

令和元年6月11日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19012

研究課題名(和文)細胞内局在性ムスカリン受容体の海馬神経新生における役割の解明

研究課題名(英文)Functional role of intracellular muscarinic receptor for hippocampal adult neurogenesis

研究代表者

宇和田 淳介 (Uwada, Junsuke)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70580314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海馬歯状回は成人においても神経新生が行われる場であり、その神経ネットワークの形成や維持における役割は老化に伴う認知機能の低下などに抗するものとして着目されている。我々は本研究を通して、アセチルコリンを受容するムスカリンM1受容体が海馬歯状回の神経幹細胞において細胞の内部に局在して機能していることを明らかにした。この細胞内M1受容体は特にMAPキナーゼ系のERK1/2の活性化に働くことが分かり、神経幹細胞の増殖や維持に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬歯状回は成人においても神経細胞が新しく作られる神経新生の場であり、認知症など加齢に伴う神経疾患に関わるものとして着目されている。一方、アセチルコリンの受容体であるムスカリンM1受容体はこれまで細胞の表面に存在して働くと考えられてきた。本研究で我々は細胞の内部に局在するM1受容体が細胞の増殖や維持に関わるシグナルを引き起こすことを明らかにし、神経新生を亢進する新たな治療ターゲットとなりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus is important to generate and maintain functional neurons, therefore which has gained interest as clinical target of neurological diseases, like dementia. In this study, we found the neural stem cells in hippocampal dentate gyrus express functional intracellular muscarinic M1 receptor. Stimulation of intracellular M1 receptors activated MAP kinase (ERK1/2) signaling. Our results indicate that muscarinic stimulation might contribute to the proliferation and maintenance of neural stem cells in hippocampal dentate gyrus through activation of intracellular M1 receptors.

研究分野：分子薬理学

キーワード：ムスカリン受容体 神経新生 MAPキナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海馬におけるニューロンの新生は神経ネットワークの形成を経て記憶形成に関わる重要な役割を担っている。また、長期的なストレスが負荷された場合に海馬神経新生が低下するなど、うつ病などの病態とも関連することが示唆されている為、海馬の神経新生は老化による記憶能低下やうつ病などの精神疾患の治療対象として注目されている。

海馬の神経新生を制御している因子の一つとしてアセチルコリンが知られている。コリン性神経は内側中隔から海馬へと投射し、アセチルコリンを介して、海馬歯状回のムスカリン受容体やニコチン受容体の活性を制御している。更に、海馬神経新生に関わる神経幹細胞においてムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 サブタイプ (以下 M1 受容体) が発現し、その活性化が神経新生を正に制御することが報告されている (Itou, 2011, *Hippocampus*)。しかし、M1 受容体の活性化が神経新生を促進する分子メカニズムの詳細は不明である。

ムスカリン受容体を含む G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、細胞表面に存在し、外部からの刺激を受けて活性化されると考えられてきた。しかし近年、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR5 やカンナビノイド CB1 受容体など、いくつかの GPCR は細胞の内部にも局在し、ここでもリガンドを受容して活性を示すことが報告されてきており、新しい神経伝達様式として注目されている (Bénard, 2012, *Nat Neurosci*; Kumar, 2012, *JBC*)。我々はこれまで、ムスカリン M1 受容体が機能的受容体として細胞内に局在することを明らかにし、その役割の解明を進めてきた (Anissuzzaman, Uwada 2013, *J Neurochem*)。

2. 研究の目的

細胞内局在性 M1 受容体は海馬や大脳皮質などの中枢神経系に多く存在する。これらの組織では、アセチルコリンが、その分解産物であるコリンとは別経路で細胞内に取り込まれることが示されつつあり、同定には至っていないが何らかのトランスポーターが存在し、細胞内 M1 受容体の活性を調節していると想定されている (Muramatsu, 未発表)。これまでに申請者は、神経細胞において細胞内 M1 受容体が細胞表面の M1 受容体とは異なる経路で MAP キナーゼを活性化することを見出し、更に神経芽細胞腫由来の細胞を用いた実験で、細胞内 M1 受容体が細胞増殖を促進することを報告した (Uwada, 2010, *J Neurochem*; Morishima, Uwada, 2013, *Life Sci*)。MAP キナーゼは細胞増殖の他に、ニューロンの分化・成熟における重要性も知られている。これらのことから、我々は、細胞内 M1 受容体からの MAP キナーゼシグナリングが海馬神経新生に機能しているのではないかと仮説に至り、これを明らかにする目的で本研究を遂行した。

3. 研究の方法

海馬歯状回由来神経幹細胞、神経前駆細胞の培養

10 週齢のマウス (BALB/c、オス) より摘出した海馬歯状回部位をパパイんで消化し、Percoll による分離処理により神経幹細胞、前駆細胞を分取後、DMEM/Ham ' s F-12 (N2 サプリメント、FGF2, EGF 添加) を培養液として、ラミニン/オルニチンでコートした培養皿上で培養し、実験に供した。

細胞内 M1 受容体の解析

細胞内 M1 受容体について解析するため、神経幹細胞、神経前駆細胞はポリ L リジンおよびラミニンでコートしたカバースリップ上で培養し、パラホルムアルデヒドで固定した上で透過処理後、ムスカリン M1 受容体に対する抗体および蛍光二次抗体を使用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。また、細胞内 M1 受容体を介した細胞内シグナリングの解析を行うため、ラミニン/オルニチンでコートしたマルチウェルディッシュ上で培養した神経肝細胞、神経前駆細胞について、細胞表面の M1 受容体を細胞膜非透過性のブロッカーである Muscarinic Toxin 7 (MT-7) で阻害した上でカルバコールによる刺激を行い、得られた細胞溶解液をウェスタンブロットティングのサンプルとし、特に MAP キナーゼ系への影響を解析した。

4. 研究成果

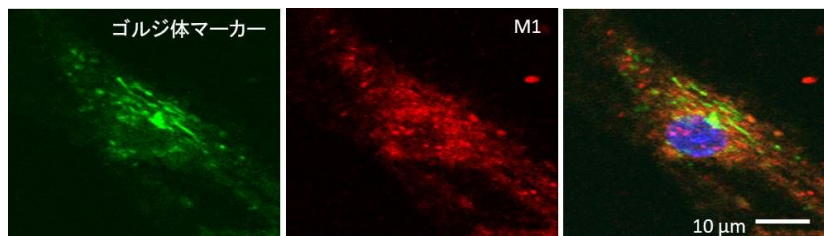
海馬歯状回由来神経幹細胞、神経前駆細胞における細胞内 M1 受容体の存在

海馬歯状回の未分化な神経系細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 サブタイプについて調べるため、マウスから摘出した海馬歯状回組織から神経幹細胞、神経前駆細胞を単離・培養する系を確立した。得られた未分化状態の細胞を免疫染色により解析したところ、実際にこの細胞においてムスカリン M1 受容体を発現していることが確認され、更にその局在は細胞内、特にゴルジ体近傍に集積していることが示された。同様の局在性は海馬ニューロンにおけるムスカリン M1 受容体でも確認されることから、神経幹細胞、神経前駆細胞における細胞内 M1 受容体についても、海馬ニューロンの細胞内 M1 受容体と同様の機能性の存在が示唆される (図 1)。

細胞内 M1 受容体を介した MAP キナーゼシグナリング解析

海馬歯状回由来の神経幹細胞、神経前駆細胞において、ムスカリン受容体アゴニストであるカルバコールで刺激したところ、MAP キナーゼ系の ERK1/2 のリン酸化が確認された。このリン酸化は細胞膜を透過する M1 受容体選択的ブロッカーであるピレンゼピンによって阻害された

図1) ムスカリン M1 受容体の細胞内局在
培養した海馬歯状回由来神経幹細胞に発現する M1 受容体の免疫染色像。ゴルジ体マーカーとして GM130 を使用。



ものの、同じく M1 選択的ブロッカーではあるが細胞膜を透過できない MT-7 では阻害されなかった。細胞免疫染色によって細胞内に M1 受容体が局在することが確認されたことと合わせて、細胞内の M1 受容体を介した ERK1/2 の活性化が起こったことが示唆された。一方で、同様に M3 サブタイプに選択性のあるアンタゴニストの darifenacin で処理した場合も一部 ERK1/2 活性化の抑制が確認されたことから、神経幹細胞、神経前駆細胞において M3 受容体も機能している可能性が示された。

実際に海馬歯状回由来の神経幹細胞、神経前駆細胞のムスカリン受容体発現プロファイルを定量的 PCR により解析したところ、M1 サブタイプとともに M3 サブタイプの発現も確認された。興味深いことに、この細胞をニューロンへ分化誘導すると、M1 受容体の発現は維持されたものの、M3 受容体は減少する様子が確認された。このことから、神経幹細胞、神経前駆細胞は、その維持から分化成熟過程において、細胞内に局在する M1 受容体と、M3 受容体がそれぞれの役割を果たしている可能性が示唆された。

MAP キナーゼ系は細胞の増殖、分化を制御する上で極めて重要なシグナル因子である。特に ERK1/2 は細胞の増殖や維持に働いている。細胞内 M1 受容体を介した ERK1/2 の活性化という今回の結果は、海馬歯状回における神経幹細胞の増殖・維持におけるムスカリン受容体、特に細胞内に局在し働く M1 受容体の重要性を示唆している。また、我々はこれらの研究と並行して、ムスカリン受容体を発現する上皮系細胞において、ムスカリン受容体刺激によりストア作動性カルシウム流入を介して p38MAPK が活性化することを明らかにした (Uwada, 投稿中)。海馬歯状回の未分化な神経系細胞において同様のことが起こっているかは未検討であるが、ストア作動性カルシウム流入が神経前駆細胞で起こることはすでに報告されている。p38MAPK シグナリングは細胞の migration に働くことから、神経系細胞が分化・成熟する過程の migration における、同様のシグナリング経路の関与の有無が新たな課題として示された。また、同様の系においてムスカリン受容体が p38 MAPK を介した TACE プロテアーゼの活性化による ERK1/2 のトランスアクチベーションを惹起するという新たな MAP キナーゼシグナリング系の存在を明らかにした (Uwada, 2017, *Cell Signal*)。この経路は炎症性シグナリングの制御にも関わっている。現在この新しい経路が海馬歯状回における神経新生に対して機能するか否かについても解析を進めているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- Muramatsu I, Uwada J, Yoshiki H, Sada K, Lee KS, Yazawa T, Taniguchi T, Nishio M, Ishibashi T, Masuoka T. "Novel regulatory systems for acetylcholine release in rat striatum and anti-Alzheimer's disease drugs." *J Neurochem.* 2019 Jun;149(5):605-623. doi: 10.1111/jnc.14701. 査読あり
- Masuoka T, Uwada J, Kudo M, Yoshiki H, Yamashita Y, Taniguchi T, Nishio M, Ishibashi T, Muramatsu I. "Augmentation of Endogenous Acetylcholine Uptake and Cholinergic Facilitation of Hippocampal Long-Term Potentiation by Acetylcholinesterase Inhibition." *Neuroscience.* 2019 404:39-47. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.01.042. 査読あり
- Kobayashi M, Mikami D, Uwada J, Yazawa T, Kamiyama K, Kimura H, Taniguchi T, Iwano M. "A short-chain fatty acid, propionate, enhances the cytotoxic effect of cisplatin by modulating GPR41 signaling pathways in HepG2 cells." *Oncotarget.* 2018 31;9(59):31342-31354. doi: 10.18632/oncotarget.25809. 査読あり
- Shirafuji T, Ueyama T, Adachi N, Yoshino KI, Sotomaru Y, Uwada J, Kaneoka A, Ueda T, Tanaka S, Hide I, Saito N, Sakai N. "The Role of Cysteine String Protein Phosphorylation at Serine 10 and 34 by Protein Kinase C for Presynaptic Maintenance." *J Neurosci.* 2018 Jan 10;38(2):278-290. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1649-17.2017. 査読あり
- Imamichi Y, Sekiguchi T, Kitano T, Kajitani T, Okada R, Inaoka Y, Miyamoto K, Uwada J, Takahashi S, Nemoto T, Mano A, Khan MRI, Islam MT, Yuhki KI, Kashiwagi H, Ushikubi F, Suzuki N, Taniguchi T, Yazawa T. "Diethylstilbestrol administration inhibits theca cell androgen and granulosa cell estrogen production in immature rat ovary." *Sci Rep.* 2017 Aug 21;7(1):8374. doi: 10.1038/s41598-017-08780-7. 査読あり

Muramatsu I, Uwada J, Masuoka T, Yoshiki H, Sada K, Lee KS, Nishio M, Ishibashi T, Taniguchi T. "Regulation of synaptic acetylcholine concentrations by acetylcholine transport in rat striatal cholinergic transmission." *J Neurochem.* 2017 Oct;143(1):76-86. doi: 10.1111/jnc.14127. 査読あり

Uwada J, Yazawa T, Islam MT, Khan MRI, Krug SM, Fromm M, Karaki SI, Suzuki Y, Kuwahara A, Yoshiki H, Sada K, Muramatsu I, Taniguchi T. "Activation of muscarinic receptors prevents TNF- α -mediated intestinal epithelial barrier disruption through p38 MAPK." *Cell Signal.* 2017 Jul;35:188-196. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.04.007. 査読あり

Muramatsu I, Yoshiki H, Uwada J, Masuoka T, Sada K, Taniguchi T, Nishio M. "Pharmacological evidence of specific acetylcholine transport in rat cerebral cortex and other brain regions." *J Neurochem.* 2016;139(4):566-575. doi: 10.1111/jnc.13843. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

宇和田 淳介 「腸上皮細胞におけるムスカリン受容体のストア作動性カルシウム流入を介した p38 MAP キナーゼ制御」第 91 回日本生化学会大会 2018 年

宇和田 淳介 「Molecular mechanism of muscarinic receptor-mediated suppression of TNF- α -induced inflammation through p38 MAP kinase.」第 90 回日本生化学会大会 2017 年

宇和田 淳介 「Molecular mechanism of muscarinic receptor-mediated suppression of TNF- α -induced intestinal epithelial barrier disruption」第 90 回日本薬理学会年会 2017 年

宇和田 淳介 「腸上皮細胞におけるムスカリン受容体を介した TNF- α シグナリングの制御」第 67 回日本薬理学会北部会 2016 年

宇和田 淳介 「ムスカリン受容体刺激は TNF 受容体の切断を促進することで腸上皮細胞における TNF- α シグナリングを抑制する」第 89 回日本生化学会大会 2016 年

宇和田 淳介 「TNF- α によって誘導される腸上皮バリア機能低下に対するムスカリン受容体の役割」第 114 回北海道癌談話会例会 2016 年

〔図書〕(計 1 件)

Muramatsu I, Masuoka T, Uwada J, Yoshiki H, Yazama T, Lee KS, Sada K, Nishio M, Ishibashi T, Taniguchi T "Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection" 2018 年, Pages 45-58, Springer,

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。