

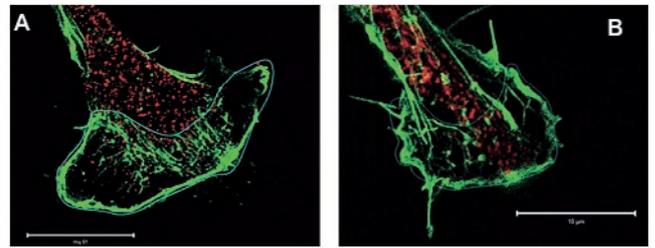
# 研究トピックス

## Research Topics

### ◆腫瘍病態学分野

## 神経栄養因子による 局所翻訳活性化機構の可視化

発達途上の神経細胞の軸索の先端部である成長円錐では、局所的な翻訳(=蛋白合成)が行われていることがわかってきました。私たちは東京医科歯科大学の星治教授との共同研究で、神経栄養因子の刺激により、ラット後根神経節の神経細胞の成長円錐で翻訳が活性化することを見出しました(Neurochem.Res2018)。この時、翻訳装置であるリボソームの動態を、特に細胞骨格のアクチン繊維との相互作用に注目して超解像度顕微鏡で可視化しています。成長円錐の辺縁部では、翻訳が活性化した状態ではリボソーム



ラット後根神経節神経細胞の成長円錐。アクチン(緑)とリボソーム蛋白(S6:赤)を染色し、構造化照明顕微鏡で観察したもの。

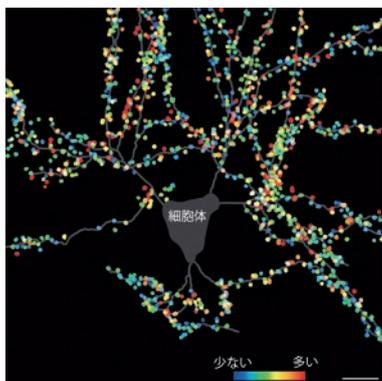
A:コントロール、 B:神経栄養因子で刺激

ムはアクチン繊維から離れていることや、小サブユニットと大サブユニットが会合して翻訳複合体を形成することを、免疫組織化学的に明らかにしました(投稿中)。

### ◆細胞病態学分野

## サイレントシナプスの1細胞 マッピングに世界で初めて成功

脳にはシナプスと呼ばれる2つの神経細胞の繋ぎ目が1000兆個も存在し、神経伝達物質とその受容体を介した情報伝達を行います。一方、一部のシナプスは受容体を欠くことから、情報伝達を行わない“サイレントシナプス”と呼ばれています。サイレントシナプスは学習・記憶に伴って受容体を容易に加えることができる性質を持つため、未来の学習・記憶のための準備状態にあると言えます。しかし、その重要性にも関わらず、どこにどのくらいあるのかを調べる方法がありませんでした。今回、私達は独自のゲノム編集による1細胞内在分子標識法により、マウス脳における1個の大脳皮質ニューロン上のサイレントシナプスをマッピングすることに世界で初めて成功しました。この方法を使えば、学習・記憶の準備段階の理解が進むことで、学習・記憶の障害を伴う発達障害や認知症のさらなる病態解明が期待されます。



1個のマウス大脳皮質ニューロン上の1249個のシナプスをAMPA型グルタミン酸受容体の密度に応じて色分け表示した例。青で表示されたシナプスがサイレントシナプスを指す。

### ◆システム脳病態学分野

## ヒト脳に適した透明化・免疫染色 プロトコルの開発

私たちの研究室では、組織透明化技術の開発に取り組んでいます。特にヒト脳の白質は脂質を潤沢に含んでおり、ホルマウント免疫染色に求められる透過処理を達成するのが難しい組織です。当分野では、化粧品材料にも使用される1,2-ヘキサジオール(HxD)が、ヒト脳透明化・免疫染色において効率的な透過処理剤であることを発見しておりました。本年度は、HxDによる透過処理に加え、過酸化水素による漂白処理を経た組織検体が、様々な抗体分子を標識することが可能であることを見出しました。更に、メタノール脱水および有機溶媒BABB液による透明化処理により、均一な免疫染色とヒト脳検体の高い透明度を両立させるプロトコルの開発に成功しました。本プロトコルを利用することで、病理学分野の柿田教授・齋藤助教との共同研究により、脳小血管病の3D神経病理学への応用を展開しております(Saito et al. bioRxiv 2021)。

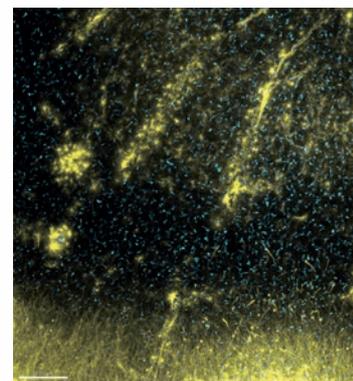
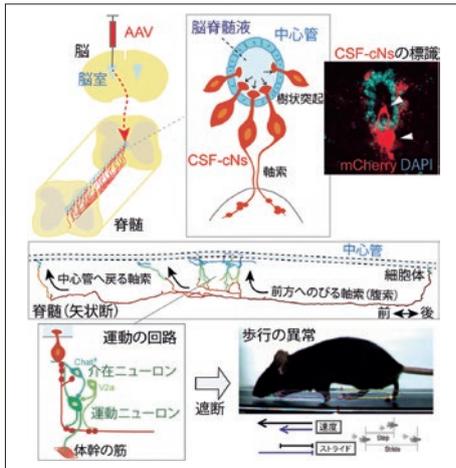


図: 抗GFAP抗体(黄)と抗Iba-1抗体(シアン)で二重染色したヒト剖検脳サンプルの3Dイメージング画像

◆システム脳病態学分野

## 脳脊髄液を感知する謎のニューロン： 歩行の神経回路と機能を解明

脳脊髄液接触ニューロン(cerebrospinal fluid-contacting neurons ; CSF-cNs) は、脊髄の中心管に並び、脳脊髄液へ突起を伸ばすユニークな神経細胞です。その構造や役割は長らく不明のままでした。私たちは、マウスの脳室内にアデノ随伴ウイルスを投与すると、CSF-cNsを特異的に標識できることを偶然に発見しました。この方法を使うと、CSF-cNsは、前方のCSF-cNsや体幹の筋肉を動かす運動のニューロンとつながる構造を持つことがわかりました。さらにCSF-cNsの活動を抑えると、歩行が上手にできなくなりました。CSF-cNsは機械的な刺激に応答することが報告されていることから、体軸や脊髄の動きを感知し、運動のニューロンをコントロールすることで、歩行運動を調節する可能性が示唆されました(Nakamura et al., eLife 2023)。

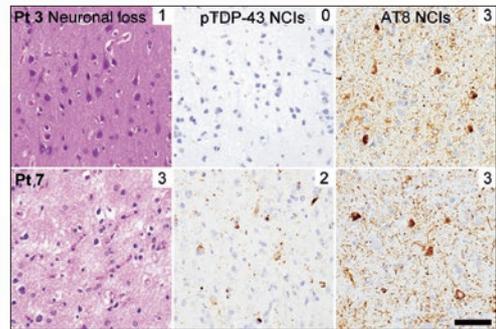


図：脳脊髄液接触ニューロン(CSF-cNs)の標識、構造、機能

◆病理学分野・脳疾患標本資源解析学分野

## 大脳皮質基底核変性症において、神経細胞内のリン酸化TDP-43異常凝集が神経変性に関与している可能性を報告

大脳皮質基底核変性症 (Corticobasal degeneration: CBD) は難治性神経変性疾患で、脳内の神経細胞やグリア細胞内に異常リン酸化したタウ蛋白が蓄積することを特徴とするタウオパチーです。大脳皮質症状や錐体外路症状など多彩な症状を呈します。CBDではリン酸化タウ封入体に加えて、リン酸化TDP-43封入体も他のタウオパチー疾患に比べて高頻度に認められることが知られています。さらに、近年、リン酸化TDP-43封入体の蓄積が臨床症状に影響している可能性も報告されました。しかし、CBDにおいてリン酸化TDP-43封入体の出現が神経変性に関与しているか否かは不明でした。本研究では、CBDに罹患された患者さんの病理組織を詳細に解析し、その結果、脳内における神経細胞内リン酸化TDP-43封入体の分布が神経細胞の脱落の分布とよく相関していることを見出しました。これにより、CBDの病態形成にはタウの異常だけでなく、TDP-43の異常リン酸化や凝集も関与している可能性が示唆されました(Neuropathol Appl Neurobiol, 2022 Apr)。



◆脳神経外科学分野

## 悪性脳腫瘍(神経膠腫)の術後に生じる静脈血栓塞栓症の病態解明と早期診断マーカーを特定 —可溶性CLEC-2値の臨床応用—

株式会社LSIメディエンスとの共同研究で、予後不良とされるインクエン酸脱水素酵素遺伝子 (IDH) 野生型の悪性神経膠腫の術後に合併する静脈血栓塞栓症の機序と早期発見・予測のためのバイオマーカーを特定することに成功しました。静脈血栓塞栓症は、手術後における突然死の原因となりまして、悪性神経膠腫患者の術後管理においては、その早期発見はとて重要で、IDH野生型悪性神経膠腫では組織中にPodoplanin (PDPN、ポドプラニン) というタンパク質の発現が

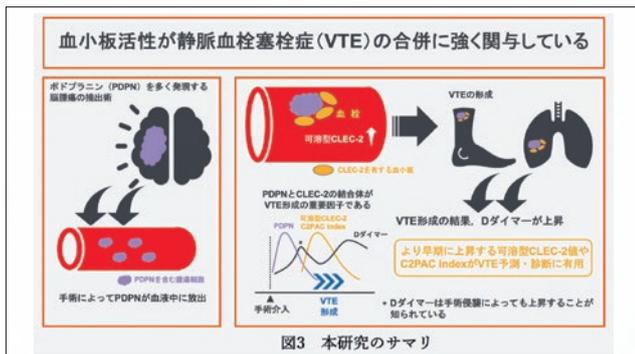


図1:ポドプラニンとCLEC-2との結合体による静脈血栓塞栓症の発生リスク

高く、PDPNの発現が高い症例では術後の静脈血栓塞栓症の合併頻度の高いことを我々は既に報告していますが、PDPNは血小板表面のレセプターであるCLEC-2と結合し血小板活性を惹起します(図1)。本研究では、悪性神経膠腫患者の術後早期に血液中のCLEC-2(可溶性CLEC-2)を測定し、IDH野生型の患者で値が上昇しており、さらには静脈血栓塞栓症を合併した患者では顕著に上昇していたことがわかりました。特に可溶性CLEC-2値を血小板数で割ったC2PAC指数が術後静脈血栓塞栓症を合併した患者で上昇しており、静脈血栓塞栓症予測の有用なバイオマーカーであることが判明しました(図2)。本研究の結果より、①PDPNの発現量が高いIDH野生型悪性神経膠腫の術後で可溶性CLEC-2値、C2PAC指数が上昇していること ②静脈血栓塞栓症を合併した際、可溶性CLEC-2値、C2PAC指数が上昇しておりIDH野生型悪性神経膠腫症例の静脈血栓塞栓症発症に血小板活性が強く関わっていること、が判明しました。これまで、静脈血栓塞栓症合併には凝固系が強く関わっていると考えられてきましたが、本研究では、凝固系の亢進の前段階に血小板の活性化も強く

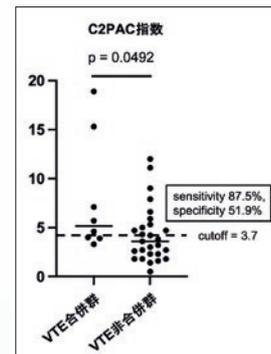


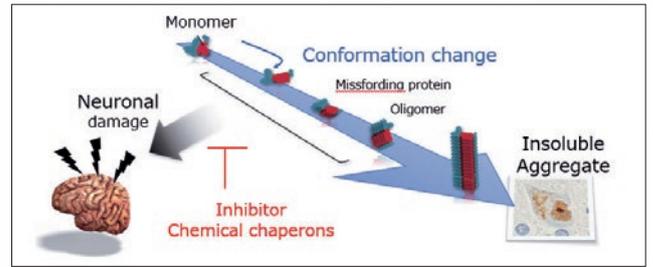
図2:VTE(静脈血栓塞栓症)合併群と非合併群のC2PAC index

関与していることが示唆され、IDH野生型悪性神経膠腫症例に合併する静脈血栓塞栓症の病態解明に繋がりました。また、術後に可溶性CLEC-2値を評価することで静脈血栓塞栓症合併をより早期に予知・発見するが可能となり、臨床におけるより安全な術後管理に寄与できることが期待されます。これらの結果は2023年のThrombosis Research誌(PMID:36706720)に報告しました。

◆脳神経内科学分野

## ポリグルタミン病に対する 医師主導治験の実施

遺伝性脊髄小脳失調症は根治的治療の確立していない、進行性の疾患です。これらの多くは共通の病態機序を有し、ポリグルタミン病と呼ばれます。これは原因遺伝子中のCAGリピート異常伸長由来のポリグルタミン鎖により引き起こされます。同蛋白質は単量体から構造変化を起こし、最終的に不溶性の重合体を形成しますが、その過程の構造変異蛋白やoligomerの神経毒性が高いことが知られています。この蛋白質の構造変化に影響を与え、神経毒性を抑制する治療薬として、L-アルギニンが、本学および共同研究機関にて見出されました (Minakawa EN, et al. Brain. 2020)。同薬を用いた医師主導臨床治験を、令和2年度AMED難治性疾患実用化研究事業の採択を受け、本学主導で実施してい



### ポリグルタミン病 発症機序 概念図

ポリグルタミン蛋白は単量体(Monomer)として産生されたのち、構造変化(conformation change)を起こし、多量体(oligomer)を形成し、不溶性凝集体(insoluble aggregate)に至る。この過程の構造変化蛋白や多量体が強い神経毒性を有している。

ます。日本国内で5施設、40名の患者さんに参加いただいています。2022年度中に全症例での観察期間が終了しました。結果については今後、公表していく予定です。

◆附属統合脳機能研究センター

## Glymphatic System機能低下は 超早期におけるアルツハイマー病 の発症リスク

脳内における老廃物の除去には、水のチャンネルであるAQP4が駆動するといわれている水の流れが深く関与している。この除去システムは体循環におけるリンパ系になぞらえてGlymphatic Systemと呼ばれている。

アルツハイマー病は認知症状が認められる10年以上前から、アミロイドと呼ばれる老廃物が脳内に蓄積し、その後ゆっくり進行し

認知機能が損なわれていくことが知られている。

この老廃物の蓄積の対策により、アルツハイマー病の発症を予防することが期待できるが、アミロイド蓄積とGlymphatic System機能との関係は十分に解明されていない。

我々は、水およびアミロイドPETを用いて脳内の水の動態とアミロイドの蓄積との関係を数年間にわたり撮像し画像解析した。この研究にて、図1,2に示すようにアミロイドの蓄積はGlymphatic Systemの機能低下後から認められることを解明した。(Yuji Suzuki, et al. Journal of Clinical Medicine. 2022 11 (20), 6118. doi.org/10.3390/jcm11206118)

この研究結果は、Glymphatic Systemの機能低下がアルツハイマー病の超早期におけるリスク因子と示唆され、新たな予防法・治療法としてGlymphatic Systemの機能改善・促進をターゲットにした開発が有効である可能性を示している。

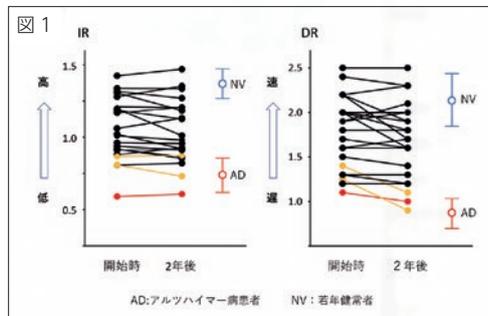


図1: 水PETの解析結果  
IR・DRともに高い値ほどGlymphatic System機能が低いことを意味する。参考に右側に若年健常者(10例)とアルツハイマー病患者(10例)の平均と標準偏差の結果を表示した。

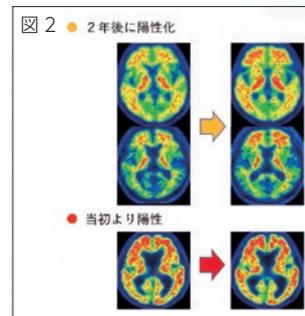


図2: アミロイドPET  
上は経過中にアミロイドが蓄積した2例の結果(図1では黄色の例)  
下は当初からアミロイドが蓄積していた1例の結果(図1では赤色の例)

◆遺伝子機能解析学分野

## リアルワールドでの脳脊髄液 バイオマーカーの認知症診断に おける有用性を検証

アルツハイマー病は臨床的には緩徐に進行する物忘れを特徴とし、病理学的にはAβの沈着、タウの蓄積、神経細胞の減少(神経変性)を特徴とします。しかし、臨床症状と病理変化の一致率は高くないため、臨床症状からアルツハイマー病の病理変化を検出するには限界があるとされてきました。

我々は診断目的に採取された558名の脳脊髄液を、臨床診断から「アルツハイマー症候群」と「非アルツハイマー症候群」に分け、脳脊髄液中の「Aβ42」、「Aβ42/Aβ40比」、「リン酸化タウ(pTau)」、「総タウ」、「ニューロフィラメント軽鎖(NfL)」を測定し、比較・解析しました。

これによりAβ42/Aβ40比、pTau、NfLを組み合わせることで、ア

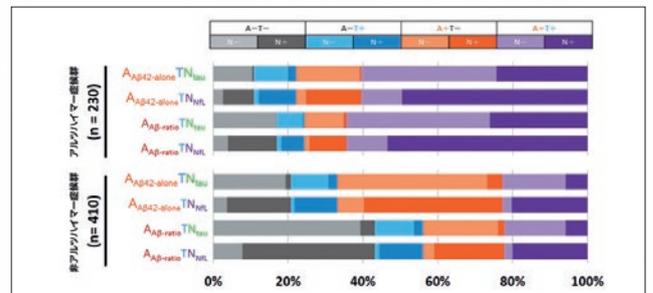


図: Aβマーカー(A)としてAβ42単独もしくはAβ42/40比を、タウマーカー(T)としてpTauを、神経変性マーカー(N)として総tauもしくはNfLをそれぞれもちいて、ATN各マーカーの陽性率を比較した。

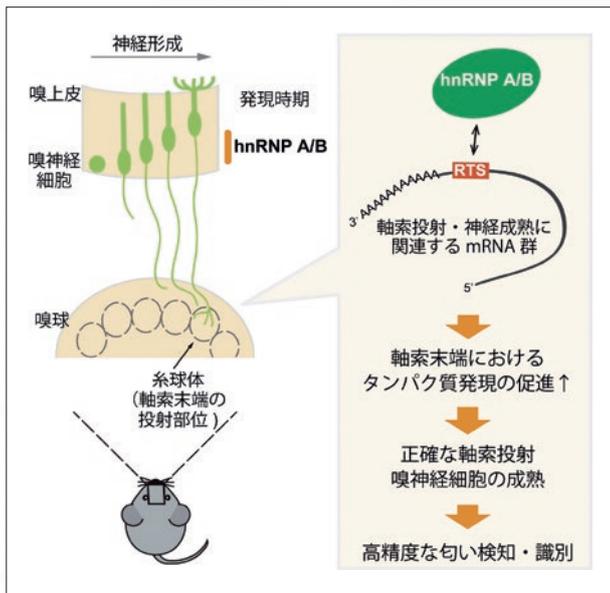
Aβ42/40比、pTau、NfLを組み合わせるとアルツハイマー症候群では濃い紫(A+T+N)が多く、非アルツハイマー症候群では濃い灰色(A-T-N)が多くなった。

ルツハイマー症候群、非アルツハイマー症候群いずれにおいても、感度・特異度高く、生前にアルツハイマー病理の存在を検出できることを報告しました(Kasuga K, et al. Neurobiol Aging 2023)。

◆動物資源開発研究分野

## 嗅神経回路の形成を担う RNA制御因子を発見

複雑な構造体である神経細胞では、mRNAからタンパク質が合成される場所や時期が厳密に制御されています。例えば神経細胞の軸索では、必要なmRNAがあらかじめ軸索末端に運ばれており、外部からの刺激に応じてその場で局所的なタンパク質合成が開始されることが知られています。このような遺伝子制御「局所翻訳」は、軸索末端のように細胞体から遠く離れた部位でも迅速に、そして必要な場所だけにタンパク質を配置することができるため、神経細胞の形成や機能に重要です。私達は、嗅神経細胞で局所翻訳の制御を担う新たな因子として、RNA結合タンパク質hnRNP A/Bを同定しました (Fukuda et al., *Cell Reports* 42, 112398, 2023)。hnRNP A/Bが機能しないマウスでは、神経回路形成に関わるタンパク質の発現が軸索の末端で局所的に低下しており、嗅神経回路が正常に形成されていませんでした。また、匂いを検知して識別する能力に低下が見られました。本研究結果は、神経回路の形成や感覚機能を担う遺伝子制御のしくみを明らかにした重要な成果のひとつです。



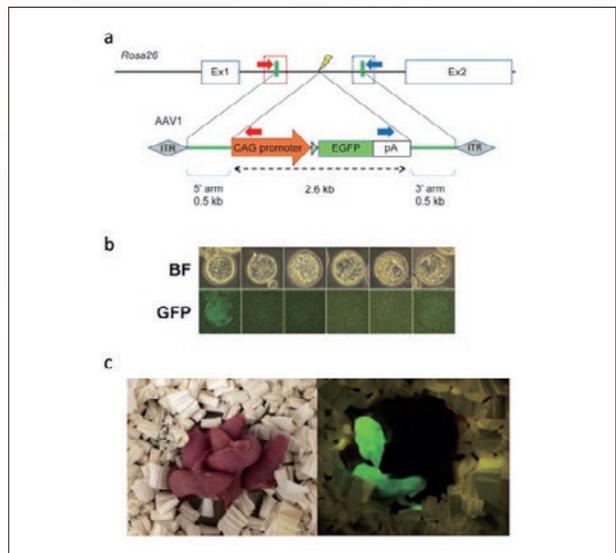
RNA結合タンパク質hnRNP A/Bは嗅神経回路の形成を担う

◆モデル動物開発分野

## ゲノム編集による遺伝子改変動物作製技術の改良に成功

モデル動物開発分野の中務 助教(2021年当時)、夏目里恵 技術専門職員、阿部学 准教授は、ゲノム編集による遺伝子改変動物作製技術を改良して、ドナーDNAとしてアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いることで、約3kbまでの長さの外来遺伝子を正確に標的遺伝子座に挿入(ノックイン)したマウスおよびラットを極めて簡単に作製することに成功し、その研究成果を2023年2月9日、*Scientific Reports*に発表しました。

この技術を用いることで精巧な遺伝子改変マウス/ラットの作製がさらに容易になり、生命科学の加速化に大きく貢献するものと思われます。特にノックインラット作製の難易度がより下がり、これまで比較的困難であった病態モデルラット等の開発に重要な技術となることが考えられます。また、他の齧歯類、中型・大型動物や霊長類の遺伝子改変への適用も期待されます。

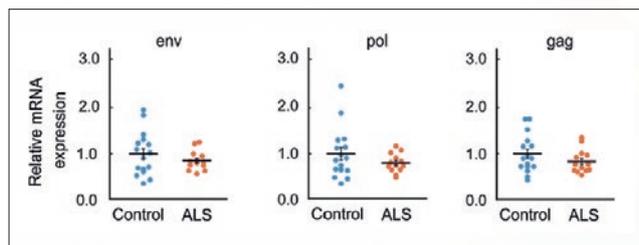


a) ドナー DNA として作製された AAV ベクターの模式図。マウス Rosa26 遺伝子座に緑色蛍光タンパク EGFP 発現カセットをノックインするように構築した。b) 体外での遺伝子改変処置により受精卵の 1 つ (左端) に EGFP 発現カセットが挿入され、緑色蛍光が観察された。c) 出産直後のマウス。2 匹は全身に緑色蛍光を発し、Rosa26 遺伝子座に正確にノックインされていることが確認された。

◆分子神経疾患資源解析学分野

## ALSにおけるレトロウイルスK 発現量の検討

神経難病の筋萎縮性側索硬化症(ALS)において、ヒト内在性レトロウイルス-K (HERV-K)の発現が増加しているという報告と、これを否定する報告がされています。当科では、本学病理学分野の保有するALS患者さん由来の病理組織を用いて、脊髄および大脳運動野におけるHERV-Kの発現を測定しました。その結果、正常対照群とALS患者さん群とで明確な差を認めませんでした (Ishihara T et al, *Neurosci Res.* 178, 2022)。今回の結果ではALSとHERV-Kの関連は否定的でしたが、抗レトロ



ウイルス薬の臨床応用の可能性を考えると、さらなる調査が必要な領域です(本研究所ウェブサイト内コンテンツ・脳研コラムにも詳細を記載しています)。

脳研コラム 2022年11月1日公開記事 タイトル「異邦人」  
<https://www.bri.niigata-u.ac.jp/research/column/001825.html>

◆脳病態解析分野

## パーキンソン病におけるα-シヌクレイン新規リン酸化の病態を発見

私達の研究室は「難病を克服する」・「障害を支え合う」・「科学の歴史を刻む」という理念のもと、日々研究を続けています。令和4年度はクラウドファンディングを含めた様々な研究費に支えられて、研究室全体で研究を推進しました。一例になりますがパーキンソン病の新しいメカニズムに関する研究を長年継続し、やや理不尽とも思える審査などにも遭遇しつつ、投稿しては追加実験をすることを延々と繰り返していました。ようやく2023年5月に*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*に掲載されることになり、サポーターの皆様にも遅ればせながらご報告できることを喜んでます。そこではパーキ



図1: 本研究に利用したアフリカメダカ  
わずか3-5ヶ月の間に老化し、パーキンソン病を含むさまざまな加齢関連疾患の病態を呈する。図は松井自身が撮影したもので、一部は松井研究室のホームページ([https://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroscience\\_of\\_disease/](https://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroscience_of_disease/))より転載。

ンソン病におけるα-シヌクレインの神経毒性に関係すると考えられるT64リン酸化の存在を明らかにしました。これまでパーキンソン病において、α-シヌクレインが重要な分子の1つであることは想定されていましたが、α-シヌクレインがどのようにしてパーキンソン病の病態に関わるかは不明な点が多くありました。本研究では、加齢とともにパーキンソン病に類似した病理を呈する魚=アフリカメダカの脳(図1)、およびヒト剖検脳におけるα-シヌクレインの翻訳後修飾を解析することで、α-シヌクレインT64リン酸化がパーキンソン病において増加することを見出しました。さらにα-シヌクレインT64リン酸化が異常な形態の複合体を形成すること、ミトコンドリア機能障害や細胞毒性を発揮することなどを明らかにしました。以上の発見はパーキンソン病の病態解明とその治療開発に役立つことが期待されます(図2)。

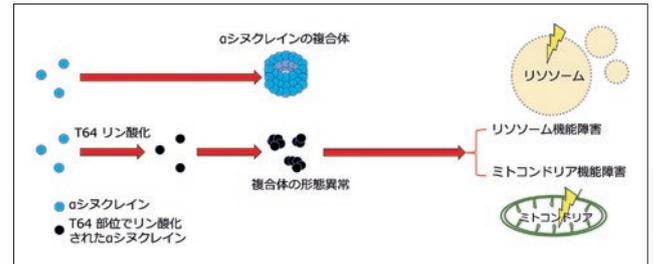
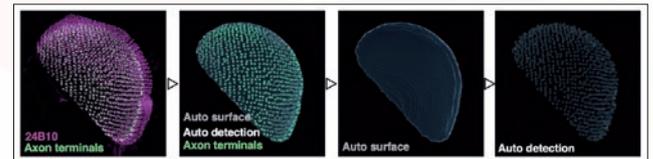


図2: 本研究の概要  
α-シヌクレインのT64リン酸化が異常な複合体の形成に繋がり、結果リソソーム機能障害やミトコンドリア機能障害、ひいては細胞毒性や神経細胞死につながると思われる。

◆脳病態解析分野

## ショウジョウバエを用いた神経変性過程の探求

神経細胞は長期間活動し、その機能を維持します。しかし、加齢の過程や神経変性疾患により、神経細胞の一部が破壊され、細胞死を招くことがあります。特にシナプスや軸索の消失は、変性過程の初期における重要な事象です。その臨界点がどこにあるのかは以前まで明らかではありませんでした。私たちは、ショウジョウバエの視神経は、その神経軸索を脳に投射し、規則的に配列される規則性(図)を利用し、軸索消失を系統的に観察する実験モ



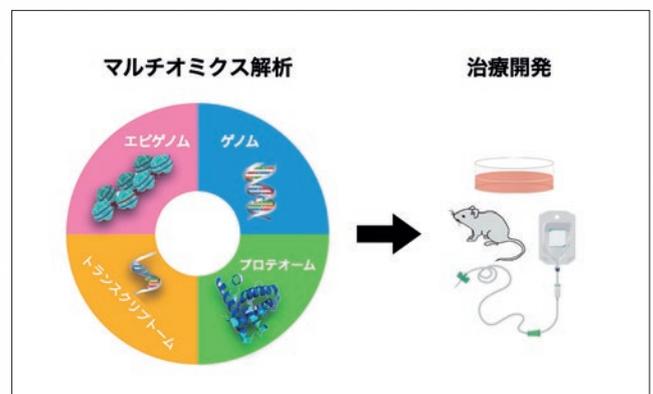
ショウジョウバエ視神経の軸索末端の切り取りおよび軸索末端数の自動定量操作

デルを開発しました(Richard et al., J. Neurosci., 2022)。さらに、この視神経変性の過程を自動的に定量化するための機械学習解析プログラムを開発しました(Nitta et al., Hum. Mol. Genet., 2023)。このソフトウェアを利用することで、様々な神経変性の研究に寄与することができます。

◆脳神経疾患先端治療研究部門

## 希少な小児脳腫瘍培養細胞株のマルチオミクス解析により新規治療法に迫る

本研究部門は令和5年度から新たに脳研究所に設置された部門です。今後行う研究の切り口としては、神経変性疾患や脳腫瘍の網羅的遺伝子解析を通じて、その病態の解明に迫るというものです。今回、我々は脈絡叢癌の培養細胞株NGT131の樹立に成功した。脈絡叢癌は稀少かつ極めて予後不良である小児悪性脳腫瘍であり、その治療法は確立されていません。高率にTP53変異を有し、その胚細胞変異(Li-Fraumeni症候群)との関連が知られています。同じく脈絡叢癌の培養細胞株CCHE-45を樹立した小児がん病院エジプトとの共同研究で、NGT131およびCCHE-45の



マルチオミクス解析を行いました。その結果、両細胞株はTP53変異を有し、Notch pathwayの異常活性化が認められることが解りました。これらの結果は、脈絡叢癌に対する新規治療法確立に繋がると期待されます。