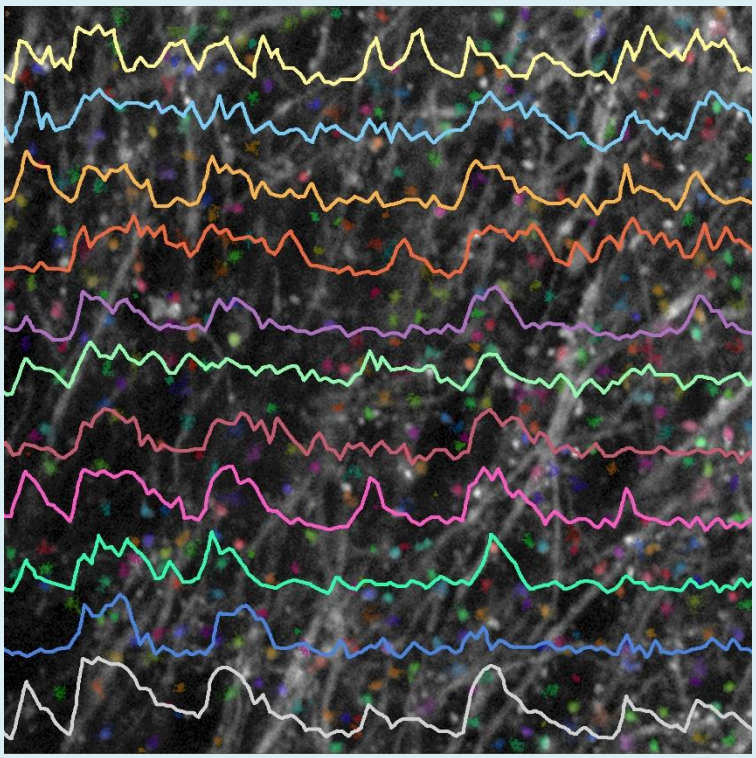
Brain Research Institute
Niigata University

Annual Report 2019

新潟大学脳研究所年報

2019



脳組織での神経シナプス活動の網羅的イメージング

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
○　細胞病態学分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8
○　システム脳生理学分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10
○　病理学分野 ／ 脳疾患標本資源解析学分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12
○　分子病態学（客員）分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17
○　脳神経外科学分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19
○　神経内科学分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
○　統合脳機能研究センター　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
○　遺伝子機能解析学分野 ／ 生命情報工学分野　・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
○　動物資源開発研究分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37
○　モデル動物開発分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41
○　分子神経疾患資源解析学分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44
○　システム脳病態学分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46
○　脳病態解析分野　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 48

３．社会との連携　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 50

４．共同利用・共同研究拠点

共同利用・共同研究採択者一覧　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61
報告書
プロジェクト型共同研究
○　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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 66
○　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　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 68

○　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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 75
○　GABA 仮説に基づいた統合失調症モデルラットの病態解析
群馬大学大学院医学系研究科　柳川　右千夫　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 78
○　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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 80
○　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
放射線医学総合研究所　樋口　真人　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 82
○　ストレス応答におけるドーパミン受容体の役割の解明
北里大学医学部　板倉　誠　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 84
○　シヌクレイノパチーにおける異常蓄積タンパク質の排出亢進と治療法の開発
弘前大学大学院医学研究科　丹治　邦和　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 87
○　血漿中 ILEI 定量による高齢者認知機能障害の初期サロゲイトマーカーとしての検証
滋賀医科大学神経難病研究センター　西村　正樹　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 90
○　アルツハイマー病に関連するゲノム情報を駆使した多遺伝子解析
大阪大学大学院医学系研究科　菊地　正隆　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 93
○　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
福島県立医科大学新医療系学部設置準備室　久保　均　・・・・・・・・・・・・・・・ 95
○　神経変性疾患特異蛋白と神経細胞脱落：ヒト基底核における定量的検討
信州大学医学部　小柳　清光　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 97
○　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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 100
○　疾患モデル動物の作製に関する最先端技術の開発
熊本大学生命資源研究・支援センター　竹尾　透　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 102
○　睡眠覚醒と記憶制御に関わる視床下部神経の動作原理解明
名古屋大学環境医学研究所　山中　章弘　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 105
○　精神疾患死後脳の分子プロファイル解析
福島県立医科大学会津医療センター　國井　泰人　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 108
○　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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 112
○　歯状回顆粒細胞の興奮性に対する diacylglycerol lipase alpha の役割の解明
東京大学大学院医学系研究科　菅谷　佑樹　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 114
○　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　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 116
○　遺伝子改変技術による生体リズム中枢の分子機構の解析
京都大学大学院薬学研究科　岡村　均　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 119
○　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

日本医科大学付属病院　西山　康裕　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 122
○　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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 124
○　内因性の意図に基づく神経基盤の解明
京都大学霊長類研究所　中村　克樹　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 127
○　精神神経疾患を対象としたヒト脳組織でのグリア細胞異常と炎症
九州大学大学院医学研究院　加藤　隆弘　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 130
○　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
西新潟中央病院　福多　真史　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 132
○　熱ショック応答による筋萎縮性側索硬化症（ALS）細胞質凝集体の形成抑制
杏林大学保健学部　渡部　和彦　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 135
○　げっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析
東海大学医学部　加藤　明　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 137
○　新規疼痛関連分子の脳および脊髄後角での神経可塑性における機能の解析
関西医科大学医学部　片野　泰代　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 139
○　マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析
国立遺伝学研究所　岩里　琢治　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 141
○　Cacna1g 変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態の解明
横浜市立大学大学院医学研究科　土井　宏　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 144
○　視床特殊核におけるグルタミン酸受容体 GluD1 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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 147
○　認知症病態における海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド（Hippocampal
cholinergic neurostimulating peptide:HCNP）発現メカニズムの解析
名古屋市立大学　神経内科　松川　則之　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 150
○　神経変性疾患における NAKα3 神経細胞の機能障害と細胞死機構の解明
神戸医療産業都市推進機構　星　美奈子　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 152
○　高磁場 MRI を用いたてんかん原性部位及び機能部位との関係の研究
静岡てんかん・神経医療センター　臼井　直敬　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 155
○　中枢神経原発悪性リンパ腫における transforming acidic
coiled-coil-containing 3（TACC 3）発現とその臨床病理学的意義
久留米大学医学部　杉田　保雄　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 157
○　超偏極低分子化合物の生体トレーサーとしての応用を目指した基礎検討
放射線医学総合研究所　青木　伊知男　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 160
○　NF-kB 活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の開発に向けた多施設
共同研究
横浜市立大学大学院医学研究科　立石　健祐　・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 162
○　特発性正常圧水頭症患者脳脊髄液中のバイオマーカー診断と重症度分類の確立

順天堂大学医学部　中島　円　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 165
○ Boron neutron capture therapy (BNCT)が播種・浸潤に及ぼす効果の検討
京都大学複合原子力科学研究所　近藤　夏子　・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 168
○ RNA-Seq 解析を用いるがん性疼痛と難治性神経障害性疼痛に関連分子の探索・同定
大阪医科大学　伊藤　誠二　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 170
○ 認知症関連疾患リスク遺伝子（特に ACE, ABCA7、FUS に関して）検索
名古屋市立大学大学院医学研究科　赤津　裕康　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 172
○ 筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病変の評価
放射線医学総合研究所　高堂　裕平　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 173

連携資源利用型共同研究

○ 発達期脳内微細構造の生体イメージングによる神経回路形成機序の解明
熊本大学国際先端医学研究機構　水野　秀信　・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 175
○ TDP-43 病変に結合する分子プローブの開発
放射線医学総合研究所　小野　麻衣子　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 178
○ 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　・・・・・・・・・・・・・・ 180
○ 歩行運動の大脳基底核ドーパミン制御機構の解明
大阪大学大学院生命機能研究科　木津川　尚史　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 183
○ 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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 185
○ 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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 187
○ 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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 189
○ 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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 191
○ APP の細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析
北陸大学医療保健学部　中山　耕造　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 194
○ 筋強直性ジストロフィーの中枢神経病態の解明
大阪大学医学系研究科　中森　雅之　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 196
○ ジストロフィン結合タンパク質複合体の代謝回転に関する研究
国立精神・神経医療研究センター　今村　道博　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 198
○ 脳・神経回路におけるドーパミンの機能解析
大阪大学大学院医学系研究科　小山内　実　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 200
○ 後部視床下部において過眠症に関連する DNA メチル化部位の探索と

各脳領域に特異的なメチル化プロファイルの探索
東京大学大学院医学系研究科　嶋多　美穂子　・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 202
○ TDP-43 細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成
北里大学医学部　佐藤　俊哉　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 205
○ てんかん脳波におけるガンマ脳波規則性とてんかん病変部の病理学的変化
の関係性の研究
昭和大学医学部　佐藤　洋輔　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 207

国際共同研究
○ Targeting of GD2 as a novel treatment for diffuse intrinsic pontine gliomas
GD2 を標的とした脳幹部グリオーマの新規治療展開
ノースウェスタン大学　HASHIZUME, Rintaro　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 209
○ Elucidating the role of autophagy in NF1-associated gliomas
NF-1 に合併するグリオーマ におけるオートファジーの役割解明
ジョンズ・ホプキンズ大学　RODRIGUEZ, Fausto　・・・・・・・・・・・・・・・・ 213
○ Preventive medicine for Alzheimer’s disease
アルツハイマー病の発症前診断・発症予防
カリフォルニア大学デービス校　KWEE, Ingrid L.　・・・・・・・・・・・・・・・・ 215
○ Elucidation of the roles of trans-synaptic molecule in neuronal homeostasis using mouse models
マウスモデルを用いた，エピゲノム修飾による神経恒常性維持機構の解明
マサチューセッツ州立メディカルスクール　FUTAI, Kensuke　・・・・・・・・・・ 217
○ Research on pathway-specific regulation of motor and cognitive functions via
dopamine D1 and D2 receptors
D1 および D2 ドーパミン受容体を介する神経回路特異的な運動調節と認知機能の解析
イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校　WANG, Yanyan　・・・・・・・・・・・・ 221
○ Amyotrophic lateral sclerosis with TAF15-predominant FET pathology:
clinicopathologic features of an autopsied patient
筋萎縮性側索硬化症患者の言語障害に関する病理学的研究
首都医科大学宣武医院　CUI, Bo　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 224
○ Production of congenital nystagmus model mice and analysis of visual function
先天性眼球振盪モデルマウスの作出と視覚機能解析
オーフス大学　YONEHARA, Keisuke　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 227
○ Development, optimization and validation of human AQP-4 PET Radioligand
新規 AQP4 特異的 PET リガンドの開発と応用
ハーバード大学　KUBICKI, Marek　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 229

進捗状況報告書

学内異分野融合・共同研究

○ 脳–腸–肝ネットワークによる病態発症のメカニズムー自律神経系，腸内細菌叢を介した難治疾患の病態解明と新規治療法の開発を目指してー
新潟大学医歯学総合研究科　寺井　崇二　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 231

○ パルス制御が拓く焦点可動ＭＲＩによる新規コントラスト機構の創出とそれに基づく革新的な機能ＭＲＩ撮像法の実現
新潟大学自然科学系工学部　佐々木　進　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 233

○ 視路圧迫症候群の器質的・機能的解析から見る，ヒト脳神経系の可塑性の探索と病態予測モデルの構築
新潟大学自然科学系工学部　飯島　淳彦　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 235

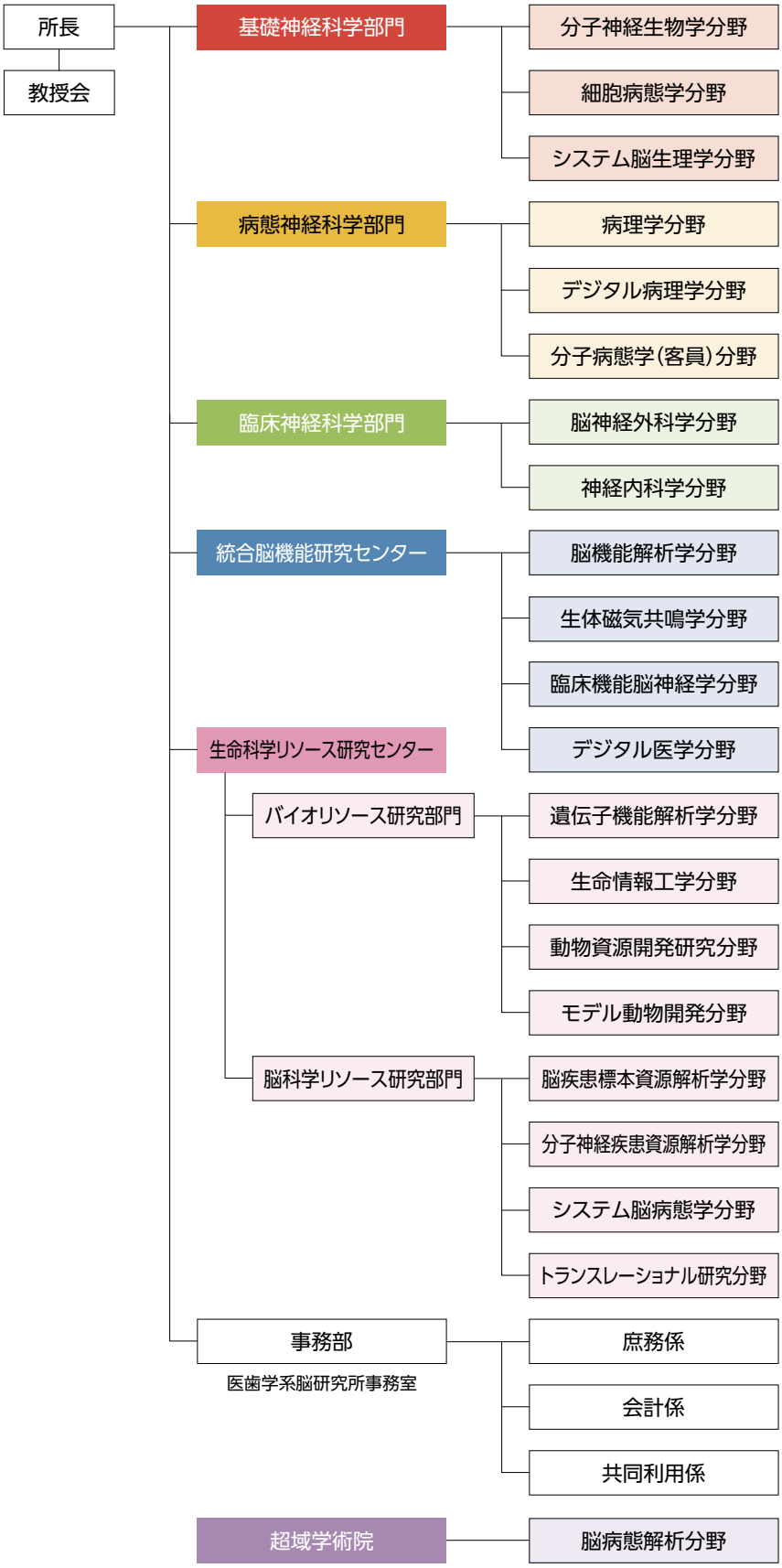
○ 組織浸透性に優れたマーカーの創出による脳の機能と病態の三次元マッピングの試み
新潟大学医歯学総合研究科　竹林　浩秀　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 237

○ 手と身体を知覚する認知神経科学的基盤の解明
新潟大学人文社会・教育科学系人文学部　新美　亮輔　・・・・・・・・・・・・・・ 239

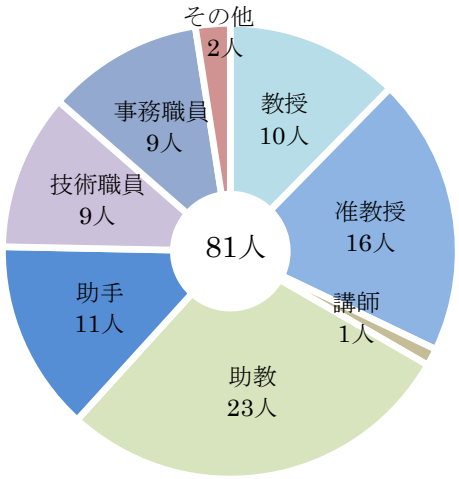
○ 病理学と連携したエニッグマティック RNA 群の発現制御機構の解明
新潟大学医歯学総合研究科　矢野 真人　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 241

１．組織図・研究所のデータ

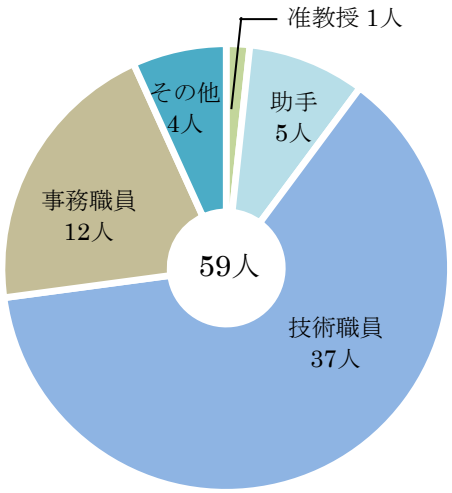
組織図（R2. 3. 31 現在）


所長
教授会
基礎神経科学部門
分子神経生物学分野
細胞病態学分野
システム脳生理学分野
病態神経科学部門
病理学分野
デジタル病理学分野
分子病態学（客員）分野
臨床神経科学部門
脳神経外科学分野
神経内科学分野
統合脳機能研究センター
脳機能解析学分野
生体磁気共鳴学分野
臨床機能脳神経学分野
デジタル医学分野
生命科学リソース研究センター
バイオリソース研究部門
遺伝子機能解析学分野
生命情報工学分野
動物資源開発研究分野
モデル動物開発分野
脳科学リソース研究部門
脳疾患標本資源解析学分野
分子神経疾患資源解析学分野
システム脳病態学分野
トランスレーショナル研究分野
事務部
医歯学系脳研究所事務室
庶務係
会計係
共同利用係
超域学術院
脳病態解析分野

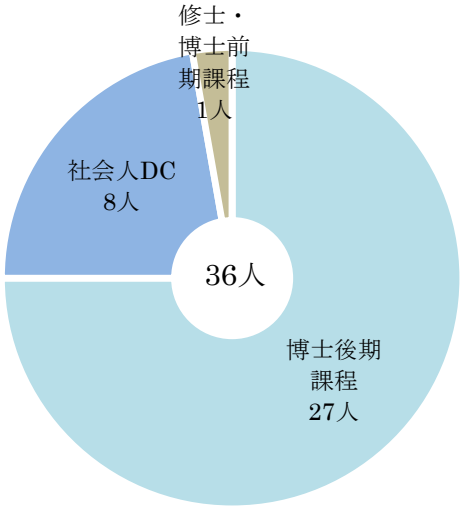
教職員数（常勤）　（R2.3.31現在）



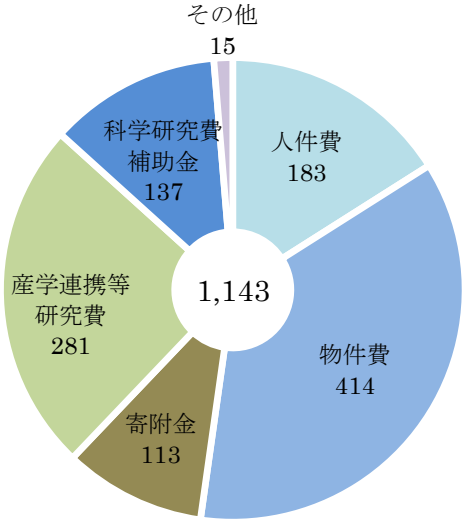
教職員数（非常勤）　（R2.3.31現在）



大学院生等の学生数　令和元年度



研究所予算（決算額）　令和元年度



外部資金獲得状況（令和元年度）

区　分	件数	金額（千円）
科学研究費補助金	54	167,120
厚生労働科学研究費補助金	2	15,990
機能強化	3	174,265
地方公共団体・民間助成団体等の研究費	21	96,600
民間企業等との共同研究	10	26,147
受託研究	35	354,337
寄 附 金	47	33,150

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2年3月31日現在）

教授	那波　宏之	特任助手	北山　栄子
准教授	武井　延之	博士課程大学院生	甲斐　竜太
助教	難波　寿明		小林　雄太朗
助教	岩倉　百合子		
特任助教	外山　英和		
特任助教	稲葉　洋芳		

Ⅱ　研究活動

脳内の神経細胞やグリア細胞は、神経伝達物質のような物質だけではなく、神経栄養因子やサイトカインと呼ばれている生理活性蛋白を介した細胞間相互作用を通して脳の恒常性を保っている。我々の研究室の最終目標は、これらの生理活性蛋白がどのように脳の発達を制御し、また脳機能を障害してしまうかという疑問を解明することにある。脳内で作用しているこのようなサイトカインは100種近く存在するが、初代培養した大脳皮質神経細胞の反応強度に基づき、主に脳由来神経栄養性因子（ＢＤＮＦ）と上皮成長因子（ＥＧＦ）とその類縁体のニューレグリン１の活性に着目している。これらのサイトカインの脳内合成放出メカニズム、神経細胞発達への影響、神経伝達への効果、動物行動への影響を中心に、分子生物学、遺伝子工学、神経生理学などを駆使して脳内サイトカイン研究を遂行している。今後、これらの研究結果が統合失調症、自閉症などの発達性脳疾患の解明に繋がるとともに、当該疾患の新薬開発のシーズとなることを期待している。

(1) 統合失調症の病因病態解明の為、動物モデルの開発解析や遺伝子解析を行っている。そのモデルとしてEGF投与動物を開発し、マウス、ラット、猿などの実験動物をモデル化して、その行動、細胞、分子変化の分析を行っている。
(2) 統合失調症モデル動物の聴覚異常について脳波やユニット記録といった電気生理学的手法やRNA-Seqなどの分子生物学的手法を用いて、その原因を探求している。
(3) 光遺伝学、薬理遺伝学の手法を用いドパミン神経系の活動操作を行い、ドパミンによる感覚・行動制御メカニズムを解析している。
(4) 神経細胞におけるmTORシグナル伝達機構の解明と生理機能及び脳発達異常病態との関連を解析している。
(5) ヒトiPS由来及びヒト胎児由来の神経幹細胞と分化誘導後の成熟神経細胞の代謝系の比較解析を行っている。

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

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Nagaoka A, Nawa H, Kakita A, Akatsu H, Hashizume Y, Yabe H. Differential protein expression of DARPP-32 versus Calcineurin in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in schizophrenia and bipolar disorder. Sci Rep. 2019 Oct 16;9(1):14877. doi: 10.1038/s41598-019-51456-7.

2. Inaba H, Sotoyama H, Narihara I, Namba H, Jodo E, Eifuku S, Yabe H, Nawa. Abnormal auditory mismatch responses to sound duration deviants in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. IBRO Reports. 2019 Sep; 6 (Suppl.): S286.

3. Yamada S, Kamata T, Nawa H, Sekijima T, Takei N. AMPK activation, eEF2 inactivation, and reduced protein synthesis in the cerebral cortex of hibernating chipmunks. Sci Rep. 2019 Aug 15;9(1):11904. doi: 10.1038/s41598-019-48172-7.

4. Kobayashi Y, Iwakura Y, Sotoyama H, Kitayama E, Takei N, Someya T, Nawa H. Clozapine-dependent inhibition of EGF/neuregulin receptor (ErbB) kinases. Transl Psychiatry. 2019 Aug 1;9(1):181. doi: 10.1038/s41398-019-0519-1.

5. Miki D, Kobayashi Y, Okada T, Miyamoto T, Takei N, Sekino Y, Koganezawa N, Shirao T, Saito Y. Characterization of functional primary cilia in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. Neurochem Res. 2019 Jul;44(7):1736-1744. doi: 10.1007/s11064-019-02806-4.

6. Piatnitskaia S, Takahashi M, Kitaura H, Katsuragi Y, Kakihana T, Zhang L, Kakita A, Iwakura Y, Nawa H, Miura T, Ikeuchi T, Hara T, Fujii M. USP10 is a critical factor for Tau-positive stress granule formation in neuronal cells. Sci Rep. 2019 Jul 22;9(1):10591. doi: 10.1038/s41598-019-47033-7.

7. Jodo E, Inaba H, Narihara I, Sotoyama H, Kitayama E, Yabe H, Namba H, Eifuku S, Nawa H. Neonatal exposure to an inflammatory cytokine, epidermal growth factor, results in the deficits of mismatch negativity in rats. Sci Rep. 2019 May 16;9(1):7503. doi: 10.1038/s41598-019-43923-y.

Ⅳ　共同研究

(1) 研究題目：「創薬のためのインビトロ脳機能評価法の確立と標準化ヒト神経細胞の開発」
研究内容：ヒトiPS由来神経細胞を用いて分化誘導、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

(2) 研究題目：「ヒトを特徴づける脳比較トランスクリプトーム・比較メチローム解析」
研究内容：ヒト及び霊長類でジンクフィンガー遺伝子群に着目し、発現比較及びゲノムメチル化比較を行い、ヒトを特徴づける遺伝子を探索する。
参加機関：京都大学霊長類研究所　郷　康広

(3) 研究題目：「統合失調症におけるドパミンシグナルの変調」

研究内容：死後脳を用いて統合失調症におけるドパミン関連分子のゲノム解析及び発現解析を行う。
参加機関：福島県立医科大学　國井泰人

(4) 研究題目：「霊長類をもちいた統合失調症モデル動物の作成」
研究内容：マーモセットを用いた統合失調症モデルの樹立を目指す。
参加機関：京都大学霊長類研究所　中村克樹

細胞病態学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　令和２年３月３１日現在）

教授　　三國　貴康
准教授　　内ヶ島　基政
助教　　内田　仁司
特任助手　仲神　友貴

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

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

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Uchigashima M, Cheung A, Suh J, Watanabe M, Futai K. Differential expression of neurexin genes in the mouse brain. ***J Comp Neurol***. 2019 Aug 15;527(12):1940-1965.

Ⅳ　共同研究

（1）　研究題目　　「生体脳内での神経シナプス活動の時空間マッピング」
　　研究内容　　二光子体積イメージング法の開発と応用
　　参加機関　　山梨大学

（2）　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

（3）　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

(4)　研究題目　　「神経伝達物質の放出機構」
研究内容　　神経伝達分子プローブの開発と応用
参加機関　　北京大学

システム脳生理学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　令和2年3月31日現在）

准教授　　菱田　竜一

Ⅱ　研究活動

当研究室は、ミトコンドリアのフラビン蛋白由来の内因性蛍光やカルシウム依存性蛍光蛋白を用いたイメージングを用い、マウス感覚野などの機能を解析してきた。現在、連合野機能の解析を進めている。マウス頭頂連合野の神経活動を操作して、それにより誘起される大脳皮質応答を、フラビン蛋白蛍光イメージング法で解析した。頭頂連合野を活性化すると、視覚野の神経活動は抑制され、視覚刺激に対する視覚応答も抑圧されることを見つけた。逆に、頭頂連合野を不活性化すると視覚応答は増強した。これらの結果より、頭頂連合野が視覚野を常に抑制していることを明らかにした。さらに、この抑制機能が痛覚刺激により誘起されることを見出し、その生理学的役割について解析を進めた。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

(1) Tsukano H, Hou X, Horie M, Kitaura H, Nishio N, Hishida R, Takahashi K, Kakita A, Takebayashi H, Sugiyama S, Shibuki K. Reciprocal connectivity between secondary auditory cortical field and amygdala in mice. Sci Rep. 9, 19610, 2019.

(2) Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Nishio N, Hishida R, Takahashi K, Horii A, Shibuki K. Associative responses to visual shape stimuli in the mouse auditory cortex. PLoS One, 14, e0223242, 2019.

(3) Onishi T, Watanabe T, Sasaki M, Kamiya Y, Horie M, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Takebayashi H, Baba H, Shibuki K. Acute spatial spread of NO-mediated potentiation during hindpaw ischaemia in mice. J Physiol, 597, 3441-3455, 2019.

(4) Hishida R, Horie M, Tsukano H, Tohmi M, Yoshitake K, Meguro R, Takebayashi H, Yanagawa Y, Shibuki K. Feedback inhibition derived from the posterior parietal cortex regulates the neural properties of the mouse visual cortex. Eur J Neurosci, 50, 2970-2987, 2019.

Ⅳ　共同研究

(1) 研究題目　「ヒト大脳皮質神経活動の術中イメージング」
研究内容　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を確立する。
参加機関　新潟大学

(2) 研究題目　「視神経炎マウスモデルの病態解析」
研究内容　抗MOG抗体関連疾患の発症機序及び病態解明のため、モデルマウスの視覚野応答をフラビン蛍光蛋白イメージングで計測し、視機能を評価する。
参加機関　新潟大学

(3) 研究題目　「近赤外レーザーを利用した新型人工内耳の開発」
研究内容　レーザーで聴覚末梢(蝸牛)を刺激した際の聴覚中枢の応答をフラビン蛍光蛋白イメージングで計測し、刺激効率などを評価する。
参加機関　同志社大学

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2年3月31日現在）

Ⅰ－１　病理学分野

教　授	柿田　明美	技術職員	丹田　智恵子
准教授	清水　　宏		濁川　慎吾
特任准教授	北浦　弘樹		高崎　順子
特別研究員	田中　英智		田中　優子
			長谷部　美和
		事務職員	吉田　真理子
			笠原　香織
			樋口　有紀
		大学院博士課程	齊ノ内　信
			Ramil Gabdulkhaev
			齋藤　祥二
			（脳神経外科）
			崔　博
			（留学生）

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なっており、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. Ohara S, Miyahira TA, Oguchi K, Takei Y, Yamagimura F, Kawachi I, Oyanagi K, Kakita A. Neuromyelitis optica spectrum disorder with massive basal ganglia involvement. a case report. BMC Neurol 2019; 19 (1): 351. doi: 10.1186/s12883-019-1580-3.

2. Tsukano H, Hou X, Horie M, Kitaura H, Nishio N, Hishida R, Takahashi K, Kakita A, Takebayashi H, Sugiyama S, Shibuki K. Reciplocal connectivety between secondary auditory cortical field and amygdala in mice. Sci Rep 2019; 9 (1): 19610. doi: 10.1038/s41598-019-56092-9.

3. Watanabe J, natsumeda M, kanemaru Y, Okada M, Oishi M, Kakita A, Fujii Y. Comparison of circulating tumor DNA between body fluids in patients with primary central nervous system lymphoma. Leukemia

Lymphoma 2019; 60 (14): 3587-3589. doi: 10.1080/10428194.2019.1639169.

4. Ide M, Ohnishi T, Toyoshima M, Balan S, Maekawa M, Shimamoto-Mitsuyama C, Iwayama Y, Ohba H, Watanabe A, Ishii T, Shibuya N, Kimura Y, Hisano Y, Murata Y, Hara T, Morikawa M, Hashimoto K, Nozaki Y, Toyota T, Wada Y, Tanaka Y, Kato T, Fujisawa S, Okano H, Itokawa M, Hirokawa N, Kunii Y, Kakita A, Yabe H, Iwamoto K, Meno K, Katagiri T, Dean B, Uchida K, Kimura H, Yoshikawa T. Excess hydrogen sulfide and polysulfides production underlies a schizophrenia pathophysiology. EMBO Mol Med 2019; 11 (12): e10695. doi: 10.15252/emmm.201910695.

5. Suzuki T, Okamoto K, Genkai N, Kakita A, Abe H. A homogeneously enhancing mass evolving into multiple hemorrhagic and necrotic lesions in amoebic encephalitis with necrotizing vasculitis. Clin Imaging 2019; 60 (1): 48-52. doi: 10.1016/j.clinimag.2019.10.015.

6. Yamada Y, Fukushima T, Kodama S, Shimizu H, Kakita A, Makino K, Sekijima Y. A case of cerebral amyloid angiopathy-type hereditary ATTR amyloidosis with Y69H (p.Y89H) variant displaying transient focal neurological episodes as the main symptom. Amyloid 2019; 26 (4): 251-252. DOI: 10.1080/13506129.2019.1632829.

7. Ozawa T, Shimizu H, Matsui H, Onodera O, Kakita A. Shrinkage of the myenteric neurons in the small intestine in patients with multiple system atrophy. Auton Neurosci 2019; 221: 102583. doi: 10.1016/j.autneu.2019.102583.

8. 他田 真理、柿田 明美. TDP–43 プロテイノパチー (1) 前頭側頭葉変性症 (FTLD). 連載 - 変性疾患のみかた- . 病理と臨床 2019; 37 (1): 1131-1137.

9. Tanji K, Miki Y, Mori F, Kon T, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Phosphorylated NUB1 distinguishes α-synuclein in Lewy bodies from that in glial cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy. Brain Pathology 2019; 29 (6): 803-812. doi: 10.1111/bpa.12728.

10. Mori F, Tada M, Kon T, Miki Y, Tanji K, Kurotaki H, Tomiyama M, Ishihara T, Onodera O, Kakita A, Wakabayashi K. Phosphorylated TDP-43 aggregates in skeletal and cardiac muscles are not a marker of myogenic degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and various conditions. Acta Neuropathol Commun 2019; 7 (1): 165. doi: 10.1186/s40478-019-0824-1.

11. Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Nagaoka A, Nawa H, Kakita A, Akatsu H, Hori A, Hashizume Y, Yamamoto S, Yabe H. Differential protein expression of DARPP-32 versus Calcineurin in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in schizophrenia and bipolar disorder. Sci Rep 2019; 9 (1): 14877. doi: 10.1038/s41598-019-51456-7.

12. Sergei A, Takahashi M, Katsuragi Y, Kakihana T, Kitaura H, Zhang L, Kakita A, Fujii M. G3BP1 inhibits ubiquitinated protein aggregations by interacting with p62 and USP10. Sci Rep 2019; 9 (1): 12896. doi: 10.1038/s41598-019-46237-1.

13. Ono CT, Yu Z, Kikuchi Y, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Nagaoka A, Ito J, Iwasaki Y, Hagihara H, Miyakawa T, Yoshida M, Saito Y, Niwa S, Yabe H, Kakita A, Tomita H. A minimal amount of tissue-based pH measurement to improve quality control in neuropsychiatryic postmortem brain studies.

Psychiatry Clin Neurosci 2019; 73 (9): 566-573. doi: 10.1111/pcn.12863.

14. Watanabe J, Natsumeda M, Okada M, Kanemaru Y, Tsukamoto Y, Oishi M, Kakita A, Fujii Y. Podoplanin expression and IDH-wildtype status predicts venous thrombolism in patients with high-grade gliomas in early postoperative period. World Neurosurg 2019; 128: e982-988. doi: 10.1016/j.wneu.2019.05.049.

15. Kon T, Tanji K, Mori F, Kimura A, Kakita A, Wakabayashi K. Immunoreactivity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein in Lewy bodies. Neuropathology 2019; 39 (4): 279-285. doi: 10.1111/neup.12564.

16. Inoue M, Saito R, Kakita A, Tainaka K. Rapid chemical clearing of white matter in post-mortem human brain by 1,2-hexanediol delipidation. Bioorganic Medicinal Chem Lett 2019; 29 (15): 1886-1890. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.05.049.

17. Piatnitskaia S, Takahashi M, Kitaura H, Katsuragi Y, Kakihana T, Zhang L, Kakita A, Iwakura Y, Nawa H, Miura T, Ikeuchi T, Hara T, Fujii M. USP10 is a critical factor for tau-positive stress granule formation in neuronal cells. Sci Rep 2019; 9 (1): 10591. doi: 10.1038/s41598-019-47033-7.

18. Ohnishi T, Balan S, Toyoshima M, Maekawa M, Ohba H, Watanabe A, Iwayama Y, Shimamoto C, Nozaki Y, Hisano Y, Esaki K, Mataga N, Hayashi-Takagi A, Kunii Y, Kakita A, Yabe H, Yoshikawa T. Investigation of betaine as a novel psychotherapyeutic for schizophrenia. EBioMedicine 2019; 45: 432-446. doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.062.

19. Kanemaru Y, Matsumeda M, Okada M, Kobayashi D, Watanabe J, Tsukamoto Y, Oishi M, Saito R, Saito H, Nagahashi M, Hashizume R, Aoyama H, Wakai T, Kakita A, Fujii Y. Dramatic radiographical response after combined BRAF and MEK inhibitor treatment in a patient with BRAF V600E-mutant epithelioid glioblastoma-establishment of a cell line and xenograft to predict clinical efficacy. Acta Neuropathol Commun 2019; 7 (1): 119. doi.org/10.1186/s40478-019-0774-7.

20. Tanji K, Miki Y, Mori F, Nikaido Y, Narita H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. A mouse model of adult-onset multiple system atrophy. Neurobiol Dis 2019; 127: 339-349. doi: 10.1016/j.nbd.2019.03.020.

21. 齋藤 理恵、柿田明美. α シヌクレイノパチー (2) 多系統萎縮症. 連載 - 変性疾患のみかた- . 病理と臨床 2019; 37 (7): 640-645.

22. Suzuki H, Sugano H, Nakajima M, Higo T, Iimura Y, Mitsuhashi T, Fusegi K, Kakita A, Otsubo H, Arai H. The epileptogenic zone in pharmacy-resistant temporal lobe epilepsy with amygdala enlargement. Epileptic Disord 2019; 21 (3): 252-264. doi: 10.1684/epd.2019.1075.

23. 村松 一洋, 清水 宏. Neurodegeneration with brain iron accumulationの一剖検例. 小児神経学の進歩 2019; 48: 74-86

24. Funayama K, Shimizu H, Tanaka H, Kawachi I, Nishino I, Matsui K, Takahashi N, Koyama A, Katsuragi-Go R, Higuchi R, Aoyama T, Watanabe H, Kakita A, Takatsuka H. An autopsy case of peliosis hepatis with X-linked myotubular myopathy. Legal Med (Tokyo) 2019; 38: 77-82. doi: 10.1016/j.legalmed.2019.04.005.

25. 他田真理、柿田明美．II. 各論 1. 多系統萎縮症 C. 病理．非定型パーキンソニズム － 基礎と臨床－ ．下畑享良（編）．文光堂，東京. pp. 94-99 (total 242 p).

26. 伊藤 陽、吉田浩樹、清水敬三、長谷川まこと、今野公和、中原亜紗、原 範和、宮下哲典、池内 健、豊島靖子、柿田明美．統合失調症として長期入院していた特発性基底核石灰化症 (Fahr 病) の臨床病理学的特徴．精神医学 2019; 61 (5): 595-603.

27. Matsumura N, Nobusawa S, Ito J, Kakita A, Suzuki H, Fujii Y, Fukuda M, Iwasaki M, Nakasato N, Yominaga T, Natsume A, Mikami Y, Shinojima N, Yamazaki T, Nakazato Y, Hirato J, Yokoo H. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis is useful for detecting a copy number gain of the *FGFR1* tyrosine kinase domain in dysembryoplastic neuroepithelial tumors. J Neurooncol 2019; 143 (1): 27-33. doi: 10.1007/s11060-019-03138-7.

28. Watanabe J, Matsumeda M, Okada M, Kobayashi D, Kanemaru Y, Tsukamoto Y, Oishi M, Kakita A, Fujii Y. High detection rate of MYD88 mutations in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system lymphomas. JCO Precis Oncol 2019; e1-e10. DOI: 10.1200/PO.18.00308.

29. Tanaka H, Kawakatsu S, Toyoshima Y, Miura T, Mezaki N, Sanpei K, Kobayashi R, Hayashi H, Otani K, Ikeuchi T, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Globular glial tauopathy type II: clinicpathological study of two autopsy cases. Neuropathology 2019; 39 (2): 111-119. doi: 10.1111/neup.12532.

30. Ota T, Natsumeda M, Yoshida S, Tsukamoto Y, Watanabe J, Kanemaru Y, Ando K, Yoshida Y, Hiraishi T, Okamoto K, Nagahashi M, Wakai T, Kakita A, Oishi M, Fujii Y. A dramatic, transient effect of nivolumab in combined with whole-brain irradiation for the treatment of primary meningeal melanomatosis. Clin Case Rep Rev 2019; 5: 1-4. doi: 10.15761/CCRR.1000451.

31. Nozawa T, Okada M, Natsumeda M, Eda T, Abe H, Tsukamoto Y, Okamoto K, Oishi M, Takahashi H, Fujii Y, Kakita A. EGFRvIII is expressed in cellular areas of tumor in a subset of glioblastoma. Neurol Med Chir (Tokyo) 2019; 59 (3): 89-97. doi: 10.2176/nmc.oa.2018-0078.

32. 竹腰顕，吉倉延亮，小澤憲司，生駒良和，竹島明，大槻美佳，中道一生，西條政幸，望月清文，柿田明美，下畑享良．経過中にBálint症候群を発症し、塩酸メフロキンとミルタザピンの併用療法により改善した進行性多巣性白質脳症の1例．Brain Nerve 2019; 71 (3): 281-286. doi: 10.11477/mf.1416201256.

33. Masaki T, Tsujimoto M, Kitazawa R, Nakano E, Funasaka Y, Ichihashi M, Kitazawa S, Kakita A, Kanda F, Nishigori C. Autopsy findings and clinical feature of a mild-type xeroderma pigmentosum complementation group A siblings: 40 years of follow-up. J Am Acad Dermatol Case Rep 2019; 5 (3): 205-208. doi: 10.1016/j.jdcr.2018.04.017.

34. Saito R, Toyoshima Y, Tanaka H, Nozaki H, Tsubata Y, Morioka T, Horikawa Y, Oyanagi K, Morita T, Nemoto K, Onodera O, Kakita A. Retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy: clinicaopathologic features of a Japanese autopsied patient with a heterozygous *TREX1* mutation. J Neuropathol Exp Neurol 2019; 78 (2): 181-186. doi: 10.1093/jnen/nly115.

35. 張　璐、田中英智、柿田明美．病理所見を理解する基礎 - 海馬硬化 - ．てんかんをわかり易く

理解するための神経科学．てんかん研究 2019; 36 (3): 664-666.

36. 北浦弘樹、柿田明美．AMPA型グルタミン酸受容体の構造とシナプス伝達機構．ペランパネルによるてんかんの治療ストラテジー．加藤天美（編集）．pp. 17-21. (total 89 p). 先端医学社.

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プロテイノパチー)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、カザン州立医科大学（露)、
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2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は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. 若林孝一. 多系統萎縮症の病理学. Clinical Neuroscience 2019; 37(9): 1064-1067.
2. Kon T, Funamizu Y, Suzuki C, Sato T, Kurotaki H, Kurihara A, Kurose A, Wakabayashi K, Tomiyama M. A long-term interval from a spinal cord lesion to subsequent brain lesion in primary central nervous system vasculitis: a case report. Intern Med 2019; 58(10): 1485-1489.
3. Kon T, Mori F, Arai A, Miki Y, Tanji K, Kurotaki H, Tomiyama M, Wakabayashi K. Atypical globular glial tauopathy with a combination of types I and II pathology. Neuropathology 2019; 39(2): 127-134.
4. Kon T, Mori F, Oyama Y, Tanji K, Kimura T, Takahashi S, Wakabayashi K. An autopsy case of early-stage amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43-immunoreactive neuronal, but not glial, inclusions. Neuropathology 2019; 39(3): 224-230.
5. Tanji K, Miki Y, Mori F, Nikaido Y, Narita H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. A mouse model of adult-onset multiple system atrophy. Neurobiol Dis 2019; 127: 339-349.
6. Katsu M, Hama Y, Utsumi J, Takashina K, Yasumatsu H, Mori F, Wakabayashi K, Shoji M, Sasaki H. MicroRNA expression profiles of neuron-derived extracellular vesicles in plasma from patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci Lett 2019; 708: 134176.
7. Tanji K, Miki Y, Mori F, Kon T, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Phosphorylated NUB1 distinguishes α-synuclein in Lewy bodies from that in glial cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy. Brain Pathol 2019; 29(6): 803-812.
8. Hayashi K, Hamaguchi T, Sakai K, Nakamura K, Wakabayashi K, Shirasaki H, Yamada M. Neuronal intranuclear inclusion disease showing blepharoptosis and positive serum anti-acetylcholine receptor antibody without myasthenia gravis. J Neurol Sci 2019; 400: 119-121.
9. Kon T, Tanji K, Mori F, Kimura A, Kakita A, Wakabayashi K. Immunoreactivity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein in Lewy bodies. Neuropathology 2019; 39(4): 279-285.
10. Nakamura T, Kawarabayashi T, Seino Y, Hirohata M, Wakabayashi K, Shoji M. Perineuritis

successfully treated with early aggressive immunotherapy. Intern Med 2019; 58(19): 2875-2878.
11. Narita H, Tanji K, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K. Trehalose intake together with exercise up-regulates a glucose transporter, GLUT8, in the brain. Biochem Biophys Res Comm 2019; 514(3): 672-677.
12. Mori F, Miki Y, Kon T, Tanji K, Wakabayashi K. Autophagy is a common degradation pathway for Bunina bodies and TDP-43 inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 2019; 78(10): 910-921.
13. Kobayashi J, Hasegawa T, Sugeno N, Yoshida S, Akiyama T, Fujimori K, Hatakeyama H, Miki Y, Tomiyama A, Kawata Y, Fukuda M, Kawahata I, Yamakuni T, Ezura M, Kikuchi A, Baba T, Takeda A, Kanzaki M, Wakabayashi K, Okano H, Aoki M. Extracellular α-synuclein enters dopaminergic cells by modulating flotillin-1-assisted dopamine transporter endocytosis. FASEB J 2019; 33(9): 10240-10256.
14. Mori F, Tada M, Kon T, Miki Y, Tanji K, Kurotaki H, Tomiyama M, Ishihara T, Onodera O, Kakita A, Wakabayashi K. Phosphorylated TDP-43 aggregates in skeletal and cardiac muscle are a marker of myogenic degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and various conditions. Acta Neuropathol Comm 2019; 7: 165.

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2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	野村 俊春、本橋 邦夫、阿部 英明、三橋 大樹、金丸 優、渡邉 潤、伊藤 陽祐

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）

- 脳腫瘍培養細胞株・マウスモデルを用いたプレシジョンメディシン確立の試み
- 悪性髄膜腫における標的可能遺伝子変異の同定と新規治療法確立
- ヒト脳腫瘍からの安定脳腫瘍幹細胞株の樹立と新規治療薬の探索への基礎研究
- 再発膠芽腫の新規治療法：EUrd-CED法のラット脳幹部腫瘍モデルでの研究
- ポドプラニンを標的とした悪性脳腫瘍への近赤外線光線免疫療法（NIR-PIT）確立の研究
- 膠芽腫における神経成長因子関連タンパク質-43kDa (GAP-43) のリン酸化の解析
- びまん性内在性橋神経膠腫 (DIPG)に対するACVR1変異を標的とした新規治療
- 小児DIPGに対するDNA障害型抗がん剤感受性因子のDNAヘリケースの発現解析
- 髄芽腫におけるGli3の役割の解明と新しい治療戦略
- 膠芽腫に対する代謝リプログラミングおよびmTORを標的とした効果的薬物療法の確立
- イソプレノイド化合物 (Ambrein)の脳腫瘍への抗腫瘍効果の探索
- Boron neutron capture therapy (BNCT)が播種・浸潤に及ぼす効果の検討
- 神経組織内因性蛍光反応を基盤とした大脳皮質活動領域の術中直接可視法の確立
- てんかんにおけるIMPDH1/2発現解析
- 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
- 脳血管障害における遺伝子変異の意義解明と培養細胞実験系の確立
- 脳動静脈奇形における体細胞変異の意義の解明
- 頚部内頚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) PulseRider and W-EB registry
・ 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
・ 覚醒下手術における悪心・嘔吐に対するオンダンセトロンの有用性
・ 新潟大学関連施設の神経膠腫に対する観察登録研究
・ 初発退形成性神経膠腫に対する術後塩酸ニムスチン（ACNU）化学放射線療法先行再発時テモゾロミド化学療法をテモゾロミド化学放射線療法と比較するランダム化第III相試験
・ JCOG1303：手術後残存腫瘍のあるWHO Grade II星細胞腫に対する放射線単独治療とテモゾロミド併用放射線治療を比較するランダム化第II相試験
・ 初発膠芽腫に対する可及的摘出術＋カルムスチン脳内留置用剤留置＋テモゾロミド併用化学放射線療法と可及的摘出術＋テモゾロミド併用化学療法のランダム化第III相試験
・ 初発治療後に再発又は増悪した膠芽腫患者を対象としたDSP-7888投与エマルションとベバシズマブ併用対ベバシズマブ単独の多施設共同ランダム化第2相試験
・ 原発性悪性脳腫瘍患者に対する標準治療成績を調査するコホート研究
・ NF-kB 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
・ 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，頚部内頚動脈狭窄症におけるポドプラニン/CLEC-2発現解析
・ 脳腫瘍における体液（血液、尿、髄液）を利用した液体診断
・ 臨床手術（脳神経外科，耳鼻咽喉科，整形外科）に関する解剖知識と手術技能の習熟を目的とした遺体解剖実習

III　論文（原著，総説，症例報告を区別しない）

1. Ando K, Hasegawa H, Kikuchi B, Saito S, On J, Shibuya K, Fujii Y. Treatment Strategies for Infectious Intracranial Aneurysms: Report of Three cases and Review of the Literature. Neurol Med Chir (Tokyo) 59(9): 344-350, 2019
2. Kanemaru Y, Natsumeda M, Okada M, Saito R, Kobayashi D, Eda T, Watanabe J, Saito S, Tsukamoto Y, Oishi M, Saito H, Nagahashi M, Sasaki T, Hashizume R, Aoyama H, Wakai T, Kakita A, Fujii Y. Dramatic response of BRAF

V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor: establishment and xenograft of a cell line to predict clinical efficacy. Acta Neuropathologica Communications 7(1): 119, 2019

3. Imamura H, Sakai N, Ito Y, Sakai C, Hyodo A, Miyachi S, Matsumaru Y, Yoshimura S, Abe T, Yamagami H, Hayakawa M, Sato H, Fujinaka T, Tanabe K, JHSR collaborators. Prospective Registry of Embolization of Intracranial Aneurysms Using HydroSoft Coils: Results of the Japanese HydroSoft Registry. WORLD NEUROSURGERY 127: e631-e637, 2019
4. Ishikawa Y, Okada M, Honda A, Ito Y, Tamada A, Endo N, Igarashi M. Phosphorylation sites of microtubule-associated protein 1B (MAP 1B) are involved in axon growth and regeneration. Molecular Brain 12(1): 93, 2019
5. Hayakawa M, Sugiu K, Yoshimura S, Hishikawa T, Yamagami H, Fukuda-Doi M, Sakai N, Iihara K, Ogasawara K, Oishi H, Yasushi Ito, Matsumaru Y. Effectiveness of staged angioplasty for avoidance of cerebral hyperperfusion syndrome after carotid revascularization. Journal of Neurosurgery, Jan. 18, 2019 (Published online)
6. Natsumeda M, Liu Y, Nakata S, Miyahara H, Hanaford A, Ahsan S, Stearns D, Skuli N, Kahlert U, Raabe E, Rodriguez F, Eberhart C. Inhibition of enhancer of zest homologue 2 is a Potential Therapeutic Target for High-MYC Medulloblastoma. Neuropathology 39(2): 71-77, 2019
7. Nozawa T, Okada M, Natsumeda M, Eda T, Abe H, Tsukamoto Y, Okamoto K, Oishi M, Takahashi H, Fujii Y, Kakita A. EGFRvIII Is Expressed in Cellular Area of Tumor in a Subset of Glioblastoma. Neurologia medico-chirurgica 59(3): 89-97, 2019
8. Sano M, Jinguji S, Yoshimura J, Okamoto K, Fujii Y. De Novo Pineal Region Germinoma in the Seventh Decade of Life: A Case Report. NMC Caser Report Journal 6(3): 75-78, 2019
9. Sato K, Ito Y, Hasegawa H, Kobayashi T, Aoki H, Jinguji S, Fujii Y. Verification of the Availability of Cerulean DD6. Journal of Neuroendovascular Therapy 13(10): 425-429, 2019
10. Suzuki T, Takizawa T, Kamio Y, Qin T, Hashimoto T, Fujii Y, Murayama Y, Patel AB, Ayata C. Noninvasive Vagus Nerve Stimulation Prevents Ruptures and Improves Outcomes in a Model of Intracranial Aneurysm in Mice. Stroke 50(5): 1216-1223, 2019
11. Tagawa M, Takeuchi S, Nakamura Y, Saeki M, Taniguchi Y, Ohno T, Watanabe H, Ochiai Y, Kato K, Chinushi M, Aizawa Y.Asymptomatic Coronary Artery Disease in Japanese Patients With the Acute Ischemic Stroke. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases 28(3): 612-618, 2019
12. Tsukano J, Kurabe S, Sugai T, Wada M, Kumagai T.Mechanical thrombectomy utilising a collateral pathway in a patient with dysgenesis of the internal carotid artery. Interventional Neuroradiology 25(1): 54–57, 2019
13. Watanabe J, Okamoto K, Ohashi T, Natsumeda M, Hasegawa H, Oishi M, Miyatake S, Matsumoto N, Fujii Y.Malignant hyperthermia and cerebral venous sinus thrombosis following ventriculoperitoneal shunt in an infant with schizencephaly and COL4A1 mutation. World Neurosurg 127: 446-450, 2019
14. Watanabe J, Natsumeda M, Okada M, Kobayashi D, Kanemaru Y, Tsukamoto Y, Oishi M, Kakita A, Fujii Y. High Detection Rate of MYD88 Mutations in Cerebrospinal Fluid From Patients With CNS Lymphomas. JCO Precision Oncology 2019 Apr.
15. Watanabe J, Natsumeda M, Okada M, Kanemaru Y, Tsukamoto Y, Oishi M, Kakita A, Fujii Y. Podoplanin expression and IDH-wildtype status predict venous thromboembolism in patients with high-grade gliomas in the early postoperative period. World Neurosurg 128: e982-e988, 2019
16. 安藤和弘, 長谷川仁, 菊池文平, 齋藤祥二, 温城太郎, 澁谷航平, 藤井幸彦 感染性脳動脈瘤の治療戦略. The Mt. Fuji Workshop on CVD 37: 105-109, 2019
17. 源甲斐信行, 阿部博史, 高橋陽彦, 齋藤祥二, 岡本浩一郎 歯性上顎洞炎から硬膜下蓄膿(膿瘍), 続発性脳動脈炎と脳虚血を生じた 1 例 脳神経外科 47(2): 205-210, 2019
18. 齋藤太希, 大石　誠, 福多真史, 塚本佳広, 大橋　伯, 渡邉　潤, 根元琢磨, 川口　正, 藤井幸彦 Posterior quadrantectomy が有効であった難治性てんかんの乳児例 脳神経外科 47(3): 349-356, 2019

19. 神保康志, 阿部博史, 高橋陽彦 Double-barrel Stent-assisted Technique が有用であった破裂脳底動脈窓形成部動脈瘤 脳血管内治療 3(2): 65-71, 2019
20. 平石哲也, 棗田　学, 岡田正康, 大石　誠, 藤井幸彦 悪性髄膜腫における個別化医療の可能性 Precision Medicine 2(1): 54-58, 2019

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

神経内科学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　令和2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　　小池 佑佳　　特任助教（病院）　大津 裕
特任助教（死因究明教育センター）畠山　公大
技術職員　金子　三津子、川口　さやか

博士課程大学院生
酒井　直子、笠原　壮、二宮 格、若杉 尚宏、坪口　晋太朗、
樋口　陽、畠野　雄也、安藤　昭一朗、山岸　拓磨、加藤　怜

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効果症」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イ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-3α antibodies) を発見し、Neurology誌 (Neurology 2016;86(24):2235.) に報告した。

【POEMS症候群のサリドマイド治療に関する検討】

1) 研究の概要

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

【脳梗塞に対する新規治療法の開発】

1) 研究の概要

金澤雅人を中心とする研究グループは、修復期の新しい細胞療法として、低酸素・低糖刺激を行った末梢血単核球の脳梗塞動物モデルへの投与が有効であることを明らかにし、発表した（Sci Rep 2019;9:16819）。本論文は、脳卒中学会草野賞を受賞し、米国脳卒中協会年次集会でもLate breaking Sessionに採択された。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。

また、脳梗塞後の血管新生の機序、その意義を検討し、血管新生による神経再生の可能性に関して、総説を発表した（Neural Regen Res 2020 Jan;15(1):16-19, クラリベイト・アナリティクスの高頻度引用論文）。

2) 研究の成果

（特許出願）

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

【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 医師主導治験の準備を進めた。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関研究分野に申請を行い、これに採択された。同年度からの医師主導治験の実施に向けて準備を進めている。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Masato Kanazawa, Tetsuya Takahashi, Masanori Ishikawa, Osamu Onodera, Takayoshi Shimohata and Gregory J del Zoppo　Angiogenesis in the ischemic core:A potential treatment target?
Journal of Cerebral Blood Flow&Metabollism. 2019 ;　DOI:10.1177/0271678X19834158

2. Masato Kanazawa, Kunio Kawamura, Tetsuya Takahashi and Takayoshi Shimohata
Pleiotropic Protective Effects of Progranulin in the Treatment of Ischemic Stroke
Progranulin and Central Nervous System Disorders 2019: 157-167

3. Funayama K, Shimizu H, Tanaka H, Kawachi I, Nishino I, Matsui K, Takahashi N, Koyama A, Katsuragi-Go R, Higuchi R, Aoyama T, Watanabe H, Kakita A, Takatsuka H. An autopsy case of peliosis hepatis with X-linked myotubular myopathy. Leg Med (Tokyo). 2019 Apr 18;38:77-82. doi: 10.1016/j.legalmed.2019.04.005.

4. Koji Kato, Ryo Maemura, Manabu Wakamatsu, Ayako Yamamori, Motoharu Hamada, Shinsuke Kataoka, Atsushi Narita, Shunsuke Miwata, Yuko Sekiya, Nozomu Kawashima, Kyogo Suzuki, Kotaro Narita, Sayoko Doisaki, Hideki Muramatsu, Hirotoshi Sakaguchi, Kimikau Matsumoto, Yuka Koike, Osamu Onodera, Makiko Kaga, Nobuyuki Shimozawa, Nao Yoshida
Allogeneic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning for patients with adrenoleukodystrophy
Mol Genet Metab Rep　2019; (18): 1-6

5. Akihiro Sugai, Taisuke Kato, Akihide Koyama, Yuka Koike, Takuya Konno, Tomohiko Ishihara, Osamu Onodera.
Non-genetically modified models exhibit TARDBP mRNA increase due to perturbed TDP-43 autoregulation
Neurobiol Dis　2019; (130):104534

6. S Koga, J.Eric Ahlskog, M. A.DeTure, M Baker, S. F. Roemer, T. Konno, R. Rademakers, O. A. Ross, D. W. Dickson　Coexistence of Progressive Supranuclear Palsy With Pontocerebellar Atrophy and Myotonic Dystrophy Type 1　J Neuropathol Exp Neurol 2019; DOI:10.1093/jnen/nlz048

7. Izumi Kawachi　Neuropathological features of "non-motor" symptoms in multiple sclerosis and neuromyelitis optica　Neuroimmunology　2019;DOI:10.1111/cen3.12533

8. Masahiro Uemura, Hiroaki Nozaki, Akihide Koyama, Naoko Sakai, Shoichiro Ando, Masato Kanazawa, Taisuke Kato, and Osamu Onodera　HTRA1 Mutations Identified in Symptomatic Carriers Have the Property of Interfering the Trimer-Dependent Activation Cascade
Front Neurol　2019; (10):DOI:10.3389/fneur.2019.00693

9. Tetsutaro Ozawa, Hiroshi Shimizu, Hideaki Matsui, Osamu Onodera, Akiyoshi Kakita
Shrinkage of the myenteric neurons of the small intestine in patients with multiple system atrophy
Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical　2019;(221):Article 102583

10. Masahiro Hatakeyama, Itaru Ninomiya, Masato Kanazawa　Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke　NEURAL REGENERATION RESEARCH　2019;15(1):16-19

11. T Kondo, I Kawachi, Y Onizuka , K Hiramatsu, M Hase, J Yun, A Matta and S Torii
Efficacy of dimethyl fumarate in Japanese multiple sclerosis patients: interim analysis of randomized, double-blind

APEX study and its open-label extension
Multiple Sclerosis Journal—Experimental, Translationaland Clinical 2019: DOI: 10.1177/2055217319864974"

12. Pietro Cortelli, MD, PhD,* Giovanna Calandra-Buonaura, MD, PhD,* Eduardo E. Benarroch, MD, Giulia Giannini, MD, Alex Iranzo, MD, Phillip A. Low, MD, Paolo Martinelli, MD, Federica Provini, MD, PhD, Niall Quinn, MD, Eduardo Tolosa, MD, PhD, Gregor K. Wenning, MD, PhD, Giovanni Abbruzzese, MD, Pamela Bower, Enrico Alfonsi, MD, Imad Ghorayeb, MD, PhD, Tetsutaro Ozawa, MD, PhD, Claudio Pacchetti, MD, Nicol`o Gabriele Pozzi, MD, Claudio Vicini, MD, Angelo Antonini, MD, PhD, Kailash P. Bhatia, MD, Jacopo Bonavita, MD, Horacio Kaufmann, MD, Maria Teresa Pellecchia, MD, PhD, Nicole Pizzorni, MSc, Antonio Schindler, MD, François Tison, MD, PhD, Luca Vignatelli, MD, PhD, and Wassilios G. Meissner, MD, PhD
Stridor in multiple system atrophy: Consensus statement on diagnosis, prognosis, and treatment
Neurology 2019.9;93(14):630-639

13. Izumi Kawachi , Shuichi Okamoto, Mariko Sakamoto, Hiroyuki Ohta, Yusuke Nakamura, Kosuke Iwasaki, Manami Yoshida, Shinzo Hiroi and Mieko Ogino
Recent transition of medical cost and relapse rate of multiple sclerosis in Japan based on analysis of a health insurance claims database BMC Neurology 2019;19（324）:doi:/10.1186/s12883-019-1534-9

14. Shoichiro Ando, Masato Kanazawa, Osamu Onodera Progressive Supranuclear Palsy with Predominant Cerebellar Ataxia J Mov Disord 2019 doi: 10.14802/jmd.19061.

15. Hatakeyama M, Kanazawa M, Ninomiya I, Omae K, Kimura Y, Takahashi T, Onodera O, Fukushima M, Shimohata T. A novel therapeutic approach using peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation Sci Rep 2019-Nov ; 9(1):16819.

16. Shinji Ohara, Taka-aki Miyahira, Kenya Oguchi, Yo-ichi Takei, Fumihiro Yanagimura, Izumi Kawachi, Kiyomitsu Oyanagi and Akiyoshi Kakita Neuromyelitis optica spectrum disorder with massive basal ganglia involvement: a case report BMC Neurology 2019.12;19(1):351

17. Ando S, Konno T, Ishihara T, Hayashi H, Saito N, Nishioka K, Hattori N, Wszolek ZK, Onodera O.
A patient clinically diagnosed as multiple system atrophy harboring LRRK2 p.G2019S.
Clin Parkinsonism Relat Disord 2019;1:100-101

18. Hara Kenju, Ishihara Tomohiko, Onodera Osamu, Ishiguro Hideaki A new Japanese amyotrophic lateral sclerosis family with TARDBP (TDP‐43) mutation Neurology and Clinical Neuroscience 2019;7(2):101-102

19. Fumiaki Mori, Mari Tada, Tomoya Kon, Yasuo Miki, Kunikazu Tanji, Hidekachi Kurotaki, Masahiko Tomiyama, Tomohiko Ishihara, Osamu Onodera, Akiyoshi Kakita, Koichi Wakabayashi
Phosphorylated TDP-43 aggregates in skeletal and cardiac muscle are a marker of myogenic degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and various conditions Acta Neuropathol Commun 2019;7(1):165

20. Saito R, Shimizu H, Miura T, Hara N, Mezaki N, Higuchi Y, Miyashita A, Kawachi I, Sanpei K, Honma Y, Onodera O, Ikeuchi T, Kakita A. Oculopharyngodistal Myopathy With Coexisting Histology of Systemic Neuronal Intranuclear Inclusion Disease: Clinicopathologic Features of an Autopsied Patient Harboring CGG Repeat Expansions in LRP12. Acta Neuropathol Commun. 2020 Jun 3;8(1):75. doi: 10.1186/s40478-020-00945-2.

21. 河内泉、その他．日本ベーチェット病学会監修．ベーチェット病診療ガイドライン2020.

2020年1月27発行. 140-147. 診断と治療社. 東京.
22. 河内泉. 可逆性の脳梁膨大部病変を伴う軽症脳炎・脳症. 『今日の疾患辞典』デジタル版 (Current Decision Support). 2019. https://www.cds.ai/docs/detail/d09420_indd
23. 河内泉. 白質脳症（総論）. 『今日の疾患辞典』デジタル版 (Current Decision Support). 2019. https://www.cds.ai/docs/detail/d09425_indd
24. 河内泉. 横断性脊髄炎. 『今日の疾患辞典』デジタル版 (Current Decision Support). 2019. https://www.cds.ai/docs/detail/d09434_indd
25. 河内泉. 放射線脊髄症. 『今日の疾患辞典』デジタル版 (Current Decision Support). 2019. https://www.cds.ai/docs/detail/d09435_indd
26. 河内泉. 放射線治療後の神経叢障害. 『今日の疾患辞典』デジタル版 (Current Decision Support). 2019. https://www.cds.ai/docs/detail/d09436_indd
27. 勇亜衣子、内山純花、島岡雄一、鈴木重明、河内泉、藤田信也　抗横紋筋抗体陽性の重症筋無力症合併ニボルマブ関連壊死性ミオパチーの 1 例　臨床神経、59：431－435，2019
28. 坪口晋太郎、石原智彦、小野寺理　神経疾患とトレース・メタル―知っていますか？ Friedreich 失調症と鉄代謝　CLINICAL NEUROSCIENCE 別冊　2019.3 37(3):308-310
29. 今野卓哉、野崎洋明、池内健、小野寺理　Ⅱ．本年の動向　3.成人発症遺伝性白質脳症の医療基盤 Annual Review神経2019,2019.3:82-88
30. 河内泉 Charcot's concept から見る視神経脊髄炎　BIO Clinica　2019.5 34(5):101-104
31. 安藤昭一朗、金澤雅人、小野寺理　各論：主な神経疾患の嚥下障害の臨床　多系統萎縮症 CLINICAL NEUROSCIENCE 2019.5,37(5):555-557
32. 小池佑佳、石原智彦、小野寺理　ALS病態における液-液相分離と非膜性構造の異常 実験医学 2019,37(9):1416-1420
33. 河内泉　多発性硬化症（MS)・視神経脊髄炎(NMOSD)　日本医事新報 2019,4967:42-43
34. 上村昌寛、小野寺理　皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症（CADASIL）［指定難病124］ 指定難病ペディア2019　2019,148巻特別号（１）:111
35. 今野卓哉・小野寺　理　神経軸索スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症［指定難病125］　指定難病ペディア2019　2019, 148巻特別号（１）:115-116
36. 中村航世、金澤雅人、小野寺理　新潟大学脳研究所神経内科　オリーブ橋小脳萎縮症 CLINICAL NEUROSCIENCE 2019.9 37(9) 1057-1058
37. 勇亜衣子、河内泉　肥厚性硬膜炎の歴史と概念―新たな診断基準 脳神経内科 2019;91(3):340-351
38. 小澤鉄太郎　シヌクレイノパチーにおける腸脳軸の障害 Medical Science Digest 2019;45(12):58-61
39. 鳥谷部 真史、金澤 雅人、下畑 享良　血管保護を目指した脳梗塞急性期治療の創薬アプローチ　血栓止血誌2019 2019;30(6):845-849
40. 金澤雅人、高橋哲哉、川村邦雄、下畑享良　総説　VEGF-t-PA治療後の脳出血合併を抑える治療標的　臨床神経学　2019;59(11):699-70
41. 畠野雄也、石原智彦、小野寺理　脆弱X症候群および脆弱X関連振戦/運動失調症候群の臨床 脳神経内科　2019;91(4):443-450
42. 穂苅万李子、河内泉　多発性硬化症・視神経脊髄炎 CLINICAL NEUROSCIENCE 2019.11;37(11):1332-1334
43. 坪口晋太郎、石原智彦、須貝章弘、横関明男、小野寺理　TDP-43封入体から解くALSの分子病態 BRAIN and NERVE　2019.11;71(11):1183-1189
44. 山岸拓磨、小野寺理　脳の排泄系と、その関連疾患 医学のあゆみ 2019.9;270(13):1183-1187

45. 加藤怜、石原 智彦、小野寺理 【ジストニア診療のupdate】ジストニア　遺伝子診断からのアプローチ　脳神経内科　2019;91(6):727-738
46. 穂苅万李子、河内泉. 神経疾患と神経障害性疼痛. 各論1: 中枢神経障害による神経障害性疼痛 病態と治療. 多発性硬化症と視神経脊髄炎. Clinical Neuroscience 2019;37(11):1332-1334.
47. 河内泉. 視神経脊髄炎の病態と治療の UP- TO- DATE; アクアポリン4抗体の発見で何が変わったのか? 神経治療 2019;36(3)217-219.
48. 中島章博、河内泉. 肥厚性硬膜炎の診断と治療. 脊髄外科 (日本脊髄外科学会機関誌) 2020;34(1):25-31.

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福島雅典センター長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。

（参加機関）新潟大学脳研究所神経内科、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

（特許）　CELL PREPARATION AND METHOD FOR PRODUCING CELL PREPARATION (WO 2018043596, US20190216856A1, CN109963573, EP3508207, KR102019004268)

(4)　脊髄小脳変性症3型のバイオマーカー探索（国際共同研究）

（概要）　今野卓哉らは、Mayo Clinic FloridaのZbigniew Wszolek教授との共同研究により、脊髄小脳変性症3型のバイオマーカー探索を行った。

（参加機関）　新潟大学脳研究所脳神経内科、Mayo Clinic Florida

統合脳機能研究センター

Ⅰ　研究組織（構成員　令和2年3月31日現在）

教授	五十嵐　博中	センター長
特任専門職員	西澤　正豊	
特任専門職員	杉浦　真	
特任専門職員	永澤　清	
客員教授	イングリッド・クウィー	
准教授	松澤　等	脳機能解析学分野
准教授	鈴木　清隆	生体磁気共鳴学分野
准教授	鈴木　雄治	臨床機能脳神経科学分野
准教授	山田　謙一	臨床機能脳神経科学分野
特任准教授	伊藤　浩介	脳機能解析学分野
助教	渡辺　将樹	生体磁気共鳴学分野
助教	植木　智志	臨床機能脳神経科学分野
特任助教	中村　ゆきみ	生体磁気共鳴学分野
特任助教	酒多　穂波	生体磁気共鳴学分野
特任助手	村木　美子	臨床機能脳神経科学分野
特任助手	大湊　詩保	臨床機能脳神経科学分野
技術職員	計良　妙	
実験助手	目黒　佳未	
実験助手	冨士　淑恵	
実験助手	上村　柊太	
大学院生	武田　基秀	
大学院生	松田　将門	
大学院生	大野　健	
医局秘書	佐藤　直子	
医局秘書	松崎　励奈	
医局秘書	遠藤　智代	
医局秘書	丸山　美穂	

Ⅱ　主な研究活動

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

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

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. 伊藤浩介　「音楽と共感覚」　生体の科学 70(6), 504-508, 2019.12.15 （査読なし）
2. Terumitsu-Tsujita M, Kitaura H, Miura I, Kiyama Y, Goto F, Muraki Y, Ominato S, Hara N, Simankova A, Bizen N, Kashiwagi K, Ito T, Toyoshima Y, Kakita A, Manabe T, Wakana S, Takebayashi H, Igarashi H. Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the Eif2b5 gene: a vanishing white matter disease model. J Neurochem. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31587290.
3. 伊藤浩介　「音階が言葉に聞こえる　―　脳から見る絶対音感と言語の関係」　academist Journal（オンライン誌 https://academist-cf.com/journal/?p=11587）　2019.9.4（査読なし）
4. Matsuda M, Igarashi H, Itoh K. Auditory T-complex reveals reduced neural activities in the right auditory cortex in musicians with absolute pitch. Front. Neurosci. 2019 Aug 6;13:809. doi: 10.3389/fnins.2019.00809.
5. Honami Sakata, Yuri Kim, Masafumi Nejime, Naho Konoike, Shigehiro Miyachi, Katsuki Nakamura. Laminar pattern of projections indicates the hierarchical organization of the anterior cingulate–temporal lobe emotion system. Frontiers in Neuroanatomy 2019 July volume 13, article 74
6. Itoh K, Nejime M, Konoike N, Nakamura K, Nakada T. Evolutionary Elongation of the Time Window of Integration in Auditory Cortex: Macaque vs. Human Comparison of the Effects of Sound Duration on Auditory Evoked Potentials. Front. Neurosci. 2019 Jun 24;13:630. doi: 10.3389/fnins.2019.00630.
7. Itoh K, Sakata H, Igarashi H, Nakada T. Automaticity of pitch class-color synesthesia as revealed by a Stroop-like effect. Conscious Cogn. 2019 May;71:86-91. doi: 10.1016/j.concog.2019.04.001.
8. 松澤　等　「画像診断 MRI の最新情報」最新主要文献でみる脳神経外科レビュー　56:251-356, 2019（査読なし）
9. 植木智志.　臨床像と病態から考える抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎の治療. 神経眼科 36：149-152, 2019（査読なし）
10. 植木智志. 視路疾患の視野の診かた. 眼科グラフィック 8：428-433, 2019（査読なし）
11. 植木智志. 抗 AQP4 抗体陽性視神経炎. 眼科 61：1165-1167, 2019 (査読なし)
12. 鈴木雄治: 「Glymphatic system の機能画像」Clinical Neuroscience　2019;37:46-48 （査読なし）
13. Yamada K, Suzuki Y, Okuyama M, Watanabe M, Nakada T. Developmental abnormalities of the brain exposed to childhood maltreatment detected by diffusion tensor imaging. Neurol. Res. 2019; 41: 19-25.
14. Huber VJ, Igarashi H, Ueki S, Terumitsu-Tsujita M, Nito C, Ohno K, Suzuki Y, Itoh K, Kwee IL, Nakada T. Visualizing the Distribution of Matrix Metalloproteinases in Ischemic Brain Using In Vivo 19F-Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging.　Contrast Media Mol Imaging. 2019 Jan 6;2019:8908943. doi: 10.1155/2019/8908943. eCollection 2019.

Ⅳ　共同研究

(1)　研究題目　　アルツハイマー病予防・治療のための先制医療（平成28年度～）
　　研究内容　　MRI・PETを用いたアルツハイマー病の発症前診断法を開発・確立すると共に、開発された診断技術をアルツハイマー病発症予防に生かすために、アクアポリンを制御する薬剤の開発を行い、アミロイド蛋白の排泄不全を予防・治療する特異的な新薬を創生することを目標とする。
　　参加機関　　Neurology, University of California, Davis　(米国)

(2)　研究題目　高磁場MRIを用いた発達障害に伴う統合的脳機能に関する研究（平成28年度～）

研究内容　高磁場MRIにおける画像解析法（機能的MRI、拡散テンソル解析）を用いて行動発達障害に関連する生態情報を非侵襲的に抽出し、脳発達病態の手掛りを探る。

参加機関　国立成育医療研究センター

(3)　研究題目　サル類における聴覚事象関連電位の記録（平成25年～）

研究内容　サル類を対象に無麻酔・無侵襲で頭皮上から聴覚誘発電位や事象関連電位を記録し、脳進化に伴う聴覚処理の種差を検討する。

参加機関　京都大学霊長類研究所

遺伝子機能解析学分野・生命情報工学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　令和2年3月31日現在）

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

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のゲノム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・レアバリアント解析を行い、孤発性アルツハイマー病の先天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900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AMEDが支援するMGeND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としての重要な役割を担っている。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、この活動において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、アルツハイマー病の新規バイオマーカーを探索し、新規候補マーカーを報告している。これらの認知症性疾患バイオバンクを活用し、「新潟大学脳研究所共同利用・共同研究」により、国内外の施設と共同研究を展開している。

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Hata S, Omori C, Kimura A, Saito H, Kimura N, Gupta V, Pedrini S, Hone E, Chatterjee P, Taddei K, Kasuga K, Ikeuchi T, Waragai M, Nishimura M, Hu A, Nakaya T, Meijer L, Maeda M, Yamamoto T, Masters CL, Rowe CC, Ames D, Yamamoto K, Martins RN, Gandy S, Suzuki T. Decrease in p3-Alcβ37 and p3-Alcβ40, products of Alcadein β generated by γ-secretase cleavages, in aged monkeys and patients with Alzheimer's disease. Alzheimers Dement (N Y). 2019 Nov 7;5:740-750.

2. Dube U, Del-Aguila JL, Li Z, Budde JP, Jiang S, Hsu S, Ibanez L, Fernandez MV, Farias F, Norton J, Gentsch J, Wang F; Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN)*, Salloway S, Masters CL, Lee JH, Graff-Radford NR, Chhatwal JP, Bateman RJ, Morris JC, Karch CM, Harari O, Cruchaga C. An atlas of cortical circular RNA expression in Alzheimer disease brains demonstrates clinical and pathological associations. Nat Neurosci. 2019 Nov;22(11):1903-1912. (*, including Kasuga K and Ikeuchi T)

3. Miyashita A, Liu L, Hara N. Genetic Analysis of Alzheimer's Disease: The Impact of Rare Variants and Their Significance. Brain Nerve. 2019 Oct;71(10):1071-1079. (Japanese)

4. Ikeuchi T. Exploring Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease by Comprehensive Genetic Analysis. Brain Nerve. 2019 Oct;71(10):1081-1088. (Japanese)

5. Nakamura M, Shiozawa S, Tsuboi D, Amano M, Watanabe H, Maeda S, Kimura T, Yoshimatsu S, Kisa F, Karch CM, Miyasaka T, Takashima A, Sahara N, Hisanaga SI, Ikeuchi T, Kaibuchi K, Okano H. Pathological Progression Induced by the Frontotemporal Dementia-Associated R406W Tau Mutation in Patient-Derived iPSCs. Stem Cell Reports. 2019 Oct 8;13(4):684-699.

6. Kikuchi M, Hara N, Hasegawa M, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T, Nakaya A. Enhancer variants associated with Alzheimer's disease affect gene expression via chromatin looping. BMC Med Genomics. 2019 Sep 9;12(1):128.

7. Choi KY, Lee JJ, Gunasekaran TI, Kang S, Lee W, Jeong J, Lim HJ, Zhang X, Zhu C, Won SY, Choi YY, Seo EH, Lee SC, Gim J, Chung JY, Chong A, Byun MS, Seo S, Ko PW, Han JW, McLean C, Farrell J, Lunetta KL, Miyashita A, Hara N, Won S, Choi SM, Ha JM, Jeong JH, Kuwano R, Song MK, An SSA, Lee YM, Park KW, Lee HW, Choi SH, Rhee S, Song WK, Lee JS, Mayeux R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Choo ILH, Nho K, Kim KW, Lee DY, Kim S, Kim BC, Kim H, Jun GR, Schellenberg GD, Ikeuchi T, Farrer LA, Lee KH, Neuroimaging Initative AD. APOE Promoter Polymorphism-219T/G is an Effect Modifier of the Influence of APOE ε4 on Alzheimer's Disease Risk in a Multiracial Sample. J Clin Med. 2019 Aug 16;8(8):1236.

8. Piatnitskaia S, Takahashi M, Kitaura H, Katsuragi Y, Kakihana T, Zhang L, Kakita A, Iwakura Y, Nawa H, Miura T, Ikeuchi T, Hara T, Fujii M. USP10 is a critical factor for Tau-positive stress granule formation in neuronal cells. Sci Rep. 2019 Jul 22;9(1):10591.

9. Asanomi Y, Shigemizu D, Miyashita A, Mitsumori R, Mori T, Hara N, Ito K, Niida S, Ikeuchi T, Ozaki K. A rare functional variant of SHARPIN attenuates the inflammatory response and associates with increased risk of late-onset Alzheimer's disease. Mol Med. 2019 Jun 20;25(1):20.

10. Murakami H, Tokuda T, El-Agnaf OMA, Ohmichi T, Miki A, Ohashi H, Owan Y, Saito Y, Yano S, Tsukie T, Ikeuchi T, Ono K. Correlated levels of cerebrospinal fluid pathogenic proteins in drug-naïve Parkinson's disease. BMC Neurol. 2019 Jun 4;19(1):113.

11. Miki T, Yokota O, Haraguchi T, Ikeuchi T, Zhu B, Takenoshita S, Terada S, Yamada N. Young adult-onset, very slowly progressive cognitive decline with spastic paraparesis in Alzheimer's disease with cotton wool plaques due to a novel presenilin1 G417S mutation. Acta Neuropathol Commun. 2019 Feb 12;7(1):19.

12. Watanabe Y, Hirao Y, Kasuga K, Tokutake T, Semizu Y, Kitamura K, Ikeuchi T, Nakamura K, Yamamoto T. Molecular Network Analysis of the Urinary Proteome of Alzheimer's Disease Patients. Dement Geriatr Cogn Dis Extra. 2019 Feb 8;9(1):53-65.

13. Hamaguchi T, Komatsu J, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Aoki S, Ikeuchi T, Yamada M. Cerebral

hemorrhagic stroke associated with cerebral amyloid angiopathy in young adults about 3 decades after neurosurgeries in their infancy. J Neurol Sci. 2019 Apr 15;399:3-5.

14. Tanaka H, Kawakatsu S, Toyoshima Y, Miura T, Mezaki N, Mano A, Sanpei K, Kobayashi R, Hayashi H, Otani K, Ikeuchi T, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Globular glial tauopathy Type II: Clinicopathological study of two autopsy cases. Neuropathology. 2019 Apr;39(2):111-119.

15. Sato K, Mano T, Matsuda H, Senda M, Ihara R, Suzuki K, Arai H, Ishii K, Ito K, Ikeuchi T, Kuwano R, Toda T, Iwatsubo T, Iwata A; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Visualizing modules of coordinated structural brain atrophy during the course of conversion to Alzheimer's disease by applying methodology from gene co-expression analysis. Neuroimage Clin. 2019;24:101957.

16. Sato K, Mano T, Ihara R, Suzuki K, Tomita N, Arai H, Ishii K, Senda M, Ito K, Ikeuchi T, Kuwano R, Matsuda H, Iwatsubo T, Toda T, Iwata A; Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative, and Japanese Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. Lower Serum Calcium as a Potentially Associated Factor for Conversion of Mild Cognitive Impairment to Early Alzheimer's Disease in the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. J Alzheimers Dis. 2019;68(2):777-788.

17. Yano K, Hirayama S, Misawa N, Furuta A, Ueno T, Motoi Y, Seino U, Ebinuma H, Ikeuchi T, Schneider WJ, Bujo H, Miida T. Soluble LR11 competes with amyloid β in binding to cerebrospinal fluid-high-density lipoprotein. Clin Chim Acta. 2019 Feb;489:29-34.

18. Funayama M, Sugihara M, Takata T, Mimura M, Ikeuchi T. Remarkable behavioural signs and progressive non-fluent aphasia in a patient with adult-onset leucoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia. Psychogeriatrics. 2019 May;19(3):282-285.

19. Sakuma M, Kitamura K, Endo N, Ikeuchi T, Yokoseki A, Onodera O, Oinuma T, Momotsu T, Sato K, Nakamura K, Narita I. Low serum 25-hydroxyvitamin D increases cognitive impairment in elderly people. J Bone Miner Metab. 2019 Mar;37(2):368-375.

20. Preische O, Schultz SA, Apel A, Kuhle J, Kaeser SA, Barro C, Gräber S, Kuder-Buletta E, LaFougere C, Laske C, Vöglein J, Levin J, Masters CL, Martins R, Schofield PR, Rossor MN, Graff-Radford NR, Salloway S, Ghetti B, Ringman JM, Noble JM, Chhatwal J, Goate AM, Benzinger TLS, Morris JC, Bateman RJ, Wang G, Fagan AM, McDade EM, Gordon BA, Jucker M; Dominantly Inherited Alzheimer Network*. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. Nat Med. 2019 Feb;25(2):277-283. (*, including Kasuga K and Ikeuchi T)

21. Kawazoe T, Abe K, Ikeuchi T, Miura T, Mezaki N, Tsukamoto T, Takahashi Y. Sporadic case of young-onset rapidly progressive dementia with a novel frameshift mutation in exon 3 of CSF1R. Neurol Clin Neurosci. 2019;7(2):103-104.

22. Vollstedt EJ, Kasten M, Klein C; MJFF Global Genetic Parkinson's Disease Study Group*. Using global team science to identify genetic parkinson's disease worldwide. Ann Neurol. 2019 Aug;86(2):153-157. (*, including Ikeuchi T)

23. Nakamura S, Hara T, Yamazaki A, Kobayashi A, Maeda S, Kasuga K, Aii J, Nakano A, Goto H, Hirayama M, Watanabe K, Koide T, Yamaguchi O, Nagamine T, Ito M, Tanaka H, Ikeuchi T, Ohtsubo K. Potential for Preventing Diabetes and Dementia by Consuming Unpolished Rice Blended with Black Unpolished Rice and Super-Hard Rice. Biomed J Sci Tech Res. 2019;20(4):15213-15226.

24. 池内健, 朱斌. ミクログリアの機能破綻を原因とする一次性ミクログリオパチー. 実験医学 37(17): 2926-2930, 2019.

25. 池内健. 老年科・認知症の実臨床におけるクリニカルシークエンスの実情と遺伝カウンセリングについて 【症例の蓄積は重要だが, 遺伝子診断は慎重に行うべき】. 日本医事新報 (4944): 55-56, 2019.

26. 春日健作. 診断・アルツハイマー病のCSFバイオマーカー. CLINICIAN 674:42-47, 2019.

27. 宮下哲典, 原範和, 劉李歆, 春日健作, 池内健. アルツハイマー病に関与する遺伝子―ゲノムワイド関連解析で見いだされた感受性遺伝子―. 老年精神医学雑誌 30(11): 1226-1235, 2019.

28. 伊藤陽, 吉田浩樹, 清水敬三, 長谷川まこと, 今野公和, 中原亜紗, 原 範和, 宮下哲典, 池内健, 豊島靖子, 柿田明美. 統合失調症として長期入院していた特発性基底核石灰化症（Fahr 病）の臨床病理学的特徴. 精神医学 61(5): 595-603, 2019.

29. 池内 健. 神経変性タウオパチーの分子遺伝学と臨床病理. 非定型パーキンソニズムー基礎と臨床― pp157-161. 2019 年 5 月 18 日発刊.

30. 池内 健. 認知症治療薬. 医薬ジャーナル・新薬展望 2019. 55(13): 445-452, 2019.

31. 池内 健. 学会印象・AAIC 2018-Alzheimer's Association International Conference 2018 (2018 年 7 月 22～26 日, シカゴ). BRAIN & NERVE 71(1): 83-85, 2019.

32. 池内 健. インスリンシグナルからみたアルツハイマー病. 月刊糖尿病 11(2): 28-32, 2019.

33. 池内 健. 特集 : 認知症の早期発見と進展防止. 遺伝要因とバイオマーカー. カレントテラピー 37(8): 761-766, 2019.

34. 池内 健. 最前線・アルツハイマー病治療薬の開発の現状と展望（新しい薬について). ファルマシア 55(9): 848-853, 2019.

Ⅳ 共同研究

(1) 研究題目：「家族性アルツハイマー病に関する縦断的観察コホート研究」
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トランスレーショナル研究。
参加機関：大阪市立大学、弘前大学、東京大学、東京都健康長寿医療センターなど

(2) 研究題目：「網羅的ゲノム解析とインフォマティクス統合解析による認知症の新規病態解析」
研究内容：アルツハイマー病をはじめとする認知症のクリニカルシーケンスや網羅的ゲノム解析を行い、得られた変異・多型情報を広く共有し、有効活用するためのデータベースを構築する。
参加機関：国立長寿医療センター、大阪大学、慶應義塾大学、東京大学、東京都健康長寿医療センター、愛知医科大学、国立精神・神経医療研究センター病院、医療法人さわらび会福祉村病院など

(3) 研究題目：「進行性核上性麻痺と関連タウオパチーの患者レジストリと試料レポジトリを活用した診療エビデンスの構築」
研究内容：進行性核上性麻痺及び類縁疾患を対象とした多施設共同臨床研究。当該疾患の臨床所見、画像所見、バイオマーカー変化などを明らかにする。
参画機関：鳥取大学、東名古屋病院、東京都健康長寿医療センター、自治医科大学、京都府立医科大学、松江医療センターなど

(4) 研究題目：「プリオン病の早期診断基準の作成を目指した新たなエビデンス創出とその検証に用いる遺伝性プリオン病未発症例の臨床調査と画像・生体材料の収集」
研究内容：プリオン病の早期診断基準の作成のため、孤発性プリオン病の鑑別における臨床症状・脳波・画像・髄液検査をベースとしたバイオマーカーの有用性の検討を行うとともに、遺伝性プリオン病の発症前または発症超早期のリスク保有者の画像検査及び生体材料を採取し、発症に至る経緯を解明する。
参画機関：長崎大学、東京医科歯科大学、金沢大学、国立精神・神経医療研究センター、福岡大学、横浜市立大学、岩手医科大学、埼玉医科大学、愛知医科大学

動物資源開発研究分野

Ⅰ　研究組織（構成員　令和2年3月31日現在）

教授	笹岡　俊邦
講師	福田　七穂
助教	藤澤　信義
助教	小田　佳奈子
技術職員	作間　赳法
技術職員・博士課程大学院生	齊藤　奈英
技能職員	那須野　純映
一般職員	加藤　明子
特任助手	山本　美丘
特任助手	阿部　光寿
特任助手	内山　澄香
特任助手	三浦　詩織
特任助手	鈴木　康浩
特任助手	足立　周子
特任助手	阿部　紗也香
事務補佐員	野澤　佳世
事務補佐員	久住　真由美

Ⅱ　研究活動

（1）ドーパミンは、運動機能、記憶や学習、意欲に重要な働きがあると考えられている。本分野の研究課題として、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、大脳基底核回路の「直接路」「間接路」に着目し、標的分子の発現解析、運動や学習・記憶の行動解析、神経回路の働きの解析により、運動調節の仕組み解明と治療法開発への発展を目指している。

（2）近年、マー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。その要因として設備、経費面に加え、受精卵の確保が挙げられる。マーモセットでは、一度に多数の受精卵を入手することが難しく、先行している研究機関では、大規模な飼育コロニーを用いて、必要な卵を確保して研究を進めている。私たちもマーモセットを用いたモデル動物開発にかかる課題解決のための方法を検討している。

　その課題解決の方法として、実験終了や体調不良などで安楽死させる個体からの卵巣の分与を受け、これらの卵巣から受精卵を得ることができれば、小規模な飼育環境においても受精卵採取の手段となり得ることから、私たちは、これまでに共同研究機関や繁殖場の協力の下で安楽死個体からの卵巣の分与を受け、ヌードマウスに移植の後、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作成することに成功した。

（3）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の方法などの発生・生殖工学技術についての先進的な実験方法の開発に努めている。

（４）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人工制限酵素技術によるゲノム編集法を活用した迅速な遺伝子改変動物作成についても、実験条件を整え、利用者からの依頼をルーチンで受託している。

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. Shioda N, Imai Y, Yabuki Y, Sugimoto W, Yamaguchi K, Wang Y, Hikida T, Sasaoka T, Mieda M, Fukunaga K. Dopamine D(2L) Receptor Deficiency Causes Stress Vulnerability through 5-HT(1A) Receptor Dysfunction in Serotonergic Neurons. Journal of Neuroscience. 2019 Sep 18;39(38):7551-7563.

2. Hashiguchi S, Doi H, Kunii M, Nakamura Y, Shimuta M, Suzuki E, Koyano S, Okubo M, Kishida H, Shiina M, Ogata K, Hirashima F, Inoue Y, Kubota S, Hayashi N, Nakamura H, Takahashi K, Katsumoto A, Tada M, Tanaka K, Sasaoka T, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Sato N, Ozaki K, Ohta K, Yokota T, Mizusawa H, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Morishita S, Tsuji S, Takeuchi H, Ishikawa K, Matsumoto N, Ishikawa T, Tanaka F. Ataxic phenotype with altered Ca(V)3.1 channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42. Neurobiology of Diseases. 2019 Oct;130:104516.

3. Nakamura T, Rios LC, Yagi T, Sasaoka T, Kitsukawa T. Dopamine D1 and muscarinic acetylcholine receptors in dorsal striatum are required for high speed running. Neuroscience Research 2019 Dec 5. pii: S0168-0102(19)30654-6.

4. Wilar G, Shinoda Y, Sasaoka T, Fukunaga K. Crucial Role of Dopamine D2 Receptor Signaling in Nicotine-Induced Conditioned Place Preference. Molecular Neurobiology 2019 Dec;56(12):7911-7928.

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) 平成31年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
Experimental autoimmune encephalomyelitisマウスの作成およびそれを用いた治療法開発
研究代表者：鈴木元　教授（藤田医科大学）
(2) 平成31年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
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　准教授（北里大学医学部）
(3) 平成31年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
疾患モデル動物の作製に関する最先端技術の開発
研究代表者：竹尾透 講師（熊本大学生命資源研究・支援センター）
(4) 平成31年度　共同利用・共同研究（プロジェク型）
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　教授（名古屋大学環境医学研究所）

(5) 平成31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）

(6) 平成31年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
遺伝子改変技術による生体リズム中枢の分子機構の解析
研究代表者：岡村均 特任教授（京都大学大学院薬学研究科）

(7) 平成31年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
新規疼痛関連分子の脳および脊髄後角での神経可塑性における機能の解析
研究代表者：片野泰代 准教授（関西医科大学）

(8) 平成31年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析
研究代表者：岩里琢治　教授（国立遺伝学研究所）

(9) 平成31年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
Cacna1g変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態 の解明
研究代表者：土井　宏　准教授（横浜市立大学医学部）

(10) 平成31年度　共同利用・共同研究（プロジェクト型）
視床特殊核におけるグルタミン酸受容体GluD1による入力選択的 回路形成機構析
研究代表者：渡辺雅彦　教授（北海道大学大学院医学研究院）

(11) 平成31年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
脳疾患ゲノム情報に基づく脳神経系病態モデルマウスの開発に関する共同研究
研究代表者：吉木　淳　室長（理化学研究所バイオリソース研究センター）

(12) 平成31年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
歩行運動の大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　准教授（大阪大学大学院生命機能研究科）

(13) 平成31年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
モノアミン神経伝達物質合成関連遺伝子の組織特異的破壊による生理機能変化の解析
研究代表者：一瀬　宏 教授 (東京工業大学生命理工学院)

(14) 平成31年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
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 准教授 (浜松医科大学)

(15) 平成31年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
APPの細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシス の解析
研究代表者：中山　耕造 教授 (北陸大学医療保健学部)

(16) 平成31年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
ジストロフィン結合タンパク質複合体の代謝回転に関する研究
研究代表者：今村　道博　室長 (国立精神・神経医療研究センター神経研究所)

(17) 平成31年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
脳・神経回路におけるドーパミンの機能解析
研究代表者：小山内　実　准教授 (東北大学大学院医学系研究科)

(18) 平成31年度　共同利用・共同研究（連携資源利用型）
TDP-43細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデ ルの作成
研究代表者：佐藤　俊哉　教授(北里大学医学部)

(19) 平成31年度　新潟大学脳研究所　国際共同研究
マウスモデルを用いた、エピゲノム修飾による神経恒常性維持機構の解明

研究代表者：二井健介　助教 (アメリカ合衆国 Univ. of Massachusetts Medical School, Brudnick Neuropsychiatry Research Institute)

(20) 平成31年度　新潟大学脳研究所　国際共同研究

ドーパミンD1/D2受容体を経由する神経回路特異的な運動調節および報酬学習行動の解析

研究代表者：Yanyan Wang 准教授 (アメリカ合衆国 イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校)

(21) 平成31年度　新潟大学脳研究所　国際共同研究

先天性眼球振盪モデルマウスの作出と視覚機能解析

研究代表者：米原圭祐　准教授 (デンマーク オーフス大学)

(22) 平成31年度　新潟大学脳研究所　国際共同研究

Lister-hooded 系統由来の胚性幹細胞より作成した遺伝子改変ラットを用いた新奇性による記憶増強の分子機構解明

研究代表者：竹内倫徳　准教授 (デンマーク オーフス大学)

モデル動物開発分野

Ⅰ　研究組織（構成員　令和２年３月３１日現在）

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

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ーに供与する支援活動である。以下にその内容を述べる。

１）　シナプス伝達、可塑性調節、シナプス形成に関与する分子群の機能を個体レベルで検証する研究では、我々の持つ高度な遺伝子改変技術を用いて、複雑なコンディショナルノックアウトや標的分子の一部機能の制御などが可能なマウスを作出し、共同研究ベースで解析をおこない多くの成果をあげた。

２）　グルタミン酸受容体は興奮性シナプス伝達の基盤を担う分子群であり、我々はこれら分子のクローニングを端緒として長くその機能を解析し、多くのことを明らかにしてきた。しかし、分子レベルでの機能を正しく評価するためには、働いているグルタミン酸受容体の分子組成が明確でなければならない。この問題を解決するために、グルタミン酸受容体チャネルを構成するサブユニットの定量をおこなってきた。これまでに、特異抗体を用いた定量的ウエスタンブロット法を開発し、脳の部位や細胞画分におけるAMPA型、NMDA型、カイニン酸型、デルタ型を構成する各サブユニットタンパクの定量を行なっている。

３）　新たな脳機能解析に資するモデル動物を作製するための技術開発を行ってきた。遺伝子ノックアウトマウスは、現在脳機能解析の中心となっているが、より高度な解析を遂行するためにはマウスより賢く、大きな動物が求められてきた。その代表がラットである。ラットは、マウスより大きく外科的な処置や経時的な生体試料の取得などが容易であり、何よりも賢く複雑な行動解析が可能になる。遺伝子改変ラットは長く求められていたが、ES細胞の樹立が困難でなかなか成就しなかった。しかし最近のiPS細胞の研究の進展により、未分化状態を保つ様々な薬剤が開発されたことでES細胞が樹立されてノックアウトラットが現実のものになった。しかし、

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

4） 我々は、C57BL/6系統マウスから独自にES細胞株RENKAを樹立して、コンディショナルノックアウトを中心に脳機能解析に資する遺伝子改変マウスを500系統以上樹立して脳研究コミュニティーに供与してきた。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9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142件（平成31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81件（平成31年度、9件）の支援をおこなった。

以上、この9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161編（平成31年度、11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 Chowdhury, S. *et al.* Dissociating orexin-dependent and -independent functions of orexin neurons using novel Orexin-Flp knock-in mice. *Elife* **8**, doi:10.7554/eLife.44927 (2019).

2 Chowdhury, S. *et al.* GABA neurons in the ventral tegmental area regulate non-rapid eye movement sleep in mice. *Elife* **8**, doi:10.7554/eLife.44928 (2019).

3 Doi, M. *et al.* Non-coding cis-element of Period2 is essential for maintaining organismal circadian behaviour and body temperature rhythmicity. *Nat Commun* **10**, 2563, doi:10.1038/s41467-019-10532-2 (2019).

4 Durose, W. W. *et al.* Cathepsin C modulates myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem* **148**, 413-425, doi:10.1111/jnc.14581 (2019).

5 Inoue, M. *et al.* Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics. *Cell* **177**, 1346-1360.e1324, doi:10.1016/j.cell.2019.04.007 (2019).

6 Itoh, M. *et al.* Perturbed expression pattern of the immediate early gene Arc in the dentate gyrus of GluA1 C-terminal palmitoylation-deficient mice. *Neuropsychopharmacol Rep* **39**, 61-66, doi:10.1002/npr2.12044 (2019).

7 Kakizaki, M. *et al.* Differential Roles of Each Orexin Receptor Signaling in Obesity. *iScience* **20**, 1-13, doi:10.1016/j.isci.2019.09.003 (2019).

8 Kim, K. *et al.* Autophosphorylation of F-actin binding domain of CaMKIIbeta is required for fear learning. *Neurobiol Learn Mem* **157**, 86-95, doi:10.1016/j.nlm.2018.12.003 (2019).
9 Nishino, K. *et al.* Mice deficient in the C-terminal domain of TAR DNA-binding protein 43 develop age-dependent motor dysfunction associated with impaired Notch1-Akt signaling pathway. *Acta Neuropathol Commun* **7**, 118, doi:10.1186/s40478-019-0776-5 (2019).
10 Ohara-Imaizumi, M. *et al.* ELKS/Voltage-Dependent Ca(2+) Channel-beta Subunit Module Regulates Polarized Ca(2+) Influx in Pancreatic beta Cells. *Cell Rep* **26**, 1213-1226.e1217, doi:10.1016/j.celrep.2018.12.106 (2019).
11 Shimizu, T. *et al.* Mechanical regulation of oligodendrocyte morphology and maturation by the mechanosensor p130Cas. *J Neurochem* **150**, 158-172, doi:10.1111/jnc.14657 (2019).
12 Sugiyama, E. *et al.* Detection of a High-Turnover Serotonin Circuit in the Mouse Brain Using Mass Spectrometry Imaging. *iScience* **20**, 359-372, doi:10.1016/j.isci.2019.09.036 (2019).

Ⅳ　共同研究

（1）研究題目　「新潟大学脳研究所　共同利用・共同研究」
研究内容　C57BL/6系統ES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製支援
参加機関　東京大学、東北大学、北海道大学、関西医科大学

（2）研究題目　「学術研究支援基盤形成「モデル動物支援プラットフォーム」」
研究内容　高品質遺伝子改変マウス作製
参加機関　東京大学、京都大学、大阪大学、新潟大学、他

（3）研究題目　「遺伝子改変動物の作製に有用なＥＳ細胞の作成・評価」
研究内容　C57BL/6由来ES細胞RENKAを用いた、遺伝子改変マウス作製方法に関する新規技術開発
参加機関　株式会社トランスジェニック、新潟大学

（4）研究題目　「自己免疫性脳炎の診断方法の確立」
研究内容　自己免疫性脳炎の原因と考えられる各種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２年３月31日現在）

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

Ⅱ　研究活動

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

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

運動ニューロンが選択的に変性する難治性の神経変性疾患であるALSは、TDP-43、FUS、C9orf72 など疾患関連遺伝子、蛋白質の発見を端緒として、病態機序解明に向けて国際的な競争が行われている。当施設では、TDP-43の病態機序、発現調整機構の解明に取り組み、原著論文、総説を発表した。さらに、これを発展させた治療薬開発を目指している。また病理学分野と連携し、病理学的に診断が確定したALS連続症例における原因遺伝子の解析を行っている。

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

Ⅲ　論文（原著、総説、症例報告を区別しない）

1. Sakai N, Uemura M, Kato T, Nozaki H, Koyama A, Ando S, Kamei H, Kato M, Onodera O. Hemorrhagic cerebral small vessel disease caused by a novel mutation in 3' UTR of collagen type IV alpha 1. Neurol Genet. 2019 Dec 26;6(1):e383.
2. Tsuboguchi S, Ishihara T, Sugai A, Yokoseki A, Onodera O. [Molecular Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis]. Brain Nerve. 2019 Nov;71(11):1183-1189.
3. Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Konno T, Ishihara T, Onodera O. Non-genetically modified models

exhibit TARDBP mRNA increase due to perturbed TDP-43 autoregulation. Neurobiol Dis. 2019 Oct;130:104534.
4. Uemura M, Nozaki H, Koyama A, Sakai N, Ando S, Kanazawa M, Kato T, Onodera O. HTRA1 Mutations Identified in Symptomatic Carriers Have the Property of Interfering the Trimer-Dependent Activation Cascade. Front Neurol. 2019 Jun 28;10:693.

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

システム脳病態学分野

Ⅰ　研究組織（構成員　令和２年３月 31 日現在）

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

Ⅱ　研究活動

本研究グループでは、脳疾患を神経回路システム障害として理解、解明するプロジェクトを展開している。
（研究１）血管障害や外傷など脳・脊髄の疾患は、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、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、この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。そのため、障害脳と健常脳、双方の神経回路システムの形成・再編過程やその分子メカニズム、動作原理の解析を行っている。特に、脳脊髄の障害によりしばしば破綻する運動回路や交感神経回路を標的としている。本年度は、運動回路の１つである皮質脊髄路が発達の段階で精緻な回路を作り出す分子メカニズムを解明し（J Neurosci, 2019）、また肝-腸-脳をつなぐ自律神経経路を可視化し、この経路が肝障害を誘導するメカニズムの解明に貢献した（Neurogastroenterol Motil, 2020）。本研究成果から、再建すべき神経回路の接続様式やその形成メカニズムの手がかりが得られた。今後さらに、中枢神経の障害後、神経回路をどのように再建するか、治療標的や戦略を見出していく。

（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。本年度は特に、ヒト脳組織の高効率な透明化手法（Bioorg Med Chem Lett, 2019）や、脱脂処理組織の物理化学的性質に基づくホールマウント免疫染色によるげっ歯類脳組織の 3D-IHC 技術（Nat Commun, 2020）を確立した。今後は引き続き、大きなヒト脳病理組織検体に適用可能な 3D ホ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. Nagoya T, Kamimura K, Inoue R, Ko M, Owaki T, Niwa Y, Sakai N, Setsu T, Sakamaki A, Yokoo T, Kamimura H, Nakamura Y, Ueno M, Terai S. Ghrelin-insulin-like growth factor-1 axis is activated via autonomic neural circuits in the non-alcoholic fatty liver disease. Neurogastroenterol Motil 32(5): e13799, 2020

2. Sato T, Homma R, Nagayama S. Direct comparison of odor responses of homologous glomeruli in the medial and lateral maps of the mouse olfactory bulb. eNeuro 0449-19, 2020

3. Gu Z, Ueno M, Klinefelter K, Mamidi M, Yagi T, Yoshida Y. Skilled movements in mice require inhibition of corticospinal axon collateral formation in the spinal cord by semaphorin signaling. J Neurosci 39: 8885-99, 2019

4. Dual functions of microglia in the formation and refinement of neural circuits during development.
Konishi H, Kiyama H, Ueno M. Int J Dev Neurosci 77: 18-25, 2019

5. 上野将紀. 脊髄損傷と自律神経–臓器–免疫連関. 実験医学. 羊土社. 37(13): 2122–8, 2019

6. Inoue M, Saito R, Kakita A, Tainaka K. Rapid chemical clearing of white matter in the post-mortem human brain by 1,2-hexanediol delipidation. Bioorg Med Chem Lett. 2019, 29(15):1886-1890.

7. Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, Morishima K, Ono H, Ode KL, Saeki Y, Miyamichi K, Isa K, Yokoyama C, Kitaura H, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Saito T, Saido TC, Fukayama M, Onoe H, Touhara K, Isa T, Kakita A, Shibayama M, Ueda HR. Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. Nat Commun. 2020, 11(1):1982.

8. Saito N, Tainaka K, Macpherson T, Hikida T, Yamaguchi S, Sasaoka T. Neurotransmission through dopamine D1 receptors is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex. Neurosci Res. 2020, 156:58-65.

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

脳病態解析分野

Ⅰ　研究組織（構成員　令和2年3月31日現在）

准教授　　松井　秀彰
助教　　杉江　淳
学振PD特別研究員　新田　陽平
小児科博士課程（休学中）医員　入月　浩美
小児科博士課程　古寺　一樹
実験補助　　松井　典子
実験補助　　小林　科野
実験補助　　杉江　歩美

Ⅱ　研究活動

松井グループ

私達は試験管、モデル動物（小型魚類、ハエ、マウスなど）、ヒトサンプルと様々な研究対象を解析することで、ヒトの脳内で起きている現象を明らかにしようとしている。特に脳・神経機能の異常によっておこる疾患や障害の原因を明らかにし、その治療や理解に結びつける。現在最も力を入れているのは、パーキンソン病などの神経変性疾患、自閉症などの小児神経精神疾患、老化関連疾患である。我々人類は系統図において虫と祖先を共有し、そしてまさに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。また中心的な神経の機能、分子の働きはハエの段階から共通である。さらに小型魚類やハエ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。私達の研究室では魚やハエの脳・神経の働きを解明し、そこにおいて再現されるヒト疾患を治療することで、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常な組織を維持する他の体細胞と異なり、回路を形成している神経細胞は独自の細胞間相互作用によって長期的に健康状態を保つメカニズムを有していると考えられる。これが破綻すると老化または神経変性疾患や精神疾患へと繋がることが予想される。しかし、神経細胞を維持するために機能する細胞間コミュニケーション機構は調査に要する期間が非常に長く、十分解明されていない。私達は個体の生活環サイクルが短く重複遺伝子が少ないショウジョウバエのメリットを活かし、複雑な遺伝子解析を迅速に推進しこの問題に取り組んでいる。そして、神経細胞間で情報伝達の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: Ozawa, T., Shimizu, H., **Matsui, H.**, Onodera, O., Kakita, A. Shrinkage of the myenteric neurons of the small intestine in patients with multiple system atrophy. ***Auton Neurosci.*** 221:102583, 2019.

2: Nitta Y., Matsui S., Kato Y., Kaga Y., Sugimoto K., **Sugie A**. Analysing the evolutional and functional differentiation of four types of Daphnia magna cryptochrome in Drosophila circadian clock. ***Sci Rep.*** 20;9(1):8857, 2019.

3: **Matsui, H.**, Kenmochi, N., Kazuhiko, N. Age- and α-Synuclein-Dependent Degeneration of Dopamine and Noradrenaline Neurons in the Annual Killifish *Nothobranchius furzeri*. ***Cell Rep.*** 26(7):1727-1733, 2019.

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かする。
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：「生理生態学」と「脳科学」の融合による新しい生物時計の分子機構の解明（新潟大学 U-go グラント）
研究内容：クサフグの持つ生物時計のメカニズムを脳科学の面から解明する。
参加機関：新潟大学佐渡自然共生科学センター、安東宏徳教授

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

研究内容：αシヌクレインによる病態伝播に関わる因子を特定し、伝播機序を明らかにする。
参加機関：大阪大学　永井義隆教授、東京都医学総合研究所　鈴木マリ主任研究員

(5) 研究題目：「モデル動物等研究コーディネーティングネットワークによる希少・未診断疾患の病因遺伝子変異候補の機能解析研究」
研究内容：未診断疾患の原因となる可能性のある遺伝子変異の効果を評価し、確定診断につなげる。
参加機関：国立遺伝学研究所　井ノ上逸朗教授

３．社会との連携

夏期セミナー

脳研究所セミナー

共同研究拠点国際シンポジウム

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

新潟大學脳研究所
BRAIN RESEARCH INSTITUTE, NIIGATA UNIV.

第49回 新潟神経学 夏期セミナー

Brain Seminar

[受講料] 無料
希望者には旅費を支給します（若干名）

脳と心の基礎科学から臨床まで
最前線の研究者、臨床家に触れて体感しよう!

BRAIN RESEARCH INSTITUTE, NIIGATA UNIV

2019.7.24(水)▶25(木)

場所：新潟大学脳研究所（新潟市中央区旭町通1-757）

主催：新潟大学脳研究所 新潟脳神経研究会

見学・体験実習コース　共同利用・共同研究拠点プログラム

① 基礎神経科学履修コース

24 wed

A. ヒト脳機能イメージング実習 定員 1~3名

fMRIや脳波（事象関連電位）を用いてヒトの脳機能を調べる方法をハンズオン方式で学び、ヒト脳機能イメージング法についての理解を深めます。

B. 動物実験施設見学と遺伝子改変動物作製の実際の紹介 定員 4名

動物を用いた基礎研究に必須の設備である動物実験施設の内部と遺伝子改変動物作製方法の実際を見学することにより、動物実験や遺伝子改変動物の有用性と問題点を理解します。

C. 脳の組織透明化・3Dイメージング 定員 3名

マウスまたはヒトの脳組織を用いた組織透明化技術、組織の免疫染色、透明化組織の3Dイメージングの一連の操作を体験し、特に組織透明化および組織染色における化学的な原理や考え方の習得を目指します。

② 脳研レジデント（臨床）体験コース 定員 10~20名

脳神経外科・神経内科の臨床と基礎研究、神経病理など、脳研の臨床を二日間で概観するコースです。
医学部生はもちろん、脳神経の臨床と研究に興味のある他学部生も歓迎します。新潟大学脳研究所脳神経外科・神経内科での初期・後期研修や、神経病理学に興味をお持ちの方は是非ご参加ください。

24 wed
- ガイダンス
- 神経病理実習(ブレインカッティング)
- 脳神経臨床病理検討会(CPC)

25 thu
- 各希望科に分かれて実習

神経内科 病棟見学、回診、研究紹介など　脳神経外科 手術見学、研究体験など　神経病理 標本観察、検討会参加、研究体験など

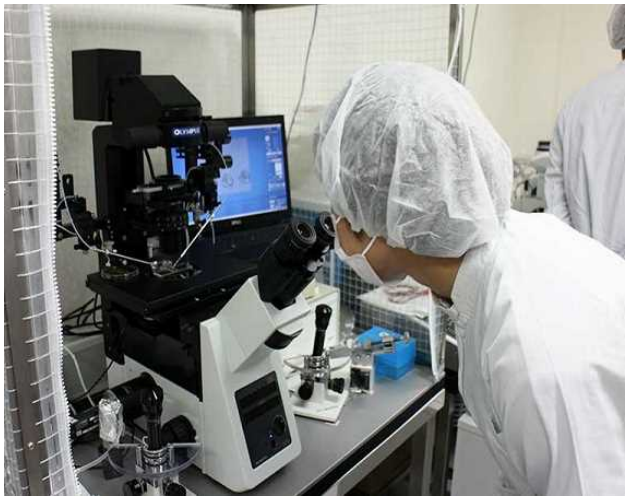
参加申込方法　夏記セミナーの申込フォームから ➡　詳細は脳研究所ホームページをご覧ください。 新潟 脳研 夏期セミナー 検索

問合せ　〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757 新潟大学脳研究所 神経学夏期セミナー事務局・山田
TEL：025-227-0388 FAX：025-227-0507 E-mail：seminar@bri.niigata-u.ac.jp URL：http://www.bri.niigata-u.ac.jp

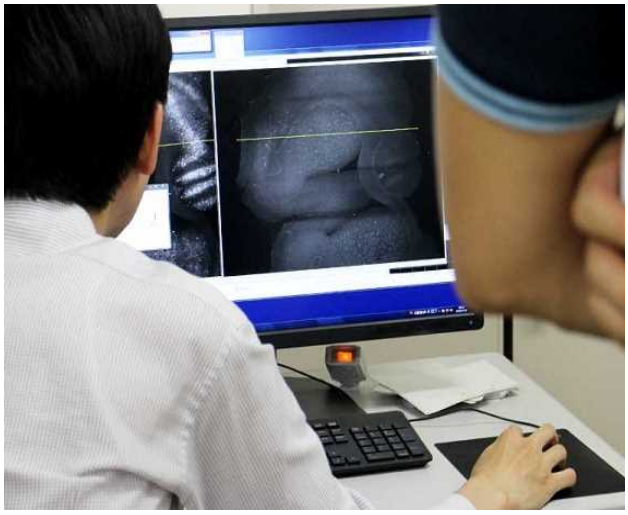
本セミナーは日本神経学会認定医更新取得単位の対象です。

夏期セミナー













脳卒中をカテーテルで治す
～頭を切らない外科治療の進歩～

10月27日（日）

新潟大学医歯学祭
脳研究所セミナー

10:00-11:30

新潟大学医歯学総合病院 脳神経外科
長谷川 仁　講師

脳卒中の外科治療は，従来頭蓋骨を開けて行う開頭術が一般的でしたが，カテーテル治療の飛躍的な進歩に伴い“切らずに治す”ことが可能な時代になりました。

脳卒中の代表的疾患であるくも膜下出血と急性期脳梗塞に対するカテーテル治療による挑戦を紹介します。

一般向け
参加無料

新潟大学 旭町キャンパス
医学部棟 1F第一講義室

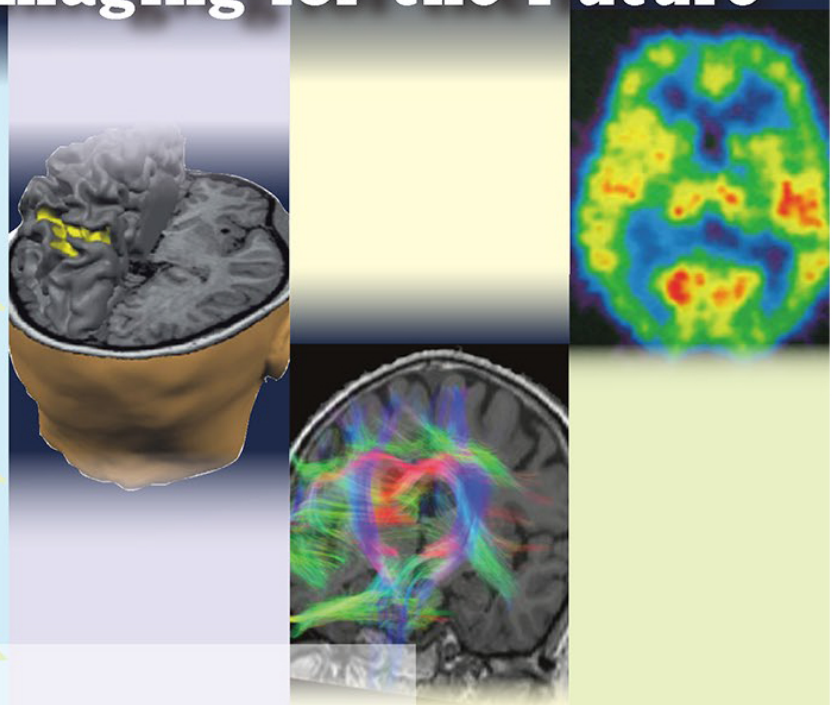


∵問い合わせ先∵
新潟大学脳研究所　共同利用係
〒951-8585 新潟市中央区旭町通１番町 757 番地
025-227-0565　http://www.bri.niigata-u.ac.jp/

BRI The 10th International Symposium

第10回 新潟大学脳研究所 共同研究拠点国際シンポジウム

Advanced Brain Imaging for the Future



2/21-22 Fri-Sat 2020

Attendance Fee : Free

Speakers

Masaki Fukunaga (National Institute for Physiological Sciences)
Hidenao Fukuyama (Kyoto University)
Michael Garwood (University of Minnesota, USA)
Makoto Higuchi (National Institute of Radiological Sciences)
Yasuomi Ouchi (Hamamatsu University School of Medicine)
Marek Kubicki (Harvard Medical School, USA)
Hironaka Igarashi (BRI, Niigata University)
Shigetoshi Takaya (Senri Rehabilitation Hospital)
Toshiaki Taoka (Nagoya University)
Kosuke Itoh (BRI, Niigata University)
Junichi Chikazoe (National Institute for Physiological Sciences)
Lennart Verhagen (University of Oxford, UK)

一般研究発表
（ポスター発表）

2019年12月より募集開始

詳細は脳研究所
ホームページをご覧ください ☞

◣問い合わせ先
新潟大学脳研究所共同利用係
〒951-8585 新潟市中央区旭町通1番町757番地
025-227-0565　http://www.bri.niigata-u.ac.jp/

ADVANCED BRAIN IMAGING FOR THE FUTURE

21st, Feb (Fri)

12:30- Poster Presentation

13:00-13:05 Opening Remark　　Akiyoshi Kakita (Deputy Director, BRI, Niigata University)

Session 1 Ultrahigh-field MRI

Chair: Hidenao Fukuyama, Kyoto University Graduate School of Medicine

13:05-13:35　Brain Microstructure and Function using Ultra High Field MRI

Masaki Fukunaga, Division of Cerebral Integration, National Institute for Physiological Sciences,

13:35-14:05　Possibilities of Ultra-high field MRI

Hidenao Fukuyama, Kyoto University Graduate School of Medicine

14:05-14:45　Bringing compact high-field MRI systems to life through novel methods that tolerate extreme field inhomogeneity

Michael Garwood, Center for Magnetic Resonance Research, Department of Radiology, University of Minnesota

・**Coffee Break 14:45-15:00**

Session2 Bridging morphology and function by MRI

Chair: Hitoshi Matsuzawa, Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, Niigata University

15:00-15:30 Hydrodynamic Pathology of the Brain - Focused on Aquaporin4 –

Hironaka Igarashi, Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, Niigata University

15:30-16:00 Bridging white matter tract and cortical function using surface-based structural connectivity analysis

Shigetoshi Takaya, Senri Rehabilitation Hospital

16:00-16:30 Perivascular space and brain lymphatics

Toshiaki Taoka, Department of Innovative Biomedical Visualization (iBMV), Graduate School of Medicine, Nagoya University

・**Poster Session 16:30-17:30**

22nd, Feb (Sat)

Session 3, Imaging of Neuro-Psychiatric function by PET/MRI

Chair: Hironaka Igarashi, Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, Niigata University

09:00-09:30 Imaging neural and glial pathways and their functions in homeostasis and pathogenesis
Makoto Higuchi, Department of Functional Brain Imaging Research, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

09:30-10:00 Dynamic controls of the dopamine and serotonin systems in neuro-psychiatric disorders
Yasuomi Ouchi, Department of Brain Biofunctional Imaging, Hamamatsu University, School of Medicine

10:00-10:40 Diffusion Imaging in Neuropsychiatry- from Big Data to Biomarker Development
Marek Kubicki, Departments of Psychiatry, Harvard Medical School

・**Coffee Break 10:40-10:55**

Session 4　New paradigms in neuroimaging

Chair: Kosuke Itoh, Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, Niigata University

10:55-11:25 Primate non-invasive EEG: a window into human brain evolution
Kosuke Itoh, Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, Niigata University

11:25-11:55 The role of the default mode network in value estimation: A combinatorial study of fMRI and deep learning
Junichi Chikazoe, Section of Brain Function Information, Supportive Center for Brain Research, National Institute for Physiological Sciences

11:55-12:35 Non-invasive modulation of deep brain circuits with focused ultrasound
Lennart Verhagen, Donders Institute, Radboud University, the Netherlands

12:35-12:40 Closing Remark　Hironaka Igarashi, Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, Niigata University

P01 Scalp distribution of event-related potential following error-feedback sounds in patients with myotonic dystrophy type1.
Shugo Suwazono, Center for Clinical Neuroscience, NHO Okinawa Hospital

P02 Impaired PtdIns(4,5)P2 synthesis in Drosophila neurons causes Calpain-dependent neurodegeneration
Yohei Nitta, Transdisc Res Prog, Niigata University

P03 Excitatory/Inhibitory Ratios observed by proton MRS measurements at 7T
Tomohisa Okada, Human Brain Research Center, Kyoto University

P04 3D pathology of cerebral amyloid angiopathy based on tissue clearing method
Masafumi Inoue, Brain Research Institute, Niigata University

P05 A novel splicing variant of ANXA11 in Japanese sporadic ALS patients
Yuya Hatano, Department of Molecular Neuroscience, Resource Branch for Brain Disease Research, Center for Bioresource-based Research, Brain Research Institute, Niigata University

P06 BRAFoma- a radiographically homogeneous, morphologically heterogeneous entity?
Manabu Natsumeda, Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, Niigata University

P07 Exome analysis in 54 autopsied Japanese sporadic ALS patients
Tomohiko Ishihara, Brain Research Institute, Niigata University

P08 Anatomical and functional features of corticospinal circuit in healthy and injured brain
Tokiharu Sato, Department of System Pathology for Neurological Disorders, Brain Research Institute, Niigata University

P09 Analysis of the role of basal ganglia circuit using dopamine receptor and NMDA receptor mutant mice
Toshikuni Sasaoka, Department of Comparative and Experimental Medicine, Brain Research Institute, Niigata University

P10 Glutamate Imaging of Alzheimer's disease model mouse
Ken Ohno, Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, University of Niigata

P11 Participant-driven simulation protocol with a mock scanner for pediatric magnetic resonance neuroimaging preparation without sedation
Kenichi Yamada, Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, University of Niigata

P12 Epileptogenic mechanisms in resected foci are different between LEAT and Tuberous sclerosis: An optical imaging study of human brain slices ex vivo.
Kitaura Hiroki, Department of Pathology, Brain Research Institute, University of Niigata

P13 Elucidation of motor control and aversive memory formation mechanism by dopamine using dopamine D1 receptor gene modified mice

Nae Saito, Brain Research Institute, Niigata University

P14 Aif1-iCre knock-in mouse line: a tool for conditional gene manipulation in microglia

Manabu Abe, Brain Research Institute, Niigata University

P15 Interactions of three monoamine neurons in social defeat stress responses

Maki Kikawa, Hidekazu Sotoyama, Hisaaki Namba, Hiroyuki Nawa
Department of Molecular Neurobiology, Brain Research Institute, Niigata University

P16 Blood Biomarkers for Differentiating Cognitive disorders from Psychiatric disorders

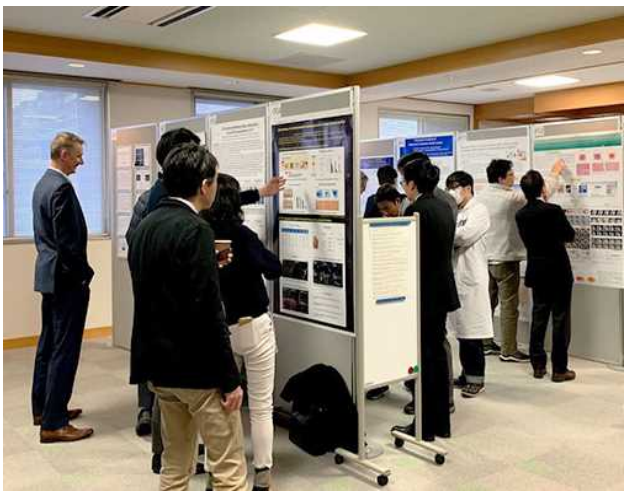
Yo Higuchi, Department of Molecular Genetics, Center for Bioresources, Brain Research Institute, Niigata University

国際シンポジウム













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「第4回：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～」と題した体験実習の場を開催しました。





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。



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

学内異分野融合・共同研究

平成31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
マルチモーダルな脳画像と脳機能データを用いたマルチモーダル機械学習	東京医科歯科大学	助教	服部　高明	脳機能解析学分野	松澤　等
認知症の解明と精密医療実現を目的としたゲノム-オミクス解析	国立長寿医療研究センター	部長	尾崎　浩一	遺伝子機能解析学分野	宮下　哲典
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	神経内科学分野	小野寺　理
GABA仮説に基づいた統合失調症モデルラットの病態解析	群馬大学大学院医学系研究科	教授	柳川　右千夫	分子神経生物学分野	那波　宏之
高磁場MRIを用いた発達障害に伴う統合的脳機能に関する研究	国立成育医療研究センター	副院長・統括部長	小枝　達也	臨床機能脳神経学分野	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	放射線医学総合研究所	次長	樋口　真人	病理学分野	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	北里大学医学部	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	弘前大学大学院医学研究科	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	滋賀医科大学神経難病研究センター	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	大阪大学大学院医学系研究科	特任講師	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	福島県立医科大学新医療系学部設置準備室	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	信州大学医学部	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	モデル動物開発研究分野	阿部　学
疾患モデル動物の作製に関する最先端技術の開発	熊本大学生命資源研究・支援センター	講師	竹尾　透	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
睡眠覚醒と記憶制御に関わる視床下部神経の動作原理解明	名古屋大学環境医学研究所	教授	山中　章弘	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
精神疾患死後脳の分子プロファイル解析	福島県立医科大学会津医療センター	准教授	國井　泰人	病理学分野	柿田　明美
遺伝子改変マウスを用いた大脳基底核疾患の病態生理の解析	自然科学研究機構生理学研究所	助教	知見　聡美	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
歯状回顆粒細胞の興奮性に対するdiacylglycerol lipase alpha の役割の解明	東京大学大学院医学系研究科	助教	菅谷　佑樹	モデル動物開発研究分野	阿部　学
タウ凝集体の伝播におけるミクログリアの役割	鹿児島大学医歯学総合研究科	助教	松本　信英	病理学分野	柿田　明美
遺伝子改変技術による生体リズム中枢の分子機構の解析	京都大学大学院薬学研究科	特任教授	岡村　均	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
腸内細菌叢および腸管上皮細胞からのDAMPs制御による脳虚血病巣進展への影響	日本医科大学大学院	准教授	西山　康裕	生体磁気共鳴学分野	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
内因性の意図に基づく行動の神経基盤の解明	京都大学霊長類研究所	教授	中村　克樹	生体磁気共鳴学分野	五十嵐　博中
精神神経疾患を対象としたヒト脳組織でのグリア細胞異常と炎症	九州大学大学院医学研究院	講師	加藤　隆弘	病理学分野	他田　真理
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	西新潟中央病院	部長	福多　真史	脳神経外科学分野	藤井　幸彦
熱ショック応答による筋萎縮性側索硬化症（ALS）細胞質凝集体の形成抑制	杏林大学保健学部	教授	渡部　和彦	病理学分野	柿田　明美
げっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析	東海大学医学部	准教授	加藤　明	分子神経生物学分野	那波　宏之
新規疼痛関連分子の脳および脊髄後角での神経可塑性における機能の解析	関西医科大学医学部	准教授	片野　泰代	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析	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
Cacna1g変異ノックインマウス解析を通じた脊髄小脳変性症病態の解明	横浜市立大学医学部	准教授	土井　宏	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
視床特殊核におけるグルタミン酸受容体GluD1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	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
認知症病態における海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド（Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide:HCNP）発現メカニズムの解析	名古屋市立大学大学院医学研究科	教授	松川　則之	遺伝子機能解析学分野	池内　健
神経変性疾患におけるNAKα3神経細胞の機能障害と細胞死機構の解明	神戸医療産業都市推進機構	部長	星　美奈子	病理学分野	柿田　明美

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
高磁場MRIを用いたてんかん原性部位及び機能部位との関係の研究	静岡てんかん・神経医療センター	医長	臼井　直敬	臨床機能脳神経学分野	鈴木　雄治
中枢神経原発悪性リンパ腫におけるTACC 3発現とその臨床病理学的意義	久留米大学医学部	教授	杉田　保雄	病理学分野	柿田　明美
超偏極低分子化合物の生体トレーサーとしての応用を目指した基礎検討	放射線医学総合研究所	チームリーダー	青木　伊知男	生体磁気共鳴学分野	五十嵐　博中
NF-kB活性化を標的とした中枢神経原発悪性リンパ腫治療法の開発に向けた多施設共同研究	横浜市立大学大学院医学研究科	助教	立石　健祐	脳神経外科学分野	藤井　幸彦
特発性正常圧水頭症患者脳脊髄液中のバイオマーカー診断と重症度分類の確立	順天堂大学医学部	准教授	中島　円	遺伝子機能解析学分野	池内　健
Boron neutron capture therapy (BNCT)が播種・浸潤に及ぼす効果の検討	京都大学複合原子力科学研究所	助教	近藤　夏子	脳神経外科学分野	嚢田　学
RNA-Seq解析を用いるがん性疼痛と難治性神経障害性疼痛に関連分子の探索・同定	大阪医科大学	客員教授	伊藤　誠二	遺伝子機能解析学分野	池内　健
認知症関連疾患リスク遺伝子（特にACE, ABCA7、FUSに関して）検索	名古屋市立大学大学院医学研究科	教授	赤津　裕康	遺伝子機能解析学分野	宮下　哲典
筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病変の評価	放射線医学総合研究所	研究員	高堂　裕平	病理学分野	清水　宏

連携資源利用型

研究課題名	研究代表者			所内対応教員	
	所属	職名	氏名	分野名	氏名
発達期脳内微細構造の生体イメージングによる神経回路形成機序の解明	熊本大学国際先端医学研究機構	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	放射線医学総合研究所	研究員	小野　麻衣子	病理学分野	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	理化学研究所バイオリソース研究センター	室長	吉木　淳	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
歩行運動の大脳基底核ドーパミン制御機構の解明	大阪大学大学院生命機能研究科	准教授	木津川　尚史	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
モノアミン神経伝達物質合成関連遺伝子の組織特異的破壊による生理機能変化の解析	東京工業大学生命理工学院	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	京都大学大学院医学研究科	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	浜松医科大学	准教授	矢尾　育子	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
APPの細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析	北陸大学医療保健学部	教授	中山　耕造	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の中枢神経病態の解明	大阪大学医学系研究科	助教	中森　雅之	病理学分野	清水　宏
ジストロフィン結合タンパク質複合体の代謝回転に関する研究	国立精神・神経医療研究センター	室長	今村　道博	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
脳・神経回路におけるドーパミンの機能解析	東北大学大学院医学系研究科	准教授	小山内　実	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
後部視床下部において過眠症に関連するDNAメチル化部位の探索と各脳領域に特異的なメチル化プロファイルの探索	東京都医学総合研究所	特別研究員	嶋多　美穂子	病理学分野	柿田　明美
TDP-43細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成	北里大学医学部	教授	佐藤　俊哉	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
てんかん脳波におけるガンマ脳波規則性とてんかん病変部の病理学的変化の関係性の研究	昭和大学医学部	助教	佐藤　洋輔	病理学分野	柿田　明美

※所属・職名は、申請時のものです。

平成31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				所内対応教員	
英	国	所属機関・組織名	職名	氏名	分野名	氏名
Targeting of GD2 as a novel treatment for diffuse intrinsic pontine gliomas GD2を標的とした脳幹部グリオーマの新規治療展開	米	Department of Neurological Surgery, Biochemistry and Molecular Genetics / Feinberg School of Medicine / Northwestern University （ノースウェスタン大学）	Assistant Prof.	HASHIZUME, Rintaro	脳神経外科分野	藤井　幸彦
Elucidating the role of autophagy in NF1-associated gliomas NF-1に合併するグリオーマ におけるオートファジーの役割解明	米	Johns Hopkins University School of Medicine （ジョンズ・ホプキンズ大学）	Associate Prof.	RODRIGUEZ, Fausto	脳神経外科分野	藤井　幸彦
Preventive medicine for Alzheimer's disease アルツハイマー病の発症前診断・発症予防	米	Neurology, Univ. of California Davis （カリフォルニア大学デービス校）	Prof.	KWEE, Ingrid L.	生体磁気共鳴学分野	五十嵐　博中
Elucidation of the roles of trans-synaptic molecule in neuronal homeostasis using mouse models マウスモデルを用いた，エピゲノム修飾による神経恒常性維持機構の解明	米	Dept. Neurobiology, Univ. of Massachusetts Medical School, Brudnick Neuropsychiatriy Research Institute （マサチューセッツ州立メディカルスクール）	Assistant Prof.	FUTAI, Kensuke	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
Research on pathway-specific regulation of motor and cognitive functions via dopamine D1 and D2 receptors D1およびD2ドーパミン受容体を介する神経回路特異的な運動調節と認知機能の解析	米	Department of Medical Information Science, Institute for Genomic Biology, Univ. of Illinois at Urbana-Champaign （イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校）	Associate Prof.	WANG, Yanyan	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
Amyotrophic lateral sclerosis with TAF15-predominant FET pathology: clinicopathologic features of an autopsied patient 筋萎縮性側索硬化症患者の言語障害に関する病理学的研究	中	Department of neurology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University （首都医科大学宣武医院）	Fellow	CUI, Bo	病理学分野	柿田　明美
Production of congenital nystagmus model mice and analysis of visual function 先天性眼球振盪モデルマウスの作出と視覚機能解析	ﾃﾞﾝﾏ	DANDRITE, Department of Biomedicine, Aarhus University （オーフス大学）	Associate Prof. / Group Leader	YONEHARA, Keisuke	動物資源開発研究分野	笹岡　俊邦
Development of gene-cell therapy of Alzheimer's disease based on delivery of neurotrophic factors to brain: translational study アルツハイマー病モデルマウスを用いた神経栄養因子導入治療法の開発	露	Kazan State Medical University （カザン医科大学）	Prof.	MUKHAMEDYAROV, Marat	病理学分野	柿田　明美
Assessing molecular mechanisms of novelty-induced memory boost by using genetically-modified rats derived from embryonic stem cell line for Lister-hooded rat Lister-hooded系統由来の胚性幹細胞より作成した遺伝子改変ラットを用いた新奇性による記憶増強の分子機構解明	ﾃﾞﾝﾏ	Department of Biomedicine, Aarhus University （オーフス大学）	Associate Prof.	TAKEUCHI, Tomonori	モデル動物開発分野	阿部　学
Development, optimization and validation of human AQP-4 PET Radioligand 新規AQP4特異的PETリガンドの開発と応用	米	Departments of Psychiatry and Radiology / Harvard Medical School （ハーバード大学）	Prof.	KUBICKI, Marek	生体磁気共鳴学分野	五十嵐　博中
Examining the role of Aquaporin 4 in recovery from Experimental Cerebral Malaria 実験的中枢性マラリアモデルにおけるAQP4の機能	英	University of Manchester （マンチェスター大学）	Senior Lecturer	COUPER, Kevin	生体磁気共鳴学分野	五十嵐　博中

新潟大学脳研究所との学内異分野融合・共同研究　採択者一覧

番号	共同研究テーマ番号	共同研究テーマ	研究課題名	申請者			脳研究所対応教員
				所属	職名	氏名	
1	6	その他（脳腸肝連関の横断的研究による病態解明と新規治療開発のための共同研究）	脳ー腸ー肝ネットワークによる病態発症のメカニズム ー自律神経系，腸内細菌叢を介した難治疾患の病態解明と新規治療法の開発を目指してー	医歯学総合研究科 消化器内科学分野	教授	寺井　崇二	小野寺　理
2	4	非侵襲的脳機能画像解析技術開発と臨床医学への応用に向けた橋渡し共同研究	パルス制御が拓く焦点可動MRIによる新規コントラスト機構の創出とそれに基づく革新的な機能MRI撮像法の実現	自然科学系工学部 量子電子物性，近接場光学	准教授	佐々木　進	五十嵐　博中
3	4	非侵襲的脳機能画像解析技術開発と臨床医学への応用に向けた橋渡し共同研究	視路圧迫症候群の器質的・機能的解析から見る，ヒト脳神経系の可塑性の探索と病態予測モデルの構築	自然科学系工学部 神経生理学，生体医工学	教授	飯島　淳彦	藤井　幸彦
4	5	組織標本，組織病理に関する共同研究	組織浸透性に優れたマーカーの創出による脳の機能と病態の三次元マッピングの試み	医歯学総合研究科 神経生物・解剖学分野	教授	竹林　浩秀	柿田　明美
5	2	神経生理活動解析に関する共同研究	手と身体を知覚する認知神経科学的基盤の解明	人文社会・教育科学系 人文学部　認知心理学，知覚心理学	准教授	新美　亮輔	伊藤　浩介

※本学U-go事業で採択

6	5	組織標本，組織病理に関する共同研究	病理学と連携したエニッグマティックRNA群の発現制御機構の解明	新潟大学医歯学総合研究科	准教授	矢野 真人	柿田　明美

所属別　申請内訳

所　　属		申請数	採択数
医歯学総合研究科		9	3
自然科学系工学部		3	2
自然科学系農学部		1	0
人文社会・教育科学系人文学部		1	1
	計	14	6

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

マルチモーダルな脳画像と脳機能データを用いたマルチモーダル機械学習

研究代表者　服部　高明 1)
研究分担者　安田　永智 1)，松澤　等 2)

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

研究要旨

本研究では、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 を用いて通常の撮像法（FLAIR 法など）に加えて、①安静時 fMRI による機能的結合（神経ネットワークの評価)、②拡散テンソル画像（白質の微小構造)、③3 次元 T1 強調像（灰白質の厚み、灰白質・白質の体積） を撮像する。また、脳機能データとして、dual task や triple task を組み合わせた定量的歩行解析による運動機能評価、さらには、神経心理士が 6 つの認知ドメインにおいて包括的認知機能評価を行う。こうしたマルチモーダルな情報を統合することを目標として、まず 3 次元 T1 強調像を機械学習において認識し、健常人とアルツハイマー病を認識できるかを検証し、Grad-CAM にて可視化したところ、確かにアルツハイマー病患者では海馬の萎縮を認識していることを確認している。

A. 研究目的

本研究は、マルチモーダルな脳 MRI 画像（神経ネットワーク、白質や灰白質の構造の評価)、歩行解析、包括的認知機能評価を脳の各システムが障害された疾患群に対して薬剤の投与前後も含めて行ったデータベースを構築し、マルチモーダルな脳 MRI 画像のみから脳の障害されたシステムの同定、薬剤による治療効果まで推定する「マルチモーダル学習」を実装した人工知能の基盤を開発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）

同一症例から取得したマルチモーダル脳画像と診断名や詳細な脳機能データ（歩行機能などの運動機能、認知機能）を対にして人工知能に学習させる（教師付き学習)。さらに、脳の特定のシステムが障害された典型的な症例を多く学習させ、縦断的なデータや治療前後のデータも学習させて、臨床的に有益な情報を引き出せるようにする。

機械学習には、Graphics Processing Unit を搭載したスーパーコンピューター（東大医科研を予定）を用いて、Python の深層学習ライブラリの Keras などを利用して、マルチモーダル学習を実装した人工知能を開発する。

マルチモーダル画像のみから障害された脳のシステムの推定、診断や治療効果の予測を行う。最終的には、マルチモーダル画像のみならず脳機能データも与えられた場合の総合的な判断や、歩行解析のみからの判断も可能となるように開発する。

人工知能が学習するために膨大なデータが必要であり、本研究の 200 例という症例数では不十分であるが、他の情報ですでに学んだ人工知能（例：120 万枚の画像から学習した VGG16）を転用する転移学習を採用する。健常人 40 人とアルツハイマー病患者 120 人の 3 次元強調画像をもち

いて、分類を学習させた。さらにどの領域をみて、2 群に分類しているかを確認するために、Grad-CAM 技術によって人工知能が捉えた解剖学的構造を特定して検証した。

C. 研究結果

多次元脳 MRI、歩行解析データ、包括的認知機能評価、動画といったデータをおよそ 100 人程度で集積をできている。

120 万枚の画像にて事前に深層学習を完了した人工知能の VGG16 を用いた転移学習によって、アルツハイマー病患者と健常人の 3DT1 強調画像の区別を 90%以上の精度で成功した。さらに両者を区別するときに VGG16 が注目した領域を Grad-CAM にて可視化したところ、確かにアルツハイマー病患者では海馬の萎縮を認識していることを確認している。

D. 考察

畳み込みニューラルネットワークを用いた深層学習による画像分類プロセスは、大きく 2 つの段階で構成されていると考えることができる。第一段は、入力画像から特徴量（多次元の数値）を抽出する「特徴抽出器」、第二段は、その特徴量を用いてクラス分類をする「分類器」である。

本研究では、第一段階の特徴抽出器に対して、公開されている VGG16 学習済みモデルをそのまま用いた。そして第二段階の分類器に対して、対象の脳 MRI 画像で学習させた。VGG16 は動物などの大量の画像を学習してはいるが、脳 MRI 画像はデータとして含まれていない。よって、VGG16 の画像から特徴量を抽出する畳み込み処理は、脳 MRI 画像のような特殊な画像に対しても、適切な特徴の同定に成功したと考えられる。

抽出された特徴を可視化する技術が研究されてきており、Grad-CAM はその一つで、画像中のどの部分が判別に利用されたかの度合いをカラーマップで表示する技術である。本研究では、アルツハイマー病と健常人を分類するタスクで海馬に相当する部分がカラーで表示されたが、現在の情報は限定的で、詳細な検討は難しい。例えば、海馬が萎縮していることを捉えることが出来たか否かは判断が困難であった。

Grad-CAM によるカラーマップに加えて、特徴として捉えたピクセル単位の表示を重ねる Guided-Grad-CAM や、さらには Grad-CAM の精度を改善する Grad-CAM++ および Score-CAM 技術も報告されているので、より詳細な可視化が出来るようになる可能性がある。

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 100 人程度の画像であっても、大量の画像セットで事前に学習済みのモデルを転移学習させ、対象の 3DT1 強調画像を追加で学習させることにより、高い精度で MRI 画像をアルツハイマー病患者と健常人とで区別することに成功した。

また、深層学習の判断根拠を可視化する Grad-CAM 技術によるカラーマップ表示により、MRI 画像の海馬部分の特徴が疾患分類する判別根拠として重要であったことが明らかになった。

本研究は、アルツハイマー病と健常人との分類を行う学習モデルを構築したが、それ以外の神経疾患にも適用できる可能性がある。また、サンプル数を増やし精度を高めることで、疾患のより早期の状態での検出が可能になることが期待される。

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

1. 森藤弘士、服部高明、安田永智　平田浩聖　陳清夢　喜納里子　大原正裕　横田隆徳、認知負荷をかけた歩行解析による中枢神経疾患の病態把握, **計測制御学会**、2019 年 11 月 23 日、千葉

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

認知症の解明と精密医療実現を目的としたゲノム-オミクス解析

研究代表者　尾崎　浩一 1)
研究分担者　宮下　哲典 2)

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

2) 新潟大学脳研究所　遺伝子機能解析学分野

研究要旨

アルツハイマー病（AD）などの認知症は日本において 2025 年までに 700 万人が罹 患すると推測されており、早急に効果的な予防策や治療薬を開発する必要がある。しかし 、その治療薬開発については、様々な薬剤の治験が進められてきたが、未だ成果が上が っていないのが現状である。これは、認知症の根本的な病態が解明されていないことが大き な理由である。一方で、AD の発症には遺伝的要因が大きく（58%～79%）関与しているこ とが疫学研究により証明されているが、ゲノム構造には人種差があり、日本人における疾患全容を理解するためには日本人に特化した解析が必要になる。本研究では日本人に特化した大規模ゲノムワイド関連解析から遺伝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、ゲノムーフェノム解析、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が期待でき、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、認知症の精密医療を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）

認知症の根本的な発症機構の解明および革新的な創薬や正確な疾患の診断、層別化に結びつけるための手法として日本人に特化した大規模ゲノムワイド関連解析（GWAS）を基盤とした横断的フェノム、オミクス統合解析を推進する。日本人に特化した GWAS を進めるために、約 20,000 検体（すでに国立長寿医療研究センター（NCGG） 新潟大学にてリクルート済みであり、NCGG サンプルの 8,000 検体についてはすでにジェノタイピングを施行済み）を用いたイルミナ社のアジアスクリーニングアレイ（ASA）による

ジェノタイピングデータの収集を行う。このジェノタイピングデータを基盤として、大規模日本人集団（約7,000 人）における全ゲノム配列解析を基に作製された高精度な全ゲノムリファレンスパネルを用いたインピュテーション法による擬似全ゲノム配列（約 1,000 万バリアント）を取得する。この高精度全ゲノムデータについて新潟大学、NCGG コホートそれぞれで GWAS を施行し、両結果をメタ解析することにより網羅的に認知症の遺伝的素因群を同定する。遺伝的素因群についてはフェノム（年齢、性別や一般的な検査データだけでなく、認知症の指標や MRI や PET 脳画像等から得られる質的量的データ）を用いて、種々の補正を加味したロジステック回帰分析によりフェノムワイド関連解析（PheWAS）を施行し他疾患や表現型との関係を明らかとし、認知症との関係を精査する。RNA 発現情報などのオミクスデータも可能な限り取得し、認知症の指標や MRI、PET 脳画像等から得られる質的量的データ等の詳細なフェノムデータをすべて横断的に統合したビッグデータについて遺伝統計学、機械学習、AI を駆使して統合解析を施行する。ここでの統合解析にはロジット・ロジステック回帰、ラッソ、リッジ回帰やランダムフォレスト等の回帰および次元削減のための主成分（教師あり）、因子分析等を用いたＰ値、Ｚスコア解析などの遺伝統計学的、機械学習、数理的なアルゴリズムを評価検討し、より最適な方法を用いて遂行する。また、ここで得られた大規模情報および既存情報を用いて AI による予知診断法、予防法、創薬の開発検討、検索にも役立てる。

C.研究結果

GWAS においては民族特異的アレイによる SNP の全ゲノムジェノタイピングにより 14,000 例のデータを取得している。ここで得られたジェノタイプデータの一部から、3,500 人の全ゲノムシークエンスデータを用いて構築されたリファレンスパネルを用いたインピュテーション解析を施行し、サンプル、マーカーのクオリティーコントロールフィルター施行後、試験的に認知症疾患として AD + MCI 約 3,000 例、コントロール 約 3,200 例を用いて、約 640 万個の SNP を用いた認知症に関連した GWAS を施行した。本解析でゲノムワイド有意性（GWAS 有意性、$P = 5 \times 10^{-8}$ 未満）を得たのは既報の *APOE* 座位のみであったため、さらに研究のパワーを増すためにこれまでに日本人において報告されていた新潟大学における AD 989 例、コントロール 979 例による認知症の GWAS 結果（Miyashita et al. PLOS ONE (2013)）を統合メタ解析する解析を行った。そうしたところ、GWAS 有意性を示す座位は APOE 座位に加え、既報の染色体 11 番長腕の SORL1 座位および第 4 染色体上に新規座位を同定することができている。この第 4 染色体上の新規座位は欧米人には存在しないアジア人特異的な AD 関連座位であるとこが公的なデータベース上で示唆され、さらに解析を進めることにより、認知症疾患の人種特異性を示す重要な知見が得られるものと考えられる。

エクソーム解析を用いた手法により頻度は少ないが、アジア人特異的であり、認知症発症への影響力が大きいバリアントを同定した。この分子は炎症に関係する分子であると考えられ今後の解析により認知症解明の一旦を担う可能性が期待できる。

認知症関連サンプルを用いたトランスクリプトーム解析については、これまでに約 900 例について高品質な RNA を取得し、全 RNA 配列解析用のライブラリ作製を進めてきた。現在までに 766 例（AD 323、MCI 238、Control 205 例）について次世代シークエンサーによる配列決定を完了しており、そのリファレンス配列へのマッピング効率は 80%を超えておりクオリティーにおいて問題ないことを確認した。

D.考察

国立長寿医療研究センターバイオバンクが保有する DNA サンプルおよびバフィーコートを用いた 20,000 例を目標とした一塩基多型（SNP）アレイによるジェノタイピングによるゲノムワイド関連解析（GWAS）、認知症疾患に影響力の強い低頻度バリアントの効率の良い同定および 1,000 例を目標としたトランスクリプトーム解析を進めてきた。またエクソーム解析により疾患バリアントの同定も試みてきている。これらの解析は概ね計画通りに進んでいる。

GWAS メタ解析より GWAS 有意性をもつ新規座位を同定している。エクソーム解析を用いた手法により頻度は少ないが、アジア人特異的であり、認知症発症への影響力が大きいバリアントを同定した。この分子は炎症に関係するものとして考えることができるが、

認知症発症における関連機構は未だ不明であるため、このような分子の詳細な解析より新たな認知症発症機構が解明できる可能性があり、また、今までにない分子やそのカスケードをターゲットとした創薬に繋がる可能性が期待できる。

現在は日本人数万例になる認知症 GWAS も進めると共に、さらに上記全 RNA 配列解析(トランスクリプトーム)をはじめとするマルチオミックス解析を進め、これらを統合解析することにより得られるデータより疾患の全容が解明できるのみならず、網羅的なポリジェニックリスクスコアの構築による正確な発症予知診断や疾患の層別化、さらにはこれまでの生物学的研究のみでは見出すことの難しかった真の疾患分子パスウェーイ、ハブ遺伝子群の解析を介した認知症等のドラッグリポジショニング、革新的な創薬に繋げることが可能になる。

E.結論

2000 年からは、理化学研究所・遺伝子多型研究センター (その後、ゲノム医科学研究センターを経て、生命医科学研究センターと改称)において、循環器疾患などの生活習慣病のゲノム解析に従事してきた。2002 年に世界初の GWAS を報告(Ozaki et al. Nature Genet. 2002)して以来、ゲノム解析をスタート点としたオミクス解析を国際共同研究も含めて遂行し、ヒト疾患の解明に貢献してきた(Ozaki et al. Nature 2004, Nature Genet.2006, 2009, Elinor, Ozaki et al. Nature Genet. 2012, Sinner, Ozaki et al. Circulation 2014, Low,..Ozaki et al. Nature Genet. 2017)。2017 年からは、国立長寿医療研究センターにて、日本人、アジア人に特化した老年病のゲノム、オミクス解析も同時に進めており、AMED 大規模ゲノム、オミクスプロジェクトにも参画している。2019 年には日本人における新規認知症関連遺伝子 SHARPIN を同定した(Asaumi et al. Molecular Medicine 2019)。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1) Shigemizu D, Akiyama S, Asanomi Y, Boroevich KA, Sharma A, Tsunoda T, Sakurai T, **Ozaki K**, Ochiya T, Niida S. A comparison of machine learning classifiers for dementia with Lewy bodies using miRNA expression data. ***BMC Med Genomics***. 12: 150 (2019).

2) Ebana Y, Sun Y, Yang X, Watanabe T, Makita S, **Ozaki K**, Tanaka T, Arai H, Furukawa T. Pathway analysis with genome-wide association study (GWAS) data detected the association of atrial fibrillation with the mTOR signaling pathway. ***International Journal of Cardiology. Heart & Vasculature*** 24:100383 (2019).

3) Asanomi Y, Shigemizu D, Miyashita A, Mitsumori R, Mori T, Hara K, Ito K, Niida S, Ikeuchi T, **Ozaki K**. A rare functional variant of *SHARPIN* attenuates the inflammatory response and associates with increased risk of late-onset Alzheimer's disease. ***Molecular medicine*** 25: 20 (2019).

4) Shigemizu D, Akiyama S, Asanomi Y, Boroevich KA, Sharma A, Tsunoda T, Matsukuma K, Ichikawa M, Takizawa S, Sakurai T, **Ozaki K**, Ochiya T, Niida S. Risk prediction models for dementia constructed by supervised principal component analysis using miRNA expression data. ***Communication Biology*** 2:77 (2019).

5) Shigemizu D, Miya F, Akiyama S, Okuda S, Boroevich K, Fujimoto A, Nakagawa H, **Ozaki K**, Niida S, Kanemura Y, Okamoto N, Saitoh S, Kato M, Yamasaki M, Matsunaga T, Mutai H, Kosaki K, and Tsunoda T. IMSindel: An accurate intermediate-size indel detection tool incorporating de novo assembly and gapped global-local alignment with split read analysis. ***Sci. Rep.*** 8(1):5608 (2018).

6) Nagata Y, Hirayama A, Ikeda S, Shirahata A, Shoji F, Maruyama M, Kayano M, Bundo M, Hattori K, Yoshida S, Goto Y, Urakami K, Soga T, **Ozaki K**, Niida S. Comparative analysis of

cerebrospinal fluid metabolites in Alzheimer's disease and idiopathic normal pressure hydrocephalus in a Japanese cohort. *Biomarker Research* in press (2018)

7) Sudo T, Okada Y, **Ozaki K**, Urayama K, Kanai M, Kobayashi H, Gokyu M, Izumi Y, Tanaka T. Mutations in *NOD2* cause aggressive periodontitis. ***Journal of Dental Research*** 96(10):1100-1105 (2017).

8) **Ozaki K** Molecular Genetics of Coronary Artery Disease. ***eLS (Encyclopedia of Life Sciences)*** review, November 2017.

9) Low SK, Takahashi A, Ebana Y, **Ozaki K**, Christophersen IE, Ellinor PT, AFGen Consortium, Ogishima S, Yamamoto M, Satoh M, Sasaki M, Yamaji T, Iwasaki M, Tsugane S, Tanaka K, Naito M, Wakai K, Tanaka H, Furukawa T, Kubo M, Ito K, Kamatani Y, Tanaka T. Identification of six novel genetic loci associated with atrial fibrillation in Japanese population. ***Nature Genetics*** 49 (6), 953-958 (2017).

10) Konta A, **Ozaki K***, Sakata Y, Takahashi A, Morizono T, Suna S, Onouchi Y, Tsunoda T, Kubo M, Komuro I, Eishi Y, Tanaka T. A functional SNP in FLT1 increases risk of coronary artery disease in a Japanese population. ***Journal of Human Genetics*** 61 (5): 435-441 (2016). ***Corresponding author.**

2.学会発表

1) 尾崎浩一 Molecular Genetics of Late-onset Alzheimer's disease in Japanese population. AMED ゲノム医療実現プラットフォーム事業「マルチオミックス連関による循環器疾患における次世代型精密医療の実現」小室班 班会議（東京、2019年7月1日）

2) Ozaki K. Molecular Genetics of Late-onset Alzheimer's disease. The 5th NCGG - ICAH Symposium（大府、2019 年 4 月 11 日）

3) Ozaki K、Genetic analysis for Alzheimer's disease in Japanese population. Asian Forum on Alzheimer's and Dementia 2018 (AFAD2018), Jeju, Invited speaker（November 23, 2018）.

4) Ozaki K. Biological and pharmaceutical investigation of molecules associated with the increased risk coronary artery disease. Genomic Medicine 2018, Houston (February 28, 2018).

5) 尾崎浩一、日本人アルツハイマー病のゲノム解析 AMED 脳と心の研究課研究交流会 講演（東京、2017 年 11 月 30 日）

6) 尾崎浩一、日本人におけるアルツハイマー病のゲノムワイド関連解析 第 59 回 日本老年医学会学術集会 シンポジウム 講演（名古屋、2017 年 6 月 14 日）

7) Ozaki K, Tanaka T. Molecular genetics of coronary artery disease; Toward to personalized medicine. 第 80 回 日本循環器学会 シンポジウム 講演（仙台、2016 年 3 月）

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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)]，齊藤　聡[1)]，山本　由美[1)]，細木　聡[1)]，
殿村　修一[1)]，服部　頼都[1)]

[1)] 国立循環器病研究センター　[2)] 脳研究所

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.CADASIL の疾患特異的 iPS 細胞から壁細胞を誘導し,その表現型を明らかにした.今後の創薬研究への展望が期待される.

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を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

今年度は主にCADASIL iPS細胞を用いた研究を行った．既存の血管内皮細胞の分化誘導手法を改良し，成熟した血管壁細胞を患者のiPS細胞から分化誘導する手法を確立した．この新たな手法により分化誘導したCADASIL iPS細胞由来壁細胞において，CADASILの病態としてこれまでに知られている，NOTCH3タンパク質の細胞外部分の凝集，細胞骨格アクチン繊維の構造異常，およびPDGFRβの増加が再現されていることが確認された．また，CADASIL患者の血管壁に観察されるGOM (Granular osmiophilic material)と呼ばれる凝集体が再現され，CADASILに見られるようにNOTCH3細胞外部分とHtrA1というタンパク質が含まれていた(図1)．患者iPS細胞由来の壁細胞が，CADASILの病態モデルとして信頼できることを示している．また，HtrA1はCARASILの責任遺伝子産物であり，CADASILとCARASILの間に共通病態が存在することを強く示唆している．

さらに，健常コントロール群との比較の結果，CADASILの壁細胞において細胞遊走能が亢進しており，これに変異NOTCH3と過剰発現したPDGFRβが関わっていることが示唆された．PDGFRβは，血管壁細胞の増殖と遊走の切り替えに関与することが知られている．CADASILの壁細胞では，PDGFRβが過剰発現することにより，血管新生の際の増殖と遊走の切り替えが正常に働かなくなり，結果として血管形成や構造の不安定化につながることでこの病気を引きおこすのではないかと考えられた．

D. 考察

今後，CADASILの病態モデルにより，詳細な病態メカニズムの解明だけでなく，治療薬の探索に利用されることが期待される．

iPS細胞は乏突起膠細胞前駆細胞含め，血液脳関門の様々な細胞への分化が可能である．CADASILは壁細胞のみならず，乏突起膠細胞の機能障害が併存していることが最近の報告で明らかにされている．CADASIL（およびCARASIL）が白質を主体とする疾患であることに再度立ち返り，CADASIL iPS細胞から分化させた乏突起膠細胞の機能障害が存在するのか探索を継続する．

さらに，CADASILの壁細胞モデルが試験管内で確立されたことから，薬剤スクリーニングのプラットフォームが完成したことになる．CADASIL患者からの血管生検ならびに血管壁細胞の初代培養が極めて困難であることは言を俟たない．今後CADASILの創薬研究への展開が期待される．

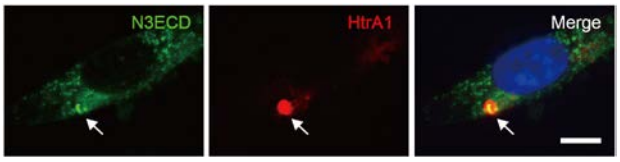


図１．CADASIL iPS細胞から誘導した壁細胞内にNOTCH3細胞外ドメイン（N3ECD）とHtrA1が共局在する封入体が観察される（矢印）．Bar=10 μm.

E. 結論

疾患特異的iPS細胞を用いてCADASILの試験管内モデルの確立に成功した．CADASILの病態の一端が明らかとなり，今後創薬研究への応用が期待される．

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

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

disease. ***Mol Brain*** 2020;13(1):38.

2. 学会発表

1. Ihara M. Modeling mural cell pathology of CADASIL with disease-specific iPS cells. International Stroke Conference 2020 (Los Angels). Feb 19, 2020.
2. Ihara M. Role of induced pluripotent stem cell in CADASIL research. CADASIL symposium (Jeju). Oct 24, 2019.
3. 猪原匡史. 専門医試験対策講座「血管性認知症」. 第38回日本認知症学会学術集会（東京）. 2019年11月8日.
4. 猪原匡史. 血管性認知症のモデル構築と*RNF213*遺伝子改変動物への応用. 第20回日本分子脳神経外科学会（東京）. 2019年8月9日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

GABA 仮説に基づいた統合失調症モデルラットの病態解析

研究代表者　柳川　右千夫 [1)]
研究分担者　那波　宏之 [2)]，藤原　和之 [1)]，柿崎　利和 [1)]，宮田　茂雄 [1)]，姜　玮茹 [1)]

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

研究要旨

GABA は代表的な抑制性神経伝達物質であり、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD; GAD65 と GAD67 の 2 型存在）により合成される。統合失調症死後脳における GAD67 発現低下や GAD67 ミスセンス変異をもつ統合失調症家系の存在から、GABA 神経伝達の障害が統合失調症の病因や病態に関連すると提唱されている（統合失調症の GABA 仮説）。我々等はこの仮説を検証するために GAD67 ノックアウトラットを作製・解析した結果、作業記憶の障害を見出し、このラットが統合失調症モデル動物であることを示唆した。本研究では、GAD67 ノックアウトラットの病態を明らかにする目的で脳の生化学的変化について検討した。GAD67 ノックアウトラットおよび野生型ラットの大脳皮質および小脳にける GABA 含量を測定した結果、いずれの領域でもノックアウトラットで野生型ラットより GABA 含量が低下していた。この脳内 GABA 含量の低下が作業記憶の障害に関与することが推測された。

A. 研究目的

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

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究での動物実験は、群馬大学動物実験委員会で承認されている（承認番号 19-009）。GAD67 ノックアウトラットヘテロ接合体（GAD67+/-ラット）同士を交配し、GAD67 ノックアウトラットホモ接合体（GAD67-/-ラット）と野生型ラット（GAD67+/+ラット）を得た。各遺伝子型は離乳期に PCR を用いたゲノタイピングで同定した。20 日齢から 24 日齢の GAD67-/-ラット、GAD67+/-ラット、GAD67+/+ラットから大脳皮質と小脳を取り出し、ホモゲナイズ後、遠心分離し、S1 画分を得た。この S1 画分について、オルトフタルアルデヒド試薬で誘導体化を行い、HPLC（HTEC-500, EICOM 社）で分離し、蛍光

検出により、GABA とグルタミン酸の濃度を測定した。一方、S1 画分のタンパク質濃度については BCA タンパク質アッセイキットを用いて測定した。

C. 研究結果

GAD67-/-ラット、GAD67+/-ラット、GAD67+/+ラット各 7 匹から大脳皮質と小脳の GABA 含量とグルタミン酸含量を測定した。大脳皮質の GABA 含量は、GAD67+/+ラット：14.4 ± 1.5 nmol/mg of protein、GAD67+/-ラット：13.0 ± 0.9 nmol/mg of protein、GAD67-/-ラット：7.4 ± 0.9 nmol/mg of protein であり、小脳の GABA 含量は、GAD67+/+ラット：10.9 ± 0.8 nmol/mg of protein、GAD67+/-ラット：9.1 ± 0.8 nmol/mg of protein、GAD67-/-ラット：4.0 ± 0.4 nmol/mg of protein であった。大脳皮質、小脳ともに、GAD67-/-ラットの GABA 含量が、GAD67+/-ラットや GAD67+/+ラットの GABA 含量よりも有意に低かった。しかし、GAD67+/-ラットと GAD67+/+ラットの間では、大脳皮質、小脳ともに GABA 含量に有意差はなかった。一方、グルタミン酸含量は、大脳皮質、小脳ともに、各ゲノタイプ間で同等であり、有意な違いはなかった。

D. 考察

大脳皮質と小脳の GABA 含量について、GAD67-/-ラットは GAD67+/+ラットのそれぞれ 51%、44%であり、GAD67+/+ラットに比べ GAD67-/-ラットで減少していることが判明した。さらに、小脳の方が大脳皮質よりも減少の程度が大きいことがわかった。GABA 合成酵素には GAD67 と GAD65 の 2 種類のアイソフォームがあり、小脳の方が大脳皮質よりも GABA 合成における貢献度で GAD67 の方が GAD65 より大きいことが推測された。那波教授と数回の打ち合わせの中で、神経伝達物質の含量が脳の領域ごとで違っている可能性を指摘していただいた。今後は、GAD67 欠損による GABA 含量の低下が脳のどの領域で顕著であるかを検討する。具体的には、複数の脳領域（大脳皮質前頭前野、視覚野、聴覚野、海馬、扁桃体など）の GABA 含量とコントロールのグルタミン酸含量を HPLC で測定する。GABA 含量低下によるドーパミン含量の変化についても同様に測定し、GAD67-/-ラットにおける行動障害に関わる分子病態についてさらに検討する。

E. 結論

統合失調症モデル動物の GAD67 ノックアウトラットについて生化学的解析を行い、大脳皮質、小脳ともに GABA 含量が野生型ラットよりも低下していることを明らかにした。脳内 GABA 含量の低下が統合失調症様の行動障害と関連す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

Miyata S, Kumagaya R, Kakizaki T, Fujihara K, Wakamatsu K, Yanagawa Y.
Loss of glutamate decarboxylase 67 in somatostatin-expressing neurons leads to anxiety-like behavior and alteration in the Akt/GSK3β signaling.
Front Behav Neurosci. 13: 131, 2019.

2. 学会発表

藤原和之、柿崎利和、宮田茂雄、山田一夫、一谷幸男、梶田裕貴、大城朝一、虫明元、渡辺雅彦、宮坂佳樹、真下知士、安田浩樹、柳川右千夫
GAD67ノックアウトラットの認知機能障害
第 41 回日本生物学的精神医学会、2019 年 6 月 22~23 日、新潟

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   特になし。
2. 実用新案登録
   特になし。
3. その他
   特になし。

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

高磁場 MRI を用いた発達障害に伴う統合的脳機能に関する研究

研究代表者　小枝　達也 1)
研究分担者　鈴木　雄治 2)

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

研究要旨

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

A.研究目的

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

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

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

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

国立成育医療研究センター病院こころの診療部（以下成育医療研究センターと略）外来を受診し、発達障害の存在が確認された患者を対象とする。半構造的な問診、神経学的診察に加えて、必要に応じて、行動質問紙、評価尺度等の動作記録を行う。

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

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

ターに導入されている撮影シミュレータ「ゼロテスラ MR プレパレーションシステム」を使用した撮像体験を通じて不安を取り除き、円滑な撮像を行っていく。

C.研究結果

本年度は健常ボランティアを中心に撮像を行い、自閉症児の安静時における脳活動の不安定さをエントロピーの観点で解析することに着目し、解析方法の開発（プログラミング）を進めるとともに、DTI 及び SWI などの脳微細構造異常の有無を確認した。

現時点で、2 名の自閉症児の撮像を行っており、我々が開発を目指しているエントロピー解析により、明らかな脳機能構造異常は認めないが、安静時における脳活動の不安定さを示唆する結果（エントロピーの増大）が得られた。

D.考察

今回の結果から、明らかな脳機能構造異常は認めない自閉症のメカニズムの解明に、我々が開発しているエントロピー解析が臨床症状に関連する脳活動の不安定さを評価するにあたり有用であることが示唆された。

今後も共同研究を継続し、更なる自閉症児、及びそれぞれに対するコントロール群のデータ獲得を目指し（目標　各々10 症例程度)、開発中のエントロピー解析法の確立及び臨床症状との相関を確認していく。

本研究により自閉症児が共通して抱えている様々な臨床的問題解明につながる可能性があり、社会的にも医学的にも大変意義のあるものといえる。

加えて、様々な疾患で出現する臨床症状の異なる発達障害児に対し、それぞれの疾患特有の発症メカニズムの解明も求められることから、更なるエントロピー解析に対する撮像及び解析方法の開発を進めていき、安静時 fMRI のみならず活動時 fMRI へと撮像方法を拡張することを目指す。

ことにより社会的に大きな問題となっている学習障害（Dyslexia など）や注意欠陥多動性障害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することが可能となることが期待できる。

E.結論

安静時 fMRI におけるエントロピー解析は、自閉症児の脳活動の特徴を反映する結果が得られる可能性があることが示された。

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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・放射線医学総合研究所　2) 新潟大学脳研究所・病理学分野

研究要旨

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

A. 研究目的

タウタンパクは、アルツハイマー病を含むタウオパチーにおいて神経障害との関与が示唆されており、生体内でのタウの蓄積を可視化する技術は、タウオパチーの早期診断や発症メカニズムの解明、タウを標的とする疾患治療薬の薬効評価に寄与することが期待される。これまでに、タウオパチー患者を対象として、量子科学技術研究開発機構にて開発されたタウ PET プローブ[^{11}C]PBB3 および[^{18}F]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グラフィおよび組織化学的解析を実施する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

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

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

C. 研究結果

量子科学技術研究開発機構にて実施されたタウオパチー患者における[^{11}C]PBB3 あるいは[^{18}F]PM-PBB3 PET 撮像において、PET プローブの集積が認められた脳領域の患者剖検脳組織を対象にした。組織化学的解析およびオートラジオグラフィにより、組織切片におけるタウ病変の分布、および存在するタウ病変への PET プローブの結合性を検証した。その結果、アルツハイマー病および進行性核上性麻痺患者において、PET における当該プローブの高集積領域でのタウ病変の蓄積が確認され、病変蓄積領域への当該 PET プローブの *in vitro* での結合が確認された。さらに、非標識体 PBB3 および PM-PBB3 を用いた詳細な組織化学的解析により、6 アイソフォームタウオパチーであるアルツハイマー病、4 リピートタウオパチーである進行性核上性麻痺および大脳皮質基底核変性症、3 リピートタウオパチーであるピッ

ク病それぞれの特徴的なタウ病変に対する、当該PETプローブの結合も確認された。

D.考察

本年度には、タウオパチー患者の中でも特にアルツハイマー病および進行性核上性麻痺患者に焦点を当て、PET における[^{11}C]PBB3 あるいは[^{18}F]PM-PBB3 の高集積領域の一部における、タウ病変の蓄積、および存在するタウ病変への当該プローブの結合を、患者剖検脳組織を用いて確認した。タウPETプローブの脳内分布と、タウオパチー患者剖検脳組織におけるタウ病変分布の相関の検証には、本年度に検証を行った脳領域以外の領域においても同様の検証を実施する必要がある。また、大脳皮質基底核変性症やピック病などのタウオパチー患者においても同様の検証を実施することで、当該PETプローブを用いて得られる画像と病理の相関に関する深い理解がもたらされると考える。

E.結論

本研究により、アルツハイマー病および進行性核上性麻痺患者脳内におけるタウ PET プローブ[^{11}C]PBB3 および[^{18}F]PM-PBB3 の集積と、患者剖検脳組織におけるタウ病変蓄積の相関が確認された。また、6アイソフォーム、4リピート、3リピートタウオパチーの広範なタウ病変への当該 PET プローブの結合性が確認された。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

1. medRxiv, doi: 10.1101/2020.03.05.20028407, 2020
2. Movement Disorders, 34, 744-754, 2019

2.学会発表

1. ^{18}F-PM-PBB3 (^{18}F-APN-1607) uptake associates with plasma NfL level and motor disability in patients with progressive supranuclear palsy, Human Amyloid Imaging 2020, 2020/01/15-17, Miami
2. In vivo tracking of tau pathologies with ^{18}F-PM-PBB3 (^{18}F-APN-1607) PET in AD and diverse non-AD tauopathies, The annual Alzheimer's Association International Conference (AAIC2019), 2019/07/12-18, Los Angeles

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度 新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・研究報告書

ストレス応答におけるドーパミン受容体の役割解明

研究代表者　板倉 誠 [1)]
研究分担者　飯田 諭宜 [2)]，笹岡 俊邦 [3)]，齊藤 奈英 [3)]

1）北里大学医学部生化学　2）北里大学医学部精神科　3）新潟大学脳研究所

研究要旨

ドーパミン作動性神経細胞は、主に黒質や腹側被蓋野などに存在し、線条体や大脳皮質へ投射している。また、神経伝達物質ドーパミンは、運動や情動などの神経機能の制御に深く関与していることが知られている。本研究では、マウスに一過性のストレスを負荷した際に、ドーパミン作動性神経細胞の投射先である扁桃体，海馬，大脳皮質，線条体などにおいて、神経細胞やグリア細胞の細胞内情報伝達系がどう変化するかを、定量リン酸化プロテオーム解析によって明らかにする。さらに、一過性のストレスによる脳内変化に、ドーパミン受容体(D1~D3 受容体) ファミリーがどのように関与しているかを、それぞれの受容体のノックダウンおよびノックアウトマウスを用いて検討する。また、ストレスによってリン酸化が変動するシナプスタンパク質が同定できれば、その部位に対するリン酸化抗体を作製し、ストレスが引き起こす脳内変化を解析する。

A. 研究目的

現代日本は高ストレス社会と言われており、不安障害や抑うつといった精神疾患を抱える患者が増加している。そのため、その発症機序の解明や治療法の開発が重要な課題となっている。

本研究では、マウスに一過性のストレスを負荷した際に脳内の細胞内情報伝達系にどのような変化が起きているのかを定量リン酸化プロテオーム解析により明らかにする。また、これまでの共同研究の成果として、ドーパミン D2 および D3 受容体アゴニストが、マウスに不安感を誘発することを確認している。そこで神経伝達物質ドーパミンが、ストレスによる細胞内情報伝達系の変化にどのような役割を果たしているかを、ドーパミン受容体ファミリーのノックダウンおよびノックアウトマウスを用いて、明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. 拘束浸水ストレス負荷マウスの大脳皮質タンパク質の定量リン酸化プロテオーム解析

すべての動物実験は、北里大学における動物実験等に関する規程に従って行った。

7～10週齢のC57B6/Nマウス(♂)を、空気穴を開けた遠心管(50 ml) に入れて蓋をした後、肩まで18℃の水に30分間浸して一過性のストレスを加えた。その後、コントロールマウス(拘束浸水ストレス負荷なし)と拘束浸水ストレス負荷マウスの

大脳皮質を採取した。

大脳皮質の定量リン酸化プロテオーム解析は、共同研究者の小寺教授[北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンター] と行った。まずマウス大脳皮質からタンパク質を、界面活性剤を用いて抽出し、プロテアーゼ(Trypsin, Lys-C)でペプチドに切断した。次に、安定同位体標識により分子量の異なるジメチル化を、コントロールおよび拘束浸水ストレス負荷マウスの切断ペプチドのアミノ基に対して行い、混合した。その後、Titansphere®Phos-TiO キット(ジーエルサイエンス) を用いて、リン酸化ペプチドを濃縮・回収した。回収したリン酸化ペプチドは、LC-MS/MSシステム(EASY-nLC 1000, Q Exactive, Thermo Fisher Scientific)で分析した。

さらに、定量リン酸化プロテオーム解析により拘束浸水ストレスによってリン酸化が変動すると確認されたタンパク質 Dynamin I, p21 activated kinase1(PAK1) については、イムノブロットによる確認も行った。

2. D1受容体ノックダウンマウスの線条体タンパク質の定量リン酸化プロテオーム解析

笹岡教授[新潟大学脳研究所]から、ドキシサイクリン(DOX) 投与によってドーパミンD1受容体をノックダウンしたマウスの脳を供与して頂いた。

そこで、コントロールマウス(ドーパミンD1受容体ノックダウンマウスにDox投与なし)およびドーパミンD1受容体ノックダウンマウス(Dox投与あり)脳から、ドーパミンD1受容体が高発現している線条体を回収した。

それぞれのマウスの線条体タンパク質を抽出し、小寺教授[北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンター]の協力を得て、前述した実験方法を用いて、ドーパミンD1受容体ノックダウンマウスの定量リン酸化プロテオーム解析を行った。

C. 研究結果

1.ストレス負荷マウスの大脳皮質タンパク質の拘束浸水定量リン酸化プロテオーム解析

コントロールおよび拘束浸水ストレス負荷マウスの約1700種類の大脳皮質タンパク質に由来する約5000種類のリン酸化ペプチドが検出された。さらに、検出したリン酸化ペプチドのうち、約700種類については、コントロールおよび拘束浸水ストレス負荷マウス間で定量比較を行うことができた。

次に定量リン酸化プロテオーム解析の有用性を、ストレス負荷マウスでリン酸化の亢進が確認された 2 つのリン酸化部位(Dynamin I Ser^{774}, PAK1 Thr^{212})のリン酸化抗体を用いてイムノブロットにより確かめた。結果、イムノブロットにおいても、拘束浸水ストレスの負荷によって明らかに 2 つの部位のリン酸化が亢進していることが確かめられた。(図 1)

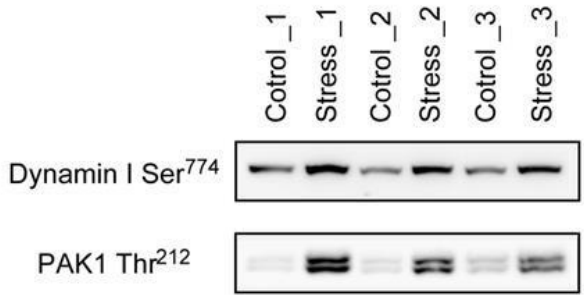


図1. 拘束浸水マウス大脳皮質のイムノブロットの結果

2. D1受容体ノックダウンマウスの線条体タンパク質の定量リン酸化プロテオーム解析

線条体タンパク質(約900種類)に含まれる約1400種類のリン酸化部位について、コントロールマウスとドーパミンD1受容体ノックダウンマウスの比較を行うことができた。

結果、ドーパミンD1受容体のノックダウンによって、リン酸化が3倍以上亢進していた部位は73か所あり、逆に1/3以下になった部位は、54か所あった。

また、コントロールマウスではドーパミン D1 受

容体の 445 番目の Ser 残基のリン酸化ペプチドが検出されたが、ドーパミン D1 受容体ノックダウンマウスのサンプルからはまったく検出されなかった。さらに、ドーパミン受容体の下流の重要なシグナル分子としてよく知られている DARPP-32 の Thr_{75} のリン酸化が、ドーパミン D1 受容体ノックダウンマウスにおいて 2 倍程度亢進していた。(図 2)

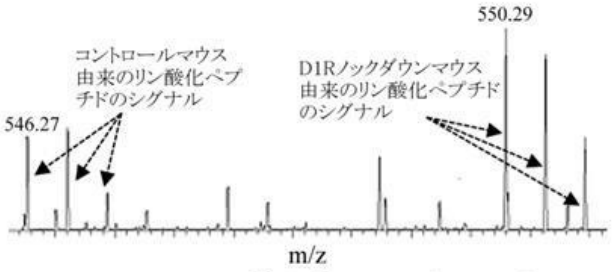


図2. DARPP-32 Thr^{75} を含むリン酸化ペプチドのLC-MS/MSによる検出結果

DARPP-32 以外のリン酸化量が変動するタンパク質について検討したところ、翻訳制御に関わるリン酸化酵素 mTOR1 との関与が示唆されるリン酸化の変化が 3 つのタンパク質(TSC2, Raptor, eIF4B)から検出された。

D. 考察

拘束浸水マウス大脳皮質の定量リン酸化プロテオーム解析から、マウスに一過性のストレスを負荷すると大脳皮質内の細胞内情報伝達経路に比較的大きな変化が起こることを確認できた。また、リン酸化量が変動するタンパク質には、シナプス伝達制御に関与しているタンパク質に多く見られた。

今後は、このストレスに依存した細胞内情報伝達経路の変化において、ドーパミン受容体ファミリーが果たす役割を明らかにしていきたいと考えている。しかしながら、ドーパミン受容体の量を変動させるだけで、脳内のリン化酸化状態が変化することが、ドーパミンD1受容体ノックダウンマウスの解析から明らかになったので、それを加味しながら研究する必要性がある。

また、大脳皮質と線条体などの脳の領域の違いにより、LC-MS/MS で検出できるリン酸化ペプチドにかなり差異があることもわかった。

E. 結論

本年度の研究結果から、定量リン酸化プロテオーム解析は、ストレスによる脳内変化を検出するための非常に有効な実験方法であることを明らかにした。

F.研究発表（上記課題名に関するもの ）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 「水中拘束ストレスマウスの大脳皮質を対象とした包括的なタンパク質存在様式の比較分析」紺野亮，他(日本プロテオーム学会, 7/24, 2019,宮崎)
2. 「脳の機能状態モニタリングを目指した脳脊髄液の詳細な比較分析への取り組み」角田貴樹，他(日本プロテオーム学会，7/24, 2019,宮崎)

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点 J
共同利用・共同研究報告書

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)]、今智矢[1)]、柿田明美[2)]、若林孝一[1)]

1)弘前大学大学院医学研究科 脳神経病理学講座　2) 新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

αシヌクレインタンパク質の異常凝集を特徴とする「シヌクレイノパチーJ は、加齢に伴い発症する神経難病であり、これまで、病態の進行を遅延・阻止する治療法は確立されていない。我々は以前から異常蓄積を防ぐために、細胞内分解システムを活性化する新たな治療法を目指してきた。特に、天然二糖類のトレハロースが、マウスの脳内で細胞内分解システムの一つである「オートファジー」を活性化することをこれまでに報告してきた。本研究では，トレハロース摂取に加えて、運動を併用することで脳内オートファジー活性化の効果を検討した。

A.研究目的

神経変性疾患では「異常タンパク質の蓄積」という共通の病態が存在し、そのメカニズムとしては、①合成系の亢進、②分解系の抑制、③移動・輸送系の障害の 3 つが考えられている。これまで我々はシヌクレイノパチー（レビー小体病および MSA）に焦点をあて、これらの疾患におけるαシヌクレイン（ 以下、シヌクレイン）の蓄積には細胞内分解システムの低下が関与していることを報告してきた。また、これらの知見から、細胞内分解システムを活性化することで異常タンパク質の蓄積を緩和し、病態を改善する方策を考えるに至った。実際に、天然二糖のトレハロースによって脳内オートファジーが活性化されることを報告した。しかし、効果が予想よりも弱く、蓄積したシヌクレインを軽減することはできなかった。そこで今回、運動を併用することでより高い効果を期待した。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

正常マウス（n = 32） およびオートファゴソームを緑色蛍光タンパク質（GFP）で可視化できるトランスジェニックマウス（Tg）（n = 4）に、2%のトレハロース（n = 10） またはマルトース（n =10）、スクロース（n = 8）、水（n = 8）を 7 日間、経口投与した。正常マウスは運動群と非運動群に分けた。

運動群はトレッドミル運動を最後の 3 日間（5、6、7 日目）で実施、7 日目の運動直後にマウスを解剖し、組織学的および生化学的解析（ウエスタンブロッティング）を行った。また、運動による生体の代謝反応（グリコーゲン含有量）を検討する目的で、肝臓の Periodic acid-Schiff (PAS)染色を実施した。

一方、GFP-LC3 Tg マウスの脳および肝臓を SCALE 法で透明化し、光学顕微鏡（Zeiss Light-sheet Z. 1 顕微鏡、Carl Zeiss 社）で蛍光 GFP

ドットを確認した。

動物実験に関しては、弘前大学動物実験委員会に承認された動物実験を順守している。

C.研究結果

トレハロースを摂取したマウスの脳および肝臓ではオー トファゴソ ーム膜の構成タンパク質である LC3-II の増加を認めた。一方、トレハロースに運動を併用することで LC3-II は減少した。しかし、 オートファジーの活性化因子とされるリン酸化 AMP-activated protein kinase (P-AMPK)は運動後では、 トレハロース摂取マウスは対照と比較し有意に高かった。

PAS 染色にて肝臓のグリコーゲンを運動前後で比較したところ、 運動後マルトースおよびスクロース摂取マウスの PAS 陽性染色は消失した。一方、興味深いことにトレハロース摂取マウスの肝臓では、 PAS 陽性染色は運動後も保存されていた（図 1 ）。 これらの PAS 陽性染色はアミラーゼ処理により消失したことから、 グリコーゲンと判断した。

トレハロースと運動による併用効果を形態的に観察するために、オートファジーを可視化できる GFP-LC3-Tg マウスの脳と肝臓を透明化して観察したが、有意な差を観察することはできなかった。

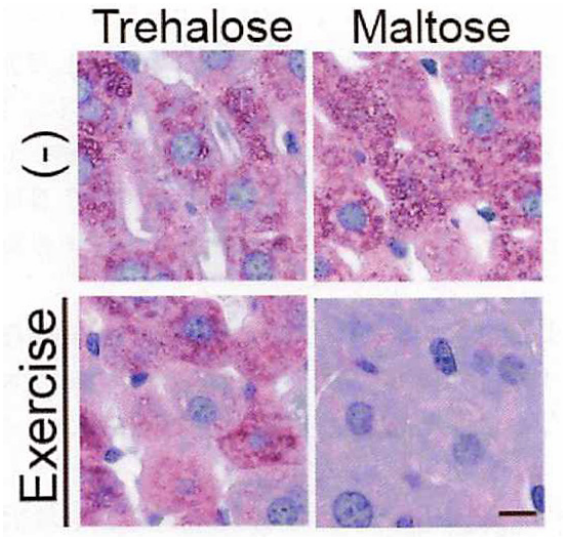


図 1 糖質摂取と運動の併用による肝臓グリコーゲンへの影響　トレハロースまたはマルトースな 7 日間摂取すると、肝臓では PAS 陽性染色が増強される（上段)。 一方、運動直後にネズミ肝臓を観察すると、マルトース摂取の場合には PAS 陽性染色が消失するが、トレハロース摂取の場合には PAS 陽性染色が残っている。Bar= 20 um

D.考察

他施設や我々の以前の報告と同様に、トレハロースはマウスの肝臓および脳においてオートファジーを活性化させた。 しかし、本研究の目的である「オートファジーと運動の併用」による効果は、 期待に反して認められなかった。 逆にオートファジー膜の構成分子である LC3-Ⅱは脳と肝臓で減少した。

近年、トレハロストランスポーターとして Glucose transporter 8 (GLUT8) が報告された。興味深いことに運動後のトレハロース摂取マウスの脳では GLUT8 レベルが有意に増加していた。特に GLUT8 の発現はアストロサイトで認められた。

これらのことから、運動時の脳機能を維持するためには、より多くのエネルギー源が神経細胞に必要であり、アストロサイトの発現する GLUT8 を通してトレハロースが供給されている可能性がある。 引き続きシヌクレイノパチーの新たな治療法を模索してしていく。

E.結論

運動は認知機能を改善することが知られている。 また、運動は糖尿病、心血管疾患および炎症性疾思などの生活習慣病においても有益な効果を有する。今回、天然糖トレハロースと運動の併用効果を病理学的、生化学的に検討したが、 結果は期待に反して、脳内オートファジーの活性化は認められなかった。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

1. Sato C, Tanji K, Shimoyama S, Chiba M, Mikami M, Koeda S, Sumigawa K, Akahira K and Yamada J, Effects of voluntary and forced exercises on motor function recovery in intracerebral hemorrhage rats, **Neuroreport** 31 189-196, (2020).
2. Tanji K, Miki Y, Mori F, Kon T, Kakita A, Takahashi H and Wakabayashi K, Phosphorylated NUBl distinguishes alpha-synuclein in Lewy bodies from that in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy, **Brain Pathol** 29 803-812, (2019).
3. Narita H, Tanji K, Miki Y, Mori F and Wakabayashi K, Trehalose intake and exercise upregulate a glucose transporter, GLUT8, in the brain, **Biochem Biophys Res Commun** 514 672-677, (2019).
4. Mori F, Tada M, Kon T, Miki Y, Tanji K, Kurotaki H, Tomiyama M, Ishihara T, Onodera O, Kakita A and Wakabayashi K, Phosphorylated TDP-43 aggregates in skeletal and cardiac muscle are a marker of myogenic degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and various conditions, **Acta Neuropathol Commun** 7 165, (2019).
5. Mori F, Miki Y, Kon T, Tanji K and Wakabayashi K, Autophagy Is a Common Degradation Pathway for Bunina Bodies and TDP-43 Inclusions in Amyotrophic Lateral Sclerosis, **J Neuropathol Exp Neural** 78 910-921, (2019).
6. Kon T, Tanji K, Mori F, Kimura A, Kakita A and Wakabayashi K, Immunoreactivity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein in Lewy bodies, **Neuropathology** 39 279-285, (2019).

2.学会発表

1. 丹治邦和, 三木康生, 森文秋, 今智矢, 柿田明美, 髙橋均, 若林孝一, Synphilin-1結合タンパク質（NUB1)のリン酸化とレビー小体への局在, 第60回日本神経病理学会（2019).
2. 森文秋, 三木康生, 今智矢, 丹治邦和, 若林孝一, 筋萎縮性側索硬化症の脊髄前角における Bunina 小体と TDP-43 封入体の関連, 第60回日本神経病理学会（2019).
3. 今智矢, 中村琢洋, 羽賀敏博, 森文秋, 丹治邦和, 鬼島宏, 東海林幹夫, 若林孝一, アルツハイマー病変を合併した原発性側索硬化症 1 剖検例, 第 60 回日本神経病理学会（2019).

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

特願 2020-8430

「TDP-43プロテイノパチーの治療薬並びに予防薬」出願者:若林孝一、丹治邦和、森文秋（弘前大学)、清宮啓之、内海潤（がん研究会)、深見竹広（理化学研究所)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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

研究代表者　西村　正樹 [1)]
研究分担者　渡邊　直希 [1)]，三ツ石　弥千代 [1)]，春日　健作 [2)]，池内　健 [2)]

[1)] 滋賀医科大学・神経難病研究センター 分子神経病理学部門
[2)] 新潟大学･脳研究所

研究要旨

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

A. 研究目的

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

本課題では、認知症、軽度認知機能障害、健常高齢者の各症例を対象に血漿中の ILEI 定量を行い、既知のバイオマーカーや認知機能障害の程度との相関解析を横断的・縦断的に進めることにより、認知症発症前後における血漿中 ILEI の診断的意義に関する検証を行うことを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

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

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

(3) Aβ40・Aβ42・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

Alzheimer 病を認知症の有無に拘わず Aβ 蓄積症スペクトラムとして捉える概念 Alzheimer's continuum が NIA-AA から提唱されている(*Alzheimers Dement* 14:535, 2018)。その中でのカテゴリー分類は、髄液所見や脳画像所見などバイオマーカーをもとにした脳 Aβ 蓄積(A+)、タウ蓄積(T+)、神経変性(N+)の 3 項目による。今年度は、新潟大学脳研究所認知症疾患コホートにて採取された髄液サンプル(135 症例)の解析による ATN カテゴリー分類（それぞれ Aβ42、p-tau、t-tau により判定）をもとに、髄液中 ILEI レベルを解析した。その結果、A+群では A–群に比して、有意に低値であったのに加え、A+T–群の平均は A–T–群に比しても有意に低値であることが判明した。

また、マウスを用いた解析から、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、細胞分画化ではシナプス前部を主体とする分画に濃縮して局在していた。とくに活性型シナプス小胞において APP やγセクレターゼ複合体などと共局在することが明らかになった。さらに、大脳皮質マイクロダイアリシスを用いた解析の結果、Aβ と同様に細胞間質液中に分泌されていること、その濃度を経時的にみると緩徐な変動があることなどが確認された。マウスの麻酔や神経活動電位の抑制（テトロドトキシン投与）によって、ILEI および Aβ の細胞間質濃度が低下したことから、この分泌は神経活動依存的であることが示された。我々は以前、ILEI や APP-C99 がシナプス小胞に豊富に局在することを報告している(*Neuroscience 330:236-246, 2016*)が、そのエクソサイトーシスをピクロトキシンにより阻害すると細胞間質液中の ILEI および Aβ 濃度がともに 80%以上低下した。これは、細胞外の殆どの ILEI や Aβ は、神経活動に伴いシナプス前部から放出されることを示す。

D. 考察

髄液中 ILEI レベルを ATN カテゴリー分類との対比により解析した。A+T–群において、とくに顕著な低下所見が得られたことは、脳 Aβ 蓄積の早期から ILEI レベルに変化が認められることを示唆しており、発症前早期のサロゲイトマーカーとして有用である可能性がある。血液を用いた解析に進める計画である。

マウス脳マイクロダイアリシスを用いた解析からは、ILEI が Aβ と同様にシナプス前部から神経活動に伴って分泌されることが示唆された。

E. 結論

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

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. Nakano M, Mitsuishi Y, Watanabe N, Hibino E, Saito T, Saido TC, Suzuki T, Nishimura M. “Synaptic activity- dependent release of presynaptic ILEI/FAM3C.” AAIC 2019, 2019 年 7 月 Los Angeles, USA
2. 中野将希, 三ツ石弥千代, 渡邊直希, 日比野絵美, 斉藤貴志, 西道隆臣, 鈴木利治, 西村正樹. “Presynaptic ILEI/FAM3C is released in an activity-dependent manner like Aβ exocytosis.” Neuro2019, 2019 年 7 月 新潟
3. 中野将希、三ツ石弥千代、渡邊直希、日比野絵美、斉藤貴志、西道隆臣、鈴木利治、西村正樹.「大脳皮質における ILEI/FAM3C および Aβ の間質液への分泌様式に関する比較検討」第 38 回 日本認知症学会学術集会 2019 年 11 月 東京

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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、全ゲノムシークエンシングデータ)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の間のミッシングリンクを明らかにする。また、AD の遺伝的要因がその他の疾患（特に精神疾患等）の遺伝的要因とどの程度関連するのかを調べるために遺伝的相関解析等を行うことにより遺伝的相関が高い疾患ですでに承認されている薬剤が AD で奏功するかどうかといったドラッグリポジショニングへの応用を検討する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

遺伝子機能解析学分野で解析した約 2,000 例の健常者およびアルツハイマー病患者のゲノムデータは SNP アレイで測定されており、約 180 万箇所の SNP マーカーをジェノタイピングしている。SNP アレイに載っていない領域のジェノタイピングを行うためにインピュテーション解析を行う。また 500 例以上の検体でエクソーム解析や全ゲノムシークエ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、リスクアリ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リ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

本年は研究を遂行するために必要なゲノムデータを新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学教室より受領した。さらに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ために必要なリファレンスゲノムデータを公共のデータベースよりダウンロードした。またインピュテーション解析のためのソフトウェアであるIMPUTE2をダウンロードし解析環境を整えた。

D. 考察

本年度は研究を遂行するために必要なデータの準備および計算環境を整えた。来年度は受領したデータのインピュテーション解析を行うとともにポリジェニックリスクスコアの計算を進める。

E. 結論

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

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. Masataka Kikuchi. Polygenic analysis of Alzheimer's disease in a Japanese population. Asian Forum on Alzheimer's Disease (AFAD) 2020. February, 2020. Hotel Mielparque Tokyo (Oral Presentation).
2. 菊地正隆、宮下哲典、原範和、重水大智、尾崎浩一、新飯田俊平、池内健、中谷明弘. 日本人集団におけるアルツハイマー病ポリジェニック解析. 第 38 回日本認知症学会学術集会. 令和元年 11 月 7 日（火）～11 月 9 日（木)、京王プラザホテル、新宿 NS ビル（ポスター発表)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし。

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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

研究代表者氏名　久保　均[1, 2)]
研究分担者氏名　高橋　和弘[2)]，五十嵐　博中[3)]，鈴木　雄治[3)]，中村　ゆきみ[3)]

[1)] 福島県立医科大学新医療系学部設置準備室，[2)] 福島県立医科大学先端臨床研究センター，
[3)] 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター

研究要旨

本研究では，新潟大学が開発したヒト用 AQP-4 PET 測定に用いるイメージング薬剤[11C]TGN-020 の製造方法を、異なる実施環境、異なる性能（ハードウェア）を含む、異なる自動合成装置が設置された福島県立医科大学で実現することが求められる。そのため、基本的な合成反応は変更せずに[11C]TGN-020 の製造法の移植の可能性について検討した。その結果、いくつかの工夫により大きな問題なく合成できる可能性が明らかとなった。また、従来の合成法で問題とされていた比放射能の改善に関して、使用する試薬の種類や使用量を最適化することにより向上する可能性が明らかとなり、今後、合成手順のさらなる最適化により高比放射能の [11C]TGN-020 製造が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

新潟大学が開発されたヒト用 AQP-4 PET 法が確立することにより、ヒト脳における AQP-4 マッピングが可能となり、様々な脳活動下における水動態が解明できると期待されている。この AQP-4 PET に用いる薬剤[11C]TGN-020 の院内製造は、これまで新潟大学でのみで実現されていたが、本共同研究を進めるにあたり①福島県立医大でも製造を可能にする必要がある。また同時に、②従来の合成手順で不十分であった比放射能の向上を目指した改良法の検討が求められている。今年度は上記①②の実現について検討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）

目的①について：新潟大学で[11C]TGN-020 の院内製造には GE ヘルスケア社製の自動合成装置を用いているが、福島県立医大では住友重機械工業㈱製の自動合成装置を用いているため、合成手順をそのまま移植することは、ハード的にもソフト的にも難しいので、類似の動作が出来るように工夫することが必要となる。配管のつながりや長さ、電磁弁の位置、温度制御、流量調整等はもちろんのこと、ハード的に対応していない機能を別な方法で代替えする等をして、新潟大学の合成装置に近い動作が可能なようにできる範囲で改造する。

目的②について：新潟大学で実現した[11C]TGN-020 合成手順では、[11C]O2 から中間体[11C]ニコチン酸を合成する際に、残ったアリルリチウム試薬をクエンチするために非放射性の CO2 ガスを過剰に吹き込んでおり、それにより比放射能が著しく低下していることは明らかである。そこで、試薬の種類や量を変更することで、その改善策を考える。

C. 研究結果

目的①について：住友重機製自動合成装置 MPS-100 を用いて、配管や電磁弁についての改造は比較的容易に対応でき、ソフトの対応も容易に可能であった。GE 装置で用いられる液体窒素を用いた[11C]O2 の濃縮についてはモレキュラーシーブスを用いた濃縮法に変えることで可能になった。液体窒素吹付を使った低温の反応温度調整はドライアイスーメタノール等の冷媒を用いることで

対応可能であった。
目的②について：残ったアリルリチウム試薬をクエンチするために使用する化合物として、アリルリチウム試薬との反応性が高く、それ自体が除去しやすく、さらに付加体が次の反応に影響を与えない、もしくは除去しやすいものである必要があり、加えて装置内の配管を詰まらせたりしないという性質が求められることが分かった。

D.考察

目的①について：住友重機製自動合成装置 MPS-100 は、GE ヘルスケア社製の合成装置とハード的に異なる部分が存在するが、[11C]TGN-020 合成を移植することは可能であった。ホットな合成は未だ十分とは言えないが、福島県立医大での[11C]TGN-020 製造が近い将来可能になると予想される。また、住友重機械工業㈱の合成装置は国内では大きなシェアを持っており、国内の医療用サイクロトロン施設での[11C]TGN-020 製造の可能性が大きく広がることが期待される。
目的②について：[11C]O2 から中間体[11C]ニコチン酸を合成する際に残ったアリルリチウム試薬の処理の仕方によって、比放射能を大きく高める可能性が確認されたことから、今後、さらなる最適化により、高比放射能の[11C]TGN-020 の製造法が確立し、ヒト脳における AQP-4 マッピングが可能となり，様々な脳活動下における水動態が解明できると期待される。

E.結論

①福島県立医大でも[11C]TGN-020 製造ができる可能性が大きくなった。また、②使用する試薬の種類や使用量を最適化することにより従来の合成よりも高比放射能の[11C]TGN-020 の製造法の確立が期待される。

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

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

神経変性疾患特異蛋白と神経細胞脱落：ヒト基底核における定量的検討

研究代表者　小柳　清光 1)
研究分担者　山田　光則 1)，柿田　明美 2)

1）信州大学医学部神経難病学講座　2）新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

ポリグルタミン沈着と神経細胞脱落との連関を明らかにする目的から、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）とジョセフ病（MJD）の線条体神経細胞の脱落を定量的に検討し、我々が既に報告したハンチントン病（HD）と比較しつつ、連続切片にポリグルタミン免疫染色して神経細胞脱落との相関を分析した。ポリグルタミン病では線条体の小型神経細胞脱落が HD で強調されてきたが、本研究で、DRPLA と MJD では大型神経細胞優位の減少が生じていること、減少の程度は、小型神経細胞は HD で対照の 10%程度まで減少しているが、DRPLA でも MJD でも小型神経細胞は対照の 50%～76%まで減少し、大型神経細胞は DRPLA では HD と同様に対照の 34～39%まで減少、MJD では 19～25%まで減少していた。各疾患とも神経細胞脱落は核内ポリグルタミン沈着と関連することが考えられた。なお各疾患の対照群での加齢性変化として大型神経細胞の減少が見られた。

A. 研究目的

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

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

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

検索方法：（1）神経細胞計測：*Oyanagi et al. 1987* と同様の方法を用いた。すなわちホルマリ

ン固定−パラフィン包埋された 20μm 間隔の 10μm 厚切片 2 枚を KB 染色し、ニッスル小体と明瞭な核小体を有する細胞を神経細胞と同定した。冠状断された側坐核レベルの尾状核頭部と乳頭体レベルの被殻においてそれらの上半正中部と下半正中部において 0.5mm^2 に含まれる核小体を有する神経細胞核の断面積をニコン描画装置とディジタイザを用いて計測し、尾状核または被殻の断面積を乗じて全体の神経細胞数を算出した。神経細胞核の断面積 100 μm^2 未満を小型神経細胞とし、100 μm^2 以上を大型神経細胞として、大型神経細胞は尾状核および被殻の全体を計測した。計測結果の比較は、DRPLA は対照 A 群と、ジョセフ病とハンチントン病は対照 B 群と行った。(2) これらに連続する 6μm 厚切片を用いてポリグルタミン免疫染色を施行して光顕で観察した。

（倫理面への配慮）全症例とも剖検施設においてインフォームドコンセントが得られている。信州大学医学部倫理委員会承認済み（#3397）。

C. 研究結果

(1) 対照 A 群と B 群における神経細胞数の比較では、核の断面積 100μm^2 未満の小型神経細胞に有意な差は見られなかったが、核の断面積 100μm^2 以上の大型神経細胞では、B 群は、尾状核で A 群の 80.7%まで減少し、被殻では 70.7%まで減少していた。(2) DRPLA の小型神経細胞数は、尾状核では対照の 60.6%まで減少し、被殻では 50.8%まで減少していた。大型神経細胞数は、尾状核では対照の 34%まで減少し、被殻では 39.2%まで減少していた。(3) ジョセフ病の神経細胞減少の程度は症例によってばらつきが大きいが、小型神経細胞数は尾状核では対照の 76%まで減少し、被殻では 65.2%まで減少、大型神経細胞数は尾状核では対照の 19.4%まで、被殻では 25.9%まで減少していた。(4) 既報のハンチントン病のデータは、小型神経細胞数は尾状核では対照の 15.9%まで減少し、被殻では 11.7%まで減少、大型神経細胞数は尾状核では 35.2%まで、被殻では 33.6%まで減少していた（*Oyanagi et al. 1987*）。(5) ポリグルタミン病各疾患の線条体では、多くの残存神経細胞で核がポリグルタミン免疫染色でびまん性の染色性を示し、それは大型神経細胞でやや高頻度で認められた。一方、核内封入体は少数の残存神経細胞で認められた。

D. 考察

27.5 歳から 55.6 歳までの加齢性の線条体の神経細胞脱落は、大型神経細胞で進行していることが考えられた。ポリグルタミン病の線条体神経細胞の脱落はこれまでハンチントン病で強調されてきたが、本研究により、ハンチントン病では小型神経細胞優位の神経細胞脱落が見られる一方、DRPLA とジョセフ病ではむしろ大型神経細胞優位の脱落が生じていることが考えられた。神経細胞脱落の程度は、小型神経細胞脱落はハンチントン病で最高であるが、DRPLA でも、ジョセフ病でも、小型神経細胞は対照の 50%～76%程度まで減少し、大型神経細胞は、DRPLA がハンチントン病と同程度の 34～39%まで減少し、ジョセフ病では対照の 19～25%まで減少していた。

いずれの疾患でも、残存神経細胞では核内のびまん性ポリグルタミン染色が多数の神経細胞で見られ、封入体を有する神経細胞は少数であった。DRPLA とジョセフ病の神経細胞核内のポリグルタミン陽性所見は既に研究分担者山田らにより報告され細胞変性との因果が論じられている（*Yamada M, Tan C-F, Inenaga C, Tsuji S, Takahashi H*: Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology 2004;30:665-675. doi: 10.1111/j.1365-2990.2004.00583.x*）。ポリグルタミン病の線条体における神経細胞脱落は、DRPLA、ジョセフ病、ハンチントン病ともに、ポリグルタミンの核内沈着と関係して生じることが考えられた。

E. 結論

（1）対照 A 群と B 群の比較では、小型神経細胞数に有意な差は見られなかったが、大型神経細胞では、B 群は、尾状核で A 群の 80.7%まで、被殻で 70.7%まで減少していた。(2) DRPLA の小型神経細胞数は、尾状核では対照の 60.6%まで減少し、被殻では 50.8%まで減少していた。大型神経細胞は、尾状核では対照の 34%まで、被殻では 39.2%まで減少していた。（3）ジョセフ病の神経細胞数の減少の程度は症例によってばらつきが大きいが、小型神経細胞は尾状核では対照の 76%まで減少し、被殻では 65.2%まで減少し、大型神経細胞は尾状核では対照の 19.4%まで、被殻では 25.9%まで減少していた。(4) 既報のハンチントン病では、小型神経細胞数は尾状核では対照の 15.9%まで減少し、被殻では 11.7%まで減少、大型神経細胞は尾状核では対照の 35.2%まで、被殻では 33.6%まで減少していた。(5) DRPLA、ジョセフ病、ハンチントン病の線条体神経細胞脱落は、ポリグルタミンの核内沈着と関連して生じていることが考えられた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Verheijen BM, Lussier C, Müller-Hübers C, Garruto RM, Oyanagi K, Braun RJ, van Leeuwen FW: Activation of the unfolded protein response and proteostasis disturbance in parkinsonism-dementia of Guam. ***Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*** 2020; 79: 34-45. doi: 10.1093/jnen/nlz110
2. Saito R, Nozaki H, Kato T, Toyoshima Y, Tanaka H, Tsubata Y, Morioka T, Horikawa Y, Oyanagi K, Morita T, Onodera O, Kakita A: Retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy: clinicopathologic features of an autopsied patient with a heterozygous *TREX 1* mutation. ***Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*** 78: 181-186, 2019 doi: 10. 1093/jnen/nly115
3. Ohara S, Miyahira T, Takei Y, Yanagimura F, Kawachi I, Oyanagi K, Kakita A: Neuromyelitis optica spectrum disorder with massive basal ganglia involvement. A clinico-pathological study. ***BMC Neurology*** 2019; 19: 351. doi.org/10.1186/s12883-019-1580-3

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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) 関西医科大学薬理学講座　2) 新潟大学脳研究所モデル動物開発分野

研究要旨

我々は脳からどのような糖タンパク質(およびエクソソームのような糖鎖修飾された細胞外小胞)が血中に移行しているかを網羅的に同定する方法の確立を試みる。具体的には Ggta1 遺伝子欠損マウスの脳のみに Ggta1 を発現させ、その遺伝子産物の活性による糖鎖構造 Galα1-3Gal を持つ血中糖タンパク質を検出することで、脳が産生する糖タンパク質を網羅的に同定する。ゲノム編集により作製された Ggta1 遺伝子欠損マウスの脳、血漿および各種臓器からのタンパク質について抗 Galα1-3Gal 抗体によるウェスタンブロットを行ったところ検出されるタンパク質成分は見られなかった。

A. 研究目的

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

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

糖転移酵素である Ggta1 の遺伝子欠損マウスの脳のみに Ggta1 を発現させ、その遺伝子産物の活性による糖鎖構造 Galα1-3Gal 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。Galα1-3Gal 構造は GSB4 レクチンにより検出されるが、Ggta1 遺伝子欠損マウスの組織はこのレクチンに対して陰性であることが既に報告されている。本研究では Ggta1 遺伝子欠損マウスはゲノム編集技術を用いて作製する（脳研究所にて作製済み)。脳特異的に Ggta1 を発現させる方法として、細胞系譜解析に用いられる Rosa-mT/mG ミニジーンに P2A 配列を介して Ggta1 を連結させたミニジーンを作製し、これをマウスの Rosa26 座位にノックインすることで、Cre リコンビナーゼを発現している臓器でのみ Ggta1 が発現するような遺伝子改変マウスを作製する（脳研究所にて作製済み)。Cre ドライバーマウスとしては Nestin-Cre マウスと GFAP-Cre マウスを用いることを予定している（Nestin-Cre は入手済み)。これらのマウスを掛け合わせて Ggta1(-/-)/Rosa26(+/mTmG)/Nestin-Cre（あるいは GFAP-Cre) マウスを作製し、その血液から GSB4 レクチン陽性の糖タンパク質を単離してそのタンパク質を質量分析器により同定する。この解析にて検出された分泌タンパク質はその脳での発現を RT-PCR や免疫染色及びウェスタンブロッティングなどで確認する。

C. 研究結果

脳研究所にて作製された Ggta1 遺伝子はゲノム編集にて 1 塩基欠失を導入されており、フレームシフトにより Ggta1 の酵素活性ドメインが発現されないことを PCR およびサンガーシークエンスにより確認した。この 1 塩基欠失について RFLP が検出

されるようにPCRプライマーを設定し、PCRとその後の制限酵素処理により容易に変異を検出できる系を構築した。この Ggta1 遺伝子欠損マウスを関西医大の動物飼育施設に搬入し、ヘテロ型マウス同士の交配によりホモ変異体マウスの作製を行った。現在までに得られたホモ変異体マウスは3匹で、外観や行動からは野生型やヘテロ型マウスとの明らかな違いは見られなかった。このことは既報の情報と一致している。次に得られたGgta1 遺伝子欠損マウスについて、糖タンパク質上の Galα1-3Gal 構造が消失していることを抗Galα1-3Gal 抗体にて検証した。ホモ変異体マウス1匹から脳、血漿を含む各種臓器を調製し、核を除いた細胞破砕液をSDS-PAGEにて展開し、PVDF膜に転写して抗Galα1-3Gal抗体による検出を行ったところ、野生型マウスからの検体については全ての臓器において抗Galα1-3Gal抗体陽性シグナルがレーン全体に広がるように検出されたが、ホモ変異体マウスからの検体については陽性シグナルが検出されなかったことからGgta1ホモ変異体マウスには糖タンパク質のGalα1-3Gal構造が消失していることが確認された。

D.考察

当初の予定通りGgta1ホモ遺伝子欠損マウスが作製され、そのマウスの臓器にはGalα1-3Gal構造が消失していることが確認された。マウスにおいて糖タンパク質上のGalα1-3Gal構造はGgta1遺伝子産物により合成されていると報告されており、今回の結果はそれを確認するものであった。一方で糖脂質上のGalα1-3Gal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 Galα1-3Gal 構造が無くなっているかどうかは不明である。血中糖タンパク質のみを対象とするならば今回作製した変異マウスだけで充分であると考えられるが、エクソソームの産生臓器も特定しようとするのであればA3galt2の遺伝子欠損マウスの作製も必要かも知れない。この点についてはエクソソームの単離とその糖脂質上の Galα1-3Gal 構造の有無を詳細に調べると同時に、バックアップとしてA3galt2の遺伝子欠損マウスの作製も検討する。

E.結論

Ggta1 遺伝子欠損により糖タンパク質上の Galα1-3Gal 構造が消失することが確認された。今後は遺伝子欠損マウスの繁殖と組織特異的Ggta1遺伝子発現マウスとの掛け合わせを行い、脳由来血中糖タンパク質の同定を進める。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

該当なし

G.知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

疾患モデル動物の作製に関する最先端技術の開発

研究代表者　竹尾　透 1)
研究分担者　中川佳子 1)，中潟直己 1)，笹岡邦俊 2)

1) 熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野、2) 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター / バイオリソース研究部門動物資源開発研究分野

研究要旨

近年、ゲノム編集技術の進歩は目覚ましく、世界中の研究施設において遺伝子改変マウスの作製が急増している。ゲノム編集技術で作製したマウスを用いて効果的に研究を展開するには、研究拠点が中心となり、研究リースと研究者のシームレスな連携を実現するマウスの作製、繁殖、保存および輸送システムを構築する必要がある。そこで本研究では、ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いた効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウス作製法の確立および作製された遺伝子改変マウスの輸送や繁殖、凍結保存等に有用な生殖工学技術の開発・改良に関する研究を実施した。

A. 研究目的

近年、TALEN（transcription activator-like effector nuclease）や clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) を利用したゲノム編集技術の発展は目覚ましく、受精卵へのマイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法などのデリバリー法と組み合わせることにより、簡便な遺伝子改変マウスの作製が可能となった。本研究では、当研究室の生殖工学技術と CRISPR-Cas システム、および、簡便なデリバリーシステムであるエレクトロポレーション法を用いた、効率的かつ簡素化されたゲノム編集個体作製法の確立を目的として研究を行う。また、作製後の遺伝子改変マウスの輸送や繁殖、凍結保存等に有用な生殖工学技術の開発・改良を目的として研究を行い、当研究室の生殖工学技術を活用した効率的な脳疾患関連遺伝子改変マウス作製および作製後の個体利用に役立つ生殖工学技術の開発・改良を行う。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

脳疾患動物モデルを効率的に作製・個体利用するため、遺伝子改変マウスの作製や繁殖、輸送、凍結保存などに有用な技術の開発を目的として研究を行った。

本研究室で開発した超過剰排卵誘起法を用いて体外受精を行い、凍結受精卵を作製後、合成 gRNA と Cas9 タンパク質複合体（ribonucleoprotein: RNP）のエレクトロポレーションに使用した。産子への発生率、変異導入効率共に良好なノックアウトマウスの作製を目的とし、エレクトロポレーションの条件検討やエレクトロポレーションを行うタイミング、偽妊娠雌マウスに移植する卵および胚のステージを検討した。また、得られる産子のモザイク率に与える影響について詳細な検討を行った。なお、本研究は、熊本大学動物実験委員会の承認を得て実施された。

C.研究結果

凍結受精卵の加温から数時間培養後、15-20V (3 ms ON + 97 ms OFF)でエレクトロポレーションを行い、受精卵あるいは2細胞胚を仮親へ移植することにより、産子への発生率、変異導入効率共に良好なノックアウトマウスの作製を行うことができた。20V のエレクトロポレーションを行うことにより、比較的モザイク率の低い変異個体を得ることができた。

D.考察

エレクトロポレーションの電圧条件を検討することにより、高い変異導入効率を維持しつつ、産子への発生率を改善することが可能であった。さらに、モザイク率の低い変異個体を得られる効率に差が生じることも確認できた。今後、ゲノム編集個体の作製を行う研究者の個体作製要望や技術者の作業効率改善など、目的に応じた条件で本法を応用していく予定である。

E.結論

これまでに私達は、マウス胚・精子の凍結保存法や凍結精子を用いた体外受精における受精率の向上、胚・精子の簡易冷蔵輸送など様々な生殖工学技術の開発、改良を行っており、当センターの生殖工学技術はグローバルスタンダードとしての地位を確立しつつある。また、精子や卵子についての基礎研究を行うことにより、作製後の個体利用に有用な生殖工学技術の開発・改良も行っている。近年、極めて多数の排卵卵子を採取することが可能な超過剰排卵誘起法を開発し、本法を用いた体外受精により作製した凍結受精卵と様々な CRISPR-Cas システムを利用して、効率的なゲノム編集個体の作製が可能であることも明らかにしてきた。現在、ゲノム編集技術を活用して遺伝子改変マウスの作製や繁殖、輸送、凍結保存等に有用な生殖工学技術の更なる改良を進めている。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

1. Mukunoki A, Takeo T, Nakagata N. N-acetyl cysteine restores the fertility of vitrified-warmed mouse oocytes derived through ultrasuperovulation. PLoS One. 2019;14:e0224087.
2. Yoshimoto H, Takeo T, Nakagata N. Simple Transportation of Genetically Engineered Mice via Cold Storage Techniques. Methods Mol Biol. 2020;2066:211-216.
3. Takeo T, Nakagata N. Cryobanking and Recovery of Genetically Modified Mice. Methods Mol Biol. 2020;2066:195-209.
4. Nakagata N, Takeo T. Basic mouse reproductive techniques developed and modified at the Center for Animal Resources and Development (CARD), Kumamoto University. Exp Anim. 2019;68:391-395.
5. Takeo T, Mukunoki A, Nakagata N. Ovulation of juvenile, mature, and aged female C57BL/6 mice following coadministration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin. Theriogenology. 2019;135:1-6.
6. Takeo T, Sztein J, Nakagata N. The CARD Method for Mouse Sperm Cryopreservation and In Vitro Fertilization Using Frozen-Thawed Sperm. Methods Mol Biol. 2019;1874:243-256.
7. Nakagata N, Sztein J, Takeo T. The CARD Method for Simple Vitrification of Mouse Oocytes: Advantages and Applications. Methods Mol Biol. 2019;1874:229-242.
8. Takahashi M, Ikeda K, Ohmuraya M, Nakagawa Y, Sakuma T, Yamamoto T, Kawakami K. Six1 is required for signaling center formation and labial-lingual asymmetry in

developing lower incisors. Dev Dyn. 2020;[Epub ahead of print]
9. Shindo R, Katagiri T, Komazawa-Sakon S, Ohmuraya M, Takeda W, Nakagawa Y, Nakagata N, Sakuma T, Yamamoto T, Nishiyama C, Nishina T, Yamazaki S, Kameda H, Nakano H. Regenerating islet-derived protein (Reg)3β plays a crucial role in attenuation of ileitis and colitis in mice. Biochem Biophys Rep. 2020;21:100738

2.学会発表

1. マウスの保存・作製・輸送における生殖工学技術の活用術
   第66回日本実験動物学会 2019年5月15日
2. Mouse Reproductive Technology
   TT2019 Workshop 2019年4月11日
3. 凍結受精卵加温後のエレクトロポレーションを行うタイミングが産子のモザイク率に与える影響について
   日本ゲノム編集学会 第4回大会 2019年6月4日
   第66回日本実験動物学会総会 2019年5月15日

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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)

1）東海国立大学機構 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が、最近記憶の制御にも重要であることが明らかになってきた。これらの神経細胞を光遺伝学・薬理遺伝学等を用いて操作し、睡眠覚醒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。視床下部の神経細胞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。

A.研究目的

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

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、オレキシンを産生するオレキシン神経に着目して解析を行う。オレキシン神経特異的に Flippase recombinease を発現する遺伝子改変マウス(Orexin-Flippase マウス)を用いて、オレキシン神経特異的に遺伝子発現を誘導する。Orexin-Flippase マウスを様々な神経細胞に Cre を発現する遺伝子改変マウスと交配させて Bigenic マウスを作成し、Cre 依存的な遺伝子発現と組み合わせることによって、異なる 2 種類の神経細胞に別々の遺伝子を発現させる。光遺伝学適用のために、チャネルロドプシン２(ChR2)を発現させ、特定神経を光で活性化し、オレキシン神経から記録を行うことで、特定神経からの入力と、それに対するオレキシン神経の反応様式を明らかにすることができる。まずは、GABA 作動性神経特異的に Cre を発現する GAD67-Cre マウスを用いて、それらの神経細胞からの入力がオレキシン神経においてどのような作用を示すのかについて明らかにする。これらの研究によって、オレキシン神経を中心とした神経回路とその動作原理が明らかになると考えられる。オレキシン神経は睡眠覚醒調節において覚醒レベルの調節に関わっていることが知られており、それらがどのような神経細胞によって調節されているのかが明らかになると考えられる。また、睡眠中の記憶制御における役割について、様々な記憶を評価できる実験系と操作を組み合わせて明らかにする。

C.研究結果

光遺伝学、化学遺伝学を用いて報酬に関わるドーパミン神経が存在することで知られている腹側被蓋野の GABA 作動性神経(VTA-GABA 神経)が、ノンレム睡眠調節に関わっていることを明らかにした。オレキシン神経と VTA-GABA 神経は比較的近い脳領域に存在する。近接する異なる 2 種類

の神経細胞に異なる遺伝子を発現させるために、Cre リコンビナーゼと Flippase(Flp)リコンビナーゼを用いた。Flp は Cre が認識する loxP 配列とは異なる FRT 配列を認識して組換えを誘導する。そこで、オレキシン神経特異的に Flp を発現するマウスと GAD-Cre マウスを交配させて、バイジェニックマウス Orexin-Flp; GAD-Cre マウスを作成した。Flp 依存的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現する AAV を視床下部に局所注入し、Cre 依存的に ChR2 を発現する AAV を VTA に局所注入することで、オレキシン神経が赤色蛍光タンパク質を発現し、VTA-GABA 神経が ChR2 を発現する遺伝子改変マウスを作成した。このマウスから脳スライス標本を作成し、赤色蛍光でオレキシン神経を同定してルーズセルパッチクランプ記録によって、活動電位頻度をモニターしながら青色光を照射して視床下部に投射する VTA-GABA 神経軸索末端を活性化すると、オレキシン神経活動が青色光パルス頻度依存的に抑制された。さらに、インビボにおいて同マウスの視床下部に光ファイバーを両側留置し、青色光照射を行って視床下部に投射する VTA-GABA 神経軸索末端を活性化させると、ノンレム睡眠が誘導されることが明らかになった。

D. 考察

VTA のドーパミン神経は、覚醒、報酬や依存などに関わることが知られている。今後の研究によって、VTA-GABA 神経とドーパミン神経との機能連関が明らかになると、睡眠覚醒調節における VTA-GABA 神経の役割の理解がさらに進むほか、ベンゾジアゼピン系の睡眠薬が依存を形成するメカニズム解明などに繋がる可能性が考えられる。

E. 結論

以上の結果から、VTA-GABA 神経活動がノンレム睡眠の開始と維持に重要な役割を持っており、視床下部のオレキシン神経活動抑制がノンレム睡眠誘導の主要な経路であ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. eLife, 8: 44928, 2019.
2. eLife, 8: 44927, 2019.
3. IBRO Rep, 7:1-9, 2019.
4. Brain Res, 1719:243-252, 2019.
5. Sci Rep, 9(1): 7863, 2019.
6. Commun Biol, 2(1): 232, 2019.
7. Eur J Pain, 23(10): 1801-1813, 2019.
8. Neuropharmacology, 9: 107703, 2019.
9. Science, 365(6459): 1308-1313, 2019.
10. J Neurosci, 39(47): 9435-9452, 2019.
11. Neurochem Int, 129: 104494, 2019.
12. Addict Biol, 25(1): e12723, 2020.
13. Neuropharmacology, 166: 107968, 2020.
14. Mol Brain, 13(1): 14, 2020.
15. Sci Rep, 10(1): 3191, 2020.

2. 学会発表

1. Yamanaka A. Optogenetics as a tool to understand regulatory mechanism of sleep and memory by the hypothalamic neurons. IBRO APRC School 2019, 2019.4. (Kerala, India)
2. 山中章弘. 睡眠覚醒調節神経と痛みの制御. 第 13 回日本緩和医療薬学会年会, 2019.6 .（千葉）
3. 山中章弘. レム睡眠を調節する神経回路の機能と操作. 日本睡眠学会第 44 回定期学術集会, 2019.6. （名古屋）
4. 山中章弘. 神経活動操作による睡眠覚醒調節神経の機能的同定. 日本睡眠学会第 44 回定期学術集会, 2019.6.（名古屋）
5. 山中章弘. 睡眠覚醒状態変化に関わる神経回路の機能的同定. 第 42 回日本神経科学大会, 2019.7.（新潟）
6. Yamanaka A. Role of MCH neurons in the regulation of metabolism, sleep/wakefulness and memory. **国際シンポジウム**「Sensing food/nutrient/environment toward integrative metabolic regulation」, 2019.7. (Okazaki, Japan)
7. Yamanaka A. Functional interaction between the hypothalamus, septum and hippocampus to regulate sleep and memory. NUS Physiology Research Seminar, 2019.8. (Singapore)
8. Yamanaka A. Role of REM sleep on memory. Cold Spring Harbor Asia Neurobiology of Behavior & Neuropsychiatric Disorders, 2019.9. (Jiangsu, China)
9. Yamanaka A, Izawa S. REM sleep active MCH neurons are involved in forgetting hippocampus-dependent memories. IBRO 2019, 2019.9. (Daegu, Korea)
10. 山中章弘. MCH neurons impaired memories during REM sleep. 第 11 回光操作研究会, 2019.9. （名古屋）

11. Yamanaka A. MCH neurons impaired memories during REM sleep. 2019 Chinese Sleep Research Society (CSRS) Annual Academic Conference, 2019.10. (Jinan, China)
12. 山中章弘. MCH neurons impaired memories during REM sleep. 理化学研究所セミナー, 2019.10. (和光)
13. Yamanaka A. REM sleep active MCH neurons are involved in forgetting hippocampus-dependent memories. 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2019.10. Fukuoka, Japan.
14. 山中章弘. ファイバーレス光遺伝学の開発とその応用による神経回路機能の同定. 異分野融合による次世代光生物学 研究会, 2019.11. (岡崎)
15. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠覚醒と記憶の制御. 第 218 回精神科医会及び第 174 回学術講演会, 2020.2. (高知)

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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) 3)]

研究分担者　柿田　明美[2)]　矢部　博興[1)]、日野　瑞城[1)]、長岡　敦子[1)]、泉　竜太[1)]

那波　宏之[2)]、吉川　武男[4)]、廣川 信隆[5)]、星野 幹雄[6)]

[1)] 福島県立医科大学　[2)] 新潟大学脳研究所　[3)] 福島県立医科大学会津医療センター

[4)] 理化学研究所　[5)] 東京大学　[6)] 国立精神神経医療研究センター

研究要旨

本研究の目的は、統合失調症をはじめとする精神疾患脳病態における神経伝達システム関連分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子の異常について死後脳を用いて明らかにすることである。本研究では、統合失調症をはじめとする精神疾患発症のメカニズム解明を目的として患者死後脳内分子の分子プロファイル解析を行う。すなわち、これまで代表者らが統合失調症死後脳組織を用いて分析を進めてきたドパミン系・グルタミン酸・GABA系の分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子について、それらの死後脳における分子プロファイル（遺伝子発現やタンパク発現及びエピジェネティクスパターン）をエンドフェノタイプとして、各々の遺伝子多型と関連を解析するというアプローチ（ジェネティックニューロパソロジー）を通して精神疾患病態の鍵となる分子や治療標的分子を同定する。

A. 研究目的

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

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

福島精神疾患死後脳バンクにおいて凍結保存された死後脳及び新潟大学脳研究所保管の年齢、性別、死後時間等をマッチさせた非精神神経疾患対照例を測定対象として、神経伝達システム関連分子や細胞内代謝・ダイナミクス制御関連分子について、脳内の複数の部位を用いて ELISA、ルミネックス法によるタンパク発現解析、in situ 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

これまで福島精神疾患死後脳バンク保管の統合失調症群とマッチした新潟脳研保管の健常対照死後脳（前頭、側頭、後頭）28 例について、下記解析に使用可能な状態に試料調整を完了し、使用可能な試料は最大で統合失調症 24 例、双極性障害 8 例、健常対照 36 例、その他 8 例となった。福島及び新潟脳研で別々に集積された試料が比較可能であることを検証するため、ユビキタスな分子(GFAP,GAPDH)の発現量の比較解析を行い、二施設間で発現量に有意な差がないことを確認した(論文作成中)。また、上記に追加して令和元年 10 月 10 日 - 11 日に前頭前皮質、尾状核計 26 例の採取作業を行い、提供いただいた。

上記死後脳試料を用いて、DSCAML1、S6、mTOR、AUTS2 について前頭皮質､側頭皮質における ELISA によるタンパク質発現解析を順次行い、統合失調症群において前頭及び側頭での S6 の低下、前頭での mTOR 増加を見出した（論文作成中)。また、KIF3A、KIF3B、KAP3、KIF17、CRMP2、NR2A、NR2B を含む 20 種のタンパク質について、統合失調症及び健常対照約 30 例に対して direct ELISA で脳内の発現量の定量により疾患関連タンパク質のスクリーニングを行い、direct ELISA で定量が困難だった分子については、sandwich ELISA 法でより精密な定量を順次行った。その結果、統合失調症群において、側頭での NR2A の増加、前頭での KIF3A の低下、前頭及び側頭での CRMP2 の低下を見出した（論文投稿中)。また、過硫化ストレス仮説の検証として、統合失調症 24 例、双極性障害 7 例、コントロール 31 例の解析を行い、統合失調症死後脳における MPST タンパク質の高発現は生前の臨床症状の重篤さに関連すること、統合失調症死後脳におけるベタイン含量の低下・メチル化指数 (SAM/SAH)の低下、酸化ストレスの一種であるカルボニルストレスの亢進などを明らかにし、それぞれ国際誌に報告した（EMBO Molecular Medicine 2019、EBioMedicine 2019)。更に、*Mpst* KO および *Mpst* Tg マウスの RNA-seq データを結合して IPA 解析して検出された、DARPP-32-dopamine pathway に着目し、統合失調症死後脳でのタンパク発現解析を行ったところ、前頭において DARPP-32 とその活性を調節する calcineurin の発現バランスが著しく乱れていること、側坐核における calcineurin の発現を、若年発症で人当たりが柔らかく陰性症状が軽度といった臨床特徴を示す *DRD2* Ser 311 Cys 多型（rs1801028）が予測することを明らかにし、この多型の過硫化ストレスのバイオマーカーとしての可能性を示した（Sci Rep 2019)。

D.考察

E.結論

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

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

1. Ono CT, Yu Z, Kikuchi Y, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Nagaoka A, Ito J, Iwasaki Y, Hagihara H, Miyakawa T, Yoshida M, Saito Y, Niwa SI, Yabe H, Kakita A, Tomita H. A minimal amount of tissue-based pH measurement to improve quality control in

neuropsychiatric postmortem brain studies.Psychiatry Clin Neurosci. 2019;73(9):566-573.

2. Ohnishi T, Balan S, Toyoshima M, Maekawa M, Ohba H, Watanabe A, Iwayama Y, Fujita Y, Tan Y, Hisano Y, Shimamoto-Mitsuyama C, Nozaki Y, Esaki K, Nagaoka A, Matsumoto J, Hino M, Mataga N, Hayashi-Takagi A, Hashimoto K, Kunii Y, Kakita A, Yabe H, Yoshikawa T. Investigation of betaine as a novel psychotherapeutic for schizophrenia. EBioMedicine. 2019;45:432-446.
3. Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Nagaoka A, Nawa H, Kakita A, Akatsu H, Hashizume Y, Yabe H. Differential protein expression of DARPP-32 versus Calcineurin in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in schizophrenia and bipolar disorder. Sci Rep. 2019 ;9(1):14877.
4. Ide M, Ohnishi T, Toyoshima M, Balan S, Maekawa M, Shimamoto-Mitsuyama C, Iwayama Y, Ohba H, Watanabe A, Ishii T, Shibuya N, Kimura Y, Hisano Y, Murata Y, Hara T, Morikawa M, Hashimoto K, Nozaki Y, Toyota T, Wada Y, Tanaka Y, Kato T, Nishi A, Fujisawa S, Okano H, Itokawa M, Hirokawa N, Kunii Y, Kakita A, Yabe H, Iwamoto K, Meno K, Katagiri T, Dean B, Uchida K, Kimura H, Yoshikawa T. Excess hydrogen sulfide and polysulfides production underlies a schizophrenia pathophysiology. EMBO Mol Med. 2019:e10695.
5. 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.細胞,51(14): 733-736, 2019.
6. 國井泰人.精神疾患死後脳研究の実際.日本生物学的精神医学会誌,30(4):163-167,2019.
7. Nagaoka A, Kunii Y, Hino M, Izumi R, Nagashima C, Takeshima A, Sainouchi M, Nawa H, Kakita A, Yabe H. ALDH4A1 expression levels are elevated in postmortem brains of patients with schizophrenia and are associated with genetic variants in enzymes related to proline metabolism. J Psychiatr Res. 2020 Feb 6;123:119-127.

2.学会発表

1. 泉 竜太、國井 泰人、渡邉　千明、長岡 敦子、日野　瑞城、矢部　博興：福島精神疾患ブレインバンクにおける自殺予防の取り組み. 第 14 回日本統合失調症学会,札幌,2019/4/19
2. 平井 志伸、新井 誠、三輪 秀樹、國井 泰人、日野 瑞城、長岡 敦子、矢部 博興、岡戸 晴生：栄養環境と遺伝的要因の組み合わせにより生じる新たな統合失調症モデルマウスの 作製とその発症機序の解析. 第 14 回日本統合失調症学会,札幌,2019/4/20
3. 湯川尊行、岩倉百合子、武井延之、斎藤摩美、渡部雄一郎、豊岡和彦、五十嵐道弘、新里和弘、大島健一、國井泰人、矢部博興、松本純弥、和田明、日野瑞城、入谷修司、丹羽真一、竹内亮子、高橋均、柿田明美、染矢俊幸、那波宏之：統合失調症患者における脳内コンドロイチン硫酸鎖の変化.第 115 回日本精神神経学会総会学術総会,新潟,2019/6/20
4. 坂井美和子、渡部雄一郎、染矢俊幸、荒木一明、澁谷雅子、新里和弘、大島健一、國井泰人、矢部博興、松本純弥、和田明、日野瑞城、橋本健志、菱本明豊、北村登、入谷修司、白川治、前田潔、宮下哲典、丹羽真一、高橋均、柿田明美、桑野良三、那波宏之；統合失調症患者の脳内ゲノムにおけるコピー数変異の評価.115 回日

本精神神経学会総会学術総会, 新潟, 2019/6/21

5. 國井泰人、長岡　敦子、泉 竜太、日野瑞城、矢部　博興：特別ポスター, 福島県立医科大学神経精神医学講座の研究死後脳研究. 第115回日本精神神経学会総会学術総会, 新潟, 2019/6/21
6. 國井泰人：若手研究者育成プログラム交流会, ヒト研究 - 精神疾患死後脳研究の実際 - . 第 41 回日本生物学的精神医学会, 新潟, 2019/6/22
7. 岩倉百合子、原範和、川原玲香、外山英和、稲葉洋芳、小林雄太朗、北山栄子、柿田明美、高橋均、國井泰人、日野瑞城、矢部博興、池内健、喜田聡、那波宏之：統合失調症とそのモデル動物における聴覚皮質過活動の分子プロファイル. NEURO2019, 新潟, 2019/7/26
8. 國井泰人：共催シンポジウム 01 今日の統合失調症研究. 統合失調症における死後脳研究. 第 49 回日本臨床神経生理学会, 福島, 2019/11/28

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。

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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（D1R）と D2 受容体（D2R）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。2019 年度は、D2R 発現ニューロンの NMDA 受容体における Mg^{2+} ブロック機構が機能しない遺伝子改変マウス GEMA において、線条体 D2R 発現ニューロンの投射先である淡蒼球外節の神経活動を記録した。大脳皮質運動野の電気刺激に対する応答を調べたところ、野生型では早い興奮－抑制－遅い興奮の 3 相性の応答が観察されるが、GEMA マウスでは 3 相性応答のうち抑制と遅い興奮が増大していることから、「間接路」を介する情報伝達が増強されていることが示唆された。

A. 研究目的

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、パーキンソン病の病態解明とより効果的な治療法の開発を目指す。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究では主に、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（D2 受容体(D2R)の発現は正常で D1 受容体(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、2019 年度は D2R ノックダウンマウスの作製を待つ間、比較のために、D2R 発現ニューロンのグルタミン酸 NMDA 受容体における Mg^{2+} ブロック機構が機能しない遺伝子改変マウス GEMA の神経活動の解析を行った。麻酔下において手術を行い、頭部固定器具をマウスの頭蓋骨に装着しておく。また、大脳皮質運動野の上肢および口腔顔面領域を同定して刺激電極を埋め込み留置する。マウス頭部を固定器具により無痛的にステレオ装置に固定し、大脳基底核ニューロンの活動を覚醒下で記録する。ドーパミン作動性神経細胞の主な投射先は、大脳基底核の入力部である線条体であるが、D2R は間接路ニューロンに発現しているので、その投射先である淡蒼球外節(GPe) から神経活動の記録を行い、野生型マウス、および、2018 年度に解析した D2R ノックアウトマウスとの比較を行った。

C.研究結果

GEME マウスの淡蒼球外節ニューロンの自発発火頻度は 56 Hz で、野生型マウス(52 Hz)およびD2R ノックアウトマウス(54 Hz)と異ならなかった。また、大脳皮質運動野の電気刺激に対する応答を調べたところ、早い興奮－抑制－遅い興奮の 3 相性の応答が観察されるが、GEMA マウスでは 3 相性応答のうち抑制の増大と遅い興奮の著しい延長が観察された。

D.考察

淡蒼球外節における皮質由来の早い興奮は大脳皮質－視床下核－淡蒼球外節路を、抑制は大脳皮質－線条体－淡蒼球外節路を、遅い興奮は大脳皮質－線条体－淡蒼球外節－視床下核－淡蒼球外節路を介して伝達されることから、GEMA マウスでは大脳皮質から線条体間接路ニューロンを介して淡蒼球外節に到る情報伝達が増強されていることが示唆された。線条体の間接路ニューロンは D2R を発現することが知られているが、GEMA マウスでは D2R 発現ニューロンのグルタミン酸 NMDA 受容体における Mg^{2+} ブロック機構が機能しないため、間接路ニューロンが大脳皮質の電気刺激に対して過剰な興奮を生じた結果、抑制と遅い興奮が増強したと考えられる。さらに、GEMA マウスにおける皮質由来の応答様式は、D2R ノックアウトマウスで観察されたものと類似していた。D2R ノックアウトマウスの神経活動の解析結果から、このマウスでは神経細胞の興奮を抑制するように働く D2R を介するドーパミン神経伝達消失しているため、D2R を発現している間接路ニューロンの興奮性が増大した結果、皮質由来の抑制と遅い興奮が増強されたと考察した。今回得られた GEMA マウスの解析結果は、D2R ノックアウトマウスにおける考察を裏付けるものである。

E.結論

GEMA マウスでは D2R 発現ニューロンのグルタミン酸 NMDA 受容体における Mg^{2+} ブロック機構が機能しないため、D2R を発現している線条体の間接路ニューロンが、大脳皮質の電気刺激に対して過剰な興奮を生じ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

2.学会発表

Saito N, Hara S, Tainaka K, Sato A, Abe M, Kawamura M, Yamaguchi S, Chiken S, Ichinose H, Sakimura K, Nambu A, Sasaoka T (2019.7.27) Elucidation of motor control mechanism by dopamine using genetically modified mice harboring tetracycline regulated expression of dopamine D1 receptors. Neuro 2019（新潟）

Chiken S, Nambu A (2019.7.27) Abnormal information processing through the cortico-basal ganglia pathways is responsible for parkinsonian symptoms. Neuro 2019 シンポジウム”New understanding of functions of basal ganglia in health and disease”（新潟）

Chiken S, Nambu A (2019.11.15) Dopaminergic transmission maintains dynamic activity changes in the basal ganglia to control appropriate movements。The 9th NIPS/CIN Joint Symposium（岡崎）

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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

研究代表者氏名　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 (DGLα)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・組織学的に明らかにすることを目的とした。平成 31 年度はコンディショナルノックアウトマウスを作出し、歯状回顆粒細胞の発達および興奮性の制御に対する顆粒細胞由来の 2-AG の役割を検討した。

A.研究目的

内因性カンナビノイドは生体において合成される脂質メディエーターであり、中枢神経系においてはシナプス前終末に発現する CB_1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 DGLα 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）

新潟大学において作出した DGLα flox マウスを POMC-Cre マウスや Nestin-CreER^{T2} マウス, Cre 特異的 mCherry 発現マウスと交配することにより、顆粒細胞特異的に DGLα を欠損したコンディショナルノックアウトマウスや、DGLα を欠損した細胞で蛍光タンパクが発現するマウスを作出した。

次に成体の Nestin-CreER^{T2}: DGL α flox: mCherry マウスにタモキシフェン 2mg/日を 5 日間腹腔内投与し、Nestin 陽性神経幹細胞において DGLα を欠損させ、かつ同細胞で蛍光タンパクである mCherry を発現させた。タモキシフェン投与 5 週間後に 4%パラホルムアルデヒドで脳を還流固定後、スライス標本を作製し、mCherry 陽性の顆粒細胞の数や樹状突起の発達を確認した。対照群として DGLα flox ではなく野生型の DGLα をもつ Nestin-CreER^{T2}: mCherry マウスを用いた。

また、歯状回の神経回路の興奮性に対する顆粒細胞由来の 2-AG の影響を明らかにするため、成体の POMC-Cre:DGLα flox マウスにカイニン酸 (30mg/kg) を腹腔内投与し、急性のけいれん発作を誘発した。歯状回の興奮性の指標として、カイニン酸投与による急性のてんかん発作の出現率と潜時を測定した。対照群として、同腹の Cre をもたない DGLα flox マウスを用いた。また歯状回顆粒細胞特異的に DGLα が欠損していることを確認するために、実験後にマウスを還流固定し、DGLα の免疫染色を行った。

C.研究結果

Nestin-CreER^{T2}: DGLα flox: mCherry マウスにおいて mCherry 陽性の 5 週齢の新生顆粒細胞の数や形態を解析したところ、対照群と比較して新生細胞の数に有意な変化は認められなかった。また、新生顆粒細胞の樹状突起の形態にも明らかな異常は認められなかった。

次に、POMC-Cre:DGLα flox マウスを用いて、歯状回顆粒細胞全体で DGLα が欠損した場合の、歯状回の興奮性を測定した。カイニン酸投与による急性のてんかん発作の出現率と潜時を測定したところ、POMC-Cre:DGLα flox マウスにおいて発作の出現率が有意に低下し、発作潜時が有意に短縮していた。したがって、歯状回顆粒細胞で 2-AG が産生されないと、歯状回の興奮性が高まることが明らかとなった。

D.考察

本年度の研究の結果から、成体の海馬神経新生において、細胞発達初期から 2-AG の産生がおこなわれない場合でも、その細胞の生存や樹状突起の発達に与える影響は小さい可能性が示唆された。過去の研究で DGLα が神経幹細胞に発現していることが免疫染色により確認できているので、令和 2 年度以降は新生顆粒細胞の樹状突起、軸索の発達に対する 2-AG の影響をより詳細に解析する。

一方、成長後の顆粒細胞において 2-AG が産生されないと、急性発作モデルにおける過剰な興奮は著しく上昇したことから、2-AG は顆粒細胞の興奮性を強く抑制していることが示唆された。令和 2 年度以降は記憶・学習試験やシナプス可塑性の誘発実験をこれらのマウスで行い、歯状回顆粒細胞やその中でも新生顆粒細胞由来の内因性カンナビノイドシグナルが海馬依存性の記憶・学習において果たす役割を明らかにする。

E.結論

歯状回顆粒細胞で産生される内因性カンナビノイド 2-AG は、それを産生する神経細胞の生存・発達に必須ではないが、歯状回の過剰な興奮を強く抑制する。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

なし

2.学会発表

1. Production of 2-arachidonoyl glycerol in granule cells of the dentate gyrus ameliorates kainate-induced seizures. Yuki Sugaya, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Masanobu Kano. Cannabinoid function in the CNS: Gordon research conference・2019 年 7 月 21～26 日・Castelldefels, Spain

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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、ミクログリアの関与も注目されている。タウの C 末端断片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 脳の不溶性画分に存在する C 末端断片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 の脳で見出された断片と類似の配列を持つことがわかった。また、培養細胞を用いた細胞間タウ伝播モデルを構築し、ミクログリアがタウの伝播にどのように関与するか検討した結果、ミクログリアが伝播を抑制する可能性を見出した。今後は in vitro および in vivo モデルを用いてより詳細な伝播メカニズムの解明・および伝播におけるミクログリアの役割を明らかにしたい。

A. 研究目的

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いる。申請者は野生型ヒトタウタンパクを過剰発現するタウオパチーモデルマウス Tg601 において加齢に伴い増加するタウ C 末端断片（Tau-CTF）を見出し、Tau-CTF が全長タウ（Tau-FL）と比較して極めて高い凝集能・伝播能を示すことを報告した。AD 患者脳サンプルを用いたウエスタンブロッティングによる検討の結果、ヒトでも類似の Tau-CTF が検出されたことから、これらの Tau-CTF が AD 病態の進展・悪化に寄与する可能性が考えられた。一方で、タウ病理の周囲には活性化されたミクログリアの集積が観察されることから、Tau-CTF を含む病的凝集タウがミクログリアに作用することでタウの伝播や神経炎症を促進し病態進行に関与する可能性が考えられる。

そこで本研究では、ヒト AD 脳のサルコシル不溶性画分に含まれる Tau-CTF のアミノ酸配列を決定すること、さらにヒト AD 脳由来 Tau-CTF が、MG への作用を介して神経炎症や病態の進行に寄与するか明らかに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. ヒト AD 脳のホモジネートからサルコシル不溶性画分を調製し、SDS-PAGE 電気泳動により分離した。タウの C 末端（404-441）を認識する抗体 T46 を用いたウエスタンブロッティングにより Tau-CTF に相当するバンドのサイズを推定しゲルから切り出し、トリプシン、キモトリプシン、V8、Asp-N、Lys-C によるゲル内消化を行い質量分析による解析を行った。

2. ヒト神経芽腫由来細胞株である SH-SY5Y の細胞内タウ蓄積モデルを用いて、ヒト AD 脳由来不溶性タウが細胞間伝播するかどうかを検討した。また、ミクログリア細胞株である BV-2、および初代培養ミクログリアとの共培養が、タウの伝播・蓄積に与える影響を検討した。

C. 研究結果

1. AD 患者由来の側頭葉新皮質からサルコシル不溶性画分を調製し SDS-PAGE 電気泳動を行い、ウエスタンブロッティングおよび CBB 染色を行った。タウの C 末端断片に相当すると推測される分子量約 21,25,35kDa のバンドを切り出してゲル内消化を行い質量分析に供した結果、タウ由来のペプチドが検出された。今回の解析により検出されたペプチドは主に 181aa〜406aa の C 末端側に集中しており、N 末端側の断片はほとんど見られなかった。

2. EGFP-タウを過剰発現させた SH-SY5Y に、ヒト AD 脳由来不溶性タウを導入することによって EGFP-タウの細胞内蓄積を誘導したドナーSH-SY5Y と、mCherry-タウを過剰発現させたアクセプターSH-SY5Y との共培養による細胞間伝播モデルを構築した。その結果、アクセプターSH-SY5Y のサルコシル不溶性画分に mCherry-タウが検出された。また、フローサイトメトリーによる検討の結果、EGFP-タウと mCherry-タウのダブルポジティブ細胞が検出された。さらに、上記の細胞間伝播モデルと BV-2 あるいは初代培養ミクログリアとの共培養により、アクセプターSH-SY5Y における不溶性 mCherry-タウの細胞内蓄積が低減する傾向が見られた。

D. 考察

1. AD を含むタウオパチーでは、サルコシル不溶性のタウ凝集体が検出される。いずれの疾患においても、タウの C 末端断片が検出されており、これらの C 末端断片は自己凝集に必要である微小管重合ドメインを含むことから、凝集性・伝播能の亢進を通じてタウオパチー病態を促進する可能性が考えられる。本研究では、有用な培養細胞モデルおよび動物モデルを構築することを目的として、質量分析により実際のヒト AD 脳に含まれるタウ C 末端断片の同定を試みた。その結果、今回切り出した約 21, 25, 35 kDa のいずれのバンドにおいても、主に 181aa-406aa に分布するタウ由来のペプチドが検出された。この配列は Tg601 マウスで見出された Tau-CTF（243aa-441aa）と同様に、凝集体形成に寄与する微小管重合領域を含むことから、ヒト AD 脳においても Tau-CTF と類似の凝集しやすい C 末端断片が蓄積していることが示唆された。以上の結果を受けて、タウオパチーモデルマウスとして有用であると考えられる Tau-CTF 過剰発現マウスの作出を進めている。

2. タウの細胞間伝播にミクログリアが関与する可能性を検討するために、SH-SY5Y を用いた細胞間伝播モデルと、ミクログリアとの混合培養モデルを構築した。ヒト AD 脳由来不溶性タウを導入し EGFP-タウの細胞内蓄積を誘導したドナーSH-SY5Y を、mCherry-タウを発現させたアクセプターSH-SY5Y と共培養した結果、アクセプターSH-SY5Y 細胞内に不溶性の mCherry-タウが形成されたことから、ドナーSH-SY5Y 細胞内で形成された不溶性の EGFP-タウが何らかの形でレシピエント SH-SY5Y に伝播し、新たに mCherry-タウの細胞内蓄積を誘導したと考えられた。さらに、この細胞間伝播モデルに BV-2 あるいは初代培養ミクログリアを加えた結果、アクセプターSH-SY5Y における不溶性 mCherry-タウの細胞内蓄積が減少したことから、ミクログリアがドナー細胞から放出された不溶性タウを貪食するなどして細胞間伝播を抑制する可能性が示唆された。今後は、伝播するタウの追跡を通じて、ミクログリアがどのようにタウの伝播に関与しているのか検討したい。また、この伝播モデルにおいて、ミクログリアの機能が変化するかどうかを、TNF-α や IL-6 といった炎症性サイトカインの産生や CD68 等の活性化マーカーの発現を指標として検討したい。

E. 結論

1. 今回、ヒトAD脳に含まれるC末端断片も、タウオパチーモデルマウスで見出されたTau-CTF と同様に微小管重合領域を含む類似の断片であることを確認した。現在作出を進めているTau-CTF過剰発現マウスは、有用なタウオパチーモデルマウスとなり得る。

2. ヒト AD 脳由来不溶性タウと培養細胞を用いたタウの細胞間伝播モデルを構築した。また、不溶性タウの細胞間伝播がミクログリアにより抑制される可能性が示唆された。このモデルを用いることで、例えば TREM2 等の AD 危険因子が伝播に与える影響や、薬剤の効果などを in vitro で簡便に検討できると考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

遺伝子改変技術による生体リズム中枢の分子機構の解析

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

[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・動物資源開発研究分野

研究要旨

我々は、哺乳類時計遺伝子の生体リズム形成の中心となる *Period2* 遺伝子の制御領域の DNA 解析より、生体リズム発現のスイッチとなる DNA 配列を発見した。この部位の配列を変化させると、行動や体温の正しい生体リズムが維持されず、体内時計が間違った時刻を打つようになる。これまで、遺伝子のうち蛋白質をコードしない DNA 配列がなぜあるのか、また、実際の生体で役に立っているのかは、発生期の役割を除いてはほとんど解明されていなかった。今回、生体リズムという日常生活での基本的な生理現象で、ノンコーディング領域の DNA 配列の重要性を初めて明らかにしたものである。今年度の研究成果は、10 年以上にわたる新潟大学脳研究所と共同研究を開始した最初の課題であり、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みである 24 時間周期の生体リズム研究の、遺伝子改変マウスのプロジェクトの先見性と有効性を示すものと考えられる。

A. 研究目的

1984 年、生体リズムを司る時計遺伝子 *Period* が初めてショウジョウバエで単離された。その後、哺乳類でも同遺伝子の同定に種々の研究グループがチャレンジしたがかなわなかった。時代が変わり、1990 年に入ると、ヒトのゲノムの全塩基配列を解析するヒトプロジェクト（Human genome project）が開始され、意味のあるヒトの全遺伝子を単離しようとする機運が盛り上がってきた。その結果、1997 年、ヒト *Period* 遺伝子が単離された。そのホモローグ検索より、まもなく、ヒトやマウスの *Period* 遺伝子は *Per1*, *Per2*, *Per3* の 3 種からなることが明らかとなった。この３つの遺伝子とも、強い 24 時間の日内リズム発振を刻むことが明らかである。

では、この３つのうちどれが生体リズムの発振に重要であろうか。数年後、これらの遺伝子の遺伝子改変マウスの作成がなされ、その課題が決着した。その結果、*Per1* ノックアウトマウスではリズム周期の短縮を、*Per2* ノックアウトマウスではリズム周期の短縮から長期的には消失を、*Per3* ノックアウトマウスでは、リズム周期は正常であることが確認された。さらに、*Per1* と *Per2* のダブルノックアウトマウスでは、リズム周期の即座かつ完全な消失が確認された。以上のノックアウトマウスの生体リズムの検索の結果、*Per1* と *Per2* 遺伝子が生体リズム発振に関与していることが明らかである。特に、単独 *Per2* ノックアウトマウスは、徐々にではあるがリズム消失に至ることから、*Per2* 遺伝子が哺乳類においてはリズム発振の中枢を担う発振子であることは明らかである。

では、このリズムは、どのような機構で生ずるのであろうか？ハエの研究より、ショウジョウバエ *period* 遺伝子自身が、自分自身の発現を抑制するというフィードバック説が唱えられた。具体的には、このリズムは、*period* 遺伝子の 5’上流ノンコーディング領域のシスエレメントが仲介

する転写レベルのフィードバックループによって成立すると考えられている。 なお、2017 年ノーベル生理学 ・医学賞は、体内時計を生み出す遺伝子機構の発見に与えられた。

しかしながら、このモデルの論理的根拠は時計遺伝子の蛋白質コーディング領域を欠落させた遺伝学的見地に基づいており、実際にノンコーディング領域のシスエレメントを介したフィードバックループが生体のリズム形成に不可欠であるかどうかは大きな謎のままであった。

このような中、私共は今回、*Per2*遺伝子の発現を制御するノンコーディング制御領域の DNA 配列を変異させ、マウス個体の活動および体温の日内リズムの発現や維持に必要であるかどうかを検索した。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

体内時計の振動形成の中核機能を担う *Per2* 遺伝子の 5’上流プロモーター領域に存在するシスエレメント E’-box に点変異を導入したマウスを piggyBac トランスポゾンを用いた特殊な DNA 改変技術を駆使して作出し、遺伝子発現、タンパク質発現、体温・行動リズムを測定し、体内時計機構に関する、物質レベル、細胞レベル、生体レベルの研究成果を得た。

C.研究結果

(1) E’-box 点変異マウス m/m）の行動量と体温の日内変動を計測し、時計遺伝子のプロモーター領域のシスエレメントが成体の安定的な生体リズム形成に不可欠であることを明らかにした。

(2) 体内時計の最高位中枢器官である視交叉上核のスライスカルチャーおよび末梢臓器のスライスカルチャーにおける時計遺伝子発現リズムを計測し、組織自律的な生体リズム形成に時計遺伝子プロモーター領域のシスエレメントが不可欠であることを示した。

(3) 末梢組織から採取した初代培養細胞を用いて時計遺伝子の発現リズムを mRNA および蛋白質レベルにおいて追跡し、細胞自律的な概日リズム形成に時計遺伝子プロモーター領域のシスエレメントが必須であることを明らかにした。

D.考察

蛋白質をコードしないノンコーディング領域の DNA 配列だけを piggyBac トランスポゾンを用いて特異的に改変したという点が、従来の研究にはない本研究の独自性である。その結果、このマウスでは時計蛋白質自体は全く正常な状態のままで、リズムが消失してしまった。これにより、シスエレメントを介した転写制御が体内時計の発振にはなくてはならないことが明確に証明されたのである。

*period*遺伝子自身が、自分自身の発現を抑制するというフィードバック説はノーベル賞に輝いたが、その考え方に必ずしも沿ってはいない実験事実も近年報告されるようになった。原核生物であるシアノバクテリアにおいては、転写を阻害しても時計蛋白質のリン酸化が概日変動を示すことや（Science, 307, 251, 2005)、ヒトにおいても脱核し転写が行われない細胞である赤血球が酸化還元反応において概日リズムを示すことが報告され、従来のモデルに合わない分子時計機構の存在が議論され始めている(Nature, 469, 498, 2011; Nature, 485, 459, 2012; Nature, 532, 375, 2016)。

本研究は、自己フィードバック説の正当性を示すものである。生体リズム自身は、35 億年にも及ぶ生命進化に耐えて保存されているシステムである。地球の自転は紛れもなく生命が地上に出現する前から起こっており、その環境下で生命が出現する。従って、日周リズムの成立は、原初の生命が出現する以前の環境からあり、生物自身の発生にすら関与している可能性もある。従って、現存する生体リズム機構は、その種々のリズム発振機構を統合したシステムとして存在している可能性もある。今後も、生体リズムの遺伝子改変マウスを用いて、生体リズムの全貌の解明に迫りたい。

今年度の研究成果は、10 年以上にわたる新潟大学脳研究所と共同研究の結果であり、生命にとっ

て最も根源的な「時間」の仕組みである 24 時間周期の生体リズム研究の、遺伝子改変マウスのプロジェクトの先見性と有効性を示すものと考えられる。

E. 結論

生物の設計図であるゲノムには蛋白質をコードする領域とコードしない領域があり、後者はノンコーディング領域と言われ、その DNA 配列は生物の発生や進化の過程で重要であるとされる。しかし、発生の段階を過ぎた成体において、日常的な活動や生理機能の制御におけるノンコーディング領域の役割は、未だ大部分明らかではない。

時計の中心的な遺伝子である Per のノンコーディング領域の DNA 配列に着目した本研究は、体内時計の形成原理の根幹にかかわる重要な知見を提供するとともに、蛋白質をコードしない DNA 配列の成体における役割を日々の活動制御のレベルで明らかにした初めての成果と言える。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Masao Doi, Hiroyuki Shimatani, Yuta Atobe, Iori Murai, Hida Hayashi, Yukari Takahashi, Jean-Michel Fustin, Yoshiaki Yamaguchi, Hiroshi Kiyonari, Nobuya Koike, Kazuhiro Yagita, Choogon Lee, Manabu Abe, Kenji Sakimura & Hitoshi Okamura (2019). Non-coding cis-element of Period2 is essential for maintaining organismal circadian behaviour and body temperature rhythmicity. Nature Communications, 10:2563.

2. 学会発表

岡村均：哺乳類の睡眠覚醒リズムの分子機構、日本睡眠学会第 44 回定期学術集会・特別講演、名古屋国際会議場（名古屋)、2019 年 6 月 27 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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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　五十嵐　博中 [2)]

1）日本医科大学付属病院　脳神経内科　2）新潟大学脳研究所

研究要旨

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

A. 研究目的

脳梗塞による組織の細胞死に伴って自己由来の炎症が惹起されるが、これは病原体によるものではなく、無菌性炎症と呼ばれるものであり、病原性炎症と同様にミクログリア、好中球、マクロファージによる炎症が起こる。脳梗塞後の脳組織破壊によりペルオキシレドキシン(PRX)が細胞外に放出され、TLR 依存的にマクロファージや好中球を活性化に導くダメージ関連分子パターン（ damage-associated molecular patterns: DAMPs）として働く。DAMPs として働くタンパク質は HMGB1 が知られている。脳梗塞においても発症２−４時間以内に虚血に陥った脳細胞から HMGB1 が細胞外へ放出され、主に脳血液関門の破綻に関わることが明らかとなっており、我々は HMGB1 に注目した。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。

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 HGMB1 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。

C.研究結果

１．平均の飲水量は両群ともに一日 6mL で有意差を認めなかった。
２．抗生物質投与１４日間でマウスの体調に変化は認めず、死亡例はなかった。
３．虚血後２４時間の梗塞サイズにおいて、健常側比にて皮質、基底核および全脳いずれにおいても vehicle 群と抗生物質投与群に統計学的有意差を認めなかった。脳浮腫率においても、両群間で有意差を認めなかった。
４．虚血後 72 時間の梗塞サイズにおいて、健常側比にて皮質および全脳において vehicle 群と抗生物質投与群に統計学的有意差を認めた。脳浮腫率においては両群間で有意差を認めなかった。今後は、抗生物質投与群・非投与群にて脳梗塞前後でのマウス糞便の固さを定性的に評価し、継時的に比較すると同時に 16S rRNA メタゲノム解析を行い、細菌叢の変化を調べる。Positive control としてコレラトキシン投与マウスを用いる予定である。

D.考察

食物等を介して多数の異物が侵入する腸管は体内で最も大きなリンパ器官の一つであり、侵入異物の監視役を演じているものと推察される。腸管粘膜には全末梢リンパ球の６割、抗体産生性 B 細胞の８割が集結すると言われ、腸管上皮細胞や腸管上皮細胞間 T リンパ球（intestinal intraepithelial lymphocytes: IEL）が恒常的あるいは感染などの刺激に反応してサイトカインを発現している。

これらの粘膜免疫は消化管内だけではなく、全身の免疫システム制御に影響すると注目されている。一旦バランスが乱れた状態になると、全身の免疫系を過剰に活性化して自己免疫疾患などの炎症を悪化させることがわかっている。実際に我々は B 細胞を欠損するマウスに腸管上皮細胞の再生速度が著しく亢進することを発見した(Nishiyama Y et al. J Immunol 2002)が、この現象は広域スペクトルを持つ抗生物質を経口投与することにより正常化されることがわかった。すなわち、腸内細菌叢の変化が恒常性に変化を与えることが明らかとなった。

一方、脳梗塞は近年、組織炎症の一つであり、免疫系が大きく関与している可能性があるとの報告が相次いでおり、腸内細菌叢の変化が脳虚血のシステムに関連するかに注目した。抗生物質を２週間経口投与した後に脳虚血モデルを作成し、２４時間後の脳梗塞サイズおよび神経スコアを検証した結果は、vehicle 群と抗生物質投与群の間にいずれも有意な差を認めなかった。しかしながら、７２時間後の評価では、抗生物質を投与した群で梗塞サイズ縮小を認めた。これらの研究結果が抗生剤投与により炎症が制御され、腸管上皮細胞の DAMPs である HMGB1 減少し、炎症を制御することによる可能性をさらに追求したい。

E.結論

虚血後急性期に観察した梗塞サイズにおいては、両群での差が有意とならなかったものの、脳内に侵入した免疫担当細胞がさらに活性化する２４時間から７２時間で有意な差となって現れた。このことから、急性期に侵入する好中球ではなく、その後侵入する単球などの免疫担当細胞が影響している可能性がある。この差を見いだす一因として、腸管上皮細胞の損傷・細胞死を誘導し、上皮細胞質における HBGB1 核蛋白の発現を増加させ、損傷した上皮細胞からの HBGB1 の放出を促すことを検証していく予定である。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

孤発性 ALS 患者で見出された新規 microRNA の機能解析

研究代表者　保住　功 1)
研究分担者　栗田　尚佳 1)、 位田　雅俊 1)、柿田　明美 2)、北浦　弘樹 2)、田中　英智 2)

1) 岐阜薬科大学　薬物治療学　2) 新潟大学 脳研究所

研究要旨

これまでに亜鉛代謝と ALS 発症の関連が示唆されている。また、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、ALS 剖検にて顕著な増加が認められた *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。本年度は、*miR-5572* の ALS 治療標的としての可能性、亜鉛代謝との関連性を評価するための *in vitro* 実験系の準備を試みた。ALS モデル細胞に対して、*miR-5572* inhibitor を導入すると、変異 SOD1 凝集の減少が認められた。したがって、*miR-5572* は治療標的として有用である可能性が示された。また、キレート樹脂を用いた、亜鉛除去培地を作製することで、厳密に亜鉛量を制御できる *in vitro* 実験系の準備ができた。

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。本年度は、*miR-5572* の ALS 治療標的としての可能性、亜鉛代謝との関連性を評価するための *in vitro* 実験系の準備を試みた。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究は、新潟大学、岐阜大学および岐阜薬科大学倫理委員会承認のもと遂行された。家族性 ALS の原因遺伝子の１つである *SOD1* に蛍光タンパクの mCherry を融合した、SOD1 タンパクを発現するベクター、野生型 *SOD1* (*SOD1*^{WT})、変異型 *SOD1* (*SOD1*^{G85R}) ベクター、および miRNA inhibitor (Negative control inhibitor:NC 、 *miR-5572* inhibitor)を HEK293 細胞に、Lipofectamine2000 を用い、一過性に遺伝子導入した。遺伝子導入後、48 時間後の SOD1 凝集体を IN CELL ANALYZER 2200 にて、網羅的に解析した。亜鉛除去培地を作成するために、キレート樹脂である Chlex-100 を用い、胎仔ウシ血清(FBS)中の亜鉛を除去し、亜鉛除去 FBS を作製した。亜鉛除去 FBS 中の金属量は、FBS を湿式灰化後、原子吸光度計を用いて測定した。亜鉛除去 FBS を DMEM 培地に加えることで、亜鉛除去培地を作製した。次に、作製した亜鉛除去培地を基に、高亜鉛、および低亜鉛条件による細胞傷害を検討した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、亜鉛除去培地に、$ZnSO_4$ 0～200 μM、もしくは、細胞内亜鉛キレート剤である TPEN 0～50 μM を加え、24 時間後の細胞傷害を LDH assay を用いて検討した。また、細胞内ストレスマーカーの発現量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。

C.研究結果

まずは、前年度までに孤発性 ALS 患者より見出した *miR-5572* について、その治療標的としての可能性を検討するために、HEK293 細胞に変異 SOD1

G85R を導入した ALS モデル細胞に *miR-5572* inhibitor を導入し、細胞内凝集体変化を検討した。その結果、*miR-5572* inhibitor により、細胞内 SOD1 凝集体の減少が認められた（図 1）。したがって、*miR-5572* は ALS の治療標的として、有用である可能性が示された。

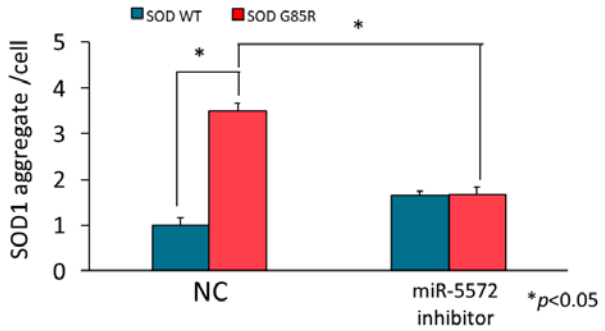


図1. ALSモデル細胞におけるmiR-5572 inhibitorの変異SOD1凝集に対する影響

これまでに我々は、ALS 患者の脊髄中の亜鉛輸送体、金属代謝関連タンパクのメタロチオネイン発現の減少、髄液中の亜鉛の上昇が確認し、亜鉛代謝と ALS 発症の関連を報告してきた。そこで、ALS 発症と亜鉛代謝との関連性をより詳細に検討するために、*in vitro* の実験系の構築を試みた。そのために、先行報告（Nishito Y and Kambe T., J Biol Chem, 2019; Kimura T et al., J Toxicol Sci, 2015）を基に、亜鉛除去培地の作製を検討した。培地中の亜鉛は FBS 由来がほとんどであるため、まずは FBS 中の亜鉛を金属キレート樹脂である Chelex100 で処理し、亜鉛を除去した。この Chelex100 処理後の FBS について、亜鉛濃度、およびこれまでに ALS に関与がある可能性があり、かつ Chelex100 にキレートされやすい、銅と鉄についても濃度を測定した。その結果、FBS 中の亜鉛は除去され、また含まれている量は少ないが、銅についても除去されていた（図 2）。また、FBS 中の亜鉛濃度を基に、培地中の亜鉛濃度を算出すると、約 4 µM の濃度で亜鉛が含まれていることが分かった。また、減少が認められた銅について、Chelex100 による減少分を加えた。今後の実験は、亜鉛除去 FBS を加えた DMEM 培地をベースにして、$ZnSO_4$ や細胞内亜鉛キレート剤の TPEN を加えることで、亜鉛代謝異常の影響を検討することとした。

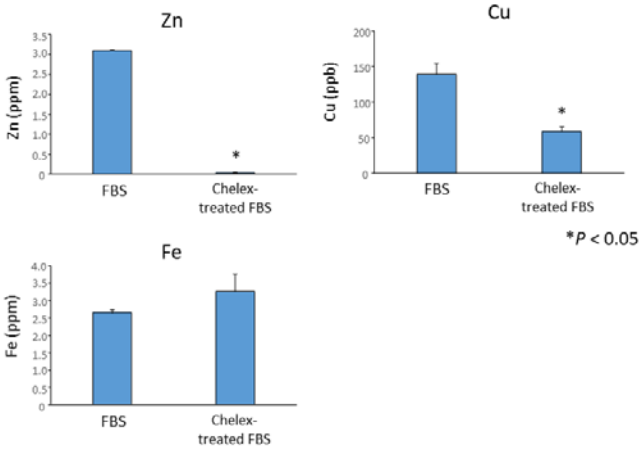


図2. Chelex 100処理FBS中の亜鉛、銅、鉄濃度の測定

続いて、作成した亜鉛除去培地を用いて、亜鉛代謝異常の影響を検討するために、SH-SY5Y 細胞を用いて、細胞傷害性を評価した。高亜鉛影響をみるために、種々の濃度の $ZnSO_4$, または低亜鉛状態を検討するために種々の濃度の TPEN を処置した。その結果、高亜鉛条件下では、$ZnSO_4$ 100 µM 以上の濃度で顕著な細胞傷害が認められた（図 3）。また、低亜鉛条件下では、TPEN 20 µM 以上の条件で顕著な細胞傷害が認められた（図 4）。また、この時の細胞内ストレスマーカーの遺伝子発現量の変化を、リアルタイム RT-PCR 法で測定したところ、今回の条件では、高亜鉛、低亜鉛ともに、変動は認められなかった（図 5, 図 6, 図 7 および図 8）。

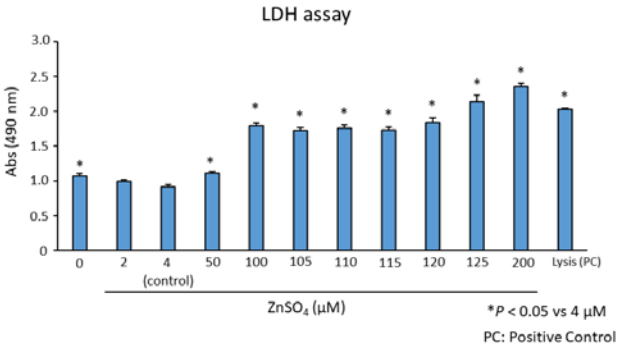


図3. 高亜鉛条件における細胞傷害の評価

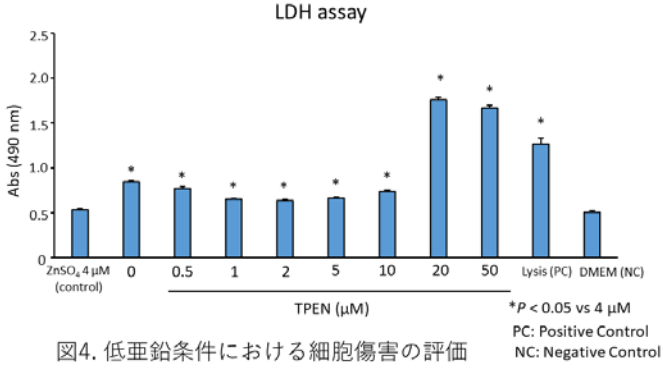


図4. 低亜鉛条件における細胞傷害の評価

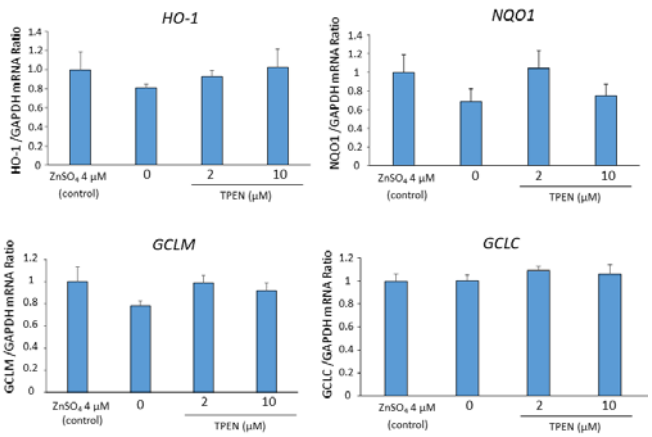


図5. 低亜鉛条件下での酸化ストレスマーカーの変化

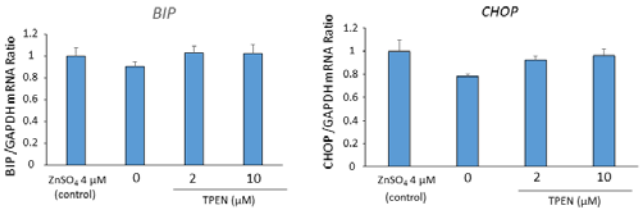


図6. 低亜鉛条件下での小胞体ストレスマーカーの変化

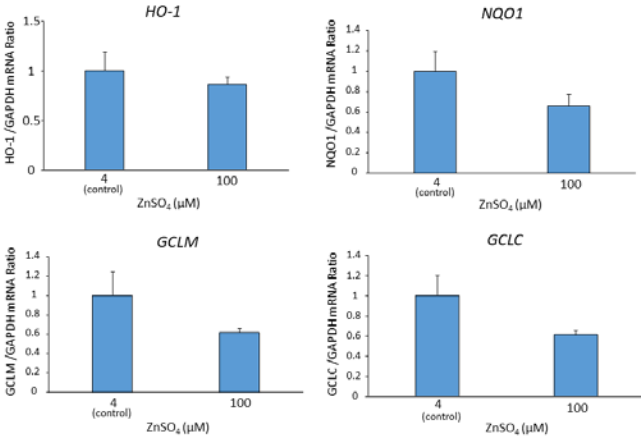


図7. 高亜鉛条件下での酸化ストレスマーカーの変化

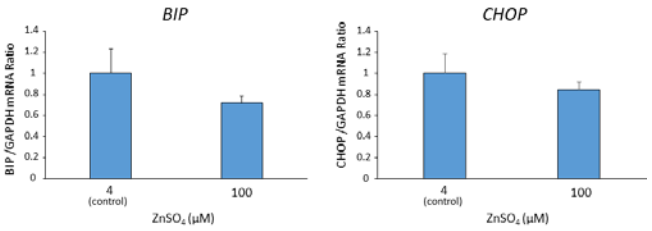


図8. 高亜鉛条件下での小胞体ストレスマーカーの変化

D. 考察

今回の結果より、孤発性 ALS 患者より見出した *miR-5572* が治療標的として有用である可能性が示唆された。また、キレート樹脂を用いた、亜鉛除去培地を作製することで、厳密に亜鉛量を制御できる *in vitro* 実験系の準備ができた。今回の条件では細胞内ストレスが起きなかったが、今後、ALS との関連を検討していくためには、細胞内ストレスが引き起こされるような、高亜鉛条件、または低亜鉛条件を見出す必要がある。

E. 結論

孤発性 ALS 患者より見出した *miR-5572* が治療標的として有用である可能性が示唆された。今後は、亜鉛代謝と ALS 発症との関連性を、および miRNA との関わりを詳細に検討していく必要がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 栗田　尚佳, 矢部　沙織, 位田　雅俊, 柿田　明美, 保住　功 「孤発性筋萎縮性側索硬化症患者における新規 microRNA の解析」第 4 回名大医薬系 3 部局交流シンポジウム, 令和元年 10 月 31 日, 名古屋
2. 栗田　尚佳, 矢部　沙織, 位田　雅俊, 柿田　明美, 保住　功 「孤発性筋萎縮症側索硬化症患者における新規 microRNA の探索と機能解析」メタルバイオサイエンス研究会 2019, 令和元年 10 月 29～30 日, 東京
3. 小川　皓大, 栗田　尚佳, 矢部　沙織, 位田　雅俊, 柿田　明美, 保住　功 「孤発性筋萎縮症側索硬化症患者で見出した新規 microRNA の機能解析」第 13 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 令和元年 10 月 19～20 日, 岐阜

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

内因性の意図に基づく神経基盤の解明

研究代表者　中村 克樹 [1)]
研究分担者　酒多 穂波 [2)]，伊藤 浩介 [2)]，五十嵐 博中 [2)]

[1)] 京都大学 霊長類研究所 高次脳機能分野　[2)] 新潟大学 脳研究所 統合脳機能研究センター

研究要旨

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

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

さらに、これまでに得られた結果をふまえ、自

己開始運動をおこなう前の自発的な脳活動に実験的操作を加えることによって運動の発生に影響があるかどうかを行動実験により調べた。被験者は、３条件（刺激呈示のない条件、意識的に知覚出来ない閾下の強度の視覚刺激が呈示される条件、知覚できる刺激強度の視覚刺激が呈示される条件）のもとで自己開始運動をおこなった。視覚刺激は、1 秒間に 10 回反転する反転刺激を用いた。

C. 研究結果

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

次に自己開始運動にともなう運動準備電位を検討した結果、運動をおこなうまでの時間が試行ごとに、あるいは個人ごとに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被験者と短い被験者では運動準備電位の傾きが異なる傾向が見られた。

最後に行動実験の結果について、何も刺激呈示が無い条件と刺激を呈示した条件では、運動を実施するまでの時間に異なる傾向が見られることが分かった。知覚できる視覚刺激を呈示する条件では何も刺激呈示が無い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。閾下の視覚刺激を呈示する条件では、運動を実施するまでの時間に与える影響は被験者によって異なる傾向が見られた。

D. 考察

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

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

さらに、感覚野への刺激入力が自発的な運動の発生に影響を与えている可能性があることも示唆された。今後は刺激呈示の条件などをさらに検討し、被験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、感覚野までを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

1. Honami Sakata, Kosuke Itoh, Yuji Suzuki, Katsuki Nakamura, Masaki Watanabe, Hironaka Igarashi, Tsutomu Nakada “Endogenous brain activities preceding self-initiated movements（自己開始運動に先行する自発的脳活動）” ポスター発表、NEURO2019 大会（第 42 回日本神経科学大会）2019/7/27 新潟

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

精神神経疾患を対象としたヒト脳組織でのグリア細胞異常と炎症

研究代表者　加藤　隆弘 1)
研究分担者　扇谷　昌宏 1)　　他田　真理 2)

1) 九州大学医学研究院精神病態医学分野　2) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

近年、精神神経疾患に脳内炎症が関与していることが多数報告されている。特に、脳内グリア細胞はその炎症誘発物質のソースとして注目されている。しかし、それらの報告の大部分はげっ歯類を用いた研究報告であり、ヒトの脳組織を用いた研究例は少ない。

本研究では、ヒトの脳組織を用いて精神神経疾患におけるグリア細胞の異常を病理学的・分子細胞生物学的に捉え、精神神経疾患の新規病態機序解明を最終的な目的としている。

A. 研究目的

本研究では、ヒトの脳組織を用いて精神神経疾患におけるグリア細胞の異常を病理学的・分子細胞生物学的に捉え、精神神経疾患の新規病態機序の解明を最終的な目的としている。

具体的には、新潟大学脳研究所から提供されるヒト脳組織を用いてミクログリア・アストロサイトを中心とするグリア細胞の形態学的評価や炎症性サイトカインの定量を行う。健常群と疾患群での比較を行い、疾患特異的な異常を見いだす。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

新潟大学脳研究所から提供されるヒトパラフィン包埋標本およびヒト凍結脳組織を用いてグリア細胞の異常と炎症性関連物質の定量を行う。

ヒトパラフィン包埋標本を用いて免疫組織化学を行い、グリア細胞の形態や炎症関連物質の挙動を明らかにする。

ヒトパラフィン包埋標本を用いて in situ hybridization を行い、各種遺伝子発現を検討する。

ヒト凍結脳組織を用いて炎症関連物質の定量を CBA（Cytometric Beads Array）法を用いて行う。

得られた結果について、脳研究所共同研究者である柿田教授、他田准教授と、特に形態学的評価について検討・議論を行う。

C. 研究結果

本研究課題は、現時点で順調に共同研究が進んでおり、特にミクログリアに関して興味深い結果が得られている。

具体的には、ALSP（神経軸索スフェロイドおよび色素性グリアを伴う成人発症白質脳症）患者死後脳の組織切片画像および凍結脳組織を提供いただき、ALSP におけるミクログリア異常を明らかにするための共同研究を実施している。

本年度の成果としては、我々が細胞モデルで確

認していた特定のフェノタイプが提供いただいた死後脳組織切片においても確認することができた。このフェノタイプは細胞の特定の分子が原因であることを確認しており、原因不明とされてきた ALSP における新規病態メカニズムを分子レベルで明らかにできる可能性を含んでいる。

本研究費の支援により、新潟大学において他田准教授および柿田教授と方向性や結果の解釈についてディスカッションを行い、共同研究を進めている。現在、検証作業および論文作成を行っているところである。

D. 考察

現在論文作成中であるため、具体的な分子については表記できないが、これまで原因不明とされてきた ALSP におけるミクログリア異常を分子レベルで明らかにできる可能性を含んでいる。

E. 結論

本研究課題は、ALSP におけるミクログリア異常を分子レベルで明らかにできる可能性を含んでいる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

2. 学会発表

1. サイコグリア研究会、2019 年 5 月、岩手
2. 生物学的精神医学会、2019 年 6 月、新潟
3. 日本神経化学会、2019 年 7 月、新潟
4. AsCNP2019、2019 年 10 月、福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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

研究代表者氏名　福多真史 1)
研究分担者氏名　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

MRI 陰性てんかん症例での術前評価として，現在長時間ビデオ脳波同時記録，SPECT，脳磁図などの様々なモダリティーを用いて検査が行われているが，焦点を絞りきれず，頭蓋内電極の留置範囲の決定に困難を来す場合が少なくない．てんかん外科適応症例において，脳研究所の高密度脳波計，高磁場 MRI,FDG-PET などの検査を追加した症例が 31 例で，高密度脳波計，高磁場とくに 7 テスラ MRI,FDG-PET の検査を追加したことによって新たな情報が得られ，より確実にてんかん焦点の検索を行うことができた症例があった．各検査のモダリティーの特徴を生かした，術前検査の組み合わせにより，てんかん外科の焦点検索の精度は上げられる可能性があると思われた．今後てんかん外科の予後について検討を行い，これらの術前検査の妥当性を検証する必要がある．

A.研究目的

MRI でてんかん病変を認めない症例でのてんかん外科による発作消失率は，おおむね５０％以下で現時点では決して良好とは言えない．当院では長時間ビデオ脳波モニタリング,MRI,SPECT 検査,脳磁図などの標準的な術前検査を行っているが，本研究では脳研究所に設置されている高密度脳波計，高磁場ＭＲＩ検査，^{18}fluorodeoxy glucose-positron emission tomography (FDG-PET)を追加することによって，術前に見えないてんかん焦点をより正確に把握し可視化することが目的である．これらの多角的術前検査による術前評価は，ＭＲＩ陰性てんかんの術後予後の改善に貢献できるものと思われる．

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

１．MRI 陰性てんかん症例で，術前検査として脳磁図，長時間ビデオ脳波，ＳＰＥＣＴ検査を西新潟中央病院で行い，高磁場 MRI，高密度脳波計検査，を脳研究所で， FDG-PET を新潟大学医歯学総合病院で行う．

２．西新潟中央病院で硬膜下電極を留置して記録を行い，発作起始部を同定する．

３．発作起始部と術前評価によるてんかん焦点の推定部位との関係を把握し，多角的検査の妥当性を評価する．

４．術後の予後と切除範囲について検討し，多角的検査評価とてんかん原性のひろがりを確認する．

高密度脳波計，高磁場 MRI，FDG-PET については一般的に行われているてんかん外科の術前評価であるため，とくに倫理面への配慮は必要ないと思われる．
また追加検査については患者に説明し，同意を得た症例のみを紹介して脳研究所で検査を行っている．

C.研究結果

２０１５年１０月から２０19 年 12 月までに，てんかん外科適応症例 31 例において当院と新潟大学脳神経外科と連携してんかん外科治療を行った．このうち術前検査として高密度脳波計，高磁場 MRI を施行した症例は 28 例で，そのうち 16 例ですでに西新潟でてんかん外科を終了している．7 テスラ MRI を施行した症例は 6 例で，結節性硬化症の tuber がより鮮明に確認できたものが 1 例，通常の MRI では認められなかった静脈奇形が確認できたものが 1 例，高齢発症の皮質形成異常で病変の境界がより明瞭に確認できたものが 1 例あった．高磁場脳波計では 8 ヶ月の小児例や海馬硬化などの病変のない側頭葉てんかんの例で，dipole が容易に推定できて，通常の脳波検査よりも得られる情報量が多かった．

また FDG-PET も 14 例に施行しており，このうち１例では病変なしの側頭葉てんかん症例で，FDG-PET により右内側側頭葉の代謝低下が認められ，硬膜下電極の発作起始部と一致し，切除術に至った．

術後の発作予後との関係については，まだ術後間もないため，今後検討する予定である．

D.考察

MRI 陰性てんかんのてんかん外科の成績向上のためには，術前検査によって，できるだけてんかん焦点の範囲をしぼることがポイントとなる．通常，MRI 陰性てんかん症例では，頭蓋内電極留置が必要になるが，現時点で，留置範囲を決定するのに苦慮する症例が少なくない．頭蓋内電極は脳表面，あるいは深部から直接脳波活動を記録することができるため，感度は高いが，留置範囲以外の情報は全く得られない．術前評価の誤りによって留置範囲にてんかん焦点が含まれていない場合には，当然てんかん焦点を捉えることはできず，てんかん外科の予後は不良となる．

西新潟中央病院の術前検査として 1.5 テスラ MRI,脳磁図，脳血流 SPECT，ベンゾジアゼピン受容体 SPECT，長時間ビデオ脳波同時記録を行っているが，それでもてんかん焦点を絞り込めない症例が存在する．これらの検査に加えて，脳研究所に設置されている高密度脳波計，高磁場 MRI，さらに FDG-PET などのモダリティーを追加することで，症例によっては，焦点検索の新たな情報を得ることができ，術前評価として有用であった．

各検査のモダリティーの特徴を生かした，術前検査の組み合わせにより，てんかん外科の焦点検索の精度は上げられる可能性があると思われた．てんかん外科の予後の検討については，まだ術後観察期間が短い症例が多いため，今後長期予後を観察して，術前検査の妥当性を検証する．

E.結論

MRI 陰性てんかん症例の術前検査として脳研究所の高密度脳波計，高磁場 MRI,FDG-PET などの追加検査が，てんかん外科の予後の改善に繋がる可能性があると思われる．今後症例を蓄積してその妥当性を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. Hiroki Kitaura, Hiroshi Shirozu, Hiroshi Masuda, Masafumi Fukuda, Akiyoshi Kakita: Pathophysiological characteristics associated with epileptogenesis in human hippocampal sclerosis. EBioMedicine 29:38-46, 2018
2. 福多真史,増田　浩,白水洋史,伊藤陽祐,中山遥子，東島威史，藤井幸彦:難治性てんかんに対する迷走神経刺激療法後の脳血流変化の検討．CI 研究 40: 61-66, 2018
3. 福多真史:てんかん外科治療の現状（総説）．医療 72: 491-498, 2018
4. 福多真史：機能的脳神経外科の古往今来．新潟市医師会報　第 574 号：1-9,2019
5. 齋藤太希，大石誠，福多真史，塚本佳広，大橋伯，渡邉潤，根元琢磨，川口正，藤井幸彦：Posterior quadrantectomy が有効であった難治性てんかんの乳児例．No Shinkei Geka 47:349-356, 2019

2.学会発表

1. 第 28 回脳神経外科手術と機器学会（2019 年 4 月 12 日から 13 日，岡山市）
   Trans-T3 approach による海馬扁桃体切除術の有用性
   福多真史，増田，浩，白水洋史，伊藤陽祐，東島威史，藤井幸彦

2. 第 77 回日本脳神経外科学会総会（2019 年 10 月 9 日から 12 日，大阪市）
   難治性てんかんに対する迷走神経刺激療法後のベンゾジアゼピン受容体の変化-迷走神経刺激療法の作用機序の考察-
   福多真史，伊藤陽祐，増田，浩，白水洋史，村井志乃，藤井幸彦
3. 第 77 回日本脳神経外科学会総会（2019 年 10 月 9 日から 12 日，大阪市）
   NODDI による皮質形成異常の可視化の試み―初期経験から-
   伊藤陽祐，松澤　等，福多真史，増田　浩，白水洋史，村井志乃，北浦弘樹，柿田明美，藤井幸彦
4. 第 53 回日本てんかん学会学術集会（2019 年 10 月 31 日から 11 月 2 日，神戸市）
   Long-term epilepsy-associated tumor の術後長期予後
   福多真史，増田，浩，白水洋史，伊藤陽祐，村井志乃，藤井幸彦，北浦弘樹，柿田明美
5. 第 53 回日本てんかん学会学術集会（2019 年 10 月 31 日から 11 月 2 日，神戸市）
   小児内側側頭葉てんかんの長期術後発作転帰
   増田，浩，白水洋史，伊藤陽祐，村井志乃，福多真史，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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

熱ショック応答による筋萎縮性側索硬化症(ALS)細胞質凝集体の形成抑制

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・デジタル病理学分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)における運動ニューロン細胞質内 TDP-43 凝集体形成を抑制する因子の探索を目標として，培養ニューロン TDP-43 凝集体形成モデルに対し，組換えウイルスを用いた熱ショック応答関連分子群の共発現により，TDP-43 凝集体形成を抑制しうるか解析した．得られた結果をヒト ALS 剖検例における熱ショック応答分子群の発現と比較検討することにより, ALS に対する熱ショック応答を利用した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., 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., 2017). 一方，ALS を含む神経変性疾患モデルに対する熱ショック応答の蛋白凝集体消去作用が注目されている．そこで本研究では，組換えアデノウイルスを用いて熱ショック応答に関与する分子群を共発現させることにより，上記の実験的 TDP-43 凝集体形成を抑制しうるか解析し, 併せてヒト ALS 剖検例と比較検討することにより，熱ショック応答を利用した ALS に対する新規治療法の開発を目指している．

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

ヒト正常または C 末断片 (208-414) TDP-43 とともに DsRed を発現する組換えアデノウイルス，および熱ショック応答のマスター制御因子である heat shock transcription factor 1 (HSF1)とともに EGFP を発現する組換えウイルスを培養ラット神経幹細胞 1464R 由来ニューロンに各々共感染させ, プロテアソーム阻害剤 MG-132 を負荷して細胞質 DsRed 陽性 TDP-43 凝集体を形成させた．これら培養細胞から total RNA を調製し, Agilent SurePrint を用いた cDNA マイクロアレイにより各実験群間の遺伝子発現を解析し，EGFP, TDP-43, HSF1 組換えウイルス感染の有無による各遺伝子の発現比を求めた．HSF1 組換えウイルスによる凝集体形成抑制に伴って発現の上昇を認めた遺伝子の蛋白翻訳領域を RT-PCR により EGFP ベクターにクローニングし，1464R 細胞由来ニューロンにトランスフェクションして候補因子の TDP-43 凝集体形成抑制効果を蛍光顕微鏡で検討した．一部の

候補因子については組換えウイルスを作製し1464R 由来ニューロンに各々共感染させ，蛍光顕微鏡およびウェスタンブロットで解析した．さらにヒト脳神経病理標本を用いて，正常および ALS 運動ニューロンにおける候補因子の発現を免疫組織化学的に検討した．

C. 研究結果

MG-132 によるプロテアソーム阻害条件下で正常および C 末断片 TDP-43 組換えウイルスを分化ニューロンに感染発現させると，DsRed 強陽性の粗大な細胞質凝集体が形成されたが，HSF1 組換えウイルスの共感染により凝集体形成は有意に抑制され, ウェスタンブロットではリン酸化 TDP-43 を含む RIPA 不溶性分画の著明な減少を認めた．DNA マイクロアレイ解析では，HSF1 により 2 倍以上に発現が上昇する遺伝子が 64 個，HSF1 による凝集体形成抑制に伴って 2 倍以上に発現が上昇する遺伝子が 393 個同定された．このうち 50 候補遺伝子の蛋白翻訳領域をクローニングし，一部は組換えウイルスを作製して蛍光観察およびウェスタンブロットで解析したところ，新たな機能分子として Praja 1 (PJA1) RING-finger E3 ユビキチンリガーゼに顕著なリン酸化 TDP-43 凝集体形成抑制効果を見出した．この効果は RING finger domain を欠く PJA1 では認められず，PJA1 が TDP-43 をユビキチン化し分解を促進していると考えられた．免疫沈降では PJA1 は TDP-43 の主に C 末断片に結合してユビキチン化し，UBE2E3 が E2 結合酵素として働くことが示唆された．さらに，PJA1 はヒト脳では主に神経細胞に豊富に存在し，ALS の TDP-43 凝集体を有する運動ニューロンも PJA1 陽性であった．

D. 考察

cDNA マイクロアレイ解析を手がかりとして，PJA1 に顕著なリン酸化 TDP-43 凝集体形成抑制効果を見出した．現在，上記 TDP-43 組換えウイルスを成体マウス顔面神経に接種し，ウイルスの逆行輸送による顔面神経核運動ニューロンにおける TDP-43 凝集体形成を試みており，本モデルでの HSF1, PJA1 組換えウイルスの TDP-43 凝集体形成抑制効果を検討していきたい．また，HSF1 の下流に位置する他の TDP-43 凝集体抑制候補因子についても解析を行っており，ALS の新規治療法の開発に繋げていきたい．

E. 結論

ラット神経幹細胞由来ニューロン培養を用いた TDP-43 凝集体形成モデルにおいて, HSF1 の著明な凝集抑制効果を認め, DNA マイクロアレイ解析により HSF1 の下流に位置する新たな候補分子として PJA1 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

1) Niida-Kawaguchi M, Kakita A, Noguchi N, Kazama M, Masui K, Kato Y, Yamamoto T, Sawada T, Kitagawa K, Watabe K, Shibata N. Soluble iron accumulation induces microglial glutamate release in the spinal cord of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathology. 2020;40:152-166.

2. 学会発表

1) 新井田（川口）素子，渡部和彦，山本智子，加藤陽一郎，柴田亮行．筋萎縮性側索硬化症 (ALS) におけるアストロサイト増殖性の検討．第 108 回日本病理学会総会，東京国際フォーラム（東京都），2019 年 5 月 10 日．

2) 渡部和彦，加藤陽一郎，佐久間美帆，村田麻喜子，新井田（川口）素子，柿田明美，柴田亮行．培養ニューロン細胞質 TDP-43 凝集体形成を抑制する分子の探索．第 60 回日本神経病理学会総会学術研究会，ウインクあいち（名古屋市），2019 年 7 月 15 日．

3) 渡部和彦，加藤陽一郎，佐久間美帆，村田麻喜子，新井田（川口）素子，柿田明美，柴田亮行．培養ニューロン細胞質 TDP-43 凝集体形成を抑制する分子の解析．第 42 回日本神経科学大会，朱鷺メッセ（新潟市），2019 年 7 月 26 日．

4) 渡部和彦，加藤陽一郎，佐久間美帆，村田麻喜子，新井田（川口）素子，竹村太郎，花方信孝，柿田明美，柴田亮行．培養ニューロン細胞質 TDP-43 凝集体形成を抑制する分子の解析．第 14 回日本臨床ストレス応答学会大会，大阪市立大学（大阪市），2019 年 11 月 2 日．

5) 新井田素子，渡部和彦，山本智子，柴田亮行．Characterization of astrocytes associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS)．第 41 回神経組織培養研究会，東京大学薬学部講堂（東京都），2019 年 11 月 16 日．

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

げっ歯類統合失調症モデル作製と行動解析

研究代表者　加藤　明 [1)]
研究分担者　那波　宏之 [2)]

[1)] 東海大学医学部生体構造機能学　[2)] 新潟大学脳研究所基礎神経科学部門

研究要旨

眼球運動異常を呈する神経疾患の客観的診断基準を確立する目的で作製したヒト EGF 皮下投与による環境誘発型統合失調症モデルマウスについて引き続き解析を行なったところ、発達初期の低体重、早期開眼、反射性眼球運動の亢進に加え、前庭あるいは視覚刺激非存在下で眼振が観察された。今後、脳の特定領域の形態・機能不全の有無、リスペリドン投与による眼球運動異常のレスキュー実験などの解析を進めることで、特に統合失調症の発症機序や治療への応用が期待される。

A.研究目的

眼球運動は視覚情報の入出力の検出系であると共に、脳内の異常を客観的かつ非侵襲的に読み出す優れた指標である。いつ発症したのか、病状がどれくらい進行しているかを患者の主観に頼らざるを得ないケースがしばしば生じる神経疾患においては、疾患の明確かつ客観的な早期鑑別基準の確立が必要とされる。統合失調症は神経症状を有する精神疾患であり、先天的及び後天的な様々な疾患原因が提唱されているが、その全容は明らかではない。眼球運動異常は統合失調症患者の症状の一つであることから、眼球運動が客観的診断指標となり得るという研究結果が報告されたが (Miura, 2019)、異常を生じるメカニズムについては不明である。本共同研究では、生後直後のマウスへのヒト EGF 投与により、統合失調症患者に多く見られるドーパミン神経異常を誘発する疾患モデル動物を作製し、眼球運動を中心とした神経生理学的解析を行なうことで、統合失調症の客観的診断基準を確立することを目的とする。すでに当該モデル動物は、大脳基底核の異常に起因する運動機能の異常も観察されている。評価指標としての眼球運動計測の有効性を明らかにすることにより、将来的にはシックハウス症候群など他の神経疾患への応用も見据える。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

前年度までに作製し、眼球運動計測を行なったヒト EGF 皮下投与マウス (ヒト EGF を生後 2 日目から 10 日目まで 1 日 1 回皮下投与 (0.875 μg/体重 1 g) した C57BL/6Ncr マウス) の眼球運動周波数解析を行なった。眼球運動計測は、生理食塩水を皮下投与した対照群と共に生後 10 日目以降通常環境下で飼育し、生後 10 週齢から 17 週齢まで各個体隔週で既に行なっている。眼球運動は、前庭刺激により頭部運動と逆方向に生じる前庭動眼反射 (vestibulo-ocular reflex: VOR) 及び視野の大きな動きに追随する視運動性眼球反応 (optokinetic response: OKR) を計測し、刺激に対する眼球運動の振幅 (gain) 及びタイミング (phase) を算出した。前庭刺激、視覚刺激共、水平方向の正弦波状刺激を用いた (最大角速度 10°/s、周波数 0.125-1.0 Hz)。更に前庭刺激を与えない条件の下、暗所及び明所で 2 分間の自発性眼球運動計測を行なった。ヒト EGF 投与群の体重、開眼時期については前年度報告済みである。これらの実験はすべて東海大学動物実験委員会にて承認済みである。

C.研究結果

前年度までに報告した生後一か月までの低体重、開眼時期の早期シフトに加え、ヒト EGF 投与群では自発性眼球運動時に水平方向及び垂直方向の眼振が観察された (図 1)。眼振の周波数は 0.1 Hz から 5 Hz を超えるまで広範囲に渡っており、また生後 10-11 週齢では暗所でのみ生じる傾向があった一方、生後 16-17 週齢では暗所・明所共に観察された。

また、ヒト EGF 投与群マウスでは、特に計測初期、生後 10 週齢から 13 週齢まで OKR gain が対照群に比べて高い傾向があったが (前年度報告済)、OKR を誘発する視覚刺激中、及び VOR を誘発する前庭刺激中には、上述の眼振は検出されなかった。

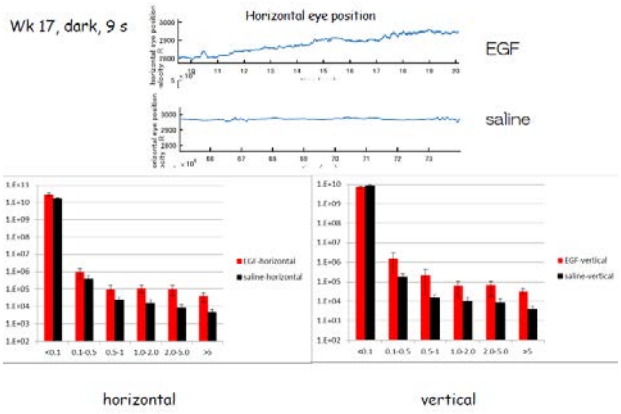


図 1. 非刺激条件下での自発性眼球運動の周波数解析

D.考察

ヒト EGF 投与群マウスで観察された自発性眼球運動の異常及び視覚刺激誘導性反射性眼球運動 OKR の gain 増加は、統合失調症患者の眼球運動障害を反映している可能性がある。このマウスでは、現時点で眼球運動以外の行動異常が観察されないことから、これらの眼球運動異常は統合失調症発症の前兆シグナルとして有用となるかもしれない。現在、解剖学的解析並びにリスペリドン投与による症状改善の有無などを調べることにより、これら眼球運動異常の原因について検討を進めている。さらに、ヒト EGF 投与の追加実験(EGF 投与後より長期間にわたる眼球運動計測など) 並びに組織学的解析による EGF 投与が脳の特定の領域に与える影響、特にドーパミン神経を含む神経細胞形態及び機能への影響についても検討を行なう予定である。現在までに得られた結果については、投稿論文執筆中である。

E.結論

生後ヒト EGF を投与した C57BL/6 マウスでは、発達初期の低体重、早期開眼、視運動性眼球運動の振幅増加に加え、自発性眼球運動時の眼振を認めた。これらの結果は、ヒト EGF 皮下投与マウスがドーパミン神経異常に由来する統合失調症モデルマウスとしての特性を有し、客観的指標としての眼球運動計測を基にした統合失調症発症メカニズムへのアプローチに用いることができる可能性を示唆する。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

なし

2.学会発表

1. 加藤明、山際天衣子、木村 穣. ストレス環境下におけるマウス前庭動眼反射運動学習への影響. 第 28 回日本臨床環境医学会学術集会、2019.6.23, 北里大学、東京
2. 加藤明、渡邉郁也. 長期ストレス負荷が尿中バイオマーカーと運動学習に及ぼす影響. 第 15 回「空間認知と運動制御」学術研究会、2020.3.14, 東海大学、東京（誌上発表）

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

新規疼痛関連分子の脳および脊髄後角での神経可塑性における機能の解析

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

1) 関西医科大学医化学　2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

慢性疼痛病態では、触覚あるいは痛覚の感受性を亢進させる神経の可塑的変化が生じ、中枢神経系では神経伝達に関わる分子のシナプスでの発現量変化が報告される。申請者らは、神経障害性疼痛時に脊髄後角シナプスで発現量が増加する分子として、Brain enriched guanylate kinase associated protein （BEGAIN）を同定した。そして、新潟大学脳研究所の支援を受け作成した BEGAIN のノックアウトマウスを用いることで、BEGAIN の欠損により末梢神経損傷に伴う疼痛などの異常感覚の発症が抑制されることを明らかにした。しかしながら、BEGAIN の分子機能あるいは、BEGAIN 陽性神経細胞の局所神経回路への影響については、未だ明らかではない。そのことから、脊髄後角における BEGAIN 陽性細胞の性格付けと痛みへの関与を明らかにするために、これを可視化する方法について検討をおこなった。

A. 研究目的

慢性疼痛病態では、脳あるいは脊髄などの中枢神経系で、触覚あるいは痛覚の感受性を亢進させる可塑的変化、中枢性感作が生じている。脊髄では、この基盤として脊髄内神経回路の形成、増強が報告されている。この回路形成にかかわる脊髄内介在ニューロンの可視化は、特定神経細胞のマーカータンパクを指標として行われてきた。

BEGAIN 蛋白の発現は、脊髄後角で痛みの伝達修飾に重要な多くの介在ニューロンが存在する領域に限局することを免疫染色にて確認している。そのことから、BEGAIN 陽性細胞を可視化、同定し、その性格付けを行うことで、BEGAIN の慢性疼痛の脊髄内神経回路への関与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）

脊髄後角にて、*in situ* hybridization 法によって、BEGAIN の mRNA を検出し、BEGAIN 陽性細胞を可視化する。また BEGAIN レポーターマウスを作製することで、BEGAIN 陽性細胞を可視化する。BEGAIN レポータマウスは、脳研究所との共同研究にて作出する。BEGAIN のプロモーター下流で 3x Venus を発現するマウスとした。また BEGAIN 陽性細胞特異的な分子のノックダウンにも使用可能なように、同プロモーター下流において、Cre-recombinase 遺伝子も発現するレポーター・ドライバーマウスとした。

C. 研究結果

脊髄において BEGAIN タンパク質は、侵害刺激が入力する脊髄後角の浅層に特異的に発現し、運動ニューロンが局在する脊髄の前角には発現しない事を western blot および免疫染色で確認している。しかしながら、*in situ* hybridization で検出された BEGAIN mRNA は脊髄の後角のみならず、前角のニューロンにも偏りなく発現していた。この発現について確認するために、定量 RT-PCR を実施したが、脊髄での発現量は前、後角で同じであることがわかった。これらの結果から、BEGAIN 蛋白の発現は、mRNA の発現部位と一致し

ないことが示された。

よって、我々は BEGAIN レポーター・ドライバーマウスを作製し、マウス脊髄における BEGAIN 蛋白質陽性細胞の可視化を検討した。今年度マウスが作出されており、現在、本マウスを用いて脊髄後角における BEGAIN 陽性細胞の解析を開始している。

D. 考察

BEGAIN 蛋白質の発現には、組織特異的な翻訳調節機構、あるいはタンパク質としての安定化調節分子が存在することが予想される。今後 BEGAIN 特異的な相互作用分子を解析することで、これらの機序についての解明が期待できる。

また、今後 BEGAIN レポーター・ドライバーマウスを用いることで、BEGAIN 陽性細胞を同定し、慢性疼痛回路への関与が明らかにできると考えた。

E. 結論

BEGAIN タンパク質の発現部位、および BEGAIN 陽性細胞は *in situ* hybridization のような mRNA の解析では不可能であることがわかった。今後の BEGAIN レポーター・ドライバーマウスマウスの解析で、BEGAIN 陽性細胞の同定は可能になると考えられる。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Pham VM, Matsumura S, Katano T, Funatsu N, Ito S. Diabetic neuropathy research: from mouse models to targets for treatment. Neural regen. Res. 14 (11):1870-1879, 2019.

2. 学会発表

1. 片野泰代、今野幸太郎、西田和彦、渡辺雅彦、崎村建司、小林拓哉、伊藤誠二
   脊髄後角における疼痛関連タンパク BEGAIN 陽性細胞の機能的特徴
   第 42 回日本神経科学大会/第 62 回日本神経化学大会/NEURO2019、新潟（朱鷺メッセ）2019 年 7 月 25-28 日
2. Katano, T., Konno, K., Nishida, K., Watanabe, M., Sakimura, K., Ito, S. and Kobayashi, T. Expression analysis of BEGAIN mRNA and protein in the nervous systems.
   49th annual meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, USA, October 19-23, 2019.

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析

研究代表者　岩里　琢治[1),2)]
研究分担者　笹岡　俊邦[3)]
研究分担者　中川　直樹[1),2)]

1) 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所神経回路構築研究室
2) 総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻
3) 新潟大学脳研究所

研究要旨

哺乳類など高等動物の脳の神経回路は、動物が生まれる前後からの自発活動や生まれた後の外界からの感覚入力など、様々な神経活動の影響下に大規模に再編されることによって成体での脳機能を担う成熟した回路となる。その仕組みを理解することは、ヒトの子供の時期の正常な脳発達や発達障害などの異常を理解する上で重要である。われわれは、マウス体性感覚系をモデルとして、マウス遺伝学の手法を活用することにより、大脳皮質における神経回路精緻化の分子メカニズム、次いで、視床における分子メカニズムの解明に取り組んできた。本課題では、最も解析の遅れている脳幹における分子メカニズムに焦点を絞り、その理解を目指している。

A. 研究目的

高等動物の脳の神経回路は主に生後の発達期に神経活動によって精緻化されることによって、成体の脳機能を担う成熟した回路となる。ヒトの脳が子供の時期に発達する仕組みを理解するために、モデル動物を用いた研究は重要である。本研究課題では、優れたモデルであるマウスの体性感覚系を用いて、生後発達期における神経回路精緻化の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。特に、大脳皮質や視床と比較して研究の遅れている脳幹でのメカニズムの解明を目指している。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

標的遺伝子が 2 個の loxP 配列で挟まれた構造のゲノムをもつ flox マウス、および、発達期の脳幹で発現するプロモーターの制御下に Cre 組換え酵素遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを交配することにより条件的遺伝子ノックアウトマウスを作製し、組織学的手法を中心に解析を行った。組換え DNA 実験は、法律と所属機関の規程に従い、機関長に承認された計画に沿って行った。動物を使用する実験は、文科省の定める指針と所属研究機関の規程に従い、機関長に承認された計画に沿って行った。特定化学物質等の取り扱いについては、所属研究機関の規程に従い使用した。研究に用いる実験動物・試薬などの提供に関する MTA は提携済みである。

C. 研究結果、考察

マウスやラットなどげっ歯類の体性感覚系では、脳幹、視床、大脳皮質にそれぞれバレレット、バレロイド、バレルとよばれる頬におけるヒゲの配置に対応したトポグラフィックな体性感覚マップが存在する。これらをモデルとして利用し、神経活動依存的回路発達に関する解析を行った。これまでの体性感覚系の大脳皮質や視床での研究によって、神経活動依存的な回路発達において重要な働きをもつことが示唆される分子が同定されてきたが、そうした分子のいくつかはその発現パターンから脳幹でも重要な働きをすることが期待される。本課題では特に可塑性において重要

な役割が示されるカルシウムシグナルに関連した分子に注目して研究を行っている。脳幹特異的に Cre 組み換え酵素遺伝子を発現する2種類の Cre マウスと標的遺伝子の flox マウスを交配することにより脳幹特異的ノックアウトマウスを作製した。そして、そのマウスにおいて体性感覚マップであるバレル、バレロイド、バレレットがどのように形成されているかを、cytochrome oxidase 染色(CO 染色)、免疫染色などの組織学的手法を用いて解析した。さらに、末梢体性感覚器であるヒゲからの感覚入力の大脳皮質における受容野の様子を、ヒゲを数本だけ残して残りを切断して飼育したマウスから調製した大脳皮質で、最初期遺伝子の発現を用いて解析を行った。これまでの解析で一定の方向性が見えてきた。今後はさらにサンプル数を増やすことによって定量解析を行い、論文としての公表につなげる。本解析は遺伝子変異マウスの作製と遺伝子変異マウスを用いた神経回路解析に関して豊富な知識と経験をもつ新潟大学脳研究所の笹岡俊邦教授の協力を得ることによって、効率的な研究遂行が可能となったものであり、本共同研究によるご支援に感謝いたします。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 岩里琢治

マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析

2019 年度新潟大学脳研究所共同利用共同研究（笹岡班）合同セミナー

2020 年 1 月 8 日　（新潟）　招待講演

2. 岩里琢治

新生仔期の大脳皮質における神経回路発達

認識と形成研究会 2019

2019 年 9 月 7 日-8 日　（岡崎）　招待講演

3. 中嶋ちえみ、鈴木亜友美、岩里琢治

脳幹 NMDA 受容体欠損マウスの体性感覚神経回路

第 2 回遺伝学会春季分科会 2020

2020 年 3 月 9 日（COVID-19 のため遠隔開催）　ポスター

4. Naoki NAKAGAWA, Takuji IWASATO

Long-term in vivo imaging of neuronal spatial remodeling during the barrel column formation

New Frontier in Neuroscience 2020

2020 年 1 月 9 日-10 日（金沢）　ポスター

5. Shingo NAKAZAWA, Hidenobu MIZUNO, Takuji IWASATO

Developmental Phase Transitions of Spatial Organization of Spontaneous Activity in Postnatal Mouse Barrel Cortex

New Frontier in Neuroscience 2020

2020 年 1 月 9 日-10 日（金沢）　口演、ポスター

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

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

New Frontier in Neuroscience 2020

2020 年 1 月 9 日-10 日（金沢）　ポスター

7. Chiemi NAKAJIMA, Ayumi SUZUKI, Takuji IWASATO

Roles of brainstem NMDA receptor in neural circuit formation in mouse somatosensory system

New Frontier in Neuroscience 2020

2020 年 1 月 9 日-10 日（金沢）　ポスター

8. Piu BANERJEE, Takuji IWASATO

Deciphering the source and mechanism of synchronized spontaneous activity in the neonatal mouse barrel cortex

New Frontier in Neuroscience 2020

2020 年 1 月 9 日-10 日（金沢）　ポスター

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

In vivo imaging of dendritic refinement in neonatal mouse barrel cortex with high time resolution

NEURO 2019（第 42 回日本神経科学大会、第 62 回日本神経化学会大会）

2019 年 7 月 24 日-28 日　（新潟）　ポスター

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

Cacna1g 変異ノックインマウス解析を通じた 脊髄小脳変性症病態の解明

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

常染色体優性脊髄小脳失調症 42 型（SCA42）家系において同定された *CACNA1G* の R1715H 変異（マウス *Cacna1g* R1723H に相当）をゲノム編集により導入したノックインマウスを作成・解析した。その結果、ヘテロおよびホモノックインマウスともに Rotarod test で緩徐進行性の運動機能障害を認めた。病理学的には 50 週齢においてプルキンエ細胞の脱落、分子層の菲薄化を認め、緩徐進行型の小脳失調症状、神経変性を再現する良好な SCA42 動物モデルの作成に成功したと考えられる。電気生理学的には急性スライスを用いたプルキンエ細胞のパッチクランプにおいて電位電圧曲線の偏位を認め、rebound firing の減少が認められた。下オリーブ核神経細胞では Resonance 強度の低下を認めた。カルシウムチャネル修飾薬投与実験ではヘテロノックインマウスの失調症状の改善を認めた。

A. 研究目的

常染色体優性脊髄小脳失調症 42 型（SCA42）家系において同定された *CACNA1G*（T 型電位依存性カルシウムシャネル $Ca_V3.1$ をコード）の R1715H 変異（マウス *Cacna1g* R1723H に相当）を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、表現型を多方面から解析することで、SCA42 の神経変性機序を明らかにする。また、本モデルを用いて、T 型電位依存性カルシウムチャンネル機能修飾薬等を用いた SCA42 疾患修飾療法を開発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）

*Cacna1g*_R1723H_KI マウスの作成

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によって、マウス *Cacna1g* に SCA42 原因変異であるヒト *CACNA1G* の R1715H に相当する R1723H 変異を導入したノックインマウスを作成し、ヘテロ、ホモノックインマウスの解析を行った。マウス実験については横浜市立大学動物実験委員会の承認（F-A-16-043 および F-A-19-049）を得た上で実施した。

*Cacna1g*_R1723H_KI マウスの行動解析

ヘテロおよびホモノックインマウスの行動解析に際しては Wire hang test、Rotarod test、Footprint test など運動機能を中心とした解析を、50 週齢を目途に行った。

*Cacna1g*_R1723H_KI マウスの病理学的・電気生理学的解析

野生型、ヘテロ、ホモノックインマウスを対象に解析を行った。病理学的解析に際しては通常の形態学的評価に加えてプルキンエ細胞数の評価、Klüver-Barrera 染色によるミエリンの評価など、多方面から解析した。また、それぞれのマウス小脳または脳幹から作成した急性スライスを用いて、プルキンエ細胞または下オリーブ核神経細胞のパッチクランプを行った。

薬物投与試験

T 型カルシウムチャネル機能促進薬および阻害薬の投与を開始し、投与群と非投与群に分け、10 週～50 週にかけて Rotarod test によって運動機能を評価した。

C. 研究結果

***Cacna1g*_R1723H_KI マウスの行動解析・モデルマウスとしての確立**

SCA42 原因変異 R1715H と相同の変異を導入した *Cacna1g*_R1723H_KI マウスの作成は完了し、ヘテロノックイン、ホモノックインマウスを得た。前年度までに Wire hang test、Rotarod test、Footprint test など運動機能を中心に行動解析を 50 週齢まで行っている。その結果、11~20 週齢の時点でヘテロノックインマウス、ホモノックインマウスともに Rotarod test において野生型に比較し、軽度な進行性の運動機能の低下を認めた。

***Cacna1g*_R1723H_KI マウスにおける神経変性**

病理学的解析に際しては通常の形態学的評価に加えて、神経細胞数の評価、抗 $Ca_V3.1$ 抗体を用いた免疫染色など多角的な病理学的解析を行った結果、30 週齢ではホモ、ヘテロノックインマウス共に有意な異常を認めなかったが、50 週齢のホモノックインマウスで分子層の菲薄化、小脳プルキンエ細胞の脱落が、50 週齢のヘテロノックインマウスで小脳プルキンエ細胞の脱落が確認された。

***Cacna1g*_R1723H_KI マウスにおける電気生理学的異常**

野生型およびホモノックインマウスの急性スライスを用いたプルキンエ細胞の電気生理学的解析では、電位電圧曲線の右方へのシフト、rebound firing の減少が認められた。その一方、プルキンエ細胞へのシナプス伝達には異常がないことを示した。ホモノックインマウスでは下オリーブ核神経細胞における Resonance 強度の低下が認められ、プルキンエ細胞への出力の障害が起きている可能性が示唆された。

薬物投与試験

T 型カルシウムチャネル機能促進薬および阻害薬の投与を開始し現在は rotarod test で投与効果を検証し、一種の薬剤でヘテロノックインマウスの失調症状の改善を認めた。

D. 考察

本研究で作成した *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た。一方、Wire hang test では異常を認めなかったため、筋力低下は来していないと考えられ、本マウスモデルで見られた運動機能障害は失調を反映していると考えられた。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 週齢でプルキンエ細胞脱落が明らかとり、病理学的にも SCA42 の所見を再現することができた。

興味深いことに、*Cacna1g*_R1723H_KI ホモノックインマウスは 30 週齢において病理学的にプルキンエ細胞脱落は認められなかったが、それ以前から失調症状が発症していた。これは単純なプルキンエ細胞脱落が失調の原因でない可能性を示唆する結果であった。

カルシウムチャネル修飾薬を投与した結果では投与群で失調症状の改善を認めており、チャネル機能の修飾が治療法となりうる可能性を示した。

E. 結論

SCA42 の表現型を再現するマウスの作成に成功した。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

Hashiguchi S, Doi H, Kunii M, Nakamura Y, Shimuta M, Suzuki E, Koyano S, Okubo M, Kishida H, Shiina M, Ogata K, Hirashima F, Inoue Y, Kubota S, Hayashi N, Nakamura H, Takahashi K, Katsumoto A, Tada M, Tanaka K, Sasaoka T, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Sato N, Ozaki K, Ohta K, Yokota T, Mizusawa H, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Morishita S, Tsuji S, Takeuchi H, Ishikawa K, Matsumoto N, Ishikawa T, Tanaka F:Ataxic

phenotype with altered $Ca_V3.1$ channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42. Neurobiol Dis.・**130**・104516・2019.

Okubo M, Doi H, Fukai R, Fujita A, Mitsuhashi S, Hashiguchi S, Kishida H, Ueda N, Morihara K, Ogasawara A, Kawamoto Y, Takahashi T, Takahashi K, Nakamura H, Kunii M, Tada M, Katsumoto A, Fukuda H, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Suzuki J, Ito Y, Sone J, Sobue G, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F. GGC repeat expansion of *NOTCH2NLC* in adult patients with leukoencephalopathy. Ann Neurol・**86**(6)・962-968・2019.

Hayashi N, Doi H, Kurata Y, Kagawa H, Atobe Y, Funakoshi K, Tada M, Katsumoto A, Tanaka K, Kunii M, Nakamura H, Takahashi K, Takeuchi H, Koyano S, Kimura Y, Hirano H, Tanaka F:Proteomic analysis of exosome-enriched fractions derived from cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurosci Res・in press・2019.

Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, Mizuguchi T, Hamanaka K, Mori K, Koike H, Hashiguchi A, Takashima H, Sugiyama H, Kohno Y, Takiyama Y, Maeda K, Doi H, Koyano S, Takeuchi H, Kawamoto M, Kohara N, Ando T, Ieda T, Kita Y, Kokubun N, Tsuboi Y, Katoh K, Kino Y, Katsuno M, Iwasaki Y, Yoshida M, Tanaka F, Suzuki IK, Frith MC, Matsumoto N, Sobue G:Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in *NOTCH2NLC* associated with neuronal intranuclear inclusion disease. Nat Genet・**51**(8)・1215-1221・2019.

2. 学会発表

Hiroshi Doi, Shunta Hashiguchi, Misako Kunii, Yukihiro Nakamura, Misa Shimuta, Etsuko Suzuki, Masaki Okubo, Toshikuni Sasaoka, Hideyuki Takeuchi, Taro Ishikawa, Fumiaki Tanaka : Ataxic phenotype with altered $Ca_V3.1$ channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42. Neuroscience 2019・Nov. 2019・Chicago IL.

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。

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

視床特殊核におけるグルタミン酸受容体 GluD1 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　今野　幸太郎 1)，笹岡 俊邦 2)

1) 北海道大学大学院医学研究院解剖発生学教室、2) 新潟大学脳研究所モデル動物開発分野

研究要旨

グルタミン酸受容体の中には、グルタミン酸との結合能を失いシナプス伝達機能を失ってしまった分子ファミリー（GluD ファミリー）が存在する。小脳に豊富な GluD2 についての研究から、この分子がシナプスの構造的および機能的結合性を制御する重要な分子であり、その遺伝子異常により小脳性の運動障害が起こることが遺伝子変異を有するヒト家系やマウスの研究から明らかになっている。しかし、その類縁分子である GluD1 については、シナプス発現から分子機能に至るまで、長い間不明な分子である。2014 年、私達は GluD1 が成体脳に広く発現する分子であり、小脳においては入力選択的な回路発現を示す分子であることを見出した。
本研究プロジェクトでは、新潟大学において作成された GluD1 欠損マウスを共同研究として利用することにより、感覚情報の中継核である視床特殊核におけるシナプス回路形成制御における役割を、GluD1 欠損マウスの形態学的解析を通して解明するものである。

A. 研究目的

GluD1 の視床特殊核における細胞発現と回路発現を解析し、その解析結果から想定される GluD1 のシナプス回路形成制御に対する機能について GluD1 欠損マウスを用いて解析する。具体的には、GluD1 が豊富な視覚系中継核外側膝状体と、体性感覚系中継核後内側腹側核に着目し、入力選択的な GluD1 の回路発現を検討し、その回路形成維持基盤を GluD1 遺伝子欠損に伴うシナプス回路網の変化から解明することを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

以下の２つの研究項目について、視床特殊核における GluD1 の細胞発現を蛍光 in situ ハイブリダイゼーションにより、シナプス発現を蛍光抗体法および免疫電顕法により明らかにする。その発現情報に基づき、GluD1 遺伝子欠損に伴う神経回路の変化を蛍光抗体法・免疫電顕法・神経トレーサー標識法を駆使して解明する。

①視床外側膝状体（LGN）における GluD1 の入力選択的シナプス発現とその機能解析

GluD1 が豊富に分布する LGN は網膜からの視覚性投射と視覚野からの下行性投射を受け取る。さらに、そのシナプス伝達は脳幹や大脳基底部からのモノアミンやアセチルコリンによる調節を受ける。GluD1 がどのシナプス回路に発現しているかを解明し、GluD1 欠損にともなうこの投射系の形態学的変化を解明する。

②視床後内側腹側核（VPM）における GluD1 の入力選択的シナプス発現とその機能解析

VPM は三叉神経を経由する体性感覚情報を処理する特殊中継核の１つである。この神経核には、三叉神経核からの上行性投射に加え、大脳皮質からの下行性投射が到来する。GluD1 の局在をこれら

の投射系との関連で明らかにし、その分子欠損に伴う形態学的変化を解明する。

C.研究結果

①視床外側膝状体（LGN）における GluD1 の入力選択的シナプス発現とその機能解析

蛍光 in situ hybridization を行い、LGN における GluD1 mRNA 発現細胞を検討した結果、GluD1 mRNA は GABA 作動性介在ニューロンと比較してグルタミン酸作動性リレーニューロンに発現が強いことが明らかとなった。次に、GluD1 に対する特異的抗体を用いて局在を検討した。様々な神経終末マーカーを用いて蛍光抗体法および包埋後免疫電顕法を用いて GluD1 の局在を検討した結果、LGN において GluD1 はグルタミン酸作動性かつコリン作動性神経終末のシナプス後部に選択的に局在することが明らかとなった。さらにリガンドである Cbln1 との近接も認められた。脳内においてコリン作動性の神経核は 8 カ所知られている。これらのコリン作動性神経核においてグルタミン作動性の発現特性を有するコリン作動性神経細胞が存在するかどうかを in situ hybridization によって検討した。その結果、内側手綱核（Ch7）および二丘傍核（Ch8）においてすべてのコリン作動性神経細胞はグルタミン酸作動性でもあることが明らかになった。また、内側手綱核および二丘傍核において Cbln1 の発現を検討した結果、二丘傍核の細胞に発現が認められたが、内側手綱核の細胞に発現は認められなかった。次に LGN に逆行性神経トレーサーを注入した結果、二丘傍核において多くの逆行性に標識された神経細胞が認められ、in situ hybridization を用いて標識細胞の神経化学的特性を検討した結果、標識細胞はグルタミン酸作動性かつコリン作動性神経細胞であり、Cbln1 の発現が認められた。以上の結果から、LGN における GluD1 は二丘傍核由来のグルタミン酸作動性かつコリン作動性神経終末とリレーニューロン間の非対称性シナプス後部に選択的に局在することが明らかとなった。最後に、GluD1 遺伝子欠損マウス、Cbln1 遺伝子欠損マウスを用いて LGN における GluD1 および Cbln1 のシナプス形成能を検討した結果、GluD1 遺伝子欠損マウス、Cbln1 遺伝子欠損マウスにおいてグルタミン酸作動性かつコリン作動性神経終末は野生型マウスと比較し有意に減少していた。

②視床後内側腹側核（VPM）における GluD1 の入力選択的シナプス発現とその機能解析

初めに蛍光抗体法および包埋後免疫電顕法を用いて視床後腹側核における GluD1 の局在を検討した。その結果、GluD1 は vesicular glutamate transporter（VGluT）2 陽性グルタミン酸作動性神経終末と視床皮質ニューロンとの間に形成される非対称性シナプスのシナプス後膜に限局した局在を示した。また、GluD1 と Cbln1 の免疫染色を行った結果、GluD1 と Cbln1 は近接して局在することが明らかとなった。逆行性神経トレーサーを用いて GluD1 に入力する VGluT2 陽性神経終末の由来を検討した結果、三叉神経主知覚核・脊髄路核・中脳路核において逆行性に標識された神経細胞が認められ、その標識細胞は VGluT2 mRNA および Cbln1 mRNA を発現することが明らかとなった。GluD1 遺伝子欠損マウスを用いて、視床皮質ニューロンの形態解析を行った結果、GluD1 遺伝子欠損マウスにおいて視床皮質ニューロンのスパイン様突起の伸長と非対称性シナプス数の増加が認められた。さらに、三叉神経脊髄路核に順行性神経トレーサーを注入し三叉神経核脊髄路核由来の神経線維における単位長さ当たりの終末ボタンを測定した結果、GluD1 遺伝子欠損マウスにおいて単位長さ当たりの終末ボタンの増加が認められた。Cbln1 遺伝子欠損マウスにおいても同様の表現型が認められた。

D.考察

①視床外側膝状体（LGN）における GluD1 の入力選択的シナプス発現とその機能解析

LGN において GluD1 はグルタミン酸作動性ニューロンに発現が強く GABA 作動性介在ニューロンに発現が弱かった。小脳では GluD1 は分子層に発現が強くプルキンエ細胞や顆粒細胞には発現が弱い。これは小脳と同様に LGN においても細胞種選択的な発現様式をとることが考えられる。LGN における GluD1 は二丘傍核由来グルタミン酸作動性かつコリン作動性神経終末とリレーニューロン間に限局した局在が認められた。小脳では GluD1 は平行線維－介在細胞間シナプスに選択的に局

在することを考慮すると、LGN においても入力選択的な局在様式をとることが考えられる。
GluD1 遺伝子欠損マウスおよび Cbln1 遺伝子欠損マウスにおいてグルタミン酸作動性・コリン作動性神経終末が有意に減少していた。小脳における GluD ファミリーや Cbln1 のシナプス形成能に関する報告は数多くあるが、GluD1 および Cbln1 は小脳外でもシナプス回路形成に重要な役割を担っていることが示唆される。

②視床後内側腹側核（VPM）における GluD1 の入力選択的シナプス発現とその機能解析

小脳の GluD1 と GluD2 に対して、視床後腹側核における GluD1 はシナプス形成に対して抑制的に働く可能性を示唆する。これは過去に報告された線条体における Cbln1 遺伝子欠損マウスの表現型と同様の結果である。GluD1 遺伝子欠損マウスおよび Cbln1 遺伝子欠損マウスにおけるスパイン様突起の伸長と非対称性シナプス数の増加が終末ボタンの増加の表現型とどのような関係を有するのか、今後の検討課題である。

E. 結論

視床特殊核における GluD1 は局所シナプス回路の基盤構築に重要な役割を担っている。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Nakamoto C, Konno K, Miyazaki T, Nakatsukasa E, Natsume R, Abe M, Kawamura M, Fukazawa Y, Shigemoto R, Yamasaki M, Sakimura K, Watanabe M. Expression mapping, quantification, and complex formation of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain. J Comp Neurol. 2020. 528: 1003-1027. doi: 10.1002/cne.24792.

2. 学会発表

1. Kohtarou Konno, Chihiro Nakamoto, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Masahiko Watanabe. Expression mapping, quantification, and complex formation of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain. IBRO2019, 2019 年 09 月 21 日～25 日、大邱（韓国）
2. Kohtarou Konno and Masahiko Watanabe. Glyoxal fixative is effective for immunohistochemical detection of synaptic molecules in vivo. 第 42 回日本神経科学大会、2019 年 7 月 25 日～28 日、新潟市（新潟県）
3. 今野幸太郎、渡辺雅彦. Glyoxal 固定液は in vivo におけるシナプス関連分子の検出に有用である. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019 年 3 月 27 日～29 日、新潟市（新潟県）
4. Kohtarou Konno, Kenji Sakimura, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe. Extracerebellar localization of glutamate receptor GluD2 in rodents and primates. 第 41 回日本神経科学大会、2018 年 7 月 26～29 日、神戸市（兵庫県）

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

認知症病態における海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド(Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide:HCNP）発現メカニズムの解析

研究代表者氏名　松川　則之[1)]
研究分担者氏名　池内　健[2)]、水野　将行[1)]

1) 名古屋市立大学　神経内科　2) 新潟大学･脳研究所

研究要旨

アルツハイマー病(AD)脳では前脳基底野コリン作動性神経機能障害が確認され、その賦活化によって認知機能・意欲の改善をすることが臨床的にも確認されている。しかしながら、ヒト脳内における前脳基底野コリン作動性神経機能の調節メカニズムは不明な点が多い。我々はこれまでに、海馬可溶性成分に前脳基底野コリン作動性神経のアセチルコリン産生を誘導するペプチド（HCNP）を発見し、その生理機能を報告してきた。また、アルツハイマー病海馬において早期から発現が低下することを報告した。現在遺伝子改変動物（ＫＯマウス）においても、海馬内 Ach 量の低下および海馬神経活動の抑制が確認されてきている（Madokoro Y, IJMS 2019)。HCNP 発現メカニズムおよびアルツハイマー病を始めとする認知症における発現低下の機序解明を目指す。

A. 研究目的

平成 30 年度までに､アルツハイマー病脳における網羅的遺伝子発現量解析を行い、ＨＣＮＰの脳内発現量が、病理変化（Braak stage）進行に従い低下すること、全シークエンス解析によりプロモーター領域に有意なＳＮＰは存在しなかったこと､100 例中１例にHCNP 前駆体Lys113Glu 置換が存在したことを確認した。今回は症例数を増やして検討した。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

患者もしくは家族同意のもとに、新潟大学脳研究所に蓄積されたアルツハイマー病脳病理脳を用いた全シークエンス解析を実施し FASTQ を取得,バリアントコールにより VCF を作成した。HCNP および本因子のプロモーター領域のＳＮＰを解析する。

C. 研究結果

残念ながら新たな結果は得られなかった。

D. 考察

HCNP 発現低下のメカニズムは、プロモーター領域の SNP の可能性は低いことが明らかになった。これは、少数例を用いて検討した我々のデータと一致する結果であった（Okita K 2009 BBRC)。今後 DNA メチル化・ヒストン修飾などエピジェネティクスの関与について検討したい。また、対象疾患を替えて検討したい。

E. 結論

アルツハイマー病病理の進行に伴い、発現量が低下する HCNP の発現調節には､プロモーター領域のＳＮＰは関与しない。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当するものはありません

2. 学会発表

該当するものはありません

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

該当するものはありません

2.実用新案登録

該当するものはありません

3.その他

該当するものはありません

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

神経変性疾患における NAKα3 神経細胞の機能障害と細胞死機構の解明

研究代表者氏名　星　美奈子 1)
研究分担者氏名　柿田　明美 2)

1) 神戸医療産業都市推進機構　2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

研究代表者である星は、柿田博士との長年の共同研究により、アルツハイマー病患者脳から神経細胞死活性を持つ Aβ集合体「アミロスフェロイド（ASPD）」の単離に初めて成功し（Noguchi *et al*. JBC2009）、ASPD は神経細胞の生存と機能に必須な Na, K-ATPase ポンプのα3 サブユニット（NAKα3）に特異的に結合することで細胞死を誘導するという全く新たな神経細胞死メカニズムを世界に提示した（Ohnishi *et al*. PNAS2015）。

NAKα3 の活性阻害による神経細胞死は、その後、パーキンソン病や ALS においても相次いで報告され（右図）、星らの発見した細胞死メカニズムが神経変性疾患に共通な経路であることが解ってきた。本研究では、実際に各種神経変性疾患の患者脳及び正常脳において NAKα3 神経細胞の分布や発現を解析し、ヒト脳における NAKα3 神経細胞の生理的機能と病態における関与を検証したい。

A. 研究目的

神経細胞死がアルツハイマー病の臨床症状と最も相関することは ADNI でも確認をされたが、神経細胞死の原因及び機構は殆ど解明されていなかった。我々は、新潟大学脳研究所よりタンパク質の保存状況の極めて良い剖検脳の供与を受けることにより、世界で初めてアルツハイマー病患者脳より神経毒性を持つ球状の Aβ集合体である Amylospheroid（以下、ASPD）の単離に成功し（Noguchi *et al*, JBC2009）、さらに ASPD が神経細胞の生存と機能に必須な Na, K-ATPase ポンプのα3 サブユニット（NAKα3）に結合することでそのポンプ活性を阻害し、成熟神経に細胞死を誘導することを見出した（Ohnishi *et al*. PNAS2015）。上記のとおり、過去の共同研究により、我々は原因物質の非常に有力な候補を示し、なぜ成熟神経細胞死が起きるかについてもアルツハイマー病の病態を非常に良く説明する機構を明らかにすることが出来た。さらに、ASPD に結合するペプチド（ASPD 結合ペプチド）を同定しているが、これは ASPD と ASPD ターゲット分子との結合を阻害し、ASPD の神経細胞死活性を中和することができることがわかり、神経細胞死を直接阻止する治療薬、ASPD を検出する PET プローブ開発という、２つの大きな創薬及び医療技術基盤の可能性を拓いた。この我々が見出した新たな神経細胞死メカニズムが、実は主要な神経変性疾患に共通なメカニズムであることが解ったことは我々に取っても驚きで有り、これまでの新潟大学脳研究所との共同研究成果をさらに発展させアルツハイマー病に留まらず神経変性疾患全体を俯瞰することは是非とも重要で有り、新たなプロジェクトとして共同研究実施することとした。

本研究では、これまでの共同研究によりアルツハイマー病で明らかにしてきた NAKα3 の機能障害による神経細胞死が、本当に他の神経変性疾患で起きているのかを実際に患者脳で検証すると

ともに、そもそも生理的にはNAKα3神経の分布はどうなっているのかを解明することを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

上記目的を達成するために、以下の研究を実施する。

（1）NAKα3 に対するラビットモノクローナル抗体を作製し、その反応性を検証する。

（2）市販の NAKα3 抗体､NAKα1 抗体を用いた固定、染色方法を改善し、再現的かつ明瞭な分布を同定出来る条件を確立する。

アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS など、主な神経変性疾患、さらに、対照群として正常脳においてNAKα3神経､NAKα1神経の分布や発現がどうなっているのかを検証する。並行して、アルツハイマー病においてはASPDの分布なども検証を行う予定である。

C. 研究結果

これまで NAKα3 ポンプは生存にあまりに必須であるため神経変性疾患に関わるとは思われていなかったが、星らの報告に続いて、パーキンソン病やALSにおいても、異常な凝集体がNAKα3ポンプに結合することでその活性を阻害し神経細胞死を引き起こすことが相次いで報告されるに至った。しかも、パーキンソン病の原因となるαシヌクレインの凝集体が NAKα3 ポンプに結合する部位は、ASPD が NAKα3 ポンプに結合する部位とほぼ同一であることから、我々が発見した神経細胞死のメカニズムは神経変性疾患に共通な経路であることが強く示唆された。

しかしながら、NAKα3 ポンプについては、NAKα1 ポンプなどと配列の相同性が高いことから良い抗体がなく、そもそも脳内での生理的な分布が殆ど解析されていないことが解った。また、ASPD が NAKα3 ポンプに結合しその活性を阻害するメカニズムは、これまで予想されていなかった新たなメカニズムであることが解った。そこで、本研究では実際に各種神経変性疾患の患者脳及び正常脳において NAKα3 神経細胞の分布や発現を解析し、ヒト脳における NAKα3 神経細胞の生理的機能と病態における関与を検証することをめざし、まず、齧歯類組織を用いて NAKα3 神経細胞の正常での分布を解明するとともに、ヒトに対する NAKα3 選択的抗体を確立することを目指した。

In situ を用いた解析から､驚いたことにNAKα3選択的な神経細胞群が存在することが解ってきた。また、神経細胞種により NAKα1/ NAKα3 の発現比にはかなり差があることも分かり、それぞれがどう役割分担をしているのか興味深いところである。これについては今年度、論文として出版することが出来た。抗体の作成については、NAKα1-3 ポンプの立体構造モデルに基づき最も適切な配列を選び、それを大腸菌の発現系を用いて抗原を調製、モノクローナル抗体の作成に着手した。しかしながら、１０回膜貫通タンパク質である NAK の抗体作製には難航し、ようやく NAKα3 について、目的の抗体が得られ、解析を進めているところである。

さらに新たに脳の微小血管由来内皮細胞において、NAKα3 に結合することで ASPD が血管の機能を阻害していることが解った。これについてはまもなく論文を投稿する予定である。

D. 考察

上記のとおり、極めて順調に研究を進めることが出来た。上述した in situ の解析結果は、実は国際学会でも非常な驚きをもって受け止められた。NAKα3 ポンプがどのように関わっているのかを明らかにすることは、アルツハイマー病に留まらず各種神経変性疾患の病理診断上も極めて有効である可能性もあり、是非、特異的抗体を確立し、患者脳由来の試料を用いた解析を引き続き進めたいと考えている。

E. 結論

NAKα3 は、これまでの予想を超えて、神経変性疾患に深く関わることが解ってきた。ただ、抗体などの必要なツールが乏しい。今回のプロジェクトにより、少なくとも NAKα3 の分布が明らかになり、また抗体を確立出来たのは意義がある。今後も引き続き解析を進めたい。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Alzheimer Aβ Assemblies Accumulate in Excitatory Neurons upon Proteasome Inhibition and Kill Nearby NAKα3 Neurons by Secretion *iScience*, (2019), 2019 Mar 29; 13: 452-477.
2. Tracking down a missing trigger for Alzheimer's disease by mass spectrometric imaging based on brain network analysis; Progress in Molecular Biology and Translational Science (2019), 168, p.25-55
3. Region- and neuronal-subtype-specific expression of Na,K-ATPase alpha and beta subunit isoforms in the mouse brain J. Comp. Neurol. 2020 in press
4. Alzheimer's amyloid-β assembly blocks endothelial nitric oxide release through a mechanism different from that of physiological regulation in preparation

2. 学会発表

1. ナトリウムポンプと神経変性疾患の新たな関係　星美奈子　第30回日本医学会総会 2019 ヒトの老化は制御できるか−抗老化研究の最前線（座長：鍋島陽一）（名古屋）（2019 年 4 月 28 日）（招待講演）
2. 生化学者が進めてきたアルツハイマー病研究の道のり：基礎から応用また基礎へ　星美奈子　生化学若い研究者の会　近畿支部　2019年初夏のセミナー（大阪）（2019年6 月 29 日）（招待講演）
3. 32. ナトリウムポンプとアルツハイマー病　星美奈子　東北大学加齢医学研究所セミナー　（仙台）（2019 年 7 月 4 日）（招待講演）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

高磁場 MRI を用いたてんかん原性部位及び機能部位との関係の研究

研究代表者　臼井直敬 1)
研究分担者　鈴木雄治 2)　近藤聡彦 1)　松平敬史 1)　荒木保清 1)

1) NHO 静岡てんかん・神経医療センター　2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

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

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

C. 研究結果

撮像プロトコール等を決定し、現時点までに、難治性てんかん患者１名（プロトコール決定のために健常ボランティア２名）の撮像を行い、順調に研究が継続されている。プレパレーションシステム、撮像時の映像視聴などにより、撮像時に問題等は生ずること無く経過している。新潟大学にて、難治性てんかん患者１名の測定を行った症例では、てんかん原生部位は、左の頭頂葉に皮質形成異常を認めたが、脳機能部位（言語）が両側性であることが確認された。この結果により、手術適応の可能性がひらけたため、頭蓋内脳波記録を行い、覚醒下手術にて詳細な脳機能マッピングを行っての外科治療を行うに至った。術後、患者のてんかん発作は抑制され、言語障害はみられていない。

D.考察

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

E.結論

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

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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

研究代表者　杉田　保雄 [1)]
研究分担者　大島　孝一 [1)]　三好　寛明 [1)]　松田　光太郎 [1)]　柿田　明美 [2)]

[1)] 久留米大学医学部病理学講座　[2)] 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)における transforming acidic coiled-coil-containing 3 (TACC3) 発現とその臨床病理学的意義について検討した。対象 PCNSL 例は 43 例であり、患者の性別は男性 26 例、女性 17 例であり、年齢は 51 歳から 85 歳（平均：67.9 歳）であった。多発病変症例は 21 例、単発病変症例は 22 例であった。経過観察中の死亡例は 29 例であり、生存例もしくは追跡困難のための打ち切り数は 14 例であった。PCNSL の病理組織型は 39 例はびまん大細胞 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)であり、4 例は濾胞辺縁帯 B 細胞リンパ腫 (FMZL) と診断された。また DLBCL 中 MUM-1 陽性例は 35 例であり、Non-GCB type は 35 例、GCB type 4 例と診断された。腫瘍細胞における TACC3 および Ki-67 の標識率 (%)の平均値はそれぞれ 38.4± 28.1, 38.0±28 であり両者は正の相関を示した(相関係数 r=0.53, p<0.001)。また腫瘍細胞における p53 の標識率 (%)の平均値 は 28.4±23.9 であり TACC3 および p53 の標識率は正の相関を示した (相関係数 r=0.72, p<0.001)。TACC3 の標識率で分類した低標識率群は 24 例 (A: DLBCL 19 例、B: FMZL 4 例) であり、高標識率群は 20 例 (DLBCL 20 例)であった。統計学的解析から低標識率症例群に属する患者の予後は高標識率群に属する患者に比べて予後良好であることが示唆された (p<0.5, Logrank 検定)。以上の結果から PCNSL における TACC3 の解析は腫瘍の悪性度、患者の予後の判定に有用であることが示唆された。

A.研究目的

transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3) は染色体上の 4p16.3 に位置する、TACC family の member である。TACC3 は Aurora A キナーゼのターゲットであり、核分裂の際に中心体に位置しており、細胞の核分裂の際に、微小管の成長と安定に寄与している [1,2]。 近年、TACC3 の異常と様々な悪性腫瘍との関わりが指摘されているが [1,2]、私共の渉猟し得た範囲においては中枢神経系腫瘍あるいはリンパ腫についての TACC3 研究の詳細な報告は未だにみられない。それゆえに中枢神経原発悪性リンパ腫（PCNSL）の腫瘍増殖における TACC3 について役割を明らかにするために本研究を行った。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

対象

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

方法

TACC3, 細胞周期マーカーなどを免疫組織化学的に検討し、臨床情報と併せて臨床病理学的検討を行った。 組織標本は 20% の緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。これらから作製した切片 (5 μm)を使用して hematoxylin and eosin (HE) 染色および免疫染色 (IHC) を行った。組織診断基準は WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue によった。免

疫組織化学についてはパラフィン切片を熱処理にて抗原賦活後に自動染色機 (Dako autostainer universal staining system) 及び ChemMate ENVISION kit/HRP (DAB), DakoCytomation) を使用して染色を行った。一次抗体として CD3 (希釈率 1:50), CD20 (希釈率 1:50), CD79a (希釈率 1:150), MUM1 (希釈率 1:100; DakoCytomation, Carpinteria, CA), p53 (希釈率 1:30; Ventana, Arizona, USA), MIB-1(抗 Ki-67) (希釈率 1:100; Novocastra, Newcastle, UK)を用いた。免疫組織化学の評価は 2 人の病理医が独立して行った (Y.S., K.M) 。評価が有意に異なる症例では同意が得られるまで再評価を行った。 腫瘍細胞の TACC3 の陽性率と増殖能の指標である (p53, Ki-67) との相関関係を Pearson product-moment correlation coefficient を用いて分析した。また腫瘍細胞の TACC3 の陽性率 40%を cut off 値として症例群を低標識率群(A)と高標識率群(B)の 2 群に大別した。A, B 群の生存率を Kaplan-Meier 法で解析して両者を Logrank 法で検定した。

倫理面

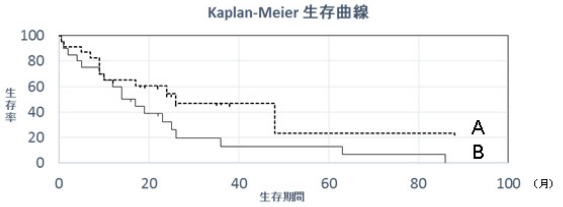
本研究は久留米大学及び新潟大学脳研究所の倫理審査委員会で承認を得ており、患者の人権を尊重して行われた。

C. 研究結果

PCNSL 検討例は 43 例であり、患者の性別は男性 26 例、女性 17 例であり、年齢は 51 歳から 85 歳（平均 : 67.9 歳）であった。多発病変症例は 21 例、単発病変症例は 22 例であった。経過観察中の死亡例は 29 例であり、生存例もしくは追跡困難のための打ち切り数は 14 例であった。

ICH による検討では全例が CD20, CD79a に陽性であり、CD3 については陰性であった。病理組織学的所見と併せて 39 例はびまん大細胞 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)であり、4 例は濾胞辺縁帯 B 細胞リンパ腫 (FMZL) と診断された。また DLBCL 中 MUM-1 陽性例は 35 例であり、Non-GCB type は 35 例、GCB type 4 例と診断された。腫瘍細胞における TACC3 および Ki-67 の標識率 (%)の平均値はそれぞれ 38.4± 28.1, 38.0±28 であり両者は正の相関を示した (相関係数 r=0.53, p<0.001)。また腫瘍細胞における p53 の標識率 (%)の平均値 は 28.4±23.9 であり TACC3 と Ki-67 の標識率は正の相関を示した (相関係数 r=0.72, p<0.001)。TACC3 の標識率で分類した A 群は 23 例 (A: DLBCL 20 例、B: FMZL 4 例) であり、B 群は 20 例 (DLBCL 20 例)であった。A 群と B 群の Kaplan-Meier 法による生存曲線は図 1 に示す（上段は A 群、下段は B 群を示す。）。Logrank 検定では A, B 群の生存率には有意差 (p<0.05) がみられ、低標識率群(A)の患者は高標識率群(B)に比べて予後良好であることが示唆された。

図 1



D. 考察

いくつかの悪性腫瘍において腫瘍細胞における TACC3 の過剰発現と患者の予後不良との相関性が報告されている[1,2]。しかしながら、私共が渉猟し得た範囲では PCNSL における TACC3 の過剰発現とその臨床病理学的意義に関しての知見はみられない。それゆえに今回、私共は PCNSL における TACC3 の腫瘍発生に関わる機序とおよび PCNSL 患者の予後との関係について臨床病理学的見地から検討を加えた。まず、腫瘍細胞の増殖との関係から TACC3 発現と p53, MIB-1 との関係について検討した。一般に悪性腫瘍の発生や進展に ｐ53遺伝子の関与が指摘されており、p53の変異はhigh-gradeあるいはhigh-stageの腫瘍に認められる。一方、抗Ki-67抗体 (MIB-1) は静止期である G0期を除く、抗Ki-67抗体 (MIBI) は全ての増殖期すなわち細胞周期のG1の後期、S、G2, M期にある細胞の核内に発現するKi-67抗原を認識する[1,2]。

PCNSLにおいてもp53, MIB-1の腫瘍細胞の高標識率は予後不良因子として報告されている[3]。本研究ではPCNSLの腫瘍細胞におけるTACC3の発現とp53, MIB-1は正の相関を示しており、PCNSLにおいてもTACC3発現は他の悪性腫瘍と同様に腫瘍の増殖能に関わっていることが示唆された。また本研究では臨床データと併せた解析においてTACC3の高発現群が低発現群と比較して予後不良であることを明らかになった。以上の臨床病理学的検討の結果からPCNSLにおけるTACC3の標識率の検討は腫瘍の悪性度、罹患患者の予後の推定に有用であることが示唆された。

参考文献

1. Matsuda K. et al. Clinicopathological and prognostic value of transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3) expression in soft tissue sarcomas. PLoS One. 2017. 12(11):e 0188096

2. Matsuda K. et al. Elevated Expression of Ttransforming Acidic Coiled-Coil-Containing Protein 3 (TACC3) Associated With a Poor Prognosis in Osteosarcoma. Clin Orthop Relat Res. 2018. 476 (9):1848-1855

3. Chang C et al. Expression of p53, c-Myc, or Bcl-6 suggests a poor prognosis in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma among immunocompetent individuals. Arch Pathol Lab Med. 2003.127:208-212

E. 結論

PCNSL における TACC3 の解析は腫瘍の悪性度及び患者の予後の判定に有用である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

特記すべき事項は無し。

2. 学会発表

特記すべき事項は無し。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特記すべき事項は無し。
2. 実用新案登録
特記すべき事項は無し。
3. その他
特記すべき事項は無し。

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

超偏極低分子化合物の生体トレーサーとしての応用を目指した基礎検討

研究代表者　青木　伊知男 1)
研究分担者　五十嵐　博中 2)，高草木　洋一 1)，高堂　裕平 1)

1）量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所　2）新潟大学脳研究所

研究要旨

NMR 測定において、トレーサーを生体に投与し、その代謝変化を追うことにより生体の脳代謝を評価することが可能であるが、この場合トレーサーの希釈による測定感度の低下が問題となり、いまだ臨床応用への道が開けていない。今回、トレーサーを特殊な磁場装置（超偏極装置）の中であらかじめ偏極させることにより測定感度を理論的に 10000 倍まで高めることが可能な超偏極法を用いた生体脳における高分解能代謝解析を可能とする手法の開発を目的として、低分子化合物の超偏極における試適条件の解明および、超偏極物質の MRI 撮像法の開発を昨年度に引き続いて行った。

A. 研究目的

脳代謝において、神経細胞のエネルギー源となっているが、その代謝については明らかにされていないピルビン酸、乳酸、酢酸など、血液脳関門を越えて代謝されることが確認されている物質について、NMR で測定できる安定同位体である 13C を炭素基に含むトレーサーを合成し、この 13C を含む炭素基を統合脳機能研究センターが生体由来物質の研究に用いている超偏極装置を用いて超偏極させ、もっとも超偏極効率の高い条件を解明すると共に、超偏極状態の半減時間を解明する。基礎検討をおこなうことにより、生体投与を目的としたトレーサーに関して超偏極のための偏極時間・偏極温度等の試適条件を解明し、動物を用いた実験への礎を築くことを目的とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

前年度に引き続き、超偏極法の一つである dynamic nuclear polarization を行い、超偏極した低分子化合物を生体に投与するための基礎実験を、1-13C ピルビン酸を用いて行った。

最初に用いた 1-13C ピルビン酸は、分子量が小さく、理論上、超偏極の半減時間が長いという特徴を持ち、かつ生体に投与した場合、脳組織中に移行しやすいことが、統合脳機能研究センターでの基礎実験から確認されている。

C. 研究結果

1-13C ピルビン酸を用い統合脳機能研究センターの超偏極装置を用いた基礎検討において、13C を含む炭素基の偏極効率を上昇させることが可能であることが実証できた。ピルビン酸については、通常の 13C-NMR を用いた生体測定にて、全身投与により脳に移行し、乳酸・ グルタミン酸・ グルタミン等に代謝されることが確認されている。

D. 考察

超偏極装置によって測定感度を上昇させ、ピル

ビン酸から乳酸への変換の過程を観察することが可能となった。近年、マウスやラット、さらにはヒトにおいても腫瘍や脳機能の評価方法として超偏極を用いる研究が、世界各地で行われている。本邦では、超偏極装置で実験できる環境は数少なく、今回の検討は国内における超偏極研究を継続していくうえで重要な基礎検討であると考えられる。

来年度以降、さらに、グリア細胞の代謝に大きくかかわっている酢酸、神経細胞の活動にかかわる乳酸についても逐次、基礎検討を進める予定である。更に、13C 化合物の分布をイメージ化する新たな MRI 撮像法の開発を並行して行う。今回のプロジェクトでは、低分子化合部を用いた基礎検討を行い、動物実験はこれらを用いた基礎検討が充分行われ具体的な生体投与方法が固まった時点で、新たに、ないしはこのプロジェクトの継続実験として申請する予定である。

E. 結論

1-13C ピルビン酸を用い統合脳機能研究センターの超偏極装置を用いた基礎検討において、13C を含む炭素基の偏極効率を上昇させることが可能であることが実証できた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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

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

1）横浜市立大学大学院医学研究科　脳神経外科学
2）新潟大学脳研究所脳神経外科学分野

研究要旨

難治性脳腫瘍である中枢神経原発悪性リンパ腫（PCNSL)に対する新規治療法の開発を目指した共同研究を継続して行った．研究代表者らが独自に樹立した 12 種のヒト由来 PCNSL 細胞株（PDX 細胞)を用いて,NF-kB 経路が糖代謝異常を制御し腫瘍細胞増殖に影響を及ぼしていることを見出した.これらの機構を制御する遺伝子発現を抑制することで抗腫瘍効果が得られることが明らかになった．cell free DNA を用いた liquid biopsy 法の開発に着手した．これらの成果をもとに次年度以降，新規分子標的治療の可能性を提唱することを目指す.

A.研究目的

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

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究を行うにあたり横浜市立大学倫理委員会及び動物実験委員会の承認を得てい(A190100003, FA19-024)．申請者らがこれまで独自に樹立した 12 種の PCNSL PDX モデルは世界随一の数であり，これらのモデルを活用して研究を行う.具体的には PCNSL に高頻度に認められる B cell receptor, Toll like receptor signaling に関連する遺伝子異常（*CD79B*, *MYD88*, *CARD11*, *A20* 等）を，全エキソン解析を用いて網羅的に解析を行う．更には RNA シークエンスにて NF-kB シグナル経路，解糖系に関連する遺伝子発現を解析する．次に正常脳組織をコントロールとし，解糖系蛋白の発現レベルに違いがあるか免疫染色、western blotting 法等にて検討を図る．また臨床データでも同様の傾向が認められるか両研究機関で独立したコホート研究を行う．NF-kB 経路に関連する遺伝子をノックダウン，強制発現を行い解糖系酵素の発現レベルに変化が生じるか検証する．更にこれらの遺伝子発現調節にて薬剤感受性に影響が生じるか検証する．In vitro レベルで細胞毒性のメカニズムを明らかにするとともに，in vivo 研究にて薬剤治療によりマウス生存期間の延長効果が得られるか検討する.更に得られた研究結果を基に新たな研究計画を立案する.

C.研究結果

申請者らはこれまでに PCNSL では BCR シグナルに

関連する遺伝子変異（CD79B, MYD88)が高頻度に認められることを世界に先駆けて見出した(Nakamura T, Tateishi K et al. Neuropathol Appl Neurobiol. 2016).また全身性 B 細胞型リンパ腫と比較してPCNSLではDNAメチル化が上昇していることを見出した(Nakamura, Tateishi K et al. Acta Neuropathol. 2017). これらの先行研究によりPCNSLの治療標的を立案した. またグリオーマ幹細胞株の樹立などの経験を通じて遺伝子変異に起因する代謝異常を標的とした治療法をこれまでに提唱してきた（Tateishi K et al. Cancer Cell. 2015, Tateishi K et al. Clin Cancer Res. 2016, Tateishi K et al. Cancer Res. 2017, Tateishi K et al. Clin Cancer Res. 2019). これらの研究基盤をもとに本研究の構想を立案するに至った。組織学的検討も終了しており、表現型が100%一致していることを確認した。既に全エキソン解析を含めた遺伝子解析は概ね完了しており、患者検体とPDX細胞間における遺伝子異常が高率に継代されていること，腫瘍内のサブクローンによるヘテロ化を確認している。またPDX 細胞株及び患者検体において解糖系が亢進していること，解糖系亢進に *MYD88*, *CD79B* などの遺伝子異常が関与していることを PET,ウエスタンブロット法，免疫組織学的検討等にて確認した。更にはcell free DNAを用いてMYD88変異がPDX マウスの血清から検出可能であることを明らかにした. これらの研究成果は現在論文再投稿中にある（Tateishi K et al. revision submitted).

D.考察

これまでの共同研究成果により，PCNSL の細胞起源,進化の基礎的背景がより明確になった. 更にNF-kB経路を標的としたアプローチはPCNSLという疾患に対する極めて重要であることを本研究により見出した. これらの結果は，今後のPCNSL 研究の核となる研究背景に繋がる可能性が高いと考えられる.同時に世界最多の PCNSL 細胞株を樹立することに成功した. この成果は今後の治療法開発や耐性機序解明などに大きく貢献できるものと考える.

E.結論

PCNSL に対して NF-kB 経路を標的とした治療アプローチは強い抗腫瘍効果を発揮す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. なし（再投稿中）

2.学会発表

1. 立石健祐，佐々木重嘉，河津正人，三宅勇平，中村大志，吉井幸恵，松下裕子，山中正二，山本哲哉，脇本浩明，永根基雄，市村幸一. ヒト由来中枢神経原発悪性リンパ腫細胞株を用いた腫瘍発生進展機構の解明、治療法探求のためのトランスレーショナル研究. 第 37 回日本脳腫瘍学会学術総会（シンポジウム，Top Scoring Abstract），金沢，2019.12.
2. 立石健祐；脳腫瘍幹細胞株の樹立と遺伝子異常を標的とした治療法開発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セミナー（教育講演），横浜，2019，10.
3. 立石健祐，佐々木重嘉，河津正人，三宅勇平，中村大志，吉井幸恵，松下裕子，山中正二，山本哲哉，脇本浩明，永根基雄，市村幸一. ヒト由来中枢神経原発悪性リンパ腫細胞株を用いた腫瘍発生進展機構の解明、治療法探求のためのトランスレーショナル研究. 第 78 回学術総会，大阪，2019，10.
4. 立石健祐，佐々木重嘉，河津正人，三宅勇平，中村大志，吉井幸恵，松下裕子，山中正二，山本哲哉，脇本浩明，永根基雄，市村幸一. ヒト由来中枢神経原発悪性リンパ腫細胞株を用いた腫瘍発生進展機構の解明、治療法探求のためのトランスレーショナル研究 20 回日本分子脳神経外科学会（シンポジウム），名古屋，2019，5.

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

申請中（横浜市立大学）

2.実用新案登録

3.その他

脳研究所は本研究の中で特に liquid biopsy 解析に重要な役割を果たしている.

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

特発性正常圧水頭症患者脳脊髄液中のバイオマーカー診断と重症度分類の確立

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

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

研究要旨

特発性正常圧水頭症（iNPH）は認知障害，歩行障害などの症候を呈する高齢者に特有の疾患で，主に髄液吸収障害を原因とし，髄液シャント介入が主な治療である．研究代表者らの先行研究により神経毒性蛋白の髄液排泄経路が阻害され，神経毒性蛋白が脳実質内に沈着しアルツハイマー(AD)病理を併発した iNPH 患者は症状改善に乏しい．本研究では，髄液シャント術後の iNPH 症状，特に認知機能の改善には，髄液を介した病的な神経毒性蛋白の排泄が必須との仮説を立て，iNPH の臨床像，アミロイドβ重合体，異常リン酸化タウ蛋白に代表される髄液中の神経毒性蛋白測定を実施し，治療予後を反映した重症度分類を確立する．

A.研究目的

特発性正常圧水頭症（iNPH）は認知障害，歩行障害などの症候を呈する高齢者に特有の疾患で，主に脳脊髄液（CSF）吸収障害を原因とし，髄液シャント介入が主な治療となる．症候からは他の神経変性疾患との鑑別が困難であり，またこれらの疾患が併存する場合も少なくないため，様々なバイオマーカーによる鑑別診断が試みられる．
我々は、iNPH における CSF 代謝障害は髄液中のアミロイドβ蛋白(Aβ)の凝集を促進させているとの仮説を立て，iNPH 患者における CSF 中高分子 Aβオリゴマー（HMAβ）を定量評価し，他の神経変性疾患と比較した．さらに iNPH 患者において髄液シャント術前後の変化を解析し，CSF を介した病的蛋白の代謝変化を確認した．

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

52 名の iNPH 患者(年齢中央値 76.5 歳)，27 名の健常高齢者(HC；77.5 歳)，16 名のアルツハイマー病(AD；75.6 歳)，15 名のパーキンソン病患者(PD；70.8 歳)，14 名の進行性核上性麻痺患者(PSP；71.0 歳)を対象とした．各群間で CSF 中 HMAβ，Aβ$_{1-42}$，Aβ$_{1-38}$，pTau を測定した．髄液中 HMAβ（9 量体以上）の定量評価による他の神経変性疾患との鑑別の検知力を ROC（Receiver Operating Characteristic)曲線による解析で評価した．

また iNPH 患者を，CSF 中リン酸化タウ(pTau)濃度 <30pg/mL および DAT scan による集積低下を認めない（specific binding ratios，SBR values ≥3）を併存神経変性疾患のない iNPH，pTau≥30pg/mL を AD 併存 iNPH，SBR<3 を Parkinson’s spectrum (PS)併存 iNPH と定義し，3 群に分類した．iNPH 群においては術前および術後 1 年で CSF を採取し，HMAβ，Aβ$_{1-42}$，Aβ$_{1-38}$，pTau を測定し，Mini-Mental State Examinaton (MMSE score)，Frontal Assessment Battery (FAB)，iNPH grading scale による評価を行った．

順天堂大学脳神経外科学教室の CSF バンクに保管された iNPH 患者のシャント治療介入前に検査で得られた CSF 検体を用いて行われた．シャント介入による症状の改善度，経過中の機能予後を術

前CSFのバイオマーカーから予測する後方視的研究である.本研究は順天堂大学医学部倫理委員会で審査を受けており，すでに承認を得たうえで実施する．対象者には研究の趣旨説明文書を配布し，研究の目的・プログラム内容と方法・調査内容と方法の説明，調査は匿名で行い個人情報は厳重に保護され，研究への参加は自由意志に基づき不参加によって何も不利益はないことを伝え，書面にて同意を得た上で研究に参加していただいた.

C.研究結果

CSF中HMAβ濃度は，HC(mean 3.53±1.20[SD] pM)，AD(6.01±1.18 pM)，PDD/DLB(3.30±0.88 pM)，PSP(4.54±0.98 pM)と比較し，iNPH(平均6.52±1.65 pM)は有意に高値であった．ROC解析ではiNPH群とAD群間はAUC 0.61(カットオフ値5.65pM,感度50%，特異度76.9%）で鑑別は困難と考えられた.一方，iNPH群とPD群間およびPSP群はAUC 0.94（カットオフ値5.31 pM，感度100%，特異度82.7%）と高い検知力を示した.

CSFシャント治療を行ったiNPHはA：併存疾患の無いiNPH群(15名,75.9歳),B：AD併存iNPH18名，78.1歳)，C：PD併存iNPH（14名，74.0歳）に分類され，HMAβ濃度はそれぞれA:7.26±0.90(pM)，B：6.40±1.83(pM)，C:5.93±1.5(pM)と併存疾患の無いiNPHが最も高値で，A vs Cで統計学的有意差が認められた．さらにCSFシャント治療1年後は，それぞれA:5.10±2.02(pM)，B：6.38±2.06(pM)，C:4.80±1.64(pM)とA,C群で有意に低下が認められた.

D.考察

iNPH病態下ではCSFは停滞し，シャント治療後に停滞は解除され，CSFターンオーバーが加速される．iNPHが他の神経変性疾患よりHMAβ濃度が高値であったのは，CSF代謝の停滞によりAβ凝集が高まる，あるいは9量体30kDa以上の分子量の大きいHMAβの排泄経路が，通過障害があり，貯留された可能性が推察された.

E.結論

HMAβはiNPHにおいて特異的に高値であり，有用な診断マーカーと考えられた．またiNPHに対するCSFシャント術は，髄液中のAβ凝集を抑制す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

なし

2.学会発表

1. Madoka Nakajima, Tuomas Rauramaa, Petra M Mäkinen, Mikko Hiltunen, Sanna-Kaisa Herukka, Merja Kokki, Henna-Kaisa Jyrkkänen, Nils Danner, Antti Jukkari, Anne M Koivisto, Juha E Jääskeläinen, Masakazu Miyajima, Ikuko Ogino, Akiko Furuta, Chihiro Akiba, Kaito Kawamura, Chihiro Kamohara, Hidenori Sugano, Yuichi Tange, Kostadin Karagiozov, Ville Leinonen, Hajime Arai: Diagnosis of idiopathic normal pressure hydrocephalus using protein tyrosine phosphatase receptor type Q concentration in the cerebrospinal fluid. Hydrocephalus2019 Sep 13-16. 2019, Vancouver, Canada
2. 中島　円: iNPHと併存する神経変性疾患について．第16回 新潟県脳機能解析研究会，新潟, 22 Aug 2019
3. 中島　円: 特発性正常圧水頭症におけるPTPR type Qの髄液診断価値と脳内での役割―日本とフィンランドの多国間分析．日本脳神経外科学会第78回総会，大阪,9.Oct.2019
4. 中島　円，秋葉ちひろ，宮嶋雅一: 特発性正常圧水頭症におけるPTPR type Qの髄液診断価値．第38回日本認知症学会学術集会，東京, 7. Nov. 2019

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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

研究代表者氏名　近藤　夏子 1)
研究分担者氏名　稟田　学 2)，藤井　幸彦 2)

1) 京都大学複合原子力科学研究所　粒子線腫瘍学　2) 新潟大学脳研究所　脳神経外科教室

研究要旨

膠芽腫は予後が極めて悪く、再発は必発である。その再発形式は局所再発が 80%以上である。我々はホウ素中性子補足療法(Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)を再発膠芽腫患者に対して行い、予後を延長してきた。BNCT は Boronophenylalanine（BPA）を投与し、ホウ素 ^{10}B を取り込んだ腫瘍細胞に熱中性子が照射されると、^{10}B と熱中性子が反応しα粒子と Li 反跳核が発生する。これらは極短飛程の高 Linear Energy Transfer(LET)放射線で腫瘍細胞を選択的に破壊・死滅させる。しかし、BNCT 後も再発する。再発の特徴として、標準治療に比べて、脳脊髄液播種の形式が多かった。脳脊髄液播種は、BNCT が誘引したのか、または腫瘍の特徴であるのかは明らかではない。我々は細胞間コミュニケーションツールとして注目されている、細胞外小胞の中の exosome が BNCT 後の脳脊髄液播種と関係があるかを調べる。

A. 研究目的

膠芽腫は手術・化学放射線療法を用いても生命予後は極めて悪く 15 か月~18 か月である。通常は局所再発が 80%以上であるが、細胞選択的高 LET 放射線治療であるホウ素中性子捕捉療法（BNCT）によって腫瘍の局所制御の向上が可能となってきた。しかし脳脊髄液腔播種を防ぐことができず最大の死因(37.5%)となっている。本研究では膠芽腫の放射線治療後に生じる脳脊髄液腔播種に関するメカニズムを、exosome を調べることで明らかにする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

１．膠芽腫細胞の細胞培養液中に含まれる exosome を BNCT 照射群、非照射群から抽出する。

①Exosome free の Fetal bovine serum (FBS) を Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)培地中に 10%添加し、膠芽腫細胞 (U87MG) を 37℃ CO_2 インキュベーターで 2 日間程度培養する。BPA 非投与・非照射群、BPA 投与非照射群、BNCT 群、BPA 非投与・熱中性子照射群の 4 群を作る。BPA 投与群は 25ppm の濃度で BPA を照射前日に添加する。1群 3×10^6 個以上の細胞を準備する。

②PBS でリンス、トリプシン処理を行い 1×10^6 cells/mL の濃度で BPA 25 ppm 添加あり or なしの DMED 培地(FBS free)中に細胞懸濁液を作る。エッペンチューブに移し、京都大学複合原子力科学研究所の重水照射設備（レール）で熱中性子線照射を 1 時間行う。

③各細胞群を 1000rpm で 3 分遠心後、上清を捨てて Exosome free FBS 10% DMEM 1ml に細胞懸濁液を作り、9ml の同培地を入れた 10 cm dish に播種する(1×10^6 cells / dish)。

④各群、播種 48 時間後に培養上清を 50ml チューブに回収し、2000 rpm 20 分 4℃で遠心後、0.2 μm の滅菌フィルターでろ過し、- 80℃で凍結保存する。Dish の細胞は RNA 用サンプルとして QIAzol で溶解し凍結保存した。

⑤④で保存した培養上清を融解し、遠心式限外ろ過フィルターユニット（アミコンウルトラ-15, 100kDa）を用いて 4 ℃、4000G で 2 時間、遠心し、500μL に濃縮する。

⑥サイズ排除クロマトグラフィー法・qEV original カラムを用いて PBS500 μL 中にエクソソームを回収する。そのうち、450μL は-80℃で凍結保存する（proteomics 解析用）。

⑦残りのエクソソーム in PBS 50μL のサイズ・濃度を qNano ナノ粒子マルチアナライザーを用いて測定する。

C. 研究結果

4 群のエクソソームの粒子径は直径 50-150nm であることを確認（平均直径 110-120nm）した。それぞれのエクソソームの濃度(/mL)は BPA 非投与・非照射群が 2.68×10^{9}、BPA 投与・非照射群 1.89×10^{8}、BNCT 群 1.18×10^{8}、BPA 非投与・熱中性子照射群 1.84×10^{9} であった。

D. 考察

BPA 非投与・非照射群に比べて、BPA 投与・非照射群でエクソソームの量が 10 %以下に減少した理由は現在不明である。熱中性子照射のみの BPA 非投与・熱中性子照射群では 70 %程度に減少した。BNCT 群が最も少なく 5 %以下に減少した。細胞にストレスがかかり、減少したと考えられる。

E.結論

今後、凍結保存したエクソソームをペプチドに断片化し､LC-MS/MS を用いて protomics 解析する。BNCT 後の再発形式に影響を及ぼす因子があるか否かについて調べる。また凍結保存した細胞そのものについても BNCT の生物効果について調べ、エクソソームと比較する予定である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表　未発表

2. 学会発表　未発表

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

未定。

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

RNA-seq 解析を用いるがん性疼痛と難治性神経障害性疼痛に関連分子の探索・同定

研究代表者 伊藤 誠二[1)]
研究分担者 池内 健[2)]、原 範和[2)]、松村 伸治[3)]、片野 泰代[3)]、舩津 宣雄[3)]、稲田 有史[4)]

[1)]大阪医科大学麻酔科学教室、[2)]新潟大学脳研究所、[3)] 関西医科大学医化学講座、[4)]稲田病院

研究要旨

本研究の共同利用の目的は RNA-seq 解析により病態関連の遺伝子の同定とその機能の解明にある。研究代表者らが同定した転写因子 *0vo12* のノックアウトマウスは、血管形成不全、神経管閉鎖不全等により胎生 9.5-10.5 日で致死するが、*Ovol2* の機能は不明である。第 1 回目は E7.5 の *Ovol2*$^{+/-}$ と *Ovol2*$^{-/-}$ マウスの RNA-seq 解析を行い、*Ovol2* 関連遺伝子として *Grhl2, Rab25* などが有意に上昇していた。第 2 回目は E9.5 の *Ovol2*$^{+/-}$ と *Ovol2*$^{-/-}$ 胎盤と卵黄膜マウスの RNA-seq 解析を行い、血管新生に関係する遺伝子の顕著な発現の変動が探索でき、現在 *Ovol2* の血管形成における役割の解明を行っている。

A. 研究目的

本研究の共同利用の目的は RNA-seq 解析により病態関連の遺伝子の探索・同定とその機能の解明にある。RNA-seq 解析には、明確な表現型があり、遺伝子の発現に明確な差があり、機能的に絞り込むことができる系の確立が必要となる。本研究では、*Ovol2* の血管形成に関連する遺伝子とがん性疼痛に関連する遺伝子の探索を共同研究で行う。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

胎生期における血管形成は胎盤、卵黄膜、尿膜で見られる。Ovol2 の血管形成における役割を解明するために、*Ovol2*$^{+/-}$ と *Ovol2*$^{-/-}$ マウスの E7.5 と E9.5 の胎仔、胎盤、羊膜から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行う。

がん性疼痛に関連する遺伝子は、がん性疼痛モデルを作製した後、初代培養した後根神経節細胞を標識し、セルソーターで分離後 RNA を調製し、RNA-seq 解析を行う。2 番目の課題は現在、条件検討中であり、今回は 1 番目の課題について報告する。

C. 研究結果

E7.5 の *Ovol2*$^{+/-}$ と *Ovol2*$^{-/-}$ マウスの解析結果、上昇する上位遺伝子 22 位に *Rab25, Spint2, Grhl2* が含まれていた。*Grhl2* は腎上皮の管腔形成に関与すること、*Grhl2* の下流に *Ovol2* があり、*Grhl2* の機能を代替できることが最近報告されている（*JASN* **26**:2704-15, 2015）ことより、本研究の RNA-seq 解析は期待がもてる結果であった。そこで、*Ovol2* の血管形成不全の明確な表現型が現れる E9.5 の *Ovol2*$^{+/-}$ と *Ovol2*$^{-/-}$ マウスの胎盤と卵黄膜から RNA を抽出し RNA-seq 解析した結果、血管形成に関与する遺伝子の変動が上位にみられ、現在、Ovol2 の血管形成の役割の解明を進めている。

D. 考察

RNA-seq は Microarray では得られない、予想外かつ有意義な結果を提供するが、膨大な結果から、必要な情報を抽出することが重要である。

E. 結論

RNA-seq 解析により、*Ovo12* の標的遺伝子の同定と機能解明につながることを期待している。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Pham VM, Matsumura S, Katano T, Funatsu N, Ito S. Diabetic neuropathy research: from mouse models to targets for treatment. Neural Regen Res. 14:1870-1879, 2019.

2. Okuda-Ashitaka E, Kakuchi Y, Kakumoto H, Yamanishi S, Kamada H, Yoshidu T, Matsukawa S, Ogura N, Uto S, Minami T, Ito S, Matsumoto K. Mechanical allodynia in mice with tenascin-X deficiency associated with Ehlers-Danlos syndrome. Sci Rep in press, 2020.

3. Fujiwara A, Nakao K, Ueno T, Matsumura S, Ito S, Minami T. Stiripentol alleviates neuropathic pain in L5 spinal nerve-transected mice. J Anesthesiol in press, 2020.

1～3 の論文は、RNA-seq 解析に必要な RNA 抽出ための動物モデルの実験の成果である。

2. 学会発表

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

認知症関連疾患リスク遺伝子（特に *ACE*, *ABCA7*、*FUS* に関して）検索

研究代表者　赤津　裕康 1)
研究分担者　宮下　哲典 2)，池内　健 2)

1) 名古屋市立大学大学院医学研究科地域医療教育学　2) 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野

研究要旨

福祉村病院の保有する認知症関連疾患患者の脳解剖症例から得た凍結脳を用いて認知症関連疾患における各種リスク遺伝子の検索を進めた。その中でアルツハイマー病患者脳での *ABCA7* 遺伝子多型解析において、日本人特有のバリアントを発見した。

A. 研究目的

認知症関連疾患のリスク遺伝子検索により認知症の原因、リスクファクターなどの検討を行い、診断、治療に役立てることを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

福祉村病院の保有する認知症関連疾患患者の脳解剖症例から得た凍結脳由来ゲノム DNA、全 RNA を脳研にある次世代シーケンサーを用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行うと共に、全エクソーム解析や全ゲノム解析を行い、疾患との遺伝学的関連性を検討する。

C. 研究結果

これまでの症例では *ABCA7* 多型において odds 比である程度のリスク遺伝子としての優位性が示された。また、AD8 例、コントロール 4 例の解析で日本人特有のレアバリントが示された。

D. 考察

APOE 多型を考慮した解析を行い、既存報告を確認できたとともに、これまでには報告のない人種特異的なレアバリアントが発見された点では学術的意義は大きい。

E. 結論

ABCA7 はコレステロールの細胞膜輸送で重要な働きをしており、今回 *APOE* と独立に AD 発症のリスク因子としての検討により、その可能性が証明された。また日本人固有のレアバリアントも発見でき、人種間検索も必要であることが証明された。

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

1. 第 38 回日本認知症学会学術集会・日本人集団における *ABCA7* 機能喪失型変異とアルツハイマー病発症リスクとの関連（2019 年 11 月・東京）
2. 第 38 回日本認知症学会学術集会・ヒト死後脳における *APP*・*APOE* の遺伝子発現解析・(2019 年 11 月・東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

筋強直性ジストロフィーにおけるタウ病変の評価

研究代表者　高堂　裕平 1)
研究分担者　柿田　明美 2)，清水　宏 2)，樋口　真人 1)，小野　麻衣子 1)

1) 量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所　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（DM1）では筋症状を含む多彩な症状を呈することが知られているが、中枢神経症状も日常生活および QOL に影響しうる重要な症状である。神経病理学的な検討により、DM1 患者脳では異常タウ蛋白が蓄積することが知られているがその詳細については明らかになっていない。本研究では DM1 患者における脳内タウ病変の検出がポジトロン断層撮像（PET）により可能であるかの検証を目的とした。[^{18}F] PM-PBB3 リガンドによるタウ PET を、軽度の前頭葉機能障害を認めるが MMSE では認知機能障害の明らかでない DM1 患者 4 名（40 代～50 代）に実施し、昨年検討を行った脳病理所見のタウ病変の分布から PET 画像の妥当性を検討したところ、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た。[^{18}F] PM-PBB3 を用いたタウ PET は DM1 患者脳のタウ病変をとらえる可能性がある。認知機能との関連を検討するために今後は認知機能低下のある DM1 患者での撮像が必要である。

A. 研究目的

本研究では PBB3 および PM-PBB3 といった放射線医学総合研究所で開発した薬剤の、筋強直性ジストロフィー（DM1）患者脳におけるタウ病変への結合性を、蛍光染色やオートラジオグラフィーで評価し、生体脳で病変を画像化できる可能性を検討してきた。今年度は、DM1 患者脳のタウ病変を［^{18}F］PM-PBB3 を用いたタウ PET によって検出できるか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）

対象：DM1 患者 4 名。

方法：タウ PET トレーサー［^{18}F］PM-PBB3 を用いて PET 撮像を実施した。また脳構造情報は MRI を用いて取得し、得られた脳 MRI 画像と PET データを用いて、脳の各領域における［^{18}F］PM-PBB3 の集積からタウ蛋白の蓄積の有無を検討する。認知機能障害の有無は MMSE, FAB を用いて実施する。

C. 研究結果

現時点までに 4 例の DM1 患者において、タウ PET および MRI 検査を実施した。検査を実施したのは、46 歳の女性（A）、47 歳の女性（B）、58 歳の男性（C）、52 歳の女性（D）の 4 名である。全例で MMSE には低下を認めなかったが、FAB は症例 A をのぞき、B-D では 14-15 と若干低下を認め、軽度の前頭葉機能障害の存在が疑われた。タウ PET の結果、1 例には海馬に信号の集積を認め、タウの蓄積が疑われた。1 例には明らかな集積を認めなかった。残りの 2 例には、白質にびまん性の信号の集積を認めたが、分布から明らかなタウ病変とは断定できなかった。

D. 考察

軽度の前頭葉機能障害が認められる DM1 患者において[^{18}F]PM-PBB3 を用いたタウ PET を実施し、1 例でタウの蓄積の検出が疑われ、一例では明らかな集積を認めなかった。これまでの［^{18}F］

PM-PBB3 を用いたタウ PET の検討により、若年では白質の信号集積が高くなる場合が認められている。原因としては、参照領域の信号集積値の影響が考えられ、解決策を検討中である。そのため、今回は残りの 2 例で白質の信号集積高値を認めたが、この集積がタウの蓄積によるものかどうかは断定できなかった。今後、解析法の工夫や認知症の明らかな DM1 症例での撮像によりタウ検出の確度を確かめる必要がある。

E. 結論

DM1 患者脳においてタウ蛋白を PET イメージングによって描出できる可能性が示唆された。今後は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、および白質の集積を検討するための解析法の工夫を検討していく必要がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. medRxiv, doi:10.1101/2020.03.05.20028407, 2020

2. 学会発表

1. ^{18}F-PM-PBB3 (^{18}F-APN-1607) uptake associates with plasma NfL level and motor disability in patients with progressive supranuclear palsy, Human Amyloid Imaging 2020, 2020/01/15-17, Miami

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成31年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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。本年度の研究では、発達期の大脳皮質神経細胞に対し内在性タンパク質を蛍光標識するSLENDR 法を適用し、内在性タンパク質を生体2 光子顕微鏡イメージングすることに成功した。現在、内在性タンパク質と細胞形態を同時観察する条件を検討中であり、今後タンパク質動態と神経回路形成の関連が明らかになると期待される。また、本研究で開発される技術は病態モデルマウスにも適用可能であるため、病態解析にも貢献できることが期待される。

A.研究目的

発達期における大脳皮質神経回路の正確な形成は、認知などの高次脳機能に必須である。正確な神経回路形成には細胞内で無数のタンパク質が働くことが必要である。しかし生体内においては、細胞内タンパク質の時空間的動態とその回路形成との関連はほとんど不明である。

これまでの多くの研究において、タンパク質の細胞内局在は、蛍光タンパク質と融合した目的タンパク質を外来的に導入しその蛍光を観察することで調べられてきた。しかし外来的導入では、タンパク質の発現量の制御が困難であり、しばしばタンパク質の細胞内分布を再現できない。この回避方法としては、蛍光タンパク質と目的タンパク質の遺伝子を融合したノックイン動物の作成が挙げられるが、高いコスト・長い作成期間・作成失敗リスクのため、普及は限られていた。近年、研究分担者三國らによりCRISPR/Cas9 法を用いた生体内の内在性タンパク質の蛍光標識法が開発されたことで（SLENDR 法、Mikuni et al., Cell 2016）、内在性タンパク質の生体イメージングの可能性が広がった。しかし現在までのところ、SLENDR 法で標識されたタンパク質の分布は固定組織で解析されており、生体内でのタンパク質の動態解析はなされていなかった。

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

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

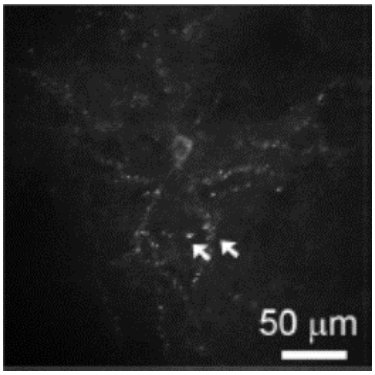
麻酔下で妊娠14 日齢マウスの子宮内の胎仔の脳にDNA 溶液を投与し、電気パルスを与えることで遺伝子導入した。その後、子宮を戻し腹部を縫合した。術後はマウスを保温し回復させた。

・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、麻酔下において生後2週齢マウスの頭部に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。

C.研究結果

研究では、まず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。次に、作成したプラスミドを子宮内エレクトロポレーション法で導入することで、GFPと融合された内在性シナプス後部局在タンパク質を大脳皮質第2/3層の興奮性神経細胞に発現させた。GFPと融合したタンパク質の蛍光シグナルは、生後2週齢マウスにおいて生体2光子顕微鏡観察することに成功した（図）。



図,SLENDR 法で蛍光標識された内在性シナプス後部タンパク質の発達期生体イメージング

生後 16 日齢マウスの大脳皮質第 2/3 層興奮性神経細胞の観察例。GFP 融合したシナプス後部タンパク質（矢印部）を生体 2 光子顕微鏡イメージングした。

D.考察

生体イメージングで得られたGFPシグナルは、樹状突起上に点状に観察された（図矢印部）。これはシナプス後部の分布と類似しており、SLENDR用プラスミドの導入によって、標的遺伝子の配列部位にGFPのDNA配列が挿入されたことが示唆される。しかしながら、今後シナプス後部マーカーとの共局在を調べる、シーケンシングによりGFPのDNA配列が標的遺伝子のDNA配列に正しく挿入されていることを調べるなど、確認実験が必要である。

また、GFP標識されたシナプス後部タンパク質の細胞内局在と、神経細胞形態変化の関連を調べるためには、ノックインされた細胞の形態をRFPなどの別の蛍光タンパク質で標識する事が必要であるため、現在条件検討中である。

E.結論

本研究は、大脳皮質神経回路形成に細胞内タンパク質の動態がどのように関わるかを解明することにつながる。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

・Hidenobu Mizuno

In vivo imaging of the developing cerebral cortex to elucidate the mechanism for activity-dependent circuit maturation.

IBRO 2019 (The 10th IBRO World congress of Neuroscience): Development and plasticity of brain connectivity, Daegu, Korea 2019年9月25日（シンポジウム口演）

・Hidenobu Mizuno

Elucidating the mechanisms for activity-dependent neuronal circuit formation by in vivo imaging.
Korea Advanced Institute for Science and Technology (KAIST), Daejeon, Korea 2019年9月19日（招待口演）

・水野 秀信
In vivo imaging of the developing cerebral cortex to elucidate the mechanisms for activity-dependent circuit formation.
九州大学・医学研究院 2019年5月9日（招待口演）

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得
なし

2.実用新案登録
なし

3.その他
なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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・放射線医学総合研究所　2) 新潟大学脳研究所・病理学分野

研究要旨

TDP-43 タンパクは筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症などの発症と密接に関連しており、生体内での TDP-43 の蓄積を可視化する技術は、これらの疾患の早期診断や発症メカニズムの解明、TDP-43 を標的とする疾患治療薬の薬効評価に寄与することが期待される。本研究ではポジトロン断層撮影により TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する新規 PET プローブの開発を行う。

A. 研究目的

TDP-43 タンパクは筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症などの発症と密接に関連しており、生体内での TDP-43 の蓄積を可視化する技術は、これらの疾患の早期診断や発症メカニズムの解明、TDP-43 を標的とする疾患治療薬の薬効評価に寄与することが期待される。本研究ではポジトロン断層撮影（PET）により TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する新規 PET プローブを開発するべく、前頭側頭葉変性症および筋萎縮性側索硬化症死後脳ホモジェネートを用いた親和性評価やオートラジオグラフィーにより新規 PET プローブ候補化合物の TDP-43 病変への結合性を評価する。良好な結合性が確認された候補化合物について、さらなる特性評価を in vitro および in vivo で行い、PET プローブとしての有用性を検証する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

対象：前頭側頭葉変性症および筋萎縮性側索硬化症の死後脳

方法：新規 PET プローブ候補化合物の TDP-43 病変への結合性を評価するために、PET 核種標識体候補化合物を用いて以下の解析を行う

① 死後脳組織ホモジェネートを用いた結合実験 (homologous binding assay)
② 死後脳組織切片を用いたオートラジオグラフィ
③ 組織化学的解析（免疫染色、β シートリガンドによる蛍光染色）。

C. 研究結果

前頭側頭葉変性症死後脳固定標本を用いた組織化学的解析により、約 100 種の PET プローブ候補化合物において、TDP-43 病変への結合性評価を実施した。その結果、約 40 種の候補化合物において、高濃度溶液（μM）中での化合物・TDP-43 病変間の結合を確認した。これらの候補化合物の PET プローブとしての性能を評価するために、PET 核種標識をした候補化合物の低濃度溶液（nM）中での化合物・病変間の結合性を評価した。その結果、候補化合物 1 種において、前頭側頭葉変性症死後脳組織切片を用いたオートラジオグラフィにて、TDP-43 病変蓄積領域への当該候補化合物の結合が確認された。また、前頭側頭葉変性症死後脳組織ホモジェ

ネートを用いた結合実験により、当該候補化合物が中程度の親和性（Kd=10～100 nM）にて死後脳組織ホモジェネートに対して結合を示す可能性が明らかとなった。さらに、PET 核種標識をした当該候補化合物を用い、野生型マウスにおいて PET スキャンを実施した。その結果、末梢投与した当該候補化合物は充分に脳に移行し、また、脳からのクリアランスも良く、中枢をターゲットとした PET プローブとして適切な動態を示すことが明らかとなった。

D. 考察

本研究により、TDP-43 PET プローブ候補化合物 1 種が、TDP-43 病変への結合親和性は中程度であるものの、中枢をターゲットとした PET プロ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、前頭側頭葉変性症死後脳固定標本を用いた組織化学的解析による 100 種近い候補化合物の特性評価から、化合物構造と TDP-43 病変への結合活性の相関に関するデータの蓄積が実現した。今後、本研究で見いだされた化合物をリード化合物として、当該化合物の有する良好な動態を維持しつつ、TDP-43 病変への結合親和性を向上させる構造展開を実施することで、TDP-43 病変を *in vivo* PET にて画像化する有用なプローブの開発が期待される。

E. 結論

本研究において、PET により TDP-43 の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化する PET プロ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

1. Journal of Neurosciesnce, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2880-19.2020, 2020

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

脳疾患ゲノム情報に基づく病態モデルマウスの開発に関する研究

研究代表者　吉木　淳 [1)]
研究分担者　綾部　信哉 [1)] 仲柴　俊昭 [1)] 天野　孝紀 [1)] 笹岡　俊邦 [2)] 池内　健 [2)]

[1)] 理化学研究所バイオリソース研究センター　[2)] 新潟大学脳研究所

研究要旨

理化学研究所バイオリソース研究センター（理研 BRC）は、我が国の実験動物マウスの中核機関としてヒト疾患研究に有用なモデルマウスを収集・保存・提供ならびに開発している。新潟大学脳研究所（脳研）には、脳疾患臨床ゲノム情報及び病態に関する知見の蓄積に加えて疾患モデルマウスの優れた開発能力がある。両機関の連携により高齢社会が直面する脳疾患の治療・創薬に有用なモデル動物を、ゲノム情報及び病態に関する知見に基づき開発する。さらに、脳研と共同で開発された脳神経系疾患モデルマウスを理研 BRC に寄託して頂き、研究コミュニティに提供し、脳神経系の基礎から医療・創薬研究に貢献する。

A.研究目的

日本人患者のゲノムシークエンス及び大規模サンプルを用いたゲノムワイド関連解析（GWAS）により認知症のゲノム要因が明らかにされつつある。さらに、ゲノム編集と発生工学技術の進展により、患者のバリアント情報に基づくヒト疾患の精密モデルの作出が期待されている。本共同研究では、臨床ゲノム情報の解析から得られた知見に基づき、アルツハイマー病の複数の遺伝子変異やレアバリアントを導入したマウスモデルの開発を目指す。さらに、脳研と国内研究者の共同で開発された先端的な脳疾患モデルマウスの寄託を促進し、理研 BRC を通じて国内外の研究コミュニティに提供して脳疾患研究の推進に貢献する。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

メール通信および脳研における打合せにより臨床ゲノム情報を収集・整理する。また、既存の疾患モデル・病態モデルの特性ならびにヒト疾患に関するゲノム情報および病態に関する情報を収集し、マウスのゲノム改変の設計に必要な情報を整理する。さらに、脳研において開発済みの先端的なモデルマウスについて、開発研究者に寄託を依頼し、承諾が得られた系統について、MTA 等の適切な手続きを経て収集、公開する。

C.研究結果

笹岡教授とは神経変性疾患を対象としたヒト疾患モデルマウス、ドーパミン受容体変異マウスとドーパミン関連遺伝子の変異マウスの整備について打ち合わせを継続している。脳研・池内健教授からはアルツハイマー病・タウオパチーの疾患変異に関する助言をいただいている。平成 31 年度脳研究所合同セミナー（2 月）においては、理研 BRC におけるヒト疾患モデル開発の新たな体制について紹介するとともに参加研究者との意見交換を行った。

新潟大学脳研および新潟大学脳研との共同研究により開発された遺伝子改変マウス系統の理研 BRC への寄託は本度までに累計 46 系統に達し、36 系統をウェブカタログから公開している。崎村教授らによって開発されたアルドラーゼ C 遺伝子座に蛍光タンパクをノックインしたマウス（RBRC10927 C57BL/6N-Aldoc$^{tm1(tdTomato)Ksak}$）、

および医歯薬総合研究科・竹林教授らによって樹立された Myo6 遺伝子に変異をもつ自然発生ミュータントマウス(RBRC10790 STOCK Myo6^{ksv}/Htak)を寄託いただき、BRCから公開し、提供体制を整え、脳科学研究の推進に貢献した。

マウス作出法に関して、BRC を含めた国際共同研究により CRISPR-Cas9 を用いたコンディショナルノックアウトマウス作製法の検証を行った。loxP 配列を含む 1 本鎖オリゴ 2 本を用いる手法は作製効率が極めて低いため、1 本のノックインテンプレートを使用する手法が適切であることを報告した。本研究を通して効率的な遺伝子改変マウス作製法が普及することは、動物実験における使用動物数の削減と研究コミュニティにおける新たなマウスリソースの作出に貢献することが期待できる。

さらに、卵管膨大部へ直接エレクトロポレーションする GONAD 法によりマウス受精卵へのゲノム編集を行った。これにより、C57BL/6N マウスの ALS 関連遺伝子に変異を有する 1 系統を樹立することができた。GONAD 法により採卵と仮親の準備等の実験操作を省略可能となり、ゲノム編集マウス作製のさらなる効率化が期待される。遺伝的背景による神経変性疾患の発症率の違いを検証する実験でも JF1 系統に対して GONAD 法を用いて 1 系統の遺伝子ノックアウトマウスが得られている。

D.考察

E.結論

今後もマウスリソースの利活用に関する協力関係を継続・発展させ、新たなヒト疾患モデルマウスの開発状況に関する情報収集を行うと共に、特にアルツハイマー病などの神経変性疾患の研究ならびにドーパミンおよびその関連分子の機能研究に有用なマウス系統を中心に情報収集と意見交換を行う計画である。

F.研究発表(上記課題名に関するもの)

1.論文発表

1. Gurumurthy CB, O'Brien AR, Quadros RM, Adams Jr J, Alcaide P, Ayabe S（6/113 番目）, Nakashiba T（57/113 番目）, Yoshiki A（100/113 番目）et al. Reproducibility of CRISPR-Cas9 methods for generation of conditional mouse alleles: a multi-center evaluation. Genome Bio. 20(1):171, 2019.
2. Wilar G, Shinoda Y, Sasaoka T, Fukunaga K. Crucial Role of Dopamine D2 Receptor Signaling in Nicotine-Induced Conditioned Place Preference. Mol Neurobiol. 2019 Dec;56(12):7911-7928. doi: 10.1007/s12035-019-1635-x. Epub 2019 May 25. PubMed PMID: 31129809.
3. Shioda N, Imai Y, Yabuki Y, Sugimoto W, Yamaguchi K, Wang Y, Hikida T, Sasaoka T, Mieda M, Fukunaga K. Dopamine D(2L) Receptor Deficiency Causes Stress Vulnerability through 5-HT(1A) Receptor Dysfunction in Serotonergic Neurons. J. Neurosci**.** 2019 Sep 18;39(38):7551-7563. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0079-19.2019.
4. Nakamura T, Rios LC, Yagi T, Sasaoka T, Kitsukawa T. Dopamine D1 and muscarinic acetylcholine receptors in dorsal striatum are required for high speed running. Neurosci Res. 2019 Dec 5. pii: S0168-0102(19)30654-6. doi: 10.1016/j.neures.2019.12.001.
5. Saito N, Tainaka K, Macpherson T, Hikida T, Yamaguchi S, Sasaoka T. Neurotransmission through dopamine D1 receptor is required for aversive memoryformation and Arc activation in the cerebral cortex. Neurosci Res. 2020 May 4. pii: S0168-0102(20)30206-6. doi: 10.1016/j.neures.2020.04.006.

2.学会発表

1. Ayabe S, Nakashima K, Nakashiba T, Tamari T, Yanagisawa E, Iwama M, Ijuin M, Hashimoto T, Kadota M, Mizuno S, Nakade K, Nakata H, Murata T, Obata T, Yoshiki A, 「MUTANT MOUSE CREATION IN RIKEN BRC FOR THE INTERNATIONAL MOUSE PHENOTYPING CONSORTIUM」、『Frontiers in Genome Engineering 2019』、P38、Kobe, Japan、November 2019
2. 吉木淳、綾部信哉、池郁生、仲柴俊昭、平岩典子、中田初美、水野沙織、持田慶司、小倉淳郎、小幡裕一、城石俊彦、「遺伝子機能の解明と疾患研究に貢献するマウスリソース整備」、『日本プロテオーム学会 2019 年大会/第 70 回日本電気泳動学会総会』、2S2-8、宮崎、2019 年 7 月
3. 綾部信哉、「リソース機関における遺伝子改変マウスの遺伝品質管理」、『第 66 回日本実験動物学会総会』、福岡、2019 年 5 月
4. Ayabe S, Nakashima K, Nakashiba T, Tamari T,

Yanagisawa E, Iwama M, Ijuin M, Hashimoto T, Kadota M, Mizuno-Iijima S, Nakade K, Nakata H, Murata T, Obata Y, Yoshiki A、「Applying genome editing technology to mutant mouse model creation in RIKEN BRC」、『The 15th Transgenic Technology Meeting (TT2019).』、P-93、Kobe, Japan、April 2019

5. 仲柴俊昭, 綾部信哉, 吉木淳, “理研バイオリソース研究センターに収集された神経科学研究用マウスリソース” 第 42 回日本神経科学大会, 新潟, 2019 年 7 月
6. 笹岡俊邦, 齊藤奈英, 知見聡美, 佐藤朝子, 大久保直, 福田七穂, 阿部学, 川村名子, 小田佳奈子, 佐藤俊哉, 藤澤信義, 山口瞬, 田井中一貴, 崎村建司, 南部篤, “D1/D2 ドーパミン受容体コンディショナル発現マウスによる運動制御機構の解明”,平成 30 年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会, 大津, 2019 年 1 月.
7. 齊藤奈英, 知見聡美, 大久保朝子, 阿部学, 川村名子, 山口瞬, 崎村建司, 田井中一貴, 南部篤, 笹岡俊邦, “Elucidation of motor control mechanism using genetically modified mice harboring tetracycline regulated expression of D1/D2 dopamine receptors” 第 8 回生理研–霊長研–脳研合同シンポジウム, 新潟, 2019 年 3 月.

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

歩行運動の大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)、中村 徹 1)

1) 大阪大学大学院 生命機能研究科 時空生物学研究講座 心生物学研究室
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、ドーパミンによる大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。しかし、PD における運動異常はドーパミン神経細胞が欠失した後の慢性期の運動症状であり、実際の歩行中にドーパミンがどのように歩行運動に関与しているのか、など詳細な作用メカニズムは不明であった。そこで我々は、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て、マウスの歩行能力をマウス走行解析装置「ステップホイール」を用いて測定した。その結果､D1 ドーパミン受容体(D1R)cKD マウスおよび D1R 阻害剤を投与したマウスで走行能の低下が観察され、ドーパミンが急性期にも歩行・走行に影響を与えることを見出した。このことは、運動遂行時において、ドーパミンが運動を制御している可能性を示唆している。

A. 研究目的

PD において歩行障害などの運動異常が見られることから、ドーパミンが運動制御にかかわっていると考えられている。また、笹岡らが作製した D1 ドーパミン受容体(D1R)遺伝子欠損マウスおよび D2 ドーパミン受容体(D2R)遺伝子欠損マウスについて、中村、木津川らがステップホイールを用いた行動実験などを行い走行能力の解析を行った結果、両マウスともに走行に異常が観察され、D1R、D2R の走行運動への関与が示唆されている（Nakamura et al., 2014)。しかし、PD で異常が観察されるのはドーパミン量が減少した慢性期であること、また通常の遺伝子欠損マウスでは受精時にはすでに遺伝子産物が欠損しているため、ドーパミンやドーパミン受容体が実際の運動時に機能しているか否か、機能しているとしたらそのメカニズムはどのようになっているかについては不明のままであった。そこで本研究では、様々なドーパミン関連遺伝子改変マウスや薬理学的手法を用いて、実際の運動時におけるドーパミンないしドーパミン受容体の、マウスの走行や線条体運足関連神経活動への影響を解析し、歩行・走行制御におけるドーパミンの役割と基底核神経回路の機能解明を目的とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

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指定のスピードでの走行を訓練できるホイール装置である。今回は、コンピュータ制御により、ホイールの回転スピードを徐々に速くしていき、マウスがどの程度の速

度まで回転スピードに遅れずに走行可能であるか、その最高スピードを計測した。

走行時のドーパミン受容体の機能を解析するためには、ドキシサイクリン（Dox）投与によりD1R の発現を制御できるノックダウンマウスD1RcKD マウス(Chiken et al. 2015)、D1R 阻害剤SCH23390（0.1μg, 1.0μg）または D2R 阻害剤Haloperidol（0.5μg, 1.0μg）を線条体に走行30 分前に投与したマウスを用いた。

また、オプトジェネティクスにより走行中のマウスの線条体内でドーパミンを増加、減少させるために、ドーパミン細胞にリコンビナーゼ Cre を発現するマウスを用意して、ステップホイールでの走行トレーニングを行った。

なお、マウスを用いた実験、DNA 組換え実験については、新潟大学および大阪大学における審査を経て承認された実験計画に沿って、規約を遵守して行った。

C.研究結果

Dox 投与前には、野生型(WT)マウス（n = 5）と D1R cKD マウス（n = 8）で、走行可能スピードに差は観察されなかったが、Dox 投与中においてはD1R cKD マウスのみ、走行スピードが有意に低下していることが確認された(P < 0.001、T 検定)。

また、D1R 阻害剤 SCH23390 を投与したマウスでは、Saline を投与したコントロール群と比較して、低濃度条件（0.1μg）のマウスでは差は観察されなかったものの、高濃度条件（1.0μg）では有意な走行スピードの低下が観察された（p< 0.05, Steel-Dwass test)。これに対し、D2R 阻害剤 Haloperidol を投与したマウスでは、高濃度条件下においても有意な走行スピードの低下は観察されなかった。

D.考察

D1RcKD マウスでは、Dox 投与前には D1R は神経細胞に発現しており Dox 投与後に失われる。Dox 投与中にのみ走行能力が低下したことは、D1R が走行時の運動制御に関与していた可能性を示唆している。走行 30 分前に投与した D1R 阻害剤 SCH23390 によっても走行能力が低下したことは、この可能性を支持している。一方で、D2R 阻害剤である Haloperidol では走行能力の低下が見られなかったことは、運動制御機構を考えるうえで興味深い。線条体において、D1R は直接路神経細胞に、D2R は間接路神経細胞に発現している。高いスピードで走行することに関しては、間接路よりも直接路が機能する必要があるのかもしれない。

E.結論

以上の結果から、直接路神経細胞に発現する D1R が正常な運動機能発現に必要であることが示された。このことは、正常な運動のために、ドーパミンによる線条体神経細胞活動の制御が必要である可能性を強く示唆している。この点についてさらに解析を進めるためには、ドーパミン神経細胞の活動を制御して、走行、線条体神経活動への影響の解析を進める必要がある。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

1. Dopamine D1 and muscarinic acetylcholine receptors in dorsal striatum are required for high speed running.Nakamura T, Rios LC, Yagi T, Sasaoka T, Kitsukawa T. Neurosci Res. 2019 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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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)]、鈴木 実乃里 [1)]、原 怜 [1)]、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

ドーパミンやノルアドレナリン、セロトニンなどのモノアミン神経伝達物質は、脳内で情動や学習など高次神経機能の調節を行っているばかりでなく、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が、未解明な部分も多く残されている。カテコールアミン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産生細胞でタモキシフェン投与により誘導的に破壊して、臓器中のドーパミン量がどのように変化するか検討した。タモキシフェン投与後に、*Cre-Th*$^{fl/fl}$ マウスの副腎や、心臓の交感神経終末で TH 免疫反応性が低下していることを組織化学的に確認した。また、ウェスタンブロッティングによる解析の結果、TH タンパク質量が、副腎、心臓、膵臓では対照群の約 3 割まで減少した。このような条件において、腎臓 DA 量は対照群と比べて変化がなかったのに対し、膵臓 DA 量は約 4 割まで減少しており、臓器ごとに DA の低下量に違いがみられ、腎臓の DA は交感神経以外の細胞で合成されていることが示唆された。

A. 研究目的

ドーパミン・ノルアドレナリン・セロトニンなどを神経伝達物質とするモノアミンニューロンは、パーキンソン病・感情障害・統合失調症・注意欠陥多動性障害など、多くの神経精神疾患の病態と関連していると考えられているが、分子機序については未だ明らかとなっていない。これらのモノアミンは、神経伝達物質としての働きだけでなく、末梢臓器でも重要な生理機能を数多く営んでおり、中枢神経だけでなく末梢臓器を介して生理機能を変化させているが、詳細について明らかになっていない。

本研究では、モノアミン神経伝達物質合成関連遺伝子を組織特異的に破壊した時の生理機能変化・生化学的変化を解析することにより、行動や認知機能・睡眠など数々の生理機能をモノアミンニューロンがどのように調節しているか、モノアミンニューロンの異常によりどのような変化が生じるのかを明らかにすることを目的としている。

腎臓のドーパミンは、ナトリウム利尿に関与することが知られているが、ドーパミンの由来や調節機構については、ほとんど明らかとなっていない。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

Cre-loxP システムを利用した遺伝子破壊法を用いる。カテコールアミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素(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*$^{fl/fl}$ マウス)を用意する。

Th$^{fl/fl}$ マウスと、ノルアドレナリン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 マウスを交配して、DBH の発現する交感神経と副腎髄質で *TH* をタモキシフェン投与により破壊できるマウスを作製した。Cre-ERT2 は、

タモキシフェン投与によりDNA組換え酵素活性が誘導される。マウスにタモキシフェンを5日間連続で投与して、最終投与日から2週間、4週間後にソムノペンチル麻酔下で全採血してから末梢臓器を摘出し、モノアミン類をHPLC-電気化学検出器により測定した。

本研究は、東京工業大学の遺伝子組換え実験等安全委員会、および、動物実験に関する倫理審査委員会により承認されている。

C.研究結果

タモキシフェン投与後に、*Cre-Th*$^{fl/fl}$マウスの副腎や、心臓の交感神経終末でTH免疫反応性が低下していることを組織化学的に確認した。また、ウェスタンブロッティングによる解析の結果、THタンパク質量が、副腎、心臓、膵臓では2週間,4週間後に対照群(Creをもたない*Th*$^{fl/fl}$マウス)の約3割まで減少した。このような条件において、腎臓ドーパミン量は対照群と比べて変化がなかったのに対し、膵臓ドーパミン量は約4割まで減少しており、臓器ごとにドーパミンの低下量に違いがみられた。

D.考察

本研究において、タモキシフェンの投与により交感神経内と副腎髄質のノルアドレナリン産生細胞において*TH*遺伝子が特異的に破壊される。実際、副腎、心臓、膵臓でTHタンパク質量が経時的に対照群の３割にまで低下している。しかし、腎臓のDAは対照群と比べて低下しなかった。

この結果は、心臓や膵臓の臓器中のドーパミンはこれらの臓器に投射している交感神経終末で、ノルアドレナリンの前駆体として合成されているが、腎臓中のドーパミンは交感神経終末以外の細胞で作られていることを示唆した。今後腎臓でのドーパミン合成細胞および合成経路について、さらに解析を進めていく。

E.結論

末梢臓器に存在するドーパミンの由来は、臓器により異なり、主に交感神経終末に由来する臓器と、交感神経終末以外の臓器が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

2.学会発表

1. 宮嶋克也，原怜，一瀬宏：交感神経特異的チロシン水酸化酵素遺伝子破壊による末梢臓器におけるドーパミン生合成機構に関する研究. 第92回日本生化学会大会，2019年9月,パシフィコ横浜（横浜市）

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ミクログリア機能を反映する PET イメージングの開発

研究代表者　木村　泰之 1)
研究分担者　小縣　綾 1)，他田　真理 2)，柿田　明美 2)

1) 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター 脳機能画像診断開発部
2) 新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患において、タンパクの異常蓄積が最終的に神経細胞障害をきたす。そのメカニズムに、脳内の免疫を担当する主要な細胞であるミクログリアの機能異常が、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、ミクログリアに特異的に発現し、創薬標的として有望とされる分子を可視化する新規 PET リガンドの開発を行う。具体的にはミクログリアの分化・生存に必須な分子を標的とした新規 PET リガンドの開発を行い、多面的なミクログリア機能の臨床イメージングを可能にし、病態評価から創薬バイオマーカーまでの応用を目指す。

A. 研究目的

本研究の目的は、ミクログリアに特異的に発現し、創薬標的として有望とされる分子を可視化する新規 PET リガンドの評価・開発を行い、神経変性疾患の新規治療法開発に役立てることである。本研究では、ミクログリア特異的な分子として、colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) を標的とした PET リガンドの評価・開発として、CSF1R に結合するシーズ化合物を元にした PET リガンドの標識合成法の確立を行い、小動物やヒト死後脳を用いてそれらの有効性を明らかにする。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

ミクログリア特異的な分子である CSF1R に高い親和性と選択性を有し、脳移行性を認める低分子化合物である BLZ945 (CSF1R 阻害剤)を基にした新規放射性化合物を、PET リガンド候補とする。BLZ945 を塩基性条件下、[^{11}C]CH3 基を導入する最適な合成条件を確立する。合成した ^{11}C 標識 PET リガンドを健常ラットに投与し、PET イメージングによる脳移行性を評価する。

ミクログリア密度や、疾患関連ミクログリアが増えている疾患モデルマウス、標的分子を遺伝的に欠損させたマウスなどを用いて、特異結合の程度、他分子との選択性、脳内・血漿中代謝、定量性の評価を行う。また、autoradiography や 結合性試験、標的分子の特異的抗体を用いる免疫染色、レーザーマイクロディセクション質量分析イメージングなどを用いて、PET リガンドの細胞特異的な集積評価を行う。本共同研究においては、標的分子の選定や組織評価について、脳研共同研究者の助言を得る。また、開発中の PET リガンドの特性を確認し、ラットにおける autoradiography の条件検討の終了後に、新潟大学脳研究所から提供されるヒト標本を用いた autoradiography を実施する。

C. 研究結果

ミクログリアに発現する分子である colony-stimulating factor-1 受容体(CSF1R)を標的とした PET リガンドとして、[^{11}C]NCGG401 を設計・合成した。また、NCGG401 の CSF1R キナーゼ阻害活性について、BLZ945 と同程度であることを確認した。ついで、^{11}C 標識合成条件を最適化し、PET リガンドとして十分な収量、純度、比放射能を持った[^{11}C]NCGG401 の合成に成功した。

この PET リガンドを健常ラットに投与し PET イメージングすることで、脳内に取り込まれ、比較的早い洗い出しを認め、PET リガンドの動態として良好であることが明らかになった。さらに、非標識体を前投与することで、ブロッキング効果を認め、CSF1R に特異結合している可能性が高いと考えられた。また、急性神経炎症モデルとして、痙攣誘発モデルラットおよび LPS 脳内局所投与モデルを用いて評価を行い、特異結合の軽度の上昇を認め、[^{11}C]NCGG401 は CSF1R を標的とした PET リガンドとして有用と考えられた。

D. 考察

本研究では、ミクログリア特異的に発現している分子 CSF1R を標的とした PET リガンドを設計・合成し、その有用性を齧歯類の急性炎症モデルにおいて評価した。今後、アルツハイマー病モデル動物やアルツハイマー病患者剖検脳を用いた検討ならびに臨床イメージング等によって、疾患における有用性を評価する必要がある。

E. 結論

ミクログリア特異的に発現している分子 CSF1R を標的とした PET イメージングの開発を行い、健常ラット及びラット急性炎症モデルにおいてその有用性を明らかにした。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Kimura Y: PET imaging of microglia. The 5th NCGG-ICAH Symposium, Apr 11, 2019, Obu
2. 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.
3. 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
3. その他
   なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

脳バンク検体を用いた加齢に伴う脳組織のクローン再構成及び脳腫瘍発生に関する研究

研究代表者　荒川　芳輝 1)
研究分担者　柿田　明美 2)，住吉　壯介 1)，小川　誠司 1)，宮本　享 1)，藤井　幸彦 2)，
棗田　学 2)，中川　正宏 1)，住吉　壯介 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する知見は、殆ど報告がない。脳組織におけるクローンの選択・拡大について、組織特異性、頻度と程度、選択に関わるドライバー、また、その進化上の履歴を含めた微細構造にいたるまでを、微小組織採取と次世代シーケンス、単一細胞技術を駆使して、包括的に探索し、その全体像の解明を目指す。

A. 研究目的

本研究では、正常脳組織におけるクローンの拡大とこれによる組織の再構築に関する包括的な理解に基づいて、がんの発生、進展、さらには、組織の老化に関する新たな視点での理解を目指す。本研究で期待される成果は以下である。

1）ドライバー変異による脳組織のクローンの進化・拡大に関する全体像の解明。具体的には、脳におけるクローンの拡大が、どのようなドライバー変異によって駆動されるのか、いつから、どのような早さで進行するのか、それによる組織の再構築はどの程度に及ぶのか、また、炎症や環境因子はこれらにどのように影響を及ぼすのかに関する包括的な知見が得られると期待される。

2）未だ不明な点の多いがんの起源や発がんの初期過程に関して、がんにおけるクローン選択が正常組織におけるクローン拡大とどのように関連するのか、また、両者はどのような点で異なるのか、を知ることにより、「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　（倫理面への配慮を含む）

本研究では、加齢に伴った健常脳組織におけるクローンの拡大の微細構造と進化のトラジェクトリを、微小サンプリングの標的遺伝子シーケンス、全エクソンシーケンスおよび全ゲノムシーケンスや、単一細胞シーケンス等を用いて同定する。この収集したデータを解析することから、クローン拡大とこれによる組織の再構築が、どのような部位で、どのような程度で、どのようなドライバー遺伝子により、どのような時間経過で生ずるのか、を包括的に明らかにする。それらは、がん組織におけるクローン進化と多様性の拡大とどのような点で類似し、またどのような点で、区別されるのか、さらに、それは組織や幹細胞の老化とどのような機能的な関連を有するのか、それはど

のようなメカニズムによるのか、を明らかにする。

以上の結果を踏まえて、マウスモデル等を用いた機能的検証実験により、正常組織におけるクローン拡大が、発がん、老化、ストレス応答において果たす生物学的意義を明らかにする。

C.研究結果

申請者らの研究グループでは、健常食道上皮の微小サンプリングと次世代シーケンス解析によって、1)食道上皮においては、食道がんと共通するドライバー変異が頻繁に生じていること、2)それはすでに乳児期からはじまり、加齢に伴ってすべての個体の正常食道上皮であまねく認められ、3)高齢者では全食道面積の実に 80%内外が約 10,000 個もの独立なドライバー変異クローンによって覆われること、を見いだした(Yokoyama et al. Nature, 2019)。

また、潰瘍性大腸炎や正常乳管でも、上皮が多数の変異クローンで置換される症例が存在することを確認した(未発表データ)。

2019 年年度は、正常脳組織における微小サンプリングの標的遺伝子シーケンス、全エクソンシーケンスおよび全ゲノムシーケンスや、単一細胞シーケンス解析技術を確立した。さらに、脳研究所の脳バンク検体にある正常脳組織から微小サンプリングを行い、予備実験を実施した。

D.考察

これらの成果は、多数のドライバー変異クローンによる正常組織の「再構築」は、加齢に伴って、あらゆる正常組織で不可避的に生ずる現象である可能性、また、それらはがんの発症進展における「進化」や「多様性の獲得」とも密接な関係がある可能性を指し示している。

脳研究所の脳バンク検体にある正常脳組織微小サンプリングを行い、予備実験では、正常脳における各種遺伝子変異を同定できる解析技術が確立したことを確認した。そこで、十分な解析が可能と判断し、標本数を増やして解析を進める予定である。

E.結論

様々な臓器において、上皮が多数の変異クローンで置換されることを確認した。正常脳組織においても同様に変異クローンによる置換が予想され、その実態の解明を進める。

F.研究発表

1.論文発表

特記事項なし

2.学会発表

1. 荒川 芳輝　悪性脳腫瘍に対する京都大学の取り組み　第 56 回ニューロ・オンコロジィの会　特別講演　2019/1/19　東京

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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　衞藤　史博 1) 2)　笹岡　俊邦 3)　阿部　学 3)　崎村　建司 3)

1) 関西学院大学　2) 浜松医科大学　1) 新潟大学脳研究所

研究要旨

SCRAPPER は神経シナプスに局在し、神経伝達物質放出の制御にかかわるユビキチン E3 リガーゼである。*Scrapper* 遺伝子ノックアウト（SCR-KO）マウスが生後致死であるため、成体での SCRAPPER 分子の機能を十分に解析できなかった。そこで部位特異的なコンディショナル KO（cKO）マウスを作製し、その詳細な機能解析を行うことを計画した。前年度までに、コンディショナルノックアウトマウス作製のための floxed 型のベクターを構築し、組換え ES 細胞株よりキメラマウスを作出している。本共同研究により floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスが得られている。現在、ドライバーマウスとの交配により神経組織特異的 SCR-cKO マウスの作製を行っている。また、発生初期から Cre 組換え酵素を発現するドライバーマウスとの交配により、SCR-KO マウスを作製し解析を行っている。

A. 研究目的

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浜松医科大学大学の委員会承認を得たうえで、内規に準じて行う。実験時には適切に麻酔処理を行い、動物への苦痛を可能な限り除く。

C. 研究結果

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

個体より標的 floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスを得ている。現在までに、浜松医大への導入を完了し、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。現在、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。また、発生初期から Cre 組換え酵素を発現するドライバーマウスとの交配により、SCR-KO マウスを作製し以前に解析した C57BL/6J 系と 129/Sv 系混合バックグラウンド null ノックアウトマウスと同じ表現型が得られるかを合わせて検討している。得られたマウスの表現型解析のために、共同研究の継続を予定している。

D. 考察

脳部位特異的な Cre 発現マウスを利用して、部位特異的なノックアウトマウスを作製して解析に供する計画であることから、神経細胞で特異的にノックアウト可能なドライバーマウスラインとして Emx1-Cre マウスの導入することとした。今後、さらに交配を行いノックアウトマウスラインの樹立が必要であるが、交配成績が芳しくない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、解析に適するドライバーマウスの選択および交配、その後の解析を行う必要がある。現存するノックアウトマウスはバックグラウンド系統が複数の雑種となっていることから、新たに得られるマウスを用いた解析はバックグラウンド系統の影響を消去できる点でも有用であると考える。

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. Takeyama E, Islam A, Watanabe N, Tsubaki H, Fukushima M, Mamun MA, Sato S, Sato T, Eto F, Yao I, Ito TK, Horikawa M, Setou M.
   Dietary Intake of Green Nut Oil or DHA Ameliorates DHA Distribution in the Brain of a Mouse Model of Dementia Accompanied by Memory Recovery.
   Nutrients 11(10) (2019)

2. Saito Y, Eto F, Take S, Yao I, Setou M.
   Imaging mass spectrometry reveals sodium lauryl sulfate-induced changes in skin lipoquality, principally affecting sphingomyelin.
   Medical Mass Spectrometry 3:35-42 (2019)

3. Aizawa F, Sato S, Yamazaki F, Yao I, Yamashita T, Nakamoto K, Kasuya F, Setou M, Tokuyama S.
   N-3 fatty acids modulate repeated stress-evoked pain chronicity.
   Brain Res. 1714:218-226 (2019)

4. Mihara Y, Horikawa M, Sato S, Eto F, Hanada M, Banno T, Arima H, Ushirozako H, Yamada T, Xu D, Okamoto A, Yamazaki F, Takei S, Omura T, Yao I, Matsuyama Y, Setou M.
   Lysophosphatidic acid precursor levels decrease and an arachidonic acid-containing phosphatidylcholine level increases in the dorsal root ganglion of mice after peripheral nerve injury.
   Neurosci Lett. 698:69-75 (2019)

2. 学会発表

1. S. Suzuki, K. Karita, Y. Yamamoto, N. Inagaki, I. Yao, M. Toriyama
   DHA enhances dendritic spine formation mediated by RNF39
   第 42 回日本分子生物学会年会
   2019/12/4 福岡国際会議場（福岡市）

2. 豊永優月，鳥山道則，矢尾育子
   アミロイドベータは神経細胞の一次繊

毛の形成を抑制する（ポスター）
第 42 回日本分子生物学会年会
2019/12/3 マリンメッセ福岡（福岡市）

3. 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 42 回日本分子生物学会年会
2019/12/3 マリンメッセ福岡（福岡市）

4. 鈴木慎一郎，苅田憲人，山本優香，稲垣直之，矢尾育子，鳥山道則
DHA は RNF39 を介して樹状突起スパインの形成を促進する（ポスター）
第 42 回日本分子生物学会年会
2019/12/5 マリンメッセ福岡（福岡市）

5. 吉田瑠加，衛藤史博，鈴木慎一郎，鳥山道則，矢尾育子
神経変性モデルにおける不溶性成分のプロテオーム解析（ポスター）
第 42 回日本分子生物学会年会
2019/12/3 マリンメッセ福岡（福岡市）

6. 鈴木慎一郎，苅田憲人，稲垣直之，矢尾育子，鳥山道則
神経機能を制御するドコサヘキサエン酸（DHA)の新規作用機序の解明
日本脂質栄養学会第 28 回大会
2019/9/27（東京）

7. 衛藤史博，齋藤祐介，武井史郎，矢尾育子，瀬藤光利
質量顕微鏡法により明らかとなったラウリル硫酸ナトリウムによる皮膚表面のスフィンゴミエリン（d18:0/24:0）の減少
第 44 回日本医用マススペクトル学会年会
ウインクあいち（名古屋市）

8. 末谷大道，衛藤史博，矢尾育子
多様体学習によるマウス脳質量顕微鏡イメージングデータの解析/Manifold learning approach to data analysis of imaging mass spectrometry in the mice brains
第 42 回日本神経科学大会
2019/7/26 朱鷺メッセ（新潟市）

9. 山岸覚，衛藤史博，篠田陽，小川修平，矢尾育子，高雄啓三，宮川剛，佐藤康二
反発性ガイダンス因子FLRT2 による社会性行動制御 /Repulsive guidance molecule FLRT2 regulates social behavior
第 42 回日本神経科学大会
2019/7/25 朱鷺メッセ（新潟市）

10. Fumihiro Eto and Ikuko Yao
Scrapper deficiency upregulates glutamate and gamma-aminobutyric acid in specific mouse brain regions
第 28 回神経行動薬理若手研究者の集い
2019/3/13 兵庫医科大学（西宮市）

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

APP の細胞内ドメインに誘導される神経細胞特異的アポトーシスの解析

研究代表者氏名　中山　耕造 1)
研究分担者氏名　長瀬　尚志 2)
笹岡　俊邦 3)

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

研究要旨

我々は、Notch や Delta のシグナル伝達は、アルツハイマー病(AD)の原因である γ-セクレターゼによって制御されていることを示している。これらの結果をもとに、APP も Notch や Delta に類似した γ-セクレターゼによって制御されるシグナル伝達機構もち、それが AD の発症に何らかの形で関係している可能性を考えている。実際我々は、γ-セクレターゼで細胞膜から切り出された APP の細胞内ドメイン（AICD）が核へ移行し、遺伝子発現を大きく変化させ、神経細胞選択的にアポトーシスを引き起こす事を示している。本研究開発の目的は、AICD の核移行の過程を明らかにし、AICD の神経毒性の分子機序を解明することにある。

A. 研究目的

我々は、1 型膜タンパク質である Notch や Delta のシグナル伝達は、アルツハイマー病(AD)の原因である γ-セクレターゼによって制御されていることを示している。これらの結果をもとに、やはり 1 型膜タンパク質である APP も、Notch や Delta に類似した γ-セクレターゼによって制御されるシグナル伝達機構を持ち、それが AD の発症に何らかの形で関係している可能性を考えている。具体的には、Notch や Delta と同様に、APP が何らかの刺激を受け取ると最終的に γ-セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出され、それが核に移行して転写因子に結合し遺伝子発現を調節すると考えている。

我々は実際に、細胞膜から γ-セクレターゼによって切り出された APP の細胞内ドメイン(AICD)が核に移行し、多くの遺伝子の発現を変化させ、神経細胞選択的にアポトーシスを誘導する事を示している。これらの結果は、APP も Notch や Delta と類似した γ-セクレターゼによって制御さるシグナル伝達機構を持ち、それが AD の発症に関係していることを示している。

本研究開発の目的は、AICD の核移行の過程を明らかにし、AICD の神経毒性の分子機序を解明することにある

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

(a)AICD 脱リン酸化酵素の解析

マウス脳のライセートを DEAE sepharose カラム及び Hydroxyapatite カラムを用いて部分的に精製した。

脱リン酸化活性測定の基質としては、HEK293T 細胞に、FLAG タグを持つ AICD の発現ベクターを導入して ^{32}P でメタボリックラベルしたリコンビナント FLAG-AICD タンパク質を用いた。

（b）AICD の神経細胞周期に対する影響

既に作製ずみの AICD を発現する EC 細胞 P19 を、レチノイン酸によって神経細胞へと分化誘導した。なおコントロールとしてはベクターのみを含む、AICD を発現しない P19 細胞を用いた。

分化誘導後２、３、４日でそれぞれ細胞を冷エ

タノールで固定し、Propidium Iodide（PI）染色してフローサイトメータで DNA 量を測定することで細胞周期を検討した。

(c)タウの異常リン酸化に対する AICD の影響
（b）で述べた、AICD を発現する P19 細胞をレチノイン酸で分化誘導した。文化誘導後２、３、４日でそれぞれ細胞を回収し、12 種類の代表的なタウの異常リン酸化部位に対する抗体を用いてウエスタンブロットをおこなった。

C. 研究結果

(a) AICD 脱リン酸化酵素の解析
マウス脳のライセートを DEAE sepharose カラムで分画した場合、225-300mM の NaCl で溶出したフラクションに AICD 脱リン酸化酵素活性が認められた。
これらのフラクションをさらに Hydroxyapatite カラムに吸着させ、リン酸濃度を上げる事により蛋白質を溶出した。その結果、幅広い範囲のフラクションが AICD 脱リン酸化活性を示した。

（b）AICD の神経細胞周期に対する影響
AICD を発現する P19 細胞をレチノイン酸で分化誘導し、フローサイトメータで DNA 量を測定することで、G1 期、S 期、G2／M 期の細胞の割合を調べた。その結果、各分化段階でコントロール細胞と比較して AICD を発現する細胞では S 期の割合が約半分程度に頻度が下がっており、また G2/M 期の割合も 2/3 程度に下がっていた。

（c）AICD のタウ異常リン酸化に対する影響
12 種類の代表的なタウの異常リン酸化部位に対する抗体を用いてウエスタンブロットをおこなった。しかしながら、AICD によってリン酸化が増強されている部位は検出できなかった。

D. 考察

(a) AICD 脱リン酸化酵素の解析
現在までの結果では、AICD は膜に存在する状態で構成的にリン酸化されており、核移行に必須なアダプター蛋白質 Fe65 との結合には、AICD 自体の脱リン酸化が必要だと考えられる。
本研究において、マウスの脳のライセート中に AICD 脱リン酸化活性を検出した。これらの結果は、AICD 脱リン酸化酵素が実際に存在することを示している。

（b）AICD の神経細胞周期に対する影響
コントロール細胞と比較して AICD を発現する細胞では S 期の割合が約半分程度に頻度が下がっており、G2/M 期も 2/3 程度に下がっている。これらのことから AICD は特に G1 から S 期への移行に必要な分子の遺伝子発現に影響を与えている可能性があるかもしれない。今後、G1 チェックポイントとの関連を調べる予定である。

(c) AICD のタウ異常リン酸化に対する影響
AICD を強制発現する P19 細胞を用いて、12 種類の代表的なタウの異常リン酸化部位に対する抗体でウエスタンブロットをおこなったが、タウのリン酸化の増強は検出できなかった。AICD が誘導する神経細胞選択的なアポトーシスは、タウの異常リン酸化と関係ない現象である可能性が考えられた。

E. 結論

(a) マウスの脳のライセートを用いて、APP 脱リン酸化酵素活性を検出した。

(b) AICD を発現する細胞ではコントロール細胞に比べて、S 期の割合が約半分程度に頻度が下がっていることを明らかにした。

(c) AICD は、タウの異常リン酸化に対して影響しなかった。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表　　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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

筋強直性ジストロフィーの中枢神経病態の解明

研究代表者　中森　雅之 1)
研究分担者　清水　宏 2)，柿田　明美 2)，望月　秀樹 1)

1) 大阪大学　医学系研究科　神経内科学　2) 新潟大学　脳研究所　病理学分野

研究要旨

筋強直性ジストロフィー(MyD)は DMPK 遺伝子非翻訳領域の CTG 繰り返し配列（リピート）の異常伸長が原因の遺伝性難治性筋疾患である。原因遺伝子より転写された、伸長した CUG リピートをもつ異常 RNA の毒性により、筋細胞障害を来す可能性が示唆されている。MyD では、骨格筋や心筋症状だけでなく、認知機能障害や性格変化、過眠など様々な中枢神経症状を呈する。こうした中枢神経症状は患者の QOL を著しく低下させるが、その機序は全く不明である。本研究では新潟大学脳研究所および大阪大学医学系研究科が保有する MyD 患者脳検体を用いて、病理学的・分子生物学的・生化学的解析を網羅的にすすめることにより、MyD の中枢神経病態を解明する。

A. 研究目的

筋強直性ジストロフィー(MyD)は、骨格筋のみならず、心筋、平滑筋や脳、眼、内分泌器官など、様々な臓器をおかす全身性疾患である。DMPK 遺伝子上の CTG 繰り返し配列（リピート）の異常伸長が原因であり、異常遺伝子より転写された伸長 CUG リピートをもつ異常 RNA の毒性により、選択的スプライシング制御因子が障害される。この結果、広汎なスプライシング異常が引き起こされ、多彩な全身症状につながるとされている。MyD では認知機能障害や性格変化、過眠など様々な中枢神経症状を呈するが、その機序は今もって全く不明である。本研究では、MyD の中枢神経病態を解明するため、新潟大学脳研究所および大阪大学医学系研究科が保有する、病理学的変化・特徴が明らかとなっている MyD 患者中枢神経病変組織で分子生物学的解析および生化学的解析を行う。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

MyD 患者および疾患対象群患者剖検脳組織より白質、皮質、海馬、また脊髄から Laser Capture Microdissection により神経細胞を採取し、DNA, RNA を抽出した。得られた DNA を 0.5-2 genome equivalents まで希釈し、DMPK-CTG リピート増幅プライマー（Forward primer: ACCCTAGAACTGTCTTCGACTCC, Reverse primer: TTCCCGAGTAAGCAGGCAGAG）を用いて Roche Expand Long Template PCR System®による Small pool PCR を行った。得られた PCR 産物を 0.7% SeaKem agarose®ゲルにて 60Ｖで４時間電気泳動し、泳動後にゲルより Alkaline transfer 法により Roche Nylon Membrane®へ DNA をトランスファーさせた。トランスファー後に UV crosslink を行い、DIG labeled (CAG)7 LNA probe によるハイブリダイゼーション（70℃、４時間）ののち、CDP-Star®による化学発光で CTG リピート含有 DNA を検出して、

リピート長の判定を行った。また、RNA については SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing をもちいた微量 RNA 増幅後に RNA-seq による遺伝子発現解析と選択的スプライシング異常の網羅的解析をおこなった。発見された新規スプライシング異常については、RT-PCR により確認を行った。なお、本研究は、大阪大学医学部附属病院研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

MyD 患者各３例の側頭葉皮質、側頭葉白質、脊髄神経細胞より抽出した DNA の解析（small pool PCR と Southern blot 法）により、同一患者由来組織でも CTG リピート長とそのばらつきに大きな差があることが明らかとなった。特に、MyD 患者側頭葉皮質で神経細胞ごとの CTG リピート長のばらつき(somatic instability)が大きく、脊髄神経細胞でのばらつきが少ないことが判明した（図1)。また、MyD 患者、疾患対象群患者各３例の側頭葉皮質、側頭葉白質、脊髄神経細胞より抽出した RNA の解析により、MyD 患者皮質・白質・脊髄神経細胞で疾患特異的な新規スプライシング異常を多数見出したほか、発現が亢進あるいは低下している遺伝子も同定した。

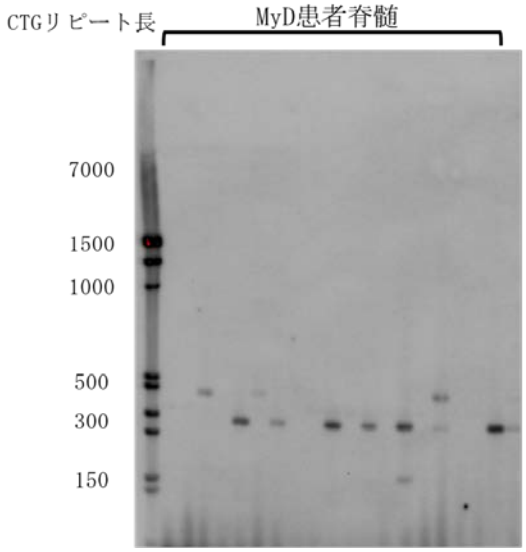


図１. Small pool PCRおよびSouthern Blot法による MyD患者脊髄組織でのリピート長解析
MyD由来脊髄組織では、リピート長の変動が少ないことが判明した。

D. 考察

MyD 患者皮質神経細胞で CTG リピート長のばらつきが著しく大きく、また最大リピート長も長いことは、皮質神経細胞でリピート伸長に寄与する因子が存在することを強く示唆している。リピート伸長には、DNA 修復蛋白やリピート周囲のエピゲノム変化が関与することが知られており、今後 MyD 患者皮質神経組織でのこれらの因子の探索を行う予定にしている。また、脊髄運動神経でのリピート変動が少ないことも何らかの理由があると考えられ、その要因の探索を行う。

また、今回同定された MyD 患者皮質神経細胞、白質神経細胞、脊髄前角神経細胞特異的なスプライシング異常について、分子生物学的、細胞生物学的、病理学的検討をおこない、MyD の病態への関連を調べていく。

E. 結論

MyD 患者中枢神経組織では、細胞ごとに CTG リピートを伸長させる要因や異なる。また各神経組織でスプライシング異常を来す要因も異なることが判明した。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ジストロフィン結合タンパク質複合体の代謝回転に関する研究

研究代表者　今村　道博[1)]
研究分担者　武田　伸一[1)] 笹岡　俊邦[2)]

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

研究要旨

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の原因遺伝子にコードされるジストロフィンは筋肉のみならず中枢神経系においても様々なタンパク質と相互に作用し、機能している。DMD ではジストロフィンが消失すると、その結合タンパク質群を不安定にし、著しく減少させることから、これらのタンパク質の(見かけ上の)発現抑制が神経や筋肉の病態に影響する可能性が考えられる。しかしながらこの不安定化と発現抑制の分子機序は不明のままである。本研究では NH-413 筋ジストロフィーニワトリの原因遺伝子にコードされる WWP1 と呼ばれる HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼに注目し、WWP1 とこれに類似する E3 リガーゼ分子がジストロフィン結合タンパク質の発現レベル調節に関与する可能性を検証すると共に筋線維のメインテナンスに果たす役割について解析する。

A. 研究目的

筋細胞形質膜でジストロフィンを中心に形成される巨大な分子複合体は 10 種類を超えるジストロフィン結合タンパク質 (DAP) により構成されている。DMD におけるジストロフィンの欠損では、これら DAP に著しい減少が認められるが、肢体型筋ジストロフィーの 2C 型から 2F 型に分類される 4 種類のサルコグリカン(SG)欠損症においても DAP 複合体を構成する小機能単位に顕著な減少が生じ、筋ジストロフィーとなる。本研究の目的はこのようなタンパク質分子群の見かけ上の発現抑制 (減少) がどのような分子機序に因り生じるのかを明らかにすることであり、特に、骨格筋に発現する HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼである WWP1、WWP2、ITCH 分子に注目して解析を行う。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

WWP1、WWP2、ITCH の 3 種類の E3 ユビキチンリガーゼを欠失した遺伝子改変マウスの系統を樹立し、これらマウスの筋肉における DAP の発現について解析する。

我々は、NH-413 ニワトリと同じミスセンス変異により R436Q WWP1 を発現するノックインマウス (WWP1-KI) に加え、*Wwp2* と *Itch* 遺伝子の改変マウスを作製したが、本年度は安定して継代可能な系統を樹立すると共に、その一部をγ-SG を欠失するサルコグリカノパチー(SGP)モデルマウスと交配することにより SG 分子の安定性を解析する。また、WWP1 の機能代償を検証するため WWP1-KI マウスと WWP2 及び ITCH 遺伝子改変マウスを順次交配し、2 重変異体及び 3 重変異体の作製を試みる。

尚、本研究は国立精神・神経医療研究センター内に設置されている DNA 組換え実験安全委員会及び動物実験倫理問題検討委員会での審査・承認の

下に行われた。

C. 研究結果

DAP 複合体中ではαからδまでの 4 種類の SG が小複合体を形成しているが、これらのうちどれか１つが欠失すると、残り 3 つの SG も消失してしまう。我々は、α-SG、β-SG、γ-SG、それぞれの分子を欠失する 3-4 週齢の SGP モデルマウス骨格筋を調べたところ、そのどれにおいても WWP1 の著しい発現上昇が認められた。そこでγ-SG 欠損マウスと WWP1-KI マウスを交配し、WWP1 の機能抑制下における(γ-SG 以外の)SG 分子の発現を調べてみたが、タンパク質分子として検出することは出来なかった。

骨格筋では WWP1 と高い相同性を有し、機能代償を行う可能性がある 2 種類の E3 ユビキチンリガーゼ、WWP2 と ITCH が発現しているため、これらの影響を抑える目的でそれぞれの遺伝子改変マウスを作製し、変異の種類別に系統を樹立した。WWP2 ではナンセンス変異とインフレーム欠失を持つ 2 種類のマウス系統を樹立した。一方、ITCH ではインフレーム欠失を持つ２系統とアウトオブフレーム欠失の可能性を持つ 1 系統を樹立しようとしている段階である。今年度は　WWP2 をインフレーム欠失し、また、R436Q WWP1 を発現する 2 重変異マウスを作製することができたが、更に ITCH E3 の欠損、或いはジストロフィンやγ-SG 欠損マウスとの交配による遺伝子の多重欠損マウス作製にまでは至らなかった。

D. 考察

我々はαからγまでの異なる 3 種類の SG 分子を欠損するそれぞれの筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋で WWP1 の発現が上昇することを明らかにした。解析に用いたマウス骨格筋では欠失した SG 分子のみならず、残り 3 種類の SG も全て消失するが、これら SG は DAP 複合体中においてはジストログリカン(DG)と接していること、そして DG は C 末端側のプロリンリッチドメインで WWP1 と結合すると考えられることから、WWP1 が SG 分子の消失(分解)に関与している可能性がある。今回、γ-SG KO マウスと WWP1-KI マウスの二重変異マウスを作製して骨格筋を解析したが、SG 分子の変化を検出することはできなかった。これには WWP1 の機能代償の問題があるため、WWP2 と ITCH 分子の機能を抑制したマウスの解析が重要になると考えられた。今回、WWP1 と WWP2 の二重改変マウスを得ることができたため、今後はこのような分子環境下で、ジストロフィンや SG を欠失した場合の DAP 複合体構成分子の安定性を解析する必要がある。

E. 結論

WWP1 分子単独の機能喪失は直ちに、DMD や SGP での DG や SG 分子の消失に影響しないことが示された。骨格筋で発現する WWP1 類似分子の WWP2 と ITCH の役割が注目されるため、これらの E3 ユビキチンリガーゼの機能を抑えた上で WWP1 を欠失、或いは R436Q 変異型 WWP1 を発現する骨格筋を解析することが重要となる。

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. Imamura M, Inoue YU, Inoue T, Arima S, Takeda S: Disruption of Inhibitory System for Autoubiquitination by an R441Q Missense Mutation in the *Wwp1* Gene in Chicken Muscular Dystrophy. American Society for Cell Biology/European Molecular Biology Organization Annual Meeting, Washington DC, USA, December 8, 2019

2. 有馬さゆり、柴﨑浩之、今村道博、谷端　淳、倉岡睦季、松坂恭成、内海文彰、田沼靖一、武田伸一. 筋ジストロフィー犬の血清で増加する miR-188 の筋分化に関する機能的解析. 第 5 回日本筋学会学術集会. 東京 2019 年 8 月 2 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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

脳・神経回路におけるドーパミンの機能解析

研究代表者　小山内　実 1) 2)
研究分担者　笹岡　俊邦 3)

1）大阪大学大学院医学系研究科　2）東北大学大学院医学系研究科　3）新潟大学脳研究所

研究要旨

ドーパミンの枯渇によりパーキンソン病が発症することなどから、ドーパミンは脳機能を制御する重要な因子であると考えられている。しかし、ドーパミン受容体を介した情報伝達がどのような機能を担っているのかは必ずしも明らかではない。そこで、本研究では、D1 ドーパミン受容体のノックダウンマウスを用い、ドーパミンが関与していると考えられている運動能力試験と、定量的マンガン造影 MRI による全脳神経活動履歴計測を行った。3 週間のドキシサイクリン投与によりドーパミンをノックダウンした結果、運動能力の低下と無動症状が観察された。また、自由行動時の全脳神経活動履歴計測の結果、側坐核と視床下部を中心に神経活動の亢進が観察された。

A. 研究目的

黒質緻密部のドーパミンニューロンが減少することでパーキンソン病が発症することなどから、ドーパミン受容体は神経活動を調節する重要な代謝型受容体であると考えられている。ドーパミン受容体のノックアウト動物では、脳・神経回路の発生、生後発達に影響を与える恐れがある。そこで、ドーパミン受容体を生後任意の時期にノックダウンすることができるコンディショナルノックダウンマウスを用い、ドーパミン D1 受容体、D2 受容体のノックダウンマウスの提供を受け、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。これにより、ドーパミン受容体の機能解明を目指す。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

本研究は東北大学環境・安全委員会遺伝子組換え実験安全専門委員会、及び同動物実験専門委員会の許可を得て行った。

D1R の機能を調べるために、実験動物には、笹岡らが作成した、ドキシサイクリン（Dox）投与により任意のタイミングで D1R をノックダウン（KD）することができる D1R-KD マウスを用いた（Chiken et al., Cereb Cortex 2015）。

このマウスおよび野生型マウスを用いて、Dox 投与前、投与初期、投与後期に運動機能等を調べるための行動実験および、全脳神経活動計測を行った。

全脳神経活動計測法には、定量的活動依存性マンガン造影 MRI 法（quantitative Activation-Induced Manganese-enhanced MRI, qAIM-MRI）を用いた（Kikuta et al., Sci Rep 2015）。この計測法は、MRI を用いた非侵襲神経活動計測であるため、行動実験を行った個体に対して神経活動計測を繰り返し行うことができる。

行動実験としては、運動能力試験として、ローターロッドテスト、ビームウォークテスト、ポールテストを行い、無動症状の試験として、カタレプシーテストを行った。これらの行動実験は、パーキンソン病などの運動失調の判定によく利用される試験である。

これらの実験で得られた結果を解析すること

により、D1R をノックダウンした際の行動変化及び、神経活動が変化した脳の領域を明らかにした。

C.研究結果

(1) D1R ノックダウンによる行動異常

Dox 投与前、1 週間後、3 週間後に行動試験を行ったところ、ローターロッドテスト、ビームウォークテスト、ポールテストのいずれも、Dox 投与 3 週間後に、投与前及び健常動物と比べて、運動能力の低下が見られた。カタレプシーテストでは、Dox 投与 1 週間後から無動時間の延長が見られ、3 週間後にはさらに無動時間が長くなった。

(2) D1R ノックダウンによる神経活動変化

qAIM-MRI による全脳神経活動計測の結果、健常マウス及び Dox 投与前と比較して、Dox 投与 3 週間後では、多くの領域で神経活動亢進が観察されたが、特に側坐核と視床下部の神経活動の亢進が顕著であった。

D.考察

(1) D1R ノックダウンによる行動異常

従来から提唱されている大脳基底核の神経回路モデルでは、線条体直接路は運動の開始に関与しているといわれてきた。D1R は線条体直接路に発現しており、D1R をノックダウンすることで、その神経活動に変化を及ぼすことが考えられる。そのため、本研究では行動実験の成績低下が見られたと考えることができる。しかしながら、運動能力が低下したのか、単にモチベーションが低下しているのかを区別することは現在の結果からだけでは困難である。今後更なる行動実験を行い、行動の表現型を精査する必要がある。

(2) D1R ノックダウンによる神経活動変化

D1R-KD マウスでは Dox 投与により、側坐核や視床下部を中心に神経活動が亢進した領域が観察された。従来、D1R の活性化は神経細胞の興奮性を高めると考えられてきたが、今回の結果はこの考え方とは矛盾するように思われる。しかし、D1R が多く発現している線条体直接路ニューロンは抑制性ニューロンであり、D1R ノックダウンによりその活動が低下することにより、むしろ脳全体としては興奮性が高まる可能性が考えられる。

E.結論

D1R をノックダウンすることにより、運動能力の低下及び無動の症状が観察された。加えて、側坐核や視床下部を中心に、神経活動の亢進が見られた。今後更なる研究を重ね、D1R の機能を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

なし

2.学会発表

1. Osanai M, Tanihira H, Inagaki R, Kikuta S, Sasaoka T, Nambu A. The role of dopamine D1 receptor on the whole brain activity and on the motor function. 第 97 回日本生理学会大会, 別府（紙上開催), 2020/3/17-19.
2. Osanai M. Multiscale Ca^{2+} imaging for brain function analysis. 第 93 回日本薬理学会年会シンポジウム「Ca2+シグナルのマルチスケール解析による脳機能制御機構と新たな治療戦略へのアプローチ」, 横浜（紙上開催), 2020/3/16-18.

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

後部視床下部において過眠症に関連する DNA メチル化部位の探索と各脳領域に特異的なメチル化プロファイルの探索

研究代表者氏名　嶋多　美穂子[1, 2)]
研究分担者氏名　柿田　明美[3)]、宮川　卓[1, 2)]

[1)] 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野　[2)] 公益財団法人東京都医学総合研究所精神医学行動分野睡眠プロジェクト　[3)] 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

研究要旨

本研究では代表的な過眠症であるナルコレプシーに関連する DNA メチル化部位のゲノムワイドな探索を目的とし、患者と対照群の死後脳の後部視床下部、及び側頭葉皮質における網羅的メチル化解析を行った。その結果、脳の各部位では含まれる細胞の構成が大きく異なることが原因となり、メチル化の特性もまた大きく異なること、ナルコレプシー関連メチル化部位は脂肪酸代謝に関わる遺伝子近傍の領域に多く集積していることが明らかとなった。そこでさらに脳内の代謝に着目し、脳脊髄液を用いたメタボローム解析を実施したところ、ヒスチジンがナルコレプシーと最も強い関連を示し($P = 4.0 \times 10^{-4}$)、その他 22 の代謝物質が有意な関連を示した。それらの代謝物質を用いたパスウェイ解析の結果、糖原性アミノ酸の代謝に関わるパスウェイが検出され、ナルコレプシーにおいて脂肪酸代謝が障害されていることに対する代償的な変化である可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、ナルコレプシーに関連する DNA メチル化部位を、患者でオレキシン神経の脱落が起こる後部視床下部とそれ以外の脳領域（側頭葉皮質）で探索し、疾患関連メチル化部位を同定すると共に、それらが脳の領域特異的なものなのかを確認することを第一の目的とした。またその解析の結果を踏まえて、脳内の代謝の異常がナルコレプシーに関連している可能性について検討するために、脳内の代謝プロファイルをよく反映していると考えられている脳脊髄液を用いて網羅的な代謝物の解析も実施した。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. ナルコレプシー関連メチル化部位の探索

ナルコレプシー患者並びに健常者の死後脳から後部視床下部と側頭葉皮質を切り出し、DNA を抽出し、アレイを用いて網羅的な DNA メチル化解析を実施した（後部視床下部：case N = 4, control N = 4, replication control N = 4, 側頭葉皮質： case N = 7, control N = 7）。患者・対照群間でメチル化が連続して差を示す領域（DMR）を、Bumphunting 法を用いて検出した。DMR に位置する遺伝子の特徴を探索するために、Metacore 及び goseq を用いたパスウェイ解析を実施した。

さらに同一サンプルの 3 つの脳領域からサンプルを切り出し、DNA 抽出を行った（後部視床下部, 側頭葉皮質, 小脳：各 N = 4）。得られたメチル化データを用いて、MeDeCom 法にて各サンプルを構成する細胞の種類と比率の推定を実施した。各領域間の比較を、年齢・性別の影響を補正した回帰分析、並びに年齢・性別に加えて推定した細胞の比率の影響を補正した回帰分析にて実施した。

2. 脳脊髄液を用いたメタボローム解析

ナルコレプシー患者 14 例、及び対照群 17 例の脳脊髄液を capillary electrophoresis coupled

with Fourier transform mass spectrometry (CE-FTMS)によって解析した。20%以上のサンプルで検出された代謝物質を対象（N = 229）とし、代謝物質ごとに各サンプルのピークの Relative area の log 変換値を用いて関連解析を実施した。さらに P < 0.05 を示した代謝物質を対象としてパスウェイ解析を実施した。

なお、本研究はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に則り実施され、東京大学、東京都医学総合研究所並びに新潟大学の倫理委員会の承諾を得ている。また全ての被験者からは書面でのインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1. ナルコレプシー関連メチル化部位の探索

側頭葉皮質の解析では 5DMR しか検出されなかったのに対し、後部視床下部の解析においては 77DMR が検出された。後部視床下部関連 77DMR を用いたパスウェイ解析の結果、“response to fatty acid”（$P = 9.0\times10^{-10}$）、“glycerolipid metabolic process”（$P = 1.9\times10^{-6}$）といったナルコレプシーとの関連がすでに報告されている脂肪酸の代謝に関わるパスウェイが検出された。これらの結果を異なる対照群のサンプルを用いて検証したところ、視床下部の 77DMR のうち 45DMR の関連が再現され、脂肪酸代謝関連パスウェイ上の遺伝子近傍の DMR の再現性も確認された。

さらに、後部視床下部、側頭葉皮質および小脳の 3 領域のメチル化データを解析したところ、領域ごとに非常に顕著なメチル化プロファイルの違いが確認された。そこで、そのようなメチル化の差異が領域の違いに起因するものなのか、細胞の違いに起因するものなのかを検討するために、細胞の構成比率の推定を実施した。その結果、構成細胞の比率は脳の部位ごとに大きく異なることが確認された。そこで、推定した細胞の比率を共変量に加え、再度領域ごとの比較を実施したところ、P 値のインフレーションが抑えられ、各領域のメチル化プロファイルの大きな違いは、領域を構成する細胞の種類とその比率の違いに由来することが示された。

2. 脳脊髄液を用いたメタボローム解析

CE と FTMS を結合させ、従来よりも感度良く多くの代謝物質を検出することが可能な新技術を用いた脳脊髄液の解析は管見によれば本研究が初めてのものとなるが、229 の代謝物質が検出された。多重検定の補正後も有意に疾患と関連する代謝物質は同定されなかったが、最も強い関連を示したのはヒスチジンであり、患者群で増加していた($P = 4.0\times10^{-4}$)。さらに $P < 0.05$ を示した 22 の代謝物質を対象として実施したパスウェイ解析の結果、糖原性アミノ酸の代謝に関わる複数のパスウェイが検出され、これらに関わるアミノ酸は全て患者群で増加していた（Glycine, serine and threonine metabolism, $P = 2.68\times10^{-6}$, FDR $= 2.14\times10^{-4}$ など）。

D. 考察

ナルコレプシーに関連する DMR の検討から、DNA のメチル化は特にオレキシン神経の脱落が起こっている後部視床下部において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、脳領域ごとの DNA メチル化の検討から、脳の領域が異なると、そのメチル化は大きく異なるものの、それらは“領域”が異なることに起因するのではなく、領域ごとに構成する細胞の種類と比率が異なることに起因していることが示唆された。

さらに脳脊髄液のメタボローム解析では、技術的な問題で直接的に脂肪酸を測定することができなかったものの、糖原性アミノ酸の代謝が患者で亢進していることが示唆され、脂肪酸代謝の異常に対する代償的な機構である可能性が示唆された。

E. 結論

後部視床下部において特異的に認められるナルコレプシー関連 DNA メチル化は、後部視床下部特異的であるものの、関連メチル化領域は既存のゲノム研究などからも示唆されていた脂肪酸代謝に関わる遺伝子領域に多く、脳内の脂肪酸代謝の異常が疾患と関連する可能性が示唆された。さらに脳脊髄液中では糖原性アミノ酸の代謝が患者群で亢進しており、今後脳内のエネルギー代謝に着目したさらなる検討が必要である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Sleep. 13;43(1). 2020 doi:10.1093/sleep/zsz198
   Shimada M, Miyagawa T, Takeshima A, *et al.* Epigenome-wide association study of narcolepsy-affected lateral hypothalamic brain and overlapping DNA methylation profiles between narcolepsy and multiple sclerosis
2. Shimada M, Miyagawa T, Kodama T, *et al.* Metabolome analysis using cerebrospinal fluid from narcolepsy type 1 patients 査読中

2. 学会発表

1. 国際ゲノム会議　2019 年 6 月 25 日～26 日 学術総合センター（東京）
2. 日本睡眠学会　2019 年 6 月 27 日 名古屋国際会議場（愛知）
3. アメリカ人類遺伝学会　2019 年 10 月 15～19 日（米・ヒューストン）
4. 日本人類遺伝学会 2019 年 11 月 6 日～9 日 長崎ブリックホール（長崎）

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

平成 31 年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

TDP-43 細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成

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

1) 北里大学医学部実験動物学　2) 北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター
3) 北里大学医療系研究科　4) 新潟大学脳研究所

研究要旨

ゲノム編集技術を用い、内在性 TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 12 系統を樹立した。各系統の特性から、TDP-43 C 末領域の約半分程度を欠損させると TDP-43 機能が失われること、C 末領域の前半部分は機能維持、後半部分は蛋白の安定性維持に重要な領域であることを明らかにした。この C 末領域の前半部分が欠損した TDP-43 は 36 kDa の変異蛋白として確認されたが、核移行シグナル（NLS）が存在するにも拘らず核移行が阻害されていた。この結果から、NLS を制御するスイッチが TDP-43 C 末領域に存在するとの仮説を立て、生理的条件下で認められる TDP-43 の翻訳後修飾を検索した。質量分析を用いた結果、脱アミドと酸化を確認した。しかし細胞内局在と一致し、可逆的な制御を受ける翻訳後修飾は同定できなかった。また TDP-43 のカバー率も低いため、新たな濃縮法が必要と考えられた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動神経特異的な変性を特徴とする神経難病である。2006 年秋、孤発性 ALS に認められるユビキチン陽性封入体（skein-like inclusion）の主要な構成蛋白として TAR DNA-binding protein 43 kDa（TDP-43）が発見された。さらに TDP-43 は、常染色体性優性遺伝形式を示す家族性 ALS の原因遺伝子にもなることが報告され、ALS 病態の中心的な分子となった。TDP-43 は、2 つの RNA 認識モチーフ（RRM）を有する不均一核内リボ核酸蛋白に分類され、主に核に局在するが、実際には核移行シグナル（NLS）と核外移行シグナル（NES）があり、核-細胞質間をシャトルしている。しかし ALS の残存運動神経では、TDP-43 は細胞質に局在を変えて凝集体を形成することから、このシャトルを制御するスイッチの同定が、ALS 病態の解明に必要である。申請者は、ゲノム編集技術を用いて TDP-43 C 末領域の部分欠損マウスを作成し、このスイッチが C 末領域内に存在することを示唆する結果を得た。C 末領域はプリオン様ドメインとも呼ばれる天然変性領域である。一般的に天然変性蛋白は、細胞内ネットワークにおけるハブ蛋白として働き、翻訳後修飾により制御され、様々な蛋白と結合する。そこで、このマウスを起点としてプロテオミクス技術を融合させることにより、未知の TDP-43 細胞内局在スイッチを明らかにする計画を立案した。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

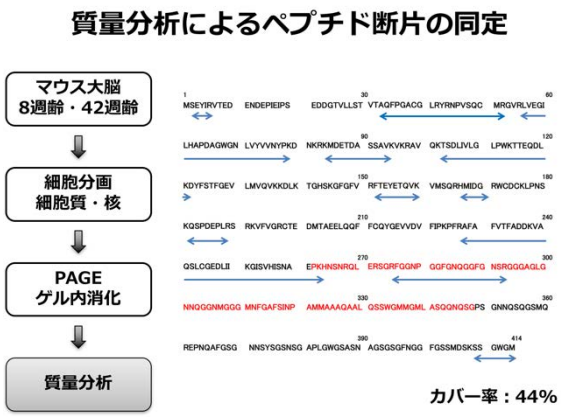
高精度質量分析計を用い、以下の 3 つの観点から進めた。(a) 生理的条件下における TDP-43 翻訳後修飾の有無、有るとすれば細胞内局在との相関、(b) 核移行が阻害された TDP-43 と野生型 TDP-43 における結合蛋白の相違、(c) 病態を包括的に理解するための質量分析を用いた網羅的発現比較解析であり、今年度は (a) を中心に進めた。野生型マウス（8 週および 42 週齢）の大脳を用い、EzSubcell Extract (ATTO)により細胞質と核に分画後、ゲル内消化と質量分析により TDP-43 の同定を試みた。さらに免疫沈降法にて TDP-43 を濃

縮し、ゲル内消化との比較を行った。

なお、本研究における遺伝子組換え実験は、北里大学医学部遺伝子組換え実験安全管理委員会、および北里大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査と学長の承認を受けて実施した。また動物実験は、北里大学医学部動物実験委員会の審査と医学部長の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

野生型マウス大脳の細胞質および核分画を、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。CBB 染色およびウェスタンブロット法により TDP-43 の位置を確認し、トリプシンを用いたゲル内消化と質量分析にてペプチド断片を同定したところ、TDP-43 のカバー率は 41%と低かった。TDP-43 特異抗体による免疫沈降法を用いてもカバー率は 42%に止まり、両者を合わせても 44%であった（図）。同定されたペプチド断片の一部には、脱アミドと酸化が認められたが、細胞内局在と一致する変化は、現在までのところ確認できなかった。



D. 考察

TDP-43 のカバー率が低かった理由として、TDP-43 の特殊なアミノ酸配列が挙げられる。TDP-43 C 末領域に存在するプリオン様ドメインは、非荷電極性アミノ酸（Asn、Gln、Tyr）と Gly を主体とする low complexity 配列から成り、トリプシンによる切断部位（Lys、Arg）が極めて少ないため、ペプチド鎖が長くなるために同定できないものと考えられる。これに加えて TDP-43 の濃縮率の低さも原因と考えている。近年、TDP-43 などの天然変性タンパク質を特異的に沈殿させる方法として、Biotinylated isoxazole (b-isox) 分画法が開発されているため（Kato et al. *Cell* 2012 6 149: 753)、来年度は、本法を用いた TDP-43 の濃縮を試みる。

E. 結論

野生型 TDP-43 には、生理的な翻訳後修飾として脱アミドと酸化を確認した。しかし細胞内局在と一致し、可逆的な制御を受ける翻訳後修飾は同定できなかった。また注目している TDP-43 C 末領域の同定率も低いため、新たな濃縮法の導入が必要と考えられた。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

佐藤俊哉、大久保直. TDP-43 細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成. 2019 年度脳研究所共同利用共同研究（笹岡班)合同セミナー、令和 2 年 1 月 8 日、新潟大学脳研究所（新潟）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

平成31年度新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

てんかん脳波におけるガンマ脳波規則性と てんかん病変部の病理学的変化の関係性の研究

研究代表者　佐藤 洋輔[1)]
研究分担者　北浦 弘樹[2)]，柿田 明美[2)]

1）昭和大学医学部脳神経外科学講座　2）新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

てんかん患者において，脳病変切除範囲の決定やてんかん病勢の把握には，安全で確実なバイオマーカーが求められる。申請者の最近の研究成果から，マルチスケールエントロピー法を用いて30-70 Hzのガンマ波規則性を定量化することにより，正確なてんかん病変部の検出とてんかん病勢の評価が可能となりつつある。本研究では，様々なてんかん患者を対象に，マルチスケールエントロピー法を用いて，定量化されたガンマ波規則性とてんかん病変との関係を評価する。さらに，てんかん病変部の病理学的変化との関係性を詳細に評価することで，てんかん病変部マーカーの開発へと繋げる。

A. 研究目的

種々の脳病変（脳皮質形成異常症，脳血管奇形・異常症，脳腫瘍など）により難治性てんかんを呈する患者の脳波におけるガンマ波規則性の時間空間的分布を解析し，切除を行った場合はてんかん病変部の詳細な病理学的評価を行う。ガンマ波規則性は病的特異性の高いマーカーとなり得り，通常の脳波計でも十分測定可能という汎用性を有する。こうした利点を生かし，ガンマ波規則性を，より正確なてんかん病変部の為の新規バイオマーカーとして臨床応用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）

対象は，様々な脳病変（皮質形成異常症，血管異常症，腫瘍など）を有するてんかん患者さんにおける術前脳波データ，手術実施例の頭蓋内脳波データおよび病理学的評価のための切除標本とした。方法は，脳波データに対してマルチスケールエントロピー法を適用しガンマ波規則性を定量化して時間空間的に評価を行った。切除病変部の病理学的な詳細評価は，新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター柿田明美先生および北浦弘樹先生にご協力いただいた。

C. 研究結果

発作間欠期におけるガンマ波規則性の高さは，てんかん原性の強さとよく相関することが示された。特に，皮質形成異常症のてんかん脳波のガンマ波規則性の高い部位は，従来の脳波評価法により決定されたてんかん原性部よりも範囲が狭く，

且つ，病理学的異常部位を正確に同定できた。また，術中脳表脳波において広範囲に棘波が認められる症例において，最もてんかん原性が強い棘波を識別可能で，同部位は病理学的にもてんかん原性部として整合性のある所見を呈していた。

D.考察

現在のところ，脳波においてんかん病変部マーカーとして用いられることの多いhigh-frequency oscillation：HFOには，病的なHFOおよび生理的(正常)HFOの区別がつけられないことや，頭皮脳波ではHFOを検出しにくい，膨大な脳波データの中においてHFOを検出しなければならない，等の欠点が多い。また，direct current：DCもてんかん病変部マーカーとなりうるが，こちらも同様に脳波測定条件が揃わないと検出出来ないため汎用性に問題がある。本法は，非発作期における背景波のたった数十秒間を解析するだけで，感度と特異度の高いてんかん病変部検出が可能であることが示されつつある。また通常の施設・脳波計という環境でも十分測定・解析可能であるという汎用性を有する。さらに将来的には，脳波計のボタンを一つ押すだけで自動的にてんかん病変部が可視化されるようなソリューションを目指している。本研究は，安全で確実な低侵襲てんかん外科治療の実現のために急務であり，てんかん患者の機能予後に大きく関わる重要度の高いものである。

E.結論

てんかん脳波におけるガンマ脳波規則性の高さとてんかん病変部の病理学的変化はよく相関することが示された。今後，ガンマ波規則性がより正確なてんかん病変部のマーカーとして臨床応用されることが期待される。

F.研究発表（上記課題名に関するもの）

1.論文発表

1. Sato, Y, Ochi, A, Mizutani T, Otsubo, H. (2019)：Low entropy of interictal gamma oscillations is a biomarker of the seizure onset zone in focal cortical dysplasia type II. Epilepsy Behav. 96:155-159.
2. Sato, Y, Wong, SM, Iimura, Y, Ochi, A, Doesburg, SM, Otsubo H. (2017)：Spatiotemporal changes in regularity of gamma oscillations contribute to focal ictogenesis. Sci Rep. 24;7:9362.

2.学会発表

1. 発作間欠期ガンマ波規則性の定量解析よる新規てんかん病変部マーカー開発：第78回日本脳神経外科学会学術総会（大阪，2019/10/19）
2. 安全で確実なてんかん外科実践のための工夫：第11回湾岸脳神経外科懇話会（白金台，2019/4/23）

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

Joint Usage / Research Report FY 2019
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Targeting of GD2 as a novel treatment for diffuse intrinsic pontine gliomas

Principal Investigator Hashizume Rintaro[1]
Co-Investigators Manabu Natsumeda[2], Jun Watanabe[2], Hideaki Abe[2], Yoshihiro Tsukamoto[2], Masayasu Okada[2], Yukihiko Fujii[2], and Akiyoshi Kakita[3]

[1]Department of Neurological Surgery, Biochemistry and Molecular Genetics, Northwestern University Feinberg School of Medicine, [2]Department of Neurosurgery and [3]Department of Pathology, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

Diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs) are deadly brain tumors mostly seen in children. Near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) a new treatment method aimed at targeting surface antigens of cancer cells. GD2 is a disialoganlioside expressed in both DIPGs and glioblastomas, and successful anti-GD2 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy has been reported in DIPGs. In the present research, we set out to look at GD2 expression in DIPG and glioblastoma cell lines and surgically obtained glioblastoma tissues by western blotting, flow cytometry, and immunohistochemistry. Flow cytometry revealed that the DIPG cell line SF8628 and glioblastoma cell lines LN229, LN319, AM38, and U87MG were positive for GD2, NGT41, and T98G were weakly GD2 positive. Furthermore, 4 out of 9 (44%) glioblastoma cases stained positive for GD2, of which one case was strongly positive. Together, GD2 is a candidate of surface antigen for NIR-PIT in gliomas. Further studies are needed to confirm *in vivo* efficacy of anti-GD2 NIR-PIT in gliomas and potential *in vitro* efficacy in DIPGs.

A. INTRODUCTION

Diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) is a deadly disease and seen almost exclusively in children, with a median survival of less than 12 months. Near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) is a new treatment method developed by Dr. Hisataka Kobayashi at NIH using a target-specific photosensitizer based on a near-infrared dye (IR700) conjugated to monoclonal antibodies targeting surface antigens of cancer cells. After binding of the monoclonal antibody-IR700 conjugate, irradiation with near infrared light causes highly selective and potent cell death (Kobayashi *et al.*, *Nat Med*, 2011) (Fig 1). GD2 is a disialoganglioside uniformly expressed in DIPG cell lines. The efficacy of anti-GD2 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy in DIPGs has recently been reported (Mount *et al.*, *Nat Med*, 2018). The present research aims to show that NIR-PIT using the human anti-GD2 antibody dinutuximab is effective in the treatment of DIPGs.

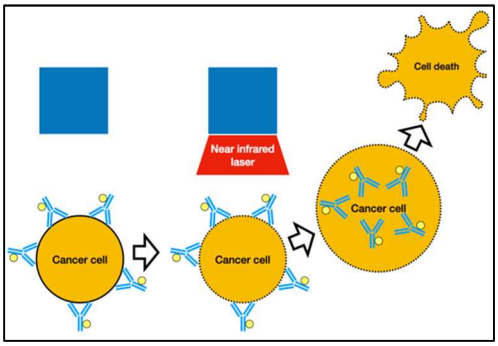


Fig. 1 Schematic figure of NIR-PIT

B. MATERIALS AND METHODS

Establishment of DIPG and GBM cell lines

The DIPG cell lines, SF7761 and SF8628 were established and supplied by Drs. Rintaro Hashizume and Nalin Gupta after written consent was obtained from the family (University of California San Francisco Internal Review Board). JHH-DIPG1 was a kind gift from Drs. Eric H. Raabe and Charles G. Eberhart (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA). The GBM cell line NGT41 was established at Niigata

University after written consent was obtained from the family (Niigata University Internal Review Board). U87MG, T98G, and LN229 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC), LN319 was purchased from AddexBio and. AM38 was purchased from Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB). Cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% Antibiotic-Antimycotic.

Western blotting

Total cell lysate was collected from asynchronously proliferating cells in buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% Glycerol) containing protease inhibitors (1 mM EDTA, 20 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin, 1 mM PMSF) and phosphatase inhibitors (1 mM NaF, 1 mM Na_2MoO_4, 1 mM Sodium orthovanadate). 15 µg of protein from each Lysate sample were separated by SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. After probing with the primary antibody GD2 or β-actin, the membranes were incubated with horseradish peroxide-conjugated secondary antibody (1:1,000; CST), and visualized by ECL prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA).

Flow cytometry

We incubated cell line samples (SF8628, NGT41, AM38, U87MG, T98G, LN319 and LN229) for 30 minutes at room temperature in the dark with GD2 (anti-Mouse, BD Biosciences) antibody, followed by secondary antibody (Anti-mouse IgG Alexa488, Jackson ImmunoResearch). After incubation, the cells were centrifuged for 2 minutes at 700 rpm and the supernates discarded. Cell pellets were washed with phosphate-buffered saline (PBS) before and after each step. Next, the cell pellets were resuspended in On-chip Sample Buffer (On Chip Biotechnologies Co., Ltd) analyzed the results of flow cytometry characterization by On-chip Flow (On Chip Biotechnologies Co., Ltd). Negative control omitting the primary antibody was used.

Immunohistochemistry

Surgical specimens were fixed with 20% buffered formalin and embedded in paraffin (FFPE). Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and GD2. Histological analysis of glioblastoma was made by AK according to the 2016 WHO classification.

C. RESULTS/OUTCOMES

First, we set out to look at GD2 expression in DIPG cell lines. Western blotting revealed that GD2 was expressed in SF8628 but not SF7761 and JHH-DIPG1 (Fig 2A). Flow cytometry confirmed that GD2 was expressed at the cell surface of SF8628 (Fig 2B).

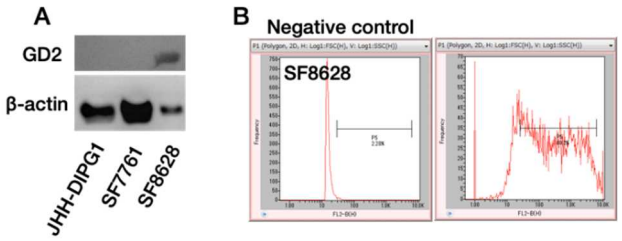


Fig 2. (A) GD2 expression in DIPG cell lines. (B) Flow cytometry confirmed expression of GD2 in SF8628.

Next, staining for GD2 was performed in tissue taken from 9 glioblastoma patients. GD2 was positive in 4 out of 9 (44%) cases, and in one IDH-mutant glioblastoma, GD2 was storngly positive (Fig 3).

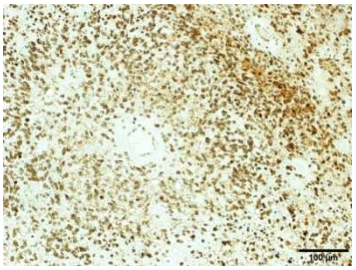


Fig 3. Expression of GD2 in an IDH-mutant glioblastoma.

By flow cytometry, AM38, LN229, and U87MG were positive for GD2, NGT41 and T98G were weakly GD2 positive. LN319 was negative (Fig 4). These findings were largely consistent with those of a previous report (Yeh et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016).

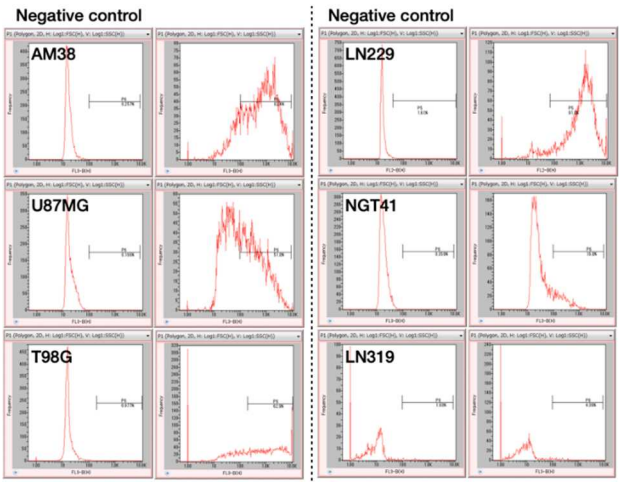


Fig 4. Flow cytometry results in 6 GBM cell lines

D. DISCUSSION

NIR-PIT was developed by Dr. Hisataka Kobayashi's group at NIH. By making a conjugate between a monoclonal antibody which binds to any surface antigen specific to cancer cells and a near infrared dye (IR700), many types of cancer can be targeted. Already, clinical trials have commenced in the US and Japan, including Herceptin-IR700 for Her2-positive breast cancer and Erlotinib-IR700 for EGFR-amplified head

and neck cancers.

We are searching antibodies for surface antigens specific to glioma cell, and GD2 came up as a surface antigen expressed on the cell surface of glioblastomas (Yeh et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016) and DIPGs (Mount *et al.*, *Nat Med*, 2018).

Preliminary results shown in the present report suggest that GD2 is a promising target for NIR-PIT in both DIPGs and glioblastomas. The human anti-GD2 antibody dinutuximab has already been developed and has shown promise in GD2-positive neuroblastoma (Barry et al., Clin Can Res, 2018). Thus, Dinutuximab-IR700 NIR-PIT is an exciting candidate for the treatment of glioblastomas and DIPGs.

E. CONCLUSION

We found GD2 to be consistently expressed in DIPG cell lines and glioblastoma tissue and cell lines. Further experiments are needed to prove i*n vitro* and *in vivo* efficacy of anti-GD2 NIR-PIT targeting DIPGs and glioblastomas.

F. PUBLICATIONS

(Relevant to the research)

1. PAPERS

1. **Abe H**, **Natsumeda M**, **Okada M**, **Watanabe J**, **Tsukamoto Y**, Kanemaru Y, Yoshimura J, Oishi M, **Hashizume R**, **Kakita A**, **Fujii Y.** MGMT expression contributes to temozolomide resistance in H3K27M-mutant diffuse midline gliomas. Front Oncol, 9:1568, 2020.
2. Kanemaru Y, **Natsumeda M**, **Okada M**, Saito R, Kobayashi D, Eda T, **Watanabe J**, Saito S, **Tsukamoto Y**, Oishi M, Saito H, Nagahashi M, Sasaki T, **Hashizume R**, Aoyama H, Wakai T, **Kakita A**, **Fujii Y**. Dramatic response of *BRAF* V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor: establishment and xenograft of a cell line to predict clinical efficacy. *Acta Neuropathol Commun*, 7(1):119, 2019.
3. Meel MH, de Gooijer MC, Metselaar DS, Sewing ACP, Zwaan K, Waranecki P, Breur M, Buil LCM, Lagerweij T, Wedekind LE, Twisk JWR, Koster J, **Hashizume R**, Raabe EH, Montero-Carcaboso A, Bugiani M, Phoenix TN, van Tellingen O, van Vuurden DG, Kaspers GJL, Hulleman E. Combined therapy of AXL and HDAC inhibition reverses mesenchymal transition in diffuse intrinsic pontine glioma. *Clin Can Res,* accepted.
4. Katagi H, Louis N, Unruh D, Sasaki T, He X, Zhang A, Ma Q, Piunti A, Shimazu Y, Lamano JB, Carcaboso AM, Tian X, Seluanov A, Gorbunova V, Laurie KL, Kondo A, Wadhwani NR, Lulla R, Goldman S, Venneti S, Becher OJ, Zou L, Shilatifard A, **Hashizume R**. Radiosensitization by histone H3 demethylase inhibition in diffuse intrinsic pontine glioma. *Clin Cancer Res*, 25(18):5572-5583, 2019.
5. Tsvankin V, **Hashizume R**, Katagi H, Herndon JE, Lascola C, Venkatraman TN, Picard D, Burrus B, Becher OJ, Thompson EM. ABC transporter inhibition plus dexamethasone enhances the efficacy of convection enhanced delivery in H3.3K27M mutant diffuse intrinsic pontine glioma. *Neurosurgery*, 2019 Jun 21. pli: nyz212. doi: 10. 1093/neuros/nyz212 [Epub ahead of print].
6. Koncar RF, Dey BR, Stanton AJ, Agrawal N, Wassell ML, McCarl LH, Locke AL, Sanders L, Morozova-Vaske O, Myers MI, Hamilton RL, Carcaboso AM, Kohanbash G, Hu B, Amankulor NM, Felker J, Kambhampati M, Nazarian J, Becher OJ, James CD, **Hashizume R**, Broniscer A, Pollack IF, Agnihotri S. Identification of novel RAS signaling therapeutic vulnerabilities in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Cancer Res*, 79(16): 4026-4041, 2019.
7. Qi J, Esfahani DR, Huang T, Ozark P, Bartom E, **Hashizume R**, Bonner ER, An S, Horbinski CM, James CD, Saratsis AM. Tenascin-C expression contributes to pediatric brainstum glioma tumor phenotype and represents a novel biomarker of disease. *Acta Neuropathol Commun*, 7(1):75, 2019.
8. Hoeman CM, Cordero FJ, Hu G, Misuraca K, Romero MM, Cardona HJ, Nazarian J, **Hashizume R**, McLendon R, Yu P, Procissi D, Gadd S, Becher OJ. *ACVR1* R206H cooperates with H3.1K27M in promoting diffuse intrinsic pontine glioma pathogenesis. *Nat Commun*: 10(1):1023, 2019.
9. Wang L, Zhao Z, Ozark PA, Fantini D, Marshall SA, Rendleman EJ, Cozzolino KA, Louis N, He X, Morgan MA, Takahashi Y, Collings CK, Smith ER, Ntziachristos P, Savas JN, Zou L, **Hashizume R**, Meeks JJ, Shilatifard A. Resetting the epigenetic balance of polycomb and COMPASS function at enhancers for cancer therapy. *Nat Med*, 2018, accepted.
10. Louis N, Liu S, He X, Drummond, DC, Noble CO, Goldman S, Mueller S, Bankiewicz K, Gupta N, **Hashizume R**. New therapeutic approaches for brainstem tumors: a comparison of delivery routes using nanoliposomal irinotecan in an animal model. *J Neurooncol*, 136(3):475-84, 2018.
11. **Hashizume R.** Epigenetic targeted therapy for

diffuse intrinsic pontine glioma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 57(7):331-42, 2017.
12. Cordero FJ, Huang Z, Grenier C, He X, Hu G, McLendon RE, Murphy SK, **Hashizume R**, Becher OJ. Histone H3.3K27M represses p16 to accelerate gliomagenesis in a murine model of DIPG. *Mol Cancer Res*, 18(13):3167-3177, 2017.
13. Wainwright DA, Horbinski CM, Hashizume R, James CD. Therapeutic hypothesis testing with rodent brain tumor models. *Neurotherapeutics.* 14(2):385-92, 2017.
14. Piunti A, **Hashizume R**, Morgan MA, Bartom ET, Horbinski CM, Marshall SA, Rnedleman EJ, Ma Q, Takahashi YH, Woodfin AR, Misharin AV, Abshiru NA, Lulla RR, Saratsis AM, Kelleher NL, James CD, Shilatifard A. Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med*, 23(4) 493-500, 2017.
15. Maury E, **Hashizume R**. Epigenetic modification in chromatin machinery and its deregulation in pediatric brain tumors: insight into epigenetic therapies. *Epigenetics*, 12(5):353-369, 2017.
16. **Abe H**, **Natsumeda M**, Kanemaru Y, **Watanabe J**, **Tsukamoto Y**, **Okada M**, Yoshimura J, Oishi M, **Fujii Y**. MGMT expression contributes to temozolomide resistance in H3K27M-mutant diffuse midline gliomas and MGMT silencing to temozolomide sensitivity in IDH-mutant gliomas. *Neurologica Medico Chir (Tokyo)*, 58(7):290-295, 2018.

2. PRESENTATIONS

(★= especially relevant presentation)

1. **Hashizume R**. Epigenetic targeted therapy for diffuse intrinsic pontine gliomas. June, 2019, Niigata. ★
2. **Natsumeda M.** Establishment of cell lines and xenografts for precision medicine in pediatric brain tumors. June, 2019, Niigata. ★
3. **Natsumeda M.** New treatments in the field of malignant gliomas including photodynamic therapy and near-infrared photoimmunotherapy. 72nd Niigata Neurosurgery Conference. December, 2018, Niigata. ★
4. **Natsumeda M.** Diagnosis and treatment of IDH mutant gliomas through collaborations. 18th annual meeting of Protein Science Society of Japan. June, 2019, Niigata. ★
5. **Hashizume R.** Epigenetic targeted therapy for pediatric brain tumors. 311th Niigata Brain Research Seminar, June, 2017, Niigata.★
6. **Natsumeda M.** Establishment of cell lines in pediatric brain tumors. 311th Niigata Brain Research Seminar, June, 2017, Niigata. ★
7. **Hashizume R.** Novel approach for epigenetic therapy targeting EZH2 and BET bromodomain in pediatric diffuse midline gliomas with H3K27M mutant. The 35th Annual Meeting of the Japan Society for Neuro-Onclogy, November, 2017, Kagawa.
8. **Hashizume R.** Novel approach for epigenetic therapy targeting EZH2 and BET bromodomain in pediatric diffuse midline gliomas with H3K27M mutant. 14th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology, October, 2017, Osaka.
9. **Natsumeda M.** Histone H3 mutant midline gliomas. 50th Touhoku Brain Tumor Conference, March 2017, Sendai.
10. **Tsukamoto Y.** A case report of a H3.1 K27M mutant diffuse intrinsic pontine glioma undergoing multidisciplinary treatment. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Pediatric Neurosurgery, June 2017, Kobe.
11. **Abe H.** MGMT expression in H3K27M cell lines and resistance to temozolomide. 18th Annual Meeting of the Japanese Society of Molecular Neurosurgery, August 2017, Kofu.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

None

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

None

3. OTHERS

SF8628 and SF7761 were sent to Niigata University after MTAs were signed.

Joint Usage / Research Report FY 2019
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Elucidating the role of autophagy in NF1-associated gliomas

Principal Investigator Fausto J Rodriguez[1]
Co-Investigators Manabu Natsumeda[2], Shoji Saito[2], Masayasu Okada[2], Yukihiko Fujii[2], Akiyoshi Kakita[3]

[1]Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine,

[2]Department of Neurosurgery and [3]Pathology, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

We have previously shown mTOR activation in neurofibromatosis type 1 (NF1)-associated gliomas, tuberous sclerosis complex, subependymal giant cell astrocytomas and focal cortical dysplasia (FCD) type IIb with somatic mutations in mTOR. The mTORC1 pathway is a well-known regulator of autophagy. However, the induction/suppression has not been well studied in these disease entities. We present preliminary results of immunohistochemistry of autophagy markers in these tissues.

A. INTRODUCTION

Our group and others have demonstrated a role for mTOR activation in the biology of gliomas developing in patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) [5], similar to tumors developing in patients with tuberous sclerosis complex (TSC1) [6]. Additionally, a subset of NF1-associated gliomas demonstrates phenotypic features similar to subependymal giant cell astrocytoma (SEGA), a disease defining manifestation of TSC complex[2]. Also, mTOR is known to be activated in focal cortical dysplasia (FCD) type IIb with somatic mutations in mTOR[4]. The mTORC1/2 pathway, especially mTORC1, is known to be a master regulator of autophagy. Inhibition of mTORC1/2 induces autophagy and activation suppresses autophagy. We now aim to test protein levels of autophagy related proteins in NF1-associated gliomas, TSC and FCD Type IIb.

B. MATERIALS AND METHODS

Patients

Unstained slides of previously characterized NF-1 associated gliomas were sent to BRI for immunohistochemical analysis. Additional unstained slides from characterized TSC, SEGA and FCD Type IIb cases were prepared.

Histological and immunohistochemical analysis

Surgical specimens were fixed with 20% buffered formalin and embedded in paraffin (FFPE). Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE), LC3B and p62.

C. RESULTS/OUTCOMES

We found staining for LC3B and p62 in NF1-associated gliomas to be robust (Fig 1). We had speculated that LC3B expression would be suppressed and p62 expression to be high in NF1-associated gliomas, expected to be mTORC1-activated. This was not the case.

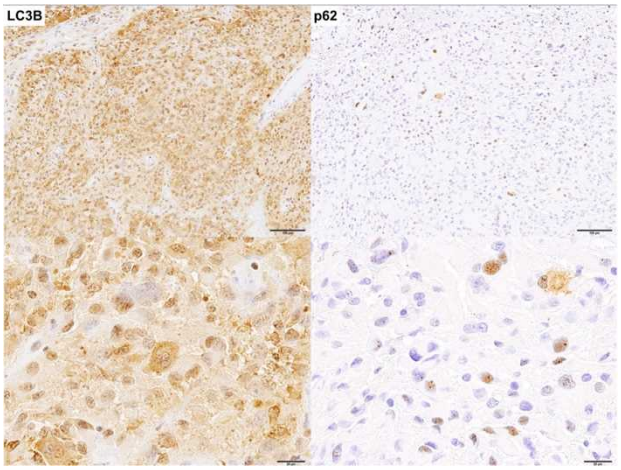


Fig 1. Immunostaining of LC3B and p62 in NF1-

associated gliomas.

D. DISCUSSION

To improve our understanding of the preliminary results, the following steps were thought to be necessary.

1. Immunohistochemistry analysis of phosphor-S6 is needed to assess whether mTORC1 pathway is activated in these lesions or not.
2. Careful assessment of punctate staining, suggesting the presence of autophagosomes, in the cytoplasm of cells is necessary.
3. We had used a very diluted concentration of p62 (x1000), and thus should be increased.

E. CONCLUSION

Preliminary results showed that assessment of LC3B and p62 is feasible by immunohistochemistry. Further steps shown above are needed to properly assess mTORC1 activation and expression of autophagy-associated proteins in NF1-activated gliomas, SEGAs, TSC and FCD type IIb with somatic mutations of mTOR.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

1. **Natsumeda M,** Liu Y, Nakata S, Miyahara H, Hanaford A, Ahsan S, Stearns D, Skuli N, Kahlert UD, Raabe EH, **Rodriguez FJ**, Eberhart CG. Inhibition of enhancer of zest homologue 2 is a potential therapeutic target for high-MYC medulloblastoma. *Neuropathology* 39:71-77, 2019.
2. Palsgrove DN, Brosnan-Cashman JA, Giannini C, Raghunathan A, Jentoft M, Bettegowda C, Gokden M, Lin D, Yuan M, Lin MT, Heaphy CM, **Rodriguez FJ**. Subependymal giant cell astrocytoma-like astrocytoma: a neoplasm with a distinct phenotype and frequent neurofibromatosis type-1-association. *Mod Pathol* 31(12): 1787-1800, 2018.
3. **Natsumeda M**, Maitani K, Liu Y, Miyahara H, Kaur H, Chu Q, Zhang H, Kahlert U, Eberhart CG. Targeting Notch signaling and autophagy increases cytotoxicity in glioblastoma neurospheres. *Brain Pathol* 26(6):713-23, 2015.
4. Nakashima M, Saitsu H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, **Kakita A**, Matsumoto N. Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. *Ann Neurol* 78(3):375-86, 2015.
5. Hütt-Cabezas M, Karajannis MA, Zagzag D, Shah S, Horkayne-Szakaly I, Rushing EJ, Cameron JD, Jain D, Eberhart CG, Raabe EH, **Rodriguez FJ**. Activation of mTORC1/mTORC2 signaling in pediatric low-grade glioma and pilocytic astrocytoma reveals mTOR as a therapeutic target. *Neuro Oncol* 15(12):1604-14, 2013.
6. Miyahara H, **Natsumeda M**, Shiga A, Aoki H, Toyoshima Y, Zheng Y, Takeuchi R, Murakami H, Masuda M, Kameyama S, Izumi T, **Fujii Y**, Takahashi H, **Kakita A**. Suppressed expression of autophagosomal protein LC3 in cortical tubers of tuberous sclerosis complex. *Brain Pathol*, 23(3): 254-62, 2013.
7. **Natsumeda M**, Aoki H, Miyahara H, Yajima N, Uzuka T, Toyoshima Y, **Kakita A**, Takahashi H, **Fujii Y**. Induction of autophagy in temozolomide treated malignant gliomas. *Neuropathology* 31: 486-93, 2011.
8. Jentoft M, Giannini C, Cen L, Scheithauer BW, Hoesley B, Sarkaria JN, Abell-Aleff PC, Rodriguez EF, Li Y, **Rodriguez FJ**. Phenotypic variations in NF1-associated low grade astrocytomas: possible role for increased mTOR activation in a subset. *Int J Clin Exp Pathol* 4(1):43-57, 2010.

2. PRESENTATIONS

1. **Rodriguez F.** Role of ATRX and alternative lengthening of telomeres (ALT) in neurofibromatosis type 1-associated solid malignancies. Niigata Neuroscience Seminar, August 2019, Niigata.
2. **Natsumeda M.** Monitoring of autophagy in gliomas. Niigata Neuroscience Seminar, August 2019, Niigata.

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

(Including prospects)

1. PATENT

None

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

None

3. OTHERS

4. Memorandum of Understanding (MOU) was signed between Department of Pathology, Johns Hopkins University and Brain Research Institute, Niigata University in the February, 2019.

Joint Usage / Research Report FY 2019
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Preventive medicine for Alzheimer's disease

Principal Investigator Ingrid L Kwee[1]
Co-Investigator Hironaka Igarashi[2]

[1] Neurology, University of California Davis [2] BRI, University of Niigata

Abstract

Late onset Alzheimer's disease (LOAD) should be prevented rather than treated when cognitive decline is established. We have clarified that debris clearance from the brain can be profoundly affected by water dynamics through the aquaporin 4 (AQP4) system, the astrocyte abundant water channel, and that perturbation in the AQP4 system plays a role in the pathogenesis of LOAD.

To seek out application of newly developed AQP4 modulators for LOAD, we will utilize high-throughput in vivo MR method developed at the Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute for screening of drugs. Next, we will perform detailed animal studies to assess these effects on an Alzheimer's disease animal model.

A. INTRODUCTION

The purpose of the research is to seek out applications of newly developed aquaporin modulators for treatment of Alzheimer's disease in human. Candidate compounds will be selected using a newly developed high-throughput in vivo MR method [1]. The therapeutic effect of chronic administration of these compounds will be assessed in an Alzheimer mouse model.

[1] Igarashi H, Tsujita M, Kwee IL, Nakada T. Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1: 17O JJVCPE MRI study in knockout mice. Neuroreport. 2014 Jan 8;25(1):39-43

B. MATERIALS AND METHODS

We will use high-throughput in vivo JJVCPE MR method developed at the Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute for screening of drugs. Candidate drugs will be administered following best effect protocol.MRI experiments will be performed on a 15 cm bore 7 T horizontal magnet (Magnex Scientific, Abingdon, UK) with a Varian Unity-INOVA-300 system (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with an actively shielded gradient. Normal saline, 0.2 ml, containing 20% of H2(17)O will be administered as an intravenous bolus injection at the 75th phase (10 minutes after the first scan) using an automatic injector at 0.04 ml/second. Data will be analyzed using software developed at the Center to assess the efficiency of water metabolism.

C. RESULTS

Utilizing wild type and AQP4 knockout mice (KO), we have demonstrated water entry into CSF is reduced in AQP4 KO mice[1]. The AQP4 facilitator TGN-101 decreases the relative concentration of H2(17)O in cerebral cortex.

[1]Nakada T, Kwee IL. Neuroscientist. 2019 Apr;25(2):155-166. doi: 10.1177/1073858418775027. Epub 2018 May 25.

D. DISCUSSION

From these results, it is inferred that astrocytes appear to play an important role in active water transport in brain. Water transport in interstitial space can be driven by the active transport of water by astrocytes[1] Also we proved that another AQP4 facilitator TGN-073 ameliorated hydrocephalus and filed a JP patent for this .

E. CONCLUSION

We have developed two AQP4 facilitators that impact water transport in brain.

F. PUBLICATIONS

Nomura T, Okamoto K, Igarashi H, Watanabe M, Hasegawa H, Oishi M, Fujii Y. Vascular Hyperintensity on Fluid-Attenuated Inversion Recovery Indicates the Severity of Hypoperfusion in Acute Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2020 Feb;29(2):104467. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104467. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31767525

Terumitsu-Tsujita M, Kitaura H, Miura I, Kiyama Y, Goto F, Muraki Y, Ominato S, Hara N, Simankova A, Bizen N, Kashiwagi K, Ito T, Toyoshima Y, Kakita A, Manabe T, Wakana S, Takebayashi H, Igarashi H. Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the Eif2b5 gene: a vanishing white matter disease model. J Neurochem. 2019 Oct 6. doi: 10.1111/jnc.14887. [Epub ahead of print]. PMID: 31587290

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

S2020-0004-N0
水頭症の予防又は治療薬及び水頭症の予防又は治療用医薬組成物

Joint Usage / Research Report FY 2019
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Elucidation of the roles of trans-synaptic molecule in neuronal homeostasis using mouse models

Principal Investigator Kensuke Futai[1]
Co-Investigators Toshikuni Sasaoka[2]
Manabu Abe[2]

[1] Dept. Neurobiology, Univ. Massachusetts Medical School, Brudnick Neuropsychiatry Research Institute,
[2] Niigata University, Brain Research Institute

Abstract

Malfunction of neuronal excitatory and inhibitory balance (*E-I balance*) causes Runaway Network Excitation in the brain that induces epilepsy and neuronal cell death. Trans-synaptic protein interaction is critical for synapse formation, regulation and maintenance. In this research report, we have proposed that the trans-synaptic adhesion molecule, *neuroligin 3 (Nlgn3)*, plays critical role on the regulation of *E-I balance*.

Synapse formation is a dynamic process essential for neuronal circuit development and maturation. At the synaptic cleft, trans-synaptic protein-protein interactions constitute major biological determinants of proper synapse efficacy. *E-I balance* is important to maintain synaptic activity constant. However, the molecular mechanisms underlying *E-I balance* remain to be elucidated. Here, we investigate *Nlgn* genes that encode a family of postsynaptic adhesion molecules known to shape excitatory and inhibitory synaptic function. We demonstrate that Nlgn3 protein differentially regulates inhibitory synaptic transmission in a splice isoform-dependent manner at hippocampal CA1 synapses. Distinct subcellular localization patterns of Nlgn3 isoforms contribute to the functional differences observed among splice variants. Finally, single-cell sequencing analysis reveals that *Nlgn1* and *Nlgn3* are the major *Nlgn* genes and that expression of *Nlgn* splice isoforms are highly diverse in CA1 pyramidal neurons

A. INTRODUCTION

Neuroligin proteins (Nlgns) were the first identified binding partners of α-latrotoxin receptors, neurexin proteins (Nrx), and localize at postsynaptic sites to regulate synapse maturation and function. Four Nlgn genes (*Nlgn1, Nlgn2, Nlgn3* and *Nlgn4*) encode trans-synaptic adhesion proteins (Nlgn1, Nlgn2, Nlgn3 and Nlgn4) that contain extracellular cholinesterase-like domains and transmembrane and PDZ-binding motif-containing intracellular domains. While the intracellular domain is important for NLGN binding with postsynaptic scaffold molecules, the extracellular domain confers the formation of excitatory and inhibitory synapses with Nrx, its sole presynaptic binding partner. Therefore, precise combinations of Nrx-Nlgn interactions allow Nlgns to diversify synapse identity.

Nlgn1 and Nlgn2 are postsynaptic adhesion molecules localized to excitatory and inhibitory synapses, respectively. Overexpression, knockdown and knockout approaches have revealed that Nlgn1 is important for excitatory synaptic structure and transmission and synaptic plasticity, but not for inhibitory synaptic function. Nlgn2 has specific functional roles in inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. In contrast, it has been reported that Nlgn3 protein localizes at both excitatory and inhibitory synaptic sites and regulates both synaptic functions. This unique ability alludes to a Nlgn3 protein-specific molecular code that promotes its translocation to both excitatory and inhibitory sites.

Splice insertion in *Nlgn* genes differentially regulates *E-I balance* and alters their binding affinity with presynaptic Nrx partners. In the extracellular cholinesterase-like domain, *Nlgn3* gene have two splice insertion sites, A1 and A2, leading to four theoretical splice isoforms. However, to the best of our knowledge, the splice isoform-specific function of Nlgn3 and the transcript levels of Nlgn splice isoforms at the single-cell level have not been addressed.

In the present study, we assess the function of Nlgn3 splice isoforms on excitatory and inhibitory synaptic transmission in CA1 pyramidal neurons in mouse organotypic slice cultures. Our results suggest that Nlgn3 up- or down- regulates inhibitory synaptic

transmission in a splice isoform-dependent manner.

MATERIALS AND METHODS

Animals: All animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Massachusetts Medical School. ***Single-cell RNA sequencing****:* Single-cell RNA were isolated from hippocampal CA1 pyramidal neurons. Sequencing libraries were run on single-end 50-bp modules in Illumina HiSeq 2000. ***Electrophysiology:*** Organotypic hippocampal slice cultures were prepared from postnatal 6-7 days old rats of either sex as described previously. Neurons at DIV 4-6 were transfected using a biolistic gene gun and were assayed 3 days after transfection. Whole–cell voltage clamp recordings were made simultaneously from a pair of CA1 pyramidal neurons, one transfected (visualized by cotransfecting GFP) and one untransfected neighbor.

B. RESULTS/OUTCOMES

Nlgn3 splice isoform-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission: The Nlgn3 gene contains two splice insertion sites (A1 and A2) that can yield four Nlgn3 splice isoforms (Nlgn3Δ, A1, A2 and A1A2). Nlgn3Δ lacks all splice insertions, while Nlgn3A1, 3A2 and 3A1A2 receive insertion of A1, A2 or both A1A2 cassette(s), respectively. To examine the potential roles of Nlgn3 splice isoforms on excitatory and inhibitory synapse function, we biolistically transfected the Nlgn3 splice isoforms in CA1 pyramidal cells of organotypic hippocampal slice cultures. Simultaneous electrophysiological recordings were made from transfected and neighboring untransfected neurons. CA1 pyramidal neurons overexpressing Nlgn3Δ or 3A2 showed increased evoked IPSCs compared with neighboring untransfected control neurons and a marked increase in EPSCs, as reported previously. In contrast, overexpression of Nlgn3A1 or 3A1A2 resulted in reduced amplitude of IPSCs and increased amplitude of EPSCs compared with neighboring untransfected cells.

Subcellular localization of Nlgn3 splice isoforms in the dendritic segment of CA1 pyramidal neurons: To understand the mechanistic roles of Nlgn3 splice isoforms in inhibitory synaptic transmission, we next performed immunocytochemistry to elucidate the subcellular localization of Nlgn3Δ and 3A1A2, which displayed strong enhancement and suppression of IPSC, respectively (**Fig. 1**). Excitatory synaptic sites were characterized by spine or VGluT1. Inhibitory synaptic sites were identified by the dendritic shaft proximal to VIAAT puncta. HA immunoreactivity illustrated that Nlgn3A1A2 is highly concentrated in spines. In contrast, Nlgn3Δ showed more diffuse expression in both spines and dendrites. The ratio of Nlgn3A1A2 signals between excitatory and inhibitory synapses was significantly higher than that of 3Δ. Next, we addressed whether these Nlgn3 splice isoforms differentially

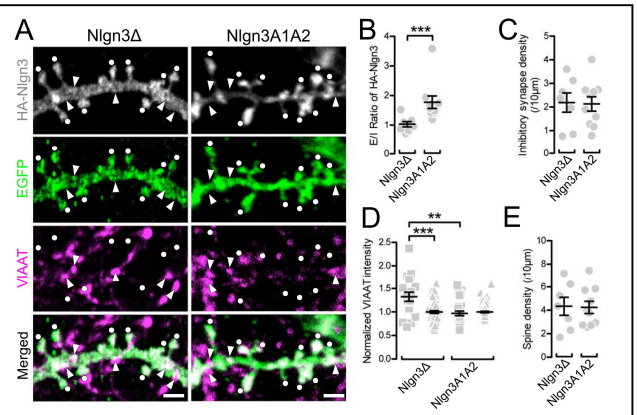


Figure 1 Synaptic targeting of Nlgn3 splice isoforms in CA1 pyramidal neurons (A) Maximum projection images of dendritic segments labeled for HA-Nlgn3 (gray), EGFP (green) and VIAAT (magenta) in CA1 pyramidal cells overexpressing HA-Nlgn3Δ (left) and A1A2 (right). White dots and arrows indicate EGFP+ spines and VIAAT+ inhibitory synapses, respectively. Scale bars: 2 μm. (B-D) Summary scatter plot showing the E/I ratio of HA signals (B), density of inhibitory synapses(C), normalized VIAAT intensity (D), and spine density (E) for individual dendritic segments of CA1 pyramidal cells overexpressing HA-Nlgn3Δ and A1A2. Normalized VIAAT intensity is obtained from contacting (square) and non-contacting (triangle) terminals to HA-Nlgn3-overexpressing dendrites. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test or U-test).

promote excitatory and inhibitory synapses. Importantly, inhibitory synapse density was comparable between Nlgn3Δ and 3A1A2, whereas VIAAT signal intensity in 3A1A2-expressing neurons was significantly lower than that of 3Δ. The spine density was comparable between Nlgn3Δ- and 3A1A2-overexpressing neurons. These results suggest that differences in the subcellular localization of Nlgn3Δ and 3A1A2 contribute to their distinct inhibitory synaptic functions.

Endogenous expression of *Nlgn* genes and splice isoforms in hippocampal CA1 pyramidal neurons: Finally, to understand the expression of endogenous *Nlgn* genes in CA1 pyramidal neurons, we harvested cytosol from four neurons and performed single-cell deep RNA-seq (**Fig. 2**). The quantification of *Nlgn* genes indicates that the expression of *Nlgn1* and *Nlgn3* are comparable but that of *Nlgn2* is significantly lower than the other two genes. We also compared the

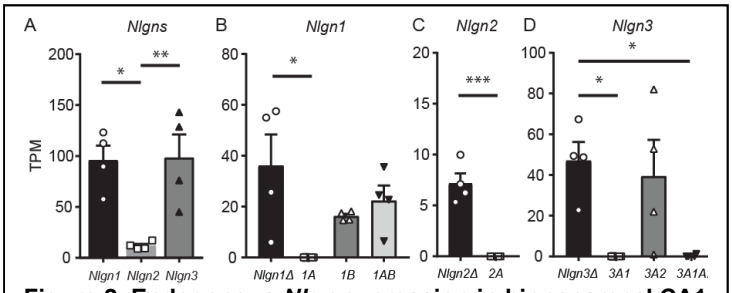


Figure 2. Endogenous *Nlgn* expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. (A) Summary bar graph of Nlgn gene (*Nlgn1, 2* and *3*) expression. (B-D) Summary graphs of splice isoforms of *Nlgn1* (B), *2* (C) and *3* (D). * $p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test or U-test, n = 4.

expression of *Nlgn* splice isoforms in each *Nlgn* gene. *Nlgn1Δ, 1B* and *1AB* were the most highly expressed Nlgn1 splice isoforms. *Nlgn2Δ* was the only isoform counted in the *Nlgn2* gene. *Nlgn1A* and *2A* transcripts were not detected in any of the four CA1 pyramidal neurons. Importantly, *Nlgn3Δ* and *3A2*, which exhibited increased inhibitory synaptic transmission, were the dominant *Nlgn3* splice isoforms in CA1 pyramidal neurons. The expression of *Nlgn3A1* and *3A1A2* were significantly lower than *Nlgn3Δ*.

C. DISCUSSION: The distinct subcellular localization of Nlgn3Δ and 3A1A2 suggests intriguing mechanisms regarding how splice isoforms influence synapse specificity. Given that the intracellular and transmembrane domains are identical between Nlgn3 splice isoforms, each isoform exerts their synapse coding effect through their unique extracellular domains. It is possible that inhibitory interneurons do not express Nrx isoforms that can bind to Nlgn3A1A2. Therefore, Nlgn3A1A2 may exclusively localize to excitatory synapses. Further studies should be performed to identify specific Nrx-Nlgn3 isoform interactions which affect inhibitory synaptic function. It has been suggested that the relative levels of Nlgns and their postsynaptic scaffold complex at excitatory and inhibitory synapses determine *E-I balance*. Additional studies are required, but it is interesting to address the hypothesis that postsynaptic Nlgn3A1 and A1A2 are strong and specific regulators at excitatory synaptic sites and sequester the necessary protein interactions from inhibitory synapses to reduce inhibitory synaptic transmission.

The single-cell sequencing results demonstrate a comprehensive unbiased gene expression profile of *Nlgn* splice isoforms in hippocampal CA1 pyramidal neurons obtained from neonatal mice. Our transcriptome findings are highly correlated with the expression pattern of the three *Nlgns* genes provided by the Allen Brain Atlas single-cell database from adult neurons, indicating that the expression ratio of *Nlgns* are stable throughout development. Interestingly, Nlgn2 has been well-characterized at inhibitory synapses, yet its transcript levels were significantly lower than *Nlgn1* and *Nlgn3*. Nlgn2 may have unique post-translational modifications and turnover mechanisms compared with Nlgn1 and Nlgn3. The expression of *Nlgn3A1* and *3A1A2* were much lower than *Nlgn3Δ* and *3A2*, suggesting that these two splice isoforms are not the major functional *Nlgn3* molecules under basal conditions. Further work is necessary to address whether modifications to neuronal activity such as synaptic plasticity can alter the expression of *Nlgn* splice isoforms.

D. CONCLUSION: Trans-synaptic protein-protein interactions are fundamental biological events for synapse formation, maturation and function. Nlgns are critical postsynaptic adhesion molecules that regulate excitatory and inhibitory synaptic transmission. Here we demonstrated that Nlgn3 regulates inhibitory synaptic transmission in a splice isoform-dependent manner.

A shift in *E-I balance* has been considered a pathophysiological hallmark of neurodevelopmental disorders and repeatedly reported in corresponding mouse models. Mutations and deletions of *Nlgn3* loci are associated with autism spectrum disorders, and mutant mice that mimic the human autism *Nlgn3* mutation exhibit *E-I imbalance* and abnormal synaptic plasticity. A closer examination of specific Nlgn3 splice isoform functions will elucidate their role in producing critical molecular outcomes that may influence neuropsychiatric disease pathogenesis

This achievement is currently under revise status at Journal of Biological Chemistry and we will resubmit the manuscript shortly.

E. PUBLICATIONS

1. PAPERS

M. Uchigashima, A. Cheung, J. Suh, M. Watanabe, **K. Futai**. Differential expression of neurexin genes in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* Feb 13. (2019), doi: 10.1002/cne.24664., PMID: 30761534

DG. Keener, A. Cheung, **K. Futai**. A highly efficient method for single-cell electroporation in mouse organotypic hippocampal slice culture. *J. Neurosci. Met.* (2020), ***In press***
https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108632

M. Uchigashima, M. Leung, T. Watanabe, A. Cheung, M. Watanabe, Y. Imamura, **K. Futai**. Neuroligin3 splice isoforms shape mouse hippocampal inhibitory synaptic function. *J. Biol. Chem.*, under revision status, https://doi.org/10.1101/2020.01.22.915801

2. PRESENTATIONS

1. Invited Speaker, University of Illinois at Chicago, Illinois, Feb. 19th, 2019, Presentation Title "Regulation & Dysregulation of Neuronal Homeostasis"
2. Symposium Speaker, 6th Venusberg Meeting on Neuroinflammation, Bonn, Germany, May 9-11th, 2019, Role of the NLRP3 Inflammasome Pathway in Epilepsy
3. Symposium Organizer and Speaker, The 42nd Annual Meeting of the Japan Society for Neuroscience, Niigata Japan, July 25th, 2019, Symposium Title: Matching Matters: Roles of trans-synaptic protein interactions, Presentation Title "Matching matters: Neuroligin-mediated input-specific homeostatic plasticity"
4. Invited Speaker, Harvard Medical School, VA Boston Healthcare System, Massachusetts, Oct. 17th, 2019, Presentation Title "Matching matters: Trans-synaptic code dependent regulation of E-I balance"

F. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. **PATENT**
2. **UTILITY MODEL REGISTRATION**
3. **OTHERS**

None.

Joint Usage / Research Report FY 2019
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Research on pathway-specific regulation of motor and cognitive functions via dopamine D1 and D2 receptors

Principal Investigator YanYan Wang[1]
Co-Investigator Toshikuni Sasaoka[2]

[1]Department of Medical Information Science, College of Medicine, Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA
[2]Department of Comparative & Experimental Medicine, Brian Research Institute, Niigata University

Abstract

In collaboration with Prof. Sasaoka and Professors Sakimura and Abe, we have made progress in generating the dopamine D2S conditional knockout (D2S cKO) mouse using the new RNA splicing and Cre-loxP recombination method. The D2S cKO is designed to express both D2L and D2S isoforms before Cre-loxP recombination and express only D2L after Cre-loxP recombination. Profs Sakimura and Abe have already obtained the targeted recombinant ES cells and generated progeny mice derived from ES cells. Prof. Sasaoka group is in the process of breeding these mice with recombinase-expressing mice to produce D2S cKO mice. It is expected that the D2S cKO mice will be obtained in 4-5 months.

In addition, we have established the condition and protocol for studying synaptic transmission in mouse striatal neurons using electrophysiological recordings in corticostriatal slices.

This collaborative research will enhance our understanding of the role of the dopamine D1 receptor (D1R) and two isoforms of the dopamine D2 receptor (D2R) in the regulation of motor activity and cognitive functions and in dopaminergic-related neuropsychiatric disorders.

A. INTRODUCTION

The neuronal activity in the striatum, a main receptive nucleus in the basal ganglia, plays an important role in motor control, reward-related behaviors, and various cognitive functions. The striatum sends its projections to other basal ganglia areas through two main pathways: the direct pathway (projections from the striatum to the substantia nigra pars reticulate) that is mediated by D1R, and the indirect pathway (projections from the striatum to the globus pallidus) that is mediated by D2R. D2R is found to exist in two isoforms - D2L (long form) and D2S (short form) in the brain of rodents and humans. Our research proposal is focused on delineating the role of D1R and individual D2R isoforms in motor and learning functions and in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders such as schizophrenia and Parkinson's disease.

B. MATERIALS AND METHODS

We are using a multidisciplinary approach to analyze the effect of the deletion of D1R and D2R isoforms in mice on motor and cognitive functions. These approaches include molecular genetic technology, behavioral tests, immunohistochemistry, electrophysiological recordings, and brain imaging.

We are collaborating with Prof. Kenji Sakimura and Assoc. Prof. Manabu Abe group to generate D2S conditional KO mice. We take advantage of the new method using RNA splicing and Cre-loxP recombination to produce the conditional KO of D2S (Hayashi et al. Molecular Brain, 2014, 7:44). In this way, before Cre-loxP recombination the

mice will express both D2S and D2L. By the Cre-loxP recombination the exons coding D2S and D2L will be changed to the mutated exon coding only D2L.

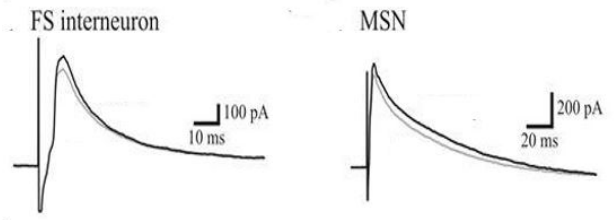
C. RESULTS/OUTCOMES

Using a multidisciplinary approach and the D2L KO mouse, we have previously demonstrated that D2L and D2S possess differential functions. Our studies also indicate that the D2L KO mouse provides a valuable model system to enable us to investigate the distinct role of individual D2R isoforms in the mammalian central nervous system. It is a logical step forward to generate the D2S KO mouse, which will greatly strengthen our research.

Prof. Sasaoka has received a D2S KO chimeric mouse from Profs. Sakimura and Abe group, and his research team is in the process of breeding these mice with recombinase-expressing mice to produce the D2S heterozygous mice.

Prof. Sasaoka's group has published that using D1R knockdown (KD) mice and Arc-dVenus mice D1R-mediated dopaminergic transmission is critical for aversive memory formation, specifically by influencing Arc expression in the cerebral cortex (Saito et al. *Neurosci. Res.* In press).

To study the modulation of synaptic transmission by D1R and the isoforms of D2R, we have established the condition and protocol for studying synaptic transmission in striatal neurons in corticostriatal slices. The figure below shows GABAA receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) in a fast-spiking (FS) interneuron and a medium-spiny projection neuron (MSN) recorded in the striatum of wild-type (WT) mice using whole-cell patch-clamp recordings while stimulating synaptic fibers.



D. DISCUSSION

In collaboration with Profs. Sakimura and Abe group, we are in the process of breeding these mice with recombinase-expressing mice to produce the D2S cKO heterozygous mice. Once D2S heterozygous cKO mice are produced, they will be used to generate D2S homozygous cKO mice.

Prof. Sasaoka's group has discovered that using D1R KD mice and Arc-dVenus mice, D1R-mediated dopaminergic transmission is critical for aversive memory formation, specifically by influencing Arc expression in the cerebral cortex (Saito et al. *Neurosci. Res.* In press).

We have established the procedures for evoking and recording synaptic currents in striatal neurons. This enables us to study the modulation of synaptic transmission in WT and KO mice.

E. CONCLUSION

In summary, we have made good progress towards generating the D2S conditional KO mice. Prof. Sasaoka's group has discovered that D1R-mediated dopaminergic transmission is critical for aversive memory formation and for influencing Arc expression in the cerebral cortex. We have established procedures for studying synaptic transmission in the striatum. We look forward to continuing our collaborative research.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

Norifumi Shioda, Yoshiki Imai, Yasushi Yabuki, Wataru Sugimoto, Yanyan Wang, Takatoshi Hikida, Toshikuni Sasaoka, Emi Hasegawa, Michihiro Mieda, and Kohji Fukunaga (2019) Dopamine D2L receptor deficiency causes stress vulnerability through 5-HT1A receptor dysfunction in serotonergic neurons. Journal of Neuroscience 39:7551-7563.

Wilar G, Shinoda Y, Sasaoka T, Fukunaga K. Crucial Role of Dopamine D2 Receptor Signaling in Nicotine-Induced Conditioned Place Preference. ***Mol Neurobiol.*** 2019 Dec;56(12):7911-7928. doi: 10.1007/s12035-019-1635-x. Epub 2019 May 25. PubMed PMID: 31129809.

Nakamura T, Rios LC, Yagi T, Sasaoka T, Kitsukawa T. Dopamine D1 and muscarinic acetylcholine receptors in dorsal striatum are required for high speed running. ***Neurosci Res.*** 2019 Dec 5. pii: S0168-0102(19)30654-6. doi: 10.1016/j.neures.2019.12.001. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31812651.

Nae Saito, Kazuki Tainaka, Tom Macpherson, Takatoshi Hikida, Shun Yamaguchi, Toshikuni

Sasaoka. Neurotransmission through dopamine D1 receptor is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex. Neurosci Res. 2020 May 4. pii: S0168-0102(20)30206-6. doi: 10.1016/j.neures.2020.04.006. [Epub ahead of print]

2. PRESENTATIONS

The University of Texas at Tyler Fisch College of Pharmacy, USA, June 2019
Satellite Symposium in Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, Japan, July 2019

Joint Usage / Research Report FY 2019
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Amyotrophic lateral sclerosis with TAF15-predominant FET pathology: clinicopathologic features of an autopsied patient

Principal Investigator Cui Bo[1]
Co-Investigators Tada Mari[2], Kakita Akiyoshi [2]

[1] Xuanwu Hospital of Capital Medical University [2] Department of Pathology, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

【Introduction】Patients harboring brain inclusions positive for FET (FUS, EWS, and TAF15) proteins usually manifest frontotemporal dementia. Here we describe an autopsied amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients showing characteristic TAF15-predominant FET pathology.

【Clinical summary】A 77-year-old female without family history of neurological disorders presented with progressive weakness of her upper limbs and neck, dysphasia, and dyspnea. Diffuse neurogenic pattern of electromyography supported the diagnosis of ALS. She died at 81 years of age. Gene analysis identified a novel p.Ser76lle (c.227G>T) mutation in *TAF15.*

【Pathologic findings】The brain weighed 1044 g. The cervical and thoracic spinal anterior nerve roots showed severe atrophy. Neuronal loss and gliosis were evident in the motor cortex, spinal anterior horns, and brainstem motor nuclei, including the hypoglossal nucleus. A few basophilic inclusions were observed in these areas. Immunohistochemistry using antibodies against FET and their nuclear transport receptor transportin1 (TRN1) revealed that the numbers of both TAF15 and TRN1 inclusions were much greater than those of both FUS and EWS inclusions. Interestingly, FUS inclusions were localized in lesions with severe neuronal loss. Immunohistochemistry using methylation-specific FUS antibodies revealed the unique methylation pattern different from those in previous reported ALS cases with FUS pathology.

【Discussion】Widespread and abundant TAF15-positive and FUS-negative inclusions are the feature implying characteristic cellular pathomechanisms associated with the *TAF15* mutation.

A. INTRODUCTION

FUS, EWS and TAF15 are all RNA binding proteins with similar structures, which composed FET family. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cases with FUS pathology were featured by FUS-positive inclusions (ALS-FUS), but not all of them harbored *FUS* gene mutation. The differences between cases with and without *FUS* mutation lied in the inheritance patterns, clinical phenotypes and immunoreactivity to other FET proteins. Cases with *FUS* mutation are mainly autosome dominant inherited ALS cases, and the inclusions in their brains are only positive to FUS. In contrast, cases without *FUS* mutation show mainly sporadic frontotemporal lobe degeneration (FTLD), and the inclusions in their brain are positive to EWS, TAF15, and also the nucleus transporter of FET proteins named TRN1. Furthermore, it has been reported recently that methylation patterns of RGG3 domain of FUS were also different between cases with and without *FUS* mutation.

B. CASE AND METHODS

Case

A 77-year-old female patient, with no family history of neurological disorders, complained of weakness of the left thumb, followed by gradually worsening neck and bilateral upper limb weakness. Twelve months after disease onset, neurological examination revealed hyperreflexia in all limbs, and muscle weakness and atrophy in her neck and upper limbs. No sensory and autonomic impairment was detected. Electromyography indicated diffuse neurogenic change. Therefore, a clinical diagnosis of ALS was made. Her muscle weakness worsened gradually, and she developed dysphagia and dyspnea 23 and 35 months after disease onset, respectively. Three months after she complained dyspnea, she died suddenly at 81 years of age. She could walk until her death.

Methods

Neuropathologic examinations was performed by making multiple, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks, and 4-μm-thick sections were stained with hematoxylin and eosin and Klüver-Barrera method. We performed immunohistochemistry using antibodies against phosphorylated TDP-43 (pTDP-43), FUS, EWS, TAF15, and TRN1. We also used methylation-specific FUS antibodies (unmethylation: UMA, monomethylation: MMA, and asymmetrical demethylation: ADMA). Double-label immunofluorescence was performed using antibodies against TAF15 together with FUS or TRN1.

Whole exome sequencing (WES) analysis was performed to detect the gene mutations in known ALS related genes.

This study was approved by the Research Ethics Committee of Niigata University.

C. RESULTS

The brain, showing mild atrophy of the frontal lobe, weighed 1, 044 g. The spinal anterior nerve roots were severely atrophic in the cervical and thoracic levels, and mildly in the lumbar levels. Microscopically, the middle and lateral sides of the motor cortex showed severe loss of pyramidal neurons, including complete loss of Betz cells, and gliosis was evident, whereas the medial side showed some remaining Betz cells and active macrophage infiltration. The spinal cord showed mild degeneration of the corticospinal tracts from the cervical to the lumbar level. The cervical and thoracic spinal anterior horns and the hypoglossal nucleus showed severe neuronal loss with gliosis, and the trigeminal motor nucleus, facial nucleus, and ambiguus nucleus showed only mild neuronal loss. No Bunina bodies were observed in remaining motor neurons. No degeneration was evident in other CNS areas except the mild neuronal loss in the premotor cortex. A few basophilic inclusions were identified in the spinal anterior horns and hypoglossal nucleus. Immunohistochemistry using pTDP-43 antibody revealed no immunoreactive structures. Immunohistochemistry using antibodies against FET proteins and TRN1 revealed that the various numbers of fibrous or dense round neuronal cytoplasmic inclusions in the remaining lower motor neurons. Some neurons also showed fibrous intranuclear inclusions. In the motor cortex, the majority of inclusions were neuronal perinuclear, ring-like or U-shape inclusions. The numbers of both TAF15 and TRN1 inclusions were much greater than those of FUS and EWS inclusions. Furthermore, TAF 15 and TRN1 immunohistochemistry revealed wide spread distribution of neuronal inclusions in the CNS including basal ganglia and cerebellum, whereas FUS inclusions were localized mainly in lesions with severe neuronal loss. Small numbers of TAF15 and TRN1-positive dystrophic neurites and oligodendroglial inclusions were also evident. Immunohistochemistry using methylation-specific FUS antibodies revealed almost similar numbers of

inclusions with UMA, MMA, and also ADMA.

Double immunofluorescence revealed that TAF15 and FUS were co-localized frequently in the spinal anterior horns but less frequently in the motor cortex, whereas TAF15 and TRN1 always co-localized in both regions.

WES analysis revealed a novel p.Ser76Ile (c.227G>T) mutation in the prion domain of *TAF15* gene. The frequency of this mutation in healthy control is 1 of 2420 alleles in HGVD, and no same mutation was detected in ExAC. In silico predictive algorithms suggest that it has pathological significance.

D. DISCUSSION

We demonstrated histological and immunohistochemical features of the ALS-FUS case harboring a novel *TAF15* mutation. Comparing to previously published ALS/FTLD-FUS with and without *FUS* mutation, the features of the present case were not consistent with those of both two groups.

In the present case, inclusions were immunoreactive not only to FUS but also TAF15, EWS, and TRN1, similarly to those in ALS/FTLD-FUS without *FUS* mutation. However, widespread and abundant TAF15-positive and FUS-negative inclusions were a characteristic feature of the present case. Furthermore, immunohistochemistry using methylation-specific FUS antibodies revealed the unique pattern of FUS methylation in the present case. According to the previous reports, FUS would be fully methylated in ALS-FUS with *FUS* mutation similarly to those in physiological condition, thus inclusions were positive with ADMA in these cases. On the other hand, methylation of FUS would be disrupted in ALS/FTLD-FUS without *FUS* mutation, thus inclusions were positive with UMA and MMA, but not with ADMA in these cases. Concerning the present case, inclusions displayed positivity to both ADMA and UMA/MMA almost to a same degree, being different from previously published patterns. Based on these characteristic histologic features, we speculate that the pathomechanisms underlying the present case were different from those in known cases of ALS/FTLD-FUS with and without *FUS* mutation, and might be related to *TAF15* mutation.

E. CONCLUSION

The present case showed widespread and abundant TAF15-positive and FUS-negative inclusions, and unique methylation pattern of FUS being different from previously reported ALS-FUS cases. These results implied the characteristic cellular pathomechanisms associated with the *TAF15* mutation.

F. PUBLICATIONS

1. PAPERS

In preparation

2. PRESENTATIONS

Joshinetsu Neuropathology Conference, Oct. 2019, Niigata

G. APPLICATION AND REGISTRATION STATUS ON INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

1. PATENT

None

2. UTILITY MODEL REGISTRATION

None

Joint Usage / Research Report FY 2019
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Production of congenital nystagmus model mice and analysis of visual function

Principal Investigator Keisuke Yonehara[1]
Co-Investigators Toshikuni Sasaoka[2], Manabu Abe[2]

[1] DANDRITE, Department of Biomedicine, Aarhus University [2] Dept. of Comparative & Experimental Medicine, Brain Research Institute, Niigata University

Abstract

Detection of visual motion is fundamental to the function of our visual system. The first stage where visual motion is computed in the brain is the retina. Dysfunction of retinal motion computation is linked to congenital nystagmus, a severe eye movement disorder of humans and mice. In collaboration with Prof. Toshikuni Sasaoka and Dr. Manabu Abe, we have been producing knock-in mice for genetically labeling retinal bipolar cell types, which play critical roles in retinal motion computation. We have been creating 3 mouse lines in which cell type specific promoters are connected to DNA recombinase or tetracycline-controlled transactivator (tTA). The obtained mouse lines will be transported to DANDRITE Denmark where PI of this project will analyze light responses of labeled cell types with two-photon-targeted patch clamp recordings and two-photon glutamate imaging, and then test the effect of silencing these cell types with chemogenetic tools such as DREADD on the retinal motion computation and eye movements to gain causal relationship between temporal dynamics of individual bipolar cell types and direction-selective computation by direction-selective ganglion cells. This project would provide key insights not only into the basic functioning of retinal circuits but also how impaired activity and connectivity of retinal cell types may lead to the visual disorders.

A. INTRODUCTION

Yonehara recently found that spatially asymmetric wiring between type-5 bipolar cell types and ON direction-selective cells are important for the visual motion computation in the mouse retina (Matsumoto et al., 2019 Curr Biol). In order to genetically target individual type-5 bipolar cells for manipulating activity or gene expression, we aimed to generate knock-in mouse lines in which cell type specific promoters are connected to either Cre recombinase or tTA.

B. MATERIALS AND METHODS

Materials

BAC DNA constructs for containing mouse Sox6, Chrm2, and Slitrk5.

ES cells derived from C57BL6 mouse line.

Culture medium for the ES cells.

ICR mice for implanting gene-introduced ES cells.

Methods

First, targeting vectors to generate knock-in mouse lines were made by DNA cloning and recombinant DNA experiment. Next, the targeting vectors were electroporated into ES cells, and the cells were cultured under the drug selection. ES cell colonies which were survived under the drug selection were screened for the correct homologous recombination. After the ES cells harboring the correct gene insertion are confirmed by Southern blot or DNA sequencing, the ES cells were microinjected into 8-cell stage embryos of ICR strains by the micro-manipulation. The microinjected blastocysts were transplanted into the uterus of pseudo-pregnant female mice.

C. RESULTS/OUTCOMES

Yonehara visited BRI Niigata University 14-15 November 2019 to discuss the plan for this collaborative project.

To label type-5A bipolar cells, we made a targeting vector for making Sox6-mtTA-KI mice, in which mtTAwprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon in exon 3 of Sox6 in the mouse genome. Endogenous Sox6 gene is disrupted. We will use heterozygous mice for experiments.

To label type-5B bipolar cells, we made a targeting vector for making Chrm2-iCreS-KI mice, in which iCreSwprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon in exon 3 of Chrm2 in the mouse genome. Endogenous Chrm2 gene is disrupted. We will use heterozygous mice for experiments.

To label type-5C bipolar cells, we made a targeting vector for making Slitrk5-CreERT2-KI mice, in which CreERT2wprepA-Neo cassette is inserted immediately after ATG start codon of Slitrk5 in the mouse genome. Endogenous Slitrk5 is disrupted. We will use heterozygous mice for experiments.

D. DISCUSSION

When we obtain chimeric male with high contribution of ES cell, we will cross the chimeric males the C57BL/6J mice. We will test the genotypes of the offsprings generated from crossing of chimera mice with C57BL/6J mice by genotyping by PCR. Positive mice will be crossed with C57BL6/J mice to obtain F1 heterozygous mice for analysis. 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 targeting vectors was successfully obtained. We will continue this Global Collaborative Research Project next year to complete the generation of mouse lines.

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.

Joint Usage / Research Report FY 2019
The Collaborative Research Center for Brain Diseases Utilizing Neuropathological Resources
Brain Research Institute, Niigata University

Development, optimization and validation of human AQP-4 PET Radioligand

Principal Investigator Marek Kubicki[1]
Co-Investigators Hironaka Igarashi[2], Ofer Pasternak[1], Changning Wang[1]

1 Professor, Director of Psychiatry Neuroimaging Laboratory, Department of Psychiatry, Harvard Medical School. **2** Professor, 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 ^{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. 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, [^{11}C]TGN-020, which was developed at Niigata University, for our studies. [^{11}C]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 [^{11}C]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 radiosythetic routes, including the necessary precursors that can be used to effect the introduction of 18F-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 rodent in vivo, and rodent 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 radiosythetic routes, including the necessary precursors that can be used to effect the introduction of 18F-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. Data analysis is currently ongoing.

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 understanding 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

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

令和元年度

Ａ．研究課題名：脳-腸-肝ネットワークによる病態発症のメカニズム
―自律神経系、腸内細菌叢を介した難治疾患の病態解明と新規治療法の開発を目指して

Ｂ．研究代表者　　所属部局名　消化器内科学　　職名　教授

氏名　寺井　崇二

Ｃ．研究成果（研究期間内（H29～R1）で得られた成果）
これまでに、自律神経系を介した様々な消化管ホルモンの分泌変化を解析し、セロトニンが肝切除後の肝再生時に重要であること、その活性化が求心性交感神経のシグナル伝達経路を介していることを明らかとし、論文発表した。(Inoue R, et al. FEBS open Bio, 2018)。さらに、総合的な議論を進めるための review が accept された(Kamimura K, et al. World J Gastroenterol., 2018）。
2019 年には、自律神経系のネットワークを介する胃グレリンと非アルコール性脂肪性肝炎の病態、進行の関与を明らかとし、発表することができた。本研究では、共同研究者である脳研究所、上野教授とともに関連する自律神経の走行、分布を AAV vector を用いて可視化するとともに、脳内のグレリンの発現についても検証することができた。この自律神経が繋ぐ消化器、神経、脳を繋ぐ臓器間ネットワークの疾患への関与の検証は、新潟大学の脳研究所との異分野融合共同研究でなければ、なしえなかった成果である。現在は腸内細菌叢と神経疾患の関与、自律神経ネットワークを介した消化器疾患の治療への応用を松井教授、上野教授と共同で解析を行なっている。

Ｄ．研究発表(上記課題名に関するもの)
１．論文発表

1) Inoue R, Kamimura K (corresponding), Nagoya T, Sakai N, Yokoo T, Goto R, Ogawa K, Shinagawa-Kobayashi Y, Watanabe-Mori Y, Sakamaki A, Abe S, Kamimura H, Miyamura N, Nishina H, Terai S. (2018) Effect of a neural relay on liver regeneration in mice: activation of serotonin release from the gastrointestinal tract. FEBS Open Bio. 2018 Jan 31;8(3):449-460. doi: 10.1002/2211-5463.12382. eCollection 2018 Mar. PMID: 29511622 PMCID: PMC5832978 DOI: 10.1002/2211-5463.12382

2) Kamimura K, Inoue R, Nagoya T, Sakai N, Goto R, Ko M, Niwa Y, Terai S. (2018) Autonomic nervous system network and liver regeneration. World J Gastroenterol. 2018 Apr 21;24(15):1616-1621. doi:10.3748/wjg.v24.i15.1616.

3) Nagoya T, Kamimura K, Inoue R, Ko M, Owaki T, Niwa Y, Sakai N, Setsu T,

Sakamaki A, Yokoo T, Kamimura H, Nakamura Y, Ueno M, Terai S. (2020) Ghrelin-insulin-like growth factor-1 axis is activated via autonomic neural circuits in the non-alcoholic fatty liver disease. Neurogastroenterol Motil. 2020 In Press

２．学会発表

上村顕也、名古屋拓郎、寺井崇二
NASH/NAFLD の病態における自律神経を介した消化管ホルモンの関与
第 55 回日本肝臓学会総会、2019 年 5 月東京

名古屋拓郎、上村顕也、井上良介、酒井規裕、後藤諒、高昌良、丹羽佑輔、坂牧僚、寺井崇二.NASH モデルマウスにおける自律神経系を介した消化管ホルモンの関与 JDDW 2019 年 11 月，神戸

高昌良、上村顕也、名古屋拓郎、井上良介、酒井規裕、丹羽佑輔、坂牧僚、寺井崇二. NASH の病態への臓器間ネットワークの関与　JDDW 2019 年 11 月，神戸

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

令和元年度

Ａ．研究課題名：パルス制御が拓く焦点可動 MRI による新規コントラスト機構の創出とそれに基づく革新的な機能 MRI 撮像法の実現

Ｂ．研究代表者　　所属部局名　自然科学系（工学部）　　職名　准教授

氏名　佐々木　進

Ｃ．研究成果（研究期間内（H29～R1）で得られた成果）

異分野融合による予備実験を足がかりとして，2018 年度には AMED 先端計測・要素技術のプログラム「多彩な解析情報を得る機能的 NMR の生組織への展開と生体の所望部位を可視化する MRI の開発」に採択された（採択倍率 20 倍）。

採択後は，このテーマの本流である「所望部位の可視化」を実現する「量子パルス」の性質を多岐にわたって調べ，効率的にイメージングを実現する手法を着実に展開している。また，「量子パルス」が「所望部位の可視化」に効果的に機能するのは，既存のプロトンによる MRI よりも Na による MRI であることが判明したため，「通常パルス」による Na-MRI も急速に進展している。具体的には，生体マウスの両方の腎臓の Na 画像の撮像に世界で初めて成功した。

さらに R1 年度末には，モデルマウスを用いて，糖尿病性腎臓病の早期診断が Na-MRI で可能となることを世界で初めて見出した。

以上の成果は，国内特許の出願が済み，本学の知財を通して PCT 公開における JST の財政支援にも採択されている。この間，AMED プロジェクトの進展により，R1 では，春の調整費と夏の加速費に採択された。

脳研究所とのネットワークを利用した研究や教育：異分野融合を開始した段階では，「量子パルス」による「所望部位の可視化」を可能とする新奇な現象を見出したばかりで黎明期であった。このため，五十嵐教授の設備を有効活用して融合研究を展開するだけの知見が得られていなかった。しかしながら，AMED プロジェクトの到達目標（＝複合ファントムに対する「量子パルス」による「所望部位の可視化」）は，まさに，五十嵐教授との異分野融合研究を開始したときの出発点であった。つまり，現在の AMED プロジェクトの到達目標の目処が明確になる今年度後半から，ようやく五十嵐教授との本格的な融合研究が始まると認識しており，連絡を密にして徐々に本格的な共同研究に展開したいと考えている。

Ｄ．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. Tomoyuki Haishi, Ryohei Kaseda, Ichiei Narita, Susumu Sasaki , In-vivo 23Na-MRI of mice toward renal clinical applications, NMR**2 Spring meeting, 2019/5/18, 米国.

2. 拝師智之，忰田亮平，成田一衛，佐々木進，マウス腎疾患モデルの生体内ナトリウムを可視化する 23Na-MRI の開発，第 47 回日本磁気共鳴医学会大会（熊本），2019/9/20，国内，口頭.

3. 拝師智之，忰田亮平，成田一衛，佐々木進，9.4Tesla-MRI を用いて生体マウス腎臓のナトリウム分布を可視化する，第 58 回 NMR 討論会，2019/11/7，国内，ポスター.

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

令和元年度

Ａ．研究課題名：視路圧迫症候群の器質的・機能的解析から見る，ヒト脳神経系の可塑性の探索と病態予測モデルの構築

Ｂ．研究代表者　　所属部局名　自然科学系　　職名　教授

氏名　飯島　淳彦

Ｃ．研究成果（研究期間内（H29～R1）で得られた成果）

【概要】

下垂体腫瘍による視路圧迫は視野障害を引き起こし，手術によって圧迫が解除されると視野が回復する．本チームでは，先行研究において，腫瘍の形状と視野の関係をモデル化し，術前のデータから予後を予測するモデルを構築した(Ito et. al., 2015)．これより，実際の病態解析から脳内で起きている現象の器質的変化と機能との関係を工学的手法でモデル化することに成功した．これを受けて，1)病態に関する神経生理学的な解析，2)臨床検査データのディジタル処理法の開発を研究課題とした．

【期間内で得られた成果】

1)腫瘍による神経圧迫の影響を他覚的にとらえる

腫瘍摘出術中に視覚誘発電位(VEP)を測定し，腫瘍摘出前後(視神経への圧迫解除前後)の VEP の変化について分析した．VEP は，第一次視覚野から記録した．その結果，硬膜切開に伴い視神経への圧迫解除が開始されるが，その直後から VEP 波形には顕著な変化が観察された．特に，視覚刺激定時後の 100ms 付近に観察される陽性波 P100 に注目すると，視路圧迫解除直後で振幅が増大する例が確認された．さらに，術前後の視野を比較し，視野の回復が見られた群と見られなかった群に分けてP100を精査したところ，視野の回復群においてP100の潜時が短縮する現象が確認された．これらは，腫瘍による神経への可逆的器質的変化を電気生理学的に検出できたと考えられ，今後の診断に大きく貢献できる可能性がある．

2)視野データの解析の自動化とディジタル処理

紙媒体に手書きで記録される視野データは，従来から画像として保管されており，解析が困難であった．本研究では，このデータのディジタル化とディジタル保存の手法を新たに検討した．開発手法については特許の出願を検討中であるため，詳細は割愛する．なお，成果の一部を学会発表予定であったが，諸般の事情と社会情勢の影響により延期した．

【今後の展望】

特許の出願を進めたのち，学会発表と論文発表を行う予定である．

【脳研究所との学内異分野融合研究による特筆すべき成果】

専門臨床科とのコラボレーションにより，臨床データに基づく解析，開発を行うことができた．引き続き，自然科学系学生も参加した共同研究活動の推進，脳研教員の自然科学系科目への出講など，研究，教育の両面でのコラボレーションを継続致したい．

D．研究発表(上記課題名に関するもの)

１．論文発表

投稿準備中　Iijima A., et al., Advanced Biomedical Engineering.

２．学会発表

1）小出碧，米岡有一郎，畑瀬哲尚，藤井幸彦，福地健郎，飯島淳彦，下垂体腫瘍における術中視覚誘発電位と術後視野との関係，第 55 回日本神経眼科学会総会，2017.11.11，横浜

2）発表予定学会の中止（2020.03）

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

令和元年度

Ａ．研究課題名：　組織浸透性に優れたマーカーの創出による脳の機能と病態の三次元マッピングの試み

Ｂ．研究代表者　　所属部局名　医歯学系　　職名　教授

氏名　竹林　浩秀

Ｃ．研究成果（研究期間内（H29～R1）で得られた成果）

本研究課題では、病態を描出する免疫染色可能な抗体の検討および in situ hybridization プローブの作製を行った。細胞ストレス等を検出する複数のプローブや抗体を同定あるいは作製することができた。本プロジェクトで同定した抗体やプローブを用いたデータは、*dystonia musculorum* マウス、*Purkinje cell degeneration* マウスや *Eif2b5* 変異マウスの表現型解析についての論文をまとめる際に活かされている。脳研究所の田井中一貴教授と組織透明化による３次元観察の共同研究を行い、マウス脳および脊髄において良好な結果が得られている。また、自然科学研究科の落合秋人准教授とは抗体作製の共同研究を行った。いずれも本異分野融合研究にて大きく研究が進んだ。なお、透明化技術を用いたデータは、今後論文発表予定である。

Ｄ．研究発表（上記課題名に関するもの）

１．論文発表

１）Hossain M.I., Horie M., Yoshioka N., Kurose M, Yamamura K. Takebayashi H. Motoneuron degeneration in the trigeminal motor nucleus innervating masseter muscle in *dystonia musculorum* mice. **Neurochem Int** 119: 159-170, 2018.
２）Zhou L, Hossain MI, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Konno K, Kageyama S, Komatsu M, Watanabe M, Sakimura K, Takebayashi H. Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (*pcd*) phenotype. **J Neurochem** 147(4): 557-572, 2018.
３）Terumitsu-Tsujita M, Kitaura H, Miura I, Kiyama Y, Goto F, Muraki F, Ominato S, Hara N, Simankova A, Bizen N, Kashiwagi K, Ito T, Toyoshima Y, Kakita A, Manabe T, Wakana S, Takebayashi H, Igarashi H. Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the *Eif2b5* gene: a vanishing white matter disease model. **J Neurochem** [Epub ahead of print]
４）Yoshioka N, Kabata Y, Kuriyama M, Bizen N, Zhou L, Tran MD, Yano M, Yoshiki A, Ushiki T, Sproule TJ, Abe R, Takebayashi H. Diverse mutations in *dystonin* gene cause distinct patterns of *Dst* isoform deficiency and phenotypic heterogeneity in *dystonia musculorum* mice. **Disease Model and Mechanism** accepted

２．学会発表

１） 吉岡望、堀江正男、竹林浩秀 末梢神経系特異的な*Dystonin* KOマウスを用いた遺伝性ニューロパチーの病態解析 第123回日本解剖学会総会 全国学術集会 2018.3.28.-30. 日本医科大学武蔵境校舎 日本獣医生命科学大学（東京都武蔵野市）
２） 竹林浩秀 オリゴデンドロサイトの分化と脳機能・脳研夏期セミナー 2018.7.21. 新潟大学脳研究所（新潟県新潟市）
３） Yoshioka N, Takebayashi H. Establishment of a new animal model for hereditary sensory autonomic neuropathy VI by conditional deletion of dystonin in the peripheral nervous system. 第 41 回日本神経科学大会 2018.7.26-29. 神戸コンベンションセンター（神戸市）
４） 吉岡望, 竹林浩秀 末梢神経系における*dystonin*遺伝子トラップによる遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー6型の新規モデル動物の確立 第124回日本解剖学会総会全国学術集会 2019.3.27-29. 朱鷺メッセ (新潟市)
５） Takebayashi H, Zhou L, Hossain MI, Abe M, Natsume R, Konno K, Watanabe M, Sakimura K. Purkinje cell-specific *Nna1* conditional KO mice showed cell-autonomous degeneration of Purkinje cells. Neuro2019, 2019.7.25-28. Niigata
６） Horie M, Yoshioka N, Kusumi S, Sano H, Hossain MI, Iida-Watanabe I, Chiken S, Abe M, Sakimura K, Nambu A, Shibata M, Takebayashi H. Disruption of *Dystonin* in Schwann cells results in peripheral neuropathy. Neuro2019, 2019.7.25-28. Niigata
7）Yoshioka N., Takebayashi H. Conditional rescue of dystonin using *Wnt1-Cre* transgenic mice in mouse model of hereditary sensory autonomic neuropathy VI. Neuro2019, 2019.7.25-28. Niigata
8）Terumitsu-Tsujita M, Kitaura H, Miura I, Kiyama Y, Goto F, Muraki F, Ominato S, Hara N, Simankova A, Bizen N, Kashiwagi K, Ito T, Toyoshima Y, Kakita A, Manabe T, Wakana S, Takebayashi H, Igarashi H. A novel spontaneous mouse mutant of the *Eif2b5* gene. 14th Biennial ISN satellite meeting on Myelin Biology, 2019.8.1-4. Saint-Paulin, Canada
9）Takebayashi H, Yoshioka N, Sano H, Chiken S, Nambu A. Establishment of a new animal model for hereditary sensory autonomic neuropathy VI by conditional deletion of *dystonin*. 2019 ISN-ASN meeting, 2019.8.4-8. Montreal, Canada
10）Takebayashi H. Establishment and analysis of *Eif2b5* mutant mice: a vanishing white matter disease model. 2019 International symposium on myelin in health and disease, 2019.12.13-15. Hangzhou, China
11）吉岡望、黒瀬雅之、山村健介、竹林浩秀 *dystonia musculorum*マウスの運動異常に関する神経回路基盤の解析 第125回日本解剖学会総会全国学術集会, 2020.3.25-27. 紙上開催

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

令和元年度

Ａ．研究課題名：手と身体を知覚する認知神経科学的基盤の解明

Ｂ．研究代表者　　所属部局名　人文学部　　職名　准教授

氏名　新美　亮輔

Ｃ．研究成果（研究期間内（H29～R1）で得られた成果）

1．研究成果

手の知覚のうち特に指差しの知覚について，脳波計測実験を行った。具体的には，右または左向きの指差し写真提示時の空間的注意の誘導効果を，指ではない単なる矢印記号や上下逆転した指差し写真との比較により検討した。まず行動実験により，いずれも刺激でも注意の誘導効果が生じることを確かめた。手がかり刺激（指差し，上下反転指差し，矢印）に対する事象関連電位を計測したところ，後頭・側頭部において，指差し刺激に比べ上下反転指差し刺激はより遅く，振幅の大きい P1 や N1 成分を生じることが確かめられた。注意に関連する活動は，左向き手がかり刺激と右向き手がかり刺激での電位差が左右半球で逆方向に生じるようなパターンを調べることで検討し，後頭葉や側頭部でそのような傾向が見られた。指差しは日常的な行動だが，その注意誘導効果の機序は未解明な部分が多く，今回の成果は新しい知見である。今後，詳細を検討したい。

指差ししている手の知覚については，同様に空間的注意の誘導効果を持つことが知られている視線の知覚との関連性についても，成人を対象とした認知心理学的実験によって検討した。日常的なコミュニケーション場面において，人間は視線と指差しを組み合わせて用いることが多いからだ。その結果，指差しによる注意誘導効果と視線による効果は独立・加算的なのではなく，相互作用があることがわかった。この成果は国際会議でも発表の上，論文にまとめ，国際学術誌に投稿予定である。

指差しはジェスチャーの一種である。そこで，指差しの知覚に限らず，指差しを含めたさまざまな身体ジェスチャーが他の認知機能とどのような影響を与えるかというより包括的な観点からの研究も行なった。第一に，ジェスチャー理解の発達過程を実験的に検討した。幼児を対象に，ジェスチャーが物体の使い方の学習やオノマトペの理解を助けるのではないかという仮説を実験的に検討した。ジェスチャーそのものが物体の使い方やオノマトペの理解を直接的に助けるという明確な結論は得られなかったが，ジェスチャー理解は 2～3 歳の間に上昇しており，この時期がジェスチャー理解の発達において重要な時期であることが明らかになった。第二に，成人を対象に，ジェスチャーと記憶との関係を検討した。ジェスチャーが発話内容の理解に影響することは知られているが，発話内容の記憶への長期的な影響は知られていない。そこでジェスチャーの有無やジェスチャーの内容を操作した記憶実験を行い，ジェスチャーの有無や内容が発話内

容の長期的な記憶には大きく影響しないにもかかわらず,発話内容と関連したジェスチャーがあると発話者の映像の再認成績は高いことがわかった。

最後に，身体の認知への顔認知の影響という観点から興味深い発見もあった。顔の魅力がその人物の能力やパーソナリティなどの推測に影響することは知られているが,顔以外の身体部位の認知にどう影響するかはあまり知られていない。服の魅力評価の実験において，顔の魅力を操作したところ，高魅力顔の人物が着用する服は，同じ服画像であってもより高魅力に評価されることがわかった。しかもその効果は，評価者（実験参加者）の性別にかかわらず，刺激顔が女性のときに大きかった（論文発表済）。対人知覚における顔認知と身体認知の相互作用を考える上で，新奇な発見と言える。

2．今回の異分野融合研究により期待される今後の展開

研究代表者が所属する人文学部心理･人間学主専攻プログラムと脳研究所対応教員の間では,人文学部学生が授業の一環として脳波実験室の見学を行うなど教育面で以前より部分的な交流があったが，近年，研究上の交流はあまりなかった。しかし，今回の異分野融合研究がきっかけとなり，研究活動上でも実質的な交流ができるようになった。教育面でも,これまで一度の見学のみだった脳波計測実験を学生が実際に研究活動として体験する機会が生まれ，大きな効果があった。今回の研究課題に限らず，脳波計測，認知心理学実験,発達心理学実験という異なるアプローチを柔軟に統合することで可能な研究の可能性は広く，今後の展開が期待される。

D．研究発表（上記課題名に関するもの）

１．論文発表

髙橋のぞ美・白井　述・新美亮輔　2，3 歳児のジェスチャー理解におけるオノマトペの影響　電子情報通信学会技術研究報告（信学技報），118（437），71—76，2019 年 2 月 1 日

三尾聖二・新美亮輔　ジェスチャーが発話内容の記憶に与える影響の検討　電子情報通信学会技術研究報告（信学技報），119（348），61—64，2019 年 12 月 19 日

新美亮輔・山田真也　顔の魅力が服の魅力評価に与える影響とその性差　心理学研究，91（2），2020 年 5 月 15 日（印刷中）

２．学会発表

白井　述・髙橋のぞ美・新美亮輔　2, 3 歳児におけるジェスチャーの理解　日本心理学会第 82 回大会，2018 年 9 月 26 日，仙台.

新美亮輔・山田真也　「服の印象に対する顔の魅力度の影響」　日本心理学会第 82 回大会，2018 年 9 月 27 日，仙台.

Niimi, R. How hands and faces guide visual selective attention. Psychonomic Society Annual Meeting, November 17, 2018, New Orleans, LA.

Niimi, R. Attentional cueing effect by pointing hand and other cues: Differences and interactions. Poster session presented at the 15th Asia-Pacific Conference on Vision, July 30, 2019, Osaka, Japan.

新潟大学脳研究所
脳研究所との学内異分野融合・共同研究進捗状況報告書

令和元年度

Ａ．研究課題名：病理学と連携したエニッグマティック RNA 群の発現制御機構の解明
（令和元年 9 月-令和二年 3 月）

Ｂ．研究代表者　　所属部局名　医歯学系　　職名　准教授

氏名　矢野 真人

Ｃ．研究成果（研究期間内（R1.9～R2.3）で得られた成果）

我々は、トランスオミクスデータを基にした、神経変性疾患特異的に発現する新しいクラスのエニグマティック RNA 群の探索を行っている。本研究課題では、病理学と連携したエニグマティック RNA 群の発現制御機構の解明を目的として、培養細胞モデルおよび病理組織を用いて、ミニ mRNA およびマイクロペプチドの発現解析を実施した。特に、本グラントの枠組みにてミニ mRNA 解析では､脳研究所のデジタル PCR 機での解析を用い、また 1 分子 in situ ハイブリダイゼイション解析では、RNAScope キットの最適化実験を行った。さらに、内在する病態特異的マイクロペプチドの検出に対しては、ウサギを用いたポリクローナル抗体を作成し抗原に対する Mass 解析を行った。今後は、培養細胞モデルを用いた CLIP 解析（Yugami et al *PLoS One 2020*）技術を用い、予測される撹乱 RNA 情報をコントロールする核酸や化合物の開発等が遺伝子性疾患の先端的予防や治療法開発を目指した研究を行う。

本研究を遂行するにあたり、病理学の研究チームとの研究打ち合わせを複数回実施する事ができた。また病理サンプルを用いた解析を展開する事ができたいへん有意義であった。

Ｄ．研究発表(上記課題名に関するもの)

１．　論文発表

Yugami M, Okano H, Nakanishi A and ***Yano M**: Analysis of the nucleocytoplasmic shuttling RNA-binding protein HNRNPU using optimized HITS-CLIP method. ***PLoS One***. 2020 Apr 17;15(4):e0231450 (***Corresponding Author & Last author**)

２．学会発表

矢野真人: HITS-CLIP provides new mechanisms of RNA regulatory loop in gene regulation in brain 第 42 回日本分子生物学会ワークショップ 2019 年 12 月 5 日”RNA 結合蛋白質解析の成せる用と美” **(ワークショップの主催、招待講演)**

新潟大学脳研究所年報 2019

令和２年 10 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/