

【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)

