

### ◆分子神経生物学分野

## 統合失調症モデル動物におけるミスマッチ陰性電位の変調

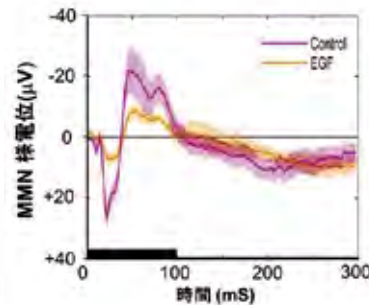
聴覚ミスマッチ陰性電位(MMN)は、人間の音繰り返しパターンからの逸脱を検出する脳機能を反映していて、精神疾患の診断評価に応用されようとしています。このMMNレベルは、標準音の規則的なパターンからの稀な逸脱(音量、音程、音長)への脳波応答成分に対応すると考えられていて、標準音に対する脳波・事象関連電位(ERP)の逸脱音ERPからの減算値として計算されます。このMMNの減少は、統合失調症患者に特徴的とされているものの、その神経生理学的機序および神経回路基板はほとんど判っていません。自由行動下のラットに3kHz標準音(1800回)と6kHz逸脱音(200回)からなるオド

ボールパラダイムを負荷して、一次聴覚皮質および前頭皮質 ECoG電極からそのERPをモニターしました。上皮成長因子 EGFを投与して作製された統合失調症に対するモデルラットでは、コントロールラットに比べて3kHz標準音のERPはほぼ同じですが、たまに聞こえる6kHz逸脱音に対するERPが前頭葉電極で半減していました。結果その引き算で得られるMMN様電位も、刺激後50-100msの時間帯で半減していました。このことは、聴覚ミスマッチ陰性電位(MMN)が、ヒトと動物間でトランスレータブルな精神疾患に対する神経生理学指標であることを意味します。



$$\text{MMN様電位} = 6\text{kHz誘発電位} - 3\text{kHz誘発電位}$$

(R1, 5, Scientific Reportに掲載)



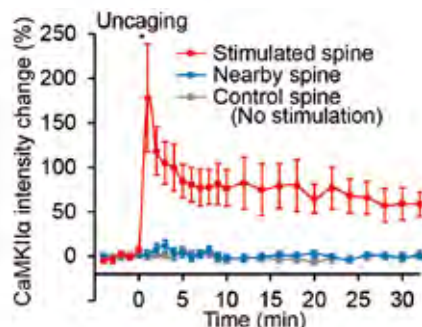
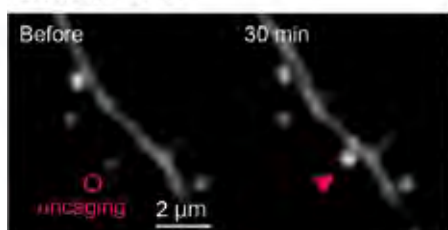
### ◆細胞病態学分野

## 生体脳でゲノム編集を行い、内在性タンパク質をイメージングする

ヒトや動物は、様々なことを学習し、脳で記憶しています。このとき脳では何が起きているのでしょうか?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す。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ます。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思っています。また、最近、発達障害に対する社会的関心が高まっています。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ます。では、発達障害の人とそうでない人で、脳の中の何が違うのでしょうか?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思っています。私たちはこれまでに、脳内で自在にゲノム編集を行う技術群を開発し、様々な内在性タンパク質を高精度に可視化することに成功してきました(Cell 2016, Neuron 2017)。現在はこれらの技術群を使って、学習・記憶の際に脳内の各細胞で機能タンパク質がどのように振舞っているのかを時間的・空間的に高精度に観察し、学習・記憶を細胞・分子レベルで理解することを目指しています。また、学習・記憶に異常をきたす疾患モデル動物において各タンパク質の挙動を観察し、病態の理解と新たな治療法の開発を目指しています。

### CaMKIIα knock-in



大脳皮質組織中の神経細胞での内在性CaMKIIαタンパク質の動態の二光子ライブイメージング画像。赤丸において二光子グルタミン酸アンケージングを行い、単一樹状突起スパインを刺激したところ、刺激したスパインに選択的にCaMKIIαタンパク質が集積することがわかった。

◆システム脳生理学分野

## 視覚野をフィードバック抑制するマウス頭頂連合野の解析

大脳皮質連合野は、認知や注意など高度な脳機能に働くとされていますが、その機能の基盤となる神経回路メカニズムに関してはほとんど分かっていません。私たちは、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ました。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ました(図1)。逆に、頭頂連合野を不活性化すると視覚応答は増強することも分かりました。これらの結果は、頭頂連合野が視覚野を常に抑制していることを示しています(図2)。この抑制

機能を破壊したマウスでは、視覚野興奮性ニューロンの方位選択性が鈍くなっていることも、2光子顕微鏡によるカルシウムイメージングで明らかにしました。サルを使った研究では、頭頂連合野が注意機能に重要であること、見る対象に注意を向けると視覚野ニューロンの方位選択性が鋭くなることが示されています。これらを考え合わせると、私たちが見出したマウス頭頂連合野から視覚野への抑制投射は、注意に働く神経回路メカニズムの一部であると考えられます。(R1 European Journal of Neuroscience (in press)に掲載)

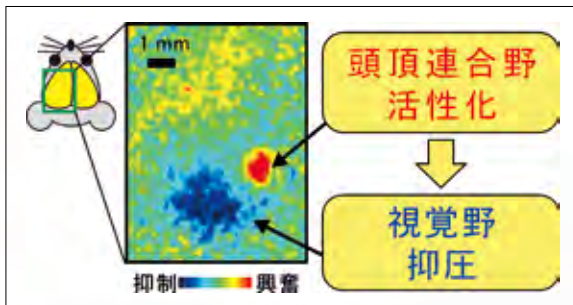


図1: マウス頭頂連合野を賦活すると視覚野が抑制される。

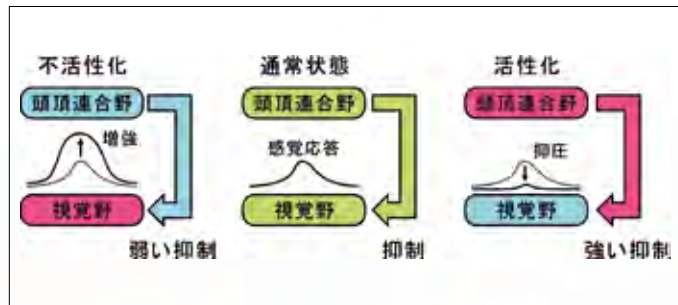
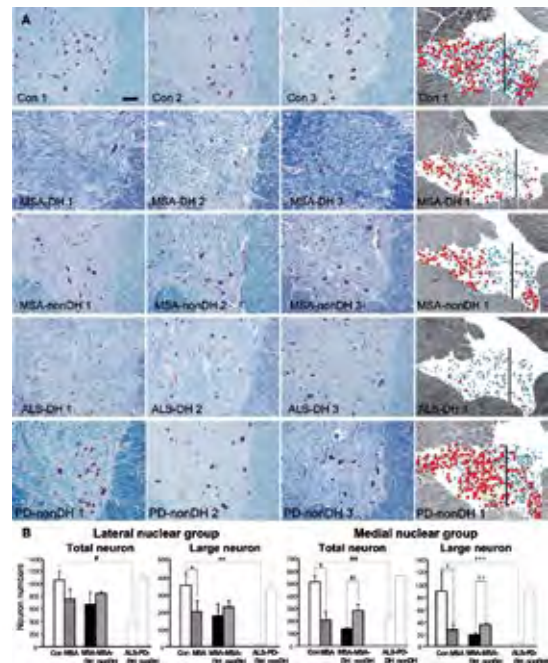


図2: 頭頂連合野による視覚野のフィードバック抑制。

◆病理学分野・脳疾患標本資源解析学分野

## 多系統萎縮症における首下がり： 主要臨床兆候における新たな責任病巣の同定

多系統萎縮症(multiple system atrophy: MSA)は中年期以降に発症し、小脳失調、パーキンソニズム、自律神経障害を呈する神経変性疾患です。病理学的にはリン酸化 $\alpha$ シヌクレイン( $\alpha$ S)陽性グリア細胞質内封入体(glial cytoplasmic inclusions: GCI)の出現を特徴とします。一方、頭頸部の異常な前屈を来す首下がり(dropped head: DH)は、神経筋疾患でしばしば認められ、パーキンソン症候群においては、特にMSAで比較的多く認められることからMSAの支持的症候として認識されています。また、首下がり患者さんの視野を狭め、食事や発声を困難にしQOLを大きく損ない臨床で大きな問題となります。しかしながらその機序は未だ不明であり、これまで錐体外路性兆候であるジストニアや、頸部伸筋のミオパチー等が示唆されてきました。今回私たちは、MSAにおいて時に神経原性筋萎縮を来すことに着目し、MSAの首下がりを呈した例において、頸部-肩甲帯支配髄節であるC4前角を、頸部筋を支配する内側核群と、肩甲帯筋を支配する外側核群について評価しました。結果、外側核群には運動ニューロンの脱落は認めず、内側核群に選択的に運動ニューロンの脱落を認めることを示しました。これにより、従来の仮説に加えて頸髄前角の運動ニューロン脱落が、首下がりに関与する可能性を初めて明らかにしました。これを認識することは、MSAの首下がりの病態を理解し、適切に治療する上で重要であると考えられます(H30, 4 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology)。



A: 第4頸髄内側核群における各群のKBセミマクロ像(左)とlarge neuron, small neuronの分布(右)。B: 内側核群と外側核群のlarge neuron数。MSA-DH(首下がり)群では、MSA-nonDH(非首下がり)群に比して前角の変性が強く、頸部筋を支配する内側核群において有意にlarge neuronの数が減少していた。興味深いことに、肩甲帯を支配する外側核群においては両群に有意差はみられなかった。

◆脳神経外科学分野

## 髄液から中枢神経原発性リンパ腫の診断が可能に

近年の網羅的遺伝子解析により、脳腫瘍の形成、増殖に関わるドライバー変異が同定されるようになりました。これは脳腫瘍の標的治療を可能とただけではなく、脳腫瘍の診断に劇的な変化をもたらしています。今回、我々は中枢神経原発性リンパ腫(PCNSL)患者の髄液1mlからcell free DNA (cfDNA)を抽出し、ドライバー遺伝子として知られるMYD88遺伝子の検出に成功しました。共同利用として購入したcfDNA精製機を用いて簡便に髄液cfDNAを検出し、共同利用のdroplet digital PCR(図A)を用いて、Sanger法(図B)と比べて約100倍の感度でMYD88遺伝子変異が

検出できるようになりました。また、脳研病理学分野との共同研究で髄液中cfDNA及び摘出腫瘍中のMYD88遺伝子変異の有無を比較した所、調べた29例全例で一致しました。この成果はJCO Precision Oncologyに報告しました(Watanabe et al., 2019.4 online publish)。さらに同一症例の髄液のみならず、血液や尿からもMYD88変異が同定できることが解り、PCNSLの起源に迫るきっかけりとなる画期的な発見でした。臨床現場ではPCNSLが鑑別としてあがるが生検が難しい症例を経験する事があり、診断向上の一助を担うと実感しています。

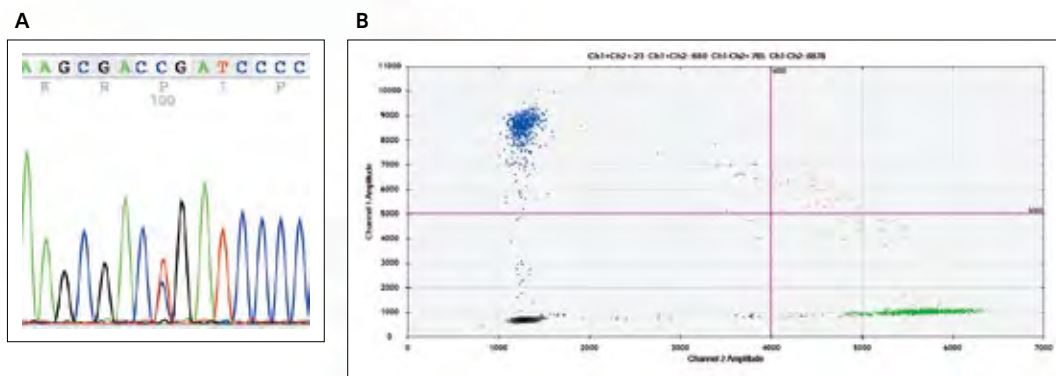


図: PCNSL患者の髄液cfDNAからMYD88 L265P変異をSanger法(A)及びddPCR (B)で検出。

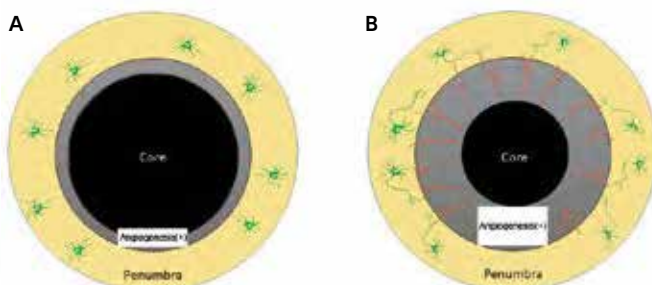
◆神経内科学分野

## 脳梗塞後の治療可能・介入域の拡大を示す新しい概念

脳梗塞後、運動感覚機能が障害され、後遺症が生じます。この障害された機能を回復させようものとして、血管新生を起こすことで、神経再生の可能性が考えられております。これは、脳梗塞後に、病変周辺で血管を増やすことで、その部位の環境を改善させて、神経軸索進展に寄与するという仮説によるものです。脳梗塞後の血管新生の局在、血管新生の機序、さらに血管新生が機能回復に与える影響について、概念を示しました(Kanazawa et al., J Cereb Blood Flow Metab 2019)。

脳梗塞後、神経細胞が失われ、回復の可能性がないとされている虚血中心(コア、図A、Bの真っ黒+オレンジの領域)が存在します。私たちや複数の研究の結果、その虚血中心の辺

縁(図A、Bのオレンジ域)や虚血の周辺部(その外側)において、血管新生が生じること、さらに虚血の周辺部で神経軸索進展の可能性があることを明らかにしました。このことは、これまで治療の可能性がないといわれていた虚血中心は、実は均一ではなく、血管新生という再生が生じている部分があることを示しました(可逆性の治療可能域ペナンプラにあたる)。さらに、神経軸索進展の誘導を血流のみならず新生した血管内皮、周囲細胞、ミクログリア由来の増殖因子、サイトカインなどが担うことで、脳梗塞後、病変を縮小させ、さらに機能回復につながる可能性を示しました。現在、私たちは、ここを標的としたさらなる応用を目指した研究に取り組んでおり、機能回復を目指した検討を継続しております。



図A 脳梗塞後の自然経過を示す。軽度の血管新生が虚血中心辺縁部に生じるが、神経軸索の進展は生じない。

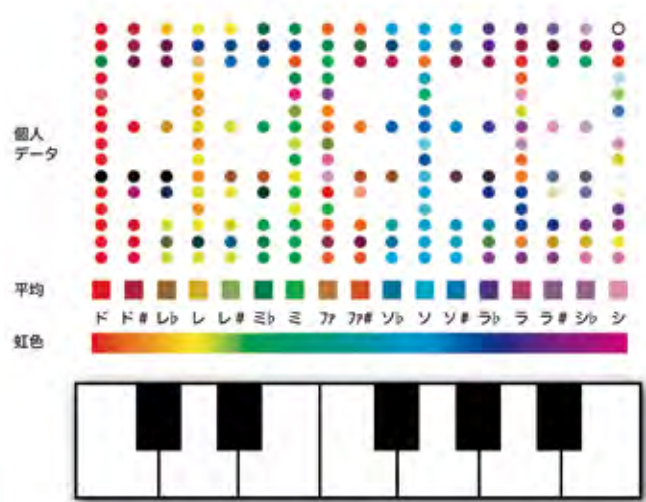
図B 脳梗塞後、薬剤、細胞療法で、血管新生を促進したのちの変化を示す。虚血中心辺縁部の血管新生は促進され、神経軸索の進展が生じる可能性がある。いわゆる治療可能・介入域ペナンプラは、血管新生域も含んだ領域(オレンジの帯)であることを新たに示した。赤線: 新生血管、緑: 神経細胞を示す。

## 「共感覚」で音に色を感じる隠れた法則を明らかに

音や音楽を聞くと色を感じる脳の現象を共感覚といい、古今東西、音楽家には比較的多くみられます。ただし、色の感覚には個人差が大きく、音と色の対応には一定の法則はないと思われていました。しかしこれまでの研究は、少数の共感覚者を対象としたものが散発的にあるのみで、十分な検討はされていません。そこで15名という多数の共感覚者を集めて、あらためて詳しく調べてみました。

音に感じる色を自由に選んでもらうと、確かに個人差がありました。しかし、選ばれた色の平均値を計算して背後に共通するパターンを探ると、ドレミファソラシの七つの音と虹の七色が順序良く対応する、隠れた法則が明らかになりました(図)。心理学実験でさらに詳しく調べると、色は音そのものではなく、音の名前(階名)と結びついていることも分かりました。

この現象の究明は、我々の脳が、何故どのように音楽に心を動かされるのかという未解明の問題に、ヒントを与えてくれるかもしれません。

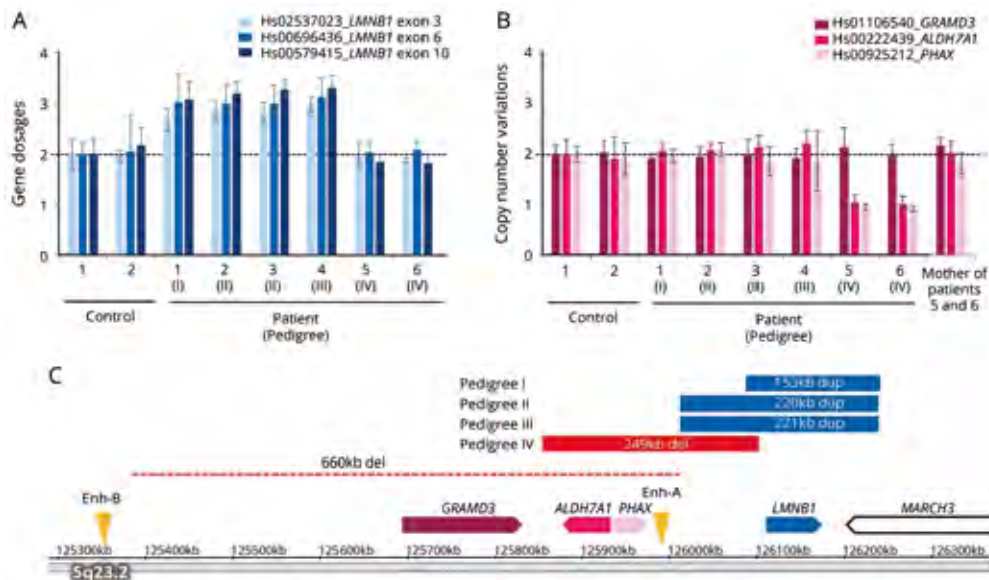


図：個々の共感覚者の選んだ色(○)とその平均色(□)

## 本邦の成人発症白質変性症においてラミンB1遺伝子コピー数異常を同定

成人発症大脳白質変性症は臨床的に多彩な病型を示す神経難病です。当教室は、成人発症の大脳白質変性症の遺伝子診断の全国拠点として活動している中、原因不明の成人発症大脳白質脳症の症例が蓄積されました。本研究では原因不明の成人発症大脳白質脳症96症例を対象に、ラミンB1遺伝子(LMN B1)の解析を行いました。この解析により、3家系にLMNB1重複変異、1家系にLMNB1上流の欠失変異を同定しました(図)。LMNB1重複変異の報告は本邦初であり、LMNB1上流の欠失変異は、イタリア家系に次いで世界で2家

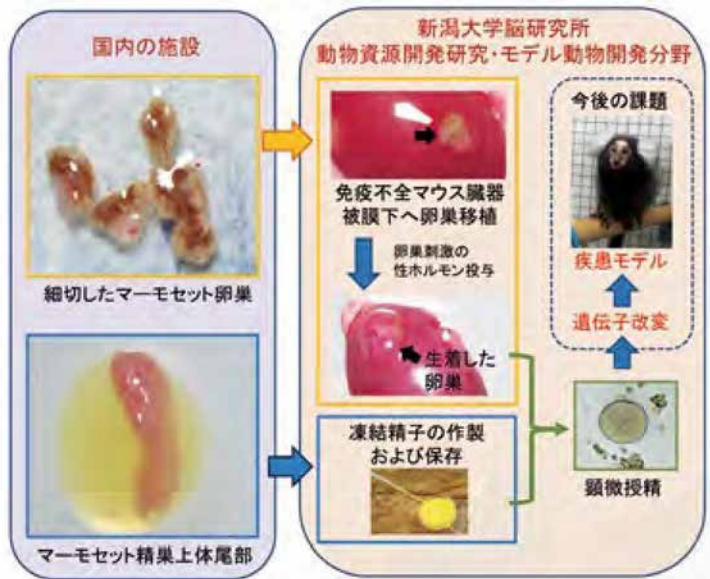
系目の報告です。LMNB1重複変異を伴う患者では、LMNB1 mRNA発現が有意に亢進しており、LMNB1の過剰産生が大脳白質変性症の原因になることが示唆されました。LMNB1上流の欠失により、LMNB1プロモーター領域の欠失が生じ、組織特異的なプロモーターが機能する機序が想定されました。本邦の家系では既報例と比較して、臨床的に認知機能低下が顕著でした。本研究により、成人発症大脳白質脳症の分子臨床遺伝学的な成因が明らかになり、本症に対する包括的な理解が進みました。



## 異種間移植によるマーモセット受精卵の作出に成功

近年、遺伝子改変が様々な動物で行えるようになってきていますが、実際に遺伝子改変マーモセットを作出するためには多くの受精卵の獲得が必須です。私たちは動物実験の3Rの理念に基づいて、国内施設より通常は廃棄される卵巣や精巣の分与を受け、異種間移植の手法を用いてマーモセット個体を介さず受精卵や精子を作出する研究を進めています。

マーモセット卵巣の異種間移植は、免疫不全マウスの臓器被膜下に細切した卵巣片を移植し、卵巣刺激のための性ホルモン投与を行います。卵胞からマーモセット卵子を採取後、体外培養して顕微授精することで、前核期受精卵を得ることに成功しました。また、精子の凍結保存は冷蔵輸送後の精巣上体尾部を卵黄糖液内にて細切して、精子懸濁液を作製し、冷却後、耐凍剤入り保存液を添加して液体窒素により凍結します。今後、これらの研究を基礎に、遺伝子改変による疾患モデルマーモセットの作製を目指しています。



## ALSの遺伝学的背景の解析

本分野は脳研究所他分野と連携し、中枢神経疾患病態機序の分子生物学的な解析を進めています。研究疾患の一つが筋萎縮性側索硬化症(ALS)です。ALSの発症には遺伝的な要因が大きく関わり、原因遺伝子は20種類以上が知られています。さらに発症のリスクとなる遺伝子、疾患関連遺伝子も複数知られています。これらの機能解析を通じて、病態機序解明、ひいては治療法の開発が期待されます。

当教室でもALS疾患関連遺伝子の一つ、SMNの解析を行っています。SMN遺伝子のコピー数異常は脊髄性筋萎縮症という疾患を来しますが、ALSの発症リスクともなることが欧米から報告されています。我々は本邦での影響を検討すべく、ALS遺伝子データベース(JACALS)および当研究所病理学分野由来のDNAを用いた多数例で解析を行っています。その結果、SMN 遺伝子のコピー数低下はALS群で有意に多いこと、さらに予後にも影響する可能性があることを見出しています(図)。これらの結果は国内/海外の学会で報告を行い、論文投稿準備を進めています。

今後もALSの病態機序解明を通じ臨床に還元を行うこと、即ちALSの早期診断、治療法解明に寄与することを目指してまいります。

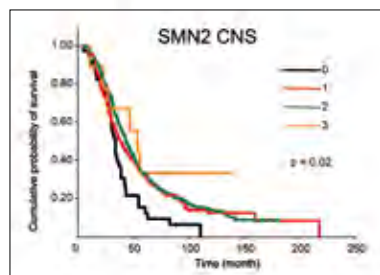


図: SMN遺伝子コピー数とALSの予後 (論文投稿準備中)。

## 水溶性化合物による組織透明化の化学

私たちの研究室では、脳内の様々な細胞を立体的に観察するために、組織透明化技術の開発に取り組んでいます。当分野は、東京大学大学院医学系研究科の上田泰己教授らとの共同研究により、水溶性化合物を用いた組織透明化の化学的原理の体系化に向けて、求められる透明化パラメータ(脱脂・脱色・屈折率調整・脱灰)の包括的なプロファイリングに基づいた合理的な手法を開発しました(Tainaka et al. Cell Rep. 2018)。それぞれのパラメータに対して約1,600種類の水溶性化合物のケミカルプロファイリングを実施した結果、それぞれのパラメータにおいて必須な化学的性質が明らかになりました。各パラメータにおいて最適化されたケミカルカクテルを統合した一連の新しい透明化プロトコルを開発することで、マウス全脳および大きなヒト脳サンプルの高度な透明化に成功しました。ヒト脳全細胞解析に向けて、従来の偶発的発見に依存した透明化試薬の開発戦略から、化学的原理に基づく合理的な開発戦略へのパラダイムシフトが期待できます。



図: マウス全脳遺伝子発現状況の一細胞解像度の比較観察

◆システム脳病態学分野

## 巧みな動作のもとになる多様な神経回路の発見

大脳皮質と脊髄を結ぶ「皮質脊髄路」と呼ばれる神経回路は、運動の開始や手足の巧みな動きに必要な神経回路として知られています。しかし、この回路がどのような種類の神経細胞でつながり、複雑な運動動作を生み出せるのか、その動作原理は不明のままでした。私たちは、最新の技術を用いて皮質脊髄路の詳細な神経細胞の構成と働きを探りました。その結果、皮質脊髄路には、これまで知られていなかった多様な接続を持った神経回路が内在することを見いだしました。これらの回路は、それぞれが異なる運動機能の要素を制御していることもわかりました。この成果は、複雑な動作を発揮するもととなる神経基盤を明らかにするとともに、脳卒中や脳脊髄の損傷など運動機能が障害されるさまざまな神経疾患において、どのような神経回路の再建が必要であるか手がかりを示すものです(Cell Rep 23:1286-1300, 2018に掲載)。

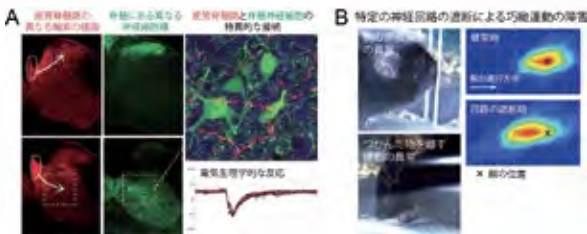


図:皮質脊髄路の中に潜む多様な接続様式と機能。(A)皮質脊髄路の中の異なる軸索の投射経路(神経トレーサーで標識;赤、白矢印)と脊髄の標的神経細胞(遺伝子改変マウスで標識;緑)。(B)皮質脊髄路の内在回路の遮断による巧みな動作の様々な障害。

◆脳病態解析分野

## アフリカメダカは加齢とともにパーキンソン病の表現型を呈する

アフリカのモザンビークの池は乾期には干上がりります。当然、魚はそこでは生きていけない……はずですが、ところが、乾期を卵で過ごし、短い雨期に孵化することで子孫を残してきた魚が存在します。アフリカメダカ“*Nothobranchius furzeri*”です。この魚は長生きする必要がない、なぜなら乾期には必ず死ぬからです。“長生きする努力=老化の抑制”をするぐらいであれば、むしろ雨期の中に子孫を確実に、文字通り“必死”に残すことを優先すべきです。そのためアフリカメダカは脊椎動物で現在最も短命です。私達はこの奇妙な小型魚類が加齢とともにパーキンソン病に類似した表現型を呈すること、 $\alpha$ シヌクレインを除去するとその表現型が改善することなどを報告しました(Matsui et al., Cell Reports, 2019)。

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

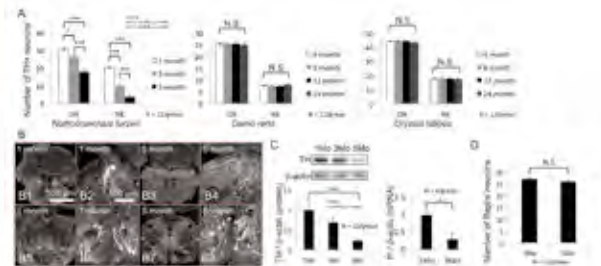


図: アフリカメダカは加齢のみでパーキンソン病様の表現型を呈する。

◆脳病態解析分野

## ショウジョウバエのシンプルな脳神経回路を利用したシナプス研究

脳の神経回路が適切な情報伝達を行うために、神経細胞は細胞間をつなぐシナプス結合を形成します。生物は変化する環境に適応するため、または学習や記憶をするために、シナプス構造の再編成が行われると考えられています。私たちはドイツ神経変性疾患研究所(DZNE)のGaia Tamosanis教授らと共同で、神経活動によってシナプス構造が機能的に変化する現象やメカニズムをまとめ、モデル生物であるショウジョウバエに焦点を当てた総説を発表いたしました(Sugie et al., Neural Development, 2018)。これまでに蓄積した様々なシナプス可視化マーカーや、電子顕微鏡による中枢神経系のシナプスを網羅した地図がすでに整備されているショウジョウバエは、今後さらに神経生物学のモデル生物の一つとして、シナプス構造変化と動物の行動変化の因果関係の理解、さらには神経精神疾患の病態解明につなげていくことに期待できます。

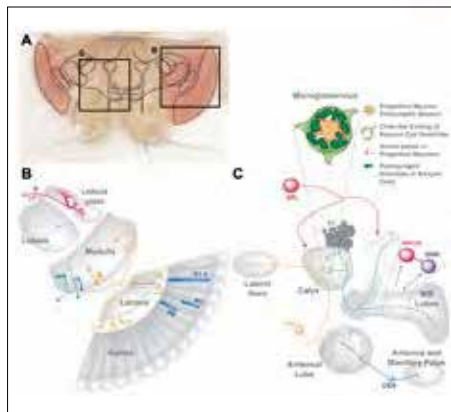


図1. ショウジョウバエの視覚系中枢と嗅覚系中枢。(A)背側から見たショウジョウバエの頭部。(B)視覚系中枢の模式図。(C)嗅覚系中枢の模式図。

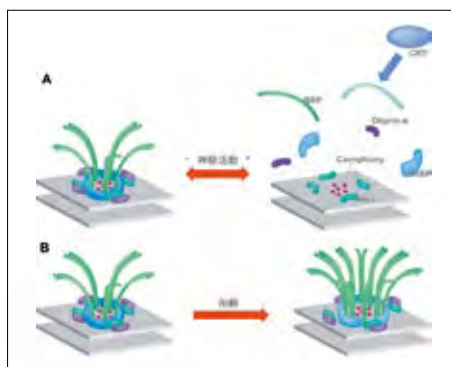


図2. 変化する前シナプス構造模式図。(A)前シナプス構造を構成する因子が神経活動レベルに依存してシナプス部位への局在を変化させる。(B)加齢依存的に前シナプスの構造体を構成する因子が蓄積し大きくなる。