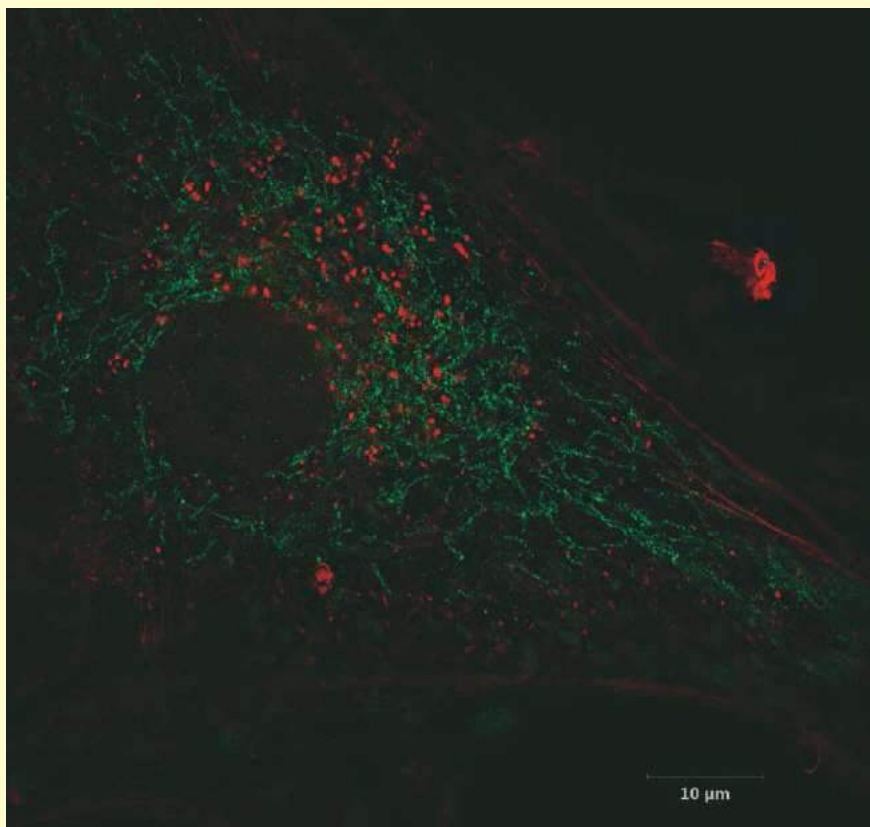


Brain Research Institute
Niigata University
Annual Report 2017

新潟大学脳研究所年報

2017



U87MG（グリオーマ細胞株）の超解像度顕微鏡画像
膠芽腫におけるミトコンドリアの機能を探索している。緑：ミトコンドリア（Tim-23）、赤：F-Actin

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	18
○ 脳神経外科学分野	20
○ 神経内科学分野	24
○ 統合脳機能研究センター	30
○ 遺伝子機能解析学分野 / 生命情報工学分野	33
○ 動物資源開発研究分野	36
○ 分子神経疾患資源解析学分野	40
○ システム脳病態学分野	42
○ 脳病態解析分野	44
3. 社会との連携	47
4. 共同利用・共同研究拠点	
共同利用・共同研究採択者一覧	63
報告書	
プロジェクト型共同研究	
○ MRI 陰性てんかん症例での多角的術前検査によるてんかん焦点の可視化 国立病院機構西新潟中央病院 福多 真史	68
○ 家族性進行性核上性麻痺（PSP）の原因遺伝子の探索と孤発性 PSP 及び類縁疾患との 関連解析 北海道大学大学院医学研究院 矢部 一郎	70

○ 熱ショック応答による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 細胞質凝集体の形成抑制 杏林大学保健学部 渡部 和彦	72
○ ケラタン硫酸糖鎖合成酵素遺伝子のノックアウトマウスの作成とその表現型解析および ALS 発症における影響の解析 関西医科大学 赤間 智也	75
○ 不安障害モデルマウスの脳内分泌タンパク質のプロテオーム解析 北里大学医学部 板倉 誠	77
○ 神経障害エステラーゼの機能解析 東海大学医学部 木村 穰	80
○ グアム島のパーキンソン認知症と筋萎縮性側索硬化症：リン酸化 TDP-43 とリン酸化タ ウの脳内進展様式 信州大学医学部 小柳 清光	83
○ げっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析 東海大学医学部 加藤 明	85
○ ドーパミン受容体コンディショナルノックダウンマウスを用いたパーキンソン病の病 態生理の解析 自然科学研究機構生理学研究所 南部 篤	87
○ 新規疼痛関連分子の脳および脊髄後角での神経可塑性における機能の解析 関西医科大学 片野 泰代	90
○ アルツハイマー病の病態におけるタウ C 末端断片の役割の解明 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 松本 信英	92
○ マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析 国立遺伝学研究所 岩里 琢治	94
○ 糖脂質代謝異常から紐解くアルツハイマー病の病態解明 国立長寿医療研究センター 里 直行	97
○ Cacnalg 変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態の解明 横浜市立大学医学部 土井 宏	99
○ 視床特殊核におけるグルタミン酸受容体 GluD1 による入力選択的回路形成機構 北海道大学大学院医学研究院 渡辺 雅彦	102
○ 認知症病態における海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide:HCNP) 発現メカニズムの解析 名古屋市立大学大学院医学研究科 松川 則之	104
○ 神経変性疾患における NAK α 3 神経細胞の機能障害と細胞死機構の解明 神戸医療産業都市推進機構 星 美奈子	106
○ Gut microbiota の制御が脳虚血病巣進展に及ぼす影響 日本医科大学付属病院 西山 康裕	109

○ 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	112
○ 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	115
○ 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	117
○ 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 久保 均	119
○ 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	121
○ 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	124
○ 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	126
○ 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	130
○ 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	133
○ ジェネティックニューロパソロジーによる精神疾患脳内分子表現型解析 福島県立医科大学会津医療センター 國井 泰人	135
○ 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	138
○ 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	141
○ 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 山中 龍也	143
○ 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	146
○ 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	149
○ 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	151
○ 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 杉田 保雄	153

- 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 156
- 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 158
- 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 160

連携資源利用型共同研究

- 意識科学の基づく「自動学習実験機能を備えた飼育装置による遠隔操作実験法」を用いたマウス表現型解析
国立研究開発法人理化学研究所 若菜 茂晴 163
- 結合性解析を用いた統合失調症における情報統合機能の解析
京都大学大学院医学研究科 宮田 淳 165
- 血液および髄液におけるアルカデインのアルツハイマー病バイオマーカーとしての検証と解析
北海道大学大学院薬学研究院 鈴木 利治 167
- APP の細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析
北陸大学医療保健学部 中山 耕造 169
- 22q11.2 欠失症候群関連因子の機能解析
北里大学医学部 大久保 直 172
- 脳疾患動物モデルの生体イメージングによる、脳疾患機序の解明
国立遺伝学研究所 水野 秀信 174
- ニコチン作動性アセチルコリン受容体の神経系における局在の検討
熊本大学医学部附属病院 中根 俊成 177
- 脳アミロイドアンギオパチーの病態関連分子の解析
熊本大学医学部附属病院 植田 光晴 179
- 意識的機能を実現する神経回路構築の多次元的研究
京都大学大学院医学研究科 古田 貴寛 181
- クラスター型プロトカドヘリン遺伝子を用いた意識研究へのアプローチ
大阪大学大学院生命機能研究科 八木 健 183
- 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 185
- 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 187
- 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 190

- 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
国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター 吉木 淳 …… 192
- 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 …… 196
- 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 林 健太郎 …… 198
- 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 …… 200
- ドーパミン受容体遺伝子改変マウスの線条体におけるドーパミン代謝の解析
東京工業大学生命理工学院 一瀬 宏 …… 202
- 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 …… 204

国際共同研究

- Preventive medicine for Alzheimer's disease
アルツハイマー病の発症前診断・発症予防
カリフォルニア大学デービス校 KWEE, Ingrid L. …… 207
- Elucidation of the roles of chromatin remodeler in neuronal homeostasis using mouse models
マウスモデルを用いた, エピゲノム修飾による神経恒常性維持機構の解明
マサチューセッツ大学メディカルスクール FUTAI, Kensuke …… 209
- Research on pathway-specific control of motor activity and motor- and reward-related learning behaviors via dopamine D1 and D2 receptors
ドーパミン D1/D2 受容体を經由する神経回路特異的な運動調節及び報酬学習行動の研究
イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校 WANG, Yanyan …… 213

進捗状況報告書

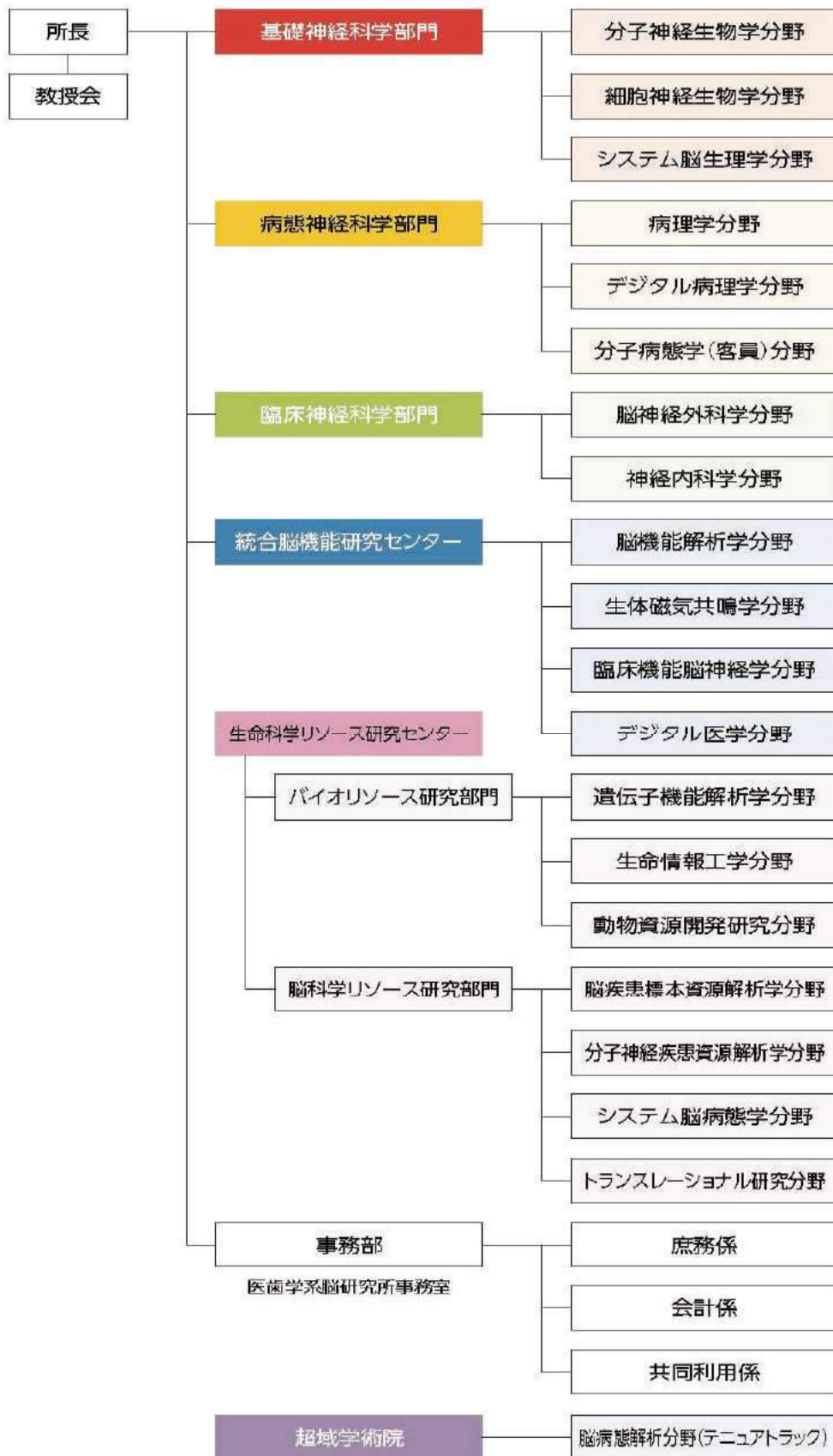
学内異分野融合・共同研究

- 脳-腸-肝ネットワークによる病態発症のメカニズムー自律神経系、腸内細菌叢を介した難治疾患の病態解明と新規治療法の開発を目指してー
医歯学総合研究科 寺井 崇二 …… 215
- パルス制御が拓く焦点可動 MRI による新規コントラスト機構の創出とそれに基づく革新的な機能 MRI 撮像法の実現
自然科学系工学部 佐々木 進 …… 216
- 視路圧迫症候群の器質的・機能的解析から見る, ヒト脳神経系の可塑性の探索と病態予測モデルの構築
自然科学系工学部 飯島 淳彦 …… 217

- UFM1 システムの異常によるヒト遺伝性発達障害発症機構の解明
医歯学総合研究科 小松 雅明 219
- 組織浸透性に優れたマーカーの創出による脳の機能と病態の三次元マッピングの試み
医歯学総合研究科 竹林 浩秀 221
- 手と身体を知覚する認知神経科学的基盤の解明
人文社会・教育科学系人文学部 新美 亮輔 222

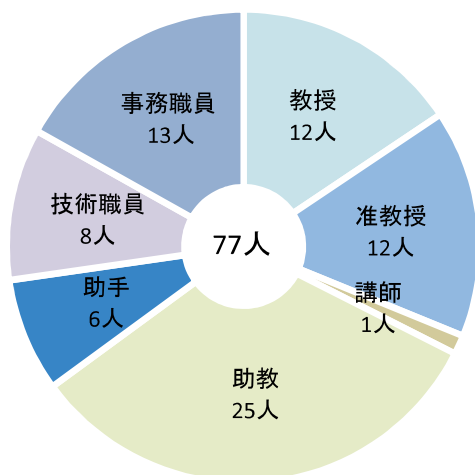
1. 組織図・研究所のデータ

組織図 (H30. 3. 31 現在)

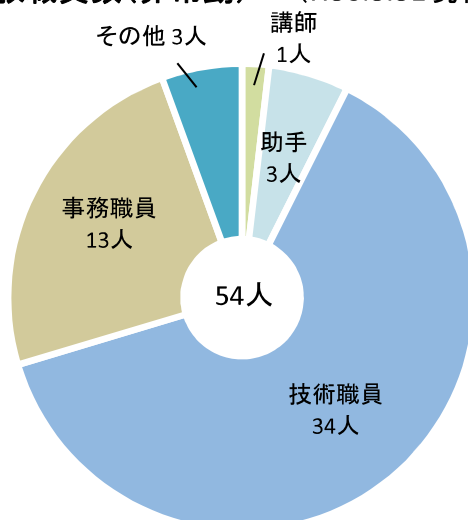


研究所のデータ

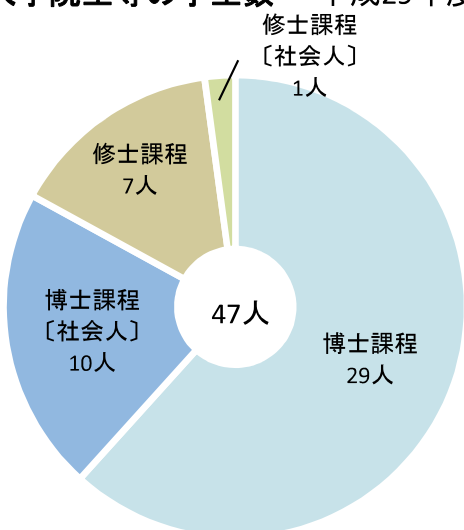
教職員数(常勤) (H30.3.31現在)



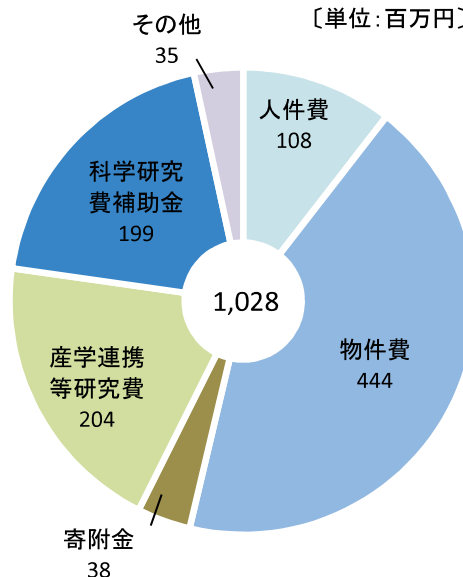
教職員数(非常勤) (H30.3.31現在)



大学院生等の学生数 平成29年度



研究所予算(決算額) 平成29年度
〔単位:百万円〕



外部資金獲得状況 (平成 29 年度)

区分	件数	金額 (千円)
科学研究費補助金	42	152,490
厚生労働科学研究費補助金	3	36,883
運営費交付金特別経費	3	175,970
地方公共団体・民間助成団体等の研究費	18	21,795
民間企業等との共同研究	5	25,490
受託研究	22	241,406
寄附金	39	25,995

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30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		甲斐竜太
助教	岩倉百合子		齋藤摩美
特任助教	外山英和		
特任助手	北山栄子	修士課程大学院生	小林雄太郎

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脳生理学分野、医学部の生理学第1・第2教室、京都大学霊長類研究所、岡崎・生理学研究所、名古屋大学環境医学研究所、東京農業大学、福島県立医科大学医学部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）

Sotoyama H, Iwakura Y, Oda K, Sasaoka T, Takei N, Kakita A, Enomoto H, Nawa H. Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*. 2017 Jul 27;654:99-106. doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.005.

Namba H, Nagano T, Jodo E, Eifuku S, Horie M, Takebayashi H, Iwakura Y, Sotoyama H, Takei N, Nawa H. Epidermal growth factor signals attenuate phenotypic and functional development of neocortical GABA neurons. *J Neurochem*. 2017 Jun 13. doi: 10.1111/jnc.14097.

Iwakura Y, Wang R, Inamura N, Araki K, Higashiyama S, Takei N, Nawa H. Glutamate-dependent ectodomain shedding of neuregulin-1 type II precursors in rat forebrain neurons. *PLoS One*. 2017 Mar 28;12(3):e0174780. doi: 10.1371/journal.pone.0174780.

Furukawa K, Fuse I, Iwakura Y, Sotoyama H, Hanyu O, Nawa H, Sone H, Takei N. Advanced glycation end products induce brain-derived neurotrophic factor release from human platelets through the Src-family kinase activation. *Cardiovasc Diabetol*. 2017 Feb 8;16(1):20. doi: 10.1186/s12933-017-0505-y.

IV 共同研究

- (1) 研究題目：「創薬のためのインビトロ脳機能評価法の確立と標準化ヒト神経細胞の開発」
研究内容：ヒトiPS由来神経細胞を用いて分化誘導、機能評価の手法を標準化し、創薬／安全性に利用する。
参加機関：大阪医療センター、群馬大学、東京大学
- (2) 研究題目：「ヒトを特徴づける脳比較トランスクリプトーム・比較メチローム解析」
研究内容：ヒト及び霊長類でジンクフィンガー遺伝子群に着目し、発現比較及びゲノムメチル化比較を行い、ヒトを特徴づける遺伝子を探索する。
参加機関：京都大学霊長類研究所 郷 康広
- (3) 研究題目：「統合失調症におけるドパミンシグナルの変調」
研究内容：死後脳を用いて統合失調症におけるドパミン関連分子のゲノム解析及び発現解析を行う。
参加機関：福島県立医科大学 國井泰人
- (4) 研究題目：「霊長類をもちいた統合失調症モデル動物の作成」
研究内容：マーモセットを用いた統合失調症モデルの樹立を目指す。
参加機関：京都大学霊長類研究所 中村克樹

I 研究組織（構成員 平成30年3月31日現在）

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

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、脳におけるグルタミン酸受容体分子群の機能を正しく評価するためにおこなう当該分子の定量である。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」などの、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ン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、チャン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し、顕微授精に適用することで産子が得られたことから、安価で容易に遺伝子改変ラットが作製できる技術の開発に成功したと言える。また、この技術を最近ヒト脳機能解析のモデル動物として注目されている霊長類のマーモセットに応用しようと現在取り組んでいる。従来廃棄されていた実験死動物や病死したマーモセット卵巣の供与を受け、それらの卵巣をヌードマウスに移植して成熟卵を取得する手法の開発をおこなっている。また、胚盤胞補完法により遺伝子改変マーモセットの精子を取得すべく基礎的な条件検討をおこなっている。この研究は基盤研究 (B)「多様な発想で研究可能なリソースとしての遺伝子改変マーモセット作製法の開発」によってサポートされている。

- 4) 我々は、C57BL/6系統マウスから独自にES細胞株RENKAを樹立して、コンディショナルノックアウトを中心に脳機能解析に資する遺伝子改変マウスを500系統以上樹立して脳研究コミュニティに供与してきた。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7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104件（平成29年度、19件）のマウス作製支援をおこなった。さらに、脳研究所の事業である全国共同利用・共同研究で合計65件（平成29年度、7件）の支援をおこなった。

以上、この7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123編（平成29年度、26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. Good JM, Mahoney M, Miyazaki T, Tanaka KF, Sakimura K, Watanabe M, Kitamura K, Kano M.: Maturation of Cerebellar Purkinje Cell Population Activity during Postnatal Refinement of Climbing Fiber Network. *Cell Rep.* 2017 Nov 21;21(8):2066-2073.
2. Katori S, Noguchi-Katori Y, Okayama A, Kawamura Y, Luo W, Sakimura K, Hirabayashi T, Iwasato T, Yagi T.: Protocadherin- α C2 is required for diffuse projections of serotonergic axons. *Sci Rep.* 2017 Nov 21;7(1):15908.
3. Nakayama K, Ohashi R, Shinoda Y, Yamazaki M, Abe M, Fujikawa A, Shigenobu S, Futatsugi A, Noda M, Mikoshiba K, Furuichi T, Sakimura K, Shiina N.: RNG105/caprin1, an RNA granule protein for dendritic mRNA localization, is essential for long-term memory formation. *Elife.* 2017 Nov 21;6. pii: e29677.

4. Soya S, Takahashi TM, McHugh TJ, Maejima T, Herlitze S, Abe M, Sakimura K, Sakurai T.: Orexin modulates behavioral fear expression through the locus coeruleus. *Nat Commun.* 2017 Nov 20;8(1):1606.
5. Honda A, Usui H, Sakimura K, Igarashi M.: Rufy3 is an adapter protein for small GTPases that activates a Rac guanine nucleotide exchange factor to control neuronal polarity. *J Biol Chem.* 2017 Dec 22;292(51):20936-20946.
6. Miyamoto H, Shimohata A, Abe M, Abe T, Mazaki E, Amano K, Suzuki T, Tatsukawa T, Itohara S, Sakimura K, Yamakawa K.: Potentiation of excitatory synaptic transmission ameliorates aggression in mice with Stxbp1 haploinsufficiency. *Hum Mol Genet.* 2017 Dec 15;26(24):4961-4974.
7. Hayakawa-Yano Y, Suyama S, Nogami M, Yugami M, Koya I, Furukawa T, Zhou L, Abe M, Sakimura K, Takebayashi H, Nakanishi A, Okano H, Yano M.: An RNA-binding protein, Qki5, regulates embryonic neural stem cells through pre-mRNA processing in cell adhesion signaling. *Genes Dev.* 2017 Sep 15;31(18):1910-1925.
8. Hou X, Yoshioka N, Tsukano H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, Yanagawa Y, Sakimura K, Takeuchi K, Kitagawa H, Hensch TK, Shibuki K, Igarashi M, Sugiyama S.: Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Sci Rep.* 2017 Oct 3;7(1):12646.
9. Yamauchi K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Lickert H, Kawasaki T, Murakami F, Hirata T.: Netrin-1 Derived from the Ventricular Zone, but not the Floor Plate, Directs Hindbrain Commissural Axons to the Ventral Midline. *Sci Rep.* 2017 Sep 20;7(1):11992.
10. Kajita Y, Kojima N, Koganezawa N, Yamazaki H, Sakimura K, Shirao T.: Drebrin E regulates neuroblast proliferation and chain migration in the adult brain. *Eur J Neurosci.* 2017 Sep;46(6):2214-2228.
11. Mashud R, Nomachi A, Hayakawa A, Kubouchi K, Danno S, Hirata T, Matsuo K, Nakayama T, Satoh R, Sugiura R, Abe M, Sakimura K, Wakana S, Ohsaki H, Kamoshida S, Mukai H.: Impaired lymphocyte trafficking in mice deficient in the kinase activity of PKN1. *Sci Rep.* 2017 Aug 9;7(1):7663.
12. Choo M, Miyazaki T, Yamazaki M, Kawamura M, Nakazawa T, Zhang J, Tanimura A, Uesaka N, Watanabe M, Sakimura K, Kano M.: Retrograde BDNF to TrkB signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum. *Nat Commun.* 2017 Aug 4;8(1):195.
13. Kawai T, Okochi Y, Ozaki T, Imura Y, Koizumi S, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Yamashita T, Okamura Y.: Unconventional role of voltage-gated proton channels (VSOP/Hv1) in regulation of microglial ROS production. *J Neurochem.* 2017 Sep;142(5):686-699.
14. Yamaguchi J, Suzuki C, Nanao T, Kakuta S, Ozawa K, Tanida I, Saitoh T, Sunabori T, Komatsu M, Tanaka K, Aoki S, Sakimura K, Uchiyama Y.: Atg9a deficiency causes axon-specific lesions including neuronal circuit dysgenesis. *Autophagy.* 2017 May 17:1-14.
15. Koike M, Shibata M, Sunabori T, Yamaguchi J, Sakimura K, Komatsu M, Tanaka K, Uchiyama Y.:

Purkinje Cells Are More Vulnerable to the Specific Depletion of Cathepsin D Than to That of Atg7. *Am J Pathol.* 2017 Jul;187(7):1586-1600.

16. Rubio ME, Matsui K, Fukazawa Y, Kamasawa N, Harada H, Itakura M, Molnár E, Abe M, Sakimura K, Shigemoto R.: The number and distribution of AMPA receptor channels containing fast kinetic GluA3 and GluA4 subunits at auditory nerve synapses depend on the target cells. *Brain Struct Funct.* 2017 Nov;222(8):3375-3393.

17. Shimizu T, Wisessmith W, Li J, Abe M, Sakimura K, Chetsawang B, Sahara Y, Tohyama K, Tanaka KF, Ikenaka K.: The balance between cathepsin C and cystatin F controls remyelination in the brain of Plp1-overexpressing mouse, a chronic demyelinating disease model. *Glia.* 2017 Jun;65(6):917-930.

18. Danno S, Kubouchi K, Mehruba M, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Eguchi S, Oka M, Hirashima M, Yasuda H, Mukai H.: PKN2 is essential for mouse embryonic development and proliferation of mouse fibroblasts. *Genes Cells.* 2017 Feb;22(2):220-236.

19. Yabuki Y, Matsuo K, Izumi H, Haga H, Yoshida T, Wakamori M, Kakei A, Sakimura K, Fukuda T, Fukunaga K.: Pharmacological properties of SAK3, a novel T-type voltage-gated Ca²⁺ channel enhancer. *Neuropharmacology.* 2017 May 1;117:1-13.

20. García-Hernández S, Abe M, Sakimura K, Rubio ME.: Impaired auditory processing and altered structure of the endbulb of Held synapse in mice lacking the GluA3 subunit of AMPA receptors. *Hear Res.* 2017 Feb;344:284-294.

IV 共同研究

- | | |
|----------|-----------------------------------------------|
| (1) 研究題目 | 「新潟大学脳研究所 共同利用・共同研究」 |
| 研究内容 | C57BL/6系統ES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製支援 |
| 参加機関 | 自然科学研究機構、東北大学、東京大学、関西医科大学 |
| (2) 研究題目 | 「学術研究支援基盤形成「モデル動物支援プラットフォーム」」 |
| 研究内容 | 高品質遺伝子改変マウス作製 |
| 参加機関 | 東京大学、京都大学、大阪大学、新潟大学、他 |
| (3) 研究題目 | 「遺伝子改変動物の作製に有用なES細胞の作成・評価」 |
| 研究内容 | C57BL/6由来ES細胞RENKAを用いた、遺伝子改変マウス作製方法に関する新規技術開発 |
| 参加機関 | 株式会社トランスジェニック、新潟大学 |
| (4) 研究題目 | 「自己免疫性脳炎の診断方法の確立」 |
| 研究内容 | 自己免疫性脳炎の原因と考えられる各種高原の測定方法を確立し、臨床現場で利用可能にする |
| 参加機関 | 株式会社コスミックコーポレーション、新潟大学 |

I 研究組織（構成員 平成30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
特任助教	西尾	奈々
技術職員	磯貝	麻莉
博士課程大学院生		
	小木	学（耳鼻科）

II 研究活動

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

- 1) 聴覚野の解析：マウス聴覚野では、これまで電気生理学的手法による古典的な領野分類しかなかったが、フラビン蛋白蛍光イメージングを用いて詳細に領野の活動を記録し、同定した領野にトレーサーを打ち込むことによって、入力を受ける内側膝状体の部位を確認するという研究を行っている。特に今年度は二次聴覚野の特性を詳しく解析し、内側膝状体との結合様式が一次聴覚野などの他の聴覚領野と異なることを明らかにした。またその機能的な特性を、二光子イメージングによって明らかにした。
- 2) 視覚野の解析：視覚野の腹側経路は視覚刺激の形状および質感を処理するために重要である。しかしマウスでは、一次視覚野（V1）とそれに隣接するいくつかの皮質領域の性質が調べられているが、マウスの腹側経路の全体像はまだ良く理解されていない。マ我々は、皮質興奮性ニューロンにおいてG-CaMP8を発現する覚醒マウスにおける視覚反応を調べた。特に今回、動く視覚刺激をもちいたところ、postrhinal cortex（POR）およびectorhinal cortex（ECT）の二箇所が明確な視覚的応答を示した。PORおよびECTにおける網膜地図は、V1と比較して明確には観察されず、PORおよびECT応答は、視覚刺激のサイズを変化させてもV1ほど明確に応答強度を変化させなかった。またECTでは、異なるサイズの視覚刺激がECT内の異なる部位を活動させた。これらの知見は、マウスの腹側経路が聴覚野の腹側にあるECTまで及ぶこと、およびPOR、ECTの応答はV1の応答とは明確に異なる特性を有することを示している。また、霊長類の腹側経路との共通性があるものの、動く刺激に応じやすいなどの性質はマウス独特であり、霊長類とげっ歯類の生物学的な違いを示しているものと思われる。
- 3) 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。連合野の中でも後部頭頂連合野は視覚と体性感覚の統合機能を有すると考えられている。マウスに前後に動く移動縞刺激とヒゲ刺激を同時に与えたときに、両者の方向が異なる場合に後部頭頂連合野が大きく活動する。この後部頭頂連合野の応答が、幼少時からの学習に依存すること、プロトカドヘリンの多様性減少マウスでは消失することを見出した。
- 4) 行動学的解析：我々はこれまでマウスの図形認知機能をM字型の迷路を用いて研究してきた。

この方法を用いると、図形の短期記憶や、図形と音の連想記憶などを解析することができる。しかし、実験者が直接マウスをハンドルして行うので、6～8匹のマウスを解析するのに一人当たり3ヶ月もの期間が必要である。そこで、マウスのホームケージに小型のディスプレイと左右二本の給水口（迷路の代用）を設け、マウスの飼育環境下で行動解析を自動的に行う装置を開発した。現在のところ、図形を提示したサイドの給水口を舐める学習（第一段階）は、数日で80%以上の正答率を示す程度にマウスを訓練することができている。第二段階として、特定の図形と報酬との関連性を覚える学習も、一週間程度で80%以上の正答率を示すまでに訓練できるようになった。しかし、ある図形から別の図形に変化した（あるいはしない）場合を認知して応答する第三段階の学習は、マウスのパフォーマンスが低く、成績も不安定である。今後学習方法を改良して、実験者が直接行う迷路学習以上のパフォーマンスを示すようにしていく必要がある。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

(1) Hou X, Yoshioka N, Tsukano H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, Yanagawa Y, Sakimura K, Takeuchi K, Kitagawa H, Hensch TK, Shibuki K, Igarashi M, Sugiyama S, Chondroitin sulfate is required for onset and offset of critical period plasticity in visual cortex. *Sci Rep*, 7, 12646, 2017.

(2) Tsukano H, Horie M, Ohga S, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K, Reconsidering tonotopic maps in the auditory cortex and lemniscal auditory thalamus in mice. *Front Neural Circuits*, 11, 14, 2017.

(3) Tsukano H, Horie M, Takahashi K, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K, Independent tonotopy and thalamocortical projection patterns in two adjacent parts of the classical primary auditory cortex in mice. *Neurosci Lett*, 637, 26-30, 2017.

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GFAP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30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		南 歩惟
助教	北浦 弘樹		田中 優子
		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)
			張 璐 (留学生)
			金丸 優 (脳神経外科)

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. Sakamoto M, Kakita A, Domingo JL, Yamazaki H, Oliveir RB, Sarrazin S, Eto K, Murata K. Stable and episodic/bolus patterns of methylmercury exposure on mercury accumulation and histopathologic alterations in the nervous system. *Environ Res* 2017; 152: 446-453. doi: 10.1016/j.envres.2016.06.034.
2. Jiang H, Shimizu H, Shiga A, Tanaka M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Familial amyotrophic lateral sclerosis with an I104F mutation in the SOD1 gene: multisystem degeneration with neurofilamentous aggregates and SOD1 inclusions. *Neuropathology* 2017; 37 (1): 69-77. doi:10.1111/neup.12324.
3. Hoshi A, Tsunoda A, Tada M, Takahashi H, Nishizawa M, Ugawa Y, Kakita A. Immunohistochemical evaluation of aquaporin 1 and aquaporin 4 in the temporal cortex of patients with Parkinson's disease. *Brain Pathology* 2017; 27 (2): 160-168. doi: 10.1111/bpa.12369.
4. 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* 2017; 645: 40-45. doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.027.
5. 柿田明美. 稀少てんかんの病理. 稀少てんかんの診療指針. 日本てんかん学会（編集）. 診断と治療社. pp. 28-31. total 259 pages.
6. Kitaura H, Sonoda M, Teramoto S, Shirozu H, Shimizu H, Kimura M, Masuda H, Ito Y, Takahashi H, Kwak S, Kameyama S, Kakita A. Ca²⁺-permeable AMPA receptors associated with epileptogenesis of hypothalamic hamartoma. *Epilepsia* 2017; 58 (4): e59-e63. doi: 10.1111/epi.13700.
7. Sotoyama H, Iwakura Y, Oda K, Sasaoka T, Takei N, Kakita A, Enomoto H, Nawa H. Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett* 2017; 654: 99-106. doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.005.
8. Nagahara Y, Shimazawa M, Ohuchi K, Ito J, Takahashi H, Tsuruma K, Kakita A, Hara H. GPNMB ameliorates mutant TDP-43-induced motor neuron cell death. *J Neurosci Res* 2017; 95 (8): 1647-1665. doi: 10.1002/jnr.23999.
9. 清水宏. ポリグルタミン病. 日本神経病理学会教育委員会（編集）, 第13回教育セミナーハンドアウト, pp.66-73.
10. Miki Y, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of mitochondrial protein PDHA1 in Lewy body disease and PARK14. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 489 (4): 439-444. pii: S0006-291X(17)31071-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.162.
11. Nakayama Y, Masuda H, Shirozu H, Ito Y, Higashijima T, Kitaura H, Fujii Y, Kakita A, Fukuda M. Features of amygdala in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: an MRI volumetric and histopathological study. *Epilepsy Res* 2017; 135: 50-55. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2017.05.010.
12. 清水宏, 柿田明美. 脊髄小脳変性症の神経病理. 運動失調のみかた、考えかた -小脳と脊髄小脳変性症-. 宇川義一（編集）. 中外医学社. pp. 300-307. total 358 pages. 2017年9月25日.
13. 柿田明美. Melanocytic lesions. 脳腫瘍臨床病理カラーアトラス 第4版. 日本脳腫瘍病理学会（編集）. 医学書院, 東京. pp. 147-149. total 218 pages. 2017年10月1日.
14. Nishiura K, Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Kunii Y, Kashiwagi K, Tanaka M, Hino M, Sugino T, Yabe H, Takahashi H, Kakita A, Imura T, Chiba H. PKA activation and endothelial claudin-5 breakdown in the schizophrenic prefrontal cortex. *Oncotarget* 2017; 8 (55): 93382-93391. doi: 10.18632/oncotarget.21850.
15. Inoue Y, Ueda M, Tasaki M, Takeshima A, Nagatoshi A, Masuda T, Misumi Y, Kosaka T, Nomura T, Mizukami M, Matsumoto S, Yamashita T, Takahashi H, Kakita A, Ando Y. Sushi repeat-containing protein 1: a novel disease-associated molecule in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 2017; 134 (4): 605-617. doi: 10.1007/s00401-017-1720-z.

16. Yoneoka Y, Okada M, Watanabe N, Aoki S, Kakita A, Fujii Y (2017 December). Ectopic pituitary null cell adenoma arising from the infundibulum in the third ventricle: a successful endonasal transsphenoidal resection after long-term follow-up with MR imaging. *Interdisciplinary Neurosurgery* 2017; 10: 122-125.
17. 柿田明美. Focal cortical dysplasia (FCD). てんかん学用語事典. 日本てんかん学会 (編集). pp. 59-60. total 165 pages. 診断と治療社. 2017年12月20日.

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30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. Furukawa T, Shimoyama S, Miki Y, Nikaido Y, Koga K, Nakamura K, Wakabayashi K, Ueno S. Chronic diazepam administration increases the expression of Lcn2 in the CNS. *Pharma Res Per* 5: e00283, 2017
2. 若林孝一. 傍腫瘍性の運動ニューロン疾患は存在しますか？ 神経内科clinical questions and pearls 『運動ニューロン疾患』. 中外医学社、p 46-50, 2017
3. Miki Y, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino Y, Kijima H, Shoji M, Mori A, Yamashita C, Hatano T, Hattori N, Wakabayashi K. Neuropathology of PARK14 is identical to idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 32: 799-800, 2017
4. 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
5. 若林孝一、丹治邦和、森文秋. リン酸化 α シヌクレインの局在. *Annual Review神経*2017. 中外医学社、p 22-29, 2017
6. 若林孝一. レビー小体型認知症の臨床病理の基礎. *Dementia Japan* 31: 280-287, 2017
7. Miki Y, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of mitochondrial protein PDHA1 in Lewy body disease and PARK14. *Biochem Biophys Res Com* 489: 439-444, 2017
8. Miki Y, Tanji K, Kimura K, Yajima N, Mori M, Wakabayashi K. Status epilepticus causing extensive microvacuolar change with astrocytosis and diffusion MRI abnormalities in the subcortical white matter. *J Neurol Sci* 382: 55-57, 2017

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30年3月31日現在)

教授	藤井 幸彦
准教授	大石 誠
助教	平石 哲也
助教	棗田 学
博士課程大学院生	野村俊春、本橋邦夫、阿部英明、三橋大樹、金丸優、渡邊潤、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
- ・ 脳幹グリオーマに対するヒストン修飾酵素阻害剤の有効性の検討
- ・ ヒト脳腫瘍からの安定脳腫瘍幹細胞株の樹立と新規治療薬の探索への基礎研究
- ・ NF- κ B活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の開発に向けた多施設共同研究
- ・ Boron neutron capture therapy (BNCT)が播種・浸潤に及ぼす効果の検討
- ・ てんかんにおけるIMPDH1/2発現解析
- ・ EGFRvIIIを発現する神経膠腫の研究

(2) 臨床研究 (共同研究含む)

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

III 論文 (原著, 総説, 症例報告を区別しない)

1. Natsumeda M, Uzuka T, Watanabe J, Fukuda M, Akaiwa Y, Hanzawa K, Okada M, Oishi M, Fujii Y. High Incidence of Deep Vein Thrombosis in the Perioperative Period of Neurosurgical Patients. *World Neurosurg.* 2018 Apr;112:e103-e112. doi: 10.1016/j.wneu.2017.12.139. Epub 2017 Dec 30.
2. Kwee IL, Matsuzawa H, Nakada K, Fujii Y, Nakada T. Inferior colliculus syndrome: Clinical magnetic resonance microscopy anatomic analysis on a 7 T system. *SAGE Open Med Case Rep.* 2017 Dec 5;5:2050313X17745209. doi: 10.1177/2050313X17745209. eCollection 2017.
3. Ohno H, Yoneoka Y, Jinguji S, Watanabe N, Okada M, Fujii Y. Has acromegaly been diagnosed earlier? *J Clin Neurosci.* 2018 Feb;48:138-142. doi: 10.1016/j.jocn.2017.10.086. Epub 2017 Nov 4.
4. Sugita Y, Furuta T, Ohshima K, Komaki S, Miyoshi J, Morioka M, Abe H, Nozawa T, Fujii Y, Takahashi H, Kakita A. The perivascular microenvironment in Epstein-Barr virus positive primary central nervous system lymphoma: The role of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1. *Neuropathology.* 2018 Apr;38(2):125-134. doi: 10.1111/neup.12435. Epub 2017 Oct 24.
5. Natsumeda M, Motohashi K, Igarashi H, Nozawa T, Abe H, Tsukamoto Y, Ogura R, Okada M, Kobayashi T, Aoki H, Takahashi H, Kakita A, Okamoto K, Nakada T, Fujii Y. Reliable diagnosis of IDH-mutant glioblastoma by 2-hydroxyglutarate detection: a study by 3-T magnetic resonance spectroscopy. *Neurosurg Rev.* 2018 Apr;41(2):641-647. doi: 10.1007/s10143-017-0908-y. Epub 2017 Sep 27.
6. Yoneoka Y, Yoshimura J, Sano M, Okada M, Kakita A, Fujii Y. Third Ventricle Germ Cell Tumor Originating from the Infundibulum with Rapidly Expansive Enlargement. *Pediatr Neurosurg.* 2018;53(1):49-54. doi: 10.1159/000480021. Epub 2017 Sep 26.
7. Fukuda M, Masuda H, Shirozu H, Ito Y, Nakayama Y, Higashijima T, Fujii Y. Additional resective surgery after the failure of initial surgery in patients with intractable epilepsy. *Neurol Res.* 2017 Dec;39(12):1049-1055. doi: 10.1080/01616412.2017.1376471. Epub 2017 Sep 11.
8. Suzuki Y, Nakamura Y, Yamada K, Kurabe S, Okamoto K, Aoki H, Kitaura H, Kakita A, Fujii Y, Huber VJ, Igarashi H, Kwee IL, Nakada T. Aquaporin Positron Emission Tomography Differentiates Between Grade III and IV Human Astrocytoma. *Neurosurgery.* 2018 Jun 1;82(6):842-846. doi: 10.1093/neuros/nyx314.

9. Nakayama Y, Masuda H, Shirozu H, Ito Y, Higashijima T, Kitaura H, Fujii Y, Kakita A, Fukuda M. Features of amygdala in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: An MRI volumetric and histopathological study. *Epilepsy Res.* 2017 Sep;135:50-55. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2017.05.010. Epub 2017 May 22.
10. Terasaka S, Taoka T, Kuroda S, Mikuni N, Nishi T, Nakase H, Fujii Y, Hayashi Y, Murata JI, Kikuta KI, Kuroiwa T, Shimokawa S, Houkin K. Efficacy and safety of non-suture dural closure using a novel dural substitute consisting of polyglycolic acid felt and fibrin glue to prevent cerebrospinal fluid leakage-A non-controlled, open-label, multicenter clinical trial. *J Mater Sci Mater Med.* 2017 May;28(5):69. doi: 10.1007/s10856-017-5877-8. Epub 2017 Mar 29.
11. Miyahara H, Yadavilli S, Natsumeda M, Rubens JA, Rodgers L, Kambhampati M, Taylor IC, Kaur H, Asnagli L, Eberhart CG, Warren KE, Nazarian J, Raabe EH: The dual mTOR kinase inhibitor TAK228 inhibits tumorigenicity and enhances radiosensitization in diffuse intrinsic pontine glioma. *Cancer Letters*, 2017 Aug 1;400:110-116. doi: 10.1016/j.canlet.2017.04.019. Epub 2017 Apr 25.
12. Sano M, Yamashita S, Aiba T: The prevalence of calcification around odontoid process and the incidence of crowned dens syndrome in the neurosurgical ward: A single institution's analysis. *Modern Rheumatology.* 2017 Apr 25:1-6. doi: 10.1080/14397595.2017.1316461. [Epub ahead of print]
13. Koyanagi M, Ishii A, Imamura H, Satow T, Yoshida K, Hasegawa H, Kikuchi T, Takenobu Y, Ando M, Takahashi JC, Nakahara I, Sakai N, Miyamoto S. Long-term outcomes of coil embolization of unruptured intracranial aneurysms. *JNS* Jan 5:1-7, 2018
14. Maruya J, Tamura S, Hasegawa R, Saito Ayana, Nishimaki K, Fujii Y. Endoscopic hematoma evacuation following emergent burr hole surgery for acute subdural hematoma in critical condition: Technical note. *INAT* 12: 48-51, 2018
15. Funaki T, Takahashi JC, Houkin K, Kuroda S, Takeuchi S, Fujimura M, Miyamoto S; on behalf of the JAM Trial Investigators.: Angiographic features of hemorrhagic moyamoya disease with high recurrence risk: a supplementary analysis of the Japan Adult Moyamoya Trial. *JNS* 161650 Apr14:1-8, 2017
16. 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.* 2017;52(2):87-92. doi: 10.1159/000450583. Epub 2016 Nov 11.
17. 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, Fujii Y. Long-term survivors of primary central nervous system lymphoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2017 Feb 23;47(2):101-107. doi: 10.1093/jco/hyw171.
18. 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. Epub 2016 Jul 10.
19. 岡本 浩一郎, 本橋 邦夫, 藤原 秀元, 石原 智彦, 二宮 格, 小野寺 理, 藤井 幸彦【Stroke-Like Diseases-鑑別時に注意を要する5病態】 PRES Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome. *BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩(1881-6096)*69 巻2号 Page129-141
20. 藤井幸彦, 大石誠: VI 2 Transsylvian approach (Pterion approach). *プライム脳神経外科* 1 脳動脈瘤. 1: 107-118, 2017
21. 長谷川仁: Enterprise VRD. 頭蓋内動脈ステントのすべて(メディカ出版), p42-55, 2017
22. 森田健一, 飯原弘二: VII 10 再発脳動脈瘤に対する外科治療. *プライム脳神経外科*1 脳動脈瘤. 1: 297-304, 2017

23. 棗田学：転移性脳腫瘍. Brain Nursing 第33巻4号, 70-72, 2017
24. 長谷川仁：カテーテルアクセスにおけるグースネックスネア活用法. 脳血管内治療ブラッシュアップセミナー2017テキスト
25. 森田健一：Chapter 2 脳血管障害 ②症状・合併症 他. BRAIN NURSING 決定版 脳神経疾患の病態生理ビジュアル大辞典 2017年夏季増刊39-44, 66, 78, 136-138, 148-151, 2017
26. 高尾哲郎 福多真史、大石誠、平石哲也、藤井幸彦、森井研、石田剛、佐藤光弥：局在関連性てんかん発作におけるArterial Spin Labelingによる画像評価法の確立 公益財団法人 てんかん治療研究振興財団 研究年報 2017; 28: 77-82
27. 棗田 学, 藤井幸彦、柴原純二：19. Angiocentric glioma. 脳腫瘍臨床病理アトラス第4版, 2017
28. 棗田 学, 藤井幸彦、廣瀬隆則：20. Astroblastoma. 脳腫瘍臨床病理アトラス第4版, 2017
29. 伊藤 靖：第III章 脳血管内治療3 各種コイルの特性 プライム脳神経外科 第1巻 脳動脈瘤, 2017
30. 伊藤 靖：VII 脳動静脈奇形 脳動静脈奇形に対する塞栓物質の選択とその使用法. 新NS NOW 第11巻 Advanced脳血管内治療2017
31. 長谷川仁：知行合一 脳動静脈奇形に対するOnyx塞栓術の実際：基本から応用まで, 日本脳神経血管内治療学会学術総会CEPテキスト, 2017
32. 齋藤文菜, 丸屋淳, 田村智, 西巻啓一：放射線治療後に発生した脳内海綿状血管腫の2例. 秋田赤十字病院医学雑誌, 5(1):31-39, 2017
33. 長谷川仁：脳底動脈先端部動脈瘤, 脳動脈瘤に対する血管内治療. 知行合一, メジカルビュー社, p216-229, 2017

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30年3月31日現在）

教授 小野寺 理 講師 河内 泉 講師 他田 正義
助教 堅田 慎一 助教 金澤 雅人 助教 徳武 孝允
助教 佐治 越爾 特任助教（救急部）須貝 章弘
特任助教（死因究明教育センター）茂木 崇秀
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、上村 昌寛、宇津見 宏太、齋藤 理恵、佐藤 朋江、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、坪口 晋太郎、樋口 陽、畠野 雄也

修士課程大学院生

笠原 杏子、山崎 和樹

II 研究活動

【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症例の臨床免疫学的・病理学的特徴を明らかにしてきた (Neurology 2009;73:1628)。引き続き、NMOにおける認知機能障害の臨床的・心理学的・病理学的特徴を解析し、その発症機序を世界に先駆けて発表した (Annals of Neurology 2013;73:65)。さらにNMOのミトコンドリア蓄積を伴う神経変性の詳細を明らかにした (Annals of Neurology 2016;79:605)。これらをまとめた総説をオーストリア・ウィーン大学・Hans Lassmann教授と報告した (J Neurol Neurosurg Psychiatry 2017;88:137)。またMSに関しては、新規治療薬フィンゴリモドによる髄腔内免疫細胞動態を可視化し、服用早期におけるMS再発のリスク因子を解析した (Multiple Sclerosis Journal 2013;19(9):1230-1233)。さらにMSとNMOの免疫現象と神経変性の詳細を検討中である。

2) 研究の成果 (2017年)

1. 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.
2. Kawachi I. Clinical characteristics of autoimmune optic neuritis. Clinical and Experimental Neuroimmunology. 2017;8(Suppl.1):8-16. DOI: 10.1111/cen3.12354.
3. Kawachi I. Autoantibodies in Paraneoplastic Neurological Syndrome. Brain Nerve. 2018 Apr;70(4):329-339. doi: 10.11477/mf.1416201006.
4. 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.

5. Ogino M, Okamoto S, Ohta H, Sakamoto M, Nakamura Y, Iwasaki K, Yoshida M, Hiroi S, Kawachi I. Prevalence, treatments and medical cost of multiple sclerosis in Japan based on analysis of a health insurance claims database. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2017;8(4):318-326. First published: 4 September 2017. doi: 10.1111/cen3.12411.
6. Ogino M, Shiozawa A, Ota H, Okamoto S, Hiroi S, Kawachi I. Treatment and comorbidities of multiple sclerosis in an employed population in Japan: analysis of health claims data. *Neurodegener Dis Manag*. 2018 Apr;8(2):97-103. doi: 10.2217/nmt-2017-0047. Epub 2018 Apr 25.
7. 河内泉, その他 (多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン作成委員会). 日本神経学会監修. 多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン2017. 2017年6月発行. 医学書院. 東京.
8. 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.
9. 若杉尚宏, 河内泉. 第5章 神経内科の重要疾患へ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).
10. 河内泉. NMO の disease modifying therapy. NMO と MS の最新情報. *脊椎脊髄ジャーナル* 2017;30(8):765-773.
11. 河内泉. NMO はどのような病気か教えてください. II. 疾患概念と臨床症状. *神経ないk Clinical Questions & Pearls*. 2018年2月10日発行. 30-39. 中外医学社.
12. 河内泉. *Pharma Medica* 2018年3月号 特集. 多発性硬化症診療最前線. 5. 再発予防・振興抑制療法. 3) モノクローナル抗体治療. 2018;36(3):37-44.

【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、特発性肥厚性硬膜炎の診断基準を作成中である。

【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。

【POEMS症候群のサリドマイド治療に関する検討】

1) 研究の概要

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

【脳梗塞に対する新規治療法の開発】

1) 研究の概要

金澤雅人を中心とする研究グループは、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、岐阜大学大学院医学部神経内科・老年学分野下畑享良教授と

共に、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、国際特許出願を行った。本研究課題は、平成29年度日本医師会医学研究奨励賞を受賞した。

2) 研究の成果

(論文)

1. Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 13;18(10). pii: E2135.

(特許出願)

細胞製剤および細胞製剤の製造方法 (PCT/JP2017/031246)

【多系統萎縮症の突然死予防を目的としたチーム医療モデルの構築】

1) 研究の概要

多系統萎縮症患者を対象に睡眠呼吸障害の機序の解明、および睡眠呼吸障害に伴う突然死の予防を目的とした臨床研究を継続した。本年度は多系統萎縮症における認知機能障害、それを予測する排尿障害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、16年間で20の英文原著論文を報告した。

(論文)

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

III 論文 (原著、総説、症例報告を区別しない)

1. 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.
2. Kawachi I. Clinical characteristics of autoimmune optic neuritis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology.* 2017;8(Suppl.1):8-16. DOI: 10.1111/cen3.12354.
3. Kawachi I. Autoantibodies in Paraneoplastic Neurological Syndrome. *Brain Nerve.* 2018 Apr;70(4):329-339. doi: 10.11477/mf.1416201006.
4. 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.
5. Ogino M, Okamoto S, Ohta H, Sakamoto M, Nakamura Y, Iwasaki K, Yoshida M, Hiroi S, Kawachi I. Prevalence, treatments and medical cost of multiple sclerosis in Japan based on analysis of a health insurance claims database. *Clinical and Experimental Neuroimmunology.* 2017;8(4):318-326. First published: 4 September 2017. doi: 10.1111/cen3.12411.
6. Ogino M, Shiozawa A, Ota H, Okamoto S, Hiroi S, Kawachi I. Treatment and comorbidities of multiple sclerosis in an employed population in Japan: analysis of health claims data. *Neurodegener Dis Manag.* 2018 Apr;8(2):97-103. doi: 10.2217/nmt-2017-0047. Epub 2018 Apr 25.

7. 河内泉, その他 (多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン作成委員会). 日本神経学会監修. 多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン2017. 2017年6月発行. 医学書院. 東京.
8. 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.
9. 若杉尚宏, 河内泉. 第5章 神経内科の重要疾患へ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).
10. 河内泉. NMOの disease modifying therapy. NMOとMSの最新情報. 脊椎脊髄ジャーナル 2017;30(8):765-773.
11. 河内泉. NMOはどのような病気か教えてください. II. 疾患概念と臨床症状. 神経内科Clinical Questions & Pearls. 2018年2月10日発行. 30-39. 中外医学社.
12. 河内泉. *Pharma Medica* 2018年3月号 特集. 多発性硬化症診療最前線. 5. 再発予防・振興抑制療法. 3) モノクローナル抗体治療. 2018;36(3):37-44.
13. Hatakeyama M, Sato T, Takahashi T, Kanazawa M, Onodera O, Nishizawa M, Shimohata T. Predictors of cognitive impairment in multiple system atrophy. *J Neurol Sci*. 2018 May 15;388:128-132. Epub 2018 Mar 10.
14. Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Fujiyama A, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Suzuki Y, Sugano S, Qu W, Ichikawa K, Yurino H, Higasa K, Shibata S, Mitsue A, Tanaka M, Ichikawa Y, Takahashi Y, Date H, Matsukawa T, Kanda J, Nakamoto FK, Higashihara M, Abe K, Koike R, Sasagawa M, Kuroha Y, Hasegawa N, Kanesawa N, Kondo T, Hitomi T, Tada M, Takano H, Saito Y, Sanpei K, Onodera O, Nishizawa M, Nakamura M, Yasuda T, Sakiyama Y, Otsuka M, Ueki A, Kaida KI, Shimizu J, Hanajima R, Hayashi T, Terao Y, Inomata-Terada S, Hamada M, Shiota Y, Kubota A, Ugawa Y, Koh K, Takiyama Y, Ohsawa-Yoshida N, Ishiura S, Yamasaki R, Tamaoka A, Akiyama H, Otsuki T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S.. Expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy. *Nat Genet*. 2018 Apr;50(4):581-590.
15. Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Kasahara S, Konno T, Ishihara T, Onodera O. Robustness and Vulnerability of the Autoregulatory System That Maintains Nuclear TDP-43 Levels: A Trade-off Hypothesis for ALS Pathology Based on *in Silico* Data. *Front Neurosci*. 2018 Feb 1;12:28.
16. Saito N, Ishihara T, Kasuga K, Nishida M, Ishiguro T, Nozaki H, Shimohata T, Onodera O, Nishizawa M.. Case Report: A patient with spinocerebellar ataxia type 31 and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion*. 2018 Mar 9:1-3.
17. Tohnai G, Nakamura R, Sone J, Nakatochi M, Yokoi D, Katsuno M, Watanabe H, Watanabe H, Ito M, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Onodera O, Naruse H, Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Ishiura H, Morishita S, Yoshimura J, Doi K, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Atsuta N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Frequency and characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2018 Apr;64:158.e15-158
18. Utsumi K, Takano K, Okahara Y, Komori T, Onodera O, Kansaku K. Operation of a P300-based brain-computer interface in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep*. 2018 Jan 29;8(1):1753.
19. Preethish-Kumar V, Nozaki H, Tiwari S, Vengalil S, Bhat M, Prasad C, Onodera O, Uemura M, Doniparthi S, Saini J, Nashi S, Polavarapu K, Nalini A. CARASIL families from India with 3 novel null mutations in the *HTRA1* gene. *Neurology*. 2017 Dec 5;89(23):2392-2394.

20. Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 13;18(10). pii: E2135.
21. Mizuta I, Watanabe-Hosomi A, Koizumi T, Mukai M, Hamano A, Tomii Y, Kondo M, Nakagawa M, Tomimoto H, Hirano T, Uchino M, Onodera O, Mizuno T. New diagnostic criteria for cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy in Japan. *J Neurol Sci.* 2017 Oct 15;381:62-67.
22. Ninomiya I, Kanazawa M, Akaiwa Y, Shimohata T, Okamoto K, Onodera O, Nishizawa M. Apparent diffusion coefficient reduction might be a predictor of poor outcome in patients with posterior reversible encephalopathy syndrome. *J Neurol Sci.* 2017 Oct 15;381:1-3.
23. Konno T, Yoshida K, Mizuta I, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda SI, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T. Diagnostic criteria for adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia due to CSF1R mutation. *Eur J Neurol.* 2018 Jan;25(1):142-147.
24. Ibrahim M, Nozaki H, Lee A, Onodera O, Reichwein R, Wicklund M, El-Ghanem M. A CARASIL Patient from Americas with Novel Mutation and Atypical Features: Case Presentation and Literature Review. *Cerebrovasc Dis.* 2017;44(3-4):135-140
25. Shimohata K, Hasegawa K, Onodera O, Nishizawa M, Shimohata T. The Clinical Features, Risk Factors, and Surgical Treatment of Cervicogenic Headache in Patients With Cervical Spine Disorders Requiring Surgery. *Headache.* 2017 Jul;57(7):1109-1117.
26. Shiba-Fukushima K, Ishikawa KI, Inoshita T, Izawa N, Takanashi M, Sato S, Onodera O, Akamatsu W, Okano H, Imai Y, Hattori N. Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2017 Aug 15;26(16):3172-3185.
27. Ozawa T, Onodera O. Multiple system atrophy: clinicopathological characteristics in Japanese patients. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017;93(5):251-258.
28. 金澤 雅人, 高橋 哲哉, 小野寺 理, 下畑 享良. 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. *脳循環代謝* 28巻2号 Page315-320, 2017
29. 酒井 直子, 野崎 洋明, 上村 昌寛, 小野寺 理. 【CADASILとCARASIL】 CARASILの臨床遺伝学的特徴と分子病態. *神経内科.* 87巻6号 Page638-642, 2017
30. 他田 正義, 小野寺 理. 【脊髄小脳変性症(SCD)-最新診療マニュアル】 治療と介護の現状パーキンソニズム*Clinical Neuroscience* 35巻9号 Page1097-1100, 2017
31. 他田 正義, 横関 明男, 小野寺 理 【遺伝性脊髄小脳失調症の病態と治療展望】 本邦における遺伝性脊髄小脳変性症の全体像. *BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩* 69巻8号 Page879-890, 2017
32. 小野寺 理. 【多系統萎縮症の新しい道】 [第3部]過去10年の多系統萎縮症の薬の開発について. *難病と在宅ケア* 23巻2号 Page14-17. 2017
33. 小野寺 理. 【遺伝が関与する認知症-主な認知症と遺伝子との関連について】 *脳血管性認知症 認知症の最新医療* (2185-7741)7巻2号 Page69-73, 2017

IV 共同研究

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

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

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

(3) 脳梗塞に対する機能回復促進させる細胞療法の開発 (学外共同研究)

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

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

(特許) 細胞製剤および細胞製剤の製造方法 (PCT/JP2017/031246)

(4) 脳梗塞に対する血管保護療法の開発 (学外共同研究)

(概要) 金澤雅人らは、岐阜大学大学院医学部神経内科・老年学分野下畑享良教授、東京大学農学部東京大学大学院農学生命科学研究科の西原真杉教授、およびお茶ノ水女子大の由良敬教授らとの共同研究を行い、脳梗塞に対する新規脳梗塞治療薬プログラニューリンに対する研究を行った。

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

統合脳機能研究センター

I 研究組織（構成員 平成30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	山田 謙一	臨床機能脳神経科学分野
助教	伊藤 浩介	脳機能解析学分野
助教	渡辺 将樹	生体磁気共鳴学分野
助教	北浦 弘樹	臨床機能脳神経科学分野
助教	植木 智志	臨床機能脳神経科学分野
助教	中村 亨弥	生体磁気共鳴学分野(超域学術院)
特任助教	酒多 穂波	
特任助手	村木 美子	
特任助手	大湊 詩保	
技術職員	五十嵐 妙	
実験助手	目黒 佳未	
実験助手	富士 淑恵	
大学院生	武田 基秀	
大学院生	松田 将門	
大学院生	大野 健	
医局秘書	佐藤 直子	
医局秘書	松崎 励奈	
医局秘書	遠藤 智代	
医局秘書	丸山 美穂	

II 主な研究活動

統合脳機能研究センターでは「こころの科学的解明」を目的とした中核的研究拠点（COE）形成プログラムから、さらに文部科学省連携融合事業「水分子の脳科学」（平成17年度～22年度）、文部科学省特別経費「意識の脳科学」（平成23年度～27年度）と引き継がれた研究活動を推進してきた。このプロジェクトでは水分子の移動に特異的に関与するタンパク質のチャンネル、アクアポリンの動態的機能解析を行い、生体におけるアクアポリンの動態を画像化する方法の開発に初めて成功すると共に、世界初のアクアポリン4阻害剤を開発した。さらに、これらのプロジェクトは、今までの研究成果を臨床に還元すべく平成28年度～32年度文部科学省共同利用・共同研究拠点強化事業「アルツハイマー病予防・治療薬の創生」へと引き継がれ、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. Suzuki Y, Higuchi S, Aida I, Nakajima T, Nakada T. Abnormal distribution of GABAA receptors in brain of duchenne muscular dystrophy patients. *Muscle Nerve*. 2017 Apr;55(4):591-595. doi: 10.1002/mus.25383.
2. Kitaura H, Sonoda M, Teramoto S, Shirozu H, Kimura T, Masuda H, Itoh Y, Takahashi H, Kwak S, Kameyama S, Kakita A. Ca²⁺-permeable AMPA receptors associated with epileptogenesis of hypothalamic hamartoma. *Epilepsia*. 2017 Apr;58(4):e59-e63.
3. Suzuki K, Yamada K, Nakada K, Suzuki Y, Watanabe M, Kwee IL, Nakada T. MRI characteristics of the glia limitans externa: A 7T study. *Magn Reson Imaging*. 2017;44:140-5.
4. Nakada T, Suzuki K, Suzuki Y, Nakada K, Kwee IL. 3DAC PROPELLER: An overly underused powerful MRI modality. *Anatomy Physiol Biochem Int J*. 2018;4(1):1-2.
5. Itoh K, Sakata H, Kwee IL, Nakada T. Musical pitch classes have rainbow hues in pitch class-color synesthesia. *Scientific Reports*, 2017 Dec 19;7(1):17781.
6. Uemura M, Terajima K, Suzuki Y, Watanabe M, Akaiwa Y, Katada S, Okamoto K, Nishizawa M, Igarashi H, Nakada T. Visualization of the Intimal Flap in Intracranial Arterial Dissection Using High-Resolution 3T MRI. *J Neuroimaging*. 2017 Jan;27(1):29-32. doi: 10.1111/jon.12380. Epub 2016 Aug 11.
7. Honami Sakata, Kosuke Itoh, Yuji Suzuki, Katsuki Nakamura, Masaki Watanabe, Hironaka Igarashi, Tsutomu Nakada. Slow Accumulations of Neural Activities in Multiple Cortical Regions Precede Self-Initiation of Movement: An Event-Related fMRI Study. *eNeuro*, Vol.4, No.5, 2017/10
8. Suzuki Y, Nakamura Y, Yamada K, Kurabe S, Okamoto K, Aoki H, Kitaura H, Kakita A, Fujii Y, Huber VJ, Igarashi H, Kwee IL, Nakada T, Aquaporin PET differentiates between grade III and IV human astrocytoma. *Neurosurgery*. 2017 Jun 21. doi: 10.1093/neuros/nyx314
9. Nakada T, Kwee IL, Igarashi H, Suzuki Y. Aquaporin-4 Functionality and Virchow-Robin Space Water Dynamics: Physiological Model for Neurovascular Coupling and Glymphatic Flow. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 18;18(8). pii: E1798. doi: 10.3390/ijms18081798.
10. Shimizu M, Suzuki Y, Yamada K, Ueki S, Watanabe M, Igarashi H, Nakada T. Maturational decrease of glutamate in the human cerebral cortex from childhood to young adulthood: a 1H-MR spectroscopy study. *Pediatr Res*. 2017 Nov;82(5):749-752. doi: 10.1038/pr.2017.101. Epub 2017 Jul 12.
11. Igarashi H, Ueki S, Ohno K, Ohkubo K, Suzuki Y. Magnetic resonance imaging of neurotransmitter-related molecules. *J Nippon Med Sch*. 2017;84(4):160-164. doi: 10.1272/jnms.84.160

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探る。

参加機関 国立成育医療研究センター

(3) 研究題目 サル類における聴覚事象関連電位の記録（平成25年～）

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

参加機関 京都大学霊長類研究所

I 研究組織（構成員 平成30年3月31日現在）

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

II 研究活動

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

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

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Mano T, Nagata K, Nonaka T, Tarutani A, Imamura T, Hashimoto T, Bannai T, Koshi-Mano K, Tsuchida T, Ohtomo R, Takahashi-Fujigasaki J, Yamashita S, Ohyagi Y, Yamasaki R, Tsuji S, Tamaoka A, Ikeuchi T, Saido TC, Iwatsubo T, Ushijima T, Murayama S, Hasegawa M, Iwata A. Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation and tau-related dysfunction of BRCA1 in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(45):E9645-E9654.

2. Tagami S, Yanagida K, Kodama TS, Takami M, Mizuta N, Oyama H, Nishitomi K, Chiu YW, Okamoto T, Ikeuchi T, Sakaguchi G, Kudo T, Matsuura Y, Fukumori A, Takeda M, Ihara Y, Okochi M. Semagacestat Is a Pseudo-Inhibitor of γ -Secretase. *Cell Rep.* 2017;21(1):259-273.
3. Watanabe Y, Kitamura K, Nakamura K, Sanpei K, Wakasugi M, Yokoseki A, Kabasawa K, Onodera O, Ikeuchi T, Kuwano R, Momotsu T, Narita I, Endo N. Association between dialysis treatment and cognitive decline: A study from the Project in Sado for Total Health (PROST), Japan. *Geriatr Gerontol Int.* 2017;17(10):1584-1587.
4. Hosaka T, Ishii K, Miura T, Mezaki N, Kasuga K, Ikeuchi T, Tamaoka A. A novel frameshift GRN mutation results in frontotemporal lobar degeneration with a distinct clinical phenotype in two siblings: case report and literature review. *BMC Neurol.* 2017;17(1):182.
5. Iwasaki Y, Hoshino KI, Mori K, Ito M, Kawai Y, Mimuro M, Tsukie T, Ikeuchi T, Yoshida M. Longitudinal clinical and neuro-radiological findings in a patient with leukoencephalopathy with brain calcifications and cysts (Labrune syndrome). *eNeurologicalSci.* 2017;8:28-30.
6. Ikeuchi T. Emerging Therapeutic Targets Revealed by Genome Analysis in Alzheimer's Disease. *Brain Nerve.* 2017;69(7):789-798.
7. Nakamura S, Hara T, Joh T, Kobayashi A, Yamazaki A, Kasuga K, Ikeuchi T, Ohtsubo K. Effects of super-hard rice bread blended with black rice bran on amyloid β peptide production and abrupt increase in postprandial blood glucose levels in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81(2):323-334.
8. Hara N, Kikuchi M, Miyashita A, Hatsuta H, Saito Y, Kasuga K, Murayama S, Ikeuchi T, Kuwano R. Serum microRNA miR-501-3p as a potential biomarker related to the progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5(1):10.
9. Hasegawa A, Koike R, Koh K, Kawakami A, Hara N, Takiyama Y, Ikeuchi T. Co-existence of spastic paraplegia-30 with novel KIF1A mutation and spinocerebellar ataxia 31 with intronic expansion of BEAN and TK2 in a family. *J Neurol Sci.* 2017;372:128-130.
10. Konno T, Broderick DF, Mezaki N, Isami A, Kaneda D, Tashiro Y, Tokutake T, Keegan BM, Woodruff BK, Miura T, Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T. Diagnostic Value of Brain Calcifications in Adult-Onset Leukoencephalopathy with Axonal Spheroids and Pigmented Glia. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2017;38(1):77-83.
11. Konno T, Yoshida K, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda SI, Nishizawa M, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T. Clinical and genetic characterization of adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia associated with CSF1R mutation. *Eur J Neurol.* 2017;24(1):37-45.

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：「認知症臨床ゲノム情報データベース構築に関する開発研究」

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

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

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

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

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

動物資源開発研究分野

I 研究組織（構成員 平成30年3月31日現在）

教授	笹岡 俊邦
助教	藤澤 信義
助教	小田 佳奈子（育児休業中）
助教	福田 七穂
技術職員	田中 稔
技術職員	作間 赴法
技能職員	那須野 純映
一般職員	加藤 明子
派遣技術職員	山本 美丘
派遣技術職員	阿部 光寿
特任助手	内山 澄香
特任助手	齊藤 奈英
特任助手	三浦 詩織
事務補佐員	田代 智子
事務補佐員	久住 真由美
修士課程大学院生	宮本 純

II 研究活動

- (1) ドーパミンは、運動機能、記憶や学習、意欲に重要な働きがあると考えられている。本分野の研究課題として、重要な神経疾患の一つであるパーキンソン病 (PD) の運動障害に着目し、PDのモデル動物として、ドーパミン情報を伝えるドーパミン受容体や関連分子の遺伝子操作マウスを開発し、大脳基底核回路の「直接路」「間接路」に着目し、標的分子の発現解析、運動や学習・記憶の行動解析、神経回路の働きの解析により、運動調節の仕組み解明と治療法開発への発展を目指している。
- (2) 近年、マーモセットは脳研究の分野で大きく注目され、遺伝子改変動物が作出されているが、まだ限られた研究機関以外での作出は困難な状況にある。その要因として設備、経費面に加え、受精卵の確保が挙げられる。マーモセットでは、一度に多数の受精卵を入手することが難しく、先行している研究機関では、大規模な飼育コロニーを持ち、必要な卵を確保して研究を進めている。私たちもマーモセットを用いたモデル動物開発にかかる課題解決のための方法を検討している。
- 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て、受精卵を作成することに成功した。
- (3) モデル動物の作成に必須の実験手段である、体外受精、胚移植、胚・精子の凍結保存、薬剤投与による過剰排卵の方法などの発生・生殖工学技術についての先進的な実験方法の開発に努めている。

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

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

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. 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 2017 Aug;22(8):1205-1222. doi: 10.1038/mp.2016.200. Epub 2016 Dec 6.
2. Sotoyama H, Iwakura Y, Oda K, Sasaoka T, Takei N, Kakita A, Enomoto H, Nawa H:
Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor.
Neuroscience Letters 2017 Jul 27;654:99-106. doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.005. Epub 2017 Jun 21. PMID:28645787
3. Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Sasaoka T, Fukaya M:
BRAG2a, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, is a component of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the photoreceptor terminal.
Investigative Ophthalmology and Visual Science (IOVS) 2017 Jul 1;58(9):3795-3803. doi: 10.1167/iovs.17-21746. PMID: 28744553, Open access
4. Fukai Y, Ohsawa Y, Ohtsubo H, Nishimatsu S, Hagiwara H, Noda M, Sasaoka T, Murakami T, Sunada Y:
Redundancy of matrix metalloproteinases cleaving beta-dystroglycan: Implications for the pathogenesis of sarcoglycanopathy
Biochemical. Biophysical. Research. Communications. 492 (2) 199-205 2017 doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.048. Epub 2017 Aug 15. PMID:28821434
5. Okubo T, Sato A, Okamoto H, Sato T, Sasaoka T:
Differential behavioral phenotypes of dopamine D1 receptor knockdown mice at the embryonic, postnatal, and adult stages.
International Journal of Developmental Neuroscience. 2017 Nov 26;66:1-8. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.11.004. [Epub ahead of print]
6. 笹岡俊邦、藤澤信義：
「動物実験の基本と倫理」

IV 共同研究

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

- (1) 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29年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
神経障害エステラーゼの機能解析
研究代表者：木村 穰 教授（東海大学）
- (3) 平成29年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
Cacna1g変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態の解明
研究代表者：土井 宏 准教授（横浜市立大学）
- (4) 平成29年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析
研究代表者：岩里 琢治 教授（国立遺伝学研究所）
- (5) 平成29年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
ドーパミン受容体コンディショナルノックダウンマウスを用いたパーキンソン病の病態生理の解析
研究代表者：南部 篤 教授（自然科学研究機構生理学研究所）
- (6) 平成29年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
不安障害モデルマウスの脳内分泌タンパク質のプロテオーム解析
研究代表者：板倉 誠 准教授（北里大学）
- (7) 平成29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29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29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29年度 共同利用・共同研究（連携資源利用型）
22q11.2欠失症候群関連因子の機能解析
研究代表者：大久保 直 准教授（北里大学）
- (11) 平成29年度 共同利用・共同研究（連携資源利用型）
APPの細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析
研究代表者：中山 耕造 講師（信州大学）
- (12) 平成29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）

(13) 平成29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）

(14) 平成29年度 新潟大学脳研究所 国際共同研究

ドーパミンD1/D2受容体を経由する神経回路特異的な運動調節及び報酬学習行動の研究

研究代表者：Yanyan Wang 准教授（アメリカ合衆国 イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校）

I 研究組織（構成員 平成30年3月31日現在）

教授 小野寺 理（兼任）
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、神経内科学教室と共に、臨床との融合拠点として活動を推進している。また病理学教室、動物実験施設、遺伝子実験施設を中心とする、脳研究所の各教室、および国内、国外の研究室とも共同研究を推進している。当施設では特に遺伝性脳小血管病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄小脳変性症の各疾患について研究を推進している。

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

ALSについては、TDP-43 mRNAの代謝、局在、発現量調節に関する研究、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の発現調節機構モデルについてFront. Neurosci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。本研究はそのTDP-43のロバストネスによる厳密な発現調節機構、すなわち外的要因によらず蛋白質発現を一定範囲に調整する細胞内機構と、その破綻によるTDP-43の蓄積モデルを示した。本報告はALSの病態生理を考える上で重要である。

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。さらに慶応大学と共同で遺伝性神経疾患患者由来のiPS細胞作製を進めている。

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

Ⅲ 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Kasahara S, Ishihara T, Onodera O et al. Robustness and vulnerability of the autoregulatory system that maintains nuclear TDP-43 levels: a trade-off hypothesis for ALS pathology based on in silico data. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;12:28.
2. Saito N, Ishihara T, Kasuga K, Nozaki H, Onodera O. et al. Case Report: A patient with spinocerebellar ataxia type 31 and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion*. 2018 Feb 7:0.

Ⅳ 共同研究

1. 研究題目 「HtrA1欠損マウスにおける脳小血管の機能解析」
研究内容 CARASILモデルマウスにおける脳血流の解析
参加機関 国立循環器病循環器病研究センター
2. 研究題目 「神経疾患患者からのiPS細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」
研究内容 遺伝性神経疾患患者からのiPS細胞の樹立とそれを用いた疾患解析
参加機関 慶應義塾大学

I 研究組織（構成員 平成30年3月31日現在）

特任教授： 上野 将紀

特任教授： 田井中 一貴

特定研究支援者： 中村 由香

実験補助： 田辺 千帆

実験補助： 本田 綾子

II 研究活動

本研究グループでは、脳疾患を神経回路システム障害として理解、解明するプロジェクトを展開している。

（研究1）血管障害や外傷により脳や脊髄が障害されると、神経回路の破綻に伴い重篤な機能不全に陥るが、神経回路が自然に再生する能力は非常にとぼしいため、根本的な治療法は未だ確立されていないのが現状である。私たちはこれまでに、障害後に残存した神経回路が接続様式を変えて再編する能力を有し、運動や自律神経の機能を変容させることを見出してきた（Nat Neurosci (2016), Brain (2012)）。本研究グループでは、この回路の再編機序を深く理解し、その動態を制御することで、機能を回復へと導く方法を見出すことを目指している。そのため、障害脳と健常脳、双方の神経回路システムを対象に、回路の形成・再編過程やその分子メカニズム、動作原理の解析を行っている。特に、脳脊髄の障害により頻繁に破綻する運動回路や交感神経回路を標的として、遺伝子改変マウスやウイルス神経トレーサー、光・化学遺伝学、3次元行動解析、など多様な回路解析ツールを駆使し、その回路や機能の破綻と変容のメカニズムを探っている。これらの研究から、中枢神経が障害された場合に神経回路をどのように再建するか、治療標的や戦略を見出すことで、リハビリテーションの科学的基盤を理解することや新たな治療方法の創出へつながることが期待される。

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

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Shinohara Y, Koyama YM, Ukai-Tadenuma M, Hirokawa T, Kikuchi M, Yamada RG, Ukai H, Fujishima H, Umehara T, Tainaka K, Ueda HR. Temperature-Sensitive Substrate and Product Binding Underlie Temperature-Compensated Phosphorylation in the Clock. *Molecular Cell* 67(5):783-798.e20, 2017.

2. 上野将紀. ミクログリアと脳発達. *Brain and Nerve*. 医学書院. 69(9):985-97, 2017.
3. Gu Z, Kalambogias J, Yoshioka S, Han W, Li Z, Imamura Kawasawa Y, Pochareddy S, Li Z, Liu F, Xu X, Wijeratne SHR, Ueno M, Blatz E, Salomone J, Kumanogoh A, Rasin MR, Gebelein B, Weirauch MT, Sestan N, Martin JH, Yoshida Y. Control of species-dependent cortico-motoneuronal connections underlying manual dexterity. *Science* 357(6349): 400-4, 2017
4. Kubota SI, Takahashi K, Nishida J, Morishita Y, Ehata S, Tainaka K, Miyazono K, Ueda HR. Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. *Cell Reports* 20(1):236-250, 2017
5. Gu Z, Serradj N, Ueno M, Liang M, Li J, Baccei ML, Martin JH, Yoshida Y. Skilled movements require non-apoptotic Bax/Bak pathway-mediated corticospinal circuit reorganization. *Neuron* 94(3): 626-41, 2017
6. 上野将紀. 障害による神経回路の再編と機能の回復. ライフサイエンス領域融合レビュー. 大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 ライフサイエンス統合データベースセンター. 6, e003, 2017

IV 共同研究

- | | |
|------------|----------------------------------------|
| 研究題目 | 「新潟大学脳研究所 異分野融合共同研究」 |
| 研究内容
試み | 組織浸透性に優れたマーカーの創出による脳の機能と病態の三次元マッピングの試み |
| 参加機関 | 新潟大学 |
| 研究題目 | 「新潟大学脳研究所 異分野融合共同研究」 |
| 研究内容 | 脳-腸-肝ネットワークによる病態発症のメカニズム |
| 参加機関 | 新潟大学 |

脳病態解析分野

I 研究組織（構成員 平成30年3月31日現在）

准教授 松井 秀彰
助教 杉江 淳
学振PD特別研究員 新田 陽平
小児科博士課程（休学中）医員 入月 浩美
神経内科修士課程 山崎 和樹
実験補助 松井 典子
実験補助 杉江 歩美

II 研究活動

松井グループ

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

杉江グループ

脳は学習や記憶を司り、快・不快を感じる情動と密接に結びついている。そのため、様々なストレス要因から脳を健康に保つ事は私たちの豊かな生活を支えるために必須である。しかしながら、神経変性疾患や精神疾患を始めとして、脳の回路に起こる障害の発症機序はわかっていないことが多い。私たちは、比較的単純な神経回路と豊富な遺伝学的ツールによって遺伝子プログラムをいち早く解明することができ、神経細胞死を人為的に誘導することができるショウジョウバエをモデルとして用いて、外因性・内因性ストレスに対して神経やグリアの異常がどのようにして起こっているのか解明することを目指している。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

- 1: Matsui H, Sugie A. An optimized method for counting dopaminergic neurons in zebrafish. PLoS One. 2017;12(9):e0184363.
- 2: Matsui H, Matsui N. Cerebrospinal fluid injection into adult zebrafish for disease research. J Neural Transm (Vienna). 2017;124(12):1627-1633.
- 3: Matsui H, Takahashi R. Parkinson's disease pathogenesis from the viewpoint of small fish models. J Neural Transm (Vienna). 2018;125(1):25-33.
- 4: Matsui H. Dopamine system, cerebellum, and nucleus ruber in fish and mammals. Dev Growth Differ. 2017;59(4):219-227.
- 5: Sugie A, Möhl C, Hakeda-Suzuki S, Matsui H, Suzuki T, Tavanois G. Analyzing Synaptic Modulation of *Drosophila melanogaster* Photoreceptors after Exposure to Prolonged Light. J Vis Exp. 2017;(120).
- 6: Matsui H. The use of fish models to study human neurological disorders. Neurosci Res. 2017;120:1-7.
- 7: Nitta Y, Sugie A. Identification of glaiKit in a genome-wide expression profiling for axonal bifurcation of

the mushroom body in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;487(4):898-902.

8: Nitta Y, Sugie A. DISCO interacting protein 2 determines direction of axon projection under the regulation of c-Jun N-terminal kinase in the *Drosophila* mushroom body. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;487(1):116-121.

IV 共同研究

(1) 研究題目：「水・陸に適応した複眼の進化と機能の解明」

研究内容：複眼は、脊椎動物のカメラ眼と並び高度な発展を遂げてきた眼である。本研究では、ミジンコの分子細胞生物学とショウジョウバエの遺伝学を融合させることにより、節足動物の複眼の機能優位性及び分子的進化を明らかにする。

参加機関：新潟大学 自然研 杉本健吉准教授

(2) 研究題目：「パーキンソン病を発症、進展、細胞死の3カ所でブロックする治療方法の検索」

研究内容：パーキンソン病に対して様々なステップにおいて介入することを目的とし、その病態研究を行う。

参加機関：武田薬品工業株式会社

(3) 研究題目：「PI4P 駆動型脂質対向輸送システムの分子機構とその生理機能の解明」

研究内容：小胞体と細胞膜が近接した膜接触部位において、異なる脂質が小胞体と細胞膜の間で交換輸送される仕組み（脂質対向輸送機構）とその生理的機能を明らかにする。

参加機関：新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞機能学 中津史准教授

3. 社会との連携

夏期セミナー

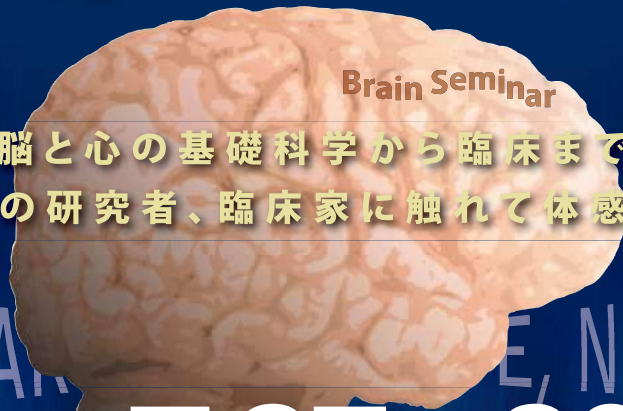
新潟大学公開講座

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47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!

2017.7.27(木)▶29(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

見学・体験 実習コース

7.27
thu

- 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(7/27のみ)(3~6名)
B.遺伝子改変動物作製の実際(7/26~27)(4名)
C.神経細胞の培養と遺伝子導入(7/27のみ)(6名)
- ②脳研レジデント(臨床)体験コース：(7/27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。

脳コネクトームの 最先端

7.28
fri

特別講演

- | | | |
|-------------|----------------------|--------------------|
| 10:00~11:00 | 組織透明化技術と脳コネクトーム | 田井中一貴(新潟大・脳研) |
| 11:00~12:00 | 障害によるコネクトームの再編 | 上野 将紀(新潟大・脳研) |
| 13:00~14:00 | ショウジョウバエのコネクトーム | 伊藤 啓(東大・分生研) |
| 14:00~15:00 | ドーパミン/セロトニン神経のコネクトーム | 小川 幸恵(Texas大:UTSW) |
| 15:00~16:00 | 遺伝子改変動物作製と脳機能解析 | 崎村 建司(新潟大・脳研) |
| 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!) | |

神経疾患の 遺伝子治療

7.29
sat

特別講演

- | | | |
|-------------|--------------------------------|------------------------------------------------|
| 9:30~ 9:35 | Opening | 金澤 雅人(新潟大・脳研) |
| 9:35~10:05 | ALS病態モデルとその応用展開 | 須貝 章弘(新潟大・脳研) |
| 10:05~10:50 | 神経筋疾患に対する核酸医薬開発 | 青木 吉嗣(NCNP・神経研) |
| 10:50~11:35 | 「福山型」筋ジスの新知見とアンチセンス治療 | 戸田 達史(神戸大・医) |
| 11:45~12:30 | 先天性神経疾患を標的とした創薬 | 萩原 正敏(京大・医) |
| 12:30~13:15 | AAVベクターによる遺伝子治療 | 村松 慎一(自治医大) |
| 14:00~15:00 | 脳腫瘍におけるGTP代謝リプログラムと
新たな治療戦略 | 佐々木敦朗(Cincinnati大)
(日本学術振興会平成29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(希望者のみ)を以下までお知らせください。[受講料(懇親会費無料)]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: blib@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



「新潟脳研」が取り組む脳とこころの 病気の克服に向けた研究最前線

講義概要

私たちの脳の中では、千数百万億個の神経細胞が精巧なネットワークを構成することで、高次の脳機能が可能になります。この精緻な脳機能を障害する脳とこころの病気の理解を深め、病気の克服を目指した研究に脳研究所は取り組んでいます。脳とこころの病気に関する最先端研究を脳研究所の専門家がわかりやすく講義します。

- 日 時 10月6日～11月17日 (11/3を除く) 毎週金曜日 合計6回
18時30分～20時
- 会 場 新潟大学脳研究所 統合脳機能センター セミナーホール
(新潟市中央区旭町通1-757)
- 対象者 一般市民
- 募集人数 50人
- 受講料 6,000円 ※学生(大学生以下)の受講料は無料です。
- 申込締切日 10月2日(月) 詳しくは申込先へご確認の上、お申込みください。



講義内容

日 程	講義題目	講義内容	講 師
10月 6日(金)	18時15分～18時30分まで開講式を行います。		
10月 6日(金) 18時30分～ 20時	幻聴と幻覚の脳科学：精神疾患との関連	幻聴と幻覚が生じる脳内メカニズムを理解し精神疾患の病気の機序に迫ります。	脳研究所 教授 那波 宏之
10月13日(金) 18時30分～ 20時	記憶と脳の仕組み	脳は情報を解釈し、記憶し、その情報を元にアクションを起こす臓器です。脳がどうやって、この様々な力の振り分けをしているのか、記憶とはどういうことか探ります。	脳研究所 教授 小野寺 理
10月20日(金) 18時30分～ 20時	認知症克服に向けた研究フロンティア	認知症が生じる謎を解き明かし、新しい診断法と治療法の開発に向けた研究を紹介します。	脳研究所 教授 池内 健
10月27日(金) 18時30分～ 20時	脳梗塞の診断・治療の最前線	ここ10年で長足の進歩を遂げた脳梗塞の最新の診断・治療法とその礎となった研究をわかりやすく解説します。	脳研究所 教授 五十嵐 博中
11月10日(金) 18時30分～ 20時	健やか脳と病める脳：細胞のかたちをみる	アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかんなどの病に侵された脳にはどのような変化が生じているか？細胞のかたちからみてみましょう。	脳研究所 教授 柿田 明美
11月17日(金) 18時30分～ 20時	脳とこころの病気に対する外科的治療の最前線	脳とこころの病気に対する最新の外科的治療を分かり易く解説します。	脳研究所 教授 藤井 幸彦
11月17日(金)	20時～20時15分まで閉講式を行います。		

第7回 新潟脳研一霊長研一生理研合同シンポジウム

日時：2018年3月6日(火)～7日(水)
場所：生理研(明大寺地区)1F 大会議室

2018年3月6日(火)

13:00～

受付、ポスター掲示

14:00～

開会の挨拶 井本敬二(生理研所長)

Session 1

座長 定藤規弘(生理研)

14:05～

1. 鈴木雄治 (新潟脳研・統合脳機能研究センター)
Relationship between reduction of water influx
into CSF and senior plaque formation (β -amyloid)

14:35～

2. 柿木隆介 (生理研・統合生理)
神経イメージング手法を用いたヒト頭顔認知機構の解明

15:05～

写真撮影、コーヒーブレーク

Session 2

座長 五十嵐博中(新潟脳研)

15:45～

3. 宮地重弘 (霊長研・高次脳機能分野)
ルールの選択およびルール間のコンフリクトに関わる
サル前頭前野ニューロンの応答
一内側及び背外側前頭前野の比較

16:15～

4. 上野将紀 (新潟脳研・システム脳病態学)
巧緻運動をなす皮質脊髄路の構成と機能

16:45～

5. 池田一裕 (生理研・分子神経生理)
脳白質における情報統合と病態

17:15～

ポスター発表

18:30～

情報交換会(職員会館1階)

2018年3月7日(水)

Session 3

8:45～

6. 杉江淳 (新潟脳研・脳病態解析分野)
人工光が引き起こす中枢神経障害の
発症機序の解明にむけて

9:15～

7. 木村梨絵 (生理研・視覚情報処理)
低コントラストの視覚弁別に関わる
ラット一次視覚野の神経活動

9:45～

8. 田井中一貴 (新潟脳研・システム脳病態学)
生体組織透明化技術CUBICによる
3次元神経病理学の開発

10:15～

コーヒーブレーク

Session 4

座長 古瀬幹夫(生理研)

10:30～

9. 則武厚 (生理研・認知行動発達機構)
サル大脳皮質・皮質下回路における
自己および他者の報酬情報表現

11:00～

10. 小野寺理 (新潟脳研・神経内科学)
脳小血管ニューロンの維持機構と
その疾患遺伝性脳小血管病の解明から

11:30～

11. 箕越靖彦 (生理研・生殖・内分泌系発達機構)
炭水化物と脂肪の食べ分けを制御するニューロンを発見
一視床下部 AMP キナーゼによる炭水化物嗜好性の
制御機構一

12:00～

閉会の挨拶 那波宏之(新潟脳研所長)

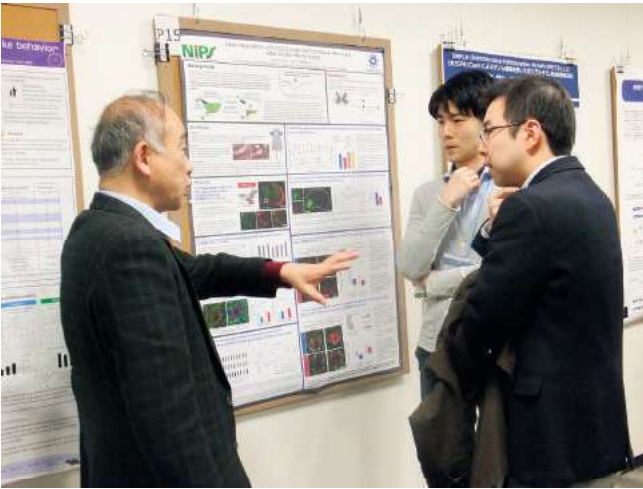
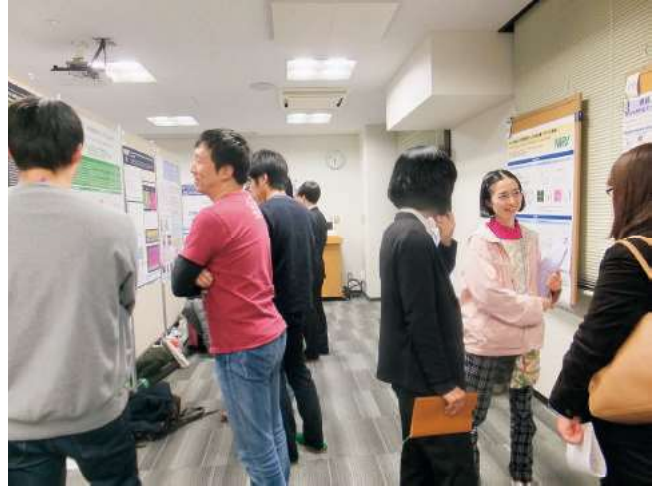
ポスター発表演題

- P1. 柴田 明裕 (生理研・多光子顕微鏡室)
シナプス可塑性研究のための光応答性 CaMKII の開発
Development of a genetically encoded photo-activatable CaMKII for the study of synaptic plasticity
- P2. 岡田 正康 (新潟脳研・脳神経外科学分野)
Development of the neuronal growth and regeneration marker in Primates
- P3. 西村 明幸 (生理研・心循環シグナル研究部門)
Drp1-細胞骨格の相互作用による心筋ミトコンドリアの品質管理
- P4. 辺田 創思 (霊長研・統合脳システム)
霊長類および齧歯類の脳における逆行性感染型レンチウイルスベクターの遺伝子導入特性
- P5. 張 璐 (新潟脳研・病理学分野)
進行性核上性麻痺: 短期経過剖検例の病理組織学的検討
Histopathological features of patients with progressive supranuclear palsy who died in a short clinical course
- P6. 植松 明子 (生理研・認知行動発達機構研究部門)
小脳の高次機能への関与
- P7. 伊藤 浩介 (新潟脳研・統合脳機能研究センター)
霊長類聴覚機能の種差: ヒトとマカクにおける皮上脳波記録による検討
- P8. 角田 潤 (生理研・形態情報解析室)
Single particle analysis of EhV-ATPase by phase-plate cryo-electron microscopy
- P9. 西尾 奈々 (新潟脳研・システム脳生理学分野)
Revealing a ventral stream extending to temporal cortex in mice
- P10. 下田 翔 (生理研・心循環シグナル研究部門)
プリン作動性 P2Y6 受容体を介した心筋保護シグナルの誘導

- P11. 高田 裕生 (霊長研・統合脳システム分野)
Morphological differences of large layer V pyramidal neurons in the cortical motor-related areas of the primate
- P12. 渡辺 将樹 (新潟脳研・統合脳機能研究センター)
有限要素法を用いた電磁界シミュレータによる MRI-RF Coil の設計について
—新しい Head Phantom Model の開発—
- P13. 小林 憲太 (生理研・ウイルスベクター開発室)
新規ウイルスベクターシステムの開発と脳研究への応用
- P14. 加藤 泰介 (新潟脳研・分子神経疾患資源解析学分野)
DRPLA (Dentatorubral-Pallidoluysian Atrophy) をモデルとした CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いたポリグルタミン病治療戦略研究
- P15. 戸田 拓弥 (生理研・生体恒常性発達研究部門)
Downregulation of KCC2 enhances functional recovery after sciatic nerve injury
- P16. 中本 千尋 (新潟脳研・細胞神経生物学分野)
GluD1 deficient mouse as a model animal of depression-like behavior
- P17. 小田 紗矢香 (生理研・心循環シグナル研究部門)
高血糖負荷心臓における TRPC6 発現増加の生理的意義
- P18. 稲葉 洋芳 (新潟脳研・分子神経生物学分野)
統合失調症モデル動物における聴覚応答の異常
- P19. Singh Balbir (生理研・心生理学研究部門)
Decoding of global and local activation patterns from local activation patterns
- P20. 榎原 慧 (霊長研・高次脳機能分野)
コモンマーマウス用 PPI 測定系の開発
Development of Prepulse inhibition (PPI) Measurement System in Common Marmosets

- P21. 中村 由香 (新脳脳研・システム脳病態学)
脊髄損傷後の転写因子による Semaphorin の発現制御と軸索再生阻害
- P22. 宮田 紘平 (生理研・心理生理学研究部門)
Neural correlates with the imagination
of self-related and other-related emotional events
- P23. 原 範和 (新脳脳研・遺伝子機能解析学分野)
網羅的 RNA-seq 解析によるアルツハイマー病脳における
細胞種特異的な発現変動
- P24. 菅原 翔 (生理研・心理生理学研究部門)
The association between finger areas and myelin distribution in human S1
- P25. 宮本 純 (新脳脳研・動物資源開発研究分野)
異種間移植マーマーモセット卵巣由来卵子を用いた受精卵の効率的作成法の検討
- P26. 下村 拓史 (生理研・神経機能素子研究部門)
Two-pore Na⁺ channel 3 の特徴的な電位依存性制御メカニズムについての解析
- P27. 塚野 浩明 (新脳脳研・システム脳生理学分野)
マウス二次聴覚野に入力する新たな視床経路の発見
- P28. 長谷川 拓 (生理研・生体システム研究部門)
Deciphering the functional role of the STN using the DREADD technology
- P29. 深田 優子 (生理研・生体膜部門)
Assessment of palmitoylation status and cycles on PSD-95 in neurons and in vivo

合同シンポジウム



The innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models

Organizer: Joint Usage / Research Center for Brain Research
February 10 – 11, 2018 | Center for Integrated Human Brain Science (6F), Niigata University

Saturday, February 10

Admission Free

10:00 **Opening Remarks** *Hiroyuki Nawa (Director, BRI, Niigata University)*

10:10 **Integral system by CAST/ELKS protein family to regulate retinal photoreceptor development and maintenance**

Chaired by *Toshihisa Ohtsuka (University of Yamanashi)*

Molecular mechanisms underlying neuronal homeostasis
Chaired by *Kensuke Futai (University of Massachusetts Medical School, USA)*

Anayasis of Autism Susceptibility Candidate 2 (AUTS2) gene during development
Chaired by *Mikio Hoshino (National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry)*

Clustered protocadherins regulate complex neural networks
Chaired by *Takeshi Yagi (Osaka University)*

13:10 **Complement family proteins bridge over troubled synapses**

Chaired by *Michisuke Yuzaki (Keio University)*

Mechanisms of activity-dependent synapse elimination in the developing cerebellum

Chaired by *Masanobu Kano (The University of Tokyo)*

Molecular mechanisms for cerebellar circuitry refinement
Chaired by *Masahiko Watanabe (Hokkaido University)*

15:00 **Mechanism that arrests myelin regeneration in chronic demyelinated lesions**

Chaired by *Kazuhiro Ikenaka (National Institute for Physiological Sciences)*

Molecular machinery for controlling synaptic transmission

Chaired by *Susumu Tomita (Yale School of Medicine, USA)*

16:10 **Poster Session**

17:30 **Reception (Ikehara Memorial Hall)**

Sunday, February 11

09:00 **Unraveling the regulatory mechanisms for hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons using novel mouse lines**

Chaired by *Keiichi Itoi (Tohoku University)*

Regulatory mechanism of sleep/wakefulness and memory

Chaired by *Akihiro Yamanaka (Nagoya University)*

Molecular integration of circadian clocks in mammals

Chaired by *Hitoshi Okamura (Kyoto University)*

10:50 **Cell-type-specific STORM super-resolution of synaptic endocannabinoid signaling in the hippocampus**

Chaired by *István Katona (Institute of Experimental Medicine (KOKI), Hungarian Academy of Sciences (MTA), Hungary)*

Development of gene manipulation methods for animal models, mouse, rat and marmoset, for the analysis of brain function

Chaired by *Kenji Sakimura (BRI, Niigata University)*

13:00 **Dopaminergic memory enhancement by two distinct novelty systems**

Chaired by *Tomonori Takeuchi (Aarhus University, Denmark)*

Arc-haeology of learning and memory

Chaired by *Haruhiko Bito (The University of Tokyo)*

Axon growth and regeneration regulated by extracellular and intracellular signals

Chaired by *Michihiro Igarashi (Niigata University)*

14:50 **Paternally inherited transgenerational epigenome changes to understand neurodevelopmental disorders**

Chaired by *Noriko Osumi (Tohoku University)*

Disease modeling and brain mapping using genetically modified marmosets

Chaired by *Hideyuki Okano (Keio University)*

15:50 **Closing Remarks** *Kenji Sakimura (BRI, Niigata University)*

Contact noukyoudo@adm.niigata-u.ac.jp
025-227-0565

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26日(月)に「見てみようヒトの脳と心」という題の研究所公開と講演を企画しましたので、学生の皆さんに積極的に参加していただければ幸いです。

代表 新潟大学脳研究所長 那波宏之

参加費
無料

平成30年3月26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、eメールまたはハガキで下記まで(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58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) 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 |
| 4) 遺伝子で迫る認知症の謎 (遺伝子機能解析学分野) | 10名 |
| 5) 脳の病気を手術で治す (脳神経科学分野) | 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

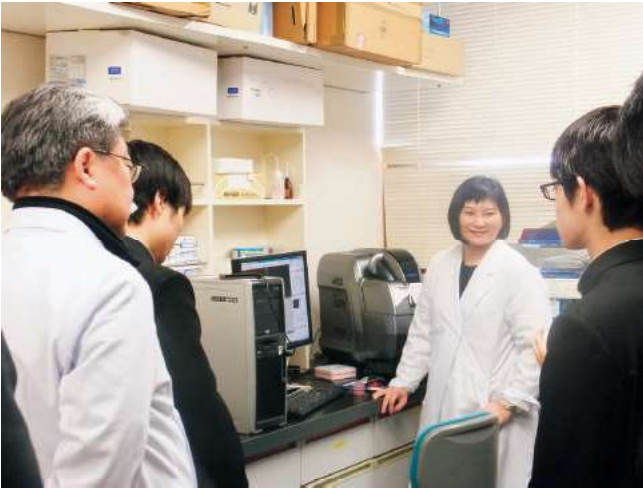
計80名

- | | |
|-------------------------|------|
| 1) 脳が心を持つしくみ | 澁木克栄 |
| 2) 脳内のご褒美の物質「ドーパミン」について | 笹岡俊邦 |



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

見てみようヒトの脳と心



4. 共同利用・共同研究拠点

脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点

プロジェクト型共同研究

連携資源利用型共同研究

国際共同研究

学内異分野融合・共同研究

平成29年度 新潟大学脳研究所共同利用・共同研究採択者一覧

プロジェクト型

研究課題名	研究代表者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
MRI陰性で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	国立病院機構西新潟中央病院	神経部長	福多 真史	脳神経外科学分野	藤井 幸彦
家族性進行性核上性麻痺 (PSP) の原因遺伝子の探索と孤発性PSP及び類縁疾患との関連解析	北海道大学大学院医学研究院	准教授	矢部 一郎	遺伝子機能解析学分野	池内 健
熱ショック応答による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 細胞質凝集体の形成抑制	杏林大学保健学部	教授	渡部 和彦	デジタル医学分野	柿田 明美
ケラタン硫酸糖鎖合成酵素遺伝子のノックアウトマウスの作成とその表現型解析およびALS発症における影響の解析	関西医科大学	准教授	赤間 智也	細胞神経生物学分野	崎村 建司
不安障害モデルマウスの脳内分泌タンパク質のプロテオーム解析	北里大学医学部	准教授	板倉 誠	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
神経障害エステラーゼの機能解析	東海大学医学部	教授	木村 穰	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
グアム島のパーキンソン認知症と筋萎縮性側索硬化症：リン酸化TDP-43とリン酸化タウの脳内進展様式	信州大学医学部	特任教授	小柳 清光	デジタル医学分野	柿田 明美
げっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析	東海大学医学部	准教授	加藤 明	分子神経生物学分野	那波 宏之
ドーパミン受容体コンディショナルノックダウンマウスを用いたパーキンソン病の病態生理の解析	自然科学研究機構生理学研究所	教授	南部 篤	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
新規疼痛関連分子の脳および脊髄後角での神経可塑性における機能の解析	関西医科大学	准教授	片野 泰代	細胞神経生物学分野	崎村 建司
アルツハイマー病の病態におけるタウC末端断片の役割の解明	鹿児島大学大学院医学総合研究科	助教	松本 信英	デジタル医学分野	柿田 明美
マウス遺伝子を用いた体性感覚系神経回路発達の解析	国立遺伝学研究所	教授	岩里 琢治	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
糖脂質代謝異常から紐解くアルツハイマー病の病態解明	国立長寿医療研究センター	部長	里 直行	遺伝子機能解析学分野	池内 健
Cacna1g変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態の解明	横浜市立大学医学部	准教授	土井 宏	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
視床特殊核におけるグルタミン酸受容体GluD1による入力選択的回路形成機構	北海道大学大学院医学研究院	教授	渡辺 雅彦	細胞神経生物学分野	崎村 建司
認知症病態における海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide:HCNP) 発現メカニズムの解析	名古屋市立大学大学院医学研究科	教授	松川 則之	遺伝子機能解析学分野	池内 健
神経変性疾患におけるNAK α 3神経細胞の機能障害と細胞死機構の解明	神戸医療産業都市推進機構	部長	星 美奈子	デジタル医学分野	柿田 明美
Gut microbiotaの制御が脳虚血病巣進展に及ぼす影響	日本医科大学大学院医学研究科	准教授	西山 康裕	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
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
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
CADASIL・CARASIL モデル動物を使用した脳小血管病新規治療法の開発	国立循環器病研究センター	部長	猪原 匡史	神経内科学分野	小野寺 理
同時収集型PET/MR装置を用いた脳内アクアポリン動態に関連する脳機能探索に資するデータ収集解析手法の開発	福島県立医科大学	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
脳内アミロイド42蓄積を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	福島県立医科大学会津医療センター	准教授	國井 泰人	デジタル医学分野	柿田 明美
細胞内分解機構に着目したシヌクレイン/バ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系研究科	教授	岡村 均	細胞神経生物学分野	崎村 建司
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	部長	奥山 真紀子	臨床機能脳神経学分野	鈴木 雄治
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PDL-1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に関わる治療エビデンス標的因子の探索	岐阜薬科大学	教授	保住 功	デジタル医学分野	柿田 明美
認知症症例における髄液および血液中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

平成29年度 新潟大学脳研究所共同利用・共同研究採択者一覧

連携資源利用型

研究課題名	研究代表者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
意識科学に基づく「自動学習実験機能を備えた飼育装置による遠隔操作実験法」を用いたマウス表現型解析	国立研究開発法人理化学研究所	チームリーダー	若菜 茂晴	システム脳生理学分野	澁木 克栄
結合性解析を用いた統合失調症における情報統合機能の解析	京都大学大学院医学研究科	講師	宮田 淳	システム脳生理学分野	澁木 克栄
血液および髄液におけるアルカデインのアルツハイマー病バイオマーカーとしての検証と解析	北海道大学大学院薬学研究院	教授	鈴木 利治	遺伝子機能解析学分野	池内 健
APPの細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析	北陸大学医療保健学部	教授	中山 耕造	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
22q11.2欠失症候群関連因子の機能解析	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
脳疾患動物モデルの生体イメージングによる、脳疾患機序の解明	国立遺伝学研究所	助教	水野 秀信	システム脳生理学分野	澁木 克栄
ニコチン作動性アセチルコリン受容体の神経系における局在の検討	熊本大学医学部附属病院	特任教授	中根 俊成	デジタル医学分野	柿田 明美
脳アミロイドアンギオパチーの病態関連分子の解析	熊本大学医学部附属病院	講師	植田 光晴	デジタル医学分野	柿田 明美
意識的機能を実現する神経回路構築の多角的な研究	京都大学大学院医学研究科	准教授	古田 貴寛	システム脳生理学分野	澁木 克栄
クラスター型プロトコドヘリン遺伝子を用いた意識研究へのアプローチ	大阪大学大学院生命機能研究科	教授	八木 健	システム脳生理学分野	澁木 克栄
筋線維メンテナンスに果たすWPP1エ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
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
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	国立研究開発法人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
運動制御における大脳基底核ドーパミン神経伝達系の機能解析	大阪大学大学院生命機能研究科	准教授	木津川 尚史	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
ドーパミン受容体遺伝子改変マウスの線条体におけるドーパミン代謝の解析	東京工業大学生命理工学院	教授	一瀬 宏	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
神経組織特異的Scrapperコンディショナルノックアウトマウスの作製と解析	浜松医科大学	准教授	矢尾 育子	細胞神経生物学分野	崎村 建司

平成29年度 新潟大学脳研究所国際共同研究探択者一覧

研究課題名	研究代表者				所内対応教員	
	国	所属	職名	氏名	分野名	氏名
Preventive medicine for Alzheimer's disease アルツハイマー病の発症前診断・発症予防	米	Neurology, Univ. of California Davis (カリフォルニア大学デービス校)	Prof.	KWEE, Ingrid L.	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
Screening for potent histone transferase inhibitors in the treatment of diffuse intrinsic pontine gliomas 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	米	Department of Neurological Surgery, Biochemistry and Molecular Genetics, Feinberg School of Medicine, Northwestern Univ. (ノースウェスタン大学)	Assistant Prof.	HASHIZUME, Rintaro	脳神経外科分野	藤井 幸彦
Ca channel abnormality in an NMDA Receptor hypofunction model of schizophrenia NMDA受容体機能低下型統合失調症モデルにおけるCaチャネルの異常の解析	米	Dept. of Psychiatry and Behavioral Neurobiology, Univ. of Alabama at Birmingham (アラバマ大学バーミンガム校)	Associate Prof.	NAKAZAWA, Kazutoshi	細胞神経生物学分野	崎村 建司
Elucidation of the roles of chromatin remodeler in neuronal homeostasis using mouse models マウスモデルを用いた、エピゲノム修飾による神経恒常性維持機構の解明	米	Dept. of Psychiatry, Univ. of Massachusetts Medical School, Brudnick Neuropsychiatry Research Institute (マサチューセッツ大学メディカルスクール)	Assistant Prof.	FUTAI, Kensuke	細胞神経生物学分野	崎村 建司
Research on pathway-specific control of motor activity and motor- and reward-related learning behaviors via dopamine D1 and D2 receptors ドーパミンD1/D2受容体を經由する神経回路特異的な運動調節及び報酬学習行動の研究	米	Department of Medical Information Science, Beckman Institute, Univ. of Illinois at Urbana-Champaign (イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校)	Associate Prof.	WANG, Yanyan	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
Neuropathological and technical training for advanced laboratory works for brain bank ブレインバンクのための神経病理学および技術的相互交流	韓	Dept. of Pathology, Seoul National Univ. Hospital, College of Medicine (ソウル大学校)	Prof.	PARK, Sung-Hye	デジタル医学分野	柿田 明美

学内共同研究

異分野融合による革新的ヒト脳研究推進事業

平成29年度学長裁量経費（将来構想実現促進費）



2017年

9月15日(金)
より開始

目標

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

募集した共同研究テーマ

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

公募結果

合計14件の申請があり、厳正な審査の結果、6件の共同研究を採択

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

新潟大学脳研究所との学内異分野融合・共同研究 採択者一覧

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

所属別 申請内訳

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

MRI 陰性てんかん症例での多角的術前検査による てんかん焦点の可視化

研究代表者 福多真史 1)

研究分担者 藤井幸彦 2)

1) 国立病院機構西新潟中央病院脳神経外科 2) 新潟大学脳研究所脳神経外科

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. MRI 陰性てんかん症例で、術前検査として脳磁図、長時間ビデオ脳波、SPECT検査を西新潟中央病院で行い、高磁場MRI、高密度脳波計検査を脳研究所で行う。
2. 西新潟中央病院で硬膜下電極を留置して記録を行い、発作起始部を同定する。
3. 発作起始部と術前評価によるてんかん焦点の

推定部位との関係を把握し、多角的検査の妥当性を評価する。

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

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

C. 研究結果

2015年10月から2017年12月までに、てんかん外科適応症例20例において当院と新潟大学得脳神経外科と連携しててんかん外科治療を行った。このうち術前検査として高密度脳波計、高磁場MRIを施行した症例は15例で、その中の7例ですでにてんかん外科を終了している。高密度脳波計の解析はまだ行っていないが、高磁場MRIとくに7テスラを施行した症例の中で、結節性硬化症の

tuber がより鮮明に確認できたものが 1 例、通常の MRI では認められなかった静脈奇形が確認できたものが 1 例あった。

また最近の症例では FDG-PET も一緒に施行しており、今後の症例蓄積によりその有用性を検討する予定である。

D. 考察

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

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Masafumi Fukuda, Hiroshi Masuda, Hiroshi Shirozu, Yosuke Ito, Yoko Nakayama, Takefumi Higashijima, Yukihiro Fujii: Additional resective surgery after the failure of initial surgery in patients with intractable epilepsy. *Neurol Res* 39:1049-1055, 2017

2. 学会発表

1. 第 40 回日本脳神経 CI 学会総会 (2017 年 3 月 3 日から 4 日、鹿児島市)
難治性てんかんに対する迷走神経刺激療法後の脳血流変化の検討
福多真史, 増田, 浩, 白水洋史, 伊藤陽祐, 中山遥子, 東島威史, 藤井幸彦
2. 第 51 回日本てんかん学会 (2017 年 11 月 3 日から 5 日、京都市)
両側頭蓋内電極留置術を施行した側頭葉てんかんの術後長期予後
福多真史, 増田, 浩, 白水洋史, 伊藤陽祐, 中山遥子, 東島威史, 藤井幸彦
3. 第 47 回日本臨床神経生理学学会学術大会 (2017 年 11 月 29 日から 12 月 1 日、横浜市)
難治性てんかんに対する迷走神経刺激療法後のベンゾジアゼピン受容体分布の変化
福多真史, 増田, 浩, 白水洋史, 伊藤陽祐, 東島威史, 藤井幸彦

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

家族性進行性核上性麻痺 (PSP) の原因遺伝子の探索と 孤発性 PSP 及び類縁疾患との関連解析

研究代表者 矢部 一郎¹⁾

研究分担者 矢口 裕章¹⁾、池内 健²⁾、佐々木秀直¹⁾

1) 北海道大学大学院医学研究院神経病態学分野神経内科学教室

2) 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野

研究要旨

進行性核上性麻痺(PSP)は孤発性疾患であるが、まれに家系内に複数の発症者をみた家系も報告されている。われわれは、認知症とパーキンソン症状を主な症状とし臨床的に進行性核上性麻痺と診断し、病理学的に海馬、淡蒼球、視床下核、黒質の神経変性を伴い、3 リポートと 4 リポートのタウ蛋白の蓄積を伴う家族性神経変性疾患があることを見出した。遺伝子解析を詳細に行ったところ、神経終末アクティブゾーンにある bassoon 蛋白を作り出す bassoon (*BSN*)遺伝子の変化を見出しました。さらに、今まで PSP と臨床診断していた患者を対象に遺伝子解析を実施したところ、その約 10%に *BSN*遺伝子変化を同定した。*BSN*遺伝子に遺伝子変化を導入した HEK293T 細胞で検討すると、この遺伝子変化により不溶性のタウ蛋白が蓄積することが確認された。この結果を踏まえて、現在この遺伝子変化の PSP 病態への関与について共同研究が進捗中である。

A. 研究目的

われわれは最近、家族歴を有する進行性核上性麻痺の家系例と孤発性進行性核上性麻痺症例を対象に連鎖解析とエクソーム解析、および神経病理学的解析を行い起因遺伝子候補 Bassoon(*BSN*)遺伝子を同定し報告した(Yabe I et al Sci Rep 2018)。進行性核上性麻痺については、JALPAC (Japanese Longitudinal Biomarker Study in PSP and CBD)と名付けられた全国規模のコンソーシアムがすでに存在し、日本医療研究開発機構研究費にて「進行性核上性麻痺及び類縁疾患を対象とした多施設共同コホート研究によるバイオマーカー開発と自然歴の解明班」(研究代表者 新潟大学 池内 健 教授)が運営しており、北海道大学神経内科も参画している。本コンソーシアムでは血液、髄液、DNA および RNA 検体が臨床情報と共に集積されており、一部に剖検例も存在する。本研究は JALPAC に集積された検体を用い、*BSN*遺伝子変異の本病態に関与する頻度と機序を解明することや、新たなバイオマーカーを見出

すことを目的に実施する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究は北海道大学医学研究院倫理委員会にて承認済みの研究であり、研究対象者からは文書にて同意を得ている。

家族歴のある患者 DNA については、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を実施した。孤発例 41 例については候補遺伝子解析を実施した。また、ラットの *BSN* に家族例で見出された遺伝子変化を導入し HEK293 細胞に発現させタウ蛋白の挙動を観察した。

C. 研究結果

北海道大学で実施された先行研究の結果を示す。家族歴のある患者を対象に過去に進行性核上性麻痺の原因遺伝子として報告されている遺伝子やパーキンソン病や認知症の原因遺伝子などを含む 50 遺伝子を候補遺伝子として解析したが、それらの遺

伝子には原因となる変異を認めなかった。そこでさらに、全エクソーム解析および連鎖解析を実施し、bassoon (*BSN*) 遺伝子に発症者特異的にミスセンス変異が存在することを見出した。進行性核上性麻痺と臨床診断された孤発例患者 41 名を対象に解析したところ、4名の患者において3種類のミスセンス変異が認められた。これらの遺伝子変化は健常者データベースには記載が無いが、あっても0.5%以下のまれな変化であった。次いで、遺伝子変化を導入した変異型ラット *BSN* 遺伝子と野生型ラット *BSN* 遺伝子を導入した HEK293T 細胞でタウ蛋白を比較検討すると、遺伝子変化を導入した細胞で不溶性のタウ蛋白が多く存在することが確認された。

D. 考察

BSN 遺伝子から翻訳される BSN 蛋白は神経終末アクティブゾーンに piccolo 蛋白と伴って存在する巨大タンパク質である。発現解析において、この遺伝子がタウオパチー発症に深く関与することが推定された。家族例の病理学的所見では、障害部位は進行性核上性麻痺に類似するが3+4リピートタウが蓄積し tufted astrocyte が認められていないことから、進行性核上性麻痺とは異なるタウオパチーと考えられるが、臨床的に孤発性進行性核上性と診断された患者の約 10%に *BSN* 遺伝子変化を伴っていたことから、JALPAC (Japanese Longitudinal Biomarker Study in PSP and CBD) を基盤とした生体試料を対象とした confirmation study が急務であり、現在共同研究が進捗中である。

E. 結論

- 認知症とパーキンソン症状を主な症状とし、病理学的に海馬、淡蒼球、視床下核、黒質の神経変性を伴い、3リピートと4リピートタウ蛋白の蓄積を伴うタウオパチーを見出した。
- 次世代シーケンサーを用いた解析により神経終末アクティブゾーンにある bassoon 蛋白を作り出す bassoon (*BSN*) 遺伝子の変化が発症原因である可能性を発見した。
- 孤発性進行性核上性麻痺と臨床診断していた患者の約 10%に *BSN* 遺伝子変化があることを見出した。
- この遺伝子変化が不溶性タウの蓄積を誘導する

可能性があることを発見した。

- JALPAC (Japanese Longitudinal Biomarker Study in PSP and CBD) を基盤とした生体試料を対象とした confirmation study が急務であり、現在共同研究が進捗中である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Yabe I, Yaguchi H, Kato Y, Miki Y, Takahashi H, Tanikawa S, Shirai S, Takahashi I, Kimura M, Hama Y, Matsushima M, Fujioka S, Kano T, Watanabe M, Nakagawa S, Kunieda Y, Ikeda Y, Hasegawa M, Nishihara H, Ohtsuka T, Tanaka S, Tsuboi Y, Hatakeyama S, Wakabayashi K, Sasaki H. Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome. *Sci Rep* 8; 819, 2018

2. 学会発表

Yabe I, Yaguchi H, Kato Y, Miki Y, Takahashi H, Tanikawa S, Shirai S, Takahashi I, Fujioka S, Watanabe M, Nakagawa S, Kunieda Y, Ikeda Y, Hasegawa M, Nishihara H, Tanaka S, Tsuboi Y, Hatakeyama S, Wakabayashi K, Sasaki H. Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome. 23rd World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, 9/16-9/21, 2017

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし
- その他
なし

熱ショック応答による筋萎縮性側索硬化症(ALS)細胞質凝集体の 形成抑制

研究代表者 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

筋萎縮性側索硬化症(ALS)における運動ニューロン細胞質内 TDP-43 凝集体を消去する因子の探索を目標として、培養ニューロンおよびマウス顔面神経核 TDP-43 凝集体形成モデルに対し、組換えウイルスを用いた熱ショック応答関連分子群の共発現により、TDP-43 凝集体形成を抑制しうるか解析した。得られた結果をヒト ALS 剖検例における熱ショック応答分子群の発現と比較検討することにより、ALS に対する熱ショック応答を利用した新規治療法の開発を目指している。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンの選択的な変性脱落により死に至る最も過酷な神経変性疾患であり、ニューロン、グリアにリン酸化 TDP-43 蛋白を含む細胞質凝集体が出現する。我々はこれまで、ヒト正常 TDP-43 とその C 末断片を発現する組換えアデノウイルスをプロテアソーム阻害条件下で培養ニューロンや成体ラット・マウス運動ニューロンに感染発現させると、リン酸化 TDP-43 を含む不溶性の細胞質粗大凝集体が高率に形成されることを報告した (Watabe et al., 2014)。さらに、培養タイムラプス解析により、正常および C 末断片 DsRed/TDP-43 組換えアデノウイルスをニューロンに感染発現させプロテアソーム阻害剤 MG-132 を負荷すると、DsRed 陽性 TDP-43 凝集体が細胞質に徐々に充満し、細胞膜の破綻とともに細胞死に至り、残存した不溶性凝集体が放出される像を観察した。この凝集体はリン酸化 TDP-43 を含む sarkosyl 不溶性の顆粒状構造物からなり、隣接する細胞に取り込まれ、時間とともに細胞質で増大し、凝集シードとして機能することを確認した (Ishii et al., 2017)。一方、ALS を含む神経変性疾患モデルに対する熱ショック応答の蛋白凝集体消去作用が注目されている。そ

こで本研究では、組換えアデノウイルスを用いて熱ショック応答に関与する分子群を共発現させることにより、上記の実験的 TDP-43 凝集体形成を抑制しうるか解析し、併せてヒト ALS 剖検例と比較検討することにより、熱ショック応答を利用した ALS に対する新規治療法の開発を目指している。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. ヒト正常または C 末断片 (208-414) TDP-43 とともに DsRed を発現する組換えアデノウイルス、ヒト heat shock transcription factor 1 (HSF1), heat shock protein 70 (HSP70), DNAJB2a/b, HSPB8 または HSPH3 とともに EGFP を発現する組換えウイルスを作製し、ラット神経幹細胞 1464R 由来分化ニューロンに各々感染させ、プロテアソーム阻害剤 MG-132 を負荷、あるいはプロテアソーム分子 PSMC1 に対する shRNA 組換えウイルスを共感染させた後、細胞質凝集体の形成を解析した。

2. 上記正常および C 末断片 TDP-43, HSF1 組換えアデノウイルスを 1464R 細胞由来ニューロンに共感染させ、プロテアソーム阻害剤 MG-132 を負荷し、total RNA を調製した。Agilent SurePrint を用いた cDNA マイクロアレイにより各実験群間の

遺伝子発現を解析し、プローブ毎にシグナル強度を集計、EGFP, TDP-43, HSF1 の有無による発現比を求めた。

C. 研究結果

1. MG-132 あるいは PSMC1 shRNA によるプロテアソーム阻害条件下で正常および C 末断片 TDP-43 組換えウイルスを分化ニューロンに感染発現させると、DsRed 強陽性の粗大な細胞質凝集体が形成されたが、HSF1 組換えウイルスの共感染により凝集体形成は有意に抑制され、ウェスタンブロットではリン酸化 TDP-43 を含む RIPA 不溶性分画の著明な減少を認めた。一方、これまでに細胞質凝集体形成抑制作用が報告されている HSP70, DNAJB2a/b, HSPB8, HSPH3 各分子を発現する組換えウイルスには TDP-43 凝集体形成抑制効果を認めなかった。

2. cDNA マイクロアレイ解析により、EGFP 組換えウイルスに比べて HSF1EGFP 組換えウイルスで 2 倍以上に発現が上昇する遺伝子は 64 個、2 分の 1 以下に減少する遺伝子は 15 個同定された。一方、TDP-43 組換えウイルス感染、MG-132 存在下で EGFP 組換えウイルスに比べて HSF1EGFP 組換えウイルスで 2 倍以上に発現が上昇する遺伝子は 393 個、2 分の 1 以下に減少する遺伝子は 359 個同定された。

D. 考察

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大いに注目を集めている。本研究の培養 TDP-43 凝集体形成モデルにおいても熱ショック応答のマスター制御因子である HSF1 の著明な凝集抑制効果が認められたが、その下流はこれまでに凝集体形成抑制作用が報告されている HSP70, DNAJB2a/b, HSPB8, HSPH3 とは異なる他の熱ショック応答関連分子を介していると考えられ、更なる検討が必要である。

一方、cDNA マイクロアレイ解析を手がかりとして HSF1 の下流に位置する TDP-43 凝集体抑制因子を同定することにより ALS の新規治療法の開発に繋げていきたい。現在、候補分子について発現および機能解析を行い、組換えウイルスを順次作製し検討を行っている。

E. 結論

本研究の培養 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 の著明な凝集抑制効果が認められたが、その下流は HSPB8, HSPH3, HSP70, DNAJB2a/b, HSPB8, HSPH3 とは異なる他の熱ショック応答関連分子を介していると考えられ、更なる検討が必要である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

- 1) Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K. Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging. *PLoS One* 2017;12:e0179375.
- 2) Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K. Myelinating coculture of rodent stem cell line-derived neurons and immortalized Schwann cells. *Neuropathology* 2017;37:475-481.
- 3) Yanagisawa H, Ishii H, Endo K, Kawakami E, Akiyama K, Watabe K, Komatsu M, Yamamoto D, Eto Y. L-leucine and SPNS1 coordinately ameliorate dysfunction of autophagy in mouse and human Niemann-Pick type C disease. *Sci Rep* 2017;7:15944.
- 4) Niimi N, Yako H, Takaku S, Kato H, Matsumoto T, Nishito Y, Watabe K, Ogasawara S, Mizukami H, Yagihashi S, Chung SK, Sango K. A spontaneously immortalized Schwann cell line from aldose reductase-deficient mice as a useful tool for studying polyol pathway and aldehyde metabolism. *J Neurochem* 2018;144:710-722.

2. 学会発表

- 1) 佐久間美帆, 加藤陽一郎, 村田麻喜子, 新井田素子, 柿田明美, 柴田亮行, 渡部和彦. 熱ショック応答による培養ニューロン内 TDP-43 細胞質凝集体の形成抑制. 第 58 回日本神経病理学会総会学術研究会. 学術総合センター (東京), 2017 年 6 月 3 日.
- 2) Watabe K, Kato Y, Murata M, Sakuma M, Niida-Kawaguchi M, Kakita A, Shibata N. Heat shock response suppresses adenovirus-induced TDP-43 aggregate formation in cultured neuronal cells. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, September 19, 2017.
- 3) Shibata N, Niida-Kawaguchi M, Kato Y, Noguchi N, Kakita A, Watabe K. Soluble iron accumulation makes microglia to overproduce and release glutamate via aconitase 1, TACE and glutaminase C in ALS spinal cords. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, September 19, 2017.

4) 佐久間美帆, 加藤陽一郎, 村田麻喜子, 新井田素子, 柿田明美, 柴田亮行, 渡部和彦. HSF1 による培養ニューロン細胞質 TDP-43 凝集体の形成抑制. 第 12 回臨床ストレス応答学会大会. 東京女子医科大学 (東京), 2017 年 11 月 4 日.

5) 新井田素子, 塚原富士子, 須藤則弘, 山本智子, 澤田誠, 丸義朗, 渡部和彦, 柴田亮行. ミクログリアにおける ALS 関連変異 SOD1 蛋白の除去機構の解明. 第 12 回臨床ストレス応答学会大会. 東京女子医科大学 (東京), 2017 年 11 月 4 日.

6) 柳澤比呂子, 秋山けい子, 石井智裕, 渡部和彦, 遠藤堅太郎, 河上江美子, 小松雅明, 山元大輔, 衛藤義勝. SPNS1 はニーマンピック病 C 型のオートファジー不全と関連している. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 神戸ポートアイランド (神戸市), 2017 年 12 月 6 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

ケラタン硫酸糖鎖合成酵素遺伝子のノックアウトマウスの作成とその表現型解析および ALS 発症における影響の解析

研究代表者 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 2) 新潟大学 脳研究所 細胞神経生物学分野

研究要旨

我々は角膜や脳に存在する直鎖状糖鎖であるケラタン硫酸グリコサミノグリカンの生合成経路とその生物学的機能解明に向けた研究を行なっている。近年の報告で ALS 発症においてケラタン硫酸鎖の産生が疾病の進行に関連しているとの報告があり、神経機能維持における糖鎖の役割が示唆されている。ケラタン硫酸糖鎖のガラクトースへの硫酸転移には *Chst1* 遺伝子が関わっていることは報告されているが、N-アセチルグルコサミンへの硫酸化には複数ある糖転移酵素のどの酵素が主に関わっているのは明らかにはされていなかった。そこでそれぞれの遺伝子変異マウスから脳サンプルを調製してケラタン硫酸合成を調べたところ、*Chst5* 遺伝子変異マウスにてケラタン硫酸糖鎖の激減が見られたことから、成体マウスの脳では *Chst5* が主たる硫酸転移酵素として働いていることが明らかとなった。

A. 研究目的

角膜や軟骨、脳などに存在するケラタン硫酸はコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸と同様に硫酸基修飾を有する直鎖状糖鎖であり、グリコサミノグリカン (GAG) と総称されるが、他の二種の GAG とは異なり、ケラタン硫酸 GAG は通常タンパク質の糖鎖修飾である N 型糖鎖や O 型糖鎖上に存在する。このためケラタン硫酸の合成は他の二種の GAG 合成とは異なっており、独自の合成制御が行われていると考えられる。ケラタン硫酸鎖の合成および伸長には二種類の糖転移酵素と二種類の硫酸転移酵素が関わっており、それぞれの酵素の発現および活性の強弱によって合成されるケラタン硫酸の性質 (糖鎖長やその硫酸化度など) が変化し、生物学的機能も変化する。脳において GAG はシナプス周辺のペリニューロナルネットや軸索のランビエ絞輪に存在しており、近年では神経細胞機能の制御に関係しているとして注目されている。

我々は GAG の中枢神経損傷からの修復の過程にお

ける役割からケラタン硫酸鎖の生物学的機能について解析を行っている。近年の報告で ALS 発症においてケラタン硫酸鎖の産生が疾病の進行に関連しているとの報告から、神経機能維持におけるケラタン硫酸糖鎖の働きを解析するべく、ケラタン硫酸糖鎖合成不全マウスと ALS 発症モデルマウスを交配させてその表現型の違いを調べることを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

これまでに申請者や他のグループがケラタン硫酸合成に関わる糖転移酵素、硫酸転移酵素を報告してきており、申請者もいくつかのノックアウトマウスを脳研究所との共同研究にて作成済みである。本申請研究では現在所有している硫酸化糖鎖合成不全マウスの成体マウスの脳についてケラタン硫酸鎖の分布を確認し、成体マウス脳における最も重要なケラタン硫酸合成酵素を同定する。その上で ALS モデルマウス (SOD1-G93A トランスジェニックマウス、Jackson Lab から購入予

定)と交配して遺伝子改変 ALS モデルマウスを作成し、その発症時期や重篤度を解析する。

C. 研究結果

近年の研究で GAG 鎖の硫酸化のパターンが機能的に重要であると考えられていることから、我々はケラタン硫酸糖鎖の硫酸化酵素の寄与を成体マウス脳において調べた。糖鎖の硫酸化酵素は Chst (CarboHydrate SulfoTransferase) 遺伝子群に分類されており、その中でケラタン硫酸を構成する糖の一つである N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) への硫酸付加を行う酵素として *Chst2*、*Chst4*、*Chst5*、*Chst7* の 4 種が考えられているが、これまで証明されていなかった (ヒトには *CHST6* もあるがマウスにはこの遺伝子はない)。そこでそれぞれのノックアウトマウスの成体から脳を摘出してライセートを調製し、ケラタン硫酸糖鎖に対する抗体 (R-10G) を用いて免疫ブロッティング法にてその存在を調べたところ、*Chst5* ノックアウトマウスの脳においてのみ抗体反応の著しい減少が見られた。また *Chst2/Chst5* ダブルノックアウトマウスでは抗ケラタン硫酸鎖抗体によるシグナルが全く見られなかったことから、成体マウスの脳ではケラタン硫酸鎖の GlcNAc の硫酸化はそのほとんどが *Chst5* によって、ごく一部が *Chst2* によって行われており、*Chst4*、*Chst7* は脳ではケラタン硫酸鎖合成に関与していないことが明らかとなった。

D. 考察

マウスの脳におけるケラタン硫酸鎖合成についてこれまで調べられていなかったが、近年の研究で新生児期までは高硫酸化型ケラタン硫酸 (ケラタン硫酸鎖を構成する 2 つの糖、GlcNAc とガラクトースの両方に硫酸基が付加されている) が合成されているが、成長につれて低硫酸化型 (GlcNAc のみに硫酸基が付加されている) に変化することが知られており、この硫酸化パターンの変化はガラクトースに硫酸を付加する酵素である *Chst1* の発現と一致することが明らかとなっている。GAG の硫酸化のパターンの変化は GAG の生物学的機能の変化に深く関連することから、その詳細な制御機構を明らかにすることが必要であった。今回の研究にて成体マウス脳では *Chst5* が主にケラタン硫酸鎖の硫酸化を担っていることが明らかとな

り、*Chst5* の遺伝子変化をコントロールすることで成体マウス脳のケラタン硫酸鎖の硫酸化の割合を変化させることができるものと考えられた。

E. 結論

ALS 発症モデルマウスと *Chst5* ノックアウトマウスとを交配させることで ALS 発症におけるケラタン硫酸鎖の関与を解析できるものと考えられる。また痕跡程度ではあるものの *Chst2* によってもケラタン硫酸鎖が合成されるため、*Chst2/Chst5* ダブルノックアウトマウスにて ALS 発症モデルを作製することでケラタン硫酸鎖のより精密な機能解析が可能であ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

- 1) Keratan Sulfate Phenotype in the β -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase-7-Null Mouse Cornea. Littlechild Stacy L., Young Robert D., Caterson Bruce, Yoshida Hideyuki, Yamazaki Maya, Sakimura Kenji, Quantock Andrew J., Akama Tomoya O., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59(3), pp1641-51, 2018, DOI:10.1167/iovs.17-22716

2. 学会発表

- 1) Keratanase II の最小酵素活性ドメインの同定 (ポスター発表)
赤間智也、川寄敏祐、中邨智之
第 36 回日本糖質学会年会 (2017 年 7 月 19 日-21 日・旭川)
- 2) Determination of the minimum enzymatic domain of keratanase II (ポスター発表)
Tomoya O. Akama, Toshisuke Kawasaki, Tomoyuki Nakamura
Society for Glycobiology 2017 Annual Meeting (2017 年 11 月 5 日-8 日・米国オレゴン州ポートランド)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) 該当なし

不安障害モデルマウスの脳内分泌タンパク質のプロテオーム解析

研究代表者 板倉 誠¹⁾
研究分担者 飯田 諭宜²⁾, 笹岡 俊邦³⁾

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

研究要旨

不安や抑うつといった情動は、多くの神経回路網や様々な脳内液性因子によって複雑に制御されている。そこで不安感や抑うつの誘発や鎮静化に関与している脳内分泌タンパク質の同定を目的とし、コントロールマウスを用いてプロテオーム解析法の条件検討を行った。不安感と相関して分泌量が変化する脳内タンパク質の探索は、脳組織とともに脳脊髄液も解析対象とした。まず C57B6 マウスの大槽から脳脊髄液を、ガラスキャピラリーを用いて採取し、トリプシン消化後、LC-MS/MS 質量分析計でショットガン解析を行ったところ、1 µl の脳脊髄液から約 450 種類のタンパク質 (ペプチドホルモン 20 種類) を同定することができた。次にマウス脳組織からペプチドを精製し、直接質量分析計で解析したところ、約 6900 種類の翻訳後修飾を含むペプチドが同定できた。現在、不安様行動を示すモデルマウスからサンプル調製を行っており、コントロールマウスとの定量比較解析に進む予定である。

A. 研究目的

気分障害や不安障害といった情動異常を示すストレス関連疾患の生涯罹患率は高く、非常に大きな社会問題である。そこで、過度な不安感の誘発や不安感の鎮静化に関わる脳内分子メカニズムを解明することを本研究の目的とする。脳脊髄液タンパク質および脳内分泌タンパク質を、様々な不安障害モデルマウスとコントロールマウスで定量比較解析し、不安感の強さに相関して存在量や翻訳後修飾が変化するタンパク質の同定を目指す。また脳内での分泌タンパク質の変化を、血清中でも捉えることができれば情動異常の疾患マーカーの有力な候補となるため、血液サンプルの解析も同時に行う。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

・不安様行動を示すモデルマウスの作成

北里大学医学部動物実験委員会の規定に従い、動物の苦痛軽減に配慮して行った。

- 1) ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニスト、ピロカルピン投与マウス
メチルスコポラミン (2 mg/kg) を C57B6 マウスに腹腔内注射をしてピロカルピンの末梢での作用を阻害した後 (30 分間)、ピロカルピン (300 mg/kg) を腹腔内注射する。約 1 時間後に発生するてんかん重積を 1.5 または 4.5 時間持続させた後、抗てんかん薬フェノバルビタールで、てんかん重積を停止させる。
- 2) ドーパミン受容体 D2R, D3R アゴニスト投与マウス
生理食塩水に D2R アゴニスト (QNP), D3R アゴニスト (PD128907) を溶解後、C57B6 マウスに腹腔内注射をして不安様行動を示すマウスを作成する。それぞれの受容体を介した作用かを確認するために、新潟大学脳研究所の笹岡俊邦教授から譲渡された D2R および D3R ノックアウトマウスも用いる。

・マウス脳脊髄液の採取とプロテオーム解析

C57B6 マウスを麻酔下で頭部を固定し、背側から頭蓋骨を露出させる。ガラスキャピラリーを脳膜を貫通するように刺し、大槽に貯まっている脳脊髄液 (5~8 μ l) を採取する。

採取した脳脊髄液中のタンパク質をトリプシンで消化後、質量分析装置 Orbitrap LC-MS/MS Q Exactive (Termo Fischer Scientific) を用いてショットガン解析を行った。プロテオーム解析は共同研究者の小寺教授 [北里大学理学部疾患プロテオミクスセンター] にお願ひした。

・マウス脳組織の採取とプロテオーム解析

C57B6 マウスから麻酔下で脳を取り出し、尿素/チオ尿素溶液でホモジナイズした。ホモジナイズ溶液から、低分子量タンパク質およびペプチドを抽出した。抽出された **native** なペプチドを Orbitrap LC-MS/MS Q Exactive で解析した。ペプチドの調製およびプロテオーム解析は小寺教授にお願ひした。

C. 研究結果

・マウス脳脊髄液のショットガン解析

C57B6 マウス大槽から採取した脳脊髄液 1 μ l を解析したところ、約 450 種類のタンパク質を同定することができた。

Adiponectin
Amyloid beta A4 protein
Angiotensinogen
CX3CL1(Fractalkine)
CXCL4 (Platelet factor 4)
CXCL7 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 7)
Dickkopf-related protein 3
Galectin-1
Insulin-like growth factor I
Insulin-like growth factor II
Kininogen-1
Kininogen-2
Ly-6/neurotoxin-like protein 1
Macrophage migration inhibitory factor
Neuropeptide-like protein C4orf48 homolog
Pigment epithelium-derived factor
Proenkephalin-A
Reelin
Scrapie-responsive protein 1
VIP peptides

Fig. 1 マウス髄液中で同定されたホルモンやサイトカインなどの分泌タンパク質

うち約 200 種類が細胞外マトリクスタンパク質を含む分泌タンパク質であった。また分泌タンパク質の 20 種類が、ホルモンなどの情報伝達分子であった [Fig. 1]。またマウス脳脊髄液から同定されたタンパク質の多くが、すでに報告されているヒト脳脊髄液含有タンパク質のマウスホモログであった。

・マウス脳組織から抽出した **Native** なペプチドのプロテオーム解析

C57B6 マウス脳組織約 3 mg から抽出した低分子量タンパク質およびペプチドを、Orbitrap LC-MS/MS Q Exactive で解析したところ、39137 回の MS/MS を行い、2172 の翻訳後修飾を含むペプチド配列が同定された。これらペプチド約 700 種類のタンパク質由来するが、そのうちペプチドホルモンは 20 種類であった。神経ペプチド、ニューロペプチド Y (NPY) の翻訳後修飾を含むペプチドが同定された。

D. 考察

・マウス脳脊髄液のショットガン解析

マウス脳脊髄液のタンパク質濃度は、血清の 1/10 程度であり、1 μ l では 450 種類のタンパク質の同定にとどまった。しかしながら、本研究において、血液がほとんど混ざらない脳脊髄液を再現良く採取できる技術を確認できたので、10 μ l 程度の脳脊髄液を用いて、定量プロテオーム解析へ研究を進める予定である。定量プロテオーム解析は、ペプチドのアミノ基の水素を安定同位体でラベルしたメチル基に置換するジメチル化法を用いて行う [共同研究者の小寺らが開発, Mass Spectrom (Tokyo) 3:S0044 (2014)]。

・マウス脳組織から抽出した **Native** なペプチドのプロテオーム解析

同定された 20 種類の神経ペプチドの 1 つであるニューロペプチド Y は、記憶や学習、摂食、てんかんなど多様な神経機能に関与している。また構造の特徴としてカルボキシ末端がアミド化されている。今回のプロテオーム解析の結果は、ニューロペプチド Y が C 末のアミド化以外の翻訳後修飾を受ける可能性を示唆していた。

E. 結論

本研究ではマウス脳脊髄液の採取技術の確立とマウス脳 **Native** なペプチドを網羅的にプロテオーム解析する条件の至適化を行った。これらの技術を用いて、コントロールマウスと不安様行動を示すモデルマウスの脳分泌タンパク質の量および翻訳後修飾の差異の同定を目指す。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

神経障害エステラーゼの機能解析

研究代表者 木村 穰¹⁾
研究分担者 加藤 明¹⁾ 笹岡俊邦²⁾

1) 所属 東海大学医学部 2) 所属 新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野

研究要旨

我々は有機リン等の曝露が原因とされるシックハウス症候群患者単核球において、Neuropathy Target Esterase (以下NTE)の活性が健常者に比べて高いことを2013年に報告したが、一方でNTEは有機リン複合体変化により神経病変を引き起こす可能性がある。今年度は遺伝子導入マウスを利用して暴露実験等により、病態モデルを追究すると共に、近年NTEをコードする遺伝子に変異を伴う運動失調等の疾患報告がある当該酵素について、ゲノム編集技術を利用した変異マウスを開発し、当該遺伝子の機能を探ることを目的とした。本年は変異マウスを多数作成するとともに、有機リン中毒患者の脳凍結標本では他の疾患の死後標本に比べ脳内でのNTE存在量が低下し、顆粒細胞層の神経細胞の変性などが観察された。また、今後の研究に有用なNTEの大量産生に成功した。

A. 研究目的

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は、究極の目的の一つであるが、近年この酵素をコードする遺伝子に変異を伴う運動失調等の疾患が見つかってきたことや、ヌル変異のホモ型マウスは胎生致死であることなどからこの遺伝子の機能は単に酵素としての役割だけではないと推測され、ここ子では特に神経機能を中心として、その遺伝子機構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）

大腸菌における NTE の大量産生では pET49 ベクターを用い N 末に相当する部分に His-tag を、C 末に相当する部分に V5-tag さらにその外側に Strept-tag を配置した。なお、NTE は全体で 1350a. a. 分子量 125KDa 程度であるが、すでに大腸菌に発現させる系で C 末側の 60KDa 程度のペプチドで酵素活性はほぼ 100%存在することが証明されているため、その部分の cDNA を用いた。有

機リンの代表として今年度は DDVP (ジクロロボス、和光純薬) を用い、活性の低下などを検討した。

CRISPR/Cas9 システムについては通常の方法を用いたが、Cas9 は RNA でなく IDT 社のタンパク質を用いた。また変異を導入するために塩基配列を変化させた ssDNA を同時に用いた。注入はマウス受精卵細胞質と核の双方もしくは細胞質のみに行っている。

農薬中毒者の凍結死後脳標本については生命科学リソース研究センター 脳疾患標本資源解析学の柿田明美教授より他の疾患で死亡した数例の凍結標本等とともに分与いただいた。

なお、本研究の実施にあたっては遺伝子組換え実験計画、動物実験計画を提出し、大学承認を得て実施した。またヒト死後試料を研究材料に用いることについては新潟大学および東海大学の倫理委員会の承認を受けている。

本研究における利益相反はない。

C. 研究結果

1) 有機リンの一種、DDV を投与したところ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という以前の初期結果を追認した。なお成体マウスは耐性度がヒトに比して高い。

ヒト NTE 高発現遺伝子導入マウスに対する揮発性化学物質および有機リンの影響解析が一つの目標であったが、今年度は有機リン投与による NTE との複合体解析のためのツール作りに専念した。

昨年度までに大腸菌、ヒト胎児腎臓由来293細胞、再び大腸菌と3回の大量発現方法を試み、最終的には NTE 活性として総タンパク量の 20%程度にまで精製することができた。しかしながら、N 末端側に接続した His タグを先に切断処理しようが、C 末端側に接続した V5 タグを先に切断処理しようが、タグのないサイズのバンドがゲル電気泳動では単一とはならず、2本のバンドとして検出された。

2) マウス受精卵に変異 ssDNA を導入し、CRISPR/Cas9 システムで変異マウスを作成する計画では、結果的に複数の変異マウスを得ることができたしかしながら目的の点突然変異マウスは得られていない。現在交配中であるが、今のところ、ホモ型あるいはコンパウンドヘテロの個体は生まれてこない。

3) 有機リン含有農薬により自殺死亡した方の脳凍結サンプルと病理標本 1 例を解析したところ。急性腹部痛死後脳、多発性神経障害死後脳と比較して、Western Blot では発現が半分程度に低下していた。また病理切片の観察では有機リン中毒患者脳では、顆粒細胞層の神経細胞が変性、凝集し、正常形態の神経細胞では NTE が核を含めて均一に局在するのに対し、NTE 局在が顆粒状に見えプルキンエ細胞周辺の NTE 発現が見られなかった。

D. 考察

1) 遺伝子導入マウスの有機リン暴露後の眼球運動解析については、飼育場所の移動等があり、かつ暴露量がかなり高濃度であるため工夫が必要との判断をしている。また、当初鳥類も実験動物の候補と考えたが、眼球運動が複雑で適さないことが判明した。

一方、NTE の大量生産は進み、mg オーダーでの精製ができたことから、有機リンとの複合体の分

析を今後予定している。しかしながら、精製の過程で tag の切断の順序を変えても分子量の異なる 2 つの分子になってしまい、これは原因不明である。しかしながら 2 本とも酵素活性はあるものと推測される。

2) NTE 変異マウスの作製に関しては、変異マウスという点では取得に成功した。が、本当にヒト疾患に対応する変異を持つ点突然変異マウスは得られていない。とはいうものの、ホモ型もしくはコンパウンドヘテロ型のマウスは生まれてこないため、やはりこのタンパク質としての重要な機能を示唆する結果となっている。今後、ヘテロ型マウスでの行動解析などを予定している。

3) 有機リン中毒死亡個体での解析は、なかなか試料は得られにくいですが、柿田教授のご好意により解析することができた。今後、年齢による発現変化を解析するとともに、症例報告として投稿準備中である。

E. 結論

1. 大腸菌に NTE の高発現を実現したが、活性ペプチドの部分は完全な精製には至っていない。しかしながら複合体解析には十分量を得た。

2. CRISPR/Cas9 システムを駆使し、運動失調などのヒト疾患で検出された変異部位に対応する欠失変異等を持つマウスを複数種得ることができた。

3. 農薬中毒者の凍結死後脳標本では顆粒細胞層の神経細胞での変性、凝集が認められ、また他の疾患で死亡した例に比べ NTEV の発現量は低下していた。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表 (学会名・発表年月・開催地なども記入)

1) 阿部如子、田中正史、本杉奈美、伊藤誠敏、大久保朋一、木村穰：有機リンによる NTE (Neuropathy Target Esterase) の活性阻害について 生命科学系合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会) 2017. 12. 7

2) 畑中朋美、井上貴暁、田中亨、藤堂浩明、杉林堅次、内堀雅博、青山謙一、太田嘉英、今川孝太郎、赤松正、宮

坂宗男、坂部貢、木村穰： エステル化合物の経皮吸収における carboxyesterase の役割-シックハウス症候群との関連性- 第 26 回日本臨床環境医学会学術集会
2017. 6. 24-25 東京

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

グアム島のパーキンソン認知症と筋萎縮性側索硬化症： リン酸化 TDP-43 とリン酸化タウの脳内進展様式

研究代表者 小柳 清光 1), 2)
研究分担者氏名 橋本 智代 3), 柿田 明美 4)

- 1) 信州大学医学部神経難病学講座 2) 初石病院脳機能研究施設
3) 産業医科大学神経内科 4) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

タウオパチーと TDP-43 が共存するグアム島のパーキンソン認知症(G-PDC)と筋萎縮性側索硬化症(G-ALS)の発病機構を解明するために、リン酸化(p-)TDP-43 の脳内進展様式を G-PDC、G-ALS 及び G-PDC-ALS 合併例、グアム人対照、日本人前頭側頭葉変性症(J-FTLD-TDP)、日本人 ALS(J-ALS)、日本人認知症を伴う ALS(J-ALS-D)、日本人対照で、脳脊髄 34 箇所 の p-TDP-43 免疫染色結果を定量的に解析した。G-PDC では pTDP-43 は大脳と脳幹に広範囲かつ大量に存在し、J-FTLD-TDP と J-ALS-D とは前頭葉と側頭葉で G-PDC より顕著であったが、脳幹への拡がりは弱かった。G-ALS では下位運動ニューロンで見られ、J-ALS と同様であった。G-PDC-ALS では大脳、脳幹は G-PDC と同様で、これに加え脊髄で p-TDP-43 がみられた。

A. 研究目的

タウオパチーと TDP-43 オパチーが共存する稀な疾患であるグアム島のパーキンソン認知症(G-PDC)と筋萎縮性側索硬化症(G-ALS)の発病機構を解明するために、リン酸化(p-)TDP-43 の脳内進展様式を G-PDC、G-ALS 及び G-PDC-ALS 合併例、グアム人対照(G-con)、日本人前頭側頭葉変性症(J-FTLD-TDP)、日本人 ALS(J-ALS)、日本人認知症を伴う ALS(J-ALS-D)、日本人対照(J-con)で、脳脊髄 34 箇所を p-TDP-43 免疫染色し、神経細胞脱落との関連を解析する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

G-PDC 13 剖検例、G-ALS 9 剖検例、G-PDC-ALS 合併 5 剖検例、グアム人対照(G-con)8 剖検例、J-FTLD-TDP 4 剖検例、J-ALS 2 剖検例、J-ALS-D 4 剖検例、J-con 2 剖検例で、ホルマリン固定パラフィン

包埋された脳脊髄 34 箇所 の 6 ミクロン厚切片を p-TDP-43 免疫染色し、0.25 平方ミクロン当たりの陽性所見をカウントして、その数を 4 段階に分けて表に図示し解析した。用いた p-TDP-43 抗体はコスモバイオ社製マウスモノクローナル抗体であり、免疫染色の前処置としてオートクレーブ処置を行った。なお 34 計測箇所は、前頭葉皮質と白質、運動野皮質と白質、側頭葉皮質と白質、尾状核、被殻、淡蒼球、視床、内包、扁桃核、海馬、歯状核、海馬傍回、黒質、中脳水道周囲灰白質、動眼神経核、中脳網様体、赤核、大脳脚、顔面神経核、橋核、橋網様体、舌下神経核、延髄網様体、下オリーブ核、小脳皮質、歯状核、脊髄前角と口角、脊髄白質などである。

C. 研究結果

G-PDC では pTDP-43 は大脳と脳幹に広範囲かつ

大量に存在した。しかも皮質の神経細胞のみならず白質でもみとめられた。G-ALS では下位運動ニューロンで見られ、J-ALS と部位的にも量的にも同様であった。G-PDC-ALS では大脳脳幹は G-PDC と同様で、これに加え脊髄では G-ALS および J-ALS と同様の p-TDP-43 がみられた。

J-FTLD-TDP と J-ALS-D とは前頭葉と側頭葉の p-TDP-43 は G-PDC より顕著であったが、脳幹への拡がりには G-PDC より弱かった。

D. 考察

G-PDC の大脳脳幹に広範かつ多量に p-TDP-43 が認められた事は、この疾患が典型的な TDP-43 オパチーの 1 型である事を示している。G-PDC における p-TDP-43 の局在は、同じく p-TDP-43 が多量に出現する J-FTLD-TDP とは、J-FTLD-TDP が脳幹への拡がり弱い点で決定的に異なっていた。

G-ALS の p-TDP-43 は下位運動ニューロンにほぼ限られており、これは J-ALS と完全に一致した。一方、G-PDC とは全く異なっていた。すなわちこれは、G-ALS が G-PDC と全く別の疾患であることを示している。

G-PDC-ALS では大脳脳幹は G-PDC と同様で、これに加え脊髄では G-ALS と同様の p-TDP-43 がみられた。この所見は、G-PDC-ALS 合併例が、文字通り、G-PDC と G-ALS の「合併疾患」であることを示している。

p-TDP-43 の局在と定量所見からは、J-FTLD-TDP と J-ALS-D は区別が付かず、同一疾患のスペクトラムである可能性が示唆された。

E. 結論

G-PDC は、独特の p-TDP-43 の出現様態と広範な p-タウの沈着を示す屹立した疾患単位である。G-ALS は世界各地で見られる孤発性 ALS と区別が出来ない。G-ALS は G-PDC とは異なる疾患である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Verheijen BM, Oyanagi K, van Leeuwen FW. Dysfunction of protein control in parkinsonism-dementia complex of Guam. *Front Neurol* 9: Article 173, 2018 doi: 10.3389/fneur.2018.00173

2. Verheijen BM, Hashimoto T, Oyanagi K, van Leeuwen FW. Deposition of mutant ubiquitin in parkinsonism-dementia complex of Guam. *Acta Neuropathol Comm* 5: 82, 2017 doi: 10.1186/s40478-017-0490-0
3. Shintaku M, Kaneda D, Oyanagi K. Atypical lower motor neuron disease with enlargement of Nissl substance. *Clin Neuropathol* 37: 74-81, 2018 doi: 10.5414/NP301065
4. Shintaku M, Kaneda D, Oyanagi K. Novel intracytoplasmic inclusions immunoreactive for phosphorylated-TDP-43 and cystatin C in anterior horn cells in a case of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol* 37: 526-534, 2017 doi: 10.1111/neup.12392

2. 学会発表

1. Hashimoto T, Yamazaki M, Kakita A, Takahashi H, Adachi H, Oyanagi K. Two distribution patterns of TDP-43-immunopositive inclusions in amyotrophic lateral sclerosis of Guam: Comparison with parkinsonism-dementia complex of Guam and classic ALS. *World Congress of Neurology*, September 9, 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
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。

げっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析

研究代表者 加藤 明¹⁾
研究分担者 那波 宏之²⁾

1) 東海大学医学部生体構造機能学 2) 新潟大学脳研究所基礎神経科学部門

研究要旨

眼球運動異常を呈する神経疾患の客観的診断基準を確立する目的で、EGF 皮下投与による環境誘発型統合失調症モデルマウスを作製したところ、発達初期の低体重、早期開眼、自発性眼球運動の低周波揺らぎなどの症状を呈することがわかった。反射性眼球運動に与える影響、脳の特定領域の形態・機能不全の有無などの解析を進めることで、特に統合失調症の発症機序や治療への応用が期待される。

A. 研究目的

統合失調症は神経症状を有する精神疾患であり、先天的及び後天的な様々な疾患原因が提唱されているが、その全容は明らかではない。神経症状の多くは成人以降に発症し、疾患の早期発見による早期の治療が重要となるため、疾患の明確な早期鑑別基準の確立が急務である。最近、統合失調症患者の眼球運動異常が明らかとなり、眼球運動が客観的診断指標となり得るという解析結果が報告されたが、異常を生じるメカニズムについては不明である。本研究では、生後直後のマウスへの EGF 投与により、統合失調症患者に多く見られるドーパミン神経異常を誘発する疾患モデル動物を作製し、眼球運動を中心とした神経生理学的解析を行なうことで、統合失調症の客観的診断基準を確立することを目的とする。すでに当該モデル動物は、大脳基底核の異常から運動変化も観察されている。評価指標としての眼球運動の有効性を明らかにすることにより、将来的には他の神経精神疾患への応用も見据える。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

C57BL/6Ncr マウスを用いた。ヒト EGF を生後

2 日目から 10 日目まで 1 日 1 回皮下投与した (0.875 μ g/体重 1 g)。その後、通常環境下で飼育し、生後 9 週齢から経時的に眼球運動計測を行なった。眼球運動は、前庭刺激により頭部運動と逆方向に生じる前庭動眼反射 (vestibulo-ocular reflex: VOR) 及び視野の大きな動きに追従する視運動性眼球反応 (optokinetic response: OKR) を計測し、刺激に対する眼球運動の振幅 (gain) 及びタイミング (phase) を算出した。また明所及び暗所における自発性眼球反応を計測し、眼振頻度、揺らぎの周波数解析などを行なった。これらの実験はすべて東海大学動物実験委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

妊娠マウス 2 個体から生まれた仔マウス各 8 匹 (計 16 匹) に対し、4 匹にヒト EGF (計 8 匹)、4 匹に生理食塩水 (計 8 匹) を投与したところ、9 日間の投与中から生後 1 カ月まで、EGF 投与群の体重が有意に少なかった (EGF: 11.1 ± 0.6 g, control: 13.5 ± 0.4 g, P28)。生後 2 カ月では、投与群と対照群の体重に差はなかった。また、EGF 投与群は対照群と比較して生後開眼までに要した日数が短かった (EGF: 8.6 ± 0.2 days,

control: 14.6 ± 0.2 days)。

生後 10-11 週で計測した自発性眼球運動眼球運動のデータから周波数解析を行なったところ、EGF 投与群で低周波数 (0.5-1.5 Hz) 付近に対照群には見られないピークが観察された。VOR、OKR については現在解析中である。

D. 考察

これまでに、EGF の転写を増加させるような EGF gene の SNP が統合失調症のリスクファクターを大きくする (Anttila 2004)、あるいは統合失調症患者の前脳部で EGF 受容体が増加している (Futamura 2002) 等の報告がある。今回 EGF 投与群で見られた自発性眼球運動の低周波数の揺らぎは、統合失調症患者の眼球運動異常を反映している可能性がある。一方で、EGF 投与群に生じた発達初期の低体重、早期開眼などの症状が影響している可能性もある。VOR、OKR データの解析を進めると共に、組織学的解析による EGF 投与が脳の特定の領域に与える影響、特にドーパミン神経を含む神経細胞形態及び機能への影響についても、十分な検討が必要と思われる。また、今後 EGF 投与後長期間にわたる計測や、リスペリドン投与によるレスキュー実験を計画している。これらの実験については既に平成 30 年度の共同利用・共同研究に採択済みである。

E. 結論

生後ヒト EGF を投与した C57BL/6 マウスでは、発達初期の低体重、早期開眼、自発性眼球運動の低周波揺らぎを呈した。これらはドーパミン神経異常に由来する統合失調症モデルマウスとしての特性を有し、客観的指標としての眼球運動計測を基にした統合失調症発症メカニズムへのアプローチに用いることができる可能性を示唆する。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

加藤明. 神経障害エステラーゼの機能解析及び

げっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析. 新潟大学脳研究所共同研究共同利用合同セミナー. 2017.12.16, 新潟

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

ドーパミン受容体コンディショナルノックダウンマウスを用いた パーキンソン病の病態生理の解析

研究代表者 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

パーキンソン病は、ドーパミン作動性神経細胞が変性、脱落することによって、無動、筋強剛、振戦などの重篤な運動障害を生じる神経難病であるが、その病態生理については不明な点が多い。本研究では、ドーパミン D1 および D2 受容体を介する神経伝達がそれぞれ、パーキンソン病症状の発現にどのように寄与するのかを明らかにすることを目的として、D1/D2 受容体の発現を調節できるコンディショナルノックダウンマウスを作製し、覚醒下で神経活動を記録することにより、これらの受容体を介する情報伝達を阻害した際に生じる神経活動の変化と運動障害との関係を調べる実験を行う。今年度は D2 受容体ノックダウンマウスの作製を進めたが、作製を待つ間、比較のために D2 受容体ノックアウトマウスの神経活動の記録・解析を行った。その結果、D2 受容体を介する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

パーキンソン病は、ドーパミン作動性神経細胞が変性、脱落することによって、無動、筋強剛、振戦などの重篤な運動障害を生じる神経難病であるが、その病態生理については不明な部分が多い。本研究では、ドーパミン D1 および D2 受容体の発現を調節できるコンディショナルノックダウンマウスを作製し、これらの受容体を介する情報伝達を阻害した際に生じる神経活動の変化と各症状の発現との関係を調べることで、D1 および D2 受容体を介するドーパミン神経伝達がそれぞれ、パーキンソン病症状の発現にどのように関与するのかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

今年度は、D1 受容体の発現は正常で D2 受容体の発現が on/off 可能な D2 受容体ノックダウンマウスの作製を進めた。D2 受容体ノックダウンマウスの作製を待つ間、比較のために D2 受容体ノックアウトマウスの神経活動の記録・解析を行った。

マウスに十分なハンドリングを行い、実験環境に馴化させた後、ケタミン (100 mg/kg)・キシラジン (2-5 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下において手術を行い、頭部固定器具をマウスの頭蓋骨に装着した。また、大脳皮質運動野に刺激電極を埋め込み留置した。これらの手術から数日後、マウス頭部を固定器具により無痛的にステレオ装置に固定し、大脳基底核ニューロンの活動を覚醒下で記録した。ドーパミン作動性ニューロンの主な投射先は、大脳基底核の入力部である線条体であり、線条体の直接路ニューロンは D1 受容体を、間接路ニューロンは D2 受容体を発現しているため、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。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て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PIA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PIAレベルの実験室で行った。

C. 研究結果

野生型マウスのGPiおよびGPeニューロンは、約50Hzのランダムな自発発火を示す。D2受容体ノックアウトマウスでは、GPi、GPeニューロンともに発火頻度は野生型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様式が観察された。また、野生型マウスのGPiおよびGPeニューロンは、大脳皮質の電気刺激に対して「早い興奮-抑制-遅い興奮」という3相性の応答を示す。D2受容体ノックアウトマウスのGPeでは、大脳皮質由来の抑制とそれに続く遅い興奮が有意に増強されていた。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。

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-GPe-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。D2受容体ノックアウトマウスにおいて、抑制と遅い興奮が増強されていたことから、線条体の間接路ニューロンの興奮性が高まっていると考えられる。これらのことから、D2受容体を介する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。GPiで観察された皮質

由来の長い抑制の機序については、GPeからGPiに直接投射があることを考慮すると、著しく増強されたGPeにおける遅い興奮がGPiの活動を強く抑制した可能性が考えられる。

E. 結論

D2受容体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

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、前田宣俊、神保幸弘、佐藤俊哉、藤澤信義、崎村建司、南部篤 (2017.7.2) 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。第32回日本大脳基底核研究会 (愛知)

Toshikuni Sasaoka, Asako Sato, Satomi Chiken, Tadashi Okubo, Manabe Abe, Meiko Kawamura, Satohiro Nakao, Kanako Oda, Seiko Sakai, Yoshitaka Maeba, Yukihiro Jimbo, Minoru Tanaka, Yoshitaka Yamamoto, Toshiya Sato, Nobuyoshi, Fujisawa, Kenji Sakimura Atsushi Nambu (2017.7.20) Elucidation of motor control mechanism using genetically mice harboring tetracycline-regulated expression of D1/D2 dopamine receptors. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (千葉)

Satomi Chiken (2018.1.24) Dopaminergic transmission maintains dynamic activity changes in the basal ganglia to control appropriate movements. Stockholm-Okazaki Workshop on "Multi-scale dynamics of basal ganglia in brain function and dysfunction" (Sweden, Stockholm)

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

新規疼痛関連分子の脳および脊髄後角での神経可塑性における機能の解析

研究代表者 片野 泰代¹⁾
研究分担者 崎村 建司²⁾

1) 関西医科大学医化学 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

慢性疼痛は重大な臨床課題であるにも関わらず、その発症維持を担う関連分子や神経回路の変化の全容は明らかにされていない。申請者は、脊髄後角に焦点を当てた慢性疼痛モデルを用いたプロテオミクス解析から、BEGAIN を関連分子として同定した。しかしながら、これまで BEGAIN の機能や脊髄での分子局在、疼痛回路への関与については報告されてこなかった。本研究では新潟大学で作成された BEGAIN 欠損(BEG-KO)マウスを利用することで、BEGAIN が慢性疼痛に関与する分子であることを明らかにしている。他方、BEGAIN は脊髄後角で介在ニューロンが多く存在する痛みの伝達修飾に重要な領域に局限して発現していることも明らかにした。現在、共同研究で着手しているレポーター/ドライバーマウスを使用することで、アロディニアの発症により形成される脊髄内での神経回路への BEGAIN 欠損の影響についてさらなる解明が期待できる。

A. 研究目的

慢性疼痛や記憶形成には、中枢神経系での可塑的变化が関与し、受容体や、足場蛋白といったシナプス伝達を担う多くの分子の変化、軸索の分岐やスパインの形成といった形態の変化が関わることが知られている。一方で、すべての関連分子については未だ明らかではない。今回申請者は、疼痛の関連分子として同定した BEGAIN が *in vivo* に置いて、疼痛の発症に関与するのか、そしてどのように疼痛回路の形成に影響を与えるかを明らかにすることを目的としておこなった。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

BEGAIN-flox マウスと Cre ドライバーマウスとの交配にて、BEG-KO マウスを作出する。同 KO マウスを陰性対照とし、脊髄後角における免疫染色および生化学的解析をおこない、BEGAIN の脊髄における発現領域を同定する。さらに、野生型および BEG-KO マウスを用いて、神経障害性疼痛モデルの作出と行動解析をおこなう。行動解析では、

von Frey フィラメントを使用し、機械的刺激に対する逃避行動から、刺激に対する感受性を評価し、病態の有無およびその程度について評価する。異常感覚の発症に伴う脊髄後角での神経回路における BEGAIN の関与を明らかにするために、レポーター/ドライバーマウスの作出を行う。

C. 研究結果

BEGAIN は脊髄では運動ニューロンが存在する前角には認められず、感覚ニューロンが存在する後角にのみ発現することが Western blot 法および免疫染色法にて、明らかになった。また BEGAIN の脊髄後角での発現は、主に侵害刺激が入力する領域である Iii-IIIo 層に限定して発現することがわかった。免疫染色における BEGAIN シグナルの特異性は BEG-KO を用いた解析を同時に行うことで達成された。さらに細胞内遠心分画および、マーカー蛋白の抗体を使用することで、BEGAIN がシナプスで発現する蛋白であることも明らかになった。

次に、神経障害性疼痛の1つである Spared nerve injury (SNI)モデルを野生型およびBEG-KOマウスの両方で作成し、その後の異常感覚の発症を von Frey テストで評価した。その結果、野生型ではモデル作成1日後より刺激に対する感受性が亢進し、極めて弱い触覚に対しても逃避行動を示す「アロディニア」を発症していることが確認できた。一方、BEG-KOマウスでも野生型同様にモデル作成1日後から閾値の低下が生じることがわかった。興味深いことに、BEG-KOで認められた閾値は、野生型のそれに比べ有意に高く、末梢神経損傷によって生じたアロディニアの発症を有意に抑制することがわかった。さらに、これらの異常感覚はモデル作成40日後においても継続することがわかった。

BEGAINは脊髄では後角に特異的に発現している一方、脳では海馬に濃縮して発現することも明らかになった。そのことから、海馬においても脊髄の疼痛維持と同様の機能を果たすことで、記憶・学習での神経の可塑的变化に関与する可能性も考えられた。

これらの成果から、BEGAINが脊髄で慢性疼痛の発症維持に関わることを明らかにしたものの、分子としての機能、疼痛形成の回路へのBEGAIN陽性細胞の関与などについて未だ明らかではない。よって、現在共同研究内で、レポーター/ドライバーマウスの作出を継続中である。同マウスを使用することで、BEGAIN陽性細胞を選択的に可視化し、病態依存的な疼痛回路の確立にBEGAIN陽性細胞の活性化や、どのように関与するのかといった解析が実施可能になる。

D. 考察

これまでに我々はBEGAINを脊髄後角のPSD画分で神経障害性疼痛に伴い増加する分子として同定した。BEGAINは、脊髄の疼痛伝達を修飾すると考えられる介在ニューロンが多く、さらに侵害刺激が入力するIIi-IIIo層の限局した発現パターンを示すことから、正常な感覚の伝達から異常感覚として認識されるようになる「異常回路」の形成に関与する可能性が示された。この可能性は、作出したBEG-KOマウスでアロディニアが有意に抑制されたというデータからも支持されると考えた。

E. 結論

BEGAINは脊髄後角において慢性疼痛の発症維持に関与する分子であることがわかった。今後の研究により詳細な脊髄あるいは脳における可塑性の回路形成での役割が明らかになると考えられる。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. 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., and Ito, S. Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury. *eNeuro*, 3(5) e0110-16, 1-18, 10月, 2016年

2. 学会発表

1. 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., and Ito, S. Identification of novel neuropathic pain-related proteins. 第8回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、新潟、2018、2月

2. 片野泰代、福田正史、山崎真弥、阿部学、渡辺雅彦、矢尾育子、奥村宣明、中澤敬信、山本雅、崎村建司、高尾敏文、伊藤誠二、脊髄後角における神経障害性疼痛関連分子BEGAINの同定、Identification and characterization of brain-enriched guanylate kinase-associated protein as a neuropathic pain-related protein in the spinal dorsal horn. 第40回日本神経科学大会、千葉、2017、7月

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

アルツハイマー病の病態におけるタウ C 末端断片の役割の解明

研究代表者 松本 信英¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾

1) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科感染防御学講座免疫学分野

2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

アルツハイマー病・ピック病・進行性核上性麻痺・皮質基底核変性症などの脳では、微小管結合タンパクであるタウが、リン酸化や切断などの翻訳後修飾を受け異常蓄積した病変が共通した特徴として観察されることから、これらの疾患はタウオパチーと総称される。タウの C 末端断片は微小管結合ドメインを含んでおり、全長タウと比較して凝集性が高いことが報告されている。本研究では、ヒト AD 脳の不溶性画分に存在する C 末端断片の質量分析による解析を試みたが、配列の同定に至らなかった。今後標的の濃縮により配列の同定を試みる予定である。また、培養細胞を用いたタウの細胞間伝播モデルを構築し、ミクログリアがタウの伝播にどのように関与するか検討した結果、ミクログリアが伝播を抑制する可能性を見出した。今後は AD 危険因子のノックアウト等を行い、ミクログリアのどのような機能がタウの伝播に影響を与えるか検討する予定である。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) をはじめとするタウオパチーでは、タウタンパク質 (tau) の凝集・伝播が病態に寄与する可能性が指摘されている。研究代表者である松本は野生型ヒト tau を過剰発現するタウオパチーモデルマウス Tg601 において加齢に伴い増加するタウ C 末端断片 (Tau-CTF) を見出し、Tau-CTF が全長タウ (Tau-FL) と比較して極めて高い凝集性・伝播能を示すことを報告した (Mastumoto et al, Hum. Mol. Genet. 2015)。一方で、tau 病理の周囲には活性化したミクログリアの集積が観察されることから、Tau-CTF を含む病的凝集タウが MG に作用することで tau の伝播や神経炎症を促進し病態進行に寄与する可能性が考えられる。本研究では、ヒト AD 脳に含まれる Tau-CTF のアミノ酸配列を決定すること、さらにヒト AD 脳由来の Tau-CTF を含む病的凝集 tau が、ミクログリアを介して病態に寄与するかどうか明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. ヒト AD 脳のホモジネートからサルコシル不溶性画分を調製し、SDS-PAGE 電気泳動により分離した。tau の C 末端 (404-441) を認識する抗体 T46 を用いたウエスタンブロッティングにより Tau-CTF に相当するバンドのサイズを推定しゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内消化を行い質量分析による解析を行った。
2. ヒト神経芽腫由来細胞株である SH-SY5Y を用いた細胞内 tau 蓄積モデルを用いて、不溶性タウが細胞間伝播するかどうかを検討した。また、ミクログリアの細胞株である BV-2 との共培養が、tau の細胞内蓄積に与える影響を検討した。

C. 研究結果

1. 不溶性 tau の含有量に部位による違いがあ

るかどうかを確認するため、同一の AD 患者由来の前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉からサルコシル不溶性画分を調製し、ウエスタンブロッティングによる比較を行った結果、不溶性 tau の含有量は側頭葉において最も多いことがわかった。以後はこの側頭葉由来のサンプルを用いて解析を行った。tau の C 末端断片に相当すると推測される分子量 25kDa 前後のバンドを質量分析に供した結果、GFAP、CAMKII 由来のペプチドが検出されたが、tau 由来のペプチドは検出できなかった。

2. tau を過剰発現させた SH-SY5Y に不溶性 tau を導入することによって tau の細胞内蓄積を誘導したドナー SH-SY5Y と、EGFP-tau を過剰発現させたレシピエント SH-SY5Y との共培養を行った結果、レシピエント SH-SY5Y のサルコシル不溶性画分に EGFP-tau が検出された。また、BV-2 との共培養により、ドナー SH-SY5Y およびレシピエント SH-SY5Y における不溶性 tau の細胞内蓄積がともに減少した。

D. 考察

アルツハイマー病、ピック病、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症などのタウオパチーでは、サルコシル不溶性の病的 tau が検出される。いずれの疾患においても、tau の C 末端断片が検出されており、これらの C 末端断片は自己凝集に必要である微小管重合ドメインを含むことから、凝集性・伝播能の亢進を通じてタウオパチー病態を促進する可能性が考えられる。本研究では、有用な培養細胞モデルおよび動物モデルを構築することを目的として、質量分析により実際のヒト AD 脳に含まれる tau C 末端断片の同定を試みたが、現時点で tau 由来のペプチドを検出することが出来なかった。今後は、免疫沈降による標的の濃縮を行い、配列の同定を進める予定である。

一方で、tau の細胞間伝播にミクログリアが関与する可能性が考えられることから、SH-SY5Y を用いた細胞間伝播モデルと、BV-2 との混合培養モデルを構築した。試験管内で重合させた組換え tau を導入し tau の細胞内蓄積を誘導したドナー SH-SY5Y を、EGFP-tau を発現させたレシピエント SH-SY5Y と共培養することで、レシピエント SH-SY5Y 細胞内に不溶性の EGFP-tau が形成された

ことから、ドナー SH-SY5Y で形成された不溶性 tau が何らかの形でレシピエント SH-SY5Y に伝播し、新たに EGFP-tau の細胞内蓄積を誘導したと考えられた。さらに、この細胞間伝播モデルに BV-2 を加えた結果、レシピエント SH-SY5Y における不溶性 EGFP-tau の細胞内蓄積が減少したことから、BV-2 がドナー細胞から放出された不溶性 tau を貪食するなどして細胞間伝播を抑制する可能性が示唆された。今後は、伝播する tau の追跡を通じて、ミクログリアがどのように tau の伝播に関与しているのか検討する予定である。また、この伝播モデルにおいて、ミクログリアの機能が変化するかどうかを、TNF- α や IL-6 といった炎症性サイトカインの産生や CD68 等の活性化マーカーの発現を指標として検討したい。さらに、ヒト AD 脳由来の不溶性 tau を用いた場合も同様の結果を再現できるかどうか検討する予定である。

E. 結論

1. 今回、ヒト AD 脳に含まれる C 末端断片の配列同定には至らなかった。免疫沈降等によるターゲットの濃縮が必要と考えられる。
2. 培養細胞を用いた tau の細胞間伝播モデルを構築した。また、tau の細胞間伝播がミクログリアにより抑制される可能性が示唆された。このモデルを用いることで、例えば TREM2 等の AD 危険因子が伝播に与える影響や、薬剤の効果などを試験管内で簡便に検討できると考えられる。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

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

マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析

研究代表者 岩里 琢治^{1), 2)}

研究分担者 笹岡 俊邦³⁾

研究分担者 香取 将太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

げっ歯類の体性感覚系では、動物の生後にヒゲからの入力を受けることによって回路の精緻化がおきる。その仕組みを理解することは、ヒトの子供期の脳発達およびその異常である発達障害を理解する上でも重要である。われわれはこれまでに、マウス遺伝学の手法を活用することにより、大脳皮質における神経回路精緻化の分子メカニズム、また、視床における分子メカニズムの解明に取り組んできた。本課題では、最も解析の遅れている脳幹における分子メカニズムに焦点を絞り、その理解を目指している。

A. 研究目的

哺乳類の大脳皮質感覚野の神経回路が正常に発達するためには、誕生後の一定期間に、感覚器からの入力や自発活動など神経活動を受ける中で微調整されることが必要である。モデル動物を用いてその仕組みを理解することは、ヒトの脳が子供期に環境の影響を受けながら発達する機構を理解する上でも重要である。ヒゲ感覚のための特殊な神経回路構造であるパレル(およびパレロイド、パレレット)をもつマウス体性感覚系はそのための優れたモデルである。マウス体性感覚系の回路発達は脳幹、視床、大脳皮質の各レベルで起きるが、我々を含む多くの研究室が、これまでに大脳皮質、視床における分子機構の解明に取り組んできた。一方、脳幹における分子機構解明は大きく遅れている。本課題では脳幹におけるメカニズムの解明に取り組む。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

体性感覚系の大脳皮質や視床での研究によって、回路発達における重要な働きが示唆される分子が多

数同定されてきたが、それらの中のいくつかは脳幹でも重要な働きをすることが期待される。本研究はカルシウムシグナルに特に着目して行っている。標的遺伝子が 2 個の loxP 配列で挟まれた構造のゲノムをもつ flox マウス、および、発達期の脳幹で発現するプロモーターを利用し Cre 組換え酵素遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを入手した。そして、それらを交配することにより条件的ノックアウトマウスを複製し、組織学的手法を中心に解析を行った。

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

カルシウムシグナルにおいて重要な機能を担う分

子が脳幹においてどのような働きをするかをみるために、脳幹特異的ノックアウトマウスを作製した。具体的には、標的遺伝子の flox マウス、および、脳幹特異的に Cre 組み換え酵素を発現するトランスジェニックマウスを入手し交配した。脳幹特異的 Cre マウスとしては、2 種類のマウスが作製されているが、その両者を手に入れ、それぞれを用いて条件的ノックアウトマウスを作製した。新生仔期の条件的ノックアウトマウスから脳を摘出、切片を作製し、組織学的解析によりヒゲ感覚地図の解析を行った。解析は脳幹だけでなく、視床、大脳皮質のレベルでも行い、脳幹での遺伝子欠損が視床や大脳皮質での回路精緻化にどのような影響を与えるかの解析も行った。脳幹から視床への投射パターンに関しては、Cre-loxP 組換え依存的に軸索で GFP を発現するレポーターマウスを入手し活用した。視床から大脳皮質への投射パターンの解析には視床皮質軸索に GFP を発現するマウスを用いた。

D. 考察

Cre マウスとして 2 種類をそれぞれ用いて、条件的ノックアウトマウスを作製し、解析したが、これまでの解析では期待通りの効率で組換えが起きていないという印象を得ている。この問題を解決できるアイデアがあるので、今後それを試す。

E. 結論

一連の解析は、遺伝子変異マウスの作出とその神経回路異常の解析に関して、豊富な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。

なお、平成 28 年度まで 2 年半にわたり新潟大学脳研究所「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」共同利用・共同研究としてご支援いただいた課題に関しては、2017 年に Journal of Neuroscience 誌にて発表することができました (Katori et al., 2017)。ご支援に感謝いたします。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Katori, S., Noguchi-Katori, Y., Itohara, S., Iwasato, T. Spinal RacGAP α -chimaerin is required to establish

the midline barrier for proper corticospinal axon guidance. *J Neurosci.* **37**(32), 7682-99. (2017)

Katori, S., Noguchi-Katori, Y., Okayama, A., Kawamura, Y., Luo, W., Sakimura, K., Hirabayashi, T., Iwasato, T., Yagi, T. Protocadherin- α C2 is required for diffuse projections of serotonergic axons. *Sci Rep.* **7**(1), 15908. (2017)

Mizuno, H., Ikezoe, K., Nakazawa, S., Sato, T., Kitamura, K., Iwasato, T. Patchwork-type spontaneous activity in neonatal barrel cortex layer 4 transmitted via thalamocortical projections. *Cell Rep.* **22**(1), 123-135. (2018)

2. 学会発表

H. Mizuno., K. Ikezoe., T. Sato., K. Kitamura., T. Iwasato.

新生仔の体性感覚野第 4 層に存在するバレル特異的パッチワーク発火 Barrel-confined patchwork activity of the somatosensory layer 4 neurons in neonates.

第 40 回日本神経科学大会 2017 年 7 月 20-23 日 (千葉) ポスター

S. Katori., Y. Noguchi-Katori., S. Itohara., T. Iwasato.

Midline barrier for axon guidance is protected by EphA4- α -chimaerin signaling in the spinal cord.

第 40 回日本神経科学大会 2017 年 7 月 20-23 日, 若手研究者国際交流会 2017 年 7 月 19 日 (千葉) ポスター

S. Nakazawa., T. Iwasato.

新生仔期のバレル皮質第 4 層における樹状突起再編の長期 in vivo イメージング Three-day-long in vivo imaging of dendritic reorganization in barrel cortex layer 4 in neonates.

第 40 回日本神経科学大会 2017 年 7 月 20-23 日 (千葉) 口演

主催:Neuroscience Program of Academia Sinica

岩里琢治 (招待講演)

マウス大脳皮質の生後発達期神経回路リモデリング
第5回「幸福脳」研究会(名古屋大学・慶応大学合同
ミーティング) 2017年8月29日-8月30日(修善
寺)

共催:名古屋大学 環境医学研究所 神経系分野2、
慶応大学 医学部 精神・神経科学

岩里琢治 (招待講演)

マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の
解析

新潟大学脳研究所共同研究合同セミナー 2017年
12月16日(新潟)

主催:新潟大学脳研究所

岩里琢治 (招待講演)

生後発達期の脳皮質リモデリング
生理学研究所研究会「大脳皮質回路の機能原理を
探る」2017年9月7日-9月8日(愛知県岡崎市)
主催:生理学研究所

岩里琢治 (招待講演)

マウス大脳皮質の生後発達期神経回路リモデリング
第12回「認識と形成」研究会 2017年9月23日-9
月-24日 熊本大学 発生医学研究所(熊本)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

H. Mizuno., K. Ikezoe., T. Sato., K. Kitamura., T.
Iwasato.

Patchwork-type spontaneous activity in layer 4
of neonatal barrel cortex transferred via
thalamocortical projections

Society for Neuroscience 2017, 11月11日-15日,
(Washington, DC) ポスター

S. Nakazawa., H. Mizuno., T. Iwasato.

Three-day-long in vivo imaging of dendritic
reorganization in barrel cortex layer 4 in
neonates

Society for Neuroscience 2017, 11月11日-15日,
(Washington, DC) ポスター

岩里琢治 (招待講演)

Unveiling the mechanisms of neuronal circuit
refinement in the neonatal mouse barrel Cortex
Academia Sinica Symposium, 2017年11月27
日, (台湾)

糖脂質代謝異常から紐解くアルツハイマー病の病態解明

研究代表者 里 直行¹⁾

研究分担者 篠原充¹⁾ 福森亮雄¹⁾ 池内 健²⁾ 宮下哲典²⁾

- 1) 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター 分子基盤研究部
2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

本研究では糖尿病や脂質異常に関連する因子がアルツハイマー病 (AD) の発症を促進する分子機序を明らかにすることにより、次世代認知症薬の標的分子を同定することを目的とする。その候補としてアルツハイマー病の最大の危険因子でありコレステロール輸送蛋白である APOE や、糖尿病合併 AD モデルマウスである APPob/ob マウスで発現が増加していたラノステロール・シンテースを含めた脂質制御因子の、神経変性や AD 病理、認知機能、加齢に対する役割を検証し、池内健教授らが AD で低下していることを見出したデスモステロールとの関連性も検討する。

A. 研究目的

高齢化社会においてアルツハイマー病 (AD) は根本的治療薬がないことから解決が迫られている重要な課題である。AD に対する根本的治療薬は老人斑の主要構成成分である A β を標的とした治療薬が開発の途上にある。AD の大部分は孤発性であるが、その遺伝子的に最大の危険因子として APOE があるとともに、AD には糖尿病や脂質異常といった後天的危険因子も知られている。本研究では、APOE や、糖尿病、脂質異常が AD の発症を促進する分子機序を明らかにすることにより、次世代認知症薬の標的分子を同定することを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

APOE や糖尿病、脂質異常、動物モデルやヒト臨床データ、病理データを適宜組合せ、解析することで、それら因子のアルツハイマー病や神経変性、加齢性変化に対する影響を検討する。さらにそれらを繋ぐ候補因子として糖尿病合

併 AD モデルマウスである APPob/ob マウスで発現が増加していたラノステロール・シンテースのゲノム編集マウスの作成も行う。また池内健教授らが AD で低下していることを見出したデスモステロールとの関連性も検討する。

C. 研究結果

① 糖尿病合併アルツハイマー病マウスモデルの検討から糖尿病はアルツハイマー病を促進するのみならず、寿命も短くさせることが判明した。またヒトの臨床データからもそのような効果が支持された。さらに動物モデルの解析から、両疾患共存化で脳内で炎症系のマーカーが増加することが確認された。

② APOE や糖尿病、脂質異常のアルツハイマー病に対する役割を、我々のこれまでの研究や他機関の報告も踏まえ、総括し、報告した。

D. 考察

研究期間が 1 年と短く、原著化までの十分な

成果までは得られていないが、それを踏まえても興味深いデータが得られた。今後もこれら成果をさらに発展させるながら、APOE や脂質制御因子の動物モデルの導入、解析を進め、デスモステロールとの関連性を理解し、アルツハイマー病の発症機序の解明に迫りたいと考える。

E. 結論

病糖脂質代謝からアルツハイマー病を検討するアプローチは有用である。今後も研究を続け、疾患の克服に貢献していきたいと考える。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Mitsuru Shinohara & Naoyuki Sato, “The roles of apolipoprotein E, lipids and glucose in the pathogenesis of Alzheimer’ s disease” , Advances in Experimental Medicine and Biology (Book, Springer Nature), accepted, 2018 April

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

***Cacnalg* 変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態の解明**

研究代表者 土井 宏¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾
研究分担者 田中 章景¹⁾

- 1) 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

常染色体優性脊髄小脳失調症 42 型 (SCA42) 家系において同定された *CACNA1G* の R1715H 変異 (マウス *Cacnalg* R1723H に相当) をゲノム編集により導入したノックインマウスを作成・解析した。その結果、20 週齢以降において、ヘテロおよびホモノックインマウスともに Rotarod test で緩徐進行性の運動機能障害を認めた。一方で、Wire hang test は異常を認めず、筋力低下ではなく失調による運動機能障害と考えられた。病理学的には 48 週齢においてプルキンエ細胞の脱落を認め、電気生理学的には小脳急性スライスを用いたプルキンエ細胞のパッチクランプにおいて電位電圧曲線の偏位を認めた。ヒトにおける表現型として、20~30 台発症で、非常に緩徐な小脳失調症状の進行を認めることから、これに合致する表現型と考え、良好な動物モデルの作成に成功したと考えられる。

A. 研究目的

常染色体優性脊髄小脳失調症 42 型 (SCA42) 家系において同定された *CACNA1G* (T 型電位依存性カルシウムチャネル $Ca_v3.1$ をコード) の R1715H 変異 (マウス *Cacnalg* R1723H に相当) をゲノム編集により導入したノックインマウス (*Cacnalg*_R1723H_KI マウス) を作成し、表現型を多方面から解析することで、SCA42 の神経変性機序を明らかにする。また、今後 T 型電位依存性カルシウムチャネル機能修飾薬等を用いた疾患修飾療法を行うことを視野に、SCA42 疾患モデルを確立する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

***Cacnalg*_R1723H_KI マウスの作成**

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によって、マウス *Cacnalg* に SCA42 原因変異であるヒト

CACNA1G の R1715H に相当する R1723H 変異を導入したノックインマウスを作成し、ホモ接合体を中心に解析した。マウス実験については横浜市立大学動物実験委員会の承認 (F-A-16-043) を得て行った。

***Cacnalg*_R1723H_KI マウスの行動解析**

ヘテロおよびホモノックインマウスの行動解析に際しては Clasping test、Wire hang test、Rotarod test、Footprint test など運動機能を中心とした解析を 50 週齢を目途に行った。

***Cacnalg*_R1723H_KI マウスの電気生理学的・病理学的解析**

野生型、ホモノックインマウスを対象に解析を行った。病理学的解析に際しては通常形態学的評価に加えてプルキンエ細胞数の評価、抗 GFAP 抗

体を用いたアストロサイトの形態学的異常の評価、Klüver-Barrera 染色によるミエリンの評価など、多方面から解析した。また、それぞれのマウス小脳から作成した急性スライスを用いて、プルキンエ細胞のパッチクランプを行った。また、生体マウスからのプルキンエ細胞の電気活動記録を行い、変異がもたらす電氣的活動の変化を解析する。

C. 研究結果

***Cacna1g_R1723H_KI* マウスの行動解析・モデルマウスとしての確立**

SCA42 原因変異 R1715H と相同の変異を導入した *Cacna1g_R1723H_KI* マウスの作成は完了し、ヘテロノックイン、ホモノックインマウスを得た。本年度は Clasp test、Wire hang test、Rotarod test、Footprint test など運動機能を中心に行動解析を 50 週齢まで行った。その結果、20 週齢の時点でヘテロノックインマウス、ホモノックインマウスともに Rotarod test において野生型に比較し、軽度な進行性の運動機能の低下を認め、その後緩徐進行性に悪化した。その他のテストでは明らかな異常を認めなかった。

***Cacna1g_R1723H_KI* マウスにおける神経変性**

病理学的解析に際しては通常形態学的評価に加えて、神経細胞数の評価、GFAP 染色を用いたアストロサイトの形態学的異常の評価、抗 Ca_v3.1 抗体を用いた免疫染色など多角的な病理学的解析を行った結果、48 週齢のホモノックインマウスで分子層の菲薄化、小脳プルキンエ細胞の脱落、反応性アストロサイトの増加が確認された。

***Cacna1g_R1723H_KI* マウスにおける電気生理学的異常**

野生型およびホモノックインマウスの急性スライスを用いたプルキンエ細胞の電気生理学的解析では、電位電圧曲線の右方へのシフト、rebound firing の減少が認められた。また生体からのプルキンエ細胞活動記録では自発的な complex spike の発火頻度の異常が認められた。

D. 考察

本研究で作成した *Cacna1g_R1723H_KI* ヘテロノ

ックイン、ホモノックインマウスともに Rotarod test において緩徐進行性の運動機能の低下を認めた。一方、Wire hang test では異常を認めなかったため、筋力低下は来していないと考えられ、本マウスモデルで見られた運動機能障害は失調を反映していると考えられた。ヒトにおける表現型としては、20~30 台発症で非常に緩徐な小脳失調症状の進行を認めることから、これに合致する表現型と考え、良好な動物モデルの作成に成功したと考えられる。また、48 週齢でプルキンエ細胞脱落が明らかとなり、病理学的にも SCA42 の所見を再現することができた。

興味深いことに、*Cacna1g_R1723H_KI* ホモノックインマウスは 20 週齢で病理学的にプルキンエ細胞脱落は認められないにもかかわらず、失調症状が発症していた。これは単純なプルキンエ細胞脱落が失調の原因でない可能性を示唆する結果であった。本研究で確認されたプルキンエ細胞の電気生理学的異常はプルキンエ細胞変性前の機能障害を反映しており、この機能障害が失調症状に寄与している可能性が考えられる。

E. 結論

SCA42 の表現型を再現するマウスの作成に成功した。今後の治療法開発に重要なモデルとなると考えられる。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

MTCL1 plays an essential role in maintaining Purkinje neuron axon initial segment. / Satake T, Yamashita K, Hayashi K, Miyatake S, Tamura-Nakano M, Doi H, Furuta Y, Shioi G, Miura E, Takeo YH, Yoshida K, Yahikozawa H., Matsumoto N, Yuzaki M, Suzuki A. - EMBO J. 36(9):1227-1242, 2017.

Matrin 3 is a component of neuronal cytoplasmic inclusions of motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Tada M, Doi H, Koyano S, Kubota S, Fukai R, Hashiguchi S, Hiramata N, Kawamoto Y, Kunii M, Tanaka K, Takahashi K, Ogawa Y, Iwata R, Yamanaka S, Takeuchi H, Tanaka F. Am J Pathol 188(2):507-514, 2018.

Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with *ERCCA* mutations. Doi H, Koyano S, Miyatake S, Nakajima S, Nakazawa Y, Kunii M, Katsumoto A, Oda K, Yamaguchi Y, Fukai R,

Ikeda S, Kato R, Ogata K, Kubota S, Hayashi N, Takahashi K, Tada M, Tanaka K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake, Saitsu H, Ogi T, Aihara M, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F. J Hum Genet 63(4):417-423, 2018.

White matter hyperintensities on MRI in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease with dementia, and Alzheimer's disease. Joki H, Higashiyama Y, Nakae Y, Kugimoto C, Doi H, Kimura K, Kishida H, Ueda N, Nakano T, Takahashi T, Koyano S, Takeuchi H, Tanaka F. J Neurol Sci. 15:385:99-104, 2018.

Cerebrospinal fluid level of Nogo receptor 1 antagonist lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) correlates inversely with the extent of neuroinflammation. / Takahashi K, Takeuchi H, Kurihara Y, Doi H, Kunii M, Tanaka K, Nakamura H, Fukai R, Tomita-Katsumoto A, Tada M, Higashiyama Y, Joki H, Koyano S, Takei K, Tanaka F. (4/15) J Neuroinflammation. 17;15(1):46), 2018

2. 学会発表

Doi H, Koyano S, Kunii M, Miyatake S, Nakajima S, Hashiguchi S, Ikeda S, Kubota S, Hiramana N, Ogawa Y, Takahashi K, Tada M, Tanaka K, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F. Exome analysis of autosomal recessive or sporadic cases of cerebellar ataxia and spastic paraplegia. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, 2017, 9.

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。

視床特殊核におけるグルタミン酸受容体 GluD1 による入力選択的回路形成機構

研究代表者 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院 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

視床外側膝状体は視覚の中継核として、網膜で捉えた視覚情報を視覚野に伝達する。視床後内側腹側核は体性感覚路の中継核であり、頭頸部の温痛覚や触圧覚を体性感覚野に伝達する。これらの視床特殊核は、末梢からの感覚情報を上行性に受け取るだけでなく、大脳皮質からの下行性投射や、モノアミンやアセチルコリンなどの調節系投射も受けとる。本研究では、多様な入力を受ける視床特殊核におけるグルタミン酸受容体 GluD1 のシナプス発現と回路形成における役割を検討した。平成 29 年度の共同利用・共同研究の推進により、GluD1 の入力選択的なシナプス発現を明らかにすることができた。具体的には、外側膝状体では 2 型小胞膜グルタミン酸輸送体と小胞膜アセチルコリン輸送体を共発現する特殊な入力線維との間のシナプスに、後内側腹側核では 2 型小胞膜グルタミン酸輸送体を単独発現する三叉神経核からの上行性投射との間のシナプスに発現していた。

A. 研究目的

グルタミン酸は、脳における興奮性シナプス伝達の主要な伝達物質で、神経情報の生成と伝達、脳の可塑性、シナプス回路発達などに重要な役割を果たす。これを伝えるグルタミン酸受容体の中には、グルタミン酸との結合能を失いシナプス伝達機能を失ってしまった不思議な分子ファミリー (GluD ファミリー) が存在する。これまで小脳プルキンエ細胞に豊富な GluD2 についての研究から、この分子がシナプスの構造的および機能的結合性を制御する重要な分子であり、その遺伝子異常により小脳性の運動障害が起こることを遺伝子変異を有するヒト家系やマウスの研究から明らかになっている。しかし、その類縁分子である GluD1 については、シナプス発現から分子機能に至るまで、長い間不明な分子である。2014 年、私達は GluD1 が成体脳に広く発現する分子であり、小脳においては入力選択的な回路発現を示す分子であることを見出した。

本研究プロジェクトでは、新潟大学において作成された GluD1 欠損マウスを共同研究として利用することにより、感覚情報の中継核である視床特殊核におけるシナプス回路形成制御における役割を、GluD1 欠損マウスの形態学的解析を通して解明することを目的として行なった。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

マウス視床特殊核における GluD1 の細胞発現を、長鎖リボプローブを用いた高感度蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した。さらに、GluD1 のシナプス発現を蛍光抗体法および免疫電顕法により解析した。

C. 研究結果

in situ ハイブリダイゼーションを用いて発現細胞種を検討した結果、視覚の中継核である視床外側膝状体 (DLG) において、GluD1 mRNA は 1 型小胞膜グルタミン酸輸送体 (VGluT1) mRNA およ

び VGluT2 mRNA を共発現するニューロンに選択的な発現が認められた。次に、タンパク質レベルでの GluD1 の発現を光顕および電顕にて解析したところ、GluD1 は DLG ニューロンと VGluT2 および小胞膜アセチルコリン輸送体 (VACht) 陽性終末との間に形成される非対称性シナプスのシナプス後膜に局在していた。現在神経トレーサーを用いて、VGluT2 陽性・VACht 陽性終末の由来を検討している。

一方、体性感覚の中継核である後内側腹側核 (VPM) は三叉神経を経由する体性感覚情報を処理する特殊中継核の 1 つである。この神経核には、三叉神経核からの上行性投射に加え、大脳皮質からの下行性投射が到来する。GluD1 は VGluT2 陽性の上行性投射線維との間のシナプスに局在することを突き止めた。

今後、このような入力選択的なシナプス発現が、これらの神経回路網形成にどのような役割を果たしているかを、GluD1 欠損マウスを用いて検討する予定である。

D. 考察

小脳において、GluD2 はプルキンエ細胞と平行線維の間のシナプスに選択的に発現し、そのシナプス形成に重要な役割を果たしている。一方、GluD1 は小脳分子層の介在ニューロンと平行線維の間のシナプスに選択的に発現し、そのシナプス形成に重要な役割を果たしている。今回、小脳外領域において世界で初めて GluD1 の細胞発現とシナプス発現を解析した。その結果、GluD1 は、小脳と同様に、2 種類の視床特殊核の細胞選択的かつ入力選択的な発現をする分子であることを明らかにした。平成 30 年度の継続研究により、この分子のシナプス回路形成への関与に迫りたいと考えている。

E. 結論

この共同研究プロジェクトを通して、視床特殊核において GluD1 は特定の入力線維との間のシナプスに発現する分子であることが明らかとなった。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

マウス視床後腹側核におけるグルタミン酸受容体 GluD1 とそのリガンドである Cbln1 の機能解析：第 122 回日本解剖学会全国学術集会、2017 年 3 月、長崎

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

認知症病態における海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide:HCNP) 発現メカニズムの解析

研究代表者 松川 則之¹⁾

研究分担者 池内 健²⁾、原 範和²⁾、水野 将行¹⁾

1) 名古屋市立大学 神経内科 2) 新潟大学・脳研究所

研究要旨

アルツハイマー病 (AD) 脳では前脳基底野コリン作動性神経機能障害が確認され、その賦活化によって認知機能・意欲の改善をすることが臨床的にも確認されている。しかしながら、ヒト脳内における前脳基底野コリン作動性神経機能の調節メカニズムは不明な点が多い。我々はこれまでに、海馬可溶性成分に前脳基底野コリン作動性神経のアセチルコリン産生を誘導するペプチド (HCNP) を発見し、その生理機能を報告してきた。また、アルツハイマー病海馬において早期から発現が低下することを報告した。現在遺伝子改変動物 (KOマウス) においても、認知症様行動障害が確認されてきている (未報告)。HCNP 発現メカニズムおよびアルツハイマー病を始めとする認知症における発現低下の機序解明を目指す。

A. 研究目的

平成 29 年度においては、新潟大学脳研究所に蓄積されたアルツハイマー病脳における HCNP 遺伝子発現量を検討する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

患者もしくは家族同意のもとに、新潟大学脳研究所に蓄積されたアルツハイマー病脳における網羅的遺伝子発現量解析を行い、HCNP に焦点を絞り脳内発現量を非アルツハイマー病脳と比較した。

C. 研究結果

剖検脳を用いた遺伝子発現の検討では、前頭葉においてアルツハイマー病の病理変化進行 (Braak stage) に従い発現低下している傾向が認められた。

D. 考察

これまでに我々が他施設での病理脳を用いて、In

situ hybridization および Northern blot 法によりアルツハイマー病脳内において確認した HCNP 遺伝子発現低下の妥当性が確認された。更に、今回の検討では病理変化 (Braak stage) 進行に従い進行することが確認された。

E. 結論

HCNP 遺伝子発現は、アルツハイマー病脳にて減少するが、そのメカニズムは不明である。最近我々は、動物モデルを用いて HCNP 強発現は、アミロイドオリゴマーによる海馬神経抑制を阻止できることを報告した。HCNP 発現低下の機序解明は、認知予備能のメカニズム解明になるかもしれない。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

該当するものではありません

2. 学会発表

該当するものではありません

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当するものではありません

2. 実用新案登録

該当するものではありません

神経変性疾患における NAK α 3 神経細胞の機能障害と細胞死機構の解明

研究代表者 星 美奈子¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾

1) 神戸医療産業都市推進機構（旧：先端医療振興財団） 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

研究代表者である星は、柿田博士との長年の共同研究により、アルツハイマー病患者脳から神経細胞死活性を持つ A β 集合体「アミロスフェロイド (ASPD)」の単離に初めて成功し (Noguchi *et al.* JBC2009)、ASPD は神経細胞の生存と機能に必須な Na, K-ATPase ポンプの α 3 サブユニット (NAK α 3) に特異的に結合することで細胞死を誘導するという全く新たな神経細胞死メカニズムを世界に提示した (Ohnishi *et al.* PNAS2015)。

NAK α 3 の活性阻害による神経細胞死は、その後、パーキンソン病や ALS においても相次いで報告され (右図)、星らの発見した細胞死メカニズムが神経変性疾患に共通な経路であることが解ってきた。本研究では、実際に各種神経変性疾患の患者脳及び正常脳において NAK α 3 神経細胞の分布や発現を解析し、ヒト脳における NAK α 3 神経細胞の生理的機能と病態における関与を検証したい。

A. 研究目的

神経細胞死がアルツハイマー病の臨床症状と最も相関することは ADNI でも確認をされたが、神経細胞死の原因及び機構は殆ど解明されていなかった。我々は、新潟大学脳研究所より剖検脳の供与を受けることで、世界で初めてアルツハイマー病患者脳より神経毒性を持つ球状の A β 集合体 = Amylospheroid (以下、ASPD) の単離に成功し (Noguchi *et al.* JBC2009)、さらに ASPD が神経細胞の生存と機能に必須な Na, K-ATPase ポンプの α 3 サブユニット (NAK α 3) に結合することでそのポンプ活性を阻害し、成熟神経に細胞死を誘導することを見出した (Ohnishi *et al.* PNAS2015)。上記のとおり、過去の共同研究により、我々は原因物質の非常に有力な候補を示し、なぜ成熟神経細胞死が起きるかについてもアルツハイマー病の病態を非常に良く説明する機構を明らかにすることが出来た。さらに、ASPD に結合するペプチド (ASPD 結合ペプチド) を同定しているが、

これは ASPD と ASPD ターゲット分子との結合を阻害し、ASPD の神経細胞死活性を中和することができることがわかり、神経細胞死を直接阻止する治療薬、ASPD を検出する PET プローブ開発という、2つの大きな創薬及び医療技術基盤の可能性を拓いた。この我々が見出した新たな神経細胞死メカニズムが、実は主要な神経変性疾患に共通なメカニズムであることが解ったことは我々に取っても驚きで有り、これまでの新潟大学脳研究所との共同研究成果をさらに発展させアルツハイマー病に留まらず神経変性疾患全体を俯瞰することは是非とも重要で有り、新たなプロジェクトとして共同研究実施することとした。

本研究では、これまでの共同研究により我々がアルツハイマー病で明らかにしてきた NAK α 3 の機能障害による神経細胞死が、本当に他の神経変性疾患で起きているのかを実際に患者脳で検証するとともに、そもそも生理的には NAK α 3 神経

の分布はどうなっているのかを解明することを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

上記目的を達成するために、以下の研究を実施する。

- (1) NAK α 3 に対するラビットモノクローナル抗体を作製し、その反応性を検証する。
- (2) 市販の NAK α 3 抗体、NAK α 1 抗体を用いた固定、染色方法を改善し、再現的かつ明瞭な分布を同定出来る条件を確立する。

アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS など、主な神経変性疾患、さらに、対照群として正常脳において NAK α 3 神経、NAK α 1 神経の分布や発現がどうなっているのかを検証する。並行して、アルツハイマー病においては ASPD の分布なども検証を行う予定である。

C. 研究結果

これまで NAK α 3 ポンプは生存にあまりに必須であるため神経変性疾患に関わるとは思われていなかったが、星らの報告に続いて、パーキンソン病や ALS においても、異常な凝集体が NAK α 3 ポンプに結合することでその活性を阻害し神経細胞死を引き起こすことが相次いで報告されるに至った。しかも、パーキンソン病の原因となる α シヌクレインの凝集体が NAK α 3 ポンプに結合する部位は、ASPD が NAK α 3 ポンプに結合する部位とほぼ同一であることから、我々が発見した神経細胞死のメカニズムは神経変性疾患に共通な経路であることが強く示唆された。

しかしながら、NAK α 3 ポンプについては、NAK α 1 ポンプなどと配列の相同性が高いことから良い抗体がなく、そもそも脳内での生理的な分布が殆ど解析されていないことが解った。また、ASPD が NAK α 3 ポンプに結合しその活性を阻害するメカニズムは、これまで予想されていなかった新たなメカニズムであることが解った。そこで、本研究では実際に各種神経変性疾患の患者脳及び正常脳において NAK α 3 神経細胞の分布や発現を解析し、ヒト脳における NAK α 3 神経細胞の生

理的機能と病態における関与を検証することをめざし、まず、初年度は齧歯類組織を用いて NAK α 3 神経細胞の正常での分布を解明するとともに、ヒトに対する NAK α 3 選択的抗体を確立することを目指した。

初年度の研究により、驚いたことに NAK α 3 選択的な神経細胞群が存在することが解ってきた（投稿準備中）。また、神経細胞種により NAK α 1/NAK α 3 の発現比にはかなり差があることも分かり、それぞれがどう役割分担をしているのか興味深いところである。抗体の作成については、NAK α 1-3 ポンプの立体構造モデルに基づき最も適切な配列を選び、それを大腸菌の発現系を用いて抗原を調製、モノクローナル抗体の作成に着手したところである。年度終わりには抗体が得られる予定であり、これを用いて、次年度以降に解析を試みたいと考えている。

D. 考察

上記のとおり、極めて順調に研究を進めることが出来た。上述した *in situ* の解析結果は、実は国際学会でも非常な驚きをもって受け止められた。NAK α 3 ポンプがどのように関わっているかを明らかにすることは、アルツハイマー病に留まらず各種神経変性疾患の病理診断上も極めて有効である可能性もあり、是非、特異的抗体を確立し、患者脳由来の試料を用いた解析を行いたいと考えている。

E. 結論

上記のとおり、極めて順調に研究を進めることが出来た。上述した *in situ* の解析結果は、実は国際学会でも非常な驚きをもって受け止められた。NAK α 3 ポンプがどのように関わっているかを明らかにすることは、アルツハイマー病に留まらず各種神経変性疾患の病理診断上も極めて有効である可能性もあり、是非、特異的抗体を確立し、患者脳由来の試料を用いた解析を行いたいと考えている。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Distinct cellular distribution of alpha subunit isoforms of Na, K ATPase in the mouse brain. (in preparation)

2. 学会発表

Na⁺, K⁺-ATPase α 3 is a Death Target of Alzheimer Amyloid- β Assembly : What Shall We Do Next towards A Better Understanding of Na⁺, K⁺-ATPase α 3's Role in Health and Disease?, Hoshi, M., 6th Symposium on ATP1A in Disease 2017, Sep 20-21 2017, Tachikawa, Tokyo (招待講演)

Na⁺, K⁺-ATPase α 3 and Alzheimer's Disease, Minako HOSHI, The 15th International Conference on Na,K-ATPase and Related Transport ATPase, Sep 24-30 2017, Otsu, Shiga

ナトリウムポンプとアルツハイマー

星美奈子 (2017年2月21日) 分子細胞生物学研究所セミナー (東京大学) (招待講演)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

Gut microbiota の制御が脳虚血病巣進展に及ぼす影響

研究代表者 西山 康裕¹⁾

研究分担者 五十嵐 博中²⁾

1) 日本医科大学付属病院 神経・脳血管内科 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

日本医科大学動物実験規程に基づき、脳梗塞モデルとして、8週から10週齢の C57BL/6J マウスを用いて、総頸動脈からシリコンコートした塞栓糸を挿入して中大脳動脈内を閉塞し、45分後に塞栓糸を抜去し、急性脳梗塞モデルとした(中大脳動脈閉塞術(MCAO モデル))。Li らの報告(Immunity. 2015;43:527)に基づき抗生物質の混合含有水投与を行う。具体的には Ampicillin(1g/L), Neomycin(1g/L),

Vancomycin(0.5g/L), Metronidazole(0.25g/L)を飲料水に溶解し、14日間投与を続けた。①と同様に脳梗塞モデルで抗生物質投与の有無により、腸管免疫担当細胞を解析した。脳梗塞については、同様に24時間後、72時間後に解析した。TTC 染色を行い、TTC 染色で染色されない梗塞巣を両群間で比較した。このとき、皮質領域、基底核領域については各々測定した。また、同時に脳浮腫率も測定した。さらに、脳虚血前および24時間後、72時間後に神経学的スコアを計測し、両群間で比較した。なお、脳浮腫率は脳浮腫率(%) = [虚血半球-対側半球] × 100 / 対側半球で計算した。

C. 研究結果

1. 平均の飲水量は両群ともに一日 6mL で有意差を認めなかった。
2. 抗生物質投与14日間でマウスの体調に変化は認めず、死亡例はなかった。

3. 虚血後 24 時間の梗塞サイズにおいて、健常側比にて皮質、基底核および全脳いずれにおいても vehicle 群と抗生物質投与群に統計学的有意差を認めなかった（皮質； 32.01 ± 4.73 vs 37.1 ± 7.01 % of control, respectively, n=10）（基底核； 16.53 ± 3.79 vs 20.6 ± 6.14 % of control）（全脳； 48.54 ± 5.70 vs 57.80 ± 12.49 % of control）。脳浮腫率においても、両群間で有意差を認めなかった。

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

D. 考察

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

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

一方、脳梗塞は近年、組織炎症の一つであり、免疫系が大きく関与している可能性があるとの報告が相次いでおり、腸内細菌叢の変化が脳虚血のシステムに関連するかに注目した。抗生物質を

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

E. 結論

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

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

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

学会発表

脳梗塞モデルマウスにおける脳内マクロファージとミクログリアの経時的な性質変化について
第 27 回日本脳循環代謝学会総会 2015 年 10 月、富山

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 の発現部位や病態下での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。健常人および ALS 患者の脊髄において、VGF mRNA の発現が確認された。灰白質と白質の各部位における観察を行ったところ、VGF mRNA は灰白質、中でも脊髄前角及び後角に局在していることが明らかになった。また、neurofilament heavy との共染色により、脊髄前角において VGF mRNA は運動ニューロンに特異的に存在することが明らかになった。さらに、VGF mRNA 陽性運動神経は ALS 病態下で低下していた。以上の結果は ALS 病態における VGF の関与を示唆しており、脊髄における VGF 発現量の低下は運動神経の VGF 産生減少に起因する可能性がある。

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。約 90%の症例は孤発例であり、約 10%が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、過剰発現マウス等が研究に汎用されている。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およびラジカルスカベンジャーのエダラボンが用いられているが、いずれも生存期間の延長作用は十分ではなく、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い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。

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し(2)、ALS モデルマウスの生存期間を延長させた (3)。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。

現在、ヒト脳脊髄液中における VGF の発現量低下が報告されているが、産生細胞等は不明であり、病態下における VGF 発現低下の原因は不明である。本検討では、健常人および ALS 患者の脊髄サンプルを用いて *in situ hybridization* を行い、神経ペプチド VGF の発現細胞や病態下での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。

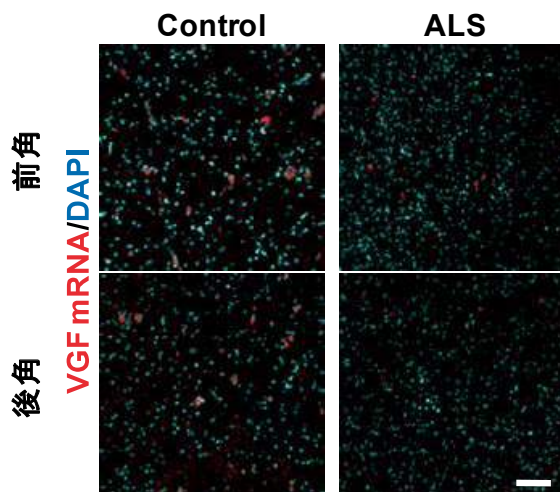
B.研究方法

新潟大学脳研究所において、対照疾患（非神経変性疾患）患者9例、孤発性ALS患者9例および長期生存ALS患者3例の頸髄・胸髄・腰髄のパラフィン切片（厚さ4 μ m）を作製した。各サンプルにおいて、RNAscope®およびhuman VGFプローブを使用し、製品プロトコールに従い *in situ* hybridization を行った。また、neurofilament heavy (NFH)との共染色においては、*in situ* hybridization 終了後、以下の手順で免疫染色を行った。PBSでWash後、10% Goat serumによりブロッキング（室温、1時間）を行った。

PBSでWash後、Mouse anti- NFH antibody (1/1000; SMI-32, Merck Millipore) を4°Cで一晩反応させた。PBSでWash後、Alexa 488-conjugate rabbit anti-mouse IgG (1/1,000; #A11056, Invitrogen) を室温で1時間反応させた。PBSでWash後、DAPI (1/1,000) を室温で15分反応させることで核染色を行った。PBSでWash後、フルオロマウントを用いて封入した。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i; Olympus) を用いて行った。

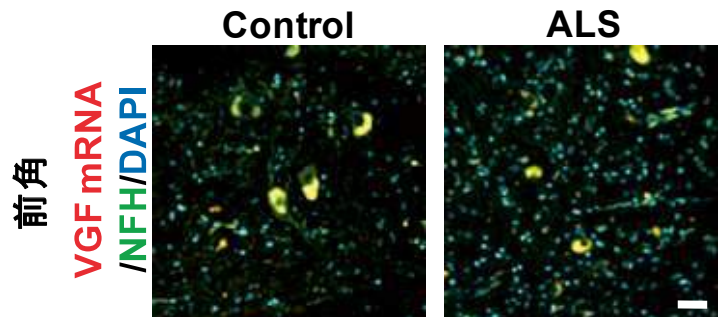
C.研究結果

健常人およびALS患者の脊髄において、VGF mRNAの発現が確認された。灰白質と白質の各部



位における観察を行ったところ、VGF mRNAは脊髄前角及び後角に局在していることが明らかになった。

Scale bar = 100 μ M



また、neurofilament heavyとの共染色により、VGF mRNAは運動ニューロンに特異的に存在することが明らかになった。

Scale bar = 50 μ M

D.考察

今回得られた結果より、脊髄において、VGFは神経細胞で発現しており、ALS病態において、脊髄前角の運動神経細胞において発現が低下することが示唆された。

E.結論

ALS病態下における脳脊髄液中VGFの低下は運動神経細胞由来のVGF供給低下に起因しており、ALSの治療ターゲット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

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

[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 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.

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 30 年 3 月末の時点で、予定症例全例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全く異なる変遷パターンが得られた。また、多系統萎縮症とレビー小体病の合併例の存在、 α -シヌクレインの蓄積による前頭側頭葉変性症と思われる症例の存在など、新たな症例が発見された。

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、グリア細胞の胞体内に形成される封入体 (glial cytoplasmic inclusion, GCI) が疾患特異性の高い病理学的分子マーカーとして認識されている。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した。

近年、 α -シヌクレインに対するプローブを用いた 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。本研究は、その精度や感度の検証に必要な GCI の分子病理マップを剖検脳で確立することを目指しており、MSA に関する臨床面への貢献が期待される。

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 例を検索対象とした。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とした。

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、整理した。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、病理学的解析を行った。

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した (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した。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した。こうして得られた GCI パターンの特徴から、各病型のステージ分類を決定した。

本研究は新潟大学医学部倫理審査委員会(受付番号 2322)ならびに信州大学倫理審査委員会(承認番号 3211)の承認を得ている。本研究に関係す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した。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30年3月末の時点で79例全例のデータを取得し得た。現在、3病型に分けてGCIの変遷パターンを解析中であるが、中間結果でも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、多系統萎縮症とレビー小体病の合併例が2例見出された。また、 α -シヌクレインの蓄積が前頭葉・側頭葉皮質にも多く生じているMSA例が発見された。

D. 考察

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可能性が高い。また、SDSも固有のGCI変遷パターンをとる可能性が高く、症例数をさらに増やしSNDおよびOPCAとの比較検討を行う必要がある。GCIの画像描出技術が発展し臨床応用が実現した場合、本研究成果との対比により、MSAの画像確定診断、病型分類、病期進行度などの判定が可能になるものと期待される。さらに病態に即した薬

物療法が開発された場合、GCI変化を根拠とする治療法の効果判定にも応用が可能となる。

多系統萎縮症とレビー小体病は、通常それぞれが独立して生じるが、本研究ではこの二疾患が共存する症例が2例発見された。二つの病態が互いにとどのような影響を及ぼしているのか興味深い。

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。しかしながら本例では認知症の存在が不明瞭であり、疾患分類上興味深い症例である。

E. 結論

SNDおよびOPCAではそれぞれに固有のGCIの空間的・時間的形成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

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

研究代表者 猪原 匡史¹⁾

研究分担者 齊藤 聡¹⁾ 山本 由美²⁾ 上村 麻衣子³⁾ 小野寺 理⁴⁾

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

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 *HtrA1* 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, *HtrA1* 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, *HtrA1* 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, *HtrA1* 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 *HtrA1* 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することが期待され, 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, *HtrA1* 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 *HtrA1* 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

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。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Uemura MT, Ihara M, Maki T, Nakagomi T, Kaji S, Uemura K, Matsuyama T, Kalaria RN, Kinoshita A, Takahashi R. *Brain Pathol.* (in press).

2. 学会発表

なし。

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。

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, 2)}

研究分担者 伊藤 浩³⁾, 深谷 岳史⁴⁾, 根本 彩香²⁾, 五十嵐 博中⁵⁾

- 1) 福島県立医科大学新医療系学部設置準備室, 2) 福島県立医科大学先端臨床研究センター,
3) 福島県立医科大学放射線医学講座, 4) 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。本年度は、種々の代謝物を極短 TE-MRS を用いて経時的かつ定量的に測定する手法の開発を行い、その性能評価のために反復経頭蓋磁気刺激 (rTMS) を行った際の神経化学的变化を測定して評価した。その結果、神経伝達物質であるグルタミン、グルタミン酸 (Glx) や γ -アミノ酪酸 (GABA) の経時的測定を極短 TE の STEAM 法と LCMoel の組み合わせで行うことで、精度向上および長時間反復測定が可能となることがわかった。rTMS として QPS 法にて抑制性および興奮性の変化を与え、その際の Glx, GABA の濃度などの変化を測定したところ、それぞれに経時・位置特異的な変化を観察でき、AQP-4 PET と組み合わせることの有用性が示唆された。

A. 研究目的

新潟大学が開発しているヒト用 AQP-4 PET 法の確立がなされると、ヒト脳における AQP-4 マッピングが可能となり、様々な脳活動下における水動態が解明できると期待されている。この AQP-4 PET 法を同時収集型 PET/MR 装置を用いて行えば、AQP-4 PET 測定と同時に様々な脳活動を MR を用いて同時収集できるため、真の関連性を評価することが可能となる。そこで、本研究では AQP-4 PET と同時に行うべき MR による脳機能測定およびその解析法を開発することにより、AQP-4 PET 実用時に迅速に同時測定および解析ができる環境を構築することを主目的とした。本年度は、種々の代謝物を極短 TE-MRS を用いて経時的かつ定量的に測定する手法の開発を行った。

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、ミネソタ大学で開発された極短 TE の STEAM シーケンスと定量解析ソフトウェアである LCMoel を組み合わせた脳内代謝物の定量評価手法を確立した。

また、反復経頭蓋磁気刺激法 (rTMS) は非侵襲的にヒト大脳皮質の可塑性を誘導する手法であり、脳機能評価や精神神経疾患への治療に応用されている。単相性 4 連発刺激法 (QPS) は刺激間隔により長期増強/抑圧 (LTP/LTD) 様効果の可塑性変化を誘導でき、それによる経時的な神経化学変化が期待される。そこで、今回はこれらの手法の組み合わせによる神経化学変化の評価を行った。

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。MRSのシーケンスは、共同研究契約に基づいてミネソタ大学から供給されたSTEAM法($TR = 3000\text{ms}$ 、 $TE = 6\text{ms}$)を用い、データ解析はLCModelを用いた使用したbasis-setは、開発者から供給された $TE=0$ 用のものであった。代謝物はN-アセチルアスパラギン酸(NAA)、イノシトール、コリン、グルタミン酸(Glu)、グルタミン(Gln)、 γ アミノ酪酸(GABA)等であり、QPS施行前および施行後65分程度まで経時的に測定した。LCModelの解析結果はQPS測定前の代謝物量で標準化し、対刺激前比として評価した。対象は、本研究内容に関する同意を得た健常人ボランティア5名(男性、 24.6 ± 5.8 歳)であり、事前にfMRIで位置の同定を行った右手に相当する左一次運動野(M1)にQPSを行い、QPS前後で左M1直下と対側M1直下に $20\text{mm} \times 20\text{mm} \times 20\text{mm}$ の立方体の関心領域を設定してMRSを経時的に測定した。QPSは長期増強(LTP)様効果を誘導する5ms.間隔のもの(QPS_{5ms})と、長期抑制(LTD)様効果を誘導する50ms.間隔のもの(QPS_{50ms})を最低でも1週間の期間をおいて施行した。なお、本研究内容は本学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

QPSと同時に測定した運動誘発電位(MEP)振幅は、QPS_{5ms}では増大傾向を示し、QPS_{50ms}では有意に抑圧されていた。MRSで測定したGABA濃度は刺激側M1ではQPS_{5ms}で有意に低下し、QPS_{50ms}では増加傾向にあった。なお、反対側M1ではQPS_{5ms}およびQPS_{50ms}の双方で有意な変化はなかった。MEPの変化とGABAの変化に関しては、有意な逆相関($r^2=0.4249$, $p<0.05$)が見られた。Glx濃度は、刺激側M1ではQPS_{5ms}で低下傾向を示し、QPS_{50ms}では増加傾向を示した。なお、反対側M1ではQPS_{5ms}およびQPS_{50ms}の双方で有意な変化はなかった。NAA濃度では、刺激側M1ではQPS_{5ms}で有意に低下し、QPS_{50ms}では変化はなかった。なお、反対側M1ではQPS_{5ms}およびQPS_{50ms}の双方で有意な変化はなかった。

D. 考察

本検討では、QPS施行後の神経化学的变化を極短TE-MRSとLCModelの組み合わせで評価した。その結果、極短TE-MRSとLCModelの組み合わせ

で非常に精密に神経化学的变化を8分程度の時間分解能で測定できることがわかった。また、QPS刺激を与えた刺激側M1および反対側M1を連続して測定することで、複数部位の定量的・経時的測定が可能であることも示された。本結果から、QPS施行反対側での神経化学的变化に特徴的なものは見られなかったが、施行側でのLTP誘導ではMEPの増大傾向、GABAの有意な低下、Glxの低下傾向、およびNAAの有意な低下が観察された。また、LTD誘導でのMEPの有意な抑圧、GABAの増大傾向、およびGlxの増大傾向が観察された。これらの神経化学的变化は、いずれもQPSによる神経可塑性の誘導と、それに伴う神経化学的变化であることが示唆された。今回開発した手法で経時的な神経化学变化を捉えることが可能であったため、これをAQP-4 PETと同時に測定することで、AQP-4 PETのデータ解釈を神経化学的な観点で支援できることがわかった。これは、同時収集型PET/MR装置を用いた場合の非常に強い利点となり得るものであり、何らかの神経刺激を与えて神経活動を生じさせた場合のAQP-4 PETと機能的MRIおよびMRSの組み合わせ測定が可能であることを示すものであると考えられた。

E. 結論

同時収集型PET/MR装置を用いたAQP-4 PET収集とMRSを用いた代謝物の経時的同時観察が可能であることが示され、今後の脳内アクアポリン動態の評価に同時測定による神経化学的評価を加えることが可能であることが示唆された。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特記すべきことなし

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

- mRNA やマイクロ RNA の発現と関連する SNP を調べるために、SNP6.0 アレイにより測定された SNP データを用い、expression Quantitative Trait Locus (eQTL)解析を行う。これにより SNP と mRNA およびマイクロ RNA の関係を明らかにする。
- mRNA やマイクロ RNA の発現と関連する

CNV を調べるために、SNP6.0 アレイにより測定された SNP データを用い、コピー数が増加または減少している領域を、**plink** ソフトウェアを用いて同定する。コピー数と mRNA およびマイクロ RNA の発現量の相関関係を算出し、CNV と mRNA およびマイクロ RNA の関係を明らかにする。

- 各オミックスデータの関係からネットワーク解析を行い、病態を反映する分子パスウェイやキー遺伝子を同定する。
- 各検体の臨床情報と上記の網羅的な生体分子データを統合し、検索可能な公開データベースを構築する。さらにデータの可視化ツールも準備する。

C. 研究結果

脳研究所・遺伝子機能解析学分野で解析された LOAD 患者を含む 71 例で測定された約 90 万の SNP データと、同患者群における剖検脳・3 脳部位(嗅内皮質、前頭皮質、側頭皮質)で測定された約 15,000 遺伝子(約 88 万プローブセット)の mRNA 発現量を用いて発現量的形質座位(eQTL)解析を行った。eQTL 解析とは SNP の遺伝型によってある遺伝子の発現量が増加するような SNP と遺伝

子の関係を調べる手法である。例えばエンハンサー上に生じた変異は何らかの遺伝子の発現量に影響を与えると考えられ、どの遺伝子が影響を受けるのかを調べるために eQTL 解析は有用である。本解析では SNP データから QC を経て得られた約 60 万の SNP と約 88 万プローブセットの遺伝子発現量のあいだで eQTL 解析を行った。解析は同一染色体上に座位する SNP と遺伝子(プローブセット)のあいだで行われ、これは特に cis-eQTL 解析と呼ばれる。cis-eQTL 解析は 3 脳部位それぞれで全 71 例を解析したほか、コントロール 33 例と LOAD 38 例に層別化したデータセットでの解析も行った。解析の結果、1 脳部位 1 データセットにおいて 8,000 万以上の SNP と遺伝子のあいだ統計量(係数、t 統計量、Wald 検定による p 値)を算出し、総計 7 億 2,000 万以上の関係を網羅的に算出した。

我々は次に統計的に有意な関係を見つけるために FDR 法により p 値の多重検定補正を行った。FDR 補正後 p 値<0.05 となる eQTL を抽出した結果、1 脳部位 1 データセットにおいておよそ 15,000 の SNP と遺伝子の関係を見つけることができた。全 71 例のデータセットで各脳部位において統計的に有意な eQTL 遺伝子群の機能を調べるために遺伝子機能エンリッチメント解析を行ったところ、すべての脳部位に共通して微小管に関連する遺伝子群が観察された。また LOAD 38 例のデータセットでは各脳部位で約 3,000 の関係を見出すことができ、嗅内皮質における遺伝子機能エンリッチメント解析ではユビキチンを介したタンパク分解に関する機能が見つかった。

D. 考察

アルツハイマー病の発症機序の 1 つとして神経原線維変化が知られている。これは神経細胞の微小管をつなぎとめているタウタンパク質が異常にリン酸化されることで互いに結合し凝集体を形成する現象である。これによりタウ蛋白によってつなぎとめられていた微小管は安定に存在できなくなり神経細胞死が引き起こされると考えられている。正常な脳組織では神経原線維変化などの異常なタンパク質凝集体はユビキチン-プロテアソーム系などのタンパク分解経路を通じて分解されるが、AD 患者脳ではこの機能が低下

し異常タンパクの凝集が促進することが報告されている。今回全 71 例のデータセットを用いて行った eQTL 解析では興味深いことに 3 つの脳部位で共通して微小管に関連する遺伝子が同定された。また LOAD 38 例のデータセットでは嗅内皮質においてタンパク分解に関する遺伝子が集積しており、eQTL の AD の病理機序への寄与が示唆された。今後は eQTL が見つかった SNP や遺伝子の疾患への寄与についてさらに調べていく予定である。

E. 結論

本研究では同一患者で測定された SNP データと遺伝子発現データを組み合わせることで eQTL 解析を行った。総計 7 億 2,000 万以上の関係を網羅的に算出した。さらにその中から統計的に有意な関係を抽出した結果、微小管に関連する遺伝子群やタンパク分解に関連する遺伝子群が見つかった。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. **菊地 正隆**、中谷 明弘. (2017) アルツハイマー病のバイオインフォマティクス解析. *Brain and Nerve*. 69(7):835-842
2. 宮下 哲典、原 範和、春日 健作、**菊地 正隆**、中谷 明弘、池内 健. (2017) アルツハイマー病の遺伝学的リスク. *老年精神医学*. 28(7):754-765

2. 学会発表

1. **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、アルツハイマー病関連ノンコーディングバリエーションの染色体高次構造解析、第 40 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所、2017 年 12 月 6 日(水)~9 日(土)
2. **菊地 正隆**、宮下 哲典、池内 健、中谷 明弘、アルツハイマー病 GWAS データを用いたポリジェニック解析、第 36 回 日本認知症学会 学術集会、石川県立音楽堂・ANA クラウンプラザホテル金沢、11 月 24 日(金)~11 月 26 日(日)

3. **Masataka Kikuchi**, Norikazu Hara, Mai Hasegawa, Akinori Miyashita, Ryoza Kuwano, Takeshi Ikeuchi, and Akihiro Nakaya. The prediction method of deleterious variants for Alzheimer's disease using chromatin higher-order structure. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2017. July 16-20 London, United Kingdom.

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、運動開始前の自発的な神経活動に着目し、自由な運動のタイミングの決定にどのように関わっているかを明らかにすることを目的とした。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ところ、感覚野を含む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上昇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。したがって運動開始前の脳活動をさらに詳細に検討する必要があることが示唆された。そこで、自発的に運動が発生する前の期間に感覚野を刺激する操作をおこない運動発生への影響を調べたところ、運動発生までの時間が長くなる傾向があることが分かった。

A. 研究目的

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

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

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

「自由意志に基づく行動」の単純な例として「自由なタイミングでおこなう単純な運動」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には、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。得られたデータは前処理の後、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。先行研究において自分で開始する、あるいは自由な意思決定を要する実験課題に関与することが示唆されている脳領域を関心領域各領域における時系列データは運動に関連してどのような変化を示すかを調べた。次に、これまでに得られた結果をふまえ、行動実験をおこなった。被験者は free timing 条件で fMRI 実験と同

様の運動をおこなったが、そのうち何回かの試行では運動前にランダムなタイミングで視覚刺激（10Hz で反転するチェッカーボード）が 1 秒間呈示された。運動前に視覚刺激が呈示された試行とされなかった試行の運動発生までの時間を計測して比較した。

C. 研究結果

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

次に行動実験の結果、運動前に視覚刺激が呈示された試行は呈示されなかった試行よりも、運動発生までの時間が有意に長くなることが分かった。

D. 考察

fMRI 実験の結果から、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の上昇が見られることが分かった。また、先行研究においては示されていなかったが、感覚野の活動までもが自由な意思決定に関与することがわかった。さらに、感覚野への刺激入力自発的な運動の発生に影響を与えている可能性があることも示唆された。今後はさらに被験者数を増やし、同時に運動準備電位等の計測もおこない、背景にある神経メカニズムについてさらに詳細に検討する予定である。

E. 結論

先行研究で報告のある補足運動野以外の領域にも徐々に上昇するような活動があったことから、内因的な意図に基づく行動は、以前考

えられていたように補足運動野を中心とする特定の少数の脳領域だけが究極の起源となって生じているというよりは、感覚野までもを含む複数の脳領域にまたがるネットワークの活動の上昇の中から生じている可能性がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Honami Sakata, Kosuke Itoh, Yuji Suzuki, Katsuki Nakamura, Masaki Watanabe, Hironaka Igarashi, and Tsutomu Nakada (2017) “Slow accumulations of neural activities in multiple cortical regions precede self-initiation of movement: an event-related fMRI study.” eNeuro Vol. 4, Issue 5.

2. 学会発表

Honami Sakata, Kosuke Itoh, Yuji Suzuki, Katsuki Nakamura, Masaki Watanabe, Hironaka Igarashi, Tsutomu Nakada “Endogenously initiated movements are preceded by neural activities in multiple cortical regions: an event-related fMRI study.” 47th Annual meeting of Society for Neuroscience, Washington D.C., November 2017.

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った。今年度はその結果を受けての検証を進めた。

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 シヌクレイと同様の神経細胞蓄積型であった。今年度はその結果を受けて、生化学的解析を進めたが未だ結果を得るには至っていない。

D. 考察

α シヌクレイ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 シヌクレイ蓄積、拡散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。現在、 α シヌクレイ蓄積、拡散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

- 1) Hirayama-Kurogi M, Takizawa Y, Kunii Y, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Kondo T, Ito S, Tachikawa M, Niwa SI, Yabe H, Terasaki T, Setou M, Ohtsuki S. Downregulation of GNA13-ERK network in prefrontal cortex of schizophrenia brain identified by combined focused and targeted

quantitative proteomics.

J Proteomics. 2017 Mar 31;158:31-42.

- 2) Zhang Z, Takeda-Uchimura Y, Foyez T, Ohtake-Niimi S, Narentuya, Akatsu H, Nishitsuji K, Michikawa M, Wyss-Coray T, Kadomatsu K, Uchimura K. Deficiency of a sulfotransferase for sialic acid-modified glycans mitigates Alzheimer's pathology. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2017 Apr 4;114(14):E2947-E2954.
- 3) Matsumoto J, Nakanishi H, Kunii Y, Sugiura Y, Yuki D, Wada A, Hino M, Niwa SI, Kondo T, Waki M, Hayasaka T, Masaki N, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Sato S, Sasaki T, Setou M, Yabe H. Decreased 16:0/20:4-phosphatidylinositol level in the post-mortem prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. **Sci Rep.** 2017 Mar 23;7:45050.
- 4) Niwa A, Ii Y, Shindo A, Matsuo K, Ishikawa H, Taniguchi A, Takase S, Maeda M, Sakuma H, Akatsu H, Hashizume Y, Tomimoto H. Comparative Analysis of Cortical Microinfarcts and Microbleeds using 3.0-Tesla Postmortem Magnetic Resonance Images and Histopathology. **J Alzheimers Dis.** 2017;59(3):951-959.
- 5) Tomioka M, Toda Y, Mañucat NB, Akatsu H, Fukumoto M, Kono N, Arai H, Kioka N, Ueda K. Lysophosphatidylcholine export by human ABCA7. **Biochim Biophys Acta.** 2017

Jul;1862(7):658-665.

- 6) Manabe T, Mizukami K, **Akatsu H**, Hashizume Y, Ohkubo T, Kudo K, Hizawa N. Factors Associated with Pneumonia-caused Death in Older Adults with Autopsy-confirmed Dementia. **Intern Med.** 2017;56(8):907-914.
- 7) Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, Umemoto H, Morimoto Y, **Akatsu H**, Inoue K, Tsuneyama K. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. **Sci Rep.** 2017 Nov 20;7(1):15876.
- 8) Fujita K, Chen X, Homma H, Tagawa K, Amano M, Saito A, Imoto S, **Akatsu H**, Hashizume Y, Kaibuchi K, Miyano S, Okazawa H. Targeting Tyro3 signals ameliorates PGRN-mutant FTLD-TDP model via tau-mediated synapse pathology **Nat Commun.** 2018 Jan 30;9(1):433.
- 9) Matsuo K, Shindo A, Niwa A, Tabei KI, **Akatsu H**, Hashizume Y, Akiyama H, Ayaki T, Maki T, Sawamoto N, Takahashi R, Oikawa S, Tomimoto H. Complement Activation in Capillary Cerebral Amyloid Angiopathy. **Dement Geriatr Cogn Disord.** 2018 Feb 8;44(5-6):343-353.

2. 学会発表

- 1) 赤津裕康、正木克由規、田中創始、木村雄子、川出義浩、竹尾淳、小林洋大、柳澤尚武、清水金忠、兼松孝好、岩田彰、鈴木匡、

大原弘隆

地域高齢者住民に対する認知症になる前のアドバンスケアプランニング意識調査

第7回日本認知症予防学会 2017年9月22日 岡山コンベンションセンター

- 2) 荒川和幸、兼松孝好、田中創始、正木克由規、赤津裕康、内木綾、大原弘隆
セラチア菌重症敗血症により急激な経過を辿り、病理解剖で血球貧食症候群と診断しえた症例
第15回日本病院総合診療医学会学術総会 2017年9月14~15日 ディズニーアンバサダーホテル
- 3) 柿本卓也、田中創始、荒川和幸、正木克由規、赤津裕康、兼松孝好、黒部亮、松原章宏、柴田裕子、水野晶紫、福田道雄、早川潔、大手信之、大原弘隆
診断に苦慮した敗血症性ショックに続発したコレステロール結晶塞栓症 (CCE) の1例
第15回日本病院総合診療医学会学術総会 2017年9月14~15日 ディズニーアンバサダーホテル
- 4) 野田 巧、六車宜央、筒井陽仁、赤津裕康、井之上浩一
LC-MS/MS を用いたヒト脳脊髄液中におけるアルツハイマー病の新規バイオマーカー探索
第42回日本医用マススペクトル学会年会 2017年9月14日
- 5) 高山卓大、水野 初、井之上浩一、赤津裕康、豊岡利正、轟木堅一郎
LC-HR/MS によるアルツハイマー病患者脳脊髄液のキラルメタボロミクス」ピコリルアミン誘導体化 LC-MS/MS を用いた腸内細菌叢解析を目指した短鎖脂肪酸の網羅的分析法の開発
第42回日本医用マススペクトル学会年会 2017年9月14日
- 6) 長友涼介、岡田泰毅、筒井陽仁、赤津裕

- 康、丸山光生、井之上浩一
 ピコリルアミン誘導体化 LC-MS/MS を用いた腸内細菌叢解析を目指した短鎖脂肪酸の網羅的分析法の開発
 第42回日本医用マススペクトル学会年会(ポスター賞受賞) 2017年9月15日
- 7) 小嶋雅代、赤津裕康、浅井清文、大原弘隆、木村和哲、酒々井眞澄、村上里奈、川出義浩、鈴木匡、坂下真大、山本美由紀、明石恵子
 「なごやかモデル」を通じた大学教育における IPE の取り組み
 第19回日本在宅医学会大会 2017年6月17~18日 名古屋国際会議場
- 8) 間辺利江、水上勝義、赤津裕康、工藤宏一郎
 認知症内患者の肺炎による死亡の検討：システマティックレビュー& メタアナリシス
 第59回日本老年医学会学術集会 2017年6月14~15日 名古屋国際会議場
- 9) 赤津裕康、正木克由規、田中創始、近藤麻央、野崎耀志郎、長野弘季、伊藤禎芳、兼松孝好、大原弘隆
 地域高齢者に対する死後も視野に入れたアドバンスケアプランニング (ACP) の意識調査
 第59回日本老年医学会学術集会 2017年6月14~15日 名古屋国際会議場
- 10) 兼坂岳志、小川倫弘、赤津裕康、谷口知恵、山本左近、山本孝之、高尾昌樹、村山繁雄、橋詰良夫
 福祉村 Brain Bank 2016 年次報告
 第58回日本神経病理学会学術研究会 2017年6月1~3日 東京学術総合センター
- 11) 加藤智子、小西吉裕、椎野顕彦、下濱 俊、Beach Thomas G、赤津裕康、遠山育夫
 アルツハイマー病ヒト脳とアルツハイマー病モデルマウス脳に置ける $\alpha 1$ -chimaerin の発現と局在について
- 第58回日本神経病理学会学術研究会 2017年6月1~3日 東京学術総合センター
- 12) 田野光敏、田村未来、佐藤愛海、青柳真一、飯島仁美、谷津隆之、諏訪部 桂、木村浩晃、高橋陽子、相沢勝健、赤津裕康、村山繁雄、高尾昌樹、美原 盤、美原恵里、美原樹
 美原記念病院ブレインバンクからの年次報告 (2016年)
 第58回日本神経病理学会学術研究会 2017年6月1~3日 東京学術総合センター
- 13) 赤津裕康、正木克由規、田中創始、川出義浩、竹尾淳、兼松孝好、大原弘隆
地域高齢者住民に対する人工栄養に対する意識調査
 第33回日本静脈経腸栄養学会(JSPEN) 2018年 横浜 口演
- 14) 川出義浩、赤津裕康、丸山光生、大原弘隆
ペクチン含有濃厚消化態流動食(ハイネীগール®)の長期投与が栄養状態および消化管に及ぼす影響
 第33回日本静脈経腸栄養学会(JSPEN) 2018年 横浜 口演
- 15) 荒川和幸、兼松孝好、田中創始、正木克由規、藤原かをる、赤津裕康、吉田篤博、大原弘隆
 死亡患者からみた名市大病院における総合内科・総合診療科の現状と役割 第16回日本病院総合診療医学会学術総会
 2018年 大分 口演

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
 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 小野千晶 1)、兪志前 1)、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)

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 2 施設よりから提供を受けた検体を追加したクオリティーコントロール(QC)の評価と微量 pH 測定系の検証、これまでに多型-画像相が示されているオリゴデンドロサイト関連遺伝子 OLIG2 の多型と発現の相関の検討を米国より提供された検体と比較し人種差に焦点を当て行った。

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目的とした。

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、昨年度までに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(健常者 (25 例×計 3 部位)および統合失調症

罹患者(9 例×1 部位))を対象とし、十数 mg の微量な死後脳組織を用いた pH 測定系の検証を行っている、本年度は国立精神・神経医療研究センターおよび愛知医科大学加齢医学研究所から提供を受けた検体も含めた追加検証と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の一環として、これまでに多型-脳画像相関が示され、さらに人種差があると考えられたオリゴデンドロサイト関連遺伝子(OLIG2)の多型と発現の相関の検討を行った

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1) 対象検体

①死後脳検体

新潟大学脳研究所、福島県立医科大学(精神疾患死後脳・DNA バンク)、国立精神・神経医療研究センターおよび愛知医科大学加齢医学研究所から提供を受けた死後脳組織検体

A)健常者（前頭前野(白質/灰白質領域)または後頭葉(灰白質領域));各 32 例×計 3 部位、1 例×1部位;100mg~300mg

B)統合失調症罹患者（前頭前野(灰白質領域));各 19 例×1部位;200mg

②核酸検体

米国 Stanley Medical Research Institute において集積された 105 検体[統合失調症罹患者 (n=35)、双極性障害患者 (n=35)および健常者 (n=35)]の死後脳組織由来の gDNA 検体および総 RNA 検体

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を約 100mg を分取し、組織量の 10vol 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。pH METER F52 (HORIBA 電極;LAQUA9615)を用い測定した。

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い 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、抽出した RNA の退縮の程度 (RIN, rRNA ratio (28S/18S))を評価した。

5) オリゴデンドロサイト関連遺伝子(OLIG2)の多型解析

gDNA を対象に TaqMan SNP Genotyping Assays Kit と Werfagen 社の定量 RT-PCR 装置を用いて OLIG2 遺伝子のゲノム多型 (rs1059004)を検証した。

6) オリゴデンドロサイト関連遺伝子(OLIG2)の発現解析

totalRNA から合成した cDNA を対象に OLIG2 遺伝子に特異的なプライマーを用い、バイオオラド社の定量 RT-PCR 装置と SyberGreen 法により、OLIG2 遺伝子の発現量を定量した。

本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会が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いる。

C. 研究結果

新潟大学脳研究所および他 3 施設より提供を受けた死後脳検体の QC 評価の統合およびオリゴデンドロサイト関連遺伝子(OLIG2)の多型と発現の相関解析を行った

①組織 pH

各組織部位での pH は前頭葉灰白質で平均 6.22(微量測定法; 6.24)、後頭葉灰白質では 6.27 (6.24)であった。各提供施設における平均組織 pH は新潟大学脳研究所が 6.24(6.26)、福島県立医科大学が 6.27(6.30)、国立精神・神経医療研究センターが 5.93(5.99)および愛知医科大学加齢医学研究所では 6.19(6.21)であった。一般的な既存の測定法と微量測定法間の相関性は $r^2=0.86$ と高い値を示した。

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 7.8(9.8-1.2) rRNA 比 (28S/18S)は 2.58(0-5.71)であった。RIN 値と pH 値間の相関は低く、 $r^2=0.085$ を示した。

③オリゴデンドロサイト関連遺伝子 (OLIG2) の多型-遺伝子発現相関解析

国内 4 施設から提供を受けた日本人死後脳および欧米人死後脳由来の gDNA、Total RNA を用いた OLIG2 の多型-遺伝子発現解析を行った結果、多型-画像相関解析における日本人と欧米人の人種差を裏付ける多型-遺伝子発現相関の傾向がみられた。

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。また、これまでに行ってきた OLIG2 の多型-画像相関解析を裏付けられる多型-死後脳組織遺伝子発現の相関を得ることができた。

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、今回解析を行った OLIG2 に加え、今後シナプスや神経伝達に関連する精神疾患罹患感受性候補遺伝子、オリゴデンドロサイト関連遺伝子、アストロサイト関連遺伝子およびミクログリア関連遺伝子を解析対象とし本死後脳検体の多型解析、メチル化解析、遺伝子発現解析を行う。本研究結果の微量 pH 測定系の検証結果および

OLIG2 に関する多型-脳画像相関解析—遺伝子発現解析結果に関して現在、論文準備中である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表
投稿準備中
2. 学会発表
無し

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
3. その他
無し

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。アルツハイマー病は認知機能が低下した後では治療介入が難しいことが徐々に明らかになっている。そ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だけではなく、軽度認知機能低下や健常高齢者も含め同一個体からほぼ同時に採取した脳脊髄液および血液検体のセットを解析し、脳内アルツハイマー病病理を血液バイオマーカーで検出することができるかどうかを検討した。

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 比やタウ蛋白などとのよ

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ことで共同研究を実施してきた。

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した。血液約 0.5 mL 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 を用いて免疫沈降物を精製し、血液中に微量に存在する脳内の神経細胞由来と考えられる ALP1 β 28 ペプチド 3 分子種 (ALP1 β 28, 27, 25) の量を LC/MS/MS 法を用いて AB Sciex Q-Trap6500 型質量分析装置で測定した。

CSF 中の APL1 β についても同様の方法で測定した。

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

引き続き、新潟脳研を含む複数の施設から供与を受けた血漿、CSF ペアード検体と新たに血漿、アミロイドPET ペアードサンプルについて測定を重ねデータ数を増加させた。

その結果、「血漿中 APL1 β 28 比率」から「CSF 中 A β 42 低下」または「アミロイド病変あり」を下記の感度・特異度で検出した。

健常者・MCI・AD 患者の血漿中 APL1 β 28 比率から CSF 中 A β 42 低下を推測する

29 年度サンプル全体

- ・「血漿 APL1 β 28 比率」は「CSF A β 42 低下群」で「CSF A β 42 正常群」と比較して有意に高い(p=0.0001, AUC 0.67)
- ・「血漿 APL1 β 28 比率」上昇(カットオフ>0.9249)により CSF A β 42 低下群を感度 49%・特異度 81%で検出した

29 年度 MCI コホート群

- ・「血漿 APL1 β 28 比率」は「CSF A β 42 低下群」で「CSF A β 42 正常群」と比較して有意に高い(p=0.021, AUC 0.68)
- ・「血漿 APL1 β 28 比率」上昇(カットオフ>0.9128)により CSF A β 42 低下群を感度 54%・特異度 80%で検出した

29 年度健常コホート群

- ・「血漿 APL1 β 28 比率」は「CSF A β 42 低下群」

で「CSF A β 42 正常群」と比較して有意に高い(p=0.0004, AUC 0.81)

- ・「血漿 APL1 β 28 比率」上昇(カットオフ>0.9132)により CSF A β 42 低下群を感度 75%・特異度 81%で検出した

血漿中 APL1 β 28 比率からアミロイド病変を推測する

29 年度サンプル全体

- ・「血漿 APL1 β 28 比率」は「アミロイド病変あり群」で「アミロイド病変なし群」と比較して有意に高い(p=0.0009, AUC 0.74)
- ・「血漿 APL1 β 28 比率」上昇(カットオフ>0.9269)により「アミロイド病変あり群」を感度 65%・特異度 80%で検出した

D. 考察

E. 結論

単一では検出力に限界はあるが、「血漿 APL1 β 28 比率」は健常者群から脳内アミロイド病変を有するものをスクリーニングする試薬として有用かもしれない。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Semagacestat Is a Pseudo-Inhibitor of γ -Secretase.

Tagami S, Yanagida K, Kodama TS, Takami M, Mizuta N, Oyama H, Nishitomi K, Chiu YW, Okamoto T, Ikeuchi T, Sakaguchi G, Kudo T, Matsuura Y, Fukumori A, Takeda M, Ihara Y, Okochi M.

Cell Rep. 2017 Oct 3;21(1):259-273. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.032.

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⁾
吉川武男⁵⁾、那波宏之²⁾、高橋均²⁾

1) 福島県立医科大学 2) 新潟大学脳研究所 3) 福島県立医科大学会津医療センター
4) 東京大学 5) 理化学研究所

研究要旨

本研究の目的は、統合失調症をはじめとする精神疾患脳病態における神経伝達システム関連分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子の異常について死後脳を用いて明らかにすることである。

本研究では、統合失調症をはじめとする精神疾患発症のメカニズム解明を目的として患者死後脳内分子のジェネティックニューロパソロジー解析を行う。すなわち、これまで代表者らが統合失調症死後脳組織を用いて分析を進めてきたドパミン系・グルタミン酸・GABA系の分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子について、それらの死後脳における遺伝子発現やタンパク発現及びエピジェネティック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

当講座の精神疾患死後脳バンクにおいて凍結保存された統合失調症死後脳 24 例に対して年齢、性別、死後時間等をマッチさせた新形大学脳研究所保管の非精神神経疾患対照例を選定し、平成 28 年 8 月 18 日 - 19 日に前頭前皮質、側頭皮質、後頭皮質を各 28 例ずつの採取作業を行い、提供いただいた。また更に、平成 29 年 8 月 24 日 - 25 日に 28 例の健常脳サンプル（後頭）の追加切り出し（各例につき 300~500 mg）を行い、サンプル調整を完了した。現時点で使用可能なサンプルは最大で統合失調症 24 例、双極性障害 8 例、健常対照 36 例、その他 8 例であるが、施設間の脳試料の同質性を評価するために、ローディングコントロールとして用いられる、神経組織を代表するタンパク質（GFAP, GAPDH, Tubulin, Actin）の発現量を定量することにし、まず GFAP の解析を行ったところ、両施設の健常コントロール群の GFAP 発現量には 2 領域（前頭、側頭）ともに有意差はなく、GFAP 発現量の疾患（統合失調症、双極性障害）—健常群の比較でも群間に有意差はなかった。また、GFAP 発現量は各種交絡因子（組織 pH, 死後経過時間 (PMI), 死亡時年齢, 男女差）との間に有意な相関はなかった。これらの試料を用いて、微小循環・慢性炎症関連分子 28 分子についてルミネックス法を用いたタンパク質発現解析を行ったところ、IL-10、IL17A が統合失調症群で低下を示した。また、死亡前 3 か月間の平均抗精神病薬投与量と IP-10 のタンパク発現量との間に正の相関を認めた ($p=0.032$)。その他、細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子についての解析準備を進め、おおよそ条件検討が完了している。

D. 考察

E. 結論

IP-10 は炎症の慢性化に関与すると言われている分子であり、統合失調症において慢性化している炎症を IP-10 を低下させることにより抑制しようとしている可能性がある。IL-17A は炎症を促進する場合もあるが抑制することもあり、統合失調症においては神経系の慢性炎症を抑制する調節因子として働いている可能性がある。

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

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. 國井泰人、和田明「生前登録システムに基づく精神疾患ブレインバンクの取り組み」医学のあゆみ 261(10) : 969-975, 2017.
2. 長岡敦子、國井泰人、松本純弥、日野瑞城、矢部博興「幻聴体験の分子メカニズムを考える—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 1 例」精神医学 59(12) : 1141-1145, 2017.
3. Nishiura K, Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Kunii Y, Kashiwagi K, Tanaka M, Yokoyama Y, Hino M, Sugino T, Yabe H, Takahashi H, Kakita A, Imura T, Chiba H. PKA activation and endothelial claudin-5 breakdown in the schizophrenic prefrontal cortex. *Oncotarget*. 2017;8(55):93382-93391.
4. Matsumoto J, Nagaoka A, Kunii Y, Miura I, Hino M, Niwa SI, Nawa H, Takahashi H, Kakita A, Yabe H. Effects of the -141C insertion/deletion polymorphism in the dopamine D2 receptor gene on the dopamine system in the striatum in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2018; 264:116-118.

2. 学会発表

國井泰人：シンポジウム 30 精神科臨床と脳病理-精神科ブレインバンクへの期待- 生前登録制度に

基づく精神疾患ブレインバンクの実践～当事者と研究者が協働する研究体制とは～. 第 113 回日本精神神経学会総会学術総会,名古屋,2017/6/23

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, 精神疾患死後脳研究：ジェネティックニューロパソロジー及びリソース利用の有用性. 第 39 回 日本生物学的精神医学会,福岡,2017/9/29

和田明 國井泰人 日野瑞城 松本純弥 長岡敦子 丹羽真一 竹島明 高橋均 那波宏之 柿田明美 笠井清登 矢部博興；統合失調症脳における慢性炎症関連分子のジェネティックニューロパソロジー. 第 13 回日本統合失調症学会,徳島,2018/3/23

國井泰人、日野瑞城、松本純弥、長岡敦子、丹羽真一、矢部博興；精神疾患死後脳研究の最前線. 若手中堅シンポジウム 1「ここまで分かった統合失調症～分子生物学的研究～」. 第 13 回日本統合失調症学会,徳島,2018/3/24

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

「シヌクレイノパチー」は、 α シヌクレインの異常凝集を特徴とする神経難病であり、その進行を遅延・阻止する治療法は現在まで確立されていない。シヌクレイノパチーの原因および病態には、複数の要因が関与しており、我々はヒト剖検脳を用いた解析を通して「分解システムの障害」をこれまで報告してきた。しかし病態の進行期において「分解システムの障害」は起こっているか、また他のどのような要因が障害をうけているのか、など不明な点も多い。そこで今回、PD 患者および健常対照例の末梢血をもちいた病態進行期の解析を行った。

A. 研究目的

レビー小体病 {パーキンソン病 (PD)、レビー小体型認知症} 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・阻止する治療法は現在まで確立していない。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。しかし、病態進行期におけるタンパク質分解システムの障害については不明である。そこで今回、凍結脳組織で異常が示唆されたタンパク質分解システム関連分子について、病態進行期の変化

を PD 患者および健常対照例の末梢血単核球を用いて解析した。

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解析

細胞内のタンパク質分解、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、生化学的に検討した。

2. ヒト検体材料を用いた網羅的解析

PD 患者 (47 歳から 80 歳、平均 65.3 歳、 $n = 35$) および年齢の一致した対照 (48 歳から 78 歳、平均 62.1 歳、 $n = 23$) を対象とした。患者および正常対照例から末梢血単核球を採取し、トランスクリプトームアッセイおよびウェスタンブロット解析を行った。さらにこれらの結果と臨床検査

項目との相関を検討した。患者検体については、弘前大学大学院倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

トランスクリプトームアッセイにより網羅的に末梢血単核球由来の全転写物を解析した結果、免疫システムの障害、特に炎症反応に関する分子の変動が顕著であった。また剖検脳組織を用いた解析結果と一致して、オートファジーに関連する複数の分子が有意に変動していた。特に以下の mRNA が減少していた。{図 1A UNC-51 様キナーゼ (ULK) 3、オートファジー関連 (Atg) 2A、Atg4B、Atg5、Atg16L1、およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC6)}。

タンパク質レベルでの変動を検討するためにウェスタンブロット解析をおこなったところ、複数のオートファジー関連分子が有意に増加していた。特にオートファジー膜形成を調節する複数の分子 {ULK1、Beclin1、およびオートファジー/ベクリン 1 レギュレーター (AMBRA) 1} が増加していた。ウェスタンブロット解析では α シヌクレインのオリゴマー (70 kDa 付近の高分子のシグナル) が確認できた。 α シヌクレインのオリゴマーの発現レベルを PD の臨床的重症度および心臓交感神経の変性との関連を検討したところ、PD の臨床的重症度および心臓交感神経の変性が強くなるほど、オリゴマー量は減少し、負の相関を示した (図 1B)。

図 1 PD 患者および対照例の末梢血単核球を用いた網羅的解析 (A) オートファゴソーム形成に関与する遺伝子のボルケーノプロット。有意な減少または増加を示す遺伝子。(B) PD 患者シヌクレインオリゴマーと MIBG 心臓シンチ結果の相関。シヌクレインオリゴマーと MIBG 心筋シンチの間に病態初期には負の相関が認められるが、病態が進行すると統計的に有意差は見られなかった。p = 0.05 以下を統計的に有意とした。

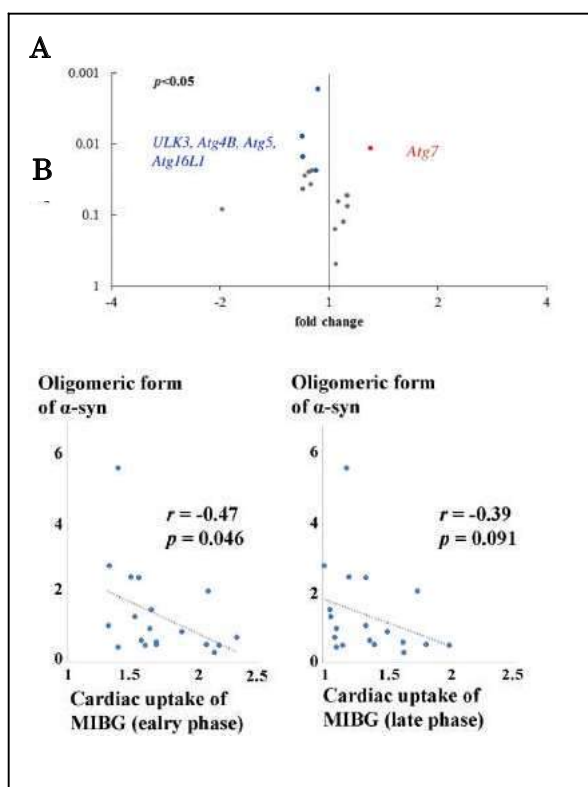
D. 考察

これまでシヌクレイノパチーの剖検脳において、病態の一つとして「タンパク質分解システムの障害」が報告されてきた。今回の PD 患者検体を用いた検討から、病態末期だけでなく、病態の進行期でも「タンパク質分解システムの障害」がおこっていることを明らかにした。また、免疫システムの変化、特にサイトカインやその受容体の変動も有意に大きかった。シヌクレイノパチーの病態には進行期から複数の要因が絡み合い、悪循環となり徐々に障害が増悪することを示唆している。

重要なこととして、今回用いた末梢血単核球の「変化」が神経系の障害度と相関していることである。近年、自律神経系によって血液成分が調節されていることが明らかになってきている。がん領域だけでなく、シヌクレイノパチーを含めた神経難病に対しても、末梢血単核球を用いたリキッドバイオプシーを行うことで、病態の進行度を簡易にモニターできる可能性を秘めている。

E. 結論

昨年度に引きつづきシヌクレイノパチーを含む神経難病の病態解明および治療法の開発を視野に入れ研究を遂行した。特に病態末期のみならず、進行期においても「タンパク質分解システムの障害」を認めたことから、引き続きこれらを逆に活性化することで病態の改善に結びつく治療法を開発する。



F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

- [1] Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Sasaki H, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Immunohistochemical localization of exoribonucleases (DIS3L2 and XRN1) in intranuclear inclusion body disease, **Neurosci Lett**, 662, 389-394, 2018.
- [2] Miki Y, Tanji K, Mori F, Tatara Y, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Fimia GM, Wakabayashi K, AMBRA1, a novel alpha-synuclein-binding protein, is implicated in the pathogenesis of multiple system atrophy, **Brain Pathol**, 28, 28-42, 2018.
- [3] Miki Y, Shimoyama S, Kon T, Ueno T, Hayakari R, Tanji K, Matsumiya T, Tsushima E, Mori F, Wakabayashi K, Tomiyama M, Alteration of autophagy-related proteins in peripheral blood mononuclear cells of patients with Parkinson's disease, **Neurobiol Aging**, 63, 33-43, 2018.
- [4] Shirai K, Shimada T, Yoshida H, Hayakari R, Matsumiya T, Tanji K, Murakami M, Tanaka H, Imaizumi T, Interferon (IFN)-induced protein 35 (IFI35) negatively regulates IFN-beta-phosphorylated STAT1-RIG-I-CXCL10/CCL5 axis in U373MG astrocytoma cells treated with polyinosinic-polycytidylic acid, **Brain Res**, 1658, 60-67, 2017.
- [5] Miki Y, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Alteration of mitochondrial protein PDHA1 in Lewy body disease and PARK14, **Biochem Biophys Res Commun**, 489, 439-444, 2017.

2. 学会発表

- 第 58 回 日本神経病理学会（2017 年 6 月 1-3 日、東京）
- 1) 丹治邦和, 三木康生, 成田秀美, 三村純正, 森文秋, 伊東 健, 若林孝一, 天然糖質投与によるレビー小体病モデルマウスへの影響.
 - 2) 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 RNA 分解酵素の免疫組織化学的検討.
 - 3) 三木康生, 丹治邦和, 森 文秋, 柿田明美, 高橋 均, 若林孝一, PLA2G6 は PARK14 と特発性パーキンソン病のレヴィ小体に蓄積する.

その他の学会

- 4) Tanji K, Mori F, Miki Y, Utsumi J, Sasaki N, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Deubiquitin enzyme, YOD1, is involved in neurodegeneration, 第40回日本神経科学大会, 2017.
- 5) Tanji K, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Trehalose intake improves spatial memory through autophagy activation in the brain of mice, 第 55 回日本生物物理学会, 2017

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

特願 2017-110020

多系統萎縮症の病態を再現したモデルマウス
(出願時の名称：多系統萎縮症モデル動物)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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限界まで短縮し、

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の承認のもと、これまでに 6 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見出した。しかし、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。一方、安静時データのエン트로ピー推定により、一次視覚野を中心とした低周波変動を確認した。これは default mode network

(DMN) として知られるものと性質が一致し、視覚刺激により信号成分が消失した。

Steady state free precession (SSFP) 法による T1/T2 コントラストを用いた fMRI も試行したが、撮像時の SAR (電磁波エネルギー比吸収率) が大きく、実用的で無いことが判った。

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¹⁾。T1 の変化を脳賦活と結びつけるには flow 効果の分離が必須であり、更なる検討を要する。視覚刺激に伴う default mode network (DMN) 成分の消失は新たな fMRI 手法のヒントになり得る。

E. 結論

脳表の T1 緩和に関する知見ならびに賦活と DMN の関係について新たな示唆を得た。次年度は研究代表者らによって開発された m-sequence (M 系列) 型刺激パラダイムを用いて fMRI 信号時系列から HRF(と flow)を直接分離することを試みる。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

[1] Suzuki K, Yamada K, Nakada K, Suzuki Y, Watanabe M, Kwee IL, Nakada T. MRI characteristics of the glia limitans externa: A 7T study. Magn Reson Imaging. 2017;44: 140-145.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

無し。

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、再発時に集積してくる遺伝子異常を検討する。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

サンプル収集中である。

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) 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. 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.

2. 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.

3. Ma C, Horlad H, Pan C, Yano H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Matsuoka M, Lee A, Niidome T, Yamanaka R, Takeya M, Komohara Y. Stat3 inhibitor abrogates the expression of PD-1 ligands on lymphoma cell lines. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 57(1):21-25, 2017.

4. Hayano A, Komohara Y, Takashima Y, Takeya H, Homma J, Fukai J, Iwadate Y, Kajiwara K, Ishizawa S, Hondoh H and Yamanaka R. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Primary Central Nervous System Lymphomas: A Clinicopathological Study. *Anticancer Res* 37(10):5655-5666, 2017.

5. Yamanaka R, Hayano A: Secondary glioma following acute lymphocytic leukemia: Therapeutic implications. *Neurosurg Rev* 40(4):549-557, 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 101:722-730, 2017.
9. Yamanaka R, Hayano A: Radiation-induced schwannomas and neurofibromas: a systematic review. World Neurosurg 104:713-722, 2017.
10. Yamanaka R, Hayano Radiation-induced malignant peripheral nerve sheath tumors: a systematic review. World Neurosurg 105:961-970, 2017.
11. Yamanaka R, Hayano, Takashima Y: Trilateral retinoblastoma: a systematic review of 211 cases. Neurosurg Rev 2017 Aug 16. [Epub ahead of print]
12. Yamanaka R, Abe E, Sato T, Hayano A and Takashima Y. Secondary Intracranial Tumors Following Radiotherapy for Pituitary Adenomas: A Systematic Review. Cancers (Basel) 9(8); 2017.

2. 書籍発表

特になし

3. 学会発表

1. 山中龍也, 早野あづさ, 藤井幸彦.
脳リンパ腫の長期生存例の検討.
第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 神戸, 7 月 27 日-29 日, 2017
2. 吉田健一, 越智陽太郎, 白石友一, 磯部知弥, 千葉健一, 田中洋子, 岡田愛, 早野あづさ, 奥野友介, 鈴木啓道, 宮野悟, 山中 龍也, 小川誠司.
中枢神経原発悪性リンパ腫の統合的解析。第 76 回日本癌学会学術集会, 横浜, 9 月 28 日-30 日, 2017
3. 早野あづさ, 菰原義宏, 高島康郎, 本間順平, 深井順也, 岩立康男, 梶原浩司, 石澤伸, 本道洋昭, 山中龍也. 脳原発および転移性脳悪性リン

パ腫における Programmed Cell Death Ligand 1 発現の検討. 第 76 回日本癌学会学術集会, 横浜, 9 月 28 日-30 日, 2017

4. 高島康郎, 川口淳, 金山知彦, 早野あづさ, 山中龍也. がん免疫療法のターゲットとなる分子と予後との関連の解析. 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 6 日-8 日, 2017

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

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

24 時間周期の生体リズムは遺伝子で規定され、細胞レベルで生み出される、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進化してきた。哺乳類においては、時計遺伝子のリズムだけでは生理的なリズム発振は不可能であり、細胞間のシグナル連絡によるリズム発振システムの存在が必須である。細胞間の強力な時間シグナルの局所回路を形成しているのが、脳の視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) である。この SCN から生み出された強力なリズム信号は、全身の細胞で発生するリズムを調律・統合している。本研究は SCN に存在する物質の網羅的解析より新たなリズム調整物質を探索するプロジェクト(SCN-Gene Project)を推進しているが、本研究では、我々が近年見出したバソプレッシン関連物質の生体リズムを検索する。

A.研究目的

時計遺伝子により生み出された、約 24 時間周期の生体リズムは、体温、ホルモン分泌等多くの生理機能に認められる。しかるに、現代社会では、交替制勤務、夜型生活により、生体リズムが乱される機会が急増しており、これが生活習慣病や癌など誘因になることが、憂慮されている。

我々は既に、生体リズムの中核である視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus : SCN) のリズム生成に関わる分子として、SCN に発現する遺伝子群の網羅的解析 (SCN-Gene Project) から SCN の主要なペプチド、アルギニンバソプレッシン (arginine vasopressin : AVP) の受容体である V1a と V1b 受容体をダブルノックアウトしたマウス (V1aV1bDKO) が、時差症状を全く示さないことを報告した (Yamaguchi et al., Science 2013)。

今回、バソプレッシン関連物質のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、詳細に解析した。

B.研究方法 (倫理面への配慮を含む)

(1) Floxed-マウスの作成

①Floxed-V1a 受容体マウスおよび、②Floxed-V1b 受容体マウスを作製する。

(2) Floxed マウスと CAG-Cre マウスを掛け合わせて、V1a 受容体のシングルノックアウトマウス (V1aKO)、V1b 受容体シングルノックアウトマウス (V1bKO)、V1aV1b ダブルノックアウトマウスを作成し、行動リズムを比較する。

(3) V1a 受容体・V1b 受容体組織特異的ノックアウトマウスの作成とその行動リズムの測定。

組織特異的ノックアウトマウス作製には、特定の組織のみで遺伝子改変を起こす Cre-loxP システムを用いた。

①SCN 特異的ノックアウトマウス作製。

上記 Floxed マウスと、SCN-specific CRE を掛け合わせて作成したコンディショナルノックアウトマウスにて、時差条件負荷時の行動リズムを測

定する。

②SCN 以外組織特異的ノックアウトマウス作成
組織特異的 Cre (アルブミン Cre 等) マウスを
Floxed マウスと掛け合わせて、行動リズム異常を
検索する。

C.研究結果

マウス行動検索には、12 時間明期 12 時間暗期の明暗条件下で 1 週間飼育し、その後 8 時間明暗周期を前進させることで時差を与えた。この時差への再同調に必要となる日数を測定することで時差への再同調速度を評価した。

(1) V1a 受容体のシングルノックアウトマウス (V1aKO) と V1b 受容体シングルノックアウトマウス (V1bKO) の行動リズム所見

V1a、V1b 受容体それぞれのシングルノックアウトマウス (V1aKO、V1bKO) と V1aV1b 受容体をダブルノックアウトした V1aV1bDKO マウスとを時差条件 (8 時間位相前進) への同調日数を検索した。同調に必要な日数は、V1aV1bDKO<V1bKO<V1aKO の順に速やかに行われた。

(2) 臓器特異的 V1a、V1b 受容体ノックアウトマウスの作製

V1a 遺伝子は SCN に強く発現している。また、V1b 遺伝子も SCN への発現報告がある。そこでどちらの遺伝子が SCN の時差機能に効果があるかを調べるため SCN 特異的 Cre を用いて、SCN 特異的コンディショナルノックアウトを用いて、生体リズムの時差機能を検索した。その結果、SCN のバソプレッシン受容体は時差調整に重要な働きをすることが解明された。

バソプレッシン受容体は SCN 以外の、肝臓等にも存在する。そこで、アルブミン Cre マウス等を floxed マウスに掛け合わせた。その結果、肝臓のバソプレッシン受容体は時差調整に関与しないことが解明された。

D.考察

生体リズムの中枢である SCN における機能性受容体の一つを同定することが出来た。

24 時間周期の生体リズムは遺伝子で規定され、全細胞で生み出される、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みである。しかし、哺乳類にお

いては、時計遺伝子のリズムだけでは生理的なリズム発振は出来ず、時計中枢での細胞間のシグナル伝達が必要である。バソプレッシンは細胞間の強力な時間シグナルの局所回路の重要な伝達物質である。

E.結論

バソプレッシン(英: Vasopressin)は言うまでも無く、視床下部で合成され、脳下垂体後葉から分泌され、腎臓での水の再吸収を増加させ、利尿を妨げる抗利尿ホルモンである。今回、SCN では生体リズムの調節に重要であることが明らかとなった。今後、組織特異的コンディショナルノックアウトの手法で、詳細な解析が期待される。

F.研究発表 (上記課題名に関するもの)

1.論文発表

なし

2.学会発表

- 1) 岡村 均: 多層的時間発振機構: 細胞の時計とシステムの時計、東京都総合研究所主催航海セミナー、東京 (東京都総合研究所)、2015 年 4 月 26 日。
- 2) 岡村均: 生体リズム異常の分子機構の検索、生命科学 4 プラットフォーム説明会・成果シンポジウム、東京 (学術総合センター・一橋講堂)、2017 年 7 月 13 日。
- 3) Hitoshi Okamura: How clock genes are expressed in mammals Time of Our Life: Circadian Clock Mechanisms Chronobiological Symposium, Hanover (Geisei School of Medicine at Dartmouth, NH, USA)、2017 年 7 月 14 日。
- 4) 岡村 均: 生体リズムと疾患～高血圧を中心として～、東京 (第 5 回東京肥満内分泌研究会 ザ・キャピトルホテル東急)、2017 年 7 月 28 日。
- 5) Hitoshi Okamura: Clock on clocks: how clock ticking in the heart of the cell is coupled to physiological rhythms, XV European Biological Rhythms Society Congress, Amsterdam, 2017 年 8 月 1 日。
- 6) 岡村 均: 昼行性哺乳類の生体リズム、第 7 回日本マーモセット研究会大会、京都 (芝蘭会館)、2017 年 7 月 28 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)
研究分担者 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 受容体が免疫系だけでなく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。

これまでの共同研究から、CB₂ 受容体の薬理的阻害によって神経回路の興奮性が上昇し、てんかん発作が出やすくなることが明らかとなっている。平成 29 年度は CB₂ 受容体の薬理的阻害を行ったマウスを用いて自発行動量、馴化の速度、不安の程度を行動実験により評価した。その結果、いずれの指標においても CB₂ 受容体を薬理的に阻害したマウスと対照群で有意な差は認められなかった。今後は学習課題に関する行動実験を追加し、並行しててんかん発作に対する CB₂ 受容体シグナルの影響を詳細に解析する。

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 系統で作出する。次に、全身の細胞で Cre を発現する CMV-Cre マウスや興奮性細胞で Cre を発現する Emx1-Cre マウスと CB₂ floxed マウスを交配することで CB₂ ノックアウトマウスや興奮性細胞特異的 CB₂ ノックアウトマウスを作出する。これらのマウスが作出できれば、それら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オープンフィールドでの行動量の変化も検討する。

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。具体的には、CB₂ 受容体の薬理的阻害を行ったマウスを用いてオープンフィールド課題における自発行動量、馴化の速度、不安の程度を評価した。その結果、いずれの行動指標も対照群と比較して有意な変化を認めなかった。現在、海馬歯状回の興奮性細胞特異的に内因性リガンド産生酵素を欠損したマウス、CB₁ 受容体を欠損したマウスの作出を開始しており、興奮性細胞特異的に CB₂ 受容体を欠損したマウスと表現型を比較する準備をしている。

D. 考察

以上の結果とこれまでの共同研究の結果から、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が、自発運動量や周りの環境の探索行動には影響を与えないと考えられた。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異ができなかった。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や CRISPR-Cas9 によるタンパク標識法などを通じて、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を行う。

E. 結論

CB₂ 受容体の活性化は神経回路の過剰興奮を抑え、社会性を抑制するが、自発運動量や環境の探索行動には影響を与えない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

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

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体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。

正常対照群および対象患者群の症例を積み重ねることにより、昨年度に指摘した頭頂葉及び被殻における拡散特性の異常所見がはっきり認められた。この所見から、大脳皮質下の構造において、connectivity の発達の異常が存在する可能性が示唆された。この結果を踏まえ、関心領域解析と合わせて、全脳解析による異常所見検出の検討も進めている。

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10 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や解離体験）のメカニズム解明につながる可能性があり、社会的にも医学的にも大変意義のあるものといえる。

E. 結論

頭頂葉及び被殻にコントロール群と比較して水拡散特性の異常所見が検出され、大脳皮質下の構造において、connectivity の発達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

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

研究代表者 杉田 保雄¹⁾
研究分担者 三好 寛明¹⁾ 古田 拓也¹⁾ 牟田 絃子¹⁾ 柿田 明美²⁾

1) 久留米大学医学部病理学講座 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

前年度の共同研究で Epstein-Barr virus (EBV) 関連 PCNS リンパ腫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 の役割を検討して EBV 陽性例と陰性例では腫瘍微小環境が異なることを明らかにした。この結果を踏まえて今回の研究では腫瘍細胞の糖代謝に関連する因子 glut-1 の PCNS リンパ腫における働きを検討した。方法及び対象: 過去 10 年間の久留米大学及び新潟大学で診断された PCNS リンパ腫 31 例を対象にした。腫瘍細胞における glut-1 の発現について免疫染色で検討した。glut-1 の発現の評価は腫瘍細胞の細胞膜、細胞質の染色性、標識率(0, 0-5%, 5-50%, 50-100%)により 4 段階で評価した。in situ hybridization により EBER の存在を確認した。結果: 対象症例 31 例中 EBV 陽性例は 11 例であり、EB 陰性例は 20 例であった。glut-1 標識率の平均値は EBV 陽性例では 2.09 ± 1.04 (0: 0, +1: 2 例, +2: 3 例, +3: 5 例)、EB 陰性例では 2.45 ± 1.94 (0: 2 例, +1: 0 例, +2: 5 例, +3: 13 例) であり、両者間に有意差がみられなかった。結論: EBV 関連 PCNS リンパ腫と EBV 陰性例で生物学的差異がみられるが、その差は腫瘍増殖能の差では無く EBV の宿主免疫の抑制が考えられた。

A. 研究目的

前年度の共同研究で Epstein-Barr virus (EBV) 関連 PCNS リンパ腫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 の役割を検討した。その成果として EBV 陽性例では PD-1 陽性の腫瘍浸潤 T 細胞数は陰性例と比較して有意に多く、両者では腫瘍微小環境が異なることを明らかにした。そこで今回はこの結果を踏まえて両者の腫瘍細胞の代謝機構、とくに腫瘍細胞の糖代謝に関連する因子 glut-1 の PCNS リンパ腫における働きを検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

過去 10 年間の久留米大学及び新潟大学脳研究所で診断された PCNS リンパ腫 31 例を対象にした。腫瘍細胞における glut-1 の発現について免疫染色で検討した。glut-1 の発現の評価は腫瘍細胞の細胞膜、細胞質の染色性、標識率(0, 0-5%, 5-50%, 50-100%)により 4 段階で評価した。in situ hybridization により EBER の存在を確認した。また代表症例において β -catenin, glut-1 の蛍光 2 重染色により PCNS リンパ腫における β -catenin, GLU-T1 の相関関係を検討した。

本研究ではゲノムあるいは遺伝子解析ではな

くタンパク発現の解析が行われた。しかしながら、ゲノム解析に準じて久留米大学および新潟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

対象症例 31 例中 EBV 陽性例は 11 例であり、EB 陰性例は 20 例であった。glut-1 標識率の平均値は EBV 陽性例では 2.09 ± 1.04 (0:1 例, +1:2 例, +2:3 例, +3:5 例)、EB 陰性例では 2.45 ± 1.94 (0: 2 例, +1:0 例, +2:5 例, +3:13 例) であり、両者間に有意差がみられなかった (t 検定 $p=0.34$)。また蛍光 2 重染色では PCNS リンパ腫細胞において同一細胞から β -catenin, glut-1 の共発現が確認された。

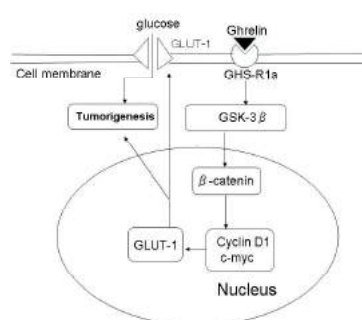
D. 考察

前年度の共同研究で Epstein-Barr virus (EBV) 関連 PCNS リンパ腫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 の役割を検討した。その結果として EBV 陽性例と陰性例では腫瘍微小環境が異なることを明らかになった。今回の研究ではこれらの結果を踏まえて PCNS リンパ腫の腫瘍細胞の糖代謝に関連する因子 GLUT-1 の PCNS リンパ腫における働きを検討した。すなわち PCNS 関連リンパ腫と EBV 陰性例で生物学的差異がみられるが、腫瘍増殖能の差であるのかあるいは EBV の生体の免疫抑制によるものなのかを検討した。そして両者において GLUT-1 発現は有意差はみられないが、むしろ EBV 陰性例で強い傾向がみられた。

一方、細胞膜を通過するグルコースの能動輸送は輸送促進蛋白であるグルコーストランスポーター (GLUTs) により触媒されており、14 種類の GLUTs が同定されている。その中でも生体内に最も広く分布して重要な GLUT family member が glut-1 である。癌細胞は代謝エネルギーを好気性解糖よりも嫌気性解糖により得ている (Warbur 効果) ために正常細胞と比較して細胞増殖と代謝の

ために多量のグルコースを必要としている。glut-1 の発現は多数の癌腫で確認されており、同時に glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) pathway を介してのグルコースの腫瘍細胞内取り込みに関与していることが明らかにされている (図 1)。今回の研究では EBV 陽性あるいは陰性にかかわらず、PCNS リンパ腫では蛍光 2 重染色により glut-1、 β -catenin 発現が確認された。したがって PCNS リンパ腫においても他の癌腫と同様に腫瘍細胞の増殖はグルコース代謝に依存していると考えられる。

図 1. Glut-1 の細胞内グルコース取り込み機構



一方、今回の研究結果では有意差はみられないが、EBV 関連 PCNS リンパ腫は EBV 陰性例よりも glut-1 発現は低値の傾向がみられ、むしろ増殖能は低い可能性もある。したがって EBV 関連 PCNS リンパ腫と EBV 陰性例で予後、発生年齢など生物学的差異がみられるが、その差は腫瘍増殖能の差では無く EBV の宿主免疫の抑制 (すなわち PD1/PD-L1 発現の差) であることが考えられた。

E. 結論

EBV 関連 PCNS リンパ腫と EBV 陰性例では生物学的差異がみられるが、その差は腫瘍増殖能の差では無く EBV の宿主免疫の抑制によ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

Sugita Y, Furuta T, Ohshima K, Kakita A et al. The perivascular microenvironment in Epstein-Barr virus positive primary central nervous system lymphoma: The role of programmed cell death 1 and programmed

cell death ligand 1. Neuropathol; 38:
125-134, 2018.

2. 学会発表

- ① 第58回日本神経病理学会・平成29年6月
3日・東京
- ② 93th annual meeting of American
Association of Neuropathologists, 2017,
June 10, 2017, Orange County Garden
Grove 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 とくに無し。
2. 実用新案登録 とくに無し。
3. その他 とくに無し。

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⁾、柿田 明美²⁾、田中 英智²⁾

1) 岐阜薬科大学 薬物治療学 2) 新潟大学 脳研究所

研究要旨

これまでに ALS 患者の脊髄中の亜鉛輸送体、金属代謝関連タンパクのメタロチオネイン発現の減少、髄液中の亜鉛の上昇が確認されており、亜鉛代謝と ALS 発症の関連が示唆される。また、孤発性 ALS 発症に、後天的な環境因子によるエピジェネティクス変化が関連すると考えられる。これまでに、ALS 患者検体において、エピジェネティクス因子の 1 つであるマイクロ RNA (miRNA) の変動を見出した。今年度は、ALS 剖検にて顕著な増加が認められた miR-5572 について、その標的遺伝子の 1 つが *SLC30A3* であることを見出した。また同 ALS 剖検サンプルにおいて、*SLC30A3* の有意な減少が認められたことから、孤発性 ALS における *SLC30A3* 減少に miR-5572 の増加が関与する可能性が考えられる。以上から、ALS 剖検の *SLC30A3* 減少について、microRNA を介した新規分子メカニズムを見出すことができた。

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。これまでに、ALS 患者検体において、エピジェネティクス因子の 1 つである、2 種類のマイクロ RNA (miRNA) の変動を見出した。本年度はこれら miRNA の機能解析ならびに金属代謝関連遺伝子との関連性を検討する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究は、新潟大学、岐阜大学および岐阜薬科大学倫理委員会承認のもと遂行された。ALS 脊髄剖検にて変動が認められた microRNA のうち、*SLC30A3* 発現を調節する可能性があるものを、TargetScan (microRNA 標的遺伝子予測プログラム) にて予測し、Real time RT-PCR 法で確認した。

これらの解析を経て抽出した microRNA に対する microRNA mimic をヒト胎児腎臓由来細胞株 (HEK293) に導入し、*SLC30A3* 発現量を Real time RT-PCR 法ならびにウエスタンブロット法にて測定した。microRNA の *SLC30A3* 遺伝子への直接的な転写・翻訳抑制のメカニズムを解明するために、pmirGLO vector に *SLC30A3* 遺伝子 3' -UTR をクローニングしたレポーターベクターを作製した。このベクターはレポーター遺伝子であるルシフェラーゼの下流に 3' -UTR をクローニングするマルチクローニングサイトを持ち、クローニングした目的の遺伝子の 3' -UTR に検討したい microRNA が作用すると、レポーター遺伝子アッセイ時のルシフェラーゼ活性が減少する。このレポーターベクターと microRNA mimic を CHO 細胞に Lipofectamine 2000 でコトランスフェクションし、24 時間後にレポーター遺伝子アッセイを行い、ルシフェラーゼ活性を測定する。

C. 研究結果

変化が認められた miR-5572 と miR-139-5p の標的遺伝子について、TargetScan にて標的遺伝子候補を抽出したところ、miR-5572 の標的候補遺伝子に *SLC30A3* が含まれていた。そこで、miR-5572 が SLC30A3 発現を制御しているかを解析するために、HEK293 細胞に miR-5572 mimic を一過性にトランスフェクションし、miR-5572 過剰発現させ、SLC30A3 発現量を検討した。miR-5572 mimic を導入した細胞では、SLC30A3 の有意な減少が mRNA およびタンパク発現レベルともに観察された。続いて、miR-5572 が直接的に *SLC30A3* 遺伝子転写・翻訳抑制を行っているかを、*SLC30A3* 遺伝子の 3' -UTR をクローニングした pmirGLO vector を用いて、miR-5572 mimic を導入した場合のレポータージーンアッセイを行った。結果は、miR-5572 mimic を導入した群において、ルシフェラーゼ活性の有意な減少が確認され、miR-5572 が直接的に *SLC30A3* 遺伝子の 3' -UTR に作用し、転写・翻訳抑制を行っている可能性が示唆された。

D. 考察

ALS 剖検脊髄において顕著に発現増加が確認された miR-5572 の標的遺伝子として *SLC30A3* が見出された。また同 ALS 剖検サンプルにおいて、SLC30A3 の有意な減少が認められたことから、孤発性 ALS における SLC30A3 減少に miR-5572 の増加が関与する可能性が考えられる。

E. 結論

本研究より、ALS 剖検脊髄において顕著に発現増加が確認された新規 microRNA として、miR-5572、また有意な発現減少が確認された新規 microRNA として miR-139-5p を見出した。miR-5572 に関しては、ALS 剖検において発現量の低下を報告している SLC30A3 の転写・翻訳を調節する microRNA としての新規分子メカニズムを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

なし

2. 学会発表

1). 矢部沙織、栗田尚佳、位田雅俊、柿田明美、保住 功「筋萎縮性側索硬化症患者における亜鉛

輸送体 SLC30A3 関連新規 microRNA の探索」メタ
ルバイオサイエンス研究会 2017・2017 年 10 月 13
日・岡山 (実行委員特別賞 受賞)

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⁾
研究分担者 川月 章弘¹⁾
研究分担者 池内 健²⁾
研究分担者 春日 健作³⁾

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

研究要旨

アルツハイマー病(AD)に対する根治的治療の実現が求められるなか、発症前期からの治療的介入が必要であるとの認識が共有されてきた。分子病態を惹起するとされるアミロイドβペプチド(Aβ)の脳内蓄積に対し、孤発例ではその原因についての理解も充分ではない。つまり、脳内 Aβ 蓄積のリスク要因に関しては、遺伝子多型との相関を除いて未だ知見に乏しいのが現状である。申請者らは、γセクレターゼ複合体に結合しながら、その活性を阻害することなく Aβ 産生を抑制する内在性分子として ILEI/FAM3C (interleukin-like epithelial-mesenchymal transition inducer or family with sequence similarity 3, member C) を同定している。ILEI は健常脳では高レベルに発現するが、加齢とともに漸減することにより 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 発現レベルの測定が初期 Aβ 蓄積ないしそのリスクに対するバイオマーカーとして成立する可能性がある。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、Aβ 産生を伴わない APP-C99 の非特異的分解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、ILEI 発現レベルの評価が脳内 Aβ 蓄積ないしそのリスクに対するバイオマーカーになり、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可能性を示唆している。

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

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 例）、軽度認知障害(MCI)（50 例）者、および非認知症例（50 例）を対象とし、血液及び脳脊髄液を採取する。
- (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。A β 40・A β 42・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 例）、非認知症例（10 例）から脳脊髄液を採取した。また、認知症（10 例、72.5 \pm 5.2 歳）、MCI 例（10 例、65.9 \pm 18.3 歳）、非認知症例（10 例、66.6 \pm 6.0 歳）から血漿を採取した。
- (3) 上記の脳脊髄液中 ILEI・A β 40・A β 42・総 tau・リン酸化 tau の測定を行った結果、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た。また、血漿の ILEI 値については、非認知症例 519.6 \pm 104.0 (mean \pm SD) ng/m に比して、認知症例 430.1 \pm 103.6 ng/mL, MCI 例 395.0 \pm 77.4 ng/mL とそれぞれ有意な減少が認められている。

D. 考察

脳脊髄液 ILEI については、AD の診断的意義が指摘されている A β 42/A β 40 比および総 tau 値との間に有意な相関が予想されることから、症例を増やしての検討が必要と考えられる。血漿 ILEI

についても、非認知症対照例に比較し、認知症および MCI 例では有意な減少が認められ、症例を増やすことにより検証を進めることが重要になる。

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。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表：未発表。
2. 学会発表：未発表。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得（本課題に関連した特許）

- (1) 米国特許 特許番号；US 9,649,360 B2,
日付；2017 年 5 月 16 日

発明者：西村正樹

出願者：滋賀医科大学

題目；Pharmacological composition for the treatment and/or prevention of disease involving abnormal accumulation of amyloid β protein

2. 実用新案登録

3. その他

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。さらにスライスパッチクランプなどの *in vitro* 電気生理学的解析を用いて神経回路の動作原理についても明らかにする。

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 Cre リコンビナーゼ (Cre) や Flippase リコンビナーゼ (Flp) を発現させる遺伝子改変マウス (Cre マウスや Flp マウス) を作成し、Cre や Flp 依存的に遺伝子発現を行うアデノ随伴ウイルス (AAV) 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に、それぞれの神経細胞特異的に Cre や Flp を発

現する遺伝子改変動物を作成し、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

オレキシン神経特異的に Flp を発現するノックインマウスオレキシン-Flp マウスを新潟大学にて作成して頂いた。このマウスは、オレキシン神経特異的に Flp と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発

現するようになってきている。また、両アリルをホモにすることによってオレキシンノックアウトマウスとなる。オレキシン-Flp ホモマウスは、オレキシン神経において、オレキシンを産生しないがGFPを発現するために、同定が可能となる。このオレキシンを産生しないオレキシン神経の活動について、脳スライス標本を作成し、スライスパッチクランプにて活動を記録した。その結果、オレキシンを産生しないオレキシン神経は過分極しており、活動が低下していることが明らかとなった。また、オレキシン神経細胞の容量が僅かに増加していることも判明した。ボルテージクランプ記録によって、興奮性入力 (EPSC) を解析するとEPSC 頻度が有意に減少していることが明らかになった。さらに、オレキシン神経に hM3Dq を発現させて、オレキシンを産生しないオレキシン神経を活性化させ、睡眠覚醒における影響を観察したところ、クロザピン N オキサイド (CNO) を投与してオレキシン神経を活性化したマウスでは、覚醒時間が延長し、ノンレム睡眠とレム睡眠の減少が認められた。しかしながら、脱力発作は減少せず、明期ではむしろ有意に増加した。

D. 考察

オレキシン神経は、オレキシンだけでなく、ダイノルフィンやグルタミン酸などを共産生し、共遊離する。オレキシンを産生しないオレキシン神経活動を活性化すると、睡眠覚醒の異常の多くは改善されたことから、オレキシン以外の神経伝達物質によって、補償されると考えられた。しかしながら、脱力発作は減少せず、むしろ増加したことから脱力発作にはオレキシンが重要であることが明らかになった。

E. 結論

オレキシンを産生しないオレキシン神経活動を活性化させ、睡眠覚醒や脱力発作における影響を解析したところ、睡眠覚醒はオレキシン以外の伝達物質によって、改善されたが、脱力発作はオレキシン以外の伝達物質によって改善されなかった。これらの結果はオレキシンが脱力発作を防ぐのに重要であることを示している。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Am J Physiol Heart Circ Physiol 312: H808-H817, 2017.
2. Proc Natl Acad Sci U S A 114: E3699-E3708, 2017.
3. eLife 6: e24779, 2017.
4. Endocrinology 159: 763-775, 2018.
5. Sci Rep 8: 2717, 2018.
6. Biochem Biophys Res Commun 496: 1102-1108, 2018.
7. Mol Pain 14: 1744806918756406, 2018.
8. Mol Pain 14: 1744806918754934, 2018.
9. Front Neural Circuit, 12:6, 2018.
10. Behav Brain Res 346: 96-104, 2018.

2. 学会発表

1. 山中章弘. オレキシン神経活動の操作と記録～摂食行動-睡眠覚醒調節における役割の解明～. 第15回桜山睡眠研究会, 2017.4, 名古屋.
2. 山中章弘. 視床下部神経による摂食代謝・睡眠覚醒・記憶の制御. 第27回日本行動神経内分泌研究会 教育講演, 2017.4, 瀬戸内.
3. Yamanaka A. Optogenetics and pharmacogenetics reveals regulatory mechanism of sleep/wakefulness and memory. Cell biology and systems biology course meeting, 2017.4, Kyoto.
4. 山中章弘. 光遺伝学・薬理遺伝学を用いた睡眠覚醒と記憶の制御. 島根大学大学院セミナー, 2017.5, 出雲.
5. 山中章弘. 技術革新が切り拓く最新神経科学研究. 星薬科大学薬理学教室 平成29年度同門会学術セミナー, 2017.5, 東京.
6. 山中章弘. 光遺伝学・薬理遺伝学を用いた睡眠覚醒と記憶の制御: メカニズム解明. 第64回日本実験動物学会総会, 2017.5, 福島.
7. 山中章弘. 特定神経活動操作で迫る. 代謝疾患フォーラム 2017, 2017.6, 仙台.
8. 山中章弘. アップコンバージョンを用いたファイバーレス光遺伝学の開発と応用. 第二回ルミノジェネティクス研究会, 2017.6, 箱根.
9. Yamanaka A. Hypothalamic neurons erase memory during sleep. New York University Seminar, 2017.6, New York, NY, U.S.A.
10. Yamanaka A. Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory. Mount Sinai seminar, 2017.6, New York, NY, U.S.A.
11. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節に

- おける役割について. Tochigi Insomnia 研究会 2017, 2017.7, 宇都.
12. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. SLEEP SYMPOSIUM 2017, 2017.7, さいたま市.
 13. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠覚醒調節と記憶の制御. 第 40 回日本神経科学大会, 2017.7, 千葉市.
 14. 山中章弘. ファイバーレス光遺伝学の開発. 第 4 回包括的緩和医療科学学術研究会・第 5 回 Tokyo 疼痛緩和次世代研究会 合同研究会, 2017.8, 東京.
 15. Yamanaka A. The physiological role of orexinergic neurons in the regulation of sleep wakefulness, pain and metabolism. International Conference of Sleep Medicine and Research (ISSR 2017), 2017.9, Goa, India.
 16. 山中章弘、向井康敬. オレキシン神経に対するドーパミンの長期的作用の解析. 第 52 回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 2017.9, 横浜.
 17. 山中章弘. 光遺伝学・薬理遺伝学を用いた睡眠覚醒調節メカニズムの解明. 第 47 回日本小児神経学会小児神経学セミナー, 2017.9, 府中.
 18. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠と記憶の制御. 第 47 回日本神経精神薬理学会 シンポジウム 8: 睡眠・生体リズムの神経機構解明による神経精神疾患へのアプローチ, 2017.9, 札幌.
 19. Yamanaka A. Generation of sleep disorder model mice by ablation of specific types of neurons. World Sleep, 2017.10, Prague, Czech Republic.
 20. Yamanaka A. Regulatory mechanism of sleep and memory by the hypothalamic neurons. World Sleep, 2017.10, Prague, Czech Republic.
 21. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. 香川県睡眠治療セミナー, 2017.10, 高松.
 22. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. 第 6 回世田谷クリニカルフォーラム, 2017.10, 東京.
 23. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠覚醒・記憶・代謝内分泌調節. 第 42 回日本比較内分泌学会シンポジウム 「摂食とエネルギー代謝研究の最前線」, 2017.11, 奈良.
 24. 山中章弘. 光遺伝学・光生理による睡眠覚醒と記憶の制御メカニズム解明. 日本比較生理生化学会 第 39 回福岡大会 シンポジウム 「動物と光: 光生理学と光遺伝学」, 2017.11, 福岡.
 25. Yamanaka A. Regulatory mechanism of sleep/wakefulness by the hypothalamic neuropeptide-producing neurons. 120th WPI-IIIIS Seminar, 2017.12, Tsukuba, Japan.
 26. 山中章弘. シングルセル解析による本能行動に関わる視床下部神経回路の機能解明. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 日本薬理学会シンポジウム 「シングルセル解析が切り開く薬理学の新潮流」, 2017.12, 神戸.
 27. 山中章弘. ファイバーレス光遺伝学を用いた神経活動操作と行動制御. 光量子工学研究領域セミナー, 2017.12, 和光.
 28. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. 第 70 回九州精神神経学会 第 63 回九州精神医療学会 ランチョンセミナー, 2018.1, 宮崎.
 29. Yamanaka A. Regulatory mechanism of sleep/wakefulness and memory. The BRI International Symposium 2018 "The innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models", 2018.2, Niigata, Japan.
 30. 山中章弘. 光遺伝学・薬理遺伝学による特定神経活動操作を用いた睡眠覚醒、リズム研究. 時間学特別セミナー, 2018.2, 山口.
 31. 山中章弘. 起きるべきか?、寝るべきか?、それが問題だ. 第二回名古屋リズム研究会, 2018.2, 名古屋.
 32. 山中章弘. ファイバーレス光遺伝学を用いた神経活動操作と行動制御. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 S10: 「神経ペプチドによる行動制御研究の最前線」, 2018.3, 武蔵野.
- 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

意識科学の基づく「自動学習実験機能を備えた飼育装置による遠隔操作実験法」を用いたマウス表現型解析

研究代表者 若菜 茂晴¹⁾
研究分担者 澁木 克栄²⁾

- 1) 理化学研究所バイオリソースセンターマウス表現型解析開発チーム
- 2) 新潟大学脳研究所システム脳生理学分野

研究要旨

表現型解析は生物機能そのものを解明する手段であり、その結果を見いだすことは生物学の目的といっても過言でない。しかしもともと表現型とは遺伝学で生まれた言葉で、遺伝子型によって規定された生物の形態、構造、行動や生理的機能をあらわすものである。近年、実験動物としてマウスはその厳格性を求められてきており、精密に記すことが大切である。マウスの表現型解析を進めるに当たってその情報をどのように扱うべきか、個人研究レベルでなく、広く国際標準化したものとして理解してもらう必要がある。我々はこれまで ENU ミュータジェネシス、日本マウスクリック、および IMPC (International Mouse Phenotyping Consortium) の活動を通じてマウスの網羅的表現型解析に取り組んできた。これらの経験を踏まえ、「自動学習実験機能を備えた飼育装置による遠隔操作実験法」の重要さと困難さについて検討した。

A. 研究目的

マウス表現型解析における自動学習実験機能を備えた飼育装置による遠隔操作実験法」の課題を検討する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

理化学研究所バイオリソースセンターマウス表現型解析開発チームで展開している日本マウスクリックの各種表現型解析と新潟大学脳研の共同研究者の開発した「自動学習実験機能を備えた飼育装置」のプロトコルの比較検討を行った。

C. 研究結果

理化学研究所マウスクリックの行動バッテリーでは 13 種類の検査を行う基本検査パイプライン 1 と 7 種類の行動検査を行う行動解析バッテリーパイプライン 2 がある。

http://ja.brc.riken.jp/lab/jmc/mouse_clinic/business/pipeline.html

これらはそれぞれ詳細な SOP (標準検査基準書) に基づいて行われており、特にパイプライン 2 では Naïve なマウスを用意して各検査をリレーショナルに行うシステムになっている。一方、澁木から開発した「自動学習実験機能を備えた飼育装置による遠隔操作実験法」では、短期記憶+情報統合機能が特異的に障害された遺伝子改変マウスを探索することが可能である。これらのスクリーニングにより、意識に関与する遺伝子群 (分子群) の同定を行うことを目的としている。しかし、本試験に於いてはマウスの取り扱い、実験にかなりの熟練を要し、データを取得するには、実験者のかなりな訓練が必要と思われた。また、遠隔操作実験法ではネットワーク環境の調整が必要である。

E. 結論

「自動学習実験機能を備えた飼育装置による遠隔操作実験法」はマウスの意識を客観的に測定し、精神機能解明の重要な課題に取り組む画期的な方法である。しかし、マウスの表現型解析の開発においては、これまで日本マウスクリニックで取り組んできた表現型解析にまつわる多くの問題を解決しなければならない。特に実験データの再現性、信頼性は本科学を理解する上で保証されなければならない問題である。「自動学習実験機能を備えた飼育装置による遠隔操作実験法」では、短期記憶＋情報統合機能が特異的に障害されたマウスにおいて精神行動を理解する方法で有り、「意識」を理解する手がかりになることが期待されている。今後マウスクリニックで経験した諸処の問題を解決していくことが重要と思われる。さらに本方法はマウスクリニックで開発した行動解析バッテリーとともに、マウスを用いたヒト精神疾患解明の手がかりとなることが期待される。

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 特になし

結合性解析を用いた統合失調症における情報統合機能の解析

研究代表者 宮田 淳¹⁾
研究分担者 澁木 克栄²⁾

- 1) 京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座精神医学教室
2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

統合失調症の症状は、まさに意識統合の異常と考えられるにもかかわらず、これまで意識の問題としてアプローチされることはなかった。本研究では、統合失調症が「短期記憶+情報統合機能」としての意識の異常に他ならないという仮説を、患者の構造的・機能的結合性解析、及び意識のしくみ障害マウスや他の統合失調症モデルマウスにおける所見との比較を通して検証する。

A. 研究目的

統合失調症はさせられ体験などの妄想、幻聴、緊張病症状(意識変容状態)等の自我意識の異常と、短期記憶を含む広汎な認知機能障害を呈する。その病態については、脳ネットワークの構造的・機能的な Connectivity(結合性)の異常を示唆する知見が集積してきている。これらの症状は、まさに意識統合の異常と考えられるにもかかわらず、これまで意識の問題としてアプローチされることはなかった。本研究では、統合失調症が「短期記憶+情報統合機能」としての意識の異常に他ならないという仮説を構造的・機能的結合性解析を用いて検証する。以下の研究を行う:

- (1) 共同研究者の澁木が作成した「意識のしくみ障害マウス」の知見に基づいて、統合失調症患者の行動課題を選定・解析する。
- (2) 統合失調症患者で超高磁場・高傾斜磁場による fMRI・拡散MRIを撮像し、次世代結合性解析により、情報統合機能の異常と結合性異常を明らかにする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究課題では、3 テスラの高傾斜磁場 MRI および 7 テスラの超高磁場 MRI によって撮像された、多モダリティの脳画像による次世代構造的・機能的結合性解析を用いて、意識の統合およびその異常の神経基盤を明らかにする。それぞれ約 100 名の統合失調症および健常対照群を対象とする。

1) 各被験者について、幻覚・妄想、緊張病症状の臨床評価、および意識のしくみ障害マウスにおける「短期記憶+情報統合機能の障害」に対応する認知機能評価を施行する。

2) 次世代拡散 MRI 解析手法により、白質線維の全脳的および線維束特異的解析を行い、統合失調症における白質の構造的結合性異常を同定する。

3) 機能的 MRI の Seed based 解析および独立成分分析により、意識や意思に関わる Default mode network (DMN)、注意の切り替えに関わる Salience network、皮質-視床-基底核ネットワークなどのネットワーク内及びネットワーク間の機能的結合性解析を行い、統合失調症における機能的結合性異常を同定する。

4) 統合失調症の治療前後で上記臨床評価および撮像を行い、幻覚・妄想、意識変容、認知機能の改善の神経基盤を明らかにする。

本研究は京都大学医の倫理委員会の審査を経て行う。

C. 研究結果

統合失調症では動機 salience と salience network の間の機能的結合性に異常があり、そ

の異常のパターンが発病前、発病直後、「慢性期で異なっていることを明らかにした (Miyata et al, Society for Neuroscience 2017, ワシントン DC, 米国)。また DMN における Precuneus の機能的結合性が高いと健常者では保守性バイアス、患者では JTC バイアスに傾くことを明らかにした (Miyata et al, Schizophrenia International Research Society 2018, フィレンツェ, イタリア)。

D. 考察

海馬・線条体の異常 salience と Insula-ACC の SN とは関連し、統合失調症ではその異常があることが示された。またこのような結合性は発病の前後でパターンが変わる可能性が示唆された。また DMN とくに Precuneus の結合性が、分析的・直感的な意思決定のスタイルと関連していると考えられた。

E. 結論

結合性解析の手法は統合失調症の病態を意識の異常の観点から明らかにするのに有用である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

Two network model of aberrant salience in schizophrenia. Society for Neuroscience 2017, Washington DC, USA.

Neural correlates of conservatism and jumping to conclusions biases. Schizophrenia International Research Society 2018, Florence, Italy.

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

血液および髄液におけるアルカデインのアルツハイマー病バイオマーカーとしての

検証と解析

研究代表者 鈴木 利治¹⁾

研究分担者 池内 健²⁾、羽田沙緒里¹⁾、齊藤 遥³⁾

1) 北海道大学大学院薬学研究院 2) 新潟大学脳研究所 3) 北海道大学大学院生命科学院

研究要旨

アルカデインファミリーである Alca と Alcβ は、α セクレターゼと γ セクレターゼによる切断を受け、p3-Alca および p3-Alcβ を分泌する。これまで p3-Alca の主要分子種 p3-Alca35 を測定して来たが、今回 p3-Alcβ37 及び p3-Alcβ40 を定量する方法を確立し、老化および神経変性疾患との関連性の解析を進めた。加齢に伴い p3-Alcβ は減少傾向を示す。本共同研究で、髄液中 p3-Alcβ37 が MCI 及び AD 患者でさらに有意に低下することが明らかになった。細胞を用いた解析から、p3-Alcβ 37 の生成減少と Aβ42 の生成増は逆相関を示すことが明らかになり、p3-Alcβ37 の減少は Aβ42 の生成増を反映すると考えられた。p3-Alcβ は凝集性を示さないため、AD 患者髄液中での減少は、脳内沈着による Aβ の減少とは異なり、γ セクレターゼ機能の低下を示すことが示唆された。

A. 研究目的

これまで、アルカデインファミリーである Alca と Alcβ は APP α セクレターゼと γ セクレターゼによる切断を受け、p3-Alca および p3-Alcβ を分泌する。35 アミノ酸からなる p3-Alca35 は CSF 中の主要分子種であり、マイナー分子種として p3-Alca38 が検出出来る。一方、p3-Alcβ はヒト髄液(CSF)中では p3-Alcβ37 と p3-Alcβ40 が検出出来る。今回 p3-Alcβ37 と p3-Alcβ40 を特異的に定量出来る sELISA 法を開発し、ヒト CSF 中の定量を行った。

本共同研究では、新潟大学で測定した髄液中の複数の既存バイオマーカーとの相関性を解析し、AD バイオマーカーとしての妥当性を検証する事を目的とした。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

p3-Alcβ37 と p3-Alcβ40 の C 末端側を特異的に認

識するモノクローナル抗体を作成し、N 末側の共通抗体と組み合わせて、p3-Alcβ37 と p3-Alcβ40 を定量する sELISA 系を樹立した。共同研究者の池内らが Aβ42 及び Tau を解析した CSF サンプルを用いて、p3-Alcβ37 及び p3-Alcβ40 を定量し、AD における変化を解析した。なお、本サンプル以外に、別の 2 箇所のコホートサンプルも同じ解析を行った。

p3-Alcβ37 及び p3-Alcβ40 の変化の原因を解明する目的で、細胞を用いた解析も行った。

C. 研究結果

CSF 中 p3-Alcβ は、MCI 及び AD 患者で有意に減少するか、減少傾向を示した。既存バイオマーカーである、Aβ42 も有意に減少し、また Tau 及び pTau は増加した。AD 患者 CSF における p3-Alcβ の減少は、p3-Alcβ が凝集性を示さないため、Aβ の減少とは異なる機構が考えられた。そこで、細

胞を用いた解析を行い p3-Alc β と A β の生成機構の関連性を調べた。細胞に A β 42 の生成が増加する γ セクレターゼの修飾剤を作用させ、p3-Alc β の生成を解析した。その結果、p3-Alc β 37 の生成減少と A β 42 の生成増加は相関し、p3-Alc β 40 は A β 40 様の変化を示した。

D. 考察

既存バイオマーカーである A β 42 の CSF 中での低下とタウの上昇を示す典型的な AD 患者では CSF 中の p3-Alc β 37 が減少するが、これは p3-Alc β 37 の脳内生成量の低下を反映すると考えられた。すなわち、CSF 中の p3-Alc β 37 が低値を示す患者は、CSF の A β 42 が低値であっても脳内 A β 42 の生成は増加して居る事が示唆された。今後バイオマーカーとして、発症前対照者の CSF p3-Alc β 37 を解析する事で、脳内 γ セクレターゼの変化を捉えることが期待できる。さらに血液で測定を行う事で、AD バイオマーカーとしての検討を今後おこなう予定である。

E. 結論

p3-Alc β 37 と p3-Alc β 40 の C 末端側を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成し、p3-Alc β 37 と p3-Alc β 40 を定量する sELISA 系を樹立した。

作成下 sELISA 系を用いて CSF 中の p3-Alc β を定量した。既存バイオマーカーで AD と診断された患者の CSF では p3-Alc β は低値を示した。これは、A β 42 が凝集により低値を示すのと異なる仕組みによる。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

” Changes in p3-Alc β 37 and p3-Alc β 40, products of Alcadin β generated by γ -secretase cleavages, in aged monkeys and Alzheimer’s disease patients.” by Saori Hata^{1*} ξ , Chiori Omori^{1,2} ξ , Ayano Kimura¹ ξ , Haruka Saito¹, Nobuyuki Kimura^{3,4}, Veer Gupta^{5,6, 7}, Steve Pedrini^{6,7}, Eugene Hone^{6,7}, Pratihtha Chatterjee⁸, Kevin Taddei⁶, Kensaku Kasuga⁹, Takeshi Ikeuchi⁹, Masaaki Waragai¹⁰, Masaki Nishimura¹¹, Anqi Hu¹, Laurent Meijer¹², Masahiro Maeda¹³, Colin L Masters¹⁴, Chris Rowe¹⁵, David Ames^{16,17}, Ralph N Martins^{5,6,7,8}, Kazuo

Yamamoto² and Toshiharu Suzuki^{1*}

2. 学会発表

OHata S., Kimura Y., Waragai M., Ikeuchi T., Martins R., Kimura N., Nishimura M., Suzuki T.

Level of of p3-Alc β peptides alter in CSF of Alzheimer’s patients.

Alzheimer’s Association International Conference 2017

July 16-20 2017, ExCeL London, London, England

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

APP の細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析

研究代表者 中山 耕造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 の解析から、 γ -セクレターゼによって制御されるシグナル伝達機構が存在することを示している。我々はさらに、amyloid precursor protein (APP) も Notch 同様に 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もち、APP が γ -セクレターゼによって切断されるときに $A\beta$ と同時に生じる細胞内ドメイン (AICD) が、細胞質から核へ移行し、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誘導することを示している。これは APP が $A\beta$ アミロイドの沈着以外にも、アルツハイマー病の発症に関与する可能性を示唆する結果である。本研究の目的は、AICD の核移行を制御する機構を解明することにある。

現在、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、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ている。また、AICD の神経細胞分裂に対する影響を調べている。

A. 研究目的

我々は Notch や Delta の解析から、 γ -セクレターゼ本来の生理活性は 1 型膜タンパク質のシグナル伝達の制御にあると考えている。このことより、APP も Notch 同様に 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可能性を示唆している。実際我々は、 γ -セクレターゼによって APP が切断されるときに $A\beta$ と同時に生じる細胞内ドメイン (AICD) が核に移行して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誘導することを培養細胞レベルで示している。これらの結果は、 $A\beta$ アミロイド以外にも APP を介した AD の発症に関与する機構が存在する可能性を示唆している。

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

第一歩として、この核移行のメカニズムを解明することにある。

アダプター蛋白質 Fe65 は、AICD の核移行に必須である。我々は、AICD 自体のリン酸化/脱リン酸化によって AICD と Fe65 の結合が制御されていることを示している。AICD は、細胞膜に存在する状態で構成的にリン酸化されている。リン酸化された AICD は、 γ -セクレターゼによって細胞膜から切り出されても Fe65 には結合できない。したがって、リン酸化された AICD は核に移行できず、特定の酵素による AICD の脱リン酸化が核移行に必須ではないかと考えている。

これらのことより、本研究では、AICD の核移行を制御する AICD 脱リン酸化酵素の同定を試みる。

また神経細胞において、細胞分裂に AICD が何らかの影響を及ぼさないかを調べる。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

脱リン酸化活性の測定に使う基質は、既に作製済みの大腸菌で産生したリコンビナント AICD を使用した。

AICD 脱リン酸化酵素は、セリン/スレオニンホスファターゼであり、細胞質に存在する可溶性蛋白質である可能性が高い。そこで、マウス脳のライセートを用いて定法に従いクロマトグラフィーを行い、DEAE sepharose カラムおよび、Creamic Hydroxyapatite カラムによって分画した。

また我々は、レチノイン酸処理により神経細胞に分化誘導することが可能な、AICD を発現する embryonic carcinoma 細胞（P19 細胞）を作製している。この細胞は正常に神経細胞に分化するが、神経細胞への分化に伴ってアポトーシスをおこす。

この細胞を、レチノイン酸処理によって神経細胞に分化誘導し、その分化過程の種々の点で細胞を回収し、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。

C.研究結果

マウス脳のライセートを、常法に従って DEAE sepharose カラムで分画した。その結果、225-300mM の NaCl で溶出した画分に酵素活性が検出された。

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、150mM から 300mM のリン酸で溶出したフラクションが幅広く高い脱リン酸化酵素活性を示した。

各画分を SDS 電気泳動し、銀染色によってパターンを比較した。しかしながら、AICD 脱リン酸化酵素活性と相関するバンドは検出できなかった。

AICD の神経細胞分裂に対する影響を調べるために、AICD を発現する P19 細胞の神経細胞への分化過程で、DNA 量を測定した。G1 期、S 期、

G2/M 期の細胞の割合を検討したところ、各分化段階で AICD を発現しないため神経細胞への分化に伴う細胞死が起きない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。

D.考察

前述したように、AICD の核移行には Fe65 との結合が必須であるが、AICD は構成的にリン酸化されており、AICD が核移行するにはそれ自体の脱リン酸化が必要だと考えられる。

本研究において、実際に AICD を脱リン酸化する酵素活性を検出しており、この仮説が正しいことを示唆していると考えている。

AICD を強制発現する P19 細胞を用いて、神経分化の各段階で DNA 量を測定し、AICD の神経細胞分裂に対する影響を検討した。

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高いように思われた。

E.結論

現在、AICD 脱リン酸化酵素の同定を目標に、精製を進めている。この酵素を同定し、精製した蛋白質の情報を基に cDNA をクローニングする予定である。

その後、それを培養細胞に発現させて、実際に AICD の核移行及び神経細胞特異的な細胞死に関わっていることを確認する。

AICD を強制発現する P19 細胞を用いて、AICD の神経細胞分裂に対する影響を検討した。その結果、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高いと考えられた。

今後、AICD はどのような遺伝子の発現に影響を与え、この過程に関係しているか、検討する予定である。

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

22q11.2 欠失症候群関連因子の機能解析

研究代表者 大久保直 1)
研究分担者 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

22q11.2 欠失症候群/DiGeorge 症候群は、胎児期に現れる咽頭弓の形成異常により、その後心血管系、胸腺、脳神経系の異常につながる先天性疾患と考えられている。その原因遺伝子として最も有力なのが、T-box 型転写因子のひとつ Tbx1 であり、Tbx1 ノックアウト (KO) マウスは、胸腺や心臓に異常を呈する。しかし、Tbx1 の機能や下流遺伝子についてはまだ不明な点が多い。近年、大久保らにより同定された Ripply3 は、培養細胞を用いた解析から Tbx1 の転写調節因子であると示唆されている。Ripply3 KO マウスは、咽頭弓の形成不全により胸腺や心臓流出路、舌咽神経の伸長等に異常があることを見出している。本研究では、Cas9 により Ripply3 に新たな変異を導入したノックインマウスを作製し、その表現型を解析することで、22q11.2 欠失症候群関連因子の生体内での機能を明らかにした。

A. 研究目的

22q11.2 欠失症候群/DiGeorge 症候群は、胎児期に現れる咽頭弓の形成異常により、その後心血管系、胸腺、脳神経系の異常につながる先天性疾患と考えられている。その原因遺伝子として最も有力なのが、T-box 型転写因子のひとつ Tbx1 であり、Tbx1 ノックアウトマウス (KO) は、胸腺や心臓に異常を呈する。しかし、Tbx1 の機能や下流遺伝子についてはまだ不明な点が多い。

一方大久保らによって同定された Ripply3 は、培養細胞を用いた解析から Tbx1 の新規転写調節因子であると示唆されている。Ripply3 KO マウスは、咽頭弓の形成不全により、胸腺や心臓流出路の形成、舌咽神経の軸索の伸長が大きく阻害されることを見出している (Okubo et al. 2011, 2015)。本研究では、Cas9 により Ripply3 遺伝子に新たな変異を導入したノックインマウスを作製し、その表現型を解析することにより、22q11.2 欠失症候群関連因子の詳細な機能を解明することを目的とした。 Ripply (Ripply1, 2, 3) ファミ

リー遺伝子における機能ドメインはいくつか想定されており、例えば、N 末側にある WRPW モチーフは進化的にもよく保存されている。特に Ripply3 の WRPW モチーフは、Tbx1 の転写抑制に関与すると示唆される。そこ本研究では、CRISPR Cas9 システムを用いて WRPW モチーフに変異を導入した遺伝子改変マウスを作製し、その表現型を形態学的に解析した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

WRPW モチーフを全てアラニン (AAA) に置換するため、体外受精で凍結しておいた前核期のマウス受精卵を融解した後、ノックイン用の ssDNA、Cas9、gRNA をエレクトロポレーション法により導入した。その後 2 細胞期まで培養した後、偽妊娠雌マウスの卵管に移植した。生まれた仔マウス (P0 日) をすべてサンプリングし、遺伝子解析を行った。遺伝子型の確定とともに、個体は 4% PFA 固定した後、組織学的な解析に供した。

C. 研究結果

生まれた仔マウスの遺伝子型解析を行った結果、11匹中4匹はインフレームでアラニンに置換された(WRPW→AAAA)ノックインホモ個体であった。またそれ以外は、何らかの in-del が生じたノックアウト個体、あるいはモザイク変異個体であった。

これらの個体についてパラフィン切片を作製し組織学的な解析を行った。その結果、Ripply3 WRPW→AAAA ノックインホモ個体は、いずれも心臓流出路や胸腺の形成に異常が見られた。胸腺は咽頭から分離せず低形成であった。また心臓流出路は重篤な大動脈離断が観察された。この表現型は、これまで知られている Ripply3 KO マウスの胸腺や心臓流出路の表現型と非常に類似していた。

D. 考察

以上の結果から、Ripply3 の WRPW モチーフに変異を入れると、胸腺や心臓流出路の形成に重篤な影響が出ることがわかった。従って Ripply3 の WRPW モチーフは、形態形成に必須であると考えられた。

E. 結論

これまで、Ripply3 の WRPW モチーフの機能は培養細胞を用いた解析のみであったが、本研究により生体内でも重要な役割があることが示された。恐らく咽頭弓が形成される際に、Ripply3 の WRPW モチーフは Tbx1 の転写抑制を担うのに必須なアミノ酸配列であると示唆された。今後は、Ripply3 の進化的に保存された他のドメインにも着目し、特定のアミノ酸置換ノックインマウスを作製し、Ripply3 遺伝子の in vivo での機能を詳細に解析し、22q11.2 欠失症候群の発症メカニズムを解明していく予定である。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

Okubo T, Hara K, Kano M, Takada S. Ripply3 expressing cells give rise to epibranchial

placode derived ganglia and vestibulocochlear ganglia. 日本分子生物学会 ConBio 2017. 12. 7, 神戸

阿部真吾、久保地誠司、佐藤貴文、梶原雄也、高橋晃、佐藤俊哉、大久保直、東貞宏. 北里大学医学部におけるマウスの体外受精とその成績. 動物生殖工学会 2017. 12. 2, 川崎市

佐藤貴文、阿部真吾、久保地誠司、梶原雄也、佐藤俊哉、東貞宏、大久保直. CRISPR Cas9 を用いたエレクトロポレーション法による遺伝子改変マウスの作製. 動物生殖工学会 2017. 12. 2, 川崎市

Okubo T, Hara K, Kano M, and Takada S. Ripply3 expressing cells give rise to epibranchial placode derived ganglia and vestibulocochlear ganglia. 日本発生生物学会 2017. 5. 10-13 東京

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

脳疾患動物モデルの生体イメージングによる、脳疾患機序の解明

研究代表者 水野 秀信 1) 2)
研究分担者 澁木 克栄 3)

- 1) 熊本大学国際先端医学研究機構
- 2) 国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門
- 3) 新潟大学脳研究所システム脳生理学分野

研究要旨

本研究の目的は、生体において脳活動様式の解析するための 2 光子カルシウムイメージング法を開発および洗練すること、またこれを脳疾患動物モデルに適用することで脳疾患の機序を明らかにすることである。研究の過程において、新生仔の体性感覚野における新しいパッチワーク状の同期活動パターンを発見した (Mizuno et al., 2018)。このパッチワーク状活動は正常な大脳皮質神経回路の形成に深く関わりと考えられる。今後、脳疾患モデルにおける活動変化を、パッチワーク活動がどのように破綻するかという指標で解析することが可能となった。これにより、脳疾患機序の解明が進むと期待される。

A. 研究目的

哺乳類の脳神経回路は、胎児期に遺伝情報によって大まかに作られた後、生後発達期に神経活動に依存し成熟する。発達異常により引き起こされる脳疾患の機序を理解するためには、正常脳および疾患脳の両者における神経活動の相違点を知ることが重要である。しかしながら、発達過程において単一細胞レベルで活動の動態を観察する方法の開発は進んでおらず、活動動態は多くが不明であった。

我々はこれまでの研究で、2 光子顕微鏡イメージングを用い、新生仔マウス大脳皮質内の個々の神経細胞の形態変化を観察する方法を開発している (Mizuno et al., 2014; Luo et al., 2016)。本研究の目的は、2 光子イメージング法を洗練し、新生仔大脳皮質の個々の細胞の活動動態を観察する方法を開発すること、また開発した方法を脳疾患動物モデルに適用することで、脳疾患により発達期の活動動態がどのように変わりうるかを明らかにすることである。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

研究に用いた手法はすべて国立遺伝学研究所動物実験委員会において審査および承認されており、倫理面の配慮がなされている。

・エレクトロポレーション

活動様式を可視化するため、大脳皮質神経細胞にカルシウムインディケータ GCaMP6s を導入した。具体的には、麻酔下で妊娠マウスの子宮内の胎仔の脳に DNA 溶液を投与し、電気パルスを与えることで DNA を導入した。その後、子宮を戻し腹部を縫合した。術後保温し回復させた。

・生体イメージング

活動様式を観察するため、生体において大脳皮質神経細胞を 2 光子顕微鏡イメージングした。

具体的には、麻酔下でカミソリを用いて頭蓋骨に小さな穴をあけ、観察用窓を取り付けた。2 光子観察時に頭部を固定するための金具を頭部に取り付け、術後保温し回復させた。回復したマウスを用い、麻酔下あるいは無麻酔下において 2 光

子顕微鏡で神経細胞の活動パターンを観察した。

C. 研究結果

研究ではマウスのヒゲ感覚を担う大脳皮質体性感覚野をモデルとして用いた。マウスにおいて個々のヒゲからの感覚情報を処理する神経細胞は、体性感覚野で集まりバレルとよばれる構造を形成する。バレル内の個々の神経細胞にカルシウムインディケータ GCaMP を発現させ、2光子顕微鏡を用いて活動パターンを観察したところ、バレル内の神経回路形成が活発に行われる生後5日目のマウスでは、体性感覚野の神経細胞がバレル毎に同期して活動することを見出した。この同期活動は体性感覚野全体で見るとパッチワーク状に見える事から、「パッチワーク活動」と名付けた(図1)。

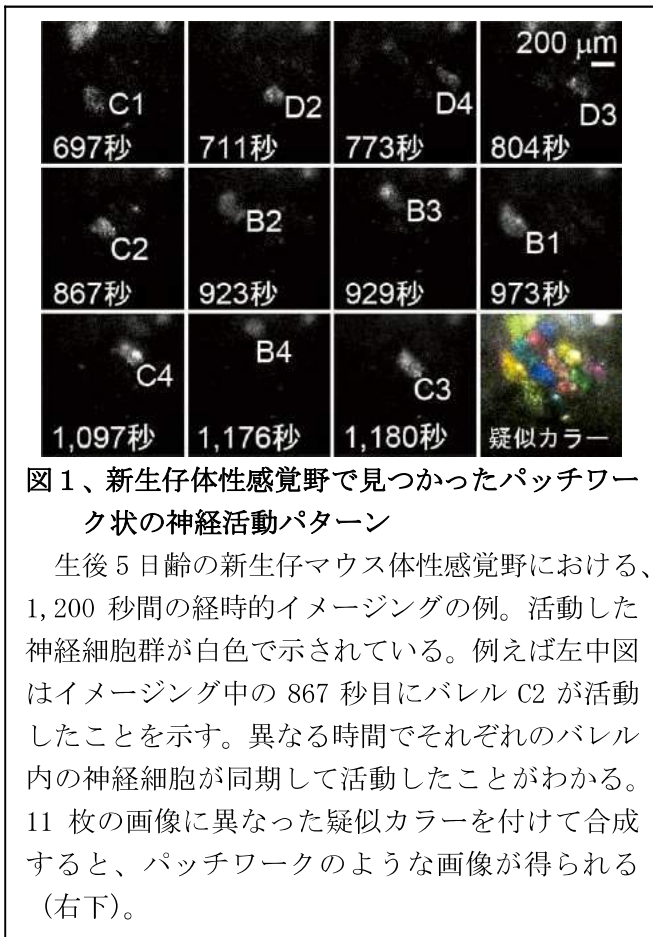


図1、新生仔体性感覚野で見つかったパッチワーク状の神経活動パターン

生後5日齢の新生仔マウス体性感覚野における、1,200秒間の経時的イメージングの例。活動した神経細胞群が白色で示されている。例えば左中図はイメージング中の867秒目にバレルC2が活動したことを示す。異なる時間でそれぞれのバレル内の神経細胞が同期して活動したことがわかる。11枚の画像に異なった疑似カラーを付けて合成すると、パッチワークのような画像が得られる(右下)。

一方、バレル内の回路形成がおおむね完成した後の生後11日目では同じバレルの神経細胞であっても活動の同期性は低下し、パッチワーク型の活動パターンが消失した(図2)。

以上の結果は、バレル神経回路の形成において

パッチワーク活動が重要な役割を担う可能性を示唆する(Mizuno et al., 2018)。

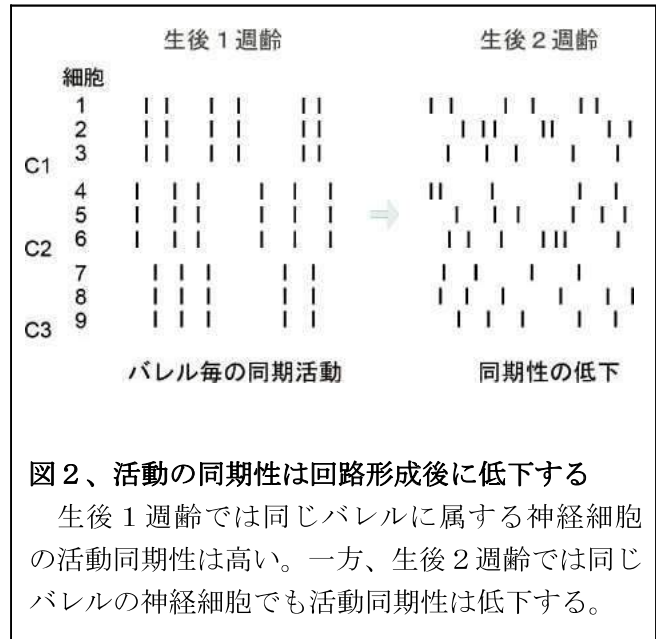


図2、活動の同期性は回路形成後に低下する

生後1週齢では同じバレルに属する神経細胞の活動同期性は高い。一方、生後2週齢では同じバレルの神経細胞でも活動同期性は低下する。

D. 考察

今回の研究により、新生仔期の体性感覚野にパッチワーク状の同期活動が存在することが明らかになった。一方、新生仔期の視覚野には、眼で発生するretinal waveに由来した波上の同期活動が存在することが知られている。これらの事により、発達期の同期活動は領野を問わずに存在するが、異なる同期パターンにより回路形成が駆動されることが考えられる。

今後の課題として、パッチワーク活動が実際に回路形成に関わるか否かを解析することが必要である。現在、活動パターンと神経細胞形態の同時2光子イメージング法の開発を進めており、これを用いることでパッチワーク活動の回路形成における重要性を解析することができると考えられる。この解析と並行し、脳疾患モデルにおける活動(および細胞形態)の変化を調べる事で、活動パターンと回路形成の関連、さらに脳疾患によるこれらの破綻を明らかにすることかできる。これらにより、脳疾患機序の解明につながると考えられる。

E. 結論

哺乳類において発達期の脳皮質では同期活動が観察され、この同期活動は正常な神経回路形成に関わる。その仕組みを解明することで、

正常な子供の脳の発達の理解、および、その破綻による発達障害や精神疾患の理解につながると期待される。

なお、研究推進にあたり、澁木克栄教授に多くのアドバイスを頂いた。また、今後の研究方向性を考える上で、本共同利用・共同研究は多くの助けとなった。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

- Hidenobu Mizuno*, Koji Ikezoe, Shingo Nakazawa, Takuya Sato, Kazuo Kitamura, Takuji Iwasato*. (*corresponding authors)
Patchwork-type spontaneous activity in neonatal barrel cortex layer 4 transmitted via thalamocortical projections.
Cell Rep. 22, 123-35 (2018)

2. 学会発表

(口演)

- 水野 秀信
生体イメージングによる発達期の脳神経回路形成機構の解明
新潟大学脳研究所・新潟脳神経研究会特別例会 2017年12月 新潟市
- Hidenobu Mizuno
In vivo imaging of the developing mouse somatosensory cortex for elucidating the mechanism of neuronal circuit refinement.
Circuit construction in the mammalian brain, NIG symposium 2017年12月 三島市
- Hidenobu Mizuno
Imaging the mouse barrel cortex in vivo to analyze the mechanism of cortical circuit development.
National Taiwan University main campus, 2017年11月 Taipei
- Hidenobu Mizuno
In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in developing cerebral cortex.
National Taiwan University medical campus, 2017年11月 Taipei
- 水野 秀信
発達期脳の生体イメージングによる、脳神経回

路形成と脳病態の解明

熊本大学第14回生命資源研究・支援センターシンポジウム 2017年11月 熊本市

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

ニコチン作動性アセチルコリン受容体の神経系における局在の検討

研究代表者 中根俊成¹⁾
研究分担者 柿田明美²⁾

- 1) 熊本大学医学部附属病院神経内科（分子神経治療学寄附講座）
- 2) 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

ニコチン作動性アセチルコリン受容体（nAChR）に対する自己抗体が産生されることにより何らかの神経疾患を発症することが知られている。自律神経節の nAChR に対する自己抗体によって自己免疫性自律神経節障害が起こるが、同じ nAChR サブユニットが自律神経節だけではなく、脳にも存在するとの報告があることから脳症発症の可能性が考慮される。今回の研究では脳、自律神経節標本を用いて、nAChR の局在をサブユニット別に検討した。

A. 研究目的

ニコチン作動性アセチルコリン受容体（nAChR）に対する自己抗体が産生されることにより何らかの神経疾患を発症することが知られている。神経筋接合部の nAChR に対する自己抗体によって重症筋無力症、自律神経節の nAChR に対する自己抗体によって自己免疫性自律神経節障害（AAG）が起こる。特に後者では自己抗体の標的となる nAChR サブユニット（ $\alpha 3$ 、 $\beta 4$ ）が自律神経節だけではなく、脳にも存在することがこれまでの研究より報告されていることから脳症発症の可能性が考慮される。今回の研究では研究期間内にヒト脳・自律神経節標本において nAChR サブユニット（ $\alpha 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ ）別に組織学的検討を行い、その局在を確認する。それによって脳において自己抗体の標的となる nAChR サブユニットが存在するかどうかを明らかにする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

対象：ヒト脳および自律神経節標本
方法：上記の標本を用いて免疫組織化学染色を行う。nAChR サブユニット毎の免疫染色を計画して

いる。自律神経節に主に存在する $\alpha 3$ 、 $\beta 4$ の両サブユニット、脳に主に存在するとされている $\alpha 4$ 、 $\alpha 7$ について脳および自律神経節における局在を明らかにする。

C. 研究結果

抗自律神経節 nAChR 抗体陽性 AAG 症例の剖検例における脳、自律神経節の免疫組織化学染色（ $\alpha 3$ 、 $\beta 4$ ）を行った。他の神経疾患（脳幹梗塞、筋萎縮性側索硬化症、多系統萎縮症、若年性ミオクロニーてんかん）剖検例における同様の検討と比べると染色性の低下を認めた。また頸部交感神経節、腹腔神経節における神経細胞密度のカウント（3-6 視野の平均、1 視野=1 mm²）を比較し、前者では AAG 症例における低下傾向を認めた。

D. 考察

AAG 症例では交感神経優位の障害を認めたことより上述の免疫組織学的解析の結果は興味深い。これまでに AAG 症例での剖検例に関して報告はないが、AAG の動物モデルでは頸部交感神経節における神経細胞密度が低下していることが報告され

ており、今回の結果はそれに合致する。
しかし染色性、神経細胞密度の結果はいずれも定量性が十分ではないと判断し、今後は残余の検体での nAChR サブユニットのタンパク量あるいは遺伝子レベルでの発現をウェスタンブロッティングや RT-PCR で確認していくこととした。

E. 結論

今回の研究では AAG 症例において特徴的な nAChR サブユニットの染色結果を得たとは言い難い。しかし手がかりになる結果として神経細胞密度の低下を認めており、他の方法による検証を行う予定である。

また他の AAG 症例の病理検体の集積が今後は特に必要になると考えた。

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

脳アミロイドアンギオパチーの病態関連分子の解析

研究代表者 植田 光晴¹⁾
研究分担者 柿田 明美²⁾
安東 由喜雄¹⁾
小阪 崇幸¹⁾
井上 泰輝¹⁾

1) 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野 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

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は、アルツハイマー病患者の 80% にみられ、アミロイドベータ (A β) が脳血管に沈着し、脳出血や認知機能低下を生じる。脳血管へ A β 沈着が生じる過程でどのような分子が関与しているか不明な点が多い。本研究では、A β アミロイドが沈着した CAA 症例の脳血管をプロテオミクス等の手法を用いることで、本病態の形成に関与する分子の同定を含めた病態解析を行う。

A. 研究目的

アルツハイマー病では、A β との共存タンパク質が同定され、アポリポ蛋白 E はその代表格であり、AD の病態促進、リスク遺伝子であることが報告されている。このように共存タンパク質の研究を通じ、AD の病態生理が明らかとなっている。ところが、CAA における共存タンパク質はこれまで不明であった。本研究では CAA に罹患した脳血管において A β と共存するタンパク質を同定、その機能を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)

CAA 症例、コントロール症例として、年齢調整した非 CAA 症例の病理組織標本から、レーザーマイクロダイセクションを用い、脳血管を切り出し、プロテオミクス解析により CAA 罹患血管に特異的に多く発現する分子のプロファイリングデータを得た。研究に関しては、倫理委員会からの承認を得た。

C. 研究結果

得られたタンパク質のデータよりこれまでに脳アミロイド沈着との関連の報告のない Sushi-repeat containing protein 1 (SRPX1) が、CAA 罹患血管において多く発現していることに着目した。SRPX1 は、464 個のアミノ酸からなる膜タンパクであり、3 つの sushi ドメインとよばれる特徴的なモチーフ

を有し、補体との相互作用、結合タンパクとして機能する。さらに病理学的検討により、SRPX1 が老人斑には局在せず、CAA 罹患脳血管のみと共局在する興味深い所見を得た。そこで、本研究で用いた症例における脳血管の SRPX1 陽性率の検討を行った。血管径別に分類し検討すると髄膜動脈において、CAA の重症度が高まるにつれ、血管の SRPX1 陽性率が上昇し、疾患との関連が示された。さらにマウスとヒトの脳部位別の SRPX1 の発現を検討したところ、特に脳血管成分における SRPX1 が高値であり脳血管特異性の高い分子であることも併せて示した。

次にマウスより脳血管平滑筋の初代培養細胞を樹立し、A β 40 添加による SRPX1 の発現量について検討を行い mRNA、蛋白レベルで SRPX1 の発現が上昇することを *in vitro* で確認した。次に SRPX1 と A β の相互作用、結合能力について ELISA 法を用いて検討したところ A β 40、42 が濃度依存性に、SRPX1 との結合量が上昇することが判明した。

脳血管平滑筋細胞に A β 40 を添加することでアポトーシスが誘導されるが、A β 40 と SRPX1 を同時に添加すると、アポトーシス作用は A β 単独に比べて増強した。続けて、SRPX1 の siRNA を用いてノックダウンしたところ、血管平滑筋細胞への A β 40 の沈着量が減少した。SRPX1 をノックダウンすることにより、アポトーシスが、軽減され

ることが判明した。

D. 考察

SRPX1 はがん抑制遺伝子としての機能を有し、それ自身でも細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。CAA に罹患した脳血管で SRPX1 が増加し、 $A\beta_{40}$ と結合することによって、平滑筋への細胞毒性をさらに増強させる機序を考えた。このように SRPX1 は $A\beta$ によるアポトーシス作用を強め、血管変性を加速させることが考えられ

E. 結論

本研究はプロテオミクス解析により CAA 罹患血管における $A\beta$ 共存タンパク「SRPX1」を新しく同定し、同タンパク質の CAA の病態制御への応用の可能性を示した。SRPX1 の遺伝子発現抑制による $A\beta$ 沈着抑制、アポトーシス作用抑制は、新しい予防、治療ターゲットとなる可能性がある

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue Y, Ueda M, Tasaki M, Takeshima A, Nagatoshi A, Masuda T, Misumi Y, Kosaka T, Nomura T, Mizukami M, Matsumoto S, Yamashita T, Takahashi H, Kakita A, Ando Y. Sushi repeat-containing protein 1: a novel disease-associated molecule in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*, 2017; 134: 605-617.

2. 学会発表

- 第5回日本アミロイドーシス研究会学術集会
2017年8月, 京都.
第36回日本認知症学会学術集会
2017年11月金沢.

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

意識的機能を実現する神経回路構築の多次元的研究

研究代表者 古田 貴寛 1) 2)
研究分担者 澁木 克栄 3)

- 1) 京都大学大学院医学研究科高次脳形態学
- 2) 大阪大学大学院歯学研究科高次脳口腔機能学
- 3) 新潟大学脳研究所システム脳生理学分野

研究要旨

我々は、「意識」が関連する脳機能との関連性の中で、神経回路の構造を定量的に解析することにより、意識を生み出す神経回路構造の特徴を抽出することを目指す。意識的機能に関連して表現形を持つモデル動物（例えばプロトカドヘリン変異マウス）を題材として、単一ニューロンの樹状突起や軸索の形状を可視化する方法を用いて厳密に回路構造を再構築し、それを定量的に評価する。

A. 研究目的

脳は、情報処理過程においてソフトウェアを持たず、作動アルゴリズムは神経同士の結合構造そのものに埋め込まれていると考えられる。意識機能に異変を持つモデルマウスを題材として、三次元電子顕微鏡技術等の先進的な形態学的実験技術を活用することにより、意識機能と関わりのある大脳皮質や視床のニューロンが形成する神経回路の構造を定量的に解析し、意識を生み出す神経回路構造の特徴を抽出することを目指す。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

本申請課題では、意識機能に異変を持つモデルマウスを題材として、大脳皮質や視床のニューロンが形成する回路構造にどのような変化が生じているかを解析する。光学顕微鏡レベルのデータに関連させる形で、投射先、あるいは細胞体周辺樹状突起の超微細構造データを取得して、シナプス構築を丁寧に解析する。これにより、長距離軸索投射を含む大きなスケールの神経回路をシナプスレベルの分解能を持って分析することが出来る。この時、自動的に超微細構造の連続を撮影し 3D データが得られる装置（集束

イオンビーム走査型電子顕微鏡、FIB-SEM) を利用することにより、効率よく、かつ大規模な超微細データを取得する。こうして得られたデータはシナプス構築を定量的に評価することに活用できる。さらに加えて、明らかにした回路構造の働きを説明する理論モデルを確立し、構造の意義に対する解釈の妥当性を検討する。最終的にはモデルマウスとノーマルマウスの比較から意識機能に関連する回路構造の特徴を抽出する。

上記の研究計画を主体として研究を進めるが、その前段階として、代表者がこれまで研究題材としてきた野生型ラットを用いて、皮質と視床が相互に連絡し合う回路の機能について調べる研究を行う。感覚皮質を破壊することにより、皮質から視床に投射する神経線維を除去したモデル動物を製作し、そのラットの視床ニューロンにおける感覚入力に対する反応特性を調べる。

C. 研究結果

覚醒ラットにおいて触覚刺激に対する視床ニューロンの反応を調べた。感覚皮質を破壊することにより、皮質から視床への影響を除去した状態

では、視床ニューロンの触覚刺激に対する反応は亢進していた。また、その発火パターンはバースト活動が増えていた。視床ニューロンの自発活動を解析した結果において、強い周期的な活動が見られた。さらに、皮質6層では皮質から視床に投射するニューロンが触覚刺激に早い潜時で反応することがわかった。

D. 考察

皮質破壊ラットにおける、視床ニューロンの発火パターンは、バースト活動を示したため、その膜電位に関して低下していることが強く示唆された。皮質の内的状態が、上行性の感覚情報中継ニューロンの膜電位を調節することにより、反応特性や活動特性を就職し、結果として皮質に到達する神経活動信号がダイナミックに変化することが示唆された。

E. 結論

大脳皮質から視床への投射が、感覚入力に対する視床中継ニューロンの応答特性に影響を与えることを明らかにした。感覚情報処理において皮質視床連関の果たす役割について理解が進んだ。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Shaping somatosensory responses in awake rats: cortical modulation of thalamic neurons. Hirai D, Nakamura KC, Shibata KI, Tanaka T, Hioki H, Kaneko T, Furuta T. Brain Struct Funct. 2018 Mar;223(2):851-872.

2. 学会発表

古田貴寛「覚醒ラットにおける体性感覚反応の成形：大脳皮質が視床ニューロンの活動を修飾する」(新潟脳神経研究会特別例会・平成 29 年 12 月 20 日・新潟大学)

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

クラスター型プロトカドヘリン遺伝子を用いた意識研究へのアプローチ

研究代表者 八木 健¹⁾
研究分担者 平山 晃斉¹⁾
研究分担者 澁木 克栄²⁾

1) 大阪大学・生命機能研究科 2) 新潟大学・脳研究所

研究要旨

脳にある複雑なニューラルネットワークにより情報が統合され意識が生まれると考えられている。これまでに我々は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子群が、神経細胞でランダムな組み合わせで発現し、個々の神経細胞の特異的な回路形成に関わることを明らかにしてきた。クラスター型プロトカドヘリン α は大脳皮質に広範に分布しているため、広範な情報統合機能と短期記憶が障害されていると推定される。本研究では、クラスター型プロトカドヘリン α の分子多様性を 12 種類 ($\alpha 1 \sim \alpha 12$) から 2 種類 ($\alpha 1$ と $\alpha 12$ のみ) に減少させたマウスにおいて、1) 後部頭頂連合野におけるヒゲ感覚と視覚の統合機能の異常、2) 後部頭頂連合野における視覚的空間情報の短期記憶の異常、3) 視覚野腹側部における図形情報の短期記憶の異常、4) 視覚野腹側部における聴覚と視覚の統合機能の異常を明らかにした。この様に、クラスター型プロトカドヘリン α の多様性減少マウスでは、異なる感覚の統合機能と短期記憶が同時に障害されていた。これらの結果は、マウスが短期記憶も情報統合機能をも持つことを示し、マウスでも少なくとも原始的な意識を持ち、短期記憶+情報統合機能 (=意識) が、クラスター型プロトカドヘリン α の分子多様性減少マウスでは特異的に障害されていたことを示す。

A. 研究目的

これまでの研究で、クラスター型プロトカドヘリン α の分子多様性が減少したマウスの解析を行い、ヒゲ感覚と視覚との統合機能障害、空間情報の視覚的短期記憶障害、図形情報の視覚的短期記憶障害、聴覚と視覚の統合機能障害の 4 種類の表現型を見出してきた。クラスター型プロトカドヘリン α は大脳皮質全般に渡って広範囲に分布するため、様々な感覚情報の統合機能障害と短期記憶障害が生じていることが推測される。そこで本研究では、クラスター型プロトカドヘリン α の分子多様性減少マウスにおける感覚情報の統合機能障害と短期記憶の障害について解析を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

クラスター型プロトカドヘリン α の分子多様性減少マウスを用いて、1) 後部頭頂連合野におけるヒゲ感覚と視覚の統合機能、2) 後部頭頂連合野における視覚的空間情報の短期記憶、3) 視覚野腹側部における図形情報の短期記憶、4) 視覚野腹側部における聴覚と視覚の統合機能の解析を行った。

C. 研究結果

クラスター型プロトカドヘリン α の分子多様性減少マウスでは、1) 後部頭頂連合野におけるヒゲ感覚と視覚の統合機能の異常、2) 後部頭頂連合野における視覚的空間情報の短期記憶の異常、3) 視覚野腹側部における図形情報の短期記

憶の異常、4) 視覚野腹側部における聴覚と視覚の統合機能の異常が明らかになった。この様に、クラスター型プロトカドヘリン α 多様性減少マウスでは、異なる感覚の統合機能と短期記憶が同時に障害されていた。

D. 考察

クラスター型プロトカドヘリン α は大脳皮質に広範に分布しているため、広範な情報統合機能と短期記憶が障害されていると推定される。これらの結果は、マウスは短期記憶も情報統合機能も持つことを示し、マウスでも少なくとも原始的な意識を持つことと思われる。この短期記憶+情報統合機能(=意識)が、クラスター型プロトカドヘリン α の分子多様性減少マウスでは特異的に障害されていたことになる。

E. 結論

意識を科学的に研究するためには、特異的な意識のしくみが存在しなければならない。即ち意識が複雑な神経回路に必然的(非特異的)に宿る性質であれば、意識を他の神経機能と分離することは不可能であり、意識のしくみを解明することは脳全体のしくみを解明することと等価になってしまう。麻酔や睡眠に伴って一般的な神経機能が大幅に低下すると意識もなくなるので、意識のしくみは非特異的であり、他の神経機能と分離できないように思われる。しかし、我々の結果は、この予想に反し、遺伝子改変マウス(=クラスター型プロトカドヘリン α 多様性減少マウス)では、外見や一見して判る行動異常がないにもかかわらず、短期記憶+情報統合機能の同時障害が生じていたことを示していた。即ち、意識は他の神経機能と分離可能であり、特異的な意識のしくみが存在する可能性が強い。このような特異的な意識のしくみは、クラスター型プロトカドヘリンを始めとする特異的な分子群(遺伝子群)に依存するはずである。このような分子群(遺伝子群)を見つけ出し、その詳細な脳機構を解明していくことによって、昔から人類にとって大きな謎であった、心(意識)のしくみを解明する重要な手掛かりが得られると思われる。

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. Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K, Analysis of prediction error responses in the posterior parietal cortex of awake mice, 第40回日本神経科学会、2017/7/20、幕張メッセ(千葉県千葉市)

2. Nishio N, Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K, Optical imaging of temporal cortical areas involved in audiovisual integration in awake mice, 第40回日本神経科学会、2017/7/20、幕張メッセ(千葉県千葉市)

3. Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Nishio N, Hishida R, Horii A, Yagi T, Shibuki K, Complexity of sound stimuli required for sound-shape associative responses in the mouse auditory cortex, 第40回日本神経科学会、2017/7/20、幕張メッセ(千葉県千葉市)

4. Yagi T, Clustered protocadherins regulate complex neural networks, 第8回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2018/2/10、新潟大学脳研究所(新潟県新潟市)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

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や治療法の開発では、自然発生により得られ樹立された筋疾患モデル動物の研究が重要な役割を果たしてきた。そこで我々は NH-413 と呼ばれる筋ジストロフィーニワトリに注目し、ヒト筋疾患との関連について解析を進めている。この筋ジストロフィーは 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ており、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を導入した WWP1 ノックインマウスや E3 リガーゼ機能を欠いたノックアウトマウスを作製してきたが、更に E3 ユビキチンリガーゼの基質特異性に関与する WW ドメインの一部を欠失した複数系統の遺伝子改変マウスを樹立した。

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。

筋疾患を自然発症し系統維持されていた実験動物の原因遺伝子は、ヒト筋ジストロフィーの原因として認められているものがほとんどであり、それら疾患の病態解明や治療法開発に大きな役割を果たしてきた。一方、NH-413 と呼ばれるニワトリの筋ジストロフィーは WWP1 遺伝子のミスセンス変異が原因とされるが、この遺伝子に関わるヒト疾患はまだ確認されていない。本研究では、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。

通常、WWP1 は 130 kDa のタンパク質として筋細胞膜に局在するが、NH-413 ニワトリでは分解し、筋形質膜から消失する。これは NH-413 に生じた WWP1 の R441Q 変異が E3 機能を喪失させた結果、筋ジストロフィーとなる可能性を示唆していた。この変異は WWP1 の基質特異性に関わる 4 つの WW ドメインの中心に位置するため、基質との結合や選択性に影響する可能性がある。今回、これを明らかにするため、一部の WW ドメインを欠いた WWP1 を発現する遺伝子改変マウスを作製した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

WWP1 E3 ユビキチンリガーゼの WW ドメインの機能と筋ジストロフィーの関連を解析するため、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、WW ドメ

インの一部を異なる範囲でインフレーム欠失したマウスを作製した。マウス骨格筋における 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。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の下に行われた。

C. 研究結果

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集では、マウス *Wwp1* 遺伝子のエクソン 11 内に 2 箇所、或いはイントロン 10 を跨ぎ、エクソン 10 からエクソン 11 に及ぶ範囲内に 2 箇所のガイド RNA を設定し、この間で非相同末端結合を生じさせた。その結果、設定領域内の様々な範囲で遺伝子を欠失した 7 種類のマウス系統を得た。骨格筋を用いた RT-PCR による解析から、これらのうち 3 系統がインフレームで WW ドメインの一部を欠失する WWP1 として発現することが予測された。欠失の形態としては WW1 と WW2 の両 WW ドメインを欠失するもの (Δ WW1&2)、WW2 のみを欠失するもの (Δ WW2)、WW2 中心部の数アミノ酸を欠くもの (Δ sWW2) であった。抗体を使ってこれらのタンパク質発現を調べたところ、いずれの場合も検出は可能であったが正常分子の発現に比べると著しく減少していた。また、局在は変異の種類によって異なっており、 Δ sWW2 は筋細胞膜に留まるのに対して Δ WW1&2 と Δ WW2 は筋細胞膜から消失していた。

D. 考察

最近になり、WWP1 と高い相同性を持つ WWP2 の解析から、HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼの活性制御機構が明らかになり報告された。それによると通常は 4 つの WW ドメインのうち N 末から 2 番目の WW2 が酵素ドメイン内の窪みに収まり E3 酵素活性を抑えているが、外部からの作用によりこれが外れるとリガーゼ活性が上昇する。この抑制解除は基質によってなされると考えられるが、基質非存在下で同様の構造変化を生じさせると自らをユビキチン化し、自己消化を起こすことが示

されている。我々が作製した WW1 から WW2 を欠く 3 種類の WWP1 の振る舞いはこれに酷似しており、WWP1 も WWP2 と同様の機構で E3 リガーゼ活性を制御しているものと考えられた。また、このことは R441Q 変異が WW2 と WW3 の架橋部に生じているにもかかわらず、WW2 ドメインを含む周辺構造に大きな変化を与えている可能性を示唆していた。

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分子の高次構造を変化させることで WWP1 の分解を誘導し、E3 ユビキチンリガーゼとしての機能を喪失させることを明らかにした。しかしながら、これが筋ジストロフィーの発症とどのように結びつくのかは明らかでなく、今後の更なる研究の進展に期待がかかる。

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

今村道博, 井上-上野由紀子, 井上高良, 武田伸一: ゲノム編集による筋ジストロフィーニワトリのモデルマウス化と病態の解析. 第 3 回日本筋学会学術集会, 東京, 8 月 4 日, 2017 年

平田悠, 野村和弘, 千賀陽子, 今村道博, 武田伸一, 岡田裕子, 細岡哲也, 小川渉: 高血糖は WWP1/KLF15 経路を介して筋萎縮を促進する. 第 3 回日本筋学会学術集会, 東京, 8 月 4 日, 2017 年

北澤萌恵, 林晋一郎, 今村道博, 大石由美子, 武田伸一, 金児-石野知子, 石野史敏: Peg11/Rt11 は真獣類の胎児期の筋発生に重要である. 第 3 回日本筋学会学術集会, 東京, 8 月 4 日, 2017 年

Imamura M, Inoue YU, Inoue T, Takeda S: Generation of mouse models for muscular dystrophic chicken by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. ASCB/EMBO 2017 Meeting, Philadelphia, PA (USA), December 4, 2017

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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⁾ 竹尾 透¹⁾ 笹岡 俊邦²⁾

1) 熊本大学生命資源研究・支援センター 2) 新潟大学脳化学研究所

研究要旨

近年、ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変マウス作製は多くの施設で行われるようになり、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た効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウス作製法の確立を目的とし、ノックインマウス作製効率の改善を試みた。また、当研究室が培ってきた生殖工学技術(超過剰排卵誘起法の開発、体外受精率向上のための培地開発、二細胞期胚・精巣上体尾部の冷蔵輸送等)に加え、本研究で行った冷蔵精子を用いた体外受精についてのメカニズム解明および精巣上体尾部冷蔵保存液の開発は、脳疾患関連遺伝子改変マウス研究の今後の発展に大いに貢献できると考える。

A. 研究目的

近年、ジンクフィンガーヌクレアーゼや TAL エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR-Cas システムなどのゲノム編集技術が開発され、受精卵へのマイクロインジェクション法を用いて、高速な遺伝子改変マウスの作製が可能となった。私たちは、超過剰排卵誘起法(Takeo and Nakagata, 2015)、体外受精、受精卵の凍結保存などの生殖工学技術とゲノム編集技術を用いることにより、効率的な遺伝子改変マウスの作製が可能であることを報告した(Nakagawa *et al.*, 2016)。しかしながら、ノックインマウスの作製効率は、ノックアウトマウスの作製効率ほど高率ではなく、ノックインマウスの作製効率を改善することは主要な課題であった。そこで、本研究では、凍結受精卵の融解後の培養時間がノックインマウス作製効率に及ぼす影響について調べた。

また、当研究室では、作製後の遺伝子改変マウス

の輸送や繁殖、凍結保存等に有用な生殖工学技術の開発・改良を目的として研究を行っている。そこで、本研究では、マウス生体輸送より簡便で低コストな精巣上体尾部冷蔵輸送について、冷蔵精子を用いた体外受精率改善における詳細なメカニズム解明および冷蔵精子の長期生存を可能にする新規冷蔵保存液の開発を目的として研究を行った。

B. 研究方法(倫理面への配慮を含む)

CRISPR-Cas システムと 1 本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)および PITCh (Precise Integration into Target Chromosome) システムを用いたノックインマウスの作製を試みた。体外受精後、凍結保存した受精卵を加温、培養後、異なるタイミングでマイクロインジェクションを行い、ノックインマウスの作製効率が異なるか否かを検討した。

冷蔵精子を用いた体外受精においては、精子生

体膜からのコレステロール漏出を促進するメチル-β-シクロデキストリン(MBCD)の受精能改善効果について、冷蔵保存後のMBCD処理精子をfilipin染色し、フローサイトメリーにより解析することにより、精子中のコレステロール量を評価した。また、M540とYo-Pro 1を用いた染色により、生存精子生体膜の流動性を解析し、さらにPNA-FITC染色により、先体反応誘起率を評価した。

新規冷蔵保存液の開発においては、ケルセチン及びその溶剤であるジメチルスルホキシド(DMSO)の低温保護効果を冷蔵精子の運動能解析と体外受精率およびミトコンドリア活性と先体反応誘起率により評価した。

C. 研究結果

ゲノム編集技術を用いたノックインマウス作製においては、マイクロインジェクションを行うまでの受精卵の培養時間を変えることにより、ノックインマウスの作製効率に差異が生じた。ssODNの導入では、比較的短時間および長時間の培養で良好なノックイン効率を得ることができ、PITChシステムを用いた場合は、比較的短時間の培養でのみ良好なノックイン効率を得ることができた。

冷蔵精子を用いた体外受精において、MBCDは冷蔵精子の受精能を向上させ、精子の頭部、中片部および尾部全体からコレステロールを強力に除去していた。また、MBCD処理により、精子生体膜の流動性が変化しており、精子超活性化の指標である頭部の振幅および先体反応誘起率が上昇することが明らかとなった。

新規冷蔵保存液の開発においては、ケルセチンおよびDMSOを既存の保存液に加えることにより、冷蔵精子の良好な運動能・受精能維持期間を3日から10日に延長することができ、ケルセチンおよびDMSO添加の新規保存液を使用した場合もこれまで同様に体外受精・胚移植により正常産子を得ることができた。

D. 考察

ゲノム編集技術を用いたノックインマウス作製にお

いて、良好なノックイン効率を得るためには、ドナーDNAの種類と受精卵の培養時間を念頭に置き、インジェクション作業を行うことが重要であった。本研究では、体外受精や受精卵の凍結保存等の生殖工学技術とゲノム編集技術を活用した効率的かつ有用性の高いノックインマウス作製法を提供できたと考える。

冷蔵精子を用いた体外受精におけるMBCDの受精率改善効果は、コレステロールの漏出により精子生体膜の流動性変化が起り、精子の超活性化および先体反応誘起といった一連の受精能獲得誘導が効率的に起こるためと考えられた。新規冷蔵保存液の開発においては、ケルセチンおよびDMSOが精子への強力な低温保護効果を持つことが明らかとなり、冷蔵期間の更なる延長を可能にした。これらのことから、精巣上体尾部輸送中の到着遅延トラブル(特に国際輸送時の通関等)にも十分対応可能であり、冷蔵精子の輸送およびその後の体外受精において有益な情報を提供できたと考える。

E. 結論

当センターでは、これまで、様々な生殖工学技術の開発、改良のための研究を行ってきた。近年急速な発展を続けるゲノム編集技術は、遺伝子改変マウス作製のスタンダード技術となりつつあり、生殖工学技術との有効利用により、更なるゲノム編集技術の発展および効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウスの作製に貢献できると考える。また、遺伝子改変マウスの効率的な繁殖、輸送、凍結保存等に役立つ生殖工学技術の開発・改良を継続して行い、脳疾患関連遺伝子改変マウス研究の国際的な支援に貢献できれば幸いである。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Biol Open. 6(5):706-713. 謝辞無し

Dimethyl sulfoxide and quercetin prolong the survival, motility, and fertility of

cold-stored mouse sperm for 10 days. Yoshimoto H, Takeo T, Nakagata N. Biol Reprod., 97(6):883-891. 謝辞無し

Fertility of cold-stored mouse sperm is recovered by promoting acrosome reaction and hyperactivation after cholesterol efflux by methyl-beta-cyclodextrin. Yoshimoto H, Takeo T, Irie T, Nakagata N. Biol Reprod. 96(2):446-455. 謝辞無し

2. 学会発表

- CRISPR-Cas システムを用いたノックインマウス作製における凍結受精卵培養時間の検討
第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年
福島
- CRISPR-Cas システムを用いたノックインマウス作製における凍結受精卵培養時間の検討
日本ゲノム編集学会 第 2 回大会 2017 年
大阪
- 生体膜コレステロール量がマウス凍結精子の耐糖能に及ぼす影響
第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年
福島
- メチル-β-シクロデキストリンによる生体膜脂質環境の変化がマウス冷蔵精子の超活性化を誘起する
第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年
福島
- マウス生殖工学技術で切り拓く科学研究の未来
第 51 回日本実験動物技術者協会 2017 年
山形

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

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、凝集体形成に重要な構造は、C 末領域の天然変性領域内に存在する 2 箇所の α ヘリックスである。この構造を残すためには、C 末領域の中心に位置する Q/N 領域 (320-367) が必要である。そこで CRISPR/Cas9 を用い、C 末の終端領域のみを欠損させ、Q/N 領域が残るよう設計されたマウスを作成した。現在までに 4 系統の分離に成功し、その表現形に関しては解析中であるが、Y09d29 系統マウス (367 アミノ酸残基からなる TDP-43 を発現) において、ホモマウスの生存を確認したことから、TDP-43 の生理的機能の維持・発現における α ヘリックス構造の重要性が示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経特異的な変性を特徴とする神経難病である。2006 年秋、孤発性 ALS に認められるユビキチン陽性封入体 (skein-like inclusion) の主要な構成蛋白として TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) が発見された。さらに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の作成をおこなった。

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、各領域の間を標的とし、CRISPR/Cas9 に必要な gRNA を 4 種類作成した。この gRNA と Cas9 蛋白をエレクトロポレーション法にて受精卵へ導入し、新規マウスを作成した。

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、昨年度まで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。

この後半部分欠損蛋白は非常に不安定であるものの、この変異をホモに有するマウスは、ヌル欠損マウスと異なり出生直前まで生存することが明らかとなった。これは TDP-43 の生理的機能が残存していることを示し、ZFN の標的である 344 番目のグルタミンより C 末側に欠損領域を移動させることにより、残存活性を変化させることが可能になると考えた。そこで 414 アミノ酸残基からなる TDP-43 の 374 番目のチロシン (Y374) を標的とした gRNA 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。この gRNA 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。ファウンダーマウスと C57BL/6J マウスとの交配により 4 系統の分離に成功、各系統のヘテロ間交配によりホモマウスを作成し、TDP-43 の残存活性を推定した。ホモマウスの表現形に関しては現在解析中であるが、C 末の終端領域のみを欠損した Y09d29 系統マウス (367 アミノ酸残基からなる TDP-43 を発現) において、ホモマウスの生存を確認した。

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 の機能を維持させ、かつ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す必要があると考えられる。CRISPR/Cas9 を用いて作成した Y09d29 系統マウスは、ほぼ完全な形で Q/N 領域 (320-367) が含まれているため、この α ヘリックス構造が残っていると考えられ、それが TDP-43 機能の維持に重要であったと考えている。なお、この 367 アミノ酸残基からなる変異 TDP-43 の凝集性や残存活性の程度に関しては、現在解析中である。

E. 結論

TDP-43 の C 末領域には、GRR、Q/N、C 末の終端領域という 3 領域が存在するが、生存という観点からは GRR と Q/N 領域が必須であることが証明された。この結果から、TDP-43 の生理的機能発現において、プリオン様ドメイン内の α ヘリックス構造が重要と推察された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

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)

該当なし

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⁾
研究分担者 仲柴 俊昭¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾

1) 理化学研究所バイオリソース研究センター 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

理化学研究所バイオリソース研究センター（理研 BRC）・実験動物開発室は、我が国の実験動物マウスの中核機関としてヒト疾患研究に有用なモデルマウスを収集・保存・提供している。一方、新潟大学脳研究所（脳研）には、ヒト脳神経疾患の脳病理所見、ゲノム及び病態に関する豊富な情報と先端的な疾患モデルマウスの開発実績がある。二機関のポテンシャルを活かして、高齢社会が直面する脳神経系疾患の治療や創薬に有用な新たな病態モデルマウスを、患者の脳病理所見、ゲノム及び病態に関する知見に基づき開発する。さらに、脳研で開発された先端的な脳神経系疾患モデルマウスを理研 BRC に寄託頂き、広く研究コミュニティに提供することで脳神経系の基礎から医療・創薬研究へ貢献する。

A. 研究目的

高齢社会が直面する脳神経系疾患の治療や創薬に有用な病態モデルマウスの開発が求められている。既存の病態モデルマウスならびにヒト疾患のゲノムおよび病態に関する情報を文献等により再評価し、ゲノム編集等の新たな技術を用いてヒト疾患情報に基づく改良型または新規モデルの開発に必要な情報を収集し、モデルマウスを開発する。さらに、脳研において開発済みの先端的な脳神経系モデルマウスを理研 BRC に寄託いただき、研究コミュニティに提供する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

我が国において優先的に取り組むべき脳神経系疾患についてゲノム情報および病態に関する情報を収集し、独自のモデルマウス開発の準備を行う。

脳研において既開発済みの先端的なモデルマウスについて、開発研究者に寄託の依頼を行い、

収集する。寄託の承諾が得られた系統について、MTA 等の適切な移転の手続きを行う。

新規モデルマウスの作製方法、予想される特性および治療法の開発や創薬における利用価値について情報収集する。寄託マウスについても寄託手続きの完了と特性情報の整備を開発研究者の協力を得て行う。寄託系統は研究コミュニティに公開し、提供する。

C. 研究結果

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が皮膚疾患のモデルとしても有用であることを見出した。

今後、開発す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。

笹岡教授とは、アルツハイマー病、レビー小体型認知症、前頭側頭葉変性症に加えてパーキンソン病などの神経変性疾患を対象としたヒト疾患モデルの整備やドーパミン受容体変異マウスとドーパミンの生合成酵素の変異マウス等の開発の重要性について意見交換した。

D. 考察と E. 結論

以上の成果を踏まえ、共同研究の継続により、1) マウスリソースの利活用に関する協力関係を発展させ、2) 新たなヒト疾患モデルマウスの開発状況についてさらなる調査を加えると共に、3) アルツハイマー病、レビー小体型認知症、前頭側頭葉変性症、パーキンソン病などの難治性の神経変性疾患の研究ならびにドーパミンおよびその関連分子の機能研究に有用なマウス系統の開発について、さらなる助言を受け、具体的なモデルマウスの開発を検討する。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Sotoyama H, Iwakura Y, Oda K, Sasaoka T, Takei N, Kakita A, Enomoto H, Nawa H: Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroscience Letters* 654:99-106, 2017.
2. Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Sasaoka T, Fukaya M BRAG2a, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, is a component of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the photoreceptor terminal. *Investigative Ophthalmology and Visual Science (IOVS)* 58(9):3795-3803, 2017.
3. Yuta Fukai, Yutaka Ohsawa, Hideaki Ohtsubo, Shin-ichiro Nishimatsu, Hiroki Hagiwara, Makoto Noda, Toshikuni Sasaoka, Tatsufumi

Murakami, Yoshihide Sunada Redundancy of matrix metalloproteinases cleaving beta-dystroglycan: Implications for the pathogenesis of sarcoglycanopathy. *Biochem Biophys Res Comm* 492 (2):199-205, 2017.

4. Okubo T, Sato A, Okamoto H, Sato T, Sasaoka T. Differential behavioral phenotypes of dopamine D1 receptor knockdown mice at the embryonic, postnatal, and adult stages. *Int J Dev Neurosci* 66:1-8, 2017.
5. Bowl MR et al. A large scale hearing loss screen reveals an extensive unexplored genetic landscape for auditory dysfunction. *Nat Commun* 8:886, 2017.
6. Roy DS, Kitamura T, Okuyama T, Ogawa SK, Sun C, Obata Y, Yoshiki A, Tonegawa S. Distinct neural circuits for the formation and retrieval of episodic memories. *Cell* 170:1000-1012, 2017.
7. Meehan TF et al. Disease model discovery from 3,328 gene knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium. *Nat Genet* 49:1231-1238, 2017.
8. 栗山桃奈, 吉岡 望, 加畑雄大, 牛木辰男, 吉木 淳, Thomas J Sproule, 阿部理一郎, 竹林浩秀. 単純性水疱症モデルとしての新規 Dystonin/Bpag1 遺伝子変異マウスの解析. *新潟医学会雑誌*131:655-663, 2017.

2. 学会発表

1. 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, 齊藤 奈英, 酒井 清子, 神保 幸弘, 佐藤 俊哉, 岡本 浩嗣, 藤澤 信義, 崎村 建司, 南部 篤, “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” 科学研究費補助金「新学術領域研究(研究領域提案型)」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 国際シンポ

ジウム. 神経オシレーションカンファレンス 2017「意識とネットワーク病」東京, 2017年6月.

2. 小山内実, 菊田里美, 谷平大樹, 本間経康, 中尾聡宏, 小田佳奈子, 笹岡俊邦, 南部篤, “qAIM-MRI による D1 ドーパミン受容体コンディショナルノックダウンマウスの全脳活動解析” 第 32 回日本大脳基底核研究会. 西尾, 2017年7月.
3. 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” 第 32 回 日本大脳基底核研究会. 西尾, 2017年7月.
4. 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, 田中稔, 山本美丘, 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” 第 40 回日本神経科学大会 千葉, 2017年7月.
5. 前田 宜俊, 中務 胞, 三輪 美樹, 宮本 純, 小田佳奈子, 藤澤 信義, 夏目 里恵, 中尾 聡宏, 神保幸弘, 田中 稔, 山本 美丘, 坪井 広樹, 阿部 光寿, 崎村 建司, 中村 克樹, 笹岡 俊邦, “マーモ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” 第 47 回(2017) 新潟神経学夏期セミナー 新潟, 2017年7月.
6. 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, 田中 稔, 山本 美丘, 佐藤 俊哉, 藤澤 信義, 崎村 建司, 南部 篤, “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” 科学研究費補助金「新学術領域研究(研究領域提案型)」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「オシロロジー」2017年度第1回領域会議 熱海, 2017年8月.
7. Toshikuni Sasaoka, Asako Sato, Satomi Chiken, Tadashi Okubo, Manabu Abe, Meiko Kawamura, Satohiro Nakao, Nae Saito, Seiko Sakai, Kanako Oda, Yoshitaka Maeda, Yukihiro Jimbo, Minoru Tanaka, Yoshitaka Yamamoto, Toshiya Sato, Nobuyoshi Fujisawa, Kenji Sakimura, Atsushi Nambu, “Elucidation of motor control mechanism using genetically modified mice harboring tetracycline-regulated expression of D1/D2 dopamine receptors” 2017年度生命科学系学会合同年次大会 第40回日本分子生物学会 第90回日本生化学会大会 神戸, 2017年12月.
8. 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, 齊藤 奈英, 酒井 清子, 神保 幸弘, 佐藤 俊哉, 岡本 浩嗣, 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” 科学研究費補助金「新学術領域研究(研究領域提案型)」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「オシロロジー」2017年度第2回領域会議 東京, 2017年12月.
9. 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, 齊藤 奈英, 酒井 清子, 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 29 年度先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会 大津, 2018 年 1 月 Yoshiki A, “Mouse resources for visualization and conditional experiments” Frontiers in Precision Medicine, National Cancer Center International Symposium Seoul Korea, June 2017.

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

10. Ayabe S, Nakashima K, Ijuin M, Nakade K, Hashimoto T, Kadota M, Iwama M, Nakata H, Nakashiba T, Murata T, Yoshiki A, Obata Y, “Updates on mutant mouse production using genome editing technology and mouse resource archiving” 4th World Congress of Reproductive Biology 2017 (WCRB 2017) Ginowan, September 2017.

11. 吉木 淳, “高次生命機能の理解および疾患克服に必要なマウスリソース整備” NBRP 第 4 期開始記念シンポジウム 東京, 2017 年 12 月.

12. 綾部信哉, 中島謙一, 岩間瑞穂, 伊集院麻衣子, 山村竜典, 中出浩司, 仲柴俊昭, 村田武英, 吉木淳, 小幡裕一, “国際マウス表現型解析コンソーシアム (IMPC) マウス作製へのゲノム編集技術の適用” 第 64 回日本実験動物学会総会 郡山, 2017 年 5 月.

13. 仲柴俊昭, 綾部信哉, 吉木淳, “Mouse Resources For Neuroscience Researches at RIKEN BioResource Center” 第 40 回日本神経科学大会 千葉, 2017 年 7 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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)
研究分担者 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

代表的な神経変性疾患であるアルツハイマー病 (AD)、レビー小体病 (LBD) および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態に酸化ストレスの関与が指摘されて久しい。酸化ストレスの発生源は様々であり、AD ではアミロイド β ($A\beta$) 毒性、LBD では α -シヌクレイン (αS) 毒性、ALS ではグルタミン酸毒性が好捕に挙げられている。一方、酸化ストレスの下流に位置する細胞毒性分子の挙動については十分明らかにされているとは言えない。そこで、AD 海馬、LBD 扁桃体および ALS 脊髄の剖検組織切片を用いて、phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK)、phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK)、Nrf2、NF- κ B、p-IKK α/β 、poly(ADP-ribose) polymerase (PAR)、apoptosis-inducing factor (AIF)、OH-dG および ONE-dG の局在を免疫組織化学的に解析した。

A.研究目的

AD、LBD および ALS の病態における酸化ストレス下流分子の局在を剖検組織を免疫組織化学的手法を用いて解析した。

B.研究方法 (倫理面への配慮を含む)

研究使用に関するご遺族の同意が得られた剖検組織を研究に用いた。AD (n = 3) 海馬、LBD (n = 3) 扁桃体および ALS (n = 3) 脊髄のホルマリン固定パラフィン包埋材料から 6 μ m 厚の切片を製作した。これらの切片を脱パラフィン親水処理後、p-p38 MAPK、p-JNK、Nrf2、NF- κ B、p-IKK α/β 、PAR、AIF、OH-dG および ONE-dG のそれぞれに対する特異抗体を 4°C 下一晩反応させ、免疫反応産物をポリマー免疫複合体法で可視化し、染色結果を年齢一致対照症例群 (各部位 n = 3) と比較した。

C.研究結果

p-p38 MAPK、p-JNK、Nrf2、NF- κ B、p-IKK α/β は、AD 海馬、LBD 扁桃体および ALS 脊髄の主に反応性アストロサイトと活性化ミクログリアに発現しており、Nrf2 と NF- κ B は細胞核に、その他は細胞質に局在していた。PAR と AIF は AD 海馬、LBD 扁桃体および ALS 脊髄のニューロンの細胞質と細胞核に局在していた。OH-dG および ONE-dG は AD 海馬、LBD 扁桃体および ALS 脊髄のニューロン、アストロサイトおよびミクログリアに局在していた。年齢一致対照群では、これらの解析物質の免疫活性は乏しく、NF- κ B は細胞質に集積していた。

D.考察

グリアにおいて、p-p38 MAPK と p-JNK は炎症シグナルを発生させる。Nrf2 は細胞が酸化ストレス

に曝されていることを反映している。細胞質の NF- κ B を構成する I κ B α は p-IKK α / β によってリン酸化され、核内並行して種々の炎症促進性遺伝子の転写を促進する。AIF はグルタミン酸に曝されたニューロンに起こる細胞死パータナトスに関わることが知られている。すなわち、グルタミン酸刺激により脱分極型グルタミン酸受容体に共役するカルシウムチャンネルが解放されて細胞内に流入したカルシウムイオンがニューロン型一酸化窒素合成酵素を活性化し、大量の一酸化窒素を産生する結果、ミトコンドリア電子伝達系で恒常的に発生しているスーパーオキシドアニオンと非酵素的に結合してペルオキシニトリドを形成し、これが核内 DNA を攻撃して広範囲に亘る遺伝子損傷が生じる。するとこれを修復するミッションを帯びた poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) が核内で活性化するため、大量の poly-(ADP-ribose) (PAR) が核内で産生され、核内から細胞質へとオーバーフローすることになる。細胞質に溢れる PAR はミトコンドリア外膜を刺激してミトコンドリアの内外膜間腔に存在するオキシドリダクターゼ AIF を切断し、細胞質に遊離させ、核内移行して DNA を long-scale fragmentation 様式で切断する。本研究の結果は、AD、LBD および ALS のニューロンがパータナトスにより細胞死に陥っていることを示している。AD、LBD および ALS におけるグルタミン酸発生源はいまだ特定されていないが、本研究の結果はグルタミン酸の発生源を明らかにする意義を明らかにしたと言える。OH-dG と ONE-dG が AD、LBD および ALS のニューロンとグリアに集積していた事実は、病巣における酸化ストレスの発生が亢進していることを表している。

E. 結論

AD、LBD および ALS の病巣では酸化ストレスの亢進および下流シグナルに位置づけられるグリアの炎症シグナルとニューロンの細胞死シグナルの亢進が明らかになった。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

執筆中。

2. 学会発表

1) Shibata N, et al: Soluble iron accumulation makes microglia to overproduce and release glutamate via aconitase 1, TACE and glutaminase C in ALS spinal

cords. World Congress of Neurology 2017 (WCN2017)・2017年9月19日・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

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)

柿田 明美 3)、渡部 和彦 4)、小柳 清光 5)、小森 隆司 6)、磯崎 英治 1)

- 1) 東京都立神経病院 脳神経内科 2) 東京都立北療育医療センター 神経内科
3) 新潟大学脳研究所 4) 杏林大学 保健学部 5) 信州大学 神経難病学

研究要旨

TIV (tracheostomy invasive ventilation) を導入した場合、communication stage V (totally locked-in state) にいたるリスクの高い、発症 1 年以内の剖検例 8 例を検討した。運動ニューロンの神経細胞脱落と、グリオーシスの程度には特徴は見られなかったが、NCI (neuronal cytoplasmic inclusion) はすでに運動ニューロン以外にも広く出現し、その分布は stage V に至った症例と共通していた。また stage V では神経細胞脱落の軽い病変である下オリブ核に、すでに NCI が出現していた。側頭葉では、ALS-FTLD で報告されていた病変と共通の部位に病変が見られ、島輪状溝にも NCI が出現していた。経過の早い ALS 例の中には早期から運動ニューロン以外の病変が存在する例があり、TIV 導入によって経過が長引くと運動ニューロン以外の病変が顕在化し、stage V に至る可能性がある。NCI の病的意義は病変により異なる可能性がある。また、島輪状溝は経過の早い症例では病変部位として評価する必要がある病変である可能性がある。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、人工呼吸器装着例の約 13% の症例で、外眼筋も含めた全随意筋が完全麻痺し、現在の補助手段では意思伝達不能 (意思伝達能力 stage V、完全閉じ込め状態: totally locked-in state) になる。このような症例は、発症 2 年以内に呼吸器装着をする例が多いこと、病理学的には運動ニューロン以外に、黒質、淡蒼球、視床下核、延髄網様体、小脳出力系に変性がみられ、それらの病変は蛋白の違いによらず共通であることを明らかにした (Hayashi K, et al. Acta Neuropathol Commun. 2016; 4: 107)。さらに経過の早い、発症 1 年以内の死亡例はもし TIV (tracheostomy invasive ventilation) が導入された場合には stage V にいたるリスクが高い

群であり、本研究ではそれらの例を調査することで、stage V で見られる所見の早期像を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所、都立神経病院の ALS 剖検例を調査し、発症から 1 年以内に死亡した、蓄積蛋白が TDP-43 の弧発性 ALS 患者で、明らかな認知機能低下や、脳虚血のエピソードの見られない 8 例を対象として、病理学的検討を行った。各部位の神経細胞脱落、グリオーシス、細胞質内封体 (neuronal cytoplasmic inclusion: NCI) を半定量的に評価した。

そのうち海馬歯状回顆粒細胞に NCI のある Nishihira らの type 2 の 6 症例に関しては海馬、

海馬支脚、側頭葉新皮質、側頭極、島皮質輪状溝で、AT8 陽性 NCI についても評価を加えた。

C. 研究結果

男性 5 例、女性 3 例、死亡年齢:62~83 歳であった。また死因は呼吸不全 4 例、肺炎 3 例、突然死 1 例であった。脳重は 930~1510g 平均 1259.8 g。Brettschneider の TDP-43 pathological stage は II~V であり、Nishihira らの Type 1 が 2 例、type 2 が 6 例であった。

ALS としての病変は、Bunina 小体が 6 例でみられ、全例で脊髄前角、舌下神経核に神経細胞脱落を伴うグリオシスがみられ、skein inclusion と spheroid が散見された。

運動ニューロン以外ではいずれの部位でも神経細胞脱落は明らかでなかったものの、stage V の共通病変である、淡蒼球、視床下核、黒質、延髄網様体、小脳出力系（赤核）には NCI が出現していた。いずれも少数であり、NCI の多寡に関しては大きな差はみられなかった。

一方で stage V 例では比較的神経細胞脱落の軽い病変である下オリブ核では 7 例で NCI が出現しており、その量は他の部位と差はなかった。

Type 2 の 6 例では Brrak NFT stage は I から III で、側頭極には全例でリン酸化 TDP-43 陽性 NCI (pTDP-43-ir NCI) と AT8-ir NCI が出現し、うち 3 例ではグリオシスを伴っていた。海馬支脚では pTDP-43 NCI は 5 例で、AT8-ir NCI は全例で NCI が出現しており、AT8-ir NCI は貫通路に沿って、pTDP-43-ir NCI は貫通路の外側に分布する傾向が見られた。島輪状溝には 4 例でグリオシスがみられ、pTDP-43-ir NCI は全例で、AT8-ir NCI は 5 例でみられた。

D. 考察

経過 1 年の死亡例で、運動ニューロン病変は活動性の高い病初期としての特徴を呈しており、運動ニューロン以外には、TIV 導入前であったが既に NCI が出現していた。このことから、本研究の対象例は病初期から病変拡大の要素を持っていた可能性があり、運動ニューロン以外への病変拡大は、運動ニューロン病変が高度になってからは始まるわけではない可能性が示唆される。

下オリブ核は Brettschneider らの TDP-43

stage でも stage II であり、比較的早期から NCI が出現することはこれまでも報告されていたが、経過 1 年の段階では NCI の量に大差のない黒質、淡蒼球、視床下核、延髄網様体などは stage V では高度の神経細胞脱落があるにもかかわらず、stage V 例の下オリブ核は神経細胞脱落の軽い部位として目立っている。このことから ALS における NCI の持つ病的意義は病変によって異なる可能性が示唆される。

Type 2 症例における側頭病変はタウ蛋白と TDP-43 との関連を考察する上でも興味深い、更なる検討が必要である。しかし、経過 1 年の認知機能低下を伴わない症例でも ALS-FTLD で報告されている病変に NCI が分布していた。また、これまで報告のない島輪状溝には海馬支脚と同等量の pTDP-43-ir NCI が出現しており、経過の早い ALS では注目すべき病変である可能性がある。

E. 結論

経過の早い例で TIV が導入され、経過が長引くと運動ニューロン以外の病変が顕在化し、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
なし

2. 学会発表

World Congress of Neurology 2017 9 月 京都
第 58 回日本神経病理学会 2017 年 6 月 東京
ICN 2018 Tokyo (予定)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
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った。ドーパミン受容体 D1R の発現を薬剤ドキシサイクリン (Dox) 依存的に制御できるマウスを用いて、D1R の発現有無による走行への影響を解析した。行動課題として、マウスの運足や走行速度を制御できるステップホイール装置を使用した。この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。Dox 投与前、投与中、および投与終了後で走行課題の成績を調べ、結果 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た。さらに、より報酬系機能への影響を抽出する試みとして、20cm 飲水課題を行った。この課題では、給水制限中のマウスが開門から 20cm 先の給水口に到達するまでの時間を計測した。結果、D1R 発現が無いことによって運動系機能とともに報酬機能も損なわれ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 の機能を明らかにするために、その発現を薬剤依存的に制御できるマウスを利用し、運動・報酬系の行動課題への影響を測定・評価する。

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、D1R の機能を明らかにするため

に、Dox により直接路神経細胞の D1R 発現を制御できるコンディショナルノックダウンマウス (D1R cKD マウス) を用いる。D1R cKD 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 投与により抑制できる。したがって、D1R cKD マウスでは、Dox 非投与時 (Dox-) には直接路神経細胞に D1R が発現し、Dox 投与時 (Dox+) になると消失する。

この D1R cKD マウスに走行装置ステップホイールを走行させて、運動機能を解析する。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、給水制限を施したマウスに飲水を報酬として走行させる。今回、徐々に回転速度を上げる加速テストを行い、どれだけ速くまで走行可能かを運動機能の指標として計測した。

また、報酬系機能への影響を評価するため、

20cm 飲水課題を行った。この課題では、給水口が一方の壁に設置されている箱に給水制限中のマウスを入れ、スタート地点から給水口まで 20cm の距離の到達時間を計測した。運動機能による成績への貢献度を低くすることで、報酬系機能への障害の有無を調べた。

これらの行動課題ではマウスに給水制限を施すため、マウスの健康状態には常に気を配り、体調不調の際には実験を中断して給水し、回復を図る。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、マウスへの負担を最小限に努めた。

C. 研究結果

Dox 投与前 (Dox-)、投与中 (Dox+) および投与終了後 (Dox++) の各タイミングでステップホイール装置による加速テストを行った結果、Dox 投与中の Dox+マウスでのみ顕著な成績低下が確認出来た。

同様に 20cm 飲水課題においても Dox+マウスでのみ顕著な時間増加が認められた。

D. 考察

ステップホイールによる加速テストでは Dox+ の D1R 発現消失時に成績低下が認められた。ステップホイール課題は、運動系機能とともに報酬系機能もその結果に影響することが想像される。そこで、より報酬系機能に特化した 20cm 飲水課題を行った所、Dox+で顕著な成績低下が認められ、報酬系機能の障害を示唆する結果を得た。

これらのことから、ステップホイール加速テストにおける結果は、単に運動系機能低下によるものではなく、報酬系機能の低下によるものの寄与が大きいと考えられる。今後は、より運動機能に特化した検証により、D1R の運動系機能への貢献を探ることが課題となる。

E. 結論

Dox 投与により D1R 発現を無くした D1R cKD マウスでは、ステップホイール加速テストにおける成績が有意に低下した。一方、Dox 投与前および投与中止から十分期間をおき D1R が発現している状態では、対照群 (野生型マウス) との差は認められないことから、D1R 発現の有無が運動機能に関

与している事が示唆された。また、20cm 飲水課題においても Dox 投与中のマウスにおいて報酬系機能に障害が起きていることを示唆する結果が得られたことから、ステップホイール課題での結果は報酬系機能による影響が現れていることが推測される。

D1R cKD マウスの行動実験における表現型が、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、詳細な検討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

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

ドーパミン受容体遺伝子改変マウスの線条体におけるドーパミン代謝の解析

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

ドーパミン受容体遺伝子改変マウスの、線条体中のドーパミンおよびその代謝物の定量解析を行った。運動量が亢進するドーパミン D1 受容体 (D1R) のノックアウトマウスでは、ドーパミンや代謝物に変化はなかった。一方、運動量が減少するドーパミン D2 受容体 (D2R) のノックアウトマウスでは、ドーパミン代謝物であるホモバニリン酸が増加した。また、D1R の発現をドキシサイクリン (Dox) 投与依存的に制御できるマウスは、Dox の投与による D1R の発現低下に依存して運動量が減少し、Dox 投与の中止による D1R の発現の回復によって顕著に運動量が増加した。このように運動量の変化と D1R ノックダウンの代償機構の存在が示唆されているにもかかわらず、線条体中のドーパミン、その代謝物には変化が認められなかった。以上の結果は、D1R 発現量の変化に伴う運動量の変化は、ポストシナプスで起こる現象であることを示唆している。

A. 研究目的

ドーパミンは中枢神経系で情動や運動を調節する神経伝達物質であり、パーキンソン病などの神経疾患がドーパミン神経系の異常に起因することが知られている。運動機能に関与することが知られている大脳基底核の中で、ドーパミン神経は中脳黒質-線条体経路に存在している。線条体には、ドーパミン D1 受容体 (D1R) をもつ直接路を構成する神経細胞と、ドーパミン D2 受容体 (D2R) をもつ間接路を構成する神経細胞の、投射先の異なる 2 種類の神経細胞が混在している。

D1R, D2R それぞれのノックアウトマウス (D1R-KO, D2R-KO)、および D1R のコンディショナルノックダウンマウス (D1R-KD) で、運動量の変化が認められた。これは、ポストシナプスにおけるドーパミン感受性の変化、逆行性情報伝達あるいは経シナプス情報伝達などのフィードバック制御によるプレシナプスでのドーパミンの放出や代謝の変化などが考えられる。そこで私たちは、

運動量に異常のあるドーパミン受容体遺伝子改変マウスの線条体におけるドーパミンおよびその代謝物を定量した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

運動量が増加する D1R-KO マウス、運動量が減少する D2R-KO マウスの成獣マウスの線条体を採材した。線条体をホモジナイズ、除タンパク質したのちに、組織中のドーパミンおよびその代謝物を、HPLC 電気化学検出器によって定量した。

D1R のコンディショナルノックダウンは、tet-off システムを導入したマウスを用いた。ドキシサイクリン (Dox) を 4 週間飲水投与したマウス (Dox+) では、線条体の D1R がほぼ検出されないレベルまで減少し、運動量が減少する。その後、Dox を含まない通常の水を 3 日間与え、D1R を再び発現させたマウス (Dox++) は、一過的に運動量が顕著に増加する。この Dox+マウス、Dox++マウス、および Dox 非投与マウス (Dox-) の線条体を採

材し、線条体中のモノアミンを、同様の方法で定量した。

C. 研究結果

D1R-KO は、ドーパミンおよびその代謝産物であるジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)、ホモバニリン酸 (HVA) のいずれにも野生型との有意な差は認められなかった。一方、D2R-KO マウスでは、ドーパミン、DOPAC は変わらないものの、HVA は 1.3 倍に有意に増加していた。

D1R-KD マウスは、運動量の変化が観察された 3 群 (Dox+, Dox+, Dox-) 間において、ドーパミン、DOPAC、HVA に有意な差は認められなかった。

D. 考察

ノックアウトマウスの線条体におけるモノアミン量の解析から、D2R-KO において HVA が増加していることが明らかとなった。これは、線条体におけるドーパミンの代謝回転が亢進していることを意味している。これは、ドーパミン神経に自己受容体としても発現している D2R が欠損したことにより、フィードバック制御が消失したことによると考えられる。

D1R をノックダウンした Dox+マウスは運動量が減少する。その後、Dox 投与を停止する (Dox+) と、一過的に運動量が顕著に増加することから、D1R の減少を代償するなんらかのメカニズムがあることが示唆される。今回、D1R-KD の 3 群間で、線条体中のモノアミンに変化は見られなかった。このことから、D1R の発現量の変化による運動量の可逆的な変化は、プレシナプスでのドーパミン代謝による制御ではなく、ポストシナプスで機能していることが強く示唆された。さらに、間接路である淡蒼球外節における電気生理学的な解析では、D1R のノックダウンによる間接路の情報伝達での変化は見いだされなかった (Chicken et al., 2015)。このことから、直接路のポストシナプスにおけるドーパミン感受性の変化の可能性が考えられる。

E. 結論

D1R-KO マウスではモノアミン量の変化は認められなかった。一方、D2R-KO マウスでは HVA が 1.3 倍に増加していたことから、ドーパミンの代

謝回転が亢進したと考えられた。また、D1R-KD マウスでは、運動量の変化を示す 3 群間の線条体におけるモノアミン量の変化は認められなかった。

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

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。昨年度までに floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスが得られており、現在ドライバーマウスとの交配により神経組織特異的 SCR-cKO マウスの作製を行っている。また、発生初期から Cre 組換え酵素を発現するドライバーマウスとの交配により、SCR-KO マウスを作製し解析を行っている。

A. 研究目的

Scrapper 欠損マウス (SCR-KO マウス) は体が小さい上に寿命が短く、恐怖記憶形成の異常、脳の海綿状変性や神経細胞の萎縮といった老化現象が見られる。SCR-KO マウス脳において変動している分子の同定が神経変性疾患病態解明の 1 つの鍵になると考えられる。

SCR-KO マウスは、多くの個体が生後半年程度で死亡する。また、産仔数もメンデルの法則に従わず少ないことから、SCRAPPER が発生段階においても機能していることが予想される。本研究では、致死の表現型を回避し脳に限定した機能を解析することができる、神経細胞特異的なコンディショナル KO マウスを作製し解析をおこなう。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

floxed 型のベクターを構築し、このベクターを新潟大学崎村研究室で開発された RENKA 株 ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選別する。これら

の組換え ES 細胞株よりキメラマウスを作出し、生殖系列に ES 細胞が分化した個体より標的 floxed 型マウスを樹立する。さらに、神経細胞特異的な Cre 発現マウスを利用して、神経組織特異的なノックアウトマウスを作製して電気生理学実験等の機能解析や行動解析実験に供する。

動物実験計画は新潟大学および浜松医科大学大学の内規に準じて行う。実験時には適切に麻酔処理を行い、動物への苦痛を可能な限り除く。

C. 研究結果

現在までに、コンディショナルノックアウトマウス作製のための floxed 型のベクターを構築し、このベクターを新潟大学崎村研究室で開発された RENKA 株 ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選別した。これらの組換え ES 細胞株よりキメラマウスを作出し、生殖系列に ES 細胞が分化した個体より標的 floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスを得ている。現在までに、浜松医大への

導入を完了し、FLP マウスとの交配を進めスクリーニングのために導入されていたネオマイシン耐性遺伝子を除いたマウスを作製した。現在、ドライバーマウスとの交配により、神経細胞特異的なノックアウトマウスを作製する段階である。また、発生初期から Cre 組換え酵素を発現するドライバーマウスとの交配により、SCR-KO マウスを作製し以前に解析した C57BL/6J 系と 129/Sv 系混合バックグラウンド null ノックアウトマウスと同じ表現型が得られるかを合わせて検討している。得られたマウスの表現型解析のために、共同研究の継続を予定している。

D. 考察

脳部位特異的な Cre 発現マウスを利用して、部位特異的なノックアウトマウスを作製して解析に供する計画であることから、神経細胞で特異的にノックアウト可能なドライバーマウスラインとして Emx1-Cre マウスの導入することとした。今後、さらに交配を行いノックアウトマウスラインの樹立が必要であるが、交配成績が芳しくないため脳研究所の助言を得ながら共同研究を推進、継続する。また、解析に適するドライバーマウスの選択および交配、その後の解析を行う必要がある。現存するノックアウトマウスはバックグラウンド系統が複数の雑種となっていることから、新たに得られるマウスを用いた解析はバックグラウンド系統の影響を消去できる点でも有用であると考えられる。

E. 結論

SCR-cKO マウス作製のための floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスを浜松医科大学に導入している。今後さらに繁殖、ドライバーマウスとの交配により神経細胞特異的 SCR-cKO マウスを作製し、表現型を解析する。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1) Sugiyama E, Yao I, Setou M.

Visualization of local phosphatidylcholine synthesis within hippocampal neurons using a compartmentalized culture system and imaging mass spectrometry.

Biochem Biophys Res Commun.

495(1):1048-1054 (2018)

2) 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 1(1):2-9(2017)

3) 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 37(14):3887-3895 (2017)

2. 学会発表

1) Matsuda T, Fukano H, Eto F, Yao I.

“Analysis of rivastigmine distribution in the brain by imaging mass spectrometry”
第 36 回日本認知症学会学術集会
2017/11/24 ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市)

2) Matsuda T, Fukano H, Waki M, Takei S, Eto F, Setou M, Maki T, Yao I

“Brain amine neurotransmitters are comprehensively visualized by matrix-free laser desorption/ionization imaging mass spectrometry using a unique photocleavable derivatizing agent”
the 47th annual meeting of the Society for Neuroscience 2017/11/14 Washington, DC (USA)

3) Eto F, Matsuda T, Setou M, Yao I

“Alteration of amine neurotransmitters in Scrapper-knockout mice brain visualized by imaging mass spectrometry”
the 47th annual meeting of the Society for Neuroscience
2017/11/12 Washington, DC (USA)

4) 衛藤史博、松田孟士、瀬藤光利、矢尾育子
「MALDI-IMS を用いた Scrapper ノックアウト
マウス脳組織における神経伝達物質局在分布
の可視化」

第 42 回日本医用マススペクトル学会年会
2017/9/14 一橋講堂（東京都千代田区）

5) 松田孟士、矢尾育子

「MALDI-IMS を用いたマウス肺組織における
アセチルコリン局在分布の可視化」

第 42 回日本医用マススペクトル学会年会
2017/9/14 一橋講堂（東京都千代田区）

6) 矢尾育子、深野華、脇紀彦、瀬藤光利、真
木俊英

「光開裂分子を用いたアミノ酸神経伝達物質
の質量分析イメージング」

第 40 回日本神経科学大会
2017/7/22 幕張メッセ（千葉県千葉市）

7) 松田孟士、久恒辰博、矢尾育子

「記憶障害を有する A β PP^{swe}/PSEN1^{dE9} アル
ツハイマー病モデルマウス脳組織におけるア
セチルコリンの質量分析イメージング」

第 40 回日本神経科学大会
2017/7/22 幕張メッセ（千葉県千葉市）

8) 深野華、脇紀彦、武井史郎、瀬藤光利、真
木俊英、矢尾育子

「光開裂分子を用いた神経伝達物質のイメー
ジング」

第 65 回質量分析総合討論会
2017/5/19 つくば国際会議場（茨城県つくば
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

Preventive medicine for Alzheimer's disease

Principal Investigator Ingrid L Kwee¹

Co-Investigator Hironaka Igarashi²

¹ Neurology, University of California Davis ² BRI, University of Niigata

Abstract

Late onset Alzheimer's disease (LOAD) should be prevented rather than treated when cognitive decline is established. We have clarified that debris clearance from the brain can be profoundly affected by water dynamics through the aquaporin 4 (AQP4) system, the astrocyte abundant water channel, and that perturbation in the AQP4 system plays a role in the pathogenesis of LOAD.

To seek out application of newly developed AQP4 modulators for LOAD, we will utilize high-throughput in vivo MR method developed at the Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute for screening of drugs. Next, we will perform detailed animal studies to assess these effects on an Alzheimer's disease animal model.

A. INTRODUCTION

The purpose of the research is to seek out applications of newly developed aquaporin modulators for Alzheimer's disease in human, we will take newly developed high-throughput in vivo MR methods [1] for selection of candidate compounds. Next we will assess the effect of chronic administration of these compounds on an Alzheimer mouse model.

[1] Igarashi H, Tsujita M, Kwee IL, Nakada T. Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1: 17O JJVCPE MRI study in knockout mice. *Neuroreport*. 2014 Jan 8;25(1):39-43

B. MATERIALS AND METHODS

We will use high-throughput in vivo JJVCPE MR method developed in Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute for screening of drugs. Candidate drugs will be administered following best effect protocol. Then MRI experiments will be performed on a 15 cm bore 7 T horizontal magnet (Magnex Scientific, Abingdon, UK) with a Varian Unity-INOVA-300 system (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with an actively shielded gradient. Normal saline, 0.2 ml, containing 20% of H₂(17)O is to be administered as an intravenous bolus injection at the 75th phase (10 minutes after the first scan) using an automatic injector at 0.04 ml/second. Data will be analyzed using software developed at the Center to assess the efficiency of water metabolism.

C. RESULTS

We have developed candidate small molecules, which effectively facilitate the water transport of AQP4 in living mice brain [2].

[2] Huber VJ, Igarashi H, Ueki S, Kwee IL, Nakada T. Aquaporin-4 facilitator TGN-073 promotes interstitial fluid circulation within the blood-brain barrier: [17O]H₂O JJVCPE MRI study. *Neuroreport*. 2018 Mar 20. doi: 10.1097/WNR.0000000000000990. [Epub ahead of print]

D. DISCUSSION

We have developed the AQP4 facilitators. These molecules can be effective not only LOAD, but also diseases having something to do with brain water dynamics.

E. CONCLUSION

We developed the first AQP4 facilitator in the world.

F. PUBLICATIONS

Huber VJ, Igarashi H, Ueki S, Kwee IL, Nakada T. Aquaporin-4 facilitator TGN-073 promotes interstitial fluid circulation within the blood-brain barrier: [17O]H₂O JJVCPE MRI study. *Neuroreport*. 2018 Feb 27.

Sakata H, Itoh K, Suzuki Y, Nakamura K, Watanabe M, Igarashi H, Nakada T. Slow Accumulations of Neural Activities in Multiple Cortical Regions Precede Self-Initiation of Movement: An

Event-Related fMRI Study. *eNeuro*. 2017 Oct 30;4(5).

Natsumeda M, Motohashi K, Igarashi H, Nozawa T, Abe H, Tsukamoto Y, Ogura R, Okada M, Kobayashi T, Aoki H, Takahashi H, Kakita A, Okamoto K, Nakada T, Fujii Y. Reliable diagnosis of IDH-mutant glioblastoma by 2-hydroxyglutarate detection: a study by 3-T magnetic resonance spectroscopy. *Neurosurg Rev*. 2017 Sep 27.

Nakada T, Kwee IL, Igarashi H, Suzuki Y. Aquaporin-4 Functionality and Virchow-Robin Space Water Dynamics: Physiological Model for Neurovascular Coupling and Glymphatic Flow. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 18;18(8). Review.

Suzuki Y, Nakamura Y, Yamada K, Kurabe S, Okamoto K, Aoki H, Kitaura H, Kakita A, Fujii Y, Huber VJ, Igarashi H, Kwee IL, Nakada T. Aquaporin Positron Emission Tomography Differentiates Between Grade III and IV Human Astrocytoma. *Neurosurgery*. 2017 Jun 21.

Shimizu M, Suzuki Y, Yamada K, Ueki S, Watanabe M, Igarashi H, Nakada T. Maturation decrease of glutamate in the human cerebral cortex from childhood to young adulthood: a ¹H-MR spectroscopy study. *Pediatr Res*. 2017 Nov;82(5):749-752.

Takado Y, Terajima K, Shimohata H, Nakayama H, Watanabe M, Okamoto T, Ozawa T, Nishizawa M, Kwee IL, Igarashi H, Nakada T. Sleep Apnea in Multiple System Atrophy of Cerebellar Type: A 3.0 T MRS/Volumetry Pilot Study, *eNeurologicalSci*. 2016 Oct 11;6:6-8.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

Int. Patent, filing No. PC-23387

Elucidation of the roles of chromatin remodeler in neuronal homeostasis using mouse models

Principal Investigator Kensuke Futai¹

Co-Investigator Kenji Sakimura²

¹ Dept. Neurobiology, Univ. Massachusetts Medical School, Brudnick Neuropsychiatry Research Institute,

² Niigata University, Brain Research Institute

Abstract

Malfunction of neuronal excitatory and inhibitory balance (*E/I balance*) causes *Runaway Network Excitation* in the brain that induces epilepsy and neuronal cell death. Neuronal functions are associated with epigenetic mechanisms that regulates gene expression without altering DNA sequence, but the association of *E/I balance* with epigenetics still needs to be addressed.

Based on our preliminary data from next generation transcriptome profiling of activity-induced neurons and mouse models, we have proposed that the chromatin reader proteins, *MBT (malignant brain tumor)* and *Bromodomain proteins*, play critical role in homeostatic plasticity.

In this proposal, we will elucidate the epigenetic regulatory mechanisms that prevent runaway excitation and maintain *E/I balance* by generating mouse models. Alteration of neuronal homeostasis underlies many neurological disorders, including epilepsy, autism spectrum disorders, schizophrenia and Alzheimer's disease. Therefore, elucidation of *MBT and bromodomain protein*-mediated epigenetic regulatory mechanisms will provide a better understanding of the pathophysiology of neurological disorders and will likely identify novel therapeutic targets.

During the last year, we have started generating *Baz1a* flox mouse line. *Baz1a* is one of the bromodomain proteins and has been suggested as a risk factor of neurodevelopmental disorder, William Syndrome. During the last grant period, we established ES cell lines. Currently, we have been working on generating *Baz1a* chimera lines. We expect to obtain F1 line by the end of 2018. By using this line, we will generate cell type-specific *Baz1a* knockout mice lines by crossing cre reporter lines. We consider that elucidation of *Baz1a* function can help to identify the pathophysiological hallmarks of neurodevelopmental disorder.

A. INTRODUCTION

Runaway excitation of neuronal circuits induces epileptic seizures, leading to other detrimental consequences, including neuronal cell death. Neurons possess homeostatic mechanisms that compensate for activity perturbations and maintain the excitatory and inhibitory balance (*E/I balance*). Synaptic scaling is a specific form of homeostatic plasticity that maintains proper neuronal excitability via bidirectional regulation of synaptic strength of a neuron. Both excitatory and inhibitory synaptic strength are regulated by scaling mechanisms through changes in the abundance (scale) of postsynaptic receptors.

Importantly, homeostatic synaptic plasticity requires activity-dependent transcriptional and translational machineries. However, the roles of epigenetic factors, particularly chromatin regulators, in this plasticity is largely unknown. Over two hundred chromatin regulators have been identified in mammals and are sub-classified by function (e.g., readers, erasers or writers of histone modifications, etc.). However, to the best of our knowledge, there are no reports describing a systematic analysis of chromatin regulators for potential roles in synaptic scaling.

Recently, we demonstrate that *L3mbtl1*, one of the chromatin reader proteins, regulates basal synaptic transmission and homeostatic plasticity. Importantly, *L3mbtl1* protein binds to the transcription start sites of *Ctnnb1* and *Gabra2*, whose products mediate homeostatic synaptic scaling and inhibitory synaptic transmission, respectively. These results provide novel insight as to the roles of a chromatin reader molecule in synaptic function and neuronal homeostasis. During the course of this project, we identified that a chromatin reader molecule, *Baz1a*, is increased its expression in an activity-dependent manner. *Baz1a* has been suggested as a risk factor of neurodevelopmental disorder, William Syndrome, and elucidation of *Baz1a* function can help to identify the pathophysiological hallmarks of this disorder. To further study the role of *Baz1a* in synaptic function and animal behavior, we have started establishing the cell type-specific *Baz1a* knockout mouse models.

B. MATERIALS AND METHODS

Animals: All animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Massachusetts Medical School and Niigata University (PMID: 29398357 and 29034317). *L3mbtl1* mutant mice were generated previously and backcrossed with C57BL/6 for four generations. C57BL/6 mice were also used for RNA sequencing and primary cultures.

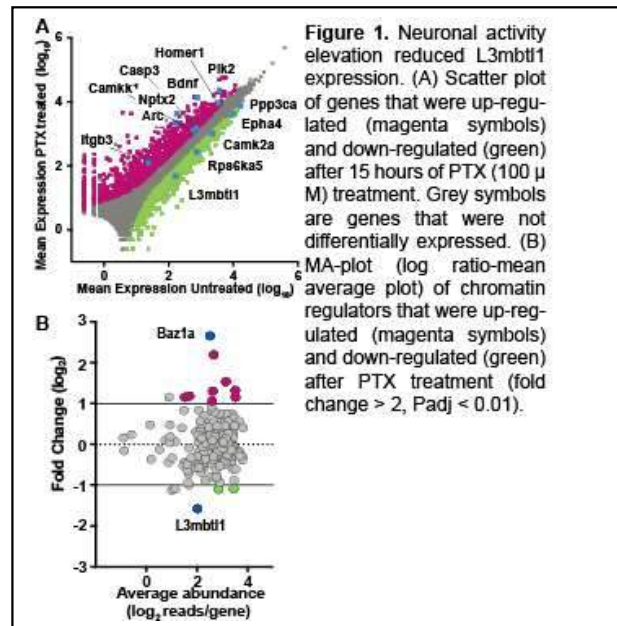
RNA Extraction and RNA sequencing: Total RNA was extracted from hippocampus or hippocampal primary cultures using RNAqueous Micro Kits (Ambion). Sequencing libraries were prepared according to ScriptSeq v2 protocol following rRNA depletion (RiboZero, Illumina), and run on single-end 50-bp modules in Illumina HiSeq 2000.

Primary culture preparation: Primary hippocampal cultures were prepared from early postnatal (P0-1) mouse as described previously with some modifications (Futai et al., 2013). Briefly, hippocampal neurons were dissociated and plated onto coverslips coated with poly-D-lysine and laminin. Neurons were maintained in B27 supplement containing medium for 14-16 days *in vitro* (DIV).

C. RESULTS

To date, over 40 genes have been reported as regulators of homeostatic up- and down-scaling in hippocampal and cortical neurons. Because the expression of many of these genes changes during induction and expression of the scaling, we hypothesized that chromatin regulator molecules, whose expression is altered by neuronal activity, contribute to homeostatic synaptic scaling. To test this hypothesis, we performed unbiased transcriptome analysis by RNA-sequencing of cultured primary neurons after induced homeostatic down-scaling.

Hippocampal primary cultures were prepared from C57BL6 mice and homeostatic synaptic scaling was induced by applying picrotoxin (PTX), a



non-competitive GABA_AR blocker, for 15 hours at DIV14. Total RNA isolated from Control and PTX challenged samples was subjected to an unbiased transcriptome (RNA-Seq) screen. RNA-seq was performed in quadruplicate for each treatment and the results were highly clustered into two treatment groups. Using stringent criteria, we identified 1150 and 689 of up- and down-regulated genes, respectively. Multiple genes previously identified as neuronal activity-dependent, including *Arc*, *Bdnf*, *Plk2*, and *Homer1*, showed a significant change from baseline in our transcriptome profiling, confirming the validity of our system (blue symbols in **Fig. 1A**). Importantly, 12 out of 246 chromatin regulatory genes showed changes in mRNA expression (**Fig. 1B**). In particular, *L3mbtl1* and *Baz1a* mRNA expression were decreased and increased to 30 and 631% of control value, as the top ranking down- and up-regulated molecules amongst chromatin regulatory genes, respectively (**Fig. 1B**, blue symbols).

If down-regulation of *L3mbtl1* RNA and protein is part of an essential switch to induce homeostatic synaptic down-scaling, then *L3mbtl1* KO neurons may exhibit smaller basal synaptic transmission and lack homeostatic plasticity. To test this possibility, we prepared hippocampal primary and slice cultures from wild type and *L3mbtl1* KO mice and compared amplitudes and frequencies of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs). Interestingly, we found that *L3mbtl1* KO neurons showed smaller mEPSC amplitudes than that of wild type (**Fig. 2A**), suggesting that the lack of *L3mbtl1* reduces the number of AMPARs per synapse. We then studied *L3mbtl1* deficiency in homeostatic plasticity by application of PTX. Most importantly, *L3mbtl1* KO cultured neurons failed to induce homeostatic down-scaling by PTX treatment, whereas wild type neurons could induce down-scaling (**Fig. 2**).

Furthermore, genome-scale mapping of *L3mbtl1*

occupancies identified Ctnnb1 as a key gene downstream of L3mbtl1. Importantly, the occupancy of L3mbtl1 on the Ctnnb1 gene was regulated by neuronal activity. L3mbtl1 knockout neurons exhibited reduced Ctnnb1 expression. Partial knockdown of Ctnnb1 in wild type neurons reduced excitatory synaptic transmission and abolished homeostatic down-scaling; while transfecting Ctnnb1 in L3mbtl1 knockout neurons enhanced synaptic transmission and restored homeostatic down-scaling. These results highlight a unique role for L3mbtl1 in regulating homeostasis of synaptic efficacy. Currently, we resubmitted these findings to Cell Reports (See section **F. Publication** below).

To further extend our findings, we have decided to elucidate the role of Baz1a in scaling and animal behavior. Drs. Sakimura and Abe have started generating Baz1a flox mouse line at BRI, Niigata Univ., in summer 2017. ES cell lines that carry floxed alleles have been established. We expect to generate chimera mice within 2 – 3 months. By using the Baz1a flox line, we will generate cell type-specific Baz1a knockout mouse models during the upcoming

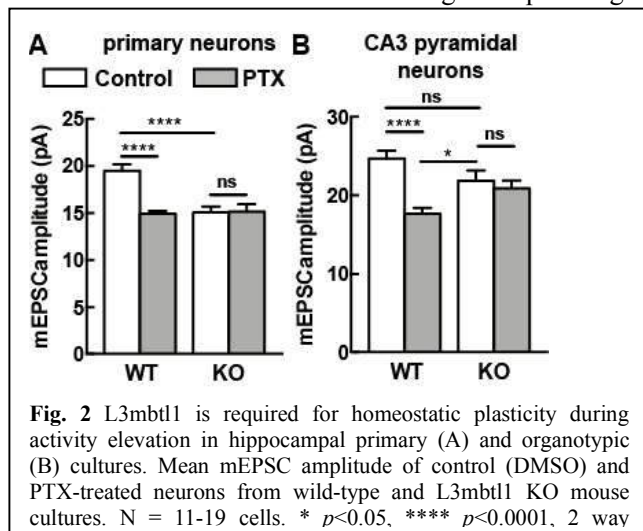


Fig. 2 L3mbtl1 is required for homeostatic plasticity during activity elevation in hippocampal primary (A) and organotypic (B) cultures. Mean mEPSC amplitude of control (DMSO) and PTX-treated neurons from wild-type and L3mbtl1 KO mouse cultures. N = 11-19 cells. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, 2 way

grant year.

D. DISCUSSION

The number of neurotransmitter receptors located postsynaptically is dynamically regulated through many different mechanisms. Homeostatic synaptic scaling is one of the most important regulatory mechanisms of synaptic strength that prevents the detrimental consequences of runaway neuronal over-excitation. In the present study, we found that neuronal activity down-regulates the chromatin reader molecule, L3mbtl1. Hippocampal primary neurons prepared from L3mbtl1 KO mice showed a lack of homeostatic down-scaling and reduced amplitude of AMPAR current in excitatory synapses. Moreover, L3mbtl1 KO neurons in organotypic hippocampal neurons specifically abolished down-scaling without changing basal transmission, supporting the importance of L3mbtl1 in homeostatic down-scaling of synaptic strength. Our CHIP-seq and CHIP-qPCR

studies identified Ctnnb1 and Gabra2 genes as activity-dependent targets of L3mbtl1 protein. Ctnnb1 expression is reduced in L3mbtl1 KO, partial KD of Ctnnb1 causes a lack of homeostatic down-scaling, and transfection of Ctnnb1 into L3mbtl1 KO neurons restores homeostatic down-scaling, suggesting that L3mbtl1 controls synaptic strength through Ctnnb1. Our results highlight a critical role for the activity-regulated chromatin reader molecule, L3mbtl1, in homeostatic control of synaptic strength and adds to our understanding of epigenetic mechanisms of activity-dependent gene regulation.

E. CONCLUSION

Our discovery of L3mbtl1 as an activity-dependent chromatin reader that coordinates the homeostatic control of synaptic strength raises the intriguing possibility that other chromatin regulators and their downstream genes are required for homeostatic synaptic plasticity. Elucidating the roles of the other chromatin regulator, Baz1a, in synaptic plasticity coupled with our results presented here will provide a comprehensive view of epigenetic regulation of gene expression in homeostatic synaptic scaling. During the next grant period, we will establish Baz1a flox mouse line and start crossing cre-reporter lines to generate cell type-specific Baz1a knockout mouse lines.

F. PUBLICATIONS

1. Activity-induced Epigenetic Regulation of Synaptic Strength through the Chromatin Reader, L3mbtl1, Wenjie Mao, Anna C. Salzberg, Motokazu Uchigashima, Yuto Hasegawa, Hanno Hock, Masahiko Watanabe, Schahram Akbarian, Yuka Imamura, and **Kensuke Futai**, *Cell Reports*, Resubmitted

2. Luciferase shRNA presents off-target effects on voltage-gated ion channels in mouse hippocampal pyramidal neurons, Yuto Hasegawa, Sucharita Saha, Georgia Gunner, Jenya Kolpakova, Gilles Martin, **Kensuke Futai**, *eNeuro* (2017), PMID: 29034317, PMCID: PMC5635487, Published in 2017

3. The inflammasome-derived cytokine IL18 suppresses amyloid-induced seizures in Alzheimer's prone mice, Te-Chen Tzeng, Yuto Hasegawa, Daniel R. Caffrey, Elizabeth Jeanne Thatcher, Wenjie Mao, Gail Germain, Nelsy DePaula Tamburro, Michael Heneka, Eicke Latz, **Kensuke Futai*** and Douglas T. Golenbock*, *Corresponding authors, *PNAS*, under revision status

G. PRESENTATIONS

1. Symposium Organizer and Speaker, The 40th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, Chiba, Japan, March 20-23, 2017, Symposium Title "Epigenetic Regulation and Dysregulation in Neurodevelopment"

2. Invited Symposium Speaker, The 8th International Symposium: The innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models, Niigata, Japan, Feb. 10-12, 2018, Presentation Title "Molecular Mechanisms

Underlying Neuronal Homeostasis”

3. Invited speaker, Brain Research Institute, Niigata Univ., Niigata, Japan, July 14, 2017 “Epigenetic regulation of homeostatic synaptic plasticity through chromatin reader L3mbtl1”

4. Invited speaker, UT Southwestern, Texas, April 16, 2018, “Epigenetic Regulation of homeostatic plasticity”

H. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

None.

I. OTHERS

None.

Research on pathway-specific control of motor activity and motor- and reward-related learning behaviors via dopamine D1 and D2 receptors

Principal Investigator YanYan Wang¹

Co-Investigator Toshikuni Sasaoka²

¹ Department of Medical Information Science, College of Medicine, Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA,

² Department of Comparative & Experimental Medicine, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

We have made progress in three aspects of our collaborative research project. First, in collaboration with Prof. Sasaoka, Prof. Sakimura and Assoc. Prof. Abe group, we have made progress in making the D2S conditional KO mouse using the new RNA splicing and Cre-loxP recombination method. The process of making the construction of targeting vector is going well, and the targeting vector will be soon transfected into ES cells, which will be used to produce chimeric mice. Second, using conditional D1R knockdown and conventional D1R knockout mice, Prof. Sasaoka group has discovered that the time of eliminating D1R expression affects the behavioral phenotypes with respect to motor activity. Third, we have made progress in establishing the condition and protocol for studying neuronal excitability in KO mice using electrophysiological recordings in brain slices. Together, we strive to make contributions to a better understanding of the neurobiological mechanisms of D1R- and D2R-mediated dopaminergic transmission and their roles in neuropsychiatric disorders.

A. INTRODUCTION

The dopaminergic transmission in the striatum and its projection areas plays an important role in motor control, reward, and learning. The striatal efferents are divided into two main pathways: one is the direct pathway (projections from the striatum to the substantia nigra), which is mediated by the dopamine D1 receptor (D1R), and another is the indirect pathway (projections from the striatum to the globus pallidus), which is mediated by the dopamine D2 receptor (D2R). Two isoforms of D2R: termed D2L (long form) and D2S (short form), have been identified in the brain of rodents and humans. Our research proposal is focused on delineating the role of D1R and individual D2R isoforms in motor and learning functions and in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders such as schizophrenia and Parkinson's disease.

B. MATERIALS AND METHODS

A multidisciplinary approach is used including molecular genetic technology, behavioral tests, immunohistochemistry, and electrophysiological recordings.

C. RESULTS

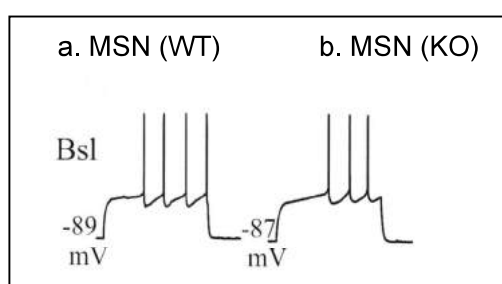
Previously, we generated D2L knockout (KO) mice. Our studies have demonstrated that the D2L KO mouse provides a valuable model system to enable us to begin to investigate the distinct role of individual D2R isoforms in the mammalian central nervous system (CNS). However, if we also have D2S KO mice, this series of research would be greatly strengthened.

We are collaborating with Prof. Sasaoka, Prof. Kenji Sakimura and Assoc. Prof. Manabu Abe group to generate D2S conditional KO mice. We take advantage of the new method using RNA splicing and Cre-loxP recombination to produce the conditional KO of D2S, as described in Hayashi et al. (*Molecular Brain*, 2014, 7:44). In this way, before Cre-loxP recombination the mice will express both D2S and D2L receptors. By the Cre-loxP recombination the exons coding D2S and D2L will be changed to the mutated exon coding only D2L.

Prof. Sasaoka group investigated the role of D1R in motor activity using conditional D1R knockdown (KD) and conventional D1R KO mice. They examined the motor behaviors of D1R KD, D1R KO, and WT mice using the balance beam test and open field test.

They found that mice with D1R expression eliminated at the adolescent to adult stages displayed hypoactivity, whereas mice lacking of D1R at the initial developmental stage displayed hyperactivity (Okubo et al. 2018).

To study the modulation of neuronal excitability and synaptic transmission and plasticity by D1R and D2R isoforms, we are working on the condition and protocol for performing electrophysiological recordings in medium spiny neurons (MSNs) in the striatum. Figure 1 shows action potentials recorded in MSNs from the striatum of WT and D2L KO mice in response to the injection of depolarized currents using whole-cell patch-clamp recordings. This procedure is necessary for studying neuronal excitability.



D. DISCUSSION

In collaboration with Drs. Sasaoka, Sakimura and Abe group, we have made progress in making the D2S conditional KO mouse. Dr. Abe has informed us that the construction of targeting vector is going well, and they will produce the mutated ES cell using the targeting vector. We anticipate the process of producing chimeric mice will be going smoothly using the ES cell.

The study by Prof. Sasaoka group indicates that the time of eliminating D1R expression affects the behavioral phenotypes with respect to motor activity examined.

We have made progress in studying neuronal excitability, and will work on establishing the condition and protocol for studying synaptic plasticity in KO mice using electrophysiological recordings.

E. CONCLUSION

In summary, we have made progress in three aspects of our collaborative project, as described above. We look forward to continuing our collaborative research.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

Shioda N, Yabuki Y, Wang YY, Uchigashima M, Hikida T, Sasaoka T, Mori H, Watanabe M, Sasahara M, Fukunaga K (2017) 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* 22:1205-1222.

Sotoyama H, Iwakura Y, Oda K, Sasaoka T, Takei N, Kakita A, Enomoto H, Nawa H (2017) Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroscience Letters* 654:99-106.

Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Sasaoka T, Fukaya M (2017) BRAG2a, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, is a component of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the photoreceptor terminal. *Investigative Ophthalmology and Visual Science (IOVS)* 58(9):3795-3803.

Fukai Y, Ohsawa Y, Ohtsubo H, Nishimatsu S, Hagiwara H, Noda M, Sasaoka T, Murakami T, Sunada Y (2017) Redundancy of matrix metalloproteinases cleaving beta-dystroglycan: Implications for the pathogenesis of sarcoglycanopathy. *Biochem Biophys Res Comm* 492(2):199-205.

Min E, Ban S, Wang YY, Popescu G, Popescu C-B, Jung W (2017) Multispectral scattering properties of brain tissue. *Biomedical Optics Express* 8:1763-1770.

Okubo T, Sato A, Okamoto H, Sato T, Sasaoka T (2018) Differential behavioral phenotypes of dopamine D1 receptor knockdown mice at the embryonic, postnatal, and adult stages. *International Journal of Developmental Neuroscience* 66:1-8.

2. PRESENTATIONS

Institute for Genomic Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, June 2017

School of Pharmaceutical Sciences, Shenzhen University, China, Nov. 2017

Beijing Research Institute of Zhendong Pharmaceutical Co., China, Dec. 2017

College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, China, Dec. 2017

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

None

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

None

3. OTHERS

None

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成29年度

A. 研究課題名：脳-腸-肝ネットワークによる病態発症のメカニズム
—自律神経系、腸内細菌叢を介した難治疾患の病態解明と新規治療法の開発を目指して—

B. 研究代表者 所属部局名 消化器内科学 職名 教授

氏名 寺井崇二

C. 研究の進捗状況

これまでに、自律神経系を介した様々な消化管ホルモンの分泌変化を解析し、セロトニンが肝切除後の肝再生時に重要であること、その活性化が求心性交感神経のシグナル伝達経路を介していることを明らかとし、論文発表した。(Inoue R, et al. FEBS open Bio) 現在は、非アルコール性脂肪性肝炎の病態、進行に関わることが想定される消化管ホルモンの変化を検証しており、脳、神経のシグナル伝達の検証のために、脳研究所、小野寺教授、上野教授、松井准教授と共同で解析を行なっている。

D. 下記にあるもので該当するものがある場合は記載する。

研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1) Ryosuke Inoue, Kenya Kamimura, Takuro Nagoya, Norihiro Sakai, Takeshi Yokoo, Ryo Goto, Kohei Ogawa, Yoko Shinagawa-Kobayashi, Yukari Watanabe-Mori, Akira Sakamaki, Satoshi Abe, Hiroteru Kamimura, Norio Miyamura, Hiroshi Nishina and Shuji Terai. Effect of a neural relay on liver regeneration in mice: activation of serotonin release from the gastrointestinal tract. FEBS open Bio. 8(3):449-460, MAR 2018

2. 学会発表

1)
なし。

2)

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成29年度

A. 研究課題名：パルス制御が拓く焦点可動 MRI による新規コントラスト機構の創出とそれに基づく革新的な機能 MRI 撮像法の実現

B. 研究代表者 所属部局名 自然科学系（工学部） 職名 准教授

氏名 佐々木 進

C. 研究の進捗状況

今年度の進捗：佐々木が NMR によって見出した量子パルスを、そのまま共同研究者である五十嵐（脳研）の小動物用 MRI 装置に搭載することに成功した。

つぎに、佐々木が NMR ファントム（尿・食塩水・ゲル状ゼラチン）で観測した振動現象を、五十嵐の MRI で再現するか調べた。

その結果、佐々木の NMR での条件をそのまま転用しても、焦点可動の基礎動作原理である、信号強度の振動は観測されなかった。理由として、佐々木の NMR と五十嵐の MRI とでは装置の構造が異なるため、照射するパルスの最適条件が異なること、もしくは佐々木は Na 核スピンの結果であるが、五十嵐の装置は現時点では H 核スピンであること、が考えられる。

今後の見通し：佐々木の NMR 装置において、Na ではなく H によって信号強度の振動が観測されるかを確認する。同時に、佐々木の NMR 装置を MRI に upgrade し、五十嵐の装置でコントラストが得られる条件を詰めてゆく。

D. 下記にあるもので該当するものがある場合は記載する。

研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1) 特許 「磁気共鳴イメージング装置、磁気共鳴イメージング方法、及びプログラム」 (特願 2018-036934：平成 30 年 3 月 1 日出願)

2)

2. 学会発表

1)

2)

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成 29 年度

A. 研究課題名：視路圧迫症候群の器質的・機能的解析から見る、ヒト脳神経系の可塑性の探索と病態予測モデルの構築

B. 研究代表者 所属部局名 自然科学系 職名 教授
氏名 飯島 淳彦

C. 研究の進捗状況

【概要】

下垂体腫瘍による視路圧迫は視野障害を引き起こし、手術によって圧迫が解除されると視野が回復する。本チームでは、先行研究において、腫瘍の形状と視野の関係をモデル化し、術前のデータから予後を予測するモデルを構築した(Ito et. al., 2015)。これより、実際の病態解析から脳内で起きている現象の器質的変化と機能との関係を工学的手法でモデル化することに成功した。これを受けて、本研究で取り組むべき以下の新たな疑問点と課題が見つかった。

【本年度の進捗】

申請時に設定した課題のうち、一つ目の課題として「腫瘍による神経圧迫の影響を他覚的にとらえる」ことについて検証した。腫瘍摘出術中に視覚誘発電位(VEP)を測定し、腫瘍摘出前後(視神経への圧迫解除前後)の VEP の変化について分析した。VEP は、第一次視覚野から記録した。

その結果、硬膜切開に伴い視神経への圧迫解除が開始されるが、その直後から VEP 波形には顕著な変化が観察された。特に、視覚刺激定時後の 100ms 付近に観察される陽性波 P100 に注目すると、視路圧迫解除直後で振幅が増大する例が確認された。

さらに、術前後の視野を比較し、視野の回復が見られた群と見られなかった群に分けて P100 を精査したところ、視野の回復群において P100 の潜時が短縮する現象が確認された。これは、腫瘍により物理的圧迫のあった視神経が減圧された際、引き伸ばされていた状態から元の状態に神経の長さが戻ったことが推測され、その影響で神経伝導する時間が短縮された可能性が考えられる。あるいは、圧迫解除により伝導速度に変化が見られたかもしれず、この点は、今後の症例数の増加により再現性を検証する。

【次年度の展望】

まず、術後の P100 が視野回復の指標となり得るのか、検証する。特に、神経圧迫による神経ダメージがどのように回復し、機能的な変化が見られるのか、P100 の分析から明らかにする。次に、視野データの自動解析システムの構築を進め、本件のデータベース作成の自動化と機械学習による解析を進め、ビッグデータ解析を本格化する。

学会発表、2 件、VEP の術前後変化に関する論文を投稿する予定である。

D. 下記にあるもので該当するものがある場合は記載する。

研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1) 投稿準備中 Iijima A., et al., Advanced Biomedical Engineering.

2)

2. 学会発表

1) 小出碧, 米岡有一郎, 畑瀬哲尚, 藤井幸彦, 福地健郎, 飯島淳彦, 下垂体腫瘍における術中視覚誘発電位と術後視野との関係, 第 55 回日本神経眼科学会総会, 2017.11.11, 横浜

2)

以上

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成29年度

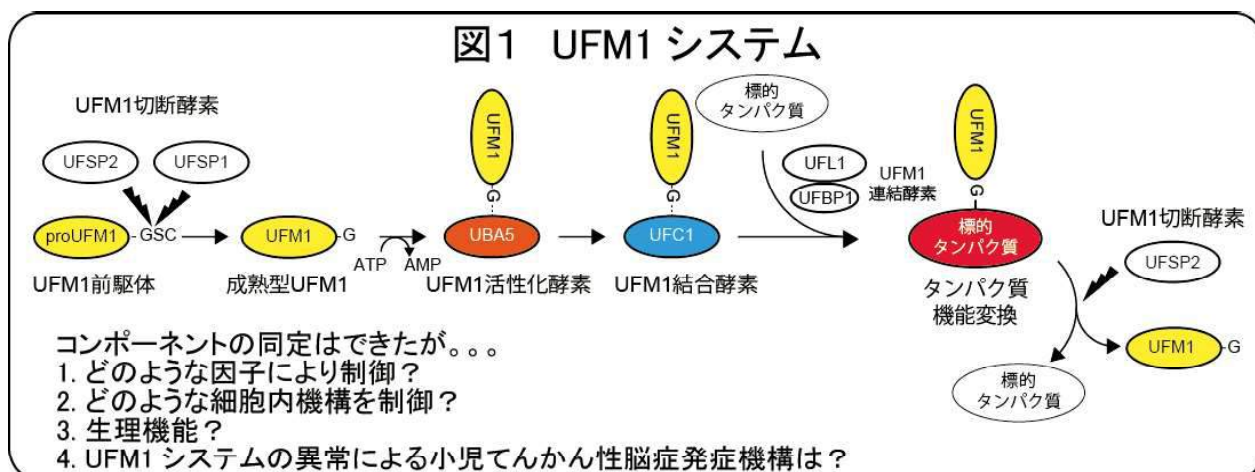
A. 研究課題名： UFM1 システムの異常によるヒト遺伝性発達障害発症機構の解明

B. 研究代表者 所属部局名 医歯学系 職名 教授

氏名 小松雅明

C. 研究の進捗状況

我々はタンパク質修飾システム UFM1 システムを発見し、その作動原理や生理機能を解析してきた。ユビキチン様タンパク質 UFM1 は、活性化酵素 UBA5、結合酵素 UFC1、そして連結酵素 UFL1-UFBP1 複合体を介し細胞内標的タンパク質に共有結合 (UFM1 化) することにより、標的タンパク質の機能変換を担う (図1)。



欧米、オセアニア、中東、そして日本の小児てんかん性脳症患者において UFM1 システムに関わる遺伝子群の変異を同定するとともに、それら変異により UFM1 による細胞内標的タンパク質への結合が減少することを見出した。実際、患者由来の線維芽細胞やリンパ芽球においても標的タンパク質への UFM1 の結合の減少が確認された。したがって、患者細胞内の標的タンパク質への UFM1 化を増加させることが本疾患の予防・治療につながると考えられる。本疾患は治療法が確立されておらず、アンメット・メディカル・ニーズの高い希少疾患である。

今後、遺伝子改変マウスを用いた POC の検証、さらに本研究の発展を考慮し AMED の創薬総合支援事業 (創薬ブースター) あるいは難治性疾患実用化研究事業 (希少難治性疾患の克服に結びつく病態解明研究) に応募する。

D. 下記にあるもので該当するものがある場合は記載する。

研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1) Nahorski MS, Maddirevula S, Ishimura R, Alsahli S, Brady AF, Begemann A, Mizushima T, Guzmán-Vega FJ, Obata M, Ichimura Y, Alsaif HS, Anazi S, Ibrahim N, Abdulwahab F, Hashem M, Monies D, Abouelhoda M, Meyer BF, Alfadhel M, Eyaid W, Zweier M, Steindl K, Rauch A, Arold ST, *Woods CG, *Komatsu M, *Alkuraya FS. Biallelic UFM1 and UFC1 mutations expand the essential role of ufmylation in brain development. **Brain** 141: 1934-1945 (2018)

2)

2. 学会発表

1) 該当なし

2)

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成29年度

A. 研究課題名：組織浸透性に優れたマーカーの創出による脳の機能と病態の
三次元マッピングの試み

B. 研究代表者 所属部局名 医歯学系 職名 教授

氏名 竹林 浩秀

C. 研究の進捗状況

初年度は、病態脳の脳切片を用いた、病態時に発現が変化する mRNA やタンパクの検索を行った。我々の研究室にて、これまでに見出してきたマーカーに加えて、新規のマーカーについての知見も得られてきている。今後は、これらの新規のマーカー候補について、どのような病態と関連するのか、あるいは、どのような細胞種で上昇するのか、などについて、さらに詳細な解析を行う。次年度以降に whole mount 染色を行い、脳を丸ごと染色する方法についての検討も開始する。

D. 下記にあるもので該当するものがある場合は記載する。

研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1)

2)

2. 学会発表

1) 吉岡望、堀江正男、竹林浩秀・末梢神経系特異的な *Dystonin* KOマウスを用いた遺伝性ニューロパチーの病態解析・第123回日本解剖学会総会 全国学術集会・2018.3.28.-30.・日本医科大学武蔵境校舎 日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市)

2)

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

平成29年度

A. 研究課題名：手と身体を知覚する認知神経科学的基盤の解明

B. 研究代表者 所属部局名 人文学部 職名 准教授

氏名 新美亮輔

C. 研究の進捗状況

[1] 脳波計測による手の知覚機構解明のため、脳研究所において事象関連電位計測を開始している。実験補助アルバイトの学生2名にトレーニングを行い、すでに計測ができるようになってきている。データの解析環境も整えることができた。さまざまな条件のもとで予備的測定を5回にわたり行っており、手の写真を観察したときの視覚誘発電位や、手の知覚の実験でよく用いられている右手左手判断課題 (hand laterality task) を行った場合の計測も行われた。これらの予備的検討を踏まえて今後は本実験の準備を進め、本格的な実験的計測に移行できる見通しである。

[2] 成人を対象とした心理学実験では、手のジェスチャーと注意の関係について検討した。手のジェスチャー、特に指さし (pointing) が視覚的注意を誘導することは実験的にもよく確かめられている。一方、他人の視線も視覚的注意を誘導する。これらはそれぞれ独立に研究されてきたが、現実の場面では視線と指さしの両方を同時に観察することが多い。そこで、指さしをしている手の写真と、視線の写真 (顔写真のうち目の周囲を切り取った画像) を同時に提示し、指さし方向と視線の方向を操作して、それが実験参加者の視覚的注意にどのような影響を与えるか心理学実験によって検討した。たとえば、指さしと視線がともに右を向いていれば、実験参加者の注意は右側に誘導されるだろう。しかもその効果は、右向きの指さしだけの場合や、右向きの視線だけの場合に比べて強いことが予想される (具体的には、右に現れる標的刺激に対する反応が早くなることが予想できる)。また、指さしが左、視線が右を向いているような (不一致の) 場合は、右向きの視線だけの場合に比べて、右に現れる標的刺激に対する反応が遅くなることが予想できる。この実験により、顔知覚と手の知覚の相互作用を調べることができる。

19名の大学生が実験に参加したが、残念ながら現時点でははっきりした結果は得られなかった。先行研究で明らかになっている視線単独の効果や指さし単独の効果も強く出でおらず、写真刺激や実験手続きが最適でなかった可能性が考えられる。そのため、今後は刺激や手続きの最適化を進めた上で、本実験に移行する予定である。

[3] 手を用いたジェスチャーを理解する能力の発達過程の検討も行った。先行研究 (Novack et al., 2015) の実験手法を踏襲した予備的研究を実施した。実験には2歳児14名、3歳児18名が参加した。実験中は、実験者が参加児と対面する形で座り、

様々な玩具を順に参加児に提示した。その際、実験者が(1)玩具の正しい遊び方をジェスチャーとして見せる場合(e.g., 積み木を2つ, 縦に積む), (2)玩具で遊ぼうとするが, 正しい遊び方ができず失敗してしまう場合(e.g., 積み木を2つ, 縦に積もうとするが上手く積めず崩してしまう), (3)玩具で遊ぶことをせず, 単に玩具を指差す場合(e.g., 積み木を指差すだけ)の, 3つの提示条件を設けた。これらの3条件間で, 玩具の「正しい遊び方」の生起率を求め, 相互に比較した。もし参加児がジェスチャーを理解する能力を持つならば, 「正しい遊び方」と非常に近い動作が提示される(2)の条件では「正しい遊び方」の生起率が高くなると考えられる。

また(2)の条件に比べると具体的な情報には乏しいものの, (1)の条件におけるジェスチャーの提示によっても「正しい遊び方」の生起率は相応に上昇すると予測される。一方, (3)の条件では「正しい遊び方」の生起率が, (1), (2)の条件に比べて著しく低下すると予測された。

実験の結果, (1), (2), (3)の各条件間で「正しい遊び方」の生起率に有意な差は認められなかった。また2, 3歳児間で「正しい遊び方」の生起率について比較した場合にも有意差は無かった。一方で, 2, 3歳児間で(1)のジェスチャーが提示される条件の成績のみを比較した場合には, 「正しい遊び方」の生起率は3歳児でより高かった。

今後本実験に移行するにあたって, さらなる予備実験によって実験に用いる玩具やジェスチャーの種類を厳選するとともに, より若齢, あるいは高齢の子どもを対象とした実験計画も模索するなどの作業が必要になると考えられる。

D. 下記にあるもので該当するものがある場合は記載する。

研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

(該当なし)

2. 学会発表

(該当なし)

新潟大学脳研究所年報 2017

平成 30 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/>