

研究トピックス

Research Topics

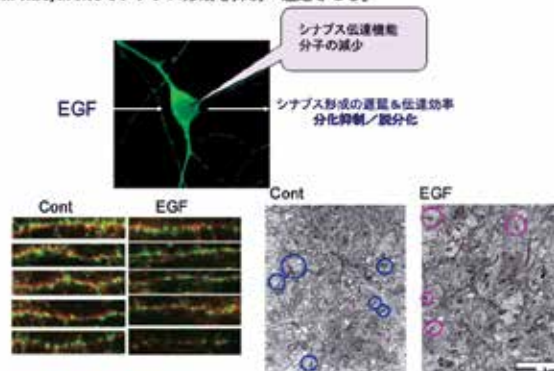
◆腫瘍病態学分野

上皮成長因子(EGF)はプレシナプスの成熟を負に制御し、シナプス形成を抑制する

上皮成長因子(Epidermal Growth Factor:EGF)は腫瘍などでの作用がよく知られる、代表的な増殖因子であり、中枢神経系においても特に神経幹細胞の増殖には必須と考えられています。では増殖を停止した神経細胞に対する作用はどうでしょうか？ ラット神経細胞の初代培養神経細胞に対し、EGFはプレシナプス蛋白のレベルの低下や成長円錐の運動性の亢進などを引き起こしました。またシナプスの減少も免疫組織化学と電気生理学の手法で明らかになりました。さらに個体の脳においても、生後すぐにEGFを連続投与すると、大脳皮質におけるシナプスの数が減少することが透過型電子顕微鏡を用いた解析で明らかになりました(Neurochem Res. 2022)。つまりEGFは増殖こそ引き起こさないものの、神経

細胞をより未熟な状態にする、脱分化の方向に作用することがわかってきました。これは分化誘導型の神経栄養因子であるBDNFとは反対の作用であり、脳の正常発達にはこれらの因子によって正・負に制御されていることが示唆されました。

EGFはin vitro, in vivoでシナプス形成を抑制・遅延させる。



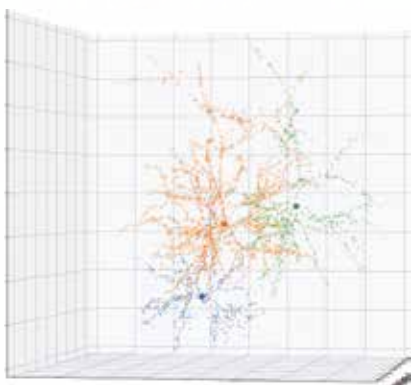
◆細胞病態学分野

大脳皮質内の神経細胞で内在性グルタミン酸受容体の分布を大規模にマッピング

マウスでは、わずか0.4グラムの脳の中に7000万個の神経細胞がひしめいています。個々の神経細胞は「シナプス」という構造を介して他の神経細胞と回路を形成しており、ひとつの神経細胞には数千個のシナプスがあるとされています。シナプスは学習・記憶などの様々な脳機能にとって重要な構造であり、脳の多くの病態ではシナプスに何らかの異常があると考えられています。とりわけ、個々の神経細胞が持つ数千個のシナプスにおいて、主要な神経伝達物質・グルタミン酸の受容体がどのように空間的に分布しているのかを網羅的に可視化することは、これまで容易ではありませんでした。

当研究室では、生体脳内ゲノム編集・分子イメージング技術を駆使して、マウスの大脳皮質の神経細胞で、迅速かつ正確に内在性グルタミン酸受容体の空間的分布をマッピングすることに成功しました。この方法を用いれば、脳内の神経細胞に入力する情報の分子基盤を定量的かつ包括的に理解できるので、脳機能の生理および病態の細胞・シナプスレベルでの解明につながります。

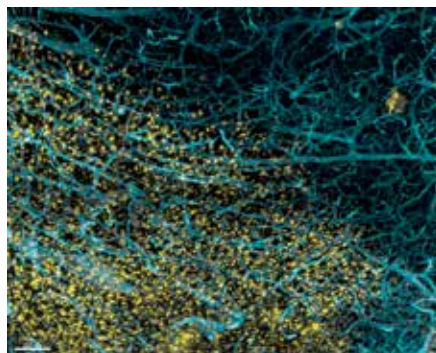
マウス大脳皮質中の3個の神経細胞でグルタミン酸受容体の分布を3次元マッピングした一例。



◆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)。



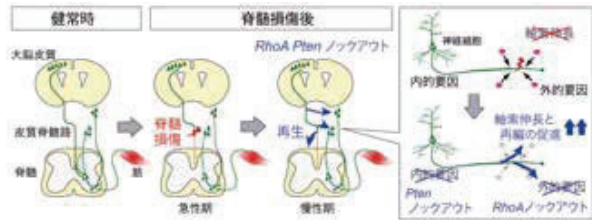
図：脳アミロイドアンギオパチー(CAA)の3D免疫染色イメージング、GFAP(黄)Laminin(シアン)

◆システム脳病態学分野

脊髄損傷で運動をになう神経回路網の再編を促す分子標的

「皮質脊髄路」は大脳皮質と脊髄をつなぎ手足を動かすのに重要な神経経路です。この経路は、脳卒中や脊髄損傷などでしばしば壊され運動障害を引き起こしますが、一度壊れた神経の軸索はほとんど再生できず、回路の再建は困難となっています。再生が難しい理由として、軸索の伸長を阻害する環境が存在する外的要因と、神経細胞が軸索を伸長する能力を失っている内的要因が挙げられてきました。そこで私たちは、この両要因を取り除けるRhoとPtenのノックアウトマウスを作製し、再生をどこまで促進できるのか課題に取り

組みました。その結果、両分子を除去すると、損傷後に皮質脊髄路で代償性のネットワークが形成され、神経回路の再編が顕著に促進することがわかりました(Nakamura et al., J Neurosci 2021)。本研究から、外的・内的要因の制御は、脊髄損傷において運動回路を再建する有用な標的となることが示されました。



図：外的・内的要因の除去による皮質脊髄路の再編の促進。

◆病理学分野・脳疾患標本資源解析学分野

筋萎縮性側索硬化症(ALS)剖検例から興味深い病態を報告

- ・ANXA11遺伝子変異を伴う症例
 - ・症状に左右差を認めた2症例の臨床病理像
- 脳神経内科学分野と共同で報告

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は運動ニューロンの選択的な障害を引き起こす致死性の神経難病です。ALS患者の約10%は家族性に発症し、30以上の原因遺伝子が知られています。家族性ALSの原因遺伝子の変異や機能、臨床症状や病理組織像との関連を調べることは、ALSの発症メカニズムの解明や治療法の開発に役立っています。今回、私たちは家族性ではないALSの病理解剖例1例において、原因遺伝子スクリー

ニングによりALSの原因遺伝子のひとつであるANXA11の新規スプライシング変異を見出しました。そして、in silico解析や培養細胞実験に加えて、患者剖検脳のmRNAの解析や組織学的解析を行いました。その結果、今回見出したANXA11の変異が、実際に患者の脳や脊髄の細胞内、特に運動ニューロンの細胞質内で、ANXA11やALSの原因タンパクであるTDP-43の異常な凝集を引き起こしていることを示しました。このことは、ALSの運動ニューロン障害におけるANXA11の関与を示唆する重要な知見です。(Acta Neuropathol Commun, 2021 June)。

運動に関わる神経細胞は大脳皮質運動野および脳幹・脊髄に局在し、各々上位および下位運動神経細胞と呼ばれます。ALSではこれらが障害され、全身の筋萎縮と筋力低下を生じます。下肢、上肢、舌・表情筋の順に筋力低下が進み、病期を通じて症状に左右差を認めたALSの2剖検例を経験しました。臨床病理像の解析により、症状の出現順序・左右差と病理学的な変性程度との間に密接な相関が確認されました。ALS病変進展の連続性・不連続性、上位・下位運動神経変性の関連性について重要な示唆が与えられました。(J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2021 Sept)。

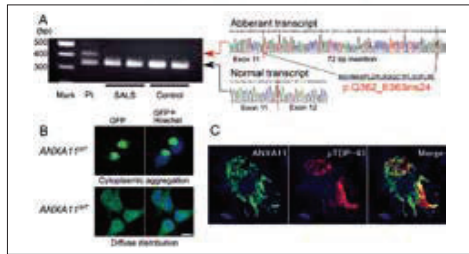


図1：患者脳組織のANXA11のmRNA解析では72塩基の挿入を認めた(A)。変異ANXA11導入細胞は凝集体を形成した(B)。患者組織の運動ニューロンにANXA11とTDP-43を含む凝集体を認めた(C)。

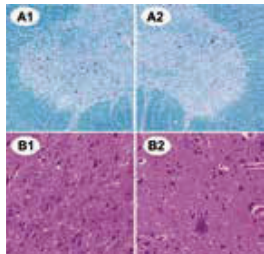


図2：症状は左下肢、左上肢、右下肢の順に進展した。下位運動神経細胞の脱落は左(A2)が右(A1)より強い。上位運動神経細胞の脱落も左下肢支配領域(B1)で右下肢支配領域(B2)より強い。

◆脳神経外科学分野

フラビン蛋白を用いた神経活動イメージングの術中応用に世界で初めて成功

脳神経外科手術の安全性向上を目的としてNavigationや覚醒下手術など様々な術中支援技術が進歩してきました。機能局在の同定という点での目標は神経活動を直接可視化する事であり、Haglundらは1992年に皮質の神経活動に伴って生じる血流変化を術中に捉える事に初めて成功しました。この血流変化に基づく手法はsignal-to-noise ratioが高いというメリットがある一方、実際の神経活動領域を過大評価してしまうデメリットなどが指摘されております。我々は今回既存の手法と異なる新たな術中イメージング技術の確立を目的として、ミトコンドリア電子伝達系に関わる内因性物質であるフラビン蛋白に着目し研究を行いました。

フラビン蛋白は神経活動が生じると青色光照射下で緑色の自家蛍光反応を発する特徴があります。今回我々は脳腫瘍手術7例で脳表電極から皮質刺激を行い、励起光はlaser光源の狭波長青色光(464±5nm)を用い、bandpassフィルター(525±25nm)を通じて緑色蛍光反応の

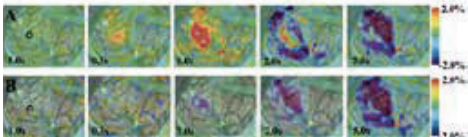


図1:Aフラビン蛋白イメージング B血流イメージング

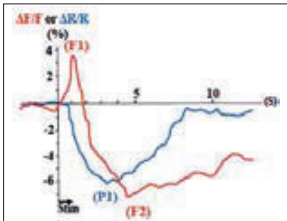
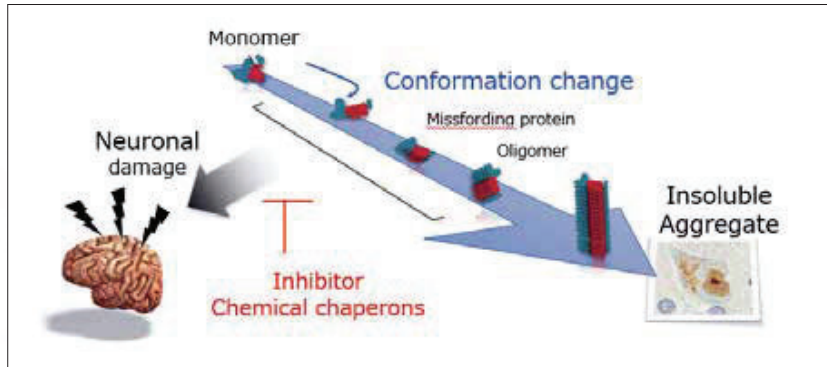


図2: それぞれのイメージングにおける経時的信号変化

◆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



ポリグルタミン病 発症機序 概念図

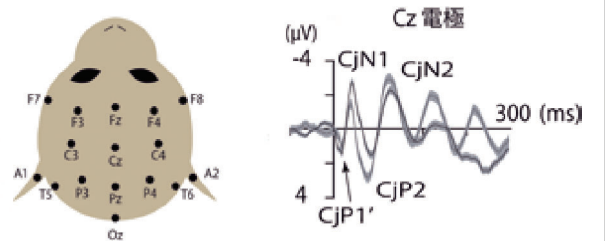
ポリグルタミン蛋白は単量体(Monomer)として産生されたのち、構造変化(conformation change)を起こし、多量体(oligomer)を形成し、不溶性凝集体(insoluble aggregate)に至る。この過程の構造変化蛋白や多量体が強い神経毒性を有している。

◆統合脳機能研究センター

無侵襲でのマーモセット脳波記録に成功

コモンマーモセットは小型の霊長類で、脳科学において重要な実験動物です。我々は、コモンマーモセットの頭皮上に設置した電極から、無侵襲で脳波を記録することに、世界で初めて成功しました(Itoh et al., Hearing Research, 2021)。既に成功しているマカクザルの無侵襲脳波記録と併せて、ヒト・マカクザル・マーモセットの霊長類3種で無侵襲で脳波を記録して比較する、世界的にもユニークな実験系が完成しました。

サルで無侵襲的に脳波を記録することには、幾つもの利点があります。例えば、倫理的な障壁が低いため、適用できる種が広く被検体数を増やしやすいこと、他の実験と干渉することなく、発達から老化まで長い期間に渡って何度でも記録ができること、ヒトと実験動物をつなぐトランスレータブルな脳機能の指標となり得ること、などが挙げられます。この方法論の今後の活用が期待されます。

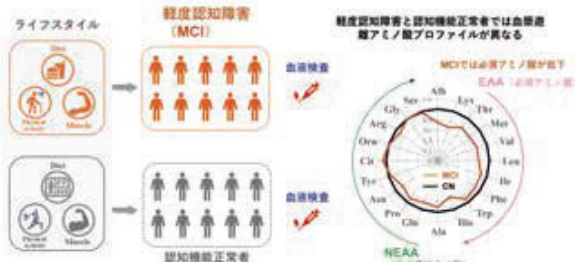


マーモセットの頭皮上から無侵襲で記録した聴覚誘発電位。ヒトの聴覚誘発電位の成分と相同と思われる成分 (CjP1'; CjN1, CjP2, CjN2) を同定し命名した。

◆遺伝子機能解析学分野

認知症に対する栄養学的なアプローチを実証

軽度認知障害(MCI)は客観的な認知機能低下はあるものの、日常生活は自立しており認知症には至っていない状態を指します。本学を中心とする多施設共同研究により、血液中のアルブミンと必須アミノ酸を中心とした複数のアミノ酸がMCI者において有意に低下していることを明らかにしました(Nutrients 14:637, 2022)。この所見は、MCIの段階で栄養学的な低下が生じていることを示唆します。また、栄養的介入により認知機能を改善させることを目的に、高圧処理黒米配合玄米食が認知機能に及ぼす影響をヒト試験により検証し、12週間の黒米摂取により言語性記憶にかかわる認知機能が有意に向上することを示しました(Foods 11:818, 2022)。認知症の栄養学的な面に着目することで、認知機能低下のリスクを血液マーカーにより客観的に評価し、機能性米などの食品を介して認知症予防に貢献できる可能性を示しました。



◆動物資源開発研究分野

D1ドーパミン受容体を介する神経情報伝達が文脈的恐怖条件付けの遠隔記憶の形成に重要な働きをする

「脳のごほうぶ物質」と呼ばれるドーパミンは、報酬に反応するとともに嫌悪刺激に対する反応にも働くと考えられています。ドーパミンの特異的受容体であるD1受容体(D1R)を介する情報伝達は、報酬学習に重要と考えられてきましたが、近年、嫌悪刺激に対する回避学習にも寄与すると報告されています。

そこで、動物資源開発研究分野の齊藤 奈英 技術職員及び笹岡俊邦 教授は、北里大学医学部の板倉 誠 准教授と共同して、D1Rを介した神経伝達が、回避学習において学習後数週間保持される遠隔記憶の形成に重要な役割を果たすことを明らかにしました。

齊藤らは、D1Rノックダウン(D1RKD)マウスを用いて、文脈的恐怖記憶試験と聴覚的手がかりの恐怖記憶試験の2つの回避学習試験を行いました。D1RKDマウスは、薬物(ドキシサイクリン)の投与によりD1Rが欠損状態となり、D1Rを介する情報伝達が遮断されます。薬物投与を止めるとD1Rの発現が回復し、D1Rを介する情報伝達が回復する性質を持つマウスです。

D1R欠損マウスを小箱(文脈)に入れ、音を提示して弱い電気刺激により条件付けをすると、海馬依存と言われている文脈的恐怖記憶試験において遠隔記憶形成が障害されましたが、D1R発現マウスでは、遠隔記憶形成が保たれていました。一方、海馬依存ではない聴覚の手がかりの恐怖記憶試験では、D1Rの発現に関わらず遠隔記憶形成、近時記憶形成ともに保たれていました(添付図参照)。

この記憶形成に関わる脳部位の解析のため、条件付け後の神経活動を最初期遺伝子c-Fosの発現上昇で観察すると、D1R発現マウスでは、条件付け後に、海馬、線条体、扁桃体、内側前頭前野で、c-Fosの発現上昇が見られますが、D1R欠損マウスでは、海馬と線条体のc-Fosの発現上昇が見られませんでした。

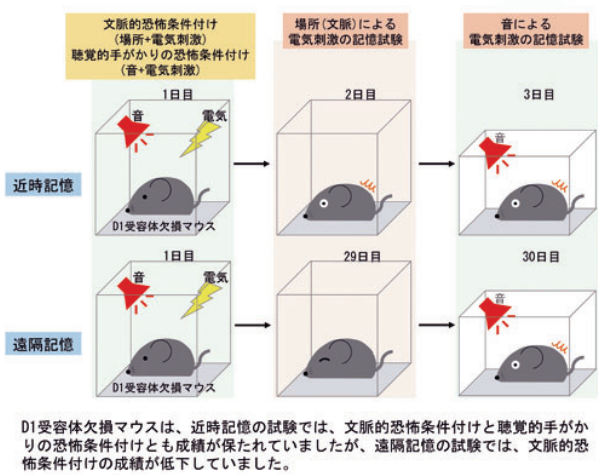
これらから、海馬と線条体のD1Rを介するドーパミン神経伝達が文脈的恐怖条件付けの遠隔記憶形成に重要であることが明らかになりました。

本研究成果は、2022年2月17日、Frontiers in Behavioral Neuroscience, Pathological Condition誌に掲載されました。Nae Saito, Makoto Itakura and Toshikuni Sasaoka: D1 receptor mediated dopaminergic neurotransmission facilitates remote memory of contextual fear conditioning. 【doi】<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.751053> (リンク先: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2022.751053/full>)

◆モデル動物開発分野

プライム編集による遺伝子改変マウス作製法の開発

プライム編集は、DNA二本鎖切断を介さずドナーDNAを必要とせず、標的部位の塩基置換や短い配列の挿入および欠失を可能とする新しいゲノム編集技術です。従来法に比べオフターゲット効果が低減されることから遺伝子改変動物作製や遺伝子治療等の各種技術への応用が期待されていますが、変異導入効率が低いケースがあることが問題となっていました。我々はゲノム編集ツールPE2について改良を加えCMP-hPE2*を開発し、変異導入効率を高めた実験系を確立することができました。さらに、変異導入後のマウス胚性細胞(mES細胞)からの遺伝子改変マウスの樹立にも成功しました(第44回分子生物学会3LBA-082)。本研究において開発された実験系は、遺伝子改変動物作製技術を含む、プライム編集の応用技術への発展に貢献できることが期待されます。



「ドーパミンとドーパミン受容体」:

ドーパミンを神経伝達物質とするドーパミン神経は、中枢では4つの経路(黒質-線条体路、中脳-皮質路、中脳-辺縁系路、隆起漏斗路)に分類されます。ドーパミン神経は、運動機能調節・認知機能・報酬学習・神経内分泌・視覚に働き、パーキンソン病・統合失調症などの神経精神疾患にも深く関わります。ドーパミンが作用する特異受容体は、D1RからD5Rの5つのサブタイプが存在し、動きの違いなどによりD1様受容体(D1R, D5R)とD2様受容体(D2R, D3R, D4R)に分類されます。

「文脈的恐怖条件付け試験」:

床に電線のある小箱(文脈)の中で、軽い電気ショックをマウスに与える。この場合は場所を含めた状況(文脈)を条件刺激、電気ショックによる恐怖を非条件刺激とする文脈的恐怖条件付けが行われる。条件付けの成立は、電気ショックを与えた小箱にマウスを再び戻して、マウスの恐怖反応である、「すくみ(恐怖)反応」を測定して評価します(脳科学辞典から改変して引用)。

「聴覚的手がかりの恐怖記憶試験」:

小箱の中で軽い電気ショックを与える際に、大きな音量のブザー音を30秒程度鳴らして、ブザー音の終了間際に短時間の電気ショックを与えれば、ブザー音を条件刺激とする聴覚的手がかりの恐怖条件付けとなる。この場合、電気ショックを与えた時とは異なる小箱にマウスを入れ、条件刺激であるブザー音を提示した時のすくみ反応を測定する(脳科学辞典から改変して引用)。

「遠隔記憶」:

一般に、記憶形成後の保持時間により分類され、短期記憶(数分~数時間)と長期記憶(数時間以上)に分けられます。長期記憶は、さらに近時記憶(数時間~数日)と遠隔記憶(数週間以上)に分けられます。

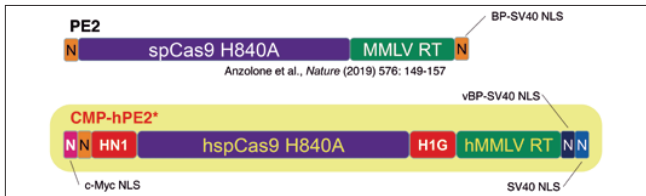


図1: プライム編集においてゲノム編集ツールとして機能するPE2に対し、コドン最適化や核移行シグナル付加などの改良を加えた新規ツール CMP-hPE2* を作製した。PE2 に比較して変異導入効率が約 1.5 ~ 2 倍程度高くなった。

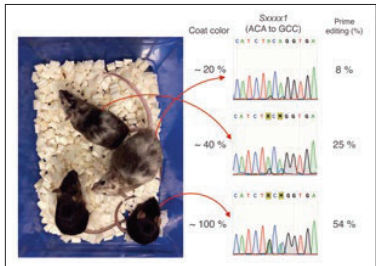


図2: (左) プライム編集により遺伝子 Sxxx1 に対して 2 塩基変異を加えた mES 細胞より作製されたキメラマウス。黒色マウス由来の mES 細胞の寄与率によって毛色が異なる。(右) 遺伝子配列の解析により、寄与率と変異率は相関していることがわかる。ほぼ 100% 黒色のキメラマウスでは、その子孫に変異遺伝子が伝達することが確認された。

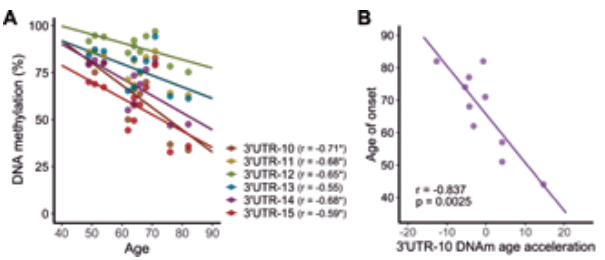
◆分子神経疾患資源解析学分野

DANメチル化の加齢性変化から迫るALS病態

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は中年期以降に発症し、運動野の神経細胞を障害する難病です。この特定部位が加齢により侵されるという特徴に、本症の解明の鍵があると考えられます。本症では、TDP-43というタンパク質が細胞に蓄積し、障害を引き起こします。そのため正常な細胞では、TDP-43の量が厳密に調節されています。これは、TDP-43が自身のmRNAに作用して、スプライシングを誘導することにより、成り立ちます。これを、「TDP-43の量の自己調節」と呼びます。

我々は、TDP-43の発現量をきめるスプライシングがどのような要因により変化するのかを検討しました。その結果、DNAメチル化の変化がその大きな要因であることを我々は見出しました。一般的に、DNAメチル化の程度は、組織によって異なり、環境因子や加齢などにより影響されます。そこで、剖検脳でTDP-43 mRNAのスプライシングに影響を与えるDNAメチル化の程度を調べた結果、運動野では、加齢とともに、このDNA領域のメチル化が減少していくことが見出されました。DNAメチル化の減少に伴いTDP-

43 mRNA発現が増加し、不溶性TDP-43タンパク質の蓄積が増加していました。DNAメチル化の程度から、身体の本当の年齢(生物学的年齢)を推定できます。ALS患者ではこのDNA領域から算定される生物学的年齢が進んでいるほど、発症する年齢が若くなっていました(Koike, et al. Communications Biology 2021)。「TDP-43の量の自己調節」に影響を与えるDNAメチル化状態の解明は、特定の部位が加齢によって侵されやすくなるALSの病態の謎に迫るものといえます。



A: 脳疾患がないヒト運動野では加齢によりTDP-43自己調節に関わるDNAメチル化が減少する
B: ALSの運動野ではDNAメチル化の年齢加速が強いほど発症年齢が若くなる

◆脳病態解析分野

ミトコンドリアDNAがミトコンドリアから細胞質に漏出することで神経変性を惹起することを報告

研究を推進するためには研究費が必要です。私の力不足で研究費の谷間ができるかもしれない危機があり、新潟大学のサポートの上で令和4年2/17から4/15までクラウドファンディングを実施しました。「パーキンソン病の病態解明を目指して、アフリカメダカを使った研究を」というタイトルで、最終的には179名の方から総額9,421,000円(達成率188%)のご寄付をいただきました。期間中のみならずその前後には様々な方々の有形無形のご支援やご声援をいただき、研究室一同大変感謝しております。引き続き皆様のご支援を力に変えて、研究費以上の成果につなげ、なおかつ皆様そして社会に発信してまいります。ありがとうございます。

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。特に老化によって増加する難病に重点を置いており、疾患状態を模倣した培養細胞、小型魚類の疾患モデル、マウスの疾患モデル、そして脳研究所に蓄積された疾患例の剖検脳、これらを総合的に解析することで、パーキンソン病、認知症、その他の難病の病態に迫ろうとしています。令和3年度には様々なパーキンソン病モデルにおいて、ミトコンドリアDNAがミトコンドリアから細胞質に漏出することで神経変性が

惹起されていること、その漏出したミトコンドリアDNAのセンサーがIFI16であること、そしてヒト脳において実際にそれを支持する所見が確認できたことを報告しました(図、*Nat. Commun.*, 2021)。また様々な困難を強いられる研究室にも関わらず、その理念と研究テーマのもとに多様な人材が集まりつつあり、日本・バングラデシュ・ベナンの研究者や学生らの個とチームの力が徐々に発揮されつつあります(*Neural Regen. Res.*, 2022. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2022. *Neuroreport*, 2022.)。

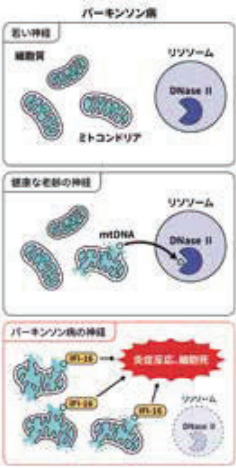


図: ミトコンドリアDNAが細胞質に漏出することで惹起されるパーキンソン病の神経変性
若い神経: ミトコンドリア機能は正常で、構造も保たれている。健康な老齢の神経: ミトコンドリアはときに障害をきたしミトコンドリアDNAの細胞質への漏出を招くが、それでもリソソームのDNaseIIなどにより分解されるため、炎症や細胞死は最小限に抑えられる。パーキンソン病の神経: パーキンソン病ではミトコンドリア障害によりミトコンドリアDNAの細胞質への漏出にいたり、さらにリソソーム機能も低下しているためミトコンドリアDNAの分解ができず、IFI16を介した炎症や細胞死が顕著になり神経変性をきたす。

◆脳病態解析分野

神経疾患研究にシンプルなモデル生物ショウジョウバエを利用する

臨床のおよび遺伝学的評価によって、ADP-ribosylation factor 3 (ARF3)で2つの新規遺伝子変異(Asp67ValとArg99Leu)を発見しました。これらの変異について、ヒト培養細胞やショウジョウバエを用いて解析し、Asp67Val変異は機能欠失、Arg99Leu変異は機能獲得型毒性を示す可能性を明らかにしました(Sakamoto et al., Human Molecular Genetics, 2021)。

アミロイドβの凝集体を解離させるクルクミン誘導体を特定し、ショウジョウバエのアルツハイマーモデルでその効果を実証しました

(Utomo et al., Chemical Communicatins, 2022)。特定したクルクミン誘導体BおよびNは、血液脳関門の透過性や経済的な観点から、アルツハイマー病の治療薬として臨床応用に可能性を秘めています。

