

◆分子神経生物学分野

統合失調症関連分子上皮成長因子の脳皮質GABA機能発達遅延作用

脳研究所分子神経生物学分野では、新生仔期に上皮成長因子(EGF)を投与した統合失調症モデル動物を使って、脳機能異常の解析を進めています。この精神疾患が発症する要因には、中枢発達障害の一つとしてGABA機能の異常が関連する可能性が唱えられています。今回、EGFのGABA機能発達に及ぼす影響を解析したところ、EGFがGABA神経としての表現型やシナプス機能の発達を遅延させる作用を持つことが明らかにになりました(図1)。また新生仔におけるEGFの影響は生育

後の皮質機能にも障害をもたらす、認知機能などを担う高周波数帯域の脳波活動を低下させることも判明しました(図2)。動物モデルより得られたこれらの結果は、発達期と生育後の2つ段階でGABA機能の異常が疾患の脳病態に関与することを示唆しています(H29. 6 Journal of Neurochemistryに掲載)。この研究は、新潟大学医歯学総合研究科、福島県立医科大学との共同研究です。

EGF投与によるGABAシナプス接続の低下

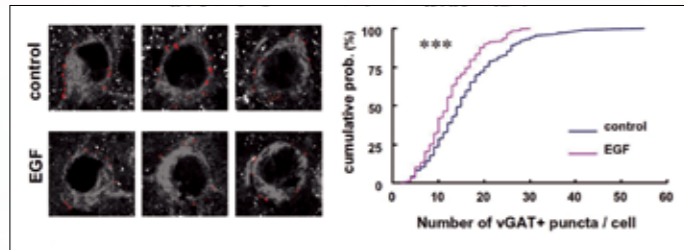


図1

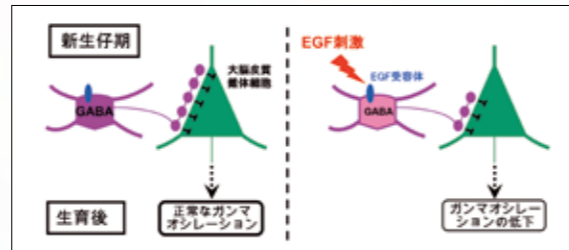


図2

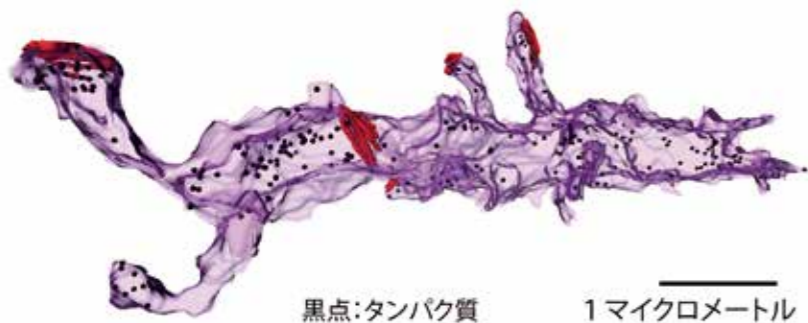
◆細胞病態学分野

生体脳で自在にゲノム編集を行い、内在性タンパク質を高精度にイメージングする

人間や動物が学習し記憶できるのは、状況に応じて脳の構造や機能がダイナミックに変化できるからです。では、学習し記憶するときに、脳の中では細胞・分子レベルで何が起きているのでしょうか? 私たちはこれまでに、脳内で自在にゲノム編集を行う技術群を開発し、様々な内在性タンパク質を高精度に可視化することに成功しています(Cell 2016, Neuron

2017)。今後はこれらの技術群を使って、学習・記憶の際に脳内の各細胞で機能タンパク質がどのように振舞っているのかを時間的・空間的に高精度に観察し、学習・記憶を細胞・分子レベルで理解することを目指します。また、学習・記憶に異常をきたす疾患モデル動物において各タンパク質の挙動を観察し、病態の理解と新たな治療法の開発を目指します。

3次元超高解像度イメージ



大脳皮質組織中の神経細胞樹状突起の電子顕微鏡による3次元再構築。黒点はCaMKIIβタンパク質の局在を示す。CaMKIIβの分布は一律ではなく、例えば赤色で示す神経細胞同士の間接に重要な構造(シナプス後肥厚)に集積していることがわかる。

◆システム脳生理学分野

マクロ共焦点イメージングによる交叉神経移植後のマウス体性感覚野応答の解析

上腕神経叢の引き抜き損傷は、交差神経移植によって治療される場合があります。我々は交差神経移植を行ったときのマウス体性感覚野応答を、フラビン蛋白蛍光シグナルとしてマクロ共焦点顕微鏡で解析しました。左正中・尺骨神経を、神経移植片を介して右正中・尺骨神経の中枢端に連結した8週間後、左前肢刺激は両側性の体性感覚野応答を起しました。我々は、直接入力を受ける左の応答は、第IV層への視床入力によって直接生じ、右の応答は左から右の第II/III層への脳梁線維を介して間接的に生ずると考えました。この予想を確認するため、マクロ共焦点顕微鏡を用いてフラビン蛋白蛍光シグナルの断層イメージングを行ったところ、健常マウスの体性感覚野応答は第IV層に強く見られましたが、間接入力を受ける右側では、むしろ第II/III層の応答が優位に生じました。以上の結果は、交差神経移植によって生じる大規模な皮質回路の再編が、マクロ焦点顕微鏡を用いたフラビン蛋白蛍光シグナルの断層イメージングで捉えられたことを示すものです(H30.2 PLOS ONEに掲載)。

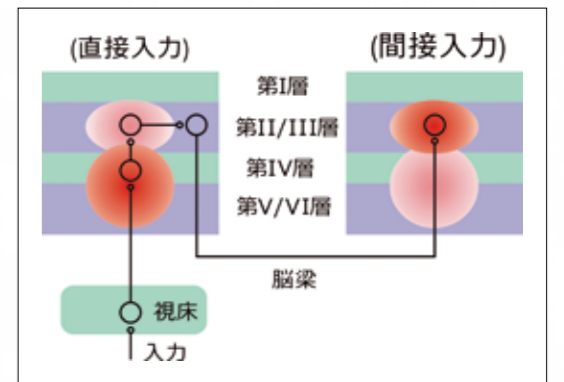
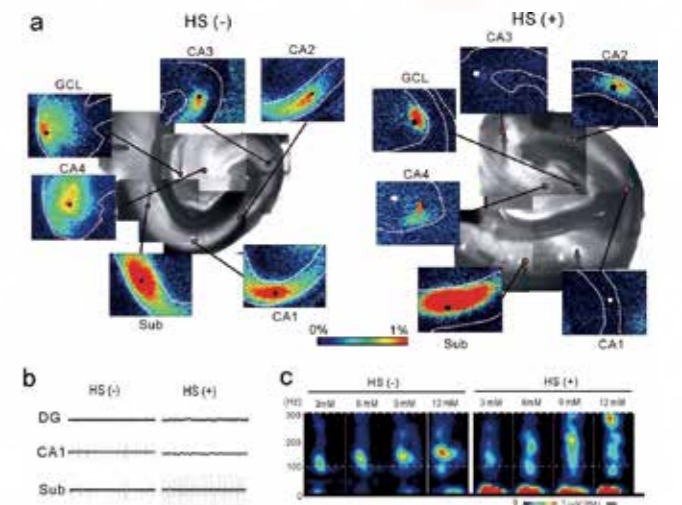


図: 交差神経移植後の両側体性感覚野の模式図。視床を介して直接入力がある側は第IV層優位に応答が生じるが、脳梁を介して間接入力がある側では第II/III層優位に応答が生じる。

◆病理学分野

外科手術標本上での神経活動の可視化により、側頭葉てんかんの新たな発症メカニズムを解明

内側側頭葉てんかんでは手術により原因となっている海馬を切除することで発作を良好に抑制できることから、海馬にてんかんの原因があると考えられています。しかし、切除された海馬組織を顕微鏡下で調べてみると、その病理像は同一ではなく、ほとんど変化がみられない場合を含め、幾つかのパターンがあることがわかってきました。しかし、これまではこうした病理像に対応した異常神経活動を、神経回路レベルで詳細に解析する術がありませんでした。そこで当分野では、てんかん患者の方の切除後の脳手術標本から、生体外で異常な神経活動を可視化する手法を確立し、内側側頭葉てんかんの発症メカニズムを検討しました。その結果、切除された海馬の中でも、海馬支脚と呼ばれる領域で異常な神経活動が生じており、この異常神経活動にはこれまであまり重視されてこなかった、グリア細胞の機能異常が大きく関わっていることを明らかにしました。本研究により得られた成果は、難治性てんかんの新たな治療法開発につながることを期待されます。特に、病理組織学的な進展に応じて異なったてんかん原性メカニズムが存在している可能性は、将来的により個別化した治療手法の確立に寄与するものです。また、グリア細胞の機能障害による過剰神経活動は、これまでの抗てんかん薬の作用機序とは全く異なります(H30.3 EBioMedicineに掲載)。



(a) 切除後の海馬標本を電気刺激したときの神経活動を画像化。(b) 自発放電の細胞外電位記録。病理像に関わらず、海馬支脚(Sub)で興奮性が高まっている。(c) 周波数スペクトラム解析。細胞外K⁺濃度を段階的に上げていくと、海馬硬化群: HS(+)では中心周波数のスポットが上昇していく。このことは細胞外K⁺濃度のバランス調節機構の失調が生じていることを示唆している。

◆脳神経外科学分野

磁気共鳴スペクトロスコピーを用いて神経膠腫の遺伝子変異をヒト脳で無侵襲に捉える方法を確立

神経膠腫には低悪性度のものから悪性転化するタイプと、最初から極めて悪性度の高いタイプとがあることが知られています。前者の場合は、腫瘍化の早期にイソクエン酸脱水素酵素 (IDH) 変異が起きることが知られており、新しいWHO脳腫瘍病理診断で神経膠腫の診断を行う際にはIDH変異の検出は必須項目とされています。この変異は摘出組織の免疫染色(図1A)により、また摘出組織からDNAを抽出してDNAシーケンス(ある特定の遺伝子の配列を調べる)を行うことで解析可能(図1B)ですが、脳研究所統合脳機能研究センター及び病理学分野との共同研究から生体において脳内代謝物を解析可能な磁

気共鳴スペクトロスコピー(MRS)を用い、生きたヒト脳においてMR装置に横たわらただけで無侵襲にIDH変異の有無が解析できることを突き止めました。これはIDH変異を有する神経膠腫でのみ、2-ヒドロキシグルタル酸(2-HG)という代謝物が蓄積し、MRSで解析出来るからです(図C)。2-HGは従来、MRSで検出が難しい代謝物とされてきましたが、工夫により信頼性高く検出可能となりました(2014.11 Acta Neuropathologica Communications; 2018.4 Neurosurgical Review; Neuropsychiatry (in press)に掲載)。

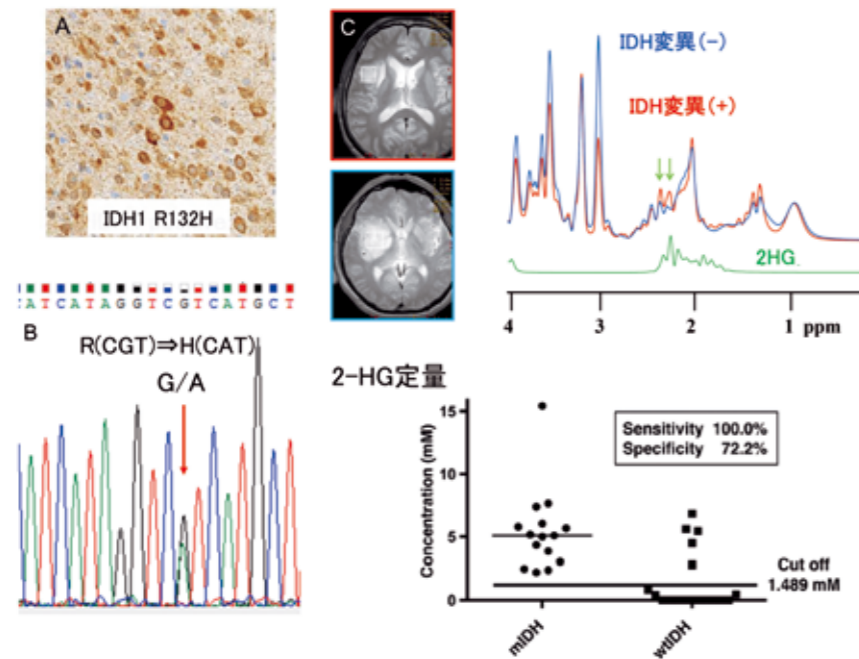


図: A. IDH1 R132H免疫染色 B. IDH1 DNAシーケンスでR132H変異を確認 C. MRSにより、IDH変異型グリオーマ症例で2-HGを検出

◆統合脳機能研究センター

世界で初めて低分子アクアポリン4促進剤の開発に成功

脳脊髄組織は水に富んだ組織である一方、脳脊髄以外の組織においてリンパ管とその中のリンパ液が担う組織の廃棄物の除去経路は間質液と髄液が担っていると考えられています。しかし、その効率を調整する分子は長年の謎でした。統合脳機能研究センターはマウス生体脳において、この廃棄物除去経路の効率をMRIにて測定する手法(JJVCPE法)を開発し、除去効率の調節にグリア細胞に豊富に存在する水チャンネル蛋白アクアポリン4が関与し、さらにアルツハイマー病態にて除去効率が低下していることを突き止めています。今回、これらの知見を創薬に応用し、世界で初めての低分子アクアポリン4促進剤の開発に成功、生体脳におけるアクアポリン4機能の促進効果を証明しました。アクアポリン4の機能促進により脳内排泄物除去効果が高まり、アルツハイマー病をはじめとする脳組織内蛋白等の蓄積を原因とする病態の新しい治療法の開発につながる可能性が期待されます。

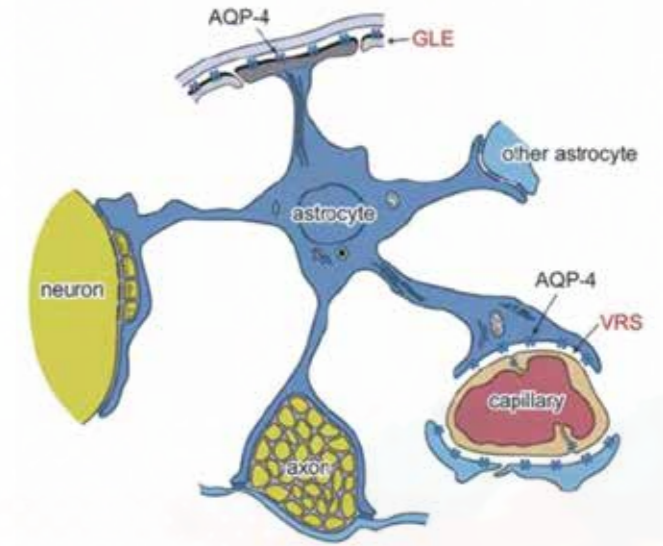


図: 脳組織内のアストログリアとアクアポリン4(AQP4)の分布 GLE: glia limitans externa, VRS: Virchow-Robin space

Huber VJ, Igarashi H, Ueki S, Kwee IL, Nakada T. Aquaporin-4 facilitator TGN-073 promotes interstitial fluid circulation within the blood-brain barrier: [17O]H2O JJVCPE MRI study. Neuroreport. 2018 Jun 13;29(9):697-703. doi:10.1097/WNR.0000000000000990.

◆遺伝子機能解析学分野

脳神経疾患克服を推進するバイオリソース基盤構築に基づく疾患研究の推進

当分野は認知症を始めとする脳神経疾患の克服を目指し、ヒト患者に生じる複雑な病態の解明に取り組んでいます。その研究基盤となる脳神経疾患のバイオリソースを国内の多施設から集積し、運用することで国内有数のバイオリソース拠点として活動しています。バイオリソースとしては末梢血や死後脳由来するゲノムDNAやRNA、脳脊髄液、全血、血漿、血清、リンパ芽球セルライン等を保有しています。これらを効果的に、かつ効率良く活用することで、アルツハイマー病のリスク遺伝子探索、認知症の早期診断手法としての脳脊髄液バイオマーカー、低侵襲性・汎用性を有する認知症の血液バイオマーカーの開発で成果を上げています。また、脳研究所は平成22年度より文部科学省の共同利用・共同研究拠点として活動しております。当分野もその一員として、これまでに集積した脳神経疾患のバイオリソースを活用した共同研究を国内外の複数の研究機関と活発に行なっています。今後も脳神経疾患のバイオリソースを永続的に収集し、活用し、地道に成果を上げることで脳神経疾患の克服に貢献していきたいと考えています。

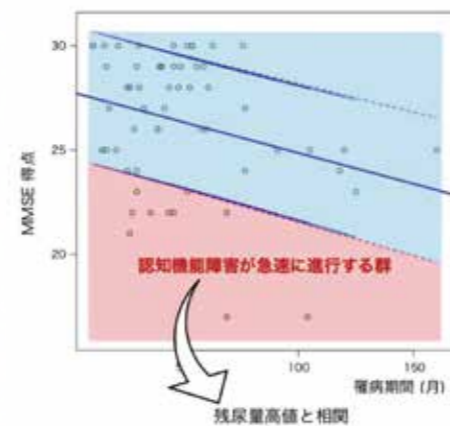


◆神経内科学分野

多系統萎縮症における認知機能障害と相関する因子を同定

多系統萎縮症(MSA)は、自律神経障害、小脳症状、錐体外路症状を特徴とする神経変性疾患であり、本邦の脊髄小脳変性症の中で最多を占めます。従来、MSAでは認知機能障害を合併しないと考えられてきましたが、近年多くの症例で認知機能障害を呈することが明らかになってきました。MSAの認知機能障害は前頭葉機能障害が主体で、中には病初期から重度の認知機能障害を呈する症例も報告されています。

我々は、MSAの認知機能・前頭葉機能障害に影響する因子、並びに急速に認知機能障害が進行する症例の特徴を解析しました。その結果、全般的な認知機能障害は、罹病期間、疾患の重症度、自律神経障害と相関し、前頭葉機能障害は、運動機能障害、MRI上の白質病変と相関していました。さらに、罹病期間に比し急速に認知機能障害が進行する一群では、残尿量高値が独立したリスク因子でありました。すなわち、MSA症例において、残尿量が高値のときには、急速に認知機能障害が進行する可能性があることを明らかにしました(J Neurol Sci.2018;388:128-132)。



◆動物資源開発研究分野

D1ドーパミン受容体の発現抑制を、胎生期、新生児期、成熟期に行うと、それぞれ異なる行動表現型を示す

北里大学医学部の大久保直准教授らとの共同研究により、以下の研究成果を報告しました。

ドーパミンは、運動活動、認知、動機付け、および報酬に関連する行動に広く関与しています。ドーパミンシグナルはドーパミン受容体遺伝子ファミリーを介して伝達されます。ドーパミンD1受容体(D1R)は線条体で多く発現し、運動機能の調節に関与します。最近、私たちは、成体段階でD1Rを条件的に欠損したD1Rノックダウン(KD)マウスが、野生型マウスよりも運動量が低下していることを報告しました。しかし、従来のD1Rノックアウト(KO)マウスは、運動量の過剰を示します。そこで、D1R発現を欠損させる時間の差が行動表現型に影響するかどうかを評価するために、私たちは出生後および成熟期にD1R欠損状態としたマウスを作製し、それらの運動機能をD1R KOマウスと比較しました。その結果、新生児期および成熟期にD1R欠損状態としたマウスは、D1R KOマウスと比較して重度の運動能力の障害を生じました。これらの結果は、D1Rは多彩な機能を有し、そしてノックダウンによる発現抑制のタイミングは、若年期から成熟期の正常な運動活動に大きく影響することを示しています(Okubo et al. Int J. Dev. Neurosci. 2018 66: 1-8)。

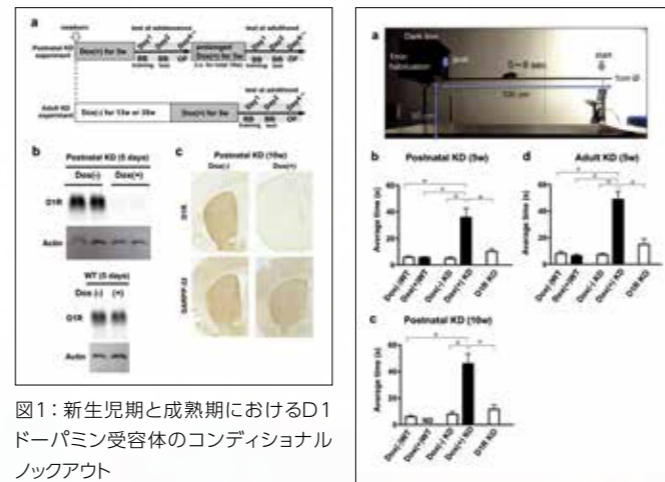


図1: 新生児期と成熟期におけるD1ドーパミン受容体のコンディショナルノックアウト
(a)新生児期と成熟期のD1Rノックダウン(KD)の実験スケジュール。行動解析は、幼若期と成熟期に実施した。(b) D1R発現様式のエスタンプ解析。(c) D1RとDARPP-32の発現様式のエスタンプ解析。

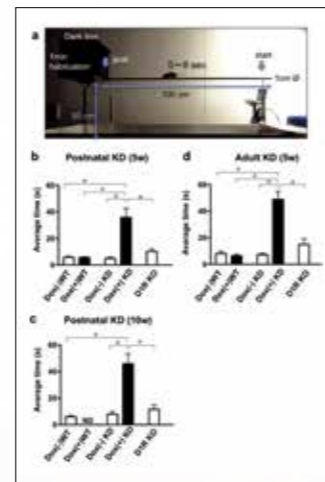


図2: バランスビームテスト(a) 実験装置をマウスが移動中の写真。(b)5週令(c)10週令(d)成熟期の個体のビームを横切るまでの平均時間。

◆システム脳病態学分野

巧みな動作を生み出すもとになる多様な神経回路を発見

私たちの研究室では、大脳皮質と脊髄を結ぶ「皮質脊髄路」と呼ばれる神経回路に着目して研究を行っています。この回路は運動を開始したり、手足を巧みに動かしたりするのに必要な神経回路として知られていますが、どのような神経細胞で構成されて、かくも複雑な動作を生み出せるのか、その実体はよくわかっていません。私たちは、皮質脊髄路を構成する神経細胞とその動きを最新の技術を用いて徹底的に探ってきました。その結果、皮質脊髄路

の中に、これまで知られていなかった多様な接続を持った神経回路が内在していることを見いだしました。これらの回路は、複雑な動作を行う際に、それぞれ異なる運動機能の要素をコントロールしていることが見えてきています。この成果から、動作を發揮するもととなる神経基盤が明らかになり、脳卒中や外傷など運動機能が障害される神経疾患において、どのような神経回路の再建が必要であるか理解することにつながります。

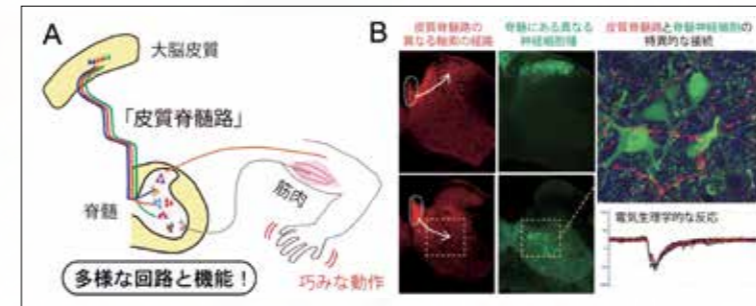
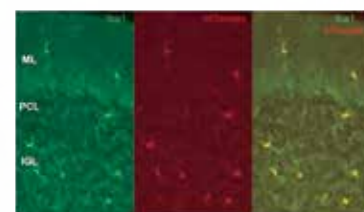


図: 皮質脊髄路の中にある多様な神経回路。(A)大脳皮質と脊髄にある多様な神経細胞種によって回路が作られ、巧みな動作を行う際にそれぞれ異なる機能を持っている。(B)皮質脊髄路には軸索を伸ばす別々の経路があり(左図、赤、白矢印)、それらは異なる脊髄の神経細胞(右図、緑)と接続して特異的な回路を作っている。

◆モデル動物開発分野

脳内免疫細胞ミクログリアが小脳の正常な神経回路発達を可能とする

脳が正常に動くためには機能的な神経回路の発達が重要です。シナプス刈り込みと呼ばれる過剰なシナプスの除去過程は機能的神経回路発達に必須であると考えられており、生後発達期の小脳はその現象のメカニズムを解析するのに良いモデルとなっています。当分野は、新規遺伝子変異マウス(図)を作製し、ミクログリアが小脳皮質のシナプス刈り込みに重要な役割を果たしていることを、広島大学の橋本浩一教授らとの共同研究により明らかにしました(Nakayama H*, Abe M*, et al., Nature Communications, in press (* Co-first authors))。ある種の神経・精神疾患発症の根底には神経回路発達の異常があると考えられており、本研究の成果はそれらの病態の解明にも貢献できる可能性があります。

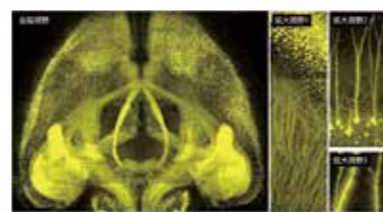


ミクログリア選択的遺伝子発現抑制を可能とする遺伝子変異マウス(lba1-iCreマウス)により赤色蛍光タンパクtdTomatoを発現させた小脳皮質切片の蛍光像を示す(左: lba1抗体による蛍光免疫染色像(緑)、中央: tdTomatoの蛍光像、右: 重ね合わせ)。本研究ではこのマウスを用いてミクログリアを除去することで、小脳皮質におけるシナプス刈り込みのメカニズムの一端を明らかにすることができた。

◆システム脳病態学分野

1細胞解像度を有する点描脳アトラスの創出—組織の膨潤および透明化を利用してマウス脳内の全細胞を解析—

脳は、膨大な数・種類からなる細胞が複雑なネットワークを形成することで、その多様な機能を有することが可能としています。当分野は東京大学大学院医学系研究科の上田泰己教授らとの共同研究により、新しい全脳膨潤・透明化手法「CUBIC-X」を開発することで、マウス脳の全ての細胞を詳細に観察することを可能とするイメージング技術を確認し、全脳全細胞解析を行うことにより、1細胞解像度でマウスの全脳アトラス(地図)を創出しました。この全脳アトラスを用いることにより脳内に存在する全ての細胞を網羅的に分析することが可能となり、1細胞レベルでの脳機能の理解に繋がることが期待されます(H30.4 Nature Neuroscienceに掲載)。



マウス全脳の1細胞解像度での観察
蛍光タンパク質(YFP)が一部の神経細胞に発現しているマウス脳を用いてCUBIC-Xで膨潤・透明化した後に、高解像度シート照明型蛍光顕微鏡で全脳を観察した。

◆分子神経疾患資源解析学分野

ALSの新たな分子病態モデル

新潟大学脳研究所 神経内科、分子神経疾患資源解析学分野の須貝章弘先生、小野寺理教授らの研究チームは、TDP-43蛋白質の発現調節に注目した筋萎縮性側索硬化症(ALS)の分子病態モデルを報告しました。

ALSは原因不明の運動神経変性疾患です。TDP-43はALS病理での細胞内封入体の主要構成成分で、一部の遺伝性ALSの原因遺伝子となる、病態機序に深く関わる蛋白質です。本研究はそのTDP-43発現のロバストネスによる厳密な調節機構、すなわち外的要因によらず蛋白質発現を一定範囲に調整する細胞内機構と、その破綻によるTDP-43の蓄積モデルを示しました(図)(Front. Neurosci (2018), Sugai A. et al.)。

変性疾患発症機序の研究は、大変難しく、家族性/遺伝性疾患を手掛かりとして行われます。今回の報告は、孤発性ALSの病態も説明しうる、重要なものです。今後もALSの病態機序解明を通じ臨床に還元を行うこと、即ちALSの早期診断、治療法解明に寄与することを目標としていきます。

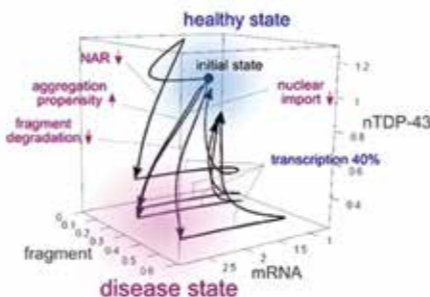


図: TDP-43 の発現調節モデル (Front. Neurosci (2018), Sugai A. et al.)。

◆脳病態解析分野

小型魚類を使ったパーキンソン病研究

脳病態解析分野はin vitroモデル、ショウジョウバエ、小型魚類、組織培養、マウス、ヒト剖検脳を縦断的に利用し、神経変性疾患の病態研究に取り組んでいます。平成29年度は、小型魚類のドーパミン神経や小脳の機能や解剖における哺乳類との類似性や相違について報告しました(Matsui, 2017)。また常染色体劣性遺伝形式の家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物PINK1のKOゼブラフィッシュのドーパミン神経の減少を、ドーパミン神経の信頼性の高い計数方法とともに報告しました(Matsui and Sugie, 2017)。その他、髄液注射のmethod、小型魚類モデルからのパーキンソン病の病態考察、なども論文として公表しました(Matsui and Matsui, 2017; Matsui and Takahashi, 2018)。

私達は今後もパーキンソン病の病態解明に取り組み、その病態に基づいた治療の開発を目指します。

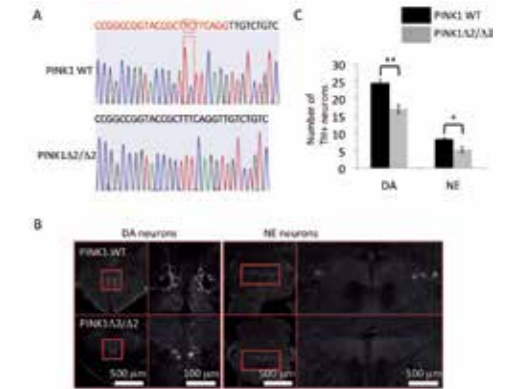


図: pink1変異体ゼブラフィッシュ。A: 2塩基欠損の遺伝子。B: ドーパミン神経、ノルアドレナリン神経の代表図。C: ドーパミン神経、ノルアドレナリン神経の数を比較。図はMatsui and Sugie, 2017より。