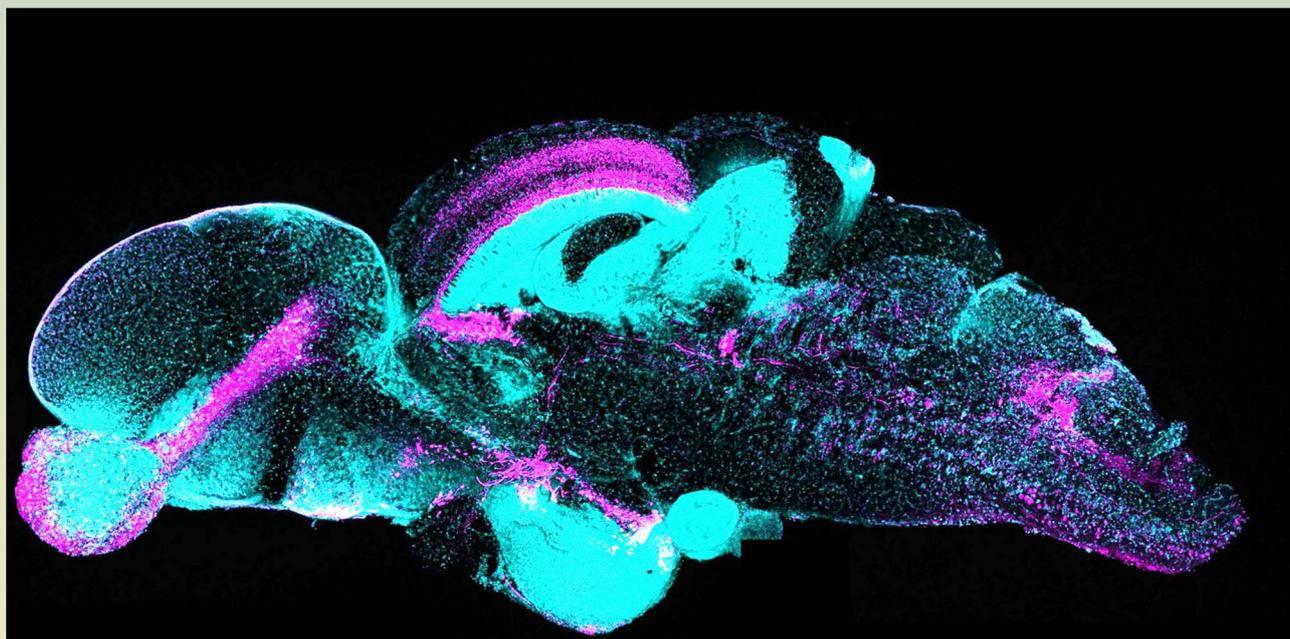


Brain Research Institute
Niigata University
Annual Report 2021

新潟大学脳研究所年報

2021



マゼンタはゼブラフィッシュの Tyrosine Hydroxylase 陽性細胞で主にドパミン神経を表す。

一部はノルアドレナリン神経。シアンは細胞核のヘキストによる染色。左が吻側で右が尾側。

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	9
○ システム脳病態学分野	11
○ 病理学分野 / 脳疾患標本資源解析学分野	14
○ 分子病態学（客員）分野	19
○ 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	35
○ 動物資源開発研究分野	39
○ モデル動物開発分野	41
○ 分子神経疾患資源解析学分野	45
○ 脳病態解析分野	47
3. 社会との連携	49
4. 共同利用・共同研究拠点	
共同利用・共同研究採択者一覧	62
報告書	
プロジェクト型共同研究	
○ 補体関連因子が孤発性神経変性疾患の病態に及ぼす影響に関して 名古屋市立大学 赤津 裕康	66
○ BRAF V600E 変異膠芽腫に対する分子標的治療後獲得耐性の克服に向けたトランスレーショナル研究 横浜市立大学大学院医学研究科 立石 健祐	68

○ ATN 分類における γ -secretase 活性変化の解析 同志社大学 角田 伸人	71
○ 中枢神経系原発悪性リンパ腫における caveolin-1 発現とその臨床病理学的意義 久留米大学 杉田 保雄	73
○ 体内時計を制御するオーファン受容体のリン酸化変動を介した睡眠制御機構の解明 京都大学大学院 土居 雅夫	75
○ 日本人由来ヒトアルツハイマーアミロイドの NMR 研究 東京工業大学 石井 佳誉	77
○ CEST による脳機能評価系の確立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	79
○ マルチスケールイメージングによる大脳基底核の機能解明 大阪大学 小山内 実	81
○ アルツハイマー病感受性遺伝子バリエーションが中枢神経病理に及ぼす影響の検討 医療法人さわらび会 福祉村病院 金田 大太	83
○ CRF 受容体 1 および 2 遺伝子改変マウスによる CRF ニューロン回路の同定と機能解析 東北大学 井樋 慶一	85
○ 高いアミロイド β 凝集阻害能をもつ分子のクルクミン誘導体の開発 東京工業大学 中村 浩之	88
○ 筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病理：タウ PET を用いた検討 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 互 健二	90
○ 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	92
○ 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	95
○ 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 鈴木 元	99
○ 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	101
○ 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	104
○ 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 樋口 真人	106
○ 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 板倉 誠	108
○ 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 丹治 邦和	111

○ 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 西村 正樹	114
○ 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 菊地 正隆	117
○ 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 久保 均	119
○ 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 小柳 清光	121
○ 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 赤間 智也	124
○ 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 山中 章弘	127
○ 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	130
○ 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	133
○ 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 菅谷 佑樹	135
○ 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	137
○ 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 岡村 均	140
○ 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	143
○ 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	146
○ 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 松川 則之	149
○ 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 渡部 和彦	151
○ 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 杉山 拓	153
○ 内因的行動の神経基盤の解明 中京大学 酒多 穂波	156
○ 新しいフェルトーシス阻害システムによる神経細胞保護の検討 群馬大学 鳥居 征司	158
○ 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 片野 泰代	160
○ 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	162
○ 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	165
○ 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 岩里 琢治	168
○ 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 山田 薫	172
○ 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 土井 宏	174
○ 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 高堂 裕平	177
○ 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 渡辺 雅彦	179

連携資源利用型共同研究

○ 疾患モデル動物の作製、保存、繁殖に有用なゲノム編集および生殖工学技術の開発	
熊本大学 竹尾 透	182
○ 筋強直性ジストロフィーにおける多臓器障害の原因解明	
大阪大学 中森 雅之	185
○ アルツハイマー病における三叉神経中脳路核—青斑核周囲病変の解析	
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 後藤 哲哉	187
○ DNA 障害型抗がん剤の感受性増強因子 SLFN11 の脳腫瘍における発現解析と臨床的有用性の検討	
慶應義塾大学 村井 純子	190
○ 運動ニューロン変性に関与する翻訳後修飾の同定	
北里大学 佐藤 俊哉	192
○ 超短命アフリカメダカを用いた各種抗酸化食品成分のアンチエイジング効果の研究	
筑波大学 小林 麻己人	194
○ 遺伝性筋疾患における HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼの機能の解明	
国立精神・神経医療研究センター 今村 道博	196
○ ヒト特異的な脳細胞は果たしてあるのか？単一細胞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 郷 康広	198

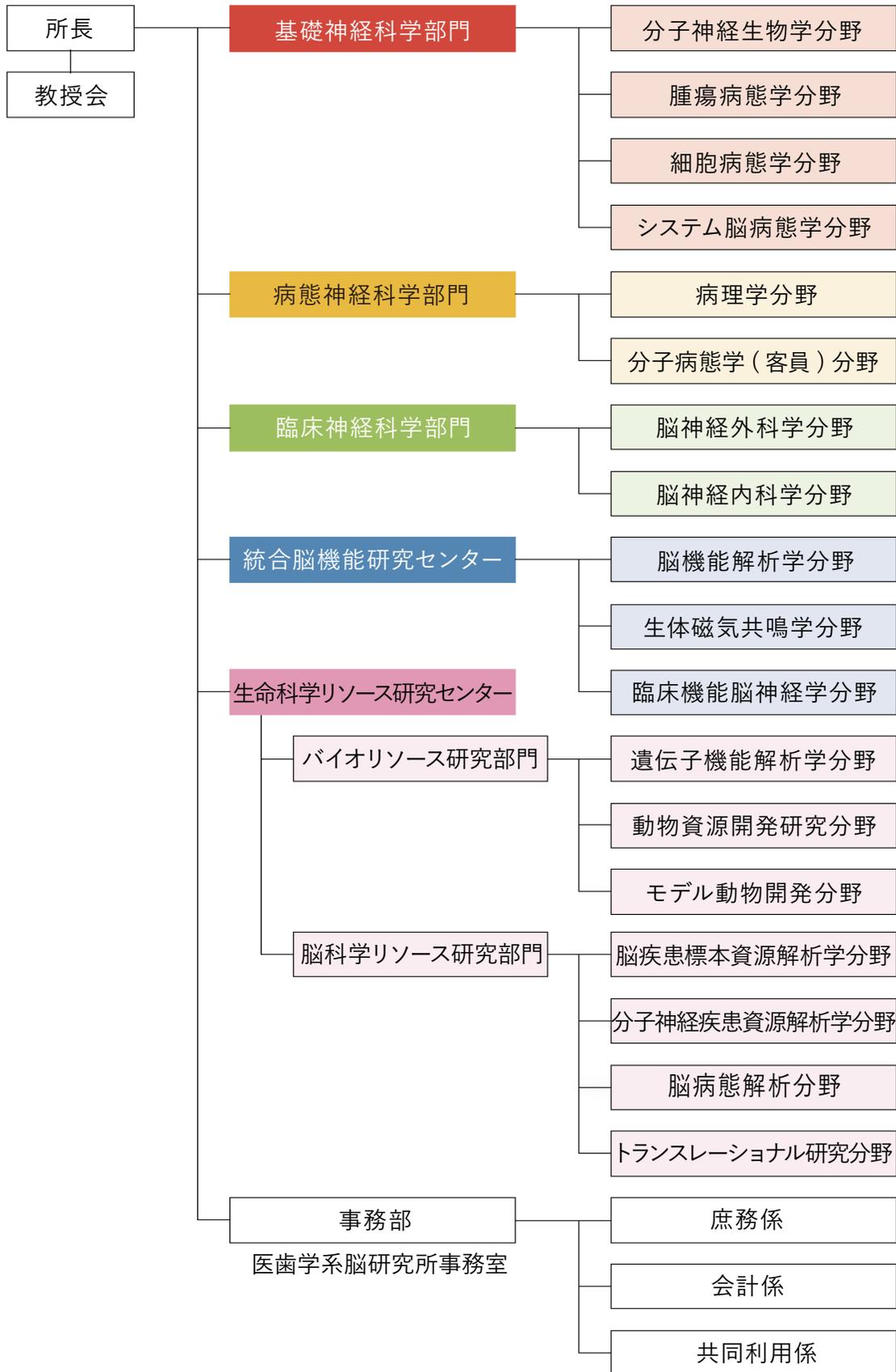
○ 脳神経筋疾患モデルマウスにおける超過剰排卵誘起処理と反復採卵による系統保存システムの開発2	
公益財団法人 実験動物中央研究所 高橋 利一	200
○ 発達期脳内微細構造の生体イメージングによる神経回路形成機序の解明	
熊本大学 水野 秀信	203
○ TDP-43 病変に結合する分子プローブの開発	
量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門 小野 麻衣子	206
○ 脳疾患ゲノム情報に基づく病態モデルマウスの開発に関する研究	
理化学研究所バイオリソース研究センター 吉木 淳	208
○ 歩行運動の脳基底核ドーパミン制御機構の解明	
立命館大学生命科学部 木津川 尚史	211
○ モ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	213
○ 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	215
○ 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	217
○ 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	219
○ 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	222
○ 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 大滝 博和	224
○ 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 程 久美子	226
○ 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	229
○ 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	231

国際共同研究

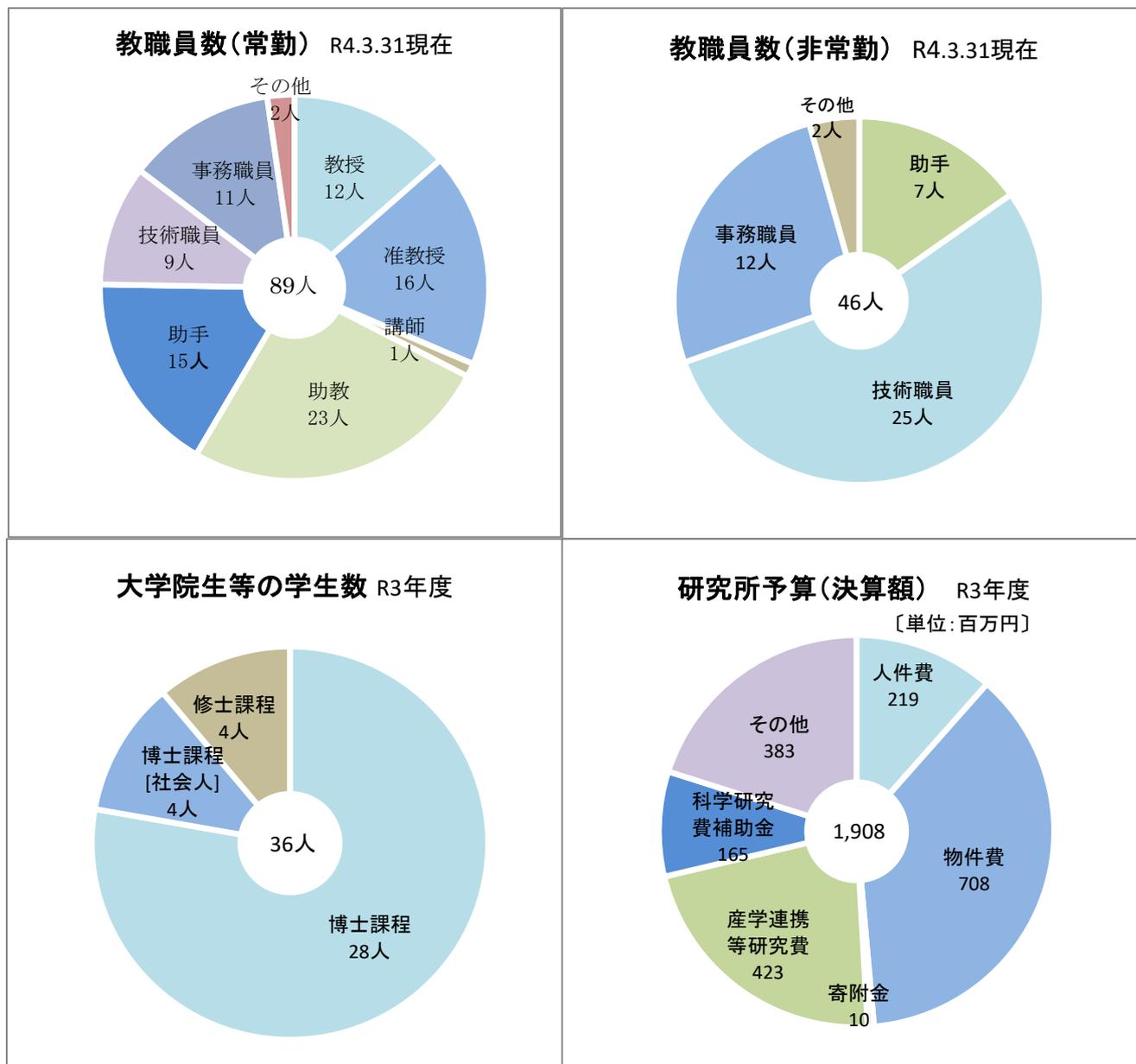
- Development, optimization and validation of human AQP-4 PET Radioligand
AQP-4 PET トレーサーの開発と最適化
ハーバード大学 **Marek Kubicki** 234
- Hydrodynamic Pathology of the Brain
脳水動態病理学の創生
カリフォルニア大学デービス校 **Ingrid L Kwee** 236
- The role of striatal direct and indirect pathways and dopamine D2 isoforms in the pathophysiology 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 **Yanyan Wang** 238
- 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 **Kensuke Futai** 241
- Production of transgenic mouse lines for labeling retinal cell types and analyses of their roles in visual function
網膜細胞タイプ標識のための遺伝子改変マウス系統の作出と視覚機能解析
オーフス大学 **Keisuke Yonehara** 246

1. 組織図・研究所のデータ

組織図 (R4.3.31 現在)



2. 研究所のデータ



外部資金獲得状況 (R3 年度)

区分	件数	金額 (千円)
科学研究費補助金	61	187,114
厚生労働科学研究費補助金	2	51,899
運営費交付金機能強化等	5	530,823
地方公共団体・民間助成団体等の研究費	8	16,100
民間企業等との共同研究	11	34,374
受託研究	43	595,167
寄附金	37	20,745

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4年3月31日現在）

客員教授 那波 宏之

II 研究活動

分子神経生物学分野では、教授・那波宏之の和歌山県立医科大学への移籍に伴い、脳研究所では客員教授として本分子神経生物学分野の運営を継続した。特任助教とともに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を継続した。妊産婦の胎児羊水中に高濃度で含有される上皮成長因子に着目して、炎症性サイトカインによる脳神経回路障害とその認知行動への影響を調べた。結果、統合失調症患者とおなじく、今後、上皮成長因子投与で作製されたモデル動物では聴覚野の過活動が起きていること、また大脳皮質のシナプス形成が障害されていることが判明した。これらの研究結果は統合失調症の病態解明に繋がるとともに、当該疾患の新薬開発のヒントを与えるかもしれない。

<主な研究テーマ>

- (1) 統合失調症の病態解明の為、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、当該モデル動物のドーパミン活動変化と社会行動変化の関係性を研究した。
- (2) 統合失調症患者とそのモデル動物の聴覚神経活動を遺伝子レベルで調査した。
- (3) 上皮成長因子などの炎症性サイトカインによるシナプス形成阻害の分子メカニズムを探求した。

なお、これらの研究テーマは本学脳研究所の腫瘍病態学分野、病理学分野、動物資源開発研究分野、ならびに東京農業大学、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た。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Sotoyama H, Namba H, Kobayashi Y, Hasegawa T, Watanabe D, Nakatsukasa E, Sakimura K, Furuyashiki T, Nawa H. Resting-state dopaminergic cell firing in the ventral tegmental area negatively regulates affiliative social interactions in a developmental animal model of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2021 Apr 22;11(1):236. (原著、査読有)
2. Narihara I, Kitajo K, Namba H, Sotoyama H, Inaba H, Watanabe D, Nawa H. Rat call-evoked electrocorticographic responses and intercortical phase synchrony impaired in a cytokine-induced animal model for schizophrenia. *Neurosci Res*. 2022 Feb;175:62-72. (原著、査読有)

3. Takei N, Yokomaku D, Yamada T, Nagano T, Kakita A, Namba H, Ushiki T, Takahashi H, Nawa H. EGF Downregulates Presynaptic Maturation and Suppresses Synapse Formation In Vitro and In Vivo. *Neurochem Res.* 2022 Jan 4 doi: 10.1007/s11064-021-03524-6. Online ahead of print. (原著、査読有)
4. Sotoyama H, Inaba H, Iwakura Y, Namba H, Takei N, Sasaoka T, Nawa H. The dual role of dopamine in the modulation of information processing in the prefrontal cortex underlying social behavior. *FASEB J.* 2022 Feb;36(2):e22160. (原著、査読有)

IV 共同研究

- (1) 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
- (2) 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

腫瘍病態学分野

I 研究組織（構成員 令和4年3月31日現在）

准教授 武井 延之
助教 岩倉 百合子

II 研究活動

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応答が、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、脱分化誘導機構の解析。

#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の解析。

#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。

#神経細胞における局所的翻訳機構の解析。

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) Kano T, Tsumagari R, Nakashima A, Kikkawa U, Ueda S, Yamanoue M, **Takei N**, Shirai Y. (2021) RalA, PLD and mTORC1 Are Required for Kinase-Independent Pathways in DGK β -Induced Neurite Outgrowth. *Biomolecules* 11, no. 12: 1814. <https://doi.org/10.3390/biom11121814>
- 2) Togo K, Fukusumi H, Shofuda T, Ohnishi H, Yamazaki H, Hayashi MK, Kawasaki N, **Takei N**, Nakazawa T, Saito Y, Baba K, Hashimoto H, Sekino Y, Shirao T, Mochizuki H, Kanemura Y. (2021) Postsynaptic structure formation of human iPS cell-derived neurons takes longer than presynaptic formation during neural differentiation in vitro. *Mol Brain*. 2021 Oct 11;14(1):149. doi: 10.1186/s13041-021-00851-1.
- 3) **武井延之** (2021) BDNF 概論 和光純薬時報 v89 n3 15-17

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

(3) 研究題目：「成長円錐における局所的翻訳の解明」

研究内容：主にラット後根神経節細胞を用い、成長円錐における局所翻訳/蛋白合成を免疫細胞化学法と超解像度顕微鏡、原子間力顕微鏡を用いて明らかにし、そのシグナル伝達系を解析する。

参加機関：東京医科歯科大学

細胞病態学分野

I 研究組織（構成員 令和4年3月31日現在）

教授 三國 貴康 准教授 内ヶ島 基政 助教 佐藤 大祐
助教（スイングバイ）井口 理沙 学振海外特別研究員 劉 歆儀
特任助手 岡本 友貴 特任助手 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きている。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, Cheung A, Futai K. Neuroligin-3: A Circuit-Specific Synapse Organizer That Shapes Normal Function and Autism Spectrum Disorder-Associated Dysfunction. *Front Mol Neurosci.* 2021 Oct 6;14:749164.

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

システム脳病態学分野

I 研究組織（構成員 令和4年3月31日現在）

教授 上野 将紀 助教 佐藤 時春 助教 宮下 聡
特任助手 中村 由香

教授 田井中一貴 助教 内田 仁司
技術職員 榎 祐子、榎 蒼生

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う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、軸索の再生を阻む内的要因である **Pten**、外的要因のシグナル分子である **Rho** をノックアウトすると、運動回路の1つである皮質脊髄路の再編を劇的に増加させることができること（*J Neurosci*, 2021）、また脳梗塞モデルでは、梗塞の大きさや領域の違いにより皮質脊髄路の再編のパターンが異なることを見出した（*Front Neurosci*, 2021）。これらの成果から、障害後の神経回路の再建へ向け標的となりうる分子や回路網を見出した。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ールの開発に取り組んでいる (Nat Commun, 2020)。本年度は、実験的マウスマラリア脳症における病態 3D イメージング (Int Immunol, 2021) やマウス全身透明化による骨成長の調節機構 (Cell Rep, 2021)、正常なヒト子宮内膜上皮におけるクローン選択と多様化の時空間ダイナミクス (Nat Commun, 2022) を明らかにした。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 ホー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. Nakamura Y, Ueno M, Niehaus JK, Lang RA, Zheng Y, Yoshida Y. Modulation of both intrinsic and extrinsic factors additively promotes rewiring of corticospinal circuits after spinal cord injury. J Neurosci 41(50): 10247-60, 2021
2. Sato T, Nakamura Y, Takeda A, Ueno M. Lesion area in the cerebral cortex determines the patterns of axon rewiring of motor and sensory corticospinal tracts after stroke. Front Neurosci 15: 737034, 2021
3. Ueno M. Restoring neuro-immune circuitry after brain and spinal cord injuries. Int Immunol 33(6): 311-325, 2021
4. 上野将紀. 中枢神経障害による免疫系の変容. 医学のあゆみ. 277(13): 1104-7, 2021
5. 上野将紀. 中枢神経の障害がもたらす免疫系の変容と病態. 生体の科学. 72(5): 409-11, 2021
6. Watanabe-Takano H, Ochi H, Chiba A, Matsuo A, Kanai Y, Fukuhara S, Ito N, Sako K, Miyazaki T, Tainaka K, Harada I, Sato S, Sawada Y, Minamino N, Takeda S, Ueda HR, Yasoda A, Mochizuki N. Mechanical load regulates bone growth via periosteal Osteocrin. Cell Rep. 2021, 36(2):109380.
7. Matsuo-Dapaah J, Lee MSJ, Ishii KJ, Tainaka K*, Coban C*. Using a new three-dimensional CUBIC tissue-clearing method to examine the brain during experimental cerebral malaria. Int Immunol. 2021, 33(11):587-594. *Co-corresponding author
8. Yamaguchi M, Nakaoka H, Suda K, Yoshihara K, Ishiguro T, Yachida N, Saito K, Ueda

H, Sugino K, Mori Y, Yamawaki K, Tamura R, Revathidevi S, Motoyama T, Tainaka K, Verhaak RGW, Inoue I, Enomoto T. Spatiotemporal dynamics of clonal selection and diversification in normal endometrial epithelium. Nat Commun. 2022, 13(1):943.

IV 共同研究

(1) 研究題目：「皮質脊髄路の再生メカニズムの解明」

研究内容： 皮質脊髄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4年3月31日現在）

I - 1 病理学分野

教授 柿田 明美 准教授 清水 宏 特任准教授 北浦 弘樹
特任助教 田中 英智
技術職員 丹田 智恵子、濁川 慎吾、高崎 順子、田中 優子、砂塚 眞子
事務職員 吉田 真理子、武石 佳子
博士課程大学院生 齊ノ内 信、Ramil Gabdulkaev、林 秀樹（脳神経内科）
高橋 陽彦（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. Ito Y, Fukuda M, Matsuzawa H, Masuda H, Kobayashi Y, Hasegawa N, Kitaura H, Kakita A, Fujii Y (2021) Deep learning-based diagnosis of temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis: an MRI study. *Epilepsy Res* 178: 106815
2. Natsumeda M, Igarashi H, Gabdulkaev R, Takahashi H, Motohashi K, Ogura R, Watanabe J, Tsukamoto Y, Okamoto K, Kakita A, Nakada T, Fujii Y (2021) Detection of 2-hydroxyglutarate by 3.0-tesla magnetic resonance spectroscopy in gliomas with rare IDH mutations: making sense of “false-positive” cases. *Diagnostics* 11 (11): 2129
3. Kimura A, Kato S, Takekoshi A, Yoshikura N, Yanagida N, Kitaguchi H, Kakita A, Shimohata T (2021) Autoimmune GFAP astrocytopathy diagnosed as isolated central nervous system lymphomatoid granulomatosis. *J Neuroimmunol* 361: 577748
4. Koike Y, Sugai K, Hara N, Ito J, Yokoseki A, Ishihara T, Yamagishi T, Tsuboguchi S, Tada M, Ikeuchi T, Kakita A, Onodera O (2021) Age-related demethylation of the TDP-43 autoregulatory region in the human motor cortex. *Commun Biol* 4 (1): 1107
5. Kato T, Manabe R, Igarashi H, Kametani F, Hirokawa S, Sekine Y, Fujita N, Saito S, Kawashima Y, Hatano Y, Ando S, Nozaki H, Sugai A, Uemura M, Fukunaga M, Sato T, Koyama A, Saito R, Sugie A, Toyoshima Y, Kawata H, Murayama S, Matsumoto M, Kakita A, Hasegawa M, Ihara M, Kanazawa M, Nishizawa M, Tsuji S, Onodera O (2021) Candesartan prevents the progression of arteriopathy in

CARASIL model mice. *J Clin Invest* 131 (22): e140555

6. Toyoshima Y, Takahashi H, Katada S, Kojima N, Tada M, Nani T, Koike R, Nozawa T, Aida I, Nakajima T, Onodera O, Kakita A (2021) Parkinson's disease and parkinsonism: clinicopathologic discrepancies on diagnosis in three patients. *Neuropathology* 41 (6): 450-456
7. Shi Y, Zhang W, Yang Y, Murzin A, Falcon B, Kotecha A, van Beers M, Tarutani A, Kametani F, Garringer HJ, Vidal R, Hallinan GI, Lashley T, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Tanaka H, Kakita A, Ikeuchi T, Mann DMA, Kovacs GG, Revesz T, Ghetti B, Hasegawa M, Goedert M, Sheres SHW (2021) Structure-based classification of tauopathies. *Nature* 598 (7880): 359-363
8. Kitaura H, Itoh Y, Hiraishi T, Fujii Y, Fukuda M, Kakita A (2021) Reactive astrocytes contribute to epileptogenesis in patients with cavernous angioma. *Epilepsy Res* 176: 106732
9. Yoshitomi S, Hamano SI, Hayashi M, Sakuma H, Hirose S, Ishii A, Honda R, Ikeda A, Imai K, Jin K, Kada A, Kakita A, Kato M, Kawai K, Kawakami T, Kobayashi K, Matsuishi T, Matuo T, Nabatame S, Okamoto N, Ito S, Okumura A, Saito A, Shiraishi H, Shirozu H, Saito T, Sugano H, Takahashi Y, Yamamoto H, Fukuyama T, Kuki I, Inoue Y, Japan Rare Epilepsy Syndrome Resistry Group JRESG (2021) Current medico-psycho-social conditions of patients with West syndrome in Japan. *Epileptic Disord* 23 (4): 579-589
10. Kunii Y, Matsumoto J, Izumi R, Nagaoka A, Hino M, Akatsu H, Hashizume Y, Kakita A, Yabe H (2021) Evidence for altered phosphoinositide signaling-associated molecules in the postmortem prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Int J Mol Sci* 22 (15): 8280
11. Sasahara T, Satomura K, Tada M, Kakita A, Hoshi M (2021) Alzheimer's A β assembly binds sodium pump and blocks endothelial NOS activity via ROS-PKC pathway. *iScience* 24 (9): 102936
12. Natsumeda M, Kanemaru Y, Kawaguchi Y, Umezumi H, Kakita A, Fujii Y (2021) Less-invasive diagnosis of disseminated epithelioid glioblastoma harboring BRAF V600E mutation by cerebrospinal fluid analysis – a case report. *Clin Case Rep* 9 (7): e04551
13. 北浦弘樹、柿田明美 (2021) 海馬硬化症のてんかん原性. *Epilepsy* 15 (2): 74-77
14. Sugita Y, Takahashi K, Fukuda K, Kimura Y, Furuta T, Arakawa F, Ohshima K, Nakamura H, Miyata H, Watanabe M, Kakita A (2021) Primary non-dural central nervous system marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type mimicking CNS inflammatory diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 80 (8): 789-799
15. Natsumeda M, Chang M, Gabdulkaev R, Takahashi H, Tsukamoto Y, Kanemaru Y, Okada M, Oishi M, Okamoto K, Rodriguez FJ, Kakita A, Fujii Y, Schreck KC (2021) Predicting BRAF V600E mutation in glioblastoma-utility of radiographic features. *Brain Tumor Pathol* 38 (3): 228-233
16. Mori F, Miki Y, Tanji K, Kon T, Tomiyama M, Kakita A, Wakabayashi K (2021) Role of VAPB and vesicular profiles in α -synuclein aggregates in multiple system atrophy. *Brain Pathol* 31 (6): e13001

17. Miura T, Iwasaki T, Mezaki N, Sato T, Saito S, Saito R, Ajioka Y, Kakita A, Mashima T (2021) Long spinal cord lesion caused by venous congestive myelopathy associated with intravascular large B-cell lymphoma. *Intern Med* 60 (23): 3809-3816
18. Sainouchi M, Tanaka H, Shimizu H, Mashima T, Fukushima T, Ishihara T, Makino K, Onodera O, Kakita A (2021) Hemiplegic type ALS: clinicopathological features of two autopsied patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 92 (9): 1014-1016
19. Seike N, Yokoseki A, Takeuchi R, Saito K, Miyahara H, Miyashita A, Ikeda T, Aida I, Nakajima T, Kanazawa M, Wakabayashi M, Toyoshima Y, Takahashi H, Matumoro R, Toda T, Onodera O, Ishikawa A, Ikeuchi T, Kakita A (2021) Genetic variations and neuropathologic features of patients with PARK2. *Mov Disord* 36 (7): 1634-1643
20. Li J, Wisessmith W, Ito J, Kakita A, Kunisawa K, Shimizu T, Ikenaka K (2021) Exploring the factors underlying remyelination arrest by studying the post-transcriptional regulatory mechanisms of Cystatin F gene. *J Neurochem* 157(6): 2070-2090
21. Zhang L, Toyoshima Y, Takeshima A, Shimizu H, Tomita I, Onocera O, Takahashi H, Kakita A (2021) Progressive supranuclear palsy: neuropathology of patients with short disease duration due to unexpected death. *Neuropathology* 41(3): 174-182
22. 豊島靖子、岡本浩一郎、小野寺理、柿田明美 (2021) 中毒・代謝障害の白質脳症の画像と病理. *Annual Review 神経2021*. 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 pp. 21-29 (total 376 pages)
23. Sainouchi M, Hatano Y, Tada M, Ishihara T, Ando S, Kato T, Tokunaga J, Ito G, Miyahara H, Toyoshima Y, Yokoseki A, Ozawa T, Akazawa K, Onodera O, Kakita A (2021) A novel splicing variant of *ANXA11* in a patient with amyotrophic lateral sclerosis: histologic and biochemical features. *Acta Neuropathol Commun* 9 (1): 106
24. Matsui H, Ito J, Matsui N, Uechi T, Onodera O, Kakita A (2021) Cytosolic dsDNA of mitochondrial origin induces cytotoxicity and neurodegeneration in cellular and zebrafish models of Parkinson's disease. *Nat Commun* 12 (1): 3101
25. Yoshihara S, Jiang X, Morikawa M, Ogawa T, Ichinose S, Yabe H, Kakita A, Toyoshima M, Kunii Y, Yoshikawa T, Tanaka Y, Hirokawa N (2021) Betaine ameliorates schizophrenic traits by functionally compensating KIF3-based CRMP2 transport. *Cell Rep* 35 (2): 108971
26. Miyahara H, Natsumeda M, Kanemura Y, Yamazaki K, Riku Y, Akagi A, Oohashi W, Shofuda T, Yoshioka E, Sato Y, Taga T, Naruke Y, Hasegawa D, Yoshida M, Sakaida T, Okada N, Watanabe H, Ozeki M, Arakawa Y, Yoshimura J, Fujii Y, Suenobu S, Ihara K, Hara J, Kakita A, Yoshida M, Iwasaki Y (2021) Topoisomerase II β immunoreactivity (IR) co-localizes with neuronal marker-IR but not glial fibrillary acidic protein-IR in Gli3-positive medulloblastomas: an immunohistochemical analysis of 124 medulloblastomas from the Japan Children's Cancer Group. *Brain Tumor Pathol* 38 (2): 109-121
27. On J, Natsumeda M, Watanabe J, Saito S, Kanemaru Y, Abe H, Tsukamoto Y, Okada M, Oishi M,

Yoshimura J, Kakita A, Fujii Y (2021) Low detection rate of H3K27M mutations in cerebrospinal fluid taken by lumbar puncture in newly diagnosed diffuse midline gliomas. *Diagnostics* 11(4): 681

28. Izumi R, Hino M, Wada A, Nagaoka A, Kawamura T, Mori T, Sainouchi M, Kakita A, Kasai K, Kunii Y, Yabe H (2021) Detailed postmortem profiling of inflammatory mediators expression revealed dpost-inflammatory alteration in the superior temporal gyrus of schizophrenia. *Front Psychiatry* 12: 653821
29. 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, Rodrigues FJ, Takahashi H, Hovestadt V, Suva ML, Taylor MD, Eberhart CG, Fujii Y, Kakita A (2021) Gli3 induces neuronal differentiation in SHH-activated and WNT-activated medulloblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 80 (2): 129-136
30. Tanji K, Mori F, Shirai F, Fukami T, Seimiya H, Utsumi J, Kakita A, Wakabayashi K (2021) Novel tankyrase inhibitors suppress TDP-43 aggregate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 537: 85-92
31. Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Nishiura K, Sano Y, Kakita A, Kanda T, Chiba H (2021) Serotonin/5-HT1A signaling in the neurovascular unit regulates endothelial CLDN5 expression. *Int J Mol Sci* 22 (1): E254

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4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. Mori F, Miki Y, Tanji K, Kon T, Tomiyama M, Kakita A, Wakabayashi K. Role of VAPB and vesicular profiles in α -synuclein aggregates in multiple system atrophy. *Brain Pathology* 2021; 31: e13001.
2. 鹿戸将史、佐藤裕康、太田康之、若林孝一. 神経核内封入体病. *画像診断* 2021; 41(9): 916-917.
3. Nishijima H, Kimura T, Mori F, Wakabayashi K, Kinoshita I, Nakamura T, Kon T, Suzuki C, Tomiyama M. Effects of aging on levo-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2021; 13: 650350.
4. Miki Y, Kamata K, Akemoto Y, Tsushima F, Sakuraba H, Yamagata K, Kurose A, Fukuda S, Wakabayashi K. Leptomeningeal and intraventricular myelomatosis manifesting an aggressive form of communicating hydrocephalus. *Neuropathology* 2021; 41(3): 243-249.
5. Miki Y, Tsushima E, Foti SC, Strand KM, Asi YT, Yamamoto AK, Hoskote C, Bettencourt C, Oliveira MCB, De Pablo-Fernández E, Jaunmuktane Z, Lees AJ, Wakabayashi K, Warner TT, Quinn N, Holton JL, Ling H. Identification of multiple system atrophy mimicking Parkinson's disease or progressive supranuclear palsy. *Brain* 2021; 144(4): 1138-1151.
6. Tanji K, Mori F, Shirai F, Fukami T, Seimiya H, Utsumi J, Kakita A, Wakabayashi K. Novel tankyrase inhibitors suppress TDP-43 aggregate formation. *Biochem Biophys Res Comm* 2021; 537: 85-92.
7. 若林孝一、三木康生. 病理形態学から見た脳の老化. *Clinical Neuroscience* 2021; 39(1): 30-33.

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4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	棗田 学
博士課程大学院生	温城太郎、斎藤 祥二、安藤和弘、澁谷航平、高橋陽彦

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ジジョンメディシン確立の試み
- ・ 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
- ・ 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
- ・ 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
- ・ 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
- ・ 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
- ・ 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
- ・ 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新潟県悉皆調査
- ・ 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
- ・ 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)
- ・ 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遗体解剖実習
- ・ 低悪性度神経膠腫における分子分類と予後についての後方視的研究
- ・ 「厚生労働省がん研究助成金による胚細胞腫に対する多施設共同臨床研究」の後方視的長期フォローアップ研究

- 多機関共同研究によるマルチオミックス解析に基づく脳腫瘍の発生・進展の分子機構の解明
- 石灰化を有する神経膠腫の臨床病理学的検討

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Takanori Nozawa, Kouichirou Okamoto, Shinji Nakazato, Kunio Motohashi, Tomoaki Suzuki, Kotaro Morita, Hideki Tashi, Kei Watanabe, Hitoshi Hasegawa, Masato Watanabe, Hiroyuki Kawashima, Yukihiro Fujii, 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), 2021
2. Tomoaki Suzuki, Hitoshi Hasegawa, Kazuhiro Ando, Kohei Shibuya, Haruhiko Takahashi, Shoji Saito, Jotaro On, Makoto Oishi, Yukihiro Fujii. Hemodynamic features of an intracranial aneurysm rupture predicted by perianeurysmal edema: A case report *Surgical Neurology International*. 12:49.2021Feb 10
3. Klionsky DJ, Natsumeda M, 他、 2922 authors. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 17(1):1-382, 2021
4. Igarashi H, Takeda M, Natsumeda M, Fujii Y. Proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS). *No Shinkei Geka* 49(2):438-444, 2021
5. Fukuda M. Diagnosing status epilepticus. *No Shinkei Geka* 49(2):335-341, 2021
6. Yoneoka Y, Okada M. Pituitary Hypertrophy. *No Shinkei Geka* 49(2):301-315, 2021
7. Suzuki T. Computational fluid dynamics (CFD) *No Shinkei Geka* 49(2):425-431, 2021
8. Okamoto K, Natsumeda M, Oishi M, Fujii Y. Dysplastic Cerebellar Gangliocytoma (Lhermitte Duclos Disease). *No Shinkei Geka* 49(2):395-399, 2021
9. Okamoto K, Natsumeda M, Oishi M, Fujii Y. Melanocytic Tumors. *No Shinkei Geka* 49(2):389-394, 2021
10. Okamoto K, Natsumeda M, Oishi M, Fujii Y. Multinodular and Vacuolating Neuronal Tumor of the Cerebellum (MVNT). *No Shinkei Geka* 49(2):383-387, 2021
11. Miyahara H, Natsumeda M, Kanemura Y, Yamasaki K, Riku Y, Akagi A, Oohashi W, Shofuda T, Yoshioka E, Sato Y, Taga T, Naruke Y, Ando R, Hasegawa D, Yoshida M, Sakaida T, Okada N, Watanabe H, Ozeki M, Arakawa Y, Yoshimura J, Fujii Y, Suenobu S, Ihara K, Hara J, Kakita A, Yoshida M, Iwasaki Y. Topoisomerase II β immunoreactivity (IR) co-localizes with neuronal marker-IR but not glial fibrillary acidic protein-IR in GLI3-positive medulloblastomas: an immunohistochemical analysis of 124 medulloblastomas from the Japan Children's Cancer Group. *Brain Tumor Pathology* 38(2):109- 121, 2021
12. Masayasu Okada, Yosuke Kawagoe, Yuta Sato, Motohiro Nozumi, Yuya Ishikawa, Atsushi Tamada, Hiroyuki Yamazaki, Yuko Sekino, Yonehiro Kanemura, Yohei Shinmyo, Hiroshi Kawasaki, Naoko Kaneko, Kazunobu Sawamoto, Yukihiro Fujii and Michihiro Igarashi. Phosphorylation of GAP-43 T172 is a molecular marker of growing axons in a wide range of mammals including primates. *Molecular Brain* 8;14(1):66, 2021
13. Tomoaki Suzuki, Hitoshi Hasegawa, Kouichirou Okamoto, Kazuhiro Ando, Kohei Shibuya, Haruhiko Takahashi, Shoji Saito, Makoto Oishi, and Yukihiro Fujii. Development and natural

- course of lateral posterior choroidal artery aneurysms arising from fragile choroidal collaterals in moyamoya disease: illustrative cases. *Journal of neurosurgery: Case Lessons* 1(15), 2021
14. Jotaro On, Manabu Natsumeda, Jun Watanabe, Shoji Saito, Yu Kanemaru, Hideaki Abe, Yoshihiro Tsukamoto, Masayasu Okada, Makoto Oishi, Junichi Yoshimura, Akiyoshi Kakita and Yukihiko Fujii. Low Detection Rate of H3K27M Mutations in Cerebrospinal Fluid Obtained from Lumbar Puncture in Newly Diagnosed Diffuse Midline Gliomas. *Diagnostics* 11(4):681, 2021
 15. Kazuhiro Ando, Hitoshi Hasegawa, Tomoaki Suzuki, Shoji Saito, Kohei Shibuya, Haruhiko Takahashi, Makoto Oishi, Yukihiko Fujii. Delayed Bleeding of Unruptured Intracranial Aneurysms After Coil Embolization: A Retrospective Case Series, *World neurosurgery*, Vol. 149, May 2021, e135-145
 16. Nobuyuki Genkai, Kouichirou Okamoto, Toshiharu Nomura, Hiroshi Abe. Endovascular treatment of a ruptured aneurysm arising from the proximal end of a partial vertebrobasilar duplication with a contralateral prominent persistent primitive hypoglossal artery: Illustrative Case. *Journal of neurosurgery: Case Lessons*, 1(19), 2021
 17. Natsumeda M, On J, Watanabe J, Tsukamoto Y, Okada M, Fujii Y, Adachi J, Nishikawa R. The Present and Future of Less-invasive Liquid Biopsy for the Diagnosis of Gliomas and Brain Tumors. *No Shinkei Geka* 49 (3):527-534, 2021
 18. Masayasu Okada, Asami Kawasaki, Naoko Kaneko, Manabu Natsumeda, Makoto Oishi, Yukihiko Fujii, Michihiro Igarashi, Phosphorylated T172 in GAP-43: A novel molecular marker of axonal growth and regeneration in primate neurons identified by phosphoproteomics (Review Article), *Cytometry Research* 31(1):1 - 7, 2021
 19. Kohei Shibuya, Hitoshi Hasegawa, Tomoaki Suzuki, Shoji Saito, Kazuhiro Ando, Haruhiko Takahashi, Toru Takino, Ryota Ohkura, and Yukihiko Fujii, Retrograde T-Stent Technique for Large, Wide- Necked Internal Carotid-Posterior Communicating Artery Aneurysm, *JNET Journal of Neuroendovascular Therapy*. 15 (6) , (2021).
 20. Natsumeda, M., Kanemaru, Y., Kawaguchi, Y., Umezu, H., Kakita, A., & Fujii, Y. Less-invasive diagnosis of disseminated epithelioid glioblastoma harboring BRAF V600E mutation by cerebrospinal fluid analysis-A case report. *Clinical case reports*, 9(7), e04551. (2021).
<https://doi.org/10.1002/ccr3.4551>
 21. Natsumeda M, Chang M, Gabdulkaev R, Takahashi H, Tsukamoto Y, Kanemaru Y, Okada M, Oishi M, Okamoto K, Rodriguez FJ, Kakita A, Fujii Y, Schreck KC. Predicting BRAF V600E mutation in glioblastoma: utility of radiographic features, *Brain Tumor Pathology*, 38(3):228-233, (2021)
 22. Nao Shibata, Hiromi Nyuzuki, Sunao Sasaki, Yohei Ogawa, Masayasu Okada, Keisuke Nagasaki, Peripheral precocious puberty in a girl with an intracranial hCG-producing tumor: case report and literature review, *Endocrine Journal*, Article ID EJ21-0117, (2021).
<https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ21-0117>
 23. 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, *Neurooncology Advances*, 3(1):vdab086
24. Mineharu Y., Takagi Y, Koizumi A, Morimoto T, Funaki T, Hishikawa T, Araki Y, Hasegawa H, Takahashi ,JC, Kuroda S, Houkin K, Miyamoto S. *Journal of Neurosurgery* 10:1-10, 2021
 25. Kamimura H, Sano M, Tsujimura T, Takeda Y, Komoro Y, Yokoyama J, Terai S, Rapid Onset of Weight Gain and Liver Dysfunction Successfully Treated With Nutrition and Exercise. *Cureus* 13(7):e16530 2021
 26. Nakayama Y, Kawaguchi T, Fukuda M, Oishi M, Intraoperative findings of abnormal muscle response for hemifacial spasm following botulinum neurotoxin treatment, *Acta Neurochirurgica*, Published online:09 October 2021, <https://doi.org/10.1007/s00701-021-05017-5>
 27. Taiki Saito, Yasushi Jimbo, Tetsuro Takao, Manabu Natsumeda, Tadashi Kawaguchi. Choroid Plexus PapillomaintheFourthVentricleAssociatedwithPheochromocytoma:ACaseReport, *NMCCase Report Journal* 8 (1) :727-731 2021
 28. Yasuko Toyoshima, Yasuko Toyoshima, Hitoshi Takahashi, Shinnichi Katada, Naoyuki Kojima, Mari Tada, Takashi Tani, Ryoko Koike, Takanori Nozawa, Izumi Aida, Takashi Nakajima, Osamu Onodera and Akiyoshi Kakita. Parkinson’s disease and parkinsonism: Clinicopathological discrepancies on diagnosis in three patients. 2021 Nov 14. doi: 10.1111/neup.12777. Online ahead of print.
 29. M Natsumeda, H Igarashi, R Gabdulkaev, H Takahashi, K Motohashi, R Ogura, J Watanabe, Y Tsukamoto, K Okamoto, A Kakita, T Nakada, Y Fujii. Detection of 2-Hydroxyglutarate by 3.0-Tesla Magnetic Resonance Spectroscopy in Gliomas with Rare IDH Mutations: Making Sense of “False-Positive” Cases. *Diagnostics*. 11(11), 2129, 2021
 30. Akihiko Saito, Naoki Yajima, Kimihiko Nakamura, Yukihiko Fujii. Acute neurological deterioration after surgical interruption of spinal dural arteriovenous fistulas: clinical characteristics, possible predictors, and treatment. *Patient series. JNS: Case Lessons. Vol.2(25)*, 2021. DOI: 10.3171/CASE21548
 31. Iihara K, Saito N, Suzuki M, Date I, Fujii Y, Houkin K, Inoue T, Iwama T, Kawamata T, Kim P, Kinouchi H, Kishima H, Kohmura E, Kurisu K, Maruyama K, Matsumaru Y, Mikuni N, Miyamoto S, Morita A, Nakase H, Narita Y, Nishikawa R, Nozaki K, Ogasawara K, Ohata K, Sakai N, Sakamoto H, Shiokawa Y, Takahashi JC, Ueki K, Wakabayashi T, Yoshimoto K, Arai H, Tominaga T; Japan Neurosurgical Society. The Japan Neurosurgical Database: Statistics Update 2018 and 2019. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 61(12):675-710.2021
 32. Mizobuchi Y, Nagahiro S, Kondo A, Arita K, Date I, Fujii Y, Fujimaki T, Hanaya R, Hasegawa M, Hatayama T, Inoue T, Kasuya H, Kobayashi M, Kohmura E, Matsushima T, Masuoka J, Morita A, Nishizawa S, Okayama Y, Shigeno T, Shimano H, Takeshima H, Yamakami I. Microvascular Decompression for Trigeminal Neuralgia: A Prospective, Multicenter Study. *Neurosurgery*. 89(4):557-564.2021
 33. Mizobuchi Y, Nagahiro S, Kondo A, Arita K, Date I, Fujii Y, Fujimaki T, Hanaya R, Hasegawa M, Hatayama T, Hongo K, Inoue T, Kasuya H, Kobayashi M, Kohmura E, Matsushima T, Masuoka J, Morita A, Munemoto S, Nishizawa S, Okayama Y, Sato K, Shigeno T, Shimano H, Takeshima H, Tanabe H, Yamakami I. Prospective, Multicenter Clinical Study of Microvascular Decompression for Hemifacial Spasm. *Neurosurgery*. 88(4):846-854.2021
 34. Kitaura H, Hiraishi T, Itoh Y, Oishi M, Fujii Y, Fukuda M, Kakita A. Reactive astrocytes contribute to epileptogenesis in patients with cavernous angioma. *Epilepsy Res*. 176:106732.2021

35. Ito Y, Fukuda M, Matsuzawa H, Masuda H, Kobayashi Y, Hasegawa N, Kitaura H, Kakita A, Fujii Y. Deep learning-based diagnosis of temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis: An MRI study. *Epilepsy Res.* 178:106815.2021
36. Yoshimura S, Sakai N, Yamagami H, Uchida K, Beppu M, Toyoda K, Matsumaru Y, Matsumoto Y, Kimura K, Takeuchi M, Yazawa Y, Kimura N, Shigeta K, Imamura H, Suzuki I, Enomoto Y, Tokunaga S, Morita K, Sakakibara F, Kinjo N, Saito T, Ishikura R, Inoue M, Morimoto T. Endovascular Therapy for Acute Stroke with a Large Ischemic Region. *N Engl J Med.* 2022 Feb 9. doi: 10.1056/NEJMoa2118191. Epub ahead of print.
37. Nobuyuki Sakai, Masataka Takeuchi, Hirotoshi Imamura, Norihito Shimamura, Shinichi Yoshimura, Hiromichi Naito, Naoto Kimura, Osamu Masuo, Nobuyuki Hirotsumi, Kenichi Morita, Kazunori Toyoda, Hiroshi Yamagami, Hideyuki Ishihara, Takafumi Nakatsu, Naoki Miyoshi, Miharuru Suda, Shigeru Fujimoto. Safety, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of DS-1040, in Combination with Thrombectomy, in Japanese Patients with Acute Ischemic Stroke. *Clin Drug Investig.* 2022 Feb;42(2):137-149. doi: 10.1007/s40261-021-01112-8.
38. T Eda, M Okada, R Ogura, Y Tsukamoto, Y Kanemaru, J Watanabe, J On, H Aoki, M Oishi, N Takei, Y Fujii, M Natsumeda, Novel repositioning therapy for drug-resistant glioblastoma: In vivo validation study of clindamycin treatment targeting the mTOR pathway and combination therapy with temozolomide, *Cancers (Basel)*, 14(3): 770, 2022
39. D Mitsuhashi, R Hishida, M Oishi, T Hiraishi, M Natsumeda, K Shibuki, and Y Fujii, Visualization of cortical activation in human brain by flavoprotein fluorescence imaging, *Journal of Neurosurgery* 1.aop:1-9, 2022
40. 長谷川仁. 前交通動脈瘤に対するステント併用コイル塞栓術 - ステント留置血管の選択とテクニックの詳細 - 脳血管内治療の進歩, 診断と治療社, P28-36, 2021
41. 長谷川仁. dAVF に対する Onyx TAE におけるバルーンカテーテル活用法. 脳血管内治療ブラッシュアップセミナー 2021 テキスト
42. 源甲斐信行, 長谷川仁, 岡本浩一郎, 小林 勉, 竹内茂和, 宮川照夫, 山崎一徳, 恩田 清. ステント支援下コイル 塞栓術で治療に成功した動脈瘤破裂による直接型内頸動脈海綿静脈洞瘻例における MRA 元画像・再構成画像の 初期診断・評価としての有用性, 脳血管内治療 6(1): 49-57, 2021
43. 森田健一, Trouseau 症候群の治療戦略 3 ステントリトリーバーと吸引カテーテルの併用療法, 脳神経外科速報, 31 (5) 818-823, 2021.9
44. 田村哲郎, 山下慎也, 菊池文平, 渡邊潤, 瀧野透, 青木悟. トルコ鞍内に存在する内頸動脈間吻合動脈. *Folia Endocrinologica Japonica* Volume 97 : 63-65 (2021)

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

脳神経内科学分野

I 研究組織（構成員 令和4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 北原 匠
特任助教（死因究明教育センター）畠山 公大
病院専任助教 坪口 晋太郎、石黒 敬信
技術職員 川口 さやか、保科 加奈

博士課程大学院生

酒井 直子、山岸 拓磨、加藤 怜、大津 裕、永井 貴大、中島 章博、山田 友美、
金山 武史、森 秀樹

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、群馬大学の鳥居征司教授らとの共同研究により、2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO)ガスが酸化ストレスを軽減され、細胞死フェロトーシスを抑制する効果があることを示した。さらに、ガス吸入で脳梗塞マウスの梗塞病変を縮小することを見出した。その成果を*Journal of Biochemistry*, <https://doi.org/10.1093/jb/mvac044>に報告した。

2) 研究の成果

(特許出願)

特願2021-56280、PCT/JP2022/13766 細胞培養バッグ

【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。昨年度に続き、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」を実施している。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5施設で症例登録を行い、年度中に目標症例 40例の登録を行った。次年度に治験薬AJA030の安全性・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 畠山公大、二宮格、小野寺理、下畑享良、金澤雅人, 脳梗塞に対する細胞療法の最前線, 日本内科学会, 2021.110 (1) 117-123.
- 2 Ryutaro Hanyu, Masahiro Hatakeyama*, Masaki Namekawa, Yutaka Otsu, Mayura Sukegawa, Hiromi Hashida, Izumi Kawachi, Masato Kanazawa, Osamu Onodera. Progressive micrographia without parkinsonism caused by autoimmune brainstem encephalitis: A case report
Clinical Neurology and Neurosurgery. 2021.1. 202. 106496
- 3 Naohiko Seike, Akio Yokoseki, Ryoko Takeuchi, Kento Saito, Hiroaki Miyahara, Akinori Miyashita, Tetsuhiko Ikeda, Izumi Aida, Takashi Nakajima, Masato Kanazawa, Masatoshi Wakabayashi, Yasuko Toyoshima, Hitoshi Takahashi, Riki Matsumoto, Tatsushi Toda, Osamu Onodera, Atsushi Ishikawa, Takeshi Ikeuchi, Akiyoshi Kakita.
Genetic Variations and Neuropathologic Features of Patients With PRKN Mutations.
Movement Disorders. 2021.2 DOI:10.1002/mds.28521
- 4 Iva Stankovic, Alessandra Fanciulli, Vladimir S. Kostic, Florian Krismer, Wassilios G. Meissner, Jose Alberto Palma, Jalesh N. Panicker, Klaus Seppi, and Gregor K. Wenning, The MoDiMSA Study Group
Laboratory-supported Multiple System Atrophy beyond Autonomic Function Testing and Imaging :A Systematic Review by the MoDiMSA Study Group. Movement Disorders Clinical Practice. 2021.3 DOI:10.1002/mdc3.13158
- 5 小澤鉄太郎、延髄と消化管ペプチド：シヌクレイノパチーでの考察
脳神経内科 2021.3 94(1) 166-171
- 6 中島章博、河内 泉 Tumefactive demyelinating lesion(TDL)
脳神経外科, 2021 49(2) 376-382
- 7 Giulia Giannini, Alex Iranzo, Phillip A. Low, Paolo Martinelli, Federica Provini, Niall Quinn, Eduardo Tolosa, Gregor K. Wenning, Giovanni Abbruzzese, Pamela Bower, Angelo Antonini, Kailash P. Bhatia, Jacopo Bonavita, Maria Teresa Pellecchia, Nicole Pizzorni, François Tison, Imad Ghorayeb, Wassilios G. Meissner, Tetsutaro Ozawa, Claudio Pacchetti, Nicol'o Gabriele Pozzi, Claudio Vicini, Antonio Schindler, Pietro Cortelli,1, Horacio Kaufmann
Dysphagia in multiple system atrophy consensus statement on diagnosis, prognosis and treatment
Parkinsonism and Related Disorders 2021.3 DOI:10.1016/j.parkreldis.2021.03.027
- 8 Makoto Sainouchi, Hidetomo Tanaka, Hiroshi Shimizu, Takuya Mashima, Takao Fukushima, Yuya Hatano, Tomohiko Ishihara, Kunihiro Makino, Osamu Onodera, Akiyoshi Kakita

Hemiplegic-type ALS: clinicopathological features of two autopsied patients
J Neurol Neurosurg Psychiatry 2021 doi:10.1136/jnnp-2021-326257

- 9 中島章博、河内 泉 IgG4関連疾患
BRAIN and NERVE 2021.5 73(5) 584-594

- 10 Makoto Sainouch, Yuya Hatano, Mari Tada, Tomohiko Ishihara, Shoichiro Ando, Taisuke Kato,
Jun Tokunaga, Gaku Ito, Hiroaki Miyahara, Yasuko Toyoshima, Akio Yokoseki, Tetsutaro Ozawa,
Kohei Akazawa, Osamu Onodera and Akiyoshi Kakita
A novel splicing variant of ANXA11 in a patient with amyotrophic lateral sclerosis: histologic and
biochemical features
Acta Neuropathologica Communications 2021 9(106) DOI:10.1186/s40478-021-01202-w

- 11 林秀樹、上村昌寛、小野寺理 白質脳症を呈する遺伝性脳小血管病
脳神経内科 2021 94(5) 656-661

- 12 Satoshi Ueki, Tetsuhisa Hatase, Megumi Kiyokawa, Izumi Kawachi, Etsuji Saji, Osamu Onodera, Takeo
Fukuchi, Hironaka Igarashi
Visual outcome of aquaporin-4 antibody-positive optic neuritis with maintenance therapy
Japanese Journal of Ophthalmology 2021 19 DOI: 10.1007/s10384-021-00858-0

- 13 上村昌寛、小野寺理 那須・ハコラ病 [PLOSL または OMIM221770 : Polycystic
lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy] Care Net 2021

- 14 種田朝音、今野卓哉、小野純花、徳武考允、小野寺理
発熱と白血球増多を伴わず、脳出血で発症した *Staphylococcus warneri* による感染性心内膜炎の
1 例 臨床神経 2021 61 563-566

- 15 Jaroslaw Dulski, Takuya Konno, Zbigniew Wszolek. DCTN1-Related Neurodegeneration
GeneReviews 2021

- 16 小野寺理、上村昌寛、安藤昭一朗、林秀樹、金澤雅人 ラクナ梗塞の再考 - フィッシャーの
呪縛を超えて BRAIN and NERVE 2021 73(9) 991-998

- 17 山岸拓磨、須貝章弘、小野寺理 神経変性疾患
CLINICAL NEUROSCIENCE 2021 39(9) 1163-1167

- 18 Yusuke Sakata, Masato Kanazawa, Masahiro Hatakeyama, Takuya Konno, Tetsutaro Ozawa & Osamu
Onodera Do patients with multiple system atrophy have the decreased nocturnal urinary
concentration? Clinical Autonomic Research 2021
"DOI: <https://doi.org/10.1007/s10286-021-00826-1>"

- 19 Yuka Koike, Akihiro Sugai, Norikazu Hara, Junko Ito, Akio Yokoseki, Tomohiko Ishihara,
Takuma Yamagishi, Shintaro Tsuboguchi, Mari Tada, Takeshi Ikeuchi, Akiyoshi Kakita &

Osamu Onodera

"Age-related demethylation of the TDP-43 autoregulatory region in the human motor cortex"
communications biology 2021 DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02621-0>

- 20 河内 泉 "特集：多発性硬化症と視神経脊髄炎update ー基礎・臨床研究の最新知見ー
II. 脱髄性疾患の診断update 視神経脊髄炎の臨床像と自然経過"
日本臨牀 2021 79(10) 1521-1527
- 21 上村昌寛 HTRA1へテロ変異で脳症血管病を発症する臨床的特徴は？
日本医事新報 2021 5084 48
- 22 石原智彦、小野寺理 新規医療開発におけるAMEDおよび医師主導治験
Urology Today 2021 28(3) 4-8
- 23 河内泉 A.モノクローナル抗体の基礎 モノクローナル抗体の意義
CLINICAL NEUROSCIENCE 2021.1239(12) 1472-1476
- 24 Tomone Taneda, Masato Kanazawa, Yo Higuchi, Hironori Baba, Aiko Isami, Masahiro Uemura, Takuya
Konno, Arata Horii, Takeshi Ikeuchi and Osamu Onodera
Neuronal Intranuclear Inclusion Disease Presenting with Voice Tremor
Movement Disorders clinical practice 2021.12 doi:10.1002/mdc3.13382
- 25 坪口晋太郎、石原智彦、小野寺理 Seminar 7.高齢者の神経疾患における遺伝子診断
Geriatric Medicine 2021.1259(12) 1189-1192
- 26 河内泉 3-1. 肥厚性硬膜炎 脳神経内科診断ハンドブック 編著：下畑享良
2021.12 257-262
- 27 大津裕、金澤雅人 第3節 脳血管疾患モデル動物ーげっ歯類と霊長類
モデル動物の作製と利用 循環器疾患2021下巻 2021 219-226
- 28 Emi Nomura, Yuko Kawahara, Yoshio Omote, Yoshiaki Takahashi, Namiko Matsumoto, Ken Ikegami,
Mami Takemoto, Nozomi Hishikawa, Yumiko Nakano, Taijun Yunoki, Ryuta Morihara, Masahiro
Uemura, Koji Abe, Toru Ymashita
A case of a heterozygous ABCC6 mutation showing recurrent ischemic strokes and intracranial
hemorrhages Neurology and Clinical Neuroscience 2021.12 DOI:10.1111/ncn3.12575

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、新潟県立新発田病院神経内科、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
- (4) 脳梗塞に対するTEMPOガス治療効果の探索（学外共同研究）
（概要） 金澤雅人らは、群馬大学食健康科学教育研究センター鳥居征司教授らとの共同研究を行い、抗酸化ガスTEMPOの脳梗塞に対する治療効果の研究を行った。
（参加機関）新潟大学脳研究所脳神経内科、群馬大学食健康科学教育研究センター、群馬大学脳神経外科

統合脳機能研究センター

I 研究組織（構成員 令和4年3月31日現在）

生体磁気共鳴学分野

教授 五十嵐博中 准教授 伊藤 浩介 助教 渡辺 将樹

臨床機能脳神経科学分野

教授 島田 斉 准教授 村上 佳裕
特任助手 村木 美子 特任助手 大湊 詩保 特任助手 松田 豪

脳機能解析学分野

准教授 鈴木 雄治 助教 中村ゆきみ

客員教授 イングリッド・クウィー

技術職員 計良 妙

実験助手 富士 淑恵、大杉 勇輝

大学院生 大野 健、武田 基秀、虻川 直人

医局秘書 佐藤 直子、松崎 励奈、遠藤 智代、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、生体脳病理イメージングなどの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. Itoh K, Iwaoki H, Konoike N, Igarashi H, Nakamura K. Noninvasive scalp recording of the middle latency responses and cortical auditory evoked potentials in the alert common marmoset. *Hear Res.* 2021 Jun;405:108229.

2. Ueki S, Hatase T, Kiyokawa M, Kawachi I, Saji E, Onodera O, Fukuchi T, Igarashi H. Visual outcome of aquaporin-4 antibody-positive optic neuritis with maintenance therapy. *Jpn J Ophthalmol*. 2021 Sep;65(5):699-703.
3. Kubota M, Seki C, Kimura Y, Takahata K, Shimada H, Takado Y, Matsuoka K, Tagai K, Sano Y, Yamamoto Y, Okada M, Kikuchi T, Ichise M, Kawamura K, Zhang MR, Higuchi M. A first-in-human study of ¹¹C-MTP38, a novel PET ligand for phosphodiesterase 7. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021 Aug;48(9):2846-2855.
4. Moriguchi S, Takahata K, Shimada H, Kubota M, Kitamura S, Kimura Y, Tagai K, Tarumi R, Tabuchi H, Meyer JH, Mimura M, Kawamura K, Zhang MR, Murayama S, Suhara T, Higuchi M. Excess tau PET ligand retention in elderly patients with major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2021 Oct;26(10):5856-5863.
5. Ueki S, Suzuki Y, Kiyokawa M, Hanyu T, Fukuchi T. Hyperopic anisometropia with a shorter axial length ipsilateral to the ptotic eye in children with congenital ptosis. *BMC Ophthalmology*. 2021 Oct 9;21(1):358
6. Kubota M, Kimura Y, Shimojo M, Takado Y, Duarte JM, Takuwa H, Seki C, Shimada H, Shinotoh H, Takahata K, Kitamura S, Moriguchi S, Tagai K, Obata T, Nakahara J, Tomita Y, Tokunaga M, Maeda J, Kawamura K, Zhang MR, Ichise M, Suhara T, Higuchi M. Dynamic alterations in the central glutamatergic status following food and glucose intake: in vivo multimodal assessments in humans and animal models. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2021 Nov;41(11):2928-2943.
7. Kato T, Manabe RI, Igarashi H, Kametani F, Hirokawa S, Sekine Y, Fujita N, Saito S, Kawashima Y, Hatano Y, Ando S, Nozaki H, Sugai A, Uemura M, Fukunaga M, Sato T, Koyama A, Saito R, Sugie A, Toyoshima Y, Kawata H, Murayama S, Matsumoto M, Kakita A, Hasegawa M, Ihara M, Kanazawa M, Nishizawa M, Tsuji S, Onodera O. Candesartan prevents arteriopathy progression in cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy model. *J Clin Invest*. 2021 Nov 15;131(22):e140555.
8. Natsumeda M, Igarashi H, Gabdulkaev R, Takahashi H, Motohashi K, Ogura R, Watanabe J, Tsukamoto Y, Okamoto K, Kakita A, Nakada T, Fujii Y. Detection of 2-Hydroxyglutarate by 3.0-Tesla Magnetic Resonance Spectroscopy in Gliomas with Rare IDH Mutations: Making Sense of "False-Positive" Cases. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Nov 16;11(11):2129.
9. Yamada K, Watanabe M, Suzuki K. Reduced pituitary volume with relative T1 shortening correlates with behavior in Prader-Willi syndrome. *Biomarkers in Neuropsychiatry* Volume 5, December 2021, 100039. doi:10.1016/j.bionps.2021.100039.
10. Yamada K, Yoshimura J, Watanabe M, Suzuki K. Application of 7 tesla magnetic resonance imaging for pediatric neurological disorders: Early clinical experience. *Journal of clinical imaging science*. 2021 Dec 2;11:65.
11. Ohno K, Ohkubo M, Zheng B, Watanabe M, Matsuda T, Kwee IL, Igarashi H. GlyCEST: Magnetic Resonance Imaging of Glycine-Distribution in the Normal Murine Brain and Alterations in 5xFAD Mice. *Contrast media & molecular imaging*. 2021 Dec 30;2021:8988762. doi: 10.1155/2021/8988762. eCollection 2021.
12. Itoh K, Konoike N, Nejime M, Iwaoki H, Igarashi H, Hirata S, Nakamura K. Cerebral cortical processing time is elongated in human brain evolution. *Sci Rep*. 2022 Jan 20;12(1):1103.
13. Yamada K, Watanabe M, Suzuki K. Differential volume reductions in the subcortical,

- limbic, and brainstem structures associated with behavior in Prader-Willi syndrome. Scientific reports. 2022 Mar 23;12(1):4978.
14. Yamada K, Suzuki K, Watanabe M. Altered Functional Network Architecture of the Brain in Prader-Willi Syndrome. Brain connectivity. 2022 Mar;12(2):174-179.
 15. 互健二, 島田斉. 非アルツハイマー病性タウオパチーのタウ PET イメージング. 臨床放射線. 2021;4:335-341.
 16. 遠藤浩信, 島田斉. 臨床に役立つ Q&A 1. AD の早期診断におけるバイオマーカーの役割はどのようなことか. 2021;59(2):191-194.
 17. 島田斉. タウ PET による認知症病態解明. 脳神経内科. 2021;10:465-475.
 18. 島田斉. 画像バイオマーカー. 医学と薬学. 2021;79(1):25-34.
 19. 島田斉. 80 歳以上で発症の認知機能低下では Alzheimer 病を筆頭鑑別としない方が良い. 臨床雑誌内科. 2021;128(3):604-607.
 20. 島田斉. 認知症分子イメージングの進歩. Dementia Japan. 2021;35:320.
 21. 島田斉. 脳機能イメージング研究の足跡と新たな展開. 2022;54(6):85-90.
 22. 島田斉. 脳病態はどこまで見えたか? -神経変性疾患の脳病態イメージング. 2022;862:1-6.
 23. 島田斉. 汎用型タウ PET イメージングリガンド ¹⁸F-PM-PBB3 の開発. Isotope News. 2022;779:2-6.
 24. 酒多穂波, 松田将門, 伊藤浩介. 心理学実験における事象関連電位記録の基本とコツ. 基礎心理学研究 2022 Mar;40(2):234-246.

IV 共同研究

- | | | |
|-----|----------------------|--|
| (1) | 研究題目
研究内容 | 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～）
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標とする。 |
| | 参加機関 | Neurology, University of California, Davis（米国） |
| (2) | 研究題目
研究内容
参加機関 | 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～）
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。
国立成育医療研究センター |
| (3) | 研究題目
研究内容
参加機関 | サル類における聴覚事象関連電位の記録（平成25年～）
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。
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4年3月31日現在）

教授	池内 健	准教授	宮下 哲典	助教	春日 健作
特任助教	原 範和	特任助手	荒木 亜希	特任助手	長谷川 舞衣
特任助手	大滝 悠莉				
技術職員	月江 珠緒				
技術補佐員	大日方 藍、佐藤 康平、工藤 結子、佐久間 香織、小竹 葵				
事務補佐員	桑山 恵美子				
博士課程大学院生	劉 李歆、朱 斌、Ady Fitriah Yusran				
修士課程大学院生	番匠 涼雅				

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クエ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

Seike N, Yokoseki A, Takeuchi R, Saito K, Miyahara H, **Miyashita A**, Ikeda T, Aida I, Nakajima T, Kanazawa M, Wakabayashi M, Toyoshima Y, Takahashi H, Toda T, Matsumoto R, Onodera O, Ishikawa A, **Ikeuchi T**, Kakita A. A Comprehensive study of genetic variations and neuropathologic features of patients with PARK2. *Movement Disorders* 36:1634-1643, 2021 / doi: 10.1002/mds.28521

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. Ethnic and trans-ethnic genome-wide association studies identify new loci influencing Alzheimer's disease risk in Japanese. *Translational Psychiatry* 11:151, 2021 / doi: 10.1038/s41398-021-01684-1

Ishida C, Kato-Motozaki Y, Noto D, Komai K, Hasegawa M, **Ikeuchi T**, Yamada M: An autopsy case of corticobasal degeneration with the inferior olivary hypertrophy. *Neuropathology* 41:226-235, 2021 / doi: 10.1111/neup.12725

Futamura A, Hieda S, Mori Y, Sugimoto A, Kasai H, Kuroda T, Yano S, **Kasuga K**, Murakami H, **Ikeuchi T**, Ono K. Cingulate Island Sign in single photon emission computed tomography: clinical-biomarker correlation in Lewy body Disease and Alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's disease* 79:1003-1008, 2021 / doi: 10.3233/JAD-201145

Futamura A, Hieda S, Mori Y, **Kasuga K**, Sugimoto A, Kasai H, Kurora T, Yano S, **Ikeuchi T**, Tsuji M, Kiuchi Y, Irie K, Ono K. Toxic amyloid β 42 conformer may accelerate the onset of Alzheimer's disease in the preclinical stage. *Journal of Alzheimer's Disease* 80:639-646, 2021 / doi: 10.3233/JAD-201407

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 ILE1/FAM3C and amyloid- β is associated with the activation of distinct synapse and subpopulations. *Journal of Alzheimer's Disease* 80:159-174, 2021 / doi: 10.3233/JAD-201174

Mori Y, Tsuji M, Oguchi T, **Kasuga K**, Kimura A, Futamura A, Sugimoto A, Kasai H, Kuroda T, Yano S, Hieda S, Kiuchi, **Ikeuchi T**, Ono K. Serum BDNF as a potential biomarker of Alzheimer's disease: verification through assessment of serum, cerebrospinal fluid, and medial temporal lobe atrophy. *Frontiers Neurology* 12:653267, 2021 / doi: 10.3389/fneur.2021.653267

Kakuda N, Takami M, Okochi M, **Kasuga K**, Ihara Y, **Ikeuchi T**. Switched A β 43 generation in familial Alzheimer's disease with presenilin 1 mutation. *Translational Psychiatry* 11, 558, 2021 / doi: 10.1038/s41398-021-01684-1

Watanabe R, Kawakami I, **Ikeuchi T**, Murayama S, Arai T, Akiyama H, Onaya M, Hasegawa M. An autopsied FTDP-17 case with *MAPT* IVS 10+14 mutation presenting with frontotemporal dementia. *eNeurologicalSci* 24, 100363, 2021 / doi.org/10.1016/j.ensci.2021.100363

Senda M, Ishii K, Ito K, **Ikeuchi T**, Matsuda H, Iwatsubo T, Iwata A, Ihara R, Suzuki K, **Kasuga K**, Ikari Y, Niimi Y, Arai H, Tamaoka A, Arahata Y, Itoh Y, Tachibana H, Ichimiya Y, Washizuka S, Odawara T, Ishii K, Ono K, Yokata T, Nakanishi A, Matsubara E, Mori H, Shimada H. A Japanese multicenter study on PET and other biomarkers for subjects with potential preclinical and prodromal Alzheimer's disease. *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 8:495-502, 2021 / doi: 10.14283/jpad.2021.37

Mano T, Sato K, **Ikeuchi T**, Toda T, Iwatsubo T, Iwata A. Peripheral blood BRCA1 methylation positively correlates with major Alzheimer's disease risk factors. *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 8:477-482, 2021 / doi: 10.14283/jpad.2021.31

Shi Y, Zhang W, Yang Y, Murzin A, Falcon B, Kotecha A, van Beers M, Tarutani A, Kametani F, Garringer HJ, Vidal R, Hallinan GI, Lashley T, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Tanaka H, Kakita A, **Ikeuchi T**, Mann DMA, Kovacs GG, Revesz T, Ghetti B, Hasegawa M, Goedert M, Scheres SHW. A structure-based classification of tauopathies. *Nature* 598:359-363, 2021 / doi: 10.1038/s41586-021-03911-7

Koike Y, Sugai A, Hara N, Ito J, Yokoseki A, Ishihara T, Yamagishi T, Tsuboguchi S, Tada M, **Ikeuchi T**, Kakita A, Onodera O. Age-related demethylation of the TDP-43 autoregulatory region in the 2 human motor cortex. *Communications Biology* 4: 1107, 2021 / doi: 10.1038/s42003-021-02621-0

Wabanabe Y, **Kasuga K**, Tokutake T, Kitamura K, **Ikeuchi T**, Nakamura K. Alterations in glycerolipid and fatty acid metabolic pathways in Alzheimer's disease identified by urinary metabolic profiling: A Pilot Study. *Frontiers in Neurology* 12:719159, 2021 / doi: 10.3389/fneur.2021.719159

Nan H, Kim YJ, Tsuchiya M, Fukao T, Hara N, Hagihara A, Nishioka K, Hattori N, **Hara N**, **Ikeuchi T**, Ohtsuka T, Takiyama Y. A novel heterozygous missense variant in the CIAO1 gene in a family with Alzheimer's disease: The Val67Ile variant promotes the interaction of CIAO1 and amyloid- β protein precursor. *Journal of Alzheimer's Disease* 84:599-605, 2021 / doi: 10.3233/JAD-210706

Taneda T, Kanazawa M, Higuchi Y, Baba H, Isami A, Uemura M, Konno T, **Ikeuchi T**, Onodera O. Neuronal intranuclear inclusion disease presented with spasmodic dysphonia as the initial symptom. *Movement Disorders Clinical Practice* 9:404-406, 2021 / doi: 10.1002/mdc3.13382

Watanabe N, Nakano M, Mitsuishi Y, **Hara N**, Murayama S, Iwata A, Suzuki T, **Ikeuchi T**, Nishimura M. Transcriptional downregulation of FAM3C/ILEI in Alzheimer's brain. *Human Molecular Genetics* 31:122-132, 2021 / doi: 10.1093/hmg/ddab226

Gonneaud J, Baria AT, Pichet Binette A, Gordon BA, Chhatwal JP, Cruchaga C, Jucker M, Levin J, Salloway S, Farlow M, Gauthier S, Benzinger TLS, Morris JC, Bateman RJ, Breitner JCS, Poirier J, Vachon-Preseu E, Villeneuve S; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI); Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN) Study Group*; Pre-symptomatic Evaluation of Experimental or Novel Treatments for Alzheimer's Disease (PREVENT-AD) Research Group. Accelerated functional brain aging in pre-clinical familial Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2021 9;12:5346. doi: 10.1038/s41467-021-25492-9. (*, including **Kasuga K** and **Ikeuchi T**)

Delaby C, Teunissen CE, Blennow K, Alcolea D, Arisi I, Amar EB, Beaume A, Bedel A, Bellomo G, Bigot-Corbel E, Bjerke M, Blanc-Quintin MC, Boada M, Bousiges O, Chapman MD, DeMarco ML, D'Onofrio M, Dumurgier J, Dufour-Rainfray D, Engelborghs S, Esselmann H, Fogli A, Gabelle A, Galloni E, Gondolf C, Grandhomme F, Grau-Rivera O, Hart M, **Ikeuchi T**, Jeromin A, **Kasuga K**, Keshavan A, Khalil M, Körtvelyessy P, Kulczynska-Przybik A, Laplanche JL, Lewczuk P, Li QX, Lleó A, Malaplate C, Marquié M, Masters CL, Mroczko B, Nogueira L, Orellana A, Otto M, Oudart JB, Paquet C, Paoletti FP, Parnetti L, Perret-Liaudet A, Peoc'h K, Poesen K, Puig-Pijoan A, Quadrio I, Quillard-Muraine M, Rucheton B, Schraen S, Schott JM, Shaw LM, Suárez-Calvet M, Tsolaki M, Tumani H, Udeh-Momoh CT, Vaudran L, Verbeek MM, Verde F, Vermunt L, Vogelgsang J, Wiltfang J, Zetterberg H, Lehmann S. Clinical reporting following the quantification of cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: An international overview. *Alzheimers Dement.* 2021. doi: 10.1002/alz.12545. Online ahead of print.

Pichet Binette A, Vachon-Preseu É, Morris J, Bateman R, Benzinger T, Collins DL, Poirier J, Breitner JCS, Villeneuve S; Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN)*; PREVENT-AD Research Group. Amyloid and Tau Pathology Associations With Personality Traits, Neuropsychiatric Symptoms, and Cognitive Lifestyle in the Preclinical Phases of Sporadic and Autosomal Dominant Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry.* 2021;89:776-785. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.01.023. (*, including **Kasuga K** and **Ikeuchi T**)

池内 健. 成人発症大脳白質変性症. 脳神経内科診断ハンドブック. 中外医学社 2021年12月発刊

池内 健. 認知症におけるゲノム医療展望. 臨床遺伝専門医テキストシリーズ. 診断と治療社 2021年12月30日発行

池内 健. 神経変性疾患の疾患コホート研究. p105-110, 神経変性疾患の治療開発の現状：新たな戦略構築の基盤をめざして. 医歯薬出版株式会社. 2021年2月15日

池内 健, Yusran Ady Fitrah, 朱 斌. 中枢性希少難病における恒常性ミクログリアの破綻と細胞移植療法の可能性. 日本薬理学雑誌 156:225-229, 2021

原 範和, 池内 健. 非アルツハイマー型認知症：前頭側頭型認知症とレビー小体型認知症を中心に. 医学のあゆみ 278:451-455, 2021

池内 健, 井原涼子. DIAN Japan研究とゲノム医療. 認知症学会誌35:35:408-417, 2021

春日健作. 進行性核上性麻痺・大脳皮質基底核変性症に関連する遺伝子. 脳神経内科 95: 476-481, 2021.

春日健作. アルツハイマー病病理とバイオマーカー. 老年医学 59: 135-142, 2021.

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

動物資源開発研究分野

I 研究組織（構成員 令和4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
特任助教 竹鶴 裕亮
技術職員 作間 赴法, 齊藤 奈英, 平澤 克哉
教務助手 那須野 純映 一般職員 加藤 明子
特任助手 山本 美丘, 阿部 光寿, 内山 澄香, 鈴木 康浩, 足立 周子
阿部 紗也香, 佐々木 綾音, 桑原 沙耶香
事務補佐員 野澤 佳世, 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、運動調節と学習・記憶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、マーモ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、当分野ではマーモセット卵巣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モセット卵巣の分与を受け、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) 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*. 2021 Jan 8; 9(1): E49.
doi: 10.3390/biomedicines9010049.PMID: 33429895
- (2) 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. *J Biol Chem*. 2021 Mar 15; 100544.
doi: 10.1016/j.jbc.2021.100544. Online ahead of print. PMID: 33737022
- (3) 西條康夫、周啓亮、冉慶松、北原哲彦、小田佳奈子、泰江章博、笹岡俊邦、叶許緑、阿部学、崎村建司、土田正則、味岡洋一：胚盤胞補完法を用いた多能性幹細胞由来肺の作出、**日本呼吸器学会誌(Web)** (*Annals of the Japanese Respiratory Society (Web)*) 巻：10号：増刊号(冊子) ページ：14 発行年：2021年04月10日、JST資料番号：U1489A ISSN：2186-5884
- (4) 冉慶松、周啓亮、小田佳奈子、泰江章博、阿部学、笹岡俊邦、崎村建司、味岡洋一、西條康夫：胚盤胞補完法とES細胞を用いた甲状腺再生、**日本再生医療学会総会(Web)** 巻：20th ページ：ROMBUNNO. P-01-03 (WEB ONLY) 発行年：2021年 JST資料番号：U1460A

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3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3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）
- (3) 令和3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

モデル動物開発分野

I 研究組織（構成員 令和4年3月31日現在）

教授（兼） 笹岡 俊邦 准教授 阿部 学 特任助教 川村 名子
特任助手 望月 雪絵 技術職員 夏目 里恵 フェロー 崎村 建司
非常勤講師 田中 恵子
実験補助 矢部 恵稚子、大堀 千洋、石本 菜穂子、早川 香織、小幡 桃子
小林 智子
修士課程大学院生 平山 瑠那

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ン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11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180件（令和3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91件（令和3年度、5件）の支援をおこなった。

以上、この11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196編（令和3年度、20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 Yuza, K. *et al.* Activin a Receptor Type 2A Mutation Affects the Tumor Biology of Microsatellite Instability-High Gastric Cancer. *J Gastrointest Surg* (2021). <https://doi.org:10.1007/s11605-020-04889-9>
- 2 Yokoi, N. *et al.* 14-3-3 proteins stabilize LGI1-ADAM22 levels to regulate seizure thresholds in mice. *Cell reports* **37**, 110107 (2021). <https://doi.org:10.1016/j.celrep.2021.110107>
- 3 Varuzhanyan, G. *et al.* Fis1 ablation in the male germline disrupts mitochondrial morphology and mitophagy, and arrests spermatid maturation. *Development* **148** (2021). <https://doi.org:10.1242/dev.199686>
- 4 Utsunomiya, S. *et al.* Ezh1 regulates expression of Cpg15/Neuritin in mouse cortical neurons. *Drug Discov Ther* (2021). <https://doi.org:10.5582/ddt.2021.01017>
- 5 Uchida, S. *et al.* A Discrete Glycinergic Neuronal Population in the Ventromedial Medulla That Induces Muscle Atonia during REM Sleep and Cataplexy in Mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **41**, 1582-1596 (2021). <https://doi.org:10.1523/jneurosci.0688-20.2020>

- 6 Simankova, A. *et al.* Ddx20, DEAD box helicase 20, is essential for the differentiation of oligodendrocyte and maintenance of myelin gene expression. *Glia* (2021). <https://doi.org:10.1002/glia.24058>
- 7 Sakai, S. S. *et al.* Loss of Atg2b and Gskip impairs the maintenance of the hematopoietic stem cell pool size. *Molecular and cellular biology*, Mcb0002421 (2021). <https://doi.org:10.1128/mcb.00024-21>
- 8 Miyata, S. *et al.* Global knockdown of glutamate decarboxylase 67 elicits emotional abnormality in mice. *Molecular brain* **14**, 5 (2021). <https://doi.org:10.1186/s13041-020-00713-2>
- 9 Miura, K. *et al.* Dysregulation of sphingolipid metabolic enzymes leads to high levels of sphingosine-1-phosphate and ceramide in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* (2021). <https://doi.org:10.1111/hepr.13625>
- 10 Matsuoka, T. *et al.* Kv11 (ether-à-go-go-related gene) voltage-dependent K(+) channels promote resonance and oscillation of subthreshold membrane potentials. *J Physiol* **599**, 547-569 (2021). <https://doi.org:10.1113/jp280342>
- 11 Kawai, T. *et al.* Heterogeneity of microglial proton channel in different brain regions and its relationship with aging. *Journal of neurochemistry* (2021). <https://doi.org:10.1111/jnc.15292>
- 12 Kageyama, S. *et al.* p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response. *Nature communications* **12**, 16 (2021). <https://doi.org:10.1038/s41467-020-20185-1>
- 13 Jitsuki-Takahashi, A. *et al.* Activity-induced secretion of semaphorin 3A mediates learning. *The European journal of neuroscience* **53**, 3279-3293 (2021). <https://doi.org:10.1111/ejn.15210>
- 14 Iwasaki, K. *et al.* Induction of Mutant Sik3(Sleepy) Allele in Neurons in Late Infancy Increases Sleep Need. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **41**, 2733-2746 (2021). <https://doi.org:10.1523/jneurosci.1004-20.2020>
- 15 Ito, H. *et al.* Activation of proprotein convertase in the mouse habenula causes depressive-like behaviors through remodeling of extracellular matrix. *Neuropsychopharmacology* **46**, 442-454 (2021). <https://doi.org:10.1038/s41386-020-00843-0>
- 16 Iida, I. *et al.* A comparative analysis of kainate receptor GluK2 and GluK5 knockout mice in a pure genetic background. *Behav Brain Res* **405**, 113194 (2021). <https://doi.org:10.1016/j.bbr.2021.113194>
- 17 Hagiwara, H. *et al.* Sex differences in pain-induced modulation of corticotropin-releasing hormone neurons in the dorsolateral part of the stria terminalis in mice. *Brain Res* **1773**, 147688 (2021). <https://doi.org:10.1016/j.brainres.2021.147688>
- 18 Fujima, S. *et al.* CAPS2 Deficiency Impairs the Release of the Social Peptide Oxytocin, as Well as Oxytocin-Associated Social Behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*

Neuroscience 41, 4524-4535 (2021).

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3240-20.2021>

- 19 Chipman, P. H. *et al.* Astrocyte GluN2C NMDA receptors control basal synaptic strengths of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the stratum radiatum. *eLife* 10 (2021). <https://doi.org/10.7554/eLife.70818>
- 20 Abe, Y. *et al.* Optical manipulation of local cerebral blood flow in the deep brain of freely moving mice. *Cell reports* 36, 109427 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109427>

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高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

分子神経疾患資源解析学分野

I 研究組織（構成員 令和4年3月31日現在）

教授	小野寺 理（兼任）	准教授	加藤 泰介
助教	須貝 章弘	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いる。本年度は、CARASILが、マトリソームタンパク質の蓄積による加齢性の血管硬化によって発症するという新たな分子メカニズムを発見し、カンデサルタンの投与によって、CARASILモデルマウスの脳血管機能障害が治療可能であることを発見した。本研究成果は、今後の脳小血管病に対する治療法開発の基盤になることが期待される。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。

ALSは、ALSは中年期以降に発症し、運動野の神経細胞を主体にTDP-43が蓄積する神経変性疾患である。当教室では、ALSの原因遺伝子から、病態の解明、治療法の開発まで一貫した研究を行っている。本年度は、TDP-43発現調節におけるエピジェネティックな要因を基礎的な研究から明らかにし、さらにヒト剖検脳を用い、運動野におけるエピジェネティックな加齢変化が、TDP-43発現調節機構を乱すことを見出した。本研究は、加齢により、運動野という特定の領域に疾患が引き起こされるALSの謎に迫る成果であり、今後の治療法開発への発展が期待される。また、原因遺伝子の解析について、病理学分野と連携し、病理学的に診断が確定したALS連続症例における解析を進めている。

III 論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Kato T, Manabe RI, Igarashi H, Kametani F, Hirokawa S, Sekine Y, Fujita N, Saito S, Kawashima Y, Hatano Y, Ando S, Nozaki H, Sugai A, Uemura M, Fukunaga M, Sato T, Koyama A, Saito R, Sugie A, Toyoshima Y, Kawata H, Murayama S, Matsumoto M, Kakita A, Hasegawa M, Ihara M, Kanazawa M, Nishizawa M, Tsuji S, Onodera O. Candesartan prevents arteriopathy progression in cerebral autosomal

recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy model. J Clin Invest. 2021 Nov 15;131(22):e140555.

2. Yuka Koike, Akihiro Sugai, Norikazu Hara, Junko Ito, Akio Yokoseki, Tomohiko Ishihara, Takuma Yamagishi, Shintaro Tsuboguchi, Mari Tada, Takeshi Ikeuchi, Akiyoshi Kakita, Osamu Onodera. Age-related demethylation of the TDP-43 autoregulatory region in the human motor cortex. Commun Biol. 2021 Sep 21;4(1):1107
3. 山岸 拓磨, 須貝 章弘, 小野寺 理 【神経疾患を克服する-わが国の戦略(1)】神経疾患研究の現状の課題と展望 神経変性疾患. Clinical Neuroscience(0289-0585)39巻9号 Page1163-1167(2021.09)

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4年3月31日現在)

教授	松井 秀彰	准教授	菱田 竜一	准教授	山中 智行
准教授	杉江 淳	特任助教	酒井 晶子	特任助教	新田 陽平
特任助手	松井 典子	特任助手	杉江 歩美		
遺伝医療支援センター医員	入月 浩美	博士研究員	Mohammad Hussan		
技術職員	小林 科野、Fahmida Zannat				
博士課程大学院生	古寺 一樹、加藤 怜				

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、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・アルツハイマー病・筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、自閉症・ADHDなどの発達障害、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のが予想される。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場となるシナプスや、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. **Matsui, H.***, Ito, J., Matsui, N., Uechi, T., Onodera, O., Kakita, A. Cytosolic dsDNA of mitochondrial origin induces cytotoxicity and neurodegeneration in cellular and zebrafish models of Parkinson's disease. *Nat. Commun.* 12(1):3101, 2021.
2. 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.* 66(11):3960-3967, 2021.

3. Sakamoto, M., Sasaki, K., Sugie, A., Nitta, Y., et al. De novo ARF3 variants cause neurodevelopmental disorder with brain abnormality. *Hum. Mol. Genet.* 31(1):69–81, 2021.

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：「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

(5) 研究題目：「クルクミン誘導体によるアミロイド β 凝集体の解毒」

研究内容：クルクミン誘導体が、アミロイド β 凝集体を解離させることを明らかにする。

参加機関：東京工業大学の中村浩之教授

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 51 回 新潟神経学脳研セミナー

令和 4 年 2 月 25 日 (金) 9:30~15:30

オンライン(Zoom)

第一部 PI による分野紹介 (9:30-11:34)

- | | |
|-------------|---------------|
| 9:30-9:35 | 開会の挨拶 |
| 9:35-9:42 | 脳神経内科学分野 |
| 9:42-9:49 | 分子神経疾患資源解析学分野 |
| 9:49-9:56 | 脳神経外科学分野 |
| 9:56-10:03 | 腫瘍病態学分野 |
| 10:03-10:10 | 病理学分野 |
| 10:10-10:17 | 脳疾患標本資源解析学 |
| 10:17-10:24 | 生体磁気共鳴学分野 |
| 10:24-10:31 | 脳機能解析学分野 |
| 10:31-10:38 | 臨床機能脳神経学分野 |
| 10:38-10:45 | 遺伝子機能解析学分野 |
| 10:45-10:52 | 動物資源開発研究分野 |
| 10:52-10:59 | モデル動物開発分野 |
| 10:59-11:06 | 細胞病態学分野 |
| 11:06-11:13 | 脳病態解析分野 (松井) |
| 11:13-11:20 | 脳病態解析分野 (杉江) |
| 11:20-11:27 | システム脳病態学(上野) |
| 11:27-11:34 | システム脳病態学(田井中) |

第二部 新人教員による自己紹介 (13:00-14:01)

第三部 女性研究者育成に向けたパネルディスカッション (14:10-14:40)

第四部 ブロードマン事業および脳研究所の大きな研究目標に向けたパネルディスカッション (14:50-15:30)

The 12th BRI International Symposium
第12回 新潟大学脳研究所共同研究拠点 国際シンポジウム

The Old and New Crossroads of Microorganisms and Neurodegeneration

Thursday 24 February 2022

9:00 to 17:40 (Japan time)

Online via Zoom

Free - with prior registration

Vera Gorbunova
Univ. of Rochester



Matthew Chapman
Univ. of Michigan



Speakers

Nan Yan
UT Southwestern



Chaogu Zheng
Univ. of Hong Kong



Akiko Takahashi
The Cancer Institute of JFCR



Suehiro Sakaguchi
Tokushima Univ.



Shinichi Fukuda
Univ. of Tsukuba



Taisuke Tomita
The Univ. of Tokyo



Sachiko Miyake
Juntendo Univ.



Masahiro Fujii
Niigata Univ.



Hideaki Matsui
BRI, Niigata Univ.



参加登録リンク
To sign up



bit.ly/3D30Em2

問い合わせ先

新潟大学脳研究所事務室

〒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 Website : www.bri.niigata-u.ac.jp/en

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



新潟大学
NIIGATA UNIVERSITY



新潟大学脳研究所
Brain Research Institute, Niigata University

The 12th BRI International Symposium "The Old and New Crossroads of Microorganisms and Neurodegeneration"
Thursday 24 February 2022, Online
Brain Research Institute, Niigata University, Japan

Japan time (JST)		Speaker / Symposist	Institute	Local time - Time zone
9:00-9:05	Opening remarks	Dr. Osamu Onodera	Director of BRI, Niigata University	
	Chair: Dr. Hideaki Matsui			
9:05-9:45	Transposable elements, inflammation and aging: a friend or foe?	Dr. Vera Gorbunova	University of Rochester	19:05-19:45, 23 Feb - EST
9:45-10:25	Connecting the fiber between neurodegenerative disease and the microbiome	Dr. Matthew R. Chapman	University of Michigan	19:45-20:25, 23 Feb - EST
10:25-11:05	The innate immune STING signaling in neurodegenerative disease	Dr. Nan Yan	University of Texas Southwestern Medical Center	19:25-20:05, 23 Feb - CST
Break 5 mins				
	Chair: Dr. Taisuke Kato			
11:10-11:50	Neurodegeneration induced by mitochondrial DNA leakage	Dr. Hideaki Matsui	BRI, Niigata University	
11:50-12:30	Molecular mechanisms of inflammatory gene expression in senescent cells	Dr. Akiko Takahashi	The Cancer Institute of JFCR	
12:30-13:10	Intracellular deposition of retrotransposon in age related macular degeneration	Dr. Shinichi Fukuda	University of Tsukuba	
Lunch Break				
	Chair: Dr. Taichi Kakhana			
14:10-14:50	Pathogenic mechanisms in viral and non-viral neurodegenerative diseases	Dr. Masahiro Fujii	Niigata University	
14:50-15:30	Prion protein in health and disease	Dr. Suehiro Sakaguchi	Tokushima University	
Break 5 mins				
	Chair: Dr. Tomoyuki Yamanaka			
15:35-16:15	Novel strategies for enhanced amyloid clearance in the Alzheimer disease brain	Dr. Taisuke Tomita	The University of Tokyo	
16:15-16:55	Gut dysbiosis and neuroinflammation	Dr. Sachiko Miyake	Juntendo University	
16:55-17:35	Genome-wide screen identifies pro-neurodegenerative genes in bacteria	Dr. Chaogu Zheng	University of Hong Kong	15:55-16:35, 24 Feb - HKT
17:35-17:40	Closing remarks	Dr. Hideaki Matsui		

第11回 生理研-霊長研-新潟脳研 合同シンポジウム The 11th NIPS-PRI-BRINU Joint Symposium

Date: 17th (Thu) 13:00~18th (Fri) 12:00
February, 2022

参加費無料・要事前参加登録

[Free of charge, advance registration required]

■会場 [Venue]:
Zoom & Remo

■参加登録 [Registration]:
下記よりご登録ください

<https://forms.office.com/r/fvGfGNPOuX>

■スケジュール [Schedule]:
Feb 17th

13:00~17:20

口頭発表 [Oral presentation]

17:20~19:30

ポスター発表

[Poster presentation]

Feb 18th

9:00~12:00

口頭発表 [Oral presentation]



ポスター発表登録締切:
[Registration deadline of
poster presentation] :

Jan 7th (Fri)

一般参加登録締切:

[Registration deadline] :

Feb 10th (Thu)

■お問合せ [Contact us]:

新潟大学脳研究所 [Brain Research Institute, Niigata University]

事務室共同利用係 <Email: noukyoudo@adm.niigata-u.ac.jp>

動物資源開発研究分野 笹岡俊邦 <Email: sasaoka@bri.niigata-u.ac.jp>

第 11 回
生理研－霊長研－新潟脳研
合同シンポジウム
The 11th NIPS-PRI-BRINU
Joint Symposium

DATE: 17th-18th, February, 2022

Venue: Zoom & Remo

受付/ reception: Zoom

参加案内メールで配布されたリンクからZoomに下記の名前でログインしてください。Please login to Zoom with the following name from the link provided in the invitation email.

Zoom Name : Taro Yamada

Zoomの名前表示の変更方法/How to change your Zoom name:

<https://support.zoom.us/hc/en-us/articles/201363203-Customizing-your-profile>

<講演者と座長の方/For speakers and chairs>

Venue: Zoom

Language : English

20 min talk + 5 min discussion

スライド提示は各自の PC からZoom 画面共有で行っていただきます。Zoom 環境の事前チェックは各自でお願いいたします。

当日発表前の休憩時でも確認をお願いいたします。

Please share the screen from your PC to present the slides. Please check your system for Zoom beforehand on your own.

You can check your system during the break before your presentation.

<参加者の方へ/for attendees>

質問のある方はチャットに下記のように名前・所属を記入してください。発表終了後、座長の指示に従って質問してください。

If you have a question, please send a chat message as follows. After the presentation, please follow the instructions of the chair and ask questions.

> Question Toshikuni Sasaoka BRINU

情報交換会・ポスター発表/Information exchange meeting & Poster presentation: Remo

参加案内メールで配布されたリンク(後日配布します)からRemoにログインしてください。Remoの使用法については同電子メールに添付された資料(後日配布します)をご参照ください。

Please login to Remo from the link provided in the invitation email (to be announced later). Please refer to the documents (to be distributed later) attached to the email as to

how you can use Remo.

<ポスター発表の方/For poster presenters>

Venue: Remo

Language: English

Poster size: Any

Recommended file format: jpg (and pdf). Poster exhibition: 17:30 – 19:30 on the 17th

Poster assigned time/ポスター担当時間:

Odd numbers (奇数番号) : 17:30-18:00

Even numbers (偶数番号) : 18:00-18:30

Presenters are obligated to be around their poster for the assigned time. ポスター発表者は上記の時間には自分のポスターに常駐してください。

※ポスター番号に対応したRemoテーブルのホワイトボードにご自身でポスター画像を貼ってポスター掲示してください。ポスター掲示についてはメールに添付されたtutorial資料(後日配布します)をご参照ください。Floorは複数のフロアがあるのでご注意ください。

Place the poster on the whiteboard of the Remo table that corresponds to your poster table number. Please refer to the documents (to be distributed later) attached to the email as to how you can put the poster on your own. Please be noticed that there are multiple floors.

禁止事項/Prohibited matters

※研究会開催中の録画、録音、画面のキャプチャ保存、SNS等へ公開するなどの行為は禁止します。

Please do not record, save screen, publish to SNS, etc., the presentation contents.

※ZoomミーティングのID、パスワード、Remo URLを他者に転送する行為は厳に禁止します。

Please do not transfer the Zoom meeting ID, password, and Remo URL to others.

Symposium Agenda

DAY1: February, 17

13:00	Reception
13:10	Opening remarks Osamu Onodera, Director, BRI, Niigata University 小野寺理 新潟大学脳研究所 所長
Session 1 Chair: Takayasu Mikuni, Department of Cellular Neuropathology, BRINU 座長：三國貴康 新潟大学脳研究所	
13:15	Neuropathological imaging for elucidation of brain pathology and promotion of drug discovery Hitoshi Shimada, Department of Functional Neurology & Neurosurgery, Center for Integrated Human Brain Science, BRINU 島田斉 新潟大学脳研究所 臨床機能脳神経学分野
13:40	Break (5 minutes)
13:45	Neuronal encoding of emotional valence and intensity in the monkey amygdala Haruhiko Iwaaki, Cognitive Neuroscience Section, PRI 岩冲晴彦 京都大学霊長類研究所 高次脳機能
14:10	Break (5 minutes)
14:15	Metaplasticity in hippocampal neurons revealed by photo-activatable CaMKII Ueda Hiromi, Supportive center for brain research, NIPS 植田大海 生理学研究所 多光子顕微鏡室
14:40	Break (10 minutes)
Session2 Chair: Katsuki Nakamura, Section of Cognitive Neuroscience, PRI 座長：中村克樹 京都大学霊長類研究所 高次脳機能分野	
14:50	Improvement of two-photon microscopy toward realizing in vivo nanoscale 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
15:15	Break (5 minutes)

15:20	Development of new transsynaptic viral tracers Kunio Kondoh, Division of Endocrinology and Metabolism, NIPS 近藤邦生 生理学研究所 生殖内分泌系発達機構研究部門
15:45	Break (5 minutes)
15:50	Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease Kensaku Kasuga, Department Molecular Genetics, Center for Bioresources, BRINU 春日健作 新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析分野
16:15	Photo session and break
Session3 Chair: Tomomi Nemoto, Biophotonics Research Group, NIPS 座長：根本知己 生理学研究所 バイオフォトンクス研究部門	
16:25	Regulatory mechanisms of the LGI1-ADAM22 level to prevent epilepsy in mice Norihiro Yokoi, Division of Membrane Physiology, NIPS 横井紀彦 生理学研究所 生体膜研究部門
16:50	Break (5 minutes)
16:55	3'UTR binding of hnRNP A/B is crucial for axon targeting and maturation of olfactory sensory neurons Nanaho Fukuda, Department of Comparative and Experimental Medicine, BRINU 福田七穂 新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野
17:20	Break and poster preparation
17:30	Poster session and information exchange meeting
19:30	

DAY2: February, 18

9:00	Reception
9:10	Announcement from organizer Session4 Chair: Hiroaki Wake, Division of Multicellular Circuit Dynamics, NIPS 座長：和氣弘明 生理学研究所 多細胞回路動態研究部門
9:15	Modulating astrocyte activity reverse allodynia in chronic pain Ikuko Takeda, Division of Multicellular Circuit Dynamics, NIPS 竹田育子 生理学研究所 多細胞回路動態研究部門
9:40	Break (5 minutes)
9:45	Rewiring of corticospinal circuits after CNS injuries Masaki Ueno, Department of System Pathology for Neurological Disorders, BRINU 上野将紀 新潟大学脳研究所 システム脳病態学分野
10:10	Break (5 minutes)
10:15	Inflammation spreads to other limbs through an ATP-mediated sensory-interneuron network Rie Hasebe, Division of Molecular Neuroimmunology, NIPS 長谷部理絵 生理学研究所 分子神経免疫研究部門
10:40	Break (10 minutes) Special lectures Chair: Osamu Onodera, BRINU, Atsushi Nambu, NIPS 座長：小野寺理 新潟大学脳研究所, 南部篤 生理学研究所 *本講演は日本語で行われます。These lectures will be given in Japanese.
10:50	Inflammatory Cytokines in Schizophrenia; Reviewing My 30 Years in Niigata BRI Hiroyuki Nawa, Division of Molecular Neurobiology, BRINU 那波宏之 新潟大学脳研究所 分子神経生物学分野
11:20	Break (5 minutes)
11:25	「私の履歴書：神経回路研究 40 年」 Masahiko Takada, Systems Neuroscience Section, PRI 高田昌彦 京都大学霊長類研究所 統合脳システム分野
11:55	Closing remarks Junichi Nabekura, Director-General, NIPS 鍋倉淳一 生理学研究所 所長

Poster List

- P1 Ddx20, a novel Olig2-binding factor, is indispensable for maintenance of neural and oligodendrocyte progenitor cells in the central nervous system.
Bizen Norihisa, Division of Neurobiology and Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University
備前 典久 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 脳機能形態学分野
- P2 Development of a retrofittable SLM-based holographic optogenetics system for live microscopy.
Dennis Lawrence Cheung, Division of Homeostatic Development, NIPS
Dennis Lawrence Cheun 生理学研究所 生体恒常性発達研究部門
- P3 Revealing dopamine dynamics in primate striatum by a fluorescent sensor.
Gaoge YAN, Systems Neuroscience Section, PRI, Kyoto University
Gaoge YAN 京都大学 霊長類研究所 統合脳システム
- P4 Single-cell brain transcriptome analysis in autism model marmosets.
Go Yasuhiro, Cognitive Genomics Research Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems, 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
- P5 The role of gamma-band neural synchronization in the integration of visual information between cerebral hemispheres.
Hagiwara Makoto, Division of Neural Dynamics, NIPS
萩原 淳 生理学研究所 神経ダイナミクス研究部門
- P6 Marmoset mature oocytes generated from unused ovaries by xenotransplantation.
Hirayama Luna, Department of Model Animal Development, BRI, Niigata University
平山瑠那 新潟大学脳研究所 モデル動物開発分野
- P7 Phosphoinositide regulates the movement of the 2nd S4 in Two-pore channel 3.
Hirazawa Ki-ichi, Division of Biophysics and Neurobiology, NIPS
平澤 輝一 生理学研究所 神経機能素子研究部門
- P8 Representation and sensing mechanisms of gut osmolality in the peripheral sensory ganglia.
Ichiki Takako, Division of Oral Biochemistry, Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University
市木 貴子 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 口腔生化学分野

- P9 Kainate-type glutamate receptor subunit GluK3 KO mice showed anxiolytic behavior and its involvement in expression of dopamine receptors.
Iida Izumi, Division of Oral Biochemistry, Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University
飯田 和泉 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 口腔生化学分野
- P10 Assessment of higher brain functions with neuronal activity.
Kato Daisuke, Division of Multicellular Circuit Dynamics, NIPS
加藤 大輔 生理学研究所 多細胞回路動態研究部門
- P11 Drosophila Model of Retinal Vasculopathy With Cerebral Leukoencephalopathy
Kato Rei, 1. Department of Neurology, 2. Sugie Laboratory, BRI, Niigata University
加藤 怜 新潟大学脳研究所 1.脳神経内科学分野, 2.杉江研究室(脳病態解析分野)
- P12 Comparison of ASSRs (auditory steady-state responses) among humans, rhesus monkeys, and common marmosets
Konoike Naho, Section of Cognitive Neuroscience, PRI, Kyoto University
鴻池 菜保 京都大学 霊長類研究所 高次脳機能
- P13 Use of an infrared-light staircase apparatus and AI-driven posture determination to automate behavioral analyses of parkinsonian model marmosets.
Louie Richard Ueno-Nigh, Systems Neuroscience Department, PRI, Kyoto University
Louie Richard Ueno-Nigh 京都大学 霊長類研究所 統合脳システム
- P14 Exercise-induced changes in the hypothalamic neural circuits controlling energy metabolism.
Misu Hirotake, Division of Endocrinology and Metabolism, NIPS
三須 宏武 生理学研究所 生殖内分泌系発達機構研究部門
- P15 Investigating structural covariance and heritability of the optic tract and primary visual cortex in neuroimaging dataset.
Miyata Toshikazu, Division of sensory and cognitive brain mapping, NIPS
宮田 季和 生理学研究所 感覚認知情報研究部門
- P16 Exploring RhoGEF involved in the long-term Cdc42 activation during LTP.
Nagasawa Yutaro, Multiphoton Neuroimaging, NIPS
長澤 裕太郎 生理学研究所 多光子顕微鏡室
- P17 Role of NPY-CRH neural axis in the PVH in carbohydrate selection in mice.
Nawarat_Rattana-jearakul, Division of Endocrinology and Metabolism, NIPS
Nawarat_Rattana-jearakul 生理学研究所 生殖内分泌系発達機構研究部門
- P18 CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by electroporation.
Oda Kanako, Department of Comparative & Experimental Medicine, BRI, Niigata University
小田 佳奈子 新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野
- P19 GlyCEST: Magnetic Resonance Imaging of Glycine—Normal Distribution in the Brain and Alterations in 5xFAD Mice.
Ohno Ken, Center for Integrated Human Brain Science, BRI, Niigata University
大野 健 新潟大学脳研究所 統合脳機能研究センター
- P20 Phosphoproteomics reveals the multiple JNK-dependent phosphorylation sites of GAP-43 in both rodents and human.
Okada Masayasu, Department of Neurosurgery, BRI, Niigata University
岡田正康 新潟大学脳研究所 脳神経外科学分野
- P21 Near-infrared Photoimmunotherapy for Malignant Brain Tumors Targeting Podoplanin.
On Jotaro, Department of Neurosurgery, BRI, Niigata University
温 城太郎 新潟大学脳研究所 脳神経外科学分野
- P22 A chronological study of phosphorylated tau expression after cerebral ischemia in rats.
Otsu Yutaka, Department of Neurology, BRI, Niigata University
大津 裕 新潟大学脳研究所 脳神経内科学分野
- P23 Somatotopic reorganization of sensorimotor cortex in Japanese macaques after accidental arm amputation
Pimpimon NONDHALEE, Division of System Neurophysiology, NIPS
ノントラー ピンピモン 生理学研究所 生体システム研究部門
- P24 Hemiplegic type ALS: Clinicopathological features of two autopsied patients.
Sainouchi Makoto, Department of Pathology, BRI, Niigata University
齊ノ内 信 新潟大学脳研究所 病理学分野
- P25 Thermal Gradient Ring Reveals Thermosensory Changes in Diabetic Peripheral Neuropathy in Mice.
Sasajima Sachiko, Diabetes, Department of Internal Medicine, Aichi Medical University School of Medicine
笹島 沙知子 愛知医科大学病院 糖尿病内科
- P26 A microsensing system for in vivo real-time monitoring of drug kinetics in brain.
Sawamura Seishiro, Division of Global Pharmacology, Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Osaka University
澤村 晴志朗 大阪大学医学系研究科 薬理学講座統合薬理学

- P27 The Role of Reactive Sulfur Species in Myocardial Ischemic Stress Resistance.
Shimoda Kakeru, 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
- P28 Inter-individual motion entrainment in non-human primates is associated with social context.
Tomatsu Saeka, Division of Behavioral Development, NIPS
戸松 彩花 生理学研究所 認知行動発達機構研究部門
- P29 Image analysis based super-resolution two-photon microscopy for in vivo imaging.
Tsutsumi Motosuke, Division of Biophotonics, NIPS
堤 元佐 生理学研究所 バイオフォニクス研究部門
- P30 Three-dimensional imaging of brain macrophages.
Uchida Hitoshi, Department of Pathology, Department of System Pathology for Neurological Disorders (Tainaka Lab), BRI, Niigata University
内田 仁司 新潟大学脳研究所 病理学分野, システム脳病態学分野 (田井中研究室)
- P31 Focused structural analysis of Medusavirus shows structural changes during viral particle formation.
Watanabe Ryoto, Division of Structural Biology, NIPS
渡邊 凌人 生理学研究所 生体分子構造研究部門
- P32 Live brain imaging through cleared skull.
Xinyi Liu, Department of Cellular Neuropathology, BRI, Niigata University
リュウシンイ 新潟大学脳研究所 細胞病態学
- P33 Emotional behavior in the absence of kinase activity of calmodulin kinase II alpha
Yamagata Yoko, Section of Multilayer Physiology, NIPS
山肩 葉子 生理学研究所 多階層生理機能解析室
- P34 Accelerated DNA Methylation Age of the TARDBP 3'UTR in the Motor Cortex is Associated with Age of Sporadic ALS Onset.
Yamagishi Takuma, Department of Neurology, BRI, Niigata University
山岸 拓磨 新潟大学脳研究所 脳神経内科学分野
- P35 Development of the connectivity between fast-spiking interneurons and pyramidal neurons in mouse visual cortex.
Yamamoto Mariko, Division of Visual Information Processing, NIPS
山本 真理子 生理学研究所 視覚情報処理研究部門
- P36 A transcriptional factor involved in neurogenesis and degeneration.
Yamanaka Tomoyuki, Department of Neuroscience of Disease, BRI, Niigata University
山中 智行 新潟大学脳研究所 脳病態解析分野

- P37 MMP9 reduces SNP-induced variant plasminogen levels in intestine but not in the blood to develop inflammatory colorectal polyps.
Yamazaki Takeshi, Division of Molecular Neuroimmunology, NIPS
山崎 剛士 生理学研究所 分子神経免疫研究部門
- P38 Role of sensory-motor circuit in the movement disorders observed in dystonia musculorum mice.
Yoshioka Nozomu, Division of Neurobiology and Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University
吉岡 望 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 脳機能形態学分野
- P39 Cell type-selective gene transduction into striatal parvalbumin-positive neurons in nonhuman primates.
ZHENG Andi, Systems Neuroscience Section, PRI, Kyoto University
チェン アンディ 京都大学 霊長類研究所 統合脳システム
- P40 CSF1R tyrosine kinase function impacts CSF1R-related leukoencephalopathy phenotypes.
Zhu Bin, Department of Molecular Genetics, BRI, Niigata University
シュ ヒン 新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学

(問い合わせ先)

新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

動物資源開発研究分野 笹岡 俊邦

Inquiry: Prof: Toshikuni Sasaoka, BRINU

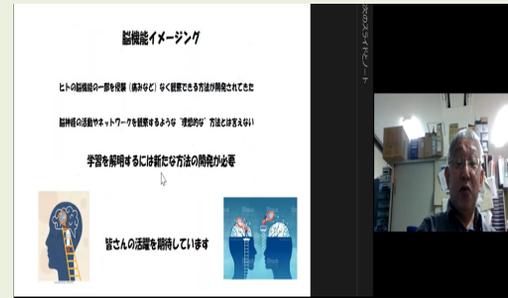
Email: sasaoka @ bri.niigata-u.ac.jp

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。

新潟や近隣県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。

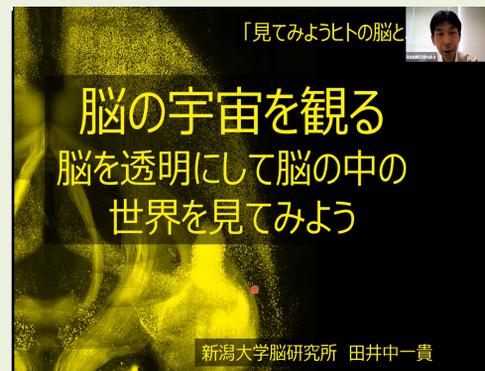


スーパーサイエンスハイスクール(SSH) 事業

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3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
補体関連因子が孤発性神経変性疾患の病態に及ぼす影響に関して	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
BRAF V600E変異膠芽腫に対する分子標的治療後獲得耐性の克服に向けたトランスレーショナル研究	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
ATN分類における γ -secretase活性変化の解析	同志社大学	助教	角田 伸人	遺伝子機能解析学分野	春日 健作
中枢神経系原発悪性リンパ腫におけるcaveolin-1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
体内時計を制御するオーファン受容体のリン酸化変動を介した睡眠制御機構の解明	京都大学大学院	教授	土居 雅夫	モデル動物開発分野	阿部 学
日本人由来ヒトアルツハイマーアミロイドのNMR研究	東京工業大学	教授	石井 佳誉	病理学分野	柿田 明美
CESTによる脳機能評価系の確立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	グループリーダー	青木 伊知男	生体磁気共鳴学分野	五十嵐 博中
マルチスケールイメージングによる大脳基底核の機能解明	大阪大学	教授	小山内 実	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
アルツハイマー病感受性遺伝子バリエーションが中枢神経病理に及ぼす影響の検討	医療法人さわらび会 福祉村病院	副所長	金田 大太	遺伝子機能解析学分野	宮下 哲典
CRF受容体1および2遺伝子改変マウスによるCRFニューロン回路の同定と機能解析	東北大学	客員研究員	井樋 慶一	モデル動物開発分野	阿部 学
高いアミロイド β 凝集阻害能をもつ分子のクルクミン誘導体の開発	東京工業大学	教授	中村 浩之	脳病態解析分野	杉江 淳
筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病理:タウPETを用いた検討	量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所	技術員	互 健二	病理学分野	清水 宏
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	講師	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
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	東北大学災害科学国際研究所	准教授	國井 泰人	病理学分野	柿田 明美

令和3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
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
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	講師	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	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科	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	研究員	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
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
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
新しいフェロトーシ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	主幹研究員	高堂 裕平	脳神経内科学分野	金澤 雅人
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

令和3年度 新潟大学脳研究所共同利用・共同研究採択者一覧

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
疾患モデル動物の作製、保存、繁殖に有用なゲノム編集および生殖工学技術の開発	熊本大学	講師	竹尾 透	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
筋強直性ジストロフィーにおける多臓器障害の原因解明	大阪大学	特任准教授 (常勤)	中森 雅之	病理学分野	清水 宏
アルツハイマー病における三叉神経中脳路核—青斑核周囲病変の解析	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科	教授	後藤 哲哉	病理学分野	柿田 明美
DNA障害型抗がん剤の感受性増強因子SLFN11の脳腫瘍における発現解析と臨床的有用性の検討	慶應義塾大学	特任准教授	村井 純子	脳神経外科学分野	梶田 学
運動ニューロン変性に関与する翻訳後修飾の同定	北里大学	教授	佐藤 俊哉	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
超短命アフリカメダカを用いた各種抗酸化食品成分のアンチエイジング効果の研究	筑波大学	講師	小林 麻己人	脳病態解析分野	松井 秀彰
遺伝性筋疾患におけるHECT型E3ユビキチンリガーゼの機能の解明	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
ヒト特異的な脳細胞は果たしてあるのか？単一細胞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2	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
発達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	立命館大学	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	教授	矢尾 育子	動物資源開発研究分野	笹岡 俊邦
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
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
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
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

※所属・職名は、申請時のものです。

令和3（2021）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
Development, optimization and validation of human AQP-4 PET Radioligand AQP-4 PET トレーサーの開発と最適化	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 脳水動態病理学の創生	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
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 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
Production of transgenic mouse lines for labeling retinal cell types and analyses of their roles in visual function 網膜細胞タイプ標識のための遺伝子改変マウス系統の作出と視覚機能解析	デンマ	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
Characterization of novelty circuits responsible for memory boosts 日常の記憶の増強を担う新奇な体験情報を伝達する神経回路の同定	デンマ	Department of Biomedicine, Aarhus University (オーフス大学)	Associate Prof.	Tomonori Takeuchi 竹内 倫徳	システム脳病態学分野	田井中 一貴

補体関連因子が孤発性神経変性疾患の病態に及ぼす影響に関して

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⁾, 金田 大太³⁾, 橋詰 良夫³⁾

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、3) 福祉村病院神経病理研究所

研究要旨

認知症を発症する各種の神経変性疾患の一部について、脳内外における補体因子の関与が注目されている。特にアルツハイマー型認知症 (AD) においては脳内補体活性の報告が多数ある。そこで、我々は補体関連因子の遺伝子多型に着目し、神経変性疾患全般でその解析を進め、病態への関与を検討することにした。本年度はADの感受性遺伝子として2009年に報告された *CRI* (complement C3b/C4b receptor 1 (Knops blood group)) のゲノムバリエーションに着目し、若年性ADと家族性ADを対象に解析を行った。

A. 研究目的

補体関連因子の遺伝子多型解析を中心に神経変性疾患全般でその解析を進め病態への関与を検討する。本年度はADの感受性遺伝子の一つである補体関連遺伝子 *CRI* に着目し、バリエーション解析を展開した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

対象: 愛知県豊橋市にある福祉村病院・神経病理研究所 (所長: 橋詰良夫) が管理する福祉村ブレインバンクの剖検脳を用いた。若年性AD30例 (男6例、女24例; 平均発症年齢62.7歳 [標準偏差5.8])、家族性AD27例 (男8例、女19例; 平均発症年齢71.1歳 [標準偏差9.4]) を解析対象とした。

方法: 遺伝子機能解析分野に剖検脳 (凍結生) を提供し、ゲノムDNAの抽出を行った。ADの強力な感受性遺伝子である *APOE* については、その遺伝型 ($e2*2$, $e2*3$, $e2*4$, $e3*3$, $e3*4$, $e4*4$) を全症例に対して決定した。全エクソームシーケンシング (WES) により、エクソン上のバリエーションをゲノム網羅的に同定した。*CRI* のエクソンに位置するバリエーションを列挙し、リスト化した。アミノ酸置換を伴うレアバリエーションは疾患感受性を著し

く高める効果があるので、特に着目した。

C. 結果・考察

CRI にアミノ酸置換を伴うレアバリエーションを3つ同定した。具体的には p.T132P (dbSNP ID, rs55906048)、p.P1314L (dbSNP ID, なし)、p.V2218A (dbSNP ID, rs191751915) である。p.T132Pバリエーション保因者は1名 (ヘテロ: 孤発性若年性AD)、p.P1314Lバリエーション保因者は1名 (ヘテロ: 家族性若年性AD)、p.V2218Aバリエーション保因者は3名 (全員ヘテロ: 1名の孤発性若年性ADと2名の家族性AD) であった。

D. 結論

ADの感受性遺伝子 *CRI* にアミノ酸置換を伴う頻度の低いバリエーションを3つ同定した。今後、解析検体を増やすことで、これらのバリエーションがAD発症にどのように寄与するのかを、遺伝学的に明らかにする。

E. 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

F. 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

BRAF V600E 変異膠芽腫に対する分子標的治療後獲得耐性の克服に向けたトランスレーショナル研究

研究代表者 立石 健祐¹⁾
研究分担者 藤井 幸彦²⁾ 棗田 学²⁾ 山本 哲哉¹⁾

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

研究要旨

BRAF^{V600E} 変異を有する膠芽腫など、高悪性度神経膠腫に対する分子標的治療の耐性機序を分子生物学的・遺伝学的に検討した。またドラッグスクリーニングなどの手法を通じて BRAF 阻害剤や MEK 阻害剤との相乗効果により分子標的薬の不応・耐性を克服する治療法を開発することを目指した。その結果、今回のトランスレーショナル研究を通じて、MAPK 経路を標的とした分子標的治療に対し薬剤抵抗性を引き起こす分子生物学的機序が見いだされた。また研究を通じて薬剤治療抵抗性を克服する標的分子 HSP90 を見出した。

A. 研究目的

本研究では BRAF^{V600E} 変異神経膠腫に対する薬剤治療後の耐性、抵抗性の機序の解明を図るとともに、抵抗性機序を克服する分子機序を明らかにし、さらには分子機序に基づく治療法の開発を目指した。臨床像を再現する質の高いモデルを活用することはこの研究を行う上で重要であるため、分子標的治療前後に採取した腫瘍検体から初代培養細胞、さらにはヒト由来脳腫瘍マウスモデル (patient-derived xenograft, PDX) を作成し、これらのモデルを活用して研究を進めた。

B. 研究方法

横浜市立大学倫理委員会(B220100017)承認のもと、分子標的前後に採取した2種類の腫瘍細胞 YMG62, YMG89 (P; 治療前, R; 治療後)と分子標的治療後に採取した新潟大学脳研究所にて樹立したNGT41R腫瘍細胞に対して細胞培養を行ったところ、安定細胞株が樹立された。また腫瘍細胞を免疫不全マウス (SCID Beige) マウスの脳内に移植したところ、ヒト由来 BRAF 変異神経膠腫細胞株 (PDX) モデルの樹立に成功した。そこでこれらの細胞株を用いて以下の検討を行った。

1. 全エキソーム解析を通じた耐性化に関わる遺伝子

異常の網羅的解析

2. High throughput drug screening による薬剤感受性試験を通じて生体分子経路を調節する標的分子の探索
3. BRAF^{V600E} 変異細胞株および PDX を用いた治療効果の検証

C. 研究結果

最初に ①患者腫瘍同様に、PDX マウスモデルで髄膜播種を主体とした腫瘍形成を呈する表現型の再現、②PDX モデルでも BRAF V600E、TERT 変異、CDKN2A 欠失といった遺伝子異常を有する遺伝型の再現、③*in vitro* での分子標的治療反応性/抵抗性の再現などを確認した。また、耐性株では分子標的薬投与下で MAP kinase 経路の再活性化や PI3 kinase 経路の活性化を Western blotting 法を通じて明らかにした。特に PI3K 経路の AKT と MAPK 経路下流の p90RSK が薬剤濃度、投与時間依存的に活性化することから、薬剤耐性化との関連が強く示唆された。このことから、BRAF^{V600E} 変異神経膠腫細胞における分子標的治療の耐性機序は RTK 経路、MAPK 経路や AKT-mTOR 経路のフィードバック機構による

活性化が主たる要因であることが判明した。

次に分子標的薬に耐性を示す YMG89R 細胞に対して BRAF 阻害剤との併用効果について 1,280 種類の化合物を用いて網羅的に検証したところ、65 種類の薬剤で BRAF 阻害剤との併用効果が認められた。中でも複数の HSP90 阻害剤が BRAF 阻害剤との併用効果を示したことから、HSP90 阻害剤は分子標的薬との併用効果を示す可能性を有すると考えられた。そこで複数の *BRAF^{V600E}* 変異神経膠腫細胞株において BRAF 阻害剤あるいは MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤 (BIIB021) との併用効果を検証したところ HSP90 阻害剤、BRAF 阻害剤、MEK 阻害剤単独での抗腫瘍効果は乏しく、一方で併用により強い相乗効果が生まれることが判明した。更に動物モデルで検証するため、複数の *BRAF^{V600E}* 変異神経膠腫細胞株をマウス皮下に移植し、PDX モデルを作成し治療したところ MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤の併用療法により腫瘍は退縮後に消失し、この所見は長期間に及びました。またマウス脳腫瘍モデルを用いて治療効果を検討したところ、皮下腫瘍モデル同様に MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤による併用療法により有意な生存期間の延長効果が確認された。

D. 考察

BRAF^{V600E} 変異高悪性度神経膠腫に対し、BRAF 阻害剤、MEK 阻害剤は治療上その効果が期待される分子標的薬である一方、分子標的薬に対する治療反応を示さない例 (不応) や治療後に耐性化を引き起こす例が多く報告されている。このことから薬剤耐性の機序や耐性化を克服する治療法の開発が望まれている。今回の研究では、分子標的治療前後の検体を活用するとともに、臨床像を広く模倣する細胞株、動物モデルを樹立したことで、病態の解明や治療標的分子を同定するなどといった詳細な検討が可能となった。その結果 *BRAF^{V600E}* 変異高悪性度神経膠腫に対する分子標的治療後の主たる耐性化機序は、フィードバック機構による MAPK 経路や AKT-mTOR 経路の過剰な活性化であることが判明した。さらに、HSP90 は MAPK 経路を標的とした分子標的治療後の耐性化を克服する重要な標的分子であることが判明した。このことから分子標的治療による効果

が乏しい症例や耐性化を期待した症例では、HSP90 阻害剤を併用することで腫瘍抑制効果が得られることが期待できると考えられる。近年では血液脳関門を通過し中枢神経に移行しうる HSP90 阻害剤が開発されていることから臨床応用に向けた研究が進められています。しかしながら実際の臨床への応用には課題は残ることからも、次年度以降も多角的に研究を進める必要があると考えている。

E. 結論

臨床情報と腫瘍検体から樹立したヒト由来脳腫瘍マウスモデル (PDX モデル) を活用したトランスレーショナル研究を通じて、*BRAF^{V600E}* 変異高悪性度神経膠腫の分子標的治療法に対する薬剤抵抗性機序を解明するとともに、耐性化を克服する標的分子と治療候補薬剤を見出した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表 Sasame J, Ikegaya N, Kawazu M, **Natsumeda M**, Hayashi T, Isoda M, Satomi K, Tomiyama A, Oshima A, Honma H, Miyake Y, Takabayashi K, Nakamura T, Ueno T, Matsushita Y, Iwashita H, Kanemaru Y, Murata H, Ryo A, Terashima K, Yamanaka S, **Fujii Y**, Mano H, Komori T, Ichimura K, Cahill DP, Wakimoto H, **Yamamoto T** and **Tateishi K**. HSP90 inhibition overcomes resistance to molecular targeted therapy in *BRAF^{V600E}* mutant high-grade glioma. *Clin Cancer Res (in press)*
2. 学会発表
 1. 立石健祐: PCNSL における NF- κ B 経路の重要性-マウスモデルを用いた検討-. 第 2 回 PCNSL Scientific Exchange Meeting (パネリスト). Online 形式. 2022.1.
 2. 立石健祐, 三宅勇平, 中村大志, 笹目丈, 大島聡人, 本間博邦, 池谷直樹, 末永潤, 村田英俊, 山本哲哉: 悪性脳腫瘍に対する橋渡し研究のためのプラットフォーム構築. 第 39 回日本脳腫瘍学会学術総会, 2021,12, 神戸.
 3. 立石健祐, 笹目丈, 山本哲哉: *BRAF^{V600E}* 変異高悪性度グリオーマに対する分子

標的治療後獲得耐性の克服に向けたトランスレーショナル研究. 2021年度新潟大学脳研究所 共同研究成果報告.

2021,11, 新潟.

4. 立石健祐, 三宅勇平, 中村大志, 笹目丈, 大島聡人, 本間博邦, 池谷直樹, 末永潤, 村田英俊, 山本哲哉: 悪性脳腫瘍に対する橋渡し研究のためのプラットフォーム構築. 第80回日本脳神経外科学会学術総会(シンポジウム), 2021,11, 横浜.
5. 立石健祐: 中枢神経原発悪性リンパ腫の病態と遺伝子異常. 第59回日本癌治療学会学術集会(臓器別シンポジウム), 2021,10, 横浜.
6. 立石健祐, 三宅勇平, 中村大志, 笹目丈, 林貴啓, 大島聡人, 本間博邦, 池谷直樹, 末永潤, 村田英俊, 山本哲哉: 悪性脳腫瘍に対する橋渡し研究のためのプラットフォーム構築. 第80回日本脳神経外科学会学術総会(シンポジウム), 2021,10, 横浜.
7. 立石健祐, 三宅勇平, 本間博邦, 河津正人, 佐々木重嘉, 吉井幸恵, 脇本浩明, 永根基雄, 市村幸一, 山本哲哉: トランスレーショナルアプローチにて見えた中枢神経原発悪性リンパ腫の進展機序と治療標的. 第21回分子脳神経外科学会学術総会, 2021,9, 京都.
8. 立石健祐: PCNSL症例に対するベレキシブル錠の使用経験. PCNSL web conference in Kanagawa(講演), 2021,6, 横浜.
9. 立石健祐: BRAF変異脳腫瘍の臨床像と分子標的治療の展望. 第62回日本神経病理学会学術総会(ワークショップ), 2021,5, 東京.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

プレスリリース

https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2021/20220330tateishi_ccr.html

※ 本研究を遂行する上で脳研究所が独自に樹立した BRAFV600E 変異膠芽腫細胞株 NGT41R を活用し、多角的に検証を行った。また脳研究所脳神経外科学が得た臨床情報を論文作成の資料として活用した。

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

ATN 分類における γ -secretase 活性変化の解析

研究代表者 角田 伸人¹⁾
研究分担者 春日 健作²⁾

1) 同志社大学生命医科学部 医生命システム学科 2) 新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学

研究要旨

臨床でアルツハイマー病 (AD) と診断された症例においても、AD 病理を伴わない症例が存在する。そのため脳病態分類は、AD および軽度認知障害 (MCI) の分類ではなく、脳脊髄液 (CSF) の生化学的バイオマーカーおよび脳画像バイオマーカーのアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) 沈着 (A マーカー)、病的 tau 蓄積 (T マーカー)、神経変性 (N マーカー) による『ATN 分類』が提唱されている。AD 病理の時系列では A マーカーが最初に変化するため、極めて重要な指標となる。これまでに我々は、AD 脳内における γ -secretase 活性変化を示してきた。この活性変化は、産生される $A\beta$ 分子の比率に変化を生じ、A マーカーが陰性でも血漿 $A\beta$ に変化が表れている可能性がある。そこで本研究は、A マーカー陰性・陽性の検体に着目し、これらの血漿 $A\beta$ を測定することにより、A マーカーと γ -secretase 活性変化について解析した。その結果、これまで CSF で見てきた複数の $A\beta$ が増減する挙動と、血漿での挙動に相違があることが明らかとなった。

A. 研究目的

ATN 分類における A マーカーは $A\beta$ であり、これは酵素である γ -secretase により産生される。臨床所見では AD と診断されても、A (-) である患者が存在する。つまりこの患者脳内では、まだ $A\beta$ の蓄積は認められないのであるが、 γ -secretase は MCI/AD 脳と同様な活性変化を起こしているのではないだろうか？本研究では、新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野の春日健作先生とこの問題について取り組み、A マーカーと γ -secretase 活性変化の関係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)

CSF の生化学検査や画像診断から A (-) と A (+) に分類された患者の血漿検体を春日健作先生より供与いただいた。ヒト血漿検体を使用するため、同志社大学の「人を対象とする研究」に関する倫理審査にて承認を受けた。また、すでに採取済みの検体を使用するため、オプトアウトを新

潟大学医歯学総合病院に掲示した。市販の ELISA および角田が作製した ELISA 測定系を使用し、測定を行った。角田が作成した ELISA 測定系に用いた抗体は、試薬として市販されているものではなく、角田がこれまでの研究において作製した $A\beta$ 特異的抗体である。そのため、ELISA 測定系は唯一のものである。

C. 研究結果

新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学分野の春日健作先生より供与いただいた血漿 250mL を使用し、複数種の $A\beta$ について ELISA 測定を行った。ある種類の $A\beta$ については、低濃度のため測定値が非常に低値であり、測定限界を下回ってしまった。一方、今回測定した検体中でもある種の $A\beta$ は、他の検体と比較して高値を示す検体が見られた。これを ATN 分類でみると、興味深いことに高値の群は A(+)¹⁾の検体であることがわかった。この A マーカーを評価している $A\beta$ と、高値を示す $A\beta$ は、分子種が異なった。

D. 考察

今回測定した検体は、ATN 分類の中でも A(-) と A(+)のみに注目し、血漿 A β を ELISA で測定した。これまで角田が CSF で見てきた A β が血漿中の濃度の挙動に反映されているかという、ある種の A β は反映していると考えられた。一方で、これと同様に変化すると予想した A β については、A マーカーの結果を反映していない。この結果より、血漿 A β は、T マーカーおよび N マーカーが陰性の脳病態で γ -secretase 活性変化を反映している可能性が考えられる。しかし、CSF 中に存在する A β がそのままの比率で血漿へ排出されているのではないだろうと考えられる。排出機序は未解明であり今後検討する必要がある。このように、血漿と CSF の A β には乖離があるため、本解析には注意が必要であることがわかった。

E. 結論

ある種の A β は、これまで角田が見てきた CSF の A β 変動と同様に濃度変化を示していたが、他の A β では変動が CSF と異なった。つまり CSF で見られたものがそのまま血漿へ反映される A β と、反映されない A β がある。これはある種の A β を限定的に見ると γ -secretase 活性変化を反映している可能性を示唆するが、CSF で観察してきた A β の比率が、そのまま血漿へ反映されないので、CSF での比率をそのまま血漿に適応するにはかなり慎重にならなければいけない。ただしこれは、AD 患者以外も含んでいるため、これだけで AD バイオマーカーの可否を解釈することは困難である。そのため、本研究で使用した検体に加え、ATN 分類の T および N にも着目し、今後これらの検体ではどのような変化が見られるのか解析する必要があると考えられる。この課題については、引き続き次年度に行う予定である。さらに健常人群も加えて比較する必要がある。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Switched A β 43 generation in familial Alzheimer's disease with presenilin1 mutation. 11. 558. 2021. *Translational Psychiatry*.

2. 学会発表

1. 第 40 回日本認知症学会・2021 年 11 月・東京国際フォーラム

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

中枢神経系原発悪性リンパ腫における caveolin-1 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 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

caveolin-1(cav-1)は caveolae と呼ばれる細胞膜の小胞様構造の構成蛋白の一つである。cav-1 は中枢神経系細胞を含む様々な細胞の細胞膜から細胞内への物質輸送を担っている。本研究では中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)の腫瘍増殖における cav-1 の役割を明らかにするためにPCNSLにおける cav-1 発現と臨床病理像の関係について検討した。

【対象および方法】PCNSL 42 例を対象にした。免疫染色で腫瘍細胞、増殖血管内皮細胞での cav-1 の発現について検討した。免疫染色の評価は標識率により 3 段階で行って低標識(L)群(0<L<30%)、中間標識(I)群(30%<I<60%)、高標識(H)群(60%<H)の 3 群に分類した。

【結果】組織型の内訳はびまん性大細胞型 40 例、濾胞辺縁型 2 例であった。cav-1 は 42 例中 40 例で陽性(L:18 例, I: 21 例, H:11 例)であった。腫瘍細胞の標識率と増殖血管の陽性率及び標識率と染色強度も相関傾向がみられた。L, I 群と H 群に属する患者を比較すると L, I 群は H 群よりもの生存率が高かった(Log-rank test, P<0.01)。

【考察および結論】cav-1 H 群に属する患者の予後は cav-1 L, I 群の患者に比較して予後不良であり、cav-1 は PCNSL の増殖、腫瘍血管新生などに関与している可能性がある。

A. 研究目的

caveolin-1(cav-1)は caveolae と呼ばれる細胞膜の小胞様構造の構成蛋白の一つである。cav-1 は中枢神経系細胞を含む様々な細胞の細胞膜から細胞内への物質輸送を担っている。¹⁾ cav-1 は様々な腫瘍の増殖に関与することが知られている。¹⁻³⁾ 中枢神経系腫瘍では Senetta らは glioma の増殖に cav-1 が関与することを報告している。²⁾ 本研究では中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)の腫瘍増殖における cav-1 の役割を明らかにするために PCNSL における cav-1 発現と臨床

病理像の関係について検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

PCNSL 42 例を対象にした。免疫染色で腫瘍細胞、増殖血管内皮細胞での cav-1 の発現について検討した。免疫染色の評価は標識率により 3 段階で行って低標識(L)群(0<L<30%)、中間標識(I)群(30%<I<60%)、高標識(H)群(60%<H)の 3 群に分類した。本研究は久留米大学の倫理委員会での審査で承認されている。

C. 研究結果

組織型の内訳はびまん性大細胞型 29 例、濾胞辺縁型 2 例であった。cav-1 は 42 例中 40 例で陽性(L:15 例, I: 14 例, H:11 例)であった。腫瘍細胞の標識率と増殖血管の陽性率及び標識率と染色強度も相関傾向がみられた。対象症例の臨床病理学的因子は表 1 に示す。L, I 群と H 群に属する患者を比較すると L, I 群は H 群よりもの生存率が高かった (Log-rank test, $P < 0.01$ Kaplan-Meier 生存曲線は図 1 に示す。点線は L, I 群、実線は H 群)。

D. 考察

cav-1 は caveolae と呼ばれる細胞膜の小胞様構造の構成蛋白の一つであり、血管については血管内腔側から間質への物質輸送に関与する。また cav-1 は VEGF 受容体 2 のシグナル伝達に関与することが報告されている。cav-1 と腫瘍新生血管、腫瘍の増殖については様々な議論がある。すなわち、cav-1 の発現は腫瘍血管の成熟化/正常化を促進して腫瘍形成を抑制するとの報告がある一方で、腫瘍血管の成熟化/正常化は血管数の増加をきたして腫瘍を増殖する報告もみられる。^{1,2)} この違いは腫瘍の性格あるいは実験系の違いが考えられる。一方、Chen et al. はヒトグリオーマ例において cav-1 は単に腫瘍血管の増加を来すだけではなく、vasculogenic mimicry (血管擬態形成)を促して腫瘍増殖を促進することを明らかにしている。³⁾ 本研究では cav-1 過剰発現群の患者の予後は不良であり、cav-1 は PCNSL 患者の予後推定に有用であることが示唆された。

E. 結論

本研究の結果から cav-1 は PCNSL の増殖、腫瘍血管新生などに関与している可能性がある。

文献

1. 高倉信幸. がんと血管新生. 血栓止血誌 21:283-290, 2010
2. Senetta R et al. Caveolin-1 expression independently predicts shorter survival in oligodendrogliomas. J Neuropathol Exp Neurol 68:425-431 2009
3. Chen et al. Caveolin-1 promotes tumor cell

proliferation and vasculogenic mimicry formation in human glioma. Braz J Med Biol Res. 54:e10653, 2021

F. 研究発表

1. 論文発表

論文を準備中である。

2. 学会発表

第 68 回日本神経病理学会学術総会・令和 4 年 6 月 24 日・京都

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特記すべきことなし。

2. 実用新案登録

特記すべきことなし。

3. その他

特記すべきことなし。

F. 本研究における新潟脳研究所の役割

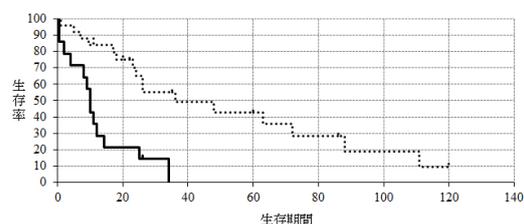
PCNSL は稀少癌であり、一施設のみでは系統的な解析が困難である。新潟脳研究所病理学分野からの症例の提供により、本研究が可能となった。また柿田 明美教授の適切な助言により、的確な臨床病理学的な解析を行い得た。

表 1 PCNSL 罹患患者における臨床病理学的因子

factors	Total number	DLBCL	MALTL
Gender			
Male	29	27	2
Female	13	13	0
Age			
<65	21	19	2
>65	21	21	0
Cav-1 expression			
LLI	28	26	2
HLI	14	14	0

DLBCL: diffuse large B cell lymphoma, MALTL: mucosa associated tissue type, lymphoma, LLI: low labelling index, HLI: high labelling index, Cav:Caveolin-1

図 1 生存曲線



体内時計を制御するオーファン受容体のリン酸化変動を介した睡眠制御機構の解明

研究代表者 土居 雅夫¹⁾
研究分担者 阿部 学²⁾,

- 1) 京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻システムバイオロジー分野
- 2) 新潟大学脳研究所モデル動物開発分野

研究要旨

G 蛋白質共役受容体は、薬理学上最も重要でかつ効率の良いターゲット分子群である。しかし、未だに100種類以上のオーファン受容体が存在し、その機能が明らかにされていない。オーファン受容体 Gpr176 は、体内時計の最高位中枢である視交叉上核 (SCN) に発現し、生体リズム調整能を有することから、生体リズム異常を伴う不眠症や生活習慣病に対する新しい治療薬の標的となることが期待される (Nat Commun 2016; Wang et al., Sci Rep 2020; Yamaguchi et al., Sci Rep 2021)。本研究では、申請者が見出した Gpr176 のリン酸化修飾部位 (unpublished) に対する点変異マウスの作製を行うことをまず研究の出発点とし、その後の作出されたマウスを用いた詳細な解析から、オーファン受容体のリン酸化変動を介した睡眠制御機構の解明を目指した。今年度は目的の点変異マウスの樹立にまでは至らなかったが、作出のためのストラテジーが確立し、予備実験から目的のマウスの作製の目途がついた。

A. 研究目的

申請者は、in vitro の培養細胞を用いた実験において、Gpr176 の基礎活性レベルがC末端領域にある3か所のリン酸化を介して高度に制御されることを見出した。しかしながら、生体レベルでの役割が明らかにできていない。本研究では、これらの3か所のリン酸化部位に対する変異マウスとして、リン酸化不能トリプルAマウスおよびリン酸化模倣トリプルDマウスの作製を行う。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所の共同研究者 (崎村フェロー、阿部准教授) らのグループのもつ技術を用いて、当該トリプル点変異マウスの作製を行う。本マウスを用いて、当該リン酸化修飾を介した体内時計および睡眠リズムの調節機構を生体レベルで解明する。なお、遺伝子組み換えを伴うすべての研究およびウイルス・培養細胞を用いる実験は、所

属機関である新潟大学および京都大学において組換えDNA実験計画書を提出し、承認を得て行った。また樹立後の動物実験に際しても、所属機関である新潟大学および京都大学で策定された動物実験倫理規定に従ってプロトコルを作成し、倫理委員会による承認を得て行う。

C. 研究結果

今年度は目的の点変異マウスの樹立にまでは至らなかった。しかし、作製のためのストラテジーが確立し、予備実験から目的マウス作出成功への目途がついた。現在、順調に、2重変異ノックインの候補個体が得られ、確認解析中である。得られ次第、フェノタイプ解析に進む予定である。

D. 考察

これまでに、申請者は今回の標的遺伝子であるオーファン受容体 Gpr176 について、これが体内時

計の最高位中枢である視交叉上核 (SCN) に発現し、生体リズム調整能を有すること (Doi et al., Nature Commun 2016)、さらに、当該受容体の機能を制御する翻訳後化学修飾として、N 末端領域の N 型糖鎖修飾 (Wang et al., Sci Rep 2020; Nakagawa et al, Int J Mol Sci. 2020) および C 末端領域のリン酸化修飾 (unpublished) を同定することに成功している。申請者は体内時計の異常が高血圧や肝代謝疾患、眼加齢疾患の発症原因になることを見出しており (Doi et al., Nat Med 2010; Chao et al., Nat Commun 2017; Sasaki et al., Nat Aging 2022)、Gpr176 はこれら生体リズム関連疾患の治療薬における候補標的分子になる可能性がある。

E. 結論

非常に複雑な点変異の導入が不可欠な研究課題であるため、高度で熟練の技術によるご支援が必要であることが判明した。初年度に実施した研究により、目的の点変異動物の作出へ近づきつつあるため、本研究の継続によって課題の解決と今後のフェノタイプ解析を進めることができると考えている。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Yamaguchi Y, Murai I, Goto K, Doi S, Zhou H, Setsu G, Shimatani H, Okamura H, Miyake T, and Doi M: Gpr19 is a circadian clock-controlled orphan GPCR with a role in modulating free-running period and light resetting capacity of the circadian clock. Sci Rep. 2021;11(1):22406

2. 学会発表

1. Masao Doi, Circadian clock: disease etiology and drug target exploration. The 5th Asian Forum on Chronobiology, Kaifeng, China (virtual & onsite), July 18, 2021 [Speaker]
2. Masao Doi, Time as medicine and disease etiology. The CFBT Summer Showcase, Manchester, UK (virtual & onsite), June 29, 2021 [Speaker]

3. 土居雅夫, 生体リズムを基盤とした時間医薬科学の展開. 日本薬学会東海支部主催特別講演会、名古屋、2021 年 12 月 10 日 (招待講演)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

日本人由来ヒトアルツハイマーアミロイドの NMR 研究

研究代表者 石井 佳誉¹⁾
研究分担者 柿田 明美²⁾, 星 美奈子³⁾, 山崎 俊夫⁴⁾

1) 東京工業大学 生命理工学院 2) 新潟大学 脳研究所 病理学分野
3) 神戸医療産業都市推進機構 4) 理化学研究所 生命機能科学研究センター

研究要旨

アルツハイマー病は主要な認知症で、65 歳以上人口の約 6%が罹患しており患者数が多い。発症の有力な仮説として、APP タンパク質から A β ペプチドが切り出され、線維状沈殿（アミロイドという）として蓄積するところから始まると考えられている。近年、固体 NMR 測定を中心とした解析でアミロイドの立体構造が明らかになり、いくつかの立体構造が発表されている。驚いたことに、患者から採ったアミロイドを核として線維を成長させると、患者ごとに異なった構造が得られることが近年の研究で分かった。アミロイドの立体構造と病気の性質との相関があるか注目される。

A β ペプチドには主に、アミノ酸 40 残基からなる A β 40 と 42 残基からなる A β 42 がある。A β 40 のほうが実験的に扱いやすいため、先行して構造研究が進んでいる。日本人患者の脳組織から抽出した、A β 42 を含む A β ペプチドのアミロイド構造の種類を把握することを、本研究の目的とする。

A. 研究目的

(1) A β 42 を含んだ A β ペプチドのアミロイド構造の種類を把握することを最終目的として、本研究では固体 NMR による構造研究のフィージビリティスタディー（実行可能性の検証）を行う。

(2) 本研究によりアミロイドの立体構造が決まる。患者によってアミロイドの構造が異なるため（Wickramasinghe *et al.*, JACS 2021 など）、構造の種類を把握することが必要である。全容を把握し分類を確立することで、アミロイドの型に応じた治療法の開発が期待される。この基礎研究の成果が医療にフィードバックされ、病気の分類確立、機序解明、治療へとつながることが期待される。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

新潟大学脳研究所におけるアルツハイマー型認知症患者の剖検（死亡後解剖）で病理診断過程に作製された脳組織を凍結保存したものを受領する。受領した凍結脳組織から A β 由来のアミロイドを抽出・精製・定量し、別途合成した A β モノマーと混合培養する等の作業により固体 NMR 測定用に調製する。NMR 測定用に調製されたアミロイド試料は、固体試料用 NMR 装置を用いて測定・解析を行う。必要に応じて、電子顕微鏡測定も行う。

固体 NMR 測定により得られたスペクトル等を試料ごとに比較し、構造に違いがあるか検証し、分類可能であるかを調べる。質の良い試料が得られた場合はさらに 3 次元実験等を追加で行い、原子レベルの構造決定を行う予定である。

本研究は、東京工業大学 人を対象とする研究倫理審査委員会（承認番号：第 2020095 号、第 2021004 号、第 2021138 号）、新潟大学 倫理審査

委員会（承認番号：2020-0404）、神戸医療産業都市推進機構 研究倫理審査委員会（承認日：2021年7月11日）、理化学研究所 横浜事業所研究倫理審査委員会（許可番号：2021-16）の承認を得ている。

C. 研究結果

研究開始直前に東工大学内の実験制限で実験場所等の変更の必要が生じたため、抽出～定量の過程で既存のプロトコルが使えなくなり、急遽新たなプロトコルを一から作成することになった。現在、動物の凍結脳組織を用いた予備実験を行い、抽出・精製効率の向上、サブピコモルオーダーの定量に向けたプロトコルの改良に取り組んでいる。電子顕微鏡を使ったアミロイドの観測や質量分析を用いた A β 42 と A β 40 の定量などに予備的な結果を得ている。来年度の後半には、実際の患者由来の凍結脳組織を用いた実験を開始する予定である。

D. 考察

なし（研究継続中のため）

E. 結論

なし（研究継続中のため）

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし（研究継続中のため）

2. 学会発表

なし（研究継続中のため）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

CESTによる脳機能評価系の確立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⁾, 住吉 晃¹⁾, 高堂 裕平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

研究要旨

Chemical exchange saturation transfer (CEST) は生体内の分子に結合した水素原子と自由水の水素原子が異なる共鳴周波数を有することを活用し、生体内の化合物の計測を可能とするイメージング手法である。磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) を用いることでもグルタミン酸 (Glu) やグルコース (Glc) の測定は可能である一方、MRS で測定できる領域は限定されるため空間情報を得るには不利な面がある。CEST は脳の広範囲をイメージングとして評価できるため、MRS では困難な空間情報を得ることができ、疾患の病態研究や臨床研究に有用である可能性がある。本共同研究では、前臨床としてのマウス実験とヒト実験を並行して行うことでそれぞれの強みを生かし、CEST の臨床利用へ向けた基礎検討を行うことを目指している。本年度は MRS と CEST の比較に有用な動物モデルマウスの探索として、MRS での評価を実施した。その結果、海馬と皮質において Glu の変化が異なることを見出し、CEST での評価に有用なモデルマウスであることが確認できた。

A. 研究目的

Chemical exchange saturation transfer (CEST) は生体内の分子に結合した水素原子と自由水の水素原子が異なる共鳴周波数を有することを活用し、生体内の化合物の計測を可能とするイメージング手法である。CEST で測定できる対象は複数あり、そのうちのグルタミン酸 (Glu) やグルコース (Glc) は脳における神経伝達物質・エネルギー源である。磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) でも Glu や Glc の測定は可能である一方、MRS で測定できる領域は限定されるため空間情報を得るには不利な面がある。CEST は脳の広範囲をイメージングとして評価できるため、MRS では困難な空間情報を得ることができ、疾患の病態研究や臨床研究に有用である可能性がある。本共同研究では、前臨床としてのマウス実験とヒト実験を並行して行うことでそれぞれの強みを生かし、CEST の臨床利用へ向けた基礎検討を行うことを目的とする。本年度は、CEST と MRS を比較するモデルマウスの探索として MRS での評価を実施した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

タウ蓄積型モデルマウス (N=6) と健常対照群を対象に MRS 実験を行った。7T Bruker 装置において PRESS シーケンス (TR 3000 ms, TE 20 ms) により、関心領域を皮質と海馬の2か所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 (mI), 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

MRS での測定結果では、海馬においてタウ蓄積

型モデルマウスと野生型マウスの Glu/tCr はそれぞれ、 0.97 ± 0.04 、 1.04 ± 0.05 ($p=0.03$) であった。皮質の Glu/tCr には二群に差を認めなかった。

D.考察

タウ蓄積型モデルマウスにおいて、海馬領域において Glu が低下している所見を MRS により同定した。異常タウ蛋白蓄積による Glu 低下の関係は量研機構における臨床研究において認めており (Matsuoka et al. ISMRM 2022)、今回の結果もヒトデータに矛盾のない結果であることが確認された。今回の MRS では海馬と皮質の比較において Glu の脳局在の違いを見出すことができているが、脳の他の領域でどのように異なるのか、今後 CEST での評価が有用であると考えられる。

E.結論

タウ蓄積型モデルマウスの海馬において Glu が低下していることを MRS により同定した。脳の他の領域で Glu の変化が認められるか、異常タウ蛋白との関係はどのようになるか、今後 CEST での検討が有用と考える。

F.研究発表 (上記課題名に関するもの)

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

1. Matsuoka K, Hirata K, et al. ISMRM 2022 proceedings accepted

G.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

マルチスケールイメージングによる大脳基底核の機能解明

研究代表者 小山内 実^{1) 2) 3)}
研究分担者 笹岡 俊邦⁴⁾, 田村 篤史¹⁾

- 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) 情報通信研究機構・大阪大学 脳情報通信融合研究センター 4) 新潟大学脳研究所

研究要旨

脳は生体の中でも極めて複雑な階層構造を成しており、その機能発現メカニズム明らかにするためには、多階層に渡るマルチスケールデータの取得が必要である。そこで、MRI による全脳神経活動計測と、光学 Ca^{2+} イメージングを組み合わせた、マルチスケールイメージングにより、大脳基底核の機能解明を目指した。非侵襲全脳神経活動計測としての、定量的活動依存性マンガン造影 MRI を用いて、D1 ドーパミン受容体のノックダウンマウスの全脳神経活動を行うと共に、運動能力試験を行い、D1 受容体のノックダウンによる神経活動の変化と、運動能力との関連を調べた。また、in vitro 神経活動計測としての、光学 Ca^{2+} イメージングを行うために、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系統を確立し、多細胞 Ca^{2+} イメージングによる神経活動計測を行った。

A. 研究目的

大脳基底核線条体における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から、ドーパミン受容体は大脳基底核の機能発現に重要な役割を果たしている。このドーパミン受容体の機能を明らかにするために、D1, D2 ドーパミン受容体のノックダウンマウスに対して、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解析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、D2 受容体発現細胞に cre を発現しているマウスの提供を受け、floxed-G-CaMP マウスと交配することにより、D2 受容体発現細胞の Ca^{2+} イメージングを行う。これらの研究により、大脳基底核の機能発現に対するドーパミンの役割の解明を目指す。

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、投与 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 (qAIM-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 D1 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、全脳神経活動の変化と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 Drd2-iCre マウスと、既に新潟大学脳研究所 崎村研究室より提供を受けていた

flox-G-CaMP8.5 マウスとを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。

加えて、Drd1-Cre マウスを MMRRC より入手し、flox-G-CaMP8.5 マウスと交配させ、D1 受容体に G-CaMP を発現しているマウスの系統の構築も行った。

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、中隔核、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。加えて、嗅球、梨状皮質、無名質、線条体、視床、黒質網様部、下丘、橋などにローターロッドの成績と有意な相関がみられた。

(2) ドーパミン受容体発現細胞特異的な神経活動計測

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、floxed-G-CaMP8.5 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+} イメージングを行い、線条体 D2 投射ニューロンの入出力特性を計測することに成功した。

D. 考察

(1) D1 受容体ノックダウンによる行動異常及び

qAIM-MRI による全脳神経活動計測

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、qAIM-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、複数の脳領域の神経活動が亢進することが明らかとなった。過去の知見では、D1 受容体の活性化は神経活動の亢進を引き起こすと考えられていたが、今回の結果は、この知見を覆すものであり、今後の更なる研究が必要である。

(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、このマウスを用いることで、D2 ニューロンの神経活動計測を行うことができ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、これは複数脳領域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 *in vitro* 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

1. 小山内 実. マルチスケールイメージングによる大脳基底核の機能解明. 2021 年度 脳研共同利用共同研究 笹岡班合同セミナー, オンライン, 2022/2/9

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

アルツハイマー病感受性遺伝子バリエントが 中枢神経病理に及ぼす影響の検討

研究代表者 金田 大太¹⁾

研究分担者 宮下 哲典²⁾, 赤津 裕康³⁾ 櫻井 圭太⁴⁾ 橋詰 良夫¹⁾ 池内 健²⁾

- 1) 医療法人さわらび会福祉村病院神経病理研究所 2) 新潟大学脳研究所・遺伝子機能解析学分野
3) 名古屋市立大学大学院医学研究科地域医療教育学・総合内科
4) 国立長寿医療研究センター放射線診療科

研究要旨

福祉村ブレインバンクにおいて詳細な神経病理所見が検討された症例につき、アルツハイマー病感受性遺伝子バリエントの有病率を検討し、バリエント毎にアルツハイマー病性変化であるアミロイド・タウ発現を病理学的に検討する。その他の高齢者タウ病変である嗜銀顆粒やタウ陽性アストロサイトの出現頻度、その他の代表的な認知症関連蛋白質である α -シヌクレインや、TDP-43、血管病変としてのアミロイドアンギオパチーも総合して、遺伝子多型が神経病理ならび神経変性に与える影響を検討する。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の最も重要な感受性遺伝子であるApoE4アレルの保有は、アミロイド蓄積にとどまらず、タウ病理単独の増悪に加え、 α -シヌクレインやTDP-43の蓄積にも増悪因子として影響していることが知られる。一方、E3アレルのある種の変異にはタウ蓄積に対し保護的に働く可能性も示唆されている。また、近年欧米のGWASで明らかとされた他の感受性遺伝子についても、詳細な病態への影響や人種差との関連は不明である。

日本人に対する認知症Polygenic risk scoreの確立、根本治療薬に対する有効性予測への応用、さらには社会実装を目指し、日本人症例を対象として縦断的に蓄積された認知症・非認知症を含有した高齢者連続剖検例を用いて、アルツハイマー病理にとどまらない総合的な神経病理所見と遺伝子多型の関連につき検討を行う。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

対象:福祉村ブレインバンクが管理する固定・凍結脳ならび放射線画像

倫理:医療法人さわらび会福祉村病院ならび新潟大学の倫理委員会の承認を得ている。

方法:対象凍結脳より抽出した遺伝子サンプルにつき、新潟大学脳研究所においてApoEをはじめとする感受性遺伝子の解析を行う。詳細な神経病理所見が検討された症例を福祉村ブレインバンクデータベースより抽出し、主要病理診断につき疾患毎のApoE各アレルの保有頻度を検討する。並存神経病理の各項目についても同様の検討を行うとともに、ApoE各アレル毎の認知症関連蛋白質の有病率を算出し群間比較を行う。MRIが撮像された症例については各種定性半定量評価、体積MRIに対してfreesurfer等の解析ソフトを用いた海馬体積・関心領域皮質厚測定を含む定量評価項目を追加検討し、同様の群間比較を行うことで、神経変性への寄与度を求める。その他の感受性遺伝子についても適宜同様の検討を行う。

C. 研究結果

福祉村ブレインバンクデータベースより、何らかの認知症の家族歴を有する 31 症例（うち 2 症例は遺伝学的に同胞と判定された）、ならび 65 歳未満の発祥である若年性 AD25 例が同定された。

上記症例につき品質チェックならび ApoE タイピングを行うとともに、候補遺伝子の抽出を試みた。浸透率の高い APP 遺伝子や PS1, PS2 遺伝子については明らかに pathogenic と判断し得る変異を同定し得ない一方、ABCA7、RELN など欧米でも注目されている遺伝子に加え、複数のバリエントが検出された。興味深いことに、今年度に解析した症例は全て病理学的にアルツハイマー型病理が主病理と判定されているにも関わらず、前頭側頭型認知症なら LATE (Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy) のリスクバリエントとして知られる GRN 遺伝子や、TMEM106B 遺伝子に複数のバリエントが検出されている。

D. 考察

現在の AD に対する DMT (disease modifying therapy) のターゲットはアミロイド、そしてタウの順に薬剤開発が継続されている。アミロイド仮説がその理論的背景となっているが、TDP-43 をはじめとするその他の神経変性疾患へ強く影響すると考えられるリスクバリエントが病理確定 AD 剖検脳より複数例検出された点は、アミロイドやタウを超えた治療の有効性を示唆するかもしれない。

E. 結論

今後の AD の根本的治療ならび、遺伝子検査の社会実装を考える上で重要な知見を得られる可能性が示唆された。次年度には病理学的に LATE、原発性年齢関連タウオパチー (PART) と判断される病理所見を呈した症例についても検索範囲を広げ、さらなる知見を収集予定である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

今年度、本研究に関する論文発表なし

2. 学会発表

今年度、本研究に関する学会発表なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

現在なし

2. 実用新案登録

現在なし

3. その他

現在なし

CRF 受容体 1 および 2 遺伝子改変マウスによる CRF ニューロン回路の同定と機能解析

研究代表者 井樋 慶一¹⁾
研究分担者 阿部 学²⁾, 崎村 建司²⁾

1) 東北大学大学院生命科学研究所超回路脳機能分野 2) 新潟大学脳研究所モデル動物開発分野

研究要旨

視床下部室傍核に細胞体を有する CRF ニューロンは生体ストレス防御において重要な役割を担っている。脳内 CRF ニューロンは種々の生理作用を担っているが、これらに關与する CRF ニューロンの脳内投射神経路、CRF ニューロンの下流の二次ニューロン、三次ニューロンなどの機能解剖学的検討は未だ行われておらず、それぞれの神経回路において CRF の果たす生理的役割も判っていない。そこで我々は、CRF 生理作用発現を媒介する CRF 受容体 1 (CRFR1) および CRF 受容体 2 (CRFR2) をコードする遺伝子に、Cre リンビナーゼをノックインしたマウス (CRFR1-Cre および CRFR2-Cre マウス) を作製し、脳内 CRF ニューロン系の構造と機能を明らかにすることを目的として本研究を行った。これまでの研究において、CRFR1-Cre マウスおよび CRFR2-Cre マウスの系統化をおこない、また、これらのマウスと GFP-reporter マウスを交配し、CRFR1 および CRFR2 発現ニューロン選択的に GFP を発現するマウスを作製した。現在、免疫蛍光法を用いて CRFR1 および CRFR2 発現ニューロンの脳内分布を検討中である。

A. 研究目的

視床下部室傍核 (PVH) に細胞体を有する CRF ニューロンは生体ストレス防御における重要な役割を担っている。すなわち、PVH CRF ニューロンは、下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン放出を介して副腎皮質における糖質コルチコイド合成を促す (これを視床下部 - 下垂体 - 副腎系調節と呼ぶ)。しかしながら、最近の我々の研究成果によれば、PVH CRF ニューロンの一部は正中隆起ではなく、脳内の様々な領域に投射し種々の脳機能に關与している。一方、脳内には PVH 以外にも CRF ニューロン細胞体が存在する複数の領域が存在し、それぞれ広範な脳内領域に投射している。これらもまた脳内で種々の生理機能に關与することが明らかになって来た。

CRF は CRF 受容体 1 (CRFR1) または CRF 受容体 2 (CRFR2) を介して生理作用を発現する

が、脳内 CRF ニューロン回路において、CRF の作用がいずれの受容体を介して発現するかは明らかでない。そこで、新潟大学脳研モデル動物開発分野との共同研究において、CRFR1 および CRFR2 の遺伝子に Cre リンビナーゼをノックインしたマウスを開発した。本研究では、これらのマウスを用いて、脳内 CRFR1 および CRFR2 の分布を明らかにし、さらに、CRFR1 および CRFR2 発現ニューロンの下流の神経回路を同定する。また、光遺伝学や化学遺伝学の手法を用いることにより、CRFR1 発現ニューロン、または、CRFR2 発現ニューロンを選択的に刺激したり抑制したりすることにより、これらの機能を明らかにする。

B. 研究方法

本研究で行われた遺伝子組換え実験および、動

物実験は、新潟大学および東北大学の遺伝子組換え実験安全専門委員会および動物実験専門委員会で承認されている。

1. CRFR1-Cre ノックインマウスおよび CRFR2-Cre ノックインマウスの作製

C57BL/6N 系統由来 ES 細胞 RENKA 株を用いて相同組み換えを行い、マウス CRFR1 遺伝子座、または CRFR2 遺伝子座において遺伝子翻訳開始部位に Cre 遺伝子を挿入した。Southernblot 法で組換え体をスクリーニングし、陽性細胞を選別した。4-8 細胞期胚を偽妊娠マウス卵管内に移植し、出生したキメラ個体の中から改変細胞が生殖器官を形成した個体を選別した。

2. CRFR1-Cre マウス、および、CRFR2-Cre マウスの系統化

CRFR1-Cre マウス、および、CRFR2-Cre マウスの系統化を行った。まず、Flpe 発現 deleter mouse と交配してネオマイシン耐性遺伝子（予め FRT 配列で挟んである）をゲノムから除去した。次に、これらを野生型マウスと交配し、Flpe アレルを除去した。

3. 免疫蛍光法

CRFR1 ニューロン選択的 GFP 発現マウス、および、CRFR2-Cre ニューロン選択的 GFP 発現マウス（研究成果参照）を深麻酔し、心臓から生理食塩水および 4%パラホルムアルデヒドを灌流し、脳を固定した。脳を摘出後、後固定し 20%蔗糖中に浸漬後、クリオスタットを用いて 30 μm 切片を作製した。ラット抗 GFP 抗体を一次抗体、Alexa Fluor 488 結合抗ラット IgG を二次抗体として既報の免疫蛍光法で染色し、共焦点顕微鏡を用いて GFP 発現ニューロンの分布と形態を観察した。

C. 研究結果

1. CRFR1-Cre マウス、および、CRFR2-Cre マウスの作製と系統化

上記研究方法 1. および 2. に記載の方法で、CRFR1-Cre マウス、および、CRFR2-Cre マウスを作製し、これらを系統化した。

2. CRFR1 ニューロン選択的 GFP 発現マウス、

および、CRFR2-Cre ニューロン選択的 GFP 発現マウスの作製

研究成果 1. で系統化された CRFR1-Cre マウス、および、CRFR2-Cre マウスを、大阪大学、宮崎純一氏から供与された Cre 依存性 GFP 発現レポーターマウス（CAG-CAT-EGFP マウス）と交配し、CRFR1 ニューロン選択的 GFP 発現マウス、および、CRFR2-Cre ニューロン選択的 GFP 発現マウスを作製した。

3. CRFR1 発現ニューロンおよび、CRFR2 発現ニューロンの脳内分布の検討

研究成果 2. で得られたマウスを用いて CRFR1 発現ニューロンおよび CRFR2 発現ニューロンの脳内分布を検討した。現在それらの結果を解析中である。

D. 考察

CRFR1-Cre ノックインマウスおよび CRFR2-Cre ノックインマウスを作製し系統化した。これらのマウスを用いて CRFR1 発現ニューロンおよび、CRFR2 発現ニューロンの脳内分布を明らかにした。本研究は脳内 CRF ニューロン系の形態と機能解析に貢献した。

E. 結論

本研究で作製された CRFR1-Cre ノックインマウスおよび CRFR2-Cre ノックインマウスは脳内 CRF ニューロン研究に極めて有用な実験ツールである。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawatani M, de Groat WC, Itoi K, Uchida K, Sakimura K, Yamanaka A, Yamashita T, Kawatani M. Downstream projection of Barrington's nucleus to the spinal cord in mice. J Neurophysiol. 2021; 126(6):1959-1977.
2. Kawatani M, Itoi K, Talukder AH, Uchida K, Sakimura K, Kawatani M. Cholinergic modulation of CRH and non-CRH neurons in Barrington's nucleus of the mouse. J Neurophysiol. 2020; 124(2): 443-457.

3. Hagiwara H, Sakimura K, Abe M, Itoi K, Kamiya Y, Akema T, Funabashi T. Sex differences in pain-induced modulation of corticotropin-releasing hormone neurons in the dorsolateral part of the stria terminalis in mice. Brain Res. 2021; 1773: 147688.

2. 学会発表

該当なし.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし.

高いアミロイドβ凝集阻害能をもつ分子の クルクミン誘導体の開発

研究代表者 中村 浩之¹⁾

研究分担者 杉江 淳²⁾, Rohmad Yudi Utomo³⁾, 岡田 智¹⁾, 三浦一輝¹⁾

- 1) 東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所、2) 新潟大学 脳研究所、
3) 東京工業大学 生命理工学院

研究要旨

アルツハイマー病の治療候補薬の1つであるクルクミンは、アミロイドβ (Aβ) 阻害活性を示すことが報告されているが、その活性領域は高用量であることから、臨床応用には至っていない。本研究では、既存の膨大な構造活性相関 (SAR) データベースである ChEMBL にある既知の Aβ 阻害剤から、SAR Matrix 解析により新規のクルクミン誘導体構造を取得した。予測された化合物を合成し、ThT 蛍光アッセイによって Aβ 阻害活性をスクリーニングした結果、クルクミンよりも強力な Aβ 阻害活性を有する誘導体を見出した。中でも化合物 B は、クルクミンの 100 倍高い阻害活性を示した。Aβ 発現ショウジョウバエモデルを用いて、擬似的血液脳関門透過性の検証と薬剤の in vivo での効果を検証したところ、化合物 B と N で、投与 2 週間後に有意に運動機能障害を回復させた。

A. 研究目的

アルツハイマー病は、アミロイドβ (Aβ) を含むプラークの形成を特徴としている。その治療候補薬の1つであるクルクミンは Aβ 阻害活性を示すことが報告されているが、その活性領域は高用量であることから、臨床応用には至っていない。我々は、既存の膨大な構造活性相関 (SAR) データベースである ChEMBL にある既知の Aβ 阻害剤から、Bajorath 教授が開発した SAR Matrix 解析を応用し、非対称クルクミン誘導体である化合物 B を見出し、クルクミンの 100 倍強力な Aβ 阻害活性を有する誘導体を見出した。明らかにした。化合物 B は、Aβ のオリゴマーへの凝集を阻害し、神経芽細胞腫細胞における Aβ 刺激による細胞毒性を低減させた。そこで、本共同研究では、化合物 B の構造を基軸に、バイオアベイラビリティを向上させた新規クルクミン誘導体を開発し、神経芽腫細胞および新潟大学脳研究所杉江研究室が有する Aβ 発現ショウジョウバエモデルを用いて、

擬似的血液脳関門透過性の検証と薬剤の in vivo での効果を検証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)

【1】クルクミン誘導体合成

我々がすでに見出した in vitro で Aβ に対し、高い凝集阻害を示す化合物 B のエステル基部位に種々の置換基を導入した誘導体を合成した。

【2】in vitro Congo Red 蛍光アッセイ

合成した化合物の Aβ 凝集阻害活性を in vitro Congo Re 蛍光アッセイにより評価した。得られたデータはさらに SARM プログラムに入力し学習させることにより、データベースの拡充を行った。

【3】Aβ 発現ショウジョウバエモデルを用いた擬似的血液脳関門透過性の検証と薬剤の in vivo での運動機能障害抑制効果の検証

発達段階からすべてのニューロンで Aβ を発現したショウジョウバエの 3 つのグループには、それぞれ、餌にクルクミンと化合物 B および N を混

合して投与した。1日または2週間後、クライミングアッセイを実行して移動機能を測定し、運動機能障害抑制効果を検証した。

C. 研究結果

化合物Bのメトキシエステルをベンジルアミドに置換し、バイオアベイラビリティを向上させた新規クルクミン誘導体である化合物Nを開発した。化合物Bの合成に用いた既報の方法に従って化合物Nの合成を達成した(図1)。

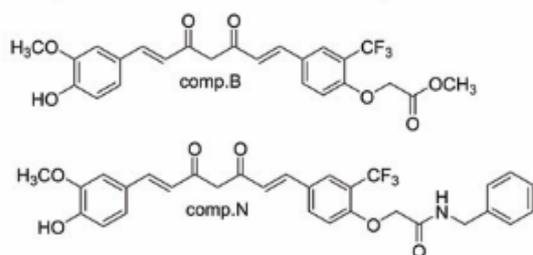


図1. 化合物BとNの化学構造

両化合物とも、濃度依存的にAβの凝集を抑制し、化合物NのIC50は0.015 μMであり、ベンジルアミド基がかなりの阻害活性を保持していることが示唆された。さらに、興味深いことに、化合物BとNは効果的に線維化したAβを分解することがわかった。そこで、このAβ繊維の分解を直接証明するために、透過電子顕微鏡(TEM)を用いてAβ線維の形態的変化を観察した。その結果、コントロール群ではAβ線維の典型的な形状である長い棒状が多数観察されたのに対し、化合物BとNを加えた群では、Aβ線維をより小さな凝集種に分解されていることがわかった。

最後に、Aβ発現ショウジョウバエモデルを用いた擬似的血液脳関門透過性の検証と薬剤のin vivoでの運動機能障害抑制効果の検証を行なった。発生段階から全神経細胞にAβを発現している3群のショウジョウバエに、それぞれクルクミンと化合物BおよびNを餌として供給した。1日後または2週間後に、クライミングアッセイを行い、運動機能を測定した。その結果、1日後では、コントロール群とAβ発現ハエの運動機能は同程度であったが、2週間後、Aβ発現ハエは運動機能の著しい低下を示した。一方、化合物BとNを与えた群では、2週間後のAβ発現ショウジョウバエの運動機能障害を有意に回復した。

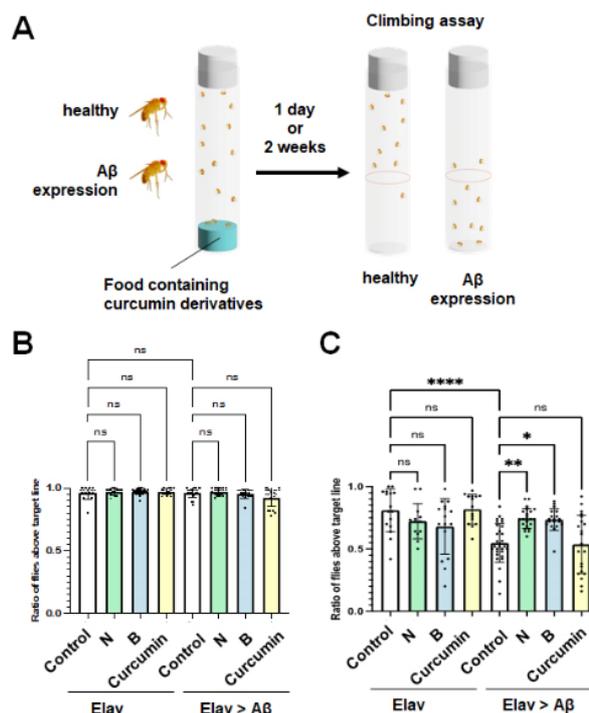


図2. (A) ADモデルショウジョウバエにおける摂食・クライミングアッセイの模式図。投与1日後 (B) および2週間後 (C) のアッセイの定量結果 **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

D. 考察

化合物BおよびNは、低濃度で線維形成を阻害し、さらにアミロイド分解を誘発することで、Aβ線維誘発毒性を抑制することが示唆された。また、ADモデルショウジョウバエのもつBBBを透過することでAβ毒性を緩和したと考えられる。

E. 結論

本研究で開発したクルクミン誘導体BおよびNは、AD治療薬候補に共通するBBB透過性の問題を考慮すると、有用な候補化合物と考えられる。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

- R. Y. Utomo, A. Sugie, * S. O kada, K. Miura, H. Nakamura, * *Chem. Commun.* 58, 2576-2579 (2022)

2. 学会発表

- Rohmad Yudi Uto, 杉江 淳、岡田 智、三浦 一輝、中村 浩之、日本薬学会第142年会・2022年3月・オンライン

筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病理： タウ PET を用いた検討

研究代表者 互 健二¹⁾

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⁾、高堂 裕平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)

本研究は倫理委員会の承認を経て行われた。研究は被験者の同意を口頭および文書で得た上で行われた。

4 名の DM1 患者を対象にタウ PET トレーサー [¹⁸F] PM-PBB3 を用いて脳内のタウ病変を評価し、神経心理学的検査を用いて認知機能および精神症状についての評価を行った。画像解析にはヒストグラムを用いて参照領域を最適化し、定量した SUVR 画像を用いた。SUVR 画像は SPM12 を用いて DARTEL アルゴリズムによって標準脳へと変換した後に、

全脳解析による jack-knife 検定を行った。検定には年齢マッチさせ、同じくヒストグラム法により定量化した健常者の SUVR 画像 15 例 (40-59 歳) を使用した。新潟大学脳研究所病理学分野の筋強直性ジストロフィー剖検脳でのタウの免疫染色によりタウ病理の広がり进行评估した。

C. 研究結果

ヒストグラム法を用いた定量の結果、概ねどの症例にも白質を中心とした領域にタウ PET 薬剤の集積を認めた。一方、年齢をマッチさせた健常群においても同様の部位における集積を認め、同集積が特異的な集積 (タウ病変) か非特異的集積を反映したものかどうかの判別が困難であった。そこで、jack-knife 検定による全脳解析を行った結果、4 例中 1 例の大脳皮質、特に海馬傍回や辺縁系を中心とした大脳皮質の一部の領域に、有意に PET 薬剤の高集積を認めた。また同症例では認知機能は保持されていたが、精神症状について、特に Apathy scale による評価ではアパシーの存在が疑われた。PET で捉えられたタウ病理の広がり、

脳病理で確認した分布と矛盾のない結果であった。

D. 考察

ヒストグラム法による定量、ならびに健常者との比較によって、タウ病変を反映していると考えられる、PET 薬剤の集積部位を検出できた。検出された部位の一つである、海馬傍回は健常加齢やアルツハイマー病などで早期からタウ病変を認める部位として知られているが、当該症例の年齢（47 歳）での検出は決して多いことではない。アパシーもまた、認知症の発症前後から出現しうる精神症状として知られていることから、同症例における PET 薬剤の高集積は DM1 における脳内の加齢性変化を加速を示唆する所見であると考えられた。ただし本検討は限定的な症例数での検討であり、今後更なる多数例での検証が必要である。

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, Ikoma Y, Endo H et al. An optimized reference tissue method for quantification of tau protein depositions in diverse neurodegenerative disorders by PET with ¹⁸F-PM-PBB3 (18F-APN-1607) medRxiv 2022

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

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⁾, 島野 薫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、マルチモーダルな脳画像と脳機能データを用いた深層学習によって、疾患、障害された脳のシステム、治療効果を予測することを目指す。マルチモーダルな脳MRI画像として、3T-MRIを用いた通常の撮像法（FLAIR法など）に加えて、T1強調像、拡散テンソル画像（白質の微小構造）、安静時fMRIによる機能的結合画像などを用いる。

通常のMRI画像では診断が難しい脳神経疾患の患者画像に対して、各モードの3次元画像を用いて深層学習を行い、それぞれの結果を総合的に検証することにより、高い精度での疾患分類の実現を目指す。また、画像のどの領域が判断に重要であったかを可視化する技術を適用し、適切な分類が行えているかを確認する。

さらに、各モードの画像から抽出した特徴量（多次元の数値）や歩行解析などの脳機能データを結合した情報を用いて深層学習を行うアプローチについても研究を行う。

A. 研究目的

これまでT1強調像などの単一のモード画像を用い、健常人とアルツハイマー病の分類を行う深層学習の例は複数報告されているが、それ以外の脳神経疾患の識別に成功した例は少ない。

そこで、本研究では、通常はMRI画像から診断が難しい筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの疾患に対して、マルチモーダルな先端的脳画像を総合的に活用し、障害された脳のシステム、病態の把握、薬剤による治療効果などの臨床的に重要な情報を引き出し、医師の診断の支援となるデータベースおよび深層学習の基盤システムを構築することを目標とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

健常人とALSの症例から得られる3次元マルチモーダル脳画像を用いて、疾患分類が可能な深層学習モデルを構築する。安定した深層学習モデルを構築するには数千枚以上の膨大な数の画像を必要とするが、研究対象としている画像は約60例

と限定されているため、疾患分類を行う「教師あり学習」に加えて、オートエンコーダによる「教師なし事前学習」を含めた2段階の3次元畳み込みニューラルネットワークのプロセスを構築した。

教師なし事前学習では、畳み込みニューラルネットワークを用いたオートエンコーダを採用し、120x160x120のサイズの3次元画像を3段階のオートエンコーダを重ねて、30x40x30のサイズに圧縮し、元通りの画像を復元できるように学習させた。

次に、事前学習で構築した3段階の畳み込みオートエンコーダに加えて、クラス分類を行う2層の全結合層を加えた教師あり学習モデルを構築し、画像と共に健常人とALSの2クラスの教師ラベルを与え、再学習させた。

構築した2段階の学習モデルの評価については、それぞれのモードの画像を入力して分類予測を実行、3分割の交差検証により検証した。画像は、FLAIR、T1強調像、拡散テンソル画像などの

中から、分類予測の精度が高い画像を探す。

それぞれの学習経過の正解率とロス（損失）の推移を学習データとテストデータに対して観察し、学習データに適合しすぎて、テストデータに対して精度が低い「過学習」が確認できる場合は、学習プロセスの改善の余地がある。例えば、事前学習で与える画像数の拡充、元の学習データに変換(画像の反転、回転、拡大など)を加えてデータ量を増やすデータ拡張、ニューラルネットワークのハイパーパラメータの調整などを試みる。

最後に、高い精度で分類された画像に対して、画像のどの領域が分類に重要であったかを可視化する技術を適用し、臨床的に有意義な分類が行えているかを確認する。ボクセル単位での分類結果への影響度を算出し、その大小により色分けを行うサリエンシー（顕著性）マップによる可視化法を主として採用した。

深層学習および可視化の実行には、ニューラルネットワークライブラリである Keras などを用いた、Python プログラムを開発した。

C. 研究結果

健常人 30 例と ALS 28 例の T1 強調像、FLAIR、拡散テンソル画像の撮像および画像処理が完了している。

事前学習は、健常人と ALS 以外の症例を含めた約 200 枚のマルチモーダル 3 次元画像を入力し、学習させた。

事前学習後の教師あり学習により、健常人と ALS 患者の区別を T1 強調像、FLAIR、拡散テンソル画像を用いて実行したところ、それぞれ平均で、49%、63%、76%の正解率で分類した。事前学習を行わない場合の正解率はそれぞれ、53%、61%、61%であり、特に拡散テンソル画像の分類において、事前学習の効果がみられた。

T1 強調像および FLAIR の正解率は全体的に低く、両者を区別するとき深層学習が注目した可視化においても、脳画像の領域の特定に至らなかった。一方、拡散テンソル画像を用いた場合は、条件によっては 80%近くの精度で予測に成功し、その場合の可視化においては、深層学習が注目した領域と ALS 患者でみられる白質の損傷部位が一致した。

D. 考察

各モーダルの健常人と ALS の分類精度は十分に高くはないが、医師が同じ画像から診断する場合と比べて、高い分類精度を達成できていると考えられる。特に拡散テンソル画像を用いた分類精度は高くなる傾向があり、その場合の可視化結果を用いて、医師が臨床的な知識と照らし合わせ診断することで、ALS の診断補助となりうる。

学習経過を観察すると過学習が発生していることが多くみられるため、今後の分類精度の向上が期待できる。特に、他の症例画像を活用した事前学習の拡充など、学習モデルの汎用化を保ちつつ、研究対象の分類精度向上に取り組むべきである。一方で、位置調整を行った各モーダルの脳画像から、対象とする疾患で特に注目したい 3 次元の領域があれば、その部分を切り取って教師あり学習を実施するなど、マルチモーダル脳画像を加工することで、精度が向上する可能性もある。

また、別のアプローチとして、各モーダル脳画像をオートエンコーダにより抽出した特徴量およびそれ以外の脳機能データを含めて結合し、1 次元の数値列に平滑化したデータをクラスタリングすることで、疾患ごとの特徴を把握できる可能性もあり、今後の研究での取り組みが期待される。

E. 結論

深層学習はデータが少ない場合には適切な学習が難しいとされているが、本研究では 60 例程度の画像であっても、3 次元畳み込みオートエンコーダによる事前学習を組み込むことによって、健常人と ALS 患者の 2 クラス分類予測が可能となることを示した。

また、T1 強調像などの単一モーダル画像による深層学習では分類が難しい場合でも、拡散テンソル画像を含めたマルチモーダル画像を学習させることによって、深層学習は様々な特徴を捉えて分類することが可能であることを確認した。

拡散テンソル画像を用いた健常人と ALS の分類例では、76%の正解率でその区別に成功している。そして、深層学習の判断根拠を可視化する顕著性マップ表示により、その深層学習が重要とした領域と ALS 患者でみられる損傷部位が一致していた。

本研究は、健常人と ALS の分類を行う学習モデ

ルを構築したが、各種のマルチモーダル画像を用いて、さらに高い分類精度を達成し、疾患部位を特定することで、それ以外の神経疾患を含め、医師の目視による早期診断の支援となることが期待される。

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。180例のAD患者および180例の軽度認知症患者の全ゲノム配列 (WGS) データをNCGG バイオバンクより得た。WGSライブラリの作成はイルミナ社 TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit により行い、NovaSeq 6000あるいは HiSeq X Ten により配列決定を行った。全ゲノム配列解析により同

定した候補バリエントについてはCombined Annotation Dependent Depletion score (CADD)等によりさらに絞り込んだ。絞り込んだバリエントについてはNCGGバイオバンクよりアジアスクリーニングアレイジェノタイプングデータをダウンロードしインシリコで関連解析を施行した。関連解析の検出力の算定はGAS (Genetic Association Study) PowerCalculator (http://csg.sph.umich.edu/abecasis/cats/gas_power_calculator/index.html)を使用した。また、NCGGバイオバンクデータの存在しなかったrs1378764618についてはPCRインバーダーアッセイ法(サードウェーブ社)により解析した。機能解析として以前に作成したルシフェラーゼ遺伝子安定発現型HEK293細胞株を使用し、SHARPINあるいはコントロール強制発現系におけるNFkBの活性を測定した。強制発現系における免疫染色はタグ配列に対する抗体を使用し蛍光染色を行いBIOREVO BZ-9000蛍光顕微鏡により検出した。

(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

日本人におけるSHARPINの新規バリエントを同定しADとの関連を探求することを目的として、AD 180例、軽度認知障害 180例の全ゲノム配列解析データからSHARPINエクソン領域に存在するバリエントの探索を行った。この調査を行う前に使用したサンプルデータについては常染色体優性AD原因遺伝子、APP、

PSEN1、PSEN2、に変異がないことを確認した。また、我々が以前に発見したSHARPIN既存変異であるrs572750141についても変異がないことを確認した。この過程で13個のエクソニックバリエント(9ミスセンス、1フレームシフト、1ストップゲイン、2同義置換)が発見され、これらについてCADDスコア > 20を抽出したところ6個のバリエントが選別された。この6個についてサンガーシーケンス法により配列を確認後、マイナーアレル頻度から関連解析の検出力を算定したところ、2個(rs77359862とrs1378764618)のバリエントが我々の所有するサンプル数で十分な関連解析を施行できることが示された。関連解析は2段階スクリーニングを行った。初めにAD 1763例、コントロール 3214例をスクリーニングしたところrs77359862が統計値 $P = 0.012$ と統計学的に有意であることが示された。2次コホートにおける再検証ではでも統計学的に有意($P = 0.029$)であり、メタ解析により $P = 0.0016$ 、オッズ比1.43という統計学的有意差を得た。このバリエントはアミノ酸が変化する非同義変異をSHARPINタンパクにもたらす(R274W)。以前の解析でSHARPIN G186Rが免疫系の中心的なメディエータであるNFkBの活性を低下させること、また発現タンパクが細胞核付近でドット状に存在(G186は細胞内に一様に発現)することが、ADに関連することを報告してきた。したがって、R274Wについても同様の実験を行ったところ、やはりG186と同様ではあるが、少し弱いNFkBの活性低下および細胞内異常発現が認められた。

D. 考察

SHARPIN 遺伝子をターゲットとした認知症関連の全ゲノム配列解析を通して 6 個の AD 関連候補バリエントを同定した。4 個のバリエントについては我々のサンプル数における検出力の低下から関連解析における検討はできなかったが、CADD スコア 20 以上であり、非同義置換およびナンセンスフレームシフト置換を含んでおり、SHARPIN 機能に与える影響が大きいのと考えられ、今後のサンプルの拡大化が期待される。今回同定した R274W についてはそのバリエントのオッズ比は 1.43 であり、G186R (rs572750141)のオッズ比(6.1)と比べると小さい。

NFkB 等の機能解析データについても R274W については G186R よりもマイルドな変化をもたらしており、ジェノタイプとフェノタイプが相関した結果となった。また、rs77359862 の日本人におけるキャリアーは 1%から 4%であり、ある程度頻度が高い事からも疾患リスク判定などの臨床応用の可能性が示唆される。最近の AD 病因メカニズムとしてミクログリアなどの神経システムにおける免疫機能の異常が示されている。欧米人における変異が同定されている TREM2 についてはミクログリアにおけるアミロイド β の貪食に影響を与えることが示されている。ここで示した SHARPIN についても神経システムにおける免疫機能を変化させることにより、AD 発症リスクを上昇させている可能性がある。また最近の欧米人 GWAS において日本人には存在しない SHARPIN の 2 つのコモンミスセンスバリエーション (S17F、P294S) が AD と統計学的に有意な関連が示されている。SHARPIN はアミロイド β の分解にも関与する可能性が報告されており、今後の SHARPIN 研究の展開が期待される。

E. 結論

本研究では SHARPIN 内に機能性バリエーションが新規かつ統計学的に日本人 AD のリスクを上昇することを同定した。我々が 2 年前に SHARPIN が AD に関連することを報告して以来、海外お含め AD と SHARPIN の関係が明らかになってきており SHARPIN 機能変化の AD 発症における重要性が示唆される。AD は罹患者本人のみではなくその家族にも多大な負担がかかるが、有効な予防法や治療薬が存在しないのが現状である。先進国、特に日本では急速な高齢化社会が進んでおり、AD を含めた認知症のケアが急務となる。SHARPIN の機能的側面の解明からこれまでに知られていない AD 発症メカニズム解明の糸口を見いだせる可能性があり、ドラガエーブルな分子の同定から革新的な治療薬の開発に迫れる可能性がある。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1) Whole-genome sequencing reveals novel ethnicity-specific rare variants associated with Alzheimer's disease. Shigemizu D, Asanomi Y, Akiyama S, Mitsumori R, Niida

S, Ozaki K. Mol Psychiatry. 2022 Mar 10. doi: 10.1038/s41380-022-01483-0.

- 2) A functional variant SHARPIN confers increased risk of Alzheimer's disease. Asanomi Y, Shigemizu D, Akiyama A, Mitsumori R, Miyashita A, Hara N, Ikeuchi T, Niida S, Ozaki K. *Journal of Human Genetics* 2021 Nov 5. doi: 10.1038/s10038-021-00987-x.
- 3) JAMIR-eQTL: Japanese genome-wide identification of microRNA expression quantitative trait loci across dementia types. Akiyama S, Higaki S, Ochiya T, Ozaki K, Niida S, Shigemizu D. *Databases* Nov 3 (2021). doi: 10.1093/database/baab072.
- 4) 尾崎浩一 日本人における新規孤発性アルツハイマー病感受性遺伝子の同定と解析 医学のあゆみ 第 5 土曜特集第 278 巻 5 号 2021 年 7 月 31 日、(2021)
- 5) 尾崎浩一 生活習慣病の遺伝因子群とポリジェニックリスクスコア 愛知県医師会雑誌「現代医学」誌第 68 巻1号(2021 年 6 月号) p22-27.

2. 学会発表

- 1) Large-scale genomic analysis for Alzheimer's disease in Japan. 尾崎浩一、第 40 回日本認知症学会学術集会、シンポジウム 16、2021/11/28、国内、口頭。
- 2) 日本人におけるアルツハイマー病のゲノム解析 尾崎浩一、第 66 回日本人類遺伝学会総会、シンポジウム、2021/10/14、国内、口頭
- 3) 日本人および民族横断的ゲノムワイド関連解析による認知症の感受性座位の探索. 光森 理紗、浅海 裕也、重水 大智、秋山 真太郎、森園 隆、寺尾 知可史、新飯田 俊平、尾崎 浩一、第 66 回日本人類遺伝学会総会、2021 年 10/14、国内、ポスター
- 4) 遅発性アルツハイマー病関連遺伝子 SHARPIN の疾患リスクとなる新規機能的ミスセ

ンスバリアントの同定. 浅海 裕也、重水 大智、
秋山 真太郎、宮下 哲典、光森 理紗、原 範
和、池内 健、新飯田 俊平、尾崎 浩一 第 66
回日本人類遺伝学会総会、2021/10/16、国内、
口演

- 5) A genome-wide association study for
Tachycardia-induced Cardiomyopathy in
Japanese population. Furutani M,
Okamura S, Morizono T, Shigemizu D,
Niida S, Nakano Y, Ozaki K, 第 66 回日本人
類遺伝学会総会 2021/10/14、国内、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
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

研究代表者氏名 鈴木 元¹⁾
研究分担者氏名 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）マウス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 (Ceramide 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 陽性ラメリポディア形成を促進、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 活性促進はスフィンゴシン-1-リン酸 (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性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、多発性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 モデルを作成

し、3週間後まで、薬剤投与群における臨床症状の軽減を観察した。

2. 前年度までの研究では、開発薬剤単独ではEAE改善効果が得られないことが判明した。そこで、2021年度はCERS6経路の相補経路を合わせて阻害することとした。新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センターにおいてCERS6阻害剤と相補経路阻害剤を同時投与したところ、相補経路阻害剤単剤では、CERS6阻害剤単剤同様、有効性は観察されなかった。その一方で、2剤併用により症状改善傾向が観察された。

D. 考察

CERS6阻害剤および相補経路阻害剤の併用はEAE症状を改善させる可能性がある。しかし、今年度の研究では有意差を出すには至らなかった。今後は実験回数を重ね、統計的有意差を得られるかどうか検討する必要がある。

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、マウス匹数を増やすこと、また、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合成することにより、臨床応用可能な薬剤開発に結びつく可能性がある。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表 (掲載誌名・巻号・頁・発行年を記入し、掲載論文あるいはPDFファイルを別紙で1部提出)

本研究に関する各種発表は、知財取得後に行う。

2. 学会発表 (学会名・発表年月・開催地なども記入)

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

化合物最適化後に行う。

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⁾

- 1) 国立循環器病研究センター 脳神経内科 2) 新潟大学大学院医学系研究科脳研究所
3) 国立循環器病研究センター 病態代謝部

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, ホモの変異のみならず, 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くなかったが, 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

令和2～3年度は、CADASIL壁細胞の低酸素刺激への反応性について再検証を行った。以前、CADASILの壁細胞を低酸素下で培養すると、HIF1 α の誘導が低下していることが示された。今回は、iPS細胞由来壁細胞に、低酸素ストレスを誘導する塩化コバルトの添加を行ったところ、コントロール細胞はむしろわずかに増殖が活性化されるのに対し、CADASIL壁細胞は細胞死による細胞数の減少が起こることが確認された。また、アドレノメデュリンの添加により、塩化コバルトによる細胞死が抑制される可能性が示唆された。この結果と、アドレノメデュリンが既に急性脳梗塞などの治療薬としてすでに治験が行われていることから、国立循環器病研究センターでCADASILを対象としたアドレノメデュリンの医師主導治験を始めた。

また、もう一つの治療法候補である、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)によるエキソン・スキッピングの検証にも取り組んだ。まずは、Ruttenら (*Brain*, 2016) によるNOTCH3のエキソン・スキッピングで報告されていたExon 4-5を取り除くAONが、本当に報告通りの効果を持つのか検証した。血管壁細胞に3種類のAONを遺伝子導入し、24時間後にRNA抽出をして調べたところ、Exon4-5が読み飛ばされているのが確認された。また、3つのAONのうち、2つのAONだけでも遺伝子変異の最も多いExon4を読み飛ばすことはできたが、その効率はExon4-5を両方飛ばすものと比べて悪かった。そこで、新たにExon4

のAONを設計し、有望そうな1つについて現在さらに解析を進めている。

並行して、Control iPS細胞にCRISPR-Cas9によりR141C変異の導入を試みたが、うまく組換えが起こらず、また新型コロナの流行により一部試薬や人員の安定的な確保が難しくなったため、こちらは一時中断することとなった。

D.考察

CADASILの病態にはPDGFR β が関わっている可能性をこれまで報告してきたが、今回の低酸素刺激による病態は、PDGFR β とは別経路のものである。PDGFR β が脳の血管構造の不安定化を招き、脳梗塞が起きた場合に低酸素への適応障害により細胞死が優位に増加するというのではないかと仮説をたてている。

E.結論

アドレノメデュリンは、急性脳梗塞の治療薬として治験が行われていることもあり、CADASILに対してもある位程度の効果が期待される。しかし、現状アドレノメデュリンは注射薬であり、半減期も短いため、遺伝子疾患であるCADASILでどこまで長期間の効果が見込めるかは未知数である。そういう意味では、エクソン・スキッピングはゲノム編集に次ぐ根本的な治療法として、さらなる研究が必要である。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

1. Yamamoto Y, Hase Y, Ihara M, Khundakar A, Roeber S, Duering M *et al.* Neuronal densities and vascular pathology in the hippocampal formation in CADASIL. *Neurobiol Aging* 2021; 97: 33-40.

2.学会発表

1. 猪原匡史. ラクナ梗塞と過小診断される遺伝性認知症CADASILとその治療法探索. *STROKE* 2022 (大阪). 2022年3月18日.
2. 猪原匡史. CADASILに対する医師主導治験:AMCAD試験. 日本脳血管・認知

症学会総会(Web). 2021年8月28日.

G.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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・学習障害などの総称である神経発達症に特徴的な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 による機能画像を基盤とした解析方法を開発して、行動発達障害に関連した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

神経発達症は、知的能力障害、自閉スペクトラム症、注意欠如・多動症、コミュニケーション症群、限局性学習症、チック症群、発達性協調運動症などといった発達障害の総称で、これらの障害は別々のものではなく、神経の発達阻害という共通の原因を持つ連続的な障害なのだという考え方に基づいている。発達の早期、しばしば就学前に明らかとなり、個人的、社会的、学業または職業において期待される機能を発揮しづらくなる。定型的な発達の経過をたどる方々との明確な区別は難しく、誤解が生じやすいのが大きな問題となっている。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、新たに開発したエントロピー解析を用いた脳機能解析が、行動発達障害に関連した機能的発達の異常を非侵襲的に抽出可能かを検討し、脳発達病態の手掛りにすることにある。

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、安静時および活動時 functionalMR 画像 (fMRI) の撮影を施行した (撮像時間 5 分)。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。

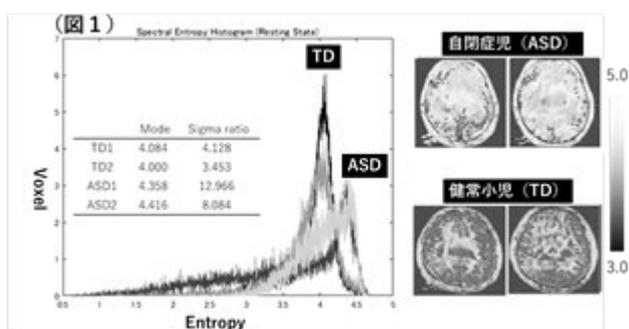
実際の撮像検査は研究参加者の負担を考慮し 1 時間以内で終了予定であり、身体・精神状態にあわせて行い、希望があれば途中で休憩または終了する。また、鎮静のための薬物や造影剤等は一切使用しない。撮影に先立ち、統合脳機能研究センターに導入されている撮影シミュレータ「ゼロテ

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

① 自閉症児の安静時における脳活動の不安定さを評価する目的で、安静時 fMRI (resting state-fMRI; rs-fMRI) エントロピー解析の開発を行い定型発達児と比較して、明らかに高エントロピー状態にあることを解明した (図 1)。

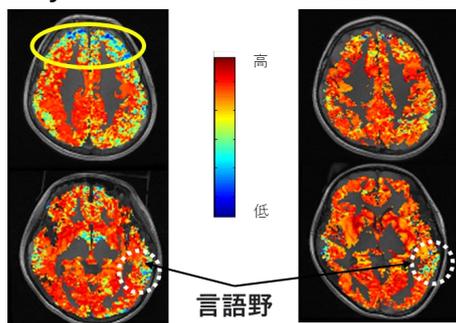
この結果は自閉症児の安静時の脳活動がランダムな状況に置かれていることを意味しており自閉症児の脳内の混沌とした状態を的確に解析し



ていることが示唆された。

② 学習障害 (Dyslexia) の読書時における脳内の活動を解析する目的で、活動時 fMRI (active state-fMRI; as-fMRI) エントロピー解析の開発を行った。as-fMRI は rs-fMRI とは異なり、脳全体のランダムさを評価するものではなく、各部位における脳活動のエントロピーを評価するようにプログラミングされている。活動が活発な部位は低エントロピーになる。この方法を用いることにより、読書時 (簡単なひらがなや単語) に言語中枢であるウェルニッケ野は共通して活動していたが (低エントロピー)、Dyslexia 児においては、定型発達児よりも前頭葉 (特に前頭前野) が活発に活動していることが描出された (図 2)。この結果は定型発達児では簡単に処理できる読

(図 2) Dyslexia 児 定型発達児



字プロセスが、Dyslexia 児には非常に複雑な情報処理が必要な作業であることを示唆しており、彼らが抱えている困難さを的確に解析している。

D. 考察

今回開発した高磁場 fMRI を用いた時系列エントロピー解析は、明らかな脳機能構造異常は認めない自閉症、学習障害をはじめとした神経発達症の臨床症状に関連する脳活動の複雑さを評価するにあたり有用であることが示唆された。これは、従来の fMRI やネットワーク解析では検出不可能なことであり、我々が開発しているエントロピー解析が神経発達症のメカニズム解明に役立つ可能性があると考えられる。

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やオーバーラップした症状を持つ児に対し、それぞれの疾患 (症状) 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・活動時 fMRI に最適な撮像方法の開発を目指す。学校生活のみならず社会的にも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は、医学的にも社会的にも大変意義のあるものといえる。

以上の結果を踏まえ、今後もエントロピー解析を軸に、様々な症状を持つ神経発達症の撮像を進めることで解析方法を確立し、最終的には病態解明を目指して研究を続けていく必要がある。

E. 結論

安静時・活動時 fMRI におけるエントロピー解析は、神経発達症の症状に対応する脳活動の特徴を反映することから、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、 $^{[11C]}$ PBB3 および $^{[18F]}$ 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 $^{[11C]}$ PBB3 および $^{[18F]}$ 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、 $^{[11C]}$ PBB3 および $^{[18F]}$ 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

大脳皮質基底核症候群 16 例と健常対照者 12 例において、T1 強調 MRI とともに、 $^{[11C]}$ PBB3、 $^{[11C]}$ PiB および $^{[18F]}$ FDG PET によるタウ病理、アミロイド病理と糖代謝の in vivo 評価を実施した。16 例の大脳皮質基底核症候群症例は、アルツハイマー病の病態を示すアミロイドとタウ陽性が 13%、アミロイド陰性でタウ陽性が 69%、アミロイド陰性タウ陰性が 19%となった。これらのサブクラスの比率は、病理学的報告における大脳皮質基底核症候群の相対的な構成と一致した。アミロイド陰性タウ陽性症例では健常対照者と比較して前頭葉、基底核、中脳において $^{[11C]}$ PBB3 の保持が増加し、大脳皮質基底核症の既知のタウトポロジーと一致した。前頭葉灰白質および白質における $^{[11C]}$ PBB3 保持の増加は、糖代謝障害および萎縮と部分的に重なり、認知症の重要度との関連が示された。

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症候群患者に焦点を当て、 ^{11}C PBB3 PET によるタウ病変の検出と大脳皮質基底核症候群の神経病理学的分類を検討することを目的に解析を実施した。本研究により、タウ PET が大脳皮質基底核症候群の生物学的分類を容易にすることが実証された。大脳皮質基底核症型のタウの沈着は糖代謝障害を引き起こし、当該部位や神経回路を介した遠位領域で最終的には神経細胞の脱落を引き起こして認知機能の低下をもたらすと考えられる。

E. 結論

本研究により、タウ PET が大脳皮質基底核症候群の生物学的分類を容易にすることが実証された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Parkinsonism & Related Disorders, 2022 (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）

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 笹岡 俊邦²⁾, 齊藤 奈英²⁾

1) 北里大学医学部生化学 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

黒質や腹側被蓋野などに存在するドーパミン作動性ニューロンは、線条体などに投射していることが知られている。また投射先で分泌されるドーパミンは、正常な運動の遂行や快感情を伴う情動系などの制御に重要な役割を果たしている。本研究では、マウスの脚に電気刺激によるストレス(フットショックストレス)負荷を行った際に、ドーパミン作動性神経細胞の投射先である海馬、線条体、扁桃体、大脳皮質などにおいて、細胞内情報伝達系がどのように変化するかを、ウエ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ことを目的とする。また細胞内情報伝達系の変化は、ドーパミン受容体(D1~D5 受容体)ファミリーを介している可能性が考えられる。そこで、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、どの受容体が細胞内情報伝達系の変化に関与しているかを明らかにする。また、フットショックストレス依存的に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

現代はストレス社会と呼ばれており、パニック障害を含む不安障害やうつ病といった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、これら疾患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、マウスにフットショック(脚への電気刺激)によるストレス負荷を行った際に、脳内の細胞内情報伝達系に、どのような変化が起きるかを明らかにするため、ウエ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、マウスに異なる不安感を誘発することを確認している。そこで、ストレスによる細胞内情報伝達系の変化に、どのドーパミン受容体(D1~D5 受容体)が関係しているかを明らかにするため、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た解析を行う。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. 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

笹岡教授[新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野]に、1. 野生型 C57BL/6 コントロールマウス、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 Dox(-)、3. DOX 投与(4週間)によってドーパミン D1 受容体をノックダウンした遺伝子改変マウス Dox(+), 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遺伝子改変マウス Dox(+→-)の4種類のマウスを用意して頂いた。

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へのフットショック負荷とウエスタンブロット

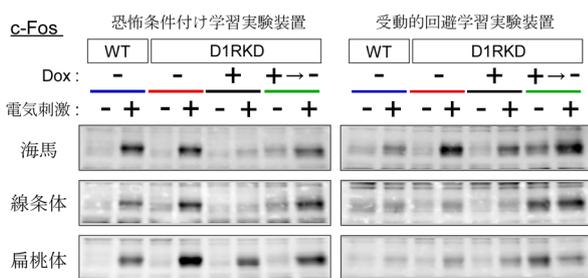
恐怖条件付け学習実験装置および受動的回避学習実験装置(暗所で電気刺激)を用いて、4種類のマウスにフットショックストレス負荷後、60分間

経過したマウスの海馬、線条体、扁桃体を採取、凍結したサンプルを笹岡教授から供与して頂いた。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、ウエスタンブロットのサンプルとした。

C. 研究結果

1. フットショックストレス負荷後のマウス脳内の最初期遺伝子 c-Fos の発現解析

フットショックストレス負荷 60 分間後のマウス海馬、線条体、扁桃体について、c-Fos のウエスタンブロットを行った(図 1)。



Saito et al. *Front. Behav. Neurosci.* 16, 751053 (2022) 改変

図1 D1受容体遺伝子改変マウスのc-Fosのウエスタンブロット

野生型マウスに恐怖条件付け学習実験装置を用いて、フットショックストレス負荷を行うと、海馬、線条体、扁桃体において c-Fos の発現量が顕著に増加していた。一方、受動的回避学習実験装置を用いて暗所でフットショックストレス負荷を行うと、海馬では c-Fos の発現量の増加が見られたが、線条体および扁桃体では、c-Fos の発現量に大きな変化はなかった。

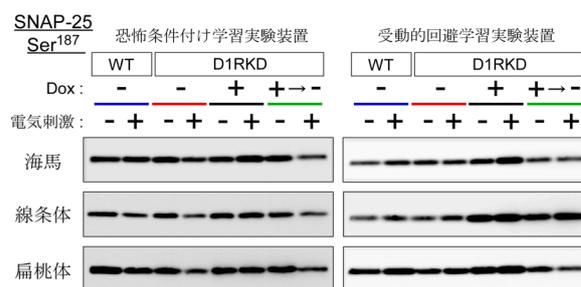
次にドーパミン D1 受容体遺伝子改変マウスの恐怖条件付け学習実験装置を用いた結果を見ると、海馬および線条体では、ドーパミン D1 受容体をノックダウンした遺伝子改変マウス、Dox(+)では、ドーパミン D1 受容体が発現している遺伝子改変マウス、Dox(-)および Dox(+→-)で見られる c-Fos の発現量の増加が見られなかった。一方、扁桃体においては 3 種類のドーパミン D1 受容体遺伝子改変マウス、Dox(-)、Dox(+), Dox(+→-)で明らかな c-Fos の発現量の増加を確認できた。受動的回避学習実験装置を用いたフットショ

ックストレス負荷では、ドーパミン D1 受容体をノックダウンした遺伝子改変マウス Dox(+)の海馬においても、c-Fos の発現量の明らかな増加が見られた。

c-Fos 以外の最初期遺伝子である Arc についても恐怖条件付け学習実験装置を用いたサンプルで確認した。野生型マウスとドーパミン D1 受容体をノックダウンした遺伝子改変マウス Dox(+)の海馬において、野生型マウスではフットショック負荷依存的な Arc の発現量の増加が見られたが、Dox(+)マウスでは有意な Arc の発現量の変化は見られず c-Fos と同様の結果となった。

2. フットショックストレスマウスの SNAP-25 Ser¹⁸⁷ のリン酸化解析

これまでの研究で拘束ストレス依存的にリン酸化が亢進することが知られている SNARE タンパク質 SNAP-25 Ser187 のリン酸化部位の解析を行った(図 2)。SNAP-25 は神経伝達物質放出に必須なタンパク質であり、Ser187 のリン酸化はドーパミンの放出を促進すると考えられている。



Saito et al. *Front. Behav. Neurosci.* 16, 751053 (2022) 改変

図2 D1受容体遺伝子改変マウスのリン酸化SNAP-25のウエスタンブロット

リン酸化の定量は、非リン酸化 SNAP-25 抗体のウエスタンブロットの結果から SNAP-25 の量を補正して行った(Data not shown)。恐怖条件付け学習実験装置でフットショックストレス負荷を行った場合は、海馬、線条体、扁桃体において、3 種類の遺伝子改変マウス、Dox(-)、Dox(+), Dox(+→-) のすべてで、SNAP-25 Ser187 のリン酸化量が減少する傾向が見られた。

受動的回避学習実験装置によるフットショックストレス負荷では、Dox(-)および Dox(+→-)の遺伝子改変マウスの線条体で SNAP-25 Ser187 のリン酸化量の増加が見られた。これに対して、海馬および扁桃体では、明らかな Ser187 のリン酸化量の変化は確認できなかった。

また、ドーパミン D1 受容体がノックダウンされた Dox(+)マウスでは、線条体および扁桃体において、フットショック前のコントロールとなる、SNAP-25 Ser187 のリン酸化量が、他のマウスと比べて増加していた。

D.考察

フットショックストレス負荷マウスの脳内の変化を検討したが、恐怖条件付け学習実験装置と受動的回避学習実験装置 (暗所で電気刺激) というわずかな違いによって、脳内変化に大きな違いが出るのがわかった。

より脳内変化の大きかった恐怖条件付け学習実験装置を用いた場合、最初期遺伝子 *c-fos* の発現量が顕著に増加することから、フットショックストレスによって神経活動が活発になることがわかる。しかしながら、ドーパミン D1 受容体をノックダウンした海馬や線条体では *c-fos* の発現量の増加がほとんど見られないことから、ストレス応答にドーパミン D1 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆される。

また PKC によってリン酸化される SNAP-25 Ser187 のリン酸化量を調べると、ドーパミン D1 受容体をノックダウンした遺伝子改変マウスでは、ストレス負荷をしていない線条体や扁桃体でリン酸化の亢進が見られることから、ストレスに依存しない脳内活動にもドーパミン D1 受容体が大きく関与していることが示唆された。

しかしながら、リン酸化についてはストレス負荷 60 分間後の結果だけでは不十分で、経時的な変化をみていく必要がある。

E.結論

フットショックストレス負荷によるマウス脳内のストレス応答に、ドーパミン D1 受容体に関与している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. D1 Receptor Mediated Dopaminergic Neurotransmission Facilitates Remote Memory of Contextual Fear Conditioning.
Saito N, Itakura M, Sasaoka T.
Front. Behav. Neurosci. 16, 751053 (2022)

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 森 文秋¹⁾, 三木 康生¹⁾, 今 智矢²⁾, 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（パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症）は α シヌクレインの異常蓄積を特徴とする神経難病である。しかし、異常 α シヌクレインの蓄積や伝播の機序は依然として不明である。今回、多系統萎縮症患者脳細胞内封入体において、リン酸化 α シヌクレインが、granulofilamentousな構造に加え、径100~200 nmの小胞構造にも高頻度に局在している所見を見出した。脂質膜で構成される小胞構造を介することで、異常 α シヌクレインは細胞内の局在変化だけでなく、細胞間伝播にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、クライオ電顕やReal-time Quaking-induced Conversion (RT-QuIC)など新たな技術が開発・改良されたことにより、シヌクレイノパチーの病態解明が進んでいる。特にこれらの技術によってパーキンソン病およびレビー小体型認知症 (PD/DLB)における異常 α シヌクレインと、多系統萎縮症 (MSA)の異常 α シヌクレインを区別することが可能となった。これまでにMSA由来の異常 α シヌクレインは、PD/DLB由来のものと比較して、より広範に伝播することが知られている。しかし、 α シヌクレインの構造変化だけでは、その伝播様式の違いを説明するには不十分である。今回、我々はMSA患者脳細胞内封入体において、リン酸化 α シヌクレインが、granulofilamentousな構造に加え、径100~200 nmの小胞構造にも高頻度に局在している知見を見出した。

B. 研究方法

MSA患者7例および正常対照5例の剖検脳組織を用いた。リン酸化 α シヌクレイン抗体を用いて

免疫染色および免疫電顕を行った。なお、患者検体の使用にあたり弘前大学医学研究科倫理委員会の承認を得ている。

B. 研究方法

MSA患者7例および正常対照5例の剖検脳組織を用いた。リン酸化 α シヌクレイン抗体を用いて免疫染色および免疫電顕を行った。なお、患者検体の使用にあたり弘前大学医学研究科倫理委員会の承認を得ている。

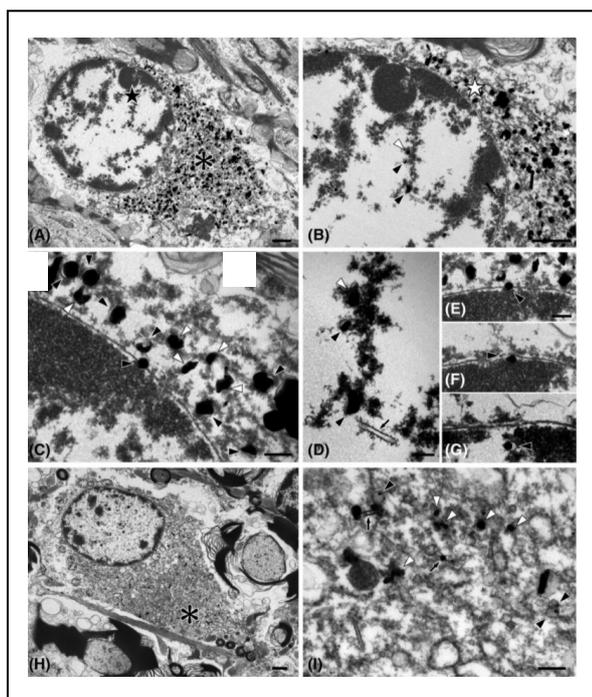
C. 研究結果

MSA患者脳では免疫組織化学的に、リン酸化 α シヌクレインはグリア細胞質内封入体 (GCI) および神経細胞質内封入体 (NCI) に局在していた。免疫電顕では、リン酸化 α シヌクレインはgranulofilamentousおよびtubularな構造物に加え、小胞構造にも局在していた。特に発症前MSA患者脳のGCIでは、径40~180 nmの小胞構造にリン酸化 α シヌクレイン陽性の免疫産物がより

高頻度に観察された (図 1)。

図 1 MSA 患者脳におけるリン酸化 α シヌクレイン免疫電顕 (A-C)オリゴデンドロサイト細胞質 (*) および核内封入体 (★) において小胞構造 (黒矢印) および granulofilamentous 構造 (白矢印) にリン酸化 α シヌクレイン陽性免疫産物が認められる。(D) Tubular 構造にも陽性免疫産物が認められる。(E-G) 小胞構造は核膜近傍および内側に認められる。(H, I) 発症前 MSA 患者 GCI における多数の小胞構造 (黒矢頭)、granulofilamentous 構造 (白矢頭) および tubular 構造 (矢印)。(A, B, H) Bar = 1 μ m、(C-G, I) Bar = 0.2 μ m

図 1



D. 考察

1989 年に Papp らは MSA の GCI が電顕的に filament 構造からなることを報告している。また、1990 年に加藤らは NCI が granulofilamentous 構造からなることを報告している。今回我々はこれらの所見に加え、GCI および NCI に多数の小胞構造を認め、リン酸化 α シヌクレイン陽性シグナルが小胞構造にも局在することを確認した。細胞内において、小胞は、代謝、輸送、一時的な貯蔵など、様々な機能を果たすことが知られている。さ

らに MSA モデルマウスの細胞内封入体でも多数の小胞構造が観察されることから、 α シヌクレインタンパク質の過剰発現もしくは分解抑制によって小胞構造の形成が惹起されている可能性が考えられる。一方、PD/DLB 内の細胞内封入体(レビー小体やその前段階に相当する構造物)では、リン酸化 α シヌクレイン陽性の小胞構造は MSA の封入体に比べ少数であり、この違いは PD/DLB と MSA における α シヌクレインの構造、局在および伝播の違いを反映している可能性が高い。

E. 結論

MSA 患者脳由来の α シヌクレインは小胞構造と密接に関連していることを初めて見出した。これら小胞構造は α シヌクレインの細胞内局在だけでなく、細胞間伝播にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Mori F, Miki Y, Tanji K, Kon T, Tomiyama M, Kakita A, and Wakabayashi K, Role of VAPB and vesicular profiles in α -synuclein aggregates in multiple system atrophy. *Brain Pathol* 31:e13001, (2021).

2. 学会発表

第 62 回 日本神経病理学会 (2021 年 5 月 27-29 日、東京・オンライン)

- 1) Mori F, Miki Y, Tanji K, Kon T, Tomiyama M, Kakita A, Wakabayashi K, Vesicular structures are associated with aggregation of α -synuclein in multiple system atrophy.
- 2) Miki Y, Eiki T, Wakabayashi K, Warner T, Quinn N, Holton J, Ling H, Clinical pointers to identify multiple system atrophy mimicking Parkinson's disease or progressive supranuclear palsy.
- 3) Tanji K, Mori F, Nikaido Y and Wakabayashi K, Co-localization of phosphorylated tau and phosphorylated

alpha-synuclein in multiple system atrophy model mice.

4) Kon T, Mori F, Kurotaki H, Tomiyama M, Wakabayashi K, Immunohistochemistry of anterior horn cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis of short disease duration.

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 三ツ石 弥千代¹⁾, 渡邊 直希¹⁾, 中野 将希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 病脳で顕著であるとともに、脳内 A β 蓄積レベルと負に相関する。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中 ILEI レベルの検討を行い、認知症との間に相関性が示唆される結果を得た (特許出願済)。しかし、今後の実用化を考慮すると、末梢血液を用いた評価が侵襲性も少なく優れていることから、本課題では、血漿 ILEI の定量系を確立し、臨床症状に加え A β 40・A β 42・総 tau・リン酸化 tau などの Alzheimer 病関連既知バイオマーカーとの相関性を解析し、血漿 ILEI レベル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

我々は、新たな分泌型機能分子 FAM3 スーパーファミリーに属す ILEI が APP-C99 の非特異的分解を促進するにより A β 産生を抑制する一方で、 γ セクレターゼ活性や Notch 切断は阻害しないことを明らかにした (*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同年齢対照と比較し Alzheimer 病症例で顕著な発現低下が認められ、かつ 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 (MCI)、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した。

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)、MCI (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) 血漿中の 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

新型コロナウイルス感染症蔓延の影響から、外来患者の血液採取は計画通りに進まなかったため、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 γ セクレターゼ複合体などと共局在していた。また、Alzheimer 病の剖検脳では ILEI 発現レベルが有意に低下していることも報告済である。

本課題において、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日内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、リバースダイアリシス手法を用い、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解析成果を合わせて報告した。

Alzheimer 病脳における ILEI 発現レベル低下について、RNA-Seq 解析から確認した。さらに、レポーターアッセイを用い、ヒトゲノム上で FAM3C (ILEI の遺伝子名)のプロモーター活性を示す領域を転写開始点から -40~-23 と特定した。この配列情報をもとに、認識モチーフデータベースを用いて転写因子候補を挙げ、神経系培養細胞 SH-SY5Y への強制発現や発現抑制から、SP1 と EBF1 が転写因子候補、SMAD1 が誘導性転写因子候補、KLF6 が抑制因子候補であることが明らかになった。RNA-Seq データからは、これら因子は Alzheimer 病脳での発現変化は有意でなかったが、剖検脳から核内タンパク質を抽出して定量すると SP1 と EBF1 のレベルが低下していた。さらに、核内 SP1 と EBF1 についてのゲルシフトアッセイから、プロモーターDNA への結合能が低下していることが判明した。ChIP アッセイでは、SP1 や EBF1 を転写因子とする他の遺伝子発現も

Alzheimer 病脳で低下していたことから、何らかの翻訳後修飾を受け SP1 と EBF1 の DNA 結合能が低下する可能性が示唆された。以上を、論文 (Watanabe, et al. 2021) に報告した。

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 と同様にシナプス小胞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。

また、Alzheimer 病脳における ILEI 発現レベル低下は転写因子 SP1 と EBF1 の翻訳後修飾による DNA 結合能低下による可能性が示唆され、本症の分子病態の一端が明らかになった。これらの原因をさらに突きとめることが治療法開発に向けた知見の解明に繋がると期待される。

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、今後さらなる解析に進めたい。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

- 1) Watanabe N, Nakano M, Mitsuishi Y, Hara N, Mano T, Iwata A, Murayama S, Suzuki T, Ikeuchi T, Nishimura M. Transcriptional downregulation of FAM3C/ILEI in the Alzheimer's brain. *Human Molecular Genetics* 31(1):122-132, 2022
doi:10.1093/hmg/ddab226
- 2) 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

- 1) 渡邊直希、村山繁雄、西村正樹. A β 産生抑制分子 ILEI/FAM3C の発現制御機構. 第 40 回日本認知症学会学術集会、2021 年 11 月、東京.
- 2) Nakano M, Mitsuishi Y, Liu L, Watanabe N, Saito T, Saido TC, Suzuki T, Nishimura M. "Extracellular release of ILEI/FAM3C and A β is associated with the activation of distinct synapse subpopulation." AAIC 2021, 2021 年 7 月, on line.

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 と相関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相関するかどうかを検討し、その他の疾患で算出した PRS とどの程度相関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

これまで新潟大学脳研究所 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ーション解析およびポリジェニックリスクスコアの算出を行った。今年度は個々人で算出したポリジェニックリスクスコアと様々な表現型との関係について調べた。表現型には髄液バイオマーカー（ $A\beta$ 量、総タウ量、リン酸化タウ量）、MRIによる脳体積データ（嗅内皮質、海馬）、神経心理学検査スコア（MMSE、FAQ、CDR-SB、CDR、ADAS）を用いた。関連性については線形回帰モデルを用い、共変量の異なる3つのモデルで解析した。すなわち、モデル1：性別、教育年数、検査時年齢；モデル2：性別、教育年数、検査時年齢、APOE ϵ 4アレル数；モデル3：性別、教育年数、検査時年齢、APOE ϵ 4アレル数、APOE ϵ 2アレル数である。解析の結果、髄液中の総タウ量およびリン酸化タウ量とすべての神経心理学検査スコアはすべてのモデルで統計的有意にポリジェニックリスクと相関することがわかった。また $A\beta$ 量と海馬体積はモデル1でのみ有意となった。

D. 考察

本研究では日本人におけるポリジェニックリスクスコアが特に髄液中のタウ量と相関することが明らかになった。このことはアルツハイマー病に関連する多くの遺伝的な効果が異常にリン酸化したタウによる神経原線維変化の形成や神経細胞死の背景にあることを示唆する。またすべての神経心理学検査スコアで有意な関連を示したが、これらの指標はAD診断に用いられることから妥当な結果であると考えられる。

E. 結論

本研究では日本人ゲノムデータを用いることで個々人のアルツハイマー病の遺伝的リスクを定量化するポリジェニックリスクスコアを開発するとともに、表現型との関連解析を行った。その結果、本研究で開発したポリジェニックリスクスコアは有意に健常者とAD患者を判別し、髄液中のタウ量と有意な相関を示した。今後ポリジェ

ニックリスクスコアを用いた層別化解析や、生活習慣等の後天的な指標を組み合わせることにより有用な判別方法が開発できる可能性がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 菊地 正隆. AI 技術を活用した認知症の発症リスク予測とその不均一性の理解. 第94回日本生化学会大会. 2021年11月3日. オンライン開催（口頭発表）
2. 菊地 正隆. 認知症ポリジェニック解析による病態の層別化. 第40回日本認知症学会学術集会. 2021年11月28日. 東京国際フォーラム（口頭発表）

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¹⁾[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

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¹⁾[11C]TGN-020 の製造における高収量化および高比放射能化を図るため、福島県立医科大学の環境に合わせた²⁾ [11C]TGN-020 の製造法の設計を行い、³⁾[11C]TGN-020 を製造合成することに成功した。しかし、製造の安定性の向上、および更なる高収量及び高比放射能化が必要であり、合成手順のさらなる最適化を行った。その結果、開発手法による¹⁾[11C]TGN-020 製造合成の限界点が明らかとなり、次の最適化に必要な技術開発の方向性などを獲得することができた。

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¹⁾[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¹⁾[11C]TGN-020 の製造における高収量化および高比放射能化を図るため、¹⁾従来の¹⁾[11C]TGN-020 の製造合成スキームの手順の簡素化や最適化などを再検討し、製造合成時間の迅速化を図り、高比放射能かつ高収量で¹⁾[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。²⁾ [11C]TGN-020 を動物に投与する上で薬液成分の低毒性化を意識した調整を行った。

C. 研究結果

¹⁾従来の製造合成スキームでは、第1反応の未反応のアリルリチウム試薬のクエンチをアセトンと 1N 塩酸で行っていたが、合成装置の都合上別のホットセルから手動で行っていた。そのため製造の際には別のホットセルまで使用することになり、実験手順が複雑になるだけでなく、他の実験を同日に行うことが不可能だった。また、第1反応で合成した化合物¹⁾[11C]ニコチン酸(及びその Li 塩)は有機溶媒に溶けにくく、その後の移送が困難だった。そこで未反応のアリルリチウム試薬のクエンチを 1N 塩酸のみで行うことにした。第2反応の縮合反応においては、HATU/THF を使用していたが、縮合前駆体である 2-Amino-1,3,4-thiadiazole と HATU を THF に溶かすのに要する時間が長いという欠点があった。そこで HATU/THF を HCTU, HOBt/DMF に変更した。それにより縮合用の反応液の作成が簡便になった。

この合成法を用いて[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。その時の収量は57MBqであった。

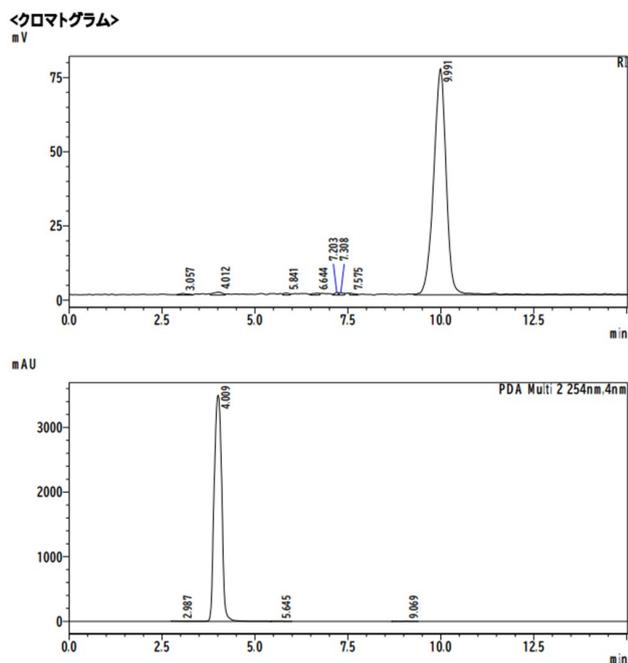


図1: [11C]TGN-020 の HPLC 解析結果。下の 4 min の UV ピークはアスコルビン酸。

2)については動物 PET の撮像を目標として、[11C]TGN-020 薬液に含まれる毒性成分であるエタノールを最小限にするため薬液の希釈を行った。しかし、希釈により[11C]TGN-020 薬液の濃度が低下する問題があった。図1[11C]TGN-020 薬液は57 MBq/8 mLの20%エタノール水溶液であり、これを動物へ投与できる10%エタノール水溶液にまで希釈すると57 MBq/16 mLとなり、[11C]の半減期を考慮すると大変厳しかった。そこで[11C]TGN-020 合成時の分取操作をトップピークだけ回収するように工夫することで収量39MBq/6 mLに改善した。

D. 考察

本年度は実際に福島県立医大の環境で動物 PET の撮像まで視野に入れて[11C]TGN-020 の製造合成系を再検討し、その結果収量は前年度から大きく改善はしなかったが、[11C]TGN-020 を動物 PET を行える前段階までは到達した。低収量の問題は照射量の改善や、分取方法の最適化を行うことで改善できると考えられた。

E. 結論

前年度までの低収量の改善とまではいかなかったが、動物 PET を視野に入れた[11C]TGN-020 の製造合成が可能となった。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

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

ヒト神経変性疾患における疾患特異的蛋白と神経細胞脱落との関連を知る目的から、リン酸化 α シヌクレイン (p- α Syn) 沈着を示すシヌクレイノパチーであるパーキンソン病 (PD) とびまん性レビー小体病 (DLB) における基底核とくに尾状核と被核すなわち線条体において解析を進めた。PD および DLB の線条体では、p- α Syn は小型神経細胞胞体とアストロサイトなどへの沈着が見られたが大型神経細胞胞体への沈着は見られなかった。一方 PD と DLB で AD 病変を合併した症例では大型神経細胞にリン酸化タウ (p-tau) 沈着が見られた。神経細胞数の定量的検討では、PD では大型神経細胞数が有意に減少していたが小型神経細胞は減少していなかった。DLB2 例では尾状核でも被核でも大型神経細胞が著しく減少し、うち1例の尾状核では小型神経細胞数が対照の約70%であった。PD および DLB の線条体の大型神経細胞の脱落機序については、(1) 合併する AD 病変の影響、(2) 黒質からの入力線維 (nigro-striate fiber) の脱落による経シナプス性変性、(3) 今回施行していない免疫染色である p- α Syn オリゴマーが沈着した可能性、また (4) 今回の検索標本では認められなかった p- α Syn 沈着が切片違いで生じていた可能性、が考えられた。

A. 研究目的

ヒト神経変性疾患における疾患特異蛋白と神経細胞脱落との関連を知ることを目的とする。本研究では、リン酸化 α シヌクレイン (p- α Syn) 沈着を示すシヌクレイノパチーであるパーキンソン病 (PD) とびまん性レビー小体病 (DLB) の基底核とくに尾状核と被核すなわち線条体において解析を進める。

この結果と、これまで私どもが本共同研究などにより明らかにし得た、リン酸化タウ (p-tau) が沈着するタウオパチーであるアルツハイマー病 (AD) (Oyanagi K, et al. *Brain Res* 1987, *Brain Res* 1991)、進行性核上性麻痺 (PSP) (Oyanagi K, et al. *Brain Res* 1988)、グアム島のパーキンソン認知症 (PDC) (Oyanagi K, et al. *Acta Neuropathol* 1994)、またポリグルタミンが主に神経細胞に沈着する

ポリグルタミン病である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)¹⁾、マチャド-ジョセフ病 (MJD)¹⁾ とハンチントン病 (HD)¹⁾ の線状体における疾患特異的蛋白の沈着と神経細胞脱落の特徴とその関連について比較検討する。

B. 研究方法

検索症例は、遺伝歴が無く、臨床症状と、レビー小体の分布と神経細胞脱落の局在、およびこれらの程度などに基づいて、DLB コンセンサス (McKeith et al. *Neurology* 2017) から、PD と分類できる6例 (46歳から78歳; 63.2 \pm 12.2歳、男性5人、女性1人) である。これら6名の Braak PD stage (Braak et al. *Neurobiol Aging* 2003) は2から6、Braak NFT stage (Braak and Braak. *Acta Neuropathol* 1991) は2例でII、SP stage (Braak and Braak. *Acta Neuropathol* 1991) は1名でAであっ

た。DLB と分類された 2 例 (2 例とも男性、74 歳、いずれも neocortical type、NFT stage は II と III、SP stage はどちらも C)。対照は有意な神経徴候と神経病理学的所見を呈さない 57 歳から 80 歳まで (68.8±8.4 歳) の男性 2 名、女性 4 名を用いた。

方法は (1) 神経細胞計測: *Oyanagi et al. Clinical Neuropathol 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、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の断面積を計測した。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、尾状核と被殻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ジタルカメラを用いて計測して、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。(2) 免疫染色: (1) に連続する 6 μ m 厚切片を用いて p- α Syn、p-tau、 β アミロイド免疫染色を施行して顕微鏡で観察した。

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である (#5108)。

C. 研究結果

PD および DLB の線条体には有意な萎縮、組織の粗しょう化、グリオーシスはみられなかった。

p- α Syn 免疫染色は PD および DLB 線条体で小型神経細胞とアストロサイト、スレッドや coiled body が散在性に陽性であった。DLB2 例の少数の線条体大型神経細胞で p-tau が陽性であった。 β アミロイド免疫染色では DLB で少数の陽性所見がみられた。

PD の小型神経細胞数には尾状核でも被殻でも変化がなかったが、大型神経細胞数は尾状核で対照の 77%まで減少していた。また被殻では核の断面積 100 μ m² から 120 μ m² までの大型神経細胞数は有意に減少していた。DLB2 症例の線条体の大

型神経細胞は尾状核ではそれぞれ 54%と 42%であり、被殻では 53%と 67%であった。DLB1 例で尾状核の小型神経細胞数が対照の約 70%であった。

D. 考察

ヒト線条体の小型神経細胞は主には GABA 作動性の出力性神経細胞であり、大型神経細胞は主にはコリン作動性の介在神経細胞であるという (*Bird and Iversen. Brain 1974, Kanazawa et al. J Neurol Sci 1980*)。今回の検索結果からは、p- α Syn の沈着と線条体の個々の神経細胞脱落は直結していないことが考えられ、むしろ合併した AD 病変との相関が考えられた。線条体におけるこの所見は、神経細胞脱落と p- α Syn 沈着がほぼ同時に認められる青斑核や黒質、迷走神経背側核の所見とは異なって見えた。すなわち、シヌクレイノパチーであっても脳の解剖学的部位が違えば、p- α Syn 沈着と神経細胞脱落との関連性は異なっている可能性が考えられた。

これまでの報告で、DLB では AD 病変を合併しやすいといわれ (*Jellinger and Attems. Acta Neuropathol 2006*)、PD では小型のみならず大型神経細胞にも p- α Syn 沈着の報告もみられる (*Mori et al. Acta Neuropathol 2008*)。また最近の報告では毒性を持つ p- α Syn オリゴマー沈着の重要性も言われている (*Alam et al. J Neurochem 2019*)。

シヌクレイノパチー線条体の大型神経細胞脱落の機序については、(1) 合併する AD 病変の影響、(2) シヌクレイノパチーでは必発する黒質からの入力線維 (nigro-striate fiber) の脱落による経シナプス性変性の可能性、(3) 今回施行していない免疫染色である p- α Syn オリゴマーが沈着した可能性、また (4) 今回の検索標本では認められなかった p- α Syn 沈着が切片違いで生じていた可能性、が考えられた。

この結果と、私共がこれまでの本共同研究などにより明らかにし得た、タウオパチーである AD、PSP、PDC、ならびにポリグルタミン病の DRPLA、MJD、HD の線条体における疾患特異蛋白の沈着と神経細胞脱落所見とを比較検討すると、AD、PSP、PDC では多くの残存大型神経細胞に p-tau の

沈着が見られ、大型神経細胞の選択的な脱落が認められた。DRPLA、MJD、HD ではポリグルタミンが小型神経細胞と大型神経細胞ともに認められたが、DRPLA と MJD では大型神経細胞有意の脱落がみられ、HD では小型神経細胞有意の脱落が認められた。

以上の研究結果をまとめると、疾患特異的の蛋白が沈着する神経変性疾患では、タウオパチーでは個々の神経細胞胞体への p-tau 沈着が神経細胞脱落と密接に関連している一方、シヌクレイノパチーとポリグルタミン病における神経細胞胞体への p- α Syn 沈着またはポリグルタミン沈着は、解剖学的な部位によっては個々の神経細胞脱落とは直結していない可能性が考えられた。

E. 結論

p- α Syn 沈着を示すシヌクレイノパチーである PD と DLB における基底核とくに尾状核と被核すなわち線条体における疾患特異的の蛋白沈着と神経細胞脱落機序との関連を追及した。神経細胞数の定量的検討では、PD では大型神経細胞数が対照の 77%に減少していたが小型神経細胞は減少していなかった。DLB2 例では尾状核でも被核でも大型神経細胞が著しく減少し、1 例では小型神経細胞数が対照のおよそ 70%であった。PD と DLB における尾状核と被核における疾患特異的の蛋白の沈着は p- α Syn は小型神経細胞とアストロサイトなどへの沈着が見られたが大型神経細胞への沈着は見られなかった。一方 AD 病変を合併した DLB では大型神経細胞に p-tau 沈着が見られた。線条体神経細胞胞体への p-tau 沈着は個々の神経細胞の脱落と関連しているが、p- α Syn は個々の神経細胞脱落とは直結していない可能性が考えられた。

本研究結果は”*Neuropathology 2022*”印刷中²⁾。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Oyanagi K, Shimizu H, Yamada M, Kakita A.
The neostriatum in polyglutamine diseases: preferential decrease of large neurons in dentatorubral-pallidolusian

atrophy and Machado-Joseph disease, but of small neurons in Huntington disease.

Neuropathology 2022 In press

2. Oyanagi K, Hayashi H, Yamada M, Kakita A.
The large neuron involvement in the neostriatum in Lewy body diseases.
Neuropathology 2022 In press
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
4. Hineno A, Oyanagi K, Yoshida T, Sakai Y, Kannno H, Sekijima Y: Spread of vimentin-immunopositive cells within the plaque-like lesion of the spinal anterior horn of a patient with post-poliomyelitis syndrome. *Neuropathology* 2021: 41, 406-411
5. 金子 順, 佐藤 竜一郎, 渡辺 正秀, 小柳 清光, 木下 通亨: 高浸透圧高血糖状態を 2 回発症し Totally locked-in state (TLS) を呈した筋萎縮性側索硬化症の剖検例. *臨床神経学* 2022 印刷中

2. 学会発表

ありません

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
ありません
2. 実用新案登録
ありません
3. その他
ありません

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だけに 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。Ggta1(+/-)の母マウスから胎盤を通じて Ggta1(-/-)胎児マウスに移行する Gal α 1-3Gal 修飾 IgG の検出に成功し、また Nestin プロモータ依存的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスとの掛け合わせで作製した Ggta1(-/-)/Rosa26(+/Ggta1-mTmG)/Nestin-Cre マウスの血漿中に抗 Gal α 1-3Gal 抗体陽性のタンパク質が存在することを確認した。このことから Cre リコンビナーゼによる組織特異的 Ggta1 遺伝子発現誘導により、特定細胞から産生された Gal α 1-3Gal 修飾を有する血中糖タンパク質を検出するという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だけに 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(+/Ggta1-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ト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

これまでの解析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ている。この遺伝子改変マウスを用いて、Ggta1 発現組織に由来する Gal α 1-3Gal 修飾糖タンパク質を血液中から検出できるかどうかを検証するために次の実験を行った。新生児の血中には母親由来の IgG が移行しており、新生児の免疫が獲得できるまで液性免疫を担っている。そこで Ggta1(+/-) の雌マウスに Ggta1(-/-) の雄マウスを交配させて Ggta1(-/-) の新生仔を得、その血漿中の IgG に Gal α 1-3Gal 修飾糖タンパク質が見られるかどうか確認した。新生仔血漿から Protein G beads にて IgG を調製し、ウェスタンブロットを行なって抗 Gal α 1-3Gal 抗体で検出したところバンドが確認された。この時、Ggta(-/-) の雌マウスから生まれた Ggta(-/-) の新生仔血漿からの IgG にはバンドが検出されなかったことから、新生仔の血漿中に検出された Gal α 1-3Gal 修飾 IgG は母親由来であると考えられる。

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も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。このマウスに Ggta1(-/-)/Nestin-Cre Tg を掛け合わせて Ggta1(-/-)/Rosa26(+/*mTmG*-Ggta1)/Nestin-Cre Tg を作成し、血漿をサンプルとして抗 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、複数のバンドが検出されたことから Cre リコンビナーゼ依存的に Gal α 1-3Gal 修飾タンパク質が産生され、血中に流入していることが確認された。

D. 考察

母体から胎児への IgG の移行が確認されたことから生体においても Ggta1 依存的に Gal α 1-3Gal 修飾タンパク質が産生され血中に移行していることが示され、またこれが抗体により検出されることが確認された。本実験で新生仔の血漿から Gal α 1-3Gal 修飾タンパク質を検出することで母親から胎児に移行する糖タンパク質を同定することが可能と考えられる。また Ggta1(-/-)/Rosa26(+/*mTmG*-Ggta1)/Nestin-Cre Tg マウスの血漿中に Gal α 1-3Gal 構造を持つ血中糖タンパク質が検出されたことから、Nestin プロモータにより Cre リコンビナーゼが発現している細胞から産生され血中に移行している糖タンパク質が確認されているものと考えられた。

今回の研究ではウェスタンブロットにて血中糖タンパク質のみの検出を行なったが、あらかじめ可溶性タンパク質とエクソソームとを分離してから免疫沈降することで Ggta1 が発現している細胞由来のエクソソームも検出することが可能である。しかしながら糖脂質上の 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。このことから A3galt2 の遺伝子欠損マウスの作製も進めており、必要であれば二重変異マウスの作製も検討する。

E. 結論

生体サンプルから Ggta1 発現細胞由来の Gal α 1-3Gal 修飾糖タンパク質を検出することに成功した。今後は免疫沈降の方法を検討して Gal α 1-3Gal 修飾糖タンパク質を回収し、質量分析器による解析でどのようなタンパク質が細胞特異的に血中タンパク質を産生しているか調べる。また、別の組織特異的 Cre 発現マウスを使って同様の解析を行い、由来組織の違いにより血中糖タンパク質の種類が異なるかどうか検討する。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

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。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、睡眠覚醒調節や概日リズム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、それらの中でもコルチコトロピン放出因子(CRF)を産生する神経(CRF神経)に着目して睡眠覚醒調節や概日リズム調節における役割について明らかにする研究を行った。CRF神経は様々な脳領域に分布するが、視床下部室傍核に非常に密に存在することが知られている。近年の我々の研究によって、体内時計の中核である視交叉上核(SCN)のGABA作動性神経が、視床下部室傍核のCRF神経活動を調節し、CRF神経が視床下部外側野のオレキシン産生神経を介して睡眠覚醒調節を行っていることを示した(Ono et al.,

Science Advances 2020)。この神経回路は、体内時計のリズムを睡眠覚醒調節に反映させるために重要と考えられた。そこで、視床下部室傍核のCRF神経において、体内時計のリズム発振のために重要な役割を持つ転写因子であるBmal1遺伝子の役割について明らかにするために、CRF神経特異的にBmal1遺伝子を欠損させたマウスを用いて、概日リズムに与える影響と睡眠覚醒調節に与える影響について解析を行った。このコンディショナルノックアウトマウスの作成のために、CRF神経特異的にCreリコンビナーゼ(Cre)を発現するマウス(CRF-Creマウス)とCre依存的にBmal1遺伝子を欠損させるBmal1 floxマウスを交配させてCRF神経特異的にBmal1遺伝子欠損マウスを作成した。

C. 研究結果

CRF神経特異的なBmal1遺伝子の欠損を確認するために、コンディショナルノックアウトマウスの脳を用いて免疫組織化学的染色を行いCRF神経特異的なBmal1の欠損を確認した。抗CRF抗体と抗Bmal1抗体を用いて免疫蛍光二重染色を行ったところ、CRF-Cre; Bmal1^{CRF flox/flox}マウスのCRF神経においてBmal1が発現していないことを確認でき

た。これらのマウスを用いて、体内時計のリズム、睡眠覚醒にどのような影響があるのかについて自発行動量の測定、脳波筋電図による睡眠解析を行った。その結果、概日リズムや自発行動量に変化がないことが明らかになった。また覚醒時間、ノンレム睡眠時間、レム睡眠時間や脳波の周波数特性にも変化が見られなかった。これらのことから、CRF 神経の *Bmal1* は体内時計のリズム発振や睡眠覚醒調節にほとんど作用がない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。これまでの研究によって、体内時計の中枢である 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てきた。しかし、CRF 神経自体の *Bmal1* を欠損させても体内時計のリズム発振や、睡眠覚醒調節に影響がないことから、*Bmal1* のリズム発振機能は SCN を介していることが示唆された。

E. 結論

脳研究所において作出された、CRF-Cre マウスと *Bmal1*^{flox} マウスを用いて、体内時計発振に重要な *Bmal1* を CRF 神経だけで欠損させること CRF 神経における *Bmal1* のリズム発振や睡眠覚醒調節における役割について検討を行った。その結果、CRF 神経特異的な *Bmal1* の欠損は概日リズムや睡眠覚醒調節に顕著な影響を与え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. Yamashita A, Moriya S, Nishi R, Kaminosono J, Yamanaka A, *Kuwaki T. Aversive emotion rapidly activates orexin neurons and increases heart rate in freely moving mice. *Mol Brain*, 2021; 14(1):104. doi: 10.1186/s13041-021-00818-2.
2. *Ohmura Y, Iwami K, Chowdhury S, Sasamori H, Sugiura C, Bouchekioua Y,

Nishitani, Yamanaka A, Yoshioka M. Disruption of model-based decision making by silencing of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus. *Curr Biol*, 2021; 31(11): 2446-2454. doi: 10.1016/j.cub.2021.03.048.

3. Moriya S, Yamashita A, Masukawa D, Sakaguchi J, Ikoma Y, Sameshima Y, Kambe Y, Yamanaka A, *Kuwaki T. Involvement of A5/A7 noradrenergic neurons and B2 serotonergic neurons in nociceptive processing: a fiber photometry study. *Neural Regen Res*, 2022; 17(4):881-886. doi: 10.4103/1673-5374.322465.
4. *Izawa S, Yoneshiro T, Kondoh K, Nakagiri S, Okamatsu-Ogura Y, Terao A, Minokoshi Y, Yamanaka A, Kimura K. Melanin-concentrating hormone-producing neurons in the hypothalamus regulate brown adipose tissue and thus contribute to energy expenditure. *J Physiol*, 2022; 600(4):815-827. doi: 10.1113/JP281241.
5. Sun Y, Tisdale R, Park S, Ma SC, Heu J, Haire M, Allocca G, Yamanaka A, Morairty SR, *Kilduff TS. The Development of Sleep/Wake Disruption and Cataplexy as Hypocretin/Orexin Neurons Degenerate in Male vs. Female Orexin/tTA; TetO-DTA Mice. *Sleep*, 2022; 19; zsac039. doi: 10.1093/sleep/zsac039.
6. Hung CJ, Yamanaka A, *Ono D. Conditional Knockout of *Bmal1* in Corticotropin-Releasing Factor Neurons Does Not Alter Sleep-Wake Rhythm in Mice. *Front Neurosci*, 2022; 15:808754. doi: 10.3389/fnins.2021.808754. eCollection 2021.
7. Zhou S, Yamashita A, Su J, Zhang Y, Wang W, Hao L, Yamanaka A, *Kuwaki T. Activity of putative orexin neurons during cataplexy. *Mol Brain*, 2022; 15(1):21. doi: 10.1186/s13041-022-00907-w.

2. 学会発表

1. Yamanaka A. Identification of neural pathway which converts circadian rhythm to sleep/wakefulness. 2020 Oriental International Sleep Medicine Summit Forum, 2021.12. (Shanghai, China: attended virtually)
2. Yamanaka A. Regulation of non-REM and REM sleep by the hypothalamic neurons. World Sleep, 2022.3. (Rome, Italy: attended virtually)
3. 山中章弘. 視床下部の特定神経細胞の運命操作、活動操作を用いた睡眠覚醒調節機構の解明. 第 68 回日本実験動物学会総会 学術集会委員会シンポジウム, 2021.5.(オンライン開催)
4. 山中章弘. オレキシン神経活動によるレム睡眠と脱力発作の調節. 2021 年度生理学研究所研究会 運動・行動から紐解く

- 脳神経回路発達メカニズムの異分野融合研究による解明, 2021.9.(オンライン開催)
5. 山中章弘. 神経活動操作を用いた睡眠覚醒と記憶の制御機構の解明. 第 145 回日本薬理学会関東部会, 2021.10.(オンライン開催)
 6. 山中章弘. オレキシシンとナルコレプシー症状発現メカニズムの最新研究. 第 12 回日本臨床睡眠医学会学術集会, 2021.10.(大阪)
 7. 山中章弘. 睡眠覚醒調節におけるオレキシシンの役割について. 第 49 回日本頭痛学会総会, 2021.11.(静岡)
 8. 山中章弘. 光による神経活動の操作と記録を用いた睡眠覚醒調節機構の解明. 2021 年度 キャンパスライフ健康支援センター研究推進 F D, 2022.1.(福岡)
 9. 山中章弘. 神経活動の操作と記録によるナルコレプシー症状発現メカニズムの解明. Rising Neurologist Club 2022, 2022.1.(オンライン参加)
 10. 山中章弘. 光を用いた視床下部神経活動の記録と操作によって解明する睡眠覚醒調節メカニズム. 日本薬学会第 142 年会, 2022.3.(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¹⁾, 長岡 敦子²⁾
泉 竜太²⁾, 岩本 和也⁴⁾, 糸川 昌成⁵⁾, 廣川 信隆⁶⁾, 宍戸 理紗²⁾

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) 東京都医学総合研究所 6) 東京大学

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

hybridysation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frontopolar cortex、upper frontal gyrus、

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(mTOR, S6K, pS6K, S6, pS6)及び、CRMP2 のタンパク発現解析を行い、mTOR 系分子群と CRMP2 との相関を解析した。その結果、CRMP2 の発現量と mTOR 翻訳制御のエフェクターである pS6K、pS6 の発現とに有意な相関を認め、また、統合失調症において mTOR と CRMP2 の相互作用が破綻していることが示唆された。これらの結果をまとめて論文報告した。

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。また、PRODH は 6、PEPD は 18 の SNP についてそれぞれのタンパク質発現量との関連について検討したが、cis-acting な影響は見られなかった。

3) 死後脳試料のオミックス情報の取得

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を完了した。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) 死後脳オミックス情報の解析

① ストレス関連分子の mRNA 発現量に基づき統合失調症病態を層別化し、各群で mRNA 発現量の相違が大きい遺伝子トップ 10 について算出し IPA によるパスウェイ解析を実施した (論文準備中)。

② 生前の臨床症状によるクラスター解析で統合

失調症を層別化し、RNA-seq データ を用いて遺伝子発現のクラスター間比較解析を実施した結果、抗精神病薬治療反応性良好群が見出された。さらに各群で差の大きかったトップ 10 の遺伝子についてパスウェイ解析を行なったところ、10 個中 5 個の遺伝子が DRD2 との関連を認め、そのうち 2 つは DRD2 の活性化/不活性化のサイクルの速度の律速に関与する分子であった (論文準備中)。

③ その他、RNA-seq データを用いて、いくつかの統合失調症病態関連分子について、タンパク質-mRNA 発現の検討を行い論文報告した。

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 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. Yoshihara S, Jiang X, Morikawa M, Ogawa T, Ichinose S, Yabe H, Kakita A, Toyoshima M, Kunii Y, Yoshikawa T, Tanaka Y, Hirokawa N. Betaine ameliorates schizophrenic traits by functionally compensating for KIF3-based CRMP2 transport. *Cell Rep.* 2021 Apr 13;35(2):108971.
2. Kunii Y, Matsumoto J, Izumi R, Nagaoka A, Hino M, Shishido R, Sainouchi M, Akatsu H, Hashizume Y, Kakita A, Yabe H. Evidence for Altered Phosphoinositide Signaling-Associated Molecules in the Postmortem Prefrontal Cortex of Patients with Schizophrenia. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 31;22(15):8280.

3. 國井泰人「死後脳マルチオミクス・プロファイルに基づく統合失調症病態の構成的理解」*Precision Medicine* 11: 1051-1055, 2021.
4. Izumi R, Hino M, Nagaoka A, Shishido R, Kakita A, Hoshino M, Kunii Y, Yabe H. Dysregulation of DPYSL2 expression by mTOR signaling in schizophrenia: Multi-level study of postmortem brain. *Neurosci Res.* Sep 17:S0168-0102(21)00206-6, 2021.
5. Hirai S, Miwa H, Tanaka T, Toriumi K, Kunii Y, Shimbo H, Sakamoto T, Hino M, Izumi R, Nagaoka A, Yabe H, Nakamachi T, Shioda S, Dan T, Miyata T, Nishito Y, Suzuki K, Miyashita M, Tomoda T, Hikida T, Horiuchi J, Itokawa M, Arai M, Okado H. High-sucrose diets contribute to brain angiopathy with impaired glucose uptake and psychosis-related higher brain dysfunctions in mice. *Sci Adv.* 7(46):eabl6077, 2021.
6. 國井泰人、長岡敦子、日野瑞城、泉竜太、宍戸理紗、矢部博興「精神疾患ブレインバンクと死後脳研究の現在」*日本生物学的精神医学会誌* 32(4):179-185, 2021.
7. 長岡敦子、國井泰人、日野瑞城、泉竜太、宍戸理紗、齊ノ内信、柿田明美、矢部博興「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」*日本生物学的精神医学会誌* 32(4):186-190, 2021.
8. 長岡敦子、國井泰人、大沼裕美、日野瑞城、泉竜太、宍戸理紗、矢部博興「精神疾患ブレインバンクの現状と課題」.*精神科* 40(4)416-421, 2022.
2. 長岡敦子、國井泰人、日野瑞城、泉竜太、宍戸理紗、齊ノ内信、柿田明美、矢部博興；統合失調症病態におけるプロリン代謝経路分子の解析-死後脳研究, 第43回日本生物学的精神医学会, 京都, 2021/7/16.
3. 宍戸理紗、國井泰人、日野瑞城、長岡敦子、泉竜太、柿田明美、矢部博興；死後脳を用いた統合失調症脳病態のストレス・炎症関連分子による層別化の試み, 第43回日本生物学的精神医学会, 京都, 2021/7/16.
4. Shinobu Hirai, Hideki Miwa, Kunii Yasuto, Makoto Arai, Haruo Okado. High Sugar Diets Contribute to Brain Angiopathy with Impaired Glucose Logistics and Induce Psychosis-related Higher Brain Dysfunctions in Mice. 7th Congress of AsCNP, Singapore (virtual congress), 2021/10/22-23.
5. 平井 志伸、三輪 秀樹、國井 泰人、新井 誠、岡戸 晴生；栄養環境依存的な統合失調症モデルマウスの解析から得た、統合失調症『脳内エネルギー不全仮説』の提唱, 第16回日本統合失調症学会, 東京(web), 2022/3/21.

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。

2. 学会発表

1. 平井 志伸、三輪 秀樹、國井 泰人、新井 誠、岡戸 晴生；Glucose 取り込み低下を伴う脳毛細血管障害は新たな精神疾患の指標となりうるか, 第51回日本神経精神薬理学会, 京

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により、病態解明と効果的な治療法の開発を目指す。2021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、6-OHDAを用いて作製したパーキンソン病モデルマウスの神経活動を記録し、D1受容体ノックダウンマウスおよびD2受容体ノックアウトマウスとの比較を行い、パーキンソン病における大脳皮質-大脳基底核経路の情報伝達異常に、D1およびD2受容体がそれぞれどのように寄与するのかを考察した。

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、2021年度はD2Rノックダウンマウスの作製を待

つ間、6-OHDAを用いて作製したパーキンソン病モデルマウスの神経活動を記録し、D1RノックダウンマウスおよびD2Rノックアウトマウスとの比較を行い、パーキンソン病における大脳皮質-大脳基底核経路の情報伝達の異常に、D1RおよびD2Rがそれぞれどのように寄与するのかを考察した。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、内側前脳側に6-OHDAを投与した。2週間待ったのち、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した。マウス頭部を固定器具により無痛的にステレオ装置に固定し、大脳基底核ニューロンの活動を覚醒下で記録した。ドーパミン作動性ニューロンの主な投射先は、大脳基底核の入力部である線条体であり、線条体の直接路ニューロンはD1Rを、間接路ニューロンはD2Rを発現しているため、直接路ニューロンの投射先である淡蒼球内節(GPi)および間接路ニューロンの投射先である淡蒼球外節(GPe)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、D1Rノックダウンマ

ウス、D2R ノックアウトマウスと比較した。

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 GPi および GPe ニューロンはどちらも、大脳皮質の電気刺激に対して「早い興奮ー早い抑制ー遅い興奮」という3相性の応答を示す。PD マウスの GPi ニューロンでは、3相性の応答のうち抑制が消失し、2相性興奮の後に長い抑制が続くという応答様式が観察され、GPe ニューロンでは、遅い興奮が有意に増強されていた。GPi における抑制は直接路を介して伝達されることが示されているが、この皮質由来の抑制の消失は D1R ノックダウンマウスと共通しており、またどちらのマウスも自発運動量の低下を示した。これらのことから、PD における直接路を介する情報伝達の減弱は D1R を介する情報伝達の消失によるものであり、D1R を介する情報伝達は随意運動の遂行に必須であると考えられる。また、PD マウスの GPi で観察された2相性興奮の後に続く長い抑制は、D2R ノックダウンマウスで観察された3相性応答の後に続く長い抑制とよく似ており、D2R を介する情報伝達の消失に起因するものと考えられるが、この遅い長く続く抑制が PD における症状発現にどのように寄与するかは、今後の実験によって明らかにする必要がある。また、PD マウスの GPe ニューロンで観察された遅い興奮の増強も D2R ノックダウンマウスと共通していたことから、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。

D. 考察

線条体の直接路ニューロンは D1R を発現しており、GPi に投射することが知られている。D1R を介する情報伝達が消失すると、直接路を介する情報伝達が上手く行われなくなることが示唆された。直接路を介する情報伝達は、運動開始の情報を担っているため、PD では運動の開始が困難になる無動が生じると考えられる。一方、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 を介する情

報伝達が消失すると、間接路を介する情報伝達が増強され、GPe における遅い興奮の増強に至ったと考えられる。また、GPe から GPi へは直接の抑制性入力があることから、PD マウスおよび D2R ノックダウンマウスで観察された GPi における皮質由来の遅い長く続く抑制は、この増強された GPe の遅い興奮が引き起こした可能性がある。

E. 結論

PD における直接路を介する情報伝達の減弱は、主に D1R を介する情報伝達が消失したことに起因する。また、D2R を介する情報伝達の消失によって引き起こされた GPe の増強された遅い興奮が、GPi における遅い長く続く抑制を引き起こしている可能性があるが、この抑制が PD の症状発現にどのように寄与するかは、今後の実験によって明らかにする必要がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

本年度は論文発表に至りませんでした。

2. 学会発表

本年度は発表機会がありませんでした。

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

歯状回顆粒細胞の興奮性に対する diacylglycerol lipase alpha の役割の解明

研究代表者 菅谷 佑樹¹⁾
研究分担者氏名 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3年度はコンディショナルノックアウトマウスを作出し、DGL α を欠損した顆粒細胞の記憶課題中の活動をカルシウムイメージング法を用いて測定した。

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成績に変化が認め

られた。また、組織学的には DGL α が欠損した歯状回新生顆粒細胞の形態に粗大な異常は認められなかった。

これらの歯状回顆粒細胞選択的 DGL α 欠損マウスの歯状回顆粒細胞では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逆行性シナプス伝達抑制が欠如し、顆粒細胞からの入力に変化していると考えられる。そこで記憶課題中のこれらの細胞の活動の変化を明らかにするために DGL α が欠損した顆粒細胞にカルシウムセンサー GCaMP を発現するマウスを作出した。これらのマウスで記憶課題中の顆粒細胞のカルシウムイメージングを行うことで、DGL α が欠損し逆行性シナプス伝達抑制が行われない顆粒細胞の記憶課題中の活動を測定することができた。その結果、記憶課題中のカルシウムシグナルの振幅や頻度に大きな変化は認められなかった。現在、細胞の同期性等のより詳細な解析を行っている。

D. 考察

本研究の結果から、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。また、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行ったところ、カルシウムシグナルの振幅や頻度に大きな変化は認められなかった。これまでの研究からは、歯状回顆粒細胞、とくに成体神経新生により産生された新生顆粒細胞の活動が記憶の様々な過程に重要であることが明らかとなっている。今後は、DGL α が欠損した新生顆粒細胞の記憶課題中の活動のより詳細な解析を継続する予定である。

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、タウオパチーモデルマウス Tg601 の脳で見出された CTF (243aa-441aa) と類似する 236aa~243aa を N 末断端とする CTF が含まれていることがわかった。そこで、新たなタウオパチーモデルマウスとして Tau-CTF を発現するトランスジェニックマウスの作出を試み、解析を行った。また、タウオパチーモデルマウスを用いた *in vivo* 伝播モデルにおける TREM2 の役割を解明するために、ゲノム編集により TREM2 KO マウス、TREM2 R47H 点変異マウスを作出した。

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、伝播モデルの AD シードとした。EGFP-Tau または mCherry-Tau を発現させた SH-SY5Y 細胞に AD シードを導入することで、*in vitro* 伝播モデルを作製した。また、これらの AD シードを C57BL/6N マウスの脳にインジェクションすることで *in vivo* 伝播モデルの作製を試みた。

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 KO マウス、および 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ェニックの改変を行うことによ

り、Tau-CTF を過剰発現する Tau-CTF Tg マウスの作出を試みた。

C. 研究結果

1. AD 患者由来の AD シードを用いた *in vitro* 伝播モデルにおいても、リコンビナント Tau 凝集体を用いた場合と同様に、不溶性画分における EGFP-Tau、mCherry-Tau の増加が認められた。これらの AD シードを C57BL/6N マウスの脳にインジェクションすることで *in vivo* 伝播モデルの作製を試みたが、免疫染色およびウエスタンブロッティングによる検討の結果、内在性マウス Tau の凝集を確認することはできなかった。
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 蛋白単独あるいは 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、TREM2 KO マウスおよび TREM2 R47H ノックインマウスを作製し、ゲノム DNA のシーケンス解析の結果から、目的の欠失あるいは変異が確認できた 4 系統ずつを得た。各系統から骨髄由来マクロファージ (BMDM) を誘導し、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 TREM2 の発現検討を行った。その結果、TREM2 の発現が見られない系統を TREM2 KO マウスとして確立した。また、WT マウスとほぼ同等に TREM2 R47H を発現する系統を TREM2 R47H マウスとして確立した。TREM2 R47H マウスの
3. Tg601 マウスのトランスジーン上にあるヒト Tau 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 Tau 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改変が導入され、全長 Tau の cDNA が CTF の cDNA に置換されていることを確認した。また、マウス脳から RNA を抽出し、RT-PCR により Tau-CTF の cDNA が発現し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、Tg601 と比較して、Tau-CTF Tg では不溶性画分における全長 Tau の増加が認められたが、可溶性画分・不溶性画分ともに Tau-CTF に相当するバンドを検出することができなかった。

D. 考察

1. Tau を過剰発現させた SH-SY5Y 細胞を用いた *in vitro* 伝播モデルにおいては、AD 患者由来の不溶性画分が AD シードとして機能したことから、これらの AD シードをマウスの脳にインジェクションすることで *in vivo* 伝播モデルを作製できると考えられた。しかし、今回 C57BL/6N マウスを用いた *in vivo* モデルにおいては、内在性マウス Tau の凝集は観察できなかった。
2. Tau の伝播における TREM2 の役割を検討するために、TREM2 KO マウスおよび 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 Tau の凝集体や、ヒト AD シード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 Tau の伝播にどのような影響を与えるか検討する必要があるが、C57BL/6N マウスを用いた *in vivo* 伝播モデルの確立が困難であったことから、PS19 等の Tau オパチーモデルマウスとの交配が必要であると考えられた。
3. 今回作出された Tau-CTF Tg マウスにおいては、脳の不溶性画分において全長 Tau が増加していることが確認できたが、可溶性および不溶性の画分において Tau-CTF を検出することができなかった。したがって、本マウスの不溶性画分における全長 Tau の増加が Tau-CTF によるものかどうか不明である。

E. 結論

1. 今回作出した Tau-CTF 過剰発現マウスは、可溶性および不溶性画分における Tau-CTF そのものの発現を確認することができず、Tau オパチーモデルマウスとしては不適合であった。

2. 今回作出した TREM2 KO マウスおよび 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

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

研究代表者氏名 岡村 均¹⁾
研究分担者氏名 崎村 建司²⁾, 阿部 学²⁾, 笹岡 俊邦³⁾

- 1) 京都大学大学院薬学研究科・分子脳科学研究室
- 2) 新潟大学脳研究所・生命科学リソース研究センター・モデル動物開発分野
- 3) 新潟大学脳研究所・生命科学リソース研究センター・動物資源開発研究分野

研究要旨

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。朝起き、夜寝るのは、この環境周期に引き起こされる現象であると長らく信じられてきた。ところが、そうではなく、睡眠覚醒は、体内における時間装置である生体リズムシステムであることは、前世紀末に時計遺伝子 clock genes が発見されたことで決定的となった。通常の細胞にある一群の転写因子であるわずかな数の時計遺伝子は、数千もの遺伝子を周期的に発現させて、細胞周期、エネルギー代謝を時間的オーダーで管理している。すなわち、時を刻む時計遺伝子の時間装置は全身の細胞にあり（細胞時計）、生体リズムは全身の細胞で出現することがわかったのである。では、これまで生体リズムの発振中枢とされてきた視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus:SCN) の役割はどうしたのか？視交叉上核に存在する細胞間を伝達する細胞間伝達が鍵を握っていることが明らかになってきた。

A. 研究目的

視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: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。この小さな直径1mmにも満たない、左右の視神経が脳底で合流する視交叉直上に存在する神経核は、時計遺伝子が見つかった現在、たいした役割が無いのであろうか？しかし、1972年に発見された、「SCNを破壊すると、行動覚醒の概日リズムもホルモンの概日リズムも完全に止まる」という、SCNの生理学における実験を覆すことは無い。

実際、全くリズムの消失した全身の時計が止まっている時計遺伝子であるCry1とCry2の両者をCry-nullマウスに、野生型マウスのSCNを移植すると、24時間周期の行動リズムは回復する。すなわち、SCN以外の組織には時計が無いにもかかわらず、SCNの時計の24時間周期を回復するだけで、24時間の行動リズムが惹起されるのである。この

結果は、行動のリズムは全身の時計の時刻とは全く関係なく、SCNのみが行動リズムを24時間周期に調律していることを示している。

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、数カ月間、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のである。

SCNの時計と、その他の部位の時計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ン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唆している。

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、全身の細胞の時計を同期させるのである。

次に、SCN ではどのようにして、時が生まれるのであるのだろうか。今回は、10 年以上にわたる新潟大学脳研究所と取り組んで来た、遺伝子改変マウスによる、概日リズム発振系について述べる。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

我々は、時計のリズム位相を示すことのできる Per1-luc マウスより作成した SCN の各細胞の時の位相を、器官培養系であるスライスカルチャーの手法を用いて、空間的位置関係に着目して解析した。その検索の後、SCN-Gene project で、SCN に強く発現する遺伝子をノックアウトし、行動リズムをスクリーニングした。この時、各種明暗条件、時差条件も検索条件とした。

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

SCN スライスカルチャーにて、各時計細胞のリズムピーク位相が SCN 内の空間的位置により異なることが分かった。すなわち、背内側極のニューロン群の興奮は早く、SCN 本体のリズムより 4-8 時間先行し、そのリズムが徐々に中央に移り、最後に腹側、外側に放散した。従って、SCN 細胞の時刻位相は、はじめと終わりのものには、8-12 時間差がある。

SCN の Per1-luc スライスに TTX を投与しニュー

ロンの脱分極を止めると、SCN シングルセルレベルでの Per1-luc の振幅が減弱するとともに、細胞のリズム周期もバラバラで、多様なものとなった。これは、SCN 各細胞におけるリズム発振 (振幅、周期や位相決定) が単一の細胞だけで決まるのではなく、シナプス連絡を介する他細胞のリズムが関与することを強く示唆する。

具体的に何がリズム形成に関与するのかを検索するため、TTX の代わりに他の各種薬剤投与を行ったところ、百日咳毒素 (PTX) 投与を行った群において、TTX とほぼ同じ効果を認めた。すなわち投与後、SCN 全体のリズム振幅が減弱し、各細胞のリズム周期がバラバラとなったのである。これは、SCN 各細胞リズムの形成に重要な経路は、Gi/o タンパク質を介するシグナル伝達が重要であることを示唆している。

一般に、G タンパク質は GDP-GTP 交換反応により活性化となり、自身の GTPase 活性により不活性化型となるが、近年この GTPase 活性を制御する一群の RGS (Regulator of G-protein signaling) の存在が注目されている。SCN-Gene project で、SCN では RGS16 が非常に強く発現し、しかも強いリズムを描くことが判明した。この RGS16 は時計遺伝子の転写翻訳ループのポジティブ因子である Clock/Bmal1 ヘテロダイマーの刺激で朝に発現し、cAMP シグナルを朝のみ特異的に通す、言わば「目覚まし蛋白質」であることが解明された。

先に述べたように、SCN は全体として一つの統一されたリズム情報を発信している。RGS16 のノックアウトマウスでは、SCN の cAMP の 24 時間リズムが消失していた。cAMP の早朝の増大をアデニル・サイクレーズの阻害剤である THFA を脳室内に投与すると、行動周期が延長する。これは、RGS16 のノックアウトマウスも同様である。これは、cAMP の細胞間伝達による SCN の細胞間の同期が、SCN の自律的なリズム発振に必須であることを示している。

D. 考察

構造からみると、通常の脳の神経核と同様、SCN はニューロン、グリア、そして毛細血管からなる。SCN のニューロンの特徴は、小型で (脳内で最も小さい細胞の一つ)、1 万個の細胞が密に詰まっている (脳内で最も密な神経核の一つ)。また、

SCN のニューロンのほとんどは隣接する同じ神経核内のニューロンと相互に強固なシナプスを形成する局所ニューロンである。また、SCN のニューロンは、その周囲の大部分を薄いグリア細胞で覆われている。

また発生の視点から見ると、SCN 腹外側部の視交叉との接点に最も古いニューロンが位置し、そこから玉ねぎ状に新しいニューロンが追加されていく。最も新しいニューロンが第3脳室に接した SCN 最背内側に存在する。すなわち、ヘテロな細胞集団が強固な結合をする構造にこそ、そのリズム維持の秘密があるのではないかと。

昔からよく言われている視交叉上核のペプチド性神経伝達物質の分布は、この発生と良く相関している。すなわち、最も古いニューロンは VIP/GRP ニューロン、その周りの比較的新しいニューロンは Arginine vasopressin (AVP) 作動性で背内側に、最も新しいニューロンは AADC/AVP 作動性で背内側極の脳室近傍に、各々まとまって分布している。腹外側部からは背内側部に強力な投射があり、腹外側部と接する背内側部の境界領域に存在するソマトスタチン (SS) ニューロンは、腹外側部に投射し、核内で回路形成をしている。このような特徴的なペプチド性ニューロン間の SCN 内神経回路は、この神経核の統一的な 24 時間リズム発振が作り出す。

SCN への出入力も、この SCN 構造と相関している。SCN 腹外側部には、眼からと他の脳部位からの入力が集まる。この中で、網膜からのグルタミン酸作動性入力は、個体の生体リズムと外界明暗リズムとの同調を受け持つ重要なものである。また、体内の臓器の時間情報は、視床外側膝状体 NPY 情報、中脳縫線核セロトニン情報に変換され、やはり SCN 腹外側部に入力し、リズム位相の微調整を行う。SCN の出力は、その内側から外側部のものの主なものは、内側前視床下部野に、扇型に展開する。

今回の実験結果は、多様な細胞が密に相互作用する SCN の構造そのものが、SCN のリズム発振を支えている可能性を強く示している。近年、英国の Hastings らのグループは、SCN のアストロサイトにも時計発振能力があるとした。細胞間リズムを統合するミューチャルカップリングを引き起こす cAMP 伝達を支える構造として、ニューロン・

グリア結合は非常に注目される。

E. 結論

SCN 細胞は、TTFL をもって、数千個の独自のリズムを刻む細胞時計からなる。SCN が、細胞間リズムを統合する cAMP 伝達を支える構造は、安定した周期で、自律した振幅の大きい、ロバストなリズムを産生するのに、きわめて重要である。SCN は、近年急増している概日リズム異常性睡眠障害 Circadian rhythm sleep disorders のターゲットとして、注目されている。SCN は米粒よりも小さいが、いまだ謎の多い神経核であり、今後も、睡眠覚醒リズムの研究標的として注目される。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表
なし
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
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%と高頻度で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。我々は脳梗塞マウスモデルの確立が困難であったが、解決の糸口が見られたため、脳梗塞病変部位組織および腸管組織のRNAシーケンシング(RNA-seq)により発現変動遺伝子を網羅的に解析したところ、両組織での発現変化を認めた。今後は梗塞部位の細胞死と炎症の特徴について調べると共に、脳組織と腸管組織における遺伝子発現変化の関連について調べる方針に切り替えていく。

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わ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(%) = [虚血半球 - 対側半球] × 100 / 対側半球で計算した。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. 脳梗塞処置または偽処置C.B-17マウスの脳および腸管組織を摘出し、RNA laterで処理した後にRNAを抽出、ライブラリー調整、シーケンシングを行い、2群間の発現変動遺伝子について網羅的に解析した結果、発現に有意な変化を認めたが詳細は今後の検討である。

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。今後はBALB-cおよびC.B-17マウスの脳および腸管組織のシーケンシングを行い、発現変動遺伝子について解析を行っていく。腸内内容物については、現時点で変化を認めないが、合わせて検討を進めていく。

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、脳および腸管組織のシーケンシングを行い、発現変動遺伝子について解析を行っていく。腸内内容物については、DNAを抽出、細菌特有な16S V3-V4領域のライブラリー調整を行なっているが、現時点で変化を認めないが、合わせて検討を進めていく。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 1. 論文発表 なし

2. 学会発表（

1. Wakabayashi A, Nishiyama Y, et al.
Increased inflammatory cell death in intestinal epithelial cells by oral administration of aluminum salt as a food additive. 日本アレルギー学会 2021年10月 横浜
2. Wakabayashi A, Nishiyama Y, et al. An aluminum-containing food additive upregulates gene expression involved in inflammatory cell death in intestinal epithelial cells. 日本免疫学会 2021年12月 奈良

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⁾

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。HEK293 細胞を用い、高亜鉛 (ZnSO₄ 処置)、低亜鉛 (TPEN 処置) 状態または亜鉛正常 (ZnSO₄ 4 μM) の、細胞内ストレスが惹起される条件において、*miR-5572* 発現量を検討したところ、低亜鉛状態で有意な *miR-5572* 発現の上昇を確認した。併せて、小胞体ストレス誘導剤においても *miR-5572* 発現増加を確認した。さらに、*miR-5572* の mimic を導入した細胞において、TPEN 処置による細胞死がより増悪した。したがって、低亜鉛による小胞体ストレスを介した *miR-5572* 上昇が、低亜鉛による細胞死に関与することが示唆された。今後は、低亜鉛状態における *miR-5572* の発現増加と ALS 病態とのより詳細な関連性を明らかにすることが必要である。

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。今年度も、前年度から引き続き HEK293 細胞を用い、高亜鉛、低亜鉛状態における *miR-5572* の変動と、亜鉛恒常性への関与を検討した。

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 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に ZnSO₄ (4~100 μM) および亜鉛キレーターの TPEN (0~10 μM) および小胞体ストレス誘導剤のツニカマイシンを処置し、24~72 時間後の細胞内ストレスマーカーと *miR-5572* の発現量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。また、*miR-5572* mimic を HEK293 細胞に遺伝子導入し、TPEN 処置後 24 時間後の細胞生存率を WST-8 assay で検討した。

C. 研究結果

HEK293 細胞に ZnSO₄ 処置をしたところ、酸化ストレスマーカー遺伝子の発現には変化は認められなかった (Fig. 1)。一方、小胞体ストレスマーカー遺伝子変化については、ZnSO₄ 100 μM 48 時間処置において BIP の発現上昇が確認された (Fig. 2)。miR-5572 発現は、今回の ZnSO₄ 処置では変化は認められなかった (Fig. 3)。

TPEN 処置では、酸化ストレスマーカー遺伝子の上昇が確認されたが、HO-1 のみ TPEN 10 μM の 24 時間処置で有意に低下した (Fig. 4)。小胞体ストレスマーカー遺伝子は、TPEN 処置に関わらず、低亜鉛条件で有意に上昇した (Fig. 5)。miR-5572 についても、TPEN 処置に関わらず、低亜鉛条件で有意に上昇した (Fig. 6)。

小胞体ストレス誘導剤のツニカマイシンでも miR-5572 発現量の有意な上昇を確認した (Fig. 7)。最後に、低亜鉛による影響に miR-5572 の関与を検討するために、miR-5572 の mimic を導入した細胞において、TPEN 処置による細胞死を検討したところ、miR-5572 mimic により TPEN による細胞生存率の低下が確認された (Fig. 8)。

D. 考察

低亜鉛による小胞体ストレスを介した miR-5572 上昇が、低亜鉛による細胞死に関与することが示唆された。今後は、今回の低亜鉛の条件における ALS 病態と miR-5572 との関連性を検討する必要がある。

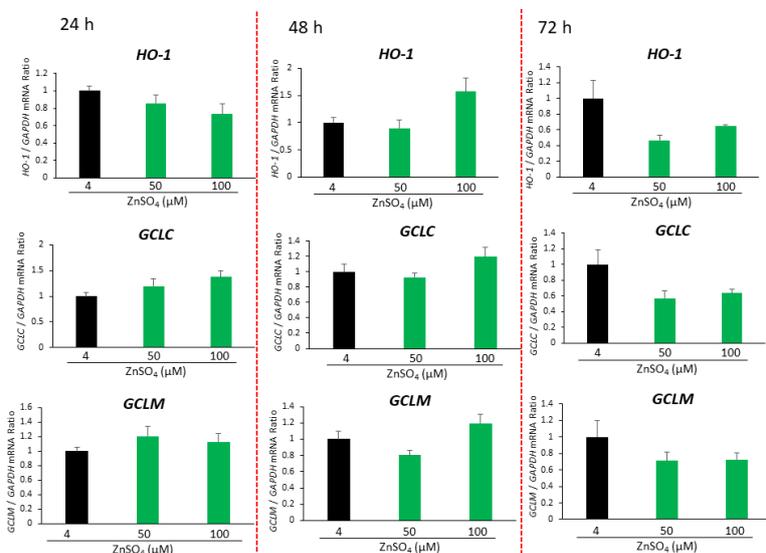


Figure 1. 高Zn条件における酸化ストレスマーカーの変化

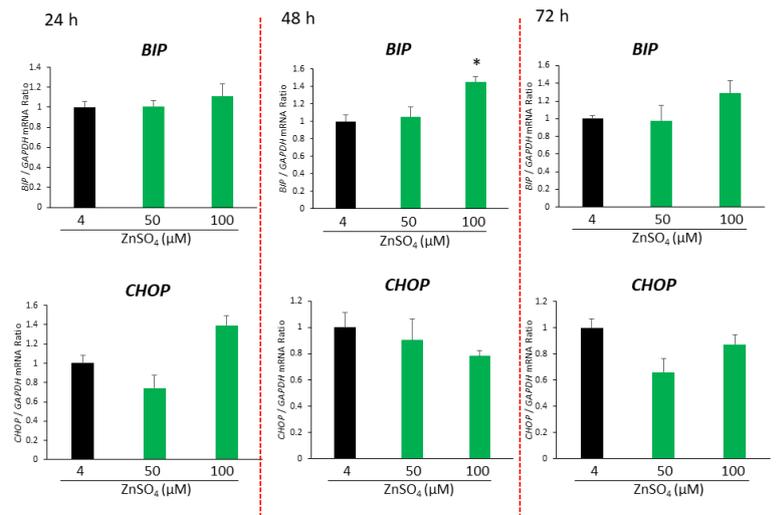


Figure 2. 高Zn条件における小胞体ストレスマーカーの変化

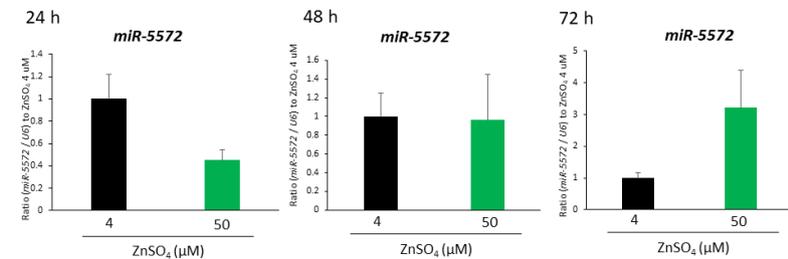


Figure 3. 高Zn条件におけるmiR-5572の変化

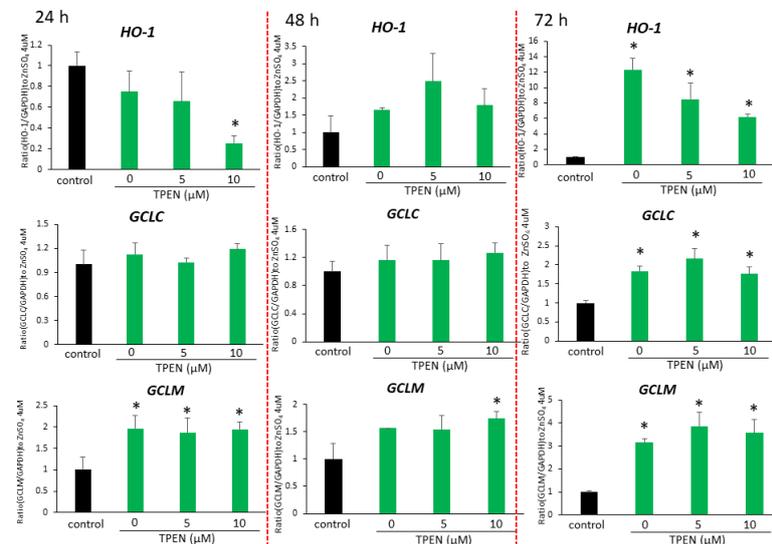


Figure 4. 低Zn条件における酸化ストレスマーカーの変化

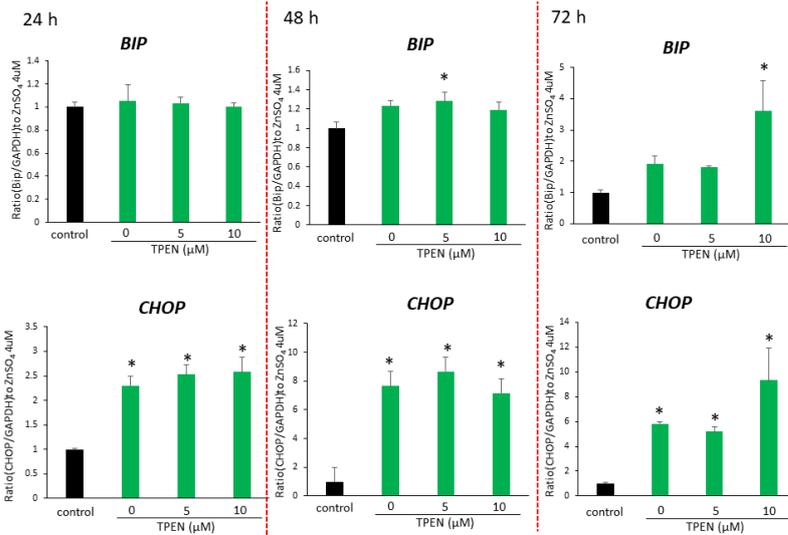


Figure 5. 低Zn条件における小胞体ストレスマーカーの変化

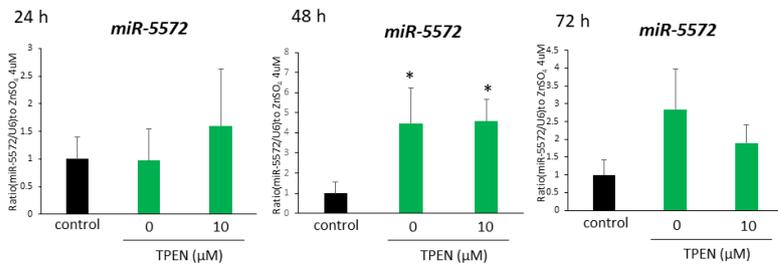


Figure 6. 低Zn条件におけるmiR-5572の変化

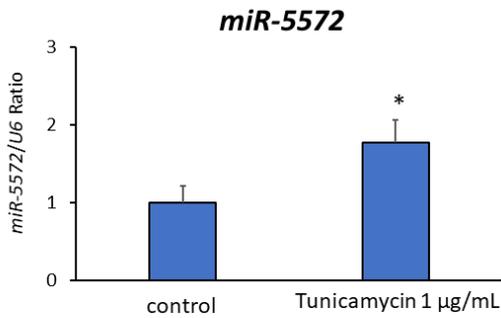


Figure 7. 小胞体ストレスによるmiR-5572の変動

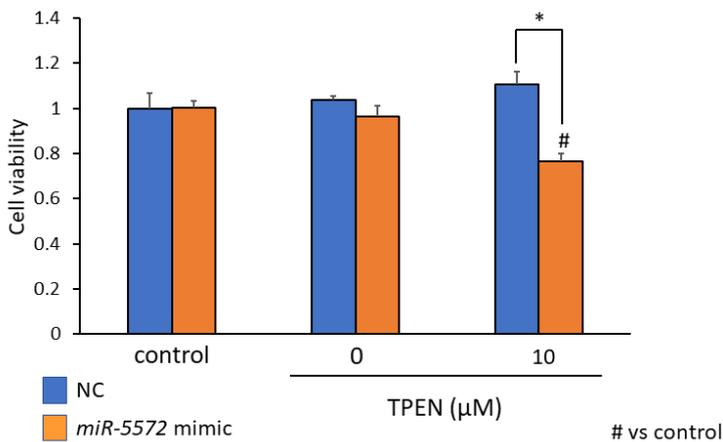


Figure 8. miR-5572の低Znによる細胞死との関連

E. 結論

細胞内低亜鉛状態による細胞死について小胞体ストレスによる *miR-5572* 上昇が関与する可能性が示された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

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

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⁾, 原 範和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781例におけるHCNP前駆体遺伝子レアバリエントの検索を行った。病理学的にGlobular glial tauopathy (GGT) type IIと診断された76才女性においてExon 2にPro 71 Leuアミノ酸変異を伴うレアバリエントを確認した。

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781例のHCNP前駆体遺伝子レアバリエントの検索を行う。

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染色体DNA全シーケンス解析データを用い、HCNP前駆体遺伝子のExon1, 2, 3, 4のエクソーム解析にて①アレル頻度5%未満、②アミノ酸変異を伴うレアバリエントは抽出し、サンガー法にて最終的に変異を確認する。

C. 研究結果

今回調べられた範囲では、76才女性 舞踏病様運動を伴う筋委縮性側索症と臨床診断され、病理学的にはGlobular glial tauopathy (GGT) type IIと診断された症例において、Exon2 Pro 71 Leuへのアミノ酸変異を伴う212 C>Tレアバリエントを確認した。

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。今回確認されたレアバリエントは非常に確認される頻度は低い。GGTにおける病的意義について、更に検討する必要がある。また今後、PART患者脳に視点を移して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。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

- 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.
- 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.

3. Kondo-Takuma Y et al., Reduction of acetylcholine in the hippocampus of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein knockout mice. Sci Rep. 2021;11(1):22072

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

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

研究代表者氏名 渡部 和彦¹⁾
研究分担者氏名 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、ヒト剖検例と比較検討することにより、ALS を含む神経変性疾患に対する新規治療法の開発を目指している。今年度は、PJA1 が他の神経変性疾患関連分子の凝集を抑制しうるかを検討した。

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正常または変異 ALS 関連分子 fused in sarcoma (FUS), superoxide dismutase 1 (SOD1), Parkinson 病 (PD) 関連分子 α -synuclein, Huntington 病 (HD) 関連分子 huntingtin, Machado-Joseph 病 (MJD) 関連分子 ataxin 3 を各々発現する組換えアデノウイルスと PJA1 発現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 PJA1 の各分子に対する結合および凝集体形成抑制効果を共免疫沈降、ウェスタンブロットで解析した。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、正常および各種神経疾患脳における PJA1 の発現を免疫組織化学的に検討した。

C. 研究結果

PJA1はTDP-43のほかにFUS, SOD1, α -synucleinにも結合し凝集体形成を抑制した。ごく最近PJA1が ataxin 3, huntingtin にも結合し凝集体形成を抑制することが報告されており(Ghosh et al., 2021), 我々も本実験系で確認した。一方, PJA1はヒト脳では主に神経細胞に豊富に存在したが, SOD1-ALSの hyalin inclusion やPDの Lewy 小体, HDの核内封入体はいずれもPJA1免疫染色陰性で, MJDのみ核内封入体が一部陽性に染色された。

D. 考察

PJA1は種々の神経変性疾患関連分子に結合しその凝集を抑制することがわかった。すなわちPJA1は神経変性疾患全般の治療に関わる極めて重要なターゲット分子のひとつであると考えられた。

E. 結論

培養ラット神経幹細胞株1464R由来分化ニューロンに神経変性疾患関連分子を発現する組換えアデノウイルスとPJA1発現ウイルスを共感染させたところ, PJA1はTDP-43, FUS, SOD1, α -synuclein, huntingtin, ataxin-3に結合しこれら蛋白質の凝集体形成を抑制することがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 渡部和彦, 加藤陽一郎, 村田麻喜子, 新井田素子, 他田真理, 柿田明美, 柴田亮行. Praja1, ZNF179 ユビキチンリガーゼのTDP-43凝集体形成抑制効果. 第62回日本神経学会学術大会(京都), 2021年5月21日.
- 2) 渡部和彦, 加藤陽一郎, 村田麻喜子, 新井田素子, 他田真理, 柿田明美, 柴田亮行. Praja1, ZNF179 ユビキチンリガーゼのTDP-43凝集体形成抑制効果. 第62回日本神経病理学会総会学術研究会(東京, WEB開催), 2021年5月28日.
- 3) 新井田素子, 須藤則宏, 塚原富士子, 渡部和彦, 柴田亮行. ミクログリアにおける家族性ALS変異SOD1蛋白分解機構の解明. 第62回日本神経病理学会総会学術研究会(東京, WEB開催), 2021年5月28日.
- 4) 渡部和彦, 加藤陽一郎, 村田麻喜子, 新井田素子, 他田真理, 柿田明美, 柴田亮行. Praja1, ZNF179 E3 ユビキチンリガーゼのTDP-43凝集体

形成抑制効果. 第43回日本神経科学大会(神戸), 2021年7月31日.

- 5) 渡部和彦. 培養神経変性疾患モデルにおける蛋白質凝集とその抑制. 第43回神経組織培養研究会(吹田), 2021年11月6日

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

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

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

脳神経外科における顕微鏡手術に関して、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、顕微鏡手術映像を分析することにより、外科手術の命題である‘安全
性の担保’の本質に定量的に迫ることであり、新しい外科研究概念を提唱・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、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。現在も、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などを内在し、患者の Quality of life にも多大な影響を与えるものでもある。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ることが指摘されている。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った。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 17 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=5) 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解析 (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、映像倍率が変化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。

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 症例に一過性嘔声認められていた。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%) を有害イベント発生症例とした。

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 2219 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 253.1 ± 162.9 、intermediate 群で 351.2 ± 269.0 、novice 群で 424.5 ± 297.3 mm/s² であり、各群で有意な差を認めた ($p<0.01$)。有害イベント発生例と非発生例を比較すると、各症例における MAX-A の平均値は、有害イベント発生例で有意に高かった (420.2 ± 156.8 vs 304.8 ± 104.4 , $p<0.01$)。

エラー分析に用いるプラークの加速度閾値は 450.4 mm/s² と算出された。これを上回るエラー試技は、術者群別には、1 症例につき expert 群で

5%、intermediate 群で 19%、novice 群で 37%であった ($p<0.01$)。

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 ($p<0.05$) と current smoker 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 ($p<0.01$) 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
なし

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が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算出した。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検討した。

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。視覚刺激として、1秒間に10回反転する反転刺激を用いた。また、本実験の補足となる追加の行動実験を実施した。実験参加者は、自己開始運動の実施とその意図の知覚の研究において従来用いられている実験パラダイムで呈示される時計状の刺激を呈示する条件と、注視点のみ呈示し視覚刺激を呈示しない条件において、自己開始運動を行った。両条件を比較した場合に、運動が発生するまでの時間に違いがあるかどうかを検討した。

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かな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定す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参加者と短い参加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1つめの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って生じているというよりは、感覚野までも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

- 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

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 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。本研究所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、ペナンブ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。また本共同研究において、マウスを用いた中大脳動脈永久閉塞モデルに対して阻害剤-Aの吸入投与による脳梗塞抑制効果が確認された。本研究では引き続き、阻害剤-Aの気体成分による神経細胞死抑制効果を検証する。

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ウェルプレートに僅かに滴下したのものでも、最も対極側の細胞に作用し細胞死を抑制した。阻害剤-Aの気化成分についてGC-MSで分析を行ったところ、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。

本研究はまず、質量分析を中心とした解析を行い、阻害剤-Aの物理的・化学的性質の詳細を明らかにする。また、培養神経細胞を用いた解析を行い、フェロトーシスにみられる活性酸素発現や脂質過酸化連鎖を解析する。

マウス中大脳動脈永久閉塞モデルによる解析を継続して行い、気化させる阻害剤-Aの濃度や吸入方法を検討する。また本共同研究では、金澤博士の指導のもとマウスで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。

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、毒性試験などを行う。

C. 研究結果

阻害剤-Aの気化成分についてはGC-MSで分析を行い、Aが変化することなく揮発していることが分かった。また気化成分が離れた場所の水系に再び溶けだすことを確認し、LC-MSによる分析を進めている。

マウス HT22 培養神経細胞を用いて、グルタミン酸刺激によるオキシトシスの誘導実験を行った結果、揮発した阻害剤-Aによって完全に細胞死が阻害された。蛍光プローブで活性酸素種や脂質過酸化といった指標を解析し、時間や程度は異なるもののフェロトシス同様の機序が働くことが確認された。

マウス虚血モデルによる検証では、自然揮発の条件でも濃度依存的に阻害剤-A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、マウスで安定作成することができず検証まで至っていない。今後は虚血モデル作成を継続するだけでなく、種々の脳神経疾患における解析を進めることで、阻害剤-Aがフェロトシスに留まらず汎用性の高い脳保護薬になりうるかを検討する。

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

1) Mizuno H, Kanazawa M, Torii S, et al., in submission.

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

1) 国内出願 2020年10月1日

2) 国際出願(PCT) 2021年10月1日

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

研究代表者氏名 片野 泰代¹⁾
研究分担者氏名 阿部 学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、低閾値刺激を高閾値刺激として投射する神経回路が形成され、アロディニアが発症すると考えられる。我々は本病態に関与する分子 **BEGAIN** を同定し、その欠損マウスではアロディニアが抑制されることを明らかにしてきた。今年度、**BEGAIN**-欠損マウスでは、アロディニア誘発時に野生型マウスより多くの抑制性ニューロンの活性化が生じることを明らかにした。さらに本研究課題内で作成した **BEGAIN-Cre**-ドライバーマウスを用い、脊髄後角の **BEGAIN** 陽性細胞中における解析を実施した。結果、非侵害性の刺激による活性化ニューロン数は、無処置群と神経障害性疼痛群で有意差を認めなかった。このことから、**BEGAIN** の欠損は、**BEGAIN** 陽性細胞により形成される神経回路以外へも広く作用し、アロディニアの抑制に寄与することが示唆された。

A. 研究目的

神経障害性疼痛では、非侵害性の刺激を激しい痛みと感じる異常感覚である「アロディニア」が生じる。この病態には、中枢神経系での病態依存的な神経回路の形成が考えられる。しかしながら、この可塑的変化の機序は完全には明らかにされていない。

末梢から脊髄後角への一次求心性線維の入力は、侵害性は浅層、非侵害性は深層と異なる層へ入力する。我々はこれまでの解析から浅層に局限して発現するタンパク質 **BEGAIN** を見出し、神経障害性疼痛の新規関連分子であることを同定した。しかしながら、この **BEGAIN** の分子機能は未だ不明であり、病態依存的に形成される脊髄内神経回路への関与もわかっていない。これらの背景から、**BEGAIN** がアロディニア発症時に活性化する神経細胞群に与える影響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)

野生型および **BEGAIN-KO** マウスで神経障害性疼痛モデルマウスを作成し、非侵害性の刺激を加えることでアロディニアを誘発する。その後還流固定を行い、免疫染色を実施した。さらにこれらの解析は、新潟大学脳研究所との共同研究・支援を受けて作成した **BEGAIN-Cre** ドライバーマウスと新潟大学脳研究所より供与をうけた **CAGfS-tdTomato/R26** レポーターマウスを交配することで **BEGAIN** 陽性細胞を脊髄後角で可視化したマウスでも実施した。

C. 研究結果

神経細胞の活性化を **cFos** 陽性を指標に評価し、野生型と **BEGAIN-KO** 間でのアロディニア依存的に活性化するニューロン数の解析を実施した。その結果、野生型マウスに比べ **BEGAIN-KO** マウスでより多くの活性化ニューロンが検出された。また **Pax2** 陽性の抑制性ニューロンで、その

差がより顕著であることがわかった。その一方で、BEGAIN 陽性ニューロン内での触刺激による活性化抑制ニューロンの数は、無処置群と神経障害性疼痛モデル群で差がないことがわかった。

D. 考察

BEGAIN 陽性ニューロンは、健常時にも脊髄内神経ネットワークに作用する一方で、病態依存的に形成される回路にも関わることが示された。そして病態依存的な条件下で、脊髄内の抑制性の神経回路に作用することで、アロディニアの発症に関わる可能性が示唆された。これらがBEGAIN-KO でアロディニアが抑制されることの説明になると考えられる。

E. 結論

BEGAIN-KO では病態時に、抑制性のニューロンの活性化を促進し、病態依存的な脊髄内神経回路の形成に関わる。

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. Katano, T., Abe, M., Watanabe, M., Sakimura, K. and Kobayashi, T.

Comparative analyses of neuronal activation in the spinal dorsal horn for mechanical allodynia after Spared nerve injury between wild-type and BEGAIN-knockout mice.

The 1st CJK international Meeting / 第43回日本神経科学大会, 神戸, 2021年7月28-31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が検討することがこの研究の目的である。今回大学でFDG-PETを行った後に側頭葉切除を施行した14例で検討した。14例中9例は頭蓋内電極留置をせずに一期的に側頭葉切除術を行い、全例術後短期間ではあるが発作は消失した。また9例中4例は当院でのMRI検査で病変が認められず、FDG-PETで側頭葉内側の糖代謝が認められたもので、FDG-PETの有用性を示すものであった。今後高密度脳波計検査の結果、3T-MRIの結果についても検討し、これらmultimodalityを用いた術前評価が側頭葉てんかんの術後の発作予後向上に貢献するかどうか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2022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26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、FDG-PET のみの検査を施行した症例が 17 例であった。高密度脳波計検査は大学の検査科の都合で、2021 年度は施行できず、9 例のままであり、解析についてもまだ進んでいない。今回は大学で FDG-PET 検査を行った側頭葉てんかん 17 例で検討した。

17 例中すでに手術が行われたのが 14 例で、14 例中 5 例は頭蓋内電極を留置した後に側頭葉切除術を施行し、残りの 9 例は、電極留置をスキップして、側頭葉切除術を行った。

一期的に手術を施行したこの 9 例中 4 例は、いわゆる non-lesional の症例で、当院での MRI, SPECT 検査などの画像検査や、その他の術前評価においても側頭葉てんかんの側方性がはっきりしなかった症例で、大学での 3T-MRI, FDG-PET の追加検査によって、側方性が確実となり、電極留置をせずに切除できた症例であった。さらに、これら 4 例は術後観察期間が短い症例も含まれているが、今のところ全例発作は消失している。

また、9 例中 5 例は当院での画像評価において、海馬硬化所見が認められた症例が 4 例、髄膜腫摘出後で右側頭葉に外傷性変化が認められた lesional の症例であった。しかし、これらの症例でも FDG-PET の追加検査で焦点側の側頭葉内側での糖代謝低下が認められており、側方性を確信する上で有用な情報になった。これら 5 例も今のところ術後発作は消失している。

電極留置を行った 5 例では、1 例のみ術後発作は消失し、1 例は意識減損を伴わない発作が残存、残りの 3 例は意識減損発作が残存している。発作が消失した 1 例は FDG-PET で切除された側の側頭葉内側での糖代謝低下があり、発作が残存している 1 例でも切除側の左側頭葉先端部での糖代謝低下所見はあったが、左前頭葉にも広がっていたため、焦点が完全に切除できていない可能性がある。残りの 3 例は FDG-PET では陽性所見ははっきりせず、このうち 2 例は両側性の側頭葉てんかんが疑われた。

D. 考察

今回の側頭葉てんかんにおける FDG-PET 検査は、lesional な症例では側方性を確認する上で、また non-lesional な症例では、電極留置をせずに一期的に側頭葉切除が可能であった。また FDG-PET 検

査で陽性である側頭葉てんかんに対する切除術の発作予後においても、まだ術後短期間の観察期間ではあるが良好であった。

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においては、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。しかし、FDG-PET による糖代謝低下の範囲が側頭葉以外にも広がっている症例では、切除範囲を決定するのが困難である。術後発作が残存している 1 例でも、前頭葉まで糖代謝低下の範囲が広がっていたが、硬膜下電極記録の所見から、側頭葉先端部、内側部のみの切除に留めたものの、術後発作は残存した。

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。今回の症例でも、FDG-PET で明らかな陽性所見が得られなかった症例で、高密度脳波計検査で焦点の絞り込みが可能であれば、側頭葉てんかんの術後の予後にも寄与できると思われる。

今後は高密度脳波計検査の解析も進め、FDG-PET 所見、3T-MRI 所見との関係、手術症例においては予後との関係を検討し、multimodality を用いた術前評価が、側頭葉てんかんの手術の成績向上にどれだけ関与できるかを解明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. Yosuke Ito, Masafumi Fukuda, Hitoshi Matsuzawa, Hiroshi Masuda, Yu Kobayashi, Naoya Hasegawa, Hiroki Kitaura, Akiyoshi Kakita, Yukihiro Fujii: Deep learning-based diagnosis of temporal

lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis: An MRI study. Epilepsy Res 178:106815, 2021

2. Hiroki Kitaura, Tetsuya Hiraishi, Yosuke Itoh, Makoto Oishi, Yukihiro Fujii, Masafumi Fukuda, Akiyoshi Kakita: Reactive astrocytes contribute to epileptogenesis in patients with cavernous angioma. Epilepsy Res, 176: 106732, 2021
3. 福多真史: てんかん重積の評価 特集「脳神経画像 Critical findings」 おさえておきたい症状と CT/MRI 画像所見. 脳神経外科 49 (2): 335-341, 2021

2. 学会発表

1. 第 45 回日本てんかん外科学会 (2022 年 1 月 27 日～28 日, 大阪, ハイブリッド開催)
Trans-T3 による側頭葉内側病変へのアプローチ
福多真史, 伊藤陽祐, 増田浩, 白水洋史, 太田智慶, 藤井幸彦
2. 第 45 回日本てんかん外科学会 (2022 年 1 月 27 日～28 日, 大阪, ハイブリッド開催)
内側側頭葉てんかんに対する Trans T3 approach での側頭筋切開の工夫
伊藤陽祐, 福多真史, 増田浩, 太田智慶, 藤井幸彦

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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が知られており、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についての解明を目指した。

2020 年度の成果として新潟大学脳研究所が保有する J-ADNI のエクソームデータから選出した2つの MAPs レアバリエーションを有するリコンビナント MAP2 の高度精製を行い、機能および凝集への影響について解析した。また、MAP2 機能欠損モデルとして MAP2-KO マウスの機能及び形態解析を行った。MAP2WT、tau-KO、MAP2-KO、double-KO マウス (n=4) の脳幹より精製した total RNA をもとに RNA-seq 解析を行った。得られたデータベースについての主成分分析、および組織病理学的検討から double-KO マウスの表現型についての解析を進めた。

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明確な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 欠損でそれぞれ特徴的な表現型が確認されている。とくに MAP2 欠損 (MAP2-KO) マウスの解析から、生体の機械的刺激受容にかかわる機能に障害が起こることを見出している。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 の加算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ものである。はじめに2020 年度に同定した複数の MAP2 レアバリエーションについて、MAP2 のタンパク質機能に対する影響について検証した。さらに解析中の tau/MAP2 欠損 (double-KO) マウスの表現型を説明すべくメカニズムの解明を目指した RNA-seq による発現解析を行った。同時に行った組織学的解析とともにタウ欠損、および MAP2 欠損が神経機能に与える影響について検証した。

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 ゲノムサンプルより得られたバリエーション情報をもとに、同志社大学にて変異型リコンビナント MAP2 を精製した。2020 年度に達成した精製度では精密な機能解析に至らないと判断したため、さらに精製度の向上を目指し、逆相 HPLC での精製を行った。これにより 95% 以上高純度のリコンビナント MAP2 の精製に成功した。

各種リコンビナント MAP2 について *in vitro* tubulin polymerization assay (Cytoskeleton Inc) を行った。既報に従い、精製チューブリンと MAP2 を混和し、37° C で加温、経時的な微小管の形成についてプローブの蛍光で解析した。さらに重合反応後の微小管について遠心分離し、SDS-PAGE により定量した。

精製リコンビナント MAP2 タンパク質について、ヘパリンによる *in vitro* 凝集解析を行った。規定濃度の各種 MAP2 に対し、Thioflavin-T およびヘパリンを添加し、37° C での経時的なタンパク質凝集について評価した。168 時間のインキュベーション後、1% Sarkosyl 含有バッファーで処理した後、遠心分離することにより凝集した MAP2 について分画した。得られた不溶性画分について SDS-PAGE を行い、凝集 MAP2 について定量した。

MAP2-KO マウスで認められる聴覚障害の病理解析を目的に蝸牛のホールマウント染色を試みた。マウスを灌流固定し、蝸牛を含む側頭骨を採取した。後固定後、脱灰した後に実体顕微鏡下で蝸牛から内有毛細胞、外有毛細胞を含む部位について頂部、中部、基底部分けて採取した。得られた標本について、ホールマウント免疫染色を試みた。また、出産直後の WT, tau-KO, MAP2-KO, double-KO マウスより脳幹ピブラトーム切片を作成し、抗 c-fos 抗体、抗 oxytocin 抗体を用いた免疫染色を行った。染色結果については共焦点顕微鏡で解

析し、ImageJ をもちいて定量化した。

本研究は同志社大学動物実験委員会 (A21039 号) および同志社大学組換え DNA 実験安全管理委員会 (D21028 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、2つの注目すべき MAP2 遺伝子のバリエーション (X, Y) を同定した。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。

得られたバリエーション X, Y の MAP2 機能への影響について検証する目的で、リコンビナント MAP2 を精製し、チューブリン重合促進活性について検証した。その結果、バリエーション X については野性型に比べて有意に微小管重合活性は低下していた。これより、X を含む領域が微小管重合促進に必須であること、このレアバリエーションは MAP2 タンパク質に対して重大な機能障害を引き起こすことが明らかとなった。

これまでの解析から Tau-KO 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。一方、同志社大学による先行研究において、MAP2-KO マウスにおける特徴的な聴覚障害が認められている。ABR 解析の結果からこの機能障害の責任病巣がコルチ器における感覚受容の低下の可能性が疑われている。MAP2 欠損によるコルチ器発生障害の有無について解析する目的で、蝸牛のホールマウント染色法についての確立を試みた。現在、マウス蝸牛のホールマウント標本の作製、および免疫組織染色のための条件検討を終えており、今後蝸牛各部位における有毛細胞の形成、有毛細胞における MAP2 の局在解析、感覚毛の形態解析を進める予定である。

Tau-KO と MAP2-KO の交配により産生された double-KO マウスは、目立った脳の形態形成異常は認められなかったものの、雌マウスにおいて出産後の育児行動に障害が認められた。はじめに double-KO マウスの発現異常について解析する

目的で WT, tau-KO, MAP2-KO, double-KO より調製した RNA をもちいた RNA-seq 解析を行った。その結果、double-KO マウスでは tau-KO, MAP2-KO で認められた発現異常が加算的に起きていることが明らかとなった。さらに、double-KO マウスの行動障害についてオキシトシンの分泌能の異常が想定されたため、周産期におけるオキシトシンの投与を行った。その結果、オキシトシンの経鼻与党により double-KO マウスの育児行動に有意な改善が認められた。さらに上記4系統のマウスを対象にオキシトシン分泌神経細胞の機能について免疫組織学的解析を行った。その結果、MAP2-KO マウスでは c-fos で検出されるオキシトシン神経細胞の発火が低下すること、tau-KO マウスではオキシトシン分泌能の低下に起因すると思われる細胞体におけるオキシトシンの滞留が認められた。さらに double-KO では双方の異常が認められ、tau および MAP2 それぞれの欠損による表現型の加算が double-KO マウスにおけるオキシトシン分泌障害に繋がっている可能性を見出した。

D. 考察

2021 年度成果として、実際に臨床 WES データの解析から見出したレアバリエントについてタンパク質の機能解析を行い、機能低下に繋がる候補を同定した。この成果はまさに発案当初目指していた「エクソームデータからタンパク質の機能異常同定に至るモデルケース」を体現したものであり、本研究戦略の今後の発展性を示すとともに、本研究戦略についての概念実証に至ったと考えている。さらに、用いるデータベースを拡張することで、新たなレアバリエントの同定と機能解析が可能と考えている。また、tau-KO, MAP2-KO およびその交配による double-KO マウスについての解析から、少なくとも tau と MAP2 についてその表現型は独立したものであり、それぞれの表現型は加算的に出現しうることを明らかとした。Tau と MAP2 は脊椎動物の出現から遺伝子重複により生じたパラログとされている。得られた結果から、一般的に想定される直接的な機能相補とは異なり、それぞれの遺伝子産物が独自に機能するなかで、特定の生理機能に対して間接的に機能補完している一例と考えている。

E. 結論

データベースから同定した MAP2 レアバリエントの一部について、確かに機能障害にかかわることを明らかとした。また、tau および MAP2 欠損の影響は独立したものであるにもかかわらず、両事象が重なる場合新たな生理機能障害を呈する可能性があることを見出した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表
現在準備中。
2. 学会発表
現在準備中。

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。

神経回路精緻化メカニズムの遺伝学的解析

研究代表者 岩里 琢治¹⁾ 2)
研究分担者 笹岡 俊邦³⁾，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

哺乳類の感覚系神経回路は、胎児期の後期から子供の時期にかけての発達期に、自発活動や感覚入力などの神経活動の影響を受け精緻化されることによって成熟する。モデル動物であ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メカニズム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伝達と処理を行う体性感覚系の三叉神経経路をモデルとして、マウス遺伝学的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。本研究課題では、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

ヒトを含む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、ゲノムにコードされた遺伝情報だけでは不十分であり、それに加えて、胎児期の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を受けることにより精緻化されることが重要である。モデル動物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、マウス遺伝学的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 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) の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いる。

B.研究方法 (倫理面への配慮を含む)

げっ歯類 (マウス、ラット) 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層にそれぞれパレレット、パレロイド、パレルとよばれる、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 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。さらに、変異マウスにおけるヒゲから大脳皮質への情報伝達様式の変化をみるために神経活動マーカーである c-Fos の免疫組織化学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

Cre 組換え酵素を脳幹特異的に発現するトランスジェニックマウスと 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、一系統の脳幹特異的 NR1 欠損マウスにおいて、脳幹のバレレットが形成されないこと、それにもかかわらず、視床のバレロイド、大脳皮質のバレルは一定レベルで形成されることを、昨年度までの研究で明らかにしていた。また、この表現型は脳幹での組換え効率が高くないことが原因であり、別の種類の脳幹特異的 Cre マウスを組合わせて脳幹でのノックアウトの効率をあげることにより表現型が重篤になることも見出していた。

本年度はこれらの二種類の脳幹特異的 NR1 ノックアウトマウスの脳幹、視床、大脳皮質において、様々なマーカーを用いた免疫染色などにより回路精緻化の異常に関する詳細な解析を行った。さらに、それぞれの染色でサンプル数を増やすことにより、定量的な解析のための準備を行った。また、上述の二種類の脳幹特異的 NR1 欠損マウスでヒゲからの情報がどのように大脳皮質バレル野に伝達されるかを、機能的に調べる実験を行った。具体的には、成体まで成長したマウスを用いて、少数のヒゲだけを残して残りは刈り取ったのち、enriched environment に置くことによりヒゲの刺激を行い、その後、大脳皮質サンプルを調製し、神経活動マーカーである c-Fos に対する免疫染色を行った。コントロールマウスでは残っているヒゲに対応するバレルに局限して強い c-Fos の染色が検出された。一方、脳幹特異的 NR1 欠損マウスでは広い領域で染色がみられ、ヒゲから大脳皮質への経路の精緻化に異常がみられることが機能的にも検出された。今後はサンプル数を増やして定量的な解析を行う予定である。

最初にあげた脳幹特異的 NR1 ノックアウトマウス系統で、バレレットは検出されないにも関わらず、バレロイドやバレルが一定レベルで形成される理由として、視床の NMDA 受容体の役割を考え、それを検証する実験を行った。具体的には、我々が以前に作製した視床特異的 Cre マウスを組合わせることにより、脳幹と視床の両方で NMDA 受容体の機能を欠損させ、そのマウスでの表現型の解析を行った。今後は、サンプル数を増やして定量解析を行い、今年度中に論

文を完成させる予定である。

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ご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

1. 論文発表

1. Kohei MIURA, Takashi KOBAYASHI, Zhengkun ZHANG, Pankaj PRASOON, Yuki HIROSE, Hirosuke ISHIKAWA, Kazuyasu TAKIZAWA, Jun SAKATA, Shiori MIURA, Toshikuni SASAOKA, Toshifumi WAKAI: Establishment of a long-term survival swine model for observation of transplanted islets: A preliminary step in an allogeneic transplant experiment. *Transplant Proc* 2022 Mar;54(2):507-512.
2. Hidekazu SOTOYAMA, Hiroyoshi INABA, Yuriko IWAKURA, Hisaaki NAMBA, Nobuyuki TAKEI, Toshikuni SASAOKA, Hiroyuki NAWA : The dual role of dopamine in the modulation of information processing in the prefrontal cortex underlying social behavior *The FASEB Journal*, FASEB J. 2022 Feb;36(2): e22160.
3. Nae SAITO, Makoto ITAKURA Toshikuni SASAOKA: D1 receptor mediated dopaminergic neurotransmission facilitates remote memory of contextual fear conditioning. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2022 Feb 17;16: 751053.
4. Nanxi LIU, Atsuhiko IJIMA, Yutaka IWATA, Kento OHASHI, Nobuyoshi FUJISAWA, Toshikuni SASAOKA, Isao HASEGAWA: Mental construction of object symbols from meaningless elements by Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Scientific Reports*. 2022 Mar 4;12(1):3566.
5. 西條康夫、周啓亮、冉慶松、北原哲彦、小田佳奈子、泰江章博、笹岡俊邦、叶許緑、阿部学、崎村建司、土田正則、味岡洋一：胚盤胞補完法を用いた多能性幹細胞由来肺の作出、日本呼吸器学会誌(Web) (Annals of the Japanese Respiratory Society (Web)) 巻：10 号：増刊号(冊子) ページ：14 発行年：2021年04月10日、JST 資料番号：U1489A ISSN：2186-5884
6. 冉慶松、周啓亮、小田佳奈子、泰江章博、阿部学、笹岡俊邦、崎村建司、味岡洋一、西條康夫：胚盤胞補完法と ES 細胞を用いた甲状

腺再生、日本再生医療学会総会(Web)
巻：20th ページ：ROMBUNNO.P-01-03
(WEB ONLY) 発行年：2021年 JST資料番号：U1460A

2.学会発表

1. 中川直樹 / Naoki NAKAGAWA
活動依存的なゴルジ体局在変化による大脳皮質神経細胞の樹状突起精緻化 / Activity-regulated positioning of the Golgi apparatus facilitates dendritic refinement in the neonatal mouse barrel cortex 研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」 / Symposium “Circuit Construction in the Mammalian Brain” 2021年12月17日-18日 (オンライン) ポスター
2. Luwei WANG, Shingo NAKAZAWA, Hidenobu MIZUNO, Takuji IWASATO
High spatiotemporal-resolution imaging of dendritic refinement dynamics of barrel cortex layer 4 neurons in neonates 研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」 / Symposium “Circuit Construction in the Mammalian Brain” 2021年12月17日-18日 (オンライン) ポスター
3. Chiemi KIMURA-NAKAJIMA, Ayumi SUZUKI, Takuji IWASATO
Somatosensory neural circuit development in mice lacking barrelettes 研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」 / Symposium “Circuit Construction in the Mammalian Brain” 2021年12月17日-18日 (オンライン) ポスター
4. Piu BANERJEE, Fumi KUBO, Hirofumi NAKAOKA, Takuya SATO, Tatsumi HIRATA, Takuji IWASATO
Spontaneous activity in the whisker-innervating region of neonatal mouse trigeminal ganglion 研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」 / Symposium “Circuit Construction in the Mammalian Brain” 2021年12月17日-18日 (オンライン) ポスター
5. 木村(中嶋) ちえみ、鈴木亜友美、岩里琢治 / Chiemi KIMURA-NAKAJIMA, Ayumi SUZUKI, Takuji IWASATO
脳幹 NMDA 受容体欠損マウスの特徴的な体性感覚地図 / Distinctive somatotopic maps in the brainstem NMDA receptor deficient mice 第44回日本分子生物学会 2021年12月1日-3日 (横浜) ポスター
6. Luwei WANG, Shingo NAKAZAWA, Hidenobu MIZUNO, Takuji IWASATO
High spatiotemporal-resolution imaging of dendritic refinement dynamics of barrel cortex layer 4 neurons in neonates Society for Neuroscience 2021 (Chicago), 2021年11月8日-11日 (オンライン) ポスター
7. 中川直樹、岩里琢治 / Naoki NAKAGAWA, Takuji IWASATO
ゴルジ体局在変化による大脳皮質神経細胞の樹状突起精緻化 / Developmental dynamics of the Golgi apparatus regulate dendritic refinement in the mouse barrel cortex 第44回日本神経科学大会 (神戸) 2021年7月28日-31日 (オンライン) ポスター
8. Luwei WANG, Shingo NAKAZAWA, Hidenobu MIZUNO, Takuji IWASATO
High spatiotemporal-resolution in vivo imaging of dendritic refinement dynamics in neonatal barrel cortex 第44回日本神経科学大会 (神戸) 2021年7月28日-31日 (オンライン) ポスター
9. 木村(中嶋) ちえみ、鈴木亜友美、岩里琢治 / Chiemi KIMURA-NAKAJIMA, Ayumi SUZUKI, Takuji IWASATO
脳幹 NMDA 受容体欠損マウスの特徴的な体性感覚神経回路 / Characteristic somatosensory neural circuits in the mice lacking brainstem NMDA receptors 第44回日本神経科学大会 (神戸) 2021年7月28日-31日 (オンライン) ポスター

10. Piu BANERJEE, Tatsumi HIRATA, Fumi KUBO, Takuji IWASATO Deciphering the role of trigeminal ganglion in generating correlated spontaneous activity in the neonatal mouse barrel cortex 第44回日本神経科学大会（神戸） 2021年7月28日-31日（オンライン）ポスター
11. 笹岡俊邦：D1及びD2ドーパミン受容体を介する神経伝達による運動制御と学習記憶の仕組みの理解 シンポジウム4 「ドーパミン研究の最近の展開」 第43回日本生物学的精神医学会・第43回日本神経精神薬理学会合同大会 2021年7月14日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

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

神経細胞内におけるタウの異常蓄積は様々な神経変性疾患の発症原因となっている。タウの凝集は細胞内で生じるが、細胞外へ放出されると、細胞間を伝播し蓄積を拡大することが知られている。従って細胞外タウの除去促進はタウの蓄積軽減に繋がるものと考えられた。研究代表者はこれまでに脳細胞外液の代謝経路である glymphatic system の重要分子 aquaporin-4 (AQP4) を欠損したタウトランスジェニックマウスではタウの異常蓄積と神経変性が亢進していることを見出した。この結果を受け、本研究では glymphatic system の機能促進が、タウ蓄積と神経変性を抑制できるかについて、aquaporin-4 の機能促進薬 TGN-073 をタウトランスジェニックマウスに投与する実験を行った。TGN-073 投与は脳脊髄液中のタウ量を上昇させること、タウの蓄積を減少させることが明らかになった。

A. 研究目的

タウオパチーと総称される、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患患者脳ではタウの異常蓄積が主因となり神経細胞脱落が生じることが知られている。タウの異常蓄積は神経細胞内で生じるが、細胞外腔を介し細胞間を伝播することから、細胞外液におけるタウの動態制御は細胞間伝播の阻害を介してタウ異常蓄積を抑制できる可能性があると期待できる。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標とした。

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か月間投与する実験を行った。本年度は当該実験に供するマウス個体数をさらに増加させるとともに、昨年度に行った生化学的解析に加え、リン酸化タウの蓄積を免疫組織学的に評価することで、TGN-073 の効果を評価した。

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 投与マウスの脳を免疫組織学的に解析したところ、TGN-073 の投与により、リン酸化タウの蓄積が低下する傾向が認められた。生化学的な解析では脳の可溶画分、不溶画分双方におけるタウ量の有意な減少が認められた。また TGN-073 の投与により、脳脊髄液 (CSF) 中のタウが有意に上昇することも明らかになった。

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生化学的、組織学的検討の両面から示唆され、glymphatic system の機能促進がタウ蓄積減少に繋がることを示す所見であると考えられた。また TGN-073 の投与により、CSF 中のタウが上昇していたことから、TGN-073 が脳間質液から CSF へのタウクリアランスを促進させた可能性が示唆された。今後 TGN-073 がタウのクリアランスに与える影響を詳細に解析するとともに、TGN-073 の投与が神経変性に対してどのような影響を及ぼすか、タウ蓄積を減少させるメカニズムは何かについても解析していく予定である。

E. 結論

神経変性疾患発症に対する glymphatic clearance の関与は以前から示唆されていたが、glymphatic clearance の促進が異常タンパク質蓄積を抑制できるかについては不明であった。本研究では AQP4 の機能促進薬を投与する実験によって、glymphatic system の促進がタウ蓄積の抑制において有効であることを初めて実証することができた。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

#は co-first authors、*は corresponding authors

1. Ishida K[#], Yamada K^{#,*}, Nishiyama R, Hashimoto T, Nishida I, Abe Y, Yasui M, Iwatsubo T* Glymphatic system clears extracellular tau and protects from tau aggregation and neurodegeneration. *J Exp Med* Mar 7;219(3):e20211275. doi: 10.1084/jem.20211275. 2022

2. 学会発表

1. 山田 薫「アルツハイマー病タウ病態における glymphatic system の役割」Neurovascular Unit 研究会 2022 年 1 月 29 日 オンライン
2. 山田 薫、石田 和久、西山 里瑛、橋本 唯史、阿部 陽一郎、安井 正人、岩坪 威「Aquaporin4 がタウ蓄積と神

経変性に果たす役割」第 40 回 日本認知症学会 2021 年 11 月 28 日 東京

3. 石田 和久、山田 薫、西山 里瑛、橋本 唯史、阿部 陽一郎、安井 正人、岩坪 威「Aquaporin-4 がタウの除去及び蓄積に与える影響の解明」第 40 回 日本認知症学会 2021 年 11 月 26 日 東京
4. 山田 薫「glymphatic system とタウ病態」タウ研究ミーティング 2021 オンライン 2021 年 8 月 28 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) 該当なし

SCA42 モデルマウス解析を通じた脊髄小脳変性症治療法の開発

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(*Cacna1g_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)

①RNA sequencingによる小脳遺伝子発現変化の解析

症状が開始する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。

②In 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から直接電氣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*Cacna1g_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。

③T 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与前後での変化について評価を行う予定である。また、症状発現後の 40 週齢マウスに対する機能阻害薬投与実験を行う。

C. 研究結果

RNA sequencing による小脳遺伝子発現変化の解析

現在各遺伝子型の 50 週齢マウス小脳について RNA シーケンス解析を終了し、IPA における異常パスウェイの同定、qPCR による結果の検証を行っている。

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 *Cacna1g_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 *Cacna1g_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た。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 *Cacna1g_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. Kubota S, Doi H, et al., SGTA associates with intracellular aggregates in neurodegenerative diseases. *Mol Brain*, **14**(1):59, 2021.
2. Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Suzuki K, Ogasawara A, Takahashi K, Azuma YT, Doi H, Tanaka F, Ablation of interleukin-19 improves motor function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Brain* **14**(1):74, 2021.
3. Miyatake S, Kato M, Kumamoto T, Hirose T, Koshimizu E, Matsui T, Takeuchi H, Doi H, et al., De novo *ATPIA3* variants cause polymicrogyria. *Sci Adv*, **7**(13):eabd2368, 2021.
4. Mizuguchi T, Toyota T, Miyatake S, Mitsuhashi S, Doi H, et al., Complete sequencing of expanded *SAMD12* repeats by long-read sequencing and Cas9-mediated enrichment. *Brain*, **144**(4):1103-1117, 2021.

5. Lipponen J, Helisalml S, Raivo J, Siitonen A, Doi H, et al. Molecular epidemiology of hereditary ataxia in Finland. *BMC Neurol*, **21**(1):382, 2021.
6. Fukuda H, Yamaguchi D, Nyquist K, Yabuki Y, Miyatake S, Uchiyama Y, Hamanaka K, Saida K, Koshimizu E, Tsuchida N, Fujita A, Mitsuhashi S, Ohbo K, Satake Y, Sone J, Doi H, et al., Father-to-offspring transmission of extremely long *NOTCH2NLC* repeat expansions with contractions: genetic and epigenetic profiling with long-read sequencing. *Clinical Epigenetics* **13**(1):204, 2021.

2. 学会発表

1. 土井宏、大久保正紀、橋口俊太、中村行宏、石川太郎、田中章景：脊髄小脳失調症モデルマウスを用いた運動失調の電気生理学的基盤の解析と治療開発. 第11回小脳学会シンポジウム「LTDと運動失調」, 東京, 2021年3月
2. 土井宏、中村治子、宮武聡子、三橋里美、水口剛、大久保正紀、工藤洋祐、浅野徹也、國井美紗子、田中健一、多田美紀子、上木英人、竹内英之、松本直通、田中章景：Identification of intronic repeat expansion of *RFC1* by long-read sequencer. 第62回日本神経学会学術大会, 京都, 2021年5月.

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。

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。認知症病態においては、ミクログリアの活性化・異常タウ蓄積・神経変性がどのように関わりあっているか、その詳細についてはまだ明らかになっていない。今年度は異常タウが蓄積する認知症モデルマウス rTg4510 を用い、ミクログリアの発達や長期生存に不可欠な CSF-1 receptor を阻害する薬剤 (PLX3397) を投与することで、ミクログリアを減少・消失させた際の変化を観察することで認知症病態におけるタウ蓄積・神経変性へのミクログリアの役割を明らかにすることを旨とした。

A. 研究目的

タウが蓄積する認知症モデルマウス rTg4510 を用い、ミクログリアの発達や長期生存に不可欠な CSF-1 receptor を阻害する薬剤 (PLX3397) を投与することで、ミクログリアを減少・消失させた際の変化を観察することで認知症病態におけるタウ蓄積・神経変性へのミクログリアの役割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)

月齢依存的に大脳皮質、海馬に異常なタウ蛋白が蓄積し、かつ前脳の萎縮を認める遺伝子改変モデルマウス rTg4510 (rTg マウス) を用い、コントロールとして、CAMKII-tTA マウス(tTA マウス)を用いた。4ヶ月齢の rTg4510 マウスおよび tTA マウスに PLX3397 もしくは vehicle を2か月間および4か月間投与した。6ヶ月齢、8ヶ月齢時点で MRI を撮影し脳萎縮を評価するとともに、脳へのタウ沈着を陽電子放出断層撮影 (PET) により観察した。PET imaging 終了後サンプリングを行い、死後脳切片で Iba1 陽性ミクログリアの消失率を評価するとともに、免疫染色、Western Blotting を用いてタウ蓄積量の変化を解析した。

C. 研究結果

PLX 投与によって rTg および tTA マウスにおいてミクログリアが消失することを確認した。この現象は雌雄差が認められ、オスで消失率が高かったため、オスを用いることとした。PLX 投与により Iba1 陽性ミクログリアは6ヶ月齢では84.2%、8ヶ月齢では87.8%の消失を認めた。

MRI では6ヶ月齢、8ヶ月齢ともに PLX 投与群で皮質の萎縮が抑制傾向だったが、海馬は萎縮が強い傾向だった。

免疫染色による解析では、AT8 陽性タウ蓄積は、6ヶ月齢では PLX 投与群で減少傾向を示し、8ヶ月齢ではやや増加していたが有意差は認めなかった。

Western Blotting では凝集性タウは、6ヶ月齢で有意に減少を認めたが、8ヶ月齢では PLX 投与の有無で有意差は認めなかった。

PET では6ヶ月齢では皮質、海馬いずれにおいても PLX 投与の有無でタウの集積に有意な差は認めなかったが、8ヶ月齢では PLX 投与群で皮質および海馬においてタウ集積が有意に上昇した。

D. 考察・結論

6ヶ月齢ではタウ蓄積は減少傾向である一方、8ヶ月齢ではタウ蓄積は増加傾向であった。また6ヶ月齢、8ヶ月齢ともに皮質の萎縮は抑制されていた。

6ヶ月齢、8ヶ月齢においてミクログリアの消失率は同様だったにも関わらず、タウ蓄積の変化に差を認めたのは、それぞれの段階においてミクログリア以外の要素が関与している可能性が示唆される。その一因として、アストロサイトの関与や神経細胞の cell autonomous によるタウ分解の可能性が考えられ、今後検討していく予定である。

E. 研究発表（上記課題名に関するもの）

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

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はまだ不明である。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 法を組み合わせることで検証する。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ることで検討する。

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3年度は研究項目②の光顕解析を遂行した。はじめに脳梁膨大後皮質において GluD2 と Cbln1 との局在関係を蛍光抗体法にて検討した結果、GluD2 の多くが Cbln1 と近接して局在することが判明した。続いて Cbln1 遺伝子欠損マウスおよび GluD1 遺伝子欠損マウスを用いて VGlut1, VGlut2 の 2 重蛍光染色を行い、脳梁膨大後皮質における単位面積当たりのグルタミン酸作動性神経終末数を検討した。その結果、野生型マウスと比較し Cbln1 遺伝子欠損マウスおよび GluD1 遺伝子欠損

マウスにおいて、単位面積あたりの VGlut2 単独用陽性グルタミン酸作動性神経終末の有意な減少が認められた。

D. 考察

脳梁膨大後皮質への興奮性入力には皮質由来 VGlut1 単独陽性終末、視床前背側核由来 VGlut1/2 共陽性終末、視床前腹側核由来 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し、GluD2 は視床前腹側核由来 VGlut2 単独陽性終末の近傍に選択的に局在するといった回路選択的局在特性を有することを前年度明らかにした。小脳において GluD2 は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平行線維-プルキンエ細胞シナプス形成に関与することが知られている。今回の GluD1 遺伝子欠損マウスおよび Cbln1 遺伝子欠損マウスの解析結果と前年度の結果を合わせて考察すると、脳梁膨大後皮質において GluD2 と Cbln1 は視床前腹側核とのシナプス回路形成に重要な役割を担っ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 は細胞種選択的発現・回路選択的局在特性を有し Cbln1 を介して視床前腹側核との神経回路基盤構築に関与することが示唆される。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Miyazaki T, Morimoto-Tomita M, Berthouix C, Konno K, Noam Y, Yamasaki T, Verhage M, Castillo PE, Watanabe M, Tomita S. Excitatory and inhibitory receptors utilize distinct post- and trans-synaptic mechanisms *in vivo*. *Elife*. 2021, 10 :e59613. doi: 10.7554/eLife.59613.

2. 学会発表

1. 今野幸太郎、山崎美和子、渡辺雅彦. マウス脳における Neuroigin 1 の発現およ

び局在特性. 第 127 回日本解剖学会総会全国学術集会、Web 開催、2022 年 3 月 27-29 日

2. Kotaro Konno, Kenji Sakimura, Michisuke Yuzaki, Masahiko Watanabe. GluD1 interacts with Cbln1 to connect glutamatergic/cholinergic afferents from the parabrachial nucleus to the visual thalamus and superior colliculus. 第 44 回日本神経科学大会、神戸コンベンションセンター（兵庫県、神戸市）、Hybrid 開催、2021 年 7 月 28 日-7 月 31 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

脳研究所よりグルタミン酸受容体 GluR2 遺伝子欠損マウスの提供をして頂きました。

疾患モデル動物の作製、保存、繁殖に有用なゲノム編集 および生殖工学技術の開発

研究代表者 竹尾 透¹⁾

研究分担者 中尾 聡宏¹⁾、中川 佳子¹⁾、中潟 直己²⁾、笹岡 俊邦³⁾

- 1) 熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野
- 2) 熊本大学生命資源研究・支援センター生殖工学共同研究分野
- 3) 新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野

研究要旨

実験用ラットの動物施設間の輸送は、専用のコンテナを用いて行われている。しかしながら、動物の生体輸送は、微生物学的統御、輸送中の逃亡や死亡、動物福祉の観点から課題が多い。そこで本研究では、ラットの輸送課題を解決するために、ラット精子の冷蔵輸送法の開発を行った。精子冷蔵保存液にケルセチンを添加することで、5日間低温保存したラット精子の運動能と受精能が維持された。低温保存した精子を用いて体外受精を行ったところ、受精卵が得られ、胚移植後により産子も得られた。さらに、本技術を用いて冷蔵輸送したラット精子からも、産子が得られることを実証した。以上の結果から、ラット精子の低温輸送は、生体輸送に代わる有用なラットリソースの輸送法として有用であることが明らかになった。

A. 研究目的

遺伝子改変ラットは、専用コンテナで施設間を輸送されることが多い。しかしながら、動物の生体輸送には、感染症の拡大、動物の逃亡・死亡、動物福祉などの課題がある。本課題を解決するために、遺伝子改変ラットの簡便な輸送法が求められている。

精子の冷蔵輸送は、生体輸送に代わる有用な輸送技術であるが、ラット精子は冷蔵保存により運動能および受精能が24時間以内に低下することが報告されている。以前、我々は、マウス精子の冷蔵保存技術を開発し、ジメチルスルホキシド(DMSO)とケルセチンがマウス精子の受精能を10日間維持できることを明らかにした。しかしながら、DMSOとケルセチンがラット精子に有効であるかは、明らかになっていなかった。

そこで本研究では、ラット精子の冷蔵保存においてDMSOとケルセチンの有用性を評価した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

動物

精子および卵子は、Jcl:SDラットを株式会社クレアジャパン(日本、東京)より購入した。精子は、雄ラット(11-15週齢)から、卵子は若齢雌ラット(5-6週齢)から採取した。Cr1j:CD(SD)雄ラット(>13週齢)は、胚移植に用いる精巣摘出雄ラットとして日本チャールズリバー(日本、神奈川)より購入した。Cr1:CD(SD)雌ラット(10-12週齢)は、日本チャールズリバー社から購入し、胚移植のためのレシピエントとして使用した。トランスジェニック雄ラット(SD-Tg(CAG-EGFP)40sb)および雌ラット(S1c:SD)はS1c Japan(日本、静岡県)より購入し、冷蔵輸送に使用した。飼育環境は、明暗(07:00-19:00 h)、室温は22℃±2℃、餌と水を自由に摂取できるようにした。雄ラットは1ケージに2匹、雌ラットは1ケージに3匹で飼育した。

動物実験は、熊本大学動物実験委員会の承認 (ID : A2021-025) を得て実施し、全ての方法は ARRIVE ガイドラインおよび関連法規に準拠して実施された。

精巣上部尾部の冷蔵保存

安楽死した成熟雄性ラットから、精巣上部尾部を採取し、保冷剤 (Lifor + DMSO + quercetin) の入った 1.5mL プラスチックチューブに封入した。本チューブを冷蔵輸送キットに梱包し、冷蔵庫で 0~6 日間保管した。

精子の調製

低温保存後、清掃上部尾部を低温保存液から取り出し、パラフィンオイルに移動した。精巣上部尾部から、mHTF のドロップに精子を移動して培養した。精子は、2 時間培養した後、体外受精と精子運動性の評価に使用した。

体外受精

若齢雌ラットに 30IU のウマ絨毛性ゴナドトロピンを投与した。PMSG 投与後 50-55 時間に、30IU ヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与した。hCG 投与後 16~18 時間に、安楽死した雌ラットから採卵した。卵母細胞と精子を 5% CO₂、37°C で 6-7 時間培養した。その後、卵母細胞を 3 回洗浄し、翌日まで培養した。翌日、卵子を観察して、受精率を算出した。

精子運動性の評価

精子運動性解析装置を用いて、新鮮な精子と低温保存した精子の運動性を評価した。新鮮な精子を最終濃度 500 sperm/ μ L に希釈し、パラフィンオイルで覆った 200 μ L の mHTF 滴下で、37°C、5% CO₂ で 2 時間培養した。次に、精子懸濁液を 10 μ L 採取し、測定チャンバーに加え、運動率などを測定した。

胚移植

体外受精で得られた胚 (前核受精卵および 2 細胞胚) は、擬似妊娠 CRL : CD (SD) 雌ラットに移植した。出生率は、生きていた仔の数を移植した胚の数で割って、100 を掛けたものとして計算した。

ラット精巣上部尾部の低温輸送

安楽死させた雄ラット (SD-Tg (CAG-EGFP) 40sb) から精巣上部を採取し、15% DMSO と 200 μ g/mL ケルセチンを含む Lifor で保存し、上記の精巣上部の低温保存の項と同じ方法で梱包し、新潟大学から熊本大学へ冷蔵輸送した。冷蔵輸送した精子を用いて、体外受精および胚移植を行った。

統計解析

統計解析は、Prism version 8 (GaphPad Software) を用いて、パーセントデータを逆正弦変換し、分散分析により有意差検定を行った。統計的有意性は 5% または 1% 水準以下とした。

C. 研究結果

DMSO とケルセチンは、低温保存されたラット精子の運動能を改善した。15% DMSO 中の 150-300 μ g/mL ケルセチンを含む Lifor で保存した精子は、運動率および直進運動率が増加した。また、15% DMSO と 200 μ g/mL ケルセチンでラット精子を低温保存すると受精率も向上した。本精子は、低温保存して 5 日間まで受精能を維持した。さらに、胚移植により、冷蔵精子由来の胚が産子へと発生した。

最後に、冷蔵輸送したラット精子を用いて体外受精および胚移植を行った結果、冷蔵輸送した精子からも受精卵および産子が得られた。

D. 考察

DMSO とケルセチンを低温保存液に添加することにより、ラット低温精子の運動能と受精能の保存可能期間が 5 日まで延長された。本技術を用いて作製した受精卵は、胚移植後、正常に産子へ発生した。さらに、冷蔵輸送されたラット精子は、受精能と発育能を維持していた。本技術は、遺伝子改変ラット精子の簡便かつ効率的な輸送に利用できる。

ラット冷蔵精子の受精率は、冷蔵保存液の影響を受ける。以前、私たちは、10% DMSO と 100 μ g/mL ケルセチンが、マウス精子を低温保存において 10 日間受精能を維持できることを報告した。また、ケルセチンが精子のミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア活性の維持に有効であることも明らかにした。本知見から、ラット精子においても

ケルセチンがミトコンドリア活性を維持することで、ラット精子の保護効果を示していると考えている。

以上、DMSO およびケルセチンを用いた精子の低温輸送技術は、遺伝子改変ラットの輸送において実用的かつ効率的な方法である。ラット精子を低温輸送することで、生体輸送の課題を克服できるため、今後、有益な手段として理ようされることが期待できる。ただし、冷蔵保存の条件や5日間という保存期間など、低温保存技術の限界は残されている。

E. 結論

実験用ラットは、ゲノム編集技術により、重要なヒト疾患モデル、生理学および毒性学における薬剤開発のモデルとして価値が高まっている。その結果、遺伝子改変ラットの作出と輸送は、時間の経過とともに増加すると予想される。本技術を活用したラットリソースの輸送システムの構築は、多施設共同研究を加速し、動物科学の再現性を高め、生物医学のさらなるイノベーションを促進すると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaga, K., Nakao, S., Mikoda, N. et al. Quercetin-treated rat sperm enables refrigerated transport with motility and fertility for five days. *Sci Rep* 11, 22641 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02166-6>

2. 学会発表

1. 山鹿優真, 中尾聡宏, 三小田伸之, 中瀧直己, 竹尾 透
ラット精子冷蔵保存における保存期間の延長および冷蔵精子からの個体作出、第69回日本実験動物学会、仙台、2022年5月18日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

筋強直性ジストロフィーにおける多臓器障害の原因解明

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をバイサルファイト処理し、DMPK遺伝子上のCTGリピート上流および下流のCTCF結合部位をPCRにより増幅、Ion Fragment LibraryとIon Xpress Barcode Adaptors Kitでライブラリ作成の後、Ion PGM sequencerでシーケンスを行い、リピート周囲のCpGメチル化について、Bismarkを用いて解析した。

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をおこなった。選択的スプライシング異常の網羅的解析については、Modeling Alternative Junction Inclusion Quantification (MAJIQ) version 2.1-c3da3ceをもちいて行った。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 例の側頭葉皮質神経、側頭葉白質グリア、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、前年度までに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り、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ていたが、皮質神経細胞では CTG リピート周囲の CpG メチル化の程度が強く、また脊髄神経細胞では CpG メチル化の程度が低いことがわかった。これらの結果から、各 MyD 神経系細胞でのリピート長のばらつきと、CTG リピート周囲の CpG メチル化の程度の相関が示された。また、MyD 患者、疾患対象群患者各 3 例の側頭葉皮質神経細胞、側頭葉白質グリア細胞、脊髄神経細胞より抽出した RNA の解析により、MyD 患者各神経系細胞で特異的に発現変動する遺伝子群を同定した。さらに、MyD 患者皮質神経細胞、白質グリア細胞、脊髄神経細胞で部位特異的な新規スプライシング異常を多数見出した。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理由のひとつに、リピート周囲の CpG メチル化が関与していることが示唆された。MyD 患者骨格筋でも、CTG リピート長とリピート周囲 CpG メチル化が相関しており、こうした CpG メチル化により転写・クロマチン調節因子 CTCF の結合が阻害され、リピート伸長を促進する可能性が示された。

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

1. 筋強直性ジストロフィーの中枢神経病態. 中森雅之, 第 40 回日本認知症学会学術大会, 2021/11/27, 東京, 口頭.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

アルツハイマー病における三叉神経中脳路核—青斑核周囲病変の解析

研究代表者 後藤哲哉¹⁾

研究分担者 倉本恵梨子¹⁾, 園田怜美²⁾, 南総一郎²⁾, 柿田明美³⁾

1) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科機能形態学分野

2) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野

3) 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(AD)モデルマウスの研究により、ADの初期病変に三叉神経中脳路核(Vmes)並びに青斑核(LC)の神経変性に関わっていることが見出された。そこで、ヒトでも同様の神経変性が生じているのかどうか確かめるため、新潟大学脳研究所よりAD患者および健常高齢者の死後固定脳組織の提供を受け、Vmes, LC及び大脳皮質におけるアミロイド β (A β)、A β オリゴマー、リン酸化タウ(p-tau)を指標とした神経変性の病態を調べた。AD患者脳大脳皮質では老人斑、並びに血管壁にA β とA β オリゴマーの免疫陽性反応が確認された。P-tauについても免疫陽性反応が確認された。脳幹のVmes, LCに関してはAD患者脳で多数の老人斑が確認されたが、Vmes, LCとも健常高齢者脳に比べて神経細胞の数が減少しており、ADモデルマウスのような明確なVmesとLCの神経変性の対応は確認できなかった。

A. 研究目的

ヒト脳組織を用いて、アルツハイマー病の初期病変発症部位である脳幹のVmes、LCの神経変性、特にA β とオートファゴゾームに関して病変を解析し、すでにADモデルマウスで得られている知見と比較解析することを目的としている。この研究によってヒトでもADモデルマウスで見られたVmesやLCにおける神経変性が認められれば、臨床においてもAD進行予防及び治療法の開発につながる可能性がある。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

ヒト脳固定標本に対し下記の免疫組織学的解析を行った。

① 新潟大学脳研究所で作成されたヒトAD患者脳及び健常高齢者脳の組織切片を使い、大脳皮質と脳幹部におけるA β 、A β オリゴマー、リン酸化タウ(p-tau)、Iba1の局在をそれぞれの特異抗体、A β (6E10; Covance, Princeton, NJ)、 β Amyloid (1-42)-Conformation Specific(GTX134510 GeneTex, Irvine, CA)、p-Tau (44-752G, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、Iba 1 (Fujifilm/Wako, Osaka, Japan)、を用い diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) にて検出した。

ヒト組織切片の使用については、鹿児島大学生命科学・医学系研究倫理審査にて承認された(200147疫)。

C. 研究結果

まず、AD モデルマウスで使った抗体がヒトの組織でも特異的に標識されるかを、ヒトの脳皮質の組織で調べたところ、 $A\beta$ は AD 患者脳組織において多数の老人斑のみならず血管壁にも強い局在が示された。また、老人斑よりは弱い反応が脳皮質の神経細胞にも認められた(図1)。

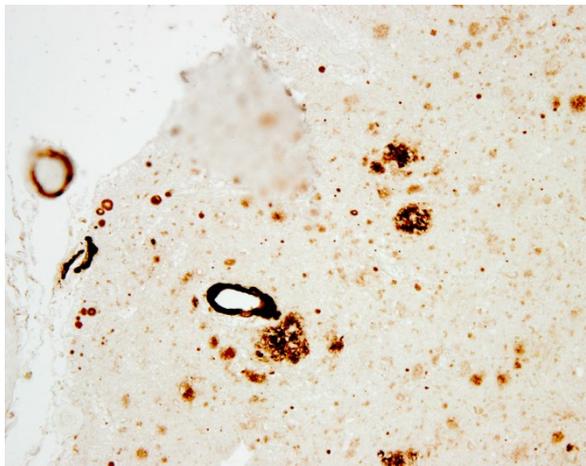


図1. AD 患者の脳皮質における $A\beta$ の局在

$A\beta$ オリゴマーの脳皮質における局在はほぼ $A\beta$ の局在と等しかった(図2)。 $A\beta$ では小型の血管や神経細胞と思われるところにも反応が認められたが、 $A\beta$ オリゴマーに関してはそれらには局在が認められなかった。

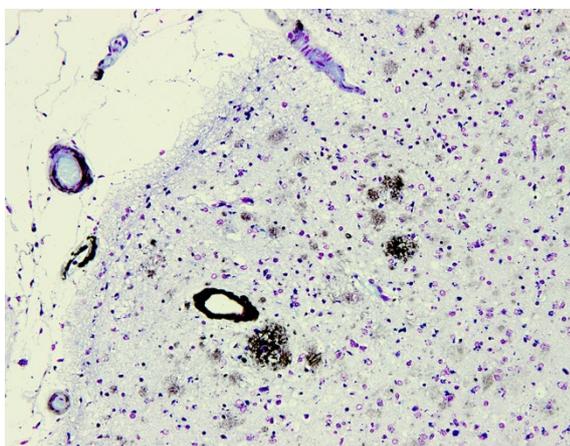


図2. 図1と同部位の $A\beta$ オリゴマーの局在
(対比: ニッスル染色)

AD 患者脳の大脳皮質の $A\beta$ 、 $A\beta$ オリゴマーと同じ部位について p-tau と Iba1 の免疫染色を行った。外顆粒層では細胞体に p-tau の反応は強くなかったが、軸索には明瞭な反応が認められた外顆粒層より内側の、特に大型の細胞の細胞体にも強い陽性反応が認められた(図3)。

Iba1 については AD 患者脳の大脳皮質の場合 $A\beta$ 免疫陽性の老人斑付近には神経細胞も少ないが、

Iba1 陽性細胞も少なかった。むしろ、深部の p-tau 陽性細胞が多くみられた付近に Iba-1 陽性細胞が多く認められた。

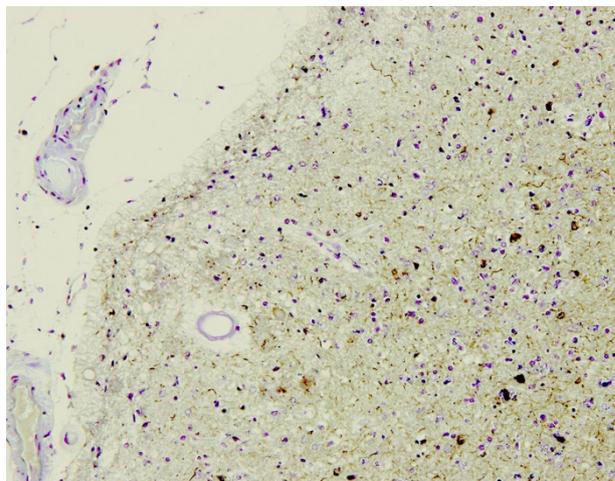


図3. 図1と同部位の p-tau の局在
(対比: ニッスル染色)

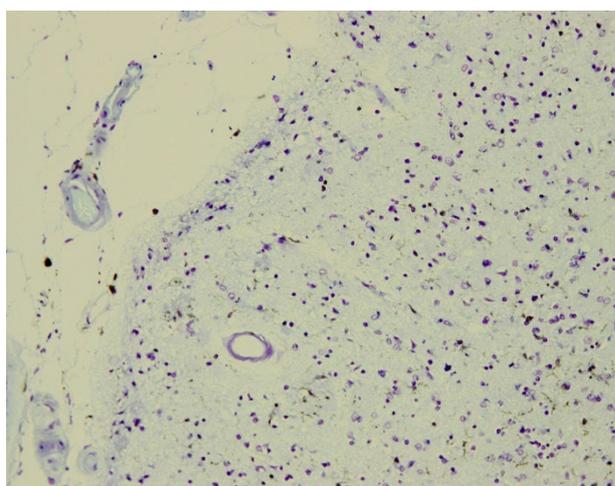


図4. 図1と同部位の Iba-1 の局在
(対比: ニッスル染色)

次に脳幹部に関して $A\beta$ の局在について調べた。脳幹の Vmes 並びに LC についてまずニッスル染色によりその局在について調べた。

健常高齢者脳の場合 Vmes 神経細胞は室周囲灰白質の外側周辺部に位置しており、比較的大型で認識しやすい。しかしながら、死後脳の場合は組織固定が実験動物の時よりも劣るために細胞内の構造が明確ではなかった。また、LC の上外側に位置しており、さらには LC 神経細胞のサイズがマウスに比べ比較的大きく、しかもメラニン色素を有するため、DAB 反応陽性の Vmes 神経細胞との識別がマウスよりは困難であった(図5)。

AD 患者脳の場合、Vmes 及び LC の神経細胞の数が健常高齢者脳と比べかなり減少しており、しかも

Vmes 神経細胞は吻側から尾側にかけて広い範囲に分散しているため、橋上部から少し位置がずれるとほとんど Vmes 神経細胞が見つからなかった(図6)。

AD 患者脳の橋上部の組織切片で A β の局在を調べたところ、小型の A β 陽性老人斑が認められた。位置的に、Vmes 神経細胞が局在すると思われるところを調べると数個の Vmes 神経細胞と思われるところに A β の陽性反応が認められた(図7、矢印)。また、Vmes 神経細胞の腹側にメラニン色素を含む LC 神経細胞が観察された(図7、矢頭)。

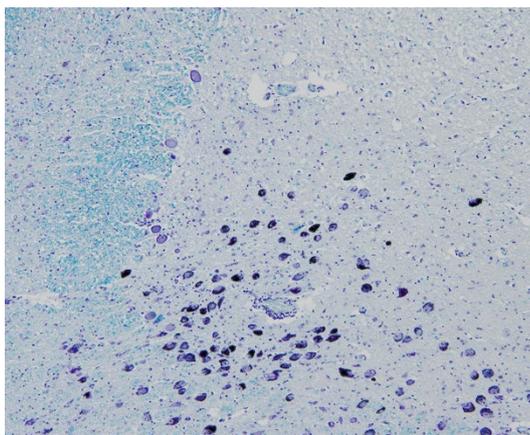


図5.健常高齢者の脳幹(ニッスル染色)

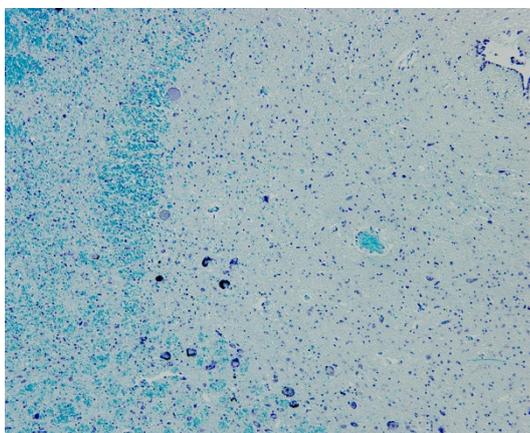


図6.AD 患者の脳幹(ニッスル染色)

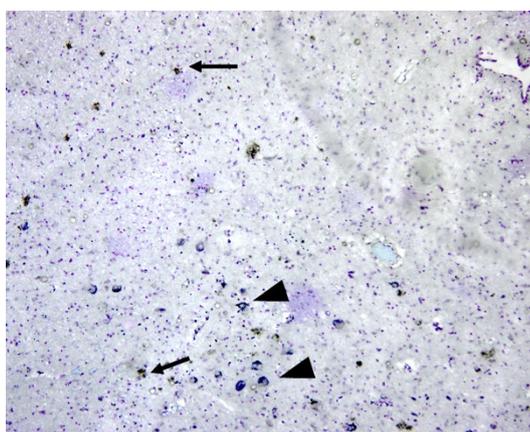


図7. AD 患者脳幹の A β の局在

D. 考察

今回の脳研究所から供与を受けたヒト健常高齢者脳と AD 脳との解析により AD モデルマウスとヒトとの違いを確認できた。

ヒトの AD 脳の場合、老人斑及び血管では A β と A β オリゴマーの局在部位はほぼ同じであるが、A β は神経細胞内でも反応が見られるのに対し A β オリゴマーでは神経細胞内での反応が認められなかった。

脳幹での Vmes 及び LC の神経細胞の分布が、マウスとはかなり異なっていた。特に Vmes は吻側から尾側へかなり広く分散しており、さらには AD 脳では細胞数の減少が著しく、健常高齢者脳での基礎データの収集が重要であると思われる。

今回のデータだけでは Vmes と LC の病変の解析は難しいが、脳幹においても A β 陽性の老人斑が存在した事、A β 陽性の Vmes 神経細胞が認められた事、LC の神経細胞数が減少していたことから見ると何らかの関連があることが示唆された。今後はさらに健常高齢者脳並びに AD 患者脳の脳幹を調べることによりヒトの Vmes 神経細胞の分布を明らかにし、他の神経変性のマーカーも使って更なる解析を進める予定である。

E. 結論

ヒトの老人斑、血管には A β とともに A β オリゴマーが認められた。A β は神経細胞内にも認められたが A β オリゴマーは主に細胞外に局在していた。

AD 患者脳では Vmes、LC とも神経細胞の減少が顕著であり、脳幹にも A β 陽性の老人斑が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

DNA 障害型抗がん剤の感受性増強因子 SLFN11 の脳腫瘍における 発現解析と臨床的有用性の検討

研究代表者 村井 純子¹⁾
研究分担者 棗田 学²⁾, 岡田 正康²⁾, 中田 聡³⁾

1) 慶應義塾大学先端生命科学研究所 2) 新潟大学脳研究所
3) Johns Hopkins University School of Medicine

研究要旨

Schlafen (SLFN) ファミリーのメンバーの1つ、SLFN11はプラチナ製剤などのDNA障害型抗がん剤の感受性増強因子として、注目されている。脳腫瘍ではしばしばDNA障害型抗がん剤を含む化学療法が適応となるが、SLFN11の発現解析や治療における有用性についての報告はほとんどない。脳腫瘍の1つ髄芽腫(medulloblastoma)は4つのサブタイプに分かれるが、サブタイプごとに治療成績が異なり、b-cateninシグナルの活性型変異を持つタイプ(WNT-subgroup)は化学療法に良く反応し、5年生存率は100%近くもある。その他のサブタイプに比べて、治療が奏効する理由については不明な点が多い。我々はSLFN11の発現レベルが、治療反応性に寄与している可能性を考え、本共同研究を立ち上げた。データベース解析、脳研究所が保有する髄芽腫患者の腫瘍サンプル解析、髄芽腫細胞株を用いた遺伝学的、分子生物学的解析を行い、WNT-subgroupではSLFN11の発現が高いことを突き止め、それがプラチナ製剤感受性に寄与していることを明らかにした。

A. 研究目的

髄芽腫ではサブタイプごとに、治療反応性が異なる。その理由を探るべく、薬剤感受性に寄与することが最近明らかとなってきたSLFN11遺伝子に注目し、その発現レベル、発現制御機構を解析する。SLFN11が髄芽腫において薬剤感受性に寄与しているかを明らかにする。

B. 研究方法

SLFN11の発現を、79症例の髄芽腫組織の免疫組織化学染色で評価した。髄芽腫を含むデータベースを解析して、生命予後とSLFN11発現量の相関性を評価した。数種類の髄芽腫細胞株を用いて、SLFN11の発現を遺伝的またはエピジェネティックに調節し、*in vitro* および *in vivo* でDNA傷害剤であるシスプラチンやtopoisomerase 1阻害剤(SN-38)に対する反応を評価した。本研究は新潟大学医学部倫理委員会の承認のもと行った。

C. 研究結果

髄芽腫のWNT活性型サブグループの大半とSHH活性型サブグループの一部でSLFN11が高発現していた(図1)。WNT活性化はb-cateninシグナルを増強させて、様々な遺伝子発現に影響するが、細胞株を使った実験では、b-cateninシグナルがSLFN11の過剰発現の直接的な原因ではないことがわかった。一方、WNT活性型サブグループのSLFN11高発現は、SLFN11プロモーター上の特定の低メチル化部位と相関していることが分かった。SLFN11の遺伝的過剰発現または欠失により、髄芽腫細胞株はシスプラチンまたはSN-38にそれぞれ感受性および抵抗性になった。ヒストン脱アセチル化阻害剤RG2833は、ヒストンのアセチル化レベルを上昇されるが、この薬剤によってSLFN11髄芽腫細胞株でSLFN11の発現が上昇し、シスプラチンおよびSN-38に対する感受性を獲得した。マウスの頭蓋内への髄芽腫細胞株異種移植試験でも、SLFN11を過剰発現した髄芽腫細胞では、

SLFN 11 の発現が低いコントロール株に比べてシスプラチンに対する顕著な感受性が示された。
(論文投稿中のため、一部のデータのみ図として表示)

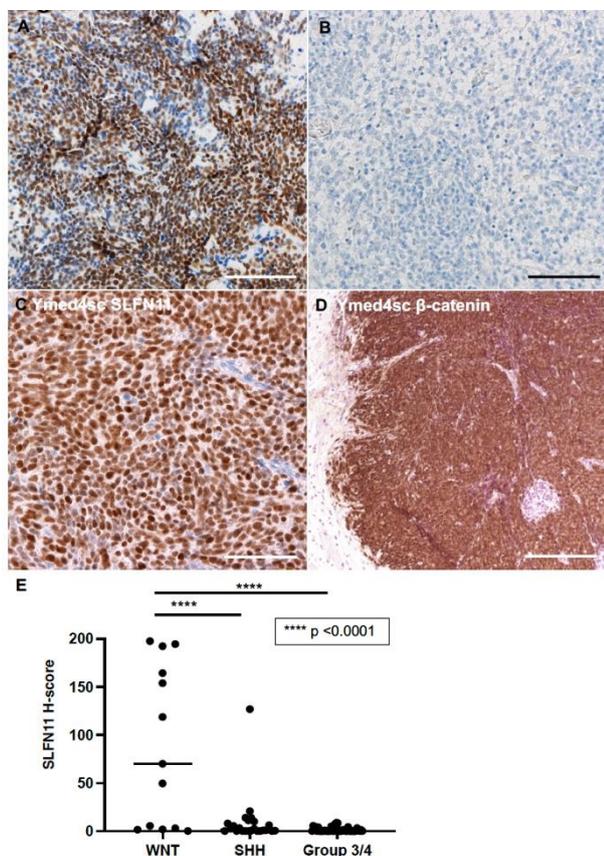


図 1) 79 症例の髄芽腫組織を SLFN 11 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、サブグループごとに H スコア評価した。

D. 考察

髄芽腫の WNT-subgroup は化学療法に良く反応し、生命予後が良好なことがわかっているが、その原因の 1 つとして、SLFN11 の高発現が考えられた。WNT-subgroup が SLFN11 を高発現する理由は、少なくとも b-catenin シグナルの活性化ではないことを示したが、直接的な原因は不明である。WNT-subgroup では SLFN11 プロモーターの一部に低メチル化部位が見つかっており、この領域で転写制御が行われていることが示唆された。

E. 結論

SLFN11 の高発現は、シスプラチンへの反応性を高めることにより、髄芽腫の WNT 活性化サブグループおよび SHH 活性化サブグループに寄与していると考えられた。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

との併用療法は、SLFN11 の発現が低い髄芽腫においてシスプラチンに対する反応を改善すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし (Neuro-Oncology 誌に投稿準備中)

2. 学会発表

1. 棗田 学、中田 聡、村井 純子、岡田 正康、塚本佳広、大石誠、藤井幸彦、Charles G. Eberhart. 髄芽腫における SLFN11 発現および DNA 障害型抗がん剤への感受性および予後の検討。第 50 回日本小児神経外科学会、2022.6.10-11、岐阜。
2. 中田 聡、村井純子、岡田正康、宮原弘明、信澤純人、柿田明美、大須賀覚、Charles G. Eberhart、棗田 学。髄芽腫における SLFN11 発現および新たな治療戦略の検討。第 40 回日本脳腫瘍病理学会、2022. 5. 27- 28、川越。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

運動ニューロン変性に関与する翻訳後修飾の同定

研究代表者 佐藤 俊哉¹⁾
研究分担者 中村 幹昭²⁾、加藤 利佳³⁾、笹岡 俊邦⁴⁾

1) 北里大学医学部実験動物学 2) 北里大学医学部脳神経内科
3) 北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター 4) 新潟大学脳研究所

研究要旨

Wobbler マウスは筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と類似の表現型を示す古典的な ALS モデルマウスであり、*Vps54* 遺伝子の L967Q ミスセンス変異により発症する。我々は Wobbler マウスに認められる運動ニューロン変性と蛋白レベルの変化を検討するため、安定同位体標識を用いた大脳の定量的プロテオーム解析を行った。トリプシン消化ペプチドの網羅的解析から、annexin A6 (AnxA6) の N 末端側近傍の 2 ペプチドに特異的な信号強度比の低下を認めた。また 2 種の抗体を用いたウェスタンブロットの定量評価でも、N 末抗体を用いた場合のみ、AnxA6 の発現低下を Wobbler マウスに認めた。これらの結果は、AnxA6 の N 末端側近傍に複数の翻訳後修飾が同時に存在するなど、AnxA6 に質的な変化が生じていることを示唆したが、質量分析による翻訳後修飾の同定には至らなかった。

A. 研究目的

運動ニューロン疾患は、遺伝及び環境要因を受けるとともに、加齢という明確なリスク要因の影響を受けて発症する。加齢との関連から、酸化ストレスの影響が注目されているが、酸化ストレスにより変化する分子の実体は明らかではない。酸化傷害の標的となる細胞成分は、核酸・蛋白・脂質などであるが、加齢による蓄積性、神経変性に共通して認められる蛋白凝集などとの直接的な関連を推察しやすいことから、本研究では蛋白に認められる異常な翻訳後修飾に着目して検討する。具体的には、ALS の原因遺伝子産物である TDP-43 に認められる翻訳後修飾の検索とともに、新潟大学脳研究所 (笹岡俊邦教授) と共同でモデルマウスを樹立し、遺伝子変異が集中する TDP-43 C 末領域の機能解析を進める。またこれと並行して、古典的な ALS モデルである Wobbler マウスの定量的プロテオミクス解析を行い、運動ニューロン変性と蛋白レベルの変化を解析する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

運動ニューロン変性と翻訳後修飾の関連を調べるため、以下の方法で解析を進めた。

(1) TDP-43 C 末領域の機能解析と翻訳後修飾の同定 (加藤利佳、佐藤俊哉)

TDP-43 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。しかし C 末領域はアミノ酸配列の特殊性から、トリプシンで切断されにくく、野生型ペプチドの同定すら困難な領域であることが分かっている。そこで TDP-43 C 末に存在する 4 つの領域 (GaroS1、HP、Q/N、GaroS2) の機能的な違いを個体および培養細胞を用いて明らかにし、領域を絞った上で翻訳後修飾の候補を検索する方針で進めている。

(2) Wobbler マウスの定量的プロテオミクス解析 (中村幹昭、加藤利佳)

6 週齢の Wobbler マウス大脳を用い、トリプシン消化後に Tandem mass Tag (TMT) で安定同位体

標識し、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) にて定量的プロテオーム解析を行った。トリプシン消化ペプチドの由来は、データベースソフトウェア (Proteome discoverer) を用いて同定した。野生型マウスとの比較解析では、TMT 標識されたペプチドの信号強度に基づき信号強度比を求め、Wobbler マウスで 1.2 倍を超えるものを増加ペプチド、0.83 未満のものを減少ペプチドと定義した。なお本検討では、蛋白の発現量比較に加え、トリプシン消化ペプチドの発現量比較を行うことにより、翻訳後修飾やスプライシング異常などの変化も推定した。

C. 研究結果

本年度は (2) の結果を中心に報告する。LC-MS では 5,432 種の蛋白に由来する 25,576 ペプチドを同定し、増加ペプチドが 360、減少ペプチドが 314 であった。蛋白全体の発現量比較では大きな変動を示す蛋白はなかったが、ペプチド信号強度比では、0.12、0.19 と著明に低下している 2 ペプチドを認め、annexin A6 (AnxA6) の N 末端側近傍のペプチドと同定された。AnxA6 に由来するペプチドは 22 ペプチドが同定されたが、減少しているペプチドは、上記の 2 ペプチドのみであった。

AnxA6 の RT-PCR では明らかなスプライシング異常が認められなかったことから、翻訳後修飾によるトリプシン切断の阻害などを想定し、AnxA6 の N 末および C 末抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、N 末抗体を用いた場合のみ、AnxA6 の発現低下 (シグナル強度比 0.74) を Wobbler マウスに認めた。AnxA6 の N 末抗体の認識部位と減少ペプチドは、N 末端側近傍にあるものの同一ではないため、単一の変化では説明できないが、複数の翻訳後修飾が同時に存在するなど、AnxA6 の質的変化が推定された。

D. 考察

Annexin はカルシウムおよびリン脂質に結合する蛋白ファミリーで、N 末側ドメインが各 Annexin の特異性を決めている。その中で AnxA6 は、コレステロールにより膜への結合が促進され、遊離コレステロールが蓄積する Niemann-Pick 病 C 型 (NPC) で後期エンドソームに集積することが知られている。また AnxA6 の過剰発現が NPC 類似の

コレステロール蓄積を示すこと。さらに NPC 細胞における AnxA6 の発現抑制が、Rab7 の活性化を介してコレステロール蓄積を改善させることから、コレステロール輸送の制御分子として AnxA6 が注目されている。一方、Wobbler マウスの原因遺伝子である *Vps54* は、NPC の原因遺伝子である NPC2 の小胞輸送に関与し、*Vps54* の機能障害により Wobbler マウスでは NPC 類似のコレステロール蓄積が生じると報告された。我々が発見した AnxA6 の質的変化の実態は不明であるが、翻訳後修飾の網羅的解析からは、AnxA6 の N 末側ドメインに複数の翻訳後修飾 (リン酸化およびアセチル化) が報告されている。これらの知見は、運動ニューロン変性・コレステロール蓄積・AnxA6 の質的変化の相関を示唆するものであることから、今後は、翻訳後修飾を擬態した変異型 AnxA6 による機能解析および AnxA6 の質的変化の同定を目指す。

E. 結論

Wobbler マウスを用いた定量的プロテオーム解析の結果、AnxA6 の N 末端側近傍に複数の質的変化があると推定された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Nakamura, M. et al. Quantitative proteomic analysis and single-protein-derived tryptic peptide profiling indicate qualitative alterations of annexin A6 in the brain of wobbler mice. *Kitasato Med J* 51, 76-83 (2021).

2. 学会発表

佐藤俊哉. ALS 原因遺伝子産物 TDP-43 の解析. 2021 年度脳研究所共同利用共同研究 (笹岡班) 合同セミナー、2022 年 2 月 9 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

超短命アフリカメダカを用いた各種抗酸化食品成分の アンチエイジング効果の研究

研究代表者 小林 麻己人¹⁾
研究分担者 渡邊 朝美¹⁾, 玉置 準也¹⁾, 松井 秀彰²⁾

1) 筑波大学医学医療系 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

研究代表者は、ゼブラフィッシュを用いて酸化障害を緩和する食品成分の探索と解析を行い、効果をもつ14成分を見出している。当該成分のアンチエイジング効果も調べたいが、ゼブラフィッシュの長い寿命が研究の障害となっている。新潟大学脳研究所の松井博士が活用する超短命アフリカメダカは2ヶ月で老化が始まり、半年で寿命となる最も短命なモデル脊椎動物である。本研究の目的は、各種食品成分のアンチエイジング効果を解析するための超短命アフリカメダカ解析システムの構築である。本年度は、まず超短命アフリカメダカの飼育環境のセットアップに主眼を置いた研究を行った。その結果、導入した受精卵を成魚まで育成させることに成功し、交配・産卵を経て、次世代の作出にも成功した。さらに、JM-OCT技術を用いてアフリカメダカ成魚の脳内可視化を試みた。以上により、各種食品成分の解析を超短命アフリカメダカで行える体制が整った。

A. 研究目的

研究代表者は、ゼブラフィッシュを用いて、酸化障害を緩和する食品成分の探索と解析を行ってきた。これまで約50成分を調べ、14成分が有意に効果があることを見出している(Endo et al. 2020)。一方、Nrf2変異ゼブラフィッシュの活用により、抗酸化応答のマスター機構Keap1-Nrf2経路の研究も行い、同経路を介して抗酸化食品成分がさまざまなストレス障害緩和することも見出している(Mukaigasa et al. 2018; Fuse et al. 2018)。前述の14成分に関しては、8種がKeap1-Nrf2経路を介することを同定している。

これらの系統を用いて、寿命や学習能力の解析も行っているが、ゼブラフィッシュの長い寿命が研究の障害となっている。新潟大学脳研究所の松井秀彰博士が活用する超短命アフリカメダカは2ヶ月で老化が始まり、半年で寿命となる最も短命なモデル脊椎動物であり、これを活用すればゼブラフィッシュの弱点を克服しうると考えた。

本研究では、松井博士との共同研究により、研

究代表者が同定してきた抗酸化食品成分が、加齢性脳疾患予防とアンチエイジングに有効かを超短命アフリカメダカを活用して動物レベルで解析することを目的とする。

B. 研究方法

超短命アフリカメダカに対する各種抗酸化食品成分の効果を検証するためには、超短命アフリカメダカの安定した供給が必要となる。加えて、老化状態を生きのまま評価できる解析システムがあれば、サンプル数を減らすことができ、倫理的にも優れた解析が行える。

研究代表者はこれまで超短命アフリカメダカを飼育したことはなく、本年度はまず、共同研究者である新潟大学脳研究所・松井博士の指導を仰いで飼育環境を整えることに主眼を置いた。一方、研究代表者は、JM-OCTという光干渉断層撮影技術により、ゼブラフィッシュ成魚体内の非侵襲での可視化に成功している(Lichtenegger et al. 2022)。この技術を超短命アフリカメダカにも活

用できれば、老化過程を生きのまま観察し続けることができる。そこで JM-OCT 技術を用いて、超短命アフリカメダカ成魚脳内の可視化も試みた。

C. 研究結果

1) 超短命アフリカメダカの飼育環境セットアップ

本研究の目的達成のためには、まず筑波大学における小型魚類飼養施設で超短命アフリカメダカの安定した供給を行う必要があるが、ゼブラフィッシュと異なり、超短命アフリカメダカの飼育・継代は簡単ではない。そこで共同研究者である筑波大学・渡邊及び玉置を新潟大学脳研究所に派遣し、松井博士に飼育方法を伝授していただいた。これをもとに筑波大学での飼育環境をセットアップし、超短命アフリカメダカを実際に導入したが、育成に失敗してしまった。そこで、新たに第二弾の超短命アフリカメダカを導入し、松井博士にさらなる助言を仰ぎながら、第一弾で問題になった可能性のある箇所を修正しながら飼育を進めた。その結果、第二弾では成魚まで育成させることに成功し、交配・産卵を経て、次世代の作出にも成功した。

2) 老化過程の非侵襲での可視化の試み

JM-OCT 技術を用いて、超短命アフリカメダカ成魚脳内の可視化を試みたところ、撮影自体には成功したが、これまでのところ老化状態を判別することはできていない。引き続き、観察を続けているところであるが、何らかの工夫が必要かも知れない。解決策としては、JM-OCT 技術の解像度自体の向上を目指すか、それとも脳内の可視化は諦めて、別の組織での老化進行の観察を試みるのだが、現在、検討を行っているところである。

D. 考察

超短命アフリカメダカの飼育環境がセットアップできたことは重要な成果と考えている。当初、各種抗酸化食品成分の解析まで行う予定であったが、コロナ渦のため、共同研究の開始が遅れてしまったのは残念なことであった。それでも、筑波大及び新潟大双方の共同研究者のワクチン接種が済んだ秋になってようやく開始することができ、JM-OCT 技術を駆使した超短命アフリカメダカの脳内可視化を試みるまではたどり着けた。脳内可視化にはまだ課題が残るので、その課題克服のための研究と平行して、寿命や外見の違いで、

抗酸化食品成分の効果を判断する研究も開始する予定である。幸い、本共同研究は継続していただけたことになったので、抗酸化食品成分の解析を開始するとともに、松井博士がもつ超短命アフリカメダカの老化解析系の活用も導入できればと希望している。

E. 結論

本研究の成果により、超短命アフリカメダカの飼育環境のセットアップに成功し、老化過程の非侵襲での可視化を試みた。

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

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

2. 実用新案登録

3. その他

特になし

遺伝性筋疾患における HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼの機能の解明

研究代表者 今村 道博¹⁾
研究分担者 青木 吉嗣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

遺伝子疾患の病因解明および治療法開発においてはモデル動物を用いた研究から極めて重要な知見を得ることができる。筋ジストロフィーを発症する NH-413 ニワトリの原因遺伝子 *Wwp1* は HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼをコードしている。NH-413 で同定されたミスセンス変異は WWP1 分子を分解し、機能を喪失した結果、筋ジストロフィーを発症するものと考えられる。しかしながら、これと同じ変異を導入したマウスモデルでは、NH-413 と同様の分子変化を生じるものの、顕著な筋症状は認められないため、WWP1 の機能が何らかの機構により補償されるものと考えられる。そこで我々は、WWP1 と ITCH という WWP1 に酷似した2種類の HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼに着目し、これらが骨格筋において、WWP1 とどのように関係し、また機能するのか解析する。

A. 研究目的

筋ジストロフィーを発症する NH-413 ニワトリは、胸筋などの白筋が選択的に侵され、線維内に空胞を認めるという特徴を示す。遺伝形式は常染色体不完全優性であり、HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼをコードする WWP1 遺伝子に生じたミスセンス変異が原因と報告されている。自然発症の筋ジストロフィーモデル動物はほぼ全てがヒトの遺伝性筋疾患に対応しており、病態解析や治療法の開発などに用いられている。しかしながら、NH-413 ニワトリだけは対応するヒト疾患が見つからない。我々は WWP1 の機能に関連するヒトの筋疾患は存在するのか、という問いを明らかにすることを目的として研究を行っている。我々は WWP1 分子に対する特異抗体を作製し、世界に先駆けて正常型および変異型 WWP1 タンパク質を骨格筋中で検出することに成功した。その結果、WWP1 タンパク質は変異依存的に分解し、筋形質膜から消失することが明らかになった。そこで、NH-413 と同じミスセンス変異を導入したノック

イン (KI) マウスを作製したところ、WWP1 タンパク質の分解や細胞膜からの消失など、NH-413 に認められる生化学的、組織学的特徴が再現された。その一方で、骨格筋組織における顕著な変性は認められなかった。マウス骨格筋では WWP1 に加え、これに酷似した2種類の HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ、WWP2 と ITCH が発現しているため、これらと WWP1 との間に機能補完性が存在するのかどうか明らかにする必要がある。そこで本研究では *Wwp2* および *Itch* 遺伝子改変マウスを用いて WWP1 との機能的関係性について解析を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

マウスの *Wwp1* と *Wwp2*、*Itch* 遺伝子に変異を持つ遺伝子改変マウスを用いて筋肉の発生および再生、メンテナンスについて生化学的、組織学的解析を行った。マウスモデルとしては *Wwp1* 遺伝子に NH-413 ニワトリに認められる R441Q ミスセンス変異を模倣し、436 番目のアルギニンがグルタミンに置換されるように遺伝子改変した R436Q

ノックイン (KI) マウスを用いた。*Wwp2* 遺伝子と *Itch* 遺伝子では、上記 346 番目のアルギニンの 5' 側に位置する WW ドメイン 2 をインフレームで欠失する遺伝子改変マウスを使用した。これらのマウスを単独で、あるいは交配により二重変異体にして用い、組織学および生化学的解析を行った。なお、これらのマウスは新潟大学脳研究所での助言を受けて作製した。また、本研究は国立精神・神経医療研究センターの実験動物倫理問題検討委員会による審査と承認を受けて行われた。

C. 研究結果

WWP2 および ITCH 分子内の WW2 ドメインをインフレーム欠失した WWP2-del と、ITCH-del の下肢骨格筋群（前脛骨筋、長趾伸筋、ヒラメ筋、大腿直筋）について組織学的解析を行ったところ、どの筋肉にも顕著な異常は認められなかった。横隔膜や舌、そして心筋についても同様であった。これらのマウス下肢筋における WWP1 の発現をイムノブロットにより調べたところ、いずれのマウスでも上昇しているのが確認された。また、WWP1-KI と WWP2-del の 2 重変異体 (WWP1-KI/WWP2-del) においては 1 年齢を超えたマウスの筋線維内に空胞の形成が認められた。そしてこれらはまず、後脛骨筋に現れ、その後加齢に伴って周辺の筋肉へも広がるものと推察された。さらに、WWP1-KI /WWP2-del マウスで *Itch* 遺伝子を ITCH-del へテロにした場合には、1 年齢未満のより若い月齢であっても空胞の出現が確認された。

D. 考察

NH-413 の胸筋では WWP1 が消失するにも関わらず全体のユビキチン化が亢進する。WWP1-KI においても同様の現象を再現するが、これは WWP1 の機能喪失が結果的に他の E3 ユビキチンリガーゼを活性化したものと推察される。また、今回は WWP2-del と ITCH-del の両方の筋肉において WWP1 の発現上昇を認めている。これらのことは WWP1 喪失時には WWP2 や ITCH の発現が上昇している可能性を示唆していた。WWP1-KI/WWP2-del の二重変異マウスでは、筋線維内に空胞が出現したが、さらにこのマウスの *Itch* 遺伝子の一方のアレル（対立遺伝子）を ITCH-del とした場合には、より早期に空胞が認められるようになることから、

これら 3 種類の HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼの機能的相互関係が筋変性に関係するのではないかと推察された。ただし、C57BL/6 系統の遺伝子背景を持つ雄マウスの筋肉では 1 年齢近辺から管状構造凝集体 (tubular aggregate) と呼ばれる空胞が現れるため、それとの関連についても注意深く検討する必要がある。

E. 結論

我々は *Wwp1* 遺伝子に NH-413 ニワトリと同じミスセンス変異を導入した WWP1-KI マウスの筋変性について、WWP1 の類似分子である WWP2 および ITCH が及ぼす影響を検討した。マウス骨格筋では WWP1 と WWP2、そして ITCH の 3 分子が発現しており、そのうちどれか 1 つの機能が失われると、残りの分子の発現が上昇して相互に機能を補うよう働く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

1. 橋本泰昌, 國石洋, 境和久, 福島雄大, Xuan Du, 本橋紀夫, 今村道博, 位高啓史, 一戸紀孝, 関口正幸, 青木吉嗣. 短いジストロフィン Dp140 欠損は、興奮性シナプス伝達を抑制し、自閉症様行動を引き起こす. 第 7 回日本筋学会, 2021 年 12 月 11-12 日, 京都.

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

ヒト特異的な脳細胞は果たしてあるのか？ 単一細胞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⁾

- 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

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「ヒト特異的脳細胞」を同定することを目的とした。令和3年度は、ヒト2検体、チンパンジー1個体、ゴリラ1個体死後脳の前頭前野から約5000から1万細胞の細胞核の遺伝子発現データを取得した。情報解析の結果、それぞれのサンプルから1細胞核あたり平均2000から3500遺伝子の遺伝子発現データを取得することができた。4サンプルを統合して解析した結果、合計30種類の細胞タイプを3種すべてにおいて同定することができた。解析サンプル、解析細胞核数が十分でないものの、細胞タイプの構成比は3種の間で異なっている可能性が示唆された。

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。申請者は過去3年間にわたり、マウスやマーモセット、また共同研究においてその他の脊椎動物の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。

それらの高度化した実験・解析パイプラインを用いて、令和3年度は、ヒト2検体、チンパンジー1個体、ゴリラ1個体死後脳の前頭前野から約5000から1万細胞の細胞核の遺伝子発現データを取得した。情報解析の結果、それぞれのサンプルから1細胞核あたり平均2000から3500遺伝子の遺伝子発現データを取得することができた。4サンプルを統合して解析した結果、11種類の興奮

性神経細胞、8種類の抑制性神経細胞、2種類のアストロサイト、3種類のオリゴデンドロサイト、1種類のオリゴデンドロサイト前駆細胞、2種類のミクログリア、1種類の上皮細胞を3種すべてにおいて同定することができた。解析サンプル、解析細胞核数が十分でないものの、細胞タイプの構成比は3種の間で異なっている可能性が示唆された。

D. 考察

ヒトと類人猿を用いたシングル核トランスクリプトーム解析の実験・情報解析プロトコルを確立した。しかし、サンプル数も解析脳領域も十分でないため、今後スループットをさらに上げる必要がある。予備結果として細胞タイプの構成比が種間で異なる可能性が示唆されたが、用いる脳試料の不均一性を可能な限り排除（大脳6層構造がすべて含まれるようにするなど）し、またサンプル数を向上させることにより精度の高い検証を行う必要がある。

E. 結論

令和3年度はヒトと類人猿のシングル核トランスクリプトーム解析プロトコルの開発と最適化を行った。次年度以降は、確立したプロトコルを用いて、飛躍的にサンプル数と解析細胞核数を向上させ、本研究の目的である、ヒト脳の特異性を担保する「ヒト特異的脳細胞」を同定することに挑戦する。

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. 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

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2

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⁾, 竹澤 久美子¹⁾, 保田 昌彦¹⁾, 横山 峯介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、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卵管膨大部の卵巣側切開により、組織接着剤を用いた場合と同程度の採卵率を確認することができた。B6 マウスでは、卵管膨大部の切開部位が塞がる8週間隔で、抗インヒビン血清を用いてもアナフィラキシーショックを起こさずに反復採卵が可能であった。NOG マウスでは採卵率は悪く、排卵数も少ないが、3回反復採卵が可能であった。しかし、共通して外科的処置採卵時に受精率の低下がみられた。

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。

A. 研究目的

脳神経筋疾患モデルマウスの維持生産において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、抗インヒビン血清(IAS)を用いた超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. 卵管膨大部の卵巣側切開による反復採卵検討

先行論文(JRD 2020)で卵管膨大部の卵巣側切開により、組織接着剤を用いなくても2回目の採卵率が向上するとの報告があったので、ICR 19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、卵管膨大部の卵巣側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。

近交系マウスにおける抗インヒビン血清を用いた反復採卵の検討

2. 若齢B6Jマウスにおける検討

超過剰排卵効果が期待される4週齢C57BL/6JJc1雌マウスを用い、過剰排卵処置

(0.1ml IASe - 7.5IU hCG)後、1. 同様、三種混合麻酔下で採卵し、体外受精により受精率を算出した。その後、昨年度の結果から卵管の切開跡のふさがりの確認できる8週間後の12週齢で再度、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. 重度免疫不全であるNOGマウスにおける抗インヒビン血清反復投与による採卵の検討

8週齢NOG雌マウスを用い、8週齢から2週間間隔の10週齢、12週齢で過剰排卵処置(0.1ml IASe - 7.5IU hCG)を反復投与した後、各々8週齢、10週齢、12週齢で頸椎脱臼による安楽死後、採卵し、排卵数、NOG凍結精子との体外受精により受精率を算出した

4. 重度免疫不全であるNOGマウスにおける3回反復採卵の検討

8週齢NOG雌マウスを用い、過剰排卵処置(0.1ml IASe - 7.5IU hCG)後、1. 同様、三種混合麻酔下で採卵し、NOG凍結精子での体外受精により受精率を算出した。2週間後の10週齢で再度、過剰排卵処置後、上記同様に麻酔下で採卵し、排卵数、受精率を算出した。その2週間後の12週齢で再度、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。

C. 研究結果

前年度の研究結果で、外科的処置採卵後の卵管切開は8週間後には切開跡もふさがり、反復採卵が可能であった。切開後接着剤(アロンアルファ)処理は、2週間後採卵でコントロールと同等程度の採卵が可能であった。また三種混合注射麻酔下の外科的処置採卵卵子は、体外受精率ならびに産子率が低値を示すこともわかった。

1. 卵管膨大部の卵巣側切開による反復採卵検討

2回目採卵時の卵管膨大部における排卵卵子の採卵率は、卵巣側切開で42.9%、アロンアルファを用いた場合50.0%と同程度に改善された。

雌1匹当たりの排卵数は、1回目通常採卵の安楽死後のコントロールで41.5個に対し、外科的処置採卵をおこなったものは25.0個であった。外科的処置採卵後2週間後に再度、過剰排卵した卵巣側切開は17.6個、アロンアルファは33.4個であった。コントロールの過剰排卵後、切開をせず、2週間後に再度過剰排卵したものは34.6個と、卵巣側切開での排卵数はアロンアルファやコン

トロールの半分程度であった。

採卵卵子の体外受精率は、コントロールで75.9%、外科的処置採卵をおこなったもので45.7%であった。過剰排卵後切開をせず、2週間後に再度過剰排卵をしたコントロールは91.3%、卵巣側切開で94.3%、アロンアルファで54.0%と卵巣側切開では、コントロールと遜色ない受精率を示した。

2. 若齢B6Jマウスにおける抗インヒビン血清を用いた反復採卵の検討

2回目採卵時の卵管膨大部における排卵卵子の採卵率は58.3%であり、IASを用いても8週間の採卵間隔で反復採卵が可能であった。

雌1匹当たりの排卵数は、安楽死後のコントロールで36.0個、外科的処置採卵をおこなったもので25.2個であった。過剰排卵後に切開せず8週間後に再度過剰排卵をしたコントロールで41.8個、外科的処置採卵後、8週間後に2回目採卵で27.4個であり、排卵数は1回目採卵、2回目採卵のどちらもコントロールより少なかった。

採卵卵子の体外受精率は、コントロールで92.5%、外科的処置採卵をおこなったもので65.1%であった。過剰排卵後切開をせず、8週間後に再度過剰排卵をしたものは86.3%、2回目採卵では94.8%と外科的処置採卵をおこなった受精率のみ低値を示した。

3. 重度免疫不全であるNOGマウスにおける抗インヒビン血清反復投与による採卵の検討

反復採卵はおこなわずに反復投与で、8週齢では1度過剰排卵処置した雌1匹あたりの排卵数は、87.0個。体外受精率は87.0%であった。

8週齢と10週齢の2度過剰排卵処置した雌1匹あたりの排卵数は、107.0個。体外受精率は83.2%であった。

8週齢と10週齢と12週齢の3度過剰排卵処置した雌1匹あたりの排卵数は、96.0個。体外受精率は71.0%であった。

NOGマウスでは2、3度抗インヒビン血清を投与しても、正常に排卵卵子は採卵出来、体外受精で受精卵の作出もできた。

4. 重度免疫不全であるNOGマウスにおける抗インヒビン血清を用いた3回反復採卵の検討

2回目採卵時の卵管膨大部における排卵卵子の採卵率は37.5%であり、3回目採卵では29.2%であったため、採卵率は低値ながらも3回反復採卵は可能であった。

雌1匹当たりの排卵数は、安楽死後のコントロ

ールで 87.0 個、外科的処置採卵をおこなったもので 58.2 個であった。2 週間後の 2 回目採卵で 32.8 個であった。更に 2 週間後の 3 回目採卵で 9.8 個と排卵数は採卵回数を経るごとに少なくなった。

採卵卵子の体外受精率は、コントロールで 87.0%、外科的処置採卵をおこなったもので 55.3%であった。2 週間後の 2 回目採卵で 41.2%であった。更に 2 週間後の 3 回目採卵で 85.3%と外科的処置採卵をおこなった 1 回目、2 回目採卵時の体外受精率で低値を示した。

D. 考察

外科的処置採卵時に卵管膨大部の卵巣側を切開することにより、組織接着剤を用いた場合と同程度の採卵率を確認することができた。そのため、アロンアルファを用いた場合より作業時間が短縮され、2 回目採卵時の体外受精率も改善した。

免疫正常なマウスにおける抗インヒビン血清 (IAS) の 1~2 週間間隔の反復投与は、抗体価が高いため、一部のマウスは即時性のアレルギーによるアナフィラキシーで死亡することが知られている。

そこで我々は、B6 マウスでの反復採卵の検討では、IAS による超過剰排卵処置に効果の高い若週齢の 4 週齢と、卵管切開部位のふさがる 8 週間後の 12 週齢でおこなった。結果、免疫正常の B6 マウスにおいても採卵率、排卵数とも低値を示すが、IAS を用いた反復採卵が可能であることを示した。B6 マウスの 4 週齢での反復採卵は外科的採卵処置時に卵巣脂肪が少なく、手技的に採卵が困難だった。また、外科的採卵処置時のダメージか、12 週齢のマウスの卵巣が 4 週齢ほどの大きさのままである個体も見られたため、マウスが性成熟を迎えてから外科的採卵処置をおこなうことが望ましいかもしれない。

重度免疫不全である NOG マウスは、B 細胞、T 細胞と NK 細胞が欠損し、マクロファージと樹状細胞の機能が低下しているため、抗体が産生されず、アナフィラキシーはおきない。NOG マウスへの IAS を用いた反復採卵の検討は、まず反復採卵はおこなわず、IAS 反復投与による効果を検討した。結果、8 週齢から 2 週間間隔で、2 度、3 度反復投与しても、アナフィラキシーショックはおこらず、正常に 100 個弱の高値で排卵がみられ、反復投与が可能であることが見いだされた。

次に 3 回反復採卵をおこなったが、免疫不全の NOG マウスにおいても B6 同様、採卵率、排卵数とも低値を示すが、IAS を用いた反復採卵が可能であることを示した。NOG マウスでは 2 回目の外科的採卵処置時に脂肪や卵巣が腹膜の切開部に癒着

し、採卵が困難な個体も見られたため、癒着防止をはかる必要がある。また、卵管膨大部の切開部位は完全に塞がっていないため、排卵卵子の紛失があるため、アロンアルファ以外の卵管膨大部の接着方法の検討も必要である。

E. 結論

外科的処置採卵時に卵管膨大部の卵巣側を切開することにより、組織接着剤を用いた場合と同程度の採卵率を得ることができた。B6 マウスでは、卵管膨大部の切開部位が塞がる 8 週間間隔で、抗インヒビン血清を用いてもアナフィラキシーショックを起こさずに反復採卵が可能であった。NOG マウスでは採卵率は悪く、排卵数も少ないが、3 回反復採卵が可能であった。しかし、共通して外科的処置採卵時に受精率の低下がみられた。

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

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。昨年度までの研究で、発達期の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。また、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。今年度の研究では、タンパク質動態と神経回路形成の関連を明らかにするため、2 重標識した脳皮質神経細胞を生体イメージングすることを試みた。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。

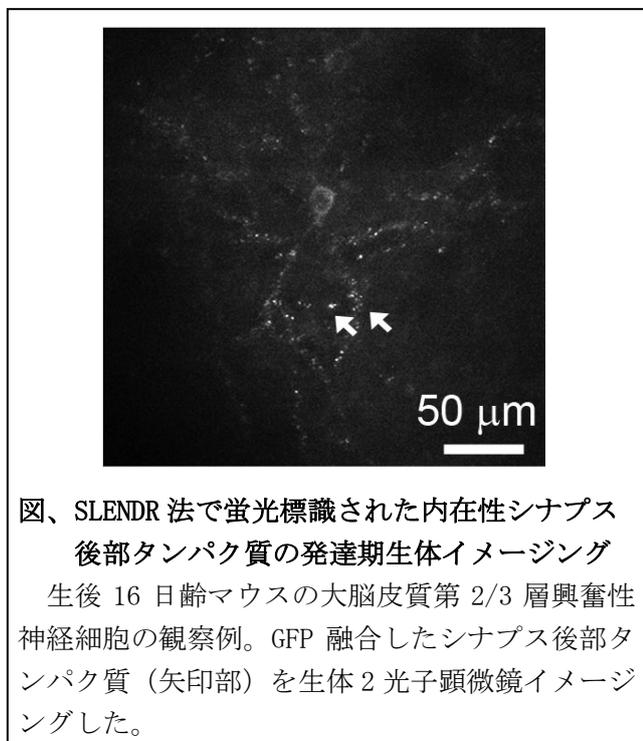
一方、研究代表者水野らは、これまでの研究で発達期マウス脳皮質内の個々の神経細胞を生体 2 光子顕微鏡イメージングする方法を開発した (Mizuno et al., Neuron 2014; Cell Rep 2018)。本研究では、SLENDR 法と発達期マウス生体イメージング法を融合することで、神経回路形成期の内在性タンパク質の動態を明らかにすること、タンパク質の動態と回路形成の関連を調べることを目指した。

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脳皮質第 2/3 層の興奮性神経細胞に発現させる

ことに成功した。

- 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)。



- ④ 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る。

胎生 14 日齢において SLENDR 法を適用した胎仔に対し、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、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確認された。

今年度の研究では、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 層興奮性神経細胞をタイムラプス観察する条件の検討を行った。

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 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。タイムラプス観察する際は、大脳皮質の同一視野を 9 時間ごとに 2 光子顕微鏡イメージングする予定であった。

・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

今年度の研究では、残念ながらタイムラプス観察の十分なデータは得られなかった。

D. 考察

タイムラプス観察のデータが得られなかった理由として、共発現細胞の割合が低いことが挙げられる。GFP 発現細胞において RFP が共発現している確立は 1%程度である。また SLENDR 法により、2 光子顕微鏡イメージング下で個々の細胞において GFP 標識された細胞内分子の分布を観察できる個体が得られる割合は、10%程度である。さらに、タイムラプス観察の成功率が 20%程度であることを考えると、作成した観察窓下にいる共発現細胞がタイムラプス観察できる可能性は現在の実験条件では極めて低いと予想される。

E. 結論

今年度の研究により、研究の成功の鍵が、遺

伝子導入条件の検討であることが分かった。今後、遺伝子導入する GFP 発現プラスミドの濃度、RFP 発現プラスミドを導入するタイミングを検討し、共発現細胞の割合を増加させることで、イメージングの成功に繋がると期待される。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

なし

2. 学会発表

発達期大脳皮質第4層における神経細胞動態と活動様式のイメージング（兼シンポジウムオーガナイザー）

水野秀信

第44回日本神経科学大会 [1S02a] 神経活動依存的なネットワーク形成：細胞間コミュニケーションから細胞内分子シグナルまで

2021年7月28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

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 組織化学的解析 (免疫染色、候補化合物による蛍光染色)
- ② 死後脳組織切片を用いたオートラジオグラフィ
- ③ 死後脳組織ホモジェネートを用いた結合実験系の構築・および構築された結合実験系での候補化合物評価

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の TDP-43 病変への結合評価を実施した。その結果、約 90 種の候補化合物において、高濃度溶液 (μM) 中での化合物と TDP-43 病変の結合を確認し、さらに、14 種の化合物では、開発のリード化合物と比較して、TDP-43 病変への結合選択性の向上が示唆された。これらの化合物のうち 11 種について、高濃度溶液 (μM) 中での化合物と筋萎縮性側索硬化症死後脳の TDP-43 病変の結合を検証したところ、前頭側頭葉変性症死後脳の TDP-43 病変に対する結合性とは異なる特性を示した。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、4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・病変間の結合や、*in vivo* での脳移行性を評価した。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、野生型マウスを用いた PET イメージングでは、末梢投与した当該候補化合物の脳への移行と良好なクリアランスが確認された。

D. 考察

本研究により、TDP-43 PET プローブ候補化合物 1 種が、中枢をターゲットとした PET プローブとして適切な動態を示すことが明らかとなった。また、前頭側頭葉変性症および筋萎縮性側索硬化症の死後脳を用いた組織化学的解析による候補化合物の特性評価から、化合物構造と各疾患の 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ーブの開発が期待される。

E. 結論

本研究において、前頭側頭葉変性症の TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する PET プロー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

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、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト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・品質管理・提供している。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整備する。さらに、脳研と国内研究機関との共同研究により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なれつつある。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、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整備することを目指す。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）

毎年開催される脳研究所合同セミナーに参加することにより国内の先端的な脳研究者の開発したマウスリソース情報や特性解析に関する情報を収集・整理する。収集した情報に基づ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

令和4年2月9日に合同セミナーに参加して、精神・神経疾患モデルマウスの開発、維持保管、提供に関する進行状況を報告し、さらにドーパミントランスポーター（DAT）Cre マウス系統の解析に関する情報交換を実施した。

脳研との共同研究により、笹岡教授らの開発したドーパミン関連遺伝子の改変マウスならびに崎村教授らの開発系統した多数の精神・神経疾患モデルマウス、さらに、合同セミナー参加研究者からご寄託いただいた脳・神経系の研究に有用なマウスを理研 BRC から研究コミュニティに提供して利活用の促進に貢献している。

医歯学総合研究科・五十嵐教授の研究室の中津史准教授によって進行中の研究プロジェクトに対して、理研 BRC の保有するマウス系統の提供支援を行なった。

脳研究所・池内教授には、認知症ゲノム情報の研究成果に基づいて、アルツハイマー病等の脳疾患モデルマウスに今後導入すべき遺伝子変異について、アジア人あるいは日本人に特徴的な疾患関連バリエーションに関する貴重な情報をいただいた。

新潟脳研で開発されたマウスを理研 BRC のホームページから広報した。①Today's Tool 8 系統、②「今月のマウス 2021 年 10 月号」照光-辻田先生からご寄託頂いた *Eif2b5* 遺伝子に変異を有する白質消失病モデル toy マウス (*J Neurochem* 154(1):25-40, 2020. RBRC10057, RBRC10058)。

D. 考察および

E. 結論

今後も脳研と国内研究機関との共同研究等により開発された脳神経系疾患モデルマウスの収集を進めて、研究コミュニティに広く提供し、脳神経系の基礎から医療・創薬研究に貢献する。

F. 研究発表(上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Kuno A, Ikeda Y, Ayabe S, Kato K, Sakamoto K, Suzuki S, Morimoto K, Wakimoto A, Mikami N, Ishida M, Iki N, Hamada Y, Takemura M, Daitoku Y, Tanimoto Y, Dinh TTH, Murata K, Hamada M, Muratani M, Yoshiki A, Sugiyama F, Takahashi S, Mizuno S. DAJIN enables multiplex genotyping to simultaneously validate intended and unintended target genome editing outcomes. *PLoS Biol* 20(1): e3001507, 2022. doi: 10.1371/journal.pbio.3001507
2. Mizuno-Iijima S, Nakashiba T, Ayabe S, Nakata H, Ike F, Hiraiwa N, Mochida K, Ogura A, Masuya H, Kawamoto S, Tamura M, Obata Y, Shiroishi T, Yoshiki A. Mouse resources at the RIKEN BioResource Research Center and the National BioResource Project core facility in Japan. *Mamm Genome* 16:1–11, 2021. doi: 10.1007/s00335-021-09916-x.
3. Birling MC, Yoshiki A, Adams DJ, Ayabe S et al. A resource of targeted mutant mouse lines for 5,061 genes. *Nat Genet* 53(4):416-419, 2021. doi: 10.1038/s41588-021-00825-y.
4. Takada T, Fukuta K, Usuda D, Kushida T, Kondo S, Kawamoto S, Yoshiki A, Obata Y, Fujiyama A, Toyoda A, Noguchi H, Shiroishi T, Masuya H. MoG+: a database of genomic variations across three mouse subspecies for biomedical research. *Mamm Genome* 33(1):31-43, 2022. doi: 10.1007/s00335-021-09933-w.
5. Mekada K, Yoshiki A. Substrains matter in phenotyping of C57BL/6 mice. *Exp Anim* 70:145-160, 2021. doi: 10.1538/expanim.20-0158.
6. Saito N, Itakura M, Sasaoka T. D1 Receptor Mediated Dopaminergic Neurotransmission Facilitates Remote Memory of Contextual Fear Conditioning. *Front Behav Neurosci* 16:751053, 2022. doi: 10.3389/fnbeh.2022.751053.
7. Sotoyama H, Inaba H, Iwakura Y, Namba H, Takei N, Sasaoka T, Nawa H. The dual role of dopamine in the modulation of information processing in the prefrontal cortex underlying social behavior. *FASEB J* 36(2):e22160, 2022. doi: 10.1096/fj.202101637R.
8. 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 KO mice reveal peripheral tissue-dependent differences in dopamine biosynthetic pathways. *J Biol Chem* 296:100544, 2021. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100544.
9. Watanabe N, Nakano M, Mitsuishi Y, Hara N, Mano T, Iwata A, Murayama S, Suzuki T, Ikeuchi T, Nishimura M. Transcriptional downregulation of FAM3C/ILEI in the Alzheimer's brain. *Hum Mol Genet* 31(1):122-132, 2021. doi: 10.1093/hmg/ddab226.
10. Kakuda N, Takami M, Okochi M, Kasuga K, Ihara Y, Ikeuchi T. Switched A β 43 generation in familial Alzheimer's disease with presenilin 1 mutation. *Transl Psychiatry* 11(1):558, 2021. doi: 10.1038/s41398-021-01684-1.
11. Shi Y, Zhang W, Yang Y, Murzin AG, Falcon B, Kotecha A, van Beers M, Tarutani A, Kametani F, Garringer HJ, Vidal R, Hallinan GI, Lashley T, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Tanaka H, Kakita A, Ikeuchi T, Robinson AC, Mann DMA, Kovacs GG, Revesz T, Ghetti B, Hasegawa M, Goedert M, Scheres SHW. Structure-based classification of tauopathies. *Nature* 598(7880):359-363, 2021. doi: 10.1038/s41586-021-03911-7.

2.学会発表 (学会名・発表年月・開催地なども記入)

1. 吉木 淳 “NBRP によるマウスリソースの研究基盤の整備” 第 127 回日本解剖学会総会・全国学術集会・教育講演 2022 年 3 月 (オンライン)
2. Yoshiki A “Advancing mouse resources for studies of health and disease” Session 5 Animal Research Resources: Forefront and Diversity. ANRRC 2021 hosted by NSTDA, Thailand. 2021 年 10 月 (オンライン)
3. 久野朗広, 池田祥久, 綾部信哉, 坂本航太郎, 鈴木沙耶香, 森本健斗, 脇本新, 三上夏輝, Dinh Tra Thi Huong, 村田知弥, 濱田理人, 村谷匡史, 吉木淳, 杉山文博, 高橋智, 水野聖哉 “機械学習を用いたロングリード配列解析による多サンプルでのゲノム編集変異アレル解析” 日本ゲノム編集学会第 6 回大会 2022 年 6 月 (オンライン)
4. 吉木淳, 水野沙織, 中田初美, 櫛田達矢, 臼田大輝, 高田豊行, 榎屋啓志 “マウスリソース情報の高度化” 第 61 回日本先天異常学会 2022 年 8 月 (オンライン)
5. 吉木淳, 水野沙織, 仲柴俊昭, 綾部信哉, 池郁生, 中田初美, 平岩典子, 持田慶司, 小倉淳郎, 小幡 裕一, 城石俊彦 “理研 BRC および NBRP 実験動物マウスの収集・保存・提供事業” 第 68 回日本実験動物学会総会 2021 年 5 月 (オンライン)

G.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

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。実際の歩行に際して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脳基底核の神経回路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、マウス歩行装置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、脳基底核線条体から神経活動を計測した。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。また、線条体神経細胞が脚の運動の周期や位相などリズムのパラメータに反応して活動していることを見出した。この結果は、線条体が周期的運動のリズムに関連した働きをしていることを示しており、パーキンソン病の病態を理解する手掛かりになると考えられる。

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。我々も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、歩行・走行中においてドーパミンによる運動制御が大切であることを示した (Nakamura et al., 2020)。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・走行時に重要な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

どのような局面で線条体神経回路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することを目的とした。本年度は、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と、走行時の神経活動パターンを解析した。

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歩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。神経活動の計測は、テトロード電極を線条体に留置させたマウスにステップホイールを走行させることにより行った。

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、運足の周期が一定で、左右脚の位置関係が安定している走行区間が見いだされた。安定部は、ペグパターン 1 周期あたり 1-3 個見いだされ、トレーニングが進むにしたがって個々の安定部が伸長する傾向が見いだされた。この安定部では繰返し均一に近い運動が見られることから「チャンク」であると考えられる。

走行するマウスの線条体から記録された神経活動を解析したところ、足のペグへのタッチに反応している神経細胞（タッチ反応性細胞）や報酬である水の飲み口に向かう際に活動する神経細胞などが見いだされた。そのなかで、タッチ反応性細胞について詳細に解析したところ、細胞ごとに異なる、至適な運足周期、至適な左右足タッチの時間差に反応していることが見いだされた。また、安定な周期で走行する歩数が多いほど、発火頻度が上昇する神経細胞が多いことがわかった。

D. 考察

以上の結果から、マウスは複雑なペグパターン場を走行する際には、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チャンクを形成し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。線条体から記録された神経活動は、リズムのパラメタである周期や繰返しに反応しており、連続運動の効率的生成・遂行に寄与している可能性が考えられる。

E. 結論

繰返し運動の場合、個々の運動を別個にコードするより、リズムパラメタを利用してコードするほうが、必要とされる情報量を節約できる。線条体神経細胞は、リズムパラメタをコードしており、繰返し運動の効率的制御に関与している可能性がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1. 広兼浩二郎、中村徹、寺下拓真、八木健、久保田康夫、Dan Hu、Ann M Graybiel、木津川尚史 複雑な走行運動中のマウスにおけるリズム情報は、線条体のニューロンによってコードされている 第 44 回日本神経科学大会、神戸・国際会議場、日本。2021 年 7 月 28-31 日。
2. Kojiro Hirokane, Toru Nakamura, Takuma Terashita, Takeshi Yagi, Yasuo Kubota, Dan Hu, Ann M Graybiel, Takashi Kitsukawa.
“Rhythm parameters were encoded by striatal neurons of mice running in complex stepping.” The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan, July28-31,2021.

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

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。末梢臓器での DA 作用は十分明らかとなっていないが、統合失調症に使われる薬剤は DA 受容体遮断作用を有している化合物が多く、患者における服薬コンプライアンスの低下など治療にも影響が出る原因となっている。我々は、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、心臓と膵臓では NA の減少とともに DA が比例して減少する一方、胃や肺では NA と DA の減少は相関していないことを明らかとした。そこで、DA 受容体の発現細胞を、レポータマウスを用いて免疫組織化学的に解析した。その結果、胃や肺において DA 受容体発現細胞が検出され、これらの臓器で DA が生理機能を担っていることが示唆された。

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 などの発達障がい病態にも深く関係している。また、統合失調症の治療には、DA 受容体阻害作用を有する化合物が多く使われている。一方、DA は末梢臓器でも、腎臓での Na 排泄の促進、膵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 の生理機能や、合成調節機構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) の働きにより生合成される。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 NA 産生細胞である交感神経と副腎髄質で選択的に *Th* 遺伝子を破壊したマウスにおける末梢臓器での DA 合成の解析結果を基に、胃や肺での DA 受容体の発現細胞の分布を、D1 受容体レポータマウスを用いて解析した。

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。

また、Tet-off システムにより、D1 遺伝子プロモ

ータにより発現が調節されているテトラサイクリン調節性転写活性化因子 (tTA) と、tTA がテトラサイクリン応答配列 (TRE) に結合すると *lacZ* と D1 受容体の発現が誘導されるマウスは、新潟大学の笹岡博士により作製された。このマウスを用いて D1 遺伝子の発現細胞を *lacZ* の染色により解析した。

本研究は、東京工業大学および新潟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実施した。

C. 研究結果

マウスの副腎髄質や交感神経などのノルアドレナリン産生細胞で *Th* 遺伝子を誘導的に破壊した後に、各臓器の DA, NA, TH タンパク質の変化を解析した。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ており、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が示唆された。

そこで、胃や肺の組織切片を用いて抗 TH 抗体、抗 AADC 抗体による免疫組織化学染色と、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マウス (笹岡教授から提供) を用いて D1 受容体の胃や肺での発現細胞を調べた。

その結果、右上図のように胃の粘膜層で TH 陽性細胞、AADC 陽性細胞を検出した。また、*LacZ* による X-gal の発色は筋層で観察された。肺では、気管の上皮細胞で TH と AADC 陽性細胞が同定され、X-gal 染色は血管周囲で観察された。

D. 考察

胃や肺などの末梢組織内に TH や AADC 発現細胞が存在し、D1 受容体の発現もレポータ遺伝子の発現から確認されたので、これらの末梢臓器で DA が自律的に生合成され生理機能を営んでいることが示唆された。

今回調べたのは、D1 受容体の発現細胞だが、統合失調症の治療には D2 受容体の拮抗薬が使われるため、末梢臓器での D2 受容体の発現や生理機能についても調べていく必要がある。

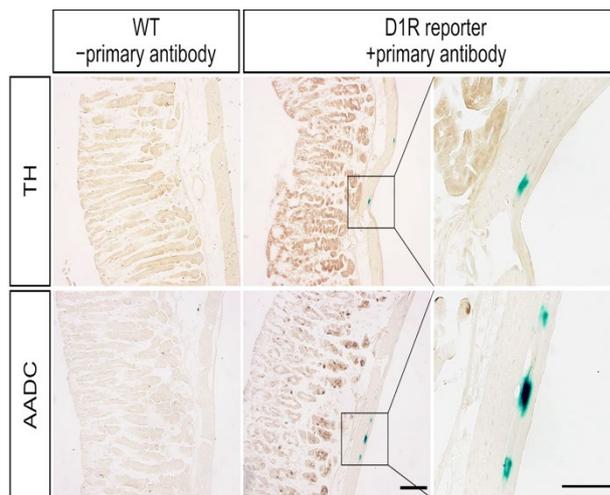


図 1. D1 受容体レポータマウスの胃切片での抗 TH 抗体 (上段) と抗 AADC 抗体 (下段) による染色結果

E. 結論

D1 受容体の末梢組織における発現細胞を、レポータマウスを用いて解析した。その結果、胃や肺において DA 受容体発現細胞が存在することが示され、これらの臓器で DA が生理機能を担っている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 真里²⁾, 柿田 明美³⁾

- 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 脳疾患標本資源解析学分野 3) 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 に結合するリード化合物を元にした 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、^[11C]CH₃ 基を導入する最適な合成条件を確立する。合成した ¹¹C 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、標的分子の特異的な抗体を用いる免疫染色などを用いて、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、人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に基づき、新潟大学脳研究所など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、^[11C]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、¹¹C 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 [¹¹C]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。また、ラットおよびアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症患者の脳切片における autoradiography において、特異結合を認めた。

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、ラットにおいて *in vivo* 評価し、ラットおよびアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症患者の剖検脳を用いた autoradiography において有用性を明らかにした。以上より、ヒトにおける有用性が期待できる。

E. 結論

[¹¹C]NCGG401 は、ラット生体およびヒト剖検脳を用いた検討において、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 イメージングとして有用と考えられる。今後、非臨床安全性評価を行ったのち、特定臨床研究として、ヒトにおける安全性・有用性を明らかにする。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

Ogata A, Ji B, Yamada T, Hattori S, Abe J, Ikenuma H, Zhou X, Seki C, Ono M, Nagai Y, Ishise M, Koyama H, Minamimoto T, Higuchi M, Zhang MR, Suzuki M, Kato T, Ito K, Kimura Y. [¹¹C]NCGG401, a novel PET ligand for imaging of colony-stimulating factor 1 receptors, a specific biomarker of microglia. *Bioorg Med Chem Lett.* 2022;128704.

2. 学会発表

1. Ogata A, Yamada T, Abe J, Ichise M, Ikenuma H, Koyama H, Suzuki M, Kato T, Ito K, Kimura Y. PET imaging of [¹¹C]NCGG401 for colony stimulating factor 1 receptor, NRM 2021 mapping neuroreceptors at work, Dec 14, 2021, Montréal, Canada (online).
2. Kimura Y: PET Imaging in Drug Development for Neurodegenerative Diseases. The 14th International Conference on Complex Medical and Engineering, Aug 1-15, 2020, Takamatsu, Japan (online)
3. Kimura Y: PET imaging of microglia. The 5th NCGG-ICAH Symposium, Apr 11, 2019, Obu, Japan
4. 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.
5. 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⁾, 山中 利之¹⁾, 小川 誠司¹⁾,
宮本 享¹⁾, 藤井 幸彦²⁾, 棗田 学²⁾, 垣内 伸之¹⁾, 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、微小组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、を知ることにより、「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。

サンガーシーケンスと MLPA を組み合わせて悪性度因子を検出することで、予後不良の星細胞腫を同定できるかを検証するために、42 症例を対象に、摘出手術標本から DNA を抽出し、サンガーシーケンスと MLPA、メチル化特異的 qPCR を行った。サンガーシーケンスは IDH1/2、TERT プロモーターと H3F3A、HIST1H3B を対象として行った。MLPA は SALSA MLPA KIT probemix P105 を使用し、EGFR、PTEN、PDGFRA など標的としたコピー数解析を行った。メチル化特異的 qPCR では MGMT プロモーターのメチル化を検索した。初回手術以降の臨床経過が追跡可能である 40 症例を対象に生存解析を実施した。P105 で検出した

chromosome 7 と chromosome 10 のコピー数変異を検証するために、全症例に対して SALSA MLPA KIT probemix P309 と P370 を用いて MLPA 解析を行い、さらに 9 症例に対して染色体マイクロアレイ解析を行った。

C. 研究結果

申請者らの研究グループでは、2021 年度は、確立した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用いて解析を継続した。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による結果、3 例中 1 例において、ddPCR で 3-9 mutations /3000 (0.1-0.3%) の頻度で IDH1 の変異を検出した。検出された正常脳組織の免疫組織学的な解析を進行中である。

42 症例の中で 21 症例が cIMPACT-NOW update3 における悪性度因子を有し、予後不良群に分類された。これらは全例が TERT プロモーター変異、もしくは EGFR amplification を有しており、サンガーシーケンスと MLPA によって特定することが可能であった。P105 で検出した chromosome 7 と chromosome 10 のコピー数変異検証では、P105 で EGFR gain と PTEN loss の両者を示す症例のすべてが、chromosome 7 gain と chromosome 10 loss を示しており、この対象群において MLPA での EGFR gain と PTEN loss の検出が、chromosome 7 と chromosome 10 のコピー数異常の検出に高い信頼性を持つことを明らかにした。予後解析では、悪性度因子を有する予後不良群がその他の群に比較して予後不良であることを同定した。COX 比例ハザード解析では、PTEN loss と PDGFRA amplification が独立した予後不良因子であることを明らかにした。

D. 考察

IDH 野生型膠芽腫の詳細な解析から、脳室壁に沿って存在する脳室下帯の正常グリア幹細胞に TERT プロモーター領域の変異クローンが発生し、そのクローンが脳内に移動し膠芽腫を発生する可能性が報告された。これは、正常脳組織においても IDH 野生型膠芽腫発生に関わるドライバー遺伝子変異を有するクローンの存在を示唆する。正

常脳組織、特に若年の正常脳組織において IDH 変異を有するクローンの存在や発生部位については未だ不明であるが、申請者らは IDH 変異型クローンの存在を示唆する結果を得た。

IDH 変異型グリオーマは、1 番染色体短腕欠失と 19 番染色体長腕欠失 (1p/19q 共欠失) を伴う乏突起膠腫と 1p/19q 共欠失を伴わない星細胞腫に分類される。IDH 変異による代謝産物 2-hydroxyglutarate (2-HG) の蓄積が腫瘍化の要因と示唆される。しかし、IDH 変異を有するクローンが乏突起膠腫、星細胞腫へと異なったクローン拡大に至る分子基盤についても不明である。これらの解明を行うことで、正常組織での変異クローンの拡大と組織再構築に関する包括的な理解、がんの発生、進展、組織の老化に関する新たな視点での理解が進む。

E. 結論

正常脳組織のゲノム解析による IDH 変異型グリオーマ発生の分子基盤を解明し、早期診断・早期予防治療の標的分子群の同定を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

Makino, Arakawa, et. Al. Prognostic stratification for IDH-wild-type lower-grade astrocytoma by Sanger sequencing and copy-number alteration analysis with MLPA. Scientific reports 11, 1, 14408-14408, 2021.

2. 学会発表

特記事項なし

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 *Scrapper* 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 笹岡 俊邦²⁾, 阿部 学²⁾, 崎村 建司²⁾, 高雄 啓三³⁾

1) 関西学院大学 2) 新潟大学脳研究所 3) 富山大学

研究要旨

SCRAPPER は神経シナプスに局在し、神経伝達物質放出の制御にかかわるユビキチン E3 リガーゼである。*Scrapper* 遺伝子ノックアウト (SCR-KO) マウスが生後致死であるため、成体での SCRAPPER 分子の機能を十分に解析できなかった。そこで部位特異的なコンディショナル KO (cKO) マウスを作製し、その詳細な機能解析を行うことを計画した。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、発生初期に Cre 組換え酵素の mRNA をエレクトロポレーション法により導入し、SCR-KO マウスを作製し解析を行っている。

A. 研究目的

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

SCR-KO マウスは、多くの個体が生後半年程度で死亡する。また、産仔数もメンデルの法則に従わず少ないことから、SCRAPPER が発生段階においても機能していることが予想される。本研究では、致死の表現型を回避し脳に限定した機能を解析することができる、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富山大学の動物実験委員会および組換え DNA 安全実験委員会の承認を得たうえで、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 マウスを導入したところ、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見られ、予想外の表現型となる可能性があることが判明した。そのため、解析に適する別のドライバーマウスを検討、選択および交配、その後の解析を行う必要がある。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を行っていたが、富山大学との共同研究で Cre リコンビナーゼの mRNA を受精卵に導入し、SCR-KO マウスを作製、関西学院大学に導入することができた。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現在検討しており、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

今後、解析に適するドライバーマウスを選択し、さらに交配を行い、ノックアウトマウスラインの樹立とその後の解析が必要であるため、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、過去に作製解析した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たことから、新たに得られた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ており、次年度以降解析を行う予定である。

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. Fujisawa Y, Ono H, Konno A, Yao I, Itoh H, Baba T, Morohashi K, Katoh-Fukui Y, Miyado M, Fukami M, Ogata T. Intrauterine Hyponutrition Reduces Fetal Testosterone Production and Postnatal Sperm Count in the Mouse. *J Endocr Soc.* 2022 Feb 15;6(4)
2. Matsuo T, Isosaka T, Hayashi Y, Tang L, Doi A, Yasuda A, Hayashi M, Lee CY, Cao L, Kutsuna N, Matsunaga S, Matsuda T, Yao I, Setou M, Kanagawa D, Higasa K, Ikawa M, Liu Q, Kobayakawa R, Kobayakawa K. Thiazoline-related innate fear stimuli orchestrate hypothermia and anti-hypoxia via sensory TRPA1 activation. *Nat Commun.* 2021 Apr 6;12(1):2074.

2. 学会発表

1. 清家碧夏、鳥山道則、矢尾育子、古賀浩平
急性ストレスによる脳内環境変化の解析
第31回 神経行動薬理若手研究者の集い
2022/3/6
九州大学（福岡市）※ハイブリッド開催・オンライン発表
◆若手優秀賞受賞
2. 川端遼、荒田晶子、矢尾育子、古賀浩平
中枢神経における TRPA1 の働き
第31回 神経行動薬理若手研究者の集い
2022/3/6
九州大学（博多市）※ハイブリッド開催・オンライン発表
◆若手優秀賞受賞
3. 山ノ井俊宏、西建瑠、山下七夕美、矢尾育子、鳥山道則
蛍光 RNA 免疫沈降法による RNA 結合タンパク質の同定手法の確立（ポスター）
第44回分子生物学会年会 2021/12/1-3
パシフィコ横浜（横浜市）
4. 西建瑠、山下七夕美、山ノ井俊宏、鈴木慎一郎、矢尾育子、鳥山道則
新規 RNA 結合タンパク質 RNF39 の機能解析（ポスター）

- 第 44 回分子生物学会年会 2021/12/ 1-3
パシフィコ横浜（横浜市）
5. 横田 麻里子、苅田 憲人、鈴木 慎一郎、
鳥山 道則、矢尾 育子
ドコサヘキサエン酸の摂取は神経細胞
の一次繊毛形成を促進する（ポスター）
第 44 回分子生物学会年会 2021/12/ 1-3
パシフィコ横浜（横浜市）
 6. 清家碧夏、川上紘生、鳥山道則、古賀浩
平、矢尾育子
急性ストレスによる神経伝達変化の解
析（ポスター）
第 94 回日本生化学会大会 2021/11/3-5
パシフィコ横浜（横浜市）※オンライン
開催
 7. 小上馬純奈、鳥山道則、矢尾育子
ユビキチンリガーゼ Scrapper タンパク
質のリン酸化解析（ポスター）
第 94 回日本生化学会大会 2021/11/3-5
パシフィコ横浜（横浜市）※オンライン
開催
 8. 福森あみ、鳥山道則、矢尾育子
ユビキチンリガーゼ SCRAPPER 結合分子
の同定と機能解析（ポスター）
第 94 回日本生化学会大会 2021/11/3-5
パシフィコ横浜（横浜市）※オンライン
開催
 9. 矢尾育子
神経伝達物質の量的変化を質量分析で
可視化する試み/Visualization of the
alteration of the amount of
neurotransmitters by mass
spectrometry
シンポジウム：最先端技術をつかって神
経系細胞の生涯を理解する
第 64 回日本神経化学学会大会
2021/10/1
奈良県立医科大学（橿原市）※オンライ
ン開催
 10. 森田夕月、衛藤史博、矢尾育子
質量分析イメージングへの位相的デー
タ解析適用による脳内代謝物変化の探
索
第 44 回日本医用マススペクトル学会年
会 2021/9/17
東北大学（仙台市）
 11. 森田夕月、衛藤史博、矢尾育子
Scrapper 欠損マウス脳における脂質分
子変化の探索
第 43 回日本神経科学大会 2021/7/30
神戸国際展示場（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
1 件出願準備中
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
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

2021年度本研究では、遺伝子組換えヒトアルブミン(以下 recHA)をヒト体外受精培養液と同程度の1w/v%加えた培養液を用いて、オクタン酸(以下 OA)濃度を0.400, 600 μ Mとして培養・移植実験を行い、胎仔への影響を確認した。recHA1w/v%加 KSOM(以下 A群)、OAをそれぞれ400, 600 μ M加えてから recHAを加熱滅菌したのちに0.1%加えた KSOM(以下 B, C群)の胚盤胞発生率はそれぞれ94.1%、77.8%、70.0%とOA添加量が増加するに従って有意に低下した。これらの胚盤胞を移植して得られた胎仔の出生体重は、オスでそれぞれ1.4、1.4、1.4gと差が認められなかったが、メスでは1.1、1.2、1.5gとOA濃度が増加するに従って出生体重が増加する傾向を認めた。出生後の体重は、三群で有意な差を認めなかった。

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のために60 $^{\circ}$ C、10時間の低温加熱滅菌が行われるが、そのときに起こるアルブミンの重合(変性)を防ぐ目的でアルブミン1gあたりオクタン酸(以下 OA)80 μ mol、およびN-Acetyl-Tryptophane(以下 NAT)80 μ molが添加されている(ヒト体外受精培養液のHSA最終アルブミン濃度1%として、最終的なOA、NAT濃度は800 μ M程度となる。)ヒト血清中のOA濃度(0.2 μ M程度)と比較して異常に高く、培養中の受精卵への影響が懸念される。実際マウス胚の培養によりOAが培養液中で消費され、胚の糖代謝経路内に取り込まれていることを我々は報告しており、近年指摘されているヒト体外受精児(特に凍結胚移植由来児)の高出生体重と関連している可能性も否定できない。

そこで本研究は、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

し、高OA濃度環境が胚およびそれに由来する出生仔にどのような影響を及ぼすかを確認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)

遺伝子組換えヒトアルブミン(recHA)をヒト体外受精培養液と同程度の1w/v%加えた培養液を用いて、オクタン酸(以下 OA)濃度を0.400, 600 μ Mとして培養・移植実験を行い、胎仔への影響を確認した。

具体的な培養液調整法は以下の通りである。対照として生理食塩水中でNAT80 μ mol/1g・recHAを加えた20w/v%recHAを調整(非加熱)、これをKSOM中で20倍希釈して1%recHA加KSOMを調整した(A液)。実験群は生理食塩水中で20w/v%recHAにNAT80 μ mol/1g・recHAと、OAをそれぞれ80 μ mol/1g・recHA、120 μ mol/1g・recHA加えた後に60 $^{\circ}$ C、10時間加熱滅菌して加熱濃厚(20w/v%)recHA液を調整、これをKSOM中で20倍希釈して1%recHA加KSOM(800 μ M NAT+800 μ M OA、および800 μ M NAT+1200 μ M OA)培養液を

調整した (B,C 群)。

マウス胚は (C57BL/6N) の雄マウス精巣上体精子と、PMSG5IU、hCG5IU で過排卵した同系雌マウス排卵卵子を BSA0.3%加 KSOM 液中で体外受精した受精後 24 時間の 1 細胞期胚を用いた。

移植実験は、偽妊娠 ICR 雌マウス卵管角に行った。1 細胞期胚の移植までの培養時間は 72 時間、偽妊娠マウスの移植は膣栓確認後 2.5 日で行った。

出生直前に帝王切開にて胎仔を取り出し、仮親に保育をさせて出生児から 1 週間ごと、4 週までの体重を雄・雌それぞれについて行った。

C. 研究結果

培養 96 時間後の胚盤胞への発生率は A、B、C 群においてそれぞれ 94.1% (32/34)、77.8% (28/36)、70.0% (28/40) であった。

A,B,C 群の移植胚あたり着床率はそれぞれ 68% (27/40)、64% (26/36)、68% (27/40)、胎仔数は 25% (10/40)、19% (7/36)、18% (7/40) であった。

新生仔の出生体重はオスでそれぞれ 1.4、1.4、1.4g と差が認められなかったが、メスでは 1.1、1.2、1.5g と OA 濃度が増加するに従って出生体重が増加する傾向を認めた。出生後 1 週間ごと、4 週間まで新生仔の体重を調査したが、OA 濃度による差は認められなかった。

D. 考察

本実験系は 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そのものによるものか、OA 以外に添加されている N-Acetyl-Tryptophane (NAT) や、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、2019 年度及び 2020 年度に NAT も加えた加熱 recHA を用いた基礎実験を行い、本年度の実験系を確立することができた。

その結果、1.0 w/v %recHA および NAT800 μ M を含み、OA をそれぞれ 0 μ M、800 μ M、1200 μ M 含む培養液で 72 時間培養することによって、雌の出生体重が有意に変化し、培養液中の OA 濃度

が上昇するとともに出生体重が増加することが明らかとなった。このことは、培養液中の OA がマウス胚に何らかの影響をおよぼし、それが移植後の胎仔発育・出生体重に影響を及ぼす可能性を示している。

このことはヒトの体外受精凍結胚移植由来児で出生体重が自然妊娠由来児に比べて増加することを考えると、極めて興味深い結果である。

現在、この体外受精培養胚盤胞の遺伝子発現解析を行っており、その結果が待たれる。

E. 結論

培養液中の OA が濃度依存性にマウス胚に何らかの影響をおよぼし、それが移植後の胎仔発育・出生体重に影響を及ぼすことが示唆された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表 (なし)

2. 学会発表 (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関連

研究代表者 大滝 博和^{1) 2)}
研究分担者 柿田 明美³⁾

1) 昭和大学・医学部・顕微解剖学, 2) 東京薬科大学・薬学部・機能形態学
3) 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。代表者は Pin1 KO マウスの脳視床に大きなサイズの抗 APP 抗体陽性反応の出現を認めている。本研究の目的は APP 抗体陽性反応物の実態解明とヒト神経変性疾患への関連を明らかにすることである。昨年までに Pin1 KO の APP 陽性反応はエオシン好性視床封入物と類似する病理学的特徴を有すること示し、ヒト筋硬直性ジストロフィー (DM) 患者の剖検脳に APP 陽性反応の存在を見出した。本年度は DM 患者の例数を増加し APP 陽性反応の分布局在を調べた。さらに、マウス視床をマイクロダイセクションおよび LC-MS/MS によりプロテオミクス解析を試みた。その結果、DM 患者の視床への APP 陽性反応の局在化を認めた。さらにプロテオミクス解析により APP が有意であることに加えアルツハイマー病 (AD) と関連する SOD1 や ApoE も有意であった。

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・治療法は明らかとなっていないもの少ない。Pin1 は多様なタンパク質を触媒するが、アミロイド前駆タンパク質 (APP) 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にあることが示され AD などとの関与が示唆されている。また Pin1 遺伝子欠損 (KO) マウスは加齢性の神経異常を呈するとの報告がある。更に、AD や前頭側頭葉認知症 (FTD) の Pin1 のメチル化および酵素活性の解析により AD は Pin1 の活性が高く、FTD は活性が低いと報告されている。

申請者は Pin1 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた脳を解析したところ加齢に伴い視床に増加する APP 陽性反応物の存在を見出した。新潟大学脳研究所が所有する脳神経変性疾患に関わる剖検脳

を用いて調べたところ筋硬直性ジストロフィー (DM) 患者のエオシン好性視床封入物と一致し APP 陽性反応が認められた。さらに、Pin1 KO マウスの視床を病理染色したところエオシン好性視床封入物と同様の所見を得た。本年度は、DM 患者の例数を増加し APP 免疫染色を試み、その陽性反応の分布局在を調べるとともに、マウス視床のプロテオミクス解析を試みた。

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。

ヒトの剖検脳は DM 患者剖検脳 6 例 (男 4, 女 2 例, 年齢 65 ± 8.5 歳) を新潟大学脳研究所「脳神経病理標本資源活用の先端的共同研究拠点」の支援を受け提供された。

Pin1 KO マウスの動物実験は、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を行った。

【マウスの組織切片の作成】

マウスの脳は生理食塩水および 10%中性緩衝ホルマリンの還流固定後にパラフィン切片を作成した。

【アミロイド免疫染色】

マウス (Pin1 KO) および DM 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。

【マイクロダイセクション】

マウス脳パラフィン切片 (10 μm) を MembraneSlides (Leuca) に貼り付け HE 染色を行った。両半球の視床部位をレーザーマイクロダイセクション (LMD7000, Leuca) により切り出し、界面活性剤で可溶化、トリプシン処理にてペプチド化した後に、LC-MS/MS [DiNa nano-LC system (KYA TECH Corporation), coupled online with the Triple TOF 5600+ system]にてタンパク質断片を同定した。解析は Scaffold5 にて行った。

C. 研究結果

DM 剖検脳を APP 染色の後、APP 陽性反応の局在をスコア化 (0-3; 3が多い) した。その結果、視床の背外側核、外側腹側核、後外側核、内側核に主に分布していることが明らかとなった。年齢、性別などに偏りは見られなかった。次にマイクロダイセクションおよび LC-MS/MS によるプロテオミクス解析の結果、APP, A β 1-42 (amyloid-like protein 2), Park7 (Parkinson disease protein 7) などに加え、SOD1 や ApoE などを含む 102 種に有意な変化を認めた。

D. 考察

高齢者の剖検脳の解析により視床にエオシン陽性の封入体が認められることは報告されてきた。この封入体は HE 染色によりエオシン好性であり、Luxol fast blue で明るい青に染色されるが、アミロイド染色である Congo red 陰性と報告

されている。DM 患者の視床にエオシン陽性封入体が高頻度に認められることはこれまで報告されていた。そして、DM 剖検脳において前例で観察されることが知られていた。一方高齢マウスにおいても同様な封入体の存在が示されてきた。本研究においてこの封入体はマウス脳、ヒト剖検脳において APP 抗体により極めて特異的に染色されることが明らかとなった。さらに、高齢の Pin1 KO マウスは野生型に比べ、この封入体のサイズが有意に非常に大きくなる。Pin1 KO は空間認知、社会性、落ち着きなど様々な神経機能異常をきたす。この結果は、この APP 陽性視床封入体の蓄積が神経機能異常と深く関与する可能性を示唆している。

E. 結論

DM 患者の視床封入体の役割はわかっていないが、DM 患者も中枢神経症状 (認知症状, 性格変化) などが報告されており、Pin1 KO マウスを解析すること、視床に蓄積する APP を解析することにより DM 患者の中枢神経症状の原因を明らかにできるかもしれない。

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 (学会名・発表年月・開催地なども記入)

1. Ohtaki H, Uchida T, Yoshikawa A, Ono K, Kakita A, Honda K. Characterization of amyloid positive deposit in Pin1 KO mice. 第 64 回日本神経化学会大会 (2021/9/30~10/1) オンライン

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

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

小児脳腫瘍の中でもっともよく発生する悪性脳腫瘍のひとつとして小児の髄芽腫が知られている。近年の次世代シーケンシング法の進展により、髄芽腫には WNT シグナルや SHH シグナルが関与する浸潤の程度が低いグループと、それらとは異なり、浸潤の頻度が高い Group 3, Group 4 髄芽腫という4グループがあることが明らかにされた。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、Single Nucleotide Polymorphism-Distinguishable small interfering RNA (SNPD-siRNA)の開発を行う。昨年度までの共同研究により、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 SNPD-siRNA は、変異型遺伝子に極めて特異的に抑制効果を示すことを明らかにした。本年度はそれらに加えて、WNT シグナル経路に関わる SMARCA4 や SHH シグナル経路に関与する SMO, MYCN、さらにグループ III に含まれる SMARCA4、およびグループ IV の MYCN、SNCAIP に対する SNPD-siRNA も有用であることが明らかになり、特異的治療薬の候補を拡大することができた。

A. 研究目的

小児髄芽腫の発症には WNT シグナル経路や SHH シグナル経路などの神経発生に関わる経路の異常が関与する。ゲノム解析診断に関する近年の研究の進展により、その原因遺伝子および腫瘍形成に関わる塩基変異部位が特定されてきた。本研究では、それらのがんドライバー遺伝子の特性を脳研究所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 SNPD-siRNA をレポーターアッセイで構築する。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)

髄芽腫は、WNT, SHH, Group 3, Group 4 という4グループに分類される。それぞれのグループにおいて、1塩基の変異が腫瘍形成を誘導する遺伝子を選択し、変異遺伝子は抑制するが野生型遺伝子は抑制しない SNPD-siRNA を開発し、変異特異的治療薬として開発する。昨年までには、WNT 髄芽腫では CTNNB1

および Group 4 髄芽腫の原因遺伝子である ZMYM3 に対する SNPD-siRNA の構築に成功している。今年度は、さらに WNT 髄芽腫における SMARCA4, SHH 髄芽腫における SMO, MYCN、グループ III の SMARCA4、およびグループ IV の MYCN, SNCAIP に対する SNPD-siRNA の開発を行った。アッセイ系としてはルシフェラーゼ発現レポーター遺伝子を用いた。海椎茸ルシフェラーゼの3'UTRにそれぞれの遺伝子の野生型と変異型の1塩基変異部位を挿入し、変異型のみを抑制して野生型は抑制しない SNPD-siRNA を設計・構築した。さらに、マイクロアレイや RNA シーケンシングを行うことで、SNPD-siRNA のオフターゲット効果をゲノムワイドに解析する予定である。

C. 研究結果

小児髄芽腫のドライバー遺伝子の中で、昨年度に構築した 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 SNP-D-siRNA に加えて、本年度は WNT シグナル経路に関わる SMARCA4 や SHH シグナル経路に関与する SMO, MYCN, さらにグループ III に含まれる SMARCA4、およびグループ IV の MYCN、SNCAIP に対する SNP-D-siRNA の構築にも成功し、特異的治療薬の候補を拡大することができた。

D. 考察

これまでに構築した小児髄芽腫原因遺伝子に対する SNP-D-siRNA は核酸医薬品として有用と考えられる。今後は、野生型と変異型に対する抑制効果の明確な違いがでなかった他の遺伝子の中から、脳研究所の方々との議論から特に重要な遺伝子を選定し、それらに対する SNP-D-siRNA の改善・改良を行うことで、候補遺伝子のさらなる拡大を目指す。

E. 結論

本研究で開発した、CTNNB1、ZMYM3、SMARCA4、SMO、MYCN、SNCAIP などに対する SNP-D-siRNA を構築し、これらが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。これらの siRNA の有効性を脳研究所の病理標本や腫瘍由来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

1. Kobayashi Y, Tian S, Ui-Tei K. (2022) siRNA off-target effect is determined by base-pairing stabilities of two different regions with opposite effects. *Genes (Basel)*, 13, 319.
2. Kobayashi Y, Fukuhara D, Akase D, Aida M, Ui-Tei K. (2022) siRNA Seed Region Is Divided into Two Functionally Different Domains in RNA Interference in Response to 2'-OMe Modifications. *ACS Omega*, 7, 2398-2410.
3. Kobayashi Y, Miyamoto K, Aida M, Ui-Tei K. (2021) Selection of chemical modifications in the siRNA seed region that repress off-target effect. *Methods in Molecular Biology, Design and Delivery of siRNA Therapeutics*, 2282, 17-30.
4. 小林芳明、程久美子 (2021) siRNA 医薬：siRNA 医薬とオフターゲット回避技術

siRNA Drug : Development of method avoiding off-target effect 日本薬学会医薬化学部会機関誌「MEDCHEM NEWS」31-4 号「ESSAY 特集」,じほう MEDCHEM NEWS

5. 浅野吉政、小林芳明、程久美子 (2021) mRNA を制御するモダリティ: siRNA と miRNA 一分子的作用機序から開発動向まで— 実験医学・増刊号『核酸医薬 本領を發揮する創薬モダリティ』(編集・横田隆徳), 39(17)、30-36、羊土社
6. 浅野吉政、程久美子 (2021) 遺伝子発現抑制効果を評価する: siRNA による RNAi 実験医学別冊『リアルタイム・デジタル PCR 実験スタンダード～検出・定量・診断のためのパーフェクトマニュアル』(編集・北條浩彦), 88-96、羊土社

2. 学会発表

1. Seongjin An, Yoshiaki Kobayashi, Kohei Nomura, Akase Dai, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe, Misako Aida, Kumiko Ui-Tei. Avoidance of siRNA off-target effect using two types of chemical modifications: base and sugar. 第 44 回日本分子生物学会 (2021.12.2) パシフィコ横浜 オンライン-プラス形式
2. 大山隼礼、小林芳明、佐藤淳、程久美子 PIK3CA がん原遺伝子の一塩基変異を識別して抑制する小分子干渉 RNA(SNP-D-siRNA)の有効性の検証. 第 44 回日本分子生物学会 (2021.12.2) パシフィコ横浜 オンライン-プラス形式
3. 小林芳明、田中、福原大輝、赤瀬大、相田美砂子、程久美子 2'-OMe 修飾した siRNA の seed 領域は 2 つの機能ドメインをもつ 第 44 回日本分子生物学会 (2021.12.1) パシフィコ横浜 オンライン-プラス形式
4. 鈴木ゆりあ、小林芳明、程久美子 トリプレットリピート病の原因遺伝子における一塩基多型を識別する小分子干渉 RNA (SNPD-siRNA) の構築とマカド・ジョセフ病由来細胞における検証 第 44 回日本分子生物学会 (2021.12.1) パシフィコ横浜 オンライン-プラス形式
5. 程久美子 1塩基の変異を区別する siRNA 核酸医薬品開発と脳腫瘍原因遺伝子への適用の可能性 新潟大学脳科学研究所セミナー@新潟大学(2021.11.29)

6. 鈴木ゆりあ、小林芳明、程久美子 トリプレットリピート病の原因遺伝子における一塩基多型を識別する小分子干渉 RNA (SNPD-siRNA) の構築 日本核酸医薬学会第 6 回年会・シンポジウム(生物) (2021.6.27) オンライン開催
7. 佐藤淳、小林芳明、浅野吉政、谷口博昭、程久美子 1 塩基変異型 KRAS を野生型と区別して抑制する SNPD-siRNA による変異 KRAS 遺伝子抑制効果の膵臓がん由来細胞における検証 日本核酸医薬学会第 6 回年会(2021.6.27) オンライン開催
 - 小林芳明、レディ奈緒美、程久美子 一塩基変異を識別して特異的に抑制する single nucleotide polymorphism-distinguishable siRNA (SNPD-siRNA) の開発 日本核酸医薬学会第 6 回年会(2021.6.27) オンライン開催
 - Shengliang Ni, Kumiko Ui-Tei Whole Genome analysis-based design and validation of siRNAs targeting the conserved regions of coronaviruses 日本核酸医薬学会第 6 回年会(2021.6.27) オンライン開催
 - 程久美子 K-RAS 変異特異的 SNPD-siRNA 医薬品の開発 第 25 回日本がん分子標的治療学会シンポジウム (2021.5.28) Online

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特願 2021-005335:2021 年 1 月 15 日
 RNA 分子、キメラ型 NA 分子、二本鎖 RNA 分子、および二本鎖キメラ型 NA 分子
 発明者:程久美子、小林芳明、佐藤淳、浅野吉政、鈴木ゆりあ、LEDEY Naomi、西郷薫、名取幸和
 出願人:国立大学法人 東京大学

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

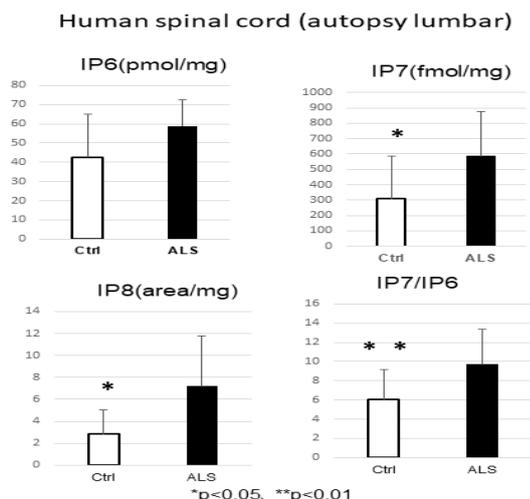
本研究の目的は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の脊髄において、IP6、IP7 を我々が開発した質量分析の手法を用いて定量測定を行い、コントロール検体と比較検討する。この測定方法により世界で初めて IP6、IP7 定量測定ができるようになった。それにより、IP6、IP7 の比率を計算して、我々が、培養細胞実験や動物実験で報告してきた結果と合致するかを検討する。その結果、ALS の神経細胞死に IP6 を IP7 にリン酸化する酵素の IP6K が関与していることを明らかとする。

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 (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、脳脊髄液検査、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



コントロール5例（年齢 70歳前後）、ALS患者9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）（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

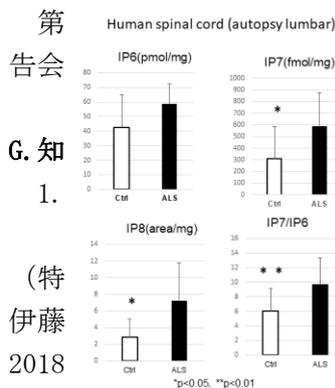
IP6、IP7は、ALS病態に深く関与しており、ALSの重要な新たな神経細胞死メカニズムの一端をなしていると考えられる。現在某企業との共同開発でIP6Kに選択的に阻害する薬剤を開発中であり、近日中にも動物投与実験を行う予定である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

本年度はなし。

2. 学会発表



G. 知

1.

（特
伊藤
2018

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DNAメチル化アレイを用いて取得されたDNAメチル化プロファイルの比較検討を実施した。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DNAメチル化プロファイル差の更なる詳細な解析と、エピゲノムレベルでの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正常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。令和2年度は、RNA sequencing (RNA-seq)法を用いて、ヒト正常神経幹細胞及び脳腫瘍患者由来腫瘍幹細胞の遺伝子発現の特性解析を実施したが、近年は脳腫瘍発生とエピゲノム異常との関連性に関する多くの知見の報告があり、脳腫瘍特性解析のためには、遺伝子発現特性

解析に加えて、エピゲノム特性解析が重要であると考えられる。

以上より、令和3年度は、ヒト正常神経幹細胞及び脳腫瘍患者由来腫瘍幹細胞のエピゲノム特性解析を目的として、DNAメチル化アレイを用いて取得されたDNAメチル化プロファイルの比較検討を実施した。

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

令和2年度に継続して、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)11株、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)2株、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)2株、の

合計 15 株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 から分離された DNA を使用して、illumina 社 Methylation EPIC BeadChip を用いて取得された DNA メチル化プロファイル情報に関して、hN-NSPC および hiPSC-NPC を、対照細胞として使用した解析を実施した。

C. 研究結果

正常細胞である hN-NSPC (oh-NSC-3-fb, oh-NSC-7-fb: 図赤字) および hiPSC-NPC (1201C1-NPC-A, 1201B2-NPC-A: 図青字) の DNA メチル化プロファイルに関しては、令和 2 年度に解析した RNA sequencing 法を用いた遺伝子発現プロファイルと同様に、類似性が高いことが確認された。これら 2 種類 4 株の正常細胞に GDC11 株 (図黒字) の DNA メチル化プロファイル情報を加えた条件で実施した合計 15 株でのクラスター解析の結果では、11 株中 9 株 (81.8%) の GDC は正常細胞と同じクラスターに含まれるが、その全ては正常細胞とは異なるサブクラスターに属することが明らかとなった。一方、11 株中 2 株 (18.2%) の GDC は、他の GDC および正常細胞とは別の独立したクラスターを形成し、GDC 内でも複数のサブグループに分類されることが明らかとなった (図)。

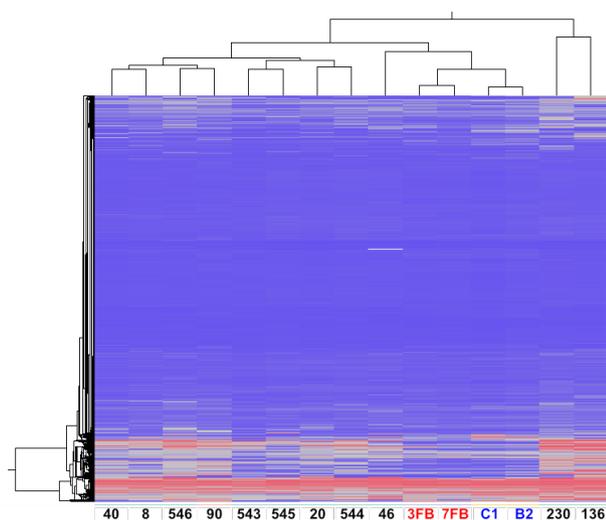


図: DNA メチル化プロファイル解析 (クラスター解析)

D. 考察

令和 2 年度に実施した遺伝子発現解析のデータと一致して、GDC と正常細胞 (hN-NSPC および hiPSC-NPC) との間には DNA メチル化プロファイルレベルでも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、DNA メチル化プロファイル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 DNA メチル化プロファイル特性の更なる詳細な解析と、エピゲノムレベルでの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、研究を順次進めていく予定である。

E. 結論

DNA メチル化アレイを用いた DNA メチル化プロファイル解析にて、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 DNA メチル化プロファイル特性の更なる詳細な解析と、エピゲノム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

無し

2. 学会発表

- 金村米博: グリオーマの分子分類. 第 41 回日本脳神経外科コンgres 総会, 2021 年 5 月 13 日 ; WEB
- Kijima N, Kanematsu D, Shofuda T, Yoshioka E, Yamamoto A, Handa Y, Fukusumi H, Katsuma A, Moriuchi S, Nonaka M, Okita Y, Tsuyuguchi N, Uda T, Kawashima T, Fukai J, Kodama Y, Mano M, Higuchi Y, Suemizu H, Kanemura Y: Genetic and molecular properties of long-term proliferating tumorsphere -forming glioma derived cells. 26th Annual Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, 2021 年 11 月 19 日 ; Boston, USA
- 木嶋教行、兼松大介、正札智子、吉岡絵麻、山本篤世、半田有佳子、福角勇人、勝間亜沙子、隅田美穂、森内秀祐、埜中正博、沖田典子、露口尚弘、宇田武弘、

川嶋俊幸、深井順也、児玉良典、眞能正幸、樋口裕一郎、末水洋志、金村米博：グリオーマにおける患者腫瘍組織由来初代培養細胞株の遺伝学的、分子生物学的解析。第39回日本脳腫瘍学会学術集会，2021年12月6日；神戸市

4. 金村米博：WHO2021 脳腫瘍分類の概要と今後の分子診断の課題。第3回悪性神経膠腫治療カンファレンス，2022年3月11日；WEB

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

Development, optimization and validation of human AQP-4 PET Radioligand

Principal Investigator Marek Kubicki¹

Co-Investigators Hironaka Igarashi², Ofer Pasternak¹, Changning Wang¹

¹Professor, Director of Psychiatry Neuroimaging Laboratory, Department of Psychiatry, Harvard Medical School. ²Professor, Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, University of Niigata

Abstract

The overall goal of this proposal is to identify, develop, characterize and validate a new ¹⁸F-based radioligand for the non-invasive clinical imaging of AQP-4, the protein that forms the most prominent water channel found in the human brain. We believe such a ligand will be essential to investigate the roles of AQP-4 in psychiatric and neurodegenerative diseases. With the support and assistance of BRI faculty members, Professor Tsutomu Nakada and Dr. Vincent Huber, we investigated the possibility of adopting the first generation AQP-4 radioligand, [¹¹C]TGN-020, which was developed at Niigata University, for our studies. [¹¹C]TGN-020 was demonstrated to have robust differential uptake in wild type mice and AQP-4 knockout mice consistent with selective AQP-4 binding. Pilot PET imaging with [¹¹C]TGN-020 in healthy humans also demonstrated a specific and expected distribution pattern for AQP-4, with higher expression in the subpial, perivascular end-feet of astrocytes and the choroid plexus, as well as an affinity of the ligand for astrocytic brain tumors. However, due to its relatively low binding affinity and low radiochemical yield, we were unable to successfully radiolabel human or rat tissue *ex vivo*, which is a prerequisite for advancing into human studies at our institution. Consequently, we are working towards developing a second generation of AQP-4 PET ligand, and wish to do so in collaboration with the Niigata University's Brain Research Institute.

A. INTRODUCTION

The human brain is approximately 77% water. Water homeostasis is strictly regulated through various protective mechanisms that allow for its movement across biological membranes, while simultaneously keeping the brain from swelling. Aquaporins (AQP) are a unique class of proteins that serve as the main water channels in the brain. They are principally expressed on the end-feet of the astrocytes and vital to normal physiological brain functions, such as neural-flow coupling. More importantly, AQPs play significant role in the pathophysiology of various brain diseases. For example, following brain injury, AQPs initiate

migration of astrocytes (by changing osmotic gradients) toward the site of the injury to facilitate healing process. Also, down-regulation of AQPs in Alzheimer's disease might result in attenuated brain clearance, further leading to amyloid plaque accumulation and neurodegeneration. Finally, AQPs play a key role in astrocytic mediated neuroplasticity.

The central goal of this project is to develop *in vivo* neuroimaging methods to visualize and quantify the distribution of astrocyte-AQP complex, and to model water homeostasis and movement in the human brain.

B. MATERIALS AND METHODS

The overall goal of this proposal is to identify,

develop, characterize and validate a new ^{18}F -based radioligand for the non-invasive clinical imaging of AQP-4, the protein that forms the most prominent water channel found in the human brain. We believe such a ligand will be essential to investigate the roles of AQP-4 in psychiatric and neurodegenerative disease.

1. We feel that ligand, N-(3-(benzyloxy)pyridin-2-yl)-4-fluorobenzamide (TGN-080), can be developed into a tracer suitable for investigating the distribution and role of astrocytes and AQP-4 in water homeostasis, brain neuroplasticity, neuroinflammation, and brain reactivity in acute psychosis and other pathological brain conditions. The ligand is not FDA approved, and it has yet to be identified as a “CNS Radiotracer that has been advanced for use in Human Studies” by the NIMH. In this application, we plan to:

1. Confirm the details of TGN-080 structure, in vitro AQP4 inhibition and selectivity, and known in vivo effects (CIHBS);
2. Identify potential radiosynthetic routes, including the necessary precursors that can be used to effect the introduction of ^{18}F -group needed for ^{18}F]TGN-080 (initial CIHBS, refinement and optimization PNL);
3. Synthesize ^{18}F]TGN-080 using manual and automated synthesizer methods (PNL);
4. Confirm radiosynthesis and ligand radiometric properties (CIHBS)
5. Perform animal in vivo, and animal and human ex vivo imaging studies (PNL). Comparison of AQP4 KO and WT mice (optional, CIHBS).
6. Complete necessary tests and certifications to apply for IRB approval to begin human testing of ^{18}F]TGN-080

C. RESULTS/OUTCOMES

To date, the following steps have been performed:

1. We confirmed the details of TGN-080 structure, in vitro AQP4 inhibition and selectivity, and known in vivo effects (CIHBS);
2. We have identified potential radiosynthetic routes, including the necessary precursors that can be used to effect the

introduction of ^{18}F -group needed for ^{18}F]TGN-080 (initial CIHBS, refinement and optimization PNL);

3. We successfully synthesized ^{18}F]TGN-080 using manual and automated synthesizer methods (PNL);
4. We have performed two rhesus monkey scans with ^{18}F]TGN-080 radioligand.
5. We have analyzed the data, and the results are shown in Figure 1.

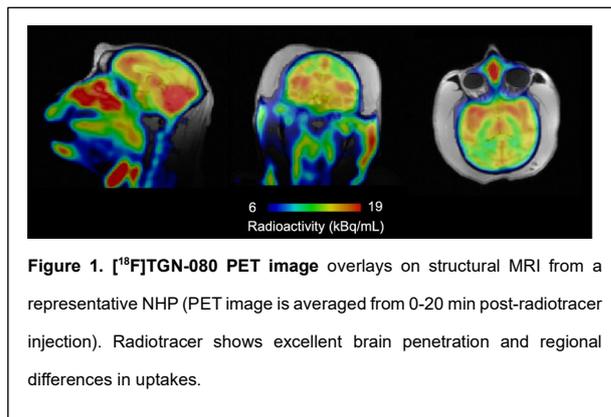


Figure 1. ^{18}F]TGN-080 PET image overlays on structural MRI from a representative NHP (PET image is averaged from 0-20 min post-radiotracer injection). Radiotracer shows excellent brain penetration and regional differences in uptakes.

6. We have applied for the R21 NIH grant to continue the project-translate these results to human scans

D. CONCLUSION

At the end of this project, we hope to have a potent AQP-4 PET ligand available for human research. This project, if successful, has the potential to deliver a viable tool for better understand the role of water homeostasis in neuropsychiatric conditions such as psychosis, traumatic brain injury and Alzheimer’s Disease.

E. PUBLICATIONS

N/A

F. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

N/A

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

N/A

3. OTHERS

N/A

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

To evaluate the effect of TGN-073, an AQP4 facilitator, on hydrocephalus, mice models of hydrocephalus received an initial dose of 400 mg/kg of TGN-073, followed by continuous treatment with 66 mg/kg for the next 72 hours. Mice were monitored neurologically. Brain water content was evaluated by MRI, also used for assessing brain damage. The TGN-073-treated group showed improvement in neurological symptoms and TGN-073 prevented brain edema and neuronal loss.

A. INTRODUCTION

Brain water dynamics still represent an enigma. On the other hand, the water channel AQP4 has been shown to be strongly involved in brain water dynamics. We developed a method for evaluating brain water dynamics in vivo and demonstrated that TGN-073 promotes brain water dynamics by stimulating AQP4. We also evaluated whether TGN-073 improves brain edema and neurological signs in a mouse model of hydrocephalus, in which water dynamics is strongly impaired and causes brain edema.

B. MATERIALS AND METHODS

Experiments were conducted after obtaining permission from the Niigata University Animal Experiment Committee.

1. *TGN-073 promotes brain water dynamics*

C57BL/6 mice were used for the experiment. 10 micro l of Gd-DOTA was injected into the large cerebral artery during the administration of TGN-073 and vehicle, and the signal changes were followed by MRI.

2. *TGN-073 ameliorates brain edema and neuropathy in a hydrocephalus model*

Experiments were performed on C57BL/6 mice, and a hydrocephalus model was created by injecting 20 micro l of 20% Kaolin to the cerebral cortex during the administration of TGN-073 (initial 400 mg/kg i.p., 3 days 66 mg/kg/day continuous s.c.) and vehicle The

neurological findings and brain water content and neuronal degeneration were evaluated using MRI at 72

hours.

C. RESULTS/OUTCOMES

1. *TGN-073 promotes brain water dynamics*

Influx and excretion of Gd-DOTA into the brain parenchyma were significantly faster in the TGN-073-treated group.

2. *TGN-073 improves brain edema and neuropathy in a hydrocephalus model*

The TGN-073-treated group had significantly milder neurological findings and significantly improved brain edema and neuronal loss.

D. DISCUSSION

By using TGN-073, it was demonstrated that the promotion of AQP4 promotes hydrodynamics in the brain and improves brain edema and neurological signs in hydrocephalus.

E. CONCLUSION

TGN-073 is a new drug candidate for the treatment of hydrocephalus.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

Ohno K, Ohkubo M, Zheng B, Watanabe M, Matsuda T, Kwee IL, Igarashi H.

GlyCEST: Magnetic Resonance Imaging of Glycine-Distribution in the Normal Murine Brain and Alterations in 5xFAD Mice.

Contrast Media Mol Imaging. 2021 Dec

30;2021:8988762. doi: 10.1155/2021/8988762.
eCollection 2021.
PMID: 35046756

2. PRESENTATIONS

Currently, an undisclosed company has signed a confidentiality agreement with a pharmaceutical company and is developing a joint research project. Disclosure of specific details of the research is prohibited.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

(Including prospects)

1. PATENT

Property Patent of TGN-073
JP 2018-503417
US 16081267
EU 2017760166

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

¹ Department of Pharmaceutical Sciences and Health Outcomes, Ben and Maytee Fisch College of Pharmacy, The University of Texas at Tyler, USA

² Department of Comparative & Experimental Medicine, Brain Research Institute, Niigata University

ABSTRACT

The goals of this research are to determine the differential role of D2L (long isoform), D2S (short isoform), and D1R in the pathophysiology of psychosis in mice and decipher the involvement of striatal direct and indirect pathways in neuropsychiatric disorders such as schizophrenia and Parkinson's disease (PD). In collaboration with Professors Sasaoka, Abe and Sakimura, we have obtained the homozygous D2S knockout (KO) mice. We are now in the process of expanding the transgenic mouse colony. This new KO mice will significantly strengthen our research. In collaboration with Drs. Fukunaga's and Kawahata's group, it was found that both D2L receptors and caveolae were required for the uptake of α -synuclein. The findings revealed a novel mechanism regulating α -synuclein uptake in neurons and provide new insights in developing new therapeutic strategy for PD. In another series of study, we showed that D2L KO mice displayed enhanced abnormal involuntary movements (AIMs) in response to L-dopa treatment. AIMs or stereotyped behaviors induced by L-dopa in rodents have been used as an experimental model for studying the pathophysiology of dopamine agonist-induced side effects such as psychosis or dyskinesia in humans. Our results suggest that the increased expression ratio of D2S to D2L contributes significantly to the side effects induced by L-dopa, a main medication for PD. A thorough delineation of the specific functions of D2R isoforms and D1R in the brain would help us gain a deeper understanding of the involvement of striatal direct and indirect pathways in physiological and pathophysiological conditions.

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 output 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). The adequate balance between these two output

pathways is crucial for motor control and various cognitive functions. An imbalance of these two output pathways would lead to disruption of basal ganglia circuitry, resulting in movement disorders. D2R exists in two isoforms, termed D2L (long form) and D2S (short form). We and other scientists have demonstrated D2L and D2S have differential functions. Our collaborative research focuses on delineating the involvement of direct and indirect pathways and D2R isoforms and D1R 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, electrophysiological recordings, and imaging technology. In collaboration with Profs. Abe and Sakimura group and using the method based on RNA splicing and Cre-loxP recombination, we have obtained D2S conditional KO mice. Immunocytochemistry, cell culture, and fixed/live cell imaging using fluorescence microscopes were used in the study of investigating the regulation of α -synuclein uptake. Behavioral tests and pharmacological approaches were used in the study of investigating the differential role of individual D2R isoforms in hyperkinetic disorders induced by chronic treatment of L-dopa and D2R agonist.

C. RESULTS/OUTCOMES

In collaboration with Professors Sasaoka, Abe and Sakimura, we have generated the homozygous D2S knockout (KO) mice. We are now in the process of expanding the transgenic mouse colony. In collaboration with Drs. Fukunaga's and Kawahata's group, it was found that D2L deficiency diminished the uptake of α -synuclein by neurons and this process was also dependent on the presence of caveolin-1 (Kawahata et al., 2021). In another series of study, we showed that D2L KO mice displayed enhanced abnormal involuntary movements (symptoms of hyperkinetic disorders) in response to chronic treatment of L-dopa or quinpirole, a preferential D2R agonist (Li et al., 2021).

D. DISCUSSION

The results from the collaborative research with Drs. Fukunaga's and Kawahata's group uncover a novel mechanism regulating α -synuclein uptake in neurons and provide new insights in developing new therapeutic strategy for PD. Abnormal involuntary movements or stereotyped behaviors induced by L-dopa in rodents have been used as an experimental model for studying the pathophysiology of dopamine agonist-induced

side effects such as psychosis or dyskinesia in humans. Our results from L-dopa study suggest that the alterations in the expression level of D2L and D2S may contribute significantly to the side effects induced by L-dopa.

E. CONCLUSION

In summary, we have finally obtained the D2S KO mice. The new D2S KO mouse is complementary to the D2L KO mouse we generated before and will significantly strengthen our research. The aforementioned results suggest that both D2L receptors and caveolae were required for the uptake of α -synuclein and this has implications in understanding the pathophysiology of α -synuclein accumulation that is observed in patients with PD or dementia with Lewy bodies. In addition, our results obtained from L-dopa study suggest that the increased expression ratio of D2S to D2L may result in hyperkinetic movement disorders, characterized by abnormal involuntary movements.

F. PUBLICATION

PAPERS

Ichiro Kawahata, Tomoki Sekimori, Haoyang Wang, YanYan Wang, Toshikuni Sasaoka, Luc Bousset, Ronald Melki, Tomohiro Mizobata, Yasushi Kawata, and Kohji Fukunaga Dopamine D2 long receptors are critical for caveolae-mediated α -synuclein uptake in cultured dopaminergic neurons. *Biomedicines* 2021 Jan 8;9(1): E49. doi: 10.3390/biomedicines9010049. PMID: 33429895.

Luke Li, Lei Cheng, YanYan Wang (2021) Differential roles of two isoforms of dopamine D2 receptors in L-dopa-induced abnormal involuntary movements in mice. *NeuroReport* 32:555-561.

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. *J Biol Chem*. 2021 Mar 15; 100544. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100544. Online ahead of print. PMID: 33737022 DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100544

Miura K, Kobayashi T, Zhang Z, Prasoon P, Hirose Y, Ishikawa H, Takizawa K, Sakata J, Miura S, Sasaoka T, Wakai T: Establishment of a long-term survival

swine model for observation of transplanted islets: A preliminary step in an allogeneic transplant experiment. **Transplant Proc** In press

Hidekazu Sotoyama, Hiroyoshi Inaba, Yuriko Iwakura, Hisaaki Namba, Nobuyuki Takei, Toshikuni Sasaoka, Hiroyuki Nawa : The dual role of dopamine in the modulation of information processing in the prefrontal cortex underlying social behavior **The FASEB Journal**, in press

Nae Saito, Makoto Itakura and Toshikuni Sasaoka*: D1 receptor mediated dopaminergic neurotransmission facilitates remote memory of contextual fear conditioning. **Frontiers in Behavioral Neuroscience** 17 February 2022 <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.751053>

Toshiya Sato*, Kanako Oda, Seiko Sakai, Rika Kato, Saori Yamamori, Makoto Itakura, Yoshio Koderu, Masatoyo Nishizawa, Toshikuni Sasaoka,

Osamu Onodera, Minesuke Yokoyama: Importance of the Q/N-rich segment for protein stability and activity of endogenous mouse TDP-43. **Scientific Reports**, in revision

Amy Cheung, Aya Matsui, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Toshikuni Sasaoka, Takeshi Uemura, Yuka Imamura Kawasawa and Kensuke Futai: Neurexins in serotonergic neurons regulate serotonin transmission and complex mouse behaviors. **BioRxiv** in revision

Liu N, Iijima A, Iwata Y, Ohashi K, Fujisawa N, Sasaoka T, Hasegawa I.*: Mental construction of object symbols from meaningless elements by Japanese macaques (*Macaca fuscata*). **Scientific Reports**. 2022 Mar 4;12(1):3566. doi: 10.1038/s41598-022-07563-z.

Investigation of pathogenesis of Alzheimer's disease using mouse models

Principal Investigator Kensuke Futai¹

Co-Investigators Toshikuni Sasaoka² and 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 submitted a manuscript to *eLife* entitled “Neurexins in serotonergic neurons regulate serotonin transmission and complex mouse behaviors”. Since this manuscript is also supported by the collaborative project, we presented it as the Research Report FY 2022.

Extensive serotonin (5-HT) innervation throughout the brain corroborates 5-HT’s modulatory role in numerous cognitive activities. Volume transmission is the major mode for 5-HT transmission but mechanisms underlying 5-HT signaling are still largely unknown. Abnormal brain 5-HT levels and function have been implicated in autism spectrum disorder (ASD). Neurexin (Nrxn) genes encode presynaptic cell adhesion molecules important for the regulation of synaptic neurotransmitter release, notably glutamatergic and GABAergic transmission. Mutations in Nrxn genes are associated with neurodevelopmental disorders including ASD. However, the role of Nrxn genes in the 5-HT system is poorly understood. Here, we generated a mouse model with all three Nrxn genes disrupted specifically in 5-HT neurons to study how Nrxns affect 5-HT transmission. Loss of Nrxns in 5-HT neurons impaired 5-HT release in the dorsal raphe nucleus and dorsal hippocampus and decreased serotonin transporter distribution in specific brain areas. Furthermore, 5-HT neuron-specific Nrxn knockout reduced sociability and increased depressive-like behavior. Our results highlight functional roles for Nrxns in 5-HT neurotransmission and the execution of complex behaviors.

A. INTRODUCTION: Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) neurons in the raphe nuclei project their axons throughout the brain and modulate social interactions, stress responses, and valence among other processes. Abnormalities in 5-HT signaling have been extensively reported in neuropsychiatric disorders including depression, anxiety disorders, schizophrenia (SCZ), and autism spectrum disorder (ASD). 5-HT reaches postsynaptic specializations through volume transmission or at synapses and synaptic triads. While much work has focused on deciphering receptor and reuptake dynamics in 5-HT signaling, the functional component important for 5-HT release remains undefined.

Nrxn genes (*Nrxn1-3*) encode alpha-, beta-, and gamma- (α/β *Nrxn1-3*, γ *Nrxn1*) isoforms, and regulate synapse specification and function (Sudhof, 2017). Copy number variations and mutations in Nrxns are associated with ASD and SCZ. Numerous studies of α and β Nrxn KO mice demonstrate impaired excitatory and inhibitory synaptic transmission. While Nrxns regulate fast synaptic transmission, no studies have examined the role of Nrxns in central neuromodulatory systems like the 5-HT system. Therefore, elucidating the impact of Nrxns in 5-HT transmission will allow a better understanding of pathophysiological mechanisms underlying neuropsychiatric disorders.

In this study, we investigated the functions of Nrxns in the 5-HT system by assessing signaling

properties and behavior in 5-HT neuron-specific Nrxn triple knockout (TKO) mice. We demonstrated that the loss of Nrxn genes reduced 5-HT release and serotonin transporter (SERT)-labeled 5-HT fibers in the mouse brain. Moreover, the lack of Nrxns in 5-HT neurons altered social behavior and depressive-like phenotypes. Our findings highlight Nrxns as functional regulators of neurotransmission and complex behaviors in the 5-HT system.

B. MATERIALS AND METHODS: Animals: All experiments were conducted under approved animal protocols from the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the University of Massachusetts Medical School. 5-HT neuron-specific tdTomato mice (Fev/RFP) were generated by crossing $lox\text{-STOP}\text{-lox}$ tdTomato and Fev^{Cre} mice. Fev/RFP mice were crossed with Nrxn1^{f/f}/2^{f/f}/3^{f/f} mouse line to generate 5-HT neuron-specific triple Nrxn knockout mouse line (Fev^{Cre}/ $lox\text{-STOP}\text{-lox}$ / $lox\text{-STOP}\text{-lox}$ tdTomato/Nrxn1^{f/f}/2^{f/f}/3^{f/f}; Fev/RFP/NrxnTKO). The Fev/RFP/NrxnTKO line was maintained by breeding Fev/RFP/NrxnTKO mice with Cre-negative ($lox\text{-STOP}\text{-lox}$ tdTomato/Nrxn1^{f/f}/2^{f/f}/3^{f/f}; WT) mice. All experiments and analyses were performed blind to genotype. **Transcriptome analysis:** Single-cell RNA-seq data was obtained from a recent publication (Ren et al., 2019). See Ren et al., 2019 for the single-cell isolation and sequencing (Ren et al., 2019). **Immunohistochemistry:** All mice were fixed with 4%

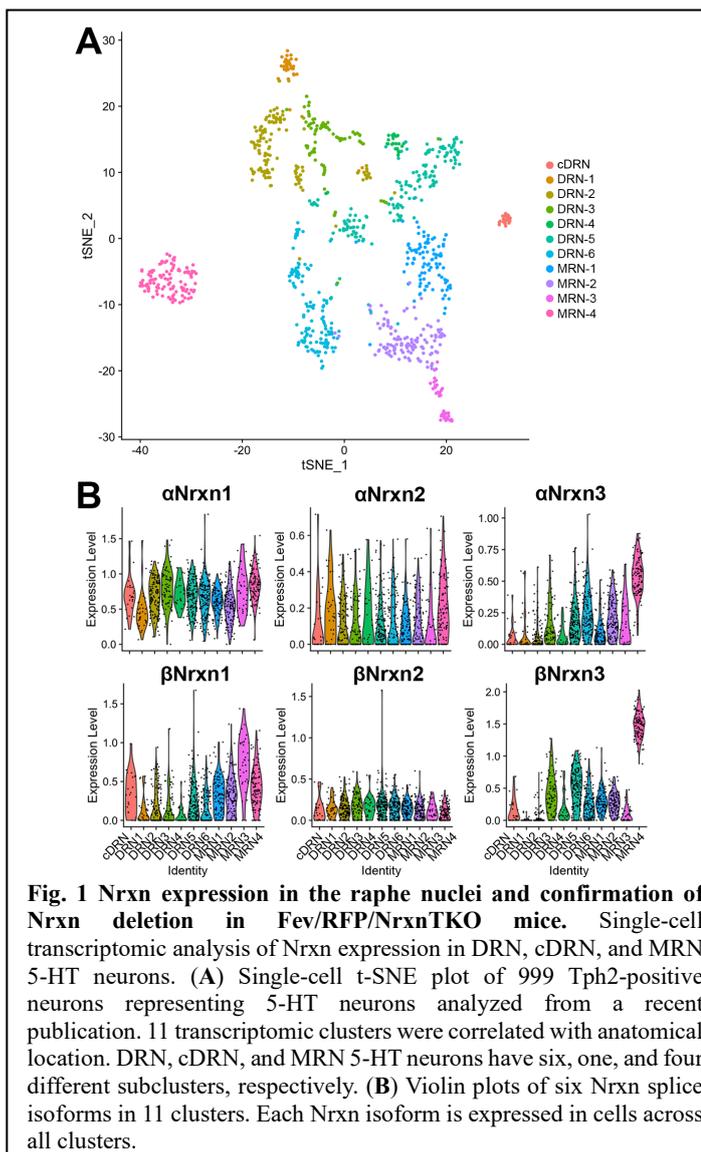
PFA in 0.1 M PB. Coronal 40 μm -thick brain sections were stained with SERT. **Electrophysiology:** Fast scan cyclic voltammetry (FSCV) for 5-HT release were performed in the radiatum of dorsal CA3 and DRN. 5-HT release was evoked with electrical stimulation (30 pulses, 30 Hz, 150 or 250 μA , 1 ms) from an adjacent custom-made bipolar tungsten electrode every 10 min. **Behavioral assays:** All behavioral experiments were performed on male mice aged 8 weeks or older. **Direct social interaction test:** The test was adapted from Hitti and Siegelbaum, 2014. Each mouse was placed individually into a standard mouse cage and allowed to habituate for 5 minutes followed by the introduction of a novel male juvenile mouse. The activity was monitored for 10 min and social behavior initiated by the subject mouse was measured by an experimenter sitting approximately 2 meters from the testing cage with a silenced stopwatch. Scored behaviors were described previously (Kogan, Frankland, & Silva, 2000): direct contact with the juvenile including grooming and pawing, sniffing including the anogenital area and mouth and close following (within 1 cm) of the juvenile. After 24 hours, the 10 min test was run

again with the previously encountered mouse. Any aggressive encounters observed between animals led to exclusion of the subject mouse from analysis.

C. RESULTS/OUTCOMES: To characterize *Nrxn* genes expressed in 5-HT neurons, we analyzed scRNAseq data from a published database consisting of over 900 single-cell 5-HT neuron datasets which generated 11 different 5-HT neuron clusters from the principal dorsal raphe nucleus (DRN), caudal DRN (cDRN), and median raphe nucleus (MRN) (**Fig. 1A**) (Ren et al., 2019). Transcriptional expression of six *Nrxn* isoforms (α -, β *Nrxn*1/2/3) in 11 clusters indicated that all 5-HT neuron clusters express at least one α - and β *Nrxn* isoform (**Fig. 1B**). These results suggest that *Nrxn* proteins are expressed in 5-HT neurons in all RN regions.

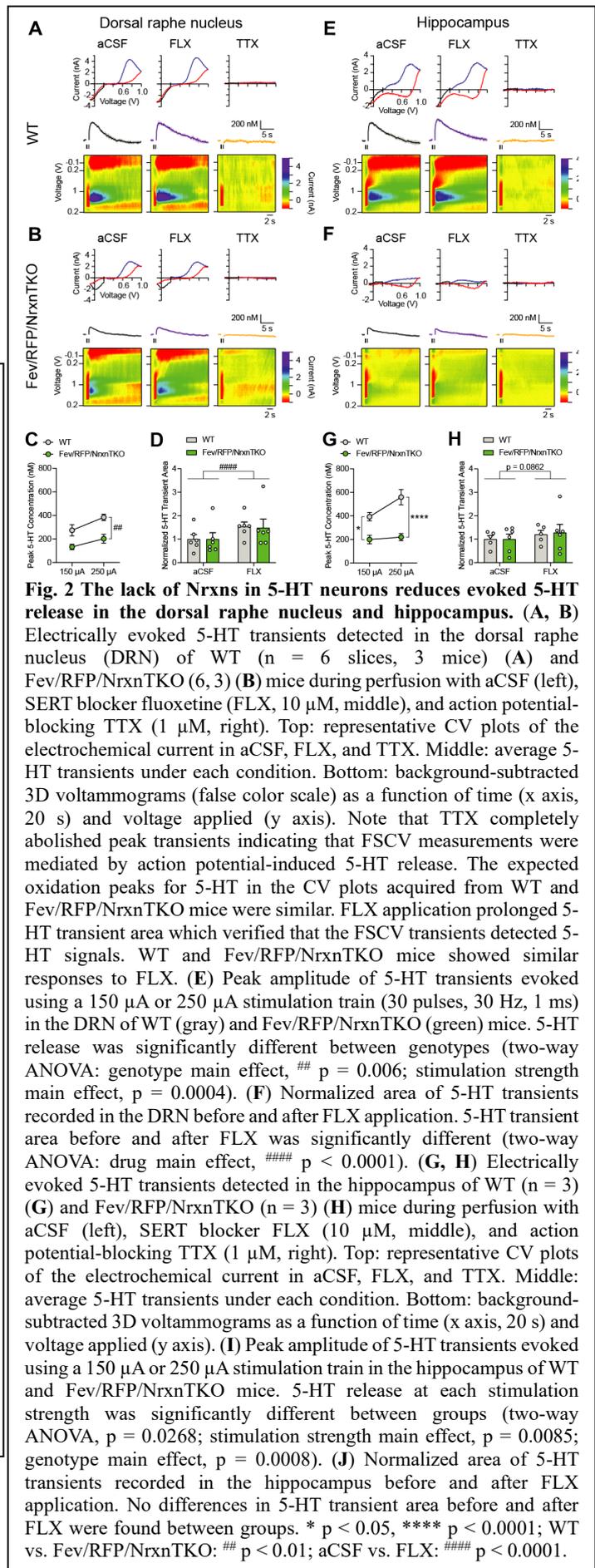
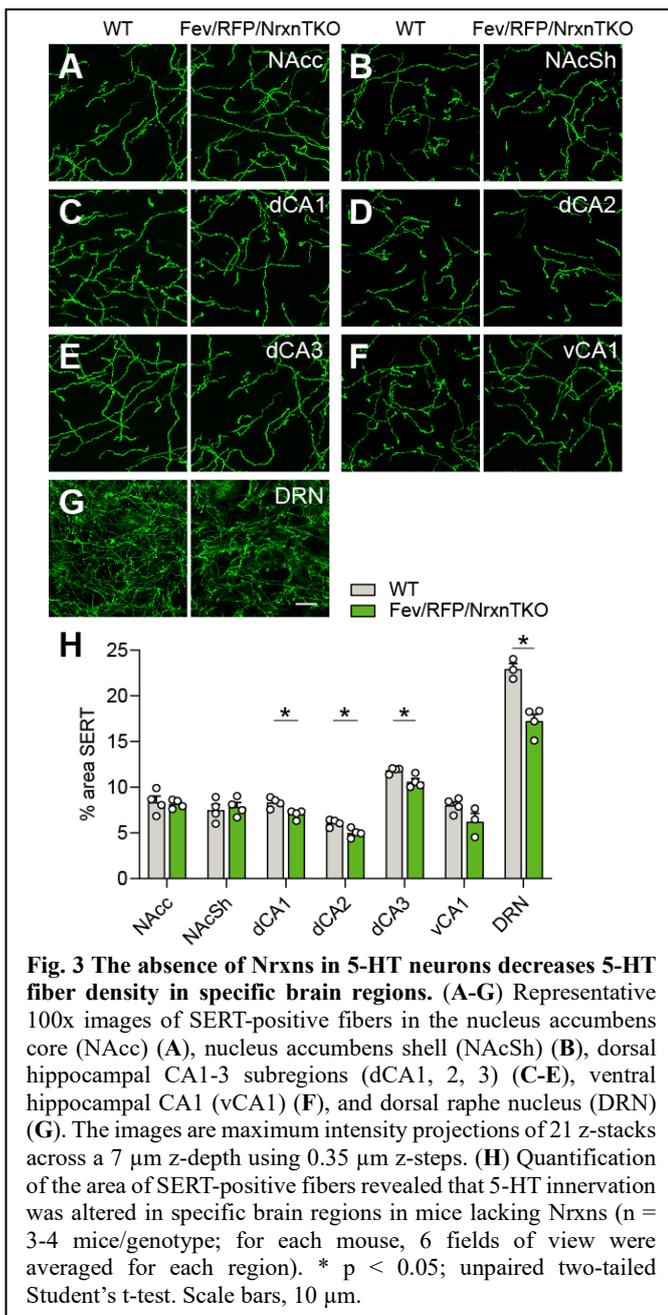
While numerous studies indicate that *Nrxns* regulate fast neurotransmitter release including that of glutamate and GABA, no studies have tested *Nrxn* function in central neuromodulatory systems. To directly examine the role of *Nrxn* on 5-HT release, we generated 5-HT neuron-specific *Nrxn* triple knockout mice (*Fev/RFP/NrxnTKO*) and measured 5-HT transients in the DRN and hippocampus using FSCV (**Fig. 2**). The specific deletion of *Nrxns* in 5-HT neurons was confirmed by single-cell RT-qPCR. 5-HT transients were recorded in the DRN where 5-HT neurons are highly clustered in WT and *Fev/RFP/NrxnTKO* mice (**Fig. 2A-D**). Electrical stimulation was applied at two different stimulus strengths to evoke 5-HT release in acute brain slices containing the DRN. To confirm that electrically evoked FSCV transients were mediated by 5-HT release, the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine (FLX) and action potential inhibiting sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX) were applied. Importantly, 5-HT peak amplitude was significantly reduced in *Fev/RFP/NrxnTKO* mice (**Fig. 2C**). FLX caused a similar increase in 5-HT transient area in each genotype, indicating that *Nrxn* TKO did not change transporter activity (**Fig. 2D**). Next, we performed FSCV recordings in the dorsal hippocampal CA3 region to determine whether differences in 5-HT release could be detected in a distal region receiving 5-HT fiber projections (**Fig. 2E-H**). We observed robust suppression of 5-HT currents in *Fev/RFP/NrxnTKO* mice and no genotype-specific differences in response to FLX. Taken together, these findings indicate that *Nrxns* are important for 5-HT release.

Next, we analyzed whether *Nrxns* are important for 5-HT innervation in brain regions that receive 5-HT projections by analyzing SERT-positive fibers (**Fig. 3**). We found that SERT fibers were reduced in the dorsal hippocampus and the DRN of *Fev/RFP/NrxnTKO* mice relative to controls. Interestingly, no differences were seen in the projections to the nucleus accumbens and vCA1 indicating that SERT inputs are not globally altered. These findings suggest that *Nrxns* selectively



mediate SERT-positive fiber area depending on the innervated circuit.

We investigated the behavior of adult Fev/RFP/NrxnTKO mice in a variety of assays. Basic activities, evaluated by locomotor activity, rotarod performance, and open field, did not differ between Fev/RFP/NrxnTKO mice and Cre-negative controls. To examine the role of Nrxns in 5-HT system-related behavior, we next assessed social behavior. WT and Fev/RFP/NrxnTKO underwent a direct social interaction test to examine naturally occurring interactions between a subject mouse and a juvenile stimulus mouse. In trial 1, the stimulus mouse was



unfamiliar to the subject mouse. After 24 hours, the subject mouse was re-exposed to the same stimulus mouse (trial 2) (Fig. 4A). Social investigation was measured across both trials and as a reduction in time that the subject mouse spent investigating the stimulus mouse in trial 2. We found that Fev/RFP/NrxnTKO mice spent less time exploring the stimulus mouse in trial 1 (Fig. 4B) and differed in their investigation of the stimulus mouse across trials (Fig. 4C) compared with WT mice. These results suggest that Fev/RFP/NrxnTKO mice have deficits in sociability. Interestingly, one of the depression tests, the forced swim test but not tail suspension test, revealed increased immobility behavior in Fev/RFP/NrxnTKO compared with WT mice (Fig. 4D-E). Importantly, other tests addressing learning and memory and repetitive behaviors displayed no abnormalities in Fev/RFP/NrxnTKO mice. These results demonstrate that the absence of Nrxns in 5-HT neurons impairs social behavior and moderately influences depression-related behavior.

D. DISCUSSION: Nrxns regulate the release of fast neurotransmitters such as glutamate and GABA by coupling Ca^{2+} channels to presynaptic release machinery. However, their roles in central neuromodulatory systems have never been addressed. Here we provide evidence that Nrxns control neuromodulatory 5-HT release. We found that the DRN and hippocampus displayed > 40% reduction in 5-HT release in Fev/RFP/NrxnTKO mice. Fev expression begins in the embryonic stage, therefore the impact of Nrxn TKO during development should be noted. However, compared with the robust functional deficit observed in Fev/RFP/NrxnTKO mice, the structural deficit identified by SERT-positive fiber density was moderate (< 25%) suggesting that the primary role of Nrxns in the 5-HT system is the formation of functional components important for 5-HT release.

It is important to consider the mechanisms through which Nrxns influence release events and the specific sites that express Nrxns to control 5-HT neurotransmission. In the hippocampus, approximately 80% of 5-HT varicosities are extra-synaptic, while the remaining 20% form synapses. Given the predominance of non-junctional specializations, we speculate that Nrxns reside at 5-HT release sites that lack a direct postsynaptic target. The ability of Nrxns to couple with release machinery triggering 5-HT vesicle exocytosis and their roles in postsynaptic differentiation at synapses are yet to be explored. Decreased SERT innervation suggests that 5-HTergic Nrxns contribute to fiber formation, regulate the abundance of SERT itself, or that inefficient 5-HT release requires less SERT as a compensatory mechanism. Indeed, sparse pan-Nrxn deletion has been shown to blunt inferior olive neuron climbing fiber projections in the cerebellum while complete removal of Nrxns at climbing fiber synapses did not alter

climbing fiber axons but impaired synaptic

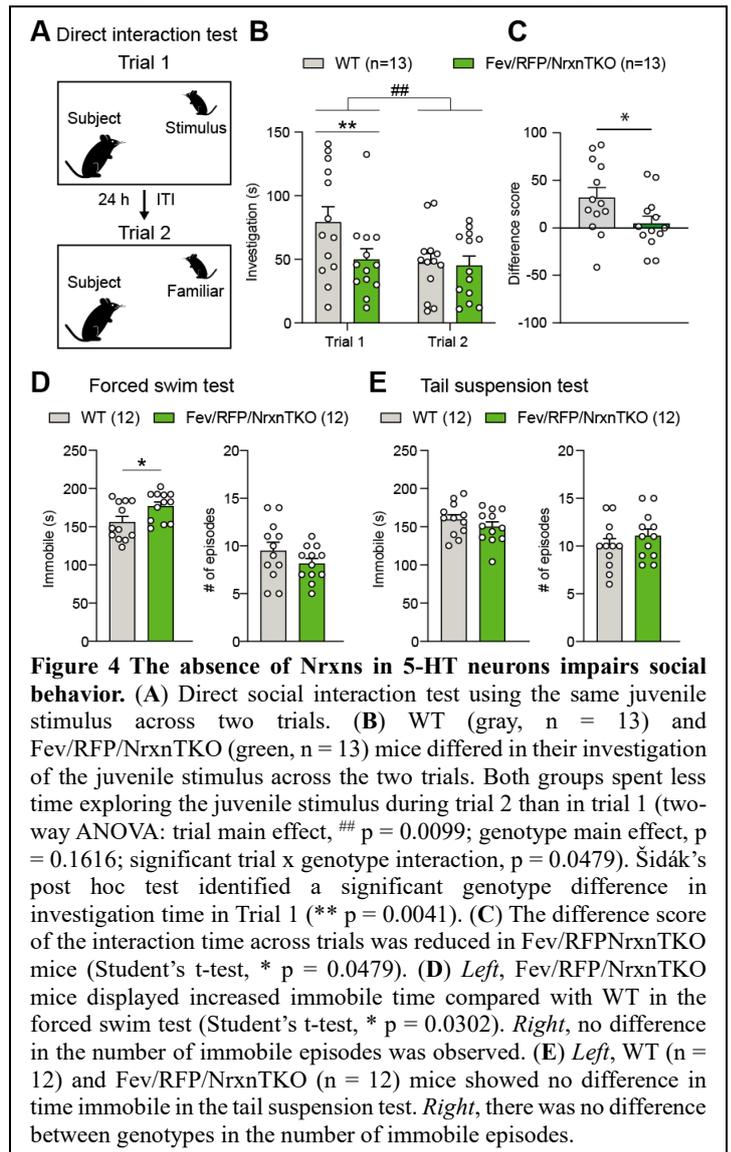


Figure 4 The absence of Nrxns in 5-HT neurons impairs social behavior. (A) Direct social interaction test using the same juvenile stimulus across two trials. (B) WT (gray, n = 13) and Fev/RFP/NrxnTKO (green, n = 13) mice differed in their investigation of the juvenile stimulus across the two trials. Both groups spent less time exploring the juvenile stimulus during trial 2 than in trial 1 (two-way ANOVA: trial main effect, ## p = 0.0099; genotype main effect, p = 0.1616; significant trial x genotype interaction, p = 0.0479). Šidák's post hoc test identified a significant genotype difference in investigation time in Trial 1 (** p = 0.0041). (C) The difference score of the interaction time across trials was reduced in Fev/RFP/NrxnTKO mice (Student's t-test, * p = 0.0479). (D) *Left*, Fev/RFP/NrxnTKO mice displayed increased immobile time compared with WT in the forced swim test (Student's t-test, * p = 0.0302). *Right*, no difference in the number of immobile episodes was observed. (E) *Left*, WT (n = 12) and Fev/RFP/NrxnTKO (n = 12) mice showed no difference in time immobile in the tail suspension test. *Right*, there was no difference between genotypes in the number of immobile episodes.

transmission.

E. CONCLUSION: The observed deficits in sociability and depressive-related behaviors are relevant to ASD which often presents with co-occurring conditions. The forced swim test was performed following the tail suspension test and it is possible that Fev/RFP/NrxnTKO are more susceptible to stress rather than despair-associated coping responses. Overall, the behavioral phenotypes of Fev/RFP/NrxnTKO mice are milder than that of null Nrxn KO mouse lines. Both α Nrxn1 KO and α Nrxn2 KO mice display social behavior deficits, elevated anxiety, and increased stereotypic behaviors. In contrast, no abnormalities in repetitive behaviors were found in Fev/RFP/NrxnTKO mice suggesting that Nrxn TKO in 5-HT neurons has more selective effects on 5-HT mediated behaviors.

Our results reveal that Nrxns expressed in midbrain 5-HT neurons are important for maintaining the presynaptic molecular function of 5-HT release sites.

Further investigations are necessary to decipher Nr1n-mediated 5-HT release machinery, examine the consequences of Nr1n deletion in raphe nuclei-innervated circuits in other brain regions, and address whether 5-HT therapeutics can improve behavioral deficits.

F. PUBLICATIONS

PAPERS

1. M. Uchigashima, A. Cheung, **K. Futai**. Neuroligin-3: a circuit-specific synapse organizer that shapes normal function and ASD-associated dysfunction. *Front Mol. Neurosci.* 2021 Oct 6;14:749164. doi: 10.3389/fnmol.2021.749164. eCollection 2021.PMID: 34690695
2. A. Cheung, A. Matsui, M. Abe, K. Sakimura, T. Sasaoka, T. Uemura, Y.I. Kawasawa, and **K. Futai**. Neurexins in serotonergic neurons regulate serotonin transmission and complex mouse behaviors. 2021, under review status in *eLife*. <https://doi.org/10.1101/2021.12.09.471904>

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT
2. UTILITY MODEL REGISTRATION
3. OTHERS

None.

Production of transgenic mouse lines for labeling retinal cell types and analyses of their roles in visual function

Principal Investigator Keisuke Yonehara¹
Co-Investigators Toshikuni Sasaoka², Manabu Abe²

¹DANDRITE, Department of Biomedicine, Aarhus University ²Center for Bioresource-based Researches, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

In order to understand circuit mechanisms underlying neurological diseases, it is important first to understand how neuronal computation, which is impaired in relevant disease, is achieved by synaptic and circuit mechanisms in healthy state. In collaboration with Prof. Toshikuni Sasaoka and Dr. Manabu Abe, we aim to create several mouse lines in which a single subtype of retinal bipolar cells is genetically labeled. So far, we have successfully created Igfn1-iCreS-KI mice, in which type-7 bipolar cells are supposed to be selectively labelled in the retina. We have plan to create Sox6-iCreERT mice to label type-5A bipolar cells. With these mice, we will test the effect of cell-type-specific manipulation of neuronal activity or gene expression on the retinal motion computation and eye movement reflex. Specifically, we aim to understand how retinal ganglion cells compute visual motion by integrating excitatory inputs from retinal bipolar cells, and how impaired function of retinal bipolar cells may lead to impaired retinal motion computation and pathogenic nystagmus. Interestingly, dopamine receptor 1 (Drd1) is expressed in specific bipolar cell subtypes, including type 5 and type7 (Farshi et al., J Comp Neurol 2016). We aim to understand the role of dopamine signaling in the modulation of bipolar cell outputs for motion computation. 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

(The purpose of the research)

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; 2021 Neuron). 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 Cre recombinase.

B. MATERIALS AND METHODS

Materials

BAC DNA constructs for containing mouse Sox6 and Igfn1.

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

Due to the pandemic, Yonehara could not visit BRI Niigata University during 2021 to discuss the plan for this collaborative project.

During Global Collaborative Research Project FY 2020, 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. Therefore, we have been continuing 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-7 bipolar cells, we made Igfn1-iCreS-KI mice, in which iCreSwprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon in exon 1 of Igfn1 in the mouse genome. Endogenous Igfn1 gene has been disrupted. The cryopreserved sperm has been shipped to Yonehara and the live mice have been rederived from the sperm with IVF. We will use heterozygous mice for experiments.

D. DISCUSSION

F1 heterozygous mice for labeling type-7 bipolar cells have been successfully established. Frozen sperm from these lines have been 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 1 strain has been successfully achieved. Through Global Collaborative Research Project FY2022 we aim to complete the analysis of visual function of these mouse lines and generate a few more mouse lines to label type-5A 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.

新潟大学脳研究所年報 2021

令和4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/>