

### ◆分子神経生物学分野

## 統合失調症に関連する陰性行動は、 ドパミン神経の慢性的過剰興奮で 起きているかもしれない。

上皮成長因子(EGF)はコロナ(COVID-19)感染で誘導されるサイトカインであり、主要なコロナ肺炎の原因分子です。この上皮成長因子を新生児ラットに暴露すると、成熟後に中脳ドパミン神経が慢性的な過剰発火を呈するとともに、統合失調症に関連する社会行動低下、脳波障害、薬物感受性を示します。今回、統合失調症の陰性症状に相同なラットの社会行動低下がこの慢性的ドパミン過剰興奮とどのような因果関係にあるのか、薬理遺伝学法(DREADD)により検討しました。EGFモデルラットの中脳ドパミン神経にはAAVベクターを用いて、抑制性の人工ムスカリン受容体を発現させておきました。人口リガンドCNOを、対照ラット、EGFモデルラット、人工ムスカリン受容体を発現させたEGFモデル、全3種類の動物に慢性投与しました。抑制性人工ムスカリン受容体を発現させたEGFモデルでのみ、ドパミン神経の過剰発火とドパミン放出が沈静化するとともに、その社会行動量が正常化しました。このことは、従来、主に陽性症状の原因とされてきたドパミン興奮も慢性化することで陰性症状を誘起していることを示しています。なお、この研究は、モデル動物開発分野との所内協力成果であるとともに、京都大学、神戸大学との共同研究です。(R3, Transl Psychiatry11巻に掲載)

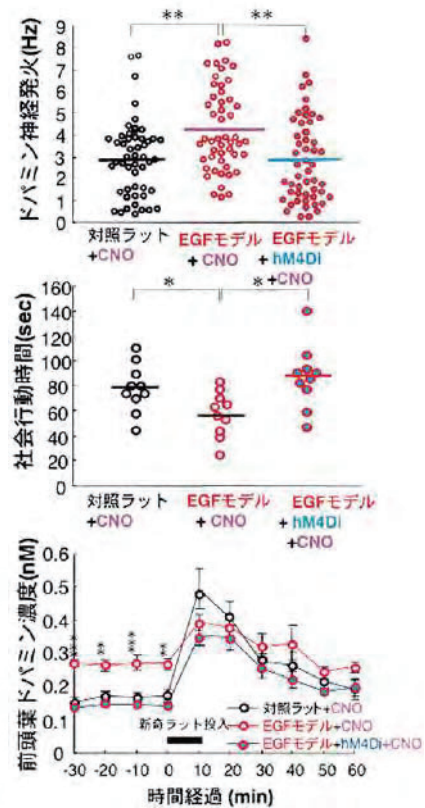
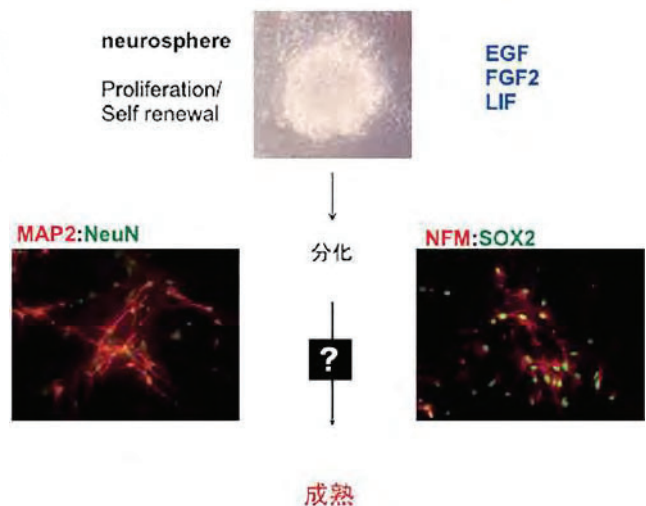


図1: 中脳ドパミン神経細胞の発火頻度、社会行動時間、社会行動前後の前頭葉のドパミン濃度の関係性を、正常ラット(対照群)、EGFモデルラット、およびDREADDの人工ムスカリン受容体をドパミン神経に発現させたEGFモデルラットの3者で比較したもの。

### ◆腫瘍病態学分野

## iPS由来神経幹細胞の効果的分化成熟法の開発: 多施設バリデーション

iPS細胞は今日では一般的な技術となっており、疾患由来iPS細胞など様々な利用がなされています。iPS由来の神経細胞も市販品を含め、手に入りやすくなり論文報告も増えています。iPS由来神経細胞は確立した技術のように考えられていますが、実際は神経細胞の成熟度には問題があり、シナプスを形成し神経機能を十全に発揮できる細胞の樹立は容易ではありません。我々は大阪医療センターを中心に、東京大、大阪大など多施設でのバリデーション試験を通じ、iPS由来神経幹細胞から、成熟したヒト神経細胞の樹立法を検討しています。現在までにシナプス後分子の蛋白発現とシナプス部位への移行は、シナプス前分子に比して時系列として遅く、そのため機能的成熟に時間がかかることがわかってきました(投稿revise中)。現在さらに効果的な成熟誘導法を探索していて、真のヒト神経細胞と呼べる細胞の樹立を目指しています。



## ◆細胞病態学分野

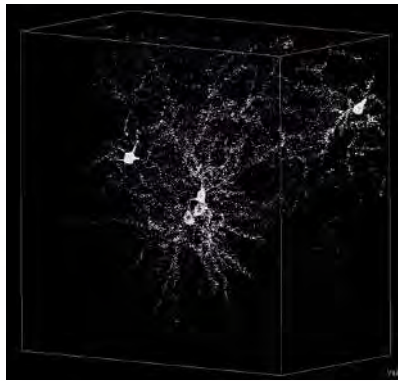
# 脳組織内の神経細胞まるごとで内在性グルタミン酸受容体の分布を可視化

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、個々の神経細胞の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、組織中の細胞まるごとで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神経細胞まるごとで、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分子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。

マウス大脑皮質の神経細胞まるごとでグルタミン酸受容体の分布を3次元イメージングした一例。



## ◆システム脳病態学分野

# 全脳免疫染色プロトコルの開発

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、細胞や組織構造を染色してラベリングする組織化学的手法の開発に取り組んでいます。これまで、経験則に基づく3次元染色プロトコルが複数提案されていましたが、幅広い染色剤や抗体に適用できるものではありませんでした。経験則による組織染色プロトコル開発の限界を突破するため、生体組織の物理化学的物性を詳細に調べた結果、生体組織(特に透明化処理を行なった組織)が、主にタンパク質によって構成される「電解質ゲル」の一種であることを再発見しました。この物性から組織を模倣できる人工ゲルを選別し、組織3次元染色の必須条件を探索するスクリーニング系を構築しました。開発したCUBIC-HV法(CUBICに基づく3次元組織学・3次元イメー

ジング)は、CUBIC透明化法、高速ライトシート顕微鏡との組み合わせにより、マウスの全脳、マーモセットの半脳、ヒト脳組織ブロック等を均一に染色し、3次元的全臓器組織観察を可能にしました(Susaki et al., Nat. Commun. 2020)。



図：マウス全脳の3D免疫染色イメージング

## ◆システム脳病態学分野

# 脊髄損傷で運動をになう神経軸索の再生が阻害される機序

私たちの研究室では、大腦皮質と脊髄をつなぎ、手足を意図して動かすのに重要な「皮質脊髄路」と呼ばれる神経経路に着目し研究を行っています。この経路は、脳卒中や脊髄損傷などでしばしば障害され、重い運動障害を引き起こします。一度壊された神経の軸索はほとんど再生できないため、再生を促す機序の理解が求められています。私たちは、脊髄損傷のモデル動物において、軸索再発因子として知られるSemaphorinファミリーに属する分子の発現が、損傷部で増加することを見出しました。遺伝子改変マウスを用いてその発現を抑えると、障害された軸索の退縮を抑えられることがわかりました (Ueno et al., Cereb Cortex 2020)。本研

究から、脊髄損傷において軸索の再生が阻害される機序の一端が明らかとなりました。運動が障害される神経疾患において、皮質脊髄路の回路網をいかに再建するか、さらに研究を進めています。

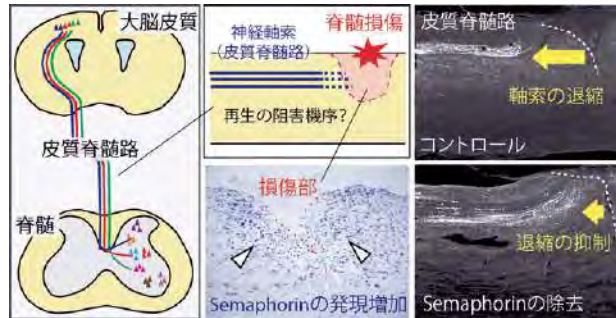


図. 脊髄損傷でのSemaphorinによる皮質脊髄路の軸索再生阻害。損傷によるSemaphorinの発現増加(中)。Semaphorinの除去による軸索退縮の抑制(右)。Ueno et al., Cereb Cortex 2020を改訂。

## ◆病理学分野・脳疾患標本資源解析学分野

# 2 遺伝性疾患のどちらも世界初となる各 1 剖検例を報告

・CGGリピート伸長を伴う眼咽頭遠位型ミオパチー  
・CHP1 - 常染色体劣性遺伝性小脳失調症  
遺伝子機能解析学分野、脳神経内科学分野と共同で報告

眼咽頭遠位型ミオパチー(oculopharyngodistal myopathy, OPDM)は、外眼・咽頭・遠位筋障害を呈する常染色体優性遺伝性の筋疾患で、筋生検では細胞質の縁取り空胞と筋核内の封入体の特徴とします。2019年に原因遺伝子として*LRP12*遺伝子における非翻訳領域のCGCリピートの異常伸長が報告されました。同時に、神経核内封入体病(neuronal intranuclear inclusion disease, NIID)、さらにはNIID様の白質脳症と眼咽頭ミオパチーの特性を併せ持つ疾患においても、遺伝子は異なるものの同一リピートモチーフが原因遺伝子として同定され、NIIDとOPDMを両端とする疾患スペクトラムの存在が示唆されました(Nat Genet. 2019)。しかしこれまで剖検例の報告はNIID

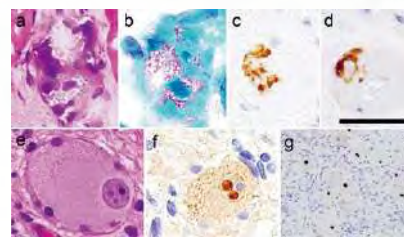


図1：本家系で認められたOPDM病理(a-d)とNIID病理(e-g)。骨格筋には縁取り空胞(a-d)と筋核内封入体(data not shown)を認める。中枢・末梢神経には神経細胞・グリアに核内封入体を認め、その形態はこれまでNIIDで報告されてきたものと同一である。

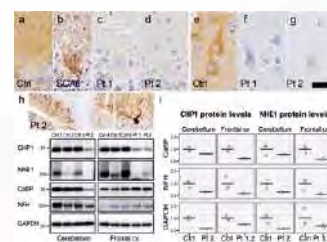


図2：CHP1とNHE1の小脳と前頭葉における発現。抗CHP1抗体を用いた免疫化学染色を行うと、コントロールでは細胞質や細胞膜が陽性となる(a,b,e,f)一方、症例では陽性像は観察されない(c,d,f,g)。イムノブロットでもCHP1とNHE1の高度発現低下が認められた(h,i)。

## ◆脳神経外科学分野

# 髄芽腫における神経分化マーカーGli3の発現および役割を解明

髄芽腫は小児に多い悪性脳腫瘍の代表であり、手術技術の進歩や全脳全脊髄照射および大量化学量による治療の進歩により、5年生存率が80%を超えました。しかし未だに治療が奏効しない症例があるなど、世界中で病態解明が研究されている疾患です。Taylor先生(Toronto Sick Children病院)の提唱により、髄芽腫がWNT群、SHH群、Group 3群、Group 4群の4群に分子的に分類(MAGIC分類)され、群別に病態の解明や最適治療が模索されるようになりました。

我々は、髄芽腫におけるSHH経路の下流分子マーカーの一つであるGli3に着目し、役割について解析を進めました。Gli3の主な働きは、サブタイプであるGli1/2を抑制し、細胞分化を誘導す

ることです(図1)。Taylor先生、Eberhart先生(Johns Hopkins大学)と共同で髄芽腫88例を4群に分類しGli3免疫染色(図2)を行いました。その結果、SHH群やWNT群では、Group 3群やGroup 4群と比べて有意にGli3陽性例が多いことを見出しました。さらにSuva先生(Massachusetts総合病院)と共同で、髄芽腫細胞のsingle cell RNA sequencingを行いました。組織学的にdesmoplastic/nodular typeの形態を示すSHH群は、結節内細胞(nodular type)ではGli3が高発現神経分化を示し、間質(desmoplastic type)ではGli1が高発現していること、さらにWNT群ではGli1が全体的に抑制され、Gli3がびまん性に発現する結果として一部が神経分化することを見出しました(図3)。これらの結果は、免疫染色の結果を裏付けするものでありました。髄芽腫ではGroup 3群やGroup 4群に比較してWNT群やSHH群が予後良好と知られていましたが、今回の研究よりWNT群やSHH群でGli3を発現し、腫瘍細胞が神経分化する結果、予後が良好になることを明らかにしました。尚、これらの結果は2021年のJournal of Neuropathology Experimental Neurology 誌(PMID 33249504)に掲載されました。

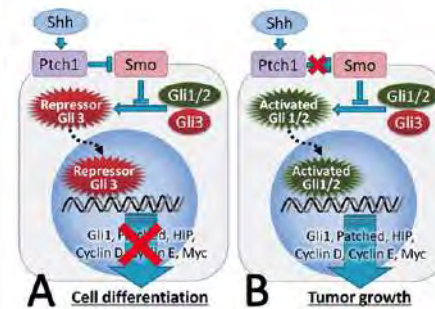


図1 神経細胞の正常発達時(A)および腫瘍形成時(B)におけるGli3の動き

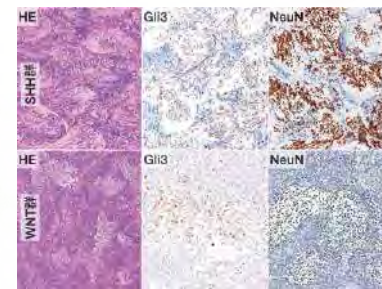


図2 上段：髄芽腫SHH群代表例の病理所見  
下段：WNT群代表例の病理所見

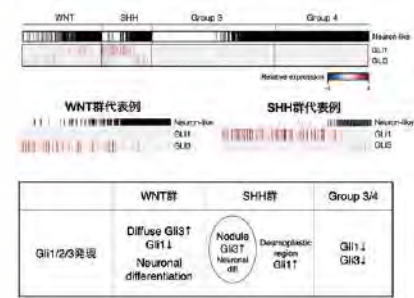


図3 Single cell RNA sequencingによる髄芽腫細胞のGli1/Gli3発現解析結果

◆脳神経内科学分野

## 脳梗塞の病型診断 バイオマーカーの探索

脳梗塞では、発症早期には診断が難しい症例も経験します。病態に基づき、早期に適切な診断、病型分類することが、的確な治療選択につながります。なかでも、アジア人に多い症状が進行するタイプの病型(Branch Atheromatous disease, BAD)は、早期には症状が軽いラクナ梗塞と鑑別が困難です。私たちは、血管障害の病態を鋭敏に反映して、局所の炎症応答が発症早期から生じるという仮説のもと、発症24時間以内のバイオマーカーの検討を行いました。その結果、炎症反応蛋白の一つであるペントラキシン3(PTX3)が、

BADの新規バイオマーカーであることを報告しました(Eur J Neurol 2020;27:1279-84)。現在、本技術の臨床応用を目指して、産学連携の多施設共同研究が進行中です。

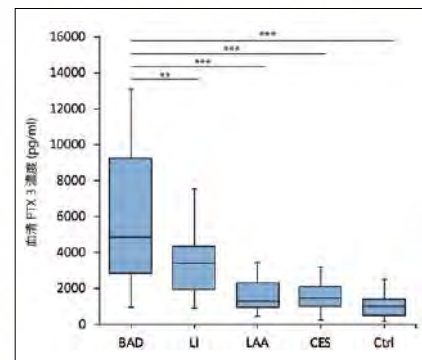


図1 各病型における入院時血清PTX3濃度

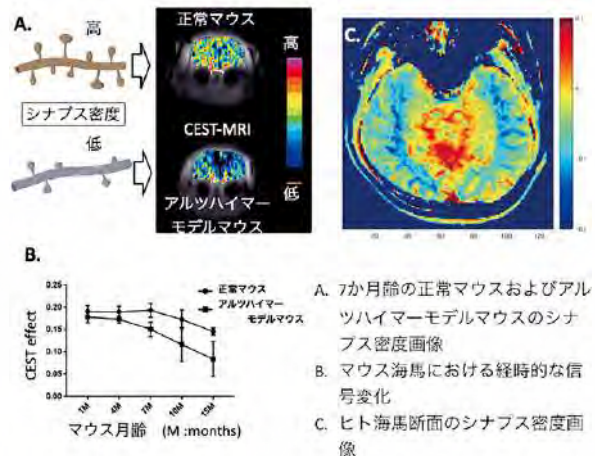
入院時に採血した検体を用いて、ELISA法で血清PTX3値を測定した。

BADは他の病型(LI:ラクナ梗塞、LAA:大血管粥状硬化型、CES:心原性塞栓症、Ctrl:健常者)と比べて有意に入院時PTX3が高値であった。

◆統合脳機能研究センター

## シナプス密度を反映したMRI撮像法を開発

シナプスは脳の神経回路の基本となるパーツであり、シナプスの局所における障害は機能障害に直結します。統合脳機能研究センターでは、局所シナプス密度を評価する無侵襲なMRI技術を開発することにより、ヒトの局所神経機能に直結した客観的機能評価が可能となるのではないかとこの作業仮説から、化学交換飽和移動磁気共鳴イメージング(CEST-MRI)を用いたシナプス密度画像撮像法を開発し、信号強度が生化学的なシナプス密度の指標と関連すること、シナプス障害が早期に認められるアルツハイマー病モデルマウスにて局所のシナプス障害が生体にて検出可能であることを証明(Contrast Media and Molecular Imaging, 2020, doi:10.1155/2020/8831936)、更にヒト用7T超高磁場MRIを用いることにより、ヒト脳においても無侵襲にシナプス密度画像を撮像することに成功しました。この手法を神経疾患に応用することにより、通常のMRI等では検出が不可能であった機能障害部位の推定、機能障害メカニズムの解明等に大きく役立つことが期待されます。

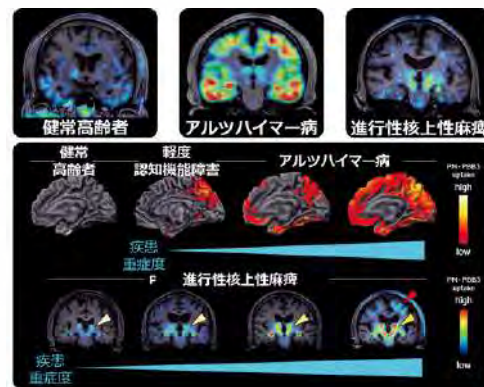


◆統合脳機能研究センター

## 世界初のタウイメージング技術の開発ー生体脳病態評価システムの構築へ向けてー

本邦では人口高齢化を背景に、高齢者に多い認知症患者さんは右肩上がりに増え続けています。認知症の多くは、脳内にさまざまな異常たんぱくというゴミのようなものが蓄積することが発症に関与していると考えられています。本分野の主催者はこれまで、陽電子放射断層撮影装置(PET)を用いて、さまざまな認知症の脳内でみられる多様なタウたんぱく病変を生体内で可視化する世界初のタウイメージング技術の開発に携わってきました。このイメージング技術を用いることで、脳内にタウたんぱく病変が見られるさまざまな認知症の鑑別診断や客観的な重症度評価を行えることも明らかにしました(Tagai, *et al.* Neuron, 2021;109(1):42-58.e8.)。

本分野では今後、既述のタウイメージング技術を含む、先進的イメージングを用いた生体脳病態評価システムの構築を行っていきます。さらに脳研究所内外の、基礎から臨床までの多分野にわたる研究者や企業と密な連携を図り、認知症の早期診断・治療・予防法の開発に資する成果が得られるものと期待されます。



図：タウ PET による鑑別診断と病期診断

◆遺伝子機能解析学分野

## アルツハイマー病に関連する新たな遺伝子の発見

アルツハイマー病(AD)は65歳以上の高齢者で発症することが多い神経疾患で、そのほとんどが家族歴のない孤発性です。認知症の半数以上を占め、遺伝要因を背景に環境要因が複雑に作用することで発症します。双子研究から遺伝要因の発症寄与率は高いことが知られており、およそ60~80%と推定されています。これまでの研究から、多数の遺伝子がADの病因や進行に関係することが分かっています。とりわけ、染色体19番に位置するアポリポタンパクE遺伝子(*APOE*)は、孤発性ADの強力な感受性遺伝子として、人種を超えて確立されてい

ます。しかし、日本人において、*APOE*以外のAD感受性遺伝子はほとんど報告されておらず、病態解明の観点から、大きな課題となっていました。そこで当分野は国立長寿医療研究センター、東北大学・東北メディカルメगाバンク機構と共同でこの課題に取り組み、日本人の孤発性ADと関連する新たな遺伝子(*FAM47E*)を同定しました。本研究成果は孤発性ADの発症メカニズムの解明に貢献すると共に、新たなバイオマーカーの開発や創薬の候補分子探索に役立つものと期待されます。

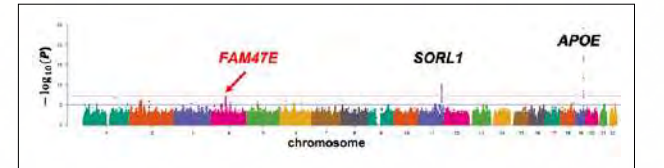


図. ゲノムワイド関連解析のマンハッタンプロット:日本人の孤発性AD感受性遺伝子

◆動物資源開発研究分野

## マウス生体内でES細胞由来肺臓器の創出

In vitroで多能性幹細胞から肺臓器を作成するのは極めて難しいと考えられています。動物資源開発研究分野およびモデル動物開発分野では、本学大学院医歯学総合研究科の周啓亮助教、西條康夫教授らの研究グループおよび徳島大学との共同研究により、胚盤胞補完法を用いてin vivoでマウスの生体内にGFP陽性mES細胞に由来する機能的肺臓器の作出に成功しました。CRISPR/Cas9で作成した肺臓器を欠損するFgf10複合ヘテロマウスの胚盤胞にGFP陽性マウスES細胞(RENKA C57BL/6NcrJ; #CFS-EGFP27)をマイクロインジェクションし、本来では出産後に生存できないFgf10欠損マウスがES細胞に補完され、成体まで異常なく発育・成熟しました。キメラ産仔及び成体キメラマウスを解析したところ、肺の実質部分および間質部分が優位にGFP陽性ES細胞由来であることを示

し、Fgf10欠損マウスにおいて胚盤胞補完法によりES細胞由来の肺臓器が作成された可能性を示しました。

Akihiko Kitahara, Qingsong Ran, Kanako Oda, Akihiro Yasue, Manabu Abe, Xulu Ye, Toshikuni Sasaoka, Masanori Tsuchida, Kenji Sakimura, Yoichi Ajioka, Yasuo Saijo, Qiliang Zhou. Generation of Lungs by Blastocyst Complementation in Apneumic Fgf10-Deficient Mice. Cell Reports. 31(6):107626, 2020.

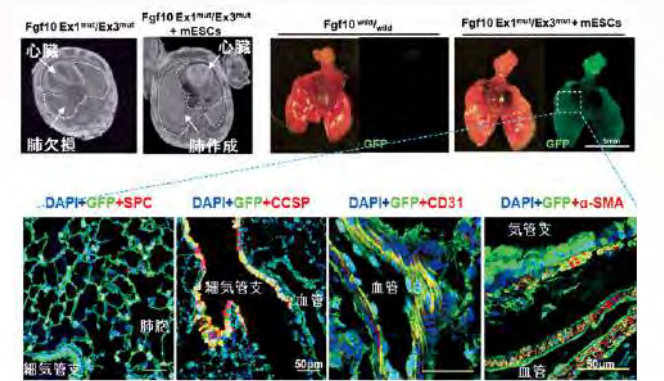


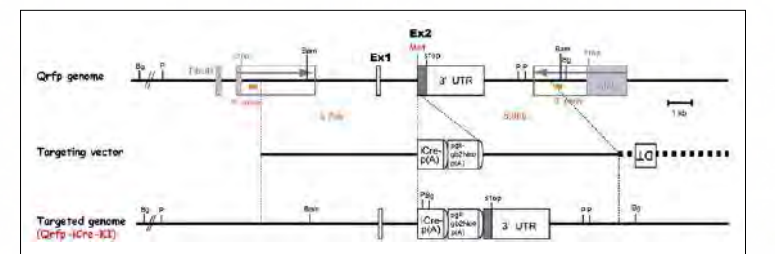
図: 同種異系間胚盤胞補完法により作成したマウスES細胞由来の肺臓器

◆モデル動物開発分野

## 冬眠様状態を誘導する新規神経回路の発見に貢献

私たちの研究室が筑波大学の研究グループとの共同研究により開発した遺伝子改変マウスを用いることで、同研究グループが、本来は冬眠しないマウスに冬眠様状態を誘導する新規神経回路を発見しました。脳の一部の小領域に存在するQRFPという神経ペプチドを有する神経細胞に、特定の遺伝子の発現制御を可能とするCreというタンパク質を産生する遺伝子改変マウス(Qrfp iCreマウス)を用いることで、マウスの体温や酸素消費量を急激に低下させ冬眠のような状態にさせるQ神経(Quiescence-inducing neurons: 休眠誘導神経)と名付けられた神経細胞群を発見すること

ができました。この発見により人工冬眠の研究が大きく前進したと言えます。(Nature 2020, 583:109-114)



図説明文: Qrfp iCreマウスを開発するための遺伝子改変の設計図

## TGF- $\beta$ 1産生の亢進が脳小血管壁細胞変性の原因になることを発見

脳小血管病は、脳へ酸素と栄養素を供給する脳の小血管の変性によって脳梗塞や白質病変をきたす疾患で、認知症の主要な原因の一つです。脳小血管病の患者さんの脳血管では、血管平滑筋細胞やペリサイトと呼ばれる血管壁細胞が変性・脱落するという変化が起こり、これが血管機能障害の大きな要因であると考えられていますが、その原因は不明でした。

我々は、トランスフォーミング増殖因子 (Transforming Growth Factor- $\beta$ 1: TGF- $\beta$ 1)の過剰産生マウスを用いて、TGF- $\beta$ 1シグナルの亢進が、患者さん類似の血管平滑筋細胞やペリサイトの脱落を引き起こすことを発見し、以下に報告しました。TGF- $\beta$ 1の増加は脳小血管病患者さんの脳内でも見られ、新たな治療法の開発に繋がることが期待されます。

Kato T, et al. Excessive Production of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Causes Mural Cell Depletion From Cerebral Small Vessels. Front Aging Neurosci. 2020.

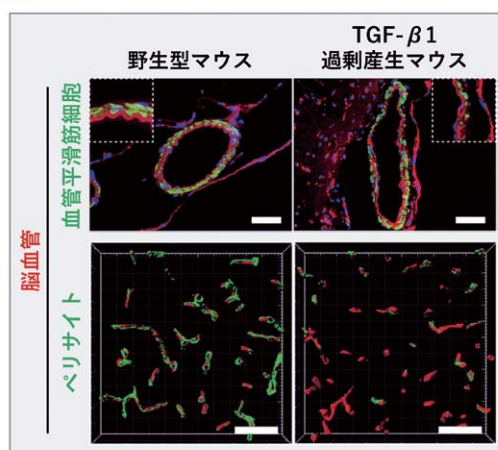


図. 野生型とTGF- $\beta$ 1過剰産生マウスの血管平滑筋細胞 (上段) とペリサイト (下段) の染色像。TGF- $\beta$ 1過剰産生マウス脳小血管では血管壁細胞の脱落が起こる。

## 魚の実験からヒト難病へ

疾患状態を模倣した培養細胞、小型魚類の疾患モデル、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。疾患病態における最先端の知見を得るためには、地道なモデル作りやヒトサンプルの解析が欠かせません。これまでに主に小型魚類のパーキンソン病モデルを多数報告してきましたが(*Cell Rep.*, 2019; *PLOS One* 2017; *PLOS Genet.* 2015; *Ann. Neurol.* 2013等)、2020年度は新たにヒト家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物であるATP13A2についてゼブラフィッシュのAtp13a2変異体の表現型を報告しました(*IBRO Rep.*, 2020)。また本論文は脳病態解析分野初の博士論文となりました(入月浩美博士)。ヒト疾患では新潟大学消化器内科との共同研究で慢性偽性腸閉塞症の腸管神経病

理を報告しました(*Dig. Dis. Sci.*, 2020)。

それまでスタッフ1人の研究室であったのが2020年3月にてテニユアトラック終了後、徐々にスタッフが配備されつつある年でもありました。それに伴い研究室のテーマも発展させつつあります。小型魚類もゼブラフィッシュだけでなく、メダカ、アフリカメダカ、ジャイアントダニオと野生型だけでも多様な種を実験に用いており、少し変わった研究室の雰囲気を感じ出しています。研究室自体もそれなりにユニークですがそれ以上にスタッフや学生さんの各々の研究テーマは独創的かつ建設的です。脳研究所の剖検脳を始めとしたリソースと、小型魚類の利点と、各メンバーの力を組み合わせて、さらに研究を発展させていきます。



図: 研究室で扱う小型魚類たち

## グリア細胞と神経細胞のコミュニケーションによる正確な神経回路形成

ショウジョウバエ視覚系中枢において、膜貫通タンパク質 Golden goal (Gogo) は、視神経軸索を脳の適切な投射領域へ導きます。これまで、Gogoはリン酸化状態と脱リン酸化状態で、異なる機能があることが示唆されていましたが、それを制御する分子メカニズムは分かっていませんでした。この問題に対し、私達は、視覚系中枢に存在する「グリア細胞」か

ら分泌されるインスリンがGogoのリン酸化状態のスイッチをON/OFF切り替えることによって、Gogoによる2つの異なる機能(①ターゲティング領域を正確に認識する機能、②フィロポディアの伸長を抑制する機能)を発生 of 適切なタイミングで調節し、緻密で正確な神経回路を形成することを実証しました(Takechi et al., *eLife*, 2021; 東工大の鈴木崇之准教授との共同研究)。

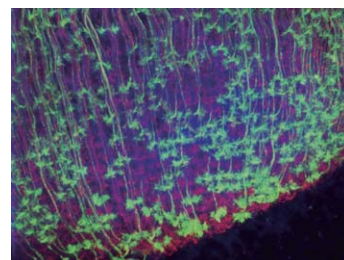


図: ショウジョウバエ脳内の正確な領域へ投射する視神経軸索 (緑)