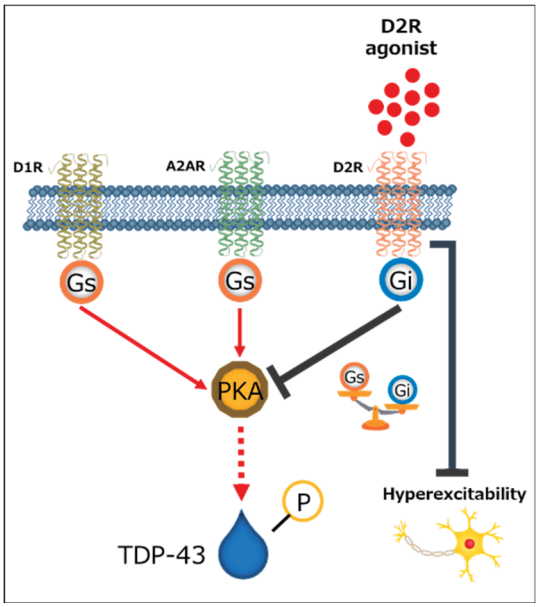
155　ALS運動ニューロンにおけるD2R介在性Gs/Giリバランス	森本　悟

【目的】ドパミン D2 受容体（D2R）は、G タンパク質と共役して細胞の興奮性を抑制し、ドパミン D1 受容体（D1R）は、G タンパク質と共役して興奮性を高めることが知られている。共同研究者である貝淵らは、独自に開発した高感度かつ網羅的な方法を用いて、D1R を発現する神経細胞に存在する PKA のリン酸化基質を 100 種類以上同定し、PKA はリン酸化 Rasgrp2 を介して Rap1-MAP キナーゼシグナルを活性化し、報酬関連行動を惹起することを明らかにした。ALS の脊髄運動ニューロンでは、神経の過剰興奮による細胞毒性が示され、D2R 刺激により神経過剰興奮が抑制されることが明らかにされている。また、我々は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者に対して、D2R アゴニストであるロピニロールが有効である可能性を、*in vitro* および臨床的に示した。以上から、本研究では“ヒト運動ニューロンにおける D2R の役割”に着目し、“ALS 病態”、“ロピニロールの作用メカニズム”、そして“Gs/Gi バランス”の観点から明らかにすることを目的とする。

【方法】本研究はヘルシンキ宣言に基づき実施され、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得て実施された（承認番号：20080016、20160273）。本研究課題において新たに迅速かつ高効率な脊髄運動ニューロン分化誘導法を開発し、健常者由来 iPS 細胞からゲノム編集技術を用いて作製した *TARDBP* 変異 iPS 細胞（isogenic cell lines、heterozygous あるいは homozygous mutation）と parent cell line から、運動ニューロンに分化誘導を行った。ドパミン D1 受容体遺伝子（*DRD1*）、ドパミン D2 受容体遺伝子（*DRD2*）およびアデノシン A2A 受容体遺伝子（*ADORA2A*）の発現確認のために RT-qPCR を、D2R の発現確認のために免疫細胞化学染色を実施した。また、リン酸化カスケード解析のために、イムノブロットおよび各種リン酸化モチーフ抗体（PKA、PKC、MAPK/CDK、ATM/ATR、Akt、AMPK、CK2）を使用した。

【結果】高純度なヒト脊髄運動ニューロンを迅速かつ効率的に分化誘導する方法を確立し、いずれの iPS 細胞からも安定して脊髄運動ニューロンへと分化誘導することに成功した。ヒト脊髄運動ニューロンにおいては、*DRD1* や *ADORA2A* が発現しており、特に *DRD2*（D2R）の発現が顕著であることが分かった。さらに、*DRD5* も高発現しており、Gs シグナルについては、D1R よりも D5R がシグナル入力を担っている可能性が示唆された。また、作製した全てのヒト脊髄運動ニューロンにおいて、Gs/Gi 下流のリン酸化シグナル伝達活性が明確に検出され、ALS 運動ニューロンにおける D2R 介在性 Gs/Gi リバランスを検討する上で適切なモデルであることが示された。

ドパミン／アデノシン受容体刺激を介した Gs/Gi カスケードが運動ニューロン変性に与える影響（概念図）



155. ALS 運動ニューロンにおける D2R 介在性 Gs/Gi リバランス

森本　悟

三重大学 大学院医学系研究科 腫瘍病理学講座

Key words：筋萎縮性側索硬化症（ALS），ドパミン D2 受容体（D2R），Gs/Gi バランス，運動ニューロン，iPS 細胞

緒　言

ドパミン D2 受容体（D2R）は、Gi ファミリーG タンパク質と共役して、二次メッセンジャーcAMP の産生を抑制する。さらに、protein kinase A（PKA）を不活化し、下流のタンパク質のリン酸化を抑制する、あるいは細胞の興奮性を減少させる。一方で、ドパミン D1 受容体（D1R）は Gs ファミリーG タンパク質と共役して、D2R シグナルと拮抗する働きを担う。

1. ドパミン受容体シグナルとタンパク質のリン酸化

線条体においてドパミンは、D1R-cAMP 経路を介してリン酸化酵素である PKA を活性化し、medium spiny neurons（MSNs）の興奮性および報酬関連行動を制御すると考えられてきた。共同研究者である貝淵らは、独自に開発した高感度かつ網羅的にリン酸化タンパク質を解析する方法を用いて、D1R を発現する MSNs に存在する PKA のリン酸化基質を 100 種類以上も新たに同定した。細胞レベルおよび個体レベルにおける詳細な解析により、PKA はリン酸化 Rasgrp2 を介して Rap1-MAP キナーゼシグナルを活性化し、D1R を発現する MSNs の興奮性を高めて報酬関連行動を惹起することが見出された［1］。また同グループは、側坐核における D2R-MSNs は、抑制性の D2R シグナルが乏しい状況で、アデノシン A2A 受容体（adenosine A2A receptor：A2AR）-PKA-Rap1 経路を介して細胞興奮性が増大し、嫌悪行動を調節することを報告している［2］。

2. ドパミン受容体と運動ニューロン

これまでドパミン受容体は、パーキンソン病研究等含め前述のように線条体での分子メカニズムに関する研究が数多く行われてきた。ところが、2018 年に共同研究者グループから、iPS 細胞由来脊髄運動ニューロンを用いた iPS 細胞（iPSCs）創薬により、筋萎縮性側索硬化症（ALS）病態に対して D2R アゴニストであるロピニロールが有効であることが *in vitro* で示され［3］、その後研究代表者が実施した医師主導治験により、ロピニロールが臨床的にも ALS 患者に有効である可能性が高いことを明らかにした［4，5］。

近年、家族性 ALS モデルと GCaMP（Ca indicator）を用いた解析から、ALS の脊髄運動ニューロンでは神経の過剰興奮による細胞毒性が示され、さらに D2R 刺激により神経過剰興奮が抑制されることが明らかとなった［5，6］。

3. ALS と TDP43 のリン酸化

TAR DNA-binding protein 43 kDa（TDP43）は、ストレス顆粒形成、mRNA 安定化、mRNA 輸送、lnc/nc RNA の調整、miRNA のプロセシング、リボソームの軸索輸送など、RNA binding protein としての性質を含め多岐にわたる機能を有している。こと ALS 患者運動ニューロンでは、TDP43 が核外移行し、細胞質内で異常リン酸化を受けて凝集体を形成することで、核内外での機能を喪失する。それにより、ALS の病態を発症するという仮説が現状有力となっている。重要なことに、PKA が Ser379、Ser285、Ser403/404、Ser409/410 のアミノ

酸残基において TDP43 をリン酸化することも確認されている［7］。

以上から、“ヒト運動ニューロンにおける D2R の役割”に着目し、“ALS 病態”、“ロピニロールの作用メカニズム”、そして“Gs/Gi バランス”の観点から明らかにすることを目的とする。すなわち、ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンモデルを用いて、ALS において病態のコアとなる“運動ニューロンの細胞興奮毒性”および“リン酸化 TDP43 の蓄積”について、Gs/Gi バランスの破綻が鍵となっているという仮説を検証し、Gs/Gi リバランスによる病態修復を行う薬剤の同定を目指した（図 1）。本研究から、ヒト運動ニューロンの高効率かつ迅速な誘導法の開発に成功し、これまで知られていなかったヒト脊髄運動ニューロンにおける D2R の重要性の一端が明らかとなった。

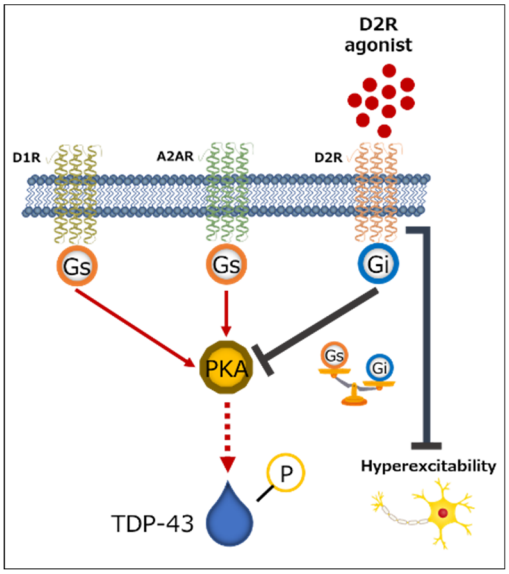


図 1. ドパミン／アデノシン受容体刺激を介した Gs/Gi カスケードが運動ニューロン変性に与える影響（概念図）
D1R および A2AR は Gs と共役し、PKA を活性化する。一方で、D2R は Gi と共役し、PKA を抑制する。PKA は TDP43 のリン酸化を促進し、Gi カスケードは神経興奮性に対して抑制的に働きうる。したがって、ロピニロールなどの D2R アゴニストは、Gi カスケードを刺激することで神経の過剰興奮を抑えることに加え、PKA を阻害することで ALS の主要病態である TDP43 の異常リン酸化を抑制しうると考えられる。

方　法

1. 研究倫理

本研究はヘルシンキ宣言に基づき実施され、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得て実施された（承認番号：20080016、20160273）。健常者 iPS 細胞である 201B7（RRID：CVCL_A324）については CiRA より提供され、WD39 （RRID：CVCL_Y528）は当教室の保有株を用いた。ヒト脳試料については、美原記念病院ブレインバンクより提供された（文部科学省コホート・生体試料支援プラットフォームの支援）。

2. ヒト iPSCs の脊髄運動ニューロンへの分化誘導

健常者由来 iPSCs からゲノム編集技術を用いて作製した *TARDBP* 変異 iPS 細胞（isogenic cell lines、heterozygous あるいは homozygous mutation）［8］と parent cell line から、研究代表者が本研究課題において新たに開発した、迅速かつ高効率な脊髄運動ニューロン分化誘導法［9］を用いて、iPSCs から運動ニューロンに分化誘導を行った。分化誘導法の概略を図 2 に示す［9］。

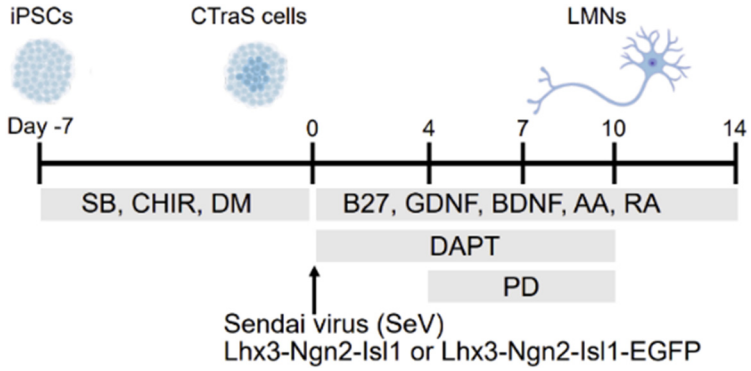


図 2. 迅速かつ高効率なヒト脊髄運動ニューロンの新規分化誘導法の概略図
iPSCs に小分子化合物を添加することで神経分化指向性を強化した細胞（chemically transitional embryoid-body-like state（CTraS）cells）に、Sendai virus により運動ニューロン分化に重要な転写因子（Lhx3、Ngn2、Isl1）を導入することで、iPSCs から計 14 日という短期間で形態的に成熟したヒト iPSCs 由来運動ニューロンを作製することが可能となった。

3. Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

DRD1、*DRD2* および *ADORA2A* の発現確認のために、下記プライマーを使用し、RT-qPCR を行った。
ACTB：F-TGAAGTGTGACGTGGACATC、R-GGAGGAGCAATGATCTTGAT
DRD1：F-GACCTTGTCTGTACTCATCTCCT、R-GTCACAGTTGTCTATGGTCTCAG（PrimerBank ID：88758587c3）
DRD2：F-CTCTTCGGACTCAATAACGCAG、R-GACGATGGAGGAGTAGACCAC（PrimerBank ID：181337009c2）
ADORA2A：F-CGCTCCGGTACAATGGCTT、R-TTGTTCCAACCTAGCATGGGA（PrimerBank ID：156142194c1）

4. 免疫細胞化学染色（ICC）

D2R に対する ICC のために、anti-dopamine D2R antibody（NLS1403、Novus Biologicals あるいは clone 3D9、Merck Millipore）を使用した。

5. イムノブロット

各種リン酸化モチーフ抗体（PKA、PKC、MAPK/CDK、ATM/ATR、Akt、AMPK、CK2）を使用した。

結果および考察

1. 健常者および *TARDBP* 変異 isogenic iPSCs から高純度な脊髄運動ニューロンを作製

Chemically transitional embryoid-body-like state（CTraS）法およびセンダイウィルス（SeV）を用いて、ヒト iPSCs に Lhx3、Ngn2、Islet1 の 3 因子を導入することにより、ヒト脊髄運動ニューロン（LMN）に迅速かつ高効率に分化させる新たな手法を開発した［5，9］。この方法を用いて、parent cell line である 201B7、*TARDBP*$^{G295S/WT}$、*TARDBP*$^{G295S/G295S}$、*TARDBP*$^{K263E/WT}$ および *TARDBP*$^{K263E/K263E}$ iPSCs から安定して高純度な脊髄運動ニューロンを作製することに成功した（図 3）。

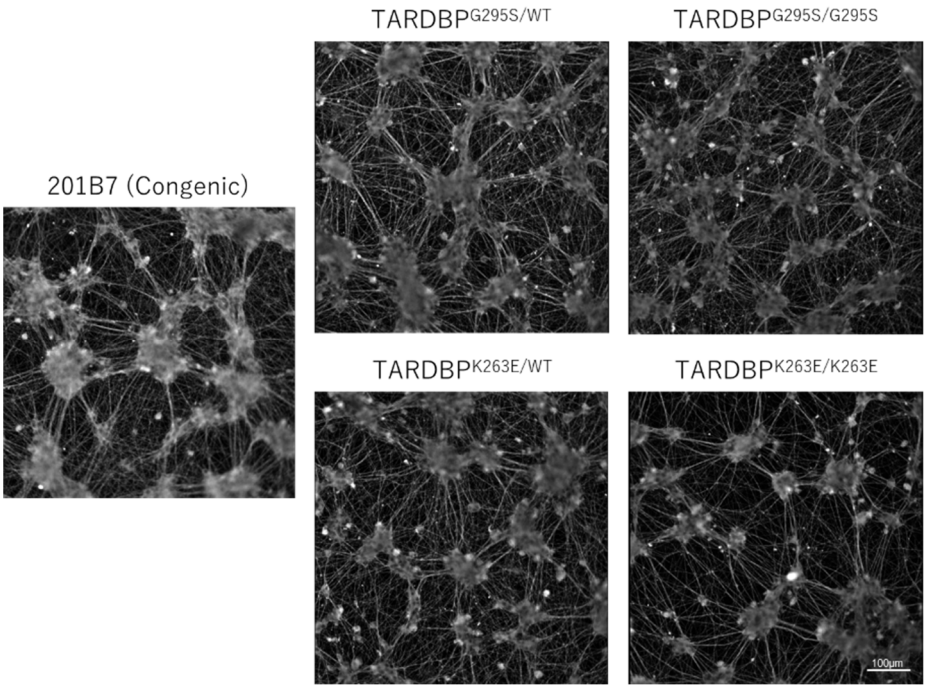


図 3. 健常および *TARDBP* 変異 iPSCs 由来脊髄運動ニューロン
Congenic cell line である 201B7、*TARDBP* G295S あるいは K263E 変異を伴う iPSCs 株から分化誘導された脊髄運動ニューロンを示す（スケールバー：100 μm）。

2. ヒト脊髄および脊髄運動ニューロンにおける *DRD1*、*DRD2* および *ADORA2A* の発現

まず、脊髄運動ニューロンにおける *DRD1*、*DRD2* および *ADORA2A* の mRNA 発現を調べたところ、いずれの発現も確認された（図 4a）。とりわけ、*DRD2* の発現が非常に高く、*DRD1* と *ADORA2A* の発現は弱い傾向を認めた。また、高発現を認めた *DRD2* に関して、タンパク質レベルでの発現を確認したところ、iPSCs 由来運動ニューロンおよびヒト脊髄前角細胞（運動ニューロン）においても D2R が高発現していることを初めて明らかにした（図 4b、c）[5]。加えて、運動ニューロンには D1 family としては D5 が高発現しており（運動ニューロンでは D2R の次に発現が多い）[5]、Gs シグナルについては D1R ではなく D5R が主として担っている可能性が強く示唆された。

3. 健常者および *TARDBP* 変異 isogenic iPSCs 由来脊髄運動ニューロンにおけるリン酸化カスケード

201B7、*TARDBP*$^{G295S/WT}$、*TARDBP*$^{G295S/G295S}$、*TARDBP*$^{K263E/WT}$ および *TARDBP*$^{K263E/K263E}$ 由来脊髄運動ニューロンの定常状態において、イムノブロットおよび各種リン酸化モチーフ抗体（PKA、PKC、MAPK/CDK、ATM/ATR、Akt、AMPK、CK2）を用いて、リン酸化シグナル伝達活性の評価を行った。その結果、今回作製した全てのヒト運動ニューロンモデルにおいても、シグナル伝達活性が明確に検出可能であることを確認し得た。

4. D2R 刺激による運動ニューロンにおけるリン酸化カスケードへの影響

今度は、D2R 刺激による Gi 下流リン酸化カスケードへの影響を明らかにするために、10 μM ropinirole hydrochloride（*in vitro* の系において証明されたロピニロールの抗 ALS 作用域濃度が 1 nM～10 μM）を運動ニューロンの培養培地に添加し、結果 3 と同様にイムノブロットによりリン酸化カスケードの変動を調べた。結果として、リン酸化シグナル伝達活性における明らかな変動は確認されなかった。

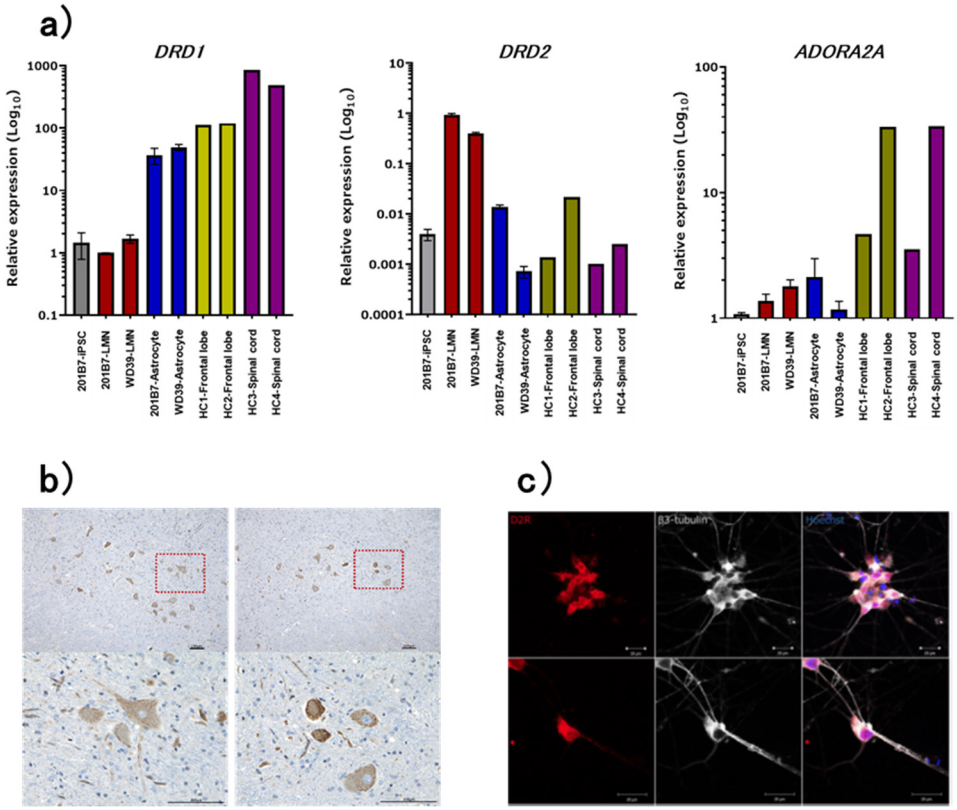


図 4. ヒト脊髄および脊髄運動ニューロンにおける *DRD1*、*DRD2*（D2R）および *ADORA2A* の発現

a）RT-qPCR を用いた、健常者 iPSCs、運動ニューロン、アストロサイト、剖検脳（前頭葉）、剖検脊髄（胸髄）における *DRD1*、*DRD2* および *ADORA2A* の mRNA 発現レベル（ΔΔCT 法）。

b）ヒト脊髄前角細胞における D2R の発現。抗ドパミン D2R 抗体（NLS1403）と健常ヒト胸髄のホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用いた。上図は低倍率、下図は上図の赤四角内の拡大画像（スケール バー：100μm）。

c）ヒト iPSCs 由来脊髄運動ニューロンにおける D2R の発現。健常者 iPSCs（201B7）から運動ニューロンを誘導し、抗ドパミン D2R 抗体（clone 3D9）、抗β3-tubulin 抗体（T8660、Sigma-Aldrich）、Hoechst33342 により染色を行った（スケールバー：20μm）。

b)、c）については、本研究課題の成果である文献［5］より引用。

今後、D2R - Gi - PKA カスケードの最終ターゲットの一つである GluR のリン酸化状態の変化、A2AR 刺激によるリン酸化カスケードの変化について解析を行い、ALS 運動ニューロンにおける D2R 介在性 Gs/Gi リバランスの影響、ならびに治療ターゲットしての可能性を探索していく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部生理学教室の岡野栄之教授、藤田医科大学精神・神経病態解明センター細胞生物学部門の貝淵弘三教授、坪井大輔講師、ならびに名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センターの天野睦紀准教授である。

また、慶應義塾大学医学部生理学教室のテクニカルスタッフ（実験補助）である中村志穂氏ならびに小澤史子氏に謝意を表します。

文　献

1) Nagai T, Nakamuta S, Kuroda K, Nakauchi S, Nishioka T, Takano T, Zhang X, Tsuboi D, Funahashi Y, Nakano T, Yoshimoto J, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Miura M, Nishi A, Kobayashi K, Yamada K, Amano M, Kaibuchi K. Phosphoproteomics of the Dopamine Pathway Enables Discovery of Rap1 Activation as a Reward Signal In Vivo. Neuron. 2016 Feb 3;89(3):550-65. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.019. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26804993.

2) Lin YH, Yamahashi Y, Kuroda K, Faruk MO, Zhang X, Yamada K, Yamanaka A, Nagai T, Kaibuchi K. Accumbal D2R-medium spiny neurons regulate aversive behaviors through PKA-Rap1 pathway. Neurochem Int. 2021 Feb;143:104935. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104935. Epub 2020 Dec 7. PMID: 33301817.

3) Fujimori K, Ishikawa M, Otomo A, Atsuta N, Nakamura R, Akiyama T, Hadano S, Aoki M, Saya H, Sobue G, Okano H. Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. Nat Med. 2018 Oct;24(10):1579-1589. doi: 10.1038/s41591-018-0140-5. Epub 2018 Aug 20. PMID: 30127392.

4) Morimoto S, Takahashi S, Fukushima K, Saya H, Suzuki N, Aoki M, Okano H, Nakahara J. Ropinirole hydrochloride remedy for amyotrophic lateral sclerosis - Protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, and open-label continuation phase I/IIa clinical trial (ROPALS trial). Regen Ther. 2019 Jul 26;11:143-166. doi: 10.1016/j.reth.2019.07.002. PMID: 31384636; PMCID: PMC6661418.

5) Morimoto S, Takahashi S, Ito D, Daté Y, Okada K, Kato C, Nakamura S, Ozawa F, Chyi CM, Nishiyama A, Suzuki N, Fujimori K, Kondo T, Takao M, Hirai M, Kabe Y, Suematsu M, Jinzaki M, Aoki M, Fujiki Y, Sato Y, Suzuki N, Nakahara J; Pooled Resource Open-Access ALS Clinical Trials Consortium; Okano H. Phase 1/2a clinical trial in ALS with ropinirole, a drug candidate identified by iPSC drug discovery. Cell Stem Cell. 2023 Jun 1;30(6):766-780.e9. doi: 10.1016/j.stem.2023.04.017. PMID: 37267913.

6) Huang X, Roet KCD, Zhang L, Brault A, Berg AP, Jefferson AB, Klug-McLeod J, Leach KL, Vincent F, Yang H, Coyle AJ, Jones LH, Frost D, Wiskow O, Chen K, Maeda R, Grantham A, Dornon MK, Klim JR, Siekmann MT, Zhao D, Lee S, Eggan K, Woolf CJ. Human amyotrophic lateral sclerosis excitability phenotype screen: Target discovery and validation. Cell Rep. 2021 Jun 8;35(10):109224. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109224. PMID: 34107252; PMCID: PMC8209673.

7) Iulita MF, Bejanin A, Vilaplana E, Carmona-Iragui M, Benejam B, Videla L, Barroeta I, Fernández S, Altuna M, Pegueroles J, Montal V, Valldeneu S, Giménez S, González-Ortiz S, Torres S, El Bounasri El Bennadi S, Padilla C, Rozalem Aranha M, Estellés T, Illán-Gala I, Belbin O, Valle-Tamayo N, Camacho V, Blessing E, Osorio RS, Videla S, Lehmann S, Holland AJ, Zetterberg H, Blennow K, Alcolea D, Clarimón J, Zaman SH, Blesa R, Lleó A, Fortea J. Association of biological sex with clinical outcomes and biomarkers of Alzheimer's disease in adults with Down syndrome. Brain Commun. 2023 Mar 17;5(2):fcad074. doi: 10.1093/braincomms/fcad074. PMID: 37056479; PMCID: PMC10088472.

8) Imaizumi K, Ideno H, Sato T, Morimoto S, Okano H. Pathogenic Mutation of TDP-43 Impairs RNA Processing in a Cell Type-Specific Manner: Implications for the Pathogenesis of ALS/FTLD. eNeuro. 2022 Jun 8;9(3):ENEURO.0061-22.2022. doi: 10.1523/ENEURO.0061-22.2022. PMID: 35641224; PMCID: PMC9186108.

9) Setsu S, Morimoto S*, Nakamura S, Ozawa F, Tomari Y, Okano H*. An efficient induction method for human spinal lower motor neurons and high-throughput image analysis at the single cell level. bioRxiv 2023. doi: https://doi.org/10.1101/2023.04.18.537412. *co-corresponding author