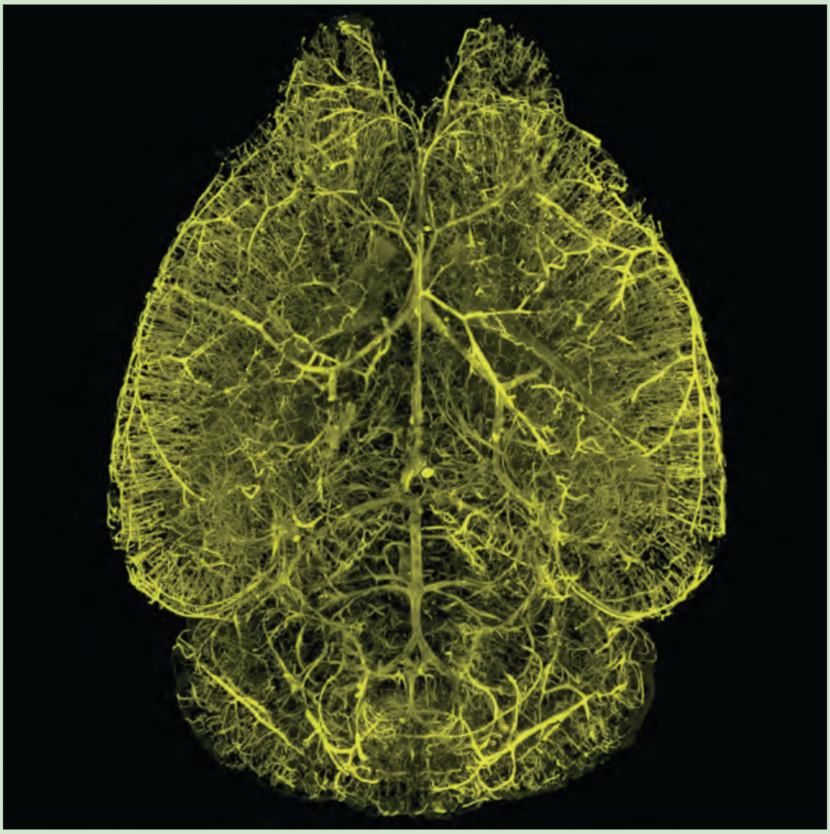
Brain Research Institute
Niigata University

Annual Report 2018

新潟大学脳研究所年報

2018



蛍光標識抗α平滑筋アクチン抗体で染色した3Dマウス全脳イメージング画像

目　次

国際共同研究

学内異分野融合・共同研究

進捗状況報告書

学内異分野融合・共同研究

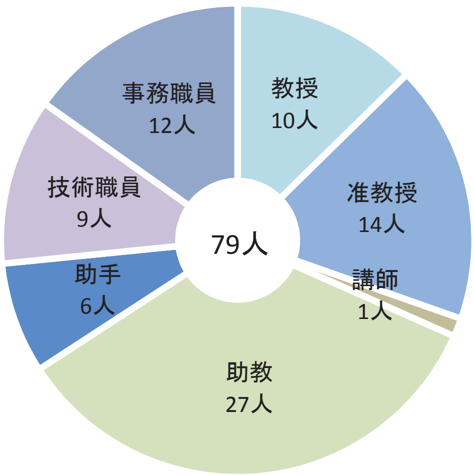
１． 組織図・研究所のデータ

組織図（H31.3.31 現在）

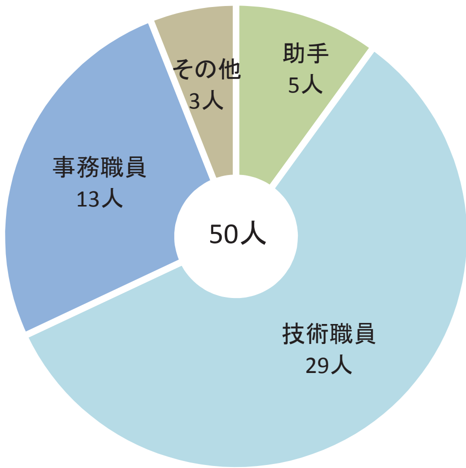
- 所長
  - 教授会
- 基礎神経科学部門
  - 分子神経生物学分野
  - 細胞病態学分野
  - システム脳生理学分野
- 病態神経科学部門
  - 病理学分野
  - デジタル病理学分野
  - 分子病態学（客員）分野
- 臨床神経科学部門
  - 脳神経外科学分野
  - 神経内科学分野
- 統合脳機能研究センター
  - 脳機能解析学分野
  - 生体磁気共鳴学分野
  - 臨床機能脳神経学分野
  - デジタル医学分野
- 生命科学リソース研究センター
  - バイオリソース研究部門
    - 遺伝子機能解析学分野
    - 生命情報工学分野
    - 動物資源開発研究分野
    - モデル動物開発分野
  - 脳科学リソース研究部門
    - 脳疾患標本資源解析学分野
    - 分子神経疾患資源解析学分野
    - システム脳病態学分野
    - トランスレーショナル研究分野
- 事務部（医歯学系脳研究所事務室）
  - 庶務係
  - 会計係
  - 共同利用係
- 超域学術院
  - 脳病態解析分野

研究所のデータ

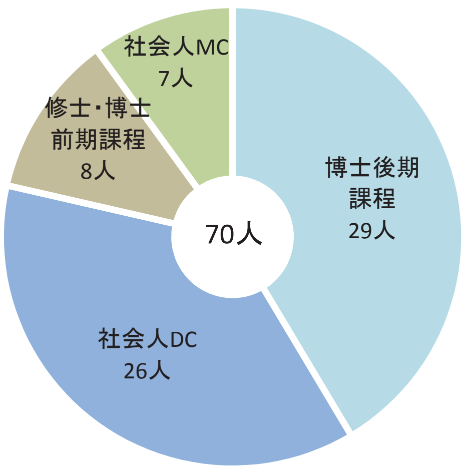
教職員数（常勤）　（H31.3.31現在）



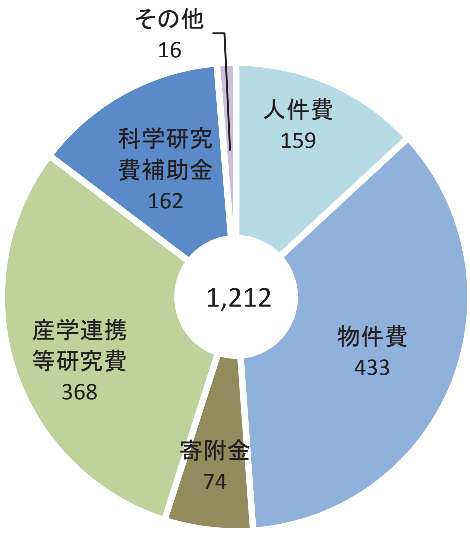
教職員数（非常勤）　（H31.3.31現在）



大学院生等の学生数　平成30年度



研究所予算（決算額）　平成30年度



外部資金獲得状況（平成 30 年度）

区　分	件数	金額（千円）
科学研究費補助金	51	149,836
厚生労働科学研究費補助金	1	13,000
運営費交付金特別経費	3	150,712
地方公共団体・民間助成団体等の研究費	13	19,800
民間企業等との共同研究	9	41,069
受託研究	26	464,294
寄　附　金	49	32,920

２．各分野の研究活動

分子神経生物学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

教授	那波　宏之	特任助手	北山　栄子
准教授	武井　延之	博士課程大学院生	湯川　尊行
助教	難波　寿明		甲斐　竜太
助教	岩倉　百合子		小林　雄太郎
特任助教	外山　英和		
特任助教	稲葉　洋芳	修士課程大学院生	鬼川　真希

Ⅱ　研究活動

脳内の神経細胞やグリア細胞は、神経伝達物質のような物質だけではなく、神経栄養因子やサイトカインと呼ばれている生理活性蛋白を介した細胞間相互作用を通して脳の恒常性を保っている。我々の研究室の最終目標は、これらの生理活性蛋白がどのように脳の発達を制御し、また脳機能を障害してしまうかという疑問を解明することにある。脳内で作用しているこのようなサイトカインは100種近く存在するが、初代培養した大脳皮質神経細胞の反応強度に基づき、主に脳由来神経栄養性因子（ＢＤＮＦ）と上皮成長因子（ＥＧＦ）とその類縁体のニューレグリン１の活性に着目している。これらのサイトカインの脳内合成放出メカニズム、神経細胞発達への影響、神経伝達への効果、動物行動への影響を中心に、分子生物学、遺伝子工学、神経生理学などを駆使して脳内サイトカイン研究を遂行している。今後、これらの研究結果が統合失調症、自閉症などの発達性脳疾患の解明に繋がるとともに、当該疾患の新薬開発のシーズとなることを期待している。

(1) 統合失調症の病因病態解明の為、動物モデルの開発解析や遺伝子解析を行っている。そのモデルとしてEGF投与動物を開発し、マウス、ラット、猿などの実験動物をモデル化して、その行動、細胞、分子変化の分析を行っている。
(2) 統合失調症モデル動物の聴覚異常について脳波やユニット記録といった電気生理学的手法やRNA-Seqなどの分子生物学的手法を用いて、その原因を探求している。
(3) 光遺伝学、薬理遺伝学の手法を用いドパミン神経系の活動操作を行い、ドパミンによる感覚・行動制御メカニズムを解析している。
(4) EGFファミリー分子とErbBsのリガンド–受容体相互作用、EGFファミリー分子のシェディング機構の詳細な検討、及び神経細胞に対する作用について解析を行っている。
(5) 神経細胞におけるmTORシグナル伝達機構の解明と生理機能及び脳発達異常病態との関連を解析している。
(6) ヒトiPS由来及びヒト胎児由来の神経幹細胞と分化誘導後の成熟神経細胞の代謝系の比較解析を行っている。

なお、これらの研究テーマは本学脳研究所のシステム脳生理学分野、医学部の生理学第１・第２教室、京都大学霊長類研究所、岡崎・生理学研究所、名古屋大学環境医学研究所、東京農業大学、福島県立医科大学医学部、大阪医療センターなど多くの研究機関と共同研究で実施されている。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

Yukawa T, Iwakura Y, Takei N, Saito M, Watanabe Y, Toyooka K, Igarashi M, Niizato K, Oshima K, Kunii Y, Yabe H, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Iritani S, Niwa SI, Takeuchi R, Takahashi H, Kakita A, Someya T, Nawa H. Pathological alterations of chondroitin sulfate moiety in postmortem hippocampus of patients with schizophrenia. Psychiatry Res. 2018 Dec;270:940-946. doi: 10.1016/j.psychres.2018.10.062.

Takahashi M, Kitaura H, Kakita A, Kakihana T, Katsuragi Y, Nameta M, Zhang L, Iwakura Y, Nawa H, Higuchi M, Komatsu M, Fujii M. USP10 Is a Driver of Ubiquitinated Protein Aggregation and Aggresome Formation to Inhibit Apoptosis. iScience. 2018 Nov 30;9:433-450. doi: 10.1016/j.isci.2018.11.006.

Xu C, Li Q, Efimova O, He L, Tatsumoto S, Stepanova V, Oishi T, Udono T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Kakita A, Nawa H, Khaitovich P, Go Y. Human-specific features of spatial gene expression and regulation in eight brain regions Genome Res. 2018 Aug;28(8):1097-1110. doi: 10.1101/gr.231357.117.

Matsumoto J, Nagaoka A, Kunii Y, Miura I, Hino M, Niwa SI, Nawa H, Takahashi H, Kakita A, Yabe H. Effects of the -141C insertion/deletion polymorphism in the dopamine D2 receptor gene on the dopamine system in the striatum in patients with schizophrenia. Psychiatry Res. 2018 Jun;264:116-118. doi: 10.1016/j.psychres.2018.03.029.

Hoshi O, Sugizaki A, Cho Y, Takei N. BDNF Reduces eEF2 Phosphorylation and Enhances Novel Protein Synthesis in the Growth Cones of Dorsal Root Ganglia Neurons. Neurochem Res. 2018 Jun;43(6):1242-1249. doi: 10.1007/s11064-018-2541-8.

Ⅳ　共同研究

(1) 研究題目：「創薬のためのインビトロ脳機能評価法の確立と標準化ヒト神経細胞の開発」
研究内容：ヒトiPS由来神経細胞を用いて分化誘導、機能評価の手法を標準化し、創薬／安全性に利用する。
参加機関：大阪医療センター、群馬大学、東京大学

(2) 研究題目：「ヒトを特徴づける脳比較トランスクリプトーム・比較メチローム解析」
研究内容：ヒト及び霊長類でジンクフィンガー遺伝子群に着目し、発現比較及びゲノムメチル化比較を行い、ヒトを特徴づける遺伝子を探索する。
参加機関：京都大学霊長類研究所　郷　康広

(3) 研究題目：「統合失調症におけるドパミンシグナルの変調」
研究内容：死後脳を用いて統合失調症におけるドパミン関連分子のゲノム解析及び発現解析を行う。
参加機関：福島県立医科大学　國井泰人

(4) 研究題目：「霊長類をもちいた統合失調症モデル動物の作成」
研究内容：マーモセットを用いた統合失調症モデルの樹立を目指す。
参加機関：京都大学霊長類研究所　中村克樹

細胞病態学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年３月31日現在）

教授　　　三國　貴康
准教授　　内ヶ島　基政
助教　　　内田　仁司

Ⅱ　研究活動

ヒトや動物は、様々なことを学習し、脳で記憶している。このとき脳では何が起こっているのだろうか？嫌いな勉強はなかなか覚えられず、覚えてもすぐに忘れてしまいがちである。一方で、好きな遊びの内容はすぐに覚えられ、ずっと覚えていられる。学習や記憶を可能にする脳の仕組み、記憶を長続きさせる仕組み、思い出す仕組み、忘れてしまう仕組みを、私たちは明らかにしたいと考えている。

また、最近は、発達障害に対する社会的関心が高まっている。発達障害の人とそうでない人との違いは、脳にあると考えられている。では、発達障害の人とそうでない人とで、脳の中の何が違うのだろうか？発達障害の症状につながる脳の仕組みを、私たちは明らかにしたいと考えている。

これまでに私たちは、生体脳内でのゲノム編集技術「SLENDR法」や「vSLENDR法」を開発し、脳での特定の内在性タンパク質の挙動を高精度にイメージングできるようにした (*Cell* 2016, *Neuron* 2017)。これらの技術開発により、従来の方法では解決できなかった様々な脳神経科学の問題に挑めるようになっている。この「SLENDR法」「vSLENDR法」に加えて、現在研究室では、生体脳内で特定の分子・細胞・回路を選択的に標識し、行動中の動物において特定の分子・細胞・回路の動態をイメージングし、操作する技術を開発している。本研究室で開発した技術に加えて、２光子イメージング、ウイルスや電気パルスによる遺伝子導入、光遺伝学、パッチクランプ電気生理、分子生物学などの先端技術を駆使して、学習・記憶の「生理」と発達障害の「病態」を、分子・細胞・回路のマルチレベルで明らかにすることを目指している。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Péterfi Z, Farkas I, Denis RGP, Farkas E, Uchigashima M, Füzesi T, Watanabe M, Lechan RM, Liposits Z, Luquet S, Fekete C. Endocannabinoid and nitric oxide systems of the hypothalamic paraventricular nucleus mediate effects of NPY on energy expenditure. ***Mol Metab***. 2018 Dec;18:120-133.

2. Nonomura S, Nishizawa K, Sakai Y, Kawaguchi Y, Kato S, Uchigashima M, Watanabe M, Yamanaka K, Enomoto K, Chiken S, Sano H, Soma S, Yoshida J, Samejima K, Ogawa M, Kobayashi K, Nambu A, Isomura Y, Kimura M. Monitoring and Updating of Action Selection for Goal-Directed Behavior through the Striatal Direct and Indirect Pathways. ***Neuron***. 2018 Sep 19;99(6):1302-1314.

3. Mao W, Salzberg AC, Uchigashima M, Hasegawa Y, Hock H, Watanabe M, Akbarian S, Kawasawa YI, Futai K. Activity-Induced Regulation of Synaptic Strength through the Chromatin Reader L3mbtl1. ***Cell Rep***. 2018 Jun 12;23(11):3209-3222.

4. Uchida H, Matsumura S, Katano T, Watanabe M, Schlossmann J, Ito S. Two isoforms of cyclic GMP-dependent kinase-I exhibit distinct expression patterns in the adult mouse dorsal root ganglion. ***Mol Pain***. 2018 Jan-Dec;14:1744806918796409.

5. Uesaka N, Abe M, Konno K, Yamazaki M, Sakoori K, Watanabe T, Kao T, Mikuni T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. Retrograde signaling from Progranulin to Sort1 counteracts synapse elimination in the developing cerebellum. ***Neuron***, 2018; 97(4):796–805.

Ⅳ　共同研究

（1）　研究題目　「生体脳内での神経シナプス活動の時空間マッピング」
研究内容　二光子体積イメージング法の開発と応用
参加機関　山梨大学

（2）　研究題目　「生体脳内での神経細胞内シグナルの時空間マッピング」
研究内容　細胞内シグナルプローブの開発と応用
参加機関　鹿児島大学、東京大学、山梨大学

（3）　研究題目　「発達期生体脳でのシナプス分子イメージング」
研究内容　シナプス分子のプローブの開発と応用
参加機関　熊本大学

（4）　研究題目　「神経伝達物質の放出機構」
研究内容　神経伝達分子プローブの開発と応用
参加機関　北京大学

システム脳生理学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

教授　　　　澁木　克栄
准教授　　　菱田　竜一
助教　　　　塚野　浩明
助教　　　　吉武　講平
技術職員　　磯貝　麻莉
博士課程大学院生
　　　　　　小木　学（耳鼻科）

Ⅱ　研究活動

当研究室は、ミトコンドリアのフラビン蛋白由来の内因性蛍光やカルシウム依存性蛍光蛋白を用いたイメージングを用い、マウス感覚野や連合野の機能を中心に解析している。また、行動学的な解析も行っている。

1）　連合野機能の解析１：大阪大学の八木らと共同で神経特異的な細胞接着因子プロトカドヘリンの多様性減少マウスの解析を行っている。連合野の中でも後部頭頂連合野は視覚と体性感覚の統合機能を有すると考えられている。マウスに前後に動く移動縞刺激とヒゲ刺激を同時に与えたときに、両者の方向が異なる場合に後部頭頂連合野が大きく活動したことから、この連合野が予測誤差検出機能を持つことを明らかにした。この後部頭頂連合野の応答が、入力誤差が大きいほど強くなること、幼少時からの学習に依存すること、プロトカドヘリンの多様性減少マウスでは消失することを見出した。

2）　連合野機能の解析２：マウス頭頂連合野の神経活動を操作して、それにより誘起される大脳皮質応答を、フラビン蛋白蛍光イメージング法で解析した。頭頂連合野を活性化すると、視覚野の神経活動は抑制され、視覚刺激に対する視覚応答も抑圧されることを見つけた。逆に、頭頂連合野を不活性化すると視覚応答は増強した。これらの結果より、頭頂連合野が視覚野を常に抑制していることを明らかにした。2光子顕微鏡によるカルシウムイメージングで解析したところ、この抑制機能を破壊したマウスでは、視覚野興奮性ニューロンの方位選択性が鈍くなっており、頭頂連合野から視覚野への抑制投射が注意という高度な脳機能に働く神経回路メカニズムの一部であるとの洞察を得た。

3）　聴覚野の解析：マウス聴覚野では、これまで電気生理学的手法による古典的な領野分類しかなかったが、フラビン蛋白蛍光イメージングを用いて詳細に領野の活動を記録し、同定した領野にトレーサーを打ち込むことによって、入力を受ける内側膝状体の部位を確認するという研究を行っている。特に今年度は二次聴覚野と扁桃体との結合様式を詳しく解析し、強い双方向結合を持つことを明らかにした。

4）　行動学的解析：マウスの図形認知機能を解析するには、通常、実験者の手間と時間を多大に必要とする。そこで、マウスのホームケージに小型ディスプレイと左右二本の給水口を設け、飼育環境下で行動解析を自動的に行う装置を開発した。図形を提示したサイドの給水口を舐める学習は、数日で８０％以上の正答率を示す程度にマウスを訓練することができた。次の段階として、特定の図形と報酬との関連性を覚える学習も、一週間程度で８０％以上の正答率を示すまでに訓練できるようになった。しかし、さらに次の段階として、ある図形から別の図形に

変化した（あるいはしない）場合を認知して応答する学習を試みたが、マウスのパフォーマンスが低く、成績も不安定であり、学習方法を改良していく必要があると思われる。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

(1) Ohga S, Tsukano H, Horie M, Terashima H, Nishio N, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K, Direct Relay Pathways from Lemniscal Auditory Thalamus to Secondary Auditory Field in Mice. Cereb Cortex, 28, 4424-4439, 2018.

(2) Nishio N, Tsukano H, Hishida R, Abe M, Nakai J, Kawamura M, Aiba A, Sakimura K, Shibuki K, Higher visual responses in the temporal cortex of mice. Sci Rep, 8, 11136, 2018.

(3) Yamagishi T, Yoshitake K, Kamatani D, Watanabe K, Tsukano H, Hishida R, Takahashi K, Takahashi S, Horii A, Yagi T, Shibuki K, Molecular diversity of clustered protocadherin-α required for sensory integration and short-term memory in mice. Sci Rep, 8, 9616, 2018.

(4) Maniwa K, Yamashita H, Tsukano H, Hishida R, Endo N, Shibata M, Shibuki K, Tomographic optical imaging of cortical responses after crossing nerve transfer in mice. PLoS One, 13, e0193017, 2018.

Ⅳ　共同研究

（1）研究題目　「プロトカドヘリンの脳機能」
研究内容　神経特異的かつ多様性を有する細胞接着因子のプロトカドヘリンがどのような脳機能に関与するかを解析する。
参加機関　大阪大学

（2）研究題目　「大脳皮質ＮＭＤＡ受容体の機能」
研究内容　大脳皮質特異的にＮＭＤＡ受容体機能が半減している遺伝子改変マウスを用い、大脳皮質ＮＭＤＡ受容体がどのような経験依存的可塑性や脳機能に関わるのかを解析する。
参加機関　遺伝学研究所

（3）研究題目　「大脳皮質抑制ニューロンの機能」
研究内容　抑制性ニューロンに特異的にＧＦＰを発現するマウスを用い、大脳皮質の抑制性ニューロンがどのような経験依存的可塑性や脳機能に関わるのかを解析する。
参加機関　群馬大学

病理学分野
脳疾患標本資源解析学分野（生命科学リソース研究センター）

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

Ⅰ－１　病理学分野

教　授	柿田　明美	技術職員	丹田　智恵子
准教授	豊島　靖子		濁川　慎吾
助　教	清水　　宏		高崎　順子
助　教	他田　真理		田中　優子
助　教	北浦　弘樹	事務職員	吉田　真理子
特別研究員	田中　英智		笠原　香織
			樋口　有紀
		大学院博士課程	伊藤　絢子
			中原　亜紗
			竹島　明 （神経内科）
			張　璐 （留学生）
			金丸　優 （脳神経外科）
			崔　博 （留学生）

Ⅰ－２　脳疾患標本資源解析学分野（生命科学リソース研究センター）

教　授（兼）柿田　明美
助　教　　　齋藤　理恵

Ⅱ　研究活動

病理学分野と脳疾患標本資源解析学分野は、神経・精神疾患の剖検例を対象とした臨床病理、および脳腫瘍やてんかん原性脳病巣等の手術・生検例を対象とした外科病理を行なっており、また脳神経疾患の病態形成機序を明らかにする研究を進めている。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Yukawa T, Iwakura Y, Takei N, Saito M, Watanabe Y, Toyooka K, Igarashi M, Niizato K, Ohima K, Kunii Y, Yabe H, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Iritani S, Niwa S, Takeuchi R, Takahashi H, Kakita A, Someya T, Nawa H. Pathologic alterations of chondroitin sulfate moiety in the postmortem hippocampus of patients with schizophrenia. Psychiatry Res 2018; 270: 940-946. doi.org/10.1016/j.psychres.2018.10.062.
2. Takahashi M, Kitaura H, Kakita A, Kakihana T, Katsuragi Y, Nameta M, Zhang L, Iwakura Y, Nawa H, Higuchi M, Komatsu M, Fujii M. USP10 is a driver of ubiquitinated protein aggregation and aggresome formation to inhibit apoptosis. iScience 2018; 9: 433-450. doi: 10.1016/j.isci.2018.11.006.

3. Motoki M, Nakajima H, Sato T, Tada M, Kakita A, Arawaka S. Neuronal intranuclear inclusion disease showing intranuclear inclusions in renal biopsy 12 years earlier. Neurology 2018; 91 (19): 884-886. doi: 10.1212/WNL.0000000000006480.
4. Ito J, Shimada T, Tada M, Shimizu H, Wakabayashi M, Yokoseki A, Onodera O, Takahashi H, Kakita A. Clinicopathologic features of two patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis who maintained communication ability for over 30 years. J Neuropathol Exp Neurol 2018; 77 (11): 981-986. doi: 10.1093/jnen/nly082.
5. Hoshi A, Tsunoda A, Yamamoto T, Tada M, Kakita A, Ugawa Y. Altered expressions of glutamate transporter-1 and water channel protein aquaporin-4 in human temporal cortex with Alzheimer’s disease. Neuropathol Appl Neurobiol 2018; 44 (6): 628-638. doi: 10.1111/nan.12475.
6. Hirose T, Nobusawa S, Sugiyama K, Fujimoto N, Sasaki A, Mikami Y, Kakita A, Tanaka S, Yokoo H. Astroblastoma: a distinct tumor entity characterized by alterations of the X chromosome and *MN1* rearrangement. Brain Pathol 2018; 28 (5): 684-694. doi: 10.1111/bpa.12565.
7. Miki Y, Tanji K, Mori F, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Autophagy mediators (FOXO1, SESN3 and TSC2) in Lewy body disease and aging. Neurosci Lett 2018; 684: 35-41. doi: 10.1016/j.neulet.2018.06.052.
8. 豊島靖子、柿田明美．神経 (2) 変性・炎症．カラーアトラス 病理組織の見方と鑑別診断．第6版．（監修）赤木忠厚、松原修、真鍋俊明、（編集）吉野正、小田義直、坂元亨宇、森井英一．医歯薬出版，東京．pp. 473-505 (total 699 pages)． 2018年9月10日．
9. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shizimu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Lino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical landscape for tissue clearing based on hydrophilic reagents. Cell Rep 2018; 24 (8): 2196-2210.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.056.
10. Ito J, Nozaki H, Toyoshima Y, Abe T, Sato A, Hashidate H, Igarashi S, Onodera O, Takahashi H, Kakita A. Histopathologic features of an autopsied patient with cerebral small vessel disease and a heterozygous *HTRA1* mutation. Neuropathology 2018; 38 (4): 428-432. doi: 10.1111/neup.12473.
11. Xu C, Li Q, Efimova O, He L, Tatsumoto S, Oishi T, Udono T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Kakita A, Nawa H, Khaitovich P, Go Y. Human-specific features of special gene expression and regulation in eight brain regions. Genome Res 2018; 28 (8): 1097-1110. doi: 10.1101/gr.231357.117. IF = 11.9
12. 北浦弘樹、柿田明美．フラビン蛍光イメージングによるてんかん原性の解析．Clin Neurosci 2018; 36 (8): 970-972.
13. Suzuki Y, Nakamura Y, Yamada K, Kurabe S, Okamoto K, Aoki H, Kitaura H, Kakita A, Fujii Y, Huber VJ, Igarashi H, Kwee I, Nakada T. Aquaporin PET differentiates between grade III and IV human astrocytoma. Neurosurgery 2018; 82 (6): 842-846. doi: 10.1093/neuros/nyx314.
14. Sumitomo N, Ishiyama A, Shibuya M, Nakagawa E, Kaneko Y, Takahashi A, Otsuki T, Kakita A, Saito Y, Sato N, Sugai K, Sasaki M. Intractable epilepsy due to a rosette-forming glioneuronal tumor with dysembryoplastic neuroepithelial background. Neuropathology 2018; 38 (3): 300-304. doi:10.1111/neup.12450.
15. Matsumoto J, Nagaoka A, Kunii Y, Miura I, Hino M, Niwa S, Nawa H, Takahashi H, Kakita A, Yabe H. Effects of the -141C insertion/deletion polymorphism in the dopamine D2 receptor gene on the dopamine system in the striatum in patients with schizophrenia. Psychiatry Res 2018; 264: 116-118. doi: 10.1016/j.psychres.2018.03.029.

16. 齋藤理恵、伊藤慎治、野崎洋明、柿田明美．遺伝性脳血管障害の神経病理．特集：神経病理：update．神経内科 2018; 88 (5): 516-523.
17. 田中英智、豊島靖子、柿田明美．Globular glial tauopathyの神経病理．特集：神経病理：update. 神経内科 2018; 88 (5): 477-482.
18. 他田真理、柿田明美．前頭側頭葉変性症の組織学的分類．特集：非アルツハイマー型認知症の病理学．Brain Nerve 2018; 70 (5): 501-516. doi: 10.11477/mf.1416201033.
19. Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Kawabe Matsukawa M, Toyoda A, Fujiyama A, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Suzuki Y, Sugano S, Yurino H, Higasa K, Tanaka M, Ichikawa Y, Takahashi Y, Date H, Matsukawa T, Nakamoto F, Kanda J, Higashihara M, Abe K, Koike R, Sasagawa M, Kurohane Y, Hasegawa N, Kanazawa N, Kondo T, Tada M, Takano H, Saito Y, Sanpei K, Onodera O, Nishizawa M, Nakamura M, Sakiyama Y, Ohtsuka M, Ueki A, Kaida K, Shimizu J, Hanajima R, Hayashi T, Terao Y, Terada S, Hamada M, Shirota Y, Kubota A, Ugawa Y, Koh K, Takiyama Y, Ohsawa-Yoshida N, Ishiura S, Kira J, Tamaoka A, Akiyama H, Otsuki T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S. Intronic TTTCA and TTTTA repeat expansions in benign adult familial myoclonic epilepsy. Nat Genet 2018; 50 (4): 581-590. doi: 10.1038/s41588-018-0067-2.
20. Sugita Y, Furuta T, Ohshima K, Komaki S, Miyoshi J, Morioka M, Abe H, Tsukamoto Y, Takahashi H, Kakita A. The perivascular microenvironment in Epstein-Barr virus positive primary central nervous system lymphoma: the role of programed cell death protein 1 and programed cell death ligand 1. Neuropathology 2018; 38 (2): 125-134. 10.1111/neup.12435.
21. Natsumeda M, Motohashi K, Igarashi H, Nozawa T, Abe H, Tsukamoto Y, Ogura R, Okada M, Kobayashi T, Aoki H, Takahashi H, Kakita A, Okamoto K, Nakada T, Fujii Y. Reliable diagnosis of IDH-mutant glioblastoma by 2-hydroxyglutarate detection: a study by 3-T magnetic resonance spectroscopy. Neurosurg Rev 2018; 41 (2): 641-647. DOI 10.1007/s10143-017-0908-y.
22. Saito R, Tada M, Toyoshima Y, Nishizawa M, Onodera O, Takahashi H, Kakita A. Motor neuron loss in the upper cervical cord in patients with multiple system atrophy and dropped head. J Neuropathol Exp Neurol 2018; 77 (4): 317-324. doi: 10.1093/jnen/nly007.
23. Tanji K, Mori F, Miki Y, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. YOD1 attenuates neurogenic protein-toxicity through deubiquitinating activity. Neurobiol Dis 2018; 112: 14-23. doi: 10.1016/j.nbd.2018.01.006.
24. Kitaura H, Shirozu H, Masuda H, Fukuda M, Fujii Y, Kakita A. Pathophysiological characteristics of the subiculum associated with epileptogenesis in human hippocampal sclerosis. EBioMedicine 2018; 29: 38-46. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.02.013.
25. Kidana K, Tatebe T, Ito K, Hara N, Kakita A, Saito T, Ouchi Y, Ikeuchi T, Makino M, Saido TC, Akishita M, Iwatsubo T, Hori Y, Tomita T. Astrocyte-derived kallikrein-related peptidese 7 attenuates amyloid-β pathology in brain. EMBO Mol Med 2018; 10 (3): e8184. doi: 10.15252/emmm.201708184.
26. 他田真理、柿田明美．ミクログリアの組織学的特徴．臨床医のための神経病理 再入門. Clinical Neuroscience 2018; 36 (3): 276-277.
27. Yoneoka Y, Akiyama K, Seki Y, Hasegawa G, Kakita A. Frontoethmoidal schwannoma with exertion cerebrospinal fluid rhinorrhea: a case report and review of the literature. World Neurosurg 2018; 111: 381-385. doi: 10.1016/j.wneu.2018.01.015.
28. Mutoh H, Kato M, Akita T, Shibata T, Wakamoto H, Ikeda H, Kitaura H, Aoto K, Nakashima M, Wang T, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Kakita A, Miyake K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H. Biallelic variants in *CNPY3*, which encodes an endoplasmic reticulum chaperone, cause early-onset epileptic encephalaopathy. Am J Hum Genet 2018; 102 (2): 321-329. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.01.004.

29. Yokose M, Furuya K, Suzuki M, Ozawa T, Kim Y, Miura K, Matsuzono K, Mashiko T, Tada M, Koide R, Shimazaki H, Matsuura T, Fujimoto S. Vertical Gaze Palsy Caused by Selective Unilateral Rostral Midbrain Infarction. Neuro-Ophthalmology 2018; 42: 309-311. doi: 10.1080/01658107.2017.1401092.
30. Yoneoka Y, Yoshimura J, Sano M, Okada M, Kakita A, Fujii Y. Third ventricle germ cell tumor originating from the infundibulum with rapidly expansive enlargement. Pediatr Neurosurg 2018; 53 (1): 49-54. doi: 10.1159/000480021.
31. Miki Y, Tanji K, Mori F, Tatara Y, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Fimia GM, Wakabayashi K. AMBRA1, a novel α-synuclein-binding protein, is implicated in the pathogenesis of multiple system atrophy. Brain Pathology 2018; 28 (1): 28-42. doi: 10.1111/bpa.12461.
32. Kitamura Y, Komori T, Shibuya M, Ohara K, Saito Y, Hayashi S, Sasaki A, Nakagawa E, Tomio R, Kakita A, Nakatsukasa M, Yoshida K, Sasaki H. Comprehensive genetic characterizeation of rosette-forming glioneuronal tumors: independent component analysis by tissue microdissection. Brain Pathology 2018; 28 (1): 87-93. doi: 10.1111/bpa.12468.
33. Mori F, Tanji F, Miki Y, Toyoshima Y, Sasaki H, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Immunohistochemical localization of exoribonucleases (DIS3L2 and XRN1) in intranuclear inclusion body disease. Neurosci Lett 2018; 662: 389-394. doi: 10.1111/neup.12435.

Ⅳ　共同研究

病理学分野・脳疾患標本資源解析学分野は、文部科学省認定の共同利用・共同研究拠点「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」の中核分野として、ヒト脳科学に関するプロジェクト型および連携資源利用型の国内（国外）共同研究を推進している。

（1）研究題目　「神経変性疾患に関する神経病理学的研究」
研究内容　神経変性疾患、とくにアルツハイマー病や進行性核上性麻痺などのタウオパチー、多系統萎縮症やパーキンソン病などのシヌクレイノパチー、あるいは筋萎縮性側索硬化症(TDP-43プロテイノパチー)の臨床病理や病因に関する共同研究を行なっている。
参加機関　弘前大学、東京大学、岐阜薬科大学、カザン州立医科大学（露）、
信州大学、東京女子医科大学、愛知医科大学、京都大学　他

（2）研究題目　「難治てんかん原性病巣に関する外科病理標本の解析」
研究内容　難治てんかん原性病巣の病態形成機序の解明を目的に、各種病態（限局性皮質形成異常、結節性硬化症など）の切除脳組織を用いた病理組織学的、生化学的、生理学的解析を進めている。
参加機関　国立病院機構西新潟中央病院、京都大学、東京医科歯科大学、
広島大学、杏林大学　他

（3）研究題目　「精神神経疾患の分子病理学的解析」
研究内容　精神神経疾患の剖検脳を対象とした臨床病理、及び分子病理学的病態解析のための凍結脳標本資源を提供することで、精神神経疾患、とくに統合失調症の病態形成機序の解析を進めている。
参加機関　福島県立医科大学、理化学研究所、東北大学、東京大学　他

分子病態学（客員）分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

教　授（併）　　若林　孝一
准教授（併）　　森　文秋

Ⅱ　研究活動

当分野では、神経難病の病態解明を目標に、病理形態学、分子生物学、病態生化学などの手法を用い研究を進めている。神経変性疾患の多くはタンパク質蓄積病であることから、「タンパク質の結合・修飾・分解」の観点からアプローチを行っている。さらに、「封入体形成」や「神経細胞死」だけでなく、神経症状の発現に重要な部位として「シナプス」の変化にも焦点を当てている。

現在の研究テーマは、１）神経変性疾患における封入体形成と神経変性メカニズム、２）細胞内分解系の活性化による蓄積物質の除去、３）遺伝子改変モデル動物を用いた病態解析である。特に、シヌクレイノパチー（パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症）やポリグルタミン病の剖検脳組織を用いた研究は病理学分野や脳疾患標本資源解析学分野と共同で進めている。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Miki Y, Holton J, Wakabayashi K. Autophagy in neurodegeneration and aging. Aging 10: 3632-3633, 2018
2. Miki Y, Tanji K, Mori F, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Autophagy mediators (FOXO1, SESN3 and TSC2) in Lewy body disease and aging. Neurosci Lett 684: 35-41, 2018
3. Miki Y, Mori F, Seino Y, Tanji K, Yoshizawa T, Kijima H, Shoji M, Wakabayashi K. Co-localization of Bunina bodies and TDP-43 inclusions in a case of sporadic amyotrophic lateral sclerosis with Lewy body-like hyaline inclusions. Neuropathology 38: 521-528, 2018
4. 若林孝一.　マクロクイズ第114回.　筋萎縮性側索硬化症.　病理と臨床　36: 1005-1007, 2018
5. 若林孝一.　マクロクイズ第113回.　前頭側頭葉変性症（ピック病）.　病理と臨床　36: 905-907, 2018
6. 若林孝一.　マクロクイズ第112回.　多発性硬化症.　病理と臨床　36: 803-805, 2018
7. 若林孝一.　マクロクイズ第111回.　単純ヘルペスウイルス脳炎.　病理と臨床　36: 691-693, 2018
8. 若林孝一.　マクロクイズ第110回.　一過性の全脳虚血.　病理と臨床　36: 587-589, 2018
9. 若林孝一.　マクロクイズ第109回.　脳アミロイド血管症.　病理と臨床　36: 473-475, 2018
10. Kawarabayashi T, Nakamura T, Seino Y, Hirohata M, Mori F, Wakabayashi K, Ono S, Harigaya Y, Shoji M. Disappearance of MRI imaging signals in a patient with neuronal intranuclear inclusion disease. J Neurol Sci 388: 1-3, 2018
11. Yabe I, Yaguchi H, Kato Y, Miki Y, Takahashi H, Tanikawa S, Shirai S, Takahashi I, Kimura M, Hama Y, Matsushima M, Fujioka S, Kano T, Watanabe M, Nakagawa S, Kunieda Y, Ikeda Y, Hasegawa M, Nishihara H, Ohtsuka T, Tanaka S, Tsuboi Y, Hatakeyama S, Wakabayashi K, Sasaki H. Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome. Sci Rep 8: 819, 2018
12. 若林孝一、三木康生.　レヴィ小体型認知症の全身病理.　Brain and Nerve 70: 489-500, 2018
13. Tanji K, Mori F, Miki Y, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. YOD1 attenuates neurogenic proteotoxicity through its deubiquitinating activity. Neurobiol Dis 112: 14-23, 2018
14. Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Sasaki H, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Immunohistochemical localization of exoribonucleases (DIS3L2 and XRN1) in intranuclear inclusion body disease.

Neurosci Lett 662: 389-394, 2018

Ⅳ　共同研究

(1) 研究題目　「細胞内分解機構に着目したシヌクレイノパチーの分子病態解明と治療法開発

研究内容　神経変性疾患、特にレビー小体病や多系統萎縮症におけるオートファジーの異常について、剖検脳組織やモデル動物を用い研究を進めている。

参加機関　弘前大学医学研究科脳神経血管病態研究施設脳神経病理学講座、同　高度先進医学研究センター、新潟大学脳研究所病理学分野、同　脳疾患標本資源解析学分野

脳神経外科学分野

Ⅰ　研究組織　（構成員　平成31年3月31日現在）

教授	藤井　幸彦
准教授	大石　誠
助教	平石　哲也
助教	棗田　学
博士課程大学院生	野村　俊春、本橋　邦夫、阿部　英明、三橋　大樹、金丸　優、渡邉　潤、伊藤　陽祐

Ⅱ　研究活動

(1)　基礎研究（共同研究含む）

・悪性神経膠腫に対して腫瘍特異的ポドプラニンを標的とした術中療法の開発
・びまん性内在性橋神経膠腫(DIPG)に対するACVR1変異を標的とした新規治療
・膠芽腫における神経成長因子関連タンパク質-43kDa (GAP-43) のリン酸化の解析
・再発膠芽腫の新規治療法：EUrd-CED法のラット脳幹部腫瘍モデルでの研究
・mTORシグナルを標的とした悪性グリオーマに対する新規化学療法の基盤構築
・悪性髄膜腫における標的可能遺伝子変異の同定と新規治療法確立
・髄芽腫におけるGli3の役割の解明と新しい治療戦略
・脳幹グリオーマに対するヒストン修飾酵素阻害剤の有効性の検討
・ヒト脳腫瘍からの安定脳腫瘍幹細胞株の樹立と新規治療薬の探索への基礎研究
・NF-kB活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の開発に向けた多施設共同研究
・Boron neutron capture therapy (BNCT)が播種・浸潤に及ぼす効果の検討
・てんかんにおけるIMPDH1/2発現解析
・NF-1に合併するグリオーマにおけるオートファジーの役割解明
・アンブレインを軸とした新潟大学発香料・医薬品開発および新規基礎研究
・脳血管シリコンモデルを用いた術前シミュレーションシステムの構築

(2)　臨床研究（共同研究含む）

・脳腫瘍における体液（血液、尿、髄液）を利用した液体診断
・フローダイバーターの有効性と安全性に関する全国悉皆調査
・脳卒中の医療体制の整備のための研究
J-ASPECT study (Nationwide survey of Acute Stroke care capacity for Proper designation of Comprehensive stroke center in Japan)
・臨床手術（脳神経外科，耳鼻咽喉科，整形外科）に関する解剖知識と手術技能の習熟を目的とした遺体解剖実習
・未破裂大型近位部内頚動脈瘤の治療法に関する全国実態調査
・急性脳主幹動脈閉塞に対する血栓回収療法の普及プロジェクト
・フラボプロテイン自家蛍光反応を用いた新たな神経活動イメージングの確立への臨床研究
・MRI陰性てんかん症例での多角的術前検査によるてんかん焦点の可視化
・神経組織活動の内因性蛍光反応を応用したヒト大脳皮質活動領域の術中可視法の確立
・てんかん焦点同定のための高精度術前評価法の開発-高密度脳波での高周波律動の解析-

・ 髄芽腫：3T-MRSでのglutamine, 2HG検出による遺伝子型・予後予測
・ 7T-MRIによる神経膠腫の局在診断と病理組織分類について
・ 覚醒下手術における悪心・嘔吐に対するオンダンセトロンの有用性
・ 新潟大学関連施設の神経膠腫に対する観察登録研究
・ 初発退形成性神経膠腫に対する術後塩酸ニムスチン（ACNU）化学放射線療法先行再発時テモゾロミド化学療法をテモゾロミド化学放射線療法と比較するランダム化第III相試験
・ JCOG1303：手術後残存腫瘍のあるWHO Grade II星細胞腫に対する放射線単独治療とテモゾロミド併用放射線治療を比較するランダム化第II相試験
・ 初発膠芽腫に対する可及的摘出術＋カルムスチン脳内留置用剤留置＋テモゾロミド併用化学放射線療法と可及的摘出術＋テモゾロミド併用化学療法のランダム化第III相試験
・ 初発治療後に再発又は増悪した膠芽腫患者を対象としたDSP-7888投与エマルションとベバシズマブ併用対ベバシズマブ単独の多施設共同ランダム化第2相試験
・ 原発性悪性脳腫瘍患者に対する標準治療成績を調査するコホート研究

Ⅲ　論文（原著，総説，症例報告を区別しない）

1. Sano M, Takahashi N, Nagasaki K, Oishi M, Yoshimura J, Fujii Y. Polysomnography as an indicator for cervicomedullary decompression to treat foramen magnum stenosis in achondroplasia. Child's Nervous System. 2018 Nov; 34(11): 2275- 2281
2. Abe H, Natsumeda M, Kanemaru Y, Watanabe J, Tsukamoto Y, Okada M, Yoshimura J, Oishi M, Fujii Y. MGMT Expression Contributes to Temozolomide Resistance in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas and MGMT Silencing to Temozolomide Sensitivity in IDH-Mutant Gliomas. Neurol Med Chir (Tokyo). 2018 Jul 15; 58(7): 290-295
3. Natsumeda M, Igarashi H, Motohashi K, Suzuki Y, Ohkubo M, Okamoto K, Watanabe M, Nakada T, Fujii Y. Advances and challenges in assessing 2-hydroxyglutarate in gliomas by magnetic resonance spectroscopy: a short review. Neuropsychiatry (London). 2018; 8(6), 1831-1838
4. Okada M*, Kawasaki A*, Tamada A*, Okuda S, Nozumi M, Ito Y, Kobayashi D, Yamasaki T, Yokoyama R, Shibata T, Nishina H, Yoshida Y, Fujii Y, Takeuchi K, Igarashi M (*These three authors contributed equally.). Growth cone phosphoproteomics reveals that GAP-43 phosphorylated by JNK is a marker of axon growth and regeneration. ISCIENCE. June 2018; 4: 190-203
5. Suzuki Y, Nakamura Y, Yamada K, Kurabe S, Okamoto K, Aoki H, Kitaura H, Kakita A, Fujii Y, Huber VJ, Igarashi H, Kwee IL, Nakada T. Aquaporin Positron Emission Tomography Differentiates Between Grade III and IV Human Astrocytoma. Neurosurgery. 2018 Jun 1; 82(6): 842-846.
6. Maruya J, Tamura S, Hasegawa R, Saito Ayana, Nishimaki K, Fujii Y. Endoscopic hematoma evacuation following emergent burr hole surgery for acute subdural hematoma in critical conditionos: Technical note. Interdisciplinary Neurosurgery 12: 48-51, 2018
7. Natsumeda M, Uzuka T, Watanabe J, Fukuda M, Akaiwa Y, Hanzawa K, Okada M, Oishi M, Fujii Y. High Incidence of Deep Vein Thrombosis in the Perioperative Period of Neurosurgical Patients. World Neurosurg. 2018 Apr; 112:e103-e112.
8. Sakai N, Ota S, Matsumoto Y, Kondo R, Satow T, Kubo M, Tsumoto T, Enomoto Y, Kataoka T, Imamura H, Todo K, Hayakawa M, Yamagami H, Toyoda K, Ito Y, Sugiu K, Matsumaru Y, Yoshimura S; RIVER JAPAN Investigators. Efficacy and Safety of REVIVE SE Thrombectomy Device for Acute Ischemic Stroke: River JAPAN (Reperfuse Ischemic Vessels with Endovascular Recanalization Device in Japan). Neurol Med Chir (Tokyo). 2018 Apr 15; 58(4):164-172.

9. Sugita Y, Furuta T, Ohshima K, Komaki S, Miyoshi J, Morioka M, Abe H, Nozawa T, Fujii Y, Takahashi H, Kakita A. The perivascular microenvironment in Epstein-Barr virus positive primary central nervous system lymphoma: The role of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1. Neuropathology. 2018 Apr; 38(2): 125-134.
10. Natsumeda M, Motohashi K, Igarashi H, Nozawa T, Abe H, Tsukamoto Y, Ogura R, Okada M, Kobayashi T, Aoki H, Takahashi H, Kakita A, Okamoto K, Nakada T, Fujii Y. Reliable diagnosis of IDH-mutant glioblastoma by 2-hydroxyglutarate detection: a study by 3-T magnetic resonance spectroscopy. Neurosurg Rev. 2018 Apr; 41(2):641-647.
11. Funaki T, Takahashi JC, Houkin K, Kuroda S, Takeuchi S, Fujimura M, MiyamotoS; on behalf of the JAM Trial Investigators. Angiographic features of hemorrhagic moyamoya disease with high recurrence risk: a supplementary analysis of the Japan Adult Moyamoya Trial. J Neurosurgery Mar 2: 1-6, 2018
12. Ohno H, Yoneoka Y, Jinguji S, Watanabe N, Okada M, Fujii Y. Has acromegaly been diagnosed earlier? J Clin Neurosci. 2018 Feb; 48: 138-142.
13. Koyanagi M, Ishii A, Imamura H, Satow T, Yoshida K, Hasegawa H, Kikuchi T, Takenobu Y, Ando M, Takahashi JC, Nakahara I, Sakai N, Miyamoto S. Long-term outcomes of coil embolization of unruptured intracranial aneurysms. J Neurosurgery Jan 5:1-7, 2018
14. Sano M, Yamashita S, Aiba T: The prevalence of calcification around odontoid process and the incidence of crowned dens syndrome in the neurosurgical ward: A single institution's analysis. Modern Rheumatology. 2018 Jan; 28 (1): 182- 187
15. Yoneoka Y, Yoshimura J, Sano M, Okada M, Kakita A, Fujii Y. Third Ventricle Germ Cell Tumor Originating from the Infundibulum with Rapidly Expansive Enlargement. Pediatr Neurosurg. 2018; 53(1): 49-54.
16. Sano M, Yoshimura J, Fujii Y. Adult Chiari Type 1 Malformation with Holocord Syringomyelia Associated with Sagittal Synostosis. NMC Case Report Journal 2018; 5: 27- 30
17. 渡邉徹, 大杉繁昭, 相場豊隆. アルツハイマー型認知症に合併した高齢発症てんかんの治療におけるペランパネル(フィコンパ錠)の有用性. 新薬と臨床 67(5): 502- 511, 2018
18. 長谷川仁. 破裂椎骨動脈解離に対するステントを併用した急性期血管内治療. 脳血管内治療ブラッシュアップセミナー 2018 テキスト
19. 長谷川仁. 前頭蓋底部 dAVF の開頭手術. Hybrid Neurosurgeon のための疾患別臨床脳血管解剖テキスト(メ ディカ出版). 2018; 脳神経外科速報 2018 年増刊号: p122-135
20. 長谷川仁. 血管病理学　血管炎　①感染性動脈瘤, 血管炎. 完全版 脳血管内治療学(メディカ出版). 2018; p289-291
21. 長谷川仁. 脳動静脈奇形と Onyx 塞栓術 —重要な文献的知識と塞栓術の基本をおさえる一日本脳神経血管内 治療学会学術総会 CEP テキスト 2018. 2018; P75-93
22. 神保康史, 阿部博史, 高橋陽彦: Double- barrel Stent- assisted Technique が有用であった破裂脳底動脈開窓形成部動脈瘤. 脳血管内治療 3 巻 2 号: 65- 71, 2018
23. 伊藤 靖. アクセスのすべて—脳血管内治療成功の鍵 A. 基礎編 2. こんなに違うYコネ、止血弁-自分のお気に入りをみつけよう-. 脳血管内治療の進歩ブラッシュアップセミナー2017. 診断と治療社: 2018.67-73
24. 長谷川仁. カテーテルアクセス時の Goose neck snare 活用法. 脳血管内治療の進歩ブラッシュアップセミナー2017. 診断と治療社: 2018.22-26
25. Kikuchi B, Ando K, Nakazawa S, Sasaki O, Watanabe M, Saito A. Emergency Retrograde Left

Common Carotid Artery Stenting after Thoracic Endovascular Aortic Repair with Regional Cerebral Oxygen Saturation Monitoring: Report of Two Cases. Journal of Neuroendovascular Therapy 12: 103- 108, 2018
26. 高橋陽彦, 阿部博史, 神保康史, 高野弘基, 岡本浩一郎, 柿田明美, 藤井幸彦. IgM 抗体・PCR で診断した健常免疫者のトキソプラズマ脳炎. CI 研究 40(1): 33- 37, 2018
27. 瀧野透，渋間啓，金丸優，岡村光司，大島章，田澤真奈美，梨本岳雄，土屋尚人，吉村淳一，根津公教，斎藤隆史．両側頸部内頚動脈解離を来した茎状突起過長症の1例．脳神経外科 46(1): 53-59, 2018
28. 菊池文平，新保淳輔，安藤和弘，齋藤祥二，渡部正俊，斉藤明彦，佐々木修．脳虚血で発症した小児頭蓋内内頚動脈解離に対してstent retrieverを用いた超急性期脳血栓回収術が奏功した1例．脳神経外科速報28(1): 95- 101, 2018
29. Takahashi S. Importance of cervicogenic dizziness. J Rural Med 13(1): 48-56, 2018

Ⅳ　共同研究

1. てんかん原性獲得の機序解明に関する研究
　　新潟大学脳研究所　国立病院機構西新潟中央病院

神経内科学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

教授	小野寺　理	講師	河内　泉	講師	金澤　雅人
助教	堅田　慎一	助教	徳武　孝允	助教	佐治　越爾
助教	今野　卓哉	特任助教	須貝　章弘	特任助教	上村　昌寛

特任助教（死因究明教育センター）畠山　公大
特任助教　中野　仁美
技術職員　金子　三津子、川口　さやか

博士課程大学院生
樋口　真也、會田　泉、遠藤　寿子、石黒　敬信、小池　佑佳、酒井　直子、竹島　明、飛永　雅信、畠山　公大、柳村　文寛、笠原　壮、二宮　格、若杉　尚宏、坪口　晋太朗、樋口　陽、畠野　雄也、安藤　昭一朗、斎藤　奈つみ

修士課程大学院生
山崎　和樹

Ⅱ　研究活動

【多発性硬化症・視神経脊髄炎に関する研究】

1)　研究の概要

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) と視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica: NMO) は中枢神経系炎症性自己免疫疾患である。これまでに河内泉を中心とする研究グループは、本邦のNMO症例の臨床免疫学的・病理学的特徴を明らかにしてきた (Neurology 2009;73:1628)。引き続き、NMOにおける認知機能障害の臨床的心理学的・病理学的特徴を解析し、その発症機序を世界に先駆けて発表した (Annals of Neurology 2013;73:65)。さらにNMOのミトコンドリア蓄積を伴う神経変性の詳細を明らかにした (Annals of Neurology 2016;79:605)。これらをまとめた総説をオーストリア・ウィーン大学・Hans Lassmann教授と報告した (J Neurol Neurosurg Psychiatry 2017;88:137)。またMSに関しては、新規治療薬フィンゴリモドによる髄腔内免疫細胞動態を可視化し、服用早期におけるMS再発のリスク因子を解析した (Multiple Sclerosis Journal 2013;19(9):1230-1233)。さらにMSとNMOの免疫現象と神経変性の関係を検討した。

日本神経学会監修「多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン2017」の作成委員を務めた。

これまでにMSおよびNMOの臨床治験薬開発を9件行い，新薬開発を大きく推進した。

希少・難治性疾患であるMSとNMOを持つ患者が働きながら治療を受け、幸せな家庭生活を送ることができる持続可能な社会に向け、2019年3月、政府主催の「W20・国際女性会議」で講演した (https://www.mofa.go.jp/mofaj/files/000461874.pdf)。米国ガシー・ジャクソン慈善財団主催の全米NMO患者会に招待され、研究の成果を発表した。日本多発性硬化症協会医学顧問団として社会活動を行った。

【免疫介在性肥厚性硬膜炎の臨床像に関する検討】

1)　研究の概要

河内泉を中心とする研究グループは、免疫介在性肥厚性硬膜炎の臨床免疫学的・病理学的特徴

を検討し、特にANCA関連疾患群において新たな亜型の存在を明らかにした (Brain 2014;137(2):520-536)。厚生労働科学研究費・難治性疾患等政策研究事業「神経免疫疾患のエビデンスによる診断基準・重症度分類・ガイドラインの妥当性と患者QOLの検証」(研究代表者; 松井真 [金沢医科大学]) において、特発性肥厚性硬膜炎の診断基準を作成し、日本神経学会より承認を受けた。

【NMDA受容体抗体脳炎をはじめとした自己免疫性脳炎の臨床像に関する検討】

1) 研究の概要

河内泉を中心とする研究グループはペンシルバニア大学のJosep Dalmau教授との共同研究により、NMDA受容体抗体脳炎の長期治療予後を解析し、Lancet Neurology誌 (Lancet Neurology 2013;12(2):157)、Neurology誌 (Neurology 2013; 81(12):1058) に報告した。さらにJosep Dalmau教授との共同研究により、自己免疫性脳炎の新しい標的抗体 (neurexin-3α antibodies) を発見し、Neurology誌 (Neurology 2016;86(24):2235.) に報告した。

【POEMS症候群のサリドマイド治療に関する検討】

1) 研究の概要

河内泉、西澤正豊を中心とする研究グループは千葉大学の桑原聡教授らとの共同研究により、POEMS症候群に対するサリドマイド治療の開発を行い、その成果をLancet Neurology誌 (Lancet Neurology 2016;15(11):1129)、BMJ open (2015 Jan 8;5(1):e007330.) に報告した.

【脳梗塞に対する新規治療法の開発】

1) 研究の概要

金澤雅人を中心とする研究グループは，修復期の新しい細胞療法として，低酸素・低糖刺激を行ったミクログリアの脳梗塞動物モデルへの投与が有効であることを明らかにし，国際特許出願を行った．JSTの支援も受け海外各国移行を進めた．

また，脳梗塞後の血管新生の機序，その意義を検討し，ワシントン大学内科Gregory del Zoppo教授と共同で，総説を発表した（J Cereb Blood Flow Metab. 2019 May;39(5):753-769）.

2) 研究の成果

（特許出願）

CELL PREPARATION AND METHOD FOR PRODUCING CELL PREPARATION（WO 2018043596）

【多系統萎縮症の突然死予防を目的としたチーム医療モデルの構築】

1) 研究の概要

多系統萎縮症患者を対象に睡眠呼吸障害の機序の解明、および睡眠呼吸障害に伴う突然死の予防を目的とした臨床研究を継続した．本年度は多系統萎縮症における排尿障害の検討を行った.

2) 研究の成果

2001年から進めている研究で、16年間で20の英文原著論文を報告した。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Konno T, Yoshida K, Mizuta I, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda SI, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T.　Diagnostic criteria for adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia due to CSF1R mutation.　Eur J Neurol. 2018 Jan;25(1):142-147.

2. Tohnai G, Nakamura R, Sone J, Nakatochi M, Yokoi D, Katsuno M, Watanabe H, Watanabe H, Ito M, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Onodera O, Naruse H, Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Ishiura H, Morishita S, Yoshimura J, Doi K, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Atsuta N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS).　Frequency and characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.　Neurobiol Aging. 2018 Apr;64:158.e15-158.e19.

3. Saito N, Ishihara T, Kasuga K, Nishida M, Ishiguro T, Nozaki H, Shimohata T, Onodera O, Nishizawa M. Case Report: A patient with spinocerebellar ataxia type 31 and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.　Prion. 2018 Mar 4;12(2):147-149

4. Hatakeyama M, Sato T, Takahashi T, Kanazawa M, Onodera O, Nishizawa M, Shimohata T.　Predictors of cognitive impairment in multiple system atrophy.　J Neurol Sci. 2018 May 15;388:128-132.　Epub 2018 Mar 10.

5. Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Fujiyama A, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Suzuki Y, Sugano S, Qu W, Ichikawa K, Yurino H, Higasa K, Shibata S, Mitsue A, Tanaka M, Ichikawa Y, Takahashi Y, Date H, Matsukawa T, Kanda J, Nakamoto FK, Higashihara M, Abe K, Koike R, Sasagawa M, Kuroha Y, Hasegawa N, Kanesawa N, Kondo T, Hitomi T, Tada M, Takano H, Saito Y, Sanpei K, Onodera O, Nishizawa M, Nakamura M, Yasuda T, Sakiyama Y, Otsuka M, Ueki A, Kaida KI, Shimizu J, Hanajima R, Hayashi T, Terao Y, Inomata-Terada S, Hamada M, Shirota Y, Kubota A, Ugawa Y, Koh K, Takiyama Y, Ohsawa-Yoshida N, Ishiura S, Yamasaki R, Tamaoka A, Akiyama H, Otsuki T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S.. Expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy. Nat Genet. 2018 Apr;50(4):581-590.

6. Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Kasahara S, Konno T, Ishihara T, Onodera O. Robustness and Vulnerability of the Autoregulatory System That Maintains Nuclear TDP-43 Levels: A Trade-off Hypothesis for ALS Pathology Based on *in Silico* Data. Front Neurosci. 2018 Feb 1;12:28.

7. Utsumi K, Takano K, Okahara Y, Komori T, Onodera O, Kansaku K.　Operation of a P300-based brain-computer interface in patients with Duchenne muscular dystrophy.　Sci Rep. 2018 Jan 29;8(1):1753.

8. Ogino M, Shiozawa A, Ota H, Okamoto S, Hiroi S, Kawachi I. Treatment and comorbidities of multiple sclerosis in an employed population in Japan: analysis of health claims data. Neurodegener Dis Manag. 2018 Apr;8(2):97-103.

9. Ito J, Nozaki H, Toyoshima Y, Abe T, Sato A, Hashidate H, Igarashi S, Onodera O, Takahashi H, Kakita A. Histopathologic features of an autopsied patient with cerebral small vessel disease and a heterozygous HTRA1 mutation.　Neuropathology. 2018 May 25. doi: 10.1111/neup.12473.

10. Yuki A, Shinkuma S, Hayashi R, Fujikawa H, Kato T, Homma E, Hamade Y, Onodera O, Matsuoka M, Shimizu H, Iwata H, Abe R.　CADM1 is a diagnostic marker in early-stage mycosis fungoides: Multicenter study of 58 cases.　J Am Acad Dermatol. 2018 Dec;79(6):1039-1046.

11. Sakuma M, Kitamura K, Endo N, Ikeuchi T, Yokoseki A, Onodera O, Oinuma T, Momotsu T, Sato K, Nakamura K, Narita I. Low serum 25-hydroxyvitamin D increases cognitive impairment in elderly people. J Bone Miner Metab. 2019 Mar;37(2):368-375.

12. Ohara N, Hirokawa M, Kobayashi M, Ikeda Y, Yoneoka Y, Seki Y, Akiyama K, Tani T, Terajima K, Ozawa T. Reversible Non-parkinsonian Bradykinesia with Impaired Frontal Lobe Function as the Predominant Manifestation of Adrenal Insufficiency. Intern Med. 2018 Dec 1;57(23):3399-3406

13. Miura T, Mezaki N, Konno T, Iwasaki A, Hara N, Miura M, Funayama M, Unai Y, Tashiro Y, Okita K, Kihara T, Ito N, Kanatsuka Y, Jones DT, Hara N, Ishiguro T, Tokutake T, Kasuga K, Nozaki H, Dickson DW, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T. Identification and functional characterization of novel mutations including frameshift mutation in exon 4 of CSF1R in patients with adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia. J Neurol. 2018 Oct;265(10):2415-2424.

14. Ito J, Shimada T, Tada M, Shimizu H, Wakabayashi M, Yokoseki A, Onodera O, Takahashi H, Kakita A. Clinicopathologic Features of Two Patients With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Who Maintained Communication Ability for Over 30 Years. J Neuropathol Exp Neurol. 2018 Nov 1;77(11):981-986.

15. Kato K, Maemura R, Wakamatsu M, Yamamori A, Hamada M, Kataoka S, Narita A, Miwata S, Sekiya Y, Kawashima N, Suzuki K, Narita K, Doisaki S, Muramatsu H, Sakaguchi H, Matsumoto K, Koike Y, Onodera O, Kaga M, Shimozawa N, Yoshida N. Allogeneic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning for patients with adrenoleukodystrophy. Mol Genet Metab Rep. 2018 Nov 20;18:1-6.

16. Mezaki N, Miura T, Ogaki K, Eriguchi M, Mizuno Y, Komatsu K, Yamazaki H, Suetsugi N, Kawajiri S, Yamasaki R, Ishiguro T, Konno T, Nozaki H, Kasuga K, Okuma Y, Kira JI, Hara H, Onodera O, Ikeuchi T. Duplication and deletion upstream of *LMNB1* in autosomal dominant adult-onset leukodystrophy. Neurol Genet. 2018 Dec 7;4(6):e292.

17. Kawachi I. Autoantibodies in Paraneoplastic Neurological Syndrome. Brain Nerve. 2018 Apr;70(4):329-339. doi: 10.11477/mf.1416201006.

18. 河内泉. Pharma Medica 2018 年 3 月号 特集. 多発性硬化症診療最前線. 5. 再発予防・振興抑制療法. 3）モノクローナル抗体治療. 2018;36(3):37-44.

19. 河内泉. Charcot’s concept から見る視神経脊髄炎. Bio Clinica 2019;34(5):101-104.

20. 河内 泉. 中枢神経系脱髄疾患の最前線-抗MOG抗体の関与を考える. 多発性硬化症に自己抗体の関与はあるか. Clinical Neuroscience. 36巻11号 Page1286-1290

21. 金澤 雅人, 小野寺 理, 饗場 郁子. 【パーキンソン病(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート-】 検査・診断 関連疾患 進行性核上性麻痺 臨床病型の多様性およびパーキンソン病との鑑別診断. 日本臨床 76巻増刊4 パーキンソン病 Page330-337.

22. 小池 佑佳, 須貝 章弘, 小野寺 理【脳タンパク質老化と認知症制御】 脳タンパク質とその標的RNAの均衡と破綻. 細胞 (1346-7557)50巻6号 Page13-16.

23. 酒井 直子, 上村 昌寛, 小野寺 理【脳血管障害の最近の進歩】 単一遺伝子異常による脳小血管病. Medical Science Digest 45巻3号 Page165-168.

24. 上村 昌寛，小野寺 理．医学と医療の最前線 Glymphatic systemと脳小血管機能不全．日本内科学会雑誌．108巻3号 Page582-586．
25. 小野寺 理．【研修医が知っておきたい神経疾患の診断と治療】 運動失調症の診断と治療．月刊レジデント 11巻10号 Page74-81．
26. 坪口 晋太朗，石原 智彦，小野寺 理【神経疾患とトレース・メタル-知っていますか?】鉄 Friedreich失調症と鉄代謝．Clinical Neuroscience．37巻3号 Page308-310．

Ⅳ 共同研究

(1) 中枢神経系疾患における炎症回路・ゲートウェイ反射の解析 (学外共同研究)

（概要） 河内泉らは、中枢神経系疾患における炎症回路・ゲートウェイ反射の解析に関する臨床検体を用いた解析を行った。

（参加機関）新潟大学脳研究所神経内科、北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫分野

(2) 自己免疫性脳炎の病態解析 (国際共同研究)

（概要） 河内泉らは、ペンシルバニア大学・バルセロナ大学のJosep Dalmau教授との共同研究より、自己免疫性脳炎の自己抗体に関する解析を行った。

（参加機関）ペンシルバニア大学・バルセロナ大学Josep Dalmau教授

(3) 末梢神経・骨格筋を用いた末梢神経・筋疾患の診断，検体保存，病態研究（学外共同研究）

（概要） 末梢神経・骨格筋を侵す神経・筋疾患には，炎症性筋疾患，筋ジストロフィー，炎症性末梢神経疾患，遺伝性感覚運動ニューロパチーなどが該当し，末梢神経・骨格筋を用いた病理・生化学的検査、病態研究を行った．

（参加機関）新潟大学脳研究所神経内科、長岡赤十字病院神経内科、新潟県立中央病院神経内科、新潟県立新発田病院神経内科、国立病院機構西新潟中央病院

(4) Niigata MSA study （院内共同研究）

（概要） 2001年に開始し、多系統萎縮症患者を対象に睡眠呼吸障害の機序の解明、および睡眠呼吸障害に伴う突然死の予防を目的とした臨床研究を本年度も継続した。

（参加機関）新潟大学脳研究所神経内科、同統合脳機能研究センター、新潟大学医歯学総合病院呼吸器内科、耳鼻咽喉科、循環器内科、摂食・嚥下機能回復部

(5) 脳梗塞に対する機能回復促進させる細胞療法の開発 （学外共同研究）

（概要） 金澤雅人らは、岐阜大学大学院医学部神経内科・老年学分野下畑享良教授，先端医療振興財団臨床研究情報センターの福島雅典センター長らとの共同研究を行い、脳梗塞に対する脳保護的細胞療法の研究を行った。

（参加機関）新潟大学脳研究所神経内科、岐阜大学大学院医学部神経内科・老年学分野、先端医療振興財団臨床研究情報センター

（特許） CELL PREPARATION AND METHOD FOR PRODUCING CELL PREPARATION (WO 2018043596)

(6) 脳梗塞に対する血管保護療法の開発 （学外共同研究）

（概要） 金澤雅人らは、岐阜大学大学院医学部神経内科・老年学分野下畑享良教授、

東京大学農学部東京大学大学院農学生命科学研究科の西原真杉教授、および
お茶ノ水女子大の由良敬教授らとの共同研究を行い、脳梗塞に対する新規脳
梗塞治療薬プログラニュリンに対する研究を行った。

（参加機関）新潟大学脳研究所神経内科、岐阜大学大学院医学部神経内科・老年学分野、
京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学研究室，
お茶ノ水女子大理学部生命情報学研究室

統合脳機能研究センター

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

教授	五十嵐　博中	センター長
リサーチコーディネーター	西澤　正豊	
同	杉浦　真	
同	永澤　清	
客員教授	イングリッド・クイー	
准教授	松澤　等	脳機能解析学分野
准教授	鈴木　清隆	生体磁気共鳴学分野
准教授	鈴木　雄治	臨床機能脳神経科学分野
准教授	山田　謙一	臨床機能脳神経科学分野
特任准教授	伊藤　浩介	脳機能解析学分野
助教	渡辺　将樹	生体磁気共鳴学分野
助教	北浦　弘樹	臨床機能脳神経科学分野
助教	植木　智志	臨床機能脳神経科学分野
特任助教	中村　ゆきみ	生体磁気共鳴学分野
特任助教	酒多　穂波	生体磁気共鳴学分野
特任助手	村木　美子	臨床機能脳神経科学分野
特任助手	大湊　詩保	臨床機能脳神経科学分野
技術職員	計良　妙	
実験助手	目黒　佳未	
実験助手	冨士　淑恵	
大学院生	武田　基秀	
大学院生	松田　将門	
大学院生	大野　健	
医局秘書	佐藤　直子	
医局秘書	松崎　励奈	
医局秘書	遠藤　智代	
医局秘書	丸山　美穂	

Ⅱ　主な研究活動

統合脳機能研究センターでは「こころの科学的解明」を目的とした中核的研究拠点（COE）形成プログラムから、さらに文部科学省連携融合事業「水分子の脳科学」（平成17年度～22年度）、文部科学省特別経費「意識の脳科学」（平成23年度～27年度）と引き継がれた研究活動を推進してきた。このプロジェクトでは水分子の移動に特異的に関与するタンパク質のチャンネル、アクアポリンの動態的機能解析を行い、生体におけるアクアポリンの動態を画像化する方法の開発に初めて成功すると共に、世界初のアクアポリン４阻害剤を開発した。さらに、これらのプロジェクトは、今までの研究成果を臨床に還元すべく平成28年度～32年度文部科学省共同利用・共同研究拠点強化事業「アルツハイマー病予防・治療薬の創生」へと引き継がれ、シーズとなる薬剤3種類の開発を終え、国内特許を申請、さらにJSTの大学等知財基盤強化支援に採択されPCTを申請するとともに、企業との共同研究開発契約を進めている。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Yamada K, Suzuki Y, Okuyama M, Watanabe M, Nakada T. Developmental abnormalities of the brain exposed to childhood maltreatment detected by diffusion tensor imaging. Neurol. Res. 2019; 41: 19-25.
2. Huber VJ, Igarashi H, Ueki S, Terumitsu-Tsujita M, Nito C, Ohno K, Suzuki Y, Itoh K, Kwee IL, Nakada T. Visualizing the Distribution of Matrix Metalloproteinases in Ischemic Brain Using In Vivo 19F-Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging. Contrast Media Mol Imaging. 2019 Jan 6;2019:8908943. doi: 10.1155/2019/8908943. eCollection 2019.
3. Masaki Watanabe, Hitoshi Matsuzawa, Kenichi Yamada, Hironaka Igarashi, Tsutomu Nakada. Novel Modified 3D Shepp-Logan Phantom Model for Simulation of MRI Radiofrequency Coil Design. Advanced Biomedical Engineering. 7 156-159 Oct 2018.
4. Itoh K, Nakada T. Absolute pitch is not necessary for pitch class-color synesthesia. Conscious Cogn. 2018 Oct;65:169-181. doi:10.1016/j.concog.2018.08.010.
5. Manabu Natsumeda , Hironaka Igarashi , Kunio Motohashi , Yuji Suzuki , Masaki Ohkubo , Kouichirou Okamoto , Masaki Watanabe , Tsutomu Nakada , Yukihiko Fujii. Advances and Challenges in Assessing 2-Hydroxyglutarate in Gliomas by Magnetic Resonance Spectroscopy: A Short Review. Neuropsychiatry (London). 8(6)1831-1838 Jul 2018.
6. 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.
7. Urakawa T, Tanaka Y, Goto S, Matsuzawa H, Watanabe K, Endo N. Detecting intertrochanteric hip fractures with orthopedist-level accuracy using a deep convolutional neural network. Skeletal Radiol. 2018 Jun 28. doi:10.1007/s00256-018-3016-3.
8. Suzuki Y, Nakamura Y, Yamada K, Kurabe S, Okamoto K, Aoki H, Kitaura H, Kakita A, Fujii Y, Huber VJ, Igarashi H, Kwee IL, Nakada T. Aquaporin Positron Emission Tomography Differentiates Between Grade III and IV Human Astrocytoma. Neurosurgery. 2018 Jun 1;82(6):842-846. doi: 10.1093/neuros/nyx314.
9. Kim Y, Sakata H, Nejime M, Konoike N, Miyachi S, Nakamura K. Afferent connections of the dorsal, perigenual, and subgenual anterior cingulate cortices of the monkey: Amygdalar inputs and intrinsic connections. Neuroscience Letters 2018 May vol:681:93-99. doi:10.1016/J.NEULET.2018.05.028
10. Nakada T, Kwee IL. Fluid Dynamics Inside the Brain Barrier: Current Concept of Interstitial Flow, Glymphatic Flow, and Cerebrospinal Fluid Circulation in the Brain.Neuroscientist. 2018 May 1:1073858418775027. doi: 10.1177/1073858418775027. [Epub ahead of print]
11. Natsumeda M, Motohashi K, Igarashi H, Nozawa T, Abe H, Tsukamoto Y, Ogura R, Okada M, Kobayashi T, Aoki H, Takahashi H, Kakita A, Okamoto K, Nakada T, Fujii Y. Reliable diagnosis of IDH-mutant glioblastoma by 2-hydroxyglutarate detection: a study by 3-T magnetic resonance spectroscopy. Neurosurg Rev. 2018 Apr;41(2):641-647. doi: 10.1007/s10143-017-0908-y. Epub 2017 Sep 27.
12. Kitaura H, Shirozu H, Masuda H, Fukuda M, Fujii Y, Kakita A. Pathophysiological Characteristics Associated With Epileptogenesis in Human Hippocampal Sclerosis. EBioMedicine 29: 38-46, 2018
13. Tobinaga M, Suzuki Y, Fujinaka H, Ozawa T, Nakajima T. Age-related increase in GABAA receptor distribution in the prefrontal cortex: a 123I-Iomazenil SPECT study. J Clin Neurosci. doi: 10.1016/j.jocn.2019.03.044
14. Tobinaga M, Suzuki Y, Nakajima T.　A case of atraumatic tetanus developed initially with worsening headache in a woman regularly cared for chronic headache at an outpatient clinic. Clinical Case Reports. 2019;00:1-5. doi: org/10.1002/ccr3.2024

Ⅳ　共同研究

(1)　研究題目　アルツハイマー病予防・治療のための先制医療（平成28年度～）

研究内容　MRI・PETを用いたアルツハイマー病の発症前診断法を開発・確立すると共に、開発された診断技術をアルツハイマー病発症予防に生かすために、アクアポリンを制御する薬剤の開発を行い、アミロイド蛋白の排泄不全を予防・治療する特異的な新薬を創生することを目標とする。

参加機関　Neurology, University of California, Davis　(米国)

(2)　研究題目　発達障害者及び幼少期被害体験者の統合的脳機能に関する研究（平成28年度～）

研究内容　高磁場MRIにおける画像解析法（機能的MRI、拡散テンソル解析）を用いて行動発達障害に関連する生態情報を非侵襲的に抽出し、脳発達病態の手掛りを探る。

参加機関　国立成育医療研究センター

(3)　研究題目　サル類における聴覚事象関連電位の記録（平成25年～）

研究内容　サル類を対象に無麻酔・無侵襲で頭皮上から聴覚誘発電位や事象関連電位を記録し、脳進化に伴う聴覚処理の種差を検討する。

参加機関　京都大学霊長類研究所

遺伝子機能解析学分野・生命情報工学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

教授	池内　健	技術補佐員（続き）	大日方　藍
准教授	宮下　哲典		小川　由貴
助教	春日　健作	事務補佐員	高殿　恵子
特任助教	原　範和	大学院生（博士）	黒羽　泰子
特任助手	荒木　亜希		石黒　敬信（神経内科）
技術職員	月江　珠緒		樋口　陽（神経内科）
技術補佐員	小林　智子		劉　李歆
	佐藤　怜奈	大学院生（修士）	朱　斌
	廣瀬　美香		村上　涼太

Ⅱ　研究活動

本分野はヒト生体試料を用いた統合解析に基づく認知症性疾患の診断・治療法の開発、並びに病態解明に関する研究活動を行っている。国内の多施設と共同してアルツハイマー病のゲノムDNAを収集し、数千例規模のゲノムDNAを有するリソースを構築している。これらのサンプルを活用してアルツハイマー病の感受性遺伝子探索やコモン・レアバリアント解析を行い、孤発性アルツハイマー病の先天的な観点から発症機序解明を目指している。単一遺伝子性の家族性認知症の遺伝子解析については、全国の医療施設から原因遺伝子変異の解析の依頼を受け（累計850症例以上）、その結果を臨床に還元するクリニカルシークエンスを実施している。本邦における家族性アルツハイマー病の実態を把握する目的で、本邦家族性アルツハイマー病変異データベースJFADdbを作成し、Web上に公開している（http://www.alzdb.org/jfad/about_en.html）。これらの実績をふまえ、平成28年度からAMED「認知症臨床ゲノム情報データベース構築に関する開発研究」のゲノム解析拠点として活動している。

ゲノムDNAに加えて、全国多施設共同研究により統一されたプロトコルで採取された脳脊髄液、血液、RNAなどを維持、管理、運用し、認知症性疾患バイオバンクとしての重要な役割を担っている。多施設共同認知症臨床研究におけるバイオマーカー測定の品質を担保することを目的に、この活動において生体試料の取り扱いと測定方法の標準化を実施している。さらに、これらの生体試料リソースを用いて、アルツハイマー病の新規バイオマーカーを探索し、新規候補マーカーを報告している。これらの認知症性疾患バイオバンクを活用し、「新潟大学脳研究所共同利用・共同研究」により、国内外の施設と共同研究を展開している。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Konno T, Yoshida K, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda S, Nishizawa M, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T. Diagnostic criteria for adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP). European Journal of Neurology 25:142-147, 2018 / doi: 10.1111/ene.13464

2. Kidana K, Tatebe T, Ito K, Hara N, Kakita A, Saito T, Ouchi Y, Makino M, Ikeuchi T, Saido TC, Akishita M, Iwatsubo T, Hori Y, Tomita T. Astrocyte-derived kallikrein-related peptidase 7 attenuates amyloid-β deposition in a mouse model of Alzheimer disease. EMBO Molecular Medicine 10(3). pii: e8184, 2018 /

10.15252/emmm.201708184

3. Konno T, Miura T, Harriott A, Mezaki N, Edwards ES, Ross OA, Meschia JF, Ikeuchi T, Wszolek ZK. Partial loss of function of CSF1R in a patient with white matter abnormalities. European Journal of Neurology 25:875-881, 2018 / doi: 10.1111/ene.13611

4. Ikeuchi T, Mezaki N, Miura T. Cognitive dysfunction and symptoms of movement disorders in adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia. Parkinsonism & Related Disorders 46:S39-S41, 2018 / doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.08.018

5. Morihara R, Yamashita T, Deguchi K, Kurata T, Nomura E, Sato K, Nakano Y, Ohta Y, Hishikawa N, Ikeuchi T, Kitaguchi M, *Abe K. Familial and sporadic chronic progressive degenerative parietal ataxia. Journal of Neurological Science 387:70-74, 2018 / doi: 10.1016/j.jns.2018.01.031

6. Hasegawa I, Takeda A, Hatsuta H, Kubo Y, Osawa M, Nakano Y, Ikeuchi T, Hasegawa M, Murayama S, Itoh Y. An autopsy case of globular glial tauopathy presenting with clinical features of motor neuron disease with dementia. Neuropathology 38:372-379, 2018 / doi: 10.1111/neup.12457

7. Iwatsubo T, Iwata A, Suzuki K, Ihara R, Arai H, Ishii K, Senda M, Ito K, Ikeuchi T, Kuwano R, Matsuda H, Japanese ADNI, Sun CK, Beckett LA, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Donohue MC, ADNI. Japanese and North American ADNI studies: harmonization for international trials. Alzheimers & Dementia 14:1077-1087, 2018 / doi: 10.1016/j.jalz.2018.03.009

8. Miura T, Mezaki N, Konno T, Iwasaki A, Hara N, Miura M, Funayama M, Unai Y, Tashiro Y, Ohkita K, Kihara T, Ito N, Kanatsuka Y, Jones DT, Ishiguro T, Tokutake T, Kasuga K, Nozaki H, Dickson DW, Onodera O, Wszolek ZK, *Ikeuchi T. Identification and functional characterization of novel mutations including frameshift mutation in exon 4 of CSF1R in patients with ALSP. Journal of Neurology 265: 2415-2424, 2018 / doi: 10.1007/s00415-018-9017-2

9. Mezaki N, Miura T, Ogaki K, Eriguchi M, Mizuno Y, Komatsu K, Yamazaki H, Suetsugu N, Kawajiri S, Yamasaki R, Ishiguro T, Konno T, Nozaki H, Kasuga K, Okuma Y, Kira J, Hara H, Onodera O, *Ikeuchi T. Duplication and deletion upstream of LMNB1 in families with autosomal dominant adult-onset demyelinating leukodystrophy. Neurology Genetics 4 (6) e292, 2018 / doi: 10.1212/NXG.0000000000000292

10. Takahashi Y, Ohta Y, Sasaki R, Tadokoro K, Sato K, Shang J, Takemoto M, Hishikawa N, Yamashita T, Haraguchi T, Ikeuchi T, *Abe K. A novel presenilin 1 mutation (Leu418Trp) associated with spasticity, parkinsonism, and white matter lesionin a dominant Alzheimer's family. Journal of Neurological Science 387:166-169, 2018 / doi: 10.1016/j.jns.2018.01.006

11. Konno T, Kasanuki K, Ikeuchi T, Dickson DW, *Wszolek ZK. CSF1R-related leukoencephalopathy: a major player in primary microgliopathies. Neurology 91:1092-1104, 2018 / doi: 10.1212/WNL.0000000000006642

12. Nakajima M, Miyajima M, Ogino I, Akiba C, Kawamura K, Kamohara C, Fusegi K, Harada Y, Hara T, Sugano H, Tange Y, Karagiozov K, Ikeuchi T, Tokuda T, Arai H. Preoperative phosphorylated tau concentration in the cerebrospinal fluid can predict cognitive function three years after shunt surgery. Journal of Alzheimer's Disease 66:319-331, 2018 / doi: 10.3233/JAD-180557

13. Ihara R, Iwata A, Suzuki K, Ikeuchi T, Kuwano R, Iwatsubo T, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Clinical and Cognitive Characteristics of Preclinical Alzheimer's Disease in the

Japanese ADNI cohort. Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions 4:645-651, 2018 / doi: 10.1016/j.trci.2018.10.004

14. Iwata A, Iwatsubo T, Ihara R, Suzuki K, Matsuyama Y, Tomita N, Arai H, Ishii K, Senda M, Ito K, Ikeuchi T, Kuwano R, Matsuda H, Japanese ADNI. Effects of gender, educational background, and renal function on cognitive and functional decline in Japanese patients with mild cognitive impairment. Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions 4:765-774, 2018 / doi: 10.1016/j.trci.2018.06.008

15. Nakamura S, Hara T, Yamazaki A, Kobayashi A, Maeda S, Kasuga K, Ikeuchi T, Goto H, Hirayama M, Watanabe K, Koide T, Ohtsubo K. Trial for the development bio-functioal foods to prevent diabetes and dementia using a high-pressure treatment. Journal of Diabetes Obesity 5:22-30, 2018 / doi: 10.15436/2376-0494.18.1902

16. Qamar S, Wang G, Randle SJ, Ruggeri FS, Varela JA, Lin JQ, Phillips EC, Miyashita A, Williams D, Ströhl F, Meadows W, Ferry R, Dardov VJ, Tartaglia GG, Farrer LA, Kaminski Schierle GS, Kaminski CF, Holt CE, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Klenerman D, Knowles T, Vendruscolo M, St George-Hyslop P. FUS Phase Separation Is Modulated by a Molecular Chaperone and Methylation of Arginine Cation-π Interactions. Cell. 173:720-734.e15, 2018 / doi: 10.1016/j.cell.2018.03.056.

17. St George-Hyslop P, Lin JQ, Miyashita A, Phillips EC, Qamar S, Randle SJ, Wang G. The physiological and pathological biophysics of phase separation and gelation of RNA binding proteins in amyotrophic lateral sclerosis and fronto-temporal lobar degeneration. Brain Res. 1693(Pt A):11-23, 2018 / doi: 10.1016/j.brainres.2018.04.036.

18. Miyagawa T, Khor SS, Toyoda H, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Ariyoshi Y, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Ikegami A, Wada Y, Takami M, Higashiyama Y, Miyake R, Kondo H, Fujimura Y, Tamura Y, Taniyama Y, Omata N, Tanaka Y, Moriya S, Furuya H, Kato M, Kawamura Y, Otowa T, Miyashita A, Kojima H, Saji H, Shimada M, Yamasaki M, Kobayashi T, Misawa R, Shigematsu Y, Kuwano R, Sasaki T, Ishigooka J, Wada Y, Tsuruta K, Chiba S, Tanaka F, Yamada N, Okawa M, Kuroda K, Kume K, Hirata K, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K. A variant at 9q34.11 is associated with HLA-DQB1*06:02 negative essential hypersomnia. J Hum Genet. 63:1259-1267, 2018 / doi: 10.1038/s10038-018-0518-8.

19. Masataka Kikuchi, Norikazu Hara, Mai Hasegawa, Akinori Miyashita, Ryozo Kuwano, Takeshi Ikeuchi, Akihiro Nakaya. Enhancer variants associated with Alzheimer’s disease affect gene expression via chromatin looping. bioRxiv. Posted September 25, 2018 / doi: https://doi.org/10.1101/426312

Ⅳ　共同研究

(1) 研究題目：「家族性アルツハイマー病に関する縦断的観察コホート研究」
研究内容：遺伝子変異が同定された家族性アルツハイマー病の家系員を対象とした縦断的コホート研究である。認知症を発症前のバイオマーカーの変化を明らかにするトランスレーショナル研究。
参加機関：大阪市立大学、弘前大学，東京大学，東京都健康長寿医療センターなど

(2) 研究題目：「認知症臨床ゲノム情報データベース構築に関する開発研究」

研究内容：アルツハイマー病をはじめとする認知症のクリニカルシーケンスや網羅的ゲノム解析を行い、得られた変異・多型情報を広く共有し、有効活用するためのデータベースを構築する。

参加機関：大阪市立大学、国立長寿医療センター，慶應義塾大学，東京大学、東京都健康長寿医療センター、愛知医科大学、埼玉医科大学国際医療センター、国立精神・神経医療研究センター病院、医療法人さわらび会福祉村病院など

(3) 研究題目：「進行性核上性麻痺を対象とした多施設共同コホート研究に基づく疾患バイオマーカーの開発と自然歴解明」

研究内容：進行性核上性麻痺及び類縁疾患を対象とした多施設共同臨床研究。当該疾患の臨床所見，画像所見，バイオマーカー変化などを明らかにする。

参画期間：鳥取大学，東名古屋病院，東京都健康長寿医療センター，自治医科大学，京都府立医科大学，松江医療センターなど

(4) 研究題目：「プリオン病の早期診断基準の作成を目指した新たなエビデンス創出とその検証に用いる遺伝性プリオン病未発症例の臨床調査と画像・生体材料の収集」

研究内容：プリオン病の早期診断基準の作成のため、孤発性プリオン病の鑑別における臨床症状・脳波・画像・髄液検査をベースとしたバイオマーカーの有用性の検討を行うとともに、遺伝性プリオン病の発症前または発症超早期のリスク保有者の画像検査及び生体材料を採取し、発症に至る経緯を解明する。

参画期間：長崎大学、東京医科歯科大学、金沢大学、国立精神・神経医療研究センター、福岡大学、横浜市立大学、岩手医科大学、埼玉医科大学、愛知医科大学

動物資源開発研究分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

教授	笹岡　俊邦
特任講師	福田　七穂
助教	藤澤　信義
助教	小田　佳奈子
技術職員	田中　　稔
技術職員	作間　赳法
技術職員・博士課程大学院生	齊藤　奈英
技能職員	那須野　純映
一般職員	加藤　明子
特任助手	山本　美丘
特任助手	阿部　光寿
特任助手	内山　澄香
特任助手	三浦　詩織
特任助手	鈴木　康浩
特任助手	足立　周子
事務補佐員	野澤　佳代
事務補佐員	久住　真由美
修士課程大学院生	宮本　　純

Ⅱ　研究活動

（１）ドーパミンは、運動機能、記憶や学習、意欲に重要な働きがあると考えられている。本分野の研究課題として、重要な神経疾患の一つであるパーキンソン病 (PD) の運動障害に着目し、PDのモデル動物として、ドーパミン情報を伝えるドーパミン受容体やNMDA受容体等の関連分子の遺伝子操作マウスを開発し、大脳基底核回路の「直接路」「間接路」に着目し、標的分子の発現解析、運動や学習・記憶の行動解析、神経回路の働きの解析により、運動調節の仕組み解明と治療法開発への発展を目指している。

（２）近年、マーモセットは脳研究の分野で大きく注目され、遺伝子改変動物が作出されているが、まだ限られた研究機関以外での作出は困難な状況にある。その要因として設備、経費面に加え、受精卵の確保が挙げられる。マーモセットでは、一度に多数の受精卵を入手することが難しく、先行している研究機関では、大規模な飼育コロニーを用いて、必要な卵を確保して研究を進めている。私たちもマーモセットを用いたモデル動物開発にかかる課題解決のための方法を検討している。

その課題解決の方法として、実験終了や体調不良などで安楽死させる個体からの卵巣の分与を受け、これらの卵巣から受精卵を得ることができれば、小規模な飼育環境においても受精卵採取の手段となり得ることから、私たちは、これまでに共同研究機関や繁殖場の協力の下で安楽死個体からの卵巣の分与を受け、ヌードマウスに移植の後、ホルモン投与により成熟卵子を得て、体外受精等の方法により受精卵を作成することに成功した。

（３）モデル動物の作成に必須の実験手段である、体外受精、胚移植、胚・精子の凍結保存、薬剤投与による過剰排卵の方法などの発生・生殖工学技術についての先進的な実験方法の開発に努

めている。

（４）本分野は全学共同利用の動物実験施設の管理運営を担当し、高度化した動物実験の推進のため、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ブタ、ニホンザル、マーモセット、メダカなどを用いる動物実験環境を整えるとともに、上記の発生・生殖工学技術を用いた研究支援を行っている。また、近年、急速に発展している人工制限酵素技術によるゲノム編集法を活用した迅速な遺伝子改変動物作成についても、実験条件を整え、利用者からの依頼をルーチンで受託している。

これらの実験技術を駆使して、動物実験環境をSpecific Pathogen Free (SPF)環境に保持し、かつ計画的な動物の生産による迅速な研究の実施にも貢献している。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Miura S, Maeda Y, Miyamoto J, Nakatsukasa E, Fujisawa N, Miwa M, Nakamura K, Sakimura K and Sasaoka T: Generation of functional oocytes of common marmoset by xeno-transplantation of ovarian tissue. *Proceedings of International Symposium on Animal Production and Conservation for Sustainable Development* 2018, 31-33

2. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A and Ueda HR: Chemical Landscape for Tissue Clearing based on Hydrophilic Reagents. *Cell Reports* 2018 Aug 21;24(8):2196-2210.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.056.

3. Fukusumi Y, Zhang Y, Yamagishi R, Oda K, Watanabe T, Matsui K, Kawachi H.: Nephrin-Binding Ephrin-B1 at the Slit Diaphragm Controls Podocyte: Function through the JNK Pathway. *J Am Soc Nephrol.* 2018 May;29(5):1462-1474.

4. Okubo T, Sato A, Okamoto H, Sato T, Sasaoka T Differential behavioral phenotypes of dopamine D1 receptor knockdown mice at the embryonic, postnatal, and adult stages. *Int J Dev Neurosci.* 2018 May; 66:1-8. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.11.004. [Epub ahead of print]

Ⅳ　共同研究

以下の新潟大学脳研究所共同利用共同研究課題、および国際共同研究課題について、主に遺伝子改変マウス作成・解析実験、胚操作実験技術を利用して研究を推進している。

(1) 平成30年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
神経障害エステラーゼの機能解析
研究代表者：木村 穣 教授（東海大学）

(2) 平成30年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
Cacna1g変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態の解明
研究代表者：土井　宏 准教授（横浜市立大学）

(3) 平成30年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析

研究代表者：岩里 琢治 教授（国立遺伝学研究所）
(4) 平成30年度　共同利用・共同研究（プロジェク型）
ドーパミン受容体コンデョショナルノックダウンマウスを用いたパーキンソン病の病態生理の解析
研究代表者：南部 篤 教授（自然科学研究機構生理学研究所）
(5) 平成30年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
不安障害モデルマウスの脳内分泌タンパク質のプロテオーム解析
研究代表者：板倉　誠　准教授（北里大学）
(6) 平成30年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
ヒト疾患情報に基づく脳神経系病態モデルマウスの開発に関する共同研究
研究代表者：吉木 淳 室長（理化学研究所バイオリソースセンター）
(7) 平成30年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
運動制御における大脳基底核ドーパミン神経伝達系の機能解析
研究代表者：木津川 尚史 准教授（大阪大学大学院生命機能研究科）
(8) 平成30年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
遺伝子改変マウスを用いた細胞外ドーパミン濃度制御機構の解析
研究代表者：一瀬 宏 教授（東京工業大学大学院生命理工学研究科）
(9) 平成30年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
22q11.2欠失症候群関連因子の機能解析
研究代表者：大久保 直 准教授（北里大学）
(10) 平成30年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
APPの細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析
研究代表者：中山 耕造 講師（信州大学）
(11) 平成30年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
筋線維メインテナンスに果たすWWP1ユビキチンリガーゼの機能の解析
研究代表者：今村 道博 室長（国立精神・神経医療研究センター神経研究所）
(12) 平成30年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いた効率的な遺伝子改変マウス作製
研究代表者：中潟 直己 教授（熊本大学生命資源研究・支援センター）

(13)平成30年度 新潟大学脳研究所　国際共同研究
ドーパミンD1／D2受容体を経由する神経回路特異的な運動調節及び報酬学習行動の研究
研究代表者：Yanyan Wang 准教授（アメリカ合衆国 イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校）

生理学研究所　平成３０年度 共同利用共同研究：計画研究1件
対応者： 生理学研究所　南部篤教授
研究課題：「ドーパミン受容体遺伝子操作マウスを用いた運動制御機構の解析」
(http://www.nips.ac.jp/collabo/planned.html)

京都大学霊長類研究所　平成３０年度 共同利用共同研究：1件
対応者：京都大学霊長類研究所　中村克樹教授
研究課題：「異種間移植によるマーモセット受精卵の効率的作成方法の開発研究」
課題番号：2018-B-14
(https://www.pri.kyoto-u.ac.jp/research/kyodo/db/H29.html)

国立遺伝学研究所　平成３０年度 共同利用共同研究：1件
対応者：国立遺伝学研究所　岩里琢治教授

研究課題：「D1/D2ドーパミン受容体遺伝子操作マウスを用いた大脳基底核回路の運動調節と学習記憶機能の解明
課題番号：8A2018
(https://www.nig.ac.jp/welcome/kyoudoukenkyu/18/saitaku.pdf)

以上

モデル動物開発分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年３月31日現在）

教授（兼）	笹岡　俊邦	実験補助	矢部　恵稚子
准教授	阿部　学	実験補助	大堀　千洋
助教	中務　胞	実験補助	望月　雪絵
特任助教	川村　名子	実験補助	石本　菜穂子
技術職員	夏目　里恵	実験補助	大野　萌
研究員	中本　千尋	非常勤講師	田中　惠子
フェロー	﨑村　建司		

Ⅱ　研究活動

本分野では脳機能の分子機構解明を目的として、現分野の前身である旧細胞神経生物学分野より継続して多方向から研究を展開しており、それは大きく分けて４つに分類される。第１は、シナプス伝達、可塑性調節、シナプス形成に関与する分子群の機能を個体レベルで検証するために、当該分子を標的とした遺伝子改変マウスを作製して解析をおこなう研究である。第2は、脳におけるグルタミン酸受容体分子群の機能を正しく評価するためにおこなう当該タンパクの定量である。第3は、新たな脳機能解析に資するモデル動物を作製するための技術開発である。第4は、我々の持つ脳機能解析に特化した遺伝子改変マウス作製技術とリソースを研究者コミュニティーに供与する支援活動である。以下にその内容を述べる。

１）　シナプス伝達、可塑性調節、シナプス形成に関与する分子群の機能を個体レベルで検証する研究では、我々の持つ高度な遺伝子改変技術を用いて、複雑なコンディショナルノックアウトや標的分子の一部機能の制御などが可能なマウスを作出し、共同研究ベースで解析をおこない多くの成果をあげた。

２）　グルタミン酸受容体は興奮性シナプス伝達の基盤を担う分子群であり、我々はこれら分子のクローニングを端緒として長くその機能を解析し、多くのことを明らかにしてきた。しかし、分子レベルでの機能を正しく評価するためには、働いているグルタミン酸受容体の分子組成が明確でなければならない。この問題を解決するために、グルタミン酸受容体チャネルを構成するサブユニットの定量をおこなってきた。これまでに、特異抗体を用いた定量的ウエスタンブロット法を開発し、脳の部位や細胞画分におけるAMPA型、NMDA型、カイニン酸型、デルタ型を構成する各サブユニットタンパクの定量を行なっている。

３）　新たな脳機能解析に資するモデル動物を作製するための技術開発を行ってきた。遺伝子ノックアウトマウスは、現在脳機能解析の中心となっているが、より高度な解析を遂行するためにはマウスより賢く、大きな動物が求められてきた。その代表がラットである。ラットは、マウスより大きく外科的な処置や経時的な生体試料の取得などが容易であり、何よりも賢く複雑な行動解析が可能になる。遺伝子改変ラットは長く求められていたが、ES細胞の樹立が困難でなかなか成就しなかった。しかし最近のiPS細胞の研究の進展により、未分化状態を保つ様々な薬剤が開発されたことでES細胞が樹立されてノックアウトラットが現実のものになった。しかし、遺伝子改変ラットの樹立には膨大な経費と時間が掛かる難点がある。我々は、遺伝子改変ラッ

トを安価かつ容易に作製する方法を確立し、ノックアウトマウスと同様の感覚でノックアウトラットを研究リソースとして利用できる基盤を作ることを計画した。そのために、SD、BN、Wistarラットなど複数の系統からES細胞を樹立し、相同組換えによる遺伝子改変ラット作製法を確立した。さらに、精巣形成不全マウスにラットES細胞を導入して胚盤胞補完法によりマウス体内でラット精子を作出し、顕微授精に適用することで産子が得られたことから、安価で容易に遺伝子改変ラットが作製できる技術の開発に成功したと言える。また、この技術を最近ヒト脳機能解析のモデル動物として注目されている霊長類のマーモセットに応用しようと現在取り組んでいる。従来廃棄されていた実験死動物や病死したマーモセット卵巣の供与を受け、それらの卵巣をヌードマウスに移植して成熟卵を取得する手法の開発をおこなっている。また、胚盤胞補完法により遺伝子改変マーモセットの精子を取得すべく基礎的な条件検討をおこなっている。この研究は基盤研究（B）「多様な発想で研究可能なリソースとしての遺伝子改変マーモセット作製法の開発」によってサポートされている。

４）　我々は、C57BL/6系統マウスから独自にES細胞株RENKAを樹立して、コンディショナルノックアウトを中心に脳機能解析に資する遺伝子改変マウスを500系統以上樹立して脳研究コミュニティーに供与してきた。これらの活動は、新学術研究「包括脳」、それに引き続き新学術研究「モデル動物支援プラットフォーム」の事業として継続されている。さらに新潟大学脳研究所共同利用・共同研究の柱の一つとして支援事業展開をおこなっている。この8年間で包括脳、マウス作製支援プラットフォーム事業として合計123件（平成30年度、19件）のマウス作製支援をおこなった。さらに、脳研究所の事業である全国共同利用・共同研究で合計72件（平成30年度、7件）の支援をおこなった。

以上、この8年間これら4方面から遂行した研究の成果として、いわゆる一流紙を含めて150編（平成30年度、27編）の論文を発表することができた。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1: Wang S, Yabuki Y, Matsuo K, Xu J, Izumi H, Sakimura K, Saito T, Saido TC, Fukunaga K. T-type calcium channel enhancer SAK3 promotes dopamine and serotonin releases in the hippocampus in naive and amyloid precursor protein knock-in mice. PLoS One. 2018 Dec 20;13(12):e0206986.

2: Yuza K, Nakajima M, Nagahashi M, Tsuchida J, Hirose Y, Miura K, Tajima Y, Abe M, Sakimura K, Takabe K, Wakai T. Different Roles of Sphingosine Kinase 1 and 2 in Pancreatic Cancer Progression. J Surg Res. 2018 Dec;232:186-194.

3: Nagahashi M, Abe M, Sakimura K, Takabe K, Wakai T. The role of sphingosine-1-phosphate in inflammation and cancer progression. Cancer Sci. 2018 Dec;109(12):3671-3678.

4: Saito YC, Tsujino N, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Sakurai T. Serotonergic Input to Orexin Neurons Plays a Role in Maintaining Wakefulness and REM Sleep Architecture. Front Neurosci. 2018 Nov 30;12:892.

5: Itoh M, Yamashita M, Kaneko M, Okuno H, Abe M, Yamazaki M, Natsume R, Yamada D, Kaizuka T, Suwa R, Sakimura K, Sekiguchi M, Wada K, Hoshino M, Mishina M, Hayashi T. Deficiency of AMPAR-Palmitoylation Aggravates Seizure Susceptibility. J Neurosci. 2018 Nov 21;38(47):10220-10235.

6: Hagiwara A, Kitahara Y, Grabner CP, Vogl C, Abe M, Kitta R, Ohta K, Nakamura K, Sakimura K, Moser T, Nishi A, Ohtsuka T. Cytomatrix proteins CAST and ELKS regulate retinal photoreceptor development and maintenance. J Cell Biol. 2018 Nov 5;217(11):3993-4006.

7: Zhou L, Hossain MI, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Konno K, Kageyama S, Komatsu M, Watanabe M, Sakimura K, Takebayashi H. Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. J Neurochem. 2018 Nov;147(4):557-572.

8: Katano T, Takao K, Abe M, Yamazaki M, Watanabe M, Miyakawa T, Sakimura K, Ito S. Distribution of Caskin1 protein and phenotypic characterization of its knockout mice using a comprehensive behavioral test battery. Mol Brain. 2018 Oct 25;11(1):63.

9: Müller MK, Jacobi E, Sakimura K, Malinow R, von Engelhardt J. NMDA receptors mediate synaptic depression, but not spine loss in the dentate gyrus of adult amyloid Beta (Aβ) overexpressing mice. Acta Neuropathol Commun. 2018 Oct 23;6(1):110.

10: Yasuda H, Kojima N, Hanamura K, Yamazaki H, Sakimura K, Shirao T. Drebrin Isoforms Critically Regulate NMDAR- and mGluR-Dependent LTD Induction. Front Cell Neurosci. 2018 Oct 8;12:330.

11: Ageta-Ishihara N, Konno K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Kinoshita M. CDC42EP4, a perisynaptic scaffold protein in Bergmann glia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration. Neurochem Int. 2018 Oct;119:190-198.

12: Iwasaki K, Komiya H, Kakizaki M, Miyoshi C, Abe M, Sakimura K, Funato H, Yanagisawa M. Ablation of Central Serotonergic Neurons Decreased REM Sleep and Attenuated Arousal Response. Front Neurosci. 2018 Aug 7;12:535.

13: Nishio N, Tsukano H, Hishida R, Abe M, Nakai J, Kawamura M, Aiba A, Sakimura K, Shibuki K. Higher visual responses in the temporal cortex of mice. Sci Rep. 2018 Jul 24;8(1):11136.

14: Nakayama H, Abe M, Morimoto C, Iida T, Okabe S, Sakimura K, Hashimoto K. Microglia permit climbing fiber elimination by promoting GABAergic inhibition in the developing cerebellum. Nat Commun. 2018 Jul 19;9(1):2830.

15: Dong W, Radulovic T, Goral RO, Thomas C, Suarez Montesinos M, Guerrero-Given D, Hagiwara A, Putzke T, Hida Y, Abe M, Sakimura K, Kamasawa N, Ohtsuka T, Young SM Jr. CAST/ELKS Proteins Control Voltage-Gated Ca(2+) Channel Density and Synaptic Release Probability at a Mammalian Central Synapse. Cell Rep. 2018 Jul 10;24(2):284-293.

16: Sadato D, Ono T, Gotoh-Saito S, Kajiwara N, Nomura N, Ukaji M, Yang L, Sakimura K, Tajima Y, Oboki K, Shibasaki F. Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit e is essential for embryonic development and cell proliferation. FEBS Open Bio. 2018 Jul 5;8(8):1188-1201.

17: Kawabata Galbraith K, Fujishima K, Mizuno H, Lee SJ, Uemura T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe N, Kengaku M. MTSS1 Regulation of Actin-Nucleating Formin DAAM1 in Dendritic Filopodia Determines Final Dendritic Configuration of Purkinje Cells. Cell Rep. 2018 Jul 3;24(1):95-106.

18: Nagahashi M, Yamada A, Katsuta E, Aoyagi T, Huang WC, Terracina KP, Hait NC, Allegood JC, Tsuchida J, Yuza K, Nakajima M, Abe M, Sakimura K, Milstien S, Wakai T, Spiegel S, Takabe K. Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 Axis That Links Obesity, Chronic Inflammation, and Breast Cancer Metastasis. Cancer Res. 2018 Apr 1;78(7):1713-1725.

19: Littlechild SL, Young RD, Caterson B, Yoshida H, Yamazaki M, Sakimura K, Quantock AJ, Akama TO. Keratan Sulfate Phenotype in the β-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase-7-Null Mouse Cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018 Mar 1;59(3):1641-1651.

20: Uesaka N, Abe M, Konno K, Yamazaki M, Sakoori K, Watanabe T, Kao TH, Mikuni T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. Retrograde Signaling from Progranulin to Sort1Counteracts Synapse Elimination in the Developing Cerebellum. Neuron. 2018 Feb 21;97(4):796-805.

21: Tan GH, Liu YY, Wang L, Li K, Zhang ZQ, Li HF, Yang ZF, Li Y, Li D, Wu MY, Yu CL, Long JJ, Chen RC, Li LX, Yin LP, Liu JW, Cheng XW, Shen Q, Shu YS, Sakimura K, Liao LJ, Wu ZY, Xiong ZQ. PRRT2 deficiency induces paroxysmal kinesigenic dyskinesia by regulating synaptic transmission in cerebellum. Cell Res. 2018 Jan;28(1):90-110.

22: Chiu CQ, Martenson JS, Yamazaki M, Natsume R, Sakimura K, Tomita S, Tavalin SJ, Higley MJ. Input-Specific NMDAR-Dependent Potentiation of Dendritic GABAergic Inhibition. Neuron. 2018 Jan 17;97(2):368-377.

23: Kawai T, Tatsumi S, Kihara S, Sakimura K, Okamura Y. Mechanistic insight into the suppression of microglial ROS production by voltage-gated proton channels (VSOP/Hv1). Channels (Austin). 2018 Jan 1;12(1):1-8.

Ⅳ　共同研究

（1）研究題目　「新潟大学脳研究所　共同利用・共同研究」
研究内容　C57BL/6系統ES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製支援
参加機関　自然科学研究機構、東北大学、東京大学、関西医科大学

（2）研究題目　「学術研究支援基盤形成「モデル動物支援プラットフォーム」」
研究内容　高品質遺伝子改変マウス作製
参加機関　東京大学、京都大学、大阪大学、新潟大学、他

（3）研究題目　「遺伝子改変動物の作製に有用なＥＳ細胞の作成・評価」
研究内容　C57BL/6由来ES細胞RENKAを用いた、遺伝子改変マウス作製方法に関する新規技術開発
参加機関　株式会社トランスジェニック、新潟大学

(4) 研究題目　　「自己免疫性脳炎の診断方法の確立」
研究内容　　自己免疫性脳炎の原因と考えられる各種高原の測定方法を確立し、臨床現場で利用可能にする
参加機関　　株式会社コスミックコーポレーション、新潟大学

分子神経疾患資源解析学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

教授　　　　小野寺　理（兼任）
助教　　　　石原　智彦
特任准教授　加藤　泰介
特任助手　　廣川　祥子

Ⅱ　研究活動

本教室は神経疾患の分子生物学的解析により、病態機序を明らかにし、最終的には神経疾患の有効な治療方法の開発を行うこと目的としている。本学脳研究所、神経内科学教室と共に、臨床との融合拠点として活動を推進している。また病理学教室、動物実験施設、遺伝子実験施設を中心とする、脳研究所の各教室、および国内、国外の研究室とも共同研究を推進している。当施設では特に遺伝性脳小血管病、筋萎縮性側索硬化症（ALS)、脊髄小脳変性症の各疾患について研究を推進している。

脳小血管の障害はラクナ梗塞や脳出血の他にも微小出血や血管周囲腔の拡大などを引き起こし、認知機能低下が生じる。これら脳小血管の異常で引き起こされる病態を脳小血管病と総称する。脳小血管病は一般的には老化や生活習慣病などが原因であるが、一部は単一遺伝子異常により引き起こされる。当施設ではこのうち、*high-temperature requirement A serine peptidase 1 (HTRA1)* の遺伝子変異で生じる cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy（CARASIL）を主要な研究対象としている。遺伝性脳小血管病を疑った症例の遺伝子サンプルを全国から収集し、*HTRA1*の遺伝子変異検査に加え臨床症状との対応や分子病態機序について解析を行っている。さらにCARASIL以外の遺伝性脳小血管病についても症例の収集、エクソーム解析による原因遺伝子の解析を行い、日本における遺伝性脳小血管病の頻度について調査を行っている。

ALSについては、TDP-43 mRNAの代謝、局在、発現量調節に関する研究、原因遺伝子・発症関連遺伝子研究を行い、国内外の学会にて発表を行っている。ALSはTDP-43、FUS、C9orf72 など疾患関連遺伝子、蛋白質の発見を端緒として、病態機序解明に向けて国際的な競争が行われている。本年度はALS原因遺伝子Xのメチルに注目した両調節機構の解析を行っている。また病理学分野と連携し、病理学的に診断が確定したALS連続症例における原因遺伝子の解析を行っている。Exome解析による網羅的な検討で、新規変異を含めた複数の原因遺伝子変異を見出している　(投稿準備中)。

共同研究では、“HtrA1欠損マウスにおける脳小血管の機能解析”を推進し、CARASILの病態研究を進めた。さらに慶応大学と共同で遺伝性神経疾患患者由来のiPS細胞作製を進めている。

また研究資金は科学研究費補助金を始めとして、各々の研究者が競争的研究資金を獲得し、研究活動を推進した。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Kasahara S, Ishihara T, Onodera O et al. Robustness and vulnerability of the autoregulatory system that maintains nuclear TDP-43 levels: a trade-off hypothesis for

ALS pathology based on in silico data. Frontiers in Neuroscience. 2018

2. Saito N, Ishihara T, Kasuga K, Nozaki H, Onodera O. et al. Case Report: A patient with spinocerebellar ataxia type 31 and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Prion. 2018

Ⅳ　共同研究

1.　　研究題目　「HtrA1欠損マウスにおける脳小血管の機能解析」
研究内容　CARASILモデルマウスにおける脳血流の解析
参加機関　国立循環器病循環器病研究センター

2.　　研究題目　「神経疾患患者からのiPS細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」
研究内容　遺伝性神経疾患患者からのiPS細胞の樹立とそれを用いた疾患解析
参加機関　慶應義塾大学

システム脳病態学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年３月31日現在）

テニュアトラック教授：　　上野　将紀
テニュアトラック教授：　　田井中　一貴
特任助教：　佐藤　時春
特任助教：　井上　雅文
特定研究支援者：　中村　由香
研究支援者：　保科　加奈
実験補助：　　榊　祐子
実験補助：　　本田　綾子

Ⅱ　研究活動

本研究グループでは、脳疾患を神経回路システム障害として理解、解明するプロジェクトを展開している。
（研究１）血管障害や外傷により脳や脊髄が障害されると、神経回路が破綻し重篤な機能不全に陥るが、神経回路が再生する能力は非常にとぼしいため、根本的な治療法は未だ確立されていない。私たちはこれまでに、障害後に残存した神経回路が接続様式を変えて再編する能力を有し、運動や自律神経の機能を変容させうることを見出してきた。本研究では、この回路の再編機序を理解し、その動態を制御することで、機能を回復へと導く方法を見出すことを目指している。そのため、障害脳と健常脳、双方の神経回路システムを対象に、回路の形成・再編過程やその分子メカニズム、動作原理の解析を行っている。特に、脳脊髄の障害によりしばしば破綻する運動回路や交感神経回路を標的としている。本年度は特に、運動回路の１つである皮質脊髄路の詳細な神経細胞の構成と働きを探った結果、これまで知られていなかった多様な接続と機能を持った神経回路が内在することを見いだした(Cell Rep, 2018)。複雑な動作を発揮するもととなる神経基盤が明らかになり、脳脊髄の障害において、どのような神経回路の再建が必要であるか手がかりが得られた。これらの研究から、中枢神経が障害された場合に神経回路をどのように再建するか、治療標的や戦略を見出すことを目指している。

（研究２）これまでヒト脳生検・剖検サンプルの組織診は、薄切した病理組織に対して各種特異染色や免疫組織化学的染色などの2D染色画像の観察に基づいて行われてきた。広視野かつ高解像度にヒト脳病理組織の3D画像を簡便に取得できれば、バイオマーカーの定量的・包括的解析に基づく神経病理学的な診断基準の構築や、新たな病変形成メカニズムの解明が期待できる。私たちはこれまでに、マウスの組織を高度に透明化する手法およびシート照明型蛍光顕微鏡を駆使した高速かつ高解像度の3DイメージングCUBICを開発した(Cell (2014a), Cell (2014b))。本研究グループでは、脂質含量の豊富なヒト脳組織を高度に透明化する新規手法の開発と共に、種々のケミカルプローブや抗体を深部まで均一に浸透させる染色プロトコールの開発に取り組んでいる。本年度は特に、透明化パラメータ（脱脂・脱色・屈折率調整・脱灰）の包括的なプロファイリングに基づいた合理的手法を開発し、マウス全脳および大きなヒト脳サンプルの高度な透明化を実現した（Cell Rep, 2018）。今後は引き続き、従来の2D組織診で用いられてきた代表的な神経組織染色技術に替わる各種3D蛍光染色技術の開発や3Dホールマウント免疫染色技術の開発を通じて、新たな3D神経病理学の確立を目指す。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Ueno M, Nakamura Y, Li J, Gu Z, Niehaus J, Maezawa M, Crone SA, Goulding M, Baccei ML, Yoshida Y. Corticospinal circuits from the sensory and motor cortices differentially regulate skilled movements through distinct spinal interneurons. Cell Reports 23: 1286-1300, 2018

2. Tanaka T, Shimizu S, Ueno M, Fujihara Y, Ikawa M, Miyata S. MARCKSL1 regulates spine formation in the amygdala and controls the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and anxiety-like behaviors.
EBioMedicine 30: 62-73, 2018

3. 上野将紀. 脳・脊髄の障害による神経− 免疫制御システムの破綻. 実験医学. 羊土社. 36(3): 370-6, 2018

4. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR.
Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. Cell Reports 24: 2196-2210.e9, 2018

Ⅳ　共同研究

（1）研究題目：「脳−腸−肝ネットワークによる新規肝再生治療法の開発」
研究内容：　脳− 腸− 肝ネットワークによる病態発症のメカニズムを解明する。
参加機関：　新潟大学大学院医歯学総合研究科　寺井崇二

（2）研究題目：「組織浸透性に優れたマーカーの創出による脳の機能と病態の三次元マッピングの試み」
研究内容：　組織浸透性に優れたマーカーを創出し、組織透明化技術を用いて脳の機能と病態の三次元マッピングを実施する
参加機関：　新潟大学大学院医歯学総合研究科　竹林浩秀

脳病態解析分野

Ⅰ　研究組織（構成員　平成31年3月31日現在）

准教授　　　松井　秀彰
助教　　　　杉江　淳
学振PD特別研究員　新田　陽平
小児科博士課程（休学中）医員　入月　浩美
小児科博士課程　古寺　一樹
実験補助　　松井　典子
実験補助　　杉江　歩美

Ⅱ　研究活動

松井グループ

私達は試験管、モデル動物（小型魚類、ハエ、マウスなど）、ヒトサンプルと様々な研究対象を解析することで、ヒトの脳内で起きている現象を明らかにしようとしている。特に脳・神経機能の異常によっておこる疾患や障害の原因を明らかにし、その治療や理解に結びつける。現在最も力を入れているのは、パーキンソン病などの神経変性疾患、自閉症などの小児神経精神疾患、老化関連疾患である。我々人類は系統図において虫と祖先を共有し、そしてまさに魚類を経て進化してきた。確かにヒトにしかない構造物もあるにはある。しかし実はほとんどの脳・神経の構造や機能は既に魚の段階から存在する。また中心的な神経の機能、分子の働きはハエの段階から共通である。さらに小型魚類やハエにおいてヒト疾患と同様の病態を再現することも可能である。私達の研究室では魚やハエの脳・神経の働きを解明し、そこにおいて再現されるヒト疾患を治療することで、これまで難しかったヒト神経精神疾患・障害の治療や理解につなげていく。

杉江グループ

脳の神経回路は、通常は生涯に渡ってその機能を維持し続ける。そのためターンオーバーによって健常な組織を維持する他の体細胞と異なり、回路を形成している神経細胞は独自の細胞間相互作用によって長期的に健康状態を保つメカニズムを有していると考えられる。これが破綻すると老化または神経変性疾患や精神疾患へと繋がることが予想される。しかし、神経細胞を維持するために機能する細胞間コミュニケーション機構は調査に要する期間が非常に長く、十分解明されていない。私達は個体の生活環サイクルが短く重複遺伝子が少ないショウジョウバエのメリットを活かし、複雑な遺伝子解析を迅速に推進しこの問題に取り組んでいる。そして、神経細胞間で情報伝達の場となるシナプスや、隣接細胞間を隔てる細胞膜を構成するリン脂質の代謝に焦点を当てた細胞間相互作用解明に向けた研究を進めている。これらの研究から、シナプスや脂質代謝の適切な調節による新規神経保護の分子基盤の知見の提案し、従来説明がつかなかった神経変性疾患や精神疾患の脳回路で起こる障害の実体解明につなげることを目指す。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1: **Matsui, H.***, Kenmochi, N., Kazuhiko, N. Age- and α-Synuclein-Dependent Degeneration of Dopamine and Noradrenaline Neurons in the Annual Killifish *Nothobranchius furzeri*. ***Cell Reports*** 26(7):1727-1733, 2019.
2: **Matsui, H.***, Ryosuke, T. Parkinson’s Disease pathogenesis from the viewpoint of small fish models. ***J Neural Transm*** 125(1):25-33, 2018.
3: 松井秀彰*.　αシヌクレインとそのリン酸化. ***Medical Science Digest*** 44(3): 66-67, 2018
4: 松井秀彰*.　パーキンソン病はリソソーム異常が原因である:「Yes」の立場から. ***Frontiers in Parkinson Disease*** 11(2): ,2018

5: 松井秀彰*. 興奮毒性. *日本臨床パーキンソン病（第2版）− 基礎・臨床研究のアップデート−* 162-166, 2018 (5/31発行)

6: 松井秀彰*. アフリカメダカは老化とともにパーキンソン病に罹患する. *新潟医学会雑誌*132(5): 166-180, 2018

7: 松井秀彰*. 小型魚類を利用したパーキンソン病モデル. *別冊・医学のあゆみ パーキンソン病の新展開− 発症の分子機構と新規治療* 53-58, 2018 (6/20発行)

8: **Sugie A.**, Marchetti G., and Tavosanis G. (2018) ***Neural Dvelopment*** 13:14 https://doi.org/10.1186/s13064-018-0111-z Structural aspects of plasticity in the nervous system of *Drosophila*.

Ⅳ　共同研究

(1) 研究題目 :「ヒトと魚類の比較検討によるパーキンソン病の病因解明」
研究内容 : パーキンソン病に対して様々なステップにおいて介入することを目的とし、その病態研究をヒトサンプルと小型魚類などを活用して行う。
参加機関 : 武田薬品工業株式会社

(2) 研究題目 :「PI4P 駆動型脂質対向輸送システムの分子機構とその生理機能の解明」
研究内容 : 小胞体と細胞膜が近接した膜接触部位において，異なる脂質が小胞体と細胞膜の間で交換輸送される仕組み（脂質対向輸送機構）とその生理的機能を明らかにする。
参加機関 : 新潟大学大学院医歯学総合研究科　分子細胞機能学　中津史准教授

(3) 研究題目 :「脳—腸ネットワークによる病態発症のメカニズム」(異分野融合による学内共同研究公募)
研究内容 : 脳—腸ネットワークの関与が示唆される難治疾患の病態メカニズムの解明と新規治療法の開発にむけて、臓器連関の観点から神経・消化器分野の研究者が分野横断的に共同研究を行う。
参加機関 : 新潟大学大学院医歯学総合研究科　消化器科内科学　寺井崇二教授、上村顕也助教

(4) 研究題目 :「水・陸に適応した複眼の進化と機能の解明」
研究内容 : 複眼は、脊椎動物のカメラ眼と並び高度な発展を遂げてきた眼である。 本研究では、ミジンコの分子細胞生物学とショウジョウバエの遺伝学を融合させることにより、節足動物の複眼の機能優位性及び分子的進化を明らかにする。
参加機関 : 新潟大学　自然研　杉本健吉准教授

(5) 研究題目 :「モデル動物等研究コーディネーティングネットワークによる希少・未診断疾患の病因遺伝子変異候補の機能解析研究」
研究内容 : 未診断ではあるものの神経性と考えられる疾患において、17 つの病因遺伝子変異候補についてショウジョウバエホモログで機能解析研究を行う。
参加機関 : 国立遺伝学研究所　井ノ上逸朗教授

３．社会との連携

夏期セミナー

脳研究所セミナー

脳研究所・生理学研究所・霊長類研究所合同シンポジウム

共同研究拠点国際シンポジウム

見てみようヒトの脳と心

新潟大學腦研究所
BRAIN RESEARCH INSTITUTE, NIIGATA UNIV.

第48回 新潟神経学
夏期セミナー

脳と心の基礎科学から臨床まで
最前線の研究者、臨床家に触れて体感しよう!

BRAIN RESEARCH INSTITUTE, NIIGATA UNIV

2018.7.19(木)▶21(土)

場所:新潟大学脳研究所 統合脳機能研究センター(6F)セミナーホール

主催 : 新潟大学脳研究所 新潟脳神経研究会

7.19 thu 見学・体験 実習コース

①基礎神経科学履修コース:A.脳活動の光学的イメージング(3~6名)
B.遺伝子改変動物作製の実際(4名)
C.神経細胞の培養と遺伝子導入(6名)

②脳研レジデント(臨床)体験コース:脳外科、神経内科、病理(Brain Cutting, CPC)、3T-MRIなど脳研の臨床を一日で体験できるコース(10~20名)

共同利用・共同研究拠点プログラム
共同利用・共同研究拠点プログラム(**旅費支給あり**)に応募される方は下記HPをご覧ください。

7.20 fri 脳ー臓器機能連関の最前線

9:30~10:15	脳による代謝熱産生の調節	中村 和弘(名大・医)
10:15~11:00	交感神経による適応免疫応答の制御	鈴木 一博(阪大・IFReC)
11:00~11:45	心ー脳ー腎連携による恒常性維持	真鍋 一郎(千葉大・医)
12:45~13:30	情動生成における脳腸相関の役割	福土 審(東北大・医)
13:30~14:15	臓器間ネットワークと代謝恒常性	片桐 秀樹(東北大・医)

特別講演

14:20~15:10	脳腫瘍幹細胞の代謝特性	佐谷 秀行(慶應大・医・先端研)
15:10~16:00	フェロモン行動を制御する神経回路	東原 和成(東大・農)
16:00~	ポスター発表(脳研究所の研究紹介)	
18:00~	懇親会(講師・研究者,臨床家と語ろう!)	

7.21 sat グリアが織り成す神経回路の動態制御とその病態

10:00~10:30	脳血管障害におけるグリアによる脳保護	金澤 雅人(新潟大・脳研)
10:30~11:00	ミクログリア異常と白質脳症	今野 卓哉(新潟大・脳研)
11:00~11:45	ミクログリアと心の病気:橋渡し研究	加藤 隆弘(九大・医)
11:45~12:30	オリゴデンドロサイトの分化と脳機能	竹林 浩秀(新潟大・医)
13:30~14:15	神経変性疾患におけるグリア病態	山中 宏二(名大・環医研)
14:15~15:00	グリア細胞による脳リモデリング	小泉 修一(山梨大・医)

申込み・問合せ
〇氏名、所属、連絡先、1日目の希望コース(希望者のみ)を以下までお知らせください。 [受講料]無料
〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757 新潟大学脳研究所 神経学夏期セミナー事務局・佐藤
TEL:025-227-0617 FAX:025-227-0815 E-mail:blib@bri.niigata-u.ac.jp URL:http://www.bri.niigata-u.ac.jp

本セミナーは日本神経学会認定医更新取得単位の対象です。

夏期セミナー

10月28日日

新潟大学医歯学祭
脳研究所セミナー

一般向け
参加無料

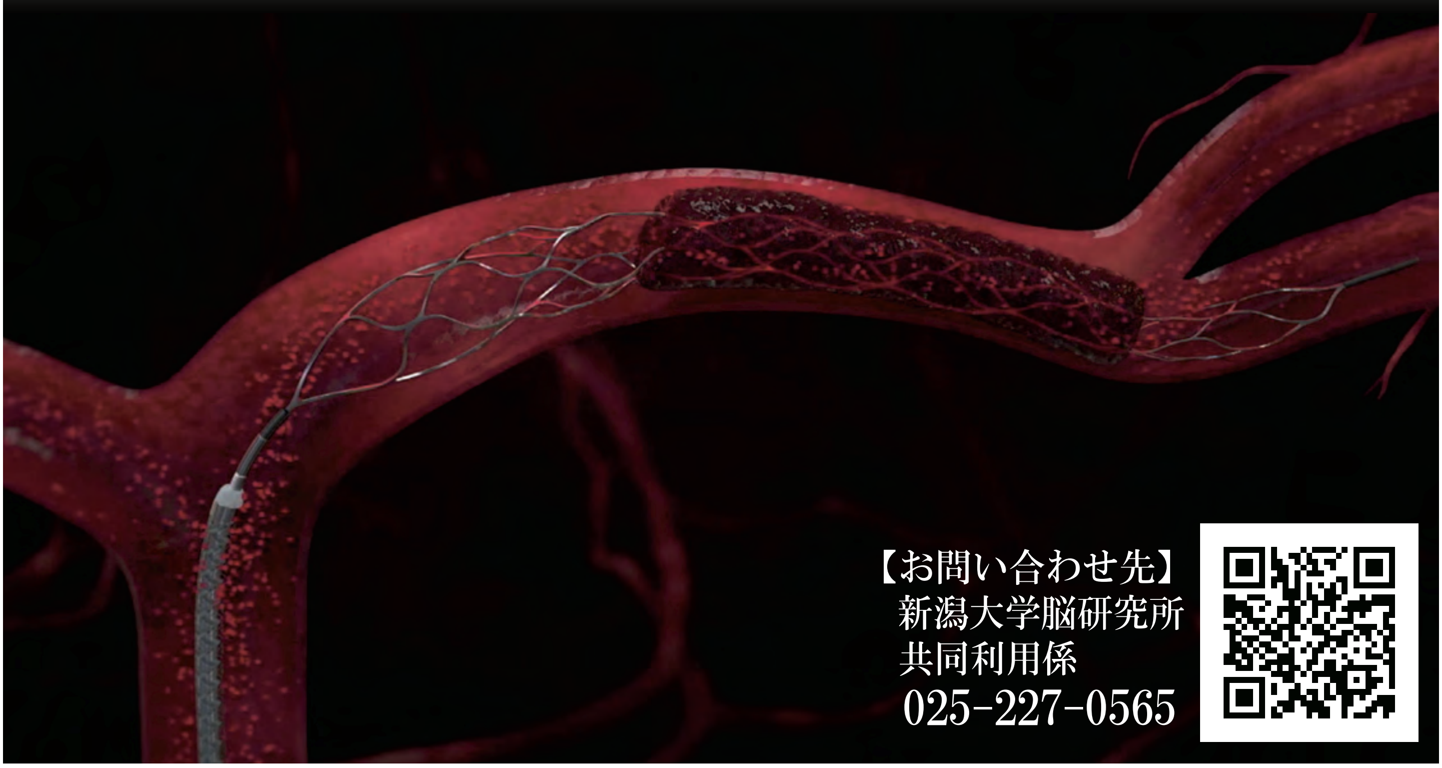
10:00 ～ 11:30
医療人育成センター 4F ホール

　脳卒中の外科治療は，従来頭蓋骨を開けて行う開頭術が一般的でしたが，カテーテル治療の飛躍的な進歩に伴い“切らずに治す”ことが可能な時代になりました。

　脳卒中の代表的疾患であるくも膜下出血と急性期脳梗塞に対するカテーテル治療による挑戦を紹介します。

新潟大学医歯学総合病院 脳神経外科
長谷川 仁　講師

脳卒中のカテーテル治療
～脳をさわらずに治す外科治療～



【お問い合わせ先】
新潟大学脳研究所
共同利用係
025-227-0565

第8回生理研-霊長研-脳研合同シンポジウム
平成31年3月7日（木）～8日（金）
新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター6F 中田記念ホール

プログラム

平成 31 年 3 月 7 日（木）　司会：五十嵐　博中

13:00～　受付　ポスター展示

14:00　開会の挨拶　那波　宏之　新潟大学脳研究所長

14:05～15:35　セッション 1　座長：五十嵐　博中

1. Musical scale has a rainbow color in synesthesia
伊藤　浩介　脳研・統合脳

2. Variability in neural dynamics and human behavior
北城　圭一　生理研・神経ダイナミクス研究部門

3. Visualizing epileptogenic activities in human brain lesions ex vivo
北浦　弘樹 1、福多　真史 2、藤井　幸彦 3、柿田　明美 1
1）脳研・病理、2）西新潟病院　機能脳神経外科、3）脳研・脳神経外科部門

15:35～15:50　写真撮影・コーヒーブレイク

15:50～17:20　セッション 2　座長：高田 昌彦

4. Synapse maturation regulated by palmitate cycling on PSD-95 and trans-synaptic LGI1 and ADAM22
深田　正紀　生理研・生体膜研究部門

5. A new perspective of the structure and function of tight junctions
古瀬　幹夫、大谷　哲久　生理研・細胞構造研究部門

6. PIP2-dependent modulation of voltage dependence in Two-Pore Na+ Channel 3
下村　拓史、久保　義弘　生理研・神経機能素子研究部門

17:20～18:20　ポスターセッション

18：30　意見交換会場へ移動（統合脳機能研究センター正面玄関前から，タクシーで移動をお願いします。）

平成 31 年 3 月 8 日（金）　司会：鈴木　雄治

9:00～　受付

9:30～10:30　セッション 3　座長：南部 篤

7. Receptors, lipids and signaling molecules involved in temperature sensation in fruit flies
曽我部　隆彰 1 、Craig Montell2　1）生理研・細胞生理研究部門、2) University of California, Santa Barbara

8. Characterization of the secondary field in the mouse auditory cortex
塚野　浩明、澁木　克栄　脳研・システム脳生理学分野

10:30～10:45　コーヒーブレイク

10:45～11:45　セッション 4　座長：鈴木　雄治

9. Genetics of Dementia
宮下　哲典　脳研・遺伝子機能解析学分野

10. Two sporadic genetic diseases found in the Primate Research Institute, Kyoto University
大石　高生　霊長研・神経科学研究部門

11：45　閉会の挨拶　鍋倉　淳一　生理学研究副所長

===========================

ポスター発表

P1 神経発達におけるリン酸化 GAP-43 T172 発現解析

岡田 正康 1,2、河嵜 麻実 2、玉田 篤史 2,3、野住素弘 2、嚢田 学 1、大石 誠 1、藤井 幸彦 1、五十嵐 道弘 2

1) 脳研・脳神経外科 2)新潟大学医歯学系 神経生化学分野(医学部生化学第二)

2) 関西医科大学医学部 iPS・幹細胞応用医学講座

P2 Kinase-dead knock-in mouserevealed differential involvement of kinase activity of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha in hippocampus- and amygdala-dependent memory

山肩 葉子 1,2、柳川 右千夫 3、井本 敬二 1,2

1) 生理研・神経シグナル研究部門、2) 総研大院・生命科学生理、3) 群馬大院・医・遺伝発達行動

P3 Development of the connectivity between fast-spiking interneurons and pyramidal neurons in mouse visual cortex

Mariko Yamamoto1, 2, Takuji Iwasato3, 4 & Yumiko Yoshimura1, 2

1) 生理研・視覚情報処理研究部門、Division of Visual Information Processing, National Instutute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan

2) Department of Physiological Sciences, Sokendai, Okazaki, Japan

3) Division of Neurogenetics, National Institute of Genetics, Mishima, Japan

4) Department of Genetics, Sokendai, Mishima, Japan

P4 TRPV4 is functionally expressed in cultured mouse Schwann cells.

FENG XIAONA 生理研・細胞生理研究部門

P5 人工知能による医療画像認識の問題点について

松澤 等、五十嵐 博中 脳研・統合脳

P6 統合失調症モデルラットにおける聴覚ミスマッチ陰性電位の異常

稲葉 洋芳、那波 宏之 脳研・分子神経生物学分野

P7 Elucidation of motor control mechanism using genetically modified mice harboring tetracycline regulated expression of D1/D2 dopamine receptors

齊藤 奈英 1、知見 聡美 2、大久保 朋子 3 、阿部 学 1、川村 名子 1、山口 瞬 4、崎村 建司 1、田井中 一貴 1、南部 篤 2、笹岡 俊邦 1

脳研究所, 2) 生理学研究所, 3) 北里大学医学部, 4)岐阜大院 医学系研究科

P8 Cortico-subcortical mechanisms underlying social reward monitoring and evaluation

磯田 昌岐 生理研・認知行動発達機構研究部門

P9 Sublayer- dependent inhibitory-excitatory connections in the layer 5 of rat frontal cortex

森島 美絵子、川口 泰雄 生理研・大脳神経回路論部門

P10 内因性・外因性の軸索再生阻害因子の解除による皮質脊髄路再生の試み

中村 由香 1、上野 将紀 1、Jesse Niehaus 2、Yi Zheng 2、吉田 富 2

1) 脳研・システム脳病態学、2) シンシナティ小児病院医療センター

P11 哺乳類生体脳でのゲノム編集技術の開発と応用

三國 貴康 脳研・細胞病態学分野

P12 Time- and extent- dependent effect of neuronal activation on β-amyloid precursor protein (APP) processing

Takanobu Ishiguro1,2, Kensaku Kasuga1, Kento Saito1, Naomi Mezaki1,2, Takeshi Miura1,2, Takayoshi Tokutake2, Osamu Onodera2, Takeshi Ikeuchi1

1) 脳研・遺伝子機能解析学分野、2) 脳研・神経内科学分野

P13 Potential roles of melanoma cell adhesion molecule-expressing lymphocytes in aquaporinopathy of the CNS

Fumihiro Yanagimura1, Etsuji Saji1, Takahiro Wakasugi1, Yasuko Toyoshima2, Hitoshi Takahashi2, Akiyoshi Kakita2, Osamu Onodera1, Izumi Kawachi1

1) 脳研・神経内科学分野, 2) 脳研・病理学分野

P14 Optogenetic manipulation of basal ganglia and cerebellar outflow to the thalamo-cortical system in macaque monkeys

Satomi Chiken1,2, Hiromi Sano1,2, Kenta Kobayashi2,3, Atsushi Nambu 1,2

1) Division of System Neurophysiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan

2) Department of Physiological Sciences, SOKENDAI, Okazaki, Japan

3) Section of Viral Vector Development, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan

P15　Hypothalamic neuronal circuits regulating hunger-induced taste modification

中島　健一朗 1、傅　欧 2、三坂　巧 2、箕越　靖彦 1

1) 生理研・生殖・内分泌系発達機構研究部門、2) 東京大学・生物機能開発化学

P16　Functional features of pairs of glomeruli between medial and lateral maps in the mouse olfactory bulb

佐藤　時春 1,2、本間　良太 2、永山　晋 2

1) 脳研・システム脳病態学、2) テキサス大学ヒューストン校医学部

P17　Pathology-dependent Drp1-Filamin A interaction in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

Tomohiro Tanaka1, Akiyuki Nishimura2,3,Okiru Komine4, Koji Yamanaka4 and Motohiro Nishida1,2,3

1) Division of Plasma Biology, Center for Novel Science Initiatives (CNSI), Tokyo, Japan
2) Exploratory Research Center on Life and Living Systems and National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, Okazaki, Japan
3) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan
4) Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya City University, Nagoya, Japan

P18　Morphological differences of large layer V pyramidal neurons in the cortical motor-related areas of the primate models of spinal cord injury

高田　裕生 1、中川　浩 2、山中　創 1、高田　昌彦 1

1) 霊長研・統合脳システム分野、2) 大阪大学・免疫学フロンティア研究センター

P19　筋萎縮性側索硬化症における脊髄運動神経細胞の初期障害像

中原　亜紗 1)、他田　真理 1)、佐藤　朋江 2)、竹内　亮子 3)、黒羽　泰子 4)、小池　亮子 4) 、中島　孝 5)、小野寺　理 2)、柿田　明美 1)

1) 脳研・病理学分野、2) 脳研・神経内科学分野、3) 亀田総合病院脳神経内科
4) 西新潟中央病院脳神経内科、5) 新潟病院脳神経内科

P20　Corticobasal degeneration and TDP-43 burden: a clinicopathological stud

齊ノ内　信 1、他田　真理 1、豊島　靖子 1、田中　弘 2、小島　直之 3、小野寺　理 4、柿田　明美 1

1) 脳研・病理、2) 三島病院精神科、3) 新潟医療センター脳神経内科, 4)脳研・神経内科

P21　Does the DNA methylation state of the TARDBP 3'-UTR cause sporadic ALS?

小池　佑佳、須貝　章弘、横関　明男、小野寺　理　脳研・神経内科学分野

P22　Afferent connections of the dorsal, perigenual, and subgenual anterior cingulate cortices of the monkey: inputs from temporal pole and medial temporal cortex

Shigehiro Miyachi, Honami Sakata, Yuri Kim, Masafumi Nejime, Naho Konoike, and Katsuki Nakamura　　霊長研・高次脳機能分野

P23　霊長類脳への神経細胞特異的かつ高効率な遺伝子導入を実現する改変 AAV ベクターの開発

木村　慧 1、永井 裕司 2、田辺 創思 1、Zheng Andi1、Oh Jungmin1、藤原 真紀 1、中野 真由子 1、南本 敬史 2、井上 謙一 1,3、高田 昌彦 1

1) 霊長研・統合脳システム分野、2) 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所脳機能イメージング研究部、3) 科学技術振興機構 さきがけ

P24　Playing with the NEURON Simulator

井本　敬二　　生理研

P25　The Roles of Cortical Astrocytes in Neuropathic Pain

竹田 育子、江藤 圭、鍋倉 淳一　生理研・生体恒常性発達研究部門

P26　成体脳梗塞ラット由来のミクログリアによる脳梗塞細胞療法の応用

畠山　公大、金澤　雅人、小野寺　理　　脳研・神経内科学分野

P27　Control of mRNA translation by hnRNP A/B variants

Nanaho Fukuda1,2, Piergiorgio Percipalle3, Kevin Czaplinski4, Yasumasa Ishida2, Tomoyuki Fukuda5, and Toshikuni Sasaoka1

1) Brain Research Institute Niigata University,
2) Department of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology,
3) New York University Abu Dhabi,
4) Stony Brook University Center for Nervous System Disorders, Stony Brook NY 11749, USA.

5) Niigata University School of Medicine

P28　異種間移植マーモセット卵巣由来卵子による受精卵作出法の検討

中務　胞 1,2、宮本　純 2,3、藤澤　信義 2,3、夏目　里恵 1,2、三浦　詩織 2,3、阿部　学 1,2、三輪　美樹 4、中村　克樹 4、崎村　建司 1,2)、笹岡　俊邦 1,2,3

1）脳研・モデル動物開発分野、2)新潟大学・医歯学総合研究科・発生生殖工学分野

3）脳研・生命科学リソース研究センター・バイオリソース研究部門・動物資源開発研究分野、4）霊長研・高次脳機能分野

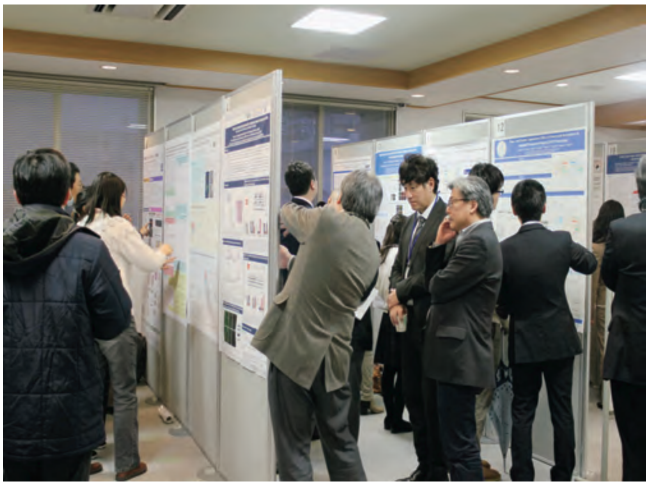
P29　新潟大学における中型実験動物の飼育管理と利用

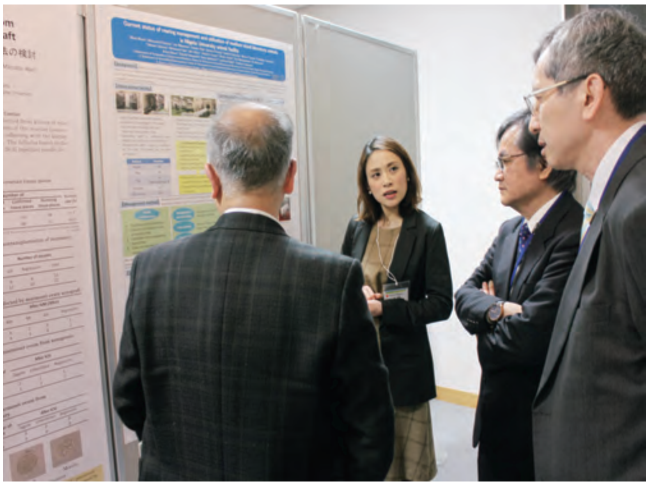
三浦　詩織 1、藤澤　信義 1 、宮本　純 1 、小田　佳奈子 1、福田　七穂 1 、内山　澄香 1、田中　稔 1 、山本　美丘 1 、作間　赳法 1 、阿部　光寿 1 、齊藤　奈英 1 、鈴木　康浩 1、中務　胞 2 、夏目　里恵 2、小林　隆 3 、三浦　宏平 3 、崎村　健司 2、若井　俊文 3、笹岡　俊邦 1

1）脳研・動物資源開発研究分野、2）脳研・モデル動物開発分野、

2）新潟大学・医歯学総合研究科　消化器・一般外科学分野

合同シンポジウム





新潟大學腦研究所
BRAIN RESEARCH INSTITUTE, NIIGATA UNIVERSITY

Visualization of brain network and function

8 - 9 March 2019 | Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, Niigata University

DAY 1
Friday 8 March

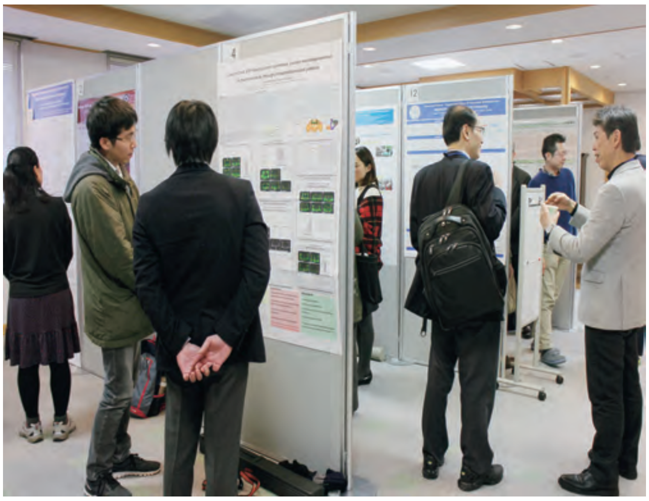
13:00	**Opening Remarks** Hiroyuki Nawa (Director, BRI, Niigata University)
	Session I Chairs: Masaki Ueno and Hideaki Matsui
13:05-13:35	**Transsynaptic mapping and optical imaging of neural circuits in the mouse visual system** Fumitaka Osakada (Nagoya University, Japan)
13:35-14:05	**CUBIC: Whole-brain/body imaging with single-cell resolution using hydrophilic chemical cocktails** Kazuki Tainaka (BRI, Niigata University, Japan)
	Special Lecture Chairs: Masaki Ueno and Hideaki Matsui
14:05-14:45	**Spying on the dynamics of purinergic and monoaminergic neuromodulation by constructing new genetically-encoded GRAB sensors** Yulong Li (Peking University, China)
14:45-15:05	COFFEE BREAK
	Session II Chairs: Kazuki Tainaka and Atsushi Sugie
15:05-15:35	**Multiscale understanding of synaptic pathology of psychiatric disorders** Akiko Hayashi-Takagi (Gunma University, Japan)
15:35-16:05	**Applications for upconversion nanoparticles in neurobiology** Thomas J McHugh (RIKEN Center for Brain Science, Japan)
	Special Lecture Chairs: Kazuki Tainaka and Atsushi Sugie
16:05-16:45	**Modeling human diseases using human organoid systems** Huck Hui Ng (Genome Institute of Singapore, Singapore)
17:00-18:00	POSTER SESSION
19:00-	OFFSITE MEETING / WELCOME BANQUET

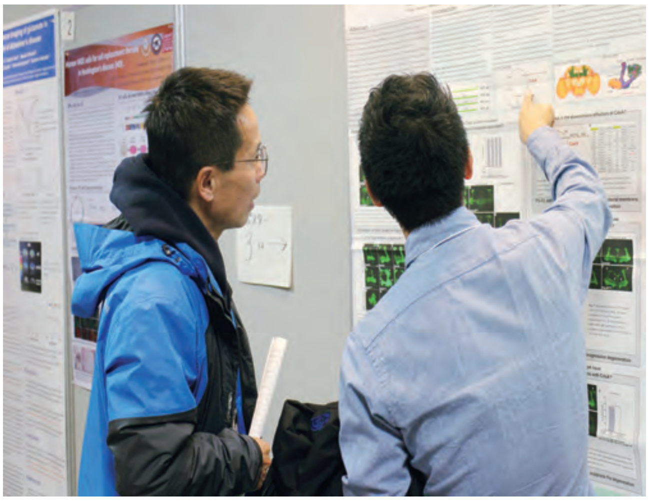
DAY 2
Saturday 9 March

	Session III Chairs: Toshikuni Sasaoka and Manabu Abe
09:00-09:30	**Development and application of genome editing technologies in the mammalian brain *in vivo*** Takayasu Mikuni (BRI, Niigata University, Japan)
09:30-10:00	**Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying persistence of structural LTP** Yasunori Hayashi (Kyoto University, Japan)
10:00-10:30	**Chemical labeling of endogenous receptors in live neurons** Itaru Hamachi (Kyoto University, Japan)
10:30-10:45	COFFEE BREAK
	Special Lecture Chairs: Hironaka Igarashi and Takayasu Mikuni
10:45-11:25	**Luminescent protein applications in research, medicine, and bioengineering** Atsushi Miyawaki (RIKEN Center for Brain Science, Japan)
	Session IV Chairs: Hironaka Igarashi and Takayasu Mikuni
11:25-11:55	**Revisiting memory consolidation theory: Is protein synthesis required?** Yi Zhong (Tsinghua University, China)
11:55-12:25	**Homeostatic behavior of network activity** Yuji Ikegaya (The University of Tokyo, Japan)
12:30	**Closing Remarks** Masaki Ueno (BRI, Niigata University)

No attendance fee required.

For inquiries or information
email **noukyoudo@adm.niigata-u.ac.jp**
call **025-227-0565**





見てみよう ヒトの脳と心

「世界脳週間」は、脳科学の重要性を広く社会に訴える世界的キャンペーンです。日本でも、脳の最先端研究を実施している約15の研究機関が、科学研究の将来を担うべき学生を対象に、最先端の脳研究をわかりやすく紹介し、脳と心の科学に興味を持ってもらおうと、研究室／実験の公開と講演を予定しています。

当新潟大学脳研究所においてもこの趣旨に沿って、3月26日（火）に「見てみようヒトの脳と心」という題の研究所公開と講演を企画しましたので、学生の皆さんに積極的に参加していただければ幸いです。

代表　新潟大学脳研究所長　那波宏之

Ⅰ 概要説明（統合脳機能研究センター〈6F〉中田記念ホール）

14:00 ～ 14:10

Ⅱ 脳研究所公開／脳研究の実際（会場：各分野研究室）

14:10 ～ 15:40	計65名
1）脳を観察する（病理学分野）	6名
2）脳の病気を手術で治す（脳神経外科学分野）	10名
3）ヒトの脳と心を探る（脳機能解析学分野）	12名
4）遺伝子で迫る認知症の謎（遺伝子機能解析学分野）	10名
5）脳の働きを明らかにするモデル動物（動物資源開発研究分野）	12名
6）神経回路を3次元で観察する（システム脳病態学分野）	6名
7）小動物で脳の病気を解明する（脳病態解析分野）	9名

Ⅲ 講演「ヒトの脳の不思議」（統合脳機能研究センター〈6F〉中田記念ホール）

15:50 ～ 17:00

1）脳における現実と幻想の境界；幻覚・幻聴の脳科学	那波宏之
2）きおくの仕組み	小野寺理

参加費 無 料

平成31年3月26日（火）

14:00~17:00

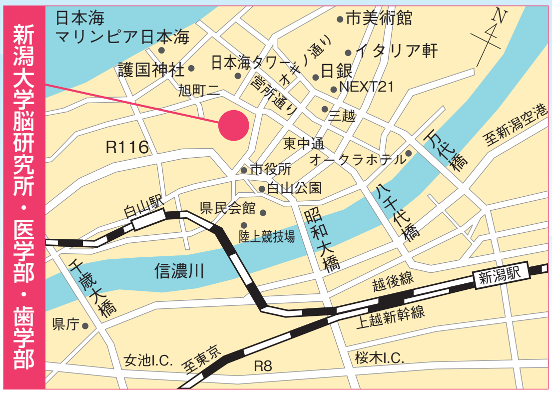
会 場　新潟大学脳研究所

対 象　高校生、大学生

主催●NPO法人 脳の世紀推進会議／新潟大学脳研究所
後援●新潟県教育委員会

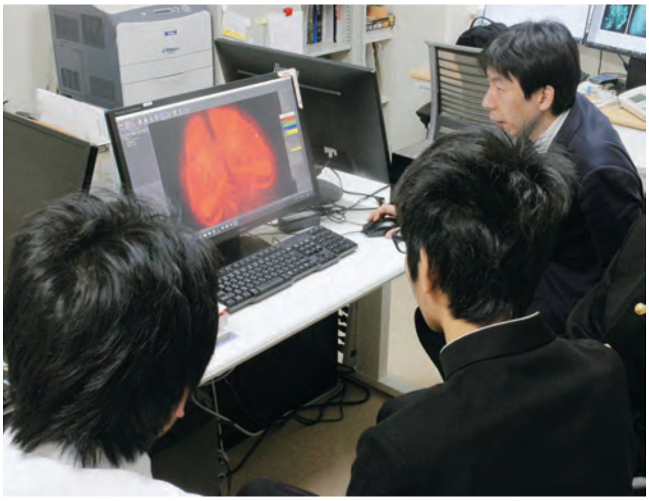
《申込方法》
①氏名 ②住所・電話番号 ③学校名・学年 ④公開コース1）～7）のうち第1＆2希望を明記して、eメールで下記まで〈先着順〉

《申込先》
〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所　共同利用係
E-mail: noukyoudo@adm.niigata-u.ac.jp　TEL: 025-227-0565
FAX: 025-227-0507　URL: http://www.bri.niigata-u.ac.jp



http://www.bri.niigata-u.ac.jp

見てみようヒトの脳と心



４． 共同利用・共同研究拠点

脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点

プロジェクト型共同研究

連携資源利用型共同研究

国際共同研究

平成30年度 新潟大学脳研究所共同利用・共同研究採択者一覧

プロジェクト型

研究課題名	研究代表者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
TDP-43病変に結合する分子プローブの開発	放射線医学総合研究所	チームリーダー	樋口 真人	デジタル医学分野	柿田 明美
統合失調症モデル動物の聴覚生理機能障害と聴覚認知変化	福島県立医科大学医学部	准教授	浄土 英一	分子神経生物学分野	那波 宏之
高磁場MRIを用いたてんかん原性部位及び機能部位との関係の研究	静岡てんかん・神経医療センター	医長	臼井 直敬	臨床機能脳神経学分野	鈴木 雄治
中枢神経原発悪性リンパ腫におけるtransforming acidic coiled-coil-containing protein 3 発現とその臨床病理学的意義	久留米大学医学部	教授	杉田 保雄	デジタル医学分野	柿田 明美
超偏極低分子化合物の生体トレーサーとしての応用を目指した基礎検討	放射線医学総合研究所	チームリーダー	青木 伊知男	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
NF-kB活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の開発に向けた多施設共同研究	横浜市立大学大学院医学研究科	助教	立石 健祐	脳神経外科学分野	藤井 幸彦
中枢神経系疾患における炎症回路活性化の解析	北海道大学遺伝子病制御研究所	教授	村上 正晃	神経内科学分野	小野寺 理
特発性正常圧水頭症患者脳脊髄液中のバイオマーカー診断と重症度分類の確立	順天堂大学医学部	准教授	中島 円	遺伝子機能解析学分野	池内 健
大脳皮質基底核変性症剖検例におけるMAPT遺伝子異変およびMAPT多型の検討	東名古屋病院	部長	饗場 郁子	遺伝子機能解析学分野	池内 健
Boron neutron capture therapy (BNCT) が播種・浸潤に及ぼす効果の検討	京都大学複合原子力科学研究所	助教	近藤 夏子	脳神経外科学分野	棗田 学
RNA-Seq解析を用いるがん性疼痛と難治性神経障害性疼痛に関連分子の探索・同定	大阪医科大学	客員教授	伊藤 誠二	遺伝子機能解析学分野	池内 健
複合現実デバイスを装着した術者視界への高分解能機能的MRIデータの付加	新潟国際情報大学	教授	近山 英輔	生体磁気共鳴学分野	鈴木 清隆
百寿者から同定した長寿関連遺伝因子の認知症患者での解析	慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター	センター長	岡野 栄之	遺伝子機能解析学分野	池内 健
腸管上皮細胞の障害が脳虚血病巣進展に及ぼす影響	日本医科大学大学院	准教授	西山 康裕	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
アルツハイマー病リスク遺伝子（特にACE,ABCA7に関して）検索	名古屋市立大学大学院医学研究科	特任教授	赤津 裕康	遺伝子機能解析学分野	池内 健
CADASIL・CARASIL モデル動物を使用した脳小血管病新規治療法の開発	国立循環器病研究センター	部長	猪原 匡史	神経内科学分野	小野寺 理
同時収集型PET/MR装置を用いた脳内アクアポリン動態に関連する脳機能探索に資するデータ収集解析手法の開発	福島県立医科大学新医療系学部設置準備室	教授	久保 均	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
アルツハイマー病に関連するマルチオミックスデータの統合解析	大阪大学大学院医学系研究科	特任助教	菊地 正隆	遺伝子機能解析学分野	池内 健
自由意志に基づく運動の神経基盤の解明	京都大学霊長類研究所	教授	中村 克樹	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
ジェネティックニューロパソロジーによる精神疾患脳内分子表現型解析	福島県立医科大学会津医療センター	准教授	國井 泰人	デジタル医学分野	柿田 明美
細胞内分解機構に着目したシヌクレイノパチーの分子病態解明と治療法開発	弘前大学大学院医学研究科	助教	丹治 邦和	デジタル医学分野	柿田 明美
7T-MRIの特性を生かした脳機能解析法の開発	自然科学研究機構生理学研究所	准教授	福永 雅喜	生体磁気共鳴学分野	鈴木 清隆
生体リズムの遺伝子改変マウスによる解析	京都大学大学院薬学研究科	教授	岡村 均	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
神経回路の興奮性に対するCB_2受容体の役割の解明	東京大学大学院医学系研究科	助教	菅谷 佑樹	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
高磁場MRIを用いた発達障害者及び幼少期被害体験者の統合的脳機能に関する研究	国立成育医療研究センター	部長	奥山 眞紀子	臨床機能脳神経学分野	鈴木 雄治
孤発例ALSに関わる治療エピジェネティクス標的因子の探索	岐阜薬科大学	教授	保住 功	デジタル医学分野	柿田 明美
認知症症例における髄液および血液中ILEI定量の意義に関する検証	滋賀医科大学神経難病研究センター	教授	西村 正樹	遺伝子機能解析学分野	池内 健
視床下部のペプチド作動性神経による本能行動調節機構の解明	名古屋大学環境医学研究所	教授	山中 章弘	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
MRI陰性てんかん症例での多角的術前検査によるてんかん焦点の可視化	西新潟中央病院	部長	福多 真史	脳神経外科学分野	藤井 幸彦
家族性進行性核上性麻痺(PSP)の原因遺伝子の探索と孤発性PSP及び類縁疾患との関連解析	北海道大学大学院医学研究院	准教授	矢部 一郎	遺伝子機能解析学分野	池内 健
熱ショック応答による筋萎縮性側索硬化症（ALS）細胞質凝集体の形成抑制	杏林大学保健学部	教授	渡部 和彦	デジタル医学分野	柿田 明美
ケラタン硫酸糖鎖合成酵素遺伝子のノックアウトマウスの作製とその表現型解析およびALS発症における影響の解析	関西医科大学	准教授	赤間 智也	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
不安障害モデルマウスの脳内分泌タンパク質のプロテオーム解析	北里大学医学部	准教授	板倉 誠	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
神経障害エステラーゼの機能解析	東海大学医学部	教授	木村 穣	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
グアム島のパーキンソン認知症と筋萎縮性側索硬化症：リン酸化TDP-43とリン酸化タウの脳内進展様式	信州大学医学部	特任教授	小柳 清光	デジタル医学分野	柿田 明美
げっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析	東海大学医学部	准教授	加藤 明	分子神経生物学分野	那波 宏之
ドーパミン受容体コンディショナルノックダウンマウスを用いたパーキンソン病の病態生理の解析	自然科学研究機構生理学研究所	教授	南部 篤	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
新規疼痛関連分子の脳および脊髄後角での神経可塑性における機能の解析	関西医科大学	准教授	片野 泰代	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析	国立遺伝学研究所	教授	岩里 琢治	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
Cacna1g変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態の解明	横浜市立大学医学部	准教授	土井 宏	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
視床特殊核におけるグルタミン酸受容体GluD1による入力選択的回路形成機構	北海道大学大学院医学研究院	教授	渡辺 雅彦	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
認知症病態における海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド（Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide:HCNP）発現メカニズムの解析	名古屋市立大学大学院医学研究科	教授	松川 則之	遺伝子機能解析学分野	池内 健
神経変性疾患におけるNAKα3神経細胞の機能障害と細胞死機構の解明	神戸医療産業都市推進機構	部長	星 美奈子	デジタル医学分野	柿田 明美

平成30年度　新潟大学脳研究所共同利用・共同研究採択者一覧

連携資源利用型

研究課題名	研究代表者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病変の評価	放射線医学総合研究所	研究員	高堂　裕平	デジタル医学分野	柿田　明美
筋強直性ジストロフィーの中枢神経病態の解明	大阪大学大学院医学系研究科	助教	中森　雅之	デジタル医学分野	柿田　明美
ジストロフィン結合タンパク質複合体の代謝回転に関する研究	国立精神・神経医療研究センター神経研究所	室長	今村　道博	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
生殖工学技術を用いた効率的な遺伝子改変マウス作製	熊本大学生命資源研究・支援センター	教授	中潟　直己	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
脳・神経回路におけるドーパミンの機能解析	東北大学大学院医学系研究科	准教授	小山内　実	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかんに対する解析	順天堂大学医学部	准教授	菅野　秀宣	デジタル医学分野	柿田　明美
アルツハイマー病発症機構におけるグリア細胞病態解明	東京大学大学院薬学系研究科	教授	富田　泰輔	遺伝子機能解析学分野	池内　健
後部視床下部において過眠症に関連するDNAメチル化部位の探索と各脳領域に特異的なメチル化プロファイルの探索	東京大学大学院医学系研究科	客員研究員	嶋多　美穂子	デジタル医学分野	柿田　明美
TDP-43細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成	北里大学医学部	教授	佐藤　俊哉	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
DNA複製因子polD4と発がん	藤田医科大学	教授	鈴木　元	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
ヒト疾患情報に基づく脳神経系病態モデルマウスの開発に関する共同研究	理化学研究所バイオリソース研究センター	室長	吉木　淳	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
剖検脳脊髄を用いた酸化ストレスによる神経細胞機能の障害と細胞死に関する研究	東京女子医科大学	教授	柴田　亮行	デジタル医学分野	柿田　明美
運動制御における大脳基底核ドーパミン神経伝達系の機能解析	大阪大学大学院生命機能研究科	准教授	木津川　尚史	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
遺伝子改変マウスを用いた細胞外ドーパミン濃度制御機構の解析	東京工業大学生命理工学院	教授	一瀬　宏	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
神経組織特異的Scrapperコンディショナルノックアウトマウスの作製と解析	浜松医科大学光尖端医学教育研究センター	准教授	矢尾　育子	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
APPの細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析	北陸大学医療保健学部	教授	中山　耕造	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
脳疾患動物モデルの生体イメージングによる，脳疾患機序の解明	熊本大学　国際先端医学研究機構	准教授	水野　秀信	システム脳生理学分野	澁木　克栄

平成30年度　新潟大学脳研究所国際共同研究　一覧

研　究　課　題　名	研　究　代　表　者				所内対応教員	
	国	所　　属	職　名	氏　　名	分野名	氏　名
Elucidating the role of Gli3 in medulloblastoma as a target for treatment 髄芽腫におけるGli3の役割解明と新規治療展開	米	Johns Hopkins University School of Medicine （ジョンズ・ホプキンズ大学）	Prof.	EBERHART, Charles G.	脳神経外科分野	藤井　幸彦
Elucidating the expression of IMPDH1/2 in brain tissue from epilepsy patients てんかん脳におけるIMPDH1/2発現解析	米	University of Cincinnati, College of Medicine （シンシナティ大学）	Associate Prof.	SASAKI, Atsuo T.	脳神経外科分野	藤井　幸彦
Pathology and neuroimaging study of language impairment in amyotrophic lateral sclerosis 筋萎縮性側索硬化症患者の言語障害に関する病理学的研究	中	Department of neurology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University （首都医科大学宣武医院）	Fellow	CUI, Bo	脳疾患標本資源解析学分野	柿田　明美
Production of congenital nystagmus model mice and analysis of visual function 先天性眼球振盪モデルマウスの作出と視覚機能解析	ﾃﾞﾝﾏ	DANDRITE, Department of Biomedicine, Aarhus University （オーフス大学）	Associate Prof.	YONEHARA, Keisuke	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
Development of gene-cell therapy of Alzheimer’s disease based on delivery of neurotrophic factors to brain: translational study アルツハイマー病モデルマウスを用いた神経栄養因子導入治療法の開発	ロ	Kazan State Medical University （カザン医科大学）	Associate Prof.	MUKHAMEDYAROV, Marat	脳疾患標本資源解析学分野	柿田　明美
Assessing molecular mechanisms of novelty-induced memory boost by using genetically-modified rats derived from embryonic stem cell line for Lister-hooded rat Lister-hooded系統由来の胚性幹細胞より作成した遺伝子改変ラットを用いた新奇性による記憶増強の分子機構解明	ﾃﾞﾝﾏ	Department of Biomedicine, Aarhus University （オーフス大学）	Associate Prof.	TAKEUCHI, Tomonori	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
Preemptive medicine for Alzheimer’s disease アルツハイマー病の発症前診断・発症予防	米	Neurology, Univ. of California Davis （カリフォルニア大学デービス校）	Prof.	KWEE, Ingrid L.	生体磁気共鳴学分野	五十嵐　博中
Elucidation of the roles of chromatin remodeler in neuronal homeostasis using mouse models マウスモデルを用いた，エピゲノム修飾による神経恒常性維持機構の解明	米	Dept. Neurobiology, Univ. of Massachusetts Medical School, Brudnick Neuropsychiatriy Research Institute （マサチューセッツ大学）	Assistant Prof.	FUTAI, Kensuke	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
Research on pathway-specific control of motor activity and learning behaviors via dopamine D1 and D2 receptors ドーパミンD1／D2受容体を経由する神経回路特異的な運動調節及び報酬学習行動の研究	米	Department of Medical Information Science, Beckman Institute, Univ. of Illinois at Urbana-Champaign （イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校）	Associate Prof.	WANG, Yanyan	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦

新潟大學腦研究所

平成29年度学長裁量経費（将来構想実現促進費）

異分野融合による革新的ヒト脳研究推進事業

学内共同研究

2017年

9月15日(金)

より開始

目 標

新潟大学内に脳研究にかかる新規の研究グループ，ネットワークの形成を図るとともに，学内イノベーション創出を目指す。

募集した共同研究テーマ

・ゲノム解析・バイオマーカー開発に関する共同研究
・神経生理活動解析に関する共同研究
・動物モデルの作製・行動解析に関する共同研究
・非侵襲的脳機能画像解析技術開発と臨床医学への応用に向けた橋渡し共同研究
・組織標本，組織病理に関する共同研究
・その他　脳研究所の資源，施設を活用した共同研究

公募結果

合計14件の申請があり，厳正な審査の結果，6件の共同研究を採択

研究代表者			共同研究テーマ	脳研担当者
所属	職名	氏名		
医歯学総合研究科 消化器内科学分野	教授	寺井　崇二	脳腸肝連関の横断的研究による病態解明と新規治療開発のための共同研究	小野寺　理
自然科学系工学部 量子電子物性，近接場光学	准教授	佐々木　進	非侵襲的脳機能画像解析技術開発と臨床医学への応用に向けた橋渡し共同研究	五十嵐　博中
自然科学系工学部 神経生理学，生体医工学	教授	飯島　淳彦	非侵襲的脳機能画像解析技術開発と臨床医学への応用に向けた橋渡し共同研究	藤井　幸彦
医歯学総合研究科 分子生物学分野	教授	小松　雅明	ゲノム解析・バイオマーカー開発に関する共同研究 動物モデルの作製・行動解析に関する共同研究	﨑村　建司
医歯学総合研究科 神経生物・解剖学分野	教授	竹林　浩秀	組織標本，組織病理に関する共同研究	柿田　明美
人文社会・教育科学系 人文学部認知心理学，知覚心理学	准教授	新美　亮輔	神経生理活動解析に関する共同研究	伊藤　浩介

新潟大学脳研究所との学内異分野融合・共同研究　採択者一覧

番号	共同研究テーマ番号	共同研究テーマ	研究課題名	申請者			脳研究所対応教員
				所属	職名	氏名	
1	6	その他（脳腸肝連関の横断的研究による病態解明と新規治療開発のための共同研究）	脳―腸―肝ネットワークによる病態発症のメカニズム ―自律神経系，腸内細菌叢を介した難治疾患の病態解明と新規治療法の開発を目指して―	医歯学総合研究科 消化器内科学分野	教授	寺井　崇二	小野寺　理
2	4	非侵襲的脳機能画像解析技術開発と臨床医学への応用に向けた橋渡し共同研究	パルス制御が拓く焦点可動MRIによる新規コントラスト機構の創出とそれに基づく革新的な機能MRI撮像法の実現	自然科学系工学部 量子電子物性，近接場光学	准教授	佐々木　進	五十嵐　博中
3	4	非侵襲的脳機能画像解析技術開発と臨床医学への応用に向けた橋渡し共同研究	視路圧迫症候群の器質的・機能的解析から見る，ヒト脳神経系の可塑性の探索と病態予測モデルの構築	自然科学系工学部 神経生理学，生体医工学	教授	飯島　淳彦	藤井　幸彦
4	1 3	ゲノム解析・バイオマーカー開発に関する共同研究 動物モデルの作製・行動解析に関する共同研究	UFM1システムの異常によるヒト遺伝性発達障害発症機構の解明	医歯学総合研究科 分子生物学分野	教授	小松　雅明	﨑村　建司
5	5	組織標本，組織病理に関する共同研究	組織浸透性に優れたマーカーの創出による脳の機能と病態の三次元マッピングの試み	医歯学総合研究科 神経生物・解剖学分野	教授	竹林　浩秀	柿田　明美
6	2	神経生理活動解析に関する共同研究	手と身体を知覚する認知神経科学的基盤の解明	人文社会・教育科学系 人文学部　認知心理学，知覚心理学	准教授	新美　亮輔	伊藤　浩介

所属別　申請内訳

所　　属	申請数	採択数
医歯学総合研究科	9	3
自然科学系工学部	3	2
自然科学系農学部	1	0
人文社会・教育科学系人文学部	1	1
計	14	6

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

TDP-43 病変に結合する分子プローブの開発

研究代表者　樋口　真人 1)
研究分担者　柿田　明美 2)，清水　宏 2)，小野　麻衣子 1)，高堂　裕平 1)

1) 量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所　2) 新潟大学脳研究所・病理学分野

研究要旨

TDP-43 タンパクは筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症などの発症と密接に関連しており、生体内での TDP-43 の蓄積を可視化する技術は、これらの疾患の早期診断や発症メカニズムの解明、TDP-43 を標的とする疾患治療薬の薬効評価に寄与することが期待される。本研究ではポジトロン断層撮影により TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する新規 PET プローブの開発を行う。

A. 研究目的

TDP-43 タンパクは筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症などの発症と密接に関連しており、生体内での TDP-43 の蓄積を可視化する技術は、これらの疾患の早期診断や発症メカニズムの解明、TDP-43 を標的とする疾患治療薬の薬効評価に寄与することが期待される。本研究ではポジトロン断層撮影（PET）により TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する新規 PET プローブを開発するべく、前頭側頭葉変性症および筋萎縮性側索硬化症死後脳ホモジェネートを用いた親和性評価やオートラジオグラフィーにより、新規 PET プローブ候補化合物の TDP-43 病変への結合性を評価する。良好な結合性が確認された候補化合物について、さらなる特性評価を *in vitro* および *in vivo* で行い、PET プローブとしての有用性を検証する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

対象：前頭側頭葉変性症および筋萎縮性側索硬化症の死後脳

方法：新規 PET プローブ候補化合物の TDP-43 病変への結合性を評価するために、PET 核種標識体候補化合物を用いて以下の解析を行う

① 死後脳組織ホモジェネートを用いた結合実験　(homologous binding assay)
② 死後脳組織切片を用いたオートラジオグラフィ
③ 組織化学的解析（免疫染色、βシートリガンドによる蛍光染色）。

C. 研究結果

前頭側頭葉変性症死後脳固定標本を用いた組織化学的解析により、複数の PET プローブ候補化合物において、高濃度溶液（μM）中での化合物・TDP-43 病変間の結合を確認した。これらの候補化合物の PET プローブとしての性能を評価するために、PET 核種標識をした候補化合物の低濃度溶液（nM）中での化合物・病変間の結合性を評価した。その結果、候補化合物 1 種において、前頭側頭葉変性症死後脳組織切片を用いたオートラジオグラフィにて、TDP-43 病変蓄積領域への当該候補化合物の結合が確認された。また、前頭側頭葉変性症死後脳組織ホモジェネートを用いた結合実験により、当該候補化合物が中程度の親和性（Kd=10～100 nM）にて死後脳組織ホモジェネートに対して結合を示す可能性が明らかとなった。

D.考察

前頭側頭葉変性症の死後脳組織を用いた解析により、候補化合物 1 種が、PET プローブとしては中程度の親和性にて TDP-43 病変に結合する可能性が示唆された。生体脳に蓄積する TDP-43 病変を *in vivo* PET にて画像化するプローブとして、当該候補化合物の病変に対する結合親和性は充分ではないと考えられるが、より高い結合親和性を有する候補化合物を開発するためのリード化合物としての有用性が、当該候補化合物には期待される。

E.結論

本研究において、PET により TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する PET プローブ開発に有用なリード化合物が見いだされた。

F.研究発表

1.論文発表

Hitoshi Shinoto, Hitoshi Shimada, Yasumasa Kokubo, Kenji Tagai, Fumitoshi Niwa, Soichiro Kitamura, Hironobu Endo, Maiko Ono, Yasuyuki Kimura, Shigeki Hirano, Maya Mimuro, Masanori Ichise, Naruhiko Sahara, Ming-Rong Zhang, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi. Tau imaging detects distinctive distribution of tau pathology in ALS/PDC on the Kii Peninsula. Neurology. 2019, 92(2): e136-e147

2.学会発表

小野麻衣子. 認知症疾患のタウ病理とイメージング. 第37回日本認知症学会学術集会. 2018 年 10 月. 札幌

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

統合失調症モデル動物の聴覚生理機能障害と聴覚認知変化

研究代表者　浄土英一 1)
研究分担者　那波宏之 2)　難波寿昭 2)

1）福島県立医科大学医学部システム神経科学講座　2）新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

研究要旨

新生児期の上皮細胞成長因子（EGF）への過剰暴露は成熟後に統合失調症の症状に類似した認知行動異常を引き起こす。統合失調症患者では刺激属性変化特異的に応答する事象関連電位成分である mismatch negativity（MMN）の低下が知られている。本研究ではラットを被験体として、周波数・呈示確率の異なる２音を経時的に呈示する oddball 課題を用いて MMN 電位を記録し、新生児期の EGF 暴露が成熟後に記録された MMN 電位におよぼす影響について検討した。前頭皮質表面から波形・反応特性がヒトの MMN 電位と類似した MMN 様電位が記録され、この電位は EGF 暴露群で有意に低下していた。また時間周波数解析により、EGF 群の MMN 様電位低下は主に β、γ 領域の同期性低下に起因することが明らかとなった。以上の結果から、新生児期 EGF 暴露モデルは統合失調症の有望な発達障害モデルとなりうることが示唆された。

A. 研究目的

ラットを被検体として、新生児期の EGF 暴露により成熟後に統合失調症患者で観察されるのと同様の MMN 電位の低下が認められるのかを検討する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

<u>被検体</u>：Sprague-Dawley ラット 45 匹。新潟大学実験動物研究施設で飼育（12 時間の明暗サイクル、一定の室温、湿度、餌および水の自由摂取）。

<u>EGF 暴露</u>：ラットは無作為に EGF 群と統制群のいずれかに割り当てられた。EGF 群のラットは生後 2 日～10 日の 9 日間、毎日 EGF を皮下投与（875 ng/g）され、統制群のラットは同量の生理食塩水を同期間、皮下投与された。

<u>電極埋め込み手術</u>：ペントバルビタール麻酔下（65mg/kg, i.p.）で電極埋め込み手術を実施した。鎮痛のため切開部位には局所麻酔薬（2%塩酸リドカイン液）を注入した。ラットは麻酔下で脳定位固定装置に頭部を固定され、頭皮切開後、デンタルドリルで頭蓋に穴を開け、脳波記録用、参照および接地用のステンレス製ネジ電極（直径 1.4mm）を脳表に接地するまで頭蓋にねじ込み、電極から伸びているリード線を IC ソケットに接続した後、デンタルセメントで頭蓋上に固定した。各電極の接地座標は以下の通り。

前頭皮質（FC）→ AP +2.0, ML 2.0 mm
聴覚皮質（AC）→ AP -4.5, ML 8.0 mm
参照電極 → AP +10.0, ML 1.0 mm
接地電極 → AP -11.0, ML 2.0 mm

データの記録は手術後最低 2 週間の回復期間をおいて実施した。

<u>聴覚刺激</u>：音刺激は大別して以下の２つの条件で呈示された。Oddball 条件では 6000Hz と 3000Hz の純音（85db SPL, 持続時間 0.1s）のいずれかが刺激呈示間間隔 0.3 s で経時的に呈示された。呈示確率は 6000Hz 音が 10%（逸脱音）で、3000Hz 音は 90%（標準音）。一部のラット

（16 匹）では上記 2 音の呈示確率を逆転させた条件も実施した。Many-standards 条件では上記 2 音を含む 10 種類の純音（1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 7500, 8000 Hz; いずれも85db SPL, 持続時間0.1s, 刺激呈示間間隔 0.3 s ）のいずれかを呈示確率 10％で経時的に呈示した。

記録：記録は薄暗く照明された部屋で実施し、記録中ラットは透明な電気的にシールドされた実験箱に入れられた。脳波信号はラットの頭蓋に固定されている IC ソケットに無痛的に差し込まれたヘッドアンプ（JH-440, 日本光電製）を介して生体信号増幅器（AB-611, 日本光電製）に入力し（0.5-300Hz の帯域幅フィルタ）、さらに増幅信号を信号記録装置（Micro 1401, Cambridge Electronics 製）を介してコンピュータに入力、デジタル的に脳波データを保存。

データ処理：各音刺激ごとに刺激開始点に同期させて脳波の加算平均波形を求めた。Oddball 条件では逸脱音と標準音に対する事象関連電位（ERP）波形の SN 比を合わせるため、1800 試行の標準音データから 200 試行分を無作為に抽出し、加算回数を逸脱音と同じ回数（200）になるようにした。

C. 研究結果

前頭皮質誘導脳波では明瞭な MMN 様電位が記録され、この MMN 様電位は波形においても刺激反応特性においてもヒトの MMN 電位に類似していた。一方、聴覚皮質誘導脳波においては明瞭な MMN 電位が認められなかった。MMN 様電位は EGF 群で有意に低下しており、wavelet 変換を用いた時間周波数解析の結果、特に β および γ 帯域で顕著な低下を示していた。位相解析により、MMN 様電位の出現タイミングで β および γ 帯域の試行間位相同期性が EGF 群で有意に低下していることが示された。

D. 考察

実験結果から、新生児期 EGF 暴露動物においても統合失調症患者と同様の MMN 電位低下が認められ、また、この低下が主に β および γ 帯域脳波の同期性異常により生じていることが明らかになった。特に γ 律動の異常は統合失調症患者でも多数報告されており、新生児期 EGF 暴露動物が統合失調症と一部共通の病態を有している可能性を示唆する。

E. 結論

以上の結果から、新生児期 EGF 暴露動物は統合失調症の有望かつ妥当性のある発達障害モデルとなりうることが示唆される。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Scientific Reports, in press (https://doi.org/10.1038/s41598-019-43923-y)

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

高磁場 MRI を用いたてんかん原性部位及び機能部位との関係の研究

研究代表者　臼井　直敬 1)
研究分担者　鈴木　雄治 2)

1) 静岡てんかん・神経医療センター　2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

難治性てんかんにて外科治療を検討している患者においては、切除すべき皮質領域と、機能的に重要な運動・感覚野、言語野などの関係を明確にすることが重要である。外科治療を検討中の患者で高磁場 MRI を用いて、てんかん原性部位を同定し、加えて同部位を対象とした機能的 MRI を行い、てんかん原性部位と機能部位の関係を検討する。さらに実際に外科治療を行った患者では、fMRI で賦活された機能野と頭蓋内電極を用いた脳機能マッピングで同定された機能野との関係を検討する。

A. 研究目的

外科治療を検討中の患者で高磁場 MRI を用いて、てんかん原性部位を同定し、加えて同部位を対象とした機能的 MRI を行い、てんかん原性部位と機能部位の関係を検討する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

高磁場 MRI を用いた脳画像撮影は、高解像度脳構造画像で得られる解剖学的情報を基準にして、機能的 MR 画像（fMRI）、拡散テンソル画像、磁化率強調画像（SWI）などの撮影を行う。fMRI は、推測されるてんかん原性部位を対象に行い、運動・感覚野、言語野などの機能部位を同定する。

C. 研究結果

新潟大学にて、難治性てんかん患者 1 名の測定を行った。てんかん原生部位は、左の頭頂葉に皮質形成異常を認めたが、脳機能部位（言語）が両側性であることが確認された。この結果により、手術適応の可能性がひらけたため、頭蓋内脳波記録を行い、覚醒下手術にて詳細な脳機能マッピングを行っての外科治療が施行され、良好な転帰につながった。

D. 考察

本症例では f MRI で言語機能が両側性であることが明らかになり外科治療適応がひらけた。今後、さらなる患者データの蓄積により、てんかん原性部位及び機能部位との関係がより明らかになることが期待される。

E. 結論

言語野近傍にてんかん原性を有する患者での術前検査として、fMRI の有用性が示唆された。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表
   なし
2. 学会発表
   なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

中枢神経原発悪性リンパ腫における transforming acidic coiled-coil-containing 3 (TACC 3)発現とその臨床病理学的意義

研究代表者　杉田　保雄 1)
研究分担者　三好　寛明 1)　松田　光太郎 1)　柿田　明美 2)

1) 久留米大学医学部病理学講座　2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

中枢神経原発悪性リンパ腫 34 症例について transforming acidic coiled-coil-containing3(TACC3)発現を免疫染色で検討した。TACC3 の発現の評価は腫瘍細胞の細胞膜、細胞質の染色性、標識率(0, 5-50%, 50-100%)により 3 段階 (G1-G3)で評価した。G1(0%:2 例)2 例、G2(20%:6 例,30%:2 例,40%:4 例)12 例、G3(50%:6 例,70%:6 例,80%:4 例, 90%:4 例)20 例であった。G2・G3 が 94%であり、他臓器の悪性腫瘍と同様に中枢神経原発悪性リンパ腫においても腫瘍細胞において transforming acidic coiled-coil-containing3(TACC3)発現が確認された。また G2、G3 群の予後を比較した場合では G2 群の方が予後良好の傾向を示した(Log-rank, P = 0.0879)。

A. 研究目的

transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3) は染色体上の 4p16.3 に位置する、TACC family の member である。TACC3 は Aurora A キナーゼのターゲットであり、核分裂の際に中心体に位置しており、細胞の核分裂の際に、微小管の成長と安定に寄与している。 近年、TACC3 の異常と様々な悪性腫瘍との関わりが指摘されている。本研究は中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)の腫瘍増殖における TACC3 についての役割を解決することが目的である。そして PCNSL における TACC3 の役割を明らかにすることにより、TACC3 解析が PCNSL の診断、治療などの臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

① PCNSL 症例を対象として TACC3、 細胞周期マーカーなどを蛋白レベル、RNA レベルで解析、検討する。
② PCNS リンパ腫の特異性を明らかにするために他臓器の悪性腫瘍との比較検討を行う。
③ ヒト脳原発リンパ腫由来細胞株 HKBML を使用して TACC3 の発現と PCNSL 増殖機構との関係を明らかにする。
④ 臨床病理学的な検討を行い、①～④で得られたデータとリンパ腫症例の予後、生物学的態度との相関関係を明らかにする。

C. 研究結果

本年度は研究方法・計画の①～③が達成できた。下記結果が得られた。中枢神経原発悪性リンパ腫 34 症例について transforming acidic coiled-coil-containing3(TACC3)発現を免疫染色で検討した。TACC3 の発現の評価は腫瘍細胞の細胞膜、細胞質の染色性、標識率(0, 5-50%, 50-100%)により 3 段階 (G1-G3)で評価した。G1(0%:2 例)2 例、G2(20%:6 例,30%:2 例,40%:4 例)12 例、G3(50%:6 例,70%:6 例,80%:4 例, 90%:4 例)20 例であった。G2・G3 が 94%であり、多臓器の悪性腫瘍と同様に中枢神経原発悪性リンパ腫においても腫瘍細胞において transforming acidic coiled-coil-containing3(TACC3)発現が確認された。また G2、G3 群の予後を比較した場合では G2 群の方が予後良好の傾向を示した(Log-rank, P = 0.0879)。

D.考察
TACC3 の発現は、ヒトの正常組織では精巣・脾臓・胸腺・リンパ球などの増殖能を有する組織で認められる(1)。一方、様々な悪性腫瘍においても TACC3 の発現が報告されており、肺癌や肝細胞臓癌では、TACC3 の発現と腫瘍の分化度が相関することが指摘されている (2,3)。Ma らは乳癌において DCIS から浸潤性乳管癌に移行する際に TACC3 の発現亢進を報告している(4)。その一方で、彼らは核分裂像を示していない腫瘍細胞も TACC3 を発現し、TACC3 の発現は Ki-67 の発現とも関係していることを記載している。

同様に Nahm らは肝細胞癌では、TACC3 の発現は腫瘍の増殖能と関係していることを報告している(5)。今回の私共の症例では全例 PCNSL 症例であったために分化度による差異は検討できなかったが、TACC3 高発現群の方が予後不良の傾向がみられた。TACC3 は PCNSL の腫瘍発生機構に重要な役割を担っていることが示唆された。

今後、
① 臨床的要素を含めた多変量解析を行う。
② 細胞周期マーカーとの相関を検討する。
③ 対象症例数の増やす。
④ 低異型度悪性リンパ腫との比較検討を行う。
⑤ GLUT-1 との比較検討を行う。
などの検討を加え、PCNSL の腫瘍発生における TACC3 の役割を解明する予定である。

文献

1. Sadek, C.M., et al., *TACC3 expression is tightly regulated during early differentiation.* Gene Expr Patterns, 2003.
2. Jiang, F., et al., *The clinical significance of transforming acidic coiled-coil protein 3 expression in non-small cell lung cancer.* Oncol Rep, 2016.
3. Nahm, J.H., et al.; *Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3) overexpression in hepatocellular carcinomas is associated with "stemnes" and epithelial-mesenchymal transition-related marker expression and a poor prognosis.* Tumour Biol, 2016
4. Ma, X.J., et al., *Gene expression profiles of human breast cancer progression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003.
5. Nahm, J.H., et al., *Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3) overexpression in hepatocellular carcinomas is associated with "stemness" and epithelial-mesenchymal transition-related marker expression and a poor prognosis.* Tumour Biol, 2016.

E.結論
他臓器の悪性腫瘍と同様に中枢神経原発悪性リンパ腫においても腫瘍細胞において transforming acidic coiled-coil-containing3(TACC3)発現が確認された。また G2、G3 群の予後を比較した場合では G2 群の方が予後良好の傾向を示した(Log-rank, P = 0.0879)。TACC3 は PCNSL の腫瘍発生機構に重要な役割を担っていることが示唆された。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)
1.論文発表
特に無し

2.学会発表
①
19th International Congress of Neuropathology, 2018, September 24, Keio Plaza Hotel Tokyo, Japan

G.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1.特許取得
特に無し
2.実用新案登録
特に無し
3.その他
特に無し

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

超偏極低分子化合物の生体トレーサーとしての応用を目指した基礎検討

研究代表者　青木　伊知男 1)
研究分担者　五十嵐　博中 2)、高堂　裕平 1)、高草木　洋一 1)、佐藤　千佳 1)

1)　量子科学技術研究開発機構　2)　新潟大学脳研究所

研究要旨

NMR 測定において、トレーサーを生体に投与し、その代謝変化を追うことにより生体の脳代謝を評価することが可能であるが、この場合トレーサーの希釈による測定感度の低下が問題となり、いまだ臨床応用への道が開けていない。今回、トレーサーを特殊な磁場装置（超偏極装置）の中であらかじめ偏極させることにより測定感度を高めることが可能な超偏極法を用い、生体脳における高分解能代謝解析を可能とする手法の開発を目的として、種々の低分子化合物の超偏極における試適条件の解明および、超偏極物質の MRI 撮像法の開発を行う。

A. 研究目的

NMR 測定において、トレーサーを生体に投与し、その代謝変化を追うことにより生体の脳代謝を評価することが可能であるが、この場合トレーサーの希釈による測定感度の低下が問題となり、いまだ臨床応用への道が開けていない。今回、トレーサーをあらかじめ偏極させることにより測定感度を理論的に 7000 倍まで高めることが可能な超偏極法の一つである dynamic nuclear polarization を行い、超偏極した低分子化合物を生体に投与することで、従来不可能であった高空間かつ高時間分解能で脳代謝を観測することが理論的に可能である。これを目的とした基礎実験をピルビン酸・乳酸などの脳で代謝される一般的な小分子化合物を用いて行う。これにより、生体投与を目的としたトレーサーに関して、偏極時間・偏極温度等の試適条件を解明し、動物を用いた実験への礎を築く。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

最初に脳代謝において、神経細胞のエネルギー源となっているが、その代謝については明らかにされていないピルビン酸、乳酸、酢酸など、血液脳関門を越えて代謝されることが確認されている物質について、NMR で測定できる安定同位体である ^{13}C を炭素基に含むトレーサーを合成し、この ^{13}C を含む炭素基を統合脳機能研究センターが生体由来物質の研究に用いている超偏極装置 (HyperSense™, Oxford Instruments) を用いて超偏極させ、もっとも超偏極効率の高い条件を解明すると共に、超偏極状態の半減時間を解明する。

C. 研究結果

議論を重ねた結果、基礎検討を進める低分子代謝トレーサーとして、[1-^{13}C]ピルビン酸を選定した。本化合物は分子量が小さく、理論上、超偏極の半減時間が長いという特徴を持ち、かつ生体に投与した場合、脳組織中に移行しやすいことが、統合脳機能研究センターでの基礎実験から確認されている。また、計測に必要なセットアップの検討や、3 T MRI の立ち上げなどを進めた。

次年度以降については、超偏極装置にて偏極するための [1-^{13}C]ピルビン酸やラジカル化合物の最適化について検討し、実際に偏極シグナ

ルを取得することを目標とする。また、グリア細胞の代謝に大きくかかわっている酢酸、神経細胞の活動にかかわる乳酸についても逐次、基礎検討を進める。更に、^{13}C 化合物の分布をイメージ化する新たな MRI 撮像法の開発を並行して進める。

D. 考察

計測を進めていく低分子化合物として選定した [1-^{13}C]ピルビン酸は、カルボニル基の根元の炭素を NMR で観測可能な ^{13}C で標識している。すなわち、直接結合する水素原子を持たない 4 級炭素であるため、双極子–双極子相互作用を主としたスピン緩和を受けにくいことから、トレーサーとしての応用に耐えうる長い偏極時間を維持するのではないかと期待される。

E. 結論

超偏極法での計測を進めていく低分子化合物として、[1-^{13}C]ピルビン酸を選定し、計測環境の確認や、各種セットアップの検討を進めた。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

NF-kB 活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の開発に向けた多施設共同研究

研究代表者　立石　健祐 1)
研究分担者　藤井　幸彦，棗田　学 2)

1) 横浜市立大学脳神経外科　2) 新潟大学脳研究所　脳神経外科学

研究要旨

本研究では中枢神経原発悪性リンパ腫（PCNSL)に対し，高頻度に伴う NF-kB の恒常的な活性化に関連する分子を標的とした治療法の開発を目指している。研究代表者らはこの研究を遂行する上で極めて重要なヒト由来 PCNSL 細胞株の樹立に多数成功しており，世界をリードする研究基盤は既に構築されている。 本研究により遺伝子異常に基づく標的治療法を確立させ臨床応用につなげることを目指す。

A. 研究目的

難治性脳腫瘍である中枢神経原発性リンパ腫（PCNSL)に対する独創的治療法の開発を志向した共同研究を行う。申請者と脳研共同研究者らがそれぞれ独自に樹立したヒト由来 PCNSL 細胞株（PDX 細胞)を用いて，特に NF-kB 経路及び糖代謝異常を標的とした治療法を探求する。具体的には PCNSL において恒常的に活性化されている NF-kB 経路と糖代謝異常の関連性を明確にするとともに，これらの機構を制御する遺伝子異常を標的として抗腫瘍効果が得られるか検討を行う。併せて分子生物学的解析を駆使し，標的治療に対する細胞障害メカニズム，糖代謝制御機構を解明することを研究の全体構想とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

申請者らが独自に樹立した PCNSL PDX モデルは世界でも類を見ない株数であり，これらのモデルを活用して研究を行っている。具体的には PCNSL に高頻度に認められる B cell receptor (BCR)，Toll like receptor signaling に関連する遺伝子異常（CD79B，MYD88，CARD11 等）を，次世代シークエンサーを用いて網羅的に解析を行い，更には RNA シークエンスにて NF-kB シグナル経路，解糖系に関連する遺伝子発現を解析している。また神経膠芽腫をコントロールとし，解糖系蛋白の発現レベルに違いがあるか RT-PCR，western blotting 法等にて検討を図った。解糖系を標的とした治療法により抗腫瘍効果が得られるか検討を行った後，NF-kB 経路に関連する遺伝子をノックダウン，強制発現を行い解糖系酵素の発現レベルに変化が生じるか検証している。 In vitro レベルで細胞毒性のメカニズムを明らかにするとともに，in vivo 研究にて薬剤治療によりマウス生存期間の延長効果が得られるか現在動物実験を行っている。加えて得られた研究結果を基に新たな研究計画を立案する。

C. 研究結果

難治性脳腫瘍である中枢神経原発性リンパ腫（PCNSL)に対する独創的治療法の開発を志向した共同研究を行っている。申請者が独自に樹立した 10 種のヒト由来 PCNSL 細胞株（PDX 細胞)を用いて，特に NF-kB 経路及び糖代謝異常を標的とした治療法を探求している。既に全エキソン解析を含めた遺伝子解析は完了しており，患者検体と PDX 細胞間における遺伝子異常が高

率に継代されていることを確認している。また PDX 細胞株及び患者検体において解糖系が亢進していることを PET 及び免疫組織学的検討にて確認した。更には組織学的検討も終了しており，表現型が 100%一致していることを確認した。これらの研究成果は現在論文投稿準備中である (Tateishi K et al. under preparation)。
更には cell free DNA を用いて MYD88 変異が PDX マウスの血清から 100%検出可能であることを明らかにした（未発表データ)。今後は MYD88 変異を指標とした治療効果判定のための liquid biopsy 法の開発についても目指していく。

D. 考察

これまでの研究結果より PCNSL は高率に NF-kB 経路上流の遺伝子異常を伴うことが判明している。一方で NF-kB 経路の活性化は遺伝子異常単独では不十分であることが今回の研究にて明らかになっている。とくに NF-kB canonical pathway の活性化が腫瘍形成能と強い関連性を有することが判明しており，次年度以降は NF-kB canonical pathway の活性化に関わる分子生物学的機序の解明とともに，本経路を強力に抑制する治療法の開発を目指す。

E. 結論

本年度研究成果として，高品質の PCNSL PDX モデルの樹立に成功した事，更には同モデルを用いて NF-kB canonical pathway の活性化と腫瘍形成能に強い関連が存在することを明らかにした。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

未発表（投稿準備中）

2. 学会発表

未発表

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   YML15 細胞について特許出願中

2. 実用新案登録

3. その他

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

中枢神経系疾患における炎症回路活性化の解析

研究代表者　村上　正晃 1)
研究分担者　小野寺　理 2)
研究分担者　上村　大輔 1)
研究分担者　中山　千恵美 1)

1) 北海道大学遺伝子病制御研究所大学院医学院分子神経免疫学教室
2) 新潟大学脳研究所神経内科学分野

研究要旨
我々は、炎症誘導の分子機構として、非免疫細胞において存在する炎症回路（NF-κB 活性増幅によるケモカイン過剰産生機構）を報告し、その制御遺伝子群を同定している。この炎症回路は、多発性硬化症や関節リウマチをはじめとする種々の慢性炎症疾患の病態に関わっていることが臨床検体などを用いた検討から分かっている。本研究では、炎症回路活性化が中枢神経系疾患の病態に関連するという仮説に基づき、中枢神経系疾患の脳神経病理標本における炎症回路活性化の存在を確認する。臨床検体およびマウス個体・臓器透明化法 CUBIC を用いることで、我々が動物実験で得た結果の橋渡し研究を行うとともに、臨床検体から得られる知見を基に動物実験でそのメカニズムを追うことで、これらの疾患に対する新たな治療法の開発に繋げることを目指す。

A. 研究目的
本研究では、炎症回路活性化が、多発性硬化症、視神経脊髄炎、アルツハイマー病および脳卒中といった中枢神経系疾患の病態に関連するという仮説に基づき、これら疾患の脳神経病理標本における炎症回路活性化の存在を免疫染色等で確認する。臨床検体およびマウス個体・臓器透明化法 CUBIC を用いることで、我々が動物実験で得た結果の橋渡し研究を行うとともに、臨床検体から得られる知見を基に動物実験でそのメカニズムを追うことで、これらの疾患に対する新たな治療法の開発に繋げることを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）
多発性硬化症、視神経脊髄炎、アルツハイマー病および脳卒中のヒト脳神経病理固定標本の連続切片を用いて、炎症回路の活性化に必須である転写因子 NF-κB p65 および STAT3 の活性化型(リン酸化型)を免疫染色によって検出する。リン酸化 NF-κB p65 およびリン酸化 STAT3 を同時に発現する細胞を炎症回路活性化細胞と判断し、病巣部位や非病巣部位における炎症回路活性化状態を解析する。さらに、必要に応じて、血管内皮細胞やグリア細胞の免疫染色を行い、炎症回路活性化細胞種を決定する。また、同一の組織切片を用いて、これらの分子の多重染色系を確立する。
新潟大学脳研究所システム脳病態学分野 田井中一貴先生が開発されたマウス個体・臓器透明化法 CUBIC を北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野に導入するほか、分子神経免疫学分野で開発・実施されている各種神経活性化モデル、自己免疫疾患モデル、感染モデルを利用し、CUBIC による全身的な神経回路解明、炎症部位同定および病原体感染部位の同定を実施する。具体的には、分子神経免疫学分野で行った動物実験のサンプルを透明化後に脳研

究所に設置されているシート型蛍光顕微鏡で撮影する。データを共有し、必要な場合はサンプルを返却して組織切片などでより詳細な部位する。

臨床検体の情報は、誰のものか一見して判別できないよう、氏名・住所等をまったく別の管理番号（研究用 ID）に置き換えたうえで管理する。対応表は、研究代表者が厳重に保管するよう監督する。共同研究者に提供する場合は、この管理番号を使用する。また、研究代表者等が本研究で得られた情報を公表する際は、研究対象者を特定できる情報を含まないようにする。

C.研究結果

非免疫細胞における NF-κB p65 および STAT3 の同時活性化が、炎症回路の活性化に必須であるため、臨床検体の組織切片を用いて、活性型（リン酸化）NF-κB p65 および STAT3 の組織染色を行うことで炎症回路活性化を検出できる。これまでは、連続切片を用いてリン酸化 NF-κB p65 およびリン酸化 STAT3 を検出していたが、同時活性化細胞をより正確に検出するために、多重染色法を試みた。リン酸化 NF-κB p65 およびリン酸化 STAT3 が強く染色されることが分かっているケロイド病変部の皮膚組織切片をポジティブコントロールとして、ウサギ由来抗リン酸化 NF-κB p65 抗体、ウサギ由来抗リン酸化 STAT3 抗体を用いて、同じ生物種由来の抗体でも多重染色が可能な Opal 多重蛍光染色試薬（パーキンエルマージャパン）を利用して染色を行った。その結果、期待通りに、同じ生物種由来の抗体を用いても、同一の切片でリン酸化 NF-κB p65 およびリン酸化 STAT3 を染色することができた。これに、ビメンチンなどの非免疫細胞マーカーを加えることで、非免疫細胞における炎症回路の活性化状態が 1 枚の切片で観察できると考えられる。

組織切片とともに、臓器全体をまるごと透明化し、イメージングすることが可能となっている。田井中一貴先生が、マウス個体・臓器透明化法 CUBIC を改良するために、透明度を規定する各パラメーターについて化合物のスクリーニングを行い、最適な透明化プロトコルを確立した。この改良型 CUBIC について、実際にマウス臓器で期待される透明化効果が得られるか自己免疫疾患モデルなどを用いた共同研究を行い、脳研究所と共著論文を Cell Reports に発表した。また、CUBIC 透明化法と免疫染色法を組み合わせた染色プロトコルを分子神経免疫学分野に導入し、透明化したマウス全脳での血管の染色を行った。

2018 年 11 月 6 日に研究分担者の上村が新潟大学脳研究所を訪問し、新潟大学脳研究所神経内科学分野の河内先生にヒト脳神経病理固定標本の取り扱いや染色方法、そしてホルマリン固定切片に適用可能な抗体の種類について詳細なアドバイスをいただいた。また、脳研究所 1F 検討会室において、「ヒトとマウスの疾患脳における glymphatic system の全容解明に向けて」と題したクローズドミーティングに参加した。新潟大学脳研究所に所属される神経内科 柳村文寛先生、病理学教室 豊島靖子先生、システム脳病態学分野 田井中一貴先生、統合脳機能研究センター 五十嵐博中先生、神経内科 河内泉先生らとともに約 3 時間にわたって、中枢神経系疾患や glymphatic system についての最近の動向をディスカッションした。

D.考察

炎症回路は、非免疫細胞における NF-κB p65 および STAT3 の同時活性化を特徴とするため、組織切片における炎症回路の活性化は、リン酸化 NF-κB p65、リン酸化 STAT3 および非免疫細胞マーカーといった 3 種類の抗体を用いて評価することが望ましい。連続切片を用いてそれぞれを染色することも可能であるが、複数枚の切片を必要とする。今回試した多重蛍光染色試薬を使うことによって、同一の切片で炎症回路の活性化が評価できるようになる。また、CUBIC 法を利用することで、炎症回路の活性化細胞の 3 次元イメージングが可能となる。

ホルマリン固定検体を用いる場合には、染色に使用するそれぞれの抗体によって、反応条件が異なってきたり、臓器によってブロッキングなどの染色過程に工夫が必要であったりするため、新潟大学脳研究所の先生方など、組織染色やイメージングに関して経験豊富な先生方のアドバイスをいただくことが重要である。

E.結論

今後は、改良型 CUBIC 法を活用した共同研究に加えて、リン酸化 NF-κB p65 およびリン酸化

STAT3 に加えて、ビメンチンなどの非免疫細胞のマーカーの染色を含めた組織切片の多重染色系を確立し、ヒト脳神経病理固定標本の染色を行っていきたい。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Tainaka, K., TC. Murakami, EA. Susaki, C. Shimizu, R. Saito, K. Takahash, A. Hayashi-Takagi, H. Sekiya, Y. Arima, S. Nojima, M. Ikemura, T. Ushiku, Y. Shimizu, M. Murakami, KF. Tanaka, M. Iino, H. Kasai, T. Sasaoka, K. Kobayashi, K. Miyazono, E. Morii, T. Isa, M. Fukayama, A. Kakita, and HR. Ueda. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. Cell Rep. 2018 Aug 21;24(8):2196-2210

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

特発性正常圧水頭症患者脳脊髄液中のバイオマーカー診断と重症度分類の確立

研究代表者　中島　円[1)]

研究分担者　池内　健[2)]　宮嶋雅一[1)]　春日健作[2)]　宮下哲典[2)]　月江珠緒[2)]

1) 順天堂大学・医学部・脳神経外科学講座
2) 新潟大学・脳研究所・遺伝子機能解析学分野

研究要旨

特発性正常圧水頭症（iNPH）は認知障害，歩行障害などの症候を呈する高齢者に特有の疾患で，主に髄液吸収障害を原因とし，髄液シャント術が主な治療である。 iNPH 患者に対する髄液シャントにより長期間症状が改善する群，非改善群を予測する特徴的なバイオマーカー診断を確立することを本研究の目的とした。iNPH 患者に対し，タップテストで得られた髄液を新潟大学脳研究所にて一括して髄液中のアミロイドβ蛋白，タウ蛋白，リン酸化タウ（p-tau）を xMAP® platform で測定した。結果，髄液中 p-tau 濃度は，シャント術後3年後の iNPH 患者の認知機能のみならず，日常生活自立度の改善度も予測し得た。高 p-tau 群はアルツハイマー病理を併存し，シャント治療効果が短期間に限定されることが推察された。病的な神経毒性蛋白が脳内に沈着したアルツハイマー病(AD)病理を併発した患者は症状改善に乏しく，病的蛋白の脳内沈着により神経毒性蛋白の髄液排泄経路を阻害していることが示唆された。

A. 研究目的

特発性正常圧水頭症（iNPH）は高齢者特有の髄液吸収障害が主病態となり，直接的な脳の圧迫だけでは歩行障害や認知障害，排尿障害など様々な機能障害を説明し得ず，研究代表者らはアミロイドβ蛋白（Aβ42）やタウ，リン酸化タウ蛋白（p-tau）といった神経毒性蛋白質のクリアランス障害が，これらの症状に影響を与えている病態と仮説を立てた。特に認知障害の程度は，AD 病理を高率に合併することと相関があり，これまでの先行研究結果より iNPH ではシャント介入により髄液クリアランスを促進させることで，認知機能が改善されており，髄液中に放出されるAβ42 や p-tau などの神経毒性蛋白が脳内へ沈着することを予防する効果があると推察した。

本研究の核心となる問いは，「アルツハイマー病理脳を併存する iNPH は髄液シャント介入による症状効果に差が生じるのか」である。アルツハイマー病（AD）病理とは，脳内への Aβ42 の蓄積（老人斑）および p-tau の沈着（神経原線維変化）を指している。

脳室拡大に加え，脳底槽やシルビウス裂のくも膜下腔の拡大，高位円蓋部および大脳縦裂のくも膜下腔の狭小化を示したくも膜下腔の不均衡な拡大を伴う水頭症（disproportionately enlarged subarachnoid-space hydrocephalus；DESH）の特徴的な画像診断と歩行障害を主とする神経症状により診断された iNPH 患者は，髄液シャント介入で80％以上に modified Rankin Scale（mRS）の改善が得られる。しかし裏を返せば，およそ 2 割の iNPH 患者がシャント介入後も mRS の改善が得られない我々は患者髄液中に含まれる AD 関連蛋白に着目し，J-ADNI 研究などで実績のある新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野にて，INNO-BIA

AlzBio3, xMAP® platform によるバイオマーカー測定値を用いて，改善群，非改善群に特徴的なバイオマーカー診断を確立する。AD 病理の併存に着目した新たなiNPHの重症度分類法を作成することが本研究の目的である。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

順天堂大学で iNPH 患者から採取された脳脊髄液（CSF）を新潟大学の Luminex/MesoScale で測定し，iNPH 患者 40 名，平均年齢 74.3(標準偏差 6.6)歳に対し髄液シャント術治療後の症状改善度に基づき，カットオフ値を検討する。AD 病理の併存で治療効果が乏しくなるとの仮説をたて，xMAP 測定値により髄液中のリン酸化タウ蛋白高値群をAD病理併存群（以下 AD (+)群）として同定する。先行研究よりAD 病理を併存する iNPH では p-tau 濃度のカットオフ値はおよそ 30pg/mL 前後となると予測している。

順天堂大学脳神経外科学教室の髄液バンクに保管される iNPH 患者のシャント前に検査で得られた髄液検体とシャント介入 1 年後，2 年後，3 年後の髄液検体を用いて，シャント介入による症状の改善度，経過中の機能予後を術前髄液のバイオマーカーから予測する後方視的研究である。

主要エンドポイントは治療介入 12，24，36ヶ月後の，認知機能評価（MMSE，FAB）で，日常生活自立度(mRS)の改善，iNPH grading scale の評価を副次エンドポイントとした。

本研究は順天堂大学医学部倫理委員会で審査を受けており，すでに承認を得たうえで実施している。対象者には研究の趣旨説明文書を配布し，研究の目的・プログラム内容と方法・調査内容と方法の説明，調査は匿名で行い個人情報は厳重に保護され，研究への参加は自由意志に基づき不参加によって何も不利益はないことを伝え，書面にて同意を得た上で研究に参加していただいている。

C. 研究結果

40名の iNPH 患者にてシャント介入前に採取された髄液を xMAP® platform を用いて測定した結果，p-tau と total tau は相関を認めたが，Aβ42 は測定値にばらつきがあり，有意な相関は得られなかった。解析結果，p-tau 値は術前の MMSE との相関はなく，術後 1 年以降の MMSE と有意に相関（R^2＝0.352，p＜0.001）し，術後経過が長期になるほど強い相関関係が示された。そこで AD 病理患者の長期予後の指標として p-tau のみを使用し，AD 病理併存患者のカットオフ値を p-tau 値 30pg/mL に設定し，2群間で比較解析した。iNPH 患者 40 名を p-tau 値で p-Tau≧30pg/mL，12 名（75.5 (5.7) 歳）と p-tau<30pg/mL，28 名（73. 7 (7.0)歳）に分類し，2 群間で年齢調整を行なった高 p-tau 群 11 名と低 p-tau 群 24 名で age matched control study を行なった。

結果，認知機能（MMSE, FAB）は，低 p-tau 群で術早期より改善が得られ，その後も維持されるのに対し，高 p-tau 群は，術後早期（3-6 か月）に改善が得られるものの，その後徐々に低下し，2 年後は術前より低下，3 年後両群間では統計学的有意差が生じた（MMSE，p=0.04; FAB，p=0.02)。また mRS においても低 p-tau 群は早期から改善が得られたのに対し，高 p-tau 群は，改善が得られるものの統計学的な有意差はなく，両群間で術後 2 年目以降，悪化する割合に有意差が生じた。歩行評価に関しては両群間で術後 3 か月から有意差が出現し，最も両群間の差が少ない排尿障害においても術後 3 年目には統計学的有意差が生じた。

D. 考察

髄液シャントは，患者の神経症状が低下するにつれて，外来で圧設定を下げて対応し，交通が保たれていることを常に確認されていた。ゆえに高 p-tau 群が一時期改善するにも関わらず，長期間の機能が維持されないのは，併存する神経変性疾患の進行によるものであると推察する。AD 病理像を併存した iNPH が，AD 病理の進行により 3 年後には症状が悪化したものと考えられる。今回の結果より，髄液シャント介入前の画像所見と歩行障害などに代表される症候のみの診断では，iNPH に対するシャント治療効果が長期継続するかを予測することはできず，従来の診断に加えて，術前の髄液測定値の情報は，長期予後予測に有用であることが判明した。

一方で iNPH の髄液バイオマーカーに関しては，アミロイドβ蛋白やタウ蛋白の細胞間質液から腰部くも膜下腔の髄液への移行あるいはクリアランスの障害を反映し，腰椎穿刺で得られる髄液のバイオマ

ーカーは髄液貯留や拡散障害など様々な影響を受けるため，アルツハイマー病理を確定する根拠とならないという意見もある。

E. 結論

iNPH 患者において，術前の髄液中 p-tau が高値(≧30pg/mL)である患者は，画像診断にて iNPH の典型的所見である DESH 所見を有していても，術後 3 か月，6 か月の時点では一時的な症状の改善が得られるが，1 年，2 年，3 年と経過年数とともに，明らかな activities of daily livin (ADL)の低下が認められ，とくに認知機能低下が著しいことが判明した。 一方，低値群 (p-tau< 30pg/mL)では，術後早期から改善が得られており，1 年後，2 年後も ADL を維持していた。3 年後も若干の ADL 低下が認められたものの，おおむね維持が確認された。初期の髄液中 p-tau 測定により，シャント術後3年後の iNPH 患者の MMSE を予測した。高 p-tau 群は AD 病理の併存を意味し，シャント治療効果は短期間に限定された。

本研究内容は，J Alzheimers Dis. 66 319-331. 2018, doi: 10.3233/JAD-180557 にて報告した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Madoka Nakajima, Masakazu Miyajima, Ikuko Ogino, Chihiro Akiba, Kaito Kawamura, Yoshinao Harada, Takeshi Hara, Hidenori Sugano, Kostadin Karagiozov, Takeshi Ikeuchi, Takahiko Tokuda, Hajime Arai: Early stage phosphorylated tau measurement of cerebrospinal fluid can predict cognitive function 3 years after shunt surgery in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. J Alzheimers Dis. 66 319-331. 2018, doi: 10.3233/JAD-180557 (IF 3.476)

2.学会発表

1. 中島 円，宮嶋雅一，秋葉ちひろ，新井 一: xMAP platform による術前髄液のリン酸化タウ蛋白測定は特発性正常圧水頭症患者のシャント術後3年後の認知機能を予測し得る。 日本脳神経外科学会第 77 回総会，仙台,12.Oct.2018

2. Madoka Nakajima, Masakazu Miyajima, Ikuko Ogino, Chihiro Akiba, Kaito Kawamura, Hajime Arai: Early stage p-tau measurement of cerebrospinal fluid can predict cognitive function 3 years after shunt surgery in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. Hydrocephalus 2018, Bologna, Itary, 21.Oct.2018

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む)

1. 特許取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

大脳皮質基底核変性症剖検例における臨床像の解明および臨床診断基準の妥当性検証～多施設共同研究～

Japanese validation study of consensus criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration ~multicenter study~ (J-VAC study)

研究代表者　饗場郁子[1)]

研究分担者　池内　健[2)]、小野寺　理[3)]、豊島靖子[4)]、柿田明美[4)]、高橋　均[4)]、下畑享良[5)]、吉田眞理[6)]、村山繁雄[7)]、徳丸阿耶[8)]、長谷川成人[9)]、矢部一郎[10)]、小森隆司[11)]、若林孝一[12)]、齋藤祐子[13)]、櫻井圭太[14)]、足立正[15)]、瀧川洋史[15)]、花島律子[15)]、中島健二[16)]、J-VAC study group

所属 [1)]国立病院機構東名古屋病院神経内科、[2)] 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学、[3)]同　神経内科、[4)]同　病理学、[5)]岐阜大学大学院　医学系研究科　神経内科・老年学分野、[6)]愛知医大加齢医科学研究所、[7)]東京都健康長寿医療センター神経内科･バイオリソースセンター･神経病理（高齢者ブレインバンク）、[8)]同　バイオリソースセンター、[8)]同　放射線診断科、[9)]東京都医学総合研究所　認知症・高次脳機能研究分野、[10)]北海道大学神経内科、[11)]東京都立神経病院検査科、[12)]弘前大学脳神経血管病態研究施設脳神経病理学講座、[13)]国立精神・神経医療研究センター臨床検査部、[14)]帝京大学放射線科学講座、[15)]鳥取大学脳神経医科学講座脳神経医科学講座脳神経内科学分野　[16)]国立病院機構松江医療センター神経内科

研究要旨

病理学的に大脳皮質基底核変性症(Corticobasal degeneration:CBD)と診断された症例において遺伝子・生化学・臨床像の中間解析を行った。わが国における CBD の発症年齢や罹病期間は欧米の報告とほぼ同等であった。わが国における CBD の最終臨床診断は CBD/CBS が 44%、進行性核上性麻痺 28%、アルツハイマー型認知症、前頭側頭型認知症が各々8%であった。臨床症候の出現頻度は、認知機能障害、遂行機能障害、歩行障害、パーキンソニズムが多く、失行をはじめとする CBS の特徴は少なかった。Armstrong 基準の感度は、診察時 43%、全経過 63%であった。今後中央病理診断、遺伝子、生化学解析の結果を合わせ、最終的な検討対象例を絞り込み、解析を行う予定である。

A.研究目的

大脳皮質基底核変性症 (Corticobasal degeneration:CBD)の臨床症候は多彩で、大脳皮質基底核症候群(corticobasal syndrome:CBS)は一部に過ぎず、さまざまな臨床像をとることが明らかにされた。そのため CBD の生前診断率はきわめて低い。2013 年に Armstrong らにより CBD の新しい臨床診断基準(Armstrong 基準)が提案されたが、その後の validation study によれば、感度・特異度は高くないことが示されている。わが国の CBD 患者の臨床像を多施設共同で明らかにするとともに、CBD と臨床診断した例の背景病理を検討することにより Armstrong 基準の感度および特異度を検討し、CBD に陽性的中率の高い臨床所見を抽出し、より精度の高い臨床診断基準を作成することを目標とする。本年度は、病理学的に CBD と診断された症例の臨床像を明らかにすることを目的とする。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

対象は病理診断にて CBD と診断され、遺伝子および生化学的解析にて CBD であることが確認された症例。中央病理診断を行う研究機関（弘前大学、都立神経病院、国立精神・神経医療研究センター）では、独立して年齢・性別のみの情報を基に、病理学的に CBD の診断基準（Dickson et al. 2002）を満たすかどうかを確認する。新潟大学にて *MAPT* 変異の有無を、東京都医学総合研究所にてウエスタンブロット(WT)法等を用いて蓄積タウのバンドパターン

が CBD に合致するかを検討する。また診療録から性別、発症年齢、死亡時年齢、初期の診断名、最終臨床診断名、発症時の症候、診療科、CBD Armstrong 診断基準の項目、CBS 改訂ケンブリッジ基準の項目、NINDS-SPSP の項目などを後方視的に調査するとともに、保管されているMRIを東京都健康長寿医療センター、名古屋市立大学へ送付し、神経放射線科医が萎縮の有無・部位、異常信号の有無などについて、性別・年齢のみの情報をもとに、客観的評価を行う。Armstrong 基準における各臨床病型の割合を調べ、感度を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究を実施する。個人を特定できる個人情報は収集しない。対応表は各研究機関に保管し、他の研究機関へは提供しない。本研究のデータは施錠可能な部屋（東名古屋病院神経内科医局）の中に保管される。

平成 27 年 9 月 14 日国立病院機構東名古屋病院倫理委員会に申請し、承認された。本研究で扱う既存試料・情報の使用について、ご遺族から本研究に関する再同意をいただくことは困難であるため、再同意の手続きは行わない。そのため、ご遺族からの問い合わせの機会及び既存試料・情報の研究への利用を拒否する機会を保障するために、平成 27 年 10 月 29 日ホームページ上で本研究の内容を公開した。

C.研究結果

現時点で把握している CBD 病理診断例 78 名のうち、凍結あり症例は 39 例で、発症時平均年齢 65.0 歳、死亡時平均年齢 72.8 歳、平均罹病期間 7.6 年であった。この中から情報が得られた症例について中間解析を行った。

(1) 遺伝子(*MAPT*)解析 (n=32)

解析を行った 32 検体の中で Benign polymorphism が 8 家系で見いだされた。FTDP-17 の 1 家系でベルギーから報告のある pathogenic mutation が 1 例で認められた。

(2) 生化学解析 (n=36)

36 名中 32 名は生化学的に CBD として矛盾なしと判断された。CBD の特徴(37kD)を有するが、アルツハイマー病に類似した特徴もあり判断が難しい例が 1 例、PSP パターンを示す例が 1 例、バンドが検出されなかった症例を 2 例認めた。

(3) 病理中央診断

3 症例中央病理診断が完了し、残りの症例について確認作業中。全症例の検討が終了した時点で、問題症例を審議する予定である。

(4) 臨床像（n=35）

CBD の生前臨床診断名は CBD/CBS が 44%、進行性核上性麻痺 (progressive spranuclear palsy:PSP) 28%、アルツハイマー型認知症 8%、前頭側頭型認知症 (FTD)8%、レヴィ—小体病 6%であった。CBD の初期診断で最も多いのは CBD/CBS、PSP で各々19%、ついでレヴィー小体病（PD14%、Dementia with Lewy body3%)が 17%であったが、その他アルツハイマー型認知症 8%、FTD6%、認知症 6%など多岐にわたっていた。

Armstrong 基準における臨床病型の割合（診察時/全経過）は、probable CBS 3%/4%、possible CBS 33%/44%、Frontal behavioral-spatial syndrome(FBS) 50%/68%、non-fluent /agrammatic varant of primary progressive aphasia(naPPA) 7%/21%、progressive supranuclear palsy syndrome (PSPS) 45%/86%であった。また probable sporadic CBD の感度は 43%/63%、possible CBD の感度は 67%/67%であった。

D.考察

わが国における CBD の発症年齢や罹病期間は欧米の報告とほぼ同等であった。また CBD の臨床病型は CBD、PSP は欧米よりやや多く、FTD が少なく、失語が主となるタイプはなかった。Armstrong 基準で臨床病型に加えられなかった AD-like dementia はわが国でも 8%存在していた。初期診断名は欧米に比べ CBD が少なく、PSP、レヴィ—小体病と初期診断されている割合が多かった。これは、今回の参加施設は神経内科が多いことに起因すると考えられた。症候の出現時期は、PSP の経過と似ているが、CBD では異常行動が早期に出現していた。

Armstrong 基準の感度は欧米の報告と同等であり、臨床病型は欧米に比べ PSPS が多く、FBS は同等で、CBS、naPPA が少なかった。

E.結論

わが国における CBD 病理診断例の臨床症候 35 例、遺伝子 34 例、生化学 36 例の解析結果の中間解析結果を報告した。CBD 病理診断例の生前診断率は 44%で、全般性認知機能障害、歩行障害、パーキンソニズムを高頻度に認め、失行を初めとする CBS の特徴や左右差は少なかった。Armstrong 基準の感度は、診察時 43%、全経過 63%で欧米と同等であった。中央病理診断

評価、遺伝子、生化学解析の結果より、コンセンサスミーティングで最終的な対象症例を抽出予定である。

F.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

・I. Aiba, T. Shimohata, S. Murayama, K. Hasegawa, Y. Iwasaki, O. Yokota, H. Fujimura, M. Sakai, T. Yokota, I. Yabe, H. Takigawa, K. Sugaya, K. Mori, M. Ito, C. Ishida, M. Kobayashi, Y. Hashizume, T. Ikeuchi, M. Hasegawa, M. Yoshida, T. Komori, K. Wakabayashi, Y. Saito, A. Tokumaru, K. Sakurai, K. Nakashima. Clinical features and natural history of pathologically-confirmed corticobasal degeneration:A Japanese validation study of CBD (J-VAC study). International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (Hong Kong) 2018.10.7

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

Boron neutron capture therapy (BNCT)が播種・浸潤に及ぼす効果の検討

研究代表者　近藤　夏子 1)
研究分担者　棗田　学 2)，藤井　幸彦 2)

1) 京都大学複合原子力科学研究所　粒子線腫瘍学　2) 新潟大学脳研究所 脳神経外科教室

研究要旨

膠芽腫は予後が極めて悪く、再発は必発である。その再発形式は局所再発が 80%以上である。一方、ホウ素中性子補足療法(Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)はホウ素を取り込んだ腫瘍細胞に中性子が照射されると、ホウ素と中性子が反応しアルファ粒子とリチウム反跳核が発生する。これらは細胞 1 個分のごく短い飛程の高 Linear Energy Transfer(LET)放射線で腫瘍細胞を選択的に破壊・死滅させる。我々は BNCT を再発膠芽腫患者に対して行い、予後を延長してきた。しかし、BNCT 後再発することを防げていない。再発の特徴として、標準治療に比べて、脳脊髄液播種の形式が多かった。脳脊髄液播種は、BNCT が誘引したのか、または腫瘍の特徴であるのかは明らかではない。今回、我々は細胞間コミュニケーションツールとして注目されている、細胞外小胞の中の exosome がBNCT 後の脳脊髄液播種に関係があると仮定し、BNCT 後の播種と関係があるかを調べることにした。今年度は exosome を超遠心機で抽出する手法を行ったが、うまくいかなかった。来年度は方法を替えて進めていく。

A.研究目的

膠芽腫は手術・化学放射線療法を用いても生命予後は極めて悪く 15 か月~18 か月である。通常は局所再発が 80%以上であるが、細胞選択的高 LET 放射線治療であるホウ素中性子捕捉療法（BNCT）によって腫瘍の局所制御の向上が可能となってきた。しかし脳脊髄液腔播種を防ぐことができず最大の死因(37.5%)となっている。本研究では膠芽腫の放射線治療後に生じる脳脊髄液腔播種に関するメカニズムを、exosome を調べることで明らかにする。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

１．膠芽腫細胞を放射線（X 線または BNCT）照射後、細胞培養液中に含まれる exosome を抽出、LC-MS でタンパクを解析し、非照射群と比較する。さらに非照射でも播種する cell line（NGT-41 または GBM1）についても非照射・照射群について同様に調べる。

２．Exosome を照射されていない膠芽腫細胞、NGT-41 または GBM1 培養液中に添加して遊走能が亢進するかどうかを in vitro で調べる。

３．照射されていない膠芽腫細胞 NGT-41、GBM1 を移植した脳腫瘍モデルの slice culture に exosome を添加して遊走・播種が亢進するかどうかを顕微鏡下で調べる。

C.研究結果

膠芽腫細胞 U87MG の非照射コントロール群の exososome を、超遠心機を用いて、培地中から回収することができた。しかし、照射群の培地中から exosome を回収することができなかった。

D.考察

照射群は細胞周期停止となり、増殖していないために、細胞数が少なかった。そのために非照射群と比べて exosome を回収することが困難

であったと考えられる。超遠心機を用いて回収するよりも市販のキットを使って回収する方法に変更する予定である。

E.結論

今年度はexosomeの回収プロトコールを確立することができなかった。来年度は方法を改善し研究を進めていく。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

なし。

2.学会発表

なし。

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

RNA-seq解析を用いるがん性疼痛と難治性神経障害性疼痛に関連する分子の探索・同定

研究代表者　伊藤　誠二[1)]
研究分担者　池内　健[2)]、原　範和[2)]、松村　伸治[3)]、
片野　泰代[3)]、船津　宣雄[3)]、稲田　有史[4)]

[1)]大阪医科大学麻酔科学教室、[2)]新潟大学脳研究所、[3)]関西医科大学医化学講座、[4)]稲田病院

研究要旨

触るだけで失神するほど激しい神経障害性疼痛患者の治療として行われた手術の摘出標本の 13 か所から採取した神経、皮膚を含む組織からRNAを抽出し、RNA-seq解析を行った。RNA-seqライブラリーは総じて問題なく、シークエンスも良好に行えた。皮膚と神経組織間では発現プロファイルが大きく異なり、数百の遺伝子の変動が見られた。しかし、期待した神経支配の異なるサンプル間の発現変動解析はn=1なので、統計的有意差を見出すのは難しかった。

A.研究目的

本研究では、難治性末梢神経障害性疼痛患者の治療において採取される手術摘出標本及びがん性疼痛マウスモデルの脊髄や末梢神経のRNA-Seq解析より新規疼痛関連分子を同定することを目的とする。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

難治性末梢神経障害性疼痛患者の治療において採取された手術摘出標本から、RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行い、疼痛関連分子の探索を行った。なお、本研究は稲田病院及び関西医科大学医学倫理委員会の承認を得ている。

C.研究結果

左尺骨骨折後難治性末梢神経障害性疼痛を発症した患者の手術摘出標本の 13 か所から採取した神経、皮膚を含む組織からRNAを抽出し、RNA-seq を行った。RNA-seq ライブラリーは総じて問題なく、シークエンスも良好に行えた。主成分分析の結果から、皮膚と神経組織の間では発現プロファイルが大きく異なっており、数百の遺伝子の変動が見られた。期待した神経支配の異なるサンプル間の発現変動解析は n=1 なので、統計的有意差を見出すのは難しかった。正常皮膚と障害部位の皮膚での遺伝子発現には明確な違いが認められた。

障害部位の皮膚の組織染色は正常部位の皮膚との構造的な変化は見られなかった。

D.考察

左尺骨骨折後のカウザルギーの患者で、治療時に左手を触るだけで失神するほどの激しい痛みを伴うため、手術摘出が実施された。手には尺骨神経、正中神経、橈骨神経により支配されているので、尺骨と橈骨支配領域で遺伝子発現に違いがみられると期待したが、手根管から先の神経の分枝、骨折後6年間経過しており、この間に神経支配の再構築された可能性がある。末梢神経の細胞体は脊柱内の後根神経節にあるので、後根神経節から末梢神経に輸送されるRNA が微量であると考えると、研究デザインに限界があるように思われた。

E.結論

激しい神経障害性疼痛を伴う患者サンプルは

貴重であるが、動物モデルのサンプルを用いてRNA-seq解析を行うことが理にかなっている。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表 (掲載誌名・巻号・頁・発行年を記入し,

1. Katano T, Takao K, Abe M, Yamazaki M, Watanabe M, Miyakawa T, Sakimura K, Ito S. Distribution of Caskin1 protein and phenotypic characterization of its knockout mice using a comprehensive behavioral test battery. Mol Brain 11(1):63, 2018.

2. Harada M, Minami T, Ito S, Okuda-Ashitaka E. Development of a novel photoaffinity probe for labeling nocistatin receptor. Biochem Biophys Res Commun 501(2):514-519, 2018.

3. Uchida H, Matsumura S, Katano T, Watanabe M, Schlossmann J, Ito S. Two isoforms of cyclic GMP-dependent kinase-I exhibit distinct expression patterns in the adult mouse dorsal root ganglion. Mol Pain 14:1-11, 2018.

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

複合現実デバイスを装着した術者視界への高分解能機能的 MRI データの付加

研究代表者　近山　英輔 1)
研究分担者　鈴木　清隆 2)

1) 新潟国際情報大学情報システム学科　2) 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター

研究要旨

患者頭部に fMRI 画像を固定表示して、術者のハンドジェスチャーにより、その画像を術者視界内で操作する、複合現実デバイス Microsoft HoloLens 上で稼働する Windows アプリを開発することを目的とする。術者を想定した HoloLens 装着者が移動しても、MRI データを仰臥位患者の頭部に固定して表示することを目指した。Windows アプリの開発は Microsoft Visual Studio を用いて、C++/CX 言語、DirectX ライブラリ、HLSL 言語を用いて行った。T1 強調画像はレイキャスティング法、MRA 画像は MIP 法によるボリュームレンダリングアルゴリズムを実装した。その結果、仰臥位患者頭部を想定した 3D プリント頭部モデルに MRA 画像を固定表示できた。また、ハンドジャスチャーの非接触操作による、脳画像の位置調整機能を試験的に実装した。

A. 研究目的

患者頭部に fMRI 画像を固定表示して、術者のハンドジェスチャーにより、その画像を術者視界内で操作する、Microsoft HoloLens 上で稼働する Windows アプリを開発することを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

MR（複合現実、Mixed Reality）デバイスとして Microsoft HoloLens(図 1)を用いた。HoloLens は赤外線の適宜照射により周辺地形を 3 次元（3D）認識し、その認識空間内に 3D のコンピュータ画像（CG）を重ねることができるため、術者が移動しても、MRI データを仰臥位患者の頭部に固定して表示できる利点がある（図 2)。

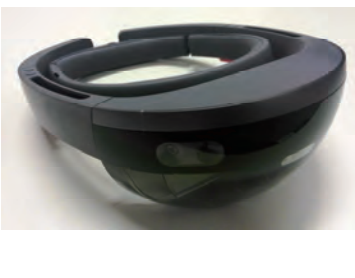


図 1 Microsoft HoloLens

Windows アプリの開発は Microsoft Visual Studio（図 3）を用いた。C++/CX 言語を用いた Universal Windows Platform アプリである。3DCG 部分は DirectX11 を使用し、High Level Shading Language（HLSL）を用いてレンダリング部分を開発した。T1 強調／fMRI 画像用はレイキャスティング法、MRA 画像用は MIP（Maximum Intensity Projection、最大値投影）法によるボリュームレンダリングアルゴリズムを実装した。また、ハンドジャスチャーの非接触操作による、脳画像の位置調整機能を試験的に実装した。

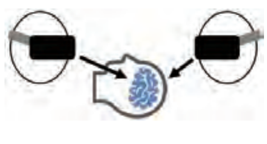


図 2 術者視点を変更しても 3DCG が空間固定され現実物体に重ね合わせることが可能になる。

T1 強調／fMRI 画像、MRA 画像を可視化できるコードを実装した。T1 強調画像（仮想データ）は BrainWeb（http://insight-journal.org/midas/collection/view/28、マギル大）custom MRI simulation から取得した（181x217x181）。MRA データは Designed Database of MR Brain Images of Healthy Volunteers（http://insight-journal.org/midas/collection/view/40）の Normal001-MRA.mha を使用した（266x344x128）。また、複合現実画像の投影のために頭部モデルの STL データを取得し、3D プリンターで印刷した。3D プリンターは LultzBot Taz5 を使用した。

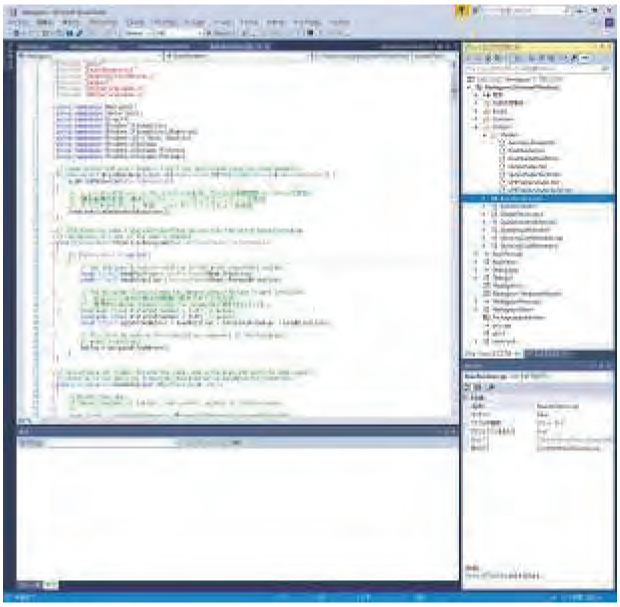


図 3 Microsoft Visual Studio

C. 研究結果

本研究で開発した T1 強調画像の複合現実可視化アプリの実行結果を示す（図 4-7）。Microsoft HoloLens では準透明メガネ型部品を通して現実の視界が通常的に装着者の目に入る。そこで HoloLens が生成した 3DCG がレーザーで目に投射されるため、装着者は現実の視界に 3DCG が融合した視界を得る。図 4 は装着者のアプリ使用中に録画機能を使用して記録した動画のスクリーンショットである。HoloLens を起動すると図のようにメニューが出現する。図 5 は T1 強調画像可視化アプリを起動して表示した図である。この画像は空間に固定されて表示されるため、HoloLens 装着者が徒歩等で移動すると実際の物体がそこにあるように 3DCG の角度が変化して表示される。図 6、図 7 は視点を移動して異なる立ち位置から見たスクリーンショットである。

図 8-10 は 3D プリンターで印刷した頭部モデルを机上に設置して、MRA 画像可視化アプリで視界に重ね合わせたときのスクリーンショットである。装着者が術者であると仮定すると、術者の視点が移動しても MRA 画像が頭部モデルに固定された。

図 4 HoloLens 起動時の装着者からの視界。右下は装着者の指、背景は撮像時の部屋にあったロッカー。

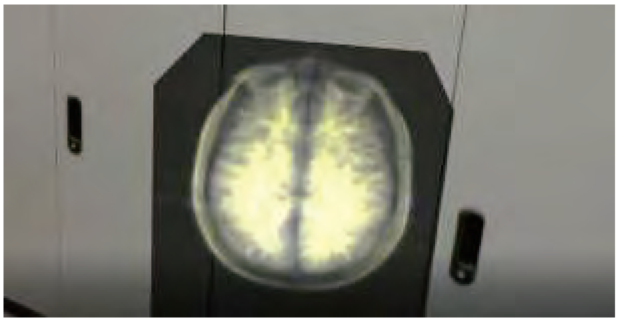


図 5 T1 強調画像可視化アプリ起動後にボリュームレンダリングされた状態。T1 強調画像は宙に浮いた状態にある。ボリュームレンダリングは一瞬で行われ、1 秒間に数十回再描画される。それによりデバイスの位置が変わっても適切な角度から見た 3DCG が視界に得られる。装着者の実際の視界では黒いボックス部分は透明であるが、HoloLens 視界の動画記録時に劣化してしまう仕様になっている。

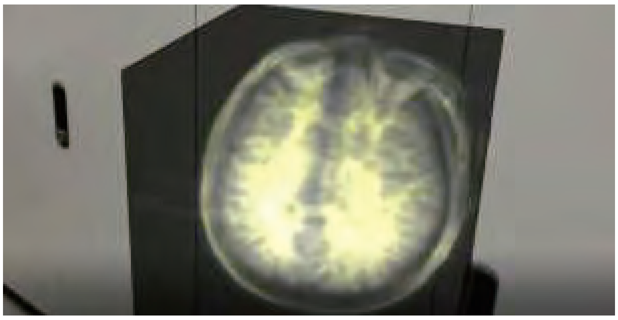


図 6 少し画像に近いて異なる角度から見た場合

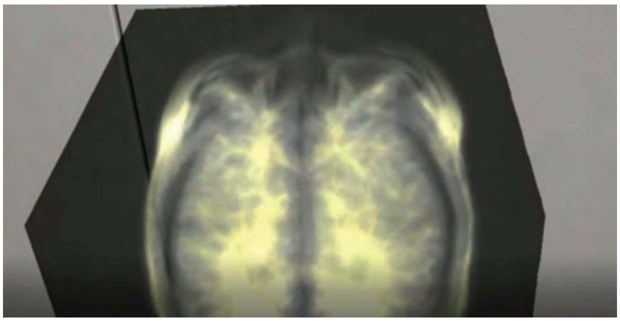


図 7 さらに近づいた場合

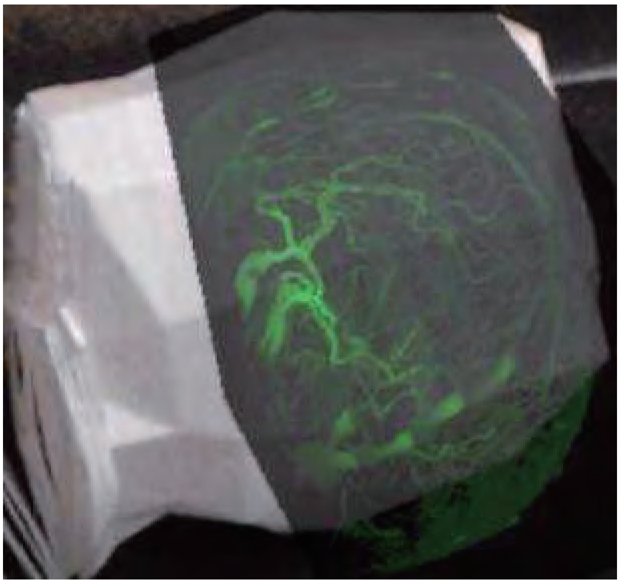


図 8 MRA 画像可視化アプリ起動後に 3D プリント頭部モデルへ描画位置を調整した写真。

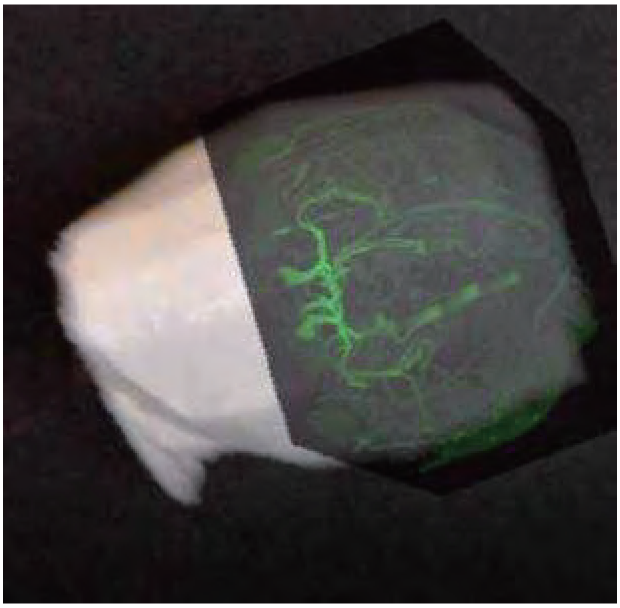


図 9 少し上面から覗くように立ち位置を移動

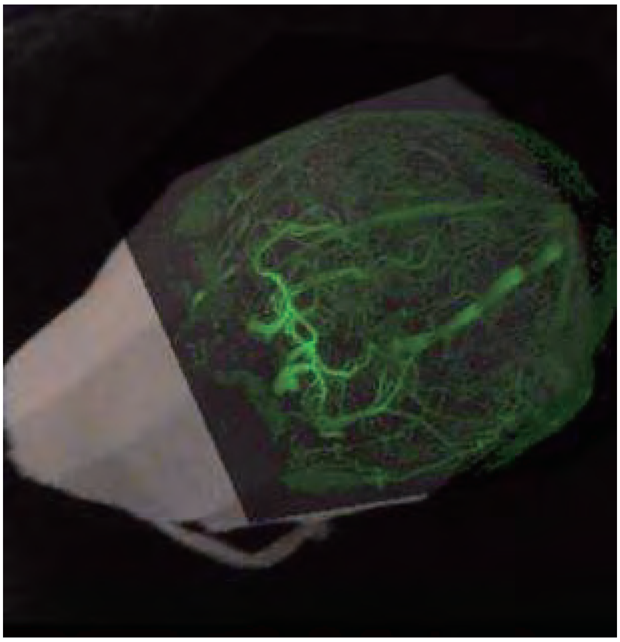


図 10 さらに少し移動

D. 考察

今回開発した Microsoft HoloLens 上で稼働する MRI 画像可視化アプリはプロトタイプであるものの、MRI 画像を複合現実空間に固定してボリュームレンダリングできることが確認できた。ボリュームレンダリングは一瞬で行われるため、術者の視点移動に伴って 3DCG も書き換えられ、現実の物体に追随して見えた。また、3DCG の出現位置を装着者のハンドジェスチャーを HoloLens が認識して調整する機能の実現も確認できた。これらのことより、術者が施術中にモニタと術部を交互に見る必要がなく、術部に集中しながら、かつ視点変更、立ち位置の移動ができ、ハンドジェスチャー等の非接触操作で、3DCG 表示の変更もできる、従来の AR 利用手術支援システム等で CG が施術を妨害する問題の解決になることが示唆された。一方で、今回のプロトタイプでは、術部へのレジストレーションなどを行っていないため、視点の移動情報は専ら HoloLens のセンサーが検知した移動情報

と精度に依存している。そのため装着者の移動に対して微妙な誤差が蓄積する傾向があったり、突然 HoloLens が空間情報を失い、3DCG が消失したりすることがわかった。そのような場合に現実の物体映像にレジストレーションして空間位置表示精度を維持するような機能が今後の課題になる。

今回 fMRI 画像の表示を目的にしていたが、統計解析を進めて 3 次元解剖画像に重ね合わせる統計マップの作製を完成させることができなかった。しかし、MRI 画像データとしては同じファイルフォーマットで可能であるため、このアプリを用いて、T1 強調画像や MRA 画像のように複合現実空間内に表示することが可能であることを示すことができたものと考える。

E. 結論

患者頭部の 3D 模型に T1 強調画像、MRA 画像、fMRI 画像等を固定表示する Microsoft HoloLens 上で稼働する Windows アプリを試作できた。また、HoloLens 装着者（術者を想定）のハンドジェスチャーにより、その画像を術者視界内で操作する部分に関しては簡易的な位置調整のみを実装した。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

付録：

T1 強調画像アプリ用ピクセルシェーダー（レイキャスティング法）の HLSL コード

```
Texture3D <float4> t: register(t0);

// Per-pixel color data passed through the
pixel shader.
struct PixelShaderInput
{
	min16float4 pos   : SV_POSITION;
	min16float3 color : COLOR0;
	min16float3 norm   : NORMAL;
	min16float3 tex   : WDGYU;
	min16float3 abab   : ABAB;
;

// The pixel shader passes through the color
data. The color data from
// is interpolated and assigned to a pixel at
the rasterization step.
min16float4 main(PixelShaderInput input) :
SV_TARGET
{


	uint w, h, d;
	t.GetDimensions(w, h, d);

	float4 tval;

	// (x, y, z, miplevel)
	float4 dr = float4(input.abab.x * w,
input.abab.y * h, input.abab.z * d, 0);
	float4 loc = float4(input.tex.x * w,
input.tex.y * h, input.tex.z * d, 0) *
0.999999;

	// 積算する場合
	tval = t.Load(loc) * 0.015;

	float tvalx = tval.x;
	float tvaly = tval.y;
	float tvalz = tval.z;
	for (uint i = 0; i < 200/*120*/; i++)
{
		loc += dr;
		float4      newTval      =
t.Load(loc);

		// lay cast
		tvalx += newTval.x * 0.016;
```

```
			tvaly += newTval.y * 0.016;
			tvalz += newTval.z * 0.016;
		}
//	tval = float4(tvalx, tvaly, tvalz, 1);
	tval = float4(tvalx * 0.2f, tvaly, tvalz * 0.2f, 1);

	return (min16float4)tval;
}
```

MRA 画像アプリ用ピクセルシェーダー (MIP 法) の HLSL コード

```
Texture3D <float4> t: register(t0);

//static float aaa = 0;

// Per-pixel color data passed through the pixel shader.
struct PixelShaderInput
{
	min16float4 pos   : SV_POSITION;
	min16float3 color : COLOR0;
	min16float3 norm   : NORMAL;
	min16float3 tex   : WDGYU;
	min16float3 abab   : ABAB;
};

// The pixel shader passes through the color data. The color data from
// is interpolated and assigned to a pixel at the rasterization step.
min16float4 main(PixelShaderInput input) : SV_TARGET
{

	uint w, h, d;
	t.GetDimensions(w, h, d);

	float4 tval;

	// (x, y, z, miplevel)
	float4 dr = float4(input.abab.x * w, input.abab.y * h, input.abab.z * d, 0);
	float4 loc = float4(input.tex.x * w, input.tex.y * h, input.tex.z * d, 0) * 0.999999;

	// MIP
	tval = t.Load(loc);

	float tvalx = tval.x;
	float tvaly = tval.y;
	float tvalz = tval.z;
	for (uint i = 0; i < 200/*120*/; i++)
{
		loc += dr;
		float4 newTval = t.Load(loc);

		//	maximum intensity projection
		if (newTval.x > tvalx) {
			tvalx = newTval.x;
		}
		if (newTval.y > tvaly) {
			tvaly = newTval.y;
		}
		if (newTval.z > tvalz) {
			tvalz = newTval.z;
		}

	}
//	tval = float4(tvalx, tvaly, tvalz, 1);
	tval = float4(tvalx * 0.2f, tvaly, tvalz * 0.2f, 1);

	return (min16float4)tval;
}
```

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

百寿者から同定した長寿関連遺伝因子の認知症患者での解析

研究代表者　岡野　栄之[1)]
研究分担者　佐々木　貴史[1)]　池内　健[2)]

1) 慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター　2) 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野

研究要旨

最近の解析により認知症でもレアバリアント変異の関与が明らかになってきた。慶應義塾大学医学部百寿総合研究センターで解読した百寿者全ゲノムDNA配列と新潟大学脳研究所で解読した認知症患者のDNA配列データとの認知症関連遺伝子でのレアバリアント解析を比較し認知症関連遺伝因子候補の同定を試みた。その結果、既にレアバリアント変異が認知症に関与すると報告されている2遺伝子で、百寿者と認知症患者でレアバリアント数や変異部位に差があることが明らかになった。

A. 研究目的

日本は超高齢化社会に突入し、今後もさらに深刻化していくことが予想される。超高齢化社会の問題の一つは、平均寿命と健康寿命の差である"健康ではない期間"に必要な介護の人的及び資金的負担である。そこで健康寿命を延伸し"健康ではない期間"を短くすることが、個々のQOL上昇と負担抑制につながると考えられる。慶應義塾大学医学部百寿総合研究センターでは、百寿者を中心とした高齢者の研究を進めており、特に110歳以上のスーパーセンチナリアン(SSC)に関して世界最大級のバイオリソースを有している。SSCを含む百寿者の全ゲノム解読を行った結果、アルツハイマー型認知症(AD)の既知遺伝性リスク因子APOEε4を保因する百寿者が非常に少なく、認知症のアンチリスク集団であることが明らかになった。

そこで本研究では、新潟大学脳研究所で解読した認知症患者のDNA配列データとの認知症関連遺伝子でのレアバリアント解析を比較し、百寿者から抗認知症遺伝因子候補を認知症患者からは認知症関連遺伝因子候補の同定を試みた。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

認知症関連レアバリアント候補を抽出するために、既知認知症関連40遺伝子を選択した。百寿者全ゲノムデータ及び認知症患者のエクソームデータから、40遺伝子のコーディング領域に存在する全多型の頻度情報を抽出し、各多型の頻度情報の比較を行った。百寿者全ゲノムデータはbwaプログラムを用いてfastqデータをヒトゲノム配列(hs37d5)にマッピングを行った。マッピングデータはGATKツールを用いて修正後、SnpEff及びSnpSiftプログラムを用いてアノテーション、頻度情報を付加した。レアバリアントを抽出するために、データベースでのMAFが1.0%以下の多型を抽出し、百寿者既知認知症関連40遺伝子レアバリアント候補とした。認知症患者でのレアバリアント候補の抽出は、研究分担者の池内に依頼した。また、一般集団での既知認知症関連40遺伝子レアバリアントの解析を行うため、東北メディカル・メガバンクの公開データを利用した。

得られた多型情報及びレアバリアント情報は必要に応じてTaqman Probeを用いた遺伝型決定法、もしくは周辺領域を含めたgDNA配列を解読するSanger法で確認を行った。

C. 研究結果

百寿者全ゲノムデータから既知認知症関連40遺伝子に存在する全バリアントを同定し、その中

からレアバリアント(東北メディカルメガバンクデータベース MAF ≤ 0.01)を抽出した。その中から、新潟大認知症患者から抽出した遺伝子とレアバリアント数が異なる変異を抽出したところ、欧州認知症コホートでレアバリアントが多く同定されている *SORL1* が検出された。そこで同様に認知症患者でのレアバリアントの集積が同定されている *ABCA7* 遺伝子の解析も行った。*ABCA7* 遺伝子と *SORL1* 遺伝子のレアバリアントを比較したところ、百寿者と認知症患者ではほとんど一致せず、特に認知症患者から同定されたレアバリアントの殆どがデータベースに登録されていない新規のレアバリアントであった。

D. 考察

既知認知症関連 40 遺伝子に対するレアバリアント解析から、*SORL1, ABCA7* に認知症患者で多くの未知レアバリアントが存在し、百寿者ではレアバリアント比率は少ないことが明らかになった。認知症患者から同定されたレアバリアントの一つ一つのタンパク質機能に対する影響を測定することは難しいことからレアバリアントの意義付けをすることは難しいものの、予測プログラムでは、多くのレアバリアントがタンパク質機能に大きく影響を与えると評価されることから、これらの遺伝子のレアバリアントが認知機能へ影響を及ぼしている可能性が高いと考えられた。

E. 結論

百寿者全ゲノム DNA 配列と認知症患者の DNA 配列データとの認知症関連遺伝子でのレアバリアント解析の結果、既にレアバリアント変異が認知症に関与すると報告されている 2 遺伝子で、百寿者と認知症患者でレアバリアント数や変異部位に差があることが明らかになった。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Gut microbiota の制御が脳虚血病巣進展に及ぼす影響

研究代表者 西山 康裕 [1)]
研究分担者 五十嵐 博中 [2)]

1）日本医科大学付属病院 脳神経内科 2）新潟大学脳研究所

研究要旨

脳梗塞における組織炎症に免疫系が大きく関与していることが解明されつつある。この免疫系の制御に重要な役割を果たしている機構の一つに腸管免疫を修飾する Gut microbiota（腸内細菌叢）があるが、現時点において microbiota の制御により脳梗塞病巣の進展が変化する可能性についての研究はなされていない。本研究では、抗生物質を2週間経口投与した後に脳虚血モデルを作成し、24時間後の脳梗塞サイズおよび神経スコアを検証した。結果は、vehicle 群と抗生物質投与群の間にいずれも有意な差を認めなかったが、梗塞サイズの検討では vehicle 群が健常側比 48.5%であるのに対して、抗生物質投与群では 57.8%と 19.0%の梗塞サイズ拡大を認めている。本実験系では虚血後急性期に観察した梗塞サイズにおいては、両群での差が有意とならなかったものの、脳内に侵入した免疫担当細胞がさらに活性化する72時間以降での現象を検討することが必要であると考えている。

A. 研究目的

近年脳梗塞の研究分野において、脳梗塞後の組織炎症に免疫系が大きく関与している可能性が報告されている。一方で、この免疫系の制御に重要な役割を果たしているのが、腸管免疫を修飾する Gut microbiota である。本研究は腸管免疫と急性期脳梗塞における炎症の関連を明らかにし、解明することが目的である。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

日本医科大学動物実験規程に基づき、脳梗塞モデルとして、８週から１０週齢の C57BL/6J マウスを用いて、総頸動脈からシリコンコートした塞栓糸を挿入して中大脳動脈内を閉塞し、４５分後に塞栓糸を抜去し、急性脳梗塞モデルとした(中大脳動脈閉塞術(MCAO モデル))。Li らの報告(Immunity.2015;43:527)に基づき抗生物質の混合含有水投与を行う。具体的には Ampicillin(1g/L), Neomycin(1g/L), Vancomycin(0.5g/L), Metronidazole(0.25g/L)を飲料水に溶解し、１４日間投与を続けた。①と同様に脳梗塞モデルで抗生物質投与の有無により、腸管免疫担当細胞を解析した。脳梗塞については、同様に２４時間後、７２時間後に解析した。TTC 染色を行い、TTC 染色で染色されない梗塞巣を両群間で比較した。このとき、皮質領域、基底核領域については各々測定した。また、同時に脳浮腫率も測定した。さらに、脳虚血前および２４時間後、７２時間後に神経学的スコアを計測し、両群間で比較した。なお、脳浮腫率は脳浮腫率（%）＝〔虚血半球－対側半球〕×１００／対側半球で計算した。

C. 研究結果

１．平均の飲水量は両群ともに一日 6mL で有意差を認めなかった。
２．抗生物質投与１４日間でマウスの体調に変化は認めず、死亡例はなかった。
３．虚血後２４時間の梗塞サイズにおいて、健常側比にて皮質、基底核および全脳いずれにお

いても vehicle 群と抗生物質投与群に統計学的有意差を認めなかった（皮質；32.01±4.73 vs 37.1±7.01％of control, respectively, n=10)（基底核；16.53±3.79 vs 20.6±6.14% of control)(全脳;48.54±5.70 vs 57.80±12.49％ of control)。脳浮腫率においても、両群間で有意差を認めなかった。

４．虚血後 72 時間の梗塞サイズにおいて、健常側比にて皮質および全脳において vehicle 群と抗生物質投与群に統計学的有意差を認めた（皮質；34.88±9.36 vs 22.6±12.21％of control, respectively, n=6)（基底核；22.24±5.51 vs 17.41±4.42% of control)(全脳；57.12±13.22 vs 40.03±13.98％of control)。脳浮腫率においては両群間で有意差を認めなかった。

D.考察

食物等を介して多数の異物が侵入する腸管は体内で最も大きなリンパ器官の一つであり、侵入異物の監視役を演じているものと推察される。腸管粘膜には全末梢リンパ球の６割、抗体産生性Ｂ細胞の８割が集結すると言われ、腸管上皮細胞や腸管上皮細胞間Ｔリンパ球（intestinal intraepithelial lymphocytes: IEL）が恒常的あるいは感染などの刺激に反応してサイトカインを発現している。

これらの粘膜免疫は消化管内だけではなく、全身の免疫システム制御に影響すると注目されている。一旦バランスが乱れた状態になると、全身の免疫系を過剰に活性化して自己免疫疾患などの炎症を悪化させることがわかっている。実際に我々はＢ細胞を欠損するマウスに腸管上皮細胞の再生速度が著しく亢進することを発見した(Nishiyama Y et al. *J Immunol* 2002)が、この現象は広域スペクトルを持つ抗生物質を経口投与することにより正常化されることがわかった。すなわち、腸内細菌叢の変化が恒常性に変化を与えることが明らかとなった。

一方､脳梗塞は近年､組織炎症の一つであり、免疫系が大きく関与している可能性があるとの報告が相次いでおり、腸内細菌叢の変化が脳虚血のシステムに関連するかに注目した。抗生物質を２週間経口投与した後に脳虚血モデルを作成し、２４時間後の脳梗塞サイズおよび神経スコアを検証した結果は、vehicle 群と抗生物質投与群の間にいずれも有意な差を認めなかった。しかしながら、７２時間後の評価では、抗生物質を投与した群で梗塞サイズ縮小を認めた。本実験系は薬剤投与や遺伝子操作を加えた実験などによる特定の分子を標的とした実験系ではないため、虚血後急性期に観察した梗塞サイズにおいては、両群での差が有意とならなかったものの、脳内に侵入した免疫担当細胞がさらに活性化する７２時間で有意な差となって現れた。このことから、急性期に侵入する好中球ではなく、その後侵入する単球などの免疫担当細胞が影響している可能性がある。この差を見いだす免疫担当細胞および放出するサイトカインなどを検証し、分子生物学的アプローチにより、さらに病態を解明していくことが可能であると考えている。

E.結論

１．抗生物質を２週間経口投与した後に４５分間中大脳動脈閉塞術を作成し、２４時間後の脳梗塞サイズおよび神経スコアを検証したが、vehicle 群と抗生物質投与群の間にいずれも有意な差を認めなかったが、７２時間後の評価では、抗生物質を投与した群で有意な梗塞サイズ縮小を認めた。

２．本実験系は薬剤投与や遺伝子操作を加えた実験などによる特定の分子を標的とした実験系ではないため、虚血後急性期においては、統計学的に梗塞サイズの差が有意とならなかったが、免疫担当細胞がさらに活性化する７２時間以降での病態を検討することが必要と考える。今後、具体的な機序について報告していく。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

学会発表

脳梗塞モデルマウスにおける脳内マクロファージとミクログリアの経時的な性質変化について

第２７回日本脳循環代謝学会総会　2015 年 10 月、富山

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

アルツハイマー病リスク遺伝子（特にACE，ABCA7に関して）検索

研究代表者　赤津　裕康[1)]
研究分担者　池内　健[2)]、橋詰　良夫[3)]、宮下　哲典[2)]、春日　健作[2)]、原　範和[2)]

[1)] 名市大・地域医療教育学、[2)] 新潟大学・脳研究所、[3)] 福祉村病院神経病理研

研究要旨
福祉村病院神経病理研究所には700例を超える神経病理学的検索を終えた脳サンプルが凍結保存されている。ABCA7 はコレステロール代謝に関連しその遺伝子多型はアルツハイマー病のリスク因子として注目されている。また、アンギオテンシン変換酵素(ACE)もアルツハイマー病の病因因子と考えられるAβ代謝に関連する事が示唆されており、その遺伝子多型が酵素活性に影響すると考えられている。本共同研究を通じて、福祉村病院の脳サンプルでの遺伝子解析を系統的に行いその臨床・病理所見と照合し病態の本質に迫りたい。

A.研究目的
アルツハイマー病リスク遺伝子の検索の中で、これまで福祉村ブレインバンクで追跡しているABCA7とACEの多型遺伝子の解析を進めていく。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）
福祉村病院ブレインバンクに蓄積されている神経病理診断を得ている症例のAB CA7とACEの多型解析をAffymetrix SNP6.0を用いた網羅的ジェノタイピングを行い、疾患特異性と検討を加える。

C.研究結果
これまで、他コホートで収集された例ではABCA7多型においてレアバリアント複数発見された。従来、報告された部位においてはodds比においても、リスク遺伝子としての優位性が示された。

D.考察
ABCA7 多型レアバリアントはアルツハイマー病の病態に何等かの影響を及ぼしているものと考えられ、今後、福祉村病院の脳サンプルでの遺伝子解析を系統的に行いその臨床・病理所見と照合し検討を加えていく

E.結論
本共同研究により新らABCA7のレアバリアントと AD 病態との関連性を見出していける可能性が生まれた。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)
1.論文発表
なし
2.学会発表
なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1.特許取得
なし
2.実用新案登録
なし
3.その他
なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

CADASIL・CARASILモデル動物を使用した脳小血管病新規治療法の開発

研究代表者　猪原 匡史 1)
研究分担者　齊藤 聡 1)　山本 由美 2)　上村 麻衣子 3)　小野寺 理 4)

1) 国立循環器病研究センター 脳神経内科
2) 国立循環器病研究センター 再生医療部
3) 京都大学大学院医学研究科 臨床神経学
4) 新潟大学脳研究所 神経内科分野

遺伝性血管性認知症であるCADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy), CARASIL (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)は脳小血管の機能的・構造的異常がその病態の一角をなすと考えられている．CADASIL, CARASILの病態解明，新規治療法の開発は，孤発性の血管性認知症，そして血管障害の合併頻度が極めて高いアルツハイマー型認知症の治療法開発に直結する．

今回我々は，*C455R変異NOTHC3*遺伝子導入マウスについて，CADASILモデルマウスとしての有用性を検証するとともに，現在，認知症治療薬として医師主導治験が行われているシロスタゾールの効果についての前検討を行った．その結果，*C455R変異NOTHC3*遺伝子導入マウスについては，18ヶ月齢時点では脳血流量や認知機能で有意な差は見られず，さらに高齢での解析または，何らかの負荷をかける必要があることが示唆された．

A.研究目的

脳血管障害はわが国における三大死因の一つであると同時に，認知症による要介護・寝たきり状態の最大の原因である．近年，血管病変のアルツハイマー病への関与も示唆され，血管性認知症への関心も高まっている．しかし，血管性認知症研究の障壁となるのが，その多くが孤発性であるが故の危険因子あるいは病型の多様性である．そこで，単一遺伝子疾患CADASILおよびCARASILを突破口に血管性認知症の病態を明らかにすることを目的として，本研究を開始した．

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. 実験動物

CADASILのモデルマウスとして，*C455R変異NOTHC3*遺伝子導入マウスを使用した．対照群として，正常*NOTHC3*遺伝子導入マウスを使用した．すべての動物実験は国立循環器病研究センター動物実験管理委員会で審査され，承認された内容である．シロスタゾール食またはコントロール食の投与は4週齢から開始した（各群n=4)．

2. 脳血流量の測定

18ヶ月齢の*C455R変異NOTHC3*遺伝子導入マウス(mtN3Tg)と正常*NOTHC3*遺伝子導入マウス(wtN3Tg)を解析した．脳血流はレーザースペックル血流計（Omegazone-2；Omegawave社，日本）にて測定した．麻酔は2%イソフルレンで導入し，1.5%イソフルレンで維持した．bregmaから2mm外側，1mm後方を中心とした直径1mmの円を関心領域として設定し，左右の測定値の平均値を記録した．

3. 行動試験

認知機能と不安水準は，それぞれY迷路と高架式十字迷路試験により評価した．

C.研究結果

１．脳血流量の測定

MtN3Tg マウスと wtN3Tg マウスとの間で脳血流に有意な差異は見られなかった.

２．不安水準の測定

MtN3Tg マウスは，やや Open arm での滞在時間が長くなる個体(不安行動の抑制)があったが、個体差が大きく、統計的有意差は認められなかった.

３．認知機能の測定

Y 迷路の Alteration 率は、シロスタゾールを投与した MtN3Tg マウスでわずかに増加したが、wtN3Tg，mtN3Tg のコントロール食・シロスタゾール食投与群の４群の ANOVA では有意差は認められなかった.

４．ハゲスコア

アルツハイマー病モデルマウスでは，シロスタゾール投与により被毛の状態の改善が見えられることが報告されている．シロスタゾール投与の wtN3Tg マウスは被毛の状態がよく(ハゲスコア：0) 保たれていたが，mtN3Tg マウスにおいては，著しい脱毛（ハゲスコア：2-3）が観察された.

D.考察

１８カ月の育成期間中に死亡した個体がいたため、群によってはn=2となり，個体差の影響が大きくなってしまった．また，wtN3Tg および mtN3Tg のバッククロスが完全でないことも影響している可能性がある．そのため，現在各系統の C57/BL6 へのバッククロスを進めている．現時点では，CADASIL モデルマウスへのシロスタゾールの効果は，少なくともアルツハイマー病モデルに対するものほどではなく，他の治療法を検討する必要があると思われる。

E.結論

今後，シロスタゾール以外の薬剤についても検討を進める.

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

なし.

2.学会発表

① Masafumi Ihara, Yumi Yamamoto. In vitro model of CADASIL: iPS cell-derived mural cells for unraveling the pathogenesis. 第41回日本分子生物学会年会（横浜）．2018 年 11 月 29 日

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし.

2.実用新案登録

なし.

3.その他

なし.

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

同時収集型 PET/MR 装置を用いた脳内アクアポリン動態に関連する脳機能探索に資するデータ収集解析手法の開発

研究代表者氏名　久保　均 1，2)
研究分担者氏名　伊藤　浩 3)，高橋　和弘 2)，五十嵐　博中 4)，鈴木　雄治 4)，中村　ゆきみ 4)

1) 福島県立医科大学新医療系学部設置準備室，2) 福島県立医科大学先端臨床研究センター，
3) 福島県立医科大学放射線医学講座，4) 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター

研究要旨

本研究では，同時収集型 PET/MR 装置を用いてヒト用 AQP-4 PET 測定と同時に脳活動の計測を MR で行う際に必要な MR での脳機能測定法，解析法及びそれらの最適化を行った．本年度は，実際に [11C]TGN-020 を合成して同時収集型 PET/MR 装置で測定を行うことを想定し，その実施環境，合成手順，測定手順などのシミュレーションを行い，問題点を評価した．その結果，実施環境には大きな問題はなかったが，合成時間が比較的長く問題となりそうであること，収量が低く臨床でヒトに用いるには十分でない可能性があること，等が明らかとなった．今後，同時収集型 PET/MR 装置を用いた [11C]TGN-020 の測定を行うためには，これらの問題点を解決する必要性があることが示唆された．

A.研究目的

新潟大学が開発しているヒト用 AQP-4 PET 法の確立がなされると，ヒト脳における AQP-4 マッピングが可能となり，様々な脳活動下における水動態が解明できると期待されている．この AQP-4 PET 法を同時収集型 PET/MR 装置を用いて行えば，AQP-4 PET 測定と同時に様々な脳活動を MR を用いて同時収集できるため，真の関連性を評価することが可能となる．そこで，本研究では AQP-4 PET と同時に行うべき MR による脳機能測定およびその解析法を開発することにより，AQP-4 PET 実用時に迅速に同時測定および解析ができる環境を構築することを主目的とした．昨年度までの 2 年間で，PET と同時に測定すべき MR 測定に関する検討を行い，初年度は機能的 MRI（fMRI）測定に必要なマルチバンド技術の最適化を，次年度は神経化学変化を捉えるための MR Spectroscopy 法の中の測定法の一つである極短 TE の STEAM シーケンスを用いた測定法および定量解析法の最適化を行った．本年度は，これらの評価に基づいて設定した MR 測定手法を PET 測定と同時に実施するにあたり，実際に実行できるかなどを様々な観点で評価するためにシミュレーションを行い，実施に向けての問題点の抽出を行うことを目的とした．

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究は，福島県立医科大学に設置された同時収集型 PET/MR 装置を用い，[11C]TGN-020 を被検者に投与して PET 測定を行うのと同時に MR の測定を行い，脳内における水分布とそれに関連する現象を見つけるものである．そのためには，被検者の前処置，トレーサーの投与，被検者の準備とセッティング，PET と MR 測定の方法，タイミングとその順序，等を決定する必要がある．そこで，今回は脳研究所生体磁気共鳴学分野の鈴木准教授と中村特任助教にインタビューを行い，現在実施可能な合成，撮像の条件を洗い出し，これを同時収集型 PET/MR 装置を用いた PET および MRI の測定手法に当てはめて比較することで，実際に実施するにあたり生じるであろう問題点の抽出を行った．

シミュレーションのための条件であるが，以下のように設定した．

PET 測定：投与量は 4MBq/kg body weight，投与と同時にダイナミック測定を開始し，60 分間収集を続ける．

MR 測定：撮像すべき画像および MR Spectroscopy (MRS)は,以下の通りとした.なお,括弧内は撮像や測定に必要な実時間である．1)位置決め用の localizer (30 秒), 2)MRAC 用 DIXON 画像 (30 秒), 3)MRAC 用 UTE 画像 (1 分 30 秒), 4)3D-T1 強調矢状断像 (5 分), 5)3D-T2 強調矢状断像(5 分 30 秒),6)Arterial Spin Labeling (ASL)画像 (4 分), 7)Diffusion Tensor Imaging (DTI)画像 (6 分), 8)rs-fMRI 画像 (10 分), 9)quantitative susceptibility mapping (QSM)画像 (10 分), 10)定量評価のための single voxel STEAM を用いた MRS 測定 (6 分/一部位)

C.研究結果

インタビューの結果,[11C]TGN-020 の合成については今までの経験より 1) 合成開始から投与までは 2 時間必要, 2) 最終収量は 300～500MBq 程度であるが, 装置の状況によっては 100MBq 未満しか得られないことがある, 3) 物質量からの比放射能の評価はできていないが, かなり低いことが想定されている, ということであった. また, [11C]TGN-020 の被験者への投与については, 1) 必要な前処置は特にない, 2) 投与の際に必要な処置は特にない, ということで, [11C]TGN-020 に特有な投与のために必要な注意点はなかった. また, 今回は投与と同時に PET 測定を開始するダイナミック撮像を想定しているため, 被験者を PET/MR 装置内へポジショニングした後での投与となる. そのために, [11C]TGN-020 投与用のルート確保や環境確保が必要であるが, これらの手法は他のトレーサーと同一であり, 特に問題はないと思われた.

これらの結果及び MR の測定プロトコルの測定時間とその内容を勘案し, [11C]TGN-020 を用いた PET/MR ダイナミック同時収集法の測定手法は以下のように行うべきとした.

1) 投与 120 分前頃から合成準備開始
2) 投与 90 分前に合成装置稼働開始
3) 投与 90 分前頃から被験者受付, 問診, 着替え, トイレ
4) 投与 60 分前にサイクロトロンの運転を開始し合成装置へのデリバリー開始 (ただし, 開始時間は必要放射能量により調整が必要)
5) 投与 45 分前頃から被験者のトレーサー投与用静脈ルート確保 (肘静脈)
6) 投与 30 分前頃から PET/MR 装置へのポジショニング,MR 用コイルは頭部用 12 チャンネルコイルを使用
7) 投与 10 分前頃から位置決め用 localizer 撮像
8) PET および MR 撮像位置を決定し計画立案
9) MRAC 用 DIXON 画像撮像
10) MRAC 用 UTE 画像撮像
11) [11C]TGN-020 の合成終了, 検定結果待ち
12) 3D-T1 強調矢状断像撮像
13) 検定合格を確認し[11C]TGN-020 を投与, 同時に PET 撮像開始
14) 3D-T2 強調矢状断像撮像
15) DTI 撮像
16) QSM 撮像
17) rs-fMRI 撮像
18) single-voxel STEAM を 4 部位で測定
19) PET 撮像が終了
20) MR 撮像が終了
21) 被験者の状態を確認し, 全測定終了

D.考察

本検討では, 今までの[11C]TGN-020 合成の経験及び同時収集型 PET/MR 装置で実行可能な MR 撮像プロトコルの実際のデータを元に, 実行可能な[11C]TGN-020 を用いた脳の PET/MR 同時撮像法のシミュレーションを試みた. その結果, 投与 120 分頃前から合成の準備を始め, 投与と同時に PET 撮像を開始し 60 分収集するプロトコルで, 投与後 80 分程度で評価に必要と考えられる MR 撮像も全て実施し全測定終了できることがわかった. これらの MR 撮像により, 脳全体の形態的, 機能的, 及び神経化学的情報を得ることができるため, AQP-4 マップとの相関性を評価することによる水動態と脳形態・機能の関係性を明らかにできる可能性を十分に有することが示唆された.

しかし, 上記のプロトコルでは PET 収集終了後 MR 終了まで 20 分程度の時間がかかってしまい, 効率的なデータ収集とは言い難い. 一般的な C-11 トレーサーで用いられている 90 分収集を行うことで PET データ量の増加とそれに伴う解析精度の向上が期待できるが, そのためには確実に 300MBq

程度の[11C]TGN-020の収量が必要である．今までの経験では，場合によっては合成が完全に成功せずに収量が不十分になる場合があり，また物質量当たりの比放射能が高くないと考えられるため，この部分の改善が必要であると考えられた．また，合成に時間がかかっているために合成作業を開始してから被験者への問診やルート確保を行うこととなるため，被験者の状態によっては合成作業を開始してから測定中止を決定しなければならない場合が発生し，試薬などのロスが発生する可能性が比較的高いと考えられる．

現状では，合成に関しては 1）合成手順が複雑である，2）合成に時間がかかる，3）物質量当たりの比放射能が低い，などの問題があり，これらが PET/MR 同時収集を行う上でも問題となることが明らかとなった．今後は，これらの合成に関する手順の簡略化による時間短縮，成功率の向上，物質量当たりの比放射能の向上を図ることにより，PET/MR 同時収集に必要な PET トレーサーの条件をより精度良く確保していく必要性が示唆された．

E.結論

同時収集型 PET/MR 装置を用いた AQP-4 PET 収集と MR を用いた脳形態・機能・神経化学的情報の同時収集が実行可能であることが示された．しかし，[11C]TGN-020合成におけるいくつかの問題点が抽出されたので，改善に向けた今後の開発が必要であることが示唆された．

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特記すべきことなし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

アルツハイマー病に関連するマルチオミックスデータの統合解析

研究代表者氏名　菊地 正隆[1)]
研究分担者氏名　池内 健[2)]，宮下 哲典[2)]，春日 健作[2)]，中谷 明弘[1)]

[1)]大阪大学大学院医学系研究科 ゲノム情報学　[2)]新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学

研究要旨

アルツハイマー病患者剖検脳から得られた生体分子マルチオミックスデータの統合によるアルツハイマー病病態の解析を行う。脳研究所・遺伝子機能解析学分野（池内健教授）で解析された晩期発症型 AD (LOAD)患者剖検脳における一塩基多型(SNP)、コピー数多型(CNV)、mRNA 発現量およびマイクロ RNA 発現量の各種データを用いて解析を行う。それぞれの測定データを用いた単一軸解析に加え、マルチオミックスデータをインフォマティクスによる手法でそれぞれに関連づけを行い、統合的な病態解析を実施する。さらにデータを整理し公開データベースを構築する。

A. 研究目的

複合的要因が関与するアルツハイマー病(AD)病態を単一の解析軸により理解することは不可能であり、ゲノミクスやトランスクリプトミクス、さらには各患者に付随する臨床表現型データといったマルチオミックス解析を導入する必要がある。本研究では、前年度に解析した同一患者 71 症例における mRNA 発現量およびマイクロ RNA 発現量の網羅的データに加え、一塩基多型(SNP)、コピー数多型(CNV)のデータを用いて解析を行うことにより、より詳細に AD 病理に関連する分子パスウェイを同定する。加えて各種データを整理し、学外に公開するためのデータベースを構築する。

B. 研究方法

- mRNA やマイクロ RNA の発現と関連する SNP を調べるために、SNP6.0 アレイにより測定された SNP データを用い、expression Quantitative Trait Locus (eQTL)解析を行う。これにより SNP と mRNA およびマイクロ RNA の関係を明らかにする。
- mRNA やマイクロ RNA の発現と関連する CNV を調べるために、SNP6.0 アレイにより測定された SNP データを用い、コピー数が増加または減少している領域を、plink ソフトウェアを用いて同定する。コピー数と mRNA およびマイクロ RNA の発現量の相関関係を算出し、CNV と mRNA およびマイクロ RNA の関係を明らかにする。
- 各オミックスデータの関係からネットワーク解析を行い、病態を反映する分子パスウェイやキー遺伝子を同定する。
- 各検体の臨床情報と上記の網羅的な生体分子データを統合し、検索可能な公開データベースを構築する。さらにデータの可視化ツールも準備する。

C. 研究結果

これまでに上記の方法で解析を行ってきた遺伝子発現データに加え、公共データも加えて解析を行い、データベース化を進めた。公共データは NCBI Gene Expression Omnibus と EMBL-EBI Array Express より取得した。各データベースから得られた数値情報を用い、二項ロジスティック回帰分析によりアルツハイマー病と関連を示す統計量(p 値や係数など)を算出した。解析によって得られた各遺伝子の統計量を申請者らが構築したデータベースである ADMIX データベース (http://www.alzdb.org/admix/gene_submit.html)に格納した。

また昨年度は脳研究所･遺伝子機能解析学分野（池内健教授）で測定した晩期発症型 AD (LOAD)患者剖検脳の網羅的遺伝子発現データと SNP データを用いた expression Quantitative

Trait Locus (eQTL)解析を行い、総計 7 億 2,000 万以上の遺伝子-SNP の網羅的な統計量を算出している。この統計量も検索できるようにデータベース化を進めた。

D. 考察

H28 から H30 にかけて行われた本プロジェクトにより脳研究所・遺伝子機能解析学分野（池内健教授）で測定されたアルツハイマー病オミックスデータを多角的に解析することができ、新知見を得ることができた。またデータベース化を進めることで多くの研究者と得られた結果を共有する基盤を構築することができた。

E. 結論

網羅的な解析を行い、さらにそれらの情報を検索できるようデータベース化を進めた。今後これらの情報を他の研究者と共有することで新たな研究の萌芽に結びつくと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Enhancer variants associated with Alzheimer's disease affect gene expression via chromatin looping. Kikuchi M, Hara N, Hasegawa M, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T, and Nakaya A. bioRxiv, 2018, doi:https://doi.org/10.1101/426312.

2. 学会発表

1. 染色体高次構造を介したアルツハイマー病リスクバリアントの影響. 菊地正隆, 原範和, 長谷川舞衣, 宮下哲典, 桑野良三, 池内健, 中谷明弘. 第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(口頭発表). 2018 年 11 月.
2. ポリジェニックハザードスコアを用いたアルツハイマー病発症年齢解析. 菊地正隆, 宮下哲典, 池内健, 中谷明弘. 第 37 回認知症学会, ロイトン札幌・札幌市教育文化会館(ポスター発表). 2018 年 10 月.
3. アルツハイマー病の原因遺伝子と感受性遺伝子:我々の取り組みと国内外の最新情報. 宮下哲典, 原範和, 菊地正隆, 月江珠緒, 春日健作, 中谷明弘, 池内健. 第 37 回認知症学会, ロイトン札幌・札幌市教育文化会館(ポスター発表). 2018 年 10 月.
4. APOE 遺伝型は APP の遺伝子発現量に影響を及ぼすか?:ヒト死後脳における検証. 村上涼太, 朱斌, 原範和, 菊地正隆, 月江珠緒, 春日健作, 宮下哲典, 中谷明弘, 赤津裕康, 柿田明美, 村山繁雄, 池内健. 第 37 回認知症学会, ロイトン札幌･札幌市教育文化会館(ポスター発表). 2018 年 10 月.
5. A meta-analysis for APOE genotypes and alleles in Japanese populations. Miyashita A, Hara N, Kikuchi M, Tsukie T, Kasuga K, Nakaya A, Ikeuchi T. Alzheimer's Association International Conference 2018, McCormick Place, Chicago, Illinois (Poster presentation). July, 2018.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   該当なし。
2. 実用新案登録
   該当なし。
3. その他
   該当なし。

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

自由意志に基づく運動の神経基盤の解明

研究代表者　中村克樹 1)
研究分担者　酒多穂波 2)、伊藤浩介 2)、五十嵐博中 2)

1) 京都大学 霊長類研究所 高次脳機能分野　2) 新潟大学 脳研究所 統合脳機能研究センター

研究要旨

我々の行動は、きっかけとなる外部からの刺激入力がない状態で内因的に生じる場合がある。このような‘自由意志’に基づく行動の神経基盤は未だに解明されていない。先行研究では、限局した脳領域に自由な行動の発生源があるとの考えに基づき、局所的な脳活動が短い時間窓において重点的に調べられてきた。しかし申請者のこれまでの研究からは、複数の脳領域における自発的な脳活動の増加が行動前の早い段階から始まり、行動の発生に 関与していることがわかった。したがって、行動開始前の安静状態から行動実施の瞬間までを含めた長い時間スケールにおける全体的な脳活動を検討する必要がある。本研究では fMRI と脳波を用いて自由なタイミングでおこなう運動に先行する脳活動を計測し、様々な脳領域の活動が安静状態から運動実施に至るまでにどのように変化していくかを明らかにする。

A. 研究目的

我々は自由に自分の意志を決定し行動を選択することができる。しかし、このとき感じている主観的な自由は、行動開始前からの無意識的な脳活動の影響を受けて形成された、いわば“見せかけの自由”である可能性が示唆されているなど、自由な意図に関する神経基盤には不明な点が多い。そこで本研究では、自由意志に関する神経基盤の一端を解明するため、行動開始前の自発的な脳活動に着目し、自由な運動のタイミングの決定にどのように関わっているかを明らかにする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究は新潟大学倫理委員会の承認および霊長類研究所ヒト倫理委員会の承認を受けて実施した。

「自由意志に基づく行動」の単純な例として「自由なタイミングでおこなう単純な運動（＝自己開始運動)」を対象とし、運動のタイミングに関する意図に注目して検討した。まず、被験者が内因的な自己開始運動（free timing 条件）と外因的な運動（cued timing 条件）をそれぞれおこなう際の脳活動を fMRI によって計測し、条件間で比較した。運動の内容は利き手による掌握運動であった。2 条件で運動の回数やタイミングが一致するようにして、意図に関する脳活動を検討できるようにした。得られたデータは事象関連デザインで解析した。先行研究において自由な意思決定を要する実験課題に関与することが示唆されている脳領域を関心領域として、各領域における時系列データは運動に関連してどのような変化を示すかを調べた。

次に、何もしていない状態から内因的に行動を開始するまでの脳活動の時間的特性を詳細に検討するため、自己開始運動をおこなう際の被験者の脳波を記録して、自己開始運動に先行する指標として知られている運動準備電位を検討した。長時間窓での計測に適した DC 記録によって脳波を計測し、短い時間窓で検討されることが多い運動準備電位を長時間窓で算出した。

さらに、これまでに得られた結果をふまえ、自己開始運動をおこなう前の自発的な脳活動に実験的操作を加えることによって運動の発生に影響があるかどうかを行動実験により調べた。被験

者は、３条件（刺激呈示のない条件、閾値下の強度の意識的に知覚出来ない視覚刺激が呈示される条件、知覚できる刺激強度の視覚刺激が呈示される条件）のもとで自己開始運動をおこなった。視覚刺激は、10Hz の反転刺激を用いた。

C.研究結果

まず fMRI 実験に関して、複数の領域において、自由なタイミングで実施する運動の前から徐々に増加するような神経活動が見られることが分かった。その領域は、先行研究ですでに報告のある補足運動野に加え、視覚野、聴覚野、楔前部、右半球の下頭頂小葉、右半球の下前頭回、島皮質であった。またこのような神経活動は、血流動態の遅れも考慮すると約 10 秒前から始まっていた。今回特に新しい結果となったのは、free timing 条件においては感覚刺激がなかったにもかかわらず、視覚野と聴覚野において運動前から徐々に増加する活動が見られたことであった。

次に自己開始運動にともなう運動準備電位を検討した結果、運動をおこなうまでの時間が試行ごとに、あるいは個人ごとにかなりばらついていることにより、長時間窓の事象関連電位として検討することは難しいことが分かった。また、運動をおこなうまでの時間が長い被験者と短い被験者では運動準備電位の傾きが異なる傾向が見られた。

最後に行動実験の結果について、何も刺激呈示が無い条件よりも、刺激を呈示した条件の方が試行開始から運動を実施するまでの時間が長くなる傾向が見られた。

D.考察

fMRI 実験の結果から、複数の脳領域において、自己開始運動に先行する自発的な神経活動の上昇が見られ、感覚野までもが自由な意思決定に関与することが示唆された。

また、自己開始運動が発生するまでの時間と運動準備電位の傾きには相関関係があることから、行動開始前からの脳活動の増加が実際の行動の違いに関与していることが示唆された。

さらに、感覚野への刺激入力が自発的な運動の発生に影響を与えている可能性があることも示唆された。今後はさらに被験者数を増やして脳波計測および行動実験をおこない、背景にある神経メカニズムについてさらに詳細に検討する予定である。

E.結論

先行研究で報告のある補足運動野以外の領域にも徐々に上昇するような活動があったことから、内因的な意図に基づく行動は、以前考えられていたように補足運動野を中心とする特定の少数の脳領域だけが究極の起源となって生じているというよりは、感覚野までをも含む複数の脳領域にまたがるネットワークの活動の上昇の中から生じている可能性がある。また、運動実施前に自発的に上昇する脳活動は、単なる相関ではなく運動の発生に対して因果関係がある可能性がある。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

なし

2.学会発表

酒多穂波、伊藤浩介、鈴木雄治、中村克樹、渡辺将樹、五十嵐博中、中田力　内因性の意図に基づく自己開始運動に先行する脳活動　日本基礎心理学会第 37 回大会 2018.12.02 専修大学生田キャンパス（川崎）

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ジェネティックニューロパソロジーによる精神疾患脳内分子表現型解析

研究代表者氏名　國井　泰人 1) 3)

研究分担者氏名　柿田明美2)　矢部博興1)、和田明4)、松本純弥1)、日野瑞城1)、長岡敦子1)

吉川武男5)、那波宏之2)、高橋均2)

1) 福島県立医科大学　2) 新潟大学脳研究所　3) 福島県立医科大学会津医療センター

4) 東京大学　5) 理化学研究所

研究要旨

本研究の目的は、統合失調症をはじめとする精神疾患脳病態における神経伝達システム関連分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子の異常について死後脳を用いて明らかにすることである。本研究では、統合失調症をはじめとする精神疾患発症のメカニズム解明を目的として患者死後脳内分子のジェネティックニューロパソロジー解析を行う。すなわち、これまで代表者らが統合失調症死後脳組織を用いて分析を進めてきたドパミン系・グルタミン酸・GABA系の分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子について、それらの死後脳における遺伝子発現やタンパク発現及びエピジェネティクスパターンをエンドフェノタイプとして、各々の遺伝子多型と関連を解析するというアプローチを通して精神疾患病態の鍵となる分子や治療標的分子を同定する。

A. 研究目的

本研究では、統合失調症をはじめとする精神疾患発症のメカニズムの解明を目的として、神経伝達システム関連分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子に関して、その遺伝子多型（SNPs）と分子表現型（タンパク発現、遺伝子発現、DNA メチル化）との関連を解析する。更に得られた統合失調症脳からのデータについては、病型・罹病期間・抗精神病薬の服薬量・死後時間、症状スコアなどの臨床プロファイルを利用して各分子との関係を検討する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

当講座の精神疾患死後脳バンクにおいて凍結保存された死後脳及び新潟大学脳研究所保管の年齢、性別、死後時間等をマッチさせた非精神神経疾患対照例を測定対象として、神経伝達システム関連分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子について、脳内の複数の部位を用いて ELISA、ルミネックス法によるタンパク発現解析、in situ hybridysation による遺伝子発現解析、DNA メチル化解析を行う。更に各々の分子について遺伝子多型解析を行い、脳内分子表現型（タンパク発現、遺伝子発現、DNA メチル化）との関連を解析する。統合失調症群に関しては、当バンク特有の詳細な臨床情報（罹病期間、抗精神病服薬量、生活歴・既往歴・手術歴・鎮痛薬を含む全服薬歴、生前の臨床症状スコア等）を駆使して関連を検討する。

なおこの研究は各施設の倫理委員会の承認を得ており、ヘルシンキ宣言に基づいた倫理的原則に則って実施され、発表にあたっては死後脳提供遺族から十分なインフォームド・コンセン

トを得て、プライバシーに関する守秘義務を遵守し、匿名性の保持に十分な配慮をした。

C. 研究結果

当講座の精神疾患死後脳バンクにおいて凍結保存された統合失調症死後脳 24 例に対して年齢、性別、死後時間等をマッチさせた新形大学脳研究所保管の非精神神経疾患対照例を選定し、平成 28 年 8 月 18 日 - 19 日に前頭前皮質、側頭皮質、後頭皮質を各 28 例ずつの採取作業を行い、提供いただいた。また更に、平成 29 年 8 月 24 日 - 25 日に 28 例の健常脳サンプル（後頭）の追加切り出し（各例につき 300～500 mg）を行い、サンプル調整を完了した。使用可能なサンプルは最大で統合失調症 24 例、双極性障害 8 例、健常対照 36 例、その他 8 例となった。これらのサンプルを用いて、前頭皮質（PFC；BA10）、上側頭回皮質（STG;BA22）における、Aldehyde dehydrogenase 4 family member A1（ALDH4A1）の発現量の解析を行った。ALDH4A1 はプロリン代謝に関わる酵素の一つであり、以前に行った統合失調症と健常群の死後脳における網羅的なタンパク質発現解析によって、統合失調症死後脳の前頭で有意に増加していた。今回は ELSA 法を用い、上記の脳領域における ALDH4A1 のタンパク発現解析を行ったところ、PFC、STG において、統合失調症及び双極性障害群で ALDH4A1 の発現量が有意に高かった。また、プロリン代謝に関わる分子における SNP が ALDH4A1 の発現量に及ぼす効果を解析したところ、PFC において P5C synthetase の遺伝子 *ALDH18A1* の SNPs（rs10882639）と Prolidase の遺伝子 *PEPD* の SNPs(rs33823,rs153508)と有意な相関がみられ、それぞれアレル依存性を認めた。

その他、細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子等について、S6、mTOR、CRMP2、KIF3A、KIF3B、NR2A、C4、GFAP、GAPDH の ELISA によるタンパク定量解析を、上記のサンプルについて、順次施行している。

D. 考察

E. 結論

統合失調症の主要な病態仮説の 1 つに、NMDA 受容体の機能低下が統合失調症の陽性症状および陰性症状を引き起こすというグルタミン酸仮説があるが、なぜ NMDA 受容体機能低下が引き起こされるかは解明されていない。統合失調症患者においてコラーゲン分解しプロリンを合成するプロリダーゼ活性が亢進していること、統合失調症患者の血漿中でプロリンが上昇していることが報告されており、今回見出した統合失調症患者死後脳における ALDH4A1 発現上昇の所見を合わせて考えると、統合失調症患者においてプロリンの合成、分解が亢進した結果グルタミン酸産生過剰を招き、二次的に NMDA 受容体の機能低下につながる可能性が示唆された。この知見はドパミン仮説に基づく既存の抗精神病薬とは異なる新規の観点からの創薬につながる可能性がある。

今後も、準備できた統合失調症銀 24 例、双極性障害 8 例、健常群 36 例の死後脳サンプルセットを用いて、神経伝達システム関連分子、細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子についての解析を引き続き進めていく。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表　國井泰人,松本純弥,長岡敦子,日野瑞城,丹羽真一,矢部博興.生前登録制度に基づく精神疾患ブレインバンクの実践―当事者と研究者が協働する研究体制とは―.精神神経学雑誌.2018,120,269-276.

1. 國井泰人「ブレインバンクと死後脳研究」最新精神医学　別冊　診断と治療の ABC 136 「統合失調症」第 2 章　病態. 2018,54-61.
2. Yukawa T, Iwakura Y, Takei N, Saito M, Watanabe Y, Toyooka K, Igarashi M, Niizato K, Oshima K, Kunii Y, Yabe H, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Iritani S, Niwa SI, Takeuchi R, Takahashi H, Kakita A, Someya T, Nawa H. Pathological alterations of chondroitin sulfate moiety in postmortem hippocampus of patients with schizophrenia. Psychiatry Res. 2018,270,940-946.

2. 学会発表

1. シンポジウム 4,脳から見た精神科臨床-精神科ブレインバンクへの期待-,精神科臨床と死後脳とを結ぶ研究とは, 口頭, 國井泰人, 第 114 回日本精神神経学会総会学術総会,神戸,2018/6/21,国内.
2. Special speech,The alternation of DARPP-32 in the postmortem brains from patients with schizophrenia: genetic neuropathology,口頭, 國井泰人, 2018 Annual Meeting of the Taiwan

Society of Schizophrenia Research,,Taipei, Taiwan, 2018/8/25,国外.

3. 若手研究者育成プログラム・プログレスレポート,精神疾患死後脳研究：ジェネティックニューロパソロジー及びリソース利用の有用性, 口頭, 國井泰人, 第 40 回 日本生物学的精神医学会,神戸国,2018/9/7,国内.
4. 統合失調症死後脳における ALDH4A1 についてのジェネティックニューロパソロジー, ポスター,長岡敦子,國井泰人,日野瑞城,松本純弥,丹羽真一,竹島明,那波宏之,柿田明美,矢部博興,第40回日本生物学的精神医学会,神戸,2018/9/7,国内.
5. シンポジウム 21,精神疾患を死後脳から解明する-精神科ブレインバンクへの期待-,精神疾患死後脳研究の実際, 口頭, 國井泰人, 第 40 回 日本生物学的精神医学会,神戸,2018/9/8,国内.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   なし。
2. 実用新案登録
   なし。
3. その他
   なし。

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理標本資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

細胞内分解機構に着目したシヌクレイノパチーの分子病態解明と治療法開発

研究代表者氏名　丹治　邦和[1)]、
研究分担者氏名　三木　康生[1)]、森　文秋[1)]、柿田　明美[2)]、高橋　均[2)]、若林　孝一[1)]

[1)]弘前大学大学院医学研究科　脳神経病理学講座　[2)]新潟大学脳研究所　病理学分野

研究要旨

「シヌクレイノパチー」は、αシヌクレインタンパク質の異常凝集を特徴とする神経難病であり、病態の進行を遅延・阻止する治療法は現在まで確立されていない。シヌクレイノパチーの治療は早期から行うほど効果的であるが、これまでシヌクレイノパチーの超早期に着目したモデル動物はいずれもウイルスベクターを利用しており、より簡便で安定したモデル動物が望まれていた。そこで今回 cre-loxp を利用したシヌクレインノックインマウスを作製し、シヌクレイノパチーの超早期病態モデルの作製を試みた。

A.研究目的

レビー小体病{パーキンソン病(PD)、レビー小体型認知症(DLB)}と多系統萎縮症（MSA）では、神経細胞およびグリア細胞内におけるαシヌクレインの異常凝集（封入体形成）を特徴とすることから、シヌクレイノパチーと称される。残念ながら、これらの病態の進行を遅延・阻止する治療法は現在まで確立していない。αシヌクレインの凝集をできるだけ早期に阻止できれば、病態の増悪も防ぐ可能性があるが、これまで早期病態に着目したシヌクレイノパチーのモデル動物は限られていた。そこで我々は cre-loxp システムを利用した新規のαシヌクレイン誘導マウスを作製した。さらに、このマウスをオリゴデンドロサイト特異的に発現させるマウスと交配し、MSA モデルを作製した。このモデルマウスの病理学的、生化学的および行動学的解析を行うと同時に、ヒト剖検材料を用いて異常αシヌクレインの検出を行い、作製したモデルマウスと比較・検討した。

B.研究方法

1.ヒト剖検材料を用いた高密度異常αシヌクレインの検出

DLB および MSA 患者脳サンプルをショ糖密度勾配法により分画した後、αシヌクレイン抗体を用いて、ドットブロット法にて検出した。患者検体については、弘前大学倫理委員会の承認を得ている。

2. MSA モデル動物の作製

定法に従い受精卵に目的遺伝子を導入し、キメラ動物を作成後、αシヌクレインノックインマウスを作製した。このマウスをタモキシフェン誘導オリゴデンドロサイト特異的発現マウス（ジャクソンラボラトリーから購入）と交配し、MSA モデルマウスを作製した。動物実験に関しては、弘前大学動物実験委員会に承認された動物実験を順守している。

C. 研究結果

DLB および MSA 患者脳をショ糖密度勾配法により分画した後、ドットブロット法でαシヌクレインを検出しところ､以前報告したDLBと同様にMSAでも高密度の分画に異常αシヌクレインが検出された（図1A 矢頭)。また作製したMSAモデルマウスでも高密度異常αシヌクレインが検出された。病理学的にMSAモデルマウスではタモキシフェン誘導後1週間でαシヌクレインの蓄積がオリゴデンドロサイト特異的に認められた（図 1B)。また、一部の神経細胞の核周囲にもαシヌクレインの蓄積を認めた（図1C)。

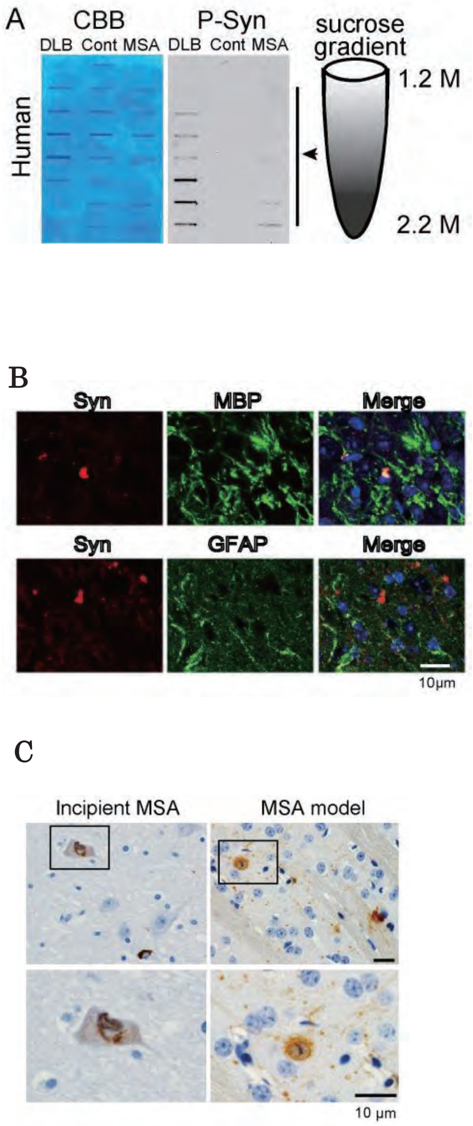


図１　患者脳およびMSAモデルマウス由来αシヌクレインの検出　（A）タンパク質染色クーマシーブルー染色(CCB 左)とリン酸化αシヌクレインの同定。DLB および MSA 患者脳由来サンプルでは高密度にリン酸化αシヌクレイン陽性反応が見られる。一方、正常脳では認められない。(B) MSA モデルマウス脳の二重染色像。オリゴデンドロサイト特異マーカーミエリンベーシックタンパク質（MBP）陽性細胞の中にαシヌクレイン陽性反応が認められる（黄色)。一方、アストロサイト特異マーカー（GFAP）陽性細胞にαシヌクレインの陽性反応は見られない。(C) ヒトMSAおよびMSAモデルマウスの神経細胞内凝集体｡ヒトMSAおよびMSAモデルマウスともに神経細胞内にαシヌクレイン陽性反応が認められる。

D. 考察

我々はこれまでにヒト凍結脳組織を用いた検討から、αシヌクレイノパチーの病態には「タンパク質分解システムの障害」が深く関与していることを報告してきた。さらに､PD患者および健常対照例の末梢血を用いて病態進行期においても、「分解システムの障害」が起こっていることを報告してきた。

今回作製したMSAモデルマウスは病理学的・生化学的にヒトMSA患者の病態を模倣しており、また行動学的にはαシヌクレインを誘導後、数カ月で運動機能の低下が示された。特にαシヌクレイン蓄積開始後、1 週間で認められる神経細胞内封入体はこれまでMSA患者で報告のある超早期の病理像と類似していた。これらの解析結果から､MSAモデルマウスを用いてMSAの超早期の病態をモニターできると同時に、治療の効果を検証できる可能性がある。特に分解システムを亢進させることにより病態の進行を遅延・改善できるか今後、検討予定である。

E. 結論

昨年度に引きつづきシヌクレイノパチーを含む神経難病の病態解明および治療法の開発を視野に入れ研究を行った。特に病態の早期に着目して MSA のモデルマウスを作製した。MSA モデルマウスは、αシヌクレイン蓄積直後の病態の解明や超早期の治療効果を検証するために有用なツールとして利用可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Usuki S, Tamura N, Tamura T, Higashiyama S, Tanji K, Mitsutake S, Inoue A, Aoki J, Mukai K, Igarashi Y, Konjac ceramide (kCer) regulates keratinocyte migration by Sema3A-like repulsion mechanism, **Biochem Biophys Rep**, 17, 132-138, 2019.

[2] Tanji K, Miki Y, Mori F, Nikaido Y, Narita H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, A mouse model of adult-onset multiple system atrophy, **Neurobiol Dis**, 127, 339-349, 2019.

[3] Kon T, Mori F, Arai A, Miki Y, Tanji K, Kurotaki H, Tomiyama M, Wakabayashi K, Atypical globular glial tauopathy with a combination of types I and II pathology, **Neuropathology**, 39, 127-134, 2019.

[4] Kasai S, Yamazaki H, Tanji K, Engler MJ, Matsumiya T, Itoh K, Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control, **J Clin Biochem Nutr**, 64, 1-12, 2019.

[5] Do LD, Gupton SL, Tanji K, Bastien J, Brugiere S, Coute Y, Quadrio I, Rogemond V, Fabien N, Desestret V, Honnorat J, TRIM9 and TRIM67 are new targets in paraneoplastic cerebellar degeneration, **Cerebellum**, 18, 245-254, 2019.

2. 学会発表

1) Mori F, miki Y, Seino Y, Tanji K, Yoshizawa T, Kijima H, Shoji M, Wakabayashi K, Are Bunina bodies generated as a byproduct in the process of TDP-43 degradation?, 19th International Congress of Neuropathology, 2018.

2) Tanji K, Miki Y, Mori F, Nikaido Y, Narita H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, New MSA model mice recapitulate some pathological and clinical features in human patients, 19th International Congress of Neuropathology, 2018.

3) Tanji K, Miki Y, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Phosphorylated NUB1 at serine 46 is associated with aggregates in brain of Lewy body disease, 11th FENS2018 Forum of Neuroscience, 2018.

4) Tanji K, Miki Y, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Wakabayashi K, Trehalose suppresses proliferation of cancer cells through inhibition of aerobic glycolysis, Keystone Symposia Conference, 2018.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

特願２０１８−９８８５４

（出願時の名称：多系統萎縮症モデル動物）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

7T-MRIの特性を生かした脳機能解析法の開発

研究代表者　福永 雅喜 1)
研究分担者　鈴木 清隆 2)

1) 自然科学研究機構生理学研究所・システム脳科学研究領域・心理生理学研究部門
2) 新潟大学脳研究所附属統合脳機能研究センター・生体磁気共鳴学分野

研究要旨

MRI(磁気共鳴画像法)は非侵襲的脳機能解析の強力な手段のひとつである。MRIは磁場強度が大きいほど得られる信号も大きくなるため、高磁場装置を用いることによる解析精度の向上が期待される。しかしながら、高磁場での機能的 MRI(fMRI)の多くが、より低磁場で実施されているものと同じデータ採取法と解析法を採用しており、装置の潜在能力を十分に引き出しているとは言い難い。本研究では、7T(テスラ)MRI 装置を運用する2施設の研究者が協力し、高磁場での核スピン緩和特性を生かした fMRI 手法を開発することを目指した。

A.研究目的

昨年までの研究により 7T-MRI において脳表に特異的な緩和特性を見出し、グリア境界膜（glia limitans）の構造的特徴と整合することを発表している（Magnetic Resonance Imaging 2017;44: 140-145、図1)。特に T1 はグリア突起の高い電子密度による緩和時間短縮効果を反映していると推測されることから、T1 変化を fMRI の新しい指標として活用し得る。昨年までのパイロットスタディでは通常の T2*強調型（BOLD）fMRI で得られる情報以上のものを得ることはできなかったが、オフレゾナンス反転パルスをプレパレーションシーケンスとして付加した T1 強調型スピンエコーEPI（Echo Planar Imaging)（IrP-EPI）を用いて再度検討を行うこととした。

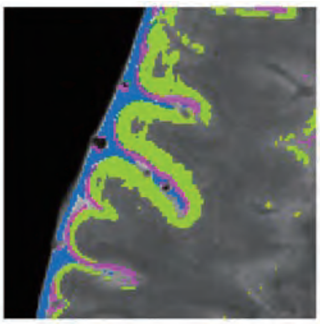


図1：
7T装置を用いた relaxometry により、glia limitans が特徴的な緩和特性を持つ領域（赤紫色）として分離された。

B.研究方法

視覚刺激（14 Hz flipping checkerboard）の提示下に multi-phase IrP-EPI 撮像を実施し、信号時系列を解析した。MRI 撮像では被験者の権利保護と安全確保を最優先とし、新潟大学倫理審査委員会の承認のもと、新潟大学学生に被検者として協力いただいた。

なお、脳研究所 7T-MRI 装置において傾斜磁場コイルの障害が発生し、コイル交換が完了するまでのおよそ半年間に渡り装置を使用できなかったため、研究代表者らによって開発された m-sequence 型刺激パラダイムを用いて fMRI 信号時系列から flow 成分を直接分離する試みは時間的な問題から断念し、一般的な刺激パターンに対する応答信号の観察に留めることとした。

C.研究結果

一次視覚野を中心に刺激の ON-OFF パターンに同期した MRI 信号の変動を確認した（図2)。通常の BOLD-fMRI と同様に血行動態を反映した信号成分（ベースラインから最大値をとるまでの立ち上がり時間が刺激開始から 6～7 秒の成分）が観察

されたが、BOLD-fMRI と異なる現象として、刺激開始とほぼ同時に大きく信号が減少すること（initial dip）が観測された。

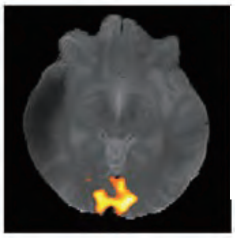
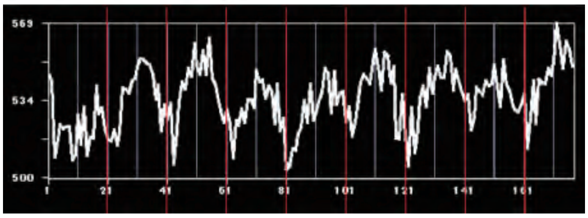


図 2:
視覚刺激に対する賦活領域（左）と信号変化パターン（下)。赤色の縦線が刺激開始のタイミングを表す。



D.考察
プレパレーションシーケンスによる磁化反転は化学交換によって水プロトンの磁化を変化させるため、水プロトンの T1 変化に対する感度を増すと考えられる。刺激の開始に同期した顕著な信号減少（initial dip）は BOLD-fMRI とは明らかに異なる信号成分であり、より直接的に脳賦活に関係する可能性があるが、厳密な検証を行うには今回断念した m-sequence 刺激による血流（flow 効果）の分離が必須である。

E.結論
本研究の重要な成果である脳表の緩和特性に関する新しい知見に基づき、T1 変化を用いた fMRI 手法の可能性について検討した。確実な道筋をつけることは叶わなかったが、ポテンシャルは示唆されており、今後の研究に期待したい。

F.研究発表
1.論文発表
無し。
2.学会発表
1. Suzuki K, Suzuki Y, Fukunaga M, Sakata M, Nakada T. Entropy-based functional magnetic resonance imaging, Entropy 2018 (Barcelona, Spain) 2018 年 5 月

G.知的財産権の出願・登録状況
無し。

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理標本資源活用の先端的共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

生体リズムの遺伝子改変マウスによる解析

研究代表者氏名　岡村　均[1)]
研究分担者氏名　崎村　健司[2)]、笹岡　俊邦[2)]

[1)] 所属　京都大学大学院薬学研究科・分子脳科学研究室
[2)] 所属　新潟大学脳研究所・生命科学リソース研究センター・動物資源開発研究分野

研究要旨

生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みである24時間周期の生体リズムは、進化の最初期からある古いもので、細胞の代謝制御と深くリンクしている。この仕組みは、単細胞生物から多細胞生物にいたるまで、高度に保存されており、多細胞生物においては、個々の細胞レベルでの時計遺伝子によるリズム発振が基本であるが、細胞間の伝達経路でもそのリズムは増幅される機構がある。哺乳類には、全身の細胞時計を統括する中枢時計が視交叉上核（Suprachiasmatic nucleus: SCN）に存在する。我々はSCNに発現する遺伝子を組織化学で同定し、リズムに及ぼす影響をノックアウトマウスで網羅的に検定するプロジェクト(SCN-Gene Project)を推進しており、今回は、細胞間の神経伝達に注目し、その神経伝達に関与する遺伝子改変マウスを作成し、概日リズム障害の分子機構を検索した。

A.研究目的

現代の我々の生活は、自然と乖離した人工的なものとなっており、それによる数々の健康障害が報告されている、睡眠覚醒など日常生活に関しても、シフトワークや生活スタイルの変動で、概日リズム睡眠障害 Circadian rhythm sleep disorders が増大している。この容態を分子レベルで解明することを我々は目的としている。その中で我々は、概日リズムの中枢であり、身体の全ての概日リズムを統括する視交叉上核 suprachiasmatic nucleus (SCN)に注目して研究を進めている。その中でも、我々はSCNに発現する遺伝子を組織化学により同定し、リズムに及ぼす影響をノックアウトマウスで網羅的に検定するプロジェクト(SCN-Gene Project)を推進して、概日リズム睡眠障害の分子機構の解明に全力をあげている。

今回、SCN に発現する各種ペプチドおよびその受容体、その他、SCN に発現する神経伝達に関与すると考えられる生理活性物質のSCN特異的ノックアウトマウスを作製しその行動リズムを検定し、その作用を分子レベルで解明した。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

SCN-Gene Projectは、以下のスクリーニングストラテジーで遂行する。

１）一次スクリーニング:SCNをパンチアウトし、Affimetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 arrayによる第一次スクリーニングを行う。同定した12,379個の遺伝子のうち、活性物質、機能が未知の受容体を２次スクリーニングにまわした。このうち、最も組織的に行なって先行しているのは、機能の未知な、リガンドの同定されていないGPCR検索である。

２）二次スクリーニング：SCN での発現を定量形態学的に in situ hybridization の手法で確認する。これは、視交叉上核が直径0.5mmの球形の小神経核であるため、上記のパンチアウト法では、それ以外の部分も試料に含まれるため、一次スクリーニングだけでは false positive が多いからである。この定量形態学的手法により、昼（CT4）と夜（CT16）で遺伝子発現の差も検出できる。こ

の結果、視交叉上核に強く発現する約 2000 個の遺伝子を抽出した。
３）三次スクリーニングとしてノックアウトマウスの作成、四次スクリーニングとして遺伝子改変した動物の行動解析によるリズム異常を来たすマウスの同定を行った。そののち、専用の明暗コントロールボックスにて、個体ごとのマウスの 24 時間リズムを一ヶ月以上にわたって検索する。

今回、全身の細胞の遺伝子改変マウスだけでなく、SCN に極めて大量に限局性の強い SCN-specific CRE を用いて、コンディショナくノックアウトの手法にて検索した。

本研究で行う動物実験は全て、京都大学動物実験委員会の承認を得ている。また、本研究で行う組換え DNA 実験についても、京都大学組換え DNA 実験委員会の承認を得ている。また、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）を遵守して遂行する。

C. 研究結果

ターゲットである SCN 遺伝子の機能ドメインをコードしているエクソンを loxP 配列で挟み、セレクションのための Neo 配列と frt 配列を導入したターゲティングベクターを作成し、エレクトロポレーション法により C57BL/6 マウス由来の ES 細胞へと導入した。サザンブロット法、PCR 法により、相同組換えが生じた ES 細胞を選別した。続いて、組換え ES 細胞を胚盤胞へ注入し、仮親の子宮へと移植することでキメラマウスを得、組換え ES 細胞の寄与率が高い雄のキメラマウスと、雌の C57BL/6 マウスを交配させることで F1 マウスを得た。F1 マウスと、全身で Cre を発現するマウスを交配させることでノックアウトマウスを得た。

さらに、SCN に発現するこれら遺伝子は、SCN の他にも他臓器で発現しているため、SCN の遺伝子発現が行動リズム異常を引き起こすかは不明である。そこで、我々は、この遺伝子の F1 マウスと全身で flippase を発現するマウスを交配させることで Neo 配列を除去したマウスを得た。さらに、SCN-Cre マウスと交配させることで、SCN 特異的ノックアウトマウスを作製している。

この SCN 特異的 KO マウスが得られれば、このマウスの行動リズムを、恒常暗条件下、恒常明条件下、短時間光パルス照射時、あるいは、時差環境下において行動を測定し、この遺伝子の SCN ので の概日機能を特定する。このストラテジーを、SCN に発現する他の遺伝子についても行っており、多くの、SCN 特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製を得ている。

以上の工程で進めているが、これまでに、SCN 特異的 V1a あるいは V1b ノックアウトマウス、肝臓特異的 V1a ノックアウトマウス、下垂体特異的 V1b ノックアウトマウスの作製が完了した。また、SCN のアセチルコリン受容体変異マウス、G タンパク質シグナル伝達を修飾する因子の機能変異マウス、蛋白質リン酸化酵素変異マウスも複数、作製し、リズム異常の有無も検索中である。

行動実験としては、現在までに、光シグナルに同調システムに関する検定をし、時差実験も完了した。本年度、研究成果を順次発表予定である。

D. 考察

このストラテジーを用いて、これまで、我々はアルギニンバソプレッシンの受容体である V1a と V1b のダブルノックアウトマウスが、時差症状を全く示さないことを見出した（Yamaguchi et al. Science, 342: 85-90, 2013）。また、SCN に存在する各種ペプチド、またその受容体は、生体リズム異常を示すことを明らかにしてきた。

時差とは、身体の内にある時計が、環境周期の時計と一致しない状況を言い、内因性時計の振動が強い哺乳類では、その不一致は、さまざまな病態をもたらす。日常例は、ジェット機旅行によるジェットラグであり、短期的に不眠や胃腸症状等をもたらす。また、時差が慢性的に続く労働形態であるシフトワークの時は、上記の短期的な症状に加えて、意欲減退や生活習慣病発症の増大のリスクをはらむと言われている。

我々は、内因性時計と環境の時計のずれである時差の有無が、この健康障害の原因であると考えている。以前、Virginia 大学の Gene Block のグループは、老齢マウスを恒常的な時差環境におくと（一週間ごとに明暗環境を前進させる）、老齢マウスは非常な高率で死亡するという事実を発表した（Davidson et al. Curr Biol 16: R914-916.2006）。これは、時差が大きな生理的障

害を来すという、初めての重要な報告である。

我々は、時差による環境と内因性時計の恒常的なズレが、身体の健康に重要ではないかと考え、時差が無い V1aV1b ダブルノックアウトマウスなら、老齢になっても、健康障害が起きないのではないかと想定した。実際、慢性時差環境下においても、野生型老齢マウスは大きく死亡率が上するのに比して、時差が無い V1aV1b ダブルノックアウトマウスその上昇は認められなかった（Yamaguchi and Okamura, iScience, 5:118-122, 2018)。

E.結論

現在、環境の時計の時刻が移動しても、内因性時計が移動し、速やかに対応できれば、健康リスクは生じないのではないか、と考えている。従って、他の SCN 特異的なコンディショナルノックアウトマウスでも、環境と内因性時計のずれに焦点をあて、鋭意、検証中である。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

なし

2.学会発表

1. 岡村　均：時計遺伝子によるステロイド制御、第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 Current Issue 2：　ステロイドホルモンによる生体調節機構、平成 30 年 5 月 26 日・JP タワー（東京）.
2. Okamura H: (Symposium) Molecular mechanism of circadian rhythm and metabolism in mammals, in XV European Biological Rhythms Society Congress, July 31, 2017, Amsterdam, Netherlands.
3. 岡村均：哺乳類分子時計と行動リズム、第 25 回日本時間生物学会学術大会、平成 30 年 10 月 21 日・長崎大学医学部記念講堂（長崎）

G.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

神経回路の興奮性に対する CB_2 受容体の役割の解明

研究代表者氏名　菅谷　佑樹 1)
研究分担者氏名　狩野　方伸 1)
研究分担者氏名　笹岡　俊邦 2)
研究分担者氏名　阿部　学 2)

1) 東京大学大学院医学系研究科　2) 新潟大学脳研究所

研究要旨
近年、カンナビノイド CB_2 受容体が中枢神経系において発現し、何らかの機能を担っている可能性が示唆されている。昨年度までの研究で、てんかん発作による海馬の過剰興奮を CB_2 受容体を介した内因性カンナビノイドシグナルが抑制している可能性が示唆された。平成 30 年度は長期増強に対する内因性カンナビノイドシグナリングの影響を自由行動下のマウスで検討した。内因性カンナビノイド 2-arachidonoyl glycerol の産生酵素を欠損したマウスと CB_1 受容体を欠損したマウスでシャッファー側枝-海馬 CA1 錐体細胞シナプスにおける長期増強を自由行動下で誘発したところ、2 種類の遺伝子改変動物で野生型マウスと比較して同程度のシナプス伝達の増強が認められた。したがって、自由行動下のマウスにおける海馬 CA1 興奮性シナプスの長期可塑性への CB_1 受容体、CB_2 受容体の有意な影響はないと考えられた。

A. 研究目的

近年、CB_2 受容体が中枢神経系の神経細胞に発現し、その機能を調節している可能性を示す論文が多く報告されている。しかし、CB_2 受容体の抗体染色はいまだ信頼性のある結果が報告されておらず、神経細胞特異的ノックアウトマウスを用いた研究も少ないことから、神経細胞における発現と機能は明らかになっていない。

本研究は新潟大学脳研究所の笹岡俊邦教授、阿部学准教授と共同でカンナビノイド 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) の産生酵素 Diacylglycerol lipase α (DGLα) と、2-AG の受容体である CB_1、CB_2 受容体について、遺伝子改変マウスを作出し、行動学的、生理学的、解剖学的解析を行い、CB_2 受容体の中枢神経系における役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

新潟大学によって作出された遺伝子改変マウスを用いた。具体的には、内因性カンナビノイド 2-AG の産生酵素 DGLα を全身で欠損した DGLα ノックアウトマウスと内因性カンナビノイドの受容体である CB_1 受容体を全身で欠損した CB_1 ノックアウトマウスを用いた。対照群として、それらのマウスと同腹の野生型マウスを用いた。

これらの成体マウスの海馬 CA1 領域に刺激電極、記録電極を麻酔下で埋め込み、1 週間後に自由行動下でシャッファー側枝を刺激した時の誘発局所電場電位を長期増強誘発の前後でそれぞれ 1 分毎に 20 分間、40 分間記録した。長期増強を誘発する刺激は θ 波刺激を用いた。
また並行して、C57BL/6N 系統での CB_2 floxed マウスの作出を進めた。

C. 研究結果

長期増強誘発前、シャッファー側枝の刺激による誘発局所電場電位の振幅は DGL α ノックアウトマウスにおいても CB_1 ノックアウトマウスにおいても対照群と比較して有意な差は認められなかった。長期増強誘発後、DGLα ノックアウトマウスの局所電場電位の振幅は長期増強誘発前と比較して 140%に有意に増強された。増強の程度は野生型マウスと比較して有意な差が認められなかった。CB_1 受容体ノックアウトマウスにおいても同程度の増強が認められ、2 種類の遺伝子改変動物でシナプス可塑性に有意な差は認められなかった。

現在、CB_2 floxed マウスの薬剤耐性カセットの除去を行っている。今後、Cre マウスと交配し、解析対象の動物を作出して解析に供する。

D. 考察

昨年度までの共同研究から、カイニン酸や貫通路線維の電気刺激によるてんかん発作の持続時間や重症度を内因性カンナビノイド 2-AG が CB_1 受容体と CB_2 受容体を介して調節している可能性が示唆された。本年度の研究では海馬 CA1 の可塑性に対する内因性カンナビノイドシグナルの影響を検討したが、自由行動下のマウスにおいて有意な影響は認められなかった。

近年の報告で、CB_2 受容体の活性化は海馬 CA3 の錐体細胞の細胞興奮性を抑制しているが、海馬 CA1 の錐体細胞や歯状回顆粒細胞の細胞興奮性には影響を与えないことが報告されている (Stempel V., et al., Neuron 2016)。したがって、これまでの共同研究の結果も併せて考えると、CB_2 受容体を介した内因性カンナビノイドシグナルは海馬内の領域によって作用が異なる可能性が示唆される。近年、RNA Scope 法という高感度の *In situ* hybridization 法によって、中枢神経系の興奮性神経細胞での CB_2 受容体 mRNA の発現を確認したという報告がなされているが、抗体を用いた免疫染色による受容体タンパクの発現分布に関しては再現性のある報告がない。今後は、CRISPR-Cas9 を利用した SLENDR 法によるタンパク標識法などを通じて、CB_2 受容体の発現分布を明らかにするとともに、遺伝子改変マウスを用いたより詳細な機能解析を行う。

E. 結論

CB_2 受容体の活性化は神経回路の過剰興奮を抑えるが、CB_2 受容体による興奮性の制御は部位特異的である可能性が示唆された。今後は CB_2 受容体の発現分布解析や遺伝子改変動物を用いた機能解析が必要である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

高磁場MRIを用いた発達障害者及び幼少期被害体験者の統合的脳機能に関する研究

研究代表者　奥山　眞紀子[1)]
研究分担者　鈴木　雄治[2)]、山田　謙一[2)]、小枝　達也[1)]

1) 国立成育医療研究センター　　2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

幼少時被害体験および発達障害に関連した行動発達特性の、脳発達基盤に関する生物学的証拠は未だ少ない。臨床的介入に有意義な生物学的証拠を得ることを目的に、当事者自身を対象とし、高磁場 MRI を用いて、行動発達障害に関連した脳微細構造および機能的発達の異常を非侵襲的に抽出する。高磁場 MRI の特性を利用した様々なアプローチ法は、一般的な臨床画像では検出できない定型発達児との比較を可能とし、その発症のメカニズムの解明に近づけることが期待できる。

拡散テンソル画像解析（脳微細構造発達の異常）・機能的MR画像解析（機能的発達の異常）を利用して行動発達障害に関連する生体情報を非侵襲的に抽出し、幼少期被害体験者においてright parietal lobe、bilateral、frontal lobes、 bilateral temporal lobesにおける拡散特性の異常所見が認められた。この所見から、大脳皮質下の構造において、connectivityの発達的異常が存在する可能性が示唆された。

A.研究目的

発達障害者および幼少期被害経験者における行動発達障害は、共通した一連の特徴をもって成人期までも持続する。これらの障害には脳発達異常の存在が示唆されているが、臨床的介入に有意義な生物学的証拠は未だ少ない。高磁場MRIの特性を利用した様々なアプローチ法は、一般的な臨床画像では検出できない、定型発達児との比較を可能とし、その発症のメカニズムの解明に近づけることが期待できる。

本研究の目的は、当事者自身を対象に、高磁場 MRI を用いて、脳発達病態の手掛りを得ることである。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

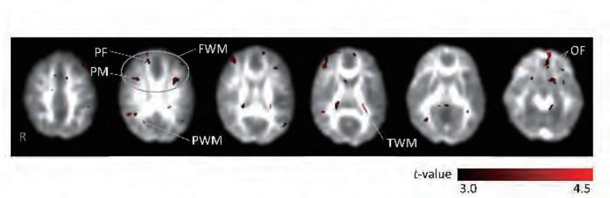
国立成育医療研究センター病院こころの診療部（以下成育医療研究センターと略）外来を受診し、発達障害の存在または不適切な被養育経験（幼少期被害体験）の事実が確認された患者を対象とする。半構造的な問診、神経学的診察に加えて、必要に応じて、行動質問紙、評価尺度等の動作記録を行う。

研究参加者（発達障害者、幼少期被害体験者）と保護者が伴って、統合脳機能研究センターに移動し、高磁場MRIを用いて脳画像撮影を行う。高解像度脳構造画像（T2R、3D 画像など）で得られる解剖学的情報を基準にして、機能的MR画像、拡散テンソル画像等の撮影を施行する。取得した画像データは最適化された画像解析法を用いて、定型発達者と比較し、詳細な分析を施行する。個別解析に加えてグループ解析を行い、群間比較による相違を検出する。更に臨床的な行動発達特性および動作解析との関連を解析する。

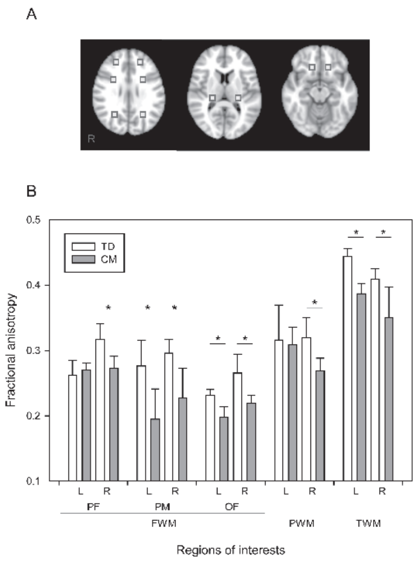
実際の撮像検査は研究参加者の負担を考慮し1時間以内で終了予定であり、身体・精神状態にあわせて行い、希望があれば途中で休憩または終了する。また、鎮静のための薬物や造影剤等は一切使用しない。撮影に先立ち、統合脳機能研究センターに導入されている撮影シミュレータ「ゼロテスラ MR プレパレーションシステム」を使用した撮像体験を通じて不安を取り除き、安全で円滑な撮像を行った。

C.研究結果

幼少期被害体験者 5 例（14-18 歳）と年齢を同じくした正常対照群 7 例（14-20 歳）との臨床所見と拡散テンソル画像解析の結果との対比を行い、right parietal lobe、 bilateral、frontal lobes、 bilateral temporal lobes における拡散特性の異常所見が認められた。



この所見から、下記に示すように大脳皮質下の構造において、connectivity の発達的異常が存在する可能性が示唆された。この結果を踏まえ、幼少期被害体験は脳の発達に影響を与えることが示された。



D.考察

この研究より、幼少期被害体験が与える脳発達への影響を及ぼすことが示唆された。これらの結果から、彼らが共通して抱えている様々な臨床的問題（協調運動機能、感覚運動機能などの機能的統合の問題や解離体験）のメカニズム解明につながる可能性があり、社会的にも医学的にも大変意義のあるものといえる。

E.結論

コントロール群と比較して right parietal lobe, bilateral frontal lobes, bilateral temporal lobes における水拡散特性の異常所見が検出され、大脳皮質下の構造において、connectivity の発達的異常が存在する可能性が示唆された。

更なる研究は、自閉症を含めた発達障害者の症例を重ね、様々な要因で生じる脳発達病態の詳細なメカニズムの解明につながる事が期待できる。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

1. Developmental abnormalities of the brain exposed to childhood maltreatment detected by diffusion tensor imaging. Yamada K, Suzuki Y, Okuyama M, Watanabe M, Nakada T.
Neurol Res.2019 Jan;41(1): 19-25.
doi: 10.1080/01616412.2018.1522413

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得
なし
2.実用新案登録
なし
3.その他
なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

孤発例ALSに関わる治療エピジェネティクス標的因子の探索

研究代表者　保住　功 1)
研究分担者　栗田　尚佳 1)、位田　雅俊 1)、柿田　明美 2)、田中　英智 2)

1) 岐阜薬科大学　薬物治療学　2) 新潟大学 脳研究所

研究要旨

これまでにALS患者の脊髄中の亜鉛輸送体、金属代謝関連タンパクのメタロチオネイン発現の減少、髄液中の亜鉛の上昇が確認されており、亜鉛代謝とALS発症の関連が示唆される。また、孤発性ALS発症に、後天的な環境因子によるエピジェネティクス変化が関連すると考えられる。これまでに、ALS患者検体において、エピジェネティクス因子の１つであるマイクロRNA (miRNA)の変動を見出し、ALS剖検にて顕著な増加が認められた *miR-5572* について、その標的遺伝子の１つが *SLC30A3* であることを見出した。今年度は、未だ機能不明である *miR-5572* のALSにおける役割を検討した。変異SOD1^{G85R}遺伝子を導入したHEK293細胞において、凝集体形成、酸化ストレスマーカー上昇、小胞体ストレスマーカー上昇に先駆けて、*miR-5572* 発現が上昇していた。また、miRNA mimic導入によりmiR-5572を過剰発現させた細胞にて、酸化ストレス、小胞体ストレスによる細胞死がより増加した。以上より、*miR-5572* は、ALSにおいて変異タンパク凝集体蓄積に伴う、細胞内ストレスに対する増悪因子になる可能性が示唆された。

A.研究目的

孤発性ALS発症に、後天的な環境因子によるエピジェネティクス変化が関連すると考えられる。これまでに、孤発例のALS患者検体において、エピジェネティクス因子の１つであるマイクロRNA (miRNA)の変動を見出し、ALS剖検にて顕著な増加が認められた *miR-5572* について、その標的遺伝子の１つが *SLC30A3* であることを見出した。今年度は、未だ機能不明であるmiR-5572のALSにおける役割を検討した。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究は、新潟大学、岐阜大学および岐阜薬科大学倫理委員会承認のもと遂行された。家族性ALSの原因遺伝子の１つである *SOD1* に蛍光タンパクのmCherryを融合した、SOD1タンパクを発現するベクター、野生型 *SOD1*（*SOD1*^{WT}）、変異型 *SOD1*（*SOD1*^{G85R}）ベクターを HEK293 細胞に、Lipofectamine2000 を用い、一過性に遺伝子導入した。遺伝子導入後、24、48、72時間後のSOD1凝集体をIN CELL ANALYZER 2200にて、網羅的に解析した。また、同時に *miR-5572* 発現量、酸化ストレスマーカー発現量(*HO-1*、*NQO-1*)、小胞体ストレスマーカー発現量（*BIP*、*CHOP*)をリアルタイム RT-PCR にて測定した。また、miRNA mimic (Negative control mimic:NC、*miR-5572* mimic)をHEK293細胞に一過性に遺伝子導入し、過剰発現させ、酸化ストレス誘導剤として、過酸化水素 (H_2O_2)、小胞体ストレス誘導剤としてツニカマイシンを処置し、細胞死をWST-8 assayにて測定、酸化ストレスマーカー（*HO-1*、*NQO-1*、*GCLC*、*GCLM*)、小胞体ストレスマーカー（*BIP*、*CHOP*)についてはリアルタイム RT-PCR にて測定した。

C. 研究結果

変異 *SOD1*^{G85R}遺伝子を導入した HEK293 細胞において、凝集体形成が遺伝子導入 48 時間以降に有意に上昇した（図 1）。変異 *SOD1*^{G85R} 導入 72 時間後において、酸化ストレスマーカーの *HO-1*、*NQO-1*、小胞体ストレスマーカーの *BIP*、CHOP の有意な上昇が認められた（図 2）。また、*miR-5572* 発現は変異 *SOD1*^{G85R}遺伝子導入 24 時間以降有意に上昇していた（図 2）。また、miRNA mimic 導入により *miR-5572* を過剰発現させた細胞にて、酸化ストレス誘導剤の H_2O_2 50 μM 処置において、細胞死がより増加し、酸化ストレスマーカーの *GCLC* 発現が *miR-5572* mimic により有意に増加した（図 3）。同様に、小胞体ストレス誘導剤のツニカマイシン 0.5、1 μg/ml 処置においても、*miR-5572* 過剰発現によって、細胞死がより増加し、小胞体ストレスマーカーの *BIP*、*CHOP* 発現が *miR-5572* mimic により有意に増加した（図 4）。

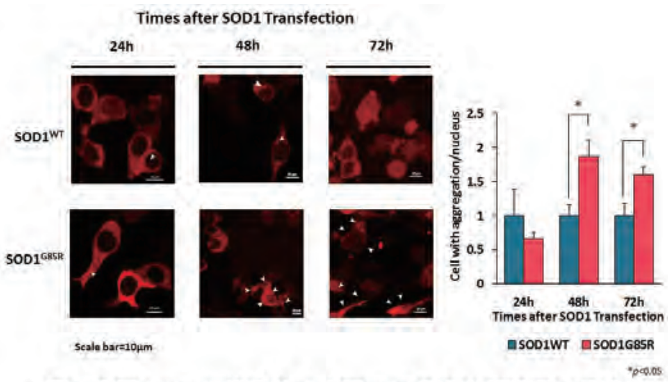


図1. 変異SOD1^{G85R}導入後の変異SOD1凝集体蓄積量の変化

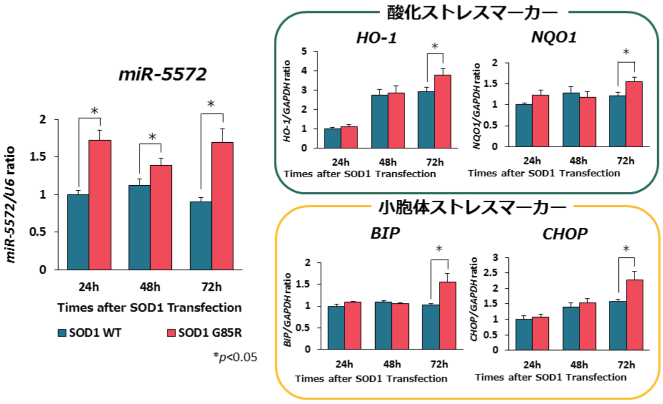


図2. 変異SOD1^{G85R}導入後のmiR-5572発現、細胞内ストレスマーカーの変化

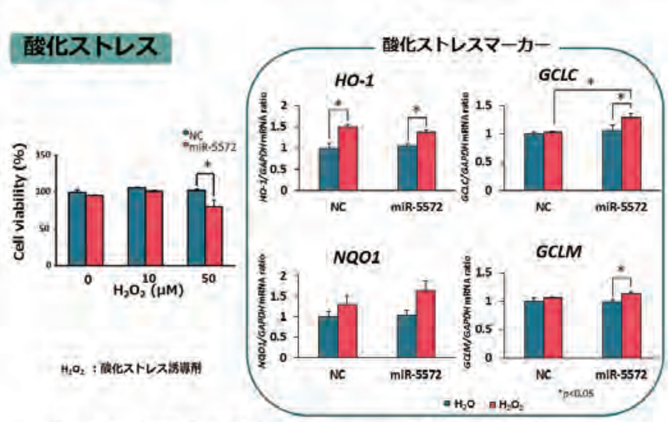


図3. *miR-5572*過剰発現細胞における酸化ストレスによる細胞死と酸化ストレスマーカーの変化

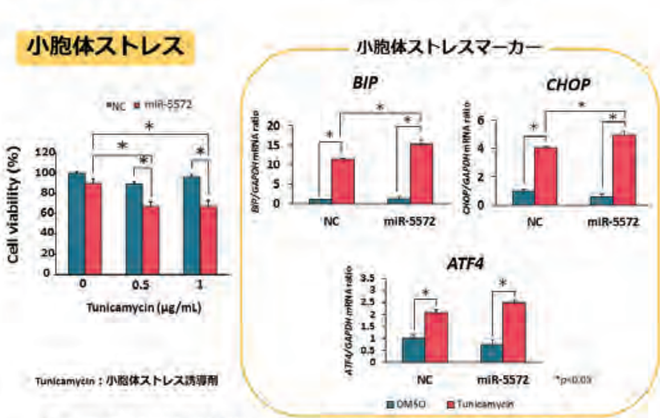


図4. *miR-5572*過剰発現細胞における小胞体ストレスによる細胞死と小胞体ストレスマーカーの変化

D. 考察

変異 *SOD1*^{G85R}遺伝子を導入した HEK293 細胞において、凝集体形成、酸化ストレスマーカー上昇、小胞体ストレスマーカー上昇に先駆けて、*miR-5572* 発現が上昇していた。また、miRNA mimic 導入により *miR-5572* を過剰発現させた細胞にて、酸化ストレス、小胞体ストレスによる細胞死がより増加した。以上より、*miR-5572* は、ALS において変異タンパク凝集体蓄積に伴う、細胞内ストレスに対する増悪因子になる可能性が示唆された。

E. 結論

miR-5572 の機能として、*miR-5572* は、ALS において変異タンパク凝集体蓄積に伴う、細胞内ストレスに対する増悪因子になる可能性が示唆された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

認知症症例における髄液および血液中ILEI定量の意義に関する検証

研究代表者　西村　正樹 1)
研究分担者　渡邊　直希 1)
研究分担者　三ツ石　弥千代 1)
研究分担者　池内　健 2)
研究分担者　春日　健作 3)

1) 滋賀医科大学・神経難病研究センター 分子神経病理学部門
2) 新潟大学・脳研究所
3) 新潟大学・研究推進機構

研究要旨

孤発例アルツハイマー病(AD)の分子病態を惹起するアミロイドβペプチド(Aβ)の脳内蓄積については、そのリスク要因の理解も未だ充分でない。申請者らは、γセクレターゼ複合体に結合しながら、そのプロテアーゼ活性を阻害することなく Aβ 産生を抑制する活性を示す内在性分子として ILEI/FAM3C (interleukin-like epithelial-mesenchymal transition inducer or family with sequence similarity 3, member C) を同定している。ILEI は健常脳に高レベルの発現を認めるが、これは加齢とともに漸減する。AD 脳では発現減少が顕著であり、脳 Aβ 蓄積レベルと逆相関していた。この所見は、脳 ILEI 発現減少が Aβ 蓄積のリスクであり、ILEI レベルの測定が初期 Aβ 蓄積ないしそのリスクに対するバイオマーカーとして成立する可能性を示唆する。本研究課題では、これを臨床生体試料を用いた解析から検証し、発症前 AD に対する診断的意義を評価した。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)に対する根治的治療の実現が求められるなか、認知症発症の前段階からの治療的介入が必要であるとの認識が共有されてきた。しかし、分子病態を惹き起こすとされるアミロイドβペプチド(Aβ)の脳内蓄積について、その要因解明は必ずしも進んでおらず、分子遺伝学的に孤発例 AD と連鎖を認める遺伝子座が明らかにされてきた一方、それらによる発症促進のメカニズムなどの解析は未だ不充分である。また、AD 脳で特異的に発現変化する分子の探索も精力的に進められてきたが、リスク分子の探索としては充分な知見が得られていない。

申請者らが同定した ILEI は新たな機能分子 FAM3 スーパーファミリーに属す分泌タンパク質であり、APP-C99 が Aβ 産生を伴わず非特異的に分解される経路を促進する活性により Aβ 分泌を抑制する一方で、γ セクレターゼ活性や Notch シグナル伝達は阻害しないことが明らかになった(*Hasegawa H, et al.: Nat Commun 5: 3917, 2014*)。ILEI は発生の早い段階から中枢神経系において神経細胞に発現しているが、遺伝子転写活性は加齢とともに減少する。さらに、AD 剖検脳の Aβ 蓄積レベルは ILEI レベルに逆相関していた(*Liu L, et al.: Neuroscience 330: 236-246, 2016*)。これは、加齢に伴う ILEI 減少が脳内 Aβ 産生亢進の一次的な原因となり、脳内Aβ蓄積の要因となる可能性を示唆している。即ち、ILEI 発現レベルの評価が脳内 Aβ 蓄積ないしそのリスクに対するバイオマーカーになる可能性、さらに早期段階において脳内 ILEI 活性

を補充することが Aβ 蓄積に対する予防的先制医療として成立する可能性を示唆している。

本課題では、認知症症例を対象に髄液および血液中ILEI定量を行い、既知のバイオマーカーや認知機能障害の程度との相関解析を進めることにより、その診断的意義に関する検証を行った。

B. 研究方法

(1) ILEI の高感度定量を可能にするサンドイッチ ELISA 法を確立する。

(2) 新潟大学病院神経内科外来（研究分担者の担当する外来）を受診する患者のうち、NIA-AA 診断基準を満たす認知症（50 例），軽度認知障害(MCI)（50 例）、および非認知症例（50 例）を対象とし、血液及び脳脊髄髄液を採取する。

(3) 血液中および脳脊髄液中の ILEI の測定は滋賀医科大学神経難病研究センターで行う。ILEI を認識する特異抗体を用いた高感度 ELISA により定量解析を行う。Aβ40・Aβ42・総 tau・リン酸化 tau などの ILEI 関連物質の測定を新潟大学脳研究所で実施する。これらの値と既知のバイオマーカーや認知機能障害の程度との相関解析を進めることにより、ILEI の診断的意義に関する検討を行う。

なお、以上に関しては、滋賀医科大学及び新潟大学にて「人を対象とする医学系研究」の倫理委員会承認済である。

C. 研究結果

(1) ILEI の異なるエピトープを認識する２つのモノクローナル抗体を作製し、これらを用いたサンドイッチ ELISA 法にて ILEI 定量を試みた。その特異性、測定感度、再現性などを評価することで、高感度 ILEI 定量系として確立した。

(2) NIA-AA 診断基準を満たす認知症（10 例），非認知症例（10 例）から脳脊髄髄液を採取した。また、認知症（10 例、72.5±5.2 歳），MCI 例（10 例、65.9±18.3 歳）、非認知症例（10 例、66.6±6.0 歳）から血漿を採取した。

(3) 上記の脳脊髄液サンプル中 ILEI・Aβ40・Aβ42・総 tau・リン酸化 tau の測定を行った。結果、ILEI 値と Aβ42/Aβ40 比および総 tau 値との間に、有意な正相関が確認された。また、血漿の ILEI 値についても、有意な差が示唆されることから、特許出願を行った。

D. 考察

脳脊髄髄液 Aβ42/Aβ40 比および総 tau 値については従来より AD の診断的意義が認知されている。今回得られた脳脊髄髄液 ILEI 値について、それらとの間に有意な相関が推測された。

血漿 ILEI の結果をもとに、特許出願を行った上で、本課題を一旦終了し、改めて血漿 ILEI に着目し、症例を増やした検証課題を共同研究として開始する計画とした。

E. 結論

髄液・血漿 ILEI 値に関し、アルツハイマー病との有意な相関が強く推測された。新たに設定する共同研究課題において、血漿 ILEI 定量の臨床的意義を検証する。

〈関連論文〉

Liu L, Watanabe N, Akatsu H, Nishimura M. Neuronal expression of ILEI/FAM3C and its reduction in Alzheimer's disease. ***Neuroscience*** 330:236-246, 2016

Hasegawa H, Liu L, Tooyama I, Murayama S, Nishimura M. The FAM3 superfamily member ILEI ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by destabilizing the penultimate amyloid-β precursor. ***Nat Commun*** 5:3917, 2014

F. 研究発表

1. 論文発表：

Nishimura M, Watanabe N, Mitsuishi Y, Hibino E, Nakano M, Liu L, Sugi T. FAM3C in Alzheimer’s disease. A risk-related molecule and potential therapeutic target. ***Neurosci Dement***, *in press*.

2. 学会発表：

未発表

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得（本課題に関連した特許）

(1) 国内特許　出願　特願 2018-177844
日付；2018 年 9 月 21 日
発明者：西村正樹、池内　健
出願者：滋賀医科大学
題目；血液検体を用いた MCI 及び認知症の補助診断方法

(2) 米国特許　特許番号；US 9,649,360 B2
日付；2017 年 5 月 16 日
発明者：西村正樹
出願者：滋賀医科大学
題目；Pharmacological composition for the treatment and/or prevention of disease involving abnormal accumulation of amyloid β protein

(3) 国内特許　特許番号；P6296995
日付；2018 年 3 月 2 日
発明者：西村正樹
出願者：滋賀医科大学
題目；アミロイドβタンパク質が異常に蓄積する疾患の治療及び／又は予防用の医薬組成物

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

視床下部のペプチド作動性神経による本能行動調節機構の解明

研究代表者　山中　章弘 [1)]
研究分担者　笹岡　俊邦 [2)]，阿部　学 [2)]

[1)] 名古屋大学環境医学研究所　[2)] 新潟大学脳研究所

研究要旨

視床下部に存在するペプチド作動性神経は、本能行動（摂食・飲水行動、性行動、睡眠覚醒）において、極めて重要な役割を担っている。これらの神経細胞を光遺伝学・薬理遺伝学等を用いて操作し、本能行動がどのように調節されているのか明らかにする。それぞれのペプチド作動性神経特異的に遺伝子発現させる遺伝子改変マウスを作成し、ウイルスベクターとの組み合わせによって、特定神経の神経活動操作・活動測定を達成し、丸ごと個体動物を用いて生理的役割について明らかにする。

A. 研究目的

視床下部に存在するペプチド作動性神経は、本能行動（摂食・飲水行動、性行動、睡眠覚醒）において、極めて重要な役割を担っている。これらの行動は、全ての神経回路が保存された個体動物でのみ発揮されるが、特定の神経活動を高い時間空間精度で操作する技術が無かったために研究が進んでいなかった。近年開発された光遺伝学・薬理遺伝学などの特定神経の活動を人為的に操作できる技術によって、解析が可能になってきた。そこで、本研究では、これらの技術を視床下部のペプチド産生神経に適用し、神経回路レベルで本能行動がどのように調節されているのか明らかにすることを試みる。それぞれのペプチド作動性神経特異的に組換え酵素であるCreリコンビナーゼ(Cre)や、Flippase リコンビナーゼ(Flip)を発現する遺伝子改変マウスを作成し、ウイルスベクターと組み合わせることによって、特定神経の活動操作を達成し、生理的役割について明らかにする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

視床下部に存在する、オレキシン神経特異的に Flippase recombinease を発現する遺伝子改変マウス(Orexin-Flippase マウス)を用いて、オレキシン神経特異的に遺伝子発現を誘導する。Flippase はオレキシン遺伝子にノックインすることで、正確な発現制御を達成する。Orexin-Flippase マウスと、オレキシン神経近傍の様々な神経細胞にCreを発現する遺伝子改変マウスと交配させてBigenicマウスを作成する。Cre依存的な遺伝子発現と組み合わせることによって、異なる2種類の神経細胞に別々の遺伝子を発現制御することが可能になる。光遺伝学適用のために、チャネルロドプシン２(ChR2)を発現させ、特定神経を光で活性化し、オレキシン神経から記録を行うことで、特定神経からの入力と、それに対するオレキシン神経の反応様式を明らかにすることができる。まずは、アセチルコリン作動性神経特異的に Cre を発現する ChAT-Cre マウス、メラニン凝集ホルモン(MCH)神経特異的に Cre を発現する MCH-Cre マウス、GABA 作動性神経特異的に Cre を発現する GAD67-Cre マウスを用いて、それらの神経細胞からの入力がオレキシン神経においてどのような作用を示すのかについて明らかにする。これらの研究によって、オレキシン神経を中心とした神経回路とその動作原理が明らかになると考えられる。オレキシン神経は睡眠覚

醒調節など様々な本能行動調節に関わっていることが知られており、それらがどのような神経細胞によって調節されているのかが明らかになると考えられる。

C.研究結果

オレキシン神経活動を光遺伝学にて操作して、抑制すると覚醒からノンレム睡眠が開始されること(Tsunematsu et al., J Neurosci 2011)、また、薬理遺伝学を用いて持続的に活性化させると、覚醒が持続して摂食・飲水行動が亢進し、また全く眠らなくなることを明らかにしてきた(Inutsuka et al., Neuropharmacology 2014)。これによってオレキシン神経細胞の活動がどのように睡眠覚醒を調節しているのかについて明らかになってきた。また、メラニン凝集ホルモン(MCH)産生神経を光遺伝学にて活性化すると、ノンレム睡眠からレム睡眠を誘導可能であることを見いだしており(Tsunematsu et al., J Neurosci 2014)、MCH 神経がレム睡眠調節に関わっていることを示してきた。しかし、未だに睡眠覚醒を調節する神経については十分分かっていない。特に近年ノンレム睡眠を制御する領域として新たに、側座核(NAc)、視索前野(POA)、吻側内側被蓋野(RMTg)などが同定されてきている。今回我々は、腹側被蓋野(Ventral Tegmental Area: VTA)の GABA 作動性神経がノンレム睡眠調節に関わっていることを明らかにした。GAD67-Cre マウスの VTA 領域に Cre 依存的に緑色蛍光タンパク質である hrGFP を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を局所注入して、VTA の GABA 作動性神経(VTA-GABA)特異的に発現させた。その結果、それらの神経は睡眠覚醒調節に関わることが知られている脳領域に軸索を密に投射していることが明らかになった。これら VTA-GABA 神経の生理的役割について明らかにするために、化学遺伝学である活性化 DREADD を適用し、hM3Dq を発現させた。hM3Dq の特異的リガンドであるクロザピンーN―オキサイド(CNO)をマウスに投与して、VTA-GABA 神経を活性化させたところ、マウスの覚醒時間が減少し、ノンレム睡眠が増加することを見いだした。一方レム睡眠は変化しなかった。次に、VTA-GABA 神経に光遺伝学を適用し、その活動を光で制御することを試みた。GAD67-Cre マウスの VTA 領域に Cre 依存的に青色光で神経活動を抑制する分子である ACR2(Anion Channelrhodopsin2)を発現させた.VTA 領域に光ファイバーを刺入し、青色光を照射して、VTA-GABA 神経を抑制した。ノンレム睡眠時に VTA-GABA 神経を抑制されたマウスは直ちに覚醒したが、レム睡眠時に抑制しても覚醒しなかった。これらのことは、VTA-GABA 神経活動がノンレム睡眠を制御していることを示している。さらに、VTA-GABA 神経の活動と睡眠覚醒との関係を明らかにするために、ファイバーフォトメトリーを用いて脳波筋電図を測定しながら VTA-GABA 神経活動を光で記録した。GAD67-Cre マウスの VTA 領域に Cre 依存的にカルシウムインジケータである GCaMP6 を発現する AAV を局所注入して感染させた。光ファイバーを同領域に刺入して活動記録を行うと、VTA-GABA 神経の活動はノンレム睡眠中に高いことが明らかになった。

D.考察

VTA-GABA 神経の活動操作によって睡眠覚醒が変化し、睡眠覚醒状態変化に応じて VTA-GABA 神経の活動レベルが変化していた。これらのことから、VTA-GABA 神経活動がノンレム睡眠を制御していると考えられる。

E.結論

これらの結果から、VTA-GABA 神経はノンレム睡眠を制御する重要な神経であることが明らかになった。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

1. Nat Commun 9: 2048, 2018.
2. Sci Transl Med, 10, 2018.
3. Front Physiol 9: 832, 2018.
4. Neuroscience 386: 16-23, 2018.
5. eNeuro 5, 2018.
6. Cell Rep 24(8):2191-2195.e4, 2018.
7. Sleep 41 (9), 2018.
8. Nat Commun 9(1): 4604, 2018.
9. J Physiol Sci 69 (1): 65-77, 2019.
10. Cell Rep 26: 1033-1043.e1035, 2019.

11. Neurochem Int 126:11-18, 2019.
12. Front Behav Neurosci 13:50, 2019.
13. Nat Commun 10 (1): 1391, 2019.

2. 学会発表

1. 山中章弘. 睡眠覚醒調節、痛み調節におけるオレキシンの役割. 第 12 回日本緩和医療薬学会年会, 2018.5, 東京.
2. 山中章弘. 睡眠覚醒調節におけるオレキシンの役割. 第 41 回日本神経科学大会, 2018.7, 神戸.
3. 山中章弘、宮﨑杜夫. Role of cholinergic neurons in the septum on the regulation of sleep and memory. 第 41 回日本神経科学大会, 2018.7, 神戸.
4. Yamanaka A. Regulation of sleep and memory. Joint symposium of 10th Optogenetics Research Conference and Second International Symposium on Brain Information Dynamics 2018. 2018.7, Tokyo.
5. 山中章弘. Study of regulatory mechanism of sleep/wakefulness and memory by optogenetical neural activity manipulation. 第 91 回日本生化学会大会, 2018.9, 京都.
6. Yamanaka A. Orexin and MCH neurons double ablation mice. Isolation of effect of orexin using orexin-Flippase mice. 7th International Symposium on Narcolepsy, 2018.9, Beverly MA, USA.
7. 山中章弘. 内側中核アセチルコリン作動性神経による睡眠と記憶の制御. 記憶研究会 2018 記憶・学習の基盤機構と回路研究の新展開へのアプローチ, 2018.9, 岡崎.
8. 山中章弘. 睡眠と記憶を制御する神経活動の操作と記録. 第 8 回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科合同シンポジウム, 2018.9, 名古屋.
9. 山中章弘. 睡眠と記憶を制御する神経活動の操作と記録. 星薬科大学セミナー, 2018.10, 東京.
10. 山中章弘. ファイバーレス光遺伝学を用いた睡眠覚醒と記憶制御のメカニズム解明. 第三回ルミノジェネティクス研究会, 2018.11, 宮城県苅田郡蔵王町.
11. Yamanaka A. Neural activity manipulation and behavior control by using fiber-less optogenetics. National University of Singapore, Department of Chemistry, Research Seminar, 2018.12, Singapore.
12. 山中章弘. 生活習慣病と睡眠覚醒とのただならぬ関係. 第 3 回 Cortin Conference, 2018.12, 名古屋.
13. 山中章弘. 腹側被蓋野(VTA)の GABA 作動性神経はノンレム睡眠を調節する. 平成 30 年度脳研究所共同利用共同研究合同セミナー, 2018.12, 新潟.
14. 山中章弘. 睡眠覚醒調節と記憶の制御に関わる神経の活動記録と操作. 平成 30 年度生命融合科学教育部シンポジウム 神経科学が解き明かす動物の行動:機能の変容と疾患, 2019.1, 富山.
15. 山中章弘. 睡眠覚醒調節神経の機能的同定. 第 92 回日本薬理学会年会, 2019.3, 大阪
16. Yamanaka A. Adeno-associated virus vector micro injection into mice brain to reveal function of neural circuitry involved in the regulation of sleep/wakefulness. FAOPS2019, 2019.3, Kobe.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   該当なし
2. 実用新案登録
   該当なし
3. その他
   該当なし・

MRI 陰性てんかん症例での多角的術前検査による てんかん焦点の可視化

研究代表者　福多真史 1)
研究分担者　藤井幸彦 2)

1）国立病院機構西新潟中央病院脳神経外科　2）新潟大学脳研究所脳神経外科

研究要旨

MRI 陰性てんかん症例での術前評価として，現在長時間ビデオ脳波同時記録，SPECT，脳磁図などの様々なモダリティーを用いて検査が行われているが，焦点を絞りきれず，頭蓋内電極の留置範囲の決定に困難を来す場合が少なくない．現在，てんかん外科適応症例において脳研究所の高密度脳波計，高磁場 MRI,FDG-PET などの検査を追加した症例を蓄積中の段階だが，追加検査による新たな情報が得られた症例も散見される．今後症例をさらに増やし，またてんかん外科を施行した症例については予後の検討を行い，術前検査の妥当性を検証する予定である．

A. 研究目的

MRI でてんかん病変を認めない症例でのてんかん外科による発作消失率は，おおむね50%以下で現時点では決して良好とは言えない．当院では長時間ビデオ脳波モニタリング，MRI，SPECT 検査，脳磁図などの標準的な術前検査を行っているが，本研究では脳研究所に設置されている高密度脳波計，高磁場ＭＲＩ検査，18fluorodeoxy glucose-positron emission tomography (FDG-PET)を追加することによって，術前に見えないてんかん焦点をより正確に把握し可視化することが目的である．これらの多角的術前検査による術前評価は，MRI陰性てんかんの術後予後の改善に貢献できるものと思われる．

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

1．MRI 陰性てんかん症例で，術前検査として脳磁図，長時間ビデオ脳波，SPECT検査を西新潟中央病院で行い，高磁場 MRI，高密度脳波計検査，を脳研究所で， FDG-PET を新潟大学医歯学総合病院で行う．

2．西新潟中央病院で硬膜下電極を留置して記録を行い，発作起始部を同定する．

3．発作起始部と術前評価によるてんかん焦点の推定部位との関係を把握し，多角的検査の妥当性を評価する．

4．術後の予後と切除範囲について検討し，多角的検査評価とてんかん原性のひろがりを確認する．

高密度脳波計，高磁場 MRI，FDG-PET については一般的に行われているてんかん外科の術前評価であるため，とくに倫理面への配慮は必要ないと思われる．
また追加検査については患者に説明し，同意を得た症例のみを紹介して脳研究所で検査を行っている．

C. 研究結果

2015年10月から2018 年 12 月までに，てんかん外科適応症例 24 例において当院と新潟大学得脳神経外科と連携しててんかん外科治療を行った．このうち術前検査として高密度脳波計，高磁場 MRI を施行した症例は 22 例で，その中の 12 例で

すでにてんかん外科を終了している.高密度脳波計の解析はまだ行っていないが,高磁場 MRI とくに 7 テスラを施行した症例の中で,結節性硬化症の tuber がより鮮明に確認できたものが 1 例,通常の MRI では認められなかった静脈奇形が確認できたものが 1 例,高齢発症の皮質形成異常で病変の境界がより」明瞭に確認できたものが1例あった.

またFDG-PET も7例に施行しており,このうち1例では病変なしの側頭葉てんかん症例で,FDG-PET により右内側側頭葉の代謝低下が認められ,硬膜下電極の発作起始部と一致し,切除術に至った.今後の症例蓄積によりその有用性を検討する予定である.

D.考察

MRI 陰性てんかんのてんかん外科の成績向上のためには,術前検査によって,できるだけてんかん焦点の範囲をしぼることができるかがポイントとなる.通常,MRI 陰性てんかん症例では,頭蓋内電極留置が必要になるが,現時点で,留置範囲を決定するのに苦慮する症例が少なくない.頭蓋内電極は脳表面,あるいは深部から直接脳波活動を記録することができるため,感度は高いが,留置範囲以外の情報は全く得られない.術前評価の誤りによって留置範囲にてんかん焦点が含まれていない場合には,当然てんかん焦点を捉えることはできず,てんかん外科の予後は不良となる.

西新潟中央病院の術前検査として 1.5 テスラ MRI,脳磁図,脳血流 SPECT,ベンゾジアゼピン受容体 SPECT,長時間ビデオ脳波同時記録を行っているが,それでもてんかん焦点を絞り込めない症例が存在する.これらの検査に加えて,脳研究所に設置されている高密度脳波計,高磁場 MRI,さらに FDG-PET などのモダリティーを追加することでの,てんかん焦点検索の精度を上げることが目的である.

現在症例は徐々に蓄積されつつあるが,まだ不十分である.とくに MRI 陰性てんかんの症例が少ないので今後さらに症例を増やして検討する予定である.またてんかん外科の予後の検討も,まだ術後観察期間が短い症例が多いため,今後長期予後を観察して,術前検査の妥当性を検証する予定である.

E.結論

MRI 陰性てんかん症例の術前検査として脳研究所の高密度脳波計,高磁場 MRI,FDG-PET などの追加検査が,てんかん外科の予後の改善に繋がる可能性があると思われる.今後症例を蓄積してその妥当性を検証する予定である.

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

1. Hiroki Kitaura, Hiroshi Shirozu, Hiroshi Masuda, Masafumi Fukuda, Akiyoshi Kakita: Pathophysiological characteristics associated with epileptogenesis in human hippocampal sclerosis. EBioMedicine 29:38-46, 2018
2. 福多真史,増田　浩,白水洋史,伊藤陽祐,中山遥子,東島威史,藤井幸彦:難治性てんかんに対する迷走神経刺激療法後の脳血流変化の検討.CI 研究 40:61-66,2018
3. 福多真史:てんかん外科治療の現状(総説).医療 72:491-498,2018
4. 福多真史:機能的脳神経外科の古往今来.新潟市医師会報　第 574 号:1-9,2019
5. 齋藤太希,大石誠,福多真史,塚本佳広,大橋伯,渡邉潤,根元琢磨,川口正,藤井幸彦:Posterior quadrantectomy が有効であった難治性てんかんの乳児例.No Shinkei Geka 47:349-356,2019

2.学会発表

1. 第 77 回日本脳神経外科学会総会(2018 年 10 月 10 日から 12 日,仙台市)
   難治性てんかんに対する迷走神経刺激療法後の脳血流変化の検討
   福多真史,伊藤陽祐,増田,浩,白水洋史,東島威史,藤井幸彦
2. 第 52 回日本てんかん学会(2018 年 10 月 25 日から 27 日,横浜市)
   てんかんにて発症した海綿状血管腫の周囲組織のイメージング解析
   福多真史,北浦弘樹,増田,浩,白水洋史,伊藤陽祐,東島威史,大石　誠,平石哲也,藤井幸彦,柿田明美
3. 第 48 回日本臨床神経生理学会学術大会(2018 年 11 月 8 日から 10 日,東京都)

てんかん外科における術中大脳皮質記録
による VEP モニタリング
福多真史, 増田, 浩, 白水洋史, 伊藤陽祐,
東島威史, 藤井幸彦

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

家族性進行性核上性麻痺（PSP）の原因遺伝子の探索と孤発性 PSP 及び類縁疾患との関連解析

研究代表者　矢部　一郎[1)]
研究分担者　矢口　裕章[1)]、池内　健[2)]、佐々木秀直[1)]

1） 北海道大学大学院医学研究院神経病態学分野神経内科学教室
2） 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野

研究要旨

進行性核上性麻痺(PSP)は孤発性疾患であるが、まれに家系内に複数の発症者をみた家系も報告されている。われわれは、先行研究により孤発性 PSP と診断された患者の約 10％に Bassoon（*BSN*）遺伝子変化を認めることを見出し報告した。*BSN*遺伝子に遺伝子変化を導入したHEK293T 細胞で検討すると、この遺伝子変化により不溶性のタウ蛋白が蓄積することも確認された。この結果を踏まえて、共同研究としてより多数例を対象に *BSN* 遺伝子解析を実施したところ、258 例中 29 例(11.2%)に rare variant を認めた。

A. 研究目的

われわれは最近、家族歴を有する進行性核上性麻痺の家系例と孤発性進行性核上性麻痺症例を対象に連鎖解析とエクソーム解析、および神経病理学的解析を行い起因遺伝子候補 Bassoon(*BSN*)遺伝子を同定し報告した（Yabe I et al Sci Rep 2018）。進行性核上性麻痺については、JALPAC（Japanese Longitudinal Biomarker Study in PSP and CBD）と名付けられた全国規模のコンソーシアムがすでに存在し、日本医療研究開発機構研究費にて「進行性核上性麻痺及び類縁疾患を対象とした多施設共同コホート研究によるバイオマーカー開発と自然歴の解明班」（研究代表者　新潟大学　池内　健　教授）が運営されている。その他、池内教授研究室では大脳皮質基底核変性症の診断基準策定を目指す研究である Japanese validation study of consensus criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration； J-Vac study（研究代表者　NHO 東名古屋病院　饗場郁子先生）において遺伝子解析やバイオマーカー探索を担っている。北海道大学神経内科もそれらの研究に参画しており、これらの研究では血液、髄液、DNA および RNA 検体が臨床情報と伴に集積されており、一部に剖検例も存在する。本研究は JALPAC および J-Vac study に集積された検体を主に対象として、*BSN* 遺伝子変異の本病態に関与する頻度と機序を解明することや、新たなバイオマーカーを見出すことを目的に実施する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究は北海道大学医学研究院倫理委員会を含む参加施設倫理委員会承認済みの研究である。

JALPAC および J-Vac 研究で蓄積された 258 検体を対象に遺伝子解析を実施した。

C. 研究結果

258 例中 29 例 11.2%に *BSN* 遺伝子 rare variant が確認された。その中には北海道大学での先行研究で見出された P3866A、G3627V、R3146C 変異が含まれていた。この結果は先行研究とほぼ同様の結果であった。

D. 考察

BSN 遺伝子から翻訳される BSN 蛋白は神経終末アクティブゾーンに piccolo 蛋白と伴に存在する巨大タンパク質である。発現解析において、この遺伝子がタウオパチー発症に深く関与することが推定された。家族例の病理学的所見では、障害部位は進行性核上

性麻痺に類似するが3＋4リピートタウが蓄積しtufted astrocyte が認められてないことから、進行性核上性麻痺とは異なるタウオパチーと考えられるが、先行研究では進行性核上性麻痺と臨床診断された孤発例患者 41 名を対象に解析したところ、4名の患者において3種類のミスセンス変異が認められた。これらの遺伝子変化は健常者データベースには記載が無いか、あっても 0.5%以下のまれな変化であった。今回の共同研究においても rare variant が 11.2%において検出され、先行研究と同様の結果であることが確認された。見出された変異のうち P3866A 変異については、遺伝子変化を導入した変異型ラット *BSN* 遺伝子と野生型ラット *BSN* 遺伝子を導入した HEK293T 細胞でタウ蛋白を比較検討し、遺伝子変化を導入した細胞で不溶性のタウ蛋白が多く存在することが確認されているが、他の変異については病原性が確認されていない。今後見出された変異の病原性の確認や、神経病理学的特徴を明らかにすることを目指す。

E. 結論

258 例中 29 例 11.2%に *BSN* 遺伝子 rare variant が確認された。その中には北海道大学での先行研究で見出された P3866A、G3627V、R3146C 変異が含まれていた。この結果は先行研究とほぼ同様の結果であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yabe I, Yaguchi H, Kato Y, Miki Y, Takahashi H, Tanikawa S, Shirai S, Takahashi I, Kimura M, Hama Y, Matsushima M, Fujioka S, Kano T, Watanabe M, Nakagawa S, Kunieda Y, Ikeda Y, Hasegawa M, Nishihara H, Ohtsuka T, Tanaka S, Tsuboi Y, Hatakeyama S, Wakabayashi K, Sasaki H. Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome. Sci Rep 8; 819, 2018

2. 学会発表

Yabe I, Yaguchi H, Kato Y, Miki Y, Takahashi H, Shirai S, Takahashi I, Kano T, Fujioka S, Watanabe M, Nakagawa S, Kunieda Y, Ikeda Y, Hasegawa M, Nishihara H, Tanaka S, Tsuboi Y, Hatakeyama S, Wakabayashi K, Sasaki H. A part of tauopathy may be caused by mutations in bassoon. 第 59 回日本神経学会学術大会, 札幌, 5/23-5/26, 2018

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理標本資源活用の先端的共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

熱ショック応答による筋萎縮性側索硬化症(ALS)細胞質凝集体の形成抑制

研究代表者氏名　渡部　和彦 1）
研究分担者氏名　柿田　明美 2）

1） 杏林大学保健学部臨床検査技術学科・神経病理学
2） 新潟大学脳研究所・デジタル病理学分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)における運動ニューロン細胞質内 TDP-43 凝集体を消去する因子の探索を目標として，培養ニューロンおよびマウス顔面神経核 TDP-43 凝集体形成モデルに対し，組換えウイルスを用いた熱ショック応答関連分子群の共発現により，TDP-43 凝集体形成を抑制しうるか解析した．得られた結果をヒト ALS 剖検例における熱ショック応答分子群の発現と比較検討することにより, ALS に対する熱ショック応答を利用した新規治療法の開発を目指している．

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンの選択的な変性脱落により死に至る最も過酷な神経変性疾患であり，ニューロン，グリアにリン酸化 TDP-43 蛋白を含む細胞質凝集体が出現する．我々はこれまで，ヒト正常 TDP-43 とその C 末断片を発現する組換えアデノウイルスをプロテアソーム阻害条件下で培養ニューロンや成体ラット・マウス運動ニューロンに感染発現させると，リン酸化 TDP-43 を含む不溶性の細胞質粗大凝集体が高率に形成されることを報告した（Watabe et al., 2014）. さらに, 培養タイムラプス解析により，正常および C 末断片 DsRed/TDP-43 組換えアデノウイルスをニューロンに感染発現させプロテアソーム阻害剤 MG-132 を負荷すると，DsRed 陽性 TDP-43 凝集体が細胞質に徐々に充満し, 細胞膜の破綻とともに細胞死に至り，残存した不溶性凝集体が放出される像を観察した．この凝集体はリン酸化 TDP-43 を含む不溶性の顆粒状構造物からなり，隣接する細胞に取り込まれ，時間とともに細胞質で増大し，凝集シードとして機能することを確認した (Ishii et al., 2017)．一方，ALS を含む神経変性疾患モデルに対する熱ショック応答の蛋白凝集体消去作用が注目されている．そこで本研究では，組換えアデノウイルスを用いて熱ショック応答に関与する分子群を共発現させることにより，上記の実験的 TDP-43 凝集体形成を抑制しうるか解析し, 併せてヒト ALS 剖検例と比較検討することにより，熱ショック応答を利用した ALS に対する新規治療法の開発を目指している．

B. 研究方法

ヒト正常または C 末断片 (208-414) TDP-43 とともに DsRed を発現する組換えアデノウイルス，および熱ショック応答のマスター制御因子である heat shock transcription factor 1 (HSF1)とともに EGFP を発現する組換えウイルスを培養ラット神経幹細胞 1464R 由来ニューロンに各々共感染させ, プロテアソーム阻害剤 MG-132 を負荷して細胞質 DsRed 陽性 TDP-43 凝集体を形成させた．これら培養細胞から total RNA を調製し, Agilent SurePrint を用いた cDNA マイクロアレイにより各実験群間の遺伝子発現を解析し，EGFP, TDP-43, HSF1 組換えウイルス感染の有無による各遺伝子の発現比を求めた．HSF1 組換えウイルスによる凝集体形成抑制に伴って発現の上昇を認めた遺伝子の蛋白翻訳領域を RT-PCR により EGFP ベクターにクローニングし，1464R 細胞由来ニューロンにトランスフェクションして TDP-43 凝集体形成抑制効果を蛍光顕微鏡で検討した．一部の cDNA については組換えウイルスを作製し 1464R 由来ニューロンに各々共感染させ，蛍光顕微鏡およびウェス

タンブロットで解析した．

C. 研究結果

MG-132 によるプロテアソーム阻害条件下で正常および C 末断片 TDP-43 組換えウイルスを分化ニューロンに感染発現させると，DsRed 強陽性の粗大な細胞質凝集体が形成されたが，HSF1 組換えウイルスの共感染により凝集体形成は有意に抑制され, ウェスタンブロットではリン酸化 TDP-43 を含む RIPA 不溶性分画の著明な減少を認めた. cDNA マイクロアレイ解析では， HSF1 により 2 倍以上に発現が上昇する遺伝子は 64 個，HSF1 による凝集体形成抑制に伴って 2 倍以上に発現が上昇する遺伝子は 393 個同定された．このうちこれまでに 38 遺伝子産物について TDP-43 凝集体形成抑制効果を組換えプラスミドあるいは組換えウイルスを作製して検討し，新たな候補機能分子 heme binding protein 2 (HEBP2) を見出した．

D. 考察

cDNA マイクロアレイ解析を手がかりとして HSF1 の下流に位置する TDP-43 凝集体抑制因子を同定することにより ALS の新規治療法の開発に繋げていきたい．現在，候補分子について発現および機能解析を行い，組換えウイルスを順次作製し検討を行っている．

E. 結論

ラット神経幹細胞由来ニューロン培養を用いた TDP-43 凝集体形成モデルにおいて，熱ショック応答のマスター制御因子である HSF1 の著明な凝集抑制効果を認め，cDNA マイクロアレイにより HSF1 の下流に位置する新たな候補分子として HEBP2 を見出した．

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Niimi N, Yako H, Takaku S, Kato H, Matsumoto T, Nishito Y, Watabe K, Ogasawara S, Mizukami H, Yagihashi S, Chung SK, Sango K. A spontaneously immortalized Schwann cell line from aldose reductase-deficient mice as a useful tool for studying polyol pathway and aldehyde metabolism. J Neurochem 2018;144:710-722.

2) Moriwaki Y, Ohno Y, Ishii T, Takamura Y, Kita Y, Watabe K, Sango K, Misawa H. SIMPLE binds specifically to PI4P through SIMPLE-like domain and participates in protein trafficking in the trans-Golgi network and/or recycling endosomes. PLoS One 2018;13(6):e0199829.

3) 渡部和彦．組換えウイルスを用いた筋萎縮性側索硬化症病変の発症進展機序の解明．Medical Science Digest 2019;45(4):191-194.

2. 学会発表

1) 渡部和彦，加藤陽一郎，佐久間美帆，村田麻喜子，新井田素子，柿田明美，柴田亮行．熱ショック応答関連分子による TDP-43 細胞質凝集体形成の抑制効果．第 59 回日本神経学会学術大会，ロイトン札幌（札幌市），2018 年 5 月 23 日．

2) 渡部和彦，加藤陽一郎，佐久間美帆，村田麻喜子，新井田素子，柿田明美，柴田亮行．熱ショック応答による TDP-43 細胞質凝集体の形成抑制効果．第 41 回日本神経科学大会，神戸国際会議場（神戸市），2018 年 7 月 28 日．

3) Shibata N, Niida-Kawaguchi M, Masui K, Kakita A, Watabe K. Excessive soluble iron stimulates microglia to release glutamate in ALS spinal cords. 19th International Congress of Neuropathology, Keio Plaza Hotel (Tokyo), September 24, 2018.

4) Watabe K, Kato Y, Sakuma M, Murata M, Niida-Kawaguchi M, Kakita A, Shibata N. HSF1 suppresses adenovirus-induced neuronal TDP-43 aggregate formation in culture. 19th International Congress of Neuropathology, Keio Plaza Hotel (Tokyo), September 26, 2018.

5) 村上龍文，刀祢重信，三五一憲，渡部和彦，水口峰之，砂田芳秀．家族性アミロイドポリニューロパチーTTR E61K の神経変性機序の研究：アミロイド凝集能の検討．第 29 回日本末梢神経学会学術集会，海峡メッセ下関（下関市）2018 年 9 月 7 日．

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ケラタン硫酸糖鎖合成酵素遺伝子のノックアウトマウスの作製とその表現型解析およびALS発症における影響の解析

研究代表者氏名　赤間　智也 1)
研究分担者氏名　笹岡　俊邦 2)
研究分担者氏名　阿部　学 3)

1) 関西医科大学　薬理学　2) 新潟大学　脳研究所　動物資源開発研究分野
3) 新潟大学　脳研究所　細胞神経生物学

研究要旨

中枢神経系におけるケラタン硫酸(KS)糖鎖の機能を調べる目的で、我々は成体マウス脳における低硫酸化KSの分布をR10G抗体による免疫染色にて解析したところ、視覚野のparvalbumin陽性神経細胞のペリニューロナルネットに一致して存在することがわかった。また遺伝子欠損マウスを用いた解析にて、成体マウスの脳においてはオリゴデンドロサイトに発現するGlcNAc6ST3（またはChst5）がKSの硫酸化を大きく担っていることが明らかとなった。さらに我々は成体マウス脳でのKSのキャリアタンパク質はチロシンフォスファターゼの一つであるPTPRZであることを明らかにした。

A.研究目的

脳に検出されるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(chondroitin sulfate proteoglycans; CSPGs)やテネイシンといった細胞外マトリックスタンパク質は細胞間を充填して組織の形状を維持すると共に他からの細胞の浸潤や移動を抑制する機能を有している。CSPGはまた神経細胞の表面に局在してペリニューロナルネット(perineuronal nets; PNNs)と呼ばれる構造物を形成する。PNNsは複数の構成成分からなる構造物で、脳の発生の臨界期の終結と共に構築されることが知られている。以前の研究において脳のCSPGsのコアタンパク質はprotein-tyrosine phoshatase receptor type Z (PTPRZ)の分泌型アイソフォームであるphosphacanであることが知られており、またこのphosphacanにはコンドロイチン硫酸だけでなくケラタン硫酸(KS)も結合していることが報告されている。更にこのKS修飾はマウスの幼若期の脳の臨界期における神経可塑性に必要であることが示されている。一方で、成体マウスの脳におけるKSの分布や機能については不明な点が多い。

ケラタン硫酸糖鎖(KS)は6位に硫酸修飾を持つN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とガラクトース(Gal)が交互に繋がった構造をしており、細胞外プロテオグリカンを修飾する直鎖状糖鎖の一つである。マウスの脳の発生段階の一つである臨界期においてKSは視覚野の神経可塑性に必要とされており、KS合成に関わる硫酸転移酵素の一つであるGlcNAc6ST1（またはChst2）がその役割を担っていることが報告されているが、成体マウス脳でのKS合成には関わる硫酸転移酵素は不明であった。

本研究では脳におけるKSの機能とその合成酵素の特定を行うべく、成体マウス脳のKSの分布を免疫化学的方法を用いて解析した。また遺伝子欠損マウスを用いて、成体マウス脳のKS合成に必要であるKS合成酵素の特定を試みた。

B.研究方法

KSに対する抗体として、高硫酸化KSに反応する5D4と低硫酸化KSに反応するR10Gを用いて免疫組織化学及びウェスタンブロッティング法にてKSの分布と生化学的性質をを成体マウス脳にて解析した。KS合成酵素の同定には、KS合

成に関わる糖鎖硫酸転移酵素の遺伝子欠損マウスの脳における KS の有無をウェスタンブロッティングにて調べ、特定した。KS が結合するコアタンパク質は免疫沈降にて単離した後、LC-MS/MS にて同定した。

C. 研究結果

幼若時のマウス脳では高硫酸化KSに対する抗体である 5D4 により強いシグナルが検出されていたが、成体マウス脳では非常に弱いシグナルしか得られていなかった。一方で低硫酸化 KS に対する抗体である R10G による検出では成体マウス脳でも幼若時の脳と同程度のシグナルが得られたことから、成体マウス脳では GlcNAc にのみ硫酸修飾がある低硫酸化 KS が存在することが明らかとなった。免疫組織化学による解析で、この R10G によるシグナルは PNNs を周囲に構築する parvalbumin 陽性の神経細胞に局在し、細胞体ではなく細胞の周囲に分布していたことから成体マウス脳に存在する低硫酸化 KS は PNNs に局在することがわかった。

次にこの低硫酸化KSはどのような硫酸転移酵素により合成されているのか、遺伝子欠損マウスを用いて解析した。KS の GlcNAc に硫酸修飾を行う糖鎖硫酸転移酵素はマウスでは 4 種類あることが報告されており、この 4 種類の酵素をそれぞれ欠損している遺伝子変異マウスの脳についてウェスタンブロッティングにて R10G 陽性シグナルの変化を調べたところ、GlcNAc6ST3(または Chst5) において R10G シグナルが激減しており、また GlcNAc6ST1 (または Chst2) との二重欠損マウスでは完全にシグナルが消失していたことから、成体マウス脳での KS 合成における主要な糖鎖硫酸転移酵素は GlcNAc6ST3 であり、一部 GlcNAc6ST1 の寄与もあるということが明らかとなった。

また成体マウス脳でKSの修飾を受けるコアタンパク質を同定するべく、脳抽出物を R10G で免疫沈降し、得られたタンパク質画分をトリプシン分解して LC-MS/MS にて解析したところ、幼若マウス脳でも KS 修飾を受けている CSPG である PTPRZ がコアタンパク質であることがわかった。PTPRZ はいくつかのアイソフォームがあるが、抗体の特異性から、KS 修飾を受けている PTPRZ は分泌型のアイソフォームの phosphacan か、全長型 PTPRZ の細胞外ドメインであることが明らかとなった。

D. 考察

今回の研究で成体マウスの脳にもKSが存在することが明らかとなった。成体マウス脳の KS は角膜や幼若マウス脳に見られるような高硫酸化 KS ではなく、Gal に硫酸修飾がされていない低硫酸化 KS であるが、その修飾を受けるコアタンパク質は幼若時の脳で高硫酸化 KS の修飾を受けていたPTPRZあるいはphosphacanであることが示された。幼若時の KS 合成には KSGal6ST (または Chst1) と GlcNAc6ST1 (または Chst2) が関わっているが、成体マウス脳では GlcNAc6ST3 (または Chst5) が主に関わっていることから、これらの遺伝子発現の変化により発生時の脳の KS 量を規定されていることが示唆された。

成体マウス脳の KS も PNNs と同様な分布を示し、幼若マウス脳では KS の合成と臨界期の終了に相関があることから、KS が PNNs の構成要素の一つであり、その合成が臨界期のコントロールに関与していることが考えられる。ヒトの脳で今回発見された KS 修飾を受けた PTPRZ/phosphacan が存在するかどうかは不明であり、今後の研究が必要である。

E. 結論

成体マウス脳には低硫酸型KSが存在することが明らかとなり、またその主要な合成酵素は GlcNAc6ST3 (または Chst5)、KS の修飾を受けるコアタンパク質は PTPRZ/phosphacan であることがわかった。今後 KS の成体マウス脳における機能を解析し、KS の変化と ALS 発症との相関を調べたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Narentuya, Takeda-Uchimura, Y., Foyez, T., Zhang, Z., **Akama, T.O.,** Yagi, H., Kato, K., Komatsu, Y., Kadomatsu, K., Uchimura, K., GlcNAc6ST3 is a keratan sulfate sulfotransferase for the protein-tyrosine phosphatase PTPRZ in the adult brain. Sci. Rep. 9, 4387 (2019)

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

不安障害モデルマウスの脳内分泌タンパク質のプロテオーム解析

研究代表者氏名　板倉　誠 [1)]
研究分担者氏名　飯田　諭宜 [2)]，笹岡　俊邦 [3)]

[1)] 北里大学医学部生化学　[2)] 北里大学医学部精神科　[3)] 新潟大学脳研究所

研究要旨

情動の 1 つである不安感が過度に誘発される疾患が不安障害である。不安障害は、生涯の罹患率が 15～20%におよび治療法の開発が急務となっている。そのため、不安感を誘発する脳内分子機構の詳細を明らかにすることは非常に重要である。これまでにセロトニンやドーパミンといった低分子量の神経伝達物質が不安感の誘発に関与することが明らかにされている。またペプチド性の神経伝達物質であるニューロペプチド Y には抗不安作用があると考えられている。そこで本研究では不安感に関与するタンパク質の同定を目的とし、無麻酔下のマウス脳内分泌タンパク質を、マイクロダイアリシス法を用いて回収し、質量分析器で同定・定量する実験系の構築を試みた。マウス海馬のマイクロダイアリシスを行ったところ、約 260 種類の脳内分泌タンパク質を同定することができた。また脳内分泌タンパク質の一部は、脱分極刺激によって細胞外の量が増加する結果を得た。

A.研究目的

高ストレス社会では、不安障害や抑うつといった精神疾患を抱える患者が増加しており、その発症機序の解明が重要な課題となっている。

不安障害や抑うつでは、健常人とは脳内の神経活動が異なると考えられている。またその際には神経伝達物質をはじめとする様々な脳内分泌タンパク質も変動していることが予想される。

そこで本研究では、無麻酔下のマウス脳内分泌タンパク質を回収・定量する実験法を確立することを目的とする。この実験法を用いて、正常マウスと情動障害を示す疾患モデルマウスの脳内分泌タンパク質を比較することで、疾患の発症機序の解明に寄与できると考えている。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. マイクロダイアリシスによるマウス海馬の脳内分泌タンパク質の回収

すべての動物実験は、北里大学における動物実験等に関する規程に従って行った。

8～10 週齢のオスの C57B6/N マウスの海馬に手術によって、ガイドカニューラ(エイコム)を埋め込む。ガイドカニューラの挿入による損傷からの回復のため、マウスを 1 日飼育する。その後、タンパク質回収用の透析プローブ(エイコム)をガイドに差し込み、ペプチドマイクロダイアリシスを行った(Fig. 1)。通常のマイクロダイアリシスとは異なり、シリンジポンプによる送液だけでなく、ローターポンプを用いて能動的

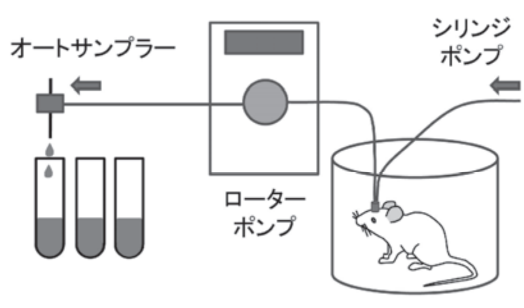


Fig. 1 *In vivo* ペプチドマイクロダイアリシス

に透析液を回収した。送液の組成は、Low K^+ 溶液(1 mg/ml BSA, 140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose, 15 mM HEPES-NaOH, and pH 7.4)および High K^+ 溶液(1 mg/ml BSA, 95 mM NaCl, 59.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose, 15 mM HEPES-NaOH, and pH 7.4) を用いた。High K^+ 溶液の灌流は、透析プローブの周りの神経細胞を脱分極し、神経活動依存的に分泌されるタンパク質の回収を目的として行った。送液は 2 μl/min で行い 30 分間ずつオートサンプラーによって分取した。

2.マウス海馬の脳内分泌タンパク質の同定

ペプチドマイクロダイアリシスによって回収した溶液を LC-MS/MS システム(EASY-nLC 1000, Q Exactive, Thermo Fisher Scientific)で分析し、Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific)を用いてタンパク質の同定を行った。

質量分析器を用いたタンパク質の同定は、共同研究者の小寺教授 [北里大学理学部疾患プロテオミクスセンター] にお願いした。

C.研究結果

マウス海馬からマイクロダイアリシスによって回収した Low K^+ 溶液，High K^+ 溶液に含まれているタンパク質を、質量分析器を用いて 263 種類同定した。約半数のタンパク質は、シグナル配列と考えられる疎水性アミノ酸のクラスターをアミノ末端側に含んでいた。したがって、少なくとも同定したタンパク質の多くは分泌タンパク質であることが示唆される。

生理機能 (GOTERM_BP_4)

Term	Count	%	P-value
protein activation cascade	21	9.5	3.6E-21
peptidase inhibitor activity	41	18.6	1.4E-14
fibrinolysis	12	5.5	4.8E-17
blood coagulation	23	10.5	1.0E-16

タンパク質の機能 (GOTERM_MF_4)

Term	Count	%	P-value
endopeptidase regulator activity	31	14.1	1.2E-23
peptidase inhibitor activity	31	14.1	2.4E-23
protease binding	11	5	4.4E-6
serine-type peptidase activity	14	6.4	5.4E-6

Table 1 回収液に含まれるタンパク質のGO解析

また、同定したタンパク質の生理機能を GO 解析で検討したところ、プロテアーゼインヒビター，補体系，血液凝固・線溶系といった血漿中に見られるタンパク質が多く含まれていた(Table 1)。しかしながら、アンジオテンシン，アディポネクチンといったホルモンやサイトカインも 6 種類同定することができた。

次に Low K^+ 溶液と High K^+ 溶液の灌流後の回収液から同定したタンパク質を比較した。存在量の目安になる PSM 値が、High K^+ 溶液に Low K^+ 溶液から切り替えた結果、増加したタンパク質が 8 種類あった(Table 2) 。PSM 値の合計値の上位 10 位までのタンパク質は、High K^+ 溶液に交換後もほとんど変動を示さなかった。

D.考察

A0A0G2JF07	Complement component factor I
A0A0G2JGY9	Phospholipid phosphatase related 4(Plppr4)
P12246	Serum amyloid P-component (Apcs)
Q4V9W0	Serine peptidase inhibitor, clade A, member 3G(Serpina3g)
Q60785	Collagen, type I, alpha 1(Col1a1)
Q62238	Sex-limited protein Slp(w7) alpha-gamma chain
Q8CC60	Glutathione peroxidase 5(Gpx5)
Q91ZW9	CD209 antigen-like protein C (Cd209c)

Table 2 脱分極刺激中に透析液で増加するタンパク質

マウス海馬からペプチドマイクロダイアリシスによって回収した溶液から同定された 63 種類のタンパク質(PSM 値≧2)と、以前に同定したマウス髄液タンパク質の PSM 値の上位 63 種類(PSM 値≧18)を比較したところ、21 種類のタンパク質のみが共通であった。42 種類のタンパク質が異なっているため、マイクロダイアリシスによって、髄液とは異なる細胞外成分を回収できていることが確認できた。また、回収したタンパク質は、血漿タンパク質の組成とも大きく異なっていた。

しかしながら、回収液中に炎症や損傷治癒に関与するタンパク質が多く含まれていることから、手術による損傷からの治癒が不十分であったと考えられる。

また、High K^+ 溶液の灌流後の回収液に含まれていることが期待されるニューロペプチド Y(NPY)や脳由来神経栄養因子(BDNF)は、今回の実験では同定することができなかった。Low

K^+ 溶液を High K^+ 溶液に切り替えることで、新たに同定されるタンパク質(Table 2)もあるため、NPY や BDNF が検出されなかったのは、マイクロダイアリシスによるタンパク質の回収率が低いことが原因の 1 つであると考えられる。今度、タンパク質の回収率を上げるため、透析プローブの材質および形状，透析溶液の組成などを工夫する必要がある。

E. 結論

マイクロダイアリシスによって、無麻酔下のマウス脳内分泌タンパク質を回収、同定する実験系のベースを確立することはできた。

しかしながら、同定できたタンパク質の数は不十分であり、様々な実験系の改良によって、同定されるタンパク質の種類を増やすことが求められる。同定タンパク質の数を増やした後に、不安障害や抑うつの疾患モデルマウスと正常マウスの脳内分泌タンパク質の比較解析を行いたい。

F.研究発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

神経障害エステラーゼの機能解析

研究代表者氏名　　木村　穣 1)
研究分担者氏名　加藤　明 1)　笹岡俊邦 2)

1) 所属　東海大学医学部　2) 所属 新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野

研究要旨

シックハウス症候群患者は有機リン暴露も原因の一つとされ、2013年に我々は患者の単核球において、Neuropathy Target Esterase (以下NTE)の活性が健常者より有意に高いことを報告した。NTEは有機リン複合体変化により神経病変を引き起こす可能性があると考え、まず質量分析による複合体を目指したが,最終的にゲル電気泳動で一部の有機リンにおいて複合体の存在を確認するにとどまった。また、NTEをコードする*PNPLA6*遺伝子に変異のある疾患（ataxiaを含む）が近年報告されていることから、ヒト遺伝子導入マウスおよびマウスホモログ遺伝子の変異系統をCRISPR/Cas9法により多数作成し、RotaRod解析やOpen Field解析などの行動解析を含む表現型を解析することにより当該遺伝子の機能を探った。その結果、遺伝子操作マウスでは酵素活性のみならず表現型に変化が認められた。

A. 研究目的

これまでに確立したヒト NTE の高発現系統や活性中心等に変異を持つ遺伝子操作マウスを利用し、シックハウス症候群発症に関わる揮発化学物質や有機リンに対する、感受性を調べると共に、ほぼ全身に発現する NTE の主に神経系における機能解析を行うことを目的とする。また、我々は有機リン-NTE 複合体の存在が神経機能を低下させているという仮説のもとに、NTE-有機リン複合体の存在を証明することも一つの目標とした。一方、有機リン農薬中毒患者の死後脳における NTE の状況解析は柿田教授からの試料提供を得ている。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

昨年度までにヒト NTE 高発現マウスの他に、CRISPR/Cas9 マウス *pnpla6* 変異マウス(微少変異マウス)を複数系統得ていたが、今年度も同様の方法でさらに数例の変異系統を樹立した。ホモマウス取得にはヘテロマウスの交配によった。表現型解析のうち、行動解析には RotaRod 解析（Med associates Inc.社）、および Open Field 解析(60cm x 60cm、15min 計測後、Duo Mouse により解析)を用いた。

質量分析に関しては、大腸菌に高発現させたヒト NTE について、まずは、MS: LCMS-IT-TOF (Shimadzu) LC: Prominence Nano system(Shimadzu) により解析した。3種の有機リンを反応させウェスタンブロット解析等は Phos tag Gel（富士フイルム和光純薬工業)を用い、NTE 抗体(Santa Cruz 社 G-4)により、常法によって実施した。

動物実験、遺伝子組換え実験に関しては計画書を提出し、東海大学の承認を得て進めた。また、死後脳を使用させていただくことについては新潟大学および東海大学の倫理委員会の承認を得ている。なお、本研究における利益相反はない。

C. 研究結果

NTE-有機リン複合体解析を目指して、まずは高発現 NTE についてトリプシン分解ペプチドの同定を試みたが、残念ながら安定した結果は得られなかった。そこでリン酸化状態の違いを異

なる電気泳動バンドとして分離検出出来るPhos-tag ゲルを用いて複合体の検出を試みた。結果として、DDVP では移動度の違いはなかったが、マラチオンについて高分子側への移動が検出できた。

ヒト NTE 高発現マウスについては、以前に報告したように、皮膚でのフタル酸エステル（シックハウス症候群原因物質の一つ）代謝がマウス型からヒト型に変換していることを追認した。

マウス NTE（*pnpla6*）遺伝子変異ヘテロマウス系統複数種の解析では一般的には活動性の低下や運動機能の低下が見られるが、今年度活性中心の変異を複数種得たことにより、活性中心付近２アミノ酸交換型では NTE 活性低下や行動解析でも野生型マウスとさして変わらないのに対し、２ヌクレオチド、４ヌクレオチド欠損型などでは当該遺伝子もしくは NTE の活性が低下する傾向が観察されるとともに、走行距離が短くロータロッド試験でも同腹の野生型マウスに比べて成績が悪い個体がしばしば観察された。以上はすべてヘテロ型変異マウスの結果である。

またヘテロ型変異マウス間の交配では、今のところホモ型マウスの出生は観察され図、すべてヘテロ型か野生型の遺伝子型となっている。

D. 考察

NTE-有機リン複合体の質量分析解析がうまくいかなった点については、海外で高性能の質量分析器を用いた解析結果がブチルコリンエステラーゼではあるものの成功例が報告されているので、今回の結果は用いた質量分析器の性能の限界であったと思われる。一方、Phos-tag gel での複合体検出はマラチオンで成功したものの、DDVP ではうまくいっておらず、これも Phos-tag gel の限界かもしれない。ただしもう少し条件を変更するなどして追加実験がまたれる。

ヒト NTE 高発現マウスについては、皮膚などからの環境物質の吸収などについて、ヒト疾患モデルとしての利用が期待できる。

マウスホモログ変異マウスでは、ホモ型の出生は今のところ認められず、これは既報のコンベンショナルノックアウトマウスの結果と一致する。胎生中期の胎盤でのアポトーシスによるものかどうかを現在検討中である。また、行動解析は出生後の日数などにもよって変化するのでなかなか確定的なことは結論できないが、いずれも２-3 日の実験条件への馴化を経て実施した。結果、遺伝子変異の影響は少なからず協調運動機能に影響を与えているようである。さらなる解析が必要であるが、これが Oliver-MacFarlane 症候群、Laurence-Moon 症候群、Boucher-Neuhauser 症候群等種々のヒト遺伝性疾患のモデルとなることを期待している。シックハウス症候群との関係では遺伝子操作マウスを用いての有機リン暴露等を詳細に検討したい。

自殺企図の農薬摂取等による有機リンを原因とする死後脳の検討は新たな例が認められなかったので、症例報告的に現在結果をまとめている。

E. 結論

以下に今年度の結論を述べる。１）質量分析による NTE-有機リン複合体検出に至らなかったが、３種の有機リンのうちマラチオンにおいては複合体の検出ができた。２）遺伝子操作マウスの結果からは、マウス脳で当該遺伝子が神経機能に影響を及ぼしていることが判明した。３）また微少変異ホモ個体が得られないことから、コンベンショナルノックアウトマウスの場合と同じく、胎生期における当該遺伝子の機能の重要性が示唆された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表　，

なし

2. 学会発表

１）阿部如子、田中正史、本杉奈美、伊藤誠敏、大久保朋一、加藤明、坂部貢、木村穣：有機リンによる神経障害発症機序の解明に向けて　第 27 回日本臨床環境医学会学術集会 2018.7.7-8 三重

２）畑中朋美、Khampeeraphan Ramphai、瀧本駿、本杉奈美、阿部如子、竹下秀、岡村陽介、木村穣：　色素性乾皮症患者の QOL 改善を目的とした紫外線吸収なのシート製剤の創製　第 27 回日本臨床環境医学会学術集会 2018.7.7-8 三重

３）阿部如子、田中正史、本杉奈美、伊藤誠敏、大久保朋一、加藤明、坂部貢、木村穣：有機

リンによる神経障害発症メカニズムについての研究
第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.28-30 横浜

4）木村穣、加藤明、阿部如子、本杉奈美、坂部貢、: ヒト Neuropathy Target Esterase 高発現マウスにおけとマウスホモログ遺伝子変異マウスの行動解析
第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.28-30 横浜

G.知的財産権の出願・登録状況（予定をむ）

1.特許取得
なし
2.実用新案登録
なし
3.その他
なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

グアム島のパーキンソン認知症と筋萎縮性側索硬化症：リン酸化 TDP-43 とリン酸化タウの脳内進展様式

研究代表者　小柳　清光 [1, 2]
研究分担者氏名　橋本　智代 [3]，柿田　明美 [4]

[1]信州大学医学部神経難病学講座　[2]初石病院脳機能研究施設
[3]産業医科大学神経内科　[4]新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

タウオパチ−と TDP-43 オパチーが共在するグアム島のパーキンソン認知症（G−PDC）と筋萎縮性側索硬化症（G-ALS）、および G-PDC-G-ALS 合併症例の発病機構を解明するために、今年度、G-PDC と G-ALS、G-PDC-G-ALS 合併例およびグアム人対照例（G-con）の脳・脊髄におけるリン酸化（p-）タウ（tau）免疫染色陽性所見の形態学的特徴と局在、進展様式を検索し、その特徴を解析した。グアム島症例の p-tau 陽性所見は G-con および G-ALS では少数で、G-PDC および G-PDC-G-ALS 合併例では多数認められた。p-tau 陽性所見の進展様式は、陰性またはごく少数が海馬などに見られる症例（Stage 0）、少数の陽性所見が海馬、扁桃核、眼窩回、上前頭回と青斑核に見られる Stage I、側頭葉と眼窩回、扁桃体と中脳被蓋に多量の、前頭葉、頭頂葉皮質と基底核、視床、橋および延髄被蓋に中等量の陽性所見がみられる Stage IV までの 5 段階（Stage 0 - IV）に分けられた。p-tau 陽性所見は、Stage I から II までは殆どが神経原線維変化（NFT）であり、Stage III では NFT とスレッドが陽性であった。Stage IV ではこれらにアストロサイトの陽性所見（granular hazy astrocyte: Oyanagi K, et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997） が重畳した。AD と比較したグアム島症例の p-tau 陽性所見の特徴は、(1)スレッドが乏しいこと、(2)海馬や前頭葉皮質に発し、大脳皮質と基底核を広範に侵して脳幹への進展が顕著であり、5 段階のステージに分けられること、(3) ステージ IV ではアストロサイトの陽性所見（granular hazy astrocyte: Oyanagi K, et al. 1997）が多数認められること、が上げられる。グアム島症例と AD は、同じく 4 リピート +3 リピートのタウアイソフォームを構成成分とするタウオパチーであるが、グアム島症例と AD の p-tau は根本的に異なるメカニズムによって生じた可能性があり、脳脊髄内を異なる様式で進展していた。

A. 研究目的

タウオパチ−と TDP-43 オパチーが共存する稀な疾患であるグアム島のパーキンソン認知症（G−PDC）と筋萎縮性側索硬化症（G-ALS）の発病機構を解明する。

昨年度の新潟大学脳研究所共同研究（#2907）により、リン酸化（p-）TDP-43 の脳内進展様式を G-PDC、G-ALS 及び G-PDC-G-ALS 合併例、グアム人対照（G-con）、日本人前頭側頭葉変性症（J-FTLD-TDP）、日本人 ALS（J-ALS）、日本人認知症を伴う ALS（J-ALS-D）、日本人対照（J-con）で、脳脊髄 34 箇所を p-TDP-43 免疫染色し、神経細胞脱落との関連を解析した。

その結果は、(1)G-PDC では pTDP-43 は大脳と脳幹に広範囲かつ大量に存在し、しかも皮質の神経細胞のみならず白質でもみとめられたこと、(2)G-ALS では下位運動ニューロンで見られ、J-ALS と部位的にも量的にも同様であり、(3)G-PDC-ALS 合併例では大脳脳幹は G-PDC と同様で、これに加え脊髄では G-ALS および J-ALS と同様の p-TDP-43 がみられたこと、(4)J-FTLD-TDP と J-ALS-D とは前頭葉と側頭葉の p-TDP-43 は G-PDC より顕著であったが、

脳幹への拡がりはG-PDCより弱かったこと、を見出し、TDP-43オパチーの中でグアム島症例は屹立した神経病理学的所見を有することを報告した。

今年度の継続研究により、G-PDC、G-ALS及びG-PDC-G-ALS合併例、G-conにおけるリン酸化(p-)タウ(tau)免疫染色陽性所見の脳・脊髄における形態学的特徴と局在、進展様式を検索し、所見をアルツハイマー病(AD)と比較してグアム島症例におけるp-tauの特異性を解析した。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

G-PDC 13剖検例、G-ALS 9剖検例、G-PDC-G-ALS合併 5剖検例、G-con 8剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋された脳脊髄34箇所の6ミクロン厚切片をp-tau(AT-8)免疫染色し、その陽性所見の形態学的特徴と局在を検索し、陽性所見の進展様式を検討した。なお34計測箇所は昨年度の共同研究と同様、前頭葉皮質と白質、運動野皮質と白質、側頭葉皮質と白質、尾状核、被殻、淡蒼球、視床、内包、扁桃核、海馬、歯状核、海馬傍回、黒質、中脳水道周囲灰白質、動眼神経核、中脳網様体、赤核、大脳脚、顔面神経核、橋核、橋網様体、舌下神経核、延髄網様体、下オリーブ核、小脳皮質、歯状核、脊髄前角と後角、脊髄白質である。

C. 研究結果

(1)p-tau陽性所見は、G-conおよびG-ALSでは少数で、G-PDCおよびG-PDC-G-ALS合併例では多数認められた。(2)p-tau陽性所見の進展様式は、陰性症例(Stage 0)、海馬、扁桃核、眼窩回、上前頭回と青斑核に少数の陽性所見が見られるStage I、側頭葉内側部と扁桃体、中脳被蓋に中等量の、前頭葉と頭頂葉皮質、基底核と視床、橋、延髄被蓋に散在性に陽性所見が見られるStage II、これらの部の陽性所見が増量し、散在性にスレッドが認められるStage III、側頭葉と眼窩回、扁桃体と中脳被蓋に多量の、前頭葉、頭頂葉皮質と基底核、視床、橋および延髄被蓋に中等量の陽性所見がみられるStage IVまでの5段階(Stage 0 - IV)に分けられた。(3)p-tau陽性所見は、Stage IからIIまでは殆どが神経原線維変化(NFT)であり、Stage IIIではNFTとスレッドが陽性であった。Stage IVではこれらに加えアストロサイトの陽性所見(granular hazy astrocyte: Oyanagi K, et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997）が多数認められた。

D. 考察

グアム島症例とADその他のタウオパチーとTDP-43オパチーとの神経病理学的所見の比較では、タウアイソフォームがグアム島症例とADでは4リピート+3リピートであり、4リピート疾患である進行性核上性麻痺や皮質基底核変性症、嗜銀性顆粒認知症と、また3リピート疾患であるピック小体病とはタウ生成機構が異なること、グアム島症例特にG-PDCおよびG-PDC-G-ALS合併例には多くのNFTが認められるがADとは異なり老人斑は一般に少数であること、またG-PDCとG-PDC-G-ALS合併例にはp-TDPが大脳皮質のみならず白質等に多量に存在する点こと、などからグアム島症例は他のタウオパチーとTDP-43オパチーとは発症機構が異なる疾患群であると理解されてきた。

本研究によりグアム島症例のp-tauの脳内進展様式が他のタウオパチーとは異なる特徴的なものであることを明らかにした。

昨年度のグアム島症例のTDP-43に関する共同研究結果を本年の研究結果に併せ総合すると、G-PDCは多数のp-tauとTDP-43を併せ示す屹立した疾患であり、G-ALSはJ-ALSとは区別出来ない疾患であること、G-PDCとG-ALSは異なる疾患であること、G-PDC-G-ALS合併例は、G-PDCとG-ALSが「合併した」疾患であること、が明らかとなった。

E. 結論

グアム島症例のp-tau陽性所見の特徴は、(1)スレッドが乏しいこと、(2)海馬や前頭葉皮質に発し、大脳皮質と基底核を広範に侵して脳幹への進展が顕著で5段階のステージ(0-IV)に分けられること、(3)ステージIVではアストロサイトの陽性所見(granular hazy astrocyte: Oyanagi K, et al. 1997)が多数認められること、が上げられる。グアム島症例とADは、同じく4リピート+3リピートのタウアイソフォームを構成成分とするタウオパチーであるが、グアム島症例とADのp-tauは根本的に異なるメカニズムによって生じた可能性があり、脳脊髄内を異なる様式で進展していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Verheijen BM, Oyanagi K, van Leeuwen FW. Dysfunction of protein control in parkinsonism-dementia complex of Guam. Front Neurol 9: Article 173, 2018 doi: 10.3389/fneur.2018.00173
2. Shintaku M, Kaneda D, Oyanagi K. Atypical lower motor neuron disease with enlargement of Nissl substance.Clin Neuropathol 37: 74-81, 2018 doi: 10.5414/NP301065
3. Saito R, Nozaki H, Kato T, Toyoshima Y, Tanaka H, Tsubata Y, Morioka T, Horikawa Y, Oyanagi K, Morita T, Onodera O, Kakita A: Retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy: clinicopathologic features of an autopsied patient with a heterozygous TREX1 mutation. J Neuropathol Exp Neurol 78: 181-186, 2019
4. Kobayashi M, Sakai Y, Kariya S, Sakai H, Hineno A, Oyanagi K, Kanno Y: First pathological report of a denovo CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma patient presenting with Guillain-Barré syndrome-like neuropathy due to neurolymphomatosis. Neuropathology 38: 417-421, 2018

2.学会発表

1. Oyanagi K, Hashimoto T, Yamazaki M, Yamada M, Takahashi H, Kakita A. Staging of brain lesions by phosphorylated tau-immunohistochemistry in the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. International Congress of Neuropathology, September 25, 2018, Tokyo
2. Oyanagi K, Kinoshita M, Satoh J, Ishihara K, Hasegawa K, Terada S, Yoshida M, Akiyama H, Mitsuyama Y, Ikeda S. Dynamic changes in microglia along with progression of lesion stages in ALSP and Nasu-Hakola disease. International Congress of Neuropathology, September 25, 2018, Tokyo

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

ありません。

2.実用新案登録

ありません。

3.その他

ありません。

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

げっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析

研究代表者氏名　加藤　明 [1)]
研究分担者氏名　那波　宏之 [2)]

1）東海大学医学部生体構造機能学　2）新潟大学脳研究所基礎神経科学部門

研究要旨

眼球運動異常を呈する神経疾患の客観的診断基準を確立する目的で前年度作製した EGF 皮下投与による環境誘発型統合失調症モデルマウスについて解析を行なったところ、発達初期の低体重、早期開眼、自発性眼球運動の低周波揺らぎに加え、反射性眼球運動の亢進が観察された。今後、脳の特定領域の形態・機能不全の有無、リスペリドン投与による眼球運動異常のレスキュー実験などの解析を進めることで、特に統合失調症の発症機序や治療への応用が期待される。

A. 研究目的

眼球運動は視覚情報の入出力の検出系であると共に、脳内の異常を客観的かつ非侵襲的に読み出す優れた指標である。しばしばその発症や進行度合いを患者の主観に頼らざるを得ないケースが生じる神経疾患においては、疾患の明確かつ客観的な早期鑑別基準の確立が必要とされる。統合失調症は神経症状を有する精神疾患であり、先天的及び後天的な様々な疾患原因が提唱されているが、その全容は明らかではない。最近、統合失調症患者の眼球運動異常が明らかとなり、眼球運動が客観的診断指標となり得るという解析結果が報告されたが、異常を生じるメカニズムについては不明である。本共同研究では、生後直後のマウスへの EGF 投与により、統合失調症患者に多く見られるドーパミン神経異常を誘発する疾患モデル動物を作製し、眼球運動を中心とした神経生理学的解析を行なうことで、統合失調症の客観的診断基準を確立することを目的とする。すでに当該モデル動物は、大脳基底核の異常から運動変化も観察されている。評価指標としての眼球運動計測の有効性を明らかにすることにより、将来的には他の神経精神疾患への応用も見据える。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

前年度作製し、眼球運動計測を行なったヒト EGF 皮下投与マウス (ヒト EGF を生後 2 日目から 10 日目まで 1 日 1 回皮下投与 (0.875 μg/体重 1 g) した C57BL/6Ncr マウス) の解析を行なった。眼球運動計測は、生理食塩水を皮下投与した対照群と共に生後 10 日目以降通常環境下で飼育し、生後 10 週齢 から 17 週齢まで各個体隔週で行なった。眼球運動は、前庭刺激により頭部運動と逆方向に生じる前庭動眼反射 (vestibulo-ocular reflex: VOR) 及び視野の大きな動きに追随する視運動性眼球反応 (optokinetic response: OKR) を計測し、刺激に対する眼球運動の振幅 (gain) 及びタイミング (phase) を算出した。前庭刺激、視覚刺激共、水平方向の正弦波状刺激を用いた (最大角速度 10°/s、周波数 0.125-1.0 Hz)。ヒト EGF 投与群の体重、開眼時期、明所及び暗所における自発性眼球反応中の揺らぎの周波数解析については前年度報告済みである。これらの実験はすべて東海大学動物実験委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

前年度に報告した生後一か月までの低体重、開眼時期の早期シフト、自発性眼球運動の低周波数ピークに加え、ヒト EGF 投与群マウスでは OKR gain が対照群に比べて高い傾向があることがわかった (図 1)。この傾向は特に計測初期、生後 10 週齢から 13 週齢までに顕著にみられ、また計測に用いた 4 つの異なる刺激周波数全てで同様の傾向がみられた。一方、VOR については大きな差はみられなかった。

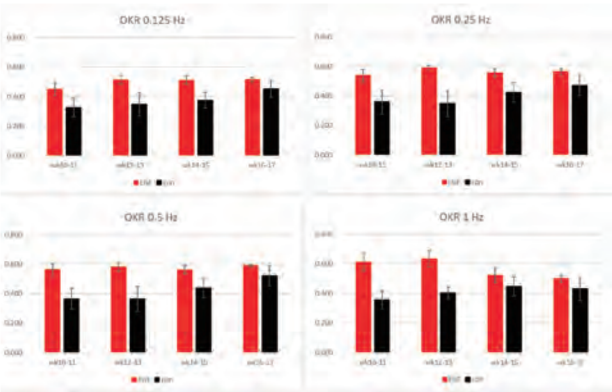


図 1. ヒト EGF 皮下投与マウスの OKR gain

D. 考察

今回 EGF 投与群で観察された OKR gain の増加の原因として、EGF 投与による開眼時期の早期シフトとのリンクを考慮する必要がある。すなわち、対照群に比べて早い時期に視覚刺激に晒された結果、視覚刺激誘導性の眼球運動システムの発達が早まった可能性がある。一方で、EGF 投与群では自発性眼球運動の低周波数の揺らぎが見られることから、統合失調症患者の眼球運動異常を反映している可能性も否定できない。現在、視覚刺激及び前庭刺激中の眼球運動の詳細な周波数解析を行ない、刺激周波数以外の異常な眼球運動の有無について解析を進めている。さらに、ヒト EGF 投与の追加実験（EGF 投与後長期間にわたる眼球運動計測、リスペリドン投与によるレスキュー実験など）並びに組織学的解析による EGF 投与が脳の特定の領域に与える影響、特にドーパミン神経を含む神経細胞形態及び機能への影響についても検討を行なう予定である。これらの実験については既に平成 31 年度の共同利用・共同研究に採択済みである。

E. 結論

生後ヒト EGF を投与した C57BL/6 マウスでは、発達初期の低体重、早期開眼、自発性眼球運動の低周波揺らぎに加え、視運動性眼球運動の振幅増加を認めた。これらの結果は、ヒト EGF 皮下投与マウスがドーパミン神経異常に由来する統合失調症モデルマウスとしての特性を有し、客観的指標としての眼球運動計測を基にした統合失調症発症メカニズムへのアプローチに用いることができる可能性を示唆する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

加藤明. 神経障害エステラーゼの *in vivo* における機能解析及びげっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析. 新潟大学脳研究所共同研究共同利用合同セミナー. 2018.12.19, 新潟

加藤明.「眼」で診る脳　～前庭動眼反射を中心として～. 第 10 回日本スポーツ視覚研究会. 2018.8.26, 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ドーパミン受容体コンディショナルノックダウンマウスを用いたパーキンソン病の病態生理の解析

研究代表者氏名　南部　篤 1)
研究分担者氏名　知見　聡美 1)、笹岡　俊邦 2)

1) 生理学研究所 生体システム　2) 新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野

研究要旨

パーキンソン病は、ドーパミン作動性神経細胞が変性、脱落することによって、無動、筋強剛、振戦などの運動障害を生じる神経難病であるが、その病態生理については不明な点が多い。本研究では、ドーパミンD1およびD2受容体を介する神経伝達がそれぞれ、パーキンソン病症状の発現にどのように寄与するのかを明らかにすることを目的として、D1/D2 受容体の発現を調節できるコンディショナルノックダウンマウスを作製し、覚醒下で神経活動を記録する実験を行う。今年度はD2受容体ノックダウンマウスの作製を進めたが、作製を待つ間、D2受容体ノックアウトマウスの神経活動の記録・解析を行い、6-OHDA を用いて作製したパーキンソン病モデルマウスとの比較を行った。その結果、パーキンソン病モデルの淡蒼球外節ニューロンで観察される自発発火と大脳皮質の電気刺激に対する応答様式の異常は、主にD2受容体を介する情報伝達の消失に起因することが示唆された。

A.研究目的

パーキンソン病は、ドーパミン作動性神経細胞が変性、脱落することによって、無動、筋強剛、振戦などの重篤な運動障害を生じる神経難病であるが、その病態生理については不明な部分が多い。本研究では、ドーパミンD1およびD2受容体の発現を調節できるコンディショナルノックダウンマウスを作製し、これらの受容体を介する情報伝達を阻害した際に生じる神経活動の変化と各症状の発現との関係を調べることにより、D1 および D2 受容体を介するドーパミン神経伝達がそれぞれ、パーキンソン病症状の発現にどの様に関与するのかを明らかにすることを目的とする。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

今年度は、D1 受容体の発現は正常で D2 受容体の発現が on/off 可能なD2受容体ノックダウンマウスの作製を進めた。D2受容体ノックダウンマウスの作製を待つ間、比較のために D2 受容体ノックアウトマウスの神経活動の記録・解析を行った。

マウスに十分なハンドリングを行い、実験環境に馴化させた後、ケタミン（100 mg/kg）・キシラジン（2-5 mg/kg）の腹腔内投与による麻酔下において手術を行い、頭部固定器具をマウスの頭蓋骨に装着した。また、大脳皮質運動野に刺激電極を埋め込み留置した。マウス頭部を固定器具により無痛的にステレオ装置に固定し、大脳基底核ニューロンの活動を覚醒下で記録した。ドーパミン作動性ニューロンの主な投射先は、大脳基底核の入力部である線条体であり、線条体の直接路ニューロンはD1受容体を、間接路ニューロンはD2受容体を発現しているので、間接路ニューロンの投射先である淡蒼球外節（GPe）の神経活動を記録した。GPe ニューロンの自発発火の頻度とパターン、大脳皮質の電気刺激に対する応答パターンを記録し、野生型マウス、および、6-OHDA を脳内に投与することによって作製したパーキンソン病モデルマウスとの比較を行った。

動物飼育中には注意深く様子を観察し、健康状態

を維持するように努め、動物が苦痛を感じる状態が長期に亘り、回復が困難な場合には、ただちに安楽死の処置をとるようにした。

本研究計画は所属研究機関の動物実験委員会の審査、承認を受けており、すべて「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の使用及び保管等に関する基準」および「自然科学研究機構岡崎３機関における動物実験に関する指針」を遵守して行った。動物実験および飼育保管は、動物実験委員会の承認を受けた実験室で行った。また、本研究計画はP1A レベルの遺伝子組換え実験を含むため、所属研究機関の組換えDNA 委員会の審査、承認を受け、関連する法令、ならびに、これに基づいて作成された所属研究機関の「組換えDNA 実験安全管理規定」を遵守して行った。実験場所に関しては、組換えDNA 委員会の審査、承認を受けているP1A レベルの実験室で行った。

C.研究結果

野生型マウスのGPe ニューロンは、約50 Hz のランダムな自発発火を示すが、6-OHDA パーキンソン病モデルマウスでは、バースト発火を含む異常な発火様式が観察された。ドーパミンD2受容体ノックアウトマウスのGPe ニューロンの活動を記録したところ、パーキンソン病モデルマウスのGPe ニューロンとよく似た自発活動パターンを示すことがわかった。また、野生型マウスのGPe ニューロンは、大脳皮質の電気刺激に対して「早い興奮－抑制－遅い興奮」という３相性の応答を示すが、パーキンソン病モデルマウスのGPe ニューロンでは、大脳皮質由来の抑制とそれに続く遅い興奮が有意に増強されていた。D2 受容体ノックアウトマウスのGPe ニューロンにおいて大脳皮質の電気刺激に対する応答を調べたところ、パーキンソン病モデルマウスのGPe ニューロンとよく似た応答様式を示すことがわかった。

D.考察

線条体の間接路ニューロンは、ドーパミンD2受容体を発現しており、GPe に投射することが知られている。6-OHDA パーキンソン病モデルマウスのGPe ニューロンは、自発発火においても、大脳皮質の電気刺激に対する応答様式においても、野生型マウスのGPe ニューロンとは異なっていた。D2 受容体ノックアウトマウスのGPe ニューロンが、パーキンソン病モデルのGPe ニューロンとよく似た自発活動および大脳皮質の電気刺激に対する応答様式を示したことから、パーキンソン病モデルマウスのGPe ニューロンで観察された異常な活動様式は、D2 受容体を介する情報伝達が消失したことに起因すると考えられる。

E.結論

パーキンソン病モデルの淡蒼球外節ニューロンで観察される自発発火と大脳皮質の電気刺激に対する応答様式の異常は、主にドーパミンD2受容体を介する情報伝達の消失に起因することが示唆された。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

なし

2.学会発表（学会名・発表年月・開催地なども記入)

Sasaoka T, Sato A, Chiken S, Okubo T, Abe M, Kawamura M, Saito N, Oda K, Sakuma T, Uchiyama S, Abe M, Tanaka M, Yamamoto Y, Jimbo Y, Sato T, Fujisawa N, Sakimura K, Nambu A (2018.7.26) Elucidation of motor control mechanism using genetically mice harboring tetracycline regulated expression on D1/D2 dopamine receptors. 第４１回日本神経科学大会（神戸）ポスター

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

新規疼痛関連分子の脳および脊髄後角での神経可塑性における機能の解析

研究代表者氏名　片野　泰代 1)
研究分担者氏名　崎村　建司 2)，阿部　学 2)　笹岡　俊邦 2)

1)　関西医科大学医化学　2)　新潟大学脳研究所

研究要旨
慢性疼痛病態では、触覚あるいは痛覚の感受性を亢進させる神経の可塑的変化が生じる。本病態に関わる分子を同定するために、脊髄後角の後シナプス肥厚部でプロテオミクス解析を行い、有意に増加する分子とし、CASK-interacting protein 1 (Caskin1)を同定した。Caskin1 は CASK に相互作用する分子として同定されたが、哺乳類での in vivo における機能は不明のままであった。そのことから、申請者は Caskin1 の機能について明らかにするために、マウスにおける分子局在と、新潟大学脳研究所の支援を受け作成した Caskin1 のノックアウトマウスでの行動解析をおこなった。そして、Caskin1 が神経系に広く発現しており、Caskin1 を欠損したマウスでは野生型に比べ強い不安様行動と侵害刺激に対する感受性の増大を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

神経障害性疼痛を始めとする慢性疼痛病態では、触覚や痛覚といった体性感覚の感受性が亢進し、アロディニアや痛覚過敏といった異常感覚が生じる。しかしながら、その異常感覚の発症機序は未だ明らかではない。本研究では本病態への関連候補分子として同定した Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK)-interacting protein 1 (Caskin1)の in vivo での機能を明らかにすることを目的としておこなった。

B. 研究方法

Caskin1 の分子局在を明らかにするために特異的な抗体を作成する。Caskin1-flox マウスを新潟大学脳研究所の支援を受け作成し、Cre ドライバーマウスとの交配にて、Caskin1-KO マウスを作出する。同 KO マウスを陰性対照とし、Caskin1 の発現部位を免疫染色および western blotting 法にて明らかにする。さらに同腹交配によって得られた野生型および Caskin1-KO マウスによる網羅的な行動解析を実施し、その表現型について明らかにする。

C. 研究結果

Caskin1 は脳と精巣にわずかに認められる程度で、心臓、膵臓、肺、肝臓、骨格筋のいずれの組織からも検出されなかった。また、一次求心性線維の細胞体 (DRG)あるいは坐骨神経といった末梢神経系からも検出されなかった。他方、中枢神経系では脳、脊髄のいずれの領域からも広く発現することが免疫染色および、western blot で確認された。また Caskin1 は、細胞内において広く発現する分子である一方、一部はシナプスに局在することがシナプスのマーカー蛋白である PSD-95 あるいは synaptophysin との共染色で確認できた。

さらに Caskin1-KO マウスを用いた網羅的行動バッテリーテストの結果、複数の表現型異常が確認された。Caskin1 欠損マウスでは強い不安様行動と侵害刺激に対する感受性の増大を示すことも明らかになった。

D. 考察

今回解析対照とした Caskin1 は脊髄後角で慢

性疼痛病態に関与する可能性がある分子として同定している。そして、今回 Caskin1 が健常時においても、侵害刺激の感受性に関与することと、不安様行動を示すことを明らかにしいている。人において、不安様行動を示すようなうつ的傾向では疼痛閾値が低い傾向を示すことが知られているが、その原因については明らかにされていない。そのことから、Caskin1 で得られた成果は、これらの原因について明らかにする一助になるかもしれない。

E. 結論

Caskin1 は生理的および病態生理的両方の疼痛の伝達に関与することが示唆された。さらに、中枢神経系に広く発現し、Caskin1-KO では複数の表現型異常を示したことから、疼痛の伝達以外にも多くの神経機能を担う可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Katano, T., Takao, K., Abe, M., Yamazaki, M., Watanabe, M., Miyakawa, T., Sakimura, K., Ito, S. Distribution of Caskin1 protein and phenotypic characterization of its knockout mice using a comprehensive behavioral test battery. *Mol. Brain* **11**(1):63, 2018.

2. 学会発表（学会名・発表年月・開催地なども記入）

Katano, T., Takao, K., Abe, M., Yamazaki, M., Watanabe, M., Miyakawa, T., Sakimura, K. and Ito, S.
Protein Distribution and functional characterization of CASK-interacting protein 1 (Caskin1) in mice.
48th annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, November 3-7, 2018.

片野泰代、高雄啓三、阿部学、山崎真弥、渡辺雅彦、宮川剛、崎村建司、伊藤誠二
CASK-interacting protein 1 (Caskin1)の中枢神経系における機能的特徴の解析
第 41 回日本神経科学大会、兵庫（神戸ポートアイランド）2018 年 7 月 26-29 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
　なし
2. 実用新案登録
　なし
3. その他
　なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析

研究代表者氏名　岩里　琢治[1,2]
研究分担者氏名　笹岡　俊邦[3]

1）国立遺伝学研究所 神経回路構築研究室
＊ 2019年1月より、遺伝研改組により研究室名変更
2）総合研究大学院大学 生命科学研究科 遺伝学専攻
3）新潟大学 脳研究所 動物資源開発研究分野

研究要旨

感覚系の神経回路は、（主に生後の）発達期に感覚器からの入力を受けることによって精緻化され成熟する。モデル動物を用いて発達期特有の回路精緻化の仕組みを解明することは、ヒトの子供の脳が環境の影響を受けながら正常に発達する機構やその破綻としての発達障害を理解する上でも重要である。マウス体性感覚系の回路は、新生児期に脳幹、視床、大脳皮質の各レベルで順次精緻化されるが、本課題では、解析が最も遅れている脳幹における精緻化のメカニズムの理解を目指している。特に、神経活動依存的回路発達において重要な役割が期待される分子の役割に注目して解析を行っている。

A. 研究目的

哺乳類など高等動物の神経回路が正常に発達するためには、主に生後の一定期間に、感覚器からの入力や自発活動などの神経活動を受ける中で精緻化されることが必要である。マウスなどモデル動物を用いて神経回路精緻化の仕組みを理解することは、ヒトの脳が子供期に環境の影響を受けながら発達する機構を理解する上でも重要である。マウス体性感覚系は、バレル（大脳皮質）、バレロイド（視床）、バレレット（脳幹）と呼ばれる特徴的な神経回路構造をもつが、これらは新生仔期のヒゲからの入力に依存して形成される。これらの特長により、マウス体性感覚系は神経活動依存的な回路発達の機構を詳細に理解するための優れたモデルとして広く認識されている。マウス体性感覚系の回路発達は脳幹、視床、大脳皮質の各レベルで順次起きるが、我々を含む多くの研究室が、これまでに大脳皮質、視床における分子機構の解明に精力的に取り組んできた。一方、脳幹における分子機構解明は大きく遅れている。本課題では、脳幹におけるメカニズムに焦点を絞り、その理解を目指している。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

我々を含む国内外のグループの研究により、これまでに体性感覚系の大脳皮質および視床の回路精緻化において重要な働きが示唆される分子が多数同定されてきたが、その中のいくつかは脳幹でも重要な働きをすることが期待される。本研究では可塑性において重要な役割を担うことが期待されるカルシウムシグナルに特に注目して解析を行っている。脳幹特異的 Cre マウスとしては、これまでに2種類のマウスを入手あるいは作製しており、平成30年度も引き続き用いた。

組換え DNA 実験は、法律と所属機関の規程に従い、機関長に承認された計画に沿って行った。動物を使用する実験は、文科省の定める指針と所属研究機関の規程に従い、機関長に承認された計画に沿って行った。特定化学物質等の取り扱いについては、所属研究機関の規程に従い使用した。研究に用いる実験動物・試薬などの提供に関する MTA は提携済みである。

C. 研究結果、考察

平成29年度に引き続き平成30年度も、神経活動依存的神経回路精緻化におけるカルシウムシグナルに重要な役割を担うことが期待される分子に注目し、その一つに関して作製した脳幹特異的ノックアウトマウスの解析を進めて来た。具体的にはバレル、バレロイド、バレレットの染色など組織学的解析を中心に行い定量解析のためサンプル数を増やした。さらに平成30年度は、それと並行して、別の有力なカルシウム関連分子に関しても、すでに入手していた flox マウスと上記の脳幹特異的 Cre マウスの一つとの交配をすることによって脳幹特異的ノックアウトマウスの作製を進めた。これまでに得られた数匹のマウスに関して、新生仔期の段階で脳を摘出、切片を作製し、組織学的解析によりヒゲ感覚地図の解析を行ってきた。解析は脳幹に加えて、視床、大脳皮質のレベルでも行い、脳幹で遺伝子が欠損したことが視床や大脳皮質のレベルでの回路精緻化に間接的にどのような影響を与えるかという視点で解析を行ってきた。一連の解析は、遺伝子変異マウスの作出とその神経回路異常の解析に関して、豊富な知識と経験をもつ笹岡俊邦教授の協力を得ることによって、効率的な研究遂行が可能となったものであり、本共同研究によるご支援に感謝いたします。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

（原著論文）

Nakazawa S, Mizuno H, **Iwasato T.**
Differential dynamics of cortical neuron dendritic trees revealed by long-term in vivo imaging in neonates.
Nature Commun. **9** (1), 3106. (2018) [査読有り]
2018 年 8 月
doi: 10.1038/s41467-018-05563-0.

Mizuno H, Nakazawa S, **Iwasato T.**
In Vivo Two-photon Imaging of Cortical Neurons in Neonatal Mice.
J. Vis. Exp. (140), e58340, (*JoVE)* (2018)
2018 年 10 月
doi:10.3791/58340

Mizuno, H., Ikezoe, K., Nakazawa, S., Sato, T., Kitamura, K., **Iwasato, T.**
Patchwork-Type Spontaneous Activity in Neonatal Barrel Cortex Layer 4 Transmitted via Thalamocortical Projections.
Cell Rep. **22** (1), 123-135. (2018) [査読有り]
2018 年 1 月
doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.012.

（総説）

中沢信吾、水野秀信、岩里琢治
マウス体性感覚野の回路発達と神経活動
実験医学　増刊「脳神経回路と高次脳機能」36(12)　53-61 羊土社（2018 年）

Takuji Iwasato, Reha S Erzurumlu.
Development of tactile sensory circuits in the CNS.
Current Opinion in Neurobiology, 53:66–75, ELSEVIER (2018)
doi: 10.1016/j.conb.2018.06.001.

香取将太、岩里琢治
神経回路形成における RacGAPα キメリンの役割
CLINICAL NEUROSCIENCE 36(4) 501-503 中外医学社 (2018 年)

2. 学会発表

Takuji Iwasato（招待講演）
In vivo imaging of barrel cortex layer 4 during thalamocortical reorganization
遺伝研研究会 2018 “Circuit construction in the mammalian brain”, 2018 年 12 月 20 日-21 日，（三島）

岩里琢治（招待講演）
マウス体性感覚系神経回路の生後発達
新潟脳神経研究会特別例会　2018 年 11 月 9 日（新潟）

Takuji Iwasato（招待講演）
In vivo imaging of barrel cortex circuit refinement in neonates
Spontaneous Activity in Brain Development (SPONT 2018), 2018 年 10 月 8 日-10 日，Leiden (Netherlands)

岩里琢治
Unique features of spontaneous activity in neonatal barrel cortex layer 4
CSHA(Cold Spring Harbor Asia) on

Neuroscience 2018（ｺｰﾙﾄﾞｽﾌﾟﾘﾝｸﾞﾊｰﾊﾞｰ国際神経会議）「Latest Advances in Development and Function of Neuronal Circuits」　2018年9月25日-28日（淡路）ポスター

岩里琢治（招待講演）
In vivo functional and morphological imaging of neural circuit refinement in the neonatal barrel cortex
CSHA(Cold Spring Harbor Asia) on Neuroscience 2018（ｺｰﾙﾄﾞｽﾌﾟﾘﾝｸﾞﾊｰﾊﾞｰ国際神経会議）「Latest Advances in Development and Function of Neuronal Circuits」サテライトシンポジウム　2018年9月24日（大阪）

岩里琢治（招待講演）
新生仔マウスのバレル皮質神経回路発達の in vivo イメージング(In vivo imaging of barrel cortex circuit refinement in neonates)
第41回日本神経科学大会　2018年7月26日-29日（神戸）

岩里琢治（招待講演）
マウスで迫る「赤ん坊の脳の発達のしくみ」
JT生命誌研究館・国立遺伝学研究所共同企画シンポジウム「遺伝学の最先端研究から見る生命誌」　2018年5月19日（大阪府高槻市）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

*Cacna1g*変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態の解明

研究代表者　土井　宏 1)
研究分担者　笹岡　俊邦 2)
研究分担者　田中　章景 1)

1) 所属 横浜市立大学大学院医学研究科　神経内科学・脳卒中医学

2) 所属 新潟大学脳研究所　動物資源開発研究分野

研究要旨
常染色体優性脊髄小脳失調症42型（SCA42）家系において同定された*CACNA1G*のR1715H変異（マウス*Cacna1g* R1723Hに相当）をゲノム編集により導入したノックインマウスを作成・解析した。その結果、11~20週齢以降において、ヘテロおよびホモノックインマウスともにRotarod testで緩徐進行性の運動機能障害を認めた。ヒトと類似した若年発症で緩徐進行型の小脳失調症状を再現する、良好な動物モデルの作成に成功したと考えられる。病理学的には50週齢においてプルキンエ細胞の脱落、分子層の菲薄化を認め、電気生理学的には小脳急性スライスを用いたプルキンエ細胞のパッチクランプにおいて電位電圧曲線の偏位を認め、rebound firingの減少が認められた。その一方、プルキンエ細胞へのシナプス伝達には異常がないことを示した。現在、カルシウムチャネル修飾薬による治療反応性の検討を開始している。

A.研究目的
常染色体優性脊髄小脳失調症42型（SCA42）家系において同定された*CACNA1G*(T型電位依存性カルシウムシャネルCav3.1をコード)のR1715H変異（マウス*Cacna1g* R1723Hに相当）をゲノム編集により導入したノックインマウス（*Cacna1g*_R1723H_KI マウス）を作成し、表現型を多方面から解析することで、SCA42 の神経変性機序を明らかにする。また、本モデルを用いて、T 型電位依存性カルシウムチャンネル機能修飾薬等を用いたSCA42疾患修飾療法を開発することを目的とする。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）
*Cacna1g*_R1723H_KIマウスの作成
CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によって、マウス*Cacna1g*にSCA42原因変異であるヒト*CACNA1G*のR1715Hに相当するR1723H変異を導入したノックインマウスを作成し、ホモ接合体を中心に解析した。マウス実験については横浜市立大学動物実験委員会の承認（F-A-16-043）を得て行った。

*Cacna1g*_R1723H_KIマウスの行動解析
ヘテロおよびホモノックインマウスの行動解析に際してはClasping test、Wire hang test、Rotarod test、Footprint testなど運動機能を中心とした解析を50週齢を目途に行った。

*Cacna1g*_R1723H_KI マウスの電気生理学的・病理学的解析
野生型、ホモノックインマウスを対象に解析を行った。病理学的解析に際しては通常の形態学的評価に加えてプルキンエ細胞数の評価、Klüver-Barrera 染色によるミエリンの評価など、多方面から解析した。また、それぞれのマウス小脳から作成した急性スライスを用いて、プルキンエ細胞のパッチクランプを行った。ま

た、生体マウスからのプルキンエ細胞の電気活動記録を行い、変異がもたらす電気的活動の変化を解析した。

薬物投与試験

T 型カルシウムチャネル機能促進薬および阻害薬の投与を開始した。

C.研究結果

***Cacna1g*_R1723H_KI マウスの行動解析・モデルマウスとしての確立**

SCA42 原因変異 R1715H と相同の変異を導入した *Cacna1g*_R1723H_KI マウスの作成は完了し、ヘテロノックイン、ホモノックインマウスを得た。本年度は Clasping test、Wire hang test、Rotarod test、Footprint test など運動機能を中心に行動解析を 50 週齢まで行った。その結果、11~20 週齢の時点でヘテロノックインマウス、ホモノックインマウスともに Rotarod test において野生型に比較し、軽度な進行性の運動機能の低下を認めた。

***Cacna1g*_R1723H_KI マウスにおける神経変性**

病理学的解析に際しては通常の形態学的評価に加えて、神経細胞数の評価、抗 $Ca_V3.1$ 抗体を用いた免疫染色など多角的な病理学的解析を行った結果、30 週齢ではホモ、ヘテロノックインマウス共に有意な異常を認めなかったが、50 週齢のホモノックインマウスで分子層の菲薄化、小脳プルキンエ細胞の脱落が、50 週齢のヘテロノックインマウスで小脳プルキンエ細胞の脱落が確認された。

***Cacna1g*_R1723H_KI マウスにおける電気生理学的異常**

野生型およびホモノックインマウスの急性スライスを用いたプルキンエ細胞の電気生理学的解析では、電位電圧曲線の右方へのシフト、rebound firing の減少が認められた。その一方、プルキンエ細胞へのシナプス伝達には異常がないことを示した。

薬物投与試験

T 型カルシウムチャネル機能促進薬および阻害薬の投与を開始し現在は rotarod test で投与効果を検証している。

D.考察

本研究で作成した *Cacna1g*_R1723H_KI ヘテロノックイン、ホモノックインマウスともに Rotarod test において緩徐進行性の運動機能の低下を認めた。一方、Wire hang test では異常を認めなかったため、筋力低下は来していないと考えられ、本マウスモデルで見られた運動機能障害は失調を反映していると考えられた。ヒトにおける表現型としては、20〜30 台発症で非常に緩徐な小脳失調症状の進行を認めることから、これに合致する表現型と考え、良好な動物モデルの作成に成功したと考えられる。また、50 週齢でプルキンエ細胞脱落が明らかとり、病理学的にも SCA42 の所見を再現することができた。

興味深いことに、*Cacna1g*_R1723H_KI ホモノックインマウスは 30 週齢において病理学的にプルキンエ細胞脱落は認められなかったが、それ以前から失調症状が発症していた。これは単純なプルキンエ細胞脱落が失調の原因でない可能性を示唆する結果であった。現在症状発現しているがプルキンエ細胞脱落をきたしていない時期から治療介入を行っており、今後評価を継続していく。

E.結論

SCA42 の表現型を再現するマウスの作成に成功した。現在カルシウムチャネル機能修飾薬薬の投与試験を継続している。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

Kunii M, Doi H, Ishii Y, Ohba C, Tanaka K, Tada M, Fukai R, Hashiguchi S, Kishida H, Ueda N, Kudo Y, Kugimoto C, Nakano T, Udaka N, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Ito Y, Takahashi K, Nakamura H, Tomita-Katsumoto A, Takeuchi H, Koyano S, Matsumoto N, Tanaka F:Genetic analysis of adult leukoencephalopathy patients using a custom-designed gene panel. Clin Genet, **94**(2):232-238, 2018.

Yahikozawa H, Miyatake S, Sakai T, Uehara T, Yamada M, Hanyu N, Futatsugi Y, Doi H, Koyano S, Tanaka F, Suzuki A, Matsumoto N, Yoshida K: A Japanese Family of Spinocerebellar Ataxia Type 21: Clinical and Neuropathological Studies. Cerebellum, 17(5):525-530, 2018.

Hamanaka K, Takahashi K, Miyatake S, Mitsuhashi S, Hamanoue H, Miyaji Y, Fukai R, Doi H, Fujita A, Imagawa E, Iwama K, Nakashima M, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Takeuchi H, Tanaka F, Matsumoto N: Confirmation of *SLC5A7*-related distal hereditary motor neuropathy 7 in a family outside Wales. Clin Genet, **94**(2):274-275, 2018.

Miyatake S, Schneeberger S, Koyama N, Yokochi K, Ohmura K, Shiina M, Mori H, Koshimizu E, Imagawa E, Uchiyama Y, Mitsuhashi S, Frith MC, Fujita A, Satoh M, Taguri M, Tomono Y, Takahashi K, Doi H, Takeuchi H, Nakashima M, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Saitsu H, Tanaka F, Ogata K, Hennet T, Matsumoto N. Biallelic *COLGALT1* variants are associated with cerebral small vessel disease. Ann Neurol, **84**(6):843-853, 2018.・

2. 学会発表

土井宏，児矢野繁，宮武聡子，中島伸二，中沢由華，國井美紗子，勝元敦子，深井綾子，荻朋男，竹内英之，松本直通，田中章景: Clinical characteristics of four patients with *ERCC4* mutations manifesting ataxia phenotype（英語口演）. 2018 年 5 月，札幌.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

視床特殊核におけるグルタミン酸受容体 GluD1 による入力選択的回路形成機構

研究代表者氏名　渡辺雅彦 [1]
研究分担者氏名　崎村建司 [2]、今野幸太郎 [1]

[1] 北海道大学大学院医学研究科　[2] 新潟大学脳研究所

研究要旨

視床外側膝状体は視覚の中継核として、網膜で捉えた視覚情報を視覚野に伝達する。視床後内側腹側核は体性感覚路の中継核であり、頭頸部の温痛覚や触圧覚を体性感覚野に伝達する。これらの視床特殊核は、末梢からの感覚情報を上行性に受け取るだけでなく、大脳皮質からの下行性投射や、モノアミンやアセチルコリンなどの調節系投射も受けとる。本研究では、多様な入力を受ける視床特殊核におけるグルタミン酸受容体 GluD1 のシナプス発現と回路形成における役割を検討した。平成 29 年度の共同利用・共同研究の推進により、GluD1 が VGluT2 陽性の終末と入力選択的なシナプス発現を明らかにすることができた。GluD1 欠損マウスを用いた平成 30 年度の共同利用・共同研究の推進により、外側膝状体に入力する VGluT2 陽性シナプスが著明に減少することが明らかとなった。

A. 研究目的

グルタミン酸は、脳における興奮性シナプス伝達の主要な伝達物質で、神経情報の生成と伝達、脳の可塑性、シナプス回路発達などに重要な役割を果たしる。これを伝えるグルタミン酸受容体の中には、グルタミン酸との結合能を失いシナプス伝達機能を失ってしまった不思議な分子ファミリー（GluD ファミリー）が存在する。これまで小脳プルキンエ細胞に豊富な GluD2 についての研究から、この分子がシナプスの構造的および機能的結合性を制御する重要な分子であり、その遺伝子異常により小脳性の運動障害が起こることを遺伝子変異を有するヒト家系やマウスの研究から明らかになっている。しかし、その類縁分子である GluD1 については、シナプス発現から分子機能に至るまで、長い間不明な分子である。2014 年、私達は GluD1 が成体脳に広く発現する分子であり、小脳においては入力選択的な回路発現を示す分子であることを見出した。

本研究プロジェクトでは、新潟大学において作成された GluD1 欠損マウスを共同研究として利用することにより、感覚情報の中継核である視床特殊核におけるシナプス回路形成制御における役割を、GluD1 欠損マウスの形態学的解析を通して解明することを目的として行なった。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

GluD1 欠損マウス、Cbln1 欠損マウスおよびそのコントロールマウスの視床特殊核におけるシナプス形成の違いを、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光抗体法により解析した。

C.研究結果

視床外側膝状体（DLG）において、GluD1 陽性のシグナルは小胞膜アセチルコリン輸送体(VAChT)を共発現する VGluT2 陽性終末と選択的に向かい合っていた。さらに、GluD1 は Cbln1 とも共局在していた。この神経化学特性を手がかりに、GluD1 欠損マウスおよびコントロールマウスの DLG ニューロン上における VGluT2/VAChT 共陽性終末および Cbln1 陽性構造の分布を比較した。その結果、GluD1 欠損マウスにおいて有意に減少し

ていることが判明した。同様に、Cbln1 欠損マウスにおいて、DLG ニューロン上における VGluT2/VAChT 共陽性終末および GluD1 陽性構造の有意な減少も確認された。

D.考察

小脳において、GluD2 はプルキンエ細胞と平行線維の間のシナプスに選択的に発現し、分泌生タンパク質 Cbln1 を介してシナプス形成に重要な役割を果たしている。一方、GluD1 は小脳分子層の介在ニューロンと平行線維の間のシナプスに選択的に発現し、そのシナプス形成に重要な役割を果たしている。上記の研究成果は、小脳外領域においても GluD1 は入力選択的な発現をする分子であること、さらに Cbln1 を介してシナプス形成を促進することを世界で初めて明らかにすることができた。平成 31 年度の継続研究により、体性感覚路の中継核である視床後内側腹側核においても、同様の分子機能を発揮しているかについて迫りたいと考えている。

E.結論

この共同研究プロジェクトを通して、視床特殊核において GluD1 は特定の入力線維との間のシナプスに発現する分子であり、少なくとも外側膝状体においては GluD1 が Cbln1 との接着機構を介してその入力線維とのシナプス結合を促進していることが明らかとなった。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

認知症病態における海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド（Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide:HCNP）発現メカニズムの解析

研究代表者氏名　松川　則之[1)]
研究分担者氏名　池内　健[2)]、水野　将行[1)]

1) 所属　名古屋市立大学　神経内科　2) 所属　新潟大学･脳研究所

研究要旨

アルツハイマー病(AD)脳では前脳基底野コリン作動性神経機能障害が確認され、その賦活化によって認知機能・意欲の改善をすることが臨床的にも確認されている。しかしながら、ヒト脳内における前脳基底野コリン作動性神経機能の調節メカニズムは不明な点が多い。我々はこれまでに、海馬可溶性成分に前脳基底野コリン作動性神経のアセチルコリン産生を誘導するペプチド（HCNP）を発見し、その生理機能を報告してきた。また、アルツハイマー病海馬において早期から発現が低下することを報告した。現在遺伝子改変動物（ＫＯマウス）においても、海馬内Ach量の低下および海馬神経活動の抑制が確認されてきている（未報告)。HCNP 発現メカニズムおよびアルツハイマー病を始めとする認知症における発現低下の機序解明を目指す。

A.研究目的

平成２９年度までに、アルツハイマー病脳における網羅的遺伝子発現量解析を行い、ＨＣＮＰの脳内発現量が、病理変化（Braak stage）進行に従い低下する確認した。今回はHCNP発現低下の機序解明を明らかにするために、同意の得られたアルツハイマー病脳の全ゲノム配列を解析し、プロモーター領域のＳＮＰ解析を行う。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

患者もしくは家族同意のもとに、新潟大学脳研究所に蓄積されたアルツハイマー病脳病理脳100 例を用いた全シークエンス解析を実施しFASTQ を取得，バリアントコールにより VCF を作成した。HCNPおよび本因子のプロモーター領域のＳＮＰを解析する。

C.研究結果

プロモーター領域に有意なＳＮＰは確認されなかった。100例中１例にHCNP前駆体Lys113Glu置換が確認された。

D.考察

HCNP発現低下のメカニズムは、プロモーター領域のSNPの可能性は低いことが明らかになった。これは、少数例を用いて検討した我々のデータと一致する結果であった（Okita K 2009 BBRC)。DNA メチル化などエピジェネティクスの関与について検討したい。また、頻度は低いが HCNP前駆体蛋白に変異が認められた。この病的意義について今後検討を加えたい。

E.結論

アルツハイマー病病理の進行に伴い、発現量が低下するHCNPの発現調節には、プロモーター領域のＳＮＰは関与しない可能性が示された。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

該当するものはありません

2.学会発表

該当するものはありません

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

該当するものはありません

2. 実用新案登録

該当するものはありません

3. その他

該当するものはありません

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

神経変性疾患におけるNAKα3 神経細胞の機能障害と細胞死機構の解明

研究代表者氏名　星　美奈子 1)
研究分担者氏名　柿田　明美 2)

1）神戸医療産業都市推進機構（旧：先端医療振興財団）　2）新潟大学脳研究所

研究要旨

研究代表者である星は、柿田博士との長年の共同研究により、アルツハイマー病患者脳から神経細胞死活性を持つ Aβ集合体「アミロスフェロイド（ASPD）」の単離に初めて成功し（Noguchi *et al*. JBC2009）、ASPD は神経細胞の生存と機能に必須な Na, K-ATPase ポンプのα3 サブユニット（NAKα3）に特異的に結合することで細胞死を誘導するという全く新たな神経細胞死メカニズムを世界に提示した（Ohnishi *et al*. PNAS2015）。

NAKα3 の活性阻害による神経細胞死は、その後、パーキンソン病や ALS においても相次いで報告され、星らの発見した細胞死メカニズムが神経変性疾患に共通な経路であることが解ってきた。本研究では、実際に各種神経変性疾患の患者脳及び正常脳において NAKα3 神経細胞の分布や発現を解析し、ヒト脳における NAKα3 神経細胞の生理的機能と病態における関与を検証したい。

A. 研究目的

神経細胞死がアルツハイマー病の臨床症状と最も相関するが、神経細胞死の原因及び機構は殆ど解明されていなかった。我々は、新潟大学脳研究所より剖検脳の供与を受けることで、アルツハイマー病患者脳より神経毒性を持つ球状の Aβ集合体＝Amylospheroid（以下、ASPD）の単離に初めて成功し（Noguchi *et al*, JBC2009）、さらに ASPD が神経細胞に特異的に発現し、その生存と機能に必須である Na, K-ATPase ポンプのα3 サブユニット（NAKα3）に結合することでそのポンプ活性を阻害し、成熟神経に細胞死を誘導することを見出した（Ohnishi *et al*. PNAS2015）。このとおり、過去の共同研究により、我々はアルツハイマー病の原因物質の同定と神経細胞死の分子メカニズムの解明に大きく貢献した、さらに、ASPD に結合するペプチド（ASPD 結合ペプチド）を同定しているが、これは ASPD と ASPD ターゲット分子との結合を阻害し、ASPD の神経細胞死活性を中和することができることがわかり、神経細胞死を直接阻止する治療薬、ASPD を検出する PET プローブ開発という、２つの大きな創薬及び医療技術基盤の可能性を拓いた。この我々が見出した新たな神経細胞死メカニズムが、実は主要な神経変性疾患に共通なメカニズムであることが解ったことは我々に取っても驚きで有り、これまでの新潟大学脳研究所との共同研究成果をさらに発展させアルツハイマー病に留まらず神経変性疾患全体を俯瞰することは是非とも重要で有り、新たなプロジェクトとして共同研究実施することとした。

本研究では、これまでの共同研究により我々がアルツハイマー病で明らかにしてきた NAKα3 の機能障害による神経細胞死が、本当に他の神経変性疾患で起きているのかを実際に患者脳で検証するとともに、そもそも生理的には NAKα3 神経の分布はどうなっているのかを解明することを目的としている。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

上記目的を達成するために、以下の研究を実施する。

（１）NAKα3 に対するラビットモノクローナル

抗体を作製し、その反応性を検証する。

（２）市販の NAKα3 抗体、NAKα1 抗体を用いた固定、染色方法を改善し、再現的かつ明瞭な分布を同定出来る条件を確立する。

アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS など、主な神経変性疾患、さらに、対照群として正常脳において NAKα3 神経、NAKα1 神経の分布や発現がどうなっているのかを検証する。並行して、アルツハイマー病においては ASPD の分布なども検証を行う予定である。

C. 研究結果

これまで NAKα3 ポンプは生存にあまりに必須であるため神経変性疾患に関わるとは思われていなかったが、星らの報告に続いて、パーキンソン病や ALS においても、異常な凝集体が NAKα3 ポンプに結合することでその活性を阻害し神経細胞死を引き起こすことが相次いで報告されるに至った。しかも、パーキンソン病の原因となるαシヌクレインの凝集体が NAKα3 ポンプに結合する部位は、ASPD が NAKα3 ポンプに結合する部位とほぼ同一であることから、我々が発見した神経細胞死のメカニズムは神経変性疾患に共通な経路であることが強く示唆された。

しかしながら、NAKα3 ポンプについては、NAKα1 ポンプなどと配列の相同性が高いことから良い抗体がなく、そもそも脳内での生理的な分布が殆ど解析されていないことが解った。また、ASPD が NAKα3 ポンプに結合しその活性を阻害するメカニズムは、これまで予想されていなかった新たなメカニズムであることが解った。そこで、本研究では実際に各種神経変性疾患の患者脳及び正常脳において NAKα3 神経細胞の分布や発現を解析し、ヒト脳における NAKα3 神経細胞の生理的機能と病態における関与を検証することをめざし、まず、齧歯類組織を用いて NAKα3 神経細胞の正常での分布を解明するとともに、ヒトに対する NAKα3 選択的抗体を確立することを目指した。

ナトリウムポンプ NAK のαサブユニットは４通りあり、脳には３通りが発現している。in situ の解析から、驚いたことに NAKα3 選択的な神経細胞群が存在することが解ってきた（投稿中）。また、神経細胞種により NAKα1/ NAKα3 の発現比にはかなり差があることも分かり、それぞれがどう役割分担をしているのか興味深いところである。NAK のαサブユニットは、アミノ酸配列が動物種およびアイソフォーム間で保存性が極めて高く、選択的抗体を作ることが極めて難しい。我々は、サメ由来 NAKα1 の X 線結晶構造解析の結果から得られた三次元構造モデルに基づき、NAKα1-3 ポンプの配列が最も異なり、かつ、ポンプ表面に露出している複数の部分を選んでペプチドを作り、ウサギ、マウスを用いて、モノクローナル抗体の作成に取り組んだ。その結果、NAKα3 についてはウサギ、マウスでそれぞれ１クローン選択的抗体を得ることが出来た。しかしながら、NAKα1 と 2 については別の部位で引き続き作成中である。また、βサブユニットについても解析する必要が出てきたため、その抗体をも作成中である。今年度、NAKα3 抗体についてはヒト剖検脳での解析を実施する予定である。

D. 考察

上記のとおり、極めて順調に研究を進めることが出来た。上述した in situ の解析結果は、実は国際学会でも非常な驚きをもって受け止められた。NAKα3 ポンプがどのように関わっているのかを明らかにすることは、アルツハイマー病に留まらず各種神経変性疾患の病理診断上も極めて有効である可能性もあり、是非、特異的抗体を確立し、患者脳由来の試料を用いた解析を行いたいと考えている。

E. 結論

NAKα3 ポンプが神経変性疾患にどのように関わるかは国際的にも注目されている。得られた抗体は、神経変性疾患だけではなく、NAKα3 ポンプの遺伝的突然変異による発達障害の解析にも貢献する可能性があり、引き続き抗体の作成と解析を進めたい。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Komura, H., Kakio, S., Sasahara, T., Arai, Y., Takino, N., Sato, M., Satomura, K., Ohnishi, T., Nabesima, Y.,

Muramatsu, S., Kii, I., and Hoshi, M. **Alzheimer Aβ Assemblies Accumulate in Excitatory Neurons upon Proteasome Inhibition and Kill Nearby NAKα3 Neurons by Secretion** *iScience,* (2019), https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.01.018

2. 学会発表

ナトリウムポンプとアルツハイマー病「Na^+, K^+-ATPase α3 is a NEW death target of Alzheimer amyloid-β assembly.What shall we do next towards a better understanding of Na^+, K^+-ATPase α3's role in health and disease? , Minako Hoshi, （2018 年 6 月 7 日）第 70 回日本細胞生物学会・第 51 回発生生物学会合同大会 ランチョンセミナー5（東京）（招待講演）

Analysis of cell-type differences in APP processing and Aβ production, Shota Kakio, Minako Hoshi, （2018 年 8 月 5 日-10 日）Neurobiology of Brain Disorders（Gordon Research Conference2018）(Spain Barcelona)

Toxic amyloid-β assemblies, amylospheroids, inactivate eNOS through a NAK α3-mediated mitochondrial ROS production in human brain microvascular endothelial cells, Tomoya Sasahara, Minako Hoshi, （2018 年 8 月 5 日-10 日）Neurobiology of Brain Disorders（Gordon Research Conference2018）(Spain Barcelona)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病変の評価

研究代表者氏名　高堂　裕平 1)
研究分担者氏名　柿田　明美 2)，清水　宏 2)，樋口　真人 1)，小野　麻衣子 1)

1) 量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所　2) 新潟大学脳研究所・病理学分野

研究要旨
筋強直性ジストロフィーでは筋症状を含む多彩な症状を呈することが知られているが、中枢神経症状も日常生活に影響しうる重要な症状である。神経病理学的な検討により、筋強直性ジストロフィーの脳では異常タウ蛋白が蓄積することが知られているがその詳細については明らかになっていない。タウ病変の中枢神経症状への影響を評価するには、生体におけるタウイメージング手法が有力な手段となる。

A. 研究目的

本研究では PBB3、PM-PBB3 など放射線医学総合研究所で開発した薬剤のタウ病変への結合性を、蛍光染色やオートラジオグラフィーで評価し、生体脳で病変を画像化できる可能性を検討する。あわせて、筋強直性ジストロフィーの死後脳における異常タウ蛋白の分布および量、タウ蛋白の性状も検討する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

対象：筋強直性ジストロフィー患者の死後脳
方法：タウ PET トレーサーPM-PBB3 の病変への結合性を評価するために，PM-PBB3 を用いて以下の解析を行う．

① 死後脳組織切片を用いたオートらジオグラフィ
② 組織科学的解析（免疫染色，リガンドによる蛍光染色）

C. 研究結果

現時点までに 10 例の筋強直性ジストロフィー患者剖検脳組織において、タウ病変の分布と蓄積量の客観的評価、およびアミロイドβ、α-シヌクレイン、TDP-43 といった他の異常タンパク質病変の有無の検証を、組織化学的手法を用いて実施した。その結果、筋強直性ジストロフィー患者脳では、異なるアイソフォーム組成の異常タウにより構成される、多種のタウ病変が混在して蓄積している可能性が示された。また、上記解析により、タウ病変蓄積が中程度から高頻度と評価された症例について、剖検脳組織中のタウ病変に対するタウ PET トレーサーPM-PBB3 の結合を、蛍光染色およびオートラジオグラフィーにより検証した。その結果、混在する多種のタウ分子種病変それぞれに対して、PM-PBB3 は充分な結合性を有することが確認された。

D. 考察

筋強直性ジストロフィーの死後脳組織を用いた解析によりタウ PET トレーサーPM-PBB3 がタウ病変に結合する可能性が示唆された．先行研究によると筋強直性ジストロフィー患者では通常よりも若い年齢でタウ病変が出現することが示唆される．本研究のタウ PET トレーサーPM-PBB3 を用いた死後脳評価でも比較的若い年代でのタウの同定がなされ先行研究に矛盾のない結果であった．今後，生体内で非侵襲的にイメージングで評価することにより，筋強直性ジストロフィー患者の脳機能におけるタウ蛋白の影響について明らかになってくるものと期待される．

E. 結論

本研究により，筋強直性ジストロフィー患者脳においてタウ蛋白をイメージングによって描出できる可能性が示唆された.

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Hitoshi Shinoto, Hitoshi Shimada, Yasumasa Kokubo, Kenji Tagai, Fumitoshi Niwa, Soichiro Kitamura, Hironobu Endo, Maiko Ono, Yasuyuki Kimura, Shigeki Hirano, Maya Mimuro, Masanori Ichise, Naruhiko Sahara, Ming-Rong Zhang, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi. Tau imaging detects distinctive distribution of tau pathology in ALS/PDC on the Kii Peninsula. Neurology. 2019, 92(2): e136-e147

2. 学会発表

小野麻衣子. 認知症疾患のタウ病理とイメージング. 第 37 回日本認知症学会学術集会. 2018 年 10 月. 札幌

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

筋強直性ジストロフィーの中枢神経病態の解明

研究代表者　中森　雅之 1)
研究分担者　柿田　明美 2)
研究分担者　清水　宏 2)
研究分担者　望月　秀樹 1)

1) 大阪大学医学系研究科・神経内科学　2) 新潟大学脳研究所　病理学分野

研究要旨
筋強直性ジストロフィー(MyD)は*DMPK*遺伝子非翻訳領域のCTG繰り返し配列（リピート）の異常伸長が原因の遺伝性難治性筋疾患である。原因遺伝子より転写された、伸長したCUGリピートをもつ異常RNAの毒性により、筋細胞障害を来す可能性が示唆されている。MyDでは、骨格筋や心筋症状だけでなく、認知機能障害や性格変化、過眠など様々な中枢神経症状を呈する。こうした中枢神経症状は患者のQOLを著しく低下させるが、その機序は全く不明である。本研究では新潟大学脳研究所および大阪大学医学系研究科が保有するMyD患者脳検体を用いて、病理学的・分子生物学的・生化学的解析を網羅的にすすめることにより、MyDの中枢神経病態を解明する。

A.研究目的

筋強直性ジストロフィー(MyD)は、骨格筋のみならず、心筋、平滑筋や脳、眼、内分泌器官など、様々な臓器をおかす全身性疾患である。*DMPK*遺伝子上のCTG繰り返し配列（リピート）の異常伸長が原因であり、異常遺伝子より転写された伸長CUGリピートをもつ異常RNAの毒性により、選択的スプライシング制御因子が障害される。この結果、広汎なスプライシング異常が引き起こされ、多彩な全身症状につながるとされている。MyDでは認知機能障害や性格変化、過眠など様々な中枢神経症状を呈するが、その機序は今もって全く不明である。本研究では、MyDの中枢神経病態を解明するため、新潟大学脳研究所および大阪大学医学系研究科が保有する、病理学的変化・特徴が明らかとなっているMyD患者中枢神経病変組織で分子生物学的解析および生化学的解析を行う。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

MyD患者および疾患対象群患者剖検脳組織より白質、皮質、海馬、また脊髄からLaser Capture Microdissectionにより神経細胞を採取し、DNA, RNAを抽出した。得られたDNAを0.5-2 genome equivalentsまで希釈し、DMPK-CTGリピート増幅プライマー（Forward primer: ACCCTAGAACTGTCTTCGACTCC, Reverse primer: TTCCCGAGTAAGCAGGCAGAG)を用いてRoche Expand Long Template PCR System®によるSmall pool PCRを行った。得られたPCR産物を0.7% SeaKem agarose®ゲルにて60Ｖで４時間電気泳動し、泳動後にゲルよりAlkaline transfer法によりRoche Nylon Membrane®へDNAをトランスファーさせた。トランスファー後にUV crosslinkを行い、DIG labeled $(CAG)_7$ LNA probeによるハイブリダイゼーション（70℃、４時間）ののち、CDP-Star®による化学発光でCTGリピート含有DNAを検出して、リピート長の判定を行った。また、RNAについては微量RNA増幅後にRT-PCRにより選択的スプライシング異常の解析を、RNA-seqによる遺伝子発現解析を行った。なお、本研究は、大阪大学医学部附属病院研究倫理審

査委員会の承認を得て行った。

C.研究結果

MyD 患者各３例の側頭葉皮質、側頭葉白質、脊髄神経細胞より抽出したDNAの解析により、同一患者由来組織でもCTGリピート長とそのばらつきに大きな差があることが明らかとなった。特に、MyD患者側頭葉皮質で神経細胞ごとのCTGリピート長のばらつき(somatic instability)が大きいことが判明した（図１）。

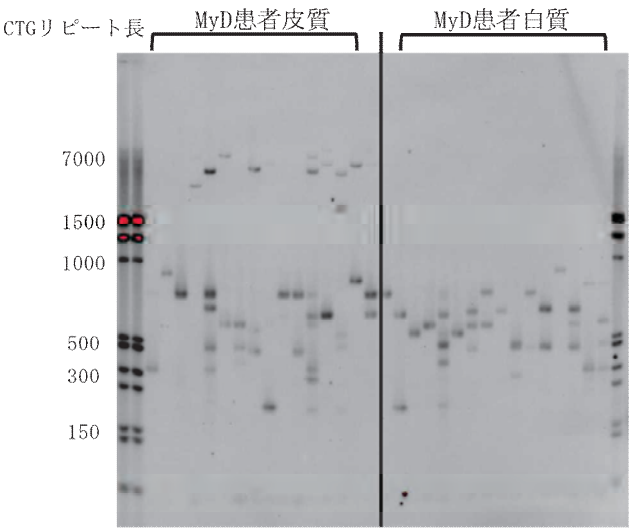


図１．Small pool PCRおよびSouthern Blot法によるMyD患者脳組織でのリピート長解析
同一MyD由来脳組織でも、皮質神経細胞でのリピート長の変動が大きく、かつリピートの大幅な伸長がみられる。

また、MyD 患者、疾患対象群患者各３例の側頭葉皮質、側頭葉白質、脊髄神経細胞より抽出したRNAの解析により、MyD患者皮質・白質・脊髄神経細胞で疾患特異的な新規スプライシング異常を多数見出したほか、発現が亢進あるいは低下している遺伝子も同定した。

D.考察

MyD 患者皮質神経細胞でCTGリピート長のばらつきが著しく大きく、また最大リピート長も長いことは、皮質神経細胞でリピート伸長に寄与する因子が存在することを強く示唆している。リピート伸長には、DNA 修復蛋白やリピート周囲のエピゲノム変化が関与することが知られており、今後MyD患者皮質神経組織でのこれらの因子の探索を行う予定にしている。

E.結論

MyD 患者中枢神経組織では、細胞ごとに CTG リピートを伸長させる要因やスプライシング異常を来す要因が異なることが判明した。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ジストロフィン結合タンパク質複合体の代謝回転に関する研究

研究代表者　今村　道博[1)]
研究分担者　武田　伸一[1)] 笹岡　俊邦[2)]

1) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
2) 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

研究要旨

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の原因遺伝子にコードされるジストロフィンは筋肉のみならず中枢神経系においても様々なタンパク質と複合体を形成し機能している。DMD ではジストロフィンが消失するだけでなく、その結合タンパク質群にも著しい減少が認められることから、これが神経や筋肉の病態と関連する可能性が議論されている。しかしながらその発現抑制の分子機序は未だ明らかでない。本研究では NH-413 筋ジストロフィーニワトリの原因遺伝子にコードされる WWP1 と呼ばれる HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼに注目し、WWP1 とこれに類似する E3 リガーゼ分子がジストロフィン結合タンパク質の発現レベル調節に関与する可能性を検証すると共に筋線維のメインテナンスに果たす役割について解析する。

A.研究目的

ジストロフィン結合タンパク質(DAP)複合体は少なくとも 10 種類の分子から構成される巨大複合体である。デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの欠損のみならず、他の構成分子の異常でも著しい複合体の減少を生じ、筋ジストロフィーとなる。本研究の目的はこのタンパク質分子群の二次的発現抑制（減少）がどのような分子機序に因り生じるのかを明らかにすることであり、特に、骨格筋に発現する HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ、WWP1, WWP2, ITCH 分子に注目して解析を行う。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

WWP1、WWP2、ITCH の３種類の E3 ユビキチンリガーゼを欠失したマウスを作製し、これらマウスの筋肉における DAP の挙動ついて解析すると共に筋発生と筋線維の成熟と維持、また、筋再生についてもどのような影響が認められるか解析する。

Wwp2 遺伝子及び *Itch* 遺伝子欠損マウスの作製：
WWP1 の欠損（WWP1-KO）と NH-413 ニワトリと同じ R441Q ミスセンス変異を導入したマウス（WWP1-KI）は既に作製しているため、本年度は *Wwp2* と *Itch* 遺伝子のノックアウトマウスを CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術で作製した。得られたマウスの一部はジストロフィンを欠失する mdx マウスと交配することによりジストロフィン結合タンパク質の安定性を解析した。また、WWP1 の機能代償を検証するため WWP1-KO マウスと WWP2-KO 及び ITCH-KO マウスを順次交配し、ユビキチン E3 リガーゼのダブルノックアウト、トリプルノックアウトマウスの作製を試みた。

尚、本研究は国立精神・神経医療研究センター内に設置されている DNA 組換え実験安全委員会及び動物実験倫理問題検討委員会での審査・承認の下に行われた。

C.研究結果

NH-413 ニワトリに認められるミスセンス変異を持つ変異型 WWP1 を培養細胞で発現させるとジ

ストロフィン結合タンパク質(DAP)複合体の主たる構成分子であるジストログリカン（DG）のうちのβ-DG サブユニットが分解され、これをニワトリ筋ジストロフィーの原因とする報告がある。しかしながら NH-413 の胸筋について筋ジストロフィーの発症前から発症後に至るまでの複数の個体について検証したところ、β-DG サブユニットの分解は認められなかった。また、我々が作製した NH-413 ニワトリと同じ変異を持つ WWP1-KI マウスにおいても同様の結果が認められた。

WWP2 及び ITCH E3 リガーゼ遺伝子の欠損マウス作製は、それぞれの分子の第二 WW ドメインをコードするエクソン 10 と 11 を標的としてゲノム編集を行った。各エクソンの 2 ヶ所にガイド RNA を設定した結果、期待通りに約 80bp の領域をアウトオブフレーム或いはインフレームで欠失するファウンダーを得ることができた。現在は、WWP2 と ITCH それぞれで変異の異なるマウス系統を樹立しているところであり、ダブル及びトリプルノックアウトマウスの完成までには至らなかった。

D. 考察

我々は NH-413 で発見された R441Q ミスセンス変異を持つ WWP1 はβ-DG を分解しないことを明らかにした。既報とは異なり、これまで我々は R441Q 変異が生じると WWP1 自身の分解が誘導され、E3 リガーゼとしての機能が失われることを示しており、今回の結果とは矛盾しない。しかしながらβ-DG が著しく減少する mdx と WWP1-KO のダブルノックアウトマウスを作製してもβ-DG の発現回復は認められなかった。但し、ここには WWP1 の機能代償の問題があり、WWP2 と ITCH 分子の機能を欠失したマウスの解析が重要になると考えられた。また、β-DG 以外にもαからδまでのサルコグリカン分子がジストロフィン消失により、著しく減少することが知られているため、この分子群の代謝回転についても検証する必要がある。

E. 結論

WWP1 分子単独の機能喪失では直ちにはβ-DG のタンパク質量に影響しないことが示された。骨格筋で発現する WWP1 類似分子の WWP2 と ITCH の役割が注目されるため、これらの E3 ユビキチンリガーゼ機能を欠失するノックアウトマウスの系統樹立と WWP1-KO 或いは KI マウスとの交配による複数分子の欠失における骨格筋の解析が待たれる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Hirata Y, Nomura K, Senga Y, Imamura M, Takeda S, Okada Y, Burden SJ, Hosooka T, Ogawa W. Hyperglycemia Promotes Muscle Atrophy Through the WWP1/KLF15 Pathway. 78th American Diabetes Association Scientific Sessions. Orland, FL (USA), Jun 23, 2018.
2. 平田悠、野村和弘、千賀陽子、今村道博、武田伸一、岡田裕子、細岡哲也、小川渉. 骨格筋量制御における KLF15 の機能の解析. 第 39 回日本肥満学会. 神戸, 2018 年 10 月 7 日.
3. 柴﨑浩之、今村道博、谷端　淳、有馬さゆり、倉岡睦季、松坂恭成、内海文彰、田沼靖一、武田伸一. 筋ジストロフィー犬の血清で見出された新規 microRNA の筋分化における解析. 第 41 回日本分子生物学会年会. 横浜 2018 年 11 月 28 日.
4. Imamura M, Inoue YU, Inoue T, Takeda S: Generation and characterization of a WWP1 knock-in mouse model for chicken muscular dystrophy. American Society for Cell Biology/European Molecular Biology Organization Annual Meeting, San Diego, CA (USA), Dec 10, 2018

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いた効率的な遺伝子改変マウス作製

研究代表者氏名　中潟　直己 1)

研究分担者氏名　中川　佳子1)　竹尾　透1)　笹岡　俊邦2)

1) 熊本大学生命資源研究・支援センター　2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

近年、ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変マウス作製が多くの施設で行われるようになり、短時間かつ低コストで遺伝子改変マウスの作製が可能となってきている。ゲノム編集技術の開発・改良は目覚ましく、本技術の利点を最大化するには、ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いた効率的な遺伝子改変マウス作製法の確立が不可欠である。本研究では、ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いた効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウス作製法の確立を目的とし検討を行った。その結果、エレクトロポレーション法と超過剰排卵誘起法（Takeo and Nakagata, 2015）、体外受精、受精卵の凍結保存などの生殖工学技術を組み合わせ、マイクロインジェクション法より効率的なゲノム編集個体の作製を行うことができた。本研究の成果は、脳疾患関連遺伝子改変マウス研究の今後の発展に大いに貢献できると考える。

A. 研究目的

近年、ジンクフィンガーヌクレアーゼや TAL エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR-Cas システムなどのゲノム編集技術が開発され、受精卵へのマイクロインジェクション法を用いて、高速な遺伝子改変マウスの作製が可能となった。私たちは、超過剰排卵誘起法（Takeo and Nakagata, 2015）、体外受精、受精卵の凍結保存などの生殖工学技術とゲノム編集技術を用いることにより、効率的な遺伝子改変マウスの作製が可能であることを報告した（Nakagawa *et al.*, 2016、2017）。これまでマイクロインジェクション法を用いた個体作製法について様々な検討を行ってきたが、本報告では、当研究室の生殖工学技術と CRISPR-Cas システム、および、より簡便なデリバリーシステムであるエレクトロポレーション法を用いた、効率的かつ簡素化されたゲノム編集個体作製法の確立を目的として下記の検討を行った。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

超過剰排卵誘起法を用いて体外受精を行い、新鮮受精卵および凍結受精卵を作製し、合成 gRNA と Cas9 タンパク質複合体（ribonucleoprotein: RNP）のエレクトロポレーションに使用した。産子への発生率、変異導入効率共に良好なノックアウトマウスの作製を目的とし、RNP のエレクトロポレーションを行うタイミング、偽妊娠雌マウスに移植する卵および胚のステージを検討した。また、ノックインマウスの作製を目的として、RNP および 1 本鎖オリゴヌクレオチドを使用した 1 アミノ酸置換個体の作製を行い、産子への発生率、ノックイン効率を確認した。なお、本研究は、熊本大学動物実験委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

超過剰排卵誘起法を用いた凍結体外受精卵を

利用したRNPエレクトロポレーション法によるゲノム編集個体の作製効率は、産子への発生率、変異導入効率、塩基置換効率全てにおいて良好であった。

D.考察

現在、受精卵へのゲノム編集においては、高額な機器や高度な技術が必要なマイクロインジェクション法に比べ、操作が簡便かつ作業時間の短いエレクトロポレーション法の使用が急激に増加している。当研究室の生殖工学技術とCRISPR-Casシステムおよびエレクトロポレーション法を組み合わせたゲノム編集個体作製法は、動物愛護、作業効率の面からみて非常に効率的な個体作製法であり、本研究で行った成果は、脳疾患関連遺伝子改変マウス研究の今後の発展に大いに貢献できると考える。

E.結論

当センターでは、これまで、様々な生殖工学技術の開発、改良のための研究を行ってきた。近年急速な発展を続けるゲノム編集技術は、遺伝子改変マウス作製のスタンダード技術となりつつあり、生殖工学技術との有効利用により、更なるゲノム編集技術の発展および効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウスの作製に貢献できると考える。また、遺伝子改変マウスの効率的な繁殖、輸送、凍結保存等に役立つ生殖工学技術の開発・改良を継続して行い、脳疾患関連遺伝子改変マウス研究の国際的な支援に貢献できれば幸いである。

F.研究発表

1.論文発表

Electroporation-mediated genome editing in vitrified/warmed mouse zygotes created by IVF via ultra-superovulation. Nakagawa Y, Sakuma T, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Exp Anim. 67:535-543 (2018).

2.学会発表

エレクトロポレーション法によるゲノム編集個体の作製-超過剰排卵誘起法を用いた体外受精卵の利用-
第65回日本実験動物学会総会
2018年5月　富山

Electroporation-Mediated Genome Editing in Vitrified/Warmed Mouse Zygotes Created by IVF via Ultra-Superovulation
ゲノム編集学会第3回大会
2018年6月　広島

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

脳・神経回路におけるドーパミンの機能解析

研究代表者氏名　小山内　実[1,2]
研究分担者氏名　谷平　大樹[1]
研究分担者氏名　笹岡　俊邦[3]
1）東北大学大学院医学系研究科　2）大阪大学大学院医学系研究科　3）新潟大学脳研究所

研究要旨
脳の神経回路におけるドーパミンの機能を明らかにするために、ドーパミン D1 受容体のコンディショナルノックダウンマウスを用いて、定量的活動依存性マンガン造影 MRI による非侵襲全脳神経活動計測及び行動実験を行った。その結果、D1 受容体をノックダウンさせたマウスでは、種々の行動実験で運動能力の低下が見られた。また、定量的活動依存性マンガン造影 MRI による全脳神経活動計測により、D1 受容体ノックダウンマウスでは、側坐核、視床の神経活動が亢進していることが分かった。今後更なる解析を行い、ドーパミン D1 受容体の機能について明らかにする。

A.研究目的

ドーパミンは神経活動調節因子として知られているが、脳の神経回路でのドーパミンの機能は必ずしも明らかではない。大脳基底核線条体のドーパミンが枯渇することでパーキンソン病が発症することからも、ドーパミンによる神経活動調節が運動制御に対して極めて重要な役割を担っていると言える。そこで本研究では、大脳基底核線条体に存在する 2 種類の投射ニューロンのうち、直接路ニューロンに発現しているドーパミン D1 受容体（D1R）を、生後ノックダウンすることにより、D1R が神経活動及び運動機能に与える影響を明らかにする。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究は東北大学環境・安全委員会遺伝子組換え実験安全専門委員会、及び同動物実験専門委員会の許可を得て行った。

D1R の機能を調べるために、実験動物には、笹岡らが作成した、ドキシサイクリン（Dox）投与により任意のタイミングで D1R をノックダウン（KD）することができる D1R-KD マウスを用いた（Chiken et al., Cereb Cortex 2015）。

このマウスおよび野生型マウスを用いて、Dox 投与前、投与初期、投与後期、投与終了後のタイミングで、運動機能等を調べるための行動実験および、全脳神経活動計測を行った。

全脳神経活動計測法には、定量的活動依存性マンガン造影 MRI 法（quantitative Activation-Induced Manganese-enhanced MRI, qAIM-MRI）を用いた（Kikuta et al., Sci Rep 2015）。この計測法は、MRI を用いた非侵襲神経活動計測であるため、行動実験を行った個体に対して神経活動計測を繰り返し行うことができる。

行動実験としては、パーキンソン病モデル動物の重篤度の判定等によく用いられる、ローターロッドテスト、カタレプシーテストを行った。

これらの実験で得られた結果を解析することにより、D1R をノックダウンした際の行動変化及び、神経活動が変化した脳の領域を明らかにした。

C.研究結果

(1) D1R ノックダウンによる行動異常

Dox 投与前、1 週間後、3 週間後に行動試験を行ったところ、ローターロッドテストでは、Dox 投与 3 週間後に、投与前及び健常動物と比べて、ロッド滞在時間の低下が見られた。

カタレプシーテストでは、Dox 投与 1 週間後

から無動時間の延長が見られ、3 週間後にはさらに無動時間が長くなった。
(2) D1R ノックダウンによる神経活動変化
qAIM-MRI による全脳神経活動計測の結果、健常マウス及び Dox 投与前と比較して、Dox 投与1 週間後のマウスでは主に側坐核の神経活動亢進が観察された。3 週間後では、脳の多くの領域で神経活動亢進が観察されたが、特に側坐核と視床の神経活動の亢進が顕著であった。

D.考察

(1) D1R ノックダウンによる行動異常
従来から提唱されている大脳基底核の神経回路モデルでは、線条体直接路は運動の開始に関与しているといわれてきた。D1R は線条体直接路に発現しており、D1R をノックダウンすることで、その神経活動に変化を及ぼすことが考えられる。そのため、本研究では行動実験の成績低下が見られたと考えることができる。しかしながら、特にローターロッドテストでは動物によるばらつきが大きく、運動能力が低下したのか、単にモチベーションが低下しているのかを区別することは、現在の結果からだけでは困難である。今後更なる行動実験を行い、行動の表現型を精査する必要がある。
(2) D1R ノックダウンによる神経活動変化
D1R-KD マウスでは Dox 投与により神経活動が亢進した領域が多数見られた。従来、D1R の活性化は神経細胞の興奮性を高めると考えられてきたが、今回の結果はこの考え方とは矛盾するように思われる。しかし、D1R が多く発現している線条体直接路ニューロンは抑制性ニューロンであり、D1R ノックダウンによりその活動が低下することにより、むしろ脳全体としては興奮性が高まる可能性が考えられる。
また、qAIM-MRI の結果では、特に側坐核で神経活動亢進が見られたが、これがどのような機序によるものかは不明である。

E.結論

D1R をノックダウンすることにより、運動機能の低下及び、側坐核をはじめとした脳の多くの領域で神経活動の亢進が見られた。今後更なる研究を重ね、D1R の機能を明らかにし、大脳基底核の機能発現メカニズムを明らかにする必要がある。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

なし

2.学会発表

小山内 実. 定量的活動依存性マンガン造影 MRI の原理とその応用. 新潟脳神経研究会特別例会. 新潟, 2018/5/28.

Osanai M, Tanihira H, Kikuta S, Fujiwara T, Homma N. Whole-brain activity history imaging by quantitative activation-induced manganese-enhanced MRI. 計測自動制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2018, 会津, 2018/9/10-12.

小山内 実. Multi-scale and multi-dimensional analysis for unraveling brain functions. 平成 30 年度 第 2 回 大脳基底核機能研究会, 会津若松, 2018/11/23-24.

小山内 実. ドーパミン D1 受容体ノックダウンマウスのマルチモーダル解析. 平成 30 年度 京都大学霊長類研究所共同利用研究会「先端技術の導入による霊長類脳科学の進展と新たな概念の創出」, 犬山, 2019/3/15-16.

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかんに対する解析

研究代表者氏名　菅野　秀宣 1)

研究分担者氏名　柿田　明美2)　中島　円1)　鈴木　皓晴1)　飯村　康司1)

1) **所属**　順天堂大学医学部 脳神経外科学講座　2) **所属**　新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

近年の画像診断の進歩により，側頭葉てんかんの中で，扁桃体腫大が注目されている．本研究では本病態を症候学的，電気生理学的，および病理学的に後方視的解析し，疾患病態を明らかにすることを目的にした．MRI 上片側性の「扁桃体腫大を伴う薬剤難治性側頭葉てんかん」，11 症例を対象に発作焦点を硬膜下電極による終夜ビデオ脳波記録で同定し，焦点切除を施行した．慢性皮質脳波の結果，てんかん発作起始部位は扁桃体のみならず高率に海馬も含まれ，広域周波数解析においても，てんかん原生マーカーとされる高周波成分が海馬に多く認められた．「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」は海馬硬化症を原因とするものとは異なり，記憶機能が保たれ，組織像では軽度の gliosis のみが観察され，病理学的変化が乏しいことが判明した．電気生理学的には，海馬がてんかん発症機序に関係し，扁桃体のみでなく海馬にもてんかん原生を有していると考えられた．

A. 研究目的

薬剤難治性側頭葉てんかんの中で，従来 MRI 上病変が指摘されなかった側頭葉てんかんの中に近年の画像検査の進歩によりその存在が明らかとなった「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」がある．これまでの報告では抗てんかん薬に良好な反応を示すとされていたが，薬剤難治性に経過し，外科手術の対象となるものも多く存在することが報告されるようになった．しかし，「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」は，病理学的診断を含め，そのてんかん原生は未だ明らかではなく，治療を進める上，病態の解明は重要な課題である．

我々は先行研究より，電気生理学的な解析の結果，その発作起始は扁桃体のみならず海馬も高率に含まれており，海馬領域のてんかん原生が重要な役割を担っていると仮説を立てた．本研究は順天堂大学で外科手術が行われた「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」症例を対象に，症候学的，電気生理学的，および病理学的に後方視的解析を行い，その病態を明らかにすることを目的にしている．

扁桃体腫大の病理像は，過去いくつかの報告例が散見されるものの一定の病理所見はなく，不明である．難治性てんかんに対する焦点切除術で得られた病理組織を新潟大学脳研究所に送付し，「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」における病理組織解析を詳細に行う共同研究を計画した．

B.研究方法

2013 年から 2017 年に順天堂大学脳神経外科・てんかんセンターで精査，加療を行ない薬剤難治性に経過した側頭葉てんかんの中で，外科手術が行われた 96 例のうち，MRI 上片側性の「扁桃体腫大

を伴う側頭葉てんかん」患者，11症例を対象とした.「扁桃体腫大」はMRI T1強調像をFree Surfer Software (Version 6.0.0; Martinos Center, Harvard University, Boston, MA, U.S.A.) を用いて体積を測定し同定した. 臨床データとしては発作初発年齢，罹患期間，発作頻度，発作症候などの症候学的検討に加え，同一心理士による神経心理学的検査を行い，MRI上の扁桃体，海馬の体積測定，フルオロデオキシグルコース (FDG)- Positron Emission Tomography (PET)による海馬及び扁桃体での脳糖代謝を検討した.

電気生理学的検討では，広域周波数帯域解析を主体とし，頭皮脳波所見と硬膜下電極による慢性皮質脳波での広域周波解析結果からてんかん原生を考察した.

病理学的検討では，当院で得られた病理組織を新潟大学脳研究所に送付し，切除された内側側頭葉検体を鈎，扁桃体，海馬の各部位ごとに詳細な病理学的解析を行なった.

本研究は順天堂大学医学部倫理委員会で審査を受けており，すでに承認を得たうえで実施された. 対象者には研究の趣旨説明文書を配布し，研究の目的・プログラム内容と方法・調査内容と方法の説明，調査は匿名で行い個人情報は厳重に保護され，研究への参加は自由意志に基づき不参加によって何も不利益はないことを伝え，書面にて同意を得た上で研究に参加して頂いた.

C.研究結果

「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」の診断に至り外科治療を行った難治性てんかん症例 11 例，平均年齢34.9歳 (range, 23-57)を対象に、本病態の症候学的特徴を検討した。

扁桃体の大きさは，病側は 1768.6 mm^3 から 2486.4 mm^3 (平均，2051.5 mm^3)であり，健側は 1503.4 mm^3 から 2471.3 mm^3 (平均，1789.8 mm^3)で，片側の扁桃体腫大を同定した($p<0.01$).

発作症候は全例に focal impaired awareness seizures (FIAS)が認められ，8例(72.7%)に手の自動症が，1例に口部自動症が認められた. 前兆症状として胃部不快感，自律神経症状を呈したものは3例(27.3%)であった.

脳糖代謝(FDG-PET)の結果では，海馬，扁桃体ともに軽度の脳糖代謝低下を認めたが，WMS™-Rウエクスラー記憶検査による記憶機能評価では「言語性記憶」,「視覚性記憶」,「注意／集中力」,および「遅延再生」全ての項目で保たれ，記憶障害は認められなかった.

硬膜下電極による慢性皮質脳波記録は，てんかん発作起始部位は扁桃体のみならず，高率に海馬も含まれ，また広域周波数解析においても，てんかん原生マーカーとして注目される高周波成分が海馬に多く認められた.

外科手術は11症例全てに扁桃体切除を施行した. 3例は海馬切除，7例の優位半球側海馬には機能温存を考慮し，多切術を施行した. 頭蓋内電極および術中脳波室より扁桃体からのてんかん波のみを認めた 1 症例は扁桃体のみの切除にとどめた。しかしながら本症例はてんかん発作の改善が認められず，12ヶ月後に海馬の追加切除を施行した.

焦点切除を必要とした「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」は，初発発作の年齢が平均 29.9 歳と海馬硬化症と比較し遅発性であったが，手術までの期間は短期間(平均5.0年)であった.

扁桃体の病理所見は，non-specific mild gliosis 3例(27.3%)のみであり，その他の病理学的異常所見は認められなかった. 海馬切除を施行した3症例の海馬病理所見はいずれも non-specific mild gliosisがあり，subtle granular cell dispersionsが確認されたが，海馬硬化所見は認められなかった.

平均 26 ヶ月(12-47 ヶ月)の術後経過期間で9例(81.8%)にEngel's classification Class I，8例(72.7%)で抗てんかん薬の減量が可能であった.

本結果から「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」では，電気生理学的に，海馬がてんかん発症機序に関係し，扁桃体のみでなく海馬にもてんかん原生を有していると考えられた. また病理学的にも症候的にも海馬硬化症を原因とするものとは異なり，記憶も温存された.

D.考察

発作症候について過去の文献では，扁桃体を含むてんかん発作は，不安・恐怖発作や自律神経症状を特徴とすると報告されるが，我々のシリーズでは27.3%にとどまり，「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」では，多くは扁桃体のみの発作症候にとど

まらず，海馬を含めた症候を示すと考察する．また我々の術中脳波記録では，扁桃体よりもむしろ海馬からのてんかん波の頻度が多く認められていた．外科治療では全ての症例で海馬に対する処理が必要であったが，その後の経過で seizure free を得たことからも「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」は海馬と扁桃体の両方がてんかん原生となっていると考察する．

病理学的所見からは，腫大化した扁桃体はほとんどの症例で異常所見はなく，切除された海馬所見もまた non-specific mild gliosis を認めるのみであった．また海馬においても，non-specific mild gliosis, subtle granular cell dispersions と病理変化はわずかであった．過去の文献では，抗てんかん薬にて良好な経過を保った扁桃体腫大の中には MRI 画像で正常に戻る報告もあり，このことから神経の恒久的なダメージや形成異常は生じていないと推察される．

今回のシリーズはまだ症例数の少ない解析となったが，将来「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」に対してさらに症例数を増やし，てんかん原生となる原因の究明が必須であると考えられた．

E.結論

我々のシリーズでは「扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん」は，扁桃体と海馬の両方がてんかん原生と考えられた．電気生理学的な検査では頭蓋内電極による慢性皮質脳波記録が重要で，てんかん発作起始を同定し，切除範囲を決定するのに有用であった．手術手技では，扁桃体のみならず海馬への処理が重要で，優位半球側の海馬多切術は，てんかん発作を制御し，術前の記銘力の状態を保つことが出来た．病理学的には，軽度の gliosis のみが観察された．

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

Hiroharu Suzuki, Hidenori Sugano, Madoka Nakajima, Takuma Higo, Yasushi Iimura, Takumi Mitsuhashi, Keiko Fusegi, Akiyoshi Kakita, Hiroshi Otsubo, Hajime Arai: The epileptogenic zone in pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy with amygdala enlargement. Epileptic Disorders 2019 in press

2.学会発表

Hiroharu Suzuki, Hidenori Sugano, Madoka Nakajima, Takuma Higo, Yasushi Iimura, Takumi Mitsuhashi, Keiko Fusegi, Akiyoshi Kakita, Hiroshi Otsubo, Hajime Arai: Amygdala is not an actual epileptic focus in temporal lobe epilepsy associated with amygdala enlargement. 2018 Annual Meeting of the American Epilepsy Society, 2018/12/4 New Orleans.

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得
なし
2.実用新案登録
なし
3.その他
なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

アルツハイマー病発症機構におけるグリア細胞病態解明

研究代表者氏名　富田　泰輔[1)]

研究分担者氏名　池内　健[2)]、宮下　哲典[2)]、春日　健作[2)]、原　範和[2)]、
高島　翔[1)]、堀　由起子[1)]

※ 脳研共同研究者（対応者）は，研究分担者に必ず記載してください。

1）東京大学大学院薬学系研究科　機能病態学教室
2）新潟大学脳研究所　生命科学リソース研究センター　遺伝子機能解析学分野

研究要旨

近年、ゲノムワイド解析の結果から、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトなどグリア細胞がアルツハイマー病の発症に関わることが示唆されている。これらグリア細胞に特異的に発現しているアルツハイマー病発症関連因子の、患者脳における発現変動やスプライシング異常を同定しそのメカニズムを解明すると同時に、病態モデルでその影響を解析し、病的意義を明らかにすることを目的として、公開されている遺伝子発現データベースの利活用によるバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、研究代表者らによって見出されていたアストロサイト由来アミロイドβタンパク分解酵素KLK7の発現量がAD患者において半減していることが確認され、KLK7がAD病態に強く関わる分子であることが示唆された。

A.研究目的

近年の遺伝学的研究から、アルツハイマー病の発症にアストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトなどグリア細胞が深く関わっていることが示されつつあるが、その病態の全容は不明である。そこでこれらグリア細胞に発現しているアルツハイマー病発症関連因子の、患者脳における発現変動やスプライシング異常を同定しそのメカニズムを解明すると同時に、病態モデルでそれらの分子機能異常を解析し、病的意義を明らかにする。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

最近、網羅的なRNA-seq解析による遺伝子発現に関するデータベースが公開されている。例えば、AMP-AD Knowledge Portal (https://www.synapse.org/#!Synapse:syn2580853/wiki/) では,ヒト剖検脳を用いた網羅的な遺伝子発現データが登録されている。The MayoRNAseq Studyにおいては，アルツハイマー病を含む276症例の側頭葉における網羅的RNA-seqデータが登録されており、任意の遺伝子におけるアルツハイマー病の発現変動を検索することが可能である。The Mount Sinai Bain Bank studyにおいてはBraak NFTステージ別のBroadmann 10, 22, 36, 40野における301症例の遺伝子発現データが登録されている。

そこで本共同研究においては、申請者らが関心を持つ遺伝子発現についてこれらの公開データベースを活用する事により、ヒト剖検脳での発現変動を検証した。

本研究においては、既に公開されている遺伝子発現データベースの利活用を行うため、倫理的な問題は発生しない。

C.研究結果

アルツハイマー病などの疾患研究を進める上で、興味のある分子がヒトにおいてどのような挙動をしているのかを知るために、ヒトにおけるDNAやRNA、タンパク質などの情報（ビック・

データ）を適切に統計解析するバイオインフォマティクスの手法は重要である。これまでにアストロサイトに発現している KLK7 がアミロイドβタンパク分解酵素として機能し、*in vivo* においてはアミロイド蓄積に影響する因子であることを同定した。また池内健教授らとの共同研究により、アルツハイマー病日本人患者脳において、KLK7 の mRNA 発現量が半減していることを見出した。そして同様の変化を、前述した Mayo クリニックやマウントサイナイブレインバンクの RNAseq データベースにおいても確認した（Kidana et al., EMBO Mol Med 2018）。

さらに本研究事業においては、池内教授の研究室で実際に行われているバイオインフォマティクス手法をご講義頂き習得することを目的として、共同セミナーが開催された。本共同セミナーは、2019 年 3 月 18 日-19 日の日程で、池内教授の研究室において開催され、新潟大学脳研究所　原範和特任助教と大阪大学大学院医学系研究科　菊池　正隆特任講師のご講義を受けた。

原先生のご講義では、共同論文として報告している KLK7 を例にとり、実際に論文中に掲載されているデータの取得にあたり、どのようにビック・データを取得し解析を行ったかについて詳細にご教示頂いた。菊地先生のご講義では、菊地先生が行った SNP の同定からその効果の解析まで、バイオインフォマティクスを駆使した研究成果をご紹介頂くと共に、様々な解析データベースをご教示頂いた。

D. 考察

本研究により、日本人 AD 患者由来剖検脳において認められた KLK7 mRNA 発現量の低下が、欧米 AD 患者剖検脳における遺伝子発現データベースの解析からも確認された。すなわち、KLK7 の発現量は AD 病態の進行とともに低下すると考えられた。

また本同セミナーを通して、多くの検体から得られる生体情報をどのように取得できるか、どのように活用することができるかについて、理解を深めることができた。そして様々なデータベースをご紹介いただき、実際の解析方法を詳細にご教示頂けたことで、すぐにでも役立つ有意義な内容であった。今後疾患研究を発展させていく上で、重要な知見とツールを得ることができた。

E. 結論

アストロサイト由来アミロイドβタンパク分解酵素 KLK7 は AD 発症プロセスに深く関わる分子であることが強く示唆された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

① Kidana K, Tatebe T, Ito K, Hara N, Kakita A, Saito T, Takatori S, Ouchi Y, Ikeuchi T, Makino M, Saido TC, Akishita M, Iwatsubo T, Hori Y, Tomita T*;「Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's model mice.」EMBO Mol. Med., 10(3), e8184, 2018

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

後部視床下部において過眠症に関連するDNAメチル化部位の探索と各脳領域に特異的なメチル化プロファイルの探索

研究代表者　嶋多　美穂子[1，2)]
研究分担者　柿田　明美[3)]、竹島　明[3)]、宮川　卓[1，2)]

1) 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野　2) 公益財団法人東京都医学総合研究所精神医学行動分野睡眠プロジェクト　3) 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

研究要旨

本研究は代表的な過眠症であるナルコレプシーに関連するDNAメチル化部位をゲノムワイドに探索し、さらに脳の領域ごとのメチル化プロファイルを明らかにすることを目的として実施した。ナルコレプシー患者並びに対照群の死後脳の疾患責任部位である後部視床下部、並びに側頭葉皮質から抽出したDNAを用いてゲノム全域にわたるDNAのメチル化率に関するデータ取得した。解析の結果、両群でメチル化が連続して差を示す領域（DMR）は皮質では5領域しか検出されないのに対し、後部視床下部では77領域が検出され、*MBP*上流のDMRが疾患と最も強い関連を示した。この部位特異性についてさらに検討するために、脳の部位ごと（後部視床下部、皮質、小脳）のメチル化の比較を実施した。その結果、脳領域特異的なメチル化プロファイルが存在するが、それらは主に各脳領域を構成する細胞種とその比率が異なることに起因することが明らかとなった。

A.研究目的

本研究は、ナルコレプシーに関連するDNAメチル化部位を、患者でオレキシン神経の脱落が起こる後部視床下部とそれ以外の脳領域（側頭葉皮質）で探索し、疾患関連メチル化部位を同定すると共に、それらが脳の領域特異的なものなのかを確認することを第一の目的とした。加えて同一被験者の異なる脳領域（後部視床下部、側頭葉皮質、小脳）の比較を実施することで、脳領域ごとに異なるDNAメチル化プロファイルが観察されるのか、またそれらがどのような特性を持つのかを検討することも目的とした。

B.研究方法

1. ナルコレプシー関連メチル化部位の探索

ナルコレプシー患者並びに健常者の死後脳から後部視床下部と側頭葉皮質を切り出し、DNAを抽出し、アレイを用いて網羅的なDNAメチル化解析を実施した（後部視床下部：case N = 4, control N = 4, replication control N = 4, 側頭葉皮質：　case N = 7, control N = 7）。患者・対照群間でメチル化が連続して差を示す領域（DMR）をBumphunting法を用いて検出した。DMRに位置する遺伝子の特徴を探索するために、Metacore及びgoseqを用いたパスウェイ解析を実施した。

2. 脳領域特異的メチル化プロファイルの探索

同一サンプルの3つの脳領域からサンプルを切り出し、DNA抽出を行った（後部視床下部, 側頭葉皮質, 小脳：各N＝4）。得られたメチル化データを用いて、MeDeCom法にて各サンプルを構成する細胞の種類と比率の推定を実施した。各領域間の比較を、年齢・性別の影響を補正した回帰分析、並びに年齢・性別に加えて推定した細胞の比率の影響を補正した回帰分析に

て実施した。

本研究はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に則り実施され、東京大学、東京都医学総合研究所並びに新潟大学の倫理委員会の承諾を得ている。また全ての被験者からは書面でのインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1. ナルコレプシー関連メチル化部位の探索

側頭葉皮質の解析では 5DMR しか検出されなかったのに対し、後部視床下部の解析においては 77DMR が検出された。後部視床下部で最も有意な関連を示した DMR は、*MBP*（*myelin basic protein*）の上流に位置していた。後部視床下部関連 77DMR を用いたパスウェイ解析の結果、“response to fatty acid”（$P = 9.0E\text{-}10$）、“glycerolipid metabolic process”（$P = 1.9E\text{-}06$）といったナルコレプシーとの関連がすでに報告されている脂肪酸の代謝に関わるパスウェイが検出された。

これらの結果を異なる対照群のサンプルを用いて検証したところ、視床下部の 77DMR のうち 45DMR の関連が再現され、*MBP* 上流の DMR の再現性も確認された。

2. 脳領域特異的メチル化プロファイルの探索

3 領域のゲノム全域にわたるメチル化部位のデータを利用し、後部視床下部と側頭葉皮質、側頭葉皮質と小脳、小脳と後部視床下部の比較を回帰分析にて実施したところ、年齢と性別の影響のみを補正した回帰分析では、どの比較においても非常に多くのメチル化部位が統計学的に有意な差異を示し、その P 値が期待値に比べインフレーションした。

そこで、そのようなメチル化の差異が領域の違いに起因するものなのか、細胞の違いに起因するものなのかを検討するために、細胞の構成比率の推定を実施した。その結果、構成細胞の比率は脳の部位ごとに大きく異なることが確認された。そこで、推定した細胞の比率を共変量に加え、再度領域ごとの比較を実施したところ、P 値のインフレーションが抑えられ、各領域のメチル化プロファイルの大きな違いは、領域を構成する細胞の種類とその比率の違いに由来することが示された。

D. 考察

ナルコレプシーに関連する DMR の検討から、DNA のメチル化は特にオレキシン神経の脱落が起こっている後部視床下部において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

また、脳領域ごとの DNA メチル化の検討から、脳の領域が異なると、そのメチル化は大きく異なるものの、それらは“領域”が異なることに起因するのではなく、領域ごとに構成する細胞の種類と比率が異なることに起因しており、ニューロン、マイクログリアといった脳の細胞はその種類によって大きく異なる DNA メチル化プロファイルを持つことが示唆された。

E. 結論

後部視床下部において特異的に認められるナルコレプシー関連 DNA メチル化は、後部視床下部特異的に起こるオレキシン神経脱落の影響を反映している可能性があり、今後ミエリン形成に関連する遺伝子などに着目したさらなる検討が必要である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Shimada M, Miyagawa T, Takeshima A, et al. Epigenome-wide association study of narcolepsy-affected lateral hypothalamic brain and overlapping DNA methylation profiles between narcolepsy and multiple sclerosis Sleep. 査読中

2. 学会発表

1. 日本睡眠学会　第 43 回定期学術集会 2018.07.11-13 （札幌コンベンションセンター、札幌）
ナルコレプシーの DNA メチル化解析
嶋多美穂子　シンポジウム
2. 日本人類遺伝学会　第 63 回大会 2018.10.10-13 （パシフィコ横浜、横浜）
EWAS of narcolepsy-affected brain and overlapping methylation profile between narcolepsy and neurological disorders
嶋多美穂子, 宮川卓, 徳永勝士, 本多真　一般口演

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

TDP-43細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成

研究代表者　佐藤　俊哉 1)
研究分担者　大久保　直 1)、加藤　利佳 2)、中村　幹昭 3)、笹岡　俊邦 4)

1) 北里大学医学部実験動物学　2) 北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター
3) 北里大学医療系研究科　4) 新潟大学脳研究所

研究要旨

Zinc-Finger Nuclease (ZFN) およびCRISPR/Cas9を用い、内在性TDP-43 C末領域の部分欠損マウス12系統を樹立し、各系統の特性からTDP-43 C末領域の機能分担について解析した。これまでの結果から、TDP-43 C末領域の約半分程度を欠損させるとTDP-43機能が失われること、C末領域の前半部分は機能維持に重要であり、後半部分は蛋白の安定性維持に重要な領域であることが明らかとなった。このC末領域の前半部分が欠損したTDP-43は、野生型とは明瞭に区別される36 kDaの変異蛋白として確認されたが、核移行シグナル (NLS) が存在するにも拘らず細胞質にのみ局在し、核蛋白としてのTDP-43機能が失われていた。この結果から、NLSを制御するスイッチがTDP-43 C末領域に存在するとの仮説を立て、生理的条件下で認められるTDP-43の翻訳後修飾を検索した。質量分析を用いたトリプシン断片ペプチドの同定では、既に複数の翻訳後修飾を確認しているが、TDP-43のカバー率は41%と低く、さらなる改善が必要と考えられた。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経特異的な変性を特徴とする神経難病である。2006年秋、孤発性ALSに認められるユビキチン陽性封入体 (skein-like inclusion) の主要な構成蛋白として TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) が発見された。さらにTDP-43は、常染色体性優性遺伝形式を示す家族性ALSの原因遺伝子にもなることが報告され、ALS 病態の中心的な分子となった。TDP-43は、2つのRNA認識モチーフ (RRM) を有する不均一核内リボ核酸蛋白に分類され、主に核に局在するが、実際には核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) があり、核-細胞質間をシャトルしている。しかしALSの残存運動神経では、TDP-43は細胞質に局在を変えて凝集体を形成することから、このシャトルを制御するスイッチの同定が、ALS 病態の解明に必要である。申請者は、ゲノム編集技術を用いてTDP-43 C末領域の部分欠損マウスを作成し、このスイッチがC末領域内に存在することを示唆する結果を得た。C 末領域はプリオン様ドメインとも呼ばれる天然変性領域である。一般的に天然変性蛋白は、細胞内ネットワークにおけるハブ蛋白として働き、翻訳後修飾により制御され、様々な蛋白と結合する。そこで、このマウスを起点としてプロテオミクス技術を融合させることにより、未知のTDP-43細胞内局在スイッチを明らかにする計画を立案した。

B.研究方法 (倫理面への配慮を含む)

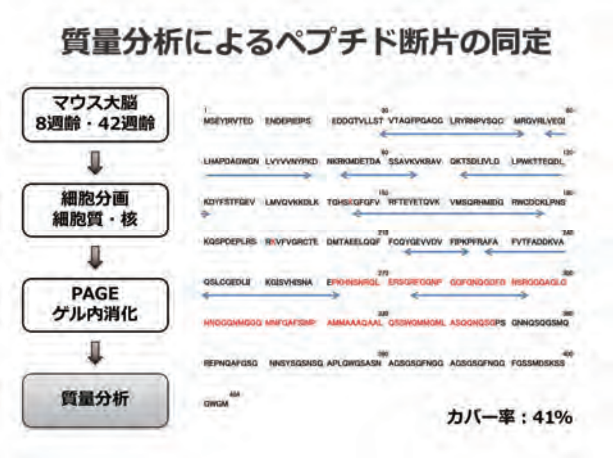
高精度質量分析計を用い、以下の3つの観点から進めた。(a) 生理的条件下におけるTDP-43翻訳後修飾の有無、有るとすれば細胞内局在との相関、(b) 核移行が阻害されたTDP-43と野生型TDP-43における結合蛋白の相違、(c) 病態を包括的に理解するための質量分析を用いた網羅的発現比較解析であり、今年度は (a) を中心に進めた。野生型マウス (8週および42週齢) の大脳を用い、EzSubcell Extract (ATTO)により

細胞質と核に分画後、ゲル内消化と質量分析により TDP-43 の同定を試みた。

なお、本研究における遺伝子組換え実験は、北里大学医学部遺伝子組換え実験安全管理委員会、および北里大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査と学長の承認を受けて実施した。また動物実験は、北里大学医学部動物実験委員会の審査と医学部長の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

野生型マウス大脳の細胞質および核分画を、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。CBB 染色およびウェスタンブロット法により TDP-43 の位置を確認し、トリプシンを用いたゲル内消化と質量分析にてペプチド断片を同定したところ、TDP-43 のカバー率は 41%であった（図）。同定されたペプチド断片の一部には、複数の翻訳後修飾が認められたが、TDP-43 全体の同定には至っていない。



D. 考察

TDP-43 のカバー率が低かった理由として、TDP-43 の特殊なアミノ酸配列が挙げられる。TDP-43 C 末領域に存在するプリオン様ドメインは、非荷電極性アミノ酸（Asn、Gln、Tyr）と Gly を主体とする low complexity 配列から成り、トリプシンによる切断部位（Lys、Arg）が極めて少ないため、ペプチド鎖が長くなるために同定できないものと考えられる。今後は、消化酵素の変更による鎖長の調整、イオンモード変更によるイオン化効率の向上などを組み合わせ、網羅性の高い翻訳後修飾同定をおこなう。

E. 結論

野生型 TDP-43 には、生理的な翻訳後修飾が存在することが示された。しかし注目している TDP-43 C 末領域の同定率は低く、さらなる改善が必要と考えられた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

佐藤俊哉、中村幹昭. TDP-43 細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成. 平成 30 年度脳研究所共同利用共同研究（笹岡班・崎村班）合同セミナー、平成 30 年 12 月 18 日、新潟大学脳研究所（新潟）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

DNA 複製因子 polD4 と発がん

研究代表者氏名　鈴木　元 1)
研究分担者氏名　笹岡　俊邦 2)

1) 藤田医科大学医学部分子腫瘍学　2) 新潟大学新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

研究要旨

申請者らはこれまで、肺がんで DNA 修復たんぱく質 POLD4 が発現低下していること、また、POLD4 発現量と DNA 損傷誘発型薬剤 4NQO 感受性とよく相関していることを見出している。本研究では、POLD4 及びそれを含む遺伝子群（POLD4 モジュール）活性が細胞障害性抗がん剤の代表であるシスプラチンの感受性とよく相関することを明らかにした。この結果は、POLD４発現レベルがシスプラチン感受性予測に使用できる可能性を示している。また、シスプラチン抵抗性肺癌においても、シスプラチン感受性を向上させる分子標的候補の特定に成功した。

A.研究目的

申請者らはこれまで、肺がんで DNA 修復たんぱく質 POLD4 が発現低下していること、また、POLD4 発現量と DNA 損傷誘発型薬剤（4NQO）感受性とよく相関していることを見出している。POLD4 が発現低下することで、ゲノムインスタビリティーが増加しがんが発生するモデルが考えられるが、現在までその実証はされていない。また、そうした背景を有する肺がんにおいては抗がん剤感受性に特徴があると考えられる。そこで、肺がんや脳腫瘍等を対象として臓器特異的に POLD4 をノックダウンする系を作成、併せて、新潟大学の保有する KRAS, HRAS 等の遺伝子改変マウスと交配し、POLD4 発現に差のある発がんマウスモデルを作成する。それらマウスを用いて、特に薬剤感受性に関する仮説の検証を行うことを目標とした。
平成３０年度はこの実験の予備段階として、細胞レベルでの POLD4 遺伝子と抗がん剤感受性との関係を検討した。

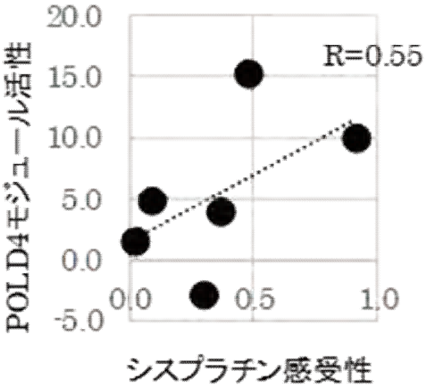
B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

放射線治療や多くの化学療法では、がん細胞に DNA 損傷をおこすことで死滅させるため、細胞の DNA 修復活性が殺細胞効果に大きく影響することが知られている。一方で、がん細胞には無数のバリエーションがあり、それぞれの DNA 修復活性を推測することは容易ではない。例えば、肺がんにおいて、プラチナ製剤は殺細胞性抗がん剤の第 1 選択肢であるが、その効果には個人差がある。また、プラチナ製剤を含んだ治療を実施しても、肺がん完治は困難である。そこで、POLD4 発現レベルで肺がんを分類することにより、プラチナ製剤感受性の投与前予測ができる可能性を検討した。より具体的には、肺がん細胞株を用いて POLD4 活性とシスプラチンおよび、作用機序の異なる抗がん剤感受性を調べることにより、POLD4 とシスプラチンに代表されるプラチナ製剤の関係特異性を調べた。

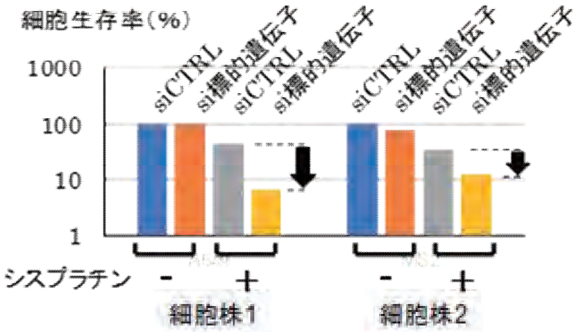
C.研究結果

1.申請者らは肺がん培養細胞において、POLD4 活性とシスプラチン感受性の間に強い相関関係を見出した。この結果は、POLD4 と統計学的解析によって一群の機能を担う可能性のある遺伝子群を POLD4 モジュールとして定義した際にも

観察された（下図）。



2.興味深いことに、POLD4 とは同一の経路で働くと推測される別の標的遺伝子（酵素）をノックダウンしたところ、シスプラチンが有効でない高 POLD4 活性細胞で、プラチナ製剤と synthetic lethal(注)な殺細胞効果を観察した（下図）。



(注) 単独遺伝子欠損では細胞や個体に対する致死性を示さないが，複数の遺伝子欠損（あるいは薬剤作用）が共存すると致死性を発揮する現象。

D.考察

POLD4 及びそれを含む遺伝子群(POLD4 モジュール）活性が細胞障害性抗がん剤の代表であるシスプラチンの感受性予測に使用できる可能性が示唆された。また、今回新たに同定された遺伝子は、シスプラチン抵抗性肺癌においても、シスプラチン感受性を向上させる分子標的候補となりうる。

E.結論

本研究により、実際に POLD4 発現低下をきたす肺癌を有するマウスモデル（およびコントロールマウス）を用いて行う実験の in vitro での作業仮説が完成した。次の段階として、マウスモデルを用いてこの仮説の実証を目指す。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

出願１件（出願番号: 2019-059018）

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ヒト疾患情報に基づく脳神経系病態モデルマウスの開発に関する共同研究

研究代表者　吉木　淳 [1)]
研究分担者　綾部　信哉 [1)]
研究分担者　仲柴　俊昭 [1)]
研究分担者　笹岡　俊邦 [2)]

1）理化学研究所バイオリソース研究センター　2）新潟大学脳研究所

研究要旨

理化学研究所バイオリソース研究センター（理研 BRC）・実験動物開発室は、我が国の実験動物マウスの中核機関としてヒト疾患研究に有用なモデルマウスを収集・保存・提供している。一方、新潟大学脳研究所（脳研）には、ヒト脳神経疾患の脳病理所見、ゲノム及び病態に関する豊富な情報と先端的な疾患モデルマウスの開発実績がある。二機関のポテンシャルを活かして、高齢社会が直面する脳神経系疾患の治療や創薬に有用な新たな病態モデルマウスを、患者の脳病理所見、ゲノム及び病態に関する知見に基づき開発する。さらに、脳研で開発された先端的な脳神経系疾患モデルマウスを理研 BRC に寄託頂き、広く研究コミュニティに提供することで脳神経系の基礎から医療・創薬研究へ貢献する。

A.研究目的

高齢社会が直面する脳神経系疾患の治療や創薬に有用な病態モデルマウスの開発が求められている。既存の病態モデルマウスならびにヒト疾患のゲノムおよび病態に関する情報を文献等により再評価し、ゲノム編集等の新たな技術を用いてヒト疾患情報に基づく改良型または新規モデルの開発に必要な情報を収集し、モデルマウスを開発する。さらに、脳研において開発済みの先端的な脳神経系モデルマウスを理研 BRC に寄託いただき、研究コミュニティに提供する。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

我が国において優先的に取り組むべき脳神経系疾患についてゲノム情報および病態に関する情報を収集し、独自のモデルマウス開発の準備を行う。

脳研において既開発済みの先端的なモデルマウスについて、開発研究者に寄託の依頼を行い、収集する。寄託の承諾が得られた系統について、MTA 等の適切な移転の手続きを行う。

新規モデルマウスの作製方法、予想される特性および治療法の開発や創薬における利用価値について情報収集する。寄託マウスについても寄託手続きの完了と特性情報の整備を開発研究者の協力を得て行う。寄託系統は研究コミュニティに公開し、提供する。

C.研究結果

今後、開発するべきヒト疾患モデルマウスについて、脳研・池内健教授より、アルツハイマー病・タウオパチーの原因候補遺伝子ならびに疾患変異の選定に関する助言をいただいた。

笹岡教授とは神経変性疾患を対象としたヒト疾患モデルマウスの整備や、ドーパミン受容体変異マウスとドーパミンの生合成酵素の変異マウス等の開発に関する検討を継続した。

平成 30 年度脳研究所合同セミナー（12 月）においては、理研 BRC におけるヒト疾患モデル開発の新たな体制について紹介するとともに参加研究者との意見交換を行った。

新潟大学脳研および新潟大学脳研との共同研究により開発された遺伝子改変マウス系統の理研 BRC への寄託は平成 30 年度までに累計 44 系統に達し、34 系統をウェブカタログから公開している。平成 30 年度は、RBRC10053 B6(Cg)-Aqp4<tm1.1Tsna>（寄託：辻田実加博士）をはじめ 4 系統、計 41 件を国内外の研究者に提供して、脳科学研究の推進に貢献した。

さらに、C57BL/6N 系統のマウス受精卵細胞質への Cas9 マイクロインジェクションもしくはエレクトロポレーションを用いて理研 BRC にてゲノム編集を行った計 59 系統を対象として、ファウンダーマウスの子の世代へオフターゲット変異が伝達する可能性について検証を行った。オフターゲット編集が起こる可能性がある計 906 箇所を PCR で増幅してシーケンス解析を行ったところ、Cas9 によるゲノム編集が起きた可能性が示唆されたのはそのうちの 1 箇所のみであり、配列特異性の高いガイド RNA を用いることでオフターゲット編集を抑制することができた。その一方で、ゲノム編集によって得られるターゲット領域のアレルは多様であり予測が困難であったことから、ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変マウス作製の品質管理においてはオフターゲット編集のみならずターゲット領域の解析手法を発展させることが重要であることを報告した。

D.考察

E.結論

以上の成果を踏まえて、次年度以降は新規テーマでの共同研究に発展させ、1) マウスリソースの利活用に関する協力関係を継続・発展させ、2) 新たなヒト疾患モデルマウスの開発状況についてさらなる調査を加えると共に、3) アルツハイマー病などの難治性の神経変性疾患の研究ならびにドーパミンおよびその関連分子の機能研究に有用なマウス系統の開発についてさらなる助言を受け、複数の遺伝子変異やレアバリアントを導入したマウスモデルなどの開発を検討する。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

Ayabe S, Nakashima K, Yoshiki A. Off- and on-target effects of genome editing in mouse embryos. J Reprod Dev. 65(1): 1-5, 2019.

1. Moore BA, International Mouse Phenotyping Consortium, et al. Identification of genes required for eye development by high-throughput screening of mouse knockouts. Commun Biol. 1:236, 2018.
2. Sato Y, Tsukaguchi H, Morita H, Higasa K, Tran MTN, Hamada M, Usui T, Morito N, Horita S, Hayashi T, Takagi J, Yamaguchi I, Nguyen HT, Harada M, Inui K, Maruta Y, Inoue Y, Koiwa F, Sato H, Matsuda F, Ayabe S, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Yoshimura A. A mutation in transcription factor MAFB causes Focal Segmental Glomerulosclerosis with Duane Retraction Syndrome. Kidney Int. 94(2):396-407, 2018.

2.学会発表

1. Ayabe S, Nakashima K, Nakashiba T, Mizuno-Iijima S, Iwama M, Ijuin M, Hashimoto T, Kadota M, Yamamura T, Noda Y, Hama D, Nakade K, Nakata H, Murata T, Obata Y, Yoshiki A, “Applying genome editing technology to mutant mouse generation and mouse resource archiving in RIKEN BRC” 32nd International Mammalian Genome Conference (IMGC2018), Rio Grande, Puerto Rico、2018 年 11 月.
2. 綾部信哉，中島謙一，仲柴俊昭，岩間瑞穂，伊集院麻衣子，山村竜典，橋本知美，中出浩司，中田初美，村田武英，小幡裕一，吉木淳, “国際マウス表現型解析コンソーシアム（IMPC）におけるゲノム編集技術を用いた遺伝子改変マウス作製”第 31 回モロシヌス研究会,札幌, 2018 年 6 月.
3. 綾部信哉, “ゲノム編集技術による遺伝子改変マウス作製・解析の進展と動向” 日本ゲノム編集学会第 3 回大会，広島, 2018 年 6 月.
4. 玉里友宏，柳澤永吉，綾部信哉，中島謙一，岩間瑞穂，中出浩司，村田武英，小幡裕一，吉木淳, “電気刺激法を用いた遺伝子改変マウス作製方法の検討” 日本ゲノム編集学会第 3 回大会，広島, 2018 年 6 月.
5. 綾部信哉，中島謙一，岩間瑞穂，仲柴俊昭，中出浩司，伊集院麻衣子，山村竜典，橋本

知美, 門田雅世、中田初美, 村田武英, 小幡裕一, 吉木淳, “ゲノム編集技術を用いた国際マウス表現型解析コンソーシアム（IMPC）遺伝子改変マウス作製” 第65回日本実験動物学会総会, 富山, 2018年5月.
6. 仲柴俊昭, 綾部信哉, 吉木淳, “理研バイオリソース研究センターより入手できる神経科学研究に役立つマウスリソースの紹介” 第41回日本神経科学大会, 神戸, 2018年7月
7. 吉木淳, “高次生命現象の理解、人の健康増進と病気克服のマウスモデル / Mouse models for understanding of sophisticated life phenomena, promotion of human health and conquering diseases” 第41回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018年11月
8. 笹岡俊邦, 齊藤奈英, 知見聡美, 佐藤朝子, 大久保直, 福田七穂, 阿部学, 川村名子, 小田佳奈子, 佐藤俊哉, 藤澤信義, 山口瞬, 田井中一貴, 崎村建司, 南部篤, “D1/D2 ドーパミン受容体コンディショナル発現マウスによる運動制御機構の解明”,平成30年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会, 大津, 2019年1月.
9. 齊藤奈英, 知見聡美, 大久保朝子, 阿部学, 川村名子, 山口瞬, 崎村建司, 田井中一貴, 南部篤, 笹岡俊邦, “Elucidation of motor control mechanism using genetically modified mice harboring tetracycline regulated expression of D1/D2 dopamine receptors” 第8回生理研–霊長研–脳研合同シンポジウム, 新潟, 2019年3月.

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

剖検脳脊髄を用いた酸化ストレスによる神経細胞機能の障害と細胞死に関する研究

研究代表者氏名　柴田　亮行[1)]
研究分担者氏名　柿田　明美[2)]

[1)] 所属：東京女子医科大学拍子学講座（病態神経科学分野）　[2)] 所属：新潟大学脳研究所病理学分野
・

研究要旨

アルツハイマー病、レビー小体病（LBD)、筋萎縮性側索硬化症（ALS)および年齢一致対照の剖検脳脊髄組織を用いて、鉄代謝関連蛋白ならびに炎症性サイトカインの免疫組織化学的局在を観察した。ヘプシジン、フェロポルチン、TNFα、IL-1β、フェリチンおよび鉄硫黄クラスター蛋白に対する免疫活性は、対照と比較して、AD海馬、DLB扁桃体、ALS脊髄のニューロンとグリアの細胞質で増強していた。AD、DLBおよびALSの病態における鉄代謝と慢性神経炎症の関与が示唆された。

A.研究目的

神経変性疾患の病態における鉄代謝と慢性神経炎症の関連性を明らかにする。

B.研究方法

ご遺族から剖検組織の研究使用に関する同意が得られているAD (n =5) 海馬、DLB (n = 5) 扁桃体、ALS (n = 5) および年齢一致対照 (n = 5) 脳脊髄のホルマリン固定パラフィン包埋切片に対し、ヘプシジン (Hepc)、フェロポルチン (FPN)、腫瘍壊死因子-α (TNFα)、インターロイキン-ベータ (IL-1β)、フェリチン (Ft) および鉄硫黄クラスター蛋白 (ISCP) に対する特異抗体を反応させ、免疫反応産物の局在を光学顕微鏡で観察した。

C.研究結果および

Hepc、FPN、TNFα、IL-1β、FtおよびISPの免疫活性は、海馬、扁桃体、脊髄のニューロンとグリアの細胞質に局在しており、その染色性は対照例と比較して、AD海馬、DLB扁桃体、ALS脊髄で増強していた。ISCPの染色性はミトコンドリア局在を反映して微細顆粒状を呈したのに対し、その他の物質の染色性は均質であった。

D.考察

細胞内鉄濃度の上昇は Ft の発現を誘導するのと同時に、ミクログリアからの TNFα や IL-1β の放出を促すことが知られている。一方、HepcはTNFαやIL-1βの刺激により産生放出され、細胞外を漂い、細胞膜に局在するFPNに結合することにより、FPN の internalization を促す。その結果、細胞内貯蔵鉄を細胞外に放出するルートが失われるため、細胞内鉄濃度が病的に上昇する。このような悪循環は非感染性慢性炎症を惹き起こす。

E.結論

神経変性疾患の病態に貯蔵鉄増加と慢性神経炎症の関与が示唆された。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表
論文投稿準備中

2.学会発表
なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

運動制御における大脳基底核ドーパミン神経伝達系の機能解析

研究代表者氏名　木津川　尚史 1)
研究分担者氏名　笹岡俊邦 2)、中村　徹 1)

1) 大阪大学大学院　生命機能研究科　時空生物学研究講座　心生物学研究室
2) 新潟大学　脳研究所　動物資源開発研究分野

研究要旨

運動制御に関与する大脳基底核ドーパミン神経回路の機能を解明するため、ドーパミン受容体 D1R のコンディショナルノックダウン（cKD）マウスの運動機能評価を行った。D1R の発現を薬剤 Dox 依存的に制御できる D1R cKD マウスを用いて、Dox 投与前・投与中・投与終了後の各タイミングで運動課題を行い、D1R 発現有無による走行への影響を解析した。運動機能を評価する課題として、マウスの運足や走行速度を制御できるステップホイール装置による漸増加速課題を用いた。この課題では、給水制限を施したマウスに飲水を報酬として、徐々に加速するホイール内で持続的に飲水・走行が可能なスピードを測定した。結果、D1R の発現有無によりステップホイール課題における走行能力に顕著な差が認められ、D1R 発現の抑制により運動系機能の低下が引き起こされたことが示唆された。

A. 研究目的

神経変性疾患の一つであるパーキンソン病では、中脳ドーパミン神経細胞が脱落し、それによりもたらされた大脳基底核のドーパミン濃度低下が歩行を始めとした運動機能の不全を引き起こすと考えられている。大脳基底核線条体には、ドーパミン受容体 D1R, D2R を発現する２つの神経細胞群、直接路神経細胞と間接路神経細胞が存在しているが、それらが歩行制御にどのように寄与しているかについては不明な点が多い。我々はドーパミン受容体の欠損マウスを利用してステップホイール装置で運動能力の解析が行い、D1R 欠損マウス、D2R 欠損マウスで運動能力における異常を見出している（Nakamara et al., 2014)。しかし、通常の遺伝子欠損マウスは発生期においても遺伝子を欠損しているため、神経回路形成に異常が生じて運動機能に影響を及ぼしている可能性がある。そこで本研究では、運動遂行時における D1R の機能をより直接的に解析するために、D1R の発現を薬剤依存的に制御できるコンディショナルノックダウンマウスを利用し、運動課題への影響を測定・評価した。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

大脳基底核線条体の直接路を形成する神経細胞群は、ドーパミン受容体 D1R を特異的に発現する。本研究では、D1R の機能を明らかにするために、薬剤ドキシサイクリン（Dox）の投与により直接路神経細胞の D1R 発現を制御できるコンディショナルノックダウンマウス（D1R cKD マウス）を用いた(Chiken et al. 2015)。D1R cKD マウスでは、D1R 遺伝子欠損マウスをベースにして、そこに D1R 遺伝子のプロモータを利用した Tet-off システムにより、直接路神経細胞特異的に D1R の発現を再現するように作製されており、D1R の発現が Dox 投与により抑制できるようになっている。したがって、D1R cKD マウスでは､Dox 非投与時には直接路神経細胞に D1R が発現し、Dox 投与後 3 週間で完全に消失する (Chiken et al. 2015)。

このD1R cKD マウスに走行装置ステップホイールを走行させて､運動機能を解析･評価した。ステップホイールは、モーター駆動により回転

するホイールで、給水制限を施したマウスに飲水を報酬として走行させる。今回、徐々に回転速度を上げる漸増加速テストを行い、どれだけ速いスピードで持続的に走行可能かを運動機能の指標として計測した。1回約70秒の試行を一日10試行行い、その内上位3つの値の平均値を各個体のその日の成績とした。

運動課題期間中はマウスに給水制限を施すため、マウスの健康状態には常に気を配り、体調不調の際には実験を中断して給水し、回復を図った。全ての実験終了時には麻酔薬の過剰投与後に安楽死させ、マウスへの身体的精神的負担を最小限に努めた。

C.研究結果

野生型(WT)マウス（n = 5）と D1R cKD マウス（n = 8）を用いて、Dox 投与前、投与中、および投与終了後の各タイミングでステップホイール装置による漸増加速テストを行った。この結果、WT マウスでは、Dox 投与前、投与中、投与終了後において、走行成績に有意な差は認められなかった（$p > 0.05$、テューキー検定)。これに対し D1R cKD マウスでは、Dox 投与中において顕著な走行成績低下が確認された($p < 0.05$、テューキー検定)。また、WT マウスと D1R cKD マウスの２群間で、それぞれ Dox 投与前、投与中、投与後の走行成績を比較した。Dox 投与前、投与後の走行成績については、D1R cKD マウスの成績は WT マウスのものと比較して遜色ないものであったが、Dox 投与中の走行成績のみ有意に成績が低下していることが確認された($P < 0.001$、T 検定)。

D.考察

今回利用した D1R cKD マウスでは発生期には D1R は発現しており、成体になってトレーニングを開始した後に D1R 遺伝子発現を消失させた。Dox 投与前、終了後の D1R 発現がある時期には野生型と遜色ない走行能力を有しており、Dox 投与中にのみ顕著な走行異常が認められた。この結果から、D1R cKD マウスでは、少なくとも走行能力のための神経回路は正常に構築されていたと考えられる。Dox 投与中では、直接路神経細胞における D1R の発現が消失した。したがって、本研究で得られた D1R cKD マウスの走行異常は、線条体の直接路神経細胞に発現する D1R が、正常な走行に必要であることを示している。

ただし、D1R にはシナプス可塑性に関与するとの報告もあり、Dox 投与後 D1R 発現が消失してから走行テストまでに直接路などの神経回路に変化が生じた可能性は残される。また、基底核ドーパミン神経回路は運動系機能のみならず、報酬系機能にも関与することが報告されている。今回我々が用いたステップホイール課題は飲水を動機づけとした報酬系行動課題であることから、運動系機能だけでなく、報酬系機能もその課題成績に影響を及ぼしていた可能性も考えられる。これらについては、薬理学的手法を用いるなどにより、ドーパミン受容体の機能を時間・空間的により詳細に解明していく必要がある。

E.結論

Dox 投与により D1R 発現を消失させたマウスでは、ステップホイール漸増加速テストにおける成績が有意に低下した。一方、Dox 投与前および投与中止から十分期間をおき D1R が発現している状態では、WT マウスとの差は認められなかった。以上の結果から、直接路神経細胞に発現する D1R が正常な運動機能発現に必要であることが示唆された。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

なし

2.学会発表

中村徹、笹岡俊邦、八木健、木津川尚史「線条体におけるドーパミン受容体 D1R とムスカリン受容体は加速式 Step-Wheel 課題での走運動に必要である」　第41回　日本神経科学学会、2018年7月、神戸

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

遺伝子改変マウスを用いた神経終末ドーパミン量制御機構の解析

研究代表者　一瀬　宏[1)]
研究分担者　原　怜[1)]，高橋里奈[1)]，笹岡　俊邦[2)]

[1)]東京工業大学生命理工学院　[2)]新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野

研究要旨

我々は、ドーパミンニューロンの神経終末が豊富に存在する線条体をモデルとして、神経終末でのドーパミン代謝調節機構を明らかにすることを目的として研究を行なっている。ドーパミンの生合成にはチロシン水酸化酵素と、補酵素であるテトラヒドロビオプテリン(BH4)を必要とする。BH4 は、ドーパミンだけでなくセロトニンや一酸化窒素 NO の生合成にも必須であることがわかっているが、BH4 欠乏が引き起こす動物個体への影響については十分明らかとなっていない。動物個体に対する BH4 欠乏の影響を明らかにするために、BH4 生合成酵素の一つであるセピアプテリン還元酵素(sepiapterin reductase; SPR) の遺伝子破壊マウス(*Spr*-KO マウス) の解析を行った。*Spr*-KO マウスは顕著な運動障害ばかりでなく、発達障害や毛色の変化も示し、BH4 がまだ未解明な多彩な生理作用を営んでいることが明らかとなった。

A. 研究目的

ドーパミンニューロンは情動や運動の制御、短期記憶など脳の高次機能調節に深く関わっている。そのため、ドーパミンニューロンの活動やドーパミン代謝の変化は、脳高次機能の変化から疾患の原因ともなり得る。従来ドーパミン代謝調節の研究は、培養細胞を用いた研究が中心に行われてきたが、培養細胞での研究では、分化させた細胞を用いていても、神経終末での調節機構を明らかにすることは非常に困難であった。我々は遺伝子改変マウスを用いることにより、ドーパミンニューロンの神経終末が豊富に存在する線条体をモデルとして、神経終末でのドーパミン代謝を明らかにすることを試みている。

ドーパミンの生合成にはチロシン水酸化酵素と、補酵素であるテトラヒドロビオプテリン(BH4)を必要とする。BH4 は、ドーパミンだけでなくセロトニンや一酸化窒素 NO の生合成にも必須であることがわかっているが、BH4 欠乏が引き起こす動物個体への影響については十分明らかとなっていない。動物個体に対する BH4 欠乏の影響を明らかにするために、BH4 生合成酵素の一つであるセピアプテリン還元酵素(sepiapterin reductase; SPR) の遺伝子破壊マウス(*Spr*-KO マウス) の解析を行った。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

Spr -KO マウスは、Lexicon Pharmaceutical Inc. により作製された。また、*Spr*-KO マウスを C57Black/6 マウス、または、Balb/C マウスにそれぞれ戻し交配を繰り返して、遺伝的背景を均一とした。遺伝的背景が C57Black/6 の KO マウスは、生後 2−３週齢で死亡する個体が多いが、Balb/C マウスの KO マウスでは、半数近くが生後 7-8 週齢まで生存する。さらに、C57Black/6 と Balb/C の F１マウスでは、6 ヶ月齢以上生存できるようになる。そのため、実験では C57Black/6 と Balb/C の F１マウスを使用した。

C.研究結果

Spr-KOマウスは、野生型マウスやヘテロマウスと比べて明らかな発達遅滞を示し、成獣での体重は、野生型の半分弱であった。脳内のBH4は野生型の約3分の1の減少にとどまっていたが、脳内ドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニンは、全て野生型の10%以下に低下していた。また、運動量は著明に減少し、前肢の振戦様震えが観察された。

全身的なモノアミン欠乏から交感神経機能の低下が予測されたが、*Spr*-KOマウスの血圧は不安定で変動の激しい高血圧を示した。さらに、血糖は顕著に低下していた。また、毛色は *Spr*-KO マウスでは野生型やヘテロマウスより黒くなっていた。

D.考察

発達障害が起こる理由が、脳内ドーパミン欠乏のためであるのか、BH4 欠乏のためであるのか明らかではない。BH4合成を担う別の酵素のKOマウスでは、インシュリン様成長因子(IGF-1)の低下が報告されているが、IGF-1 低下の分子機序は明らかとなっていない。今後、*Spr*-KOマウス IGF-1の分析を行ったり、ドーパミン前駆体を投与したりすることにより、BH4 欠乏による発達遅滞の分子機序を明らかとする。

また、交感神経の神経伝達物質であるノルアドレナリンが低下している *Spr*-KO マウスで血圧が不安定な高値を示す理由も、今後の解析が必要である。パーキンソン病患者でも脳内ドーパミンの低下や交感神経機能の低下が認められているが、血圧は不安定な高血圧を示すことが知られている。*Spr*-KOマウスの不安定な高血圧も、パーキンソン病患者と同様な機序で起きていると考えられる。

今後さらにBH4欠乏の生体への影響を調べるために、*flox-Spr*マウスを作製し、臓器・ニューロン特異的な遺伝子破壊を行い、解析していく。

E.結論

BH4の生合成酵素の一つであるSprのKOマウスでは、著明な発達障害に加えて、寡動、振戦、不安定な高血圧などパーキンソン病患者と類似した症状が観察された。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

神経組織特異的*Scrapper*コンディショナルノックアウトマウスの作製と解析

研究代表者氏名　矢尾　育子 1)
研究分担者氏名　片野　泰代 2)　衞藤　史博 1)
笹岡　俊邦 3)　阿部　学 3)　崎村　建司 3)

1) 浜松医科大学光尖端医学教育研究センター・2) 関西医科大学医化学講座・3) 新潟大学脳研究所・

研究要旨

SCRAPPERは神経シナプスに局在し、神経伝達物質放出の制御にかかわるユビキチンE3リガーゼである。*Scrapper*遺伝子ノックアウト（SCR-KO）マウスが生後致死であるため、成体でのSCRAPPER分子の機能を十分に解析できなかった。そこで部位特異的なコンディショナルKO（cKO）マウスを作製し、その詳細な機能解析を行うことを計画した。前年度までに、コンディショナルノックアウトマウス作製のためのfloxed型のベクターを構築し、組換えES細胞株よりキメラマウスを作出している。本共同研究によりfloxed型マウスを樹立し、F1世代のマウスが得られている。現在、ドライバーマウスとの交配により神経組織特異的SCR-cKOマウスの作製を行っている。また、発生初期からCre組換え酵素を発現するドライバーマウスとの交配により、SCR-KOマウスを作製し解析を行っている。

A.研究目的

*Scrapper*欠損マウス（SCR-KOマウス）は体が小さい上に寿命が短く、恐怖記憶形成の異常、脳の海綿状変性や神経細胞の萎縮といった老化現象が見られる。SCR-KOマウス脳において変動している分子の同定が神経変性疾患病態解明の1つの鍵になると考えられる。

SCR-KOマウスは、多くの個体が生後半年程度で死亡する。また、産仔数もメンデルの法則に従わず少ないことから、SCRAPPERが発生段階においても機能していることが予想される。本研究では、致死の表現型を回避し脳に限定した機能を解析することができる、神経細胞特異的なコンディショナルKOマウスを作製し解析をおこなう。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

floxed型のベクターを構築し、このベクターを新潟大学崎村研究室で開発されたRENKA株ES細胞に導入し、相同組み換え体を選別する。これらの組換えES細胞株よりキメラマウスを作出し、生殖系列にES細胞が分化した個体より標的floxed型マウスを樹立する。さらに、神経細胞特異的なCre発現マウスを利用して、神経組織特異的なノックアウトマウスを作製して電気生理学実験等の機能解析や行動解析実験に供する。

動物実験計画は新潟大学および浜松医科大学大学の委員会承認を得たうえで、内規に準じて行う。実験時には適切に麻酔処理を行い、動物への苦痛を可能な限り除く。

C.研究結果

現在までに、コンディショナルノックアウトマウス作製のための floxed 型のベクターを構築し、このベクターを新潟大学崎村研究室で開発された RENKA 株 ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選別した。これらの組換え ES 細胞株よりキメラマウスを作出し、生殖系列に ES 細胞が分化した個体より標的 floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスを得ている。現在までに、浜松医大への導入を完了し、FLP マウスとの交配を進めスクリーニングのために導入されていたネオマイシン耐性遺伝子を除いたマウスを作製した。現在、ドライバーマウスとの交配により、神経細胞特異的なノックアウトマウスを作製する段階である。また、発生初期から Cre 組換え酵素を発現するドライバーマウスとの交配により、SCR-KO マウスを作製し以前に解析した C57BL/6J 系と 129/Sv 系混合バックグラウンド null ノックアウトマウスと同じ表現型が得られるかを合わせて検討している。得られたマウスの表現型解析のために、共同研究の継続を予定している。

D.考察

脳部位特異的な Cre 発現マウスを利用して、部位特異的なノックアウトマウスを作製して解析に供する計画であることから、神経細胞で特異的にノックアウト可能なドライバーマウスラインとして Emx1-Cre マウスの導入することとした。今後、さらに交配を行いノックアウトマウスラインの樹立が必要であるが、交配成績が芳しくないため脳研究所の助言を得ながら共同研究を推進、継続する。また、解析に適するドライバーマウスの選択および交配、その後の解析を行う必要がある。現存するノックアウトマウスはバックグラウンド系統が複数の雑種となっていることから、新たに得られるマウスを用いた解析はバックグラウンド系統の影響を消去できる点でも有用であると考える。

E.結論

SCR-cKO マウス作製のための floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスを浜松医科大学に導入している。今後さらに繁殖、ドライバーマウスとの交配により神経細胞特異的 SCR-cKO マウスを作製し、表現型を解析する。

F.研究発表

1.論文発表

1) Saito Y, Eto F, Take S, Yao I, Setou M. Imaging mass spectrometry reveals sodium lauryl sulfate-induced changes in skin lipoquality, principally affecting sphingomyelin.
Medical Mass Spectrometry in press

2) Aizawa F, Sato S, Yamazaki F, Yao I, Yamashita T, Nakamoto K, Kasuya F, Setou M, Tokuyama S.
N-3 fatty acids modulate repeated stress-evoked pain chronicity.
Brain Res. in press

3) Mihara Y, Horikawa M, Sato S, Eto F, Hanada M, Banno T, Arima H, Ushirozako H, Yamada T, Xu D, Okamoto A, Yamazaki F, Takei S, Omura T, Yao I, Matsuyama Y, Setou M.
Lysophosphatidic acid precursor levels decrease and an arachidonic acid-containing phosphatidylcholine level increases in the dorsal root ganglion of mice after peripheral nerve injury.
Neurosci Lett. 698:69-75 (2019)

2.学会発表

1) Eto F, Matsuda T, Setou M, Yao I
Imaging mass spectrometry revealed the alteration of amine neurotransmitters in Scrapper-knockout mice brain
the 50th annual meeting of the Society for Neuroscience 2018/11/7San Diego (USA)

2) Suetani H, Eto F, Yao I　A manifold learning approach to imaging mass spectrometry analysis in mice brain
the 50th annual meeting of the Society for Neuroscience 2018/11/7San Diego (USA)

3) Aizawa F, Yao I, Sato S, Yamazaki F, Yamashita T, Nakamoto K, Hirasawa A, Kurihara T, Kasuya F, Miyata A, Setou M, Tokuyama S
The breakdown of free fatty acids-GPR40/FFAR1 signaling in the brain induce development of chronic pain after social defeat stress in mice
the 50th annual meeting of the Society for Neuroscience 2018/11/7San Diego (USA)

4) 松田 孟士, 鈴木 勇三, 藤澤 朋幸, 齊藤 伸幸, 菅 裕徳, 須田 隆文, 矢尾 育子
喘息モデルマウス肺組織におけるアセチルコリン過剰分泌の質量分析イメージングによる可視化
第43回日本医用マススペクトル学会年
2018/9/6 北海道大学 学術交流会館（札幌市）

4) 衞藤史博、松田孟士、瀬藤光利、矢尾育子
質量分析イメージングで可視化されたScrapper ノックアウトマウス脳における神経伝達変化
第41回日本神経科学大会
2018/7/28 神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

5) 松田 孟士、深野 華、久恒 辰博、矢尾 育子
質量分析イメージングを用いた APP/PS1 アルツハイマー病モデルマウス脳組織におけるアセチルコリン分泌減少の可視化
第41回日本神経科学大会
2018/7/28 神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1.特許取得
なし
2.実用新案登録
なし
3.その他
なし

平成 30 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

APP の細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析

研究代表者氏名　中山　耕造 1)
研究分担者氏名　長瀬　尚志 2)
笹岡　俊邦 3)

1）北陸大学医療保健学部医療技術学科、 2）信州大学医学部医学科・病理学講座、 3）新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター・バイオリソース研究部門・動物資源開発研究分野

研究要旨

我々は、Notch や Delta の解析から、γ-セクレターゼ本来の生理機能は 1 型膜蛋白質のシグナル伝達の制御にあり、それが APP のシグナル伝達を通してアルツハイマー病(AD)の発症に何らかの形で関係している可能性を考えている。実際我々は、γ-セクレターゼで細胞膜から切り出された APP の細胞内ドメイン（AICD）が核へ移行し、遺伝子発現を大きく変化させ、神経細胞選択的にアポトーシスを引き起こす事を示している。本研究開発の目的は、AICD の核移行を制御する AICD 脱リン酸化酵素を同定し、AICD の神経毒性の分子機序を明らかにすることにある。

A.研究目的

本研究開発の目的は、AICD の核移行に伴う神経毒性の分子機序を解明する第一歩として、この核移行の過程を分子レベルで解明することにある。

γ-セクレターゼによって細胞膜から細胞質内に切り出された AICD が核に移行するには、アダプター蛋白質 Fe65 と結合することが必須であることが知られている。しかしながら、APP は膜に存在する状態で既に AICD の部位が構成的にリン酸化されており、リン酸化された AICD は Fe65 に結合できないために核に移行できない。核に移行できないリン酸化 AICD は、細胞質内で速やかに分解される。従って、通常では AICD は核へ移行せず、神経細胞死は起きない。

ところが、リン酸化 AICD が脱リン酸化されると Fe65 に結合できるようになり、核に移行し転写因子に結合して遺伝子発現を変化させ、その結果としてアポトーシスが誘導されるようになるのではないかと我々は考えている。

AICD をリン酸化する酵素としては、cdk5、JNK や GSK-3β 等が知られているが、脱リン酸化酵素に関しては全く報告がない。

したがって本研究の直接的な目標は、AICD の核移行を調節する脱リン酸化酵素が実際に存在するかどうかを確かめ、それを生化学的に同定することにある。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

脱リン酸化活性の測定に使う基質として、HEK293 細胞に FLAG タグを持つ AICD 発現ベクターを導入してリコンビナント FLAG-AICD を発現させ P^{32} でメタボリックラベルした。その後、抗 FLAG 抗体カラムを用いてリコンビナント FLAG-AICD を精製した。

脱リン酸化酵素の精製は、1 回の実験について約 100 匹のリタイアマウスの脳（約 50g）を用いた。約 50ml の脳のライセートを得て、これを 20ml の DEAE sepharose カラムに添加した。カラムからの溶出は、NaCl の濃度勾配によっておこなった。さらに、AICD 脱リン酸化酵素活性を持つ DEAE sepharose フラクションを 20mM リン酸カリウムバッファーに対して透析し、2ml の Creamic Hydroxyapatite カラムに添加しリン酸の濃度勾配によっておこなう。その後ゲル

ろ過とクロマトフォーカッシングを行い、電気泳動によって AICD 脱リン酸化酵素活性と相関するバンドを検出しようとしている。

C.研究結果

リタイアマウス脳のライセートを DEAE sepharose カラムで分画した場合、左の図 2 に示したように 225-300mM の NaCl で溶出したフラクションに強い AICD 脱リン酸化酵素活性が認められた。

これらのフラクションをさらにヒドロキシアパタイトに吸着させ、リン酸濃度を上げる事により蛋白質を溶出した。その結果、幅広い範囲（150mM から 300mM）のフラクションが AICD 脱リン酸化活性を示した。なお、脳に多量に存在するカルシニューリンには AICD 脱リン酸化活性がないことを確認している。

現在さらに精製を進めており、MALDI-TOFMS 法を用いて同定し、その情報を基に cDNA をクローニングする予定である。さらにクローニングした cDNA を培養細胞に発現して、実際に AICD の核移行を制御しているか検証する予定である。

D.考察

前述したように、AICD の核移行には Fe65 との結合が必須であるが、AICD は構成的にリン酸化されている。我々は AICD が核移行するにはそれ自体の脱リン酸化が必要だと考えており、AICD 脱リン酸化酵素が存在することを想定している。

本研究において、実際に AICD を脱リン酸化する酵素活性を検出しており、この仮説が正しいことを示唆していると考えている。

前述したよに、AICD の核移行は神経細胞特異的にアポトーシスを誘導するので、AD の発症に関係している可能性が高い。

このことから、APP のシグナル伝達における AICD の核移行のステップ、特に今回同定しようとしている AICD 脱リン酸化酵素は新しい観点からの AD に対する創薬のターゲットとなる可能性が考えられ､研究を進めるつもりである。

E.結論

現在、AICD 脱リン酸化酵素の同定を目標に、精製を進めている。この酵素は、AICD の核移行を調節している可能性が高い。

今後、精製した蛋白質の情報を基に cDNA をクローニングする予定である。その後、それを培養細胞に発現させて、実際に AICD の核移行及び神経細胞特異的な細胞死に関わっていることを確認する。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

Nagase H. & Nakayama K: Present and future therapies for Alzheimer’s disease. Immunoregulatory Aspects of Immunotherapy, ed. by Seyyed Shamsadin Atthari: Chapter8,177-197, Intech Publishers, Inc., Croatia, 2018.

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

平成30年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

脳疾患動物モデルの生体イメージングによる、脳疾患機序の解明

研究代表者　水野　秀信 1)
研究分担者　澁木　克栄 2)

1) 熊本大学国際先端医学研究機構多次元生体イメージング学分野
2) 新潟大学脳研究所システム脳生理学分野

研究要旨

本研究の目的は、独自開発した生体新生仔脳2光子カルシウムイメージング法を脳疾患動物モデルに適用することで、脳疾患の機序---すなわち神経回路の破綻を引き起こす分子細胞メカニズム---を解明することである。これまでの研究で、新生仔の体性感覚野においてパッチワーク状の同期活動パターンを発見した。このパッチワーク状活動は正常な大脳皮質神経回路の形成に深く関わると考えられる。今年度の研究では、ある遺伝子をノックアウトした細胞において同期活動パターンが破綻するという予備結果を得た（未発表）。今後、同様のアプローチを脳疾患モデルに適用することで、脳疾患機序の解明が進むと期待される。

A.研究目的

哺乳類の脳神経回路は、胎児期に遺伝情報によって大まかに作られた後、生後発達期に神経活動に依存し成熟する。発達異常により引き起こされる脳疾患の機序を理解するためには、正常脳および疾患脳の両者における神経活動の相違点を知ることが重要である。しかしながら、発達過程において単一細胞レベルで活動の動態を観察する方法の開発は進んでおらず、活動動態を制御するメカニズムは多くが不明であった。

我々はこれまでの研究で、2 光子顕微鏡イメージングを用い、新生仔マウス大脳皮質内の個々の神経細胞をカルシウムイメージングする方法を開発している（Mizuno et al., 2014, 2018; Luo et al., 2016）。本研究の目的は、標的遺伝子をノックアウトした細胞をカルシウムイメージングし、活動様式を制御する分子細胞メカニズムを解明することであった。本研究と同様のアプローチを脳疾患動物モデルに適用することで、脳疾患により発達期の活動動態がどのように変わりうるかを明らかにすることが可能となる。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

研究に用いた手法は熊本大学および国立遺伝学研究所の動物実験委員会において審査および承認されており、倫理面の配慮がなされている。

・エレクトロポレーション

活動様式を可視化するため、大脳皮質神経細胞にカルシウムインディケータ GCaMP6s を導入した。具体的には、麻酔下で妊娠マウスの子宮内の胎仔の脳に DNA 溶液を投与し、電気パルスを与えることで DNA を導入した。その後、子宮を戻し腹部を縫合した。術後保温し回復させた。

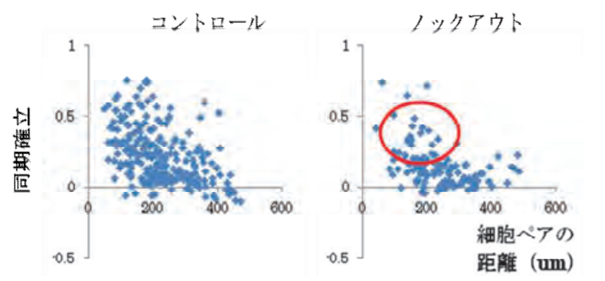
・生体イメージング

活動様式を観察するため、生体において大脳皮質神経細胞を2光子顕微鏡カルシウムイメージングした。具体的には、新生仔の頭部に2光子観察用窓および頭部を固定するための金具を取り付けた。術後はマウスを保温し回復させた。回復したマウスを用い、麻酔下あるいは無麻酔下において2光子顕微鏡で神経細胞の活動パターンを観察した。なお研究期間内にイメージング法をまとめたプロトコール論文を発表した（Mizuno et al., 2018）。

C. 研究結果

研究ではマウスのヒゲ感覚を担う大脳皮質体性感覚野をモデルとして用いた。マウスにおいて個々のヒゲからの感覚情報を処理する神経細胞は、体性感覚野で集まりバレルとよばれる構造を形成する。バレル内の個々の神経細胞にカルシウムインディケータ GCaMP を発現させ、2光子顕微鏡を用いて活動パターンを観察した。

これまでの研究で、生後5日齢のマウスでは体性感覚野の神経細胞がバレル毎に同期して活動することを報告している。本研究において、ある遺伝子Aをノックアウトすることで（未発表のため遺伝子名は公表できない）、100～300マイクロメートル離れた距離にある細胞ペアの同期確立が低下することを見出した（図）。



図、遺伝子ノックアウトによる活動同期の低下

遺伝子Aをノックアウトすることで、体性感覚野内で 100～300 マイクロメートル離れた細胞ペアにおいて、同期確立が低下した（赤丸部）。なお実験及び解析は、実験者が遺伝子型を知らない状態で行っている（ブラインド実験）。

D. 考察

今回の研究により、遺伝子Aが体性感覚野神経回路形成時の正常な同期活動の発生に関わることが示唆された。

遺伝子Aのノックアウトにより100～300マイクロメートル離れた細胞ペアの同期活動が低下したが、この距離はバレルの大きさとほぼ一致している。遺伝子Aは隣接するバレルの位置情報のコードに働いていると予想される。

E. 結論

哺乳類において発達期の大脳皮質では同期活動が観察され、この同期活動は正常な神経回路形成に関わる。本研究で用いたアプローチによりその仕組みを解明することで、正常な子供の脳の発達の理解、および、その破綻による発達障害や精神疾患の理解につながると期待される。

平成30年度の研究室立ち上げの際、澁木克栄教授および脳研究所の先生方に多くのアドバイスを頂いたことを心より御礼申し上げます。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

・Hidenobu Mizuno*, Shingo Nakazawa, Takuji Iwasato. (*corresponding author)
In Vivo Two-photon Imaging of Cortical Neurons in Neonatal Mice *J Vis Exp* 140, e58340 (2018)

2. 学会発表

・水野 秀信（招待口演）
生体マルチスケールイメージングによる脳神経回路形成機構の解明
大阪大学・Frontier Bioscience Seminar
2019年1月　吹田市

・水野 秀信（招待口演）
ミクロとマクロの生体同時イメージングを目指して
新潟大学脳研究所・新潟脳神経研究会特別例会　2018年11月　新潟市

・Hidenobu Mizuno（招待口演）
In vivo two-photon imaging of developing neuronal circuits in the cerebral cortex.
Korea Advanced Institute of Science and Technology・KU-KAIST Joint Symposium
2018年10月　Daejeon, Korea

・Hidenobu Mizuno（招待口演）
In vivo imaging of the developing cerebral cortex to elucidate the mechanism of circuit refinement.
University of Zurich, Brain Research Institute 2018年7月 Zurich, Switzerland

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Joint Usage / Research Report FY 2018
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Elucidating the role of Gli3 in medulloblastoma as a target for treatment

Principal Investigator Charles G. Eberhart[1]
Co-Investigators Manabu Natsumeda[2], Hiroaki Miyahara[1,3], Yu Kanemaru[2,3], Takanori Nozawa[2,3], Masayasu Okada[2], Makoto Oishi[2], Akiyoshi Kakita[3], Yukihiko Fujii[2]

[1]Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine,

[2] Department of Neurosurgery and [3]Pathology, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

Gli3 is a downstream factor of the Sonic Hedgehog pathway, and its main function is to suppress Gli1/2, leading to inactivation of transcription of oncogenes leading to neuronal differentiation. We have previously shown that Gli3 induces neuronal differentiation inside the nodules of desmoplastic / nodular type medulloblastamas. In the present study, we set out show in which molecular subtype of medulloblastomas Gli3 is expressed. Nanostring analysis to determine molecular subgroup and Gli3 immunohistochemistry (IHC) were performed. Furthermore, the public database R2 was analyzed for Gli3 and Gli1 expression. We found that Gli3 was highly expressed in the WNT- and SHH- activated subgroups. Gli1 expression was high in SHH- activated medulloblastomas, and suppressed in WNT- activated subgroups. We found from IHC analysis that Gli3 was highly expressed inside the nodules and Gli1/2 was activated in desmoplastic areas of SHH- activated medulloblastomas, whereas Gli3 was diffusely expressed in WNT- activated medulloblastomas, suppressing aberrant Hedgehog signaling leading to the WNT- activated morphology. Thus, we conclude that Gli3 is an important factor associated with neuronal differentiation, determination morphology, and good prognosis in WNT- and SHH- activated medulloblastomas.

A. INTRODUCTION

Gli3 is a downstream factor of the Sonic Hedgehog pathway, and its main function is to suppress Gli1/2, important transcriptional regulators involved in activation of several oncogenes such as Myc, Cyclin D/E and Patched in medulloblastomas. We have previously shown that Gli1/2 is expressed in desmoplastic areas of desmoplastic / nodular (D/N) type medulloblastomas and is associated with enhanced proliferation (Bar *et al*., Am J Pathol, 2007, Ref 1), whereas Gli3 induces neuronal and glial differentiation in medulloblastomas and D/N type medulloblastomas are overrepresented in Gli3 positive medulloblastomas (Miyahara *et al*., Neuropathology, 2013, Ref 2). In the present study, we investigated the expression of Gli3 in the molecular subgroups and found for the first time that Gli3 was upregulated in WNT- activated and SHH- activated subgroups, with different distribution within the two subgroups.

B. MATERIALS AND METHODS

31 subjects undergoing surgery for newly-diagnosed medulloblastomas from 1982 to 2010 were enrolled in the study. This study received approval from institutional review boards of Niigata University and Oita University.

Histological and immunohistochemical analysis

Surgical specimens were fixed with 20% buffered formalin and embedded in paraffin (FFPE). Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE), Gli3, NeuN, GAB1, YAP1, and β-catenin.

Tissue microarrays (TMAs) containing primary medulloblastomas obtained from the Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, with institutional review board approval were created by the Johns Hopkins microarray core facility (core diameter 0.6 mm). These TMAs, which had previously been molecularly subtyped, were sent to Niigata University and stained for Gli3. Positive staining of tumor cells was scored independently by two experienced pathologists. Histological analysis of medulloblastomas was made by multiple experienced pathologists at each institution according to the 2016 WHO classification.

Nanostring analysis
RNA taken from FFPE tissues of 31 medulloblastoma cases were sent to Hospital for Sick Children for Nanostring subgroup analysis. Specific have been previously published (Northcott et al., Acta Neuropathol, 2012). Analyses registering a confidence of less than 0.9 were considered poor representations and excluded from the analysis.

R2 analysis
The Northcott cohort of 103 medulloblastomas in R2 public database was used to assess the expression of Gli3 and Gli1 in the 4 medulloblastoma subgroups.

C. RESULTS/OUTCOMES

Immunohistochemical analysis revealed that Gli3 was

Nanostring was considered reliable (confidence > 0.9) in 28 cases. Four cases were classified as WNT-activated, 5 cases as SHH-activated, 4 cases as Group 3 and 16 cases as Group 4. Gli3 was positive in 7 out of 9 (78%) WNT-/SHH- cases, whereas Gli3 was positive in only 8 out of 19 (42.1%) non-WNT-/SHH-subgroup ($p = 0.1145$, Fisher's exact test). R2 database analysis confirmed that Gli3 was significantly elevated in WNT- and SHH-activated medulloblastoma (Fig 1A). Gli1 was elevated in SHH-activated cases but suppressed in WNT-activated cases (Fig 1B).

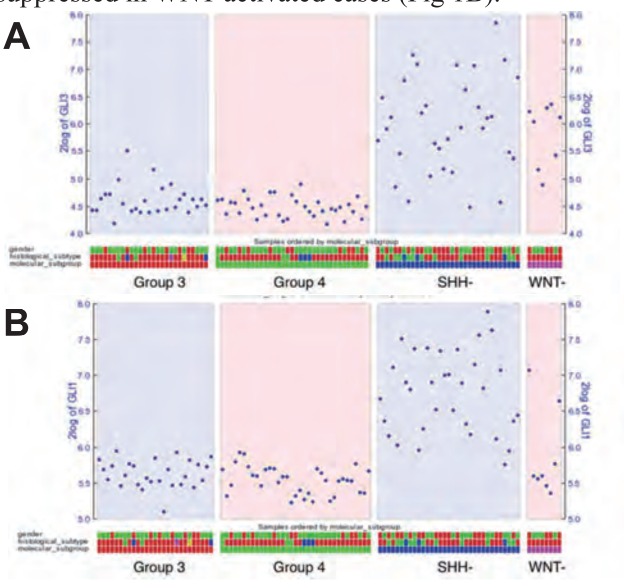


Fig 1. A. Gli3 and **B.** Gli1 expression in the different subgroups determined by R2 database analysis.

IHC analysis revealed that Gli3 was elevated inside the nodules of D/N type medulloblastoma. Positivity for NeuN was seen in these nodules. Gli3 was expressed more diffusely in WNT-activated medulloblastomas and HE sections showed a clear cell morphology suggesting neuronal differentiation. The pathoclinical characteristics of the different subtypes in terms of Gli1 and Gli3 expression are summarized in Table 1.

	WNT- activated	SHH- activated	Group 3/4
Histology	Classic	Desmoplastic / nodular	Classic / LCA
Intranuclear β-catenin	+	–	–
GAB1	–	+	–
YAP1	+	+	–
Expression of Gli1/2/3	Diffuse Gli3$\uparrow$ Gli1/2$\downarrow$ Neuronal differentiation	Nodule Gli3$\uparrow$ Neuronal diff; Desmoplastic region Gli1/2$\uparrow$	Gli1/2$\downarrow$ Gli3$\downarrow$
Prognosis	Very good	Good	Intermediate ~ poor

Table 1. Summary of Gli expression within the various molecular subgroups.

D. DISCUSSION

Until now, it was not clearly understood in which molecular subtypes of medulloblastoma Gli3 was upregulated. In this study, we found Gli3 to be upregulated in WNT- activated and SHH- activated subtypes through Nanostring analysis.

Interestingly, Gli1 was also upregulated in SHH-activated medulloblastomas, which routinely show D/N pathology. Considering that the main function of Gli3 is to suppress Gli1, it was difficult initially to make sense of these results, but we now understand that Gli3 is expressed in side of nodules showing neuronal differentiation and Gli1/2 is highly expressed in desmoplastic areas with are proliferative. We have previously shown that Gli1 is upregulated in desmoplastic areas of D/N medulloblastomas (Bar *et al.*, Am J Pathol, 2007, Ref 1). Gli3 was considered to be more diffusely expressed in WNT- activated medulloblastomas, shutting off aberrant SHH-signaling causing a WNT- phenotype.

Taken together, Gli3 is a key factor associated with neuronal differentiation, determination of morphology, and good prognosis in medulloblastomas.

Preclinical studies looking at phenotypic changes after Gli3 overexpression in medulloblastoma cell lines and treatment studies analyzing the effectiveness of Gli1 inhibitors are awaited.

E. CONCLUSION

We found Gli3 to be highly expressed in WNT- and SHH- activated medulloblastaoma. Gli3 is a key factor associated with neuronal differentiation, determination of morphology, and good prognosis in medulloblastomas.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

a. Bar E, Chaudry A, Farah MH, **Eberhart CG**. Hedgehog signaling promotes medulloblastoma survival via Bcl2. *Am J Pathol*:170(1):347-55, 2007.

b. **Miyahara H**, **Natsumeda M**, Yoshimura J, Ogura R, Okazaki K, Toyoshima Y, **Fujii Y**, Takahashi H, **Kakita A**. Neuronal differentiation associated with Gli3 expression predicts favorable outcome of patients with medulloblastoma. ***Neuropathology***:34 (1):1-10, 2014.

c. **Natsumeda M**, Maitani K, Liu Y, Miyahara H, Kaur H, Chu Q, Zhang H, Kahlert U, **Eberhart CG**. Targeting Notch signaling and autophagy increases cytotoxicity in glioblastoma neurospheres. ***Brain Pathol*** 26(6):713-723, 2015.

d. **Miyahara H**, Yadavilli S, **Natsumeda M**, Rubens JA, Rodgers L, Kambhampati, Taylor IC, Kaur H, Asnaghi L, **Eberhart CG**, Warren KE, Nazarian J, Raabe EH. The dual mTOR kinase inhibitor TAK228 inhibits tumorigenicity and enhances radiosensitization in diffuse intrinsic pontine glioma. ***Cancer Lett*** 400:110-116, 2017.

e. **Natsumeda M**, Liu Y, Nakata S, Miyahara H, Hanaford A, Ahsan S, Stearns D, Skuli N, Kahlert UD, Raabe EH, Rodriguez FJ, **Eberhart CG**. Inhibition of enhacer of zest homologue 2 is a potential therapeutic target for high-MYC medulloblastoma. ***Neuropathology***, 2019, accepted.

2. PRESENTATIONS

a. **Natsumeda M,** Miyahara H, Yoshimura J, Nozawa T, Tsukamoto Y, Wataya T, **Eberhart CG**, Takahashi H, **Kakita A, Fujii Y**. Neuronal differentiation is induced by Gli3 in WNT- and SHH- activated medulloblastoma. 22nd Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, November 2018, New Orleans, USA.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

None

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

None

3. OTHERS

Memorandum of Understanding is to be signed between Pathology Unit, Johns Hopkins University Pathology Unit and Brain Research Institute, Niigata University in the summer of 2019.

Joint Usage / Research Report FY 2018
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Elucidating the expression of IMPDH1/2 in epileptic brain and brain tumors – preliminary results

Principal Investigator Atsuo T. Sasaki [1]
Co-Investigators Manabu Natsumeda [2], Masayasu Okada [2], Akiyoshi Kakita [3], Yukihiko Fujii [2]

[1]Division of Hematology and Oncology, Department of Internal Medicine, University of Cincinnati College of Medicine,

[2] Department of Neurosurgery and [3]Pathology, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) is an essential enzyme in the production of GTP. We have previously shown that IMPDH2 is highly expressed in malignant gliomas, and that pharmacological inhibition of IMPDH using mycophenolate mofetil is effective in suppressing growth of glioblastoma. The role of IMPDH in epilepsy has not been thoroughly studied. We present preliminary results of IMPDH immunohistochemical analysis in hippocampal sclerosis. IMPDH2 was positive in areas with relatively mild neuronal degeneration.

A. INTRODUCTION

Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) is a rate-limiting enzyme of the GTP nucleotide synthesis pathway. We have previously shown that IMPDH2 but not IMPDH1 is upregulated in glioblastomas, and that glioblastomas are dependent on GTP as well as ATP for proliferation. Furthermore, we have shown that the IMPDH1/2 inhibitor mycophenolate mofetil suppresses growth of glioblastoma *in vitro* and *in vivo*. However, the expression of IMPDH1 and IMPDH2 is not known in epileptic brain. The objective of this research is to the find out the expression, distribution and role of IMPDH1 and IMPDH2 in epileptic brain. A large amount of energy is generated during a seizure, but it is not known whether GTP is produced. Preliminary results are reported; we first performed immunohistochemical (IHC) analysis of IMPDH1 and IMPDH2 on malignant gliomas for control setting, and then stained in hippocampal sclerosis.

B. MATERIALS AND METHODS

Surgical specimens were fixed with 10% buffered formalin and embedded in paraffin. 4-μm-thick sections were cut and stained with hematoxilin-eosin and IHC was performed using the following primary antibodies: IMPDH1 (WH0003614M1, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), IMPDH2 (ab131158, Abcam, Cambridge, UK), phospho-GAP-43 (our custom antibody) and synaptophysin (27G12, Novocastra, Newcasle-upon-Tyne, UK). The specifics for IHC are omitted at this time.

Pathological diagnosis of gliomas and hippocampal sclerosis was done by AK. Staining was performed by MO, analyzed by AK and discussed together by all investigators excluding YF.

C. RESULTS/OUTCOMES

First, two glioma cases were stained. One case was pathologically diagnosed as "glioblastoma, IDH-wildtype" and the second case as "oligodendroglioma, IDH-mutant, 1p/19q co-deleted" according to the 2016 World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System.

IMPDH1 was negative in the oligodendroglioma case, positive in some areas of the glioblastoma case, where IMPDH2 staining was weak (Fig 1). IMPDH2 was positive in both cases. The nuclei stained positive for IMPDH2 in the oligodendroglioma case, whereas the astrocytic projections were positive in fibrillary portions of the glioblastoma case (Fig 1).

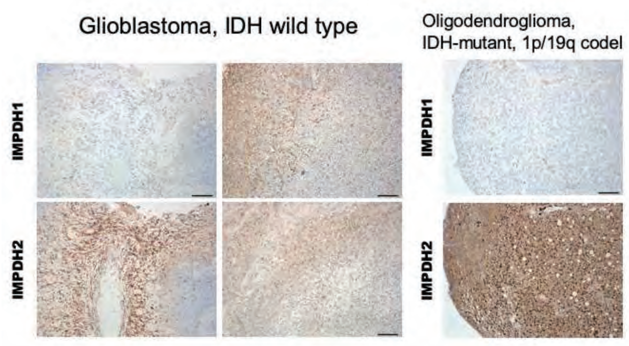


Fig 1. IMPDH1 and IMPDH2 staining of gliomas

These findings were consistent with those of staining done at University of Cincinnati, suggesting that IMPDH1 and IMPDH2 staining is robust.

Next, we sought to look at IMPDH1 and IMPDH2 staining in a hippocampal sclerosis case. IMPDH1 was negative in all areas of the tumor, whereas IMPDH2 was positive where neurons were still present (Fig 2A, C) but only slightly immunopositive in areas of severe neuronal degeneration (Fig 2B).

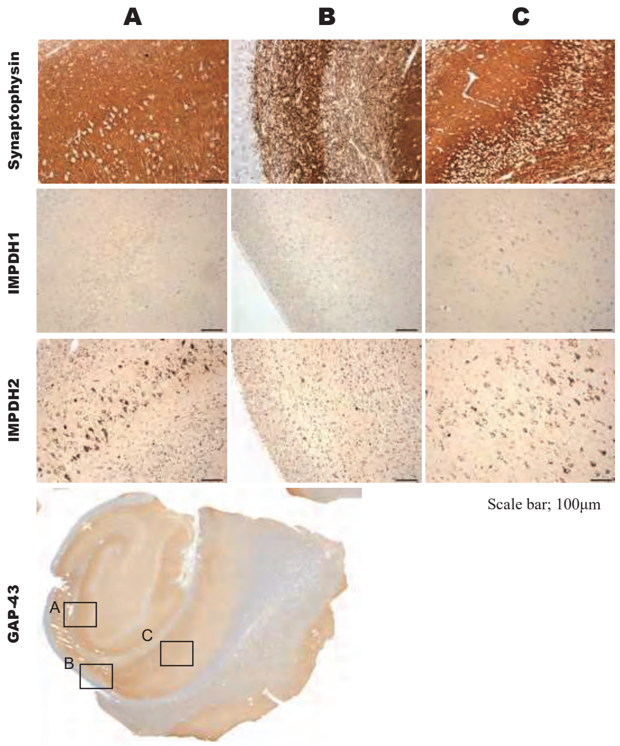


Fig.2 IMPDH1 and IMPDH2 staining in hippocampal sclerosis

D. DISCUSSION

IMPDH is the rate-limiting enzyme of the de novo purine nucleotide synthesis pathway and a molecular determinant of the fate of IMP to GTP synthesis. The human genome encodes two different IMPDH genes. IMPDH1 is ubiquitously expressed, whereas IMPDH2 is expressed in proliferative states. Both IMPDH1 and IMPDH2 are known to be upregulated in various cancers; IMPDH2 not IMPDH1 is upregulated in malignant gliomas. We have previously shown that pharmacological inhibition of IMPDH1/2 using mycophenolate mofetil suppresses growth of glioblastoma *in vitro* and *in vivo*.

The role, if any, of IMPDH1 and IMPDH2 in epilepsy is not known. A large amount of energy is generated during a seizure, but it is not known whether GTP is produced. To determine whether GTP is produced in the epileptic brain, we decided to first look at IMPDH1 and IMPDH2 expression in hippocampal sclerosis. Preliminary findings suggest that IMPDH2, but not IMPDH1, is expressed in areas of where neuronal degeneration is not severe. Professor Kakita’s group has succeeded in determining the exact location of pathophysiologic alterations responsible for epileptogenesis in patients with hippocampal sclerosis using flavoprotein fluorescence imaging. Further collaborations could determine the anatomical relationship between epileptic focus and GTP production.

Furthermore, if IMPDH2 proves to be consistently upregulated in hippocampal sclerosis and other epileptic states, pharmacological IMPDH inhibition using mycophenolate mofetil could be candidates for the treatment refractory epilepsy.

E. CONCLUSION

Preliminary results of IMPDH1 and IMPDH2 IHC for gliomas and hippocampal sclerosis suggest that IMPDH1 and IMPDH2 IHC is very reliable. IMPDH2 may be expressed in hippocampal sclerosis and warrants further examination.

F. PUBLICATIONS

(Relevant to the research)

1. PAPERS

a. Kitaura H, Shirozu H, Masuda H, Fukuda M, **Fujii Y**, **Kakita A**. Pathophysiological characteristics associated with epileptogenesis in human hippocampal sclerosis. ***EBioMedicine***. 2018;29:38-46.

b. Kawasaki A*, **Okada M***, Tamada A*, (*: equal contribution), Okuda S, Nozumi M, Ito Y, Kobayashi D, Yamasaki T, Yokoyama R, Shibata T, Nishina H, Yoshida Y, **Fujii Y**, Takeuchi K, Igarashi M. Growth cone phosphoproteomics reveals that Gap-43 phosporylated JNK is a marker of axon growth and regeneration. iScience. 2018;4:190-203.

c. Han D, Sasaki M, Yoshino H, Kofuji S, **Sasaki AT**, Steckl AJ. In-vitro evaluation of MPAloaded electrospun coaxial fiber membranes for local treatment of glioblastoma tumor cells. ***J Drug Deliv Sci Tech***. 2017;40:45-50.

d. Nakayama Y, Masuda H, Shirozu H, Ito Y, Higashijima T, Kitaura H, **Fujii Y**, **Kakita A**, Fukuda M. Features of amygdala in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: an MRI volumetric and histopathological study. ***Epilepsy Res***. 2017;135:50-55.

e. **Sasaki AT**. Dynamic role of the GTP energy metabolism in cancers. ***Keio J Med***. 2016;65:21.

f. Majd N, Sumita K, Yoshino H, Chen D, Terakawa J, Daikoku T, Kofuji S, Curry R, Wise-Draper TM, Warnick RE, Guarnaschelli J, **Sasaki AT**. A review of the potential utility of mycophenolate mofetil as cancer therapeutic. J Can Res;2014.

G. PRESENTATIONS

(Including name of conference, month and year, place)
Sasaki AT. Understanding cellular function and glioblastoma proliferation through GTP metabolism. March, 2019. Niigata, Japan.

H. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

(Including prospects)

1. PATENT

None

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

None

3. OTHERS

None

Joint Usage / Research Report FY 2018
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Production of congenital nystagmus model mice and analysis of visual function

Principal Investigator Keisuke Yonehara[1]
Co-Investigator Toshikuni Sasaoka[2]

[1] DANDRITE, Department of Biomedicine, Aarhus University [2] Dept. of Comparative & Experimental Medicine, Niigata University

Abstract

Detection of visual motion is fundamental to the function of our visual system. The first stage where visual motion is computed in the brain is the retina. Dysfunction of retinal motion computation is linked to congenital nystagmus, a severe eye movement disorder of humans and mice. In collaboration with Prof. Toshikuni Sasaoka, we will produce knock-in mice for genetically labeling retinal bipolar cell types, which play critical roles in retinal motion computation. We will create 3 mouse lines in which cell type specific promoters are connected to DNA recombinase or tetracycline activator (tTA). The obtained mouse lines will be transported to DANDRITE Denmark where PI of this project will analyze light responses of labeled cell types with two-photon-targeted patch clamp recordings and two-photon glutamate imaging, and then test the effect of silencing these cell types with chemogenetic tools such as DREADD on the retinal motion computation and eye movements to gain causal relationship between temporal dynamics of individual bipolar cell types and direction-selective computation by direction-selective ganglion cells. This project would provide key insights not only into the basic functioning of retinal circuits but also how impaired activity and connectivity of retinal cell types may lead to the visual disorders.

A. INTRODUCTION

Yonehara recently found that spatially asymmetric wiring between type-5 bipolar cell types and ON direction-selective cells are important for the visual motion computation in the mouse retina (Matsumoto et al., unpublished). In order to genetically target individual type-5 bipolar cells for manipulating activity or gene expression, we aimed to generate knock-in mouse lines in which cell type specific promoters are connected to either Cre recombinase or tTA.

B. MATERIALS AND METHODS

Materials

BAC DNA constructs for containing mouse Sox6, Chrm2, and Slitrk5.

ES cells derived from C57BL6 mouse line.

Culture medium for the ES cells.

C57BL6/J mice for implanting gene-introduced ES cells.

Methods

First, targeting vectors were made by DNA cloning. Next, the targeting vectors were electroported into ES cells, and the cells were cultured. ES cell colonies which were positive for the targeting vector was selected by drug. After correct gene insertions are confirmed by sequencing, the ES cells were implanted to adult female C57BL6/J mice.

C. RESULTS/OUTCOMES

Yonehara visited BRI Niigata University July 2018 to discuss the plan for this collaborative project.

To label type-5A bipolar cells, we made a targeting vector for making Sox6-mtTA-KI mice, in which mtTAwprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon in exon 3 of Sox6 in the mouse genome. Endogenous Sox6 gene is disrupted. We will use heterozygous mice for experiments.

To label type-5B bipolar cells, we made a targeting vector for making Chrm2-iCreS-KI mice, in which iCreSwprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon in exon 3 of Chrm2 in the mouse genome. Endogenous Chrm2 gene is disrupted. We will use heterozygous mice for experiments.

To label type-5C bipolar cells, we made a targeting vector for making Slitrk5-iCreERT-KI mice, in which iCreSERTwprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon of Slitrk5 in the mouse genome. Endogenous Slitrk5 is disrupted. We will use heterozygous mice for experiments.

D. DISCUSSION

We will test the genotypes of the generated chemera mice by genotyping by PCR. Positive mice will be crossed with C57BL6/J mice to obtain F1 heterozygous mice. In case we fail to label single cell types in the retina, we will change genetic strategy (e.g. use of Cre or CreERT or tTA).

E. CONCLUSION

Generation of targeting vectors was sucessful. We will continue this Global Collaborative Research Project next year to complete the generation of mouse lines.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

No papers published yet.

2. PRESENTATIONS

Not presented yet.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

Not applicable.

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

Not applicable.

3. OTHERS

Not applicable.

Joint Usage / Research Report FY 2018
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Preventive medicine for Alzheimer's disease

Principal Investigator Ingrid L Kwee[1]
Co-Investigator Hironaka Igarashi[2]

[1] Neurology, University of California Davis [2] BRI, University of Niigata

Abstract

Late onset Alzheimer's disease (LOAD) should be prevented rather than treated when cognitive decline is established. We have clarified that debris clearance from the brain can be profoundly affected by water dynamics through the aquaporin 4 (AQP4) system, the astrocyte abundant water channel, and that perturbation in the AQP4 system plays a role in the pathogenesis of LOAD.

To seek out application of newly developed AQP4 modulators for LOAD, we will utilize high-throughput in vivo MR method developed at the Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute for screening of drugs. Next, we will perform detailed animal studies to assess these effects on an Alzheimer's disease animal model.

A. INTRODUCTION

The purpose of the research is to seek out applications of newly developed aquaporin modulators for Alzheimer's disease in human, we will take newly developed high-throughput in vivo MR methods [1] for selection of candidate compounds. Next we will assess the effect of chronic administration of these compounds on an Alzheimer mouse model.

[1] Igarashi H, Tsujita M, Kwee IL, Nakada T. Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1: 17O JJVCPE MRI study in knockout mice. Neuroreport. 2014 Jan 8;25(1):39-43

B. MATERIALS AND METHODS

We will use high-throughput in vivo JJVCPE MR method developed in Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute for screening of drugs. Candidate drugs will be administered following best effect protocol. Then MRI experiments will be performed on a 15 cm bore 7 T horizontal magnet (Magnex Scientific, Abingdon, UK) with a Varian Unity-INOVA-300 system (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with an actively shielded gradient. Normal saline, 0.2 ml, containing 20% of H2(17)O is to be administered as an intravenous bolus injection at the 75th phase (10 minutes after the first scan) using an automatic injector at 0.04 ml/second. Data will be analyzed using software developed at the Center to assess the efficiency of water metabolism.

C. RESULTS

Utilizing wild type and AQP4 knockout mice, water entry into CSF is smaller in AQP4 mouse[1]. AQP4 facilitator TGN-073 decrease a relative concentration of H2(17)O in cerebral cortex[2].

[1]Nakada T, Kwee IL. Neuroscientist. 2019 Apr;25(2):155-166. doi: 10.1177/1073858418775027. Epub 2018 May 25.

[2]Huber VJ, Igarashi H, Ueki S, Kwee IL, Nakada T.Neuroreport. 2018 Jun 13;29(9):697-703. doi: 10.1097/WNR.0000000000000990.

PMID: 29481527

D. DISCUSSION

From these result, astrocyte seems play important role in active water transport in brain. Water transport in interstitial space can be driven by the active transport of water by astrocyte[1] Also we filed the patent in JP, EU, US of the compounds formerly developed in last year.

E. CONCLUSION

We have clarifies water transport mechanism in brain.

F. PUBLICATIONS

Huber VJ, Igarashi H, Ueki S, Terumitsu-Tsujita M, Nito C, Ohno K, Suzuki Y, Itoh K, Kwee IL, Nakada T. Visualizing the Distribution of Matrix Metalloproteinases in Ischemic Brain Using In Vivo 19F-Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging.Contrast Media Mol Imaging. 2019 Jan 6;2019:8908943. doi: 10.1155/2019/8908943. eCollection 2019.

Fluid Dynamics Inside the Brain Barrier: Current Concept of Interstitial Flow, Glymphatic Flow, and Nakada T, Kwee IL. Cerebrospinal Fluid Circulation in the Brain. Neuroscientist. 2019 Apr;25(2):155-166. doi: 10.1177/1073858418775027. Epub 2018 May 25.

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.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

TGN-073 およびその派生物質の構造および用途特許を出願済みである。
（ＰＣＴ/ＪＰ２０１７/００８４８５：アクアポリン４機能促進剤及び神経疾患用の医薬組成物）

2018 年 8 月 23 日　優先権米国移行手続き完了
2018 年 8 月 27 日　優先権 EU 移行手続き完了

Joint Usage / Research Report FY 2018
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Elucidation of the roles of chromatin remodeler in neuronal homeostasis using mouse models

Principal Investigator Kensuke Futai[1]
Co-Investigators Toshikuni Sasaoka[2]
Kenji Sakimura[2]

[1] Dept. Neurobiology, Univ. Massachusetts Medical School, Brudnick Neuropsychiatry Research Institute,
[2] Niigata University, Brain Research Institute

Abstract

Homeostatic synaptic down-scaling reduces neuronal excitability by modulating the number of postsynaptic receptors. Histone modifications and the subsequent chromatin remodeling play critical roles in activity-dependent gene expression. Histone modification codes are recognized by chromatin readers that affect gene expression by altering chromatin structure. We show that L3mbtl1 (Lethal 3 malignant brain tumor like 1), a polycomb chromatin reader, is down-regulated by neuronal activity and is essential for synaptic response and down-scaling. Genome-scale mapping of L3mbtl1 occupancies identified Ctnnb1 as a key gene downstream of L3mbtl1. Importantly, the occupancy of L3mbtl1 on the Ctnnb1 gene was regulated by neuronal activity. L3mbtl1 knockout neurons exhibited reduced Ctnnb1 expression. Partial knockdown of Ctnnb1 in wild type neurons reduced excitatory synaptic transmission and abolished homeostatic down-scaling; while transfecting Ctnnb1 in L3mbtl1 knockout neurons enhanced synaptic transmission and restored homeostatic down-scaling. These results highlight a unique role for L3mbtl1 in regulating homeostasis of synaptic efficacy.

A. INTRODUCTION

Runaway excitation of neuronal circuits induces epileptic seizures, leading to other detrimental consequences, including neuronal cell death. Neurons possess homeostatic mechanisms that compensate for activity perturbations and maintain the excitatory and inhibitory balance (E/I balance). Synaptic scaling is a specific form of homeostatic plasticity that maintains proper neuronal excitability via bidirectional regulation of synaptic strength of a neuron. Both excitatory and inhibitory synaptic strength are regulated by scaling mechanisms through changes in the abundance (scale) of postsynaptic receptors.

A number of molecules that bridge the induction and expression steps of homeostatic synaptic down-scaling have been identified. The majority of these molecules are synaptic scaffolds, kinases and phosphatases that directly regulate synaptic function. More than 10 genes, including Arc, Homer1a, and polo-like kinase 2, display altered expression levels upon an increase in neuronal activity, and are critical for the expression of homeostatic synaptic down-scaling. Importantly, the inhibitors of transcription and translation dysregulate homeostatic synaptic plasticity. These results clearly illustrate the critical role of activity-dependent transcriptional and translational machineries in homeostatic synaptic scaling. However, the roles of epigenetic factors, particularly chromatin regulators, in this plasticity is relatively unknown.

In this study, we demonstrate that L3mbtl1 mRNA is primarily expressed in neurons, and is decreased when neuronal activity is elevated. Knockout of L3mbtl1 causes a reduced excitatory synaptic transmission in primary neurons and a lack of homeostatic down-scaling at excitatory synapses both in hippocampal primary neurons and organotypic slice cultures. Importantly, L3mbtl1 protein binds to the transcription start sites of Ctnnb1 and Gabra2, whose products mediate homeostatic synaptic scaling and inhibitory synaptic transmission, respectively. These results provide insight into the roles of a chromatin reader molecule in synaptic function and neuronal homeostasis.

B. MATERIALS AND METHODS

Animals: All animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Massachusetts Medical School and Niigata University (PMID: 29398357 and 29034317). L3mbtl1 mutant mice were generated previously and backcrossed with C57BL/6 for four generations. C57BL/6 mice were also used for RNA sequencing and primary cultures.

RNA Extraction and RNA sequencing: Total RNA was extracted from hippocampus or hippocampal primary cultures using RNAqueous Micro Kits (Ambion). Sequencing libraries were prepared according to ScriptSeq v2 protocol following rRNA depletion (RiboZero, Illumina), and run on single-end 50-bp modules in Illumina HiSeq 2000.

Primary culture preparation: Primary hippocampal cultures were prepared from early postnatal mouse as described previously with some modifications (Futai et al., 2013). Briefly, hippocampal neurons were dissociated and plated onto coverslips coated with poly-D-lysine and laminin. Neurons were maintained in B27 supplement containing medium for 14-16 days *in vitro* (DIV).

C. RESULTS/OUTCOMES

To date, over 40 genes have been reported as regulators of homeostatic up- and down-scaling in hippocampal and cortical neurons. Because the expression of many of these genes changes during induction and expression of the scaling, we hypothesized that chromatin regulator molecules, whose expression is altered by neuronal activity, contribute to homeostatic synaptic scaling. To test this hypothesis, we performed unbiased transcriptome analysis by RNA-sequencing of cultured primary neurons after induced homeostatic down-scaling.

Hippocampal primary cultures were prepared from C57BL6 mice and homeostatic synaptic scaling was induced by applying picrotoxin (PTX), a non-competitive $GABA_AR$ blocker, for 15 hours at DIV14. Total RNA isolated from Control and PTX challenged samples was subjected to an unbiased transcriptome (RNA-Seq) screen. RNA-seq was performed in quadruplicate for each treatment and the results were highly clustered into two treatment groups. Using stringent criteria, we identified 1150 and 689 of up- and down-regulated genes, respectively. Importantly, 12 out of 246 chromatin regulatory genes showed changes in mRNA expression. In particular, L3mbtl1 and Baz1a mRNA expression were decreased and increased to 30 and 631% of control value, as the top ranking down- and up-regulated molecules amongst chromatin regulatory genes, respectively.

If down-regulation of L3mbtl1 RNA and protein is part of an essential switch to induce homeostatic synaptic down-scaling, then L3mbtl1 KO neurons may exhibit smaller basal synaptic transmission and lack homeostatic plasticity. To test this possibility, we prepared hippocampal primary and slice cultures from wild type and L3mbtl1 KO mice and compared amplitudes and frequencies of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs). Interestingly, we found that L3mbtl1 KO neurons showed smaller mEPSC amplitudes than that of wild type (**Fig. 2A**), suggesting that the lack of L3mbtl1 reduces the number of AMPARs per synapse. We then studied L3mbtl1 deficiency in homeostatic plasticity by application of PTX. Most importantly, L3mbtl1 KO cultured neurons failed to induce homeostatic down-scaling by PTX treatment, whereas wild type neurons could induce down-scaling (**Fig. 1**).

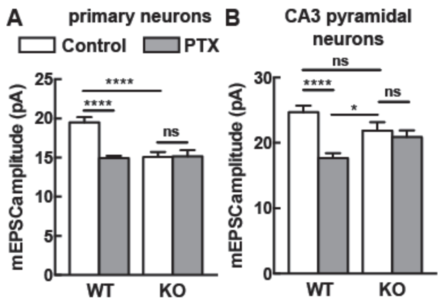


Fig. 2 L3mbtl1 is required for homeostatic plasticity during activity elevation in hippocampal primary (A) and organotypic (B) cultures. Mean mEPSC amplitude of control (DMSO) and PTX-treated neurons from wild-type and L3mbtl1 KO mouse cultures. N = 11-19 cells. * $p<0.05$, **** $p<0.0001$, 2 way ANOVA

Furthermore, genome-scale mapping of L3mbtl1 occupancies identified Ctnnb1 as a key gene downstream of L3mbtl1. Importantly, the occupancy of L3mbtl1 on the Ctnnb1 gene was regulated by neuronal activity. L3mbtl1 knockout neurons exhibited reduced Ctnnb1 expression. Partial knockdown of Ctnnb1 in wild type neurons reduced excitatory synaptic transmission and abolished homeostatic down-scaling; while transfecting Ctnnb1 in L3mbtl1 knockout neurons enhanced synaptic transmission and restored homeostatic down-scaling. These results highlight a unique role for L3mbtl1 in regulating homeostasis of synaptic efficacy.

To further extend our findings, we have decided to elucidate the role of Baz1a in scaling and animal behavior. Drs. Sakimura and Abe have started generating Baz1a flox mouse line at BRI, Niigata Univ., in summer 2017. ES cell lines that carry floxed alleles have been established. We expect to generate chimera mice within 2 – 3 months. By using the Baz1a flox line, we will generate cell type-specific Baz1a knockout mouse models during the upcoming grant year.

D. DISCUSSION

It has been considered that neuronal activity elevation induces a series of transcriptional regulatory events that alter chromatin structure, leading to a long-lasting effect on gene expression. Our results strongly suggest a tightly controlled L3mbtl1 signaling pathway specifically activated during activity elevation and regulates homeostatic synaptic plasticity. Both conventional KO and acute KD of L3mbtl1 in organotypic slice cultures blocked homeostatic down-scaling in excitatory synapses without altering baseline AMPAR abundance, indicating a critical and cell-autonomous role for L3mbtl1 and its downstream genes in synaptic down-scaling.

Ctnnb1 (β-catenin) has indispensable roles in many neurodevelopmental processes including migration and synapse formation and maturation, as a transcription factor and a synaptic scaffold molecule. At excitatory synaptic sites, β-catenin forms an adhesion complex with N-cadherin necessary for synapse formation and maturation. β-catenin KO neurons exhibited reduced basal excitatory synaptic transmission and a lack of homeostatic scaling. In this study, we showed that Ctnnb1 is necessary and sufficient for L3mbtl1-mediated regulation of synaptic strength. Whether additional L3mbtl1 target genes are involved warrants further study.

L3mbtl1-mediated transcriptional regulation

The three MBT domains in L3mbtl1 protein compact chromatin by binding to mono- and dimethylated histone marks, including H1bK26, H3K9 and H4K20. In heterologous cell lines, L3mbtl1 forms a complex with heterochromatin protein 1γ and retinoblastoma protein, and contributes to repression of E2F target genes. In this study, we identified the *in vivo* binding sites of L3mbtl1 in the brain. Our analysis of genomic occupancy suggested that L3mbtl1 localizes to open chromatin sites associated with histone marks for active chromatin. Two genes Ctnnb1 and Gabra2, bound by L3mbtl1 at their promoter regions, showed reduced transcript levels in the absence of L3mbtl1. Taken together with previous reports, the data suggest that L3mbtl1 acts as a transcriptional activator or repressor depending on the gene targets and cell types. We also observed that the binding of L3mbtl1 to the promoters of these genes was abolished by PTX treatment, indicating that upon neuronal activity elevation, L3mbtl1 protein dissociates from chromatin of target genes. Therefore, we suggest that L3mbtl1 regulates basal expression of the Ctnnb1 and Gabra2 genes, and further, that the activity-dependent dissociation of L3mbtl1 from chromatin may allow the recruitment of other protein complexes required for gene expression upon activity elevation.

E. CONCLUSION

Homeostatic synaptic scaling is one of the most important regulatory mechanisms of synaptic strength that prevents the detrimental consequences of runaway neuronal over-excitation. In the present study, we found that L3mbtl1 regulates basal excitatory and inhibitory synaptic transmission and homeostatic down-scaling in excitatory synapses. Our ChIP studies identified Ctnnb1 and Gabra2 genes as activity-dependent targets of L3mbtl1 protein. Ctnnb1 expression is reduced in L3mbtl1 KO, partial KD of Ctnnb1 causes a lack of homeostatic down-scaling, and transfection of Ctnnb1 into L3mbtl1 KO neurons restores homeostatic down-scaling, suggesting that L3mbtl1 controls synaptic strength through Ctnnb1. Our results highlight a critical role for the activity-regulated chromatin reader molecule, L3mbtl1, in homeostatic control of synaptic strength and adds to our understanding of epigenetic mechanisms of activity-dependent gene regulation.

Elucidating the roles of the other chromatin regulator, Baz1a, in synaptic plasticity coupled with our results presented here will provide a comprehensive view of epigenetic regulation of gene expression in homeostatic synaptic scaling. During the next grant period, we will first perform establishing cell type-specific Baz1a KO mouse line and next start generating Baz1a knock-in mouse line.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

a. Activity-induced Regulation of Synaptic Strength through the Chromatin Reader, L3mbtl1. W. Mao, A.C. Salzberg, M. Uchigashima, Y. Hasegawa, H. Hock, M. Watanabe, S. Akbarian, Y. Imamura, **K. Futai**. *Cell Reports*, 23, 3209-3222 (2018), PMID: 29898393.

b. Mice lacking Kcns1 in peripheral neurons show increased basal and neuropathic pain sensitivity. C. Tsantoulas, F. Denk, M. Signore, MA. Nassar, **K. Futai**, McMahon SB. *Pain*, 159, 1641-1651 (2018), PMID: 29697531, PMCID: PMC6053330

c. Inflammasome-derived cytokine IL18 suppresses amyloid-induced seizures in Alzheimer-prone mice.TC. Tzeng, Y. Hasegawa, R. Iguchi, A. Cheung, DR. Caffrey, EJ. Thatcher, W. Mao, G. Germain, ND. Tamburro, S. Okabe, MT. Heneka, E. Latz, **K. Futai***, DT. Golenbock*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2018) Aug 20., PMID: 30127003, * corresponding authors

2. PRESENTATIONS

1. Invited Symposium Speaker, The 8th International Symposium: The innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models, Niigata, Japan, Feb. 10-12, 2018, Presentation Title "Molecular Mechanisms Underlying Neuronal Homeostasis"
2. Invited speaker, UT Southwestern, Texas, April 16, 2018, "Epigenetic Regulation of homeostatic plasticity"
3. Symposium Speaker, Symposium on Heritance and Etiology of Neurological Genetic Disorders, Taipei, Taiwan, June 13-14, 2018, "The proinflammatory cytokine-meditated neuronal homeostasis in mouse model of Alzheimer's disease"
4. Symposium Speaker, The 41st Annual Meeting of the Japan Society for Neuroscience, Kobe Japan, July 26th, 2018, "The proinflammatory cytokine-meditated neuronal homeostasis in mouse model of Alzheimer's disease"
5. Invited speaker, Penn State College of Medicine, Pennsylvania, September 10th, 2018, "Regulation & dysregulation of neuronal homeostasis"
6. Invited speaker, Penn State University, Pennsylvania, September 12th, 2018, "Regulation & dysregulation of neuronal homeostasis"
7.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. UTILITY MODEL REGISTRATION

2. OTHERS

None.

BRI GCR Research Report FY 2018

Project Title: Research on pathway-specific control of motor activity and learning behaviors via dopamine D1 and D2 receptors

Principal Investigator: YanYan Wang[1]

Co-Investigator: Toshikuni Sasaoka[2]

[1] **Affiliation**: Department of Medical Information Science, College of Medicine, Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA

[2] **Affiliation:** Department of Comparative & Experimental Medicine, Brain Research Institute, Niigata University

ABSTRACT

In collaboration with Prof. Sakimura and Assoc. Prof. Abe group, we have made progress in making the dopamine D2S conditional knockout (D2S KO) mouse using the new RNA splicing and Cre-loxP recombination method. Professors Sakimura and Abe have generated the D2S KO chimeric mouse. Prof. Sasaoka group has obtained a D2S KO chimeric mouse from them and is in the process of breeding the mice to produce the D2S heterozygous mice. In addition, we have analyzed the role of direct pathway neurons in the striatum using dopamine D1 receptor (D1R) knock down mice by behavioral analyses regarding motor activity and learning functions. Furthermore, we have established the condition and protocol for studying the neuronal properties and excitability of three types of striatal neurons in mice using electrophysiological recordings in corticostriatal slices. This collaborative research will lead to a better understanding of the role of D1R and two isoforms of the dopamine D2 receptor (D2R) in regulating motor activity and learning behaviors and in neuropsychiatric disorders.

A. INTRODUCTION

The striatum and its projection areas play an important role in motor control, reward, and learning. The striatal efferents are divided into two main pathways: one is the direct pathway (projections from the striatum to the substantia nigra pars reticulate), which is mediated by D1R, and another is the indirect pathway (projections from the striatum to the globus pallidus), which is mediated by D2R. Two isoforms of D2R: termed D2L (long form) and D2S (short form), have been identified in the brain of rodents and humans. Our research proposal is focused on delineating the role of D1R and individual D2R isoforms in motor and learning functions and in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders such as schizophrenia and Parkinson’s disease.

B. MATERIALS AND METHODS

We use a multidisciplinary approach including molecular genetic technology, behavioral tests, pharmacological assays, immunohistochemistry, imaging technology, and electrophysiological recordings.

We are collaborating with Prof. Kenji Sakimura and Assoc. Prof. Manabu Abe group to generate D2S conditional KO mice. We take advantage of the new method using RNA splicing and Cre-loxP recombination to produce the conditional KO of D2S (Hayashi et al. Molecular Brain, 2014, 7:44). In this way, before Cre-loxP recombination the mice will express both D2S and D2L. By the Cre-loxP recombination the exons coding D2S and D2L will be changed to the mutated exon coding only D2L.

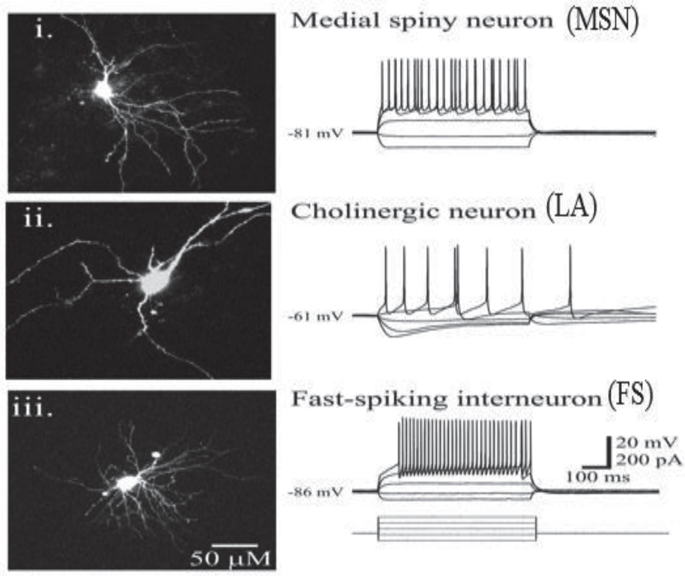
C. RESULTS/OUTCOMES

Previously, we generated the D2L KO mouse. We have demonstrated using a multidisciplinary approach that D2L and D2S indeed have differential functions. Our studies also indicate that the D2L KO mouse provides a valuable model system to enable us to investigate the distinct role of individual D2R isoforms in the mammalian central nervous system. However, this series of research would be greatly strengthened if we also have the D2S KO mouse.

Profs. Sakimura and Abe group has generated the D2S KO chimeric mouse and they have given a D2S KO chimeric mouse to Prof. Sasaoka. Prof. Sasaoka group is in the process of breeding the mice to produce the D2S heterozygous mice.

Prof. Sasaoka group has analyzed the role of direct pathway neurons in the striatum by behavioral analyses regarding motor activity and learning functions using the D1R knock down mice and morphological analysis of D1R-expressing neurons by the whole brain transparency technique using the D1R gene promoter-GFP transgenic mice.

To study the modulation of neuronal excitability by D1R and D2R isoforms, we have established the condition and protocol for performing electrophysiological recordings in striatal neurons in corticostriatal slices. The figure below shows the morphology and firing patterns of three types of neurons recorded in the striatum of wild-type (WT) mice in response to the injection of depolarized currents using whole-cell patch-clamp recordings.



D. DISCUSSION

Profs. Sakimura and Abe group has successfully generated the D2S KO chimeric mouse. This ensures us to be able to produce the D2S conditional KO mice in the future.

Prof. Sasaoka group has performed the behavioral analyses regarding motor activity and learning functions using the D1R knock down mice and the morphological analysis of D1R-expressing neurons by the whole brain transparency technique using the D1R gene promoter-GFP transgenic mice. This study will contribute to understanding of the role of the direct pathway in the striatum.

We have established the procedures for performing electrophysiological recordings in three types of striatal neurons – the medium spiny neuron, cholinergic interneuron, and fast-spiking interneuron. This enables us to study the modulation of neuronal excitability in WT and KO mice.

E. CONCLUSION

In summary, we have made significant progresses in generating the D2S conditional KO mice, understanding of the role of the direct pathway neurons expressing D1R, and establishing procedures for studying the neuronal excitability in the striatum. We look forward to continuing our collaborative research.

F. PUBLICATION

1. PAPERS

Eunjung Min, Sungbea Ban, Yanyan Wang, Gabriel Popescu, Catherine-Best Popescu, and Woonggyu Jung (2017) Multispectral scattering properties of brain tissue. Biomedical Optics Express 8:1763-1770.

Okubo T, Sato A, Okamoto H, Sato T, Sasaoka T (2018) Differential behavioral phenotypes of dopamine D1 receptor knockdown mice at the embryonic, postnatal, and adult stages. *Int J Dev Neurosci.* 2018 May; 66:1-8. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.11.004.

Kazuki Tainaka, Tatsuya C. Murakami, Etsuo A. Susaki, Chika Shimizu, Rie Saito, Kei Takahashi, Akiko Hayashi-Takagi, Hiroshi Sekiya, Yasunobu Arima, Satoshi Nojima, Masako Ikemura, Tetsuo Ushiku, Yoshihiro Shimizu, Masaaki Murakami, Kenji F. Tanaka, Masamitsu Iino, Haruo Kasai, Toshikuni Sasaoka, Kazuto Kobayashi, Kohei Miyazono, Eiichi Morii, Tadashi Isa, Masashi Fukayama, Akiyoshi Kakita and Hiroki R. Ueda (2018) Chemical Landscape for Tissue Clearing based on Hydrophilic Reagents. *Cell Reports* 2018 Aug 21;24(8):2196-2210.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.056.

2. PRESENTATIONS

West Virginia School of Osteopathic Medicine, USA, June 2018

UFM1 システムの異常によるヒト遺伝性発達障害発症機構の解明

研究代表者氏名　小松　雅明 1),2)
研究分担者氏名　﨑村　建司 3)

1）新潟大学医歯学系分子遺伝学、2）順天堂大学医学部生理学第二、3）新潟大学脳研究所細胞神経生物学

研究要旨

応募者は、後生動物以降に保存された新規ユビキチン様修飾システム UFM1 システムを発見し、その作動原理や生理機能を調べてきた。驚いたことに、ごく最近、欧州の複数の家系においててんかんを伴った重篤遺伝性発達障害の原因として UFM1 の活性化酵素をコードする UBA5 遺伝子の複合ヘテロ接合体変異を特定し、変異 UBA5 タンパク質は酵素活性が低い、あるいは無いことを明らかにした。本研究では、国内の小児患者サンプルを対象に UBA5 の変異スクリーニング行い、日本人特有の変異が見つかった場合にはその変異体の生化学的解析を行う。また、欧州で同定した患者と同じ変異アリルを持つ遺伝子改変マウスの表現型解析を行う。さらに、最近同定に成功した UFM1 の標的酵素 X を生化学的に検証するとともに、その UFM1 化の生理作用を明らかにする。これらの解析から、*UBA5* に変異を持つ遺伝性発達障害発症機構の解明に迫る。

A. 研究目的

ユビキチン様タンパク質 UFM1 は前駆体として合成され、UFM1 特異的プロテアーゼ UFSP2 で切断され、C 末端にグリシンを露出した成熟型となる。成熟型 UFM1 は E1 様酵素 UBA5 により活性化され、E2 様酵素 UFC1 に転移される。最終的に、UFM1 は細胞内の標的タンパク質と共有結合し、標的タンパク質の機能変換を引き起こす。標的タンパク質に結合した UFM1 は UFSP2 により切断されることから、このシステムは可逆的な反応システムである（Komatsu et al., *EMBO J* 2004, Tatsumi et al., *J. Biol. Chem* 2010 など)。

応募者により見出されたこの反応系は、後生動物に保存された生存に必須なタンパク質修飾反応である。事実、全身性 *Uba5* 欠損マウスは重篤な造血異常により胚性致死となる（Tatsumi et al., *Nat Commun* 2011)。さらに、神経特異的 *Ufm1* 欠損マウスは、頭頂部大脳皮質の神経細胞死を伴った小頭症を呈し、生後 1 日以内に死亡する（Muona et al., *Am J Hum Genet* 2016)。しかし、UFM1 システムの生理的役割およびヒト疾患との関連はほとんど不明なままであった。

ごく最近、応募者およびフランスのグループは独立に、欧州の複数の家系において「てんかんと小頭症を伴う遺伝性発達障害」の原因遺伝子として*UBA5*遺伝子の複合ヘテロ接合体変異を同定した（Muona et al., *Am J Hum Genet* 2016, Colin et al., *Am J Hum Genet* 2016)。また、それら*UBA5*変異遺伝子産物が酵素活性の有意に低い低形質、あるいは機能消失であることを見出した。応募者らが特定した患者は、機能欠失型*UBA5*と低形質の*UBA5*遺伝子を持っており、UBA5の機能減弱が病態発症に関与することが明らかになった（Muona et al., *Am J Hum Genet* 2016, Ishimura et al., *Febs Lett* 2017)。つまり、UFM1システムの機能異常が病態発症に関与することを意味する。The Exome Aggregation Consortiumのデータベースから、他の人種からやや少ない頻度であるがアジア人種でも機能に影響を与えうる*UBA5*バリアントが存在しており、日本人の小児患者の存在が強く示唆される。そこで、本研究課題では、本邦での稀少遺伝性重度発達障害家系を特定するとともに、生化学的解析および遺伝子改変マウスの解析を基軸に*UBA5*に変異を持つ遺伝性発達障害発症機構の解明に迫ることを目的とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. 横浜市立大学大学院医学研究科の松本直通教授らとの共同研究により、「重度の発達障害＋てんかん」を表現型とする日本人小児患者における *UBA5* の遺伝子変異スクリーニングを行う。
2. 日本人特有の変異タンパク質の酵素活性測定などの生化学的解析を行う。
3. ヒト患者と同じアリルを持つ遺伝子改変マウス（フィンランド人患者で同定された）$UBA5^{A371T/-}$マウスを作出済みである。このマウスの表現型解析を行う。また、タモキシフェン添加により UFSP2 の機能がオフとなるマウスを作出し、$UBA5^{A371T/-}$マウスと交配させる。UFSP2 の発現低下により $UBA5^{A371T/-}$マウスの表現型が回復するか否か検証する。
4. UFM1 システムの解析を遅らせてきた最大の理由は、病態発症に関与しうる標的タンパク質が未同定であったことにある。興味深いことに、標的タンパク質から UFM1 を外す UFSP2 を欠失させた HEK293T 細胞に成熟型 UFM1 と連結酵素 UFL1 および UFBP1 を過剰発現させると、UFM1 と共有結合したタンパク質が出現することを見出した（Ishimura et al., *Febs Lett* 2017)。質量分析により UFM1 の基質の同定と UFM1 修飾による機能変換を明らかにする。

C. 研究結果

1. 横浜市立大学大学院医学研究科の松本直通教授らとの共同研究により遺伝性発達障害患者を持つ日本の家系においても UBA5 の変異を同定した。また、キング・ファイサル専門病院・研究センターの Fowzan Alkuraya 教授、ケンブリッジ大学の Geoff Woods 教授らとの共同研究により、UBA5 変異を有する患者と同様の症状を示す患者を持つ中東およびスイスの複数の家系から UFM1 あるいは UFC1 のホモ遺伝子変異を同定、それらの変異により細胞内タンパク質への UFM1 修飾が減弱することを見出した（Nahorski et al. *Brain* 2018)。
2. 日本人特有の *UBA5* 変異遺伝子産物の酵素活性を測定した結果、活性が有意に低い低形質であることが明らかになった。患者由来の細胞を入手、株化を完了した。
3. フィンランド人患者で同定された同じ遺伝型である $Uba5^{A371T/-}$マウスを作出した。現在までに表現型が確認されないことから、作出済みの *Ufm1* ヘテロマウスを交配させ $Uba5^{A371T/-}$; $Ufm1^{-/-}$マウスの作出を行っている。また、タモキシフェン添加により UFSP2 の機能がオフとなるマウスの作出に関しては、ターゲティングベクターを ES 細胞に導入して相同組換えクローンのスクリーニングを始めている。
4. 東京都医学総合研究所の反町洋之博士との質量分析解析から、新規 UFM1 の標的タンパク質として酵素 X の同定に成功した（論文投稿準備中)。UFM1 による酵素 X の修飾を確かめるとともに、その修飾部位を決定した。

D. 考察

応募者を含む複数のグループは、欧米、オセアニア、中東、そして日本の小児てんかん性脳症患者において UFM1 システムに関わる遺伝子群の変異を同定するとともに、それら変異により UFM1 による細胞内標的タンパク質への結合が減少すること見出した。実際、患者由来の線維芽細胞やリンパ芽球においても UFM1 化の減少が確認される。したがって、患者細胞内の標的タンパク質への UFM１化を増加させることが本疾患の予防・治療につながると考えられる。標的タンパク質に結合した UFM1 は脱酵素 UFSP2 により切断されることから、UFSP2 の阻害剤が本疾患の治療・予防薬の候補となる。事実、UFSP2 の欠失は細胞内の標的タンパク質への UFM1 の結合を増加させる。今後、UFM1 システムの異常による小児てんかん性脳症の創薬標的に UFSP2 がなりうるか否かを検証していく必要がある。

E. 結論

本邦での *UBA5* 変異を有する稀少遺伝性重度発達障害家系を特定し、その *UBA5* 変異遺伝子産物の酵素活性が有意に低いことを明らかにした。また、重度発達障害患者を持つ中東およびスイスの複数の家系から UFM1 あるいは UFC1 のホモ遺伝子変異を同定、それらの変異により細胞内タンパク質への UFM1 修飾が減弱することを見出した。さらに、新規 UFM1 の標的タンパク質として酵素 X を同定した。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Nahorski MS, Maddirevula S, Ishimura R, Alsahli S, Brady AF, Begemann A, Mizushima T, Guzmán-Vega FJ, Obata M, Ichimura Y, Alsaif HS,

Anazi S, Ibrahim N, Abdulwahab F, Hashem M, Monies D, Abouelhoda M, Meyer BF, Alfadhel M, Eyaid W, Zweier M, Steindl K, Rauch A, Arold ST, *Woods CG, *Komatsu M, *Alkuraya FS. Biallelic UFM1 and UFC1 mutations expand the essential role of ufmylation in brain development. Brain 141:1934-1945 (2018).

1. Huber J, Obata M, Gruber J, Akutsu M, Löhr F, Rogova N, Güntert P, Dikic I, Kirkin V, Komatsu M, *Dötsch V, *Rogov VV. An atypical LIR motif within UFM1-activating enzyme 5 (UBA5) interacts with GABARAP proteins and mediates membrane localization of UBA5. Autophagy, in press.

2. 学会発表
1. Ishimura R, Obata M, Kageyama S, Daniel J, Tanaka K and Komatsu M. A novel approach to assess the ubiquitin -modifier 1 (UFM1) system in cells. EMBO conference, September 2017, Cavtat-Dubrovnik（ポスター発表）
2. 石村亮輔、小幡美貴、小松雅明「UFM1 修飾による CYB5R3 の機能変換」第 11 回オートファジー研究会・2018 年 11 月・掛川（口頭発表）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他

本研究課題は、AMED 創薬ブースター「タンパク質修飾反応系 UFM1 システムを標的とする小児てんかん性脳症治療薬の探索」の一環として継続する。

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成３０年度

Ａ．研究課題名：脳–腸–肝ネットワークによる病態発症のメカニズム
—自律神経系、腸内細菌叢を介した難治疾患の病態解明と新規治療法の開発を目指して

Ｂ．研究代表者　　所属部局名　消化器内科学　　　　　　職名　教授

氏名　寺井　崇二

Ｃ．研究の進捗状況
これまでに、自律神経系を介した様々な消化管ホルモンの分泌変化を解析し、セロトニンが肝切除後の肝再生時に重要であること、その活性化が求心性交感神経のシグナル伝達経路を介していることを明らかとし、論文発表した。(Inoue R, et al. FEBS open Bio, 2018)
さらに、総合的な議論を進めるための review が accept され、現在は、非アルコール性脂肪性肝炎の病態、進行に関わることが想定される消化管ホルモンの変化を検証しており、脳、神経のシグナル伝達の検証のために、脳研究所、小野寺教授、上野教授、松井准教授と共同で解析を行なっている。

Ｄ．　研究発表(上記課題名に関するもの)
１．論文発表

1) Inoue R, Kamimura K (corresponding), Nagoya T, Sakai N, Yokoo T, Goto R, Ogawa K, Shinagawa-Kobayashi Y, Watanabe-Mori Y, Sakamaki A, Abe S, Kamimura H, Miyamura N, Nishina H, Terai S. (2018) Effect of a neural relay on liver regeneration in mice: activation of serotonin release from the gastrointestinal tract. FEBS Open Bio. 2018 Jan 31;8(3):449-460. doi: 10.1002/2211-5463.12382. eCollection 2018 Mar. PMID: 29511622 PMCID: PMC5832978 DOI: 10.1002/2211-5463.12382

2) Kamimura K (corresponding), Inoue R, Nagoya T, Sakai N, Goto R, Ko M, Niwa Y, Terai S. (2018) Autonomic nervous system network and liver regeneration. World J Gastroenterol. 2018 Apr 21;24(15):1616-1621. doi:10.3748/wjg.v24.i15.1616.

２．学会発表

１）
2018　DDW2018
上村顕也
パネルディスカッション８　消化管疾患と肝疾患の関連－消化管・肝臓間の相互の影響－
肝臓学会総会(消化器合同)
自律神経線維による肝，脳，腸の臓器間ネットワークを介した肝切除後の肝再生メカニズムの検討

２）
2018　42 回日本肝臓学会東部会
シンポジウム 10「肝疾患と臓器相関」
上村顕也、名古屋拓郎、寺井崇二
肝疾患における自律神経による臓器間ネットワークの関与

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成３０年度

A．研究課題名：パルス制御が拓く焦点可動 MRI による新規コントラスト機構の創出とそれに基づく革新的な機能 MRI 撮像法の実現

B．研究代表者　　所属部局名　　自然科学系（工学部）　　　　職名　准教授

氏名　　　佐々木　進

C．研究の進捗状況
今年度の進捗：
[1]昨年度の課題を解決した。すなわち，佐々木の NMR 装置において，Na ではなく H によって信号強度の振動が観測されることを確認した。
[2]本融合研究を足がかりとして，H30 年度 AMED 先端計測・要素技術に応募したところ，採択された（申請件数 131 件，採択件数 7 件）。
　佐々木進，拝師智之，成田一衛：多彩な解析情報を得る機能的 NMR の生組織への展開と生体の所望部位を可視化する MRI の開発
　https://www.amed.go.jp/koubo/02/01/0201C_00008.html
[3] 獲得した AMED の資金を得て，佐々木の NMR 装置を MRI に upgrade し，H-MRI 画像が得られることを確認した。

来年度の計画：現在，この装置の画像の解像度の向上し，同時に Na-MRI へ展開する。

D．　研究発表(上記課題名に関するもの)
　１．論文発表

１）佐々木進・特許　「磁気共鳴イメージング装置、磁気共鳴イメージング方法、及びプログラム」特願 2018-036934：平成３１年３月１日再出願 PCT 公開に向けて国内特許の upgrade
２）

　２．学会発表

１）拝師智之，12田亮平，成田一衛，佐々木進・23Na-MRI による生体内 Sodium の腎臨床応用に向けた可視化検討・応用物理学会春季学術講演会・2019 年 3 月 12 日・東京工業大学大岡山キャンパス
２）

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成 30 年度

A．研究課題名：研究課題名：視路圧迫症候群の器質的･機能的解析から見る，ヒト脳神経系の可塑性の探索と病態予測モデルの構築

B．研究代表者　　所属部局名　　自然科学系　　　　　職名　　教授

氏名　　飯島　淳彦

C．研究の進捗状況

下垂体腫瘍による視路圧迫は視野障害を引き起こし，手術によって圧迫が解除されると視野が回復する．本チームでは，先行研究において，腫瘍の形状と視野の関係をモデル化し，術前のデータから予後を予測するモデルを構築した（Ito et. al., 2015）．これより，実際の病態解析から脳内で起きている現象の器質的変化と機能との関係を工学的手法でモデル化することに成功した．これを受けて，本研究で取り組むべき以下の新たな疑問点と課題が見つかった．

【本年度の進捗】

計画当初から昨年度までに得られた臨床知見と予測モデルの確認とブラッシュアップを進める中で，MR 画像の解析，視野データの解析の自動化は重要な課題であり，本年度はこちらに注力した．特に，視野データは紙媒体に手書きで記録されたものを画像として保存される旧来からの方法が主流であり，このデータのディジタル化とディジタル保存の手法を新たに検討した．開発手法については特許の出願を検討中である．なお，開発途中の内容は，出願の関係から本年度は発表を控えた．

【次年度の展望】

視野データのディジタル処理手法の確立，精度向上を目指す．アルゴリズムの最適化を進める．特許の出願を進めたのち，学会発表と論文発表を行う予定である．

D．下記にあるもので該当するものがある場合は記載する。

研究発表（上記課題名に関するもの）

１．論文発表

１）上記理由により無し
２）

２．学会発表

１）上記理由により無し

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成３０年度

Ａ．研究課題名： 組織浸透性に優れたマーカーの創出による脳の機能と病態の三次元マッピングの試み

Ｂ．研究代表者 所属部局名 医歯学系 職名 教授

氏名 竹林 浩秀

Ｃ．研究の進捗状況（現時点までの進捗状況と今後の見通しについて記載する。）

平成３０年度においては、病態を描出する免疫染色可能な抗体の検討および in situ hybridization プローブの作成を行った。小胞体ストレスのマーカーやリン酸化抗体など、複数の病態描出マーカーを同定することができた。また、脳研究所の田井中教授との共同研究により、蛍光マーカーの発現後に、組織透明化を行い、末梢神経系を GFP にて描出することに成功した。病態描出マーカーの組織浸透性の向上については、２０１９年度も引き続き検討する。なお、平成３０年度に報告した以下の論文は、Dst マウスの三叉神経運動核の神経細胞死とその支配筋における新たな表現型に関する学内共同研究論文である。最終年度には、脳研究所との共同研究論文をまとめる予定である。

Ｄ． 研究発表(上記課題名に関するもの)

１．論文発表

１）Hossain M.I., Horie M., Yoshioka N., Kurose M, Yamamura K. Takebayashi H. Motoneuron degeneration in the trigeminal motor nucleus innervating masseter muscle in *dystonia musculorum* mice. **Neurochemistry International** 119: 159-170, 2018.
２）

２．学会発表

１）竹林浩秀 オリゴデンドロサイトの分化と脳機能・脳研夏期セミナー 2018.7.21. 新潟大学脳研究所(新潟県新潟市)
２）Nozomu Yoshioka, Hirohide Takebayashi, Establishment of a new animal model for hereditary sensory autonomic neuropathy VI by conditional deletion of dystonin in the peripheral nervous system. 第 41 回日本神経科学大会 2018.7.26-29. 神戸コンベンションセンター(神戸市)
３）吉岡望，竹林浩秀 末梢神経系における*dystonin*遺伝子トラップによる遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー6型の新規モデル動物の確立 第124回日本解剖学会総会全国学術集会 2019.3.27-29. 朱鷺メッセ（新潟市）

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成３０年度

Ａ．研究課題名：手と身体を知覚する認知神経科学的基盤の解明

Ｂ．研究代表者　　所属部局名　人文学部　　　　　　職名　准教授

氏名　新美　亮輔

Ｃ．研究の進捗状況

[1] 脳波計測による手の知覚機構解明のため，脳研究所において事象関連電位計測を行っている。予備実験の結果を踏まえてディスカッションを行った結果，手の知覚と注意との関連を検討することとなった。具体的には，指さし（pointing）をしている手の写真が提示されたときと，手ではない方向性を持つ刺激（矢印）が提示されたときで，視空間的注意に関連する事象関連電位成分（e.g., Nobre et al., 2000）が異なるかを検討している。また，顔などの身体部位の視覚刺激を観察するときにはその向き（正立か倒立か）によって事象関連電位に差が生じることも知られているので（Peelen & Downing, 2007），手についてもこれがあてはまるか，正立と倒立の比較も行なう。正立の手と倒立の手で指さしが注意を誘導する効果に違いがあるかは知られていないので，この点も検討する。今後は必要十分な量のデータを蓄積し，分析を行う予定である。

[2] 成人を対象とした心理学実験では，昨年度に引き続き手と顔との同時提示による視覚的注意の誘導に関する実験が完了し，その成果を学会で発表した。4) さらに，上記脳波計測実験で用いられる行動課題を先行して実施し，指さしの刺激が想定通りに視覚的注意を誘導できること，その効果は矢印と同等であることを確認し，加えて，手が成立か倒立かで注意を誘導する効果には差がないことも発見した。倒立の効果がないことは予想外の結果であり，今後，発表を行いたい。

さらに，手に限らず身体全体の認知に関する研究も行われた。顔と顔以外の身体部位の関係を検討する実験として，服の魅力度の判断における顔の魅力度の影響が検討された。すなわち，さまざまな服を着た胴体に，さまざまな魅力度の顔を組み合わせ，服の魅力度を評定してもらった。その結果，参加者の性別にかかわらず，刺激顔が女性の場合に，服の魅力度評価に顔の魅力度が影響することがわかった。身体の中でも顔，とくに高魅力度顔は注意を引きやすいことが知られているが，高魅力度顔の知覚がその他の身体部位の知覚にどのように影響するのかはわかっておらず，新しい知見と言える。この成果は学会で発表し，3) 論文執筆中である。

[3] 手を用いたジェスチャーを理解する能力の発達過程の検討も引き続き行われた。昨年度は，先行研究（Novack et al.,2015）の実験手法を踏襲した予備的研究を実施し，今年度はその結果を学会で発表した。2) この実験では，残念ながらジェスチャー

が 2〜3 歳児の学習を助けるという確実なデータは得られず，ややはっきりしない結果となったが，その原因は音声情報がともなわずジェスチャーのみを視覚提示したからではないかと考えられた。現実には，ジェスチャーは音声とともに用いられることが多い（話しながら身振り手振りをする）。そこで，ジェスチャーと同時に音声を提示た場合の幼児のジェスチャー理解について検討することとした。具体的には，ジェスチャーとともに用いられる可能性が高く，かつ幼児にも理解しやすいオノマトペ（擬音語・擬態語）の効果に着目した。オノマトペは動作に関する情報を含むため（たとえば「どたばた」)，ジェスチャーと同時に提示されると，ジェスチャーが表す動作（たとえば，鳥の羽ばたき，はさみの使い方など）の理解を助けるのではないかと予測された。実験の結果，残念ながらオノマトペがジェスチャーの理解を助けるという明確な効果は見られなかった。しかし，2 歳児より 3 歳児の方がジェスチャー理解の成績は高く，この時期がジェスチャー理解の発達する時期であることがわかった。

D．　研究発表（上記課題名に関するもの）

１．論文発表

１）髙橋のぞ美・白井　述・新美亮輔　2，3 歳児のジェスチャー理解におけるオノマトペの影響　電子情報通信学会技術研究報告（信学技報），118(437), 71−76, 2019 年 2 月 1 日

２．学会発表

２）白井　述・髙橋のぞ美・新美亮輔．2, 3 歳児におけるジェスチャーの理解　日本心理学会第 82 回大会，2018 年 9 月 26 日，仙台.

３）新美亮輔・山田真也．服の印象に対する顔の魅力度の影響　日本心理学会第 82 回大会，2018 年 9 月 27 日，仙台.

４）Niimi, R. How hands and faces guide visual selective attention. Psychonomic Society Annual Meeting, November 17, 2018, New Orleans, LA.

新潟大学脳研究所年報 2018

令和元年９月発行

（お問い合わせ）

新潟大学脳研究所

〒951-8585　新潟市中央区旭町通１番町 757 番地

TEL:025-223-6161（代）　FAX:025-227-0507

E-mail: web@bri.niigata-u.ac.jp

http://www.bri.niigata-u.ac.jp/