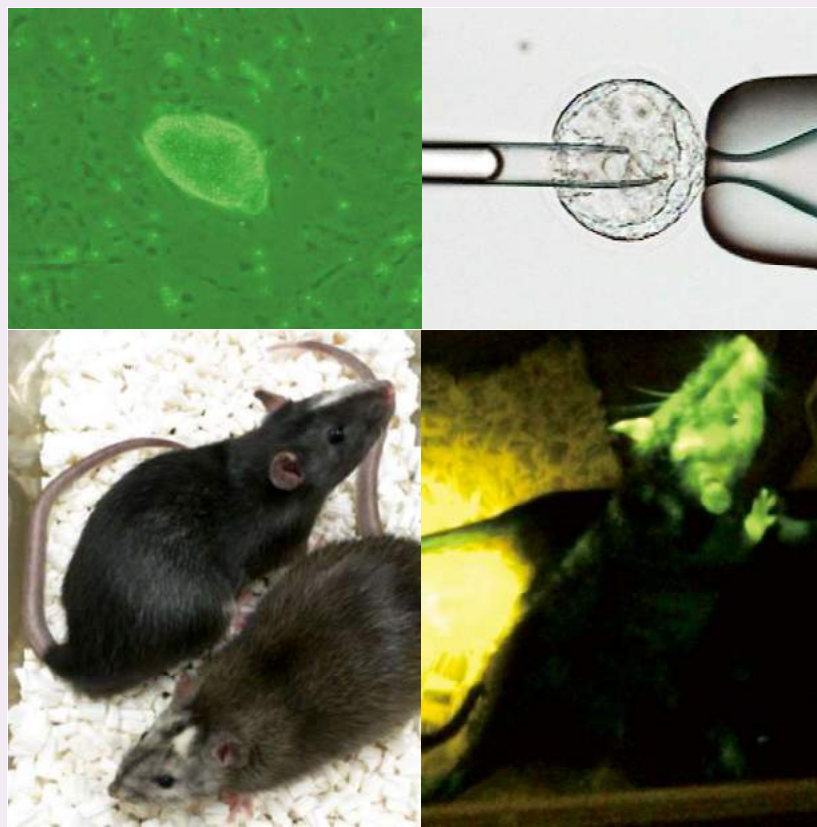


新潟大学脳研究所年報

2016



新潟大学脳研究所で開発された、脳機能解析と神経疾患モデル動物として有用な遺伝子改変ラット作製技術。独自に樹立されたSDラット由来胚性幹細胞（左上）に黄色蛍光タンパクが発現するよう遺伝子改変を行い、ラット初期胚に注入（右上）することで作製されたキメララット（下）。キメララットには胚性幹細胞由来の黄色蛍光が認められる。

目 次

1. 組織図・研究所のデータ	1
2. 各分野の研究活動	
○ 分子神経生物学分野	7
○ 細胞神経生物学分野	9
○ システム脳生理学分野	13
○ 病理学分野 / デジタル医学分野 / 脳疾患標本資源解析学分野	15
○ 分子病態学（客員）分野	19
○ 脳神経外科学分野	21
○ 神経内科学分野	25
○ 統合脳機能研究センター	31
○ 遺伝子機能解析学分野 / 生命情報工学分野	34
○ 動物資源開発研究分野	36
○ 分子神経疾患資源解析学分野	39
○ プロジェクト研究分野	41
3. 社会との連携	43
4. 共同利用・共同研究拠点	
共同利用・共同研究採択者一覧	59
報告書	
〔プロジェクト型共同研究〕	
○ 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 猪原 匡史	63
○ 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 福島県立医科大学先端臨床研究センター 久保 均	65
○ 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 菊地 正隆	68

○ 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 中村 克樹	71
○ リン酸化 α シヌクレイン陽性構造物を多く認めたダウン症例解析を中心とした リン酸化 α シヌクレイン陽性構造物発現メカニズムの探索 名古屋市立大学大学院医学研究科 赤津 裕康	73
○ 精神疾患病態解明のための死後脳組織を用いた分子遺伝学的解析および画像解析 東北大学災害科学国際研究所 富田 博秋	75
○ GluD2 と平行線維シナプス再生に関する共同研究 北海道大学大学院医学研究科 渡辺 雅彦	78
○ 脳内アミロイド42蓄積を血液バイオマーカーでスクリーニングする方法の開発 大阪大学大学院医学系研究科 大河内 正康	80
○ 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 國井 泰人	82
○ 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 丹治 邦和	85
○ 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 福永 雅喜	88
○ 中枢神経原発悪性リンパ腫の再発時の遺伝子異常の検討 京都府立医科大学 山中 龍也	90
○ 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 岡村 均	93
○ 神経変性疾患における Glymphatic system 破綻仮説の病理学的解析 福島県立医科大学 星 明彦	96
○ 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 菅谷 佑樹	98
○ 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 奥山 眞紀子	100
○ 糖鎖硫酸転移酵素遺伝子の脳特異的ノックアウトマウスの作成とその表現型解析 関西医科大学 赤間 智也	102
○ EBV 関連中枢神経系原発悪性リンパ腫の免疫回避機構における PD-1 及び PD-L1 の役割 久留米大学医学部 杉田 保雄	104
○ 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 保住 功	107
○ 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 西村 正樹	109
○ 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 山中 章弘	111

○ PNPLA6 遺伝子の脳における機能-有機リン被爆との関連から 東海大学医学部 木村 穰	114
○ UBQLN2 コンディショナルノックアウトマウスの解析に基づく神経変性機序の解明 横浜市立大学大学院医学研究科 田中 章景	118
○ 哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析 国立遺伝学研究所 岩里 琢治	121
○ 大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン神経伝達の機能の解析 自然科学研究機構生理学研究所 南部 篤	124
○ 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 杏林大学保健学部 渡部 和彦	127
○ 神経変性疾患：特異的異常蛋白はシナプスを越えるのか 信州大学医学部 小柳 清光	130
○ ドーパミン受容体変異マウスを用いた不安様行動発症機序の解明 北里大学医学部 飯田 諭宜	133
○ Gut microbiota の制御が脳虚血病巣進展に及ぼす影響 日本医科大学武蔵小杉病院 西山 康裕	136
○ 異常凝集体の形成と伝播による神経細胞死機構の解明 京都大学大学院医学研究科 星 美奈子	139
○ 多系統萎縮症のステージ分類確立：グリア封入体を基盤とする分子病理学的解析 信州大学医学部 山田 光則	142

[連携資源利用型共同研究]

○ 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センター 吉木 淳	144
○ 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 柴田 亮行	147
○ 意思伝達不能状態 (Stage V) にいたる筋萎縮性側索硬化症の臨床病理学的検討 都立神経病院 林 健太郎	150
○ パーキンソン病関連タンパク質 Inhibitory PAS Domain Protein のリン酸化修飾 東北大学大学院生命科学研究科 十川 和博	152
○ 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 木津川 尚史	154
○ 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 一瀬 宏	156
○ 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 矢尾 育子	159

○ オートファジー関連神経変性疾患 SENDA の病態解析 群馬大学大学院医学系研究科 村松 一洋	162
○ 胎仔期および発達期の脳におけるドーパミン受容体 D1R の機能解析 北里大学医学部 大久保 直	164
○ APP 細胞内ドメインの神経毒性の解析 北陸大学医療保健学部 中山 耕造	166
○ ドパミン-D1R シグナルが心不全に果たす役割の解明 東京大学医学部 小室 一成	169
○ 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の発症機構の解明 金沢大学附属病院 坂井 健二	171
○ 筋線維メ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 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 今村 道博	173
○ 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 熊本大学生命資源研究・支援センター 中潟 直己	175
○ 筋萎縮性側索硬化症脊髄における VGF の局在に関する研究 岐阜薬科大学 嶋澤 雅光	178
○ 内在性 TDP-43 遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用 北里大学医学部 佐藤 俊哉	180
○ 和歌山 ALS 症例における異常タンパク蓄積の分布と機序の解明 和歌山県立医科大学 伊東 秀文	182

進捗状況報告書

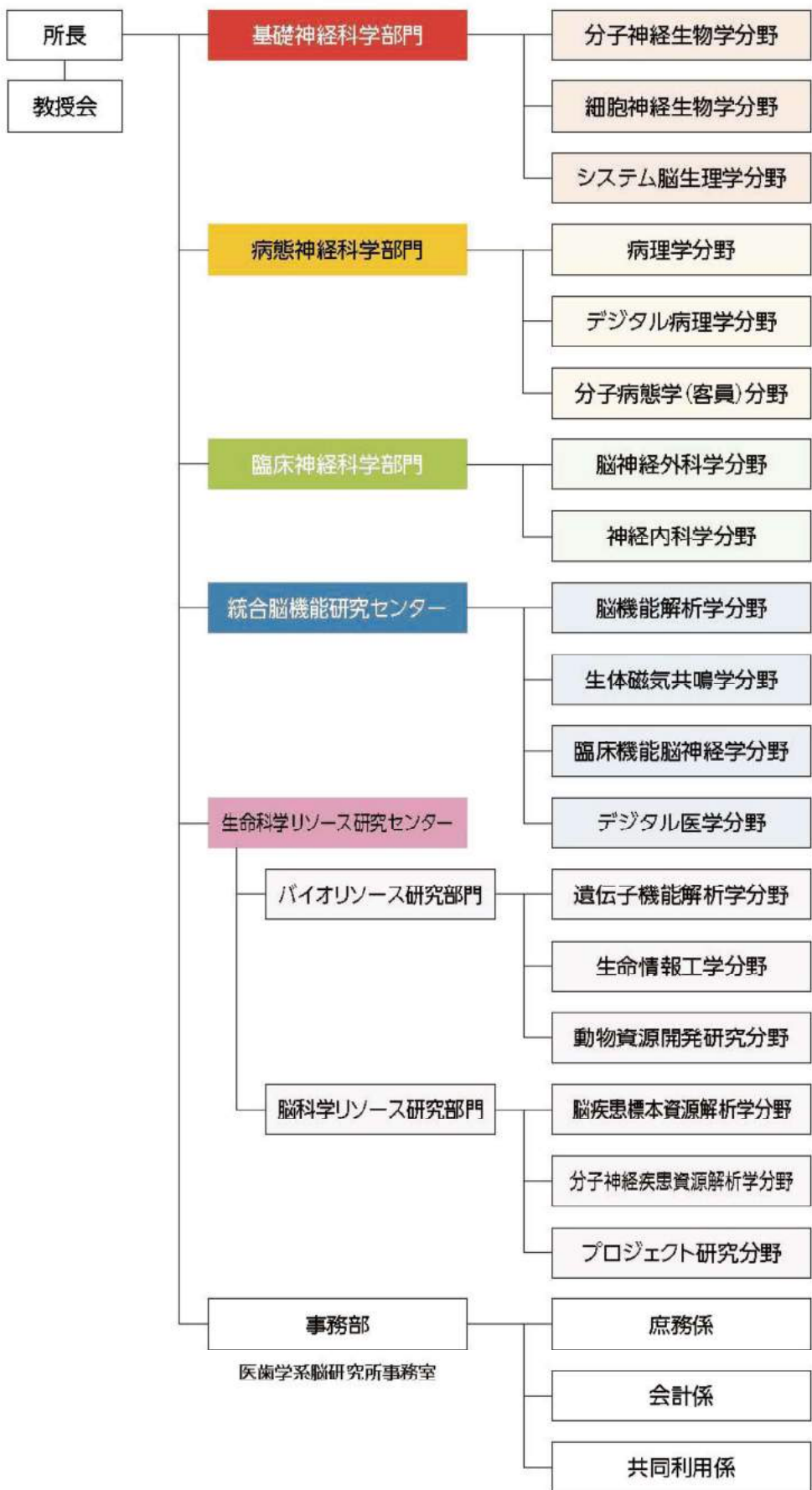
[国際共同研究]

○ A comprehends study for prospective collaboration between Korea National Brain Bank and Niigata BRI Brain Bank 韓国国立ブレインバンク-新潟大学脳研究所ブレインバンクの協力体制の確立と共同研究実施に向けた調査研究 韓国国立ソウル大学病院 Sung-Hye Park	185
○ 1. Preemptive medicine for Alzheimer's disease 2. Molecular imaging of water dynamics 1. アルツハイマー病の発症前診断・発症予防 2. 水動態の molecular imaging カルフォルニア大学デービス校 Ingrid L Kwee	186
○ Neural mechanisms for consonance/dissonance perception in music : An ERP study 音楽における協和・不協和知覚の神経機構：事象関連電位を用いた研究 バース・スパ大学 アーサーズ裕子	187

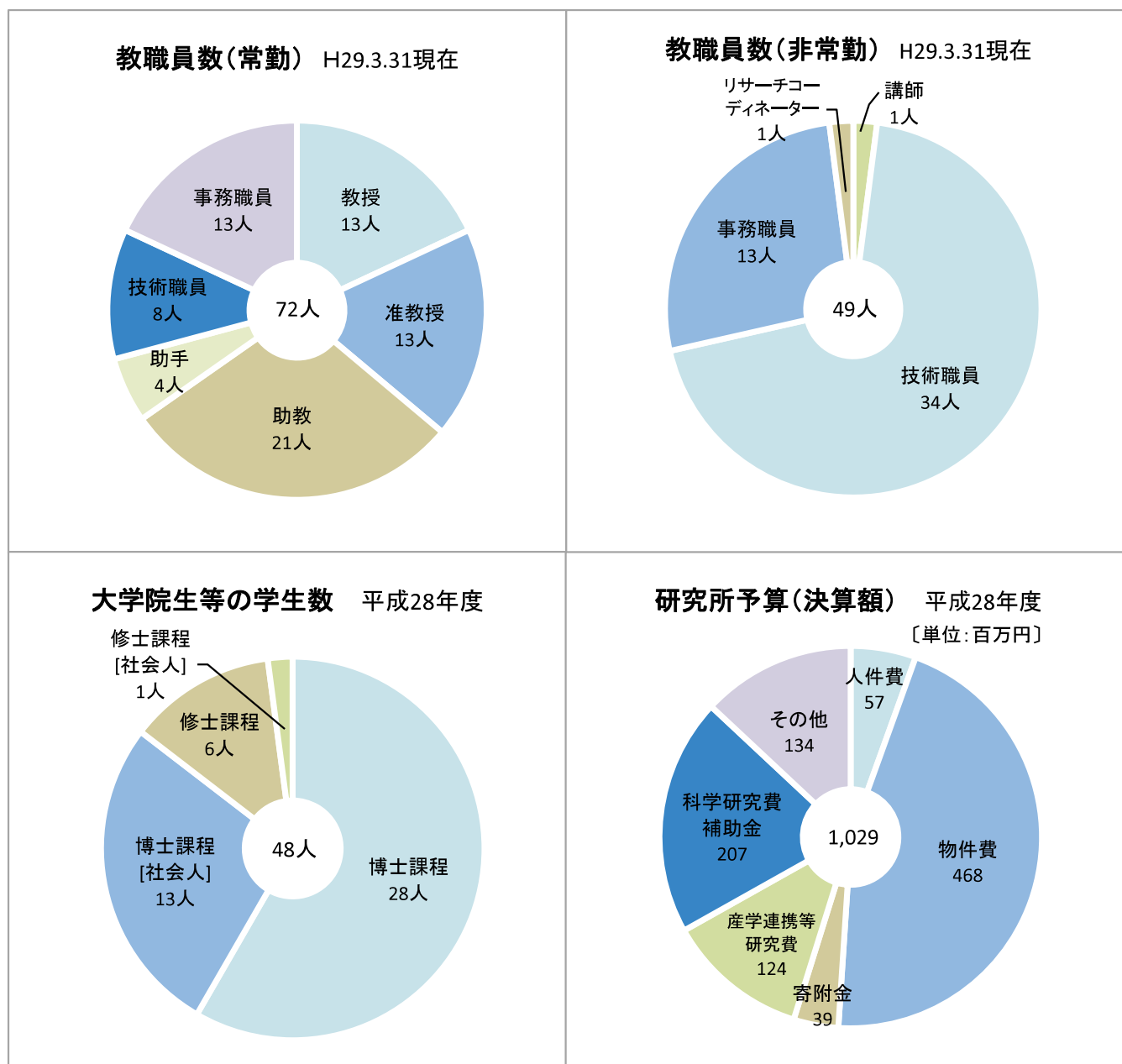
- Assessment of auditory dysfunction in model animals for schizophrenia
 統合失調症モデル動物の聴覚機能障害の計測、評価
 アラバマ大学バーミンガム校 中沢 一俊 188
- Functional analysis of homeostatic synaptic plasticity-associated molecules
 恒常性シナプス可塑性関連分子の機能解析
 マサチューセッツ大学医学部 二井 健介 189
- Research on pathway-specific control of motor activity and reward and aversive learning
 behavior via D1 and D2 dopamine receptors
 D1 及び D2 ドーパミン受容体を介する神経伝導路特異的な運動活性の調節及び
 学習行動の調節に関する研究
 イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校 Yanyan Wang 190

1. 組織図・研究所のデータ

組織図 (H29. 3. 31 現在)



研究所のデータ



外部資金獲得状況 (平成 28 年度)

区分	件数	金額 (千円)
科学研究費補助金	35	151,740
厚生労働科学研究費補助金	2	41,992
運営費交付金特別経費	3	178,495
地方公共団体・民間助成団体等の研究費	6	9,500
民間企業等との共同研究	6	11,190
受託研究	20	140,380
寄附金	48	27,485

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29年3月31日現在）

教授：	那波宏之	特別研究員：	稲葉洋芳
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		古川和郎
助教：	岩倉百合子		斎藤摩美
特任助教：	外山英和		甲斐竜太
特任助手：	北山栄子	修士課程大学院生：	小林雄太郎
			川瀬彩奈

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。

なお、これらの研究テーマは本学脳研究所のシステム生理学分野、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）

Namba H, Okubo T, Nawa H. Perinatal Exposure to Neuregulin-1 Results in Disinhibition of Adult Midbrain Dopaminergic Neurons: Implication in Schizophrenia Modeling. *Sci Rep.* 2016 Mar 3;6:22606. doi: 10.1038/srep22606.

IV 共同研究

- (1) 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
- (2) 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
- (3) 研究題目：「患者 iPS 細胞からのドパミン神経分化能力の比較」
研究内容：統合失調症患者から樹立した iPS 細胞のドパミン神経細胞への分化能力を比較する。
参加機関：理化学研究所 理化学研究所脳科学総合研究センター 吉川武男
- (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

I 研究組織（構成員 平成29年3月31日現在）

教授	崎村 建司	実験補助	望月 雪絵
准教授	阿部 学	実験補助	番場 彩子
助教	中務 胞	実験補助	大野 萌
助教	内田 仁司	実験補助	石本 菜穂子
特任講師	田中 恵子	実験補助	鈴木 康浩
特任助教	川村 名子	秘書	野澤 佳世
特任助教	飯田 和泉	大学院生（博士）	長澤 寿磨
技術職員	夏目 里恵	大学院生（博士）	中本 千尋
実験補助	石川 裕利子	大学院生（修士）	高田 華子
実験補助	矢部 恵稚子	外国人客員研究員	彭 菲
実験補助	大堀 千洋		

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、いくつかの方向から研究を展開してきたが、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共同研究をベースにした研究である。第2は、脳に於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分子の定量である。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て共同研究ベースで解析をおこなった。とりわけ、特別推進研究「シナプスにおける逆行性シグナルによる機能的神経回路形成の機構解明」、基盤研究（S）「高次脳領域におけるシナプス伝達制御機構の分子形態学的研究」など複数の科研費の研究分担者として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、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量を脳の部位や細胞画分で定量してきた。その成果の一つであるカイニン酸型受容体のサブユニット解析では、カイニン酸低親和型サブユニットの量が非常に多くあることが明らかになり、これらの分子群が、チャネル以外の働きをしていることを示唆した。

- 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することに成功した。この精子を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に成功した。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して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6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85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58件の支援をおこなった。

以上、この6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97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. Jung D, Hwang YJ, Ryu H, Kano M, Sakimura K, Cho J. : Conditional Knockout of Cav2.1 Disrupts the Accuracy of Spatial Recognition of CA1 Place Cells and Spatial/Contextual Recognition Behavior. *Front Behav Neurosci*. Nov 3;10:214. 2016
2. Otsuka S, Konno K, Abe M, Motohashi J, Kohda K, Sakimura K, Watanabe M, Yuzaki M. : Roles of Cbln1 in Non-Motor Functions of Mice. *J Neurosci*. 36(46):11801-11816. 2016
3. Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, Ma J, Nakane S, Tomita J, Ikkyu A, Kakizaki M, Hotta-Hirashima N, Kanno S, Komiya H, Asano F, Honda T, Kim SJ, Harano K, Muramoto H, Yonezawa T, Mizuno S, Miyazaki S, Connor L, Kumar V, Miura I, Suzuki T, Watanabe A, Abe M, Sugiyama F, Takahashi S, Sakimura K, Hayashi Y, Liu Q, Kume K, Wakana S, Takahashi JS, Yanagisawa M. : Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice.

Nature. 539(7629):378-383. 2016

4. Shimizu T, Osanai Y, Tanaka KF, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Ikenaka K. : YAP functions as a mechanotransducer in oligodendrocyte morphogenesis and maturation. *Glia*. 65(2):360-374. 2017

5. Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S. : Involvement of Brain-Enriched Guanylate Kinase-Associated Protein (BEGAIN) in Chronic Pain after Peripheral Nerve Injury. *eNeuro*. 3(5).e01110-16.2016 1–18 2016

6. Horie M, Mekada K, Sano H, Kikkawa Y, Chiken S, Someya T, Saito K, Hossain MI, Nameta M, Abe K, Sakimura K, Ono K, Nambu A, Yoshiki A, Takebayashi H. : Characterization of novel dystonia musculorum mutant mice: Implications for central nervous system abnormality. *Neurobiol Dis*. 96:271-283. 2016

7. Shimizu K, Kobayashi Y, Nakatsuji E, Yamazaki M, Shimba S, Sakimura K, Fukada Y. : SCOP/PHLPP1 β mediates circadian regulation of long-term recognition memory. *Nat Commun*. 7:12926. 2016

8. Dhar M, Brenner JM, Sakimura K, Kano M, Nishiyama H. : Spatiotemporal dynamics of lesion-induced axonal sprouting and its relation to functional architecture of the cerebellum. *Nat Commun*. 7:12938. 2016

9. Kono J, Konno K, Talukder AH, Fuse T, Abe M, Uchida K, Horio S, Sakimura K, Watanabe M, Itoi K. : Distribution of corticotropin-releasing factor neurons in the mouse brain: a study using corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein knock-in mouse. *Brain Struct Funct*. 222 (4) : 1705-1732 2017

10. Mochida S, Hida Y, Tanifuji S, Hagiwara A, Hamada S, Abe M, Ma H, Yasumura M, Kitajima I, Sakimura K, Ohtsuka T. : SAD-B Phosphorylation of CAST Controls Active Zone Vesicle Recycling for Synaptic Depression. *Cell Rep*. 16(11):2901-13. 2016

11. Chiba T, Otani Y, Yamaguchi Y, Ishibashi T, Hayashi A, Tanaka KF, Yamazaki M, Sakimura K, Baba H. : Microglial phospholipase D4 deficiency influences myelination during brain development. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. ;92(7):237-54. 2016

12. Sugaya Y, Yamazaki M, Uchigashima M, Kobayashi K, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. : Crucial Roles of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol in the Suppression of Epileptic Seizures. *Cell Rep*. 16(5):1405-15. 2016

13. Matsumoto-Makidono Y, Nakayama H, Yamasaki M, Miyazaki T, Kobayashi K, Watanabe M, Kano M, Sakimura K, Hashimoto K. : Ionic Basis for Membrane Potential Resonance in Neurons of the Inferior Olive. *Cell Rep*. 16(4):994-1004. 2016

14. Yang CC, Suzuki M, Yamakawa S, Uno S, Ishii A, Yamazaki S, Fukatsu R, Fujisawa R, Sakimura K, Tsurimoto T, Masai H. : Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells. *Nat Commun*. 7:12135. 2016

15. Konno A, Ikegami K, Konishi Y, Yang HJ, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Yao I, Shiba K, Inaba K, Setou M. : Ttl9^{-/-} mice sperm flagella show shortening of doublet 7, reduction of doublet 5 polyglutamylation and a stall in beating. *J Cell Sci*. 129(14):2757-66. 2016

16. Matsuda K, Budisantoso T, Mitakidis N, Sugaya Y, Miura E, Kakegawa W, Yamasaki M, Konno K, Uchigashima M, Abe M, Watanabe I, Kano M, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M. : Transsynaptic Modulation of Kainate Receptor Functions by C1q-like Proteins. *Neuron*. 90(4):752-67. 2016

17. Ichikawa R, Sakimura K, Watanabe M. : GluD2 Endows Parallel Fiber-Purkinje Cell Synapses with a High Regenerative Capacity. *J Neurosci.* 36(17):4846-58. 2016
18. Yamasaki M, Fukaya M, Yamazaki M, Azechi H, Natsume R, Abe M, Sakimura K, Watanabe M. : TARP γ -2 and γ -8 Differentially Control AMPAR Density Across Schaffer Collateral/Commissural Synapses in the Hippocampal CA1 Area. *J Neurosci.* 36(15):4296-312. 2016
19. Imai H, Shoji H, Ogata M, Kagawa Y, Owada Y, Miyakawa T, Sakimura K, Terashima T, Katsuyama Y. : Dorsal Forebrain-Specific Deficiency of Reelin-Dab1 Signal Causes Behavioral Abnormalities Related to Psychiatric Disorders. *Cereb Cortex.* pii: bhv334. 2016

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 | 「mES細胞株RENKAを用いた遺伝子導入細胞の構築とそのTGマウス細胞作製能評価」 |
| 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とその評価 |
| 参加機関 | タカラバイオ株式会社、新潟大学 |
| (5) 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抗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 |

I 研究組織（構成員 平成29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	丸山	佐英子
技術職員	磯貝	麻莉
博士課程大学院生		
	大西	毅（麻酔科）
	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、マウス感覚野の機能を中心に解析している。

- 1) 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した。これらの結果、マウスの聴覚野を、音の高さに応じたニューロン配列を示す四つの領域、及びFM音に応じる二つの領域に分類した。さらに数秒以上続く長い音の終了に応ずる領域も、新たに同定した。
- 2) 体性感覚野の解析：我々は一過性虚血後にしばしば痺れを経験する。この現象をマウスモデルによって解析した。一過性虚血後の痺れに相当する現象は、行動テスト、脊髄後角のイメージング、体性感覚野のイメージングを併用して確認した。これまでの結果により、血流遮断により末梢神経の自発発火が止まり、脊髄後角ニューロンの抑制性代謝型グルタミン酸受容体の活性化が止み、カルシウム濃度が上昇してNOが発生し、その結果広範囲にシナプス増強が生じ、痺れが生じると考えている。
- 3) 視覚野の解析：空間情報を処理する視覚野背側経路と図形情報を処理する視覚野腹側経路について解析を行っている。特にカルシウム依存性蛍光蛋白を皮質興奮性ニューロンに特異的に発現するマウスを用い、覚醒状態のマウス側面部における脳活動を解析した。その結果、ゆっくり動く図形刺激に対して聴覚野の後方部分が応答することを見出した。従来我々は麻酔下のフラビン蛋白蛍光イメージングで、聴覚野より背側に存在する部分が図形認知を担う部位であると考えていたが、実際はこの部分を含み、さらに聴覚野の後方までを含む広範な部位が対象領域であると思われる。この部分の活動は、従来知られている一次視覚野や二次視覚野と異なり、視野の広範囲を覆う縞刺激などにはあまり応じないこと、また視覚刺激のサイズにそれ程左右されないこと、ゆっくり動くと応じやすくなることなどの特徴があることが判った。さらに聴覚野の後方から、聴覚野の腹側の嗅周野に回り込む活動も記録され、視覚から記憶への移行メカニズムが解析できるのではないかと考えている。
- 4) 連合野機能の解析：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。12種類あるプロトカドヘリン α のアイソフォーム

が2種類に減少したマウスでは、2種類の感覚統合機能と2種類の短期記憶の異常が存在することが判った。このマウスでは、一次感覚野の異常は見当たらず、短期記憶と情報統合はいずれも連合野の機能ではないかと思われる。また短期記憶と情報統合は意識の要素でもあるため、意識の神経メカニズム解明の手掛かりが得られると期待される。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Baba H, Tsukano H, Hishida R, Takahashi K, Horii A, Takahashi S, Shibuki K, Auditory cortical field coding long-lasting tonal offsets in mice. *Scientific Reports*, 6, 34421, 2016.
2. Tsukano H, Horie M, Hishida R, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K, Quantitative map of multiple auditory cortical regions with a stereotaxic fine-scale atlas of the mouse brain. *Scientific Reports*, 6, 22315, 2016.

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

デジタル医学分野（統合脳機能研究センター）

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29年3月31日現在）

I - 1 病理学分野

教授（兼）	高橋 均	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		斉藤 春美
			南 歩惟
		事務職員	吉田 真理子
			古金 優子
		大学院博士課程	田中 英智
			齋藤 理恵 (神経内科)
			佐藤 朋江 (神経内科)
			清家 尚彦 (神戸大学・神経内科)
			伊藤 絢子
			中原 亜紗
			竹島 明 (神経内科)
			野澤 孝徳 (脳神経外科)
			張 璐 (留学生)

II - 2 デジタル医学分野（統合脳機能研究センター）

教授 柿田 明美

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

II 研究活動

病理学分野とデジタル医学分野および脳疾患標本資源解析学分野は、共同で基礎と臨床の融合の下、生検・剖検に立脚した「人体神経病理学」を実践している。病理解剖は、24時間365日体制で行なっており、ヒト脳科学の研究発展に資する脳神経疾患標本リソースの量的、かつ質的な充実に努めている。

研究対象には、各種神経変性疾患、脳の発生のメカニズムとその異常、脳腫瘍、脳血管障害、脱髄性疾患、さらに中毒・代謝・炎症性疾患などがある。脳神経疾患の多様性に応じた検索を基盤に臨床病理学的研究を行うとともに、原因・機序の解明を指向した主導的、支援的共同研究に取り組んでいる。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Tanaka S, Utsumi J, Sasaki H (Epub 2016 Oct 20). MicroRNA expression profiles of multiple system atrophy from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Neurosci Lett* 2016; 635: 117-122. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.034.
2. 清水 宏、柿田明美. プリオン病とは何ですか? (高尾昌樹 編) 「神経内科 Clinical questions and pearls : 認知症」, 中外医学社, pp. 374-378.
3. Uemura M, Tsukamoto Y, Akaiwa Y, Watanabe M, Tazawa A, Kasahara S, Endou M, Ogura R, Okamoto K, Fujii Y, Nakada T, Kakita A, Nishizawa M (Epub 2016 March 2). Cerebral sinus thrombosis due to oral contraceptive use: postmortem 3T-MRI and autopsy findings. *Hum Pathol Case Reports* 2016; 6: 32-36. doi:10.1016/j.ehpc.2016.01.002.
4. Ohara N, Katada S, Yamada T, Mezaki N, Suzuki H, Suzuki A, Hanyu O, Yoneoka Y, Kawachi I, Shimohata T, Kakita A, Nishizawa M, Sone H. Fibromyalgia in a patient with Cushing's disease accompanied by central hypothyroidism. *Intern Med* 2016; 55 (21): 3185-3190. DOI: 10.2169/internalmedicine.55.5926.
5. 北浦弘樹、武井延之、中島光子、松本直通、柿田明美. mTOR とてんかん. *Epilepsy* 2016; 10 (2): 97-102.
6. Hino M, Kunii Y, Matsumoto J, Wada A, Nagaoka A, Niwa S, Nawa H, Takahashi H, Kakita A, Akatsu H, Hori A, Hashizume Y, Tamamoto T, Yabe H (Epub 2016 Jul 25). Decreased VEGFR2 expression and increased phosphorylated Akt1 in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2016; 82: 100-108. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.018>.
7. 丸栄一、岡田元宏、兼子直、柿田明美、高橋幸利. 基礎研究とトランスレーショナル研究. in: てんかん白書 (日本てんかん学会 編集). 南江堂, pp. 157-162.
8. Miyake N, Fukai R, Ooba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Imagawa E, Shiina M, Ogata K, Okuno-Yuguchi J, Fueki N, Ogiso Y, Suzumura H, Watabe Y, Imataka G, Leong HY, Fattal-Valevski A, Miyatake S, Kato M, Okamoto N, Sato Y, Kaneko N, Nishiyama A, Tamura T, Mizuguchi T, Nakashima M, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N (Epub 2016 Oct 6). Biallelic *TBCD* Mutations Cause Early-Onset Progressing Multiple System Neurodegeneration. *Am J Hum Genet* 2016; 99 (4): 950-961. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.005>
9. Tada M, Konno T, Tada M, Tezuka T, Miura T, Mezaki N, Okazaki K, Arakawa M, Itoh K, Yamamoto T, Yokoo H, Yoshikura N, Ishihara K, Horie M, Tekebayashi H, Toyoshima Y, Naito M, Onodera O, Nishizawa M, Takahashi H, Ikeuchi T, Kakita A (Epub 2016 Aug 4). Characteristic microglial features in patients with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Ann Neurol* 2016; 80 (4): 554-565. doi: 10.1002/ana.24754.
10. Hayashi K, Mochizuki Y, Takeuchi R, Shimizu T, Nagao M, Watabe K, Arai N, Oyanagi K, Onodera O, Hayashi M, Takahashi H, Kakita A, Isozaki E (2016 Sept 30). Clinicopathological characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis resulting in a totally locked-in state (communication Stage V). *Acta Neuropathol Commun* 2016; 4: 107. DOI: 10.1186/s40478-016-0379-3.
11. 吉村淳一、宮原弘明、棗田 学、柿田明美、藤井幸彦. 髄芽腫の予後因子 Gli3. in 脳腫瘍学 –基礎研究と臨床研究の進歩– VI. 脳腫瘍の予後因子. *日本臨床* 2016; 74 (Suppl 7): 292-297. 総説
12. 豊島靖子、柿田明美 (2016 Sep 1). 脳表へモジゲリン沈着症. *臨床医のための神経病理. Clinical Neuroscience* 2016; 34 (9): 956-957. 総説
13. Murakami T, Yoshida K, Segawa M, Yoshihara A, Hoshi A, Nakamura K, Ichikawa M, Yokoyama Y, Toyoshima Y, Sugiura Y, Ito H, Saito K, Kakita A, Takahashi H, Ugawa Y, Suzuki O, Hashimoto Y (2016 Aug 8). A case of lymphomatosis cerebri mimicking inflammatory diseases. *BMC Neurol* 2016; 16: 128. doi: 10.1186/s12883-016-0655-7.
14. Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K, Kitamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki Y, Yoshida M, Shimizu H, Kakita A, Takahashi H, Suzuki H, Naiki H, Sanjo N, Mizusawa H, Jucker M, Yamada M (2016 Aug; Epub 2016 Jun 17).

Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial A β deposition and meningeal amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 2016; 132 (2): 313-315. doi: 10.1007/s00401-016-1588-3.

15. Yamada M, Toyoshima Y, Makifuchi T, Kakita A, Takahashi H (Epub 2015 Nov 11). Spinocerebellar degeneration: Discrepancies between clinical and pathological diagnoses. *Neuropathology* 2016; 36 (4): 405-410. Review DOI: 10.1111/neup.12278.
16. Kimura T, Miura T, Aoki K, Saito S, Hondo H, Konno T, Uchiyama A, Ikeuchi T, Takahashi H, Kakita A (Epub 2015 Dec 4). Familial ideopathic basal ganglia calcification: histopathologic features of an autopsied patient with an *SLC20A2* mutation. *Neuropathology* 2016; 36 (4): 365-371. doi: 10.1111/neup.12280.
17. Sugita Y, Muta H, Ohshima K, Morioka M, Tsukamoto Y, Takahashi H, Kakita A (Epub 2015 Nov 26). Primary central nervous system lymphomas and related diseases: pathological characteristics and discussion of the differential diagnosis. *Neuropathology* 2016; 36 (4): 313-324. DOI: 10.1111/neup.12276
18. Hoshi A, Tsunoda A, Yamamoto T, Tada M, Kakita A, Ugawa Y (Epub 2016 May 12). Increased neuronal and astroglial aquaporin-1 immunoreactivity in rat striatum by chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid. *Neurosci Lett* 2016; 626: 48-53.
19. Koyama A, Sugai A, Kato T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno T, Ishihara T, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O (Epub 2016 Jun 2). Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acid Res* 2016; 44 (12): 5820-5836. doi: 10.1093/nar/gkw499.
20. Takeuchi R, Tada M, Shiga A, Toyoshima Y, Konno T, Sato T, Nozaki H, Kato T, Horie M, Shimizu H, Takebayashi H, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2016 Jun 23). Heterogeneity of cerebral TDP-43 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: evidence for clinic-pathologic subtypes. *Acta Neuropathol Commun* 2016; 4 (1): 61. doi: 10.1186/s40478-016-0335-2.
21. Nakamura K, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, Wakabayashi K (Epub 2015 Nov 13). α -Synuclein pathology in the cranial and spinal nerves in Lewy body disease. *Neuropathology* 2016; 36 (3): 262-269. DOI: 10.1111/neup.12269.
22. Miki Y, Tanji K, Mori F, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (Epub 2015 Aug 11). Alteration of upstream autophagy-related proteins (ULK1, ULK2, Beclin1, VPS34, and AMBRA1) in Lewy body disease. *Brain Pathology* 2016; 26 (3): 357-370. doi: 10.1111/bpa.12297.
23. Hokari M, Yokoseki A, Arakawa M, Saji E, Yanagawa K, Yanagimura F, Toyoshima Y, Okamoto K, Ueki S, Hatase T, Ohashi R, Fukuchi T, Akazawa K, Yamada M, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M, Kawachi I (Epub 2016 Feb 2). Anterior visual pathway in neuromyelitis optica: significance of neuroaxonal pathology via abnormal aquaporin-4 dynamics in astrocytes and Müller cells. *Ann Neurol* 2016; 79 (4): 605-624. doi: 10.1002/ana.24608.
24. Nakamura K, Mori F, Kon T, Tanji K, Miki Y, Tomiyama M, Kurotaki H, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, Wakabayashi K (Epub 2015 Aug 31). Accumulation of phosphorylated α -synuclein in subpial and periventricular astrocytes in multiple system atrophy of long duration. *Neuropathology* 2016; 36 (2): 157-167. doi: 10.1111/neup.12243.
25. Yokoyama Y, Toyoshima Y, Shiga A, Tada M, Hasegawa K, Kitamura H, Ikeuchi T, Someya T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (Epub 2015 May 13). Pathological and clinical spectrum of a sporadic four-repeat tauopathy, progressive supranuclear palsy: with special reference to astrocytic tau pathology. *Brain Pathol* 2016; 26 (2): 155-166. doi: 10.1111/bpa.12265.
26. Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Wakabayashi K (Epub 2015 Aug 24). G protein-coupled receptor 26 immunoreactivity in intranuclear inclusions associated with polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases. *Neuropathology* 2016; 36 (1): 50-55. doi: 10.1111/neup.12237.

27. Saito R, Jinguji S, Taniguchi Y, Takeuchi S, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H, Kakita A (Epub 2015 Aug 17). Nonfunctional intra- and suprasellar tumor in a patient with visual disturbance and panhypopituitarism. *Neuropathology* 2016; 36 (1): 107-112. doi: 10.1111/neup.12236.
28. 柿田明美. 病理所見を理解する基礎. 特別企画シリーズ：てんかんをわかり易く理解するための神経科学. (編：柿田明美、岡田元宏) てんかん研究 2016; 33 (3): 688-691. 総説
29. Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Tanaka H, Shimizu H, Shiga A, Miura T, Aoki K, Aikawa A, Ishizawa S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (Epub 2015 Mar 18). Globular glial mixed four repeat tau and TDP-43 proteinopathy with motor neuron disease and frontotemporal dementia. *Brain Pathol* 2016; 26 (1): 82-94. doi: 10.1111/bpa.12262.
30. Kasahara T, Takata A, Kato TM, Kubota-Sakashita M, Sawada T, Kakita A, Mizukami H, Kaneda D, Ozawa K, Kato T (Epub 2015 Oct). Depression-like episodes in mice harboring mtDNA deletions in paraventricular thalamus. *Mol Psychiatry* 2016; 21 (1): 39-48, doi: 10.1038/mp.2015.156.
31. 塚本佳広、小倉良介、渡辺雅樹、岡本浩一郎、五十嵐弘中、柿田明美 (2016 Jan). 新潟大学脳研究所の取り組み：3T MRI を用いた Ai と病理解剖. オートプシー・イメージング(Ai)第五弾：- 社会インフラとしての Ai の普及と適切な活用に向けて- . *インナービジョン* 2016; 31 (1): 45-47, 総説.

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 プロテインオパチー) 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、東京都医学総合研究所、岐阜大学・岐阜薬科大学、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、国立成育医療センター病院 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 |

分子病態学（客員）分野

I 研究組織（構成員 平成29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メカニズム、2) グリア細胞の機能と各種病態における変化、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. Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Tanaka S, Utsumi J, Sasaki H. MicroRNA expression profiles of multiple system atrophy from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Neurosci Lett* 635: 117-122, 2016
2. Ito M, Nakamura K, Mori F, Miki Y, Tanji K, Wakabayashi K. Novel eosinophilic neuronal cytoplasmic inclusions in the external cuneate nucleus of humans. *Neuropathology* 36: 441-447, 2016
3. Kidani Y, Miki Y, Nomimura N, Minakawa S, Tanaka N, Miyoshi H, Wakabayashi K, Kudo Y. The therapeutic effect of CD133⁺ cells derived from human umbilical cord blood on neonatal mouse hypoxic-ischemic encephalopathy model. *Life Sci* 157: 108-115, 2016
4. 丹治邦和、三木康生、森文秋、若林孝一. 多系統萎縮症とオートファジー. *神経内科* 84: 452-457, 2016
5. Tanji K, Miki Y, Maruyama A, Mori F, Mimura J, Itoh K, Kamitani T, Wakabayashi K. The role of NUB1 in α -synuclein degradation in Lewy body disease model mice. *Biochem Biophys Res Com* 470: 635-642, 2016
6. Tanji H, Okada H, Igari R, Yamaguchi Y, Sato H, Takahashi Y, Koyama S, Arawaka S, Wada M, Kawanami T, Wakabayashi K, Kato T. Inflammatory pseudotumor of the brain parenchyma with IgG4 hypergammaglobulinemia. *Internal Medicine* 55: 1911-1916, 2016
7. Nakamura K, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, Wakabayashi K. α -Synuclein pathology in the cranial and spinal nerves in Lewy body disease. *Neuropathology* 36: 262-269, 2016
8. Miki Y, Tanji K, Mori F, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of upstream autophagy-related proteins (ULK1, ULK2, Beclin1, VPS34, and AMBRA1) in Lewy body disease. *Brain Pathol* 26: 359-370, 2016
9. Nakamura K, Mori F, Kon T, Tanji K, Miki Y, Tomiyama M, Kurotaki H, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, Wakabayashi K. Accumulation of phosphorylated α -synuclein in subpial and periventricular astrocytes in multiple system atrophy of long duration. *Neuropathology* 36: 157-167, 2016
10. Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Wakabayashi K. G protein-coupled receptor 26 immunoreactivity in intranuclear inclusions associated with polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases. *Neuropathology* 36: 50-55, 2016

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29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	佐藤圭輔、中山遥子、藤原秀元、本橋邦夫、阿部英明、野澤孝徳

II 研究活動

(1) 基礎研究 (共同研究含む)

- ・ IDH変異型グリオーマにおける表面抗原を標的とした術中療法の開発
- ・ 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
- ・ IDH変異型神経膠腫における2HGによるミトコンドリア機能異常と新規治療展開
- ・ 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
- ・ 髄芽腫におけるGli3の役割の解明と新しい治療戦略
- ・ 脳腫瘍におけるGTP代謝と新しい治療展開
- ・ 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
- ・ 中枢神経原発悪性リンパ腫の再発時の遺伝子異常の検討
- ・ 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

(2) 臨床研究 (共同研究含む)

- ・ 中枢神経原発性悪性リンパ腫の髄液診断と運動機能予後の予測
- ・ 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-
- ・ IDH変異型グリオーマにおけるMRS 2HG解析
- ・ 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
- ・ Fluorescein Na (フルオレセイン) を用いた脳腫瘍手術に関する臨床研究
- ・ 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効性
- ・ 希少脳腫瘍の後方視的検討—東北,新潟地方における多施設共同研究—
- ・ 新潟大学関連施設の神経膠腫に対する観察登録研究
- ・ 初発膠芽腫に対する放射線療法併用テモゾロミド、ベバシズマブ療法および増悪または再発後のベバシズマブ継続投与の有効性と安全性を検討する第II相臨床試験 (BIOMARK)
- ・ 初発膠芽腫におけるカルムスチン脳内留置用材及び放射線療法併用テモゾロミド、ベバシズマブ療法の有効性・安全性を検討する第II相試験 (RADICAL)
- ・ 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
- ・ 初発中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する照射前大量メトトレキサート療法+放射線治療と照射前大量メトトレキサート療法+テモゾロミド併用放射線治療+テモゾロミド維持療法とのランダム化比較試験
- ・ 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

III 論文（原著，総説，症例報告を区別しない）

1. Kurabe S, Okamoto K, Suzuki K, Matsuzawa H, Watanabe M, Suzuki Y, Nakada T, Fujii Y. The Posterior Limb of the Internal Capsule as the Subcortical Transitional Zone of the Anterior and Posterior Circulations: Insights from Human 7T MRI. *Cerebrovasc Dis*.41(5-6):256-64, 2016
2. Nakajima S, Morii K, Takahashi H, Fujii Y, Yamanaka R. Prognostic significance of S-phase fractions in peritumoral invading zone analyzed by laser scanning cytometry in patients with high-grade glioma: A preliminary study. *Oncol Lett*. 2016 Mar;11(3):2106-2110.
3. Suzuki T, Takao H, Suzuki T, Kambayashi Y, Watanabe M, Sakamoto H, Kan I, Nishimura K, Kaku S, Ishibashi T, Ikeuchi S, Yamamoto M, Fujii Y, Murayama Y. Determining the Presence of Thin-Walled Regions at High-Pressure Areas in Unruptured Cerebral Aneurysms by Using Computational Fluid Dynamics. *Neurosurgery*. 2016 Oct;79(4):589-95.
4. Nishino K, Hasegawa H, Morita K, Fukuda M, Ito Y, Fujii Y, Sato M. Clinical characteristics of arteriovenous malformations in the cerebellopontine angle cistern. *Neurosurg*. 2016 Apr 1:1-9. [Epub ahead of print]
5. Tsukamoto Y, Ohtsu N, Echizenya S, Otsuguro S, Ogura R, Natsumeda M, Isogawa M, Aoki H, Ichikawa S, Sakaitani M, Matsuda A, Maenaka K, Fujii Y, Kondo T. Chemical Screening Identifies EUrl as a Novel Inhibitor Against Temozolomide-Resistant Glioblastoma-Initiating Cells. *Stem Cells*. 34(8):2016-25,2016
6. Takahashi H, Jimbo Y, Takano H, Abe H, Sato M, Fujii Y, Aizawa Y. Intracerebral Hematoma Occurring During Warfarin Versus Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant Therapy. *Am J Cardiol*.118(2):222-5, 2016
7. Yamanaka R, Morii K, Shinbo Y, Sano M, Homma J, Tsuchiya N, Yajima N, Tsukamoto Y, Ogura R, Natsumeda M, Aoki H, Akiyama K, Saitoh T, Tamura T, Hondoh H, Kawaguchi A, Takahashi H, Fujii Y. Late relapse of primary central nervous system lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2017 Feb;58(2):475-477.
8. Sato K, Fukuda M, Sato Y, Hiraishi T, Takao T, Fujii Y. Cortico-cortical evoked hemodynamic responses in human language systems using intraoperative near-infrared spectroscopy during direct cortical stimulation. *Neurosci Lett*. 630:136-40, 2016
9. Yoneoka Y, Yoshimura J, Okada M, Fujii Y. Perifocal Inflammatory Reaction with Volume Fluctuation Caused by Diagnostic Radiation-Induced Regression in Germinoma Makes Histological Diagnosis Difficult despite Its Disappearance following Treatment: A Significant Pitfall and Countermeasures to It. *Pediatr Neurosurg*. 2016 Nov 11. [Epub ahead of print]
10. Yamanaka R, Morii K, Shinbo Y, Sano M, Homma J, Tsuchiya N, Yajima N, Tsukamoto Y, Ogura R, Natsumeda M, Aoki H, Akiyama K, Saitoh T, Tamura T, Hondoh H, Kawaguchi A, Takahashi H, Fujii Y. Long-term survivors of primary central nervous system lymphoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 1-7 ical Oncology, 2016
11. Kojima S, Yoshimura J, MD, Takao T, Tamura T, MD, Nishiyama K, Maruyama S, Suda M, Fujii Y. Mobile spinal enterogenous cyst resulting in intermittent paraplegia in a child: case report. *J Neurosurg Pediatr*18(4):448-451, 2016
12. Kahlert, UD, Mooney SM, Natsumeda M, Steiger HJ, Maciaczyk JKah. Targeting cancer stem-like cells in glioblastoma and colorectal cancer through metabolic pathways. *International Journal of Cancer* Epub ahead of print, 2016
13. 菊池文平、柿沼健一、佐藤圭輔、渡邊秀明. Learning curve からみた、微小血管吻合術の習熟—顕微鏡下手術初心者への訓練目標設定の試み— *脳卒中の外科* 44: 113-117, 2016
14. 大野秀子 米岡有一郎 岡田正康 藤井幸彦 GH 産生下垂体腺腫は早期発見されるようになってきたか？

—最近9年間の手術症例の検討— 日本内分泌学会雑誌 91 Suppl. HPT: 8-10, 2016

15. 長谷川仁 3章 前大脳動脈瘤のIVR-血管内アプローチ 前交通動脈瘤に対するアプローチ 前大脳動脈瘤・椎骨脳底動脈瘤のすべて メディカ出版, p46-53, 2016
16. 岡本浩一郎, 藤井幸彦. 11章脳腫瘍 診断 CT/MRI/angiography. 脳神経科学II, 金芳堂, P1385-1394, 2016
17. 長谷川仁 脳卒中 Q&A 脳卒中のコメディカル教育法は? 脳神経外科速報: 26, 628, 2016
18. 森田健一 特集6: 「食べる」に関わる局所症状 (20) 嚥下障害 BRAIN NURSING Vol.32 no.6 (567): 47-48, 2016
19. 長谷川仁 ステントアシストコイル塞栓術の応用テクニック. 脳血管内治療ブラッシュアップセミナー2016 テキスト p30-36, 2016
20. 神保康志, 佐々木修, 西野和彦, 渡部正俊, 梨本岳雄, 中村公彦, 根路銘千尋, 小池哲雄, 藤井幸彦 Hybrid手術で治療した破裂内頸動脈前壁動脈瘤の1例. 脳卒中の外科 (別刷) 第44巻3号 :44:207~211, 2016
21. 高橋 祥 頸性めまいの重要性. 日本農村医学会雑誌 65巻(1号): 15~24, 2016
22. 安藤和弘, 佐々木修, 渡部正俊, 梨本岳雄, 菊池文平. 短期間で頭頸部主幹動脈に多様な血管解離を来した線維筋性形成異常症の1例. No Shinkei Geka 44(7): 583-590, 2016
23. 長谷川仁. Big debate 内科医×外科医急性期脳梗塞で梗塞範囲が広い症例: 外科医の見解. 脳神経外科速報 26: 838-843, 2016
24. 神宮字 伸哉, 岸田 悠吾, 佐藤 拓, 古川 祐哉, 村上 友太, 黒見 洋介, 山田 昌幸, 岩楯 兼尚, 織田 恵子, 岩味 健一郎, 市川 優寛, 藤井 正純, 佐久間 潤, 齋藤 清. 三相性尿崩症を意識した頭蓋咽頭腫の術後水分出納管理. 日本内分泌学会雑誌 第26回 日本間脳下垂体腫瘍学会 Proceeding 第92号: 46-49, 2016
25. 田村 哲郎, 富川 勝, 三橋 大樹, 澁谷 航平. 妊娠中に下垂体機能低下と視野狭窄を発症した1例. 日本内分泌学会雑誌 第26回 日本間脳下垂体腫瘍学会 Proceeding 第92号: 34-37, 2016
26. 三浦隆徳, 丸屋 淳, 渡邊 潤, 佐藤隆太, 畠山 卓, 西巻啓一. 短期間に両側内頸動脈瘤破裂を繰り返した結節性多発動脈炎の1例. 脳神経外科 44:661-668, 2016
27. 吉村淳一, 宮原弘明, 棗田学, 柿田明美, 藤井幸彦. 脳腫瘍学—基礎研究と臨床研究の進歩— IV. 脳腫瘍の予後因子 髄芽種の予後因子 Gli3. 日本臨牀 74巻 増刊号7, 292-297, 2016
28. 神宮字伸哉, 齋藤清, 藤井幸彦. 胚腫 脳腫瘍学. 日本臨牀 脳腫瘍学 増刊号 74巻増刊号, 740-744, 2016
29. 渡邊徹, 大杉繁昭. 薬物療法の中止を目標とした不眠治療におけるエスゾピクロン(ルネスタ®錠)の有効性. 睡眠医療 10: 443-448, 2016
30. 福多真史, 大石誠, 平石哲也, 高尾哲郎, 藤井幸彦. 頭蓋底手術における脳神経運動誘発電位モニタリング. 特集「術中脳脊髄モニタリングの現状と問題点」脳手術におけるMEPモニタリング. 臨床神経生理学 44(4): 196-202, 2016
31. 長谷川仁. 脳動静脈奇形に対するOnyx塞栓術の基本. 日本脳神経血管内治療学会学術総会 CEP テキスト, 2016
32. 渡邊 潤, 岡本 浩一郎, 大石 誠, 藤井 幸彦. 慢性硬膜下血腫と鑑別を要する疾患. 脳神経外科速報 Vol26: 1186-1191, 2016
33. 藤原秀元, 相場豊隆, 渡邊徹, 平石哲也, 藤井幸彦. 前床突起小型髄膜腫に水頭症を合併した1例. 脳神経外科 No Shinkei Geka44(12): 1039-1044, 2016
34. 佐野正和, 山下慎也, 相場豊隆. アルテプラールゼ静注射後の口舌血管浮腫. 脳卒中 第38巻 第3号 別冊 173-175, 2016
35. 吉村淳一, 青木 洋, 米岡有一郎, 西山健一, 藤井幸彦. 先天性脳腫瘍の生命予後と精神発達の予後について: 自験例と文献的考察からの今後の展望. 小児の脳神経 41(4):1-6, 2016

36. 藤井幸彦 大石誠. 脳腫瘍学-基礎研究と臨床研究の進歩- 脳腫瘍の検査・診断 脳腫瘍の検査・診断 概論 (解説/特集) .日本臨床(0047-1852) 74 巻増刊 7 脳腫瘍学 Page349-354(2016.09)

IV 共同研究

- (1) 中枢神経原発性悪性リンパ腫のマイクロRNA発現解析
新潟大学脳研究所 京都府立医科大学 千葉大学 山口大学
- (2) 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29年3月31日現在）

教授	小野寺 理	准教授	下畑 享良	講師	河内 泉
助教	高橋 哲哉	助教	他田 正義	助教	堅田 慎一
助教	金澤 雅人	特任助教	徳武 孝允	特任助教	佐治 越爾
特任助教	須貝 章弘	特任助教（救急部）	二宮 格		
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、穂苅 万李子、鳥谷部 真史、
上村 昌寛、宇津見 宏太、齋藤 理恵、佐藤 朋江、下畑 敬子、三浦 健、目崎 直実、
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

修士課程大学院生

高山 幹大、笠原杏子

II 研究活動

【脳梗塞に対する新規治療法の開発】

1) 研究の概要

下畑享良を中心とする研究グループ（高橋哲哉、金澤雅人ら）は、血栓溶解療法に血管保護薬を併用し、脳梗塞患者の予後を改善する新規治療法の開発を、米国に設立した創薬ベンチャー ShimoJani LLC、およびクリーブランドクリニック脳卒中センターと協力し進めた。また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、論文報告、国際特許出願を行った。新聞報道された。

2) 研究の成果

（論文）

1. Kanazawa M, Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. Therapeutic Strategies to Attenuate Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Treatment for Acute Ischemic Stroke. *J Atheroscler Thromb.* 2017 Mar 1;24(3):240-253.
2. Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, Nakajima T, Onodera O, Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep.* 2017 Feb 14;7:42582

（特許出願）

細胞製剤および細胞製剤の製造方法（特願2016-168543）

【メチル水銀中毒のメカニズムの解明と新規治療法の開発】

1) 研究の概要

2011年より、下畑享良を中心とする研究グループ（高橋哲哉ら）と国立水俣病総合研究センタ

一は共同研究を行い、メチル水銀中毒の動物モデルを用いて、血管内皮増殖因子（VEGF）が、水俣病で侵される小脳や後頭葉に強く発現し、脳血管を破綻することを初めて発見した。VEGFを中和する抗体療法は、モデル動物の症状を改善した。水俣病の病態解明と治療開発につながる発見となった。新聞報道された。

2) 研究の成果

（論文）

1. Takahashi T, Fujimura M, Koyama M, Kanazawa M, Usuki F, Nishizawa M, Shimohata T. Methylmercury Causes Blood-Brain Barrier Damage in Rats via Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. PLoS One. 2017 Jan 24;12(1):e0170623.

【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。とくに神経内科、呼吸器内科、耳鼻咽喉科、循環器内科、摂食・嚥下機能回復部がチームを組織しMSA患者の診療に当たるといふ新しいチーム医療モデルを提唱した。本年度は突然死メカニズムに関する英文総説を発表するとともに、栄養障害の問題点に関する報告、および睡眠呼吸障害の経時変化に関する報告を行った。

2) 研究の成果

2001年から進めている研究で、15年間で19の英文原著論文を報告した。

（論文）

1. Shimohata T, Aizawa N, Nakayama H, Taniguchi H, Ohshima Y, Okumura H, Takahashi T, Yokoseki A, Inoue M, Nishizawa M. Mechanisms and prevention of sudden death in multiple system atrophy. Parkinsonism Relat Disord. 2016 Sep;30:1-6.
2. Sato T, Shiobara M, Nishizawa M, Shimohata T. Nutritional Status and Changes in Body Weight in Patients with Multiple System Atrophy. Eur Neurol. 2017;77(1-2):41-44.
3. Ohshima Y, Nakayama H, Matsuyama N, Hokari S, Sakagami T, Sato T, Koya T, Takahashi T, Kikuchi T, Nishizawa M, Shimohata T. Natural course and potential prognostic factors for sleep-disordered breathing in multiple system atrophy. Sleep Med. 2017 Jun;34:13-17.

【小脳型進行性核上性麻痺の疾患概念と診断基準に関する研究】

1) 研究の概要

下畑享良を中心とする研究グループ（金澤雅人ら）と国立病院機能東名古屋病院等の共同チームは、初めて小脳型進行性核上性麻痺（PSP-C）の疾患概念、および診断基準を確立し、論文報告を行った。PSP-Cは現在、PSPの新しい病型として世界的に認知されるに至った。

2) 研究の成果

（論文）

1. Shimohata T, Kanazawa M, Yoshida M, Saito Y, Iwai K, Yasuda T, Inukai A, Takahashi H, Nishizawa M, Aiba I. Clinical and imaging findings of progressive supranuclear palsy with predominant cerebellar ataxia. Mov Disord. 2016 May;31(5):760-2.

【多発性硬化症・視神経脊髄炎の病態メカニズムに関する研究】

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、特に限局型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教授を報告した (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の免疫現象の詳細を検討中である。

2) 研究の成果 (2016年)

1. Hokari M, Yokoseki A, Arakawa M, Saji E, Yanagawa K, Yanagimura F, Toyoshima Y, Okamoto K, Ueki S, Hatase T, Ohashi R, Fukuchi T, Akazawa K, Yamada M, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M, Kawachi I. Clinicopathological features in anterior visual pathway in neuromyelitis optica. *Annals of Neurology* 2016;79(4):605-624. doi: 10.1002/ana.24608. PMID: 26836302.
2. Kawachi I, Lassmann H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88:137-145. doi:10.1136/jnnp-2016-313300.
3. Ogino M, Kawachi I, Otake K, Ohta H, Otsuka Y, Iwasaki K, Hiroi S. Current treatment status and medical cost for multiple sclerosis based on analysis of a Japanese claims database. *Clinical and experimental neuroimmunology* 2016;7(2):158-167. doi: 10.1111/cen3.12299.
4. Kawachi I. Clinical characteristics of autoimmune optic neuritis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2017;8(Suppl.1):8- 16.
5. Saji E, Kawachi I. The 3rd MS Summer College in Kobe (6- 7 August 2016) Practical issues and new horizons in MS, NMOSD and related disorders. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2017;8(Suppl.1):58- 62.
6. Yamasaki R, Matsushita T, Fukazawa T, Yokoyama K, Fujihara K, Ogino M, Yokota T, Miyamoto K, Niino M, Nomura K, Tomioka R, Tanaka M, Kawachi I, Ohashi T, Kaida KI, Matsui M, Nakatsuji Y, Ochi H, Fukaura H, Kanda T, Nagaishi A, Togo K, Mizusawa H, Murai H, Kira JI. Efficacy of intravenous methylprednisolone pulse therapy in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Mult Scler*. 2016;22(10):1337-48. doi: 10.1177/1352458515617248.
7. 河内泉. III. 各種疾患. 7. 脱髄・免疫性疾患. 2. 多発性硬化症の「炎症・変性」と進行型多発性硬化症に対する治療の最新動向. *Annual Review 神経*2017. 2017年1月30日発行. 206-214. 中外医学社.
8. 河内泉, 西澤正豊. 「多発性硬化症の病因・病態から診断・治療まで」(3) 多発性硬化症の早期診断と早期治療の UP-TO-DATE. *神経治療学* 2016;33:475-477. http://doi.org/10.15082/jsnt.33.3_475
9. 河内泉. 中枢神経系炎症性脱髄疾患における自己免疫現象とミトコンドリア動態異常を伴う神経変性. *Medical science digest* 2016;42(8):357-359.
10. 若杉尚宏, 河内泉. 第5章 神経内科の重要疾患～エキスパートはこう診断する! 8. 多発性硬化症/視神経脊髄炎. レジデントノート増刊. *神経内科がわかる, 好きになる*. 2017年1月20日発行. 18(17)増刊196(3172)-203(3179).
11. 河内泉. 中枢神経系炎症性脱髄疾患における自己免疫現象とミトコンドリア動態異常を伴う神経変性. *Medical science digest* 2016;42(8):357-359.

【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)。引き続き、臨床研究を推進している。

【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-3 α antibodies) を発見し、Neurology誌 (Neurology 2016;86(24):2235.) に報告した。

2) 研究の成果 (2016年)

1. Gresa-Arribas N, Planagumà J, Petit-Pedrol M, Kawachi I, Katada S, Glaser CA, Simabukuro M M, Armangué T, Martinez-Hernandez E, Graus F, Dalmau J. Human neurexin-3 α antibodies associate with encephalitis and alter synapse development. Neurology. 2016 Jun 14;86(24):2235-42. doi: 10.1212/WNL.0000000000002775.
2. Tsuboguchi S, Yajima R, Higuchi Y, Ishikawa M, Kawachi I, Koyama Y, Nishizawa M. A case of slowly progressive anti-Yo-associated paraneoplastic cerebellar degeneration successfully treated with antitumor and immunotherapy. Rinsho Shinkeigaku. 2016 Jun 28;56(7):477-80. DOI: 10.5692/clinicalneurology-000872.

【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。

2) 研究の成果 (2016年)

1. Misawa S, Sato Y, Katayama K, Nagashima K, Aoyagi R, Sekiguchi Y, Sobue G, Koike H, Yabe I, Sasaki H, Watanabe O, Takashima H, Nishizawa M, Kawachi I, Kusunoki S, Mitsui Y, Kikuchi S, Nakashima I, Ikeda S, Kohara N, Kanda T, Kira J, Hanaoka H, Kuwabara S, for the Japanese POEMS Syndrome for Thalidomide (J-POST) Trial Study Group. Safety and efficacy of thalidomide in patients with POEMS syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Neurol 2016 Oct;15(11):1129-37. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30157-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30157-0).

III 論文 (原著、総説、症例報告を区別しない)

1. Kanazawa M, Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. Therapeutic Strategies to Attenuate Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Treatment for Acute Ischemic Stroke. J Atheroscler Thromb. 2017 Mar 1;24(3):240-253.
2. Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, Nakajima T, Onodera O,

- Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep*. 2017 Feb 14;7:42582
3. Takahashi T, Fujimura M, Koyama M, Kanazawa M, Usuki F, Nishizawa M, Shimohata T. Methylmercury Causes Blood-Brain Barrier Damage in Rats via Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *PLoS One*. 2017 Jan 24;12(1):e0170623.
 4. Shimohata T, Aizawa N, Nakayama H, Taniguchi H, Ohshima Y, Okumura H, Takahashi T, Yokoseki A, Inoue M, Nishizawa M. Mechanisms and prevention of sudden death in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016 Sep;30:1-6.
 5. Sato T, Shiobara M, Nishizawa M, Shimohata T. Nutritional Status and Changes in Body Weight in Patients with Multiple System Atrophy. *Eur Neurol*. 2017;77(1-2):41-44.
 6. Ohshima Y, Nakayama H, Matsuyama N, Hokari S, Sakagami T, Sato T, Koya T, Takahashi T, Kikuchi T, Nishizawa M, Shimohata T. Natural course and potential prognostic factors for sleep-disordered breathing in multiple system atrophy. *Sleep Med*. 2017 Jun;34:13-17.
 7. Shimohata T, Kanazawa M, Yoshida M, Saito Y, Iwai K, Yasuda T, Inukai A, Takahashi H, Nishizawa M, Aiba I. Clinical and imaging findings of progressive supranuclear palsy with predominant cerebellar ataxia. *Mov Disord*. 2016 May;31(5):760-2.
 8. Hokari M, Yokoseki A, Arakawa M, Saji E, Yanagawa K, Yanagimura F, Toyoshima Y, Okamoto K, Ueki S, Hatase T, Ohashi R, Fukuchi T, Akazawa K, Yamada M, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M, Kawachi I. Clinicopathological features in anterior visual pathway in neuromyelitis optica. *Annals of Neurology* 2016;79(4):605-624. doi: 10.1002/ana.24608. PMID: 26836302.
 9. Kawachi I, Lassmann H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88:137-145. doi:10.1136/jnnp-2016-313300.
 10. Ogino M, Kawachi I, Otake K, Ohta H, Otsuka Y, Iwasaki K, Hiroi S. Current treatment status and medical cost for multiple sclerosis based on analysis of a Japanese claims database. *Clinical and experimental neuroimmunology* 2016;7(2):158-167. doi: 10.1111/cen3.12299.
 11. Kawachi I. Clinical characteristics of autoimmune optic neuritis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2017;8(Suppl.1):8- 16.
 12. Saji E, Kawachi I. The 3rd MS Summer College in Kobe (6- 7 August 2016) Practical issues and new horizons in MS, NMOSD and related disorders. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2017;8(Suppl.1):58- 62.
 13. Yamasaki R, Matsushita T, Fukazawa T, Yokoyama K, Fujihara K, Ogino M, Yokota T, Miyamoto K, Niino M, Nomura K, Tomioka R, Tanaka M, Kawachi I, Ohashi T, Kaida KI, Matsui M, Nakatsuji Y, Ochi H, Fukaura H, Kanda T, Nagaishi A, Togo K, Mizusawa H, Murai H, Kira JI. Efficacy of intravenous methylprednisolone pulse therapy in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Mult Scler*. 2016;22(10):1337-48. doi: 10.1177/1352458515617248.
 14. 河内泉. III. 各種疾患. 7. 脱髄・免疫性疾患. 2. 多発性硬化症の「炎症・変性」と進行型多発性硬化症に対する治療の最新動向. *Annual Review 神経*2017. 2017年1月30日発行. 206-214. 中外医学社.
 15. 河内泉, 西澤正豊. 「多発性硬化症の病因・病態から診断・治療まで」(3) 多発性硬化症の早期診断と早期治療のUP-TO-DATE. *神経治療学* 2016;33:475-477. http://doi.org/10.15082/jsnt.33.3_475
 16. 河内泉. 中枢神経系炎症性脱髄疾患における自己免疫現象とミトコンドリア動態異常を伴う神経変性. *Medical science digest* 2016;42(8):357-359.
 17. 若杉尚宏, 河内泉. 第5章 神経内科の重要疾患～エキスパートはこう診断する! 8. 多発性硬化

症/視神経脊髄炎. レジデントノート増刊. 神経内科がわかる, 好きになる. 2017年1月20日発行. 18(17)増刊196(3172)-203(3179).

18. 河内泉. 中枢神経系炎症性脱髄疾患における自己免疫現象とミトコンドリア動態異常を伴う神経変性. *Medical science digest* 2016;42(8):357-359.
19. Gresa-Arribas N, Planagumà J, Petit-Pedrol M, Kawachi I, Katada S, Glaser CA, Simabukuro M M, Armangué T, Martinez-Hernandez E, Graus F, Dalmau J. Human neurexin-3 antibodies associate with encephalitis and alter synapse development. *Neurology*. 2016 Jun 14;86(24):2235-42. doi: 10.1212/WNL.0000000000002775.
20. Tsuboguchi S, Yajima R, Higuchi Y, Ishikawa M, Kawachi I, Koyama Y, Nishizawa M. A case of slowly progressive anti-Yo-associated paraneoplastic cerebellar degeneration successfully treated with antitumor and immunotherapy. *Rinsho Shinkeigaku*. 2016 Jun 28;56(7):477-80. DOI: 10.5692/clinicalneurology-000872.
21. Misawa S, Sato Y, Katayama K, Nagashima K, Aoyagi R, Sekiguchi Y, Sobue G, Koike H, Yabe I, Sasaki H, Watanabe O, Takashima H, Nishizawa M, Kawachi I, Kusunoki S, Mitsui Y, Kikuchi S, Nakashima I, Ikeda S, Kohara N, Kanda T, Kira J, Hanaoka H, Kuwabara S, for the Japanese POEMS Syndrome for Thalidomide (J-POST) Trial Study Group. Safety and efficacy of thalidomide in patients with POEMS syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2016 Oct;15(11):1129-37. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30157-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30157-0).

IV 共同研究

(1) 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

(発表論文) Shimohata T, Nakayama H, Aizawa N, Nishizawa M. Discontinuation of continuous positive airway pressure treatment in multiple system atrophy. *Sleep Med*. 2014;15:1147-9.

(2) 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、川村邦雄らは、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、および脳研究所統合脳機能研究センターの中田力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ユ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、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学研究室

(特許) 虚血後の再灌流に起因する出血を予防するための薬剤 (PCT/JP2014/076117)

統合脳機能研究センター

I 研究組織（構成員 平成29年3月31日現在）

教授	五十嵐 博中	センター長
特任教授	中田 力	
リサーチコーディネーター	西澤 正豊	
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	ビンセント フーバー	臨床機能脳神経科学分野
准教授	辻田 実加	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
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
助教	中村 亨弥	生体磁気共鳴学分野(超域学術院)
実験助手	五十嵐 妙	
実験助手	村木 美子	
実験助手	大湊 詩保	
実験助手	上田 佳未	
大学院生	大野 健	
大学院生	須田 有紀子	
大学院生	藤原 秀元	
大学院生	本橋 邦夫	
大学院生	武田 基秀	
大学院生(国内留学)	酒多 穂波	
医局秘書	佐藤 直子	
医局秘書	松崎 玲奈	
医局秘書	廣川 友紀	
医局秘書	涌井 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、初年度はシーズとなる薬剤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. Masahiro Uemura, Yoshihiro Tsukamoto, Yasuhisa Akaiwa, Masaki Watanabe, Ayako Tazawa, Sou Kasahara, Minoru Endou, Ryosuke Ogura, Kouichirou Okamoto, Yukihiko Fujii, Tsutomu Nakada, Akiyoshi Kakita, Masatoyo Nishizawa. Cerebral venous sinus thrombosis due to oral contraceptive use: Postmortem 3 T-MRI and autopsy findings. *Human Pathology: Case Reports* (2016) 6, 32- 36, December
2. Kurabe S, Itoh K, Nakada T, Fujii Y. Evidence for cerebellar motor functional reorganization in brain tumor patients: An fMRI study. *Neurosci Lett*. 2016 May 27;622:45-8
3. Huber VJ, Wacker S, Rützler M. Aquaporins: Chemical Inhibition by Small Molecules. PP 251-274. in *Aquaporins in Health and Disease: New Molecular Targets for Drug Discovery*. Soveral G, Nielsen S, Casini A, eds. CRC Press, 2016. <https://www.crcpress.com/Aquaporins-in-Health-and-Disease-New-Molecular-Targets-for-Drug-Discovery/Soveral-Nielsen-Casini/9781498707831>
4. Kurabe S, Okamoto K, Suzuki K, Matsuzawa H, Watanabe M, Suzuki Y, Nakada T, Fujii Y. The Posterior Limb of the Internal Capsule as the Subcortical Transitional Zone of the Anterior and Posterior Circulations: Insights from Human 7T MRI. *Cerebrovasc Dis*. 2016 Feb 2;41(5-6):256-264
5. Hokari M, Yokoseki A, Arakawa M, Saji E, Yanagawa K, Yanagimura F, Toyoshima Y, Okamoto K, Ueki S, Hatase T, Ohashi R, Fukuchi T, Akazawa K, Yamada M, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M, Kawachi I. Clinicopathological features in anterior visual pathway in neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 2016 Feb 2.
6. 鈴木雄治、五十嵐博中、中田力：「アクアポリンのPET」 *Clinical Neuroscience* 2016;34:1394-1395
7. 植木智志. 視神経脊髄炎に関連した視神経炎(抗アクアポリン4抗体陽性視神経炎)の治療の現状. *あたらしい眼科* 33 : 15-20, 2016. 5月号
8. 植木智志. 抗アクアポリン4抗体陽性視神経炎の臨床的特徴. *神経眼科* 33: 118-124, 2016. No. 2
9. 塚本佳広, 小倉良介, 渡辺将樹, 岡本浩一郎, 五十嵐博中, 柿田明美 新潟大学脳研究所の取り組み—3T MRIを用いたAiと病理解剖 INNERVISION 2016年1月号
10. 植木智志. 麻痺性斜視. *神経眼科* 33 : 3-10, 2016. No.1
11. 塚本佳広, 小倉良介, 渡辺将樹, 岡本浩一郎, 五十嵐博中, 柿田明美 新潟大学脳研究所の取り組み—3T MRIを用いたAiと病理解剖 INNERVISION 2016年1月号

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（H28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

を採る。

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

I 研究組織（構成員 平成29年3月31日現在）

教授	池内 健	技術職員	河合麗子
助教	宮下哲典（休職中）		小林智子
助教	春日健作（超域学術院）		佐藤怜奈
特任助手	平井香織		廣瀬美香
研究員	原 範和		横山彩香
技術職員	月江珠緒	事務職員	高殿恵子
	古川英理	大学院生（博士）	黒羽泰子
	見田順子		三浦 健（神経内科）
			目崎直実（神経内科）
			石黒敬信（神経内科）

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・治療法の開発及び病態解明に関する活動を行っている。国内多施設と共同してアルツハイマー病のゲノムDNAの収集を行い、数千例規模のゲノムDNAリソースの構築が進んでいる。これらのサンプルを活用したアルツハイマー病の感受性遺伝子、レアバリエーションの解析を実施し、孤発性アルツハイマー病の先天的な観点からの発症機序の解明が進んでいる。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800症例以上）、その結果を臨床に還元するクリニカルシーケ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/>）。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、脳脊髄液、血液、RNAなどを全国多施設共同研究により統一したプロトコルにより採取された認知症性疾患バイオバンクを当研究室に構築している。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活用することにより、アルツハイマー病の新規バイオマーカーの探索を実施し、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. Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Tanaka H, Shimizu H, Miura T, Aoki K, Aikawa A, Ishizawa S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Globular glial mixed four repeat tau and TDP-43 proteinopathy with motor neuron disease and frontotemporal dementia. *Brain Pathology* 26:82-94, 2016
2. Yokoyama Y, Toyoshima Y, Shiga A, Tada M, Hasegawa K, Kitamura H, Ikeuchi T, Someya T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Pathological and Clinical Spectrum of Progressive Supranuclear Palsy: With Special Reference to Astrocytic Tau Pathology. *Brain Pathology* 26: 155-166, 2016

3. Tada M, Konno T, Tada M, Tezuka T, Okazaki K, Arakawa M, Itoh K, Yamamoto T, Yokoo H, Yoshikura N, Ishihara K, Horie M, Takebayashi H, Toyoshima Y, Naito M, Onodera O, Nishizawa M, Takahashi H, Ikeuchi T, Kakita A. Characteristic microglial features in patients with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Annals of Neurology* 80:554-565, 2016
4. Watanabe Y, Kitamura K, *Nakamura K, Sanpei K, Wakasugi M, Yokoseki A, Onodera O, Ikeuchi T, Kuwano R, Momotsu T, Narita I, Endo N. Elevated C-reactive protein is associated with cognitive decline in outpatients of a general hospital: The Project in Sato for Total Health (PROST). *Dementia Geriatric Cognitive Disorder EXTRA* 6:10-19, 2016
5. Kimura T, Miura T, Aoki K, Saito S, Hondo H, Konno T, Uchiyama A, Ikeuchi T, Takahashi H, Kakita A. Familial idiopathic basal ganglia calcification: histopathologic features of an autopsied patient with an *SLC20A2* mutation. *Neuropathology* 36:365-371, 2016
6. Kitamura K, Watanabe Y, Nakamura K, Sanpei K, Wakasugi M, Yokoseki A, Onodera O, Ikeuchi T, Ruwano R, Momotsu T, Narita I, Endo N. Modifiable factors associated with cognitive impairment in 1143 Japanese outpatients: The Project in Sado for Total Health (PROST). *Dementia Geriatric Cognitive Disorder EXTRA* 6:341-349, 2016

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、東京大学など
- (2) 研究題目：「認知症の根本的な原因の解明を目指したコホート研究と網羅的ゲノム配列解析研究」
 研究内容：アルツハイマー病の発症に関与する遺伝的リスクを明らかにする目的で縦断的コホート研究を行い、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析を実施している。
 参加機関：東京大学
- (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、松江医療センター等

動物資源開発研究分野

I 研究組織（構成員 平成29年3月31日現在）

教授	笹岡 俊邦
助教	藤澤 信義
助教	前田 宜俊 (3月31日付退職)
特任助教	小田 佳奈子
技術職員	田中 稔
技術職員	中尾 聡宏 (3月31日付退職)
技術補佐員	那須野 純映
技術補佐員	加藤 明子
派遣技術職員	山本 美丘
派遣技術職員	坪井 広樹 (3月31日付退職)
派遣技術職員	阿部 光寿
派遣技術職員	酒井 清子
特任助手	内山 澄香
事務補佐員	田代 智子
事務補佐員	久住 真由美
博士課程大学院生	中尾 聡宏 (3月31日付退学)
卒研究生(農学部)	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関連分子の遺伝子操作マウスを開発し、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。その一因として設備、経費面に加えて、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持ち、必要な卵を確保して研究を進めている。私たちがマーモセットを用いたモデル動物の開発にかかる課題の解決のための方法を検討している。

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て、これらの卵巣から受精卵を得ることができれば、小規模な研究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ることを成功した。
- (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. Maekawa T, Sasaoka T, Azuma S, Ichikawa T, Melrose HL, Farrer MJ, Obata F; Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) regulates α -synuclein clearance in microglia.
BMC Neuroscience 17(1):77 2016 doi: 10.1186/s12868-016-0315-2
2. Shioda N, Yabuki Y, Wang Y, Uchigashima M, Hikida T, Sasaoka T, Mori H, Watanabe M, Sasahara M, Fukunaga K; Endocytosis following dopamine D2 receptor activation is critical for neuronal activity and dendritic spine formation via Rabex-5/PDGFR β signaling in striatopallidal medium spiny neurons.
Molecular Psychiatry 2016 Dec 6. doi: 10.1038/mp.2016.200.
3. Morita M, Wang Y, Sasaoka T, Okada K, Niwa M, Sawa A, Hikida T. Dopamine D2L receptor is required for visual discrimination learning.
Molecular Neuropsychiatry 2016; 2(3):124-132. DOI: 10.1159/000447970
4. Macpherson T, Morita M, Wang Y, Sasaoka T, Sawa A and Hikida T; Nucleus accumbens dopamine D2-receptor expressing neurons control behavioral flexibility in a place discrimination task in the IntelliCage.
Learning and Memory 2016 Jun 17;23(7):359-64. doi: 10.1101/lm.042507.116. Print 2016 Jul. PMID: 27317196
5. Kubo M, Nagashima R, Ohta E, Maekawa T, Isobe Y, Kurihara M, Eshima K, Iwabuchi K, Sasaoka T, Azuma S, Melrose HL, Farrer MJ, Obata F; Leucine-rich repeat kinase 2 is a regulator of B cell function, affecting homeostasis, BCR signaling, IgA production, and TI antigen responses.
Journal of Neuroimmunology 2016 Mar 15;292:1-8. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.01.005. Epub 2016 Jan 8.

IV 共同研究

以下の共同研究課題について、胚操作実験技術を利用して研究を推進している。

- (1) 遺伝子改変動物作成
脳における系統的遺伝子破壊マウスの作製
脳研究所 細胞神経生物学分野 阿部 学 准教授
- (2) 平成28年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
PNPLA6遺伝子の脳における機能-有機リン被爆との関連から
研究代表者：木村 穰 教授（東海大学）
- (3) 平成28年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
UBQLN2コンディショナルノックアウトマウスの解析に基づく神経変性機序の解明
研究代表者：田中 章景 教授（横浜市立大学）
- (4) 平成28年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析
研究代表者：岩里 琢治 教授（国立遺伝学研究所）

- (5) 平成28年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン神経伝達の機能の解析
研究代表者：南部 篤 教授（自然科学研究機構生理学研究所）
- (6) 平成28年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
ドーパミン受容体変異マウスを用いた不安様行動発症機序の解明
研究代表者：飯田 諭宜 助教（北里大学）
- (7) 平成28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）
- (8) 平成28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）
- (9) 平成28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）
- (10) 平成28年度 共同利用・共同研究（連携資源利用型）
胎仔期および発達期の脳におけるドーパミン受容体D1Rの機能解析
研究代表者：大久保 直 准教授（北里大学）
- (11) 平成28年度 共同利用・共同研究（連携資源利用型）
APP細胞内ドメインの神経毒性の解析
研究代表者：中山 耕造 講師（信州大学）
- (12) 平成28年度 共同利用・共同研究（連携資源利用型）
ドーパミン-D1Rシグナルが心不全に果たす役割の解明
研究代表者：小室 一成 教授（東京大学）
- (13) 平成28年度 共同利用・共同研究（連携資源利用型）
筋線維メ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）
- (14) 平成28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）

I 研究組織（構成員 平成29年3月31日現在）

教授（兼）	小野寺 理
助教	石原 智彦
技術職員	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、神経内科学教室の支援を受けて、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。

遺伝性脳小血管病は脳の小血管の異常により生じる病気の総称で、血管性認知症の主な原因の一つである。当施設ではcerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy（CARASIL）について、分子病態機序からの分析・解明を行っている。本症は常染色体劣性遺伝性疾患であるが、欧州の研究グループから原因遺伝子であるHTRA1遺伝子のヘテロ接合変異で、脳小血管病を発症する可能性があることが報告されていた。しかし日本人における頻度やその発症メカニズムは不明であった。当教室研究チームは、京都府立医科大学の研究チームと共同で、日本人の脳小血管病患者の約5%がHTRA1遺伝子のヘテロ接合変異によって発症すること、変異のあるHTRA1遺伝子から作り出された異常HTRA1蛋白が、正常HTRA1蛋白の活性化を阻害することを明らかにし、Neurology誌に発表した。本研究手法によるHTRA1遺伝子変異の危険性予測や、血管性認知症の治療開発が期待される。

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、機能性RNA代謝に関連した新たな病態機序に関する研究を行い、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。その中で本施設では疾患感受性蛋白質のRNA代謝に注目してALS病態機序の解析を行っている点に特色がある。本年度はALSにおけるTDP-43の発現調節機構についてNAR誌に報告を行った。TDP-43は自己mRNAの選択的 splicing やmRNAの核からの移動を介した複雑な発現調節機構を有している事、さらにALSではその破綻がある事を見出した。本報告はALSの病態生理の解明および治療法の開発の上で重要である。

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。

また研究資金は科学研究費補助金(B)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. Koyama A, Sugai A, Kato T, Onodera O, et al. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. Nucleic Acids Res. 2016;44:5820-

2. Nozaki H, Kato T, Nihonmatsu M, Onodera O, et al. Distinct molecular mechanisms of HTRA1 mutants in manifesting heterozygotes with CARASIL. *Neurology*. 2016;86:1964-1974
3. Aizawa Y, Koyama A, Ishihara T, Onodera O, et al. Performance of a real-time PCR-based approach and droplet digital PCR in detecting human parechovirus type 3 RNA. *J Clin Virol*. 2016;84:27-31

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

プロジェクト研究分野

I 研究組織（構成員 平成29年3月31日現在）

准教授	鷺山 和雄	助教	棗田 学
技術職員	小林 一雄		
研究員	薄井 宏	研究員	小林 徹

II 研究活動

当分野では、従来の形態学、免疫組織化学、生化学的分析法などの手法を用いた神経病理学に加え、各種脳疾患の遺伝子レベルでの解析を行なってきた。研究内容としては、脳腫瘍の病因病態の研究をはじめ、ウイルス疾患、脳虚血、精神神経作動薬などを対象とした研究を行なってきた。

脳腫瘍に関しては、近年では、癌抑制遺伝子をCre/loxPシステムを用いて、細胞選択的に破壊することによる脳腫瘍モデルマウスの病態観察を行なってきた。加えて、コンディショナルノックアウト法を用いて発生させた脳腫瘍の髄膜播種を解析した。

また、G蛋白質活性型内向き整流性カリウムチャンネル（GIRK; Kir3）に対する分子薬理学的研究も継続してきた。このチャンネルは、神経伝達物質、G蛋白質共役型受容体と機能的な関係を持ち、神経細胞の興奮性をダイナミックに制御する重要なイオンチャンネルである。本年度も、うつ病の治療薬として用いられている薬剤を中心に、GIRKチャンネルが抑制的に働いていることを、アフリカツメガエル卵母細胞蛋白質発現系を用いて、解析してきた。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Natsumeda M, Maitani K, Liu Y, Miyahara H, Kaur H, Chu Q, Zhang H, Kahlert UD, Eberhart CG. Targeting Notch Signaling and Autophagy Increases Cytotoxicity in Glioblastoma Neurospheres. *Brain Pathol.* 2016 Nov;26(6):713-723
2. Kahlert UD, Suwala AK, Koch K, Natsumeda M, Orr BA, Hayashi M, Maciaczyk J, Eberhart CG. Pharmacologic Wnt Inhibition Reduces Proliferation, Survival, and Clonogenicity of Glioblastoma Cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015 Sep;74(9):889-900.

IV 共同研究

- | | |
|----------|---|
| (1) 研究題目 | 「悪性グリオーマにおけるがん抑制遺伝子に関する研究」 |
| 研究内容 | 悪性グリオーマ細胞株を用いて、がん抑制遺伝子が腫瘍の増殖や治療効果にどのように影響を与えているかを研究している |
| 参加機関 | 和歌山県立医科大学 |

3. 社会との連携

夏期セミナー

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

第46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!

2016.7.28(木)▶30(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

7.28
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(7/28のみ)(3~6名)
B.遺伝子改変動物作製の実際(7/27~28)(4名)
C.神経細胞の培養と遺伝子導入(7/28のみ)(6名)
- ②脳研レジデント(臨床)体験コース：(7/28のみ)(10~20名)
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

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。

7.29
fri

ビッグデータの
医療への応用と
脳神経シミュレーション

- 9:30~10:20 薬剤応答ネットワークの探索
- 10:20~11:10 スパコンの上に小脳を作る
- 11:10~12:00 脳タンパク質老化とマクロ神経回路破綻

宮野 悟(東大・医科研)
山崎 匡(電通大)
渡辺 宏久(名大BMRC)

モデル生物を使った
脳神経研究の最先端

- 13:00~13:45 小型魚類で明らかにする神経病態
- 13:45~14:30 シナプスの変化ーハエを用いて

松井 秀彰(新潟大・脳研(超域))
杉江 淳(新潟大・脳研(超域))

特別講演

- 14:30~16:00 行動選択の脳内機構

中西 重忠(京大名誉教授)

- 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!)

7.30
sat

RNAと神経疾患

- 10:00~11:00 神経発生・疾患とRNA結合蛋白質
- 11:00~12:00 RNA編集による神経伝達物質分泌制御
- 13:00~13:40 痛みを制御するRNA編集
- 13:40~14:20 ALSにおけるRNA代謝障害
- 14:30~15:30 神経系細胞のエピジェネティクス

矢野 真人(新潟大・医)
河原 行郎(阪大・医)
内田 仁司(新潟大・脳研)
石原 智彦(新潟大・脳研)
中島 欽一(九大・医)

特別講演

- 15:30~16:30 Targeting stem cell pathways in malignant brain tumors

Charles G. Eberhart (Johns Hopkins Univ.)
(日本学術振興会平成28年度外国人招へい研究者)

申込み
問合せ

○氏名、所属、連絡先、1日目の希望コースを以下までお知らせください。[受講料]大学生・修士課程院生 無料/その他(含む博士課程院生)1,000円

〒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: 025-227-0606 FAX: 025-227-0814 E-mail: bllib@bri.niigata-u.ac.jp URL: http://www.bri.niigata-u.ac.jp

本セミナーは日本脳神経外科学会生涯教育クレジット、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



第6回 生理研 - 霊長研 - 脳研 合同シンポジウム

平成29年3月9日(木)～10日(金)

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

プログラム

平成29年3月9日(木) 司会：岩倉百合子 (脳研・分子神経)

13:00～ 受付 ポスター掲示

14:00 閉会の挨拶 那波宏之 新潟大学脳研究所長

14:05～15:05 セッション1 座長：南部 篤 (生理研・生体システム)

1 辻田美加 (脳研・統合脳機能研究センター)

EIF2B5toy: 白質消失病原因遺伝子の突然変異マウス発見と解析

2 佐野裕美 (生理研・生体システム)

遺伝子改変マウスを用いた大脳基底核の機能と

運動異常症の病態に関する研究

15:05～15:20 写真撮影・コーヒーブレイク

15:20～16:20 セッション2 座長：高田昌彦 (霊長研・統合脳システム)

3 中村克樹 (霊長研・高次脳機能)

コモンマナーモセットの認知機能検査

4 二宮太平 (生理研・認知行動発達)

トウレット障害の病態解明にむけた霊長類モデル研究

16:20～17:20 セッション3 座長：崎村建司 (脳研・細胞神経生物)

5 中村佳代 (生理研・生体恒常性発達)

K⁺-Cl⁻共輸送体 (KCC2) 過剰発現マウスにおける

皮質シナプスリモデリングの亢進および運動能力の向上

6 金澤雅人 (脳研・神経内科)

脳梗塞後の機能回復を目指したミクログリアによる細胞療法

17:20～18:20 ポスターセッション

18:30 意見交換会会場へ移動 (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。)

19:00～21:00 意見交換会

「ネルソンの庭」 新潟市中央区営所通2番町692-6

TEL: 025-224-7851 <http://crush.jp/nelson/>

平成29年3月10日(金) 司会：山田謙一 (脳研・統合脳機能研究センター)

8:30～ 受付

9:00～10:00 セッション4 座長：磯田昌岐 (生理研・認知行動発達)

7 大野信彦 (生理研・分子神経生理)

オルガネラ動態の役割に迫る3次元微細構造観察

8 清水 宏 (脳研・病理)

Static encephalopathy of childhood

with neurodegeneration in adulthood (SENDA)

: 剖検例におけるオートファジーと鉄代謝の障害

10:00～10:15 コーヒーブレイク

10:15～11:45 セッション5 座長：笹岡俊邦 (脳研・動物資源開発)

9 近添淳一 (生理研・心理生理)

主観的価値・味覚の神経基盤

10 井上謙一 (霊長研・統合脳システム)

ウィルスバクターを利用した

霊長類における神経ネットワーク操作

11 松井秀彰 (脳研・脳病態解析)

魚のドパミン神経とパーキンソン病

11:45 閉会の挨拶 井本敬二 生理学研究所長

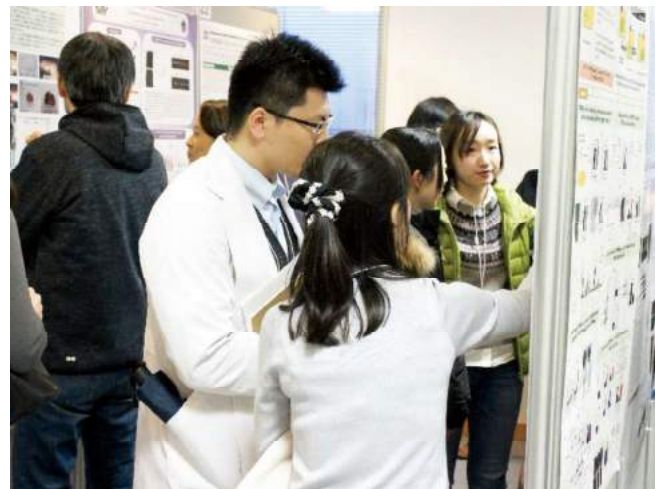
ポスター発表演題

- P1. 小林 恵 (生理研・統合生理)
乳児は似顔絵から母親顔を認識するか
- P2. 大石高生 (霊長研・統合脳システム)
霊長類研究所における遺伝病疑い家系に関する報告
- P3. 目崎直実 (脳研・遺伝子)
LaminB1 関連常染色体優性遺伝性白質脳症
: 遺伝子重複と臨床的特徴
- P4. 陳 以珊 (生理研・神経機能素子)
Behavioral analyses of forebrain specific knock-out mice
of an orphan metabotropic receptor Prnr3 and screening
of small molecule library toward identification of its ligand
- P5. 成原 格、那波宏之 (脳研・分子神経生物)
統合失調症ラットモデルにおける音声弁別能と共運動野活動
- P6. 横井紀彦 (生理研・生体膜)
PSD-95 脱パルミトイル化酵素の同定、及び蛋白質パルミトイル化
の定量的解析法の開発
- P7. 中本千尋 (脳研・細胞神経生物)
GluD1 遺伝子-KO マウスのうつ様行動に関する薬理的解析
- P8. 近添淳一 (生理研・心理生理)
主観的価値・味覚の神経基盤
- P9. 塚野浩明 (脳研・システム脳生理)
マウス大脳聴覚野と内側膝状体腹側核の結合様式の解明
- P10. 山本哲也 (生理研・心理生理)
新しい MRI データ解析プラットフォーム“HCP Pipelines”の
超高磁場 MRI への導入
- P11. 大西 毅 (脳研・システム脳生理)
後肢血流遮断後の脊髄増強：脊髄後角の神経型 NO 合成酵素と
Group II 代謝型グルタミン酸受容体の関与
- P12. 唐木智充 (生理研・視覚情報処理)
ラット一次視覚野の 5 層ニューロンにおける神経結合特性

- P13. 齋藤理恵 (脳研・病理)
腎症・網膜症で発症し脳偽腫瘍を呈した遺伝性小血管病
: RVCL の一部検例
- P14. 孫 在隣 (生理研・大脳神経回路論)
マウス大脳新皮質 VIP 陽性抑制細胞への細胞種・部位特異的入力
- P15. 清家尚彦 (脳研・病理)
EIF2B5 遺伝子変異を伴う Leukoencephalopathy with
vanishing white matter (VWM) : 成人発症例における
グリアの多彩な形態異常
- P16. 知見聡美 (生理研・生体システム)
大脳基底核内情報伝達と運動制御におけるドーパミンの機能
- P17. 棗田 学 (脳研・脳外科)
脳幹グリオーマにおける histone H3 mutation と新しい治療展開
- P18. 横井 功 (生理研・感覚認知情報)
プロジェクトンマッピングによる素材刺激を用いた
サルの行動実験
- P19. 竹本篤史 (霊長研・高次脳機能)
線条体尾核ドーパミン受容体 D2R の発現抑制による
コモンマウスセットの行動変化
- P20. 前田宜俊 (脳研・動物資源開発)
マウスセット卵巣のマウスへの移植と卵胞刺激ホルモン投与
による移植卵巣の成熟
- P21. DEROUICHE Sandra (生理研・細胞生理)
Involvement of thermosensitive TRP channels in
temperature-dependent microglia movement
- P22. 岡田正康 (脳研・脳外科)
末梢神経再生に関わる GAP-43 のリン酸化プロテオーム解析
- P23. 大谷哲久 (生理研・細胞構造)
上皮極性における密着結合の役割
- P24. 上村昌寛 (脳研・神経内科)
家族性脳小血管病患者で同定された変異型 HTRA1 蛋白質の
プロテアーゼ活性解析

- P25. 李 佳益 (生理研・分子神経生理)
Exploring the factors causing remyelination arrest through studying Cystatin F gene expression regulatory mechanism
- P26. 小池佑佳 (脳研・神経内科)
“CORRECT” for introducing nucleotide substitution with CRISPR/Cas9 system in MAPT gene.
- P27. 小田紗矢香 (生理研・心循環シグナル)
心臓の可塑性における TRPC6 の役割
- P28. 柳村文寛 (脳研・神経内科)
Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica
- P29. 稲田浩之 (生理研・生体恒常性発達)
ニューロンの興奮毒性に対するミクログリアの神経保護作用
- P30. 酒多穂波 (脳研・統合脳機能研究センター)
事象関連 fMRI による自由な意図の神経基盤の検討

合同シンポジウム



The 7th BRI International Symposium 2017
Alzheimer's disease: Narrowing the gap between basic science and clinical application

March 10 (Fri) 1pm – March 11 (Sat) 12:40pm
Center for Integrated Human Brain Science (6F)
脳研究所 統合脳機能研究センター 6階セミナーホール
Brain Research Institute, Niigata University

March 10 (Fri)	
13:00 -13:05	Opening remarks (Osamu Onodera, Vice-director of BRI)
Session I (Chaired by Takeshi Ikeuchi, Naoyuki Sato)	
13:05-13:35	Toshiharu Suzuki (Hokkaido University) Function of Alcadin in neurons and the utilization of its γ -secretase product peptide p3-A β in diagnosis and therapy of Alzheimer's disease
13:35-14:05	Masaki Nishimura (Shiga University of Medical Science) Implication of ILEI/FAM3C in the pathogenesis of Alzheimer's disease
Special Lecture 1 (Chaired by Kensaku Kasuga)	
14:05-14:50	Edward H Koo (University of California, San Diego) Targeting APP and tau in mice: Can we make a better mouse to learn about synaptic injury?
14:50-15:05	Coffee break
Session II (Chaired by Hironaka Igarashi, Yuji Suzuki)	
15:05-15:35	Mitsunori Matsumae (Tokai University) Research into the physiology of cerebrospinal fluid reaches a new horizon – Intimate exchange between cerebrospinal fluid and interstitial fluid may contribute to maintenance of homeostasis in the central nervous system -
15:35-16:05	Vincent J Huber (BRI, Niigata University) Channeling water: The why and how of APQ4 modulators
Special Lecture 2 (Chaired by Hironaka Igarashi)	
16:05-16:50	Jeffrey Iliff (Oregon Health & Science University) Impairment of glymphatic function in the aging brain and Alzheimer's disease
17:00 - 18:00	Poster Session
19:00 –	Offsite meeting (Welcome banquet)

March 11 (Sat)

Session III (Chaired by Toshiharu Suzuki, Masaki Nishimura)

9:00-9:30 **Naoyuki Sato (National Center for Geriatrics and Gerontology)**

Bidirectional interaction between diabetes and Alzheimer's disease

9:30-10:00 **Taisuke Tomita (The University of Tokyo)**

Aberrant proteolytic processing and therapeutic strategies in Alzheimer disease

10:00-10:30 **Masayasu Okochi (Osaka University)**

Plasma APL1 β 28, a surrogate marker for brain A β 42 generation, and Alzheimer pathology

10:30-10:45 Coffee break

Special Lecture 3 (Chaired by Takeshi Ikeuchi)

10:45-11:30 **Kun Ho Lee (National Research Center for Dementia, Korea)**

Prediction of Alzheimer's disease based on polygenic risk factors and imaging genetics

Session IV (Chaired by Taisuke Tomita, Masayasu Okochi)

11:30-12:00 **Yasumichi Arai (Keio University)**

Supercentenarians as a model for successful brain aging

12:00-12:30 **Atsushi Iwata (The University of Tokyo)**

Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation and tau-related dysfunction of BRCA1 in Alzheimer's disease

12:30- **Closing remarks** (Hiroyuki Nawa, Director of BRI)

Symposium office

E-mail: noukyoudo@adm.niigata-u.ac.jp

TEL: 025-227-0388

国際シンポジウム



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、わかりやすく最先端の脳研究を紹介し、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27日(月)に「見てみようヒトの脳と心」という題の研究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

参加費
無料

平成29年3月27日(月)

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)~6)のうち第1&2希望を明記して、ハガキまたは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 担当: 図書室・佐藤

E-mail: blib@bri.niigata-u.ac.jp TEL: 025-227-0606

FAX: 025-227-0814 URL: <http://www.bri.niigata-u.ac.jp>



I 脳研究所長挨拶 (検討会室)

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60名

- | | |
|----------------------------------|-----|
| 1) 脳を観察する (病理学分野) | 6名 |
| 2) 生きた神経細胞を育ててみる (分子神経生物学分野) | 10名 |
| 3) 記憶や学習の分子メカニズム (細胞神経生物学分野) | 12名 |
| 4) 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) | 10名 |
| 5) 認知症の謎を解明する (遺伝子機能解析学分野) | 10名 |
| 6) ヒトの脳と心を探る (脳機能解析学分野) | 12名 |

III 講演「ヒトの脳の不思議」 (統合脳機能研究センター (6F) セミナーホール)

15:50 ~ 17:00

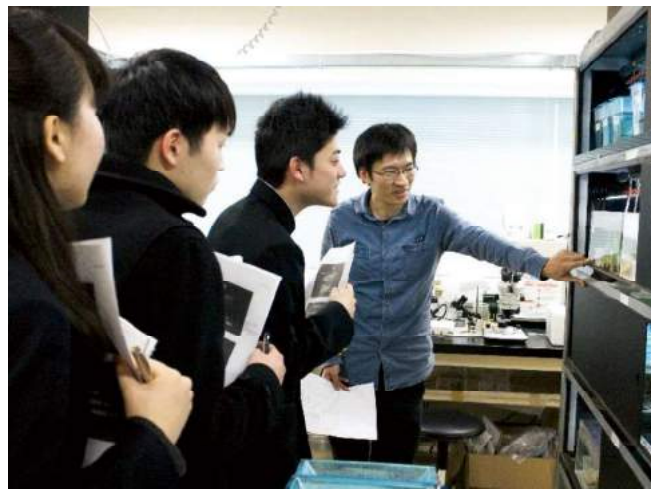
計80名

- | | |
|--------------------|------|
| 1) わたくしたちの脳を知る | 柿田明美 |
| 2) 脳はどんな仕組みで記憶するのか | 崎村建司 |



<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

[公募型] プロジェクト型共同研究

連携資源利用型共同研究

[ピックアップ型] 国際共同研究

[脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点]
平成28年度 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
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	医長	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	福島県立医科大学先端臨床研究センター	准教授	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
リン酸化 α シヌクレイン陽性構造物を多く認めたダウン症例解析を中心としたリン酸化 α シヌクレイン陽性構造物発現メカニズムの探索	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
精神疾患病態解明のための死後脳組織を用いた分子遺伝学的解析および画像解析	東北大学災害科学国際研究所	教授	富田 博秋	デジタル医学分野	柿田 明美
Glud2と平行線維シナプス再生に関する共同研究	北海道大学大学院医学研究科	教授	渡辺 雅彦	細胞神経生物学分野	崎村 建司
脳内アミロイド42蓄積を血液バイオマーカーでスクリーニングする方法の開発	大阪大学大学院医学系研究科	講師	大河内 正康	遺伝子機能解析学分野	池内 健
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	講師	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
中枢神経原発悪性リンパ腫の再発時の遺伝子異常の検討	京都府立医科大学医学部	教授	山中 龍也	脳神経外科学分野	藤井 幸彦
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	細胞神経生物学分野	崎村 建司
神経変性疾患におけるGlymphatic system破綻仮説の病理学的解析	福島県立医科大学	講師	星 明彦	デジタル医学分野	柿田 明美
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	細胞神経生物学分野	崎村 建司
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	副院長	奥山 眞紀子	臨床機能脳神経学分野	鈴木 雄治
糖鎖硫酸転移酵素遺伝子の脳特異的ノックアウトマウスの作成とその表現型解析	関西医科大学	准教授	赤間 智也	細胞神経生物学分野	崎村 建司
EBV関連中枢神経原発悪性リンパ腫の免疫回避機構におけるPD-1及びPD-L1の役割	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
孤発例ALSに関わる治療エビ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
認知症例における髄液および血液中ILEI1定量の意義に関する検証	滋賀医科大学	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	細胞神経生物学分野	崎村 建司
PNPLA6遺伝子の脳における機能一有機リン被爆との関連から	東海大学医学部	教授	木村 穰	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
UBQLN2コンディショナルノックアウトマウスの解析に基づく神経変性機序の解明	横浜市立大学大学院医学研究科	教授	田中 章景	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析	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

大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン神経伝達の機能の解析	自然科学研究機構生理学研究	教授	南部 篤	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
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	東京都医学総合研究所	副参事研究員	渡部 和彦	デジタル医学分野	柿田 明美
神経変性疾患：特異的異常蛋白はシナプスを越えるのか	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
ドーパミン受容体変異マウスを用いた不安様行動発症機序の解明	北里大学医学部	助教	飯田 諭宜	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
Gut microbiotaの制御が脳虚血病巣進展に及ぼす影響	日本医科大学	助教	西山 康裕	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
異常凝集体の形成と伝播による神経細胞死機構の解明	京都大学大学院医学研究科	特定准教授	星 美奈子	デジタル医学分野	柿田 明美
多系統萎縮症のステージ分類確立：グリア封入体を基盤とする分子病理学的解析	信州大学医学部	特任教授	山田 光則	デジタル医学分野	柿田 明美

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
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
意思伝達不能状態 (Stage V) にいたる筋萎縮性側索硬化症の臨床病理学的検討	東京都立神経病院	医員	林 健太郎	デジタル医学分野	柿田 明美
パーキンソン病関連タンパク質Inhibitory PAS Domain Proteinのリン酸化修飾	東北大学大学院生命科学研究所	教授	十川 和博	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科学機能研究科	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	東京工業大学大学院生命理工学研究科	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	准教授	矢尾 育子	細胞神経生物学分野	崎村 建司
オートファジー関連神経変性疾患SENDAの病態解析	群馬大学大学院医学系研究科	助教	村松 一洋	デジタル医学分野	柿田 明美
胎仔期および発達期の脳におけるドーパミン受容体D1Rの機能解析	北里大学医学部	准教授	大久保 直	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
APP細胞内ドメインの神経毒性の解析	信州大学医学部	講師	中山 耕造	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
ドーパミン-D1Rシグナルが心不全に果たす役割の解明	東京大学医学部	教授	小室 一成	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の発症機構の解明	金沢大学附属病院	助教	坂井 健二	デジタル医学分野	柿田 明美
筋線維メ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	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
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	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
筋萎縮性側索硬化症脊髄におけるVGFの局在に関する研究	岐阜薬科大学	准教授	嶋澤 雅光	デジタル医学分野	柿田 明美
内在性TDP-43遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用	北里大学医学部	教授	佐藤 俊哉	神経内科学分野	小野寺 理
和歌山ALS症例における異常タンパク蓄積の分布と機序の解明	和歌山県立医科大学	教授	伊東 秀文	デジタル医学分野	柿田 明美

※所属・職名は、申請時のものです。

平成28年度 共同利用・共同研究採択者一覧

国際共同研究

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
A comprehends study for prospective collaboration between Korea National Brain Bank and Niigata BRI Brain Bank 韓国国立ブレインバンク-新潟大学脳研究所ブレインバンクの協力体制の確立と共同研究実施に向けた調査研究	韓	Seoul National Univ. Hosp., College of Medicine (ソウル大学病院)	Prof.	PARK, Sung-Hye	デジタル医学	柿田 明美
1. Preemptive medicine for Alzheimer's disease 2. Molecular imaging of water dynamics 1. アルツハイマー病の発症前診断・発症予防 2. 水動態のmolecular imaging	米	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	五十嵐 博中
Neural mechanisms for consonance/dissonance perception in music : An ERP study 音楽における協和・不協和知覚の神経機構：事象関連電位を用いた研究	英	Bath Spa Univ. (バース・スパ大学)	Part-time Lecturer	ARTHURS, Yuko	生体磁気共鳴学	五十嵐 博中
An Asian Perspective on Genetic analysis for Alzheimer's disease アジア人・アルツハイマー病を対象としたゲノム解析	韓	National Research Center for Dementia (国立認知症研究センター)	Director	LEE, Kun Ho	遺伝子機能解析学	池内 健
Assessment of auditory dysfunction in model animals for schizophrenia 統合失調症モデル動物の聴覚機能障害の計測、評価	米	Univ. of Alabama at Birmingham (アラバマ大学バーミンガム校)	Assoc. Prof.	NAKAZAWA, Kazu	分子神経生物学	那波 宏之
Functional analysis of homeostatic synaptic plasticity-associated molecules 恒常性シナプス可塑性関連分子の機能解析	米	Univ. of Massachusetts Medical School (マサチューセッツ大学医学部)	Assist. Prof.	FUTAI, Kensuke	細胞神経生物学	崎村 建司
Research on pathway-specific control of motor activity and reward and aversive learning behavior via D1 and D2 dopamine receptors D1及びD2ドーパミン受容体を介する神経伝導路特異的な運動活性の調節及び学習行動の調節に関する研究	米	Univ. of Illinois at Urbana-Champaign (イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校)	Research Assoc. Prof.	WANG, Yanyan	動物資源開発研究	笹岡 俊邦

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²⁾, 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

研究要旨

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, *HtrA1* 遺伝子欠損 (*HtrA1* KO) マウスについて, CARASIL モデルマウスとしての有用性を検証した。その結果, *C455R* 変異 *NOTHC3* 遺伝子導入マウスについては脳血流量で有意な異常は見られなかったが, *HtrA1* KO マウスは野生型マウスに比して, 脳血流量の減少と, 脳循環予備能の異常が示された。

HtrA1 KO マウスは CARASIL や認知症の病態解析に有用なモデルであると考えられた。

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。

CARASIL のモデルマウスとして, *HtrA1* 遺伝子欠損 (*HtrA1* KO) 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。

2. 脳血流量の測定

18 ヶ月齢の *C455R* 変異 *NOTHC3* 遺伝子導入マウスと正常 *NOTHC3* 遺伝子導入マウス, および 16 ヶ月齢の *HtrA1* KO マウスおよび野生型マウスを解析した。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. 脳循環予備能の評価

16 ヶ月齢の *HtrAI* KO マウスおよび野生型マウスについては脳循環予備能も解析した。マウスの麻酔は α -chloralose (50 mg/kg) および urethane (750 mg/kg) の腹腔内投与で行った。気管内挿管の上、5%二酸化炭素を 10 分間吸入させ、レーザースペックル血流計にて脳血流を継続的に測定した。

C. 研究結果

1. 脳血流量の測定

C455R 変異 *NOTHC3* 遺伝子導入マウスと正常 *NOTHC3* 遺伝子導入マウスとの間で脳血流に有意な差異は見られなかった。一方、*HtrAI* KO マウスは野生型マウスに比して有意に脳血流量が減少していた ($p < 0.05$)。

2. 脳循環予備能の評価

α -chloralose および urethane 麻酔下では、炭酸ガス投与前のベースラインの脳血流量について、*HtrAI* KO マウスと野生型マウスとの間で有意な差異を認めなかった。一方、炭酸ガスの投与後、*HtrAI* KO マウスは、野生型マウスに比して、脳血流量の増加が鈍化しており、脳血管反応性の異常が示唆された ($p < 0.05$)。

D. 考察

2009 年、新潟大学で CARASIL の原因遺伝子 *HtrAI* 遺伝子が同定された。その後、欧州や中国など世界各国で CARASIL の報告が相次ぎ、本疾患は孤発性の血管性認知症全体を含む難治性血管障害疾患の病態解明や治療法開発に与ることが期待され、近年ますます注目を集めている。

CARASIL における脳梗塞の発症機序は未だ不明であるが、病理学的に血管壁細胞の変性が報告されており、血管反応性の異常が本疾患の病態機序に深く関連している可能性が考えられている。本研究においても、*HtrAI* KO マウスでは

脳血流量の減少に加え、血管反応性の障害が認められた。

本研究では *HtrAI* KO マウスが CARASIL の病態を再現していることが確認され、CARASIL の治療法開発に有用なモデル動物となりうる可能性が示された。また本モデルは CARASIL にとどまらず、認知症の病態解明にも有用であり、さらなる研究が必要と考えられた。

E. 結論

HtrAI KO マウスは CARASIL や認知症の病態解析に有用なモデルであると考えられた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

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。

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 久保 均¹⁾

研究分担者 伊藤 浩²⁾, 星 明彦³⁾, 深谷 紀元⁴⁾, 深谷 岳史⁴⁾, 五十嵐 博中⁵⁾,

- 1) 福島県立医科大学先端臨床研究センター 2) 福島県立医科大学放射線医学講座
3) 福島県立医科大学神経内科学講座 4) 福島県立医科大学附属病院放射線部
5) 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。本年は、安静時神経ネットワーク機能を解析する際の解析精度向上に寄与する時間分解能を向上させるためのマルチバンド (SMS) 技術の最適化、特にマルチバンドファクター (MBf) 設定の最適化を行った。健康人ボランティア 5 名を対象に、マルチバンドファクター (MBf) を変化させて視覚刺激を与えた際の BOLD 信号の変化や賦活領域体積、および画像 SNR の変化について比較した。その結果、MBf5 の画像が最もスライス分離が悪く、BOLD 信号の変化率、賦活領域体積および SNR の全てにおいて有意に性能が低かった。全ての項目において MBf2 が安定した結果を得ることができたので、本装置におけるマルチバンド技術の使用には MBf2 が最適であると考えられた。

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。本年度は、安静時神経ネットワーク機能を解析する際の解析精度向上に寄与する時間分解能を向上させるためのマルチバンド (SMS) 技術の最適化、特にマルチバンドファクター (MBf) 設定の最適化を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究では、福島県立医科大学に本邦で初めて設置された同時収集型 PET/MR 装置を用い、同時収集型 PET/MR 装置における MBf の設定が、信号雑音比 (SNR) や BOLD 信号に与える影響について検討した。これは、本装置のハードウェアが PET と MRI を同時に測定できなければならないため、MR 単独装置のような最新のハードウェアを使用できないためである。最適化のための信号変化を得るために、被検者にチェッカーフラッグの視覚刺激を与えた。検討項目は、1) 視覚刺激による BOLD 効果の信号変化の評価、2) 視覚刺激による視覚野賦活領域体積の評価、および 3) 安静時測定における SNR の評価とした。

使用機器は、シーメンス社製 Biograph mMR であり、12 チャンネルのヘッドコイルを使用した。視覚刺激はフィジオテック社の MR 専用視覚刺激

装置を用い、刺激は Presentation で制御した。対象は本研究内容に関して同意を得た健常人ボランティア 5 名（男性、平均年齢 26.0±1.8 歳）である。なお、本研究内容は本学倫理委員会の承認を得ている。

撮像条件は、SMS 法においては MBf を 1, 2, 5 とした。それに応じて、時間分解能を向上させるために TR を 3000, 1500, 600 msec. とした。また、SMS 法と比較するために通常使用する GR-EPI 法でもデータを取得した。その TR は 3000 msec. であった。これら以外の条件は、次の通りである：TE = 30 msec., GRAPPA 2, スライス厚 3 mm, スライスギャップ 0 mm, FOV = 220 x 220 mm², マトリックスは 74 x 74. スキャン時間は、task-based fMRI が 3 分、rs-fMRI が 6 分であった。Task-based fMRI の解析はコンソール上のメーカー標準ソフトウェアで行った。

最適化のための評価は、以下の 3 項目とした。

- 1) 視覚刺激による BOLD 効果の信号変化の評価
30 秒 x 6 回のブロックデザインで視覚刺激を与え、賦活領域での信号変化をグラフ化し、その最大・最小信号値の平均から信号値差の割合を算出した。
- 2) 視覚刺激による視覚野賦活領域体積の評価
解析された賦活マップにおける視覚野の賦活体積を算出した。
- 3) 安静時測定における SNR の評価
rs-fMRI のデータを用いて左視覚野、右大脳基底核および右頭頂葉白質に ROI を設定し、差分法で SNR を算出した。

C. 研究結果

得られた画像を観察すると、多少コントラストが変化するが、MBf2 までは十分実用化できる画像であったと思われる。MBf5 の画像は非常にノイズが多く、解剖学的構造の把握が困難であった。

実験 1) の BOLD 信号の効果による信号変化と信号値差割合をみると、信号値差が最も大きいのは MBf1 であり、最も小さいのが MBf5 であった。実験 2) の視覚野における賦活領域体積の結果を見ると、MBf5 がその他に比して有意に賦活領域体積が小さかった。実験 3) の視覚野、大脳基底核、および白質における安静時の SNR を見ると、何れの

領域においても MBf5 の SNR が有意に低かった。

D. 考察

本検討では、MBf の違いが画像や BOLD 信号に与える影響について評価した。MBf を大きくするほど時間分解能の向上につながり、fMRI の解析精度は向上するが、MBf を大きくすると SNR の低下、スライス分離能の低下が生じるために画質そのものが低下する。そのために、MBf の最適化が必要である。

今回の検討では、MBf5 での画像が非常に悪く、解剖学的構造の同定も困難なほどアーチファクトが生じていた。これは、体軸方向のスライス分解能が著しく低下したためと考えられた。通常の MR 単独装置では 32 から 64 チャンネルのコイルを用いて MBf を 10 以上にした報告も多数出ているが、我々が使用している同時収集型 PET/MR 装置では体軸方向に 3 列しかない合計 12 チャンネルのコイルしか使用できず、MBf を上げた場合に体軸方向のスライス分解能が著しく低下したものと考えられた。

今回検討した BOLD 信号の変化、賦活領域体積の変化、および SNR の変化のどれをみても、MBf を上げるほどに性能が悪くなっていく傾向が見られた。これらの傾向はこの SMS 技術の理論と合致しているが、通常の MR 単独装置ではコイルの多チャンネル化でその悪化を補っている。しかし、同時収集型 PET/MR 装置ではコイルのカスタマイズ、あるいは多チャンネル化が困難であり、装置メーカーから提供されるコイルを使わざるを得ない。そのために、本装置においては画質低下を最小にできる MBf は 2 ということになり、時間分解能を 2 倍にすることが最大である、ということがわかった。ただし、時間分解能を 2 倍にするだけでも、例えば rs-fMRI の解析を行うと分離できるコンポーネントは 1.5 倍程度増えたので（自験例）、解析精度向上には十分に寄与できるものと考えられた。

E. 結論

同時収集型 PET/MR 装置におけるマルチバンド技術を用いる場合、画質を維持しつつ解析精度を高めることができる MBf は 2 が最適であった。

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

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 菊地 正隆¹⁾
研究分担者 池内 健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手法を開発する。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 71 症例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た解析手法を提案する。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、統合的な病態解析へ応用する。

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。そこで本研究では、同一患者 71 症例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た解析手法を提案することにより、AD 病理に関連する分子パスウェイやキー遺伝子を同定する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

AD 病理ステージ(Braak ステージおよび老人斑ステージ)の進行に伴って発現変動する転写産物を同定するために、マイクロアレイや RNA シークエンスにより測定した mRNA およびマイクロ RNA の発現量の発現量相関を総当りで計算した。さらに公共のデータベースに登録されているタンパク質-タンパク質の物理的な相互作用データを取得し、先の発現量相関と組み合わせることで AD 病理ステージの進行に伴って変化する分子パ

スウェイを明らかにする解析手法を構築した。本手法を用いることで、病態を反映する分子パスウェイ中のキー遺伝子を同定した。

アルツハイマー病患者群に特有のゲノム配列パターンを理解するために、SNP6.0 アレイにより測定された SNP データを用い、ホモ接合連続領域（ROH: Runs of homozygosity）を推定し解析するパイプラインを構築した。ROH 領域の推定には plink ソフトウェアと R ソフトウェアを用いた。各検体の ROH の長さや頻度と言った統計量を算出し健常者群とアルツハイマー病患者群で比較を行った。

C. 研究結果

脳研究所・遺伝子機能解析学分野にあるサンプルを用いたトランスクリプトーム解析では、研究分担者と協力してマイクロアレイや RNA シークエンスにより測定した mRNA およびマイクロ RNA の発現量の発現量相関を計算した。さらに発現量相関とタンパク質-タンパク質の物理的な相互作用データを組み合わせることで網羅的な遺伝子ネットワークを構築した。さらに遺伝子ネッ

トワークを解析することで、同定した分子の中で中心的な役割をしていることが示唆されるキー遺伝子を同定することができた。

また、約 2,000 検体の健常者とアルツハイマー病患者の SNP アレイデータ (Miyashita et al. (2013)) を用い、健常者とアルツハイマー病患者のホモ接合連続領域 (ROH: Runs of homozygosity) について解析パイプラインを構築した。研究分担者と協力して ROH に関する統計量を健常者とアルツハイマー病患者で比較した結果、アルツハイマー病患者で統計的に有意に ROH が長いことがわかった。ROH の長さは認知機能と逆相関することが報告されている他 (Joshi et al. (2015))、アフリカン・アメリカン集団やカリブ・ヒスパニック集団でもアルツハイマー病患者で ROH が長いことが報告されており (Ghani et al. (2013), Ghani et al. (2015))、日本人集団においても同様の事象が確認された。

D. 考察

トランスクリプトーム解析によって得られたキー遺伝子の阻害はアルツハイマー病の原因タンパクであるアミロイドβ量に影響をあたえることが報告されている(論文未発表のため引用記載なし)。また精神疾患との関連も報告されていることから同定したキー遺伝子が精神・神経疾患に何らかの関与をすることが示唆される。一方でこのキー遺伝子がアルツハイマー病の起因と関係するのか、アルツハイマー病の結果生じた神経細胞死に由来する結果なのかといった因果関係については今後の課題である。

ROH 解析ではこれまで非日本人集団で明らかにされてきたアルツハイマー病患者群における ROH の延長が日本人集団でも初めて確認することができた。今後は ROH 延長が観察された周辺の遺伝子について調査を進め、認知機能との関連を考察する予定である。

E. 結論

本研究では新規に mRNA およびマイクロ RNA の発現量を用いたネットワーク解析手法を提案し、実データを用いてアルツハイマー病に関連したキー遺伝子を推定した。

さらに、約 2,000 検体の健常者とアルツハイマ

ー病患者の SNP アレイデータを用いて日本人集団における ROH の長さを健常者群とアルツハイマー病患者群で比較解析を行い、アルツハイマー病患者群で統計的に有意に ROH が長い傾向があることを見つけた。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

菊地正隆, 中谷明弘 (2017) バイオインフォマティクスを活用したアルツハイマー病病態解析. *分子精神医学* 第 17 巻第 2 号

Norikazu Hara, Masataka Kikuchi, Akinori Miyashita, Hiroyuki Hatsuda, Yuko Saito, Kensaku Kasuga, Shigeo Murayama, Takeshi Ikeuchi, Ryoza Kuwano (2016) Serum microRNA miR-501-3p as a potential biomarker related to the progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 5(1):10.

菊地 正隆, 原 範和, 中谷 明弘, 池内 健 (2016) アルツハイマー型認知症の遺伝子解析とバイオインフォマティクス. *Pharma Medica* 第 34 巻第 7 号

2. 学会発表

The prediction method of deleterious variants for Alzheimer's disease using chromatin higher-order structure. Kikuchi M, Hara N, Hasegawa M, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T, and Nakaya A. The 7th BRI International Symposium 2017, Niigata, Japan (poster presentation).

アルツハイマー病感受性領域が近接する染色体領域の同定. 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 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (ポスター発表)

Identification of chromosomal regions interacting with susceptibility loci for Alzheimer's disease. Kikuchi M, Hara N, Hasegawa M, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T, and Nakaya A. Alzheimer's

Association International Conference (AAIC)
2016, Toronto, Canada (poster presentation).

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。

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⁾, 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には不明な点が多い。そこで本研究では、神経活動の自発的なゆらぎに着目し、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ことを目的とした。自由なタイミングで運動をおこなう条件と、対照条件として呈示された視覚刺激に応じて運動をする条件の2条件の実験課題をおこなっている被験者の脳活動を fMRI で計測し、事象関連デザインで解析をおこなった。その結果、複数の脳領域において、自由なタイミングでおこなう運動に先行して徐々に増加するような神経活動が、血流動態の遅れも考慮すると約 10 秒前から見られることがわかった。これは、‘自由意志’の神経基盤にかんする研究に新たな視点をもたらす結果であると考えられる。

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、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解明するため、脳活動の自発的なゆらぎに着目し、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）

「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」に的を絞り、運動のタイミングに関する意図に注目して検討した。被験者が利き手による掌握運動を2条件下でおこなっている際の脳活動を fMRI で計測し、条件間で比較した。自由なタイミングで運動をおこなう条件（free timing 条件）と、対照条

件として呈示される視覚刺激に応じて運動をする条件（cued timing 条件）を実施した。cued timing 条件で視覚刺激を呈示するタイミングは、free timing 条件で被験者が運動をおこなったタイミングのデータを使用し、2条件で運動の回数とタイミングが完全に一致するようにした。どちらの条件も撮像時間は 10 分間とした。得られたデータは動きの補正と標準化をおこなったのち、パーセントシグナルチェンジに変換し、ベースラインは 10 分間の信号の平均とした。運動のタイミングの 15 秒前から 15 秒後までを切り出し、条件ごとに加算平均した。free timing と cued timing の差分の t 値のマップを作成し、運動の前から活動している領域があるかどうかを調べた。また、各脳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。

本研究は新潟大学倫理委員会による承認を受けて実施した。

C. 研究結果

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、補足運動野、楔前部、右の下頭頂小葉、右の中前頭回/下前頭回、島皮質、視覚野、聴覚野であった。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る。

D. 考察

本研究の結果から、複数の脳領域において、自由なタイミングでおこなう運動に先行する自発的な神経活動が見られることが分かった。そして、感覚野の活動までもが関与していたのは興味深い結果といえる。外因的な行動では感覚野への外部刺激の入力が行動開始のきっかけとなるのと同様に、自由な意図に基づく内因的な行動では感覚野におけるランダムな神経活動が蓄積することが行動開始のきっかけとなっている可能性がある。また、このような活動が、‘自由意志’研究の指標として広く知られている‘運動準備電位’によって示されているよりもずっと早くから始まっていたことも、今後の研究方針に影響する知見である。

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蓄積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補足運動野など単独の領域が発生源になっているというよりは、動的なネットワークを形成して機能する脳のシステムの中から生じてくることを示唆していると考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

投稿準備中

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 第 6 回 生理

研-霊長研-脳研 合同シンポジウム、「事象関連 fMRI による自由な意図の神経基盤の検討」、新潟、2017 年 3 月 9 日

- ・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 第 29 回 臨床 MR 脳機能研究会、「内因性の意図に基づく運動に先行する神経活動」、東京、2017 年 4 月 8 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

リン酸化 α シヌクレイン陽性構造物を多く認めたダウン症例解析 を中心としたリン酸化 α シヌクレイン陽性構造物発現メカニズムの探索

研究代表者 赤津 裕康¹⁾
研究分担者 池内 健²⁾, 橋詰 良夫³⁾, 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

アルツハイマー病(AD)脳では老人斑と神経原線維変化を認めるが、極めて病変が高度な症例では扁桃核に多くリン酸化 α シヌクレイン(pSNCA)陽性構造物を認める。今回、高齢にて死亡したダウン症例(DS)においてpSNCA陽性構造物を大脳全体に多数認めた。本症例と同様に高齢で死亡したがpSNCA陽性構造物を認めない症例との比較解析を中心に、末期ADの扁桃核、pSNCA陽性構造物を多く認めるレビー小体型認知症症例なども加え遺伝学、蛋白質化学を中心に比較検討しpSNCA陽性構造物形成の機序解明を目指す。

A. 研究目的

リン酸化 α シヌクレイン陽性構造物はパーキンソン病(PD)、レビー小体病(LBD)などの脳内で主にレビー小体内の構成成分として沈着を認める。またLBDは一定の割合でアルツハイマー病病理を認めることがある。一方、アルツハイマー病(AD)脳では老人斑と神経原線維変化を認めるが、極めて病変が高度な症例では扁桃核に多くリン酸化 α シヌクレイン(pSNCA)陽性構造物を認め、pSNCA陽性構造物の形成過程にAD病変が関係している可能性が考えられていた。高齢にて死亡したダウン症例(DS)解剖例サンプルを保持しているが、pSNCA陽性構造物大脳全体に多数認めた症例が1例ある。本症例を中心として遺伝学、蛋白質化学を中心に比較検討することでpSNCA陽性構造物の形成に関する有用な情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

Sample

i) 福祉村病院にてDSで入院しており病理解剖となりAD病変の他著しいSNCA陽性構

造物を認めた症例1例

- ii) 死亡年齢とApoE genotypeが上記症例と一致する福祉村病院で病理解剖にてAD確定診断のついた症例数例
 - iii) 死亡年齢とApoE genotypeが上記症例と一致する福祉村病院で病理解剖にてDLB確定診断のついた症例数例
 - iv) 死亡時年齢が近い福祉村病院で解剖となったDS症例1例
- の4症例

方法:

上記4例のAD関連遺伝子、SNCA遺伝子配列解析、発現遺伝子解析、発現蛋白解析、代謝産物解析を形態学、生化学、分子生物学、質量分析的な手法を用い網羅的に行う。遺伝子解析においては、Affymetrix SNP6.0を用いた網羅的ジェノタイピングを行い、APP, SNCAを含めた遺伝子のコピー数の網羅的な解析を行う。

C. 研究結果

発端となった福祉村病院でのDown症例に関し

ては APP gene dosage 上昇 (3 コピー), APOE genotype 3*4, SNCA gene dosage 正常 (2 コピー) で α シヌクレインの生化学的解析では従来のレビー小体を構成する α シヌクレインと同様の神経細胞蓄積型であった。

D. 考察

α シヌクレインの蓄積においてアルツハイマー病理との関連性が注目されている。今回はダウン症でも APOE3/4 type での症例であったために脳全体に α シヌクレインの蓄積が認められた可能性がある。今後、他の高齢発症ダウン症での検索等も進めて α シヌクレイン蓄積のメカニズムの解明を行っていきたい。

E. 結論

今回の症例でアルツハイマー病理と α シヌクレイン蓄積のメカニズムの関係を示唆する遺伝子解析結果となった。今後、さらに α シヌクレイン蓄積メカニズムに関してアルツハイマー病理との関連性に着目しさらに症例を増やしてその関係性の解明を行う。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Vu HT, Akatsu H, Hashizume Y, Setou M, Ikegami K. Increase in α -tubulin modifications in the neuronal processes of hippocampal neurons in both kainic acid-induced epileptic seizure and Alzheimer's disease. Sci Rep. 2017 Jan 9;7:40205.

1) Manabe T, Mizukami K, Akatsu H, Hashizume Y, Teramoto S, Nakamura S, Kudo K, Hizawa N. Prognostic Factors Related to Dementia with Lewy Bodies Complicated with Pneumonia: An Autopsy Study. Intern Med. 2016;55(19):2771-2776.

2. 学会発表

1) 橋詰良夫、赤津裕康、小川倫弘、兼坂岳志、谷口知恵、園田尚子
70歳で認知症を発症、著明な側頭葉委縮を示した76歳女性

臨床神経病理懇話会 2016年11月20日年 大阪 大阪大学

2) 遠山育夫、下濱俊、Beach Thomas, 赤津裕康、小西義弘

The expression and localization of alpha-chimerin in the brain of Alzheimer's disease and control cases

第57回日本神経病理学会総会学術研究会 2016年6月1~3日 弘前市 ホテルニューキャッスル

3) 赤津裕康、金森哲子、櫻井圭太、山本左近、大原弘隆、桑野良三、松川則之、吉田眞理、長谷川成人、池内 健、村山繁雄、橋詰良夫

大脳皮質広範に α -シヌクレイン陽性構造物を認め58歳にて死亡したAPOE3/4型であったダウン症例

第57回日本神経病理学会総会学術研究会 2016年6月1~3日 弘前市 ホテルニューキャッスル

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

精神疾患病態解明のための死後脳組織を用いた 分子遺伝学的解析および画像解析

研究代表者 富田 博秋¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾、伊藤絢子²⁾、村山繁雄³⁾、國井泰人⁴⁾、齋藤祐子⁵⁾、
吉田真理⁶⁾、兪志前¹⁾、小野千晶¹⁾、菊地淑恵¹⁾

- 1) 東北大学災害科学国際研究所 2) 新潟大学脳研究所
3) 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・高齢者ブレインバンク
4) 福島県立医科大学 神経精神医学講座 5) 国立精神・神経医療研究センター
6) 愛知医科大学加齢医学研究所

研究要旨

精神疾患の病態を解明する上で、有効なアプローチとして精神疾患罹患者の死後脳に特有の遺伝子転写物の発現量変化の特定と精神疾患の罹患感受性と相関のある DNA 多型の特定が精力的に行われている。これらの精神疾患特有の変化や多型の違いはさらに脳の構造・機能に影響を及ぼしていると推測される。本研究は、多型-脳画像の相関情報と多型-死後脳組織遺伝子発現相関解析を統合することで、精神疾患の病態解明の基盤情報となる遺伝子多型の脳領域特異的遺伝子発現調節を介した脳構造機能への影響を体系的に解析し、情報の集積・整理を行うことを目指す。本年度は相関解析を行う上で、基礎となる死後脳組織のクオリティーコントロール(QC) 評価を行った。また、QC 評価の重要項目の 1 つである組織の pH 測定に関しては組織使用量を最小限にするため、一般的に使用されている量の 10 分の 1 の微量な組織量での検証も行い、一般的な方法との高い相関性を示していることが分かった。

A. 研究目的

精神疾患の病態に関わる遺伝子の多型が脳領域特異的に転写物の発現量を調節し、脳構造機能に及ぼす影響については体系立った解析、情報の集積がなされてきていない。そこで、本研究は脳領域特異的な遺伝子発現、単一塩基多型(SNP)および DNA メチル化を解析し、多型-脳画像相関解析データと統合することで精神疾患の形成・進行及び脳萎縮に関わるとされる遺伝子多型の分子遺伝学的機序を解明し、治療法・予防法の開発に繋げることとした。

本年度は死後脳を用いた遺伝子発現解析を精緻に行う上で重要である死戦期の脳内変化が脳組織

および転写物発現量に及ぼす影響を評価しコントロールを行うため、提供を受けた死後脳組織の内、十数 mg の微量な死後脳組織を用い、pH 測定を行い、通常の pH 測定計との再現性も検証し、さらに同組織由来の RNA のクオリティーチェックを行い、精神疾患病態に関わる遺伝子の多型-遺伝子発現-脳画像の相関解析のための基盤整備を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1) 対象検体

新潟大学脳研究所および福島県立医科大学(精神疾患死後脳・DNA バンク)から提供を受けた死後脳組織検体

- ①健常者（前頭前野(灰白質/灰白質領域)または後頭葉(灰白質領域));各 25 例 計 3 部位 100mg~300mg
②統合失調症罹患者（前頭前野(灰白質領域));各 19 例×200mg

2) 死後脳組織の pH 測定

①一般的な組織量を用いた pH 測定

ドライアイス上で組織(前頭前野灰白質)を約 100mg を 1.5 または 5mL tube に分取し、組織量の 10 vol (約 1000 μ L) の nuclease water 中で Biomasher nipi POM (speed"2")を用い 60 秒ホモジナイズを行った。ホモジナイズした組織を常温 (20-22 $^{\circ}$ C) に戻し、3 点校正を行った pHMETER F52 (HORIBA 電極;LAQUA9615)を用いて測定した。

②微量組織を用いた pH 測定

ドライアイス上で組織を約 10mg を 0.2mL tube に分取し、組織量の 5 vol (約 50 μ L) の nuclease water 中で 10 秒間氷上で、Biomasher nipi POM (speed"2")でホモジナイズを行った。ホモジナイズした組織を常温 (20-22 $^{\circ}$ C) に戻し、3 点校正を行った FE20FiveEasy pH (METTLER TOLEDO ; 電極; InLob Ultra micro)を用いて測定した。

- 3) 検体組織からの DNA および RNA 抽出
提供を受けた組織検体から QIAGEN 社の AllPrep DNA/RNA Mini Kit を用いて DNA・RNA・タンパク質の抽出を行った。

4) RNA のクオリティーチェック

Agilent 社 Bioanalyzer 2100 を用いて、抽出した RNA の退縮の程度(RIN, rRNA ratio (28S/18S))を評価した。

本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で審査および承認を受け、本研究を実施することについては研究機関の長による承認を得て行っている。

C. 研究結果

新潟大学脳研究所および福島県立医科大学(精神疾患死後脳・DNA バンク)から提供を受けた健常

者死後脳検体 25 例の前頭前野 (2 領域 ; 灰白質/白質) および後頭葉組織の QC 評価を行った

①pH 測定

前頭前野灰白質を対象に微量 pH 測定系と一般的な測定法の相関の validation を行った。その結果、既存の測定法での pH は平均 6.255 (5.56-7.186) と微量測定法では 6.275 (5.48-7.32) であった。既存の測定法と微量測定法は高い相関 ($R=0.923$) を示した。また、部位ごとに関しては前頭前野灰白質と白質の pH の相関は高く $R=0.896$ であった。一方、後頭葉灰白質と前頭前野灰白質および白質の相関は低く、 $R=0.472/0.382$ であった。

②組織由来 RNA のクオリティーチェック

死後脳組織より抽出した total RNA の退縮を測定した結果、RIN 値の平均は 7.86 (9.8-1.2) rRNA 比 (28S/18S)は 2.58(0-5.71) であった。RIN 値と rRNA 比間の相関は 0.205、pH と RIN 値間では 0.301、pH と rRNA 比間では、-0.206 と低い値を示した。

D. 考察

重要な QC 評価項目の 1 つである組織の pH 測定に関しては一般的な pH 測定方法と微量な組織量で測定法の検証を行った結果、高い相関性を示し、微量測定法の高い正確性が認められた。さらに今後、多型-死後脳組織遺伝子発現相関解析を行うにあたり必要な対象となる死後脳組織の QC 情報が得られた。

E. 結論

本研究により、最小限の組織使用量で QC 情報を取得する事ができた。今後、多型-脳画像の相関情報と多型-死後脳組織遺伝子発現相関解析を統合のため、本死後脳検体の多型解析、遺伝子発現解析を行う。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

Tissue pH evaluation of human postmortem brain tissue and identification of pH- and RNA integrity-sensitive gene

expression profilings ~for effective quality control in postmortem brain gene expression profilings~ C Ono, Z Yu, Y Kikuchi, Y Kasahara, Y Kunii, A Kakita, S Niwa, H Tomita. The 2017 Japan-NIH joint Symposium 2017年2月 仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

GluD2 と平行線維シナプス再生に関する共同研究

研究代表者 渡辺 雅彦 1)
研究分担者 崎村 建司 2)

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

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ている。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、この分子が平行線維シナプスの発達期における形成と成体期における維持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。一方、成熟した中枢神経系では損傷軸索の再生はほとんど起こらないが、例外的に平行線維シナプスだけは高い再生能を持つことも知られていた。本研究プロジェクトでは、新潟大学において作成されたGluD2欠損マウスを共同研究として利用することにより、平行線維シナプスの高い再生能がGluD2によるものであることを実験的に解明することができた。

A. 研究目的

成熟した中枢神経系では損傷軸索の再生はほとんど起こらないが、例外的に小脳平行線維シナプスだけは高い再生能を持つことが古くより知られていた。本共同研究プロジェクトでは、新潟大学において作成されたGluD2欠損マウスを利用し神経解剖学的に解析することにより、小脳平行線維シナプスの高い再生能がこのシナプスに発現するGluD2によるものであることを実験的に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）

野生型およびGluD2欠損マウスの小脳に、メスを用いた外科的損傷を与え、その1日後、7日後、30日後におけるシナプスの変性と再生過程を比較検討する。ここでは、プルキンエ細胞に入力する平行線維シナプス、登上線維シナプス、抑制性シナプスをVGluT1標識、神経トレーサー標識、VIAAT標識による光学顕微鏡解析と、連続電子顕微鏡切片を用いた3次元立体再構築解析を行ない、プルキンエ細胞に入力するこれらのシナプスの再生過程を経時的に明らかにする。

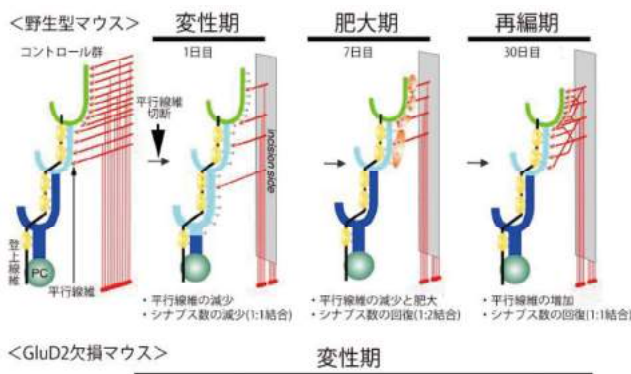
C. 研究結果

野生型マウスでは、次の3つの段階を経て平行線維と平行線維シナプスが再生することが判明した（参考図）。

1. 変性期：受傷後1日目、平行線維及び平行線維シナプスの数はどちらも半分以下にまで減少した。これは、小脳の島外から投射していた平行線維が切断により変性し、島内からの投射線維は切断から免れ残存していることを意味する。
2. 肥大型：受傷後7日目においても平行線維数は半減以下に減少したままであったが、残存している平行線維が著明に肥大した。コントロール群では一つの平行線維終末は一つのシナプスだけを形成する1:1結合であるのに対して、肥大した平行線維終末は平均2個のシナプス（1:2結合）を形成するようになった。その結果、平行線維シナプス数が増加し、コントロール群と同じレベルにまで回復した。これは、再生の初期段階は、残存している平行線維が形

態を変化させ、結合比を増大させることでシナプス再生を行っていることを物語る。

3. 再編期：受傷後 30 日目になると、残存していた平行線維から側枝が発芽して伸長し、平行線維数もコントロール群の 70%以上までに回復した。さらにm平行線維の肥大化も解消し、シナプスの結合比も 1 : 1 に戻った。これは、再生の後期段階では平行線維自体も再生することで、平行線維シナプスが数的にも形態学的にも受傷前の状態に回復することを物語る。
- 一方、GluD2 欠損マウスでは、肥大型や再編期に見られる再生に向けた変化が全く起こらず、平行線維と平行線維シナプスは変性期の状態のまま続いていた。



D. 考察

上記の研究成果は、平行線維・プルキンエ細胞シナプスに選択的な GluD2 がmこのシナプスに高い再生能力を賦与していることを示している。最近、小脳以外の脳領域では、グルタミン酸受容体 GluD2 と類縁分子である GluD1 が特定のシナプス回路に選択的に発現していることがわかりつつある。今後、中枢神経系における軸索再生能力の有無やその性質の違いを GluD ファミリー分子の発現との関係において解明できれば、新たな軸索再生への糸口が見つかる可能性がある。

E. 結論

これまでの研究を通して、平行線維シナプスに選択的な GluD2 は発達期のシナプス形成、成体期における回路維持、変性後のシナプス再生の全ての局面において重要な役割を果たしていること意味する。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Ichikawa R, Sakimura K, Watanabe M: GluD2 endows parallel fiber–Purkinje cell synapses with a high regenerative capacity. *J Neurosci*, 36:4846-4858. 2016.

2. 学会発表

Watanabe M, Ichikawa R: mGluR1 sculpts heterologous inputs to cerebellar Purkinje cells. 8th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors. Sicily (Italy), September 28-October 3, 2014.

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

脳内アミロイド 42 蓄積を血液バイオマーカーでスクリーニングする方法の 開発

研究代表者 大河内 正康¹⁾
研究分担者 田上 真次¹⁾, 春日 健作²⁾, 池内 健²⁾

1) 大阪大学大学院医学系研究科 精神医学教室 2) 新潟大学・脳研究所

研究要旨

アルツハイマー病脳内には例外なくアミロイド 42(A β 42)が蓄積している。アミロイド PET を用いた解析で、この蓄積は発症の 10 年以上前から認められることが示唆されている。アルツハイマー病の発症を未然に防ぐには、脳内 A β 42 の蓄積をいち早くスクリーニングしたり、将来的に A β 42 が蓄積するリスクが高いものを検出する方法を開発しなければならない。我々は脳内 A β 42 産生割合を反映する脳脊髄液中および血液中のサロゲートマーカーの開発に成功した。本研究ではすでに認知症を発症した臨床検体のみならず、MCI, SCI なども含め数多くの脳脊髄液および血液検体を解析し、A β 42 蓄積を検出することができるかどうかを検討する。

A. 研究目的

アルツハイマー病脳内には例外なくアミロイド 42(A β 42)が蓄積している。アミロイド PET を用いた解析で、この蓄積は発症の 10 年以上前から認められることが示唆されている。これをできるだけ早期に検出し、脳内 A β 42 を排除するかその産生を阻害することでアルツハイマー病の発症を遅延させることが可能と考えられる。このためには血液を用いたスクリーニング検査の確立が重要である。今回我々は、新潟大学脳研究所および大阪大学医学部附属病院などのアルツハイマー病患者血液検体、軽度認知機能障害や主観的認知機能障害など認知症発症前の検体中の脳脊髄液および血液中 A β 42 サロゲートマーカーを測定する。そして脳脊髄液中および血液中 A β 42 サロゲートマーカー値がアルツハイマー病患者や軽度認知機能障害で非認知症に比べて変化しているかどうか、および既存の AD バイオマーカーである脳脊髄液中 A β 42 比やタウ蛋白などどのように関連しているのかを検討する。さらに可能であれば、検体提供者を縦断的に観察し、脳内 A β 42

蓄積のどれくらい前から脳脊髄液中および血液中 A β 42 サロゲートマーカー値が上昇しているかどうかを検討する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

臨床的にアルツハイマー病と診断された検体 500 例以上、非認知症検体 500 例以上の検体中の血液中 A β 42 サロゲートマーカー(ALP1 β 28 値を測定することを目標とする。血液約 1mL を抗 ALP1 β 抗体を用いて免疫沈降し、その後有機溶媒などを用いて抗体と血中のペプチドを解離させる。Stage tip を用いて検体を精製し、血液中去くわずかに存在する脳内 ALP1 β 28 ペプチド 3 分子種の値(ALP1 β 28, 27, 25)を LC/MS/MS 法を用いて AB Sciex Q-Trap6500 型質量分析装置で測定する。そして総 ALP1 β 中の ALP1 β 28 の割合を算出する。現時点では 1 日に約 10 検体を解析することが可能である。尚、CSF 中の ALP1 β に関しては、市販の ELISA kit を用いて測定することが可能である。

臨床検体を用いた検討に関して、既に「新規細胞外アミロイド β (A β)様ペプチド群をアルツハイマー病発症前マーカーとして利用できるかについての検討」の課題名で大阪大学医学部附属病

院倫理委員会の承認を得ており、これに則って研究を進めた(承認番号 07176-6)。本研究は臨床サンプルを活用した血液バイオマーカー研究であるから、厚生労働省ほか国が定める「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成16年、文部科学省、厚生労働省告示第1号)」を遵守した。本研究開発に含まれる血液サンプル解析では、すべて匿名化(連結可能)を行い、被験者のプライバシーを保護する。サンプルやデータの提供は被験者の善意に基づくものであることに留意し、提供されたサンプルおよび個人情報 は厳重に管理した。

C. 研究結果

本年度は新潟脳研を含む複数の施設から供与を受けた血漿、CSF ペアード検体(AD および AD が疑われる 29 症例、MCI29 症例、iNPH および iNPH が疑われる 29 症例、非認知症など 22 症例、その他計 119 例の解析を重点的に行った。まず CSF 検体に関して、CSF 中の A β 42 比と ALP1 β 28 比の間には負の相関が認められた(全症例の R=0.40)。この結果は“脳内 A β 42 産生比が高ければ高い程、A β 42 が脳に蓄積しやすい”ことを示唆している。

さらに興味深いことに、CSF 中の総タウ蛋白量或いはリン酸化タウ蛋白量と ALP1 β 28 比の間には、正の相関が認められた(各々、R=0.56, 0.67)。この結果は“脳内 A β 42 産生比が高ければ高い程、神経細胞に障害を来しやすい”ことを示唆するのではないかと考えている。重要なことに、CSF 中の A β 42 比が正常な症例、つまり脳内にまだアミロイド病変が形成されていないと推測される症例群においても、CSF 中の総タウ蛋白量と ALP1 β 28 比の間には、正の相関が認められた。もしこれらの症例を縦断的に観察することが出来れば、CSF 中の ALP1 β 28 比を調べることで、将来の AD 病変の形成を予測することが可能となるかも知れない。

一方、血漿検体に関しては現在のところ、脳内アミロイド病変を有すると推定される群(CSF 中 A β 42 比が 0.07 未満)ではそうでない群に比べて、血漿中の ALP1 β 28, 27, 25 いずれの分子種の量も有意に低いという結果が得られている。

D. 考察

CSF A β 42 のサロゲートマーカーである CSF ALP1 β 28 の解析で、“脳内 A β 42 産生比が高ければ

高い程、A β 42 が脳に蓄積しやすい”こと、および“脳内 A β 42 産生比が高ければ高い程、神経細胞に障害を来しやすい”ことが示唆された。また、脳内にアミロイド病変があると、CSF から末梢血へ ALP1 β の移行が減ることが示唆された。

E. 結論

CSF 中の ALP1 β 28 比は、脳内アミロイド病変および A β 42 による神経細胞障害を予測する prediction biomarker として有用である可能性がある。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Identification of Small Peptides in Human Cerebrospinal Fluid upon Amyloid- β Degradation. Naoki Mizuta Kanta Yanagida Takashi Kodama Takeshi Tomonaga Mako Takami Hiroshi Oyama Takashi Kudo Manabu Ikeda Masatoshi Takeda Shinji Tagami Masayasu Okochi. *Neurodegener Dis* 2017;17:103-109

2. 学会発表

1. Disease Modifying therapy of Alzheimer's disease in the near future - from the aspect of psychological frailty- Shinji Tagami

The 18th International Congress of Oriental Medicine 2016

Okinawa Convention Center Room B1, April 17, 2016

2. A brain-derived A β 42 surrogate marker in peripheral blood Shinji Tagami, Kanta Yanagida, Takeshi Tomonaga, Takeshi Ikeuchi, Masaaki Waragai, Masatoshi Takeda, Manabu Ikeda, Masayasu Okochi. Neuroscience meeting 2016, Nov. 14 2016, San Diego USA

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

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 國井 泰人¹⁾ ³⁾

研究分担者 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⁾, 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

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 hybridisation 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

年齢、性別、死後時間をマッチさせた統合失調症死後脳 19 例、健常対照死後脳 21 例の凍結脳サンプルの前頭前皮質(BA10)および側坐核について vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), epidermal growth factor receptor (EGFR)、Akt1、リン酸化 Akt1 (Ser473)、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、リン酸化 ERK1/2 (Thr185/Tyr187)、glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)、リン酸化 GSK3 β (Ser9)、および cAMP response element binding protein (CREB)の蛋白質発現量を Bead-Based Multiplex Immunoassay (Luminex システム)により多項目同時測定した。さらに統合失調症群と対照群間で発現量の差がみられた VEGFR2 については、発現量と生前の臨床症状スコアとの関連について、またその遺伝子多型と各蛋白質の発現量、統合失調症発症の有無との相関を解析した。同時多項目測定の結果、VEGFR2 が統合失調症群の前頭前皮質において有意に減少していた。統合失調症群において前頭前皮質の VEGFR2 発現量と生前の陽性症状スコアの間には負の相関がみられた。また、統合失調症群の前頭前皮質ではリン酸化 Akt1 が増加していた。遺伝子多型解析の結果、VEGFR2 遺伝子の多型(rs7692791)は Akt1 の発現量と ERK1/2 および Akt1 のリン酸化レベルを予測することが示された。また VEGFR2 遺伝子の 2 多型(rs17709898 および rs1870377)が統合失調症と相関していた。

また新たに、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。これらの試料を用いて、神経伝達システム関連分子、微小循環・慢性炎症関連分子、細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子について解析を行うのに先立ち、少数のサンプルを用いて上記分子について予備的検討を行ったところ、数種類の分子が統合失調症群で異常な傾向を示した。

D. 考察

E. 結論

VEGFR2 は細胞外からの血管増殖刺激を Akt シグナル伝達系に伝える因子であることから、統合失調症群の前頭前皮質の VEGFR2 発現量低下は統合失調症の病因が微小血液循環の異常にあるとする仮説を説明するものと考えられる。

今後は、新たに準備できた統合失調症脳 24 例、双極性障害 7 例、健常群 31 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、微小循環・慢性炎症関連分子、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

Hino M, Kunii Y, Matsumoto J, Wada A, Nagaoka A, Niwa S, Takahashi H, Kakita A, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Yabe H. Decreased VEGFR2 expression and increased phosphorylated Akt1 in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2016;82:100-8.

2. 学会発表

(国内学会)

長岡敦子 國井泰人 松本純弥 日野瑞城 宮川哲平 飯田聡 山崎繁 矢部博興：幻聴体験の分子メカニズムを考えるー抗 EGFR 抗体、抗 VEGF 抗体の投与後に一過性の対話性幻聴を呈した一例. 第 38 回 日本生物学的精神医学会,福岡,2016/9/9

國井泰人：若手研究者育成プログラム・プログレスレポート, 精神疾患死後脳を用いたジェネティックニューロパソロジーの展開. 第 38 回 日本生物学的精神医学会,福岡,2016/9/9

長岡敦子 國井泰人 松本純弥 和田明 日野瑞城 丹羽真一 那波宏之 高橋均 柿田明美 赤津裕康 橋詰良夫 山本左近 尾関祐二 矢部博興；死後脳内において高頻度にコピー数多型(CNV)が観察された統合失調症 3 症例

の臨床的特徴について. 第 12 回日本統合失調
症学会,鳥取,2017/3/25

(国際学会)

Yasuto Kunii, Mizuki Hino, Junya
Matsumoto, Akira Wada, Atsuko Nagaoka,
Shin-ichi Niwa , Yuichi Yokoyama , Hiroyuki
Nawa, Hitoshi Takahashi, Akiyoshi Kakita,
Hiroyasu Akatsu, Yoshio Hashizume, Sakon
Yamamoto, Hirooki Yabe; Alternations of
DARPP-32 and Calcineurin protein
expressions in the prefrontal cortex and
nucleus accumbens of schizophrenia and
bipolar disorder and genetic associations
with their expressions. 46th Society for
Neuroscience Annual
Meeting, San Diego, CA, USA, 2016/11/15

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。

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 丹治 邦和¹⁾

研究分担者 三木 康生¹⁾, 森 文秋¹⁾, 柿田 明美²⁾, 高橋 均³⁾, 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 脳疾患リソース解析部門 3) 新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

パーキンソン病、レビー小体型認知症や多系統萎縮症では、 α シヌクレインタンパク質の異常凝集が共通の病態として認められ、「シヌクレイノパチー」と総称される。シヌクレイノパチーのタンパク質異常蓄積には分解システムの障害が関与しており、実際に我々を含めた複数のグループがヒト剖検脳を用いてオートファジーやプロテアソームの質的・量的変化を示してきた。今回、オートファジーを調節している上流分子群についてさらなる検討を行った。また、治療の観点から脳内オートファジーの活性化および可視化を進めている。将来、可視化技術を用いて脳内オートファジー活性化剤のスクリーニングを進めていくと同時に、新たに作製した多系統萎縮症のマウスモデルを用い、シヌクレイノパチーの病態を改善する治療法に結び付ける。

A. 研究目的

レビー小体病（パーキンソン病、レビー小体型認知症）と多系統萎縮症（MSA）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）を特徴とする神経難病であり、その進行を遅延・阻止する治療法は確立していない。我々はこれまでにヒト凍結脳組織を用いた検討などから、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。実際に、MSA および正常対照のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて網羅的にマイクロ RNA (miRNA) の変動を検討したところ、複数のタンパク質分解システム関連分子群が変動している可能性を得た。昨年度に引き続き本年度は以下の二点を目的として研究を遂行した。

1. miRNA 解析によって同定された分子群、特にオートファジー上流分子と病態との関連性
2. オートファジー活性化を検出する可視化技術

の開発

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. ヒト剖検脳を用いたタンパク質分解システム関連分子群の病理学的解析

細胞内のタンパク質分解系、特にオートファジーを調節している分子群に対する抗体を用い、神経変性疾患の剖検脳組織を免疫組織化学的に解析した。

2. マウスを用いた『オートファジー活性化・可視化』技術の改良

オートファジーはカロリー制限、飢餓状態、さらには種々の薬物により活性化される。既に我々を含む複数のグループによって、脳内のオートファジーは天然二糖のトレハロースによっても活性化されることが確認されている。今年度はより効果的な脳内オートファジーの活性化手法を模索すると同時にオートファジー可視化技術の改

良を目指した。活性化のスクリーニングにはオートファゴソーム膜可視化マウス (GFP-LC3 マウス) を用いた。運動にはトレッドミル (10 m/min、40 分間、角度 10 度) を用いた。運動後、マウスを解剖し、病理学的、生化学的に解析した。

本研究における動物実験計画は、弘前大学動物実験委員会により承認され、弘前大学実験動物に関する指針に遵って行った。遺伝子組み換え動物使用に当たっての拡散防止処理を踏まえ、組み換え DNA 実験に関し弘前大学動物倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. タンパク質分解システム関連分子群の病理学的解析

昨年度レビー小体病においてオートファゴソーム膜形成の調節分子群と病態との関連性を報告した。その中でも特に AMBRA1 は、レビー小体やレビーニューライトに特異的な染色像を示したことから、MSA における AMBRA1 の関与を検討した。その結果、AMBRA1 は MSA 患者脳で有意に増加しており、グリア封入体や神経細胞内封入体に局在していた (図 1)。興味深いことに、AMBRA1 は正常の α シヌクレインと比べてリン酸化 α シヌクレインと強い親和性を有していた (約 9 倍)。さらにオートファジー可視化マウス由来の初代神経細胞を用いて AMBRA1 をノックダウンすると、 α シヌクレインの異常凝集が認められた。

2. マウスを用いた『オートファジー活性化・可視化』技術の改良

マウスに天然二糖のトレハロースを経口投与すると、効率よく脳内のオートファジー (特に海馬および大脳皮質の錐体細胞) を誘導することを昨年度に報告した。今年度はトレハロース給水投与と同時にトレッドミルによる運動を並行した。しかし、レビー小体病モデルマウスの病理学的・生化学的検討からは異常分子を分解するほど強い効果は認められなかった。現在、脳の透明化技術を通して、より効率的な脳内オートファジー誘導方法を改良中である。

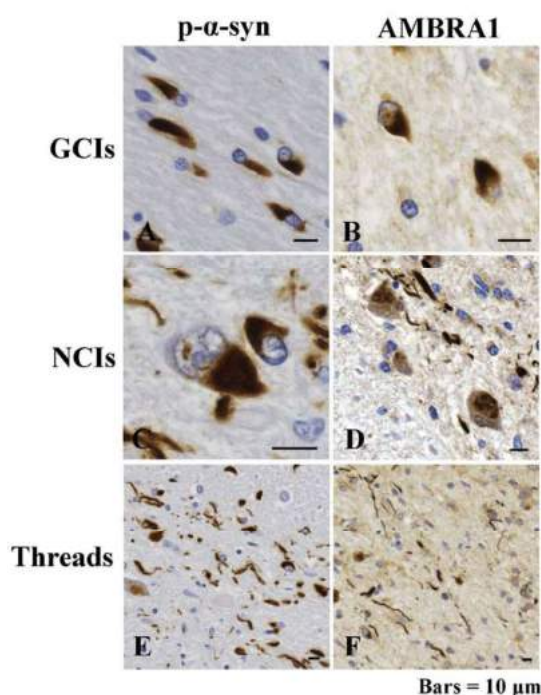


図 1 MSA 患者脳におけるリン酸化 α シヌクレインと AMBRA1 の染色像 グリア封入体 (GCIs) や神経細胞内封入体 (NCIs) および Threads にリン酸化 α シヌクレインと AMBRA1 が局在している。

D. 考察

細胞内のタンパク質分解システム (オートファジー・リソソーム系、ユビキチン・プロテアソーム系) はシヌクレイノパチーの病態と密接に関連している。今回 MSA で見出した AMBRA1 の病理学的・生化学的変化はこれまでの事実を裏付けるものである。一方、新知見を治療に結びつけるためには新たな技術や視点が必要である。オートファジーは本来生体に備わっているシステムであり、天然糖質で活性化できることからシヌクレイノパチーの病態を改善できる可能性がある。今回、運動を並行することでより効果的な脳内オートファジーの活性化を目指した。しかし残念ながら、その効果は凝集物を除去できるほど強くないため、より効果的な手法が望まれる。

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変性疾患の病態解明および治療法の開発を視野に入れ研究を遂行した。脳内オートファジー活性化の手法を模索するために可視化技術を改良中である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

- [1] Miki, Y., Tanji, K., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H., Wakabayashi, K., PLA2G6 accumulates in Lewy bodies in PARK14 and idiopathic Parkinson's disease, *Neurosci Lett*, **645**, 40-45 (2017).
- [2] Nakamura, K., Mori, F., Tanji, K., Miki, Y., Toyoshima, Y., *et al.*, alpha-Synuclein pathology in the cranial and spinal nerves in Lewy body disease, *Neuropathology*, **36**, 262-269 (2016).
- [3] Nakamura, K., Mori, F., Kon, T., Tanji, K., Miki, Y., *et al.*, Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in subpial and periventricular astrocytes in multiple system atrophy of long duration, *Neuropathology*, **36**, 157-167 (2016).
- [4] Miki, Y., Tanji, K., Mori, F., Utsumi, J., Sasaki, H., *et al.*, Alteration of Upstream Autophagy-Related Proteins (ULK1, ULK2, Beclin1, VPS34 and AMBRA1) in Lewy Body Disease, *Brain Pathol*, **26**, 359-370 (2016).
- [5] Miki, Y., Tanji, K., Mori, F., Tataru, Y., Utsumi, J., *et al.*, AMBRA1, a novel alpha-synuclein-binding protein, is implicated in the pathogenesis of multiple system atrophy, *Brain Pathol*, (in press).
- [6] Ito, M., Nakamura, K., Mori, F., Miki, Y., Tanji, K., Wakabayashi, K., Novel eosinophilic neuronal cytoplasmic inclusions in the external cuneate nucleus of humans, *Neuropathology*, **36**, 441-447 (2016).

2. 学会発表

第57回 日本神経病理学会（2016年6月1-3日、弘前）

- 1) 三木康生、丹治邦和、森 文秋、内海 潤、佐々木秀直、柿田明美、高橋 均、若林孝一、

多系統萎縮症におけるオートファジー上流分子の異常

- 2) 丹治邦和、三木康生、丸山敦史、森 文秋、三村純正、伊東 健、神谷 哲、若林孝一。レビー小体病における synphilin-1 結合タンパク質 (NUB1) の役割
- 3) 森 文秋、三木康生、丹治邦和、豊島靖子、吉田眞理、佐々木秀直、柿田明美、高橋 均、若林孝一。ポリグルタミン病および核内封入体病におけるパラスペックル関連蛋白の免疫組織化学的検討
- 4) 中村桂子、森文秋、今智矢、丹治邦和、三木康生、富山誠彦、黒滝日出一、豊島靖子、柿田明美、高橋均、山田正仁、若林孝一、多系統萎縮症の軟膜下および脳室周囲アストロサイトにおけるリン酸化 α シヌクレインの蓄積

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
Cre-loxpシステムを利用したMSAモデルマウスの特許出願を予定。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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) 装置は非侵襲的脳機能解析の強力なツールであり、磁場強度が大きくなるほど、信号強度が増し、解析精度の向上が期待される。しかしながら、高磁場装置を用いた機能的 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て、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ている。

A. 研究目的

- ①脳賦活が 7T 緩和パラメータに与える影響を実測に基づいて精査し、fMRI 信号モデルを構築する。
- ②上記信号モデルに基づいて賦活成分の高分解能検出を実現するための撮像条件と解析法を探索する。
- ③神経科学的または心理学的に意義のある実験デザインのもとで 7T-fMRI の新しい方法論の有効性を検証する。
- ④生理学研究所と脳研究所の 7T 装置で fMRI の結果に差が生じないことを確認する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

先ず灰白質及びその周囲で高分解能 relaxometry を実施し、7T でのプロトンスピン緩和 (T1, T2, T2*) のベースラインを計測する。

次に高速撮像法を用いて安静下での緩和パラメータの時間変動を見積もり、賦活時の変化との比較から得られる情報をもとに信号成分モデルを作る。

また、relaxometry の結果を参考にして、時系列信号のサンプリング幅を理論的限界値まで短縮し、hemodynamic response function (HRF) の分離を試みる。得られた信号モデルをもとに、賦

活領域とその信号変化に対する specificity を最大化するような撮像条件とデータ解析法を探索する。

Hand motion task により当該高分解能 fMRI の有効性を確認した上で、より複雑な (高次の) 脳機能を対象とした実験を行う。

なお、MRI 撮像では被験者の権利保護と安全確保を最優先とする。

C. 研究結果

新潟大学倫理審査委員会に本研究の倫理審査を申請し、平成 28 年 10 月に、脳研究所統合脳機能研究センターに設置されている 7T-MRI 装置を用いて健常被験者の撮像を実施する事に関する承認が得られた。

これを受けて、3 名の被験者 (新潟大学の学部学生、インフォームドコンセントに基づく参加) による高分解能 relaxometry と安静時の信号変動解析を実施した。その結果、脳表に特異的な T1 およびプロトン密度分布が存在することを発見したが、T1 強調型 echo planar imaging の信号変動から従来の T2*強調型で得られる情報以上のものを得ることはできなかった。

D. 考察

脳表に特異的な T1 緩和はグリア境界膜 (glia limitans) の構造的特徴と整合する。その変化は脳賦活の情報を含む可能性があるが、今回の信号変動解析では、いわゆる flow 効果の分離ができなかったため、fMRI への応用には更なる検討が必要である。

E. 結論

脳表の T1 変化が賦活を反映する可能性が見えてきた。しかしながら、fMRI に応用するためには、flow をはじめとする confounding 因子をとり除いて、より直接的に解析する手法が必要である。本研究は次年度の継続が認められたため、有望な手段と考えられる steady state free precession (SSFP) 法による撮像および proton exchange との比較を計画している。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

T1 緩和とグリア境界膜との関連について論文をまとめている。

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

中枢神経原発悪性リンパ腫の再発時の遺伝子異常の検討

研究代表者 山中 龍也 1) 2)
研究分担者 藤井 幸彦 3)

- 1) 京都府立医科大学・医学部・保健看護学研究科医学講座
- 2) 京都府立医科大学・医学研究科・腫瘍分子標的治療学分野
- 3) 新潟大学・脳研究所・脳神経外科

研究要旨

中枢神経原発悪性リンパ腫の腫瘍組織から DNA を抽出し、高速シーケンス解析から初発時および再発時の疾患特異的な遺伝子異常を解析し、バイオマーカー開発、創薬に向けた研究を進める予定である。

A. 研究目的

中枢神経原発悪性リンパ腫 (PCNSL) の再発時の腫瘍組織を高速シーケンサーを用いたエクソーム解析を行い、再発時に新たにどのような遺伝子異常が集積してくるのか検討する。また、再発腫瘍が初発腫瘍と同一クローン由来かも検討する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

提供者を選ぶ方針及び目標数：

摘出術あるいは生検術を受け、病理組織学的検査結果から中枢神経原発悪性リンパ腫と診断された症例とする。症例数は 20 例とする。

試料等の種類・量：

腫瘍組織から DNA を抽出し解析に用いる。凍結組織を用いるのが望ましいが、ホルマリン固定組織のみの場合はホルマリン固定組織から DNA を抽出して解析を行う。

解析する遺伝子の種類と方法：

腫瘍組織から DNA を抽出して、illumina HiSeq を用いた全エクソーム解析を行う。

データ解析：

臨床情報は年齢・性別・治療法・無増悪生存期間・生存期間を含むものとする。遺伝子解析はスーパーコンピュータ解析を用いたデータ解析を行う。今回の解析では特に、初発時と再発時の遺伝子異常を比較し、どのような遺伝子異常が新たに集積するのか明らかにする。また、免疫グロブリン遺伝子の再構成を指標に再発時のクローンが初発時と同一のものか検討する。

C. 研究結果

現在、症例の選択、サンプル収集の段階である。

D. 考察

がんの基礎研究の進歩から、同じ病理組織型であってもその分子病態は個々の腫瘍ごとにかなり相違があることが明らかになってきた。そうした背景から、がんの薬物療法はバイオマーカーを用いて治療方法の選択がなされるようになってきている。がん治療はバイオマーカーによって効果の期待できる症例を選別することによる個別化医療が主流となると考えられて

いる。

PCNSL は中枢神経系に原発する節外性非ホジキン型リンパ腫で、多くはB細胞リンパ腫である。PCNSL はあらゆる年齢層に発生するが、50-60 歳代の高齢者に好発し、その頻度は最近増加している。本邦では現在、High dose Methotrexate (HD-MTX) 3.5 g/m² 化学療法3コース後、全脳放射線治療 (30-40 Gy) が広く行われている。その5年生存率は約30%、生存期間中央値は33-39.5か月とされている。

本治療法の問題点として整理してみると、

- (1) 生存率の向上が見られたが、全身性非ホジキン病と比べ治療成績は不良である。
- (2) 治療効果を予測するバイオマーカーがないため、画一的な治療が行われている。
- (3) 副作用として晩発性の神経毒性がある。
- (4) 多くは再発し治療抵抗性となり、新たな治療スケジュールの開発が待たれている。

実臨床では、PCNSL という臨床診断がなされると、前記にもあるような画一的な治療がなされるが、その予後は1年以内に再発し転帰不良となる症例から、10年以上にわたって寛解が得られる症例まで、治療に対する感受性は症例毎でかなりの相違がある。本研究により治療困難なPCNSLのバイオマーカーが明らかにされると、予後が不良と考えられる症例には造血幹細胞移植などを併用することにより強力な薬物療法を選択することなどから予後の改善が期待できる。このようにバイオマーカーを用いた個別化治療が確立され、治療成績の向上が期待できる。さらに、シーケンス解析から腫瘍特異的な遺伝子異常が明らかにされ、診断マーカーとしての発展、分子標的創薬が展開されることが期待される。

E. 結論

今後、高速シーケンサーを用いた解析から、遺伝子変異解析を行い、体系的な解析から標的分子を同定し、分子標的創薬を進める。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Nakajima S, Morii K, Takahashi H, Fujii Y, Yamanaka R: Prognostic significance of S-phase fractions in peritumoral invading zone analyzed by laser scanning cytometry in patients with high-grade glioma (preliminary study). ONCOLOGY LETTERS 11:2106-212, 2016.
2. Yamanaka R, Hayano A: Secondary glioma following acute lymphocytic leukemia: Therapeutic implications. Neurosurg Rev 2016 May 10. [Epub ahead of print]
3. Yamanaka R, Hayano A, Kanayama T: Radiation-induced gliomas: A comprehensive review and meta-analysis. Neurosurg Rev [Epub ahead of print]
4. Yamanaka R, Morii K, Shinbo Y, Sano M, Homma J, Tsuchiya N, Yajima N, Tsukamoto Y, Ogura R, Natsumeda M, Aoki H, Akiyama K, Saitoh T, Tamura T, Hondoh H, Kawaguchi A, Takahashi H, and Fujii Y : Late relapse of primary central nervous system lymphoma. Leukemia Lymphoma 58(2):475-477, 2017.
5. Yamanaka R, Morii K, Sano M, Homma J, Yajima N, Tsukamoto Y, Ogura R, Natsumeda M, Aoki H, Akiyama K, Saitoh T, Hondoh H, Kawaguchi A, Takahashi H, and Fujii Y : Long-term survivors of primary central nervous system lymphoma. Jpn J Clin Oncol 47(2), 101-107, 2017.
6. Yamanaka R, Hayano A, Kanayama T: Radiation-induced meningiomas: an exhaustive review of the literature. World Neurosurg 97:635-644,2017.
7. Yamanaka R, Hayano A: Radiation-induced sarcomas of the central nervous system: a systematic review. World Neurosurg 98:818-828, 2017.
8. Yamanaka R, Hayano A: Secondary craniofacial sarcomas following retinoblastoma: a systematic review. World Neurosurg [Epub ahead of print]

2. 書籍発表

1. Kanayama T, Hayano A, Yamanaka R: MICRORNAS REGULATION AND PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. PP 81-98, In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, 2016.
2. Yamanaka R: SALVAGE THERAPY FOR PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. pp 175-187, In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, 2016.
3. Yamanaka R, Yoshioka S, Fujimoto S, Iwawaki Y: LONG-TERM OUTCOME AND SUPPORTIVE CARE IN PATIENTS WITH PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. pp 285-291, In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, 2016.

2. 学会発表

1. Yoshida K, Yamanaka R and Ogawa S, et al.: Whole-Genome Sequencing of Primary Central Nervous System Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. 58th ASH Annual Meeting and Exposition. San diego, CA, December 3-6, 2016.

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

生体リズムの遺伝子改変マウスによる解析

研究代表者 岡村 均¹⁾
研究分担者 崎村 建司²⁾

- 1) 京都大学大学院薬学研究科・医薬創成情報科学・システムバイオロジー
- 2) 新潟大学脳研究所・基礎神経科学部門・細胞神経生物学

研究要旨

生体リズムは生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みであり、細胞の代謝や基本機能と密接にリンクしている。実際、哺乳類でも、リズムの本体を司る因子である時計遺伝子 Clock genes が発見された。時を刻む時計遺伝子の解析により、生体の時間装置は全身の細胞にあり、全身のリズムは、視床下部の視交叉上核 SCN の主時計により統括されることが解明された。臨床的研究より、生体リズムの異常は、時差、睡眠異常だけでなく、高血圧、発癌など生活習慣病に関係することが明らかである。しかし、分子レベルだけの研究では、何故生体リズムの異常が具体的な、疾患を引き起こすのかは不明なままである。今回、SCN に発現する様々な物質のノックアウトマウスを解析して、中枢時計の細胞間神経伝達で時差が発現すること、また様々な病態が発現することが明らかとなった。

A. 研究目的

生物時計は、地球の自転に対応した、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みであり、細胞の基本代謝の昼夜の動的平衡状態を引き起こしている。我々は哺乳動物の体内時計遺伝子の単離・分子機構の検索より、時計遺伝子の転写振動がリズム形成の起点であることを明らかにした (Nature 1997, Science 2001)。その後、時計遺伝子の転写振動だけではリズムは減衰してしまい、より上位の生命現象のリズムが必要であることを報告したが (Science 2003)、その実態は長らく不明のままであった。最近我々は、RNA 塩基であるアデニンの窒素に化学修飾 (メチル化) が付加されると (m6A)、リズム周期が調整されることを初めて報告した (Cell 2013)。これは、mRNA は DNA の遺伝情報の忠実な運び屋に過ぎないと考えられてきた概念に変更を迫るもので、生物時計は mRNA の化学修飾が生体で機能することを示した初めての現象となった。

今回、個体としての概日リズムが引き起こされる分子機構を、中枢時計 SCN の特異的ノックアウトマウスを用いて解明する。具体的には、DNA、RNA を超えた全階層でのリズム形成機構を、生物時計に特異的な現象である時差を指標にして検索する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

SCN に発現する遺伝子を、網羅的にノックアウトする SCN-Gene Project を遂行する。ターゲット遺伝子の Flox マウスを作成し、SCN 特異的 Cre マウスをかけあわせて、SCN 特異的ノックアウトマウスを作成する。続いて、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 時間行動リズムを一ヶ月以上にわたって測定し、リズム異常をきたすマウスを同定する。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 (2015-21)。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（140157）。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

哺乳類時計中枢である SCN における時差形成に関与する遺伝子群を、SCN-Gene Project を用いて時差行動スクリーニングを行った。数あるマウスの中で、既に、時差が消失したもの（#34）、また逆に同調に 14 日もかかり延長するものも検出した（#9）。

重要なことに、それらの多くは、細胞間を連絡する神経伝達物質およびその受容体であった。それらの生体活性物質の SCN 内の細胞ネットワークのどの位置を占めるかを同定し、中枢細胞時計のあらたな調節システムを提唱した。特に検索の結果、リズム調節に重要なのは、GPCR-G 蛋白質-cAMP シグナルであることが解明された。

我々はさらに、以前 V1aV1b ダブルノックアウトマウスで時差が消失することを報告したが（Science 2013）、さらに最近、概日リズムが数理モデルでシミュレーションできる領域であることに注目し、一日前の早起きという、薬を使わずに時差ボケを軽減する方法を提案した（Scientific Research 2017）。さらに、この数理で予測される方法を実際マウスに適用し、その有用性を確認した。

D. 考察

脳の視交叉上核（SCN）における時計遺伝子の形成するリズムにより、約 24 時間周期の概日リズムは形成されている。しかし、最近では、代謝サイクルのリズムが時計発振に関与するという新しい考えが出てきおり、時計遺伝子の、転写、翻訳、またそれ以上のレベルの制御かどうかを決定することは、重要である。

時差と言う、SCN の機能と極めて密接に関連した現象を正面からとらえ、これに、SCN に特異的に発現する物質をノックアウトする SCN-Gene Project により、多くの時差関連遺伝子を見つけた。非常に興味深いのは、これらの多くが、SCN の神経細胞の神経伝達に関与する物質であるという事実である。

さらに、今回、この細胞特異的なノックアウトマウスの解析により、SCN 内でも多くの局所回路があり、この局所回路が、各々別個に働くことで、時差を形成していることが想定される。これを数理的に解析することで、時差を予測し、新たな時差予防法を提案した。それは、東回りの 8 時間の時差旅行のとき、リズムは大いに乱れるが、それは、一日前に 4 時間前もって、早く寝ることで、時差が軽減されるという結果である。この予測は、マウスで実際検証し、その予測は正しかった。この数理予測も、元はといえば、ノックアウトマウス作成によるものであった。

E. 結論

SCN-Gene project により、単純ノックアウトマウスでは、これまで、数十の遺伝子の解析を行ってきたが、その中には、致命的なものもあり、標的となる遺伝子領域を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだ遺伝子座を持つマウス（floxed マウス）を作出し、これと SCN に組織特異的に Cre リコンビナーゼを発現しているマウスとかけ合わせることで、中枢時計のみで、標的遺伝子の破壊を起こすことが可能となり、多くの遺伝子が解析可能となった。今後もこの方法を進め、時計の分子機能を解明する。

さらに、生体リズムは数理解析が有用である。これによって提案された、起床時間を変える方法は、時差ボケの症状の軽減だけでなく、シフト労働者の体の負担を軽減するようにスケジュールづくりにも応用できる可能性がある。

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

- 1) 岡村 均：時計遺伝子と感染制御機構、第 48 回日本小児感染症学会総会・学術大会、岡山（岡山コンベンションセンター）、2016 年 11 月 19 日
- 2) 岡村 均：生体リズムと疾病、Advance 研究会 2016、東京（ホテルグランドパレス）、2016 年 12 月 11 日
- 3) 岡村 均：生体リズムの調律機構、第 32 回西宮市ライフサイエンスセミナー、西宮（フレンテ西宮）、2016 年 10 月 14 日

- 4) 岡村 均：体の時計は今何時？ 東京で学ぶ 京大の知シリーズ 24、東京（新丸の内ビルディング）、2017年1月25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

神経変性疾患における Glymphatic system 破綻仮説の病理学的解析

研究代表者 星 明彦¹⁾

研究分担者 角田 綾子¹⁾, 宇川 義一¹⁾, 他田 真理²⁾, 柿田 明美²⁾

1) 福島県立医科大学神経内科 2) 新潟大学脳研究所病理

研究要旨

近年、脳脊髄液・組織間液の脳外への排出機構としてアストロサイトに発現する AQP4 依存性の Glymphatic system 仮説が注目されており、我々がこれまで観察してきた神経変性疾患剖検脳の AQP および AQP 関連タンパクの変化は Glymphatic system 破綻を示唆する可能性がある。本年度はアルツハイマー病(AD)で AQP4 と機能的複合体を呈すると言われているグルタミン酸トランスポーターGLT-1 の解析を更に進めた。AD では、びまん性の AQP4 発現増強に GLT-1 発現低下を伴う部位と AQP4 と GLT-1 が A β プラーク様に共発現する部位が明瞭に認められ、一様にグルタミン合成酵素発現の低下も確認された。これらの水代謝異常およびグルタミン酸代謝異常を示唆する所見は、AD 脳での Glymphatic system 破綻の側面を意味するものかもしれない。

A. 研究目的

近年脳内リンパ流を制御する Glymphatic system 仮説の知見が集積されつつあり、アストロサイトに発現する水チャネル-アクアポリン 4 (AQP4) がその中心的役割を担うことが判明してきた。我々はこれまで様々な神経変性疾患患者の剖検脳において、AQP4 やその関連タンパクが有意に変化することを見出しており、これらの結果は Glymphatic system 破綻を示唆する病理学的変化を意味するものとも考えられる。今回の研究ではアルツハイマー病(AD)剖検脳において、AQP4 と機能的複合体を呈すると言われているグルタミン酸トランスポーターGLT-1 の解析を進めると共に、グルタミン合成酵素 (GS) についても検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

AD 群 (n=8) 剖検脳連続パラフィン切片を使用し、側頭葉 (上・中・下側頭回) 皮質での AQP4、GLT-1、GS および GFAP の発現について対照群 (n=5) と免疫組織学的に比較検討した。画像解析ソフトを用いて各群の AQP4 と GLT-1 発現レベルを定量

化し、また後述する AD-lesion type 1 および AD-lesion type2 における AQP4 と GLT-1 発現の相関性についても検討した。

C. 研究結果

これまで示したように AD 群の各側頭回ではいずれも AQP4 の発現レベルは対照群よりも有意に高度であった。一方で各側頭回の GLT-1 発現レベルは、いずれも対照群より有意に低下していた。蛍光二重免疫染色で AD 群での AQP4 と GLT-1 発現変化は、びまん性の AQP4 発現増強に GLT-1 発現低下を伴った AD-lesion type 1 と AQP4 と GLT-1 がアミロイド β プラーク様に明瞭に共発現している AD-lesion type 2 に大別された。これらの発現レベルについて画像解析ソフトで相関性を検討したところ、AD-lesion type 2 では AQP4 と GLT-1 は有意な正の相関性を示したが、AD-lesion type 1 では有意な相関性は認められなかった。なお、血管周辺における GLT-1 と AQP4 の発現については、対照群では比較的均一な共発現像が観察されたのに対し、AD 群ではそれぞれ不均一な発現

像を呈しており一貫していなかった。

AD群のAD-lesion type 1およびAD-lesion type 2と思われる部位では、GFAP陽性アストロサイトーシス像が顕著である一方、GSの発現は高度に低下していた。また、AD群ではアミロイドβプラーク様のGFAP陽性所見は多数認められたが、GSでの同所見はわずかであり、その免疫染色性も弱かった。

D. 考察

以前よりADの病態にGLT-1の発現や機能の変化によるグルタミン酸神経毒性が関与する報告は多数あるが、GLT-1とAQP4との局在関連性については報告されていない。我々の示したAD-lesion type 1は主にアストログリオーシスにおけるGLT-1とAQP4の発現を、一方のAD-lesion type 2は老人斑におけるそれらの発現を観察した所見と考えられる。特にAD-lesion type 2のAQP4とGLT-1の共発現像は、老人斑の形成過程でこれらを発現するアストロサイトの関与を示唆する所見として興味深いものと思われた。

一方、GSはグルタミン酸をグルタミンにconvertする酵素であり、さまざまな神経疾患でグルタミン酸神経毒性に関与するkey moleculeとして知られているが、AD脳ではその発現低下を示す既報告が多い。今回の検討ではAD-lesion type 1およびAD-lesion type 2いずれの部位でもGSは一様に発現低下しており、多くの既報告と結果が一致した。GLT-1の結果と合わせ、AD脳でのグルタミン酸代謝異常を示唆する重要な知見と考えられた。

APP/PS1マウスでAQP4をノックアウトすることによりアミロイドβのクリアランスが低下し、脳内のアミロイドβ沈着が増加することが実験的に報告されている。このようなモデルからAQP4の機能不全によるGlymphatic system破綻がAD病理の悪化を来すことが想定されている。今回の我々の研究では、AQP4と機能的複合体を呈するとされるGLT-1やそのGLT-1とグルタミン酸代謝において密接な関係にあるGSの特徴的な変化をAQP4と共に見いだしており、これらはAD脳でのGlymphatic system破綻を示唆する病理学的所見とも解釈できるかもしれない。

E. 結論

AD脳における水代謝異常やグルタミン酸代謝異常を示唆するGLT-1とAQP4発現変化の所見は、Glymphatic system破綻の側面を意味するものかもしれない。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Increased neuronal and astroglial aquaporin-1 immunoreactivity in rat striatum by chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid. Akihiko Hoshi, Ayako Tsunoda, Teiji Yamamoto, Mari Tada, Akiyoshi Kakita, Yoshikazu Ugawa. *Neurosci Letters*, 626; p48-53, 2016年

2. Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 in the temporal neocortex of patients with Parkinson's disease. Akihiko Hoshi, Ayako Tsunoda, Mari Tada, Masatoyo Nishizawa, Yoshikazu Ugawa, Akiyoshi Kakita. *Brain Pathol*, 27; p160-168, 2017年

3. Altered expressions of glutamate transporter-1 and water channel protein aquaporin-4 in human temporal cortex with Alzheimer's disease. Akihiko Hoshi, Ayako Tsunoda, Mari Tada, Teiji Yamamoto, Mari Tada, Akiyoshi Kakita, Yoshikazu Ugawa. 投稿中

2. 学会発表

第21回グリア研究会. Immunohistochemical analysis of glutamate transporter-1 and water channel protein aquaporin-4 in human brain with Alzheimer's disease. Akihiko Hoshi, Saeri Saitou, Mari Tada, Akiyoshi Kakita, Yoshikazu Ugawa. 平成28年12月、大阪

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

神経回路の興奮性に対する CB₂ 受容体の役割の解明

研究代表者 菅谷 佑樹¹⁾

研究分担者 狩野 方伸¹⁾, 崎村 建司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 CB₂ 受容体が中枢神経系においても発現し、何らかの機能を担っている可能性が示唆されている。本研究では、遺伝子改変技術により作出した CB₂ 受容体コンディショナルノックアウトマウスや CB₂ 受容体の薬理的阻害を用いて、神経回路の興奮性における CB₂ 受容体の役割を明らかにすることを目的とした。自由行動下の野生型マウスにおいて電気刺激によるてんかん発作を起こしたところ、CB₂ 受容体の薬理的阻害によりてんかん発作の持続時間が延長した。この結果から、CB₂ 受容体が単独で神経回路の興奮性を抑制する可能性が示唆された。また、CB₂ 受容体の薬理的阻害により社会性行動が増加した。

現在、CB₂ 受容体の中枢神経系における機能をより詳細に明らかにするために CB₂ コンディショナルノックアウトマウスを作成中である。

A. 研究目的

内因性カンナビノイドはカンナビノイド受容体に作用する内因性のリガンドであり、主に神経系、免疫系において重要な役割を担っていると考えられている。神経系に強く発現しているカンナビノイド CB₁ 受容体はシナプス伝達を逆行性に抑制し学習や過剰興奮の抑制に重要な役割を果たしていることが報告されている。もう一つのカンナビノイド受容体である CB₂ 受容体は B 細胞やナチュラルキラー細胞などの免疫細胞に強く発現し、免疫反応を抑制していることが報告されている。しかし近年、CB₂ 受容体が中枢神経系に発現し、神経細胞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。ただ、CB₂ 受容体の抗体染色はいまだ成功しておらず、神経細胞特異的ノックアウトマウスを用いた研究もほとんどないことから、神経細胞における発現と機能は十分には明らかになっていない。本研究はカンナビノイド CB₂ 受容体について、新潟大学

脳研究所の崎村教授と共同で神経細胞特異的ノックアウトマウスを作出し、行動学的、生理学的、解剖学的解析を行い、CB₂ 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する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

興奮性細胞特異的に CB₂ 受容体を欠損したマウスを作出する目的で、CB₂ floxed マウスを C57BL/6N 系統で作出し、興奮性細胞で Cre を発現する Emx1-Cre マウスと交配する。これらのマウスを用いて神経細胞の機能を電気生理学的、行動学的に解析する。並行して、薬理学的方法により CB₂ 受容体を急性に阻害した際の神経細胞の機能および行動の変化も検討する。具体的には、CB₂ 受容体のアンタゴニストを自由行動下のマウスに投与し、電気刺激による誘発てんかん発作波の持続時間を細胞外記録によって測定する。また、CB₂ 受容体アンタゴニストの社会性への影響を新奇マウスへの

接触時間を計測することで評価する。

C. 研究結果

現在、CB₂ floxedマウスを樹立に成功し、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。

ノックアウトマウスの作成と並行して、CB₂受容体の薬理的な阻害によるCB₂受容体の役割の検討を行った。自由行動下のマウスの海馬歯状回で電気刺激によるてんかん発作波を起こしたところ、CB₂受容体アンタゴニストを投与したマウスでは溶媒投与群のマウスと比較して発作波の持続時間が有意に延長した。また、CB₂受容体アンタゴニストを投与したマウスでは、新奇のマウスに対する接触時間が溶媒投与群のマウスと比較して有意に延長した。

D. 考察

以上の結果から、CB₂受容体シグナリングの活性化は神経回路の過剰な興奮を抑制すると考えられた。さらに、CB₂受容体シグナリングは新奇のマウスに対する社会性行動を抑制している可能性が示唆された。本実験では全身投与による薬理的阻害を用いており、作用を発現している細胞種の特定ができなかった。近年、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CB₂受容体mRNAの発現を確認したという報告が複数なされているが、抗体染色による受容体の発現パターンの解析に関しては信頼性の高い報告がない。今後は、ノックアウトマウスをもちいた抗体の作成などを通じて、解剖学的な発現パターンを明らかにするとともに、コンディショナルノックアウトマウスを用いたより詳細な機能解析が必要である。

E. 結論

CB₂受容体の活性化は神経回路の過剰興奮を抑え、社会性を抑制する可能性が示唆された。今後はコンディショナルノックアウトマウスを用いた細胞特異的なCB₂受容体の欠失による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

Sugaya Y, Yamazaki M, Uchigashima M, Kobayashi K, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: Crucial roles of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the suppression of epileptic seizures. Cell Rep 16: 1405-1415, 2016

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

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⁾、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態情報を非侵襲的に抽出し、脳発達病態の手掛りを得ることから、脳発達病態を反映し臨床へ還元しうる手掛りを探索可能と考えのもと、現在進行中である。

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、円滑な撮像を行っていく。

C. 研究結果

現時点までに、正常対照群との比較及び幼少期被害体験者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っている。

少ない症例数であるが、頭頂葉及び被殻にコントロール群と比較して拡散性の異常所見が検出され、大脳皮質下の構造において、connectivityの発達の異常が存在する可能性が示唆された。

更なるデータの蓄積により、各々の臨床所見や発達障害の程度に対応した変化が検出できると考えている。

D. 考察

順調に撮像が進められているが、更なる幼少期被害体験者及び発達障害者、及びそれぞれに対するコントロール群のデータが必要である（目標 各々5症例程度）。

共同研究を継続し、症例数を重ねていくことにより、幼少期被害体験が与える脳発達への影響を解明することを目指す。

この試みは、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）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

頭頂葉及び被殻にコントロール群と比較して拡散性の異常所見が検出され、大脳皮質下の構造において、connectivityの発達の異常が存在する可能性が示唆された。健常コントロールを含め、更なる症例を重ねることにより、詳細なメカニズムの解明につながる事が期待できる。また、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を解明していく。

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)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

糖鎖硫酸転移酵素遺伝子の脳特異的ノックアウトマウスの作成と その表現型解析

研究代表者 赤間 智也¹⁾
研究分担者 崎村 建司²⁾

1) 関西医科大学 薬理学講座 2) 新潟大学脳研究所 細胞神経生物学部門

研究要旨

Chst1 は脳や角膜、軟骨などに見られるケラタン硫酸グリコサミノグリカン(KS-GAG)の高硫酸化型体を生成するのに必要な酵素である。Chst1 ノックアウトマウスには高硫酸化型 KS-GAG が存在しないがこのノックアウトマウスは特に重篤な表現型を示さず、正常に発生し成体となる。しかしながら Chst1 ノックアウトマウス同士の掛け合わせでは産まれる子供の数が極端に少ないことから我々は Chst1 ノックアウトマウスが不妊の表現型を示すのではないかと考えた。野生型マウスとの掛け合わせの結果、Chst1 ノックアウトマウスの雌には異常がなく、Chst1 ノックアウトマウスの雄が不妊の原因であることがわかった。Chst1 ノックアウトマウスの精巣には目立った異常が見られないことからこのノックアウトマウスの雄は精子形成異常による不妊ではなく、行動異常によるものと示唆された。

A. 研究目的

我々は Chst1 によって合成される硫酸化糖鎖がマウス脳の正常な神経回路形成に必要であり、その糖鎖構造の異常が神経回路形成異常を生じ、性行動の変化を引き起こしたものと推測した。本申請研究ではこの推測を検証するべく、脳特異的 Chst1 ノックアウトマウスを作成してその表現型を調べると共に、野生型と Chst1 ノックアウトの脳組織に見られる糖鎖構造の変化を調べることで硫酸化糖鎖の脳内における生物学的機能について解析を進めることを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

始めに Chst1 の脳特異的ノックアウトマウスを作成して全身性 Chst1 ノックアウトマウスと同様の表現型が得られるか調べる。Chst1 コンディショナルノックアウトマウスはこれまでに報告がないのでノックアウトベクターを用いた相同組換えにて Chst1 遺伝子上に二つの loxP 配列を導入したマウス ES 細胞を作成し、この細胞から

マウス個体を作成する。この Chst1-floxed マウスを脳特異的に Cre recombinase を発現する遺伝子改変マウス (Nestin-cre Tg など) と掛け合わせることで脳特異的に Chst1 の発現を停止させる。この脳特異的 Chst1 変異マウスの性行動における表現型を野生型マウスや Nestin-cre と掛け合わせていない Chst1-floxed マウス、及び全身性 Chst1 ノックアウトマウスと比較する。また脳特異的 Chst1 ノックアウトマウスと Chst5 ノックアウトマウスを掛け合わせることで Chst1/Chst5 二重変異マウスと同様な性行動の回復が見られるかどうか調べる。脳における Chst1 欠損が異常な糖鎖構造をもつ糖タンパク質（あるいは糖脂質やプロテオグリカンなど）を産生し、これによる神経回路形成の異常が行動異常を引き起こしていると予想していることからこれを検証するべく、糖を認識するレクチンや抗体を用いて特定の糖鎖の脳内分布を調べ Chst1 ノックアウトマウスに見られる異常を検出する。

C. 研究結果

Chst1 は脳や角膜、軟骨などに見られるケラタン硫酸グリコサミノグリカン(KS-GAG)の高硫酸化型体を生成するのに必要な酵素である。Chst1 ノックアウトマウスには高硫酸化型 KS-GAG が存在しないがこのノックアウトマウスは特に重篤な表現型を示さず、正常に発生し成体となる。しかしながら Chst1 ノックアウトマウス同士の掛け合わせでは産まれる子供の数が極端に少ない。我々は Chst1 ノックアウトマウスが不妊の表現型を示すのではないかと考え、始めに Chst1 ノックアウトマウスの雌と野生型マウスの雄の掛け合わせを行ったところ正常に子供を産んだことから、Chst1 ノックアウトマウスの雌は不妊ではないことがわかった。一方で Chst1 ノックアウトマウスの雄と野生型マウスの雌の掛け合わせでは子供がほとんど得られず、このことから Chst1 ノックアウトマウスの雄が不妊の原因であることがわかった。しかし、Chst1 ノックアウトマウスの精巣には目立った異常が見られないことと、野生型の雌マウスとの掛け合わせにおいて時々正常マウスと同等の産仔を得ることから Chst1 ノックアウトマウスの雄は精子形成異常による不妊ではなく、行動異常によるものではないかと疑わせた。

D. 考察

Chst1 が合成に関与する硫酸化糖鎖はリンパ球のリンパ節へのホーミングに関係する可能性が指摘されていたが、Chst1 ノックアウトマウスの解析でリンパ球の挙動に野生型との違いが見られないことからこの硫酸化糖鎖の生体内での機能は不明であった。今回の研究により、この硫酸化糖鎖が神経系にてそのネットワーク形成に関係する可能性が示唆されたことは非常に興味深い。細胞外への糖鎖の提示を担う酵素の一つ B3gnt2 はその欠損マウスに交尾行動異常が報告されていることから、Chst1 ノックアウトマウスも同様の行動異常が生じているのではないかと考えられる。

E. 結論

Chst1 ノックアウトマウスの解析は糖鎖構造が神経のネットワーク形成に関与しており、その構

造変化が行動異常として現れることを示唆するデータである。どのような回路形成に糖鎖構造が必要であるか、またどのようにして糖鎖構造変化が回路生成に関わるのかを解析することで動物の行動を支配する神経回路形成機構の解明に迫れるものと考えられる。

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

1. 赤間智也、安形清彦、久保田智巳、中邨智之、福田道子 B. fragilis endo-beta-galactosidase のクローニングとその酵素活性解析 第 89 回生化学会大会（2016 年 9 月 25-27 日、仙台国際センター）

以上

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

Epstein-Barr virus 関連中枢神経系原発悪性リンパ腫の 免疫回避機構における PD-1 及び PD-L1 の役割

研究代表者 杉田 保雄¹⁾
研究分担者 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

Epstein-Barr virus (EBV) 関連の中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)の免疫回避機構について活性化 T 細胞上に発現する PD-1(programmed cell death-1)およびそのリガンドである PD-L1 の役割を解析した。久留米大学および新潟大学脳研究所で蓄積された PCNSL 40 例を対象とした。EBV(+)例と EBV(-)例を比較すると TIA-1 で EBV(+)例の標識数が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。PD-1, FOXP3 標識 TIL 数で両者に差はみられなかったが、PD-1 は EBV(-)例で標識 TIL 数が少ない傾向が伺われた。

以上から PCNSL では宿主と腫瘍の間に PD-1/PD-L1 による免疫寛容が成立しており、腫瘍細胞のみならず、非腫瘍性細胞も重要な役割を担っている。EBV 関連 PCNSL では PD-1/PD-L1 に加えて EBV による免疫回避機構への関与が示唆された。

A. 研究目的

Epstein-Barr virus (EBV) 関連の中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)の免疫回避機構について活性化 T 細胞上に発現する PD-1(programmed cell death-1)およびそのリガンドである PD-L1 の役割を解析した。さらに EBV 関連 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ために PCNSL の微小環境の検討を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1) 久留米大学および新潟大学脳研究所で蓄積された PCNSL 症例 40 例を対象とした。腫瘍細胞あるいはその周囲のマクロファージにおける PD-L1 発現を蛋白レベルで解析、検討した。また TIL における cell-subset (TIA-1, FOXP3) の発現について免疫染色で検討した。

2) 対象となる PCNSL における EB ウイルス関与を EBER の検出 (in situ hybridization) によ

つ

3) EB 陽性(+)例と EB 陰性(-)例についての比較検討を行い、PD-1/PD-L1 発現あるいは宿主側と免疫応答の違いを検討した。

PD-L1 の評価は腫瘍細胞の標識率により 3 段階で評価した(1+:0-5%, 2+:5-50%, 3+:50-100%)。PD-1 および T cell-subset は標識数/X400 によった。

4) 本研究ではゲノムではなく遺伝子とタンパク発現の解析を行った。しかしながら、ゲノム解析に準じて久留米大学倫理委員会の承認を得、患者の人権および利益の保護の取り扱いについては十分に配慮した。

C. 研究結果

40 例中 EBV(+)PCNSL は 18 例であり、EBV(-)PCNSL は 22 例であった。

EBV(+)例で腫瘍細胞(T)が PD-L1 陽性の症例は 18 例中 12 例(2+: 5, 3+: 7)であり、陰性 6 例中 4 例で介在組織球(M)が陽性であった。PD-L1 陽性

16例 (T:12, M:4) では12例でPD-1陽性TILがみられた。PD-1, TIA-1, FOXP3陽性のTIL数の平均値はそれぞれ34±45, 560±670, 9.30±15.0であった。

EBV(-)例ではTがPD-L1陽性を示した例は22例中12例(1+:1, 2+:3, 3+:8)であり、陰性10例中5例でMが陽性であった。PD-L1陽性17例(T:12, M:5)では全例でTILがPD-1陽性を示した。PD-1, TIA-1, FOXP3陽性のTIL数の平均値はそれぞれ41±53, 84±83, 6.2±6.7であった。

EBV(+)例とEBV(-)例を比較するとTIA-1でEBV(+)例の標識数が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。PD-1, FOXP3標識TIL数で両者に差はみられなかったが、PD-1はEBV(+)例で標識TIL数が少ない傾向が伺われた。

D. 考察

本研究の結果からPCNSLにおいてはEBV陽性あるいは陰性例いずれにおいてもPD-1/PD-L1が高頻度に発現しており、多くの症例で宿主と腫瘍の間にPD-1/PD-L1による免疫寛容が成立していることが明らかになった。また他の癌腫でみられるように介在腫瘍細胞、リンパ球のみならず、介在マクロファージも重要な役割を担っていることが明らかになった。

EBV(+)とEBV(-)例を比較すると統計学的にはPD-1, FOXP3標識TIL数で両者に差はみられなかった。またEBV(+)例とEBV(-)例共にTILの大部分はTIA-1陽性のcytotoxic T細胞であった。TIA-1陽性リンパ球においてEBV(+)例とEBV(-)例を比較するとEBV(+)例の標識数が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。しかし、EBV(+)例でPD-1標識リンパ球数が少ない傾向が伺われた。最近の研究ではEBV関連のリンパ腫細胞においてPD-L1活性はEBV-driven LMP1により活性化することが知られている(文献1)。一方、EBV(+)例ではIL12を介してEBV-specific CD8T細胞の感染細胞への認識能の低下が既に明らかにされている(文献2)。したがってEBV(+)例ではリンパ腫細胞内のEBVを認識した宿主からのより多くのcytotoxic T細胞はEBV自身により既に無効化されている。そして

そのためにEBV(-)例よりもPD-L1が活性化しているにもかかわらず、PD-1陽性リンパ球数がEBV(-)例も少量となることが推測された。さらにEBV(+)例ではPD-1/PD-L1によるPCNSL腫瘍細胞周囲の微小環境における免疫寛容が低下している可能性が考えられた。一方、既にEBVによる宿主の免疫機能の抑制が働いているために腫瘍細胞の微小環境における免疫寛容の全体としての状態はEBV(+)例ではEBV(-)例に比較して同等かあるいはさらに亢進している可能性が考えられた。

文献1

Bi XW, Wang H, Zhang WW, Wang JH. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF- κ B pathway and correlated with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J Hematol Oncol* 2016; 9: 109-121.

文献2

Albanese M, Tagawa T, Bouuvret M, Maliqi L et al. Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 18: E6467-6475.

E. 結論

- 1) PCNSLでは多くの症例で宿主と腫瘍の間にPD-1/PD-L1による免疫寛容が成立している。
- 2) 上記の免疫寛容の病態では腫瘍細胞、リンパ球のみならず、周囲のマクロファージも重要な役割を担っている。
- 3) EBV関連PCNSLではさらにEBV自身による免疫回避機構への関与が考えられる。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

- ① 第58回日本神経病理学会総会学術研究会・平成29年6月3日・東京
- ② American association of neuropathologists 2017 93rd annual meeting・June 10, 2017・Orange County,

California, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

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⁾, 田中 英智²⁾, 柿田 明美²⁾

1) 岐阜薬科大学 薬物治療学研究室 2) 新潟大学 脳研究所病理学分野

研究要旨

孤発例 ALS 患者サンプルにおいて、エピジェネティクスの機構の重要な機構の 1 つであるマイクロ RNA (miRNA) に注目し発現量を検討した。マイクロアレイ解析を用い ALS 患者の剖検脊髄中 miRNA 発現量を網羅的に解析した。そのデータを基に TargetScan によって SLC30A3 に関連する miRNA に絞り、それらを Real-time PCR を用い miRNA 発現量を測定した。網羅的 miRNA 解析では ALS 群で 2 倍以上発現増加した miRNA が 2578 個中 37 個であった。TargetScan を用い SLC30A3 発現を制御する可能性のある miRNA を調べた結果、37 個中 4 個存在した。それらを real time RT-PCR により測定した結果、1 個が ALS 群において有意に増加した。以上より ALS の SLC30A3 に関連する新規 miRNA 候補が見出された。

A. 研究目的

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 (MT) 発現の減少、髄液中の亜鉛の上昇が確認されており、金属代謝と 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。そこで孤発例 ALS 患者サンプルにおいて、エピジェネティクスの機構の重要な機構の 1 つであるマイクロ RNA (miRNA) に注目した。miRNA は mRNA 分解または翻訳抑制を行う遺伝子発現に関与する一本鎖 RNA である。また、我々は ALS 患者の脊髄中において亜鉛輸送体である SLC30A3 発現量の有意な低下を報告している。したがって本研究では、ALS の SLC30A3 に関連する新規 miRNA の探索を試みた。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学、岐阜大学、岐阜薬科大学倫理委員会承認のもと、マイクロアレイ解析を用い ALS 患者の剖検脊髄中 miRNA 発現量を網羅的に解析した。そのデータを基に TargetScan によって SLC30A3

に関連する miRNA に絞り、それらを real time RT-PCR を用い miRNA 発現量を測定した。それとは別に、対照群と ALS 群のどちらか一方のマイクロアレイシグナル強度が 100 以上を示すものに絞り、2 倍以上、または半分以下の変動を示す miRNA について、real time RT-PCR による発現量を測定した。

C. 研究結果

網羅的 miRNA 解析では ALS 群で 2 倍以上発現増加した miRNA が 2578 個中 37 個であった。TargetScan を用い SLC30A3 の発現を制御する可能性のある miRNA を調べた結果、37 個中 4 個存在した。それらを real time RT-PCR によって測定した結果、1 個が ALS 群において有意に増加した。そのうち、対照群と ALS 群のどちらか一方のマイクロアレイシグナル強度が 100 以上を示すものに絞ると、その数は増加が 10 個、減少が 10 個であった。それらに絞って、real time RT-PCR による個々の miRNA 発現量を確認したところ、1 個の有意な減少を確認した。

D. 考察

ALS の SLC30A3 に関連する新規 miRNA の候補が 1 つ見出された。それとは別に新規に ALS において発現が減少する miRNA を 1 つ見出すことができ、この新規に見出した miRNA については標的となる遺伝子の探索が必要であると考えられる。今後、見出した新規 miRNA の SLC30A3 発現制御機能の解析と、併せて今回、未解析である残りの miRNA 発現量の解析が必要である。

E. 結論

ALS の SLC30A3 に関連する新規 miRNA の候補が 1 つ見出された。また新規に ALS において発現が減少する miRNA を 1 つ見出すことができた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1). Kurita H, Okuda R, Yokoo K, Inden M, Hozumi I. Protective roles of SLC30A3 against endoplasmic reticulum stress via ERK1/2 activation. Biochemical and Biophysical Research Communications 479:853-859 2016.

2. 学会発表

- 1). 横尾一樹、奥田莉加、栗田尚佳、位田雅俊、保住 功「SLC30A3 の小胞体ストレス応答に対する防御的役割の検討」（第 43 回日本毒性学会学術年会・2016 年 6 月 29 日・名古屋）
- 2). 栗田尚佳、奥田莉加、横尾一樹、位田雅俊、保住 功「SLC30A3 の小胞体ストレスに対する防御機構の検討」（メタルバイオサイエンス研究会 サテライト・2016 年 8 月 18 日・静岡）

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

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⁾, 川月 章弘¹⁾, 池内 健²⁾, 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

アルツハイマー病(AD)に対する先制医療の実現が求められるなか、病態を惹起するとされる脳内アミロイドβペプチド(Aβ)蓄積に対するリスク要因に関しては、遺伝的因子を除いて未だ知見に乏しいのが現状である。申請者らが Aβ 産生を抑制する内在性分子として同定している ILEI/FAM3C (interleukin-like epithelial-mesenchymal transition inducer, also known as family with sequence similarity 3, member C)は、加齢とともに脳内発現レベルが低下することにより Aβ 産生増加を引き起こし、脳 Aβ 蓄積開始に繋がるリスクとなる可能性が示唆される。従って、脳 ILEI レベルが Aβ 蓄積の初期バイオマーカーとして成立する可能性がある。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する。

A. 研究目的

申請者らが同定した ILEI は新たな分泌型機能分子 FAM3 スーパーファミリーに属し、APP-C99 から Aβ 産生を伴わない非特異的分解経路を促進することにより Aβ 分泌を抑制するが、一方で γ セクレターゼ活性や Notch シグナルは阻害しないという特異な活性を示すことが明らかとなった(Hasegawa H, et al : *Nat Commun*, 5 : 3917, 2014)。ILEI は中枢神経系の神経細胞に発現しているが、そのレベルは加齢とともに転写レベルで減少し、AD 剖検脳の Aβ 蓄積レベルは ILEI に逆相関して増加する(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、Aβ 蓄積に先立つ脳内 ILEI 発現レベル減少評価がバイオマーカーになり、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ことを示唆している。

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う。

B. 研究方法(倫理面への配慮を含む)

- (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 名)、軽度認知障害(50 名)者、および非認知症例(50 名)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 サンドイッチ ELISA 法を確立した。
- (2) NIA-AA 診断基準を満たす認知症(10名)、非認知症例(10名)者を対象とし、脳脊髄液を採取した。
- (3) 上記の脳脊髄液中 ILEI・A β 40・A β 42・総 tau・リン酸化 tau の測定を行った。未だ症例数は不十分であるが、ILEI 値と A β 42/A β 40 比および総 tau 値との間に、有意な正相関が予想されている。

D. 考察

A β 42/ A β 40 比および総 tau 値には、いずれも AD の診断的意義が指摘されているところであり、症例数が不十分ながらこれらと ILEI 値との間に相関が予想されることから、症例を増やしての検討が重要と考えられる。

E. 結論

今後も、目標の症例数に達するまで本研究を継続し、ILEI 定量の意義を検討するとともに、血液での検討も加える。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

2. 学会発表

現在まで、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

2. 実用新案登録

3. その他

現在まで、該当なし。

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 崎村 建司 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、神経活動操作を達成し、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、神経活動操作を達成し、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、メラニン凝集ホルモン(MCH)、コカイン-アンフェタミン関連ペプチド(CART)産生神経などを対象として、神経活動操作を行い、本能行動調節における役割について明らかにする。それぞれの神経ペプチド作動性神経特異的に遺伝子発現を行うための遺伝子改変動物を作成し、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターと組み合わせることで、それらペプチド作動性神経特異的に光遺伝学や薬理遺伝学に必要なタンパク質（チャンネルロドプシン 2、ハロロドプシン、hM3Dq、hM4Di など）の発現を誘

導し、神経活動操作を行う。これらの神経活動操作を行っている時の行動を解析するために、脳波筋電図測定によって、睡眠覚醒を解析し、飲水・摂食量や代謝量などを測定することで、多角的に作用を解析する。また、これらのペプチド作動性神経が、脳内のどのような神経から調節をうけているのかについても解析するために、GABA 作動性神経などを操作可能な遺伝子改変動物(GAD-Cre など)を供給して頂き、電気生理学的解析と光遺伝学を組み合わせた解析を行うことで、入力系路とその動作原理について明らかにする。

C. 研究結果

MCH 産生神経(MCH 神経)を特異的に脱落させたマウスの睡眠覚醒状態を解析したところ、ノンレム睡眠が減少し、覚醒時間が増加することが明らかとなり、MCH 神経が睡眠覚醒調節にも関わっていることが示された。さらに、MCH 神経の生理的役割について明らかにするために、MCH 神経の投射先について組織化学的解析を行ったところ、MCH 神経の細胞体は視床下部だけに存在するものの、そこから脳の幅広い領域に投射し、特に記憶に重要な海馬領域に密な投射が認められた。そこで、MCH 神経特異的脱落マウスの記憶力について、

新奇物体に認識試験で評価したところ、対照群マウスと比較して優位に記憶力が向上しており、また記憶の保持時間も長くなっていることが明らかになった。そこで、MCH 神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現する MCH-Cre マウスと、Cre 依存的に hM3Dq を発現する AAV を用いて、MCH 神経特異的に hM3Dq を発現させ、薬理遺伝学を用いて MCH 神経を活性化させた。スライスパッチクランプを用いた電気生理学的解析により、MCH 神経から電気活動を記録しながら、hM3Dq を活性化させる特異的リガンド(CNO)を投与すると、MCH 神経活動が持続的に上昇することを確認した。そこで次に、新奇物体認識試験を用いて MCH 神経活性化時の記憶を評価したところ、MCH 神経を活性化させると記憶が抑制されることを見いだした。また、同様に MCH 神経特異的にチャンネルロドプシン 2 を発現するマウスを用いて、新奇物体認識試験を行い、MCH 神経を活性化させたところ、同様に記憶が抑制されることを確認した。これらの結果は、MCH 神経が活性化されると記憶を抑制するように働くことを示している。

D. 考察

MCH 神経は睡眠時に活動しており、特にレム睡眠時に高い活動を示す一方、覚醒時にはほとんど活動が見られないことが報告されている。このことから、MCH 神経は睡眠時に活動し、海馬において記憶を抑制していることが考えられる。MCH 神経が睡眠時に記憶を抑制、もしくは消去する生理的役割として、睡眠中に不必要な記憶を消去することや、レム睡眠中の脳活動による夢などを記憶しないようにすることに関わっている可能性が考えられる。今後は睡眠中に記憶を抑制または、消去するメカニズムについて明らかにしていく。

E. 結論

視床下部の MCH 神経は、摂食行動、睡眠覚醒調節だけでなく、記憶の制御にも関わっていることが示された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Miyamoto D, Hirai D, Fung CC, Inutsuka A, Odagawa M, Suzuki T, Boehringer R,

Adaikkan C, Matsubara C, Matsuki N, Fukai T, McHugh TJ, Yamanaka A, *Murayama M. Top-down cortical input during nrem sleep consolidates perceptual memory. *Science*, 2016; 352: 1315-1318.

2. Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, Nakai J, Ohkura M, Taguchi T, *Yamanaka A. The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. *Sci Rep*, 2016; 6: 29480.
3. *Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz AR, Polotsky VY, Mendelowitz D. Direct projections from hypothalamic orexin neurons to brainstem cardiac vagal neurons. *Neuroscience*, 2016; 339: 47-53.
4. *Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz AR, Polotsky VY, Mendelowitz D. Hypoxia and hypercapnia inhibit hypothalamic orexin neurons in rats. *J Neurophysiol*, 2016; 116: 2250-2259.
5. Chowdhury S, *Yamanaka A. Optogenetic activation of serotonergic terminals facilitates gabaergic inhibitory input to orexin/hypocretin neurons. *Sci Rep*, 2016; 6: 36039.
6. Wakaizumi K, Kondo T, Hamada Y, Narita M, Kawabe R, Narita H, Watanabe M, Kato S, Senba E, Kobayashi K, Kuzumaki N, Yamanaka A, Morisaki H, *Narita M. Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with gi-dreadd in mice. *Mol Pain*, 2016; 12.

2. 学会発表

1. Yamanaka A. The role of hypothalamic peptidergic neurons in the regulation of brain states. 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, 2016.7, Copenhagen, Denmark.
2. 山中章弘, 犬東 歩, 山下 哲, 田口 徹. ファイバーフォトメトリを用いた視床下部オレキシン神経活動の記録. 第39回日本神経科学大会, 2016.7, 横浜.

3. 犬東 歩, 山下 哲, スリカント チョドリ, 田口 徹, 山中章弘. オレキシン神経による鎮痛作用. 第 36 回鎮痛薬・オピオイドペプチシンポジウム, 2016.8, 札幌.
4. Yamanaka A. Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory. CNS Collaborators Day 2016 "Emerging Techniques", 2016.9, Adelaide, Australia.
5. 山中章弘. 様々な神経活動操作法による生理機能の解明. 第 10 回骨・軟骨フロンティア, 2016.11, 東京.
6. Yamanaka A. Hypothalamic melanin concentrating hormone (MCH) neurons inhibiting memory formation during sleep. Neuroscience 2016 Satellite Meeting "Wiring and Functional Principles of Neural Circuits", 2016.11, San Diego, California, U.S.A
7. 山中章弘. 視床下部神経細胞による睡眠覚醒、睡眠関連機能の調節メカニズム. 第 23 回日本時間生物学会学術大会, 2016.11, 名古屋.
8. Yamanaka A. Good Sleep: Relief from Sleep Disorder. Fifteenth Japanese-American Kavli Frontiers of Science Symposium, 2016.12, Irvine, California, U.S.A.
9. Yamanaka A. Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory. The 5th Annual IIS Symposium, 2016.12, Tokyo, Japan.
10. 山中章弘. 視床下部神経細胞の活動記録と活動操作. 第 90 回日本薬理学会年会, 2017.3, 長崎.
11. 山中章弘. 視床下部神経活動の記録と操作による睡眠覚醒と記憶の制御機構の解明. 第 94 回日本生理学会大会, 2017.3, 浜松.

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

PNPLA6 遺伝子の脳における機能-有機リン被爆との関連から

研究代表者 木村 稔¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 畑中 朋美¹⁾, 加藤 明¹⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

我々は有機リンやホルムアルデヒド等の被爆が主要原因とされるシックハウス症候群の患者単球において Neuropathy Target Esterase(以下 NTE)の活性が健常者に比べて高いことを報告した(2013)。有機リンの曝露後に神経症状が生じることが知られているが、そのメカニズムについては良くわかっていない。本研究では、有機リン関連疾患の発症機構解明を目指し、まず NTE をコードする遺伝子 *PNPLA6* を導入したマウスを作製し、シックハウス症候群の原因物質の一つとされるフタル酸エステルの経皮吸収とエステラーゼの関わりについてのモデルを構築した。有機リンと NTE の複合体検出については、大腸菌を用いて NTE タンパクを大量に発現・精製する実験系を新たに構築し、これを用いた解析を進行中である。また、最近、いくつかの小脳疾患で *PNPLA6* に点突然変異が見いだされており、小脳疾患モデルとしての活用を念頭に、*PNPLA6* 点突然変異マウスを CRISPR/Cas9 システムにて作製した。また貴研究所柿田明美教授よりヒト脳標本を分与いただき、タンパク質発現等の解析を行った。

A. 研究目的

本研究ではシックハウス症候群やその原因物質として指針値が定められている13種の化学物質一中でも有機リンに対しての発症メカニズム-を遺伝子操作マウスを駆使して探求することを目的とした。また、対象とする酵素は有機リンと共有結合を形成することから、その複合体が種々の症状を生み出す可能性を考え、複合体検出への取り組みを行っている。すでに確立した NTE 高発現マウスと、CRISPR(Clustered regulatory Interspaced short parindromic repeats)システムによる遺伝子変異導入技術をマウス *pnpla6* 遺伝子に応用することにより最終的には *pnpla6* 変異個体を得て、*pnpla6* 遺伝子の個体レベルでの機能を、神経系を中心に明らかにしたい。また、農薬等に良く使用されるジクロロボス(DDVP)をこれらのマウスに投与し、中枢および末梢神経系における有機リンの影響を、NTE に対する急性および遅延性反応という観点から解析することが本研究の最終目的である。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウス、及び、CRISPR/Cas9 による NTE 点突然変異体マウスを用いた実験計画は東海大学遺伝子組換え実験安全委員会および東海大学動物実験委員会を通じて大学より承認されている。遺伝子導入マウスは大塚准教授の協力を得て我々独自の方法で、*ROSA26* 部位に CAG プロモーター下にヒト *PNPLA6* 遺伝子 cDNA および同時に *EGFP* 遺伝子を導入したマウスである。F₀ マウスと Cre マウスとの交配により発現を誘導し、F₁ 以降の系統化は C57BL/6 との交配によった。ヒト皮膚を用いた経皮吸収実験計画は医学部医の倫理委員会の審議後、承認を受けている。また、ヒト脳標本を貴学より分与を受けて解析する研究については、貴学および本学の倫理委員会の承認を受けて実施した。

マウスのホルムアルデヒド曝露実験および経皮吸

収実験は独自の装置を用いて行い、酵素活性測定は常法に従った。

複合体検出では島津製作所の質量分析器 (Shimazu LC-MS) を使用した。眼球運動は高速度デジタルカメラを用いた瞳孔追跡システム、空気中のホルムアルデヒド濃度は新規に開発したレーザーを用いたガスセンシング法及び高速液体クロマトグラフィを用いて測定した。

C. 研究結果

ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウスでは *PNPLA6* 遺伝子がコードする NTE の発現がモザイク状態となるようであり、全身発現性の CAG プロモーターを用いているせいか、成長遅延の個体も見られる。しかしながら各臓器で遺伝子導入個体では通常のマウスに比べ少なくとも数倍の活性上昇があった。

有機リンの一種で殺虫剤等にも使用されているジクロルボス (DDVP) を投与したが、成体では今のところ特に変化はないが、妊娠マウスに投与した場合には、遺伝子導入マウスの死亡胎仔の割合が高い。

60-80 ppm の蒸散ホルムアルデヒドガス曝露後 (18 時間 / 日、7 日間、n = 1)、HE 染色した脳切片を用いて遺伝子導入マウス脳の形態異常を解析したところ、小脳プルキンエ細胞の委縮及び海馬歯状回-CA3 周辺の層構造異常を示唆する結果が得られた。

経皮吸収に関しては表皮と真皮の境界領域で NTE の発現を免疫組織学的に認めた。ついでフタル酸ベンジルブチルの結合切断の種特異性を利用してその皮膚の透過実験からこのマウス皮膚では NTE 活性が 100 倍上昇し、かつヒト型の主代謝物の特性を備えていることを解明した。

NTE 活性は吉草酸エステルを基質として paraoxon 耐性で mipafox 感受性のエステラーゼ活性として定義されるが、より簡便な検出法開発に取り組んだ。ヒト単核球中での総エステラーゼ活性が paraoxon 耐性のエステラーゼ活性と比例することを確認し、マウス皮膚と脳で NTE 活性と paraoxon 耐性のエステラーゼ活性は比

例した。しかし、フタル酸エステル代謝活性とは必ずしも比例しなかった (以上既報告)。

一過性の NTE 高発現 293 細胞を利用し、ゲルより抽出したバンドが NTE であることを質量分析系で確認していたが、このクルードな系では NTE-DDVP 複合体の検出には至らなかった。そこで、大腸菌で活性を有するペプチド部分の N 末および C 末にタグを配置して "NTE" を大量に精製することを試み、100 µg 程度の NTE を精製可能な系を確立した。精製した NTE についてはそのエステラーゼ活性の確認を終えている。この精製 NTE と DDVP との複合体を *in vitro* で形成させ、質量分析法にて同定する実験を進行中である。

CRISPR (Clustered regulatory Interspaced short parindromic repeat) 技術は、遺伝子の特定の配列を利用して、任意の動植物種や細胞に変異を導入することができる方法である。最近、いくつかの運動失調を示すヒト小脳疾患で *PNPLA6* に点突然変異が見いだされており、この方法を用いて、マウス *pnpla6* 遺伝子への点突然変異の導入を試み、*pnpla6* 点突然変異マウスの作製に成功した。今後は、このマウスを用いて *pnpla6* 変異と小脳疾患との関係を明らかにするとともに、報告されている他の複数の *pnpla6* 変異を導入したマウスも作製する計画である。

昨年度3月に双方の倫理委員会で承認が得られた貴学ヒト脳標本の利用については、柿田教授との研究協力のもと、凍結試料等を東海大学に送付いただき、まず、Western 法を用いての特異的な NTE タンパク質の検出を試みた。前述のヒト *PNPLA6* 導入マウスを用いて特異性の検討を行なったところ、特定のモノクローナル抗体 (G-4, Santa Cruz) で、既に明らかにしている NTE 酵素活性の高低と良く相関する明瞭なタンパク質のバンドを同定することに成功した。同様の条件で、凍結脳標本より調製したタンパク質を用いた場合にも、明瞭な当該バンドを同定している。今後、この方法を用いることによって、脳凍結標本を用いた NTE タンパクの半定量的解析を進めて行く予定である。

一方では柿田教授より有機リン中毒患者の脳パラフィン切片を頂戴し、マウス抗ヒト NTE モ

ノクローナル抗体 (G-4, Santa Cruz) を用いて免疫染色をおこなった。対照群である急性腹部痛患者脳、多発性神経障害患者脳と比較すると、大脳皮質及び小脳顆粒細胞層の神経細胞が変性、凝集し、しかも NTE 局在が顆粒状に観察された。また、1) NTE の脳内毛細血管内皮における局在が検出されず、2) プルキンエ細胞周辺の NTE 発現が見られないといった特徴を見出した。年齢の異なる標本も得ていることから、加齢による発現変化も含めて解析を進めたい。

D. 考察

我々が開発した独自の方法で、全身で NTE の高発現を示すトランスジェニックマスの系統化に成功したが、DDVP 投与やホルムアルデヒド曝露では神経症状や行動上の顕著な外見上の変化はない。もともとマウスはヒトでは致死量のホルムアルデヒド濃度でも耐性であることや、そのくせ DDVP の腹腔内投与等では微妙な投与量の違いですぐに死亡する個体が出現することから、マウスはこの課題において、あまり適切な実験動物とは言えないのではないかと考えている。今後は感受性の高い鳥類の利用等も視野に入れて検討したい。

しかしながら、ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウスではフタル酸エステルの代謝について、見事にマウス型とヒト型を区別することができ、個体レベルでヒト型皮膚の経皮吸収実験が行える道が開けた。また、手術時のヒト皮膚を用いた活性測定では NTE 活性は低いものの、paraoxon 耐性の活性で代用出来る見通しがある程度出来ることとなった。

DDVP-NTE 複合体の質量分析器での検出は、大腸菌を用いた大量産生・精製系の整備を終えた段階であり、質量分析器による複合体の検出、さらには、複合体に特異的な抗体作成に挑戦したい。

NTE をコードする *PNPLA6* 遺伝子の変異が運動神経系関連疾患で続々報告されている。当研究室では、CRISPR 技術を用いて、マウス内在性 *PNPLA6* 遺伝子に点突然変異を導入することに既に成功している。今後この点突然変異マウス、及び、作製予定の他の *PNPLA6* 点突然変異マウスの解析を通じて、*PNPLA6* 機能と神経系関連疾患との関連を明らかにして行きたい。

脳凍結標本を用いた解析については、本年度に確立した Western 法を用いれば、容易に NTE タンパクを半定量的に解析することができる。従って、脳凍結標本を活用して、NTE タンパク量と疾患との関連等に着目した系統的解析が可能な状態にある。

E. 結論

有機リン関連疾患の発症機構解明を目指すために、有機リンと活性中心で共有結合を形成するヒト NTE を発現するマウスを系統化した。発現の程度は臓器や週齢によって異なるがいずれも高発現であることを、NTE 活性測定、及び、Western 法にて確認した。DDVP 投与やホルムアルデヒド曝露では少数例ではあるが影響は見られている。シックハウス症候群の原因物質とされるフタル酸エステルの経皮吸収については良いヒト型モデルができ、論文にまとめることができた。有機リンと NTE の複合体検出は動物培養細胞使用例ではうまく行かず、現在は大腸菌でのタグ付き NTE 産生に切り替え、大量産生・精製系を新たに確立した。

ヒトで報告される *PNPLA6* 遺伝子変異に相当するマウスを CRISPR 法で作製する計画については、CRISPR/Cas9 システムにて既に成功している。今後は、さらに複数の異なる変異を導入するとともに、これらの変異マウスを用いて、神経関連疾患における *PNPLA6* 遺伝子の関与・役割を明らかにして行きたい。

脳凍結標本を用いた解析については、確立した NTE の半定量的解析法を用いて、NTE タンパク質量と疾患との関連等に着目した系統的な解析への展開を計画している。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Sakabe, K., Kimura, M., Terayama, H., Tsunoda, M., Miyajima, E., Takano, H., Azuma, K., Mizukoshi, A., Matsuda, T., Mori, C., Kawakami, S., Miyata, M., Ishikawa, S. and Aizawa, Y. : Chemical Sensitivity-The Frontier of Diagnosis and Treatment (2016) Japanese Journal of Clinical Oncology Dec. 31 25(2), 49—54 (Review)

2. 学会発表

1. 杉野雅浩, 畑中朋美, 荻野瑛里奈, 従二和彦, 青山謙一, 内堀雅博, 太田嘉英, 今川孝太郎, 宮坂宗男, 坂部貢, 木村穰 シックハウス症候群における NTE の役割に関する研究—フタル酸エステルの経皮吸収に及ぼす影響 日本薬学会第 136 回年会 2016 年 3 月 26 日-29 日、横浜

2. 畑中朋美、杉野雅浩, 従二和彦, 内堀雅博, 太田嘉英, 今川孝太郎, 赤松正, 宮坂宗男, 坂部貢, 木村穰 ヒトにおけるフタル酸エステルの経皮吸収から見たシックハウス症候群について第 25 回日本臨床環境医学会学術集会 2016 年 6 月 17 日-18 日、郡山 郡山商工会議所

3. 木村穰、加藤明、本杉奈美、大久保朋一、畑中朋美、坂部貢、田中正史 ヒト Neuropathy Target Esterase 遺伝子導入マウスを用いたシックハウス症候群関連化学物質の生体影響の解析 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日横浜 パシフィコ横浜

4. 畑中朋美、中村優花、井上貴暁、田中亨、藤堂浩明、杉林堅次、内堀雅博、太田嘉英、今川孝太郎、赤松正、宮坂宗男、坂部貢、木村穰 ヒト皮膚におけるエステル化合物の経皮吸収挙動 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日-12.2 日 横浜 パシフィコ横浜

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

UBQLN2 コンディショナルノックアウトマウスの解析に基づく 神経変性機序の解明

研究代表者 田中 章景¹⁾

研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 土井 宏¹⁾, 児矢野 繁¹⁾

1) 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) 新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野

研究要旨

UBQLN2 は、家族性 ALS の責任遺伝子であることが知られている。タンパク質分解に深く関与する機能を持つため、その機能喪失により神経変性疾患の病態を形成する可能性がある。本研究では、*Ubqln2* のコンディショナルノックアウトマウスを作成・解析することで、神経変性疾患における病態進行機序を明らかにすることを目的とした。本研究期間中に♂*Actb-Cre* マウスと♀*Ubqln2^{lox/lox}* マウスの交配による全細胞ノックアウトマウスを作成し、我々の作成した *Ubqln2^{lox}* 系において *Ubqln2* が確実にノックアウトされることを確認した。また *Tubb3-Cre* マウスとの交配により、神経細胞特異的 *Ubqln2* ノックアウトモデルを作成した。さらに、成体マウス神経細胞で *Ubqln2* をノックアウトする新たなマウスモデルを作成中である。これら各種モデルにおいて行動解析、病態解析を進めることにより、UBQLN2 が神経変性において果たす役割を明らかにしていく。

A. 研究目的

我々がポリグルタミン病核内凝集体の構成成分として同定した UBQLN2 はそのコードする遺伝子が家族性 ALS の責任遺伝子であることが明らかにされたことから、両疾患の病態に深く関与する機能分子と考えられる。ALS 疾患遺伝子は RNA 結合タンパク質をコードするものが多い中、UBQLN2 はタンパク質分解に関与する機能を持つため、変異による単なる凝集性増大が毒性を持つのみにとどまらず、凝集体への取り込みや遺伝子変異による loss-of-function によって神経変性疾患の病態を形成することが予想される。そこで、*Ubqln2* のコンディショナルノックアウトマウスを作成・解析することで、ポリグルタミン病、ALS に共通する神経変性機序を明らかにする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

Ubqln1 のショウジョウバエ、オルソログ *Dsk2* については過剰発現、ノックアウトともに致死的であることが知られている。そこで、コンディショナルノックアウトを行うべく、loxP 配列で *Ubqln2* を挟み込む *Ubqln2^{lox}*

マウスと、細胞群特異的な Cre 発現をおこすマウスを交配し、その表現型と病理像を明らかにする。まず、全細胞に Cre 発現をおこす *Actb-Cre* マウスとの交配により、全細胞における *Ubqln2* ノックアウトマウスを作成し、*Ubqln2^{lox}* マウスのノックアウトが理論通りに成功しているかを確認する。その上で神経細胞特異的に Cre を発現する *Tubb3-Cre* マウスとの交配により神経細胞特異的 *Ubqln2* ノックアウトマウスを作成し、表現型を解析する。UBQLN2 はポリユビキチン化されたタンパク質とプロテアソーム間のアダプターとして機能しているので、ノックアウトによってユビキチン-プロテアソーム系による基質の分解障害、蓄積が生じる可能性が予想される。そこで、マウス樹立後は、運動機能の観察に加え、ユビキチン陽性封入体、TDP-43、FUS/TLS の細胞質内蓄積をはじめとする ALS 患者運動ニューロンで観察される各種の病理学的所見がこのマウスモデルでも見られるかを検討する。これらの各種実験において、研究分担者である笹岡俊邦教授からマウスの発生工学・生殖工学に関する助言を受け、実験経過の討論を行う。全ニューロンに Cre

発現をおこす *Tubb3-Cre* マウスとの交配においては、特にどのニューロンに神経変性が高度に生じやすいかを明らかにすることで、神経変性疾患の病変選択性の形成機序についても検討する。同時に培養細胞を用いて変異 UBQLN2 において結合が変化するタンパク質を網羅的に解析、同定し、*in vitro* の面からも神経変性機序を明らかにする。

本研究は横浜市立大学医学部遺伝子組換え実験安全委員会の承認および横浜市立大学における動物実験の実施に関する規程第 11 条に基づく動物実験申請、承認の下に行った。

C. 研究結果

平成 26 年度より *Ubqln2^{lox}* マウスの作成を開始し、平成 27 年度は♀のホモ接合性マウス(*Ubqln2^{lox/lox}*)と♂のヘミ接合性マウス(*Ubqln2^{lox}*)を作成し(*Ubqln2* は X 染色体上の遺伝子)、恒常的に *Ubqln2^{lox}* マウスを維持可能な状態とした。♂*Actb-Cre* マウスと♀*Ubqln2^{lox/lox}* を交配し、全細胞でのノックアウトマウスを作成し♂*Actb-Cre/Ubqln2^{lox}* において、*Ubqln2* が実際にノックアウトされることが確認できたが、*Actb-Cre* 自体が入ることにより、マウスの活動性が低下することが判明した。そのため全細胞ノックアウトモデルについては、一度生殖細胞で *Ubqln2* がノックアウトされたマウスから *Actb-Cre* を除去する交配を行っている。♂*Tubb3-Cre* マウスと♀*Ubqln2^{lox/lox}* マウスの交配による、神経細胞特異的ノックアウトマウスについては順調に交配が進み、現在行動解析中である。

コンディショナルノックアウトマウスについては解析中であるため、これに直接関与する研究結果は得られていないが、質量解析により UBQLN2 結合タンパクの網羅的同定を行い、野生型 UBQLN2 と変異型 UBQLN2 で異なる結合性を示す結合タンパク質を複数同定することに成功した。この結合タンパクは、UBQLN2 に特異的なドメインであり、変異が集中している PXX ドメインを欠失させると結合性が低下することを確認した。

D. 考察

我々が研究を行っている期間において Wu, Q ら (*Acta Neuropathol* 129:417-428, 2015)、Gorrie, GH ら (*Proc Natl Acad Sci* 111:14524-14529, 2015) がそれぞれ *Ubqln2* P497H 変異トランスジ

ェニクラットおよびマウスモデルを作成し、ともに *Ubqln2* 陽性凝集体形成が確認されている。一方で *Ubqln2* ノックアウトラットにおいては症状、神経細胞脱落をきたさず、行動、空間認知にも異常がみられないと報告された。さらに野生型の *Ubqln2* トランスジェニックマウスにおいても P497H トランスジェニックマウスと同様に *Ubqln2* 陽性凝集体の形成、歯状回の神経細胞脱落を認めることが報告され、これは他の ALS 責任遺伝子である TDP-43、FUS/TLS と同様な結果であった。これらの報告は我々の仮説と異なり gain-of-toxic function 仮説を支持するものである。しかしながら、UBQLN は 1-4 まで存在し、トータルノックアウトでは Gene redundancy のため表現型が明らかにならなかった可能性があると考え、♂*Tubb3-Cre* マウスと♀*Ubqln2^{lox/lox}* の交配による神経細胞特異的ノックアウトマウスの解析を継続する方針としている。さらに我々は Tamoxifen 誘導により Thy1.2 プロモーター下に *Cre* を発現するマウスを所持しており、成体となった後に Tamoxifen を投与し神経細胞における *Ubqln2* のノックアウトを行う計画も進行中である。この方法は *Ubqln2* のように gene redundancy がある遺伝子のノックアウトに有用と考えられ、また神経変性疾患は成人期発症であることから、患者の病態を反映する優れたモデルとなる可能性に期待している。

E. 結論

Ubqln2 のコンディショナルノックアウトマウスを作成・解析する目的で、♀*Ubqln2^{lox/lox}* マウスを作成した。全細胞ノックアウトモデルについては直近の研究で表現型をきたさない可能性が示唆されたため、♂*Tubb3-Cre* マウスと♀*Ubqln2^{lox/lox}* の交配による、神経細胞特異的ノックアウトモデルを作成し解析中である。さらに成体マウスで Tamoxifen 誘導によって神経細胞で *Ubqln2* をノックアウトするマウスモデルを作成中である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Miyaji Y, Kawabata Y, Joki H, Seki S, Mori K, Kamide T, Tamase A, Shima H, Nomura M, Kitamura Y, Nakaguchi H, Minami T, Tsunoda T,

Sasaki M, Yamada M, Tanaka F. Primary aldosteronism in patients with acute stroke: prevalence and diagnosis during initial hospitalization. *BMC Neurol.* 16:177, 2016

2. Nakae Y, Kudo Y, Yamamoto R, Dobashi Y, Kawabata Y, Ikeda S, Yokoyama M, Higashiyama Y, Doi H, Johkura K, Tanaka F. Relationship between cortex and pulvinar abnormalities on diffusion-weighted imaging in status epilepticus. *J Neurol.* 263(1):127-32, 2016

3. Nakamura H, Yamashita N, Kimura A, Kimura Y, Hirano H, Makihara H, Kawamoto Y, Jitsuki-Takahashi A, Yonezaki K, Takase K, Miyazaki T, Nakamura F, Tanaka F, Goshima Y. Comprehensive behavioral study and proteomic analyses of CRMP2-deficient mice. *Genes Cells.* 21(10):1059-1079, 2016

4. Sone J, Mori K, Inagaki T, Katsumata R, Takagi S, Yokoi S, Araki K, Kato T, Nakamura T, Koike H, Takashima H, Hashiguchi A, Kohno Y, Kurashige T, Kuriyama M, Takiyama Y, Tsuchiya M, Kitagawa N, Kawamoto M, Yoshimura H, Suto Y, Nakayasu H, Uehara N, Sugiyama H, Takahashi M, Kokubun N, Konno T, Katsuno M, Tanaka F, Iwasaki Y, Yoshida M, Sobue G. Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease. *Brain.* 139(Pt 12):3170-3186, 2016

5. Miyake N, Fukai R, Ohba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Imagawa E, Shiina M, Ogata K, Okuno-Yuguchi J, Fueki N, Ogiso Y, Suzumura H, Watabe Y, Imataka G, Leong HY, Fattal-Valevski A, Kramer U, Miyatake S, Kato M, Okamoto N, Sato Y, Mitsuhashi S, Nishino I, Kaneko N, Nishiyama A, Tamura T, Mizuguchi T, Nakashima M, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N. Biallelic TBCD Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 99(4):950-961, 2016

6. Tanaka F, Doi H, Kunii M. Autosomal recessive spinocerebellar ataxias in Japan. *Rinsho Shinkeigaku.* 56(6):395-9, 2016

2. 学会発表

1. Doi H, Koyano S, Shiina M, Ogata K, Hirashima

F, Inoue Y, Hashiguchi S, Kunii M, Kishida H, Yokota T, Mizusawa H, Mitsui J, Tsuji S, Matsumoto N, Ishikawa K, Tanaka F: The clinical and pathological features of autosomal-dominant SCA with *CACNA1G* mutation, 第57回日本神経学会学術大会, 神戸, 2016, 5.

2. Kunii M, Doi H, Ohba C, Ishii Y, Kudo Y, Kishida H, Ueda N, Ito Y, Saitsu H, Matsumoto N, Tanaka F: Genetic analysis of adult leukoencephalopathy patients using custom-designed exon capture library. 第57回日本神経学会学術大会, 神戸, 2016, 5.

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。

哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析

研究代表者 岩里 琢治 1) 2)
研究分担者 笹岡俊邦 3), 香取将太 1), 羅 ブンジュウ 1)

- 1) 国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門
- 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

研究要旨

哺乳類の神経回路が形成されるメカニズムを解明することは、ヒトの脳高次機能を理解するために必須である。本課題では、動物が左右の体を協調させて機能させるために重要な正中線回路形成のメカニズムを、ノックアウトマウスを中心とした手法で解明することを試みた。正中線回路形成に、脊髄で発現する RacGAP-*achimaerin* が重要な役割を担うことを明らかにし、その機構を解明した。

A.研究目的

動物が体の左右を協調させて機能させるためには、正中線において左右の神経回路が適切に連絡することが重要である。本課題では、こうした正中線回路形成の分子機構を Rac-GAP α キメリンのノックアウトマウスを中心とした手法で解明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）

Rac-GAP α キメリンの全身性ノックアウトマウス、大脳皮質特異的ノックアウトマウス、脊髄特異的ノックアウトマウスをそれぞれ繁殖し解析に用いた。上記の領域特異的 α キメリンノックアウトマウスは、 α キメリン flox マウスと適切な Cre マウスとを交配することによって作製した。

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.研究結果と考察

正常なマウスでは、皮質脊髄路神経軸索は脳幹で左右交差した後は正中線を再交差することはない。一方、全身性 α キメリンノックアウトマウスの皮質脊髄路は脳幹では正常に左右交差するが、脊髄でも異常な左右再交差が多くみられる。その原因をさぐるために、 α キメリン flox マウスと適切な Cre マウスを交配することによって、大脳皮質特異的 α キメリンノックアウトマウスと脊髄特異的 α キメリンノックアウトマウスをそれぞれ作製した。それらのマウスの大脳皮質運動野にトレーサーを注入することによって、皮質脊髄路の走行パターンを解析した。その結果、大脳皮質特異的 α キメリンノックアウトマウスの脊髄では、全身性ノックアウトマウスと同様の異常がみられた。一方、脊髄特異的 α キメリンノックアウトマウスの皮質脊髄路を解析したところ、やはり脊髄正中線における異常な再交差が検出された。

正常なマウスでは正中線には正中線グリアが存在し反発性の軸索ガイダンス分子を発現することによって正中線バリアとしての機能を担っている。脊髄特異的 α キメリンノックアウトマウスの脊髄正中線バリアを解析したところ、顕著な異常が検出された。一方、大脳皮質特異的 α キメリンノックアウトマウスではそうした異常はみられなかった。次いで α キメリンノックアウト

トマウスにおいて正中線バリア異常が発達期のいつ初めて見られるかを解析することによって、その時期を特定した。さらなる解析により、 α キメリンの上流の分子機構を明らかにすることにも成功した。これらの実験結果は現在論文としてまとめているとことである。

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。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

Shinoda, Y., Ishii, C., Fukazawa, Y., Sadakata, T., Ishii, Y., Sano, Y., Iwasato, T., Itohara, S., Furuichi, T. CAPS1 stabilizes the state of readily releasable synaptic vesicles to fusion competence at CA3-CA1 synapses in adult hippocampus. *Sci Rep.* **6**, 31540. (2016)

Iwata, R., Iwasato, T. In vitro Assay for Dendritic Spine Retraction of Hippocampal Neurons with Sparse Labeling. *Bio-Protocol* **6**, e1937. (2016)

Luo, W., Mizuno, H., Iwata, R., Nakazawa, S., Yasuda, K., Itohara, S., Iwasato, T. Supernova: A Versatile Vector System for Single-Cell Labeling and Gene Function Studies in vivo. *Sci Rep.* **6**, 35747. (2016)

Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Antón-Bolaños, N., Mezzera, C., Gezelius, H., Andrés, B., Rodríguez-Malmierca, L., Susín, R., Schaad, O., Iwasato, T., Schuele, R., Rutlin, M., Nelson, S., Ducret, S., Valdeolmillos, M., Rijli, F., López-Bendito, G. Prenatal thalamic waves regulate cortical area size prior to sensory processing. *Nature Commun.* **8**, 14172. (2017)

2.学会発表

岩里琢治（招待講演）

単一細胞蛍光標識と標識細胞特異的遺伝子操作を可能とするベクターシステム 第13回アカデミックフォーラム 2016年5月13日（東

京）

H. Mizuno, T. Sato, T. Iwasato. 新生仔バレル皮質第4層における神経活動パターンの解析 In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in developing barrel cortex layer 4. 第39回日本神経科学大会 2016年7月20日-7月22日（横浜）

S. Katori., S. Itohara., T. Iwasato. 脊髄 RacGAP α キメリンは、皮質脊髄路軸索の誤った正中線交差を防ぐ「正中線バリア」の形成に重要な役割を担う Spinal RacGAP α -chimaerin is required to establish midline barrier for proper corticospinal projection 第39回日本神経科学大会 2016年7月20日-7月22日（横浜）

W. Luo., H. Mizuno. R. Iwata., S. Nakazawa., T. Iwasato. スーパーノバ法による生体脳単一細胞の高輝度蛍光標識および標識細胞特異的遺伝子操作 Dissecting neural circuits at a single-cell level using the Supernova system 第39回日本神経科学大会 2016年7月20日-7月22日（横浜）

S. Nakazawa., H. Mizuno., T. Iwasato., 新生仔バレル皮質における神経回路精緻化の in vivo 経時観察 Time-lapse in vivo imaging of circuit refinement in the neonatal mouse barrel cortex. 第39回日本神経科学大会 2016年7月20日-7月22日（横浜）

T. Iwasato.（招待講演）
In vivo imaging of neonatal mouse barrel cortex シンポジウム”Circuit Construction in the Mammalian Brain” 2016年8月8日-8月9日（大阪）

H. Mizuno., T. Sato., T. Iwasato. 新生仔バレル皮質第4層における神経活動パターンの解析 In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in developing

somatosensory cortex layer 4 シンポジウム”Circuit Construction in the Mammalian Brain” 2016年8月8日-8月9日 (大阪)

S. Katori., S. Itohara., T. Iwasato.
RacGAP α -chimaerin is required to establish spinal midline barrier for proper corticospinal projection シンポジウム”Circuit Construction in the Mammalian Brain” 2016年8月8日-8月9日 (大阪)

岩里琢治 (招待講演)
独自の二光子イメージング技術を用いた、新生仔マウス大脳皮質における神経回路発達の解析 第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月7日 (神奈川県藤沢市)

岩里琢治 (招待講演)
新生仔大脳皮質における神経回路スクラップ&ビルド スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御シンポジウム 2016年9月8日 (東京)

香取将太、岩里琢治 (招待講演)
左右の神経回路の混線を防ぐ「正中線バリア」の形成メカニズム 第11回認識と形成研究会 2016年9月17日-18日 (名古屋)

H. Mizuno., T. Sato., T. Iwasato.
In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in layer 4 of the neonatal barrel cortex. Society for Neuroscience 2016, 2016年11月12日-16日 (San Diego)

S. Katori., S. Itohara., T. Iwasato.
RacGAP α -chimaerin is required to establish spinal midline barrier for proper corticospinal projection. Society for Neuroscience 2016, 2016年11月12日-16日 (San Diego)

S. Nakazawa., W. Luo., R. Iwata., H. Mizuno., T. Iwasato.
Supernova: Extensible vector systems that enable high intensity single-cell labeling and

labeled cell-specific gene knockout and editing In vivo. Society for Neuroscience 2016, 2016年11月12日-16日 (San Diego)

T. Iwasato. (招待講演)
In vivo imaging of neonatal mouse barrel cortex
Dart Neuroscience Seminar Series at TSRI
2016年11月18日 (San Diego)

岩里琢治 (招待講演)
哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析 新潟大学脳研究所共同研究合同セミナー 2017年3月11日 (新潟市)

G.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1.特許取得

特許の名称：ベクターシステム、遺伝子発現方法、標的遺伝子ノックアウト方法、標的遺伝子ノックダウン方法、標的遺伝子編集方法、及び遺伝子発現キット

発明者：岩里琢治、水野秀信、羅ブンジュウ、岩田亮平

権利者：情報システム研究機構

出願番号：特願 2016-094814

出願年月日：2016年5月10日

2.実用新案登録

特になし

3.その他

特になし

大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン神経伝達の機能の解析

研究代表者 南部 篤¹⁾

研究分担者 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

ドーパミン神経伝達が運動制御において重要な役割を果たすことは、大脳基底核のドーパミンが枯渇するとパーキンソン病における重篤な運動障害が生じることからも明らかであるが、大脳基底核の情報伝達や運動制御における機能については、不明な部分が多い。ドーパミン受容体を無くしたマウスにおいて神経活動の異常と運動症状を解析することは、運動制御におけるドーパミン神経伝達の機能を明らかにするだけでなく、パーキンソン病の病態解明にもつながる。本研究では、ドーパミン受容体のノックアウトマウスとコンディショナルノックダウンマウスにおいて、覚醒下神経活動の記録と行動解析を行った。その結果、1) D1 受容体を介したドーパミン神経伝達は、大脳基底核の直接路を介した情報伝達と正常な運動の発現に必須であること、また、2) D2 受容体を介したドーパミン神経伝達は、大脳基底核の間接路を介した情報伝達を抑制するように働くことが示唆された。

A. 研究目的

ドーパミン神経伝達が運動制御において重要な役割を果たすことは、大脳基底核のドーパミンが枯渇するとパーキンソン病における重篤な運動障害が生じることからも明らかであるが、大脳基底核の情報伝達や運動制御における機能については、不明な部分が多い。ドーパミン受容体を無くしたマウスにおいて神経活動の異常と運動症状を解析することは、運動制御におけるドーパミン神経伝達の機能を明らかにするだけでなく、パーキンソン病の病態解明にもつながる。本研究では、ドーパミン D1 受容体 (D1R) のコンディショナルノックダウン (D1RKD) マウスと D2 受容体 (D2R) のノックアウト (D2RKO) マウスにおいて、覚醒下神経活動の記録と行動解析を行うことにより、大脳基底核内情報伝達と運動制御におけるドーパミン神経伝達の機能を明らかにするとともに、パーキンソン病の病態生理の解明を目指す。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

今年度の実験には、D2R の発現は正常で D1R の発現が on/off 可能な D1RKD マウスと D2RKO マウスを用いた。

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 D1R を、間接路ニューロンは D2R を発現しているため、直接路ニューロンの投射先である淡蒼球内節 (GPi) と、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。D1RKD マウスにおける実験では、まず D1R が発現している状態において、GPi および 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

る応答パターンの記録、および、マウスの自発運動量の測定を行った。次に、ドキシサイクリン (Dox) を投与することによって D1R の発現を抑えた後、同様の解析を行った。D2RKO マウスにおける実験では、D2RKO マウスにおける GPi および 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。

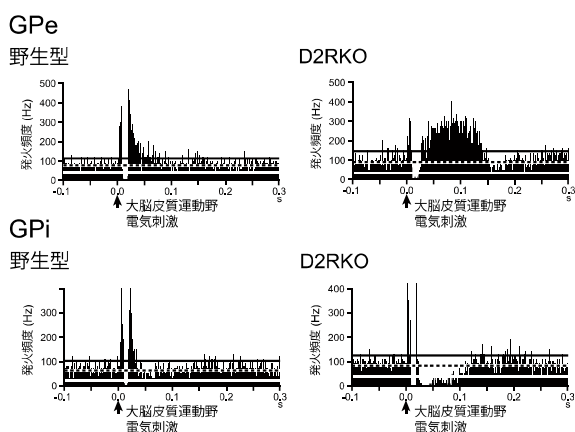
本研究計画は所属研究機関の動物実験委員会の審査、承認を受けており、すべて「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の使用及び保管等に関する基準」および「自然科学研究機構岡崎 3 機関における動物実験に関する指針」を遵守して行った。動物実験および飼育保管は、動物実験委員会の承認を受けた実験室で行った。また、本研究計画は P1A レベルの遺伝子組換え実験を含むため、所属研究機関の組換え DNA 委員会の審査、承認を受け、関連する法令、ならびに、これに基づいて作成された所属研究機関の「組換え DNA 実験安全管理規定」を遵守して行った。実験場所に関しては、組換え DNA 委員会の審査、承認を受けている P1A レベルの実験室で行った。

C. 研究結果

D1RKO マウスにおいて覚醒下で神経活動の記録を行ったところ、D1R が発現している状態では、GPi、GPe ともに、野生型マウスと同様に約 50 Hz でランダムな自発発火を示すことがわかった。次に、Dox の投与により D1R の発現を抑制した状態で記録を行ったが、GPi、GPe ともに、自発発火頻度とパターンにおいて有意な変化は示さなかった。また、大脳皮質の電気刺激に対する応答について調べたところ、D1R が発現している状態では、GPi、GPe ともに、野生型マウスと同様な早い興奮—抑制—遅い興奮という 3 相性の応答パターンを示したが、D1R の発現を抑制すると、GPi では多くのニューロンが興奮—興奮という 2 相性の応答パターンを示すようになり、抑制が消失した (図)。一方、GPe では有意な変化は見られなかった。自発運動量の変化についても解析を行ったところ、D1R の発現が抑制されている期間、運動

量が低下することがわかった。

一方 D2RKO マウスでは、GPi、GPe ニューロンともに自発発火頻度は正常マウスと同様であったが、両者においてバーストを含む異常な発火パターンが観察された。また、大脳皮質の電気刺激に対する応答を調べてみると、GPe において、3 相性応答のうちの抑制とそれに続く遅い興奮が有意に増強されていることがわかった。一方 GPi では野生型に比べて著しく長い抑制が観察された (図)。



淡蒼球外節(GPe、上段)および内節(GPi、下段)ニューロンの大脳皮質の電気刺激に対する応答を示す刺激前後時間ヒストグラム。
野生型マウスのGPe、GPiニューロンはどちらも、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 相性応答を示した (上段左と下段左)。一方 D2 受容体ノックアウトマウス(D2RKO)のGPeニューロンでは、抑制と遅い興奮が有意に増強されていた (上段右)。またGPiニューロンでは、著しく長い抑制が観察された (下段右)。

D. 考察

GPi および GPe で記録される大脳皮質由来の 3 相性の応答のうち、早い興奮は大脳皮質—視床下核—GPi/GPe 路を、抑制は大脳皮質—線条体—GPi/GPe 路を、遅い興奮は大脳皮質—線条体—淡蒼球外節—視床下核—GPi/GPe 路を介して伝達されることが明らかにされている。D1RKO マウスにおいて、D1R が発現していない状態では、GPi における抑制がほとんど消失したことから、マウスの運動量が低下したことから、D1R を介するドーパミン神経伝達は、直接路 (大脳皮質—線条体—GPi 路) を介した情報伝達と運動の発現に必須であることが示唆された。また、D1R を介したドーパミン神経伝達の消失は、パーキンソン病における無動や寡動の症状発現に寄与すると考えられる。一方 D2RKO マウスにおいて、線条体から GPe への抑制が増強されていたことから、D2R を介するドーパミン神経伝達は、線条体の間接路ニューロンに対して抑制的に作用することが示唆された。

E. 結論

D1R を介するドーパミン神経伝達は、直接路を介する情報伝達と運動の発現に必須であり、その消失はパーキンソン病における無動や寡動の症状発現に寄与していると考えられる。一方、D2R を介するドーパミン神経伝達は、線条体の間接路ニューロンに対して抑制的に作用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

Chiken S, Nambu A (2016. 7. 21) Dopaminergic transmission maintains dynamic activity changes in the basal ganglia to appropriately control movements. 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Symposium (Yokohama)

知見聡美、佐藤朝子、笹岡俊邦、高田昌彦、南部篤 (2017. 3. 9) 大脳基底核内情報伝達と運動制御におけるドーパミンの機能 (新潟) 第6回生理研-霊長研-脳研合同シンポジウム (新潟)

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

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

研究代表者 渡部 和彦¹⁾
研究分担者 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

ヒト筋萎縮性側索硬化症(ALS)における運動ニューロン変性のメカニズムは依然として不明であるが、ALS 関連遺伝子として TDP-43, FUS など様々なものが知られ、さらに蛋白分解系の異常によって運動ニューロンにおける細胞内凝集体形成や細胞死が促進されることがわかってきた。本研究では、各種の組換えウイルスベクターを用いて TDP-43, FUS などの ALS 関連遺伝子および蛋白分解系に対する shRNA を培養系および成体マウス・ラット運動ニューロンに発現させ、ALS に特徴的な凝集体の形成過程や細胞死、周囲の細胞への播種・進展様式を解析するとともに、ヒト ALS 剖検例と比較解析することにより、ALS 病変の発症進展機序の解明を目指している。

A. 研究目的

ヒト筋萎縮性側索硬化症(ALS)における運動ニューロン変性のメカニズムは依然として不明であるが、近年、ALS 関連遺伝子として TDP-43, FUS, VCP, UBQLN2, C9orf72 など様々なものが知られている。さらにプロテアソームやオートファジー経路の凝集体形成・細胞死への関与が指摘されており、これら蛋白分解系の異常が ALS の発症進行にも影響を与えていると想定される。本研究では、非増殖性組換えウイルスを用いて TDP-43, FUS などの ALS 関連遺伝子、およびプロテアソーム・エンドソーム・オートファジーに対する抑制性ショートヘアピン(sh)RNA を培養系および成体ラット・マウス運動ニューロンに単独または共発現させ、凝集体の形成過程や細胞死をヒト ALS 剖検例と比較解析することにより、ALS の運動ニューロン変性機序の解明を目指している。

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凝集体が形成されることを報告した (Watabe et al., 2014)。しかし、凝集体形成と細胞死の関連は明確ではな

い。そこで、昨年度に引き続き、培養ニューロンおよびグリア細胞における TDP-43 細胞質凝集体の形成過程と細胞死をタイムラプス・イメージングにより経時的に観察した。

一方、ALS を含む神経変性疾患に対する熱ショック応答の治療応用が近年注目を集めている。そこで今年度は、組換えウイルスを用いた熱ショック応答に関与する分子群の共発現により、上記の実験的 TDP-43 凝集体形成を抑制しうるか解析を開始した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. ニューロン、アストロサイト、またはオリゴデンドロサイトに分化すると各々 tubulin beta-3 (TUBB3), GFAP, cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP) プロモータ制御下に EGFP を発現するプラスミドをラット神経前駆細胞株 1464R に導入し各安定発現株を得た。これら細胞株をレチノイン酸負荷によって EGFP 陽性ニューロン、グリアに分化させたのち、ヒト正常および C 末断片 (208-414) TDP-43 を DsRed とともに発現する組換えアデノウイルスを共感染させた。感染 24 時間後、プロテアソ

ーム阻害剤 MG-132 を添加し、タイムラプス蛍光撮影を 72 時間行い、細胞質凝集体の形成と細胞死を経時的に観察した。

2. 上記の TDP-43 細胞質凝集体形成モデルに対して、ヒト heat shock transcription factor 1 (HSF1), heat shock proteins (HSP) 70 を発現する組換えアデノウイルスを共感染させ、凝集抑制効果を検討した。

C. 研究結果

1. 培養タイムラプスの解析では、正常および C 末断片 DsRed-TDP-43 組換えアデノウイルスを分化ニューロン、グリアに感染発現させ 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、やがて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が観察された。この凝集体は sarkosyl 不溶性の顆粒状構造物からなり、リン酸化 TDP-43 を含んでいた。また、この不溶性 TDP-43 凝集体は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。
2. 上記のリン酸化 TDP-43 不溶性凝集体形成は HSF1 組換えウイルスの共感染により顕著に抑制されることが凝集体の蛍光観察およびウェスタンブロットにより確認された。一方、HSP70 組換えウイルスには凝集体形成抑制効果を認めなかった。

D. 考察

培養ニューロン、グリアにおける TDP-43 凝集体の形成過程を経時的に観察し、組換えアデノウイルスによって形成された不溶性 TDP-43 凝集体が細胞質でシードとして機能することを見出した。本実験系は TDP-43 凝集体の細胞間伝播を解析する上で有用と考えられ解析を続けている。

一方、この培養 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 の凝集抑制効果が認められた。しかしその下流は HSP70 とは異なる他の熱ショック蛋白を介していると考えられ、現在、候補分子の組換えウイルスを順次作製しさらに検討を行っている。

今後は、これら組換えアデノウイルスを用いて成体マウス運動ニューロン TDP-43 凝集体形成モデル動物を作製し、凝集体の形成過程や細胞死をヒト ALS 剖検例と比較解析するとともに、熱シ

ック関連分子や低分子化合物の TDP-43 凝集体形成抑制効果を検討することにより ALS の治療法開発に繋げていきたい。

E. 結論

組換えアデノウイルスを用いて培養ニューロン、グリアにおける TDP-43 凝集体の形成過程と細胞死を経時的に観察し、形成された凝集体がシードとして機能することを見出した。一方、HSF1 の TDP-43 凝集抑制効果が認められた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

- 1) Niimi N, Yako H, Tsukamoto M, Takaku S, Yamauchi J, Kawakami E, Yanagisawa H, Watabe K, Utsunomiya K, Sango K. Involvement of oxidative stress and impaired lysosomal degradation in amiodarone-induced schwannopathy. *Eur J Neurosci* 2016 Jul;44(1):1723-33.
- 2) Bokuda K, Shimizu T, Kimura H, Yamazaki T, Kamiyama T, Watabe K, Kawata A, Hayashi M, Isozaki E. Quantitative analysis of the features of fasciculation potentials and their relation with muscle strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Sci.* 2016 Dec;37(12):1939-1945.
- 3) Hayashi K, Mochizuki Y, Takeuchi R, Shimizu T, Nagao M, Watabe K, Arai N, Oyanagi K, Onodera O, Hayashi M, Takahashi H, Kakita A, Isozaki E. Clinicopathological characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis resulting in a totally locked-in state (communication Stage V). *Acta Neuropathol Commun* 2016;4:107.
- 4) 村上龍文, 三五一憲, 渡部和彦, 新見直子, 李正花, 山村研一, 砂田芳秀. TTR 型アミロイドーシスでの末梢神経障害機序の研究: シュワン細胞の関与について. *Peripheral Nerve* 2017;27:62-67.

2. 学会発表

- 1) 村上龍文, 三五一憲, 渡部和彦, 新見直子, 山下倫太郎, 李正花, 山村研一, 砂田芳秀. TTR 型アミロイドーシスの神経障害発生機序の研究: シュワン細胞の関与について. 第 57 回日本神経学会学術大会, 神戸国際展示場 (神戸市),

2016年5月18日.

2) 木田耕太, 清水俊夫, 木村英紀, 山崎寿洋, 上山勉, 渡部和彦, 林雅晴, 磯崎英治.

Electromyographic findings of progressive muscular atrophy: Comparison with amyotrophic lateral sclerosis. 第57回日本神経学会学術大会, 神戸国際展示場(神戸市), 2016年5月19日.

3) 渡部和彦. 培養シュワン細胞の実験神経病理. 第57回日本神経病理学会総会学術研究会; シンポジウム1「グリア細胞から見た神経病理学」. ホテルニューキャッスル(弘前市), 2016年6月2日.(招待講演)

4) 石井智裕, 河上江美子, 秋山けい子, 遠藤堅太郎, 三澤日出巳, 渡部和彦. TDP-43組換えアデノウイルスによる培養ニューロン・グリア細胞内凝集体の形成過程. 第57回日本神経病理学会総会学術研究会. ホテルニューキャッスル(弘前市), 2016年6月3日.

5) Watabe K, Ishii T, Misawa H. Adenovirus-induced TDP-43 and FUS aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging. 46th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, November 14, 2016.

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

神経変性疾患:特異的異常蛋白はシナプスを越えるのか

研究代表者 小柳 清光^{1) 3)}
研究分担者 鈴木 絵美²⁾、柿田 明美⁴⁾

信州大学医学部¹⁾ 神経難病学講座 ²⁾ 分子神経生理学教室 ³⁾ 初石病院脳機能研究施設
⁴⁾ 新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野

研究要旨

27 年度の本研究で、古典型孤発性 (s) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の軸索内におけるリン酸化 (p) TDP-43 陽性の顆粒-網状封入体と塊状封入体を報告した。28 年度の本継続研究では、これらの封入体の形態学的詳細について検討し、(1) 塊状封入体は舌下神経核神経細胞と前角細胞から距離数十～数百 μm 以内に存在すること、一方顆粒-網状封入体は神経細胞から数百 μm から数 mm 以上の距離の軸索に存在すること、(2) 顆粒-網状封入体、塊状封入体ともユビキチン陽性、p62 陽性で、リン酸化 (p) ニューロフィラメント陰性であること、(3) 顆粒-網状封入体は軸索外縁に位置し、塊状封入体は軸索中心部に位置すること、(4) 塊状封入体は軸索中で p ニューロフィラメントに囲まれて存在するが、顆粒-網状封入体が軸索外縁に存在する部の軸索内部には p ニューロフィラメントは存在しない傾向が認められたこと、を明らかにした。

A. 研究目的

古典型孤発性 (s) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病因蛋白と考えられているリン酸化 (p) TDP-43 が、神経組織内を拡散しているのかどうか、神経細胞同士の接点であるシナプスを越えるのか、について検索を行った。これに関し、27 年度の本研究では、sALS の軸索内におけるリン酸化 (p) TDP-43 陽性の顆粒-網状封入体と塊状封入体を見出し報告した。本継続研究では、これらの軸索内封入体の形態学的特徴の詳細について免疫組織学的に解析する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

日本人古典型 sALS19 剖検例(男 11 例、女 8 例、経過は 6 カ月から 72 カ月) および日本人対照 3 例 (男 3 例) を用いた。ホルマリン固定、パラフィン包埋された脳と脊髄各箇所の切片を、ヘマトキシリン-エオジン (HE)、クリューバー-バレラ

(KB) 染色し、抗 pTDP-43 抗体、抗リン酸化非依存性 TDP-43 抗体、抗リン酸化 (p) ニューロフィラメント抗体、抗シナプトフィジン抗体等を用いて免疫染色し (ABC 法および蛍光抗体法)、前角細胞を明視野顕微鏡と共焦点顕微鏡 (ツアイス LSM5) で観察した。本研究は信州大学医学部倫理委員会で承認 (#1565)。

C. 研究結果

軸索内 pTDP-43 陽性構造物は、sALS 症例の顔面神経核、舌下神経核の神経細胞、および前角細胞の軸索で比較的多数見られ、その形態は、軸索外縁に存在する大きさ $1\mu\text{m}$ 程度の顆粒-網状のものと、軸索内部に存在する、大きさ $10\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}$ 程度の塊状のもの 2 種類からなっていた。

塊状封入体は舌下神経核神経細胞と前角細胞から距離数十～数百 μm 以内に存在し、一方顆粒-網状封入体は塊状封入体より遠位の、数百 μm か

ら数 mm 以上の距離の軸索に存在していた。顆粒-網状封入体、塊状封入体ともにユビキチン陽性、p62 陽性で、p ニューロフィラメント陰性であった。塊状封入体は軸索中心部に位置して p ニューロフィラメントに囲まれて存在し、顆粒-網状封入体が軸索外縁に存在する部の軸索内部には p ニューロフィラメントの免疫原性は存在しない傾向が認められた。

D. 考察

多くの sALS で神経細胞胞体内に pTDP-43 封入体と神経細胞脱落を呈する顔面神経核や舌下神経核、前角細胞の軸索で pTDP-43 陽性構造物が認められたことは、胞体内と軸索内で、何らかの関連性を有して pTDP-43 陽性構造物が形成されていることを示している。

これらの神経細胞の軸索で、塊状封入体は神経細胞から距離数十～数百 μm 以内に存在し、一方顆粒網状封入体は神経細胞から数百 μm から数 mm 以上の距離をおいて生じていることは、これら 2 種類の軸索内封入体の形成メカニズムが基本的に異なることを示唆している。それが軸索流の緩急や上流-下流に基づくものか、軸索の荷電-放電に関するものか、髄鞘やアストロサイト、ミクログリアなどの軸索の周囲環境の差によるのかなどは、不明である。

顆粒-網状封入体、塊状封入体ともにユビキチン陽性、p62 陽性で、p ニューロフィラメント陰性であることは、これらが神経細胞内の pTDP-43 封入体とほぼ同一の性状を有する構造であることを示唆している。しかし軸索内の封入体が細胞内の封入体が軸索に流れ込んで来たものか、軸索内で形成されたものか、は今後の検討を要する。

顆粒-網状封入体は軸索外縁のみに位置し、塊状封入体は軸索中心部に位置することは、これらの封入体の形成機序を反映した重要な所見と思われる。顆粒-網状封入体は、たとえば軸索内の液性の pTDP-43 かそのオリゴマーが軸索表面の電位差などによって表面に引きつけられて凝集した可能性などを考えさせる。一方塊状の封入体は、神経細胞胞体内で凝集した pTDP-43 が軸索流により機械的に流されてきた可能性と、軸索内の pTDP-43 オリゴマーが何らかの因子によって雪だるま式に塊を形成した可能性も考えられる。

塊状封入体が軸索中で p ニューロフィラメントに囲まれて存在していることは、細胞体内で形成された封入体が軸索に流れ込んだことを示しているのかも知れない。一方、顆粒-網状封入体が軸索外縁に存在する部の軸索内部には p ニューロフィラメントは存在しない傾向が認められたことは何を示唆するのか。顆粒-網状封入体が存在する部の軸索は細くは無く、何らかの構造物が存在して軸索の太さを維持している。この部でなぜ p ニューロフィラメントの免疫原性が存在しないのか、どんな構造物が存在しているのか、検索が必要である。

E. 結論

sALS の軸索内には pTDP-43 陽性の顆粒-網状封入体と塊状封入体が存在し、塊状封入体は神経細胞体から距離数十～数百 μm 以内に存在し、一方顆粒-網状封入体は塊状封入体より遠位の、数百 μm から数 mm 以上の距離の軸索に存在する。顆粒-網状封入体、塊状封入体ともにユビキチン陽性、p62 陽性で、p ニューロフィラメント陰性である。顆粒-網状封入体は軸索外縁に位置し、塊状封入体は軸索中心部に位置する。塊状封入体は軸索中で p ニューロフィラメントに囲まれて存在するが、顆粒-網状封入体が軸索外縁に存在する部の軸索内部には p ニューロフィラメントの免疫原性は存在しない傾向がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Onozato T, Nakahara A, Suzuki-Kouyama E, Hineno A, Yasude T, Nakamura T, Yahikozawa H, Watanabe M, Kayanuma K, Makishita H, Ohara S, Hashimoto T, Higuchi K, Sakai T, Asano K, Hashimoto T, Kanno H, Nakayama J, Oyanagi K: Axonal TDP-43 aggregates in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 42: 561-572, 2016
2. Nakayama Y, Shimizu T, Mochizuki Y, Hayashi K, Matsuda C, Nagao M, Watabe K, Kawata A, Oyanagi K, Isozaki E, Nakano I: Predictors of impaired communication in amyotrophic lateral sclerosis patients with tracheostomy-invasive ventilation. *Amyotroph Lateral Scler*

Frontotemporal Degener 17: 38-46, 2016

3. 日根野晃代、小柳清光、中村昭則、下島吉雄、吉田邦広、池田修一. SOD1 遺伝子 L106V 変異家族性筋萎縮性側索硬化症における下部尿路機能障害の発現時期と排尿神経機構の病理所見. **臨床神経学** 56: 69-76, 2016

4. Oyanagi K, Kinoshita M, Suzuki-Kouyama E, Inoue T, Nakahara A, Tokiwai M, Arai N, Satoh J, Aoki N, Jinnai K, Yazawa I, Arai K, Ishihara K, Kawamura M, Ishizawa K, Hasegawa K, Yagisita S, Amano N, Yoshida K, Terada S, Yoshida M, Akiyama H, Mitsuyama Y, Ikeda S. Adult onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP) and Nasu-Hakola disease: Lesion staging and dynamic changes of axons and microglial subsets. **Brain Pathol** [epub ahead of print]

2. 学会発表

1. 小柳清光、木下通亨、鈴木絵美、井上輝彦、中原亜紗、新井信隆、佐藤準一、青木直哉、陣内研二、矢澤 生、新井公人、石原健司、河村満. 腫大軸索を伴う優性遺伝性白質脳症 (HDLS) と那須-ハコラ病の病理学的ステージとミクログリアの変化. 第 57 回日本神経病理学会・2016 年 6 月 2 日・弘前市

2. 木下通亨、近藤恭史、石澤圭介、石原健司、吉田真理、吉田邦広、井上輝彦、三山吉夫、小柳清光、池田修一. 神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) の脳梁病変. 第 57 回日本神経病理学会・2016 年 6 月 2 日・弘前市

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。

ドーパミン受容体変異マウスを用いた不安様行動発症機序の解明

研究代表者 飯田 諭宜 1)
研究分担者 板倉 誠 2), 山森 早織 2), 笹岡 俊邦 3)

1) 北里大学医学部精神科 2) 北里大学医学部生化学 3) 新潟大学脳研究所

研究要旨

不安は情動の1つであり、その制御には大脳辺縁系の扁桃体-視床下部-中脳中心灰白質の神経回路が主要な役割を果たしている。しかしながら、扁桃体は大脳皮質や海馬とも神経回路を形成しており、情動行動には脳の広範な領域が関与していることが示唆される。

我々はこれまでに、ドーパミン D2 および D3 レセプターアゴニストをマウスに腹腔内投与すると、2 種類の行動実験において、それぞれのアゴニストが異なる不安様行動を誘発することを明らかにしてきた。そこで本研究では、ドーパミン D2 および D3 レセプターアゴニストを投与したマウス脳の様々な領域に起きている変化をマイクロダイアリシス法、免疫染色法、イムノブロット法を用いて検討した。その結果、ドーパミン D2 レセプターアゴニスト投与マウスの海馬においてドーパミン量が上昇することおよび AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1 サブユニットのリン酸化が抑制されていることを明らかにした。

A. 研究目的

不安感は危険の回避においては必須な感情であるが、過度の不安感は不安障害を引き起こす。不安障害を克服するためには、不安感を誘発する脳内分子機序の解明は必須である。

不安に関与する神経伝達物質としてはセロトニンやノルアドレナリンがよく知られ、研究が進められている。しかしながら、同じくモノアミンであるドーパミンと不安との直接的な関係は明確でない。我々は、薬理的アプローチとドーパミン D2 および D3 レセプターノックアウトマウスを用いて、ドーパミンが不安感の誘発に関与するかを検討し、明暗選択テストにおける不安感にはドーパミン D2 レセプターが主に働くこと、オープンフィールドテストにおける不安感にはドーパミン D3 レセプターが主要な働きを示すことを明らかにしてきた。本研究ではドーパミン D2 および D3 レセプターアゴニストがマウスの脳内に、どのような変化を引き起こすのか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）

1. マウスへの薬物投与

野生型マウスとしては 10～12 週齢のオスの C57BL/6 マウスを使用した。ドーパミン D2 および D3 レセプターノックアウトマウスは、新潟大学脳研究所の笹岡俊邦教授から譲渡された。動物の取り扱いについては、北里大学医学部動物実験委員会承認の下、北里大学動物指針を遵守して行った。また、遺伝子組換え動物の使用は、北里大学遺伝子組換え実験委員会の承認の下に行った。

マウスへの薬物投与は、生理食塩水に薬物を溶解後、29 ゲージの針を用いて腹腔内に注射した。

2. マウスの行動実験

- オープンフィールドテスト： 50 cm × 50 cm の箱の中にマウスを置き、マウスの動きをコンピューターに連動したビデオカメラで解析した。運動量としては行動距離を、不

安様行動の指標としては、全行動距離のうち 9 × 9 に分割した区画の最外区画以外の区画での行動距離の比率（中央滞在比率）を測定した。

- ・明暗選択テスト：50 cm × 50 cm の箱を明室と暗室とに二分し、自由に行き来できるようにした装置にマウスを置き、マウスの動きをビーム法で計測した。運動量としては行動距離、行動時間、行動速度、立ち上がり回数を、不安様行動の指標としては、明室に滞在した比率（明所区画横切り比率）を測定した。

3. マイクロダイアリシスによるマウス海馬のドーパミンとセロトニンの定量

10～12 週齢のオスの C57BL/6 マウスを用いて、マイクロダイアリシスを行った。手術によって 1 mm の透析プローブをマウスの海馬に埋め込み、翌日に無拘束下マウス海馬から透析液を 10 分毎に回収し、高速液体クロマトグラフィーを用いてドーパミンとセロトニンの定量を行った。透析を開始してから 100 分間後、生理食塩水もしくは D2 レセプターアゴニスト（キンピロール, QNP, 1 mg/kg）を腹腔内投与し、投与前と投与後のドーパミンとセロトニンの放出量を計測した。投与前 100 分間の計測値を平均化し、薬剤投与後のドーパミンとセロトニンの放出量を割り付けた。

4. c-fos の免疫染色による神経活動の可視化

9 週齢オスの C57BL/6 マウスに、生理食塩水、D2 レセプターアゴニスト（QNP, 1 mg/kg）、または D3 レセプターアゴニスト（PD128907, 1 mg/kg）を腹腔内投与した。30 分後にネンブタールを注射した後、灌流固定（4%PFA, ピクリン酸）を行った。パラフィン封入後、切片を作成して c-fos の免疫染色を行った。染色した切片の海馬 CA1 と歯状回の c-fos 陽性細胞数を計測した。

5. マウス脳の領域別イムノブロットによる解析

ドーパミン D2 レセプターアゴニスト（QNP, 1 mg/kg）または D3 レセプターアゴニスト（PD128907, 1 mg/kg）を腹腔内投与したマウスから海馬、扁桃核、線条体、小脳を取り出し、ホモジネート後、SDS-PAGE で分離し、リン酸化抗体を用いてイムノブロット解析を行った。

C. 研究結果

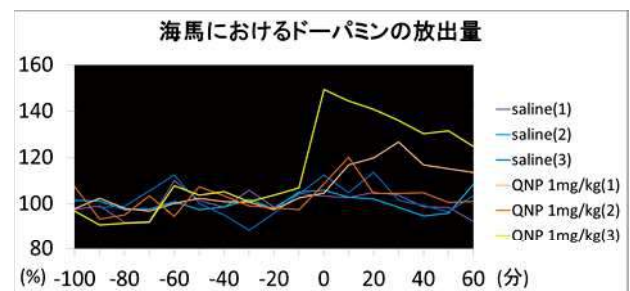
1. ドーパミン D2 および D3 レセプターアゴニストの腹腔内投与で誘発するマウスの不安様行動

生理食塩水もしくは D2 レセプターアゴニスト（QNP）、D3 レセプターアゴニスト（PD128907）をマウスに腹腔内投与し、行動実験を行った。野生型マウスにドーパミンアゴニストを投与すると、D2 レセプターアゴニストと D3 レセプターアゴニストどちらを投与した際にも、明暗選択テストとオープンフィールドテストにおいて不安様行動が亢進した。一方、D2 レセプターノックアウトマウスに D2 レセプターアゴニストを投与した際に、オープンフィールドテストでは不安様行動が亢進したのに対して、明暗選択テストでは不安様行動の亢進が見られなかった。さらに、D3 レセプターノックアウトマウスに D3 レセプターアゴニストを投与した際には、明暗選択テストでは不安様行動が亢進したが、オープンフィールドテストでは不安様行動の亢進が見られなかった。

2. 無拘束下マウス海馬のマイクロダイアリシス

D2 レセプターアゴニストを投与後、10～20 分において、ドーパミンの分泌量が上昇した。一方で、セロトニンの分泌量には、D2 レセプターアゴニスト投与による変動は見られず、周期的な変動を示した。

図 1 無拘束下マウス海馬のマイクロダイアリシス

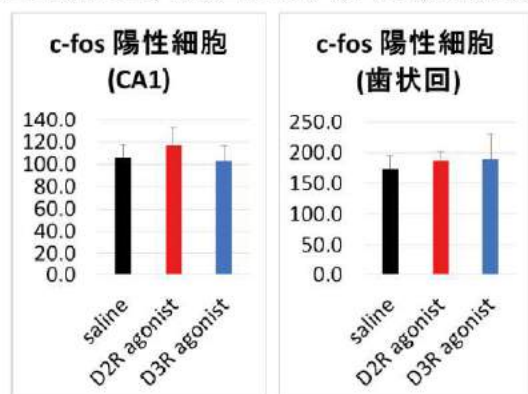


3. ドーパミン D2 および D3 レセプターアゴニスト投与マウスの c-fos 陽性細胞数の比較解析

海馬 CA1, 歯状回の c-fos 陽性細胞数を測定した。どちら領域においても、D2 レセプターアゴニストもしくは D3 レセプターアゴニストを投与しても、c-fos 陽性細胞数はコントロール

マウスと差がなかった。

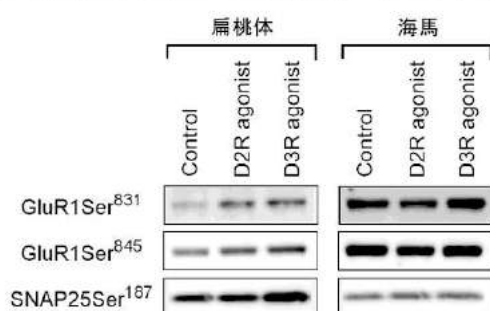
図2 海馬CA1, 齒状回におけるc-fos陽性細胞数



4. マウス脳領域別におけるリン酸化シナプスタンパク質の比較

D2 および D3 レセプターアゴニストを投与したマウスの扁桃体においては、ポストシナプスタンパク質 AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1 とプレシナプスタンパク質 SNAP-25 とともにリン酸化の亢進を確認することができた。それに対して、D2 レセプターアゴニストを投与したマウス海馬においては GluR1 の Ser831, Ser845 とともにリン酸化量が減少していた。また D3 レセプターアゴニストを投与したマウス海馬の GluR1 のリン酸化は変動していなかった。この結果は、D2 および D3 レセプターアゴニスト投与マウス海馬においてポストシナプスタンパク質のリン酸化の制御が異なる可能性を示唆している。

図3 D2RまたはD3Rアゴニスト投与マウスのイムノブロット



D. 考察

ドーパミン D2 レセプターアゴニスト投与マウスを用いたマイクロダイアリスから、明暗選択テストの不安様行動には、海馬における細胞外ドーパミン量の上昇が関与している可能性が考えられる。しかしながら、海馬の c-fos 発現細胞数

には有意な変化が見られないことから神経活動の大きな変化は起きていないと考えられた。

海馬の AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1 サブユニットの Ser831, Ser845 のリン酸化がドーパミン D2 レセプターアゴニスト投与マウスで減少していることから、シナプス伝達効率が変化したことにより明暗選択テストの不安様行動が引き起こされる可能性が考えられる。

E. 結論

ドーパミン D2 受容体アゴニスト投与マウスと D3 受容体アゴニスト投与マウスのオープンフィールドテストおよび明暗選択テストにおける不安様行動の違いに、海馬におけるドーパミン放出量と GluR1 のリン酸化が関与してい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

1. Dual mechanisms of rapid expression of anxiety-related behavior in pilocarpine-treated epileptic mice. Otsuka S, Ohkido T, Itakura M, Watanabe S, Yamamori S, Iida Y, Saito M, Miyaoka H, Takahashi M. *Epilepsy Res.* 123, 55-67 (2016)

2. 学会発表

1. 第 57 回 日本神経化学大会, 2016/9/8 福岡国際会議場 (福岡) ドーパミン D3 レセプターはマウスの特定の不安様行動に関与している
飯田 諭宜¹, 小島 孝仁², 永山 博通², 田中 涼², 森内 悠太², 渡辺 滋¹, 山森 早織², 板倉 誠², 笹岡 俊邦³, 宮岡 等¹, 高橋 正身²
1 北里大学医学部精神科学, 2 北里大学医学部生化学, 3 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

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) 日本医科大学武蔵小杉病院 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は腸管免疫を修飾する Gut microbiota であるが、現時点において、この制御により脳梗塞病巣の進展への影響についての研究はほとんどない。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時間後および72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、24時間後では vehicle 群と抗生物質投与群の間に有意な差を認めなかったが、72時間後の検討において梗塞サイズの検討では抗生物質投与群は、大脳皮質および半球全体で有意に梗塞サイズの縮小を認めた。本実験系では虚血後24時間で観察した梗塞サイズにおいては有意とならなかったものの、72時間で有意に梗塞サイズの変化を認め、脳内に侵入した免疫担当細胞が活性化されたことが原因と考えており、本病態について検討する予定である。(392文字)

A. 研究目的

臨床において、脳虚血による死亡・後遺症はその頻度の高さ、社会的な損失の大きさから重要な問題となっているが、予後改善が認められた治療は早期の血管再開通のみであるという現状である。一方で動物実験レベルでは、免疫寛容により梗塞巣の縮小・予後の改善が認められるなど、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。

我々は腸管免疫修飾が脳梗塞巣進展に及ぼす影響を検討するために、種々の microbiota 修飾モデルマウスに脳梗塞巣を作成し、腸管免疫と急性期脳虚血における炎症の関連性について解明する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

- 急性脳虚血を惹起させるために、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、60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))。
- 腸管の microbiota を修飾するため、抗生物質含有水による下痢・食思不振・体重低下等の報告を認めない(Li M. et al. Immunity, Vol.43, 527-, 2015) Ampicillin, Neomycin, Vancomycin, Metronidazole 剤の混合投与を行った。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。
- 45分脳虚血作成24時間後に断頭した後、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。また、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; 34.8 ± 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、我々が摂取する様々な飲食物を通して、病原微生物だけでなく、アレルギーや毒性を持つ物質と恒常的に接触する。こうした点から、腸管は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、実際には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。

最近、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。腸管粘膜機構の恒常性が乱れ、腸内細菌叢の

構成が変化し、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。

こうした現象に加え、近年脳梗塞は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。我々がpreliminaryに行った抗生物質を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。

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

異常凝集体の形成と伝播による神経細胞死機構の解明

研究代表者 星 美奈子¹⁾
研究分担者 柿田 明美²⁾

1) 京都大学大学院医学研究科 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

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、世界で初めてアルツハイマー病患者脳より強い神経毒性を持つ球状の A β 集合体 = Amylospheroids (以下、ASPD) を単離した (Noguchi *et al*, JBC2009)。本研究では、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るため、ASPD が成熟神経細胞に選択的に結合することで細胞死を起こすことに着目し、神経細胞膜上の ASPD 標的タンパク質を同定して下流の細胞死シグナル伝達経路を解明し、それにより新たな治療法開発への基盤を提供することを目的に進めてきた。それに加えて、過去の共同研究で培ったノウハウ及び成果を生かし、残された課題である、そもそも「なぜ異常凝集体が形成され広まるのか」というアルツハイマー病の発症機構に迫るため、病理組織化学、生化学、構造生物学を駆使した研究を進めたいと考えている。これについては、成熟神経細胞を用いた解析系を構築し、形成機構について解明することに成功した。

A. 研究目的

アルツハイマー病の原因は、アミロイド β (A β) の異常凝集体とされているが、臨床症状と最も相関する神経細胞死が、どの凝集体でどのように起こるかは不明であった。この状況で、様々な治療薬が、神経細胞死を伴わない齧歯類疾患モデルを用いて行われたが、多くは失敗に終わっている。従って、安全で有効な治療法開発のためには、ヒトでの病態を解明し、それに基づく治療法と早期診断システムを開発することである。

研究代表者である星は、柿田博士との共同研究により、患者脳から神経細胞死活性を持つ A β 集合体「アミロスフェロイド (ASPD)」を世界初めて単離するに至った (Noguchi *et al*, JBC2009)。その後の共同研究により、ASPD は、あるシナプス膜タンパク質 (ターゲット分子) に特異的に結合し、神経細胞死を誘導することを見出し、患者脳では実際に ASPD 量と相関してターゲット分子を持つ神経細胞が脱落することを明らかにした。こ

れにより、初めて神経細胞死の原因と機序について明快な説明が可能となった。更に、ASPD に結合するペプチド (ASPD 結合ペプチド) を同定し、これが ASPD の神経細胞死活性を中和することも明らかにした (Ohnishi *et al*. PNAS2015)。

本共同研究では、過去の共同研究で培ったノウハウ及び成果を生かし、残された課題である、そもそもなぜ異常凝集体が形成され、広まるのかという、アルツハイマー病の発症機構の解明を試みる。そのために、ラット成熟神経細胞を用いた解析系を構築することに成功した。また、ASPD が蓄積し神経細胞死が起きるマウスを得ることに成功した。これらの研究を足がかりに、ヒト脳で異常凝集体がどの部位でどのような機構で形成され、それがどのように伝播していくのかについて、病理組織化学、生化学、構造生物学を駆使した研究で迫りたい。

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、引き続き以下の研究を実施する。

- (1) ASPD は特定の神経細胞内で形成され細胞外に放出されることがラット神経細胞を用いた研究から明らかになった。そこで、既に確立した抗 ASPD 抗体を用いた組織染色及び電子顕微鏡観察により、遺伝子改変マウス脳及びヒト患者脳において、細胞内で ASPD 形成が起こるのかどうかを検証する。
- (2) A β は可溶性構造体以外に不溶性構造体である線維を形成するが、実はその構造にはバリエーションがあることが明らかになりつつある (Lu et al. Cell2013)。共同研究者である Prof. Ishii のラボでは、線維になる凝集核をシードとすることで、ある特定の線維構造を増幅し、NMR によって構造解析する手法を確立しており、これを用いて、新たに見出された特定の A β 種だけで形成される構造体 (Xio et al. Nat. Str. Mol. Bio.2015) が患者脳内に存在するののかどうか解析を行い、重症度との相関などについても検証を行う。

ヒト由来試料から ASPD を調製して用いる場合は、剖検脳を新潟大学脳研究所より供与を受ける。これについては、既に科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会「機関内倫理審査委員会の在り方に関する報告書」(平成 15 年 3 月 20 日) に従い、各機関内倫理・安全委員会の審査を受け、承認を受けている。実験に際しては、ご遺族の承諾を得てその範囲を守り、連結可能匿名化により個人情報保護の上で、所定の設備の整った実験室にて安全に配慮して行った。

C.研究結果

これまでの研究により、ASPD については、ASPD が結合し毒性を発揮するターゲット分子が成熟神経細胞にのみ発現するシナプス膜タンパク質 Na, K-ATPase ポンプの活性ユニットである $\alpha 3$ であることを見出し、ASPD の結合によって Na, K-ATPase ポンプ活性が消失し、膜電位が上昇し神経細胞死が起きるといった分子メカニズムを解明している (Ohnishi et al. PNAS2015)。そこで、

ラット成熟神経細胞を用いて、どのような条件下でどのような細胞において ASPD が形成されるのかを解明する目的で、実験系を構築した。その結果、ASPD は神経細胞の細胞内で形成されること、驚いたことに形成されるのは Na, K-ATPase $\alpha 3$ を発現していない細胞種であり、細胞内で作られた ASPD は分泌され、Na, K-ATPase $\alpha 3$ 神経細胞に細胞死を誘導することを見出した (論文準備中)。そこで、ASPD を蓄積する遺伝子改変マウス、ヒトアルツハイマー病患者脳において、組織染色を行ったところ、神経細胞内における染色を見出すことが出来た。線維についても、患者由来の線維をシードとして、オリジナルな構造をミミックした線維を試験管内で再構築出来る手法を確立し、それにより特定の A β 種だけで形成される、過去に報告のない新たな構造体を試験管において見出した (Xio et al. Nat. Str. Mol. Bio.2015)。この手法を生かして解析を試みている。

D.考察

上記の結果から、ASPD は神経細胞内で病態と相関して患者脳に蓄積し、その量と相関してターゲット分子を発現する神経細胞の脱落が起きていることが強く示唆された。次の課題として、ASPD の蓄積はいつから起きているのかという問題が残されている。アルツハイマー病の初期像を再現している齧歯類モデルでは、神経細胞脱落が認められないが、ここでは ASPD も蓄積していないことなどを考えると、発症の前、軽度認知症の段階で蓄積が始まっているのではないかと考えられるが、軽度認知障害の場合、その後必ずしもアルツハイマー病を発症するとは限らないため、これについては今後の課題と考えている。また、線維についても方法論が確立出来、興味深い結果が得られつつあるため、是非、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

上記のとおり、極めて順調に研究を進めることが出来た。分泌のメカニズム、なぜ、特定の神経細胞種でのみ形成されるのかについても、今後明らかにしたい。いずれも、非常に高いレベルを持つ新潟大学脳研の試料であるからこそ実施出来る課題である。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

Shigemitsu, Y., Iwaya, N., Goda, N., Matsuzaki, M., Tenno, T., Narita, A., Hoshi, M.,
*Hiroaki, H. (2016) **Nuclear magnetic resonance evidence for the dimer formation of beta amyloid peptide 1-42 in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol**, *Analytical Biochemistry*. 498, 59-67 (IF=2.243, CI=0)

星美奈子 (2016) アルツハイマー病神経細胞死の新たなターゲット分子 NA+K+-ATPase ポンプの $\alpha 3$ サブユニット 医学のあゆみ 第258巻 3号 7/16,247-248

2.学会発表

Neurotoxic, high-mass amyloid beta assemblies, amylospheroids, are formed in the Golgi apparatus of neurons that express amyloid precursor proteins with familial Alzheimer mutations, Komura, H., Arai, Y., Matsumura, S., Hoshi, M., Gordon Research Conference / Neurobiology of Brain Disorders, Aug 7 2016, PGA Catalunya Business and Convention Centre

ATP1A3 as target of beta-amyloid assembly, Hoshi, M., 5th Symposium on ATP1A3 in Disease, UCL Institute of Neurology, London, UK (招待講演)

アルツハイマー病で起こる神経細胞死の新たな分子メカニズムの発見と革新的治療法の開発、星美奈子 (2016年1月9日) 第4回 AAA (Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research) (東京) (招待講演)

アルツハイマー病患者脳由来のアミロイド β 凝集体アミロスフェロイドの発見から成熟神経細胞死の分子機構の解明までの道のり、星美奈子 (2016年2月1日) 新潟大学脳神経研究会 (新潟) (招待講演)

新たなアルツハイマー病の発生機構、星美奈子 (2016年6月10日) バイオフィナンスギルド第14期 第14回セミナー (東京) (日経BP社 Biotechnology Japan) (招待講演)
球になると毒になる？アルツハイマー病の脳で

なぜ神経細胞が死ぬのか？ (2016年6月11日) Lecture series no.140 京都大学総合博物館 (京都) (招待講演)

HFIP中における $A\beta$ (1-42) の二量体形成、重光桂基、岩谷奈央子、天野剛志、合田名都子、松崎瑞希、成田哲博、星美奈子、廣明秀一、(2015年9月27日)、第16回若手NMR研究会

HFIP中における $A\beta$ (1-42) の二量体形成、重光桂基、岩谷奈央子、天野剛志、合田名都子、松崎瑞希、成田哲博、星美奈子、廣明秀一、(2015年11月8日)、第54回NMR討論会

HFIP中における β アミロイド (1-42) ペプチドの二量体形成、重光桂基、岩谷奈央子、天野剛志、合田名都子、松崎瑞希、成田哲博、星美奈子、廣明秀一、(2016年2月29日)、2015年度生物物理学会中部支部講演会

Dimer formation of amyloid beta peptides in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2propanol、重光桂基、岩谷奈央子、合田名都子、天野剛志、松崎瑞希、天野剛志、成田哲博、星美奈子、廣明秀一、(2016年8月21-26日)、International Conference of Magnetic Resonance in Biological Systems 2016 (京都)

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

多系統萎縮症のステージ分類確立： グリア封入体を基盤とする分子病理学的解析

研究代表者 山田 光則¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾、他田 真理³⁾、吉田 邦広¹⁾、豊島 靖子³⁾

- 1) 信州大学医学部神経難病学講座 2) 新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野
3) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

多系統萎縮症ではグリア胞体内封入体の確認が病理診断の指標となっている。この封入体が本症の臨床病型と病期進行度を反映するバイオマーカーでもあることが我々の予備研究で示されたことから、本研究は検索対象を大規模化し、封入体による多系統萎縮症のステージ分類を確立することを目的とした。新潟大学脳研究所に保管されている剖検例から 79 例を抽出し、それらの臨床データを解析すると共に、中枢神経系全体に関する封入体の形成を免疫組織化学的に定量解析した。平成 29 年 3 月末の時点で、予定症例の約 6 割の病理解析が終了した。その結果、線条体黒質変性症とオリブ橋小脳萎縮症では封入体の変遷パターンが全く異なっている可能性が示された。また、比較的定型的な臨床症状を呈しながら封入体の分布が非定型的な症例が存在すること、これまで指摘されていない領域にも神経細胞へのリン酸化 α -シヌクレインが蓄積することなどが明らかになった。

A. 研究目的

多系統萎縮症(multiple system atrophy, MSA)は孤発性脊髄小脳変性症のなかで最多の疾患であり、グリア細胞に形成される封入体 (glial cytoplasmic inclusion, GCI) が診断価値の高い病理学的分子マーカーとして認識されている。一方、我々は予備研究から、GCI が本症の臨床病型と病期進行度を反映する優れたバイオマーカーでもあることを発見した。そこで本研究は検索対象を大規模化し、MSA における GCI 形成の空間的・時間的変遷パターンを明らかにし、GCI を基盤とする MSA のステージ分類を確立することを目的とする。

近年、MSA 症例で GCI のイメージングが成功し、GCI による MSA の画像確定診断法が開発中であるが、その精度や感度の検証に必要な GCI の分子病理マップは剖検脳で確立されていない。本研究は、こうした GCI 描出による MSA の早期画像診断法の確立に向けて、その病理学的根拠を創出する意義も有している。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

MSA と病理診断され、新潟大学脳研究所に保管・管理されている剖検例約 70 例を検索対象とする。また、剖検例は希少かつ貴重なため、研究期間中に新たに MSA と病理診断される症例(2~3 例と推測される)も対象に含める予定である。

本研究の検索対象となりうる剖検例を剖検台帳、臨床プロトコールからリストアップし、その臨床情報を抽出、整理する。MSA の臨床診断は以前には、線条体黒質変性症 (SND)、オリブ橋小脳萎縮症 (OPCA)、ならびに Shy-Drager 症候群 (SDS) の 3 型に分けられていたが、近年は MSA-P (SND に相当) と MSA-C (OPCA に相当) に分類されている。本研究は SDS が削除された妥当性に関しても GCI から検討する予定であることから、研究対象の MSA 全例について後方視的に臨床診断を従来の 3 病型に再評価し、病理学的解析を行う。

病理診断過程に作製された病理標本のパラフィン

ブロックより未染標本を作製し(新潟大学脳研究所で未染作製), GCI をリン酸化 α -シヌクレインの免疫組織学で描出する(信州大学で免疫染色施行)。中枢神経系全般における GCI の出現頻度を 5 段階に半定量解析し, 各症例について GCI 定量デジタルマップを作成する。SND, OPCA, SDS の各群において症例のデータを集積し, 線条体・黒質系, 橋・小脳系などの特定関心領域における GCI の経時的変遷パターンを明らかにする。こうして得られた GCI パターンの特性から, 各病型のステージ分類を決定する。

本研究は新潟大学医学部倫理審査委員会(受付番号 2322)の承認を得ている。本研究に係るすべての研究者は, ヘルシンキ宣言(2013 年フォルタレザ改訂)及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 26 年 12 月 22 日)に従って本研究を実施する。本研究では, 死体解剖保存法に基づき, 遺族から病理解剖の承諾を得る際に, 病理標本の研究利用一般についての同意を文書で得ており, かつその同意が当該研究の目的に適合するものと認められる。

C. 研究結果

本研究の対象として MSA 剖検例 79 例をリストアップし得た。これら症例の臨床データを収集し臨床的特徴, 経過年数等を解析・評価するとともに, 後方視的に臨床診断を 3 病型に再分類した。その結果, 症例の内訳は, SND 28 例, OPCA 38 例, SDS9 例, 分類不能(早期例を含む)4 例となった。これらの剖検例について, 月平均 5 例のペースで中枢神経系全体に関するリン酸化 α -シヌクレインの免疫染色標本作製とその定量解析を進め, 平成 29 年 3 月末の時点で 45 例のデータを取得した。検索予定数の約 6 割弱の解析結果ではあるが, SND と OPCA では GCI 出現の経時的変遷パターンが全く異なる結果が出つつある。一方, SDS 症例の GCI は他の 2 型と異なる分布を呈する傾向にあった。

他方, 本研究の主目的以外の成果として, 臨床型が SND あるいは OPCA を呈しながら GCI の出現量・分布が非定形的である症例が少数ながら存在すること, また, 線条体・黒質系, オリーブ・橋・小脳系, 自律神経系以外にもリン酸化 α -シヌクレインが神経細胞内に蓄積する部位があることが判明した。これらには, 海馬を含む複数の領域が挙げられた。

D. 考察

予備研究では, SND と OPCA 間で GCI の出現部位と時期に違いがあることが示唆され, 大規模観察となった本研究で, その差異が明瞭になりつつある。GCI 形成の変遷パターンにより, SND および OPCA のそれぞれに固有の病期ステージが確立されるものと期待される。一方, SDS は固有の GCI 変遷パターンをとる可能性が高いと推測されるが, 症例数が少ないため, 全例のデータ収集を待って SND および OPCA との比較検討を行う必要がある。早期例のデータは MSA の初期病理を確立する上で極めて貴重であり, 3 病型の解析結果を待って検討する。

多系統萎縮症における神経細胞の変性部位は, 線条体・黒質系, オリーブ・橋・小脳系, 自律神経系が主たる領域である。近年, 前頭側頭葉変性症(frontotemporal lobar degeneration, FTLD)類似の臨床型を呈し, 前頭葉・側頭葉(海馬を含む)領域にリン酸化 α -シヌクレイン陽性の構造物が認められる症例群が見いだされ, FTLD-synuclein と提唱された(Aoki N, et al. Acta Neuropathol 130: 93-105, 2015)。本研究でも海馬領域にリン酸化 α -シヌクレイン陽性構造物が認められる症例があり, Aoki らの報告例と一部類似していた。また, 本研究では海馬領域以外にも α -シヌクレインの神経細胞内蓄積が認められる領域が明らかとなり, MSA で注目されるべき変性部位の可能性もある。

E. 結論

SND および OPCA ではそれぞれに固有の GCI の空間的・時間的変遷パターンが存在する。

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)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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⁾, 仲柴 俊昭¹⁾, 笹岡 俊邦²⁾

1) 理化学研究所バイオリソースセンター 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

と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

脳神経の基礎的な研究に非常に有用であり、かつヒト疾患のモデルマウスとして我が国の医療・創薬研究に資する貴重なマウス系統を崎村教授からご紹介いただいた。

医歯学総合研究科・竹林浩秀教授との共同研究により、理研 BRC で開発された神経疾患マウス系統の特性解析に関する論文を発表した。

医歯学総合研究科・五十嵐道弘教授研究室の中津史准教授らの研究プロジェクトに必要なマウス系統の提供について支援を行なった。

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、レビー小体型認知症および前頭側頭葉変性症等

の精神・神経疾患における日本人の遺伝子変異に関する助言をいただいた。

脳研に於いて2回に分けて行なった理研BRCの活動を紹介するセミナーでは、新潟大学ならびに他機関所属の研究者にマウス系統の寄託と利用方法に関する案内を行った。

合同セミナーにおいて、筋ジストロフィーやシクハウス症候群などの神経系の異常が起因となる疾患の新たなモデルマウスの開発状況、また、ヒト疾患モデルとしてのドーパミン受容体変異マウスの表現型に関する知見を得た。

D. 考察

E. 結論

以上の成果を踏まえ、共同研究の継続によりマウスリソースの利活用に関する協力関係を発展させ、今後の脳神経疾患の病態モデルマウスの開発に繋げる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Horie M, Mekada K, Sano H, Kikkawa Y, Chiken S, Someya T, Saito K, Hossain MI, Nameta M, Abe K, Sakimura K, Ono K, Nambu A, Yoshiki A, Takebayashi H. Characterization of novel dystonia musculorum mutant mice: Implications for central nervous system abnormality. *Neurobiol. Dis.* 96:271-283, 2016.
2. Macpherson T, Morita M, Wang Y, Sasaoka T, Sawa A, Hikida T. Nucleus accumbens dopamine D2-receptor expressing neurons control behavioral flexibility in a place discrimination task in the IntelliCage. *Learn Mem.* 2016 Jun 17;23(7):359-64. doi: 10.1101/lm.042507.116. Print 2016 Jul. PMID: 27317196
3. Morita M, Wang Y, Sasaoka T, Okada K, Niwa M, Sawa A, Hikida T. Dopamine D2L receptor is required for visual discrimination learning. *Mol.*

Neuropsychiatry 2016; 2: 124132. DOI: 10.1159/000447970

4. Shioda N, Yabuki Y, Wang Y, Uchigashima M, Hikida T, Sasaoka T, Mori H, Watanabe M, Sasahara M, Fukunaga K; Endocytosis following dopamine D2 receptor activation is critical for neuronal activity and dendritic spine formation via Rabex-5/PDGFR β signaling in striatopallidal medium spiny neurons. *Mol. Psychiatry* doi: 10.1038/mp.2016.200. 2016

2. 学会発表

1. 吉木淳, 池郁生, 平岩典子, 中田初美, 綾部信哉, 仲柴俊昭, 持田慶司, 小倉淳郎, 小幡裕一. 研究コミュニティによる理研BRCマウスリソースの利用状況. 第63回日本実験動物学会総会. 2016年5月. 川崎.
2. 綾部信哉, 中島謙一, 岩間瑞穂, 伊集院麻衣子, 中出浩司, 村田武英, 吉木淳, 小幡裕一. Cas9ヌクレアーゼを用いた網羅的な単一遺伝子ノックアウトマウス作製. 第63回日本実験動物学会総会. 2016年5月. 川崎.
3. 仲柴俊昭, 綾部信哉, 吉木淳. Collection, Preservation and Distribution of Mouse Resources for Neuroscience Researches. 第39回日本神経科学大会. 2016年7月. 横浜.
4. 綾部信哉, 中島謙一, 岩間瑞穂, 門田雅世, 中出浩司, 村田武英, 中田初美, 仲柴俊昭, 吉木淳, 小幡裕一. ゲノム編集マウスリソースの作製および収集・保存・品質管理. 日本ゲノム編集学会第1回大会. 2016年9月. 広島.
5. Ayabe S. Mouse resources to understand human disease pathogenesis. Asian Federation of Laboratory Animal Science (AFLAS) 7th congress meeting. 2016年11月. シンガポール.

6. 笹岡 俊邦, 佐藤 朝子, 知見 聡美, 大久保 直, 前島 純, 新井 慧, 砂山 智子, 小田 佳奈子, 酒井 清子, 前田 宜俊, 神保 幸弘, 馬川 恵梨子, 佐藤 俊哉, 藤澤 信義, 横山 峯介, 南部 篤. D1ドーパミン受容体を介する神経伝達は運動情報の伝達と運動の発現に不可欠である. 第57回 新潟生化学懇話会. 2016年6月. 新潟.
7. 中村徹, 佐藤朝子, 木津川尚史, 靱山俊彦, 山森哲雄, 笹岡俊邦. ドーパミン受容体サブタイプ D1R、D2R 遺伝子欠損マウスは3種類の行動解析課題でそれぞれ異なる表現型を示す. 第57回 新潟生化学懇話会. 2016年6月. 新潟.
8. 笹岡俊邦. 「ドーパミン受容体及びNMDA受容体変異マウスを用いた大脳基底核回路の機能解析」「非線形発振現象を基盤としたヒューマンネイチャーの理解」. 第2回領域会議 (主催: オシロロジー総括班・国際活動支援班). 2016年6月. 札幌.
9. 笹岡 俊邦, 佐藤 朝子, 知見 聡美, 大久保 直, 前島 純, 新井 慧, 砂山 智子, 小田 佳奈子, 酒井 清子, 前田 宜俊, 神保 幸弘, 中尾 聡宏, 佐藤 俊哉, 藤澤 信義, 横山 峯介, 南部 篤. D1ドーパミン受容体を介する神経伝達は運動情報の伝達と運動の発現に不可欠である. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月. 横浜.
10. 笹岡 俊邦, 佐藤 朝子, 知見 聡美, 大久保 直, 阿部 学, 川村 名子, 中尾 聡宏, 小田 佳奈子, 酒井 清子, 前田 宜俊, 神保 幸弘, 佐藤 俊哉, 藤澤 信義, 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28年度先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会. 2017年2月. 大津.
11. 笹岡 俊邦, 佐藤 朝子, 知見 聡美, 大久保 直, 前島 純, 新井 慧, 砂山 智子, 小田 佳奈子, 酒井 清子, 前田 宜俊, 神保 幸弘, 中尾 聡宏, 佐藤 俊哉, 藤澤 信義, 南部 篤. D1ドーパミン受容体を介する神経伝達は運動情報の伝達と運動の発現に不可欠である. 第94回日本生理学会大会 シンポジウム. 2017年3月. 浜松.

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

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 柴田 亮行¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾、野口 範子³⁾

- 1) 東京女子医科大学病理学第一講座 2) 新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野
3) 同志社大学生命医科学医薬分子機能学

研究要旨

神経変性疾患病巣では鉄含有量の増加が指摘されている。遷移金属である鉄の貯蔵量が過剰になると病巣局所に酸化ストレスを生じる。今回我々は、アルツハイマー病 (AD) 海馬、レビー小体型認知症 (DLB) 扁桃体および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 脊髄における鉄代謝関連分子の発現様式を免疫組織化学的に解析した。その結果、セルロプラスミンはアストロサイトに、トランスフェリンはオリゴデンドロサイトとニューロンに、トランスフェリン受容体 TfR はニューロンに、ダイバalent金属トランスポーターはニューロンに、フェリチンはミクログリアに、フェロポルチンはニューロンに、それぞれ局在しており、対照例と比較して、各疾患病巣では陽性細胞の増加と染色性の増強が観察された (トランスフェリン受容体のみ変化なし)。今回得られた結果は、病巣における鉄過剰と密接な関連を示唆するが、原因か結果かを特定することはできなかった。

A.研究目的

様々な神経変性疾患に侵された神経組織病変の主座において鉄の蓄積が指摘されている。今回我々は、アルツハイマー病 (AD)、レビー小体型認知症 (DLB) および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を用いて、鉄代謝関連分子の発現様式を免疫組織化学的に解析した。

B.研究方法 (倫理面への配慮を含む)

AD 症例海馬 (n = 5)、DLB 症例扁桃体 (n = 5)、ALS 症例脊髄 (n = 5) および年齢一致対照同一部位 (n = 5) の既存資料 (ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック) から薄切切片 (6 μm 厚) を作製した。脱パラフィン処理、脱アルコール処理、親水処理、内因性ペルオキシダーゼ活性阻害処理、熱処理 (クエン酸緩衝液 pH 6 マイクロウェーブ) および非特異的抗体結合反応阻止処理を経て、切片に一次抗体を 4°C 下一晩反応させた。一次抗体

は、セルロプラスミン (Cp)、トランスフェリン (Tf)、トランスフェリン受容体 (TfR)、ダイバalent金属トランスポーター (DMT)、フェリチン (Ft) およびフェロポルチン (Fp) に対する特異的 IgG であった。免疫反応産物はポリマー免疫複合体 (PIC) 法とジアミノベンジジン (DAB) により可視化した。免疫反応産物の局在は、隣接切片における細胞マーカー免疫組織化学染色像もしくは同一切片上の時間差二重染色像 (写真撮影後熱処理を挟んで免疫反応産物の NiC₁₂/DAB 呈色反応) により同定した。対比染色にはヘマトキシリンまたはケルンエヒトートをを用いた。

C.研究結果

病巣、健常同一部位を問わず、Cp はアストロサイトに、Tf はオリゴデンドロサイトとニューロンに、TfR はニューロンに、DMT はニューロンに、Ft はミクログリアに、Fp はニューロンに、それぞれ局在していた。AD、DLB および ALS の各病巣

では、Cp 陽性反応性アストロサイト、Tf 陽性オリゴデンドロサイトおよびニューロン、DMT 陽性ニューロン、Ft 陽性ミクログリア Fp 陽性ニューロンの数と染色性が増加していたが、TfR 陽性ニューロンの染色性は対照と比較して有意な変化を示さなかった。

D. 考察

今回得られた結果は、既報告にある病巣内鉄増加に関連したものとして矛盾ない。通常、Cp は肝細胞で産生され、血液中に放出されて全身を循環する。これに対し、中枢神経系 (CNS) における Cp は専らアストロサイトで発現し、その細胞膜表面にグリセロリン脂質イノシチド (GPI) アンカー型として存在し、組織内で発生する細胞毒性の強い Fe^{2+} を低い Fe^{3+} に転換する役割を担っている。病巣内での Cp 陽性アストロサイトの数と染色性の増加は、病巣局所で増加した Fe^{2+} を無毒化するために誘導されたと理解される。

通常、Tf は肝細胞で産生され、血液中に放出されて全身を循環する。これに対し、CNS における Tf は専らオリゴデンドロサイトで産生され、CNS 内を浮遊し、 Fe^{3+} を捕捉した後、ニューロン表面に局在する TfR と結合し、受容体介在性エンドサイトーシスにより細胞内へ取りこまれる。Tf がオリゴデンドロサイトだけでなくニューロンにも検出された理由はここにある。エンドゾーム内で Tf/TfR から解離した Fe^{3+} は、エンドゾーム膜に局在する DMT を介して細胞質へ移行する。細胞内代謝に関わらない余分な Fe^{3+} は Fp を介して細胞外へ放出され、脳脊髄液腔または血管腔に到達する道筋を経て体外へ排出される。本研究で TfR 陽性ニューロンの数と染色性に変化がみられなかったのは、TfR が誘導性蛋白ではなく構成型蛋白であることを示唆している。DMT と Fp の染色結果は、鉄の取り込みと放出の増加を反映している。Ft 陽性ミクログリアの数と染色性の増加は、CNS 組織内 Fe^{3+} 濃度の増加に対する反応性誘導の結果と理解される。

一般に、 Fe^{3+} は細胞毒性が低いと評されるが、遊離体として過剰に存在すると、Haber-Weiss 反応 ($Fe^{3+} + \bullet O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$; $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$) により最も酸化力の強いヒドロキシラジカル ($\bullet OH$) を生じる。 $\bullet OH$ は DNA 塩基 dG、

形質膜リン脂質を構成する多価不飽和脂肪酸、糖質、蛋白質などを非酵素的に切断する。従って、今回得られた一連の結果は、細胞内外に $\bullet OH$ を増加させ、神経細胞死を促進する状況を窺わせるものである。

Ft 免疫組織化学染色結果を受けて、我々はさらに、マウス由来ミクログリア細胞株 (BV-2) を用い、遊離鉄 (FAC; ferric ammonium) 添加実験を行った。その結果、FAC (100 μM) 添加 24 時間後の培養上清中のグルタミン酸濃度と腫瘍壊死因子アルファ (TNF α) 濃度が有意に上昇し、これらの現象はそれぞれ、アコニターゼ 1 (ACO1) 阻害薬と TNF α 転換酵素 (TACE) 阻害薬で有意にキャンセルされた。また同実験で同時に回収された細胞溶解液をウェスタンブロット解析すると、ACO1/ β -actin 免疫活性密度比は対照実験サンプルとほぼ同様であったのに対し、TACE/ β -actin 免疫活性密度比は対照実験サンプルと比較して有意に高値を示した。以上の結果は、細胞外に増加した遊離鉄がミクログリアに取り込まれた後、ACO1 活性化と TACE 誘導を介してグルタミン酸合成を促し、グルタミン酸を細胞外へ放出するメカニズムの存在を表している。細胞外グルタミン酸濃度の上昇は、受容体結合に引き続く神経細胞内への爆発的なカルシウムイオン流入をもたらし、細胞質に存在する種々のフリーラジカル産生酵素 (xanthine oxidase; NADPH oxidase; neuronal NO synthase) を活性化することで、細胞に致命的な影響を与えることが知られている。これらの酵素が産生する $\bullet O_2^-$ と NO は親和性が高く、非酵素的に反応して $\bullet OH$ や ONOO $^-$ を発生させる。 $\bullet OH$ の毒性は前述の通りであり、ONOO $^-$ はミトコンドリア呼吸鎖の破綻と DNA 広範損傷を惹き起こす。従って、鉄過剰に起因するミクログリアのグルタミン酸産生放出増加は、各種神経変性疾患の病態に深く関わっていることが示唆される。

E. 結論

代表的な神経変性疾患である AD、DLB および ALS の病巣において、鉄の増加に密接に関連した鉄代謝関連蛋白の発現様式の変容が観察された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表
投稿準備中

2.学会発表

本研究の一部は、2017年3月10日に東京医科大学で開催された医科学フォーラム特別講演で発表した。また、2017年日本神経病理学会でも一般演題で発表する予定である。

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

意思伝達不能状態 (Stage V) にいたる 筋萎縮性側索硬化症の臨床病理学的検討

研究代表者 林 健太郎 1)

研究分担者 望月 葉子 2), 渡部 和彦 3), 小柳 清光 4), 小森 隆司 5)
柿田 明美 6), 磯崎 英治 1)

1) 都立神経病院脳神経内科 2) 都立北療育医療センター・神経内科
3) 杏林大学 4) 信州大学 5) 都立神経病院検査科 6) 新潟大学脳研究所

研究要旨

Stage V (totally locked-in stage) に至った筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、2 年以内に TIV (tracheostomy invasive ventilation) 導入されている例が多く、病理学的には運動ニューロンを超えて変性があり、蓄積タンパクの違いによらない共通する病変部位があることが明らかにした (Hayashi K, et al. *Acta Neuropathol Commun.* 2016; 4: 107)。さらに経過が早い発症 1 年以内の死亡例の病変分布を調査した。発症 1 年以内に死亡した ALS 患者では、NCI は既に運動ニューロン以外にも広く出現し、その分布は stage V に至った患者のそれと共通していた。経過の速い ALS の中には早期から広く中枢神経病変が存在する症例があり、TIV 導入により経過が長引くことにより、それが顕在化し stage V に至る可能性がある。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者が意思伝達不能状態 (stage V: totally locked-in state) に至った場合、運動ニューロン以外に、黒質、淡蒼球、視床下核、脳幹網様体あるいは小脳出力系に、神経細胞質内封入体 (NCI) を伴う変性がみられる (Hayashi K, et al. *Acta Neuropathol Commun.* 2016; 4: 107)。また、経過が速く発症から 2 年以内に TIV (tracheostomy invasive ventilation) が導入された症例は、stage V に進行するリスクが高い (Nakayama Y, et al. *Amyotroph lateral scler* 2016; 17: 38-46)。従って、発症から 1 年以内に死亡した患者は更に経過が速い症例であり、もし TIV が導入された場合には stage V に至る高リスク群と考えられる。

本研究では発症から 1 年以内に死亡し剖検となった症例の臨床的特徴と病変分布を明らかにする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

発症から 1 年以内に死亡した孤発性 ALS 患者 8 名 (男性 5、女性 3: 平均死亡年齢 72.7 歳) を対象とし、臨床歴を後方視的に調査した。組織学的には、神経細胞脱落とグリオーシス、TDP-43 免疫染色陽性 NCI の有無をそれぞれ評価した。発症早期からの認知機能低下、行動異常の見られた例、明らかな低酸素を来すイベント、高度の血圧低下を来したイベントのあった症例は除外した。また今回は pTDP-43 以外の SOD1、FUS 陽性 NCI の見られた例も除外した。

C. 研究結果

全例家族歴はない孤発例で、発症部位は球症状 5 例、上肢 2 例 下肢 1 例。経過中眼球運動障害は 1 例でみられたが、完全四肢麻痺に至った症例はなく、全例 communication stage I であった。錐体外路徴候、感覚障害、自律神経障害合併例は

なかった。死因は呼吸不全7例、突然死1例。いずれも、運動ニューロン以外に神経細胞脱落はなく、TDP-43陽性封入体を有するALS-TDP-43であった。NCIは黒質、尾状核、被殻、延髄網様体に7例、淡蒼球、赤核、下オリーブ核に6例、小脳歯状回に3例で認められた。大脳新皮質では前頭葉に4例、側頭葉に4例でみられた。海馬歯状回顆粒細胞にNCIのない症例(Nishihiraの分類type 1)は2例、NCIのある症例(type 2)は6例であった(Nishihira Y, et al. Acta Neuropathol 2008; 116: 169-182)。Type 1の症例でもNCIは運動ニューロン以外の部位に出現していた。

D. 考察

発症1年以内に死亡したALS患者では、NCIは既に運動ニューロン以外にも広く出現し、その分布はstage Vに至った患者の病変分布とおおよそ共通していた。全例非TIV導入例であり、病変拡大はTIV導入前から起こっていると考えられる。また、運動ニューロンを超えた変性を起こしにくいと報告されているNishihiraらのtype 1例でも今回対象となったような臨床経過の速い例では病変は運動ニューロン以外に拡大しうる事が判明した。

下オリーブ核はBrettschneiderらのTDP-43 pathological staging (Brettschneider J, et al. Ann Neurol 2013; 74: 20-38)ではstage 2と比較的早期からNCIの出現がみられる部位であるが、我々はstage V例においては共通病変(淡蒼球、黒質、視床下核、脳幹網様体、小脳出力系)と比べて下オリーブ核の神経細胞脱落が軽度であることを記載した。本研究において、stage Vに至るリスクのある例においても発症早期から下オリーブ核にはNCIが出現することが判明した。このことから下オリーブ核はNCIが出現しやすいが、神経細胞脱落が起こりにくい部位である可能性がある。

E. 結論

発症1年以内に死亡したALS患者では、NCIは既に運動ニューロン以外にも広く出現し、その分布はstage Vに至った患者のそれと共通していた。経過の速いALSの中には早期から広く中枢神経病変が存在する症例があり、TIV導入により経過が長引くことにより、それが顕在化しstage V

に至る可能性がある。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Hayashi K, Mochizuki Y, Takeuchi R, et al. Clinicopathological characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis resulting in a totally locked-in state (communication stage V). Acta Neuropathol Commun 2016;4:107

2. 学会発表

林健太郎、望月葉子、中原亜紗、柿田明美、小森隆司、磯崎英治. 発症から1年以内に死亡した筋萎縮性側索硬化症患者における脳病変の分布の検討 第58回日本神経病理学会総会学術研究会 2017年6月3日、東京(予定)

Hayashi K, Mochizuki Y, Nakahara A, et al. Histopathological characteristics of the inferior olivary nucleus in patients with amyotrophic lateral sclerosis. XXIII World Congress of Neurology September 16-21 2017 Kyoto

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

パーキンソン病関連タンパク質 Inhibitory PAS Domain Protein の リン酸化修飾

研究代表者 十川 和博¹⁾

研究分担者 葛西 秋宅¹⁾, 柿田 明美²⁾

1) 東北大学大学院生命科学研究所 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

Inhibitory PAS domain protein (IPAS) は Bcl-xL と結合し、不活性化することによって、細胞にアポトーシスを引き起こすタンパク質である。パーキンソン病を発症する神経毒 MPTP の投与により中脳黒質ドーパミンニューロンに誘導され、その細胞死に関与することが判明している。また HEK293T 細胞や PC12 細胞での解析の結果、p38 MAPK 経路の最終的なリン酸化酵素 MK2 の活性化により翻訳後修飾されることが判明している。LC-MS/MS 解析で Ser184 が MK2 でリン酸化され、Bcl-xL との相互作用が増強し、アポトーシス促進活性が亢進することが分かった。マウスに MPTP を投与し免疫組織染色をした結果、中脳黒質ドーパミンニューロンにおいて p38 MAPK, MK2 が活性化していることが判明した。

A. 研究目的

これまでに、Inhibitory PAS domain protein (IPAS) の誘導が、孤発性のパーキンソン病 (PD) 患者の中脳黒質のドーパミンニューロンで起きていることが判明した。また、IPAS は NF- κ B により転写活性化するが、紫外線照射などで活性化する MAPキナーゼの 1 つである p38 MAPK 経路の最終的なリン酸化酵素 MK2 によっても活性化することが判明したので、そのリン酸化部位を特定し、リン酸化部位に対する抗体で、マウス PD モデルとヒト PD 患者の脳組織を染色し、IPAS のリン酸化状態を調べることが、本研究の目的である。また、p38 MAPK, MK2 のリン酸化状態も同時に調べる。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. Flag-IPAS を HEK293T 細胞に一過性に発現し、紫外線照射を行う。Flag 抗体を用いて Flag-IPAS を濃縮し、SDS-PAGE により部分精製を行う。部分精製したタンパクを LC-MS/MS によって解析し、リン酸化部位を同定する。リン酸化ペプチドに対する抗体を

作成する。

2. MPTP 処理を行ったマウスの脳、PD 患者の中脳のパラフィン切片を用いて、リン酸化ペプチド抗体で免疫染色し、IPAS のリン酸化がコントロールと比較して増加しているかどうかを調べる。同様に、活性化された p38, MK2 をリン酸化抗体による組織染色によって検出し、コントロールと比較することにより、PD 患者の脳において IPAS のリン酸化による活性化と平行して p38MAPK 経路が活性化しているかどうかを解析する。

C. 研究結果

EGFP-IPAS 過剰発現した HEK293T 細胞での UVB 照射によるミトコンドリアの凝集、PC12 細胞でのアポトーシスの増加は、p38 MAPK 阻害剤、MK2 阻害剤、また MK2 のノックダウンによって抑制される。MK2 による IPAS のリン酸化アミノ酸残基を LC-MS/MS 解析で同定したところ、いくつかのアミノ酸残基が修飾されることが判明したが、MK2 の基質特異性、並びに Ala や Asp に置換した IPAS

を作成しその活性を調べたところ Ser184 が IPAS のアポトーシス活性を調節するリン酸化部位と同定できた。このリン酸化を認識する抗体は残念ながら現在のところ作成することができなかった。本研究の主要な目的であるヒト PD 患者の脳組織での IPAS のリン酸化状態の解析は完了できなかった。

本研究の目的とはそれるが、IPAS のコンホメーション変化を調べる目的で、IPAS の両末端に FRET ペアである Cerulean と Citrine を接続した、Citrine-IPAS-Cerulean を作成し、CHO-K1 細胞で発現し、生細胞中での FLIM-FRET 解析を行った。その結果、IPAS と Bcl-xL の結合により Cerulean の蛍光寿命が大きく短縮し、IPAS が Bcl-xL と結合により、大きく立体構造を変えることが判明した。

D. 考察

IPAS の MK2 によるリン酸化部位は Ser184 であることが同定されたが、有効なリン酸化ペプチド抗体が作成できなかったため、PD 患者中脳において IPAS のリン酸化が亢進していることは検証できなかった。有効な抗体を作成することが必要である。

E. 結論

p38 MAPK 経路の MK2 による IPAS のリン酸化部位が Ser184 であることが特定された。リン酸化模倣変異体を解析することにより、リン酸化によって Bcl-xL との結合が強くなることが推定できた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Conformational changes in inhibitory PAS domain protein associated with binding of HIF-1 α and Bcl-xL in living cells. Kasai,S., Kajimoto,S., Ito,Y., Saito, T., Yasumoto, K-i.,Tokunaga, M., Sakata-Sogawa, K., Fukumura, H., Sogawa,K.

J. Biochem. 2016;1_6 doi:10.1093/jb/mvw068

2. 学会発表

NXF および IPAS の相互抑制による神経細胞死の制御 葛西秋宅, 李賢玉, 高橋健悟, 飯島雄大, 鳥居暁, 安元研一, 十川和博 第 39 回日本分子生物学会年会・11 月 30 日・パシフィコ横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

IPAS の阻害物質に関する特許出願を検討中である。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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¹⁾
研究分担者 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

ドーパミン受容体遺伝子を改変したマウスを利用して、走行運動の解析を行う。ドーパミン受容体 D1R の発現を薬剤 Dox 依存的に制御できるマウスを用いて、D1R が発現している時と発現が失われた時とで、マウスの走行にどのような変化が現れるかを解析する。走行テストには、マウスの運足を制御できるステップホイール装置を使用する。このステップホイール課題では、マウスに給水制限を施した後、飲水を報酬として走行させるが、Dox 投与時のマウスは飲水しようとして、課題遂行が困難であった。一方、Dox 非投与マウスおよび投与中止から十分期間を置いたマウスでは課題が可能であった。これらの結果から Dox による D1R の発現有無により、ステップホイール課題の可否に顕著な差が認められ、D1R が報酬系機能に関与している事が示唆された。

A. 研究目的

大脳基底核はパーキンソン病の原因部位にあたり、運動機能に関与していることが知られている。パーキンソン病はドーパミンの欠乏が原因で引き起こされ、歩行の制御が困難になる。大脳基底核には、直接路、間接路と呼ばれる特定のドーパミン受容体を発現する神経回路群が存在しているが、それらが歩行制御にどのように寄与しているかは不明な点が多い。本研究では、直接路神経細胞に発現するドーパミン受容体 D1R の走行運動における機能を、D1R の発現を薬剤依存的に制御できるマウスを利用して明らかにする。

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、走行における直接路の機能、またそこに発現する 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) により直接路神経細胞の D1R 発現を制御できるマウス (D1R-KD

マウス) を用いる。D1R-KD マウスは、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、しかもその発現が Dox 投与により抑制されるようになっている。したがって、D1R-KD マウスでは、Dox-のときには直接路神経細胞に D1R が発現し、Dox+になると D1R の発現は消失する。この D1R-KD マウスに走行装置ステップホイールを走行させて、運足を解析する。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、マウスの足場となるペグを配置することにより運足を制御できる装置である。回転スピードやペグパターンを操作して様々な条件でマウスを走行させて、マウスの走行能力を測定する。この課題ではマウスに給水制限を施し、水を報酬として走行させるため、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、回復を図る。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、マウスの負担を最小限に努める。

C. 研究結果

Dox を投与していない、D1R が発現している状態の Dox-マウスでは、ステップホイール課題の走行が可能な事が確認できた。しかし、Dox 投与中の Dox+マウスでは、ステップホイール装置内ではほとんど動かず、課題遂行が困難な事が確認できた。また、一度 Dox を投与し、その後 Dox を抜いて D1R の発現を回復させた状態の Dox+-マウスでは、Dox-マウスと同様に課題可能である事が確認できた。

D. 考察

Dox+マウスがステップホイール装置内で無動に近かったことの原因を解明していくことが今後の課題である。代表者らが以前報告したように、D1R 遺伝子を欠損させた D1R KO マウスではステップホイール課題の成績が低い (Nakamura et al. Front Integr Neurosci. 2014)。これは線条体の直接路神経回路とその神経細胞に発現する D1R が報酬系機能に関与しており、報酬系課題であるステップホイール遂行に影響するためと推測された。今回の D1R KD の Dox+マウスの無動も、直接路神経細胞の D1R が報酬系機能に関与している可能性がある。

E. 結論

Dox 投与により D1R 発現をなくしたマウスでは、ステップホイール装置内で殆ど動かないことが観察された。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課題が可能であったことから、D1R 発現の有無がステップホイール課題遂行の可否に繋がる事が明らかになった。

Dox 投与時の D1R KD マウスがホイール装置内でほぼ無動である事について、運動機能によるものなのか、あるいは報酬系機能によるものなのか、その原因については今後の課題である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Nakamura, T., Nagata, M., Yagi, T., Graybiel, AM., Yamamori, T., Kitsukawa, T. Learning new sequential stepping patterns requires

striatal plasticity during the earliest phase of acquisition. Eur J Neurosci. 45(7):901-911. 2017.

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

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¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 岩下由佳¹⁾, 原 怜¹⁾

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

脳内ドーパミン量の調節機構の解明はドーパミンシグナルの異常に起因する疾患の病態解明および治療戦略開発のために重要である。本研究では、ドーパミン生合成律速酵素として知られているチロシン水酸化酵素 (TH) を過剰発現させることによる組織中ドーパミン量の変化について検討した。TH を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、成獣マウスの片側黒質にマイクロインジェクションした。投与後 7 日から 14 日で投与側の中脳および線条体の TH タンパク質量は、非投与側の数倍に増加した。中脳ドーパミン量は TH タンパク質量の増加とほぼ比例して増加したが、線条体ドーパミン量は TH タンパク質量の増加にもかかわらず変化しなかった。野生型 TH の代わりに、ドーパミンによるフィードバック阻害が働かない TH 変異体を用いても同様な結果であった。以上の結果は、神経終末のドーパミン量は TH 発現量の変化による影響を受けにくいことを示した。

A. 研究目的

ドーパミンは volume transmission により脳内情報処理をコントロールする神経伝達物質であり、脳内ドーパミン量の調節機構の解明は、ドーパミンシグナルの異常に起因する疾患の病態解明および治療戦略開発のために重要である。従来の研究は、株化された培養細胞を用いて生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の活性調節機構の解明に注力されてきた。しかし、実際の情報伝達を司る神経終末でのドーパミン量制御には、TH 活性ばかりでなく、ドーパミン分解酵素であるモノアミン酸化酵素やカテコール O-メチル基転移酵素、ドーパミンをシナプス小胞に取り込む小胞モノアミントランスポーター、細胞外ドーパミンを神経終末に取り込むドーパミントランスポーターなど、多くの因子が関与する動的平衡により保たれている。そのため、脳内でのドーパミンシグナルの調節機構を明らかにするためには、培養細胞ではなく動物を使った研究が必要であり、依然として多くの未解明な点が残されて

いる。

本研究では、まず TH の過剰発現により神経終末のドーパミン量がどのように変化するかについて検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

マウス野生型 TH 遺伝子を synapsin I プロモータの制御下にニューロン内で発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-TH)、および、同様のコンストラクトで EGFP を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-GFP) は、自治医科大学村松慎一博士により作製された。マウス片側中脳黒質へのマイクロインジェクションは、ペントバルビタール麻酔下に脳定位固定装置を用いて、ブレグマから尾部方向に 3.0 mm、左脳側に 1 mm、深さ 4 mm の位置に投与を行った。TH タンパク質量は、ウェスタンブロッティングにより定量し、 β アクトチンの量で標準化した。組織中モノアミンおよびそれらの代謝産物は、HPLC 電気化学検出器により定量した。本研究で行われた実験は、東京工業大

学の遺伝子組換え実験等安全委員会、動物実験委員会により審査承認されている。

C. 研究結果

成獣マウス片側の中脳黒質に AAV-TH、または、AAV-GFP を 1 μ L マイクロインジェクションした。投与後 TH の発現量は、非投与側に比べて中脳で 7 日後に 2.8 倍、14 日後には 3.4 倍に増加した。また、黒質ドーパミンニューロンの投射先である線条体でも、7 日後に 1.7 倍、14 日後に 2.3 倍に増加していたことから、AAV-TH が感染した中脳黒質ドーパミンニューロンで TH の発現量が増大し、線条体まで運ばれたと考えられた。一方、AAV-GFP を投与したマウスでは、投与側と非投与側の TH タンパク質量に有意な差は認められなかった。

次に、AAV-TH を投与したマウス中脳と線条体でドーパミン量を測定した。その結果、中脳では TH タンパク質量とほぼ比例して脳内ドーパミン量が非投与側の 2-3 倍に増加したが、線条体では TH タンパク質量の増加にもかかわらず投与側と非投与側でドーパミン量に差は認められなかった。一方、ドーパミンの主要な代謝産物であるホモバニリン酸 (HVA) 量は、中脳ばかりでなく線条体でも AAV-TH 投与 14 日後に投与側で非投与側の 1.5 倍に有意に増加していた。これらの結果は、ドーパミンニューロンの細胞体が分布する中脳では、TH タンパク質量の増加に伴い組織中ドーパミン量も増加すること、しかし、神経終末が分布する線条体では、TH タンパク質量が増加してドーパミンの代謝産物が増加しても組織中ドーパミン量は変化しないことを示した。

線条体で TH タンパク質量が増加しても組織中ドーパミン量が増加しない理由として、TH 活性が生成物であるドーパミンの結合によるフィードバック阻害により抑制されている可能性が考えられた。TH の 40 番目のセリン残基は、リン酸化されるとドーパミンによるフィードバック阻害がかからないことが、従来の研究で明らかとなっている。そこで、40 番目のセリン残基をグルタミン酸残基に変えてリン酸化型 TH を模倣した TH(S40E) 変異体をアデノ随伴ウイルスベクターに組み込み、AAV-TH(S40E) を作製し、野生型 TH と同様に片側中脳黒質に投与した。

AAV-TH(S40E) の投与により、中脳では野生型と

同様に TH タンパク質量の増加 (非投与側の 2-3 倍) と組織中ドーパミン量の増加 (7 日後に 2.6 倍、14 日後に 5.1 倍) が観察された。一方、線条体では HVA 量は野生型 TH を投与した場合より大きな増加 (非投与側の約 2 倍) を示したが、ドーパミン量は非投与側の 1.2 倍程度にしか増えなかった。以上の結果は、神経終末の分布する線条体では、生合成律速酵素である TH の活性・タンパク質量に因らず組織中ドーパミン量は一定に保たれることを示した。

D. 考察

研究代表者の一瀬らは、以前 floxTH マウスの黒質に AAV-Cre を投与して成獣で TH 遺伝子を破壊すると、線条体での TH タンパク質量の減少は細胞体に比べて有意に遅れること、さらに、ドーパミン量の減少は TH タンパク質量の減少より少ないことを報告した [Tokuoka et al. *J Biol Chem*, 286, 43549-43558, 2011]。本研究では TH タンパク質量を人為的に増加させて、中脳と線条体におけるドーパミン量変化を比較検討した。

線条体における組織中ドーパミン量は、ドーパミンニューロンの活動をあらわす一つの指標と考えられてきた。そして、ドーパミン量の変化とドーパミンニューロンの活動変化が相関関係にあると考えられてきた。しかし、今回の研究では人為的な操作による TH 発現レベルの変化ではあるものの、TH 発現量が増加しても線条体ドーパミン量はほとんど変化しないこと、神経終末のドーパミン量は生合成量ではなく別の因子により規定されることを示唆した。

神経終末のドーパミン量を規定する因子として、終末に存在するシナプス小胞の量や小胞モノアミントランスポーターの活性も関与していることが考えられる。また、シナプス後およびシナプス前ドーパミン受容体を介して、生合成量や放出量をコントロールする機構、神経回路を介してドーパミンニューロンの興奮をコントロールする機構などの存在が推測される。今後、ドーパミン受容体 KO マウス等を用いて、神経終末ドーパミン量の調節機構を明らかにしていくことを計画している。

E. 結論

成獣マウス脳内において、細胞体が分布する中脳と、神経終末の分布する線条体では、生合成律速酵素である TH 発現量が増加したときの応答が異なり、中脳では TH 発現量の増加と共に組織中ドーパミン量が増加するが、線条体では TH が増加しても組織中ドーパミン量は変化しない。

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

加藤北都、岩下由佳、徳岡宏文、原怜、村松慎一、一瀬宏（2016）チロシン水酸化酵素の過剰発現によるドーパミンニューロンへの影響.
第 20 回活性アミンに関するワークショップ,
2016 年 8 月 20 日、つくば

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

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 矢尾 育子^{1) 2)}
研究分担者 伊藤 誠二²⁾, 片野 泰代²⁾, 崎村 建司³⁾

1) 浜松医科大学 2) 関西医科大学 3) 新潟大学

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。現在 floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスが得られておりドライバーマウスとの交配により時間的空間的特異的 SCR-cKO マウスの作製が可能となった。今後神経特異的な SCR-cKO マウスを作製するとともに、以前に解析した 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するため、共同研究を継続していく予定である。

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、脳のスポンジ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の内規に準じて行う。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。昨年度、浜松医大への導入

を完了した。今年度、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。今後、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り、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られる。

E. 結論

SCR-cKO マウス作製のための floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスが得られた。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 マウスを作製する。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1) Miyagi M, Fukano H, Atsumi R, Suzuki H, Setou M, Yao I.

Distinct spatial localization of three types of phosphatidyl choline in rat buccal mucosa identified by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry.

Medical Mass Spectrometry in press

2) Koga K, Yao I, Setou M, Zhuo M.
SCRAPPER Selectively Contributes to Spontaneous Release and Presynaptic Long-Term Potentiation in the Anterior

Cingulate Cortex.

J Neurosci in press

3) Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H.

Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry.

J Neurochem 140(3):435-450 (2017)

4) Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S.

Involvement of Brain-Enriched Guanylate Kinase-Associated Protein (BEGAIN) in Chronic Pain after Peripheral Nerve Injury. *eNeuro* Sep-Oct; 3(5): ENEURO.0110-16 (2016)

5) Konno A, Ikegami K, Konishi Y, Yang HJ, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Yao I, Shiba K, Inaba K, Setou M.

Ttll9^{-/-} mice sperm flagella show shortening of doublet 7, reduction of doublet 5 polyglutamylation and a stall in beating.

J Cell Sci. 129(14):2757-66 (2016)

6) Shimma S, Kumada H-O, Taniguchi H, Konno A, Yao I, Furuta K, Matsuda T, Ito S.

Microscopic visualization of testosterone in mouse testis by use of imaging mass spectrometry.

Anal Bioanal Chem 408(27):7607-7615 (2016)

7) Taniguchi H, Katano T, Nishida K, Yao I, Morimoto Y, Matsuda T, Ito S.

Expression of h0vol2 in the XY body of human spermatocytes.

Andrologia 49(1) (2017)

2. 学会発表

1) Yao I

“Mass spectrometry imaging for transitional condition of drug to the mouse brain”

第 1 回国際マスイメージングセンターミーティング

2016/10/6 浜松医科大学（静岡県浜松市）

2) 矢尾育子

「超解像イメージングによるシナプス伝達制御機構の解析」

第 94 回日本生理学会大会

2016/3/29 アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

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

オートファジー関連神経変性疾患 SENDA の病態解析

研究代表者 村松 一洋¹⁾

研究分担者 森下 英晃²⁾, 水島 昇²⁾, 清水 宏³⁾, 柿田 明美³⁾

- 1) 群馬大学大学院医学系研究科小児科 2) 東京大学大学院医学系研究科分子生物学分野
3) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

Neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) の新たな病型である static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SEDA) において、脳組織を用いた病理学的、生化学的および分子生物学的解析により病態の解明をし、進行を抑制する画期的な治療法の開発への展開を目指す。

SEDA はオートファジー機能不全により発症することが既に報告されており、当該患者の剖検脳を用いてオートファジー機能について評価した。オートファジーマーカーである LC3-II の発現増加を黒質や淡蒼球で認め、機能が停滞していることが示された。また、画像所見と同様にフェリチンも増加していた。原因遺伝子である WDR45 がコードする WIPI4 に関してはタンパクレベルでは検出できなかった。mRNA レベルでは WIPI4 及び WIPI1-3 において脳部位別の発現量を定量した。

これらの情報と併せて今後は神経細胞傷害をきたす要因を明らかにする。

A. 研究目的

申請者はこれまでに SENDA の原因遺伝子が WDR45 であることを特定し、病態がオートファジー機能不全と密接に関与していることを解明してきたが、病態の全容はいまだ明らかではない。WIPI4 をコードする WDR45 変異により中枢神経系への鉄沈着生じるが、その機構は不明であり、またオートファジーと鉄代謝の関連も明らかではない。次の課題として、患者脳組織を用いて、中枢神経組織でのオートファジー機能不全の証明や NBIA の基盤となる鉄代謝の異常とオートファジー機能との関連の解明を目指す。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

病理学的、生化学的および分子生物学的解析により、剖検脳組織をはじめとし患者組織を利用して鉄代謝やオートファジーマーカーを健常組織と比較する。これらは、mRNA レベル、タンパクレ

ベルの他、組織切片による形態学的な評価を行う。

SEDA は病変に特異性を認める疾患である。中枢神経系では基底核とくに黒質や淡蒼球に画像で著しい変化をきたす。そこで、脳の各部位 (黒質、淡蒼球、視床、前頭皮質、小脳) における WDR45 (WIPI4) と他の 3 種の isoform (WIPI1-3) の発現の差を検討する。これは mRNA レベル、タンパクレベルで実施する。

組織切片では LC3 や Atg9A 等の各種オートファジーマーカーによる免疫染色で、オートファジー機能に健常者との差が生じていることを示す。

鉄代謝においては、鉄代謝関連分子の発現を mRNA レベル、タンパクレベルで検討し、オートファジー機能との関連を探る。

C. 研究結果

新潟大学脳研究所病理学分野で剖検された患者の脳組織及び、対照群の脳組織 (黒質、淡蒼球、

視床、前頭皮質、小脳) から抽出したタンパク及び RNA を用いて発現量を解析した。患者の黒質と淡蒼球で LC3-II の集積を認め、フェリチンは黒質、淡蒼球に加え視床でも増加を認めた。オートファジー基質となる p62 の増加は患者以外でも認め SENDA に特異的ではなかった。また、画像所見と同様に黒質、淡蒼球でフェリチンが増加していた。原因遺伝子である WDR45 がコードする WIPI4 に関してはタンパクレベルでは今回は検出できなかった。

mRNA レベルでは WIPI4 及び WIPI1-3 において脳部位別の発現量を定量した。患者と対照群 3 例の比較では WIPI4 の発現は WIPI2 に次いで多く、優位であったが、患者のみで優位ではなかった。個々の症例内で比較すると WIPI4 の発現は淡蒼球、視床、黒質で優位であり、小脳では逆に優位性を示さなかった。前頭皮質での発現の傾向は一定ではなかった。

組織染色には、黒質と淡蒼球において高度の神経細胞脱落、軸索腫大とともに、フェリチンと LC3 の沈着を認めた。フェリチンは少量ながら視床にも蓄積していた。軸索腫大は黒質・淡蒼球のみならず、延髄後索核にも認められた。

D. 考察

患者の黒質と淡蒼球でのみ LC3-II の集積を認め、対照例や黒質及び淡蒼球以外の組織に比してオートファジー経路が障害されていることが示唆された。フェリチンの発現量からは、黒質及び淡蒼球が有意に多く、MRI 画像所見の特徴と矛盾しないことが明らかであった。

WIPI4 の検出が困難であったことは、検出感度の高い抗体の作製が必要であるか、剖検後の組織保存までにタンパク変性が生じている可能性もある。

個々の症例内で比較した RNA 発現量は淡蒼球、視床、黒質での WIPI4 の発現優位性が比較的高く、病変として影響を受けやすいことが考えられる。しかし、視床に関してはこれまでは MRI 上も病変としては認識されていなかったが、病理学的には少量ながらフェリチンの沈着を認め、強い変性には至らないものの組織の機能障害を引き起こしている可能性は否定できない。

E. 結論

剖検脳を用いた解析から、SEDA 患者の中枢神経組織においてもではオートファジー機能の障害が存在することが明らかとなった。オートファジー機能障害がどのように神経細胞傷害を引き起こすか、フェリチン集積は神経細胞傷害の原因なのか結果なのかなどまだまだ不明な点が多く、今後も病態解析を継続する必要がある。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

- ・村松 一洋、月田 貴和子. WDR45 遺伝子変異によるオートファジー関連神経変性症 SENDA/BPAN. 最新医学 72(2):193-204 (2017)
- ・村松 一洋. WDR45 遺伝子変異によるオートファジー関連神経変性症 SENDA. 脳と発達. 48(3):177-83 (2016)

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

胎仔期および発達期の脳におけるドーパミン受容体 D1R の機能解析

研究代表者 大久保 直¹⁾
研究分担者 佐藤 俊哉¹⁾ , 笹岡 俊邦²⁾

1) 北里大学医学部実験動物学 2) 新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野

研究要旨

ドーパミン D1 受容体 (D1R) は、運動を促進する役割があると考えられている。これまでにコンディショナル D1R 発現マウスを用いることにより、成熟マウスにおいて D1R の働きを抑制すると運動量の減少が起こることが判明した。しかし、通常の D1R ノックアウトマウス (KO) では、運動の亢進が認められる。このような行動発現の差は、胎仔期からの D1R の欠損が脳機能の正常な構築に影響を及ぼすことを示唆している。そこで本研究では、D1R を生後発達期において時期特異的にノックダウン (KD) し、その脳に及ぼす影響を形態学的・生化学的・行動学的に解析した。まず、生後母乳を介してドキシサイクリンを摂取させた D1R KD マウスを用いて各種行動解析を行った。成体期でも同様の解析を行った結果、D1R がノックダウンされる時期により行動の表現型に違いが見られたことから、発生期、発達期、成体期における D1R の機能が異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ドーパミン D1 受容体 (D1R) は、運動を促進する役割があり、成熟マウスにおいてコンディショナルに D1R の働きを抑制すると運動量の減少が起こる (Chiken et al. 2015)。しかし、通常の D1R ノックアウト (KO) マウスでは、運動量の亢進が認められる。このような行動発現の違いは、胎仔期から D1R が欠損しているか、あるいは成熟期になって欠損するかによって、脳機能や脳組織の構造に異なる影響を与えていると示唆される。そこで本研究では、D1R を発達期、および成体期に特異的にノックダウン (KD) して行動レベルでの差異を解析し、D1R の機能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)

Tet-Off システムを導入したコンディショナル D1R 発現マウスの受精卵を仮親マウス (ICR 系

統) に移植後、ドキシサイクリンを飲水投与することにより、発達期および成体期の D1R の発現をノックダウンした。コントロールとして、野生型マウス (C57BL/6J)、D1R KO マウス、同時期に水のみを与えたコンディショナル D1R 発現マウスを用い、各種行動解析を行った。KD マウスは自力での摂餌が困難になり衰弱する可能性があるため、その場合は実験をやめ安楽死とした。

C. 研究結果

各種行動解析に先立ち、発達期と成体期における D1R の KD を平成 27 年度に検討した条件に沿って行った。まず、生後 0 日からの KD 実験の場合は、ドキシサイクリンを添加した水を母マウスに飲ませ、母乳を介して仔マウスに与えた。一方、成体期での KD 実験では直接ドキシサイクリンを添加した水を飲ませた。ドキシサイクリン投与 5 週間後、D1R の発現が検出不可能なレベルに達し

た D1R KD マウス、および野生型マウス (C57BL/6J)、D1R KO マウスそれぞれについて行動解析を行った。

行動解析として、まずバランスビームテストによる運動、平衡感覚を評価した結果、発達期の D1R KD マウスでは、D1R KO マウスと比べ行動異常の現れ方が異なることが判明した。

バランスビームテストの後、オープンフィールドテストによる新奇環境での活動性を解析したところ、5 分間での移動距離において、発達期 D1R KD マウスと成体期 KD マウスの間で顕著な差がみられた。しかし立ち上がり回数では、どちらの時期の KD マウスも野生型マウスや D1R KO マウスにくらべ顕著に減少し、時期による差は見られなかった。

D. 考察

発達期と成体期では、正常な行動発現に D1R が必要であるが、その機能は時期により異なる可能性があると考えられた。D1R KO マウスのように、受精卵の段階から D1R がないと、他のドーパミン受容体による何らかの機能的補償作用が働く可能性もあると考えられた。

E. 結論

生後発達期および成体期に D1R の発現をノックダウンしたところ、各種行動テストにおいて異なる表現型が現れたことから、発生期、発達期、および成体期では D1R が異なる機能を持つことが示唆された。

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

笹岡俊邦、佐藤朝子、知見聡美、中尾聡宏、大久保直、前島純、新井慧、砂山智子、小田佳奈子、酒井清子、前田宜俊、神保幸弘、馬川恵梨子、佐藤俊哉、藤澤信義、横山峯介、南部篤
Dopamine D1 receptor-mediated transmission maintains information flow through the

cortico-striato-entopeduncular direct pathway to release movements

第 39 回日本分子生物学会総会 2016 年 12 月 2 日 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

APP 細胞内ドメインの神経毒性の解析

研究代表者 中山 耕造¹⁾
研究分担者 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 のシグナル伝達が、 γ -セクレターゼによって調節されていることを示している。これをもとに、amyloid precursor protein (APP) も Notch や Delta に類似した γ -セクレターゼによって制御されるシグナル伝達機構を持ち、それがアルツハイマー病 (AD) の発症に関係していると考えている。我々は実際、APP が γ -セクレターゼによって切断されるときに A β と同時に生じる細胞内ドメイン (AICD) が Notch や Delta 同様に核へ移行し、遺伝子発現を変化させ、神経細胞選択的にアポトーシスを誘導することを示している。これらの結果は、AD の原因だと考えられている A β 以外にも、APP を介した AD 発症に関与する機構が存在することを示唆している。

AICD によって引き起こされる神経細胞選択的アポトーシスの機序を解明することを目標に、本年度は AICD の核移行を制御していると考えられる AICD のリン酸化に関して解析をおこなった。また、AICD の神経細胞分裂に対する影響を調べた。さらに、AICD がタウの異常リン酸化に関係するか検討した。

A. 研究目的

γ -セクレターゼは、アルツハイマー病 (AD) の発症に関係していることは知られているが、本来の生理機能は不明である。我々は Notch や Delta の解析から、この酵素の本来の機能は、amyloid precursor protein (APP) を含む 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 AD の発症に関係していると推測している(総説 : Nakayama et al., Cell Mol. Neurobiol., **31**,887,2011)。実際に我々は、 γ -セクレターゼで細胞膜から細胞質へと切り出された 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(総説 : Nakayama et al., Current Psychopharmacology, **1**,155,2012)。

これらの結果を基に、本研究の目的は、核移行に伴う AICD の神経毒性の分子機序を解明するこ

とにある。

本年度は、(1)核移行を制御している可能性がある AICD 脱リン酸化酵素の解析を行った。また、(2) AICD が神経細胞の分裂に影響しないか調べた。さらに、(3) AICD がタウの異常リン酸化に影響しないか検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

(1)AICD 脱リン酸化酵素の解析

マウス脳のライセートを DEAE sepharose カラムで分画した。さらにこれらのフラクションを Hydroxyapatite カラムを用いて精製した。

脱リン酸化アッセイの基質としては、HEK293T 細胞に、FLAG タグを持つ AICD の発現ベクターを導入して ³²P でメタボリックラベルした FLAG-AICD を用いた。

(2) AICD の神経細胞分裂に対する影響

AICD を強制発現する P19 細胞を用いて、レチノイン酸存在下で 4 日間凝集培養し、その後再度培養皿にまき直して神経細胞へと分化誘導した。なおコントロールとしてはベクターのみを含む、AICD を発現しない P19 細胞を用いた。

分化誘導後 2、3、4 日でそれぞれ細胞を回収し、冷エタノールで固定後 Propidium Iodide (PI) 染色してフローサイトメータで DNA 量を測定することで細胞周期を検討した。

(3) AICD のタウ異常リン酸化に対する影響

(2) で述べた AICD を強制発現する P19 細胞を用いた。

分化誘導後 2、3、4 日でそれぞれ細胞を回収し、12 種類の代表的なタウの異常リン酸化部位に対する抗体を用いてウエスタンブロットをおこなった。また、Phos-tag を用いたウエスタンブロットもおこなった。

C. 研究結果

(1) AICD 脱リン酸化酵素の解析

マウス脳のライセートを DEAE sepharose カラムで分画した場合、225-300mM の NaCl で溶出したフラクションに 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 Hydroxyapatite カラムに吸着させ、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、幅広い範囲のフラクションが AICD 脱リン酸化活性を示した。

(2) AICD の神経細胞分裂に対する影響

DNA 量に従って、G1 期、S 期、G2/M 期の細胞の割合を測定したところ、各分化段階でコントロール細胞と比較して AICD を発現する細胞では S 期の割合が約半分程度に頻度が下がっており、また G2/M 期の割合も 2/3 程度に下がっていた。

(3) AICD のタウ異常リン酸化に対する影響

12 種類の代表的なタウの異常リン酸化部位に対する抗体を用いてウエスタンブロットを

おこなった。また、Phos-tag を用いたウエスタンブロットもおこなったが、AICD によってリン酸化が増強されている部位は検出できなかった。

D. 考察

(1) AICD 脱リン酸化酵素の解析

AICD は構成的にリン酸化されており、核移行に必須なアダプター蛋白質 Fe65 との結合には、AICD 自体の脱リン酸化が必要だと考えられる。本研究において、マウスの脳のライセート中に AICD 脱リン酸化活性を検出した。これらの結果は、AICD 脱リン酸化酵素が実際に存在することを示しており、この酵素が AICD の核移行を調節しているという仮説が正しいことを示唆していると考えている。

AICD 脱リン酸化活性が認められた DEAE フラクションをさらに Hydroxyapatite カラムを用いて分画したが、電気泳動では AICD 脱リン酸化酵素活性と相関するバンドは検出できず、さらなる精製が必要であった。

(2) AICD の神経細胞分裂に対する影響

AICD を強制発現する P19 細胞を用いて、DNA 量を測定することで細胞周期を検討した。

コントロール細胞と比較して AICD を発現する細胞では S 期の割合が約半分程度に頻度が下がっており、G2/M 期も 2/3 程度に下がっている。これらのことから AICD は特に G1 から S 期への移行に必要な分子の遺伝子発現に影響を与えている可能性があるかもしれない。

(3) AICD のタウ異常リン酸化に対する影響

AICD を強制発現する P19 細胞を用いて、12 種類の代表的なタウの異常リン酸化部位に対する抗体でウエスタンブロットをおこなったが、タウのリン酸化の増強は検出できなかった。

用いた抗体が検出する部位以外のリン酸化が増強されている可能性もあるが、AICD が誘導する神経細胞選択的なアポトーシスは、タウの異常リン酸化と関係ない現象である可能性が高いと考えられた。

E. 結論

(1) AICD 脱リン酸化酵素の解析

最終的には、AICD 脱リン酸化酵素の同定を目標に、酵素を精製している。この酵素を同定できた場合、精製した蛋白質の情報を基に cDNA をクローニングし、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予定である。

(2) AICD の神経細胞分裂に対する影響

AICD は特に G1 から S 期への移行に必要な分子の遺伝子発現に影響を与えている可能性が考えられる。今後、どのような遺伝子がこの過程に関係しているか、検討する予定である。

(3) AICD のタウ異常リン酸化に対する影響

AICD が誘導する神経細胞選択的なアポトーシスは、タウの異常リン酸化と関係ない現象である可能性が考えられた。

今後、どのようなメカニズムで AICD が神経細胞選択的に細胞死を誘導するのか明らかにする予定である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

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

ドパミン-D1R シグナルが心不全に果たす役割の解明

研究代表者 小室 一成¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 山口 敏弘¹⁾

1) 東京大学医学部循環器内科 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

神経伝達物質ドパミンは運動調節や情動に関わり、パーキンソン病等神経疾患の発症と治療に重要な役割を持っている。一方、ヒトの心不全において、ドパミンアナログ、D1 ドパミン受容体(D1R)アゴニストの長期投与はその予後を悪化させることが報告されているが、心臓におけるドパミンの生理的作用や心不全における役割はほとんど明らかにされていない。本研究は、ドパミン-D1R シグナルが心不全の発症・進展に関与するという仮説を検証することで、心不全発症および進展における新たな分子機構の解明に取り組むものである。我々は、心不全の進展とともに顕著に変化する遺伝子として D1R を見だし、その発現が主に心筋細胞に多く認められることを明らかにした。心筋細胞特異的 D1R 欠損マウスを作成し表現型を解析したところ、心不全時に増加する心筋 D1R は心室性不整脈を惹起していることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では、心不全モデルマウスを用い、不全心においてドパミンが果たす役割を解析することで、心不全発症・進展において働く分子細胞機序の解明に取り組む。心臓における自律神経活性化の重要性は以前から知られているが、本研究は今まで解析されることが少なかった、自律神経において産生されるドパミンとその受容体である D1R の役割について注目して解析することで心不全における新たな病態生理を見いだすことを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

申請者らは、心不全モデルマウスの心臓において D1R の発現が病態の進行とともに増加すること、またその主たる発現細胞種が心筋細胞であることをすでに明らかにしている。

上記の知見をもとに

(1) In vivo

心筋特異的 D1R コンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作成し、心不全時の表現型を解析した。

(2) In vitro

Ca 濃度依存性に GFP を発現する GCaMP と D1R(コントロールとして LacZ)を共発現するアデノウイルスを作成した。同ウイルスを初代培養心筋細胞に感染させ、GFP の経時的蛍光強度の変化を観察することで、D1R の発現増加に伴う心筋収縮の変化を観察した。

C. 研究結果

心筋特異的 D1R ノックアウトマウスでは心不全時の心室性不整脈が抑制されていた。また、D1R を強制発現した心筋細胞では収縮間隔の不均一性が出現し、D1R 増加に伴うドパミンシグナルの増強が不整脈源性を担っていることが示唆された。

D. 考察

今回の研究結果により、心不全時の不整脈増加の一因として心筋細胞における D1R の発現増加が関与していることが示された。今後は D1R により惹起された不整脈が予後に寄与しているかの検証、D1R 発現増加のメカニズムの解明が課題となると考えられる。

E. 結論

心不全時の心室性不整脈発症には心不全時に増加する心筋細胞の D1R が寄与している。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

平成 28 年度 新潟大学脳研究所共同利用共同研究 合同セミナー・平成 29 年 3 月 5 日・新潟

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

特記事項なし

脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の発症機構の解明

研究代表者 坂井 健二¹⁾
研究分担者 柿田 明美²⁾

1) 金沢大学附属病院 神経内科 2) 新潟大学脳研究所 デジタル医学分野

研究要旨

脳アミロイドアンギオパチー(CAA)は脳や髄膜内の血管へのアミロイドの沈着により生じる疾患で、炎症・血管炎(CAA 関連炎症)を引き起こすが、炎症を生じる機序の詳細は不明である。本研究では炎症や免疫系の活動に関連するサイトカインや蛋白についての定量的な解析、浸潤している炎症細胞のプロファイルの検討、遺伝子多型に関する検討を行い、CAA 関連炎症の発症との関連を明らかにする。新潟大学脳研究所で病理診断され、Boston criteria の probable CAA with supporting pathology 以上を満たす症例についてパラフィンブロックおよび凍結組織を収集した。凍結組織を利用して DNA を抽出し、TREM2、TGF- β 1 や apolipoprotein E の遺伝子多型の解析を行った。パラフィン標本を用いて、炎症細胞のプロファイルの検討を行った。

A. 研究目的

脳アミロイドアンギオパチー(CAA)は脳や髄膜内の血管へのアミロイドの沈着により生じる疾患であり、アミロイド β 蛋白($A\beta$)の沈着によるものが最も多い。CAA では沈着した $A\beta$ に対する免疫反応によって生じる炎症・血管炎(CAA 関連炎症)を引き起こすことが知られているが、高度な炎症を生じる機序の詳細は不明である。

孤発性 $A\beta$ 型CAAでは炎症に関連するサイトカインである transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)の遺伝子多型が報告されており、また、脳内の免疫系を担当するミクログリアの活動に関連する triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM2)の遺伝子多型がアルツハイマー病(AD)に関連することが近年報告された。AD では老人斑として沈着した $A\beta$ の除去にミクログリアが関連していることが知られており、血管壁に沈着した $A\beta$ の除去過程において過剰な免疫応答を生じることでCAA 関連炎症を発症する可能性を考えている。

CAA および CAA 関連炎症と診断された剖検脳を用いて、炎症や免疫系の活動に関するサイトカイン

や蛋白の定量的な解析、CAA や $A\beta$ の代謝に関連した遺伝子の多型や浸潤している炎症細胞のプロファイルを検討し、CAA 関連炎症の発症機構を明らかにすることで、発症予防や新規治療法開発の端緒と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)

CAA のみおよび CAA 関連炎症を生じた症例について、孤発性 $A\beta$ 型アミロイドアンギオパチー(CAA)の遺伝的危険因子で、炎症に関連するサイトカインである transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)および脳内の免疫系を担当する細胞であるミクログリアの活動に関連する蛋白であり、アルツハイマー病との関連が報告された triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM2)の脳内における発現量を解析し、CAA 関連炎症との関連を明らかにする。また、凍結組織より DNA を抽出し、TGF- β 1 や TREM2、apolipoprotein E の遺伝子多型についての解析も行う。CAA および CAA 関連炎症の症例について、免疫染色を用いて浸潤している炎症細胞のプロファイルを検討する。

対象とする症例について、新潟大学脳研究所で病理診断され、Boston criteria の definite CAA または probable CAA with supporting pathology のいずれかを満たす症例とし、それらのパラフィンブロックおよび凍結組織を収集する。脳出血を伴う CAA の剖検例では 12 症例、生検例では 31 症例、CAA 関連炎症は剖検例で 2 例、生検例では 7 例の検体が利用可能であることを平成 27 年度に確認済みである。

研究に利用する検体については匿名化が行われている。また、研究計画について、金沢大学医学倫理委員会と新潟大学医学部倫理委員会において承認済みである。

C. 研究結果

金沢大学神経内科では遺伝子多型解析のためのプライマーの設定と条件の検討を行い、2 症例について凍結脳より DNA を抽出し、遺伝子多型の解析を行った。浸潤している炎症細胞のプロファイルを検討するため、CD3 といった炎症マーカーに関する免疫染色についての条件設定を行い、免疫染色を行った。炎症に関連したサイトカインや蛋白の定量的な解析については、条件検討を継続して行っている。

D. 考察

研究の遂行に必要な倫理申請は終了し、すでに承認が得られている。今後は提供を受けた検体を利用し、金沢大学において標本の免疫染色とその解析を継続して行う。剖検例における遺伝子多型の解析も継続する。

E. 結論

研究の遂行に必要な倫理委員会の承認と症例の抽出はほぼ終了しており、今後は金沢大学神経内科において、新潟大学脳研究所より提供された検体を使用した解析を行っていく。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Zekonyte J, Sakai K, Nicoll JAR, Weller RO, Carare RO. Quantification of molecular interactions between apoE, amyloid-beta ($A\beta$) and laminin: relevance to accumulation of $A\beta$ in Alzheimer's

disease. *Biochim Biophys Acta* 1862:1047-1053, 2016.

2. 学会発表

1. Sakai K, Boche D, Johnston D, Holmes C, Love S, Nicoll J. Aquaporin 4 and the response to $A\beta$ immunotherapy in human Alzheimer's disease. 5th International CAA Conference, Boston, September 8-10, 2016

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

筋線維メ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¹⁾
研究分担者 武田 伸一¹⁾, 笹岡 俊邦²⁾
研究協力者 井上 - 上野 由紀子³⁾, 井上 高良³⁾

- 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
- 3) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第 6 部

研究要旨

ヒト筋ジストロフィーの病因解明及び治療法の開発においては筋ジストロフィーモデル動物を用いた研究から極めて重要な知見を得ることができるため、我々は NH-413 と呼ばれる筋ジストロフィーニワトリに注目し、分子病態の解析を進めている。この筋ジストロフィーの原因は WWP1 E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子のミスセンス変異に因るとされているが、その分子機構は不明である。我々は NH-413 の骨格筋に発現する変異型 WWP1 分子が分解し局在を変化させることを明らかにしたが、このような分子の変化と筋ジストロフィー発症との関連を解析するため、NH-413 ニワトリに認められるのと同じ変異型 WWP1 を発現するトランスジェニックマウスを作製し解析を行った。また、更に解析を進めるため、ゲノム編集により NH-413 と同じ変異を導入した WWP1 ノックインマウス及び E3 リガーゼ機能を欠失した WWP1 ノックアウトマウスを作製した。

A. 研究目的

本研究は NH-413 筋ジストロフィーニワトリに着目し、その筋障害の分子機構を明らかにすることを目的としている。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子とその遺伝子産物が同定されて以来、様々な種類の筋ジストロフィーについて原因遺伝子が明らかにされている。これと並行して、筋疾患を自然発生し系統維持されていた実験動物の原因遺伝子も明らかにされ、ヒトと同じ原因遺伝子に因る場合にはヒト筋ジストロフィーの病態の解明や治療法開発に大きな役割を果たしてきた。一方、筋ジストロフィーニワトリについては、その原因が WWP1 遺伝子のミスセンス変異に因ると報告されているが、これを原因とするヒトの疾患は確認されていない。本研究はこの変異型 WWP1 による筋変性の分子機構を解明することで、これに

関わる分子群を同定し、未だ原因が明らかでないヒト筋疾患との関連を検証することも目標としている。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

NH-413 ニワトリは常染色体共優性の遺伝型式をとるため、N-413 で同定されたものと同じ変異 (R436Q) を導入したマウス WWP1 cDNA を CAG プロモーターにより発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。また、CRISPR/Cas9 システムを用いた Wwp1 遺伝子の編集により、NH-413 と同じ変異を持つノックイン (KI) マウスを作製し、更に WWP1 の E3 酵素機能を欠失するノックアウト (KO) マウスを作製した。

マウスの骨格筋における WWP1 の局在とタンパク質分子の安定性については蛍光組織染色法及びイムノブロット法によって解析した。WWP1 分解

断片の構造と酵素活性に関する解析のため、R436Q 変異を特異的に認識する抗体と、E2 分子の共有結合に必須な 890 番目のシステイン残基 (890C) のアミノ基端側を認識する抗体を作製した。また通常の WWP1 検出においてはマウス WWP1 (全 918 アミノ酸) の 199 番目から 346 番目までのアミノ酸配列を抗原として得られたアフィニティー精製抗体を用いた。尚、マウスを用いた本研究は国立精神・神経医療研究センター神経研究所の小型実験動物倫理問題検討委員会による審査と承認を得て行われた。

C. 研究結果

正常マウスの組織に発現する WWP1 は、骨格筋、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、腸、脳で 130 kDa のタンパク質として検出されるが、R436Q 変異型 WWP1-Tg マウスの骨格筋と心筋ではこれに加え、約 90 kDa の分解物が検出された。R436Q 変異を特異的に認識する抗体はこの 90-kDa 断片とは反応するが、130-kDa の全長型 WWP1 とは反応しなかった。また、これとは逆に 890C の直前数残基を認識する抗体は 130-kDa 分子と反応し、90-kDa 断片とは反応しなかったことから、R436Q 変異型 WWP1 のほとんどは分解されて酵素活性の無い 90-kDa 断片となったことを示していた。一方、Tg マウス骨格筋の免疫組織染色では、NH-413 ニワトリでの結果とは異なり、筋形質膜への局在は消失せず、むしろより強く染色されるという現象が認められた。予備的実験結果ではあるが、R436Q WWP1-KI マウスでも 130-kDa の全長型 WWP1 は認められず、Tg マウスの解析結果を支持していたが、90 kDa の分解断片は検出されなかった。また、筋形質膜への局在は消失しており、これも Tg マウスとは異なるが、NH-413 ニワトリに類似するものであった。

D. 考察

NH-413 ニワトリの解析から、我々はミスセンス変異による1アミノ酸置換が WWP1 の分解と筋形質膜からの消失を誘起するものと推察していたが、本研究の結果は、特定のアミノ酸の変化が WWP1 の分解を生じさせることを明瞭に示したと言える。一方で

WWP1-Tg マウスと WWP1-KI マウスとでは WWP1 の分解パターンと局在に差異が認められた。その原因として、1つには KI マウスでの全長型 WWP1 の消失が分解ではなく、翻訳調節に因る可能性が考えられる。もう1つは、Tg マウスにおいて野生型マウスと同等のレベルで発現する正常型 WWP1 の存在が何らかの影響を及ぼしているという可能性である。これらを明らかにすることは NH-413 における筋変性の分子機構を明らかにする上で重要であり、今後のより詳細な解析が必要である。現在、後者の可能性を検証するため、WWP1-KO マウスと Tg マウスを交配し、正常型 WWP1 を発現しない R436Q WWP1-Tg マウスの作製を行っている。

E. 結論

本研究より我々は NH-436 筋ジストロフィーニワトリに見出された WWP1 遺伝子のミスセンス変異がタンパク質の分解、或いは翻訳の抑制を生じ、E3 リガーゼとして機能していた WWP1 を消失させることを明らかにした。また、WWP1-Tg マウスと WWP1-KI マウスにそれぞれ発現する変異型 WWP1 分子の挙動には差異が認められるため、これが何に因るのか、更に詳細な解析が必要であると結論された。

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

今村道博, 中村昭則, 万年英之, 武田伸一: 筋ジストロフィーモデル動物, NH-413 ニワトリの骨格筋における WWP1 タンパク質の分解と機能の喪失. 第2回日本筋学会, 東京, 8月5日, 2016年

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

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¹⁾
研究分担者 中川 佳子¹⁾, 笹岡 俊邦²⁾

1) 熊本大学生命資源研究・支援センター 2) 新潟大学脳化学研究所

研究要旨

これまでのノックアウトマウス作製では、ES 細胞を介したキメラマウスの樹立が主流であり、作製までにかかりの時間とコストを要してきた。しかし、近年、ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変マウス作製の報告が数多くなされ、短時間、低コストな遺伝子改変マウスの作製が可能となった。ゲノム編集技術の開発、改良はかなりのスピードで進んでおり、この技術の発展に同調して遺伝子改変マウスの作製を進めるには、生殖工学技術を活かした効率的な遺伝子改変マウス作製法を確立していくことが不可欠である。本研究では、ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いて、効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウス作製法を確立する。

A. 研究目的

近年、急速に開発が進んでいるゲノム編集技術とマウス受精卵へのマイクロインジェクション技術を組み合わせることにより、遺伝子改変マウスの作製期間は大幅に短縮されつつある。私達は、体外受精や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活用した効率的な遺伝子改変マウスの作製を目的とし、これまでに体外受精由来の凍結受精卵を用いて、TALEN や CRISPR-Cas システムによる効率的な遺伝子破壊マウスの作製が可能であることを報告した(Nakagawa *et al.*, 2014, 2015)。さらに、インヒビン抗血清(IAS)とウマ絨毛性ゴナドトロピン(eCG)を同時投与(IASe)することにより、1 匹の雌マウスからより多くの卵を採取することが可能な超過剰排卵誘起法を開発したが(Takeo and Nakagata, 2015)、超過剰排卵誘起法を用いた体外受精由来の凍結受精卵をマイクロインジェクションに使用した場合も、これまで同様、ゲノム編集個体を作製することが可能か否かは明らかとなっていなかった。そのため、従来の過剰排卵誘起法(eCG-hCG)あるいは当研究室で開発した超過剰排卵誘起法(IASe-hCG)を用いて体外受精を行い、得られた C57BL/6 マウスの凍結受精卵を

用いて3種類のゲノム編集個体(ノックアウトマウス、ノックインマウス、floxed マウス)の作製を試みた。

本研究では、超過剰排卵誘起法や体外受精および受精卵の凍結保存などの生殖工学技術を用いた、より効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウス作製法の開発、改良を目的とする。遺伝子改変マウスの遺伝的背景は、ほとんど C57BL/6 マウスであるが、遺伝子改変マウスの作製には FVB や B6D2F1 を使用することも多く、作製した遺伝子改変マウスの表現型解析では様々な遺伝的背景のマウスが用いられる。そのため、様々な遺伝的背景のマウスにおいて、超過剰排卵誘起法を用いた体外受精による効率的な胚および産子の作製が可能か否かについても検討を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

ノックアウトマウスの作製においては、これまでに個体作製を行った実績のある CRISPR-Cas9 ベクター(プラスミド DNA)、あるいは合成 gRNA と Cas9 タンパク質を従来法および超過剰排卵誘起法による体外受精由来の凍結融解受精卵の前核内へインジェクションした。生存卵を偽妊娠雌マウスへ移植し、産子へ

の発生率および PCR 産物のダイレクトシーケンス解析による変異導入の確認を行った。また、超過剰排卵誘起法を用いた体外受精により作製した凍結受精卵を融解後、合成 gRNA と Cas9 タンパク質、1 本鎖オリゴヌクレオチドを受精卵の前核内へインジェクションし、ノックインマウス、flox マウスの作製が可能か否かを検討した。

様々な遺伝的背景のマウスにおける超過剰排卵誘起法を用いた体外受精では、主な近交系マウス (A/J, BALB/cByJ, C3HeJ, DBA/2J, FVB/NJ) および非近交系マウス (CD1) について、従来法あるいは超過剰排卵誘起法を用いて体外受精を行い、2 細胞期胚の体外培養により胚盤胞期胚への発生率を確認し、2 細胞期胚の仮親のへ移植により産子への発生率を確認した。

C. 研究結果

超過剰排卵誘起法を用いた体外受精卵の発生率や産子における標的遺伝子への変異導入効率は、従来の過剰排卵誘起法を用いた体外受精卵の発生率および変異導入効率とほぼ同等の成績であり、超過剰排卵誘起法を用いた体外受精卵を用いて、ノックインマウス、flox マウスを作製することも可能であった。また、マイクロインジェクションを gRNA と Cas9 を発現するプラスミド DNA から合成 gRNA と Cas9 タンパク質を使用する方法へ変更することにより、産子への発生率が改善され、ゲノム編集個体の作製効率を上昇させられることも明らかとなった。

A/J, BALB/cByJ, C3HeJ, DBA/2J, FVB/NJ および CD1 マウスにおける超過剰排卵誘起法を用いた体外受精においては、雌マウスからの採卵数を従来法よりも 1.5-3.2 倍に増加させることができ、得られた 2 細胞期胚の発生率も従来法の体外受精卵とほぼ同等であった。

D. 考察

超過剰排卵誘起法を用いた体外受精由来の凍結受精卵は、従来法を用いた体外受精由来の凍結受精卵と同様、ゲノム編集個体の作製に十分利用可能であり、今後、多くのゲノム編集個体を作製していく上で、実験動物の福祉や受精卵作製の作業効率化において有用な方法である。ゲノム編集技術と受精卵へのマイクロインジェクション法を利用した個体作製方法では、遺伝子破壊マウスは効率良く作製

可能であるが、ノックインマウスの作製については、産子への発生率や目的とする変異マウス作製効率がまだまだ低く、改善されるべき課題である。そのため、今後はノックインマウスの効率的な作製法についても検討を行い、効率的に脳疾患関連遺伝子改変マウスを作製するための研究を進める。また、様々な近交系および非近交系マウスにおいても、超過剰排卵誘起法を用いた効率的な胚および個体作製が可能であることが明らかとなり、C57BL/6 マウスだけでなく、様々な遺伝的背景における遺伝子改変マウスの作製および繁殖・維持・解析のための産子作出を効率化できる可能性が示唆された。

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。今回、研究課題としたゲノム編集技術は、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、生殖工学技術を有効利用できれば、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。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains. Takeo T, [Nakagata N](#).

Theriogenology., 86: 1341-1346 (2016). 査読有

Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. [Nakagawa Y](#), Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Yanaka N, Takeo T, [Nakagata N](#), Yamamoto T.

Biol Open., 5: 1142-1148 (2016). 査読有

2. 学会発表

- 各種マウス系統における超過剰排卵誘起法の有用性
- CRISPR-Cas システムによる遺伝子破壊マウスの作製—超過剰排卵誘起法を用いた凍結受精

卵の利用ー

第 63 回日本実験動物学会総会 2016 年 川崎

- CRISPR-Cas システムによる様々なゲノム編集個体の作製ー超過剰排卵誘起法を用いた体外受精凍結卵の利用ー

日本ゲノム編集学会 第 1 回大会 2016 年
広島

- 熊本地震で得られた教訓について
第 50 回日本実験動物技術者協会総会 2016
年 川越

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

【特許番号】5927588

【発行日】2016 年 6 月 1 日

【発明の名称】新規過排卵誘起処理によるマウス卵子の大量作製法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

筋萎縮性側索硬化症脊髄における VGF の局在に関する研究

研究代表者 嶋澤 雅光¹⁾
研究分担者 野田 泰裕¹⁾, 原 英彰¹⁾, 柿田 明美²⁾

1) 岐阜薬科大学 薬効解析学研究室 2) 新潟大学脳研究所 脳疾患標本資源解析学分野

研究要旨

本研究は、健常人および ALS 患者の脳皮質運動野および脊髄サンプルを用いて *in situ* hybridization を行い、神経ペプチド VGF の発現部位や発現量の変化などを詳細に検討することを目的として行った。岐阜薬科大学薬効解析学研究室においてヒト VGF 検出用の RNA プローブを合成し、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を用いてプローブの活性を検討した。しかし、培養器からの細胞の剥離等により、プローブの妥当性を判断することが出来なかった。そこで、細胞での検討を中止して臨床サンプルを用いた検討を行うこととした。現在、脳皮質運動野および脊髄の臨床サンプルを用いてプローブの反応性を検討中である。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症は (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は上位および下位運動ニューロンが選択的かつ進行性に変性、脱落する神経変性疾患である。多くの症例は孤発例 (約 90%) であり、約 10% は家族性に発症すると考えられている。家族性の遺伝子変異として、Cu/Zn superoxide dismutase1 (SOD1) 遺伝子のミスセンス変異などが報告されており、ヒト変異 SOD1 (SOD1^{G93A}) を過剰発現させたトランスジェニックマウスが研究に用いられている。治療薬としては、グルタミン酸放出抑制薬であるリルゾールが用いられているが、病態の進行抑制効果は約 3 ヶ月程度であり、より有効な新規治療薬の開発が望まれている。過去の報告において、孤発性 ALS の患者および ALS モデルマウスである SOD1^{G93A} マウスの脳脊髄液において、分泌ポリペプチドである VGF nerve growth factor inducible (VGF) の発現量が減少しており、SOD1^{G93A} マウスにおいて VGF の減少は ALS の主要評価項目である筋力低下に先行

して起こることが示唆されている (1)。

VGF は、中枢あるいは抹消の神経細胞や腺臓、下垂体前葉、副腎髄質、消化管等の内分泌細胞に発現している分泌ポリペプチドであり、プロセッシングによって生じる様々なペプチドが生理活性を有する。VGF は摂食行動やエネルギー恒常性の維持に関与することや、うつ病の改善や海馬シナプスの可塑性増進、海馬歯状回の神経新生に関与することが報告されている。

過去の研究により、パーキンソン病やハンチントン病などの神経変性モデルに対し、VGF の発現誘導剤は神経保護作用を示すことが明らかになった(2)。さらに、VGF の発現誘導剤は ALS モデルマウスの病態を改善し (3)、SOD1^{G93A} 遺伝子を導入した運動神経様細胞株に対して VGF 由来ペプチド AQEE-30 および LQEQ-19 は神経保護作用を示した。これらより、VGF 由来ペプチドの ALS に対する治療応用の可能性が示唆される。

しかし、ヒトにおいて脊髄等の中枢神経における VGF の役割は詳細に検討されておらず、産生

細胞や作用点など不明な点が多い。

本研究では、健常人および ALS 患者の大脳皮質運動野および脊髄サンプルを用いて *in situ* hybridization を行い、VGF の発現部位や発現量の変化などを詳細に検討する。

B.研究方法 (倫理面への配慮を含む)

岐阜薬科大学薬効解析学研究室においてヒト VGF 検出用の RNA プローブの合成を行い、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を用いてプローブの反応性を検討した。

本研究は新潟大学脳研究所で「病理解剖ならびに病理検体保存とその使用に関する承諾」が得られている症例を用い、新潟大学医学部倫理委員会の承認 (受付番号: 2523) および岐阜薬科大学生命倫理委員会の承認 (承認番号: 岐阜市薬会第 334 号) を得ている。

C.研究結果

岐阜薬科大学薬効解析学研究室においてヒト VGF 検出用の RNA プローブの合成が完了し、SH-SY5Y 細胞を用いて活性の検討を行ったが、スライドチャンバーからの細胞の剥離等によりプローブの反応性を検討することが出来なかった。

2016 年 12 月 6 日に新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野教授 柿田 明美先生と会議を行い、細胞での検討を中止して臨床サンプルを用いた検討を行うこととなり、サンプルを供与していただいた。現在は供与していただいたサンプルを用いてプローブの妥当性を検討し、並行して本検討を行っている。

D.考察

細胞培養容器のコートニング等を変更し、複数回検討を行ったが、いずれも細胞が剥離等により合成したプローブの応性を評価することができなかった。これ以上培養細胞で検討することは困難であると判断し、今後は ALS 患者サンプルを供与していただき、プローブの妥当性および本検討を並行して行う。

E.結論

今後は ALS 患者および正常対照の大脳皮質運動野および脊髄のパラフィン切片を各 10 例ずつ

供与していただき検討を行う。

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

[参考文献]

1: Zhao Z. et al., Vgf is a novel biomarker associated with muscle weakness in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), with a potential role in disease pathogenesis. *Int J Med Sci.* 2008 Apr 15;5(2):92-9.

2: Noda Y., VGF and striatal cell damage in in vitro and in vivo models of Huntington's disease. *Pharmacol Res Perspect.* 2015 Jun;3(3):e00140. doi: 10.1002/prp2.140.

3: Shimazawa M. et al., An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. *PLoS One.* 2010 Dec 9;5(12):e15307.

内在性 TDP-43 遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用

研究代表者 佐藤 俊哉¹⁾
研究分担者 大久保 直¹⁾, 東 貞宏¹⁾, 小野寺 理²⁾

1) 北里大学医学部実験動物学 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

Zinc-Finger Nuclease (ZFN) を用い、内在性 TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 8 系統を樹立した。各系統の特性から、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。しかし全ての系統で ALS 類似の表現型はなく、凝集体形成も認められなかった。TDP-43 高次構造の最新知見によると、C 末領域の天然変性領域内に存在する 2 箇所の α ヘリックスが凝集体形成に重要であり、この知見は我々の結果からも支持された。そこで CRISPR/Cas9 を用い、C 末領域の欠損長が異なる新しいマウスの作成を開始した。現在までに 9 匹のファウンダーが得られ、その特性について解析を進めている。これと並行して ALS を発症する自然突然変異マウスである wobbler マウスを解析したが、既報とは異なり、TDP-43 の発現上昇や凝集体形成は認められなかった。

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。さらに研究分担者の小野寺らは、常染色体性優性遺伝形式を示す家族性 ALS の原因遺伝子として TDP-43 を再発見し、ALS の発症機序において TDP-43 が一次的な役割を担うことを明らかにした。現在までに 40 種類以上の TDP-43 変異が報告され、その多くがミスセンス変異であり、C 末領域に集中している。この C 末領域はプリオン様ドメインとも呼ばれ、RNA 粒子などの膜をもたない構造体の形成に関与するとともに、様々な蛋白と結合して多彩な機能を発揮するが、その機能とともに C 末領域に変異が集中する理由は不明である。C 末領域の理解が進めば、ALS 病態の解明に近づくと考えられるため、Zinc-Finger Nuclease (ZFN) や CRISPR/Cas9 などのゲノム編

集技術を用い、内在性 TDP-43 C 末領域の欠損長が異なるマウスを作成している。また TDP-43 凝集を促進するシス因子に加えてトランスに作用する因子を検索するため、平成 28 年度には wobbler マウスを導入した。wobbler マウスは、逆行性小胞輸送に関与する *VPS54* 遺伝子のミスセンス変異により ALS を発症する自然突然変異マウスで、TDP-43 の発現上昇と凝集体形成が認められたことから (Dennis et al. *Neuroscience* 2009 158: 745)、この報告の再現性を確認するとともに、TDP-43 とのクロストークについて検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

昨年度までの ZFNに加え、CRISPR/Cas9 を用い、C 末領域の欠損長が異なる新しいマウスを作成した。C 末領域には、グリシンリッチ領域 (GRR、274-314)、Q/N 領域 (320-367)、C 末の終端領域 (368-414) という 3 領域が存在するため、各領域間に gRNA を設定、エレクトロポレーション法を用いて受精卵へ導入し、新規マウスを作成した。

wobbler マウス (C57BL/6J 系統) は、池田憲准教授 (東邦大学医療センター大森病院) より凍結受精卵の提供を受け、仮親への胚移植により個体化した。ヘテロ間交配によりホモ個体を得て、6 週齢の個体を用い、qPCR 法による TDP-43 mRNA 発現量の検定および病理学的解析を行った。

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

ZFN を用いて内在性 TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 8 系統を樹立した。各系統の特性に関しては、昨年度の報告書に記載したが、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。そこで今年度は、前半部分欠損蛋白の挙動を病理学的に解析するため、脊髄前角の運動神経を DAB 染色および蛍光抗体にて観察したが、TDP-43 の局在変化は推察されるものの、明らかな凝集体形成は認められなかった。また全ての系統で ALS 類似の表現型が確認されなかったため、TDP-43 高次構造の最新知見に基づき、C 末領域の欠損長が異なる新しいマウスの作成を開始した。CRISPR/Cas9 に必要な gRNA を 4 種作成し、そのうち 1 種を 100 個の受精卵にエレクトロポレーションしたところ、9 匹の産仔が得られ、目的領域への変異導入率は 94% (17/18) であった。現在、交配により各系統の分離を行っている。

6 週齢の wobbler マウスを用い、脊髄前角の運動神経を解析したが、TDP-43 の局在異常および凝集体は確認できなかった。また既に脳萎縮を示している脳より mRNA を抽出し、TDP-43 の発現レベルを確認したが、変化は認められなかった。

D. 考察

TDP-43 C 末領域はプリオン様ドメインとも呼ばれ、それ自身では特定の構造を取らない天然変性領域であり、高い凝集性を持つ。プリオン様ドメインを有する蛋白は、20 mg/ml 以上の高濃度にな

るとハイドロゲル化する (Kato et al. *Cell* 2012 149: 753)。TDP-43 にも同様の性質があり、塩濃度に依存して液-液相分離し、ゲル状の液滴が形成される (Conicella et al. *Structure* 2016 24: 1537)。この形成に必須なのが、ドメイン内の α ヘリックス構造 (残基番号 321-340) であり、ZFN を用いて作成したマウスの欠失領域に一致する。つまり TDP-43 の凝集体を形成させるためには、この α ヘリックス構造を残存させる必要があると考えられたため、CRISPR/Cas9 を用い、新たな C 末領域欠損マウスの作成を試みている。CRISPR/Cas9 の変異導入率は極めて高く、個体作成は順調に進んでいる。

wobbler マウスの解析を行ったが、既報の結果を再現することはできなかった。本解析を行った最大の理由は、TDP-43 mRNA の上昇が (1) *VPS54* 遺伝子変異の直接的な結果であるのか、(2) 神経変性 (TDP-43 局在異常を含む) の結果であるのかを検討し、*VPS54* と TDP-43 のクロストークについて明確にすることであった。つまり神経変性が生じる前の、より早期の段階で解析する必要があるため、既に機能異常が認められる脳を用いて TDP-43 mRNA の発現を確認した。しかし発現量の差は認められず、両者の直接的な関係は否定的であると推察された。

E. 結論

TDP-43 の凝集体形成には、プリオン様ドメイン内の α ヘリックス構造が重要であり、真の ALS モデルを作成するためには、TDP-43 C 末領域の欠損長が異なる新たなマウスの作成が必要である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

該当なし

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)

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

和歌山 ALS 症例における異常タンパク蓄積の分布と機序の解明

研究代表者 伊東 秀文¹⁾

研究分担者 辻 郁在¹⁾, 中山 宜昭¹⁾, 綾木 孝²⁾, 柿田 明美³⁾

- 1) 和歌山県立医科大学 神経内科学 2) 京都大学大学院医学研究科 臨床神経学
3) 新潟大学脳研究所 生命科学リソース研究センター 脳疾患標本資源解析学

研究要旨

紀伊 ALS は神経病理学的に典型的な ALS 病変に加え、神経細胞質内に tau タンパクの封入体である neurofibrillary tangles (NFT) が広範にみられる疾患である。近年、紀南地域では ALS の発症率が減少し、その背景として環境変化が想定されている。本研究では、環境変化が紀伊 ALS の病理学的特徴に影響を与えているか、過去の症例と現在の症例で比較検討した。対象は、過去(1965-1977 年死亡)の紀伊 ALS 症例 6 例と現在(2014 年死亡)の紀伊 ALS 症例 1 例とした。NFT は、運動皮質、前頭葉、側頭葉、海馬、扁桃核、および脳幹に多数分布し、大脳皮質では浅層優位に認められた。また、グアム島 ALS に特徴的とされる granular hazy inclusions が全例に見られた。TDP-43 陽性神経細胞質封入体 (NCI) は、全症例の脊髄にあり、基底核よりも海馬に多数認められた。TDP-43 病変は、Mackenzie 分類の Type B と一致した。以上から、少数例での検討ではあるが、環境の変化にも関わらず、過去と現在の紀伊 ALS の基本的な神経病理所見は共通していた。

A. 研究目的

近年行われた疫学調査では、紀南地域で ALS の発症数が減少していることが明らかとなり、その背景として生活環境の変化が想定されている。しかし、生活環境の変化を経て紀伊 ALS の病理像に変化が生じたか否かについては明らかとなっていない。今回我々は、この点について明らかにすべく、過去の紀伊 ALS 症例と近年剖検された紀伊 ALS 症例とを神経病理学的に比較検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した脳と脊髄をパラフィンに包埋し、運動野、前頭葉、側頭葉、後頭葉、基底核、扁桃核、海馬、中脳、橋、延髄、腰髄の 11 か所のパラフィンブロックから 6

μm 厚の薄切切片を作製し、リン酸化 tau、TDP-43、リン酸化 TDP-43 染色を行った。

Tau 病理では、抗リン酸化 tau 抗体 AT8 を用いて NFT とグリア細胞質内封入体の分布を調べた。NFT 定量解析として、200 倍視野にて隣接する 4 視野を観察し、1 視野あたりの平均 NFT 数(x)を算出した。x=0 を(-)、 $0 < x \leq 1$ を(+)、 $1 < x \leq 5$ を(++)、 $5 < x$ を(+++)とした。

TDP-43 病理では、抗 TDP-43 抗体と抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いて、神経細胞質内封入体、グリア細胞質内封入体、および dystrophic neurites (dn)の分布を検討した。NCI 定量解析として、NFT 定量解析と同様、200 倍視野にて 1 視野あたりの NCI 数(y)を算出した。y=0 を(-)、 $0 < y \leq 1$ を(+)、 $1 < y \leq 5$ を(++)、 $5 < y$ を(+++)とした。

C. 研究結果

1. Tau 病理

1) NFT の分布

過去、現在の症例ともに、NFT が運動野、前頭葉、側頭葉、扁桃核、海馬で多数認められ、脳幹、脊髄にまで分布しており、中脳では中脳水道周囲灰白質 (PAG) に、橋では青斑核 (LC) に多く認められた。後頭葉、基底核では比較的少数であった。また、大脳皮質では浅層優位に NFT が出現する傾向にあった。

2) Tau 陽性グリア細胞質内封入体の分布

Tau 陽性グリア細胞質内封入体として、granular hazy inclusions や granular or fuzzy tau immunoreactivity in processes of astrocytes (GFA) が認められた。GFA は加齢性変化でも認められるが、granular hazy inclusions はグアム島 ALS/PDC に特徴的な構造物であるとされている。現在の症例ではこれらに加えて嗜銀性顆粒が認められた。

2. TDP-43 病理

過去、現在の症例ともに、脊髄に skein-like inclusion が認められた。NCI は扁桃核や海馬では多数認められたが、後頭葉や基底核ではごく僅かであった。また、運動野では NCI が全層にわたって認められ、dn はごくわずかにみられるのみであった。このことから Mackenzie による TDP-43 病理分類では Type B と考えられた。また、全症例を通して neuronal intranuclear inclusions は認められなかった。

D. 考察

今回、過去と現在の紀伊 ALS 症例を神経病理学的に比較したところ、以下のような所見が得られた。

類似点としては、Tau 病理では、NFT は扁桃核、海馬といった大脳辺縁系、運動野、前頭葉、側頭葉に優位に認められ、さらに脳幹、脊髄にまで分布していたが、後頭葉、基底核には比較的少なかった。大脳皮質における NFT の分布は浅層が優位であった。Granular hazy inclusions が全症例で認められ、GFA は年齢との相関はなかった。

TDP-43 病理では、TDP-43 陽性 NCI が脊髄、脳幹に加え、海馬や扁桃核に認められたが、基底核には認められないか少数であった。TDP-43 病

変は Mackenzie による病理分類で Type B であった。

相違点としては、現在の症例では嗜銀性顆粒が認められた。嗜銀性顆粒は tau 免疫染色で直径数ミクロン程度の米穀様に染色され、神経突起内に異常リン酸化タウが数珠状に蓄積したものである。この構造物は、嗜銀性顆粒病や健常高齢者、その他のタウオパチーでしばしば観察される。現在の症例は過去の紀伊 ALS 患者より高齢であったため、嗜銀性顆粒も加齢性変化として出現したと考えられる。

TDP-43 病理に基づいた Brettschneider による ALS Stage は、Stage3 では基底核、Stage4 では海馬などの側頭葉内側前方に NCI が出現するとされ、一般に側頭葉内側前方への NCI 出現症例では基底核の NCI を伴うとされる。ところが、今回検討した過去の症例、現在の症例ともに、基底核には NCI が少ない、もしくは認められないのに対し、海馬や扁桃核に NCI が強く認められた。この点は通常の ALS としては非典型的であり、本疾患の特徴的な所見でないかと考えた。また、Mackenzie による TDP-43 病変分類では、過去の症例と現在の症例とも、NCI が主体で dn が少ない Type B であった。以上から、TDP-43 病理に関しては、過去の症例と現在の症例において病理学的な差はないと考えられた。

NFT、granular hazy inclusions、GFA などの tau 病理の分布も、年齢の影響を除き、過去の症例と現在の症例で類似していたことから、環境の変化を経ても紀伊 ALS の基本的な病理像は変化していないと考えられ、紀伊 ALS の発症には環境要因よりも遺伝的要因の関与が強いのではないかと考えた。

E. 結論

紀伊 ALS の発症率は減少しているものの、現在も、古典的な紀伊 ALS の病理学的特徴を有する症例が存在していることが明らかとなった。現在の紀伊 ALS 症例では嗜銀性顆粒が扁桃核や海馬に認められ、加齢によって出現した可能性や、重症例であった可能性が考えられた。今後、より多くの症例を検討し、環境要因や遺伝要因も含め比較検討することで、紀伊 ALS/PDC の原因解明に繋がるのではないかと考えられる。

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

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 28 年度新潟大学脳研究所 国際共同研究 進捗状況報告書

A. 研究課題名：

韓国国立ブレインバンク-新潟大学脳研究所ブレインバンクの協力体制の確立と共同研究実施に向けた調査研究

B. 研究代表者 所属機関名 韓国国立ソウル大学病院
職 名 教授
氏 名 Sung-Hye Park

C. 共同研究の進捗状況

2014 年に発足した韓国国立ブレインバンクは、事業展開に必要な制度・人員配置・医療機関との連携など様々な課題を抱えている。本共同研究は、MOF を締結した新潟大学脳研究所ブレインバンクを事業モデルとし、その制度を導入することを視野に、相互の情報を交換し、それぞれの状況に応じた実効性の高い事業展開を図る、準備調査研究である。

D. 共同研究成果

- ① 平成 28 年 7 月 22 日 漆谷慶北大学病院 ブレインバンクのメンバー 4 名 Kyunghun Kang (Assistant Professor), Sunzoo Kim (Assistant Professor), Jungeun Kim (Clinical Researcher), Kutorisa (Interpreter) が来学し、脳研究所の施設を見学し、ブレインバンク設立に関する情報交換を行った。引き続き、両国の協力体制を強化することを確認した。
- ② 平成 28 年 9 月 28-29 日に行われた第 19 回 韓国脳神経科学学会において、「韓国ブレインバンクネットワーク」に関するシンポジウムに、本共同研究課題の脳研側対応者（柿田）がシンポジストとして招待講演を行った。
- ③ 平成 28 年 9 月 30 日に、韓国国立ソウル大学病院と新潟大学脳研究所との間で MOU を締結する式典に脳研究所長の代理として脳研側対応者（柿田）が出席した。その後に行われた関連シンポジウムで講演し、脳研究所の実情を紹介し、韓国ブレインバンク設立のための情報交換を行った。

E. 今後の共同研究の計画

新潟大学脳研究所は、韓国の 2 つの施設：韓国国立脳科学院ブレインバンク及び韓国国立ソウル大学病院との間でそれぞれ MOU を締結している。以下の交流活動を通じて、将来の実質的な協力体制を築くべく、本調査研究を進めていく予定である。

- ① 今後、2017 年 7 月頃に 1 ヶ月程度 韓国国立脳科学院ブレインバンクの関連施設である高麗大学から、病理学専門医を新潟大学脳研究所に受け入れ、神経病理学のトレーニングを行う予定である。
- ② 韓国国立ソウル大学病院から、標本作製を行う技師 2 名程度を新潟大学脳研究所に受け入れ、標本作製、神経系において特殊な染色法などの研修を行う予定である。

平成 28 年度新潟大学脳研究所 国際共同研究 進捗状況報告書

- A. 研究課題名 : 1. アルツハイマー病の発症前診断・発症予防
2. 水動態の molecular imaging

B. 研究代表者 所属機関名 カルフォルニア大学デイビス校
職 名 教授
氏 名 Ingrid L Kwee

C. 共同研究の進捗状況

1. 薬剤スクリーニングにて 3 種類の候補薬剤を選定、アルツハイマー病モデルマウスへの長期投与実験を行った。現時点では 1 剤の評価を終え、効果が認められたことより、国内特許申請、さらに JST の援助の元、国際特許を申請した。
2. PET を用いた脳内水動態定量化手法を開発し、この手法を用い正常加齢者および MCI 症例からアルツハイマー病に進行する症例を予想できるかを検証するため、ボランティアを用いた基礎検討を開始した。

D. 共同研究成果

国内特許・国際特許 (PCT) 出願

E. 今後の共同研究の計画

1. スクリーニングを継続すると共に、長期投与実験で効果の認められた 2 剤について、企業 2 社と秘密保持契約を結び、実用化への道筋をつけるべく折衝中である。さらに、スクリーニングにて効果の認められている 2 剤については長期投与実験を継続する。
2. PET を用いたヒトを対象とした研究については、この春から Flutemetamol を用いた老人班 PET の測定も可能になり、この手法と脳内水動態定量化手法を併せ、アルツハイマー病の発症前診断を実用化すべく prospective study を開始する。
3. 製薬会社との折衝が終わり次第、特許および秘密保持契約上 pending であったこれらの結果を論文化する。

平成 28 年度新潟大学脳研究所 国際共同研究 進捗状況報告書

A. 研究課題名：音楽における協和・不協和知覚の神経機構：事象関連電位を用いた研究

B. 研究代表者 所属機関名 バーススパー大学
職 名 非常勤講師
氏 名 アーサーズ裕子

C. 共同研究の進捗状況

本研究は、事象関連電位を指標に、和音知覚の神経学的メカニズムを明らかにすることを目的とする。音楽における和音の知覚は、和音の(1)物理音響学的特徴、(2)音楽的文脈より得られる期待、および(3)聞き手の音楽的経験の、少なくとも3つの要因に影響される。現時点では、これまでに収集した(1)と(2)の交互作用についてのデータを解析し論文にまとめる作業を進めている。また、あらたに(3)を考慮した新たな実験計画を策定した。

D. 共同研究成果

現在、データ解析を進めている。

E. 今後の共同研究の計画

協和音・不協和音の知覚には、(1)音響的特徴、(2)音楽的文脈、(3)聴き手の期待が複雑に絡んで要因していると考えられる。これらの影響を紐解いて理解するための実験を、3年程度の期間で、順序立てて段階的に進めていく予定である。

平成 28 年度新潟大学脳研究所 国際共同研究 進捗状況報告書

A. 研究課題名 : Assessment of auditory dysfunction in model animals for schizophrenia
統合失調症モデル動物の聴覚機能障害の計測、評価

B. 研究代表者

所属機関名 Dept. of Psychiatry and Behavioral Neurobiology, Uni. of Alabama at Birmingham
職 名 Associate Professor
氏 名 Kazu Nakazawa

C. 共同研究の進捗状況

大脳皮質抑制神経細胞での NMDA 受容体を欠損する統合失調症モデルマウスにおける脳波聴覚機能障害の原因を探る研究を実施した。

D. 共同研究成果

当該モデルマウス 3 匹と対照コントロールマウス 3 匹の大脳皮質聴覚野から RNA を回収し、イルミナ社の次世代シーケンサー HiSeq 用の cDNA ライブラリーを作製し、配列解析を Cutdiff にて実施した。結果、当該モデルマウス群における NMDA 受容体低下とともに、興奮性神経伝達にかかわる分子群の遺伝子変化が観察されている。

E. 今後の共同研究の計画

得られた遺伝子プロファイルデータをパスウェイ解析し、そのシグナル路の特徴を捉えることで、聴覚機能変化との関連性を探求する。

平成 28 年度新潟大学脳研究所 国際共同研究 進捗状況報告書

A. 研究課題名 : Functional analysis of homeostatic synaptic plasticity associated molecules.

B. 研究代表者 所属機関名 Uni. of Massachusetts Medical School
(マサチューセッツ州立医科大学)
職 名 Assistant Prof.
氏 名 Kensuke Futai (二井 健介)

C. 共同研究の進捗状況

シナプス接着に関与することが知られているニューレキシン (Nrxn) は、最近神経可塑性の調節をおこなう分子機序の構成要素であることが示唆されている。本研究では 3 種類ある Nrxn1, 2, 3 の floxed マウスを用いて、特定の神経回路選択的な分子欠損を惹起し、シナプスの可塑性における当該分子の役割を形態学的な手法及び電気生理学的な手法を用いて解析をする。本年度は 3 種類の floxed 変異を持つマウスをボストンに移送し、3 種類の Nrxn を同時に欠損させるべくトリプル遺伝子変異マウスを作製し、特定の神経細胞で Cre リコンビナーゼ遺伝子を発現するドライバーマウスと交配させて解析をおこなった。

D. 共同研究成果

Nrxn1, 2, 3 floxed mice を交配させて、3 種類の遺伝子を持つマウスの作製をした。このマウスと Cre リコンビナーゼ遺伝子を発現するドライバーマウスを交配させ、解析対象動物取得に成功している。現在まずその形態学的な解析を進めており、その成果は翌年以降の学会並びに論文として発表する予定にしている。

E. 今後の共同研究の計画

この研究を遂行する上で困難な点は、4 種類の遺伝子を載せたマウスを作出することにあるが、新潟から 3 種類の遺伝子変異を持つ動物の供与を受けたので大いに研究が進捗した。今後、各種の Cre リコンビナーゼ遺伝子発現ドライバーマウスの供与を新潟大学脳研究所崎村研から受けて、研究の進捗を図りたい。また、興奮性及抑制性神経のバランスは脳機能保持に重要な働きをするが、このバランスに関与が認められているエピジェネティックな現象の解析を進める。そのために、神経細胞におけるエピジェネティックな制御に関連する Sfmbt2 分子の floxed mouse と当該分子に tag 配列をノックインしたマウスを崎村研と共同で作製して解析をすることを計画している。

平成 28 年度新潟大学脳研究所 国際共同研究 進捗状況報告書

A. 研究課題名 : Research on pathway-specific control of motor activity and reward and aversive learning behavior via D1 and D2 dopamine receptors. (D1及びD2ドーパミン受容体を介する神経伝導路特異的な運動活性の調節及び学習行動の調節に関する研究)

B. 研究代表者 所属機関名 米国 イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校 医学部
ベックマン研究所 精神医学・行動神経生物学部門
職 名 准教授
氏 名 Yanyan Wang 博士

C. 共同研究の進捗状況

ドーパミン神経系は、運動制御、運動学習および報酬関連学習に重要な役割を果たす。基底核の神経回路にはドーパミンD1受容体(D1R)を発現する「直接路」及びドーパミンD2受容体(D2R)を発現する「間接路」がある。また、D2RはD2L及びD2Sの2つの分子種がある。本研究では精神神経疾患の病態生理の理解に焦点を当て、運動制御、運動学習および報酬学習におけるD2R分子種に特異的な役割を明らかにする。これまでに正田貴俊教授(現大阪大)と共同で、タッチパネルオペラント学習試験によりD2L K0マウスは視覚弁別と逆転課題の成績が低いこと、及びIntelliCageによる場所識別学習と逆転学習において、D2L K0マウスは逆転学習の成績が低いことが解った。これらからD2Lを介する情報伝達は、以前の行動戦略を抑制し新しい戦略に行動を移す役割があることを示している。また、塩田倫史博士、福永浩司教授(東北大学)との共同研究で、D2L K0マウスを用いて、線条体ニューロンにおいて、Rabex-5/血小板由来増殖因子受容体- β (PDGFR- β)を介する細胞内のD2Lによるシグナル伝達は、細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)活性化、樹状突起形成およびニューロン活性に重要であることを明らかにした。

D. 共同研究成果

これまでに以下の成果発表を行った。

- (1) Wang Y, Xu, R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung M-P, and Sankoorikal E-B (2000) Dopamine D2 Long receptor-deficient mice display hypolocomotion and reduced level of haloperidol-induced catalepsy. *Journal of Neuroscience*, 20, 8305-8314
- (2) Wang Y, Sasaoka T, Dang M T (2013) A Molecular Genetic Approach to Uncovering the Differential Functions of Dopamine D2 Receptor Isoforms. *Methods in Molecular Biology*, 2013;964:181-200. doi: 10.1007/978-1-62703-251-3_11.
- (3) Macpherson T, Morita M, Wang Y, Sasaoka T, Sawa A, Hikida T (2016) Nucleus accumbens dopamine D2-receptor expressing neurons control behavioral flexibility in a place discrimination task in the IntelliCage. *Learning & Memory* 23:359-364.
- (4) Morita M, Wang Y, Sasaoka T, Okada K, Niwa M, Sawa A, Hikida T (2016) Dopamine D2L receptor is required for visual discrimination and reversal learning. *Molecular Neuropsychiatry* 2:124-132.
- (5) Shioda N, Yabuki Y, Wang Y, Uchigashima M, Hikida T, Sasaoka T, Mori H, Watanabe M, Sasahara M, Fukunaga K (2016) Endocytosis following dopamine D2 receptor activation is critical for neuronal activity and dendritic spine formation via Rabex-5/PDGFR β signaling in striatopallidal medium spiny neurons. *Molecular Psychiatry* doi: 10.1038/mp.2016.200.

E. 今後の共同研究の計画

D2RはD2L及びD2Sの2つの分子種があり、今後は、D2S分子種の機能を明らかにするため、脳研究所の崎村建司教授との共同研究によりD2S選択的欠損マウス(D2S K0マウス)を作成する計画である。D2S K0マウスを用いて、一連の行動実験(ロータロッド試験、オープンフィールド試験、ステップホール試験、条件付け場所嗜好性試験、能動回避学習)により、運動機能および認知機能に及ぼす影響を解析する

またD2S, D2Lの分子種が基底核の神経活動をどのように調節するかを解析するため、生理学研究所の南部篤教授との共同により、D2S K0マウス, D2L K0マウスを用いて、皮質刺激に応答する脚内核(EPN)の神経活動、すなわち初期興奮(段階I)、次いで阻害(段階II)、その後の興奮第III相)への影響を解析する。さらに、グルタミン酸作動性シナプス伝達に対するD2SおよびD2Lを介したドーパミンシグナルの寄与を明らかにするため、脳スライスに電気生理学的記録を用いて線条体神経のシナプス可塑性(長期増強および長期抑制)を分析する予定である。

これらの研究の成果を、運動障害(例えば、パーキンソン病またはジスキネジー)の病態生理学および抗パーキンソン病薬の作用機序をよりよく理解するのに役立てたい。

新潟大学脳研究所年報 2016

平成 29 年 8 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: jimu@bri.niigata-u.ac.jp

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