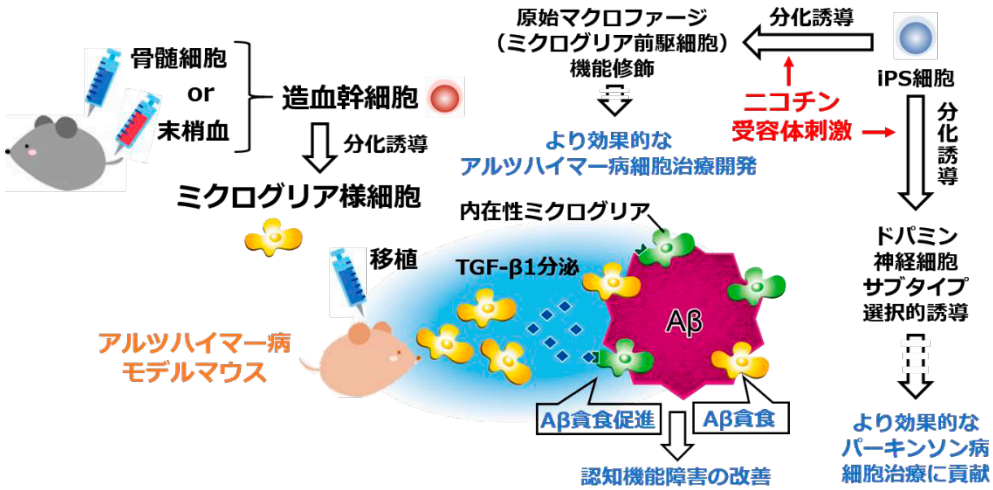
| 96　幹細胞治療最適化に向けたニコチン受容体シグナル制御 | 高田　和幸 |
|---|---|

**【目的】**加齢を最大の危険因子とするアルツハイマー病（AD）は、超少子高齢化が進む日本において、一刻も早い根本的治療法の開発が必要である。脳の組織マクロファージとして脳免疫の第一線を担うミクログリアは、胎児期の一次造血で発生する原始マクロファージを前駆細胞とし、脳に生着後は自己増殖によりポピュレーションを維持するとされている。このことは、ミクログリアの加齢に伴う機能変化が AD の発症や病態悪化に密接に関与しており、ミクログリアの再生が AD 治療に貢献できる可能性を示唆している。一方、ヒト人工多能性幹（iPS）細胞から分化誘導したドパミン神経細胞の移植によるパーキンソン病（PD）の臨床試験が開始されたが、今後は移植細胞の最適化による、より効率的な治療法の開発が進むことが予想される。脳ニコチン性アセチルコリン受容体（ニコチン受容体）は、神経細胞のみならずミクログリアにも発現しており、これら細胞の機能制御に重要であるが、ミクログリアやドパミン神経細胞の発生・分化における役割は解明されていない。本研究では、骨髄細胞や低侵襲性に採取可能な末梢血造血幹細胞からミクログリア様細胞を作製し、その脳内移植が内在性ミクログリアの機能を補填して AD 治療に貢献できるか否かを評価し、さらに、幹細胞からミクログリアの前駆細胞である原始マクロファージやドパミン神経細胞への分化・成熟におけるニコチン受容体の関与を解析した。

**【方法】**マウスの骨髄細胞または末梢血中の造血幹細胞を採取し、ミクログリア様細胞に分化誘導した。ミクログリア様細胞の AD 発症原因物質アミロイドβ（Aβ）の貪食機能を解析し、AD モデルマウスの脳内に移植して、脳内Aβ量と認知機能への作用を解析した。また、人工多能性幹（iPS）細胞を原始マクロファージやドパミン神経細胞へと分化誘導し、それぞれの分化過程における各種ニコチン受容体サブユニットの mRNA 発現とニコチン刺激が及ぼす各種分化マーカー遺伝子やタンパク質の発現への作用を解析した。

**【結果】**末梢血造血幹細胞由来のミクログリア様細胞は Aβ貪食機能を有しており、AD モデルマウス脳内においてAβ除去に働き、さらに認知機能を改善した。また、骨髄由来ミクログリア様細胞は transforming growth factor β（TGF-β）の分泌を介して、内在性ミクログリアのAβ貪食機能も促進することが分かった。一方、iPS 細胞から原始マクロファージやドパミン神経細胞の分化過程において、種々のニコチン受容体サブユニット mRNA の発現変動が認められた。分化ステージに合わせたニコチン処置により原始マクロファージの機能性タンパク質（CX3CR1）の発現や、ドパミン神経細胞 DA2 サブタイプのマーカーである *LMO3* の発現が促進された。以上より、骨髄細胞／末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞が AD 治療に貢献できること、さらには、AD や PD 治療に用いる幹細胞由来の治療細胞の作製時にニコチン受容体シグナルを制御することで、より効果的な治療細胞を作製できる可能性が示唆された。

幹細胞由来ミクログリア様細胞のアルツハイマー病治療細胞としての機能とニコチン受容体刺激の可能性



# 96. 幹細胞治療最適化に向けたニコチン受容体シグナル制御

高田　和幸

京都薬科大学 統合薬科学系

Key words：造血幹細胞，iPS 細胞，ミクログリア，ドパミン神経細胞，神経変性疾患

## 緒　言

アルツハイマー病（AD）は認知症を引き起こす代表的な神経変性疾患であり、加齢を最大の危険因子とする AD の根本的治療法開発は急務の課題である。AD の病態発症機序として、脳内でのアミロイドβタンパク質（Aβ）の蓄積が引き金となり、タウタンパク質の神経細胞内での蓄積や神経細胞死が誘導され AD が発症するという「アミロイド仮説」が支持されている。そこで、現在最も期待される AD の根本的治療法開発戦略は、脳内に蓄積する Aβの早期発見早期除去である。脳構成細胞の一つであるミクログリアは胎児期の卵黄嚢で起こる一次造血で発生する原始マクロファージを起源としており［1］、脳に生着後は自己複製を繰り返してポピュレーションを維持し［2］、組織マクロファージとして脳内免疫に機能している。ミクログリアの AD 病態との関わりは深く、ミクログリアの貪食機能が Aβ除去システムの一端を担い、加齢による機能変化が AD 病態形成に大きく関与すると考えられている。そこで、幹細胞から新たに分化誘導したミクログリア様Aβ貪食細胞の脳内補填は、AD 病態発症に抑制的に働くことが期待される。

パーキンソン病（PD）は中脳黒質－線条体ドパミン神経回路網の選択的な脱落・変性によって引き起こされる神経変性疾患である。PD に対するヒト人工多能性幹（iPS）細胞由来ドパミン神経細胞移植の臨床試験が始まったが、移植細胞の更なる適正化による治療効果の向上が次の課題となることが予想される。特に、遺伝子発現パターンによる各種ドパミン神経細胞サブタイプの存在が解明され始めたことから［3］、PD で選択的に脱落する中脳黒質－線条体に投射する DA2 サブタイプの作製と移植は、さらなる適正かつ効果的な細胞治療に貢献することが期待される。

ニコチン性アセチルコリン受容体（ニコチン受容体）は、神経細胞やミクログリアに発現しており、これら細胞の機能制御に重要であるが、ミクログリアやドパミン神経細胞の発生・分化における役割は解明されていない。

以上の幹細胞治療やニコチン受容体にまつわる研究課題のもと、本研究では、骨髄細胞や低侵襲性に採取可能な末梢血造血幹細胞からミクログリア様細胞を作製し、その脳内移植が内在性ミクログリアの機能補填や機能調節に働き AD 治療に貢献できるか否かを評価した。さらに、幹細胞からミクログリアの前駆細胞（原始マクロファージ）やドパミン神経細胞への分化過程におけるニコチン受容体の機能を解析した。

その結果、末梢血造血幹細胞からミクログリア様細胞を作製したところ、高い Aβ貪食活性を有しており、AD モデルマウスへの脳内移植によって脳内Aβ除去、さらには認知機能改善効果を示した［4］。しかし、野生型マウスの脳内移植では認知機能障害が認められ、病期を捉えた移植が重要であることが示唆された［4］。また骨髄細胞由来ミクログリア様細胞は transforming growth factor（TGF）-β1 を分泌し、内在性ミクログリアの Aβ貪食機能を促進することが分かった［5］。一方、iPS 細胞由来原始マクロファージやドパミン神経細胞の分化過程において、種々のニコチン受容体サブユニットの発現変動が認められた。分化ステージに合わせたニコチン処置により原始マクロファージの機能タンパク質（CX3CR1）の発現や、ドパミン神経細胞 DA2 サブタイプのマーカーである *LMO3* の発現が促進された。

以上より、骨髄細胞／末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞は AD 治療に貢献できる治療細胞になり得ることが分かった。また、幹細胞から AD や PD 治療に用いる治療細胞の作製時にニコチン受容体シグナルを制御することで、より適正かつ効果的な治療細胞を作製できる可能性が示唆された。

本研究成果は、神経変性疾患に対する細胞治療の新たな可能性を示すものであり、さらなる基礎的研究の発展により

今後のよりよい医療の実現に繋がることが期待される。

## 方　法

### 1.　末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞の作製と AD モデルマウスへの移植

末梢血造血幹細胞は、granulocyte-colony stimulating factor（G-CSF）および CXCR4 阻害剤である AMD3100 を C57BL/6 マウスに投与し、その後、末梢血から磁気ビーズを用いて lineage$^-$/c-kit$^+$細胞として分取した。分取した細胞を colony-stimulating factor（CSF）-1 ならびに interleukin（IL）-34 で刺激してミクログリア様細胞へ分化誘導した。ミクログリア様細胞の Aβ貪食機能は画像解析や enzyme linked-immunosorbent assay（ELISA）により解析した。AD モデルマウスとして APdE9 マウスを用い、その海馬内にミクログリア様細胞を移植した。認知機能をモリス水迷路で解析し、さらに脳を採取して切片を作製後、脳内 Aβ量をステレオロジーで解析した。

### 2.　骨髄細胞由来ミクログリア様細胞の作製、初代培養ミクログリアの培養、ならびに AD モデルマウスへの移植

骨髄細胞は、C57BL/6 マウスの大腿骨・脛骨から採取し、上記と同様に骨髄由来ミクログリア様細胞を作製した。マウス混合グリア細胞は、0～2 日齢の C57BL/6 マウス新生仔脳を摘出し、セルストレイナーに通して培養し、コンフルエントに達した混合グリア細胞の培養皿を振盪してミクログリアを回収した。骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清に含まれるサイトカインは、ELISA-based cytokine array で解析した。また、TGF-β receptor type 1（TGF-βR1）の阻害薬である SB525334 の存在または非存在下、ミクログリア様細胞の上清を初代培養ミクログリアに処置し、同じく ELISA により初代培養ミクログリアの Aβ貪食機能を解析した。さらに、SB525334 の存在または非存在下に AD モデルマウスの海馬内に骨髄由来ミクログリア様細胞を移植し、その後、脳内 Aβ量をステレオロジーで解析した。

### 3.　iPS 細胞からの原始マクロファージとドパミン神経細胞への分化誘導とニコチン刺激

マウス iPS 細胞を中胚葉系、血球血管芽細胞（hemangioblast）へと分化誘導し、最終的にミクログリアの前駆細胞である原始マクロファージへと分化誘導した。原始マクロファージへの分化過程において、各ニコチン受容体サブユニット（*Chrna1*～*7*、*9*、*10* ）の発現を RT-PCR により解析した。また、ニコチンを用いて培養細胞を刺激後、フローサイトメトリーにて、マーカータンパク質の発現を解析した。一方、ヒト iPS 細胞（京都薬科大学倫理委員会承認番号 : 19-18-26）を用いて、ドパミン神経細胞へ分化誘導し、その過程における各種ニコチン受容体サブユニット mRNA（*CHRNA4*、*CHRNA6*、*CHRNA7*、*CHRNB2*、*CHRNB3* ）の発現を RT-PCR により解析した。また、ニコチンで刺激後、ドパミン神経細胞 DA2 サブタイプへの成熟率は、*LMO3* mRNA の発現量を qPCR にて定量的に解析することで評価した。

## 結　果

### 1.　末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞の Aβ貪食除去機能と認知機能障害の改善作用

マウス末梢血に含まれる造血幹細胞からミクログリア様細胞（CD11b$^+$/F4/80$^+$）（図 1A）を作製したところ、その　Aβ貪食活性は初代培養ミクログリアと同程度であり、腹腔マクロファージよりも有意に高かった（図 1B）。EGFP マウス末梢血から作製したミクログリア様細胞を AD モデル（APdE9）マウスの海馬に移植すると、8 日目後で Aβプラークの周囲に、36 日目後には Aβプラークの中へと侵入して Aβを貪食した（図 1C）。そこで、海馬に蓄積する Aβをステレオロジーで三次元的に解析したところ、細胞移植によりその蓄積が日数依存的に減少した（図 1D）。また、モリス水迷路により、AD モデルマウスの空間認知機能障害が細胞移植により回復するが、逆に、野生型マウスへの移植では空間認知記憶機能が障害されることが示唆された（図 1E）。

### 2.　骨髄由来ミクログリア様細胞による TGF-β1 の分泌と内在性ミクログリアの Aβ貪食促進機能

マウス骨髄細胞からミクログリア様細胞を作製し、その培養上中のサイトカインを解析したところ TGF-β1 が多量に存在していた（図 2A）。そこで、その上清を初代培養ミクログリアに処置して、初代培養ミクログリアの Aβ貪食を解析したところ有意に貪食活性が促進され、また、TGF-β1 が作用する TGF-βR1 の阻害薬（SB525334）の同時処置

により、この促進は抑制された（図 2B）。さらに、骨髄由来ミクログリア様細胞を APdE9 マウス海馬内に移植した際の脳内 Aβ除去作用も、SB525334 の同時投与により減弱した（図 2C）。

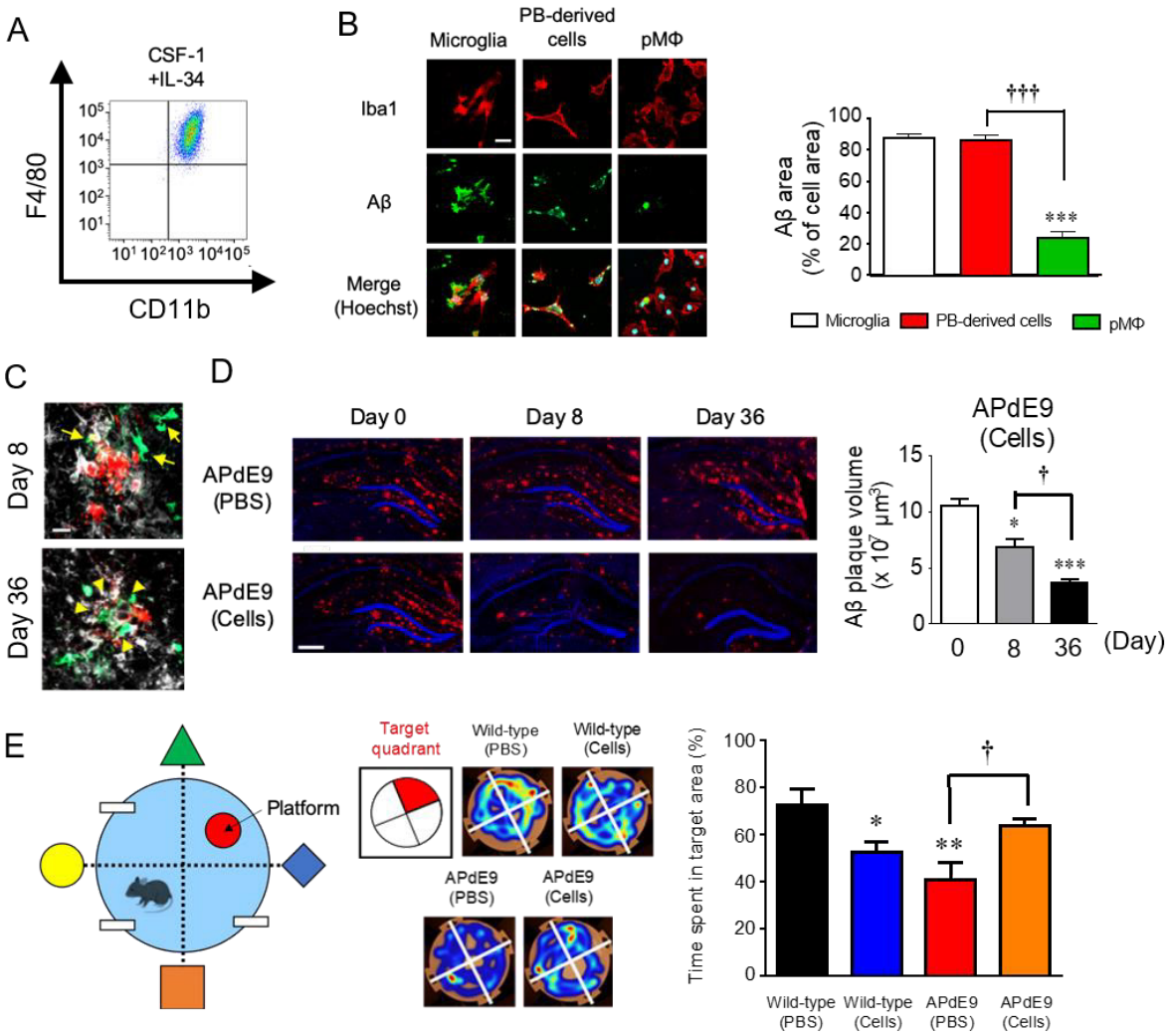



図 1. 末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞の分化誘導と AD モデルマウスへの海馬内移植

A) 末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞の細胞表面抗原発現のフローサイトメトリー解析。

B) レーザー顕微鏡による解析。赤：ミクログリアマーカー（Iba1）、緑：Aβ。Scale bar = 20 μm。グラフは貪食された Aβの面積を示す。

C, D) AD モデル（APdE9）マウス脳組織のレーザー顕微鏡による解析。緑：GFP、白：ミクログリアマーカー（Iba1）、赤：Aβ、青：核（Hoechst）。Scale bars = 20 μm（C）、200 μm（D）。グラフはステレオロジーによる Aβ斑の体積を示す。

E) モリス水迷路のプローブテストの結果をヒートマップで示した。グラフはターゲット区画に滞在した時間を示す。

上記グラフのデータは全て Bonferroni/Dunn 検定で統計処理した。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs control、†P < 0.05、†††P < 0. 001。Iba1：ionized calcium binding adapter molecule 1、PB：末梢血、pMφ：腹腔マクロファージ、PBS：phosphate buffered saline。

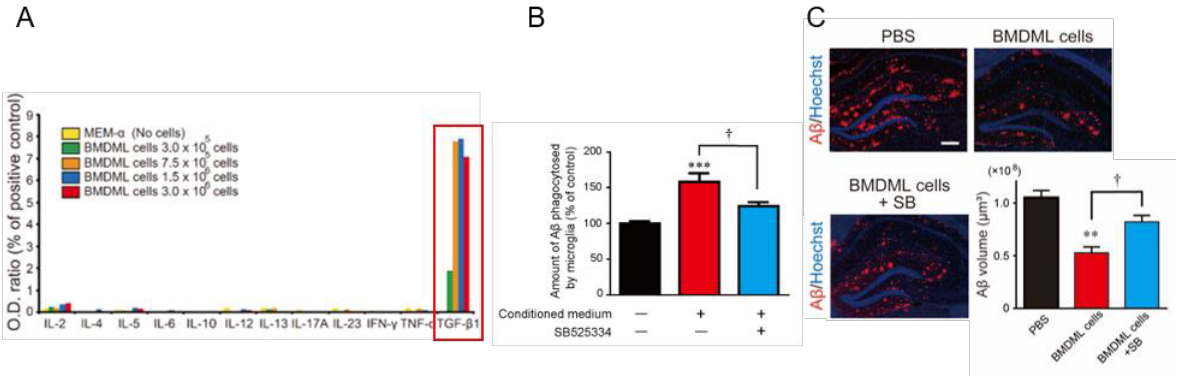



図 2. 骨髄由来ミクログリア様細胞の分泌するサイトカインとその作用

A）骨髄由来ミクログリア様細胞培養上清の cytokine array 解析。

B）初代培養ミクログリアの Aβ 貪食作用の解析。

C）APdE9 マウス脳組織のレーザー顕微鏡解析。赤：Aβ、青：核（Hoechst）。Scale bar＝200 μm。グラフはステレオロジーによる Aβ 斑の体積を示す。上記グラフのデータは全て Bonferroni/Dunn 検定で統計処理した。**P < 0.01、***P < 0.001 vs. control、†P < 0.05。BMDML：bone marrow-derived microglia-like、PBS：phosphate buffered saline、SB：SB525334。

### 3. マウス iPS 細胞由来原始マクロファージの分化過程におけるニコチン受容体サブユニットの発現とニコチン処置

原始マクロファージへの分化過程において、α1、α2、α5 サブユニット遺伝子は幹細胞から原始マクロファージに至るまで継続的に発現していたが、α7、α9、α10 は分化が進むに従い発現が減弱し、α3、α4、α6 は中胚葉系さらには血管内皮細胞／血球系細胞への分化能を有する hemangioblast の誘導期で一過性に発現した（図 3A）。Hemangioblast が誘導された後（誘導 6 日目）、ニコチンを処置し $CD11b^+/F4/80^+$の原始マクロファージを解析すると、ニコチン刺激によりケモカインレセプターCx3cr1 を高発現する細胞の割合が増加した（図 3B）。

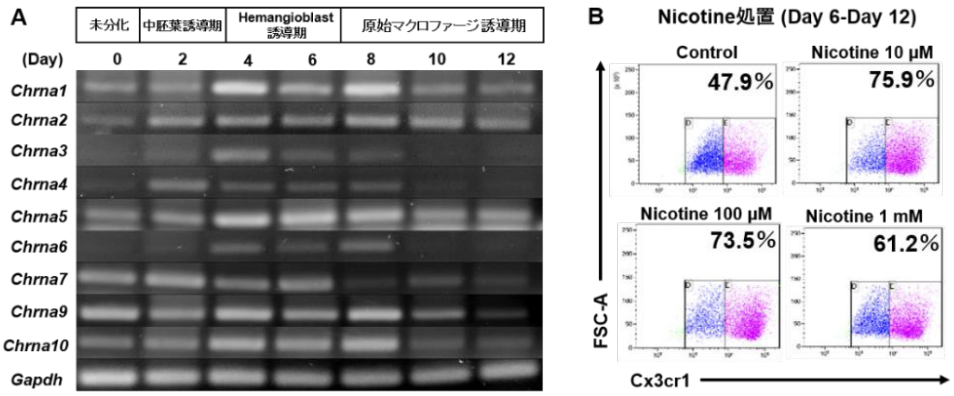



図 3. マウス iPS 細胞由来原始マクロファージの分化誘導、ニコチン受容体サブユニットの発現とその刺激

A） 分化過程における各種ニコチン受容体サブユニット発現の RT-PCR による解析。*Chrna1*～*7*、*9*、*10*：ニコチン受容体α1～α7、α9、α10 サブユニット遺伝子。上部の数字は iPS 細胞からの分化誘導日を示す。*Gapdh*：内部標準遺伝子。

B） 分化途中（6～12 日目）にニコチンを処置し、$CD11b^+/F4/80^+$の原始マクロファージにおける Cx3cr1 発現をフローサイトメトリーで解析した。

### 4.　ヒト iPS 細胞由来ドパミン神経細胞分化におけるニコチン受容体サブユニットの発現とニコチン処置

ヒト iPS 細胞を用いたドパミン神経細胞への分化誘導においてニコチン受容体α7、β2、β3 サブユニット遺伝子は、未分化な幹細胞の時期から発現しており、中脳ドパミン神経前駆細胞が誘導された後の 16 日目にα4 サブユニットが発現した。また、α6 サブユニット遺伝子は、ドパミン神経細胞への成熟が進む誘導 35 日から発現していた（図 4A)。続いてα6 サブユニット発現する前後となる誘導 28 日目から 42 日目にかけてニコチンを処置したところ、ドパミン神経細胞 DA2 サブタイプのマーカーである *LMO3* の発現がニコチンの濃度依存的に増加した（図 4B)。

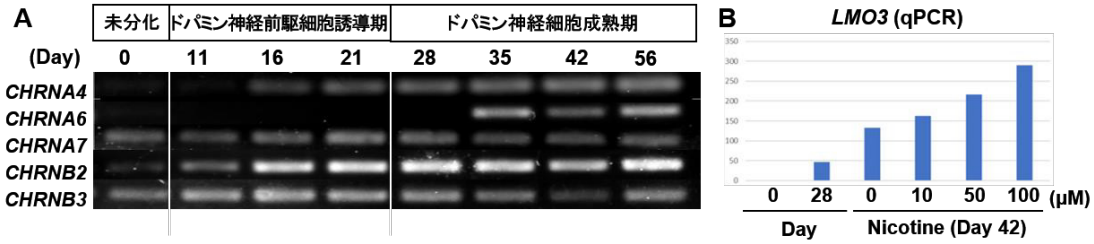



図 4.　ヒト iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の分化誘導過程、ニコチン受容体サブユニットの発現とその刺激

A)　RT-PCR にて、各種ニコチン受容体サブタイプ遺伝子の発現を解析した。*CHRNA4～6*：ニコチン受容体α4～α6 サブユニット遺伝子、*CHRNB2*、*3*：ニコチン受容体β2、3 サブユニット遺伝子。上部の数字は iPS 細胞からの分化誘導日を示す。

B)　分化誘導 28 日目から 42 日目までにおいてニコチン（0～100μM）を処置した。qPCR によるドパミン神経細胞 DA2 サブタイプのマーカーである *LMO3* 遺伝子の発現解析。

## 考　察

本研究において、低侵襲性に採取できる末梢血造血幹細胞から作製した Aβ貪食活性を有するミクログリア様細胞が、AD 細胞治療の開発において有用な細胞であることが判明した［4]。しかし、正常脳では本細胞の脳移植が、脳ホメオスタシスを攪乱する可能性も示唆された。ミクログリアの発生起源を考慮すれば、iPS 細胞から作製できる一次造血を再現した原始マクロファージ［6］の移植であれば、この有害事象の回避を期待できるかもしれない。一方、骨髄由来ミクログリア様細胞が TGF-β1 を分泌して内在性ミクログリアの貪食機能を促進することが判明し、自らの Aβ貪食だけでない、周囲の脳構成細胞への作用を介する間接的治療メカニズムの存在の一端が示唆された［5]。また、iPS 細胞を用いた原始マクロファージやドパミン神経細胞への分化誘導において、様々なニコチン受容体サブユニットが分化ステージに応じて発現しており、その発現に合わせたニコチン受容体の刺激により細胞分化や細胞機能の制御が可能であることがわかった。特にニコチン刺激が黒質－線条体に投射するドパミン神経細胞 DA2 サブタイプへの分化効率を高めることは、PD 細胞治療法における新たな貢献が期待される。さらなる基礎研究の発展が、ニコチン受容体の生物学的意義の解明ならびに様々な疾患の細胞治療法開発に貢献することが期待される。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都薬科大学統合薬科学系の西村周泰助教である。

## 文 献


1) Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science. 2010 Nov 5;330(6005):841-5. doi: 10.1126/science.1194637. Epub 2010 Oct 21. PMID: 20966214

2) Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, Tipton T, Chapman MA, Riecken K, Beccari S, Sierra A, Molnár Z, Cragg MS, Garaschuk O, Perry VH, Gomez-Nicola D. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. Cell Rep. 2017 Jan 10;18(2):391-405. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.041. PMID: 28076784

3) La Manno G, Gyllborg D, Codeluppi S, Nishimura K, Salto C, Zeisel A, Borm LE, Stott SRW, Toledo EM, Villaescusa JC, Lönnerberg P, Ryge J, Barker RA, Arenas E, Linnarsson S. Molecular Diversity of Midbrain Development in Mouse, Human, and Stem Cells. Cell. 2016 Oct 6;167(2):566-580.e19. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.027. PMID: 27716510

4) Kuroda E, Takata K, Nishimura K, Oka H, Sueyoshi M, Aitani M, Kouda A, Satake S, Shima C, Toda Y, Nakata S, Kitamura Y, Ashihara E. Peripheral Blood-Derived Microglia-Like Cells Decrease Amyloid-β Burden and Ameliorate Cognitive Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2020;73(1):413-429. doi: 10.3233/JAD-190974. PMID: 31796681

5) Kuroda E, Nishimura K, Kawanishi S, Sueyoshi M, Ueno F, Toji Y, Abo N, Konishi T, Harada K, Satake S, Shima C, Toda Y, Kitamura Y, Shimohama S, Ashihara E, Takata K. Mouse bone marrow-derived microglia-like cells secrete transforming growth factor-β1 and promote microglial Aβ phagocytosis and reduction of brain Aβ. Neuroscience. 2020 Jul 1;438:217-228. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.05.004. PMID: 32522344

6) Takata K, Kozaki T, Lee CZW, et al. Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function. Immunity. 2017 Jul 18;47(1):183-198.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.017. PMID: 28723550