

# 論 文 概 要

## ○論文題目

Functional Characterization of Acetylcholine Receptors Expressed in Human Neurons Differentiated from Hippocampal Neural Stem/Progenitor Cells

(ヒト海馬神経幹/前駆細胞由来神経細胞におけるアセチルコリン受容体の機能解析)

## ○指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 澤田 光平 教授

(所 属)

筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏 名)

福島 一幸

## 目的：

創薬の成功確度を高めるための戦略として、ヒト細胞を活用する取り組みが広く行われている。ヒト ES 細胞/iPS 細胞の樹立、及びそれらの神経系細胞への分化誘導法の開発により、本戦略は中枢疾患にも適用されるようになってきた。一方、ヒト ES 細胞/iPS 細胞を特定の脳部位特異的に分化誘導させる方法は発展途上である。特に海馬指向的な分化誘導法に関する報告は少なく、報告されているものについては、複雑で手間のかかる工程を必要とするため、創薬スクリーニングに応用するためには、さらなる改善が必要なのが現状である。

海馬は認知・学習・記憶機能に関わる脳部位であり、アルツハイマー病 (AD) における最初の病変部位として知られている。AD では、アセチルコリン受容体 (AChRs) の機能異常が報告されており、AChRs は AD の創薬ターゲットの 1 つとして注目されている。AChRs はニコチン性 (nAChRs) とムスカリン性 (mAChRs) に大別され、海馬において発現が認められ、AD の創薬ターゲットとして着目されている受容体として、 $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 7$  nAChRs、及び  $M_1$ 、 $M_3$  mAChRs がある。これらの AChRs を機能的に発現し、かつ、より取り扱いが簡便なヒト海馬細胞があれば、AChRs をターゲットとした新薬創出を加速させられることが期待される。

我々はこれまでに、取り扱いが簡便なヒト海馬細胞ソースとして、ヒト海馬由来神経幹/前駆細胞 (HIP-009) に着目し、この細胞がシンプルなプロトコルでニューロン/アストロサイトの mixed population に分化誘導可能であることや、得られた mixed population がヒト海馬と同様な遺伝子発現プロファイルを示すこと等を見出してきた。そこで本研究は、分化 HIP-009 において  $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 7$  nAChRs、及び  $M_1$ 、 $M_3$  mAChRs が機能的に発現しているかどうかを確認すること、及び認知・学習・記憶等の脳機能に必要な神経ネットワーク機能に対するこれらの受容体の役割を調べることを目的とした。

## 対象と方法：

### ○化合物

以下のものを使用した。

Acetylcholine (ACh; 非選択的 AChR agonist), muscarine (非選択的 mAChR agonist), nicotine (非選択的 nAChR agonist),

4-(4-bromophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolone-8-sulfonamide (4BP-TQS;  $\alpha 7$  nAChRs 選択的 allosteric agonist), methyllycaconitine (MLA;  $\alpha 7$  nAChR 選択的 antagonist),

epibatidine ( $\alpha 4\beta 2$  nAChR 選択的 agonist [ただし高濃度では  $\alpha 7$  nAChRs に対しても agonist 作用を示す]), dihydro- $\beta$ -erythroidine hydrobromide (DH $\beta$ E;  $\alpha 4$  receptor subunit 選択的 competitive antagonist), NS 9283 ( $\alpha 4\beta 2$  nAChR 選択的 positive allosteric modulator [PAM]),

1-(4-methoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid (BQCA; M<sub>1</sub> mAChR 選択的 PAM), VU 0255035 (M<sub>1</sub> mAChR 選択的 antagonist), 4-diphenylacetoxy-N-methyl-piperidine methiodide (4-DAMP; M<sub>3</sub> mAChR 選択的 antagonist [ただし高濃度では M<sub>1</sub> mAChRs に対しても antagonist 作用を示す]), mecamylamine (非選択的 nAChR antagonist), scopolamine (非選択的 mAChR antagonist), tetrodotoxin (TTX; sodium channel blocker)

#### ○細胞培養

HIP-009 は、メーカー推奨培地を用いて 1 日（遺伝子発現解析）、4 週間（遺伝子発現解析、及び細胞内 Ca<sup>2+</sup> flux assay）あるいは 8 週間（細胞内 Ca<sup>2+</sup> flux assay、及び神経ネットワーク機能 assay）分化させた。

#### ○遺伝子発現解析

RNeasy Micro Kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出し、SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA に逆転写した。cDNA に EagleTaq Master Mix with ROX (Roche Diagnostics)と TaqMan primer/probe set を混合し、ABI 7900HT System (Thermo Fisher Scientific)を用いて qRT-PCR を行った。

#### ○細胞内 Ca<sup>2+</sup> flux assay

Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素（calcium 4 dye; Molecular Devices）を assay buffer（組成; 20 mM HEPES, Hank's balanced salt solution with calcium and magnesium without phenol red, pH 7.4 with NaOH）に溶かし、細胞に取り込ませた（37°C、1 h）。また、assay buffer を用いて化合物を希釈した。Functional Drug Screening System 6000 (FDSS 6000; Hamamatsu Photonics)を用いて、細胞への化合物溶液の添加、及び化合物添加による蛍光強度変化（細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化）の測定を行った。

#### ○神経ネットワーク機能 assay

Multi-electrode array (MEA; 多電極アレイ)として MED64 System (Alpha MED Scientific)を用いて、神経細胞からの自発的な細胞外電位変動を測定した。TTX (100 nM)で神経細胞の自発発火を完全に抑制した時の signal を background とし、background の standard deviation (SD) を算出した。自発発火の判定閾値は、>5.5 SD とした。

## 結果：

#### ○遺伝子発現解析

分化 1 日後と 4 週間後における *CHRNA4* (nAChR α4 subunit をコード), *CHRNA7* (nAChR α7 subunit をコード), *CHRNB2* (nAChR β2 subunit をコード), *CHRM1* (mAChR M<sub>1</sub> subunit をコー

ド), *CHRM3* (mAChR M<sub>3</sub> subunit をコード), および *RIC3* (acetylcholine receptor chaperone をコード)の mRNA 発現レベルを比較した。その結果、いずれの mRNA も分化 4 週間後に、有意な発現上昇が確認された。

#### ○細胞内 Ca<sup>2+</sup> flux assay

分化 4 週間後、及び 8 週間後の細胞において、ACh、muscarine、および nicotine の濃度依存的な Ca<sup>2+</sup> flux 上昇が確認された。また、各 nAChRs および mAChRs 選択的な薬剤を組み合わせることによって、α4β2、α7 nAChRs および M<sub>1</sub>、M<sub>3</sub> mAChRs が機能的に発現していることを明らかにした。

#### ○神経ネットワーク機能 assay

分化 HIP-009 の神経ネットワーク機能に対する上記 AChRs の役割を明らかにするために、まず、自発発火に対する ACh の作用を評価した。その結果、ACh は濃度依存的に自発発火を抑制した。同様に、nicotine および muscarine についても評価した結果、muscarine は濃度依存的に自発発火を抑制したが、nicotine は抑制作用を示さなかった。次に、ACh による自発発火の減少が mecamylamine あるいは scopolamine によって回復するかどうかを検討した結果、mecamylamine では回復が認められず、scopolamine でのみ回復が認められた。これらの結果より、mAChRs の活性化が自発発火の抑制に関与していることが明らかとなった。さらに、どの subtype が自発発火の抑制に寄与しているかを、4-DAMP および VU 0255035 を用いて検討したところ、ACh による自発発火の減少は 4-DAMP でのみ回復された。この結果より、M<sub>3</sub> mAChRs の活性化が自発発火の抑制に寄与していることが明らかとなった。

### 考察：

ヒト iPS 細胞由来神経細胞における AChRs の機能解析を行っている他のグループからの報告によると、彼らが使った細胞では、ACh 単独刺激に対する機能応答は認められていない。生体においては、AChRs は ACh 単独で機能することから、ACh 単独刺激に応答する HIP-009 はこの点、現状のヒト iPS 細胞由来神経細胞よりも優れていると言える。また、この HIP-009 とヒト iPS 細胞由来神経細胞の違いは、*RIC3* の発現の有無に起因しているものと考えられる。*RIC3* は α7 nAChRs のシャペロンタンパク質であり、機能的なコンフォメーションへのフォールディング、及び細胞膜への移行に関与している。HIP-009 においては分化後に *RIC3* の遺伝子レベルでの発現上昇が認められた。それに対し、当該ヒト iPS 細胞由来神経細胞では *RIC3* の発現が認められなかったと著者らが述べている。

M<sub>3</sub> mAChRs の活性化が神経ネットワーク機能に与える影響は、脳部位によって真逆になるという現象が報告されている。すなわち、正常ラット海馬においては M<sub>3</sub> mAChRs の活性化が神経ネットワーク機能に対して抑制的に働き、一方、正常ラット視床下核では興奮性

に働くことが知られている。分化 HIP-009 の神経ネットワーク機能に対して M<sub>3</sub> mAChRs の活性化が抑制的に働くことから、少なくとも ACh に対する応答性という一側面では、HIP-009 は海馬の性質を保持していると考えられる。

#### 結論：

分化 HIP-009 において、 $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 7$  nAChRs、及び M<sub>1</sub>、M<sub>3</sub> mAChRs が機能的に発現していることを明らかにした。また、M<sub>3</sub> mAChRs の活性化が分化 HIP-009 の神経ネットワーク機能に対して、抑制的に働くことを明らかにした。

ヒト ES 細胞/iPS 細胞を海馬指向的に分化誘導する方法は未確立であり、また、ヒト ES 細胞/iPS 細胞由来神経細胞において本研究で着目した各種 AChRs の機能的な発現に成功したという報告はない。今後の発展としては、本研究の成果やそれに至る過程で得た知識・経験値を活用し、ヒト iPS 細胞においても海馬指向的な分化誘導や機能的な AChRs の発現が可能になることが期待される。これが可能になれば、疾患特異的 iPS 細胞由来神経細胞とコントロール iPS 細胞由来神経細胞との比較により、AD フェノタイプをコントロールフェノタイプまで回復させる化合物を同定すること、すなわち過剰な活性を持つ化合物を排除することが可能となり、副作用リスクの小さい AD 治療薬を創出し、副作用が原因で既存薬では十分な治療効果が得られていない患者集団に貢献できることが期待される。