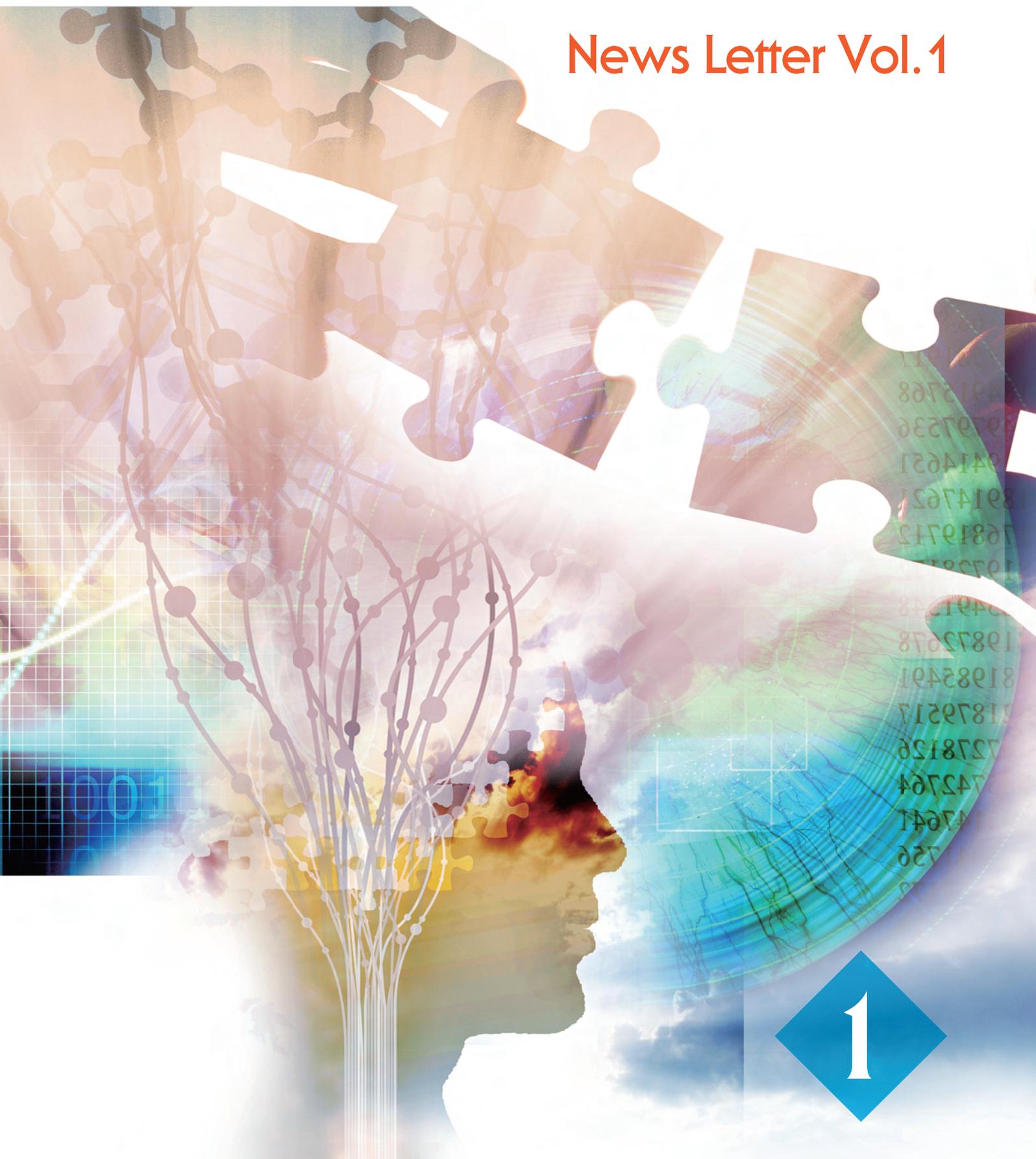


文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究
シナプス・ニューロサーキットパノロジーの創成

News Letter Vol.1



1

新学術領域研究『シナプス・ニューロサーキットパソロジーの創成』

はじめに

新学術領域研究『シナプス・ニューロサーキットパソロジーの創成』では、23年度から公募研究が採択され、新たに29名の班員が加わりました。これで総勢35名の構成となり、本格的に領域が始動しました。これを機にニュースレターの第1号を発行し、あらゆる面での皆様方の御理解と御協力をお願い申し上げます。このニュースレターでは、計画研究・公募研究ともに、それぞれの班員方々に、御自身のこれまでの研究と本領域研究における方向性と準備状況などについて紹介して頂きます。ここに含まれる情報が、領域内のみならず、領域を超えた共同研究や新たな学問分野の創成につながることを期待しております。はじめに、私が領域提案の背景と目的を説明したいと思います。既にホームページ (<http://www.tmd.ac.jp/mri/shingakujutu/jpn/message/index.html>) でも、触れておりますので、ここでは少し違った観点も含めて述べさせていただきます。

神経変性疾患については、1817年にパーキンソン病、1892年にピック病、1897年に球脊髄性筋萎縮症、1906年にアルツハイマー病が報告されており、主要な疾患について臨床的記載がなされてから既に100年以上が経過しました。しかし、神経変性疾患に対する根本的治療は未だに成功していません。この間、社会の高齢化に伴い神経変性疾患の患者は急速に増加しています。認知症患者はその定義にもよりますが、80歳以上では20%と言われ、このうち50%はアルツハイマー病とも言われています。また、実際にはそれ以上の人たちが物忘れなどの自覚症状を訴えています。PET画像診断でアミロイドの脳内沈着を検出することが出来るようになっており、症状のない段階でのアミロイド沈着が指摘されています。さらに、アミロイド抗体療法 of 長期フォローアップの結果が公表され、アミロイド沈着除去と臨床症状の改善が必ずしも一致しないことが明らかになってきました。これらの新たな知見を踏まえて、タンパク凝集、発症、脳萎縮、細胞死などの時間的順番が従来の定説から大きく変換しつつあります。このパラダイムシフトの中で私たちが学んだ最も重要なことは、シナプス変化に集約される早期病変の重要性であり、これを理解し介入することが治療に必須であるという確信です。

一方、精神疾患においては、早くから薬理学的研究が進み、ドパミン過剰仮説あるいはグルタミン酸(NMDA受容体)機能低下仮説を支持する多くの結果が得られてきました。しかし、前記のシナプス機能異常に至るまでの遺伝子からの分子病態については多くの謎が残されています。発生・発達期の異常に思春期の何らかの要因が重なって発症するというtwo hit仮説も、その実態は明らかではありません。さらに、発達障害性疾患においても、自閉症におけるスパイン異常伸長の病理報告以来、歴史的にシナプスの異常が疑われて来ました。しかし、発達障害は中間表現型を診断の基礎とするため、その背景となる遺伝子異常や分子病態は極めて多様かつ不均一であり、どのような普遍的カスケードが中間表現型に患者脳を至らせるのかは、全く分かっていません。

個人の全ゲノム塩基配列を読み解くパーソナルゲノムの時代が到来し、その前段階のGWASにおいても脳疾患について多くの情報が蓄積しています。この中で、精神疾患と発達障害は多くのCNVを共有していることも明らかになってきました。そして、その多くがシナプス関連遺伝子であることも事実です。これらの研究の歴史は、シナプス病態をハブとして多くの脳疾患が関連していることを如実に物語っており、これを解明し治療に役立たせることが極めて重要であることを意味しています。

本領域では、基礎研究者・疾患研究者の枠組み、あるいは疾患ごとの枠組みを超えて、多くの研究者がシナプス病態の解明に力を併せる場(研究フィールド)を設定しました。神経細胞の種々の機能異常がどのような分子的経路を経てシナプス異常を引き起こすのかを、多様な疾患を背景に、さらにはグリア・ニューロンの関連も含めて解明していきます。

また、本領域は、シナプス病態に加えて、部位特異性あるいはサーキット特異性とも言うべき、病変の軽重の背景となるべき分子病態の解明をもう一つの柱に据えています。変性疾患病理における系統変性は有名ですが、精神疾患、発達障害においても脳内の特定のサーキットの機能異常が起きています。サーキット病態の解明は、機能的な側面に止まらず、神経細胞の脆弱性・抵抗性について新たな知見を提供してくれるものと期待しています。

さらに、本領域はシナプス病態・サーキット病態という縦糸横糸に、この目標を解明するための技術基盤として、イメージング技術とiPS細胞技術を加えています。本領域のそれぞれの班員の研究は、神経細胞機能異常がどのようにしてシナプス異常(シナプス病態)と回路脆弱性(サーキット病態)結びつくのかを解明するものですが、時代の先端的な技術を共有する中で、班員の新たなアイデアと共同研究がインスパイアされることを期待しています。

本領域を踏み台として、各種の脳疾患への新たなアプローチが展開し、それを通じて次世代を担う若手の研究者が育つことを期待しております。

領域代表 東京医科歯科大学 岡澤 均

2011年7月25日

「シナプス病態」領域の研究目的

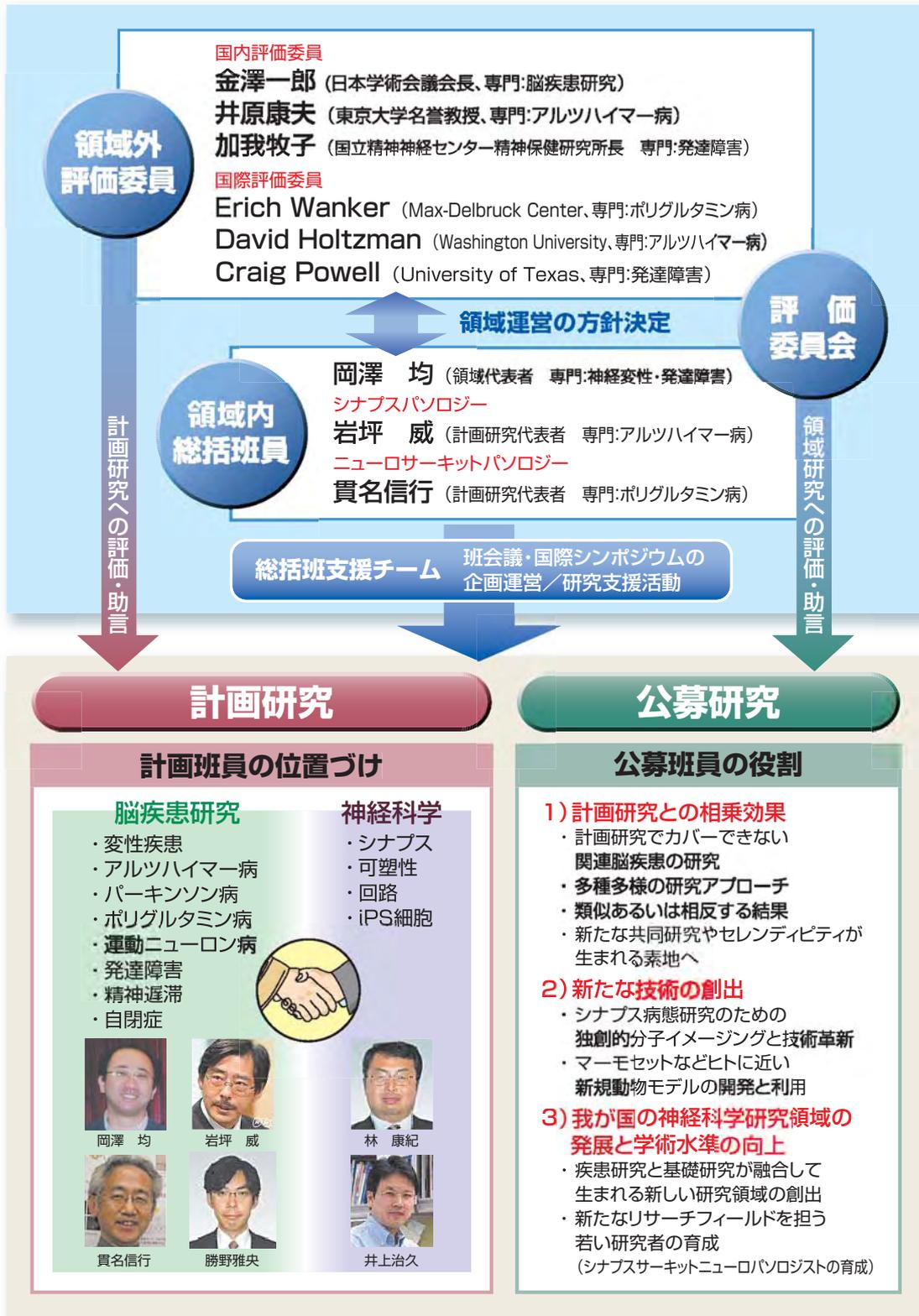


変性疾患研究では細胞死やタンパク凝集に先駆けて起きる早期病態の解明へ研究がシフトしつつあり、その中でシナプス病態は最も重要なフォーカスである。

一方、発達障害や精神疾患においては、従来よりシナプス病態が注目されて来た。ここに、変性疾患 100 年の問いであるサーキット特異的病態の解明を統合し、シナプス病態・サーキット病態を、新たな手法を用いて解明することを、本領域研究の目標とする。



「シナプス病態」研究体制



領域外評価委員と領域内総括班員が構成する評価委員会によって計画研究および公募研究を支援、評価、指導していく。

計画研究と公募研究は相互に補い、協力して領域研究を進める。





シナプスパノロジー

—多様な脳疾患におけるシナプス病態の解明—

計画 A01
公募 A01



発達障害・変性疾患のシナプスダイナミックパソロジーの解明

岡澤 均

(東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授)

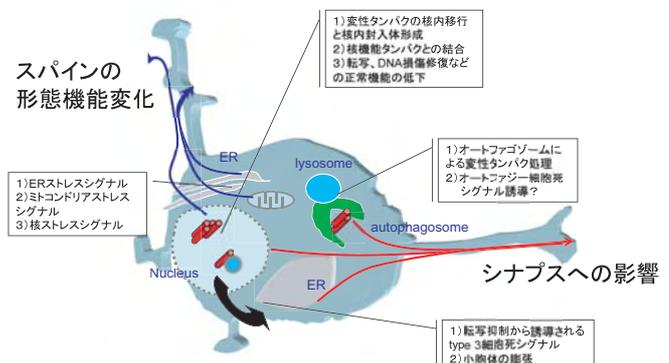
計画A01

私たちは1990年代後半からポリグルタミン病の機能病態因子をYeast Two-Hybrid法による結合蛋白スクリーニング、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析など網羅的オミックス手法を組み合わせて研究してきました(Waragai et al., Hum Mol Genet 1999; Tagawa et al., J Neurosci 2007; Qi et al., Nature Cell Biol 2007; Enokido et al., J Cell Biol 2010)。国際的にも、同時期に多くの研究者が疾患タンパクと結合する因子を探しました。この結果として明らかになってきたのは、ポリグルタミン病タンパクが、細胞内の様々な場所で種々の正常タンパクと結合し、それらの機能を阻害することです。核においては、転写因子、RNA結合タンパクと結合し、転写、スプライシング、DNA修復など多様な核機能を阻害します。細胞質においては、小胞体輸送、軸索輸送、ミトコンドリア機能を阻害するとともに、時にはタンパク分解系の機能も低下させることが明らかになりました。神経変性疾患における神経細胞死は病的に非常に緩慢なプロセスであり、今日では神経細胞死が起きる前の神経細胞機能障害が発症の直接原因と考えられつつあります。この中で、シナプス機能病態が変性疾患の興味の焦点になりつつあります。

一方、私たちがポリグルタミン病結合タンパクとして発見した新規分子PQBP1 (Waragai et al. Hum Mol Genet 1999) は、種々の行動異常を伴うヒト精神遅滞原因遺伝子であることが明らかになりました (Kalscheuer et al. Nat Genet 2003)。PQBP1はスプライシング、転写に関与し、遺伝子発現のtranscriptional/post-transcriptional controlに関与することが明らかになりつつあります。特に、PQBP1機能低下はNMDA受容体NR1サブユニットの発現低下を起こし、NR1の発現補正によって学習障害・記憶障害が改善することが明らかになりました (Ito et al. Hum Mol Genet 2009; Tamura et al. J Neurosci 2010)。このような遺伝子発現制御 (transcriptional/post-transcriptional) からシナプス受容体へ至る病態経路は脆弱X症候群 (Fragile-X syndrome) を含む複数の発達障害性疾患と共通しています。また、発達障害の研究領域において、過去数年間のGWAS (Genome-Wide Association Study) 手法によって、shank3, neurexin、さらに、同じくneurexin-neuroligin系の分子であるcontactin-associated protein-like 2 (CNTNAP2) などのシナプス分子が候補遺伝子として注目されています。

私たちは、このような研究の背景を元に、変性疾患および発達障害を対象として研究領域の重要な課題であるシナプス病態の解明に取り組みます。特に、*in vivo*モデルや2光子顕微鏡などのイメージング技術を用いて新たな発見を目指したいと考えております。

- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M. & Hamada, H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* **60**, 461-472 (1990).
- Okazawa, H., Okamoto, K., Ishino, F., Ishino-Kaneko, T., Takeda, S., Toyoda, Y., Muramatsu, M. & Hamada, H. The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *Embo J* **10**, 2997-3005 (1991).
- Okazawa, H., Shimizu, J., Kamei, M., Imafuku, I., Hamada, H. & Kanazawa, I. Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells. *J Cell Biol* **132**, 955-968 (1996).
- Waragai, M., Lammers, C.H., Takeuchi, S., Imafuku, I., Udagawa, Y., Kanazawa, I., Kawabata, M., Mouradian, M.M. & Okazawa, H. PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Hum Mol Genet* **8**, 977-987 (1999).
- Okazawa, H., Rich, T., Chang, A., Lin, X., Waragai, M., Kajikawa, M., Enokido, Y., Komuro, A., Kato, S., Shibata, M., Hatanaka, H., Mouradian, M.M., Sudol, M. & Kanazawa, I. Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death. *Neuron* **34**, 701-713 (2002).
- Qi, M.L., Tagawa, K., Enokido, Y., Yoshimura, N., Wada, Y., Watase, K., Ishiura, S., Kanazawa, I., Botas, J., Saitoe, M., Wanker, E.E. & Okazawa, H. Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases. *Nat Cell Biol* **9**, 402-414 (2007).
- Tamura, T., Horiuchi, D., Chen, Y.C., Sone, M., Miyashita, T., Saitoe, M., Yoshimura, N., Chiang, A.S. & Okazawa, H. Drosophila PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. *J Neurosci* **30**, 14091-14101 (2010).



細胞機能異常からシナプス形態機能異常への分子経路の解明を目指す図は変性疾患を示すが、発達障害も併せて対象とする



シナプスを標的とするアルツハイマー病の病態解明と治療

岩坪 威

(東京大学・大学院医学系研究科・教授)

計画AO1

アルツハイマー病 (AD) は、高齢化社会の進展とともに急増しつつある認知症の主因として、最も頻度が高く、重要な神経変性疾患の1つである。AD 脳に生じる病理学的変化のうち、老人斑アミロイドなどの形をとる A β ペプチドの蓄積は、AD の原因的過程に密接不可分な現象と捉えられているが、その形成過程ならびに神経障害のメカニズムとの関係には不明の点が多い。我々は従来 A β 形成に関わる γ セクレターゼの作用機序などについて研究を進めてきた¹⁻³⁾。近年になり AD 脳におけるシナプス異常・脱落と認知症症状の発現が注目されはじめた。さらにごく最近になり、シナプスが神経活動依存性に生じる A β 分泌の場であることも示唆され⁴⁾、AD を「シナプス異常症」と捉える視点が生じた。しかし、A β の産生・蓄積とシナプス活動の関係を *in vivo* レベルで直接検証しえた研究はない。そこで本研究においては (1) AD モデル動物脳におけるシナプス活動依存性 A β 産生・蓄積の実証 (2) シナプスにおける A β 分泌機構の解明 (3) A β によるシナプス障害機構の解明と治療法開発、に焦点を絞って検討を行う。

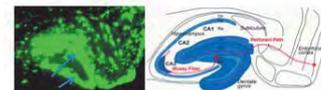
AD の主要病変部位である海馬への主要な入力線維 (perforant pathway) の起始部位である entorhinal cortex (EC) の大型神経細胞に、光刺激により神経活動を制御可能な channelrhodopsin2 (CR) 分子を発現するマウスを樹立する。皮質大型神経細胞に比較的選択的に高発現を達成可能なプロモータを選択し、channelrhodopsin2-YFP 融合遺伝子を組み込んだコンストラクトを作成し、ウィルス感染などの方法により EC ニューロンに CR 分子を発現する。タンパク質発現は YFP, CR の免疫組織化学ならびにスライス標本の光刺激による YFP 発現を指標に検出し、EC 表層の大型神経細胞に発現を確認する。CR の導入・発現は、A β 42 を神経細胞に高発現する Austrian 変異 APP Tg マウス (A7)⁵⁾ を用いて行う。A β の産生、蓄積は、慢性的には病理学的・生化学的手法により、急性的には Cirrito らにより開発されたマイクロダイアリシスプローブを海馬歯状回に留置し、細胞外液を回収することにより評価する。シナプスからの A β 分泌動態を検証するため、A β 含有ベジクル候補構造であるエンドソームの可視化を試みる。まずスライス標本を用いて、蛍光プローブを局所投与し、共焦点レーザー顕微鏡による高解像度撮影を組み合わせ、エンドソームの可視化を試みる。

これらの成果を糾合し、A β 分泌の新規制御法をつうじた新たな AD 予防・治療戦略を導く。

1. Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., Iwatsubo, T. The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature* **422**, 438-441, (2003).
2. Sato, C., Takagi, S., Tomita, T., Iwatsubo, T. The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are

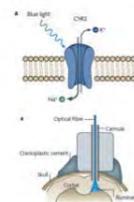
involved in the formation of the catalytic pore of the γ -secretase. *J. Neurosci.* **28**, 6264-6271 (2008).

3. Takasugi, N., Sasaki, T., Suzuki, K., Osawa, S., Isshiki, H., Hori, Y., Shimada, N., Higo, T., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Tomita, T., Iwatsubo, T. BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J. Neurosci.* **31**, 6850-6857 (2011).
4. Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R. APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**, 925-937 (2003).
5. Yamada, K., Yabuki, C., Seubert, P., Schenk, D., Hori, Y., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Hashimoto, T., Iwatsubo, T. A β immunotherapy: intracerebral sequestration of A β by an anti-A β monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble A β . *J. Neurosci.* **29**, 11393-11398 (2009).



アルツハイマー病 A β 蓄積はシナプス末端に局在嗅内野→海馬歯状回投射系でこの傾向は明瞭

Question: A β は神経活動依存性にシナプスから放出される?
方法: Optogenetics によるニューロン活動制御と A β 産生・蓄積評価



光刺激で Na⁺ イオンを通過させ神経興奮の生じるチャンネルロドプシン Tg マウスの応用



In vivo microdialysis による A β 分泌の評価

アルツハイマー病における A β とシナプスの関係を解明→新たな治療法開発の基盤を提供

シナプスを標的とするアルツハイマー病の病態解明と治療

AD 脳において A β は主に神経細胞により産生・分泌されるものと考えられてきたが、その神経活動依存性、分泌様式には不明の点が多い Optogenetics により慢性的に神経活動をコントロールしつつ、主要な A β 分泌サイトと考えられるシナプスからの A β 産生をモニターすることにより、A β 産生メカニズムの全容を解明する



シナプスパノロジーにおける脱リン酸化酵素 PP1/PP2A のスパイン制御機構の解明

塩田 倫史

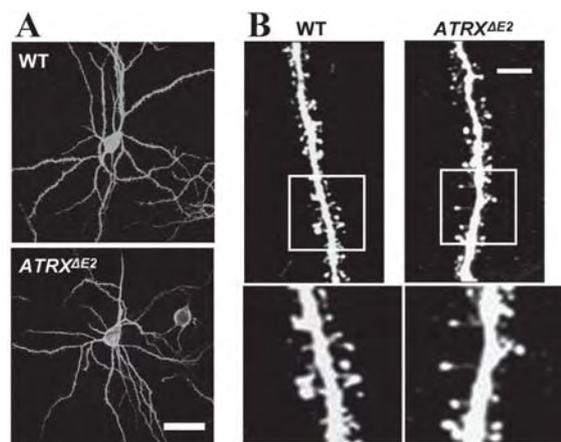
(東北大学・薬学研・助教)

公募 A01

私はこれまでの研究で、スパイン形態異常が起こる原因として、シナプス伝達に重要な役割を担う CaMKII 活性異常が起こることを明らかとしてきた¹⁾。さらに、CaMKII 活性異常は CaMKII を脱リン酸化するプロテインホスファターゼ PP1, PP2A の CaMKII 制御機構の破綻によることも報告してきた^{2,3)}。また、CaMKII アイソフォームの中で、CaMKII $\delta 3$ は細胞核内に局在し、BDNF の発現に関与することを報告した。脱リン酸化酵素 PP1・PP2A は、主に細胞核内に局在することが示唆されている。PP1・PP2A は神経細胞核内においてリン酸化酵素 CaMKII 活性を抑制し、病態関連因子の機能調節を担っていると考えられる。しかし、神経細胞核内の脱リン酸化酵素に着目し、疾患関連遺伝子の発現とシナプス分子の発現、それによるシナプス機能に与える影響に関する研究は未だ報告がない。本研究では、神経細胞核内における脱リン酸化酵素 PP1・PP2A を同定し、精神疾患のシナプスパノロジーにおける核内脱リン酸化酵素 PP1・PP2A の役割を明らかにすることを目的とする。(1) 神経細胞核内における PP1・PP2A 脱リン酸化酵素の同定。マウス脳における局在をそれぞれの特異的な抗体を用いて免疫組織化学的に検討し、マウス神経細胞核内に局在する PP1 と PP2A のアイソフォームを同定する。また、脱リン酸化酵素活性測定を行い、核内における活性を同定する。私はこれまで、脳内の脱リン酸化酵素 PP1, PP2A 及びカルシニューリンの神経疾患・神経変性疾患における機能的解析に関する研究を専門としており、これらすべての脱リン酸化酵素の活性を測定できる^{3, 4, 5)}。(2) 神経細胞核内 CaMKII/PP1・PP2A 活性バランスの破綻によるスパイン形態、シナプス伝達の異常とそのメカニズムの解析。核内において、CaMKII/PP1・PP2A 活性バランス不全が実際にマウス脳で起こるか検討するため、同定したアイソフォームと NIPP1 (nuclear inhibitor of protein phosphatase 1) を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、マウス前脳特異的に発現させ、*in vivo* における CaMKII, PP1・PP2A 活性測定を行う。核内の CaMKII/PP1・PP2A 活性バランス不全はスパイン形態異常、学習障害を引き起こすことが予想される。そこで、アデノ随伴ウイルスベクターにて NIPP1 を発現した前頭前野ニューロンでスパイン・樹状突起の形態解析を行う。(3) ヒト精神遅滞モデルマウスにおける核内 CaMKII/PP1・PP2A 活性制御によるシナプスパノロジー改善効果。これまでの研究では、精神遅滞モデルマウスの前頭前野領域において PP1 の活性低下、続いて CaMKII 活性上昇、BDNF の発現増加が見られた。その結果、顕著な細いフィロポディア型スパイン数の上昇が確認された³⁾。シナプス病態を修復するためには核内の PP1/PP2A 活性化による CaMKII $\delta 3$ 活性抑制、それに

よる BDNF の過剰な発現を抑制することが重要であると考えられる。ヒト精神遅滞モデルマウスの前頭前野領域に PP1/PP2A 触媒サブユニット発現アデノ随伴ウイルスベクターを使って核内の PP1, PP2A 活性を上昇させた後、スパイン形態解析、電気生理学的解析と記憶学習行動解析を行う。脱リン酸化酵素 PP1・PP2A の神経細胞核内におけるスパインの制御機構を明らかにして、シナプス病態解明につなげる。

1. Oyagi, A., Oida, Y., Kakefuda, K., Shimazawa, M., Shioda, N., Moriguchi, S., Kitaichi, K., Nanba, D., Yamaguchi, K., Furuta, Y., Fukunaga, K., Higashiyama, S. & Hara, H. Generation and Characterization of Conditional Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor Knockout Mice. *PLoS One* **4**, e7461 (2009).
2. Nogami, T., Beppu, H., Tokoro, T., Moriguchi, S., Shioda, N., Fukunaga, K., Ohtsuka, T., Ishii, Y., Sasahara, M., Shimada, Y., Nishijo, H., Li, E. & Kitajima, I. Reduced expression of the ATRX gene, a chromatin-remodeling factor, causes hippocampal dysfunction in mice. *Hippocampus* in press. (2010).
3. Shioda, N., Beppu, H., Fukuda, T., Li, E., Kitajima, I. & Fukunaga, K. Aberrant CaMKII activity is associated with abnormal dendritic spine morphology in the ATRX mutant mouse brain. *J Neurosci* in press. (2010).
4. Shioda, N., Moriguchi, S., Shirasaki, Y. & Fukunaga, K. Generation of constitutively active calcineurin by calpain contributes to delayed neuronal death following mouse brain ischemia. *J Neurochem* **98**, 310-320. (2006).
5. Shioda, N., Han, F., Moriguchi, S. & Fukunaga, K. Constitutively active calcineurin mediates delayed neuronal death through Fas-ligand expression via activation of NFAT and FKHR transcriptional activities in mouse brain ischemia. *J Neurochem* **102**, 1506-1517. (2007).



ヒト精神遅滞モデルマウス (ATRX $\Delta E2$) において、顕著な細いフィロポディア型スパイン数の上昇が見られた



孤発性 ALS における RNA 編集酵素活性制御異常の分子病態の解析

郭 伸

(東京大学大学院・医学系研究科・神経内科学・准教授)

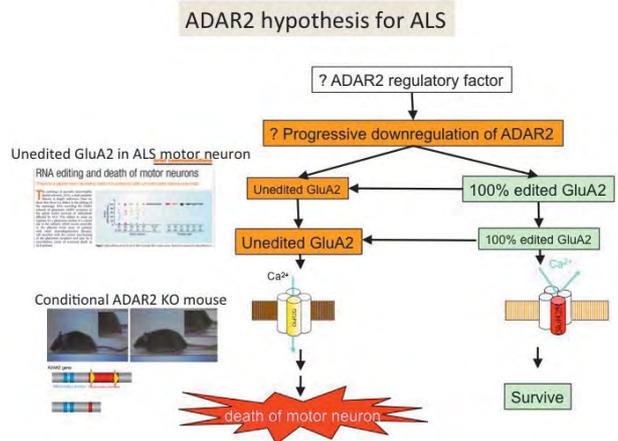
公募 A01

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 脊髄運動ニューロンでは AMPA 受容体の Ca²⁺ 透過性を決定するサブユニット GluR2 に、本来行われるべき RNA 編集の効率が低下し 1)、AMPA 受容体の Ca²⁺ 透過性を亢進させる分子変化が生じている。GluR2 の pre-mRNA は adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) により Q/R 部位において CAG コドンが CIG に転換する。CIG は Arginine (R) に翻訳されるため、Q-to-R のアミノ酸置換が起こるが、ALS 運動ニューロンでは ADAR2 活性の低下により未編集型 GluR2 が発現していると考えられる 2)。我々は ADAR2 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、ADAR2 活性が低下・消失することにより運動ニューロンにおける GluR2 の RNA 編集が消失すること、それにより緩徐な神経細胞死を引き起こすことを明らかにした 3)。さらに、外眼筋支配運動ニューロンは RNA 編集低下による神経細胞死が起こらないことから、GluR2 の RNA 編集異常は ALS の神経細胞死の選択性をも説明しうることが明らかになった。

免疫組織化学的検討から、孤発性 ALS 患者脊髄組織では約半数の運動ニューロンでは ADAR2 の免疫活性が消失しており、それらは、ALS 特異的な病理変化である TDP-43 の病理像を示している 4) ことから、ADAR2 活性低下が ALS の病因に密接に関連することが予想される。しかし、ADAR2 の発現低下が、産生の低下によるのか、タンパクの分解促進に依るのかは明らかではなく、また ADAR2 の活性を制御するメカニズムは未解明の部分が多い。孤発性 ALS の運動ニューロンでは編集型 GluR2 のみを発現する運動ニューロンもあり、単一運動ニューロンにおける未編集型 GluR2 の発現比率は 0-100% と極めて広い範囲に及んでいる。編集型 GluR2 のみを発現する運動ニューロンは細胞死に陥らないと考えられるが、このような運動ニューロンでも発症前から ADAR2 活性が低下している可能性がある。すなわち、孤発性 ALS 運動ニューロンでは ADAR2 の活性低下が発症前より進行性に生じており、ある閾値を超えて低下したときに未編集型 GluR2 が発現し、神経細胞死に陥ると考えたと説明がつく。この仮説を確かめるために、孤発性 ALS 運動ニューロンのうち編集型 GluR2 のみを発現する場合でも ADAR2 活性が低下しているかどうかを検討する。多数例の ALS 症例の剖検脊髄を用いて、運動ニューロンにおける ADAR2 活性低下の有無を、単一ニューロンレベルで編集型 GluR2 のみを発現する群と未編集型 GluR2 をも発現する群とに分けて検討する。その結果を踏まえて、ADAR2 の転写活性、分解調節機構の異常につき、患者組織および ALS モデル動物を用いた miRNA を標的としたマイクロアレイ解析で調節因子を特定する。

孤発性 ALS の病因は未解明であり、治療標的をどこに設定したらよいかに関する指標が得られていない。本研究では、孤発性 ALS 患者組織に見出された疾患特異的かつ神経細胞死に直結する分子異常を生ずる分子メカニズムを明らかにすることを目的としており、機能の正常化を通じた特異治療法の開発に繋がると考えている。

1. Kwak, S. & Weiss, J.H. Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 281-287 (2006).
2. Kawahara, Y., Ito, K., Sun, H., Aizawa, H., Kanazawa, I. & Kwak, S. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* **427**, 801 (2004).
3. Kwak, S. & Kawahara, Y. Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med* **83**, 110-120 (2005).
4. Hideyama, T., Yamashita, T., Suzuki, T., Tsuji, S., Higuchi, M., Seeburg, P.H., Takahashi, R., Misawa, H. & Kwak, S. Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci* **30**, 11917-11925 (2010).
5. Aizawa, H., Sawada, J., Hideyama, T., Yamashita, T., Katayama, T., Hasebe, N., Kimura, T., Yahara, O. & Kwak, S. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol* **120**, 75-84 (2010).
6. Kawahara, Y., Ito, K., Sun, H., Kanazawa, I. & Kwak, S. Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. *Eur J Neurosci* **18**, 23-33 (2003).



ALS では未編集型 GluR2 の発現が神経細胞死の直接原因であり、進行性の ADAR2 活性低下によると考えられる



DISC1/Neuregulin-1とシナプス形成

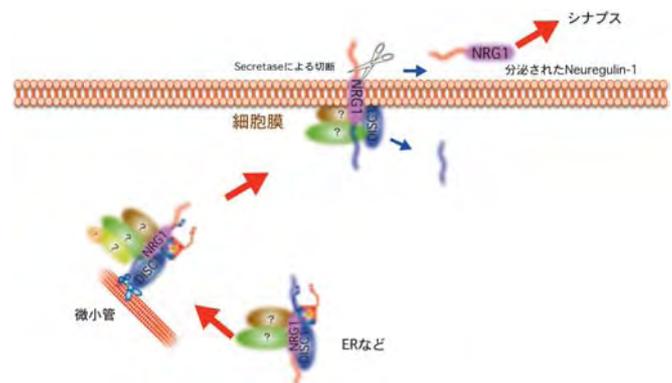
森 大輔

(名古屋大学大学院医学系研究科・神経情報薬理学教室・COE 特任講師)

公募 A01

統合失調症は世界人口の約1%が罹患する重篤な精神神経疾患である。青年期に発症することが多いが、その発症機序はよく分かっていない。統合失調症患者の多くには、神経発達（神経細胞の移動、軸索形成、シナプス形成等）に何らかの障害があり、環境因子（周産期のウイルス感染など）が加わって発症脆弱性が生じ、その後のストレス等で発症するという説が有力である。近年の研究により、神経回路網の発達障害が抑制性-興奮性神経回路のバランス異常をもたらす、発症脆弱性を高めていると推定されている。遺伝子解析により、有力な発症脆弱性因子として、DISC1、Neuregulin-1、Dysbindinなどが見つかった。しかし、統合失調症は多重遺伝子疾患であり、遺伝子間の有機的な関連性はほとんど不明である。Neuregulin-1はEGFファミリーの成長因子で、ErbB3/4受容体を介して神経の分化、成長、シナプス形成に関与している。ごく最近、Neuregulin-1とErbB4がGABA作動性の抑制性ニューロンのシナプス形成に関与することが明らかにされ、統合失調症との関連が注目されている。一方、DISC1はスコットランドの統合失調症を頻発する家系から責任遺伝子として報告された。その後の研究でDISC1は神経細胞の遊走、軸索形成、シナプス形成に関与することが分かっている。DISC1の結合分子としては、NDEL1/LIS1複合体、PSD-95、Karilin-7、Kinesin-1モーターなどが知られている。NDEL1/LIS1複合体は滑脳症の原因遺伝子であり、細胞質ダイニンと結合して神経細胞の遊走を制御し、大脳皮質の層構造の形成に重要な役割を担う¹⁾。連携研究者の貝淵らは、DISC1がNDEL1/LIS1複合体とKinesin-1との結合を仲介する積荷受容体としてはたらき、その結果、NDEL1/LIS1複合体の軸索内輸送を制御し、軸索伸長を促進させることを明らかにしてきた^{2,3)}。NDEL1はCDK5/CDK1およびAurora-Aによって活性化され、微小管重合を調節することで、神経細胞の軸索伸長を促進することが分かっている^{4,5)}。我々はDISC1とNDEL1は軸索内輸送において密接な関係があることに興味を持ち、DISC1の機能解析を開始した。DISC1の結合分子の探索を行ったところ、NDEL1/LIS1複合体、Kinesin-1モーター複合体、Neuregulin-1を同定した。Neuregulin-1は細胞膜およびゴルジ体膜上で、特異的セクレターゼによるプロセッシングを受け成長因子として機能する（図）。Neuregulin-1の分泌の制御は神経細胞の成熟とシナプス形成において極めて重要である。本研究では、DISC1によるNeuregulin-1の分泌制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、Neuregulin-1の分泌制御異常がシナプス形成へどのように関与するかを解明する（図）。統合失調症の分子病態は未だ不明であり、本研究でその発症メカニズムの一端が明らかにできれば、その社会的な貢献は極めて大きいと考えている。

1. Sasaki, S., Mori, D., Toyo-oka, K., Chen, A., Garrett-Beal, L., Muramatsu, M., Miyagawa, S., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Wynshaw-Boris, A. & Hirotsune, S. Complete loss of Ndel1 results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* **25**, 7812-7827 (2005).
2. Taya, S., Shinoda, T., Tsuboi, D., Asaki, J., Nagai, K., Hikita, T., Kuroda, S., Kuroda, K., Shimizu, M., Hirotsune, S., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. *J Neurosci* **27**, 15-26 (2007).
3. Shinoda, T., Taya, S., Tsuboi, D., Hikita, T., Matsuzawa, R., Kuroda, S., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. DISC1 regulates neurotrophin-induced axon elongation via interaction with Grb2. *J Neurosci* **27**, 4-14 (2007).
4. Mori, D., Yamada, M., Mimori-Kiyosue, Y., Shirai, Y., Suzuki, A., Ohno, S., Saya, H., Wynshaw-Boris, A. & Hirotsune, S. An essential role of the aPKC-Aurora A-NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nat Cell Biol* **11**, 1057-1068 (2009).
5. Mori, D., Yano, Y., Toyo-oka, K., Yoshida, N., Yamada, M., Muramatsu, M., Zhang, D., Saya, H., Toyoshima, Y.Y., Kinoshita, K., Wynshaw-Boris, A. & Hirotsune, S. NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol* **27**, 352-367 (2007).



DISC1はNeuregulin-1の分泌制御に関与する



ストレスホルモン曝露に伴うシナプス形成・可塑性障害の分子メカニズム

祖父江 憲治

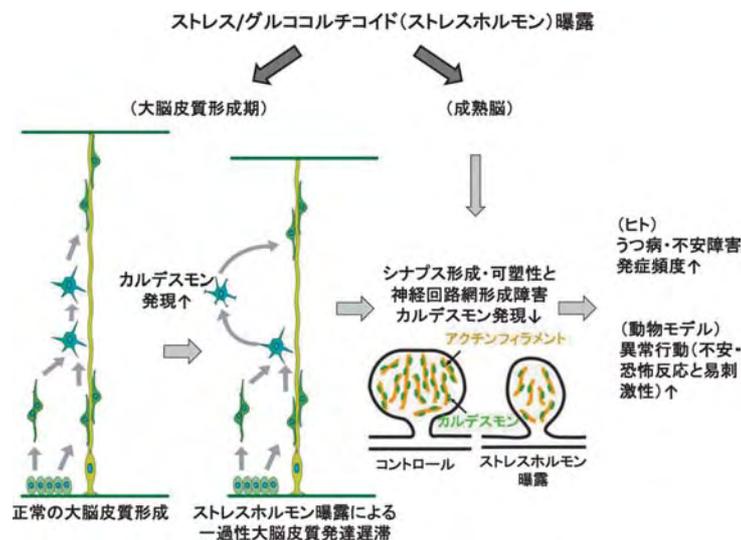
(岩手医科大学・医歯薬総合研究所・副学長)

公募A01

ストレスによる内分泌恒常性破綻に伴うグルココルチコイド(ストレスホルモン)曝露は、シナプス形成・可塑性から大脳構築に至る障害を来とし、うつ病・不安障害など広義の感情障害発症の要因と考えられている。しかしこれまでの研究は現象論的解析が中心で、障害の分子メカニズムは不明であった。私たちは細胞骨格制御機構の研究を発端として、殊にアクチン細胞骨格制御蛋白質群の発見とその細胞運動における役割¹⁾、さらにシナプス後肥厚部(postsynaptic density, PSD) 特異的蛋白質の発見とシナプス形成・ダイナミクスにおける役割^{2,3)}を追究してきた。この過程で、胎生後期ラットのストレスホルモン曝露による一過性大脳発達遅滞(殊に大脳皮質発達遅滞)の一因が、興奮性神経前駆細胞のストレスホルモン依存性カルデスモン発現(転写)亢進に伴う細胞運動(放射状移動, radial migration)異常であることを見出した^{4,5,6)}(図)。また、分子レベルでストレスホルモン曝露に関するシナプス研究を行うには神経細胞培養系を必要とするが、従来のシナプス形成に至る長期神経培養系ではストレスホルモンの存在あるいは混在は不可避であった。私たちは、ストレスホルモンを全く含まない完全合成培地を開発し長期神経細胞(分散・スライス)培養系を確立し、この培養系を用いてストレスホルモン依存性カルデスモン発現抑制(前述の神経前駆細胞では逆に発現亢進)によるアクチンフィラメント不安定化と、シナプス脆弱化を見出した(図; 投稿中)。本研究はストレスホルモン曝露によるシナプス形成・可塑性障害の分子メカニズムを、アクチン細胞骨格群とPSD蛋白質群およびシグナル伝達分子による制御から解析を行

なう。従って、本研究はストレスホルモン曝露によるシナプス形成・可塑性障害の分子メカニズム解明にとどまらず、感情障害発症の分子基盤の確立に寄与できるものと考えている。また、本領域内の他研究チームとの有機的結合によるシナプトパソロジーやサーキットパソロジーへの分子基盤共有と、新技術の融合による先駆的シナプスダイナミクス解析への展開を期待している。

1. Morita, T., Mayanagi, T. & Sobue, K. Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol* **179**, 1027-1042 (2007).
2. Maruoka, H., Konno, D., Hori, K. & Sobue, K. Collaboration of PSD-Zip70 with its binding partner, SPAR, in dendritic spine maturity. *J Neurosci* **25**, 1421-1430 (2005).
3. Sugiyama, Y., Kawabata, I., Sobue, K. & Okabe, S. Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nat Methods* **2**, 677-684 (2005).
4. Mayanagi, T., Morita, T., Hayashi, K., Fukumoto, K. & Sobue, K. Glucocorticoid receptor-mediated expression of caldesmon regulates cell migration via the reorganization of the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **283**, 31183-31196 (2008).
5. Fukumoto, K., Morita, T., Mayanagi, T., Tanokashira, D., Yoshida, T., Sakai, A. & Sobue, K. Detrimental effects of glucocorticoids on neuronal migration during brain development. *Mol. Psychiatry* **14**, 1119-1200 (2009).
6. Sobue, K. & Fukumoto, K. Caldesmon, an actin-linked regulatory protein, comes across glucocorticoids. *Cell Adh Migr* **4**, 185-189 (2010).



ストレスホルモン曝露によるシナプス形成・可塑性と神経回路網形成障害からうつ病・不安障害発症のメカニズム



自閉症ヒト型モデルマウスを用いた社会性行動のシナプスパソロジー

内匠 透

(広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授)

公募 A01

ヒトゲノム計画の成果をはじめとする昨今の生命科学の進歩により、神経変性疾患を含むさまざまな疾患の病態解明が進む中、精神疾患の病態解明は著しく遅れていると言わざるを得ない。しかしながら、これまで生物学的研究からもっとも離れていた精神疾患領域にも様々な手法が導入され、精神疾患も他の複合疾患と同様、生物学的な異常を有する疾患であり、やや極端な説ではあるが「精神疾患はスパインの異常」と考えられるようになってきた¹⁾。これまで教育心理学的な解析が中心であった自閉症も、現在では脳の発達障害と認識され、最近の遺伝学的解析からは、シナプス関連分子を中心としてシナプス異常が原因の一つとして提唱されている。また、CNV (copy number variation、コピー数変異) がこれまで考えられていた以上に多くの症例で見られることがわかってきた。

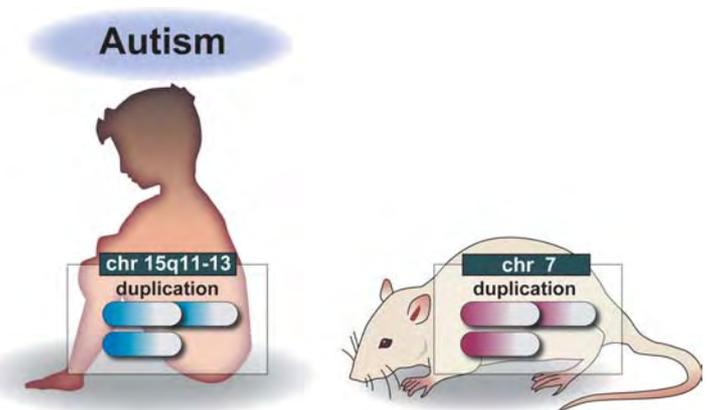
我々は、染色体工学的手法を用いて、ヒト染色体15q11-q13重複のモデルマウスの作製に成功した²⁾。15q11-q13重複は自閉症の細胞遺伝学的異常としてはもっとも頻度の高いものとして知られており、実際、本マウスは、一連の行動解析の結果、社会的相互作用の障害、超音波啼鳴の発達障害、固執的常同様行動等の自閉症様行動を示した。本モデルは、自閉症様行動を示すという表現型妥当性を示すだけでなく、自閉症の原因である染色体異常を患者と同じ型で有するという構成的妥当性をもみた自閉症ヒト型モデルマウスであり³⁾、また、CNV疾患モデルの世界最初のケースでもある。本マウスのさらなる解析の結果、発達期のセロトニン異常がある事⁴⁾を見出した。一方、我々はこれまでに、神経細胞を用いた細胞生物学的研究により、RNA結合タンパク質TLS/FUSが、グルタミン酸シグナル依存性にアクチンモータータンパク質であるMyosin Vaを介する神経細胞樹状突起およびスパインへの輸送に関与し、スパインの形態形成に重要であることを明らかにしている^{5,6)}。本TLS/FUSは、最近筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子であることが報告され、現在世界中で非常に注目されている。

本研究においては、我々が開発した自閉症ヒト型モデルマウスのシナプス異常を中心に、シナプス異常がもたらす社会性行動異常のメカニズムを明らかにすることを目標とする。具体的には、モデルマウスのスパインを中心とした細胞生物学的解析を行うとともに、社会性行動異常の脳部位、さらにそのニューロサーキットを明らかにすることを目的とする。

精神疾患の領域は、疾患自体の多様性及び特殊性及び的確な動物モデルの欠如のために、その病態解明は神経疾患に比べ著しく遅れていた。ヒト型モデルマウスを利用することにより、自閉症を含む発達障害の病態解明が進むだけでなく、ジェネラルな生物学的異常として、他の精神神経疾

患とも共通するスパインの異常が見出される可能性がある。これらの結果は、シナプスパソロジーとしてあらたな分野の創成が期待されるものである。

1. 内匠 透. 精神疾患はスパインの病気? 蛋白質・核酸・酵素 **51**, 2328-2333 (2006).
2. Nakatani, J., Tamada, K., Hatanaka, F., Ise, S., Ohta, H., Inoue, K., Tomonaga, S., Watanabe, Y., Chung, Y.J., Banerjee, R., Iwamoto, K., Kato, T., Okazawa, M., Yamauchi, K., Tanda, K., Takao, K., Miyakawa, T., Bradley, A. & Takumi, T. Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell* **137**, 1235-1246 (2009).
3. Takumi, T. A humanoid mouse model of autism. *Brain Dev.* **32**, 753-758 (2010).
4. Tamada, K., Tomonaga, S., Hatanaka, F., Nakai, N., Takao, K., Miyakawa, T., Nakatani, J. & Takumi, T. Decreased exploratory activity in a mouse model of 15q duplication syndrome; implications for disturbance of serotonin signaling. *PLoS ONE* **5**, e15126 (2010).
5. Fujii, R., Okabe, S., Urushido, T., Inoue, K., Yoshimura, A., Tachibana, T., Nishikawa, T., Hicks, G.G. & Takumi, T. The RNA binding protein TLS is translocated to the dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphogenesis. *Curr. Biol.* **15**, 587-593 (2005).
6. Yoshimura, A., Fujii, R., Watanabe, Y., Okabe, S., Fukui, K. & Takumi, T. Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/Protein (mRNP) complex in dendritic spines. *Curr. Biol.* **16**, 2345-2351 (2006).



ヒト染色体15q11-q13重複をマウスで作製する



細胞内膜系調節によるシナプス制御の分子機構

白根 道子

(九州大学・生体防御医学研究所・准教授)

公募 A01

本研究は「細胞内膜系 (endomembrane system) 調節によるシナプス制御の分子機構解明」を目的とし、(1) 細胞内小胞輸送および (2) 細胞内膜構造の調節が、高次脳機能に関連するシナプス制御、および変性疾患・発達障害・精神疾患などの脳神経疾患発症に、どのような分子機構で関与しているのか明らかにする。

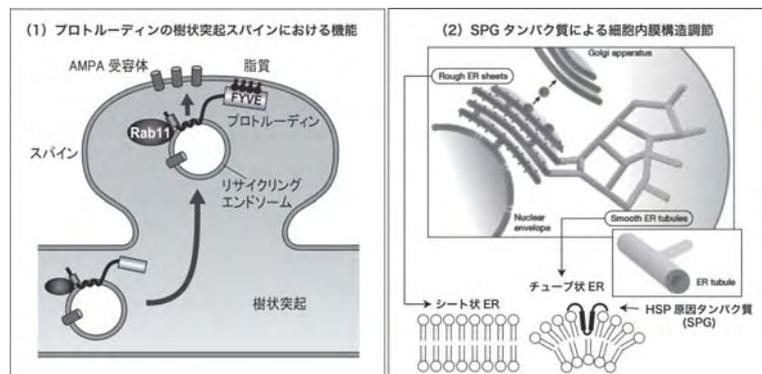
われわれが発見したプロトルーディンは、神経細胞内で Rab11 依存的リサイクリングエンドソーム輸送を制御する膜タンパク質である¹⁻⁵⁾。また、遺伝性痙性対麻痺 (HSP) の患者家系でプロトルーディンの遺伝子変異が報告されている。HSP は、細胞内小胞輸送の異常により皮質脊髄路の運動神経が変性する進行性の神経疾患だが、近年、視覚障害・聴覚障害・精神遅滞・痴呆などを伴う HSP の報告が増えつつある。そして HSP の原因遺伝子として SPG1-46 が同定されている (プロトルーディンは SPG33)。

本研究では、プロトルーディンの神経機能維持における役割とその作用機序を手掛かりに、細胞内膜系調節と神経機能制御との関係解明を目指し、以下の 2 つの課題に取り組む。

(1) 神経における Rab11 依存的リサイクリングエンドソームの機能として、軸索輸送の他に樹状突起スパインにおける AMPA 受容体の輸送調節が知られており、高次脳機能と関連する機構として注目されている。われわれはプロトルーディンの特異的結合脂質を発見した。本研究では、樹状突起スパインにおけるプロトルーディン・Rab11・脂質による小胞輸送の分子機構と生理的役割について詳細に解析する。(2) 小胞体 (ER) は状況に応じてシート状の粗面小胞体またはチューブ状の滑面小胞体に構造変換する細胞内膜系である。SPG 遺伝子である Spastin・Atlastin・REEP1 は HSP の 50% 以上で変異が同定されて

いるが、最近 3 つの遺伝子産物に共通する機能として、ER 膜の湾曲作用 (membrane curvature) とそれに伴う ER 構造調節作用が報告された。それらの変異体発現細胞では、細胞末端部でチューブ状 ER が減少する結果、細胞内ネットワークに異常を来す。すなわち HSP の病因として、ER 膜の曲率変化による ER 構造調節とそれによる細胞内情報伝達の異常に起因することが示唆された。プロトルーディンは Spastin・Atlastin と結合する膜タンパク質であるため、本研究では、ポストシナプスにおけるプロトルーディンと ER などの細胞内膜の曲率調節および構造との関係、さらに脳神経疾患との関連について検討する。そして細胞内小胞輸送および細胞内膜構造と神経疾患との関係の解明を目指す。

1. Saita, S., Shirane, M., Natsume, T., Iemura, S. & Nakayama, K.I. Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with vesicle-associated membrane protein-associated protein. *J Biol Chem* **284**, 13766-13777 (2009).
2. Shirane, M., Ogawa, M., Motoyama, J. & Nakayama, K.I. Regulation of apoptosis and neurite extension by FKBP38 is required for neural tube formation in the mouse. *Genes Cells* **13**, 635-651 (2008).
3. Nakagawa, T., Shirane, M., Iemura, S., Natsume, T. & Nakayama, K.I. Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes Cells* **12**, 709-719 (2007).
4. Shirane, M. & Nakayama, K.I. Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science* **314**, 818-821 (2006).
5. Shirane, M. & Nakayama, K.I. Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**, 28-37 (2003).



(1) 樹状突起スパインにおける小胞輸送制御機構
(2) 細胞内膜系の膜構造異常と神経疾患との関連



ヒト脳神経疾患を惹起するシナプス関連分子異常探索

松本 直通

(横浜市立大学・医学研究科・教授)

公募 A01

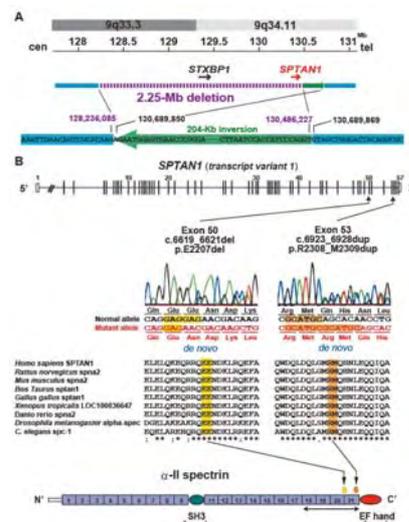
本研究では2系統の脳神経疾患を対象とする。常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 (Autosomal Recessive SpinoCerebellar Ataxia, ARSCA) と小児難治性てんかんである。ARSCAは既知遺伝子の異常に依らない、血族婚を有した3家系を集積し既にSNPアレーを用いた homozygosity mappingにより候補遺伝子領域を数カ所にまで絞っている。この内一家系に於いて全ゲノムエクソーム高速シーケンス解析を行い、原因となる遺伝子変異を特定した。さらに小児難治性てんかんは、報告済みのシナプス関連遺伝子異常に加え新規分子異常を見出している。これら2系統の疾患のシナプス関連分子探索によって、シナプス関連分子異常が惹起するヒト脳神経疾患の確立と解明を目指す。

研究代表・松本はヒトにおける遺伝性疾患を対象とした責任遺伝子クローニングを手がけ、これまでに Sotos 症候群 (Nat Genet, 2002)・外眼筋線維症 (Nat Genet, 2003)・Marfan 症候群 II 型 (Nat Genet, 2004)・CFC 症候群 (Nat Genet, 2006)・大田原症候群 (Nat Genet, 2008)・Kabuki 症候群 (Nat Genet, 2010)・髄鞘低形成を伴う West 症候群 (Am J Hum Genet, 2010)・新型 Ehlers-Danlos 症候群 (Hum Mut, 2010)・小眼球四肢異常症候群 (Am J Hum Genet, 2011) の9疾患の責任遺伝子特定に関わった。これらの研究はゲノム解析テクノロジーを駆使して達成された成果である。例えば大田原症候群・髄鞘低形成を伴う West 症候群の2疾患はゲノムマイクロアレーで同定された染色体微細欠失の中に存在する候補遺伝子群の中から責任遺伝子が同定された。大田原症候群の原因遺伝子 *STXBP1* はシナプス小胞サイクルに密接に関わるタンパク質 MUNC18-1 をコードする。小眼球四肢異常症候群においては高密度 SNP タイピングを用いたホモ接合性マッピングにより3つの小家系からの遺伝子クローニングに成功した。さらに Kabuki 症候群では高いシーケンス産出能を誇る次世代シーケンスを用いて全ゲノムのエクソン領域 (エクソーム) シーケンスを行うことで責任遺伝子単離に到達することができた。本研究では ARSCA において高密度 SNP タイピングとホモ接合性マッピングを用い、ARSCA と難治性てんかんに於いてエクソームシーケンスを利用する予定である。

エクソーム次世代シーケンスの解析においては、既に1年半の運用実績を有し複数の疾患原因の特定に至っている。例えばX連鎖性白質変成症では、SNPタイピングにより候補遺伝子領域を絞り込みX染色体エクソームの次世代シーケンス解析をすることで短期間に遺伝子異常の同定に成功している (J Med Genet, in press)。エクソームシーケンス解析では、実験手技的なハイブリダイゼーションによる曖昧さと、産出シーケンスのコンピュータ解析におけるマッピングの曖昧さを許容しながら真の遺伝子変異を同定することが肝要である。我々の解析系では複数の *in silico*

co 解析プロトコールを設定しそれらを組み合わせながら比較的効率の良い遺伝子変異探索システムを有しており本研究でも用いる予定である。

1. Ng, S.B., Bigham, A.W., Buckingham, K.J., Hannibal, M.C., McMillin, M.J., Gildersleeve, H.I., Beck, A.E., Tabor, H.K., Cooper, G.M., Mefford, H.C., Lee, C., Turner, E.H., Smith, J.D., Rieder, M.J., Yoshiura, K., Matsumoto, N., Ohta, T., Niikawa, N., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J. & Shendure, J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* **42**, 790-793 (2010).
2. Saito, H., Tohyama, J., Kumada, T., Egawa, K., Hamada, K., Okada, I., Mizuguchi, T., Osaka, H., Miyata, R., Furukawa, T., Haginoya, K., Hoshino, H., Goto, T., Hachiya, Y., Yamagata, T., Saitoh, S., Nagai, T., Nishiyama, K., Nishimura, A., Miyake, N., Komada, M., Hayashi, K., Hirai, S., Ogata, K., Kato, M., Fukuda, A. & Matsumoto, N. Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am J Hum Genet* **86**, 881-891 (2010).
3. Saito, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J., Urano, K., Kumada, S., Nishiyama, K., Nishimura, A., Okada, I., Yoshimura, Y., Hirai, S., Kumada, T., Hayasaka, K., Fukuda, A., Ogata, K. & Matsumoto, N. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* **40**, 782-788 (2008).
4. Mizuguchi, T., Collod-Beroud, G., Akiyama, T., Abifadel, M., Harada, N., Morisaki, T., Allard, D., Varret, M., Claustres, M., Morisaki, H., Ihara, M., Kinoshita, A., Yoshiura, K., Junien, C., Kajii, T., Jondeau, G., Ohta, T., Kishino, T., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Niikawa, N., Boileau, C. & Matsumoto, N. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet* **36**, 855-860 (2004).
5. Kurotaki, N., Imaizumi, K., Harada, N., Masuno, M., Kondoh, T., Nagai, T., Ohashi, H., Naritomi, K., Tsukahara, M., Makita, Y., Sugimoto, T., Sonoda, T., Hasegawa, T., Chinen, Y., Tomita, H., Kinoshita, A., Mizuguchi, T., Yoshiura, K., Ohta, T., Kishino, T., Fukushima, Y., Niikawa, N. & Matsumoto, N. Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nat Genet* **30**, 365-366 (2002).



髄鞘低形成を伴う West 症候群症例で同定された *SPTAN1* (α -II スペクトリンをコード) の in-frame 変異



細胞内 A β オリゴマーによるシナプス・細胞障害と tau との相互作用

富山 貴美

(大阪市立大学大学院医学研究科脳神経科学・准教授)

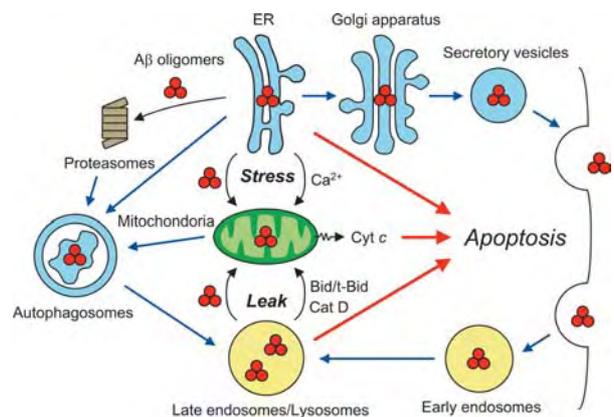
公募 A01

アルツハイマー病のシナプス機能障害や記憶障害は細胞外 A β オリゴマーが原因であると考えられている。一方で、これらの障害は A β の細胞内蓄積に一致して起こるとする報告もある。私達は、2002年に家族性アルツハイマー病患者から、老人斑を形成せず A β オリゴマーのみを形成する新しい APP 変異 E693 Δ を同定した^{1,2)}。この変異を発現するトランスジェニックマウスを作製しその脳を調べてみると、大脳皮質や海馬のニューロン内に A β オリゴマーが蓄積し、老人斑の形成なしに、シナプス機能障害、記憶障害、シナプス消失、tau 異常リン酸化、グリア細胞活性化、ニューロン消失が起こることがわかった³⁾。さらに、A β オリゴマーの細胞内蓄積は、ER ストレス、エンドソーム/リソソーム膜傷害、ミトコンドリア機能障害などを介したアポトーシスを引き起こすこともわかった(図)^{4,5)}。以上の結果は、細胞外の A β オリゴマーばかりでなく細胞内の A β オリゴマーもアルツハイマー病のシナプス障害や細胞障害に寄与していることを示唆している。

A β によるシナプス・細胞障害機構を考える上で、A β と tau との相互作用の解明は重要な問題である。細胞外 A β の毒性に tau がどのように関与しているのかについては最近いくつかの論文が出始めたが、細胞内 A β の毒性に tau が関与しているのかどうかについては不明である。そこで本研究では、E693 Δ 変異 APP トランスジェニックマウスを tau ノックアウトマウスや tau トランスジェニックマウスと交配し、tau の欠失や過剰発現が細胞内 A β オリゴマーの毒性にどのような影響を与えるかを検討する。同時に、E693 Δ 変異 APP の単独発現ではみられなかった神経原線維変化の形成が、ヒト tau との共発現で可能となるかどうかを検討する。この検討では、ヒト野生型 tau とヒト変異型 tau の両方のトランスジェニックマウスを用いる。Tau ノックアウトマウスは Jackson Laboratory から入手可能であり、2種類の tau トランスジェニックマウスはすでに私達の手で作製済みである(未発表。現在論文作成中)。マウスの系統確立には 1~2 年を要するので、その間、培養細胞を用いて同様の実験を行い、予備的なデータを取る予定である。

本研究により細胞内 A β オリゴマーと tau との相互作用が明らかになれば、アルツハイマー病のシナプス・細胞障害機構を解明し治療上の標的分子を探索するうえで重要な知見が得られるであろう。さらに、E693 Δ 変異 APP とヒト tau との共発現により神経原線維変化を呈するより完全なモデルマウスが確立できれば、アルツハイマー病の治療法やイメージングの開発において有用なツールとなることが期待される。

1. Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada, H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., Takuma, H., Kuwano, R., Imagawa, M., Ataka, S., Wada, Y., Yoshioka, E., Nishizaki, T., Watanabe, Y. & Mori, H. A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann. Neurol.* **63**, 377-387 (2008).
2. Takuma, H., Teraoka, R., Mori, H. & Tomiyama, T. Amyloid β E22 Δ variant induces synaptic alteration in mouse hippocampal slices. *Neuroreport* **19**, 615-619 (2008).
3. Tomiyama, T., Matsuyama, S., Iso, H., Umeda, T., Takuma, H., Ohnishi, K., Ishibashi, K., Teraoka, R., Sakama, N., Yamashita, T., Nishitsuji, K., Ito, K., Shimada, H., Lambert, M.P., Klein, W.L. & Mori, H. A mouse model of amyloid β oligomers: Their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss *in vivo*. *J. Neurosci.* **30**, 4845-4856 (2010).
4. Nishitsuji, K., Tomiyama, T., Ishibashi, K., Ito, K., Teraoka, R., Lambert, M.P., Klein, W.L. & Mori, H. The E693 Δ mutation in amyloid precursor protein increases intracellular accumulation of amyloid β oligomers and causes endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in cultured cells. *Am. J. Pathol.* **174**, 957-969 (2009).
5. Umeda, T., Tomiyama, T., Sakama, N., Tanaka, S., Lambert, M.P., Klein, W.L. & Mori, H. Intraneuronal amyloid β oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction *in vivo*. *J. Neurosci. Res.* **89**, 1031-1042 (2011).



A β オリゴマーの細胞内蓄積は様々なオルガネラ障害を引き起こしてアポトーシスを誘導する



神経軸索におけるタンパク分解機構とその破綻

内山 安男

(順天堂大学・医学部・教授)

公募 A01

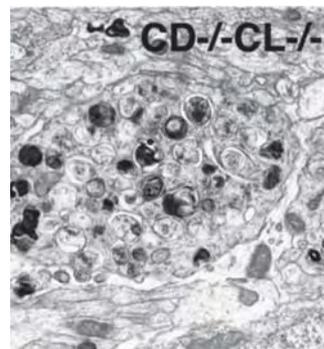
主要な細胞内のタンパク質分解系としてオートファジー/リソソーム系とユビキチン/プロテアソーム系の2つが知られている。オートファジーとは古くなって不要な細胞の構成要素を一部の細胞質と共に小胞様構造の隔離膜によって包み込み（オートファゴソームの形成）、リソソームの酵素を受けて分解する機構である。オートファゴソームに取り込まれた高分子物質は酸性条件下で生物活性のあるモノマー（アミノ酸等）にまで分解され、再利用される。近年、出芽酵母の研究から数多くのオートファジー関連遺伝子が同定され（Atg）、それらのほ乳類におけるホモログも取られてきた。各種 Atg 遺伝子欠損マウスの解析から、オートファジーの役割は、栄養飢餓状態に反応してアミノ酸の供給、非選択的タンパク質分解であることが明らかにされた¹⁾。その後、基礎的（構成性）オートファジーにおいてもある種のタンパク質はユビキチンシグナルを介してオートファジー/リソソームで分解されること²⁾、栄養飢餓のみならず様々なストレスにตอบสนองして誘導されることも明らかにされた¹⁻⁵⁾。

神経軸索の主要な役割は興奮の伝達であり、終末部で伝達物質を放出して、シナプス後膜に興奮を伝達する。興味あることに、興奮を伝える側と受ける側のタンパク代謝に関する環境は大きく異なるが、その詳細は不明な点が多い。軸索/シナプス前領域は非常に限られた空間の中で起こる物質代謝（必要な物質の供給と不要な物質の排出）によって恒常性の維持がなされていると考えられる。オートファジーの出来ないプルキンエ細胞では、初めに軸索終末部の変性が起こり、ユビキチン複合体の蓄積が認められることが報告されている。同様にリソソームカテプシンDやB/Lを欠損すると、脳梁や海馬錐体細胞周囲の終末部にオートファゴソーム様の膜成分が蓄積する³⁾。このことは、軸索/シナプス前領域においてオートファジー/リソソーム系が重要ななたらきを担っていることを示唆している。たとえば、リソソームあるいはトランスゴルジ網から選別輸送されリソソーム酵素を持つ輸送小胞が、どのような機序で軸索に運ばれないように制限されているのかは不明である。また、オートファジーに必須なタンパク質のうちLC3やAtg9Aが軸索に豊富に存在することを申請者らは見出している^{3,6)}が、オートファジーに必須な分子がすべて軸索/シナプス前領域に存在しているのか否かは依然不明である。この分解系が破綻すると、軸索変性と神経変性のトリガーとなることから、これらの実態と調節機構を分子レベルで解析することは、神経回路網の品質管理を知る上で重要である。

そこで、軸索/シナプス前領域という非常に限られた空間の中で起こるオートファジー/リソソーム系による物質代謝の分子実体について明らかにすることを本研究の目的とする。具体的には1)非常に限定された空間である軸

索/シナプス前領域におけるオートファゴソームの形成機構の解析、2)オートファゴソームに取り込まれた不要な物質が、軸索内でリソソーム酵素による分解を受けるのか、あるいは細胞体に逆行輸送された後に分解されるのか、について明らかにすることを目指す。このため、オートファジー関連遺伝子を用いて、新規にトランスジェニックマウス（唯一の膜タンパク質のAtg9Aとオートファジー関連3）軸索/シナプス前領域におけるマイトファジーのイメージング、などについて新規トランスジェニックマウスを用いて生化学的・神経細胞生物学的に検討する。

1. Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E. & Tanaka, K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**, 1149-1163 (2007).
2. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. & Tanaka, K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884 (2006).
3. Koike, M., Shibata, M., Waguri, S., Yoshimura, K., Tanida, I., Kominami, E., Gotow, T., Peters, C., von Figura, K., Mizushima, N., Saftig, P. & Uchiyama, Y. Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* **167**, 1713-1728 (2005).
4. Koike, M., Shibata, M., Tadokoshi, M., Gotow, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K. & Uchiyama, Y. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* **172**, 454-469 (2008).
5. Uchiyama, Y., Shibata, M., Koike, M., Yoshimura, K. & Sasaki, M. Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol* **129**, 407-420 (2008).
6. Tamura, H., Shibata, M., Koike, M., Sasaki, M. & Uchiyama, Y. Atg9A protein, an autophagy-related membrane protein, is localized in the neurons of mouse brains. *J Histochem Cytochem* **58**, 443-453 (2010).



リソソームカテプシンBとLの両者を欠損するマウス（生後10日）の脳梁における軸索中に蓄積したオートファゴソーム。ほとんどの顆粒は、二重膜で取り囲まれており、リソソームの酵素を持たないオートファゴソームと考えられる



オートファジー破綻におけるシナプス機能不全のメカニズム

服部 信孝

(順天堂大学・医学部・脳神経内科・教授)

公募 A01

パーキンソン病 (PD) の殆どは遺伝歴のない孤発型であるが、その一部に遺伝歴のある遺伝性パーキンソン病 (FPD) が存在する。現在まで Park1-16 まで遺伝子座が同定されており、うち SNCA, Lrrk2 が優性遺伝性 PD の原因遺伝子として明らかにされており、Parkin, PINK1, DJ-1 は劣性遺伝性 PD の原因遺伝子として同定されている。FPD も孤発型も長期に渡って L-ドーパ反応性が良好であることから、後シナプス機能は保たれており、前シナプス機能不全が本態であると予想される。PD の terminology は一つの疾患名であるが、その病態は多岐に渡っていると言わざるを得ない。この多様な疾患の病態を解明するには、単一遺伝子異常で発症する FPD の病態を解明することが最も効率的な戦略だと考えている。FPD と言っても常染色体劣性型と優性遺伝性型があり、劣性遺伝性であれば loss-of-function 型変異効果が推定され、優性遺伝性 PD であれば toxic gain-of-function 効果による細胞毒性が想定される。その中で劣性遺伝性 PD の parkin や PINK1 変異に伴う若年性 PD は若年性 PD のうち半分以上を占めている。しかもこのタイプの PD は一般的には神経病理学的にレビー小体を伴わない。Parkin は、ユビキチンリガーゼとしてユビキチンプロテアソーム系に関与していることが明らかにされた。更に Parkin, PINK1 は共同してミトコンドリアのクリアランスを担うオートファジーの一つである mitophagy に関わっていることが最近のデータから明らかにされている。既に PINK1 の上流に位置する分子 X 因子を同定しており、因子 X をノックダウンするとミトコンドリアのクリアランスに関与する mitophagy が誘導されなかった。この因子 X が直接的か間接的かは不明であるが parkin, PINK1 の両分子の上流に関与していることが予想される。この因子と両分子の関係を明らかにし、オートファジーとミトコンドリアのクリアランス機構の関係を突き止める。

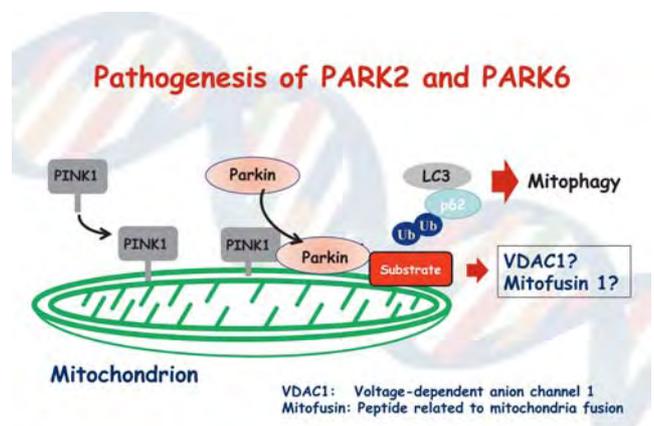
一方、神経系の病態には対象細胞が特殊なため解明に困難が伴う。神経組織自体が神経細胞、グリアなど多種多様な細胞集団により成り立っていることに起因する。

インスリン分泌とカテコラミンの分泌には、共通した Large dense core vesicle と言われる同じ構造を持つ小胞により分泌される。またインスリン分泌にはシタキシン依存性と非依存性の二つのタイプが存在しており、シタキシン依存性インスリン開口機構は神経と共通点がある。この共通したメカニズムの存在から、インスリン分泌の機能解析から神経系、特にカテコラミン分泌のメカニズム解明に繋がる可能性を想定している。インスリン分泌の機構を探索して若年性 FPD の病態を明らかにする戦略は、単に PD だけでなく他の神経変性疾患にも応用が可能と考える。膵β細胞を研究対象のツールに捉え、そこから得られた結果を神経系に応用させる戦略を考案しており、極めて独創

性の高いものとする。

本課題は近年明らかにされた parkin, PINK1 のオートファジーへの関与から、ミトコンドリアのクリアランスに関わっていることが分かっている。本課題は mitophagy の機能不全によるシナプス形成不全との関連性を、膵β細胞をモデルとして捉え、そのシナプス機能不全を明らかにしようとするものである。また優性遺伝性の代表格である α-synuclein の新規点変異を見出したので、蛋白凝集とシナプス不全について検討する。我々研究室の業績は、ここ 10 年間の PD 領域で引用回数は世界で 7 位にランクされており、世界をリードしていると自負している。新薬開発のためにも PD の病態及び原因解明を目指したい。

1. Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. & Shimizu, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608 (1998).
2. Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. & Suzuki, T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* **25**, 302-305 (2000).
3. Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N. & Tanaka, K. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin to mitophagy. *J Cell Biol* **189**, 211-221 (2010).
4. Kawajiri, S., Saiki, S., Sato, S., Sato, F., Hatano, T., Eguchi, H. & Hattori, N. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett* **584**, 1073-1079 (2010).
5. Nishioka, K., Hayashi, S., Farrer, M.J., Singleton, A.B., Yoshino, H., Imai, H., Kitami, T., Sato, K., Kuroda, R., Tomiyama, H., Mizoguchi, K., Murata, M., Toda, T., Imoto, I., Inazawa, J., Mizuno, Y. & Hattori, N. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **59**, 298-309 (2006).



ミトコンドリア膜電位の低下か PINK1 の過剰発現では parkin がミトコンドリアに移行し、PINK1 と協働して mitophagy を誘導する



モノアミン系機能亢進によるグルタミン酸シナプス表現型変化の解析

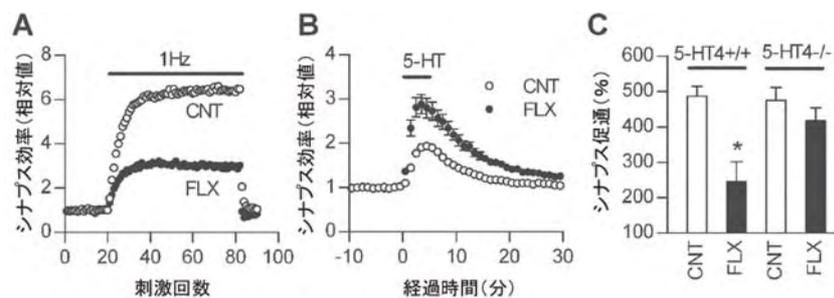
小林 克典

(日本医科大学・薬理学講座・講師)

公募 A01

統合失調症やうつ病などの精神疾患においてモノアミン神経系とグルタミン酸作動性シナプスの機能不全が示唆されているが、両者の関係は明らかではない。私たちは最近、高用量の選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) を成体マウスに慢性投与することによって、グルタミン酸作動性の海馬苔状線維-CA3 シナプスの表現型が成熟型から幼若型に変化することを発見した。さらに、セロトニン 5-HT₄ 受容体シグナル経路の亢進がこのシナプス表現型変化において重要な役割を果たすことを示した 1)。苔状線維は歯状回顆粒細胞の軸索であり、CA3 領域の錐体細胞に巨大シナプスを形成する。これまでの研究によって、苔状線維-CA3 シナプスがシナプス前性の特殊な短期・長期可塑性を持つことを示し 2)、さらに海馬 CA3 神経回路の可塑性において教師入力として重要な役割を果たすことを明らかにした 3)。これら自分自身の解析結果を含む過去の報告を考慮すると、苔状線維シナプスの表現型変化は海馬神経回路機能に大きな影響を及ぼすことが予想される。実際、SSRI 投与によってマウスはケージ内活動量の顕著な不安定化等の行動異常を示し、シナプス表現型変化と行動変化は有意に相関した 4)。同様のシナプス表現型変化は複数の系統の遺伝子改変マウスでも見られ、いずれの場合も精神疾患様の顕著な行動異常が見られる。従って、これらの変化は精神疾患もしくは薬物誘発性の行動異常とその神経基盤に関与する可能性が高い。本研究ではこの系をシナプス病態モデルとして活用し、モノアミン神経系機能亢進に依存したグルタミン酸シナプス表現型変化の誘導・発現メカニズムの解明を試みる。本研究で提唱するモノアミン-グルタミン酸シナプス相互作用の概念は他神経系のシナプス病態解析にも応用可能であり、シナプス機能不全発現メカニズムの一類型となる可能性がある。また、精神疾患において数多く存在する、中枢神経伝達異常を仮定した一見独立した病態モデルを統合できる可能性がある。

1. Kobayashi, K., Ikeda, Y., Sakai, A., Yamasaki, N., Haneda, E., Miyakawa, T. & Suzuki, H. Reversal of hippocampal neuronal maturation by serotonergic antidepressants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 8434-8439 (2010).
2. Kobayashi, K., Manabe, T. & Takahashi, T. Presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Science* **273**, 648-650 (1996).
3. Kobayashi, K. & Poo, M.-m. Spike train timing-dependent associative modification of hippocampal CA3 recurrent synapses by mossy fibers. *Neuron* **41**, 445-454 (2004).
4. Kobayashi, K., Ikeda, Y. & Suzuki, H. Behavioral destabilization induced by the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Mol. Brain* **4**, 12 (2011).



SSRIフルオキシセチン (FLX) によるシナプス表現型変化 (A) とそのセロトニン依存性 (B, C)



遺伝性側頭葉てんかんのシナプス病態、神経回路病態の解明

深田 優子
(生理学研究所・准教授)

公募 A01

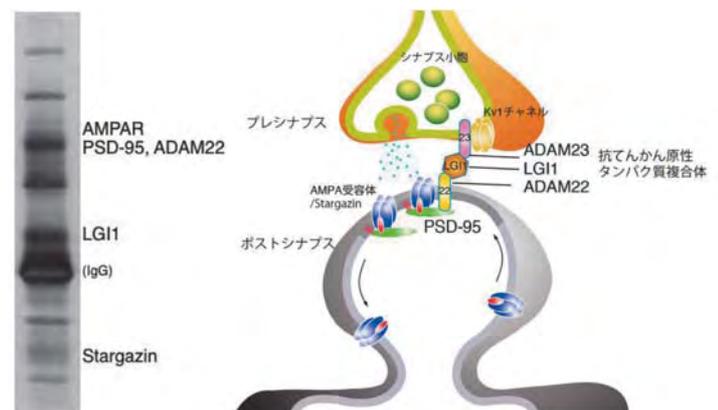
“てんかん”は人口の1%程度に発症する頻度の高い神経疾患であり、激しいけいれんや意識消失、時には幻覚幻聴等を伴う。神経細胞および神経回路の異常な興奮により引き起こされると考えられているが、その病態、病因は不明な点も多く、根本的な治療法の開発が待たれている。てんかん家系における遺伝学的解析により、現在までに約30種類の遺伝子の変異が同定されている。これら変異が神経機能に与える影響を解析すれば、脳の興奮性を制御する仕組みとてんかん病態の理解につながると考えられる。これまで同定された変異遺伝子の多くはイオンチャンネルをコードする遺伝子であり、遺伝性てんかんは「チャンネル病」と捉えられていた。一方、私共は脳内の主要な興奮性シナプス伝達を司るAMPA型グルタミン酸受容体に関連したシナプス膜タンパク質複合体を独自の生化学的手法により精製し、PSD-95¹⁾、Stargazin、ADAM22およびLGI1を主要構成分子として同定した²⁾(図左)。興味深いことに、Stargazin、ADAM22およびLGI1は遺伝学的解析から各変異がてんかん発症と関連することが報告されていた。とりわけLGI1はヒトのてんかん原因遺伝子としてイオンチャンネルをコードしない初めての分子であり注目を集めていた。また、ごく最近の臨床研究よりLGI1が記憶障害やけいれんを伴う自己免疫性辺縁系脳炎の信頼性の高い自己抗原であることが報告され、その機能に関してはてんかん以外の側面からも重要視されている。これまでに私共は1) LGI1が脳組織特異的な分泌蛋白質であり、膜蛋白質ADAM22と類縁蛋白質ADAM23のリガンドとして機能し、AMPA受容体機能を促進させることを見出した²⁾(図右)。2) また、LGI1 ノックアウト(KO)マウスでは海馬のAMPA受容体機能が低下し、100%の浸透率で致死性てんかんがおこることを見出した³⁾。つまりLGI1・ADAM22/ADAM23からなるリガンド・受容体結合が破壊されると脳内神経回路の異常興奮が惹起される。これらの知見はLGI1、ADAM22、ADAM23各欠損マウスが非常に良く似たてんかん表現型を示す遺伝学的知見にも裏付けられ、てんかん発症原因のまったく新しい側面を明らかにしたものである。しかし、「LGI1機能欠損によるAMPA受容体機能の低下が、なぜ脳内神経回路の過剰興奮状態である“てんかん”を引き起こすか」は謎であり、シナプスレベル、および神経回路レベルでの病態解明が必要不可欠な段階にある。

本研究ではてんかん発症との関連が遺伝学的に実証されたLGI1・ADAM22/23からなるリガンド・受容体を手がかりに、それら分子異常の影響をシナプス・神経細胞・神経回路レベルで解明し、てんかんの病態を解明する。本研究を通して、脳の興奮性を制御する決定的な分子基盤とてんかんの根本的な病態機構の解明を目指す。具体的には、

1) LGI1 遺伝子変異とシナプス伝達異常の関連性と、2) てんかん発症における海馬シナプス・神経回路の分子病態を解明することを目的とする。

従来、てんかんはイオンチャンネルの変異によるものと考えられていたが、LGI1は脳の興奮性を規定する分泌蛋白質であり、新しいタイプのてんかん原因遺伝子と位置づけられる。本研究によりLGI1機能異常とてんかん発症の関係が詳細に解明できれば、従来とは異なる作用点を有するてんかんの創薬開発に結びつく可能性が高い。

- 1) Fukata, Y. & Fukata, M. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **11**, 161-175 (2010).
- 2) Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Bredt, D.S., Nicoll, R.A. & Fukata, M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science* **313**, 1792-1795 (2006).
- 3) Fukata, Y., Lovero, K.L., Iwanaga, T., Watanabe, A., Yokoi, N., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Nicoll, R.A. & Fukata, M. Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3799-3804 (2010).
- 4) 岩永 剛、深田正紀、深田優子“LGI1が仲介するタンパク質複合体の破綻はシナプス伝達異常とてんかんを引き起こす”細胞工学(学研メディカル秀潤社) **29**, 594-595 (2010).



(左) PSD-95 脳内蛋白質複合体²⁾ ;
(右) 抗てんかん原性リガンド・受容体³⁾ (文献4より改変)



結節性硬化症におけるスパイン形成障害の分子病態

山形 要人

(財) 東京都医学研・神経可塑性・プロジェクトリーダー

公募 A01

自閉症は、これまで common genetic variant の蓄積で起こると考えられてきたが、最近では rare genetic variant of strong allele が単独で自閉症を引き起こすことも分かってきた。また、現在までに見つかっている自閉症の原因遺伝子産物の多くがシナプスの形成や機能に関わっていること、自閉症を含む発達障害患者において樹状突起スパインの形態や密度に異常があることなどから、自閉症や精神遅滞などの発達障害はシナプスに原因のある「シナプス病」と考えられている。

研究代表者は、樹状突起スパインの発達とともに発現が増加し、神経活動依存的に発現制御される遺伝子産物を発見し¹⁻⁴⁾、分子および細胞レベルで解析を行ってきた^{5,6)}。その一つである低分子量 G 蛋白質 Rheb は、特異的 GTPase-activating protein (GAP) によって不活化されているが、2003 年に Rheb-GAP が結節性硬化症の原因遺伝子産物 TSC2 であることが報告された。結節性硬化症は、精神遅滞やてんかん発作、自閉症などの中枢症状を呈する母斑症の一種である。Rheb は mTOR (ラパマイシンの標的分子) を活性化することから、「結節性硬化症患者では TSC2 の変異によって、Rheb が GTP 結合型となり、その下流の mTOR を活性化するため、自閉症・てんかん・精神遅滞などを発症する」と考えられてきた。一方、結節性硬化症においても、他の発達障害と同様にスパインの形成異常があることを明らかにしている。そこで、本研究課題では TSC2 に変異のある Eker ラット (結節性硬化症ラット) を用いて、スパイン形成障害が起きるメカニズムを明らかにする。具体的には、以下の二項目について研究を進める。

1) ミトコンドリアを介するスパイン形成障害機構：

結節性硬化症ニューロンにおいてミトコンドリアの異常が生じていることを見出している。そこで、TSC2-Rheb がミトコンドリアを制御するメカニズム、さらにミトコンドリア異常とスパイン形成障害との関連を検証する。

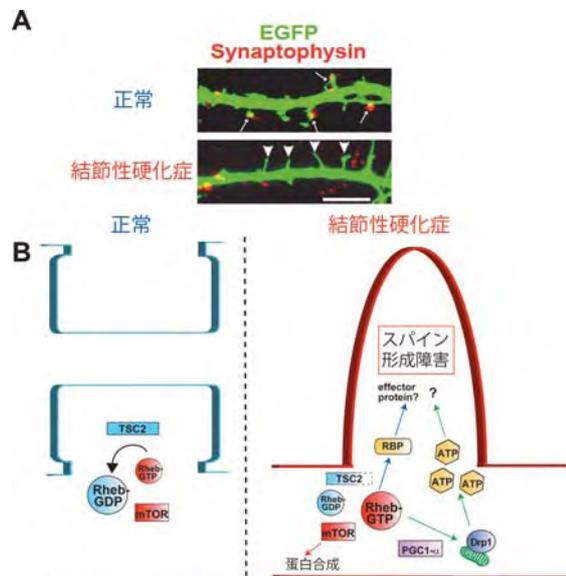
2) Rheb 結合蛋白質を介するスパイン形成障害機構：

Rheb が mTOR とは異なるシナプス蛋白質と結合することを見出している。この新しい蛋白質のスパイン形成障害における役割を明らかにする。

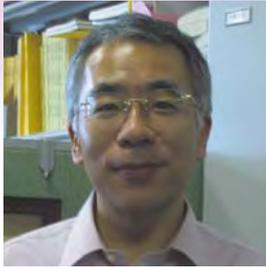
現在、米国において結節性硬化症患者に対するラパマイシンの有効性が検討されている。現在のところ、脳腫瘍に対する一定の効果は認められるものの、認知機能の改善については未だ報告が無い。すなわち、結節性硬化症の中枢症状発現において mTOR は本質的な役割を担っていない可能性も考えられる。本課題では、同病におけるスパイン形成障害とミトコンドリア異常との関連をまず検討する。次に、mTOR 非依存的経路とスパイン形成異常との関連、すなわち Rheb 結合蛋白質のスパイン形成障害における役割を明らかにする。この課題を遂行することにより、結節性硬化

症の中枢症状に対する新しい治療法開発の基盤が確立されると期待される。

1. Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A. & Worley, P.F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **11**, 371-386 (1993).
2. Yamagata, K., Sanders, L.K., Kaufmann, W.E., Yee, W., Barnes, C.A., Nathans, D. & Worley, P.F. rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J Biol Chem* **269**, 16333-16339 (1994).
3. Yamagata, K., Andreasson, K.I., Sugiura, H., Maru, E., Dominique, M., Irie, Y., Miki, N., Hayashi, Y., Yoshioka, M., Kaneko, K., Kato, H. & Worley, P.F. Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J Biol Chem* **274**, 19473-19479 (1999).
4. Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A. & Worley, P.F. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433-445 (1995).
5. Yasuda, S., Tanaka, H., Sugiura, H., Okamura, K., Sakaguchi, T., Tran, U., Takemiya, T., Mizoguchi, A., Yagita, Y., Sakurai, T., De Robertis, E.M. & Yamagata, K. Activity-induced protocadherin arcadlin regulates dendritic spine number by triggering N-cadherin endocytosis via TAO2beta and p38 MAP kinases. *Neuron* **56**, 456-471 (2007).
6. Yasuda, S., Sugiura, H. & Yamagata, K. Mek3. *UCSD-Nature Molecule Pages* (2009).



A. 結節性硬化症ラットにおけるスパイン形成障害
B. 結節性硬化症における樹状突起スパイン形成障害の分子病態



母体の食変化と子の脳機能発達に関する病態神経科学研究

和田 圭司

(独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・部長)

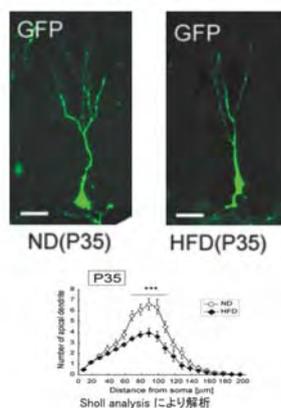
公募 A01

栄養状態の個人差がいかにシナプス機能に影響するかに関して分子的に明らかにした研究は無い。これまでに私たちは母体の妊娠前～離乳までの高脂肪食摂取は幼若期の産仔に脳機能形態学的変化（海馬での酸化脂質の蓄積と神経新生低下、記憶学習獲得過程の遅延）を誘導することをマウスで見いだした^{1,2)}。また、授乳期の摂餌量制限は幼若期の不安様行動に影響することを同じくマウスで見いだしている³⁾。本研究ではこれまでの研究を発展させ、母体の食習慣が子の脳機能発達に及ぼす影響について、その分子神経科学的基盤、特にシナプス機能・形態変化について解析する。培養細胞を用いた研究に加え、個体レベル、脳スライスレベルでの神経回路学的評価、行動学的評価と連動させ、その相関性、因果性の解析から、母体の食習慣は子の脳機能発達に対してはたして非可逆的变化をもたらすのか否かを明らかにする。特に、不可逆的もたらす場合は臨界期など時期的要因、さらには生化学的、生物学的要因を明らかにすることをめざす。本新学術領域では、遺伝子異常が細胞機能異常を介してシナプス異常に至る分子過程とサーキット選択性をもたらす病態を明らかにすることを到達目標とされているが、今回提案の研究は当該領域が解明をめざす機序がさらに食環境という環境要因によりどのように影響されるかを明らかにするものである。これまでに、母子間バイオコミュニケーションを提唱してきており^{4,5)}、今回は栄養科学と脳神経科学の融合的研究を展開する。

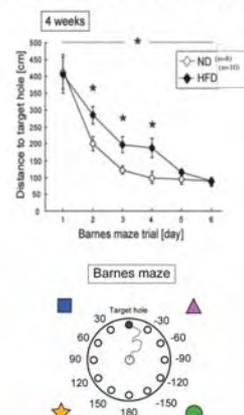
1. Tozuka, Y., Wada, E. & Wada, K. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J.* **23**, 1920-1934 (2009).
2. Tozuka, Y., Kumon, M., Wada, E., Onodera, M., Mochizuki, H. & Wada, K. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem. Int.* **57**, 235-247 (2010).
3. Kumon M., Yamamoto K., Takahashi, A., Wada, K. & Wada, E. Maternal dietary restriction during lactation influences postnatal growth and behavior in the offspring of mice. *Neurochem. Int.* **57**, 43-50 (2010).
4. Tozuka, Y., Wada, E. & Wada, K. Bio-communication between mother and offspring: Lessons from animals and new perspectives for brain science. *J. Pharmacol. Sci.* **110**, 127-132 (2009).
5. Wada, E. & Wada, K. Bio-communication between mother and offspring. In *Reproductive and Developmental Toxicology* (Eds. R.C. Gupta), Academic Press, US, 33-38 (2011).

母体高脂肪食摂取

産仔海馬で酸化脂質蓄積、BDNF低下、
新生神経細胞の形態変化



産仔(4週齢)の空間学習獲得過程
の遅延(バーンズ迷路学習試験)



母体の高脂肪食摂取は幼若期産仔マウス海馬の酸化脂質蓄積と神経新生低下、記憶学習獲得過程の遅延を誘導する



神経変性疾患におけるシナプス機能異常に着目した神経機能障害メカニズムの解明

永井 義隆

(国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長)

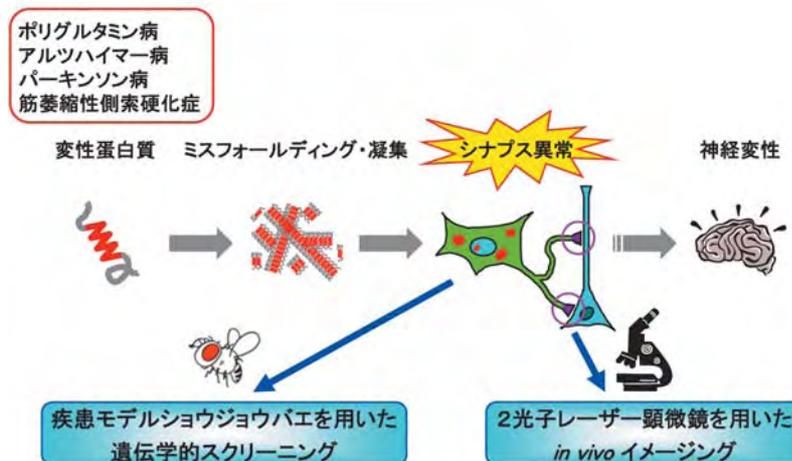
公募 A01

アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン (PolyQ) 病など多くの神経変性疾患において、それぞれ異なる蛋白質がいずれもミスフォールディング・凝集を生じて神経細胞内外に蓄積し、細胞レベル・個体レベルで様々な神経機能障害を来たして、最終的に神経症状の発症に至ると考えられている。私たちはこれまで PolyQ 病に対して、発症カスケードの最も上流に位置する蛋白質のミスフォールディング・凝集を標的として、異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1¹⁻⁴) や内在性分子シャペロンの発現誘導⁵⁾による治療法開発研究を進めてきた。しかしながら、神経症状を引き起こす神経機能障害は可逆性であることが示されたものの、その個体レベルでの分子メカニズムについてはこれまで未解明であった。

本研究では、神経症状発症に関わる個体レベルでの可逆性神経機能障害の分子メカニズムの解明を目的として、1) 疾患モデルショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングにより、シナプス機能異常に関わる神経機能障害の分子メカニズムを明らかにする。2) 2光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングにより、疾患モデル動物の神経機能障害発現過程および回復過程におけるシナプスの経時的な形態・機能変化を明らかにする。

本研究は、シナプス機能異常に着目してこれまで未解明であった神経機能障害の分子メカニズムを解明するものであり、発症後からでも治療効果が期待される新たな視点からの治療法開発につながる。また、2光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* イメージング技術により、従来知られていなかった新しい病態の解明が期待される。

1. Nagai, Y., Tucker, T., Ren, H., Kenan, D.J., Henderson, B.S., Keene, J.D., Strittmatter, W.J. & Burke, J.R. Inhibition of polyglutamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening. *J Biol Chem* **275**, 10437-10442 (2000).
2. Nagai, Y., Fujikake, N., Ohno, K., Higashiyama, H., Popiel, H.A., Rahadian, J., Yamaguchi, M., Strittmatter, W.J., Burke, J.R. & Toda, T. Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* **12**, 1253-1259 (2003).
3. Popiel, H.A., Nagai, Y., Fujikake, N. & Toda, T. Protein transduction domain-mediated delivery of QBP1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration *in vivo*. *Mol Ther* **15**, 303-309 (2007).
4. Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H.A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H. & Toda, T. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 332-340 (2007).
5. Fujikake, N., Nagai, Y., Popiel, H.A., Okamoto, Y., Yamaguchi, M. & Toda, T. Heat shock transcription factor 1-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J Biol Chem* **283**, 26188-26197 (2008).



神経変性疾患におけるシナプス機能異常に着目した神経機能障害メカニズムの解明
ショウジョウバエモデル、2光子レーザー顕微鏡を用いて神経変性疾患のシナプス機能異常を解明する



サーキットパソロジー
—多様な脳疾患における
ニューロサーキットパソロジーの解明—

計画 A02
公募 A02



選択的ニューロン病態解析法の開発・展開

貫名 信行

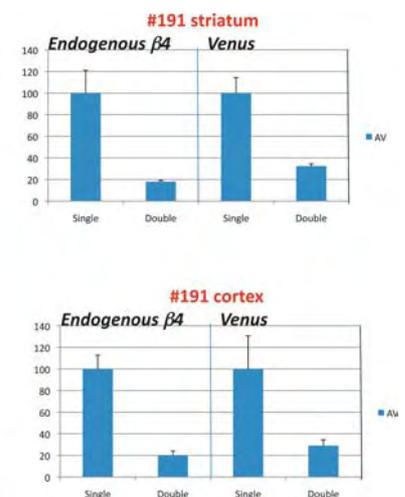
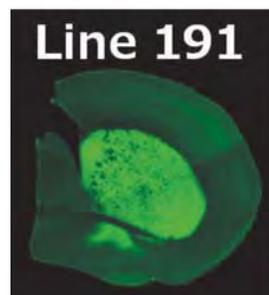
((独) 理化学研究所構造神経病理研究チーム・チームリーダー)

計画 A02

私たちはこれまでポリグルタミン病の病態を明らかにし、その病態に基づく治療法の開発をめざしてきました。その成果として、伸長ポリグルタミンをシャペロン介在性オートファジーによって特異的に分解促進することによりその病態を改善できること¹⁾、転写因子NF-YA, Brn-2などの凝集体集積がマウスモデルの病態を決定すること^{2,3)}、sodium channel beta4 subunitが線条体特異的に発現減少すること^{4,5)}などを報告してきました。これまでの研究によっても未だ十分明らかに出来てこなかった点は、病変の細胞特異性です。ネットワークを形成する神経系においてどの細胞がどのように障害されるのかは発症要因と関連し、また症状を決定します。この神経疾患における重要課題へアプローチするため、本研究では異なるプロモーターを用いて蛍光タンパク質を発現したトランスジェニックマウスから蛍光発現細胞をセルソーターによって単離し、その細胞特異性を解析する方法を確立します。この方法によってある遺伝子を特異的に発現する細胞群の特性を明らかにするとともに、ポリグルタミン病を疾患モデル系として細胞特異的解析を行います。ポリグルタミン病モデルマウスとの交配によって細胞特異的な凝集体形成とプロモーター依存性転写異常の関連についてもこれまでの論争に決着をつけたいと考えています。本研究の目標は細胞特異的分子神経病理学の基礎をモデルマウスにおいて確立することです。またこれにより、ヒト脳における選択的ニューロン病態解析のツールを確立することにあります。

具体的には以下の検討を行う予定です。ハンチントン病における主要病変は線条体のプロジェクションニューロンです。このニューロン特異的に発現するsodium channel beta 4 subunitを当研究室は同定し、beta 4 subunit promoterによって蛍光蛋白質Venusを発現するトランスジェニックマウスを作成しました。またbeta4 subunitのゲノムにCherryをノックインしたマウスも作成しています。さらにハンチントンプロモーターによるhuntingtin exon1-EGFPのトランスジェニックマウスを作成しています。このマウスは蛍光を示す凝集体を形成します。以上のマウスの他に数種類の線条体の特異ニューロンに蛍光蛋白質発現するトランスジェニックマウスを導入しています。これらを用いて線条体のプロジェクションニューロンや他のニューロンをセルソーターによって分離し、特異的に発現する遺伝子をmicroarrayにより同定、またハンチントン病モデルマウスとの掛け合わせにより、これらのニューロン特異的变化を同定する予定です。また同定された遺伝子のヒトの線条体病変を持つ疾患における変化についても検討したいと考えています。これによりニューロサーキットパノロジー創成の一翼を担いたいと思っています。

1. Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y. & Nukina, N. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nature biotechnology* **28**, 256-263 (2010).
2. Yamanaka, T., Tosaki, A., Miyazaki, H., Kurosawa, M., Furukawa, Y., Yamada, M. & Nukina, N. Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction. *Hum Mol Genet* **19**, 2099-2112 (2010).
3. Yamanaka, T., Miyazaki, H., Oyama, F., Kurosawa, M., Washizu, C., Doi, H. & Nukina, N. Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor. *Embo J* **27**, 827-839 (2008).
4. Miyazaki, H., Oyama, F., Wong, H.K., Kaneko, K., Sakurai, T., Tamaoka, A. & Nukina, N. BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* **361**, 43-48 (2007).
5. Oyama, F., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Becquet, C., Machida, Y., Kaneko, K., Uchikawa, C., Suzuki, T., Kurosawa, M., Ikeda, T., Tamaoka, A., Sakurai, T. & Nukina, N. Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem* **98**, 518-529 (2006).



$\beta 4$ promoter-Venus トランスジェニックマウス (左) : HD マウスとの double transgenic で内在性の $\beta 4$ と同程度に Venus の発現が落ちる (右)



運動ニューロン疾患におけるニューロサーキット変性の病態解明と治療法開発

勝野 雅央

(名古屋大学・大学院医学系研究科神経内科・特任准教授)

計画 A02

成人発症の神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) では、いずれも随意運動に関わるニューロサーキットが選択的に障害されるが、その分子基盤は明らかにされておらず、神経変性に対する根本治療法は見出されていない。ALS の 9 割は孤発性であり、その病態は十分に解明されていないが、運動ニューロンにおける TDP-43 の細胞質内凝集が孤発例における神経変性に関与していると考えられている。SBMA はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子における CAG 繰り返し配列の異常延長を原因とするポリグルタミン病のひとつで、男性のみに発症する下位運動ニューロン疾患である。これまで研究代表者らは、モデルマウスの解析から変異 AR が男性ホルモン依存的に核内集積することを明らかにし、LHRH アナログ (リュープロレリン) 投与による男性ホルモンの低下が変異 AR の核内集積を阻害し神経変性を抑制することを明らかにした^{1,2)}。さらに、男性ホルモン低下療法のトランスレーショナルリサーチを進めるべく臨床試験を行い、SBMA 患者においてもリュープロレリンにより陰嚢皮膚における変異 AR の核内集積が有意に抑制され、血清 CK も有意に減少することを明らかにした³⁾。また、リュープロレリン投与を受けた SBMA 患者の剖検標本を検討したところ、橋・頸髄においても変異 AR の核内集積が低下していることが示唆された。さらに、200 例の SBMA 患者を対象とした多施設共同医師主導治験では、罹病期間が短い患者における本治療法の嚥下機能に対する進行抑制効果を示唆する結果を得た⁴⁾。一方、SBMA モデルマウスにおける運動ニューロン変性の分子機構として、軸索モーター蛋白質 dynactin 1 の発現低下による逆行性軸索輸送の障害や TGF-beta の受容体 (TbRII) 遺伝子の転写障害による TGF-beta のシグナル異常を明らかにしてきた⁵⁾。運動ニューロンにおける dynactin 1 の発現低下や TGF-beta のシグナル異常は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 剖検例の病理学的解析においても報告されており、SBMA と ALS における運動ニューロン変性の分子機構に深く寄与している可能性があると考えられる。本研究では、両疾患に共通する神経変性の分子経路を解明することにより神経変性疾患における選択的な神経細胞死のメカニズムを標的とした根本治療法の開発を進めることを目的としている。とくに、TGF-beta およびその他の細胞内シグナルの異常が神経細胞の変性を惹起するメカニズムを分子レベルで解明し、こうしたシグナル異常がどのように選択的ニューロサーキット変性に繋がるかについて解析するとともに、分子標的治療法の開発を進める。

1. Katsuno, M., Adachi, H., Kume, A., Li, M., Nakagomi, Y., Niwa, H., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M. & Sobue, G. Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular

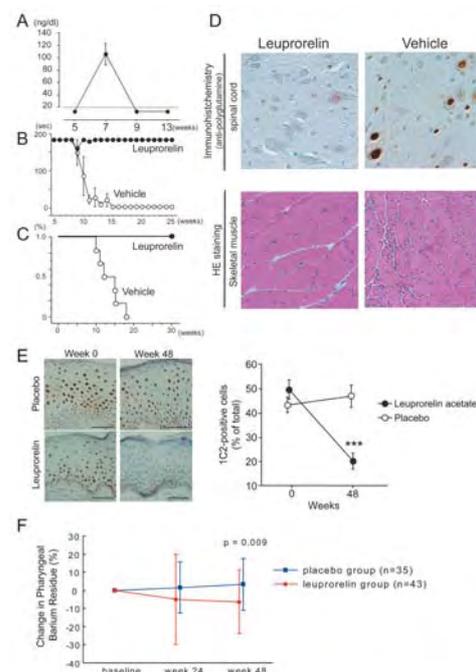
atrophy. *Neuron* **35**, 843-854 (2002).

2. Katsuno, M., Adachi, H., Doyu, M., Minamiyama, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Inukai, A. & Sobue, G. Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Med.* **9**, 768-773 (2003).

3. Banno, H., Katsuno, M., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Kawashima, M., Suga, N., Takamori, M., Ito, M., Nakamura, T., Matsuo, K., Yamada, S., Oki, Y., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Atsuta, N., Watanabe, H., Fujimoto, Y., Nakashima, T., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol.* **65**, 140-150 (2009).

4. Katsuno, M., Banno, H., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Kawashima, M., Yabe, I., Sasaki, H., Aoki, M., Morita, M., Nakano, I., Kanai, K., Ito, S., Ishikawa, K., Mizusawa, H., Yamamoto, T., Tsuji, S., Hasegawa, K., Shimohata, T., Nishizawa, M., Miyajima, H., Kanda, F., Watanabe, Y., Nakashima, K., Tsujino, A., Yamashita, T., Uchino, M., Fujimoto, Y., Tanaka, F. & Sobue, G. for the Japan SBMA Interventional Trial for TAP-144-SR (JASMITT) study group. Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* **9**, 875-884 (2010).

5. Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Doi, H., Kondo, N., Mizoguchi, H., Nitta, A., Yamada, K., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F. & Sobue, G. Disrupted TGF-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurosci.* **30**, 5702-5712 (2010).



球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) に対するトランスレーショナルリサーチ
リュープロレリンの SBMA マウスにおける効果 (A-D) および臨床試験に
おける有効性 (E, F) 引用文献 2,3,4 の改変



晩発性パーキンソン病原因遺伝子産物タンパク質ネットワークの包括的解析

今居 譲

(順天堂大学大学院医学研究科・先任准教授)

公募 A02

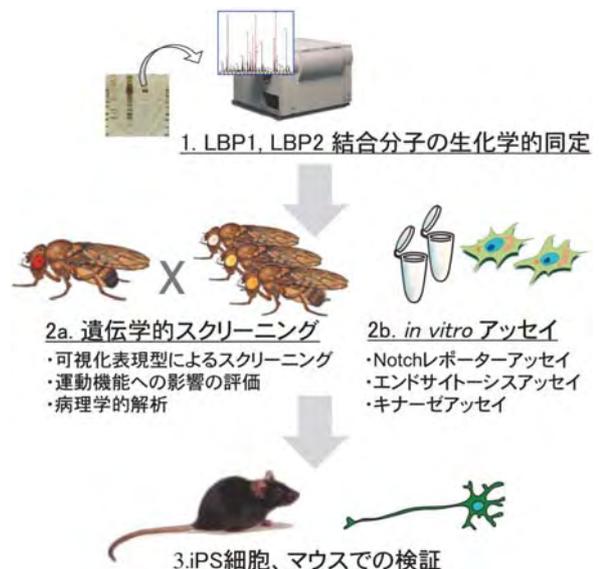
パーキンソン病原因遺伝子産物 LRRK2 タンパク質は、分子内に small GTPase ドメインやキナーゼドメインなどの複雑な領域構造を有している。LRRK2 はエンドソームに局在し、軸索の維持、シナプス小胞の Rab5 依存的なエンドサイトーシス、オートファジーの制御に関与することが示唆されているが、その分子メカニズムや基質は明らかとなっていない。本タンパク質の変異を原因とするパーキンソン病は、孤発性パーキンソン病病理の典型的な特徴を示すことから、LRRK2 シグナルの異常が本疾患の病理メカニズムの根幹を成すと予想される。LRRK2 遺伝子内には疾患にリンクする複数種類のミスセンス変異が見つかったが、本疾患が優性遺伝することからこれらの変異は機能獲得変異であることが想定されている。さらに、そのうちの少なくとも幾つかの疾患型変異はキナーゼ活性が亢進しており、LRRK2 のキナーゼ基質を明らかにすることは疾患の発症メカニズムを理解する上で重要な意味をもつ^{1,2)}。しかし、神経変性が顕在化するまでに長期間を要するため、加齢を加味した実験系における解析が必要となる^{2,3)}。

我々は LRRK2 の生理的・病理的役割を明らかにする糸口として、LRRK2 結合分子の網羅的な同定作業とショウジョウバエ分子遺伝学⁴⁾、*in vitro* アッセイを組み合わせたスクリーニング(多面的スクリーニング)にて選別し⁵⁾、LRRK2-binding protein 1 (LBP1) と LBP2 を有意な分子として絞ることに成功している。LBP1 は HECT 型のユビキチンリガーゼ、LBP2 はアダプター分子であると考えられるが、その生理的役割は不明である。生化学的結合解析により、LBP1 は LBP2 を介して LRRK2 に結合することが明らかになった。さらに、LRRK2, LBP1, LBP2 は、培養細胞において小胞輸送に関わる small GTPase Rab7 陽性のエンドソームに共局在することを見出している。一方ショウジョウバエにおいて Rab7, Notch シグナル関連分子と LRRK2, LBP1, LBP2 との間に遺伝的相互作用を観察している。Rab7 はエンドソームの機能を制御し、Notch シグナルはエンドサイトーシスやエンドソームの機能に大きく依存するシグナル伝達経路であることから、LRRK2, LBP1, LBP2 はエンドソームにおいて、Notch シグナルを調節している可能性が考えられた。実際培養細胞において、LBP1 は Notch 受容体のリガンドである Delta-like 1 (DLL1) に結合し、DLL1 をユビキチン化依存的に分解した。一方、LRRK2 は LBP2 と協調して、LBP1 による分解を抑制し、Notch シグナルを調節することが示唆された。しかし、LBP1, LBP2 は *in vitro* において、LRRK2 キナーゼの基質や調節因子とならないことを観察しており、基質や調節因子は別にあると考えられる。さらに LRRK2, LBP1, LBP2 は Notch シグナルのリガンド DLL1 の細胞内局在(エンドソームへの局在)と安定性を制御することが我々の予備実験から示唆されているが、この

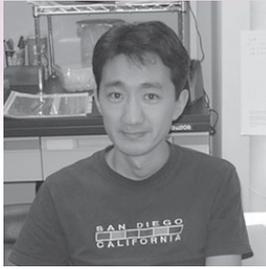
系における LRRK2 の役割は十分理解できていない。

本研究計画では、LBP1, LBP2 をプローブにして多面的スクリーニングを繰り返し適用し、LBP1, LBP2 結合タンパク質の中から、LRRK2 シグナルおよび病理に関与する分子を効率的に同定することを目指す。さらに同定した結合分子群および LRRK2 がどのようなメカニズムで Notch シグナルを修飾するかを、LRRK2 キナーゼ基質の同定を含め、分子レベルで包括的に明らかにする。

- Gehrke, S., Imai, Y., Sokol, N. & Lu, B. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* **466**, 637-641 (2010).
- Imai, Y., Gehrke, S., Wang, H.Q., Takahashi, R., Hasegawa, K., Oota, E. & Lu, B. Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *EMBO J* **27**, 2432-2443 (2008).
- Kanao, T., Venderova, K., Park, D.S., Unterman, T., Lu, B. & Imai, Y. Activation of FoxO by LRRK2 induces expression of proapoptotic proteins and alters survival of postmitotic dopaminergic neuron in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* **19**, 3747-3758 (2010).
- Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H. & Lu, B. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10793-10798 (2006).
- Imai, Y., Kanao, T., Sawada, T., Kobayashi, Y., Moriwaki, Y., Ishida, Y., Takeda, K., Ichijo, H., Lu, B. & Takahashi, R. The loss of PGAM5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of PINK1 in *Drosophila*. *PLoS Genet* **6**, e1001229 (2010).



スキームで示した多面的スクリーニングにより LRRK2 タンパク質ネットワークの全体像を明らかにする



ALSの診断と治療のための運動ニューロン変性のメカニズム解明

西頭 英起

(東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員)

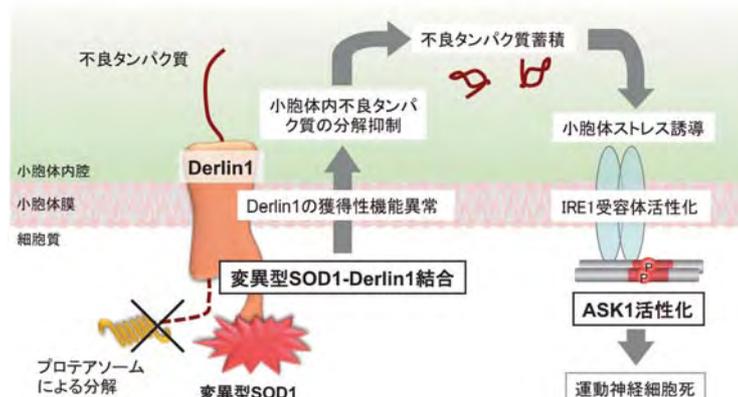
公募A02

細胞のストレスシグナル伝達を主な研究対象としており、現在はとくに、ストレス応答性MAPキナーゼを介したシグナル伝達ならびに小胞体ストレスと神経変性疾患との関係を中心に研究している¹⁻³⁾。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)発症は、運動ニューロンの選択的変性による。家族性ALSの原因としてSOD1遺伝子変異が発見されて以来、多くの研究がなされてきたが、未だ孤発性を含む全ALS病態を説明するメカニズムの解明には至っておらず、有効な治療法も存在しない。我々は、変異型SOD1に特異的に結合する分子として小胞体膜タンパク質Derlin-1を同定し、この結合により惹起される小胞体ストレスを介してストレス応答性MAPキナーゼASK1が活性化され⁴⁾、運動ニューロン死が惹起されることを報告してきた⁵⁾。その後、現在までに発見されている130種類の変異型SOD1のほとんどがDerlin-1に結合することが明らかとなり、上記分子メカニズムがSOD1遺伝子変異によるALS全てに共通することが示唆されている。さらに、ある種の細胞ストレスにより野生型SOD1もDerlin-1に結合し小胞体ストレスを惹起することを見いだしており、他の家族性・孤発性ALS病態においてもSOD1-Derlin-1結合が関与する可能性がある。従って、小胞体ストレスを介した運動ニューロン変性のメカニズム解明とそれに基づく治療薬は、広くALSの克服に繋がると期待される。一方、変異型SOD1が発揮する細胞毒性は、運動ニューロン自身の細胞自律性経路と、細胞非自律性経路すなわち運動ニューロン-支持細胞(アストロサイトやミクログリア)間あるいは運動ニューロン筋シナプス形成部での細胞間コミュニケーションの両方が、ALS病態発症に関与することが示唆されている。そこで本研究では、これまでの小胞体ストレスに関する知見をALS *in vitro*・*in vivo*モデル実験系に応

用発展させて、運動ニューロンを取り巻く細胞間コミュニケーションの中でどのようにニューロン毒性が発揮されるかを明らかにする。

1. Maruyama, T., Kadowaki, H., Okamoto, N., Nagai, A., Naguro, I., Matsuzawa, A., Shibuya, H., Tanaka, K., Murata, S., Takeda, K., Nishitoh, H. & Ichijo, H. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. *EMBO J* **29**, 2501-2514 (2010).
2. Iriyama, T., Takeda, K., Nakamura, H., Morimoto, Y., Kuroiwa, T., Mizukami, J., Umeda, T., Noguchi, T., Naguro, I., Nishitoh, H., Saegusa, K., Tobiume, K., Homma, T., Shimada, Y., Tsuda, H., Aiko, S., Imoto, I., Inazawa, J., Chida, K., Kamel, Y., Kozuma, S., Taketani, Y., Matsuzawa, A. & Ichijo, H. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J* **28**, 843-853 (2009).
3. Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. & Ichijo, H. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* **6**, 587-592 (2005).
4. Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. & Ichijo, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* **16**, 1345-1355 (2002).
5. Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K. & Ichijo, H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* **22**, 1451-1464 (2008).



変異型SOD1が小胞体膜分子Derlin-1に結合した結果、小胞体ストレスが誘導され運動神経細胞死が惹起される



ALS サルモデル、患者サンプルを用いた TDP-43 病態の検索

横田 隆徳

(東京医科歯科大学・医歯薬・教授)

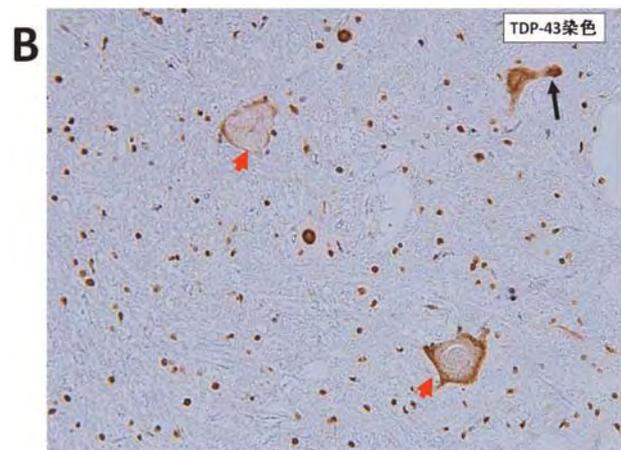
公募 A02

カニクイザルの頸髄前角にアデノ随伴ウイルスベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させることにより、進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43 蛋白の細胞質への異常局在と凝集体形成および核の染色性低下という孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 類似の病理変化の再現に成功した。実際の ALS 患者脳脊髄での検索では、死後変化のため正常コントロールの TDP-43 蛋白発現量にばらつきがあり、一定の結果を得られなかったが、孤発性 ALS の生検皮膚の表皮細胞の核で、TDP-43 発現が亢進していることが明らかになった。以上から孤発性 ALS は全身で核の TDP-43 発現が増加して、病態の一義的な原因になっている作業仮説を立てた。そこで、本研究では、孤発性 ALS 患者の生検皮膚の TDP-43 の分子病態を生化学的、分子生物学的に詳細に行い、孤発性 ALS 患者生検皮膚、正常ヒト対照生検皮膚の mRNA 発現アレイや miRNA アレイ、profiling を作製して、TDP-43 過剰発現サルの脊髄と比較することにより ALS の運動神経の選択性の機序および ALS の病態の本態にせまる。

孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンの細胞質に認められる不溶性蛋白質凝集体の主成分として、核蛋白である TDP-43 が同定され、さらに変異 TDP-43 遺伝子が常染色体優性遺伝性家族性 ALS の原因遺伝子であることが明らかになった。しかし、孤発性 ALS の病因における野生型の TDP-43 の役割は明らかでない。カニクイザル (4-10 歳♂) 3 頭で椎弓切除して利き手側の第 6 頸髄一側の前角付近に Flag でラベルしたヒト野生型 TDP-43 発現 AAV1 (1 x 10¹²-13 vg/ml, 5 μl) を注入すると、注入後 2 週-6 週後から注入側の前肢に進行性の運動麻痺、筋萎縮が生じ、4-8 週後に重度の運動麻痺、手指は完全麻痺となった。頸髄 C6 前根は大径線維の激しい軸索変性像を、上腕二頭筋は小角化線維の散在の変化を示した。電気生理学的に手関節部正中神経刺激による短拇指外転筋 (APB) の誘発筋複合電位 (CMAP) は徐々に低下して 4-8 週後には 3 頭全例で CMAP は全く導出されなくなった。病理学的には、TDP-43 蛋白の発現は C2 から Th2 までの前角広範に及び、発現した野生型 TDP-43 蛋白は前角細胞の外側核の多く細胞質に異常分布し、その神経細胞では核の内因性 TDP-43 蛋白の染色性はほぼ消失していた (図)。一方、他の前角の神経細胞や後角の神経細胞では過剰発現 TDP-43 は核に局限していた。このことは、TDP-43 の過剰発現は alpha 神経細胞において異常局在を示し、機能異常を生じるが、他の神経細胞では過剰発現 TDP-43 が上昇しても機能異常を生じないことを示している。しかし、実際の ALS 脳で TDP-43 発現が亢進していることが明らかではない。一方、尾野らや我々は孤発性 ALS の皮膚では核の TDP-43 蛋白染色性が亢進していることを発見し、その発現率上昇が病期と関連することを示した (1-5)。このことから、孤発性 ALS に

おいて全身性に TDP-43 蛋白量の増加が孤発性 ALS の本態に関与する可能性を想定した。本研究では孤発性 ALS 患者の生検皮膚の免疫組織学および生化学的検索して、その TDP-43 病態を明らかにし、TDP-43 過剰発現の脊髄の発現分子 profiling と比較検討することにより、孤発性 ALS の分子病態における TDP-43 発現上昇病態との関連を明らかにし、運動神経選択性の分子基盤を検索する。

1. Suzuki, M., Mikami, H., Watanabe, T., Yamano, T., Yamazaki, T., Nomura, M., Yasui, K., Ishikawa, H. & Ono, S. Increased expression of TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* **122**, 367-372 (2010).
2. Sasaguri, H., Mitani, T., Anzai, M., Kubodera, T., Saito, Y., Yamada, H., Mizusawa, H. & Yokota, T. Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice. *FEBS Lett* **583**, 213-218 (2009).
3. Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C.F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., Bredesen, D.E. & Volterra, A. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* **15**, 1691-1700 (2008).
4. Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K. & Ichijo, H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* **22**, 1451-1464 (2008).
5. Yokota, T., Saito, Y., Mitani, T., Anzai, M., Miyagishi, M., Taira, K. & Mizusawa, H. Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* **280**, 42826-42830 (2005).



C6 頸髄前角 TDP-43 染色 :

TDP-43 が細胞質に発現した前角細胞では核での内因性 TDP-43 の発現が消失している (赤矢印)
時に変性突起 (DNs) を認め、TDP-43 の沈着を認める (黒矢印)



遺伝性パーキンソン病動物モデルに基づく 選択的ドーパミン神経変性のメカニズムの解明

高橋 良輔

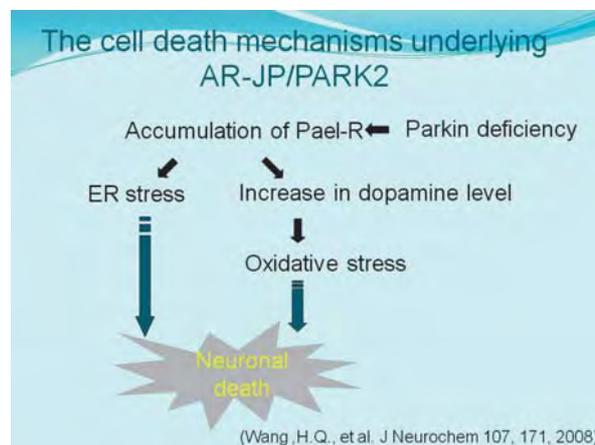
(京都大学大学院医学研究科臨床神経学・教授)

公募 A02

これまで私たちは、パーキンソン病 (PD) 1,2,5)と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 3)における神経変性メカニズム、及びアポトーシス阻害タンパク質とその制御を中心とする細胞死メカニズム 4) に興味を持ち、研究を行ってきました。本研究班では PD を中心にサーキットバソロジーの解明に取り組みたいと思っています。PD に関しては、私たちは常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP/PARK2) の病因遺伝子 Parkin がユビキチンリガーゼであること、またその基質のひとつである Pael-R の蓄積による小胞体ストレスが細胞死に深く関わることをショウジョウバエやマウスの遺伝子改変モデルの作成を通じて示してきました 5)。しかし実際のヒトの孤発性 PD の成因には、遺伝要因と環境要因を介して、小胞体ストレス、酸化ストレス、ミトコンドリア機能低下、タンパク質分解系の障害、細胞骨格の異常等が複雑に絡み合っていると想像されます。またこのような複合病態が PD にみられるサーキット選択的神経変性の基盤を形成すると考えています。このような仮説のもと、主として遺伝性 PD のモデル動物を用いて、黒質線条体経路の系統変性のメカニズムに迫りたいと思っています。私たちは常染色体劣性遺伝性 PD の病因遺伝子 Parkin, PINK1, ATP13A2 のノックアウトメダカを TILLING 法を用い、世界に先駆けて開発しました。このうち、Parkin/PINK1 の二重ノックアウトメダカ、及び ATP13A2 のノックアウトメダカは加齢とともにドーパミン神経変性を示すことから、これらの PD メダカモデルで選択的ドーパミン神経変性の分子メカニズムを探索します。一方常染色体優性遺伝性 PD の原因遺伝子である α -シヌクレインは PD の病理学的特徴である神経細胞質封入体、レビー小体の主成分であるばかりでなく、孤発性 PD の遺伝的リスクであ

ることも示され、PD の病因に最も近い分子と考えられています。私たちは α -シヌクレインの遺伝子調節領域を含む BAC クローンを導入したトランスジェニックマウスを作成しました。このマウスでは α -シヌクレインの発現が本来の組織分布を示します。このマウスに遺伝子操作によって、慢性的に酸化ストレスを加え、異常タンパク質蓄積と酸化ストレスの相互作用による PD の系統特異的変性の再現をめざします。この新規 PD モデルマウスがヒトの PD 同様の運動症状・非運動症状を発現し、新たな創薬研究のツールとなることを期待しています。

1. Egawa, N., Yamamoto, K., Inoue, H., Hikawa, R., Nishi, K., Mori, K. & Takahashi, R. The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6alpha, protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J Biol Chem* **286**, 7947-7957 (2011).
2. Matsui, H., Ito, H., Taniguchi, Y., Inoue, H., Takeda, S. & Takahashi, R. Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson's disease. *J Neurochem* **115**, 178-187 (2010).
3. Inoue, H., Tsukita, K., Iwasato, T., Suzuki, Y., Tomioka, M., Tateno, M., Nagao, M., Kawata, A., Saïdo, T.C., Miura, M., Misawa, H., Itohara, S. & Takahashi, R. The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *Embo J* **22**, 6665-6674 (2003).
4. Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. & Takahashi, R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**, 613-621 (2001).
5. Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. & Takahashi, R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**, 891-902 (2001).



PARK2 では小胞体ストレスと酸化ストレスの複合病態でドーパミン神経選択的細胞死が生じるとの仮説



運動障害と認知障害を切り分けるパーキンソン病のサーキットパソロジー

高田 昌彦

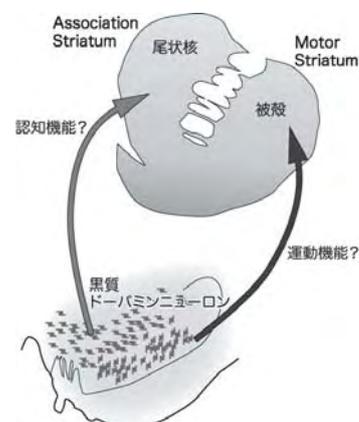
(京都大学・霊長類研究所・教授)

公募 A02

黒質線条体ドーパミン神経路には、その局在性に基づいて運動機能に関するサーキットと認知機能に関するサーキットが個別に存在すると考えられる。すなわち、黒質の外側部から被殻の後方部に投射する神経路は運動機能に、黒質の内側部から被殻の前方部や尾状核に投射する神経路は認知機能に重要な役割を果たしている¹⁾。しかしながら、このような黒質線条体ドーパミン神経路の機能局在を基盤とするサーキット選択性によってもたらされるパーキンソン病の病態（相違と共通性）については、これまでほとんど調べられていない。本研究では、独自に開発した逆行性感染型レンチウイルスベクター（逆行性LVベクター）²⁾とアデノ随伴ウイルスベクター（AAVベクター）を組み合わせて、Cre-loxPシステムを利用した遺伝子導入技術により、運動障害と認知障害を切り分けることができるパーキンソン病の霊長類モデルを作成し、そのサーキットパソロジーを明らかにすることを目的とする。具体的には、逆行性LVベクターにCreリコンビナーゼ遺伝子を組み込んだベクターとAAVベクターにloxPコンポーネントを組み込んだベクターの多重感染による部位特異的組換え反応を利用して、黒質ドーパミンニューロンに細胞死を誘導するような機能分子を発現させる。本研究では、黒質ドーパミンニューロンを特異的に変性・脱落させる機能分子として α -synuclein³⁾やLRRK2 (leucine-rich repeat kinase-2)^{4,5)}を用いる。これらの分子は、それぞれPARK 1とPARK 8と分類されている優性遺伝を示す家族性パーキンソン病の原因遺伝子であり、ドーパミンニューロンに異常蓄積し、その変性・脱落を誘導することが知られている。本研究計画では、wild-type human α -synucleinに加えて、A30PとA53Pのdouble-mutated α -synucleinなどの変異型 α -synucleinを用いる。また、 α -synucleinとLRRK2を共発現するAAVベクターの開発についても検討する。すなわち、黒質線条体ドーパミン神経路の局在性に基づいてドーパミンニューロンに α -synucleinやLRRK2を過剰発現させることにより、黒質の外側部から被殻の後方部に投射する神経路と、黒質の内側部から被殻の前方部や尾状核に投射する神経路をそれぞれ選択的に除去したパーキンソン病のモデルザルを作成する。これらのモデルザルにおいて運動課題と認知課題の遂行能力をテストし、運動機能と認知機能の脱落の程度を行動学的に解析する。また、PETイメージングによるドーパミントランスポーターの分布動態や、免疫組織化学染色によるドーパミンニューロンの変性・脱落や封入体形成などの神経病理を検討し、黒質線条体ドーパミン神経路の病態を評価する。研究代表者らはすでに、組換え体AAVベクターの黒質注入によってwild-type human α -synucleinをドーパミンニューロンに過剰発現させ、パーキンソン病様の運動障害を発症する霊長類モデル

ザルをカニクイザルにおいて作出することに成功している。本研究では、そのことをさらに発展させ、黒質線条体ドーパミン神経路をその局在性に基づいて選択的に除去したモデルザルを用いて、運動障害と認知障害を切り分けるパーキンソン病のサーキットパソロジーを解明することにより、新たな病態分類と疾患治療の基本戦略に寄与できると考える。

1. Haber, S.N., Fudge, J.L. & McFarland, N.R. Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J. Neurosci.* **20**, 2369-2382 (2000).
2. Kato, S., Kobayashi, K., Inoue, K., Kuramochi, M., Okada, T., Yaginuma, H., Morimoto, K., Shimada, T., Takada, M. & Kobayashi, K. *Hum. Gene Ther.* **22**, 197-206 (2011).
3. Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. & Nussbaum, R.L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045-2047 (1997).
4. Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J.R., Nicholl, D., Carrera, I.M., Pena, A.S., de Silva, R., Lees, A., Marti-Masso, J.F., Perez-Tur, J., Wood, N.W. & Singleton, A.B. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* **44**, 595-600 (2004).
5. Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., Stoessl, A.J., Pfeiffer, R.F., Patenge, N., Carbajal, I.C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Myhersok, B., Dickson, D.W., Meitinger, T., Strom, T.M., Wszolek, Z.K. & Gasser, T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**, 601-607 (2004).



運動機能と認知機能にそれぞれ特異的に関与すると考えられる黒質線条体ドーパミン神経路の局在



シスタチンFを介するミクログリアーオリゴデンドロサイト クロストークと脱髄性疾患

池田 一裕

(自然科学研究機構・生理学研究所・教授)

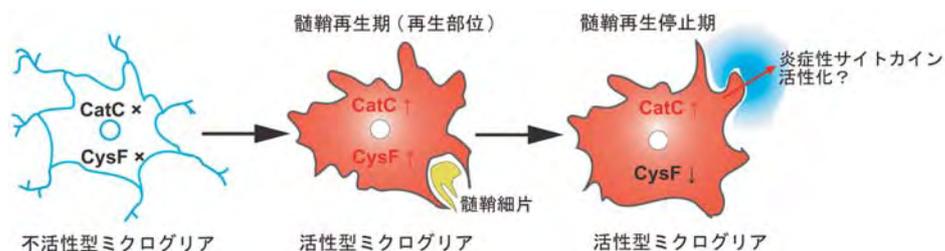
公募A02

多発性硬化症などの脱髄性疾患においては全てのニューロンサーキットにおいて脱髄が起きるのではなく、時期・領域特異性を持って発症してくる。また、脱髄モデル動物においても広範囲に脱髄が生じるものもあれば、サーキット特異的に生じるものもある。本研究は脱髄のサーキット特異性がどのようにして引き起こされるのかを明らかにする。中枢神経系髄鞘は再生可能なオリゴデンドロサイト(OL)が形成するため、髄鞘は変性・脱落しても再生が起り、軸索は裸にならない。この髄鞘再生時に神経症状は少ないが、脱髄後期になると再生が障害され、軸索が裸になる。(慢性脱髄巣の形成)この時期になると重篤な神経症状が現れる。われわれは各種脱髄モデルやヒト多発性硬化症においてミクログリアがシスタチンF(CysF)という因子を発現している間のみ髄鞘が再生しており、慢性脱髄巣においてはCysF発現が消失することを明らかにした(Ma et al, 2011)。この結果は、ミクログリアの性質変化が髄鞘再生を調節していることを示唆する。CysFは炎症性サイトカイン産生を触媒するカテプシンC(CatC)を阻害するが、CatC発現も髄鞘変性時に中枢神経系ミクログリアに誘導される。重要なことはCatC発現がCysF発現より長く残ることであり、CatCだけが発現している時期にCatC活性が強くなるのが予想される。CatCはIL1 β やTNF α の産生に関与するため、CysF発現の消失はこのようなサイトカインの産生を高める可能性がある。本研究においてはCysFおよびCatCの発現を自由に操作できるマウス(すでに作製済み)を用いて、CysF発現を介したミクログリアによる髄鞘再生調節機構を明らかにする。脱髄モデルマウスとしては、ミエリン蛋白質であるプロテオリピド蛋白質(PLP)遺伝子の過剰発現マウス(PLPtgマウス、Kagawa et al, Neuron 1994:すべての有髄線維が脱髄にいたる)、銅キレート剤のキュブリゾンを経口投与することによって作成するキュブリゾン脱髄モデルマウス(全身投与であるにもかかわらず選択的に脳梁中央部と小脳脚だけに限局して脱髄が起こる)、更に別の脱髄モデル

マウス、MOGペプチド誘導性実験的アレルギー性脳脊髄炎(MOG-EAE)マウス(病巣は限局しているがランダムに出現する)を用いる。これら多様な脱髄モデルマウスを用い、ミクログリアにおけるCysFおよびCatC遺伝子発現レベルを調節(ノックダウンや過剰発現)することによって、ミクログリアの脱髄における役割と脱髄のサーキット特異性を明らかにする。

本研究を通して、CysFの発現増加やCatC発現減少により脱髄抑制効果が観察された場合、CatC活性は合成化学物質で抑制することも可能であるため、脱髄性疾患における新たな治療法の開発につながる。

1. Ma, J., Tanaka, K.F., Shimizu, T., Bernard, C.C., Kakita, A., Takahashi, H., Pfeiffer, S.E. & Ikenaka, K. Microglial cystatin F expression is a sensitive indicator for ongoing demyelination with concurrent remyelination. *J. Neurosci. Res.* **89**, 639-649 (2011).
2. Espinosa-Jeffrey, A., Hitoshi, S., Zhao, P., Awosika, O., Agbo, C., Olaniyan, E., Garcia, J., Valera, R., Thomassian, A., Chang-Wei, R., Yamaguchi, M., de Vellis, J. & Ikenaka, K. Functional central nervous system myelin repair in an adult mouse model of demyelination caused by proteolipid protein overexpression. *J. Neurosci. Res.* **88**, 1682-1694 (2010).
3. Tanaka, K.F., Ahmari, S.E., Leonardo, E.D., Richardson-Jones, J.W., Budreck, E.C., Scheiffele, P., Sugio, S., Inamura, N., Ikenaka, K. & Hen, R. FAST (Flexible Accelerated STOP TetO-knockin): a versatile and efficient new gene modulating system. *Biol. Psychiatry* **67**, 770-773 (2010).
4. Tanaka, H., Ma, J., Tanaka, K.F., Takao, K., Komada, M., Tanda, K., Suzuki, A., Ishibashi, T., Baba, H., Isa, T., Shigemoto, R., Ono, K., Miyakawa, T. & Ikenaka, K. Mice with altered myelin proteolipid protein gene expression display cognitive deficits accompanied by abnormal neuron-glia interactions and decreased conduction velocities. *J. Neurosci.* **29**, 8363-8371 (2009).
5. Kagawa, T., Ikenaka, K., Inoue, Y., Kuriyama, S., Tsujii, T., Nakao, J., Nakajima, K., Aruga, J., Okano, H. & Mikoshiba, K. Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene. *Neuron* **13**, 427-442 (1994).



CatC と CysF が髄鞘再生期に発現し、髄鞘再生停止期には CatC の発現のみが残り、炎症性サイトカインが活性化するか？



可逆的神経伝達阻止法を用いた 大脳基底核ニューロサーキットパソロジーの解析

Endo Takashi

(財団法人 大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門・研究員)

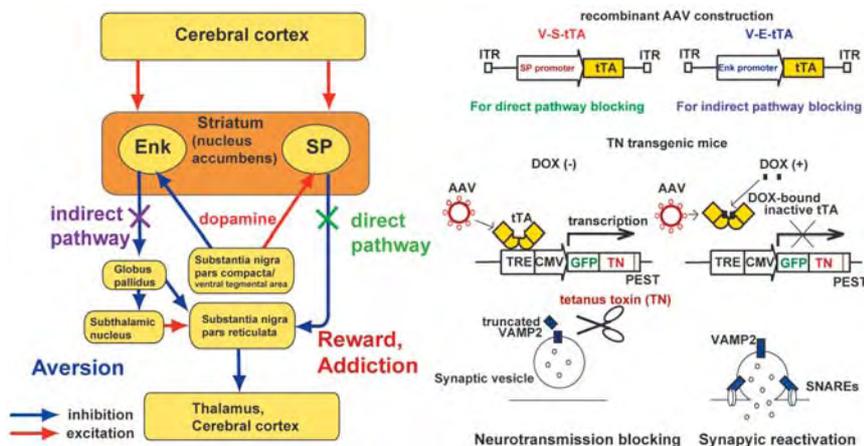
公募 A02

大脳基底核は運動機能のみならず、報酬・忌避行動、認知機能、社会・精神活動などの高次機能を司る。大脳基底核神経回路に特異的な神経変性疾患により障害を受けると、ハンチントン病、パーキンソン病といった運動障害を引き起こす神経難病を発症する。また、薬物依存症、統合失調症などの精神疾患や認知障害に深く関与している。大脳基底核の神経回路網は大脳皮質－線条体（線条体前部の側坐核）－黒質網様部－視床の神経経路で形成され、さらに海馬体や扁桃体から記憶や情動の情報入力を受ける。大脳基底核は黒質緻密部及び腹側被蓋野からのドーパミンによって制御を受け、パーキンソン病はドーパミンの枯渇によって、また薬物依存症はドーパミンの異常亢進によって誘発され、精神神経疾患を理解する上でも重要な脳部位である。私たちはイムノトキシン標的細胞破壊法を用いて、運動制御・報酬行動・薬物依存症における線条体局所神経回路の制御機構を解析してきた¹⁻⁴。しかしながら大脳基底核の主要な神経回路である線条体から黒質への直接路と間接路の2つの伝達経路のこれらの機能に対する役割については、それぞれの経路の線条体細胞が形態学的に同一であるために2つの経路を介した基底核神経回路の制御機構の多くが不明であった。

そこで私たちは大脳基底核神経回路の新規な研究法として、直接路と間接路のそれぞれに特異的な可逆的神経伝達阻止法（Reversible Neurotransmission Blocking; RNB法）を開発した⁵。私たちは直接路と間接路に特異的なプロモーターを用いて破傷風菌毒素をテトラサイクリン依存的に特異的に発現させ、直接路と間接路の伝達を選択的かつ可逆的に完全に遮断できるモデルマウスを作製した。この結果、直接路は報酬行動及び薬物依存形成を支配する伝達経路であり、一方間接路は忌避行動を支配する伝達経路であ

ることを明らかにし、大脳基底核ニューロサーキットの制御に関して全く新しい原理を示した⁵。本研究において、パーキンソン病、薬物依存症、PTSD、うつ病、統合失調症の各精神神経疾患モデルにRNB法を導入し、精神神経疾患病態における大脳基底核神経回路の直接路と間接路の役割を解析することによって、精神神経疾患の大脳基底核ニューロサーキットパソロジーを明らかにする。特に、神経回路特異的な分子病態を明らかにし、薬理的解析を行うことによって、ニューロサーキットパソロジーに即した治療法の開発につなげたい。近年、脳深部刺激法を筆頭に神経回路を標的とした治療法がパーキンソン病から薬物依存症やうつ病にその適応を広げており、精神疾患のニューロサーキットパソロジーは新しいトランスレーショナルリサーチに展開できると考えられる。

1. Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kreitman, R.J., Pastan, I. & Nakanishi, S. Synaptic Integration Mediated by Striatal Cholinergic Interneurons in Basal Ganglia Function. *Science* **289**, 633-637 (2000).
2. Hikida, T., Kaneko, S., Isobe, T., Kitabatake, Y., Watanabe, D., Pastan, I. & Nakanishi, S. Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 13351-13354 (2001).
3. Hikida, T., Kitabatake, Y., Pastan, I. & Nakanishi, S. Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6169-6173 (2003).
4. Kitabatake, Y., Hikida, T., Watanabe, D., Pastan, I. & Nakanishi, S. Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 7965-7970 (2003).
5. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. & Nakanishi, S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* **66**, 896-907 (2010).



大脳基底核ニューロサーキット（左）と、その直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法（右）



神経-グリアネットワーク変調が来す運動神経変性機序の 解明

山中 宏二

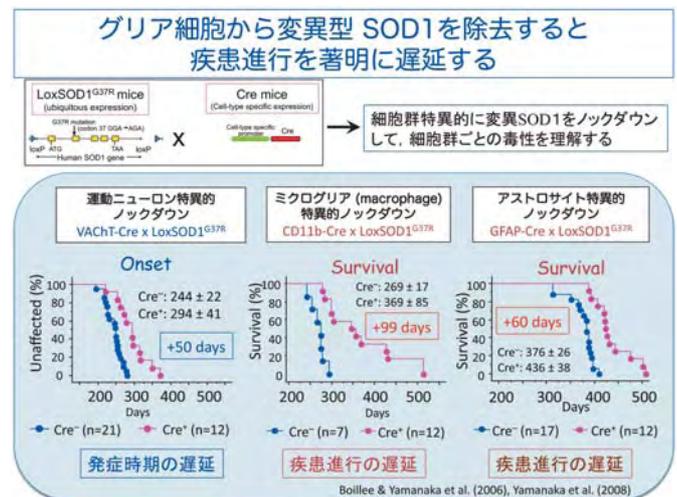
(理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー)

公募 A02

神経変性疾患の病態解明において、神経細胞だけではなく、神経系を構成する各細胞群別の分子病態の理解を深めることの重要性が広く認識されてきている。これまでに私たちの研究グループでは、運動神経の変性を特徴とする遺伝性筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルを用いて、神経変性に対する神経系の細胞群ごとの役割を *in vivo* で解析してきた。優性遺伝性 ALS の原因遺伝子である SOD1 遺伝子変異を全身に発現するマウスは、ALS でみられる運動神経特異的な神経変性を再現する。私たちはそれを応用して、Cre-lox システムを用いて変異 SOD1 を細胞群ごとにノックダウンできる新規モデルマウスを樹立して、運動神経における変異 SOD1 毒性は ALS の発症時期を、ミクログリア、アストロサイトにおける変異 SOD1 毒性は ALS の進行速度を規定することを見いだしてきた^{1,2)}。この実験系は Cre マウスの細胞群特異性に依存するものの、あらゆる細胞群の関与をテストできる優位性を有する。この他に、シュワン細胞や骨格筋の関与の検討も行ったが、これらの細胞群に発現する変異 SOD1 を除去してもモデルマウスの発症時期や進行速度は改善しなかった^{3,4)}。これら一連の研究を通じて、ALS の疾患進行にはグリア細胞の病的変化が深く関与し、ALS における神経細胞死は非細胞自律性(神経変性は神経細胞に起因する病的変化のみで自律性に起こるわけではなく非神経細胞由来の病的変化も必要である)の機序で起こりうるということが明らかとなった⁵⁾。

これらの研究結果に立脚して、本研究では、疾患進行に
関与するグリア細胞であるミクログリアの分子病態解明と
その応答調節を標的とした実験的治療研究を行う。末梢マ
クロファージと同様に、近年神経系においてもミクログリ
ア活性化は、細胞障害性(M1)と組織保護的(M2)の両面性
があると考えられつつある。M1 microglia は、TNF α などの
サイトカイン、活性酸素、NO など細胞傷害性分子の放出
を特徴とする細胞傷害性の活性化グリアとして従来から
知られている population であるが、M2 microglia は、IL-
4 や TGF β などにより誘導され、神経栄養因子放出、炎症
の軽減などの表現型が知られている。そこで、ALS モデル
においてこれらの炎症関連分子の発現解析を行うとともに、
TGF β などをを用いてミクログリアの活性調節を M2 に
誘導させ、神経細胞周囲の環境を細胞保護的に変化させる
ことを通じて、神経変性が遅延するかどうか検証する。本
研究課題によるグリア細胞応答機構の変調に着目した神経
変性疾患の病態解明を領域内の他の神経変性疾患の理解に
応用し、領域目標に貢献して行きたい。

2. Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H. & Cleveland, D.W. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* **11**, 251-253 (2008).
3. Lobsiger, C.S., Boillee, S., McAlonis-Downes, M., Khan, A.M., Feltri, M.L., Yamanaka, K. & Cleveland, D.W. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4465-4470 (2009).
4. Miller, T.M., Kim, S.H., Yamanaka, K., Hester, M., Umapathi, P., Arnsen, H., Rizo, L., Mendell, J.R., Gage, F.H., Cleveland, D.W. & Kaspar, B.K. Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19546-19551 (2006).
5. Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E.A., Garcia, M.L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O.R., Cleveland, D.W. & Goldstein, L.S. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7594-7599 (2008).



運動神経とグリア細胞における変異 SOD1 毒性は、ALS マウスの発症時期と進行速度をそれぞれ規定する

1. Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G. & Cleveland, D.W. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* **312**, 1389-1392 (2006).



広汎性発達障害モデルマウスを用いた発症メカニズムの解明

定方 哲史

(群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教)

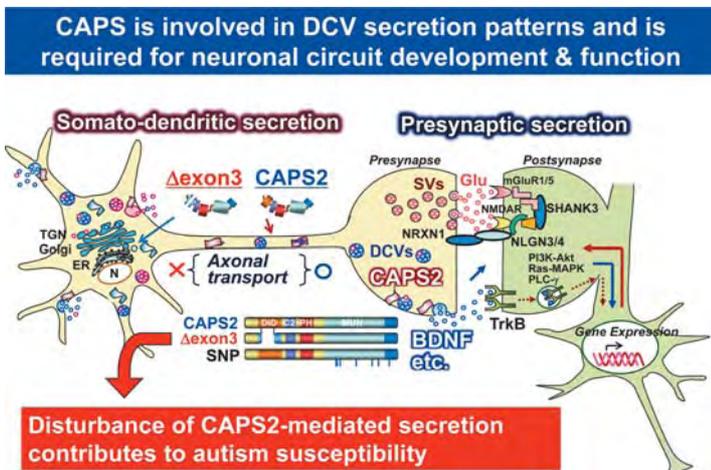
公募 A02

自閉症は、三歳までに発病する精神疾患として知られ、“対人関係における障害”、“言語などによるコミュニケーションの障害”、“興味の限局、反復的で常同的な行動”を特徴とした疾患である。私は CAPS2 遺伝子を、分泌顆粒の分泌に関与する CAPS1 の新規ホモログとしてクローニングし、小脳において BDNF を含む顆粒の分泌に関与していることなどを明らかにしてきた^{1,2)}。CAPS2 遺伝子はヒト7番染色体長腕部にある自閉症責任領域 (AUTS1) に位置しているため、作製した CAPS2 KO マウスの行動解析を行った。その結果、社会性行動の異常、母性行動の異常、多動、新奇環境への適応力の低下、小脳 VI, VII 葉の低形成、ブルキンエ細胞の減少が見られ、自閉症で見られるような様々な形質を示すことが明らかになった。そこで、ヒト自閉症患者の血中における CAPS2 の発現を解析したところ、自閉症患者特異的に CAPS2 の exon3 がスキップしていることが分かった。この exon3 がスキップした欠損型 CAPS2 は、シナプス部に輸送されなくなるなどが判明した。これらの結果から、欠損型 CAPS2 の発現によって BDNF の局所的分泌が異常になり、これが神経ネットワークの形成異常につながる可能性が示唆された (図)³⁻⁵⁾。

私は CAPS2 exon 3 スキップマウスを作製した。予備的なデータとして、exon 3 がスキップした CAPS2 は、軸索に輸送されないこと、このマウスは新奇環境への適応不全、不安の高進、社会性行動の異常を示すことが分かってきた。自閉症関連遺伝子は多数報告されているが、ヒト・マウスで共通して強い関連が示されている遺伝子は CAPS2 をおいて他にない。このマウスの解剖学的・生理学的・行動学的形質を詳細に解析し、自閉症発症のメカニズムを解明する。広汎性発達障害の一つであるレット障害のモデルマウスである MeCP2 ノックアウトマウスとの比較検討も行いたい。

さらに私は CAPS2 タンパク質が欠失することで実際にどの分泌ステップが異常を来たしているのかを解明する。すでに私は分泌顆粒のトラフィッキングが異常をきたしている結果を得ている⁶⁾。CAPS2 の働きに関しては酵母 Two Hybrid 解析や免疫共沈、質量分析等により結合タンパク質を同定し、分泌顆粒マーカータンパク質に蛍光タンパク質を融合したものをを用いた分子イメージングにより神経ネットワーク内での役割を明らかにする。

1. Sadakata, T., Mizoguchi, A., Sato, Y., Katoh-Semba, R., Fukuda, M., Mikoshiya, K. & Furuichi, T. The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. *J Neurosci* **24**, 43-52 (2004).
2. Sadakata, T., Itakura, M., Kozaki, S., Sekine, Y., Takahashi, M. & Furuichi, T. Differential distributions of the Ca²⁺-dependent activator protein for secretion family proteins (CAPS2 and CAPS1) in the mouse brain. *J Comp Neurol* **495**, 735-753 (2006).
3. Sadakata, T., Washida, M., Iwayama, Y., Shoji, S., Sato, Y., Ohkura, T., Katoh-Semba, R., Nakajima, M., Sekine, Y., Tanaka, M., Nakamura, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K.J., Mori, N., Detera-Wadleigh, S.D., Ichikawa, H., Itohara, S., Yoshikawa, T. & Furuichi, T. Autistic-like phenotypes in Cadps2-knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients. *J Clin Invest* **117**, 931-943 (2007).
4. Sadakata, T., Kakegawa, W., Mizoguchi, A., Washida, M., Katoh-Semba, R., Shutoh, F., Okamoto, T., Nakashima, H., Kimura, K., Tanaka, M., Sekine, Y., Itohara, S., Yuzaki, M., Nagao, S. & Furuichi, T. Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. *J Neurosci* **27**, 2472-2482 (2007).
5. Sadakata, T. & Furuichi, T. Developmentally Regulated Ca²⁺-Dependent Activator Protein for Secretion 2 (CAPS2) is Involved in BDNF Secretion and is Associated with Autism Susceptibility. *Cerebellum* **8**, 312-322 (2009).
6. Sadakata, T. et al. Interaction of calcium-dependent activator protein for secretion 1 (CAPS1) with the class II ADP-ribosylation factor small GTPases is required for dense-core vesicle trafficking in the trans-Golgi network. *J Biol Chem* **285**, 38710-9 (2010).





細胞内異常タンパク質と回路選択的神経変性

長谷川 成人

(財団法人東京都医学総合研究所・参事研究員)

公募 A02

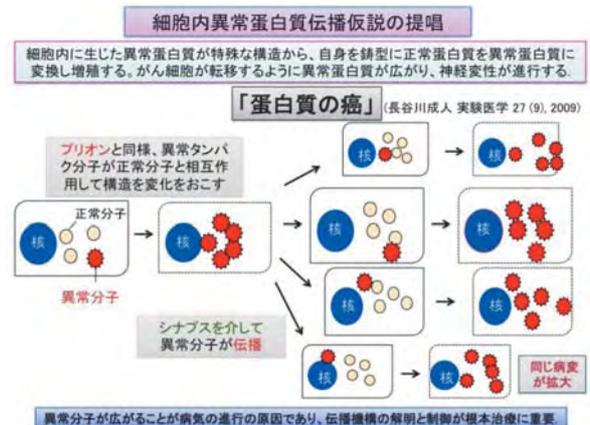
神経変性疾患は、ある特定の細胞群が原因不明の変性をおこして脱落し、侵された脳の部位の違いによって様々な症状を呈し、その症状が進行性に悪化する神経疾患である。神経病理学、生化学解析から、変性する部位の神経細胞やグリア細胞に疾患に特徴的な異常タンパク質を構成成分とする病変が認められること、その病変分布や広がりが患者の臨床症状と密接に関係していることが示されている。異常タンパク質の蓄積形態、出現部位、構成蛋白質などはそれぞれ疾患によって異なるが、それらは正常には見られない構造や性質を有する線維性成分で構成される。近年の家族性疾患患者の遺伝学的解析から、蓄積タンパク質をコードする遺伝子に変異が発見され、遺伝子の異常と蓄積病理の直接的な関連が証明されてきた。しかしながら、病変の細胞特異性や選択性、経過とともに悪化する「進行性」についてはほとんど議論されてこなかった。

我々は、アルツハイマー病、および関連の変性疾患患者剖検脳に蓄積するタウ、レビー小体病、多系統萎縮症などに蓄積する α シヌクレイン、筋萎縮性側索硬化症(ALS)および前頭側頭葉変性症(FTLD)などに蓄積するTDP-43について、その構成成分の同定から、異常翻訳後修飾の解析を中心とした病理生化学解析を行う^{1,2)}と共に、それぞれのタンパク質の試験管内凝集モデル、さらには培養細胞内凝集モデルの構築³⁻⁵⁾に関する検討を行ってきた。患者剖検脳の解析から、患者脳に蓄積するタンパク質は、リン酸化やユビキチン化、界面活性剤に対する不溶性、規則正しい線維構造をとること^{1,2)}など、多くの共通点が明らかとなった。また試験管モデルを用いた解析から、タウや α シヌクレインはリコンビナント蛋白からアミロイド様の構造、性質を有する線維が形成されること、プリオンと同様、正常分子を異常分子に変換しうる能力を有すること、異常分子の構造は多くの場合、添加したシードの構造と同じ構造に変換されること⁴⁾などが示された。さらに新規細胞モデルを用いた研究から、線維性異常タンパク質は、正常タンパク質と異なり、その構造の特異性から条件次第で比較的簡単に細胞内に入りうること、異常タンパク質が細胞内に導入されるとそれをシードとして細胞内の同種の分子が凝集、蓄積し、患者脳に認められるリン酸化をはじめとする同じ翻訳後修飾が再現されること、凝集体が形成された細胞では細胞死や明らかな増殖抑制が観察されること⁵⁾などが示された。

以上の研究結果から、我々は、ある細胞内で生じた異常タンパク質が、その特殊な構造から、シナプスを介して細胞間を移動し、自身を鋳型に自己複製しながら、癌細胞やウイルスのように細胞から細胞へと伝播して広がることにより、系統的、回路選択的神経変性がおこり、それが徐々に進行する可能性を考えるに至った。タウ、 α シヌクレイン、TDP-43の異常は「細胞内」ということで、「伝播」の考え方が議論されてこなかったが、異常分子が比較的簡単に細胞内に入りうるということがわかり、細胞内と細胞外を厳密に区別する必要がなくなった。最初にできる癌の部位やそ

の性質により、症状や進行の程度等が異なるのと同じように、脳のどの部位の神経細胞、グリア細胞に、どのタンパク質の、どのような構造変化が起こるかによって、病変の広がりや変性する細胞に選択性が決まり、臨床症状の違いとなって現れる可能性が考えられる。変性する細胞の選択性に関しては、タンパク質発現プロファイルの違いによる凝集速度の違いや、凝集体に対する細胞の脆弱性の違いなど、様々な要因によって左右されると考えられたため、単純ではないが、その伝播は単なる拡散によるものではなく、シナプスを介した神経回路のつながりを中心とした経路と考えられる。変性部位や蓄積部位が一カ所で作られたアミロイド様異常分子が、条件が整った場合に癌細胞のように徐々に広がって病気が進行する可能性について様々な実験による検証を行う。

1. Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Maslah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K. & Iwatsubo, T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* **4**, 160-164 (2002).
2. Hasegawa, M., Arai, T., Nonaka, T., Kametani, F., Yoshida, M., Hashizume, Y., Beach, T.G., Buratti, E., Baralle, F., Morita, M., Nakano, I., Oda, T., Tsuchiya, K. & Akiyama, H. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **64**, 60-70 (2008).
3. Nonaka, T., Kametani, F., Arai, T., Akiyama, H. & Hasegawa, M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* **18**, 3353-3364 (2009).
4. Yonetani, M., Nonaka, T., Masuda, M., Inukai, Y., Oikawa, T., Hisanaga, S. & Hasegawa, M. Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem* **284**, 7940-7950 (2009).
5. Nonaka, T., Watanabe, S.T., Iwatsubo, T. & Hasegawa, M. Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* **285**, 34885-34898 (2010).



細胞内異常分子が自身を鋳型に正常分子を異常に変換し増殖、伝播することで病気が進行すると考えられる



ニューロサーキット異常をきたす新規てんかんの原因遺伝子の解析とその病態解明

星野 幹雄

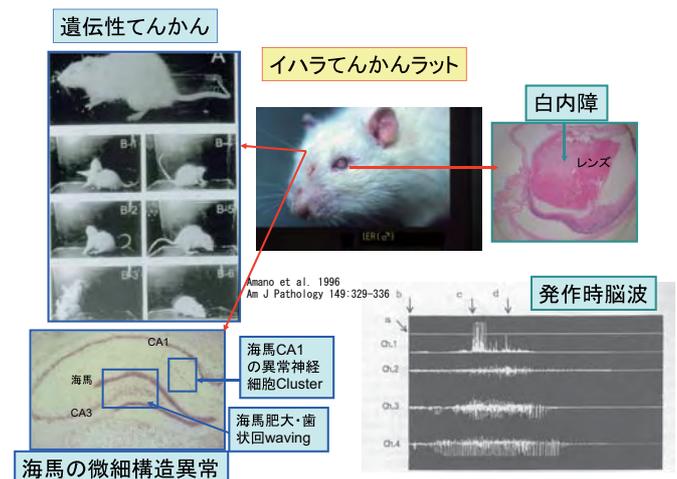
(国立精神神経医療研究センター・神経研究所・部長)

公募 A02

神経回路網すなわちニューロサーキットは、(1) 神経組織の領域化、(2) 神経細胞の誕生と個性獲得、(3) 神経細胞移動、(4) 神経突起伸長と経路探索、(5) シナプス形成と可塑的变化、などの発生過程を経て、極めて精巧に作り上げられることによって、その高次な機能を発揮するに至ります。逆に、この過程に異常が生じると、様々な精神・神経疾患が引き起こされると考えられます。私はこれまでに、「神経回路網形成」に関与する遺伝子プログラムについて研究して参りました。上記の項目(2)につきましては、小脳無形成突然変異マウス・cerebelllessの原因遺伝子*Ptf1a*の同定を端緒に、小脳における抑制性神経細胞を生み出すしくみを明らかにしました¹⁾。またその仕事を発展させることで、蝸牛神経核の中の神経細胞サブタイプの決定や登上線維神経細胞の運命決定に関わる転写因子を解明し^{2,3)}、後脳背側から生み出される神経細胞がいかにしてその個性を獲得するのか明らかにしてまいりました。また、上記項目(3)につきましては、子宮内エレクトロポレーション法を駆使することで、細胞骨格制御系や細胞内小胞輸送系が神経細胞移動に果たす役割についても報告して参りました^{4,5)}。

かようにこれまでは、正常発生における分子機構の研究ばかり行ってきたのですが、これからはその発生機構に異常が生じることによって引き起こされる精神・神経疾患について研究していきたいと考えております。そのために最近では、京都大学医学研究科保健学科の天野殖先生が研究しておられました「イハラてんかんラット(*IER; Ihara Epileptic Rat*)」を譲って頂きまして、その研究を行っております。*IER*は生後3ヶ月からてんかん症状を呈し約一年で死に至る原因不明の自然発症ラット突然変異体です。我々の最近の研究から、*IER*ではてんかん発症前から大脳皮質および海馬のニューロサーキットに形態学的な異常が認められ、さらに電気生理学的にも脳の興奮性が異常に高まっていることがわかってきました。また、てんかん発症前でも学習障害や社会性行動の障害が認められるために、*IER*は「ニューロサーキット形成異常によって引き起こされる発達障害を伴うてんかん」の良いモデル動物になるのではないかと考えております。本研究では、この突然変異体の原因遺伝子を同定し、そのコードする分子が脳の発生や機能に果たす役割について解析し、さらに同じ遺伝子の異常によって引き起こされるヒトてんかんの探索に努めて行きたいと考えております。今までは、神経発生生物学的な研究ばかりをやって参りましたので、ヒト疾患の病態の理解を目指した研究はこれが初めてです。班員の皆様方から様々なことを学んで参りたいと思っておりますので、どうかよろしくお願い申し上げます。

1. Hoshino, M., Nakamura, S., Mori, K., Kawauchi, T., Terao, M., Nishimura, Y.V., Fukuda, A., Fuse, T., Matsuo, N., Sone, M., Watanabe, M., Bito, H., Terashima, T., Wright, C.V., Kawaguchi, Y., Nakao, K. & Nabeshima, Y. *Ptf1a*, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron*, **47**, 201-213 (2005).
2. Fujiyama, T., Yamada, M., Terao, M., Terashima, T., Hioki, H., Inoue, Y. U., Inoue, T., Masuyama, N., Obata, K., Yanagawa, Y., Kawaguchi, Y., Nabeshima, Y. & Hoshino M. Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, *Ptf1a* and *Atoh1*. *Development* **136**, 2049-2058 (2009).
3. Yamada, M., Terao, M., Terashima, T., Fujiyama, T., Kawaguchi, Y., Nabeshima, Y. & Hoshino, M. Origin of climbing fiber neurons and their developmental dependence on *Ptf1a*. *J. Neurosci.* **27**, 10924-10934 (2007).
4. Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y. & Hoshino, M. Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27^{kip1}, contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nature Cell Biol.* **8**, 17-26 (2006).
5. Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Nakajima, K., Nabeshima, Y. & Hoshino, M. Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-Cadherin trafficking. *Neuron* **67**, 588-602 (2010).



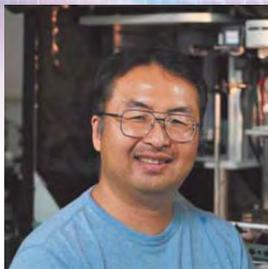
イハラてんかんラットの表現型。海馬形態異常、白内障などがあり、生後5ヶ月からてんかん発作を呈する



新技術

—脳疾患研究に向けた新たな技術開発と応用—

計画 A03
公募 A03



行動動物脳深部神経回路の可視化技術の開発と 神経回路の生理・病理下での安定性の研究

林 康紀

(理化学研究所・脳科学総合研究センター・記憶メカニズム研究チーム・チームリーダー)

計画 A03

記憶の中で陳述記憶はまず海馬で形成され、その上で大脳皮質を含む各領域に長期記憶として振り分けられる。近年二光子顕微鏡の発達に伴い個々のニューロンの活動、さらにはシナプスの安定性が覚醒動物で可視化出来るようになった。その結果、大脳皮質シナプスは数ヶ月単位にわたり保たれる事が明らかにされ、記憶の長期保存に合致した構造安定性を持つ事が示されてきた。一方、海馬の構造がどの程度安定か、また可塑的かは全く判っていない。これは、海馬のニューロンを覚醒動物で直接観察する事が不可能であった為である。

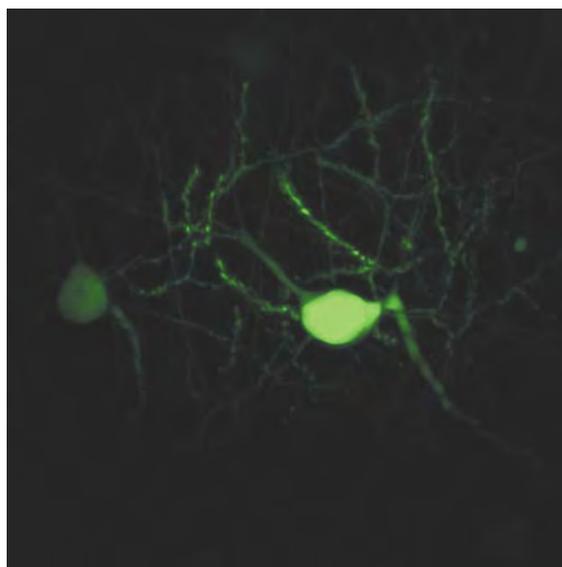
さて、我々はこれまで海馬スライス標品を用いたシナプス可塑性研究を行い、AMPA型グルタミン酸受容体の活動依存的なシナプスへの移行¹⁾、棘突起の可塑的形態変化の解明²⁾、アクチンの脱重合やCaMKII活性の光学的観察等²⁻⁴⁾、二光子顕微鏡を用いた神経の形態や活動を可視化する技術を駆使した研究を行ってきた。

これらの研究から得られた知識と技術を発展させ、我々は未開拓の領域である、覚醒動物での海馬ニューロンの活動とシナプス形態を可視化できる実験系を確立し、記憶学習における神経回路の変化を直接観察する事を試みる。そのため、カルシウムセンサー蛋白質を発現するトランスジェニックマウスを作成する。無麻酔行動下で二光子顕微鏡観察を行なう為、光学窓を作成したマウスの頭部を顕微鏡下に固定する。マウスは頭部以外は固定せず、トラックボールの上を自由に行動出来るようにする。トラックボールの回転速度を読み取り、バーチャルリアリティーを用い、行動に対応した空間画像を表示し、マウスがあたかも空間内を行動したように認識させる。バーチャルリアリティー上の擬似空間の有る一定の領域に到達した時にマウスに報酬を出す事で、空間学習を行なわせる。

この実験系を用い、海馬からの神経活動の記録を行ない、学習時の海馬神経回路の可塑的变化を細胞体レベルでのカルシウム反応、さらには一個のシナプスレベルでの形態並びに生化学反応を指標に検出していく。大脳皮質と比較し、海馬のシナプス構造がどの程度安定か、また可塑的であるかが解明出来ると期待される。またさらに他研究グループと共同で、種々疾患モデルに於ける神経活動の安定性と可塑性を検出していく事で、動的な側面からニューラルサーキットバノロジーの概念を確立する。

1. Shi, S.H., Hayashi, Y., Petralia, R.S., Zaman, S.H., Wenthold, R.J., Svoboda, K. & Malinow, R. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* **284**, 1811-1816 (1999).
2. Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A. & Hayashi, Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* **7**, 1104-1112 (2004).

3. Takao, K., Okamoto, K., Nakagawa, T., Neve, R.L., Nagai, T., Miyawaki, A., Hashikawa, T., Kobayashi, S. & Hayashi, Y. Visualization of synaptic Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in living neurons. *J Neurosci* **25**, 3107-3112 (2005).
4. Kwok, S., Lee, C., Sanchez, S.A., Hazlett, T.L., Gratton, E. & Hayashi, Y. Genetically encoded probe for fluorescence lifetime imaging of CaMKII activity. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 519-525 (2008).



GFP 標識された海馬 CA1 錐体細胞を生きたマウスから高解像度で二光子イメージングした



人工多能性幹細胞作製技術を応用した 神経変性疾患細胞機能・回路異常病理の解明

井上 治久

(京都大学・iPS細胞研究所・准教授)

計画A03

神経変性疾患は、ある特定の神経細胞が選択的に変性・死滅することによって生じる難治性疾患です。診断は臨床症状・各種検査などを併せても難渋する場合も多くあります。また、治療法が確立しておらず、病態解明に基づく新規治療法の開発が必要です。神経変性疾患患者さんの疾患に罹患する神経系細胞は生検で取り出すことができませんでしたが、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS細胞) 細胞作製技術を用いることによって、入手が可能になりました¹⁾。患者さん由来iPS細胞は、最も正確に患者さんの遺伝情報を反映しうる細胞であり、本研究領域においても最も重要なリソースの1つです²⁾。

神経変性疾患の病因病理は神経細胞機能障害、構造異常タンパク質蓄積、神経細胞死、非神経系細胞による神経変性加速により成立します。私達の研究室 (<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/inoue/>) は本研究課題において、iPS細胞作製技術を用いて、患者さん由来の神経細胞を作製することによって、神経変性の過程のうち、最も初期の変化である神経細胞機能障害を再現する神経変性疾患モデルの開発を行います。さらに、iPS細胞作製技術によって、患者さんの体内の神経系で神経回路を構築している複数種類の神経細胞を作出することにより、患者さんの体内の神経回路の再現を試みます。

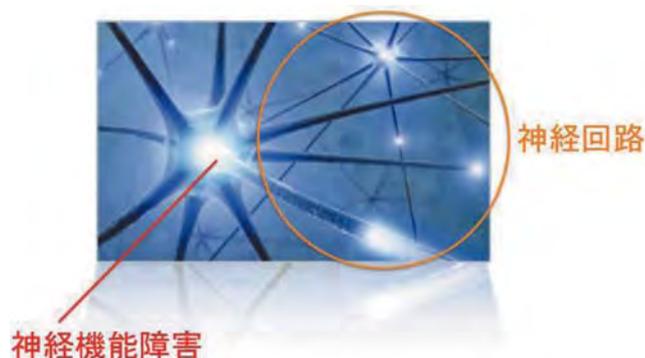
イメージング技術を導入し、疾患に罹患する神経細胞の神経機能を感度良く観察することにより、これまで捉えることができなかったヒト神経細胞での神経機能障害を正確に観察し、そのメカニズムを解明できる可能性があります。神経機能障害の観察により、病態の早期診断、病態の予測が可能になり、将来の神経変性疾患医療で重要と考えられ

ている早期診断に基づく先制医療へ繋がる可能性があります。さらに、神経変性疾患では、ある特定の種類の神経細胞が変性する一方で、神経変性が生じない種類の神経細胞が存在します (選択的脆弱性) が、iPS細胞から、変性を生じる種類の神経細胞と生じない種類の神経細胞を作製することにより、選択的脆弱性の機序の解明、脆弱な神経細胞に脆弱でない神経細胞の性質を導入することによる神経変性治療の可能性が生まれます。

また、疾患罹患神経回路の再現によって、神経回路のどの部分がはじめに神経変性を生じるのか、神経回路内でもそれぞれの神経細胞が独立して神経変性が生じるのか、一部の神経変性を正常化することにより回路全体の変性を緩和できるのか、神経回路を通して神経変性は伝搬するのか等、これまでの神経変性疾患の研究においてまだ未解明の問題に取り組むことができる可能性があります。

しかしながら、iPS細胞作製技術を用いた神経変性疾患細胞機能・回路異常病理の研究においては、神経細胞の分化誘導の効率、分化誘導速度/分化効率のクローン間の多様性、さらには加齢変化・環境因子の寄与等、技術的に未完成の部分が残されており³⁾、本研究課題においては、技術的開発と平行し、上記の可能性の実現化を目指します。

1. Inoue, H. Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. *Exp Cell Res* **316**, 2560-2564 (2010).
2. 八幡直樹、井上治久. 疾患特異的iPS細胞を用いた神経変性疾患の研究. *日本生物学的精神医学会誌*, **21**,257-260 (2010).
3. Inoue, H. & Yamanaka, S. The Use of Induced Pluripotent Stem Cells in Drug Development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **89**,655-661 (2011).



人工多能性幹細胞作製技術を応用した神経変性疾患細胞機能・回路異常病理の解明
神経細胞間での神経機能 (赤字) のイメージング (可視化) と 神経回路 (オレンジ色○内) の病理の解析



シナプス関連分子の機能解析を促進する新手法の開発

平野 丈夫

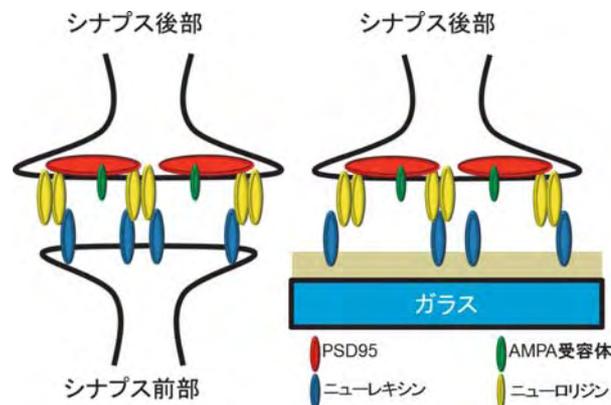
(京都大学・大学院理学研究科・教授)

公募 A03

私たちはこれまで、小脳の興奮性および抑制性シナプス可塑性の分子機構について研究を行い、各々の制御にかかわる分子のはたらきを明らかにしてきました¹⁻³⁾。また、非神経細胞と小脳神経細胞の共培養系を用いた研究で、グルタミン酸受容体関連分子の $\delta 2$ がシナプス形成誘導能をもつことを示しました⁴⁾。その他に、ES細胞の小脳プルキンエ細胞への分化に関する研究にも従事しました⁵⁾。こうした研究では、培養系に分子生物学・電気生理学・ライブイメージング手法を適用しました。そして、興奮性シナプス可塑性発現時のCキナーゼの細胞内局在変化³⁾・FRET計測による抑制性シナプス可塑性発現に際してのGABARAP分子の構造変化²⁾等を報告しました。本研究では、こうした技術を発展させることにより、シナプスにおけるタンパク質の動態および分子間相互作用の詳細を解析できる新実験手法の開発を行いたいと考えています。シナプスの形成と機能制御にかかわるタンパク質の異常と、自閉症・統合失調症等の発達障害・精神疾患との関係が指摘されていますが、シナプス関連タンパク質の異常がいかなる分子過程によって、シナプス機能失調を引き起こすかはよくわかっていません。そこで、シナプス関連分子の動態とはたらきを調べるための以下のような二つの新研究手法の確立をめざします。一つは、ガラス面上にシナプス後膜様構造を形成させ、全反射顕微鏡を用いて高シグナル・ノイズ比で蛍光観察を行う実験方法です。この手法により、シナプス異常に関連するタンパク質のシナプス後膜とその近傍における動態および他タンパク質との相互作用を、1分子レベルで可視化できるようになると期待しています。

もう一つは、非神経細胞でシナプス関連タンパク質を発現させて、シナプス後部様構造を人工的に構築し、各タンパク質のはたらきを明らかにしようという試みです。この手法により、シナプス構造形成と機能発現に必要な不可欠な分子ネットワークと各分子のはたらきを明らかにしていきたいと考えています。

1. Yawata, S., Tsuchida, H., Kengaku, M. & Hirano, T. Membrane-proximal region of GluR $\delta 2$ is critical for LTD and interaction with PICK1 in a cerebellar Purkinje neuron. *J. Neurosci.* **26**, 3626-3633 (2006).
2. Kawaguchi, S. & Hirano, T. Sustained GABARAP structural change underlies long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *J. Neurosci.* **27**, 6788-6799 (2007).
3. Tsuruno, S. & Hirano, T. Persistent activation of protein kinase C α is not necessary for expression of cerebellar long-term depression. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 38-48 (2007).
4. Kuroyanagi, T., Yokoyama, M. & Hirano, T. Postsynaptic glutamate receptor δ family contributes to presynaptic terminal differentiation and establishment of synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4912-4916 (2009).
5. Muguruma, K., Nishiyama, A., Ono, Y., Miyawaki, H., Mizuhara, E., Hori, S., Kakizuka, A., Obata, K., Yanagawa, Y., Hirano, T. & Sasai, Y. Ontogeny-recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje cells. *Nature Neurosci.* **13**, 1171-1180 (2010).



ガラス面上でのシナプス後膜形成。全反射顕微鏡を用いてEGFP融合分子の高SN比観察ができる



血管内投与型 AAV ベクターによる神経変性疾患の病態解析

村松 慎一

(自治医科大学・神経内科学・特命教授)

公募 A03

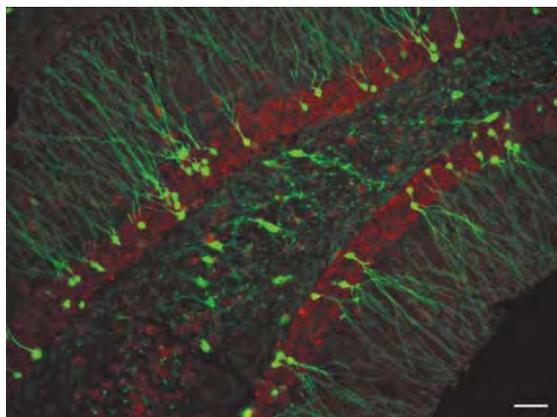
アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、神経細胞に効率よく目的遺伝子を導入し長期発現することができる。私たちは、3型 AAV ベクターの開発などの遺伝子導入法の基盤技術研究とともに、AAV ベクターを応用してパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、アルツハイマー病などの神経疾患に対する遺伝子治療法を開発してきた。パーキンソン病に対しては、ドパミン合成系の酵素遺伝子導入による治療法などを開発した。また、ALS に対してグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) を発現させることにより神経細胞の脱落を抑制する方法などを開発した。パーキンソン病の遺伝子治療では、霊長類モデルを使用した前臨床試験を経て¹⁾、2007 年から芳香族アミノ酸脱炭酸酵素遺伝子を発現する AAV ベクターを被殻に注入する方法の臨床試験を実施した。ヒトの脳内投与における AAV ベクターの安全性を確認し、positron emission tomography で 2 年後にも遺伝子発現が持続することを報告した²⁾。

AAV ベクターの基礎神経科学への応用として、Cre recombinase を発現する AAV ベクターを作製し、目標遺伝子を loxP 配列の間を含むトランスジェニックマウスの脳の特定期位に注入することにより、当該遺伝子を選択的に除去する方法を開発した^{3,4)}。また、AAV ベクターによる遺伝子導入モデル動物を利用して、側坐核のレチノイン酸受容体とドパミン機能の解析を行った⁵⁾。

このように AAV ベクターは遺伝子治療だけでなく、中枢神経疾患の病態解析に有用である。しかし、従来ベクターの投与は定位脳手術による直接注入が必要であったため、成体動物の中枢神経の広範な領域に遺伝子導入することは困難であった。そこで、私たちは、血管内投与により脳と脊髄の広範な領域の神経細胞へ遺伝子を送達可能な AAV ベクターを開発した。本研究ではこの血管内投与型 AAV ベクターを応用して、パーキンソン病や ALS などの神経変性疾患のモデル動物を作製しその病態を解析する。

成体動物に遺伝子導入することにより、発生過程の影響のないモデル動物を作製する。脳と脊髄の広範な領域の神経細胞とグリア細胞に病態発現と関連する分子を供給し、神経細胞が変性脱落する過程を再現する。マウスに加えて霊長類でもモデル動物を作製する。in vivo imaging を含む解析を実施し、これらの疾患におけるシナプス病態の解明を目指す。

1. Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Shizuma, N., Kawasaki, K., Ono, F., Shen, Y., Wang, L., Mizukami, H., Kume, A., Matsumura, M., Nagatsu, I., Urano, F., Ichinose, H., Nagatsu, T., Terao, K., Nakano, I. & Ozawa, K. Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* **13**, 345-354 (2002).
2. Muramatsu, S., Fujimoto, K., Kato, S., Mizukami, H., Asari, S., Ikeguchi, K., Kawakami, T., Urabe, M., Kume, A., Sato, T., Watanabe, E., Ozawa, K. & Nakano, I. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* **18**, 1731-1735 (2010).
3. Li, X.G., Okada, T., Kodera, M., Nara, Y., Takino, N., Muramatsu, C., Ikeguchi, K., Urano, F., Ichinose, H., Metzger, D., Chambon, P., Nakano, I., Ozawa, K. & Muramatsu, S. Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther* **13**, 160-166 (2006).
4. Kadkhodaei, B., Ito, T., Joodmardi, E., Mattsson, B., Rouillard, C., Carta, M., Muramatsu, S., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Metzger, D., Chambon, P., Lindqvist, E., Larsson, N.G., Olson, L., Bjorklund, A., Ichinose, H. & Perlmann, T. Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* **29**, 15923-15932 (2009).
5. Krzyzosiak, A., Szyszka-Niagolov, M., Wietrzyk, M., Gobbaille, S., Muramatsu, S. & Krezel, W. Retinoid x receptor gamma control of affective behaviors involves dopaminergic signaling in mice. *Neuron* **66**, 908-920 (2010).



血管内投与型 AAV ベクターによる GFP 遺伝子導入
マウス海馬：緑 GFP、赤 NeuN、Bar = 50 μm



パーキンソン病患者由来ヒト iPS 細胞を用いたシナプス病態の解析

岡田 洋平

(慶應義塾大学・医学部・特任講師)

公募 A03

多くの神経変性疾患の病態解析や治療法の開発が進まない要因として、病態モデルが欠如していることがあげられる。私たちは、この問題を克服するために、神経疾患患者由来体細胞から疾患特異的ヒト iPS 細胞を樹立し、神経系細胞へと分化誘導することで、患者の遺伝情報を持った疾患のモデル細胞、病態モデルの作成を行ってきた。特に、ヒト iPS 細胞の分化誘導過程は、実際のヒトの神経発生をよく反映することから、このモデルを用いることで、神経変性疾患の発症機構や病態の進行過程の解析が可能になる。

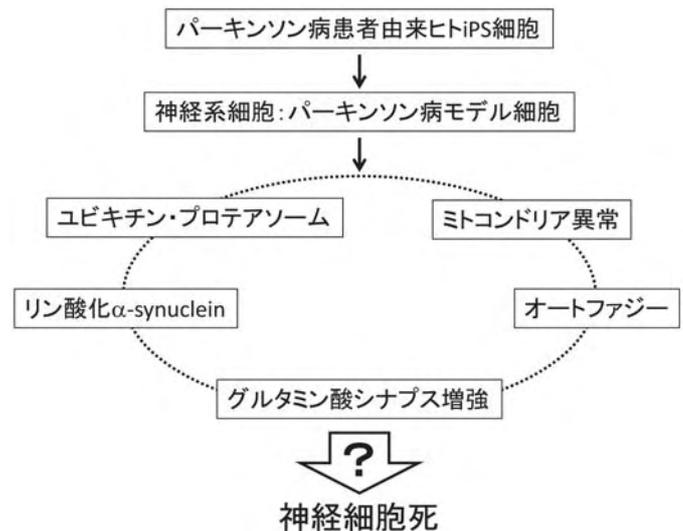
これまでの研究で、私たちはマウス ES 細胞、マウス iPS 細胞から神経幹細胞を効率的に誘導するシステムを確立^{1,2)}、また、この培養法を応用することで、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞からも神経幹細胞を効率的に誘導するシステムを開発した。このようにして誘導した神経幹細胞は、*in vitro*において電気生理学的に機能的なニューロンを生み出し、また、免疫不全マウスである NOD/SCID マウスの線条体に移植すると³⁾、*in vivo*において神経系の3系統の細胞に分化し、シナプスの形成も確認することができた。これらの結果から、*in vitro*のみならず、*in vivo*においてもヒト神経系のモデルシステムとして応用可能であると考えられた。

一方で、本研究で解析対象としているパーキンソン病では、様々な細胞機能異常が病態と関与することが示唆されてきたが、実際に細胞死が誘導されるメカニズムは明らかではない。また、遺伝子改変マウスでも、十分な表現型が表れないこともあり、その病態解析に苦慮してきた。そこで、本研究では、まず非疾患ヒト iPS 細胞を用いて神経系細胞へと分化誘導し、*in vitro*、*in vivo*における病態解析システムを構築する。また、パーキンソン病患者から採取した線維芽細胞を用いてヒト iPS 細胞を樹立し、疾患特異的ヒト iPS 細胞と非疾患ヒト iPS 細胞の両方から神経系細胞を分化誘導して比較し、これまでに考えられてきた病態も含めて様々な角度から細胞死のメカニズムを解析することでパーキンソン病の病態に迫る。

これらの解析によりパーキンソン病の病態の一端が明らかになれば、新規治療薬の開発など、さらなる応用研究への展開が期待される。また、他の神経変性疾患の病態解析へも応用可能であると考えられる。

lines. *Nat Biotechnol.* **27**, 743-745 (2009).

3. Ogawa, D., Okada, Y., Nakamura, M., Kanemura, Y., Okano, H.J., Matsuzaki, Y., Shimazaki, T., Ito, M., Ikeda, E., Tamiya, T., Nagao, S. & Okano, H. Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term *in vitro* maintenance. *J. Neurosci. Res.* **87**, 307-317 (2009).



パーキンソン病患者由来ヒト iPS 細胞から分化誘導した神経系細胞を用いて多面的な病態解析を行う

1. Okada, Y., Matsumoto, A., Shimazaki, T., Enoki, R., Koizumi, A., Ishii, S., Itoyama, Y., Sobue, G. & Okano, H. Spatio-temporal recapitulation of central nervous system development in murine ES cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* **26**, 3086-3098 (2008).
2. Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H. & Yamanaka, S. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell



これまでの活動報告

領域ホームページの紹介



シナプス病態のホームページ
(<http://www.tmd.ac.jp/mri/shingakujutu>)

では内容を随時更新して、
活動内容、研究成果、班会議、
シンポジウムなどの情報を
発信しています。

技術支援 (2光子顕微鏡・iPS技術)



シナプス病態では、班員の共同利用機器として2光子顕微鏡を東京医科歯科大学に導入しています。

機器予約システム

(<http://www.tmd.ac.jp/mri/shingakujutu/jpn/reserve/index.html>)

から班員は予約登録ができます。

5月17日、24日、27日、

6月1日に東京医科歯科大学で

『基礎コース』、6月8日に理化学研究所にて『発展コース』の講習会を開きました。

また、京都大学において7月13日にiPS技術講習会を開催しました。

第1回 国際シンポジウムの開催

2010年10月27日に第1回『シナプス病態』国際シンポジウムをキックオフシンポジウムとして東京医科歯科大学・鈴木章夫記念ホールで行いました。脳疾患研究の最先端の成果の紹介とともに、フロアーを交えて活発な議論が行われました。





文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究
シナプス・ニューロサーキットパソロジーの創成
News Letter Vol.1

編集人・発行人 岡澤 均

発行所 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究
「シナプス・ニューロサーキットパソロジーの創成」事務局

HP <http://www.tmd.ac.jp/mri/shingakujutu/>

TEL & FAX 03-5803-5847



編集人・発行人 岡澤 均

発行所 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究

「シナプス・ニューロサーキットパソロジーの創成」事務局

HP : <http://www.tmd.ac.jp/mri/shingakujutu/>

TEL & FAX : 03-5803-5847