

◆分子神経生物学分野

クロザピンが保有するErbB受容体キナーゼ活性阻害作用は 定型抗精神病薬に耐性のある統合失調症の治療に有効かもしれない

クロザピンは、モノアミン阻害を主作用とする通常の定型抗精神病薬に耐性のある統合失調症患者に対して処方されます。しかしながらこの独特な作用の薬理基盤は明らかになっていません。当分野では、クロザピンが上皮成長因子受容体ErbBキナーゼに直接作用し、リン酸化酵素を阻害することで下流シグナル抑制することを見出し、Transl Psychiatry誌に論文発表しました。培養下の細胞株や皮質神経細胞において、EGF刺激により引き起こされるErbB1受容体のリン酸化はクロザピン添加により阻害されますが、リスペリドン、オラ

ンザピンでは阻害されませんでした。またクロザピンがErbB受容体キナーゼと直接相互作用するかどうか、in vitroキナーゼアッセイにより評価したところ、クロザピンがErbB1、2、4の酵素活性を阻害することが明らかになりました。これまでに分野で報告してきたErbBキナーゼ阻害活性を持つキナゾリン化合物による抗精神病薬活性作用を考慮すると、クロザピンが保有するErbBキナーゼ活性阻害は、クロザピン独自の抗精神病薬活性の一部を説明するものと考えられます。

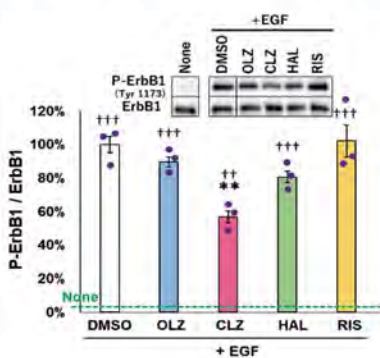


Fig. 1 皮質培養にEGF添加によって生じるErbB1受容体リン酸化はクロザピン(CLZ)によって抑制される。

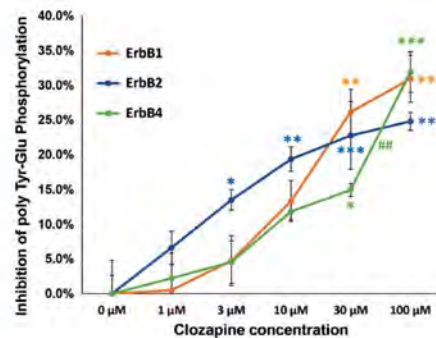


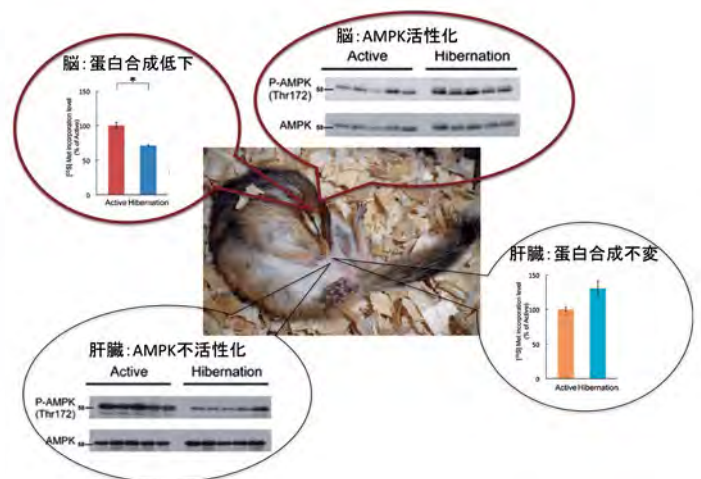
Fig. 2 ErbB受容体キナーゼの酵素活性阻害作用がクロザピンに認められた。

◆腫瘍病態学分野

冬眠シマリスの脳特異的な代謝変化

冬眠中、哺乳類の細胞は低体温、低酸素、低栄養といった過酷な環境ストレス下におかれるので、細胞は代謝を下げて対応します。AMPK(AMP-activated protein kinase)は細胞のエネルギーセンサーなので、この働きを調べました。興味深いことに脳(大脳皮質)でのみAMPKの活性化が見られ、他の臓器、肝臓や心臓、骨格筋では変化がありませんでした。さらにAMPKの下流シグナルであるmTOR(mammalian target of rapamycin)-eEF2(eukaryotic elongation factor2)を介し、大脳皮質では蛋白合成が低下していました。このことは冬眠時にはまず脳で代謝変化が起こり、環境ストレスに応答する全身応答を導く可能性を示唆するものでした。

Yamada S, Kamata T, Nawa H, Sekijima T, Takei N AMPK activation, eEF2 inactivation, and reduced protein synthesis in the cerebral cortex of hibernating chipmunks. Sci Rep. 2019 9(1):11904.



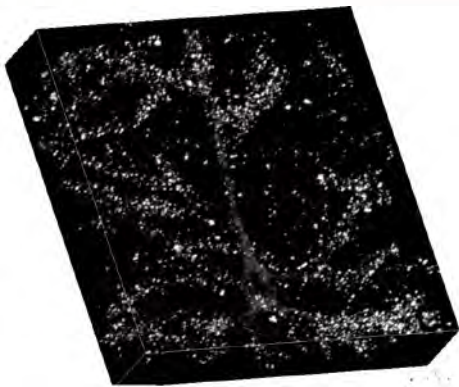
図：冬眠時にシマリス脳ではAMPKのリン酸化(活性化)が亢進し、タンパク合成能が低下しているが、肝臓では変化がない。

◆細胞病態学分野

脳内の単一神経細胞まるごとでシナプス分布を可視化

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1万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。しかしながら、個々の神経細胞において1万個のシナプスの空間的分布を可視化することは、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、マウス的大脑皮質の単一神経細胞まるごとで、迅速かつ正確にシナプスの空間的分布をイメージングすることに成功しました。この方法を用いれば、脳内神経細胞で全ての情報入力構造基盤を空間的に定量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。

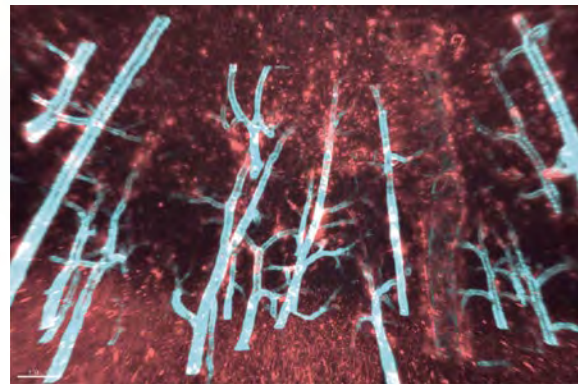


マウス大脑皮質の単一神経細胞まるごとで興奮性シナプスの分布を3次元イメージングした一例。

◆システム脳病態学分野

ヒト脳に適した透明化プロトコルの開発

私たちの研究室では、脳内の様々な細胞を立体的に観察するために、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、組織透明化に求められる脱脂過程を達成するのが難しい組織です。脱脂操作では、通常、界面活性剤が用いられます。当分野は、病理学分野の柿田教授との共同研究により、化粧品材料にも使用される1,2-ヘキサジオール(HxD)が、従来の界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムや、以前私たちが発見した脱脂試薬(CUBIC-L)よりもヒト脳白質を迅速かつ高度に脱脂することを発見しました。その結果、1cm³程度の大きさのヒト脳組織を高速に透明化する新規プロトコルを開発しました(Inoue et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2019)。また、組織化学的解析の結果、HxDにより脱脂されたヒト脳組織は、未処理の病理組織像と類似の染色性が認められました。HxDを利用した組織透明化プロトコルにより3D神経病理学への応用が期待できます。



図：ヒト脳の3D免疫染色イメージング

◆システム脳病態学分野

動きを生み出す神経回路の再建

私たちの研究室では、大脑皮質と脊髄を結ぶ「皮質脊髄路」と呼ばれる神経回路に着目して研究を行っています。この回路は意図した運動をしたり、手足を巧みに動かしたりするのに重要な神経回路として知られています。私たちはこれまで、皮質脊髄路を構成する神経細胞とその働きを最新の技術を用いて徹底的に探ってきました。その結果、皮質脊髄路の中に、これまで知られていなかった多様な接続を持った神経回路が内在し、異なる運動機能の要素をコントロールしていることを見いだしてきました(Cell Rep 23:1286-1300, 2018)。この成果から、動作を発揮するもととなる神経基盤が明らかになりました。脳卒中や脊髄損傷など運動機能が障害される神経疾患において、この複雑な神経回路網をどのようにして再建するか、さらに研究を進めています。

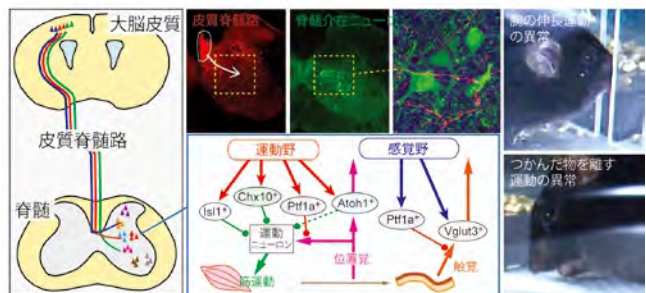


図. 皮質脊髄路の多様なネットワーク。大脑皮質の運動野、感覚野などから脊髄へ異なる投射がある(マウスで解析)(左)。これらは脊髄で、運動、感覚に関わる多様なニューロンと接続する(中)。各回路の遮断で、運動中に多様な障害が現れる(右)。皮質脊髄路が、運動の指令、出力、感覚の制御など、多様な接続と機能を持つことを示唆する。

◆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：淡蒼球・黒質・視床下核の変性を伴う稀な亜型の臨床病理像

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は成人に発症し全身の筋肉が萎縮する疾患です。通常ALSでは運動を直接担う神経細胞のみが変性・脱落し、それ以外の脳や脊髄の領域は障害を免れます。ところが稀ながら運動の調節に関わる大脳基底核という領域が侵されることがあり、淡蒼球・黒質・視床下核の変性を伴うALSとして報告されてきました。こうした症例はALS剖検例の約5%を占め、通常のALSと比較して若年で発症する、舞踏病などの不随意運動を伴うことがある、大脳皮質の運動神経細胞(一次運動神経細胞)の脱落が軽いなどの特徴があることがわかりました。

ALSではTDP-43という蛋白質の異常が病態に関わる可能性が指摘されています。脳や脊髄の様々な領域でTDP-43の異常リン酸化・凝集を観察した場合、その広がり方が通常の

ALSと本亜型とは異なり、病気のプロセスが同一ではない可能性が示唆されました。

ALSの臨床病理学的な多様性、また疾患の機序を考える上で貴重な知見が得られ、以下に報告しました。

Ito et al., ALS with pallido-nigro-luysian degeneration: a clinicopathological study. *Annals of Neurology* 2020; 87: 302-312

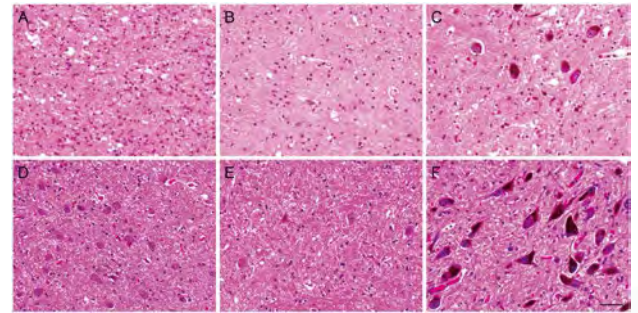


図 本亜型の視床下核(A)、淡蒼球(B)、黒質(C)では神経細胞が高度に脱落している。通常のALSではこれらの領域はよく保たれている(D-F)。

◆脳神経外科学分野

患者由来悪性脳腫瘍モデルでプレジジョンメディシンを実現

近年、脳腫瘍の網羅的な遺伝子解析から、腫瘍化や細胞増殖に関わるドライバー遺伝子変異の同定が重要であることが解って来ました。2019年に国内で2つの癌ゲノムパネルが保険収載され、癌ゲノムパネルを用いて個別化治療を図る「プレジジョンメディシン」に対する期待が高まっています。我々は、プレジジョンメディシンの効果を事前に予測するために、手術の際に培養細胞株の樹立とマウス頭蓋内移植モデルを試みております。

当科で経験した類上皮膠芽腫に対して、ゲノムパネルで

BRAF V600E変異を確認し、さらには摘出組織から培養細胞株(NGT41、図1A)を樹立し、もとの腫瘍を正確に模倣するヌードマウスの頭蓋内移植モデル(図1B)の作成に成功しました。こうした実験によりNGT41細胞株に対して*BRAF*阻害剤・*MEK*阻害剤の併用療法が有効であることを証明しました(図1C、1D)。症例が脊髄播種再発した際に、*BRAF*阻害剤・*MEK*阻害剤を使用した所、たった4週間の治療で劇的な治療効果が得られ(図2)、論文(*Acta Neuropathol Commun*, 2019)報告しました。

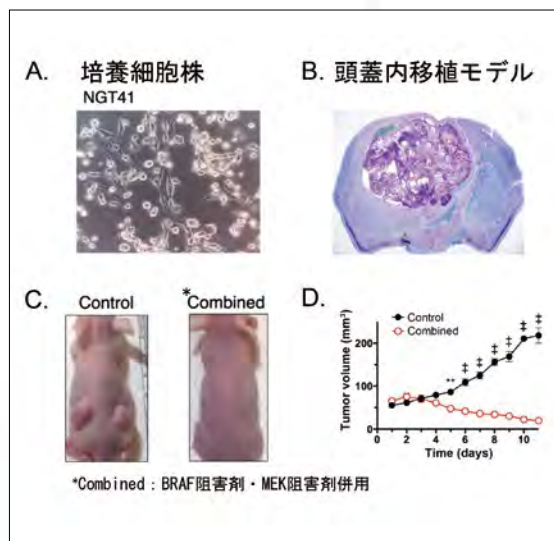


図1A. 類上皮膠芽腫症例から樹立した培養細胞株NGT41, 図1B. ヌードマウス脳内移植モデル, 図1C. 皮下移植モデル, 図1D. *BRAF*阻害剤・*MEK*阻害剤の有効性を示した。

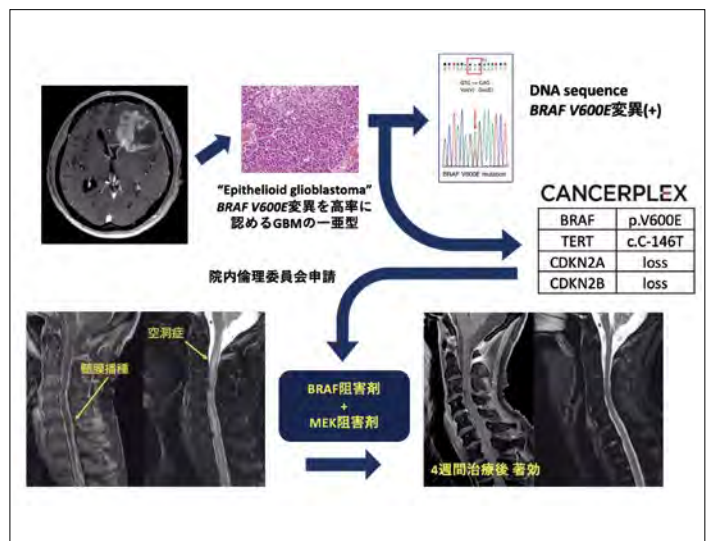


図2. 治療までの流れとその効果

末梢血単核球を用いた脳梗塞に対する新規細胞療法

脳梗塞は重度の後遺症を呈するため、脳梗塞後の機能回復療法の開発が望まれています。これまで我々は、低酸素低糖(OGD)刺激という簡便な刺激をミクログリアに加えると、ミクログリアが脳保護的な性質になり、刺激したミクログリアを脳梗塞ラットに投与すると、後遺症が改善することを示してきました(Sci Rep 2017;7:42582)。

今回、我々は本技術のヒトへの臨床応用を考え、より簡便に採取できる末梢血単核球(PBMC)に着目しました。PBMC中にはミクログリア類似の細胞が存在するため、我々は

PBMCを用いてミクログリア同様の検討を行いました。その結果、OGD刺激したPBMCは脳保護的な性質に変化することを明らかにしました。さらにOGD刺激したPBMCを脳梗塞ラットに投与すると、脳梗塞巣周囲での血管新生、軸索進展が亢進し、後遺症が改善することを明らかにしました(Sci Rep 2019;9:16819)。本技術は簡便に投与細胞を準備できる点で、iPS細胞などを用いた従来の細胞療法と一線を画します。現在、本技術の臨床応用を目指して、産学官共同の研究が進行中です。

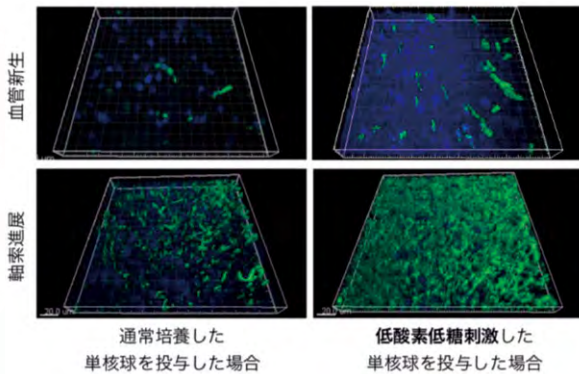


図1 保護的単核球投与による血管新生、軸索進展

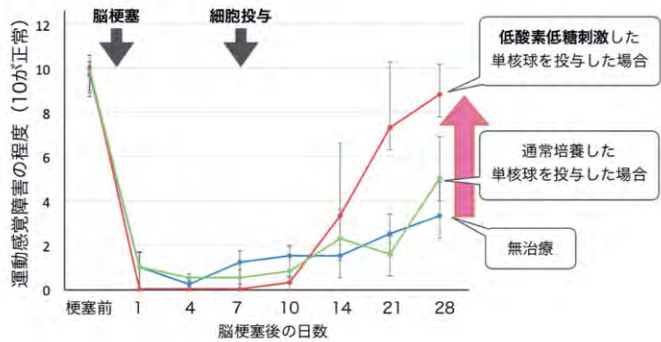


図2 保護的単核球投与による運動感覚障害の改善

小児の神経難病に迫る:白質消失病の新たな病態モデルマウスを樹立

発育不良や運動障害およびてんかんなどの神経症状を示す突然変異マウスを発見し、「toy(トイ)マウス」と名付けました。さらに脳研病理学、医学部神経解剖学教室をはじめとする共同研究にてその原因となるEif2b5遺伝子の突然変異を特定し、toyマウスの細胞では、タンパク合成の開始に関わる翻訳開始因子eIF2Bの酵素活性が低下していることを示しました。

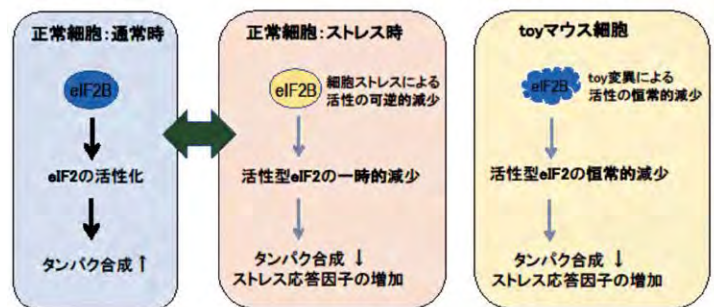
ヒトではEIF2B5遺伝子の変異により、脳の白質が急激に萎縮・消失してしまう「白質消失病」を発症することが知られています。白質消失病は、脳の白質の変性が起こる遺伝性の神経難病です。本疾患では、慢性進行性の運動障害と白質変性を示し、小児期に感染症や軽度の頭部外傷などのストレスによって急激に症状が悪化し、多くの患者が死に至ります。白質消失病における詳細な病態メカニズムは解明されておらず、現在のところ有効な治療法はありません。

本研究により、toyマウスは、新たな白質消失病の病態モデルマウスとなりうることを示しました。今後は本モデル動物を用いて病態を詳細に解析することで、白質消失病の新たな治療法を開発できる可能性があります。



図1 正常マウスとtoyマウス
5ヶ月齢のtoyマウスの体重は、正常マウスの体重の約半分である。

図2 正常マウス脊髄とtoyマウス脊髄の髄鞘染色
8ヶ月齢のtoyマウスでは、脊髄周囲で青色の髄鞘染色が薄く(矢印)、脱髄が起こっていることがわかる。

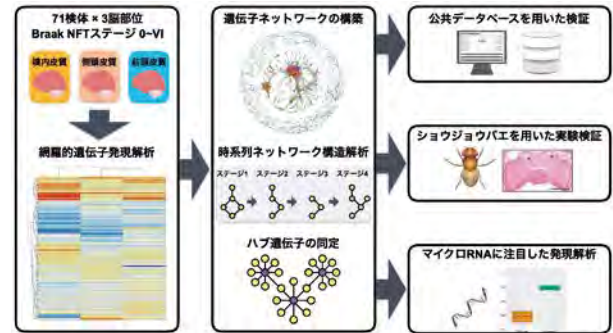


◆遺伝子機能解析学分野

新たな遺伝子ネットワーク解析によるアルツハイマー病関連遺伝子の同定

アルツハイマー病(AD)は認知症の中で最も頻度が高く、その数は年々増加しています。AD患者の脳では神経原線維変化(NFT)と呼ばれる異常なタンパク質の凝集体が観察され、神経細胞内に蓄積したNFTは神経細胞死を誘導します。NFTは記憶を司る海馬や嗅内皮質に蓄積し始め、徐々に新皮質へと進展し、それに比例して患者の認知機能は低下します。この進行ステージはBraak NFTステージと呼ばれていますが、Braak NFTステージの進行に伴って、細胞内の遺伝子の発現や遺伝子間の関係も動的に変化すると考えられます。しかし、その内容はほとんど解明されておりません。そこで当分野では大阪大、国立長寿医療研究センターと共同でこの謎に挑み、新たな遺伝子ネットワーク解析を駆使して、ADに関わる新規遺伝子RAC1を同定しました。本研究成果はADの発症

機序の解明に貢献するものと期待されます。今後のさらなる研究を通して、ADの新たなバイオマーカー開発や創薬における標的遺伝子探索等に役立つと期待されます。

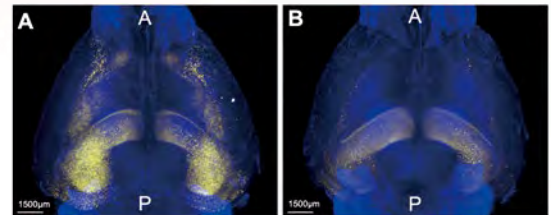


図：遺伝子ネットワーク解析技術によるアルツハイマー病関連遺伝子の同定

◆動物資源開発研究分野

ドーパミンD1受容体が伝える信号はリスク回避の学習と大脳皮質の活性化に必須の情報である

ドーパミン作動性神経伝達は、報酬学習と嫌悪学習の両方に重要な役割を果たすと考えられています。本研究では、ドーパミンD1受容体(D1R)の発現を可逆的に制御できるD1Rノックダウン(KD)マウスを用いて、受動的回避テストでの嫌悪学習におけるD1Rを介したドーパミン作動性神経伝達の役割を解析しました。また、最初期遺伝子(IEG)であるArc 制御下でdVenusを発現するトランスジェニックマウスとD1RKDマウスを掛け合わせ、電気刺激を与えた後の全脳イメージングを行い、dVenusの海馬と大脳皮質における発現分布を調べました。その結果、D1R発現が抑制されると、受動的回避テストで成績低下をもたらし、対照マウスと比較し、大脳皮質でのdVenus発現量が減少していました。これらの結果は、D1Rを介したドーパミン作動性伝達が、嫌悪学習に重要であり、特に大脳皮質のArc発現に影響を与えることを示しています(Saito et al., *Neurosci. Res.* in press)。



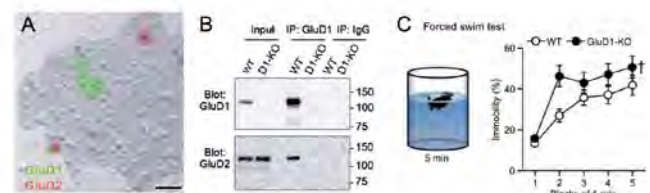
電気刺激後のArc-dVenus D1RKDマウスの全脳3Dイメージングの水平断面図。(A) D1R発現あり、電気刺激あり (B) D1R欠損、電気刺激あり 黄色はdVenusシグナル、青色は核染色 A: anterior, P: posterior

◆モデル動物開発分野

精神疾患関連遺伝子 デルタ型グルタミン酸受容体の分子機能解明

中枢神経系のシナプス形成に重要な役割を果たすデルタ型グルタミン酸受容体は精神疾患の関連遺伝子としても注目されていますが、受容体ファミリーに属するGluD1の分子機能については未知の部分が多かったため、我々はGluD1遺伝子を欠損するマウスを作製して生化学的、組織学的解析と包括的行動テストバッテリーを行いました。その結果、GluD1を含む受容体タンパクの詳細な発現脳領域、細胞内局在等について明らかとなり(Nakamoto et al., *J Comp Neurol* 2019)、GluD1遺伝子の欠損が記憶や社会性、うつ様行動の発現に影響を与えることを見出しました(Nakamoto et al., *PLOS ONE* 2020)。これらの知見が

精神疾患の病態解明に役立ち、複雑な脳機能を理解するための手掛かりになることを期待しています。

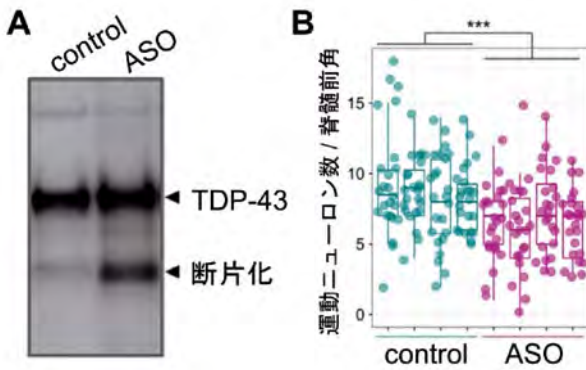


(A) 組織学的解析と(B) 生化学的解析より明らかとなったポストシナプスでのデルタ型受容体の局在様式と、(C) うつ様行動の指標となる強制水泳テストにおいてGluD1欠損マウスが示す無動時間の増加

◆分子神経疾患資源解析学分野

TDP-43選択的スプライシングの操作によるALS病態モデル

筋萎縮性側索硬化症(ALS)はTDP-43が細胞質に蓄積し、運動ニューロンが変性します。TDP-43は自身のRNAの3'UTRに結合して発現を自己調節していますが、これには選択的イントロン6のスプライシングが重要な役割を担っていることを当教室では明らかにしました。さらに、ALSの運動ニューロンでは、自己調節の関与によりTDP-43がアップレギュレートされていることを見出しています(Koyama et al., Nucleic Acids Res. 2016)。今回、アンチセンスオリゴによる選択的スプライシングの阻害により、マウス脊髄のTDP-43の断片化と不溶性画分の増加、運動ニューロン数の減少を誘導しました。ALSの病態モデルを示唆し、今後のさらなる発展が望まれます(Sugai et al., Neurobiol. Dis. 2019)。

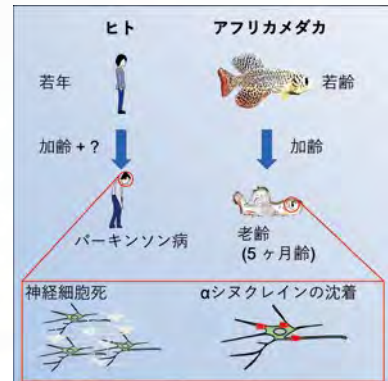


図：選択的スプライシングを阻害するアンチセンスオリゴ(ASO)をマウス髄腔内に投与すると、(A)TDP-43の断片化と不溶性画分の増加、(B)運動ニューロン数の減少を認める。

◆脳病態解析分野

ミトコンドリアDNAの漏出が起こす病態

疾患状態を模倣した培養細胞、小型魚類の疾患モデル(Matsui et al., Cell Reports, 2019等)、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、私達の研究室ではパーキンソン病、認知症、あるいはそれ以外の加齢関連疾患の病態に迫ろうとしています。具体的な一例として、ミトコンドリアDNAが細胞質に漏出することで先述の加齢関連疾患における炎症や細胞死につながる可能性を研究しており、AMED革新的先端研究開発支援事業(PRIME)、AMED脳科学研究戦略推進プログラムなどの他、武田薬品工業との共同研究を推進しています。これらの研究では、細胞質に漏出したミトコンドリアDNAのセンサーを同定し、さらに細胞質に漏出したミトコンドリアDNAが惹起する諸臓器の加齢関連疾患(認知症、パーキンソン病、心疾患、肝疾患など)について培養細胞、小型魚類、マウスモデル、剖検試料などを用いて明らかにします。また、不要となったミトコンドリアDNAおよびその周辺のパスウェイをターゲットにそれら疾患の治療の可能性を探っていきます。

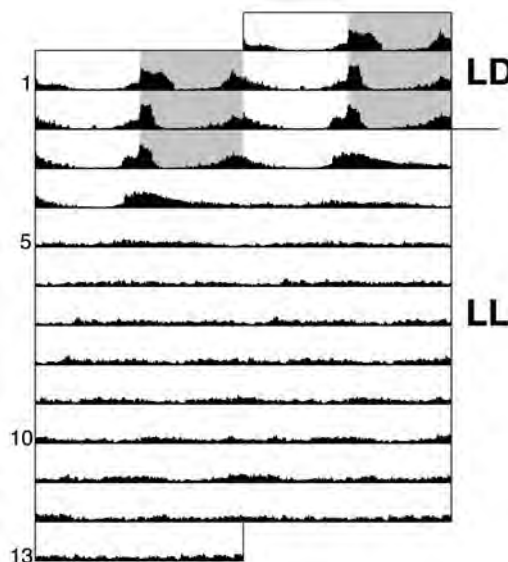


図：研究室で扱う疾患モデルの1例

◆脳病態解析分野

神経の変性前における概日リズムの変化を検証する

神経変性という構造的な損傷が起こる前に、神経の機能や個体の行動にはどのような変化が現れるのでしょうか。私たちの研究室では、モデル生物ショウジョウバエの個体の行動活動をモニタリングすることができる設備を樹立いたしました(Nitta et al., Scientific Reports, 2019)。これを利用することにより、生体にストレスがかかる条件で概日リズムを評価することが可能になりました。私たちはショウジョウバエ神経変性モデルを用い、ストレス下で神経回路を正常に戻す分子メカニズムを明らかにしたいと思っています。そのために細胞内小器官の構造変化、神経活動の変化、そして概日リズムモニタリングによる個体活動の変化を包括的に解明し、構造と機能の両面から神経回路の健康状態を保つ未知の分子基盤を包括的に解明することを目指します。



概日リズムの分析

ハエの平均自発運動活性を示すアクトグラム。個々の雄ハエを12時間:12時間サイクル(LD)で3日間同調させ、次いで常時光ストレス条件下(LL)で10日間モニターした。灰色の網掛けはLD期の暗期を示す。