

5. 共同利用・共同研究

平成27年度 共同利用・共同研究採択者一覧

プロジェクト型

研究課題名	申請者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
組換えウイルスを用いた筋萎縮性側索硬化症病変の発症進展機序の解明	東京都医学総合研究所	副参事 研究員	渡部 和彦	デジタル医学 分野	柿田 明美
神経変性疾患：特異的異常蛋白はシナプスを越えるのか	信州大学医学部	教授	小柳 清光	デジタル医学 分野	柿田 明美
ドーパミン受容体変異マウスを用いた不安様行動発症機序の解明	北里大学医学部	講師	山森 早織	動物資源開発 研究分野	笹岡 俊邦
大規模アルツハイマー病ゲノムリソースを用いた系統的網羅的エピゲノム解析	東京大学医学部附属病院	さががけ 研究員	岩田 淳	遺伝子機能解 析学分野	池内 健
アルツハイマー病に関連するゲノム配列変異の解析システムの構築	大阪大学大学院医学系研究科	特任教授	中谷 明弘	遺伝子機能解 析学分野	池内 健
バイオメタル・トランスポーターの動態と神経変性疾患に関する研究	岐阜薬科大学	教授	保住 功	デジタル医学 分野	柿田 明美
Gut microbiotaの制御が脳虚血病巣進展に及ぼす影響	日本医科大学大学院医学研究科	助教	西山 康裕	生体磁気共鳴 学分野	五十嵐 博中
異常凝集体の形成と伝播による神経細胞死機構の解明	京都大学大学院医学研究科	特定准教授	星 美奈子	デジタル医学 分野	柿田 明美
セロトニン5a受容体の生理的役割の解明	名古屋大学環境医学研究所	教授	山中 章弘	細胞神経生物 学分野	崎村 建司
遺伝子ターゲティングによるChR2/ArchTレポーターマウスの作成	東北大学大学院情報科学研究科	教授	井樋 慶一	細胞神経生物 学分野	崎村 建司
脳におけるグルタミン酸受容体GluD1の入力選択的回路形成と高次神経機能発現に関する共同研究	北海道大学大学院医学研究科	教授	渡辺 雅彦	細胞神経生物 学分野	崎村 建司
限局性皮質異形成の分子遺伝学的発生機序の解明	山形大学医学部附属病院	講師	加藤 光広	デジタル医学 分野	柿田 明美
オリブ橋小脳萎縮症における細胞障害機構の解明	鳥取大学医学部	助教	瀧川 みき	デジタル医学 分野	柿田 明美
統合失調症脳内タンパク質多項目同時測定解析及び関連遺伝子発現解析	福島県立医科大学	講師	國井 泰人	デジタル医学 分野	柿田 明美
CRISPR/Cas9システムを使った迅速なノックアウトマウス作成	関西医科大学	准教授	赤間 智也	細胞神経生物 学分野	崎村 建司
PNPLA6遺伝子の脳における機能一有機リン被爆との関連から	東海大学医学部	教授	木村 穰	動物資源開発 研究分野	笹岡 俊邦
グリオーマの分子標的治療・放射線治療耐性機構の解明と治療薬の開発	北海道大学大学院医学研究科	講師	津田 真寿美	デジタル医学 分野	柿田 明美
タンパク質分解システムを標的とするシヌクレイノパチーの分子病態解明と治療法の確立	弘前大学大学院医学研究科	准教授	森 文秋	デジタル医学 分野	柿田 明美
生体リズムの遺伝子改変マウスによる解析	京都大学大学院薬学研究科	教授	岡村 均	細胞神経生物 学分野	崎村 建司
脳基底核内情報伝達におけるドーパミン神経伝達の機能の解析	自然科学研究機構生理学研究所	教授	南部 篤	動物資源開発 研究分野	笹岡 俊邦
HtrA1欠損マウスにおける脳小血管の機能解析	国立循環器病研究センター	医長	猪原 匡史	分子神経疾患資 源解析学分野	小野寺 理
哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析	国立遺伝学研究所	教授	岩里 琢治	動物資源開発 研究分野	笹岡 俊邦
ヒトてんかん原性脳組織における酸化損傷タンパク質の網羅的探索	愛知県心身障害者コロニー中央病院	部長	島田 厚良	デジタル医学 分野	柿田 明美
optineurinタンパク質の研究	広島大学原爆放射線医学研究所	教授	川上 秀史	デジタル医学 分野	柿田 明美
脳小血管病変モデルにおけるスタチンの脳組織保護効果	日本医科大学大学院医学研究科	講師	仁藤 智香子	生体磁気共鳴 学分野	五十嵐 博中

神経変性疾患におけるアクアポリン(AQP)およびAQP関連タンパクの解析	福島県立医科大学	講師	星 明彦	デジタル医学分野	柿田 明美
多系統萎縮症剖検脳におけるTPPP (p25 α) 蛋白の発現解析およびその制御下流遺伝子の探索	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科	講師	石川 欽也	デジタル医学分野	柿田 明美
悪性脳腫瘍の非コードRNAの機能解析を基盤とした分子標的創薬の展開	京都府立医科大学医学部	教授	山中 龍也	脳神経外科学分野	藤井 幸彦
UBQLN2コンディショナルノックアウトマウスの解析に基づく神経変性機序の解明	横浜市立大学大学院医学研究科	教授	田中 章景	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
免疫不全を伴わない患者に発生するEpstein-Barr virus関連の中枢神経原発悪性リンパ腫の臨床病理学的検討	久留米大学医学部	教授	杉田 保雄	デジタル医学分野	柿田 明美

連携資源利用型

研究課題名	申請者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の発症機構の解明	金沢大学附属病院	助教	坂井 健二	デジタル医学分野	柿田 明美
筋線維メンテナンスに果たすWWP1ユビキチンリガーゼの機能の解析	国立精神・神経医療研究センター神経研究所	室長	今村 道博	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いた効率的な遺伝子改変マウス作製	熊本大学生命資源研究・支援センター	教授	中潟 直己	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
ALS/FTLDにおけるTDP-43関連軸索内mRNA輸送障害の解析	国立精神・神経医療研究センター神経研究所	室長	長野 清一	分子神経疾患資源解析学分野	小野寺 理
筋萎縮性側索硬化症脊髄におけるVGFの局在に関する研究	岐阜薬科大学	准教授	嶋澤 雅光	デジタル医学分野	柿田 明美
神経回路の興奮性に対するCB2受容体の役割の解明	東京大学大学院医学系研究科	助教	菅谷 佑樹	細胞神経生物学分野	崎村 建司
タウオパチーにおける運動ニューロン障害の病理学的研究	愛知医科大学加齢医科学研究所	教授	吉田 眞理	デジタル医学分野	柿田 明美
内在性TDP-43遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用	北里大学医学部	教授	佐藤 俊哉	分子神経疾患資源解析学分野	小野寺 理
アメリカ平原ハタネズミ (Prairie vole) からのES細胞樹立条件の検討, 及びCrispr/Cas9法による遺伝子KOハタネズミ作出の試み	東北大学大学院農学研究科	教授	西森 克彦	細胞神経生物学分野	崎村 建司
パーキンソン病治療における標的タンパク質としての Inhibitory PAS Domain Protein の検証	東北大学大学院生命科学系研究科	教授	十川 和博	デジタル医学分野	柿田 明美
APP細胞内ドメインの神経毒性の解析	信州大学医学部	講師	中山 耕造	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
意思伝達不能状態 (Stage V, TLS) の筋萎縮性側索硬化症の臨床病理学的検討	東京都立北療育医療センター	神経内科医長	望月 葉子	デジタル医学分野	柿田 明美
酸化ストレスによる神経細胞機能の障害と細胞死に関する研究	東京女子医科大学	主任教授	柴田 亮行	デジタル医学分野	柿田 明美
ドーパミン-D1Rシグナルが心不全に果たす役割の解明	東京大学医学部	教授	小室 一成	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
胎仔期および発達期の脳におけるドーパミン受容体D1Rの機能解析	北里大学医学部	准教授	大久保 直	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
Astroblastomaの網羅的遺伝子解析	群馬大学大学院医学系研究科	助教	信澤 純人	デジタル医学分野	柿田 明美
筋萎縮性側索硬化症脊髄におけるGPNMB凝集体に関する研究	岐阜薬科大学	教授	原 英彰	デジタル医学分野	柿田 明美
ヒト神経疾患脳におけるDAP12発現の病理学的検討	埼玉医科大学	教授	佐々木 惇	デジタル医学分野	柿田 明美
時間的空間的特異的Scrapperノックアウトマウスの作製と解析	浜松医科大学	准教授	矢尾 育子	細胞神経生物学分野	崎村 建司

※所属・職名は、申請時のものです。

組換えウイルスを用いた筋萎縮性側索硬化症病変の発症進展機序の解明

研究代表者 渡部 和彦¹⁾
研究分担者 柿田 明美²⁾

- 1) 公益財団法人東京都医学総合研究所・神経変性病理
- 2) 新潟大学脳研究所・デジタル病理学分野

研究要旨

ヒト筋萎縮性側索硬化症(ALS)における運動ニューロン変性のメカニズムは依然として不明であるが、ALS 関連遺伝子として TDP-43, FUS など様々なものが知られ、さらに蛋白分解系の異常によって運動ニューロンにおける細胞内凝集体形成や細胞死が促進されることがわかってきた。本研究では、各種の組換えウイルスベクターを用いて TDP-43, FUS などの ALS 関連遺伝子および蛋白分解系に対する shRNA を培養系および成体マウス・ラット運動ニューロンに発現させ、ALS に特徴的な凝集体の形成過程や細胞死、周囲の細胞への播種・進展様式を解析するとともに、ヒト ALS 剖検例と比較解析することにより、ALS 病変の発症進展機序の解明を目指している。

A. 研究目的

ヒト筋萎縮性側索硬化症(ALS)における運動ニューロン変性のメカニズムは依然として不明であるが、近年、ALS 関連遺伝子として TDP-43, FUS, VCP, UBQLN2, C9orf72 など様々なものが知られている。さらにプロテアソームやオートファジー経路の凝集体形成・細胞死への関与が指摘されており、これら蛋白分解系の異常が ALS の発症進行にも影響を与えていると想定される。本研究では、非増殖性組換えウイルスを用いて TDP-43, FUS などの ALS 関連遺伝子、およびプロテアソーム・エンドソーム・オートファジーに対する抑制性ショートヘアピン(sh)RNA を培養系および成体ラット・マウス運動ニューロンに単独または共発現させ、凝集体の形成過程や細胞死をヒト ALS 剖検例と比較解析することにより、ALS の運動ニューロン変性機序の解明を目指している。

我々はこれまで、TDP-43, FUS cDNA や蛋白分解系を阻害する shRNA を発現する組換えアデノウイルスをラット、マウス末梢神経に混合接種し、ウイルスの軸索内逆行輸送により運動ニューロンに細胞質内凝集体を形成しうることを報告した (Watabe et al., 2014)。しかし組換えアデノウイルスによる外来遺伝子発現は一過性であるため、

昨年度は、より長期間安定した遺伝子導入発現が可能な組換えアデノ随伴ウイルス 9 型(AAV9)を用いて成体マウスに TDP-43 と蛋白分解系阻害 shRNA を逆行性に共発現させ、運動ニューロン細胞体に凝集体の形成を認めた。そこで、今年度は凝集体の周囲の細胞への播種・進展様式を解析するための予備実験として、TDP-43 組換え AAV9 を新生仔マウス側脳室に接種し、脳脊髄における外来性 TDP-43 の長期発現を検討した。

一方、正常 TDP-43 とその C 末断片を発現する組換えアデノウイルスをプロテアソーム阻害条件下で培養ニューロン、グリアに感染させると、細胞質に粗大な凝集体が形成される (Watabe et al., 2014)。しかし、凝集体形成と細胞死の関連性は明確ではない。そこで、昨年度に引き続き、培養ニューロンおよびグリア細胞における細胞質凝集体の形成過程と細胞死をタイムラプス・イメージングにより経時的に観察した。

B. 研究方法

1. TDP-43 組換え AAV9 の新生仔マウス側脳室接種実験；ヒト正常 TDP-43 を EGFP とともに発現する組換え AAV9 を 1 日齢 ICR マウスの側脳室に注入接種した。接種 2,4 週～6 ヶ月後

に灌流固定し脳脊髄の凍結切片を作成、観察した。

2. 組換えアデノウイルスによる培養ニューロン・グリア細胞質内 TDP-43 凝集体形成の経時的観察;ニューロン, アストロサイト, またはオリゴデンドロサイトに分化すると各々 tubulin beta-3 (TUBB3), GFAP, cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP) プロモータ制御下に EGFP を発現するプラスミドをラット神経前駆細胞株 1464R に導入し各安定発現株を得た。これら細胞株をレチノイン酸負荷によって EGFP 陽性ニューロン, グリアに分化させたのち, ヒト正常または C 末断片 (208-414) TDP-43 を DsRed とともに発現する組換えアデノウイルスを共感染させた。感染 24 時間後, プロテアソーム阻害剤 MG-132 を添加し, タイムラプス蛍光撮影を 72 時間行い, 細胞質凝集体の形成と細胞死を経時的に観察した。

C. 研究結果

1. TDP-43/EGFP 組換え AAV9 の側脳室注入接種により, 接種 2,4 週~6 ヶ月後にわたって大脳, 脳幹, 脊髄に瀰漫性に EGFP 陽性ニューロンを認め, ヒト特異的 TDP-43 免疫組織化学では核が陽性に染色された。
2. 培養タイムラプスの解析では, 組換えアデノウイルスを EGFP 陽性分化ニューロン, グリアに感染発現させ MG-132 を負荷すると, DsRed 陽性 TDP-43 凝集体が細胞質に徐々に充満し, やがて細胞膜の破綻とともに細胞死に至り, 残存した不溶性の凝集体が長時間浮遊する像が観察された。この凝集体は sarkosyl 不溶性の顆粒状構造物からなり, リン酸化 TDP-43 を含んでいた。また細胞外に放出された凝集体が隣接する細胞に取り込まれる像も観察された。

D. 考察

TDP-43 組換え AAV9 の新生仔マウス側脳室接種により, 成体マウス脳脊髄ニューロンにおけるヒト TDP-43 の長期安定発現が可能となった。今後, このマウスにヒト TDP-43 および蛋白分解系阻害 shRNA 組換えアデノウイルスを追感染させて局所の運動ニューロンにヒト TDP-43 凝集体を形成させ, 凝集体が周囲の細胞にヒト TDP-43 を介して伝播していくか否かを経時的に観察する予定である。

一方, 培養ニューロンにおける TDP-43 凝集体の

形成過程を経時的に観察しえた。現在, 凝集体の細胞間伝播の可視化に関しても検討を行っている。

これらの実験系を用いて, 細胞変性や凝集体形成のメカニズムを解析するとともに変性を抑止する方法を見出し, ALS の治療法開発に繋げていきたい。

E. 結論

TDP-43 組換え AAV9 の新生仔マウス側脳室接種により, 成体脳脊髄ニューロンにおけるヒト TDP-43 の長期発現が可能となった。また, 培養ニューロン, グリアにおける TDP-43 凝集体の形成過程と細胞死を経時的に観察した。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) Tsukamoto M, Sango K, Niimi N, Yanagisawa H, Watabe K, Utsunomiya K. Upregulation of galectin-3 in immortalized Schwann cells IFRS1 under diabetic conditions. *Neurosci Res* 2015;92:80-85.
- 2) Murakami T, Sango K, Watabe K, Niimi N, Takaku S, Li Z, Yamamura K, Sunada Y. Schwann cells contribute to neurodegeneration of transthyretin amyloidosis. *J Neurochem* 2015;134:66-74.
- 3) Nakayama Y, Shimizu T, Hayashi K, Mochizuki Y, Nagao M, Watabe K, Kawata A, Nakano I, Oyanagi K. Predictors of impaired communication in amyotrophic lateral sclerosis patients with tracheostomy invasive ventilation. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2016;17:38-46.
- 4) Bokuda K, Shimizu T, Imamura K, Kawata A, Watabe K, Hayashi M, Nakayama Y, Isozaki E, Nakano I. Predictive factors for prognosis following unsedated percutaneous endoscopic gastrostomy in ALS patients. *Muscle Nerve*. 2016 Jan 21. doi: 10.1002/mus.25051. [Epub ahead of print]
- 5) 渡部和彦. 筋萎縮性側索硬化症とニューロパチーの病態解明をめざして;運動ニューロン・シュワン細胞病変モデルの構築と解析. 九州薬学会会報 2015;69:1-5.

2.学会発表

- 1) 渡部和彦, 石井智裕, 河上江美子, 柳澤比呂子, 秋山けい子, 遠藤堅太郎, 三澤日出巳.

Adenovirus-induced neuronal TDP-43 aggregates

demonstrated by time-lapse imaging. 第56回日本神経学会学術大会, 新潟, 2015年5月20日.

- 2) 木田耕太, 清水俊夫, 木村英紀, 山崎寿洋, 関口輝彦, 上山勉, 川田明広, 渡部和彦, 林雅晴, 磯崎英治. 筋萎縮性側索硬化症(ALS)における線維束電位(FP)のプロファイルについて. 第56回日本神経学会学術大会, 新潟, 2015年5月21日.
- 3) 村上龍文, 三五一憲, 渡部和彦, 新見直子, 高久静香, 李生花, 山村研一, 砂田芳秀. Schwann cells affect neuropathy in transthyretin amyloidosis. 第56回日本神経学会学術大会, 新潟, 2015年5月22日.
- 4) 林健太郎, 望月葉子, 竹内亮子, 小森隆司, 高橋均, 柿田明美, 渡部和彦, 関絵里香, 新井信隆, 小柳清光, 清水俊夫, 長尾雅裕, 磯崎英治. 意思伝達不能状態(意思伝達能力 stage V)となった筋萎縮性側索硬化症(ALS)における大脳病変の免疫組織学的検討. 第56回日本神経病理学会総会学術研究会, 福岡, 2015年6月5日.
- 5) 石井智裕, 河上江美子, 柳澤比呂子, 秋山けい子, 遠藤堅太郎, 三澤日出巳, 渡部和彦. 組換えアデノウイルスによる培養ニューロン細胞質内TDP-43凝集体形成の経時的観察. 第56回日本神経病理学会総会学術研究会, 福岡, 2015年6月5日.
- 6) 石井智裕, 河上江美子, 柳澤比呂子, 秋山けい子, 遠藤堅太郎, 三澤日出巳, 渡部和彦. 組換えアデノウイルスによる培養ニューロン細胞質内TDP-43凝集体形成の経時的観察. 第38回日本神経科学大会, 神戸, 2015年7月28日.
- 7) 渡部和彦, 石井智裕, 柳澤比呂子, 三五一憲, 秋山けい子, 河上江美子, 遠藤堅太郎, 阿久津英憲, 三澤日出巳. 幹細胞由来ニューロンと株化シュワン細胞の共培養によるミエリン形成. 第38回日本神経科学大会, 神戸, 2015年7月28日.
- 8) 村上龍文, 三五一憲, 渡部和彦, 大澤裕, 李正花, 山村研一, 砂田芳秀. シュワン細胞はTTR型アミロイドーシスの神経変性に関与する. 第26回日本末梢神経学会学術集会, 松本, 2015年9月18日.
- 9) Murakami T, Sango K, Watabe K, Niimi N, Takaku S, Ohasawa Y, Li Z, Yamamura K, Sunada Y. Schwann cells contribution to neuropathy in transthyretin amyloidosis. 2015 Peripheral Nerve Society Biennial Meeting, Quebec, Canada, June28-Jul2, 2015.
- 10) 渡部和彦. 筋萎縮性側索硬化症とニューロパチ

一の病態解明をめざして;運動ニューロン・シュワン細胞病変モデルの構築と解析. 第7回信州大学神経病理学セミナー, 松本, 2015年9月29日. (招待講演)

- 11) Moriwaki Y, Ohno Y, Ishii T, Takamura Y, Sango K, Watabe K, Misawa H. SIMPLE, a causative gene for Charcot-Marie-Tooth disease type 1C, participates in protein trafficking in trans-Golgi network and recycling endosome. 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago, IL, USA, October 17-21, 2015.
- 12) 石井智裕, 秋山けい子, 河上江美子, 柳澤比呂子, 岡戸晴生, 三輪昭子, 遠藤堅太郎, 三宅弘一, 三澤日出巳, 渡部和彦. 筋萎縮性側索硬化症におけるTDP-43凝集体形成モデルの確立. 第37回神経組織培養研究会, 霧島, 2015年11月8日.
- 13) 渡部和彦. 株化シュワン細胞の樹立とミエリン形成. 第37回神経組織培養研究会, 霧島, 2015年11月8日.
- 14) 柳澤比呂子, 石井智裕, 河上江美子, 遠藤堅太郎, 平岡由佳, 上野隆, 山元大輔, 小松雅明, 渡部和彦. L-leucine添加によるオートファジー不全を改善するメカニズムとSpin1との関連. 第38回日本分子生物学会年会, 神戸, 2015年12月2日.

G.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

神経変性疾患:特異的異常蛋白はシナプスを越えるのか

研究代表者 小柳 清光¹⁾
研究分担者 鈴木 絵美²⁾、柿田 明美³⁾

信州大学医学部 1) 神経難病学講座 2) 分子神経生理学教室
3) 新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野

研究要旨

古典型孤発性 (s) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の疾患特異的なリン酸化 (p) TDP-43 が神経細胞から神経細胞に連続的に伝播拡散するのかを明らかにする目的で、sALS 神経細胞の軸索内と胞体内における pTDP-43 封入体の存在部位と形態を免疫組織学的に検索した。軸索内の pTDP-43 は、顔面神経核、舌下神経核の神経細胞、および前角細胞の軸索で見られ、顆粒網状と塊状の 2 形態を示した。軸索内 pTDP-43 封入体は臨床経過が比較的短い症例でのみ見られた。赤核では神経細胞を取り巻く軸索末端に pTDP-43 がみられ、pTDP-43 に取り巻かれた神経細胞では核内の TDP-43 が消失していた。しかし後シナプスであるこれら神経細胞胞体内に pTDP-43 の沈着は見られなかった。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病、アルツハイマー病などの神経変性疾患における特異的蛋白が脳内で神経細胞から神経細胞へ連続的に伝播拡散するのかを解析する目的で、本研究では、古典型孤発性 (s) 筋萎縮性側索硬化症 (sALS) で、リン酸化 (p) TDP-43 が神経細胞から神経細胞に連続的に伝播拡散するのかを、sALS 神経細胞の軸索内と胞体内とにおける pTDP-43 封入体の存在部位と形態について免疫組織学的に検索した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

日本人古典型孤発性 ALS19 剖検例 (男 11 例、女 8 例、経過は 6 カ月から 72 カ月) および日本人対照 3 例 (男 3 例) を用いた。ホルマリン固定、パラフィン包埋された脳と脊髄各箇所切片を、HE、KB 染色し、抗 pTDP-43 抗体、抗リン酸化非

依存性 TDP-43 抗体、抗リン酸化 neurofilament 抗体、抗シナプトフィジン抗体等を用いて免疫染色し (ABC 法および蛍光抗体法)、前角細胞を明視野顕微鏡と共焦点顕微鏡 (ツアイス LSM5) で観察した。

C. 研究結果

軸索内 pTDP-43 陽性構造物は、sALS 症例の顔面神経核、舌下神経核の神経細胞、および前角細胞の軸索で比較的多数見られた。

その形態は、軸索外縁に存在する、大きさ 1 μ m 程度の顆粒-網状のものと、軸索内部に存在する、大きさ 10 μ m \times 5 μ m 程度の塊状のもの 2 種類からなっていた。

軸索内 pTDP-43 陽性構造物は、顆粒-網状のものが概ね 30 カ月以内、塊状のものが概ね 10 ヶ月以内と、比較的経過が短い例でのみ認められた。赤核では、神経細胞を取り巻く軸索末端に pTDP-43 がみられ、pTDP-43 に取り巻かれた神経細胞では核内の TDP-43 が消失していた。しかし

後シナプスであるこれら神経細胞胞体内に pTDP-43 の沈着は見られなかった。

D. 考察

多くの sALS で胞体内の pTDP-43 封入体と神経細胞脱落を呈する顔面神経核や舌下神経核、前角細胞の軸索で pTDP-43 陽性構造物が認められたことは、胞体内と軸索内で、何らかの関連性を有して pTDP-43 陽性構造物が形成されていることを示している。しかし、どちらかが先に形成され、他方に流動している、という解析は出来なかった。

軸索外縁の pTDP-43 は軸索表面の機能、とりわけ膜電位の変化を障害する可能性が考えられ、跳躍伝導に影響する可能性がある。また塊状の pTDP-43 は軸索流を阻害する可能性が考えられ、これはシナプス伝達を障害する可能性がある。これらの機能障害は、顔面や舌、四肢、呼吸筋など支配筋の麻痺を惹起する可能性が考えられ、軸索内に pTDP-43 陽性構造物を有する症例の経過が短いことや、筋の線維束攣縮と関連しているのかもしれない。

経シナプス性 pTDP-43 の拡散の可能性については、赤核の神経細胞が pTDP-43 陽性軸索に取り巻かれていたが、それらの神経細胞胞体内後シナプスに pTDP-43 陽性構造物は見られず、経シナプス的な pTDP-43 の拡散の所見は認められなかった。しかし、pTDP-43 陽性軸索に取り巻かれていた神経細胞では核内のリン酸化非依存性の TDP-43 は消失していた。これは、前シナプスの pTDP-43 によって後シナプス神経細胞の核内のリン酸化非依存性 TDP-43 が影響されることをしめしている。核内リン酸化非依存性 TDP-43 は RNA のスプライシングはじめ種々の機能に関連していると言われており、前シナプスの pTDP-43 によって後シナプス神経細胞の蛋白合成が障害されている可能性がある。

sALS 下位運動ニューロン軸索に見られた pTDP-43 凝集体は軸索の機能障害を惹起している可能性が考えられる。赤核周囲軸索末端の pTDP-43 は、核内 TDP-43 を減量させ、細胞内蛋白合成系の機能不全を惹起している事が考えられる。

E. 結論

古典型孤発性筋萎縮性側索硬化症 (sALS) 下位運動ニューロン軸索に見られる pTDP-43 凝集体は軸索の機能障害を惹起している可能性が考えられる。赤核周囲軸索末端の pTDP-43 は核内 TDP-43 を減量させ、細胞内蛋白合成系の機能不全を惹起している事が考えられる。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Onozato T, Nakahara A, Suzuki-Kouyama E, Hineno A, Yasude T, Nakamura T, Yahikozawa H, Watanabe M, Kayanuma K, Makishita H, Ohara S, Hashimoto T, Higuchi K, Sakai T, Asano K, Hashimoto T, Kanno H, Nakayama J, Oyanagi K: Axonal TDP-43 aggregates in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2016 [Epub ahead of print]
2. Nakayama Y, Shimizu T, Mochizuki Y, Hayashi K, Matsuda C, Nagao M, Watabe K, Kawata A, Oyanagi K, Isozaki E, Nakano I: Predictors of impaired communication in amyotrophic lateral sclerosis patients with tracheostomy-invasive ventilation. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 17: 388-346, 2016
3. 日根野晃代、小柳清光、中村昭則、下島吉雄、吉田邦広、池田修一. SOD1 遺伝子 L106V 変異家族性筋萎縮性側索硬化症における下部尿路機能障害の発現時期と排尿神経機構の病理所見. *臨床神経学* 56: 69-76, 2016
4. Oyanagi K, Mochizuki Y, Nakayama Y, Hayashi K, Shimizu T, Nagao M, Hashimoto T, Yamazaki M, Matsubara S, Komori T: Marked preservation of the visual and olfactory pathways in ALS patients in a totally locked-in state. *Clin Neuropathol* 34: 267-274, 2015
5. Oyanagi K, Yamazaki M, Hashimoto T, Asakawa M, Wakabayashi K, Takahashi H: Hippocampal sclerosis in the parkinsonism-dementia complex of Guam: quantitative examination of neurons, neurofibrillary tangles, and TDP-43

immunoreactivity in CA1. Neuropathology 35:
224-235, 2015

6. Kaneko M, Noguchi T, Ikegami S, Sakurai T, Kakita A, Toyoshima Y, Kamve T, Yamada M, Inden M, Hara H, Oyanagi K, Inuzuka T, Takahashi H, Hozumi I: Zinc transporter (ZnT3 and 6) are downregulated in the spinal cords of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurosci Res** 93: 370-379, 2015

2. 学会発表

ありません。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

ありません。

2. 実用新案登録

ありません。

3. その他

ありません。

ドーパミン受容体変異マウスを用いた不安様行動発症機序の解明

研究代表者 山森 早織 1)
研究分担者 笹岡 俊邦 2)
研究分担者 板倉 誠 1)
研究分担者 飯田 諭宜 1)

1) 北里大学医学部 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

マウスの不安様行動の測定には、オープンフィールドテスト、明暗選択テスト、高架式十字迷路など、様々な試験が用いられる。C57/B6 マウスにキンピロール（ドーパミン D2/D3 受容体アゴニスト：D2 高選択性）を投与してこれらの行動試験を行うと、オープンフィールドテストでは壁走性、明暗選択テストでは明所忌避の不安様行動が出現することが明らかとなった。D2 受容体ノックアウトマウスと D3 受容体ノックアウトマウスを用いて、各受容体と不安様行動の関係性を調べると、キンピロールによって生じる不安様行動のうち、明暗選択テストでの明所忌避は D2 受容体を介して発現し、オープンフィールドテストの壁走性は D3 受容体を介して発現する可能性が示唆された。さらに、野生型マウスに PD-128907（ドーパミン D2/D3 受容体アゴニスト：D3 高選択性）を投与しても、オープンフィールドテストでの壁走性が出現した。

A. 研究目的

現代社会では、うつなどを代表とする不安障害が問題となっているが、薬剤に対し難治性となるものもあり早急な対応が求められている。不安障害の克服には不安感の発症機序を分子的に明らかにすることが必要だが、未だ明らかにはなっていない。本研究はドーパミン受容体の作用薬を用いた薬理的解析と、ドーパミン受容体ノックアウトを用いた解析を行い、ある種の不安様行動の発症がドーパミン受容体のどのサブタイプに起因する可能性があるかを検証することを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

8 週齢の C67/BL6 マウスに、キンピロール（ドーパミン D2/D3 受容体アゴニスト：D2 高選択性）や PD-128907（ドーパミン D2/D3 受容体アゴニ

スト：D3 高選択性）をそれぞれ腹腔内投与し、オープンフィールドテスト、明暗選択テスト、高架式十字迷路を行った。

さらに、笹岡らから供与を受けた D2 受容体ノックアウトマウスおよび D3 受容体ノックアウトマウスを用いて同様の実験を行った。

C. 研究結果

C57/B6 マウスにキンピロールを投与すると、オープンフィールドテストでは壁走性、明暗選択テストでは明所忌避の不安様行動が出現した。D2 受容体ノックアウトマウスにキンピロールを投与すると明暗選択テストでの明所忌避は見られなくなるのに対し、オープンフィールドテストの壁走性は観察された。これらのことから、明暗選択テストでの明所忌避は D2 受容体を介して生じる不安様行動であるがオープンフィールドテスト

の壁走性は D3 受容体を介する可能性があると考えられた。

また C57/B6 マウスに PD-128907 を投与すると、オープンフィールドテストでの壁走性と明暗選択テストでの明所忌避の不安様行動が出現するが、オープンフィールドテストの方がより低濃度から不安様行動が出現した。D3 受容体ノックアウトマウスでは、PD-128907 の投与をしてもオープンフィールドテストでの壁走性行動の有意な出現は見られなかった。これらの結果から、少なくともオープンフィールドテストでの壁走性には D3 受容体が関与する可能性があることが推察できた。

D. 考察

以上の結果は、ドーパミン D2 および D3 受容体が、マウスの不安様行動と密接な関連があることを明確に示している。非常に興味深いことに、不安様行動実験の種類によって D2 受容体および D3 受容体シグナルの関与は大変異なっていた。この結果はマウスの不安感を引き起こす脳内メカニズムが多種多様であることを示唆している。この不安感を誘発する脳内の分子メカニズムの多様性を明らかにするには、今後さらなる研究が必要である。

E. 結論

D2 受容体ノックアウトマウスと D3 受容体ノックアウトマウスを用いることで、キンピロール（ドーパミン D2/D3 受容体アゴニスト：D2 高選択性）によって生じる不安様行動のうち、明暗選択テストでの明所忌避は D2 受容体を介して発現し、オープンフィールドテストの壁走性は D3 受容体を介して発現する可能性が示唆された。

さらに、D3 受容体を介してオープンフィールドテストでの壁走性が出現することは、低濃度の PD-128907（ドーパミン D2/D3 受容体アゴニスト：D3 高選択性）の投与によっても確認された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

- ・投稿準備中

2. 学会発表

- ・飯田諭宜、小嶋孝仁、永山博通、山森早織、板

倉誠、笹岡俊邦、宮岡等、高橋正身 “ドーパミン D2 レセプターはマウスの不安様行動に関与している.” 日本神経科学会、2014 年 10 月、奈良

- ・ Yuuki Iida, Takahito Kojima, Hiromichi Nagayama, Saori Yamamori, Makoto Itakura, Toshikuni Sasaoka, Hitoshi Miyaoka, Masami Takahashi “The dopamine D2 receptor is involved in some types of anxiety-like behavior in mice.” 北米神経科学会、2014 年 11 月、Washington D.C.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） なし

大規模アルツハイマー病ゲノムリソースを用いた系統的網羅的エピゲノム解析

研究代表者 岩田 淳¹⁾
研究分担者 池内 健²⁾

1) 東京大学医学部附属病院 神経内科 2) 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野

研究要旨

アルツハイマー病発症の原因を探索するために、死後脳の神経細胞核特異的 DNA メチル化解析を網羅的に施行したところ、複数の遺伝子の発現調整領域において DNA メチル化の異常を同定した。これによって得られた遺伝子群の発現変化を死後脳で検討したところ、アルツハイマー病特異的に発現変化を生じているものを同定した。この遺伝子の発現変化に至る DNA メチル化異常が中枢神経特異的かどうかの検討が次に必要と考えたが、使用した死後脳の脳以外の組織由来の DNA はなく、他のサンプルセットでの検討が必要と考えた。このため、新潟大学脳研究所で蓄積されている大規模ゲノムリソースを用いて網羅的に解析する事を提案した。それにより得られた結果が脳特異的なものなのか、また、原集団以外のサンプルでも異常と検出可能なのかを検討することとし、末梢血での DNA メチル化解析を施行する事とした。

A. 研究目的

東京大学において行われた神経細胞特異的 DNA メチル化解析では連続領域に DNA メチル化の際を認めた遺伝子を 3 つ同定した。これらのうち 2 遺伝子は遺伝子発現の差について mRNA, タンパク質の双方で確認する事が出来た。DNA メチル化の変化は神経細胞以外のグリア細胞由来の DNA, 大脳皮質ではない小脳由来の神経細胞の DNA でも同様の傾向が見られた。すなわち、DNA メチル化変化が中枢神経以外の細胞においても見られるかを検討する必要があると考えられた。

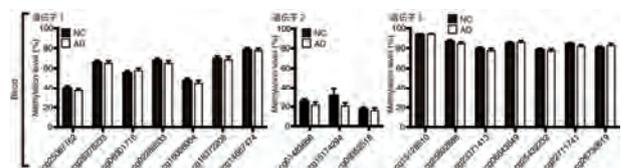
B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センターバイオリソース研究部門の遺伝子機能解析学分野において匿名化された臨床情報とともに取得された末梢血ゲノムでの DNA メチル化を pyrosequencing 法で解析した。対象 DNA は認知機能正常高齢者 40 名、臨床的に診断されたアルツハイマー病 36 名であり、22 の CpG においてメチ

ル化の程度を測定し、診断、性別、年齢などで比較検討した。

C. 研究結果

下図に示すように、測定した全ての CpG において正常■, アルツハイマー病□の間で有意な差は見いだせなかった。



D. 考察

今回使用した末梢血サンプルはアルツハイマー病の診断は臨床診断である点、認知機能正常高齢者の中には Preclinical アルツハイマー病としてアルツハイマー病病理の存在している者が統計学的には 20-30%程度存在していることを想定すると、今回の解析で末梢血に DNA メチル化異

常がないと 100%結論づけるのは早計である可能性は残る。

E. 結論

今回の解析では、少なくとも臨床的に診断されるアルツハイマー病の末梢血では神経細胞で認められるようなDNAメチル化異常は観察されなかった。今後は脳サンプル取得対象者の脳以外のDNAでの解析が考慮される。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし 現在投稿準備中

2. 学会発表

Tatsuo Mano, Kenichi Nagata, Shigeo Murayama, Takaomi C. Saido, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata Epigenome wide analysis of neuron specific DNA methylation in Alzheimer disease. The 13th International Congress of Human Genetics 2016, Kyoto, Japan, 口演, 2016/4/5

Tatsuo Mano, Shigeo Murayama, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata. Epigenetic regulation of BRCA1 in Alzheimer's disease. Evaluation of post-mortem brain and model mice reveals importance of aggregated tau. AAIC (Alzheimer's association International Conference) 2016. Toronto, ON, Canada, 2016/7/25 (予定)

Atsushi Iwata, Tatsuo Mano, Ryo Ohtomo, Kenichi Nagata, Takaomi Saido, Satoshi Yamashita, Toshikazu Ushijima, Tadafumi Hashimoto, Akira Tamaoka, Takeshi Iwatsubo, Shoji Tsuji. Neuron-specific methylome analysis reveals new pathomechanism in Alzheimer's disease brains. AAIC (Alzheimer's association International Conference) 2016, Toronto, ON, Canada. 2016/7/25 (予定)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

アルツハイマー病に関連するゲノム配列変異の解析システムの構築

研究代表者 中谷明弘¹⁾

研究分担者 池内健²⁾, 春日健作²⁾, 菊地正隆¹⁾

¹⁾大阪大学大学院医学系研究科 ゲノム情報学 ²⁾新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学

研究要旨

アルツハイマー病の2つの疾患群(家族性早期発症型/孤発性晩期発症型)および健常検体群に分類される脳研究所が保有する約2,000名を想定して、ゲノム配列の変異情報(一塩基変異やコピー数変異など)を俯瞰的に解析および可視化するソフトウェアを開発する。脳研究所にて既に蓄積している Affymetrix 社製アレイ系によるデータから配列変異情報の抽出を実現する処理パイプラインを構築し、そこで抽出した変異情報のデータベースの構築を可能とするシステムの開発を行う。構築したデータベースを用いて疾患との関連解析を行った結果の可視化を行い、抽出した知見の当該疾患の研究現場への還元を目指す。本研究では、コピー数変異(CNV)領域や一塩基変異(SNV)の連鎖不平衡(LD)領域を例とした染色体上での範囲情報を伴う変異に注目する。それによって、個々の塩基位置のみではなく、染色体領域と疾患との関連に注目することにより、検体群や疾患家系内でのゲノムワイドな変異情報の特性を明らかにする。さらに、遺伝子の発現量や、脳研究所にて公開している変異情報の文献データベースである JFADdb (Japanese Familial Alzheimer's Disease Database)等とのデータベースとの連携、および、次世代シーケンサによる全エクソーム解析/全ゲノム解析(WEA/WGA)情報との連携も検討する。

A. 研究目的

アルツハイマー病の2つの疾患群(家族性早期発症型/孤発性晩期発症型)および健常検体群に分類される約2,000名のゲノム配列の Affymetrix 社製アレイ系による変異情報(一塩基変異やコピー数変異)をはじめとする網羅的なデータを俯瞰的に解析および可視化するデータベースおよびソフトウェアを開発する。コピー数変異領域や一塩基変異の連鎖不平衡領域を例とした染色体上での範囲情報を伴う変異の標的疾患との関連を明らかにすることを目指す。また、本研究で整備するリソースと脳研究所にて公開している変異情報の文献データベースである JFADdb をはじめとする既存のデータベースとを連携させることによって日本人・アルツハイマー病に関連するゲ

データベースの統合化を行う。

B. 研究方法(倫理面への配慮を含む)

アルツハイマー病の2つの疾患群(家族性早期発症型/孤発性晩期発症型)および健常検体群に含まれる約2,000名のゲノム配列の変異情報(一塩基変異およびコピー数変異)を俯瞰的に解析および可視化するソフトウェアを開発する。本研究では、疾患群単位での変異情報の集計や疾患との関連が期待される変異領域の抽出、および、そこで抽出した変異情報のデータベースの構築するための手法の開発を行う。構築したデータベースを用いて疾患との関連解析を行った結果の可視化を行い、抽出した知見の当該疾患の研究現場への還元を目指す。

Nakaya A, Kikuchi M, Miyashita A, Hara N, Kasuga K, Nishida N, Tokunaga K, Kuwano R, and Ikeuchi T, Genomic structure and distribution of copy number variations in relation to Japanese Alzheimer's disease, Biochemistry and Molecular Biology, BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会), Kobe, December 1-4, 2015

Nakaya A, Kikuchi M, Miyashita A, Hara N, Kasuga K, Nishida N, Tokunaga K, Kuwano R, and Ikeuchi T, AD/GD CNVdb (Alzheimer's Disease Genomic Databases, Copy Number Variation Database), 生命医薬情報学連合大会2015年大会 (日本バイオインフォマティクス学会2015年年会), 京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ, 2015年10月29日~31日

菊地 正隆, 原 範和, 長谷川 舞衣, 宮下 哲典, 桑野 良三, 池内 健, 中谷 明弘「アルツハイマー病感受性領域が近接する染色体領域の同定」, 第 60 回日本人類遺伝学会年会, 京王プラザホテル(新宿), 2015 年 10 月 14 日(水)~17 日(土)

Kikuchi M, Hara N, Hasegawa M, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T, and Nakaya A, Identification of chromosomal regions interacting with susceptibility loci for Alzheimer's disease, American Society of Human Genetics 2015 Annual Meeting (ASHG2015), Baltimore, Maryland, USA, October 6-10, 2015.

菊地 正隆, 原 範和, 長谷川 舞衣, 宮下 哲典, 桑野 良三, 池内 健, 中谷 明弘「アルツハイマー病感受性領域が近接する染色体領域の同定」, 第 34 回日本認知症学会学術集会, リンクステーション青森・ホテル青森, 2015 年 10 月 2 日(金)~4 日(日)

Kikuchi M, Hara N, Hasegawa M, Miyashita A,

Kuwano R, Ikeuchi T, and Nakaya A, Identifying chromosomal regions interacting with Alzheimer's disease GWAS SNPs, QBiC Symposium 2015, 理化学研究所生命システム研究センター, 大阪, 2015 年 8 月 24 日~26 日

Kasuga K, Kikuchi M, Tokutake T, Nakaya A, Tezuka T, Tsukie T, Hara N, Miyashita A, Kuwano R, and Ikeuchi T, Systematic review of Japanese familial Alzheimer's disease and FTDP-17, Alzheimer's Association International Conference 2015 (AAIC2015), Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC, July 18-23, 2015

春日健作, 菊地正隆, 徳武孝允, 手塚敏之, 月江珠緒, 原範和, 宮下哲典, 中谷明弘, 桑野良三, 西澤正豊, 池内健, 本邦における家族性アルツハイマー病データベース (Japanese Familial Alzheimer's Disease database, JFADdb) の構築, 第 56 回日本神経学会新潟学術大会, 朱鷺メッセ: 新潟コンベンションセンター, 新潟, 2015 年 5 月 23 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

バイオメタル・トランスポーターの動態と神経変性疾患に関する研究

研究代表者 保住 功¹⁾

研究分担者 位田 雅俊¹⁾、栗田 尚佳¹⁾、柿田 明美²⁾、豊島 靖子²⁾

1) 岐阜薬科大学 薬物治療学研究室 2) 新潟大学 脳研究所

研究要旨

これまでに筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の脳髄液で亜鉛濃度の上昇、ALS 患者脊髄中において亜鉛輸送体である *SLC30A3* 発現量の有意な低下を報告している。以上より、神経における亜鉛代謝異常が ALS 発症に関わっている可能性がある。さらに近年、ALS の病因として小胞体ストレスの関与が報告されていることから、本研究では、小胞体ストレスに対する *SLC30A3* の変動と防御効果について検討した。ヒト神経芽腫 (SH-SY5Y)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) においてツニカマイシン処置により、*SLC30A3* mRNA が有意に上昇した。また、siRNA を用いて *SLC30A3* をノックダウンした HEK293 に対してツニカマイシンを 24 時間処置したところ、細胞生存率が有意に低下した。これらのことから、*SLC30A3* の小胞体ストレスに対する防御効果が示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は原因不明の神経変性疾患であり、明確な発症機構は明らかにされていない。これまでに ALS 患者の脳髄液中で亜鉛濃度の上昇を確認しており (Hozumi et al., *J Neurol Sci*, 2011)、また、我々は ALS 患者の脊髄中において亜鉛トランスポーターである *SLC30A3* 発現量の有意な低下を報告している (Kaneko et al., *J Neurosci Res*, 2015)。以上より、神経における亜鉛代謝異常が ALS 発症に関わっている可能性がある。そこで、本研究では、小胞体ストレスを与えたときの *SLC30A3* の変動と防御効果について検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

ヒト神経芽腫細胞 (SH-SY5Y)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) にツニカマイシンを 0、1、3、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SH-SY5Y)、または 0、0.5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HEK293) の終濃度で 24 時間処置し、細胞生存率について調べた。また、ツニカマイシンを 4 時間処置したときの *SLC30A3* mRNA を Real time RT-PCR によって

測定した。そして、*SLC30A3* の細胞内局在について蛍光免疫染色法を用いて検討した。さらに、siRNA を用いて *SLC30A3* をノックダウンした細胞に対しても同様にツニカマイシンを処置し、細胞生存率について調べた。

C. 研究結果

SH-SY5Y 細胞にツニカマイシンを 24 時間処置したところ、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で細胞生存率は約 60% であり、一方、HEK293 細胞では 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で細胞生存率は約 70% であった。次に、細胞が約 80% 生き残るツニカマイシン濃度 (SH-SY5Y: 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、(HEK293: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の処置により *SLC30A3* mRNA が有意に上昇した。さらに蛍光免疫染色法の結果から、*SLC30A3* は SH-SY5Y 細胞、HEK293 細胞ともに小胞体において局在していた。また、siRNA を用いて *SLC30A3* をノックダウンした HEK293 細胞に対してツニカマイシンを 24 時間処置したところ、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で細胞生存率は約 70% であり、*SLC30A3* のノックダウンにより、ツニカマイシンによる細胞死が増強され

ていることが示唆された。

D. 考察

小胞体ストレスによって *SLC30A3* mRNA 発現量が上昇した。また小胞体において *SLC30A3* が存在し、小胞体ストレスによる細胞死が *SLC30A3* のノックダウンによって増強されることを確認した。これらのことから、*SLC30A3* の小胞体ストレスに対する防御効果が示唆された。

E. 結論

SLC30A3 は小胞体ストレスに対して応答し、防御効果を示す可能性が示唆された。今後は、*SLC30A3* の防御効果のメカニズムの解明および、ALS モデル細胞を用いた検討も必要と考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1). 奥田莉加、栗田尚佳、井上綾子、市川かおり、位田雅俊、保住功「小胞体ストレス曝露による ZnT3 発現量および細胞内亜鉛の検討」メタルバイオサイエンス研究会 2015・2015年8月28日・名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

Gut microbiota の制御が脳虚血病巣進展に及ぼす影響

研究代表者 西山 康裕¹⁾
研究分担者 五十嵐 博中²⁾

1) 日本医科大学武蔵小杉病院 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

脳梗塞における組織炎症に免疫系が大きく関与していることが解明されつつある。この免疫系の制御に重要な役割を果たしている機構の一つに腸管免疫を修飾する Gut microbiota (腸内細菌叢) があるが、現時点において microbiota の制御により脳梗塞病巣の進展が変化する可能性についての研究はなされていない。本研究では、抗生物質を 2 週間経口投与した後に脳虚血モデルを作成し、24 時間後の脳梗塞サイズおよび神経スコアを検証した。結果は、vehicle 群と抗生物質投与群の間にいずれも有意な差を認めなかったが、梗塞サイズの検討では vehicle 群が健常側比 48.5% であるのに対して、抗生物質投与群では 57.8% と 19.0% の梗塞サイズ拡大を認めている。本実験系では虚血後急性期に観察した梗塞サイズにおいては、両群での差が有意とならなかったものの、脳内に侵入した免疫担当細胞がさらに活性化する 72 時間以降での現象を検討することが必要であると考えており、現在進行中である。

A. 研究目的

臨床において、脳虚血による死亡・後遺症はその頻度の高さ、社会的な損失の大きさから重要な問題となっているが、予後改善が認められた治療は早期の血管再開通のみであるという現状である。一方で動物実験レベルでは、免疫寛容により梗塞巣の縮小・予後の改善が認められるなど、脳梗塞における組織炎症に免疫系が大きく関与していることが解明されつつある。この免疫系の制御に重要な役割を果たしている機構の一つに腸管免疫を修飾する Gut microbiota (腸内細菌叢) があるが、現時点において microbiota の制御により脳梗塞病巣の進展が変化する可能性についての研究はなされていない。

我々は腸管免疫修飾が脳梗塞巣進展に及ぼす影響を検討するために、種々の microbiota 修飾モデルマウスに脳梗塞巣を作成し、腸管免疫と急性期脳虚血における炎症の関連性について解明する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

- 急性脳虚血を惹起させるために、8 週から 10 週齢の C57BL/6J マウスを用いて、総頸動脈からシリコンコートした塞栓糸を挿入して中大脳動脈内を閉塞し、60 分後に塞栓糸を抜去し、急性脳梗塞モデルとした (中大脳動脈閉塞術 (MCAO モデル))。
- 腸管の microbiota を修飾するため、抗生物質含有水による下痢・食思不振・体重低下等の報告を認めない (Li M. et al. *Immunity*, Vol. 43, 527-, 2015) Ampicillin, Neomycin, Vancomycin, Metronidazole 剤の混合投与を行った。具体的には Ampicillin (1g/L), Neomycin (1g/L), Vancomycin (0.5g/L), Metronidazole (0.25g/L) を飲料水に溶解し、14 日間投与を続けた。
- 60 分脳虚血作成 24 時間後に断頭した後、TTC 染色を行い、TTC 染色で染色されない梗塞巣を両群間で比較した。このとき、皮質領域、

基底核領域については各々測定した。また、同時に脳浮腫率も測定した。さらに、脳虚血前および24時間後に神経学的スコアを計測し、両群間で比較した。なお、脳浮腫率は脳浮腫率(%) = [虚血半球 - 対側半球] × 100 / 対側半球で計算した。

C. 研究結果

1. 平均の飲水量は両群ともに一日6mLで有意差を認めなかった。
2. 抗生物質投与14日間でマウスの体調に変化は認めず、死亡例はなかった。
3. 虚血後24時間の梗塞サイズにおいて、健常側比にて皮質、基底核および全脳いずれにおいてもvehicle群と抗生物質投与群に統計学的有意差を認めなかった(皮質; 32.01 ± 4.73 vs 37.1 ± 7.01 % of control, respectively, n=10) (基底核; 16.53 ± 3.79 vs 20.6 ± 6.14 % of control) (全脳; 48.54 ± 5.70 vs 57.80 ± 12.49 % of control)。脳浮腫率においても、両群間で有意差を認めなかった。

D. 考察

食物等を介して多数の異物が侵入する腸管は体内で最も大きなリンパ器官の一つであり、我々が摂取する様々な飲食物を通して、病原微生物だけでなく、アレルゲンや毒性を持つ物質と恒常的に接触する。こうした点から、腸管は侵入異物の監視役を演じているものと推察される。腸管粘膜には全末梢リンパ球の6割、抗体産生性B細胞の8割が集結すると言われ、実際には腸管上皮細胞や腸管上皮細胞間Tリンパ球(intestinal intraepithelial lymphocytes: IEL)が恒常的あるいは感染などの刺激に反応してサイトカインを発現している。

最近、これらの粘膜免疫は消化管内だけではなく、全身の免疫システム制御に影響すると注目されている。腸管粘膜機構の恒常性が乱れ、腸内細菌叢の構成が変化し、一旦バランスが乱れた状態になると、全身の免疫系を過剰に活性化して自己免疫疾患などの炎症を悪化させることがわかっている。実際に我々はB細胞を欠損するマウスに腸管上皮細胞の再生速度が著しく亢進することを発見したが、この現象は広域スペクトルを持つ

抗生物質を経口投与することにより正常化されることがわかった。すなわち、腸内細菌叢の変化が恒常性に変化を与えることが明らかとなった。

こうした現象に加え、近年脳梗塞は組織炎症の一つであり、免疫系が大きく関与している可能性があるとの報告が相次いでおり、腸内細菌叢の変化が脳虚血のシステムに関連するかに注目した。我々がpreliminaryに行った抗生物質を2週間経口投与した後に脳虚血モデルを作成し、24時間後の脳梗塞サイズおよび神経スコアを検証した結果は、vehicle群と抗生物質投与群の間にいずれも有意な差を認めなかった。しかしながら、梗塞サイズの平均値ではvehicle群が対側比48.5%であるのに対して、抗生物質投与群では57.8%と19.0%の梗塞サイズ拡大を認めている。本実験系は薬剤投与や遺伝子操作を加えた実験などによる特定の分子を標的とした実験系ではないため、虚血後急性期に観察した梗塞サイズにおいては、両群での差が有意とならなかったものの、脳内に侵入した免疫担当細胞がさらに活性化する72時間以降での現象を検討することが必要であると考えている。経時的に両群間で差が認められるようになれば、この差を見いだす免疫担当細胞を検証し、分子生物学的アプローチにより、さらに病態を解明していくことが可能であると考えている。

E. 結論

1. 抗生物質を2週間経口投与した後に60分間中大脳動脈閉塞術を作成し、24時間後の脳梗塞サイズおよび神経スコアを検証したが、vehicle群と抗生物質投与群の間にいずれも有意な差を認めなかったが、梗塞サイズではvehicle群が健常側比48.5%であるのに対して、抗生物質投与群では57.8%と19.0%の梗塞サイズ拡大を認めた。
2. 本実験系は薬剤投与や遺伝子操作を加えた実験などによる特定の分子を標的とした実験系ではないため、虚血後急性期においては、統計学的に梗塞サイズの差が有意とならなかったが、免疫担当細胞がさらに活性化する72時間以降での現象を検討することが必要と考え、今後の検討課題とする。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

異常凝集体の形成と伝播による神経細胞死機構の解明

研究代表者 星 美奈子¹⁾
研究分担者 柿田 明美²⁾

1) 京都大学大学院医学研究科 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

我々は、新潟大学脳研究所より剖検脳の供与を受けることで、世界で初めてアルツハイマー病患者脳より極めて強い神経毒性を持つ球状の $A\beta$ 集合体=Amylospheroids (以下、ASPD) を単離した (Noguchi *et al.*, JBC2009)。本研究では、これまでの新潟大学脳研究所との共同研究成果をさらに発展させるため、ASPD が成熟神経細胞に選択的に結合することで細胞死を起こすことに着目し、神経細胞膜上の ASPD 標的タンパク質を同定して下流の細胞死シグナル伝達経路を解明し、それにより新たな治療法開発への基盤を提供することを目的に進めてきた。それに加えて、過去の共同研究で培ったノウハウ及び成果を生かし、残された課題である、そもそも「なぜ異常凝集体が形成され広まるのか」というアルツハイマー病の発症機構に迫るため、病理組織化学、生化学、構造生物学を駆使した研究を進めたいと考えている。これについては、特に $A\beta$ 線維について、将来的に患者ごとの構造プロファイリングを取ることを目指して、初年度は方法論の確立を目指した研究を進めた。

A. 研究目的

アルツハイマー病の原因は、アミロイド β ($A\beta$) の異常凝集体とされているが、臨床症状と最も相関する神経細胞死が、どの凝集体でどのように起こるかは不明であった。この状況で、様々な治療薬が、神経細胞死を伴わない齧歯類疾患モデルを用いて行われたが、多くは失敗に終わっている。従って、安全で有効な治療法開発のためには、ヒトでの病態を解明し、それに基づく治療法と早期診断システムを開発することである。

研究代表者である星は、柿田博士との共同研究により、患者脳から神経細胞死活性を持つ $A\beta$ 集合体「アミロスフェロイド (ASPD)」を世界初めて単離するに至った (Noguchi *et al.*, JBC2009)。その後の共同研究により、ASPD は、あるシナプス膜タンパク質 (ターゲット分子) に特異的に結合し、神経細胞死を誘導することを見出し、患者脳では実際に ASPD 量と相関してターゲット分子を持つ神経細胞が脱落することを明らかにした。

これにより、初めて神経細胞死の原因と機序について明快な説明が可能となった。更に、ASPD に結合するペプチド (ASPD 結合ペプチド) を同定し、これが ASPD の神経細胞死活性を中和することも明らかにした (Ohnishi *et al.*, PNAS2015)。

本共同研究では、過去の共同研究で培ったノウハウ及び成果を生かし、残された課題である、そもそもなぜ異常凝集体が形成され、広まるのかという、アルツハイマー病の発症機構の解明を試みる。ASPD については、我々は既にラット神経において、特定のタイプの神経細胞内で形成されることを見出しており (投稿準備中)、患者脳での解析を行いたいと考えている。さらに、線維についても、特定の $A\beta$ 種だけで形成される、過去に報告のない新たな構造体を試験管において見出しており (Xio *et al.*, Nat. Str. Mol. Bio.2015)、これが患者脳に存在するのかどうかを検証したい。これらの研究を足がかりに、ヒト脳で異常凝集体がどの部位でどのような機構で形成され、それがど

のように伝播していくのかについて、病理組織化学、生化学、構造生物学を駆使した研究で迫りたい。

B.研究方法

上記目的を達成するために、引き続き以下の研究を実施する。

- (1) ASPD は特定の神経細胞内で形成され細胞外に放出されることがラット神経細胞を用いた研究から明らかになった (Komura, Hoshi et al.投稿準備中)。そこで、既に確立した抗 ASPD 抗体を用いた組織染色及び電子顕微鏡観察により、ヒト患者脳において、細胞内で ASPD 形成が起こるのかどうかを検証する。
- (2) A β は可溶性構造体以外に不溶性構造体である線維を形成するが、実はその構造にはバリエーションがあることが明らかになりつつある (Lu et al. Cell2013)。共同研究者である Prof. Ishii のラボでは、線維になる凝集核をシードとすることで、ある特定の線維構造を増幅し、NMR によって構造解析する手法を確立しており、これを用いて、新たに見出された特定の A β 種だけで形成される構造体 (Xio et al. Nat. Str. Mol. Bio.2015) が患者脳内に存在するののかどうか解析を行い、重症度との相関などについても検証を行う。

ヒト由来試料から ASPD を調製して用いる場合は、剖検脳を新潟大学脳研究所より供与を受ける。これについては、既に科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会「機関内倫理審査委員会の在り方に関する報告書」(平成 15 年 3 月 20 日) に従い、各機関内倫理・安全委員会の審査を受け、承認を受けている。実験に際しては、ご遺族の承諾を得てその範囲を守り、連結可能匿名化により個人情報を保護した上で、所定の設備の整った実験室にて安全に配慮して行った。

C.研究結果

初年度の研究により、ASPD については、ASPD が結合し毒性を発揮するターゲット分子が成熟神経細胞にのみ発現するシナプス膜タンパク質 Na, K-ATPase ポンプの活性ユニットである $\alpha 3$ であることを見出し、ASPD の結合によって Na, K-ATPase ポンプ活性が消失し、膜電位が上昇し神経細胞死が起きるといった分子メカニズムを解明した。これにより、なぜアルツハイマー病において成熟した成人神経が脱落するかについて実際の病態と合う明解な説明を与えた。さらに、ASPD 結合ペプチドは ASPD がターゲット分子 Na, K-ATPase $\alpha 3$ に結合することを阻止することで ASPD の神経毒性を抑制することも明らかにした。以上により、治療法開発への道を拓くことに成功した (Ohnishi et al. PNAS2015)。線維についても、患者由来の線維をシードとして、オリジナルな構造をミミックした線維を試験管内で再構築出来る手法を確立し、それにより特定の A β 種だけで形成される、過去に報告のない新たな構造体を試験管において見出した (Xio et al. Nat. Str. Mol. Bio.2015)。この手法を生かして、次年度以降に複数の患者脳由来の線維について解析を試みたいと考えている。

D.考察

上記の結果から、ASPD は病態と相関して患者脳に蓄積し、その量と相関してターゲット分子を発現する神経細胞の脱落が起きていることが強く示唆された。次の課題として、ASPD の蓄積はいつから起きているのかという問題が残されている。アルツハイマー病の初期像を再現している齧歯類モデルでは、神経細胞脱落が認められないが、そこでは ASPD も蓄積していないことなどを考えると、発症の前、軽度認知症の段階で蓄積が始まっているのではないかと考えられるが、軽度認知障害の場合、その後必ずしもアルツハイマー病を発症するとは限らないため、これについては今後の課題と考えている。

E. 結論

上記のとおり、極めて順調に研究を進めることが出来た。上記の結果から、ASPD は病態と相関して患者脳に蓄積し、その量と相関してターゲット分子を発現する神経細胞の脱落が起きていることが強く示唆された。次の課題として、ASPD の蓄積はいつから起きているのかという問題が残されている。アルツハイマー病の初期像を再現している齧歯類モデルでは、神経細胞脱落が認められないが、そこでは ASPD も蓄積していないことなどを考えると、発症の前、軽度認知症の段階で蓄積が始まっているのではないかと考えられるが、軽度認知障害の場合、その後必ずしもアルツハイマー病を発症するとは限らないため、これについては今後の課題と考えている。これを是非、継続課題として検証したい。また、線維についても方法論が確立出来、興味深い結果が得られつつあるため、是非、患者脳由来の試料を用いた解析を行いたいと考えている。いずれも、非常に高いレベルを持つ新潟大学脳研の試料であるからこそ実施出来る課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Xiao, Y., Ma, B., McElheny, D., Parthasarathy, S., Long, F., Hoshi, M., Nussinov, R., and *Ishii, Y. (2015) **A β (1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimers's disease** *Nature Str. Mol. Biol.* 22, 499-U97 advanced on line publication

Parthasarathy, S., Inoue, M., Xiao, Y., Matsumura, Y., Nabeshima, Y., Long, F., Hoshi, M., and *Ishii, Y. (2015) **Structural Insight into an Alzheimer's Brain-Derived Spherical Assembly of Amyloid β by Solid-state NMR** *J. Amer. Chem. Soc.* 137, 6480-6483

Ohnishi, T., Yanazawa, M., Sasahara, T., Kitamura, Y., Hiroaki, H., Fukazawa, Y., Kii, I.,

Nishiyama, T., Kakita, A., Takeda, H., Takeuchi, A., Arai, Y., Ito, A., Komura, H., Hirao, H., Satomura, K., Inoue, M., Muramatsu, S., Matsui, K., Tada, M., Sato, M., Saijyo, E., Shigemitsu, Y., Sakai, S., Umetsu, Y., Goda, N., Takino, N., Takahashi, H., Hagiwara, M., Sawasaki, T., Iwasaki, G., Nakamura, Y., Nabeshima, Y., Teplow, D. B., and *Hoshi, M. (2015) **Na,K-ATPase α 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112, E4465-E4474

2. 学会発表

アルツハイマー病で起こる神経細胞死の新たなターゲット分子の発見、星美奈子 (2015年10月20日) 東京大学大学院農学生命科学研究科 田之倉優教授主催 第4回食品薬品生物構造学研究会 (静岡) (招待講演)

Na⁺,K⁺-ATPase α 3 Is a New Death Target of Alzheimer Amyloid- β Assembly, Hoshi, M., 4th International European Neurodegenerative Diseases & Optogenetics Europe-2015 Meeting, University of Cambridge, UK, Nov 2-3, 2015

Na⁺,K⁺-ATPase α 3 Is a New Death Target of Alzheimer Amyloid- β Assembly, Hoshi, M., KU LEUVEN, Bergium, Nov 5, 2015

アルツハイマー病患者脳由来のアミロイド β 凝集体アミロスフェロイドの発見から成熟神経細胞の分子機構の解明までの道のり、星美奈子

(2015年12月17日) 明治大学大学院 構造細胞生物学持論/細胞生物学持論 (招待講演)

アルツハイマー病で起こる神経細胞死の新たな分子メカニズムの発見と革新的治療法の開発、星美奈子 (2016年1月9日) 第4回 AAA (Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research) (東京) (招待講演)

アルツハイマー病患者脳由来のアミロイド β 凝集体アミロスフェロイドの発見から成熟神経細胞死の分子機構の解明までの道のり、星美奈子

(2016年2月1日) 新潟大学脳神経研究会 (新潟) (招待講演)

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

セロトニン 5A 受容体の生理的役割の解明

研究代表者 山中 章弘¹⁾
研究分担者 崎村 建司²⁾、犬束 歩¹⁾

1) 名古屋大学環境医学研究所 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

セロトニン神経は脳内に幅広く投射しており、リズム、気分、情動や痛みの知覚など広範な生理機能を担っている。一つの伝達物質がこのように多くの生理機能に関わっている理由の一つとして、受容体が 11 種類もあり多様なことが挙げられる。それら受容体のうち、セロトニン 5A 受容体は中枢神経系に発現するが、その機能はほとんど分かっていない。本研究では、セロトニン 5A 受容体の生理機能について部位特異的遺伝子欠損マウスと、セロトニン 5A 受容体発現神経機能操作マウスを用いて明らかにすることを目的としている。これらの研究に必要な遺伝子改変マウスを本研究において作出し、セロトニン神経の生理機能について明らかにする。

A. 研究目的

セロトニン神経は脳内に幅広く投射しており、リズム、気分、情動や痛みの知覚など広範な生理機能を担っている。一つの伝達物質がこのように多くの生理機能に関わっている理由の一つとして、受容体が 11 種類もあり多様なことが挙げられる。セロトニン 5A 受容体は中枢神経系に発現するが、その機能はほとんど分かっていない。本研究では、セロトニン 5A 受容体の生理機能について部位特異的遺伝子欠損マウスと、セロトニン 5A 受容体発現神経機能操作マウスを用いて明らかにすることを目的としている。これらの研究に必要な遺伝子改変マウスを本研究において作出し、セロトニン神経の生理機能について明らかにする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

セロトニン 5A 受容体発現神経細胞の機能を操作するために、セロトニン 5A 受容体発現細胞に Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスを作成する。セロトニン 5A 受容体遺伝子に Cre リコンビナーゼ遺伝子をノックインすることで、セロトニン 5A 受容体発現細胞だけに Cre リコン

ビナーゼを発現させる。Cre リコンビナーゼ依存的に光遺伝学ツールであるチャンネルロドプシン 2 (ChR2) やアーキロドプシン (Arch) を発現するアデノ随伴ウイルスベクターと組み合わせることによって、セロトニン 5A 受容体発現神経細胞機能を操作する。その時に表出する個体レベルでの行動発現を解析することによって、セロトニン 5A 受容体発現神経細胞の機能を明らかにする。また、このマウスは全身性のノックアウトマウスとしても使用することが可能であり、セロトニン 5A 受容体機能が消失したときの表現型についても解析する。

次に、セロトニン 5A 受容体を部位特異的にノックアウトするために、flox マウスを作成する。特定神経だけに Cre リコンビナーゼ発現細胞と交配させることによって、Cre リコンビナーゼ発現細胞においてセロトニン 5A 受容体遺伝子を欠損させることができる。特に、視交叉上核においてセロトニン 5A 受容体遺伝子を脱落させた時に個体レベルでの日内リズム発現がどのように変化するのかについて解析する。

C. 研究結果

ES細胞を用いた相同組み替えによって、セロトニン5A受容体遺伝子座にCreリコンビナーゼをノックインしたキメラマウス(5ht5a-iCre)マウスを作成した。交配によりノックインマウスを得た。また、部位特異的にセロトニン5A受容体をノックアウトするために、相同組み替えを用いてセロトニン5A受容体の開始コドン含むエクソンをloxP配列で挟んだキメラマウス(flox-5ht5a)を作成した。交配によりノックインマウスを得た。これらの系統を確立したマウスを名古屋大学動物実験支援センターに搬入するために、クリーニングを行った。♂2匹から精子を採取し、体外受精を行い、受精卵を仮親の子宮に戻して産仔を得た。仮親の微生物モニタリングを行ったところ陰性であったため、飼育室への搬入を行った。野生型マウスとの交配を行い、産仔をジェノタイプングしてSPF施設においてラインの確立をおこなった。

D. 考察

セロトニン受容体の一つである5HT5A受容体の生理機能を明らかにするための遺伝子改変動物を作成することができた。セロトニン受容体は非常に数多く存在するが、受容体の構造が似ているなどから、特異的抗体を用いた発現部位の確認や、特異的拮抗薬等を用いた機能阻害が行えないために、その機能を明らかにすることが出来なかった。遺伝子工学の発展によって、特定遺伝子の遺伝子座にノックインを行うことで、細胞種特異的に外来遺伝子を発現させること、また組織特異的に脱落させることが可能となってきた。特に多くはCre/loxPを用いた組換えを応用することで達成されており、目的遺伝子のプロモーターでCreリコンビナーゼを発現する遺伝子改変動物の作成が機能同定に大きな役割を果たすことが十分証明されてきている。そこで、本研究では、5HT5A発現細胞特異的に遺伝子を発現させて、その神経機能を操作することで、生理機能を明らかにするための5HT5A-iCreマウスを作成した。また、細胞種特異的にCreを発現する動物と交配させることで、その部位における5HT5A受容体遺伝子を脱落させて機能欠損を引き起こすことが出来るマウスflox-5HT5Aマウスを作成した。今後これ

らのマウスを用いて5HT5A受容体の機能が明らかになることが予想される。

E. 結論

生理的役割が十分分かっていないセロトニン受容体の一つである、5HT5A受容体を解析するために、5HT5A発現細胞特異的に遺伝子発現が可能な5HT5A-iCreマウスおよび、部位特異的に5HT5A遺伝子を脱落させることが可能な5HT5A-floxマウスを作成しラインの確立に成功した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Black SW, Yamanaka A, Kilduff TS: Challenges in the development of therapeutics for narcolepsy. *Prog Neurobiol* (2015) PMID: 26721620.
2. Hososhima S, Yuasa H, Ishizuka T, Hoque MR, Yamashita T, Yamanaka A, Sugano E, Tomita H, Yawo H: Near-infrared (NIR) up-conversion optogenetics. *Sci Rep* (2015) 5:16533.
3. Ishii K, Kubo K, Endo T, Yoshida K, Benner S, Ito Y, Aizawa H, Aramaki M, Yamanaka A, Tanaka K, Takata N, Tanaka KF, Mimura M, Tohyama C, Takeyama M, Nakajima K: Neuronal heterotopias affect the activities of distant brain areas and lead to behavioral deficits. *J Neurosci* (2015) 35(36): 12432-12445.
4. Shibasaki K, Sugio S, Takao K, Yamanaka A, Miyakawa T, Tominaga M, Ishizaki Y: TRPV4 activation at the physiological temperature is a critical determinant of neuronal excitability and behavior. *Pflugers Arch* (2015) 467(12): 2495-507.
5. Mizoguchi H, Katahira K, Inutsuka A, Fukumoto K, Nakamura A, Wang T, Nagai T, Sato J, Sawada M, Ohira H, Yamanaka A, Yamada K: Insular neural system controls decision-making in healthy and methamphetamine-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 112(29): E3930-9.
6. Kato HE, Kamiya M, Sugo S, Ito J, Taniguchi R, Orito A, Hirata K, Inutsuka A, Yamanaka A, Maturana AD, Ishitani R, Sudo Y, Hayashi S, Nureki O: Atomistic design of microbial opsin-based blue-shifted optogenetics tools. *Nat Commun* (2015) 6:7177.
7. Manita S, Suzuki T, Homma C, Matsumoto T, Odagawa M, Yamada K, Ota K, Matsubara C, Inutsuka A, Sato M, Ohkura M, Yamanaka A, Yanagawa Y, Nakai J, Hayashi Y, Larkum ME, *Murayama M: A top-down cortical

circuit for accurate sensory perception. *Neuron* (2015) 86(5):1304-16.

2. 学会発表

1. 山中章弘、2015 年度第 2 回バイオ単分子研究会 (平成 28 年 3 月 30 日～31 日)
2. 山中章弘、日本薬学会第 136 年 (平成 28 年 3 月 26 日～29 日)
3. 山中章弘、第 93 回日本生理学会大会 (平成 28 年 3 月 22 日～24 日)
4. 山中章弘、犬束 歩、山下 哲、第 89 回日本薬理学会年会 (平成 28 年 3 月 9 日～11 日)
5. 山中章弘、千里ライフサイエンスセミナー (平成 28 年 2 月 26 日)
6. 山中章弘、第 67 回 埼玉大学脳科学セミナー (平成 28 年 2 月 24 日)
7. 山中章弘、大阪精神科診療所協会学術研究会 (平成 28 年 2 月 27 日)
8. 山中章弘、大脳新皮質構築終了国際シンポジウム「Neocortical Organization III」 (平成 28 年 2 月 11 日～12 日)
9. 山中章弘、第 29 回上田記念講演会 (平成 28 年 1 月 9 日)
10. 山中章弘、日米科学技術協力事業「脳研究」分野研究成果報告会 (平成 27 年 12 月 19 日)
11. 山中章弘、International Symposium Optogenetics 2015 (平成 27 年 12 月 4 日～5 日)
12. 山中章弘、医用光学・分光学系合同研究会 (平成 27 年 12 月 3 日)
13. 山中章弘、平成 27 年度生理学研究所研究会 大脳皮質の機能原理を探る (平成 27 年 12 月 3 日～4 日)
14. 山中章弘、第 42 回日本脳科学会 (平成 27 年 11 月 12 日)
15. 山中章弘、宮崎大学医学部精神科医講演会 (平成 27 年 11 月 11 日)
16. 山中章弘、第 68 回日本自立神経学会総会 (平成 27 年 10 月 29 日～30 日)
17. 山中章弘、比較記憶研究会 (平成 27 年 10 月 8 日～9 日)
18. 山中章弘、岡山睡眠薬理研究会 (平成 27 年 10 月 2 日)
19. 山中章弘、不眠症とオレキシン研究会 (平成 27 年 9 月 26 日)
20. 山中章弘、第 42 回日本神経内分泌学会 (平成 27 年 9 月 18 日～19 日)
21. 山中章弘、2015 年光化学討論会 (平成 27 年 9 月 9 日～11 日)
22. 山中章弘、Meeting of Sleep and Diabetes (平成 27 年 8 月 5 日)
23. 山中章弘、第 38 回日本神経科学大会 (平成 27 年 7 月 28 日～31 日)
24. 山中章弘、田中謙二、喫煙科学財団第 30 回平成 25 年度助成研究発表会 (平成 27 年 7 月 23 日)
25. 山中章弘、RIKEN BSI Summer Program Lecture Course (平成 27 年 7 月 20 日～24 日)
26. 山中章弘、犬束 歩、山下 哲、日本睡眠学会第 40 回定期学術集会 (平成 27 年 7 月 2 日～3 日)
27. 山中章弘、第 11 回帝京大学バイオカフェ 特別セミナー (平成 27 年 7 月 2 日)
28. 山中章弘、山陰周術期管理研究会 (平成 27 年 6 月 27 日)
29. 山中章弘、第 56 回日本神経学会学術大会 (平成 27 年 5 月 20 日～23 日)
30. 山中章弘、尾北医師会学術講演会 (平成 27 年 5 月 16 日)
31. 山中章弘、Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism (平成 27 年 4 月 30 日～5 月 3 日)
32. 山中章弘、岡崎内科医会学術講演会 (平成 27 年 4 月 24 日)
33. 山中章弘、犬束 歩、他 第 88 回日本内分泌学会学術総会 (平成 27 年 4 月 23 日～25 日)
34. 山中章弘、Tokyo Mental Disorder Conference (平成 27 年 4 月 4 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

遺伝子ターゲティングによる ChR2/ArchT レポーターマウスの作成

研究代表者 井樋 慶一¹⁾

研究分担者 崎村 建司²⁾

¹⁾ 東北大学大学院情報科学研究科 ²⁾ 新潟大学脳研究所

研究要旨

チャンネルロドプシンは今や脳科学の実験手法として不可欠であり、チャンネルロドプシン-floxed 遺伝子を特定のニューロンに発現させた実験系の必要性が日増しに高まっている。微量注入法を用いてウイルスベクターをドライバーマウス脳内に注入するという従来の方法にはいくつか問題点が指摘されており、Cre-loxP 系の作動原理によりチャンネルロドプシンを発現させるレポーターマウスの作成が望まれる。そこで、本研究課題では従来の問題を克服し、Cre ドライバーマウスと交配することにより組織（細胞）特異的に ChR2 が発現するレポーターマウスを作成した。また、ストレス研究に不可欠なコルチコトロピン放出因子（CRF）遺伝子座に ChR2 遺伝子がノックインされたマウスも新たに作成した。これらのマウスは今後、脳科学領域に広く用いられ未解決の問題を解くためのブレイクスルーとなるであろう。

A. 研究目的

チャンネルロドプシンは今や脳科学の実験手法として不可欠であり、チャンネルロドプシン-floxed 遺伝子を特定のニューロンに発現させた実験系の必要性が日増しに高まっている。しかしながら、微量注入法を用いてウイルスベクターをドライバーマウス脳内に注入するという従来の方法にはいくつか問題点が指摘されている。たとえば、この技術にはウイルスベクター導入方法（微量注入法）に起因したいくつかの欠点がある。すなわち、注入量や拡散範囲が個体ごとに異なるため同一条件を再現することができない。また、拡散範囲が不十分で目的とするニューロンにチャンネルロドプシンが発現しない場合がある。加えて、実験終了後全個体で注入領域を組織学的に確認する労力が要る。そこで、Cre-loxP 系の作動原理によりチャンネルロドプシンを発現させるレポーターマウスの作成が望まれる。本研究課題では従来の問題を克服し、Cre ドライバーマウスと

交配することにより組織（細胞）特異的に ChR2 が発現するレポーターマウスを作成することを目的とする。また、ストレス研究に不可欠なコルチコトロピン放出因子（CRF）遺伝子座に ChR2 遺伝子がノックインされたマウスも新たに作成する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

まず相同組換えのためのターゲティングベクターとして、CAG プロモーター下に floxstop-ChR2 (H134R)、または、floxstop-ArchT 遺伝子、さらに標識マーカーとして mCherry、または、変異型 YFP (Venus) 遺伝子を結合した DNA コンストラクトを作成する。これらのベクターを RENKA 株 ES 細胞内にエレクトロポレーションし、相同組換えによって β -actin 遺伝子下流に位置する non-coding 領域に挿入する。Southern blot により同定された陽性クローンを胚盤胞に注入し、得られたキメラマウスから germ line transmitted

line を選別しヘテロ接合体を得る。これらを交配しホモ接合体を得てライン化する。

本研究で作成されたチャンネルロドプシンレポーターマウスと様々なCre ドライバーマウスとの交配によりニューロン選択的光操作実験系を構築することができる。これは従来ウイルスベクターを用いて行われていたほとんど全ての光操作実験に応用可能であり、高い汎用性を具えた極めて有用な実験ツールである。

同様の手法を用い、CRF 遺伝子座に ChR2 遺伝子をノックインする。

C. 研究結果

本研究課題では従来の問題を克服し、Cre ドライバーマウスと交配することにより組織（細胞）特異的に ChR2 が発現するレポーターマウスを作成した。また、ストレス研究に不可欠なコルチコトロピン放出因子（CRF）遺伝子座に ChR2 遺伝子がノックインされたマウスも新たに作成した。

D. 考察

これらのマウスは今後、脳科学領域に広く用いられ未解決の問題を解くためのブレイクスルーとなるであろう。現在、これらのマウスを用い、細胞特異的に ChR2 が発現することを検証中である。

E. 結論

Cre-loxP 系で作動する ChR2 が発現レポーターマウス、および、コルチコトロピン放出因子（CRF）遺伝子座に ChR2 遺伝子がノックインされたマウスを作成した。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Itoi K, Talukder AF, Fuse T, Kaneko T, Ozawa R, Sato T, Sugaya T, Uchida K, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Sakimura K (2014) Visualization of corticotropin-releasing factor neurons by fluorescent proteins in the mouse brain and characterization of labeled neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*, 155, 4054-4060.

2. Itoi K. Exploring the regulatory mechanism of stress responses in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: background and future perspectives of corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein-knock-in mouse. *Interdisciplinary Information Sciences* 21, 213-224, 2015
3. Iwasaki Y, Itoi K. Transcriptional regulation of vasopressin gene: update in 2015. *Interdisciplinary Information Sciences* 21, 267-271, 2015
4. Junko Kono, Kohtarou Konno, Ashraf Hossain Talukder, Toshimitsu Fuse, Manabu Abe, Katsuya Uchida, Shuhei Horio, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe, and Keiichi Itoi. Distribution of corticotropin-releasing factor neurons in the mouse brain: a study using corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein knock-in mouse. *Brain Structure and Function* (in press).

2. 学会発表

招待講演

1. 井樋慶一. Visualization of corticotropin-releasing factor neurons by fluorescent proteins: development of mouse lines for structural and functional analyses. 日本神経科学学会, 神戸国際会議場, 神戸, 2015年7月30日
2. 井樋慶一. ストレス防御にはたらく神経内分泌系のメカニズム. 宮城県保険医協会第273回研究会・特別講演, 宮城県保険医協会会議室, 仙台, 2015年11月30日
3. Keiichi Itoi, Ashraf Hossain Talukder, Toshimitsu Fuse, Katsuya Uchida, Junko Kono, Kotaro Konno, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Masahiko Watanabe and Kenji Sakimura. Visualization of CRF Neurons in the Brain by Fluorescent Proteins: A Comparison Between CRF-Venus,

CRF-Venus Delta Neo, and EGFP/CRF-Cre Mouse. Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, March 6, 2015

国際会議

1. Keiichi Itoi. Characterization and future perspectives of the corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein-knock-in mouse. Parvo- and Magnocellular Symposium in Sendai, Gonryo-kaikan, Sendai, Japan, September 17, 2015
2. Takayuki Sato, Takuma Sugaya, Izumi Akiba, Toshimitsu Fuse, Katsuya Uchida, Junko Kono, Atsuo Fukuda, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi. Dual effects of serotonergic inputs to the local circuits regulating the corticotropin-releasing factor neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: an electrophysiological study using the CRF-Venus deltaNeo mouse. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago Convention Center, Chicago, IL, USA, October 19, 2015

国内学会

1. 河野順子, 内田克哉, 今野幸太郎, 布施俊光, 阿部学, 山形聡, 伊藤貞嘉, 崎村建司, 渡辺雅彦, 井樋慶一. CRF-Venus Δ Neo マウスを用いた CRF 発現細胞のマウス脳内分布の検討. 第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 9 月 19 日
2. 大塚寛子, 内田克哉, 布施俊光, 崎村建司, 井樋慶一. CRF-Venus Δ Neo ノックインマウスを用いた CRF 含有ニューロンの個体発生とその脳内分布の神経解剖学的解析. 第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 9 月 18-19 日
3. 佐藤隆幸, 菅谷琢磨, 福田敦夫, 杉本直哉, 布施俊光, 内田克哉, 阿部学, 山崎真弥, 崎村建

司, 井樋慶一. 視床下部コルチコトロピン放出因子ニューロンへの抑制性入力セロトニンによる制御機序に関する研究. 第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 9 月 18-19 日

4. 菅谷琢磨, 佐藤隆幸, 福田敦夫, 杉本直哉, 布施俊光, 内田克哉, 阿部学, 山崎真弥, 崎村建司, 井樋慶一. 視床下部コルチコトロピン放出因子ニューロンへのグルタミン酸作動性入力セロトニンによる調節メカニズムの検討. 第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 9 月 18-19 日
5. 佐藤隆幸, 菅谷琢磨, 福田敦夫, 杉本直哉, 布施俊光, 内田克哉, 阿部学, 山崎真弥, 崎村建司, 井樋慶一. 視床下部コルチコトロピン放出因子 (CRF) ニューロンへの抑制性入力とセロトニン (5-HT) による制御機序に関する研究. 包括脳冬のシンポジウム, 一ツ橋大学, 東京, 2015 年 12 月 18 日
6. 菅谷琢磨, 佐藤隆幸, 福田敦夫, 杉本直哉, 布施俊光, 内田克哉, 阿部学, 山崎真弥, 崎村建司, 井樋慶一. 視床下部コルチコトロピン放出因子 (CRF) ニューロンへのグルタミン酸作動性入力セロトニン (5-HT) による調節メカニズムの検討. 第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 12 月 18 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.

大脳におけるグルタミン酸受容体 GluD1 の入力選択的回路形成と 高次神経機能発現に関する共同研究

研究代表者 渡辺雅彦 1)
研究分担者 崎村建司 2)

1) 北海道大学大学院医学研究科 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

GluD1 はグルタミン酸との結合能を失いシナプス伝達機能を失ってしまった GluD ファミリーの 1 つである。これまで小脳プルキンエ細胞に豊富な GluD2 についての研究から、この分子がシナプスの構造および機能的結合性を制御する重要な分子であり、その遺伝子異常により小脳性の運動障害が起こることを遺伝子変異を有するヒト家系やマウスの研究から明らかになっている。しかし、その類縁分子である GluD1 については、シナプス発現から分子機能に至るまで、これまで全く不明な分子であった。GluD1 欠損マウスの作成と供給による本共同研究を通して、特異的な発現プローブを開発することができ、この分子が成体マウスの大脳を含む脳の広範な領域に発現し、特に大脳皮質、海馬、歯状回、視床 VPM 核、扁桃核、分界条床核、小脳皮質に強く発現し、小脳では特定の入力を受けるシナプスに発現し、その神経回路形成に関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

GluD1 の大脳における細胞発現と回路発現を解析し、その解析結果から想定される GluD1 のシナプス回路形成制御と高次脳機能発現に対する機能について GluD1 欠損マウスを用いて解析することを共同研究の目的とした。具体的には、GluD1 の細胞発現と神経回路発現を大脳を含むマウス脳において明らかにし、GluD1 欠損マウスの回路表現型を追求した。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

GluD1 の細胞発現をジゴキシングニン標識の *in situ* ハイブリダイゼーション法により検討し、GluD1 の神経回路発現を特異抗体を用いた免疫組織化学法により解析した。用いたプローブと抗体の特異性を共同研究により作成・供給された GluD1 欠損マウスを用いて証明した。さらに、

GluD1 欠損マウスにおける回路表現型を電子顕微鏡を用いて解析した。

C. 研究結果

1. GluD1 の細胞発現

GluD1 の全長をコードするリボプローブを用いることにより、特異的で高感度の *in situ* ハイブリダイゼーション法が可能となった。その結果、GluD1 は大脳を含む広範な領域に発現し、特に大脳皮質、海馬、歯状回、視床 VPM 核、扁桃核、分界条床核、小脳皮質に強く発現していた。

2. GluD1 の神経回路発現

平成 27 年度の共同研究では、神経回路が最もよくわかっている小脳皮質を回路発現の解析対象として行った。その結果、GluD1 は分子層の介在ニューロンに選択的に発現し、平行線維シナプス

の後部に局在していた。同様の入力選択的な回路発現は視床 VPM 核や分界条床核においても確認できた。

3. GluD1 欠損マウスの回路表現型

GluD1 欠損マウスの小脳皮質を電子顕微鏡で解析したところ、この分子が局在する平行線維・介在ニューロンシナプスが半減していた。同様の表現型は視床 VPM 核においても得られつつある。以上の観察結果より、GluD1 は特定の入力を受けるシナプスに発現し、その接着を強化していることが判明した。

D. 考察

これまで小脳プルキンエ細胞の平行線維シナプスに豊富な GluD2 についての研究から、この分子がこのシナプスの構造的および機能的結合性を制御する重要な分子であり、その遺伝子異常により小脳性の運動障害が起こることを遺伝子変異を有するヒト家系やマウスの研究から明らかになっている。一方、GluD1 の遺伝子変異も様々な精神・神経疾患と関連することが報告されているが、その細胞発現、回路発現、生理機能は全く不明であった。

本共同研究の推進により、GluD1 も特定のニューロンに発現し、特定の神経入力を受けるシナプス後部に選択的に発現し、その結合を制御する分子であることが判明した。しかも、この GluD1 の発現特性と分子機能は視床 VPM や分界条床核の解析から、小脳以外の脳領域でも保たれており、脳に普遍的なものであることもクローズアップされてきた。今後、本共同研究が最終目的とする大脳皮質や海馬などの大脳領域における研究成果へと発展・結実することにより、この分子の発現と機能の全貌が明らかとなることが期待される。

E. 結論

GluD1 および GluD2 からなる GluD ファミリーは、特定の神経入力を受けるシナプス後部に発現し、そのシナプス接着を強化する。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Konno K, Matsuda K, Nakamoto C, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Sakimura K, Yuzaki M, Watanabe M: Enriched expression of GluD1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-interneuron synapse formation in the cerebellum. **J. Neurosci**, 34:7412-7424, 2014.

2. 学会発表

今野幸太郎、渡辺雅彦：マウス脳におけるグルタミン酸受容体 GluD family の発現特性。日本解剖学会、2016年3月30日、郡山市。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

限局性皮質異形成の分子遺伝学的発生機序の解明

研究代表者 加藤 光広 1)
研究分担者 柿田 明美 2)
武井 延之 2)
松本 直通 3)
才津 浩智 3)
中島 光子 3)
亀山 茂樹 4)
遠山 潤 4)

1) 昭和大学医学部小児科学講座 2) 新潟大学脳研究所 3) 横浜市立大学遺伝学講座 4) 国立病院
機構西新潟中央病院

研究要旨

限局性皮質異形成(FCD)の原因を明らかにするために、FCD と病理診断されたてんかん患者の脳手術標本 24 検体および同患者の血液から gDNA を抽出し、次世代シーケンサーによる deep sequence を行ない、体細胞モザイク変異の有無を検討した。FCD IIb 型 13 例中 6 例で *MTOR* に体細胞モザイクのミスセンス変異を検出した。MTOR 変異体を導入した細胞では mTOR の標的である 4EBP のリン酸化が促進されていた。変異症例の脳組織では mTOR のもう一つの標的である S6 キナーゼのリン酸化が促進されていた。FCD IIb 型における MTOR 変異は機能が亢進する活性型変異であった。mTOR 信号伝達経路の上流には、結節性硬化症や巨脳症関連疾患の原因分子 TSC1/TSC2, PIK3, AKT3 が存在する。三者は病理所見の類似性から共通病態が示唆されていたが、分子レベルで共通性が証明された。

A. 研究目的

限局性皮質異形成 (FCD) は、1971 年に Taylor らが focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy として報告され、難治性てんかんの外科切除病変で認められる特異的な病理像を呈する疾患単位である。てんかん発作の発症時期は病理変化の程度に反比例し、皮質神経細胞の配列の乱れのみ I 型では中高生以降が多く、異常細胞を伴う II 型では乳幼児期から学童期に発症することが多い。発作型は年齢によって変化し、部分発作だけでなく、発症時には強直発作、強直間代発作も多く認められ、症状の進行に伴い、認知機能の障害や片麻痺など局所運動症状の出現がみ

られる。発作は薬剤抵抗性を示し、多くは病変切除を必要とする。病的には皮質層構造の異常による神経細胞の配列の乱れと、異型細胞や balloon cell などの異常細胞の出現を特徴とする。皮質の局所的な発生異常が病態として推測されているが、その原因は全く不明である。本研究では FCD の分子遺伝学的発生機序を明らかにすることを目的とする。初年度の研究で脳病理組織に存在し、血液には認められない体細胞モザイク変異の有無を検討し、1 名に細胞外カルシウム濃度の減少による神経細胞興奮に関与する遺伝子 X を同定したが、他の 8 名の患者に共通する変異は認められなかった。昨年度も脳組織で発現する

遺伝子の体細胞モザイク変異が原因と推定し、病理学的に形成異常の強い FCD II 型と診断された脳組織標本と血液のペア検体を増やして、FCD の原因遺伝子の特定をめざし、遺伝子 Y を同定した。遺伝子 Y は MTOR であり、同定された mTOR 変異体の機能を解析し、FCD の発生機序を解明する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

FCD と病理診断されたてんかん患者の脳手術標本 24 例の凍結組織もしくはパラフィン標本からゲノム DNA を抽出した。FCD IIb 型の 9 例に対してライブラリー調整後、次世代シーケンサーによるエクソーム解析を行ない、体細胞変異が検出された遺伝子を FCD の原因候補として、他の 15 例について変異解析を行った。また、新たに FCDIIb 型 4 例から同意を得て、体細胞モザイク変異の有無を比較検討した。また、ヒト培養細胞株に MTOR 変異体を発現するプラスミドをトランスフェクションし、同定された各変異が mTOR 経路に及ぼす影響を調べた。

（倫理面への配慮）

山形大学医学部倫理委員会（平成 24 年 8 月 6 日 第 71 号）および昭和大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会（平成 27 年 7 月 1 日 第 220 号）の承認を受け、患者もしくは保護者から研究に対する同意を得た。

C. 研究結果

FCD IIb 型 13 例中 6 例で MTOR の体細胞モザイク変異を同定した。脳組織のモザイク率が 1-9% に対し、血液における頻度は 0.1%未満であり、明らかに差を認めた。脳組織の他のタイプの FCD では変異が認められなかった。MTOR 変異体を発現するプラスミドをトランスフェクションした細胞株は MTOR 正常体を発現するプラスミドをトランスフェクションした細胞株に比べて、4EBP の発現が亢進し、mTOR 経路の活性が著明に上昇していた。

D. 考察

FCD IIb 型の約半数で MTOR の体細胞モザイク変異を同定し、FCD IIb 型の主要な原因と考えられた。MTOR は PI3K-AKT3-mTOR の信号伝達経路を構成するタンパク質をコードする遺伝子である。

FCD は従来から病理学的に結節性硬化症の脳病理標本所見と類似しており、結節性硬化症との病態の共通性が示唆されていた。結節性硬化症の原因遺伝子である TSC1/TSC2 は PI3K-AKT3-mTOR 経路の AKT3 と mTOR の間に位置しており、FCD と結節性硬化症の分子機構が共通することを直接的に示唆する。また、同じく病理学的に類似所見を示す片側巨脳症も PI3K-AKT3-mTOR 経路の遺伝子変異が原因である。さらに、画像的に両側性の巨脳症と脳形成異常をきたす皮膚毛細管異常を伴う巨脳症 (MCAP) や多小脳回と多指症を伴う巨脳症 (MPPH) も PIK3R2, PIK3CA, AKT3 など PI3K-AKT3-mTOR 経路の遺伝子変異が原因であることを我々と他のグループが明らかにしている。病理所見から推測されていた病態の共通性が、原因遺伝子の同定によって分子レベルで共通する病態が示されたことは「脳神経病理標本資源活用」の本プロジェクトの趣旨からも意義深いと考えられる。

MTOR の変異は FCD IIb 型のみと同定され、他のタイプ (I 型, IIa 型) では MTOR の変異は同定されなかった。上述した結節性硬化症や片側巨脳症、MCAP, MPPH のいずれもが PI3K-AKT3-mTOR 経路の複数の遺伝子が原因に関与する。FCD は PI3K-AKT3-mTOR 経路の局所的な体細胞変異が原因と考えられ、MTOR 以外の PI3K-AKT3-mTOR 経路の遺伝子や他の関連する遺伝子変異が原因で生じている可能性がある。今後さらに他の症例で解析を行うとともに、限局性皮質異形成の病態と分子基盤を細胞や臓器・個体レベルで精査する必要がある。

E. 結論

FCD 24 例の脳と血液を用いて体細胞モザイク変異解析を行い、FCD IIb 型 13 例中 6 例で PI3K-AKT3-mTOR 経路に関与する MTOR に体細胞突然変異を検出した。FCD が結節性硬化症等と共通の病態を有することが分子レベルで示された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

- 1) Nakashima M, Saitsu H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y,

Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N: Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. *Ann Neurol* 2015;78(3):375-386

- 2) Fukasawa T, Kubota T, Negoro T, Maruyama S, Honda R, Saito Y, Itoh M, Kakita A, Sugai K, Otsuki T, Kato M, Natsume J, Watanabe K: Two siblings with cortical dysplasia: Clinico-electroencephalographic features. *Pediatr Int* 2015;57(3):472-475
- 3) Kato M. Genotype-phenotype correlation in neuronal migration disorders and cortical dysplasias. *Front Neurosci* 9 (181):e1-8, 2015 doi: 10.3389/fnins.2015.00181

2. 学会発表

- 1) Mitsuhiro Kato: Molecular pathomechanisms for epilepsies in early childhood. 11th Asian Society for Pediatric Research April 17th-19th, 2015, Osaka (invited lecture)
- 2) 加藤光広：脳形成障害の分子診断。シンポジウム 7：脳形成障害の臨床、画像、病理、遺伝子の最新の知見。第 57 回日本小児神経学会学術集会：大阪 2015 年 5 月 28-30 日
- 3) 中島光子、才津浩智、武井延之、遠山潤、加藤光広、北浦弘樹、椎名政昭、白水洋史、増田浩、渡辺啓介、佐藤龍洋、竹林浩秀、緒方一博、亀山茂樹、柿田明美、松本直通：限局性皮質異形成 (FCD) IIb 型における MTOR 体細胞変異の同定。日本人類遺伝学会第 60 回大会：東京 2015 年 10 月 14-17 日
- 4) 加藤光広：mTOR 経路の分子異常による小児神経疾患。第 17 回小児神経わかつて会（東京大学小児科神経グループ）：東京 2015 年 8 月 29 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

オリブ橋小脳萎縮症における細胞障害機構の解明

研究代表者 瀧川 みき¹⁾
研究分担者 柿田 明美²⁾
加藤 信介¹⁾

- 1) 鳥取大学医学部病理学講座脳病態医科学分野
2) 新潟大学脳研究所脳科学リソース研究部門脳疾患標本資源解析学分野

研究要旨

オリブ橋小脳萎縮症 (MSA-C) 21 例、年齢層を一致させた正常対照 10 例を用い、免疫組織学的解析として、p53 抗体、caspase3 を用いた。

MSA-C の残存プルキンエ細胞は、p53 抗体で陰性を呈した。一方、caspase3 は発症後 6~9 年頃に発現が認められる傾向があった。

これまでの我々の研究により、MSA-C の残存プルキンエ細胞の一部では、酸化ストレスによる酸化型 SOD1 の形成が認められ、Ca⁺⁺代謝を含めた神経細胞の機能が低下し、やがて、酸化ストレスを一要因として、変性・細胞死に至ることが推測された。今回の研究からは、酸化ストレスと関連して p53 は MSA-C のプルキンエ細胞死に関与しないことが判明した。一方、caspase3 を介して、酸化ストレスは病態の進行に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

MSA-C は日本に多い多系統萎縮症 (MSA) の一亜型であり、プルキンエ細胞の脱落が主たる病理学的所見の一つである。しかし、MSA の基本病態とされる α -シヌクレインの蓄積はプルキンエ細胞そのものには認められず、細胞死の原因は未だ不明である。これまでの我々の研究で、MSA-C におけるプルキンエ細胞死には、酸化ストレスが関与している事が判明した。今回は、酸化ストレスがどのような機序で細胞死に関与しているかを、apoptosis の観点から検討した。

B. 研究方法

MSA-C 21 例、年齢層を一致させた正常対照 10 例を用い、通常染色に加え、免疫組織学的解析として、我々が開発した酸化型 SOD1 抗体、カルビンジン抗体、SOD1 抗体、p 53 抗体、caspase3 抗体

を用いた。

C. 研究結果

MSA-C の残存プルキンエ細胞は、p53 抗体には陰性を呈した。一方 caspsase3 抗体に対しては、発症後 6~9 年の症例は、一部の残存プルキンエ細胞で陽性を呈した。

残存プルキンエ細胞における酸化型 SOD1 の発現は、発症後より徐々に増加し、発症後 6 年頃をピークとして横ばいとなり、発症後 9 年以降は減少する傾向が見られた。

D. 考察

これまでの我々の研究で、MSA-C の残存プルキンエ細胞の一部では、酸化ストレスによる酸化型 SOD1 の形成が認められ、Ca⁺⁺代謝を含めた神経細胞の機能が低下し、やがて、酸化ストレスにより、

変性・細胞死に至る機序が推測されていた。今回 apoptosis の観点から、p53 および caspase3 抗体を用いて検討したが、p53 は明らかな発現を認めず、細胞死への関与は低い事が推測された。一方、caspase3 は、発症後 6～9 年の症例における残存プルキンエ細胞に発現が多く見られ、この時期の細胞死に深く関与していると考えられた。

酸化型 SOD1 発現様式と caspase3 発現様式が比較的似通っている点から、酸化ストレスが apoptosis を介して、残存プルキンエ細胞死を加速している可能性が示唆される。

E. 結論

MSA-C における原因不明のプルキンエ細胞死には、酸化ストレスが関与しており、酸化ストレスによる apoptosis を介した細胞死の機序が示唆された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 56 回神経病理学会 2015 年 6 月 3 日～5 日、福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

統合失調症脳内タンパク質多項目同時測定解析及び関連遺伝子発現解析

研究代表者 國井 泰人¹⁾

研究分担者 柿田明美²⁾ 矢部博興¹⁾、丹羽真一³⁾、和田明¹⁾、松本純弥¹⁾、日野瑞城¹⁾、
那波宏之²⁾、高橋均²⁾

1) 福島県立医科大学 2) 新潟大学脳研究所 3) 会津医療センター

研究要旨

本研究では、統合失調症発症のメカニズムの解明を目的として患者死後脳内タンパク質の発現解析を行う。ドパミン関連分子、グルタミン酸関連分子、GABA 関連分子を標的タンパク質として、統合失調症群と健常対照群の死後脳凍結組織における発現量の差異を大槻法で用いてスクリーニングし、タンパク質 10 種について脳内の複数の部位についてルミネックス法によるタンパク定量を行う。更に、免疫組織化学的手法を用いて、より詳細な標的タンパク質の組織内分布を観察し発現している細胞を同定する。統合失調症群に関しては、当バンク特有の詳細な臨床情報（罹病期間、抗精神病服薬量、生活歴・既往歴・手術歴・鎮痛薬を含む全服薬歴等）を駆使して関連を検討する。また、タンパク質発現解析から得られた情報を元に遺伝子発現解析を行う。

A. 研究目的

本研究の目的は、統合失調症病態におけるドパミン系・グルタミン酸・GABA 系の異常を、動物実験や画像研究などの間接的アプローチではなく、死後脳組織を用いて病態の現場を直接的に検討することである。これまで代表者らが統合失調症死後脳組織を用いて分析を進めてきたドパミン系・グルタミン酸・GABA 系の分子を中心に、ごく少量のサンプルでタンパク質の多項目同時測定を可能にするルミネックス法という革新的な手法から新たな脳内表現型の創出し、更に免疫組織化学、遺伝子発現解析などを通して精神疾患病態の鍵となる分子や治療標的分子を同定する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

当講座の精神疾患死後脳バンクにおいて凍結保存された死後脳及び新潟大学脳研究所保管の年齢、性別、死後時間等をマッチさせた非精神神経疾患対照例を測定対象として、ルミネックス法

による死後脳タンパク質群の多項目同時測定を行う。測定対象のタンパク質は大槻法によって統合失調症患者死後脳で健常対照群に対して発現量に変化が認められたタンパク質 10 種程度とする。さらに免疫組織化学的手法を用いて、より詳細な標的タンパク質の組織内分布を観察し発現している細胞を同定する。統合失調症群に関しては、当バンク特有の詳細な臨床情報を駆使して関連を検討する。解析した分子の中で異常が捉えられたものについては、レーザーマイクロダイセクション等により、免疫組織化学解析と同じ解析部位の組織を抽出し、局所的遺伝子発現解析も実施する。

なおこの研究は各施設の倫理委員会の承認を得ており、ヘルシンキ宣言に基づいた倫理的原則に則って実施され、発表にあたっては死後脳提供遺族から十分なインフォームド・コンセントを得

て、プライバシーに関する守秘義務を遵守し、匿名性の保持に十分な配慮をした。

C. 研究結果

年齢、性別、死後時間をマッチさせた統合失調症死後脳 19 例、健常対照死後脳 21 例の凍結脳サンプルの前頭前皮質(BA10)および側坐核について vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), epidermal growth factor receptor (EGFR), Akt1、リン酸化 Akt1 (Ser473)、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、リン酸化 ERK1/2 (Thr185/Tyr187)、glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)、リン酸化 GSK3 β (Ser9)、および cAMP response element binding protein (CREB)の蛋白質発現量を Bead-Based Multiplex Immunoassay (Luminex システム)により多項目同時測定した。さらに統合失調症群と対照群間で発現量の差がみられた VEGFR2 については、発現量と生前の臨床症状スコアとの関連について、またその遺伝子多型と各蛋白質の発現量、統合失調症発症の有無との相関を解析した。同時多項目測定の結果、VEGFR2 が統合失調症群の前頭前皮質において有意に減少していた。統合失調症群において前頭前皮質の VEGFR2 発現量と生前の陽性症状スコアの間を負の相関がみられた。また、統合失調症群の前頭前皮質ではリン酸化 Akt1 が増加していた。遺伝子多型解析の結果、VEGFR2 遺伝子の多型(rs7692791)は Akt1 の発現量と ERK1/2 および Akt1 のリン酸化レベルを予測することが示された。また VEGFR2 遺伝子の 2 多型(rs17709898 および rs1870377)が統合失調症と相関していた。

D. 考察

E. 結論

VEGFR2 は細胞外からの血管増殖刺激を Akt シグナル伝達系に伝える因子であることから、統合失調症群の前頭前皮質の VEGFR2 発現量低下は統合失調症の病因が微小血液循環の異常にあるとする仮説を説明するものと考えられる。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Sakai M, Watanabe Y, Someya T, Araki K, Shibuya M, Niizato K, Oshima K, Kunii Y, Yabe H, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Hashimoto T, Hishimoto A, Kitamura N, Iritani S, Shirakawa O, Maeda K, Miyashita A, Niwa S, Takahashi H, Kakita A, Kuwano R, Nawa H. Assessment of copy number variations in the brain genome of schizophrenia patients. *Mol Cytogenet.* 2015;1:8:46. doi: 10.1186/s13039-015-0144-5. eCollection 2015.

2. 学会発表

(国内学会)

國井泰人；若手研究者育成プログラム・プログレスレポート, 精神疾患死後脳を用いたジェネティックニューロパソロジーの展開. 第 37 回 日本生物学的精神医学会, 東京, 2015/9/25

日野瑞城、國井泰人ら；統合失調症患者死後脳前頭前皮質における Akt シグナル伝達系蛋白質群の多項目同時測定. 第 11 回日本統合失調症学会, 群馬, 2016/3/26

(国際学会)

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

CRISPR/Cas9 システムを使った迅速なノックアウトマウス作成

研究代表者 赤間智也 1)
研究分担者 崎村建司 2)

1) 関西医科大学薬理学 2) 新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野

研究要旨

我々は角膜や脳に存在する直鎖状糖鎖であるケラタン硫酸グリコサミノグリカンの生合成経路とその生物学的機能解明に向けた研究を行なっている。ケラタン硫酸糖鎖合成の律速段階となる酵素は β 3GnT2 および β 3GnT7 と考えられており、この遺伝子をノックアウトした変異マウスは角膜の細胞外マトリックスの異常や新生仔致死の表現型を示すことが明らかとなった。現在我々はタモキシフェン誘導型のコンディショナルノックアウトマウスを作成して成体でのケラタン硫酸合成酵素の必要性を調べており、成体で β 3GnT2 の発現を抑制した場合、急性の変化は見られなかったことから少なくとも β 3GnT2 の発現の消失は成体マウスの生存に必須ではないということが明らかとなった。

A. 研究目的

ポリ N アセチルラクトサミンやケラタン硫酸は細胞表面や細胞外マトリックスタンパク質に見られる直鎖状の糖鎖構造であり、細胞間あるいはタンパク質間相互作用に影響を与えていると考えられている。我々はこれら直鎖状糖鎖の生物学的機能を解析する目的でその合成酵素である β 3GnT2 および β 3GnT7 の遺伝子ノックアウトマウスを作成しその表現型を解析した。また化合物誘導型のコンディショナルノックアウトマウスを作成することで成体における酵素遺伝子および直鎖状糖鎖の必要性についても解析を試みた。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

我々は既に新潟大学脳研究所との共同研究にて β 3GnT2 をコードする遺伝子である *B3gnt2* の floxed マウスおよび β 3GnT7 をコードする遺伝子である *B3gnt7* の floxed マウスを作成済みである。これらのマウスに Cre 発現マウスを掛け合わせることで全身性のノックアウトマウスを作成してその表現型を解析した。また *B3gnt2* の floxed マウスを ROSA26-CreERT2 マウスと掛け合わせるこ

とでタモキシフェン誘導型の変異マウスを作成し、15 週齢の段階で腹腔内にタモキシフェンを投与することで β 3GnT2 の発現を抑制してその後のマウスの変化を調べた。一方で別のケラタン硫酸合成酵素である *Chst1* や *Chst5* 遺伝子を迅速に破壊する CRISPR/Cas9 システムの構築も行った。

C. 研究結果

1) *B3gnt2* ノックアウトマウス

B3gnt2 の全身性ノックアウトマウスは生後 2 日以内にそのほとんどが死んでしまう新生仔致死であることから β 3GnT2 の合成するポリ N アセチルラクトサミンおよびケラタン硫酸は新生仔の発生に重要であることが明らかとなったが、成体でも必須であるのかどうかは不明であった。そこで

B3gnt2(flox/-)/ROSA26(+/-)CreERT2 マウス

(*B3gnt2* CKO マウス) を作成し、成体 (15 週齢) の段階で腹腔内にタモキシフェンを投与 (150 mg/kg/日で 5 日連続投与) し、その後の影響を調べた。*B3gnt2* CKO マウスは投与後 1 週間以上経過しても特に変化を見せず生存し

ていたことから β 3GnT2の発現抑制は成体マウスの生存にとって急性の影響を与えるものではないことが分かった。このマウス(投与後1ヶ月経過)はさらに飼育を続け、 β 3GnT2発現抑制の影響の観察を続けている。

2) *B3gnt7*ノックアウトマウス

*B3gnt7*全身性ノックアウトマウスは正常に成育し交配も行うが、詳細な解析の結果、ケラタン硫酸が豊富に存在する角膜実質においてその厚さが減少し、細胞外マトリックスの構造がより乱雑になるという表現型が確認された。これはヒトの斑状角膜ジストロフィーに類似する表現型であり、この疾病を有する患者ではケラタン硫酸の生合成が不全となりケラタン硫酸鎖の伸長が抑制されていることが明らかとなっている。*B3gnt7*ノックアウトマウスでも角膜実質のケラタン硫酸合成が阻害されており、マウスにおいてもケラタン硫酸の合成阻害が角膜実質細胞外マトリックスの構築不全を引き起こして角膜厚の減少を示していることが分かった。そこで成体の角膜においてもケラタン硫酸糖鎖のターンオーバーがあるとすれば成体角膜で β 3GnT7の発現を抑制することで角膜厚が減少するのではないかと予想し、*B3gnt7*(flox^{-/-})/ROSA26(pA-*lacZ*/CreERT2)マウスを作成して眼球に直接タモキシフェンを投与することを計画している。予備的実験としてROSA26(pA-*lacZ*/CreERT2)マウスを作成し、このマウスの眼球に活性型タモキシフェンである4-hydroxytamoxifen(OHT)をワセリンに懸濁して塗布(麻酔下で5-10 μ g/眼/日で5日連続投与)したところCreERT2の活性化とそれに伴う*lacZ*の発現が角膜上皮細胞および実質細胞で確認されたことからこの条件でのOHT投与で角膜実質細胞に β 3GnT7の発現抑制を誘導することが出来るものと考えられた。現在実験に必要な数のマウスの繁殖を進めている。

3) CRISPR/Cas9による迅速な遺伝子発現抑制系の構築

*Chst1*および*Chst5*遺伝子はマウスにおいてケラタン硫酸の硫酸化を行う酵素をコードする遺伝子である。これらの遺伝子の発現していない細胞を入手するべく、ヒトの遺伝子のオノログである*CHST1*と*CHST6*をヒトHEK293T細胞

で破壊することを目的としてCRISPR/Cas9システムの構築を行った。それぞれの遺伝子に対応するgRNA発現ベクターを3種類作成してCas9発現ベクターと共に細胞内で発現させ、発現細胞をピューロマイシン選択培地で選択すると同時にクローニングし、この培養細胞における遺伝子破壊の効率をシーケンスにて調べた。その結果、CRISPR/Cas9による遺伝子の破壊効率は充分高く(*CHST1* 20アレル中15アレル、*CHST6* 20アレル中10アレル)、ケラタン硫酸の産生を行わない細胞を入手することに成功した。一方でクローニングしたはずの細胞の遺伝子変異を調べたところ3アレル以上の変異を検出し、クローニングしたはずの細胞株は2種類以上の細胞が混在することが明らかとなった。

D. 考察

β 3GnT2と β 3GnT7は*in vitro*では共にポリNアセチルラクトサミンおよびケラタン硫酸の合成に関わることが知られているが、その全身性ノックアウトマウスの表現型を調べると β 3GnT2は新生仔の発生に重要であるが β 3GnT7は必須ではないことが明らかとなった。これは β 3GnT2は主にN型糖鎖のポリNアセチルラクトサミン合成に関与し、 β 3GnT7は主に角膜におけるケラタン硫酸合成に関わっているからで、 β 3GnT7が合成を行なう糖鎖は機能が局限していて発生に致命的な影響を与えないからではないかと考えられる。 β 3GnT2は新生仔発生に必須であることが分かったが、成体で発現を抑制しても急性の影響が出ないことが今回の研究で明らかとなった。成体での糖タンパク質のターンオーバーは長いものから短いものまで幅があり、 β 3GnT2の酵素活性が寄与する糖タンパク質のターンオーバーは比較的長いいため急性の影響が表れないのかも知れない。あるいは通常のマウスの生存には必須でないが、炎症など病的な状態で必要とされることも考えられるので更なる研究が必要であると考えられる。

CRISPR/Cas9システムによる遺伝子破壊はシステムの構築が簡単に変異導入細胞を調製するだけであれば非常に迅速に行なえることが分かった。しかしながら均一なゲノムを有するクローニ化細胞の作成はクローニングが容易ではなく比

較的煩雑であるのでこの点を改良することが必要であると考えられた。この手法を遺伝子破壊マウスの作成に使用することはそれほど難しくなく、少なくとも変異 ES 細胞の作成は簡単であると考えられる。但し得られた変異細胞はクローンではなく、その細胞群の中からフレームシフトを生じている細胞のみをマウス作成に使う必要があるので注意が必要である。

E. 結論

糖鎖合成酵素のノックアウトマウスの作成により、これまでに知られていない糖鎖の生体内における機能が明らかとなり、この手法が機能解析に有用であることが分かった。またコンディショナルノックアウトマウスを作成することで成体になってからの機能を解析することができ、発生過程での機能と区別することが可能である。CRISPR/Cas9 システムは細胞内の遺伝子を破壊することは容易であり、この方法を用いた全身性遺伝子ノックアウトの作成は難しいものと考えられるが、コンディショナルノックアウト型の ES 細胞を作成するには *loxP* の挿入などいくつかの課題があると考えられる。今後の研究でこれらの問題点を克服することが出来ることを期待する。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

PNPLA6 遺伝子の脳における機能-有機リン被爆との関連から

研究代表者 木村穰¹

研究分担者 笹岡俊邦²、畑中朋美¹

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

我々は有機リンやホルムアルデヒド等の被爆が主要原因とされるシックハウス症候群の患者単球において Neuropathy Target Esterase(以下 NTE)の活性が健常者に比べて高いことを報告した(2013)。有機リンの曝露後に神経症状が生じることが知られているが、そのメカニズムについては良くわかっていない。本研究では、有機リン関連疾患の発症機構解明を目指し、まず NTE をコードする遺伝子 *PNPLA6* を導入したマウスを作製し、有機リンやホルムアルデヒド投与実験を開始した。シックハウス症候群の原因物質の一つとされるフタル酸エステルの経皮吸収とエステラーゼの関わりについては良いモデルができた。有機リンと NTE の複合体検出は進行中である。最近、いくつかの小脳疾患で *PNPLA6* に点突然変異が見いだされており、マウスモデルを作製すべく、CRISPR/Cas9 システムを整えた。

A. 研究目的

本研究ではシックハウス症候群やその原因物質として指針値が定められている13種の化学物質一中でも有機リンに対しての発症メカニズムを遺伝子操作マウスを駆使して探求することを目的とした。また、対象とする酵素は有機リンと共有結合を形成することから、その複合体が種々の症状を生み出す可能性を考え、複合体検出への取り組みを行っている。すでに確立した NTE 高発現マウスと、CRISPR(Clustered regulatory Interspaced short parindromic repeats)システムによる遺伝子変異導入技術をマウス *pnpla6* 遺伝子に応用することにより最終的には *pnpla6* 変異個体を得て、*pnpla6* 遺伝子の個体レベルでの機能を、神経系を中心に明らかにしたい。また、農薬等に良く使用されるジクロロボス(DDVP)をこれらのマウスに投与し、中枢および末梢神経系における有機リンの影響を、NTE に対する急性および遅延性反応という観点から解析することが本研究の最終目的である。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウスを用いた実験計画は東海大学遺伝子組換え実験安全委員会および東海大学動物実験委員会を通じて大学より承認されている。マウスは我々独自の方法で、*ROSA26* 部位に CAG プロモーター下にヒト *PNPLA6* 遺伝子 cDNA および同時に *EGFP* 遺伝子を導入したマウスである。F₀ マウスと Cre マウスとの交配により発現を誘導し、F₁ 以降の系統化は C57BL/6 との交配によった。ヒト皮膚を用いた経皮吸収実験計画は医学部医の倫理委員会の審議後、承認を受けている。

マウスのホルムアルデヒド曝露実験および経皮吸収実験は独自の装置を用いて行い、酵素活性測定は常法に従った。

複合体検出では島津製作所の質量分析器 (Shimadzu LC-MS) を使用した。眼球運動は高速度デジタルカメラを用いた瞳孔追跡システム、空気中のホルムアルデヒド濃度は新規に開発した

レーザーを用いたガスセンシング法及び高速液体クロマトグラフィを用いて測定した。

C. 研究結果

ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウスでは *PNPLA6* 遺伝子がコードする NTE の発現がモザイク状態となるようであり、全身発現性の CAG プロモーターを用いているせいか、成長遅延の個体も見られる。しかしながら各臓器で遺伝子導入個体では通常のマウスに比べ少なくとも数倍の活性上昇があった。

有機リンの一種で殺虫剤等にも使用されているジクロロボス (DDVP) を投与したが、成体では今のところ特に変化はないが、妊娠マウスに投与した場合には、遺伝子導入マウスの死亡胎仔の割合が高い(以上既報告)。

東海大学准教授加藤明先生の協力を得て 60-80 ppm の蒸散ホルムアルデヒドガス曝露後 (18 時間 / 日、7 日間、n = 1)、HE 染色した脳切片を用いて遺伝子導入マウス脳の形態異常を解析したところ、小脳プルキンエ細胞の委縮及び海馬歯状回-CA3 周辺の層構造異常を示唆する結果が得られた。

経皮吸収に関しては表皮と真皮の境界領域で NTE の発現を免疫組織学的に認めた。ついでフタル酸ベンジルブチルの結合切断の種特異性を利用してその皮膚の透過実験からこのマウス皮膚では NTE 活性が 100 倍上昇し、かつヒト型の主代謝物の特性を備えていることを解明した。

NTE 活性は吉草酸エステルを基質として paraoxon 耐性で mipafox 感受性のエステラーゼ活性として定義されるが、より簡便な検出法開発に取り組んだ。ヒト単核球中での総エステラーゼ活性が paraoxon 耐性のエステラーゼ活性と比例することを確認し、マウス皮膚と脳で NTE 活性と paraoxon 耐性のエステラーゼ活性は比例した。しかし、フタル酸エステル代謝活性とは必ずしも比例しなかった。

一過性の NTE 高発現 293 細胞を利用し、ゲルより抽出したバンドが NTE であることを質量分析系で確認していたが、このクルードな系では NTE-DDVP 複合体の検出には至らなかった。そこで、現在は大腸菌で活性を有するペプチド部分の N 末および C 末にタグを配置して大量産生し

た”NTE”の精製を試みている。当初のタグでは2種の分子が生じるため、ゲル上で単一バンドとすべく再度トライしている。大量精製ののち *in vitro* で DDVP との複合体を形成させ、質量分析を行う予定である。

CRISPR (Clustered regulatory Interspaced short parindromic repeat) 技術は、遺伝子の特定の配列を利用して、任意の動植物種や細胞に変異を導入することができると思われる方法だが、我々も今年度は複数のマウス遺伝子系で条件を検討しているが、点突然変異の導入に関しては難しい例もある。*pnpla6* 遺伝子の改変を進行中である。

脳研柿田教授のご協力により、ヒト農薬被爆者の標本が1例ある事が判明した。NTE 抗体で Western blot に用いることが可能な抗体が準備出来てきているので、今後、他の例も含めて年齢ごとの脳内 NTE 発現量を検討し、基礎データを得ていきたい。なお、貴学ヒト脳標本の利用については、本学では 2016 年 3 月に承認が得られた段階である。

D. 考察

我々が開発した独自の方法で、全身で NTE の高発現を示すトランスジェニックマスの系統化に成功したが、DDVP 投与やホルムアルデヒド曝露では神経症状や行動上の顕著な外見上の変化はない。もともとマウスはヒトでは致死量のホルムアルデヒド濃度でも耐性であることや、そのくせ DDVP の腹腔内投与等では微妙な投与量の違いですぐに死亡する個体が出現することから、マウスはこの課題において、あまり適切な実験動物とは言えないのではないかと考えている。今後は感受性の高い鳥類の利用等も視野に入れて検討したい。

しかしながら、ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウスではフタル酸エステルの代謝について、見事にマウス型とヒト型を区別することができ、個体レベルでヒト型皮膚の経皮吸収実験が行える道が開けた。また、手術時のヒト皮膚を用いた活性測定では NTE 活性は低いものの、paraoxon 耐性の活性で代用出来る見通しがある程度出来ることとなった。

DDVP-NTE 複合体の質量分析器での検出は現在大量精製している大腸菌に産生させた NTE によって実現可能になると思われる。その先では複合体

に特異的な抗体作成に挑戦したい。

NTEをコードする *PNPLA6* 遺伝子の変異が運動神経系関連疾患で続々報告されているので、CRISPR技術でマウスの相同遺伝子に変異導入する取り組みを開始した。

E. 結論

有機リン関連疾患の発症機構解明を目指すために、有機リンと活性中心で共有結合を形成するヒトNTEを発現するマウスを系統化した。発現の程度は臓器や週齢によって異なるがいずれも高発現である。DDVP投与やホルムアルデヒド曝露では少数例ではあるが影響は見られている。シックハウス症候群の原因物質とされるフタル酸エステルの経皮吸収については良いヒト型モデルができ、論文にまとめることができた。有機リンとNTEの複合体検出は動物細胞使用例ではうまく行かず、現在は大腸菌でのタグ付きNTE産生に切り替えた。

現在、ヒトで報告される *PNPLA6* 遺伝子変異に相当するマウスをCRISPR法で作製するべく、CRISPR/Cas9システムを整えているが、DNAの塩基配列によって効率がかなり変化する可能性を示唆するデータを得ている。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

畑中朋美、荻野瑛里奈、山村勇貴、本杉奈美、竹内絵理、坂部貢、杉野雅浩、従二和彦、木村穰
シックハウス症候群原因物質の経皮吸収に及ぼすNTE活性の影響. 臨床環境医学 24巻 2号 88-93 (2015)

2. 学会発表

畑中朋美、荻野瑛里奈、山村勇貴、本杉奈美、竹内絵理、坂部貢、杉野雅浩、従二和彦、木村穰：
シックハウス症候群原因物質の経皮吸収に及ぼすNTE活性の影響. 第24回日本臨床環境医学会学術集会 2015. 6. 6-7 東京 北里大学薬学部

畑中朋美、荻野瑛里奈、本杉奈美、竹内絵理、坂部貢、杉野雅浩、従二和彦、木村穰：
シックハウス症候群におけるNTE活性の役割に関する研究-フタル酸エステルの経皮吸収に及ぼす影響 I. 第38回日本分子生物学会年会 2015. 12. 1-4 神戸

杉野雅浩、畑中朋美、荻野瑛里奈、青山謙一、内堀雅博、太田嘉英、今川孝太郎、宮坂宗男、竹内絵理、坂部貢、従二和彦、木村穰：
シックハウス症候群におけるNTE活性の役割に関する研究-フタル酸エステルの経皮吸収に及ぼす影響 II. 第38回日本分子生物学会年会 2015. 12. 1-4 神戸

赤塚尚子、大塚正人、木村穰、井ノ上逸朗、佐藤健人：
コーデン症候群患者由来iPS細胞の樹立と解析. 第38回日本分子生物学会年会 2015. 12. 1-4 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）なし。

グリオーマの分子標的治療・放射線治療耐性機構の解明と治療薬の開発

研究代表者 津田 真寿美¹⁾

研究分担者 田中 伸哉^{1,2)}、谷野 美智枝¹⁾、王 磊²⁾、長嶋 和郎³⁾、柿田 明美⁴⁾

¹⁾北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野 ²⁾北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座
³⁾札幌東徳洲会病院、北海道大学名誉教授 ⁴⁾新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

膠芽腫は極めて予後不良の悪性腫瘍であり、この一因は腫瘍細胞が治療経過中に放射線や化学療法に対して治療抵抗性を獲得するためである。当該研究の目的は、放射線や今後高い治療効果が期待される分子標的治療薬に対する抵抗性獲得機構を解明し、より有効な新規治療法を臨床現場に届けるための基盤を構築することである。具体的には、治療抵抗性細胞株を樹立し、遺伝子プロファイリング、蛋白プロファイリングを行い、治療抵抗性獲得シグナル経路および責任分子を同定、これらの結果の普遍性を病理組織検体にて検証する。これまでの研究により、分子標的治療薬耐性株は上皮間葉移行から幹細胞様へと形質変化を遂げることを明らかとし、耐性獲得の責任分子として IGFBP2 を同定した。平成 27 年度の研究では、分子標的治療薬耐性に直接関与する分子として MSX1 を新たに同定し、ヒストンのメチル化を含むエピジェネティクスとの関連性について解明した。

A. 研究目的

膠芽腫は WHO grade IV の極めて予後不良の原発性脳腫瘍である。近年、化学療法および放射線治療の進歩に伴い一時的な腫瘍退縮が認められるようになってきたが、診療経過中に治療抵抗性を獲得し悪性転化するため、依然として長期予後は不良である。昨年、アルキル化剤による治療後の再発に際して、特定の遺伝子変異が高頻度に生じることが報告されたが (Science 343, 189-193, 2014)、その他の悪性転化の機構は未だ不明な点が多く、再発時の治療法選択が困難となっている。

近年、膠芽腫において受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の EGFR、c-Met、PDGFR の遺伝子増幅や変異が報告されており、これらを標的とした分子標的治療の臨床治験が試みられている。阻害剤投与により一時的な治療効果は認められるものの、EGFR 阻害後の c-Met 発現亢進に伴う腫瘍幹細胞性の獲得、PDGFR 阻害による副側経路の持続的な活性化や RTK 間のクロストーク等が生

じて薬剤耐性や腫瘍幹細胞性を獲得することが報告されており、分子標的治療を標準治療とするには未だ多くの課題が残されている。

本研究では、膠芽腫の分子標的治療において異なる種類の RTK 阻害剤に対する共通の治療耐性獲得メカニズムを解明し、耐性解除に有用な新規治療標的分子を同定することを目的とした。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

ヒト膠芽腫細胞株 KMG4 において、RTK 阻害剤 (EGFR、c-Met、PDGFR 阻害剤) に対する 3 種類の耐性株を樹立した (平成 25 年度の研究で樹立済み)。定量的 RT-PCR 法にて耐性細胞における幹細胞性を規定する遺伝子の発現を検討後、幹細胞関連 PCR アレイ (QIAGEN) を実施し、その結果を定量的 RT-PCR 法にて検証した。耐性細胞特異的に発現亢進を認めた分子に対し、siRNA を用いて発現を抑制後、高濃度の阻害剤を添加し、Cell Death Detection ELISA キット (Roche) を用いてア

ポトーシス誘導能を検討した。発現抑制により 3 種類の耐性細胞の薬剤耐性を共通して解除することができる分子を同定後、耐性獲得機序を解析するために、定量的 RT-PCR 及びイムノブロット法により、アポトーシス関連分子や薬剤耐性関連分子、幹細胞性を規定する分子との関連性を検討した。

C. 研究結果

EGFR、c-Met、PDGFR 阻害剤耐性 KMG4 を用いた定量的 RT-PCR により、全ての薬剤耐性細胞において幹細胞性遺伝子 *Sox2*、*Oct3/4*、*Nanog* の発現が亢進していることが明らかとなった。幹細胞関連 PCR アレイ解析より、EGFR、PDGFR 阻害剤耐性細胞において転写抑制因子 Msh homeobox 1 (MSX1) の発現亢進を認めた。

MSX1 はアポトーシス誘導遺伝子 p53 と関連して発現し、本来は腫瘍抑制遺伝子として報告されている (Park et al., 2005, *Cancer Res*)。ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa に MSX1 を過剰発現させるとアポトーシス誘導遺伝子 p53 の発現を誘導し、腫瘍形成を抑制する (Shien et al., 2013, *Cancer Res*)。MSX1 特異的 siRNA を用いて MSX1 の発現を抑制すると、全ての薬剤耐性細胞株において幹細胞性遺伝子 *Sox2* の発現が低下した。一方、アポトーシス誘導能は有意に亢進し、チロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性が回復した。また MSX1 の発現抑制により、ヒストン H3K27 トリメチル化 (H3K27me3) が抑制された。H3K27 トリメチル化酵素 Enhancer of zeste homolog (EZH2) を特異的阻害剤 GSK343 により抑制すると、H3K27me3 の低下に伴いアポトーシス関連遺伝子 *Bcl-2*、p53、薬剤耐性に関与する *ALDH1A1* の発現が亢進した。上記研究成果は、第 74 回日本癌学会学術総会 (2015.10.8-10.10、名古屋市) において報告された。

D. 考察

H27 年度の研究により、MSX1 は幹細胞マーカー遺伝子の発現上昇に寄与し、また腫瘍のエピゲノム異常に関わる因子の一つである H3K27me3 酵素の EZH2 を競合的に阻害することで、薬剤耐性遺伝子やアポトーシス抑制遺伝子の発現上昇に関与する可能性を見出した。

ヒストン H3 のメチル化酵素である EZH2 は膠芽腫幹細胞の維持に重要であり (Suva et al., 2009, *Cancer Res*)、既に他の癌腫においても EZH2 に対

する阻害剤を用いて基礎実験が実施されている。EZH2 を阻害し H3K27me3 を抑制すると、大腸癌では EGFR 阻害剤の効果が向上し細胞死が誘導され (Katona et al., 2014, *Cancer Biol Ther*)、BRG1 や EGFR の遺伝子変異が検出された肺癌においては多剤併用による抗腫瘍作用の向上が報告されている (Fillmore et al., 2015, *Nature*)。一方で、H3K27me3 活性の減少が及ぼす抗腫瘍作用機序の解析は不明であった。当該研究により、分子標的治療薬に対する耐性細胞では MSX1 の発現が亢進しており、EZH2 を介して H3K27me3 を制御することにより薬剤耐性に関する遺伝子の発現を変化させていることが明らかとなった。

将来的に MSX1 を分子標的治療の新規ターゲットとして臨床応用を目指すためには、網羅的な分子解析によって詳細な機序解析を行うと共に、生体内でも *in vitro* と同様の薬剤耐性解除効果が認められるかを検討する必要がある。また、エピジェネティックな変化が薬剤耐性に及ぼす機序を解析することは、膠芽腫のみならず、他の癌腫の新規治療法開発においてもブレイクスルーとなり得る可能性を持ち合わせていると期待される。

E. 結論

膠芽腫において、MSX1 はチロシンキナーゼ阻害剤に対する治療抵抗性獲得に重要な分子であることが明らかとなった。MSX1 および MSX1 と協調して作用する EZH2 は、膠芽腫の分子標的治療の展開に大きく貢献するものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto R, Tsuda M, Wang L, Maishi N, Abe T, Kimura T, Tanino M, Nishihara H, Hida K, Ohba Y, Shinohara N, Nonomura K, Tanaka S. CRK adaptor protein induces epithelial- mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells via HGF/c-Met feedback loop. *Cancer Sci*, 106, 709-217. 2015.
2. †Furukawa J, †Tsuda M, Okada K, Kimura T, Piao J, Tanaka S, Shinohara Y. Comprehensive glycomics of a multistep human brain tumor model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy. *PLoS One*, 10, e0128300. 2015. [†, These authors contributed equally to this work]
3. Makino Y, Tsuda M, Ohba Y, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. Tyr724 phosphorylation of ELMO1 by Src is involved in

- cell spreading and migration *via* Rac1 activation. *Cell Commun Signal*, 13:35, 2015.
4. Moriya J, Tanino AM, Takenami T, Endoh T, Urushido M, Kato Y, Wang L, Kimura T, **Tsuda M**, Nishihara H, Tanaka S, R-IHC study Group. Rapid immunocytochemistry based on alternating current electric field using squash smear preparation of central nervous system tumors. *Brain Tumor Pathol*, 33, 13-18, 2016
 5. Kimura T, Wang L, Tabu K, **Tsuda M**, Tanino M, Maekawa A, Nishihara H, Hiraga H, Taga T, Oda Y, Tanaka S. Identification and analysis of CXCR4-positive synovial sarcoma initiating cells. *Oncogene*, in press, 2016
 6. Goto K, Kimura T, Kitamura N, Semba S, Ohmiya Y, Aburatani S, Matsukura S, **Tsuda M**, Kurokawa T, Gong JP, Tanaka S, Yasuda K. Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 cells, which plays a significant role in the gel-induced chondrogenic differentiation. *J Biomed Mater Res A*. in press, 2016
 7. Inuzuka T, Fujioka Y, **Tsuda M**, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Tanaka S, Ohba Y. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. *Sci Rep*, 6:21613, 2016
 8. Yuzawa S, Nishihara H, Wang L, **Tsuda M**, Kimura T, Tanino M, Tanaka S. Analysis of NAB2-STAT6 gene fusion in 17 cases of meningeal solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma: review of the literature. *Am J Surg Pathol*, in press, 2016
 9. Hiroshima Y, Nanjo H, Sasajima T, Shimizu H, Minamiya Y, Yoshioka T, Oda M, Kudo-Asabe Y, **Tsuda M**, Tanino M, Tanaka S, Akagami Y, Goto A. Rapid immunohistochemistry of IDH-1 for the intraoperative diagnosis of gliomas. *Akita J Med* 42, 147-156, 2016
 10. Yamada T, **Tsuda M**, Wagatsuma T, Fujioka Y, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Totsuka Y, Haga H, Tanaka S, Shindoh M, Ohba Y. Receptor activator of NF- κ B ligand induces cell adhesion and integrin α 2 expression via NF- κ B in head and neck cancers. *Sci Rep*, 6: 23545, 2016
 11. Elmansuri A, Tanino M, Mahabir R, Wang L, Kimura T, Nishihara H, Kinoshita I, Akita H, **Tsuda M**, Tanaka S. Novel signaling collaboration between TGF- β and adaptor protein Crk facilitates EMT in human lung cancer. *Oncotarget*, in press, 2016
 12. Yuzawa S, Nishihara H, Yamaguchi S, Mohri H, Wang L, Kimura T, **Tsuda M**, Tanino M, Kobayashi H, Terasaka S, Houkin K, Sato N, Tanaka S. Clinical impact of targeted amplicon sequence for meningioma as a practical clinical sequence system. *Mod Pathol*, 2016, in press
 13. 伊東民雄、佐藤憲市、及川光照、杉尾啓徳、浅野目卓、尾崎義丸、中村博彦、田中伸哉、**津田真寿美**、長嶋和郎 Pilomyxoid-spectrum astrocytoma 2 例の臨床病理学的検討—BRAF 遺伝子異常の検討も加えて— *脳神経外科*、43 巻 9 号、825-833、2015
- (総説など)
1. Tanaka S, Kanno H, Ito T, Pineal Region Tumors. Advances in surgical pathology. *Brain Cancer*, 2015
- ## 2. 学会発表
- 1) 湯澤明夏、西原広史、加藤容崇、王磊、木村太一、**津田真寿美**、谷野美智枝、田中伸哉：血管周皮腫・孤在性線維性腫瘍の FFPE 検体を用いた NAB2-STAT6 融合遺伝子の検出 第 104 回日本病理学会総会 2015.4.30-5.2 名古屋国際会議場（名古屋市）
 - 2) **津田真寿美**、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、田中伸哉：膠芽腫における分子標的阻害薬耐性獲得責任分子としての IGF1R の同定 第 33 回日本脳腫瘍病理学会 2015.5.29-30 JR ホテルクレメント高松（高松市）
 - 3) 鈴木淳、**津田真寿美**、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、田中伸哉：悪性脳腫瘍におけるチロシンキナーゼ阻害剤への耐性獲得に関与する MSX1 の解析 平成 27 年度 新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」がん若手研究者ワークショップ 2015.9.2-5 蓼科グランドホテル滝の湯（長野県茅野市）
 - 4) Shinohara Y, Furukawa J, **Tsuda M**, Okada K, Kimura T, Piao J, Tanaka S: A comprehensive glycomic approach to overview the causal relationships between various phases of multistep tumorigenesis and glycosylation status by using a human brain tumor/glioma progression model.

23rd International Symposium on Glycoconjugates, September 15-20, 2015, Split, Croatia

- 5) 津田真寿美、高阪真路、王磊、木村太一、谷野美智枝、西原広史、Marc Ladanyi、田中伸哉：NGS-based MSK-IMPACT analysis reveals specific genetic alterations in recurrent glioblastoma. 第74回日本癌学会総会 2015.10.8-10 名古屋国際会議場（名古屋市）
- 6) Shinohara Y, Furukawa J, **Tsuda M**, Okada K, Kimura T, Piao J, Tanaka S：Comprehensive glycomics of multistep human brain model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy. 第74回日本癌学会総会 2015.10.8-10 名古屋国際会議場（名古屋市）
- 7) 鈴鹿淳、津田真寿美、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、田中伸哉：膠芽腫におけるチロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性獲得へのMSX1の役割 第74回日本癌学会学術総会 2015.10.8-10.10 名古屋国際会議場（名古屋市）
- 8) **Tsuda M**, Kohsaka S, Wang L, Kimura T, Tanino M, Nishihara H, Ladanyi M, Tanaka S: NGS-based MSK-IMPACT analysis reveals specific genetic alterations in recurrent glioblastoma. 20th Annual Society for Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting, November 19-22, 2015, Marriott Rivercenter, San Antonio, Texas, USA
- 9) Tanaka S, **Tsuda M**, Wang L, Tanino M, Kimura T, Nishihara H: Molecular machinery for aquisition of TKI resistance in glioblastoma by IGFBP2 through profile transition from GMT to stemness feature. 20th Annual Society for Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting, November 19-22, 2015, Marriott Rivercenter, San Antonio, Texas, USA
- 10) Yuzawa S, Nishihara H, Wang L, Kimura T, **Tsuda M**, Tanino M, Yamaguchi S, Kobayashi H, Terasaka S, Tanaka S: Analysis of NAB2-STAT6 gene fusion in 17 cases of meningeal solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma. 20th Annual Societyfor Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting, November 19-22, 2015, Marriott Rivercenter, San Antonio, Texas, USA
- 11) Yuzawa S, Nishihara H, Mouri H, Wang L, Kimura T, **Tsuda M**, Tanino M, Yamaguchi S, Kobayashi H, Terasaka S, Sato N, Tanaka S: Genotyping of meningioma by targeted amplicon

sequencing using MiSeq. 20th Annual Society for Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting, November 19-22, 2015, Marriott Rivercenter, San Antonio, Texas, USA

(シンポジウム、特別講演など)

- 1) 田中伸哉：教育講演「脳腫瘍の分子診断と治療を目指した基礎研究」第26回日本臨床口腔病理学会 2015.7.30 北大学術交流会館（札幌市）
- 2) 田中伸哉：Neuro-Oncology Challenges in a Diverse Asia 「Pathological Features of Tumors of the Pineal Region」2015.9.17 St.Luke's Medical Center（Manila, Philippines）
- 3) 田中伸哉：第74回日本癌学会学術総会「Molecular machinery for agaisition of TKI resistance in glioblastoma」2015.10.8 名古屋国際会議場（名古屋市）
- 4) 田中伸哉：第8回香川県脳腫瘍学術研究会「悪性グリオーマの分子病理学的研究：治療耐性メカニズムに挑む」2015.10.30 高松国際ホテル（高松市）

G.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

- 1) 篠原康郎、田中伸哉、古川潤一、津田真寿美：グリオーマの診断マーカー、診断方法、糖鎖マーカーを検出する方法及び糖鎖マーカー、PCT / JP2015 / 072583（国際特許出願日：平成27年8月7日）
- 2) 田中伸哉、津田真寿美、谷野美智枝：ホルマリン固定生体組織内での活性型低分子量GTP結合蛋白質検出方法、PCT / JP2016 / 056890（国際特許出願日：平成28年3月15日）

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

タンパク質分解システムを標的とするシヌクレイノパチーの分子病態解明 と治療法の確立

研究代表者 森 文秋¹⁾

研究分担者 丹治 邦和¹⁾、三木 康生¹⁾、柿田 明美²⁾、高橋 均³⁾、若林 孝一¹⁾

¹⁾弘前大学大学院医学研究科 脳神経病理学講座 ²⁾新潟大学脳研究所 脳疾患リソース解析部門
³⁾新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

シヌクレイノパチー（パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症）を含む神経変性疾患では、疾患特異的な分子の蓄積が認められる。特に異常な翻訳後修飾を受けた α シヌクレインは蓄積しやすく、病態と深く関連している。今回、多系統萎縮症の延髄および脊髄腹側の軟膜下にリン酸化 α シヌクレインの蓄積を認め、さらなる解析の結果、これらはアストロサイトの突起に局在することを見出した。一方、シヌクレイノパチーの治療法開発を目的に「脳内オートファジーの活性化」を進めた。これまでトレハロースにより脳内のどこでオートファジーが活性化しているのかは不明であった。そこで今回オートファジー可視化マウスを利用して解析を進めた結果、海馬および大脳皮質の錐体細胞において、特に強いオートファジー活性化シグナルを検出した。今後もヒト剖検例およびモデル動物の双方の利点を生かした研究を進めることにより、シヌクレイノパチーの病態を改善する新たな治療法に結び付く可能性がある。

A. 研究目的

レビー小体病（パーキンソン病、レビー小体型認知症）と多系統萎縮症（MSA）は、神経細胞およびグリア細胞内における α シヌクレインの異常凝集（封入体形成）を特徴とする神経難病であり、その進行を遅延・阻止する治療法は確立していない。我々はこれまでにヒト凍結脳組織を用いた検討などから、シヌクレイノパチーの病態にはタンパク質分解システムの障害が深く関与していることを報告してきた。実際に、MSA および正常対照のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて網羅的にマイクロRNA (miRNA) の変動を検討したところ、複数のタンパク質分解システム関連分子群が変動している可能性を得た。以上より本年度は以下二点を目的として研究を遂行した。

1. miRNA 解析によって同定された分子群と病態との関連性。
2. シヌクレイノパチーの治療を視野に入れ、オ

ートファジーを活性化した際の病態への影響。

B. 研究方法

1. ヒト剖検脳を用いたタンパク質分解システム関連分子群の病理学的解析
MSA および正常対照のホルマリン固定パラフィン包埋組織の miRNA 解析によって得られた病態関連タンパク質のうち細胞内のタンパク質分解系、特にオートファジー関連分子に対する抗体を用い、神経変性疾患の剖検脳組織を免疫組織化学的に解析した。
2. マウスを用いた『オートファジー活性化』の生化学的および病理学的解析
オートファジーはカロリー制限、飢餓状態、さらには種々の薬物により活性化される。既に二糖のトレハロースによる脳内オートファジー活性化を確認しており、より効果的な投与方法や

投与物質を検討した。活性化のスクリーニングにはオートファゴソーム膜可視化マウス (GFP-LC3 マウス) を用い、病態への効果は α シヌクレイン過剰発現 TG マウス (SNCA-TG) および対照マウスを用いて、病理学的、生化学的および行動学的に解析した。

C. 研究結果

1. タンパク質分解システム関連分子群の病理学的解析

オートファゴソーム膜形成の調節分子として働く AMBRA1 は、異常シヌクレインと病理学的に密接に関連していることを見出した。さらに、AMBRA1 はリン酸化 α シヌクレインと病理学的、生化学的に一致した挙動を示した。また、我々は今回、MSA の軟膜下アストロサイトにリン酸化 α シヌクレインの蓄積を認めた。これらは p62、ユビキチンまたは Gallyas-Braak 染色に陰性であり、線維性凝集を形成していないという点で、MSA における既知の封入体 (グリア細胞および神経細胞) とは組織学的に異なっていることを見出した。

2. マウスを用いた『オートファジー活性化』の生化学的、病理学的解析

マウスに天然二糖のトレハロースを経口投与すると、効率よく脳内のオートファジーを誘導する (前年度に報告)。しかし、脳内のどこでオートファジーが誘導されているのかは不明であった。そこでオートファジー可視化マウスを用いて検討を行った。パラフィン切片および凍結切片でオートファジーのシグナル (GFP および LC3 染色) を比較したところ、凍結切片におけるシグナルの方がより明瞭であった (図 1)。特に、海馬および大脳皮質の錐体細胞において、オートファジーのシグナルが顕著であった。トレハロース給水投与の効果を検討したところ、前述した領域において、特に神経細胞の樹状突起におけるシグナルの増強が確認できた。

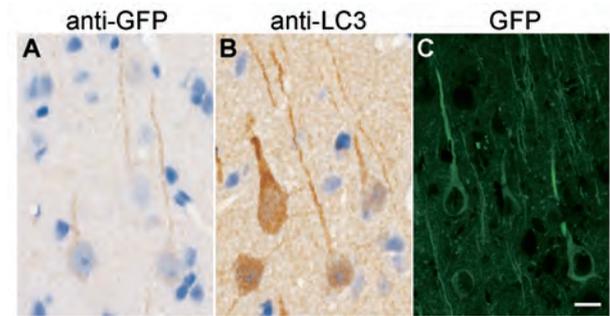


図 1 パラフィン (A, B) 及び凍結切片 (C) におけるオートファジーシグナル (GFP-LC3) の比較。パラフィン切片における GFP 抗体 (A) と LC3 抗体 (B) による免疫染色の結果から、LC3 抗体の方がより感度良く検出できた。一方、凍結切片では GFP シグナル (C) を直接可視化できるため最も感度良く検出できることを確認した。Bars = 10 μ m.

D. 考察

細胞内のタンパク質分解システム (オートファジー・リソソーム系、ユビキチン・プロテアソーム系) はシヌクレインパチーの病態と密接に関連していることをこれまでに報告してきた。

そこで細胞内の分解システムの活性化を生かして病態を改善できる可能性を探ってきた。特に天然二糖のトレハロースは脳内オートファジーを活性化し、アルツハイマー病やポリグルタミン病のモデルマウスに対して効果がある証拠を複数のグループが示している。これらの報告と一致して、我々もトレハロースがレビー小体病モデルマウスの脳内オートファジーを活性化することを報告した。しかし、トレハロースが脳内のどこで活性化しているのかについての報告はこれまでになかった。今回、オートファジー可視化マウスを利用することで海馬および大脳皮質の神経細胞において、LC3 は特に高発現していることを見出した。また、トレハロース給水投与により、これらのシグナルが増強することに加え、樹状突起部のシグナル増強が観察された。トレハロースによるオートファジー活性化をより増強する手法を探索することで、シヌクレインの異常蓄積を抑制するばかりでなく、記憶の改善も期待できる。

E. 結論

昨年度に引きつづきシヌクレインパチーを含

む神経変性疾患の病態解明および治療法の開発を視野に入れ研究を遂行した。天然二糖のトレハロースは、これらのオートファジー形成分子を修飾することにより、脳内のオートファジー、特に海馬や大脳皮質の神経細胞に影響を与えている知見を得ることができた。トレハロースはすでに食品添加物として認可されており、安定して供給されている。今後、トレハロースと相乗効果を示す活性化剤を探索することができれば、治療法として有用であり、他の神経変性疾患への応用も可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura K, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, Wakabayashi K. Alpha-synuclein pathology in the cranial and spinal nerves in Lewy body disease. *Neuropathology* (in press).
- 2) Nakamura K, Mori F, Kon T, Tanji K, Miki Y, Tomiyama M, Kurotaki H, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, Wakabayashi K. Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in subpial and periventricular astrocytes in multiple system atrophy of long duration. *Neuropathology* (in press).
- 3) Tanji K, Miki Y, Maruyama A, Mori F, Mimura J, Itoh K, Kamitani T, Wakabayashi K. The role of NUB1 in alpha-synuclein degradation in Lewy body disease model mice. *Biochem Biophys Res Commun* 470: 635-642, 2016.
- 4) Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Wakabayashi K. G protein-coupled receptor 26 immunoreactivity in intranuclear inclusions associated with polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases. *Neuropathology* 36: 50-55, 2016.
- 5) Miki Y, Tanji K, Mori F, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of upstream autophagy-related proteins (ULK1, ULK2, Beclin1, VPS34 and AMBRA1) in lewy body disease. *Brain Pathol* (in press).
- 6) Mori F, Miki Y, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Wakabayashi K. Sortilin-related receptor CNS expressed 2 (SorCS2) is localized to Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 608: 6-11, 2015.
- 7) Tanji K, Miki Y, Maruyama A, Mimura J, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Wakabayashi K. Trehalose intake induces chaperone molecules along with autophagy in a mouse model of Lewy body disease. *Biochem Biophys Res Commun* 465: 746-752, 2015.

2. 学会発表

- 第57回 日本神経病理学会(2016年6月1-3日、弘前)
- 1) 三木康生、丹治邦和、森 文秋、内海 潤、佐々木秀直、柿田明美、高橋 均、若林孝一。多系統萎縮症におけるオートファジー上流分子の異常
 - 2) 丹治邦和、三木康生、丸山敦史、森 文秋、三村純正、伊東 健、神谷 哲、若林孝一。レビー小体病における synphilin-1 結合タンパク質 (NUB1) の役割
 - 3) 森 文秋、三木康生、丹治邦和、豊島靖子、吉田真理、佐々木秀直、柿田明美、高橋 均、若林孝一。ポリグルタミン病および核内封入体病におけるパラスペックル関連蛋白の免疫組織化学的検討

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

生体リズムの遺伝子改変マウスによる解析

研究代表者 岡村 均¹⁾
研究分担者 崎村 建司²⁾

- 1) 京都大学大学院薬学研究科・医薬創成情報科学・システムバイオロジー
2) 新潟大学脳研究所・基礎神経科学部門・細胞神経生物学

研究要旨

24 時間周期の生体リズムは生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みであり、細胞の代謝や基本機能と密接にリンクしている。哺乳類生体リズムの中核は、脳の視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) である。SCN は強力なリズム信号を発し、他の脳部位や全身の細胞で発生するリズムを調律・統合している。我々は SCN に発現する遺伝子を組織化学で同定し、それがリズムに及ぼす影響をノックアウトマウスの表現型を解析することで検定する網羅的プロジェクト (SCN-Gene Project) を推進しているが、本研究では、我々が近年見出した、SCN でリズムに発現振動するアセチルコリン受容体の生体リズムへの影響を、SCN 特異的ノックアウトマウスを作製することで特定する。

A. 研究目的

網膜で受容された光シグナルは、網膜-視床下部路を介し、体内で独自のリズムを刻む概日時計の中核である視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) に到達し、体内時計の位相を外界の明暗周期に同調させている。この伝達の主力になっているのは、メラノプシン含有網膜神経節細胞-グルタミン酸受容体系であることは、よく知られている。一方、1970 年代より、アセチルコリン受容体作動薬であるカルバコール (carbachol) を用いた薬理学的研究が行われ、カルバコールの脳室内投与では行動リズムの位相が変動するとの報告がなされた。しかし、その分子メカニズムは未だ不明である。そこで、我々は概日リズムを制御するアセチルコリン受容体を特定し、カルバコールの生体リズムへの生理作用におけるアセチルコリン受容体の役割を解明する。

B. 研究方法

具体的な SCN-Gene Project の実施過程は以下の通りである。

1) 一次スクリーニング: 直径 0.5 mm の球形の視交叉上核を顕微鏡下でパンチアウトし、Affimatrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array により、SCN での発現量を測定したところ、これまでに、12,379 個の遺伝子が SCN で発現していることを同定した。このうち、ターゲット分子、制御因子といった分子機能が未知の受容体を二次スクリーニングへと進めた。

2) 二次スクリーニング: SCN は、0.5 mm 程度の小核であり、上記のパンチアウト法では SCN 以外の部分も試料に含有されるため、false positive が含まれる。そこで、in situ hybridization あるいは免疫組織化学の手法を用い、SCN での発現を定量形態学的に確認した。これにより、昼 (CT4) と夜 (CT16) で遺伝子発現の差も検出できる。この二次スクリーニングにより、ターゲット遺伝子

を約 2000 個へと絞った。

3) 三次・四次スクリーニングとして、ターゲット遺伝子のノックアウトマウスを作成する。特に、SCN 特異的 Cre マウスを用いて、SCN 特異的ノックアウトマウスを作成する。続いて、専用の明暗コントロールボックスにて、個体ごとのマウスの 24 時間行動リズムを一ヶ月以上にわたって測定し、リズム異常をきたすマウスを同定する。既に、この手法にて、バソプレッシン V1 受容体、RGS16 のリズムへの機能を明らかにしている。

本研究で行う動物実験は全て、京都大学動物実験委員会の承認を得ている (2015-21)。また、本研究で行う組換え DNA 実験についても、京都大学組換え DNA 実験委員会の承認を得ている (140157)。また、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)を遵守して遂行する。

C. 研究結果

本研究課題にて、SCN 特異的マイクロアレイを用いて、SCN に発現する 24 時間の発現変動があるアセチルコリン受容体の候補分子、AChS01 を得た。続いて、定量的 RI in situ hybridization 法により、SCN においてこの分子が明期にピークを迎える明瞭な 24 時間リズムを示すことを見出した。そこで、AChS01 が生体リズム形成に関与をするかどうかを検定するため、SCN 特異的な AChS01 コンディショナルノックアウトマウスの作成を開始した。AChS01 の機能の重要と考えられる Exon を loxP 配列で挟んだ targeting vector を作成し、ES 細胞へとエレクトロポレーションにより導入した。計画通り、AChS01 の遺伝子座にて相同組み換えを起こした ES 細胞をサザンブロッティングにより選別し、この変異 ES 細胞を胚盤胞へ注入した。これにより得た、高寄与率のキメラマウスと野生型マウスを交配させ、ヘテロ変異体 F1 マウスを得た。F1 マウスのゲノムが、計画通り遺伝子変異されたかを、サザンブロッティングにより確認した。続いて、全身で flippase を発現するマウスと交配させることで AChS01-flox マウスを得た。さらに、AChS01-flox マウスを、全身で Cre を発現するマウスとかけあわせ、全身 AChS01-KO マウスを作成した。しかし、AChS01 の全身ホモノックアウトマウスは成長障害がみられ、およそ生

後 2 週—4 週で全匹死亡した。そこで、SCN で Cre を発現するマウスとかけあわせ、SCN 特異的 AChS01-KO マウスを作成した。SCN 特異的 AChS01-KO マウスは、外見上の成長障害は確認されず、成体となり、繁殖能力も正常であった。

D. 考察

生体リズムの中枢である SCN において、大量に、かつリズムに発現変動するアセチルコリン受容体 AChS01 の SCN 特異的コンディショナルノックアウトマウスを作成できた。今後、この変異マウスを用いて、AChS01 のリズム機能を特定する。まず、明暗環境下、恒暗条件下、時差環境下での概日行動リズムや短時間光パルス照射に対する反応などの時間行動学的検索を行う。また、カルバコールによる概日行動リズム位相変動の応答性を測定する。また、SCN で AChS01 のリズムを生み出す転写調節領域をプロモーターアッセイにより同定する。

E. 結論

我々は、SCN-Gene Project により同定した遺伝子の解析を行い、SCN でリズムに発現変動するアセチルコリン受容体 AChS01 を、新たに同定した。続いて、AChS01 の概日リズムにおける生理機能を同定するために、AChS01 の全身ノックアウトマウスを作成したが、顕著な成長障害のために、成体を得ることができなかった。そこで、我々は、SCN 特異的 Cre マウスを利用して、SCN 特異的 AChS01 ノックアウトマウスを作成した。このコンディショナルノックアウトマウスは、成長障害が観察されず、成体となり繁殖も可能であった。よって、この変異マウスを用いることにより、SCN における AChS01 の生理的意義が解明されるものと期待できる。さらに、カルバコールを用いて概日行動リズムを検証することで、SCN のリズム発振の分子機構の解明や概日リズム障害に対する創薬が多いに期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 岡村 均：サーカディアンリズムの分子機構と

その異常としての生活習慣病、Circadian Rhythm Forum、東京（明治記念館）、2015年5月20日。

- 2) 岡村 均：生体リズム異常と高血圧、サーカディアンメディシンの基礎臨床連携研究拠点、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム、下野（自治医科大学）、2015年6月8日。
- 3) 山田咲子、山口賀章、土居雅夫、Fustin JM、阿部学、崎村健司、岡村均：生体リズム研究の為の視交叉上核発現物質のノックアウトマウスの作成、東京（学術総合センター）2015年12月18日
- 4) 岡村 均：時差とバソプレッシン、バソプレッシン研究会、東京（慶応義塾大学病院）、2016年1月9日。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン神経伝達の機能の解析

研究代表者 南部 篤¹⁾

研究分担者 知見 聡美¹⁾、笹岡 俊邦²⁾

- 1) 自然科学研究機構 生理学研究所 生体システム研究部門
2) 新潟大学 脳研究所 生命科学リソース研究センター 動物資源開発研究分野

研究要旨

パーキンソン病では、中脳のドーパミン作動性ニューロンが変性、脱落し、重篤な運動障害、非運動症状が生じるが、その病態生理については不明な部分が多い。ドーパミン受容体は D1 様受容体ファミリーと D2 様受容体ファミリーとに大きく分類されるが、ドーパミン受容体を無くしたノックアウトマウスの大脳基底核内情報伝達と運動症状を解析することは、パーキンソン病の病態解明につながると思われる。本研究においては、昨年度に引き続き、ドキシサイクリンの投与によりドーパミン D1 受容体の発現を制御することができるコンディショナルノックダウン (KD) マウスを用い、覚醒下神経活動の記録と行動解析を行った。その結果、D1 受容体を介したドーパミン神経伝達が、大脳基底核の直接路を介した情報伝達と正常な運動の発現に必須であることが示された。これらのことから、D1 受容体を介した神経伝達の消失がパーキンソン病における無動の少なくとも一部を説明できると考えられる。

A. 研究目的

パーキンソン病では、中脳のドーパミン作動性ニューロンが変性、脱落し、無動、筋強剛、振戦などの重篤な運動障害を生じる疾患である。有病率は 10 万人あたり 100～150 人程度と高いが、その病態生理については、まだ不明な部分が多い。本研究では、遺伝子改変マウスを用いることにより、D1 受容体 (D1R) を介したドーパミン神経伝達が、大脳基底核内情報伝達と運動制御において果たす機能を解析することにより、パーキンソン病の病態解明とより効果的な治療法の開発を目指す。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

昨年度に引き続き、笹岡らが作製した D1R コンディショナルノックダウン (KD) マウスを用いた。本マウスは、D2R の発現は正常であるが、D1R の

発現をドキシサイクリン (Dox) 投与によって on/off することが可能である (Tet-Off)。

マウスに十分なハンドリングを行い馴化させた後、ケタミン (100 mg/kg, 腹腔内投与)・キシラジン (2-5 mg/kg) 麻酔下において、頭部固定器具をマウスの頭蓋骨に装着する手術を行った。また、大脳皮質運動野に刺激電極を埋め込み留置した。手術から回復後、神経活動の記録を開始した。

マウス頭部を固定器具により無痛的にステレオ装置に固定し、大脳基底核ニューロンの活動を覚醒下で記録した。ドーパミン作動性ニューロンの主な投射先は、大脳基底核の入力部である線条体であり、線条体の直接路ニューロンは D1R を発現し淡蒼球内節 (GPi) に投射しているのに対し、間接路ニューロンは D2R を発現し淡蒼球外節 (GPe) に投射している。金属記録電極を、GPi および GPe に刺入することにより、これらニューロ

ンの自発発火の頻度とパターン、大脳皮質の電気刺激に対する応答パターンを記録した。また、ケージ内における自発運動量、ロタロッドテストによる運動機能の測定も行った。これらの計測を、D1R が発現している状態と、ドキシサイクリン (Dox) を投与することによって D1R の発現を抑えた状態で行った。

本研究計画は所属研究機関の動物実験委員会の審査、承認を受けており、関連する法令、所属研究機関の指針などを遵守して行った。動物実験および飼養保管は、動物実験委員会の承認を受けた実験室で行った。また、本研究計画は P1A レベルの遺伝子組換え実験を含むため、所属研究機関の組換え DNA 実験安全委員会の審査、承認を受け、関連する法令、ならびに、これに基づいて作成された所属研究機関の規定を遵守して行った。実験場所に関しては、組換え DNA 実験安全委員会の審査、承認を受けた実験室で行った。実験動物飼育中は注意深く様子を観察し、健康状態を維持するように努め、動物が苦痛を感じる状態が長期に亘り回復が困難な場合には、安楽死の処置をとるようにした。

C. 研究結果

まず、D1R が発現している状態において調べた。自発運動量、ロタロッドの滞在時間も野生型マウスと変わらなかった。GPi、GPe の神経活動を調べたところ、大脳皮質刺激に対して、早い興奮—抑制—遅い興奮という 3 相性の応答パターンを示した。また、GPi、GPe ともに、約 50 Hz でランダムな自発発火を示した。これら神経活動は、野生型マウスと同様であった。

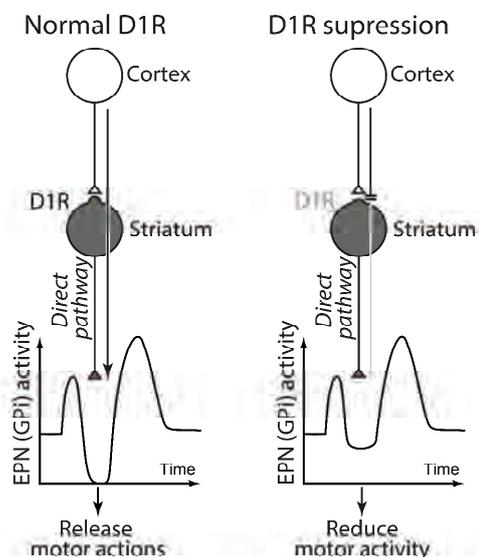
次に、Dox を投与し D1R の発現が抑制された状態で調べた。Dox 投与により、ケージ内の自発運動量が減少した。また、ロタロッド上の滞在時間は野生側マウスより短く、訓練によって増加するも、野生型マウスの成績には至らなかった。野生型マウスに Dox を投与しても、また D1RKD マウスに Dox 非投与の場合でも、このような行動変化は起こらなかった。GPi、GPe の神経活動を調べたところ、大脳皮質刺激に対して、GPi では多くのニューロンが興奮—興奮という 2 相性の応答パターンを示すようになり、抑制が消失していた。一方、GPe では有意な変化は見られなかった。GPi、GPe ともに、自発発火頻度とパターンにおいて有

意な変化は示さなかった。

Dox 投与を止めると、自発運動量も正常化した。また、大脳皮質刺激によって GPi に誘発される反応も 3 相性になり、正常化した。

D. 考察

GPi および GPe で記録される大脳皮質由来の 3 相性の応答のうち、早い興奮は大脳皮質—視床下核—GPi/GPe 路を、抑制は大脳皮質—線条体—GPi/GPe 路を、遅い興奮は大脳皮質—線条体—GPe—視床下核—GPi/GPe 路を介して伝達されることが明らかにされている。D1R が発現していない状態では、GPi における抑制がほとんど消失したことから、マウスの運動量が低下したことから、D1R を介したドーパミン神経伝達が、直接路（大脳皮質—線条体—GPi 路）を介した情報伝達と正常な運動の発現に必須であることが示された（図参照）。これらのことから、D1R を介したドーパミン神経伝達の消失が、パーキンソン病における無動や寡動の症状発現の少なくとも一部は説明していると考えられる。一方、自発発射頻度、パターンとも変化しなかったことから、これらの変化は症状発現への寄与は少ないと思われる。



E. 結論

D1R を介したドーパミン神経伝達が、直接路を介した情報伝達と正常な運動の発現に必須である。また、D1R を介したドーパミン神経伝達が、パーキンソン病における無動や寡動の症状発現に寄与すると考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Chiken S, Sato A, Ohta C, Kurokawa M, Arai S, Maeshima J, Sunayama-Morita T, Sasaoka T, Nambu A (2015) Dopamine D1 receptor-mediated transmission maintains information flow through the cortico-striato-entopeduncular direct pathway to release movements. *Cereb Cortex* 25: 4885-4897. DOI: 10.1093/cercor/bhv209

2. 学会発表

知見聡美、南部篤（2015.6.27）パーキンソン病モデルサルにおける大脳皮質－大脳基底核路の情報伝達異常. 第9回 Motor Control 研究会（京都）

Sasaoka T, Sato A, Chiken S, Maeshima J, Arai S, Sunayama-Morita T, Oda K, Maeda Y, Sakai S, Jinbo Y, Umakawa E, Sato T, Okubo T, Fujisawa N, Yokoyama M, Nambu A (2015.7.30) D1 dopamine receptor-mediated signal is required to maintain normal motor activity. 第38回日本神経科学大会（神戸）

Chiken S, Sato A, Sasaoka T, Nambu A (2015.10.31) Dopamine D1 receptor activation maintains information flow through the cortico-basal ganglia direct pathway to release movements. International Symposium on Prediction and Decision Making（東京）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HtrA1 欠損マウスにおける脳小血管の機能解析

研究代表者 猪原 匡史¹⁾

研究分担者 齊藤 聡²⁾ 山本 由美²⁾ 上村 麻衣子³⁾ 小野寺 理⁴⁾

- 1) 国立循環器病研究センター 脳神経内科
- 2) 国立循環器病研究センター 再生医療部
- 3) 京都大学大学院医学研究科 臨床神経学
- 4) 新潟大学脳研究所 神経内科分野

研究要旨

CARASIL (Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) の原因として *HtrA1* 遺伝子変異が同定されている。今回我々は、新潟大学脳研究所で作りだされた *HtrA1* 遺伝子欠損 (*HtrA1* KO) マウスについて、CARASIL モデルマウスとしての有用性を検証した。その結果、組織学的解析や行動解析では有意な異常は認められなかったが、*HtrA1* KO マウスは野生型マウスに比して、脳血流量の減少と、脳循環予備能の異常が示された。

HtrA1 KO マウスは CARASIL や認知症の病態解析に有用なモデルであると考えられた。

A. 研究目的

脳血管障害はわが国における三大死因の一つであると同時に、認知症による要介護・寝たきり状態の最大の原因である。近年、血管病変のアルツハイマー病への関与も示唆され、血管性認知症への関心も高まっている。しかし、血管性認知症研究の障壁となるのが、その多くが孤発性であるが故の危険因子あるいは病型の多様性である。そこで、単一遺伝子疾患 CARASIL を突破口に血管性認知症の病態を明らかにすることを目的として、本研究を開始した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. 実験動物

新潟大学脳研究所で作りだされた *HtrA1* 遺伝子欠損 (*HtrA1* KO) マウスと C57BL/6J マウスを使用した。すべての動物実験は国立循環器病研究センター動物実験管理委員会で審査され、承認された内容である。

2. 脳血流量の測定

16 ヶ月齢の *HtrA1* KO マウスおよび野生型マウスを解析した。脳血流はレーザースペックル血流計 (Omegazone-2; Omegawave 社, 日本) にて測定した。麻酔は 2% イソフルレンで導入し、1.5% イソフルレンで維持した。bregma から 2mm 外側、1mm 後方を中心とした直径 1mm の円を関心領域として設定し、左右の測定値の平均値を記録した。

3. 脳循環予備能の評価

16 ヶ月齢の *HtrA1* KO マウスおよび野生型マウスを解析した。マウスの麻酔は α -chloralose (50 mg/kg) および urethane (750 mg/kg) の腹腔内投与で行った。気管内挿管の上、5% 二酸化炭素を 10 分間吸入させ、レーザースペックル血流計にて脳血流を継時的に測定した。

4. 行動解析

24 ヶ月齢の *HtrA1* KO マウスおよび野生型マウス

スについて、Y 迷路試験を行い、総進入回数と自発的交替行動数を評価した。

5. 組織学的解析

HtrAl KO マウスおよび野生型マウスについて、H&E 染色、KB 染色および抗 BMP-4 抗体を用いた免疫染色を施し、解剖学的評価を行った。

C. 研究結果

1. 脳血流量の測定

HtrAl KO マウスは野生型マウスに比して有意に脳血流量が減少していた ($p < 0.05$)。

2. 脳循環予備能の評価

α -chloralose および urethane 麻酔下では、炭酸ガス投与前のベースラインの脳血流量について、*HtrAl* KO マウスと野生型マウスの間で有意な差異を認めなかった。一方、炭酸ガスの投与後、*HtrAl* KO マウスは、野生型マウスに比して、脳血流量の増加が鈍化しており、脳血管反応性の異常が示唆された ($p < 0.05$)。

3. 行動解析

HtrAl KO マウスは野生型マウスに比べ、Y 迷路試験での総進入回数が少なかったが、作業記憶の指標である自発的交替行動数には有意差がなかった。

4. 組織学的解析

H&E 染色等の一般染色や抗 BMP-4 抗体等の免疫染色では *HtrAl* KO マウスと野生型マウスの間で有意な差異を認めなかった。

D. 考察

2009 年、新潟大学で CARASIL の原因遺伝子 *HtrAl* 遺伝子が同定された。その後、欧州や中国など世界各国で CARASIL の報告が相次ぎ、本疾患は孤発性の血管性認知症全体を含む難治性血管障害疾患の病態解明や治療法開発に与することが期待され、近年ますます注目を集めている。

CARASIL における脳梗塞の発症機序は未だ不明であるが、病理学的に血管壁細胞の変性が報告されており、血管反応性の異常が本疾患の病態

機序に深く関連している可能性が考えられている。本研究においても、*HtrAl* KO マウスでは脳血流量の減少に加え、血管反応性の障害が認められた。

本研究では *HtrAl* KO マウスが CARASIL の病態を再現していることが確認され、CARASIL の治療法開発に有用なモデル動物となりうる可能性が示された。また本モデルは CARASIL にとどまらず、認知症の病態解明にも有用であり、さらなる研究が必要と考えられた。

E. 結論

HtrAl KO マウスは CARASIL や認知症の病態解析に有用なモデルであると考えられた。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析

研究代表者 岩里 琢治¹⁾,²⁾
研究分担者 笹岡 俊邦³⁾
研究分担者 香取 将太¹⁾

- 1) 国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門
- 2) 総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻
- 3) 新潟大学脳研究所

研究要旨

マウス遺伝学を用いた研究によって哺乳類の中枢神経系回路形成のメカニズムを解明することは、ヒトの脳高次機能の基盤を理解するために重要である。本課題では、細胞骨格制御に重要な Rho ファミリーの一つである Rac に特異的な GTPase activating protein (GAP) である α キメリンに焦点を当てて研究を行っている。昨年度までの研究において、様々なタイプの α キメリン変異マウスを作製し、それらのマウスの包括的な行動解析を行うことにより、 α キメリンの $\alpha 2$ イソフォーム ($\alpha 2$ キメリン) がある種の海馬依存的学習において重要な働きをすることを明らかにした。今年度はその回路レベルの基盤について解析を行った。

A. 研究目的

昨年度までの研究により、RacGAP α キメリンの $\alpha 2$ 型イソフォーム ($\alpha 2$ キメリン) を発達期に欠損したマウスではある種の海馬依存的記憶 (文脈型恐怖条件付けなど) に亢進が見られるが、成体になってから欠損したマウスは正常レベルの記憶を示すことを報告した。すなわち、発達期の $\alpha 2$ キメリンが成体での海馬依存的記憶の能力を調節していることが明らかになった。本年度は、その神経回路レベルの基盤を明らかにすることを目的に解析を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

各種の α キメリン変異マウス ($\alpha 1$ キメリンおよび $\alpha 2$ キメリンの全身性ノックアウトマウスと各種の条件的ノックアウトマウス) を用いて、スパインに特に注目して詳細な形態学的解析を行った。

組換えDNA実験は、法律と所属機関の規程に従い、機関長に承認された計画に沿って行った。動物を使用する実験は、文科省の定める指針と所属研究機関の規程に従い、機関長に承認された計画に沿って行った。特定化学物質等の取り扱いについては、所属研究機関の規程に従い使用した。研究に用いる実験動物・試薬などの提供に関する MTA は提携済みである。

C. 研究結果と考察

これまでの我々の研究によって、 $\alpha 2$ キメリンが皮質脊髄路の回路形成において軸索誘導を制御していることが明らかになっている (Iwasato et al., Cell 2007)。同様のことが海馬でも起きている可能性がある。それを検証する目的で、終脳 (海馬、大脳皮質) 特異的に $\alpha 2$ キメリンを欠損するマウス (DT- $\alpha 2$ ChnKO マウス) の海馬にお

いて、軸索投射パターンを解析したが、それらに顕著な異常が見られなかった。また、樹状突起の形態にも顕著な異常はみられなかった。

一方、 α キメリンがスパイン形成に関与しているという報告はこれまでになかったが、アクチン細胞骨格を制御するという性質から考えて、 α キメリンがスパイン形態に影響する可能性がある。それを検証する目的で、スパイン形成を解析したところ、3週齢において、 α 2キメリン変異マウスの海馬CA1の錐体細胞のスパインは、コントロールマウスのもものと比較して、大きいことがわかった。ただし、密度には違いがみられなかった。成体で解析したところ、大きさも密度もどちらもコントロールマウスのものよりも有意に増加していることが明らかになった。一方、 α 1キメリンノックアウトマウスではこうした異常は見られなかった。これらの結果によって、 α 2キメリンがスパイン形態を制御していることが初めて明らかになった。

興味深いことに、成体になってから α 2キメリンを欠損した場合にはスパインは正常であった。すなわち、発達期の α 2キメリンが成体におけるスパイン形態を制御していることがわかった。さらに α 2キメリンの作用する時期を特定する目的で、生後10日目の α 2キメリンfloxedマウスにCre組換え酵素を発現するAAVウイルスベクターをインジェクションすることによって、海馬特異的に α 2キメリンをノックアウトしたところ、3週齢においてスパインのサイズの増大が見られた。なお、2週目以降はスパイン成熟が活発に起きる時期であり、 α 2キメリンがスパイン形態形成に重要な働きをすることがさらに確認された。

なお、海馬へのAAVベクター導入によって生後10日目以降の海馬特異的に α 2キメリンをノックアウトしたマウスでは、記憶の亢進も見られた。一方、成体になってから α 2キメリンをノックアウトしても記憶は正常である。

すなわち、発達期の α 2キメリンが海馬のスパイン形態を制御することによって成体での記憶能力を制御している可能性が強く示唆された。

遺伝子変異マウスを用いた神経回路レベルの脳高次機能研究に造詣の深い研究分担者の笹岡教授との議論の機会を得られたことは本研究の推進に有効であった。

D. 研究発表

1. 論文発表

Iwata, R., Matsukawa, H., Yasuda, K., Mizuno, H., Itohara, S., Iwasato, T. Developmental RacGAPa 2-chimaerin signaling is a determinant of the morphological features of dendritic spines in adulthood. *J. Neurosci.* 35, 13728-44. (2015).

Suzuki, A., Lee, L.J., Hayashi, Y., Muglia, L., Itohara, S., Erzurumlu, R.S., & *Iwasato, T. Thalamic adenylyl cyclase 1 is required for barrel formation in the somatosensory cortex. *Neurosci.* 290, 518-529. (2015)

Mita, S., de Monasterio-Schrader, P., Fünfschilling, U., Kawasaki, T., Mizuno, H., Iwasato, T., Nave, K.A., Werner, H.B., & Hirata, T. Transcallosal Projections Require Glycoprotein M6-Dependent Neurite Growth and Guidance. *Cereb. Cortex*, 25, 4111-25 (2015).

Takahashi, A. Lee, R.X, Iwasato, T. Itohara, S, Arima, H., Bettler, B, Miczek, K.A. & Koide, T. Glutamate input in the dorsal raphe nucleus as a determinant of escalated aggression in male mice. *J.Neurosci.* 35, 6452-63 (2015).

2. 学会発表

T. Iwasato. (招待講演)

In vivo Imaging of Circuit Refinement in Cortical Layer 4 of Neonatal Mouse. 第38回日本神経科学大会(シンポジウム) 2015年7月28日-7月31日 (横浜市)

岩里琢治(招待講演)

新生仔バレル皮質における回路発達の二光子イメージング 研究戦略ワークショップ「Strategy for Neuroscience 2015」 2015年9月4日-9月5日 玉川大学(町田市)

岩里琢治(招待講演)

新生仔マウス大脳皮質における神経回路形成のin vivo イメージング 認識と形成研究会 2015 2015年9月20日-9月22日 OIST(沖縄)

S. Katori, S. Itohara, T. Iwasato.

Cell autonomous and non-autonomous functions of RacGAP α -chimaerin in axon guidance at the midline choice point. Society for Neuroscience 2015, 2015年10月17日-10月21日, (Chicago)

W. Luo, H. Mizuno, R. Iwata, S. Nakazawa, T. Iwasato.

Supernova systems enable high intensity single-cell labeling and labeled cell-specific gene-manipulation. Society for Neuroscience 2015, 2015年10月17日-10月21日, (Chicago)

S. Nakazawa, H. Mizuno, T. Iwasato.

Long-term 2-photon imaging of thalamocortical connectivity refinement in the neonatal mouse barrel cortex. Society for Neuroscience 2015, 2015年10月17日-10月21日, (Chicago)

T. Iwasato.

In vivo imaging of neural circuit formation in the neonatal mouse cortex. 遺伝研研究会 Circuit Construction in the Mammalian Brain 2015年12月6日-12月7日 国立遺伝学研究所 (三島市)

岩里琢治 (招待講演)

哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析 新潟大学脳研究所共同研究合同セミナー 2015年12月22日 (新潟市)

S. Nakazawa, H. Mizuno, T. Iwasato.

Long-term 2-photon imaging of thalamocortical connectivity refinement in the neonatal mouse barrel cortex. 遺伝研国際シンポジウム 2016年1月9日-1月11日 (東京)

S. Nakazawa, H. Mizuno, T. Iwasato.

Long-term 2-photon imaging of thalamocortical connectivity refinement in the neonatal mouse barrel cortex. 遺伝研国際シンポジウム 2016年1月12日-1月13日 国立遺伝学研究所 (三島市)

H. Mizuno, T. Iwasato.

In vivo 2-photon imaging of population activity in the neonatal barrel cortex. 新学術領域「適応回路シフト」国際シンポジウム 2016年3月3日-3月4日 同志社大学 (京都市)

香取将太、岩里琢治 (招待講演)

哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析ー神経回路形成における RacGAP α キメリンの新たな役割ー 新潟大学脳研究所共同研究合同セミナー 2016年3月11日-3月12日 (新潟市)

S. Katori, S. Itoharu, T. Iwasato

Spinal RacGAP α -chimaerin is required to establish midline barrier for proper corticospinal projection. 第9回神経発生討論会・難治疾患共同研究拠点共同学術集会 2016年3月18日-19日 (東京)

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

ヒトてんかん原性脳組織における酸化損傷タンパク質の網羅的探索

研究代表者 島田 厚良¹⁾
研究分担者 古川 絢子²⁾、千葉 陽一³⁾、柿田 明美⁴⁾

- 1) 愛知県心身障害者コロニー 中央病院 中央検査部
- 2) 鈴鹿医療科学大学 薬学部
- 3) 香川大学 医学部
- 4) 新潟大学脳研究所

研究要旨

内側側頭葉てんかんに代表されるてんかん原性脳組織では、繰り返すけいれん発作に伴う興奮毒性によって神経細胞死が生じる。興奮毒性による神経細胞死のメカニズムには酸化ストレスが関与すると報告されているが、てんかん焦点においてどのようなタンパク質が酸化損傷を受けるかは不明である。本研究は、内側側頭葉てんかんで外科的切除手術適応となった症例のうち、海馬硬化が認められる症例と、海馬硬化が認められない症例を比較し、神経細胞死が顕著で海馬硬化をきたした海馬組織において酸化損傷を受けたタンパク質の同定を行った。組織から抽出したタンパク質サンプルを二次元電気泳動にて展開し、タンパク質酸化損傷の指標のひとつであるカルボニル化を検出する抗体を用いて、酸化損傷タンパク質をウェスタンブロットにて検出した。定量解析の結果、海馬硬化組織において共通して酸化損傷を受けるタンパク質スポットが3個検出された。従って、てんかん原性脳組織においては、酸化ストレスによって特定のたんぱく質が損傷され、機能低下をきたすことが病態形成に関与するものと考えられる。現在、3個のスポットについて、飛行時間型質量分析装置を用いたタンパク質同定を試みている。

A. 研究目的

興奮毒性による神経細胞死は、新生児では低酸素性虚血性脳症や新生児仮死において認められる。この急性期の障害を脱した後は、重篤な神経学的後遺症を引き起こす事が知られている。興奮毒性による細胞死の原因のひとつとして、酸化ストレスの関与が示唆されている。我々は興奮毒であるカイニン酸を投与した3週齢ラットの海馬において、投与3時間後に特定のタンパク質に酸化損傷が生じる事を報告した (Neurobiol Dis. 43(3):706-714, 2011)。内側側頭葉てんかんに代表されるてんかんの焦点となる脳組織においては、繰り返すけいれん発作に伴う興奮毒性によっ

て、組織は慢性的な興奮毒性に曝されていると考えられ、タンパク質などの生体高分子が酸化損傷を受けている可能性がある。しかし、どのタンパク質が特異的に酸化されるかなどは明らかではなく、酸化ストレスが興奮毒性に起因する神経細胞死に果たす役割は不明な点が多い。本研究では、薬剤抵抗性の内側側頭葉てんかん患者から治療目的で外科的に切除された脳組織を用い、酸化損傷タンパク質の網羅的解析を行って、てんかん焦点において特異的に酸化傷害を受けるタンパク質を同定することが目的である。てんかん原性病態形成において中心的となり得る分子をタンパク質損傷の観点から同定し、酸化ストレスが神経

細胞死に果たす役割を解明することによって、てんかんの病態解明に繋がる基礎的知見を得たい。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究はヒト外科切除脳組織を使用するため、ヘルシンキ宣言を忠実に遵守し、「臨床研究に関する倫理指針」に従って進めている。また、愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所「ヒトおよびヒト材料を対象とする研究」倫理委員会の承認を得て行っている。

研究には、内側側頭葉てんかん患者で海馬硬化が認められた症例（グレードIV）と、海馬硬化が認められなかった症例（グレード0/I）のそれぞれから得られた外科切除脳組織を用いた。各症例から病変対象部位として海馬 CA1 領域、基準部位として側頭葉新皮質を切り出した。各組織からタンパク質を抽出した。タンパク質酸化損傷の指標のひとつであるカルボニル化タンパク質の生成を比較定量し、海馬硬化を呈する海馬組織で強く酸化損傷を受けるタンパク質を探索した。次いで、飛行時間型質量分析装置を用いて、タンパク質同定を試みた。

(1) カルボニル化タンパク質の検出

まず、タンパク質の酸化損傷により生成したカルボニル基に対して、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を反応させ、タンパク質結合 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (DNP) に誘導体化した。2次元電気泳動法により等電点および分子量の差に基づいてタンパク質を分離し、PVDF 膜に転写した後、DNP を特異的に認識する抗 DNP 抗体を用いたウェスタンブロット法を行って酸化損傷タンパク質を検出した。

(2) タンパク質発現変動の解析

抽出したタンパク質を蛍光色素で標識し、2次元電気泳動法にて分離した (2D-DIGE 法)。蛍光イメージャーにて電気泳動像を取得し、ImageMaster 2D Platinum 7.0 を用いて各タンパク質の発現量を定量解析した。

(3) タンパク質の同定

(1)、(2)の結果に基づいて絞り込んだタンパク質スポットをゲルから切り出し、トリプシン消化の後、脱塩・濃縮を行ってサンプルとした。質量分析 (MS) により得られたペプチドピークリストをデータベース検索するペプチドマスフィンガー

プリント (PMF) 法および、MS/MS 解析によるアミノ酸配列決定によりタンパク質を同定した。

C. 研究結果

昨年度までの結果に新たな症例を加え、グレード0/Iを13症例、グレードIVを15症例として解析を進めた。カルボニル化タンパク質を比較した結果、海馬硬化が認められる海馬では、3つのタンパク質スポットが強くカルボニル化されていた。現在、これらのタンパク質の同定を試みているが、まだ同定には至っていない。

タンパク質発現変動解析については、グレード0/I、グレードIVをそれぞれ10症例ずつ用いた。定量解析の結果、海馬硬化が認められる海馬において発現が有意に増加したタンパク質が8個、減少したタンパク質が24個検出された。それぞれについてタンパク質同定を進めている。これまでに、発現が増加したタンパク質として GFAP を、減少したタンパク質として熱ショックタンパク質のいくつかを同定した。他のスポットについても同定を進めている。

D. 考察

本研究から、内側側頭葉てんかんにおいて、海馬硬化が認められる海馬組織で特異的に酸化損傷を受けるタンパク質の存在が明らかになった。このような酸化損傷の蓄積はタンパク質の機能変化をもたらす可能性があり、酸化ストレスがてんかん焦点形成過程において何らかの役割を果たしていると考えられる。海馬硬化の海馬において GFAP の発現が増加したことは、海馬硬化に伴うグリオシスを反映していると考えられる。一方、熱ショックタンパク質は、ストレスに応答して発現誘導されるが、その発現が減少していたことから、海馬硬化組織ではストレスに対する応答性が低下している可能性がある。

E. 結論

本研究から、海馬硬化が認められる海馬組織において特異的に酸化されるタンパク質の存在が明らかになった。タンパク質酸化損傷はリジンを含む塩基性アミノ酸残基が標的となることから翻訳後修飾と競合することも考えられる。従って、酸化ストレスがこれらのタンパク質に何らかの

機能異常を引き起こす可能性が考えられる。今後、酸化損傷タンパク質を同定することにより、海馬硬化へと至る病変形成の過程における酸化ストレスの役割が解明できると予想する。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第57回日本新規得病理学会（平成28年6月2日、弘前市）において発表の予定。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

optineurin タンパク質の研究

研究代表者 川上 秀史¹⁾
研究分担者 大澤 亮介¹⁾ 柿田 明美²⁾ 鈴木 秀規³⁾ 高橋 均⁴⁾

¹⁾広島大学原爆放射線医科学研究所 分子疫学研究分野
²⁾新潟大学脳研究所 生命科学リソース研究センター 脳疾患標本資源解析学
³⁾広島文教女子大学 人間科学部 人間栄養学科
⁴⁾新潟大学脳研究所 病態神経科学部門 病理学分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 ALS の原因遺伝子の一つである Optineurin(OPTN)が、神経変性の発症にどのように機能しているかを明らかにする為に実験を行った。TBK1 と OPTN の遺伝子変異が FTD-ALS の患者で見ついていることから、TBK1 と OPTN の機能について、神経変性の原因のひとつとして考えられる傷害ミトコンドリアの除去 (マイトファジー) との関わりについて調べた。

A. 研究目的

ALS 患者と健常者の脳組織で起こっている変化を生化学的に明らかにし、ALS 患者特異的に生じる ALS 原因遺伝子 Optineurin タンパクの生化学的な変化を明らかにすることで ALS の発症機序を明らかにする。

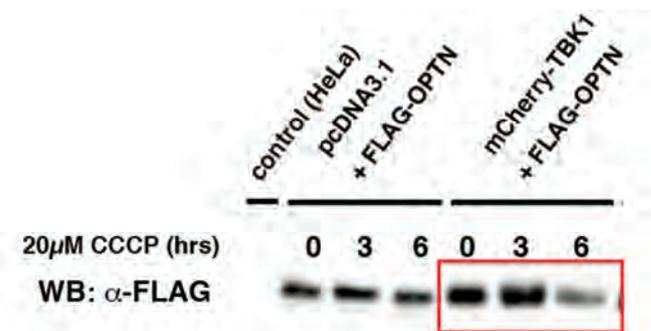
B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

HeLa 細胞に Optineurin および TBK1 をトランスフェクションして、CCCP でミトコンドリアに傷害を与えてから Optineurin タンパクに変化が生じるかどうかを調べた。

C. 研究結果

HeLa 細胞に FLAG-OPTN および FLAG-TBK1 をトランスフェクションして、20 μ M CCCP 刺激、3 時間および 6 時間後に細胞を回収して、サンプルを調製した。前年度の報告にあるようなヒトの脳のサンプルで認められるような分子量の小さい OPTN 断片は認められな

いものの、TBK1 存在下で OPTN タンパクの分解が促進されることが明らかとなった。(図 1)



(図 1)

TBK1 と OPTN を共に発現させると 177 番目のセリン残基(S177)をリン酸化すること (図 2)、さらに S177 のリン酸化がオートファジーの際に LC3 との結合を促進することがこれまでに知られていることから、S177 のリン酸化がマイトファジーの亢進に関わっていると考えられる。



(図2)

D. 考察

ALS の発症機序として傷害ミトコンドリアの除去の異常が可能性の1つとして考えられるが、その過程においてTBK1とOPTNが関わっている可能性が示唆された。TBK1の欠損もしくは変異体、OPTNの欠損または変異体を発現した細胞でミトファジーの進行に異常があるかどうかを確認する必要がある。

E. 結論

細胞内におけるOPTN、TBK1の働き、またこれらの分子のヒト脳組織での状態について更なる解析、検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

脳小血管病変モデルにおけるスタチンの脳組織保護効果

研究代表者 仁藤 智香子 1)
研究分担者 五十嵐 博中 2)

1) 日本医科大学大学院医学研究科 神経内科学分野 2) 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター

研究要旨

脳小血管病変は脳梗塞ないしは脳出血の大きなリスクファクターとなるのみならず、認知機能や遂行機能に多大な障害を惹起する。しかし、現時点では、その進展防止法としてはリスクファクターである血圧の是正があげられるのみで、これとて一度出現した病理変化、徴候の進展にたいする抑制効果は小さいのが現状である。一方、臨床に於いて既に汎用されている dyslipidemia を是正する薬剤であるスタチンが脳血管保護作用を有しており、急性期脳血管障害に対して脳組織保護的に働くという知見が得られている。本実験では脳微小血管障害モデルである SHR ラットにスタチンを投与し、その脳組織保護作用を、血液脳関門障害、脳循環障害の観点から磁気共鳴イメージング (MRI) を用いて評価する。

A. 研究目的

脳小血管病変に対して、スタチンが病変進展抑制効果を有するか否かを動物実験において評価する。具体的には、脳微小血管モデルラットにスタチンを連続投与し、微小血管病変出現、および小血管病変のマーカーである血液脳関門障害の抑制作用が認められるかを MRI にて評価する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

矢守らにより開発された高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rat: SHR) は若年時より体血圧の上昇が認められ、自然経過に於いては脳に微小出血、微小梗塞、白質病変などの脳微小血管病変を呈する。

実験にはこのラットを用いる。生後 8 週齢の SHR を次の 4 群に分けて 3 か月間治療介入を行う。

1. Vehicle 投与群 (対照群)
2. カルシウム拮抗剤投与群: 従来、唯一微小血管病変の進展抑制作用があると考えられる降圧剤としてカルシウム拮抗剤投与を行う。
3. アトルバスタチン投与群: 微小血管保護効果があると考えられるストロングスタチンの投与群である。

る。

4. カルシウム拮抗剤、アトルバスタチン併用群

上記に関して、治療介入後、日本医科大学設置の動物用 MRI 装置を用い、脳循環、血液脳関門障害、炎症性蛋白、活性酸素、脳血管障害の評価を経時的に生体にて評価する。

1. 脳循環障害: CASL 法による脳血流量絶対値の算出により各動物の数値比較を行う。
2. 血液脳関門障害: DCE 法により、Gd-DTPA の脳組織への漏出を 2 compartment model を用いて modeling することにより「漏出し易さ」を数値化し、これをもって血液脳関門障害の指標とする。
3. 微小出血・梗塞の出現頻度: T2* image および T2 image により脳梗塞、脳出血病巣の有無の評価を行う。
4. 活性酸素の産生: ラット脳切片を作成し、ハイドロエチジン法を用いて活性酸素の産生を評価する。

得られたデータの画像化および、評価条件の最適

化、数値化は新潟大学脳研究所、統合脳機能研究センターに設置された画像処理装置にて行う。得られた数値化データより4群間において微小血管障害の状態の差異を検討し、アトルバスタチン投与は脳微小血管障害抑制効果を有するか、および降圧効果を示さない用量のカルシウム拮抗剤との併用で相乗効果が認められるかを検証する。

C. 研究結果

カルシウム拮抗剤群、アトルバスタチン群および両者併用群では、血管内皮における LOX-1 および MCP1 の発現は対照群に比べて有意に抑制されていた。また、併用群では、カルシウム拮抗剤群およびアトルバスタチン単独群に比して、LOX-1、MCP1 ともに有意な陽性率の低下を認め、活性酸素の産生も有意に抑制されていた。また、アトルバスタチン投与は対照群と比較し、有意に脳血管障害(脳梗塞、脳出血)の発生を抑制し、生存日数を有意に延長させた。

D. 考察

脳小血管病変モデルを用いた研究において、自然経過に於いては、病理組織像にて血管内に投与した Evans-blue の脳実質内への漏出、小血管の破綻による微小出血の出現など血液脳関門の障害・破綻を示唆する病変が月齢を経ると共に増加し、更には脳梗塞病変が出現することが確認されている。

今回、SHR においては、低用量スタチンに加えて降圧効果を示さない用量のカルシウム拮抗薬を長期併用投与することにより、抗酸化および抗炎症作用が増強され、血管内皮細胞保護に働く可能性が示唆された。

E. 結論

ラット脳小血管病変モデルにおいて、スタチンは抗酸化および抗炎症作用により血管障害の発生を有意に抑制した。さらに、カルシウム拮抗薬との併用により血管内皮保護効果が増強され、生存期間を有意に延長させたものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし

神経変性疾患におけるアクアポリン(AQP)および AQP 関連タンパクの解析

研究代表者 星 明彦¹⁾

研究分担者 角田 綾子¹⁾、宇川 義一¹⁾、他田 真理³⁾、西澤 正豊²⁾

研究協力者 柿田 明美³⁾

1) 福島県立医科大学神経内科 2) 新潟大学脳研究所神経内科 3) 新潟大学脳研究所病理

研究要旨

本年度は多系統萎縮症 (MSA) 剖検脳における AQP および AQP 関連タンパクを含めたアストロサイトの病理学的解析を進めた。MSA 群の線条体では GFAP あるいは S100 β 陽性アストロサイトーシス像と共に AQP4 および AQP1 の発現は対照群よりも高度であった。一方、AQP 関連タンパクである Kir4.1 および GLT-1 は、MSA 群において対照群よりもそれぞれの発現が増強と減弱を示していた。グルタミン代謝酵素である GS や GDH 発現は MSA 群においていずれも対照群より低下していた。MSA-P 群の方が MSA-C 群より上述の病理学的変化は顕著な傾向であった。今回の結果は、MSA 脳の神経変性プロセスにおいてアストロサイトを介した水・カリウム代謝異常およびグルタミン酸神経毒性が関与する可能性を示唆するものと考えられる。

A. 研究目的

我々は、これまでアルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、多系統萎縮症 (MSA) 剖検脳で有意な AQP および AQP 関連タンパクの発現変化を免疫組織学的に確認し、神経変性疾患におけるこれらの役割について考察してきた (Hoshi et al., J Neuropathol Exp Neurol 2012; Hoshi et al., Brain Pathol 2016)。

一方、近年脳内リンパ流を制御する Glymphatic system 仮説 (Nedergaard, Science, 2013) の知見が集積されつつあり、アストロサイトに発現する AQP4 がその中心的役割を担うことが判明してきた。我々がこれまで示してきた AQP および AQP 関連タンパクの解析結果は神経変性疾患の Glymphatic system 破綻を示唆し、疾患発症や変性過程に関与する可能性が考えられる。

本年度は、MSA 剖検脳における AQP および AQP 関連タンパクを含め、アストロサイトに特異的に

発現する分子群の病理学的解析をさらに進めた。

B. 研究方法

MSA 群 (n=8) は MSA-C (n=4) と MSA-P (n=4) の 2 群に分類し、線条体 (尾状核、被殻) をターゲットとした。免疫組織学的に線条体での GFAP、S100 β 、AQP4、AQP1、内向き整流性カリウムチャネル Kir4.1、グルタミン酸トランスポーター GLT-1、グルタミン合成酵素 (GS) およびグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) 発現について対照群 (n=5) と比較し、さらに glial cytoplasmic inclusion (GCI) の多寡との関連性にも着目し解析を行った。

C. 研究結果

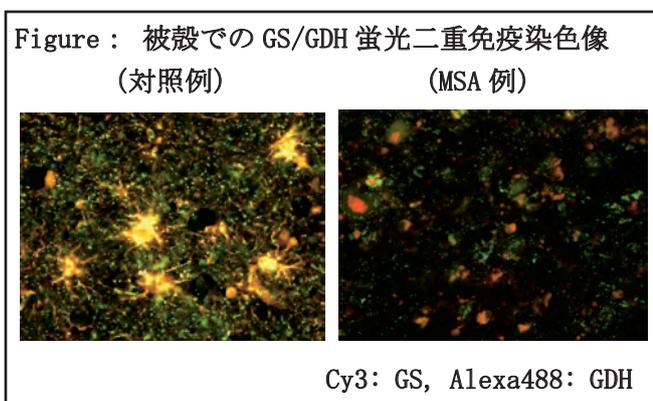
MSA 群では対照群よりも GFAP あるいは S100 β

陽性アストロサイトーシス像と共に AQP4 と AQP1 発現の増強が認められた。

一方、AQP 関連タンパクである Kir4.1 と GLT-1 免疫染色性については、MSA 群において対照群よりもそれぞれの発現が増強と減弱を示した。グルタミン代謝酵素である GS や GDH 発現は MSA 群においていずれも対照群より低下傾向であった (Figure)。

サブグループの解析結果としては、MSA-P 群の方が MSA-C 群より上記の変化は顕著であり、また尾状核よりも被殻でその傾向が強かった。

なお、 α -synuclein に標識される GCI は MSA-C 群よりも MSA-P 群の方が、またそれぞれの群において尾状核よりも被殻において高度に蓄積していた。



D. 考察

MSA 脳における詳細なアストロサイト特異的蛋白の解析は検索し得た範囲では涉猟できず、AQP の動態やグルタミン酸代謝、さらにはこれらと GCI 沈着との関連性について注目した研究もない。

今回の結果は、MSA 脳で AQP やその関連タンパクあるいはグルタミン酸代謝酵素が有意に発現変化することを示している。我々はこれらの変化と GCI の蓄積程度の軽重に何らかの相関性があることを想定しており、現在定量的なデータ解析を進めている。これらのアストロサイト特異的蛋白の病理学的変化は、MSA における GCI 病理を修飾する可能性があるものと考えられる。

E. 結論

MSA の神経変性プロセスには水・カリウム代謝異常およびグルタミン酸神経毒性が関与する可能性がある。これらを制御するアストロサイトに

特異的に発現する分子群の解析を進めることによって、新しい観点で MSA の神経変性メカニズムを解明することができるかもしれない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 in the temporal neocortex of patients with Parkinson's disease. Akihiko Hoshi, Ayako Tsunoda, Mari Tada, Masatoyo Nishizawa, Yoshikazu Ugawa, Akiyoshi Kakita. Brain Pathol, in press.
2. Increased neuronal and astroglial aquaporin-1 immunoreactivity in rat striatum by chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid. Akihiko Hoshi, Ayako Tsunoda, Teiji Yamamoto, Mari Tada, Akiyoshi Kakita, Yoshikazu Ugawa. Neurosci Letters, minor revision.

2. 学会発表

1. 第 56 回日本神経病理学会総会. 多系統萎縮症剖検脳におけるアストロサイトの病理学的解析. 星明彦、角田綾子、宇川義一、西澤正豊、他田真理、柿田明美. 平成 27 年 6 月、福岡.
2. 第 27 回日本脳循環代謝学会総会. 多系統萎縮症におけるアストロサイト特異的タンパク質の解析. 星明彦、角田綾子、宇川義一、西澤正豊、他田真理、柿田明美. 平成 27 年 10 月、富山.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

多系統萎縮症剖検脳における TPPP (p25 α) 蛋白の発現解析 およびその制御下流遺伝子の探索

研究代表者 石川 欽也¹⁾

研究分担者 柿田明美²⁾、他田真理²⁾、高橋均²⁾、水澤英洋¹⁾、
横田隆徳¹⁾、太田浄文¹⁾、尾崎心¹⁾

1) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学分野 2) 新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野

研究要旨

多系統萎縮症については、オリゴデンドログリア特異的タンパクである Tubulin polymerization promoting Protein (TPPP) の多系統萎縮症における病態への関与、細胞内局在変化を解析し、それらを他のオリゴデンドログリア変性を来たす疾患との相違について検討する。また、非中枢神経疾患患者の標本および凍結脳組織を用いて、対照状態との違いを探索する。加えて、病理学的変化をもたらす根本原因を解明するためにコントロール例と多系統萎縮症例の凍結脳での網羅的遺伝子解析も行った。

A. 研究目的

多系統萎縮症はオリゴデンドログリア（以下 ODG）の変性が原因となる孤発性脊髄小脳変性症である。ODG 特異的蛋白である TPPP が示す TPPP の細胞内局在異常に着目し病理学的解析を用いて多系統萎縮症においての細胞内局在変化と病態への関与を明らかにすること、多系統萎縮症で生じている脳白質での網羅的遺伝子発現解析を行い根本的な多系統萎縮症発症の原因を解明することを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

非中枢神経疾患患者（コントロール疾患）の剖検脳を抗 TPPP 抗体を用いた免疫組織化学にて解析し脳部位ごとに TPPP 細胞内局在の正常パターンを分析する。さらに多系統萎縮症患者ではコントロールと比較してどのような局在変化を来しているかを解析する。TPPP の局在について、GCI の主たる構成タンパクである α シヌクレインの分布との関係についても、リン酸化 α シヌクレイン抗体と TPPP 抗体との蛍光 2 重染色を行い、検討する。また MSA におけるミトコンドリア異常について検討するために TOMM20 抗体を用いて蛍光

染色を行なった。

定量的評価を行うために多系統萎縮症およびコントロール凍結脳を用いて脳部位ごとの TPPP 局在の量的変化を免疫ブロット法とマイクロアレイ法を用いて評価する。

上記の病理学的変化をもたらす根本原因を明らかにするために凍結脳を用いた網羅的遺伝子発現解析（マイクロアレイ）を行い、TPPP 制御下流遺伝子の探索を行う。

（倫理面への配慮）

公表された患者剖検脳を用いた染色結果には本人を特定できる情報はない。

C. 研究結果

これまで TPPP はオリゴデンドログリアの細胞質にのみ存在するとされていた。東京医科歯科大学脳神経病態学研究室にて独自に感度、特異度ともに優れた抗 TPPP 抗体を作製した。その抗体を用いた解析では TPPP はオリゴデンドログリアの細胞質だけではなく核質および核膜周囲にも免疫反応が強く認められた。MSA 患者脳を用いた蛍光 2 重染色では α シヌクレイン陽性の GCI を形

成する ODG と、GCI が明確でない ODG を計測し比較したところ、GCI 陽性 ODG では、統計的に有意に核内 TPPP が消失していた(19.6 ± 10.9 vs 48.63 ± 10.37 %, p<0.05)。MSA で α -synuclein 陽性の GCI を持たない ODG とコントロール患者脳の ODG の核内 TPPP 陽性率を比較すると MSA 患者で有意に核内 TPPP の減少を認めた(48.63 ± 10.37 % vs 62.4 ± 13.5 %, p<0.05)。MSA では α シヌクレインの沈着よりも早期に核内 TPPP が減少していることが推測された。ミトコンドリア関連蛋白 TOMM20、TPPP 抗体、リン酸化 α シヌクレインを用いた蛍光 3 重免疫染色では、TPPP はミトコンドリア蛋白 TOMM20 の充満で膨化した ODG 細胞体へ集積し、ほぼ一致して α シヌクレインが集積する像が見られた。このような、TPPP と TOMM20 の細胞質内集積は、 α シヌクレイン沈着前の細胞にも見られた。

また、マイクロアレイ解析では、大脳白質での検索で変性が生じる早期の状態の遺伝子発現プロファイリングを行った。結果として興味深い遺伝子を同定した。現在、検体数を増やして意義を確認中である。そのうえで、培養細胞などを用いて病態への関与を探索する。

D. 考察

MSA の ODG において TPPP は細胞質に異常集積することが報告されているが、その詳細は、まだ解明されていなかった。今回の研究で我々は、TPPP が核に多く存在することと、MSA の ODG では核から辺縁、細胞質の中のミトコンドリアに関連して集積することを見出した。さらに、この変化は、GCI 形成より先行することが示唆されたが、これはこれまでの報告の内容とも一致する。別途我々が行った研究では、TPPP は本来ミトコンドリアにも存在する蛋白であることが示されている。今後この MSA でのミトコンドリア内集積が二次的な、例えば何らかの防御的機序によって起きているのか、あるいは、ミトコンドリアへの集積が病態の悪化因子であるのか、検討する必要があると考えた。

マイクロアレイ解析については興味深い遺伝子発現変動を同定しており、現在解析を続行中である。

E. 結論

TPPP は ODG 特異的な細胞質内蛋白として知られていたが、今回の研究で ODG 核にも豊富に存在することと、MSA 脳では変性早期から核内から TPPP が減少し、細胞体へ移行しミトコンドリア蛋白とともに集積することが判明した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Acta Neuropathol Commun. 2014 Sep 11;2:136.
doi: 10.1186/s40478-014-0136-4.

Relocation of p25 α /tubulin polymerization promoting protein from the nucleus to the perinuclear cytoplasm in the oligodendroglia of sporadic and COQ2 mutant multiple system atrophy.

Ota K, Obayashi M, Ozaki K, Ichinose S, Kakita A, Tada M, Takahashi H, Ando N, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K.

2. 学会発表

太田浄文、石川欽也、大林正人、尾崎心、柿田明美、高橋均、水澤英洋： Glial cytoplasmic inclusion を形成する多系統萎縮症の oligodendroglia では、チューブリン重合促進蛋白 TPPP が核から消失する。第 54 回日本神経学会学術大会、2013 年 5 月 30 日、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

悪性脳腫瘍の非コード RNA の機能解析を基盤とした分子標的創薬の展開

研究代表者 山中 龍也^{1,2)}
研究分担者 藤井 幸彦³⁾

- 1) 京都府立医科大学・医学部・保健看護学研究科医学講座
- 2) 京都府立医科大学・医学研究科・腫瘍分子標的治療学分野
- 3) 新潟大学・脳研究所・脳神経外科

研究要旨

中枢神経原発悪性リンパ腫 (PCNSL) 腫瘍組織から DNA/RNA を抽出し、mRNA, SNP アレイ、miRNA 解析を行ってきた。特に PCNSL34 症例の遺伝子発現解析から患者の予後と関連する遺伝子 21 種類を統計学的方法を用いて選択し、それらの遺伝子の発現レベルから、患者の予後予測式を考案した。さらに、これらの中から 3 種類の遺伝子産物に対する抗体を用いた免疫組織学的解析と年齢、KPS を用いた簡便法で予後が良く予測できることが判明した。現在、高速シーケンス解析から DNA/RNA 解析を進めているが、今後は腫瘍特異的な遺伝子異常を明らかにし、バイオマーカー開発、創薬に向けた研究を進める予定である。

A. 研究目的

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)の腫瘍組織を、次世代型シーケンサーを用いて RNA シーケンス解析を行い遺伝子変異・再構成の異常、コードおよび非コード RNA の発現を検討する。以上から疾患特異的な診断治療標的となりうる分子を選択し、バイオマーカーの開発、および分子標的創薬に向けた研究を展開する。

B. 研究方法

PCNSL 対象症例について臨床サンプルと臨床情報の収集を行った。症例の年齢、性別、Karnofsky Performance Status (KPS)、画像所見、髄液所見、治療法、治療効果、副作用、転帰について詳細な検討を行った。PCNSL の凍結腫瘍組織から DNA/RNA を抽出し、エクソーム、mRNA, SNP アレイ、miRNA 解析を行い、特に患者の予後と関連する遺伝子を選択し、それらの遺伝子を標的とした創薬への取り組み、さらには新しい診断方法の開発に向けた研究を進めている。

2000 年～2010 年に外科的切除ないし生検術を受けた患者 34 人から、PCNSL 標本を得た。患者の平均年齢は 65.5 歳 (44-76 歳) であり、男性 19 人、女性 15 人であった。手術前の KPS は、80 以上が 10 人、60-70 が 16 人、50 以下が 8 人であった。病理組織学的には全て瀰漫性大細胞性 B リンパ腫であった。腫瘍の診断後に、患者は高用量メソトレキセート単独ないし高用量メソトレキセートを含む多剤併用化学療法による第一選択化学療法を受け、外照射療法 (標準線量 20-40 Gy) および再発時に多剤併用化学療法を受けた。初期治療および維持治療中の腫瘍の再発について、MRI または CT により観察した。全症例の 5 年生存率は 46.37%であった。摘出腫瘍から mRNA を抽出し、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Expression array (Affymetrix, Inc.) (約 47,000 遺伝子を含む) を用いて各 mRNA の発現量を測定した。これらの発現プロファイルと、追跡調査により得た各患者の術後の生存期間との相関を Random survival forest model を用いて統計的に処理し、発現プロファイルと生存期間との間に強い相関を示す遺伝子を同定した。さらに、これ

らの遺伝子の発現値を用いた予後予測法を考案した。

現在、これらの腫瘍 RNA を用いた高速シーケンス解析を終了し、スーパーコンピューター解析を行っている。これらの研究は倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

GeneChip 解析（遺伝子発現解析）から患者の予後と関連する遺伝子 21 種類を統計学的方法を用いて選択し、それらの遺伝子の発現レベルから患者の予後予測式を考案した。高用量メソトレキセートにより治療された症例および高用量メソトレキセートを含む多剤併用化学療法により治療された症例に拘わらず 21 遺伝子のセットによって予後が良く予測可能であった。21 遺伝子を用いた予測式により分類された群について、Kaplan-Meier 曲線を描くと Logrank 検定のための p 値 (p) は、 $p < 0.0001$ であった。この結果は、21 遺伝子予測式により予後を良く予測可能であるという事を示す。

さらに、Z 式を算出した方法で、臨床データと免疫組織化学染色の結果を考慮に入れた、より簡略化した予後予測式を考案した。

$$\cdot Z_2 = 0.04 \times \text{AGE} + 1 \times \text{DEEP. CONTACT} + 0.82 \times \text{PPP3R1} + 0.75 \times \text{BRCA1}$$

(ここで AGE は年齢値、DEEP. CONTACT とは深部病変があれば 1, なければ 0, PPP3R1, BRCA1 とは免疫組織化学染色で 1 ポイント以上なら 1, 0 ポイントなら 0)

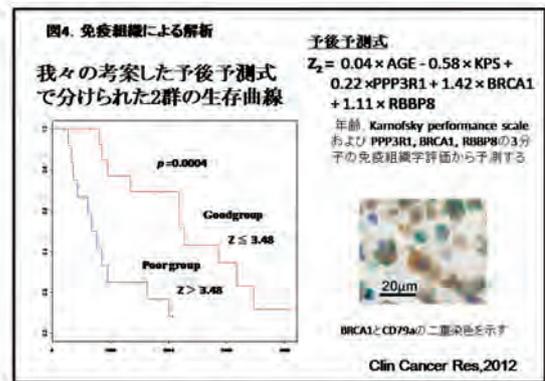
・ルール

$$Z_2 > 3.48 \Rightarrow \text{Poor 群}$$

$$Z_2 \leq 3.48 \Rightarrow \text{Good 群}$$

このルールに従って生存曲線を描いたものを図に示す。Z₂ 式でより簡易に予後良好群と不良群が分けられることがわかる。Z₂ 式の有用性は他の症例群 (validation set) を用いた解析によっても確かめられた。

RNA シーケンス解析は PCNSL30 症例について終了し、現在、コンピューター解析を行っている。



D. 考察

がんの基礎研究の進歩から、同じ病理組織型であってもその分子病態は個々の腫瘍ごとにより相違があることが明らかになってきた。そうした背景から、がんの薬物療法はバイオマーカーを用いて治療方法の選択がなされるようになっている。がん治療はバイオマーカーによって効果の期待できる症例を選別することによる個別化医療が主流となると考えられている。

中枢神経系原発悪性リンパ腫 (PCNSL) は中枢神経系に原発する節外性非ホジキン型リンパ腫で、多くは B 細胞リンパ腫である。PCNSL はあらゆる年齢層に発生するが、50-60 歳代の高齢者に好発し、その頻度は最近増加している。本邦では現在、High dose Methotrexate (HD-MTX) 3.5 g/m² 化学療法 3 コース後、全脳放射線治療 (30-40 Gy) が広く行われている。その 5 年生存率は約 30%、生存期間中央値は 33-39.5 か月とされている。

本治療法の問題点として整理してみると、

- (1) 生存率の向上が見られたが、全身性非ホジキン病と比べ治療成績は不良である。
- (2) 治療効果を予測するバイオマーカーがないため、画一的な治療が行われている。
- (3) 副作用として晩発性の神経毒性がある。
- (4) 多くは再発し治療抵抗性となり、新たな治療スケジュールの開発が待たれている。

実臨床では、PCNSL という臨床診断がなされると、前記にもあるような画一的な治療がなされるが、その予後は 1 年以内に再発し転帰不良となる

症例から、10年以上にわたって寛解が得られる症例まで、治療に対する感受性は症例毎でかなりの相違がある。本研究により治療困難な PCNSL のバイオマーカーが明らかにされると、予後が不良と考えられる症例には造血幹細胞移植などを併用することにより強力な薬物療法を選択することなどから予後の改善が期待できる。このようにバイオマーカーを用いた個別化治療が確立され、治療成績の向上が期待できる。さらに、シーケンス解析から腫瘍特異的な遺伝子異常が明らかにされ、診断マーカーとしての発展、分子標的創薬が展開されることが期待される。

E. 結論

今後、高速シーケンサーを用いた RNA 解析から、遺伝子変異、遺伝子発現情報解析も行い、体系的な解析から標的分子を同定し、分子標的創薬を進める。

F. 研究発表

1. 原著論文発表

1. Koyama-Nasu R, Hayashi T, Nasu-Nishimura Y, Akiyama T and Yamanaka R: Thr160 of Axin1 is critical for the formation and function of the β -catenin destruction complex. Biochemical biophysical Res Comm. 2015 ;459(3):411-415.
2. Nakajima S, Morii K, Takahashi H, Fujii Y, Yamanaka R: Prognostic significance of S-phase fractions in peritumoral invading zone analyzed by laser scanning cytometry in patients with high-grade glioma (preliminary study). ONCOLOGY LETTERS 11:2106-2110,2016.

2. 書籍発表

1. Yamanaka R, Hayano A: Radiation-induced glioma., pp129-141, In Terry Lichtor (ed.), Molecular Considerations and Evolving Surgical Management Issues in the Treatment of Patients with a Brain Tumor, INTECH, 2015.
2. Kanayama T, Hayano A, Yamanaka R: MICRORNAS REGULATION AND PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. In

Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, in press.

3. Yamanaka R: SALVAGE THERAPY FOR PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, in press.
4. Yamanaka R, Yoshioka S, Fujimoto S, Iwawaki Y: LONG-TERM OUTCOME AND SUPPORTIVE CARE IN PATIENTS WITH PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, in press.

3. 学会発表

1. Yoshida K, Yamanaka R and Ogawa S (他 31 名). Genetic Basis of Primary Central Nervous System Lymphoma. 57th ASH Annual Meeting and Exposition. Orland, FL, December 5-8, 2015.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

UBQLN2 コンディショナルノックアウトマウスの解析に基づく 神経変性機序の解明

研究代表者 田中 章景¹⁾
研究分担者 土井 宏¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾

- 1) 横浜市立大学大学院医学研究科 神経内科学・脳卒中医学
2) 新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野

研究要旨

われわれがポリグルタミン病核内凝集体の構成成分として同定した UBQLN2 は家族性 ALS の責任遺伝子であることが明らかにされたことから、両疾患の病態に深く関与する機能分子と考えられる。そこで UBQLN2 が神経変性の病態形成に係わる機序を明らかにするために、運動ニューロン特異的な *Ubqln2* ノックアウトマウスの作成をめざしている。UBQLN2 Flox マウスを維持し、♂ *Actb-Cre* マウスと♀ *Ubqln2^{lox/flox}* を掛け合わせ、全細胞でのノックアウトマウスを作成している。これにより、神経変性の病変選択性を明らかにする。また、野生型、変異型の UBQLN2 に結合するタンパクを網羅的に同定することにより、UBQLN2 が神経変性に係わる病態機序の解明を行った。

A. 研究目的

われわれがポリグルタミン病核内凝集体の構成成分として同定した UBQLN2 は家族性 ALS の責任遺伝子であることが明らかにされたことから、両疾患の病態に深く関与する機能分子と考えられる。UBQLN2 は、核内凝集体への sequestration により、また遺伝子変異により、loss of function によって両疾患の病態を形成することが予想される。そこで、UBQLN2 のコンディショナルノックアウトマウスを作成・解析することで、両疾患に共通する神経変性機序を明らかにする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

Ubqln1 のショウジョウバエ、オルソログ *Dsk2* については過剰発現、ノックアウトともに致死的であることが知られている。そこで、コンディショナルなノックアウトを行うべく、loxP 配列で UBQLN2 遺伝子を挟み込む UBQLN2 Flox マウスと、細胞群特異的な Cre 発現をおこすマウスを交配し、その表現型と病理像を明らか

にする。まず、運動ニューロンに Cre 発現をおこす VAChT-Cre マウス(Misawa et al, Genesis 2003)との交配により、運動ニューロン特異的な *Ubqln2* ノックアウトマウスを作成する。*Ubqln2* はポリユビキチン化されたタンパク質とプロテアソーム間のアダプターとして機能しているので、ノックアウトによってユビキチン-プロテアソーム系による基質の分解障害、蓄積が生じる可能性が予想される。そこで、マウス樹立後は、運動機能の観察に加え、ユビキチン陽性封入体、TDP-43、FUS/TLS の細胞質内蓄積をはじめとする ALS 患者運動ニューロンで観察される各種の病理学的所見がこのマウスモデルでも見られるかを検討する。これまでの我々の *dynactin1*, TDP-43 のコンディショナルノックアウトマウス作成の経験(PLoS One 2013, Brain 2013)では、Cre 発現の効率から考えると *Ubqln2* の発現は正常の 50%程度と予想され、完全にノックアウトされるわけではない。この点から、本モデルが ALS 病態を反映していることが明らかになれば、治療戦略として UBQLN2 活性化をめざし、in vitro で

スクリーニングを行った薬剤のマウスへの投与を試みる。

これらの各種実験において、新潟大学脳研究所動物資源開発分野の笹岡教授の助言を得ながら研究を推進する。また、笹岡教授と共同して、マウスの発生工学・生殖工学に関する助言をうけ、実験経過の討論を行い、全ニューロンに Cre 発現をおこすマウスをはじめとした Cre 発現マウスとの交配も同時平行で行い、特にどのニューロンにおいて神経変性が高度に生じやすいかを明らかにすることで、神経変性疾患の病変選択性の形成機序についても検討する。

C. 研究結果

われわれは、平成 26 年度より *Ubqln2* flox マウスの作成を開始し、相同組み替えベクターの構築、組み替え ES 細胞の樹立、キメラマウスの作成を経てヘテロマウス (*Ubqln2*^{flox/+}) を取得し、薬剤耐性遺伝子の除去を行った。平成 27 年度は♀のホモ接合性マウス (*Ubqln2*^{flox/flox}) マウスと♂のヘミ接合性マウス (*Ubqln2*^{flox}) を作成し (*Ubqln2*は X 染色体上の遺伝子である。)、恒常的に flox マウスを維持可能な状態とした。現在は♂*Actb*-Cre マウスと♀*Ubqln2*^{flox/flox} を掛け合わせ、全細胞でのノックアウトマウスを作成している。

D. 考察

コンディショナルノックアウトマウスについてはまだ作成中であるため、これに直接関与する研究成果はないが、質量解析により UBQLN2 結合タンパクの網羅的同定を行い、野生型 UBQLN2 と変異型 UBQLN2 で異なる結合性を示す結合タンパク質の同定に成功した。この結合タンパクは UBQLN2 に特異的なドメインであり、変異が集中している PXX ドメインを欠失させると結合性が低下することを確認している。

平成 28 年度には、全ニューロンに Cre 発現をおこすマウスをはじめとした Cre 発現マウスとの交配を行うことで、神経変性の病変選択性を明らかにする。

また、野生型、変異型の UBQLN2 に結合するタンパクを網羅的に同定することにより、UBQLN2 が神経変性に係わる病態機序を解明する。

E. 結論

UBQLN2 Flox マウスの作成が終了し、今後コンディショナルノックアウトマウスの解析を行い病態解析を進めていく。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

免疫不全を伴わない患者に発生する Epstein-Barr virus 関連の 中枢神経原発悪性リンパ腫の臨床病理学的検討

研究代表者 杉田 保雄 1)
研究分担者 柿田 明美 2)

1) 久留米大学医学部病理学講座 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

EBV 関連陽性の PCNS リンパ腫の臨床事項および EBV 関連の PCNS リンパ腫の進展と宿主の免疫機能との相関関係を検討した。今回の研究では EBV 関連の PCNS リンパ腫症例群が EBV 陰性の PCNS リンパ腫群と比較して統計学的には予後に有意差は得られなかった。しかし、EBV 関連の PCNS リンパ腫症例群と比較して EBV 陰性群では長期生存例がみられ、両者に差がある可能性は否定できない。本腫瘍と進展と宿主の免疫機能について PD-1/PD-L1 発現で検討した。EBV 陰性の PCNS リンパ腫群では高頻度に PD-1 発現が腫瘍浸潤リンパ球にみられ、一方、PD-L1 発現が腫瘍、組織球にみられた。この結果から宿主と腫瘍との間に免疫寛容の状態が成立していることが考えられる。一方、EBV 関連の PCNS リンパ腫症例群では PD-L1 の発現は陰性例と大差がないが、PD-1 については 83% の症例で PD-1 陽性リンパ球はほとんどみられなかった。この現象は腫瘍と宿主間における免疫寛容が不成立というよりも、むしろ宿主側の免疫応答の減弱を示唆する所見と考えられた。

A. 研究目的

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSリンパ腫)の脳内浸潤機構、腫瘍発生についてのEpstein-Barr Virus (EBV)の役割を明らかにする。本腫瘍の臨床事項の解析を行い、さらにEBV関連のPCNSリンパ腫の進展と宿主の免疫機能との相関関係を明らかにしてPCNSリンパ腫の臨床病理像を解明する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

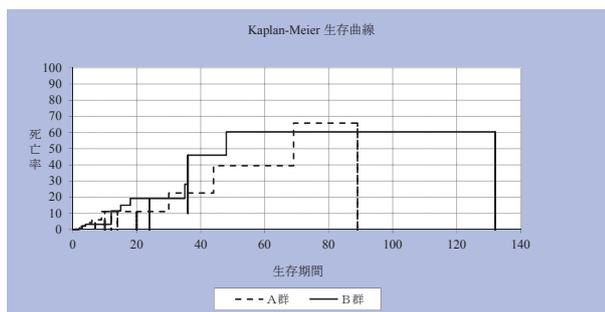
- ① 前年度 in situ hybridization (ISH) で検出した EBV 陽性例の臨床事項を検討する。
- ② 前年度 in situ hybridization (ISH) で検出した EBV 陽性例とほぼ年齢、性別が一致する EBV 陰性例と臨床事項を照合させて EBV 関連の

PCNS リンパ腫の臨床上的特徴を明らかにする。

- ③ 前年度と同様に PCNS リンパ腫症例を対象として腫瘍の免疫回避機構に関わっている免疫チェックポイント分子である Programmed death 1(PD-1) およびそのリガンドである PD-L1 検討する。
- ④ EBV 陽性 PCNS リンパ腫症例で PD-1/ PD-L1 の発現を検討して EBV 陽性 PCNS リンパ腫と宿主の間の免疫応答の状態を検討する。
- ⑤ 臨床病理学的な検討を行い、①～④で得られたデータとリンパ腫症例の予後、生物学的態度との相関関係を明らかにする。
- ⑥ 本研究の実施にあたっては久留米大学倫理委員会での承認の上で行われた。

C. 研究結果

- ① 今回の研究で予後調査可能であった EBV 関連の PCNS リンパ腫症例は ISH で検出された 23 例中 20 例であった。性別では男性:11 例、女性:9 例であった。年齢は 56 歳から 96 歳(平均 67 ± 18 歳)であった。治療内容としては生検(BP)および外科手術(SR)のみの症例は 7 例であり、BP および SR に放射線・化学療法(RA, CH)を受けた症例は 13 例であった。BP, SR のみの症例の生存期間あるいは追跡期間は平均 5.4 ± 7.0 ヶ月であり、BP, SR, RA, CH の治療を受けた症例では平均 27.7 ± 28.2 ヶ月であった。EBV 関連の PCNS リンパ腫症例においても BP, SR, RA, CH の治療群の方が BP, SR のみの治療群に比べて生存期間あるいは追跡期間は長い傾向がみられた ($P=0.02$)。
- ② 今回の研究で予後調査可能であった EBV 関連陽性の PCNS リンパ腫 19 症例と今回の研究で予後調査可能であった EBV 陰性の PCNS リンパ腫 20 症例との比較検討を Kaplan Meier 生存曲線により行った(下図)。



A 群は EBV 関連陽性の PCNS リンパ腫であり、B 群は EBV 陰性の PCNS リンパ腫である。長軸方向は生存月数を示している。EBV 陰性の PCNS リンパ腫の方が予後が良い傾向が伺われたが、Log-rank test による検定では有意差は得られなかった ($P=0.48$)。

- ③ EBV 陰性の PCNS リンパ腫での PD-1/PD-L1 の検討可能例は 21 例であり、腫瘍細胞が PD-L1 陽性を示した例は 21 例中 11 例であり、陰性 10 例中 5 例で介在組織球が陽性であった。PD-L1 陽性 16 例では全例で TIL が PD-1 陽性を示した。PD-1, TIA-1, FOXP3 陽性の TIL 数の平均値はそれぞれ 39 ± 53 , 81 ± 82 , 5.90 ± 6.80 であり、標識数において PD-1 は TIA-1 は統計学的に相関を示したが ($r=0.71$)、FOXP3 とは相関しなかった ($r=0.23$)。TIL における TIA-1 標識数は

FOX 標識数よりも有意に高かった ($p < 0.001$)

一方、EBV 陽性の PCNS リンパ腫での PD-1/PD-L1 の検討可能例は 12 例であり、腫瘍細胞が PD-L1 陽性を示した例は 12 例中 4 例であり、陰性 8 例中 4 例で介在組織球が陽性であった。PD-1 については EBV 陰性例の PD-1 陽性リンパ球の平均値を示した症例は 2 例のみであり、残り 10 例 (83%) では PD-1 陽性リンパ球はほとんどみられなかった。また腫瘍細胞からの PD-L1 陽性 4 例では全例でリンパ球は PD-1 陰性を示した。

D. 考察

- ① Oyama らは中枢神経以外で発生した EBV 関連陽性の B 細胞型リンパ腫の予後は陰性のものに比較して高齢者に好発し、生物学的に悪性度が高く予後不良であったことを報告している (1)。Utsuki らは EBV が ISH で強く発現した症例ほど予後不良であったことを報告している (2)。一方、Jama1 らは予後は症例によって様々であり、一定の傾向はみられなかったと報告している (3)。今回の私共の研究では EBV 関連陽性の PCNS リンパ腫症例群の方が EBV 陰性の PCNS リンパ腫群に比較して予後が悪い傾向が伺われたが、Log-rank test による検定では有意差は得られなかった ($P=0.48$)。その理由として 1) 比較対象とした EBV 陰性の PCNS リンパ腫群も高齢者例が多くて放射線、化学療法などが完遂できなかった例が多かったこと。2) 両群共に症例数が少なかったことの 2 点が考えられる。しかし、EBV 関連陽性の PCNS リンパ腫症例群では長期生存例は皆無であり、今後、症例数を増やして再検討する必要がある。

- ② Programmed death 1 (PD-1) は免疫チェックポイント分子であり、そのリガンドである PD-L1 と共に腫瘍細胞の免疫回避機構に重要な役割を担っている。今回の研究では EBV 陰性の PCNS リンパ腫群では高頻度に PD-1 の発現が腫瘍浸潤リンパ球、PD-L1 の発現が腫瘍、介在する組織球にみられて宿主と腫瘍との間に免疫寛容の状態が成立していることが

明らかになった。

一方、EBV 関連陽性の PCNS リンパ腫症例群では 12 例中 4 例で腫瘍細胞に PD-L1 が発現し、他の 4 例においても介在組織球に PD-L1 発現がみられた。しかし、PD-1 については EBV 陰性例の PD-1 陽性リンパ球の平均値を示した症例は 2 例のみであり、残り 10 例では PD-1 陽性リンパ球はほとんどみられなかった。また腫瘍細胞からの PD-L1 陽性 4 例では全例でリンパ球は PD-1 陰性を示した。これは宿主と腫瘍との間に免疫寛容の状態が成立していないというよりも、むしろ宿主側の免疫応答の減弱を示唆する所見と考えられる。したがって EBV 関連陽性の PCNS リンパ腫症例と陰性症例では腫瘍発生の機序に差があることが示唆される。

参考文献

1. Oyama T et al. (2007) Senile Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. Clin Cancer Res 13:5124-5132
2. Utsuki et al (2011) Epstein-Barr virus-associated primary central nervous system lymphoma: is incidence of EBV expression associated with median survival? Brain Tumor Pathology 28:145-149
3. Jamal SE et al (2014) Primary central nervous system Epstein-Barr virus-positive large B-cell lymphoma of the elderly: clinicopathologic study of five cases. Brain Tumor Pathology 31:265-273

E. 結論

- ① EBV 関連陽性の PCNS リンパ腫症例群の方が EBV 陰性の PCNS リンパ腫群に比較して予後が悪い傾向が伺われたが、Log-rank test による検定では有意差は得られなかった (P=0.48)。
- ② EBV 関連陽性の PCNS リンパ腫症例群では、腫

瘍細胞に PD-L1 が発現し、他の 4 例においても介在組織球に PD-L1 発現がみられた。しかし、PD-1 については EBV 陰性例の PD-1 陽性リンパ球の平均値を示した症例は 2 例のみであり、残り 10 例では PD-1 陽性リンパ球はほとんどみられなかった。また腫瘍細胞からの PD-L1 陽性 4 例では全例でリンパ球は PD-1 陰性を示した。これは宿主と腫瘍との間に免疫寛容の状態が成立していないということではなくて、むしろ宿主側の免疫応答の減弱を示唆する所見と考えられる。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Primary central nervous system lymphomas and related diseases: Pathological characteristics and discussion of the differential diagnosis Neuropathology Nov 26, [Epub ahead of print].

2. 学会発表

第 33 回日本脳腫瘍病理学会・2015 年 5 月 29 日・高松

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の発症機構の解明

研究代表者 坂井 健二¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾

1) 金沢大学附属病院 神経内科 2) 新潟大学脳研究所 デジタル医学分野

研究要旨

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は脳や髄膜内の血管へのアミロイドの沈着により生じる疾患である。CAA では沈着した A β に対する免疫反応によって生じる炎症・血管炎 (CAA 関連炎症) を引き起こすことが知られているが、高度な炎症を生じる機序の詳細は不明である。本研究では CAA 関連炎症の発症機構を明らかにするため、炎症や免疫系の活動に関連するサイトカインや蛋白についての定量的な解析や遺伝子多型に関する検討を行い、CAA 関連炎症の発症との関連を明らかにする。方法について、新潟大学脳研究所で病理診断され、Boston criteria の possible CAA 以上を満たす症例についてパラフィンブロックおよび凍結組織を収集する。TREM2 および TGF- β 1 の定量的な解析について、免疫組織化学染色やリアルタイム PCR 法を用いた mRNA の定量を行う予定である。また、凍結組織を利用して DNA を抽出し、TREM2、TGF- β 1 や apolipoprotein E の遺伝子多型の解析も行う。これらの結果について CAA 群と CAA 関連炎症群を比較検討する。本年度は研究を行うための倫理申請と解析を行う症例の選択、条件検討のための予備実験を行った。

A. 研究目的

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は脳や髄膜内の血管へのアミロイドの沈着により生じる疾患であり、アミロイド β 蛋白 (A β) の沈着による CAA は 60 歳以上の約半数に認められる。CAA では沈着した A β に対する免疫反応によって生じる炎症・血管炎 (CAA 関連炎症) を引き起こすことが知られているが、高度な炎症を生じる機序の詳細は不明である。本研究では CAA 関連炎症の発症に関連する危険因子を明らかにするため、炎症や免疫系の活動に関連するサイトカインや蛋白について定量的な解析を行い、CAA 関連炎症との関連を明らかにする。CAA 関連炎症の発症に関連する危険因子を明らかにし、発症予防や新規治療法開発の端緒とすることが目的である。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

CAA のみおよび CAA 関連炎症を生じた症例について、孤発性 A β 型アミロイドアンギオパチー (CAA) の遺伝的危険因子で、炎症に関連するサイトカインである transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) および脳内の免疫系を担当する細胞であるミクログリアの活動に関連する蛋白であり、アルツハイマー病との関連が報告された triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM2) の脳内における発現量を解析し、CAA 関連炎症との関連を明らかにする。また、凍結組織より DNA を抽出し、TGF- β 1 や TREM2、apolipoprotein E の遺伝子多型についての解析も行う。

対象とする症例について、新潟大学脳研究所で病理診断され、Boston criteria の possible CAA 以上を満たす症例とし、それらのパラフィンプロ

ックおよび凍結組織を収集する。

脳組織における TREM2 および TGF- β 1 の定量的な解析について、TREM2 については、パラフィンブロックを用いて免疫組織化学染色を行う。TGF- β 1 の解析については凍結脳を用いてリアルタイム PCR 法を用いた mRNA の定量にて行う。これらの結果について CAA 群と CAA 関連炎症群を比較検討する。

研究に利用する検体については匿名化が行われている。また、研究計画について、金沢大学医学倫理委員会と新潟大学医学部倫理委員会において承認済みである。

C. 研究結果

平成 27 年度では、新潟大学脳研究所における保存検体利用のための倫理委員会への申請および承認、必要な検体の準備と金沢大学における予備実験を行った。

対象とする症例について、脳出血を伴う CAA の剖検例では 12 症例、生検例では 31 症例、CAA 関連炎症は剖検例で 2 例、生検例では 7 例の検体が利用可能であることを確認した。

金沢大学神経内科では遺伝子多型解析のためのプライマーの設定と条件の検討を行った。

D. 考察

研究の遂行に必要な倫理申請は終了し、すでに承認が得られている。今後は提供を受けた検体を利用し、金沢大学において予定している解析を行っていく。

E. 結論

研究の遂行に必要な倫理委員会の承認と症例の抽出はほぼ終了しており、今後は金沢大学神経内科において、新潟大学脳研究所より提供された検体を使用した解析を行っていく。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Zekonyte J, Sakai K, Nicoll JAR, Weller RO, Carare RO. Quantification of molecular interactions between apoE, amyloid-beta ($A\beta$) and laminin: relevance to accumulation of $A\beta$ in Alzheimer's disease. *Biochim*

Biophys Acta 2016;1862:1047-1053.

2. 学会発表

1. Sakai K, Boche D, Carare R, Johnston D, Holmes C, Love S, Nicoll J. $A\beta$ immunotherapy for Alzheimer's disease: effects on apolipoprotein E and cerebral vasculature. 7th World Congress of the International Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders (Vas-Cog2015 Tokyo), Tokyo, 2015. 9. 16-19
2. Sakai K, Boche D, Carare R, Johnston D, Holmes C, Love S, Nicoll J: $A\beta$ immunotherapy for Alzheimer's disease: effects on apoE and vasculopathy. 第 34 回日本認知症学会学術集会. 青森. 2015. 10. 2-4

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

筋線維メンテナンスに果たす WWP1 ユビキチンリガーゼの機能の解析

研究代表者 今村 道博¹⁾
研究分担者 武田 伸一¹⁾ 笹岡 俊邦²⁾

¹⁾ 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 ²⁾ 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

研究要旨

ヒト筋ジストロフィーの病因解明及び治療法の開発においては筋ジストロフィーモデル動物を用いた研究から極めて重要な知見を得ることができるため、我々は NH-413 と呼ばれる筋ジストロフィーモデルニワトリに注目し、分子病態の解析を進めている。この筋ジストロフィーの原因は WWP1 E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子のミスセンス変異に因るとされているが、その分子機構は不明である。我々は WWP1 に対する特異抗体を作製し、NH-413 ニワトリの骨格筋に発現する変異型 WWP1 タンパク質の発現と局在が正常型分子とは異なることを明らかにすると同時に、これと同じ変異を導入した WWP1 分子を発現するトランスジェニックマウス(Tg マウス)を作製し、表現型を解析した。その結果、ミスセンス変異による1アミノ酸置換が WWP1 を不安定化し、E3 ユビキチンリガーゼ活性を消失させることを明らかにした。

A. 研究目的

本研究は NH-413 筋ジストロフィーニワトリに着目し、その分子機構を明らかにすることを目的としている。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子(ジストロフィン遺伝子)とその遺伝子産物が同定されて以来、様々な種類の筋ジストロフィーの原因遺伝子が明らかにされている。これと並行して自然発生により系統維持されていた筋疾患実験動物の原因遺伝子も明らかにされ、ヒトと同じ原因遺伝子を有する動物モデルはヒト筋ジストロフィーの病態の解明や治療法開発に大きな役割を果たしてきた。一方、筋ジストロフィーニワトリについては、その原因が WWP1 遺伝子のミスセンス変異に因るものと報告されたが、これに類似するヒト筋疾患は見出されていない。本研究はこの変異型 WWP1 による筋変性の分子機構を解明することで、これに関わる分子群を同定し、未だ原因が明らかにされていないヒト筋疾患との関連を検証することも目標としている。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

NH-413 ニワトリはヘテロでも軽度の筋ジストロフィー症状を呈するため、N-413 で同定されたものと同じ変異(R436Q)を持つ WWP1 を CAG プロモーターにより発現する Tg マウスを作製して、解析に用いた。マウスの骨格筋における WWP1 の局在とタンパク質分子の安定性は蛍光組織染色法とイムノブロット法によって解析した。WWP1 分解断片の構造と酵素活性に関する解析のため、R436Q 変異を特異的に認識する抗体と、E2 分子の共有結合に必須な 890 番目のシステイン残基(890C)のアミノ基端側を認識する抗体を作製した。また通常の WWP1 検出においてはマウス WWP1(全 918 アミノ酸)の 199 番目から 346 番目までのアミノ酸配列を抗原として得られたアフィニティー精製抗体を用いた。R436Q Tg マウスの骨格筋における α -DG の糖鎖修飾と機能についてはイムノブロット法とラミネンオーバーレイ法を用いて行った。尚、マウスを用いた本研究は国立精神・神経医療研究センター神経研究所の小型

実験動物倫理問題検討委員会による審査と承認を得て行われた。

C. 研究結果

正常マウス組織におけるWWP1の発現は、骨格筋、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、腸、脳で130 kDaのタンパク質として発現していたが、R436Q WWP1 Tg マウスにおいてはこの130-kDa分子に加え、骨格筋と心筋のみに約90 kDaの分解断片が検出された。この分解物はWWP1のR436Q変異を特異的に認識する抗体と反応するのに対し、130-kDa(未分解)WWP1とは反応しなかったことから、R436変異型WWP1のほとんどが分解され90-kDa断片となったことを示していた。これとは逆に890Cの直前を認識する抗体は130-kDa分子と反応し、90-kDa断片とは反応せず、分解断片がユビキチンリガーゼ活性を有さないことが示された。一方、Tgマウス骨格筋の免疫組織染色では、NH-413ニワトリでの結果とは異なり、筋形質膜への局在は消失せず、むしろより強くなるという現象が認められた。Tgマウスの骨格筋における α -DGの糖鎖修飾については、イムノブロットでもオーバーレイ法によるラミニン分子との結合能評価においても野生型マウスとの間に差は認められなかった。また、免疫沈降法による解析では変異型或いは正常型WWP1とDG分子との結合を検出することはできなかった。

D. 考察

我々の研究から、ニワトリではミスセンス変異による1アミノ酸置換がWWP1の分解と筋形質膜からの消失を誘起することが示唆されていたが、本研究により、特定のアミノ酸の変化がWWP1の分解を横紋筋特異的に生じさせることを明らかにすることができた。NH-413とは異なり、90-kDa消化断片は安定であったが、E3ユビキチンリガーゼとしての酵素機能を失っていることが明らかとなった。また、この消化断片が筋形質膜への局在をより強固にしていることが示唆されたが、このニワトリとの違いについては不明である。マウスでは正常型WWP1が野生型マウスと同じレベルで発現しており、これがNH-413ニワトリとの違いであ

ることから、正常型WWP1の非存在下での変異型WWP1を発現させ解析する必要がある。 α -DGについてはR436Q Tgマウスにおいて、糖鎖修飾とラミニン結合能について特筆すべき変化は認められず、また、免疫沈降でもDGとWWP1との結合は示されなかったが、これについても正常型WWP1の非存在下での再度解析を行う必要があると考えられた。

E. 結論

本研究により我々はNH-436筋ジストロフィーニワトリに見出されたWWP1遺伝子のミスセンス変異が横紋筋特異的なWWP1分解を生じ、E3ユビキチンリガーゼの酵素活性を消失させることを明らかにした。また、変異型WWP1の発現は α -DGの糖鎖修飾異常に直接関与しないことが示唆された。しかしながら、正常型WWP1が残存していることの影響を検証する必要があり、今後はWWP1遺伝子のノックアウトマウス、或いは変異型WWP1のノックインマウスを用いた解析の必要性が確認された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Imamura M, Nakamura A, Mannen H, Takeda S. Characterization of WWP1 protein expression in skeletal muscle of muscular dystrophic chickens. *J Biochem*, 159, 171-179, 2016

2. 学会発表

Imamura M, Nakamura A, Mannen H, Takeda S: Changes in stability and subcellular localization of WWP1 protein in skeletal muscle of muscular dystrophy chickens. 55th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Diego, USA, December 15, 2015

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いた効率的な遺伝子改変マウス作製

研究代表者 中瀬 直己¹⁾
研究分担者 中川佳子¹⁾ 笹岡俊邦²⁾

1) 熊本大学生命資源研究・支援センター 2) 新潟大学脳化学研究所

研究要旨

これまでのノックアウトマウス作製では、ES細胞を介したキメラマウスの樹立が主流であり、作製までにかかなりの時間とコストを要してきた。しかし、近年、ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変マウス作製の報告が数多くなされ、短時間、低コストな遺伝子改変マウスの作製が可能となった。ゲノム編集技術の開発、改良はかなりのスピードで進んでおり、この技術の発展に同調して遺伝子改変マウスの作製を進めるには、生殖工学技術を活かした効率的な遺伝子改変マウス作製法を確立していくことが不可欠である。本研究では、ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いて、効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウス作製法を確立する。

A. 研究目的

近年、TALEN (transcription activator-like effector nuclease) や clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-CRISPR-associated protein 9 (Cas9) を利用したゲノム編集技術の発展は目覚ましく、これらのプラスミドベクターや mRNA (CRISPR-Cas9 では gRNA と mRNA) を受精卵へインジェクションすることにより、短時間、低コストな遺伝子改変マウスの作製が可能となった。ゲノム編集技術の開発、改良はかなりのスピードで進んでおり、新規のベクター開発や効率的な遺伝子改変マウス作製法についての研究が盛んに行われている。本研究では、新規のゲノム編集ベクターや体外受精および受精卵の凍結保存などの生殖工学技術を用いた、より効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウス作製法の開発、改良を目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

私達は、体外受精により作製した凍結融解受精卵を用いて、TALEN による効率的な遺伝子破壊マウスの作製が可能であることを報告した (Nakagawa *et al.*, 2014)。しかしながら、C57BL/6 マウスを用いた体外

受精により作製した凍結融解受精卵が CRISPR-Cas システムによる遺伝子破壊マウスの作製に利用可能か否か明らかとなっていなかった。また、CRISPR-Cas システムを用いたゲノム編集では、標的遺伝子への特異性の低さから、しばしばオフターゲット問題が言及される。そのため、野生型 Cas9 ベクターの他、標的配列への特異性を上げるよう開発されたニッカーゼ型 Cas9 ベクター、FokI 融合型 dCas9 ベクターを用いて、同一遺伝子座での遺伝子破壊マウス作製を試みた。

CRISPR-Cas 9 ベクターは、1) ガイド RNA と Cas9 スクレアーゼ、2) 2 つのガイド RNA と Cas9 ニッカーゼ、3) 2 つのガイド RNA および FokI スクレアーゼと不活性化 Cas9 の融合タンパク質 (FokI-dCas9) を発現するベクターを構築した。これらの環状 DNA を体外受精により作製した凍結融解受精卵の前核内へインジェクションした。生存卵を偽妊娠雌マウスへ移植し、産子への発生率および変異導入効率の確認を行った。

C. 研究結果

全ての実験区から標的遺伝子破壊マウスが得られ

たことにより、体外受精により作製した凍結受精卵は CRISPR-Cas システムによる遺伝子破壊マウスの作製にも利用可能であることが明らかとなった。Cas9 スクレアーゼの利用では、変異導入効率が最も高く、産子への発生率は最も低かった。一方、Cas9 ニッカアーゼの利用では、その逆に、産子への発生率が高いものの、変異導入効率は最も低かった。FokI-dCas9 の利用では、変異導入効率、産子への発生率ともにバランスのとれた成績であった (Nakagawa *et al.*, 2015)。本研究では CRISPR-Cas システムを用いて遺伝子破壊マウスを作製するための有用な知見を提供することができた。

D. 考察

体外受精により作製した凍結融解受精卵が、様々なゲノム編集技術を用いた遺伝子破壊マウスの作製に利用可能であることが明らかとなった。そのため、今後も C57BL/6 マウスを用いて体外受精を行い、凍結保存した受精卵を使用することにより、交配後に採卵する新鮮受精卵の使用よりも、効率的に遺伝子改変マウス作製作業を進める。

ゲノム編集技術を利用した受精卵へのインジェクション法では、遺伝子破壊マウスは効率良く作製可能であるが、条件的ノックアウトマウスやノックインマウスの作製については、産子への発生率や目的とする変異マウス作製効率がいまだ低く、改善されるべき課題である。そのため、今後は条件的ノックアウトマウスやノックインマウスの効率的な作製法についても検討を行い、効率的に脳疾患関連遺伝子改変マウスを作製するための研究を進める。

E. 結論

当センターでは、これまで、様々な生殖工学技術の開発、改良のための研究を行ってきた。今回、研究課題としたゲノム編集技術は、遺伝子改変マウス作製のスタンダード技術となりつつあり、生殖工学技術を有効利用できれば、更なるゲノム編集技術の発展および効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウスの作製に貢献できると考える。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed

fertilized oocytes. [Nakagawa Y](#), Sakuma T, Sakamoto T, Ohmuraya M, [Nakagata N](#), Yamamoto T. BMC Biotechnol., 15: 33, 2015 査読有

2. 学会発表

- ワークショップ W3 研究者と技術者が支える実験動物科学の柱を再考する-生殖工学技術の立場から-
 - 凍結受精卵を用いた CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊マウスの作製
- 第 62 回日本実験動物学会総会 2015 年 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
該当なし

ALS/FTLD における TDP-43 関連軸索内 mRNA 輸送障害の解析

研究代表者 長野 清一 1)

研究分担者 小野寺 理 2)、西澤 正豊 3)、崎村 建司 4)、荒木 敏之 1)

- 1) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第五部
- 2) 新潟大学脳研究所脳科学リソース研究部門分子神経疾患資源解析学分野
- 3) 同臨床神経科学部門神経内科学分野
- 4) 同基礎神経科学部門分子細胞神経生物学分野

研究要旨

ALS/FTLD-U で神経細胞内に異常沈着する TDP-43 は RNA 結合蛋白質であり、mRNA の輸送に関与することが推測されている。我々はこの TDP-43 による軸索内での特定の mRNA の輸送機能が ALS/FTLD-U では障害され神経変性を生じると考え、培養神経細胞での検討により同蛋白質の標的 mRNA 候補としてリボソーム蛋白質 mRNA を同定した。本研究では神経特異的 TDP-43 遺伝子欠損マウス由来の培養大脳皮質神経細胞を用いて解析を行い、軸索の伸長障害および軸索でのリボソームによる蛋白質合成能の障害を認めた。これらより TDP-43 はリボソーム蛋白質 mRNA の輸送を介した軸索での蛋白質合成能の維持により神経細胞機能を保っており、その障害が ALS/FTLD-U の発症要因となっている可能性が考えられた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) およびユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) では RNA 結合蛋白質である TAR-DNA binding protein (TDP) -43 が病変部位の神経細胞内に異常凝集、沈着することが知られている。TDP-43 は核内での遺伝子の転写や pre-mRNA のスプライシングの制御に加え、核外での mRNA の輸送に関与することが推測されている。我々は TDP-43 の異常沈着によりその軸索への特定の mRNA の輸送機能が障害され ALS/FTLD-U における神経変性が生じる可能性を考え、培養神経細胞を用いた検討により TDP-43 の輸送標的 mRNA 候補としてリボソーム蛋白質 mRNA を同定した。そこで本研究では TDP-43 の発現低下が軸索の形成やそこでのリボソームの機能に影響を与えるかを明らかにするため、新潟大学脳研究所で作成された神経特異的 TDP-43

遺伝子欠損マウスを用いた解析を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

神経特異的 TDP-43 遺伝子欠損マウスは TDP-43 flox マウスと Enolase 2-Cre マウスとの交配により得られたものを用いた。胎生 15 日齢の胎仔より大脳を摘出して皮質神経細胞の培養を行い、培養開始 2 日後に抗 β III-チューブリン抗体を用いた免疫組織染色を行って最も長い神経突起長の計測により軸索長を評価した。さらに培養開始 5 日後に培地中にピューロマイシン (最終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$) を 1 時間添加して新規合成蛋白質の標識を行い、抗ピューロマイシン抗体を用いた免疫組織染色を行って軸索中における蛋白質合成能を評価した。本動物実験は国立精神・神経医療研究センター神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会で承認を受けた計画に基づいて実施した

C. 研究結果

神経特異的 TDP-43 遺伝子欠損 (TDP-43 flox/flox, Eno2-Cre(+)) マウス由来の脳皮質神経細胞はコントロール (TDP-43 flox/flox, Eno2-Cre(-)および TDP-43 flox/+, Eno2-Cre(+)) マウス由来の神経細胞と比較して軸索の伸長が不良であった。また神経特異的 TDP-43 遺伝子欠損マウス由来の脳皮質神経細胞ではコントロールマウスに比し軸索でのピューロマイシンの取り込みが低下しており、同部位でのリボソームによる蛋白質合成能の低下が認められた。

D. 考察

我々が同定した TDP-43 によるリボソーム蛋白質 mRNA の軸索への輸送機能が神経特異的 TDP-43 遺伝子欠損マウスの神経細胞では障害され、それにより軸索での局所蛋白質合成能が低下して軸索の伸長不全が生じることが示唆された。今後さらに TDP-43 によるリボソーム蛋白質 mRNA の詳細な輸送機構や軸索局所でのリボソーム機能障害と神経変性との関連につき、明らかにする必要がある。

E. 結論

ALS/FTLD-U において TDP-43 の細胞内異常沈着に伴う神経変性の機序として、同蛋白質によるリボソーム蛋白質 mRNA 輸送の障害を介した軸索での局所蛋白質合成能の低下が関与する可能性が考えられた。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

S. Nagano, S. Hirokawa, M. Nishizawa, K. Sakimura, O. Onodera, T. Araki. TDP-43 transports mRNA of ribosomal proteins. 第 56 回日本神経学会学術大会. 平成 27 年 5 月. 新潟.

S. Nagano, S. Hirokawa, M. Nishizawa, K. Sakimura, O. Onodera, T. Araki. TDP-43 transports mRNA of ribosomal proteins. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会. 平成 27 年 12 月. 神戸.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

長野清一、荒木敏之、上山盛夫、永井義隆.
TDP-43 プロテノパチー治療用組成物. 特願 2016-087320.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

筋萎縮性側索硬化症脊髄における VGF の局在に関する研究

研究代表者 嶋澤 雅光¹⁾

研究分担者 野田 泰裕¹⁾、原 英彰¹⁾、柿田 明美²⁾

¹⁾ 岐阜薬科大学 薬効解析学研究室 ²⁾ 新潟大学脳研究所 脳疾患標本資源解析学分野

研究要旨

我々は、VGF の発現を増加させる薬剤が ALS (筋萎縮性側索硬化症) モデルマウスにおいて発症時期および生存期間を延長することを明らかにした。また、ALS 患者の脊髄における VGF 陽性細胞数が減少していることを明らかにした。VGF は prohormone convertase などの酵素により切断され、生成したペプチドが生理活性を持つ。我々の過去の検討より、ALS 病態に対して VGF 由来ペプチド AQEE-30 が保護作用をもつ可能性が示唆されている。しかし、VGF の産生細胞や産生組織は特定されておらず、これらを明らかにすることで、VGF の病態に対する関与を明らかにすることができると思われる。そこで今回、ヒト ALS 患者のサンプルにおいて *in situ hybridization* 法を用いて解析を行う。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は上位および下位運動ニューロンが選択的かつ進行性に変性、脱落する神経変性疾患である。多くの症例は孤発例 (約 90%) であり、約 10% は家族性に発症すると考えられている。家族性の遺伝子変異として、Cu/Zn superoxide dismutase1 (SOD1) 遺伝子のミスセンス変異などが報告されており、ヒト変異 SOD1 (SOD1^{G93A}) を過剰発現させたトランスジェニックマウスが研究に用いられている。治療薬としては、グルタミン酸放出抑制薬であるリルゾールが用いられているが、病態の進行抑制効果は約 3 ヶ月程度であり、より有効な新規治療薬の開発が望まれている。過去の報告において、孤発性 ALS の患者および ALS モデルマウスである SOD1^{G93A} マウスの脳脊髄液において、分泌ポリペプチドである VGF nerve growth factor inducible (VGF) の発現量が減少しており、SOD1^{G93A} マウスにおいて VGF の減少は ALS の主要評価項目である筋力低下に先行

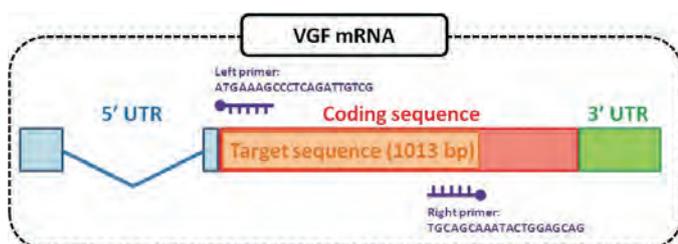
して起こることが示唆されている (1)。

VGF は、中枢あるいは抹消の神経細胞や腺臓、下垂体前葉、副腎髄質、消化管等の内分泌細胞に発現している分泌ポリペプチドであり、プロセッシングによって生じる様々なペプチドが生理活性を有する。VGF は摂食行動やエネルギー恒常性の維持に関与することや、うつ病の改善や海馬シナプスの可塑性増進、海馬歯状回の神経新生に関与することが報告されている。過去の研究により、パーキンソン病、*N-methyl-D-aspartat* 誘発高眼圧網膜障害などの神経変性を来す病態モデルマウスに対し、VGF の発現誘導剤は神経保護作用を示すことが明らかになり、神経保護作用を有する VGF 由来ペプチドの存在が示唆された。また、ハンチントン病モデル細胞において、VGF 前駆タンパク質の C 末端 30 アミノ酸からなる AQEE-30 が神経保護作用を示すことを明らかにしている (2)。さらに、VGF の発現誘導剤は ALS モデルマウスに対して神経保護作用を示すことが報告されている (3)。これらより、VGF 由来ペプチドは ALS に

対して保護作用を持つ可能性が示唆される。しかし、ALS 病態における内在性の VGF 発現は脳脊髄液中でしか検討されておらず、その産生細胞などは明らかにされていない。本検討では *in situ* hybridization 法等を用いて ALS 患者組織切片において、VGF の発現部位や発現量の変化などを詳細に検討する。

B.研究方法

RNA プローブの作製を岐阜薬科大学において行う。標的配列および設計したプライマーを示す。



Blend taq plus (Toyobo) を用いて、PCR 反応を行い、目的配列を増幅する。Template DNA には VGF 過剰発現プラスミドベクターを用いた。PCR 産物を 1 %アガロースゲルを用いて電気泳動し、トランスイルミネーターで観察しながら切り取ったゲル小片を NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (TAKARA Bio) を用いて精製する。

pGEM-T (Easy) vector systems を用いて、PCR 産物を vector へ導入し、コンピテントセル (Nippon gene) へトランスフォーメーションを行い、Amp (+) 寒天 LB 培地で培養する。翌日に数コロニーを選択し、液体 LB 培地 5mL 中で培養を行った後、PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)を用いてプラスミド DNA を回収する。M13 プライマーおよび target sequence 3'プライマーを用いて PCR を行い、導入遺伝子の挿入方向を確認した後、制限酵素 Sal I を用いてプラスミド DNA を 1 本鎖化する。得られた 1 本鎖 DNA を template とし、DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Sigma) を用いて DIG 標識 RNA プローブを得る。サンプルが届き次第染色操作を行う。

本研究は新潟大学脳研究所で「病理解剖ならびに病理検体保存とその使用に関する承諾」が得られている症例を用い、新潟大学医学部倫理委員会の承認 (申請中) および岐阜薬科大学生命倫理委員会の承認 (承認番号: 岐阜市薬会第 334 号) を

得た上で行う。

C.研究結果

2015 年 10 月 23 日(金)に共同研究の方針について、新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野教授 柿田 明美先生と打ち合わせを行なった。その会議で、本研究課題についての今後の方針について議論した。その打ち合わせにより、古典的 ALS では脊髄と並行して大脳皮質運動野も障害されるため、サンプルが限られている脊髄で検討を行う前に、運動野パラフィン切片で検討を行うてはどうかとご提案していただき合意した。現在、岐阜薬科大学生命倫理委員会の許可を得ており、新潟大学の倫理申請審査中である。岐阜薬科大学において *in situ* hybridization のプローブ作製を進めている。両倫理委員会の許可を受けた上で、新潟大学よりサンプルを受領次第染色を開始する。

D.考察

ヒト VGF に対する RNA プローブに関しては過去に使用実績が無いため、独自に設計を行った。

E.結論

サンプルが届き次第実験を開始し、2016 年 6 月頃を目途に結果を報告する予定である。

F.研究発表 (上記課題名に関するもの)

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

[参考文献]

1: Zhao Z. et al., Vgf is a novel biomarker associated with muscle weakness in amyotrophic lateral sclerosis

(ALS), with a potential role in disease pathogenesis.
Int J Med Sci. 2008 Apr 15;5(2):92-9.

2: Noda Y., VGF and striatal cell damage in in vitro and in vivo models of Huntington's disease. Pharmacol Res Perspect. 2015 Jun;3(3):e00140. doi: 10.1002/prp2.140.

3: Shimazawa M. et al., An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. PLoS One. 2010 Dec 9;5(12):e15307.

神経回路の興奮性に対する CB₂ 受容体の役割の解明

研究代表者 菅谷 佑樹¹⁾
研究分担者 狩野 方伸¹⁾
研究分担者 崎村 建司²⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

近年、カンナビノイド CB₂ 受容体が中枢神経系においても発現し、何らかの機能を持っている可能性が示唆されている。本研究では、遺伝子改変技術により作出した CB₂ 受容体コンディショナルノックアウトマウスや CB₂ 受容体の薬理的阻害を用いて、神経回路の興奮性における CB₂ 受容体の役割を明らかにすることを目的とした。野生型マウスにおける CB₂ 受容体単独の薬理的阻害では、カイン酸誘発発作に影響が認められなかったが、CB₁ ノックアウトマウスでは CB₂ 受容体の薬理的阻害によって発作が重篤化した。また、野生型マウスにおいて CB₁ 受容体との共阻害によりてんかん焦点の形成を促進する効果が認められた。この結果から、CB₂ 受容体が神経回路の興奮性を抑制する可能性が示唆された。現在、CB₂ 受容体の中枢神経系における機能をより詳細に明らかにするために CB₂ コンディショナルノックアウトマウスを作成中である。

A. 研究目的

内因性カンナビノイドは生体において合成される脂質メディエーターであり主に神経系、免疫系において重要な役割を担っていると考えられている。神経系に強く発現しているカンナビノイド CB₁ 受容体はシナプス伝達を逆行性に抑制し学習や情動、食行動、神経細胞保護に重要な役割を果たしていることが報告されている。もう一つのカンナビノイド受容体である CB₂ 受容体は免疫系細胞に発現し、免疫反応を抑制していることが報告されている。しかし近年、CB₂ 受容体が中枢神経系に発現し、神経細胞の機能を調節している可能性を示す報告が多くされている。ただ、CB₂ 受容体の抗体染色は世界的にいまだ成功しておらず、神経細胞特異的ノックアウトマウスを用いた研究もないことから、神経細胞における発現と機能は明らかになっていない。本研究はカンナビノイド CB₂ 受容体について、新潟大学脳研

究所の崎村教授と共同で神経細胞特異的ノックアウトマウスを作出し、行動学的、生理学的、解剖学的解析を行い、CB₂ 受容体の中枢神経系における役割を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

興奮性細胞特異的に CB₂ 受容体を欠損したマウスを作出する目的で、CB₂ floxed マウスを C57BL/6 系統で作出し、興奮性細胞で Cre を発現する Emx1-Cre マウスと交配する。これらのマウスを用いて電気生理学的、行動学的に解析する。特に CB₂ 受容体の活性化が回路の異常興奮やてんかん発作を抑制する可能性があるとの結果が得られていることから、カイン酸や電気刺激によるてんかん誘発試験を行う。並行して、CB₂ 受容体シグナルの急性阻害と長期阻害では異なる影響があることが報告されていることから、薬理的な急性阻害を行い、

同様に解析する。

C. 研究結果

現在、CB₂ floxedマウスを樹立に成功し、薬剤耐性カセットの除去を行っている。今後、Creマウスと交配し、解析対象の動物を作出して解析に供する。

ノックアウトマウスの作成と並行して、CB₂受容体の薬理的な阻害によるCB₂受容体の役割の検討を行った。その結果、野生型C57BL/6NマウスではCB₂受容体阻害薬を投与してもカニン酸誘発性てんかん発作に影響は認められなかったが、CB₁受容体ノックアウトマウスではCB₂受容体阻害薬の投与によりカニン酸誘発性てんかん発作開始までの潜時が短縮し、死亡率が有意に上昇した。内因性カンナビノイド2アラキドノイルグリセロールを産生できないマウス(DGL α ノックアウトマウス)でもCB₁受容体ノックアウトマウスより発作潜時が短く高い死亡率が認められた。したがって、2アラキドノイルグリセロールによるCB₂受容体の活性化がてんかん発作の悪化を阻止している可能性が示唆された。また、長期間の発作誘発によるてんかん回路の形成もCB₁受容体とCB₂受容体の共阻害によって促進した。

D. 考察

以上の結果から、CB₂受容体シグナリングは神経回路の興奮性を抑制し、てんかん発作重積による死亡率を低下させる働きがあると考えられた。さらにてんかんの進行に伴う回路変化の過程にも影響する可能性が示唆された。本実験では全身投与による薬理的阻害を用いており、作用を発現している細胞種の特定ができなかった。これまでの報告によると中枢神経系の神経細胞でのCB₂受容体mRNAの発現が認められているが、抗体染色による受容体の発現パターンの解析に関しては信頼性の高い報告がない。今後は、ノックアウトマウスをもちいた抗体の作成などを通じて、解剖学的な発現パターンを明らかにするとともに、コンディショナルノックアウトマウスを用いてスライス電気生理による詳細な機能解析が必要である。

E. 結論

CB₂受容体の活性化は神経回路の異常興奮を抑える可能性が示唆された。今後はコンディショナルノックアウトマウスを用いた細胞特異的なCB₂受容体の欠失による機能解析が必要である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Gordon Research Conference: Cannabinoid Function in the CNS・2015年5月24-29日・ルッカ、イタリア

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

タウオパチーにおける運動ニューロン障害の病理学的研究

研究代表者 吉田 眞理 1)

研究分担者 三室マヤ 1)、岩崎靖 1)、柿田明美 2)、桑野良三 3)

- 1) 愛知医科大学加齢医科学研究所 2) 新潟大学脳研究所病理学分野
3) 同附属生命科学リソース研究センター遺伝子機能解析学分野

研究要旨

臨床的に運動ニューロン疾患との鑑別が問題となったタウオパチーを抽出し、病理学的特徴を解析した。剖検 5400 例中、ALS、FTLD-MND、PLS との鑑別が問題となった 3 症例が存在し、2 例は上位および下位運動ニューロン系などに 4 リポートタウ陽性封入体を形成する globular glial tauopathy (GGT) と診断された。GGT 症例は中心前回と錐体路に高度な変性を示し、小球状タウ陽性オリゴデンドログリア封入体が多数出現した。脊髓錐体路では小径線維の脱落が強く、大径線維は残存する傾向を認めた。脊髓前角などの下位運動ニューロンにはタウ陽性封入体出現するものの、細胞脱落は比較的軽度に留まり、脊髓前根の大径軸索の脱落は軽度であった。GGT では、TDP-43 proteinopathy type B の病理像に比して、上位と下位運動ニューロン系の軸索障害の選択性や程度に相違がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、あるいは前頭側頭型認知症を伴う運動ニューロン疾患 (frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease, FTLD-MND) では 95% 以上の症例で通常 TDP-43 proteinopathy による神経細胞封入体と細胞障害を認める。一方、臨床的に ALS、FTLD-MND、あるいは原発性側索硬化症 (primary lateral sclerosis, PLS) との鑑別が問題となる症例の中に、タウオパチーが存在し、中心前回や脊髓前角などの運動ニューロン系に封入体を形成する。TDP-43 proteinopathy とタウオパチーにおける運動ニューロン障害の類似点と相違点を比較し、タウオパチーにおける運動ニューロン系障害の特徴を病理学的に検討する。この相違点は、臨床像や検査所見に反映され、生前により正確な診断に到達できる可能性が考えられる。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

愛知医科大学加齢医科学研究所に蓄積された 5400 例の剖検例中、運動ニューロン疾患との鑑別が問題となったタウオパチーの症例を抽出し、上位および下位運動ニューロン障害の特徴を検討した。また新潟大学脳研究所内で、運動ニューロン障害を呈したタウオパチーの症例の病理像を参照した。

病理学的検索は、中心前回を含む前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、基底核、視床、中脳、橋、延髄、小脳、脊髓の各髄節、HE、KB 染色、Gallyas-Braak 染色、AT8, RD3, RD4 免疫染色、CD68, リン酸化ニューロフィラメント、リン酸化 TDP-43 の免疫染色を施行し、上位および下位運動ニューロン系の変性を評価した。また剖検時にグルタル固定した頸髄、胸髄、腰髄の錐体路と前根を観察した。

C. 研究結果

5400 例中アルツハイマー病を除くタウオパチーは、ピック病 5 例、進行性核上性麻痺 110 例、大脳皮質基底核変性症 33 例、嗜銀顆粒病 86 例、石灰化を伴う神経原線維変化病 5 例、分類不能のタウオパチー 14 例であり、この中で ALS/FTLD-MND/PLS との鑑別が問題となった症例が分類不能のタウオパチー 14 例中 3 例にあった。3 例中 2 例は病理学的に globular glial tauopathy (GGT) の病理像を示し、1 例は 3 リピートと 4 リピートのタウオパチーを示した。GGT の 2 例中 1 例の臨床病理像を報告する。

【症例】82 歳女性。74 歳から右手の書字障害と、階段の上りにくさを自覚した。76 歳右手で箸を持てず歩行障害が進行したため ALS を疑われ神経内科に紹介された。会話は緩徐で言葉が出にくく、仮面様顔貌を認めた。眼球運動と挺舌はほぼ正常、舌の萎縮はなかった。頸部は固縮し、右上肢の肘関節は屈曲位で自動運動がほとんどなく、ジストニアを認めた。利き手は右で書字は困難、左手は観念運動失行を認めた。両下肢は右優位の筋力低下と固縮があり起立は困難、四肢深部反射は亢進、筋萎縮や線維束収縮はなく、感覚障害はなかった。HDS-R 26/30。頭部 MRI では左前頭から頭頂の萎縮、SPECT では左中心前回の血流低下を認めた。以上から臨床的に大脳皮質基底核変性症、原発性側索硬化症を疑った。78 歳から四肢は屈曲拘縮で無動、言語はあいさつのみで、挺舌や眼球運動は従命不可、強制泣きを認めた。79 歳時には、意思疎通困難となり、80 歳嚥下障害のため経管栄養となった。声をかけると視線を向けた。82 歳肺炎で死亡した。

【病理所見】肉眼的所見：脳重 1090 g。左優位の両側の中心前回、運動前野の高度萎縮、断面では前頭葉皮質、白質、脳幹の萎縮、黒質、青斑核の褪色を認めた。小脳歯状核は保たれ、脊髓前根は肉眼的に保たれていた。組織学的所見：中心前回、運動前野皮質は強い細胞脱落とグリオーススを認め、皮質下白質は U-fiber を含めて萎縮淡明化を示した。基底核では被殻、淡蒼球、視床下核、視床の軽度の細胞脱落とグリオーススを認めた。

黒質、青斑核の細胞脱落を認め、動眼神経核はよく残存し NFT はみられなかった。小脳歯状核、上小脳脚はよく保たれていた。脊髓は前側索の萎縮、淡明化を認め前角は萎縮しグリオーススを認めたが、大型の運動ニューロンの細胞は萎縮しているものが多いものの、細胞脱落の程度は比較的軽度に留まっていた。Bunina 小体の出現はみられず、ニッスル小体は比較的保たれるものが散見された。錐体路は中心前回から皮質下白質、内包後脚、大脳脚錐体路、橋縦束、延髄錐体、脊髓錐体路と連続した変性を認めた。

Gallyas-Braak, AT8, RD4 免疫染色では皮質、白質、基底核、脳幹部などに oligodendroglia 優位に globular inclusion (GOI) を多数認め、太い coiled body の形態も多くみられた。Astrocyte の封入体は少数で、tufted-astrocyte や astrocytic plaque はなかった。大脳皮質の神経細胞には少数の pretangle を認めた。脊髓前角には GOI とともに大型運動ニューロンにも G-B, AT8, RD4 陽性封入体を認めた。GOI などのグリア封入体の出現は中心前回、運動前野に多数認め、それ以外の前頭側頭葉では出現量はかなり減少した。

リン酸化ニューロフィラメントの免疫染色では、脊髓錐体路の軸索脱落は大径小径ともに高度であったが、高度な脱落であるにもかかわらず大径線維の残存傾向を認めた。脊髓前根の大径軸索は頸髄、胸髄、腰髄のいずれのレベルでも残存を認めた。グルタル固定した脊髓錐体路は有髄線維の強い脱落を認めるが、大径線維の一部残存を認め、前根においても大径有髄線維の残存を認めた。リン酸化 TDP-43 の免疫染色では、海馬、海馬傍回、前頭葉の神経細胞やグリア細胞に dot 状の陽性像を認め、脊髓前角にも少数の dot 状の陽性像を認めた。

老人性変化は NFT/AT8 stage III, argyrophilic grain は Saito stage III。以上の所見から本例は GGT と病理診断した。

【遺伝子検索】

凍結保存脳から解析したタウの遺伝子には *MAPT* 遺伝子変異は確認されなかった。*APOE* タイピングは 3/3 であった。

D. 考察

GGT は、従来分類不能とされていた 4 リピート (4R) タウオパチーの中から、グリアに小球状のタウ封入体が蓄積する一群として Kovac らにより提唱された疾患である^{1, 2)}。GGT は多彩な症状を示し、前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia: FTD)、進行性非流暢性失語症

(progressive non-fluent aphasia: PNFA)、進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy: PSP)、大脳皮質基底核変性症

(corticobasal degeneration: CBD)、PLS などと臨床診断される。GGT は病理学的に、封入体が前頭側頭葉に分布するタイプ I、運動野と錐体路に分布するタイプ II、前頭側頭葉と錐体路の両方に分布するタイプ III の 3 型に分類される。本例は運動野と錐体路に高度の変性、前頭側頭葉と脊髄前角にも GOI などの広がりがあることからタイプ III に相当すると考えられた。GGT には PLS や ALS との鑑別が問題となる症例が報告されている。^{3, 4)}

GGT における上位および下位運動ニューロン系の障害が、異なる蛋白である TDP-43 proteinopathy による運動ニューロン系の障害と類似しているのかあるいは相違があるのか、相違があるとするどどのような相違がありこれが臨床像にどのように反映するのかが問題である。今回の少数例の検討では、GGT では、大径軸索の選択性障害はやや弱く、小径線維の障害がより優位である可能性が示唆された。通常の ALS では錐体路は大径優位に大径線維と小径線維が脱落する。このため、TDP-43 proteinopathy による ALS より、筋萎縮や筋力低下、あるいは筋電図での神経原性変化などの臨床的な LMN の症候はより軽く、タウと TDP-43 では異なる細胞障害機序が推測された。

E. 結論

タウオパチーの中で、新たな 4R タウオパチーの一群として確立された GGT では、TDP-43 proteinopathy に比して、大径軸索の障害がより

軽く、上位と下位運動ニューロン系の軸索障害の選択性や程度に相違がある可能性が示唆された。
参考文献

1. Ahmed Z, et al. Acta Neuropathol 122:415-428, 2011
2. Ahmed Z, et al. Acta Neuropathol 126: 537-544, 2013
3. Fu YJ, et al. Acta Neuropathol 120: 21-32, 2010
4. Takeuchi R, et al. Brain Pathol 2015 March 18

F. 研究発表

1. 論文発表

佐々木良元他. 認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症の臨床像を呈した globular glial tauopathy の 1 剖検例 (現在投稿中)

2. 学会発表

吉田真理他. 第 56 回日本神経病理学会総会学術研究会 2015 年 6 月福岡市

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

内在性 TDP-43 遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用

研究代表者 佐藤 俊哉¹⁾
研究分担者 大久保 直¹⁾、東 貞宏¹⁾、小野寺 理²⁾

1) 北里大学医学部実験動物学 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

Zinc-Finger Nuclease (ZFN) を用い、内在性 TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 8 系統を樹立した。この系統は特性により 3 種に大別され (A-C 系統)、150 アミノ酸残基からなる C 末領域の中央部 6 アミノ酸までの欠損 (A 系統) では、ホモマウスにおいても明らかな異常を指摘できなかったが、C 末領域の約半分程度を欠損 (B・C 系統) させると致死となり、TDP-43 機能が失われた。蛋白レベルで検討すると、前半部分欠損 (B 系統) では 36 kDa の変異蛋白が確認されたが、核から細胞質に局在が変化し、核蛋白としての TDP-43 機能が失われた。一方、後半部分欠損 (C 系統) では僅かなバンドが確認されるのみであり、変異蛋白が何らかの品質管理を受けていると考えられた。これらの結果から、TDP-43 C 末領域の前半部分は機能維持に重要であり、後半部分は蛋白の安定性維持に重要な領域であることが明らかとなった。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経特異的な変性を特徴とする神経難病である。2006 年秋、孤発性 ALS に認められるユビキチン陽性封入体 (skein-like inclusion) の主要な構成蛋白として TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) が発見された。さらに研究分担者の小野寺らは、常染色体性優性遺伝形式を示す家族性 ALS の原因遺伝子として TDP-43 を再発見し、ALS の発症機序において TDP-43 が一次的な役割を担うことを明らかにした。しかし現在までに多くの TDP-43 変異が報告されているが、その変異が TDP-43 の C 末領域に集中している理由は不明である。そこで人工制限酵素技術の先駆けとなった Zinc-Finger Nuclease (ZFN) を用い、内在性 TDP-43 C 末領域欠損マウスの作成を計画した。この研究により、C 末領域の生理的機能を理解するとともに、その理解に基づき、全く新しい ALS モデルの開発を進めることを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

第 1 世代のゲノム編集技術である ZFN を用い、TDP-43 C 末領域の中央部を標的とした部分欠損マウスを作成し、その変異の効果を検討した。TDP-43 の残存活性に関しては、既に TDP-43 ノックアウトマウスが着床早期に死亡することが報告されていることから、各系統のホモ接合体マウスを作成し、その死亡時期により評価した。次にヘテロ接合体マウスの大脳から mRNA を抽出し、qPCR 法を用いて TDP-43 mRNA 発現量を測定することにより、オートレギュレーション機構の関与を検討した。また変異 TDP-43 蛋白の細胞内局在に変化などを検討するため、細胞分画とウェスタンブロット、あるいは病理学的解析により解析した。なお、本研究における遺伝子組換え実験は、北里大学医学部遺伝子組換え実験安全管理委員会、および北里大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査と学長の承認を受けて実施した。また動物実験は、北里大学医学部動物実験委員会の審査と医学部長の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

ZFN を用いて内在性 TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 8 系統を樹立した。この 8 系統を塩基配列から推定される蛋白構造により分類すると、150 アミノ酸残基からなる TDP-43 C 末領域の (A) 6 アミノ酸までの欠損、(B) 前半部分欠損、(C) 後半部分欠損の 3 種に大別され、グループ毎に異なる特性が認められた。

6 アミノ酸までの欠損 (A 系統) では、ホモマウスは正常に生まれ、明らかな表現型の異常も認められなかった。ウェスタンブロットでは、アミノ酸欠損に応じたバンドシフトが認められたが、TDP-43 mRNA 量は野生型と変わらず、TDP-43 機能には著明な変化は無いものと推定された。

一方、TDP-43 C 末領域の約半分程度を欠損 (B・C 系統) させると、ホモマウスが主に着床前後に致死となり、TDP-43 機能が失われた。両系統のヘテロマウスは、体格の小さい 1 系統を除き、正常に生まれた。全ての系統で TDP-43 mRNA 量は野生型に比して増加し、TDP-43 機能の低下を補正するオートレギュレーション機構の関与が示唆された。しかしヘテロマウスの脳を用いて蛋白レベルで検討すると、両系統に大きな相違があった。前半部分欠損 (B 系統) では、36 kDa の変異蛋白が確認されたが、核から細胞質に局在が変化し、核蛋白としての TDP-43 機能が失われることが明らかとなった。他方、後半部分欠損 (C 系統) では僅かなバンドが確認されるのみであり、変異蛋白が何らかの品質管理を受けている可能性が高いと考えられた。

最後に、B 系統に認められた 36 kDa の変異蛋白の挙動を病理学的に解析したが、変異蛋白は細胞質内に比較的均一に分布し、明らかな凝集体形成は認められなかった。

D. 考察

TDP-43 C 末領域は、グリシンリッチ領域 (GRR)、Q/N 領域、C 末の終端領域に分類することができるが、その 3 領域全てに ALS 変異が認められる。しかし、この 3 領域の機能的差異は明らかではなく、領域内に生じた変異による機能的変化を推定することも難しい。本研究から明らかにされた点は、GRR と Q/N 領域の約半分を含む TDP-43 C 末領域の前半部分が機能維持に重要であること、Q/N

領域の残り と C 末の終端領域を含む後半部分が蛋白の安定性維持に重要であることが明らかにされた。特に強調すべきは、36 kDa の前半部分欠損蛋白の挙動で、核移行シグナル (NLS) が残っているにも関わらず核内に移行しない現象で、この原因を検索することが、TDP-43 の核内外シャトル機構の解明、さらに細胞質内での凝集体形成機構の究明につながる可能性がある。

本研究は、新潟大学脳研究所で樹立したマウスを用いた結果であるが、既に報告された培養細胞による結果とは大きな乖離がある (Ayala et al. *J Cell Sci* 2008 121: 3778-85)。これが意味することは、TDP-43 の生理的機能を正確に理解するためには個体レベルでの解析が必須であり、新潟大学脳研究所のリソースを用いた共同研究を継続することが重要であると考えている。

E. 結論

TDP-43 C 末領域の前半部分は機能維持に重要であり、後半部分は蛋白の安定性維持に重要な領域であることが明らかとなった。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

該当なし

2. 総説・著書発表

佐藤俊哉: TDP-43 の生理的機能と ALS 病態における意義. 北里医学 45(2): 79-85, 2015

3. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

アメリカ平原ハタネズミ (Prairie Vole) からの ES 細胞樹立条件の検討、 及び CRISPR/Cas9 法による遺伝子 KO ハタネズミ作出の試み

研究代表者 西森 克彦¹⁾
研究分担者 崎村 建司²⁾

1) 東北大学農学研究科・応用生命科学専攻 2) 新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野

研究要旨

高度な社会性を持つ北米原産平原ハタネズミ (ハタネズミ) は、社会性低下を伴う神経疾患研究のモデル動物として注目されるが、遺伝子変換系が整備確立されていない大きな弱点を持つ。本共同研究で我々は遺伝子 KO ハタネズミ作成を目指し、ハタネズミ ES 細胞、又は同 iPS 細胞の樹立と、生殖工学確立による胚盤胞への当該細胞導入によるキメラ作成より、遺伝子操作ハタネズミを作成する技術開発を計画した。並行し、受精卵への CRISPR/Cas9 法適用によるオキシトシン受容体 (OXTR) 遺伝子 KO ハタネズミ作成を計画した。ES/iPS 細胞樹立に関しては、正常初代繊維芽細胞へ 6 因子を PiggyBac Transposon により導入し、三胚葉分化能等を保持しマウス ES 細胞の性質と極めて近いハタネズミ iPS 細胞を樹立した。また、CRISPR/Cas9 法により、受精卵より OXTR 遺伝子 KO ハタネズミを取得した。

A. 研究目的

社会性の低下を伴う神経疾患のモデル動物として高度な社会性を持ちながら齧歯類として扱いが容易であるアメリカ平原ハタネズミ (Prairie vole) より、その遺伝子を破壊・操作したモデル動物を作成し、社会性を支える遺伝子基盤、神経回路基盤などの研究を進めることは、自閉症を始め、統合失調症や鬱病、認知症など、社会性の低下を伴う様々な神経疾患の基礎的研究や、こうした症状の回復を狙った精神医薬開発などに大きな可能性を与える事となる。この為、(1) ハタネズミ ES 細胞 (又は iPS 細胞) を樹立し、ES 細胞での相同組み替えによる遺伝子変換と、キメラハタネズミ作成を経由した、遺伝子変換ハタネズミ作成の可能性、及び、(2) ハタネズミ生殖工学を樹立し、これにより得たハタネズミ受精卵を利用、CRISPR/Cas9 技術のハタネズミ受精卵への直接適用により、ES 細胞や iPS 細胞、そして胚盤胞キメラ等を経由せずに、遺伝子 KO ハタネズミ

ミ作成の技術を開発する事、を本研究の研究目的とした。その為、①ハタネズミ iPS 細胞の樹立を試み、並行して②ハタネズミ受精卵へガイド RNA と Cas9mRNA を導入する事で、OXTR 遺伝子の破壊を試みる事とした。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

27 年度は、iPS 細胞樹立の為の最新技術をハタネズミ胚より得た初代繊維芽細胞に適用し、Piggybac transposon 骨格に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc, Lin28, Nanog の 6 種のリプログラミング遺伝子を搭載した PB-6F ベクターを作製、これを用いてリプログラミング遺伝子をハタネズミ繊維芽細胞に導入した。

一方、ハタネズミへの過排卵処置と、受精卵の取得法の確立に努め、また過排卵処置後の未受精卵を得て、ハタネズミ精子を利用した in vitro fertilization を行うなど、ハタネズミ受精卵の取得方法を検討、確立することとした。さらに、

この受精卵へ、CRISPR/Cas9 法を適用し、ハタネズミオキシトシン受容体 (OXTR) 遺伝子を直接破壊する事を試みることにした。

C. 研究結果

ハタネズミ胚より得た初代繊維芽細胞に Piggybac transposon 骨格に Oct3/4、Sox2、Klf4、c-myc、Lin28、Nanog の 6 種のリプログラミング遺伝子を搭載した PB-6F ベクターを導入したところ、三胚葉分化能を持ち、核型が正常で、諸性質がマウス ES 細胞に酷似したハタネズミ iPS 細胞を樹立した。

一方、ハタネズミに対する過排卵処理法、ハタネズミ精子の凍結保存法、ハタネズミ卵子の *in vitro* fertilization 法、ハタネズミ受精卵のハタネズミ卵管、又は子宮への移植による、後代ハタネズミの取得等に成功し、ハタネズミ生殖工学を確立した。また過排卵処置後のハタネズミ受精卵へ CRISPR/Cas9 法を適用し、OXTR 遺伝子の破壊されたハタネズミ (OXTR 遺伝子 KO ハタネズミ) の作製に成功した。

D. 考察

CRISPR/Cas9 法は、ハタネズミ受精卵に対して極めて有効であり、遺伝子組 KO ハタネズミ作成に成功した。しかし、現在得ているハタネズミ生殖工学は、決して十分なレベルの受精卵、又は未受精卵を得られるレベルとは言い難く、季節やその他未知の因子・条件によりその受精卵や、未受精卵の収量は著しく変動する。従って、その誘導方法や取得条件についての検討を更に進めていく必要がある。

今回樹立したハタネズミ iPS 細胞は、マウス ES 細胞に類似した性質を示し、今後ハタネズミ胚盤胞への導入によるキメラハタネズミ作成を経由した、遺伝子操作ハタネズミ作製法が確立される可能性を示した。

また、CRISPR/Cas9 法により、単純な遺伝子 KO だけでなく、短い DNA 配列 (FLAG や LoxP など)、或いは長い DNA 配列 (EGFP や Td-Tomato などの蛍光マーカーなど) の特定遺伝子領域への正確な導入についての試行も、充分高いその可能性を示している。

E. 結論

ハタネズミ生殖工学樹立と CRISPR/Cas9 法により、OXTR 遺伝子 KO ハタネズミを作製した。また、良好な性質を持つハタネズミ iPS 細胞を樹立した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Katayama M, Kiyono T, Horie K, Hirayama T, Eitsuka T, Kuroda K, Donai K, Hidema S, Nishimori K, Fukuda F, "Establishment of an immortalized cell line derived from the prairie vole via lentivirus-mediated transduction of mutant cyclin-dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase reverse transcriptase" *Exp Anim*, 2016. 65 (1) pp. 87-96

Katayama M, Hirayama T, Horie K, Kiyono T, Donai K, Takeda S, Nishimori K, Fukuda T, "Induced pluripotent stem cells with six reprogramming factors from Prairie Vole, which is an animal model for social behaviors" *Cell Transplant*, 2016. 25 (5) pp. 783-96

Horie K, Hidema S, Hirayama T, Nishimori K, "In vitro culture and in vitro fertilization techniques for prairie voles (*Microtus ochrogaster*)" *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. 463 (4) pp. 907-11

2. 学会発表

第 38 回日本神経科学学会大会、2015 年 7 月 28 日、兵庫県神戸市・神戸国際会議場、神戸国際展示場” 社会行動モデルとしての遺伝子組み換えハタネズミの作製” 堀江謙吾、平山貴士、平岡優一、日出間志寿、西森克彦

第 42 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会、2015 年 9 月 18 日、宮城県仙台市・戦災復興記念館 “CRISPR/Cas を用いた Oxttr 遺伝子欠損平原ハタネズミの作製” 堀江謙吾、平山貴士、平岡優一、日出間志寿、西森克彦

第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日兵庫県神戸市ポートアイランド “Generation of oxytocin

receptor knock-out prairie voles by using CRISPR/Cas.” 堀江謙吾、平山貴士、鈴木紳吾、平岡優一、日出間志寿、西森克彦

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

パーキンソン病治療における標的タンパク質としての Inhibitory PAS Domain Protein の検証

研究代表者 十川 和博¹⁾
研究分担者 葛西 秋宅¹⁾、柿田 明美²⁾

1) 東北大学大学院生命科学研究所 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

Inhibitory PAS Domain(IPAS)は低酸素遺伝子応答を抑制する転写因子であり、ミトコンドリアでのアポトーシスを促進する因子としても機能する。われわれは IPAS のアポトーシス活性がパーキンソン病(PD)での神経細胞死に關与することを解明した。さらに培養細胞系で DNA トランスフェクションによって一過性に発現した IPAS が紫外線照射によって活性化した p38 MAPK 経路の MKII によってリン酸化されること、このリン酸化は IPAS の C 末端領域で起きること、さらにこのリン酸化によってミトコンドリアのクラスター化とアポトーシス活性が増加することを見出した。パーキンソン病でキーとなる酸化ストレスは、NF- κ B を介して IPAS を転写活性化し、さらに翻訳後修飾によって制御していることが明らかになった。

A. 研究目的

パーキンソン病は酸化ストレスの亢進によって、引き起こされることが報告されている。酸化ストレスは MAPK の活性化を誘導することが知られているので、IPAS が MAPK によってリン酸化される可能性を検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

HEK293T 細胞などの培養細胞に JNK と p38 の活性化を引き起こす紫外線を照射し、IPAS によるミトコンドリアのクラスター化とカスパーゼ 3 の活性化を、抗体染色によって解析した。また、關与するプロテインキナーゼを特異的な阻害剤、siRNA によるノックダウンによって同定した。IPAS の欠失変異体を用いて、リン酸化領域を推定した。

C. 研究結果

紫外線照射により、HEK293T 細胞にトランスフェクションにより発現した IPAS の C 末端領域が修飾されることが欠失変異体を用いて判明した。特異的な阻害剤を用いてリン酸化酵素を特定したところ、JNK の阻害剤は阻害せず、p38 MAPK の阻害剤と、それによるリン酸化で活性化する MKII の特異的阻害剤が IPAS によるミトコンドリアのクラスター化や、アポトーシスをほぼ完全に阻害し、MKII が直接のリン酸化酵素であることが判明した。また、MKII の siRNA によるノックダウンも紫外線の効果を阻害した。

D. 考察

本研究を通じて、パーキンソン病に關与する酸化ストレスは、IPAS の転写活性化を促進するほかに、同ストレスで活性化する p38 MAPK 経路を介

して、IPAS のアポトーシス活性を促進することが判明した。酸化ストレスは 2 重に IPAS 活性を調節していることになる。現在リン酸化部位を特定中であり、特定後、リン酸化抗体を作成し、ヒトパーキンソン病患者脳において、IPAS リン酸化がコントロール脳に比較して増強していることを解明する。

E. 結論

IPAS は酸化ストレスで活性化する MKII によって C 末端領域がリン酸化された。この修飾によって IPAS のアポトーシス活性は亢進した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Involvement of inhibitory PAS domain protein in neuronal cell death in Parkinson's disease. Torii, S., Kasai, S., Suzuki, A., Todoroki, Y., Yokozawa, K., Yasumoto, K-I., Sekine, N., Kiyonari, H., Mukumoto, Y., Kakita, A., Sogawa, K. ***Cell Death Discovery*** (2015) 1, 15015; doi:10.1038/cddiscovery.2015.15
2. Inhibitory PAS domain protein is a substrate of PINK1 and Parkin and mediates cell death in a Parkinson's disease model. Kasai, S., Torii, S., Kakita, A., Sogawa, K. ***Cell Death Disease*** (2015) 6, e1886; doi:10.1038/cddis.2015.243

2. 学会発表

1. PINK1/Parkin-mediated degradation of Inhibitory PAS domain protein (IPAS) attenuates neuronal cell death. S Kasai, S Torii, A Kakita, and K Sogawa 23rd Conference of the European Cell Death Organization 2015 年 10 月、スイス・ジュネーブ
2. PINK1-Parkin induces IPAS degradation and attenuates neuronal cell death. S Kasai, S Torii, K-i Yasumoto, A Kakita, K Sogawa 2015 年 12 月、神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

APP 細胞内ドメインの神経毒性の解析

研究代表者 中山 耕造¹⁾
研究分担者 長瀬 尚志²⁾
 笹岡 俊邦³⁾

1) 信州大学医学部医学科・人体構造学講座、2) 信州大学医学部医学科・病理学講座、3) 新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター・バイオリソース研究部門・動物資源開発研究分野

研究要旨

我々は Notch や Delta の解析から、 γ -セクレターゼ本来の生理機能は 1 型膜蛋白質のシグナル伝達の調節にあるという仮説を提唱している。さらに、amyloid precursor protein (APP) も Notch に類似した γ -セクレターゼによって制御されるシグナル伝達機構を持ち、それがアルツハイマー病 (AD) の発症に関係していると考えている。実際、 γ -セクレターゼによって APP が切断されるときに $A\beta$ と同時に生じる細胞内ドメイン (AICD) が核へ移行し、遺伝子発現を変化させ、神経細胞選択的にアポトーシスを誘導することを細胞レベルで明らかにしている。これらの結果は、AD の原因だと考えられている $A\beta$ 以外にも、APP を介した AD 発症に関与する機構が存在することを示唆している。

AICD によって引き起こされる神経細胞選択的アポトーシスの機序を解明することを目標に、本年度は AICD 核移行検出系の構築、及び核移行を制御していると考えられる AICD 脱リン酸化酵素の解析をおこなった。

A. 研究目的

我々は、Notch や Delta の解析から、 γ -セクレターゼ本来の生理機能は amyloid precursor protein (APP) を含む 1 型膜蛋白質のシグナル伝達の制御にあり、それが APP のシグナル伝達を通してアルツハイマー病 (AD) の発症に関係していると推測している (総説: Nakayama et al., Cell Mol. Neurobiol., **31**, 887, 2011)。実際に我々は、 γ -セクレターゼで細胞膜から細胞質へと切り出された APP の細胞内ドメイン (AICD) が核へ移行し、遺伝子発現を大きく変化させ、神経細胞選択的にアポトーシスを引き起こす事を示している (総説: Nakayama et al., Current Psychopharmacology, **1**, 155, 2012)。

これらの結果を基に、本研究の目的は、AD における新規創薬ターゲット分子の検索を念頭に、AICD の神経毒性の分子機序、特に細胞質から核

への移行の過程を解明することにある。

AICD の核移行には、アダプター蛋白質 Fe65 との結合が必須であることが知られている。また我々は、AICD と Fe65 との結合には AICD の脱リン酸化が必要ではないかと考えている。本年度は将来的に必要となる AICD 核移行阻害物質のスクリーニング系の確立を目指して (1) AICD 核移行検出系の構築を行った。加えて、前年度から続けている (2) AICD 脱リン酸化酵素の解析を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)。

(1) AICD 核移行検出系の構築

Fe65 に依存した AICD の核移行を検出する系を構築するために、AICD の前に Gal4 を繋いだ発現ベクターを構築した。このベクターの場合、 γ -セクレターゼによる切断がなくてもフュージョン

蛋白質 (Gal4-AICD) が細胞質に存在することになる。つまり通常シグナルが伝わる時に起こる、 γ -セクレターゼによる AICD の細胞膜から細胞質への切り出しを必要とせず、構成的にシグナルが伝わることになる。

Gal4 依存性のプロモーターとルシフェラーゼ cDNA を持つレポータープラスミドを核内に持つ細胞に、この発現ベクターを導入した場合、Gal4-AICD が核に移行するとルシフェラーゼが発現する事になる。

(2) AICD 脱リン酸化酵素の同定

各分画の脱リン酸化活性の測定に用いる基質は、大腸菌で産生したリコンビナント AICD を [32 P]- γ -ATP を用いて *in vitro* で 32 P ラベルすることによって作製する予定であったが、この方法では効率よくラベルする事ができなかった。そこで、 32 P を用いてメタボリックラベルを行なった。具体的には、HEK293T 細胞に、FLAG タグを持つ AICD の発現ベクターを導入して FLAG-AICD を発現させた。遺伝子導入 1 日後、リン酸を含まない培養液に、5 μ g/ml の Nocodazole と 1mCi/ml の 32 P リン酸を添加した培養液に置換してさらに一日培養を行なった。培養の後、抗 FLAG 抗体カラムを用いて細胞のライセートから FLAG-AICD を精製し、脱リン酸化アッセイのための基質として用いた。

脱リン酸化酵素の精製は、1 回の実験について約 50 匹のマウスの脳 (約 25g) をホモジェネートし、遠心して約 20ml のライセートを得て、これを 10ml の DEAE sepharose カラムに添加した。カラムからの溶出は、NaCl の濃度勾配によっておこなった。さらに、AICD 脱リン酸化酵素活性を持つ DEAE sepharose フラクシオンを 20mM リン酸カリウムバッファーに対して透析し、2ml の Creamic Hydroxyapatite カラムに添加した。カラムからの溶出は、リン酸の濃度勾配によっておこなった。

各フラクションの脱リン酸化酵素活性は、各フラクションに前述の 32 P ラベルした AICD を加え測定した。

なお、動物を用いる実験は、信州大学動物実験等実施規程に基づいておこなった。

C.研究結果

(1) AICD 核移行検出系の構築

サルの腎臓由来の Cos7 細胞と、マウスの神経由来の N2a 細胞に Gal4-AICD を発現させ、Fe65 の共発現の有無でルシフェラーゼ活性を比較した。なお、インターナルコントロールとしては、CMV プロモーターとクラゲルシフェラーゼを持つベクターを用いた。

AICD を持たない Gal4 のみ発現させた場合、Fe65 の有無にかかわらず、どちらの細胞でもルシフェラーゼ活性は検出できなかった。

Gal4-AICD を発現させても、両方の細胞において、Fe65 を共発現させなければ極めて低いルシフェラーゼ活性しか示さなかった。しかしながら、どちらの細胞においても、Fe65 を共発現させると 10 倍以上に活性の増強が見られた。

(2) AICD 脱リン酸化酵素の同定

マウス脳のライセートを DEAE sepharose カラムで分画した場合、225-300mM の NaCl で溶出したフラクションに AICD 脱リン酸化酵素活性が認められた。

これらのフラクションをさらに Hydroxyapatite カラムに吸着させ、リン酸濃度を上げる事により蛋白質を溶出した。その結果、幅広い範囲 (150mM から 300mM) のフラクションが AICD 脱リン酸化活性を示した。

溶出されたフラクションの幅が広いために、Hydroxyapatite で分画できていない可能性が考えられた。しかしながら、各フラクションを SDS 電気泳動して銀染色をおこなったところ、フラクションでバンドのパターンは異なっており、分画自体はうまくいっていた。

電気泳動では、AICD 脱リン酸化酵素活性と相関するバンドは検出できず、さらなる精製が必要でありゲルろ過を行ったところ、活性を検出できなくなった。現在、その原因を調べている。

D.考察

(1) AICD 核移行検出系の構築

Gal4-AICD を発現させても Fe65 を共発現させないとルシフェラーゼ活性が検出できないという結果は、構築した系において AICD の核移行に Fe65 が必須である事を示している。つまり、ここ

で検出されたルシフェラーゼ活性は、細胞質に存在する Gal4-AICD に Fe65 が結合したために Gal4-AICD が核に移行して、レポーターが持つ Gal4 依存プロモーターを活性化させ、ルシフェラーゼの発現を誘導したと考えられる。

現在のところ我々は、AICD は構成的にリン酸化されており、AICD と Fe65 の結合には AICD 自体の脱リン酸化が必要だと考えられる結果を得ている。Phos-tag による電気泳動を行ったところ、このアッセイ系では AICD を高発現させたために、大半の AICD はリン酸化されていなかった。その結果、脱リン酸化なしに AICD が Fe65 と結合できたのではないかと考えている。従ってこの系は、Fe65 に依存した AICD の核移行を反映しており、AICD 核移行阻害物質のスクリーニング等に有用だと考えられる。

(2) AICD 脱リン酸化酵素の同定

前述のように我々は、AICD は構成的にリン酸化されており、AICD と Fe65 の結合には AICD 自体の脱リン酸化が必要だと考えている。本研究において、マウスの脳のライセート中に AICD 脱リン酸化活性を検出した。このライセートを DEAE sepharose カラムで分画したところ、225-300mM の NaCl で溶出したフラクションに高い AICD 脱リン酸化活性が認められた。これらの結果は、AICD 脱リン酸化酵素が実際に存在することを示しており、この酵素が AICD の核移行を調節しているという仮説が正しいことを示唆していると考えている。

AICD 脱リン酸化活性が認められた DEAE フラクションを Hydroxyapatite カラムを用いて分画したところ、150mM から 300mM のリン酸で溶出したフラクションに AICD 脱リン酸化活性が認められた。電気泳動では、AICD 脱リン酸化酵素活性と相関するバンドは検出できず、さらなる精製が必要であり、ゲルろ過により精製を進めたところ、活性が検出できなくなった。現在、活性が検出できなくなった原因を調べている。

なお、カルシニューリンは脳で極めて多い脱リン酸化酵素である。この酵素が AICD 脱リン酸化酵素である可能性を検討するためにリコンビナントカルシニューリンを用いて検討したが、AICD 脱リン酸化活性は検出できなかった。従っ

て、我々が同定しようとしている酵素は、カルシニューリンではないと考えられた。

E. 結論

(1) AICD 核移行検出系の構築

Fe65 に依存した AICD の核移行を、ルシフェラーゼを測定することにより高感度で検出する細胞系を構築した。この系は、AICD 核移行阻害物質のスクリーニング等に有用だと考えられた。

(2) AICD 脱リン酸化酵素の同定

AICD 脱リン酸化酵素の同定を目標に、蛋白質の精製を進めている。この酵素を同定できた場合、実際に AICD の核移行及び神経細胞特異的な細胞死に関わっていることを確認するために、精製した蛋白質の情報を基に cDNA をクローニングし、それを培養細胞に発現させて検証する予定である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

意思伝達不能状態 (Stage V、TLS) の筋萎縮性側索硬化症の 臨床病理学的検討

研究代表者 望月葉子 1) 2)

研究分担者 林健太郎 3)、竹内亮子 4) 5)、高橋 均 5)、柿田明美 5)、渡部和彦 6)、小柳清光 7)、
小森隆司 1)、磯崎英治 3)

- 1) 都立北療育医療センター内科・神経内科 2) 都立神病院検査科 3) 都立神病院脳神経内科
4) 新潟大学脳研究所神経内科 5) 新潟大学脳研究所病理学分野
6) 都医学研運動・感覚システム研究分野 7) 信州大学医学部神経難病学

研究要旨

意思伝達不能 (Stage V) になった ALS 例の臨床病理学的な特徴について大脳皮質病変を中心に検討した。対象は TDP-43 陽性封入体を有する 6 例、SOD1 陽性封入体を有する 3 例と FUS 陽性封入体を有する 2 例。大脳萎縮の有無は蓄積蛋白の違いでは説明できなかった。TDP-43 陽性例では海馬歯状回に NCI のない例では軽度な変性が前頭葉に限局していたが、NCI のある例では大脳皮質に変性と多数の NCI が出現していた。FUS 陽性例では、逆に大脳皮質の変性が高度な例で海馬歯状回顆粒細胞に NCI はなかった。SOD1 陽性例の 3 例の大脳皮質は比較的保たれていた。したがって、Stage V に至る病理学的背景は、大脳病変よりも、全例に共通していた高度な運動ニューロン変性に加えた黒質、淡蒼球、視床下核、脳幹網様体、小脳出力系の変性と考えられた。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 例のなかで、人工呼吸器を装着して外眼筋も含めた全随意筋が完全麻痺し、現在の補助手段では意思伝達不能になった (意思伝達能力 Stage V、完全閉じ込め症状状態: totally locked-in state; TLS) 症例の臨床経過、神経病理所見を多数例で検討し、このような症例の臨床病理学的な特徴とその多様性の有無を明らかにする。平成 26 年度には、Stage V の症例には、発症 2 年以内に呼吸器を装着した例が多く、家族性/遺伝子変異 ALS のほか、TDP-43 陽性封入体を有する孤発例があること、高度な運動ニューロン変性と運動ニューロン系を超えた広汎な変性を全例で呈し、その病変分布には共通性と多様性があり、蓄積蛋白の違いでは分類できないことを明らかにした。今年度は、蓄積蛋白ごとの違いをさらに検討し、神経病理学的特徴を明らかにす

ることを目的とした。

B.研究方法

昨年度抽出した意思伝達能力 Stage V の 11 例について、神経細胞・神経線維の脱落、グリオシスの程度と免疫染色標本により、TDP-43、SOD1、または FUS による神経細胞質内封入体 (NCI) の出現について検索した。

C.研究結果

対象は 11 例で、発症から呼吸器装着までの期間は平均 17.1 ヶ月であった。早期から行動障害、感情障害、言語障害を生じた前頭側頭型認知症例はなかった。

神経病理学的には、全例で上位及び下位運動ニューロンの非常に高度な変性に加えて黒質、淡蒼球、視床下核、脳幹網様体に中等度以上変性があ

った。小脳歯状核、上小脳脚の変性も全例に見られたが、軽度な症例は Stage V に至ってから死亡までの期間が短かった。変性が高度な部位では神経細胞脱落が高度なために、NCI の評価をできなかった。

大脳萎縮が高度であったのは TDP-43 陽性の 3 例と FUS 陽性の 1 例で、その他の例では大脳は比較的保たれていた。

大脳皮質病変については、TDP-43 陽性例では海馬歯状回に NCI がいない例で変性は前頭葉に限局して脳重は保たれていた。これに対し、NCI がある例では側頭葉、海馬支脚と大脳皮質に変性があり、NCI は大脳皮質にも広汎に確認され、このうちの 3 例は高度な大脳萎縮を呈していた。FUS 陽性例では、p.P525L 変異例は前頭葉に強い高度な大脳萎縮があり、compact NCI が大脳皮質に多数出現していたが、海馬歯状回顆粒細胞に NCI はなかった。大脳萎縮が目立たなかった p.K510M 変異例は、小脳入力系の変性も伴っていた点が特徴で、non-compact NCI が海馬歯状回顆粒細胞にも出現していた。SOD1 陽性例の 3 例の大脳皮質の神経細胞脱落はなく、1 例で少数の NCI が側頭葉に見られた。

D. 考察

病理学的には、全例で上位及び下位運動ニューロンの非常に高度な変性に加えて黒質、淡蒼球、視床下核、脳幹網様体に中等度以上変性があった。小脳歯状核、上小脳脚といった小脳出力系にも全例で変性があり、これらの変性が軽度な例は Stage V から死亡までの期間が短かったことから、病変により出現する時期が異なる可能性があると考えられた。以上の病変は、大脳病変の強弱や蓄積蛋白の違いにかかわらず、共通していたので、これらの共通病変が、Stage V に至る病理学的背景と考えられた。

Nishihira ら(2008) は TDP-43 陽性 NCI を持つ例の ALS の病変を運動ニューロン系以外に変性の乏しい type 1 と、運動ニューロン以外の変性も目立つ type 2 に分類し、海馬歯状回の NCI は type 2 の指標となる事を報告している。TDP-43 陽性例の大脳皮質病変も、海馬歯状回の NCI の有無で分類可能であることが明らかになった。そして、海馬歯状回に NCI のない例も運動ニューロンを超

えて広汎な変性を来し、Stage V となりうる事を明らかにした。一方、FUS 陽性例では、大脳病変が高度な症例で海馬歯状回に NCI がなく、大脳病変が軽度な例で歯状回に NCI があった。これは、TDP-43 例と逆の傾向であり、FUS 陽性例では、海馬歯状回顆粒細胞の NCI が大脳の広範囲な病変の指標にはならないことが明らかになった。SOD1 例の大脳皮質は保たれる傾向がみられた。SOD1 変異例に前頭側頭型認知症例の報告は少数であり、SOD1 陽性例では大脳皮質病変が軽度な例が多い可能性がある。

E. 結論

Stage V に至った症例は、大脳皮質病変には多様性があったが、高度な運動ニューロン変性に加えて、黒質、淡蒼球、視床下核、脳幹網様体、小脳出力系の変性が共通しており、Stage V に至る病理学的背景と考えられた。このことから、発症から呼吸器装着までが早い症例では特に、運動ニューロン以外の症状の出現、画像による拡大病変の出現に注意することが意思伝達能力の低下を予測するうえで重要と考えられた。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

準備中。

2. 学会発表

林 健太郎、望月葉子、竹内亮子、小森隆司、高橋 均、柿田明美、渡部和彦、関絵里香、新井信隆、小柳清光、清水俊夫、長尾雅裕、磯崎英治：意思伝達不能状態 (stage V) となった筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における大脳萎縮の免疫組織学的検討。第 56 回日本神経病理学会学術研究会、2015 年 6 月 5 日、福岡。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

酸化ストレスによる神経細胞機能の障害と細胞死に関する研究

研究代表者 柴田 亮行¹⁾
研究分担者 野口 範子²⁾
研究分担者 柿田 明美³⁾

¹⁾東京女子医科大学病理学第一講座 ²⁾同志社大学生命医科学部医薬分子機能学
³⁾新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野

研究要旨

アルツハイマー病 (AD) 脳海馬におけるコレステロール-24-水酸化酵素 (C24OHase)、カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII)、リン酸化 CaMKII (p-CaMKII)、切断型カスパーゼ 8 (C-Casp8) およびリン酸化 RIPK (p-RIPK) の局在と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) におけるセルロプラスミン (Cp) およびアコニターゼ 1 (AC01) の局在を免疫組織化学的に解析した。AD 脳海馬では、CaMKII と RIPK のリン酸化活性化が観察された。ALS 脊髄では、アストロサイトにおける Cp 発現亢進とミクログリアにおける AC01 の発現維持が観察された。AD、ALS のいずれの病変の主座においても、酸化ストレス亢進の関与が示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、神経変性疾患の細胞死の様式と細胞死における酸化ストレスの関与を明らかにすることにある。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究は、新潟脳研究所と東京女子医科大学の各倫理委員会で、あらかじめヒト剖検材料を用いた研究計画書を提出して承認を得た後、開始された。AD 脳海馬 (5 例) のホルマリン固定パラフィン包埋切片に対し、C24OHase、CaMKII、p-CaMKII、C-Casp8、p-RIPK の各々に対する特異抗体を反応させ、免疫反応産物をポリマー免疫複合法で可視化した。ブニナ小体の出現する孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 脊髄 (5 例) のホルマリン固定パラフィン包埋切片に対し、Cp、AC01 の各々に対する特異抗体を反応させ、免疫反応産物をポリマー免疫複合法で可視化した。免疫反応産物の局在は、連続切片における各種細胞マーカーの免

疫組織化学染色標本との比較により同定した。

C. 研究結果

AD 脳海馬では、C24OHase と C-Casp8 に対する有意な免疫活性は検出されなかったが、CaMKII 免疫活性は全ての錐体細胞の細胞質に均一に分布しており、p-CaMKII 免疫活性は約 3 分の 2 程度の錐体細胞の細胞質に粗大顆粒状の分布を示し、p-RIPK 免疫活性は少数の錐体細胞の細胞質に粗大顆粒状の分布を示した。

ALS 脊髄では、Cp と AC01 の発現様式に違いがみられた。Cp 免疫活性は脊髄前角の反応性アストロサイトに局在し、染色性が増強していた。これに対し、AC01 免疫活性は脊髄前角の活性化ミクログリアに局在していたが、染色性は増強していなかった。

D. 考察

AD 脳海馬標本の観察から、一部の錐体細胞内部

でカルシウム流入の亢進を反映する CaMKII のリン酸化とネクローシスの実行部隊である RIPK のリン酸化が起こっているものの、ネクローシスの秘儀金と目されている酸化コレステロールの産生酵素 C24OHase の発現ならびにデスシグナル起因性アポトーシス仲介因子 Casp8 の切断が起こっていないことが判明した。p-CaMKII と p-RIPK のいずれに対する免疫活性も錐体細胞の細胞質に粗大顆粒状構造物を形成していた意義づけは現時点において困難である。

ALS 脊髄標本の観察結果から、中枢神経系の主な Cp 発現の場であるアストロサイトが Cp を過剰発現する一方、ミクログリアにおける ACO1 の発現量に増減がないことが判明した。近年、Cp は炎症促進性サイトカイン IL-1 β の刺激を受けた網膜ミュラー細胞で発現レベルの増加が報告されている。これまでに報告された多くの ALS 研究では、脊髄における IL-1 β 産生を含む炎症活動亢進が指摘されている。ミュラー細胞とアストロサイトの類似性を考慮すると、脊髄内炎症反応がアストロサイトの Cp 発現レベルを高めた可能性は十分ありうる。一方、我々は最近、培養ミクログリアに可溶性 Cp を添加すると培養上清中のグルタミン酸が増加することを発見した。これは、細胞外からの Cp 刺激を契機にミクログリア内部でグルタミン酸が産生され、細胞外へ放出されたことを意味している。細胞内でグルタミン酸を産生する酵素として近年、ACO1 が注目されている。ACO1 は細胞質内の鉄イオン濃度が低いと不活性型である iron-regulatory protein (IRP) として存在するが、鉄イオン濃度が上昇すると活性型となることが知られている。一方、Cp は細胞外鉄イオンを細胞内へ導く性質を有する。従って、細胞外 Cp の増加はミクログリア内部への鉄イオン流入を介して ACO1 の酵素活性をもたらすことが予想される。その際、ACO1 の発現レベルに変動が起こらないという実験結果が報告されている。従って、本研究で ACO1 の染色性に変動がみられなかったことは頷ける結果である。

E. 結論

AD 脳海馬における細胞内カルシウムイオン流入とネクローシスの証拠となる結果が観察された。

ALS 脊髄における Cp 発現亢進と ACO1 活性上昇の関与が示唆された。

今回、パーキンソン病剖検脳を用いた解析が不十分であったため、次年度の課題としたい。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

ドパミン-D1R シグナルが心不全に果たす役割の解明

研究代表者 小室 一成¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾
研究分担者 山口 敏弘¹⁾

1) 東京大学医学部循環器内科 2) 新潟大学脳研究所 生命科学リソース研究センター

研究要旨

神経伝達物質ドパミンは運動調節や情動に関わり、パーキンソン病等神経疾患の発症と治療に重要な役割を持っている。一方、ヒトの心不全において、ドパミンアナログ、D1 ドパミン受容体(D1R)アゴニストの長期投与はその予後を悪化させることが報告されているが、心臓におけるドパミンの生理的作用や心不全における役割はほとんど明らかにされていない。本研究は、ドパミン-D1R シグナルが心不全の発症・進展に関与するという仮説を検証することで、心不全発症および進展における新たな分子機構の解明に取り組むものである。我々は、心不全の進展とともに顕著に変化する遺伝子として D1R を見だし、その発現が主に心筋細胞に多く認められることから、現在、心筋細胞特異的 D1R 欠損マウスやテトラサイクリン制御による D1R 発現マウスに心不全を誘導し、表現型を解析中である。

A. 研究目的

本研究では、マウス心不全モデルを用い、不全心においてドパミンが果たす役割を解析することで、心不全発症・進展において働く分子細胞機序の解明に取り組む。心臓における自律神経活性化の重要性は以前から知られているが、本研究は今まで解析されることが少なかった、自律神経において産生されるドパミンとその受容体である D1R の役割について注目して解析することで心不全における新たな病態生理を見いだすことを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

申請者らは、心不全モデルマウスの心臓において D1R の発現が病態の進行とともに増加することや、心臓におけるドパミンの spill over が増加していることを示唆する予備的データを得てい

る。これらの予備的データをもとに以下の点に注目して研究を進めた。

① 不全心の D1R 発現心筋細胞の局在の同定

心不全の進行とともに mRNA レベルで心臓 D1R の発現が増加するというデータを得てきたが、心臓における D1R 高発現細胞の局在は同定しきれていなかった。これまでイムノブロットィングや免疫染色法を用いて D1R の局在の証明を図ってきたが、心臓における D1R 発現量が多くないことから完全にその局在を同定するには至っていなかった。そこで、申請者らは分担者より提供された LacZ ラベルされた D1R 強制発現マウス心臓組織を Xgal 染色することで D1R の発現細胞の局在同定を図った。

② 心筋一細胞レベルでの D1R の発現量解析

申請者らはランゲンドルフ法を用いて単離した不全心筋細胞においても D1R が mRNA レベルで上昇していることを確認している。申請者らの研究室ではランゲンドルフ法で単離した心筋一細胞毎の mRNA の発現量の違いを同定するシステムも既に構築済みである。同システムを用いて心不全時に D1R を高発現する細胞を解析することでその特徴や意義に迫った。

③ In vivo における D1R シグナルの重要性

心筋特異的 D1R コンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作成し、同マウスにおいて心不全を誘導することで D1R が心不全の進行にどのような影響を及ぼすのかを検証する。更には、分担研究者の協力により得た、テトラサイクリン制御による D1R 発現マウスに圧負荷心不全モデルを作成し、(1)生理的機能解析、(2)分子生物学的解析、(3)生存解析を行うことでドパミン-D1R シグナルが心不全の病態形成において果たす役割を検討する。

C. 研究結果

分担者の協力により、D1R 強制発現マウスを作成し、同マウスに心不全を誘導の上、心臓 Xgal 染色を行ったところ、D1R を発現している細胞がびまん性・散在性に増加していることを見出した。また、心筋一細胞レベルの RNA 解析でも、心不全時に D1R を高発現している細胞は一部の心筋細胞のみであることが明らかとなり、両者の結果は矛盾しないものであった。現在、心筋細胞特異的 D1R ノックアウトマウスに心不全を誘導し解析を行っている。

D. 考察

心不全の進展に伴い発現が増加する遺伝子として D1R を見だし、その発現増加は限局的な心筋細胞にのみ認められることを明らかにした。また、心筋細胞における D1R 刺激は CREB シグナルの活性化を誘導していることも明らかにしている。神経細胞や近位尿細管細胞においては D1R シグナルは Na-K ATPase を制御していることが知ら

れており、心臓においては心不全のみならず不整脈発症に影響を与える可能性も考えられる。In vivo で心筋細胞におけるドパミン-D1R シグナルの阻害効果を明らかにするために心筋特異的 D1R ノックアウトマウスに現在心不全を誘導し、その効果を解析中である。

今後は、ドパミン-D1R シグナルを活性化させた心筋細胞がどのような表現型を示すのかを in vitro で解析していく必要もある。現在アデノウイルスを用いて D1R を強制発現した心筋細胞を作成中である。同時に、分担者が進めているテトラサイクリン誘導型 D1R レスキューマウスの D1R 発現様式と運動機能の解析の研究成果とあわせて検討することで、ドパミン-D1R シグナルの更なる役割の理解を深めることにつなげていく

E. 結論

心不全の進展とともに D1R の発現が限局的な心筋細胞において増加し、心筋細胞におけるドパミン-D1R シグナルは CREB シグナルの活性化を誘導することを見いだした。今後の課題として、心筋細胞特異的 D1R ノックアウトマウスに対する心不全誘導時の表現型解析を行うとともに、D1R の高発現心筋細胞の in vitro における機能解析も必要となってくると考える。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

平成 27 年度 新潟大学脳研究所共同利用共同研究 合同セミナー・平成 27 年 12 月 22 日・新潟

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし

胎仔期および発達期の脳におけるドーパミン受容体 D1R の機能解析

研究代表者 大久保 直¹⁾
研究分担者 佐藤 俊哉¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾

- 1) 北里大学医学部実験動物学
- 2) 新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野

研究要旨

ドーパミン D1 受容体 (D1R) は、運動を促進する役割があると考えられている。これまでに、コンディショナル D1R 発現マウスを用いることにより、成熟マウスにおいて D1R の働きを抑制すると運動量の減少が起こることが判明した。しかし、通常の D1R ノックアウトマウス (KO) では、運動の亢進が認められる。このような行動発現の差は、胎仔期からの D1R の欠損が脳機能の正常な構築に影響を及ぼすことを示唆している。そこで本研究では、まず D1R を生後発達期において時期特異的にノックダウン (KD) し、その脳に及ぼす影響を形態学的・生化学的・行動学的に解析することを目的とした。生後母乳を介してドキシサイクリンを飲水させた D1R KD マウスを用いて各種行動解析を行った。その結果、D1R がノックダウンされる時期により行動の表現型に違いが見られたことから、発生発達期と成体期における D1R の機能が異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ドーパミン D1 受容体 (D1R) は、運動を促進する役割があり、成熟マウスにおいてコンディショナルに D1R の働きを抑制すると運動量の減少が起こる。しかし、通常の D1R ノックアウト (KO) マウスでは、運動の亢進が認められる。このような行動発現の違いは、胎仔期から D1R が欠損しているか、あるいは成熟期になって欠損するかによって、脳機能や脳組織の構造に異なる影響を与えていると示唆される。そこで本研究では、D1R を発達期、および成体期に特異的にノックダウン (KD) して運動機能を行動レベルで解析し、D1R の機能を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

Tet-Off システムを導入したコンディショナル D1R 発現マウスの受精卵を仮親マウス (ICR 系統) に移植後、ドキシサイクリンを飲水投与することにより、発達期および成体期の D1R の発現をノックダウンした。コントロールとして、野生型マウス、D1R KO マウス、同時期に水のみを与えたコンディショナル D1R 発現マウスを用い、各種行動解析を行った。KD マウスは自力での摂餌が困難になり衰弱する可能性があるため、その場合は実験をやめ安楽死とした。

C. 研究結果

平成 26 年度に検討した、発達期における D1R KO

の条件に沿って、生後0日からドキシサイクリンを母乳を介してあるいは直接飲水によって投与した。D1R の発現が検出不可能なレベルに達した時期に、D1R KD マウスと他のコントロールマウスの行動の表現型を比較した。行動解析として、オープンフィールドテストによる新奇環境での活動性、さらにバランスビームテストによる協調運動、平衡感覚を評価した結果、発達期の D1R KD マウスでは、成体期の KD マウスと比べ行動異常の現れ方が異なることが判明した。

該当無し
3. その他
該当無し

D. 考察

発達期と成体期では、正常な行動発現に D1R が必要であるが、その機能は異なる可能性があると考えられた。D1R KO マウスのように、受精卵の段階から D1R がないと、他のドーパミン受容体による何らかの機能的補償作用が働く可能性もあると考えられた。

E. 結論

生後発達期および成体期に D1R の発現をノックダウンしたところ、各行動テストにおいて異なる表現型が現れたことから、発達期と成体期では D1R が異なる機能を持つことが示唆された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

笹岡俊邦、佐藤朝子、知見聡美、大久保直、前島純、新井慧、砂山智子、小田佳奈子、酒井清子、前田宜俊、神保幸弘、馬川恵梨子、佐藤俊哉、藤澤信義、横山峯介、南部篤 D1 dopamine receptor-mediated signal is required to maintain normal motor activity 第38回日本分子生物学会総会 2015年12月3日 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

Astroblastoma の網羅的遺伝子解析

研究代表者 信澤 純人¹⁾
研究分担者 横尾 英明¹⁾ 柿田 明美²⁾

1) 群馬大学大学院医学系研究科病態病理学分野 2) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

Astroblastoma は小児～若年成人に発生する非常に稀な原発性脳腫瘍である。病理組織学的に、astroblastic rosettes と呼ばれる血管周囲性偽ロゼット構造を特徴とするが、この構造は浸潤性グリオーマ等にも見られることがあり、また、特異性の高い免疫組織化学的マーカーを欠くことから診断に難渋することがある。本研究では、astroblastoma に特異性の高い分子マーカーを検索するため、網羅的遺伝子解析を行った。高解像度の arrayCGH 法を用いた解析では、ある染色体全体に渡って chromothripsis を思わせるような大小の欠失が無数に認められた。また、鑑別を要する腫瘍に特異的として最近報告された遺伝子異常は見られなかった。今回の検索で認められた異常がどのように腫瘍発生に関わっているかは不明であるが、本腫瘍は分子遺伝学的に独立性の高い疾患群であると考えられる。

A. 研究目的

Astroblastoma は非常に稀な原発性脳腫瘍の一つであり、その組織診断基準は明確とは言えない。他のグリオーマや髄膜腫と類似した組織所見を呈するが、特異性の高い免疫組織化学的マーカーはいまだ知られていない。また、遺伝子異常に関する報告はほとんど存在していない。今回の研究では、高解像度の arrayCGH 法を用いて、astroblastoma におけるゲノム全体に亘るコピー数の異常を網羅的かつ高精度に検出し、遺伝子異常の全体像の解明と、診断に有用な特異性の高い分子マーカー、治療の標的となる可能性のある分子の探索を行う。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

- ・脳腫瘍を専門とした複数の病理医の診断が一致した astroblastoma 症例の収集を行う。
- ・収集した症例のパラフィン包埋切片から

genomic DNA を抽出し、arrayCGH 法によりコピー数異常を検索する。

本研究は群馬大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理委員会での審査を受け、承認を得ている。

C. 研究結果

全国の複数の施設から astroblastoma と診断された症例、およびそれが疑われた症例を 20 例程集め、1. 境界明瞭であること、2. 偽乳頭状構造を示すこと、3. 血管周囲に比較的均質な硝子化（線維化）を認めること、4. 血管指向性を示していること、5. 上皮様の細胞形態を有していることに重点を置き、脳腫瘍を専門とした複数の病理医にて検討した結果、典型的な astroblastoma として意見が一致した症例を 8 例収集することができた。そのうち 6 例のパラフィン包埋切片から質の高い genomic DNA を抽出することができ、

arrayCGH法を行った。結果、解析した全例において、ある染色体全体に渡って chromothripsis を思わせるような大小の欠失が無数に認められた。その他、2例で recurrent に見られる異常が3個認められた。また、astroblastoma と同様に、星細胞や上皮細胞への分化を示す angiocentric glioma や ependymoma などの腫瘍に特異的として最近報告された遺伝子異常の存在を示唆する結果は得られなかった。

D. 考察

網羅的な遺伝子解析において全例に認められた異常は、他の疾患群において recurrent に見られるものとして現在までに報告されていないため、astroblastoma に特異的と考えられる。また、astroblastoma に類似した腫瘍に特異的な遺伝子異常も認められていないため、本腫瘍は分子遺伝学的に独立性が高いと考えられる。

E. 結論

Astroblastoma は、病理組織学的に類似した腫瘍が複数あるが、分子遺伝学的には独立性の高い疾患群であると考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

無し。

2. 学会発表

Hirose T, Nobusawa S. Astroblastoma and its mimics. The 9th Asia Pacific Congress of the International Academy of Pathology. June 6, 2015, Brisbane, Australia.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

無し。

筋萎縮性側索硬化症脊髄における GPNMB 凝集体に関する研究

研究代表者 原 英彰¹⁾

研究分担者 長原 悠樹¹⁾、嶋澤 雅光¹⁾、柿田 明美²⁾

¹⁾ 岐阜薬科大学 薬効解析学研究室 ²⁾ 新潟大学脳研究所 脳疾患標本資源解析学分野

研究要旨

我々は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者腰髄で GPNMB (Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B) 凝集体が認められることを報告した。しかしながら GPNMB 凝集体の正体は明らかになっていない。そこで ALS 患者および対照疾患患者の脊髄パラフィン切片を作製し、ALS 患者における GPNMB 凝集体の局在を検討した。GPNMB 凝集体は ALS 患者の頸髄・胸髄・腰髄の灰白質および白質で観察された。GPNMB は GFAP (Glial fibrillary acidic protein) と共局在せず、MAP2 (Microtubule-associated protein 2) や SMI32 (Neurofilament H non-phosphorylated) と共局在していた。また、GPNMB は TDP-43 [Transactive response (TAR)-DNA-binding protein 43] と共局在していた。以上より、GPNMB 凝集体は ALS 患者脊髄の神経細胞に局在し、TDP-43 とも何らかの関連があることが示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は筋肉の萎縮や変性、運動機能障害等が生じる進行性の神経変性疾患であり、有病率は 2-7 人/10 万人である。患者の約半数が発症後 3-5 年以内に死亡する非常に重篤な疾患であるにもかかわらず、唯一の治療薬であるリルゾールも生存期間を約 3 ヶ月延長するのみであり、病態解明や新規治療薬の開発が切望されている。GPNMB (Glycoprotein nonmetastatic melanoma B; Osteoactivin, DC-HIL) は悪性黒色腫細胞から発見された一回膜貫通型糖タンパク質であり、種々の癌の転移に関与する他、骨吸収・骨形成、緑内障等にも関与する。

我々は DNA マイクロアレイにより、ALS モデルマウスである SOD1^{G93A} [superoxide dismutase 1 (glycine 93 changed to alanine)] マウス脊髄において、野生型マウスと比較して GPNMB が上昇していることを明らかにした。また、ALS 患者の脊髄や血清、脳脊髄液で発現上昇すること、GPNMB

の過剰発現によって SOD1^{G93A} マウスの生存期間が延長することを報告した。さらに、GPNMB が ALS の *in vitro* モデルである SOD1^{G93A} 誘発運動神経細胞死を抑制することも報告した。さらに ALS 患者の脊髄 (腰髄灰白質) で、GPNMB の異常な凝集体が見られることを明らかにした (参考文献 1)。しかしながら GPNMB 凝集体がどこに局在するか、どのような物質と結合しているか等は明らかにされていない。

TDP-43 [Transactive response (TAR)-DNA-binding protein 43] は、ALS や FTLD (前頭側頭葉変性症) 等の疾患との関連が指摘されているタンパク質である。TDP-43 は正常な神経細胞では主に核に存在しているが、ALS 等の疾患では細胞質中に凝集・蓄積し、核から消失することが知られている。

平成 26 年度、ALS 患者 (2 例) および対照疾患患者 (2 例) の検討を行ったところ、ALS 患者脊髄で観察された GPNMB 凝集体が MAP2 (Microtubule-associated protein 2) と共局在する可

能性が示唆された。そこで本年度、ALS 患者 (10 例) および対照疾患患者 (10 例) において、同様に検討を行うとともに、GFAP (Glial fibrillary acidic protein) や SMI32 (Neurofilament H non-phosphorylated) と共局在するか検討した。さらに、ALS 患者脊髄における GPNMB 凝集体が TDP-43 と共局在するか検討した。

B.研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所において孤発性 ALS 患者 10 例および対照疾患 (非神経変性疾患) 患者 10 例の頸髄・胸髄・腰髄のパラフィン切片 (厚さ 4 μ m) を作製した。

岐阜薬科大学において、脱パラフィン操作 (キシレン 15 分 \times 3 回、無水エタノール 10 秒 \times 2 回、99%エタノール 10 秒 \times 2 回、90%エタノール 10 秒 \times 1 回、70%エタノール 10 秒 \times 1 回、蒸留水 10 秒 \times 1 回) を行った。クエン酸緩衝液 (pH 6.2) を用いて 120 $^{\circ}$ C で 15 分間オートクレーブすることにより賦活化した。PBS で Wash 後、10%Horse serum によりブロッキング (室温、1 時間) を行った。PBS で Wash 後、Goat anti-human GPNMB polyclonal antibody (1/20; #AF2550, R&D) を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。PBS で Wash 後、Alexa 546-conjugate donkey anti-goat IgG (1/1,000; #A11056, Invitrogen) を室温で 1 時間反応させた。PBS で Wash 後、Mouse anti-MAP2 monoclonal antibody (1/500; #ab11267, abcam)、Mouse anti-SMI32 (1/1,000; #NE1023, Millipore Corporation)、または Rabbit anti-TDP-43 polyclonal antibody (1/100; #10782-2-AP, Proteintech) を室温で 1 時間反応させた。PBS で Wash 後、Alexa Fluor 488-conjugate rabbit anti-mouse IgG (1/1,000; #A21204, Invitrogen)、または Alexa Fluor 488-conjugated chicken anti-rabbit IgG antibody (1/1,000; #A21441, Invitrogen) を室温で 1 時間反応させた。PBS で Wash 後、Hoechst33342 (1/5,000) 又は DAPI (1/1,000) を室温で 30 分反応させることで核染色を行った。PBS で Wash 後、フルオロマウントを用いて封入した。Olympus IX50 inverted epifluorescence microscope (Olympus) を用いて、頸髄、胸髄、腰髄それぞれについて、灰白質と白質を撮影し、評価を行った。

本研究は新潟大学脳研究所で「病理解剖ならび

に病理検体保存とその使用に関する承諾」が得られている症例を用い、新潟大学医学部倫理委員会の承認 (承認番号: 2428) および岐阜薬科大学生命倫理委員会の承認 (承認番号: 岐阜市薬会第 353-1 号) を得た上で行った。

C.研究結果

GPNMB 凝集体は ALS 患者の頸髄・胸髄・腰髄の灰白質および白質において、対照疾患と比較して有意に増加していた。

GPNMB 凝集体は、神経細胞 (細胞体・樹状突起) のマーカーである MAP2 や、軸索のマーカーである SMI32 と共局在していた。その一方で、アストロサイトのマーカーである GFAP とは共局在していなかった (Fig.1)。

TDP-43 は正常な神経細胞では主に核に存在しているが、ALS 等の疾患では細胞質中に凝集・蓄積し、核から消失することが知られている。ALS 患者脊髄の神経細胞の細胞質において TDP-43 凝集体が生じていた。また、二重免疫染色を行ったところ、GPNMB 凝集体は TDP-43 と共局在していることが明らかになった (Fig.2)。

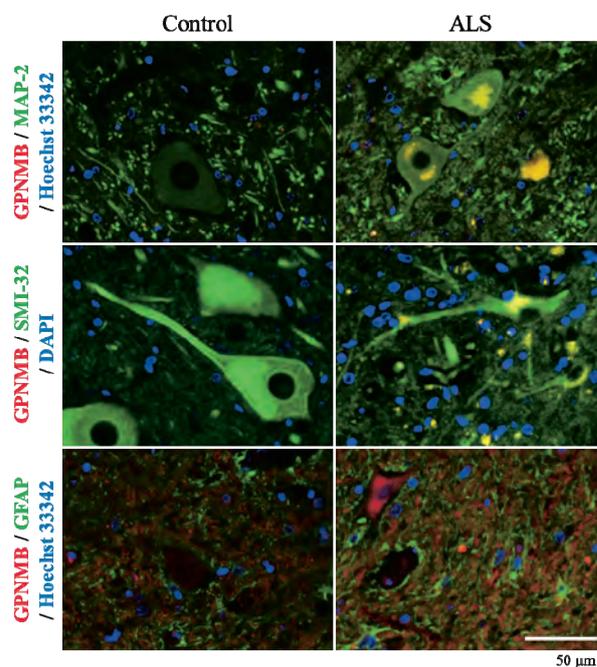


Fig.1 ALS 患者腰髄灰白質における二重免疫染色

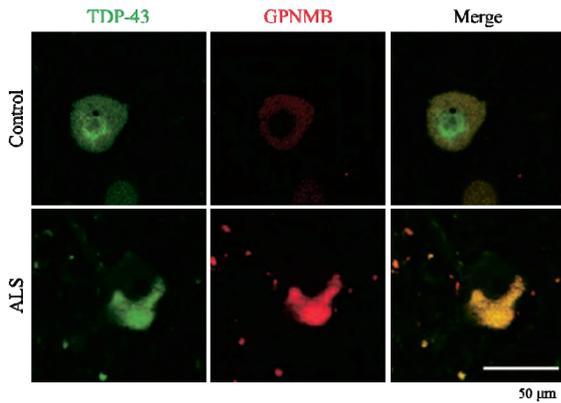


Fig.2 GPNMB と TDP-43 の二重免疫染色

D. 考察

GPNMB 凝集体は、神経細胞（細胞体・樹状突起）のマーカである MAP2 や、軸索のマーカである SMI32 と共局在していた。その一方で、アストロサイトのマーカである GFAP とは共局在していなかった。よって、GPNMB 凝集体は ALS 患者脊髄の神経細胞において形成されていることが明らかになった。

また、GPNMB 凝集体は TDP-43 と共局在していた。我々のこれまでの研究で、GPNMB が *in vivo* および *in vitro* の ALS モデルに対して保護作用を示すことが示唆されている（参考文献 1-3）。従って GPNMB は TDP-43 凝集に起因した細胞障害を抑制するために、ALS 患者脊髄の神経細胞において発現増加するのかもしれない。GPNMB 凝集体がどうして生じるのか、どのような作用をしているか等は今後の検討課題である。

E. 結論

ALS 患者の頸髄・胸髄・腰髄で GPNMB 凝集体が生じることが明らかになった。また、GPNMB 凝集体はアストロサイトには局在しておらず、神経細胞の細胞体や軸索に局在する可能性が示唆された。よって、本研究により ALS 患者脊髄の GPNMB 凝集体の局在が明らかになった。

また、GPNMB 凝集体は ALS 患者脊髄において TDP-43 と共局在していた。さらなる検討が必要ではあるが、GPNMB 凝集体が TDP-43 と関連がある可能性が示唆された。本研究をさらに進めることで、ALS の病態解明や治療薬の開発につながると考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表
準備中

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得	なし
2. 実用新案登録	なし
3. その他	なし

[参考文献]

- 1: Tanaka H. et al. The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific reports* 2, 573 (2012).
- 2: Nagahara Y. et al. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B ameliorates skeletal muscle lesions in a SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroscience research* 93, 1552-1566 (2015).
- 3: Nagahara Y. et al. The effect of GPNMB on muscular atrophy caused by ALS. *Musculoskeletal Regeneration* 1 (2015).

ヒト神経疾患脳における DAP12 発現の病理学的検討

研究代表者：佐々木 惇¹⁾

研究分担者：柿田 明美²⁾

1) 埼玉医科大学病理学, 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

Nasu-Hakola病（以下、NHDと略す）では近年、*DAP12* (DNAX-activation protein 1), also known as *TYROBP* (TYRO protein tyrosine kinase-binding protein) 遺伝子およびDAP12のアダプター分子である *TREM2* (triggering receptor expressed on myeloid cell 2) の変異ないし欠損が見出され、脳内の蛋白発現消失が脳病変の病態に関与する可能性が示唆された。DAP12 (DNAX activating protein of 12 kDa) はI型膜貫通糖タンパクであり、染色体19q13に位置する遺伝子でコードされている。本研究では、NHDなどの神経疾患でのNHD12の役割を明らかにするために、剖検および生検脳組織を用いて、DAP12蛋白/遺伝子発現を検討した。

平成26年度までの結果について、佐々木が筆頭著者となり、共同研究者の柿田をはじめとする共著者と英文論文を作成した。その論文はNeurogenetics誌に受理され、2015年度に掲載された。

NHD以外の疾患として、悪性脳腫瘍である膠芽腫を検討したところ、一部の症例で多数のtumor associated macrophage (TAM)がDAP12強陽性となり、腫瘍周囲では、activated microglia, resting microglia, perivascular cellも陽性となった。さらにTAMは膠芽腫組織内の微小血管増殖部に増加していることが示された。

A. 研究目的

本研究の目的は NHD などのヒト神経疾患での DAP12 の役割の解明であり、研究期間内に以下の点を明らかにする：

- 1) *DAP12* 遺伝時異常
- 2) DAP12 蛋白発現
- 3) 脳内 DAP12 蛋白発現のミクログリア特異性・活性化との関係

NHD 2 例、埼玉医科大学国際医療センターで摘出された膠芽腫 30 例と非神経疾患剖検例 6 例を対象とした。いずれの症例とも遺族への説明は臨床担当医師からなされており、文書により研究に使用することに関する同意が得られていた。また、すでに診断された後の保存資料であり、資料提供者本人や遺族への不利益や危険性は全く生じていない。

DAP12 遺伝子検索は、NHD 凍結脳を用いて、シーケンシング、RT-PCR、real time PCR により行った。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

新潟大学脳研究所に保存された NHD 2 例と他院

DAP12 蛋白解析は、Western blot と免疫組織化学 (IH) により行った。IH では、ホルマリン固定脳パラフィン切片を作製し、LSAB 法ないし EnVision FLEX 法を行った。一次抗体として、Iba1, glucose transporter 5 (Glut5), MHC class II (CR3.43), CD68 (PG.M1), CD204 (SRA-E5), CD163 (10D6), 抗 DAP12 抗体 (FL-113 と ab11017), を用いた。

C. 研究結果

今年度は、従来の結果にもとづき、activated microglia や TAM での DAP12 発現を解析した。抗 DAP12 抗体 (ラビット, FL-113) を用いた免疫染色では、非神経疾患脳において、DAP12 は resting microglia, perivascular cells, meningeal macrophages, choroid plexus macrophage に認められた、一方、抗 DAP12 抗体 (goat, ab11017) では、明らかな陽性像は得られなかった。

一方、脳腫瘍手術摘出組織においては、多数の TAM が DAP12 強陽性となり、腫瘍周囲では、activated microglia, resting microglia, perivascular cell も陽性となった。さらに膠芽腫の MVP 部に M2 型を含む多数の TAM がみられ、血管増生での役割が示唆された。

D. 考察

NHD 脳における DAP12 蛋白異常は、蛋白レベルでの発現低下だけでなく、蛋白の機能異常がある可能性が示された。NHD は、DAP12 ないし TREM2 分子の異常による、“microgliopathy” の可能性が高いが、その発症メカニズムは未だ未解決である。今後は、microglia と axon との関係、ミクログリアとオリゴデンドログリア・ミエリンとの関係についての詳細な解析が必要と考える。

従来検討で、我々は、DAP12 が perivascular cell を含む脳内の macrophage 系細胞にも発現することを示した。さらに、悪性グリオーマ組織内の TAM にも DAP12 が発現することを初めて示した。今後は DAP12 分子の発現細胞数や発現レベルの解析が必要と考えられた。具体的には悪性 glioma においても、免疫組織化学だけでなく、western blot 法, real-time PCR 法による mRNA および蛋白発現量の検討が必要であり、DAP12 とともに macrophage 受容体分子である TREM2 や CSF1-R の

発現との比較解析も望まれる。

E. 結論

今回、我々は、NHD 症例の中には通常の症例と同様の臨床・病理像を示し、DAP12 遺伝子変異を持つにも拘わらず、DAP12 の mRNA や蛋白が高発現される症例があることを初めて論文発表した。今後は、DAP12 ないし TREM2 の DNA, mRNA, 蛋白の詳細な解析、疾患特異性、および他の受容体分子発現との比較検討が必要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

A Sasaki, A Kakita, K Yoshida, T Konno, T Ikeuchi, S Hayashi, H Matsuo, K Shioda: Variable expression of microglial DAP12 and TREM2 genes in Nasu-Hakola disease. *Neurogenetics* 16:265-276, 2015. DOI 10.1007/s10048-015-0451-3

2. 学会発表

佐々木惇:「Nasu-Hakola 病におけるミクログリア: 病態への関与」教育講演 E-04「神経疾患においてミクログリアはもはや脇役ではない」第 56 回日本神経学会学術大会 (新潟、2015. 5. 21.)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

時間的空間的特異的 *Scrapper* ノックアウトマウスの作製と解析

研究代表者 矢尾 育子 1) 2)
研究分担者 伊藤 誠二 1)
研究分担者 片野 泰代 1)
研究分担者 崎村 建司 3)

1) 関西医科大学 2) 浜松医科大学 3) 新潟大学

研究要旨

SCRAPPER は神経シナプスに局在し、神経伝達物質放出の制御にかかわるユビキチン E3 リガーゼである。*Scrapper* 遺伝子ノックアウト (SCR-KO) マウスが生後致死であるため、成体での SCRAPPER 分子の機能を十分に解析できなかった。そこで部位特異的なコンディショナル KO (cKO) マウスを作製し、その詳細な機能解析を行うことを計画した。前年度までに、コンディショナルノックアウトマウス作製のための floxed 型のベクターを構築し、組換え ES 細胞株よりキメラマウスを作出している。生殖系列に ES 細胞が分化した個体より標的 floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスが得られており、ドライバーマウスとの交配により時間的空間的特異的 SCR-cKO マウスを作製しようとしている。今後ドライバーマウスとの交配により部位手特異的 SCR-cKO マウスを作製するとともに、以前に解析した null ノックアウトマウスと同じ表現型が得られるかも合わせて検討するため、共同研究を継続していく予定である。

A. 研究目的

Scrapper 欠損マウス (SCR-KO マウス) は体が小さい上に寿命が短く、恐怖記憶形成の異常、脳の海綿状変性や神経細胞の萎縮といった老化現象が見られる。SCR-KO マウス脳において変動している分子の同定が神経変性疾患病態解明の 1 つの鍵になると考えられる。

SCR-KO マウスは、多くの個体が生後半年程度で死亡する。また、産仔数もメンデルの法則に従わず少ないことから、SCRAPPER が発生段階においても機能していることが予想される。本研究では、致死の表現型を回避し脳に限定した機能を解析することができる、部位特異的なコンディショナル KO マウスを作製し解析をおこなう。

B. 研究方法

floxed 型のベクターを構築し、このベクターを

新潟大学崎村研究室で開発された RENKA 株 ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選別する。これらの組換え ES 細胞株よりキメラマウスを作出し、生殖系列に ES 細胞が分化した個体より標的 floxed 型マウスを樹立する。さらに、脳部位特異的な Cre 発現マウスを利用して、部位特異的なノックアウトマウスを作製して解析に供する。

動物実験計画は大学の内規に準じて行う。実験時には適切に麻酔処理を行い、動物への苦痛を可能な限り除く。

C. 研究結果

現在までに、コンディショナルノックアウトマウス作製のための floxed 型のベクターを構築し、このベクターを新潟大学崎村研究室で開発された RENKA 株 ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選別した。これらの組換え ES 細胞株よりキメラ

マウスを作出し、生殖系列に ES 細胞が分化した個体より標的 floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスを得ている。今年度、浜松医大への導入を完了し、FLP マウスとの交配を進めた。現在、ドライバーマウスとの交配により、時期あるいは部位特異的なノックアウトマウスを作製する段階である。

D. 考察

脳部位特異的な Cre 発現マウスを利用して、部位特異的なノックアウトマウスを作製して解析に供する計画であることから、今後、交配を行いノックアウトマウスラインの樹立が必要である。また、解析に適するドライバーマウスの選択および交配、その後の解析を行う必要がある。現存するノックアウトマウスはバックグラウンド系統が複数の雑種となっていることから、新たに得られるマウスを用いた解析はバックグラウンド系統の影響を消去できる点でも有用であると考えられる。

E. 結論

SCR-cKO マウス作製のための floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスが得られた。今後さらに繁殖、ドライバーマウスとの交配により部位特異的 SCR-cKO マウスを作製する。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 矢尾育子

「質量分析イメージングで何が見えるか」

第 42 回 BMS コンファレンス

2015/7/6 岐阜グランドホテル（岐阜県岐阜市）

2) 矢尾育子

「質量分析イメージングの実際」

第 56 回日本組織細胞化学会総会

2015/10/3 関西医科大学（大阪府枚方市）

3) 矢尾育子

「ユビキチンリガーゼ SCRAPPER によるシナプス可塑性の調節」

第 93 回日本生理学会大会

2016/3/22 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

4) 矢尾育子

「質量顕微鏡法による神経疾患モデル動物解析に向けて」

第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会

2016/3/28 ビッグパレットふくしま（福島県郡山市）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし