研究トピックス

Research Topics

◆腫瘍病態学分野

EGFはペリニューロナルネット形成を抑制し、抑制性神経細胞の発達抑制に関与することを解明

腫瘍病態学分野では、がん研究で知られるEGF(上皮成長因子)の、脳神経・精神疾患での作用解析を進めています。これまでEGFが統合失調症に関与するGABA神経細胞に対しては発達・機能を抑制すること、ドーパミン神経では逆に促進することを報告しました。しかし、EGFが２種の神経細胞に対しなぜ正反対に作用するのかは不明でした。今回、EGFがGABA神経細胞の特徴的な細胞外構造(ペリニューロナルネット、PNN)の形成抑制を行うことが、GABA神経細胞の発達・機能抑制に関与することを明らかにしました(Iwakura et al, Neurochem. Res 2024)。EGF過剰発現マウスは、統合失調症に関連する行動異常を示します。このマウスの大脳皮質では、PNNを持つGABA神経細胞数が減少しました。これはEGFが細胞外基質の切断酵素を活性化し、PNN形成阻害に関与するためであることが分かりました。この研究結果は、EGFが神経細胞だけでなく細胞外構造に対しても作用し、脳機能調節に寄与することを示します。

脳発達初期の過剰なEGFシグナルによるPNN形成阻害とGABA発達抑制

◆細胞病態学分野

頭蓋骨を透明にして脳の中を観察する方法を開発

2光子顕微鏡は、厚みのある生きた組織の中で起きていることを特殊な光を通じて高い解像度で観察することを可能にします。この顕微鏡を脳に応用するためには、脳が光を遮る頭蓋骨によって覆われているため、事前に頭蓋骨を取り除いてガラスに置き換えるか、または頭蓋骨を透き通るほど薄くする手術が必要です。しかし、いずれの手術も高度な技術が必要な上、脳にしばしばダメージを与えてしまうことが問題視されていました。細胞病態学分野では、システム脳病態学分野(田井中研究室)と共同で、頭蓋骨に試薬をふりかけるだけで簡便に頭蓋骨を透明化する画期的な方法「SeeThrough」を開発しました。この方法は、生きたままの脳を観察するための技術的なハードルを低くし、脳研究の一層の発展に役立つと考えられます。

SeeThrough前(左)後(右)のマウス大脳皮質の1光子(上段)および2光子(下段)顕微鏡観察像。SeeThrough後、同一の血管(上段)およびニューロンの樹状突起(下段)が明瞭に観察されている。

◆システム脳病態学分野

組織透明化技術に適合する新規ケミカルバイオロジーツールの開発

私たちの研究室では、組織透明化技術に適合する新規ケミカルバイオロジーツールの開発に取り組んでいます。本年度は、①蛍光性の金ナノ粒子を用いた微小炎症可視化方法を開発しました(Naim et al. Bio Protoc. 2023)。本手法は、特定の血管での病原性免疫細胞のリクルートによって誘導される微小炎症の段階的な進展を特定し、追跡するのに有用です。また、②薬物の局在を可視化するために、CAGリピート配列に結合するドラッグに蛍光標識を導入した新規化合物を開発し、3Dイメージングにより薬物の脳内分布を明らかにする手法を開発しました(Murakami et al. Bioconjug Chem. 2023)。更に、低酸素細胞を特異的に検出する新規ケミカルプローブにより、マウス全身・臓器丸ごと低酸素イメージングに成功しました(Sakamoto et al. ACS Nano 2024)。

Alexa594標識CAGリピート結合性ドラッグの経鼻投与後のマウス全脳3Dイメージング画像、蛍光標識ドラッグ(黄)と自家蛍光(青)

◆システム脳病態学分野

ALSの病態が運動神経回路の中を進行する機序

筋萎縮性側索硬化症（ALS)は、運動の機能を司るニューロンが進行性に変性し、体を動かすことや呼吸が困難となる難病です。当研究所では長年、ALSの臨床、病理、基礎研究を進めてきましたが、身体の局所から始まる運動障害がなぜ全身へと広がるのか、病態が進行してしまう機序は不明のままでした。私たちは、当研究所の脳神経内科学分野と共同研究を実施し、ALSの病態が運動を司る神経回路の局所から進行していく機序を見出しました(Tsuboguchi et al., Acta Neuropathol 2023)。特に、原因タンパク質の1つであるTDP-43が、神経回路の局所に蓄積する新たなマウスモデルを開発することで、大脳皮質や脊髄の運動ニューロンから、神経回路を伝って病態が実際に進んでいくことを明らかにしました。この研究をもとに、病態の進行を抑止する方法の発展が期待されます。

運動神経回路内のTDP-43による病態の進行様式

◆システム脳病態学分野

種分化や表現型進化をともなうゲノム進化の再現実験

進化生物学的研究ではこれまで現存の種や個体を比較することによって、進化を推定することが主な研究手法でしたが、線虫の短い世代時間を利用すれば、進化を実験室上で実際に再現し、どのような進化が起こるのかを観察することができます。これまで私たちはプリスティオンクス(Pristionchus)属線虫の多様な種のゲノム解析を行い、染色体融合が急速なペースで起こり、種分化、すなわち新しい種を作る原動力となっていることを示してきました(Yoshida et al. Nature Ecol. Evol., 2023)。似たような染色体融合はヒトの染色体異常や癌細胞でもよく見られるものです。このような染色体融合がゲノム進化を促進させ、表現型の進化などを引き起こしたと考えられるため、実際にこの染色体融合を人為的に引き起こし、世代をこえた進化実験を行うことを現在目指しています。この研究を足掛かりに進化を実証的に研究する研究基盤を構築します。

プリスティオンクス属線虫二種の大規模なゲノム再編成。ゲノム中の相同な領域が線で結ばれている。

◆病理学分野・脳疾患標本資源解析学分野

Nasu-Hakola病におけるミクログリアの遺伝子発現シグネチャーを同定：シグナルの制御を標的とした治療の可能性を示唆

ミクログリアは大脳白質の恒常性の維持に重要な役割を担っています。ミクログリアの機能維持に必須の遺伝子の変異によって白質脳症をきたす疾患群があり、一次性ミクログリア病と呼ばれています。Nasu-Hakola病は一次性ミクログリア病の代表的な疾患の一つで、*DAP12*もしくは*TREM2*遺伝子の変異が原因であることが知られています。しかし、その病態機序は未解明でした。本研究では、*DAP12*遺伝子変異によりNasu-Hakola病を発症された患者さんの剖検脳組織を用いて、単一核RNAシーケンス解析を行いました。その結果、ミクログリアにおけるSTAT3やTGF-βシグナル経路などを介した組織修復反応の過剰亢進を見出しました。また、ミクログリア以外のグリア細胞や血管周皮細胞にも本疾患に特徴的な遺伝子発現変動を同定しました。これらの結果から、*DAP12*の機能喪失はミクログリアの過剰な組織修復反応を引き起こし、他のグリア細胞や血管との相互作用によりミクログリアの生理機能をさらに低下させることで、Nasu-Hakola病の病態を引き起こしていると考えられました。このような過剰なミクログリアの反応の制御が治療につながる可能性が示唆されました(Nature Immunol, 2023 Mar)。

図1 単一核RNAシーケンス解析：細胞種依存性にクラスターを形成

図2 Nasu-Hakola病の病態モデル

◆脳神経外科学分野

神経皮膚黒色症における腫瘍形成と悪性化に関連する責任遺伝子を同定 ―稀少難病の克服に向けた多領域ゲノム解析―

神経皮膚黒色症は皮膚色素性母斑と髄膜色素細胞(メラノサイト)の異常増殖を特徴とする稀な先天性神経皮膚症候群です。母斑は組織学的に良性ですが、脳病変は高率に腫瘍化し急速に進行する極めて予後不良な疾患です。胎児期に、色素細胞前駆細胞に遺伝子変異を生じることが原因とされますが、脳病変のみが腫瘍化する機序は解明されておらず、現在有効な治療法はありません。

本研究では水頭症で発症し、脳室-腹腔シャントを介した広範な腹腔内播種が原因となり腫瘍死した神経皮膚黒色症剖検例に対して、腫瘍、母斑、非腫瘍部位を含めた多領域ゲノム解析を行いました(図1)。その結果、腫瘍形成と悪性化に関連するドライバー変異を同定しました(図2)。

本研究結果から腫瘍、母斑、非腫瘍部位を含む複数部位に対して網羅的遺伝子解析を行うことで腫瘍形成と悪性化に関連する真のドライバー変異が明らかとなり、神経皮膚黒色症の病態解明および新規治療の開発が期待されます。

これらの結果は科学誌「Acta Neuropathologica Communications」の2024年に報告しました。

図1 全エキソームシーケンシングで検出された遺伝子変異の分布

図2 ドライバー変異の分布と変異アレル頻度

◆脳神経内科学分野

脳保護に対するヒト末梢血単核球を用いた細胞療法を確立する

脳梗塞は非常に頻度の高い疾患です。脳卒中は、日本における死因の第4位、寝たきりの原因の第2位となっています。高齢化社会を迎え、脳卒中患者さんは急増し、3人に1人が脳卒中を発症する時代に突入しました。脳卒中のなかでも、血管が詰まることで発症する脳梗塞は、近年増加し、後遺症に苦しむ患者さんも多く、治療にかかる医療費は増加しています。

今回、後遺症を改善させる治療として、血液中の細胞による細胞療法の作用機序を明らかにしました(図)。具体的には、細胞間の情報伝達に、細胞から分泌される直径50-150 nmの顆粒状物質エクソソームが関与し、エクソソーム中のマイクロRNA-155-5pを低下させることで脳内環境を変化させることを明らかにしました。さらに、脳梗塞ラットに細胞を投与することで、脳梗塞後遺症が大幅に改善することを明らかにしました。産学官連携を通して、この創薬シーズを発展させ、日本発の治療法を目指しています。

低酸素低糖刺激による末梢血単核球を用いた細胞療法の作用機序

◆附属統合脳機能研究センター

持続性知覚性姿勢誘発めまいにおける脳領域の結合性変化

持続性知覚性姿勢誘発めまい(persistent postural-perceptual dizziness, PPPD)は、3カ月以上の長期間にわたって、ふわふわしためまいや不安定な感覚が続く慢性めまい疾患である。患者の多くは三半規管などに代表される前庭の機能自体には問題がないため、平衡感覚の統合を行う脳機能の異常が疑われるが、詳細は不明である。

我々は、PPPD患者に対し安静時機能的MRIを撮像し、脳領域の機能的結合性(=異なる脳領域の連動性)を健常者と比較した。図1に示すようにPPPDでは、体性感覚野と視覚野、及び海馬傍回と下頭頂小葉との間で機能的結合性の増強を認めた。また、前庭覚野と視覚野との間で機能的結合性の減弱を認めた(Chihiro Yagi, et al. Front. Neurol. 2023:14:1215004)。この結果は、PPPD患者が体性感覚および視覚の情報を重要視した空間認知を行っている可能性を示している。

PPPD患者における機能的結合性の変化
体性感覚野-視覚野、海馬傍回-下頭頂小葉との間で機能的結合性の増強を、前庭覚野-視覚野との間で減弱を認めた。

◆遺伝子機能解析学分野

多遺伝子リスクスコア構築により日本人アルツハイマー病の遺伝的リスクを解明

アルツハイマー病は遺伝的リスクによって発症する認知症の一つです。これまでアルツハイマー病のゲノム解析から遺伝的リスクは一つではないことがわかってきています。我々は複数の遺伝的リスクを一つの値に集約したポリジェニックリスクスコア(PRS)を開発することで個人がもつ遺伝的リスクを定量化し、その特徴を明らかにしました(Kikuchi M et al. Alzheimers Res Ther. 2024)。日本人504人に対してPRSを算出すると、健常者と比べてアルツハイマー病患者で有意にPRSが高いことが示されました(図1)。さらにこのPRSは認知機能や、アルツハイマー病の原因タンパクの一つであるタウタンパクの髄液中濃度、アルツハイマーの発症リスクとも関連することが分かりました(図2)。本研究によりアルツハイマー病の発症リスクの推定や、アルツハイマー病治療薬が奏功するグループを見極める層別化に向けた応用が期待されます。

図1 グループ別のPRS
アルツハイマー病患者では認知機能正常や軽度認知障害(MCI)と比べてPRSが高いことが分かりました。

図2 APOEε4を持たないMCI患者のPRS層別化アルツハイマー病発症リスク
MCI患者において高PRS群は低PRS群よりもより早期に発症率が増加することが分かりました。

◆動物資源開発研究分野

マウス腎臓被膜下に移植した卵巣からマーモセット卵子の取得、胚生産に世界初の成功

マーモセットは脳神経研究の実験動物としての有用性が近年高まっています。そこで、遺伝子改変マーモセット作製のため卵子の新しい供給方法の研究開発として、動物資源開発研究分野、モデル動物開発分野、富山大学の共同研究で、マーモセット卵巣をマウスの腎臓被膜下に移植する異種間卵巣移植を行い、マウス体内で発育させた卵胞からマーモセットの卵母細胞を採取することに成功しました(図1)。さらに、採取した卵母細胞を体外で成熟・受精させ、胚盤胞まで発生させることにも世界で初めて成功しました。本手法はマーモセット卵子の新しい供給方法として期待できます。本成果はScientific Reports (https://www.nature.com/articles/s41598-023-45224-x)に掲載されました。

本研究の概念図
全国の研究施設から分与された廃棄予定だったマーモセット卵巣を細かく切り分け(1)、卵巣除去した免疫不全マウスの腎臓被膜下へ移植する(2)。次にホルモン投与により、移植したマーモセット卵巣内の卵胞を発育させ(3)、マウス腎臓から採取したマーモセット卵母細胞を体外で成熟、受精させて胚を発生させる(4)。

◆モデル動物開発分野

マウス脳におけるNMDA型グルタミン酸受容体の正確なタンパク質定量に成功

モデル動物開発分野を中心とした研究グループは、マウス脳におけるNMDA型グルタミン酸受容体(NMDAR)サブユニットについて、力価の異なる各サブユニットの特異的抗体のウエスタンブロットでのシグナルを補正計算することでタンパク質定量を可能とする技術を独自に開発し、マウスの各発達段階での大脳皮質、海馬、小脳におけるNMDARサブユニットのタンパク質量について細胞分画法を用いて網羅的に測定した結果をNeurochemistry International(https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105517)に発表しました(図)。

この技術はNMDARの構成や量的関係を調べるうえで有用であり、脳機能や脳疾患に関連する分子機序の解明のための基礎的なデータとなることが期待されます。

◆分子神経疾患資源解析学分野

SCA3とDRPLAの発症年齢の予測

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、脊髄小脳変性症3型 (SCA3)をはじめとするポリグルタミン病は、原因遺伝子内のCAGリピートの伸長によっておこる病気です。ポリグルタミン病では、発症年齢とCAGリピート数が逆相関することが知られています。その逆相関を利用して、従来はパラメトリック生存分析を利用した発症年齢を予測が行われてきましたが、より精度の高い予測法が求められていました。我々は、当科で遺伝子検査が行われたSCA3 292 例、DRPLA 203 例のデータに基づき、機械学習の生存分析を用いて、未発症キャリアの現在の年齢とCAGリピート数からある年齢での未発症確率を予測しました。その結果、従来のパラメトリック生存分析よりもより高精度に発症予測を行うことができました(Hatano Y, et al. Neurol Genet. 2023)。

また、未発症キャリアの現在の年齢とCAGリピート数から、特定の年齢における未発症確率を図示できるWindows 64bit用アプリケーションをhttps://github.com/yuya-hatano/SCA-onsetにリリースしました

本研究は、未発症キャリアの人生設計のための遺伝カウンセリングに役立つことが考えられます。

DRPLA患者における解析。現在未発症であれば、ある年齢で未発症である確率をCAGリピート数60-70の範囲で示した。現在の年齢を色分けして示し、X軸に所定の年齢、Y軸に未発症である確率を示した。

◆脳病態解析分野

老化 ―加齢関連疾患― 神経難病への新しいアプローチ

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5年度はAMED-CREST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(Matsui et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2023; Yamanaka et al., *J. Biol. Chem.*, 2024.; Kodera et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2024など)。Matsui et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2023の話は前回記載してしまったのですが、Yamanaka et al., *J. Biol. Chem.*, 2024では山中准教授が前職から継続して研究してきたNF-YAという分子の機能をマウスを使って明らかにしました。Kodera et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2024は小児科から大学院博士課程の研究のためにきていた古寺さんの論文で、GPATCH4という分子の機能をこちらは培養細胞を中心に用いて明らかにしたものになります。いずれも老化や神経難病の理解に必要な基礎研究でこれからの発展が期待されます。

ところでAMED-CRESTは令和5年度10月に開始のグラントになります。新潟大学の上村顕也先生と矢野真人先生と一緒に、老化と共に細胞内に蓄積する老廃物をどのようにして廃棄するかという研究を進めていきます。もちろん老化だけでなく加齢関連疾患-神経難病へも展開していく予定です(図)。画期的な成果が報告できるよう教室一同熱心に研究をしています。引き続きよろしくお願いします。

AMED-CRESTでの研究の概要
図はAMED-CREST「根本的な老化メカニズムの理解と破綻に伴う疾患機序解明」研究開発領域のグラフィカルアブストラクトより。

◆脳病態解析分野

ショウジョウバエを用いた希少疾患・未診断疾患の遺伝子変異の病的意義の解明

短身、知的障害、および心筋緻密化障害を呈した患者から*DHX9*の新たなヘテロ接合de novoミスセンス変異体p.(Gly414Arg)を慶應大学の小崎健次郎教授らとの共同研究により発見しました（図；Yamada et al., *European Journal of Medical Genetics* 2023)。

Noonan様表現型を有するRRAS2の病原性変異が機能獲得毒性を示すことを、国立生育医療研究センターの要教授らと明らかにしました(Iida et al., *Frontier in Genetics* 2024)。

発達とてんかん性脳症および進行性神経変性疾患と関連する伸展活性化イオンチャネルTMEM63Bの新規遺伝子変異の病的意義について、横浜市立大学の松本直通教授らと報告しました(Vetro et al., *The American Journal of Human Genetics* 2023)。

新規DHX9変異の病的意義評価
(Yamada et al., Eur. J. Med. Genet. 2023から引用(一部改変))

◆脳神経疾患先端治療研究部門

嚢胞を伴う脳腫瘍の嚢胞液より遺伝子診断に成功

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。この度、脳研究所内の共同研究により、嚢胞を伴う脳腫瘍の嚢胞液中cell free DNAより脳腫瘍の診断に繋がる遺伝子変異の同定に成功しました。嚢胞を伴う脳腫瘍22例の腫瘍DNAにおける25遺伝子変異の全てを、高感度PCR(デジタルドロップレットPCR)を用いて嚢胞液中でも同定できました。また、嚢胞液中のcell free DNAの変異アレル頻度は、腫瘍DNAの変異アレル頻度と相関することを明らかにし、*J Neurooncol*誌に報告しました。嚢胞成分が主体の脳腫瘍の病理診断の一助となることが期待されます。

代表例および腫瘍DNAと嚢胞液中DNAの変異アレル頻度の相関