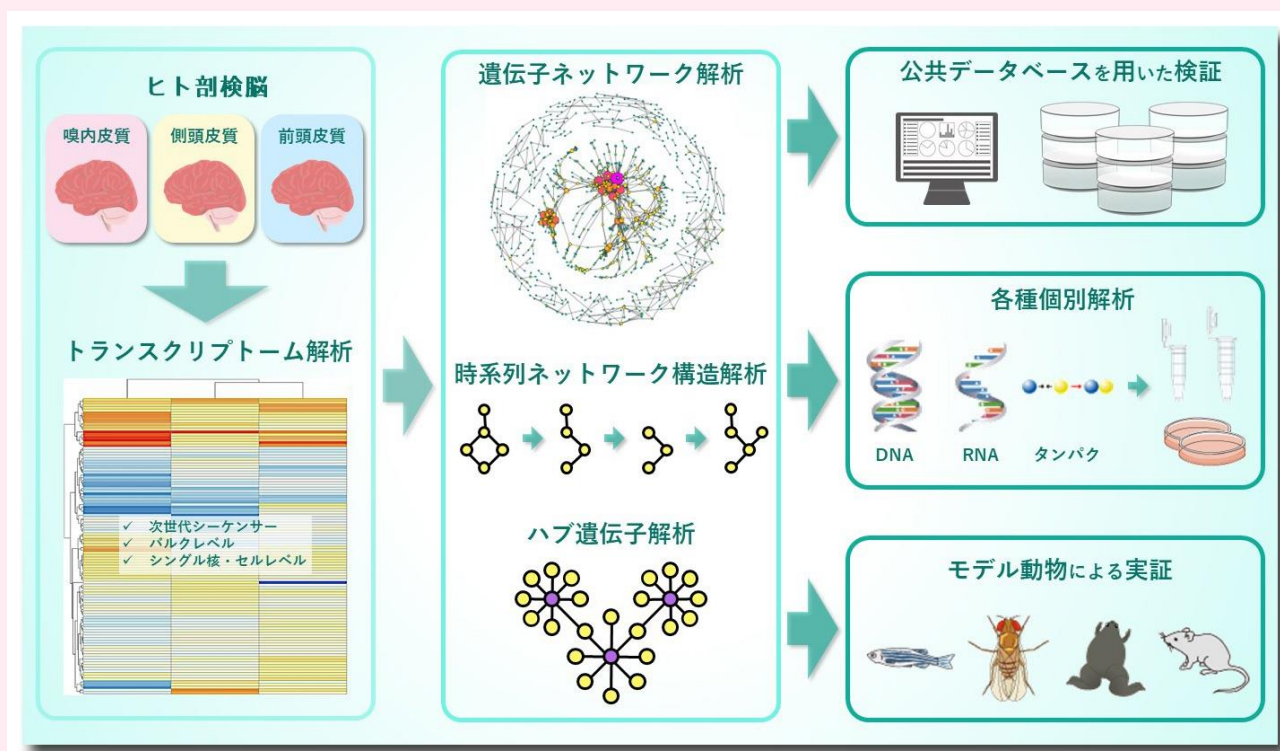


新潟大学脳研究所年報

2020



ヒト剖検脳のトランスクリプトーム解析による認知症の原因・感受性遺伝子探索
(大阪大・菊地正隆先生からご提供頂いた原図を新潟大・宮下哲典が改変し、使用した)

目 次

1. 組織図・研究所のデータ	1
2. 各分野の研究活動	
○ 分子神経生物学分野	5
○ 腫瘍病態学分野	7
○ 細胞病態学分野	8
○ システム脳病態学分野	10
○ 病理学分野 / 脳疾患標本資源解析学分野	13
○ 分子病態学（客員）分野	18
○ 脳神経外科学分野	20
○ 脳神経内科学分野	26
○ 統合脳機能研究センター	32
○ 遺伝子機能解析学分野	34
○ 動物資源開発研究分野	39
○ モデル動物開発分野	42
○ 分子神経疾患資源解析学分野	46
○ 脳病態解析分野	48
3. 社会との連携	50
4. 共同利用・共同研究拠点	
共同利用・共同研究採択者一覧	61
報告書	
プロジェクト型共同研究	
○ タウオパチーにおける海馬由来コリン作動性 神経刺激ペプチド関連因子の動態 名古屋市立大学大学院医学研究科 松川 則之	65
○ 統合失調症モデル動物を用いた幻聴の神経基盤に関する研究 熊本大学生命科学研究部 宋 文杰	67

○ アルツハイマー病脳におけるアミロスフェロイド形成と神経細胞障害の時空間的解析 神戸医療産業都市推進機構 星 美奈子	70
○ 筋萎縮性側索硬化症（ALS）細胞質 TDP-43 凝集体形成を抑制する分子の同定と機能解析 杏林大学保健学部臨床検査技術学科 渡部 和彦	73
○ 深層学習画像処理技術の開発と応用による脳神経外科手術映像解析 北海道大学病院 杉山 拓	75
○ 内因的行動の神経基盤の解明 中京大学心理学部 酒多 穂波	78
○ 新しいフェロトシス阻害システムによる神経細胞保護の検討 群馬大学食健康科学教育研究センター 鳥居 征司	80
○ 慢性疼痛関連分子を標的とした脳および脊髄での機能的解明 関西医科大学医化学 片野 泰代	82
○ 側頭葉てんかんにおけるてんかん焦点の可視化—multimodality を用いた術前評価による外科手術の成績向上に向けて— 国立病院機構西新潟中央病院脳神経外科 福多 真史	84
○ 微小管結合タンパク質を中心としたゲノム解析と機能解析 同志社大学生命医科学部 宮坂 知宏	87
○ マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 岩里 琢治	90
○ アルツハイマー病タウ蓄積および変性に対する aquaporin-4 機能促進薬 TGN-073 の効果の検証 東京大学医学系研究科 山田 薫	93
○ SCA42 モデルマウスを用いた神経変性疾患病態解明、治療法開発 横浜市立大学大学院医学研究科 土井 宏	95
○ ミクログリア機能修飾によるタウ病態の変化の検討 量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門 高堂 裕平	98
○ 中枢神経系組織における微量元素の分布：シンクロトロン放射光による測定条件の検討 藤田医科大学研究統括監理部 松浦 晃洋	100
○ 脳梁膨大後皮質におけるグルタミン酸受容体 GluR2 による入力選択的回路形成機構 北海道大学大学院医学研究院 渡辺 雅彦	102
○ マルチモーダルな脳画像と脳機能データを用いたマルチモーダル機械学習 東京医科歯科大学 服部 高明	105
○ 認知症の解明と精密医療実現を目的としたゲノム-オミクス解析 国立長寿医療研究センター 尾崎 浩一	107
○ Experimental autoimmune encephalomyelitis マウスの作成およびそれを用いた治療法開発 藤田医科大学医学部 鈴木 元	111

○ 遺伝性脳小血管病モデル動物を用いた脳卒中・認知症の新規治療法の開発 国立循環器病研究センター 猪原 匡史	113
○ GABA 仮説に基づいた統合失調症モデルラットの病態解析 群馬大学大学院医学系研究科 柳川 右千夫	115
○ 高磁場 MRI を用いた発達障害に伴う統合的脳機能に関する研究 国立成育医療研究センター 小枝 達也	118
○ タウオパチー病理組織標本を用いたタウ PET 画像病理相関解析 量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門 樋口 真人	120
○ ストレス応答におけるドーパミン受容体の役割の解明 北里大学医学部 板倉 誠	122
○ シヌクレイノパチーにおける異常蓄積タンパク質の排出亢進と治療法の開発 弘前大学大学院医学研究科 丹治 邦和	125
○ 血漿中 ILEI 定量による高齢者認知機能障害の初期サロゲイトマーカーとしての検証 滋賀医科大学神経難病研究センター 西村 正樹	127
○ アルツハイマー病に関連するゲノム情報を駆使した多遺伝子解析 大阪大学大学院医学系研究科 菊地 正隆	130
○ 臨床応用に資する[11C]TGN-020 の迅速かつ高収量な製造合成法の開発 福島県立医科大学保健科学部 久保 均	132
○ 神経変性疾患特異蛋白と神経細胞脱落：ヒト基底核における定量的検討 信州大学医学部 小柳 清光	135
○ 脳由来の血中糖タンパク質の網羅的な同定方法の確立 関西医科大学医学部 赤間 智也	138
○ 睡眠覚醒と記憶制御に関わる視床下部神経の動作原理解明 名古屋大学環境医学研究所 山中 章弘	140
○ 精神疾患死後脳の分子プロファイル解析 東北大学災害科学国際研究所 國井 泰人	143
○ 遺伝子改変マウスを用いた大脳基底核疾患の病態生理の解析 自然科学研究機構生理学研究所 知見 聡美	147
○ 歯状回顆粒細胞の興奮性に対する diacylglycerol lipase α の役割の解明 東京大学大学院医学系研究科 菅谷 佑樹	149
○ タウ凝集体の伝播におけるミクログリアの役割 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 松本 信英	151
○ 遺伝子改変技術による生体リズム中枢の分子機構の解析 京都大学大学院医学研究科 岡村 均	154
○ 腸内細菌叢および腸管上皮細胞からの DAMPs 制御による脳虚血病巣進展への影響 日本医科大学大学院 西山 康裕	156

○ 孤発性 ALS 患者で見出された新規 microRNA の機能解析	
岐阜薬科大学 保住 功	159
○ 高磁場 MRI を用いたてんかん原性部位及び機能部位との関係の研究	
静岡てんかん・神経医療センター 臼井 直敬	162
○ 中枢神経原発悪性リンパ腫における TACC 3 発現とその臨床病理学的意義	
久留米大学医学部 杉田 保雄	164
○ 超偏極低分子化合物の生体トレーサーとしての応用を目指した基礎検討	
量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 青木 伊知男	168
○ NF-κB 活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の開発に向けた多施設共同研究	
横浜市立大学大学院医学研究科 立石 健祐	170
○ 特発性正常圧水頭症患者脳脊髄液中のバイオマーカー診断と重症度分類の確立	
順天堂大学医学部 中島 円	173
○ Boron neutron capture therapy (BNCT) が播種・浸潤に及ぼす効果の検討	
京都大学複合原子力科学研究所 近藤 夏子	176
○ RNA-Seq 解析を用いるがん性疼痛と難治性神経障害性疼痛に関連分子の探索・同定	
大阪医科薬科大学 伊藤 誠二	178
○ 認知症関連疾患リスク遺伝子（特に ACE, ABCA7、FUS に関して）検索	
名古屋市立大学大学院医学研究科 赤津 裕康	180
○ 筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病変の評価	
量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 高堂 裕平	182

連携資源利用型共同研究

○ 脳研究に必須な遺伝子改変マウスの系統保存に重要な培養条件の検討	
東京医科大学 久慈 直昭	184
○ 神経変性疾患モデルマウスのヒト疾患との連関	
昭和大学医学部 大滝 博和	186
○ 統合失調症モデルザルの脳病理学的変化の研究	
京都大学霊長類研究所 中村 克樹	189
○ 脳腫瘍の原因遺伝子変異を特異的に抑制する siRNA 核酸医薬品開発	
東京大学大学院理学系研究科 程 久美子	191
○ 疾患モデル動物の作製、保存、繁殖に関する最先端技術の開発	
熊本大学生命資源研究・支援センター 竹尾 透	193
○ 筋萎縮性側索硬化症におけるイノシトール 6 リン酸キナーゼの役割	
東海大学医学部 永田 栄一郎	195

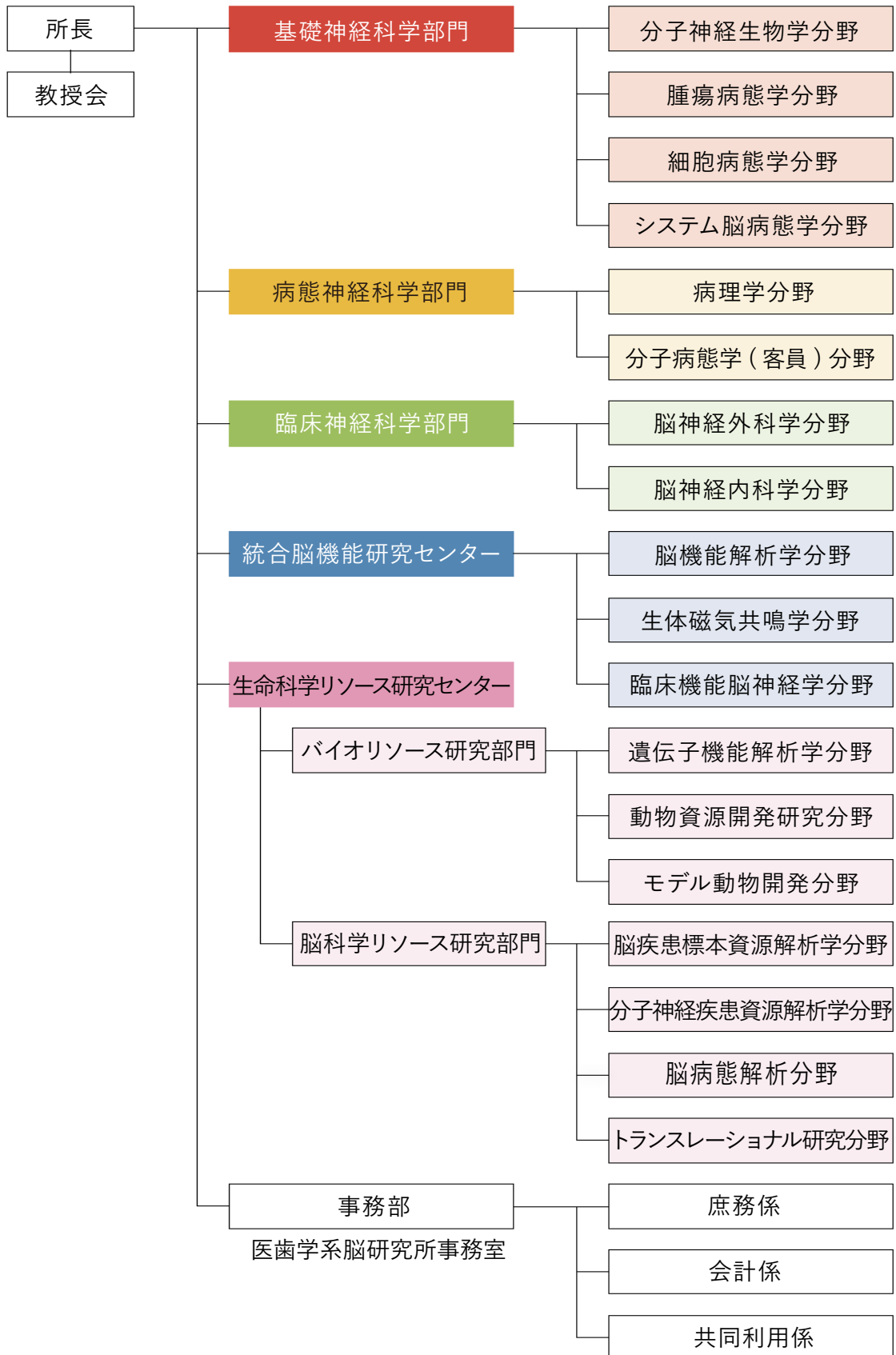
○ ヒト特異的な脳細胞は果たしてあるのか？シングルセル比較トランスクリプトーム・ エピゲノム解析 自然科学研究機構生命創成探究センター 郷 康広	197
○ 脳神経筋疾患モデルマウスにおける超過剰排卵誘起処理と反復採卵による系統保存シ ステムの開発 公益財団法人実験動物中央研究所 高橋 利一	199
○ 神経幹細胞での遺伝子変異による腫瘍化メカニズムの解析 国立病院機構大阪医療センター 金村 米博	202
○ 発達期脳内微細構造の生体イメージングによる神経回路形成機序の解明 熊本大学国際先端医学研究機構 水野 秀信	205
○ TDP-43 病変に結合する分子プローブの開発 量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門 小野 麻衣子	208
○ 脳疾患ゲノム情報に基づく病態モデルマウスの開発に関する研究 理化学研究所バイオリソース研究センター 吉木 淳	210
○ 歩行運動の脳基底核ドーパミン制御機構の解明 立命館大学生命科学部 木津川 尚史	213
○ モノアミン神経伝達物質合成関連遺伝子の組織特異的破壊による生理機能変化の解析 東京工業大学生命理工学院 一瀬 宏	215
○ ミクログリア機能を反映する PET イメージングの開発 国立長寿医療研究センター 木村 泰之	217
○ 脳バンク検体を用いた加齢に伴う脳組織のクローン再構成及び脳腫瘍発生に関する研究 京都大学大学院医学研究科 荒川 芳輝	219
○ 神経組織特異的 Scrapper ノックアウトマウスの作出と神経変性に関する解析 関西学院大学 矢尾 育子	221
○ 筋強直性ジストロフィーの中樞神経病態の解明 大阪大学医学系研究科 中森 雅之	223
○ ジストロフィン結合タンパク質複合体の代謝回転に関する研究 国立精神・神経医療研究センター 今村 道博	225
○ 脳・神経回路におけるドーパミンの機能解析 大阪大学大学院医学系研究科 小山内 実	227
○ 後部視床下部において過眠症に関連する DNA メチル化部位の探索と各脳領域に特異的 なメチル化プロファイルの探索 東京大学大学院医学系研究科 嶋多 美穂子	229
○ TDP-43 細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成 北里大学医学部 佐藤 俊哉	232

国際共同研究

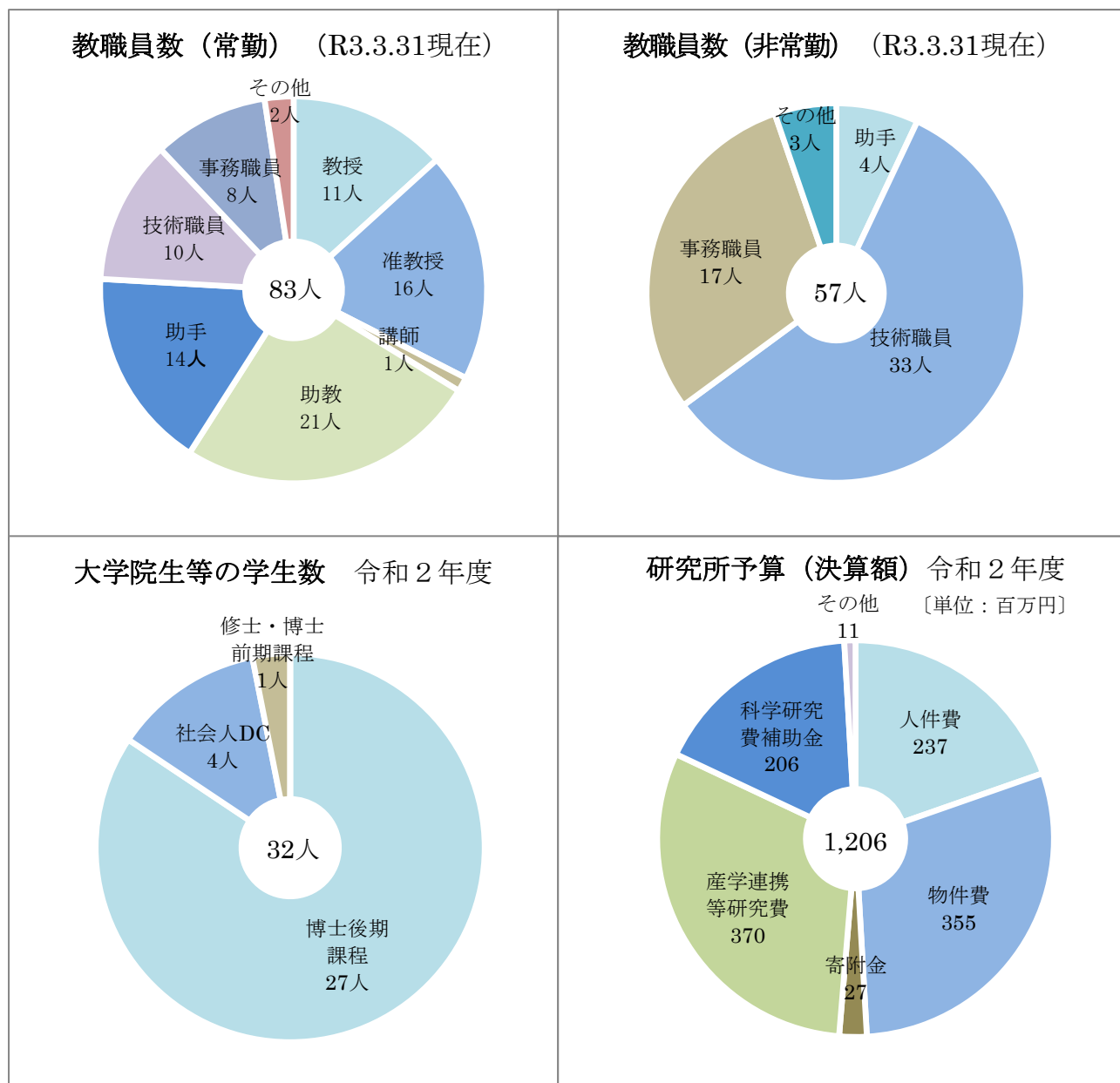
- Production of congenital nystagmus model mice and analysis of visual function
先天性眼球振盪モデルマウスの作出と視覚機能解析
オーフス大学 YONEHARA, Keisuke 234
- Elucidating the role of autophagy in NF1-associated gliomas
NF-1 に合併するグリオーマ におけるオートファジーの役割解明
ジョーンズ・ホプキンス大学 RODRIGUEZ, Fausto J 236
- Hydrodynamic Pathology of the Brain
脳水動態病理学
カリフォルニア大学デービス校 KWEE, Ingrid L. 239
- The role of striatal direct and indirect pathways and dopamine D2 isoforms in the pathophysiology of psychosis
精神疾患の病態生理における線条体の直接路と間接路および D2 ドーパミン受容体分子種の役割解明の研究
テキサス大学タイラー校 WANG, Yanyan 241
- Investigation of pathogenesis of Alzheimer's disease using mouse models
マウスモデルを用いたインフラマソームを介したアルツハイマー病の病態生理の解明
マサチューセッツ州立メディカルスクール FUTAI, Kensuke 243

1. 組織図・研究所のデータ

組織図（R3.3.31 現在）



研究所のデータ



外部資金獲得状況（令和2年度）

区 分	件数	金額（千円）
科学研究費補助金	58	199,864
厚生労働科学研究費補助金	3	50,840
機能強化	3	175,983
地方公共団体・民間助成団体等の研究費	4	39,000
民間企業等との共同研究	11	57,733
受託研究	30	464,897
寄 附 金	39	25,623

2. 各分野の研究活動

分子神経生物学分野

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授	那波 宏之	博士課程大学院生	甲斐 竜太
助教	難波 寿明		小林 雄太朗
特任助教	外山 英和		
特任助教	稲葉 洋芳		

II 研究活動

当分野に所属していた准教授・武井延之、助教・岩倉百合子、並びに特任助手・北山栄子が、年度初めに腫瘍病態学分野の設立とともに、この新設分野に移籍した。それに伴って、分子神経生物学分野の研究内容に修正が生じている。分子神経生物学分野では、今後、統合失調症に代表される精神疾患のモデル動物の作製と解析に重点を絞ることとなった。とくに、未熟な脳は炎症や虚血などの外部環境要因に脆弱で、これらの刺激により脳回路形成が障害されることが知られている。実際、未熟な神経細胞やグリア細胞は、炎症性サイトカインの受容体を有し、感染、炎症や虚血によって末梢に誘導される炎症性サイトカインに反応をする。多くの場合、この炎症性の反応は脱分化方向へ神経細胞やグリア細胞の形質を変化させてしまう。上皮成長因子などの炎症性サイトカインの末梢投与でモデル動物を作製し、その認知行動、脳神経細胞の形質、脳神経回路網を解析することで、よりよい精神疾患モデルの作製を目指している。今後、これらの研究結果が統合失調症、自閉症などの発達性脳疾患の解明に繋がるとともに、当該疾患の新薬開発のシーズとなることを期待している。

- (1) 統合失調症の病因病態解明の為、上皮成長因子などの炎症性サイトカイン投与による動物モデルを作成し、その行動、細胞、分子変化の分析を行っている。
- (2) 統合失調症モデル動物の聴覚認知異常について脳波やユニット記録といった電気生理学的手法その原因を探求している。
- (3) 光遺伝学、薬理遺伝学の手法を用いドパミン神経系の活動操作を行い、ドパミンによる感覚・行動制御メカニズムを解析している。

なお、これらの研究テーマは本学脳研究所のシステム脳生理学分野、医学部の生理学第1・第2教室、京都大学霊長類研究所、岡崎・生理学研究所、名古屋大学環境医学研究所、東京農業大学、京都大学大学院医学研究科、福島県立医科大学医学部など多くの研究機関と共同研究で実施されている。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Inaba H, Namba H, Sotoyama H, Narihara I, Jodo E, Yabe H, Eifuku S, Nawa H. Sound frequency dependence of duration mismatch negativity recorded from awake rats. *Neuropsychopharmacol Rep.* 2020 Mar;40(1):96-101. doi: 10.1002/npr2.12090.

2. Namba H, Nawa H. Post-pubertal Difference in Nigral Dopaminergic Cells Firing in the Schizophrenia Model Prepared by Perinatal Challenges of a Cytokine, EGF. *Neuroscience*. 2020 Aug 10;441:22-32. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.06.003.
3. Nagaoka A, Kunii Y, Hino M, Izumi R, Nagashima C, Takeshima A, Sainouchi M, Nawa H, Kakita A, Yabe H. ALDH4A1 expression levels are elevated in postmortem brains of patients with schizophrenia and are associated with genetic variants in enzymes related to proline metabolism. *J Psychiatr Res*. 2020 Apr;123:119-127. doi: 10.1016/j.jpsychires.2020.02.001.
4. Kobayashi Y, Inaba H, Iwakura Y, Namba H, Sotoyama H, Murata Y, Iwamoto K, Nawa H. Inter-breeder differences in prepulse inhibition deficits of C57BL/6J mice in a maternal immune activation model. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2021 Sep;41(3):416-421. doi: 10.1002/npr2.12178.

IV 共同研究

- (1) 研究題目：「GABA仮説に基づいた統合失調症モデルラットの病態解析」
 研究内容：GABA合成酵素遺伝子のノックアウトラットの脳波測定を行い、オシレーションの異常性の有無を検出する。
 参加機関：群馬大学 柳川 右千夫
- (2) 研究題目：「統合失調症モデル動物の脳波ダイナミック解析」
 研究内容：統合失調症モデル動物の脳波信号を各種解析法で分析しヒトデータと比較することで、モデルの妥当性を検討する。
 参加機関：岡崎生理学研究所 北城 圭一
- (3) 研究題目：「精神疾患発症の分子メカニズムの解明」
 研究内容：炎症によるサイトカインストームと統合失調症の関連性を探求する。
 参加機関：北海道大学遺伝子病制御研究所 村上 正晃
- (4) 研究題目：「霊長類をもちいた統合失調症モデル動物の作成」
 研究内容：マーモセットを用いた統合失調症モデルの樹立を目指す。
 参加機関：京都大学霊長類研究所 中村 克樹
- (5) 研究題目：「イムノトキシンを用いた精神疾患モデルの作製」
 研究内容：統合失調症のネットワーク障害をラットを使ってイムノトキシン回路切断法で再現する。
 参加機関：福島県立医科大学 小林 和人

腫瘍病態学分野

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

准教授 武井 延之
助教 岩倉 百合子
特任助手 北山 栄子

II 研究活動

腫瘍病態学分野は令和2年度に新設され、実際稼働を始めたのは令和3年に入ってからとなる。分野としての研究課題は以下のようなものになる。

細胞は自律的な活動に加え、外部からの刺激をうけて機能を変容する。我々は脳の正常細胞（神経幹細胞、神経細胞、グリア細胞）や病態細胞（脳腫瘍細胞や病態モデル細胞）の培養系を用い、外部からの刺激（神経伝達物質、ペプチド、神経栄養因子、増殖因子、サイトカイン、栄養素、温度変化 など）によって起こる、細胞内シグナル伝達系の変化や代謝変化という生化学的反応が、増殖や分化といった生物学的応答に変換される過程を研究している。ラット、マウスの初代培養神経細胞やグリア細胞やヒトiPS由来神経幹細胞とそこから分化させたヒト神経細胞を用い神経分化の研究を行う。

#神経栄養因子/増殖因子による分化、脱分化誘導機構。

#神経栄養因子、ガイダンス因子、神経伝達物質の相互作用による突起伸展制御とシナプス形成機構。

#神経栄養因子および栄養素シグナルのクロストークによるmTORシグナル系の解析。

また腫瘍細胞や人為的に遺伝子変異を導入した病態細胞を用い、正常細胞と病態細胞のシグナル系/代謝系の比較から、神経幹細胞の増殖/分化のスイッチ機構を解明し、脳形成異常における異常細胞形成の原因を探り、治療法の開発を目指している。

ドラッグリポジショニングの観点から抗精神病薬の抗腫瘍細胞の作用機序の解析の研究も行う。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

- 1) Nakai H, Tsumagari R, Nakashima A, Kikkawa U, Ueda S, Yamanoue M, Saito N, **Takei N**, Shirai Y
mTORC1 is involved in DGK β -induced neurite outgrowth and spinogenesis. **Neurochem. Int.** 2020 Mar;134:104645 doi: 10.1016/j.neuint.2019.104645

IV 共同研究

(1) 研究題目：「2.5次元共培養系を用いたヒト神経細胞シナプス成熟法の開発」

研究内容：ヒトiPS由来神経幹細胞を用いて十分に分化・成熟したヒト神経細胞を作成し、シナプス機能評価の手法を標準化し、創薬/安全性に利用する。

参加機関：大阪医療センター、群馬大学、東京大学など

(2) 研究題目：「脳腫瘍の原因遺伝子変異を特異的に抑制する siRNA 核酸医薬品開発」

研究内容：がんドライバー遺伝子として作用する遺伝子を選定し、変異型遺伝子を正常型遺伝子と区別して特異的に抑制できる siRNA の開発をおこなう。

参加機関：東京大学

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授	三國 貴康
准教授	内ヶ島 基政
助教	内田 仁司
研究員	劉 歆儀
特任助手	岡本 友貴
技術補佐員	磯貝 麻莉

II 研究活動

ヒトや動物は、様々なことを学習し、脳で記憶している。このとき脳では何が起きているのだろうか？嫌いな勉強はなかなか覚えられず、覚えてもすぐに忘れてしまいがちである。一方で、好きな遊びの内容はすぐに覚えられ、ずっと覚えていられる。学習や記憶を可能にする脳の仕組み、記憶を長続きさせる仕組み、思い出す仕組み、忘れてしまう仕組みを、私たちは明らかにしたいと考えている。

また、最近では、発達障害に対する社会的関心が高まっている。発達障害の人とそうでない人との違いは、脳にあると考えられている。では、発達障害の人とそうでない人とで、脳の中の何が違うのだろうか？発達障害の症状につながる脳の仕組みを、私たちは明らかにしたいと考えている。

これまでに私たちは、生体脳内でのゲノム編集技術「SLENDR法」や「vSLENDR法」を開発し、脳での特定の内在性タンパク質の挙動を高精度にイメージングできるようにした (*Cell* 2016, *Neuron* 2017)。これらの技術開発により、従来の方法では解決できなかった様々な脳神経科学の問題に挑めるようになっている。この「SLENDR法」「vSLENDR法」に加えて、現在研究室では、生体脳内で特定の分子・細胞・回路を選択的に標識し、行動中の動物において特定の分子・細胞・回路の動態をイメージングし、操作する技術を開発している。本研究室で開発した技術に加えて、2光子イメージング、ウイルスや電気パルスによる遺伝子導入、光遺伝学、パッチクランプ電気生理、分子生物学などの先端技術を駆使して、学習・記憶の「生理」と発達障害の「病態」を、分子・細胞・回路のマルチレベルで明らかにすることを目指している。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Uchigashima M, Konno K, Demchak E, Cheung A, Watanabe T, Keener DG, Abe M, Le T, Sakimura K, Sasaoka T, Uemura T, Imamura K, Kawasaki Y, Watanabe M, Futai K. Specific Neuroligin3- α Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse hippocampus. *Elife*. 2020 Dec 23;9:e59545.
2. Fukabori R, Iguchi Y, Kato S, Takahashi K, Eifuku S, Tsuji S, Hazama A, Uchigashima M, Watanabe M, Mizuma H, Cui Y, Onoe H, Hikishima K, Yasoshima Y, Osanai M, Inagaki R, Fukunaga K, Nishijo T, Momiyama T, Benton R, Kobayashi K. Enhanced Retrieval of Taste Associative Memory by Chemogenetic Activation of Locus Coeruleus Norepinephrine Neurons. *J Neurosci*. 2020 Oct 21;40(43):8367-8385.
3. Uchigashima M, Leung M, Watanabe T, Cheung A, Le T, Pallat S, Dinis ALM, Watanabe M, Kawasaki YI, Futai K. Neuroligin3 splice isoforms shape inhibitory synaptic function in the mouse hippocampus. *J Biol Chem*. 2020 Jun 19;295(25):8589-8595.

IV 共同研究

- | | | |
|-----|------|----------------------------|
| (1) | 研究題目 | 「生体脳内での神経細胞内シグナルの時空間マッピング」 |
| | 研究内容 | 細胞内シグナルプローブの開発と応用 |
| | 参加機関 | 鹿児島大学、東京大学、山梨大学 |
| | | |
| (2) | 研究題目 | 「発達期生体脳でのシナプス分子イメージング」 |
| | 研究内容 | シナプス分子のプローブの開発と応用 |
| | 参加機関 | 熊本大学 |
| | | |
| (3) | 研究題目 | 「選択的翻訳解析技術による鬱症状の発現分子機序解明」 |
| | 研究内容 | 神経活動依存的トランスレーム技術の開発 |
| | 参加機関 | 理化学研究所 |

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

テニュアトラック教授	上野 将紀
テニュアトラック教授	田井中 一貴
特任助教	佐藤 時春
特任助教	井上 雅文
特任助手	中村 由香
研究支援者	保科 加奈
実験補助	榊 祐子
実験補助	本田 綾子
実験補助	野上 彩子

II 研究活動

本研究グループでは、脳疾患を神経回路システム障害として理解、解明するプロジェクトを展開している。

（研究1）血管障害や外傷など脳・脊髄の障害は、神経回路を破綻させ重篤な機能障害をもたらすが、神経は再生する能力にとぼしいため、機能を回復する根本的な治療法は未だ確立されていない。私たちはこれまで、障害後に残存した神経回路が接続様式を変えて再編する能力を有し、運動や自律神経の機能を変容させることを見出してきた。本研究では、脳・脊髄障害のモデルマウスを用いて、神経回路の再編機序を理解し、その動態を制御することで、機能を回復へと導く方法を見出すことを目指している。本年度は、脊髄損傷モデルにおいて、運動回路の1つである皮質脊髄路の再生が、軸索伸長反発因子である Semaphorin のシグナルにより阻害される機序を解明し（Cereb Cortex, 2020）、また脳挫傷モデルにおいて、皮質脊髄路の再編と機能回復を促進するリハビリや分子機序の解明に貢献した（Cell Death Dis, 2020; Neurorehabil Neural Repair, 2020）。本研究の成果から、障害後の神経回路の再建へ向け標的となりうる機序を見出した。今後さらに、中枢神経の障害後、精緻な神経回路網をどのように再建するか、回路網に起こる病態・回復の機序や方法論を見出していく。

（研究2）これまでヒト脳生検・剖検サンプルの組織診は、薄切した病理組織に対して各種特異染色や免疫組織化学的染色などの2D染色画像の観察に基づいて行われてきた。広視野かつ高解像度にヒト脳病理組織の3D画像を簡便に取得できれば、バイオマーカーの定量的・包括的解析に基づく神経病理学的な診断基準の構築や、新たな病変形成メカニズムの解明が期待できる。私たちはこれまでに、マウスの組織を高度に透明化する手法およびシート照明型蛍光顕微鏡を駆使した高速かつ高解像度の3Dイメージング技術CUBICを開発した（Cell (2014a), Cell (2014b)）。本研究グループでは、脂質含量の豊富なヒト脳組織を高度に透明化する新規手法の開発と共に、種々のケミカルプローブや抗体を深部まで均一に浸透させる染色プロトコルの開発に取り組んでいる。本年度は特に、脱脂処理組織の物理化学的性質に基づくホルマウント免疫染色によるげっ歯類脳組織の3D-IHC技術（Nat Commun, 2020）を確立した。今後は引き続き、大きなヒト脳病理組織検体に適用可能な3Dホルマウント免疫染色技術や3D in situ hybridization技術の開発を通じて、新たな3D神経病理学の確立を目指す。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Fujita Y, Nakanishi T, Ueno M, Itohara S, Yamashita T. Netrin-G1 regulates microglial accumulation along axons and supports the survival of layer V neurons in the postnatal mouse brain. *Cell Rep* 31(4): 107580, 2020
2. Sada N, Fujita Y, Mizuta N, Ueno M, Furukawa T, Yamashita T. Inhibition of HDAC increases BDNF expression and promotes neuronal rewiring and functional recovery after brain injury. *Cell Death Dis* 11: 655, 2020
3. Ueno M, Nakamura Y, Nakagawa H, Niehaus JK, Maezawa M, Gu Z, Kumanogoh A, Takebayashi H, Lu QR, Takada M, Yoshida Y. Olig2-induced semaphorin expression drives corticospinal axon retraction after spinal cord injury. *Cereb Cortex* 30(11): 5702-5716, 2020
4. Tanaka T, Ito T, Sumizono M, Ono M, Kato N, Honma S, Ueno M. Combinational approach of genetic SHP-1 suppression and voluntary exercise promotes corticospinal tract sprouting and motor recovery following brain injury. *Neurorehabil Neural Repair* 34(6): 558-70, 2020
5. Nagoya T, Kamimura K, Inoue R, Ko M, Owaki T, Niwa Y, Sakai N, Setsu T, Sakamaki A, Yokoo T, Kamimura H, Nakamura Y, Ueno M, Terai S. Ghrelin-insulin-like growth factor-1 axis is activated via autonomic neural circuits in the non-alcoholic fatty liver disease. *Neurogastroenterol Motil* 32(5): e13799, 2020
6. Sato T, Homma R, Nagayama S. Direct comparison of odor responses of homologous glomeruli in the medial and lateral maps of the mouse olfactory bulb. *eNeuro* 0449-19, 2020
7. 上野将紀. 中枢神経障害による神経回路の再編と機能回復. *新潟医学会雑誌*. 134(1):7-12, 2020
8. 上野将紀. 随意運動をになう神経回路の再建 ～基礎研究の現状と課題～. *新潟県医師会報*. 842:2-7, 2020
9. Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, Morishima K, Ono H, Ode KL, Saeki Y, Miyamichi K, Isa K, Yokoyama C, Kitaura H, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Saito T, Saido TC, Fukayama M, Onoe H, Touhara K, Isa T, Kakita A, Shibayama M, Ueda HR. Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. *Nat Commun*. 2020, 11(1):1982.
10. Saito N, Tainaka K, Macpherson T, Hikida T, Yamaguchi S, Sasaoka T. Neurotransmission through dopamine D1 receptors is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex. *Neurosci Res*. 2020, 156:58-65.
11. Kubota SI, Takahashi K, Mano T, Matsumoto K, Katsumata T, Shi S, Tainaka K, Ueda HR, Ehata S, Miyazono K. Whole-organ analysis of TGF- β -mediated remodelling of the tumour microenvironment by tissue clearing. *Commun Biol*. 2021, 4(1):294.
12. Yamaguchi M, Yoshihara K, Suda K, Nakaoka H, Yachida N, Ueda H, Sugino K, Mori Y, Yamawaki K, Tamura R, Ishiguro T, Motoyama T, Watanabe Y, Okuda S, Tainaka K, Enomoto T. Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium. *iScience*. 2021, 24(4):102258.

IV 共同研究

(1) 研究題目：「皮質脊髓路の再生メカニズムの解明」

研究内容： 皮質脊髓路の神経軸索の再生を誘導するメカニズムを解明する。

参加機関： Burke Neurological Institute 吉田 富

(2) 研究題目：「ラット全脳神経活動マッピング技術の開発」

研究内容： ラットの全脳における神経活動の履歴の包括的な解析技術を開発する。

参加機関： Dandrite, Aarhus University 竹内倫徳

病理学分野

脳疾患標本資源解析学分野（生命科学リソース研究センター）

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

I - 1 病理学分野

教 授	柿田 明美	技術職員	丹田 智恵子
准教授	清水 宏		濁川 慎吾
特任准教授	北浦 弘樹		高崎 順子
特任助教	田中 英智		田中 優子
			長谷部 美和
		事務職員	吉田 真理子
			笠原 香織
		大学院博士課程	齊ノ内 信
			Ramil Gabdulkhaev
			温 城太郎
			（脳神経外科）

I - 2 脳疾患標本資源解析学分野（生命科学リソース研究センター）

教 授（兼）	柿田 明美
准教授	他田 真理
助 教	齋藤 理恵

II 研究活動

病理学分野と脳疾患標本資源解析学分野は、神経・精神疾患の剖検例を対象とした臨床病理、および脳腫瘍やてんかん原性脳病巣等の手術・生検例を対象とした外科病理を行っており、また脳神経疾患の病態形成機序を明らかにする研究を進めている。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Shirozu H, Hashizume A, Masuda H, Kakita A, Otsubo H, Kameyama S. Surgical strategy for focal cortical dysplasia based on the analysis of the spike onset and peak zones on magnetoencephalography. J Neurosurg 2020; 133 (6): 1850-1862. doi: 10.3171/2019.6.JNS191058.
2. 柿田明美. てんかん原性の病理. てんかん専門医ガイドブック 改訂第2版ーてんかんにかかわる医師のための基礎知識ー. 編集: 日本てんかん学会. 診断と治療者, 東京. 2020年, pp. 26-29(total 433p).
3. Kazama M, Kato Y, Kakita A, Noguchi N, Urano Y, Masui K, Niida-Kawaguchi M, Yamamoto T, Watabe K, Kitagawa K, Shibata N. Astrocytes release glutamate via cysteine/glutamate antiporter upregulated in response to increased oxidative stress related to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathology 2020; 40 (6): 587-598. doi: 10.1111/neup.12716.
4. Watabe K, Kato Y, Sakuma M, Murata M, Niida-Kawaguchi M, Takemura T, Hanagata N, Tada M, Kakita

- A, Shibata N. Prajal RING-finger E3 ubiquitin ligase suppresses neuronal cytoplasmic TDP-43 aggregate formation. *Neuropathology* 2020; 40(6): 570-586. DOI:10.1111/neup.12694.
5. 豊島靖子、柿田明美. 神経系 (2) 変性・炎症. カラーアトラス病理組織の見方と鑑別診断. 第7版. (監修) 赤城忠厚、松原修、真鍋俊明、(編集) 吉野正、小田義直、坂元亨宇、森井英一. 医歯薬出版, 東京. pp. 507-539 (total 740 pages).
 6. Furukawa A, Kakita A, Chiba Y, Kameyama S, Shimada A. Proteomic profile differentiating between mesial temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 2020; 168: 106502. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2020.106502.
 7. Komatsu H, Takeuchi H, Kikuchi T, Ono C, Yu Z, Iizuka K, Takano Y, Kakuto Y, Funakoshi S, Ono T, Ito J, Kunii Y, Hino M, Nagaoka A, Iwasaki Y, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Azechi H, Kudo N, Hashimoto R, Yabe H, Yoshida M, Saito Y, Kakita A, Fuse N, Kawashima R, Taki Y, Tomita H. Ethnicity-dependent effects of schizophrenia risk variants of the OLIG2 gene on OLIG2 transcription and white matter integrity. *Schizophr Bull* 2020; 46 (6): 1619-1628. doi: 10.1093/schbul/sbaa049.
 8. 坂本峰至、柿田明美、中村政明. メチル水銀. In 脳の発生とその異常. *Clin Neurosci* 2020; 38 (12): 1594-1597.
 9. Igarashi H, Ueki S, Kitauro H, Kera T, Ohno K, Ohkubo M, Terumitsu-Tsujita M, Kakita A, Kwee IL. Longitudinal change in gluCEST MRI and their relationship to cerebral blood flow in a 5xFAD mouse. *Contrast Medial Mol Imaging* 2020; 8831936. doi.org/10.1155/2020/8831936.
 10. Kametani F, Yoshida M, Matsubara T, Murayama S, Saito Y, Kawakami I, Onaya M, Tanaka H, Kakita A, Robinson AC, Mann DMA, Hasegawa M. Comparison of common and disease-specific post-translational modifications of pathological tau. *Frontier Neurosci* 2020; 14: 581936. doi: 10.3389/fnins.2020.581936.
 11. Prudencio M, Garcia-Moreno H, Jansen-West KR, Al-Shaikh RH, Gendron TF, Heckman MG, Spiegel MR, Carlomagno Y, Daugherty LM, Song Y, Dunmore JA, Byron N, Oskarsson B, Nicholson KA, Staff NP, Gorcenco S, Puschmann A, Lemos J, Januário C, LeDoux MS, Friedman JH, Polke J, Labrum R, Shakkottai V, McLoughlin HS, Paulson HL, Kanno T, Onodera O, Ikeuchi T, Tada M, Kakita A, Fryer JD, Karremo C, Gomes I, Carviness JN, Pitterlkow MR, Aasly J, Pfeiffer RF, Veerappan V, Eggenberger ER, Freeman WD, Huang JF, Uitti RJ, Wierenga KJ, Marin Collazo IV, Tipton PW, van Gerpen JA, van Blitterswijk M, Bu G, Wszolec ZK, Giunti P, Petrucelli L. Towards allele-specific targeting therapy and pharmacodynamics biomarker for spinocerebellar ataxia 3. *Science Transl Med* 2020; 12 (566): eabb7086.doi: 10.1126/scitranslmed.abb7086.
 12. 齊ノ内 信、Gabdulkhaev Ramil、小野寺 理、柿田明美. 良性成人型家族性ミオクロースてんかんの神経病理. *脳神経内科* 2020; 93 (3): 305-309.
 13. Kasahara T, Imamura M, Shin C, Shimizu H, Utsumi J, Hosokai R, Iwabuchi H, Takachi T, Kakita A, Kanegane H, Saitoh A, Imai C. Fatal progressive meningoencephalitis diagnosed in two members of a family with X-linked agammaglobulinemia. *Frontiers Pediatrics* 2020; 8: 579. doi: 10.3389/fped.2020.00579.

14. Sakamoto M, Kakita A, Sakai K, Yamamoto M, Nakamura M. Cerebral neuronal degeneration and declined selenoenzyme activity associated with methylmercury-induced neurobehavioral deficits in developing rats. *Environ Res* 2020; 188: 109776. doi: 10.1016/j.envres.2020.109776.
15. Saito R, Hara N, Tada M, Honma Y, Miyashita A, Onodera O, Ikeuchi T, Kakita A. Novel *CHP1* mutation in autosomal-recessive cerebellar ataxia: autopsy features of two siblings. *Acta Neuropathol Commum* 2020;8 (1): 134. doi. 10.1186/s40478-020-01008-2.
16. Takahashi M, Uchihara T, Yoshida M, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H, Toru S, Kobayashi T, Orimo S. Clinical and pathological features affecting sympathetic denervation in autopsy-confirmed dementia with Lewy bodies. *Eur J Neurol* 2020; 27 (7): 1155-1163. doi: 10.1111/ene.14240.
17. Terumitsu –Tsujita M, Kitaura H, Miura I, Kiyama Y, Goto F, Muraki Y, Ominato S, Hara N, Simankova A, Bizen N, Kashiwagi K, Itoh T, Toyoshima Y, Kakita A, Manabe T, Wakana S, Takebayashi H, Igarashi H. Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the *Eif2b5* gene: a vanishing white matter disease model. *J Neurochem* 2020; 154 (1): 25-40. doi: 10.1111/jnc.14887.
18. Kurita H, Yabe S, Ueda T, Inden M, Kakita A, Hozumi I. MicorRNA-5572 is a novel microRNA regulating SLC30A3 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Med Sci* 2020; 21 (12): E4482. doi: 10.3390/ijms21124482.
19. Muta H, Sugita Y, Furuta T, Ohshima K, Kensaku S, Morioka M, Abe H, Fujii Y, Kakita A. Expression of the Ghrelin/ GHS-R axis and its functional role in promoting tumor growth in primary CNS lymphomas. *Neuropathology* 2020; 40 (3): 232-239. doi:10.1111/neup.12634.
20. Saito R, Shimizu H, Miura T, Hara N, Miyashita A, Kawachi I, Sanpei K, Honma Y, Onodera O, Ikeuchi T, Kakita A. Oculopharyngodistal myopathy with coexisting histology of systemic neuronal intranuclear inclusion disease: clinicopathologic features of an autopsied patient harboring CGG repeat expansions in *LRP12*. *Acta Neuropathol Commun* 2020; 8: 75. doi: 10.1186/s40478-020-00945-2.
21. Tanaka H, Toyoshima Y, Kawakatsu S, Ikeuchi T, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Morphological characterization of glial and neuronal tau pathology in globular glial tauopathy (types II and III). *Neuropathol Appl Neurobiol* 2020; 46 (4): 344-358. doi: 10.1111/nan.12581.
22. Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, Morishima K, Ono H, Oda KL, Saeki Y, Miyamichi K, Isa K, Yokoyama C, Kitaura H, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Saito T, Saido TC, Fukayama M, Onoe H, Touhara K, Isa T, Kakita A, Shibayama M, Ueda HR. Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. *Nat Commun* 2020; 11: 1982. doi: 10.1038/s41467-020-15906-5.
23. 岡本浩一郎、高橋陽彦、鈴木倫明、小野寺理、柿田明美、阿部博史. 脳神経領域のまれな感染症：画像診断のポイント. まれな感染症の画像診断. *臨床放射線* 2020; 65 (4): 317-324.
24. 田中英智、柿田明美. Globular glial tauopathy. *Annual Review神経* 2020. 鈴木則宏、荒木信夫、宇川義一、桑原聡、塩川芳昭（編集）. 中外医学社、2020年4月15日. pp. 16-22 (total 367 pages).
25. Niida-Kawaguchi M, Kakita A, Noguchi N, Kazama M, Masui K, Kato Y, Yamamoto T, Sawada T,

- Kitagawa K, Watabe K, Shibata N. Soluble iron accumulation induces microglial glutamate release in the spinal cord of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 2020; 40 (2): 152-166. doi: 10.1111/neup.12632.
26. 齋藤祥二、柿田明美. 中枢神経原発メラノサイト腫瘍. 臨床医のための神経病理 再入門. *Clinical Neuroscience* 2020; 38 (4): 404-406.
27. Nagaoka A, Kunii Y, Hino M, Izumi R, Nagashima C, Takeshima A, Sainouchi M, Nawa H, Kakita A, Yabe H . ALDH4A1 expression levels are elevated in postmortem brains of patients with schizophrenia and are associated with genetic variants in enzymes related to proline metabolism. *JPsychiatr Res* 2020; 123: 119-127. doi. 10.1016/j.jpsychires.2020.02.001.
28. 畠野雄也、須貝章弘、山岸拓磨、中島章博、柿田明美、小野寺理. 出血性病変が検出されずに広範な脳病変に至ったアミロイドβ関連血管炎の1例. *臨床神経* 2020; 60 (3): 187-192. doi: 10.5692/clinicalneuro.001340.
29. Ito J, Shimizu H, Ohta K, Idezuka J, Tanaka H, Kondo H, Nakajima T, Takahashi H, Onodera O, Kakita A. ALS with pallido-nigro-Luysian degeneration: a clinicopathological study. *Ann Neurol* 2020; 87 (2): 302-312. doi: 10.1002/ana.25652.
30. Noda Y, Tanaka M, Nakamura S, Ito J, Kakita A, Hara H, Shimazawa M. Identification of VGF nerve growth factor inducible-producing cells in human spinal cords and expression change in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Med Sci* 2020; 17 (4): 480-489. doi: 10.7150/ijms.39101.
31. Suzuki Y, Nakamura Y, Yamada K, Kitaura H, Kakita A, Huber VJ, Capozzoli N, Kwee IL, Nakada T. Skull diploë is rich in aquaporin-4. *Heliyon* 2020; 6 (1): e03259. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03259.
32. Zhou Y, Song WM, Andhey PS, Swain A, Levy T, Miller KR, Poliani PL, Cominelli M, Grover S, Gilfillan S, Cella M, Ulland TK, Zaitsev K, Miyashita A, Ikeuchi T, Sainouchi M, Kakita A, Bennett DA, Schneider JA, Nichols MR, Beausoleil SA, Ulrich J, Holtzman DM, Artyomov M, Colonna M. Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and -independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nat Med* 2020; 26 (1): 131-142. doi: 10.1038/s41591-019-0695-9.
33. Abe H, Natsumeda M, Tsukamoto Y, Okada M, Kobayashi D, Sou E, Kanemaru Y, Watanabe J, Shibuma S, Nishino K, Yoshimura J, Oishi M, Hashizume Y, Kakita A, Fujii Y. MGMT expression contributes to temozolomide resistance in H3K27M-mutant diffuse midline gliomas. *Front Oncol* 2020; 9: 1568. doi: 10.3389/fonc.2019.01568.
34. Shimada M, Miyagawa T, Takeshima A, Kakita A, Toyoda H, Niizato K, Oshima K, Tokunaga K, Honda M. Epigenome-wide association study of narcolepsy-affected lateral hypothalamic brain and overlapping DNA methylation profiles between narcolepsy and multiple sclerosis. *Sleep* 2020; 43 (1): 1-13. doi: 10.1093/sleep/zsz198.
35. Arao Y, Kamimura K, Ikemi M, Hayashi K, Takaki M, Takahashi S, Seino S, Abe H, Tsuboguchi S, Otsu Y, Sanpei K, Kohisa J, Kondo S, Tani Y, Ito J, Toyoshima Y, Kakita A, Ajioka Y, Terai S. Rare brain metastasis from a pancreastobiliary subtype of intraductal papillary mucinous neoplasm. *Pancreas* 2020;

IV 共同研究

病理学分野・脳疾患標本資源解析学分野は、当研究所が進めている文部科学省認定事業：共同利用・共同研究拠点「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」の中核分野として、ヒト脳科学に関するプロジェクト型および連携資源利用型の国内（国外）共同研究を推進している。

- | | |
|----------|--|
| (1) 研究題目 | 「神経変性疾患に関する神経病理学的研究」 |
| 研究内容 | 神経変性疾患、とくにアルツハイマー病や進行性核上性麻痺などのタウオパチー、多系統萎縮症やパーキンソン病などのシヌクレイノパチー、あるいは筋萎縮性側索硬化症(TDP-43プロテインオパチー)の臨床病理や病因に関する共同研究を行なっている。 |
| 参加機関 | 弘前大学、東京大学、岐阜薬科大学、杏林大学、東京都医学研、信州大学、東京女子医科大学、愛知医科大学、京都大学 他 |
| (2) 研究題目 | 「難治てんかん原性病巣に関する外科病理標本の解析」 |
| 研究内容 | 難治てんかん原性病巣の病態形成機序の解明を目的に、各種病態（限局性皮質異形成、結節性硬化症など）の切除脳組織を用いた病理組織学的、生化学的、生理学的解析を進めている。 |
| 参加機関 | 国立病院機構西新潟中央病院、京都大学、東京医科歯科大学、広島大学、昭和大学 他 |
| (3) 研究題目 | 「精神神経疾患の分子病理学的解析」 |
| 研究内容 | 精神神経疾患の剖検脳を対象とした臨床病理、及び分子病理学的病態解析のための凍結脳標本資源を提供することで、精神神経疾患、とくに統合失調症の病態形成機序の解析を進めている。 |
| 参加機関 | 福島県立医科大学、理化学研究所、東北大学 他 |

分子病態学（客員）分野

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授（併） 若林 孝一
准教授（併） 森 文秋

II 研究活動

当分野では、神経難病の病態解明を目標に、病理形態学、分子生物学、病態生化学などの手法を用い研究を進めている。神経変性疾患の多くはタンパク質蓄積病であることから、「タンパク質の結合・修飾・分解」の観点からアプローチを行っている。さらに、「封入体形成」や「神経細胞死」だけでなく、神経症状の発現に重要な部位として「シナプス」の変化にも焦点を当てている。

現在の研究テーマは、1) 神経変性疾患における封入体形成と神経変性メカニズム、2) 細胞内分解系の活性化による蓄積物質の除去、3) 遺伝子改変モデル動物を用いた病態解析である。特に、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）や筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病の剖検脳組織を用いた研究を病理学分野や脳疾患標本資源解析学分野と共同で進めている。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Kon T, Nagawa D, Nakata M, Abe N, Haga T, Kijima H, Tomiyama M, Wakabayashi K. Cerebral ring hemorrhages and a massive hematoma in a patient with infectious endocarditis. *Neuropathology* 2020; 40(5): 526-527.
2. Nishijima H, Mori F, Arai A, Zhu G, Wakabayashi K, Okada M, Ueno S, Ichinohe N, Suzuki S, Kon T, Tomiyama M. GABA storage and release in the medial globus pallidus in L-DOPA-induced dyskinesia priming. *Neurobiol Dis* 2020; 143: 104979.
3. 若林孝一. パーキンソン病の病理学. *Clinical Neuroscience* 2020; 38(7): 819-822.
4. Wakabayashi K. Where and how alpha-synuclein pathology spreads in Parkinson's disease? *Neuropathology* 2020; 40(5): 415-425.
5. Takahashi M, Uchihara T, Yoshida M, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H, Toru S, Kobayashi T, Orimo S. Clinical and pathological features affecting cardiac sympathetic denervation in autopsy-confirmed dementia with Lewy bodies. *Eur J Neurol* 2020; 27(7): 1155-1163.
6. Nakamura T, Kon T, Kawarabayashi T, Wakabayashi K, Ikeda Y, Shoji M. An autopsy case of primary lateral sclerosis with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2020; 412: 116792.
7. Yamazaki H, Kasai S, Mimura J, Ye P, Inose-Maruyama A, Tanji K, Wakabayashi K, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Sato T, Ozaki T, Cavener DR, Yamamoto M, Itoh K. Ribosome binding protein GCN1 regulates the cell cycle and cell proliferation and is essential for the embryonic development of mice. *PLoS Genet* 2020; 16(4): e1008693.
8. Kon T, Tomiyama M, Wakabayashi K. Neuropathology of Lewy body disease: clinicopathological crosstalk between typical and atypical cases. *Neuropathology* 2020; 40(1): 30-39.

IV 共同研究

- (1) 研究題目 細胞内分解機構に着目したシヌクレイノパチーの分子病態解明と治療法開発
研究内容 神経変性疾患、特にレビー小体病や多系統萎縮症におけるオートファジーの

異常について、剖検脳組織やモデル動物を用い研究を進めている。

参加機関 弘前大学医学研究科脳神経血管病態研究施設脳神経病理学講座、同 高度先進
医学研究センター、理化学研究所、がん研究会、新潟大学脳研究所病理学分野、
同 脳疾患標本資源解析学分野

脳神経外科学分野

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授	藤井 幸彦
准教授	大石 誠
助教	平石 哲也
助教	梶田 学
博士課程大学院生	本橋 邦夫、三橋 大樹、温城太郎、斎藤 祥二、安藤和弘、 澁谷航平、高橋陽彦、伊藤 陽祐
修士課程大学院生	高橋和幹

II 研究活動

新潟大学脳研究所脳神経外科学分野は、「我が国の脳神経外科の父」と称される中田瑞穂先生が、日本で最初の脳神経外科独立講座として1953年に開設され、これまで脳腫瘍、脳血管障害、頭部外傷、機能外科といった分野の診療・研究において日本をリードしてきた。臨床で生じた疑問から基礎研究が生まれ、また臨床にフィードバックすることこそ、中田瑞穂先生が脳研究所設立当初に立てられた構想そのものであり、私たちはそれを継承し、研究結果を世界に向けて発信してゆく使命があり、教室員一同新たな挑戦を続けている。

(1) 基礎研究（共同研究含む）

- ・ 7T-MRIおよび3次元組織透明化技術を駆使した悪性神経膠腫の微小環境の可視化
- ・ 脳腫瘍培養細胞株・マウスモデルを用いたプレシジョンメディシン確立の試み
- ・ 悪性髄膜腫における標的可能遺伝子変異の同定と新規治療法確立
- ・ ヒト脳腫瘍からの安定脳腫瘍幹細胞株の樹立と新規治療薬の探索への基礎研究
- ・ 再発膠芽腫の新規治療法：EUrd-CED法のラット脳幹部腫瘍モデルでの研究
- ・ ポドプラニンを標的とした悪性脳腫瘍への近赤外線光線免疫療法（NIR-PIT）確立の研究
- ・ 膠芽腫における神経成長因子関連タンパク質-43kDa (GAP-43) のリン酸化の解析
- ・ びまん性内在性橋神経膠腫 (DIPG)に対するACVR1変異を標的とした新規治療
- ・ 小児DIPGに対するDNA障害型抗がん剤感受性因子のDNAヘリケースの発現解析
- ・ 髄芽腫におけるGli3の役割の解明と新しい治療戦略
- ・ 膠芽腫に対する代謝リプログラミングおよびmTORを標的とした効果的薬物療法の確立
- ・ イソプレノイド化合物 (Ambrein)の脳腫瘍への抗腫瘍効果の探索
- ・ Boron neutron capture therapy (BNCT)が播種・浸潤に及ぼす効果の検討
- ・ 神経組織内因性蛍光反応を基盤とした大脳皮質活動領域の術中直接可視法の確立
- ・ てんかんにおけるIMPDH1/2発現解析
- ・ 霊長類神経成長マーカー開発と神経再生機序解析
- ・ 脳血管障害における遺伝子変異の意義解明と培養細胞実験系の確立
- ・ 脳動静脈奇形における体細胞変異の意義の解明
- ・ 頸部内頸動脈狭窄症におけるプラーク破綻同定のバイオマーカー開発
- ・ 脳血管シリコンモデルを用いた術前シミュレーションシステムの構築

(2) 臨床研究（共同研究含む）

- ・ MRスペクトロスコピーを用いたIDH変異グリオーマ解析

- ・ 髄芽腫：3T-MRSでのglutamine、2HG検出による遺伝子型・予後予測
- ・ 超高磁場7T-MRIによる神経膠腫の局在診断と病理組織分類について
- ・ 7T-MRIを用いた脳腫瘍の局在診断、てんかんの焦点診断確立の試み
- ・ MRI陰性てんかん症例での多角的術前検査によるてんかん焦点の可視化
- ・ 神経組織活動の内因性蛍光反応を応用したヒト大脳皮質活動領域の術中可視法の確立
- ・ てんかん焦点同定のための高精度術前評価法の開発-高密度脳波での高周波律動の解析-
- ・ フラボプロテイン自家蛍光反応を用いた新たな神経活動イメージングの確立への臨床研究
- ・ 脳神経外科手術における3次元融合画像を用いた手術支援に関する研究
- ・ フローダイバーターの有効性と安全性に関する全国悉皆調査
- ・ 脳卒中の医療体制の整備のための研究

J-ASPECT study (Nationwide survey of Acute Stroke care capacity for Proper designation of Comprehensive stroke center in Japan)

- ・ 硬膜動静脈瘻に対する Onyx 液体塞栓システムを用いた経動脈的塞栓術に関する多施設共同登録研究 (Onyx dAVF TAE Registry)
- ・ 日本国内の脳神経血管内治療に関する登録研究4 (Japanese Registry of Neuroendovascular Therapy 4: JR-NET 4)
- ・ Vertebrobasilar dolicoectasia (VBD) の自然歴および外科的治療の成績に関する多施設共同登録研究 (VBD Registry)
- ・ 急性期虚血性脳卒中に対する機械的血栓回収療法の効果と安全性に関する多施設共同登録研究
- ・ 特定非営利活動方針 日本脳神経血管内治療学会データベースを用いた観察研究 Japanese Society of Neuroendovascular Therapy Data Base (JSNET-DB) –Pipeline Flex フローダイバーターシステム–Pipeline Flex PREMIER
- ・ FRED を用いた脳動脈瘤に対するフローダイバーター留置術の市販後初期経験に関する多施設共同登録研究

Multi center registry of flow diverter treatment for intracranial aneurysms using FRED, initial post market surveillance in Japan (JAPAN FRED PMS)

- ・ 急性脳主幹動脈閉塞に対する血栓回収療法の普及プロジェクト
- ・ Carotid artery stenting (CAS)長期成績に関する多施設共同研究
- ・ 脳卒中の急性期診療提供体制の変革に係る実態把握及び有効性等の検証のための研究
- ・ 動脈硬化性の急性頭蓋内主幹動脈閉塞に対する血管内治療に関する後ろ向き登録研究
- ・ Spinal extradural arteriovenous fistula の分類と各疾患群における臨床症状、血管構築、治療成績の検討：全国調査
- ・ 覚醒下手術における悪心・嘔吐に対するオndanセトロン の有用性
- ・ 新潟大学関連施設の神経膠腫に対する観察登録研究
- ・ 初発退形成性神経膠腫に対する術後塩酸ニムスチン (ACNU) 化学放射線療法先行再発時テモゾロミド化学療法をテモゾロミド化学放射線療法と比較するランダム化第III相試験
- ・ JCOG1303：手術後残存腫瘍のあるWHO Grade II星細胞腫に対する放射線単独治療とテモゾロミド併用放射線治療を比較するランダム化第II相試験
- ・ 初発膠芽腫に対する可及的摘出術＋カルムスチン脳内留置用剤留置＋テモゾロミド併用化学放射線療法と可及的摘出術＋テモゾロミド併用化学療法のランダム化第III相試験
- ・ 初発治療後に再発又は増悪した膠芽腫患者を対象としたDSP-7888投与エマルションとベバシズマブ併用対ベバシズマブ単独の多施設共同ランダム化第2相試験
- ・ 原発性悪性脳腫瘍患者に対する標準治療成績を調査するコホート研究
- ・ NF-κB 活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の開発に向けた多施設共同研究

- ・ JCOG1910：高齢者初発膠芽腫に対するテモゾロミド併用寡分割放射線治療に関するランダム化比較第 III 相試験
- ・ 脳神経外科周術期深部静脈血栓症の基礎臨床研究
- ・ グリオーマ術後患者頸部内頸動脈狭窄症におけるポドプラニン/CLEC-2発現解析
- ・ 膠芽腫病勢診断マーカーの開発（AMED）
- ・ BRAF V600E 変異を有する脳腫瘍の臨床病理学的検討
- ・ 脳腫瘍における SLFN11 発現および DNA 障害型抗がん剤への感受性の検討
- ・ 脳腫瘍における体液（血液、尿、髄液）を利用した液体診断
- ・ 海馬硬化症のてんかん原性機構におけるGAP-43のリン酸化解析
- ・ 臨床手術（脳神経外科、耳鼻咽喉科、整形外科）に関する解剖知識と手術技能の習熟を目的とした遺体解剖実習
- ・ CFD (Computational fluid dynamics)を用いた脳動脈瘤の破裂や術後再発に関する血流解析

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Igarashi, M., Kawasaki, A., Ishikawa, Y., Honda, A., Okada, M., & Okuda, S. (2020). Phosphoproteomic and bioinformatic methods for analyzing signaling in vertebrate axon growth and regeneration. *Journal of neuroscience methods*, 339, 108723. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108723>
2. Imamura, H., Sakai, N., Matsumoto, Y., Yamagami, H., Terada, T., Fujinaka, T., Yoshimura, S., Sugiu, K., Ishii, A., Matsumaru, Y., Izumi, T., Oishi, H., Higashi, T., Iihara, K., Kuwayama, N., Ito, Y., Nakamura, M., Hyodo, A., & Ogasawara, K. (2021). Clinical trial of carotid artery stenting using dual-layer CASPER stent for carotid endarterectomy in patients at high and normal risk in the Japanese population. *Journal of neurointerventional surgery*, 13(6), 524–529. <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2020-016250>
3. Kanamori M, Takami H, Suzuki T, Tominaga T, Kurihara J, Tanaka S, Hatazaki S, Nagane M, Matsuda M, Yoshino A, Natsumeda M, Yamaoka M, Kagawa N, Akiyama Y, Fukai J, Negoto T, Shibahara I, Tanaka K, Inoue A, Mase M, Tomita T, Kuga D, Kijima N, Fukami T, Nakahara Y, Natsume A, Yoshimoto K, Keino D, Tokuyama T, Asano K, Ujifuku K, Abe H, Nakada M, Matsuda KI, Arakawa Y, Ikeda N, Narita Y, Shinojima N, Kambe A, Nonaka M, Izumoto S, Kawanishi Y, Kanaya K, Nomura S, Nakajima K, Yamamoto S, Terashima K, Ichimura K, & Nishikawa R. Necessity for craniospinal irradiation of germinoma with positive cytology without spinal lesion on MR imaging- a controversy. (2021.) *Neurooncology Advances*, 3(1):vdab086.
4. Kanai, T., Kondo, N., Okada, M., Sano, H., Okumura, G., Kijima, Y., Ogoe, A., Kawashima, H., & Endo, N. (2020). The JNK pathway represents a novel target in the treatment of rheumatoid arthritis through the suppression of MMP-3. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 15(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13018-020-01595-9>
5. Klionsky, DJ., Natsumeda, M., 2922 other authors. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 17(1), 1-382, 2021
6. Natsumeda, M., Miyahara, H., Yoshimura, J., Nakata, S., Nozawa, T., Ito, J., Kanemaru, Y., Watanabe, J., Tsukamoto, Y., Okada, M., Oishi, M., Hirato, J., Wataya, T., Ahsan, S., Tateishi, K., Yamamoto, T., Rodriguez, F. J., Takahashi, H., Hovestadt, V., Suva, M. L., ... Kakita, A. (2021). GLI3 Is Associated With Neuronal Differentiation in SHH-Activated and WNT-Activated Medulloblastoma. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 80(2), 129–136. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlaa141>
7. Nozawa, T., Okamoto K., Nakazato S., Motohashi, K., Suzuki, T., Morita, K., Tashi, H., Watanabe, K.,

- Hasegawa, H., Watanabe, M., Kawashima H., & Fujii, Y. (2021). Repeated cerebellar infarction in the affected non-dominant vertebral artery distribution with reversible vertebral artery occlusion elicited by head tilt: Illustrative case, *Journal of Neurosurgery Case Lessons*, 1(8).
8. Ogura, R., Hasegawa, H., Kumagai, S., Takahashi, H., Fujiwara, H., Yoshimura, J., & Fujii, Y. (2020). A Case of Curative Onyx Embolization for Tentorial dAVF via Low-flow Feeders with Temporary Balloon Occlusion of High-flow Feeders. *Journal of Neuroendovascular Therapy*, 14(3), 112-117.
 9. Ogura, R., Oishi, M., Hiraishi, T., Takahashi, H., Shibuya, K., Suzuki, T., ... & Fujii, Y. (2021). Four-dimensional multifusion imaging for assessment of meningioma hemodynamics. *Interdisciplinary Neurosurgery*, 24, 101118.
 10. Ono, T., Sasajima, T., Shimizu, H., Natsumeda, M., Kanamori, M., Asano, K., Beppu, T., Matsuda, K., Ichikawa, M., Fujii, Y., Ohkuma, H., Ogasawara, K., Sonoda, Y., Saito, K., Nobusawa, S., Nakazato, Y., Kitanaka, C., Kayama, T., Tominaga, T., & Tohoku Brain Tumor Study Group (2020). Molecular Features and Prognostic Factors of Pleomorphic Xanthoastrocytoma: A Collaborative Investigation of the Tohoku Brain Tumor Study Group. *Neurologia medico-chirurgica*, 60(11), 543–552. <https://doi.org/10.2176/nmc.oa.2020-0155>
 11. Saito, S., Hasegawa, H., Takino, T., Ando, K., Shibuya, K., Takahashi, H., On, J., Suzuki, T., Oishi, M., & Fujii, Y. (2021). Unilateral oculomotor nerve palsy caused by arterial compression accompanying subarachnoid hemorrhage: a case report. *Acta neurochirurgica*, 163(3), 813–816. <https://doi.org/10.1007/s00701-020-04633-x>
 12. Saito, S., Hasegawa, H., Ota, T., Takino, T., Yoshida, Y., Ando, K., Shibuya, K., Takahashi, H., Suzuki, T., Oishi, M., & Fujii, Y. (2020). Safety and feasibility of the distal transradial approach: A novel technique for diagnostic cerebral angiography. *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences*, 26(6), 713–718. <https://doi.org/10.1177/1591019920925709>
 13. Suzuki, T., Hasegawa, H., Ando, K., Shibuya, K., Takahashi, H., Saito, S., Oishi, M., & Fujii, Y. (2020). Possibility of Worsening Flow Diversion Effect Due to Morphological Changes of a Stented Artery With Multiple Overlapping Stents for Partially Thrombosed Vertebral Artery Aneurysms. *Frontiers in neurology*, 11, 611124. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.611124>
 14. Suzuki, T., Genkai, N., Nomura, T., & Abe, H. (2020). Assessing the Hemodynamics in Residual Cavities of Intracranial Aneurysm after Coil Embolization with Combined Computational Flow Dynamics and Silent Magnetic Resonance Angiography. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 29(12), 105290. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.105290>
 15. Tateishi, K., Miyake, Y., Kawazu, M., Sasaki, N., Nakamura, T., Sasame, J., Yoshii, Y., Ueno, T., Miyake, A., Watanabe, J., Matsushita, Y., Shiba, N., Udaka, N., Ohki, K., Fink, A. L., Tummala, S. S., Natsumeda, M., Ikegaya, N., Nishi, M., Ohtake, M., ... Yamamoto, T. (2020). A Hyperactive RelA/p65-Hexokinase 2 Signaling Axis Drives Primary Central Nervous System Lymphoma. *Cancer research*, 80(23), 5330–5343. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2425>
 16. Tsuchiya, N., Fujiwara, H., Takahashi, H., Ogura, R., Yoshimura, J., & Fujii, Y. Overlapping Stents and Coil Embolization of Ruptured Anterior Cerebral Artery Dissecting Aneurysms in the Acute Phase. *Journal of Neuroendovascular Therapy*. 2020; 14: 435–440
 17. Yoneoka, Y., Akiyama, K., & Seki, Y. (2020). Glass Fragment Injury to the Craniocervical Junction with Interatlantooccipital Penetration to the Subarachnoid Space: Not-To-Be-Missed Important Aspects of Craniocervical Trauma Even in the Middle of the COVID-19 Pandemic: Case Report and

- Review of Literature. World neurosurgery, 141, 402–405. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.06.065>
18. Yoneoka, Y., Aizawa, N., Nonomura, Y., Ogi, M., Seki, Y., & Akiyama, K. (2020). Traumatic Nonmissile Penetrating Transnasal Anterior Skull Base Fracture and Brain Injury with Cerebrospinal Fluid Leak: Intraoperative Leak Detection and an Effective Reconstruction Procedure for a Localized Skull Base Defect Especially After Coronavirus Disease 2019 Outbreak. World neurosurgery, 140, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.05.236>
19. 伊藤靖：完成してからでは遅い・完成してからでも間に合うアンギオ室レイアウトの工夫，脳血管内治療の進歩-ブラッシュアップセミナー2019-，診断と治療社，P1 - 5, 2020
20. 五十嵐博中，武田基秀，棗田学，藤井幸彦．Proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS)．脳神経外科 49(2):438-444, 2021
21. 河辺啓太，長谷川 仁，菊池 文平，伊藤 靖，神保 康志，大石 誠，藤井 幸彦．顔面静脈経路による経静脈的塞栓術で治療した眼症状を有する Anterior Condylar Confluence 近傍硬膜動静脈瘻の1例．脳血管内治療 5:86-92, 2020
22. 岡本浩一郎，棗田学，大石誠，藤井幸彦．脳神経外科 異形成性小脳神経節細胞腫（レルミット・ダクロス病）脳神経外科 49(2):395-399, 2021
23. 岡本浩一郎，棗田学，大石誠，藤井幸彦．黒色腫（メラニン細胞）系腫瘍．脳神経外科 49(2):389-394, 2021
24. 岡本浩一郎，棗田学，大石誠，藤井幸彦．大脳多結節空胞状神経細胞腫瘍（MVNT）．脳神経外科 49(2):383-387, 2021
25. 斎藤祥二，柿田明美．臨床医のための神経病理 再入門 中枢神経原発 メラノサイト腫瘍，CLINICAL NEUROSCIENCE, vol.38 no.4, p404-406, 2020
26. 斎藤祥二，長谷川仁，佐藤大輔，安藤和弘，本橋邦夫，棗田学，菊池文平，大石誠，藤井幸彦．血管内再開通療法が奏効した鈍的頸動脈損傷による急性期脳梗塞の1例．脳神経外科 48 (6), p 527-532, 2020
27. 鈴木倫明．数値流体力学（CFD） 脳神経外科 49(2):425-431, 2021
28. 棗田学，藤井幸彦，五十嵐博中．脳腫瘍におけるMRSの利用，臨床画像36（5）：557-562, 2020
29. 長谷川仁．脳動静脈奇形に対する塞栓術ー術前塞栓術のプラクティカル理論と最近のトピックスー，日本脳神経血管内治療学会学術総会CEPテキスト2020, P197-220, 2020
30. 長谷川仁．安全なOnyx塞栓術に必要なセットアップ，脳血管内治療の進歩-ブラッシュアップセミナー2019-，診断と治療社, P88 - 95, 2020
31. 平石哲也，藤井幸彦．医療用ナビゲーションシステム-実臨床でのトリセツ-，LiSA 27(6), p648-652, 2020
32. 福多真史．てんかん重積の評価．脳神経外科 49(2):335-341, 2021
33. 米岡有一郎，岡田正康．下垂体の腫大．脳神経外科 49(2):301-315, 2021
34. 吉田至誠，岡本浩一郎，斎藤昭彦，河辺啓太，塚本佳広，森田健一，渡部正俊．腫瘍内辺縁部に急速に増大する多発性結節を認めた髄膜腫内癌転移の一例．CI研究 Vol.42(1)：59-64, 2020
35. 吉村淳一，森川愛美，熊谷駿介，斎藤太希，高橋陽彦，藤原秀元，小倉良介，土屋尚人．中村のI型乳児急性硬膜下血腫の手術例—Big Black Brain と過灌流について—No Shinkei Geka, 48(9)：841 - 847, 2020
36. 渡辺慶大，田村俊暁，飯塚真由美，相澤直孝，米岡有一郎．干渉波刺激療法の導入を契機に経口摂取を確立した脳梗塞慢性期の重度嚥下障害の1例．嚥下医学 9(2): 213-220, 2020.

IV 共同研究

1. てんかん原性獲得の機序解明に関する研究
新潟大学脳研究所 国立病院機構西新潟中央病院
2. 脳腫瘍細胞株に対するドラッグスクリーニングを用いた標的治療開発
新潟大学脳研究所 金沢大学がん進展制御センター

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授 小野寺 理 准教授 金澤 雅人 講師（病院）石原 智彦
助教（病院）徳武 孝允 助教（病院）佐治 越爾 助教 今野 卓哉
助教（病院）上村 昌寛 特任助教（病院）二宮 格 特任助教 林 秀樹
特任助教（死因究明教育センター）畠山 公大
病院専任助教 笠原 壮、若杉 尚宏
技術職員 金子 三津子、川口 さやか

博士課程大学院生

酒井 直子、坪口 晋太郎、樋口 陽、畠野 雄也、安藤 昭一朗、山岸 拓磨、加藤 怜
大津 裕、永井 貴大、中島 章博

II 研究活動

【多発性硬化症・視神経脊髄炎に関する研究】

1) 研究の概要

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) と視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica: NMO) は中枢神経系炎症性自己免疫疾患である。これまでに河内泉を中心とする研究グループは、本邦のNMO症例の臨床免疫学的・病理学的特徴を明らかにしてきた (Neurology 2009;73:1628)。引き続き、NMOにおける認知機能障害の臨床的・心理学的・病理学的特徴を解析し、その発症機序を世界に先駆けて発表した (Annals of Neurology 2013;73:65)。さらにNMOのミトコンドリア蓄積を伴う神経変性の詳細を明らかにした (Annals of Neurology 2016;79:605)。これらをまとめた総説をオーストリア・ウィーン大学・Hans Lassmann教授と報告した (J Neurol Neurosurg Psychiatry 2017;88:137)。またMSに関しては、新規治療薬フィンゴリモドによる髄腔内免疫細胞動態を可視化し、服用早期におけるMS再発のリスク因子を解析した (Multiple Sclerosis Journal 2013;19(9):1230-1233)。2017年には、Hans Lassmann教授と佐治越爾はMS脳に浸潤するT細胞の詳細を明らかにした (Acta Neuropathol 2017;133(4):613-627)(Brain 2017;141(7):2066-2082)。さらにMSとNMOの免疫現象と神経変性の関係を検討した。多発性硬化症をはじめとした免疫性神経疾患における妊娠・出産・授乳に関する研究を開始した。

日本神経学会監修「多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン2017」の作成委員を務めた。

これまでにMSおよびNMOの臨床治験薬開発を11件行っており、新薬開発を大きく推進した。

希少・難治性疾患であるMSとNMOを持つ患者が働きながら治療を受け、幸せな家庭生活を送ることができる持続可能な社会に向け、2019年3月、政府主催の「W20・国際女性会議」で講演した (<https://www.mofa.go.jp/mofaj/files/000461874.pdf>)。米国ガシー・ジャクソン慈善財団主催の全米NMO患者会に招待され、研究の成果を発表した。日本多発性硬化症協会医学顧問団として社会活動を行った。「知ることから始める、多発性硬化症患者が輝く社会への転換」「30歳前後の女性に多い多発性硬化症」等のタイトルで取材を受け、京都新聞をはじめとするメディアに病気啓発に関する記事が掲載された。

【免疫介在性肥厚性硬膜炎の臨床像に関する検討】

1) 研究の概要

河内泉を中心とする研究グループは、免疫介在性肥厚性硬膜炎の臨床免疫学的・病理学的特徴を検討し、特にANCA関連疾患群において新たな亜型の存在を明らかにした (Brain 2014;137(2):520-536)。厚生労働科学研究費・難治性疾患等政策研究事業「神経免疫疾患のエビデンスによる診断基準・重症度分類・ガイドラインの妥当性と患者QOLの検証」(研究代表者; 松井真 [金沢医科大学])において、特発性肥厚性硬膜炎の診断基準を作成し、日本神経学会より承認を受けた。

【NMDA受容体抗体脳炎をはじめとした自己免疫性脳炎の臨床像に関する検討】

1) 研究の概要

河内泉を中心とする研究グループはペンシルバニア大学のJosep Dalmau教授との共同研究により、NMDA受容体抗体脳炎の長期治療予後を解析し、Lancet Neurology誌 (Lancet Neurology 2013;12(2):157)、Neurology誌 (Neurology 2013; 81(12):1058) に報告した。さらにJosep Dalmau教授との共同研究により、自己免疫性脳炎の新しい標的抗体 (neurexin-3 α antibodies) を発見し、Neurology誌 (Neurology 2016;86(24):2235.) に報告した。

【POEMS症候群のサリドマイド治療に関する検討】

1) 研究の概要

河内泉、西澤正豊を中心とする研究グループは千葉大学の桑原聡教授らとの共同研究により、POEMS症候群に対するサリドマイド治療の開発を行い、その成果をLancet Neurology誌 (Lancet Neurology 2016;15(11):1129)、BMJ open (2015 Jan 8;5(1):e007330.) に報告した。

【脳梗塞に対する新規治療法の開発】

1) 研究の概要

金澤雅人を中心とする研究グループは、修復期の新しい細胞療法として、低酸素・低糖刺激を行った末梢血単核球の脳梗塞動物モデルへの投与が有効であることを明らかにし、発表した (Sci Rep 2019;9:16819)。本論文は、脳卒中学会草野賞を受賞し、米国脳卒中協会年次集会でもLate breaking Sessionに採択された。細胞療法の機序、応用につき、総説で発表した (Int J Mol Sci 2020;21:6194) 本知見をもとに、国際特許出願を行った。JSTの支援も受け海外各国移行 (米国、欧州、韓国、中国) を進めた。さらに新規特許申請を共同研究の結果行った。

【進行型脳梗塞病型のBADの新規診断バイオマーカーの探索】

1) 研究の概要

金澤雅人を中心とする研究グループは、進行型の脳梗塞一病型Branch atheromatous disease (BAD) の早期診断を可能にする診断マーカーを検討した。動脈局所の炎症に注目し、炎症マーカーペントラキン3がBADの早期診断マーカーとなることを明らかにした (Eur J Neurol 2020;27:1279-1284)。本知見をもとに、国内特許出願を行い、多施設共同研究に発展させた。

2) 研究の成果

(特許出願)

CELL PREPARATION AND METHOD FOR PRODUCING CELL PREPARATION (US20190216856A1, CN109963573, EP3508207, KR1020190042684)

特開 2020-153767 被検動物における急性期のBADの発症可能性の評価方法及び急性期の分岐粥腫型梗塞の診断薬

【脊髄小脳変性症の治療に関する医師主導治験】

1) 研究の概要

小野寺理を中心とする研究グループは脊髄小脳変性症の新規治療開発にむけた、第Ⅱ相 医師主導治験を計画し、令和2年度 AMED 希少難治性疾患に対する画期的な医薬品の実用化研究分野に採用された。本年度より、本学臨床研究推進センターおよび共同実施期間の協力のもと、「脊髄小脳変性症を対象としたAJA030の有効性と安全性を評価するプラセボ対照二重盲検無作為化群間比較試験」を開始している。本治験は脊髄小脳変性症のうちSCA6を対象とする。当施設を含めた4施設で症例登録を開始しており、令和3年9月末までに40人の登録を行い、治験薬AJA030の有効性を解析する予定である。

Ⅲ 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

- 1 Prudencio M, Garcia-Moreno H, Jansen-West KR, Al-Shaikh RH, Gendron TF, Heckman MG, Spiegel MR, Carlomagno Y, Daugherty LM, Song Y, Dunmore JA, Byron N, Oskarsson B, Nicholson KA, Staff NP, Gorcenco S, Puschmann A, Lemos J, Januário C, LeDoux MS, Friedman JH, Polke J, Labrum R, Shakkottai V, McLoughlin HS, Paulson HL, Konno T, Onodera O, Ikeuchi T, Tada M, Kakita A, Fryer JD, Karremo C, Gomes I, Caviness JN, Pittelkow MR, Aasly J, Pfeiffer RF, Veerappan V, Eggenberger ER, Freeman WD, Huang JF, Uitti RJ, Wierenga KJ, Collazo IVM, Tipton PW, van Gerpen JA, van Blitterswijk M, Bu G, Wszolek ZK, Giunti P, Petrucelli L. Toward allele-specific targeting therapy and pharmacodynamic marker for spinocerebellar ataxia type 3. .Sci Transl Med 2020.1 12(566)eabb7086.
- 2 Naoko Sakai,*, Masahiro Uemura,*, Taisuke Kato, Hiroaki Nozaki, Shouichirou Ando, Hiroyuki Kamei,, Motohiro Kato ,and Osamu Onodera Hemorrhagic cerebral small vessel disease caused by a novel mutation in 3'UTR of collagen type IV alpha 1
Neurology Genetics 2020 6 DOI:10.1212/NXG.0000000000000383
- 3 Kosei Nakamura, Akihiro Sugai, Etsuji Saji, Kensaku Kasuga, Osamu Onodera
Refractory Myositis Affecting the Intrinsic Muscles of the Hand: A Case Report
Internal Medicine 2020 Jan 17 DOI:10.2169/internalmedicine.3773-19
- 4 笠原 壮、石原 智彦、小池 佑佳、須貝 章弘、小野寺 理
Transactive response DNA-binding protein 43kDa(TDP-43) 凝集体の形成と分解からみた amyotrophic lateral sclerosis(ALS)の分子機構 臨床神経学 2020.2 2 109-116
- 5 Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera, Akihiro Hirakawa, Yoshitaka Shimizu, Masayuki Yamada
Effect of rovatirelin in patients with cerebellar ataxia: two randomised double-blind placebo-controlled phase 3 trials J Neurol Neurosurg Psychiatry 2020 Mar 91(3) 254-262
- 6 畠野雄也、須貝章弘、山岸拓磨、中島章博、柿田明美、小野寺理
出血性病変が検出されずに広範な脳病変に至ったアミロイドβ関連血管炎の1例
臨床神経学 2020.3 60(3) 187-192
- 7 I.Ninomiya, M.Kanazawa, M.Uemura, O.Onodera
Elevated serum pentraxin 3 levels might predict the diagnosis of branch atheromatous disease at a very

- 8 小出眞悟、畠山公大、上村昌寛、菊池文平、長谷川仁、小野寺理 一側視野に局限した複雑幻視を呈した硬膜動静脈瘻の一例 臨床神経学 2020.6 60(6) 425-428
- 9 Taisuke Kato, Yumi Sekine, Hiroaki Nozaki, Masahiro Uemura, Shoichiro Ando, Sachiko Hirokawa and Osamu Onodera Excessive Production of Transforming Growth Factor β 1 Causes Mural Cell Depletion From Cerebral Small Vessels Frontiers in Aging Neuroscience 2020.6 12(151)
- 10 Eiko N. Minakawa, Helena Akiko Popiel, Masayoshi Tada, Toshiaki Takahashi, Hiroshi Yamane, Yuji Saitoh, Yasuo Takahashi, Daisaku Ozawa, Akiko Takeda, Toshihide Takeuchi, Yuma Okamoto, Kazuhiro Yamamoto, Mari Suzuki, Hiromi Fujita, Chiyomi Ito, Hiroko Yagihara, Yuko Saito, KeiWatase, Hiroaki Adachi, Masahisa Katsuno, Hideki Mochizuki, Kentaro Shiraki, Gen Sobue, Tatsushi Toda, KeijiWada, Osamu Onodera and Yoshitaka Nagai
Arginine is a disease modifier for polyQ disease models that stabilizes polyQ protein conformation
BRAIN 2020.5 DOI:10.1093/brain/awaa115
- 11 中島章博、河内泉 肥厚性硬膜炎の診断と治療 脊髄外科 2020.4 34 (1) 5-31
- 12 Masahiro Uemura, Hiroaki Nozaki, Taisuke Kato, Akihide Koyama, Naoko Sakai, Shoichiro Ando, Masato Kanazawa, Nozomi Hishikawa, Yoshinori Nishimoto, Kiran Polavarapu, Atchayaram Nalini, Akira Hanazono, Daisuke Kuzume, Akihiro Shindo, Mohammad El-Ghanem, Arata Abe, Mari Yoshida, Takeshi Ikeuchi, Ikuko Mizuta, Toshiki Mizuno, and Osamu Onodera
HTRA1-Related Cerebral Small Vessel Disease: A Review of the Literature
Frontiers in Neurology 2020.7 11(545) DOI:10.3389/fneur.2020.00545
- 13 Deutschlander AB, Konno T, Soto-Beasley AI, Walton RL, van Gerpen JA, Uitti RJ, Heckman MG, Wszolek ZK, Ross OA. Association of MAPT subhaplotypes with clinical and demographic features in Parkinson's disease. Ann Clin Transl Neurol 2020 7(9) 1557-1563.
- 14 安藤昭一郎、加藤泰介、小野寺理 DNA,RNAを標的としたポリグルタミン病の新規治療戦略 実験医学 2020.8 38(13) 2191-2196
- 15 Masahiro Hatakeyama, Itaru Ninomiya, Yutaka Otsu, Kaoru Omae, Yasuko Kimura, Osamu Onodera, Masanori Fukushima, Takayoshi Shimohata and Masato Kanazawa
Cell Therapies under Clinical Trials and Polarized Cell Therapies in Pre-Clinical Studies to Treat Ischemic Stroke and Neurological Diseases: A Literature Review
International Journal of Morecular Sciences 2020.8 21(17) 6194
- 16 小池佑佳、小野寺理 副腎白質ジストロフィー 生体の科学 2020 71(5) 410-411
- 17 畠山公大、二宮格、小野寺理、下畑享良、金澤雅人
脳梗塞に対する低酸素低糖刺激末梢血単核球療法 BRAIN and NERVE 2020 72(10) 1097-1103

- 18 Maria Teresa Pellecchia, Iva Stankovic, Alessandra Fanciulli, Florian Krismer, Wassilios G. Meissner, Jose-Alberto Palma, Jalesh N. Panicker, Klaus Seppi, and Gregor K. Wenning, Members of the Movement Disorder Society Multiple System Atrophy Study Group are listed in the Appendix "Can Autonomic Testing and Imaging Contribute to the Early Diagnosis of Multiple System Atrophy? A Systematic Review and Recommendations by the Movement Disorder Society Multiple System Atrophy Study Group" *MOVEMENT DISORDERS CLINICAL PRACTICE* 2020 7(7) 750-762

- 19 Mercedes Prudencio, Hector Garcia-Moreno, Karen R Jansen-West, Rana Hanna Al-Shaikh, Tania F Gendron, Michael G Heckman, Matthew R Spiegel, Yari Carlomagno, Lillian M Daugherty, Yuping Song, Judith A Dunmore, Natalie Byron, Björn Oskarsson, Katharine A Nicholson, Nathan P Staff, Sorina Gorcenco, Andreas Puschmann, João Lemos, Cristina Januário, Mark S LeDoux, Joseph H Friedman, James Polke, Robin Labrum, Vikram Shakkottai, Hayley S McLoughlin, Henry L Paulson, Takuya Konno, Osamu Onodera, Takeshi Ikeuchi, Mari Tada, Akiyoshi Kakita, John D Fryer, Christin Karremo, Inês Gomes, John N Caviness, Mark R Pittelkow, Jan Aasly, Ronald F Pfeiffer, Venka Veerappan, Eric R Eggenberger, William D Freeman, Josephine F Huang, Ryan J Uitti, Klaas J Wierenga, Iris V Marin Collazo, Philip W Tipton, Jay A van Gerpen, Marka van Blitterswijk, Guojun Bu, Zbigniew K Wszolek, Paola Giunti, Leonard Petrucelli
Toward allele-specific targeting therapy and pharmacodynamic marker for spinocerebellar ataxia type 3 *Science Translational Medicine* 2020.1 12(566) DOI: 10.1126/s citranslmed.abb7086

- 20 Ryoichi Nakamura, Kazuharu Misawa, Genki Tohnai, Masahiro Nakatochi, Sho Furuhashi, Naoki Atsuta, Naoki Hayashi, Daichi Yokoi, Hazuki Watanabe, Hirohisa Watanabe, Masahisa Katsuno, Yuishin Izumi, Kazuaki Kanai, Nobutaka Hattori, Mitsuya Morita, Akira Taniguchi, Osamu Kano, Masaya Oda, Kazumoto Shibuya, Satoshi Kuwabara, Naoki Suzuki, Masashi Aoki, Yasuyuki Ohta, Toru Yamashita, Koji Abe, Rina Hashimoto, Ikuko Aiba, Koichi Okamoto, Kouichi Mizoguchi, Kazuko Hasegawa, Yohei Okada, Tomohiko Ishihara, Osamu Onodera, Kenji Nakashima, Ryuji Kaji, Yoichiro Kamatani, Shiro Ikegawa, Yukihide Momozawa, Michiaki Kubo, Noriko Ishida, Naoko Minegishi, Masao Nagasaki, Gen Sobue
A multi-ethnic meta-analysis identifies novel genes, including ACSL5, associated with amyotrophic lateral sclerosis *Commun Biol* 2020.9 23;3(1) 526

- 21 河内泉、小野純花 特集：免疫性神経疾患update-基礎・臨床研究の最新知見 - III. 診断と治療 開発中の治療と今後の展望 *日本臨牀* 2020.11 78(11) 1851-1861

- 22 Yutaka Otsua, Masaki Namekawa, Masafumi Toriyabeab, Itaru Ninomiya, Masahiro Hatakeyama, Masahiro Uemura, Osamu Onodera, Takayoshi Shimohata, Masato Kanazawa
Strategies to prevent hemorrhagic transformation after reperfusion therapies for acute ischemic stroke:A literature review *Journal of the Neurological Sciences* 2020.10419

- 23 齊ノ内信、Gabdulkhaev Ramil、小野寺理、柿田明美
良性成人型家族性ミオクロームスてんかんの神経病理 *脳神経内科* 2020 93(3) 305-309

- 24 大津裕、今野卓哉、石原智彦、小野寺理

- 25 山岸拓磨、須貝章弘 相分離メガネをかけて見直す神経変性疾患 2020 68-71
- 26 河内泉、西澤正豊 免疫・炎症疾患のすべて VI. 免疫・炎症疾患各論
病原微生物・新生物にされる免疫疾患
傍腫瘍性神経症候群 (PNS) 日本医師会雑誌 2020.10 149特別号(2) 330-333
- 27 河内泉 多発性硬化症診療の最前線～患者さんと共に歩む～
難病と在宅ケア 2020.12 26(9) 56-60

IV 共同研究

- (1) 自己免疫性脳炎の病態解析 (国際共同研究)
(概要) 河内泉らは、ペンシルバニア大学・バルセロナ大学のJosep Dalmau教授との共同研究より、自己免疫性脳炎の自己抗体に関する解析を行った。
(参加機関) ペンシルバニア大学・バルセロナ大学Josep Dalmau教授
- (2) 末梢神経・骨格筋を用いた末梢神経・筋疾患の診断、検体保存、病態研究 (学外共同研究)
(概要) 末梢神経・骨格筋を侵す神経・筋疾患には、炎症性筋疾患、筋ジストロフィー、炎症性末梢神経疾患、遺伝性感覚運動ニューロパチーなどが該当し、末梢神経・骨格筋を用いた病理・生化学的検査、病態研究を行った。
(参加機関) 新潟大学脳研究所神経内科、長岡赤十字病院神経内科、新潟県立中央病院神経内科、新潟県立新潟田病院神経内科、国立病院機構西新潟中央病院
- (3) 脳梗塞に対する機能回復促進させる細胞療法の開発 (学外共同研究)
(概要) 金澤雅人らは、岐阜大学大学院医学部脳神経内科分野下畑享良教授、医療イノベーション推進センターの川本篤彦センター長、LHS研究所福島雅典代表理事らとの共同研究を行い、脳梗塞に対する脳保護的細胞療法の研究を行った。新規特許申請を行った。
(参加機関) 新潟大学脳研究所脳神経内科、岐阜大学大学院医学部脳神経内科分野、医療イノベーション推進センター、LHS研究所
(特許) CELL PREPARATION AND METHOD FOR PRODUCING CELL PREPARATION (WO 2018043596, US20190216856A1, CN109963573, EP3508207, KR102019004268)
- (4) 進行性脳梗塞病型BADの新規診断バイオマーカーの探索 (学外共同研究)
(概要) 金澤雅人らは、新潟市民病院脳卒中科、国立循環器研究センター脳神経内科服部頼都医長らとの共同研究を行い、進行性脳梗塞病型BADの新規診断バイオマーカーの探索研究を行った。
(参加機関) 新潟大学脳研究所脳神経内科、新潟市民病院脳卒中科、国立循環器研究センター脳神経内科

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授	五十嵐 博中	センター長
特任専門職員	西澤 正豊	
特任専門職員	杉浦 真	
客員教授	イングリッド・クウィー	
准教授	松澤 等	脳機能解析学分野
准教授	鈴木 雄治	臨床機能脳神経科学分野
准教授	伊藤 浩介	生体磁気共鳴学分野
助教	渡辺 将樹	生体磁気共鳴学分野
助教	植木 智志	臨床機能脳神経科学分野
助教	中村 ゆきみ	生体磁気共鳴学分野
特任助手	村木 美子	臨床機能脳神経科学分野
特任助手	大湊 詩保	臨床機能脳神経科学分野
特任助手	松田 豪	臨床機能脳神経科学分野
実験助手	富士 淑恵	臨床機能脳神経科学分野
技術職員	計良 妙	
実験助手	目黒 佳未	
実験助手	上村 柊太	
大学院生	武田 基秀	
大学院生	大野 健	
医局秘書	佐藤 直子	
医局秘書	松崎 励奈	
医局秘書	遠藤 智代	
医局秘書	丸山 美穂	

II 主な研究活動

統合脳機能研究センターでは「こころの科学的解明」を目的とした中核的研究拠点（COE）形成プログラムから、さらに文部科学省連携融合事業「水分子の脳科学」（平成17年度～22年度）、文部科学省特別経費「意識の脳科学」（平成23年度～27年度）と引き継がれた研究活動を推進してきた。このプロジェクトでは水分子の移動に特異的に関与するタンパク質のチャンネル、アクアポリンの動態的機能解析を行い、生体におけるアクアポリンの動態を画像化する方法の開発に初めて成功すると共に、世界初のアクアポリン4阻害剤を開発した。さらに、これらのプロジェクトは、今までの研究成果を臨床に還元すべく平成28年度～32年度文部科学省共同利用・共同研究拠点強化事業「アルツハイマー病予防・治療薬の創生」へと引き継がれ、シーズとなる薬剤3種類の開発を終え、国内特許を申請、さらにJSTの大学等知財基盤強化支援に採択されPCTさらにはアメリカ・EUに特許を申請するとともに、企業との共同研究開発を進めている。

それと共に、もう一つの柱である画像診断技術の開発においては、脳の水動態を無侵襲に測定する手法を開発し、モデル動物、更にポジトロンCT、MRIを用いたヒトへの臨床応用を進めるとともに、先端画像技術開発において国内・国際共同研究を進めている。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Yamada K, Suzuki Y, Ueki S, Itoh K, Watanabe M, Suzuki K, Igarashi H. Participant-driven Simulation Protocol With a Mock Scanner for Pediatric Magnetic Resonance Neuroimaging Preparation Without Sedation Clinical Simulation in Nursing 47:40-47, DOI: 10.1016/j.ecns.2020.07.002
2. Terumitsu-Tsujita M, Kitaura H, Miura I, Kiyama Y, Goto F, Muraki Y, Ominato S, Hara N, Simankova A, Bizen N, Kashiwagi K, Ito T, Toyoshima Y, Kakita A, Manabe T, Wakana S, Takebayashi H, Igarashi H. Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the Eif2b5 gene: a vanishing white matter disease model. J Neurochem. 2020 Jul;154(1):25-40. doi: 10.1111/jnc.14887.
3. Kenichi Yamada, Masaki Watanabe, Kiyotaka Suzuki, Yuji Suzuki. Cerebellar Volumes Associate with Behavioral Phenotypes in Prader-Willi Syndrome. Cerebellum (London, England) 1-10.[Published online,13 July 2020]
4. Terumitsu-Tsujita M, Kitaura H, Miura I, Kiyama Y, Goto F, Muraki Y, Ominato S, Hara N, Simankova A, Bizen N, Kashiwagi K, Ito T, Toyoshima Y, Kakita A, Manabe T, Wakana S, Takebayashi H, Igarashi H. Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the Eif2b5 gene: a vanishing white matter disease model. J Neurochem. 2020 Jul;154(1):25-40. doi: 10.1111/jnc.14887. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31587290.
5. Igarashi H, Ueki S, Kera T, Ohno K, Ohkubo M, Terumitsu-Tsujita M, Kakita A, Kwee IL. Longitudinal GluCEST MRI Changes and Cerebral Blood Flow in 5xFAD Mice Contrast Media Mol Imaging. 2020 Nov DOI: 10.1155/2020/8831936
6. 伊藤浩介 「共感覚とは本当は何か？」基礎心理学研究 39 巻 1 号（2020）.

IV 共同研究

- | | | |
|-----|------|--|
| (1) | 研究題目 | アルツハイマー病予防・治療のための先制医療（平成28年度～） |
| | 研究内容 | MRI・PETを用いたアルツハイマー病の発症前診断法を開発・確立すると共に、開発された診断技術をアルツハイマー病発症予防に生かすために、アクアポリンを制御する薬剤の開発を行い、アミロイド蛋白の排泄不全を予防・治療する特異的な新薬を創生することを目指す。 |
| | 参加機関 | Neurology, University of California, Davis（米国） |
| (2) | 研究題目 | 高磁場MRIを用いた発達障害に伴う統合的脳機能に関する研究（平成28年度～） |
| | 研究内容 | 高磁場MRIにおける画像解析法（機能的MRI、拡散テンソル解析）を用いて自閉症、学習障害をはじめとした発達障害に関連する生態情報を非侵襲的に抽出し、脳発達病態の手掛りを探る。 |
| | 参加機関 | 国立成育医療研究センター |
| (3) | 研究題目 | サル類における聴覚事象関連電位の記録（平成25年～） |
| | 研究内容 | サル類を対象に無麻酔・無侵襲で頭皮上から聴覚誘発電位や事象関連電位を記録し、脳進化に伴う聴覚処理の種差を検討する。 |
| | 参加機関 | 京都大学霊長類研究所 |

遺伝子機能解析学分野

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授	池内 健	技術補佐員（続き）	佐藤 美代子
准教授	宮下 哲典		工藤 結子
助教	春日 健作		佐久間 香織
特任助教	原 範和	事務補佐員	桑山 恵美子
特任助手	荒木 亜希	大学院生（博士）	黒羽 泰子
特任助手	長谷川 舞衣		樋口 陽（脳神経内科）
技術職員	月江 珠緒		劉 李歆
技術補佐員	大日方 藍		朱 斌
	佐藤 康平		Ady Fitrah Yusran

II 研究活動

本分野はヒト生体試料を用いた統合解析に基づく認知症性疾患の診断・治療法の開発、並びに病態解明に関する研究活動を行っている。国内の多施設と共同してアルツハイマー病等の認知症性疾患ゲノムDNAを収集し、数千例規模のゲノムDNAを有するリソースを構築している。これらのサンプルを活用してアルツハイマー病の感受性遺伝子探索やコモン・レアバリエント解析を行い、孤発性アルツハイマー病の遺伝学的な観点から発症機序解明を目指している。単一遺伝子性の家族性認知症の遺伝子解析については、全国の医療施設から原因遺伝子変異の解析の依頼を受け（累計1,000症例以上）、その結果を臨床に還元するクリニカルシーケンスを実施している。本学において取得された本邦の認知症ゲノム情報は公的データベースであるMGeND（Medical Genomics Japan Variant Database）において非制限公開している。これらの実績をふまえ、令和元年からAMED「網羅的ゲノム解析とインフォマティクス統合解析による認知症の新規病態解析」の代表機関として、本邦の認知症ゲノム研究を牽引している。

ゲノムDNAに加えて、全国多施設共同研究により統一されたプロトコルで採取された脳脊髄液、血液、RNAなどを維持、管理、運用し、認知症性疾患バイオバンクを運営している。多施設共同認知症臨床研究におけるバイオマーカー測定の品質を担保することを目的に、生体試料の取り扱いと測定方法の標準化を実施している。さらに、これらの生体試料リソースを用いて、認知症性疾患の新規バイオマーカーを探索し、新規候補マーカーを報告している。これらの認知症性疾患バイオバンクを活用し、「新潟大学脳研究所共同利用・共同研究」により、国内外の施設と共同研究を展開している。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Hayakawa H, Baba K, Ikenaka K, Aguirre C, Nakatani R, Choong CJ, Tsuda H, Nagano S, Koide M, **Ikeuchi T**, Hasegawa M, Papa SM, Nagai Y, Mochizuki H. Structurally distinct G51D α -synuclein pathology, progressive neuronal loss, and motor impairment in mice. *Movement Disorder* 35:256-267, 2020 / doi: 10.1002/mds.27887

2. Barthélemy NR, Li Y, Joseph-Mathurin N, Gordon BA, Hassenstab J, Benzinger TLS, Buckles V, Fagan AM, Perrin R, Goate AM, Morris JC, Karch C, Xiong C, Allegri R, Berman SB, **Ikeuchi T**, Shimada H, Shoji M, Suzuki K, Noble J, Ringman J, Ghetti B, Farlow M, Chhatwal J, Graff-Radford NR, Salloway S, Shofield PR, Masters C, Martins R, Rossor NM, Fox NC, Levin J, Jucker M, Sato C, Bateman RJ, McDade E, **Dominantly Inherited Alzheimer Network***. A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 26: 398-407, 2020 / doi: [org/10.1038/s41591-020-0781-z](https://doi.org/10.1038/s41591-020-0781-z) (*, including **Kasuga K** and **Ikeuchi T**)
3. Tanaka H, Toyoshima Y, Kawakatsu S, Kobayashi R, Yokota O, Terada S, Kuroda S, Miura T, Higuchi Y, Otsu H, Sanpei K, Otani K, **Ikeuchi T**, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Morphological characterization of glial and neuronal tau pathology in globular glial tauopathy (type II and III). *Neuropathology Applied Neurobiology* 46:344-358, 2020 / doi: [10.1111/nan.12581](https://doi.org/10.1111/nan.12581)
4. Tamhankar PM, Zhu B, Tamhankar VP, Withbawkar SM, Seabra L, Livingston J, **Ikeuchi T**, Crow YJ. Biallelic hypomorphic mutations in CSF1R associated with fatal childhood neurodegeneration. *Neuropediatrics* 51:302-306, 2020 / doi: [10.1055/s-0040-1702161](https://doi.org/10.1055/s-0040-1702161)
5. Zhou Y, Song WM, Andhey PS, Swain A, Levy T, Miller KR, Poliani PL, Cominelli M, Grover S, Gilfillan S, Cella M, Ulland TK, Zaitsev K, **Miyashita A**, **Ikeuchi T**, Sainouchi M, Kakita A, Bennett DA, Schneider JA, Nichols MR, Beausoleil SA, Ulrich J, Holtzman DM, Artyomov M, Colonna M. Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 26:131-142, 2020 / doi: [10.1038/s41591-019-0695-9](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0695-9)
6. Kikuchi M, Sekiya M, **Hara N**, **Miyashita A**, Kuwano R, **Ikeuchi T**, Iijima KM, Nakaya A. Disruption of a RAC1-centred network is associated with Alzheimer's disease pathology and causes age-dependent neurodegeneration. *Human Molecular Genetics* 29:817-833, 2020 / doi: [10.1093/hmg/ddz320](https://doi.org/10.1093/hmg/ddz320)
7. Zhang W, Tarutani A, Newell KL, Murzin AG, Matsubara T, Falcon B, Vidal R, Garringer HJ, Shi Y, **Ikeuchi T**, Murayama S, Ghetti B, Hasegawa M, Goedert M, Scheres SGW. Novel tau filament fold in corticobasal degeneration, a four-repeat tauopathy. *Nature* 580: 283–287, 2020 / doi: [10.1038/s41586-020-2043-0](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2043-0)
8. Chiu YW, Hori Y, Ebinuma I, Sato H, **Hara N**, **Ikeuchi T**, Tomita T. Identification of calcium and integrin-binding protein 1 as a novel 1 regulator of production of amyloid β peptide using CRISPR/Cas9-based 2 screening system. *FASEB Journal* 34(6):7661-7674 / doi: [10.1096/fj.201902966RR](https://doi.org/10.1096/fj.201902966RR)
9. Senzaki S, Miura S, Ochi M, Kato T, Okada T, Matsumoto S, Shiraoka A, Ochi H, Igase M, Kitazawa R, Zhu B, **Ikeuchi T**, Ohyagi Y. Sporadic Japanese case of adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia caused by a de novo p.Phe849del mutation in *CSF1R*. *Neurology Clinical Neuroscience* 8:96-98, 2020 / doi: [10.1111/ncn3.12367](https://doi.org/10.1111/ncn3.12367)
10. Ohta Y, Hishikawa N, Ikegami K, Sato K, Osakada Y, Takemoto M, Yamashita T, Omote Y, **Ikeuchi T**, Abe K. Different clinical and neuroimaging features between Japanese dementia siblings with a new N-terminal mutation (Val225Ala) of APP gene. *Journal of Clinical Neuroscience* 72:482-484, 2020 / doi: [10.1016/j.jocn.2019.11.009](https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.11.009)
11. Saito R, **Hara N**, Tada M, Homma Y, **Miyashita A**, Onodera O, **Ikeuchi T**, Kakita A. Novel CHP1 mutation in autosomal-recessive cerebellar ataxia: autopsy features of two siblings. *Acta*

12. Saito R, Shimizu H, Miura T, **Hara N**, Mezaki N, Higuchi Y, **Miyashita A**, Kawachi I, Sanpei K, Honma Y, Onodera O, **Ikeuchi T**, Kakita A. Oculopharyngodistal myopathy with coexisting histology of systemic neuronal intranuclear inclusion disease: Clinicopathologic features of an autopsied patient harboring CGG repeat expansions in *LRP12*. *Acta Neuropathologica Communications* 8:75, 2020 / doi: 10.1186/s40478-020-00945-2
13. Suzuki K, Hirakawa A, Ihara R, Iwata A, Ishii K, **Ikeuchi T**, Sun CK, Donohue M, Iwatsubo T; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Effect of apolipoprotein E ε4 allele on the progression of cognitive decline in the early stage of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (NY)* 6:e12007, 2020 / doi: 10.1002/trc2.12007
14. Prudencio M, Garcia-Moreno H, Jansen-West KR, AL-Shaikh RH, Gendron TF, Heckman MG, Spiegel MR, Carlomagno Y, Daugherty LM, Song Y, Dunmore JA, Byron N, Oskarsson B, Nicholson KA, Staff NP, Gorgencio S, Puschmann A, Lemos J, Januário C, LeDoux MS, Friedman JH, Polke J, Labrum R, Shakkottai V, McLoughlin HS, Paulson HL, Konno T, Onodera O, **Ikeuchi T**, Tada M, Kakita A, John FD, Ataxia Study Group, Wszolek ZK, Giunti P, Petrucelli L. Towards allele-specific targeting therapy and pharmacodynamic biomarker for spinocerebellar ataxia 3. *Science Translational Medicine* 12(566):eabb7086, 2020 / doi: 10.1126/scitranslmed.abb7086
15. Uemura M, Nozaki H, Kato T, Koyama A, Sakai N, Ando S, Kanazawa M, Hishikawa N, Nishimoto Y, Kiran Polavarapu P, Nalini A, Hanazono A, D, Shindo A, El-Ghanem M, Abe A, Sato A, Yoshida M, **Ikeuchi T**, Mizuta I, Mizuno T, Onodera O. HTRA1-related cerebral small vessel disease: a review of the literature. *Frontiers in Aging Neuroscience* 11:545, 2020 / doi: 10.3389/fneur.2020.00545. *eCollection* 2020.
16. Awata S, Eda Hiro A, Arai T, Ikeda M, **Ikeuchi T**, Kawakatsu S, Konagaya Y, Miyanaga K, Ota H, Suzuki K, Tanimukai S, Utsumi K, Kakuma T. Prevalence and subtype distribution of young-onset dementia in Japan. *Psychogeriatrics* 20:817-823, 2020 / doi: 10.1111/psyg.12596
17. Watanabe Y, Hirao Y, **Kasuga K**, Tokutake T, Kitamura K, Niida S, **Ikeuchi T**, Nakamura K, Yamamoto T. Urinary Apolipoprotein C3 Is a potential biomarker for Alzheimer's disease. *Dementia Geriatrics Cognition Disease Extra* 10:94-104, 2020 / doi: 10.1159/000509561
18. Hirano M, Iritani S, Fujishiro H, Torii Y, Kawashima K, Sekiguchi H, Habuchi C, Yamada K, Ikeda T, Hasegawa M, **Ikeuchi T**, Yoshida M, Ozaki N. Globular glial tauopathy Type I presenting with bvFTD. *Neuropathology* 40:515-525, 2020 / doi: 10.1111/neup.12457
19. Ohashi R, Umezu H, Sato A, Daigo K, Sato S, **Hara N**, **Miyashita A**, **Ikeuchi T**, Motoyama T, Kishi M, Nagaoka T, Otsubo A, Ichikawa K, Kagamu H, Kikuchi T, Watanabe S, Hamakubo T, Tsuchida M, and Ajioka Y. Potential prognostic implications of germline rDNA promoter single nucleotide variants in lung adenocarcinoma patients. *Cells* 9:2409, 2020 / doi: 10.3390/cells9112409.
20. Yamasaki M, Makino T, Khor SS, Toyoda H, Miyagawa T, Liu X, Kuwabara H, Kano Y, Shimada T, Sugiyama T, Nishida H, Sugaya N, Tochigi M, Otowa T, Okazaki Y, Kaiya H, Kawamura Y, **Miyashita A**, Kuwano R, Kasai K, Tanii H, Sasaki T, Honda M, Tokunaga K. Sensitivity to gene dosage and gene expression affects genes with copy number variants observed among neuropsychiatric diseases. *BMC Med*

Genomics. 2020 Mar 29;13(1):55. doi: 10.1186/s12920-020-0699-9.

21. 池内 健. 認知症医療におけるバイオマーカーの必要性. 神経心理学 36:20-24, 2020
22. 池内 健. 神経変性疾患の疾患コホート研究. 医学のあゆみ 273:105-109, 2020
23. 樋口 陽, Yusran Adyfitrah, 池内 健. 大脳皮質基底核変性症「難病研究の進歩」生体の科学 71:388-389, 2020
24. 樋口 陽, 池内 健. 遺伝情報を活用した認知症予防. 老年内科 2:441-446, 2020
25. 池内 健, 荒木亜希. 遺伝が関与する若年性認知症. 精神医学62:1481-1491, 2020
26. 春日健作. アルツハイマー病の診断における脳脊髄液バイオマーカー. 老年精神医学雑誌 31: 14-24, 2020.
27. 春日健作, 吉田卓, 島田斉, 藤城弘樹. 症例提示ーこの2症例をあなたはどうか診るか. 老年精神医学雑誌 31: 22-35, 2020.
28. 宮下哲典, 原範和, 尾崎浩一. 日本人におけるアルツハイマー病感受性遺伝子. 医学のあゆみ 274(8): 675-676, 2020.
29. 宮下哲典, 原範和, 春日健作, 池内健. アルツハイマー病の原因遺伝子と感受性遺伝子 : 我々の取り組みと国内外の最新事情. 新潟医学会雑誌 134(1): 13-18, 2020.

IV 共同研究

- (1) 研究題目:「国際共同研究ネットワークによる家族性アルツハイマー病に関する多元的臨床データ収集とトランスレーショナル研究」
研究内容: 遺伝子変異が同定された家族性アルツハイマー病の家系員を対象とした縦断的コホート研究である。認知症を発症前のバイオマーカーの変化を明らかにする国際的なトランスレーショナル研究。
参加機関: 東京大学、神戸市立医療センター中央市民病院、東京都健康長寿医療センター、ワシントン大学など
- (2) 研究題目:「網羅的ゲノム解析とインフォマティクス統合解析による認知症の新規病態解析」
研究内容: アルツハイマー病をはじめとする認知症のクリニカルシーケンスや網羅的ゲノム解析を行い、得られた変異・多型情報を広く共有し、有効活用するためのデータベースを構築する。
参加機関: 国立長寿医療センター、大阪大学、慶應義塾大学、東京大学、東京都健康長寿医療センター、愛知医科大学、国立精神・神経医療研究センター病院、医療法人さわらび会福祉村病院など
- (3) 研究題目:「進行性核上性麻痺と関連タウオパチーの患者レジストリと試料レポジトリを活用した診療エビデンスの構築」
研究内容: 進行性核上性麻痺及び類縁疾患を対象とした多施設共同臨床研究。当該疾患の臨床所見、画像所見、バイオマーカー変化などを明らかにする。
参画機関: 鳥取大学、東名古屋病院、東京都健康長寿医療センター、自治医科大学、京都府立

医科大学、松江医療センターなど

- (4) 研究題目：「プリオン病の早期診断基準の作成を目指した新たなエビデンス創出とその検証に用いる遺伝性プリオン病未発症例の臨床調査と画像・生体材料の収集」

研究内容：プリオン病の早期診断基準の作成のため、孤発性プリオン病の鑑別における臨床症状・脳波・画像・髄液検査をベースとしたバイオマーカーの有用性の検討を行うとともに、遺伝性プリオン病の発症前または発症超早期のリスク保有者の画像検査及び生体材料を採取し、発症に至る経緯を解明する。

参画機関：長崎大学、東京医科歯科大学、金沢大学、国立精神・神経医療研究センター、福岡大学、横浜市立大学、岩手医科大学、埼玉医科大学、愛知医科大学

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授	笹岡 俊邦
講師	福田 七穂
助教	小田 佳奈子
技術職員	作間 赳法
技術職員・博士課程大学院生	齊藤 奈英
技術職員	平澤 克哉
技能職員	那須野 純映
一般職員	加藤 明子
特任助手	山本 美丘
特任助手	阿部 光寿
特任助手	内山 澄香
特任助手	鈴木 康浩
特任助手	足立 周子
特任助手	阿部 紗也香
特任助手	佐々木 綾音
特任助手	桑原 沙耶香
事務補佐員	野澤 佳世
事務補佐員	久住 真由美

II 研究活動

- (1) ドーパミンは、運動機能、記憶や学習、意欲に重要な働きがあると考えられている。本分野では、重要な神経疾患の一つであるパーキンソン病の運動障害に着目し、そのモデル動物として、ドーパミン情報を伝えるドーパミン受容体やNMDA受容体等の関連分子の遺伝子操作マウスを開発している。これらのモデル動物を用いて、大脳基底核回路の「直接路」「間接路」における標的分子の発現解析や、神経回路の働きの解析、運動や学習・記憶の行動解析を行い、運動調節の仕組み解明と治療法開発への発展を目指している。
- (2) 近年、マーマセットは脳研究の分野で大きく注目され、遺伝子改変動物が作出されているが、まだ限られた研究機関以外での作出は困難な状況にある。その要因は、飼育の設備、経費面に加えて、個体作製のために十分な数の受精卵を入手することが難しいという課題が挙げられる。その解決法として、当分野ではマーマセット卵巢を免疫不全マウスに移植し、マウス体内で成熟させることによって卵子を得る方法を開発している。これまでに共同研究機関の協力でマーマセット卵巢の分与を受け、免疫不全マウスに移植の後、ホルモン投与により成熟卵子を得て、体外受精等の方法により受精卵を得ることに成功している。
- (3) RNA結合タンパク質は、神経細胞の形成や機能に重要な働きを担っており、多種の神経変性疾患においてRNA結合タンパク質の遺伝子変異が関連付けられている。当分野では神経細胞において重要な働きを担うRNA結合タンパク質の探索と解析を進めている。
- (4) モデル動物の作成に必須の実験手段である、体外受精、胚移植、胚・精子の凍結保存、薬剤投与による過剰排卵、胚盤胞補完法などの発生・生殖工学技術について、先進的な実験方法の開発に努めている。

- (5) 本分野は全学共同利用の動物実験施設の管理運営を担当し、高度化した動物実験の推進のため、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ブタ、ニホンザル、マーモセット、メダカなどを用いる動物実験環境を整えるとともに、上記の発生・生殖工学技術を用いた研究支援を行っている。また、近年、急速に発展しているゲノム編集法を活用した遺伝子改変動物作製についても、実験条件を整え、利用者からの依頼を受託している。

これらの実験技術を駆使して、動物実験環境をSpecific Pathogen Free (SPF)環境に保持し、かつ計画的な動物の生産による迅速な研究の実施にも貢献している。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Uchigashima M, Konno K, Demchak E, Cheung A, Watanabe T, Keener D G, Abe M, Sakimura K, Sasaoka T, Uemura T, Imamura Karasawa Y, Watanabe M, Futai K.
Specific Neuroligin3- α Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse hippocampus. *Elife* 2020 Dec 23;9:e59545. doi: 10.7554/eLife.59545.
2. Ran Q, Zhou Q, Oda K, Yasue A, Abe M, Ye X, Li Y, Sasaoka T, Sakimura K, Ajioka Y, Saijo Y.
Generation of thyroid tissues from embryonic stem cells via blastocyst complementation in vivo. *Frontiers in Endocrinology, section Thyroid Endocrinology*, 2020 *Frontiers in Endocrinology* 14 December 2020 <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.609697>
3. 齊藤 奈英, 笹岡 俊邦
ドーパミンおよびNMDA受容体と大脳基底核回路の機能解析 *BRAIN and NERVE* 72巻11号 1135-1142 (2020年11月) DOI <https://doi.org/10.11477/mf.1416201666>
4. Yamaguchi T, Sumida T, Nomura S, Satoh M, Higo T, Ito M, Ko T, Fujita K, Haywood M, Sanbe A, Yoshimi K, Manabe I, Sasaoka T, Taylor M, Toko H, Takimoto E, Naito A, Komuro I.
Cardiac Dopamine D1 Receptor Triggers Ventricular Arrhythmia in Chronic Heart Failure. *Nature Communications*, 2020 Aug 31; 11(1):4364. doi: 10.1038/s41467-020-18128-x.
5. Saito N, Tainaka K, Macpherson T, Hikida T, Yamaguchi S, Sasaoka T.
Neurotransmission through dopamine D1 receptor is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex. *Neuroscience Research* 2020 Jul; 156:58-65. doi: 10.1016/j.neures.2020.04.006.
6. Kitahara A, Ran Q, Oda K, Yasue A, Abe M, Ye X, Sasaoka T, Tsuchida M, Sakimura K, Ajioka Y, Saijo Y, Zhou Q.
Generation of Lungs by Blastocyst Complementation in Apneumic Fgf10-Deficient Mice. *Cell Reports* 2020 May 12;31(6):107626. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107626.

IV 共同研究

以下の新潟大学脳研究所共同利用共同研究課題、および国際共同研究課題について、主に遺伝子改変マウス作成・解析実験、胚操作実験技術を利用して研究を推進している。

- (1) 令和2年度 共同利用・共同研究（プロジェクト型）
遺伝子改変マウスを用いた大脳基底核疾患の病態生理の解析
研究代表者：知見 聡美 助教（生理学研究所）
- (2) 令和2年度 共同利用・共同研究（連携資源利用型）
モノアミン神経伝達物質合成関連遺伝子の組織特異的破壊による生理機能変化の解析
研究代表者：一瀬 宏 教授（東京工業大学生命理工学院）
- (3) 令和2年度 共同利用・共同研究（連携資源利用型）
脳研究に必須な遺伝子改変マウスの系統保存に重要な培養条件の検討
研究代表者：久慈 直昭 教授（東京医科大学）

他17件

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授（兼）	笹岡 俊邦	実験補助	矢部 恵稚子
准教授	阿部 学	実験補助	大堀 千洋
助教	中務 胞	実験補助	石本 菜穂子
特任助教	川村 名子	実験補助	早川 香織
技術職員	夏目 里恵	実験補助	小幡 桃子
フェロー	崎村 建司	実験補助	小林 智子
非常勤講師	田中 恵子	実験補助	渡邊 ユリ
特任助手	望月 雪絵		

II 研究活動

本分野では脳機能の分子機構解明を目的として、現分野の前身である旧細胞神経生物学分野より継続して多方向から研究を展開しており、それは大きく分けて4つに分類される。第1は、シナプス伝達、可塑性調節、シナプス形成に関与する分子群の機能を個体レベルで検証するために、当該分子を標的とした遺伝子改変マウスを作製して解析をおこなう研究である。第2は、脳におけるグルタミン酸受容体分子群の機能を正しく評価するためにおこなう当該タンパクの定量である。第3は、新たな脳機能解析に資するモデル動物を作製するための技術開発である。第4は、我々の持つ脳機能解析に特化した遺伝子改変マウス作製技術とリソースを研究者コミュニティに供与する支援活動である。以下にその内容を述べる。

- 1) シナプス伝達、可塑性調節、シナプス形成に関与する分子群の機能を個体レベルで検証する研究では、我々の持つ高度な遺伝子改変技術を用いて、複雑なコンディショナルノックアウトや標的分子の一部機能の制御などが可能なマウスを作出し、共同研究ベースで解析をおこない多くの成果をあげた。
- 2) グルタミン酸受容体は興奮性シナプス伝達の基盤を担う分子群であり、我々はこれら分子のクローニングを端緒として長くその機能を解析し、多くのことを明らかにしてきた。しかし、分子レベルでの機能を正しく評価するためには、働いているグルタミン酸受容体の分子組成が明確でなければならない。この問題を解決するために、グルタミン酸受容体チャネルを構成するサブユニットの定量をおこなってきた。これまでに、特異抗体を用いた定量的ウエスタンブロット法を開発し、脳の部位や細胞画分におけるAMPA型、NMDA型、カイニン酸型、デルタ型を構成する各サブユニットタンパクの定量を行なっている。
- 3) 新たな脳機能解析に資するモデル動物を作製するための技術開発を行ってきた。遺伝子ノックアウトマウスは、現在脳機能解析の中心となっているが、より高度な解析を遂行するためにはマウスより賢く、大きな動物が求められてきた。その代表がラットである。ラットは、マウスより大きく外科的な処置や経時的な生体試料の取得などが容易であり、何よりも賢く複雑な行動解析が可能になる。遺伝子改変ラットは長く求められていたが、ES細胞の樹立が困難でなかなか成就しなかった。しかし最近のiPS細胞の研究の進展により、未分化状態を保つ様々な薬剤が開発されたことでES細胞が樹立されてノックアウトラットが現実のものになった。しかし、

遺伝子改変ラットの樹立には膨大な経費と時間が掛かる難点がある。我々は、遺伝子改変ラットを安価かつ容易に作製する方法を確立し、ノックアウトマウスと同様の感覚でノックアウトラットを研究リソースとして利用できる基盤を作ることを計画した。そのために、SD、BN、Wistarラットなど複数の系統からES細胞を樹立し、相同組換えによる遺伝子改変ラット作製法を確立した。さらに、精巣形成不全マウスにラットES細胞を導入して胚盤胞補完法によりマウス体内でラット精子を作出し、顕微授精に適用することで産子が得られたことから、安価で容易に遺伝子改変ラットが作製できる技術の開発に成功したと言える。また、この技術を最近ヒト脳機能解析のモデル動物として注目されている霊長類のマーモセットに応用しようと現在取り組んでいる。従来廃棄されていた実験死動物や病死したマーモセット卵巣の供与を受け、それらの卵巣をヌードマウスに移植して成熟卵を取得する手法の開発をおこなっている。また、胚盤胞補完法により遺伝子改変マーモセットの精子を取得すべく基礎的な条件検討をおこなっている。

- 4) 我々は、C57BL/6系統マウスから独自にES細胞株RENKAを樹立して、コンディショナルノックアウトを中心に脳機能解析に資する遺伝子改変マウスを500系統以上樹立して脳研究コミュニティに供与してきた。これらの活動は、新学術研究「包括脳」、それに引き続き新学術研究「モデル動物支援プラットフォーム」の事業として継続されている。さらに新潟大学脳研究所共同利用・共同研究の柱の一つとして支援事業展開をおこなっている。この10年間で包括脳、マウス作製支援プラットフォーム事業として合計161件（令和2年度、19件）のマウス作製支援をおこなった。さらに、脳研究所の事業である全国共同利用・共同研究で合計86件（令和2年度、5件）の支援をおこなった。

以上、この10年間これら4方面から遂行した研究の成果として、いわゆる一流紙を含めて176編（令和2年度、15編）の論文を発表することができた。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Yamashiro, K., Hori, K., Lai, E.S.K., Aoki, R., Shimaoka, K., Arimura, N., Egusa, S.F., Sakamoto, A., Abe, M., Sakimura, K., et al. (2020). AUTS2 Governs Cerebellar Development, Purkinje Cell Maturation, Motor Function and Social Communication. *iScience* 23, 101820.
2. Uchigashima, M., Konno, K., Demchak, E., Cheung, A., Watanabe, T., Keener, D.G., Abe, M., Le, T., Sakimura, K., Sasaoka, T., et al. (2020). Specific Neuroligin3- α Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse hippocampus. *eLife* 9, e59545.
3. Takahashi, T.M., Sunagawa, G.A., Soya, S., Abe, M., Sakurai, K., Ishikawa, K., Yanagisawa, M., Hama, H., Hasegawa, E., Miyawaki, A., et al. (2020). A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature* 583, 109-114.
4. Ran, Q., Zhou, Q., Oda, K., Yasue, A., Abe, M., Ye, X., Li, Y., Sasaoka, T., Sakimura, K., Ajioka, Y., et al. (2020). Generation of Thyroid Tissues From Embryonic Stem Cells via Blastocyst Complementation In Vivo. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 609697.
5. Nakamoto, C., Konno, K., Miyazaki, T., Nakatsukasa, E., Natsume, R., Abe, M., Kawamura, M., Fukazawa,

- Y., Shigemoto, R., Yamasaki, M., et al. (2020). Expression mapping, quantification, and complex formation of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 528, 1003-1027.
6. Nakamoto, C., Kawamura, M., Nakatsukasa, E., Natsume, R., Takao, K., Watanabe, M., Abe, M., Takeuchi, T., and Sakimura, K. (2020). GluD1 knockout mice with a pure C57BL/6N background show impaired fear memory, social interaction, and enhanced depressive-like behavior. *PloS one* 15, e0229288.
 7. Luo, L., Ambrozkiwicz, M.C., Benseler, F., Chen, C., Dumontier, E., Falkner, S., Furlanis, E., Gomez, A.M., Hoshina, N., Huang, W.H., et al. (2020). Optimizing Nervous System-Specific Gene Targeting with Cre Driver Lines: Prevalence of Germline Recombination and Influencing Factors. *Neuron* 106, 37-65.e35.
 8. Kitahara, A., Ran, Q., Oda, K., Yasue, A., Abe, M., Ye, X., Sasaoka, T., Tsuchida, M., Sakimura, K., Ajioka, Y., et al. (2020). Generation of Lungs by Blastocyst Complementation in Apneumic Fgf10-Deficient Mice. *Cell reports* 31, 107626.
 9. Kiguchi, N., Uta, D., Ding, H., Uchida, H., Saika, F., Matsuzaki, S., Fukazawa, Y., Abe, M., Sakimura, K., Ko, M.C., et al. (2020). GRP receptor and AMPA receptor cooperatively regulate itch-responsive neurons in the spinal dorsal horn. *Neuropharmacology* 170, 108025.
 10. Kawai, T., Kayama, K., Tatsumi, S., Akter, S., Miyawaki, N., Okochi, Y., Abe, M., Sakimura, K., Yamamoto, H., Kihara, S., et al. (2020). Regulation of hepatic oxidative stress by voltage-gated proton channels (Hv1/VSOP) in Kupffer cells and its potential relationship with glucose metabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34, 15805-15821.
 11. Ikegaya, S., Iga, Y., Mikawa, S., Zhou, L., Abe, M., Sakimura, K., Sato, K., and Yamagishi, S. (2020). Decreased Proliferation in the Neurogenic Niche, Disorganized Neuroblast Migration, and Increased Oligodendrogenesis in Adult Netrin-5-Deficient Mice. *Frontiers in neuroscience* 14, 570974.
 12. Ikeda, H., Yonemochi, N., Mikami, R., Abe, M., Kawamura, M., Natsume, R., Sakimura, K., Waddington, J.L., and Kamei, J. (2020). Central dopamine D(2) receptors regulate plasma glucose levels in mice through autonomic nerves. *Scientific reports* 10, 22347.
 13. Horie, M., Yoshioka, N., Kusumi, S., Sano, H., Kurose, M., Watanabe-Iida, I., Hossain, I., Chiken, S., Abe, M., Yamamura, K., et al. (2020). Disruption of dystonin in Schwann cells results in late-onset neuropathy and sensory ataxia. *Glia* 68, 2330-2344.
 14. Hori, K., Yamashiro, K., Nagai, T., Shan, W., Egusa, S.F., Shimaoka, K., Kuniishi, H., Sekiguchi, M., Go, Y., Tatsumoto, S., et al. (2020). AUTS2 Regulation of Synapses for Proper Synaptic Inputs and Social Communication. *iScience* 23, 101183.
 15. Hirose, Y., Kitazono, T., Sezaki, M., Abe, M., Sakimura, K., Funato, H., Handa, H., Vogt, K.E., and Yanagisawa, M. (2020). Hypnotic effect of thalidomide is independent of teratogenic ubiquitin/proteasome

pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 117, 23106-23112. *metry Imaging, iScience* **20**, 359-372, doi:10.1016/j.isci.2019.09.036 (2019).

IV 共同研究

- | | |
|----------|---|
| (1) 研究題目 | 「新潟大学脳研究所 共同利用・共同研究」 |
| 研究内容 | C57BL/6系統ES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製支援 |
| 参加機関 | 東京大学、東北大学、北海道大学、関西医科大学 |
| | |
| (2) 研究題目 | 「学術研究支援基盤形成「モデル動物支援プラットフォーム」」 |
| 研究内容 | 高品質遺伝子改変マウス作製 |
| 参加機関 | 東京大学、京都大学、大阪大学、新潟大学、他 |
| | |
| (3) 研究題目 | 「遺伝子改変動物の作製に有用なES細胞の作成・評価」 |
| 研究内容 | C57BL/6由来ES細胞RENKAを用いた、遺伝子改変マウス作製方法に関する新規技術開発 |
| 参加機関 | 株式会社トランスジェニック、新潟大学 |
| | |
| (4) 研究題目 | 「自己免疫性脳炎の診断方法の確立」 |
| 研究内容 | 自己免疫性脳炎の原因と考えられる各種抗原の測定方法を確立し、臨床現場で利用可能にする |
| 参加機関 | 株式会社コスミックコーポレーション、新潟大学 |

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授 小野寺 理（兼任）
助教 須貝 章弘
特任准教授 加藤 泰介
特任助手 廣川 祥子

II 研究活動

本教室は神経疾患の分子生物学的解析により、病態機序を明らかにし、最終的には神経疾患の有効な治療方法の開発を行うこと目的としている。本学脳研究所神経内科学教室と共に、臨床との融合拠点として活動を推進している。また病理学教室、動物実験施設、遺伝子実験施設を中心とする、脳研究所の各教室、および国内、国外の研究室とも共同研究を推進している。当施設では特に遺伝性脳小血管病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄小脳変性症の各疾患について研究を推進している。

脳小血管の異常で引き起こされる病態である脳小血管病は、一般的には老化や生活習慣病などが原因であるが、一部は単一遺伝子異常により引き起こされる。当施設ではこのうち、high-temperature requirement A serine peptidase 1 (*HTRA1*) の遺伝子変異で生じる cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) を主要な研究対象としており、原著論文と総説を発表した。また、Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy (RVCL) の原因遺伝子であるthree-prime repair exonuclease-1 (*TREX1*) の毒性機能獲得メカニズムを研究に取り組んでいる。遺伝子遺伝性脳小血管病を疑った症例の遺伝子サンプルを全国から収集し、エクソーム解析、分子病態機序の解析、臨床症状との対応を検討している。日本における遺伝性脳小血管病についての調査を行っている。

運動ニューロンが選択的に変性する難治性の神経変性疾患であるALSに対しては、その病態の主体であるTDP-43を中心に研究を進めている。TDP-43発現調整機構の解明から、ALS病態における意義、これを踏まえた治療戦略を研究している。臨床から基礎、基礎から臨床への応用という両方からの視点をもった研究を展開している。また、病理学分野と連携し、病理学的に診断が確定したALS連続症例における原因遺伝子の解析を行っている。

常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症であるDRPLA（歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症）に対して、ゲノム編集技術を用いた治療法の開発を行っている。また、脊髄小脳変性症の原因タンパク質に関連するエクソームの研究を行っている。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Masahiro Uemura, Hiroaki Nozaki, Taisuke Kato, Akihito Koyama, Naoko Sakai, Shoichiro Ando, Masato Kanazawa, Nozomi Hishikawa, Yoshinori Nishimoto, Kiran Polavarapu, Atchayaram Nalini, Akira Hanazono, Daisuke Kuzume, Akihiro Shindo, Mohammad El-Ghanem, Arata Abe, Aki Sato, Mari Yoshida, Takeshi Ikeuchi, Ikuko Mizuta, Toshiki Mizuno, Osamu Onodera. HTRA1-Related Cerebral Small Vessel Disease: A Review of the Literature. *Frontiers in neurology* 2020. 11 545-545.
2. Taisuke Kato, Yumi Sekine, Hiroaki Nozaki, Masahiro Uemura, Shoichiro Ando, Sachiko Hirokawa,

Osamu Onodera. Excessive Production of Transforming Growth Factor β 1 Causes Mural Cell Depletion From Cerebral Small Vessels. *Frontiers in aging neuroscience* 2020. 12 151-151.

3. Kosei Nakamura, Akihiro Sugai, Etsuji Saji, Kensaku Kasuga, Osamu Onodera. Refractory Myositis Affecting the Intrinsic Muscles of the Hand. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 2020. 59(9) 1211-1214.
4. Yuya Hatano, Akihiro Sugai, Takuma Yamagishi, Akihiro Nakajima, Akiyoshi Kakita, Osamu Onodera. [Amyloid β -related angiitis presenting extensive brain involvement without detection of hemorrhagic lesions: A case report]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology* 2020. 60(3) 187-192.
5. Sou Kasahara, Tomohiko Ishihara, Yuka Koike, Akihiro Sugai, Osamu Onodera. [Molecular mechanism of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from the viewpoint of the formation and degeneration of transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) inclusions]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology* 2020. 60(2) 109-116.

IV 共同研究

1. 研究題目 「HtrA1欠損マウスにおける脳小血管の機能解析」
研究内容 CARASILモデルマウスにおける脳血流の解析
参加機関 国立循環器病循環器病研究センター
2. 研究題目 「神経疾患患者からのiPS細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」
研究内容 遺伝性神経疾患患者からのiPS細胞の樹立とそれを用いた疾患解析
参加機関 慶應義塾大学
3. 研究題目 「ゲノム編集を介した遺伝子サイレンシングによるDRPLA治療法の開発」
研究内容 ウィルスベクター投与による変異ヒトATN1遺伝子ゲノム編集
参加機関 生理学研究所、東京大学

脳病態解析分野

I 研究組織（構成員 令和3年3月31日現在）

教授	松井 秀彰
准教授	菱田 竜一
准教授	杉江 淳
助教	土肥 栄祐
学振PD特別研究員	新田 陽平
遺伝医療支援センター医員	入月 浩美
小児科博士課程	古寺 一樹
脳神経内科博士課程	加藤 怜
実験補助	松井 典子
実験補助	小林 科野
実験補助	杉江 歩美

II 研究活動

松井グループ

私達は試験管、培養細胞、モデル動物（小型魚類、ハエ、マウスなど）、ヒトサンプルと様々な研究対象を解析することで、ヒトの脳内で起きている現象を明らかにしようとしている。特に脳・神経機能の異常によっておこる疾患や障害の原因を明らかにし、その治療や理解に結びつける。現在最も力を入れているのは、パーキンソン病などの神経変性疾患、自閉症などの小児神経精神疾患、全身の老化および加齢関連疾患である。我々人類は系統図において魚類を経て進化してきた。確かにヒトにしかない構造物もあるにはある。しかし実はほとんどの脳・神経の構造や機能は既に魚の段階から存在する。さらに小型魚類においてヒト疾患と同様の病態を再現することも可能である。私達の研究室では小型魚類を中心に様々な研究材料を駆使し、そこにおいて再現されるヒト疾患の病態を解明しさらに治療することで、これまで難しかったヒト神経精神疾患・障害・加齢関連の難治性疾患等の治療や理解につなげていく。

杉江グループ

脳の神経回路は、通常は生涯に渡ってその機能を維持し続ける。そのためターンオーバーによって健全な組織を維持する他の体細胞と異なり、回路を形成している神経細胞は独自の細胞間相互作用によって長期的に健康状態を保つメカニズムを有していると考えられる。これが破綻すると老化または神経変性疾患や精神疾患へと繋がることが予想される。しかし、神経細胞を維持するために機能する細胞間コミュニケーション機構は調査に要する期間が非常に長く、十分解明されていない。私達は個体の生活環サイクルが短く重複遺伝子が少ないショウジョウバエのメリットを活かし、複雑な遺伝子解析を迅速に推進しこの問題に取り組んでいる。そして、神経細胞間で情報伝達の間となるシナプスや、隣接細胞間を隔てる細胞膜を構成するリン脂質の代謝に焦点を当てた細胞間相互作用解明に向けた研究を進めている。これらの研究から、シナプスや脂質代謝の適切な調節による新規神経保護の分子基盤の知見の提案し、従来説明がつかなかった神経変性疾患や精神疾患の脳回路で起こる障害の実体解明につなげることを目指す。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1: Sato, H., Kamimura, K., **Matsui, H.**, Owaki, T., Morita, S., Tanaka, Y., Ishikawa, N., Shimada, Y., Yokoyama, J., Wakai, T., Terai, S. Esophageal High-resolution Manometry for Diagnosing the Severity of the Chronic Intestinal Pseudo-obstruction: A Case Series. *Digest. Dis. Sci.*

2: Nyuzuki, H., Ito, S., Nagasaki, K., Nitta, Y., Matsui, N., Saitoh, A., **Matsui, H.*** Degeneration of dopaminergic neurons and impaired intracellular trafficking in Atp13a2 deficient zebrafish. *IBRO Rep.* 9:1-8, 2020.

IV 共同研究

(1) 研究題目：「ヒトと魚類の比較検討によるパーキンソン病の病因解明」

研究内容：パーキンソン病に対して様々なステップにおいて介入することを目的とし、その病態研究をヒトサンプルと小型魚類などを活用して行う。

参加機関：武田薬品工業株式会社

(2) 研究題目：「PI4P 駆動型脂質対向輸送システムの分子機構とその生理機能の解明」

研究内容：小胞体と細胞膜が近接した膜接触部位において、異なる脂質が小胞体と細胞膜の間で交換輸送される仕組み（脂質対向輸送機構）とその生理的機能を明らかにする。

参加機関：新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞機能学 中津史准教授

(3) 研究題目：「自律神経調節による非アルコール性脂肪性肝疾患の治療への基盤研究」

研究内容：肝臓、神経、腸管などの臓器連関に注目し、非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明を行う。

参加機関：新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器内科学分野 寺井崇二教授、新潟大学医学部医学科 総合診療学講座 上村顕也特任教授

(4) 研究題目：「シヌクレインパチーにおける病態伝播マスター遺伝子の網羅的探索」

研究内容： α シヌクレインによる病態伝播に関わる因子を特定し、伝播機序を明らかにする。

参加機関：大阪大学 永井義隆教授、東京都医学総合研究所 鈴木マリ主任研究員

(5) 研究題目：「モデル動物等研究コーディネーティングネットワークによる希少・未診断疾患の病因遺伝子変異候補の機能解析研究」

研究内容：未診断疾患の原因となる可能性のある遺伝子変異の効果を評価し、確定診断につなげる。

参加機関：国立遺伝学研究所 井ノ上逸朗教授

3. 社会との連携

新潟神経学脳研セミナー

共同研究拠点国際シンポジウム

脳研究所・生理学研究所・霊長類研究所合同シンポジウム

新潟ジュニアドクター育成塾

スーパーサイエンスハイスクール（SSH）事業

見てみようヒトの脳と心

第50回 新潟神経学 脳研セミナー

Brain Seminar

若手研究者による
脳科学研究の最前線

オンライン
開催
(Zoom)
[定員]
300人

2021.2.18 木

主催：新潟大学脳研究所 新潟脳神経研究会

プログラム

- | | | |
|-------------|---|-----------------------------------|
| 10:30-10:40 | Opening Remark | |
| 10:40-11:20 | Epigenomic Modification-Induced Synaptic Mechanisms Underlying the Pathology of Schizophrenia | 長濱 健一郎 (Johns Hopkins大) |
| 11:20-12:00 | Utility-dependent stimulus selection during hippocampal memory reactivation and replay | 寺田 慧 (Columbia大) |
| 13:00-13:40 | オリゴデンドロサイト前駆細胞の多様性 | 眞木 崇州 (京大・医) |
| 13:40-14:20 | 延髄C1ニューロンを介する未病改善の可能性 | 安部 力 (岐阜大) |
| 14:30-15:10 | TDP-43の光遺伝学相転移を用いた筋萎縮性側索硬化症(ALS)病態の探究 | 浅川 和秀 (東京医科大) |
| 15:10-15:50 | 学習に伴う海馬情報リプレイの変化とその意義 | 佐々木 拓哉 (東大・薬) |
| 16:00-16:40 | すきまから観る脳:アストロサイトの病態生理学 | 長井 淳 (理研CBS) |
| 16:40-17:20 | Spinal excitatory interneurons define age-dependent locomotor circuit plasticity after spinal cord injury | Aya Takeoka (NERF) |
| 17:30-18:10 | Prediction error-dependent modulation of sensory processing in primary visual cortex | 古舘 昌平 (University College London) |
| 18:10-18:20 | Closing Remark | |

参加申込方法

脳研セミナーの申込フォームから →



詳細は脳研究所ホームページをご覧ください。

新潟 脳研

検索

問合せ

〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757 新潟大学脳研究所 脳研セミナー事務局
TEL: 025-227-0388 FAX: 025-227-0507 E-mail: seminar@bri.niigata-u.ac.jp URL: <http://www.bri.niigata-u.ac.jp>

本セミナーは日本神経学会認定医更新取得単位の対象です。

The 11th BRI International Symposium

第11回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム

FROM SINGLE CELL TO SYSTEMS NEUROSCIENCE



Friday 19 February 2021

9:00 to 18:10 (Japan time)

Online via Zoom

SPEAKERS



VALENTIN NÄGERL
Université de Bordeaux



LOREN LOOGER
HHMI Janelia / UC San Diego



HIROFUMI MORISHITA
Mount Sinai, NY



HIROSHI ITO
Max Planck, Frankfurt



YUKIKO GODA
RIKEN



YASUSHI OKADA
RIKEN / The Univ. of Tokyo



TAKEHARU NAGAI
Osaka Univ.



TOMOMI NEMOTO
NINS-ExCELLS



AKIKO HAYASHI-TAKAGI
RIKEN



MASANORI MURAYAMA
RIKEN



ITARU IMAYOSHI
Kyoto Univ.



KAZUNARI MIYAMICHI
RIKEN



SAKIKO HONJOH
Univ. Tsukuba IIIS

REGISTER NOW!



bit.ly/2LLv4W4

＜問い合わせ先＞ 新潟大学脳研究所事務局

〒951-8585 新潟市中央区旭町通一番町757

Phone: 025-227-0388 Email: seminar@bri.niigata-u.ac.jp

www.bri.niigata-u.ac.jp

 [@ngt_nouken_eng](https://twitter.com/ngt_nouken_eng)

第11回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム "From single cell to systems neuroscience"

2021年2月19日 (金)

Japan time				
9:00	9:10	Opening Remark	Osamu Onodera	BRI, Niigata Univ.
9:10	9:50	New tools for monitoring & manipulating neural circuits	Loren Looger	HHMI Janelia, UCSD
9:50	10:20	Mechanisms Driving Cognitive Control Circuit Maturation	Hirofumi Morishita	Mount Sinai, NY
Rest 10 min				
10:30	11:00	Extra-large spines distort dendritic and neuronal computation in psychiatric disorders: Reconsideration of pathophysiology of schizophrenia	Akiko Hayashi-Takagi	RIKEN
11:00	11:30	Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expressions	Itaru Imayoshi	Kyoto Univ.
11:30	12:00	Neural Circuit Dynamics in Life-stage Transition to Parents	Kazunari Miyamichi	RIKEN
Lunch 60 min				
13:00	13:40	A trans-scale-scope for exploring rare cellular activity in more than one million cells	Takeharu Nagai	Osaka Univ.
13:40	14:20	Development of fluorescent probes for live imaging of cellular states	Yasushi Okada	RIKEN/Univ. Tokyo
14:20	14:50	Thalamic regulation of sleep and wakefulness	Sakiko Honjoh	Univ. Tsukuba IIIS
Rest 5 min				
14:55	15:35	Rules for distributing synaptic weights in hippocampal neurons	Yukiko Goda	RIKEN
15:35	16:05	Fast, cell-resolution, contiguously-wide two-photon imaging for understanding functional cortical network architectures	Masanori Murayama	RIKEN
16:05	16:45	<i>in vivo</i> two-photon microscopic observation by realized by laser light modulation and novel material	Tomomi Nemoto	NINS-ExCELLS
Rest 5 min				
16:50	17:20	Persistent coding of spatial goals in ensemble dynamics of prefrontal cortex	Hiroshi Ito	Max Planck, Frankfurt
17:20	18:00	Nanoscale functional neuroanatomy using STED microscopy	Valentin Nägerl	Univ. Bordeaux
18:00	18:10	Closing Remark	Takayasu Mikuni	BRI, Niigata Univ.

第 10 回
生理研－霊長研－新潟脳研
合同シンポジウム
The 10th NIPS-PRI-BRINU
Joint Symposium

DATE

12th – 13th,
March, 2021

Venue

Zoom & Remo

Symposium Agenda

DAY 1: March, 12		
13:00 -	Reception	Zoom
13:30	Opening remarks Junichi Nabekura, Director-General, NIPS 鍋倉淳一 生理学研究所 所長 Chair: Keiichi Kitajo, Division of Neural Dynamics, NIPS 司会：北城圭一 生理学研究所 神経ダイナミクス研究部門	
13:40 -	Session 1	Zoom
15:20	Chair: Hiroki Kitaura Department of Pathology, BRI, Niigata University 座長：北浦弘樹 新潟大学脳研究所 病理学分野	
13:40 -	Establishment of cell lines and xenografts for the realization of precision medicine in brain tumor patients	
14:10	Manabu Natsumeda, Department of Neurosurgery, BRI, Niigata University 囊田学 新潟大学脳研究所 脳神経外科	
14:10 -	Break	
14:15		
14:15 -	Efficient generation of genetically modified rats via blastocyst complementation	
14:45	Toshihiro Kobayashi, Section of Mammalian Transgenesis, NIPS 小林俊寛 生理学研究所 遺伝子改変動物作製室	
14:45 -	Break	
14:50		
14:50 -	3D histopathologic analysis of degenerative vasculature and white matter in CADASIL, HTRA1-autosomal dominant disease and sporadic small-vessel disease	
15:20	Rie Saito, Department of Pathology, BRI, Niigata University 齋藤理恵 新潟大学脳研究所 病理学分野	
15:20 -	Photo Session & Break	Zoom
15:30		

15:30 -	Session 2	Zoom
17:10	Chair: Masahiko Takada Systems Neuroscience Section, PRI 座長：高田昌彦 京都大学霊長類研究所 統合脳システム分野	
15:30 -	Gene therapy for DRPLA model mice by AAV-delivered CRISPR/Cas9	
16:00	Taisuke Kato, Department of Molecular Neuroscience, BRI, Niigata University 加藤泰介 新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野	
16:00 -	Break	
16:05		
16:05 -	Neural regulation of taste perception and feeding	
16:35	Fu Ou, Division of Endocrinology and Metabolism, NIPS 傅欧 生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門	
16:35 -	Break	
16:40		
16:40 -	The role of the substantia nigra pars lateralis in object skill learning	
17:10	Hidetoshi Amita, Systems Neuroscience Section, PRI, Kyoto University 網田英敏 京都大学霊長類研究所 統合脳システム分野	
17:10 -	Remarks	
17:20	Osamu Onodera, Director, BRI, Niigata University 小野寺理 新潟大学脳研究所 所長	
17:20 -	Break & Poster preparation	Remo
17:30		
17:30 -	Poster session & Information exchange meeting	Remo
19:30		

DAY 2: March, 13

09:00 - Reception and Refreshments

Zoom

09:30 - Session 3

Zoom

10:45 Chair: Takayasu Mikuni

Department of Cellular Neuropathology, BRI, Niigata University

座長：三國貴康 新潟大学脳研究所 細胞病態学分野

09:30 - Visualizing neuronal circuits controlling circadian and ultradian calcium rhythms in mammals

Ryosuke Enoki, Division of Biophotonics, NIPS

榎木亮介 生理学研究所 バイオフィotonics研究部門

10:00 - Break

10:05

10:05 - Methodological development for high-throughput localization analysis of synaptic proteins in vivo

Motokazu Uchigashima, Department of Cellular Neuropathology, BRI, Niigata University

内ヶ島基政 新潟大学脳研究所 細胞病態学分野

10:35 - Break

10:45

10:45 - Session 4

Zoom

11:50 Chair: Yumiko Yoshimura

Division of Visual Information Processing, NIPS

座長：吉村由美子 生理学研究所 視覚情報処理研究部門

10:45 - Forelimb movements evoked by optogenetics in the macaque motor cortex

11:15 Hiromi Sano, Division of System Neurophysiology, NIPS

佐野裕美 生理学研究所 生体システム研究部門

11:15 - Break

11:20

11:20 - Hyperscanning fMRI to reveal neural basis of social interaction

11:50 Takahiko Koike, Division of Cerebral Integration, NIPS

小池耕彦 生理学研究所 心理生理学研究部門

11:50 - Closing remarks

12:00 Masahiko Takada, Professor, PRI, Kyoto University

高田昌彦 京都大学霊長類研究所 教授

# poster/table	Poster List
P1	Effect of auditory stimulation on visual perception in macaque monkeys Hiroshi Nishimura, Cognitive Neuroscience Section, PRI, Kyoto University 西村 洋志 京都大学 霊長類研究所 高次脳機能分野
P2	Analyses of the sound-evoked offset motion in the cochlea Takeru Ota, Division of Glocal Pharmacology, Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Osaka University 太田 岳 大阪大学大学院医学系研究科 薬理学講座 統合薬理学 分子生理学分野
P3	Hardness perception by multimodal integration and the underlying cortical mechanisms revealed by an fMRI experiment Narumi Katsuyama, Cognitive Neuroscience Section, PRI, Kyoto University 勝山成美 京都大学霊長類研究所 高次脳機能分野
P4	Elucidation of motor control and aversive memory formation mechanism by dopamine using dopamine D1 receptor gene modified mice Toshikuni Sasaoka, Department of Comparative & Experimental Medicine, BRI, Niigata University 笹岡俊邦 新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野
P5	Effective expression level of the anti-epileptic complex, LGI1-ADAM22, is maintained by ADAM22 phosphorylation Norihiko Yokoi, Division of Membrane Physiology, NIPS 横井紀彦 生理学研究所 生体膜研究部門
P6	Phosphorylation of GAP-43 T172 is a molecular marker of growing axons in a wide range of mammals including primates Masayasu Okada, Department of Neurosurgery, BRI, Niigata University 岡田正康 新潟大学脳研究所 脳神経外科
P7	The role of P2Y6R in pressure overload-induced heart failure Kakeru Shimoda, Division of Cardiocirculatory Signaling, NIPS 下田 翔 生理学研究所 心循環シグナル研究部門

P8	Understanding the functional significance of metastability in the brain by mathematical modeling Mahoko Suzuki, Division of Neural Dynamics, NIPS 鈴木万穂子 生理学研究所 神経ダイナミクス研究部門
P9	Effects of long-term SF1 neuron modulation on obesity Misbah Rashid, Endocrinology and Metabolism, NIPS
P10	Gi/o- and Gq-coupled receptors activate the THIK-2 channel Michihiro Tateyama, Division of Biophysics and Neurobiology, NIPS 立山充博 生理学研究所 神経機能素子研究部門
P11	Single-cell brain transcriptome analysis in autism model marmosets Yasuhiro Go, Cognitive Genomics Research Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), NIPS 郷 康広 生理学研究所 生命創成探究センター 認知ゲノム研究グループ
P12	High resolution imaging of the human inner ear using 7T-MRI Masaki Watanabe, Center for Integrated Human Brain Science, BRI, Niigata University 渡辺将樹 新潟大学脳研究所 統合脳機能研究センター
P13	Neural substrates of accurate time perception - An fMRI study Maho Hashiguchi, Division of Cerebral Integration, NIPS 橋口真帆 生理学研究所 心理生理研究部門
P14	Gene expression analysis in human postmortem brain Liu Lixin, Department of Molecular Genetics, BRI, Niigata University リュウ リキン 新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析分野
P15	Synaptic reconfiguration in motor cortex underlies acquisition of proficient motor skill Jaerin Sohn, Division of Cerebral Circuitry, NIPS 孫在隣 生理学研究所 大脳神経回路論研究部門

- P16

Construction of autoantibody-detection panel against synapse-related antigens to diagnose autoimmune encephalitis and exploring the pathogenesis of antibody-mediated neurological disorders
Keiko Tanaka, Department of Animal Model Development, BRI, Niigata University
田中恵子 新潟大学脳研究所 モデル動物開発分野
- P17

Whole brain imaging of Iba1-positive CNS macrophage
Hitoshi Uchida, Department of Cellular Neuropathology, BRI, Niigata University
内田仁司 新潟大学脳研究所 細胞病態学分野
- P18

Investigation of the interaction between TRPV3 and TMEM79 in mouse skin keratinocytes
Jing Lei, Division of Cell Signaling, NIPS
Jing Lei 生理学研究所 細胞生理研究部門
- P19

Perinatal Epidermal Growth Factor Signal Perturbation Results in the Series of Abnormal Auditory Neurophysiological Responses Relevant to Schizophrenia
Hiroyoshi Inaba, Department of Molecular Neurobiology, BRI, Niigata University
稲葉洋芳 新潟大学脳研究所 分子神経生物学分野
- P20

Cortical information dynamics of active vision in the whole lateral hemisphere of the marmoset brain
Takaaki Kaneko, Systems Neuroscience Section, PRI, Kyoto University
兼子峰明 京都大学霊長類研究所 統合脳州ステム分野
- P21

Two-photon STED nanoscopy with novel pulse laser system for deeper super-resolution imaging
Hirokazu Ishii, Division of Biophotonics, NIPS
石井宏和 生理学研究所 バイオフォトンクス研究部門
- P22

A mosaic AAV vector as a versatile tool that exhibits high levels of transgene expression and neuronal specificity in primate brain
Kei Kimura, Systems Neuroscience Section, PRI, Kyoto University
木村慧 京都大学霊長類研究所 統合脳システム分野

- P23

Epileptogenic mechanisms in resected foci of tuberous sclerosis and focal cortical dysplasia
Kitaura Hiroki, Department of Pathology, BRI, Niigata University
北浦弘樹 新潟大学脳研究所
- P24

State-dependent changes in optimal spatial frequencies in the primary visual cortex
Wu Jiahao, Division of Visual Information Processing, NIPS
呉嘉豪 生理学研究所 視覚情報処理研究部門
- P25

Reactivation of astrocytes can reverse chronic pain
Ikuko Takeda, Division of Homeostatic Development, NIPS
竹田育子 生理学研究所 生体恒常性発達研究部門
- P26

Break Table
- P27

Chronic neuronal excitation leads to homeostatic suppression of structural long-term potentiation
Ueda Hiromi, Supportive Center for Brain Research, NIPS
植田大海 生理学研究所 脳機能計測・支援センター
- P28

Comparison of corticospinal projections between healthy and damaged brain
Tokiharu Sato, Department of System Pathology for Neurological Disorders, BRI, Niigata University
佐藤時春 新潟大学脳研究所 システム脳病態学
- P29

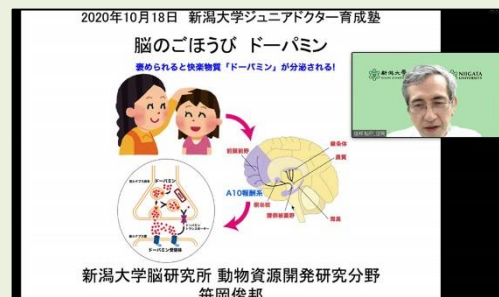
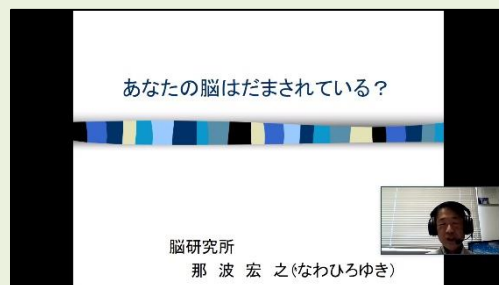
Cervical meningocele: histological features of a rare condition in a newborn
Gabdulkhaev Ramil, Department of Pathology, BRI, Niigata University

新潟ジュニアドクター育成塾

新潟ジュニアドクター育成塾は、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）次世代人材育成事業の平成31年度採択事業としてスタートし、新潟大学理学部が中心となって実施している事業です。

新潟や近隣の意欲ある小中学生を対象に、生物多様性などの課題をグローバルな視点で理解し、自然と人間を愛し、共生を実現する未来の科学人材の育成を目的としています。新潟大学を中心に、連携大学（福島大学、新潟薬科大学、新潟工科大学）と県内の博物館・植物園・企業などが協力して、地域の特色を活かした教育プログラムを提供するものです。

脳研究所では、新潟ジュニアドクター育成塾のマスタープログラムの一環である「見てみよう！ヒトの脳と心～ヒトの脳を見てその不思議を感じ考えよう～」と題した体験学習をオンラインにて開催しました。



スーパーサイエンスハイスクール(SSH)事業

脳研究所では、県内の高等学校との教育連携活動を積極的に実施しています。

SSH指定校に対して研修プログラムを実施したり、その他の高等学校へも出前講義を行う等の活動を通して、高校生が大学の教育・研究に触れることのできる機会を提供しています。

見てみようヒトの脳と心

「世界脳週間」の趣旨に沿って、高校生・大学生を対象にわかりやすく最先端の脳研究を紹介し、少しでも脳と心の科学に興味を持ってもらおうとイベントとして企画しているものです。毎年3月に実施しており、今年は脳に関する講演をオンラインで開催しました。講演を通して、脳研究の一端に触れていただくことができました。



4. 共同利用・共同研究拠点

脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点

プロジェクト型共同研究

連携資源利用型共同研究

国際共同研究

令和2年度 新潟大学脳研究所共同利用・共同研究採択者一覧

プロジェクト型

研究課題名	研究代表者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
タウオパチーにおける海馬由来コリン作動性 神経刺激ペプチド関連因子の動態	名古屋市立大学	教授	松川 則之	遺伝子機能解析学分野	池内 健
統合失調症モデル動物を用いた幻聴の神経基盤に関する研究	熊本大学	教授	宋 文杰	分子神経生物学分野	那波 宏之
アルツハイマー病脳におけるアミロスフェロイド形成と神経細胞障害の時空間的解析	公益財団法人神戸医療産業都市推進機構	部長	星 美奈子	病理学分野	柿田 明美
筋萎縮性側索硬化症（ALS）細胞質TDP-43凝集体形成を抑制する分子の同定と機能解析	杏林大学	教授	渡部 和彦	病理学分野	柿田 明美
手術安全と教育を目的とした深層学習による顕微鏡手術映像解析研究	北海道大学病院	助教	杉山 拓	脳機能解析学分野	松澤 等
内因的行動の神経基盤の解明	中京大学	任期制講師	酒多 穂波	統合脳機能研究センター	伊藤 浩介
新しいフェロトーチス阻害システムによる神経細胞保護の検討	群馬大学	教授	鳥居 征司	脳神経内科学分野	金澤 雅人
慢性疼痛関連分子を標的とした脳および脊髄での機能的解明	関西医科大学	准教授	片野 泰代	モデル動物開発分野	阿部 学
側頭葉てんかんにおけるてんかん焦点の可視化—multimodalityを用いた術前評価による外科手術の成績向上に向けて—	国立病院機構西新潟中央病院脳神経外科	神経部長	福多 真史	脳神経外科学分野	藤井 幸彦
微小管結合タンパク質を中心としたゲノム解析と機能解析	同志社大学生命医科学部	准教授	宮坂 知宏	遺伝子機能解析学分野	宮下 哲典
神経回路精緻化メカニズムの遺伝学的解析	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
アルツハイマー病タウ蓄積および変性に対するaquaporin-4機能促進薬TGN-073の効果の検証	東京大学	助教	山田 薫	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
SCA42モデルマウス解析を通じた脊髄小脳変性症治療法の開発	公立大学法人横浜市立大学	准教授	土井 宏	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
ミクログリア機能修飾によるタウ病態の変化の検討	量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所	研究員	高堂 裕平	脳神経内科学分野	金澤 雅人
脳神経疾患における銅局在のシンクロトロン放射光による解析	藤田医科大学	教授	松浦 晃洋	病理学分野	柿田 明美
脳梁膨大後皮質におけるグルタミン酸受容体GluD2による入力選択的回路形成機構	北海道大学大学院医学研究院	教授	渡辺 雅彦	モデル動物開発分野	阿部 学
マルチモーダルな脳画像と脳機能データを用いたマルチモーダル機械学習	東京医科歯科大学	助教	服部 高明	脳機能解析学分野	松澤 等
認知症の解明と精密医療実現を目的としたゲノム-オミクス解析	国立長寿医療研究センター	部長	尾崎 浩一	遺伝子機能解析学分野	宮下 哲典
Experimental autoimmune encephalomyelitisマウスの作成およびそれを用いた治療法開発	藤田医科大学	教授	鈴木 元	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
遺伝性脳小血管病モデル動物を用いた脳卒中・認知症の新規治療法の開発	国立循環器病研究センター	部長	猪原 匡史	脳神経内科学分野	小野寺 理
GABA仮説に基づいた統合失調症モデルラットの病態解析	群馬大学	教授	柳川 右千夫	分子神経生物学分野	那波 宏之
高磁場MRIを用いた発達障害に伴う統合的脳機能に関する研究	国立成育医療研究センター	副院長・統括部長	小枝 達也	統合脳機能研究センター	鈴木 雄治
タウオパチー病理組織標本を用いたタウPET画像病理相関解析	量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所	部長	樋口 真人	脳疾患標本資源解析学分野	柿田 明美
ストレス応答におけるドーパミン受容体の役割の解明	北里大学	准教授	板倉 誠	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
シヌクレイノパチーにおける異常蓄積タンパク質の排出亢進と治療法の開発	弘前大学	助教	丹治 邦和	病理学分野	柿田 明美
血漿中ILEI定量による高齢者認知機能障害の初期サロゲイトマーカーとしての検証	滋賀医科大学	教授	西村 正樹	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情報を駆使した多遺伝子解析	大阪大学	特任講師(常勤)	菊地 正隆	遺伝子機能解析学分野	宮下 哲典
臨床応用に資する[11C]TGN-020の迅速かつ高収量な製造合成法の開発	福島県立医科大学	教授	久保 均	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
神経変性疾患特異蛋白と神経細胞脱落：ヒト基底核における定量的検討	信州大学	特任教授	小柳 清光	病理学分野	柿田 明美
脳由来の血中糖タンパク質の網羅的な同定方法の確立	関西医科大学	准教授	赤間 智也	モデル動物開発分野	阿部 学
睡眠覚醒と記憶制御に関わる視床下部神経の動作原理解明	名古屋大学	教授	山中 章弘	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
精神疾患死後脳の分子プロファイル解析	福島県立医科大学会津医療センター	准教授	國井 泰人	病理学分野	柿田 明美
遺伝子改変マウスを用いた大脳基底核疾患の病態生理の解析	自然科学研究機構 生理学研究所	助教	知見 聡美	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦

研究課題名	研究代表者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
歯状回顆粒細胞の興奮性に対するdiacylglycerol lipase alpha の役割の解明	東京大学	助教	菅谷 佑樹	モデル動物開発分野	阿部 学
タウ凝集体の伝播におけるミクログリアの役割	鹿児島大学医歯学総合研究科	助教	松本 信英	病理学分野	柿田 明美
遺伝子改変技術による生体リズム中枢の分子機構の解析	京都大学	特任教授	岡村 均	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
腸内細菌叢および腸管上皮細胞からのDAMPs制御による脳虚血病巣進展への影響	日本医科大学大学院	准教授	西山 康裕	統合脳機能研究センター	五十嵐 博中
孤発性ALS患者で見出された新規microRNAの機能解析	岐阜薬科大学	教授	保住 功	病理学分野	柿田 明美
高磁場MRIを用いたてんかん原性部位及び機能部位との関係の研究	静岡てんかん・神経医療センター	医長	臼井 直敬	統合脳機能研究センター	鈴木 雄治
中枢神経原発悪性リンパ腫におけるTACC 3発現とその臨床病理学的意義	久留米大学	教授	杉田 保雄	病理学分野	柿田 明美
超偏極低分子化合物の生体トレーサーとしての応用を目指した基礎検討	量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所	チームリーダー	青木 伊知男	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
NF-κB活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の開発に向けた多施設共同研究	横浜市立大学大学院医学研究科	助教	立石 健祐	脳神経外科学分野	藤井 幸彦
特発性正常圧水頭症患者脳脊髄液中のバイオマーカー診断と重症度分類の確立	順天堂大学	准教授	中島 円	遺伝子機能解析学分野	池内 健
Boron neutron capture therapy (BNCT)が播種・浸潤に及ぼす効果の検討	京都大学複合原子力科学研究所	助教	近藤 夏子	脳神経外科学分野	棗田 学
RNA-Seq解析を用いるがん性疼痛と難治性神経障害性疼痛に関連分子の探索・同定	大阪医科大学	客員教授	伊藤 誠二	遺伝子機能解析学分野	池内 健
認知症関連疾患リスク遺伝子（特にACE, ABCA7、FUSに関して）検索	名古屋市立大学	教授	赤津 裕康	遺伝子機能解析学分野	宮下 哲典
筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病変の評価	量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所	研究員	高堂 裕平	病理学分野	清水 宏

連携資源利用型

研究課題名	研究代表者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
脳研究に必須な遺伝子改変マウスの系統保存に重要な培養条件の検討	東京医科大学	教授	久慈 直昭	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
神経変性疾患モデルマウスのヒト疾患との連関	昭和大学	准教授	大滝 博和	病理学分野	柿田 明美
統合失調症モデルザルの脳病理学的変化の研究	京都大学霊長類研究所	教授	中村 克樹	病理学分野	柿田 明美
脳腫瘍の原因遺伝子変異を特異的に抑制するsiRNA核酸医薬品開発	東京大学	准教授	程 久美子	脳神経外科学分野	藤井 幸彦
疾患モデル動物の作製、保存、繁殖に関する最先端技術の開発	熊本大学	講師	竹尾 透	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
筋萎縮性側索硬化症におけるイノシトール6リン酸キナーゼの役割	東海大学医学部	教授	永田 栄一郎	病理学分野	柿田 明美
ヒト特異的な脳細胞は果たしているのか？シングルセル比較トランスクリプトーム・エピゲノム解析	自然科学研究機構	特任准教授	郷 康広	病理学分野	柿田 明美
脳神経筋疾患モデルマウスにおける超過剰排卵誘起処理と反復採卵による系統保存システムの開発	公益財団法人 実験動物中央研究所	センター長	高橋 利一	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
神経幹細胞での遺伝子変異による腫瘍化メカニズムの解析	国立病院機構大阪医療センター	部長	金村 米博	脳神経外科学分野	藤井 幸彦
発達期脳内微細構造の生体イメージングによる神経回路形成機序の解明	熊本大学	特任准教授	水野 秀信	細胞病態学分野	三國 貴康
TDP-43病変に結合する分子プローブの開発	量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所	研究員	小野 麻衣子	脳疾患標本資源解析学分野	柿田 明美
脳疾患ゲノム情報に基づく病態モデルマウスの開発に関する研究	理化学研究所	室長	吉木 淳	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
歩行運動の脳基底核ドーパミン制御機構の解明	大阪大学	准教授	木津川 尚史	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
モノアミン神経伝達物質合成関連遺伝子の組織特異的破壊による生理機能変化の解析	東京工業大学	教授	一瀬 宏	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
ミクログリア機能を反映するPETイメージングの開発	国立長寿医療研究センター	室長	木村 泰之	病理学分野	他田 真理
脳バンク検体を用いた加齢に伴う脳組織のクローン再構成及び脳腫瘍発生に関する研究	京都大学	特定講師	荒川 芳輝	病理学分野	柿田 明美
神経組織特異的Scraperノックアウトマウスの作出と神経変性に関する解析	関西学院大学	教授	矢尾 育子	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦

研究課題名	研究代表者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
筋強直性ジストロフィーの中樞神経病態の解明	大阪大学	助教	中森 雅之	病理学分野	清水 宏
ジストロフィン結合タンパク質複合体の代謝回転に関する研究	国立精神・神経医療研究センター	室長	今村 道博	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
脳・神経回路におけるドーパミンの機能解析	大阪大学	教授	小山内 実	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
後部視床下部において過眠症に関連するDNAメチル化部位の探索と各脳領域に特異的なメチル化プロファイルの探索	東京大学	助教	嶋多 美穂子	病理学分野	柿田 明美
TDP-43細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成	北里大学	教授	佐藤 俊哉	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦

※所属・職名は、申請時のものです。

令和2（2020）年度 新潟大学脳研究所 国際共同研究 一覧

研究課題名	研究代表者（申請者）				所内対応教員	
	国	所属機関・組織名	職名	氏名	分野名	氏名
Production of congenital nystagmus model mice and analysis of visual function 先天性眼球振盪モデルマウスの作出と視覚機能解析	デンマーク	DANDRITE, Department of Biomedicine, Aarhus University (オーフス大学)	Associate Prof. / Group Leader	Keisuke Yonehara 米原 圭佑	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
Development of gene-cell therapy of Alzheimer's disease based on delivery of neurotrophic factors to brain: translational study アルツハイマー病モデルマウスを用いた神経栄養因子導入治療法の開発	露	Kazan State Medical University (カザン医科大学)	Prof.	Marat Mukhamedyarov	病理学分野	柿田 明美
Assessing molecular mechanisms of novelty-induced memory boost by using genetically-modified rats derived from embryonic stem cell line for Lister-hooded rat Lister-hooded系統由来の胚性幹細胞より作成した遺伝子改変ラットを用いた新奇性による記憶増強の分子機構解明	デンマーク	Department of Biomedicine, Aarhus University (オーフス大学)	Associate Prof.	Tomonori Takeuchi 竹内 倫徳	モデル動物開発分野	阿部 学
Role of autophagy in NF1-associated gliomas NF-1に合併するグリオーマにおけるオートファジーの役割解明	米	Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine (ジョンズ・ホプキンス大学)	Associate Professor	Fausto J Rodriguez	脳神経外科分野	藤井 幸彦
Development, optimization and validation of human AQP-4 PET Radioligand AQP-4 PET トレーサの開発と最適化	米	Departments of Psychiatry and Radiology / Harvard Medical School (ハーバード大学)	Prof.	Marek Kubicki	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
Hydrodynamic Pathology of the Brain 脳水動態病理学	米	Neurology, Univ. of California Davis (カリフォルニア大学デービス校)	Prof.	Ingrid L Kwee	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
Elucidating the role of SLFN11 in response to PARP inhibition in diffuse intrinsic pontine gliomas 脳幹グリオーマに対するPARP阻害剤感受性及びSLFN11発現解析	米	Division of Pediatric Oncology, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, Johns Hopkins School of Medicine (ジョンズ・ホプキンス大学)	Associate Prof.	Eric H. Raabe	脳神経外科分野	藤井 幸彦
Computational quantitative analysis for neuropathologic feature of α -synucleinopathy patients シヌクレイノパチーの病理組織像の定量的解析	韓	Department of Pathology, Asan Medical Center, Seoul, Republic of Korea (ソウル峨山病院)	Clinical Assistant Prof.	Soo Jeong Nam	病理学分野	柿田 明美
The role of striatal direct and indirect pathways and dopamine D2 isoforms in the pathophysiology of psychosis 精神疾患の病態生理における線条体の直接路と間接路およびD2ドーパミン受容体分子種の役割解明の研究	米	Department of Pharmaceutical Sciences, Ben and Maytee Fisch College of Pharmacy, The University of Texas at Tyler (テキサス大学タイラー校)	Associate Prof.	Yanyan Wang	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
Investigation of the role of neuromodulators in state transition of neural dynamics to represent a behavioral goal 行動目標表現の際のネットワーク動態変性における神経調節因子の役割の解明	独	Max Planck Institute for Brain Research (マックスプランク脳科学研究所)	Research Group Leader	Hiroshi Ito 伊藤 博	細胞病態学分野	三國 貴康
Investigating the role of BAI1 in the tumor cell invasion of malignant glioma 悪性神経膠腫の腫瘍細胞浸潤におけるBAI1の役割の解明	米	Department of Neurosurgery, School of Medicine and O'Neal Comprehensive Cancer Center, University of Alabama at Birmingham (アラバマ大学バーミングハム校)	Assistant Prof.	Satoru Osuka 大須賀 寛	脳神経外科分野	藤井 幸彦
Investigation of pathogenesis of Alzheimer's disease using mouse models マウスモデルを用いたインフラマソームを介したアルツハイマー病の病態生理の解明	米	Dept. Neurobiology, Univ. of Massachusetts Medical School, Brudnick Neuropsychiatry Research Institute (マサチューセッツ州立メディカルスクール)	Assistant Prof.	Kensuke Futai 二井 健介	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
Establishing the Neurodegenerative Pathologic Diagnostic Protocols by Intensive Pathologic Reviews 神経変性疾患の病理診断標準化に向けた取り組み	韓	Department of Pathology, College of Medicine, Inje University Busan Paik Hospital (仁済大学ブサン白病院)	Assistant Prof.	Hwa Jin Cho	病理学分野	柿田 明美

タウオパチーにおける海馬由来コリン作動性 神経刺激ペプチド関連因子の動態

研究代表者 松川 則之¹⁾
研究分担者 池内 健²⁾, 宮下 哲典²⁾

- 1) 名古屋市立大学大学院医学研究科神経内科学
2) 新潟大学脳研究所バイオリソース部門遺伝子機能解析学

研究要旨

これまでに、我々は海馬可溶性成分から分離した海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (hippocampal cholinergic neurostimulating peptide; HCNP) が海馬グルタミン作動性神経活動に対して重要な調節因子であることを報告してきた。タウオパチーにおける病的意義を検索する目的に、新潟大学脳研究所に蓄積されたタウオパチー脳における HCNP 関連因子の脳内遺伝子発現量、プロモーター領域および染色体遺伝子領域の変異解析を行う。

A. 研究目的

タウオパチーにおける HCNP 病的意義を検索する目的に、新潟大学脳研究所に蓄積されたタウオパチー脳における HCNP 関連因子の脳内遺伝子発現量、染色体プロモーター領域および HCNP 遺伝子領域の変異解析を行う。

HCNP 関連遺伝子異常の存在の有無を確認する予定である。

E. 結論

タウオパチー脳内における HCNP 関連遺伝子異常の存在については、未だ検索中である。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所バイオリソース部門遺伝子機能解析学分野にて展開されているタウオパチー脳を用いた網羅的遺伝子発現量解析、染色体 DNA 全シーケンス解析データを用い、HCNP 関連因子の遺伝子発現量および染色体 DNA 病的変異の存在の有無を解析する。

C. 研究結果

今回調べられた範囲にて、HCNP 関連遺伝子に異常は確認されなかった。

D. 考察

これまでに孤発性アルツハイマー病における HCNP 遺伝子発現の低下など本因子の関連性を確認してきた。今後、PART 患者脳に視点を移して

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Adachi K et al., Possible correlated variation of GABA_A receptor expression with hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;542:80-86.
2. Ohno Y et al., Rapid progression of white matter signal changes and frontotemporal atrophy in globular glial tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2021;80(5):480-3.
3. Uchida Y et al., Iron leakage owing to blood-brain barrier disruption in small vessel disease CADASIL. 2020;95(9):

e1188-e1198.

2. 学会発表

未発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無

2. 実用新案登録

無

3. その他

無

統合失調症モデル動物を用いた幻聴の神経基盤に関する研究

研究代表者 宋 文杰¹⁾
研究分担者 那波 宏之²⁾

1) 熊本大学生命科学研究部 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

統合失調症のラットモデルを用いて、統合失調症患者の主要症状である幻聴の神経基盤を探ることを目的に研究を行った。幻聴の内容は言語音が主で、患者の主観感覚であるため、動物で研究することは容易でない。本研究では、「幻聴」を定義通りに捉え、即ち、幻聴は統合失調症モデル動物にのみ見られ、対照動物に見られないとし、モデル動物において、鳴き声がない時に、他者の鳴き声に対する応答と似た活動が聴覚皮質に現れるなら、それが幻聴に対応する活動と考える。この考えの実現に向けて、モデル動物の作成、自己と他者の鳴き声を区別して録音するための無線マイクシステムの開発と、自由行動下における神経活動記録システムの開発を行った。

A. 研究目的

統合失調症の主要症状の一つに幻聴が挙げられるが、幻聴発症の神経基盤は明らかになっていない。本研究では、那波らが開発した統合失調症モデル動物 (Futamaru et al., 2003) を用いて、幻聴の神経基盤を探ることを研究目的とした。

幻聴は、言語音を主な内容とし、患者の主観的な感覚なため、動物で研究することは容易でない。本研究では、幻聴の定義、即ち、誰も話していない時に、話し声が聞こえることから、統合失調症モデル動物の聴覚野において、鳴き声がない時に、他者の鳴き声を聞いた時の活動と似た活動が生じていたら、それを幻聴に対応する活動と考える。本研究は、この考えを実現するために進めてきたものである。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

全ての実験は熊本大学動物実験委員会の承認を受けて行った。

1) 統合失調症モデルラットの作成：雄 SD ラット生後 2 日目から 10 日目に亘って、毎日の決まった時間に、同じ親が世話している 10 匹のう

ちの 5 匹に、EGF (epidermal growth factor) を皮下投与した。投与量は体重 1g 当たり、 $21.9 \mu\text{g}$ ($12.5 \mu\text{l}$) とした。残りの 5 匹に同量の生理食塩水を投与し、対照動物とした。

2) 鳴き声記録：モデル動物と対照動物の鳴き声を記録するために、まず市販の超音波マイク () を用いて鳴き声を記録した。

3) 自己と他者の鳴き声を録音して区別できるようにするために、ラットの頭部に装着できる超小型無線超音波マイクの開発を進めた。超軽量超音波マイクの選定と増幅と送信回路の設計を行い、試作機を作成した。

4) 自由行動下のラットから神経活動を記録するシステムの開発を行い、音声誘発応答を大脳皮質聴覚野と頭頂、前頭連合野から記録を行った。

C. 研究結果

1) モデル動物の作成

2 回にわたり、モデル動物を作成した。対照ラットは生後 16 日目前後に開眼したのに対し、EGF 注射を受けたラットは、生後 9 日目に開眼した。また、モデルラットは、体重が少なめで、体毛が

薄いことが、生後3週令まで、明確に確認できた。これらの特徴は以前の報告と一致し、モデルは正常に作成できたと考えられる。2回とも、EGF注射を受けた5匹中、1匹が死亡した(～生後12日)。死亡したラットは、日齢に従って体重の増加が弱いのが共通な特徴であった。

2) 鳴き声記録: モデル動物と対照動物のいずれにおいても、40kHz から 70kHz までの間の周波数の超音波鳴き声を録音できた。持続時間は 30ms 程度の短いものから、100ms 程度持続する鳴き声まで見られた。鳴き声の時間・周波数構造は極めて複雑で、急激な変動を示さず、緩やかな一定の変化を示すものから、10ms 以内に急激な周波数のアップ・ダウンを示すものまで見られた。比較的頻繁に鳴き声が記録できたため、神経活動との対応関係を調べる時に有利であるが、鳴き声全体が短い傾向があるため、鳴き声ごとに、特徴的な神経活動が誘発されるか否かは、詳細な検討が必要と考えられる。

3) 幻聴を定義通りに検討するために、ラットの頭部に装着できる超小型無線超音波マイクの開発を進めた。重さ 30 mg のマイク素子を選定し、独自の回路を設計・改善し、4 回の試作を試みたところ、全重量 4g で、2m ほど無線送信できるパワーで、2 時間程度の持続送信時間を達成できた。しかし、高周波数領域の SN 比は依然低く、現在マイク素子と回路の両方から改善を進めている。

4) 動物に慢性電極を埋め込み、自由行動下において、多チャンネル無線記録システムを用いて、聴覚応答を記録した。両側の聴覚野以外に、両側の後頭頂連合野と前頭連合野にも電極を埋め込み、音刺激に対する応答を記録した。これらの連合野は聴覚野から直接入力を受けることを以前示してある (Nakata et al., 2020)。結果、モデル動物と対照動物の何れにもいても、全ての皮質領域から聴覚応答を記録できた。また、繰り返し音の周波数と数、繰り返し音間の時間間隔、刺激提示回数などのパラメータを変更しながら、聴覚応答の時間特性を調べた結果、自由行動下においては、応答が素早いアダプテーションを示した。同じ動物において、麻酔下では、誘発応答の振幅が増大し、アダプテーションは減弱した。これらの特徴はモデル動物と対照動物間に明確な差が見られなかった。

D. 考察

新生ラットに EGF を注射し、統合失調症モデル動物を作成する方法は、2 回しか経験出来ていないが、非常に再現性の良い方法と言える。

統合失調症患者の幻聴内容は言語音が主である。本研究では、「幻聴」を定義通りに捉え、即ち、鳴き声がない時に、他者の鳴き声に対する応答と似た活動が聴覚皮質に現れるなら、それが幻聴に対応する活動と考える。この考えは、今後行動学的な証明を含めて検討できると、「幻聴」の神経基盤に関する最も妥当な捉え方と考える。本研究では、この考えの実現に向けて、自己と他者の鳴き声を区別して録音するための無線マイクシステムの開発と、自由行動下における神経活動記録システムの開発を進めてきた。後者は完成出来ているが、前者は完成に近づいている状況である。今後、これらのシステムと EGF モデル動物をもちいて、「幻聴」の神経基盤に迫る。

E. 結論

EGF 注射による統合失調症モデル動物は有用なモデルである。幻聴の神経基盤の解明のために、幻聴の定義に従い、自己と他者の鳴き声の録音と聴覚野神経活動の同時記録による新しいアプローチを提案し、部分的な成果が得られた。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Nakata S, Takemoto M, Song W-J. Differential cortical and subcortical projection targets of subfields in the core region of mouse auditory cortex. *Hearing Research* (2020) 386:107876. doi: 10.1016/j.heares.2019.107876.
2. Toru Miwa, Kunimasa Ohta, Naofumi Ito, Satoko Hattori, Tsuyoshi Miyakawa, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Wen-Jie Song & Ryosei Minoda. Tsukushi is essential for the development of the inner ear. *Mol Brain* (2020) 13, 29. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00570-z>.
3. Nishimura M, Wang C, Shu R, Song W-J. Dynamic changes of timing precision in timed actions during a behavioural

- task in guinea pigs. Scientific Reports (2020)10:20079. doi: 10.1038/s41598-020-76953-y.
4. Chen F, Takemoto M, Nishimura M, Tomioka R, Song W-J. Postnatal development of subfields in the core region of the mouse auditory cortex. Hearing Research (2020)400:108138. doi: 10.1016/j.heares.2020.108138.

アルツハイマー病脳における アミロスフェロイド形成と神経細胞障害の時空間的解析

研究代表者 星 美奈子 1)
研究分担者 柿田 明美 2)

1) 神戸医療産業都市推進機構 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

研究代表者である星は、柿田博士との長年の共同研究により、アルツハイマー病患者脳から神経細胞死活性を持つ A β 集合体「アミロスフェロイド (ASPD)」の単離に初めて成功し (Noguchi *et al.* JBC2009)、ASPD は神経細胞の生存と機能に必須な Na, K-ATPase ポンプの $\alpha 3$ サブユニット (NAK $\alpha 3$) に特異的に結合することで細胞死を誘導するという全く新たな神経細胞死メカニズムを世界に提示した (Ohnishi *et al.* PNAS2015)。NAK $\alpha 3$ の活性阻害による神経細胞死は、その後、パーキンソン病や ALS においても相次いで報告され、星らの発見した細胞死メカニズムが神経変性疾患に共通な経路であることが解ってきた。本研究では、これまでの共同研究により我々がアルツハイマー病で明らかにしてきた NAK $\alpha 3$ の機能障害による神経細胞死が、本当に他の神経変性疾患で起きているのかを実際に患者脳で検証するとともに、アルツハイマー病の患者脳を用いて、アミロスフェロイドの蓄積と神経障害の出現との間に時空間的相関が認められるかどうかを解析していく。

A. 研究目的

神経細胞死がアルツハイマー病の臨床症状と最も相関することは ADNI でも確認をされたが、神経細胞死の原因及び機構は殆ど解明されていなかった。我々は、新潟大学脳研究所よりタンパク質の保存状況の極めて良い剖検脳の供与を受けることにより、世界で初めてアルツハイマー病患者脳より神経毒性を持つ球状の A β 集合体である Amylospheroid (以下、ASPD) の単離に成功し (Noguchi *et al.* JBC2009)、さらに ASPD が神経細胞の生存と機能に必須な Na, K-ATPase ポンプの $\alpha 3$ サブユニット (NAK $\alpha 3$) に結合することでそのポンプ活性を阻害し、成熟神経に細胞死を誘導することを見出した (Ohnishi *et al.* PNAS2015)。上記のとおり、過去の共同研究により、我々は原因物質の非常に有力な候補を示し、なぜ成熟神経細胞死が起きるかについてもアルツハイマー病

の病態を非常に良く説明する機構を明らかにすることが出来た。さらに、ASPD に結合するペプチド (ASPD 結合ペプチド) を同定しているが、これは ASPD と ASPD ターゲット分子との結合を阻害し、ASPD の神経細胞死活性を中和することができることがわかり、神経細胞死を直接阻止する治療薬、ASPD を検出する PET プローブ開発という、2つの大きな創薬及び医療技術基盤の可能性を拓いた。この我々が見出した新たな神経細胞死メカニズムが、実は主要な神経変性疾患に共通なメカニズムであることが解ったことは我々に取っても驚きで有り、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アルツハイマー病に留まらず神経変性疾患全体を俯瞰することは是非とも重要で有り、新たなプロジェクトとして共同研究実施することとした。

本研究では、これまでの共同研究によりアルツハイマー病で明らかにしてきた NAK α 3 の機能障害による神経細胞死が、本当に他の神経変性疾患で起きているのかを実際に患者脳で検証するとともに、そもそも生理的には NAK α 3 神経の分布はどうなっているのか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)

上記目的を達成するために、以下の研究を実施する。

(1) 抗NAK α 3抗体、NAK α 1抗体や各種神経変性のマーカーを用いた固定、染色方法を改善し、再現的かつ明瞭な分布を同定出来る条件を確立する。

(2) アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS など、主な神経変性疾患、さらに、対照群として正常脳においてNAK α 3神経、NAK α 1神経の分布や発現がどうなっているのかを検証する。

(3) アルツハイマー病においてはASPDの分布と神経障害のマーカー出現との間に時空間的相関が認められるかどうかを解析する。

C. 研究結果

これまで NAK α 3 ポンプは生存にあまりに必須であるため神経変性疾患に関わるとは思われていなかったが、星らの報告に続いて、パーキンソン病やALSにおいても、異常な凝集体がNAK α 3 ポンプに結合することでその活性を阻害し神経細胞死を引き起こすことが相次いで報告されるに至った。しかも、パーキンソン病の原因となる α シヌクレインの凝集体がNAK α 3 ポンプに結合する部位は、ASPD がNAK α 3 ポンプに結合する部位とほぼ同一であることから、我々が発見した神経細胞死のメカニズムは神経変性疾患に共通な経路であることが強く示唆された。

しかしながら、NAK α 3 ポンプについては、NAK α 1 ポンプなどと配列の相同性が高いことから良い抗体がなく、そもそも脳内での生理的な分布が殆ど解析されていないことが解った。また、

ASPD がNAK α 3 ポンプに結合しその活性を阻害するメカニズムは、これまで予想されていなかった新たなメカニズムであることが解った。そこで、本研究では実際に各種神経変性疾患の患者脳及び正常脳においてNAK α 3 神経細胞の分布や発現を解析し、ヒト脳におけるNAK α 3 神経細胞の生理的機能と病態における関与を検証することをめざし、まず、齧歯類組織を用いてNAK α 3 神経細胞の正常での分布を解明するとともに、ヒトに対するNAK α 3 選択的抗体を確立することを目指した。

In situ を用いた解析から、驚いたことにNAK α 3 選択的な神経細胞群が存在することが解ってきた。また、神経細胞種によりNAK α 1/NAK α 3 の発現比にはかなり差があることも分かり、それぞれがどう役割分担をしているのか興味深いところである。これについては今年度、論文として出版することが出来た。抗体の作成については、NAK α 1-3 ポンプの立体構造モデルに基づき最も適切な配列を選び、それを大腸菌の発現系を用いて抗原を調製、モノクローナル抗体の作成に着手した。しかしながら、10回膜貫通タンパク質であるNAKの抗体作製には難航し、ようやくNAK α 3 について、目的の抗体が得られ、解析を進めているところである。

さらに新たに脳の微小血管由来内皮細胞において、NAK α 3 に結合することでASPDが血管の機能を阻害していることが解った。これについては現在、論文を投稿中である。

D. 考察

上記のとおり、極めて順調に研究を進めることが出来た。上述した in situ の解析結果は、実は国際学会でも非常な驚きをもって受け止められた。NAK α 3 ポンプがどのように関わっているのかを明らかにすることは、アルツハイマー病に留まらず各種神経変性疾患の病理診断上も極めて有効である可能性もあり、是非、特異的抗体を確立し、患者脳由来の試料を用いた解析を引き続き進めたいと考えている。

E. 結論

NAK α 3 は、これまでの予想を超えて、神経変性

疾患に深く関わる事が解ってきた。ただ、抗体などの必要なツールが乏しい。今回のプロジェクトにより、少なくとも NAK α 3 の分布が明らかになり、また抗体を確立出来たのは意義がある。さらに、NAK α 3 が血管病変にも関わる新たな研究成果を得たことにより、脳と血管のクロストークを解明出来る可能性が見えてきた。今後も引き続き解析を進めたい。

Alzheimer's disease brains 笹原智也、星美奈子、第 94 回日本薬理学会年会(札幌)
2021/03/8-10

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Murata, K., Kinoshita, T., Ishikawa, T., Kuroda, K., Hoshi, M., and *Fukazawa, Y., Region- and neuronal- subtype-specific expression of Na, K-ATPase alpha and beta subunit isoforms in the mouse brain, *J Comp Neurol* (2020) 528, 2654-2678. doi: [10.1002/cne.24924](https://doi.org/10.1002/cne.24924) (IF= 2.801, CI= 7)
2. Xiao, Y., Matsuda, I., Inoue, M., Sasahara, T., Hoshi, M., and Ishii, Y., NMR-based site-resolved profiling of β -amyloid misfolding reveals structural transitions from pathologically relevant spherical oligomer to fibril., *J. Biol. Chem.*(2020) 295, 458-467. doi:doi: [10.1074/jbc.RA119.008522](https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008522) (IF= 4.238, CI= 6)
3. Hoshi, M., Multi-angle development of therapeutic methods for Alzheimer's disease., *Br. J. Pharmacol.* (Cover) (2021) Feb;178(4):770-783. doi: [10.1111/bph.15174](https://doi.org/10.1111/bph.15174). (IF= 7.73)

2. 学会発表

1. アルツハイマー病とナトリウムポンプ～タンパク質間相互作用を標的とする低分子医薬品の開発～” 星美奈子 第 29 回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会(神戸)(2020 年 3 月 1 日)(招待講演)
2. Establishment of a new tri-culture system for elucidating crosstalk mechanisms between central nervous system and brain microvascular endothelial system in

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 細胞質 TDP-43 凝集体形成を抑制する分子の同定と機能解析

研究代表者 渡部 和彦¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾

1) 杏林大学保健学部臨床検査技術学科・神経病理学

2) 新潟大学脳研究所・病理学分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)における神経細胞内 TDP-43 凝集体形成を抑制する治療法の開発を主目標に、我々が確立した培養ニューロンおよびマウス顔面神経核 TDP-43 凝集体形成モデルに対し、組換えウイルスを用いて凝集体形成抑制候補分子の機能を解析する。得られた結果をヒト ALS 剖検例における候補分子の発現と比較検討することにより、ALS に対する新規治療法の開発を目指している。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンの選択的な変性脱落により死に至る最も過酷な神経変性疾患であり、ニューロン、グリアにリン酸化 TDP-43 蛋白を含む細胞質凝集体が出現する。我々はこれまで、ヒト正常 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や成体ラット・マウス運動ニューロンに感染発現させると、リン酸化 TDP-43 を含む不溶性の細胞質粗大凝集体が高率に形成されることを報告した (Watabe et al., Neuropathology 2014)。さらに、培養タイムラプス解析により、正常および C 末断片 DsRed/TDP-43 組換えアデノウイルスをニューロンに感染発現させプロテアソーム阻害剤 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、細胞膜の破綻とともに細胞死に至り、残存した不溶性凝集体が放出される像を観察した。この凝集体はリン酸化 TDP-43 を含む不溶性の顆粒状構造物からなり、隣接する細胞に取り込まれ、時間とともに細胞質で増大し、凝集シードとして機能することを確認した (Ishii et al., PLoS One 2017)。一方、この細胞質 TDP-43 凝集体形成は heat shock transcription factor 1 (HSF1)発現ウイルスの共感染により顕著に抑制されることを見出した。そこで DNA マイクロアレイ解析により HSF1 の

下流分子を探索したところ、Praja 1 (PJA1) E3 ユビキチンリガーゼなど複数の分子に TDP-43 凝集体形成抑制効果を認めた (Watabe et al., Neuropathology 2020)。本研究では、これら新規 TDP-43 凝集体形成抑制分子を培養細胞、マウスモデルを用いて詳細に解析するとともに、ヒト ALS 剖検例と比較検討することにより、ALS に対する新規治療法の開発を目指している。本年度は、我々が見出した PJA1 と、これまで TDP-43 凝集を抑制することが報告されている ZNF179 E3 ユビキチンリガーゼ (Lee et al., J Biomed Sci 2018) の TDP-43 凝集抑制効果を比較検討した。

B. 研究方法

ラット神経幹細胞株 1464R 由来分化ニューロンに TDP-43, HSF1, PJA1, または ZNF179 組換えアデノウイルスを共感染させ、プロテアソーム阻害剤 MG-132 を負荷して TDP-43 凝集体形成を解析した。一方、成体マウス顔面神経に上記組換えウイルスを接種し、顔面神経核運動ニューロンにおける PJA1, ZNF179 の TDP-43 凝集抑制効果を検討した。さらに新潟大学脳研究所のヒト脳神経病理標本を用いて、正常および ALS 運動ニューロンにおける PJA1, ZNF179 の発現を免疫組織化学的に検討した。

C. 研究結果

培養細胞の共免疫沈降では、PJA1, ZNF179 ともに TDP-43 の主に C 末端に結合することが示された。HSF1, PJA1 組換えウイルスには分化ニューロン培養における顕著な TDP-43 リン酸化凝集体形成抑制効果を認めたが、ZNF179 には認めなかった。マウス顔面神経核運動ニューロン TDP-43 凝集体モデルでは、HSF1, PJA1 ウイルスともに凝集体形成を顕著に抑制したが、ZNF179 には効果を認めなかった。一方、PJA1 はヒト脳では主に神経細胞に豊富に存在し、ALS の TDP-43 凝集体を有する脊髄運動ニューロンも PJA1 陽性であったが、ZNF179 は小脳プルキンエ細胞に陽性染色を認めるものの、脊髄運動ニューロンは陰性であった。

D. 考察

PJA1 と ZNF179 はともに TDP-43 に結合しユビキチンリガーゼとして機能すると考えられるが、細胞や E2 ユビキチン結合酵素の種類などによって機能発現が異なると考えられ、今後の詳細な比較検討が必要である。

E. 結論

ラット神経幹細胞由来ニューロン培養およびマウス顔面神経核運動ニューロン組換えアデノウイルス接種による TDP-43 凝集体形成モデルにおいて、PJA1, ZNF ユビキチンリガーゼはともに TDP-43 に結合し、PJA1 は凝集体形成を顕著に抑制したが、ZNF179 には効果を認めなかった。一方、ヒト脊髄の免疫染色では、運動ニューロンは PJA1 陽性、ZNF179 陰性であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watabe K, Kato Y, Sakuma M, Murata M, Niida-Kawaguchi M, Takemura T, Hanagata N, Tada M, Kakita A, Shibata N. Praja1 RING-finger E3 ubiquitin ligase suppresses neuronal cytoplasmic TDP-43 aggregate formation. *Neuropathology* 2020;40(6):570-586.
- 2) Kazama M, Kato Y, Kakita A, Noguchi N, Urano Y, Masui K, Niida-Kawaguchi M, Yamamoto T, Watabe K, Kitagawa K, Shibata N. Astrocytes release glutamate via cystine/glutamate antiporter upregulated in response to increased oxidative stress related to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 2020;40(6):587-598.

3) Murakami T, Yokoyama T, Mizuguchi M, Toné S, Takaku S, Sango K, Nishimura H, Watabe K, Sunada Y. A low amyloidogenic E61K transthyretin mutation may cause familial amyloid polyneuropathy. *J Neurochem* 2021;156:957-966.doi:10.1111/jnc.15162.

4) 渡部和彦. 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. *細胞* 2021;53(3):50-53.

2. 学会発表

- 1) 渡部和彦, 加藤陽一郎, 佐久間美帆, 村田麻喜子, 新井田素子, 竹村太郎, 花方信孝, 柿田明美, 柴田亮行. Praja 1 E3 ubiquitin ligase suppresses adenovirus-induced neuronal TDP-43 aggregate formation. 第 61 回日本神経学会学術大会, 岡山コンベンションセンター (岡山市), 2020 年 9 月 1 日
- 2) 村上龍文, 刀祢重信, 三五一憲, 水口峰之, 渡部和彦, 砂田 芳秀. TTR E61K アミロイドニューロパチーの神経変性機序の研究. 第 61 回日本神経学会学術大会, 岡山コンベンションセンター (岡山市), 2020 年 9 月 1 日.
- 3) 渡部和彦, 加藤陽一郎, 佐久間美帆, 村田麻喜子, 新井田素子, 竹村太郎, 花方信孝, 柿田明美, 柴田亮行. Praja 1 RING-finger E3 ubiquitin ligase による TDP-43 細胞質凝集体の形成抑制. 第 63 回日本神経化学大会 (WEB 開催), 2020 年 9 月 10-12 日.
- 4) 新井田素子, 増井憲太, 山本智子, 丸山隆志, 宮尾暁, 川俣貴一, 渡部和彦, 柴田亮行. 酸化ストレス誘導性のカルボニルマーカが高度に検出された膠芽腫の一剖検例. 第 61 回日本神経病理学会総会学術研究会 (WEB 開催), 2020 年 10 月 12-14 日.
- 5) 渡部和彦, 加藤陽一郎, 佐久間美帆, 村田麻喜子, 新井田素子, 竹村太郎, 花方信孝, 柿田明美, 柴田亮行. Praja 1 E3 ubiquitin ligase による TDP-43 細胞質凝集体の形成抑制. 第 61 回日本神経病理学会総会学術研究会 (WEB 開催), 2020 年 10 月 12-14 日.
- 6) 渡部和彦. ALS 細胞質 TDP-43 凝集体形成抑制分子の同定と機能解析. 第 42 回神経組織培養研究会, 新潟 (WEB 開催), 2020 年 11 月 15 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) 該当なし

深層学習画像処理技術の開発と応用による脳神経外科手術映像解析

研究代表者 杉山 拓¹⁾
研究分担者 松澤 等²⁾, 中山 若樹¹⁾

1) 北海道大学病院 脳神経外科 2) 新潟大学脳研究所 脳機能解析学分野

研究要旨

脳神経外科手術は、患者の予後を左右させる手技であるが、一方で、安全な手術操作とはどういったものか、科学的に明らかにはなっていない。本研究の目的は、手術映像を分析することにより、外科治療の命題である‘安全性の担保’の本質に定量的に迫ることであり、新しい外科治療概念を提唱・開発しうる橋渡し研究である。この目的のため、新潟大学統合脳機能研究センターのもつ画像解析技術を応用する共同研究を実施した。手術治療における器具や組織の動的情報の定量化することで、アウトカム・有害イベント発生・術者習熟度に関連する因子を探索した。この先にアウトカム予測、有害イベント予測、術者スキル評価人工知能などの開発を見据え研究を継続している。

A. 研究目的

脳神経外科手術は、治療効果の高い医療技術である反面、脳・神経・血管組織損傷のリスクを常に伴い、患者の Quality of life を著しく低下させるものでもある。手術を安全に実施するためには、ノンテクニカルスキルと同様にテクニカルスキルは重要であり、近年の大規模研究によっても明らかにされている。しかしながら、時に‘名人芸’などと称されるテクニカルスキルやその習得過程は、客観的分析への基づきが乏しく、経験と勘に頼ったものが主体であり、膨大な時間と労力を要してきた。技能を客観的に分析することで、術者教育における課題や目標設定の明確化、習熟度の正確な評価が期待されるうえ、手術のあり方を定量データ化することは、手術ロボットやコンピュータシミュレータのような近未来的な手術機器開発において、それを制御・構成する基盤データとしても貢献しうることが期待される。

これまで、工学技術を用いた定量解析によるスキル評価には様々なものが試みられてきた。位置センサ・加速度センサを用いた術者の手や器具の

動作解析研究や、手術器具に搭載された力センサによる、力分析などの研究成果は、一定の成果を示してきた。しかし一方で、単一の定量値のみで複雑な手術手技を包括的に表現することは、未だ確立されてもいない。

近年の映像媒体の技術的進歩や普及を背景に、また、センサやマーカーを用いない汎用性の高い研究を目指すため、本研究では、手術映像を用いた研究を立案した。特に、本研究では、‘手術で損傷を被るのは、手術操作の対象である患者組織である’という仮説の下、剥離させる側の組織の動きに着目した分析を行うことで、新しく‘愛護的な手術操作’の評価ともいえるべきテクニカルスキルの要素を調査した。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

対象

本研究は、北海道大学病院倫理審査委員会の承認を受け、研究参加者（外科医師および患者双方）に対して、研究について十分な説明を行い、適切なインフォームドコンセントのもとで実施され

た。脳神経外科医 16 名が本研究に参加し、頸動脈内膜剥離術 (carotid endarterectomy, CEA) の経験数が 10 症例以下の novice 群 (n=5)、11-49 症例の intermediate 群 (n=7)、50 症例以上の脳卒中の外科学会認定医の expert 群 (n=4) の 3 群に層別化された。2010 年から 2018 年までの間に、北海道大学病院あるいはその関連施設にて CEA を実施された患者 117 名を対象とし、その手術映像を解析した。診療情報から、患者背景 (年齢、性別、罹患側 [左右]、症候性/無症候性、body mass index [BMI])・画像的特徴 (狭窄率、プラーク性状 [脆弱性、高度石灰化]、プラーク位置の高さ)・リスクファクター (高血圧、糖尿病、脂質異常症、喫煙歴)・合併疾患 (冠動脈疾患、心不全、慢性閉塞性肺疾患、腎不全、他の脳動脈狭窄)・服薬情報 (抗血小板薬、抗凝固薬、多剤服用)・手術の有害事象 (脳梗塞、脳神経麻痺) を含む術後経過などの情報を後方視的に抽出した。

映像解析

映像解析は新潟大学脳研究所にて実施した。CEA 映像のうち、特に頸動脈を露出し、剥離する工程の映像を分析に用いた。映像は、TMPGEnc 4.0 XPress[®] (Pegasys Inc., Tokyo, Japan)を用いて、WMV format (720 x 480 pixels, 29.97 frames per second) に変換し、手術映像中に術者の手や器具が現れて、特定の操作を行い、映像外に出るまでを 1 試技 (trial) とし、1 試技ごとに分割した。

映像解析における定点追跡技術を用いて、試技ごとに頸動脈プラーク部位の定量的動的分析 (移動距離・速度・加速度) を実施した。術者の手などに遮られるシーンや、映像倍率が増減しているシーンは解析から除外し、カリブレーションは、術野内に置かれたスケールを用いた。1 試技ごとの頸動脈プラークの最大加速度 (Max. acceleration, MAX-A) を抽出し、解析に用いた。

エラー分析

expert で 5-10%程度にエラーが生じるという

想定に基づき、^{2,3}手術操作のエラーを定義するプラークの加速度閾値は、expert のすべての試技データにおける MAX-A 値の 95 パーセンタイルと定めた。この閾値を超える加速度が生じた場合に、これをエラーと定義した。

統計/数値解析

解析には、SPSS Statistics[®] version 27.0 (IBM, Chicago, IL) を用いた。手術の有害事象発生 (術後脳梗塞、神経麻痺) を抽出し、傾向分析には、Cochran-Armitage 検定を用いた。有害事象発生を目的変数とし、術者側因子である層別化された術者群、映像パラメータ (症例毎の MAX-A 平均値、エラー数)、あるいは患者側因子を説明変数として単変量ロジスティック回帰分析を実施した。連続データは、2 群間であれば Mann-Whitney U 検定、3 群間では Steel-Dwass 検定で比較した。

C. 研究結果

有害イベント

対象の 117 例のうち、術後 3 症例に症候性脳梗塞、2 症例に一過性嚔声が認められていた。また、術翌日に実施した MRI 検査では、6 症例に新たな無症候性脳梗塞を認めていた。これらの計 11 症例 (9.4%) を有害イベント発症症例とした。

有害イベントは、Novice 群の手術では 11 症例中 2 例 (18.2%)、Intermediate 群では 49 症例中 7 例 (14.2%)、Expert 群では 57 症例中 2 例 (3.5%) であり、傾向分析で有意な術者群 (術者習熟度) との相関が認められた ($p=0.04$)。

映像解析

117 症例の CEA 映像において、頸動脈周囲の剥離操作 1842 試技に関して、映像解析が実施された。各試技の MAX-A は、expert 群で 257.1 ± 174.0 、intermediate 群で 354.3 ± 280.3 、novice 群で 424.4 ± 304.5 mm/s² であり、各群で有意な差を認めた ($p<0.01$)。有害イベント発症例と非発症例を比較すると、各症例における MAX-A の平均値は、有害イベント発症例で有意に高かった (420.5 ± 157.4 vs 307.0 ± 105.8 , $p<0.01$)。

エラー分析に用いるプラークの加速度閾値は

471.5 mm/s²と算出された。これを上回るエラー試技は、1842 試技中 254 回 (13.8%) 認められていた。術者群別には、1 症例につき expert 群で 1.4、intermediate 群で 2.5、novice 群で 3.3 回であった。

ロジスティック回帰分析の結果、有害イベント発生に関連していたのは、患者側因子としては、プラークの脆弱性 ($p<0.05$) のみであった。一方、術者側因子としては、術者の習熟度 ($p<0.05$)、平均 MAX-A ($p<0.01$)、エラー回数 ($p<0.05$) のすべてが関連していた。

D. 考察

本研究のこれまでの成果を要約する。

1) CEA における術中有害事象の発生は、術者の習熟度に関連する傾向を認めた。

2) ‘愛護的な操作’の客観的な指標としての、試技中の MAX-A は、術中有害事象発生、術者習熟度の両者に対して相関していた。

3) 有害事象発生に関して、術者因子は、患者因子と同様、あるいはそれ以上に関連する重要なものであることが示された。

4) エラーが有害事象発生に関連していることも明らかとなり、閾値に対するアラーム機能搭載などが手術安全に寄与する可能性が示唆された。

今後の展望として、手術成績や術者習熟度に関連する重要因子の探索を継続するとともに、各重要因子間の相互作用も含めた解析を実施したいと考えている。また、本研究では、手術イベントに関連する因子として映像解析ソフトウェアによる CEA の映像解析結果を示したが、プロジェクトの一環として、新潟大学脳研究所での深層学習強化、開発は継続しており、手術器具の動き分析や他の手術工程への適応拡大を実施していきたいと考えている。今回の研究でエラー分析にも成果を得たため、閾値を超える手術試技に対するアラーム機能搭載も進めていきたいと考えている。

E. 結論

CEA において、剥離中のプラークの加速度やこの値より定義される ‘エラー’ は、術中有害事象

発生、術者習熟度の両者に対して相関しており、術中の安全指標として有用と考えられた。手術映像解析により、手術の安全性に関連する重要因子の探索が可能であることが示唆された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし (投稿準備中)

2. 学会発表

1. 第 50 回日本脳卒中の外科学会・2021 年 3 月 12 日・福岡国際会議場 (WEB ハイブリッド開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

内因的行動の神経基盤の解明

研究代表者 酒多 穂波¹⁾

研究分担者 伊藤 浩介²⁾

1) 中京大学 心理学部 2) 新潟大学 脳研究所 統合脳機能研究センター

研究要旨

我々の行動は、きっかけとなる外部からの刺激入力がない状態で内因的に生じる場合がある。このような内因性の意図に基づく行動の神経基盤は未だに解明されていない。先行研究では、限局した脳領域に自由な行動の発生源があるとの考えに基づき、局所的な脳活動が短い時間窓において重点的に調べられてきた。しかし申請者のこれまでの研究からは、複数の脳領域における自発的な脳活動の増加が行動前の早い段階から始まり、行動の発生に関与していることがわかった。したがって、行動開始前の安静状態から行動実施の瞬間までを含めた長い時間スケールにおける全体的な脳活動を検討する必要がある。本研究では fMRI と脳波を用いて自由なタイミングでおこなう運動に先行する脳活動を計測し、様々な脳領域の活動が安静状態から運動実施に至るまでにどのように変化していくかを明らかにする。

A. 研究目的

我々は自由に自分の意志を決定し行動を選択することができる。しかし、このとき感じている主観的な自由は、行動開始前からの無意識的な脳活動の影響を受けて形成された、いわば“見せかけの自由”である可能性も示唆されており、内因的な意図に基づく自由な行動に関する神経基盤には不明な点が多い。そこで本研究では、内因的な行動の神経基盤の一端を解明するため、行動開始前の脳活動に着目し、自由な運動のタイミングの決定にどのように関わっているかを明らかにする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究は新潟大学倫理委員会の承認を受けて実施した。

「自由意志に基づく行動」の単純な例として「自由なタイミングでおこなう単純な運動（＝自己開始運動）」を対象とし、運動のタイミングに関する意図に注目して検討した。まず、実験参加者が内因的な運動（自己開始運動、free timing

条件）と外因的な運動（cued timing 条件）をそれぞれおこなう際の脳活動を fMRI によって計測し、条件間で比較した。運動の内容は利き手による掌握運動であった。2 条件で運動の回数やタイミングが一致するようにして、意図に関する脳活動を検討できるようにした。得られたデータは事象関連デザインで解析した。先行研究において自由な意思決定を要する実験課題に関与することが示唆されている脳領域を関心領域として、各領域における時系列データは運動に関連してどのような変化を示すかを調べた。

次に、何もしていない状態から内因的に行動を開始するまでの脳活動の時間的特性を詳細に検討するため、自己開始運動をおこなう際の実験参加者の脳波を記録して、自己開始運動に先行する指標として知られている運動準備電位を検討した。長時間窓での計測に適した DC 記録によって脳波を計測し、短い時間窓で検討されることが多い運動準備電位を長時間窓で算出した。

さらに、これまでに得られた結果をふまえ、自己開始運動をおこなう前の自発的な脳活動に実

験的操作を加えることによって運動の発生に影響があるかどうかを行動実験により調べた。実験参加者は、知覚できる強度の刺激（閾上刺激）が呈示されている条件とそうでない2条件（注視点のみ呈示し視覚刺激を呈示しない条件、閾下刺激を呈示する条件）のもとで自己開始運動をおこなった。視覚刺激は、1秒間に10回反転する反転刺激を用いた。

C. 研究結果

まず fMRI 実験に関して、複数の領域において、自由なタイミングで実施する運動の前から徐々に増加するような神経活動が見られることが分かった。その領域は、先行研究ですでに報告のある補足運動野に加え、視覚野、聴覚野、楔前部、右半球の下頭頂小葉、右半球の下前頭回、島皮質であった。またこのような神経活動は、血流動態の遅れも考慮すると約 10 秒前から始まっていた。今回特に新しい結果となったのは、**free timing** 条件においては感覚刺激がなかったにもかかわらず、視覚野と聴覚野において運動前から徐々に増加する活動が見られたことであった。

次に自己開始運動にともなう運動準備電位を検討した結果、運動をおこなうまでの時間が試行ごとに、あるいは個人ごとによりばらついていることにより、運動準備電位の開始時点を決めることは難しいことが分かった。また、運動をおこなうまでの時間が長い被験者と短い被験者では運動準備電位の傾きが異なる傾向が見られた。

最後に行動実験の結果について、閾上刺激を呈示する条件では、視覚刺激を呈示しない条件および閾下刺激を呈示する条件よりも運動が生じるまでの時間が短くなることが分かった。

D. 考察

fMRI 実験の結果から、複数の脳領域において、自己開始運動に先行する自発的な神経活動の上昇が見られ、感覚野までもが自由な意思決定に関与することが示唆された。

また、自己開始運動が発生するまでの時間と運動準備電位の傾きには相関関係があることから、行動開始前からの脳活動の増加が実際の行動の違いに関与していることが示唆された。

さらに、感覚野への刺激入力が自発的な運動の発生に影響を与えている可能性があることも示唆された。今後は刺激呈示の条件などをさらに検討し、実験参加者数を増やして脳波計測および行動実験をおこない、背景にある神経メカニズムについてさらに詳細に検討する予定である。

E. 結論

先行研究で報告のある補足運動野以外の領域にも徐々に上昇するような活動があったことから、内因的な意図に基づく行動は、以前考えられていたように補足運動野を中心とする特定の少数の脳領域だけが究極の起源となつて生じているというよりは、感覚野までもを含む複数の脳領域にまたがるネットワークの活動の上昇の中から生じていることが示唆された。また、運動実施前に自発的に上昇する脳活動は、単なる相関ではなく運動の発生に対して因果関係がある可能性がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. なし

2. 学会発表

1. 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

新しいフェロトーシス阻害システムによる神経細胞保護の検討

研究代表者 鳥居 征司¹⁾
研究分担者 久保田 知里¹⁾, 水野 寛之¹⁾, 金澤 雅人²⁾

1) 群馬大学 食健康科学教育研究センター 2) 新潟大学 脳研究所

研究要旨

脳虚血による神経細胞死では活性酸素種の関与や酸化脂質の蓄積があり、鉄依存性の新規細胞死「フェロトーシス」の特徴に似ている。申請者は最近、細胞を使用したフェロトーシスの解析から新たな細胞死阻害剤（発表前のため非公表）を見出した。共同研究者・金澤博士の支援によりこの阻害剤の効果を脳疾患動物モデルで検証して、臨床応用に向けた基礎的エビデンスの確立を行う。

A. 研究目的

虚血時の神経組織では、ペナンプラ領域を境界にしてアポトーシス様、ネクローシス様双方の細胞死形態が観察され、ネクローシス様細胞死ではグルタチオン(GSH)の低下による活性酸素種(ROS)の増加と酸化酵素 12/15-リポキシゲナーゼ(ヒトではALOX15)の関与などが見出されている。フェロトーシスは2012年に提唱された新規細胞死で、細胞内遊離鉄に依存したROSおよび脂質過酸化の拡大を特徴としている。これまでにグルタチオン・ペルオキシダーゼ 4(GPX4)が抑制機構の中心であることが解明されており、申請者もまた、オートファジーおよびリソソーム機能の関与や膜上のALOX15活性の重要性などを明らかにしてきた。これらの研究成果から、虚血性神経細胞死とフェロトーシスに多くの共通性があることが判明している。

最近申請者は、1つの低分子化合物（仮名：阻害剤-A）が気体としてフェロトーシスを阻害することを見つけた。本研究では、ラットを用いた再灌流モデルに実績のある金澤雅人博士との共同研究により、阻害剤-Aの気体成分による神経細胞死抑制効果を明らかにする。

B. 研究方法

阻害剤-Aは細胞モデルによるフェロトーシス解析実験で非常に強力な作用を発揮し、96ウェルプレートに隅に僅かに滴下したものの、最も対極側の細胞に作用し細胞死を抑制した。気体作用であることを裏付けるために、阻害剤-Aを温めてガス成分を気密ガスバッグに集め、この一部を細胞培養上に注入すると、フェロトーシスが完全に阻害された。

本研究ではまず、マウスを用いた中大脳動脈永久閉塞モデルを作製して、気化させた阻害剤-Aが生体にどのような影響を与えるかを観察する。また本共同研究では、金澤博士の指導のもと自家血血栓によるラット脳塞栓モデル、あるいはラット糸再灌流モデルを作成し解析を行う。動物実験においては動物の苦痛軽減に努力し、適切に麻酔薬や鎮痛薬を使用するなど倫理的に配慮して行う。

阻害剤-Aの気化は30度程度でも確認されているが、さまざまな投与法を検討する。梗塞巣の大きさの評価はTTC染色やMRIを使用して行う。またフェロトーシスに関連するALOX15やGPX4、脂質過酸化の最終産物として知られる4-hydroxy-nonenalに対する抗体を使用した組織染色を行い、脳神経細胞死とフェロトーシスの相関をみる。明らかな抑制効果が得られた

際には、運動機能や四肢の麻痺、摂食障害など機能学的な評価を行うとともに、阻害剤-Aの代謝経路の特定、毒性試験などを詳しく進める。

C. 研究結果

まず阻害剤-Aの気化成分についてGC-MSで分析を行った。室温以上で安定的に気化されること、気化成分が再び水溶液となることなどを確認した。マウスを用いた中大脳動脈永久閉塞モデルにおいては、投与濃度や投与時間、器具等を使った投与方法について検討し、有効性を示す一定の条件を決定した。重要なことに、脳保護効果があり治療に用いられている薬剤エダラボンと比較して、明らかに脳障害体積が小さかったことから、阻害剤-Aの吸入投与による脳梗塞抑制効果が確認された。

D. 考察

本研究ではマウスを用いて中大脳動脈永久閉塞モデルを作成し、阻害剤-Aによる脳保護効果を認定した。また脳研究所・金澤博士の指導のもと、マウス再灌流モデルを用いた解析を進めてきた。しかし通常ラットで作成されるモデルであるため、マウスでの手技は難しく現時点で保護効果の検証に至っていない。今後、同様の結果が複数のモデルで確認されたとき、臨床において虚血再灌流に伴う組織障害の抑制およびtherapeutic time window 延長につながるものと考えている。

E. 結論

マウスを用いた中大脳動脈永久閉塞モデルにおいて、フェロトーシス阻害剤による脳保護効果が確認された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし（作成中）

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

出願手続き中

慢性疼痛関連分子を標的とした脳および脊髄での機能的解明

研究代表者 片野 泰代¹⁾
研究分担者 阿部 学²⁾ 笹岡 俊邦²⁾ 崎村 建司²⁾

1) 関西医科大学医化学 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

神経障害性疼痛などの慢性疼痛時には、非侵害性刺激である低閾値の刺激を、激しい痛みとして認識する「アロディニア」が認められる。アロディニアでは脊髄後角において、低閾値刺激を高閾値刺激として投射する病態依存的な神経回路の形成が生じる。このアロディニアの発症に関わる分子の一つとして、Brain enriched guanylate kinase associated protein (BEGAIN) を同定しており、さらに BEGAIN は脊髄後角の IIi-IIIo 層に局限して発現することを明らかにしている。このことから、アロディニア発症の機序の一つである病態依存的な脊髄内神経回路の再編成に BEGAIN および BEGAIN 陽性細胞が関わる事が予想される。そのことから、脊髄後角における BEGAIN 陽性細胞の性格付けと痛みへの関与について解析を進めている。

A. 研究目的

慢性疼痛病態では、中枢神経系で触覚あるいは痛覚の感受性を亢進させる可塑的变化である中枢性感作が生じている。脊髄ではこの基盤として、病態依存的な脊髄内神経回路の形成、増強が報告されている。この回路形成にかかわる脊髄内介在ニューロンは、特定神経細胞のマーカータンパク質により可視化、電気生理学的な解析などから性格付けされてきた。

我々は、BEGAIN ノックアウトマウスを陰性対象とした免疫染色法により、BEGAIN 蛋白の発現が、脊髄後角で痛みの伝達修飾に重要な IIi-IIIo 層に局限することを明らかにしている。この領域には、多くの介在ニューロンが存在する。そのことから、BEGAIN 陽性介在ニューロンを同定し、その性格付けを行うことで、BEGAIN の慢性疼痛病態依存的な脊髄内神経回路への関与について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)

免疫染色法によって可視化される BEGAIN は

主に、樹状突起に局在していることに加え、*in situ* hybridization 法では、翻訳される mRNA のみを選択的に検出することが困難であることを確認している。よって、BEGAIN プロモーター下流で 3x Venus および Cre recombinase を発現するレポーター・ドライバーマウスの作製を新潟大学脳研究所との共同研究・支援を受けて行った。

C. 研究結果

BEGAIN レポーター・ドライバーマウスの Venus 蛍光により BEGAIN 陽性細胞の検出を試みたが、発現が極めて弱く、Venus 蛍光によって BEGAIN 陽性細胞を可視化することはできなかった。そのことから、Cre recombinase による組み換えにより tdTomato 蛋白が発現する CAGfs-tdTomato/R26 マウスを新潟大学脳研究所より供与いただき、本マウスと BEGAIN レポーター・ドライバーマウスを交配、BEGAIN 陽性細胞の可視化を行った。その結果、脊髄後角において、主に浅層に tdTomato 陽性ニューロンが検出された。本シグナルを用いて、現在これらニューロン

の性格付けと、疼痛モデルにおける解析を進めている。BEGAIN 陽性ニューロンの一部の性格付けの成果については、日本神経科学会にて報告をおこなった。

D. 考察

in situ hybridization 法とは異なり、限局した領域での BEGAIN 陽性神経細胞の可視化に、BEGAIN レポーター・ドライバーマウスを用いることで成功している。よって、本マウスを用いることで、今後、神経障害性疼痛モデルによる BEGAIN 陽性細胞の病態への関与について明らかにできると考えている。その一方で、脊髄内での毛細血管での組み換えが認められており、その理由については今後検証予定である。

E. 結論

免疫染色法で可視化された Ili-IIIo 層の BEGAIN は DRG から輸送されたものではなく、脊髄後角浅層の神経細胞由来であることが示唆された。今後、疼痛モデルを用いた解析により、BEGAIN 陽性細胞の生理的および病態生理的役割について明らかにできる。

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

1. 片野泰代、阿部学、渡辺雅彦、崎村建司、伊藤誠二、小林拓哉
脊髄における BEGAIN 陽性介在ニューロンの可視化
第 43 回日本神経科学大会、Web 開催
2019 年 7 月 29 日－8 月 1 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

側頭葉てんかんにおけるてんかん焦点の可視化 -multimodalityを用いた術前評価による外科手術の成績向上に向けて-

研究代表者 福多 真史¹⁾

研究分担者 藤井 幸彦²⁾

1) 国立病院機構西新潟中央病院脳神経外科 2) 新潟大学脳研究所脳神経外科

研究要旨

側頭葉てんかんに対する側頭葉切除術は、てんかん外科の中では60-80%と発作消失率が高いが、発作残存例が存在することは確かである。従来の発作症候、発作間欠時、発作時脳波検査、脳血流とベンゾジアゼピン受容体集積を調べるSPECT検査、脳磁図検査に加えて、脳研究所での高密度脳波計検査、FDG-PET検査が、更なる焦点同定のための有用な情報が得られ、術後の成績向上に貢献するのかを検討することがこの研究の目的である。高密度脳波計検査の解析はまだ行っていないが、現在までに、9例の側頭葉てんかんの術前検査においては、少なくともFDG-PET検査は有用な情報をもたらす可能性が示唆された。今後症例を蓄積して、側頭葉てんかんの術後の予後を向上させるため、これら2つの検査の術前評価としての有用性を検証する予定である。

A. 研究目的

現在、側頭葉てんかんに対して行われている前側頭葉切除、海馬扁桃体切除術は、てんかん診療ガイドライン2018においても推奨されていて、海馬硬化や腫瘍性病変などがある症例では術後発作消失率が60-80%と高い。一方で残りの20-40%は発作消失に至らず、また病変が認められない場合の発作消失率は50%程度と低下する。

側頭葉てんかんの焦点診断には左右の側方性と内側か外側かの術前評価が重要である。当院では発作症候の他に、脳血流、ベンゾジアゼピン受容体分布を調べるSPECT検査、発作間欠時、発作時頭皮脳波、脳磁図を行ってきたが、新潟大学にはFDG-PET、256チャンネルの高密度脳波計がある。これらの検査を追加することによって、てんかん焦点の検出向上に寄与できるかどうかを検討するものである。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. てんかん外科の対象となる側頭葉てんかん患者10名を対象とする。
2. 当院でのMRI、SPECT検査、発作間欠時、発作時頭皮脳波検査を行う。
3. 脳研究所で高密度脳波計検査、新潟大学でFDG-PET検査を行う。
4. それぞれの検査所見からてんかん焦点（側方性、内側か外側か）の局在を評価する。
5. 実際にてんかん外科を行った症例で術後予後を評価する。
6. 発作消失例と残存例で術前評価としての各検査の有用性を検討する。

C. 研究結果

2016年1月から2021年3月まで新潟大学での追加検査をお願いした側頭葉てんかん症例は22例で、このうち、高密度脳波計検査、FDG-PET検査を施行した症例が9例であった。

9例中すでに手術が行われたのが7例で、7例

中3例は頭蓋内電極を留置した後に焦点切除術を施行した。この3例中2例は発作が完全に抑制されておらず、1例は両側性の可能性があり、迷走神経刺激療法を追加し、1例は意識減損を伴わない焦点発作が月単位で残存している。頭蓋内電極を留置しなかった4例は全例、前側頭葉切除、海馬扁桃体切除術を行っていて、まだ術後観察期間が短い症例も含まれているが、今のところ発作は消失している。

高密度脳波計検査の解析はまだ行われていないが、FDG-PETについては、手術を施行した7例中5例で施行されて、いずれも焦点側での糖代謝低下が確認された。5例中3例は、術前のMRI画像で明らかな所見がなかった、いわゆるnon-lesionalの側頭葉てんかんで、FDG-PET検査は焦点検索において有用であった。

D. 考察

高密度脳波計検査の解析がまだ行われていない状況の中だが、少なくともFDG-PET検査については、側頭葉てんかんの焦点検索において有用であることが示唆された。

FDG-PETがてんかん焦点の同定に有用であることは従来から言われているが、術前のMRI画像で海馬硬化、海馬萎縮の所見が認められない症例でも、FDG-PET検査で側頭葉とくに内側の糖代謝低下が捉えられるというのは、側頭葉てんかんの焦点検索、手術の成績向上には大きな意味があると思われる。手術を施行した5例のうち1例はてんかん焦点の確認のために頭蓋内電極を入れて、慢性脳波記録を行ったが、発作起始部はFDG-PETで糖代謝低下が認められた右内側であることが確認できた。また海馬硬化、萎縮が認められている症例においては、FDG-PETでの糖代謝低下が側頭葉内側のみなのか、側頭葉先端部を含めて広い範囲なのかを確認することが可能であり、それによって前側頭葉切除を加えた方がいいのか、海馬扁桃体切除だけでいいのかという術式選択の有用な情報にもなり得ると思われる。

高密度脳波計については、まだ解析が進んでいないが、頬部まで電極を覆うことができるので、側頭葉内側、先端部のてんかん性異常波が捉えられやすい。FDG-PET検査に加えて、高密度脳波計検査でのてんかん性異常波の広がりの確認でき

れば、側頭葉てんかんの焦点同定の正確性がより向上し、術後の予後にも寄与できると思われる。

今後手術症例を増やし、術後長期の観察期間における予後を検討し、FDG-PET、今後解析予定の高密度脳波計検査の有用性について、研究を継続していく予定である。

E. 結論

側頭葉てんかんの焦点検索において、FDG-PET検査を加えることで、焦点同定の向上に寄与できる可能性が示唆された。今後高密度脳波計検査の解析を進め、手術症例を蓄積して、これらの術前検査の有用性につい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

1. Ayako Furusawa, Akiyoshi Kakita, Yoishi Chiba, Hiroki Kitaura, Yukihiro Fujii, Masafumi Fukuda, Shigeki Kameyama, Atsuyoshi Shimada: Proteomic profile differentiating between mesial temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. Epilepsy Res, 168: 106502, 2020

2. 学会発表

1. 第62回日本小児神経外科学会学術集会 Web開催（2020年8月18日～20日、東京）
小児難治性てんかんに対する外科治療の実際
福多真史, 増田 浩, 白水洋史, 伊藤陽祐, 村井志乃, 藤井幸彦
2. Stroke 2020 Web開催（2020年8月23～25日、横浜）
てんかん焦点を意識した海綿状血管腫摘出の工夫
福多真史, 増田 浩, 白水洋史, 伊藤陽祐, 村井志乃, 平石哲也, 大石 誠, 藤井幸彦
3. 日本脳神経外科学会第79回学術総会 Web開催（2020年10月15日～17日、岡山）
迷走神経刺激療法がベンゾジアゼピン

受容体に与える影響について

福多真史，増田 浩，白水洋史，伊藤陽祐，熊谷駿介，藤井幸彦

4. 日本臨床神経生理学会学術大会第 50 回記念大会（2020 年 11 月 26 日～28 日，京都）

てんかん外科における術中モニタリング

福多真史，増田 浩，白水洋史，伊藤陽祐，藤井幸彦

5. 第 74 回新潟脳神経懇話会（2020 年 12 月 12 日，Web 開催，新潟市）

深層学習による海馬硬化を伴う内側側頭葉てんかんの推定

伊藤陽祐，福多真史

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

微小管結合タンパク質を中心としたゲノム解析と機能解析

研究代表者 宮坂 知宏¹⁾

研究分担者 宮下 哲典²⁾、御園生 裕明³⁾、原 範和²⁾、池内 健²⁾

1) 同志社大学生命医科学部 2) 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野 3) 同志社大学脳科学研究科

研究要旨

微小管結合タンパク質 (MAPs) にはタウタンパク質をはじめ多数知られており、それぞれ微小管の安定性や機能調節に寄与していると考えられている。このうち、タウは病理学的、遺伝学的にも認知症と強い関連が認められるものの、他の MAPs については疾患との関わりを示唆する報告は無い。本研究では、MAPs に特化したゲノムバリエーション情報と認知症との関係を再検証し、新たに見出されたバリエーションについて MAPs の機能解析を行い、その生理機能への影響解明を目指した。

健常例、MCI 例、アルツハイマー病 (AD) 例を含む Whole exome sequence データから、AD に関連した *MAPT* および *MAP2* のレアバリエーションを同定した。このうち *MAP2* のバリエーション X および Y については新規であり、健常例、MCI 例には認められなかった。これら *MAP2* バリエーションの生理機能への影響を解析する目的で、変異型リコンビナント MAP2 を作成、精製した。また、各 MAPs の欠損マウス脳における RNA-seq をを行い、新たな mRNA 発現ライブラリーを構築した。

A. 研究目的

微小管結合タンパク質 (MAPs) にはタウタンパク質、Microtubule associated protein2 (MAP2)、MAP1B、MAP1A、MAP6 など多数知られており、それぞれ微小管の安定性や機能調節に寄与していると考えられている。このうち、タウタンパク質はアルツハイマー病をはじめとする認知症の主要病理を形成するとともに、家族性認知症 (FTDP-17) の原因遺伝子としても知られている。これに対し、タウ以外の MAPs については脳神経疾患との関わりを示唆する報告は無い。最近の同志社大学神経病理学研究室における遺伝子改変動物を用いた研究の成果として、これら MAPs 欠損で特徴的な表現型が確認されている。これらの結果は、これまで微小管への相補的な安定化として信じられてきた一部 MAPs の分子機能に対し、固有の生理機能が期待される事、個々の MAPs の

変異や SNP が特定の疾患に対する責任遺伝子となり得る可能性を意味している。

本研究では MAPs に特化したゲノムバリエーションの解析と臨床症状との関係を再検証し、ヒト脳における MAPs の個々、あるいは複合的な神経機能への影響について検証する。得られた結果については、同志社大学において確立されている複数の MAPs 機能解析に供し、その生理機能への影響を検証する。本研究の成果は、神経機能を支える微小管およびその機能を調節するタンパク質群についての臨床的意義を明確にするとともに、翻って認知症にかかわるタウタンパク質の特異的な機能を明らかとするものである。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野において、これまでに解析した J-ADNI ゲノムサンプル

ルの Whole exome sequence データをもとに MAPT, MAP2 遺伝子について Mutant Allele Frequency, PEXT Score, CADD score をもとに絞り込みを行い、認知症との高い関係が疑われるレアバリエントを同定した。

得られたバリエント情報をもとに同志社大学で保有する human MAP2C 大腸菌発現ベクターをもとに site directed mutagenesis により変異型 MAP2 発現ベクターを作成した。さらにこれらプラスミドを用いて、野性型 MAP2、バリエント X-MAP2、バリエント Y-MAP2 リコンビナントタンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) 株に誘導発現させ、Ni²⁺-Sepharose カラムを用いて精製した。得られたタンパク質について SDS-PAGE / CBB 染色を行い、精製度、回収量について検証した。

野性型マウス脳を 0.5 M NaCl を添加した Microtubule Stabilization Buffer でホモジナイズし、超遠心により内在性 MAPs を持たない微小管画分を得た。得られた微小管と各リコンビナント MAP2 を混和し、4°C, 30 分静置した後に超遠心分離し、微小管結合画分および非結合画分を得た。各画分に得られた MAP2 について Western blotting 法により定量した。

3 ヶ月齢の雄 WT, TKO, MKO, DKO マウスから脳幹を摘出し、-80°C で凍結保存した。ISOGEN-LS 中でホモジナイズし、規定の手法に基づき total RNA を調整した。得られた RNA について定量および Agarose gel 電気泳動により quality check を行った。

脳幹より得られた total RNA より RNA-seq ライブラリを作成し、NextSeq500 でシーケンス解析を行った、得られたシーケンスリードについてマウス参照配列 (GRCm38: Ensembl release 102) マッピングを行い、DESeq2 v1.30.1 を用いて発現変動解析を行った。

本研究は同志社大学動物実験委員会 (A20039 号) および同志社大学組換え DNA 実験安全管理委員会 (D20024 号) の承認を得て行った。

C. 研究結果

J-ADNI で集積された健常 147 例、MCI 221 例、AD 140 例を対象に行った Whole exome sequence データをもとに、MAPT および MAP2 遺伝子のバリエントを検索した。さらにアミノ酸変異をおこ

すもの、変異アレル頻度が十分に低いもの、脳での明確な発現が認められるもの、疾患との関係性が期待されるものについて絞り込みを行った結果、MAPT では 1 例、MAP2 には 2 例の変異を同定した。タウの変異については既知であったが、MAP2 についてはこれまで報告にないレアバリエントであった。これをバリエント X, Y とした。それぞれの変異アミノ酸部位およびこれまでに同志社大学でおこなってきた MAP2 の生理機能に対するドメイン解析の結果から、これらの変異は MAP2 の神経細胞内局在、あるいは微小管への機能に影響を与える可能性が示唆された。

得られたバリエント X, Y の MAP2 への影響について検証する目的で、リコンビナントの作成を試みた。既存の His-MAPs 精製法を応用することにより、His-MAP2、His-X-MAP2、His-Y-MAP2 についてそれぞれ 1.500 mg, 1.755 mg, 2.040 mg の高純度タンパク質を精製した。現在、これらを用いてマウス脳より精製した安定微小管に対する結合解析法の検討を行っており、安定した微小管への結合条件を見出したところである。さらに次年度においてチューブリン重合促進活性、さらには神経細胞内における局在解析を行う予定である。

これまでの解析から TKO では明確な発達障害、形態学的異常はおこらないものの、様々な表現型が報告されている。MKO マウスについては同志社大学における先行研究において生理学的な機能障害が認められている。これらは MAPs 単独の機能損失が様々な神経機能へ影響を及ぼす可能性を示している。MAPs 欠損の遺伝子発現への影響を調べる目的で、各系統脳より得られた total RNA をもちいた RNA-seq 解析を行った。得られたシーケンスリードについて主成分分析を行った結果、WT, TKO, MKO については特徴的な発現パターンが確認された。DKO については TKO, MKO の特徴を併せ持つ発現パターンであることが確認された。また、クラスター解析の結果、タウまたは MAP2 の欠損で発現が変動する mRNA 群を同定した。

D. 考察

マウスにおいて、タウあるいは MAP2 の欠損により特徴的な表現型と遺伝子発現パターンの変

動が認められたことから、各 MAPs は生体において独自の機能を有していること、さらにその機能損失は何らかのステップを介し、神経細胞の機能さらには遺伝子発現に影響を与えてると考えられる。これらモデル動物より得られた情報は MAPs の疾患に関与する未知のレアバリエーションの可能性を示唆するものである。

E. 結論

MAPs には疾患や機能損失に関わる可能性があるレアバリエーションがあり、その代表として MAP2 には X、Y といったものがある。また、タウ、MAP2 の欠損によりそれぞれに特徴的な発現変動を呈する遺伝子群がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析

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 中川 直樹^{1), 2)}

1) 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所神経回路構築研究室

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

ヒトを含む高等動物の感覚系神経回路は、胎児期後期から子供の時期にかけて自発活動や感覚入力といった神経活動の影響を受けながら成熟する。マウスを用いてその仕組みを理解することは、ヒトの脳が成長期に環境の影響を受けながら正常に発達する機構やその破綻としての発達障害を理解する上で重要である。われわれは、げっ歯類の主要な体性感覚器である頬ヒゲからの触覚情報の処理を行う体性感覚系神経回路をモデルとして、マウス遺伝学の手法を用いることによって、活動依存的な神経回路発達のメカニズムの理解を目指している。本課題では特に三叉神経経路の脳幹において回路が精緻化されるメカニズム、および、脳幹での回路精緻化が下流にあたる視床や大脳皮質の回路に与える影響について解析を行っている。

A. 研究目的

哺乳類など高等動物の感覚系神経回路が機能的な回路として成熟するためには、ゲノムの遺伝情報に加えて、胎児期後期から子供の時期にかけて自発活動や感覚入力といった神経活動による精緻化を受けることが重要である。マウスを用いて生後発達期における活動依存的な神経回路精緻化の仕組みを理解することは、ヒトの脳が成長期に環境の影響を受けながら正常に発達する機構やその破綻としての発達障害を理解する上で重要である。われわれは、げっ歯類の主要な体性感覚器である頬ヒゲからの触覚情報の処理を行う三叉神経経路を主要なモデルとして、マウス遺伝学の手法を用いることによって、活動依存的な神経回路発達のメカニズムの理解を目指している。本課題では脳幹特異的に NMDA 受容体機能が失われた条件的遺伝子ノックアウトマウスを用いて、脳幹での回路精緻化のメカニズム、および、それが下流にあたる視床や大脳皮質の回路に与える影響について解析を

行ってきた。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

マウスでは、主要な体性感覚器であるヒゲからの触覚刺激の情報を伝達する三叉神経経路において、中継核である脳幹と視床および大脳皮質の第4層にそれぞれバレル、バレル、バレルとよばれる、頬におけるヒゲの配置に対応したトポグラフィックな体性感覚マップが形成される。これらをモデルとして神経活動依存的な神経回路発達に関する解析を行った。NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体）の必須サブユニットである NR1 を脳幹特異的に欠損するマウスを作製したが、このマウスを用いて体性感覚回路の脳幹、視床、大脳皮質における回路精緻化に関して、主に組織学的手法を用いて解析を行った。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。研究に用いた実験動物・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、考察

脳幹特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスの一系統と NMDA 受容体必須サブユニット NR1 の flox マウスを交配して作製した脳幹特異的 NR1 欠損マウスを用いた。このマウスの脳幹を CO 染色によって解析したところ、バレットが形成されていないことが見いだされた。前シナプスマーカーでの免疫組織化学染色でも同様の結果が得られ、脳幹の NMDA 受容体がバレット形成に必須であることが確認された。しかしながら、同時に視床のバレロイドと大脳皮質のバレルは一定レベル形成されていることも見出された。この解析で用いた脳幹特異的 Cre マウスの脳幹での組換え効率を定量的に解析したところ、完全なノックアウトになっていないことが明らかとなった。この問題を解決するために、新たな脳幹特異的 Cre マウスを作製し、上記の Cre マウスと組み合わせることで遺伝子ノックアウトすることが可能となった。この 2 種類の Cre マウスを組み合わせることで用いた NR1 ノックアウトマウスの脳幹、視床、大脳皮質を CO 染色を含む各種の組織学的手法で解析したところ、バレットだけでなく、バレロイド、バレル形成も形成されないことが明らかとなった。これらの結果は、脳幹での NMDA 受容体が脳幹での回路精緻化だけでなく、下流である視床や大脳皮質回路の精緻化にも間接的に重要な役割を担うことを示すものである。

一方、最初に述べた脳幹特異的 NR1 欠損マウスにおいて、バレットが形成されないにもかかわらずバレロイド、バレルが形成されることは、上流にあたる脳幹での回路精緻化が不十分でも下流にあたる視床や大脳皮質でそれを代償する仕組みがあることを示唆すると考えられ、興味深い。これらのことを明確にするための解析をさらに進めている。

本研究は、遺伝子変異マウスの作製とそれを用いた神経回路解析に関して豊富な知識と経験を有する新潟大学脳研究所の笹岡俊邦教授の協力を得ることによって、効率的な研究遂行が可能となったものであり、本共同研究によるご支援に感謝いたします。

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

1. 岩里琢治（招待講演）

神経回路精緻化メカニズムの遺伝学的解析

新潟大学脳研究所共同利用共同研究合同セミナー 2021 年 1 月 20 日（オンライン）

2. 岩里琢治、中沢信吾、水野秀信

バレル野第 4 層における発達に伴う自発活動相転移 (Developmental Phase Transitions of Spontaneous Activity in Barrel Cortex Layer 4)

第 43 回日本神経科学大会 2020 年 7 月 29 日・8 月 1 日（オンライン）ポスター

3. 中川直樹

ゴルジ体ダイナミクスによる大脳皮質神経細胞の樹状突起精緻化 (Intracellular dynamics of the Golgi apparatus regulate dendritic refinement in the developing barrel cortex)

第 14 回神経発生討論会 2021 年 3 月 19 日・20 日（オンライン）口演

主催：竹林浩秀（新潟大学）、平島正則（新潟大学）

4. 中川直樹（招待講演）

Spatial remodeling and organelle dynamics of L4 neurons during thalamocortical module formation in the mouse barrel cortex

遺伝研研究会 Circuit Construction in the Mammalian Brain 2020 年 12 月 11 日・12 日（オンライン）

5. 中川直樹、中沢信吾、岩里琢治

長期 in vivo イメージングによるバレル構造形成過程の神経細胞動態解析 (Long-term in vivo imaging of spatial remodeling of cortical L4 neurons for the barrel module formation)

第 43 回日本神経科学大会 2020 年 7 月 29 日・8 月 1 日（オンライン）ポスター

6. Luwei WANG, Shingo NAKAZAWA, Hidenobu MIZUNO, Takuji IWASATO

Exploring the mechanisms of dendritic refinement in neonatal mouse barrel cortex via in vivo high time-resolution imaging

第 43 回日本神経科学大会 2020 年 7 月 29 日-8
月 1 日（オンライン）ポスター

7. 中嶋ちえみ、鈴木亜友美、岩里琢治

脳幹 NMDA 受容体欠損マウスの体性感覚神経回
路 (Neural circuits in the ascending trigeminal
pathway in the mice devoid of brainstem
NMDA receptors)

第 43 回日本神経科学大会 2020 年 7 月 29 日-8
月 1 日（オンライン）ポスター

8. Piu BANERJEE, Hidenobu MIZUNO,
Takuji IWASATO

Deciphering the source and mechanism of
patchwork-type spontaneous activity in the
neonatal mouse barrel cortex

第 43 回日本神経科学大会 2020 年 7 月 29 日-8
月 1 日（オンライン）ポスター

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

アルツハイマー病タウ蓄積および変性に対する aquaporin-4 機能促進薬 TGN-073 の効果の検証

研究代表者 山田 薫¹⁾
研究分担者 五十嵐 博中²⁾

1) 東京大学医学系研究科 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

アルツハイマー病をはじめとする複数の神経変性疾患はタウオパチーと呼ばれ、細胞内におけるタウの異常蓄積が神経細胞死の原因となっている。研究代表者はこれまでに glymphatic clearance に主要な役割を果たす Aquaporin-4 (AQP4) が、細胞外液中のタウのクリアランスに関与すること AQP4 の欠損によりリン酸化タウ蓄積、及び神経変性が著明に増悪することを見出した。この研究結果に基づき、本共同研究では、脳研究所五十嵐博中教授により作出された TGN-073 を用い、AQP4 の機能促進がタウの異常蓄積と神経変性に与える影響について解析した。タウオパチーモデルマウス PS19 において、6 か月齢から 3 か月間 TGN-073 を投与すると、可溶性タウ、不溶性タウともに低下することから、glymphatic clearance の促進がタウ除去に重要な役割を果たすことが示唆された。

A. 研究目的

近年アルツハイマー病患者脳において、タウの病理が細胞外腔を介し細胞間伝播することが明らかになり、細胞外タウの動態が大きな注目を集めている。本研究では脳細胞外液中の物質クリアランスに重要な glymphatic clearance に着目し、五十嵐教授との共同研究によって glymphatic clearance を亢進させる aquaporin-4 機能促進薬 TGN-073 が、タウの異常タウ蓄積や神経変性に与える影響を解析することを目指す。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

ヒト P301S 変異型タウを過剰発現する PS19 マウスでは 6 か月齢からリン酸化タウの異常蓄積が開始し、9～12 か月齢において神経細胞死が生じることが知られている。そこで aquaporin-4 機能促進薬 TGN-073 を、リン酸化タウ蓄積開始前の早

期の治療モデルとして 6 か月齢から 3 か月間投与し、免疫組織化学及び生化学的解析により、リン酸化タウの蓄積及び神経細胞死に対する効果を検証した。

C. 研究結果

TGN-073 を PS19 に 6 か月齢から 3 ヶ月間投与する実験を行った。TGN-073 投与マウスの脳を段階的生化学的抽出法により解析すると、可溶性タウ、不溶性タウともに、TGN-073 投与で有意な低下を認め、glymphatic clearance の促進が、脳内タウの除去を促進することが示唆された。

D. 考察

本実験結果により、TGN-073 の投与は脳内タウ量を低下させることが示唆された。今後、組織学的

にもリン酸化タウの蓄積が減少しているか検討する予定である。また本実験では短期投与を行ったが、TGN-073 がタウによる神経変性にどのような影響を及ぼすかについては長期投与を行い解析する必要がある。

E. 結論

Glymphatic clearance の促進はタウオパチーにおけるタウ蓄積の抑制において有効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

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

SCA42 モデルマウスを用いた神経変性疾患病態解明、治療法開発

研究代表者 土井 宏¹⁾

研究分担者 笹岡 俊邦²⁾、田中 章景¹⁾

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

*CACNA1G*は、低電位活性化型のT型電位依存性カルシウムチャネル(VGCC)の一種であるCaV3.1をコードしており、神経細胞の興奮性の制御に重要な役割を果たしている。申請者らは*CACNA1G*のR1715H変異をCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集により導入したノックインマウス(*Cacnalg_R1723H_KI*マウス)を作成し、10~50週でヘテロ、ホモノックインマウスともにRotarod test、Foot print testにおいて失調症状を認めることを確認した。また病理学的には50週の時点でヘテロ、ホモノックインマウス共にPurkinje細胞(PC)脱落を認め、スライスカルチャーを用いたPCの電気生理学的検査において、ホモのノックインマウスで電流電圧曲線の変化、rebound firingの減少を認めた。このように、申請者らは脊髄小脳失調症42型(SCA42)モデルマウスの確立に成功し、論文発表している。本研究では我々が新たに確立したSCA42モデルマウスを用いて、RNA sequencingによる小脳遺伝子発現変化の解析、in vivoでのPCの電気生理学的解析を通じたSCA42病態解明、さらにT型VGCC機能修飾薬によるSCA42治療法開発を目的としている。

A. 研究目的

SCA42の病態解明と、治療法開発を目的として研究を進める。病態解析としてはRNA sequencingによってSCA42モデルマウスの小脳における遺伝子発現変化の検索を行い、変異が神経変性を惹起する機序の解明を目指す。また、in vivoでPCの発火異常を検出し、生体内での電気生理学的異常を評価する。治療法開発としては、T型VGCC機能修飾薬投与下に表現型解析、in vivo電気生理学的解析を行うことで、チャネル機能修飾によるSCA治療の可能性について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)

RNA sequencingによる小脳遺伝子発現変化の解析

症状が出始める15週齢、および安定して症状を呈する30週齢、50週齢の野生型、ヘテロおよびホモノックインマウスの小脳からRNAを抽出し、RNA sequencingによる網羅的解析を行う。野生型とヘテロおよびホモノックインマウス間で発現が変化する遺伝子のパスウェイを同定し、チャネル機能障害から神経変性へ至る病的機序の解明、新たな治療ターゲットの同定を目指す。

In vivoでのPCの電気生理学的解析

慈恵医科大学薬理学教室との共同研究により、野生型、ヘテロおよびホモノックインマウスのPCから直接電気的活動を記録することで、生体内で実際に起こっているPCの異常を明らかにする。PC解析においては、近年開発されたチャネルロドプシン2を用いた光遺伝学を応用し、青色光照射によりPCが選択的に発火するトランスジェニック

クマウス (Ai32×L7-Cre マウス, Barski, JJ, et al., Genesis, 2000; Madisen L, et al., Nat Neurosci, 2012) を本研究の対象となる *Cacnalg_R1723H_KI* マウスと交配することで、各ジェノタイプにおいて青色光照射により PC の同定を可能にしたうえで、異常な発火パターンの有無とその性質を解析する。

T 型 VGCC 機能修飾薬による SCA42 治療法開発

機能修飾薬としては、変異が gain-of-toxic-function であるとの立場からは T 型 VGCC 阻害薬を、loss of function の立場から、カルシウムチャネル活性化薬（東北大学薬理学教室との共同研究により、機能促進薬を投与）の効果を検討する予定である。10 週以降のオスを対象とし、機能阻害薬または促進薬を経口投与し、新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野笹岡俊邦教授の指導の下、行動解析、病理学的評価を行う。具体的には体重、飲水量の評価、Rotarod テスト、Foot Print テスト、PC 密度、分子層の変化の評価を行う。また①、②の RNA 解析、電気生理学的解析で差が出た異常について、機能阻害薬または促進薬投薬前後での変化について評価を行う予定である。

C. 研究結果

RNA sequencing による小脳遺伝子発現変化の解析

現在 15 週齢、30 週齢については、野生型、ヘテロおよびホモノックインマウスの小脳から RNA を抽出し、RNA sequencing による網羅的解析を行って結果を解析中である。また 50 週齢についても RNA 抽出まで行っている。

In vivo での PC の電気生理学的解析

現在、青色光照射により PC が選択的に発火する Ai32×L7-Cre マウスと *Cacnalg_R1723H_KI* マウスの交配を行っており、順調に解析可能なジェノタイプを持つマウスを得ることができている。

T 型 VGCC 機能修飾薬による SCA42 治療法開発

現在 *Cacnalg_R1723H_KI* マウスにおいて Rotarod テスト、Footprint テスト、病理学的変化の検討により、T 型 VGCC 機能阻害薬の一種について、治療効果の検証を進めている。その結果、ヘテロノックインマウスにおいて Rotarod テストで 30 週齢以降、有意に運動失調症状が改善することが示

され、50 週では PC 変性が改善している所見が得られている。すなわち、T 型 VGCC 機能阻害薬投与は SCA42 治療に非常に有望であると考えられる。また T 型 VGCC 機能活性化薬についても投与実験を行っている。

D. 考察

申請者らが作成した *Cacnalg_R1723H_KI* ヘテロノックイン、ホモノックインマウスともに Rotarod test において緩徐進行性の運動機能の低下を認めている。ヒトにおける表現型としては、20～30 台発症で非常に緩徐な小脳失調症状の進行を認めることから、これに合致する表現型と考え、良好な動物モデルの作成に成功したと考えられる。また、50 週齢で PC 脱落が明らかとなり、病理学的にも SCA42 の所見を再現することができている。本研究において T 型 VGCC 機能阻害薬投与した結果では投与群で失調症状の改善を認め、さらに PC 変性抑制効果を確認することができた。今後 RNA sequencing、in vivo 解析により神経変性、治療効果の病態基盤の解明を進めることにより、SCA42 の疾患修飾療法開発へつながる可能性があると考えられる。

E. 結論

SCA42 のモデルマウスに対するカルシウムチャネル機能修飾薬の投与試験では、ヘテロノックインマウスで失調改善、神経変性抑制効果を認め、疾患治療へ発展させていける可能性が示唆された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Kunii M, Doi H, Hashiguchi S, Matsuishi T, Sakai Y, Iai M, Okubo M, Nakamura H, Takahashi K, Katsumoto A, Tada M, Takeuchi H, Ishikawa T, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N, Tanaka F: De novo *CACNA1G* variants in developmental delay and early-onset epileptic encephalopathies. J Neurol Sci • 416 • 117047 • 2020.
2. Nakamura H, Doi H, Mitsuhashi S, Miyatake S, Katoh K, Frith MC, Asano T, Kudo Y, Ikeda T, Kubota S, Kunii M, Kitazawa Y, Tada M, Okamoto M, Joki H, Takeuchi H,

Matsumoto N, Tanaka F: Long-read sequencing identifies the pathogenic nucleotide repeat expansion in *RFC1* in a Japanese case of CANVAS. *J Hum Genet* • 65(5) • 475-480 • 2020.

3. Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Hatooka Y, Takahashi K, Katsumoto A, Kubota S, Nakamura H, Kunii M, Tada M, Doi H, Tanaka F: CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice. *Mol Brain* • 13(1) • 64 • 2020.

4. Doi H, Okubo M, Fukai R, Fujita A, Mitsuhashi S, Takahashi K, Kunii M, Tada M, Fukuda H, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Sone J, Sobue G, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F: Reply to "GGC Repeat Expansion of *NOTCH2NLC* is Rare in European Leukoencephalopathy". *Ann Neurol* • 88(3) • 642-643 • 2020.

5. Ogasawara M, Iida A, Kumutpongpanich T, Ozaki A, Oya Y, Konishi H, Nakamura A, Abe R, Takai H, Hanajima R, Doi H, Tanaka F, Nakamura H, Nonaka I, Wang Z, Hayashi S, Noguchi S, Nishino I: CGG expansion in *NOTCH2NLC* is associated with oculopharyngodistal myopathy with neurological manifestations • *Acta Neuropathol Commun* • 8(1) • 204 • 2020.

2. 学会発表

- 橋口俊太, 土井宏, 國井美紗子, 中村行宏, 志牟田美佐, 鈴木江津子, 大久保正紀, 窪田瞬, 多田美紀子, 児矢野繁, 竹内英之, 石川太郎, 田中章景: Ataxic phenotype with altered Cav3.1 channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42. 第61回日本神経学会学術大会・2020年5月・岡山.
- 土井宏, 大久保正紀, 深井綾子, 國井美紗子, 岸田日帯, 高橋慶太, 勝元敦子, 多田美紀子, 藤田京志, 三橋里美, 宮武聡子, 伊藤泰広, 上田直久, 児矢野繁, 竹内英之, 松本直通, 田中章景: Genetic analysis of adult leukoencephalopathies. 第61回日本神経学

会学術大会・2020年5月・岡山.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 特許取得
該当なし。
- 実用新案登録
該当なし。
- その他
該当なし。

ミクログリア機能修飾によるタウ病態の変化の検討

研究代表者 高堂 裕平¹⁾

研究分担者 金澤 雅人²⁾, 樋口 真人¹⁾, 小野 麻衣子¹⁾

1) 量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門 2) 新潟大学脳研究所脳神経内科学分野

研究要旨

ミクログリアの性質を変容することでタウ認知症病態が変容するか否かをイメージングにより検証することを課題とする。初代培養ミクログリアを薬剤刺激等により保護的ミクログリアに変容させ、これを疾患動物モデルの脳に注入する。保護的ミクログリアにより炎症が改善されるか、また、タウ蓄積など認知症でみられる変化が改善されるかを検討する。

A. 研究目的

ミクログリアの機能修飾でタウ認知症病態が変化するか否かを検討することを本研究の目的とする。脳のホメオスタシスや神経障害に重要な役割を果たしているミクログリアのうち、抗炎症サイトカインを分泌し、組織のリモデリングによる神経ネットワークの再生を促進させる保護的ミクログリアに着目する。ミクログリアに薬剤や種々の刺激を加えることにより保護的ミクログリアになるとの報告がある。また、保護的ミクログリアを虚血脳に動注し、脳血液関門や脈絡叢を介して脳に移植することで、炎症を抑え虚血を改善させるとの報告がある。一方、アルツハイマー病(AD)の病態には炎症が関与しているとの報告があり、炎症の改善がADの進行を抑制させる可能性がある。本研究では、タウ蓄積型モデルマウス(rTg4510)に保護的ミクログリアを投与することで、炎症を抑え認知症病態の進行を抑制できるかを検討する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究では、保護的ミクログリアを認知症病態モデルマウスに投与して病態が変化するか否かを

を検証することを目的とし、下記を並行してすすめる。

①初代培養ミクログリアまたは株化ミクログリアを用いて、種々の刺激により保護的ミクログリアを作成することを目指す。

fluorescence-activated cell sorting (FACS)によりミクログリアの性状を確認の後、保護的ミクログリアをrTg4510に投与し、脳内の病態(神経機能、タウ蓄積量等)がどう変化するかを検証する。

②rTg4510マウスにおいて、ミクログリアをCSF-1R阻害剤で除去し、その状態で保護的ミクログリアを投与して病態が修飾されるか否かを検討する。

C. 研究結果

本年度は、保護的ミクログリアをrTg4510に投与して脳内の病態変化を検証する実験系の検討を行い、FACSを用いてミクログリアの性状評価を行うための検出系を確立した。また、rTg4510マウスにおいてミクログリアを除去し、その状態で保護的ミクログリアを投与した際の病態変化を検証する実験系の確立のため、CSF-1R阻害剤を用

いたマウス脳内ミクログリアの除去法の最適化を行った。さらに、対照的な知見を得るために、rTg4510 マウスの脳内におけるタウ病理蓄積に伴うミクログリアの性状変化を解析した。その結果、rTg4510 マウス脳内の病理形成が豊富な領域である大脳皮質や海馬では、タウ病態の進行に伴いミクログリアの総量が増加する一方で、P2Y12 受容体を発現したミクログリアは病態の初期段階から顕著に減少することが明らかとなった。

D. 考察

rTg4510 マウスの脳内では、病態の初期段階に、恒常的ミクログリアが disease-associated ミクログリアへと遷移する可能性が示された。本年度に確立した実験系を用いて rTg4510 マウスに保護的ミクログリアを投与し、disease-associated ミクログリアが関与する炎症や病態の変化を検証するためには、病態の初期段階からの保護的ミクログリアの投与が重要であると考えられる。一方で、投与した保護的ミクログリアが rTg4510 マウスの脳内で disease-associated ミクログリアへと遷移する可能性を考慮する必要があり、投与時期や投与回数についても検討を行うことで、保護的ミクログリア投与によるタウ病態修飾に関する正しい理解がもたらされ则认为る。

E. 結論

rTg4510 マウスの脳内では、病態の初期段階に、恒常的ミクログリアが disease-associated ミクログリアへと遷移する可能性が示された。今後は保護的ミクログリア投与法の検討を実施した上で、rTg4510 脳内の病態に対する作用を検証していくことが好ましいと考える。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Brain Commun, 3, fcab011, 2021

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

中枢神経系組織における微量元素の分布：シンクロトロン放射光による測定 条件の検討

研究代表者 松浦 晃洋¹⁾

研究分担者 杵渕 幸¹⁾、柿田 明美²⁾

1) 藤田医科大学研究統括監理部, 2) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

脳神経系疾患と微量元素の関係は疫学研究や細胞培養系実験で推測されているものの明確な回答は得られているとは言えない。一方では、疾患及び正常（病気でない）状態における脳神経系の微量元素の分布に関する情報はかなり限定的である。剖検標本等を部位毎に切り出して生化学的に測定する試みはあったが検索試料や疾患も限定されているし、組織・細胞レベルでの分布は鉄や銅の組織化学染色による解析が行われたが検出感度が低く原理的に元素特異性を有しない。私たちはシンクロトロン放射光を利用して肝臓の組織銅の局在を解析する手法を工夫・樹立してきた。今回、脳神経系における微量元素の局在解析を行うため、各種の測定条件を検討した。銅過剰脳の組織学的解析例とともに報告する。

A. 研究目的

脳神経系組織における微量元素の分布を組織・細胞レベルでの空間解像度を持って解析することで、微量元素と脳神経疾患の関係を探ることを目標とする。今年度は、脳神経組織における微量元素（鉄・銅・亜鉛）を検出するために適した組織切片の作成方法（支持膜）と組織切片の厚さについて検討し、病気の組織を測定し画像化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）

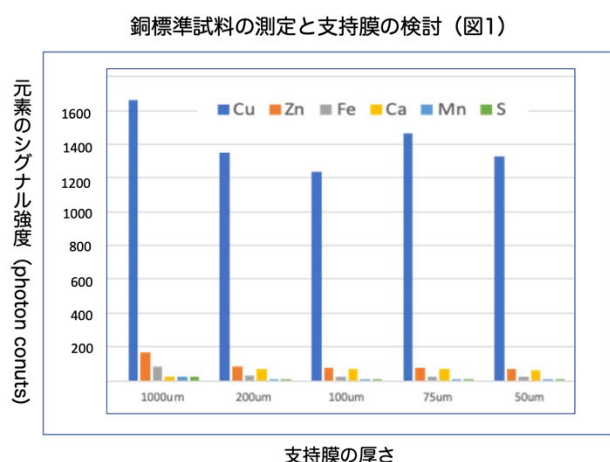
ヒト脳神経系疾患組織は新潟脳研ブレインバンク標本から、また微量元素異常疾患の組織を用いた研究は藤田医科大学医学研究審査委員会における承認を受けている。組織は10-20%ホルマリン固定液にて十分固定し観察する場所を約2-4cm角で切り出し、パラフィン包埋ブロックから切片を作成した。厚さの異なる切片（4/8 μm）を支持膜の上に載せ試料ホルダーに装着した。放射光実験は高エネルギー加速器研究機構の Photon

Factory にて行った。入射光は10-12keV程度に二結晶分光器にて調整した。集光素子はPolycapillaryとKirkpatrick-Baezミラーを用い、各々の条件のビームサイズは26ミクロン、5ミクロン程度である。検出器はエネルギー分散型X線検出器SDDを用いた。二次元分析のため測定台はピエゾ方式によるステップスキャン測定を行った。

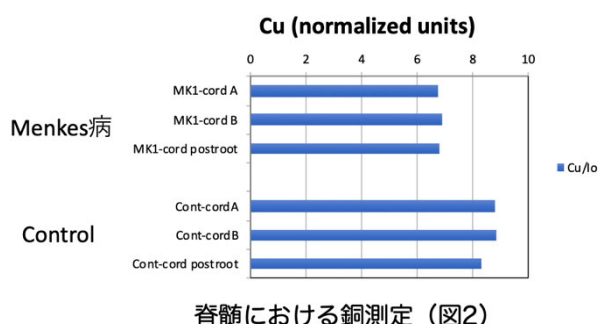
C. 研究結果及び考察

ガラスは希土類を含んでいるため支持膜の種類を検討しカプトン膜、マイラー膜などが使用可能であることがわかった。支持膜は切片を採取するため一定の厚さが必要であるが、あまり厚いとバックグラウンドが試料からのシグナルを隠す可能性がある。厚さ1000, 200, 150, 100, 75, 50 (μm) について検討した。150以下であれば操作性とバックグラウンドの問題は回避できた。銅の標準試料を用いた測定結果を図1に示す。試料測定時に混在してくる背景の元素シグナルは非常

に小さく元素特異的な検出が可能であることがわかった。そこで切片を 50 ミクロンの支持膜に採取して測定に供した。

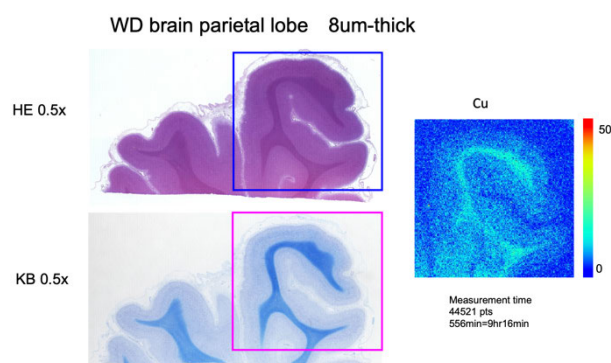


対照として Menkes 病と健常の脊髄組織の銅の検出のスポット解析例を示す (図 2)。Menkes 病脊髄では Cu-histidine の治療で血中銅が高くなっているにもかかわらず、脊髄での銅がやや低いことが判明した、



脳神経組織の切片の厚さとシグナル強度を比較した結果、Polycapillary (PolyCap) による semi-microbeam 条件と K-B ミラーによる microbeam 条件では差が認められた。PolyCap では十分なシグナルが短時間暴露で得られるが、microbeam ではシグナル強度が落ちるため、測定時間を長くする必要がある。空間解像度を上げるにはビームサイズが小さい方が望ましいが、広範囲測定にはシグナル強度が高くスポット当たりの測定時間が短い PolyCap 条件が適していることがわかった。そこで、ブラインバンク試料から WD 脳を測定した。図 3 に示すように WD 脳では白質に強い銅の局在がみられた。2020 年度はコロナ禍で放射光施設が閉鎖を余儀なくされ、正常脳 (脳神経疾患でない) との比較やより詳しい解析がこれ以上進められなかったため、再現性の確認やよ

り空間解像度の高い条件で、他の部位・他の症例で検討する必要がある。幸い、2021 年度は施設が実験用にはオープンして課題も採択されているので、継続して正常および脳神経系疾患における銅や鉄などの微量元素の局在と病理学的意義について解析を続ける。症例解析を進め英語論文とする。



D. 結論

脳神経組織における微量元素局在解析の基礎条件を整備した。銅過剰 WD 脳を観察し、特徴のある層状分布を認めた。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. ウィルソン病の高精度診断 Annual Review 神経 2021 中外医学社 印刷中

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)

なし

脳研究所柿田博士と共同で神経疾患における微量元素の局在と病理発生の研究を始めるに際し、まず、正常と病的状態 (過剰症・欠乏症) における分布を解析するべきとの結論に達し、症例の選択、病理組織像の読み方を含め一緒に行っている。新型コロナウイルス感染症の蔓延により大型放射光施設が閉鎖され、正常運転ができない状態であり、合間に試験的にコロナ対策を取りながらオープンするテスト期間を利用して実験を行った。ビームが安定しないなどの不利な条件が重なり思った通りには進んでいないが、測定条件を設定できたので、今後の共同研究を発展させて行きたい。

脳梁膨大後皮質におけるグルタミン酸受容体 GluD2 による 入力選択的回路形成機構

研究代表者 渡辺 雅彦¹⁾

研究分担者 阿部 学²⁾, 笹岡 俊邦²⁾, 今野 幸太郎¹⁾

1) 北海道大学大学院医学研究院 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

GluD2 はデルタ型グルタミン酸受容体に属し、小脳プルキンエ細胞に強く発現する。小脳顆粒細胞から分泌される Cbln1 はシナプス後部の GluD2 とシナプス前部のニューレキシンと特異的に結合することでプルキンエ細胞-平行線維シナプスの神経回路形成と維持に関わっている。近年 GluD2 の欠失変異をもつ家系が相次いで報告され、これらの患者は GluD2 欠損マウスと同様に小脳性の運動失調や自発眼振を主徴とするが、発語障害や精神遅滞などの高次脳機能障害も認められる。そのような表現系は高次脳機能領域における GluD2 の機能を示唆していると考えられるが、小脳外における詳細な分子局在や神経回路基盤構築への関与の多くはいまだ不明である。本研究は高次脳機能領域の一つである脳梁膨大後皮質に着目し、GluD2 の関与する神経回路基盤およびその機能解明を目的とする。

A. 研究目的

これまで我々は高感度検出系の *in situ* hybridization 法および蛍光抗体法を用いて、GluD2 mRNA およびタンパクは小脳以外にも大脳皮質や線条体といった高次脳機能に関与する領域にも広く分布することを明らかにしてきた (Nakamoto and Konno et al., J Comp Neurol. 2020)。特に皮質領域では脳梁膨大後皮質に強い発現が認められた。脳梁膨大後皮質は視床前核や海馬と密に連絡しており齧歯類やヒトの研究から脳梁膨大後皮質を含む神経回路は空間記憶学習に深く関与することが報告されている。脳梁膨大後皮質に入力する神経核の中で、視床前腹側核には GluD2 のリガンドである Cbln1 mRNA が発現するため、視床前腹側核-脳梁膨大後皮質の神経回路基盤構築に GluD2/Cbln1 が関与していることが予想される。本研究は高次脳機能領域の一つである脳梁膨大後皮質に着目し、GluD2 および Cbln1 の関与する神経回路基盤およびその機能解明を目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究は、高次脳機能領域の一つである脳梁膨大後皮質に着目し、以下の①および②の研究項目を実施する。

①GluD2/Cbln1 のシナプス局在および関与する神経回路を明らかにする。

②シナプス形成機構に対する GluD2/Cbln1 の関与を明らかにする。

①GluD2/Cbln1 のシナプス局在および関与する神経回路を明らかにする。

脳梁膨大後皮質において GluD2 mRNA はグルタミン酸作動性神経に強く発現し、GluD2 タンパクは第1層の表層および第3/4層の非対称性シナプス後部に局在する (Nakamoto and Konno et al., J Comp Neurol. 2020)。我々は予備検討から GluD2 は皮質下由来グルタミン酸作動性神経終末マーカーである二型小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGluT) 2 陽性グルタミン酸作動性神経終

末の近傍に選択的に局在することを明らかにしている。脳梁膨大後皮質は海馬傍回や海馬台、視床前腹側核、視床前背側核と相互に投射関係を持つ。視床前腹側核は VGluT2 発現グルタミン酸作動性神経細胞によって構成され、視床前背側核は VGluT2 および皮質由来グルタミン酸作動性神経終末マーカーである VGluT1 を共に発現するグルタミン酸作動性神経細胞によって構成されることが知られている。VGluT1 との局在関係は不明であるため、VGluT1, VGluT2, GluD2 の 3 重蛍光染色を行う。また GluD2 とリガンドである Cbln1 のシナプス部における局在関係を光顕レベルで検討し、最終的に包埋後免疫電顕法を用いて局在関係を決定する。

続いて脳梁膨大後皮質に逆行性神経トレーサーを注入し、逆行性に標識された細胞において VGluT2 および Cbln1 の発現があるかどうかを fluorescence *in situ* hybridization 法を組み合わせ検証する。さらに脳梁膨大後皮質に投射する神経核に順行性神経トレーサーを注入し、順行性に標識された神経終末は VGluT2 を発現するかどうか、GluD2 と近接するかどうか蛍光抗体法を組み合わせ検証する。

②シナプス形成機構に対する GluD2/Cbln1 の関与を明らかにする。

シナプス形成機構に対する GluD2/Cbln1 の関与を明らかにするために GluD2 遺伝子欠損マウスおよび Cbln1 遺伝子欠損マウスを用いて、GluD2 に入力する神経終末の減少が認められるかどうかを光顕および電顕レベルで定量解析する。さらに通常電顕法を用いたシナプスの形態解析を行う。

C. 研究結果

令和 2 年度は研究項目①と②のうち、①を遂行した。はじめに VGluT1, VGluT2, GluD2 の 3 重蛍光染色によって局在関係を検討した結果、脳梁膨大後皮質には VGluT1 単独陽性終末、VGluT1/2 共陽性終末、VGluT2 単独陽性終末の 3 種類のグルタミン酸作動性神経終末の入力が存在し、GluD2 は VGluT2 単独陽性グルタミン酸作動性神経終末と選択的に近接することが明らかとなった。また、蛍光抗体法を用いて GluD2 と Cbln1 の局在関係を検討した結果、共に近接した局在が認められた。

続いて逆行性神経トレーサー法を用いて GluD2 に入力する投射元の神経核を検討した結果、視床前腹側核および視床前背側核において逆行性に標識された細胞が数多く認められた。*in situ* hybridization 法を組み合わせ、逆行性に標識された視床前腹側核および視床前背側核ニューロンにおいて VGluT1, VGluT2, Cbln1 の発現があるかどうか検討した結果、視床前背側核から脳梁膨大後皮質へ投射するほぼ全てのニューロンは VGluT1 mRNA 陽性かつ VGluT2 mRNA 陽性で Cbln1 mRNA を発現しないことが明らかとなった。一方で、視床前腹側核から脳梁膨大後皮質へ投射するほぼ全てのニューロンは VGluT1 mRNA 陰性かつ VGluT2 mRNA 陽性で Cbln1 mRNA の発現が認められた。

D. 考察

脳梁膨大後皮質への興奮性入力には VGluT1 単独陽性終末、VGluT1/2 共陽性終末、VGluT2 単独陽性終末の 3 種類のグルタミン酸作動性神経終末が存在するが、GluD2 は VGluT2 単独陽性終末に選択的に近接して局在していた。逆行性神経トレーサーを用いた検討結果から VGluT1/2 共陽性終末は視床前背側核由来であり、VGluT2 単独陽性終末は視床前腹側核由来であることが考えられる。小脳において GluD2 は平行線維-プルキンエ細胞シナプスに局限した回路選択的な局在を示すが、脳梁膨大後皮質においても GluD2 は視床前腹側核との間の回路選択的な局在特性を有することを意味する。

小脳では GluD2 は小脳顆粒細胞から分泌される Cbln1 が平行線維前部のニューレキシンを介してシナプス形成に関与する。脳梁膨大後皮質の GluD2 は Cbln1 と近接して局在し、GluD2 に投射する視床前腹側核の神経細胞は Cbln1 mRNA を発現することから、視床前腹側核と脳梁膨大後皮質間神経回路においても GluD2 は Cbln1 と共同してシナプス回路形成に関与していることが予想される。

E. 結論

脳梁膨大後皮質において GluD2 は細胞種選択的に発現し、視床前腹側核由来神経終末との興奮性シナプス後部選択的に局在する。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Uchigashima M, Konno K, Demchak E, Cheung A, Watanabe T, Keener DG, Abe M, Le T, Sakimura K, Sasaoka T, Uemura T, Imamura K, Kawasawa Y, Watanabe M, Futai K. Specific Neuroligin3- α Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse hippocampus. Elife. 2020 Dec 23;9:e59545. doi: 10.7554/eLife.59545.

2. 学会発表

1. Expression mapping of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain. Kohtarou Konno, Taisuke Miyazaki, Miwako Yamasaki, Kenji Sakimura, and Masahiko Watanabe. 第 43 回日本神経科学大会、2020 年 7 月 29 日—8 月 1 日、online 開催（兵庫県、神戸市）

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

脳研究所よりグルタミン酸受容体 GluD2 遺伝子欠損マウスの提供をして頂きました。

マルチモーダルな脳画像と脳機能データを用いたマルチモーダル機械学習

研究代表者 服部 高明¹⁾
研究分担者 安田 永智¹⁾、松澤 等²⁾

1) 東京医科歯科大学 脳神経病態学 2) 新潟大学 脳研究所 脳機能解析学分野

研究要旨

本研究では、健常者42人・パーキンソン病関連疾患患者37人に対し、両足首と腰にセンサーを装着して15mの最大努力歩行をさせ、10msごとの加速度・角速度データを記録した。特徴量抽出を行うために、オートエンコーダ手法(AE)を用いた。一次元畳み込みニューラルネットワーク(CNN)、再帰性ニューラルネットワーク中でも長期の時系列が保存可能なLong short-term memory (LSTM)、さらに一次元畳み込み処理後にLSTMへと入力する畳み込みNN後LSTMを用いて、一次元データから特徴量を抽出した。また各センサーのデータを連結して二次元データを作成した後、二次元CNNを適用して特徴抽出した。抽出した特徴量を用いて、ランダムフォレスト(RF)、サポートベクターマシン(SVM)を用いた教師あり学習を行った。AEによる分類は、一次元畳み込みNN(SVM:82%, RF:76%, 以下同順)、LSTM(73%, 72%)、一次元CNN後LSTM(82%, 84%)、二次元CNN(74%, 73%)であった。一次元畳み込み後LSTMが、加速度・角速度からの特徴抽出に適していることが分かった。

A. 研究目的

パーキンソン病関連疾患では、様々な歩行障害を呈する。今日、ウェアラブルセンサー(以降センサー)によって、歩行を定量的に評価できる。Walkmate Viewer®では、歩行時の加速度・角速度を測定した後に、歩行周期に合わせてノイズ除去・積分等を行うことで、ストライド長、歩行速度などの歩行指標を出力する。一方、センサーより得られるデータである加速度・角速度には、加工されない疾患の特徴が含まれているはずである。

畳み込みニューラルネットワーク(CNN)と再帰性ニューラルネットワーク(RNN)を用いて、加速度・角速度から疾患の特徴量を抽出できる機械学習手法を開発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)

本研究は、東京医科歯科大学の倫理委員会の許可を得て行った。

健常者42人・パーキンソン病関連疾患患者37人に対し、両足首と腰にセンサーを装着した状態で15mの最大努力歩行をさせ、10msごとの加速度・角速度データを記録した。特徴量抽出を行うために、入力と出力を同一にし、中間層を抽出するオートエンコーダ手法(AE)を用いた。短期間の時系列情報に強い一次元CNN、RNN中でも長期の時系列が保存可能なLong short-term memory (LSTM)、さらに一次元畳み込み処理後にLSTMへと入力する畳み込みNN後LSTMを用いて、一次元データから特徴量を抽出した。また各センサーのデータを連結して二次元データを作成した後、二次元CNNを適用して特徴抽出した。抽出した特徴量を用いて、説明変数の様式に柔軟性を有するランダムフォレスト(RF)、入力データの次元が大きくても汎化性能が低下しにくいサポートベクターマシン(SVM)を用いた教師あり学習を行った。

C. 研究結果

Walkmate Viewer®による歩行指標を用いた教師あり学習では、71%の分類精度だった。AE による分類は、一次元畳み込み NN(SVM:82%, RF:76%, 以下同順)、LSTM(73%,72%)、一次元 CNN 後 LSTM(82%,84%)、二次元 CNN (74%,73%) であった。なかでも、腰の横ゆれ・左足首の進行方向と縦のゆれが分類に貢献していた。一次元畳み込み後 LSTM は、SVM、RF 両方で高精度の分類ができており、加速度・角速度からの特徴抽出に適していることが分かった。

D. 考察

一次元 CNN は短期間の特徴を凝縮する過程によりノイズの除去が行え、畳み込み過程の回数を増やすことでLSTMほどではないが長期間の情報が学習できたと考える。一方、LSTM は長期記憶が可能なゆえに歩行データの再現に必要な時系列のデータも学習しており精度が上がらなかった可能性がある。高感度かつノイズも混入しうる歩行データでは、LSTM のような長期記憶よりも畳み込みのように必要な情報を凝縮するアルゴリズムが歩行の特徴の抽出に寄与した可能性を考える。

一次元畳み込み後 LSTM は、SVM・RF 両方で高精度の分類ができており、分類器のアルゴリズムによらない分類が行えていた。つまり、一次元畳み込み後 LSTM は、加速度・角速度からの特徴抽出に最も適しているといえる。その理由として、CNN による短期記憶とノイズ処理、さらに LSTM による長期記憶の両方が存在することが、高精度な特徴抽出に寄与したと考える。

E. 結論

本研究により、加速度・角速度への一次元畳み込み後LSTMを用いたオートエンコーダ手法によって、パーキンソン病関連疾患と健常者を精度良く分類できることが示された。その理由として、一次元畳み込み後LSTMを用いたオートエンコーダ手法は短期記憶とノイズ処理、さらに LSTM による長期記憶の両方の長所を兼ね備えており、歩行における時系列データの特徴量抽出に適して

いることがわかった。

F. 謝辞

本研究の解析の実行、議論の深化のために新潟大学脳科学研究所の松澤等先生からのご助言を頂いたことに感謝を致します。

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

認知症の解明と精密医療実現を目的としたゲノム-オミクス解析

研究代表者 尾崎 浩一 1)
研究分担者 宮下 哲典 2)

1) 国立長寿医療研究センター メディカルゲノムセンター・臨床ゲノム解析推進部

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(AD)などの認知症は日本において2025年までに700万人が罹患すると推測されており、早急に効果的な予防策や治療薬を開発する必要がある。しかし、その治療薬開発については、様々な薬剤の治験が進められてきたが、未だ成果が上がっていないのが現状である。これは、認知症の根本的な病態が解明されていないことが大きな理由である。一方で、ADの発症には遺伝的要因が大きく(58%~79%)関与していることが疫学研究により証明されているが、ゲノム構造には人種差があり、日本人における疾患全容を理解するためには日本人に特化した解析が必要になる。本研究では日本人に特化した大規模ゲノムワイド関連解析から遺伝的要因を網羅的に同定し、臨床情報(フェノム)オミクスデータと統合解析することにより仮説フリーにて認知症の疾患発症、進展機構の全容を把握し、効果的な予防法、治療法の開発に繋げる狙いがある。

A.研究目的

日本人はほぼ均一な民族であり欧米人よりも効率よく遺伝的リスク因子を探索することができる。ADにおける遺伝率が示すように疾患発症要因の半分以上を遺伝因子が占めていることから、日本人に特化した大規模なゲノム解析による疾患関連座位の同定を出発点として、ゲノム-フェノム解析、オミクス解析を統合した横断的解析を遺伝統計学的、数理的に機械学習やAI等を組み入れて行うことにより、疾患の分子メカニズムの全容を仮説フリーで解明することを目的の一つとする。さらに、ここで蓄積した日本人に特化したオミクスデータを広く他の多くの研究者と共有することにより、ADのみならず様々な疾患の解明に役立てることもできる。このような原因・感受性分子の同定と解析からは正確な早期予知診断法の開発や既存薬を認知症の治療薬や予防薬として使用することのできるドラッグリポジショニング等の開発も目的となる。また、この横断的解析で新たな生体概念を構築する

ための研究や解析分野を切り開けるのみならず、新たな薬学的アプローチによる認知症の革新的な創薬につながることを期待でき、エビデンスに基づく治療法の開発が可能となる。本研究において、新潟大学、国立長寿医療研究センター(NCGG)が共同で解析を行い、日本人大規模検体を用いて日本人のゲノム配列に特化したゲノム解析を出発点として横断的にフェノム、オミクス統合解析を行い、認知症の精密医療に繋げることを目的とする。

B.研究方法(倫理面への配慮を含む)

国立長寿医療研究センター・メディカルゲノムセンター・バイオバンク(NCGGバイオバンク)、新潟大学脳研究所およびバイオバンクジャパンによりリクルートされた認知症及びコントロールサンプルを用いて解析を行った。約22,000例のDNAについてはillumina社のアジアスクリーニン

グアレイ (ASA) によるジェノタイピングを施行し、理化学研究所にて構築された日本人約7,000人の全ゲノム配列等によるインピュテーション解析を施行した。アルツハイマー病 (LOAD) 3,962例、コントロール4,074例を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) はplinkソフトウェアにより行った。本GWASにより同定した新規有意座位 ($P < 5 \times 10^{-6}$) についてはPCR-インベダー法を用いてLOAD 1,216例、コントロール2,446例を用いた再検証解析を施行した。トランスエスニックGWASは日本人GWAS統計値と欧米人 (IGAPステージ1データ) 統計値についてメタ解析を行った。全RNA解析についてはNCGGバイオバンクのバフィーコートより高純度のRNAを抽出し、全RNA配列解析用ライブラリ作製キットを用いて、高精度のRNAライブラリを構築した。全RNA配列解析については外注にてデータを得た。

(倫理面への配慮)

本研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター倫理・利益相反委員会の承認を得て施行されている。すべての検体において書面による同意を取得していると共に、研究対象者個人の尊厳と人権の尊重、個人情報保護等について倫理的観点から十分に配慮しながら研究を遂行している。国立研究開発法人国立長寿医療研究センターの定める「保有する個人情報の保護に関する規程」に基づき、個人情報保護管理者が厳格に守秘する。

C. 研究結果

認知症を含むDNA検体約22,700例についてASAによりジェノタイプデータの蓄積を進めた。これまでに得たデータを用いてインピュテーション後、クオリティーコントロール解析を施行し、このうちの日本人計8,036例を用いたAD GWASおよびその再検証解析を進めた (計11,698例)。このGWASで新規に示唆的な有意性 ($P < 5 \times 10^{-6}$) を

示す座位を7個発見し再検証解析を行った。第4番染色体上のFAM47E遺伝子内に存在するバリエーションはGWAS有意性 ($P < 10^{-8}$) を示し、オッズ比0.65と比較的強く関連することが示された。このバリエーションは日本人で頻度が高く、民族特異の疾患感受性バリエーションであると考えられた。このバリエーションはアミノ酸変化を伴うものではなかったので、遺伝子発現に与える影響 (遺伝子発現質的量的座位 ; eQTL) について公的なデータベースを確認したところ、このバリエーションが副腎皮質や脳でFAM47EやSCARB2遺伝子の発現を上昇することが判明した。また、示唆的な有意性を示す新たな2バリエーションをBANK1遺伝子およびLINK00899遺伝子上に同定した。トランスエスニックメタGWASを通した解析では新たに第6番染色体上OR2B2遺伝子上のバリエーションがGWAS有意性を持ってLOADに関連 (オッズ比1.34) することを発見するとともに、他5座位 (MTSS1L、FAM155A、NTM、C1S、TSPAN14) の示唆的な有意性をもってLOADに関連することを発見した。末梢血バフィーコート (主に白血球細胞) について全RNA配列解析について次世代シーケンサーを用いて進めている。これまでに約1,000例について高品質RNAを抽出、全配列解読を進めている。610例について約22,000種類の遺伝子発現解析を通して好中球の細胞数がLOADで増加することを発見するとともにADに関連した機能的モジュールとハブ遺伝子群を同定している。さらにこれらの情報を用いた機械学習を施行し軽度認知障害からADへの移行を予測している患発症予測モデルをAUC 0.878の正確性をもって構築した。

D. 考察

現在までに約23,000検体についてASAを用いた日本人に特化したジェノタイピングを施行した。これは本邦最大のデータとなった。約11,700例を用いた日本人に特化したGWASおよび再検証解析からは新規LOAD感受性座位を2領域同定しており最も有意なバリエーションは脳における遺伝子発現などに影響を与えることも判明してい

る。さらに欧米人 **LOAD GWAS** データとのトランスエスニックメタ解析からは新たに6個の染色体座位が **LOAD** に関連することが確認され着実に遺伝因子群の同定に至っている。解析の大規模化によりさらに新たな日本人 **AD** 感受性座位が同定できる。また、日本人において初めて我々が同定した **LOAD** 感受性遺伝子である **SHARPIN** については、さらに **LOAD** に強い影響を与える可能性のレアバリエントが発見されており、複数のバリエントが疾患感受性である可能性が浮上してきた。**RNA-seq** を用いたオミックス解析については、現在までに 998 例について配列決定を完了した。610 サンプルの **RNA-seq** データを用いた解析より **LOAD** における好中球の上昇、**LOAD** 関連ハブ遺伝子群の同定からこれらの情報を用いた機械学習を施行し **LOAD** 発症予測モデルを構築した (**AUC 0.878**)。これらは更なるコホートによる検証を経て臨床応用が可能になる。現在は日本人数万例になる認知症 GWAS も進めると共に、さらに上記全 RNA 配列解析(トランスクリプトーム)をはじめとするマルチオミックス解析を進め、これらを統合解析することにより得られるデータより疾患の全容が解明できるのみならず、網羅的なポリジェニックリスクスコアの構築による正確な発症予測診断や疾患の層別化、さらにはこれまでの生物学的研究のみでは見出すことの難しかった真の疾患分子パスウェイ、ハブ遺伝子群の解析を介した認知症等のドラッグリポジショニング、革新的な創薬に繋げることが可能になる。

E. 結論

民族に特化した**LOAD**のゲノムワイド関連解析を通して新たに8個の疾患感受性染色体領域を同定した。これらはこれまでの欧米における大規模解析で見つかったものではなく、日本人に特異的あるいは日本人で影響が強い**LOAD**感受性座位であると考えられた。今後の日本人サンプル数増加による解析や欧米人とのトランスエスニックメタ解析によるさらに大規模な解析を施行することにより疾患の全容解明に繋げることができると考えられる。全**RNA**配列解析及びその統合解析におい

ても同様に大規模化することによる真の疾患感受性パスウェイの同定、分子機能の解明、それらの情報を用いた機械学習などから正確度の高い疾患予測モデルの構築へと発展させることができる。またここで同定した**SHARPIN**をはじめとして疾患に強く寄与するレアバリエントの全ゲノムやエクソームシーケンス解析によるさらなる同定やこれらの統合解析から認知症の予知診断に有用なポリジェニックリスクスコアの構築、ドラッグリポジショニングなど創薬へと発展させることが可能になる。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

- 1) Ethnic and trans-ethnic genome-wide association studies identify new loci influencing Japanese Alzheimer's disease risk. Shigemizu D, Mitsumori R, Akiyama S, Miyashita A, Morizono T, Higaki S, Asanomi Y, Hara N, Tamiya G, Kinoshita K, Ikeuchi T, Niida S, Ozaki K. *Translational Psychiatry* 11 (1), 151 (2021).
- 2) Association of an IGHV3-66 gene variant with Kawasaki disease. Johnson TA, Mashimo Y, Wu JY, Yoon D, Hata A, Kubo M, Takahashi A, Tsunoda T, Ozaki K, Tanaka T, et al. *Journal of Human Genetics* Published Online 26 October (2020).
- 3) Prognosis prediction model for conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease created by integrative analysis of multi-omics data. Shigemizu D, Akiyama S, Higaki S, Sugimoto T, Sakurai T, Boroevich KA, Sharma A, Tsunoda T, Ochiya T, Niida S, Ozaki K. *Alzheimer's Research & Therapy* 12: 145 (2020).
- 4) Population-specific and transeethnic genome-wide analyses reveal distinct and shared genetic risks of coronary artery disease. Koyama S, Ito K, Terao C, Akiyama M, Horikoshi M, Momozawa Y, Matsunaga H, Ieki H, Ozaki K, Onouchi Y, et al. *Nature Genetics* 52 (11): 1169-1177 (2020).

- 5) Lower DNA methylation levels in CpG island shores of *CRI*, *CLU*, and *PICALM* in the blood of Japanese Alzheimer's disease patients. Mitsumori R, Sakaguchi K, Shigemizu D, Mori T, Akiyama S, Ozaki K, Niida S, Shimoda N. **PLOS ONE** 15(9): e0239196 (2020).
 - 6) Identification of potential blood biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease through RNA-sequencing analysis. Shigemizu D, Mori T, Akiyama S, Higaki S, Watanabe H, Sakurai T, Niida S, and Ozaki K. **Alzheimer's Research and Therapy** 12: 87 (2020).
 - 7) Large-scale genome-wide association study in a Japanese population identifies novel susceptibility loci across different diseases. Ishigaki K, Akiyama M, Kanai M, Takahashi A, Kawakami E, Sugishita H, Sakaue S, Matoba N, Low SK, Okada Y, Terao C, Amariuta T, Gazal S, Kochi Y, Horikoshi M, Suzuki K, Ito K, Koyama S, Ozaki K, Niida S, et al. **Nature Genetics** 52 (7): 669-679 (2020).
 - 8) Transethnic meta-analysis of genome-wide association studies identifies three new loci for coronary artery disease. Matsunaga H, Akiyama M, Takahashi A, Nomura S, Ozaki K, Onouchi Y, Suna S, Ogishima S, Yamamoto M, Satoh M, Sasaki M, Yamaji T, Iwasaki M, Tsugane S, Tanaka K, Naito M, Akai W, Tanaka H, Sakata Y, Morita H, Matsuda K, Murakami Y, Akazawa H, Kubo M, Kamatani Y, Komuro I, Ito K. **Circulation: Genomics and Precision Medicine**. e002670 (2020).
- ## 2.学会発表
- 1) Identification of loci influencing four types of cognitive impairment, ポスター、Mitsumori R, Asanomi Y, Shigemizu D, Akiyama S, Morizono T, Niida S, Ozaki K. The Japan Society of Human Genetics, 2020/11/18、国内 (Web) .
 - 2) Identification of the novel rare variants in SHARPIN associated with the risk of late-onset Alzheimer's disease、口頭、Asanomi Y, Shigemizu D, Mitsumori R, Niida S, Ozaki K. The Japan Society of Human Genetics, 2020/11/18、国内 (Web) .
 - 3) *ABCA7*, *SORL1*, *TREM2* におけるアルツハイマー病関連レアバリエーションの探索 原 範和、宮下 哲典、尾崎 浩一、新飯田 俊平、劉 李歆、樋口 陽、朱 斌、月江 珠緒、春日 健作、桑野 良三、岩坪 威、J-ADNI コンソーシアム、池内 健 第 39 回日本認知症学会、2020/11/26～28、国内
 - 4) アミロイドカスケード仮説；アルツハイマー病の 原因遺伝子、感受性遺伝子からの考察 宮下 哲典、原 範和、春日 健作、菊地 正隆、尾崎 浩一、新飯田俊平、池内 健 第 39 回日本認知症学会、シンポジウム、2020/11/26～28、国内 (Web)
 - 5) 大脳白質病変の臨床的意義とリスク 櫻井 孝、尾崎 浩一 第 39 回日本認知症学会、シンポジウム、2020/11/26～28、国内 (Web)
 - 6) 日本人コホート JGSCAD, J-ADNI, NCGG, ToMMo におけるバリエーション解析：*APOE* 宮下 哲典、原 範和、春日 健作、Liu Lixin, 樋口 陽, Zhu Bin, 月江 珠緒, 長谷川舞衣, Adyfitrah Yusran, 石黒 敬信, 村上 涼太, 菊地 正隆, 中谷 明弘, 尾崎 浩一, 新飯田俊平, 赤澤 宏平, 桑野 良三, 岩坪 威, 池内 健 第 39 回日本認知症学会、シンポジウム、2020/11/26～28、国内 (Web)
- ## G.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 1.特許取得
特になし
 - 2.実用新案登録
特になし
 - 3.その他
特になし

Experimental autoimmune encephalomyelitis マウスの作成 およびそれを用いた治療法開発

研究代表者 鈴木 元¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾

1) 藤田医科大学医学部分子腫瘍学 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

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド骨格を有する一群の脂質の総称である。含有する各種アシル基/ホスホコリン/糖の種類/有無等によって数多くのサブファミリーに分類される。神経系・免疫系を含む動物細胞において、細胞膜構成成分として機能するだけでなく、情報伝達、細胞周期、アポトーシス、血管新生炎症反応など各分子種固有の生物学的活性を発揮する。本申請では、スフィンゴ脂質代謝のハブ脂質、セラミド合成を行う酵素 CERS6 に対し活性促進剤を開発する。これを、多発性硬化症モデル（以下 EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis）に投与し治療効果を検証する。

A. 研究目的

申請者らは、がん制御を目指した研究を实践する過程で、149 症例の臨床肺がん検体の脂質代謝制御遺伝子発現プロファイル解析と、それに引き続くタンパク質、細胞、マウスレベルでの研究を行い、肺がん転移促進遺伝子として CERS6 (Ceramid synthase 6) を同定した。すなわち、がん抑制 miRNA101 の発現低下により、肺がん組織では CERS6 を高発現する。この遺伝子がコードするセラミド合成酵素 CERS6 の活性により、d18:1/16:0 セラミド（以下 C16 セラミド）量が増加する。過剰の C16 セラミドは RAC1 陽性ラメラボディ形成を促進、転移を誘発することを明らかにした。

本申請では、多発性硬化症の治療薬開発を目指す。多発性硬化症患者は日本に 12,000 人いると推計されている。治療薬として FTY720 が認可されているが、偽薬対照第 III 相比較臨床試験の結果、身体的障害の進行抑制については効果が認められていない (Lancet 2016)。このため、作用標的、分子構造の異なる新規薬剤が開発さ

れば、有力な選択肢となりうる。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

セラミド代謝サルベージ経路にて、CERS6 はスフィンゴシンを基質とした C16 セラミド合成を行なう。CERS6 活性促進は S1P 経路の相対的不活化を招くため、炎症性好中球の遊走、多発性硬化症、好中球性喘息等が抑制されることが想定される。申請者らはこれまで肺がん転移抑制を目指して、低分子化合物ライブラリーをスクリーニングした。サブ μM にて作用する CERS6 特異的阻害剤を開発し、肺がん転移抑制効果を検討中である。一方、この過程で、CERS6 の活性の変化が多発硬化症モデル発症に重要な役割があることを学び、CERS6 に作用する薬物が、多発硬化症治療に使えないかと考えた。この目的を実行するために EAE モデルを作成し、候補化合物を投与する。マウス生存曲線、体重、神経麻痺出現、脊髄の好中球浸潤等を指標に多発性硬化症治療薬としての可能性を検討する。

C. 研究結果

1. C57BL/6 マウスで実験的 EAE モデルの作成に成功した。
2. 百日咳毒素投与 2 週間後に、薬剤投与群における臨床症状の軽減を観察した。
3. サクリファイスをしたマウスの病理標本に対してヘマトキシリン・エオジン解析を行った結果、炎症細胞の浸潤を確認した。

D. 考察

マウスを用いて、多発性硬化症モデルである EAE の発症に成功した。発症は臨床症状を説明する病理学的変化を伴っていた。今年度の研究においては一定条件下で効果を観察したが、EAE マウスに対する薬剤の影響はさらなる検討が必要である。

E. 結論

本研究により、これまでスクリーニングしてきた薬剤が多発性硬化症の治療薬プロトタイプとなる可能性が示唆された。今後、マウス N 数を増やす、至適な薬剤投与方法を検討する、薬剤スクリーニングを継続し、より効果の高い低分子化合物を発見するなどの工夫を重ねることにより、臨床応用可能な薬剤開発に結び付く可能性がある。

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

遺伝性脳小血管病モデル動物を用いた脳卒中・認知症の新規治療法の開発

研究代表者 猪原 匡史¹⁾

研究分担者 小野寺 理²⁾, 斎藤 聡¹⁾, 山本 由美³⁾, 細木 聡¹⁾, 殿村 修一⁴⁾

1) 国立循環器病研究センター 脳神経内科 2) 新潟大学脳研究所脳神経内科学分野

3) 国立循環器病研究センター 病態代謝部 4) 国立循環器病研究センター 血管生理部

研究要旨

遺伝性血管性認知症である CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy), CARASIL (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)は脳小血管の機能的・構造的異常がその病態の一角をなすと考えられている。CADASIL, CARASIL の病態解明, 新規治療法の開発は, 孤発性の血管性認知症, そして血管障害の合併頻度が極めて高いアルツハイマー型認知症の治療法開発に直結する。本研究では, 申請者らが開発した CADASIL 患者由来の iPS 細胞および新潟大学脳研究所で開発された CARASIL モデルマウスを用いて, 脳小血管の機能解析と新規治療法の開発を行う。

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 CADASIL, CARASIL を突破口に血管性認知症の病態を解明し, 新規治療法を開発することが本研究の目的である。近年, CADASIL の原因遺伝子である NOTCH3 の変異が, 従来想定されていた頻度より明らかに多いことが判明した。また CARASIL の原因遺伝子である HTRA-1 についても, ホモ変異のみならず, ヘテロ変異であっても, 白質障害や認知症の原因となることが判明した。これまで孤発性と遺伝性は, 大きく異なる病態であると捉えられることが少なかったが, 脳血管障害の領域では, 一見

孤発性に見えても, 実は遺伝性であるという事例が, 非常に多いということが近年明らかになった。即ち, 遺伝性脳小血管病の研究は, 未だ診断に至っていない多くの患者に福音をもたらす可能性があり, この点こそが, 本研究の重要性を示している。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究では, 申請者らが開発した CADASIL 患者由来の iPS 細胞および各種のモデル動物を使用する。CADASIL のモデル動物については, C455R 変異ヒト NOTCH3 トランスジェニックマウスを使用する (Arboleda-Velasquez JF, 2011)。CARASIL のモデル動物については, 新潟大学小野寺理教授の研究グループが作成した HTRA1 欠損マウスを使用する。対照群として, 同腹子野生型マウスを使用する。

新規治療法の開発において, 既存の薬剤が CADASIL・CARASIL の発症予防・治療に利用することが可能であれば, 臨床応用までにかかる期

間が劇的に短縮される。そこで、本計画では脳梗塞や血管性認知症に効果があるとされる既知の薬剤や、iPS 細胞を用いた病態研究により明らかとなった病態関連分子をターゲットとする候補薬剤を、iPS 細胞を用いた *in vitro* 病態モデルやモデル動物に投与し、その治療効果を評価する。既存薬の候補としては、アドレノメデュリンやシロスタゾールなどが挙げられる。アドレノメデュリンは血管壁で産生される血管拡張ホルモンであり、血管再生作用を有する。すでに血管性認知症モデルマウス（慢性脳低灌流モデルマウス）や中大脳動脈閉塞モデルでその有効性が確認されており、現在臨床応用に向け、GMP 基準に則った製剤化が進められている。

C.研究結果

近年、白質病変の病態にオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) が関係しているとして注目を集め始めているが、CADASIL も、いわゆる OPC 病ではないかという説がでてきた (Zaucker A, 2013; Tang M, 2017)。そこで、申請者らが Douvaras ら (2015)の手法をもとに iPS 細胞を OPC に分化誘導したところ、CADASIL では、Spheroid から浸潤してくる O4 陽性 OPC が極端に少なく、分化が障害されている可能性が示唆された。この分化障害は、PDGFR β 阻害薬を投与することで改善した。

D.考察

壁細胞の分化誘導に PDGFR β がかわる一方、OPC の分化には、PDGFR α が関係している (Funa K, 2014)。前年度の研究で、CADASIL の iPS 細胞由来血管壁細胞で PDGFR β の発現が亢進していることが示されていたため、分化誘導中の PDGFR α と PDGFR β シグナルの不均衡が OPC の分化に影響したと仮説をたて、PDGFR β 阻害薬を分化誘導中に投与してみたところ、CADASIL の OPC 分化障害をある程度改善する可能性が示唆された。この薬物は、分化誘導培地に PDGFR α を加えるより前に薬物を投与した時のみ効果を発揮したことから、過剰な PDGFR β シグナルが OPC の分化を阻害している可能性が高まった。

E.結論

PDGFR β は、CADASIL の脳小血管病変と OPC 病変の両方の治療ターゲットとして有望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

1. Yamamoto Y, Kojima K, Taura D, Sone M, Washida K, Egawa N, Kondo T, Minakawa EN, Tsukita K, Enami T, Tomimoto H, Mizuno T, Kalaria RN, Inagaki N, Takahashi R, Harada-Shiba M, Ihara M and Inoue H. Human iPS cell-derived mural cells as an *in vitro* model of hereditary cerebral small vessel disease. *Mol Brain*. 2020;13:38.

2.学会発表

1. Yumi Yamamoto. “Patient-derived iPSC and *in vitro* model of hereditary small vessel disease” NVU 研究会, 2021 年 1 月 30 日, オンライン開催.

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

- 出願番号：特願 2016-254919, 発明者：猪原匡史, 山本由美, 井上治久, 月田香代子, 江浪貴子, 発明の名称：細胞増殖分化誘導方法, 出願人：国立研究開発法人国立循環器病研究センター, 国立大学法人京都大学, 出願日：2016 年 12 月 28 日出願

GABA 仮説に基づいた統合失調症モデルラットの病態解析

研究代表者 柳川 右千夫¹⁾

研究分担者 那波宏之²⁾, 稲葉洋芳²⁾, 藤原和之¹⁾, 柿崎利和¹⁾, 宮田茂雄¹⁾, 姜玮茹¹⁾

1) 群馬大学大学院医学系研究科遺伝発達行動学分野 2) 新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

研究要旨

GABA は代表的な抑制性神経伝達物質であり、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD; GAD65 と GAD67 の 2 型存在) により合成される。統合失調症死後脳における GAD67 発現低下などから、GABA 神経伝達の障害が統合失調症の病因や病態に関連すると提唱されている (統合失調症の GABA 仮説)。我々はこの仮説を検証するために GAD67 ノックアウトラットを作製・解析した結果、統合失調症様の行動障害を見出した。本研究では、上記ラットの病態を明らかにする目的で聴性定常反応と聴覚 N1 反応について検討した。聴覚皮質表面から脳波反応を記録し、反応パワーと位相同期性を算出した結果、当該ラットでは統合失調症患者と同様の、 β 帯域刺激に対する ASSR の増大傾向と、聴覚 N1 の減少傾向が観察された。これらの結果から、当該ラットは統合失調症と共通の聴覚病態生理を有している可能性が示唆された。

A. 研究目的

統合失調症には、ドーパミン仮説、グルタミン酸仮説や神経発達障害仮説など種々の病態仮説がある。GABA 神経伝達の障害が統合失調症の病因や病態に関連するという仮説 (統合失調症の GABA 仮説) は、統合失調症患者の死後脳で GABA 含量の低下、GAD67 の発現低下が観察されること、GAD67 遺伝子のミスセンス変異をもつ統合失調症患者の家系の存在などから提唱されている。しかしながら、GABA や GAD67 が実際に統合失調症の病態に寄与するかどうかは不明である。そこで、我々は GAD67 ノックアウトラットが統合失調症モデル動物になるかどうか検討した。GAD67 ノックアウトラットを作製し、行動解析を行った結果、作業記憶の障害を見出した。この結果は、GAD67 ノックアウトラットが認知機能障害をもつ統合失調症モデル動物であることを示唆する。これらの結果に基づき、GAD67 ノックアウトラットの病態生理や分子病態を明らかにすることで統合失調症の病因や病

態の解明を目指している。一方、聴性定常反応 (ASSR) は高い繰り返し頻度の聴覚刺激に対して一定振幅の脳波波形を呈する聴性誘発反応であり、GABA ニューロン連関聴覚神経回路機能の指標として用いられている。聴覚 N1 反応は聴覚刺激開始後数十ミリ秒の間の刺激密度によって増大する脳波成分であり、聴覚情報の時間的統合機能の指標と考えられている。統合失調症患者や同モデルラットの聴覚神経生理研究では、 γ 帯域刺激に対する ASSR の減少や β 帯域刺激に対する ASSR の増大、聴覚 N1 反応の全般的な減少が報告されている。本年度は、GAD67 ノックアウトラットを用いて ASSR と聴覚 N1 反応の研究を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究での動物実験は、群馬大学動物実験委員会 (承認番号 19-009) および新潟大学動物実験委員会 (承認番号 SA00774) で承認されている。GAD67 ノックアウトラットヘテロ接合体

(GAD67+/-ラット)を群馬大学で繁殖させ、新潟大学に送付した。このラットから体外受精により、GAD67+/-ラットとコントロールの野生型ラット (GAD67+/+ラット)を繁殖させ、新潟大学で以下の実験を行った。その際に、群馬大学の研究者が実験の一部に参加した。三種混合麻酔下で電極埋め込み手術を実施した。ラット脳定位固定装置に頭部を固定し、頭皮切開後、デンタルドリルで頭蓋に穴を開け、聴覚皮質および前頭皮質脳波記録用、参照および設置用の4本のステンレス製ネジ電極を脳表に接地するまで頭蓋にねじ込み、電極から伸びているリード線をICソケットに接続した後、デンタルセメントで頭蓋上に固定した。データの記録は手術後2週間の回復期間において実施した。聴覚刺激は1msのDCパルス(刺激頻度 20, 40, 80 Hz)によって構成される1000msのクリック音列(音圧: Max. 80dB SPL, 刺激間隔: 9s)を擬似ランダムに計300回(各刺激頻度100回)提示した。記録は薄暗く照明された部屋で実施し、記録中ラットは透明な電氣的にシールドされた実験箱に入れられた。脳波信号はラットの頭蓋に固定されているICソケットに無痛的に接続されたシールドケーブルを介して信号増幅器で増幅され、信号記録装置を介してコンピュータに保存された。数値解析ソフトウェアによる時間周波数解析を用いて、記録したデータを刺激頻度ごとに刺激開始点に同期させて、ASSRと聴覚N1反応の加算平均波形、事象関連スペクトルパワー及び試行間位相同期性を求めた。

C. 研究結果

聴覚皮質から記録した脳波において、いずれの頻度の刺激に対しても明瞭なASSRや聴覚N1反応が観察された。 γ 帯域刺激(刺激頻度40, 80 Hz)に対するASSRのスペクトルパワーや試行間位相同期性の値にはラット群間で差が認められなかった。一方、 β 帯域刺激(刺激頻度20 Hz)に対するASSRの試行間位相同期性の値は、コントロールラット群と比較してGAD67+/-ラット群で高い傾向が認められた。さらに、聴覚N1反応のスペクトルパワーや試行間位相同期性は、全体的にGAD67+/-ラット群で低い傾向が認められた。

D. 考察

統計的に有意でないものの、GAD67+/-ラットにおいて、統合失調症患者と同様の聴覚N1反応の減少が認められた。 γ 帯域刺激に対するASSRの減少は認められなかったが、 β 帯域刺激に対するASSRの増大傾向が認められた。統合失調症患者、同モデルラット及びGABA作動性抑制を減少させた神経回路モデルでのコンピュータシミュレーションにおいて、 β 帯域刺激に対するASSRの増大が報告されていることから、GAD67+/-ラットと統合失調症患者がGABA作動性抑制の障害に由来する共通の聴覚病態生理を有している可能性が示唆される。今後、GAD67ノックアウトラットホモ接合体を用いて、同様の研究をおこなうことで、より顕著な結果が得られることが期待される。

E. 結論

これまでの行動学的結果と今回の聴覚神経生理学的結果から、GAD67ノックアウトラットはGABA仮説に基づいた統合失調症の病因や病態を解明するための有用な統合失調症モデル動物となりうることが強く示唆される。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Fujihara K, Yamada K, Ichitani Y, Kakizaki T, Jiang W, Miyata S, Suto T, Kato D, Saito S, Watanabe M, Kajita Y, Ohshiro T, Mushiake H, Miyasaka Y, Mashimo T, Yasuda H, Yanagawa Y. CRISPR/Cas9-engineered *Gad1* elimination in rats leads to complex behavioral changes: Implications for schizophrenia. *Transl Psychiatry* 10 : 426, 2020
2. Kakizaki T, Ohshiro T, Itakura M, Konno K, Watanabe M, Mushiake H, Yanagawa Y. Rats deficient in the GAD65 isoform exhibit epilepsy and premature lethality. *FASEB J.* 35: e21224, 2021.
3. Fujihara K, Sato T, Miyasaka Y, Mashimo T, Yanagawa Y. Genetic Deletion of Glutamate Decarboxylase 67-kDa Isoform Alters Conditioned Fear Behavior in Rats. *FEBS Open Bio.* 11: 340-353, 2021.

4. Fujihara K, Sato T, Higeta K, Miyasaka Y, Mashimo T, Yanagawa Y. Behavioral consequences of a combination of *Gad1* haplodeficiency and adolescent exposure to NMDA receptor antagonist in Long-Evans rat. *Front Pharmacol.* 12 : 646088, 2021

2. 学会発表

1. 藤原和之、精神神経疾患モデルとしてのグルタミン酸脱炭酸酵素 GAD67 ノックアウトラット（招待講演）、文部科学省新学術領域研究・先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 2020（東京国際フォーラム、東京、2021 年 2 月 2 日）

2. 藤原和之、佐藤匠、宮坂佳樹、真下知士、柳川右千夫、グルタミン酸脱炭酸酵素 67 ヘテロ欠損と NMDA 型グルタミン酸受容体遮断の組み合わせによって生ずる行動学的表現型（口頭発表）、文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム若手技術講習会 2020（オンライン、2020 年 9 月 11 日）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

高磁場 MRI を用いた発達障害に伴う統合的脳機能に関する研究

研究代表者 小枝 達也¹⁾
研究分担者 鈴木 雄治²⁾

- 1) 国立成育医療研究センター こころの診療部
2) 新潟大学脳研究所 統合脳機能研究センター

研究要旨

自閉症・注意欠陥多動症・Dyslexiaをはじめとした学習障害といった学童期に認められる様々な発達障害に関連した行動発達特性の、脳発達基盤に関する解明はほとんど進んでいない。臨床的介入に有意義な発達障害のメカニズムを得ることを目的に、高磁場 MRI を用いて、行動発達障害に関連した脳微細構造および機能的発達の異常を非侵襲的に抽出する。脳発達病態を反映し、臨床へ還元しうる手掛りを探索する。

A. 研究目的

自閉症をはじめとした発達障害者における行動発達障害は、共通した一連の特徴をもって成人期までも持続する。これらの障害には脳発達異常の存在が示唆されているが、臨床的介入に有意義な生物学的証拠は未だ少ない。高磁場 MRI の特性を利用した様々なアプローチ法は、一般的な臨床画像では検出できない定型発達児のみならず様々な疾患で出現する発達障害児との比較を可能とし、それぞれの疾患特有の発症メカニズムの解明に近づけることが期待できる。

本研究の目的は、高磁場 MRI を用いて行動発達障害に関連した以下の点を非侵襲的に抽出し、脳発達病態の手掛りを得る新たな解析方法を開発することである。

- (1) 脳微細構造発達の異常；拡散テンソル画像 (DTI)、磁化率強調画像 (SWI)
(2) 機能的発達の異常；機能的 MR 画像解析 (fMRI)、安静時 fMRI

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

国立成育医療研究センター病院こころの診療部 (以下成育医療研究センターと略) 外来を受診し、発達障害の存在が確認された患者を対象とす

る。半構造的な問診、神経学的診察に加えて、必要に応じて、行動質問紙、評価尺度等の動作記録を行う。

研究参加者 (発達障害者) と保護者が伴って、統合脳機能研究センターに移動し、高磁場 MRI を用いて脳画像撮影を行う。高解像度脳構造画像 (T2R、3D 画像など) で得られる解剖学的情報を基準にして、機能的 MR 画像 (fMRI)、拡散テンソル画像 (DTI)、磁化率強調画像 (SWI) 等の撮影を施行する。取得した画像データは最適化された画像解析法を用いて、定型発達者と比較し、詳細な分析を施行する。個別解析に加えて各種疾患群におけるグループ解析を行い、群間比較による相違を検出する。更に臨床的な行動発達特性および動作解析との関連を解析し、様々な発達障害における発症メカニズムの詳細な解明研究への手がかりを検出する。

実際の撮像検査は研究参加者の負担を考慮し 1 時間以内で終了予定であり、身体・精神状態にあわせて行い、希望があれば途中で休憩または終了する。また、鎮静のための薬物や造影剤等は一切使用しない。撮影に先立ち、統合脳機能研究センターに導入されている撮影シミュレータ「ゼロテスラ MR プレパレーションシステム」を使用した

撮像体験を通じて不安を取り除き、円滑な撮像を行っていく。

C. 研究結果

本研究では安静時 fMRI (rs-fMRI) エントロピー解析の開発を行い、自閉症児の安静時の脳機能を評価することを目的として行っている。我々の解析結果から、自閉症児は定型発達者に比べて安静時のエントロピーが増大していることが示された。この結果は、明らかな脳機能構造異常は認めないが、安静時における脳活動の不安定さを解析するのに有用であることを示唆している。

さらに本年度は対象を学習障害 (Dyslexia) に広げ、読書時における脳内の活動を解析する方法の開発を開始している。活動時 (読書など) における脳活動を解析するための撮像法を確定し、解析方法のプログラミング開発を進めている。この新たなプロジェクトは、新たな外部資金の獲得に至っている (挑戦的研究 (開拓) 20K20514)。本年度は健常ボランティアを中心に読書時の機能画像の撮像を行い、読書時の脳活動をエントロピーの観点で解析するプログラミングの開発を進め、活動時におけるエントロピー低下を描出することを目標に進めている。

D. 考察

明らかな脳機能構造異常は認めない自閉症のメカニズムの解明に、我々が開発しているエントロピー解析が臨床症状に関連する脳活動の不安定さを評価するにあたり有用であることが示唆され、更なる自閉症児、及びそれぞれに対するコントロール群のデータ獲得を目指し、開発中のエントロピー解析法の確立及び臨床症状との相関を確認していく。本研究により自閉症児が共通して抱えている様々な臨床的問題解明につながる可能性があり、社会的にも医学的にも大変意義のあるものといえる。

加えて、様々な疾患で出現する臨床症状の異なる発達障害児に対し、それぞれの疾患特有の発症メカニズムの解明も求められることから、更なるエントロピー解析に対する撮像及び解析方法の開発を進めていき、安静時 fMRI のみならず活動時 fMRI に最適な撮像方法の開発を目指す。特に、社会的に大きな問題となっている学習障害

(Dyslexia など) や注意欠陥多動性障害 (ADHD) をはじめとした様々な行動障害を伴う発達障害のメカニズム解明につながることを期待でき、この観点から新たな競争的資金の獲得につながった。

エントロピー解析を軸に研究を進め、様々な発達障害の病態解明を目指し。対象を自閉症児から Dyslexia、ADHD へと拡大し方法論の開発及び確立を目指していく。

E. 結論

安静時 fMRI におけるエントロピー解析は、自閉症児の脳活動の特徴を反映するのみならず Dyslexia をはじめとする様々な発達障害のメカニズム解明に有用である可能性が示唆された。

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

なし

タウオパチー病理組織標本を用いたタウ PET 画像病理相関解析

研究代表者 樋口 真人¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾，清水 宏²⁾，高堂 裕平¹⁾，小野 麻衣子¹⁾

1) 量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門 2) 新潟大学脳研究所・病理学分野

研究要旨

タウタンパクは、アルツハイマー病を含むタウオパチーにおいて神経障害との関与が示唆されており、生体内でのタウの蓄積を可視化する技術は、タウオパチーの早期診断や発症メカニズムの解明、タウを標的とする疾患治療薬の薬効評価に寄与することが期待される。本研究では、量子科学技術研究開発機構にて開発されたタウ PET プローブ、 $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$ および $[^{18}\text{F}]\text{PM-PBB3}$ のタウオパチー患者における脳内分布と、患者剖検脳組織におけるタウ病変分布の相関を精査することを目的とする。

A. 研究目的

タウタンパクは、アルツハイマー病を含むタウオパチーにおいて神経障害との関与が示唆されており、生体内でのタウの蓄積を可視化する技術は、タウオパチーの早期診断や発症メカニズムの解明、タウを標的とする疾患治療薬の薬効評価に寄与することが期待される。これまでに、タウオパチー患者を対象として、量子科学技術研究開発機構にて開発されたタウ PET プローブ $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$ および $[^{18}\text{F}]\text{PM-PBB3}$ の脳内分布と、臨床症状との関連を明らかにする研究が進められてきた。本研究では、タウオパチー患者におけるタウ PET プローブの脳内分布と、タウオパチー患者剖検脳組織におけるタウ病変分布の相関を検証することを目的として、患者剖検脳の各領域組織におけるオートラジオグラフィおよび組織化学的解析を実施する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

対象：タウオパチー患者剖検脳組織

方法：タウオパチー患者におけるタウ PET プローブの脳内分布と、患者剖検脳組織におけるタウ病変分布の相関を検証するために、以下の解析を行う。

- ①剖検脳組織切片における、 $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$ および $[^{18}\text{F}]\text{PM-PBB3}$ を用いたオートラジオグラフィ
- ②組織化学的解析 (免疫染色・非標識体タウ PET プローブによる蛍光染色)

C. 研究結果

量子科学技術研究開発機構にて実施されたタウオパチー患者における $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$ あるいは $[^{18}\text{F}]\text{PM-PBB3}$ PET 撮像において、PET プローブの集積が認められた脳領域の患者剖検脳組織を対象にした。組織化学的解析およびオートラジオグラフィにより、組織切片におけるタウ病変の分布、および存在するタウ病変への PET プローブの結合性を検証した。その結果、大脳皮質基底核変性症およびピック病患者において、PET における当該プローブの高集積領域でのタウ病変の蓄積が確認され、病変蓄積領域への当該 PET プローブの *in vitro* での結合が確認された。

D. 考察

本年度には、タウオパチー患者の中でも特に大脳皮質基底核変性症およびピック病患者に焦点を当て、PET における $[^{18}\text{F}]\text{PM-PBB3}$ の高集積領域の一部における、タウ病変の蓄積、および存在するタウ病変への当該プローブの結合を、患者剖検

脳組織を用いて確認した。タウ PET プローブの脳内分布と、タウオパチー患者剖検脳組織におけるタウ病変分布の相関の検証には、本年度に検証を行った脳領域以外の領域においても同様の検証を実施する必要がある。また、これまでに解析を実施した疾患以外のタウオパチーにおいても同様の検証を実施することで、当該 PET プローブを用いて得られる画像と病理の相関に関する深い理解がもたらされると考える。

E. 結論

本研究により、大脳皮質基底核変性症、ピック病患者脳内におけるタウ PET プローブ [^{11}C]PBB3 および [^{18}F]PM-PBB3 の高集積と、患者剖検脳組織におけるタウ病変蓄積の一致が確認された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Neuron, 109, 42-58, 2021
2. Acta Neuropathol, 141, 697-708, 2021
3. Int J Mol Sci, 22, 349, 2020

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

ストレス応答におけるドーパミン受容体の役割の解明

研究代表者 板倉 誠¹⁾

研究分担者 飯田 諭宜²⁾、笹岡 俊邦³⁾、齊藤 奈英³⁾

1) 北里大学医学部生化学 2) 北里大学医学部精神科 3) 新潟大学脳研究所

研究要旨

ドーパミン作動性神経細胞は、黒質や腹側被蓋野などに存在し、線条体や大脳皮質へ投射することが知られている。また分泌されるドーパミンは、運動や情動などの神経機能の制御に深く関与している。本研究では、マウスにフットショックストレスを負荷した際に、ドーパミン作動性神経細胞の投射先である扁桃体、海馬、大脳皮質、線条体などにおいて、細胞内情報伝達系がどのように変化するかを、ウェスタンブロットと定量リン酸化プロテオーム解析によって明らかにする。さらに、一過性のストレスによる脳内のリン酸化パターンの変化に、ドーパミン受容体 (D1~D3 受容体) ファミリーがどのように関与しているかを、それぞれの受容体のノックダウンおよびノックアウトマウスを用いて検討する。また、ストレスによってリン酸化が変動するシナプスタンパク質が同定できれば、その部位に対するリン酸化抗体を作製し、ストレスが引き起こす脳内変化についてより詳細に解析する。

A. 研究目的

現代日本は高ストレス社会であり、抑うつや不安障害などのストレスに起因するとされる精神疾患が増加している。そのため、その発症機序の解明や治療法の開発が重要な課題となっている。

本研究では、マウスに一過性のストレス(フットショック)を負荷した際に、脳内の細胞内情報伝達系にどのような変化が起きているかを明らかにするために、ウェスタンブロットと定量リン酸化プロテオーム解析を行う。また、これまでの共同研究の成果として、ドーパミン D2 および D3 受容体アゴニストが、マウスに不安感を誘発することを確認している。そこでドーパミンが、ストレスによる細胞内情報伝達系の変化にどのような役割を果たしているかを、ドーパミン受容体ファミリーのノックダウンおよびノックアウトマウスを用いて、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)

1. フットショックストレスマウスのウェスタン

ブロットと定量リン酸化プロテオーム解析

C57B6 マウスにフットショックストレス(脚への電気ショック)を負荷後、15 分間および 60 分間経過した海馬、線条体、大脳皮質を採取、凍結したサンプルを笹岡教授 [新潟大学脳研究所] から供与頂いた。各サンプルを、プロテアーゼ阻害剤 (cOmplete, シグマアルドリッチ) およびプロテインホスファターゼ阻害剤 (PhosSTOP, シグマアルドリッチ) を添加した Phase-transfer surfactant バッファー (PTS, 12 mM sodium deoxycholate, 12 mM sodium N-dodecanoylsarcosinate, and 200 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB)) でホモジネートし、ウェスタンブロットおよびプロテオーム解析のサンプルとした。

定量リン酸化プロテオーム解析は、小寺教授 [北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンター] の協力のもと、現在進行中である。

2. ドーパミン D1 受容体コンディショナルノックダウンマウスのウェスタンブロットと定量リン酸化プロテオーム解析

笹岡教授 [新潟大学脳研究所] から、1. 野生型マウス、2. ドキシサイクリン (DOX) 投与前の遺伝子改変コントロールマウス、3. DOX 投与によってドーパミン D1 受容体をノックダウンしたマウス、4. DOX の投与を中止し、再びドーパミン D1 受容体を発現するようになったマウスの 4 種類について、フットショックストレスを負荷したマウスとコントロールマウスの海馬、線条体、扁桃体、大脳皮質を採取、凍結したサンプルを笹岡教授 [新潟大学脳研究所] から供与頂いた。

研究方法 1. で前述したように、サンプルを調製し、ウェスタンブロットを行った。定量リン酸化プロテオーム解析についても小寺教授 [北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンター] と協力のもと行う予定である。

C. 研究結果

1. フットショックストレスマウスの海馬および線条体のウェスタンブロット

C57B6 マウスのフットショック 15 分および 60 分間経過後の海馬と線条体のウェスタンブロットを行った。(論文未発表のため、データは非開示とします。)

海馬、線条体とも神経活動に依存して発現する最初期遺伝子 c-Fos の発現上昇が、フットショック 60 分間後に観察された。海馬においては、脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現上昇も見られた。

また転写調節に関わる MAPK 経路について、p44/p42MAPK, p38MAPK を活性化するリン酸化部位のウェスタンブロットを行った。その結果、海馬、線条体において、フットショック後の経過時間に依存したリン酸化量の変動が見られた。

次に神経伝達物質放出に必須である SNAP-25 Ser187 のリン酸化をウェスタンブロットで検討した。海馬においてはフットショック 60 分後にリン酸化の亢進が、線条体では逆にリン酸化の抑制が見られた。

2. ドーパミン D1 受容体ノックダウンマウスへのフットショックとウェスタンブロット

Dox 投与によりドーパミン D1 受容体をノックダウンしたマウスと 3 種類のコントロールマウスにフットショックを行い 60 分間経過した海馬のウェスタンブロットを行った。(論文未発表のため、データは非開示とします。)

最初期遺伝子 c-Fos の発現上昇は、ドーパミン D1 受容体ノックダウンマウスを含む 4 種類のマウスすべてで見られた。

これまでの共同研究において、拘束浸水ストレスマウス海馬では、ストレス負荷後に AMPA 型グルタミン酸 GluA1 サブユニットのリン酸化が亢進することを見出している。そこで、フットショックマウスについても GluA1 Ser831 および Ser845 のリン酸化をウェスタンブロットで検討した。

浸水拘束ストレスとは異なり、フットショックストレスでは、ストレス依存的な GluA1 のリン酸化の亢進は見られなかった。しかしながら、GluA1 Ser845 については、ドーパミン D1 受容体のノックダウンマウス海馬において、リン酸化が亢進している傾向が見られた。

D. 考察

マウスへのフットショックストレス負荷により、ドーパミン作動性神経細胞の投射先(海馬、線条体、扁桃体)で最初期遺伝子 c-Fos の発現上昇が見られることから、脳内のドーパミン系がフットショックに対するストレス応答に関与することが示唆された。

また神経伝達物質放出を促進すると考えられる SNAP-25 Ser187 のリン酸化に変化が見られることから、海馬や線条体において、ドーパミンの放出量が増えている可能性が示された。また前年に実験を行った拘束浸水ストレスとフットショックストレスでは、タンパク質リン酸化の変化のパターンが異なるため、ストレスの種類によって、脳内のストレス応答が異なることが明らかになった。

E. 結論

フットショックストレスによりドーパミンが関与する脳領域で神経活動に変化が起ることを明らかにした。そこで、定量リン酸化プロテオームにより、より網羅的なタンパク質のリン酸化の解析を進め、ドーパミン系がストレス応答に、どのように関与しているかを明らかにする。

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

なし

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

シヌクレイノパチーにおける異常蓄積タンパク質の排出亢進と 治療法の開発

研究代表者 丹治 邦和¹⁾、
研究分担者 今 智矢²⁾、三木 康生¹⁾、森 文秋¹⁾、柿田 明美³⁾、若林 孝一¹⁾

弘前大学大学院医学研究科 ¹⁾脳神経病理学講座、 ²⁾脳神経内科学講座、
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」では、 α シヌクレインが異常蓄積するという共通病態を特徴とする。しかし、その蓄積機序や病態は不明であり、その進行を遅延・阻止する治療法は現在まで確立されていない。今回、シヌクレイノパチーの病態を知るためにアルツハイマー病における危険因子の1つとして同定されている Myelin associated oligodendrocytic basic protein (MOBP)の局在を検討した。その結果、健常者ではMOBPはミエリンに強く局在していた。一方、パーキンソン病、レビー小体型認知症ではレビー小体においてMOBPは陽性所見を示した。特にレビー小体のコアの部分にMOBPの免疫原性が認められた。以上のことからMOBPがレビー小体病の病態に関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

Myelin associated oligodendrocytic basic protein (MOBP)はこれまでにアポ E4 を有するアルツハイマー病 (AD) における危険因子の1つとして同定されている。ADの約半数はシヌクレイン病理が合併していることが知られている。また、MOBPはprogressive supranuclear palsy (PSP)、corticobasal degeneration (CBD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD) においても危険因子として報告されている。今回、種々の神経変性疾患剖検例を対象にMOBPの局在を検討した。

B. 研究方法

ヒト剖検脳を用いたMOBPの解析

2種類のMOBP抗体を用い、種々の神経変性疾患の剖検脳組織を免疫組織化学的に検討した。患者検体については、弘前大学医学研究科倫理委員会

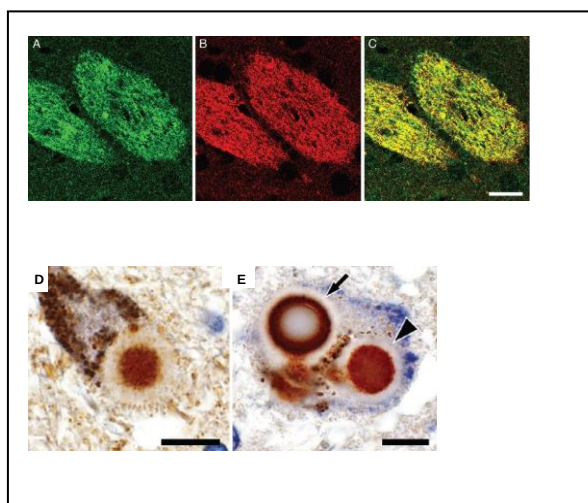
の承認を得ている。

C. 研究結果

健常者ではMOBPはミエリンに局在を示した。パーキンソン病 (PD)、レビー小体型認知症 (DLB) ではレビー小体においてMOBPは陽性所見を示した。特にレビー小体のコアの部分にMOBPの免疫原性が認められた。一方、多系統萎縮症 (MSA) AD、PSP、CBD、ALSおよびFTLDの神経細胞内、グリア封入体はいずれも陰性であった (図1)。

図1 健常者およびPD患者におけるMOBPの免疫染色 (A-C) 健常者におけるMOBP (緑色) はミエリンマーカー (赤色) である myelin basic protein (赤色) と完全に局在が一致した。(D、E) パーキンソン病黒質 (D) における脳幹型レビー小体および青斑核のレビー小体 (E) の中心部位がMOBP陽性を示した。

(A-B) Bar=20 um、(D, E) Bar =10um



D. 考察

これまでに MOBP は白質およびオリゴデンドロサイトに発現が報告されている。今回、MOBP が PD および DLB のレビー小体に凝集することを報告した。特に脳幹型レビー小体ではほぼすべてが MOBP 陽性を示した。一方、皮質型レビー小体は一部 MOBP 陽性所見はあるものの陰性所見が多かった。また、MSA の細胞内封入体は陰性であった。このことからシヌクレイノパチーに共通の病態ではなく、レビー小体病に特異的な所見である。また、AD、PSP、CBD、ALS および FTLD の神経細胞内、グリア封入体はいずれも陰性であった。

E. 結論

AD の約半数はシヌクレイン病理が合併していることが知られている。今回、シヌクレイノパチーの PD、DLB においてミエリン関連タンパク質の局在変化を示した。引き続きシヌクレイノパチーの早期の病態に着目して解析を進めていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Tanji K, Mori F, Shirai F, Fukami T, Seimiya H, Utsumi J, Kakita A and Wakabayashi K, Novel tankyrase inhibitors suppress TDP-43 aggregate formation,

Biochem Biophys Res Commun 537 85-92, (2020).

2. 学会発表

第 61 回 日本神経病理学会 (2020 年 10 月 12 -14 日、金沢・オンライン)

1) 森文秋, 他田真理, 今 智矢, 三木康生, 丹治邦和, 黒滝日出一, 富山誠彦, 石原智彦, 小野寺理, 柿田明美, 若林孝一, 筋萎縮性側索硬化症および種々の病態の骨格筋・心筋におけるリン酸化 TDP-43 凝集.

2) Tanji K, Mori F, Nikaido Y and Wakabayashi K, Effect of oral and intranasal administration of trehalose on multiple system atrophy model mice.

3) Kon T, Tanji K, Mori F, Kakita A, Tomiyama M and Wakabayashi K, Immunoreactivity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein in Lewy bodies.

その他の学会

4) Tanji T, Mori F, Shirai F, Seimiya H, Utsumi J and Wakabayashi K, Novel tankyrase inhibitors suppress formation of TDP-43 aggregates, 第 43 回日本神経科学会 (2020 年 7 月 29 日-8 月 1 日、神戸・オンライン).

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

血漿中 ILEI 定量による高齢者認知機能障害の初期サロゲイトマーカーとしての検証

研究代表者 西村 正樹¹⁾

研究分担者 渡邊 直希¹⁾, 三ツ石 弥千代¹⁾, 春日 健作²⁾, 池内 健²⁾

1) 滋賀医科大学・神経難病研究センター 分子神経病理学部門

2) 新潟大学・脳研究所

研究要旨

Alzheimer 病に対する先制医療の実現が求められるなか、診断法や治療法の開発は難航している。我々が病態惹起ペプチド A β の産生を抑制する内在性分子として同定した ILEI/FAM3C (interleukin-like epithelial-mesenchymal transition inducer or family with sequence similarity 3, member C) は、加齢とともに脳内発現が低下し、その低下レベルは Alzheimer 病脳で顕著となるとともに、脳内 A β 蓄積レベルと負に相関することを明らかにしている。この知見をもとに、2018 年度までの共同研究（課題番号 2820）により患者の脳脊髄液・血液中 ILEI の検討を行い、認知症との間に相関性が示唆される結果を得て、特許出願を行った。今後の実用化を考慮すると、血漿を用いた評価が侵襲性も少なく優れていると判断されることから、本課題では、血漿 ILEI レベルの定量が認知症リスクのサロゲイトマーカーとして成立する可能性について検証する。

A. 研究目的

我々が同定した ILEI は新たな分泌型機能分子 FAM3 スーパーファミリーに属し、APP-C99 の非特異的分解を促進するにより A β 産生を抑制するが、一方で γ セクレターゼ活性や Notch 切断は阻害しない(Nat Commun 5:3917, 2014)。この特異な活性を示す ILEI は中枢神経系においては主に神経細胞に発現している。しかし、そのレベルは加齢とともに低下し、剖検脳を用いた解析では Alzheimer 病症例で顕著な発現低下が認められ、A β 蓄積レベルに逆相関していた。これは、加齢に伴う ILEI 減少が脳内 A β 産生亢進の一次的な原因となり、脳内 A β 蓄積のリスクとなる可能性を示唆している。

本課題では、認知症、軽度認知機能障害、健常高齢者の各症例を対象に血漿中の ILEI 定量を行

い、既知のバイオマーカーや認知機能障害の程度との相関解析を横断的・縦断的に進めることにより、認知症発症前後における血漿中 ILEI の診断的意義に関する検証を行うことを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

(1) 新潟大学病院神経内科外来（研究分担者の担当する外来）を受診する患者のうち、NIA-AA 診断基準を満たす認知症（最終目標 50 例）、軽度認知障害（最終目標 50 例）、健常高齢者（最終目標 50 例）を対象とし、末梢血液を採取する。可能な症例については追跡し血液を再採取する。加えて、新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センターに保管されている既存サンプルのうち、臨床検体の二次利用の同意もしくは広範的同意が得ら

れた血液サンプルも解析の対象とする。

(2) 血液中の ILEI の測定は ELISA にて滋賀医科大学神経難病研究センターで行う。

(3) A β 40・A β 42・総 tau・リン酸化 tau などの Alzheimer 病関連既知マーカーの測定を新潟大学脳研究所で実施する。

(4) 血漿中 ILEI 値と既知のバイオマーカーや認知機能障害の程度との相関解析を進めることにより、とくに認知症発症前後における ILEI の診断的意義に関して検討を行う。

(5) 中枢神経系における ILEI タンパク質の動態や機能は、未だ不明なことも多い。マウスを用い、詳細な局在や分泌機構、生理的機能などについて解析を行う。

なお、本研究は滋賀医科大学及び新潟大学脳研究所において、研究倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

今年度は、マウスを用いた解析を中心に進めた。ILEI は中枢神経系において広範な領域のニューロンに発現が認められ、核周囲小胞（主に TGN）に加え、細胞分画法ではシナプス前部を主体とする分画に濃縮して局在することを見出し、すでに報告している。シナプス前部シナプス小胞の中でも、とくにアクティブゾーンにドッキングしたシナプス小胞群において APP やセクレターゼ複合体などと共局在していた。

活動中マウスの大脳皮質細胞間質液中の ILEI および A β レベルをモニターするため、マイクロダイアリシスを用いた解析を APP ノックイン (App^{NL-G-F}) マウスに適応した。その結果、ILEI は A β と同様に細胞間質液中に分泌されていること、そのレベルには緩徐な変動があることなどが確認された。この周期的な変動は A β にも報告されているが、同時にモニターすると ILEI と A β では鏡像関係にあった。一方、神経活動電位の抑制（テトロドトキシン投与）やシナプス小胞放出抑制（テタヌス毒素投与）によって、ILEI および A β の細胞間質レベルが顕著に低下したことから、両者は神経活動依存的にシナプス小胞から細胞外に分泌されることが明らかになった。

さらに、リバーサダイアリシスを用い、レセプターに対するアゴニストとアンタゴニストを環

流し、ILEI と A β の変動を見た。AMPA 型レセプターのアゴニストでは ILEI は増加、A β は減少した一方、アンタゴニストでは両者とも減少した。NMDA 型レセプターに対するアゴニストでは両者とも減少、アンタゴニストでは ILEI 不変、A β 著増が見られた。GABA_A/GABA_B レセプターのアゴニストでは両者とも減少、アンタゴニストで著増した。ニコチン型アセチルコリン (ACh) レセプターのアゴニスト、アンタゴニストではともに A β は増加、ILEI は不変であった。ムスカリン型 ACh レセプターでは、A β はアゴニストで減少、アンタゴニストで増加したが、ILEI はともに大きな影響を受けなかった。これらの結果は、ILEI と A β が異なる種類のシナプス群から分泌されることを示唆したが、なかでも唯一 AMPA 刺激で両者の変化の方向が逆向きであったことは ILEI と A β の周期的変動が鏡像関係にあることと AMPA 型レセプター活性化との関連を推測させる所見として注目された。以上の結果は、論文 (Nakano M, et al. 2021) に取りまとめて報告した。

また、この論文に於いて、Alzheimer 病症例の剖検脳では ILEI の発現が低下していることや認知症、MCI 症例の髄液中 ILEI は健常者に比して有意に減少しているという昨年度までの解析成果を合わせて報告した。

D. 考察

マウス脳マイクロダイアリシスを用いた解析からは、ILEI は A β と同様にシナプス前部から神経活動に伴って分泌されるが、シナプスを神経伝達物質サブタイプで見ると両者は異なる種類のシナプスから放出されると推測された。

E. 結論

ILEI は A β と同様に神経活動に伴いシナプス部から分泌される。異なるシナプス群から放出された ILEI が A β 産生を抑制する可能性が推測される。

一方、この ILEI が Alzheimer 病早期における脳 A β 蓄積のサロゲイトマーカーとして有用である可能性が高く、今後血液を用いた解析に進める。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1) Nakano M, Mitsuishi Y, Liu L, Watanabe N, Hibino E, Hata S, Saito T, Saido TC, Murayama S, Kasuga K, Ikeuchi T, Suzuki T, Nishimura M. Extracellular release of ILEI/FAM3C and amyloid- β is associated with the activation of distinct synapse subpopulations. *Journal of Alzheimer's Disease* 80:159-174, 2021 doi: 10.3233/JAD-201174

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）

1. 特許出願

出願番号：特願 2018-177844

発明者：西村正樹、池内 健

出願人：滋賀医科大学

出願年月日：2018 年 9 月 21 日

発明の名称：血液検体を用いた MCI 及び
認知症の補助診断方法

アルツハイマー病に関連するゲノム情報を駆使した多遺伝子解析

研究代表者 菊地 正隆¹⁾
研究分担者 池内 健²⁾, 宮下 哲典²⁾

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

ゲノムワイド関連解析で見つかった数十個の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) だけではなく、より多くの弱いリスクをもつ SNP を集めることで疾患をより良く説明するポリジェニック効果が知られている。本研究では脳研究所・遺伝子機能解析学分野 (池内健教授・宮下哲典准教授) で解析された晩期発症型アルツハイマー病 (late-onset Alzheimer's disease: LOAD) 患者のゲノムデータ (SNP アレイデータやエクソームデータ、全ゲノムシーケンシングデータ) を用い、複数の遺伝的効果が与える AD への影響を解析する。

A. 研究目的

疾患に対する複数遺伝的要因の寄与を定量化する手法としてポリジェニックリスクスコア (polygenic risk score: PRS) やジェノミックリスクスコア (genomic risk score: GRS) が提案されている。本研究ではまずこれらの指標を脳研独自のアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) 患者ゲノムデータを用いて解析し、複数の遺伝的要因がどの程度 AD を判別しうるのかを解析する。AD では MRI データなどによる脳萎縮や脊髄バイオマーカーの変化が知られている。複数の遺伝的要因がこれら表現型に影響を与えているのかどうかを調べるために PRS や GRS と関連する表現型を探索する。これにより AD の遺伝的要因と表現型の間のミッシングリンクを明らかにする。また、AD の遺伝的要因がその他の疾患 (特に精神疾患等) の遺伝的要因とどの程度関連するのかを調べるために遺伝的相関解析等を行うことにより遺伝的相関が高い疾患ですでに承認されている薬剤が AD で奏功するかどうかといったドラッグリポジショニングへの応用を検討する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

遺伝子機能解析学分野で解析した約 2,000 例の健常者およびアルツハイマー病患者のゲノムデータは SNP アレイで測定されており、約 180 万箇所の SNP マーカーをジェノタイピングしている。SNP アレイに載っていない領域のジェノタイピングを行うためにインピュテーション解析を行う。また 500 例以上の検体でエクソーム解析や全ゲノムシーケンシング解析が行われており、これら検体では MRI や髄液バイオマーカーが測定されている。本解析ではこれら検体の多遺伝子効果を定量化するために上記のゲノムデータを駆使することで PRS を算出する。PRS は公開されているアルツハイマー病 GWAS データに収録されている各 SNP の疾患への寄与度 (p 値やオッズ比など) を重みとし、リスクアレルの数を説明変数とした重み付け線形和として表現される。寄与度の高いリスクアレルを多く持つ検体は PRS が高くなる。計算した PRS が髄液バイオマーカーや脳萎縮と関連するかどうかを検討し、その他の疾患で算出した PRS とどの程度関連するのかを解析する。

本研究は大阪大学研究倫理審査委員会においてヒトゲノム研究審査を経て承認を得ている (承認番号: 767-2)。また新潟大学遺伝子倫理審査委

員会において遺伝子解析研究計画審査を経て承認を得ている（承認番号：G2015-0850）。

C. 研究結果

昨年度新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学教室より受領したゲノムデータを用いインピュテーション解析を行った。リファレンス配列に1000人ゲノムプロジェクトの東アジア人のデータを用い約700万マーカーをインピュテーションした。現在日本人全ゲノムシーケンシングデータを用いたインピュテーション解析を行っている。インピュテーションを行う前後のポリジェニックリスクスコアを算出し、患者の識別能力を比較したところインピュテーション後の識別能力が高かったためSNPマーカーの補填によりポリジェニックリスクスコアが改善されたことがわかった。

D. 考察

本年度はインピュテーション解析を行いポリジェニックリスクスコアの精度を比較した。その結果、インピュテーション後の方が精度が高かった。考察としてことより多くのGWAS統計量をもつSNPマーカーがポリジェニックリスクスコアの算出に利用できたため精度が高くなったと考えられる。来年度は算出したポリジェニックリスクスコアとMRIデータなどによる脳萎縮や脊髄バイオマーカーの変化との相関関係について解析を行う。

E. 結論

今後日本人におけるアルツハイマー病のポリジェニックリスクスコアを計算するとともに各検体で採取された髄液バイオマーカーとの相関解析を行うことで様々な遺伝的要因と病理指標のあいだの関連性を総合的に調べる事が可能になる。さらに異なる人種において計算した統計的指標を比較することで人種間の違いについて言及できると考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 菊地 正隆. アルツハイマー病マルチオミックスデータを用いたシステム生物学的研究. 第93回日本生化学会大会. 2020年9月15日. オンライン開催（口頭発表）.
2. Masataka Kikuchi, Akinori Miyashita, Norikazu Hara, Daichi Shigemizu, Kouichi Ozaki, Shumpei Niida, Takechi Ikeuchi, Akihiro Nakaya. Polygenic analysis of Alzheimer's disease in a Japanese population. The Alzheimer's Association International Conference. 2020年7月27日. オンライン開催（ポスター発表）.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし。

臨床応用に資する^[11C]TGN-020 の迅速かつ高収量な製造合成法の開発

研究代表者 久保均¹⁾、²⁾

研究分担者 高橋和弘²⁾、城寶大輝²⁾、五十嵐博中³⁾、鈴木雄治³⁾、中村ゆきみ³⁾

福島県立医科大学保健科学部診療放射線科学科¹⁾、福島県立医科大学先端臨床研究センター²⁾、
新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター³⁾

研究要旨

本研究の推進には、新潟大学が開発したヒト用 AQP-4 PET 測定に用いるイメージング薬剤^[11C]TGN-020 の製造を、異なる実施環境、異なる性能（ハードウェア）を含む、異なる自動合成装置が設置された福島県立医科大学で実現する必要がある。そこで、本学環境に合わせた^[11C]TGN-020 の製造法の基本設計を終了し、実際の製造合成の試行を行った。その結果、^[11C]TGN-020 を合成できることが確認された。しかし、収量及び比放射能をより高めなければ次ステップである前臨床試験に進むことができないため、合成手順のさらなる最適化による^[11C]TGN-020 製造が必要であると考えられた。

A. 研究目的

新潟大学が開発されたヒト用 AQP-4 PET 法が確立することにより、ヒト脳における AQP-4 マッピングが可能となり、本トレーサーでの水動態の可視化に基づく glymphatic system の解明や各種疾患との関連性を検討することが可能となっている。しかし、現行の製造合成手法は比較的合成時間が長く、収量も臨床で用いるに十分な量を得ることができておらず、さらに合成途中に付加される単体により比放射能が低いという弱点を有することから汎用化されてはいない。そこで、本研究では現行の^[11C]TGN-020 の製造合成系を再検討し、より比放射能が高く短時間で高収量の得られる製造合成法を新たに構築して、よって臨床応用の汎用化に資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）

新潟大学で開発された^[11C]TGN-020 の製造合成法を広く臨床へ資するため、1) 開発された手法を福島県立医科大学先端臨床研究センターに移植して新潟大学以外の施設（新潟大学と異なる合成装置）で再現できるかを検証した。また並行して現行の^[11C]TGN-020 の製造合成スキームを再

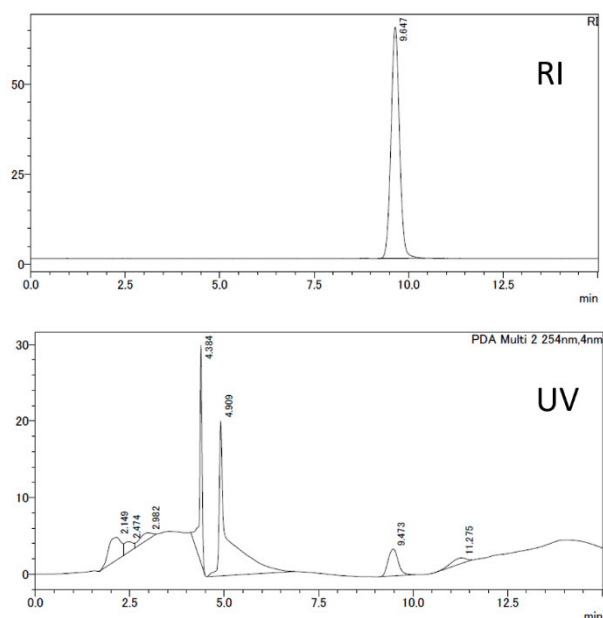
検討し、2) 単体添加量を減らし、手順の簡素化や最適化などの技術を駆使して製造合成時間の迅速化を図り、高い比放射能かつ高収量で^[11C]TGN-020 が得られる製造合成方法を新たに設計し構築した。

C. 研究結果

1) の製造合成法の移植については、自動合成装置の改造で対応した。新潟大学は GE ヘルスケア社製の自動合成装置を用いているが、福島県立医大では住友重機械工業(株)製の自動合成装置を用いているため、合成手順をそのまま移植することは、ハード的にもソフト的にも難しい。そこで、配管のつながりや長さ、電磁弁の位置、温度制御、流量等を調整して新潟大学の合成装置に近い動作が可能のようにできる範囲で改造した。TGN-020 を合成する上で必要な^[11C]CO₂ の濃縮は、モレキュラーシーブを充填したガラス管とカラムヒーターを用いて可能とした。実際のホット合成では、^[11C]CO₂ の照射終了前に反応容器 1 に予め前駆体となるアリルリチウム試薬をドライアイス-メタノール（-78℃）の冷却条件下で作製しておき、サイクロトロン照射終了後、回収した

[11C]C02 を室温でモレキュラーシーブに吸着させ、その後、加熱して窒素ガスを流すことで吸着した[11C]C02 を反応容器 1 に低流速で導入して、-78℃で反応を行った。未反応のアリルリチウム試薬をクエンチした後、反応容器 2 に反応液を移送した。この移送の理由は、反応容器 1 に加熱機能がないためである。反応容器 2 に移った反応液を加熱し、溶媒を乾固させた後に縮合反応を行った。縮合反応終了後 HPLC で分取して TGN-020 を得た。この合成装置を用いて[11C]TGN-020 の合成を試行し、図 1 に[11C]TGN-020 の合成に成功したことを示す。

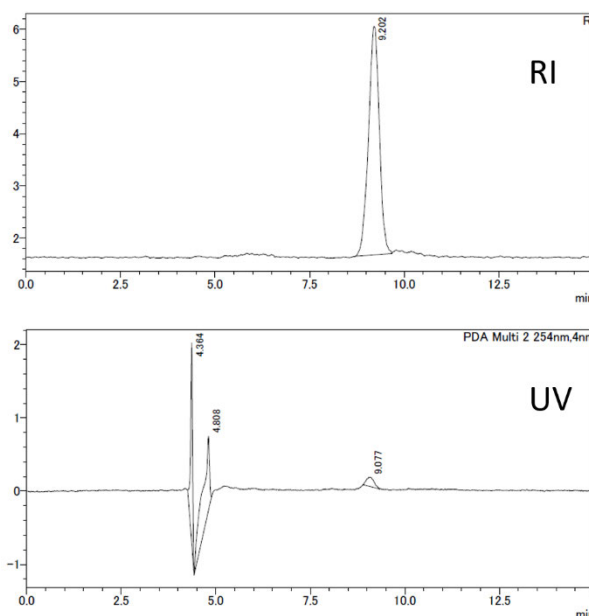
図 1 : [11C]TGN-020 の HPLC 解析結果



2) については比放射能の向上を目指し、アリルリチウム試薬のクエンチ方法に着目した。アリルリチウム試薬を塩酸やアセトンでクエンチし不活性の化合物に変換することで、比放射能を下げる要因となる非放射性的ニコチン酸を発生させずに次の縮合反応へ移ることができると考え、*n*-BuLi を利用した[11C]ニコチン酸合成反応のクエンチ剤として 1N 塩酸及びアセトンを使用した。その結果、収量は 111MBq で放射化学的収率は 2%、比放射能が 0.654GBq/ μ mol という結果を得た。次に収量の改善を図るため、縮合反応条件を EDC/DMF 溶媒から HATU/THF 溶媒へ変更することで約 10 倍の収率が得られることがわかった。この条件で製造合成の試行を行ったところ、収量は 36MBq で放射化学的収率は 0.9%、比放射能は 4.746GBq/ μ mol となった (図 2)。収量が低下した

ために原因を調査したが、使用した試薬の劣化が原因であることが判明した。

図 2 : 収量改善を目指した試行の HPLC 解析結果



D. 考察

本年度は、最終的に臨床応用するための汎用化に資するため、現行の[11C]TGN-020 の製造合成系を再検討し、より比放射能が高く短時間で高収量の得られる製造合成法を新たに構築した。我々の開発した製造合成法で試行した結果、新潟大学とは異なる製造合成環境における[11C]TGN-020 の製造合成に成功することができた。これは、製造合成過程を本学の環境に合わせて再構築することができたためと考えられた。なお、この再構築過程においては、脳研共同研究者による製造合成に関する経験の共有が非常に有効であった。

また、非放射性的ニコチン酸発生を抑制するため、アリルリチウム試薬のクエンチ方法を改善することで比放射能および収量の向上を図った。試薬の劣化により高収量の結果を出すことはできなかったが、比放射能は 7 倍以上に向上することができた。今後は、開発した手法の更なる最適化を行い、高比放射能かつ高収量な[11C]TGN-020 の製造法を確立する。

E. 結論

福島県立医科大学でも[11C]TGN-020 の製造ができることを示したと共に、従来よりも高比放射能となる[11C]TGN-020 の製造合成法の設計がで

きた。

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（予定を含む）

特記すべきことなし

神経変性疾患特異蛋白と神経細胞脱落：ヒト基底核における定量的検討

研究代表者 小柳 清光¹⁾
研究分担者 山田 光則¹⁾、柿田 明美²⁾

1) 信州大学医学部神経難病学講座 2) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

ポリグルタミン病におけるポリグルタミン沈着と神経細胞脱落との関連を明らかにする目的から、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) とマチャド・ジョセフ病 (MJD)、ハンチントン病 (HD) の線条体神経細胞の大きさと数を定量的に検討し、それらの連続切片にポリグルタミン免疫染色して陽性所見を分析し、神経細胞減少との関連を解析した。DRPLA、MJD、HD とも、多くの線条体神経細胞の核でポリグルタミンのびまん性染色所見がみられ、一方核内封入体は少数の神経細胞で認められた。神経細胞数の減少は、HD では小型神経細胞の数は対照の 12~16%まで減少し、大型神経細胞数は対照の 34~35%であり、一方 DRPLA では小型神経細胞数は対照の 51~61%、大型神経細胞数は 34~39%であった。MJD では小型神経細胞数は対照の 65%~76%、大型神経細胞は 19~26%であった。すなわちポリグルタミン病の線条体では、HD では小型神経細胞優位の減少がみられるが、DRPLA と MJD では大型神経細胞優位の減少が認められた。一方、神経細胞数の減少とポリグルタミン沈着の様態とは直接の関連は指摘しえなかった。

A. 研究目的

神経変性疾患特異蛋白と神経細胞脱落との関連を明らかにする。このため、ヒト基底核を侵す下記の疾患で免疫組織化学的に疾患特異的蛋白を検索し、連続切片を用いて細胞定量的に神経細胞脱落を検索して、これらの関連を解明する。疾患と検索部位は、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、マチャド・ジョセフ病 (MJD)、ハンチントン病 (HD) における線条体すなわち尾状核と被殻を検索する。これらの部位でポリグルタミン (1C2) 免疫染色を行い、その陽性所見を観察し、尾状核と被殻の残存神経細胞の大きさと数を計測解析して、疾患特異蛋白の出現と、神経細胞脱落の程度との関連を病理学的、細胞定量的、免

疫組織学的に解明する。

B. 研究方法

症例：DRPLA (6 剖検例、18~37 歳：26.7+/-6.6 歳) と MJD (3 剖検例、32、36、61 歳：42.3+/-16.2 歳) の尾状核と被殻の神経細胞を定量的に検討し、我々が先に報告した HD (4 剖検例、40~58 歳：52.8+/-8.5 歳) (*Oyanagi K, Ikuta F: A morphometric reevaluation of Huntington's chorea with special reference to the large neurons in the neostriatum. Clinical Neuropathology 1987; 6: 71-79*) のデータと比較検討する。用いる対照は、DRPLA の対照としての A 群 (6 例、22~37 歳：27.5+/-5.8 歳) および MJD と HD の対照として B 群 (5 例、45~66 歳：55.6+/-9.4 歳) である。

検索方法: (1) 神経細胞計測: *Oyanagi et al. 1987* と同様の方法を用いた。すなわちホルマリン固定-パラフィン包埋された 20 μ m 間隔の 10 μ m 厚切片 2 枚をクリューバー-バレラ (KB) 染色し、ニッスル小体と明瞭な核小体を有する細胞を神経細胞と同定した。冠状断された側坐核レベルの尾状核頭部と乳頭体レベルの被殻においてそれらの上半正中部と下半正中部において 0.5mm² に含まれる核小体を有する神経細胞核の断面積をニコン描画装置とディジタイザを用いて計測し、尾状核または被殻の断面積を乗じて全体の神経細胞数を算出した。神経細胞核の断面積 100 μ m² 未満を小型神経細胞とし、100 μ m² 以上を大型神経細胞として、大型神経細胞は尾状核および被殻の全体を計測した。計測結果の比較は、DRPLA は対照 A 群と、MJD と HD は対照 B 群と行った。(2) これらに連続する 6 μ m 厚切片を用いてポリグルタミン免疫染色を施行して光顕で観察した。

(倫理面への配慮) 全症例とも剖検施設においてインフォームドコンセントが得られている。信州大学医学部倫理委員会承認済み (#5108)。

C. 研究結果

(1) DRPLA の小型神経細胞数は、尾状核では対照の 60.6%まで減少し、被殻では 50.8%まで減少していた。大型神経細胞数は、尾状核では対照の 34%まで減少し、被殻では 39.2%まで減少していた。(2) MJD の神経細胞減少の程度は症例によってばらつきが大きい、小型神経細胞数は尾状核では対照の 76%まで減少し、被殻では 65.2%まで減少、大型神経細胞数は尾状核では対照の 19.4%となり、被殻では 25.9%であった。(3) 既報の HD のデータは、小型神経細胞数は尾状核では対照の 15.9%まで減少し、被殻では 11.7%まで減少していた。一方、大型神経細胞数は尾状核では対照の 35.2%まで、被殻では 33.6%まで減少していた (*Oyanagi et al. 1987*)。 (4) ポリグルタミン病 DRPLA、MJD、HD の線条体では、多くの残存神経細胞で核がポリグルタミン免疫染色でびまん性の染色性を示し、核内封入体は少数の残存神経細胞で認められた。

D. 考察

ポリグルタミン病の線条体神経細胞の脱落に関しては、これまで HD で精力的に検討され、小型神経細胞優位の神経細胞脱落が報告されてきた (*Oyanagi et al. 1987*)。本研究結果から、DRPLA と MJD では大型神経細胞優位の減少が生じていることが考えられた。神経細胞減少の程度は、小型神経細胞の脱落は HD で最高度であり、DRPLA と MJD では、小型神経細胞数は対照の 50%~76% 程度までの減少に止まり、一方、大型神経細胞は、DRPLA が対照の 34~39%まで減少し、MJD では対照の 19~26%まで減少していた。

いずれの疾患でも、残存神経細胞では核内のびまん性ポリグルタミン染色が多数の神経細胞で見られ、封入体を有する神経細胞は少数であった。DRPLA と MJD の神経細胞核内のポリグルタミン陽性所見は研究分担者山田らにより報告され細胞変性との因果が論じられている (*Yamada M, Tan C-F, Inenaga C, Tsuji S, Takahashi H: Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases. Neuropathology and Applied Neurobiology 2004;30:665-675. doi:10.1111/j.1365-2990.2004.00583.x*)。ポリグルタミン病の線条体における神経細胞脱落は、DRPLA、MJD、HD とともに、ポリグルタミンの核内沈着の様態からは神経細胞減少との相関を直接的には指摘しえなかった。

ポリグルタミン病では神経細胞の萎縮が生じている事が報告されている (*Sakai K, Yamada M, Sato T, et al. Neuronal atrophy and synaptic alteration in a mouse model of dentatorubral-pallidoluysian atrophy. Brain 2006; 129: 2353-2362. doi:10.1093/brain/awl82*)。従って、本研究が明らかにした神経細胞の減少、特に大型神経細胞数の減少には神経細胞の萎縮を考慮する必要性が考えられる。

E. 結論

(1) DRPLA の小型神経細胞数は、尾状核では対照の 60.6%まで減少し、被殻では 50.8%まで減少していた。大型神経細胞数は、尾状核では対照

の 34%まで、被殻では 39.2%まで減少していた。

(2) MJD の神経細胞数の減少の程度は症例によってばらつきが大きい、小型神経細胞は尾状核では対照の 76%まで減少し、被殻では 65.2%まで減少し、大型神経細胞は尾状核では対照の 19.4%まで、被殻では 25.9%まで減少していた。(3) 既報の HD では、小型神経細胞数は尾状核では対照の 15.9%まで減少し、被殻では 11.7%まで減少、大型神経細胞数は尾状核では対照の 35.2%、被殻では 33.6%であった。(4) すなわち、ポリグルタミン病の線条体では、HD では小型神経細胞優位、DRPLA および MJD では大型神経細胞優位の減少が見られた。(4) DRPLA、MJD、HD の線条体神経細胞脱落は、ポリグルタミンの核内沈着の様態とは直接的な相関を指摘しえなかった。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Verheijen BM, Lussier C, Müller-Hübers C, Garruto RM, Oyanagi K, Braun RJ, van Leeuwen FW: Activation of the unfolded protein response and proteostasis disturbance in parkinsonism-dementia of Guam. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2020; 79: 34-45. doi: 10.1093/jnen/nlzl110
2. Verheijen BM, Morimoto S, Sasaki R, Oyanagi K, Kokubo Y, Kuzuhara S, van Leeuwen FW: Expression of mutant ubiquitin and proteostasis impairment in Kii amyotrophic lateral sclerosis / parkinsonism-dementia complex brains. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 79: 902-907, 2020 doi: 10.1093/jnen/nlaa056
3. Kinoshita M, Oyanagi K, Kondo Y, Ishizawa K, Ishihara K, Yoshida M, Inoue T, Mitsuyama Y, Yoshida K, Yamada M, Sekijima Y, Ikeda S: Pathologic basis of the preferential thinning of corpus callosum in adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP). *eNeurologicalSci*

22; 100310, 2021 doi:

org/10.1016/j.ensci.2021.100310

2. 学会発表

1. Oyanagi K, Shimizu H, Yamada M, Kakita A. Neostriatum in patients with polyglutamine diseases: a quantitative and immunohistological investigation. **第 61 回日本神経病理学会** 2020 年 10 月 13 日 金沢市 (On line)

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

脳由来の血中糖タンパク質の網羅的な同定方法の確立

研究代表者 赤間 智也 ¹⁾
研究分担者 阿部 学 ²⁾

1) 関西医科大学医学部薬理学講座 2) 新潟大学脳研究所モデル動物開発分野

研究要旨

我々は脳からどのような糖タンパク質（およびエクソソームのような糖鎖修飾された細胞外小胞）が血中に移行しているかを網羅的に同定する方法の確立を試みる。具体的には Ggta1 遺伝子欠損マウスの脳の上に Ggta1 を発現させ、その遺伝子産物の活性による糖鎖構造 Gal α 1-3Gal を持つ血中糖タンパク質を検出することで、脳が産生する糖タンパク質を網羅的に同定する。ゲノム編集により作製された Ggta1 遺伝子欠損マウスの脳、血漿および各種臓器からのタンパク質について抗 Gal α 1-3Gal 抗体によるウェスタンブロットを行ったところ検出されるタンパク質成分は見られなかった。また Cre リコンビナーゼによる Ggta1 遺伝子発現誘導により Gal α 1-3Gal 修飾を有する血中糖タンパク質が検出されたことから、本システムが計画通りに進行するものと考えられた。

A. 研究目的

我々は脳からどのような糖タンパク質（およびエクソソームのような糖鎖修飾された細胞外小胞）が血中に移行しているかを網羅的に同定するべく、遺伝子改変マウスを用いた方法論を確立する。血中のどの糖タンパク質が脳由来であるかを知る方法が確立できれば、特定の糖タンパク質の糖鎖構造変化を検出することで血液検査による神経疾患や脳腫瘍などの早期診断方法を構築できることが期待される。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

糖転移酵素である Ggta1 の遺伝子欠損マウスの脳の上に Ggta1 を発現させ、その遺伝子産物の活性により合成される糖鎖構造 Gal α 1-3Gal を持つ血中糖タンパク質を検出することで、脳が産生する糖タンパク質を網羅的に同定する。Gal α 1-3Gal 構造はGSB4 レクチンにより検出されるが、Ggta1 遺伝子欠損マウスの組織はこのレクチンに対して陰性であることが既に報告されている。本研究では Ggta1 遺伝子欠損マウスはゲノム編集技

術を用いて作製する（脳研究所にて作製済み）。脳特異的に Ggta1 を発現させる方法として、細胞系譜解析に用いられる Rosa-mT/mG ミニジーンに P2A 配列を介して Ggta1 を連結させたミニジーンを作製し、これをマウスの Rosa26 座位にノックインすることで、Cre リコンビナーゼを発現している臓器でのみ Ggta1 が発現するような遺伝子改変マウスを作製する（脳研究所にて作製済み）。Cre ドライバーマウスとしては Nestin-Cre マウスと GFAP-Cre マウスを用いることを予定している（Nestin-Cre は入手済み）。これらのマウスを掛け合わせて Ggta1 (-/-)/Rosa26 (+/mTmG)/Nestin-Cre（あるいは GFAP-Cre）マウスを作製し、その血液から GSB4 レクチンあるいは抗 Gal α 1-3Gal 抗体陽性の糖タンパク質を単離してそのタンパク質を質量分析器により同定する。この解析にて検出された分泌タンパク質はその脳での発現を RT-PCR や免疫染色及びウェスタンブロッティングなどで確認する。本研究に関する動物実験計画は関西医科大学動物実験委員会にて審査の上、承認されている。

C. 研究結果

前年度までの研究により脳研究所にて作製された Ggta1 遺伝子変異マウス (Ggta1(-/-)) は抗 Gal α 1-3Gal 抗体に反応する糖タンパク質を持たないことが確認された。組織特異的に Ggta1 を発現させるためのミニジーンを Rosa26 座位に挿入した遺伝子改変マウスは脳研究所にて作製され、関西医大の動物飼育施設に搬入された。このマウスを Ggta1(-/-)マウスと交配させ、Ggta1(-/-)/Rosa26(+/mTmG-Ggta1)マウスを作製した。このマウスから血漿を調製し、抗 Gal α 1-3Gal 抗体にてウェスタンブロットを行なったところ、Ggta1(-/-)由来の血漿と同様に反応する糖タンパク質を持たないことが確認されたことから、Rosa26 座位に挿入した mTmG-Ggta1 ミニジーンからの Ggta1 遺伝子発現はないものと考えられた。次に Cre リコンビナーゼによる mTmG-Ggta1 からの Ggta1 遺伝子発現誘導を確認するために全身で Cre リコンビナーゼを発現する Ayu-1 Cre トランスジェニックマウスを交配させ、Ggta1(-/-)/Rosa26(+/mTmG-Ggta1)/Ayu-1 Cre Tg マウスを作製した。このマウスから血漿を調製し、抗 Gal α 1-3Gal 抗体にてウェスタンブロットを行なったところ、野生型マウスと同様に抗 Gal α 1-3Gal 抗体に反応する糖タンパク質の存在が確認された。このことから mTmG-Ggta1 ミニジーンからの Ggta1 遺伝子発現は Cre リコンビナーゼにのみ誘導され、誘導された Ggta1 は野生型のマウスと同様に Gal α 1-3Gal 修飾を持つ糖タンパク質を産生することが証明された。

D. 考察

当初の計画通り、Ggta1(-/-)/Rosa26(+/mTmG-Ggta1)マウスは Gal α 1-3Gal 構造を持つ血中糖タンパク質を有せず、Cre リコンビナーゼの誘導により Gal α 1-3Gal 構造を持つ糖タンパク質を産生することが確認された。マウスにおいて糖タンパク質上の Gal α 1-3Gal 構造は Ggta1 遺伝子産物により合成されていると報告されており、今回の結果はそれを確認するものであった。一方で糖脂質上の Gal α 1-3Gal 構造は Ggta1 だけでなく別の糖転移酵素遺伝子である A3galt2 の寄与も少なくないとする報告もあり、Ggta1 遺伝子欠損だけで血中エクソソーム上の糖脂質の Gal α 1-3Gal 構造が

無くなっているかどうかは不明である。血中糖タンパク質のみを対象とするならば今回作製した変異マウスだけで充分であると考えられるが、エクソソームの産生臓器も特定しようとするのであれば A3galt2 の遺伝子欠損マウスの作製も必要かも知れない。この点についてはエクソソームの単離とその糖脂質上の Gal α 1-3Gal 構造の有無を詳細に調べると同時に、バックアップとして A3galt2 の遺伝子欠損マウスの作製も検討する。

E. 結論

作製された遺伝子改変マウスは予定通り Cre リコンビナーゼの発現のみにより Gal α 1-3Gal 構造を持つ糖タンパク質を産生するものであった。今後は遺伝子欠損マウスの繁殖と組織特異的 Ggta1 遺伝子発現マウスとの掛け合わせを行い、脳由来血中糖タンパク質の同定を進める。

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

睡眠覚醒と記憶制御に関わる視床下部神経の動作原理解明

研究代表者 山中 章弘¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 阿部 学²⁾

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

睡眠覚醒の調節には視床下部に存在するペプチド作動性神経が重要な役割を担っている。また、これらの神経は近年の研究によって、睡眠中の記憶の制御にも重要であることが明らかになってきた。本研究では、これらのペプチド作動性神経細胞を光遺伝学・薬理遺伝学等を用いて操作し、睡眠覚醒や睡眠中の記憶がどのように調節されているのか明らかにすることを目的としている。そのために、視床下部のペプチド作動性神経特異的に遺伝子発現が可能な遺伝子改変マウスを作成し、ウイルスベクターとの組み合わせによって標的神経活動の特異的操作を達成し、動作原理について明らかにする。

A. 研究目的

視床下部に存在するペプチド作動性神経は、睡眠覚醒において、極めて重要な役割を担っているが、睡眠中の記憶制御にも重要な役割があることが分かってきた。これらの神経細胞を光遺伝学・薬理遺伝学等を用いて操作し、睡眠覚醒調節や睡眠中の記憶の制御がどのように調節されているのか明らかにする。視床下部の神経特異的に遺伝子発現させる遺伝子改変マウスを作成し、ウイルスベクターとの組み合わせによって、神経活動操作を達成し、動作原理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)

視床下部には様々なペプチド作動性神経が存在するが、それらの中でもオレキシンを産生するオレキシン神経に着目して解析を行う。オレキシン神経特異的に Flippase recombinase を発現する遺伝子改変マウス (Orexin-Flippase マウス) を用いて、オレキシン神経特異的に遺伝子発現を誘導する。Orexin-Flippase マウスを様々な神経細胞に Cre を発現する遺伝子改変マウスと交配させて Bigenic マウスを作成し、Cre 依存的な遺伝子発現と組み合わせることによって、異なる2種類の神経細胞に別々の遺伝子を発現させる。光遺

伝学適用のために、チャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させ、特定神経を光で活性化し、オレキシン神経から記録を行うことで、特定神経からの入力と、それに対するオレキシン神経の反応様式を明らかにすることができる。まずは、GABA 作動性神経特異的に Cre を発現する GAD67-Cre マウスを用いて、それらの神経細胞からの入力がオレキシン神経においてどのような作用を示すのかについて明らかにする。これらの研究によって、オレキシン神経を中心とした神経回路とその動作原理が明らかになると考えられる。オレキシン神経は睡眠覚醒調節において覚醒レベルの調節に関わっていることが知られており、それらがどのような神経細胞によって調節されているのかが明らかになると考えられる。また、睡眠中の記憶制御における役割について、様々な記憶を評価できる実験系と操作を組み合わせることで明らかにする。

C. 研究結果

体内時計の中核である、視交叉上核 (SCN) は主に GABA 作動性神経で構成されている。睡眠覚醒がどのように体内時計によって調節されているのかについて明らかにするために、GABA 作動性神経特異的に Cre リコンビナーゼ (Cre) を発現する

GAD67-Cre マウス（脳研究所において作出）を用いて Cre 依存的に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を SCN の神経細胞に感染させた。その結果、SCN の GABA 作動性神経が、室傍核 (PVN) に密に軸索を投射していることが明らかになった。そこで、室傍核の主たる神経細胞の 1 つであるコルチコトロピン放出因子 (CRF) 産生因子産生神経 (CRF 神経) に着目した。PVN の CRF 神経 (PVN-CRF 神経) は、視床下部外側野に密に軸索を投射しており、同領域には覚醒維持に重要なオレキシン産生神経 (オレキシン神経) が存在する。そこで、PVN-CRF 神経とオレキシン神経との機能連関を明らかにするために、CRF 神経特異的に Cre を発現する CRF-Cre マウス（脳研究所において作出）をオレキシン神経特異的に Flippase リコンビナーゼ (Flp) を発現する Orexin-Flippase マウス（脳研究所において作出）とを交配させて、バイジェニックマウスである CRF-Cre; Orexin-Flp マウスを名古屋大学において作出した。このマウスに AAV を脳局所注入し、PVN の CRF 神経 (PVN-CRF) 特異的にチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させた。一方、オレキシン神経には、赤色蛍光タンパク質を発現させた。脳スライス標本作製し、赤色蛍光タンパク質を発現するオレキシン神経からパッチクランプ記録を行いながら、青色光を照射して PVN-CRF 神経軸索末端を光遺伝学を用いて活性化させたところ、オレキシン神経活動が上昇することを見いだした。このことから、PVN-CRF 神経はオレキシン神経を活性化させ、覚醒を誘導することが明らかになった。これらのことから、SCN の GABA 作動性神経が、PVN の CRF 神経を介して視床下部のオレキシン神経活動を調節することが、体内時計が睡眠覚醒調節に影響を与える神経回路であることが明らかになった。

D. 考察

体内時計が睡眠覚醒を調節することは、広く知られていたが、実際に体内時計のリズムを睡眠覚醒調節に反映させる神経回路の実体については良く分かっていなかった。今回の研究によって、体内時計の中核である SCN の GABA 作動性神経が、PVN に密に投射していること、PVN の CRF 神経が視床下部外側野のオレキシン神経に投射して、活

性化することを見いだしたため、この神経経路が体内時計のリズムを睡眠覚醒リズムに変換するための重要な神経経路であることを示した。

E. 結論

脳研究所において作出された、3 種類の遺伝子改変動物 (GAD67-Cre マウス、CRF-Cre マウス、Orexin-Flp マウス) を組み合わせて、体内時計の中核である SCN の GABA 作動性神経が PVN に投射し、CRF 神経を介して視床下部のオレキシン神経活動を調節する神経経路が、体内時計のリズムを睡眠覚醒リズムに変換するために重要な経路であることを明らかにした。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Mukai Y, Nagayama A, Itoi K, *Yamanaka A. Identification of substances which regulate activity of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Sci Rep*, 2020; 10: 13639. doi: 10.1038/s41598-020-70481-5
2. *Ono D, Mukai Y, Hung CJ, Chowdhury S, Sugiyama T, Yamanaka A. The mammalian circadian pacemaker regulates wakefulness via CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Sci Adv*, 2020; 6. doi: 10.1126/sciadv.abd0384
3. Tisdale RK, Yamanaka A, *Kilduff TS. Animal Models of Narcolepsy and the Hypocretin/Orexin System: Past, Present, and Future. *Sleep*, 2020. doi: 10.1093/sleep/zsaa278.

2. 学会発表

1. Ono D. Postnatal Development of the Cellular Networks in the Suprachiasmatic Nucleus. Society for Research on Biological Rhythms 2020, 2020.6. (virtual meeting)
2. Ono D, Mukai Y, Hung CJ, Chowdhury S, Sugiyama T, Yamanaka A. The suprachiasmatic nucleus regulates wakefulness via CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.

第 27 回日本時間生物学会学術大会,
2020.9. (オンライン開催)

3. Mukai Y, Nagayama A, Itoi K, Yamanaka A.
Identification of factors regulating activity
of corticotropin-releasing factor-producing
neurons in the paraventricular nucleus of the
hypothalamus. SfN Global Connectome,
2021.1. virtual meeting.
4. 向井康敬, Michael Lazarus, 永井健治, 田
中謙二, 山中章弘. プロスタグランジン
E2 は青斑核ノルアドレナリン神経のカ
ルシウム濃度を長期的に低下させる.第
43 回日本神経科学大会, 2020.7. オンラ
イン開催

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

精神疾患死後脳の分子プロファイル解析

研究代表者 國井 泰人^{1) 2)}

研究分担者 柿田 明美³⁾、矢部 博興²⁾、日野 瑞城²⁾、長岡 敦子²⁾、泉 竜太²⁾
岩本 和也⁴⁾、吉川 武男⁵⁾、廣川 信隆⁶⁾、星野 幹雄⁷⁾

1) 東北大学災害科学国際研究所 2) 福島県立医科大学 3) 新潟大学脳研究所
4) 熊本大学 5) 理化学研究所 6) 東京大学 7) 国立精神神経医療研究センター

研究要旨

本研究の目的は、統合失調症をはじめとする精神疾患脳病態における神経伝達システム関連分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子の異常について死後脳を用いて明らかにすることである。本研究では、統合失調症をはじめとする精神疾患発症のメカニズム解明を目的として患者死後脳内分子の分子プロファイル解析を行う。すなわち、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系の分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子について、それらの死後脳における分子プロファイル（遺伝子発現やタンパク発現及びエピジェネティクスパターン）をエンドフェノタイプとして、各々の遺伝子多型と関連を解析するというアプローチ（ジェネティックニューロパソロジー）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。

A. 研究目的

本研究では、統合失調症をはじめとする精神疾患病態メカニズムの解明を目的として、神経伝達システム関連分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子に関して、その遺伝子多型（SNPs）と分子プロファイル（タンパク発現、遺伝子発現、DNAメチル化）との関連を解析する。更に得られた統合失調症死後脳からのデータについては、病型・罹病期間・抗精神病薬の服薬量・死後時間、症状スコアなどの臨床プロファイルを利用して各分子との関係を検討する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

福島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、神経伝達システム関連分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子に

ついて、脳内の複数の部位を用いてELISA、ルミネックス法によるタンパク発現解析、in situ hybridisationによる遺伝子発現解析、DNAメチル化解析を行う。更に各々の分子について遺伝子多型解析を行い、死後脳分子プロファイル（タンパク発現、遺伝子発現、DNAメチル化）との関連を解析する。

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、生前の臨床症状スコア等）を駆使して関連を検討する。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

福島精神疾患死後脳バンク及び新潟大学脳研究所で集積された死後脳の前頭前皮質、上側頭回、尾状核凍結試料を用いて、ELISA 法によるタンパク発現解析、RNA-seq データによる遺伝子発現解析、DNA メチル化解析を通して、以下のプロファイル解析を行った。

1) mTOR シグナルカスケード分子の解析

死後脳前頭前皮質、上側頭回を用いて、mTOR シグナルカスケードの下流分子のうち S6K 及び、IPA を用いて解析した CRMP2 の発現を調整する分子についてのタンパク発現解析を行い、mTOR 系分子群と CRMP2 及び DSCAML1 との相関を解析した。現在までのところ、mTOR 系分子群間の発現量及び CRMP2 の発現量と pS6K、pS6 の発現とに有意な相関を認め、また、mTOR と DSCAML1 の発現量については統合失調症において DSCAML1 と mTOR の相互作用が破綻していることが示唆される結果を得ている（投稿準備中）。

2) Pro to Glu 経路の分子プロファイル解析

死後脳前頭前皮質、上側頭回を用いて、プロリンをグルタミン酸へ代謝するプロリン代謝経路に含まれる Proline oxidase (PRODH) と Prolidase (PEPD) のタンパク質発現量を ELISA 法で測定し比較した。その結果、STG における PRODH 発現量が統合失調症において有意に低く、PFC における PRODH、PFC と STG における PEPD に有意な変化はないことがわかった。

3) 死後脳試料を利用した脳ゲノム情報解析

死後脳後頭葉試料 90 例（統合失調症・双極性障害・健常者・その他）に対して、網羅的 SNP 解析を完了し、前頭葉 39 例に対して RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析を完了した。また、統合失調症 25 例を含む 40 例の前頭葉試料についてメチル化アレイ解析に着手した。上記解析に加えて、双極性障害 10 例、統合失調症 14 例の脳由来ゲノムについて CNV 解析を行った。

4) 炎症関連分子による統合失調症病態の層別化

神経炎症仮説に着目して、前頭前皮質の RNAseq 解析で得られたデータからサイトカインを主とする炎症関連分子 8 つの mRNA 発現データを抽出し、その発現パターンに基づいてクラスター解析

を行い、統合失調症群を高炎症/低炎症の Biotype に分類した。また ELISA 法により前頭前野、上側頭回における C4 タンパク質発現量を ELSA で測定したところ、C4 のタンパク質発現は高炎症 Biotype で高く、特に BA10 では、有意な差を認めた。補体成分である C4 は、全身炎症疾患においてはサイトカインと同様に代表的な炎症マーカーとして知られるとともに、脳神経発達段階におけるシナプスの刈り込みへの関与が知られており、神経炎症が統合失調症の発症に至る神経生理学的メカニズムに、C4 による神経の過剰な刈り込みが関与している可能性が示唆された（論文投稿準備中）。

D. 考察

E. 結論

統合失調症脳病態に関わるドーパミン系・グルタミン酸・GABA 系の分子と細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子のプロファイルやそれぞれの関連が明らかになりつつある。今後も、準備できた統合失調症銀 24 例、双極性障害 8 例、健常群 36 例の死後脳サンプルセットを用いて、神経伝達システム関連分子、細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子についての解析を引き続き進めていく。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Komatsu H, Takeuchi H, Kikuchi Y, Ono C, Yu Z, Iizuka K, Takano Y, Kakuto Y, Funakoshi S, Ono T, Ito J, Kunii Y, Hino M, Nagaoka A, Iwasaki Y, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Azechi H, Kudo N, Hashimoto R, Yabe H, Yoshida M, Saito Y, Kakita A, Fuse N, Kawashima R, Taki Y, Tomita H. Ethnicity-Dependent Effects of Schizophrenia Risk Variants of the OLIG2 Gene on OLIG2 Transcription and White Matter Integrity. Schizophr Bull. 2020; 46(6):1619-1628.
2. 國井泰人. 統合失調症死後脳における

Pro to Glu 経路の分子プロファイル解 .Medical Science Digest 46(6):362-365, 2020.

3. 國井泰人「統合失調症死後脳における分子プロファイル解析- Pro to Glu 経路に着目して」地域ケアリング 22(10):48-51, 2020.
4. 矢部博興、刑部有佑、落合晴香、和田知紘、森湧平、佐藤彩、錫谷研、羽金裕也、平山緑香、高橋雄一、菅野和子、星野大、日野瑞城、戸田亘、堀越翔、志賀哲也、國井泰人、三浦至【精神科における脳回路研究の最前線】統合失調症におけるミスマッチ陰性電位(MMN)発生異常. 日本生物学的精神医学会誌 31(3):127-133, 2020.
5. Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Nishiura K, Kunii Y, Sano Y, Shimizu F, Kakita A, Kanda T, Imura T, Chiba H. Serotonin/5-HT1A Signaling in the Neurovascular Unit Regulates Endothelial CLDN5 Expression. Int J Mol Sci. 2020 Dec 29;22(1):E254.

2. 学会発表

1. 國井泰人, 長岡敦子, 日野瑞城, 泉竜太, 宍戸理紗, 矢部博興: シンポジウム 4 ブレインバンク/死後脳研究. 精神疾患ブレインバンクと死後脳研究の現在. 第 42 回 日本生物学的精神医学会 (NPBPPP 合同年会 2020), 仙台 (web), 2020/8/21-23.
2. 長岡敦子, 國井泰人, 日野瑞城, 泉竜太, 宍戸理紗, 齊ノ内信, 那波宏之, 柿田明美, 矢部博興: シンポジウム 4 ブレインバンク/死後脳研究. 統合失調症死後脳におけるタンパク定量解析 - ALDH4A1 とその発現に影響する遺伝子多型. 第 42 回 日本生物学的精神医学会 (NPBPPP 合同年会 2020), 仙台 (web), 2020/8/21-23.
3. 久保健一郎, 吉永怜史, 長岡敦子, 日野瑞城, 國井泰人, 矢部博興: シンポジウム 4 ブレインバンク/死後脳研究. 死後脳の組織学的解析による精神神経疾患の病的メカニズムの理解. 第 42 回 日本生物学的精神医学会 (NPBPPP 合同年会 2020), 仙台 (web), 2020/8/21-23.
4. 泉竜太, 宍戸理紗, 日野瑞城, 長岡敦子, 國井泰人, 矢部博興: 死後脳を用いた統合失調症 Elevated inflammatory biotype における補体 C4 の関与についての検討. 第 42 回 日本生物学的精神医学会 (NPBPPP 合同年会 2020), 2020/8/21-23 仙台 (web) .
5. 井出征行, 大西哲生, 豊島学, 岩山佳美, 大羽尚子, 渡邊明子, 加藤忠史, 糸川昌成, 森川桃, 廣川信隆, 國井泰人, 矢部博興, 岩本和也, Dean Brian, 内田和彦, 木村英雄, 吉川武男: 近交系マウスを用いたバイオマーカーの探求から発見された統合失調症における硫化水素産生過剰. 第 42 回 日本生物学的精神医学会 (NPBPPP 合同年会 2020), 2020/8/21-23 仙台 (web) .
6. 國井泰人, 長岡敦子, 泉竜太, 日野瑞城, 矢部博興: シンポジウム 63 精神科ブレインバンク各拠点からの成果と今後の臨床への展望—精神科ブレインバンクへの期待 その 4 —. 福島精神疾患ブレインバンクの成果と今後の展望. 第 116 回日本精神神経学会学術総会. 仙台 (web), 2020/9/29.
7. 國井泰人, 松本純弥, 泉竜太, 長岡敦子, 日野瑞城, 赤津裕康, 橋詰良夫, 齊ノ内信, 柿田明美, 矢部博興: 一般演題 (ポスター). 統合失調症脳病態における脂質シグナル伝達の意義—死後脳研究. 第 116 回日本精神神経学会学術総会. 仙台 (web), 2020/9/28-30.

8. 國井泰人, 日野瑞城, 近藤豪, 和田明, 松本純弥, 丹羽真一, 菊地哲郎, 佐藤慎二, 橋本徹哉, 瀬藤光利, 矢部博興：一般演題（ポスター）. 新規クロザピン結合タンパク質の探索 — α/β チューブリンに対する相互作用. 第 116 回日本精神神経学会学術総会. 仙台 (web), 2020/9/28-30.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

「KIF3 モーターに基づく精神疾患の治療又は予防、及び薬物スクリーニング」

出願番号：PCT/JP2020/42733

出願日：2020 年 11 月 17 日

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

遺伝子改変マウスを用いた大脳基底核疾患の病態生理の解析

研究代表者 知見 聡美¹⁾
研究分担者 南部 篤¹⁾、笹岡 俊邦²⁾

1) 生理学研究所 生体システム 2) 新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野

研究要旨

パーキンソン病は、大脳基底核内のドーパミン作動性神経が変性、脱落することによって、無動、固縮、振戦などの重篤な運動障害を生じる疾患であり、有病率は10万人あたり100人程度と高く、病態解明が急がれている。本研究では、D1受容体とD2受容体を介するドーパミン神経伝達の消失がそれぞれ、パーキンソン病症状の発現にどのように寄与するのかを調べることで、病態解明と効果的な治療法の開発を目指す。2020年度はD2受容体ノックダウンマウスの作製を進めたが、作製を待つ間、D2受容体ノックアウトマウスの神経活動の記録・解析を行い、6-OHDAを用いて作製したパーキンソン病モデルマウスとの比較を行った。その結果、パーキンソン病モデルの淡蒼球外節ニューロンで観察される自発発火と大脳皮質の電気刺激に対する応答様式の異常は、主にD2受容体を介する情報伝達の消失に起因することが示唆された。

A. 研究目的

パーキンソン病(PD)は、大脳基底核内のドーパミン作動性神経が変性、脱落することによって、無動、固縮、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、D1受容体(D1R)およびD2受容体(D2R)を介したドーパミン神経伝達が、それぞれ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、PD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)

本研究では主に、新潟大学脳研究所の笹岡俊邦教授らのグループが作製した、あるいは、現在作製を進めている2種類のコンディショナルノックダウンマウス(1) D1Rノックダウンマウス(D2R)の発現は正常でD1Rの発現がon/off可能)、(2) D2Rノックダウンマウス(D1Rの発現は正常でD2Rの発現がon/off可能)を用いるが、2020年度はD2Rノックダウンマウスの作製を待

つ間、比較のためにD2受容体ノックアウトマウスの神経活動の記録・解析を進めた。麻酔下において手術を行い、頭部固定器具をマウスの頭蓋骨に装着しておく。また、大脳皮質運動野の上肢および口腔顔面領域を同定して刺激電極を埋め込み留置する。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D1受容体を、間接路ニューロンはD2受容体を発現しているので、間接路ニューロンの投射先である淡蒼球外節(GPe)および直接路ニューロンの投射先である淡蒼球内節(GPi)の神経活動を記録した。大脳皮質の電気刺激に対する応答様式を調べ、野生型マウス、および、6-OHDAを脳内に投与することによって作製したPDモデルマウスと比較した。

動物飼育中に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、ただちに安楽死の処

置をとるようにした。

C. 研究結果

野生型マウスの GPe および GPi ニューロンはどちらも、大脳皮質の電気刺激に対して「早い興奮—早い抑制—遅い興奮」という 3 相性の応答を示す。D2R ノックアウトマウスの GPe ニューロンでは、3 相性応答のうち早い抑制とそれに続く遅い興奮が有意に増強されていた。この応答様式は、PD モデルマウスの GPe ニューロンとよく似ていることがわかった。一方、D2R ノックアウトマウスの GPi ニューロンでは、3 相性応答に続く遅い抑制が観察された。一方、PD モデルマウスの GPi ニューロンでは早い抑制が消失し、2 相性の興奮に遅い抑制が続くという応答様式が観察された。大脳皮質由来の遅い抑制が D2R ノックアウトマウスと PD モデルマウスの両方で共通していることがわかった。

D. 考察

線条体の間接路ニューロンは D2R を発現しており、GPe に投射することが知られている。D2R ノックアウトマウスの GPe ニューロンにおいて、早い抑制と遅い興奮の増強が観察されたが、早い抑制は大脳皮質—線条体—GPe 路を、遅い興奮は大脳皮質—線条体—GPe—視床下核—GPe 路を介して伝達されることが知られている。このことから D2R ノックアウトマウスでは、線条体の間接路ニューロンから GPe への情報伝達が増強されていることが示唆される。また、D2R ノックアウトマウスと PD モデルマウスの GPe ニューロンがよく似た応答様式を示したことから、PD で観察される GPe の異常な応答様式は、D2 受容体を介する情報伝達が消滅したことに起因すると考えられる。

一方、D2R ノックアウトマウスと PD モデルマウスの GPi ニューロンでは、皮質由来の遅い抑制が共通して観察された。GPi は GPe より直接の抑制性入力を受けていることが知られている。これらのマウスの GPe では皮質由来の遅い興奮が増強していたことより、増強された遅い興奮が GPi を強く抑制したことにより、遅い抑制が観察されたと考えられる。PD の症状発現に GPi の遅い抑制がどのように寄与するのかについては、今

後の実験により明らかにする必要がある。

E. 結論

PD モデルの GPe ニューロンで観察される大脳皮質の電気刺激に対する応答様式の異常は、主に D2R を介する情報伝達の消失に起因することが示唆された。また、PD モデルの GPi で観察される大脳皮質由来の遅い抑制は、GPe における増強された遅い興奮によって引き起こされている可能性が示唆された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

2. 学会発表

笹岡 俊邦、齊藤 奈英、知見 聡美、阿部 学、川村 名子、鍋島 曜子、鍋島 陽一、田井中 一貴、崎村 建司、南部 篤（2020. 9. 10-12）D2 受容体発現細胞における NMDA 受容体のマグネシウムブロックの減少により引き起こされる運動制御と学習および記憶の変化の分析。第 63 回神経化学会大会（Web 開催）

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

歯状回顆粒細胞の興奮性に対する diacylglycerol lipase α 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⁾ 阿部 学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

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中枢神経系においてシナプス伝達の制御に重要な役割を担っていると考えられている。本研究では内因性カンナビノイド 2-arachidonoyl glycerol (2-AG)の産生酵素 diacylglycerol lipase α (DGL α)の歯状回顆粒細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作出し、顆粒細胞由来の内因性カンナビノイドシグナルが顆粒細胞の分裂・発達や回路の興奮性、記憶・学習に対して果たしている役割を電気生理学的・組織学的・行動学的に明らかにすることを目的とした。令和2年度は引き続きコンディショナルノックアウトマウスを作出し、歯状回顆粒細胞の発達および興奮性の制御に対する顆粒細胞由来の 2-AG の役割を検討した。

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、中枢神経系においてはシナプス前終末に発現する CB₁受容体を介してシナプス伝達の制御に重要な役割を担っていると考えられている。本研究は内因性カンナビノイド 2-AG の産生酵素である DGL α の歯状回顆粒細胞特異的なノックアウトマウスを作出し、電気生理学的、組織学的、行動学的解析を行い、成体海馬神経新生における顆粒細胞の発達や回路の興奮性、海馬歯状回依存性の記憶・学習における 2-AG の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)

歯状回の幼若顆粒細胞に Cre recombinase を発現する POMC-Cre マウスや歯状回の神経幹細胞に Cre を発現する Nestin-CreER^{T2} マウスと、新潟大学において作出した DGL α flox マウスを交配することにより、歯状回の顆粒細胞特異的に DGL α を欠損した POMC-Cre:DGL α fl/fl と

Nestin-CreER^{T2}: DGL α fl/fl を作出した。

これらの動物を用いて、歯状回顆粒細胞で産生される内因性カンナビノイドが記憶・学習時に果たしている役割を明らかにするために、記憶・学習と情動に関する行動学的解析を行った。

具体的には、オープンフィールド試験で自発行動量および馴化行動の変化を検討し、文脈および音依存性恐怖条件付け試験において学習や記憶の想起の変化を検討し、明暗箱試験において不安行動の変化を検討した。

さらに、これらのマウスと、Cre 依存的にカルシウムセンサーの GCaMP を発現するマウスを交配することで、DGL α が欠損した細胞の活動をカルシウムイメージングによって測定することができるマウスを作出した。

すべての動物実験は、東京大学における動物実験等に関する倫理規程に従って行った。

C.研究結果

歯状回顆粒細胞で内因性カンナビノイド 2-AG

の産生酵素である DGL α が欠損した Nestin-CreER^{T2}: DGL α fl/fl マウスや POMC-Cre:DGL α fl/fl マウスでは、対照群と比較して記憶課題の一部において変化が認められた。

これらのマウスの歯状回顆粒細胞においては DGL α の欠損により内因性カンナビノイド 2-AG が産生されず、内因性カンナビノイドによるシナプス伝達抑制が欠如していると考えられる。そこでこれらの細胞の活動の変化を明らかにするために顆粒細胞にカルシウムセンサー GCaMP を発現させ、記録に成功した。

D.考察

本年度の研究の結果から、成体の歯状回顆粒細胞において産生される内因性カンナビノイド 2-AG は学習・記憶の過程において重要な役割を果たしており、欠如すると正常な記憶の過程の一部が障害されることが明らかとなった。令和3年度以降は内因性カンナビノイドによるシナプス伝達の制御が記憶課題中の細胞活動をどのように変化させているのかを明らかにするために、これらのマウスの行動課題中の海馬歯状回のカルシウムイメージングを継続する。

E.結論

歯状回顆粒細胞で産生される内因性カンナビノイド 2-AG は記憶の過程の一部に重要な役割を果たしている。

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）

なし

タウ凝集体の伝播におけるミクログリアの役割

研究代表者 松本 信英¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾

1) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科感染防御学講座免疫学分野

2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

アルツハイマー病 (AD) をはじめとするタウオパチーでは、タウタンパク質の凝集・伝播が病態に寄与する可能性が指摘されており、ミクログリア (MG) の関与も注目されている。また、タウの C 末端断片 (CTF) は微小管結合ドメインを含んでおり、全長タウと比較して凝集性が高いことが報告されている。本研究では、ヒト AD 脳の不溶性画分の質量分析による解析を行った結果、236aa~243aa を N 末端断端とする CTF が含まれており、タウオパチーモデルマウス Tg601 の脳で見出された CTF (243aa-441aa) と非常によく似ていることがわかった。また、タウオパチーモデルマウスを用いた *in vivo* 伝播モデルを構築するために、TREM2 R47H 点変異マウスおよび Tau-CTF トランスジェニックマウスの作出を試みた。今後はこれらのモデルを用いてより詳細な伝播メカニズムの解明・および伝播における MG の役割を明らかにしたい。

A. 研究目的

タウオパチーにおける病変拡大のメカニズムとしてタウ凝集体の細胞間伝播が注目されている。TREM2 は MG 表面に発現している自然免疫受容体であり、食餌と炎症抑制に関与する。TREM2 R47H バリエーションは AD だけでなくパーキンソン病や ALS など他の神経変性疾患のリスクも上昇させるとの報告があり、異常蛋白の蓄積・伝播に関与している可能性が高い。以上のことから、MG および TREM2 はタウの伝播・蓄積にも密接に関わると考えられるが、伝播メカニズムにおける役割は明らかではない。そこで本研究では、「MG が TREM2 を介して異常蛋白凝集体の伝播と蓄積にどのように関与するのか」を解明することを目的として研究を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. 新潟大学脳研究所より分与いただいたヒト AD 凍結脳のホモジネートからサルコシル不溶性画分を調製し、SDS-PAGE 電気泳動により分離した。タウの C 末端 (404-441) を認識する抗体 T46 を用いたウェスタンブロッティングにより Tau-CTF に相当するバンドのサイズを推定し、ゲルから切り出し、トリプシン、キモトリプシン、V8、Glu-C、Asp-N、によるゲル内消化を行い質量分析によるペプチド断片の同定を行った。
2. タウ伝播における TREM2 や MG の役割を解析するため、ゲノム編集を用いて TREM2 の機能喪失型変異である TREM2 R47H 点変異マウスの作出を行った。

3. 従来のタウオパチーモデルマウスよりもタウ伝播が促進されるマウスの作出を目的として、野生型ヒトタウ過剰発現モデルマウスである Tg601 をベースとしてゲノム編集によるトランスジーンの変換を行うことにより、Tau-CTF を過剰発現する Tau-CTF Tg マウスの作出を行った。

C. 研究結果

1. AD 患者由来の側頭葉新皮質からサルコシル不溶性画分を調製し SDS-PAGE 電気泳動を行い、ウエスタンブロッティングおよびCBB染色を行った。タウのC末端断片に相当すると推測される分子量約 21, 25, 35kDa のバンドを切り出してゲル内消化を行い質量分析に供した結果、タウ由来のペプチドが検出された。今回の解析により検出されたペプチドは主に 236aa~243aa を断端とする CTF を構成する配列であったことから、ヒト AD 脳においても微小管結合ドメインを中心とする CTF が含まれていることがわかった。
2. マウス TREM2 ゲノムの Exon2 を標的としたガイドRNAを作製し、Cas9 蛋白およびR47H 変異をコードする配列を含むドナーDNA と共にマウス受精卵にマイクロインジェクションした結果、24 匹の産仔を得た。ダイレクトシーケンスの結果そのうち 11 匹に目的の変異導入を確認し、さらにそのうち 4 系統において次世代にも R47H 変異が導入されていることを確認した。さらにチオグリコレート誘導腹腔滲出マクロファージにおける TREM2 の発現が野生型マウスとほぼ同等であることをフローサイトメトリーおよびウエスタンブロッティングにより確認した。
3. Tg601 マウスのトランスジーン上にあるヒトタウ cDNA を標的としたガイドRNAを作製し、Cas9 蛋白およびトランスジーン上の全長タウを CTF と置換した配列を含むドナーDNA と共に Tg601 マウス受精卵にマイクロインジェクションした結果、4 匹の産仔を得た。そのうち 1 匹については次世代にわたっても目的の変換が導入され、全

長タウの cDNA が CTF の cDNA に置換されていることを確認した。ウエスタンブロッティングによる確認の結果、可溶性画分には Tau-CTF に相当するバンドが検出されなかったが、不溶性画分におけるタウの増加が認められた。

D. 考察

1. AD を含むタウオパチーでは、サルコシル不溶性のタウ CTF が検出されており、これらの CTF は自己凝集に必要である微小管重合ドメインを含むことから、凝集性・伝播能の亢進を通じてタウオパチー病態を促進する可能性が考えられる。本研究では、有用な培養細胞モデルおよび動物モデルを構築することを目的として、質量分析により実際のヒト AD 脳に含まれるタウ C 末端断片の同定を試みた結果、主に 236aa-243aa を N 末端断端とする Tau-CTF 由来のペプチドが検出された。この配列は Tg601 マウスで見出された Tau-CTF (243aa-441aa) と非常によく似ており凝集体形成に重要な微小管重合領域を含む。以上の結果から、ヒト AD におけるタウの凝集・伝播においても Tau-CTF が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
2. タウの伝播における TREM2 の役割を検討するために、TREM2 R47H 変異ノックインマウスを作出した。今後は、リコンビナントタウの凝集体や、ヒト AD 脳の可溶性画分を本マウスの脳内に投与して伝播モデルを作製し、TREM2 の機能喪失がタウの伝播にどのような影響を与えるか検討する予定である。
3. タウの凝集・伝播が促進されるモデルマウスの確立を目的として、Tau-CTF Tg マウスを作出し、脳の可溶性画分においてタウが増加していることを確認した。今後本マウスを用いてタウ伝播モデルを作製し、有用性を確認する予定である。

E. 結論

1. ヒト AD 脳に含まれる Tau-CTF も、タウオパチーモデルマウス Tg601 で見出された微

小管重合領域を含む Tau-CTF とほぼ同様の配列であることを確認した。今回作出した Tau-CTF 過剰発現マウスは、有用なタウオパチーモデルマウスとなり得る。

2. TREM2 R47H ノックインマウスは AD の病態における TREM2 や MG の役割を検討するために有用である。

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

遺伝子改変技術による生体リズム中枢の分子機構の解析

研究代表者 岡村 均¹⁾
研究分担者 崎村 健司²⁾、阿部 学²⁾、笹岡 俊邦²⁾

- 1) 京都大学大学院医学研究科・高次脳科学講座神経生物学分野
2) 新潟大学脳研究所・生命科学リソース研究センター

研究要旨

自然界においては、夜明け、日没に伴う明暗の変化は、きわめて正確に24時間周期でやってくる。体内における時間装置である生体リズムシステムは、この外界の時間変化を予知し、摂食など生存のための行為の有効性を高めている。しかし、様々な時間帯を飛び越える海外旅行時には、急な明暗リズムの位相変位に、生体リズムシステムは同調できず時差が生じる。この分子機構として、我々は視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) バソプレッシン系が主要な役割を果たすことを明らかにしてきた。今回、時差の神経生理機構とそれを裏打ちする分子機構を解明するため、視床下部バソプレッシンニューロン系の遺伝子改変マウスにさまざまな時差負荷を行い、その変動を探索した。驚くべきことに、時差時、体内時計の中枢である視交叉上核 (SCN) の時計が止まり、これが回復するとともに時差が解消され、この現象にバソプレッシンおよびその受容体が関与することが明らかとなった。

A. 研究目的

SCN は約1万個のニューロンからなる神経細胞集団である。SCN の時計は、他の臓器の時計と何が違うのであろうか？通常の臓器の時計は、身体から取り出すと2-3日すればリズムが消失するが、SCN の時計は体外に取り出しても数カ月は、生体内でのリズム位相を保ってリズムを打ち続ける。すなわち、SCN の時計のみが、真の自律的な時計と言える。

その差は何であろうか？両者とも、時計遺伝子が形成する時間発振の転写翻訳フィードバックループ (transcription translation feedback loop: TTFL) 装置は同じである。違いは、脳から取り出し、強い24時間リズムを刻んでいるSCN スライスに、電位依存性ナトリウムチャネル阻害剤であるテトロドトキシン (TTX) を投与すれば、直ぐに判明する。TTX にてニューロンの活動電位を止めた直後、各細胞の時計遺伝子のリズムは、突然乱れ始め、リズムは減弱し、ついには消失する。

すなわち、TTX 投与時、SCN 時計が、末梢臓器の時計と同じようになるのである。これは、SCN 細胞のリズム発振が、細胞内のTTFLリズムだけでは十分でなく、細胞間の連絡を使って他の時計細胞のリズムと共鳴しあうことで、強大なリズムを発振していることを示している。

このSCNが発する強力で安定したリズムは、脳幹の神経核群を経て、全身組織に張り巡らされた自律神経系に出力されて、副腎からのコルチゾールを放出させ、これが全身の細胞に至り、全身の細胞の時間を同期させるのである。

「時差ボケ」は、体内時計の示す時刻が、個体の生息する環境の時刻がずれている時に起こる現象で、ジェット機による海外への東西方向の移動のとき起こる現象であるので jetlag と呼ぶが、夜勤など活動時刻を人為的に変える時にも起こる。

この時差ボケがおこるのは、このSCNの強力な自律能と大いに関連がある。SCN に特異的にある

物質に鍵があるに違いないと考え、バソプレッシンとバソプレッシン受容体、VIP とその受容体と、時差との関係を検索した。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

野生型マウスを明暗周期を日本から米国ロサンゼルスへの移動を模倣し 8 時間前進させたり、日本から欧州への時間を模倣し、8 時間後退させたりした後、行動周期を測定し、新明暗周期への同調まで数日かかる時間がかかることを確認した。これで、マウスでも時差が起こることをまず確認した。

時差ののち、各種時計遺伝子、および最早期遺伝子の発現変動を 4 時間ごとにモニターした。さらに、各種バソプレッシンおよびその受容体改変マウス、VIP 受容体改変マウスを用いて、行動リズム、時計遺伝子変動、最早期遺伝子変動を検索した。

本研究で行う行動実験は全て、京都大学実験動物委員会の承認を得ている。また、研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針を順守して遂行した。

C. 研究結果

時差時の SCN および、non-SCN 脳内領域、肝臓、腎臓の、時計遺伝子の発現リズムを測定した結果、驚くべきことに、マウスの SCN の体内時計のみ、時差後すぐに消失し、3 日目から回復し始め、8 ～9 日目にもとのリズムが復活することが判明した。Non-SCN 脳内領域や、肝臓・腎臓の時計は、時差時も強いリズムを刻んだままである。

遺伝子改変したバソプレッシンおよび各種受容体の欠損マウスは、新たな明暗周期に同調する傾向が強く、即座に同調するものもあった。SCN の時差による時計遺伝子のリズムは、同町のしやすさの程度に応じて、変動していた。VIP 受容体の改変マウスでは、環境明暗周期に完全に同調していた。

さらに、野生型マウスにバソプレッシン V1aV1b 受容体の拮抗剤を投与した後、時差を起こしてみると、時差ボケの日時は劇的に短縮された。以上の結果より、バソプレッシンニューロン系は主要なリズム発振系と考えられる。

D. 考察

深夜労働は先進国で大きな問題となっており、その解決は重要な社会医学的事項である。また、先進国においては勤労年齢が急速に高齢化しており、健康弱者である高齢者がシフトワークに携わる問題も現実のものとなっている。我々は、老齢マウスのバソプレッシン神経伝達を受容体アンタゴニストで阻害すると慢性時差による死亡率が改善するかどうかを調べた結果、バソプレッシン神経伝達を阻害すると、慢性時差環境下でも個体自身の生体リズムと環境リズムが乖離せず、健康障害を起こさず、老齢でも生存率を改善させることができた。このことは、全身の代謝やリズム同調能力も落ちている老齢者での、バソプレッシン神経回路ネットワークの理解が欠かせないことを示している。

E. 結論

現在まとめている研究成果は、10 年以上にわたる新潟大学脳研究所と取り組んでいる、バソプレッシンニューロン系遺伝子改変マウスが概日リズム発振系へのプロジェクトの先見性と有効性を示すものと考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

岡村 均：哺乳類の睡眠覚醒リズムの分子機構、第 5 2 回藤田学園医学会・特別講演 2020 年 10 月 2 日、藤田学園大学フジタホール 2000（愛知県豊明市）。

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

腸内細菌叢および腸管上皮細胞からの DAMPs 制御による 脳虚血病巣進展への影響

研究代表者 西山 康裕¹⁾

研究分担者 若林あや子²⁾、五十嵐 博中³⁾

1) 日本医科大学大学院 脳神経内科学 2) 日本医科大学大学院微生物免疫学

3) 新潟大学脳研究所

研究要旨

脳卒中は本邦における死因の第3位、介護を要する疾患の第1位であり、社会の高齢化とともに、今後も患者数の増加が懸念されている。脳卒中後の合併症として便秘などの排便困難症が知られている。コントロール群と比べて脳卒中患者は4-5倍排便困難症に罹患しやすく、また、約30-60%と高頻度に行き起こることが知られているが、このメカニズムの一つとして脳卒中後の腸内細菌叢の変化が関与すると考えられている。昨今動物実験レベルでは脳梗塞による組織の細胞死に伴って自己由来の炎症が惹起され、マクロファージや好中球を活性化に導く DAMPs の一部である HMGB1 が関与すると言われ、治療標的として注目されている。我々は脳梗塞マウスモデルを用いて HMGB1 と腸内細菌叢、腸管上皮細胞の関係性に注目し、今後も検討を重ねていく予定である。

A. 研究目的

脳梗塞による組織の細胞死に伴って自己由来の炎症が惹起されるが、これは病原体によるものではなく、無菌性炎症と呼ばれるものであり、病原性炎症と同様にミクログリア、好中球、マクロファージによる炎症が起こる。脳梗塞後の脳組織破壊によりペルオキシレドキシン (PRX) が細胞外に放出され、TLR 依存的にマクロファージや好中球を活性化に導くダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) として働く。DAMPs として働くタンパク質は HMGB1 が知られている。脳梗塞においても発症2-4時間以内に虚血に陥った脳細胞から HMGB1 が細胞外へ放出され、主に脳血液関門の破綻に関与することが明らかとなっており、我々は HMGB1 に注目した。同時に、アルミニウム含有化合物は強い免疫賦活作用を有する (Marrack P et al. Nat Rev Immunol 2009)。我々の以前の研究により抗生物質を投与することにより脳梗塞サイズが小

さくなることがわかっているが、これは抗生剤投与により炎症が制御され、腸管上皮細胞の DAMPs である HMGB1 との関連を明らかにすることが目的である。また、我々はアルミニウム含有食品添加物をマウスに経口投与した場合のアレルギー誘導を検討し、炎症反応の起点としての腸管上皮細胞死を検討している。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

マウスから小腸を摘出し、EDTA 処理した組織断片からクリプトを遠心分離、採取する。クリプトには腸管上皮幹細胞が存在し、試験管内で腸管上皮細胞を再現することが可能である。マ脳虚血モデルマウスとコントロールマウスで上皮細胞の損傷、すなわち代表的な DAMPs である HMGB1 の発現をフローサイトメトリーで評価する。またマウスの糞便中の HMGB1 両の測定を行い、脳梗塞前後 (day 0, day 1) にて比較する。また、14日間の KCV (Kanamycin-Colistin-Vancomycin) 投与を

行うことにより、microbiota 修飾モデルマウスに脳梗塞巣を作成し、脳梗塞体積の縮小効果を検討した。脳梗塞については、同様に 24 時間後、72 時間後に解析した。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、72 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 (%) = $\frac{\text{虚血半球} - \text{対側半球}}{\text{対側半球}} \times 100$ で計算した。また、アルミニウム含有化合物は強い免疫賦活作用を有する (Marrack P et al. Nat Rev Immunol 2009)。また、我々はマウスにミョウバンまたはアンモニウムミョウバンを単独、もしくは卵白アルブミン (OVA) と共に経口投与し、腸上皮細胞における死細胞の割合とアポトーシス関連スペック様カード蛋白質 (ASC) スペック形成について、フローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡により測定した。

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。脳浮腫率においても、両群間で有意差を認めなかった。
4. 虚血後 72 時間の梗塞サイズにおいて、健常側比にて皮質および全脳において vehicle 群と抗生物質投与群に統計学的有意差を認めた。脳浮腫率においては両群間で有意差を認めなかった。今後は、抗生物質投与群・非投与群にて脳梗塞前後でのマウス糞便の固さを定性的に評価し、継時的に比較すると同時に 16S rRNA メタゲノム解析を行い、細菌叢の変化を調べる。Positive control としてコレラトキシン投与マウスを用いる予定である。

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、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、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。

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。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 (Nishiyama Y et al. J Immunol 2002) 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。一方、脳梗塞は近年、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。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、72 時間後の評価では、抗生物質を投与した群で梗塞サイズ縮小を認めた。これらの研究結果が抗生剤投与により炎症が制御され、腸管上皮細胞の DAMPs である HMGB1 減少し、炎症を制御することによる可能性をさらに追求したい。また、炎症誘導を行ったマウスでは、腸上皮の AnnexinV⁺ Zombie⁺ 死細胞の割合と炎症性細胞死の過程で出現する ASC スペック数が有意に増加した。

E. 結論

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 24 時間から 72 時間で有意な差となって現れた。このことから、急性期に侵入する好中球ではなく、その後侵入する単球などの免疫担当細胞が影響

している可能性がある。この差を見いだす一因として、腸管上皮細胞の損傷・細胞死を誘導し、上皮細胞質における HBGB1 核蛋白の発現を増加させ、損傷した上皮細胞からの HBGB1 の放出を促すことを検証し、さらに腸上皮細胞を分取して次世代 RNA シークエンシングを行い、炎症性細胞死に関与する遺伝子の発現変動についても解析していく予定である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 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

孤発性 ALS 患者で見出された新規 microRNA の機能解析

研究代表者 保住 功¹⁾

研究分担者 栗田 尚佳¹⁾、位田 雅俊¹⁾、柿田 明美²⁾、北浦 弘樹²⁾、田中 英智²⁾

1) 岐阜薬科大学 薬物治療学 2) 新潟大学 脳研究所

研究要旨

孤発性 ALS 発症に、後天的な環境因子によるエピジェネティクス変化が関連すると考えられる。これまでに、孤発例の ALS 患者検体において、エピジェネティクス因子の1つであるマイクロ RNA (miRNA) の変動を見出し、ALS 剖検にて顕著な増加が認められた miR-5572 について、ALS モデル細胞で誘導される、細胞内ストレスに対する増悪因子である可能性を見出している。また、miR-5572 の ALS との関連性、また、亜鉛代謝との関連性を評価するために、解析を進めた。SOD1 変異体を導入した ALS 細胞に対して、miR-5572 の inhibitor を共導入したところ、SOD1 細胞内凝集が miR-5572 inhibitor により抑制されたことも見出し、このことより、miR-5572 が ALS に対する治療標的として、有用である可能性が示した。本年度は、前年度から引き続き亜鉛代謝異常を評価する実験系の確立を試みた。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用い、高亜鉛、低亜鉛状態において、細胞内ストレスが惹起され、細胞死が起きない条件を探索した。高亜鉛状態については、ZnSO₄ 200 μ M の8時間処置において、小胞体ストレスマーカーの CHOP 発現が上昇し、BIP 発現については減少した。また、酸化ストレスマーカーの HO-1、GCLM 発現も上昇した。TPEN を用いた低亜鉛状態については、細胞内ストレスが惹起され、細胞死が起きない条件を見出すことができなかった。今後も引き続き、今回の高亜鉛、低亜鉛の条件ならびに酸化ストレス誘導剤、小胞体ストレス誘導剤による miRNA の変化を検討する必要がある。

A. 研究目的

孤発性 ALS 発症に、後天的な環境因子によるエピジェネティクス変化が関連すると考えられる。これまでに、孤発例の ALS 患者検体において、エピジェネティクス因子の1つであるマイクロ RNA (miRNA) について、miR-5572 を見出し、miR-5572 について、ALS において変異タンパク凝集体蓄積に伴う、細胞内ストレスに対する増悪因子になる可能性を見出した。前年度から引き続き亜鉛代謝異常を評価する実験系の確立を試みた。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用い、高亜鉛、低亜鉛状態において、細胞内ストレスが惹起され、細胞死が起きない条件を探索した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

亜鉛除去培地を作成するために、キレート樹脂

である Chlex-100 を用い、胎仔ウシ血清(FBS)中の亜鉛を除去し、亜鉛除去 FBS を作製した。亜鉛除去 FBS 中の金属量は、FBS を湿式灰化後、原子吸光度計を用いて測定した。

亜鉛除去 FBS を DMEM 培地に加えることで、亜鉛除去培地を作製した。次に、作製した亜鉛除去培地を基に、高亜鉛、および低亜鉛条件による細胞傷害を検討した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、亜鉛除去培地に、ZnSO₄ 4 (control)、100、200 μ M を加えて 2~24 時間の間の経時的な細胞毒性を LDH assay で検討した。もしくは、ZnSO₄ 4 μ M を control とし、細胞内亜鉛キレート剤である TPEN 0 および 20 μ M を加え、2~12 時間の間の経時的な細胞毒性を LDH assay で検討した。また、細胞内ストレスマーカーの発現量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。

C. 研究結果

高亜鉛状態については、ZnSO₄ 200 μM の10 時間以降に細胞死が起き (Fig.1~3)、かつ8 時間処置において、小胞体ストレスマーカーの CHOP 発現が上昇し、BIP 発現については8 時間処置において減少した (Fig. 4)。また、酸化ストレスマーカーの HO-1、GCLM 発現も上昇した (Fig. 5)。TPEN を用いた低亜鉛状態については、細胞内ストレスが惹起され、細胞死が起きない条件を見出すことができなかった (Fig. 6、7)。

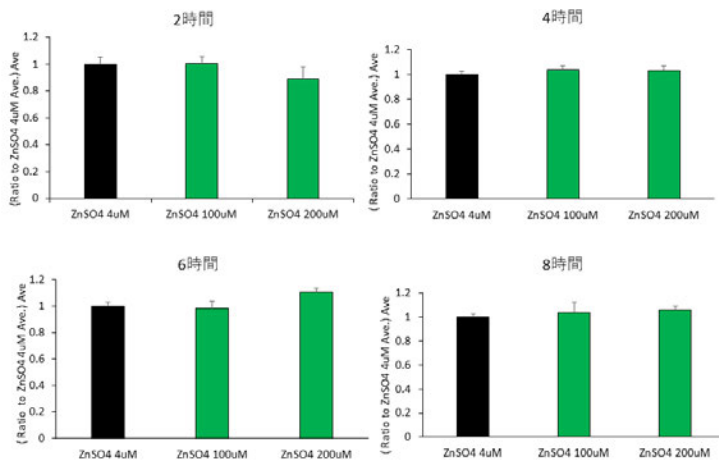


Fig.1 ZnSO₄ 2~8時間処置における LDH assay

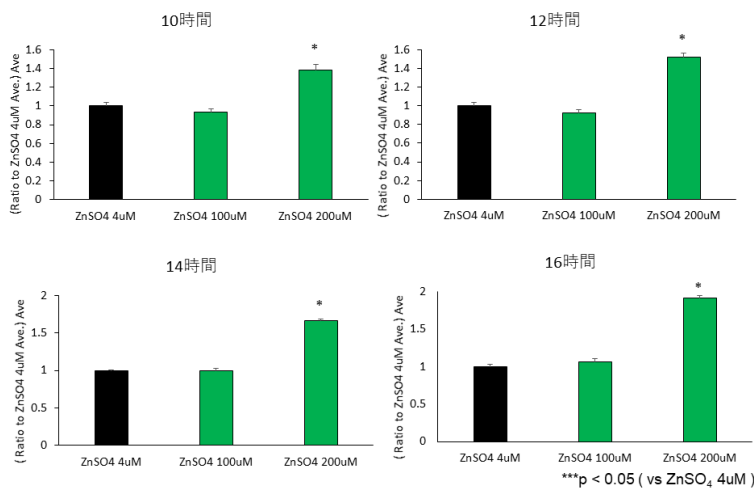


Fig.2 ZnSO₄ 10~16時間処置における LDH assay

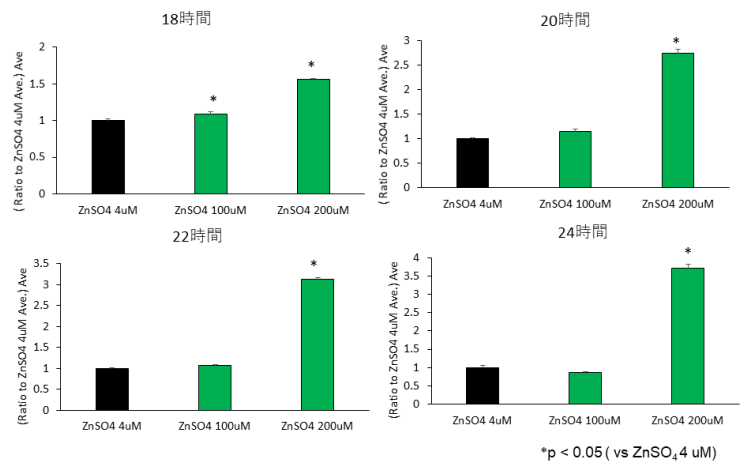


Fig.3 ZnSO₄ 18~24時間処置における LDH assay

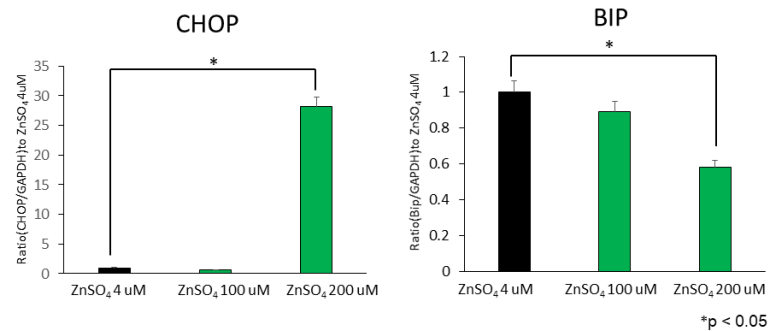


Fig.4 ZnSO₄ 8h処置における小胞体ストレスマーカー

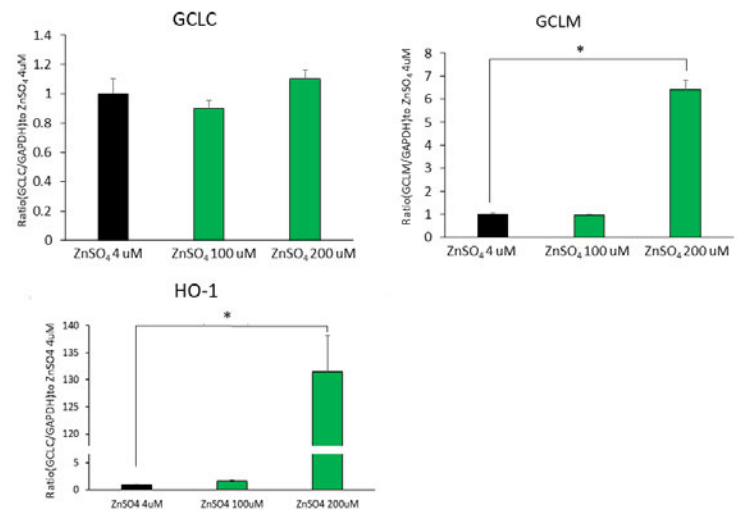


Fig.5 ZnSO₄ 8h処置における酸化ストレスマーカー

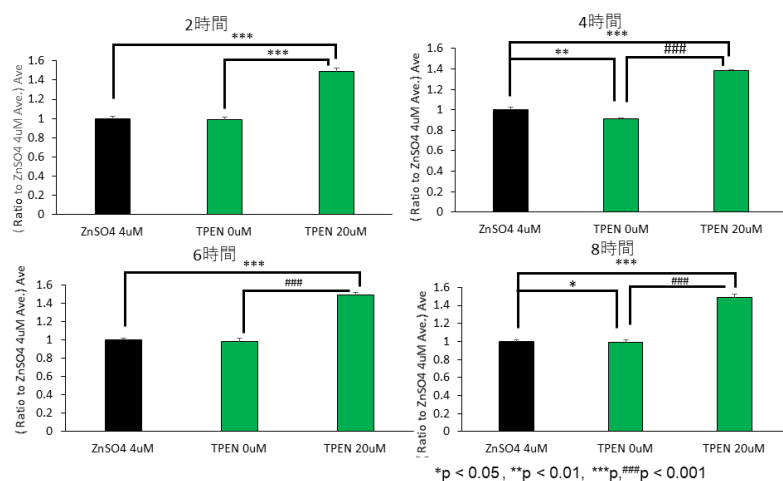


Fig.6 TPEN 2～8時間処置における LDH assay

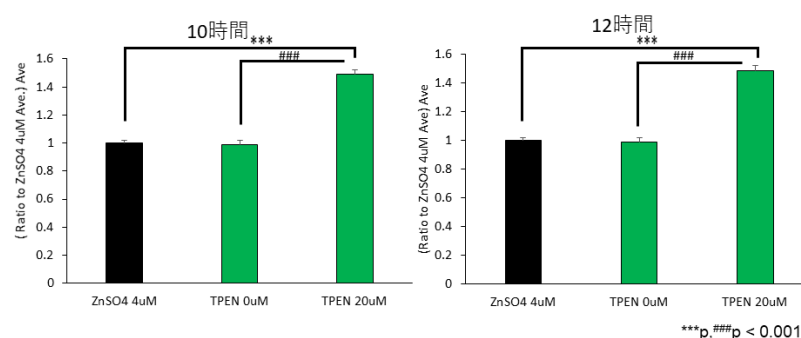


Fig.7 TPEN 10～12時間処置における LDH assay

D. 考察

これまでに、細胞内ストレスに対して ALS 剖検で見出された miR-5572 が毒性の修飾因子であることを確認している。したがって、高亜鉛や低亜鉛条件下で引き起こされる細胞内ストレスが miR-5572 を変化させる可能性を予想しているが、さらなる検討が必要である。

E. 結論

今後も引き続き、今回の高亜鉛、低亜鉛の条件ならびに酸化ストレス誘導剤、小胞体ストレス誘導剤による miRNA の変化を検討する必要がある。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Kurita H, Yabe S, Ueda T, Inden M, Kakita A, Hozumi I. MicroRNA-5572 Is a Novel MicroRNA-Regulating *SLC30A3* in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. Int J Mol Sci. 21(12):4482 2020.

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

高磁場 MRI を用いたてんかん原性部位及び機能部位との関係の研究

研究代表者 臼井直敬 1)

研究分担者 鈴木雄治 2), 近藤聡彦 1) 松平敬史 1) 荒木保清 1)

1) NHO 静岡てんかん・神経医療センター 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

難治性てんかんにて外科治療を検討している患者においては、切除すべき皮質領域と、機能的に重要な運動・感覚野、言語野などの関係を明確にすることが重要である。外科治療を検討中の患者で高磁場 MRI を用いて、てんかん原性部位を同定し、加えて同部位を対象とした機能的 MRI を行い、てんかん原性部位と機能部位の関係を検討する。

A. 研究目的

難治性てんかんにて外科治療を検討している患者においては、切除すべき皮質領域と、機能的に重要な運動・感覚野、言語野などの関係を明確にすることは術後の機能障害を低減するため極めて重要である。外科治療を検討中の患者で高磁場 MRI を用いて、てんかん原性部位を同定し、加えて同部位を対象とした機能的 MRI を行い、てんかん原性部位と機能部位（運動・感覚野、言語野など）の関係を検討する。

一にて行い、発作症状や発作時脳波・SPECT などを駆使して、てんかん原性領域の検索を行う。画像的な検討は、新潟大学脳研究所にて施行する。高磁場 MRI を用いた脳画像撮影は、高解像度脳構造画像（T2R、3D 画像など）で得られる解剖学的情報を基準にして、機能的 MR 画像（fMRI）、拡散テンソル画像、磁化率強調画像（SWI）等の撮影を施行する。fMRI は、推測されるてんかん原生部位を対象に行い、運動・感覚野、言語野などの機能部位を同定する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

静岡てんかん・神経医療センターにて、難治性てんかんにて外科治療を検討中の患者を対象とする。機能部位とてんかん原生領域が重複している、あるいは近接している可能性が高い患者においては、その位置的関係の解明は、QOL の観点においても極めて重要な情報となる。そのため、臨床的と画像的からのアプローチを行い、両者の関係を明確にし、最終的には外科治療を行った後に、術後の機能障害の有無、程度との相関を調べる。
臨床的な検討は静岡てんかん・神経医療センタ

C. 研究結果

撮像プロトコル等を決定し、現時点までに、難治性てんかん患者1名（プロトコル決定のために健常ボランティア2名）の撮像を行い、順調に研究が継続されている。プレパレーションシステム、撮像時の映像視聴などにより、撮像時に問題等は生ずること無く経過している。新潟大学にて、難治性てんかん患者1名の測定を行った症例では、てんかん原生部位は、左の頭頂葉に皮質形成異常を認めたが、脳機能部位（言語）が両側性であることが確認された。この結果により、手術適応の可能性がひらけたた

め、頭蓋内脳波記録を行い、覚醒下手術にて詳細な脳機能マッピングを行っての外科治療を行うに至った。術後、患者のてんかん発作は抑制され、言語障害はみられていない。

D. 考察

順調に撮像が進められているが、更なる難治性てんかん患者（及びそれぞれに対するコントロール群）のデータの蓄積が必要である。共同研究を継続し、症例数を重ねていくことにより、てんかん原性部位及び機能部位との関係を明らかにしてゆく必要がある。

E. 結論

1 例で機能的 MRI による解析の臨床的有用性が示唆されたが、今後さらなる症例の積み重ねが必要と考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

中枢神経原発悪性リンパ腫における transforming acidic coiled-coil-containing 3 (TACC 3) 発現とその臨床病理学的意義

研究代表者 杉田 保雄¹⁾

研究分担者 大島 孝一¹⁾, 三好 寛明¹⁾, 松田 光太郎¹⁾, 柿田 明美²⁾

1) 久留米大学医学部病理学講座 2) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)における transforming acidic coiled-coil-containing 3 (TACC3) 発現とその臨床病理学的意義について検討した。対象 PCNSL 例は 43 例であり、患者の性別は男性 26 例、女性 17 例であり、年齢は 51 歳から 85 歳（平均：67.9 歳）であった。多発病変症例は 21 例、単発病変症例は 22 例であった。経過観察中の死亡例は 29 例であり、生存例もしくは追跡困難のための打ち切り数は 14 例であった。PCNSL の病理組織型は 39 例はびまん大細胞 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) であり、4 例は濾胞辺縁帯 B 細胞リンパ腫 (MZL) と診断された。また DLBCL 中 MUM-1 陽性例は 35 例であり、Non-GCB type は 35 例、GCB type 4 例と診断された。Fisher の正確確率検定では PCNSL における p53, ki-67 は TACC3 発現と相関する結果が得られた。TACC3 の標識率で分類した低標識率群は 23 例 (A: DLBCL 19 例、B: FMZL 4 例) であり、高標識率群は 20 例 (DLBCL 20 例) であった。統計学的解析から低標識率症例群に属する患者の予後は高標識率群に属する患者に比べて予後良好であることが示唆された ($p < 0.5$, Kaplan-Meier 法, Log-rank 検定)。一方、Cox regression model による多変量解析においても TACC3 発現は他因子と比較して PCNSL 患者の予後推定の際のより正確な危険因子であることが示された。以上の結果から PCNSL における TACC3 の解析は腫瘍の悪性度、患者の予後判定に有用である。

A. 研究目的

transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3) は染色体上の 4p16.3 に位置する、TACC family の member である。TACC3 蛋白は Aurora A キナーゼのターゲットである。また核分裂の際の中心体を構成している蛋白であり、細胞の核分裂の際に、微小管の成長と安定に寄与している [1,2]。近年、TACC3 発現と様々な悪性腫瘍との関わりが指摘されているが [1,2]、私共の渉猟し得た範囲においては中枢神経系腫瘍あるいはリンパ腫についての TACC3 研究の詳細な報告は未だにみられない。それゆえに中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)の腫

瘍増殖における TACC3 について役割を明らかにするために本研究を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

対象

久留米大学医学病理学講座及び新潟大学脳研究所で診断された中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL) 症例を対象とした。

方法

TACC3, 細胞周期マーカーなどを免疫組織化学的に検討し、臨床情報と併せて臨床病理学的検討を行った。組織標本は 20% の緩衝ホルマリンで固定

し、パラフィンに包埋した。これらから作製した切片 (5 μ m) を使用して hematoxylin and eosin (HE) 染色および免疫染色 (IHC) を行った。組織診断基準は WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue によった。免疫組織化学についてはパラフィン切片を熱処理にて抗原賦活後に自動染色機 (Dako autostainer universal staining system) 及び ChemMate ENVISION kit/HRP (DAB), DakoCytomation) を使用して染色を行った。一次抗体として CD3 (希釈率 1:50), CD20 (希釈率 1:50), CD79a (希釈率 1:150), MUM1 (希釈率 1:100; DakoCytomation, Carpinteria, CA), p53 (希釈率 1:30; Ventana, Arizona, USA), MIB-1(抗 Ki-67) (希釈率 1:100; Novocastra, Newcastle, UK) を用いた。免疫組織化学の評価は 2 人の病理医が独立して行った (Y.S., K.M)。評価が有意に異なる症例では同意が得られるまで再評価を行った。腫瘍細胞の TACC3 の陽性率と増殖能の指標 (p53, Ki-67) の関係を Pearson product-moment correlation coefficient 用いて解析を加え、更に他の因子である患者の年齢、性別、組織型を加えた相関関係を Fisher の正確確率検定 (Fisher's Exact Test) を用いて分析した。また腫瘍細胞の TACC3 の陽性率 50% を cut off 値として症例群を低標識率群(A)と高標識率群(B)の 2 群に大別した。A, B 群の生存率を Kaplan-Meier 法で解析して両者を Log-rank 法で検定した。以上で得られたデータを基にして Cox regression 解析を用いて多変量解析を加えて PCNSL における TACC3 発現の意義を解析した。

倫理面

本研究は久留米大学及び新潟大学脳研究所の倫理審査委員会で承認を得ており、患者の人権を尊重して行われた。

C. 研究結果

PCNSL 検討例は 43 例であり、患者の性別は男性 26 例、女性 17 例であり、年齢は 51 歳から 85 歳 (平均: 67.9 歳) であった。多発病変症例は 21

例、単発病変症例は 22 例であった。経過観察中の死亡例は 29 例であり、生存例もしくは追跡困難のための打ち切り数は 14 例であった。

ICH による検討では全例が CD20, CD79a に陽性であり、CD3 については陰性であった。病理組織学的所見と併せて 39 例はびまん大細胞 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) であり、4 例は濾胞辺縁帯 B 細胞リンパ腫 (MZL) と診断された。また DLBCL 中 MUM-1 陽性例は 35 例であり、Non-GCB type は 35 例、GCB type 4 例と診断された。腫瘍細胞における TACC3 および Ki-67 の標識率 (%) の平均値はそれぞれ 38.4 ± 28.1 , 38.0 ± 28 であり両者は正の相関を示した (相関係数 $r=0.53$, $p<0.001$)。また腫瘍細胞における p53 の標識率 (%) の平均値は 28.4 ± 23.9 であり TACC3 と Ki-67 の標識率は正の相関を示した (相関係数 $r=0.72$, $p<0.001$)。

表 1 TACC3 と臨床病理学的事項との関係
(Fisher's Exact Test)

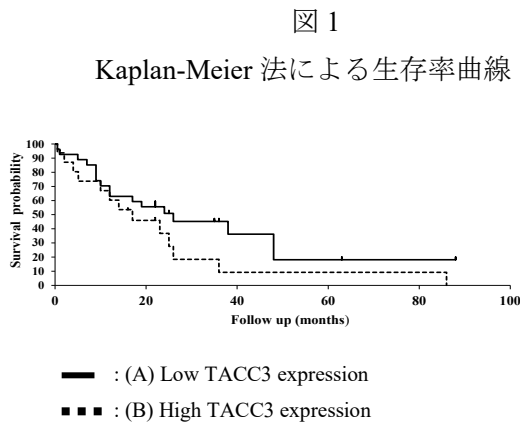
Factor	TACC3 $\geq$ 50% n=15	TACC3<50% n=28	P value
Gender			
Male	8	18	P=0.7568711 (NS)
Female	6	11	
Age			
< 65	6	9	P=0.738513 (NS)
> 65	8	12	
Histological type			
DLBCL	14	25	P=0.368687 (NS)
MZBCLof MALT	0	4	
P53 labeling index			
< 50%	7	23	P=0.0498747 ($p<0.05$)
$\geq$ 50%	7	6	
Ki-67 labeling index			
< 50%	8	26	P=0.014059 ($p<0.05$)
$\geq$ 50%	6	3	

また TACC3 の標識率で分類した A 群は 23 例 (A: DLBCL 20 例、B: MZL 4 例) であり、B 群は 20 例 (DLBCL 20 例) であった。

一方、Fisher の正確確率検定でも他の因子では TACC3 と関係はみられなかったが、PCNSL における p53, ki-67 は TACC3 発現と相関する結果が得られた (表 1)。

A 群と B 群の Kaplan-Meier 法による生存曲線は図

1 に示す（上段は A 群、下段は B 群を示す）。Log-rank 検定では A, B 群の生存率には有意差 ($p<0.05$) がみられ、低標識率群(A)の患者は高標識率群(B)に比べて予後良好であることが示唆された (単変量解析)。



一方、p53, Ki-67 では低標識率群の患者は高標識率群の患者に比べて予後に有意差はみられなかった。

表 2
Cox regression analyses of risk factors

	Hazard ratio (95% confidence interval)	P-value
TACC3	3.476 (1.381-7.0459)	0.000916
P53	0.839 (0.381-7.0459)	0.729127
Ki-67	0.533 (0.210-1.357)	0.187393

Cox regression 解析による多変量解析においても TACC3 発現は他因子と比較して PCNSL の予後の正確な危険因子であることが示された (HR:3.476, P-value<0.01, 表 2)。

D. 考察

多くの悪性腫瘍において腫瘍細胞における TACC3 の過剰発現と患者の予後不良との相関性が報告されている[1,2]。しかしながら、私共が渉猟し得た範囲ではPCNSLにおけるTACC3の過剰発現とその臨床病理学的意義に関しての知見はみられない。それゆえに今回、私共はPCNSLにおけるTACC3の腫瘍発生に関わる機序とおおよびPCNSL患者の予後との関係について臨床病理学

的見地から検討を加えた。まず、腫瘍細胞の増殖との関係からTACC3発現とp53, Ki-67との関係について検討した。一般に悪性腫瘍の発生や進展に p 53 遺伝子の関与が指摘されており、p53 の変異はhigh-gradeあるいはhigh-stageの腫瘍に認められる。一方、抗Ki-67抗体 (MIB-1) は静止期であるG0期を除く、抗Ki-67抗体 (MIBI) は全ての増殖期すなわち細胞周期のG1の後期、S、G2、M期にある細胞の核内に発現するKi-67抗原を認識する[1,2]。PCNSLにおいてもp53, Ki-67の腫瘍細胞の高標識率は予後不良因子として報告されている[3]。本研究でのPearson product-moment correlation coefficientあるいはFisherの正確確率検定ではPCNSLの腫瘍細胞におけるTACC3の発現とp53, Ki-67の発現は正の相関を示しており、PCNSLにおいてもTACC3発現は他の悪性腫瘍と同様に腫瘍の増殖能に関わっていることが示唆された。

本研究ではp53, Ki-67の腫瘍細胞の発現の差と患者生存率について単変量および多変量解析においても有意差は得られなかった。その原因として症例数が十分で無かった可能性があるが、同一条件下においてもPCNSLにおけるTACC3発現の差はPCNSL罹患患者の生存率において有意差を示した。この結果からTACC3の発現は他因子 (p53, Ki67) と比較してもより正確に罹患患者の予後を示すことが明らかになった。

E. 結論

以上の臨床病理学的検討の結果からPCNSLにおけるTACC3の標識率の検討は腫瘍の悪性度、罹患患者の予後の推定に有用である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

2. 学会発表

Sugita Y et al. Elevated expression of Transforming Acidic Coiled-Coil Containing Protein 3 (TACC3) reflects with a poor prognosis with primary central nervous system lymphomas. 97th Annual Meeting of the American Association of Neuropathologists,

June 10-13, 2021, St. Louis (hybrid web meeting) ,
USA

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

※当該研究に関する新潟大学脳研究所の関わり

PCNSL は希少疾患であり、新潟大学脳研究所からの研究材料の提供により本研究の遂行が可能になった。また共同研究者である新潟大学脳研究所病理学分野の柿田 明美教授のご指導、ご助言は共同研究遂行にあたって極めて有用であった。

超偏極低分子化合物の生体トレーサーとしての応用を目指した基礎検討

研究代表者 青木 伊知男¹⁾

研究分担者 五十嵐 博中²⁾, 高草木 洋一¹⁾, 高堂 裕平¹⁾

1) 量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

超偏極低分子化合物を用いた生体イメージング実験では、乳酸およびピルビン酸が超偏極の対象として頻用されている。ピルビン酸から乳酸への代謝は、癌細胞における乳酸生成亢進のみならず、加齢脳や脳疾患においても活性化していることが近年明らかとなってきた。そのため、超偏極技術をもちいた脳代謝評価への期待は大きい。一方、前臨床実験で用いられるマウスにおいて頻用されるイソフルラン麻酔は、乳酸生成を促進することが報告されており、マウスを用いた超偏極技術の評価には注意が必要である。本研究では、超偏極技術で頻用されるピルビン酸・乳酸代謝のうち、磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) で評価可能な乳酸を対象に、麻酔の影響がどのように作用しているかを明らかにするため、覚醒下でのマウス MRS 実験を実施した。

A. 研究目的

脳代謝において、神経細胞のエネルギー源となっているが、その代謝については明らかにされていないピルビン酸、乳酸、酢酸など、血液脳関門を越えて代謝されることが確認されている物質が超偏極技術の対象として注目を集めている。本研究では、これまで統合脳機能研究センターで検証された $1\text{-}^{13}\text{C}$ ピルビン酸から $1\text{-}^{13}\text{C}$ 乳酸への代謝について、麻酔の影響を評価することを目的に、マウスの覚醒時の脳内乳酸濃度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)

C57BL6 マウス (N=8) の頭蓋にプラスチック製の固定具を装着し、MRI 装置内でマウスが覚醒状態で脳代謝を測定できる体制で覚醒下 MRS 実験を行った。比較対象としてイソフルラン麻酔 1.5% の麻酔下での実験も実施した (N=7)。7T Bruker 装置において PRESS シーケンス (TR 3000 ms, TE 10 ms) により、関心領域を皮質に設定して脳内代謝の測定を行った。解析は LCModel を用い、水

濃度を参照として各代謝物濃度を算出した。

LCModel では alanine, aspartate(Asp), phosphorylcholine(PCh), creatine(Cre), phosphocreatine (PCr), GABA, glutamine (Gln), Glu, glutathione (GSH), glycine (Gly), myo-inositol (ml), lactate(Lac), N-acetylaspartate (NAA), Scyllo-inositol (Scyllo), taurine(Taur), glucose(Glc), N-acetylaspartylglutamate(NAAG), glycerophosphorylcholine(GPC), phosphorylethanolamine (PE), serine (Ser) and β -hydroxybutyrate (bHB) の解析を実施した。

C. 研究結果

覚醒下では脳内乳酸濃度は低値で計測されなかった一方、麻酔下では脳内乳酸が検出された ($0.74 \mu\text{mol/g tissue}$)。その他、麻酔下で検出できて覚醒下で検出できなかった代謝物はみられなかった。

D. 考察

近年、マウスやラット、さらにはヒトにおいて

も腫瘍や脳機能の評価方法として超偏極を用いる研究が、世界各地で行われている。マウスでの知見をヒトにつなげていくためには、マウスでの実験条件を可能な範囲でヒトと同様に整えていくことが必要である。そこで本研究では、マウスとヒト研究の大きな違いの一つである麻酔の作用を明らかにするために、覚醒下での脳内代謝物の測定を試みた。結果、超偏極で重要な対象となる乳酸濃度は覚醒下では低く MRS での検出限界以下であることが示された。乳酸はアストロサイト内でグルコースやグリコーゲンから生成され、そして神経細胞にトランスポートされて利用されるという、Astrocyte-Neuron Lactate shuttle (ANLS)仮説における重要な分子である。この乳酸は覚醒下においては速やかに神経細胞で利用され、検出限界以下となっている可能性が示唆された。今後、超偏極装置でピルビン酸—乳酸の動態を評価することが可能となれば、乳酸濃度のみならず代謝動態も明らかにできる可能性がある。乳酸代謝は加齢脳や脳疾患において重要な位置づけにあり、今後の超偏極代謝イメージングでのさらなる検討が期待される。

E. 結論

マウス脳における脳内乳酸濃度は、イソフルラン麻酔の影響が大きい可能性が示唆された。覚醒時における乳酸代謝状態の評価には MRS のみでは十分でない可能性が示唆され、超偏極 MRS を用いることの有用性が推測された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Takado et al. MRS-measured Glutamate versus GABA reflects excitatory versus inhibitory neural activities in awake mice. JCBFM 2021(under revision)

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

NF- κ B 活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の 開発に向けた多施設共同研究

研究代表者 立石 健祐¹⁾

研究分担者 棗田 学²⁾, 山本 哲哉¹⁾, 藤井 幸彦²⁾

1) 横浜市立大学大学院医学研究科 脳神経外科学

2) 新潟大学脳研究所脳神経外科学分野

研究要旨

難治性の原発性悪性脳腫瘍である中枢神経原発悪性リンパ腫 (primary central nervous system lymphoma: PCNSL) に対する新規治療法の開発を目指した共同研究を行った。研究代表者らが独自に樹立したヒト由来 PCNSL 細胞株 (patient-derived xenograft: PDX 細胞) を用いて, NF- κ B 経路が糖代謝異常を制御し腫瘍細胞増殖に影響を及ぼしていることを見出した。これらの機構を制御する遺伝子発現を抑制することで抗腫瘍効果が得られることが明らかになった。また本研究を通じて PCNSL のドライバー遺伝子を特定した。更に cell free DNA を用いた liquid biopsy 法の開発に着手し, MYD88 変異の存在が PCNSL 診断のバイオマーカーとなりうることを明らかにした。

A. 研究目的

研究の主目的として, PCNSL に対して高頻度に認める NF- κ B 経路の恒常的な活性化に関連する分子を標的とした開発を目指した。特に PCNSL において強い依存を示す解糖系代謝経路に注目し, NF- κ B 経路の活性化が解糖系にどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的とした。更にこれらの機構を標的とした新規治療法の開発することで PCNSL に対する将来の臨床応用を目指した。同時に PDX マウスを用いて治療効果判定に liquid biopsy 法を導入すべく研究を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究を行うにあたり横浜市立大学倫理委員会及び動物実験委員会の承認を得た (承認番号 A210300004 及び FA19-024)。申請者らがこれまで独自に樹立した PCNSL PDX モデルは 18 種類と世界最大コホートであり, これらのモデルを活用して研究を行った。具体的には PCNSL に高頻度に

認められる B-cell receptor, Toll like receptor signaling に関連する遺伝子異常 (*CD79B*, *MYD88*, *CARD11*, *TNFAIP3 (A20)* 等) を, 全エクソ解析を用いて網羅的に解析を行う。更には RNA シークエンスにて NF- κ B シグナル経路, 解糖系に関連する遺伝子発現を解析する。次に正常脳組織をコントロールとし, 解糖系蛋白の発現レベルに違いがあるか免疫染色, western blotting 法等にて検討を図る。また臨床データでも同様の傾向が認められるか両研究機関で独立したコホート研究を行う。NF- κ B 経路に関連する遺伝子をノックダウン, 強制発現を行い解糖系酵素の発現レベルに変化が生じるか検証する。更にこれらの遺伝子発現調節にて薬剤感受性に影響が生じるか検証する。In vitro レベルで細胞毒性のメカニズムを明らかにするとともに, in vivo 研究にて薬剤治療によりマウス生存期間の延長効果が得られるか検討する。更に得られた研究結果を基に新たな研究計画を立案する。

C. 研究結果

研究者らはこれまでに PCNSL では BCR シグナルに関連する遺伝子変異 (*CD79B*, *MYD88*) が高頻度に認められることを報告してきた (Nakamura T, Tateishi K et al. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016). また全身性 B 細胞型リンパ腫と比較して PCNSL では DNA メチル化が上昇していることを見出した (Nakamura, Tateishi K et al. *Acta Neuropathol.* 2017). これらの先行研究により PCNSL の治療標的を立案した. またグリオーマ幹細胞株の樹立などの経験を通じて遺伝子変異に起因する代謝異常を標的とした治療法をこれまでに提唱してきた (Tateishi K et al. *Cancer Cell.* 2015, Tateishi K et al. *Clin Cancer Res.* 2016, Tateishi K et al. *Cancer Res.* 2017, Tateishi K et al. *Clin Cancer Res.* 2019). これらの研究基盤をもとに本研究の構想を立案するに至った. 組織学的検討では表現型が 100%一致していることを確認した. また全エクソーム解析を含めた遺伝子解析を行い、患者検体と PDX 細胞間における遺伝子異常が高率に継代されていること、腫瘍内のサブクローンによるヘテロ化を確認した. また PDX 細胞株及び患者検体において解糖系が亢進していること、解糖系亢進に *MYD88*, *CD79B* などの遺伝子異常が関与していることを PET, ウェスタンブロット法、免疫組織学的検討等にて確認した. 更には cell free DNA を用いて *MYD88* 変異が PDX マウスの血清から検出可能であることを明らかにした. これらの共同研究成果は *Cancer Res* 誌に報告した (Tateishi K, Natsumeda, Fujii, Yamamoto et al. *Cancer Res.* 2020).

D. 考察

これまでの共同研究成果により、PCNSL の細胞起源、進化の生物学的背景がより明確になった. 更に NF- κ B 経路を標的としたアプローチは PCNSL という疾患に対する極めて重要であることを本研究により見出した. これらの結果は、今後の PCNSL 研究の核となる研究背景に繋がる可能性が

高いと考えられる. 重要な点として、本研究を通じて世界最多の PCNSL 細胞株を樹立することに成功した. この成果は今後の治療法開発や耐性機序解明などに大きく貢献できるものと考えられる.

E. 結論

PCNSL の形成に関わる遺伝子異常の同定と NF- κ B 経路を標的とした治療アプローチの重要性を見出した.

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Tateishi K, Miyake Y, Kawazu M, Sasaki N, Nakamura T, Sasame J, Yoshii Y, Ueno T, Miyake A, Watanabe J, Matsushita Y, Shiba N, Uda N, Ohki K, Fink AL, Tummala SS, Natsumeda M, Ikegaya N, Nishi M, Ohtake M, Miyazaki R, Suenaga J, Murata H, Aoki I, Miller JJ, Fujii Y, Ryo A, Yamanaka S, Mano H, Cahill DP, Wakimoto H, Chi AS, Batchelor TT, Nagane M, Ichimura K and Yamamoto T. Hyperactive RelA/p65-hexokinase 2 signaling axis drives primary central nervous system lymphoma. *Cancer Res.* 2020.

2. 学会発表

- 立石健祐, 三宅勇平, 河津正人, 佐々木重嘉, 笹目丈, 吉井幸恵, 脇本浩明, 永根基雄, 市村幸一, 山本哲哉. 独創的モデルを通じた中枢神経原発悪性リンパ腫の進展機序同定と治療標的の解明. 第 38 回日本脳腫瘍学会学術総会 (シンポジウム), 広島, 2020. 12.
- 立石健祐, 三宅勇平, 河津正人, 佐々木重嘉, 笹目丈, 吉井幸恵, 脇本浩明, 永根基雄, 市村幸一, 山本哲哉. 独創的モデルを通じた中枢神経原発悪性リンパ腫の進展機序同定と治療標的の解明. 第 79 回日本脳神経外科学会学術総会, 岡山, 2020. 10.
- 立石健祐, 三宅勇平, 河津正人, 佐々木重嘉, 吉井幸恵, 笹目丈, 永根基雄, 市村幸一. NF- κ B 経路の活性化は PCNSL の中枢神経浸潤を促進させる. 第 38 回

日本脳腫瘍病理学会（シンポジウム），
東京，2020. 9.

4. 立石健祐，佐々木重嘉，河津正人，三宅勇平，中村大志，吉井幸恵，松下裕子，山中正二，山本哲哉，脇本浩明，永根基雄，市村幸一．ヒト由来中枢神経原発悪性リンパ腫細胞株を用いた腫瘍発生進展機構の解明、治療法探求のためのトランスレーショナル研究．第 37 回日本脳腫瘍学会学術総会（シンポジウム，Top Scoring Abstract），金沢，2019. 12.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願 2020-174066（立石健祐）

特発性正常圧水頭症患者脳脊髄液中のバイオマーカー診断と重症度分類の確立

研究代表者 中島 円¹⁾

研究分担者 池内 健²⁾ 宮嶋雅一¹⁾ 春日健作²⁾ 宮下哲典²⁾ 月江珠緒²⁾

1) 順天堂大学・医学部・脳神経外科学講座 2) 新潟大学・脳研究所・遺伝子機能解析学分野

研究要旨

特発性正常圧水頭症 (iNPH) は認知障害、歩行障害などの症候を呈する高齢者に特有の疾患で、病態生理は加齢とともに減衰する髄液吸収能が原因とされている。過剰な脳脊髄液に対する短絡術 (シャント) の治療介入が症状改善に有用である。本病態では神経毒性蛋白の髄液排泄経路が阻害され、神経毒性蛋白が脳実質内に沈着しやすく、また脳実質へアミロイド β 蛋白が沈着したアルツハイマー病 (AD) 病理が併発した iNPH 患者では、シャント治療後も認知機能の回復が限定的である。本研究では、髄液シャント術後の iNPH 症状、特に認知機能の改善には、髄液を介した病的な神経毒性蛋白の排泄が必須との仮説を立て、アミロイド β 重合体、異常リン酸化タウ蛋白に代表される髄液中の神経毒性蛋白測定を実施した。本研究では iNPH の神経症状と髄液性状を解析し、治療予後を反映したバイオマーカーを求め、重症度分類を確立する。

A. 研究目的

特発性正常圧水頭症 (iNPH) は認知障害、歩行障害などの症候を呈する高齢者特有の疾患で、主に脳脊髄液 (CSF) 吸収障害を原因とし、脳内の CSF が過剰に蓄積している。余剰な CSF に対する短絡術 (シャント) 治療により症状の改善が期待できる。症候のみでは他の神経変性疾患との鑑別が困難であり、またこれらの疾患が併存する場合も少なくないため、様々なバイオマーカーによる鑑別診断が試みられる。神経変性疾患の併存、特にアルツハイマー病に代表される認知障害をきたす疾患の併存は治療効果を限定する。先行研究で、CSF 中のアミロイド β 42 ($A\beta$ 42), phosphorylated tau, total tau 181 (p -tau) 測定値はシャント治療予後を予測し得ることが判明した。しかしこれまで報告された多くの protein biomarker と同様、iNPH の病態発生の機序に直接関連した疾患特異性のあるものではなかった。iNPH の病態生理を理解

する上で、診断に有用なバイオマーカーの新規開発を行い、iNPH の神経症状と髄液性状より、治療予後を反映した重症度分類を確立し得る。

protein tyrosine phosphatase receptor type Q (PTPRQ) は、これまで日本の一施設からの報告があったものの、他施設また多人種間では評価されておらず、中枢神経系での働きはまだ不明である。今回我々は iNPH 患者の髄液中 PTPRQ 値を多国間で調査し、また iNPH 患者の剖検脳を用いて、PTPRQ の脳内の発現を解析した。

B. 研究方法

University of Eastern Finland (UEF) と順天堂大学脳神経外科学教室 (JU) における iNPH 患者の髄液中 PTPRQ 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定し、検査の有用性を評価した。解析群として JU-iNPH 患者 30 例 (男性 22 例、年齢 [中央値] 76 歳、MMSE

[中央値] 22 点) と 60 歳以上の認知機能正常高齢者 (NC) 群 10 例 (男性 5 例, 73 歳, 29 点) のほか, AD 患者 (12 例), パーキンソン病 (PD) 患者 (12 例), non-iNPH 群 (続発性正常圧水頭症患者 [11 例], 先天性正常圧水頭症患者 [5 例]), 検証群として, UEF-iNPH 患者 30 例 (男性 19 例, 73 歳, 25.5 点) と UEF-NC 27 例 (男性 10 例, 71 歳, 28 点) を対象とした。

髄液バイオマーカーとして *PTPRQ* の他, AD 病理マーカーである *p-Tau*, 総タウ (*t-Tau*), *Aβ42* を測定した。iNPH の髄液診断として感度, 特異度, area under the curve (AUC) を評価した。また剖検脳 iNPH (7 例) と NC (6 例) にて免疫組織染色および *in situ* hybridization にて脳内 *PTPRQ* の発現解析を行った。

本研究は, JU および UEF の CSF バンクに保管された iNPH 患者のシャント治療介入前に評価検査で得られた CSF 検体を用いて行われた。順天堂大学およびクオピオ大学病院の倫理委員会で審査を受けており, すでに承認を得たうえで実施された。対象者には研究の趣旨説明文書を配布し, 研究の目的・プログラム内容と方法・調査内容と方法の説明, 調査は匿名で行い個人情報厳重に保護され, 研究への参加は自由意志に基づき不参加によって何も不利益はないことを伝え, 書面にて同意を得た上で研究に参加していただいた。

C. 研究結果

術前髄液中の *p-Tau*, *t-Tau*, *Aβ42* 濃度は, JU-iNPH, UEF-iNPH とともに NC と比較し有意差は認められなかったが, *PTPRQ* 濃度は, JU-iNPH では, 平均 (SD), 619 (398) pg/mL, JU-NC は 296 (94) pg/mL ($p = 0.001$) と有意に高値であり, また UEF-iNPH は 762 (570) pg/mL, UEF-NC は 371 (94) pg/mL ($p < 0.001$) と iNPH では他疾患よりも髄液中に高く認められた。検出力は, 日本人対象で *PTPRQ* の cutoff 値 313 pg/mL にて, 感度 83.3%, 特異度 80.0%, ROC 曲線 AUC 0.860 であった。シャント治療による症状改善群 (46 例), 非改善群 (14 例) の 2 群間解析では, 統計学的有意差は認められなかった。non-iNPH 群 (Evans index [EI]: 0.385) は 1704 (861) pg/mL ($p < 0.001$) と高値であり, iNPH 群 (EI: 0.353) に比べて, non-iNPH 群は脳室拡大を呈した ($p = 0.011$)。脳内の *PTPRQ* 発現解析では, 脈絡叢

および脳室壁の上皮細胞に発現が多く認められた。

D. 考察

髄液中 *PTPRQ* 測定値は, 人種間に変わらず, 健常高齢者より約 2 倍高値を示した。アルツハイマー病理のマーカーである *p-Tau*, *t-Tau*, *Aβ42* とは無関係であり, 脳室拡大をきたす疾患で高値となり, 脳室内上皮細胞に発現が認められたことから, 脳室上皮細胞の機能障害と密接な関係があると推察された。

E. 結論

CSF 中 *PTPRQ* 測定は, 成人慢性水頭症の補助診断として有用である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Chihiro Kamohara, Madoka Nakajima, Kaito Kawamura, Chihiro Akiba, Ikuko Ogino, Kanei Jo, Meng Wei, Karagiozov, Kostadin, Hajime Arai, Masakazu Miyajima: Neuropsychological tests for predicting comorbidities of idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Acta Neurol Scand*, 142(6):623-631. <https://doi.org/10.1111/ane.13306>. 2020.
2. Madoka Nakajima, Tuomas Rauramaa, Petra M Mäkinen, Mikko Hiltunen, Sanna-Kaisa Herukka, Merja Kokki, Tadeusz Musialowicz, Henna-Kaisa Jyrkkänen, Nils Danner, Antti Junkkari, Anne M Koivisto, Juha E Jääskeläinen, Masakazu Miyajima, Ikuko Ogino, Akiko Furuta, Chihiro Akiba, Kaito Kawamura, Chihiro Kamohara, Hidenori Sugano, Yuichi Tange, Kostadin Karagiozov, Ville Leinonen, Hajime Arai: Diagnosis of idiopathic normal pressure hydrocephalus using PTPR type Q concentrations in cerebrospinal fluid: A two-cohort multinational study. *Eur J Neurol*. 28:389-400. 2020
3. Madoka Nakajima, Shigeki Yamada, Masakazu Miyajima, Kazunari Ishii, Nagato Kuriyama, Hiroaki Kazui, Hideki Kanemoto, Takashi

Suehiro, Kenji Yoshiyama, Masahiro Kameda, Yoshinaga Kajimoto, Mitsuhito Mase, Hisayuki Murai, Daisuke Kita, Teruo Kimura, Naoyuki Samejima, Takahiko Tokuda, Mitsunobu Kaijima, Chihiro Akiba, Kaito Kawamura, Masamichi Atsuchi, Yoshihumi Hirata, Mitsunori Matsumae, Makoto Sasaki, Fumio Yamashita, Shigeki Aoki, Ryusuke Irie, Hiroji Miyake, Takeo Kato, Etsuro Mori, Masatsune Ishikawa, Isao Date, Hajime Arai: The research committee of idiopathic normal pressure hydrocephalus Guidelines for Management of Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus (Third Edition): Endorsed by the Japanese Society of Normal Pressure Hydrocephalus. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 61(2):63-97, doi: 10.2176/nmc.st.2020-0292, 2021

4. Aleksi Vanninen, Madoka Nakajima, Masakazu Miyajima, Tuomas Rauramaa, Merja Kokki, Tadeusz Musialowicz, Petra M Mäkinen, Sanna-Kaisa Herukka, Anne M Koivisto, Juha E Jääskeläinen, Mikko Hiltunen, Ville Leinonen: Elevated CSF LRG and Decreased Alzheimer's Disease Biomarkers in Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. *J Clin Med*. 6;10(5):1105. doi: 10.3390/jcm10051105. 2021

2. 学会発表

1. 中島 円 : iNPH の概念と GL 第 3 版作成コンセプト. 第 21 回日本正常圧水頭症学会, 名古屋, 27. July – 14. Aug. 2020.
2. 川村海渡, 中島 円, 宮嶋雅一, 秋葉ちひろ, 蒲原千尋, 荻野郁子, 新井 一: DNAH14 変異マウスにおける脳室上衣線毛機能障害と遅発性慢性水頭症の発現. 第 21 回日本正常圧水頭症学会, 名古屋, 27. July – 14. Aug. 2020.
3. 中島 円 : iNPH: ガイドラインに沿った診断の現状と課題. 第 40 回日本脳神経外科コンgres 総会 (The 40th Annual Meeting of The Japanese Congress of Neurological Surgeons), 金沢, 12. Aug. 2020.
4. 中島 円 : シャント治療の予後因子を考慮した 特発性正常圧水頭症重症度分類の提案.

第 79 回日本脳神経外科学会学術総会 (The Japan Neurosurgical Society), 岡山, 16. Oct. 2020.

5. 中島 円 : “改善する認知症” 特発性正常圧水頭症 (iNPH) を見落とさない為の最新 EBM を知る～iNPH ガイドライン第 3 版 改定のポイントと Stroop Test アプリケーションの有用性～. 第 39 回日本認知症学会学術集会, 名古屋, 27. Nov. 2020
6. 中島 円 : Neuropsychological tests are useful for predicting comorbidities of iNPH. 第 39 回日本認知症学会学術集会, 名古屋, 27. Nov. 2020
7. 中島 円, 原 毅, 川村海渡, 宮嶋雅一: 髄液 シャントにより脊髄症をきたす overshunting-associated myelopathy の治療. 第 22 回日本正常圧水頭症学会, 岩手, 21. Feb. 2021.
8. 中島 円 : iNPH 治療のオーバービュー: 現状と課題. 第 22 回日本正常圧水頭症学会, 岩手, 21. Feb. 2021.

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

Boron neutron capture therapy (BNCT) が播種・浸潤に及ぼす効果の検討

研究代表者 近藤 夏子¹⁾
研究分担者 棗田 学²⁾, 藤井 幸彦²⁾

1) 京都大学複合原子力科学研究所 粒子線腫瘍学 2) 新潟大学脳研究所 脳神経外科教室

研究要旨

膠芽腫は予後が極めて悪く、再発は必発である。その再発形式は局所再発が80%以上である。我々はホウ素中性子補足療法(Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)を再発膠芽腫患者に対して行い、予後を延長してきた。BNCTはBoronophenylalanine (BPA)を投与し、ホウ素¹⁰Bを取り込んだ腫瘍細胞に熱中性子が照射されると、¹⁰Bと熱中性子が反応し α 粒子とLi反跳核が発生する。これらは極短飛程の高Linear Energy Transfer(LET)放射線で腫瘍細胞を選択的に破壊・死滅させる。しかし、BNCT後も再発する。我々は細胞間コミュニケーションツールとして注目されている、細胞外小胞の中のexosomeがBNCT後の再発と関係があるかを調べる。

A. 研究目的

膠芽腫は手術・化学放射線療法を用いても生命予後は極めて悪く15か月~18か月である。通常は局所再発が80%以上であるが、細胞選択的高LET放射線治療であるホウ素中性子捕捉療法(BNCT)によって腫瘍の局所制御の向上が可能となってきた。しかしそれでも再発を防ぐことは困難である。先行研究でX線照射後Glioma細胞から放出されたexosomeのmiRNAが非照射のGlioma細胞に浸潤を促すことが報告されている。本研究ではBNCTによってGlioma細胞から放出されるexosomeのsmall RNAを抽出し、播種・細胞死・免疫誘導などの因子や他の再発に関わる因子が含まれるか否かを調べる。本研究によるexosomeの解析から、膠芽腫のBNCT後の再発を制御し生存期間を延長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)

1. 膠芽腫細胞U87 delta EGFRの細胞培養液中に含まれるexosomeをBNCT照射群、非照射群から抽出する。

①Exosome freeのFetal bovine serum (FBS)をDulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)培地中に10%添加し、膠芽腫細胞(U87MG)を37℃CO₂インキュベーターで2日間程度培養する。BPA非投与・非照射群、BPA投与非照射群、BNCT

群、BPA非投与・熱中性子照射群の4群を作る。BPA投与群は25ppmの濃度でBPAを照射前日に添加する。1群 3×10^6 個以上の細胞を準備する。

②PBSでリンス、トリプシン処理を行い 1×10^6 cells/mLの濃度でBPA 25 ppm添加あり or なしのDMED培地(FBS free)中に細胞懸濁液を作る。エッペンチューブに移し、京都大学複合原子力科学研究所の重水中性子線照射設備(レール)で熱中性子線照射を1時間行う。

③各細胞群を1000rpmで3分遠心後、上清を捨てexosome free FBS 10% DMEM 1mlに細胞懸濁液を作り、9mlの同培地を入れた10 cm dishに播種する(1×10^6 cells / dish)。

④各群、播種48時間後に培養上清を50mlチューブに回収し、2000 rpm 20分4℃で遠心後、0.2 μ mの滅菌フィルターでろ過し、-80℃で凍結保存する。Dishの細胞はRNA用サンプルとしてQIAzolで溶解し凍結保存した。

⑤④で保存した培養上清を融解し、遠心式限外ろ過フィルターユニット(アミコンウルトラ-15, 100kDa)を用いて4℃、4000Gで2時間、遠心し、500 μ Lに濃縮する。

⑥ サイズ排除クロマトグラフィー法・qEV original カラムを用いて PBS500 μL 中にエクソソームを回収する。そのうち、450 μL は -80°C で凍結保存する (proteomics 解析用)。

⑦ 残りの exosome in PBS 50 μL のサイズ・濃度を qNano ナノ粒子マルチアナライザーを用いて測定する。

C. 研究結果

4 群の exosome の粒子径は直径 50-150nm であることを確認 (平均直径 110-120nm) した。それぞれの exosome の濃度 (/mL) は BPA 非投与・非照射群が 3.46×10^9 、BPA 投与・非照射群 2.79×10^9 、BNCT 群 9.07×10^8 、BPA 非投与・熱中性子照射群 1.29×10^9 であった (3 回分の平均値)。

D. 考察

安定した exosome 回収が本手法によって可能になった。Exosome 濃度はアナライザー解析のたびに、増減するため、そこに注視せず exosome 中に存在する small RNA (micro RNA) の解析を行うことが肝要である。今後、凍結保存 exosome から total RNA を抽出し、その中の small RNA を増幅しシーケンスを行う予定である。

E. 結論

BNCT 群には存在し、BPA 投与・中性子非照射群や BPA 非投与・中性子照射群には存在しない micro RNA は、腫瘍細胞が BPA を取り込み、ホウ素 (^{10}B) と熱中性子が反応することにより発生した $\text{N}\alpha$ 反応に起因する。 $\text{N}\alpha$ 反応は他の放射線治療には存在しない high Linear Energy Transfer 放射線を発生するので、BNCT の殺細胞効果の特徴や、誘引する免疫応答を明らかにする可能性が高い。また再発抑制のための因子を見つけることができると考える。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表 未発表

2. 学会発表 未発表

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

未定。

RNA-Seq 解析を用いるがん性疼痛と難治性神経障害性疼痛に 関連分子の探索・同定

研究代表者 伊藤 誠¹⁾

研究分担者 池内 健²⁾, 原 範和²⁾, 原 範和²⁾, 舩津 宣雄³⁾, 松村 伸治³⁾, 片野 泰代³⁾

1) 大阪医科薬科大学麻酔科 2) 新潟大学脳研究所 3) 関西医科大学医化学講座

研究要旨

乳がん、肺がん、前立腺がんをはじめ多くのがんは骨に転移して、進行に伴い増強する持続的な痛みと体動に伴う突発痛を誘発する。骨がん性疼痛は侵害受容性と神経障害性要素を併せ持ち、抗神経成長因子(NGF)抗体が効果を示す。皮膚と骨に一次求心性線維を投射する神経細胞は後根神経節(DRG)に局在し、触刺激を受容する中、大型細胞と疼痛刺激を受容する小型細胞が混在する。痛みを伝える小型細胞は NGF 受容体 TrkA を発現する。本研究では、RNA-seq 解析を用いてがん性疼痛や難治性神経障害性疼痛に関連する分子を探索・同定するために、TrkA-LacZ マウスを用いて骨がん性疼痛モデルを作製した。現在、がん性疼痛が現れたマウスの DRG から単離浮遊細胞を調製し、骨への投射、TrkA 発現の有無で単離浮遊細胞をセルソーターで4つの画分に分取し、RNA-seq 解析を進めている。

A. 研究目的

高齢社会を迎えた日本では、がんが死亡原因のトップにあり、がん性疼痛の緩和ケアが重要になっている。本研究では、がん性疼痛モデルの後根神経節や脊髄から調製した mRNA や難治性神経障害性疼痛の手術標本の神経や皮膚組織から調製した mRNA を用いて RNA-Seq 解析を行い、疼痛関連分子の探索と同定を試みることを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

TrkA-LacZ マウスの脛骨にがん細胞を注入し骨がん性疼痛モデルを作製する。脛骨に逆行性蛍光色素を注入し、骨に投射する DRG 細胞を標識する。がん細胞注入10日後に DRG を取り出し、コラゲナーゼ処理をして単離細胞を調製する。単離細胞を蛍光色素による LacZ 染色を行い、セルソーターで蛍光強度を指標に4画分の分取を行う。

4画分から抽出した RNA を新潟大学脳研で RNA-seq 解析を行う。無処置マウスから同様に抽出した RNA をコントロールとして比較検討する。

C. 研究結果

1回の実験でセルソーターで分取された画分の細胞数は、収量のいい場合は1,000から10,000細胞/画分、悪い場合は200から3,500細胞/画分と実験ごとにばらつきがある。予備実験ではあるが、後者で調製した RNA は1 ng/μL で RIN 値は8以上であり、RNA の質は担保されている。

現在、RNA-seq 解析結果の統計処理ができるように、サンプル調製を進めている段階である。

D. 考察

共同研究の開始当初は、典型的な難治性神経障害性疼痛患者の手術摘出標本の神経や皮膚組織(倫理委員会承認済)の RNA-seq を行ったが、統計処理ができず、標的を絞れないこと、RNA が合成される DRG は解析できないことから、マウスの実験にシフトした。

マウスの DRG は小さく、細胞数はせいぜい10,000である。セルソーターでの分取のストラテジーは TrkA 陽性、骨投射神経の有無で4分割するというシンプルなものであるが、単離浮遊細胞

を作製する段階で、TrkA の細胞外部分は酵素処理されるのか、TrkA 抗体で染色される陽性細胞は数個から数 10 個で、RNA を回収できる段階に至らなかった。

TrkA に代わる表面マーカーがないことから、TrkA-LacZ マウスを用いることにした。TrkA-LacZ マウス受精卵を輸入し繁殖させるのに、関西医大の動物飼育実験共同施設の厳格な規則により、実験に使用可能な TrkA-LacZ マウスの繁殖に 1 年以上費やし、2021 年になりやっと軌道に乗り始めた。

疼痛研究の分野で RNA-seq による報告はすでになされているが、発現が変化する遺伝子の列挙で、search レベルで research (研究) レベルに達していない。1990 年代から進展した疼痛研究の知見は蓄積しているので、それに RNA-seq を組み合わせることにより、新たな展開が期待される。

本研究の準備段階で、我々が 1998 年に単離同定した転写因子 *Movo* (*Ovol2*) の標的遺伝子が本共同研究で明らかになったことを報告する。

Movo はショウジョウバエの卵形成に関与する遺伝子 *ovo* のマウスの相同遺伝子で、ノックアウトマウスは E9.5 から E10.5 で胎盤形成不全、血管形成不全、神経管閉鎖不全などで胎生致死になる。成体マウスでは主に精巣に発現し、精子形成に関与することが示唆された。

Movo の機能を解明するために E7.5, 9.5, 12.5, 18.5 の (コンディショナル) ノックアウトマウス、ヘテロマウスの RNA サンプルを RNA-seq 解析を行い、*Movo* の標的遺伝子候補が見つかった。現在、そのつめの実験を行っている。*

以前に *Movo* のノックアウトマウス作製の発表をしたときに、DNA マイクロアレイで *Movo* の標的遺伝子を解析したが、候補を見つけることができなかったのも、長年の懸案事項である。

**Movo* に関する論文作成のための実験中なので、詳細は記載しなかった。

E. 結論

RNA-seq は非常に強力な実験方法であるが、結果を得るには、RNA サンプル調製が重要と考える。我々は、新潟大学脳研究所の池内研究室との共同研究で研究が進められたことに感謝する。

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

なし

**Movo* に関する論文作成のための実験中なので、詳細は記載しなかった。

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

認知症関連疾患リスク遺伝子（特に *ACE*, *ABCA7*, *FUS* に関して）検索

研究代表者 赤津 裕康¹⁾
研究分担者 宮下 哲典²⁾, 原 範和²⁾, 池内 健²⁾

1) 名古屋市立大学大学院医学研究科地域医療教育学 2) 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野

研究要旨

福祉村病院の保有する認知症関連疾患患者の脳解剖症例から得た凍結脳を用いて認知症関連疾患における各種リスク遺伝子の検索を進めた。その中でアルツハイマー病患者脳での *ABCA7* 遺伝子多型解析において、日本人特有のバリエーションを発見した昨年度の結果を受け、継続的・発展的な共同研究を展開した。

A. 研究目的

認知症関連疾患のリスク遺伝子検索により認知症の原因、リスクファクターなどの検討を行い、診断、治療に役立てることを目的とする。

スタンプロティング、及び RNA-seq 解析を行った。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

福祉村病院の保有する認知症関連疾患患者の脳解剖症例から得た凍結脳由来ゲノム DNA、全 RNA を脳研にある次世代シーケンサーを用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行うと共に、全エクソーム解析や全ゲノム解析を行い、疾患との遺伝学的関連性を検討する。

D. 考察

認知症の姉妹例（福祉村病院：検体 ID = 1808、1817）における解析では、既報の候補遺伝子に病的バリエーションを認めなかったが、全エクソーム解析によって、複数の候補遺伝子を列挙することに成功した。今後、各遺伝子の機能的な側面を精査し、疾患との関連付けを行う。FTLD 剖検例（福祉村病院：検体 ID = 0825）、*ABCA7* にアミノ酸置換を伴うバリエーション (p. Ile1690Thr) を保因する剖検例の解析については、現在データの精査を行っている。

C. 研究結果

- 1) 認知症の姉妹例（福祉村病院：検体 ID = 1808、1817）における *PSEN1*、*PSEN2*、*APP*、*MAPT*、*GRN*、*BSN* の候補遺伝子解析、及び全エクソーム解析を行った。
- 2) FTLD 剖検例（福祉村病院：検体 ID = 0825）における *TARDBP* の候補遺伝子解析、及び全エクソーム解析を行った。
- 3) *ABCA7* にアミノ酸置換を伴うバリエーション (p. Ile1690Thr) を保因する剖検脳のウエ

E. 結論

来年度も引き続き興味深い症例の候補遺伝子シーケンシング、全エクソーム解析を継続し、1 症例でも多く、原因・感受性遺伝子との関連付けを行っていく。結果的に病態解明につながるものと期待されるので、本研究の意義は十分である。

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

第 39 回日本認知症学会学術集会（名古屋）：ポスター発表「ヒト死後脳に由来する DNA、RNA の品質管理」（長谷川舞衣、宮下哲典、春日健作、原範和、月江珠緒、齋藤祐子、赤津裕康、橋詰良夫、柿田明美、吉田眞理、村山繁雄、池内健）

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

筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病変の評価

研究代表者 高堂 裕平¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾、清水 宏²⁾、樋口 真人¹⁾、小野 麻衣子¹⁾

1) 量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 2) 新潟大学脳研究所・病理学分野

研究要旨

これまでの神経病理学的検討から、筋強直性ジストロフィー (DM1) において異常タウ蛋白が蓄積することが明らかになってきたが、DM1 患者脳においてイメージングでタウタンパクの存在を捉えた報告はなかった。これまで実施し得た [¹⁸F] PM-PBB3 リガンドによる DM1 患者 4 名 (40 代~50 代) でのタウ PET のうち、1 例においてタウ病変の集積をとらえた可能性が示唆され、さらに複数例において白質にタウを疑う所見が示唆された。本年度は、[¹⁸F] PM-PBB3 の信号上昇とタウの存在の関連性を検討するため、[¹⁸F] PM-PBB3 イメージングの解析法の検討を進めた。タウオパチーとして進行性核上性麻痺患者のデータを用い、小脳、皮質、白質のどの領域が参照領域として適しているかを検討した。結果、皮質が最も安定した参照領域として使用できる可能性が示唆された。今後、DM1 の PET データにおいても本手法を応用して検討することで、より正確な評価が実現できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では量子科学技術研究開発機構で開発されたタウ PET リガンドである [¹⁸F] PM-PBB3 を用い、筋強直性ジストロフィー (DM1) 患者におけるタウ病変を生体脳で画像化できる可能性を検討してきた。今年度は、DM1 患者脳で得られた [¹⁸F] PM-PBB3 の信号上昇がタウ病変をとらえている可能性を検証するため、タウ PET 画像の解析法を改良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)

方法：タウ PET トレーサー [¹⁸F] PM-PBB3 を用いて得られた PET データ (進行性核上性麻痺 (PSP) および健常者) において、これまで実施してきた小脳を参照領域とする方法に加え、新たな参照領域の選択法としてヒストグラム法を用いた。PET データの信号をヒストグラム表示し、bimodal ガウシアン分布のフィッティングを実施、皮質および白質の信号の低い部分を選択しそれらを参照領域として評価に用いた。小脳はこれまでのとお

り Free Surfer を用いて領域の選択を行った。

C. 研究結果

ヒストグラム法を用いて、皮質、白質の参照領域の選択を行うことができた。ヒストグラム法によって領域を抽出する方法は Matlab を用いてカスタムメイドのスクリプトにより実施した。小脳、皮質、白質のそれぞれの領域における Standardized Uptake Value (SUV) を比較したところ、健常人ではほぼ同一の集積であったが、疾患群 (PSP) においては小脳への取り込みが高いことが確認された。小脳、皮質、白質のそれぞれを参照領域として視床下核の Standardized Uptake Value Ratio (SUVR) を算出すると、皮質を参照領域とした場合、ROC 解析で最も高い AUC が高くなった。そして健常群での白質の参照領域は、小脳比でみた場合、年齢と SUVR が逆相関していることが確認された。一方、健常群の皮質の参照領域は小脳に比して年齢による変化は認めなかった。皮質を参照領域として視床下核の SUVR を算出し

たところ、PSP の重症度（PSP rating scale (PSPRS)）と正の相関が示され、その r 値は小脳を参照領域とした場合よりも高値となった。

D. 考察

タウオパチー（PSP）の PET データを用いて皮質、白質、小脳のそれぞれを参照領域として比較検討したところ、皮質を参照領域とした場合に最も良好な結果が示された。PSP においては小脳にもタウが集積することが知られているため、皮質を参照領域とした場合の評価がより安定した可能性もあり、今後は小脳病変が明らかとされていない DM1 において本解析手法が有用であるか、検証が必要であると考えられた。さらに、これまでの DM1 症例は認知障害の程度が軽微であるため、より重度の症状がみられる患者でも検証することが必要であると考えられた。

E. 結論

タウ PET イメージングの評価系は、参照領域を工夫することでこれまで以上に正確にタウ病変を描出できる可能性が示唆された。今後は今回開発した手法を DM1 脳に応用することや、認知症の明らかな例での撮像により認知症とタウ蓄積の関連を検討することが必要であると考ええる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Tagai K, Ono M, Kubota M, et al. High-Contrast In Vivo Imaging of Tau Pathologies in Alzheimer's and Non-Alzheimer's Disease Tauopathies. *Neuron*, 109(1): 42-58 (2020)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

脳研究に必須な遺伝子改変マウスの系統保存に重要な培養条件の検討

研究代表者 久慈直昭¹⁾
研究分担者 笹岡俊邦²⁾、小田佳奈子²⁾

1) 東京医科大学産科婦人科学分野 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

2020年度本研究では、recHA濃度を0.1%より増加させると胚発生率が低下する原因を特定し、より高濃度アルブミンでのマウス胚培養を可能とすることを目的として実験を行った。そこで、市販されているヒト体外受精培養液と同様にOAとともにNATをrecHAに加え、加熱滅菌してから培養液を調整してマウス1細胞期胚の培養実験をおこなった。OA 400 μ MとともにNAT 400 μ Mを加え、その後recHAを加熱滅菌して培養液を作る系を構築したところ、アルブミン濃度を従来の0.1%から0.5%に増加させても胚盤胞発生率が低下しないことが明らかになった。

A. 研究目的

ヒト体外受精初期胚培養液のほぼすべてに含まれるHSAは血漿由来製剤である。混入ウイルス不活化目的の低温殺菌のために、オクタン酸（以下OA）が600-1200 μ M程度添加されており、血清中のOA濃度（0.2 μ M程度）と比較して異常に高い。本研究は、マウス受精卵が胚盤胞期までの体外培養期間中にOAに高濃度曝露することにより、当該胚およびそれから出生する産仔の形質や遺伝子にどのような影響を与えるかを解析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）

（2019年度）（OAを含まない）遺伝子組み換えHSA（以下recHA）濃度0.1、0.5、1.0%の培養液に0-1200 μ MまでのOA濃度を添加、各群における初期胚の発生スピード、胚盤胞到達率を検討する。OA濃度による発生率の差が最小となるタンパク濃度において、0-1200 μ MOA添加培養胚を移植、産仔の出生率と出生後の体重変化を検討する。（2020年度）各OA濃度群で72時間にて胚盤胞に達した胚のみについて、1）胚盤胞、および2）発生した産仔臓器、における遺伝子変化（遺伝子発現、メチル化）を検討する。また

同一HSA濃度・同一OA濃度の群において、形態学的には同一で発生速度の異なる（day 5とday 6）胚盤胞の遺伝子変化を比較する。さらにOAに暴露したF1群内部、およびF1と元系統（C57BL/6N）の雄・雌で戻し交配を行い、F2世代の出生仔の体重・臓器重量等を観察する

C. 研究結果

2019年より実験開始、まず遺伝子組み換えアルブミン濃度が1.0%（w/v）では0.1%に比較し、培養液中OA濃度にかかわらず1細胞期より胚盤胞への発生率が82.5%から60%へ低下することが明らかになった。この原因がアルブミン濃度によるものか、OA以外に添加されているN-Acetyl-Tryptophane（NAT）の影響か、それともアルブミンの加熱滅菌の有無による影響か、を確認するため、本年度に胚培養実験を行った。培養実験は研究代表者が考案し、これを研究分担者である笹岡俊邦、小田佳奈子両博士が新潟大学脳研究所においてアルブミン調整、マウス胚培養液調整と培養実験をおこなった。

その結果、1.0%および0.5%アルブミン濃度で、NAT存在化・OA400 μ M・NAT400 μ M添加群では胚盤胞への発生率がそれぞれ93%、43%とな

った。今後、0.5%濃度で、NAT 濃度を変えずに OA 濃度を变化させて加熱滅菌後のアルブミン添加培養液での発生実験を行い、一定の培養成績が得られたところで移植実験へ進む予定である。

D. 考察

当初 2020 年度に予定されていた移植実験は、培養系の確立が遅れたことと、covid-19 感染症蔓延によって、遅れている。

しかし 2020 年度の検討結果から、これまでの OA を recHA に添加する実験系ではなく、市販されている体外受精培養液と同様 OA とともに NAT を加え recHA を加熱滅菌して培養液を作る系を構築することが可能となり、さらに少なくともアルブミン濃度を 0.5%に増加させても胚盤胞発生率が低下しないことが明らかになった。

2021 年度以降、この系で OA 濃度を变化させて胚発生を見るとともに、移植実験を行って胎仔・新生仔発育および胎盤重量の観察を行う予定である。

E. 結論

市販されている体外受精培養液と同様 OA 400 μ M とともに NAT 400 μ M を加え、その後 recHA を加熱滅菌して培養液を作る系を構築し、アルブミン濃度を従来の 0.1%から 0.5%に増加させても胚盤胞発生率が低下しないことが明らかになった。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1: Tezuka A, Shiina K, Fujita Y, Nemoto Y, Nakano H, Fujii M, Yazaki Y, Yamashita J, Sakai Y, Kuji N, Nishi H, Chikamori T. Efficacy of combined estrogen-progestin hormone contraception therapy for refractory coronary spastic angina in very young women. J Cardiol Cases. 2020 Feb 27;21(5):200-203.

2: Watanabe C, Nagahori M, Fujii T, Yokoyama K, Yoshimura N, Kobayashi T, Yamagami H, Kitamura K, Takashi K, Nakamura S, Naganuma M, Ishihara S, Esaki M, Yonezawa M, Kunisaki R, Sakuraba A, Kuji N, Miura S, Hibi T, Suzuki Y, Hokari R. Non-adherence to Medications in Pregnant Ulcerative Colitis

Patients Contributes to Disease Flares and Adverse Pregnancy Outcomes. Dig Dis Sci. 2020 Apr 6.

3: Tsuchida N, Kojima J, Fukuda A, Oda M, Kawasaki T, Ito H, Kuji N, Isaka K, Nishi H, Umezawa A, Akutsu H. Transcriptomic features of trophoblast lineage cells derived from human induced pluripotent stem cells treated with BMP 4. Placenta. 2019 Oct 9;89:20-32

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)

神経変性疾患モデルマウスのヒト疾患との連関

研究代表者 大滝 博和¹⁾
研究分担者 柿田 明美²⁾

1) 昭和大学・医学部・顕微解剖学 2) 新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

Pin1 はアミロイド前駆タンパク質 (APP) やタウタンパク質代謝の律速酵素である。報告者は Pin1 KO マウスの脳に抗 APP 抗体陽性反応を高頻度に認めている。本研究はその実態解明とヒト神経変性疾患との関連を調べた。Pin1 KO の脳をヘマトキシリン・エオジンを始めとした形態染色を行うと APP 陽性反応はエオシン好性視床封入物と一致することを認めた。APP 抗体を用いアルツハイマー病様マウスや病患者剖検脳を染色すると老人斑に一致して陽性反応が認められたが Pin1 KO とは一致しなかった。さらに、ピック病や C9orf 筋萎縮性側索硬化症患者剖検脳とも異なる反応を示した。しかし筋硬直性ジストロフィーの剖検脳において Pin1 KO と類似した APP 陽性反応が認められた。この結果は Pin1 KO と筋硬直性ジストロフィーとの関連性を示唆する。

A. 研究目的

神経変性疾患は超高齢社会を迎え増加している。しかし、その発症や進展の機構はいまだ十分に解明されておらず、その予防・治療法が明らかとなっているものはほとんどない。Pin1 はペプチド結合の cis-trans 回転を触媒する酵素として知られており、タンパク質のフォールディングに関わっている。Pin1 が触媒するタンパク質は多岐におよぶが、アミロイド前駆タンパク質やタウタンパク質のリン酸化スレオニン（もしくはセリン）とプロリン（pThr[Ser]-Pro）構造のプロリンの不斉炭素の cis-trans 回転を触媒すること、さらにその触媒がこれらタンパク質の代謝の律速段階であることが明らかとなりアルツハイマー病を始めとする神経変性疾患への関与が示唆された。その遺伝子欠損マウスは加齢性の神経の異常を呈することが報告されている。さらに、アルツハイマー病患者や前頭側頭葉認知症 (FTD) の Pin1 のメチル化および酵素活性を調べたところ、アルツハイマー病患者は Pin1 の活性が高く、FTD は活性が低くなっておりヒトにおける認知症へのかわりも示唆されている。

申請者はこのような背景のもと Pin1 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて脳の加齢変化の研究を行ってきた。しかしヒトの神経変性疾患とのかかわりは全く分かっていない。当該研究は新潟大学脳研究所が所有する脳神経変性疾患に関わる資源の協力を得て、Pin1 遺伝子欠損マウスの病理組織学所見とヒト神経変性疾患患者（アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ピック病、筋ジストロフィー等）の組織学的特徴を比較・検討し Pin1 欠損マウスの病態がヒトのどのような神経変性疾患に類似するか検討する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

【ヒトおよび動物使用に関わる倫理的配慮】ヒト神経変性疾患患者の剖検脳の使用は昭和大学医学研究科「ヒトを対象とする研究等に関する倫理委員会」の承認後、昭和大学医学研究科長の研究実施許可の後に行った。

Pin1 KO マウス、APP KI マウスおよびその動物実験は、昭和大学 第二種使用等拡散防止措置計画および昭和大学動物実験計画の機関承認の後に実験プロトコールに従い研究を行った。

ヒトの剖検脳はアルツハイマー病、ピック病、C9orf 筋萎縮性側索硬化症および筋硬直性ジストロフィー患者それぞれ1例の組織切片を新潟大学脳研究所「脳神経病理標本資源活用 of 先端的共同研究拠点」の支援を受け提供された。

【マウスの組織切片の作成】

マウスの脳はペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔下にて心臓より生理食塩水に引き続き 10% 中性緩衝ホルマリンの還流固定により固定し、情報に従いパラフィン切片を作成した。

【形態染色】

Pin1 KO マウスから得た脳前額断切片を用いキシレン・アルコールによる脱パラフィン後に以下の形態染色を行った。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色, トルイジン青 (TB) 染色, ルクソール・ファスト青・クレシール紫 (LFB-CV) 染色, コンゴ赤染色, ダイレクト・ファースト・スカーレット 4BS 染色

【アミロイド免疫染色】

マウス (Pin1 KO, APP KI) および神経変性疾患患者剖検脳は脱パラフィンのち、クエン酸緩衝液において抗原の賦活化を行った。その後、過酸化水素による内因性ペルオキシダーゼ活性の不活性化および 5% 正常ウマ血清により非特異的タンパク結合ブロックした。その後、ウサギ抗 APP (1-14) 抗体 (abcam) を用い反応し、Biotin 化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体にて検出した。

C. 研究結果

老齢の Pin1 KO マウスに増加する APP 陽性反応を形態染色を用い特性を調べた。その結果、この陽性反応と一致して視床の神経細胞の核に付随して HE 染色でエオシン好性が認められた。これらは TB 染色で陰性もしくは非常に弱く、LFB-CV で髄鞘染色に類似した明るい青を呈した。しかし、アミロイド染色であるコンゴ赤およびダイレクト・ファースト・スカーレット 4BS 染色では反応を認めなかった。さらにこれらの切片をアミロイドを検出可能な偏光レンズで観察して検出されなかった。これらの特徴はヒトの視床に増加するエオシン陽性視床封入体と一致した。そこで、抗 APP (1-14) 抗体を用いてアルツハイマー病様病態を示す APP KI マウスと新潟大学脳研究所から分与された各種ヒト神経変性疾患の剖検脳を用いて免疫染色を行った。アルツハイマー病患者脳

において抗 APP (1-14) 抗体は脳皮質の老人斑に一致して陽性反応を認め、APP KI マウスの脳皮質においても類似した陽性反応を認めた。このことはこの抗 APP (1-14) 抗体はアミロイドプラークに反応することが分かる。しかし、Pin1 KO においてそのような脳皮質における反応はほとんど認められアルツハイマー様病態とは全く異なることが明らかとなった。そしてピック病、C9orf 筋萎縮性側索硬化症においてもアルツハイマー病とは異なるがそれぞれ陽性反応を認めたが、Pin1 KO のそれとは異なった分布をしめした。しかし、一方で筋硬直性ジストロフィー患者の視床において Pin1 KO と類似した核に付随した APP 陽性反応を認めた。さらに、この患者の HE 染色像を調べたところエオシン好性の視床封入体であることが明らかとなった。

D. 考察

当該研究において報告者は Pin1 KO マウスで認められる抗 APP 抗体により検出される封入体はエオシン好性視床封入体であることを認めた。しかし、この封入体はアミロイドを検出するコンゴ赤やダイレクト・ファースト・スカーレット 4BS 染色および偏光レンズによる観察ではできない。これはこの封入体はアミロイド蛋白から構成されるがベータシート構造を呈していない可能性を示唆する。また、このアミロイド陽性視床封入体は硬直性筋ジストロフィー患者でも高度に認められる。これまで申請者は Pin1 KO が認知機能・社会性・落ち着きなどに障害があることは認めているが、硬直性筋ジストロフィーとの関連は全く認められておらず、報告もない。今後、本疾患患者の剖検脳の例数を増加し再現性を調べるとともに Pin1 KO が硬直性筋ジストロフィー患者の表現型との相違性を調べ、Pin1 の欠損もしくは Pin1 酵素活性の低下が及ぼす硬直性筋ジストロフィーとの関連を明らかにしていきたい。

E. 結論

当該研究の結果、Pin1 KO で認められる視床 APP 陽性反応はエオシン好性視床封入体であることが明らかとなった。これは筋硬直性ジストロフィーの病態を関連する可能性を示した。

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. 学会発表

1. 大滝博和, 田中優希, 内田隆史, 桐山恵介, 本田一穂. Pin1K0 マウスにおける視床に増加する β アミロイド陽性反応の経時的解析. 第 125 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (オンライン) 2020/3/25~27
2. 大滝博和, 田中優希, 内田隆史, 吉川輝, 小野 賢二郎, 本田 一穂. Pin1 遺伝子欠損マウスは視床核にアミロイド封入体が増加する. 第 43 回日本神経科学大会 (オンライン) 2020/7/29~8/1

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

統合失調症モデルザルの脳病理学的変化の研究

研究代表者 中村 克樹¹⁾
研究分担者 柿田 明美²⁾、那波 宏之²⁾

1) 京都大学霊長類研究所 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

統合失調症の発症には遺伝的要因だけではなく、サイトカインの異常が関与していることが示唆されている。新生児期サイトカイン曝露により精神疾患モデルマーモセットを京都大学霊長類研究所で作出してきた。新生児期サイトカイン曝露された個体では、成獣になったばかりの頃に、およそ50%の個体で何らかの行動異常が観察される。観察された行動異常としては、多動やアイコンタクトの異常がある。さらに、前頭葉の機能を必要とする認知課題の成績低下などがみられている。本研究では、疾患モデルマーモセットの脳組織の異常の有無を検討することにより、疾患モデルの妥当性の評価および病態解明を目指す。今年度は、1頭のサイトカインを新生児期に暴露したコモンマーモセットの脳組織を検索したが、明らかな神経変性や新旧の炎症像、あるいは組織破壊像は認められなかった。

A. 研究目的

インターフェロン治療や感染などを契機としたサイトカインへの曝露により、様々な精神症状が出現することや、統合失調症患者の死後脳でサイトカイン発現の異常が見られることから、統合失調症の発症には遺伝的要因だけではなく、サイトカインの異常が関与していることが示唆されている。これまでに新潟大学的那波教授の指導のもと、新生児期サイトカイン曝露により精神疾患モデルマーモセットを京都大学霊長類研究所で作出してきた。新生児期サイトカイン曝露された個体では、成獣になったばかりの頃に、およそ50%の個体で何らかの行動異常が観察される。観察された行動異常としては、多動やアイコンタクトの異常がある。さらに、前頭葉の機能を必要とする認知課題の成績低下などがみられている。本研究では、行動や脳機能の評価が終了した疾患モデルマーモセットにおける脳組織の異常の有無の検討を、新潟大学脳研究所の柿田教授のご協力の下実施することにより、疾患モデルの妥当性の評価および病態解明を目指す。

B. 研究方法（

新潟大学脳研究所では京都大学霊長類研究所から送った、固定された後の脳サンプルを用いて、組織を検索する。よって、動物実験の実施はない。疾患モデル作出に関しては、京都大学において動物実験委員会の審査を経たのち、京都大学総長の承認を得て、関連法規を遵守しながら実施した。

今年度は、行動評価や脳機能評価を実施したコモンマーモセット1頭（新生児期にEGFを投与した個体）の脳を、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した後に、冠状面切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色、クリューバー・バレラ染色、抗GFAPおよび抗TH抗体で免疫組織化学染色を実施してもらった。

今年度の個体は、行動学的には異常行動は確認されていない個体であった。

C. 研究結果

大脳、小脳、脳幹の神経細胞配列に特に異常所見を見出せなかった。神経細胞脱落は明らかでは

なく、反応性アストロサイトーシスも惹起されている部位を指摘できなかった。TH陽性神経細胞数は十分観察された（対照との比較はおこなっていない）。左大脳半球の脳梁体直下に、小さな石灰化層が認められた。対側には認めず。病的意義は不明。

D. 考察

この1頭の脳には、少なくとも、明らかな神経変性や新旧の炎症像、あるいは組織破壊像は認められなかった。この個体は明らかな行動異常が観察されていなかったため、今後は行動異常を示した個体での検索を実施する。また、より詳細は分子の発現動向や機能的解析が必要かもしれない。

E. 結論

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

脳腫瘍の原因遺伝子変異を特異的に抑制する siRNA 核酸医薬品開発

研究代表者 程 久美子 1)
研究分担者 藤井 幸彦 2)

1) 東京大学・大学院理学系研究科・生物科学専攻 2) 新潟大学・脳研究所

研究要旨

小児の髄芽腫は小児脳腫瘍の中でももっともよく発生する悪性脳腫瘍のひとつである。近年の次世代シーケンシング法を用いたゲノム解析技術の進展により、髄芽腫には WNT シグナル経路や SHH シグナル経路が関与するグループと、それらとは異なるグループである Group 3, Group 4 髄芽腫という4グループがあることがわかった。本研究では、それぞれのグループにおいて1塩基の変異が入ることによって、がんドライバー遺伝子として作用する遺伝子を選定し、変異型遺伝子を正常型遺伝子と区別して特異的に抑制できる siRNA の開発をおこなった。その結果、WNT 髄芽腫の原因遺伝子である CTNNB1、および Group 4 髄芽腫の原因遺伝子である ZMYM3 に対する siRNA は、変異型遺伝子は極めて特異的に抑制するのに対し、正常型遺伝子に対する抑制効果はほぼ認められなかったことから、特異的治療薬の候補と考えられた。

A. 研究目的

小児髄芽腫の発症には神経発生に関わる WNT シグナル経路や SHH シグナル経路の異常が関与する。分子遺伝子診断に関する近年の研究の進展により、その原因遺伝子が特定されてきた。本研究では、それらががんドライバー遺伝子を脳研で保有する病理標本を用いて明らかにし、対応する特異的な抑制効果を示す siRNA を開発し、さらに脳研で樹立された腫瘍細胞株に対する有効性を検討する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究では、WNT, SHH, Group 3, Group 4 髄芽腫で、遺伝子変異が顕著にみられる遺伝子の中から特に WNT 髄芽腫では CTNNB1 と TP53、SHH 髄芽腫では SMO, MYCN, TP53、Group3 髄芽腫では SMARCA4 と MYC、Group 4 髄芽腫では ZMYM3 遺伝子に着目する。これらの遺伝子は、がん細胞において極めて特異的な塩基に変異が誘発されることがわかっている。たとえば CTNNB1 の場合、41 番目

のアミノ酸のコドンの1番目の塩基はアデノシンであるが、グアノシンへと変異しているものが極めて多い。そのため、トレオニンがアラニンへと変異して遺伝子機能に異常が生じ、髄芽腫形成の原因になっている可能性が示唆されている。申請者らは、先行研究で「よく効く siRNA を選択するための配列上の規則性」を明らかにした。しかし、変異が入った CTNNB1 だけを正常型と区別して抑制しようとする場合、このような従来型の方法に基づいた配列設計は不可能である。そこで、本研究では申請者らのこれまでの siRNA 開発における知見を駆使して、従来法に依存せず、変異型 CTNNB1 を特異的に抑制する siRNA の新たな設計法を構築する。(1)まず正常型と変異型 CTNNB1 は区別できないが、両者を同時に抑制し、他のすべてのヒト遺伝子に対しては抑制作用のない CTNNB1 特異的 siRNA を選択する。(2)次に個別の変異型 CTNNB1 遺伝子を正常型と区別して抑制する siRNA を開発する。(1)と(2)に関しては、

アッセイ系としてレポーター遺伝子を用いる。さらに、CTNNB1 変異に対応する siRNA を導入し、正常型と変異型 CTNNB1 遺伝子の mRNA を区別して定量することで内在遺伝子に対する効果も確認する。さらに、siRNA を導入した細胞から total RNA を抽出し、マイクロアレイや RNA シークエンスを行うことで、CTNNB1 以外の遺伝子に対するオフターゲット効果の影響をゲノムワイドに解析する。同様の方法を他の遺伝子に対しても実施し、将来的にはがん細胞を導入したマウス個体での CTNNB1 siRNA の有効性を確認し、医薬品としての可能性を検討する。

C. 研究結果

小児髄芽腫のドライバー遺伝子の中で、WNT 髄芽腫における CTNNB1 と TP53、SHH 髄芽腫の SMO、MYCN、TP53、Group 3 髄芽腫の SMARCA4 と MYC、Group 4 髄芽腫の ZMYM3 遺伝子において 1 塩基の変異が入った遺伝子のみを抑制し、正常型は抑制しない siRNA の配列設計をそれぞれおこなった。その結果、ZMYM3 と CTNNB1 に対する siRNA は、変異が入った遺伝子は極めて特異的に抑制されるのに対し、正常遺伝子にはほぼ抑制効果が認められなかった。一方で、MYCN と SMO に対する siRNA は、正常型の抑制効果は弱かったが、変異型の抑制効果もあまり強くなかった。また、SMARCA4 に対する siRNA は、変異型はよく抑制していたが、正常型にも抑制効果が見られた。

D. 考察

MYCN と SMO に対する siRNA は小児髄芽腫に対する siRNA 核酸医薬品として有用である可能性がある。これらの siRNA の投与によって小児髄芽腫由来の細胞の増殖が抑制されるかどうかを検討する必要がある。

E. 結論

本研究で開発した、少なくとも MYCN と SMO に対する siRNA は 1 塩基の違いを区別して変異型遺伝子のみを特異的に抑制可能であることが明らかとなった。

MYCN と SMO 遺伝子の作用機序を脳研で保有する病理標本を用いて明らかにし、開発した siRNA の有効性を脳研で樹立された腫瘍細胞株を用いて検

討することで、核酸医薬品としての開発につなげることが可能と考えられた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

1. 程久美子、RNA 干渉の分子機構解明と特異的 siRNA 分子設計法に基づく応用的手法の開発、東京医科大学・大学院特別講義・神経発生セミナー（2020.12.17）@東京医科大学&Zoom
2. 程久美子、RNA 干渉の分子機構解明にもとづく siRNA 配列設計法の開発、東京理科大学 核酸創薬研究部門 第 3 回シンポジウム（2020.12.5）Zoom 開催
3. 程久美子、核酸医薬品による神経難病治療～開発から実用化、今後の展望～、Oligonucleotide Therapeutics Seminar 神経難病治療の最前線（2020.11.24）Online
4. 程久美子、個別化医療のための次世代型 siRNA 分子設計、第 9 回中分子創薬に関わる次世代産業研究会 IMD2（2020.9.11）Online
5. 程久美子、RNA 干渉の分子機構と siRNA 分子設計、第 27 回 HAB 研究機構学術年会「モダリティの多様性を支える創薬研究、基盤技術」（2020.9.3）Online

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

2021 年 1 月 16 日申請予定

疾患モデル動物の作製、保存、繁殖に関する最先端技術の開発

研究代表者 竹尾 透¹⁾

研究分担者 中尾 聡宏¹⁾、中川 佳子¹⁾、笹岡 俊邦²⁾

1) 熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野, 2) 新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野

研究要旨

近年、ゲノム編集技術の進歩により、様々な動物種で遺伝子改変動物の作製が可能となった。特にラットは、マウスと比較し、脳の高い認知機能、よりヒトに近い代謝経路、同所移植が可能な臓器サイズを持つ等の特徴から、疾患モデル動物として遺伝子改変ラットの作製が急速に進んでいる。しかしながら、遺伝子改変ラットを効率的に作製、保存、繁殖するための生殖工学技術は未だ確立されていない。そこで本研究では、ラット生殖工学技術の確立を目指し、これまで凍結が極めて困難であったラット精子に対する凍結保存法および体外受精法の開発を行った。本研究では、凍結前にラット精子を0℃で十分に予冷することで、融解後も高い運動性、受精能を有した精子の凍結保存に成功した。本研究により開発された凍結保存技術は、遺伝子改変ラットの系統保存技術として、疾患モデルラットの作製、保存、繁殖に関するグローバルスタンダードとなることが期待できる。

A. 研究目的

近年、ゲノム編集技術の目覚ましい進歩により、マウスのみならず様々な動物種で遺伝子改変動物の作製が可能となった。特にラットは、生理試験、薬理試験、行動解析などで、広く利用されており、ヒト疾患モデル、創薬・毒性ヒト代謝モデル、脳機能行動解析モデルおよび再生医療移植モデル等の遺伝子改変ラットが急速に作製されつつある。

遺伝子改変ラットの効率的な作製、保存、繁殖のためには、生殖工学技術の利用が有用であるが、体外受精や配偶子の凍結保存法など、種々の生殖工学技術の開発は進んでおらず、未だ確立の域には達していない。そこで本研究では、疾患モデルラットの効率的な作製、保存、繁殖を可能とする生殖工学技術の開発を目指し、ラット精子の凍結保存法および体外受精法の開発を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

精子は成熟雄ラット (SD-Tg (CAG-EGFP) 40sb) より

採取し、卵子は幼若雌ラット (SD) より採取した。精子の凍結保存液は、中務らの方法を参考とした (Reproduction 2001)。ラット精子は、保存液中へ採精後、氷上 (0℃) で十分に予冷を行った後に、液体窒素を用いて凍結保存した。

凍結・融解後の精子の運動性を、運動性解析装置を用いて評価した。また、凍結精子の受精能を、体外受精により評価した。さらに、体外受精により得られた二細胞期胚は、体外培養による発生率および胚移植による産子率を評価した。体外培養により得られた胚盤胞および、胚移植により得られた産子は、GFP の陽性率を評価した。なお、本研究は、熊本大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

凍結精子は、新鮮精子と比較し運動性および直進運動性の低下が認められた。しかしながら、その他の精子運動性パラメータの低下は認められなかった。凍結精子は、新鮮精子と比較し体外受精

における受精率の低下が認められたが、受精率 80%以上の高い受精能を示した。体外受精により得られた二細胞期胚は、体外培養により正常に胚盤胞へと発生し、胚移植により正常に産子へと発生した。また、胚盤胞および産子の半数から GFP 陽性が確認できた。

D. 考察

本研究では、ラット精子を凍結する前に、十分な予冷を行うことで、融解後も高い運動性および受精能を有したラット凍結精子の作製に成功した。さらに胚移植により凍結精子由来胚からの個体作製も可能となったことから、効率的な遺伝子改変ラットの作製、保存に有用であると考えられる。今後、各種系統ラットの凍結精子の作製法、体外受精法に関しても検討を進めていく予定である。

E. 結論

本研究により開発されたラット精子凍結保存技術は、世界中で作製されている遺伝子改変ラットの系統保存技術として大きく貢献すると共に、疾患モデルラットの作製、保存、繁殖に関する先端技術として急速に普及し、グローバルスタンダードとなることが期待できる。また、当センターでは本研究成果をもとにラットバンク事業を開始した。今後も、さらなるラット生殖工学技術の開発に取り組むことで、ラットを利用した生命科学研究に積極的に貢献していきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagata N, Mikoda N, Nakao S, Nakatsukasa E, Takeo T. Establishment of sperm cryopreservation and in vitro fertilisation protocols for rats. Scientific Reports.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-57090-7>

2. 学会発表

1. 凍結精子を用いた遺伝子改変ラットの体外受精について
第 67 回日本実験動物学会総会 2020 年 5 月 23 日

2. 熊本大学 CARD におけるラット各種系統の体外受精について
第 67 回日本実験動物学会総会 2020 年 5 月 23 日
3. 熊本大学生命資源研究・支援センターにおけるラット有償バンクシステム
第 67 回日本実験動物学会総会 2020 年 5 月 23 日
4. ラット生殖工学技術の開発
第 14 回ラットリソースリサーチ研究会 2021 年 1 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
出願中
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

筋萎縮性側索硬化症におけるイノシトール 6 リン酸キナーゼの役割

研究代表者 永田 栄一郎¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾, 水間 敦士¹⁾, 中山 平¹⁾, 伊藤 誠敏¹⁾, 藤井 奈津子¹⁾

1) 東海大学医学部内科学系神経内科 2) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

イノシトールリン酸は、生体内に広く存在し、生物活性を示す分子で、様々な生命現象を引き起こすことが知られている。しかし、イノシトール 6 リン酸 (IP6) や 7 リン酸 (IP7) に関してはその役割は十分に解明されていない。研究申請者らは、この IP6、IP7、IP6 を IP7 にリン酸化する酵素であるイノシトール 6 リン酸キナーゼ (IP6K) と神経変性疾患との関連を研究してきた。特に IP6K は中枢神経系に多く存在し、ハンチントン病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) で活性が上昇しており、神経細胞死を促進していることを明らかとした。しかし、生体内の IP6、IP7 を定量的に測定することは不可能であったが、近年、我々はその測定法を確立した。そこで、ALS において、IP6、IP7 を測定および機能解析することにより、新たな ALS 病態メカニズムの解明および疾患特異的バイオマーカーの可能性につき検討する。

A. 研究目的

本研究の目的は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の脊髄において、IP6、IP7 を我々が開発した質量分析の手法を用いて定量測定を行い、コントロール検体と比較検討する。この測定方法により世界で初めて IP6、IP7 定量測定ができるようになった。それにより、IP6、IP7 の比率を計算して、我々が、培養細胞実験や動物実験で報告してきた結果と合致するかを検討する。その結果、ALS の神経細胞死に IP6 を IP7 にリン酸化する酵素の IP6K が関与していることを明らかとする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

IP6、IP7 の測定に関しては、研究申請者らが独自に開発した方法で定量測定を行う (J Chromatogr A, 2018)。各サンプルをホモジェネートした後に

過塩素酸で分離して、TiO₂ ビーズを添加して、TiO₂ ビーズにイノシトールリン酸を吸着させて、10%アンモニア水でイノシトールリン酸を溶出した後のサンプルを親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic interaction chromatography : HILIC) カラムを用いて LC/MS 分析を行う。それにより、微量な IP6、IP7 を定量測定する。既に研究申請者らは ALS 患者の血液、髄液検査、剖検脳、脊髄に関して東海大学倫理委員会の承認を得ている (承認番号 : 10R-010)。これにより ALS 患者の IP6、IP7 とコントロールと比較検討する。

C. 研究結果

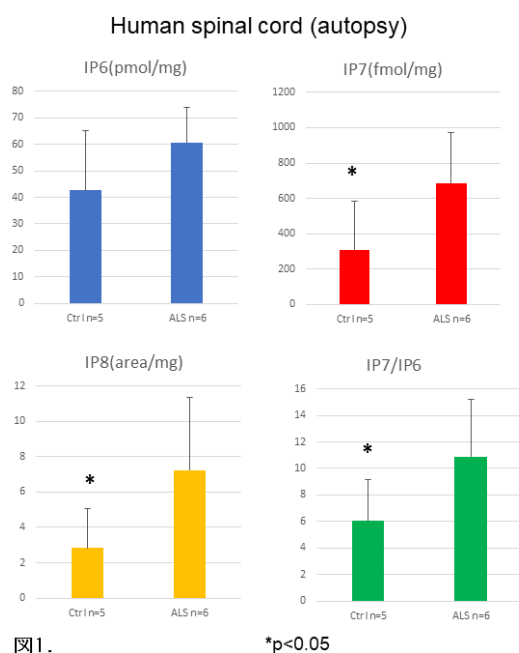


図1.

現在、コントロール5例（年齢 70 歳前後）、ALS 患者6例（年齢 70 歳前後）の凍結脊髄サンプル（胸髄）のイノシトール6リン酸（IP6）、7リン酸（IP7）、8リン酸（IP8）を測定中した。コントロールと比較してALS患者で、IP7、IP8の値が有意に高値であった。また、IP6とIP7の比率（IP7/IP6：IP6からIP7への生成量）でもALS患者で有意に高値を示した（図1.）（未発表データ）。

検体に関しては、新潟大学脳研究所・病理学分野 柿田 明美教授のご紹介で、今回は日本ブレインバンクネット（JNNB）の村山 繁雄 先生（元：東京都健康長寿医療センター・神経内科・高齢者ブレインバンク・神経病理・部長；現：大阪大学大学院医学系研究科・神経内科学講座・特任教授）、齋藤 祐子 先生（東京都健康長寿医療センター・老年病理学研究チーム（神経病理学）研究部長）、および高尾 昌樹 先生（国立精神・神経医療研究センター・臨床検査部長）より供給して頂いた。

D. 考察

今回のALS患者脊髄と神経疾患以外で亡くなられたコントロールの脊髄において、ALS患者では、IP7、IP8、ならびにIP7/IP6が有意にコントロールと比較して高値を示したこの結果は、以前の我々の報告よりALS患者末梢血中のIP6、IP7、さらにはIP7/IP6が、年齢をマッチさせた健常者コ

ントロールの値より高値を示しているという結果の裏付けとなった。また、IP7/IP6の増加により、IP6をIP7にリン酸化するIP6キナーゼ（IP6K）の活性化が起こっており、このことよりIP6、IP7、IP6Kは、ALS病態に深く関与していることが、以前の我々の培養細胞の研究結果などからも推察され、さらにALS診断バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。今後さらなる症例の追加を行い、より鮮明にIP6、IP7、IP6KのALS病態への関与を確立していく必要がある。

E. 結論

IP6、IP7は、ALS病態に深く関与しており、ALSの重要な新たな神経細胞死メカニズムの一端をなしており、今後IP6、IP7を標的とした創薬開発も期待される。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

本年度はなし。

2. 学会発表

本年度はなし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

「試薬中のイノシトール7リン酸の定量方法」（特願2018-129423）（出願人：東海大学；発明者：伊藤誠敏、永田栄一郎、藤飯奈津子）（出願日：2018年7月6日）

ヒト特異的な脳細胞は果たしてあるのか？ シングルセル比較トランスクリプトーム・エピゲノム解析

研究代表者 郷 康広¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾、那波 宏之³⁾

1) 自然科学研究機構 生命創成探究センター 認知ゲノム研究グループ 2) 新潟大学 脳研究所 病理学分野 3) 新潟大学 脳研究所 分子神経生物学分野

研究要旨

ヒトとヒトに最も近縁な類人猿の死後脳を用いたシングルセルトランスクリプトーム・エピゲノム解析を行うことで、ヒト脳の特異性を担保する「ヒト特異的な脳細胞」を同定することを目的とした。令和2年度は新型コロナウイルスの世界的蔓延とそれに伴う共同研究が大幅な制約を受けたため、新規の死後脳試料の収集を行うことができなかった。しかし、マウスや小型霊長類のマーモセットの脳試料を用いて、凍結脳試料にも適用可能な細胞核からのシングルセルトランスクリプトーム・エピゲノム解析のための実験プロトコルの最適化、解析細胞核数およびサンプル数の大幅なスループット向上に向けたプロトコル開発を進めた。令和3年度は、それらをヒトおよび類人猿の死後脳試料に用いて、研究を強力に推進する予定である。

A. 研究目的

シングルセルトランスクリプトーム・エピゲノム解析技術を用いることで、一度の実験で数万の単一細胞の個性を定量化することが可能になりつつある。それらの技術を用いたヒトとマウスの大脳皮質のシングルセル比較発現解析から、ヒト特異的な抑制性神経細胞が同定されつつある。本研究では、ヒトと類人猿の死後脳複数脳領域を対象としたシングルセル比較トランスクリプトーム・エピゲノム解析をおこなうことにより、ヒト脳の特異性を担保する「ヒト特異的な脳細胞」を同定することに挑戦する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

ヒトと類人猿の死後脳から単一細胞核の調整を行い、核内転写産物（トランスクリプトーム）およびクロマチン状態（エピゲノム）の計測を行う。具体的には、ヒト3検体と類人猿4種8個体（チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、テナ

ガザル）の死後脳3領域（大脳前頭前野、海馬、小脳）を用いて、DAPIまたは7-AAD陽性細胞核をフローサイトメトリーにより回収を行い、10x Genomics社Chromiumシステムを用いたシングル核トランスクリプトーム解析（single-nucleus RNA-seq）およびクロマチン解析（single-cell ATAC-seq）を行う。ヒトと類人猿4種の死後脳3領域からそれぞれ1万細胞核に相当する発現情報とクロマチン状態に関する情報を取得する。得られた情報をもとにノンパラメトリック次元削減法であるUMAP法による次元削減と可視化、教師なし学習によるクラスター分類をおこない、類人猿には認められないヒト特異的な脳神経系細胞が存在するかどうかを明らかにする。そのような細胞の存在が認められた場合、それらの細胞集団を規定する発現マーカー遺伝子を同定し、ヒト死後脳および比較対象としてチンパンジー死後脳のスライス標本を用いたin situ ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学的手法を用いて、該当細

胞集団の局在や形態的・解剖学的特徴を明らかにする。

ヒトの死後脳に関しては脳研究所が保有する凍結脳標本から、類人猿死後脳に関しては、ナショナルバイオリソースプロジェクト大型類人猿情報ネットワーク（GAIN）の下で京都大学霊長類研究所が保有する凍結脳標本から試料の採取を行う。ヒト脳試料に関しては、自然科学研究機構および新潟大学において「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の承認を得て研究を行う。類人猿脳試料に関しては、京都大学霊長類研究所共同利用研究の制度のもと、物質移動合意書（MTA）を交わした後、研究に用いる。

C. 研究結果

ヒトや類人猿は実験動物ではないため、新鮮な生細胞を得るための脳試料を入手することが難しい。そのため、シングルセル解析に通常用いられる生細胞ではなく、凍結試料でも使用可能と考えられている細胞核を用いたシングル核解析の実験プロトコル・解析パイプラインを構築する必要がある。令和2年度は、マウス凍結脳を用いた脳組織分散、細胞核の単離、シングル核トランスクリプトーム解析用ライブラリ作成、シーケンス、情報解析の各ステップの最適化を行った。その結果、一度の実験で一つのサンプルから約1万細胞核分の発現情報を得るプロトコル・パイプラインを構築することができた。また、生物学的反復実験（biological replicate）数を増大させるために、複数のサンプルを事前のタグ付けすることなしに、解析的に個体の変異情報から区別するための情報解析手法を構築した。このことにより、コストの増大なしに生物学的反復実験数（＝サンプル数）を増やすことが可能となり、より頑強な統計解析を行うことが可能となった。さらに、解析対象細胞（核）数を約20倍向上させるためのプロトコルを開発し、予備実験を行うためのプロトコルの検討を行った。

一方で、令和2年初頭からの新型コロナの世界的蔓延に伴う所属機関（自然科学研究機構）および関係機関（新潟大学脳研究所、京都大学霊長類研究所）における感染拡大防止措置等による大幅な研究制限のため、死後脳試料の収集が令和2年

度は達成できなかった。そのため、ヒト死後脳、類人猿死後脳を用いた研究に関して進展の遅れが見られる。

D. 考察

新型コロナ感染拡大のため、令和2年度は新規の死後脳試料の収集ができなかった。しかし、マウスやマーモセットの脳試料を用いたシングルセルトランスクリプトーム・エピゲノム解析に関する実験と解析手法の最適化と解析対象細胞核およびサンプル数のハイスループット化に関して開発を進めることができた。

E. 結論

令和2年度に開発・最適化を行った実験系を用いて令和3年度にヒトおよび類人猿死後脳を用いた実験を推進する。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. 該当なし

2. 学会発表

1. 郷康広，辰本将司，石川裕恵「ヒトとチンパンジーの選択的スプライシングの多様性解析とその脳内表現」第36回日本霊長類学会，2020年12月，オンライン開催

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

脳神経筋疾患モデルマウスにおける超過剰排卵誘起処理と反復採卵による 系統保存システムの開発

研究代表者 高橋 利一¹⁾

研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 後藤 元人¹⁾, 横山 峯介¹⁾, 保田 昌彦¹⁾

1) 公益財団法人 実験動物中央研究所、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

遺伝学的に均一な疾患モデルマウス系統の維持生産では兄妹交配が用いられている。しかし、生殖系列細胞で発生するゲノム変異に対し、その変異の蓄積により発生する遺伝的浮動(ジェネティックドリフト)への対策は重要な課題である。そこで本研究では「1ペアからできるだけ多くの系統保存胚をストックするシステム」を目指し、超過剰排卵誘起法、反復採卵法を駆使し、採卵システム構築する。

反復採卵処置技術の確立のための外科的処置採卵後の卵管切開の再付着の検討をおこなった。外科的処置採卵後の卵管切開痕の自然治癒には8週間は必要であった。また注射三種混合麻酔下での採卵した卵子は死滅卵子が多く、胚移植後の着床率ならびに産仔率も低下することがわかった。今後は、接着剤塗布法や採卵時の手技を工夫し、反復採卵処置技術の確立を目指すとともに過剰排卵誘起法との併用でB6-mdxの系統保存胚作成で実地検証をおこなう。

A. 研究目的

脳神経筋疾患の研究者に、遺伝的に均一なモデル動物を効率的かつ確実に頒布するシステムを構築することは、研究推進に極めて重要である。近交系の脳神経筋疾患モデルマウスの維持生産において、継代中にランダムに発生するゲノム変異とその蓄積により発生する遺伝的浮動(ジェネティックドリフト)への対策は、均一な実験動物の生産供給を継続するために重要な課題である。米国のジャクソン研究所においては、卵巣体外培養など生殖工学技術を駆使し、「1ペアからできるだけ多くの系統保存胚をストックするシステム」を考案し、ジェネティックドリフト対策をおこなっている。

本研究では、遺伝的に均一なモデル動物の効率的かつ確実な作出と研究者への頒布のため、過剰排卵誘起法に反復採卵を組み合わせる事により課題解決を目指す。ジャクソン研究所システムも並行して実施し、効率比較や統合した採卵システム構築を目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

反復採卵処置技術の確立のための検討

1. 外科的処置採卵後の卵管切開の再付着の検討

MCH(ICR) 19-27週齢雌マウスを用い、過剰排卵処置(5IU eCG - 5IU hCG)後、三種混合麻酔下で、背部を切開し、卵管膨大部にマイクロ剪刀で切れ込みをいれ、卵丘卵子複合体(COC)を採取し、排卵数をカウント後、体外受精により受精率を算出した。その後、2、4、6、8週間後に再度、過剰排卵処置をおこない、頸椎脱臼による安楽死後、上記同様、排卵数、受精率を算出した。

2. 組織接着剤を使用した手術後の卵管切開の再付着の検討

MCH(ICR) 12-14週齢雌マウスを用い、過剰排卵処置(5IU eCG - 5IU hCG)後、三種混合麻酔下で、背部を切開し、卵管膨大部にマイクロ剪刀で切れ込みをいれ、卵丘卵子複合体(COC)を採取し、排卵数をカウント後、体外受精により受精率を算出した。卵管膨大部の切開部に組織用接着剤(ダ

ーマボンド、アロンアルファ A) を塗布し、コラーゲン繊維シートで覆った。その後、2 週間後に再度、過剰排卵処置をおこない、頸椎脱臼による安楽死後、上記同様、排卵数、受精率を算出した。

3. 注射麻酔下採卵卵子の死滅卵母細胞の確認

先行論文で、吸入麻酔より注射麻酔下の採卵では死滅卵子が多いとの報告があったので、MCH (ICR) 19-21 週齢雌マウスを用い、過剰排卵処置 (5IU eCG - 5IU hCG) 後、三種混合麻酔下で、採卵し、排卵卵子における死滅卵子数と断片化卵子数をカウントした。

4. 注射三種混合麻酔下採卵卵子での産子率

1. で作出した頸椎脱臼安楽死後採卵した卵子からの受精卵 (コントロール) と三種混合麻酔下で採卵した卵子からの受精卵 (麻酔下採卵) を偽妊娠マウスの卵管へ胚移植し、新生児への発生率と着床率を算出した。

C. 研究結果

1. 外科的処置採卵後の卵管切開の再付着の検討

採卵間隔は、1 度目から 2, 4, 6 週間後では、卵管膨大部に排卵卵子はほとんど見られなかったが、8 週間後では 75% で排卵卵子がみられた。

雌 1 匹当たりの排卵数は、安楽死後のコントロールでは 14 個、麻酔下では 16.6 個、8 週間後の 2 度目採卵では 20 個と、8 週間後の 2 度目採卵でもコントロール等と遜色なく採卵出来ることが分かった。採卵卵子の受精率は、コントロールで 92.9%、8 週間後の 2 度目採卵で 96.7% であったのに対して、麻酔下採卵卵子は 58.6% と低いことが分かった。

2. 組織接着剤を使用した手術後の卵管切開の再付着の検討

卵管膨大部での排卵卵子はダーマボンドの 33.3% よりアロンアルファの 50% の方が、多く見られた。雌 1 匹当たりの排卵数は、安楽死後のコントロールで 35.6 個、過剰排卵後切開をせず、2 週後に再度過剰排卵をしたもので 34.6 個、アロンアルファで 33.4 個、ダーマボンドで 21 個、アロンアルファ+コラーゲンシートで 24.6 個とアロンアルファのみがコントロールと同等の排卵数

がみられた。

採卵卵子の受精率は、コントロールで 96.3%、過剰排卵後切開をせず、2 週間後に再度過剰排卵をしたものは 89.9%、ダーマボンドで 95.2%、アロンアルファで 54%、アロンアルファ+コラーゲンシートダーマボンドで 67.6% とアロンアルファは、受精率は低値を示した。

3. 注射麻酔下採卵卵子の死滅卵母細胞の確認

採卵卵子を正常、断片化、死滅に分類した。それぞれコントロールでは、34.5 個、20 個、0.5 個に対して、麻酔下採卵では、38.2 個、16.2 個、6.3 個と死滅卵子が多い傾向がみられた。

4. 注射三種混合麻酔下採卵卵子での産子率

胚移植後の着床率ならびに産子率は、それぞれコントロールで 88.2% と 64.7% に対して、麻酔下採卵では、63.9% と 41.7% と低い傾向がみられた。

D. 考察

外科的処置採卵後の卵管切開痕の自然治癒による再付着には、8 週間後では、切開痕も塞がり、コントロールと同様の排卵数採取が可能であったことから、8 週間は必要であることがわかった。組織接着剤を使用した手術後の卵管切開痕の再付着は、アロンアルファでコントロールと同等程度の採卵が可能であったが、アロンアルファで採卵した排卵卵子の体外受精率は低値を示した。これよりアロンアルファの接着効果は高いが、体外受精には負の影響があるのかもしれない。

先行論文同様、注射三種混合麻酔下で採卵した卵子は死滅卵子が多く、また胚移植後の着床率ならびに産仔率もコントロールよりも 20% も低値を示した。これは注射三種混合麻酔下では採卵操作時間が長くなることで卵子への悪影響があり、それにより死滅卵子が多くなり、産子への発生率も低下したのだと考えられる。

E. 結論

外科的処置採卵後の卵管切開痕の自然治癒には 8 週間は必要である。注射三種混合麻酔下での採卵した卵子は死滅卵子が多く、胚移植後の着床率ならびに産仔率も低下した。

今後は、接着剤塗布法や採卵時の手技を工夫し、上記の問題改善に取り組み、反復採卵処置技術の確立を目指す。また過剰排卵誘起法との併用でB6-mdx の系統保存胚作成で実地検証をおこなう。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

神経幹細胞での遺伝子変異による腫瘍化メカニズムの解析

研究代表者 金村 米博¹⁾

研究分担者 藤井 幸彦²⁾、武井 延之²⁾、岡田 正康²⁾、棗田 学²⁾

1) 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 先進医療研究開発部

2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

脳腫瘍（グリオーマ）発生メカニズムとして、神経幹細胞の増殖/分化の過程で遺伝子変異が入り、シグナル系に異常をきたした結果、制御されない分裂増殖が引き起こされたことがその原因の一つであると推察される。このような神経幹細胞の腫瘍化メカニズムの解明を目的に、患者由来脳腫瘍細胞（GDC）と2種類の正常細胞（ヒト神経組織由来神経幹/前駆細胞およびヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞）の遺伝子発現を RNA sequencing 法を用いて比較検討した。その結果、高い類似性を示した2種類の正常細胞に対して、GDCは正常細胞と同じクラスターに含まれる細胞と別クラスターに分類される細胞の大きく2グループに大別され、GDC内でも複数のサブグループに分類可能であることが明らかとなり、GDCと正常細胞との遺伝子発現差の更なる詳細な解析細胞特性に関わる遺伝子・シグナル伝達系の同定とその機能解析の重要性が示唆された。

A. 研究目的

脳腫瘍が治療困難である理由の一つとして、腫瘍の heterogeneity を説明する自己増殖能と多分化能をもつ多能性幹細胞の存在が考えられている。正常神経幹細胞と脳腫瘍幹細胞の比較により、神経幹細胞の増殖/分化の過程のどこに異常が起こり、どのようなシグナル伝達系の異常が生じたかのみならず、共通の増殖メカニズムを理解することができる。

脳研の腫瘍病理標本の解析を踏まえて、培養系で生細胞を用いて神経分化/脱分化シグナルの解析を行う。細胞は申請者の持つヒト神経幹細胞及び脳腫瘍患者由来腫瘍幹細胞と脳研究所、脳神経外科分野で樹立した脳腫瘍患者由来腫瘍幹細胞を用いる。mRNA、蛋白及び代謝産物の解析を通じ、神経分化と正常細胞周期/分化過程を外れた腫瘍細胞の特性を明らかにする。

以上の実験より異常を来しているシグナル系

の同定を行い、その経路を遮断あるいは活性化する低分子化合物や核酸医薬の開発を目指す。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. 研究に使用したヒト由来細胞

大阪医療センター医学倫理委員会承認下、EGF/FGF2を含む無血清培地を用いた浮遊培養系を使用して樹立した、①患者グリオーマ腫瘍組織に由来し、tumorsphere 形成能を有した状態で長期維持培養が可能なグリオーマ幹細胞を含む初代グリオーマ由来細胞（glioma derived cell: GDC）、neurosphere 形成能を有した状態で増幅培養が可能な、②ヒト神経組織由来神経幹/前駆細胞（hN-NSPC）、および③ヒト iPS 細胞から分化誘導して作製した神経前駆細胞（hiPSC-NPC）、を本研究に使用した。

2. 遺伝子発現解析

脳研および大阪医療センターが協力して、樹立済

GDCからtotal RNAを分離し、Agilent社Bioanalyzerで品質を確認した後、illumina社TruSeq stranded mRNA sample prep kitを用いてライブラリー作製後、次世代シーケンサー(illumina社HiSeq2500またはHiSeq3000)を用いたRNA sequencing (RNA-seq)を実施して、遺伝子発現解析を実施した。対照細胞としてはhN-NSPCおよびhiPSC-NPCを使用した。

C. 研究結果

正常細胞であるhN-NSPC (oh-NSC-3-fb, oh-NSC-7-fb) および hiPSC-NPC (1201C1-NPC-A, 1201B2-NPC-A)の遺伝子発現に関しては類似性が高いことが確認された。これら2種類の正常細胞にGDCの遺伝子発現情報を加えた条件で実施したクラスター解析の結果では、GDCは正常細胞と同じクラスターに含まれる細胞と別クラスターに分類される細胞の大きく2グループに大別されることが明らかとなり、さらにGDC内でも複数のサブグループに分類可能であることが明らかとなった(図)。

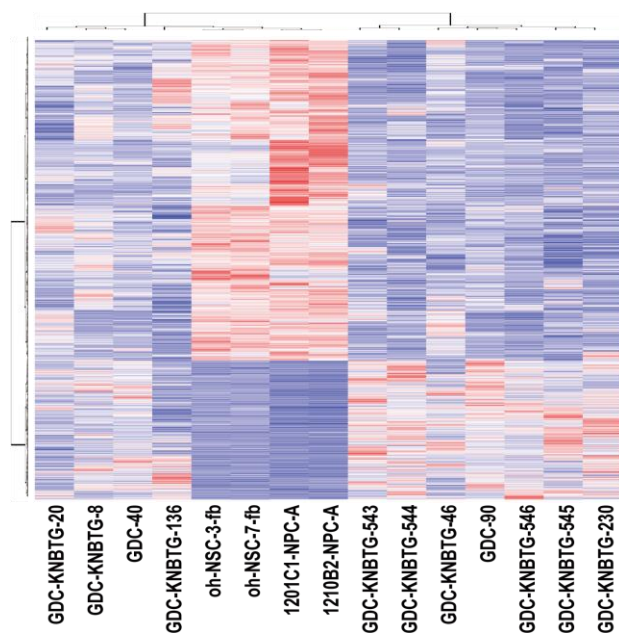


図: 遺伝子発現解析(クラスター解析)

D. 考察

GDCと正常細胞(hN-NSPC および hiPSC-NPC)との間には一定の類似性があることが明らかになったと同時に、正常細胞と腫瘍細胞では同様の細胞形態を有しても、遺伝子発現の上で大きな特性差が存在する可能性を示唆する結果であると考察された。

今後、これらGDCの遺伝子発現特性の更なる詳細な解析と、タンパク質レベルでの発現解析、並び

に細胞特性に関わる遺伝子・シグナル伝達系の同定とその機能解析が重要であると考えられ、次年度以降、順次進めていく予定である。

E. 結論

RNA sequencing法を用いた遺伝子発現解析にて、GDCは正常細胞(hN-NSPC および hiPSC-NPC)と同じクラスターに含まれる細胞と別クラスターに分類される細胞の大きく2グループに大別され、GDC内でも複数のサブグループに分類可能であることが明らかとなった。

今後、これらGDCと正常細胞との遺伝子発現差の更なる詳細な解析と、タンパク質レベルでの発現解析、並びに細胞特性に関わる遺伝子・シグナル伝達系の同定とその機能解析の重要性が示唆された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. 金村米博：総論 悪性脳腫瘍の基礎から臨床の現状. Medical Science Digest 46(8):3-5, 2020
2. 金村米博：小児脳腫瘍における遺伝子異常. 脳神経外科速報 2020 年増刊 悪性脳腫瘍のすべて—Neuro-Oncology の教科書—遺伝子診断時代の臨床リアルワールド (編集 杉山一彦, 橋本直哉), メディカ出版, 30-38, 2020

2. 学会発表

1. 金村米博：小児・AYA 世代脳腫瘍のゲノム・分子生物学的解析. 第79回日本癌学会学術総会, 2020年10月3日; 広島市
2. 金村米博, 森 鑑二：関西中枢神経腫瘍分子診断ネットワーク Gioma Research Resource Sharing System 構築. 一般社団法人日本脳神経外科学会第79回学術総会, 2020年10月16日; 岡山市

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し

3. その他
無し

発達期脳内微細構造の生体イメージングによる神経回路形成機序の解明

研究代表者 水野 秀信¹⁾
研究分担者 三國 貴康²⁾

- 1) 熊本大学国際先端医学研究機構 多次元生体イメージング研究室
2) 新潟大学脳研究所 細胞病態学分野

研究要旨

本研究の目的は、『生体脳内において神経細胞の内在性タンパク質の動態が神経回路形成に関わる仕組みを明らかにすること』である。昨年度まで研究で、発達期の大脳皮質神経細胞に対し内在性タンパク質を蛍光標識する SLENDR 法を適用し、内在性タンパク質を生体 2 光子顕微鏡イメージングすることに成功した。本年度は、内在性タンパク質と細胞形態を 2 重標識し同時観察する条件を見出した。今後 2 重標識した大脳皮質神経細胞を生体イメージングすることで、タンパク質動態と神経回路形成の関連が明らかになると期待される。また、本研究で開発される技術は病態モデルマウスにも適用可能であるため、病態解析にも貢献できることが期待される。

A. 研究目的

発達期における大脳皮質神経回路の正確な形成は、認知などの高次脳機能に必須である。正確な神経回路形成には細胞内で無数のタンパク質が働くことが必要である。しかし生体内においては、細胞内タンパク質の時空間的動態とその回路形成との関連はほとんど不明である。

これまでの多くの研究において、タンパク質の細胞内局在は、蛍光タンパク質と融合した目的タンパク質を外来的に導入しその蛍光を観察することで調べられてきた。しかし外来的導入では、タンパク質の発現量の制御が困難であり、しばしばタンパク質の細胞内分布を再現できない。この回避方法としては、蛍光タンパク質と目的タンパク質の遺伝子を融合したノックイン動物の作成が挙げられるが、高いコスト・長い作成期間・作成失敗リスクのため、普及は限られていた。近年、研究分担者三國らにより CRISPR/Cas9 法を用いた生体内の内在性タンパク質の蛍光標識法が開発されたことで (SLENDR 法, Mikuni et al., Cell 2016)、内在性タンパク質の生体イメージングの

可能性が広がった。しかし現在までのところ、SLENDR 法で標識されたタンパク質の分布は固定組織で解析されており、生体内でのタンパク質の動態解析はなされていなかった。

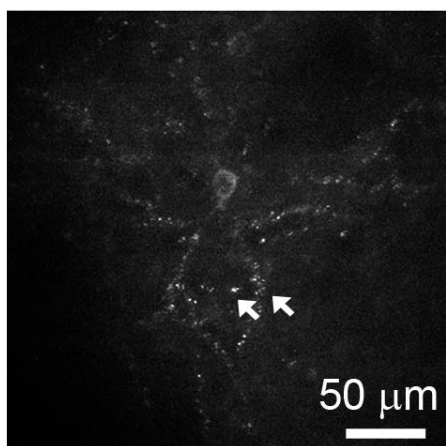
一方、研究代表者水野らは、これまでの研究で発達期マウス大脳皮質内の個々の神経細胞を生体 2 光子顕微鏡イメージングする方法を開発した (Mizuno et al., Neuron 2014; Cell Rep 2018)。本研究では、SLENDR 法と発達期マウス生体イメージング法を融合することで、神経回路形成期の内在性タンパク質の動態を明らかにすること、タンパク質の動態と回路形成の関連を調べることを目指した。

昨年度までの研究進展状況を以下にまとめる。

- ① SLENDR 法でシナプス部に局在するタンパク質を標的とした SLENDR 用プラスミドを新しく作成した。
- ② 作成したプラスミドを子宮内エレクトロポレーション法で導入することで、GFP と融合された内在性シナプス後部局在タンパク質を大

脳皮質第 2/3 層の興奮性神経細胞に発現させることができた。

- ③ GFP と融合したタンパク質の蛍光シグナルを、生後 3 週齢マウスにおいて生体 2 光子顕微鏡観察することに成功した (図)。



図、SLENDR 法で蛍光標識された内在性シナプス後部タンパク質の発達期生体イメージング

生後 16 日齢マウスの大脳皮質第 2/3 層興奮性神経細胞の観察例。GFP 融合したシナプス後部タンパク質 (矢印部) を生体 2 光子顕微鏡イメージングした。

しかしながら、細胞内タンパク質の動態と神経細胞形態の発達の関連を明らかにするためには、GFP 融合タンパク質を発現させた細胞において、同時に RFP など別の色の蛍光タンパク質を発現させ細胞形態を可視化する必要があった。2020 年度はその条件検討を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

研究に用いた手法は熊本大学の動物実験委員会において審査および承認されており、倫理面の配慮がなされている。

・子宮内エレクトロポレーション

麻酔下で妊娠 14 日齢マウスの子宮内の胎仔の脳に DNA 溶液を投与し、電気パルスを与えることで遺伝子導入した。その後、子宮を戻し腹部を縫合した。術後はマウスを保温し回復させた。

同一の胎仔に 2 度遺伝子導入を行う場合は、妊娠 14 日齢で遺伝子導入した胎仔に 12 時間後または 24 時間後に再度子宮内エレクトロポレーション法を適用した。

・生体イメージング

SLENDR 法で GFP 標識した内在性シナプス後部タンパク質の局在を生体観察するため、麻酔下においてマウスの頭部に 2 光子観察用窓および頭部を固定するための金具を取り付けた。術後はマウスを保温し回復させた。回復したマウスを用い、麻酔下において 2 光子顕微鏡で観察した。

・固定組織イメージング

生理食塩水を灌流したマウスの脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。固定脳を 30%スクロース/PBS 溶液で凍結保護し、凍結脳切片を作成し、脳切片をスライドガラスに封入した。その後共焦点顕微鏡で撮影した。

C. 研究結果

胎生 14 日齢において SLENDR 法を適用した胎仔に対し、12 時間後および 24 時間後に RFP 発現プラスミドの子宮内エレクトロポレーションを行ったところ、24 時間後にエレクトロポレーションした個体で、GFP 融合シナプス後部タンパク質と RFP を共発現している第 2/3 層興奮性神経細胞が観察された。

D. 考察

今回の研究では、24 時間の間隔でエレクトロポレーションした個体において共発現細胞が観察されたが、共発現細胞の割合は少なかった (1%未満と推定される)。生体イメージングで共発現細胞を見つけるためには、割合が多いことが望ましい。今後エレクトロポレーションの条件 (RFP 発現プラスミドのエレクトロポレーションのタイミング・遺伝子導入細胞数) をより洗練することで、共発現細胞の割合を増加させることができると期待される。

E. 結論

2020 年度の研究で、2 重標識細胞を生体イメージングできる可能性が開かれた。今後、生体イメージングで細胞内在性タンパク質の分布と神経細胞形態の発達の関連を明らかにできると期待される。本研究で用いるアプローチは、病態モデルマウスにも適用可能であるため、今後、発達障害や精神疾患の理解にもつながると期待される。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Mizuno H, Rao MS, Mizuno H, Sato T, Nakazawa S, Iwasato T. NMDA receptor enhances correlation of spontaneous activity in neonatal barrel cortex. *JNeurosci* 41, 1207-1217 (2021)
2. Rao MS, Mizuno H. Elucidating mechanisms of neuronal circuit formation in layer 4 of the somatosensory cortex via intravital imaging. *Neurosci Res* in press.

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

TDP-43 病変に結合する分子プローブの開発

研究代表者 小野 麻衣子¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾，清水 宏²⁾，樋口 真人¹⁾，高堂 裕平¹⁾

1) 量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門 2) 新潟大学脳研究所・病理学分野

研究要旨

TDP-43 タンパクは筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症などの発症と密接に関連しており、生体内での TDP-43 の蓄積を可視化する技術は、これらの疾患の早期診断や発症メカニズムの解明、TDP-43 を標的とする疾患治療薬の薬効評価に寄与することが期待される。本研究ではポジトロン断層撮影により TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する新規 PET プローブの開発を行う。

A. 研究目的

TDP-43 タンパクは筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症などの発症と密接に関連しており、生体内での TDP-43 の蓄積を可視化する技術は、これらの疾患の早期診断や発症メカニズムの解明、TDP-43 を標的とする疾患治療薬の薬効評価に寄与することが期待される。本研究ではポジトロン断層撮影 (PET) により TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する新規 PET プローブを開発するべく、前頭側頭葉変性症および筋萎縮性側索硬化症死後脳ホモジェネートを用いた親和性評価やオートラジオグラフィーにより新規 PET プローブ候補化合物の TDP-43 病変への結合性を評価する。良好な結合性が確認された候補化合物について、さらなる特性評価を *in vitro* および *in vivo* で行い、PET プローブとしての有用性を検証する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

対象：前頭側頭葉変性症および筋萎縮性側索硬化症の死後脳

方法：新規 PET プローブ候補化合物の TDP-43 病変への結合性を評価するために、PET 核種標識体候補化合物を用いて以下の解析を行う

① 死後脳組織ホモジェネートを用いた結合実

験 (homologous binding assay)

- ② 死後脳組織切片を用いたオートラジオグラフィ
- ③ 組織化学的解析 (免疫染色、 β シートリガンドによる蛍光染色)。

C. 研究結果

前頭側頭葉変性症死後脳固定標本を用いた組織化学的解析により、約 200 種の PET プローブ候補化合物において、TDP-43 病変への結合性評価を実施した。その結果、約 90 種の候補化合物において、高濃度溶液 (μ M) 中での化合物・TDP-43 病変間の結合を確認し、さらに、14 種の化合物では TDP-43 病変への結合選択性の向上が示唆された。これらの候補化合物の PET プローブとしての性能を評価するために、3 種の候補化合物について、PET 核種での標識を実施し、低濃度溶液 (nM) 中での化合物・病変間の結合性を評価した。その結果、候補化合物 1 種において、前頭側頭葉変性症死後脳組織切片を用いたオートラジオグラフィにて、TDP-43 病変蓄積領域への当該候補化合物の結合が確認された。また、前頭側頭葉変性症死後脳組織ホモジェネート

を用いた結合実験により、当該候補化合物が中程度の親和性 ($K_d=10\sim100$ nM) にて死後脳組織ホモジェネートに対して結合を示す可能性が明らかとなった。さらに、PET 核種標識をした当該候補化合物を用い、野生型マウスにおいて PET スキャンを実施した。その結果、末梢投与した当該候補化合物は十分に脳に移行し、また、脳からのクリアランスも良く、中枢をターゲットとした PET プロブとして適切な動態を示すことが明らかとなった。

なし

D. 考察

本研究により、TDP-43 PET プロブ候補化合物 1 種が、TDP-43 病変への結合親和性は中程度であるものの、中枢をターゲットとした PET プロブとして適切な動態を示すことが明らかとなった。また、前頭側頭葉変性症死後脳固定標本を用いた組織化学的解析による 200 種近い候補化合物の特性評価から、化合物構造と TDP-43 病変への結合活性の相関に関するデータの蓄積が実現した。今後、本研究で見いだされた化合物をリード化合物として、当該化合物の有する良好な動態を維持しつつ、TDP-43 病変への結合親和性を向上させる構造展開を実施することで、TDP-43 病変を *in vivo* PET にて画像化する有用なプロブの開発が期待される。

E. 結論

本研究において、PET により TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する PET プロブ開発に有用なリード化合物が見いだされた。また、化合物構造と TDP-43 病変への結合活性の相関に関するデータの蓄積が実現した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. bioRxiv,
doi:10.1101/2020.10.23.349860, 2020

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)

脳疾患ゲノム情報に基づく病態モデルマウスの開発に関する研究

研究代表者 吉木 淳¹⁾

研究分担者 綾部 信哉¹⁾ 仲柴 俊昭¹⁾ 天野 孝紀¹⁾ 笹岡 俊邦²⁾ 池内 健²⁾

¹⁾ 理化学研究所バイオリソース研究センター ²⁾ 新潟大学脳研究所

研究要旨

理化学研究所バイオリソース研究センター（理研 BRC）は、我が国の実験動物マウスの中核機関としてヒト疾患研究に有用なモデルマウスを収集・保存・提供ならびに開発している。新潟大学脳研究所（脳研）には、脳疾患臨床ゲノム情報及び病態に関する知見の蓄積に加えて疾患モデルマウスの優れた開発能力がある。両機関の連携により高齢社会が直面する脳疾患の治療・創薬に有用なモデル動物を、ゲノム情報及び病態に関する知見に基づき開発する。さらに、脳研と共同で開発された脳神経系疾患モデルマウスを理研 BRC に寄託して頂き、研究コミュニティに提供し、脳神経系の基礎から医療・創薬研究に貢献する。

A.研究目的

日本人患者のゲノムシーケンス及び大規模サンプルを用いたゲノムワイド関連解析

（GWAS）により認知症のゲノム要因が明らかにされつつある。さらに、ゲノム編集と発生工学技術の進展により、患者のバリエーション情報に基づくヒト疾患の精密モデルの作出が期待されている。本共同研究では、臨床ゲノム情報の解析から得られた知見に基づき、アルツハイマー病の複数の遺伝子変異やレアバリエーションを導入したマウスモデルの開発を目指す。さらに、脳研と国内研究者の共同で開発された先端的な脳疾患モデルマウスの寄託を促進し、理研 BRC を通じて国内外の研究コミュニティに提供して脳疾患研究の推進に貢献する。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

メール通信および脳研における打合せにより臨床ゲノム情報を収集・整理する。また、既存の疾患モデル・病態モデルの特性ならびにヒト疾患に関するゲノム情報および病態に関する情

報を収集し、マウスのゲノム改変の設計に必要な情報を整理する。さらに、脳研において開発済みの先端的なモデルマウスについて、開発研究者に寄託を依頼し、承諾が得られた系統について、MTA 等の適切な手続きを経て収集、公開する。

C.研究結果

笹岡教授とは神経変性疾患を対象としたヒト疾患モデルマウス、ドーパミン受容体変異マウスとドーパミン関連遺伝子の変異マウスの整備について打ち合わせを継続している。脳研・池内健教授からはアルツハイマー病・タウオパチーの疾患変異に関する助言をいただいている。R2 年度脳研究所合同セミナー（2 月ウェブ開催）においては、笹岡班の他の研究課題のグループとの交流・意見交換を実施した。本課題からは理研 BRC におけるマウスリソース事業の概要と進捗の紹介、新潟脳研および同共同利用・共同研究に関わる研究者により開発・寄託

されたマウス系統のご紹介、遺伝子改変系統の品質管理に関する説明、BRCにおける疾患モデルの開発・表現型解析の体制についての説明を行った。さらに、新規開発に関して、ゲノム編集マウスの開発にける新たな遺伝品質管理手法の紹介、効率の良い疾患バリエーションの評価系、iGONAD法を用いたゲノム編集によるヒト疾患変異ノックインALSモデルの開発についても話題提供を行い、参加研究者との意見交換を行った。

D.考察および E.結論

今後もマウスリソースの利活用に関する協力関係を継続・発展させ、アルツハイマー病などの神経変性疾患の研究ならびにドーパミンおよびその関連分子の機能研究に有用なマウス系統を中心に情報収集と意見交換を行う。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

1. Nakata H, Hashimoto T, Yoshiki A. Quick validation of genetic quality for conditional alleles in mice. *Genes Cells* 26(4):240-245, 2021.
2. Masuya H, Usuda D, Nakata H, Yuhara N, Kurihara K, Namiki Y, Iwase S, Takada T, Tanaka N, Suzuki K, Yamagata Y, Kobayashi N, Yoshiki A, Kushida T. Establishment and application of information resource of mutant mice in RIKEN BioResource Research Center. *Lab Anim Res.* 37(1):6 2021.
3. Mekada K, Yoshiki A. Substrains matter in phenotyping of C57BL/6 mice. *Exp Anim.* 2021 Jan 14. doi: 10.1538/expanim.20-0158.
4. Mizuno-Iijima S, Ayabe S, Kato K, Matoba S, Ikeda Y, Dinh TTH, Le HT, Suzuki H, Nakashima K, Hasegawa Y, Hamada Y, Tanimoto Y, Daitoku Y, Iki N, Ishida M, Ibrahim EAE, Nakashiba T, Hamada M, Murata K, Miwa Y, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Yagami KI, Ogura A, Obata Y, Takahashi S, Mizuno S, Yoshiki A, Sugiyama F. Efficient production of large deletion and gene fragment knock-in mice mediated by genome editing with Cas9-mouse Cdt1 in mouse zygotes. *Methods*:S1046-2023(19)30328-7, 2020.
5. Yoshioka N, Kabata Y, Kuriyama M, Bizen N, Zhou L, Tran DM, Yano M, Yoshiki A, Ushiki T, Sproule TJ, Abe R, Takebayashi H. Diverse dystonin gene mutations cause distinct patterns of Dst isoform deficiency and phenotypic heterogeneity in Dystonia musculorum mice. *Dis Model Mech* 13(5):dmm041608. doi: 10.1242/dmm.041608.
6. Nakamura T, Rios LC, Yagi T, Sasaoka T, Kitsukawa T. Dopamine D1 and muscarinic acetylcholine receptors in dorsal striatum are required for high speed running. *Neuroscience Research* 156: 50-57., 2020 doi: 10.1016/j.neures.2019.12.001.
7. Saito N, Tainaka K, Macpherson T, Hikida T, Yamaguchi S, Sasaoka T. Neurotransmission through dopamine D1 receptor is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex. *Neuroscience Research* 156:58-65, 2020. doi: 10.1016/j.neures.2020.04.006.
8. Kitahara A, Ran Q, Oda K, Yasue A, Abe M, Ye X, Sasaoka T, Tsuchida M, Sakimura K, Ajioka Y, Saijo Y, Zhou Q. Generation of Lungs by Blastocyst Complementation in Apneumic Fgf10-Deficient Mice. *Cell Reports* 31(6):107626., 2020 doi: 10.1016/j.celrep.2020.107626.
9. Yamaguchi T, Sumida T, Nomura S, Satoh M, Higo T, Ito M, Ko T, Fujita K, Haywood M, Sanbe A, Yoshimi K, Manabe I, Sasaoka T, Taylor M, Toko H, Takimoto E, Naito A, Komuro I. Cardiac Dopamine D1 Receptor Triggers Ventricular Arrhythmia in Chronic Heart Failure. *Nature Communications* 11(1):4364., 2020 doi: 10.1038/s41467-020-18128-x.
10. Ran Q, Zhou Q, Oda K, Yasue A, Abe M, Ye X, Li Y, Sasaoka T, Sakimura K, Ajioka Y, Saijo Y. Generation of thyroid tissues from embryonic stem cells via blastocyst complementation in vivo. *Frontiers in Endocrinology*, section Thyroid Endocrinology, 2020 *Frontiers in Endocrinology* 14 December 2020 <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.609697>
11. Uchigashima M, Konno K, Demchak E, Cheung A, Watanabe T, Keener D G, Abe M, Sakimura K, Sasaoka T, Uemura T, Imamura Karasawa Y, Watanabe M, Futai K. Specific Neuroligin3- α Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse

hippocampus. *Elife* 2020 Dec 23; **9**: e59545. doi: 10.7554/eLife.59545.

なし

3.その他

なし

12. Kawahata I, Sekimori T, Wang H, Wang Y, Sasaoka T, Bousset L, Melki R, Mizobata T, Kawata Y, Fukunaga K. Dopamine D2 Long Receptors Are Critical for Caveolae-Mediated α -Synuclein Uptake in Cultured Dopaminergic Neurons. *Biomedicines* **9**(1): E49., 2021 doi:10.3390/biomedicines9010049. PMID: 33429895
13. Miyajima K, Kawamoto C, Hara S, Mori-Kojima M, Ohye T, Sumi-Ichinose C, Saito N, Sasaoka T, Metzger D, Ichinose H. Tyrosine hydroxylase conditional knockout mice reveal peripheral tissue-dependent differences in dopamine biosynthetic pathways *Journal of Biological Chemistry* **296**, 100544, 2021 doi: 10.1016/j.jbc.2021.100544.

2.学会発表

1. Yoshiki A, “Update status of mouse resources for studies of gene function and disease at Riken BRC” 12th International Multiconference "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology", Novosibirsk Russia (Web conference), July 2020.
2. 吉木 淳, “ヒト疾患モデルとしてのノックアウトマウスの疾患表現型のオントロジー用語” 第 60 回日本先天異常学会学術集会 /The 60th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society, Web 開催, 7 月, 2020 年.
3. 水野沙織, 中山 百合子, 綾部 信哉, 中田初美, 仲柴 俊昭, 池 郁生, 平岩 典子, 榎屋 啓志, 吉木 淳, 小幡 裕一, 城石 俊彦 “理研バイオリソース研究センターにおけるマウスリソース有効活用に向けた広報活動について /Promotion for active use of mouse resources at RIKEN BioResource Research Center” 第 67 回日本実験動物学会総会/The 67th Annual Meeting of Japanese Association for Laboratory Animal Science, 誌上開催, 5 月, 2020 年.

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

歩行運動の脳基底核ドーパミン制御機構の解明

研究代表者 木津川 尚史¹⁾
研究分担者 笹岡俊邦²⁾

- 1) 立命館大学 生命科学部 生命情報学科
2) 新潟大学 脳研究所 動物資源開発研究分野

研究要旨

パーキンソン病 (PD) の研究の知見などから、ドーパミンによる脳基底核の神経情報処理が、歩行を始めとする運動機能に関与していることがわかっている。また、実際の歩行に際してもドーパミン受容体が重要な役割を果たしていることが、ステップホイールを走行するマウスを用いた我々の研究から示されている。しかし、歩行中のどのような局面にドーパミンが関与しているのか、詳細な作用メカニズムは不明である。この点が明らかになれば、PD 治療にも貢献があると考えられる。そこで我々は、ステップホイールで複雑なペグパターンを走行するマウスが実際にどのような運足状態になっているかを解析した。その結果、一連のペグパターンのうちの数か所において、運足などの運動にリズムカルな協調が起きていることが観察された。この結果は、運動中に自発的なリズム協調が起きている可能性を示している。リズム協調の存在を明らかにできたことは、将来的には、光遺伝学を用いて線条体内のドーパミンを瞬間的に制御するなどの方法により、ドーパミンが運足パターン形成のどのような局面に作用しているのかを解析する手掛かりになると考えている。

A. 研究目的

PD 患者では歩行に障害が生じる。このことから、ドーパミンの長期的な欠損が歩行に異常をもたらすことは古くから知られていた。歩行中のドーパミン欠如が歩行障害を引き起こすか否かは長らく知られていなかったが、当共同利用共同研究により、ドーパミン受容体のコンディショナルノックダウン (cKD) マウスやドーパミン受容体阻害剤を脳内に投与したマウスを用いた研究を行い、ドーパミン受容体 D1R が機能していない状況下では走行スピードが低下することを見出した (Nakamura et al., 2020)。このことは、歩行の最中においてもドーパミンが重要な作用を果たしていることを示している。走行スピードと線条体内のドーパミン線維の活動が相関しているとの報告 (Howe and Dombeck, 2016) とあわせて考えると、ドーパミンによる線条体神経活動の制御

は歩行・走行時に何らかの役割を果たしていると考えることが妥当であろう。しかしながら、歩行のどのような局面にドーパミン制御が機能しているのかについては、未解明の問題である。この点を解明するためには、歩行・走行中のドーパミンが作用しているタイミングを知ることが必要である。そのために本研究では、ステップホイール装置を用いてマウスに多様なステップを行わせ、運動がどのように組織されているかを明らかにし、さらにはその際の線条体神経活動を記録してドーパミンとの関係を探ることを目的とした。本年度は、その第一段階として、ステップホイールで複雑なパターンで走行するマウスの運足の特徴を解析した。

B. 研究方法

マウスの歩行・走行能力の測定は、ステップホイール装置を用いて行った。ステップホイール装

置は水を報酬としてマウスに走行を訓練できるホイール装置である。マウスの足場はペグと呼ばれるホイールに取り付けられた棒で、ペグの一連の配置に従ってマウスは運足する。すべてのペグにはタッチセンサが取り付けられており、足のタッチタイミングを計測した。

C. 研究結果

1 セッションあたり、マウスに指定の複雑なペグパターンを 50 回程度走行させた。マウス前肢のペグへのタッチタイミングを計測したところ、タイミングが毎回安定しているペグと不安定なペグが見つかった。安定部は、ペグパターン 1 周期あたり 1-3 個見いだされ、これはトレーニングが進むにしたがって、個々の安定部が伸長し、また安定部の個数も増加する傾向が見いだされた。安定部では繰返し均一に近い運動が見られることから、安定部は「チャンク」であると考えられる。

次に、チャンク内の運足の特徴について解析を行った。最初に、運足の周期について解析を行った。右または左の前肢がペグに接地するタイミングの周期性について解析したところ、チャンク内で周期が保たれていることが確認された。2 番目に、左右の足の位置関係について解析した。走行は繰返し運動なので、左右の足の位置関係は、対側足の一步の中での位置、位相を解析した。その結果、チャンク内では、連続する 2 歩において位相の変化が小さくなっていることが確認された。

D. 考察

以上の結果から、チャンク内では、運足の周期性が高く、かつ、左右の前肢の位置関係が保存されていることがわかった。このことは、マウスは複雑に配置されたペグの上を走行する際に、単にペグが到来するタイミングに合わせてペグ上に足を置いていくのではなく、自らの体部位間の協調（ここでは左右前肢の協調）を達成させていることを示している。動物の体には関節や筋肉が多数存在し自由度が非常に高いため、運動の協調を達成するための組合せは無数に存在する。連続運動を周期と位相というリズムのパラメタで表現することは、自由度を大きく低減して体部位間の協調を容易にしている可能性が考えられ、この運動のリズム化がチャンクの形成に寄与していることが推測される。

E. 結論

マウスに複雑なステップを行わせることで、走行のなかに複数の状態を見出すことに成功した。これにより、走行状態と線条体神経活動、さらにはドーパミンの影響を解析する道が開かれた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Nakamura T, Rios LC, Yagi T, Sasaoka T, Kitsukawa T. *Neurosci Res*. Jul;156:50-57 (2020) Dopamine D1 and muscarinic acetylcholine receptors in dorsal striatum are required for high speed running.

2. 学会発表

1. 広兼 浩二郎, 中村 徹, 久保田 康夫, Hu Dan, 八木 健, Graybiel AM, 木津川 尚史 複雑パターン走行時におけるリズムチャンクの解析 第 43 回日本神経科学大会 2020 月 7 月 29 日
2. 木津川 尚史, 寺下 拓真, 広兼 浩二郎, 久保田 康夫, Dan Hu, 八木 健, Graybiel AM, 中村 徹 線条体神経細胞によるリズムカルな運動制御 第 43 回日本神経科学大会 2020 月 7 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

モノアミン神経伝達物質合成関連遺伝子の組織特異的破壊による生理機能変化の解析

研究代表者 一瀬 宏¹⁾

研究分担者 宮嶋 克也¹⁾、齊藤 奈英²⁾、笹岡 俊邦²⁾

1) 東京工業大学生命理工学院 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 (DA) は、脳内で神経伝達物質として高次神経機能の調節を行うばかりでなく、末梢臓器においても種々の生理機能の制御に関わっている。一部の組織では、APUD 細胞として血中の DOPA を取り込んで DA を合成することが知られている。しかし、末梢臓器の DA が全て血中 DOPA に由来しているのか、臓器内でチロシンから合成されている DA があるのか明らかとなっていない。我々は、末梢臓器での DA による生理機能の調節と、DA 量の調節機構を解明するために、DA 生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) をノルアドレナリン (NA) 産生細胞でタモキシフェン投与により誘導的に破壊して、臓器中の DA 量がどのように変化するか解析した。誘導的に *Th* を副腎髄質・交感神経選択的に破壊したマウスで、臓器中 DA と NA 量の変化を解析した。心臓と脾臓では NA の減少とともに DA が比例して減少した。一方、胃や肺では NA と DA の減少は相関しなかった。免疫組織化学的解析により、胃と肺で TH 陽性細胞を見出した。これらの解析から、臓器ごとに DA 合成経路が異なること、末梢臓器で交感神経が DA の供給源となり得ることを示唆した。

A. 研究目的

ドーパミン (DA) は神経伝達物質として、脳内で重要な機能を営んでおり、DA 代謝の変化はジストニア・パーキンソンニズムや、ADHD などの発達障碍の病態にも関係している。一方、DA は末梢臓器でも、腎臓での Na 排泄の促進、脾臓での糖反応性インスリン分泌の抑制、胃酸分泌の促進など、さまざまな生理機能を営んでいることが知られている。しかし、末梢組織での DA 合成調節機構や代謝経路については未解明な部分が多い。

神経細胞内の DA は、チロシンからチロシン水酸化酵素 (TH) と芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の働きにより合成される。APUD 細胞という一群の細胞が知られており、アミンの前駆体である DOPA を血中から取り込んで脱炭酸して DA を作る能力を有している。さらに、末梢組織に投射している交感神経ではノルアドレナリン (NA) の前駆体として DA が合成されている。そのため、末

梢組織の DA の由来には、1. 末梢組織でチロシンから TH, AADC により合成される、2. 血中の DOPA から合成される、3. 交感神経で作られる、という3つの合成経路が考えられる。

本研究では、Cre-loxP システムを利用して TH 遺伝子を交感神経と副腎髄質選択的に破壊したマウスにおいて、それぞれの末梢臓器における DA 代謝がどのように変化するかを解析し、臓器ごとの DA 代謝経路について解析した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

Th の遺伝子イントロン内に、DNA 組換え酵素 *Cre* の認識配列である *loxP* 配列を2カ所相同組換えにより組み込んだマウス (*Th*^{f1/f1} マウス) を作製した。一方、NA 生合成酵素であるドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) のプロモータ制御下に *Cre-ERT2* を発現するマウス *Dbh-CreERT2* マウスを用意して、*Th*^{f1/f1} マウスと交配した。*Cre-ERT2* は、タモキシ

フェン(TAM)投与により DNA 組換え酵素活性 Cre が誘導されるので、*CreERT2- Th^{f1/f1}* マウスは、DBH が発現する交感神経と副腎髄質で *Th* を TAM 投与により誘導的に破壊できる。

本研究は、東京工業大学の遺伝子組換え実験等安全委員会、および、動物実験に関する倫理審査委員会により承認されている。

C. 研究結果

TAM 投与後に、*Cre ERT2-Th^{f1/f1}* マウスの副腎や、心臓の交感神経終末で TH 免疫反応性が低下していることを組織化学的に確認した。また、ウェスタンブロッティングで各組織中の TH 量も減少していた。

次に、組織中の DA 量を測定したところ、TAM 投与マウスの心臓、膵臓ではコントロールマウスの 30%程度に減少したが、胃・肺・脾臓・腎臓ではほとんど減少していなかった。心臓と膵臓では臓器中の DA と NA 量がよく相関して減少し、相関係数は 0.9 を超えていた。この結果は、心臓や膵臓では組織中で検出される DA のほとんどが交感神経に由来していることを示唆した。一方、胃と肺では組織中の DA と NA の相関が低く、これらの臓器では交感神経以外でも DA が作られている可能性を示唆した。

そこで、胃や肺の組織切片を用いて抗 TH 交代による染色を行なった。また、ドーパミン D1 受容体のプロモータで *lacZ* が発現するレポーターマウス（笹岡教授から提供）を用いて D1 受容体の組織内での局在を調べた。

その結果、胃の粘膜層で TH 陽性細胞、AADC 陽性細胞を検出した。また、*LacZ* による X-gal の発色は筋層でのみ観察された。肺では、気管の上皮細胞で TH と AADC 陽性細胞を発見した。X-gal 染色は血管周囲で観察された。

D. 考察

本研究で交感神経・副腎選択的に *Th* を TAM 投与により誘導的に破壊可能なマウスを作製し、末梢臓器中 DA, NA 量を解析した。その結果、心臓や膵臓では交感神経に由来する DA がほとんどであるのに対して、胃や肺では TH が発現していて臓器内で DA を生合成していることが示唆された。

本研究では、TAM 投与 2～4 週間後のマウスを用

いた。この間マウスに大きな表現型の変化は認められなかった。TAM 投与 4 週間後で副腎の TH タンパク質量はコントロールの約 20%に低下したが、ゼロにはなっていなかったため、残存している TH や NA が存在していたため、交感神経機能が維持されていたと考えられる。今後、TAM 投与後長期にマウスを飼育した場合、交感神経機能の低下から、どのような表現型が引き起こされるか解析していく計画である。

E. 結論

末梢組織における DA 生合成経路を、*Th* コンディショナルノックアウトマウスを用いて解析し、臓器ごとに DA 合成経路が異なることを明らかにした。心臓や膵臓では交感神経が DA の供給源となっている可能性を示唆した。また、胃や肺では臓器内の TH, AADC の分布を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyajima K, Kawamoto C, Hara S, Mori-Kojima M, Ohye T, Sumi-Ichinose C, Saito N, Sasaoka T, Metzger D, and Ichinose H. Tyrosine hydroxylase conditional KO mice reveal peripheral tissue-dependent differences in dopamine biosynthetic pathways. *J Biol Chem*, 296, 100544, 2021.

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

ミクログリア機能を反映する PET イメージングの開発

研究代表者 木村 泰之¹⁾
研究分担者 小縣 綾¹⁾, 他田 真理²⁾, 柿田 明美²⁾

- 1) 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター 脳機能画像診断開発部
2) 新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患において、タンパクの異常蓄積が最終的に神経細胞障害をきたす。そのメカニズムに、脳内の免疫を担当する主要な細胞であるミクログリアやアストロサイトの機能異常が、深く関わっていることが明らかになってきた。そこで、ミクログリア機能を標的とした治療法の開発が進みつつあるが、臨床利用できる画像バイオマーカーの信頼性は十分ではない。本研究では、ミクログリアやアストロサイトに特異的に発現し、創薬標的として有望とされる分子を可視化する新規 PET リガンドの開発を行う。具体的にはミクログリアの分化・生存に必須な分子を標的とした新規 PET リガンドの開発を行い、多面的なミクログリア機能の臨床イメージングを可能にし、病態評価から創薬バイオマーカーまでの応用を目指す。

A.研究目的

本研究の目的は、ミクログリアに特異的に発現し、創薬標的として有望とされる分子を可視化する新規 PET リガンドの評価・開発を行い、神経変性疾患の新規治療法開発に役立てることである。本研究では、ミクログリア特異的な分子として、colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) を標的とした PET リガンドの評価・開発として、CSF1R に結合するシーズ化合物を元にした PET リガンドの標識合成法の確立を行い、小動物やヒト死後脳を用いてそれらの有効性を明らかにする。

B.研究方法 (倫理面への配慮を含む)

ミクログリア特異的な分子である CSF1R に高い親和性と選択性を有し、脳移行性を認める低分子化合物である BLZ945 (CSF1R 阻害剤) を基にした新規放射性化合物を、PET リガンド候補とする。BLZ945 を塩基性条件下、 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$ 基を導入する

最適な合成条件を確立する。合成した ^{11}C 標識 PET リガンドを健常ラットに投与し、PET イメージングによる脳移行性を評価する。

ミクログリア密度や、疾患関連ミクログリアが増えている疾患モデルマウス、標的分子を遺伝的に欠損させたマウスなどを用いて、特異結合の程度、他分子との選択性、脳内・血漿中代謝、定量性の評価を行う。また、autoradiography や 結合性試験、標的分子の特異的抗体を用いる免疫染色、レーザーマイクロディセクション質量分析イメージングなどを用いて、PET リガンドの細胞特異的な集積評価を行う。本共同研究においては、標的分子の選定や組織評価について、脳研共同研究者の助言を得る。また、開発中の PET リガンドの特性を確認し、ラットにおける autoradiography の条件検討の終了後に、新潟大学脳研究所から提供されるヒト標本を用いた autoradiography を実施する。

C.研究結果

ミクログリアに発現する分子である colony-stimulating factor-1 受容体(CSF1R)を標的とした PET リガンドとして、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ を設計した。 NCGG401 の非標識体の合成条件の最適化を行い、その合成に成功し、NMR を用いてその構造を確認した。また、 NCGG401 の CSF1R キナーゼ阻害活性について、元化合物の BLZ945 と同程度であることを確認した。ついで、 ^{11}C 標識合成条件を最適化し、PET リガンドとして十分な収量、純度、比放射能を持った $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ の合成に成功した。この PET リガンドを健常ラットに投与し PET イメージングすることで、脳内に取り込まれ、比較的早い洗い出しを認め、PET リガンドの動態として良好であることが明らかになった。さらに、非標識体を前投与することで、ブロッキング効果を認め、CSF1R に特異結合している可能性が高いと考えられた。また、急性神経炎症モデルとして、痙攣誘発モデルラットおよび LPS 脳内局所投与モデルを用いて評価を行い、特異結合の軽度の上昇を認め、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ は CSF1R を標的とした PET リガンドとして有用と考えられた。アルツハイマー病やてんかん患者脳における autoradiography について、人医学実験倫理申請を行い承認された。提供を受けた脳切片に対し autoradiography を実施中である。

D.考察

本研究では、ミクログリア特異的に発現している分子 CSF1R を標的とした PET リガンドを設計・合成し、その有用性を齧歯類の急性炎症モデルにおいて評価した。今後、アルツハイマー病モデル動物やアルツハイマー病患者剖検脳を用いた検討ならびに臨床イメージング等によって、疾患における有用性を評価する必要がある。

E.結論

ミクログリア特異的に発現している分子 CSF1R を標的とした PET イメージングの開発を行い、健常ラット及びラット急性炎症モデルにおいてその有用性を明らかにした。ヒト剖検脳や臨床研究において、さらに有用性を評価する準備が進みつつある。

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

1. Kimura Y: PET Imaging in Drug Development for Neurodegenerative Diseases. The 14th International Conference on Complex Medical and Engineering, Aug 1-15, 2020, Takamatsu (online)
2. Kimura Y: PET imaging of microglia. The 5th NCGG-ICAH Symposium, Apr 11, 2019, Obu
3. Ogata A, Kimura Y, Yamada T, Ichise M, Ikenuma H, Abe J, Koyama H, Suzuki M, Kato T, Ito K. PET imaging of colony stimulating factor 1 receptor in rat brains, Brain & Brain PET 2019, July 4-7, 2019, Yokohama, Japan.
4. 小縣綾、木村泰之、山田貴史、市瀬正則、阿部潤一郎、池沼宏、古山浩子、鈴木正昭、加藤隆司、伊藤健吾：Colony stimulating factor 1 receptor を標的としたミクログリア特異的 PET イメージングの開発．第 59 回日本核医学会学術総会 2019 年 11 月 2 日 松山市

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

脳バンク検体を用いた加齢に伴う脳組織のクローン再構成及び 脳腫瘍発生に関する研究

研究代表者 荒川 芳輝¹⁾

研究分担者 柿田 明美²⁾, 住吉 壯介¹⁾, 小川 誠司¹⁾, 宮本 享¹⁾, 藤井 幸彦²⁾,
棗田 学²⁾, 中川 正宏¹⁾

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

近年、ドライバー変異を有するクローンの拡大が、「高齢者の正常組織」でしばしば観察されることが報告され、がんの起源の解明の観点から注目を集めている。一方、脳組織におけるクローン拡大に関しては、未だ十分な知見はない。本研究計画では、脳組織におけるクローンの選択・拡大について、組織特異性、頻度と程度、選択に関わるドライバー、また、その進化上の履歴を含めた微細構造にいたるまでを、微小組織採取と次世代シーケンス、単一細胞技術を駆使して、包括的に探索し、その全体像の解明を目指す。

A. 研究目的

本研究では、正常脳組織におけるクローンの拡大とこれによる組織の再構築に関する包括的な理解に基づいて、がんの発生、進展、さらには、組織の老化に関する新たな視点での理解を目指す。本研究で期待される成果は以下である。

- 1) ドライバー変異による脳組織のクローンの進化・拡大に関する全体像の解明。具体的には、脳におけるクローンの拡大が、どのようなドライバー変異によって駆動されるのか、いつから、どのような早さで進行するのか、それによる組織の再構築はどの程度に及ぶのか、また、炎症や環境因子はこれらにどのように影響を及ぼすのかに関する包括的な知見が得られると期待される。
- 2) 未だ不明な点の多いがんの起源や発がんの初期過程に関して、がんにおけるクローン選択が正常組織におけるクローン拡大とどのように関連するのか、また、両者はどのような点で異なるのか、をすることにより、「がんとは何か」という重要な疑問に対する知見が得られると期待される。
- 3) 老化に関して、正常組織のクローンによる再

構築という全く新たな観点から理解することができる可能性がある。

B. 研究方法

本研究では、加齢に伴った健常脳組織におけるクローンの拡大の微細構造と進化のトラジェクトリを、微小サンプリングの標的遺伝子シーケンス、全エクソンシーケンスおよび全ゲノムシーケンスや、単一細胞シーケンス等を用いて同定する。この収集したデータを解析することから、クローン拡大とこれによる組織の再構築が、どのような部位で、どのような程度で、どのようなドライバー遺伝子により、どのような時間経過で生ずるのか、を包括的に明らかにする。それらは、がん組織におけるクローン進化と多様性の拡大とどのような点で類似し、またどのような点で、区別されるのか、さらに、それは組織や幹細胞の老化とどのような機能的な関連を有するのか、それはどのようなメカニズムによるのか、を明らかにする。

以上の結果を踏まえて、マウスモデル等を用いた機能的検証実験により、正常組織におけるクローン拡大が、発がん、老化、ストレス応答におい

て果たす生物学的意義を明らかにする。

特記事項なし

C. 研究結果

申請者らの研究グループでは、健常食道上皮の微小サンプリングと次世代シーケンス解析によって、1)食道上皮においては、食道がんと共通するドライバー変異が頻繁に生じていること、2)それはすでに乳児期からはじまり、加齢に伴ってすべての個体の正常食道上皮であまねく認められ、3)高齢者では全食道面積の実に 80%内外が約 10,000 個もの独立なドライバー変異クローンによって覆われること、を見いだした(Yokoyama et al. Nature, 2019)。

また、潰瘍性大腸炎や正常乳管でも、上皮が多数の変異クローンで置換される症例が存在することを確認した(Kakiuchi et al. Nature, 2020)。

2020 年年度は、正常脳組織における微小サンプリングの標的遺伝子シーケンス、全エクソンシーケンスおよび全ゲノムシーケンスや、単一細胞シーケンス解析技術を確立した。さらに、脳研究所の脳バンク検体にある正常脳組織から微小サンプリングを行い、予備実験を実施した。その結果、ddPCR で 3-9 mutations /3000 (0.1-0.3%) の頻度で IDH1 の変異が検出された。

D. 考察

これまでの成果は、多数のドライバー変異クローンによる正常組織の「再構築」は、加齢に伴って、あらゆる正常組織で不可避免的に生ずる現象である可能性、また、それらはがんの発症進展における「進化」や「多様性の獲得」とも密接な関係がある可能性を指し示している。

脳研究所の脳バンク検体にある正常脳組織微小サンプリングを行い、3-9 mutations /3000 (0.1-0.3%) の頻度で IDH1 の変異があることを確認した。そこで、十分な解析が可能と判断し、標本数を増やして解析を進める予定である。

E. 結論

様々な臓器において、上皮が多数の変異クローンで置換されることを確認した。正常脳組織においても同様に変異クローンによる置換が予想され、その実態の解明を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

1. 荒川 芳輝 京都大学病院におけるがんゲノムプロファイリング検査の現状と課題 第 38 回日本脳腫瘍学会学術集会 2020/12/4 広島

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

神経組織特異的 *Scraper* ノックアウトマウスの作出と 神経変性に関する解析

研究代表者 矢尾 育子^{1) 2)}

研究分担者 衛藤 史博^{1) 2)} 笹岡 俊邦³⁾ 阿部 学³⁾ 崎村 建司³⁾

¹⁾ 関西学院大学 ²⁾ 浜松医科大学 ³⁾ 新潟大学脳研究所

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。*Scraper* 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。これまでの共同研究により、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。本共同研究により floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスが得られている。現在、ドライバーマウスとの交配により神経組織特異的 SCR-cKO マウスの作製を行っている。また、発生初期から Cre 組換え酵素を発現するドライバーマウスとの交配により、SCR-KO マウスを作製し解析を行っている。

A. 研究目的

Scraper 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、神経細胞特異的なコンディショナル KO マウスを作製し、神経変性に関する解析をおこなう。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

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、神経細胞特異的な Cre 発現マウスを利用して、神経組織特異的なノックアウトマウスを作製して電気生理学実験等の機能解析や行動解析実験に供する。

動物実験計画は新潟大学、関西学院大学および浜松医科大学大学の委員会承認を得たうえで、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。現在までに、FLPマウスとの交配を進め、スクリーニングのために導入されていたネオマイシン耐性遺伝子を除いたマウスを作製した。ドライバーマウスとの交配により、神経細胞特異的なノックアウトマウスを作製する段階である。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、神経細胞で特異的にノックアウト可能なドライバーマウスラインとしてEmx1-Creマウスの導入することとした。現在得られたヘテロ型コンディショナルノックアウトマウスは、精巣に異常がある可能性があることが判明した。また、発生初期からCre組換え酵素を発現するドライバーマウスとの交配により、SCR-KOマウスを作製し以前に解析したC57BL/6J系と129/Sv系混合バックグラウンドnullノックアウトマウスと同じ表現型が得られるかを合わせて検討している。得られたマウスの表現型解析のために、共同研究の継続を予定している。

D. 考察

神経細胞で特異的にノックアウト可能なドライバーマウスラインとしてEmx1-Creマウスの導入したところ、予想外の表現型となる可能性が出てきたため、別のラインを検討する必要がある。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。今後、さらに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ため脳研究所の助言を得ながら共同研究を推進、継続する。また、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型マウスを樹立している。今後さらに繁殖、ドライバーマウスとの交配により神経細胞特異的SCR-cKOマウスを作製し、表現型を解析する。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Eto F, Sato S, Setou M, Yao I, Sato K. Mass spectrometry imaging reveals glycine distribution in the developing and adult mouse brain. *J Chem Neuroanat.* 2020 Dec;110:101869.
2. Matsuda T, Suzuki Y, Fujisawa T, Suga Y, Saito N, Suda T, Yao I. Imaging mass spectrometry to visualise increased acetylcholine in lungs of asthma model mice. *Anal Bioanal Chem.* 2020 Jul;412(18):4327-4341.
3. Eto F, Sato S, Setou M, Yao I. Region-specific effects of Scrapper on the abundance of glutamate and gamma-aminobutyric acid in the mouse brain. *Sci Rep.* 2020 May 4;10(1):7435. doi: 10.1038/s41598-020-64277-w.

2. 学会発表

1. 矢尾育子
質量分析イメージングによる神経伝達物質の可視化/ Imaging of neurotransmitters with mass spectrometry
第43回日本神経科学大会 2020/7/31
神戸コンベンションセンター（神戸市）
※オンライン開催

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

筋強直性ジストロフィーの中枢神経病態の解明

研究代表者 中森 雅之¹⁾

研究分担者 清水 宏²⁾、柿田 明美²⁾、望月 秀樹¹⁾

1) 大阪大学 医学系研究科 神経内科学 2) 新潟大学 脳研究所 病理学分野

研究要旨

筋強直性ジストロフィー(MyD)はDMPK遺伝子非翻訳領域のCTG繰り返し配列(リピート)の異常伸長が原因の遺伝性難治性筋疾患である。原因遺伝子より転写された、伸長したCUGリピートをもつ異常RNAの毒性により、筋細胞障害を来す可能性が示唆されている。MyDでは、骨格筋や心筋症状だけでなく、認知機能障害や性格変化、過眠など様々な中枢神経症状を呈する。こうした中枢神経症状は患者のQOLを著しく低下させるが、その機序は全く不明である。本研究では新潟大学脳研究所および大阪大学医学系研究科が保有するMyD患者脳検体を用いて、病理学的・分子生物学的・生化学的解析を網羅的にすすめることにより、MyDの中枢神経病態を解明する。

A. 研究目的

筋強直性ジストロフィー(MyD)は、骨格筋のみならず、心筋、平滑筋や脳、眼、内分泌器官など、様々な臓器をおかす全身性疾患である。DMPK遺伝子上のCTG繰り返し配列(リピート)の異常伸長が原因であり、異常遺伝子より転写された伸長CUGリピートをもつ異常RNAの毒性により、選択的スプライシング制御因子が障害される。この結果、広汎なスプライシング異常が引き起こされ、多彩な全身症状につながるとされている。MyDでは認知機能障害や性格変化、過眠など様々な中枢神経症状を呈するが、その機序は今もって全く不明である。本研究では、MyDの中枢神経病態を解明するため、新潟大学脳研究所および大阪大学医学系研究科が保有する、病理学的変化・特徴が明らかとなっているMyD患者中枢神経病変組織で分子生物学的解析および生化学的解析を行う。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所が有するMyD患者および疾患対象群患者剖検脳組織より白質、皮質、海馬、また脊髄からLaser Capture Microdissectionにより神経細胞を採取し、DNA、RNAを抽出した。得られたDNAを0.5-2 genome equivalentsまで希釈し、DMPK-CTGリピート増幅プライマー(Forward primer: ACCCTAGAACTGTCTTCGACTCC, Reverse primer: TTCCCGAGTAAGCAGGCAGAG)を用いてRoche Expand Long Template PCR System®によるSmall pool PCRを行った。得られたPCR産物を0.7% SeaKem agarose®ゲルにて60Vで4時間電気泳動し、泳動後にゲルよりAlkaline transfer法によりRoche Nylon Membrane®へDNAをトランスファーさせた。トランスファー後にUV crosslinkを行い、DIG labeled (CAG)₇ LNA probeによるハイブリダイゼーション(70℃、4時間)ののち、CDP-Star®による化学発光でCTGリピート含有DNAを検出して、リピート長の判定を行った。また、RNAについてはSMART-Seq® v4 Ultra® Low Input

RNA Kit for Sequencing をもちいた微量 RNA 増幅後に RNA-seq による遺伝子発現解析と選択的スプライシング異常の網羅的解析をおこなった。発見された新規スプライシング異常については、RT-PCR により確認を行った。なお、本研究は、大阪大学医学部附属病院研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

MyD 患者各 3 例の側頭葉皮質、側頭葉白質、脊髄神経細胞核より抽出した DNA の解析 (small pool PCR と Southern blot 法) により、同一患者由来組織でも CTG リピート長とそのばらつきに大きな差があることが明らかとなった。特に、MyD 患者側頭葉皮質で神経細胞ごとの CTG リピート長のばらつき (somatic instability) が大きく、脊髄神経細胞でのばらつきが少ないことが判明した。また、MyD 患者、疾患対象群患者各 3 例の側頭葉皮質、側頭葉白質、脊髄神経細胞より抽出した RNA の解析により、MyD 患者皮質・白質・脊髄神経細胞で疾患特異的な新規スプライシング異常を多数見出したほか、発現が亢進あるいは低下している遺伝子も同定した。特に新規スプライシング異常については、MyD 由来 iPS 細胞を運動神経へ分化誘導したものでも異常がみられ、それに伴う形態変化により運動神経伸長への影響が示唆された。

D. 考察

MyD 患者皮質神経細胞で CTG リピート長のばらつきが著しく大きく、また最大リピート長も長いことは、皮質神経細胞でリピート伸長に寄与する因子が存在することを強く示唆している。リピート伸長には、DNA 修復蛋白やリピート周囲のエピゲノム変化が関与することが知られており、次世代シーケンサーをもちいたメチル化解析など、MyD 患者皮質神経組織でのこれらの因子の探索を行っている。また、脊髄運動神経でのリピート変動が少ないことも何らかの理由があると考えられ、その要因の探索も行っている。

また、今回同定された MyD 患者皮質神経細胞、白質神経細胞、脊髄前角神経細胞特異的なスプライシング異常について、分子生物学的、細胞生物学的、病理学的検討をおこない、MyD の病態への関連を調べていく。

E. 結論

MyD 患者中枢神経組織では、細胞ごとに CTG リピートを伸長させる要因や異なる。また各神経組織でスプライシング異常を来す要因も異なることが判明した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

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

ジストロフィン結合タンパク質複合体の代謝回転に関する研究

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 遺伝子疾患治療研究部 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

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の原因遺伝子にコードされるジストロフィンは筋肉のみならず中枢神経系においても様々なタンパク質と複合体を形成し機能することが示されている。DMD ではジストロフィン分子の消失がこれら結合タンパク質(dystrophin-associated proteins: DAP)の著しい減少を生じることから、神経や筋組織の病態に影響を及ぼしているのではないかと考えられる。しかしながら、この二次的な DAP 分解をトリガーとした代謝メカニズムについては明らかにされていない。本研究ではNH-413筋ジストロフィーニワトリの原因遺伝子(*Wwp1*)にコードされる HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼに注目し、WWP1 とその類似 E3 リガーゼがジストロフィン結合タンパク質の分解と代謝に関与する可能性について検証する。

A. 研究目的

筋線維形質膜においてジストロフィンと結合し巨大複合体を形成する DAP には少なくとも 10 種類の分子が存在する。これらは幾つかの小複合体に分けられるが、 α と β の二つのサブユニットから成り、細胞外基質と細胞骨格とを架橋するジストログリカン複合体 (DGC) と DGC サブユニット間の結合を強化するサルコグリカン複合体 (α から δ までの 4 サブユニットから成り、SGC と略す) が大複合体の中心的機能を担っている。ジストロフィンとは別に、ジストログリカン(DG)やサルコグリカン(SG)遺伝子が傷害され、DGC や SGC の形成が阻害された場合でも筋ジストロフィーになることが知られているが、DMD でジストロフィンが消失すると、これら複合体も著しく減少するため、DMD の病態への影響が注目される。

これまで我々はNH-413ニワトリの責任タンパク質である WWP1 E3 ユビキチンリガーゼの解析を行ってきたが、興味深いことに、DMD のマウスモデルである mdx や SG ノックアウト(KO)マウスの筋組織では WWP1 の発現が増強されていた。そこで、

本研究では WWP1 が DGC や SGC の分解に関与するのではないかという仮説を立て、これを検証することを目的とした。また、骨格筋には WWP1 に加え、これに酷似する WWP2 及び ITCH が発現するため、これらの分子にも注目し研究を進めた。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

WWP1, WWP2, ITCH E3 ユビキチンリガーゼを欠失もしくはインフレーム変異したマウス系統を樹立し、その筋肉に発現する DGC 或いは SGC の発現を解析する。WWP1 については、NH-413 ニワトリと同じミスセンス変異 (R436Q) を導入したノックイン (Knock in: KI) マウスを用いた。mdx の筋肉では顕著な DGC と SGC の分解が認められるため、WWP1-KI との2重変異マウスを作製し、これら複合体の分解が抑制されるかを検証する。また、SGC をほぼ完全に消失させる γ -SG KO マウスでも同様の解析を行う。尚、 γ -SG KO と B6 コンジェニック mdx マウスは研究分担者の笹岡俊邦教授により、それぞれ作製と系統樹立が行われた。*Wwp2* 遺伝子及び *Itch* 遺伝子欠損マウスの解析：

我々は WWP1 の機能代償を防ぐ目的で、類似の E3 リガーゼをコードする *Wwp2* と *Itch* 遺伝子の改変マウスを作製した。これらの安定的系統を樹立すると共に、WWP1-KI とこれらマウスの 2 重変異、或いは 3 重変異マウスを作製し、それぞれの筋組織における DGC や SGS への影響を解析する。

C. 研究結果

R436Q 変異を持つ WWP1-KI マウスの筋肉では WWP1 は分解し、筋細胞膜への局在が消失する。この変異は WWP1 に自己分解を誘起する機能喪失型であり、WWP1 の機能的ノックアウト (KO) マウスと見なすことができる。我々はこれを mdx と交配し DGC を構成する β -DG の発現について調べたが、ジストロフィン消失に伴う減少に変化はなかった。また、SGC についても同様の結果であった。更に、SGC をほぼ完全に消失させる γ -SG KO マウスと WWP1-KI マウスの交配を行なったが、この筋組織においても SGC の消失は抑制されなかった。これらの結果は DMD での DGC 及び SGC の減少が WWP1 の機能に因らないことを示していた。骨格筋には WWP1 に酷似した WWP2 と ITCH という E3 リガーゼが発現しているため、これら 2 種類の分子の変異体を発現するマウスと WWP1-KI との 2 重及び 3 重変異マウスの作製を試みたが、これらを mdx や γ -SG KO マウスと交配するところまでは至らなかった。予備的実験においては、WWP1-KI と WWP2 のインフレーム欠失を持つ 2 重変異マウスを mdx マウスを掛け合わせることに成功したが、この筋肉での DGC と SGC の分解に変化は認められなかった。

D. 考察

Yoon らのグループは培養細胞を用いた *in vitro* 解析からジストロフィン消失に伴う β -DG 分子の減少は WWP1 による分解の結果であると報告している (BBA-Molecular Basis of Disease, 2018)。しかしながら我々の生体を用いた実験結果はそれに疑問を呈するものであった。少なくとも WWP1 分子のみが DGC 分解に関与しているのではないことを示していた。そこで、WWP2 と ITCH との関係が注目されるが、残念ながら今回、これら 2 種類の WWP1 類似分子の役割について明らかにすることはできなかった。その原因にはこれらマウスの

継代が計画通りに進まなかったことがある。*Wwp2* 及び *Itch* 遺伝子の傷害はいくつかの疾患を生じさせることが報告されているのに加え、当方の飼育施設改修、また新型コロナウイルスによる緊急事態宣言下での飼育環境の変化などが重なったことが影響したと考えられる。今後はより効率的に産子を得られるよう、安定した飼育環境を構築し、着実に交配を重ねて行く計画である。

E. 結論

マウスの筋肉において、WWP1 単独の機能喪失が直ちに DGC や SGC の分解に影響を及ぼさないことから、WWP1 が両複合体の代謝回転にどのように関与するのかを明らかにすることはできなかった。注目されるのは WWP2 と ITCH の WWP1 に対する代償性であり、今後は、これら分子を含めた総合的な解析が重要になると考えられた。

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

1. Nogami K, Maruyama Y, Sakai-Takemura F, Motohashi N, Elhussieny A, Imamura M, Miyashita S, Ogawa M, Noguchi S, Tamura Y, Miyake K, Kira J, Aoki Y, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y. 筋小胞体カルシウムポンプ SERCA の活性化による Duchenne 型筋ジストロフィーモデルマウスにおけるミトコンドリア呼吸能の改善. 第 43 回分子生物学会. 2020 年 12 月 2-4 日 (Online 開催)
2. 野上健一郎, 丸山友輔, 竹村英子, 本橋紀夫, Ahmed Elhussieny, 今村道博, 宮下聡, 小川恵, 野口悟, 三宅克也, 田村優樹, 吉良潤一, 青木吉嗣, 武田伸一, 鈴木友子. 筋小胞体カルシウムポンプ SERCA の活性化による、Duchenne 型筋ジストロフィーモデルマウスの病態改善. 第 6 回日本筋学会 2020 年 12 月 18-19 日 (Online 開催).

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

脳・神経回路におけるドーパミンの機能解析

研究代表者 小山内 実^{1) 2)}
研究分担者 笹岡 俊邦³⁾

1) 大阪大学大学院医学系研究科 2) 東北大学大学院医学系研究科 3) 新潟大学脳研究所

研究要旨

ドーパミンの枯渇によりパーキンソン病が発症することなどから、ドーパミンは脳機能を制御する重要な因子であると考えられている。しかし、ドーパミン受容体を介した情報伝達がどのような機能を担っているのかは必ずしも明らかではない。そこで、本研究では、D1 ドーパミン受容体のノックダウンマウスを用い、ドーパミンが関与していると考えられている運動能力試験と、定量的マンガン造影 MRI による全脳神経活動履歴計測を行った。3 週間のドキシサイクリン投与によりドーパミンをノックダウンした結果、運動能力の低下と無動症状が観察された。また、自由行動時の全脳神経活動履歴計測の結果、側坐核、腹側淡蒼球、扁桃体を中心とした辺縁系を中心に神経活動の亢進が観察された。加えて、D2 受容体に Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質 G-CaMP を発現しているマウスの作出に成功し、多細胞 Ca^{2+} イメージングによる神経活動計測に成功した。

A. 研究目的

黒質緻密部のドーパミンニューロンが減少することでパーキンソン病が発症することなどから、ドーパミン受容体は神経活動を調節する重要な代謝型受容体であると考えられている。ドーパミン受容体のノックアウト動物では、脳・神経回路の発生、生後発達に影響を与える恐れがある。そこで、ドーパミン受容体を生後任意の時期にノックダウンすることができるコンディショナルノックダウンマウスを用い、行動実験、活動依存性マンガン造影 MRI による全脳神経活動履歴計測を同個体に対して実施することで、ドーパミン受容体ノックダウンによる表現系の変化、神経活動の変化を解析する。また、ドーパミン受容体発現細胞に cre リコンビナーゼを発現しているマウスと flox-G-CaMP マウスとを交配させることにより、ドーパミン受容体発現細胞の Ca^{2+} イメージングを行う。これにより、ドーパミン受容体及びドーパミン受容体発現細胞の機能解明を目指す。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究は東北大学環境・安全委員会遺伝子組換え実験安全専門委員会、同動物実験専門委員会、及び大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会、同動物実験委員会の許可を得て行った。

(1) D1 受容体ノックダウンによる行動異常及び全脳神経活動計測

新潟大学脳研究所より提供を受けた D1 ドーパミン受容体ノックダウンマウスに対して、ドキシサイクリン(Dox) 投与前、1 週間後、3 週間後、投与終了 1-2 週間後に運動機能解析を行った。また、同個体に対して定量的活動依存性マンガン造影 MRI による全脳神経活動履歴計測を行った。これにより、ドーパミン受容体の減少に伴う、運動機能としての行動学的な表現系の変化と、神経活動の変化を定量的に評価した。

(2) ドーパミン受容体発現細胞特異的な神経活動計測

新潟大学脳研究所より提供を受けたドーパミン D2 受容体に cre リコンビナーゼを発現して

いるマウスの系統を確立するとともに、flox-G-CaMP マウスと交配させることにより、線条体 D2 受容体発現細胞で Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質 G-CaMP を発現するマウスの系統を確立した。このマウスの線条体脳スライス標本を用いて、多細胞 Ca^{2+} イメージングによる神経活動計測を行うことができるかを検証した。

C. 研究結果

(1) D1 受容体ノックダウンによる行動異常及び全脳神経活動計測

協調運動テストとして、ローターロッドテスト、ビームウォークテスト、ポールテストを行った。これらの運動機能試験では、3 週間の Dox 投与により成績の低下が見られた。無動のテストとして、カタレプシーテストを行った。カタレプシーテストでは Dox 投与期間が 1 週間でも無動時間が長くなり、3 週間ではさらに長くなった。

これらの行動実験を行ったマウスに対して、定量的活動依存性マンガン造影 MRI による全脳神経活動履歴計測を行った。その結果、3 週間の Dox 投与により神経活動が亢進している領域が複数見られた。特に、側坐核、分界条床核、腹側淡蒼球、扁桃核、視床、視床下部、上丘などで、顕著な神経活動の亢進が観察された。

(2) ドーパミン受容体発現細胞特異的な神経活動計測

ドーパミン D2 受容体発現細胞に cre リコンビナーゼを発現している Drd2-iCre マウスの提供を受け、C57BL/6J と交配させることによりこのマウスの系統を確立した。この Drd2-iCre マウスと、flox-G-CaMP マウスを交配させることにより、D2 受容体発現細胞に G-CaMP を発現しているマウスの作出に成功した。このマウスの線条体スライス標本で、多細胞 Ca^{2+} イメージングを行ったところ、刺激頻度に応じた Ca^{2+} 上昇の計測を行うことに成功した。

D. 考察

(1) D1 受容体ノックダウンによる行動異常及び全脳神経活動計測

行動実験の結果から、D1 受容体ノックダウンにより運動機能の低下が起こることが明らかとなった。一方、活動依存性マンガン造影 MRI による全脳神経活動履歴計測の結果から、D1 受容体ノックダウンにより、側坐核、腹側淡蒼球、扁桃核を中心とした辺縁系の神経活動が亢進することが明らかとなった。これらの結果から、D1 受容体ノックダウンによる運動機能の低下は、脳の運動系が関与する筋活動の異常によるものよりも、辺縁系が関与する情動の異常により関連している可能性が示唆された。

(2) ドーパミン受容体発現細胞特異的な神経活動計測

D2 受容体発現細胞に G-CaMP を発現するマウスの線条体における多細胞 Ca^{2+} イメージングの結果から、単発刺激でも十分神経活動を計測することが明らかとなった。これにより、in vitro, in vivo において、多細胞神経活動イメージングを行うことが可能となることが示唆され、間接路の神経活動機序を明らかにするための端緒となった。

E. 結論

D1 受容体ノックダウンにより、運動機能の低下が見られたが、これは辺縁系の神経活動亢進によるものであることが示唆された。

D2 受容体に G-CaMP を発現しているマウスの作出及び多細胞 Ca^{2+} イメージングに成功した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

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

後部視床下部において過眠症に関連する DNA メチル化部位の探索と各脳領域に特異的なメチル化プロファイルの探索

研究代表者 嶋多 美穂子¹⁾,²⁾
研究分担者 柿田 明美³⁾, 宮川 卓²⁾, 藤本 明洋¹⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野 2) 公益財団法人東京都医学総合研究所精神医学行動分野睡眠プロジェクト 3) 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

本研究ではナルコレプシーに関連する DNA メチル化部位のゲノムワイドな探索を目的とし、患者と対照群の死後脳の後部視床下部、及び側頭葉皮質における網羅的メチル化解析を行った。その結果、ナルコレプシーに関連するメチル化部位は後部視床下部特異的であるとの結果が得られた。さらに新潟大学脳研究所の対象群サンプル（後部視床下部、側頭葉皮質、小脳）の解析を行うことにより、脳の DNA メチル化は、部位によって大きく異なり、その原因は脳の各部位を構成する細胞の構成が異なることに由来することが明らかとなった。本年度は脳の部位特異性に着目し、後部視床下部特異的に発現しているスプライシングバリエーションの検出を目的として、その解析基盤の整備を行うと共に、視床下部で神経損傷に関わる可能性が指摘されている CD4 および CD8 陽性 T 細胞各々における網羅的 DNA メチル化解析を実施した。

A. 研究目的

本研究は、新潟大学脳研究所のサンプル（後部視床下部、側頭葉皮質、小脳）を用いた DNA メチル化解析からも明らかとなった脳の部位特異性に着目し、ナルコレプシーで神経の脱落が起こっている後部視床下部特異的に発現しているスプライシングバリエーションを検出することを目的とする。これまでのスプライシングバリエーションに関する研究で用いられてきたショートリードシーケンス等の手法では、mRNA の全長を解析することができず、そのデータに基づくスプライシングバリエーションは推定にならざるを得なかった。これに対し、ロングリードシーケンスでは、多くの遺伝子に対して全長の mRNA の解析が可能であることから、スプライシングバリエーションについてのより確からしい情報を得ることができるため、本研究ではロングリードを用いて脳の後部視床下部の遺伝子発現解析を行う。

また本研究のもう一つの目的は、後部視床下部における神経損傷に関わっているとされる CD4 および CD8 陽性 T 細胞における、ナルコレプシー関連 DNA メチル化部位を探索し、各々の細胞に疾患特異的な異常がないかを検討することである。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. B 細胞由来 cDNA のロングリードシーケンス

脳由来のサンプルよりも高い RIN 値が期待される B 細胞由来の RNA から得られた cDNA を用いたロングリードシーケンスを行い、データの標準化法や解析方法についての検討を行った。国際 Hapmap 計画で解析された日本人サンプルの B 細胞株 (N = 67) から RNA を抽出し、逆転写して cDNA にしたサンプルを、Oxford Nanopore シーケンサーを用いたロングリードシーケンス法にて解析を行った。

2. データの標準化についての検討

得られたデータを用いて、標準化法の必要性について検討を行った。先行研究から、ロングリードシーケンスにおいても問題となる可能性がある Sample-specific GC content bias¹ 並びに Sample-specific length bias¹ について検討を行い、conditional quantile normalization² の有用性についての検討を行った。

3. CD4 および CD8 陽性 T 細胞における DNA メチル化解析

ナルコレプシー患者 (N=28) 及び対照群 (N=28) の末梢血から磁気ビーズを用いて CD4 および CD8 陽性 T 細胞を分離し、DNA を抽出した。それらの DNA からメチル化アレイ (Infinium® MethylationEPIC BeadChip (illumina)) を用いて DNA メチル化率についてのデータを取得した。フィルタリングならびに標準化を行い、患者・健常者間でメチル化率の比較を行った。さらにナルコレプシー患者 (N=14) 及び対照群 (N=14) からなる異なるサンプルセットを用いた再現性研究も実施した。

なお、本研究はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に則り実施され、東京大学、東京都医学総合研究所並びに新潟大学の倫理委員会の承諾を得ている。また全ての被験者からは書面でのインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1. B 細胞由来 cDNA のロングリードシーケンス

日本人 B 細胞株由来 cDNA (N = 67) から得られたロングリードシーケンスの総リード数の平均値は 13,101,930 (SD: 3,846,992) であり、平均のリード長は 1220.8bp (SD: 59.8) であった。1 サンプル当たりの総リード数を 1M に補正した値が 0.5 より大きいものを発現しているとみなし、5%以上のサンプルで発現しているスプライシングバリエーションを探索したところ、46,707 個が検出された。さらに常染色体上にあるスプライシングバリエーションに絞ったところ、16,152 遺伝子に由来する 45,003 スプライシングバリエーションが検出された。

2. データの標準化についての検討

ロングリードシーケンスにて得られたデータを用いて、サンプルごとにリードの GC 含量と

遺伝子の長さによって得られるリード数にバイアスがあるかどうかを検討した。その結果リード配列の GC 含量と得られるリード数の間には弱い負の相関があったものの、サンプル間の比較において、サンプル間の発現量変化 ($\log_2(\text{fold change})$) と GC%の相関係数の最大値は $r=0.29$ となり、明らかに補正が必要なほどのバイアスはないと考えられた。遺伝子の長さについても長さによって得られるリード数はほぼ同等であることが明らかとなった (サンプル間の発現量変化と遺伝子長の相関係数の最大値は $r=0.19$)。これらのバイアスは conditional quantile normalization を実施した後のデータでは、若干の改善が見られた (GC% $r=0.16$, 遺伝子長 $r=0.09$)。

3. CD4 および CD8 陽性 T 細胞における DNA メチル化解析

患者・健常者の比較の結果、特に CD4 陽性 T 細胞で患者・健常者間のメチル化の違いが大きいこと、患者では全体的にメチル化率が低下していることが判明した。この傾向は再現性研究でも確認された。はじめの関連解析で $P < 1E-5$ となり、再現性研究で $P < 0.05$ かつ患者での高/低メチル化の方向が一致した CpG 部位は 2 部位のみであり、患者で低メチル化していた。一方、はじめの解析の P 値について複数の閾値を設定し ($P < 1E-4$, $1E-3$, $1E-2$) 検討したところ、再現性が得られる部位のほとんどは、患者で低メチル化しており (低メチル化部位数/再現された部位数: 19/20, 192/195, 1675/1710)、これは解析 CpG 部位 (N=735, 578) のうち患者で低メチル化している部位の数 (N=448, 407) と比較した際にも有意に多かった (P の閾値 $1E-3$ の場合、 $P < 2.2E-16$, OR=41.0)。また、疾患関連メチル化領域としては *C1R* や *CCL5* といった免疫関連遺伝子上流領域が検出され、再現性が確認された。

D. 考察

ロングリードシーケンスを用いて遺伝子発現解析を実施した場合、ほとんどの mRNA については一度にその全長を読むことが可能であり、そのため Sample-specific length bias は発生しにくいと考えられる。また、ショートリードシーケンス法を用いた遺伝子発現解析で報告されているほどの GC content bias も今回のデータでは

確認されなかった。そのため conditional quantile normalizationによるバイアスの改善は大きなものではなく、ロングリードシーケンスの発現データについては、サンプルごとの総リード数を揃えれば、conditional quantile normalizationを行わなくとも妥当な結果が得られる可能性が示唆された。

また、T細胞におけるDNAメチル化解析の結果から、ナルコレプシー患者で疾患関連メチル化部位が顕著に全体的な低メチル化傾向を示した。さらに低メチル化傾向を示す部位の特性について検討したところ、これらの部位は遺伝子のプロモーター領域に有意に少ないことが明らかとなった ($P = 2.63E-5$)。患者における低メチル化傾向は先に実施した異なるサンプルの全血を用いた解析でも見られていたが、脳サンプルを用いたメチル化解析では見られていない。今後このT細胞における全体的な低メチル化が起こる原因を探索すると共に、解析やサンプルのバイアスに起因していないことをさらに詳細に検討する必要がある。

E. 結論

B細胞由来のcDNAを用いたロングリードシーケンス解析により、データの解析手法などについての知見が得られた。また、T細胞におけるDNAメチル化解析からは、特にCD4陽性T細胞におけるメチル化率の異常がみられ、患者での低メチル化傾向が見られたことから、今後この現象について詳細に検討する必要がある。

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）

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

1. Joseph K. Pickrell et al. Nature 2010

2. Kasper D Hansen et al. Biostatistics 2012

TDP-43 細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成

研究代表者 佐藤 俊哉¹⁾

研究分担者 大久保 直¹⁾、加藤 利佳²⁾、中村 幹昭³⁾、笹岡 俊邦⁴⁾

1) 北里大学医学部実験動物学 2) 北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター
3) 北里大学医療系研究科 4) 新潟大学脳研究所

研究要旨

ゲノム編集技術を用い、内在性 TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 12 系統を樹立した。各系統の特性から、TDP-43 C 末領域の約半分程度を欠損させると TDP-43 機能が失われ、C 末領域の前半部分は機能維持、後半部分は蛋白の安定性維持に重要な領域と考えられた。この C 末領域の前半部分を欠損した TDP-43 は 36 kDa の変異蛋白として確認されたが、核移行シグナル (NLS) が存在するにも拘らず核移行が阻害されていた。この結果から、NLS を制御するスイッチが TDP-43 C 末領域に存在するとの仮説を立て、質量分析を用いて TDP-43 の生理的な翻訳後修飾を検索し、脱アミドや酸化等を確認したが、細胞内局在と一致する翻訳後修飾は同定できなかった。そこで細胞内局在スイッチが存在する領域を狭め、候補となる翻訳後修飾を推定するため、Hela 細胞を用いたスクリーニング系を確立した。

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 TDP-43 は、常染色体性優性遺伝形式を示す家族性 ALS の原因遺伝子にもなることが報告され、ALS 病態の中心的な分子となった。TDP-43 は、2 つの RNA 認識モチーフ (RRM) を有する不均一核内リボ核酸蛋白に分類され、主に核に局在するが、実際には核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) があり、核-細胞質間をシャトルしている。しかし ALS の残存運動神経では、TDP-43 は細胞質に局在を変えて凝集体を形成することから、このシャトルを制御するスイッチの同定が、ALS 病態の解明に必要である。申請者は、ゲノム編集技術を用いて TDP-43 C 末領域の部分欠損マウスを作成し、このスイッチが C 末領域内に存在することを示唆する結果を得た。C 末領域はプリオン様ドメインとも呼ばれる

天然変性領域である。一般的に天然変性蛋白は、細胞内ネットワークにおけるハブ蛋白として働き、翻訳後修飾により制御され、様々な蛋白と結合する。そこで、このマウスを起点としてプロテオミクス技術を融合させることにより、未知の TDP-43 細胞内局在スイッチを明らかにする計画を立案した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

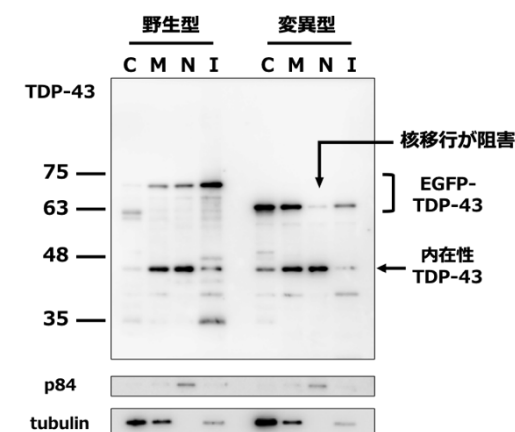
野生型マウス (8 週および 42 週齢) の脳を用い、EzSubcell Extract (ATTO) により細胞質と核に分画後、ゲル内消化と質量分析により TDP-43 由来のペプチド断片を同定した。次に TDP-43 などの天然変性蛋白を特異的に沈殿させる方法として、Biotinylated isoxazole (b-isox) 分画法が開発されているため (Kato et al. *Cell* 2012 6 149: 753)、8 週齢のマウス脳を用い、本論文に従って濃縮を行なった。培養細胞を用いた実験は、新潟大学脳研究所脳神経内科学分野の小野寺理教授より、pEGFP-C3 ベクターのクローニングサイト (XhoI/PstI) に野生型 TARDBP cDNA をつない

だクローンの提供を受け、これを PCR により改変してコンストラクトを作成し、Hela 細胞への一過性発現後、ウェスタンブロットにて TDP-43 の細胞内局在を確認した。

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

野生型マウス的大脑から細胞質および核分画を抽出し、トリプシンを用いたゲル内消化と質量分析にてペプチド断片を同定したところ、TDP-43 のカバー率は 41%と低く、TDP-43 特異抗体による免疫沈降法を用いてもカバー率は 42%に止まり、両者を合わせても 44%であった。そこで TDP-43 などの天然変性蛋白を特異的に沈殿させる方法として、b-isox 分画法を用いて TDP-43 の濃縮を試みたところ、回収率は～1%程度と低く、濃縮率は～10 倍程度と TDP-43 に対する特異性も充分ではなかった。翻訳後修飾を同定するため、これまでにゲル内消化、免疫沈降法、b-isox 分画法などを行なったが、十分な濃縮が難しいことから、細胞内局在スイッチの候補となる領域を狭める方策に転換した。候補領域をスクリーニングするため、EGFP タグを融合させたヒト TDP-43 発現コンストラクトを作成し、Hela 細胞に導入した。ヒト TDP-43 C 末領域の前半部分を欠損させたコンストラクトを発現させた結果、変異型マウスと同様に核移行が阻害された TDP-43 が確認された。



D. 考察

TDP-43 C 末領域に存在するプリオン様ドメインは、非荷電極性アミノ酸 (Asn, Gln, Tyr) と Gly を主体とする low complexity 配列から成り、トリプシンによる切断部位 (Lys, Arg) が極めて少ないため、ペプチド鎖が長くなるために質量分析による同定が困難である。また UniProt 上で示されている TDP-43 の翻訳後修飾は、SUMO 化 (K79, K84, K95, K102, K181, K263)、リン酸化 (S183, S292)、メチル化 (R293) のみである。これらはリン酸化濃縮などの特殊な方法を用いた解析により同定されたものであり、TDP-43 の十分な濃縮ができなければ、相対的な割合が少ない翻訳後修飾の同定は難しい。研究当初は、特定のバイアスなしに同定する予定であったが、今後は Hela 細胞を用いたスクリーニング系にシフトし、解析を継続する予定である。

E. 結論

野生型 TDP-43 には、脱アミドや酸化等の翻訳後修飾が確認されたが、細胞内局在と一致する翻訳後修飾は同定できなかった。今後は Hela 細胞を用いたスクリーニング系にシフトし、細胞内局在スイッチの候補領域を狭める。

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

佐藤俊哉. 筋萎縮性側索硬化症モデルの作成と解析. 2020 年度脳研究所共同利用共同研究 (笹岡班) 合同セミナー、2021 年 1 月 20 日、新潟大学脳研究所 (新潟) オンライン会議

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

Production of congenital nystagmus model mice and analysis of visual function

Principal Investigator Keisuke Yonehara¹

Co-Investigators Toshikuni Sasaoka², Manabu Abe²

¹ DANDRITE, Department of Biomedicine, Aarhus University ² Center for Bioresource-based Researches, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

Detection of visual motion is fundamental to the function of our visual system. The first stage where visual motion is computed in the brain is the retina. Dysfunction of retinal motion computation is linked to congenital nystagmus, a severe eye movement disorder of humans and mice. In collaboration with Prof. Toshikuni Sasaoka and Dr. Manabu Abe, we have been producing knock-in mice for genetically labeling retinal bipolar cell types, which play critical roles in retinal motion computation. We have been creating 3 mouse lines in which cell type specific promoters are connected to DNA recombinase or tetracycline-controlled transactivator (tTA). The obtained mouse lines will be transported to DANDRITE Denmark where PI of this project will analyze light responses of labeled cell types with two-photon-targeted patch clamp recordings and two-photon glutamate imaging, and then test the effect of silencing these cell types with chemogenetic tools such as DREADD on the retinal motion computation and eye movements to gain causal relationship between temporal dynamics of individual bipolar cell types and direction-selective computation by direction-selective ganglion cells. This project would provide key insights not only into the basic functioning of retinal circuits but also how impaired activity and connectivity of retinal cell types may lead to the visual disorders.

A. INTRODUCTION

Yonehara recently found that spatially asymmetric wiring between type-5 bipolar cell types and ON direction-selective cells are important for the visual motion computation in the mouse retina (Matsumoto et al., 2019 Curr Biol). In order to genetically target individual type-5 bipolar cells for manipulating activity or gene expression, we aimed to generate knock-in mouse lines in which cell type specific promoters are connected to either Cre recombinase or tTA.

B. MATERIALS AND METHODS

Materials

BAC DNA constructs for containing mouse Sox6, Chrm2, and Slitrk5.

ES cells derived from C57BL/6 mouse line.

Culture medium for the ES cells.

ICR mice for implanting gene-introduced ES cells.

Methods

First, targeting vectors to generate knock-in mouse lines were made by DNA cloning and recombinant DNA experiment. Next, the targeting vectors were electroporated into ES cells, and the cells were cultured under the drug selection. ES cell colonies which were survived under the drug selection were screened for the correct homologous recombination. After the ES cells harboring the correct gene insertion are confirmed by Southern blot or DNA sequencing, the ES cells were microinjected into 8-cell stage embryos of ICR strains by the micro-manipulation. The microinjected blastocysts were transplanted into the uterus of pseudo-pregnant female mice.

C. RESULTS/OUTCOMES

Yonehara visited BRI Niigata University 21 December 2020 to discuss the plan for this

collaborative project.

To label type-5A bipolar cells, we made a targeting vector for making Sox6-mtTA-KI mice, in which mtTAwprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon in exon 3 of Sox6 in the mouse genome. Endogenous Sox6 gene is disrupted. However, we have been failing to obtain chimera mice due to potential embryonic lethality. In the recently accepted Global Collaborative Research Project FY 2021, we aim to make a targeting vector for making Sox6-CreERT2-KI mice, in which CreERT2wprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon of Sox6 in the mouse genome.

To label type-5B bipolar cells, we made a targeting vector for making Chrm2-iCreS-KI mice, in which iCreSwprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon in exon 3 of Chrm2 in the mouse genome. Endogenous Chrm2 gene is disrupted. We have successfully obtained F1 heterozygous mice as confirmed by genomic PCR. We have preserved frozen sperm for shipment. We will use heterozygous mice for experiments.

To label type-5C bipolar cells, we made a targeting vector for making Slitrk5-CreERT2-KI mice, in which CreERT2wprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon of Slitrk5 in the mouse genome. Endogenous Slitrk5 is disrupted. We have successfully obtained F1 heterozygous mice as confirmed by genomic PCR. We have preserved frozen sperm for shipment. We will use heterozygous mice for experiments.

D. DISCUSSION

F1 heterozygous mice for labeling type-5B and -5C bipolar cells have been successfully established. Frozen sperm from these lines are being transported to the PI Keisuke Yonehara at DANDRITE, Denmark. For labeling type-5A bipolar cells, new strategies that do not use mtTA should be evaluated to avoid potential embryonic lethality. For this reason, we will make Sox6-CreERT2-KI mice in the future project. In case we fail to label single cell types in the retina, we will change the strategy for generation of genetically-modified mice for target genes (e.g. use of Cre or CreERT or tTA).

E. CONCLUSION

Generation of F1 heterogenous mice for 2 strains has been successfully achieved. We will start a new Global Collaborative Research Project next year to complete the analysis of visual function of these mouse lines and generate a few more mouse lines to label type-5A and type 7 bipolar cells

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

No papers published yet.

2. PRESENTATIONS

Not presented yet.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

Not applicable.

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

Not applicable.

3. OTHERS

Not applicable.

Elucidating the role of autophagy in NF1-associated gliomas

Principal Investigator Fausto J Rodriguez¹

Co-Investigators Manabu Natsumeda², Shoji Saito², Masayasu Okada², Yukihiro Fujii²,
Akiyoshi Kakita³

¹Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine,

²Department of Neurosurgery and ³Pathology, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

We have previously shown mTOR activation in neurofibromatosis type 1 (NF1)-associated gliomas, tuberous sclerosis complex, subependymal giant cell astrocytomas and focal cortical dysplasia (FCD) type IIb with somatic mutations in mTOR. The mTORC1 pathway is a well-known regulator of autophagy. However, the induction/suppression has not been well studied in these disease entities. We present preliminary results of immunohistochemistry of autophagy markers in these tissues.

A. INTRODUCTION

Our group and others have demonstrated a role for mTOR activation in the biology of gliomas developing in patients with neurofibromatosis type 1 (NF1)⁵, similar to tumors developing in patients with tuberous sclerosis complex (TSC)⁶. Additionally, a subset of NF1-associated gliomas demonstrates phenotypic features similar to subependymal giant cell astrocytoma (SEGA), a disease defining manifestation of TSC complex². Also, mTOR is known to be activated in focal cortical dysplasia (FCD) type IIb with somatic mutations in mTOR⁴. The mTORC1/2 pathway, especially mTORC1, is known to be a master regulator of autophagy. Inhibition of mTORC1/2 induces autophagy and activation suppresses autophagy. We now aim to test protein levels of autophagy related proteins in NF1-associated gliomas, TSC and FCD Type IIb.

B. MATERIALS AND METHODS

Patients

Unstained slides of previously characterized NF-1 associated gliomas were sent to BRI for immunohistochemical analysis. Additional unstained slides from characterized TSC, SEGA and FCD Type IIb cases were prepared.

Histological and immunohistochemical analysis

Surgical specimens were fixed with 20% buffered formalin and embedded in paraffin (FFPE). Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE), LC3B and p62.

C. RESULTS/OUTCOMES

We found staining for LC3B and p62 in NF1-associated gliomas to be robust (Fig 1). We had speculated that LC3B expression would be suppressed and p62 expression to be high in NF1-associated gliomas, expected to be mTORC1-activated. This was not the case.

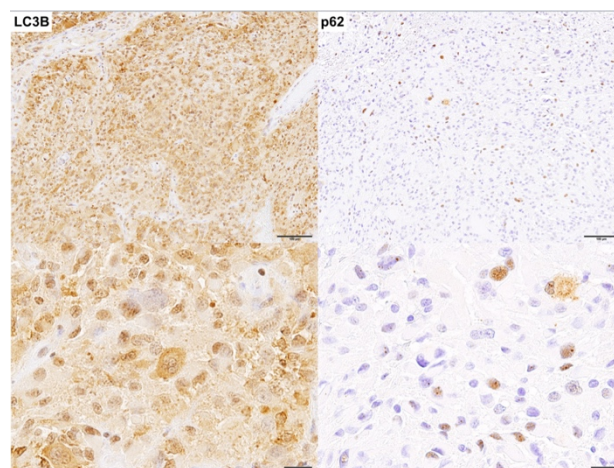


Fig 1. Immunostaining of LC3B and p62 in NF1-associated gliomas.

D. DISCUSSION

To improve our understanding of the preliminary results, the following steps were thought to be necessary.

1. Immunohistochemistry analysis of phosphor-S6 is needed to assess whether mTORC1 pathway is activated in these lesions or not.
2. Careful assessment of punctate staining, suggesting the presence of autophagosomes, in the cytoplasm of cells is necessary.
3. We had used a very diluted concentration of p62 (x1000), and thus should be increased.

E. CONCLUSION

Preliminary results showed that assessment of LC3B and p62 is feasible by immunohistochemistry. Further steps shown above are needed to properly assess mTORC1 activation and expression of autophagy-associated proteins in NF1-activated gliomas, SEGAs, TSC and FCD type IIb with somatic mutations of mTOR.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

1. **Natsumeda M**, Miyahara H, Yoshimura J, Nakata S, Nozawa T, Ito J, Kanemaru Y, Watanabe J, Tsukamoto Y, Okada M, Oishi M, Hirato J, Wataya T, Ahsan S, Tateishi K, Yamamoto T, **Rodriguez FJ**, Takahashi H, Hovestadt V, Suva ML, Taylor MD, Eberhart CG, **Fujii Y**, **Kakita A**. GLI3 is associated with neuronal differentiation in SHH-activated and WNT-activated medulloblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 80(2):129-136, 2021.
2. Nix JS, Yuan M, Imada EL, Ames H, Marchionni L, Gutmann DH, **Rodriguez FJ**. Global microRNA Profiling Identified miR-10b-5p as a Regulator of Neurofibromatosis 1 (NF1)-glioma Migration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2021; 47:96-107
3. Klionsky D, **Natsumeda M**, 2922 other authors. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*, 17(1):1-382, 2021.
4. **Natsumeda M**, Liu Y, Nakata S, Miyahara H, Hanaford A, Ahsan S, Stearns D, Skuli N, Kahlert UD, Raabe EH, **Rodriguez FJ**, Eberhart CG. Inhibition of enhancer of zest homologue 2 is a potential therapeutic target for high-MYC medulloblastoma. *Neuropathology* 39:71-77, 2019.
5. Palsgrove DN, Brosnan-Cashman JA, Giannini C, Raghunathan A, Jentoft M, Bettgowda C, Gokden M, Lin D, Yuan M, Lin MT, Heaphy CM, **Rodriguez FJ**. Subependymal giant cell astrocytoma-like astrocytoma: a neoplasm with a distinct phenotype and frequent neurofibromatosis type-1-association. *Mod Pathol* 31(12): 1787-1800, 2018.

6. **Natsumeda M**, Maitani K, Liu Y, Miyahara H, Kaur H, Chu Q, Zhang H, Kahlert U, Eberhart CG. Targeting Notch signaling and autophagy increases cytotoxicity in glioblastoma neurospheres. *Brain Pathol* 26(6):713-23, 2015.
7. 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* 78(3):375-86, 2015.
8. Hütt-Cabezas M, Karajannis MA, Zagzag D, Shah S, Horkayne-Szakaly I, Rushing EJ, Cameron JD, Jain D, Eberhart CG, Raabe EH, **Rodriguez FJ**. Activation of mTORC1/mTORC2 signaling in pediatric low-grade glioma and pilocytic astrocytoma reveals mTOR as a therapeutic target. *Neuro Oncol* 15(12):1604-14, 2013.
9. Miyahara H, **Natsumeda M**, Shiga A, Aoki H, Toyoshima Y, Zheng Y, Takeuchi R, Murakami H, Masuda M, Kameyama S, Izumi T, **Fujii Y**, Takahashi H, **Kakita A**. Suppressed expression of autophagosomal protein LC3 in cortical tubers of tuberous sclerosis complex. *Brain Pathol*, 23(3): 254-62, 2013.
10. **Natsumeda M**, Aoki H, Miyahara H, Yajima N, Uzuka T, Toyoshima Y, **Kakita A**, Takahashi H, **Fujii Y**. Induction of autophagy in temozolomide treated malignant gliomas. *Neuropathology* 31: 486-93, 2011.
11. Jentoft M, Giannini C, Cen L, Scheithauer BW, Hoesley B, Sarkaria JN, Abell-Aleff PC, Rodriguez EF, Li Y, **Rodriguez FJ**. Phenotypic variations in NF1-associated low grade astrocytomas: possible role for increased mTOR activation in a subset. *Int J Clin Exp Pathol* 4(1):43-57, 2010.

2. PRESENTATIONS

1. **Rodriguez F**. Role of ATRX and alternative lengthening of telomeres (ALT) in neurofibromatosis type 1-associated solid malignancies. Niigata Neuroscience Seminar, August 2019, Niigata.
2. **Natsumeda M**. Monitoring of autophagy in gliomas. Niigata Neuroscience Seminar, August 2019, Niigata.

**G. APPLICATION AND REGISTRATION
STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY
RIGHTS**

(Including prospects)

1. PATENT

None

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

None

3. OTHERS

4. Memorandum of Understanding (MOU) was signed between Department of Pathology, Johns Hopkins University and Brain Research Institute, Niigata University in the February, 2019.

HYDRODYNAMIC PATHOLOGY OF THE BRAIN

Principal Investigator Ingrid Kwee, M.D. ¹
Co-Investigator Hironaka Igarashi, M.D., Ph.D. ²

¹Department of Neurology, University of California, Davis ²Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, University of Niigata

Abstract

We plan to screen for aquaporin 4 modulators developed at the Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, for their impact on brain hydrodynamics using a high throughput in vivo MR technique, JJVCPE, also developed at the Center¹. Potential drugs can thereby be screened efficiently and applied to animal disease models which underlying pathology involve aberrant brain hydrodynamics.

A. INTRODUCTION

Aquaporin 4 (AQP-4) is a water channel unique to the brain. Researchers at the Center have developed a number of AQP-4 analogue modulators both of inhibitory or facilitatory nature. These modulators have helped define the nature by which central nervous system (CNS) water flow is modulated. Indeed the Center's team of researchers have had many scientific publications in this field culminating with the review paper by Dr. Tsutomu Nakada and this author, titled "Fluid Dynamics Inside the Brain Barrier:

Current Concept of Interstitial Flow, Glymphatic Flow, and Cerebrospinal Fluid Circulation in the Brain."² The impact of AQP-4 modulation on the potential prevention of Alzheimer's disease is a logical endpoint as amyloid clearance from the brain is CSF flow dependent. Nevertheless, from a scientific standpoint, a step by step approach is prudent. Therefore, we embarked on demonstrating that AQP-4 facilitation using TGN-073³ can effect CSF reduction in a common neurologic condition, hydrocephalus, in a mouse model of hydrocephalus.

B. MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in accordance with the animal research guidelines of the Internal Review Board of University of Niigata. Control and hydrocephalus mice were maintained under standard laboratory conditions under a 12/12 h light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. Animals breathing spontaneously and anesthetized with an intraperitoneal administration of urethane (1.2 g/kg) were placed supine in a custom-designed Plexiglas stereotactic holder. The head was fixed in position by ear and tooth bars. Rectal temperature was maintained at 37±0.5°C using a customized temperature control system. Oxygen saturation was monitored throughout the MR study using a pulse oximeter Mouse Ox (Starr Life Sciences Co., Oakmont, Pennsylvania, USA), with probe placement on the left thigh. Study mice received TGN-073 was administered intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg (control dose) or 200 mg/kg (experimental dose) in 0.2 ml saline 30 min, daily, for 3 days before the study. Normal saline of 0.2 ml was used for sham injection. For the dynamic imaging study, 0.2 ml normal saline containing 40% of [¹⁷O]H₂O (Isotec Inc., St Louis, Missouri, USA) was administered as an intravenous bolus injection at the 75th phase (10 min after the first scan) using an automatic injector at 0.04 ml/s through PE10 tubing inserted into the right femoral vein.

C. RESULTS/OUTCOMES

A significant reduction in the tracer ($[^{17}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$) content was found in the cortex, indicating higher turnover of interstitial fluid of the cortex associated with AQP-4 facilitation, improving brain tissue damage and brain function.

D. DISCUSSION

TGN-073 clearly reduces CSF in ventricles, thereby reducing the degree of hydrocephalus in the mice studied. The results support the application of AQP-4 facilitators in Alzheimer's disease where increased amyloid clearance is anticipated to have a preventive effect on the development of Alzheimer's disease.

E. CONCLUSION

Effect of AQP-4 facilitation using TGN-073 was clearly established in the hydrocephalus mouse model. The desired *a priori* effect on brain damage and brain function was demonstrated, paving the way to application of TGN-073 and potential other AQP-4 facilitators in the treatment of other neurologic disorders such as Alzheimer's disease.

F. PUBLICATIONS

¹Igarashi H., Tsujita M., Kwee I.L., Nakada T.
Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1:
17O JJVCPE MRI study in knockout mice.
Neuroreport. Jan 8;25(1):39-43, 2014.

² Nakada T. and Kwee I.L. Fluid Dynamics Inside the Brain Barrier: Current Concept of Interstitial Flow, Glymphatic Flow and Cerebrospinal Fluid Circulation in the Brain. The Neuroscientist May 1:1073858418775027. doi: 10.1177/1073858418775027. [Epub ahead of print], 2018.

³Huber V.J., Igarashi H., Ueki S., Kwee I.L., Nakada T. Aquaporin-4 facilitator TGN-073 promotes interstitial fluid circulation within the blood-brain barrier: [17O]H₂O JJVCPE MRI study. Neuroreport. Jun 13;29(9):697-703, 2018.

1. PAPERS

Manuscript based on the funded work is in preparation.

2. PRESENTATIONS

Not applicable

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

Not applicable.

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

Not applicable.

3. OTHERS

Not applicable.

The role of striatal direct and indirect pathways and dopamine D2 isoforms in the pathophysiology of psychosis

Principal Investigator YanYan Wang¹

Co-Investigator Toshikuni Sasaoka²

¹Department of Pharmaceutical Sciences and Health Outcomes, Ben and Maytee Fisch
College of Pharmacy, The University of Texas at Tyler, USA

²Department of Comparative & Experimental Medicine, Brain Research Institute,
Niigata University

Abstract

The goals of this research are to decipher the involvement of striatal direct and indirect pathways in the pathophysiology of psychosis and determine the differential role of two isoforms of the dopamine D2 receptor (D2L and D2S) in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders in mice. In the past year, Profs. Abe and Sakimura have transferred a D2S KO chimeric mouse they generated to Prof. Sasaoka. Through a breeding scheme, Prof. Sasaoka's lab has obtained D2S heterozygous mice harboring the loxP-flanked allele of D2R gene and beta-actin-Cre gene and is in the process of breeding the mice to produce D2S homozygous mice. In collaboration with Profs. Fukunaga's and Shioda's groups, it was revealed that D2L could interact with the 5-HT1A receptor. Deficiency in D2L caused dysfunction of the 5-HT1A receptor, resulting in stress vulnerability in mice. In addition, D2L was linked to the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway and the deletion of D2L attenuated the activity of ERK, resulting in a decrease in dendritic spine density and neuronal activity. The collaborative research leads to a better understanding of the role of the striatal pathways and two isoforms of the dopamine D2 receptor in regulating motor and cognitive functions and in neuropsychiatric disorders.

A. INTRODUCTION

The striatum is the main receptive nucleus in the basal ganglia of the forebrain and receives direct inputs from virtually all areas of the cerebral cortex. The striatum in turn sends its projections to other basal ganglia areas through two main pathways: a direct pathway (projections from the striatum to the substantia nigra pars reticulata) that is mediated by the dopamine D1 receptor (D1R), and an indirect pathway (projections from the striatum to the globus pallidus) that is mediated by the dopamine D2 receptor (D2R). Two isoforms of D2R: D2L (long form) and D2S (short form), have been identified in rodents and humans and have distinct functions. The adequate balance between these two output pathways is crucial for motor control and various cognitive functions. Our collaborative research project is focused on delineating the involvement of direct and indirect pathways and D2R isoforms in the pathophysiology of neuropsychiatric

disorders such as schizophrenia and Parkinson's disease.

B. MATERIALS AND METHODS

We use a multidisciplinary approach including molecular genetic technology, behavioral tests, pharmacological assays, immunohistochemistry, imaging technology, and electrophysiological recordings. We are collaborating with Profs. Abe and Sakimura group to generate D2S conditional KO mice. We take advantage of the new method using RNA splicing and Cre-loxP recombination to produce the conditional KO of D2S (Hayashi et al. *Molecular Brain*, 2014, 7:44).

C. RESULTS/OUTCOMES

Using the D2L KO mouse and a multidisciplinary

approach, we previously demonstrated that D2L and D2S indeed have differential functions. Our studies also indicate that the D2L KO mouse provides a valuable model system to enable us to investigate the differential role of individual D2R isoforms in the mammalian central nervous system (CNS). Clearly, this series of research would be greatly strengthened if we also have the D2S KO mouse.

Profs. Sakimura and Abe groups have generated the D2S KO chimeric mouse and given a D2S KO chimeric mouse to Prof. Sasaoka. Through a breeding scheme, Prof. Sasaoka's lab has obtained D2S heterozygous mice harboring the loxP-flanked allele of D2R gene and beta-actin-Cre gene and is in the process of breeding the mice to produce the D2S homozygous mice.

In collaboration with Profs. Fukunaga's and Shioda's groups, it was revealed that D2L could interact with the 5-HT1A receptor. Deficiency in D2L caused dysfunction of the 5-HT1A receptor, resulting in stress vulnerability in mice. In addition, D2L was linked to the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway and the deletion of D2L attenuated the activity of ERK, resulting in a decrease in dendritic spine density and neuronal activity.

D. DISCUSSION

Profs. Sakimura and Abe group has successfully generated the D2S KO chimeric mouse and Prof. Sasaoka's lab has obtained D2S heterozygous mice. This ensures us to be able to produce the D2S conditional KO mice in the future. The results from the collaborative research with Profs. Fukunaga's and Shioda's groups further demonstrate that the D2L KO mouse is a unique research tool for examining the differential functional role of individual D2R isoforms in the CNS.

E. CONCLUSION

In summary, we have made significant progresses in generating the D2S conditional KO mice. In collaboration with several faculty in Japan, we have made a valuable contribution towards a better understanding of the interactions between the dopaminergic and serotonergic systems. We look forward to continuing our collaborative research.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

Shioda N, Imai Y, Yabuki Y, Sugimoto W, Wang YY, Hikida T, Sasaoka T, Hasegawa E, Mieda M, Fukunaga K (2019) Dopamine D2L receptor deficiency causes

stress vulnerability through 5-HT1A receptor dysfunction in serotonergic neurons. *Journal of Neuroscience* 39:7551-7563.

Ran Q, Zhou Q, Oda K, Yasue A, Abe M, Ye X, Li Y, Sasaoka T, Sakimura K, Ajioka Y, Saijo Y. Generation of thyroid tissues from embryonic stem cells via blastocyst complementation in vivo. *Frontiers in Endocrinology, section Thyroid Endocrinology*, 2020 *Front. Endocrinol.*, 14 December 2020 <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.609697>

Yamaguchi T, Sumida T, Nomura S, Satoh M, Higo T, Ito M, Ko T, Fujita K, Haywood M, Sanbe A, Yoshimi K, Manabe I, Sasaoka T, Taylor M, Toko H, Takimoto E, Naito A, Komuro I. Cardiac Dopamine D1 Receptor Triggers Ventricular Arrhythmia in Chronic Heart Failure. *Nature Communications*, 2020 Aug 31;11(1):4364. doi: 10.1038/s41467-020-18128-x.

Kitahara A, Ran Q, Oda K, Yasue A, Abe M, Ye X, Sasaoka T, Tsuchida M, Sakimura K, Ajioka Y, Saijo Y, Zhou Q.: Generation of Lungs by Blastocyst Complementation in Apneumic Fgf10-Deficient Mice. *Cell Reports*. 2020 May 12;31(6):107626. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107626.

Saito N, Tainaka K, Macpherson M, Hikida T, Yamaguchi S, Sasaoka T. Neurotransmission through dopamine D1 receptor is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex. *Neuroscience Research*. 2020 Jul;156:58-65. doi: 10.1016/j.neures.2020.04.006.

Nakamura T, Rios LC, Yagi T, Sasaoka T, Kitsukawa T. Dopamine D1 and muscarinic acetylcholine receptors in dorsal striatum are required for high speed running. *Neuroscience Research* 2020 Jul; 156: 50-57. doi: 10.1016/j.neures.2019.12.001.

Uchigashima M, Konno K, Demchak E, Cheung A, Watanabe T, Keener D G, Abe M, Sakimura K, Sasaoka T, Uemura T, Imamura Karasawa Y, Watanabe M, Futai K. Specific Neuroligin3- α Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse hippocampus. *Elife* 2020 Dec 23;9:e59545. doi: 10.7554/eLife.59545. PMID: 33355091

Nakamoto C, Konno K, Miyazaki T, Nakatsukasa E, Natsume R, Abe M, Kawamura M, Fukazawa Y, Shigemto R, Yamasaki M, Sakimura K, Watanabe M (2020) Expression mapping, quantification, and complex formation of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain. *J Comparative neurology* 528(6):1003-1027.

Investigation of pathogenesis of Alzheimer's disease using mouse models

Principal Investigator Kensuke Futai¹
Co-Investigators Toshikuni Sasaoka²
Manabu Abe²

¹ Dept. Neurobiology, Univ. Massachusetts Medical School, Brudnick Neuropsychiatry Research Institute,

² Niigata University, Brain Research Institute

Abstract

In addition to perform the proposed research, we have recently published a manuscript in *eLife* entitled “Specific Neuroligin3- α Neurexin1 Signaling Regulates GABAergic Synaptic Function in Mouse Hippocampus”. Since this publication is also supported by the collaborative project, we presented it as the Research Report FY 2020.

Synapse formation and regulation require signaling interactions between pre- and postsynaptic proteins, notably cell adhesion molecules (CAMs). It has been proposed that the functions of neuroligins (NLs), postsynaptic CAMs, rely on the formation of trans-synaptic complexes with neurexins (Nrxns), presynaptic CAMs. NL3 is a unique NL isoform that localizes at both excitatory and inhibitory synapses. However, NL3 function mediated via Nrxn interactions is unknown. Here, we demonstrate that NL3 localizes at postsynaptic sites apposing vesicular glutamate transporter 3-expressing (VGT3+) inhibitory terminals and regulates VGT3+ inhibitory interneuron-mediated synaptic transmission in mouse organotypic slice cultures. Gene expression analysis of interneurons revealed that the α Nrxn1+AS4 splice isoform is highly expressed in VGT3+ interneurons as compared with other interneurons. Most importantly, postsynaptic NL3 requires presynaptic α Nrxn1+AS4 expressed in VGT3+ interneurons to regulate inhibitory synaptic transmission. Our results indicate that specific NL-Nrxn signaling generates distinct functional properties at synapses.

A. INTRODUCTION: In central synapses, cell adhesion molecules (CAMs) are major players in trans-synaptic interactions that serve a primary role in initiating synapse formation by directing contact between axonal and dendritic membranes. Emerging evidence suggests that trans-synaptic interactions are also important for synapse identity, function, plasticity and maintenance. Numerous CAM variants exist due to large gene families and alternative splicing, generating a vast array of possible combinations of pre- and postsynaptic CAMs. Although some specific trans-synaptic interactions of CAMs have been reported to underlie distinct synaptic properties, elucidating synaptic CAM complexes that dictate synapse identity and function remains a major challenge.

Four NL genes (*NL1*, *NL2*, *NL3* and *NL4*) encode postsynaptic CAMs (NL1, NL2, NL3 and NL4) that contain extracellular cholinesterase-like domains and transmembrane and PDZ-binding motif-containing intracellular domains. Interestingly, NL3 is the only NL isoform localized at both excitatory and inhibitory synapses, regulating their synaptic functions. However, the trans-synaptic framework that dictates NL3 function is poorly understood.

Nrxns are presynaptic CAMs produced from three genes (*Nrxn1*, *Nrxn2*, *Nrxn3*) that are transcribed from different promoters as longer alpha (α *Nrxn1* - 3), shorter beta (β *Nrxn1* - 3) and *Nrxn1*-specific gamma

(γ *Nrxn1*) isoforms, and serve as the sole presynaptic binding partners for NLs. Each *Nrxn* gene has six alternative splicing sites, named AS1 - AS6, resulting in thousands of potential *Nrxn* splice isoforms. Unique transcription patterns of *Nrxns* have been observed in hippocampal interneurons, suggesting that Nrxn proteins may determine the properties of GABAergic synapses in an input cell-dependent manner.

Nrxn-NL interactions depend on Nrxn protein length (long form [α] vs short form [β]), splice insertions at AS4 of Nrxns and splice insertions of NLs. For example, NL1 splice variants that have splice insertions at site B have higher binding affinities for β Nrxn1-AS4 (β Nrxn1 lacking alternative splice insertion at AS4) than for β Nrxn1+AS4 (containing an alternative splice insertion at AS4). However, it is largely unknown which Nrxn-NL combination defines specific synapse functionality. We recently found that NL3 Δ , which lacks both of the A1 and A2 alternative splice insertions, is the major NL3 splice isoform expressed in hippocampal CA1 pyramidal neurons and regulates both excitatory and inhibitory synaptic transmission. However, to the best of our knowledge, the synapses at which NL3 Δ interacts with presynaptic Nrxn isoform(s) have not been identified.

In the present study, we show that NL3 is selectively enriched at vesicular glutamate transporter 3-expressing (VGT3+) Cck+ inhibitory terminals in the

hippocampal CA1 area. Gain-of-function and loss-of-function studies revealed that NL3 regulates VGT3+ interneuron-mediated inhibitory synaptic transmission. Importantly, the effect of NL3 on VGT3+ synapses was hampered by the deletion of all *Nrxn* genes in VGT3+ interneurons and rescued by the selective expression of α Nrxn1+AS4 in VGT3+ interneurons. These results suggest that the trans-synaptic interaction between α Nrxn1+AS4 and NL3 underlies the input cell-dependent control of VGT3+ GABAergic synapses in the hippocampus.

B. MATERIALS AND METHODS: *Animal:*

All animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the University of Massachusetts Medical School. Mice were wild-type expressing interneuron-specific TdTomato (Sst/RFP, Pv/RFP and VGT3/RFP), generated by crossing a TdTomato reporter line with Sst-Cre, Pv-Cre or VGT3-Cre lines. The *Nrxn1/2/3^{f/f}* mouse line was generated recently.

Immunohistochemistry: Mice were fixed by transcardial perfusion with 3% glyoxal fixative. Brains were cryoprotected with 30% sucrose in 0.1 M PB to prepare 50 μ m-thick cryosections on a cryostat. A mixture of primary and secondary antibodies. Images were taken with a confocal laser scanning microscope (FV1200, Olympus). **Single-cell RNA sequencing:** Single-cell RNA were isolated from hippocampal CA1 interneurons. Sequencing libraries were run on single-end 50-bp modules in Illumina HiSeq 2000. **Electrophysiology:** Organotypic hippocampal slice cultures were prepared from postnatal 6-7 days old rats of either sex as described previously. Whole-cell voltage clamp recordings were made simultaneously from a pair of CA1 pyramidal neurons, one transfected (visualized by cotransfecting GFP) and one untransfected neighbor.

C. RESULTS: We recently raised a NL3 antibody, validated by NL3 KO tissue, and performed immunohistochemistry (IHC). We found that NL3 signals overlapped with markers for excitatory and inhibitory synapses, VGluT1 (vesicular glutamate transporter 1) and VIAAT (vesicular inhibitory amino acid transporter), as reported in primary neurons, cerebellum and striatum. To further understand the subcellular localization of NL3 at inhibitory synapses, we next performed IHC for NL3, VIAAT and interneuronal markers (**Fig. 1**). Remarkably, we found preferential expression of NL3 abutting terminals where the Cck markers, VGT3 and CB1 (Cannabinoid receptor type1) are co-localized (**Fig. 1A, B**; yellow arrowheads), compared with Pv and Sst terminals (**Fig. 1E**). This suggests the intriguing possibility that postsynaptic recruitment of NL3 may be determined by the type of interneuron providing inhibitory presynaptic inputs.

To understand whether NL3 has specific roles at Cck inhibitory synapses, we assessed the effect of NL3 Δ overexpression (OE) on input-specific inhibitory

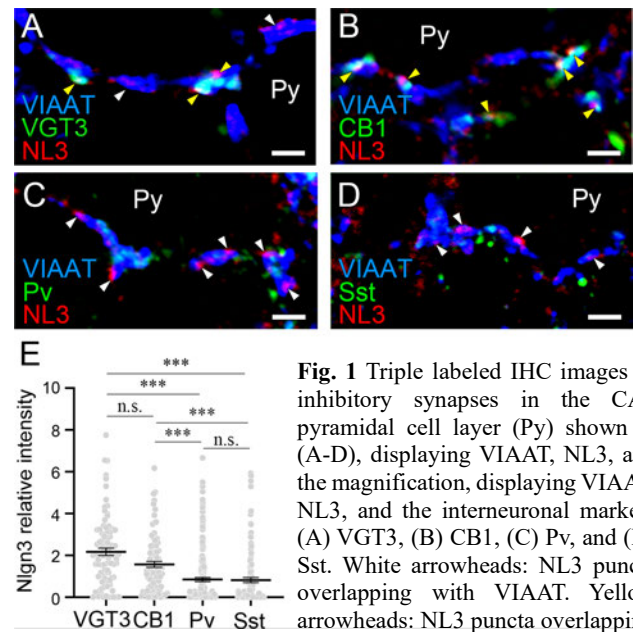
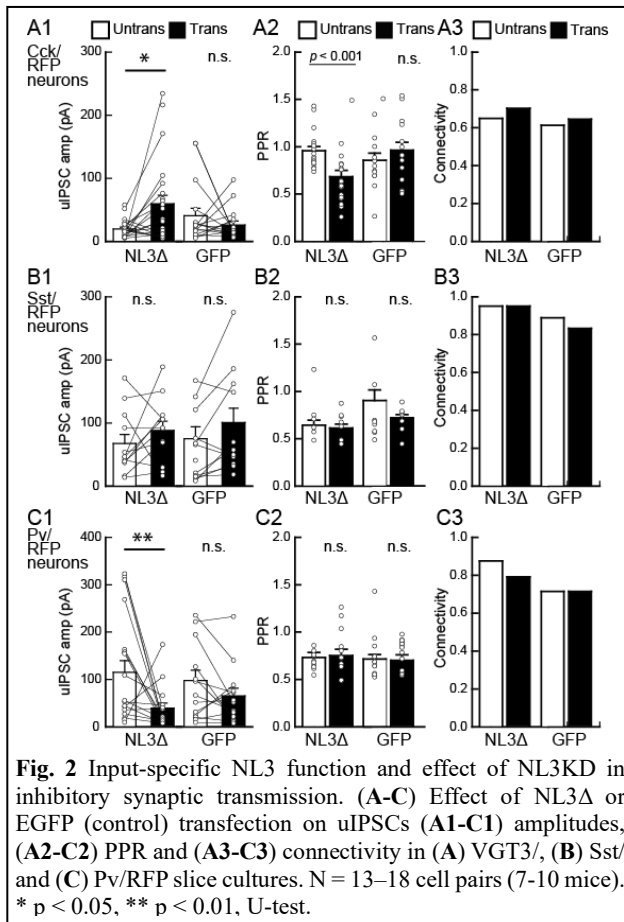


Fig. 1 Triple labeled IHC images of inhibitory synapses in the CA1 pyramidal cell layer (Py) shown at (A-D), displaying VIAAT, NL3, and the magnification, displaying VIAAT, NL3, and the interneuronal markers (A) VGT3, (B) CB1, (C) Pv, and (D) Sst. White arrowheads: NL3 puncta overlapping with VIAAT. Yellow arrowheads: NL3 puncta overlapping with VIAAT and interneuronal markers. (E) Summary of the relative intensity of immunofluorescent signals for NL3 at different inhibitory synapses. Data are represented as means $\pm$ SEM. n.s., not significant; *** $p < 0.001$ (One-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test). Scale bars: 2 μ m.

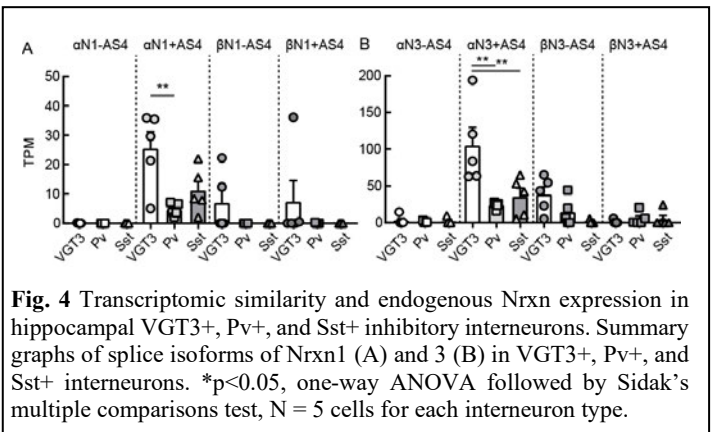
transmission. NL3 Δ lacks splice insertions and is the major splice isoform expressed in CA1 pyramidal neurons. To evoke cell-specific synaptic transmission, we generated three cell type-specific fluorescent lines, VGT3/RFP, Sst/RFP and Pv/RFP lines. We evaluated the effect of NL3 Δ OE on inhibitory synaptic transmission using triple whole-cell recordings in organotypic slice cultures from each of these. We performed current- and voltage-clamp recordings from a presynaptic RFP+ interneuron and postsynaptic GFP/NL3 Δ -transfected and -untransfected pyramidal neurons, respectively (**Fig. 2A-C**). We evoked unitary inhibitory postsynaptic currents (uIPSC) by inducing action potentials in RFP+ neurons. We compared the amplitude and paired-pulse ratio (PPR) (monitoring release probability) of uIPSC and synaptic connectivity across NL-transfected and untransfected neurons. Importantly, we observed significant potentiation of uIPSCs from Cck+ interneurons onto CA1 pyramidal neurons with NL3 Δ OE (**Fig. 2A1**). In addition, PPR was significantly reduced (**Fig. 2A2**), suggesting that postsynaptic NL3 Δ OE increases presynaptic release probability, consistent with previous work. In contrast, NL3 Δ OE did not enhance uIPSCs mediated by Sst+ neurons (**Fig. 2B**). NL3 Δ OE reduced uIPSCs in Pv+ inhibitory synaptic transmission as reported previously (**Fig. 2C**). This suggests that Pv+ synapses have a unique trans-synaptic regulatory mechanism compared with other interneurons and that NL3 Δ OE may disrupt endogenous GABA_AR complexes at Pv+ inhibitory synapses.



Our results suggest that NL3Δ specifically regulates VGT3+ inhibitory synaptic function. Is its presynaptic binding partner, *Nrxn*, in VGT3+ neurons necessary for NL3Δ function? To address this question, we generated Cck-specific triple *Nrxn* knockout mice (VGT3/RFP/*Nrxn*TKO) by crossing VGT3/RFP and triple-floxed *Nrxn* (*Nrxn*^{fl/f/2^{fl/f}/3^{fl/f}}) mice. VGT3/RFP/*Nrxn*TKO mice displayed reduced uIPSC and connectivity compared with wild-type VGT3/RFP mice, supporting the idea that *Nrxns* in VGT3 neurons regulate synaptic transmission (Fig. 3A1, A3). Next, we overexpressed NL3Δ in CA1 pyramidal neurons and performed triple whole-cell recordings. Notably, the NL3Δ uIPSC potentiation effect we observed in VGT3/RFP mice (Fig. 2A1) was completely abolished (Fig. 3B1), indicating that NL3Δ and presynaptic *Nrxn*-mediated trans-synaptic

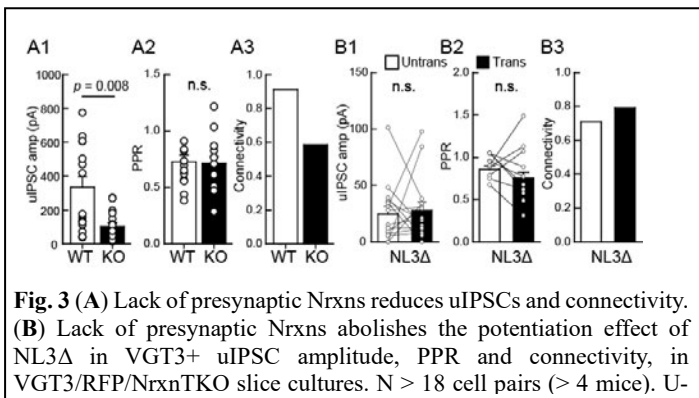
interactions are essential for inhibitory synaptic regulation.

Next, single-cell RNA sequencing was performed to elucidate splice variant expression of *Nrxn* isoforms in VGT3+, Pv+ and Sst+ interneurons. We harvested cytosol from five VGT3/, Pv/ and Sst/RFP neurons through whole-cell glass electrodes and performed single-cell deep RNA-seq (Fig. 4). We compared the expression of *Nrxn* splice isoforms in each *Nrxn* gene. Given that the insertion of AS4 determines the binding of many *Nrxn* protein binding partners including NLs, we quantified the expression of *Nrxn* isoforms with or without AS4 insertion. Twelve *Nrxn* splice isoforms were manually modified, and their expression was compared. Among *Nrxn1* splice isoforms, *αNrxn1*+AS4 was consistently detected as the sole *αNrxn1* gene expressed in the three interneurons and highly expressed in VGT3+ neurons compared with Pv+ and Sst+ neurons (Fig. 4A). *βNrxn2*+AS4 was the only confirmed *Nrxn2* gene expressed in the three interneurons but its expression was much lower than that of *Nrxn1* and 3 (data not shown). *αNrxn3*+AS4 and *βNrxn3*-AS4 were the two major *Nrxn3* genes expressed in the three interneurons, and *αNrxn3*+AS4 expression was highest in VGT3+ neurons compared with other neurons (Fig. 4B). Our single-cell RNA-seq result suggests that *αNrxn1*+AS4, *αNrxn3*+AS4 and *βNrxn3*-AS4 are *Nrxn* splice isoforms highly expressed in VGT3+ neurons. Therefore, *αNrxn1*+AS4,



αNrxn3+AS4 and *βNrxn3*-AS4 are the unique *Nrxn* genes expressed in VGT3+ neurons compared with Pv+ and Sst+ neurons.

Our electrophysiology results using *Nrxn*TKO/VGT3/RFP mice indicate that *Nrxn* proteins are important for postsynaptic NL3Δ function. We sought to determine which *Nrxn* isoform(s) is the functional partner(s) of NL3Δ at VGT3+ inhibitory synapses. Does VGT3+ interneuron-dominant *Nrxns*, *αNrxn1* and *βNrxn3*, interact with postsynaptic NL3Δ to modulate inhibitory synaptic function? To address this, we performed a rescue approach by expressing specific *Nrxn* isoforms in *Nrxn*TKO/VGT3/RFP neurons. We expressed *Nrxn* with tagBFP and NL3Δ with EGFP in VGT3/RFP and pyramidal neurons, respectively, in *Nrxn*TKO/VGT3/RFP slice cultures



using our recently developed electroporation technique, and performed triple whole-cell recordings from untransfected and tagBFP/Nrxn-transfected VGT3/RFP neurons, and GFP/NL3Δ-transfected pyramidal neurons (Fig. 5). We first identified two neighboring VGT3/RFP neurons in the hippocampal st. radiatum and oriens regions and electroporated tagBFP/Nrxn plasmids into one of the cells, while GFP/NL3Δ was electroporated into pyramidal neurons near the electroporated VGT3/RFP neuron. Given that splice insertion at site 4 in Nrxns regulates binding with postsynaptic NLs, we transfected four *Nrxn* splice isoforms, αNrxn1+AS4, αNrxn1-AS4, βNrxn3+AS4 or βNrxn3-AS4, together with tagBFP into VGT3/RFP neurons in CA1 st. radiatum and pyramidale. Two to three days after electroporation, we performed triple whole-cell recording from *Nrxn*-transfected presynaptic interneurons (Tdtomato- and tagBFP-positive) located in close proximity to untransfected VGT3/RFP and NL3Δ-transfected (EGFP-positive) postsynaptic pyramidal neurons. Cell pairs overexpressing αNrxn1+AS4 and NL3Δ in presynaptic VGT3/RFP and postsynaptic pyramidal neurons, respectively, displayed significant enhancement of uIPSC with 100% connectivity (Fig. 5A, C). In contrast, presynaptic αNrxn1-AS4/tagBFP and postsynaptic GFP/NL3Δ neuron pairs showed no enhancement of uIPSC compared with control cell pairs, suggesting that NL3Δ specifically couples with αNrxn1+AS4 to regulate inhibitory synaptic function at VGT3+ synapses. Transfection of tagBFP into VGT3/RFP neurons did not alter inhibitory synaptic transmission. Next, we tested βNrxn3-NL3Δ synaptic signals on VGT3+ inhibitory synaptic transmission (Fig. 6A-C). In contrast with αNrxn1-NL3Δ signals, neither βNrxn3+AS4 nor βNrxn3-AS4 transfection showed detectable changes in uIPSCs compared with untransfected VGT3/RFP neurons, indicating that βNrxn3 is not important for NL3-mediated inhibitory synaptic function. Interestingly, βNrxn3-AS4 expressed in NrxnTKO/VGT3/RFP/tagBFP neurons demonstrated reduced connectivity (Fig. 6C), suggesting that βNrxn3-AS4 protein hinders synapse formation between VGT3/RFP terminals and postsynaptic CA1 pyramidal neurons.

Our rescue approach suggests that αNrxn+AS4 regulates inhibitory synaptic transmission with NL3Δ. The structures of α and βNrxns are similar, therefore, different αNrxn+AS4 isoform(s) may be able to functionally substitute αNrxn1+AS4. Our single-cell RNA sequencing data indicate that αNrxn3+AS4 is another dominant *Nrxn* splice isoform in VGT3+ interneurons (Fig. 4B). Thus, we tested whether αNrxn3+/-AS4 functionally couples with NL3Δ in NrxnTKO/VGT3/RFP slice cultures (Fig. 6D-F). To our surprise, neither αNrxn3+AS4 nor αNrxn3-AS4 pairing with postsynaptic NL3Δ had any effect on inhibitory synaptic transmission. These results strongly suggest that αNrxn1+AS4, but not αNrxn3+AS4, has a

unique signal in the extracellular domain important for synaptic function with NL3Δ.

D. DISCUSSION: Synaptic protein-protein interactions are critical for the development, maturation

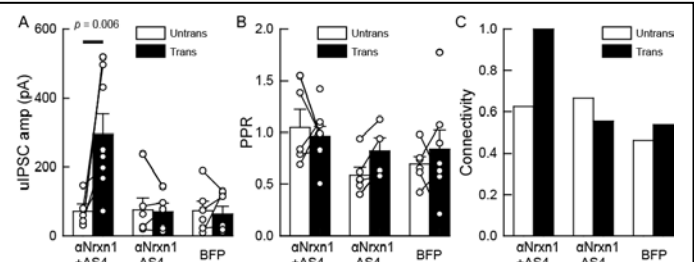


Fig. 5 Summary of uIPSC amplitude (A), paired-pulse ratio (B), and connectivity (C). Numbers of cell pairs: αNrxn1+AS4, αNrxn1-AS4, and BFP at VGT3+ synapses (seven pairs/three mice, 9/4 and 9/4). The number of tested slice cultures is the same as that of cell pairs. Mann–Whitney U-test.

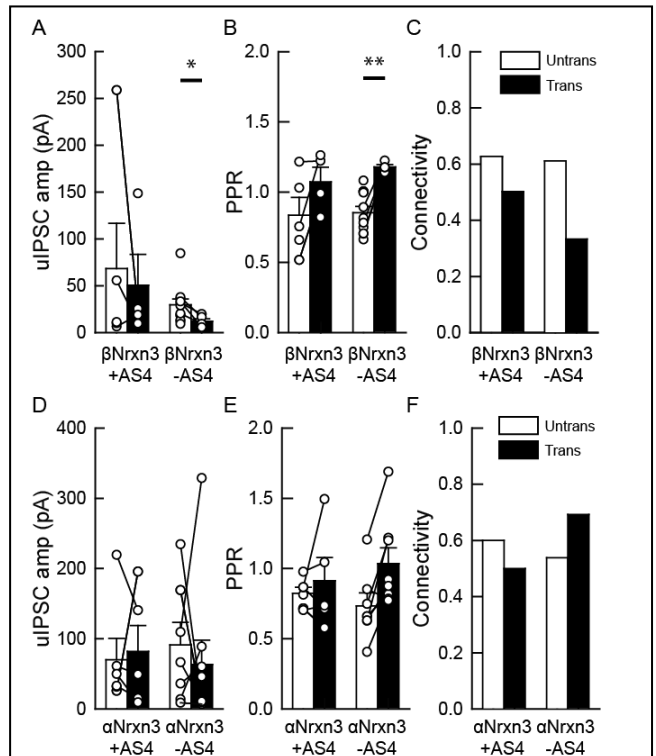


Fig. 6 α/βNrxn3–NL3Δ synaptic signals do not regulate VGT3+ inhibitory synapse transmission. (A–C) Effect of pre- and postsynaptic OE of βNrxn3(±AS4) and NL3Δ, respectively, on unitary inhibitory synaptic transmission in organotypic slice cultures prepared from NrxnTKO/VGT3/RFP mice. (D–F) Effect of pre- and postsynaptic OE of αNrxn3(±AS4) and NL3Δ, respectively, on unitary inhibitory synaptic transmission. Summary of uIPSC amplitude (A and D), paired-pulse ratio (B and E), and connectivity (C and F). Numbers of cell pairs: βNrxn3+AS4, βNrxn3-AS4, αNrxn3+AS4, and αNrxn3-AS4 at VGT3+ synapses (8 pairs/3 mice, 9/3, 5/3, and 11/3). The number of tested slice cultures is the same as that of cell pairs. Mann–Whitney U-test.

and survival of neurons. However, it is technically challenging to physiologically characterize trans-synaptic CAM protein interactions in two different neurons due to the difficulty in identifying

synaptically-connected neuronal pairs in the brain. Co-culture approaches consisting of non-neuronal cells transfected with different *Nrxn* splice isoforms and dissociated neurons expressing endogenous NLs (or expressing Nrxn-binding proteins in non-neuronal cells and observing their interactions with endogenous Nrxns) have begun to elucidate the roles of trans-synaptic Nrxn/NL isoforms on the clustering of pre-/postsynaptic molecules. However, this approach is limited to primary cultures and cannot address whether these trans-synaptic interactions are sufficient to induce functional synapse diversification. To fully understand the physiological roles of trans-synaptic molecules, one must be able to manipulate the expression of these molecules in pre- and postsynaptic neurons simultaneously followed by determination of the functional consequences of such manipulation. Using our newly developed gene electroporation method that enables us to transfect genes in minor cell types such as specific inhibitory interneurons, we demonstrated for the first time that α Nrxn1+AS4 and NL3 Δ , which are endogenously expressed in VGT3+ inhibitory and CA1 pyramidal neurons, respectively, form a specific signal that dictates inhibitory synaptic transmission.

Our gene expression and functional assays highlight that *α Nrxn1* is abundantly expressed in VGT3+ interneurons compared with other interneurons and *α Nrxn1+AS4* is the dominant *α Nrxn1* splice isoform expressed in VGT3+ interneurons which regulates inhibitory synaptic transmission with NL3 Δ . The expression of *α Nrxn1+AS4* was previously confirmed in Pv+ interneurons. Considering no effects of NL3 Δ OE on Pv+ inhibitory synapses, other postsynaptic mechanism(s) might exist to regulate inhibitory synaptic transmission with α Nrxn1+AS4 at Pv+ inhibitory synapses.

Biochemical studies have demonstrated that any Nrxn can bind to any NL with different affinities, with the exception of α Nrxn1 and NL1, which do not interact. The AS4 insertion has a critical role in changing Nrxns' affinity to postsynaptic binding partners, including NL. A splice insertion at AS4 in β Nrxn1 can weaken its interaction with NLs. Indeed, we have reported that β Nrxn1-AS4 but not β Nrxn1+AS4 increases synaptic transmission through its interaction with NL1. Similarly, α Nrxn1-AS4 specifically interacts with NL2 and enhances inhibitory synaptic transmission. In contrast, we found that an insertion at AS4 in α Nrxn1 can increase inhibitory synaptic transmission at VGT3+ synapses through a trans-synaptic interaction with NL3 Δ . It is particularly interesting that only α Nrxn1+AS4, but not α Nrxn3+AS4, encoded uIPSC enhancement with postsynaptic NL3 Δ . These results suggest that structural differences beyond the AS4 site exist between these two α Nrxns. Since the structures of the major Nrxn domains, such as LNS and EGFA-EGFC, are similar between α Nrxns, differential alternative splicing events that occur at other AS sites may regulate

binding with NL3 Δ . Further structural and functional analyses targeting these AS events could reveal a novel AS structure that modulates Nrxn-NL signaling on synaptic function.

E. CONCLUSION: Mutations and deletions in Nrxn loci are associated with neuropsychiatric and neurodevelopmental disorders. Copy number alterations and deleterious mutations in *α Nrxn1* are the most commonly reported Nrxn isoform-specific modifications predisposing people to epilepsy, autism spectrum disorders (ASDs), attention deficit hyperactivity disorder, intellectual disability (ID), schizophrenia (SCZ) and Tourette syndrome. Rare mutations in NL3 have been reported in patients with ID, SCZ and ASDs. Interestingly, ASD patients show abnormalities in memory discrimination, which is partly mediated by the activity of hippocampal Cck+ interneurons. This autistic phenotype may be caused by abnormal trans-synaptic interactions of α Nrxn1 and NL3 at VGT3+ synapses. In addition to our findings here, both Nrxn1 and NL3 are expressed at other synapses, including excitatory synapses. It will be interesting to identify Nrxn1-NL3 signals at different synapses to better understand the function of these genes on cognitive behavior.

Of note, this is the first collaborative achievement with Drs. Abe and Sasaoka, and the contribution of the Global Collaborative Research Project of Brain Research Institute is credited in the Acknowledgement section of our recent publication¹.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

(Title of journal, year, volume, pages. Please submit a copy of reprint or PDF file.)

1. M. Uchigashima, K. Konno, E. Demchak, A. Cheung, T. Watanabe, D. Keener, **M. Abe**, T. Le, **K. Sakimura**, **T. Sasaoka**, T. Uemura, Y. I. Kawasaki, M. Watanabe, **K. Futai**. Specific Neuroligin3- α Neurexin1 Signaling Regulates GABAergic Synaptic Function in Mouse Hippocampus. *eLife* (2020)
2. DG. Keener, A. Cheung, **K. Futai**. Single-Cell Electroporation across Different Organotypic Slice Culture of Mouse Hippocampal Excitatory and Class-Specific Inhibitory Neurons. *JoVE*, (2020), PMID: 33104060.
3. M. Uchigashima, M. Leung, T. Watanabe, A. Cheung, T. Le, S. Pallat, A.L.M. Dinis, M. Watanabe, Y.I. Kawasaki, **K. Futai**. Neuroligin3 Splice Isoforms Shape Inhibitory Synaptic Function in the Mouse Hippocampus. *J Biol Chem.* (2020), Jun 19;295(25):8589-8595, PMID: 32381505, PMC7307194.
4. D. Keener, A. Cheung, **K. Futai**. A Highly Efficient Method for Single-Cell Electroporation in Mouse Organotypic Hippocampal Slice Culture. *Journal of Neuroscience Methods* (2020), PMID: 32126275, PMCID: PMC7521366.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

3. OTHERS

None.

新潟大学脳研究所年報 2020

令和3年9月発行

(お問い合わせ)

新潟大学脳研究所

〒951-8585 新潟市中央区旭町通1番町757番地

TEL: 025-223-6161 (代) FAX: 025-227-0507

E-mail: web@bri.niigata-u.ac.jp

<https://www.bri.niigata-u.ac.jp/>