



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.2

CONTENTS

はじめに	1
「シナプス病態」領域の研究目的	3
「シナプス病態」研究体制	4
シナプスパソロジー	5
–多様な脳疾患におけるシナプス病態の解明–	
サーキットパソロジー	25
–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–	
新技術	39
–脳疾患研究に向けた新たな技術開発と応用–	
これまでの活動報告	47

新学術領域研究『シナプス・サーキットパソロジーの創成』

領域代表 東京医科歯科大学 岡澤 均



はじめに

新学術領域研究『シナプス・サーキットパソロジーの創成』は、新しいイメージング技術、iPS細胞技術などを用いて、シナプスレベルあるいはサーキットレベルでの新たな切り口で脳神経疾患の病態解明を行うとともに、このような観点での神経科学研究・脳病態研究を進める若手研究者を育成し、新たな研究領域を形成することを目的としています。22年度より計画班員6名で発足し、23年度からは公募班員29名の班員が加わって総勢35名の構成となり、本格的に領域が始動しました。

前半の領域研究において、共同利用設備である2光子顕微鏡を用いて脳疾患モデルマウスの神経細胞をin vivoで観察することが可能になり、公募班員との共同研究4件を含め、発達障害と変性疾患の遺伝子組み換えモデルマウスの解析が多数進行中です。iPS細胞についても、アルツハイマー病をはじめ、疾患患者からの細胞株を数多く樹立しました。また、神経細胞のCAMK II活性をin vivoで直接観察する新規技術も確立しました。これらの技術革新は、多くの班員の研究に提供されています。変性病態とシナプス分子の関係についても、アミロイド産生に関わる細胞膜上の酵素ADAM10がneurexin 1を切断することなど新たな知見が得られました。サーキット特異的なマーカータンパク質発現系も開発が進行しており、運動ニューロン変性に関わる新たな分子機構が明らかになりました。さらに、採択時に指摘のあったグリア細胞機能障害と脳疾患の関連についても、バグマングリアの変性に関わる新規分子Maxerの発見、グリア細胞と軸索再生をつなぐ新たな分子的基盤の発見など重要な成果を得ることが出来ました。

これらの研究成果は、Nature Genetics, Nature Medicine, Lancet Neurology, Nature Neuroscience, Molecular Cell, Am J Hum Genet, EMBO Journalをはじめとして、282報の国際論文となり、インパクトファクターの総計は1430を上回りました。このうち、13件はプレスリリースされ68件のマスコミ発表につながっています。また、国際特許取得4件ならびに多数の特許申請につながっています。また、領域形成については、25件の共同研究が進行中であり、領域全体で16名の若手研究者の昇進があり、22件の若手研究者の受賞があった。これらのことから、本領域研究は領域形成および成果の面で順調に進行していると考えられます。

なお、22年度から24年度にかけての業績については、詳細をホームページ（<http://www.tmd.ac.jp/mri/shin-gakujutu/jpn/message/index.html>）に掲載をしています。

25年度からは、後半領域研究がスタートして、公募班員も入れ替わりました。23年度と同様に高い競争率の中、32名の素晴らしい研究者を公募班員として採択することが出来ました。一方で、前半の領域研究で優れた研究を成し遂げ、シナプス病態研究の発展に貢献されたにも関わらず、選考に漏れた方々がおられたことは、競争的研究費の常とは言え、大変に残念なことと感じております。しかし、シナプス病態を研究領域として定着させるべく、新たなメンバーを中心に、さらに領域研究は進行していきます。

これを機にニュースレターの第2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るものです。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（シナプス病態前半の研究内容を含む）と今後行うべき研究の方向性・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の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が、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、どのような普遍のカスケードが中間表現型に患者脳に至らせるのかは、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WGAS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。

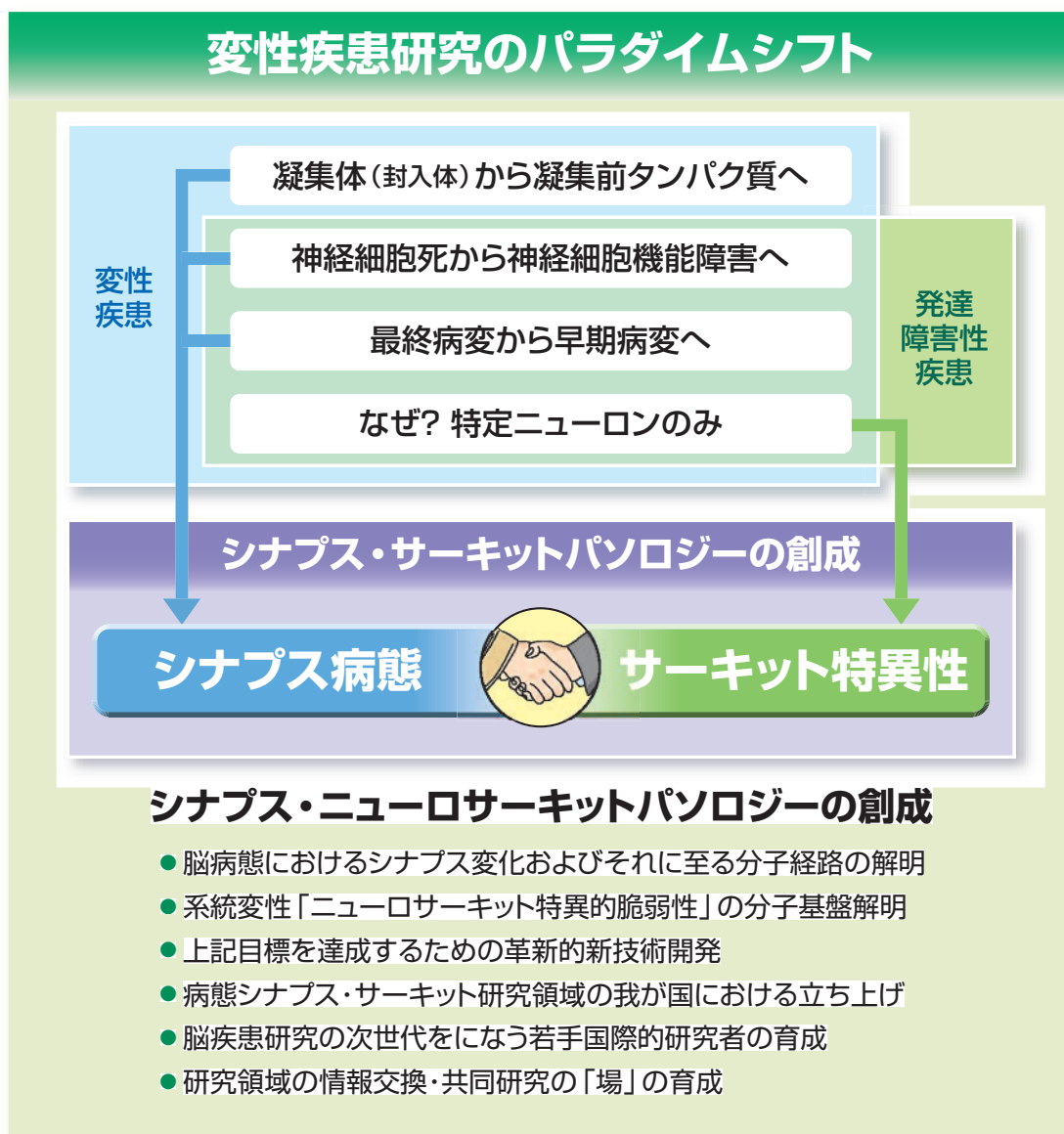
また、本領域は、シナプス病態に加えて、部位特異性あるいはサーキット特異性とも言うべき、病変の軽重の背景となるべき分子病態の解明をもう一つの柱に据えています。変性疾患病理における系統変性は有名ですが、精神疾患、発達障害においても脳内の特定のサーキットの機能異常が起きています。サーキット病態の解明は、機能的な側面に止まらず、神経細胞の脆弱性・抵抗性について新たな知見を提供してくれるものと期待しています。

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。

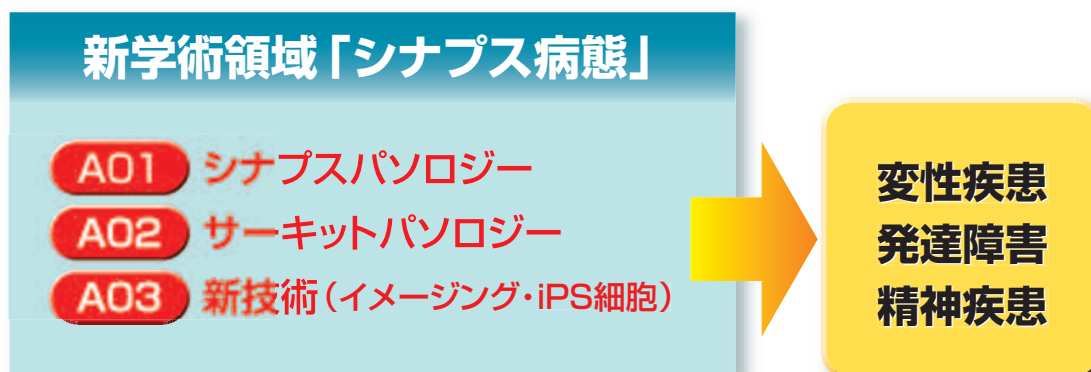
2013年7月31日

「シナプス病態」領域の研究目的

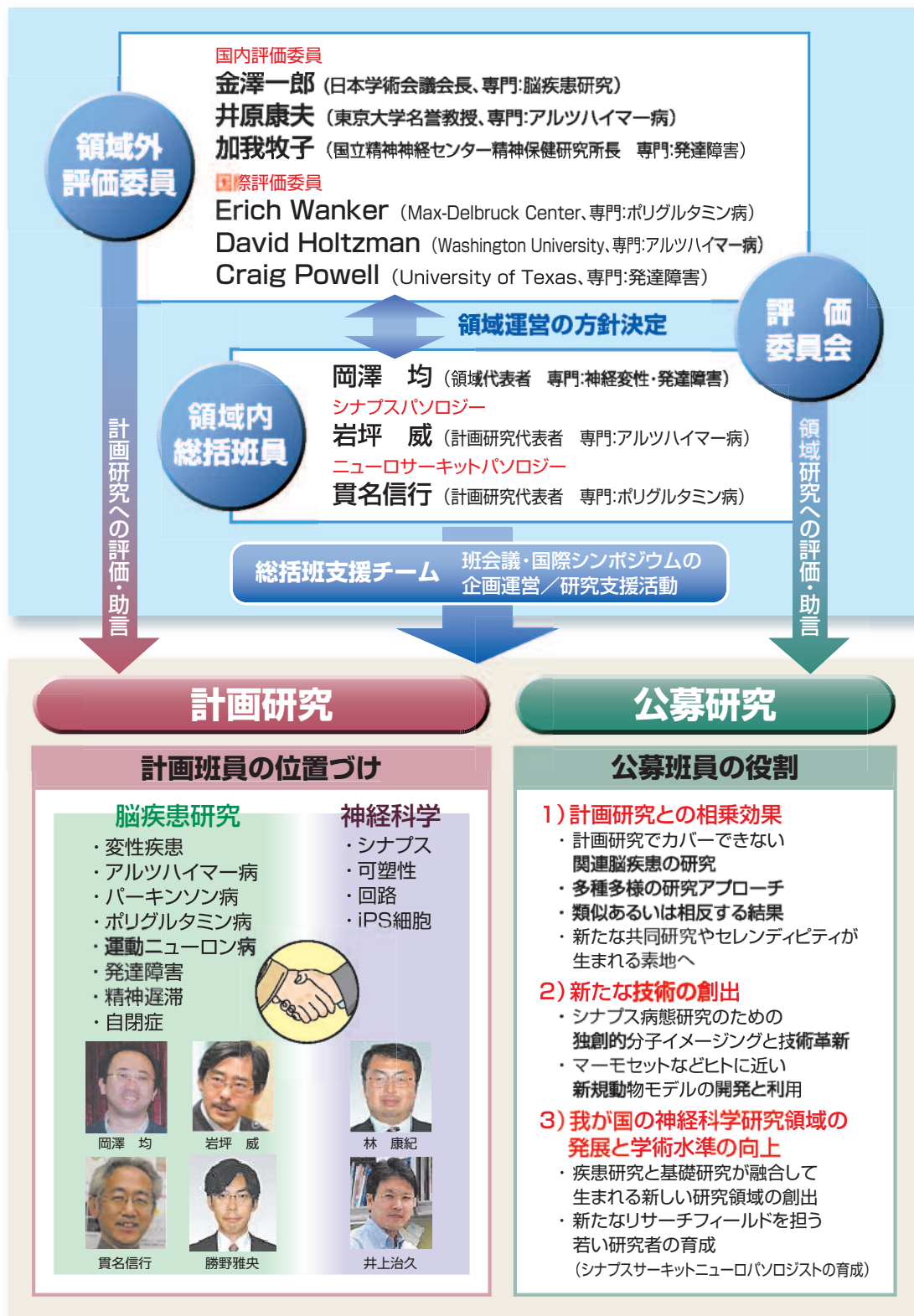


変性疾患研究では細胞死やタンパク凝集に先駆けて起きる早期病態の解明へ研究がシフトしつつあり、その中でシナプス病態は最も重要なフォーカスである。

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。



シナプスパソロジー

—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

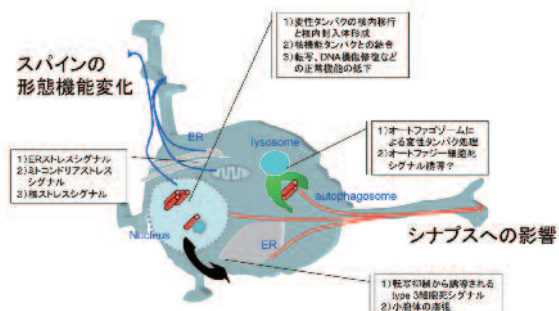
私たちは1990年代後半からポリグルタミン病の機能病態因子をYeast Two-Hybrid法による結合蛋白スクリーニング、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析など網羅的オミックス手法を組み合わせる研究してきました(Waragai et al., Hum Mol Genet 1999; Tagawa et al., J Neurosci 2007; Qi et al., Nature Cell Biol 2007; Enokido et al., J Cell Biol 2010)。国際的にも、同時期に多くの研究者が疾患タンパクと結合する因子を探索しました。この結果として明らかになってきたのは、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理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、GWASの成果によって、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。

『シナプス病態』において、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めます。これまでに、バーグマングリアに発現する新規分子Maxerを介したSCA1のnon-cell autonomous病態を示し(Shiwaku et al., EMBOJ 2010)、TERA/VCP/p97機能不全を介するポリグルタミン病の共通病態(Fujita et al.,

Nature Commun 2013)を明らかにしましたが、さらに、変性および発達障害におけるシナプス機能障害について多くの新知見を得ています。平成25-26年度の領域研究後半においても、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シナプス病態の新たなコンセプトの確立を目指したいと考えております。

1. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M and Hamada H (1990) A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. **Cell** 60, 461-472.
2. Okazawa H, Okamoto K, Ishino, F, Ishino-Kaneko T, Takeda S, Toyoda Y, Muramatsu M and Hamada H (1991) The oct-3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. **EMBO Journal** 10, 2997-3005.
3. Okazawa H, Rich T, Chang A, Lin X, Waragai M, Kajikawa M, Enokido Y, Komuo A, Kato S, Shibata M, Hatanaka H, Mouradian MM, Sudol M, and Kanazawa I (2002) Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death. **Neuron** 34, 701-713.
4. Qi M.L., Tagawa K., Enokido Y., Yoshimura N., Wada Y.I., Watase K., Ishiura S.I., Kanazawa I., Botas J., Saitoe M., Wanker E.E. and Okazawa H. (2007) Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases. **Nature Cell Biology** 9, 402-414.
5. Shiwaku H, Yoshimura N, Tamura T, Sone M, Ogishima S, Watase K, Tagawa K and *Okazawa H (2010) Suppression of the novel ER protein MAXER by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell autonomous toxicity. **EMBO Journal** 29:2446-2460.
6. Nakamura, Y., Tagawa, K., Oka, T., Sasabe, T., Ito, H., Shiwaku, H., La Spada, A.R., *Okazawa, H. (2012). Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes cytoskeletal network. **Human Mol Genet.** 21:1099-1110.
7. Kyota Fujita, Yoko Nakamura, Tsutomu Oka, Hikaru Zto, Takuya Tamura, Kazuhiko Tagawa, Toshikazu Sasabe, Asuka Katsuta, Kazumi Motoki, Hiroki Shiwaku, Masaki Sone, Chisato Yoshida, Masahisa Katsuno, Yoshinobu Eishi, Miho Murata, J. Paul Taylor, Erich E. Wanker, Kazuteru Kono, Satoshi Tashiro, Gen Sobue, Albert R. La Spada, and *Hitoshi Okazawa (2013) A functional bdeficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA damage repair in multiple polyglutamine diseases. **Nature Commun** 4, Article number: 1816



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)は高齢化の進行とともに急増しつつあり、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の原因として重要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^{1,2)}。近年AD脳におけるシナプス異常・脱落と認知症症状の関係が注目されている。さらに最近になり、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³⁾、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に関する*in vivo*レベルでの研究は極めて少ない。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、について検討を行う。

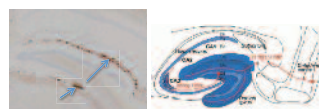
ADの主要病変部位である海馬への主要な入力線維(perforant pathway)の起始部位であるentorhinal cortex(EC)の大型神経細胞に、光刺激により神経活動を制御可能なchannelrhodopsin2(CR)分子を発現するマウスを樹立した。A β 42を神経細胞に高発現するAustrian変異APP Tgマウス(A7)⁴⁾のECの大型神経細胞に1回の刺激で60分に及ぶ持続的な神経活動を誘発可能なstabilized step function opsin(SSFO)をアデノウイルス感染により発現することに成功した。ECニューロンの急性刺激により、海馬歯状回からマイクロダイアリシスにより回収されるA β の産生増大、5ヶ月に及ぶ慢性刺激実験により、海馬歯状回におけるA β 蓄積の増加を示す結果を取得しつつある。

さらに2012年までの前半研究期間においては、シナプス形成に重要な役割を果たすシナプス膜タンパク質neurologin1が、神経活動性依存的に α セクレターゼ(ADAM10)、 γ セクレターゼというADにおけるA β 産生に関わるプロテアーゼ群により切断を受け、シナプス棘形成を負に制御するという興味深い結果を得た⁵⁾。

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・治療法を樹立したい。

D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R. APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**, 925-937 (2003)

4. 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)
5. Suzuki, K., Hayashi, Y., Nakahara, S., Kumazaki, H., Prox, J., Horiuchi, K., Zheng, M., Tanimura, S., Nishiyama, Y., Osawa, S., Sehara-Fujisawa, A., Saftig, P., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Matsuki, N., Koyama, R., Tomita, T., Iwatsubo, T. Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* **76**:410-422, 2012



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(矢印)

Question: A β 蓄積は神経活動依存性に増強されるか?
方法: Optogeneticsによるニューロン活動制御とA β 産生・蓄積評価



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

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 分泌部位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

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. Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt,



DJ-1によるドレブリンを介したスパイン形成調節

有賀 寛芳

(北海道大学大学院薬学研究院・教授)

公募A01

樹状突起スパインは神経回路の接合部を構成する典型的な細胞内構造であり、後シナプスにおける神経伝達物質受容に重要な機能を有し、種々の神経変性疾患、とりわけ認知機能低下をもたらす疾患ではスパイン形成異常が報告されている。また、家族性パーキンソン病原因遺伝子 *DJ-1* ノックアウトマウスではシナプス伝達の長期抑圧 (LTD) が見られ、ドパミン受容体アゴニストが LTD を回復させることから、ドパミンシグナル低下が LTD に関与することが示唆されている。脳特異的に発現するアクチン結合タンパク質ドレブリン A (以下ドレブリン) は、シナプス後部に局在し、スパイン形成に重要な機能を有することが知られている。またドレブリンはシナプス可塑性への関与が示唆されており、実際アルツハイマー病患者の脳海馬ではドレブリンのシナプス後部からの消失が知られている。

申請者ががん遺伝子として単離した *DJ-1*¹⁾ は家族性パーキンソン病原因遺伝子 PARK7 であることが 2003 年に明らかとなった。*DJ-1* は転写調節、抗酸化ストレス、プロテアーゼ、ミトコンドリア complex 1 の正の制御を有することが申請者より明らかになった²⁻⁴⁾。更に、*DJ-1* はドパミン合成・分泌系に関与する酵素に直接結合し、またその遺伝子発現調節することで関与する⁵⁾。

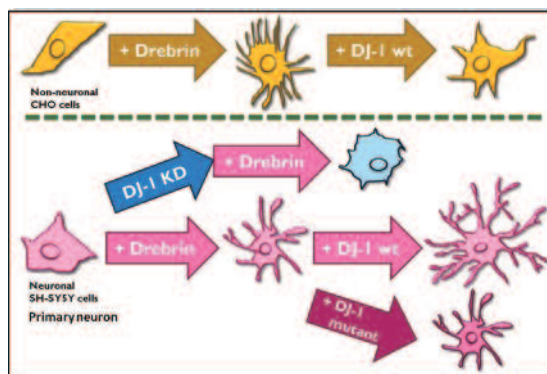
更に、*DJ-1* が直接ドレブリンに結合し、アクチン重合を活性化しスパインの突起伸長と太さを増幅することを見出した。*DJ-1* は 106 番目のシステイン (C106) の酸化レベルでその活性が調節され、過度の酸化体は活性を失う²⁾。*C106* 変異体やパーキンソン病患者で見られる *DJ-1* 変異体ではスパイン形成促進は見られなかった。また、*DJ-1* ノックダウン、*DJ-1* ノックアウトマウス、細胞では短縮スパインが観察された。アルツハイマー病は勿論のこと、孤発性パーキンソン病、ハンチントン病などは多くの患者で認知機能低下が見られ、また過度に酸化された *DJ-1* がこれらの疾患患者脳で報告されている。また、活性化 *DJ-1* 維持する *DJ-1* 結合化合物はパーキンソン病、アルツハイマー病モデル動物の症状を改善させた。こうした結果は、*DJ-1* がドレブリンとの結合を介したスパイン形成に重要な機能を有し、シナプス伝達を調節する可能性を示唆している。

この2年間に、ドレブリンとの結合を介した *DJ-1* によるシナプス制御機構を *DJ-1* 変異体、*DJ-1* ノックアウトマウスを用い、酸化ストレス等病態関連因子をからめて分子レベルで解析する。

DJ-1 は家族性パーキンソン病原因タンパク質であるが、種々の急性、慢性神経変性疾患で異常酸化型 *DJ-1* の存在が報告されている。*DJ-1* 機能は抗酸化ストレス、転写調節、ミトコンドリア制御などに視点がおかれ多くの解析がなされてきたが、シナプス制御の観点からは全く解析されていない。今回の *DJ-1* のドレブリンとの結合を介したスパイ

ン形成促進は新規かつ極めて重要な知見であり、多くの神経変性疾患発症への関与が想定されている *DJ-1* の神経変性疾患に対する共通な機構を提示するものであると考えられる。

1. Nagakubo, D. et al. *DJ-1*, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 509-13 (1997).
2. Taira, T. et al. *DJ-1* has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* **5**, 213-8 (2004).
3. Kato, I. et al. Oxidized *DJ-1* Inhibits p53 by Sequestering p53 from Promoters in a DNA-Binding Affinity-Dependent Manner. *Mol Cell Biol* **33**, 340-59 (2013).
4. Ariga, H. et al. Neuroprotective Function of *DJ-1* in Parkinson's Disease (Review). *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 683920 (2013).
5. Ishikawa, S. et al. Oxidative status of *DJ-1*-dependent activation of dopamine synthesis through interaction of tyrosine hydroxylase and 4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) decarboxylase with *DJ-1*. *J Biol Chem* **284**, 28832-44 (2009).



DJ-1 はドレブリン誘導スパイン形成において、スパイン分岐数、太さの両面で促進する。



ATR-X 症候群におけるシナプスパノロジー分子機構の解明

塩田 倫史

(東北大学大学院・薬学研究科・薬理学分野・助教)

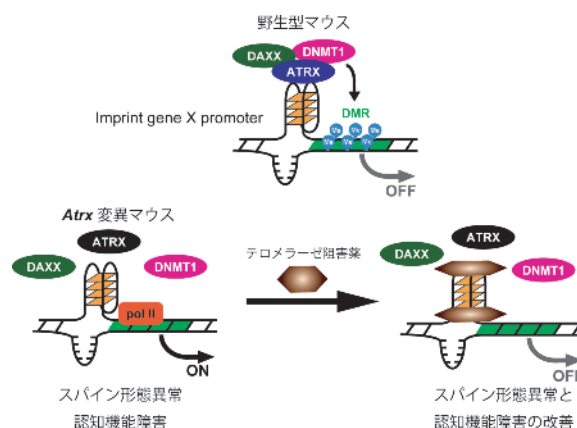
公募 A01

本研究の目的は、X 連鎖 α サラセミア精神遅滞症候群 (ATR-X 症候群) モデルマウスと ATR-X 症候群患者由来 iPS 細胞を用いて ATR-X 症候群における認知機能障害の原因因子を同定することである。ATR-X 症候群は X 染色体上の原因遺伝子 *ATRX* の変異により X 連鎖劣性遺伝形式をとる精神遅滞症候群である。罹患率は不明であるが、Juberg-Marsidi 症候群や Chudley-Lowry 症候群等の様々な精神遅滞症候群の家系でも変異が同定されていることから、遺伝子検査により診断される患者が増加するに伴い、臨床症状のスペクトラムが広がることが予想される。

ATR-X 症候群の軽症型である Chudley-Lowry 症候群の患者家系では、*ATRX* の exon 2 の変異 (R37X) が存在し、クロマチンリモデリング因子である ATRX タンパク質の発現量が約 80% 減少していることが報告されている。私達は、*ATRX* exon 2 欠損マウス (Atrx マウス) を作製し、このマウスが Chudley-Lowry 症候群と同様に発現量が約 80% 減少していることを確認した。さらに Atrx マウスは認知機能の低下、海馬 LTP の減弱、前頭皮質内側部の樹状突起スパイン形態異常を呈することを明らかにした^{1,2)}。樹状突起スパインはシナプスネットワークに必須の構造である。精神遅滞や自閉症患者の死後脳ではスパインの形態に異常がみられる。私達はこれまでの研究で、精神疾患の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 活性異常と、その下流である Rac1-GEF/PAK シグナルの過剰な活性化が起こることを明らかにした¹⁻⁴⁾。しかしながら、なぜ核内で機能するクロマチンリモデリング因子 ATRX の減少が、スパイン形態異常や精神遅滞を引き起こすのか不明である。*ATRX* 変異による精神遅滞の原因を追究するため、Atrx マウスにおいて DNA マイクロアレイを行った。スクリーニングの結果、あるインプリント遺伝子 X の mRNA が脳特異的に約 5 倍程度上昇していることが明らかとなった。しかしながら、そのインプリント遺伝子の詳細な細胞内機能は明らかとされていない。

本研究では、ATR-X 症候群において精神遅滞を引き起こす原因分子と予想されるインプリント遺伝子 X に着目し、ATR-X 症候群患者由来 iPS 細胞と動物モデルを用いて脳神経の機能解析を行い、治療ターゲットとなるシナプス病態関連分子を見出すことを目的とする。また、ATRX タンパク質が結合することが示唆されているグアニン 4 重鎖 (G4) 構造に結合するテロメラーゼ阻害薬の ATR-X 症候群における認知機能改善効果を検討する。テロメラーゼ阻害薬によるインプリント遺伝子 X の発現制御により ATR-X 症候群患者由来 iPS 細胞におけるシナプス機能の改善と Atrx マウスにおける認知機能の改善効果を検討する。

1. Shioda, N., Beppu, H., Fukuda, T., Li, E., Kitajima, I. & Fukunaga, K. Aberrant calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity is associated with abnormal dendritic spine morphology in the ATRX mutant mouse brain. *J Neurosci.* **31**, 346-358 (2011).
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.* **21**, 678-687 (2011).
3. Shioda, N., Moriguchi, S., Oya, T., Ishii, Y., Shen, J., Matsushima, T., Nishijo, H., Sasahara, M. & Fukunaga, K. Aberrant hippocampal spine morphology and impaired memory formation in neuronal platelet-derived growth factor beta-receptor lacking mice. *Hippocampus.* **22**, 371-378 (2012).
4. Shioda, N., Yamamoto, Y., Watanabe, M., Binas, B., Owada, Y. & Fukunaga, K. Heart-type fatty acid binding protein regulates dopamine D2 receptor function in mouse brain. *J Neurosci.* **30**, 3146-3155 (2010).



ATRX は DNA の G4 構造に結合し X の発現を抑制しているが、*ATRX* 遺伝子変異により、X が過剰に発現しスパイン形態異常を引き起こすと考えられる



シナプスオーガナイザーの機能破綻から神経発達障害の発症に至るシナプス病態の解明

吉田 知之

(富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)分子神経科学講座・准教授)

公募 A01

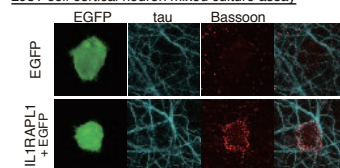
知的障害と自閉症は小児の重大なハンディーキャップとして最も高頻度の要因の1つである。自閉症患者の約7割が知的障害を伴うとされ、これらの神経発達障害に共通した病態形成のメカニズムが考えられている。私達はこれまでにX連鎖型知的障害・自閉症の原因遺伝子産物である膜分子 Interleukin-1 receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1) がシナプス誘導活性を持つ細胞接着分子(シナプスオーガナイザー)として機能することを見出している^{1,2)}。さらにシナプス後部のIL1RAPL1はシナプス前部の受容体チロシン脱リン酸化酵素 PTP δ と複合体を形成することによって双方向性にシナプス形成を誘導することを明らかにした²⁾。また、PTP δ や IL1RAPL1 欠損マウスではシナプスの減少が認められるほか、知的障害・自閉症に関連した行動異常が観察されている。これらの研究成果はシナプス誘導シグナルの破綻が知的障害・自閉症の発症に密接に関わることを強く示唆するものである。本研究ではこれらの成果を発展させ、IL1RAPL1 と PTP δ の相互作用からシナプス前部、後部が誘導される分子シグナルのネットワークを明らかにするとともに、シナプスオーガナイザーの機能欠損が引き起こす神経発達障害におけるシナプス病態と回路構築病態を明らかにすることを目標とする。具体的には私達が独自に開発したシナプス・インダクトーム解析法とシナプス分子機能解析系を用いる^{3,4)}。IL1RAPL1, PTP δ を固定化したビーズと神経細胞を共培養し、ビーズの周囲に一過的に誘導されるシナプス複合体をクロスリンカーで処理、回収、及び質量分析することによって、IL1RAPL1-PTP δ の結合からシナプス前終末及び後終末が誘導される分子シグナルの構成因子の網羅的検索を行う。さらにノックダウン法を用いてシナプス誘導調節の鍵分子をスクリーンする。

次に神経発達障害モデルとなるシナプスオーガナイザー欠損マウスのシナプス分子レベル、回路レベルの解析を通してシナプスオーガナイザー機能破綻が引き起こすシナプス分子病態と回路網構築病態を明らかにする。そのために IL1RAPL1 及び PTP δ 欠損マウスにおける上述のシナプス誘導調節分子の局在及び挙動の変化とスパイン動態を各種イメージングによって検討し、シナプスオーガナイザーの欠失に起因するシナプスの時空間的な構造変化と分子動態を抽出する。更に IL1RAPL1 及び PTP δ 欠損シナプスにおける Neuroligin-Neurexin など他の発達障害原因タンパク質の機能変化の有無を調べ、発達障害原因タンパク質間のクロストークを明らかにする。実際に IL-1 受容体サブユニットの1つである IL-1RAcP が PTP δ との結合を介してシナプス形成を誘導することが明らかになっており⁵⁾、IL1RAPL1 の機能欠損を補う複雑な機能補完系の存在が示唆されている。本研究からシナプスオーガナイザーの活性化からシナ

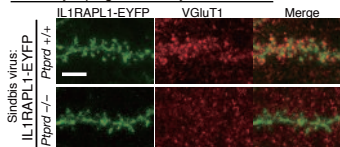
プス前部・後部の成熟を誘導するシグナル分子ネットワークが明らかとなり、これまで断片的であったシナプス形成・成熟過程における神経発達障害原因遺伝子産物の位置づけや相互関係を明らかにすることが出来る。また、自閉症・知的障害のシナプス病態および責任脳領域や神経回路の解明に貢献することが期待される。

1. Yoshida, T. & Mishina, M. Zebrafish orthologue of mental retardation protein IL1RAPL1 regulates presynaptic differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**, 218–228 (2008).
2. Yoshida, T., Yasumura, M., Uemura, T., Lee, S., Ra, M., Taguchi, R., Iwakura, Y. & Mishina, M. IL-1 receptor accessory protein-like 1 associated with mental retardation and autism mediates synapse formation by *trans*-synaptic interaction with protein tyrosine phosphatase δ . *J. Neurosci.* **31**, 13485–13499 (2011).
3. Uemura, T., Lee, S., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K. & Mishina, M. Trans-synaptic interaction of GluR δ 2 and neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell* **141**, 1068–1079 (2010).
4. Lee, S., Uemura, T., Yoshida, T. & Mishina, M. GluR δ 2 assembles four neurexins into trans-synaptic triad to trigger synapse formation. *J. Neurosci.* **32**, 4688–4701 (2012).
5. Yoshida, T., Shiroshima, T., Lee, S., Yasumura, M., Uemura, T., Chen, X., Iwakura, Y. & Mishina, M. Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule. *J. Neurosci.* **32**, 2588–2600 (2012).

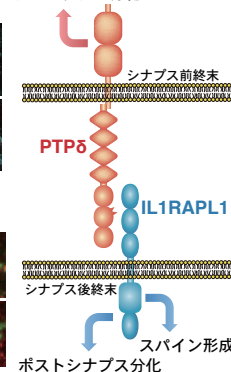
293T cell-cortical neuron mixed culture assay



In vivo synaptogenic activity of IL1RAPL1



プレシナプス分化



知的障害・自閉症原因遺伝子産物 IL1RAPL1 は PTP δ を介してシナプス形成を誘導するシナプスオーガナイザーである



Ca²⁺透過性AMPA受容体過剰発現による 緩徐な運動ニューロン死の分子病態解析

郭 伸

(東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター臨床医工部門・客員研究員)

公募AO1

これまでの研究内容

孤発性ALSに特化した病因研究を、1) 患者の剖検脊髄組織の解析、2) 得られた特異的分子異常を再現する分子病態モデルマウスの解析、3) 他の疾患特異的分子異常マーカーとの分子連関の解析、から進めてきた。1) 孤発性ALSでは運動ニューロン選択的な分子異常として、本来100%行われるべきAMPA受容体サブユニットGluA2のグルタミン・アルギニン(Q/R)部位のアデノシン・イノシン置換(A-to-I conversion, RNA編集)が起こらない未編集型GluA2 mRNAが少なからぬ割合で発現していることを患者剖検脊髄の単一運動ニューロンの解析から明らかにした^{1,2)}。この分子変化がRNA編集酵素ADAR2の選択的発現低下に依ること³⁾、孤発性ALSに疾患特異的であることも示した⁴⁾。2) ADAR2のコンディショナルノックアウトマウス(AR2)を開発し、この分子変化がALSに見られる様な緩徐な運動ニューロン死を引き起こすことを証明した⁵⁾。その解析から、この緩徐な運動ニューロン死が未編集型GluA2の発現によるCa²⁺透過性AMPA受容体の発現によることを明らかにした。すなわち、AR2マウスは孤発性ALSの分子病態モデルマウスであると同時に、AMPA受容体からの微量かつ持続的Ca²⁺流入が緩徐な神経細胞死を引き起こす初めての動物モデルである。3) 孤発性ALSにはTDP-43病理という病理学的指標がある。このTDP-43病理がADAR2活性低下に伴って出現することを患者脊髄の免疫組織化学的観察から明らかにし⁶⁾、さらに、ADAR2発現低下に依りもたらされた細胞内Ca²⁺上昇がCa²⁺依存性カルパインを活性化しTDP-43を易凝集性断片に切断されることによることを明らかにした⁷⁾。これらは、孤発性ALSの病因にADAR2発現低下が深く関与していることを示している。

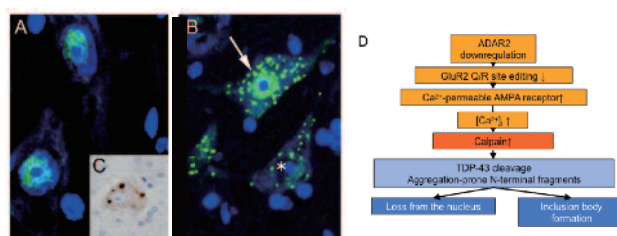
目指す研究内容

本研究班では、このモデルマウスAR2を用いて、細胞内Ca²⁺上昇が緩徐な細胞死を引き起こす更なるメカニズムを解析する。ALSに限らず変性性神経疾患ではシナプスにさまざまな病態が観察されるが、それが神経変性の原因なのか結果なのかは必ずしも明らかではない。本研究で用いるAR2マウスは、シナプスにおけるAMPA受容体のCa²⁺透過性の変化が緩徐進行性の神経細胞死を引き起こすことが詳細に検討されている初めてのモデル動物であり、孤発性ALSの分子病態を反映していることから、神経変性の分子メカニズムを形跡するための最適のモデルである。本研究では、このモデルマウスの運動ニューロン核にはnucleophagosome様構造物が形成されるという従来知られていない形態異常に着目し、シナプスに始まる病態が樹状突起→細胞体→核へと広がり細胞死に繋がる細胞死カスケードを解明することを目的とする。

予測されるアウトプット・意義

神経変性疾患の病因は未解明の部分が多く、断片的な知見は得られるものの、それらを引き起こす分子カスケードの理解に至っていない。AR2マウスは、孤発性ALSに生じている分子病態を再現していることから、細胞死に至るカスケードの解析は治療の分子標的の同定に役立つとともに、Ca²⁺シグナリング異常が想定されている他の神経変性疾患の細胞死メカニズムを理解する上にも役立つ知見を与えると考えられる。

1. Kawahara, Y. *et al.* Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* **427**, 801 (2004).
2. Takuma, H., Kwak, S., Yoshizawa, T. & Kanazawa, I. Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **46**, 806-815 (1999).
3. Hideyama, T. *et al.* Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiology of disease* **45**, 1121-8 (2012).
4. Kawahara, Y. *et al.* Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci Res* **54**, 11-4 (2006).
5. Hideyama, T. *et al.* Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci* **30**, 11917-25 (2010).
6. Aizawa, H. *et al.* TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol* **120**, 75-84 (2010).
7. Yamashita, T. *et al.* A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nature communications* **3**, 1307 (2012).



代表的な結果/研究内容の図
ALS運動ニューロンにおける
ADAR2発現低下から運動ニューロン死への分子カスケード

図：野生型マウス(A)、コンディショナルADAR2ノックアウトマウス(B)脊髄前角のTDP-43(緑)の免疫染色 TOPRO3(青)
C：ALS患者脊髄運動ニューロンのリン酸化TDP-43陽性封入体
D：ALS運動ニューロンにおけるTDP-43病理形成の分子カスケード



Ca_v2.1 遺伝子異常による神経機能障害の解明

渡瀬 啓

(東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・准教授)

公募 A01

P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルのメインサブユニット Ca_v2.1 は、神経伝達物質放出や活動電位の発火などに重要な役割を果たす。Ca_v2.1 遺伝子の変異はさまざまな優性遺伝性神経疾患と関連しており、C 末端細胞質内領域の完全欠失は、てんかんを伴う進行性失調の原因となり、また本邦で頻度が高い脊髄小脳変性症 6 型 (SCA6) では、最終エクソン (エクソン 47) に存在するポリグルタミン (PolyQ) をコードする CAG リピートが伸長している。エクソン 47 の開始部にはタンデムなスプライスアクセプター配列があり、MPI、MPc の 2 つの分子種が産生されるが、このうち MPc はアクセプター直後のストップコドンのため C 末端の細胞質内ドメインが短いチャネルとなり、MPI のみが PolyQ 鎖をコードする。

これまで我々は PolyQ 病のモデル動物として、ノックイン (KI) マウスの作製と解析を行ない、その病態を解明する研究をおこなってきた¹⁻⁵⁾。そのうち SCA6 KI マウスを用いた解析では SCA6 変異による Ca_v2.1 の構造変化それ自体は、チャネルの基本的チャネル機能には影響せず、何らかの toxic gain of function の機構を介して病態が惹起されること¹⁾。その凝集体形成やプルキンエ細胞死にエンドリソソーム分解系が重要な役割を果たすこと等を示してきた²⁾。

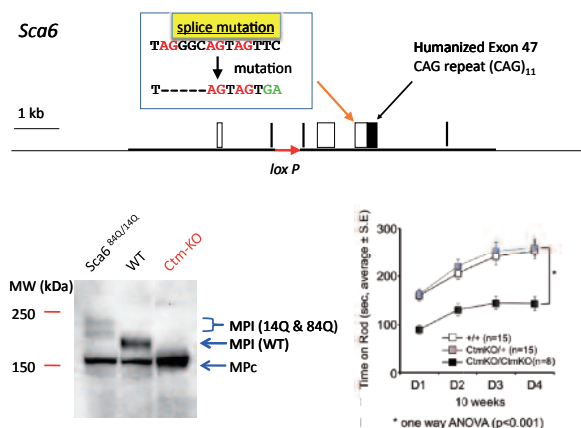
PolyQ 病の病態には、それぞれの疾患遺伝子産物が担う生理機能の異常が介在していることが明らかとなっており、SCA6 変異や C 末端細胞質内領域の欠失は、C 末端領域を介した分子間相互作用を変化させ、Ca_v2.1 チャネル近傍約数 10 nm に存在する種々の分子により構成される“Ca²⁺ナノドメイン”が担う生理機能を変化させるか、或はプロセッシングによって生ずるとされる C 末端断片 (CTF) が担う転写調節機能の変化を介して神経変性やてんかんの病態を発現させる可能性が考えられるが詳細は不明である。

最近我々は、C 末端細胞質内領域の担う機能や相互作用を解明する目的で、MPI を発現せず MPc 型チャネルのみを発現する Ctm-KO マウスや MPI のみを発現するマウスを作製し、Ctm-KO マウスが、その神経細胞の基本的 Ca チャネル機能に変化がないにもかかわらず、運動失調・てんかん発作を発症することを見出した。加えて Ca_v2.1 C 末端をベイトとした two-hybrid 解析から、RIM 結合タンパク (RIMBP-1, -2) などのシナプス機能分子や Pin1 イソメラーゼを相互作用因子の候補として同定してきた。

本研究課題では、これらの成果をさらに発展させ、Ctm-KO マウスや SCA6 KI マウスを材料として、プロテオミクス・トランスクリプトーム解析・電気生理学等の手法を駆使して、Ca_v2.1 C 末端領域の機能を蛋白間相互作用や遺伝子発現制御の面から解明し、Ca_v2.1 遺伝子異常によ

るプルキンエ細胞変性やてんかんの発症メカニズムの解明を目指す。

1. Watase, K. *et al.* Spinocerebellar Ataxia Type 6 Knock-in Mice Develop a Progressive Neuronal Dysfunction with Age-dependent Accumulation of Mutant Ca_v2.1 Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 11987-11992 (2008).
2. Unno, T. *et al.* Development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement in the pathogenesis of SCA6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 17693-17698 (2012).
3. Gatchel, J. R. *et al.* The Insulin-like growth factor pathway is altered in Spinocerebellar ataxia type 1 and type 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 291-296 (2008).
4. Watase, K. *et al.* Lithium therapy improves neurological function and hippocampal dendritic arborization in a spinocerebellar ataxia type I mouse model. *PLoS Med.*, **4**, e182 (2007).
5. Watase, K. *et al.* A long CAG repeat in the mouse *Sca1* locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron*, **34**, 905-919 (2002).



- A) Ctm-KO マウスの作製
B) 小脳抽出物のイムノブロット解析
C) ロータロッド解析



中枢シナプスの形成、維持、可塑性を制御する分子から解く 病理メカニズム

鈴木 崇之

(東京工業大学大学院生命理工学研究科・准教授)

公募A01

脳が正常に作動するにはニューロンとニューロンが正確に繋がりあい、その繋がりを維持し、状況に応じて可塑的に変化させなければならない。このことによって、脳内空間の正確な位置に必要な数のシナプスを配置し、一生の間維持し、学習や経験によってその特性を可塑的に変化させる。これらが異常となると、精神疾患など重篤な病気につながると考えられる。どのような遺伝子プログラムが異常になることによってシナプスの特性が異常となり、どのように精神疾患を引き起こすかはわかっていない。

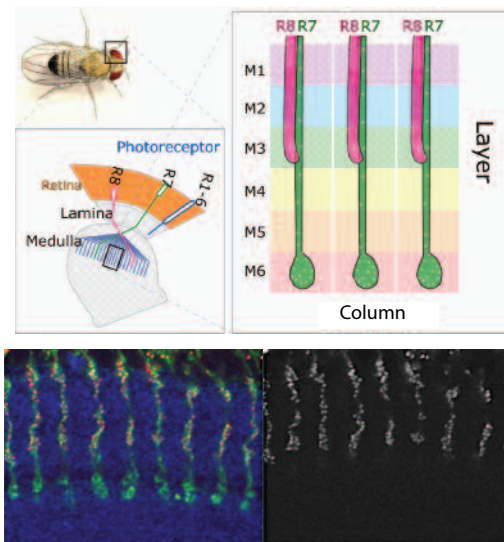
近年、シナプス形成を促進するシナプス・オーガナイザーと呼ばれる一連のタンパク質が発見され、注目を浴びている。これらのシナプスオーガナイザーは主に発生時のシナプスの形成を促進すると考えられるが、同様に加齢に対抗する脳内のシナプスの維持、あるいは柔軟に環境に順応するためのシナプス可塑性を促進する分子プログラムも存在するはずである。我々もよく知っているように、ヒトは一瞬で記憶した事柄を一生の間忘れないことがあるし、いくつになっても学習したり記憶したりすることができる。これらを維持する分子プログラムが壊れると、記憶や学習が失われるだけでなく、**自閉症、統合失調症、躁うつ病**等の精神疾患につながると考えられている。実際、このようなタンパク質との関連が疑われており、シナプス形成、維持、可塑性の分子メカニズム解明が疾患メカニズムの解明に繋がると考えられる。

我々は今まで、神経細胞の軸索がどのように標的となる次の神経細胞を認識し、それに繋がるように伸ばしていくかということを主眼として研究してきた。ショウジョウバエの視神経系をモデルとして、いくつかの重要なタンパク質がそのコントロールに必要であることを見出してきた¹⁻⁵⁾。

本研究は、今まで培ってきた神経遺伝学的手法を用いて中枢シナプスの新たなシナプス・オーガナイザーの同定し、ショウジョウバエの優れた分子生物的手法を駆使して、原因タンパク質の機能解析を1シナプスの高解像度で解析する。中枢シナプスの①形成、②維持、③可塑性の分子メカニズムを明らかにすることによって、中枢シナプス病の発症要因の解明、モデル生物の開発を目標としている。

system. *Nat Neurosci* **14**, 314-23 (2011).

5. Mann, K. et al. A putative tyrosine phosphorylation site of the cell surface receptor Golden goal is involved in synaptic layer selection in the visual system. *Development* **139**, 760-71 (2012).



上段：ショウジョウバエ視神経系の模式図
視神経細胞軸索が脳内に伸び、層状・柱状構造を形成する

下段：分子マーカーでシナプスを光学顕微鏡で可視化することができる
(緑：視神経の軸索。赤い点：前シナプスの構造体)

1. Berger, J. et al. Systematic identification of genes that regulate neuronal wiring in the *Drosophila* visual system. *PLoS Genet* **4**, e1000085 (2008).
2. Tomasi, T., Hakeda-Suzuki, S., Ohler, S., Schleiffer, A. & Suzuki, T. The transmembrane protein Golden goal regulates R8 photoreceptor axon-axon and axon-target interactions. *Neuron* **57**, 691-704 (2008).
3. Ohler, S., Hakeda-Suzuki, S. & Suzuki, T. Hts, the *Drosophila* homologue of Adducin, physically interacts with the transmembrane receptor Golden goal to guide photoreceptor axons. *Dev Dyn* **240**, 135-48 (2011).
4. Hakeda-Suzuki, S. et al. Golden Goal collaborates with Flamingo in conferring synaptic-layer specificity in the visual



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・特任講師)

公募 A01

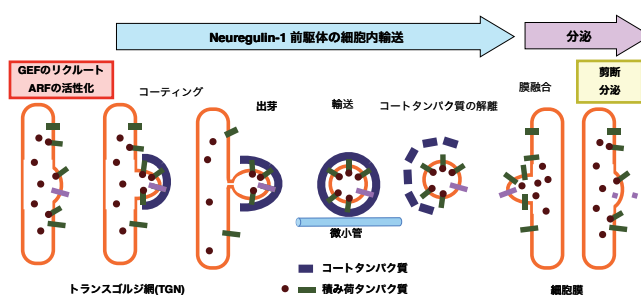
統合失調症は世界人口の約 1% が罹患する重篤な精神神経疾患であるにもかかわらず、その発症機序はよく分かっていない。統合失調症患者の多くには、神経発達（神経細胞の移動、軸索形成、シナプス形成等）に何らかの障害があり、環境因子（周産期のウイルス感染など）が加わって発症脆弱性が生じ、その後のストレス等で発症するという説が有力である。近年の研究により、神経回路網の発達障害が抑制性-興奮性神経回路のバランス異常をもたらし、発症脆弱性を高めていると推定されている。DISC1、Neuregulin-1 は、遺伝子解析によって推定された、高い可能性を有する原因遺伝子の一例である。しかし、統合失調症は極めて複雑な多重遺伝子疾患であり、遺伝子間の有機的な関連性は未だ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 (Mei et al, Nat. Rev. Neuroscience, 2008)。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 (Pietro F. et al., Nature, 2010)。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。

我々のグループは DISC1 ノックアウトマウスを作製し、その表現型解析を行った。また、市販されている抗体には特異的 DISC1 を認識するものがなかったために、特異的抗体を新規に作製した。その結果、表現型解析では複数の行動解析によりこのマウスが統合失調症様の表現型を示し、統合失調症発症脆弱性モデルマウスとして使用できることがわかった。細胞内局在の解析で、DISC1 は神経細胞のゴルジ体膜上に認められ、輸送タンパク質の選別および輸送に関与していることが示唆された。

Neuregulin-1 の細胞膜への輸送プロセス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。ゴルジ膜上で DISC1 が Neuregulin-1 と選択的に直接結合し、輸送を制御することによって、その分泌量を直接制御する機能モデルを考えている。実際に、我々は DISC1 欠損神経細胞で、前駆体型 Neuregulin-1 の分泌量が減少していることを発見し、DISC1 が Neuregulin-1 の細胞内輸送と分泌の制御に直接関与することを見出した。本研究は、DISC1 と Neuregulin-1 が機能的な分子間ネットワークを形成し、そのしていることを初めて示唆するものである。現在、DISC1 ノックアウトマウスおよび Neuregulin-1 トランスジェニックマウスを用いた個体レベルの分子生物学および行動薬理的解析から、統合失調症の診断や治療への応用を目指している。

1. Kuroda, K., Yamada, S., Tanaka, M., Iizuka, M., Yano, H., Mori, D., Tsuboi, D., Nishioka, T., Namba, T., Iizuka, Y., Kubota, S., Nagai, T., Ibi, D., Wang, R., Enomoto, A., Isotani-Sakakibara, M., Asai, N., Kimura, K., Kiyonari, H., Abe, T., Mizoguchi, A., Sokabe, M., Takahashi, M., Yamada, K. & Kaibuchi, K. Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the Disc1 gene in the mouse. *Hum Mol Genet* **20**, 4666-83 (2011).
2. Yamada, M., Yoshida, Y., Mori, D., Takitoh, T., Kengaku, M., Umeshima, H., Takao, K., Miyakawa, T., Sato, M., Sorimachi, H., Wynshaw-Boris, A. & Hirotsune, S. Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly. *Nat Med* **15**, 1202-7 (2009).
3. 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**, 1057-68 (2009).
4. Toyo-oka, K., Mori, D., Yano, Y., Shiota, M., Iwao, H., Goto, H., Inagaki, M., Hiraiwa, N., Muramatsu, M., Wynshaw-Boris, A., Yoshiki, A. & Hirotsune, S. Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J Cell Biol* **180**, 1133-47 (2008).
5. Mori, D., Yano, Y., Toyo-oka, K., Yoshida, N., Yamada, M., Muramatsu, M., Zhang, D., Saya, H., Toyoshima, 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**, 352-67 (2007).



Neuregulin-1 前駆体の細胞内輸送と成熟型 Neuregulin-1 の分泌
Neuregulin-1 前駆体のゴルジ体からの輸送は、DISC1 によって制御される



神経発達障害におけるシナプス病態の分子基盤解明

中島 欽一

(九州大学大学院医学研究院・応用幹細胞医科学部門・教授)

公募 A01

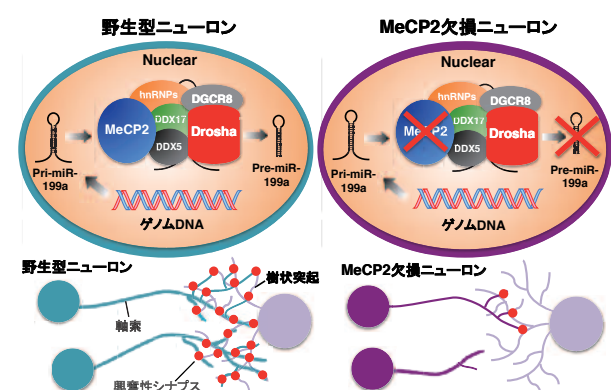
私たちはまず、全く異なる2種類のサイトカインが相乗的に作用し、胎生後期の神経幹細胞からアストロサイトへの分化を誘導すること、及びその分子メカニズム明らかにすることから神経科学の研究を始めました¹⁾。しかしその後、胎生中期神経幹細胞を前述のサイトカインで刺激してもアストロサイトへの分化が誘導されないことが分かり、これを説明するモデルとして私たちは次に、胎生中期神経幹細胞ではアストロサイト特異的遺伝子がメチル化を受けているためにアストロサイトへは分化できず、発生進行に伴いこれら遺伝子の脱メチル化が生じることで神経幹細胞は「細胞外シグナル」に応答したアストロサイトへの分化が可能になることを示しました²⁾。さらに、胎生中期に神経幹細胞から産生されたニューロンが、残存神経幹細胞のNotchシグナルを活性化させ、この脱メチル化を誘導することも報告しました³⁾。

これらの研究を行う過程で、必然的にメチル化DNA結合タンパク質の機能にも興味を抱き、今回着目するMeCP2の機能解析を開始しました。Rett症候群(RTT)の原因遺伝子産物であるMeCP2は、分化というよりはニューロンの成熟に関与すると考えられていましたが、実は神経幹細胞からアストロサイトへの分化を抑制すると共に、アストロサイト分化誘導条件下では、ニューロンへの分化を促進できることを明らかにしました^{4,5)}。しかしMeCP2の変異・欠損が何故RTTを引き起こすのか、そのメカニズムは以前不明です。私たちも含めて、幾つかのグループが遺伝子発現プロファイリングをマイクロアレイ解析で行いましたが、これまで大きな変動を示し、RTT発症の原因であろうと推定されるような遺伝子は同定されていません。そこで候補者らは、MeCP2相互作用因子を網羅的に同定することで、この問題解決に迫ろうという別の方法を選択しました。その結果、miRNAのプロセッシングに関与する分子との相互作用が明らかとなり、標的miRNAとしてmiR-199aを同定しました(未発表)。

RTT患者およびMeCP2ノックアウト(KO)マウスは、脳体積、個々のニューロンの細胞体サイズの減少、興奮性シナプス伝達の異常を示します。特にMeCP2欠損マウス由来の海馬ニューロンは、微小興奮性シナプス電流(mEPSC)頻度の減少を示すこと、MeCP2を過剰発現するトランスジェニックマウスまたはMeCP2KOマウス由来の海馬ニューロンはそれぞれ興奮性シナプス形成数の増加および減少を示すことが報告されています。これらに関して私たちは、今回同定したmiR-199aをMeCP2KOマウス海馬由来ニューロンに発現させると、mEPSC頻度の減少、興奮性シナプス形成数の減少、細胞体サイズの減少といった各種MeCP2欠損による表現型が改善されることを見出しました。

MeCP2遺伝子の変異は、RTTをはじめ、自閉症、双極性障害、統合失調症をふくめた種々の発達障害・精神疾患への関与が示唆されています。これらの疾患はいずれもシナプス機能障害との関連が示唆されているため、本研究においてMeCP2の遺伝子異常によるmiRNA生合成破綻というエピジェネティック変動を介したシナプス機能障害誘導のメカニズムを解明することが出来れば、RTTのみならず他の発達障害・精神疾患へも応用可能なシナプス病態の分子基盤解明の一助になることが期待されます。

1. Nakashima, K. *et al.* Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* **284**, 479-482 (1999).
2. Takizawa, T. *et al.* DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* **1**, 749-758 (2001).
3. Namiyama, M. *et al.* Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. *Dev. Cell* **16**, 245-255 (2009).
4. Tsujimura, K., Abematsu, M., Kohyama, J., Namiyama, M. & Nakashima, K. Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Exp. Neurol.* **219**, 104-111 (2009).
5. Kohyama, J. *et al.* Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 18012-18017 (2008).



RTT症候群はmiRNA生合成不全が引き起こすシナプス機能障害で発症する可能性がある



神経変性を伴うリソソーム蓄積症におけるシナプス病態の解明と治療への応用

伊藤 孝司

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・創薬生命工学分野・教授)

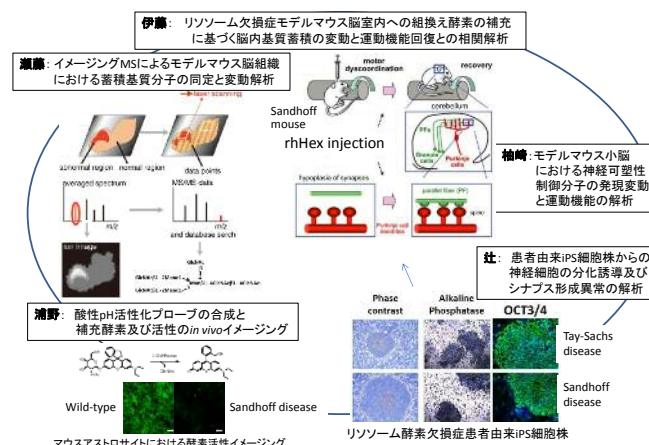
公募 A01

リソソーム蓄積症 (Lysosomal storage disease, LSD) は、タンパク、糖質や脂質の分解代謝に関わるリソソーム酵素の単一遺伝子変異が原因で、基質の過剰蓄積を伴って発症する遺伝性代謝異常症である。また多くの症例が脳組織での神経変性と中枢神経症状を伴う。しかしシナプス形成異常を含む発症機構に関しては不明の部分が多く、有効な治療法も無いのが現状である。筆者は、これまでリソソームの糖鎖分解酵素である β -Hexosaminidase (Hex) の欠損により脳内 GM2 ガングリオシド等の過剰蓄積と神経発達遅滞や小脳失調などを伴う Tay-Sachs 病や Sandhoff 病を研究対象とし、リソソーム酵素に特異的に付加されるマンノース 6-リン酸残基含有糖鎖を改変し、そのレセプターを介した神経系細胞内への取り込み効率の高い改変型ヒト Hex を開発してきた。また Sandhoff 病モデル (SD) マウスの脳脊髄液内への同酵素補充により、神経細胞やグリア細胞内の蓄積基質が分解され、運動機能が改善するとともに寿命が延長することを報告してきた^{1,2)}。

本研究では、神経変性 LSD モデルマウスや LSD 患者 iPS 細胞から分化誘導した培養神経系モデルにおけるシナプス形成異常と組換えリソソーム酵素の補充に基づく運動機能回復及びシナプスやニューロサーキットの再生メカニズムの解明を目的とする。GM2 ガングリオシドシスモデルとしての SD マウスに加え、現在筆者が作製中の、末端シアル酸含有糖鎖蓄積を伴うコンディショナル神経変性 LSD モデルマウス脳室内への酵素補充効果を検討する。連携研究者の浦野らは酸性 pH 活性化蛍光プローブを開発している³⁾。この蛍光プローブで標識された組換えリソソーム酵素やその人工蛍光基質 (Rhodol 誘導体) を用いた補充酵素の神経系細胞内輸送及び脳内分布の *in vivo* イメージングを行う。また瀬藤ら⁴⁾ が開発した質量顕微鏡を用いるイメ

ージング MS により、LSD モデルマウスの発症過程における各脳領域での蓄積物質の同定と分布および脳室内酵素補充後の消失パターンと運動機能回復との相関を解析する。また柚崎らが、これまでに発見した小脳の神経可塑性制御分子 (Cbln1 等)⁵⁾ と細胞外リソソーム酵素の関与に着目し、LSD モデルマウス小脳におけるシナプス形成異常の分子機構及び酵素補充後のシナプス再生と運動機能回復との相関を探究する。さらに最近、辻らが樹立した中枢神経症状を伴う LSD 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した Neurosphere や神経前駆細胞、成熟神経細胞およびグリア細胞などの培養細胞モデルを用い、シナプス・ニューロサーキット形成の異常と治療用改変型酵素補充による正常化の分子メカニズムを解明する。本研究で得られる知見から、現在ムコ多糖症 1 及び 2 型等の一部の疾患に対し臨床試験が行われている組換え酵素の脳脊髄液内補充療法をはじめ、中枢神経症状を伴う LSD 患者に対する新規の治療薬および治療技術の開発に繋がる可能性が期待される。

1. Tsuji, D. *et al.* Highly phosphomannosylated enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis. *Ann. Neurol.* **69**, 691-701 (2011).
2. Matsuoka, K. *et al.* Therapeutic potential of intracerebroventricular replacement of modified human β -hexosaminidase B for GM2 gangliosidosis. *Mor. Ther.* **19**, 1017-1024 (2011).
3. Urano, Y. *et al.* Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat. Med.* **15**, 104-109 (2009).
4. Setou, M. *et al.* Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* **417**, 83-87 (2002).
5. Matsuda, K. *et al.* Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor $\delta 2$, a bidirectional synapse organizer. *Science* **328**, 363-368 (2010).



神経変性を伴うリソソーム蓄積症モデルにおけるシナプス形成異常と組換え酵素補充による正常化機構の解明



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)

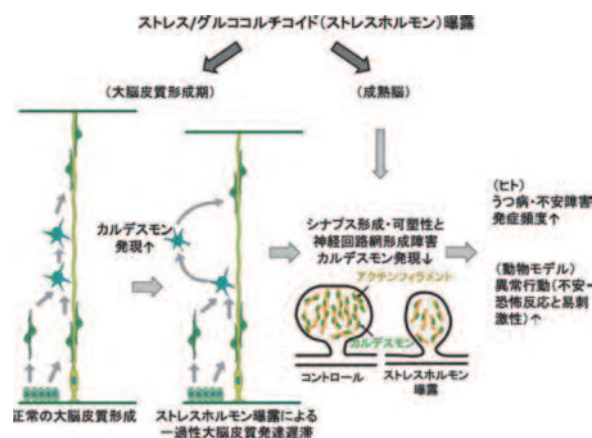
公募A01

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なっている。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。また、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、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）亢進に伴う細胞移動（放射状移動、radial migration）異常であることを見出した^{4,5,6)}（図）。従来のシナプス形成に至る長期神経培養系はストレスホルモンの存在あるいは混在が不可避であった。そこで、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）培養系を確立した。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⁷⁾（図）。

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。また、新規神経細胞培養系を用いた網羅的遺伝子解析により、ストレスホルモン曝露に伴いエピゲノム制御を受けるストレス関連遺伝子群の検索とシナプス可塑性障害への関与を解析する。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ノロジーやサーキットパノ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).
7. Tanokashira, D., Morita, T., Hayashi, K., Mayanagi, T., Fukumoto, K., Kubota, Y., Yamashita, T. & Sobue, K. Glucocorticoid suppresses dendritic spine development mediated by down-regulation of caldesmon expression. *J Neurosci* **32**, 14583-14591 (2012).



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⁴⁻⁷⁾



遺伝性側頭葉てんかんのシナプスおよび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

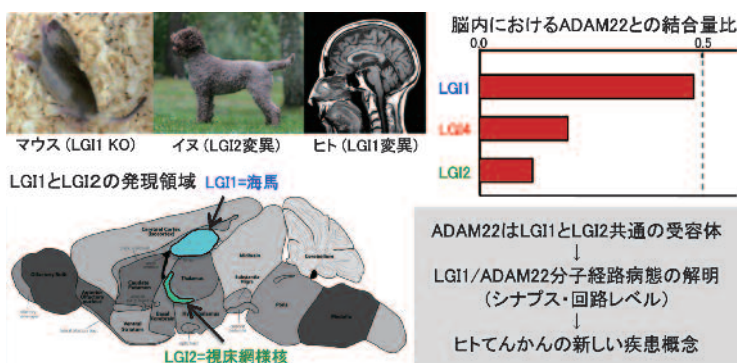
“てんかん”は人口の約1%に発症する頻度の高い神経疾患であり、けいれんや意識消失発作を反復する。神経細胞および神経回路の異常興奮によるものと考えられているが、病態解明は十分進んでおらず、治療抵抗性のてんかんも少なくない。ヒト遺伝学的解析により、現在までに多くのてんかん原因遺伝子が同定されているが、その多くはイオンチャネルをコードし、遺伝性てんかんは「チャネル病」と捉えられていた。一方、申請者は脳内の主要な興奮性シナプス伝達を司るAMPA型グルタミン酸受容体に関連した相互作用分子を独自の生化学的手法により精製し、PSD-95、Stargazin、ADAM22およびLGI1を主要分子として同定した¹⁾。興味深いことに、後者3分子はてんかんと関連する遺伝子であることが報告されていた。とりわけLGI1はイオンチャネルをコードしないヒトのてんかん原因遺伝子として初めて報告され注目を集めていた。また、最近LGI1がけいれんや記憶障害を主徴とする自己免疫性辺縁系脳炎の自己抗原であることが報告され、ヒト脳病態におけるLGI1分子異常は一層重要視されている。これまでに申請者らは1) LGI1が脳特異的な分泌蛋白質であり、膜蛋白質ADAM22と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¹⁾、2) 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、致死性てんかんが必発すること²⁾を世界に先駆けて見出した³⁾。また本新学術領域公募研究において、前年度までに、てんかん患者にみられるヒトLGI1 ミスセンス変異の性状解析を個体レベルで進め、LGI1 遺伝子異常によるてんかんの分子病態を明らかにしつつある(横井ら、査読実験中)。またLGI分子ファミリーに属するLGI2もADAM22を受容体とすること、LGI2変異がイヌてんかんと関連することを見出した⁴⁾(図1; Lohi 博士ら・ヘルシンキ大との共同研究)。このように、LGI1分子異常のてんかん病態への関与は明確であり、「LGI1/ADAM22分子

経路の異常が興奮性シナプス伝達の低下さらにはてんかんを引き起こす分子過程」が解明されれば、脳の興奮性を規定する根源的なメカニズムに基づく新しいてんかん疾患概念と治療戦略を提唱できる段階にある(図1)。

本研究では、LGI1・ADAM22/23からなるリガンド・受容体を手がかりに独自に得てきた知見を基盤として、てんかんの病態を解明する。具体的には、LGI1 遺伝子変異が1) シナプス伝達異常と2) 神経回路異常をもたらす分子過程を明らかにし、さらに3) 見出したてんかん分子病態に基づく新たなてんかん治療戦略を探索して、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。

てんかんは脳の局所あるいは全体の興奮性上昇という共通の現象をきたす疾患である一方、その病因はさまざまで、いまだ根本的な治療法はなく社会問題にもなっている。LGI1/ADAM22は、脳のけいれん閾値を決定する根源的な分子経路を担っていると考えられ、本研究により、まったく新しいてんかん疾患概念をいち早く提唱するとともに、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成果を得ることを目指す。

1. Fukata Y et al. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulates synaptic transmission. **Science** 313: 1792-1795, 2006
2. Fukata Y et al. Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. **Proc Natl Acad Sci** 107: 3799-3804, 2010
3. Yokoi N, Fukata M, Fukata Y. Synaptic plasticity regulated by protein-protein interactions and posttranslational modifications. **Int Rev Cell Mol Biol** 297: 1-43, 2012
4. Seppala EH, Jokinen TS, Fukata M, Fukata Y et al. LGI2 truncation causes a remitting focal epilepsy in dogs. **PLoS Genetics** 7:e1002194, 2012

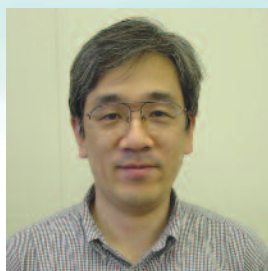


LGI1分子異常はてんかん発症と強く関連する

LGI1とLGI2変異はヒトとイヌでてんかんを引き起こす

LGI1だけでなくLGI2もADAM22の脳内リガンドであることが分かった

LGI1/ADAM22は脳のけいれん閾値を決定する普遍的なリガンド・受容体である



近視難聴合併症とシナプス病態との関連の解明

有賀 純

(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A01

近視は最も頻度の高い視機能障害であり、アジア系の人種では50%-70%にも及ぶという報告がある。近視の発症には遺伝因子が大きく関与することが知られているが、複数の全ゲノム関連解析、複数の家系の連鎖解析で確認された近視原因遺伝子は少ない。難聴（先天性）も同様に非常に頻度の高い感覚障害として知られており、出生時の有病率は約1/1000であり、先進国では50%以上の小児期の永久難聴が遺伝的要因によって起きることが知られている。難聴の小児では視機能障害の発症率が高いことが知られているが、近視と難聴の合併症の原因遺伝子は今まで不明であった。一方、内耳・網膜には共通してリボンシナプスと呼ばれる構造があり、通常のシナプスに索上の構造が付加されることにより、すぐに放出できる貯蔵されたシナプス小胞の量が増加して、常に強弱の幅の広い情報が入力する眼や内耳の感覚受容に特化した構造ではないかと提唱されている。

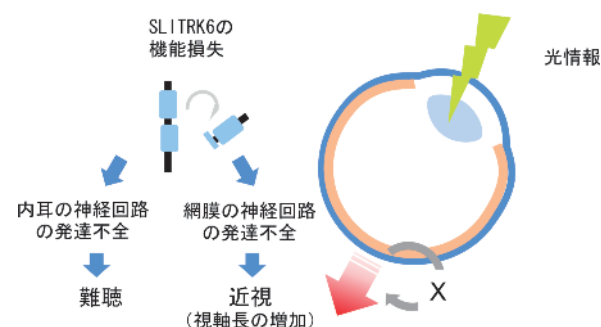
我々はこれまでに脊椎動物のロイシンリッチリピートドメインを含む膜タンパク質群と高次脳機能の関連に注目して、その1グループであるSlitrkファミリーを報告した¹⁾。これまでに、Slitrk6が内耳の神経回路網形成に重要な役割を持つこと²⁾、Slitrk6欠損マウスは感音性難聴のモデルマウスとなること³⁾、Slitrkファミリータンパク質にはシナプス誘導活性があること⁴⁾を報告した。最近、SLITRK6ファミリーのナンセンス変異が、近視難聴合併症の患者を含む独立の3家系で発見されたとの連絡を海外共同研究者より受け、我々がSlitrk6欠損マウスの眼の表現型を解析したところ、視軸長の増加が確認され、Slitrk6欠損マウスが近視と難聴の合併症の疾患モデルとなることが明らかとなった⁵⁾。

これまでの解析から、発生過程の網膜の内顆粒層、神経節細胞層でSlitrk6の遺伝子発現が認められ、Slitrk6欠損マウスでは生後発達過程で視軸長の延長がおきることがわかった。さらにリボンシナプスマーカーの一つを使って、リボンシナプスの形成を検討したところ、リボンシナプスマーカーの発現が遅延していることが明らかになった。これらの結果から、内耳・網膜に共通するリボンシナプスの形成におけるSlitrk6の役割を解明することが重要な研究課題となった。

本研究ではSlitrk6欠損マウスについて、リボンシナプスの形成障害の実態、および内耳及び網膜におけるSlitrk6のリボンシナプス誘導の分子メカニズムを解明する。これまでにSlitrkファミリーに対する結合タンパク質として知られている受容体型タンパク質酪氨酸酵素Ptp⁶⁾がこの場合にも作用しているのか、内耳の神経回路形成の異常で示唆されたニューロトロフィン⁵⁾が網膜の場合にも重要な役割を果たすのか、が主な検討項目となる。本研究

により、遺伝的要因によるシナプス形成の異常と感覚障害の発症との関連が明らかにされ、複数の神経疾患の病態との関連が提唱されているSlitrkファミリータンパク質⁶⁾の分子機能解明につながる手がかりが得られる。

1. Aruga, J. & Mikoshiba, K. Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.* **24**, 117-29 (2003).
2. Katayama, K. et al. Disorganized innervation and neuronal loss in the inner ear of Slitrk6-deficient mice. *PLoS one* **4**, e7786 (2009).
3. Matsumoto, Y. et al. Impaired auditory-vestibular functions and behavioral abnormalities of Slitrk6-deficient mice. *PLoS one* **6**, e16497 (2011).
4. Takahashi, H. et al. Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPdelta trans-synaptic interaction. *Nat. Neurosci.* **15**, 389-98, S1-2 (2012).
5. Tekin, M. et al. SLITRK6 mutations cause myopia and deafness in humans and mice. *J. Clin. Invest.* **123**, 2094-102 (2013).
6. Katayama, K. et al. Slitrk1-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities. *Mol. Psychiatry* **15**, 177-84 (2010).



SLITRK6の機能不全は、内耳および網膜の神経回路発達不全を引き起こす



自閉症関連分子 TAO2 キナーゼによるスパイン形成制御

山形 要人

((公財) 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。

私達は、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 (1-2)、解析を行ってきた (3-5)。その一つである arcadlin は、プロトカドヘリンに属する分子であるが、誘導後スパインへ運ばれ、シナプス構築に必須な N-cadherin と結合し、そのエンドサイトーシスを促進することによってスパイン密度を減少させることも明らかにしている (3) (図 A, B)。この過程には、arcadlin 細胞内領域と結合する TAO2 キナーゼ、さらに下流に存在する p38 MAP キナーゼの活性化が必要であった (図 C 左)。また、arcadlin ノックアウト (KO) ニューロンでは、スパイン密度が野生型より増加していることも見出した (図 B)。このように、arcadlin はてんかん発作後の海馬や大脳皮質等において誘導され、難治性てんかんに伴うスパイン減少を起こすと考えられる。

一方、ヒトの自閉症患者の臨床遺伝学的研究から、プロトカドヘリンの遺伝子変異が自閉症の発症に関与することが報告されている (Trends Neurosci. 32:402-12, 2009)。すなわち、プロトカドヘリンのアミノ酸変異によってスパイン形態が変化し、自閉症を発症する可能性が考えられる。また、arcadlin 情報伝達系についても、TAO2 遺伝子を含む染色体領域 (16p11.2) の微小欠失や微小重複が精神遅滞を伴う自閉症や統合失調症と関連する (N. Engl. J. Med. 358:667-75, 2008) ことも報告されている。さらに、私達は自閉症患者において TAO2 遺伝子の一塩基変異例も見出している (未発表)。以上の事実から、arcadlin およびその情報伝達分子の異常が自閉症や精神遅滞の原因となる可能性が示唆される (図 C 右)。

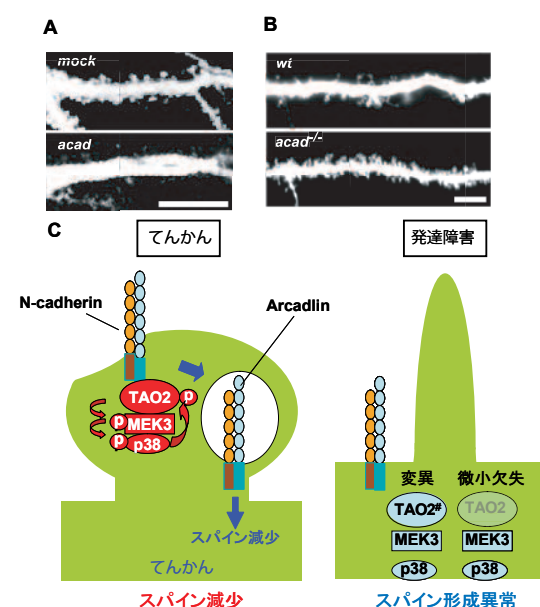
そこで、本研究では上記の仮説を検証するため、以下の3つの目標を設定する。

- 1) Arcadlin 情報伝達系の異常によって樹状突起スパイン形態が変化するか、もしそうなら、その分子機構を培養ニューロンを用いた実験により明らかにする。
- 2) 自閉症患者で見つかった情報伝達分子の欠損あるいは変異を持つマウスを作成する。
- 3) このマウスを用いて、脳内の樹状突起スパインを可視化し、形態変化を定量解析する。また、スパインの形態学的変化が電気生理学的変化や行動異常と関連するかどう

かを検証する。

他のプロトカドヘリンについても発達障害等との関連が報告されているが、そのメカニズムは明らかでない。本研究を遂行することにより、スパイン形成障害を伴う自閉症における arcadlin-TAO2-p38 MAPK カスケードの役割が明らかになり、「シナプス病態」領域の推進に貢献できるものと考えている。また、本領域の他班員とも共同研究を行っており、新しい切り口の研究が展開しつつある。これらの研究が完成すれば、精神遅滞や自閉症のメカニズムの一端が明らかとなり、新しい治療法開発のための標的分子になり得ると考えられる。

1. Yamagata, K. et al. rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J Biol Chem* **269**, 16333-9 (1994).
2. Yamagata, K. et al. Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J Biol Chem* **274**, 19473-1979 (1999).
3. Yasuda, S. et al. Activity-induced protocadherin arcadlin regulates dendritic spine number by triggering N-cadherin endocytosis via TAO2beta and p38 MAP kinases. *Neuron* **56**, 456-71 (2007).
4. Yasuda, S., Sugiura, H. & Yamagata, K. Mek3. *UCSD-Nature Molecule Pages* (2009).
5. Kim, SY. et al. Non-clustered protocadherin. *Cell Adh Migr* **5**:97-105 (2011).



Arcadlin によるスパイン密度の制御 (A, B) と TAO2 の異常によるスパイン形成障害 (C)



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

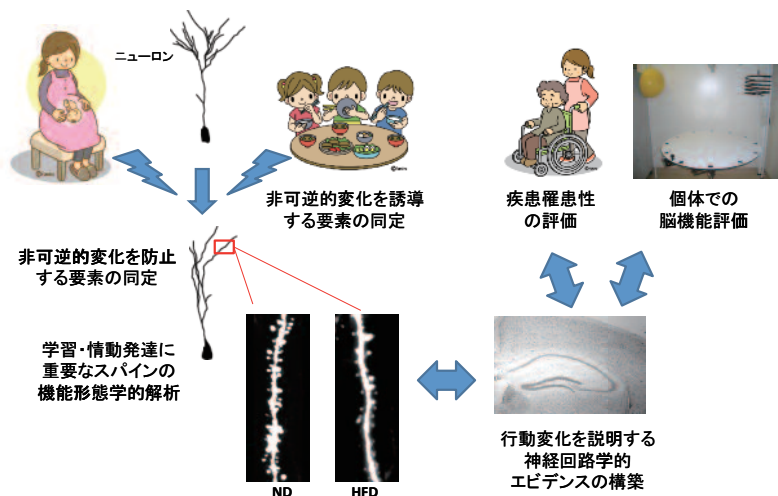
(独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・部長)

公募A01

母体の高脂肪食摂取が子の脳機能発達にどのように影響するかを、特にシナプスに焦点をあて、マウスで解析する。これまで、母体の妊娠前～離乳までの高脂肪食摂取は幼若期産仔海馬で酸化脂質の蓄積と神経新生低下、BDNF値低下、樹状突起分岐不全、記憶学習過程の遅延を誘導することを発見し^{1,2)}、さらに、微細なスパインレベルにおいても数の低下と成熟不全が産仔に存在することを示した。また、離乳後継続する産仔の高脂肪食摂取は海馬、内側前頭前皮質の樹状突起スパイン数低下と成熟不全を誘導することも見いだした。今回は、産仔を離乳後通常食で飼育した際のスパイン成熟不全の継続性、治癒性について解明し、スパインの機能形態変化を防止する物質的要因を特定する。さらに、幼若期に認めたスパインの機能形態変化が成長後の精神・神経疾患の発症に関わるのか否かを明らかにする。具体的には、マウス海馬、扁桃体、前頭前野のスパインに焦点を当て、分子蛍光イメージング、パッチクランプ法など先端技術を駆使した研究を実施するとともに、解析対象となる分子を蛋白質にとどめず、核酸、脂質へと拡張し代謝ネットワークの視点から解析する。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が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するかを明らかにするもので、精神・神経疾患の予防・治療法の開発と向上に貢献する。こ

れまでに、母子間バイオフィコミュニケーションを提唱し^{3,4)}、最近では核酸^{5,6)}、脂質代謝に関し新たな発見を行った実績等に基づき、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. et al. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem. Int.* **57**, 235-247 (2010).
3. 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).
4. Wada, E. & Wada, K. Bio-communication between mother and offspring. In *Reproductive and Developmental Toxicology* (Eds. R.C. Gupta), Academic Press, US, pp.33-38 (2011).
5. Fujiwara, Y. et al. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy*, **9**, 403-409 (2013).
6. Fujiwara, Y. et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy*, in press.



母子栄養状態と子の脳機能発達に関連性を科学的に検証する
～マウスの細胞、回路、個体を統合的に解析し、因果関係を実証～

研究の方向性と概要。樹状突起スパイン～個体に焦点を当て、分子イメージングなど先端技術を駆使した研究を実施する。イラストはフリー素材を使用 (<http://www.fumira.jp/cut/>)



霊長類特異的シナプス形成／刈り込みメカニズムと発達障害におけるその異常

一戸 紀孝

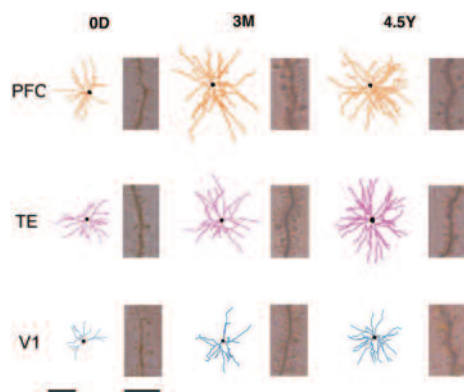
(国立精神・神経医療研究センター・微細構造研究部部長)

公募 A01

ヒトを含む霊長類では、生後に新生児期、小児期にシナプスの急速な増大が起こり、小児期にピークに達し、その後、児童期、思春期、青年期、成人とシナプスが刈り込まれて行く事が知られている。近年、このパターンの異常と精神疾患に関連がある事が解明されつつある。自閉症スペクトラムでは、全体にシナプスの増大が大きく、シナプスの刈り込みが小さく、統合失調症では、思春期のシナプスの刈り込みが異常に大きくなっていると考えられている。本研究は、遺伝子改変可能で成熟も早く、多産である点でモデル動物として適していると考えられているマーモセットを用いて、その正常な分子メカニズムを検討するとともに、今回我々が開発した自閉症モデルマーモセットを用いて、その分子的なシナプス形成／刈り込みの異常性のメカニズムを明らかにしようとするものである。モデルとしてより頻繁に用いられるマウスやラットのげっ歯類には大規模な刈り込みは存在せず霊長類独特の現象へ迫る事が難しいため（たとえば、Miyashita et al., 2010¹⁾）、本研究は、新しい霊長類モデルを用いた疾患研究の試金石となり得る。現在まで、我々は一次視覚野、側頭連合野、前頭連合野のマーモセットの3層の錐体細胞の基底樹状突起をルシファゼイエローを用いてフィルシ、樹状突起とそれに付随し、興奮性の入力部位となっていると考えられているスパインの量について検討し、上記の3つの領域で誕生後に急速にスパインが増大し、3ヶ月でピークに達し、6ヶ月まで再び急速に減少し、そこからゆっくりと成体になるまで減少し続ける事を示した²⁾。これらのイベントに関わる生後0日、2ヶ月齢、3ヶ月齢、6ヶ月齢、4.5歳の各時期に、上記3領域でサンプルを固定せずに取り出し、マーモセット用のジーンチップを行った。これらの解析により、synaptogenesis/pruningに関わる遺伝子の候補をある程

度、絞り込んだ。また、実際の自閉症スペクトラムでのシナプス形成異常と、それに関わる遺伝子を探索するために、薬物母体投与法を用いて、産児を我々の開発した手法により自閉症様の行動を示すマーモセットを作成法を確立した。評価法もげっ歯類とは異なり、よりヒトと類似の行動をテストする手法の開発に成功した。このマーモセットを用いて、上記と。同様のタイミングで、スパイン数の定量、ジーンチップ解析を行い上記の研究と組み合わせ、原因遺伝子の候補を絞り込む予定である。そして、その遺伝子とその産生物質を制御する薬物と行動評価を組み合わせ、新しい創薬を目指したいと考えている。

1. Miyashita, T., Wintzer, M., Kurotani, T., Konishi, T., Ichinohe, N., & Rockland, K.S. Neurotrophin-3 is involved in the formation of apical dendritic bundles in cortical layer 2 of the rat. *Cereb Cortex*. **20**, 229-240 (2010).
2. Oga, T., Aoi, H., Sasaki, T., Fujita, I., & Ichinohe, N. Postnatal development of layer III pyramidal cells in the primary visual, inferior temporal, and prefrontal cortices of the marmoset. *Front Neural Circuits*. 7:31 (2013).



マーモセットの前、側、後頭野の3層の細胞の規定樹状突起の典型的な形態とそのスパインの密度 (Oga et al., 2012)



シナプス発達障害仮説に基づいた神経変性疾患における機能障害発現メカニズムの解明

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、様々な蛋白質のミスフォールディング・凝集により神経機能障害を来たして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、発症カスケードの最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 QBP1 や内在性分子シャペロンの発現誘導による治療法開発研究を進めてきた¹⁻⁵⁾。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的であることが示されたものの、その *in vivo* での分子・発症メカニズムは未だ解明されていない。これを解決するため、私たちは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を行い、神経機能障害に関わるシナプス関連遺伝子群を見いだした。さらに、本研究班にて2光子レーザー顕微鏡を用いたシナプスの *in vivo* イメージング解析を行い、PolyQ 病のノックインマウスモデルにおいて、神経症状の発症前からシナプス成熟が遅滞していることを見出した。

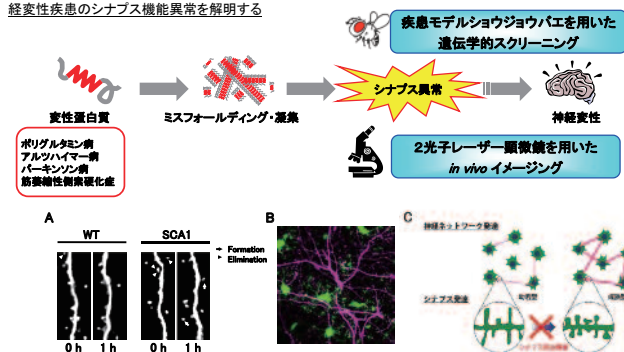
本研究では *in vivo* でのより詳細な解析により、神経変性疾患における極初期病態としてのシナプス発達障害仮説の証明と、その普遍的な統一病態機序の確立を目的とする。1) ショウジョウバエモデルを用いた遺伝学的解析により、様々な疾患に共通するシナプス機能障害の分子メカニズムを明らかにする。2) 2光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージング解析により、疾患モデルマウスにおけるシナプス-ミクログリア相互作用を明らかにし、さらに大規模多細胞集団 Ca^{2+} イメージングにより神経ネットワーク病態を解明する。本研究により、シナプスよりも上位レベルの神経

ネットワークレベルでの病態解析を行うことで、様々な疾患に共有する普遍的な神経機能障害のメカニズム解明が期待される。

1. *Nagai, Y., et al. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 332-340 (2007)
2. Fujikake, N., *Nagai, Y., et al. Heat shock transcription factor 1 (HSF1)-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **283**, 26188-26197 (2008)
3. *Nagai, Y., Popiel, H.A. Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: Exposed β -sheet hypothesis. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 3267-3279 (2008)
4. Popiel, H.A., et al. Hsp40 exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism. *PLoS One* **7**, e51069 (2012)
5. Popiel, H.A., et al. Inhibition of protein misfolding/aggregation using polyglutamine binding peptide QBP1 as a therapy for the polyglutamine diseases. *Neurotherapeutics* (in press)

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



研究スキーム

- (A) スバイン動態の亢進
- (B) ニューロン (マゼンタ) とミクログリア (緑) の *in vivo* イメージング
- (C) 神経ネットワークレベルでの異常を解析する



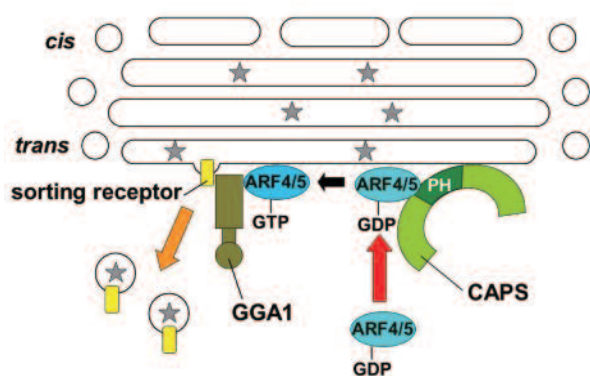
有芯小胞トラフィック異常による 精神・神経疾患モデルマウスの解析

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 A01

CAPS2 (Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2) は、有芯小胞の分泌に関与する CAPS1 のホモログとして、私たちが新規遺伝子としてクローニングし、小脳において脳由来神経栄養因子 (BDNF) を含む小胞の分泌に関与していることなどが明らかになったタンパク質である^{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) に位置しており、CAPS2 遺伝子改変マウスは様々な自閉症様形質を示した。そこで私たちが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、一部の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。また、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ことなどが明らかになってきた。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^{3,4)}。



CAPS が PH ドメインを介して ARF タンパク質をゴルジ膜に集積させることで、有芯小胞の生合成を制御している

さらに、この CAPS2 タンパク質は small GTPase であるクラス II ARF タンパク質と結合することが明らかになり、CAPS タンパク質とクラス II ARF タンパク質は協働してゴルジ体における有芯小胞生成に関与している可能性が示唆された (下図)^{5,6)}。

私たちは最近 CAPS2 exon 3 がスキップを起こす自閉症モデルマウスを作製した。CAPS2 exon3 スキップ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⁷⁾。自閉症の剖検例などで注目されている小脳における解剖学的・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に迫る。

また私たちは CAPS2 と結合することが明らかになったクラス II ARF ノックアウトマウスを作製した。このマウス

は中脳網様部特異的に強い自家蛍光が見られ、前脚と頸部に強い振戦を示し、多動や常同的な巡回運動を示すことなどが分かってきた。波長特性からこの自家蛍光はリポフスチンである可能性が高い。リポフスチンが脳内に蓄積する疾患はセロイドリポフスチノーシスと呼ばれ、ライソゾーム病に分類される。セロイドリポフスチノーシスは発育不全が認められ、急激な筋肉の収縮、けいれん、精神運動発達障害を示す疾患である。

トラフィック関連タンパク質である CAPS2 と ARF タンパク質の遺伝子改変マウスを解析し、トラフィックと精神神経疾患との関連を明らかにすることを目的とする。また、これらマウスモデルのメリットを利用し、将来的な治療法確立へ結びつくような検討を積極的に行っていく。

1. Sadakata, T. et al. The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. *J Neurosci* **24**, 43-52 (2004).
2. Sadakata, T. et al. Differential distributions of the Ca²⁺-dependent activator protein for secretion family proteins (CAPS2 and CAPS1) in the mouse brain. *J Comp Neurol* **495**, 735-53 (2006).
3. Sadakata, T. et al. Autistic-like phenotypes in Cadps2-knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients. *J Clin Invest* **117**, 931-43 (2007).
4. Sadakata, T. et al. Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. *J Neurosci* **27**, 2472-82 (2007).
5. 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).
6. Sadakata, T. et al. Calcium-dependent activator protein for secretion 2 interacts with the class II ARF small GTPases and regulates dense-core vesicle trafficking. *FEBS J* **279**, 384-94 (2012).
7. Sadakata, T. et al. Reduced axonal localization of a Caps2 splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 21104-9 (2012).



サーキットパソロジー
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ー

計画 A02
公募 A02



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・准教授)

計画 A02

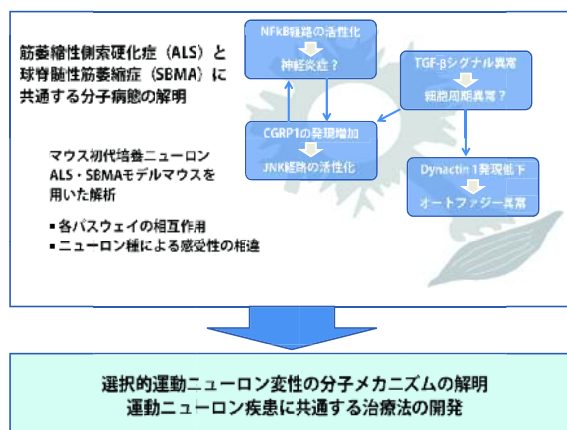
成人発症の神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）と球脊髄性筋萎縮症（SBMA）では、いずれも随意運動に関わるニューロサーキットが選択的に障害されるが、その分子病態は明らかにされておらず、神経変性に対する根本治療法は見出されていない。ALSの9割は孤発性であり、その病態は十分に解明されていないが、運動ニューロンにおけるTDP-43の細胞質内凝集が孤発例における神経変性に関与していると考えられている。これまで研究代表者らはTDP-43を運動ニューロン特異的にノックアウトするとALSに類似した運動ニューロン変性が惹起されることを明らかにしてきた（Iguchi et al., *Brain* 2013）。また、孤発性ALS患者の運動ニューロンにおいて早期から軸索モーターdynactin 1の発現が低下していること、および線虫において運動ニューロン特異的にdynactin 1の発現を抑制するとオートファゴソームの軸索内蓄積を伴う運動ニューロン変性が誘導されることを明らかにしてきた（Ikenaka et al., *PLoS One* 2012）。また、ゲノムワイド関連解析により、ALSの疾患感受性遺伝子としてTGF- β シグナルの調節因子であるZNF512Bを同定した。

一方、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、その臨床試験を進めてきた。核内に集積した変異ARがニューロン変性を惹起するメカニズムとして、dynactin 1の発現低下による逆行性軸索輸送の障害やTGF- β 受容体（TbRII）遺伝子の転写障害によるTGF- β のシグナル異常、および神経ペプチドCGRP1の発現増加によるJNK経路の活性化などを明らかにしてきた（Minamiyama et al., *Nat Med* 2012）。また、本研究領域などにおける共同研究として、疾患特異的に発現が増加するmiRNAをAAVベクターによってSBMAモデルマウスに投与することで神経変性を抑制しうることを、および熱ショック蛋白質の発現を制御する転写因子であるHSF-1の発現量がSBMAモデルマウスの病変部の選択性に影響することを報告した（Miyazaki et al., *Nat Med* 2012; Kondo et al., *Nat Commun* 2013）。

これらの成果に基づき、SBMAとALSに共通する病態を分子レベルで解明することができれば、運動ニューロンの選択的障害の分子機構を理解し治療法の開発を進めることができると考え、本研究を立案した。これまで研究代表者らが見出してきたTGF- β ・JNKに加え、Nfkbなどの細胞内シグナルや細胞周期調整に注目して分子生物学的解析を

行い、両疾患に共通する分子メカニズムを明らかにした上で、ニューロサーキットの機能回復を目的とした分子標的治療法を開発する。本研究により運動ニューロン変性の鍵となる分子経路が明らかとなることで、神経難病であるALS・SBMAに対する根本的治療法の開発に繋がる重要な知見が得られると考えられる。

1. Iguchi, Y. et al. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain* **136**, 1371-82 (2013).
2. Ikenaka, K. et al. dnc-1/dynactin 1 knockdown disrupts transport of autophagosomes and induces motor neuron degeneration. *PLoS One* **8**, e54511 (2013).
3. Minamiyama, M. et al. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. *Nat Med* **18**, 1531-8 (2012).
4. Miyazaki, Y. et al. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med* **18**, 1136-41 (2012).
5. Kondo, N. et al. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun* **4**, 1405 (2013).



本研究ではALSとSBMAに共通する選択的運動ニューロン変性の分子機構を明らかにし、治療法を開発する



選択的ニューロン病態解析法の開発・展開

貫名 信行

(順天堂大学大学院医学研究科 神経変性疾患病態治療探索講座：客員教授)

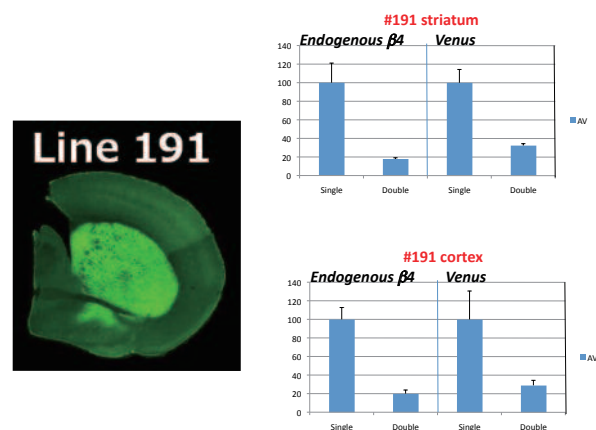
計画 A02

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ハンチントン病の病態を改善できること¹⁾、転写因子 NF-YA, Brn-2 などの凝集体への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 がハンチントン病線条体で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の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。

すでに以下の点を検討してきました。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。さらにハンチンチ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。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変化を同定する系を確立できました。現在同定された遺伝子のハンチントン病病態における意義を検討しています。また beta4 subunit のノックアウトマウスも作成しました。これにより beta4 subunit の線条体特異的役割も明らかになりつつあります。また私もが行ってきた選択的オートファジー制御における p62 の役割⁶⁾や NF-YA の機能などについても部位特異性との関連で検討を進めています。このような方向性でニューロサ

ーキットパソロジー創成の一翼を担いたいと思っています。

1. Bauer, P.O. et al. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nature biotechnology* **28**, 256-63 (2010).
2. Yamanaka, T. et al. Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor. *The EMBO journal* **27**, 827-39 (2008).
3. Yamanaka, T. et al. Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction. *Human molecular genetics* **19**, 2099-112 (2010).
4. Oyama, F. et al. Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. *Journal of neurochemistry* **98**, 518-29 (2006).
5. Miyazaki, H. et al. BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit. *Biochemical and biophysical research communications* **361**, 43-8 (2007).
6. Matsumoto, G. et al. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Molecular cell* **44**, 279-89 (2011).



$\beta 4$ 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）



NMJを起点とする dying-back パンロジの解明

山梨 裕司

(東京大学医科学研究所・教授)

公募 A02

神経筋接合部 (NMJ: neuromuscular junction) は運動神経の軸索末端と筋管 (筋繊維) を結ぶ唯一のシナプスであり、その喪失は呼吸機能を含めた運動機能の喪失を意味する。私達は独自に単離したアダプター様分子 Dok-7 の発現様式や生理機能の解析の過程で、Dok-7 が骨格筋特異的な受容体型チロシンキナーゼ MuSK の細胞内活性化因子であることを発見した¹⁾。MuSK は NMJ の形成に必須の受容体型キナーゼであり、MuSK 欠損マウスにおいては NMJ の後シナプス分化が全く起こらず、それ故、NMJ は全く形成されない。従前の研究から、MuSK には運動神経の軸索末端から分泌される活性化因子 Agrin の存在が知られていたが、私達は Dok-7 を持たない筋管細胞では Agrin による MuSK 活性化が誘導されないことを発見している⁴⁾。実際、Agrin 欠損マウスでは MuSK 依存的な後シナプス分化が進行するのに対して、私達が樹立した Dok-7 欠損マウスでは、MuSK 欠損マウスと同じく、後シナプス分化が完全に消失していた¹⁾。以上の知見は、Dok-7 が後シナプス分化を起点とする MuSK 依存的な NMJ 形成シグナルに必須の活性化因子であることを示している。事実、私達はオックスフォード大学の David Beeson 教授らとの共同研究によって、ヒト DOK7 遺伝子の劣性遺伝病として NMJ の形成不全を伴う肢帯型の先天性筋無力症 (DOK7 型筋無力症) を発見している^{2,3)}。また、Agrin による MuSK 活性化に必須の共受容体分子 Lrp4 に着目し、抗 Lrp4 自己抗体をもつ重症筋無力症を発見し、当該疾患における NMJ 形成シグナルの重要性を呈示した⁵⁾。

他方、NMJ 疾患である筋無力症とは異なり、筋萎縮性側索硬化症 (ALS: amyotrophic lateral sclerosis) は運動神経特異的な神経変性疾患に分類される。家族性 ALS の原因遺伝子として SOD1 が発見されて以来、TDP-43、FUS など、多数の原因・関連因子が同定され、ALS が酸化ストレス、神経伝達、RNA 制御、細胞内輸送、タンパク質凝集等の様々な異常が複数の細胞種において関与する他因性疾患であることが解明されている。さらに、近年、多くの動物モデルや臨床検体を用いた解析から、運動ニューロンの選択的な変性が NMJ からの運動神経軸索の離脱に始まり、軸索の変性を経て神経細胞体の変性に至ると言う「dying-back パンロジ」が提唱され、NMJ を介した逆行性 (retrograde) シグナルの重要性が注目されつつある。そこで本研究では、NMJ からの逆行性シグナルを人為的に増強する技術を活用し、NMJ からの軸索離脱の抑制が dying-back パンロジやその他の ALS 病態に与える効果の解明と、それらの知見に基づく治療基盤の開発を推進することを通じて、ニューロサーキットパンロジの解明に貢献する。

1. Okada K, Inoue A, Okada M, Murata Y, Kakuta S, Jigami T, Kubo S, Shiraishi H, Eguchi K, Motomura M, Akiyama T, Iwakura Y, Higuchi O. & Yamanashi, Y. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*, **312**, 1802-1805 (2006).
2. Beeson D, Higuchi O, Palace J, Cossins J, Spearman H, Maxwell S, Newsom-Davis J, Burke G, Fawcett P, Motomura M, Muller J, Lochmuller H, Slater C, Vincent A. & Yamanashi, Y. Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science*, **313**, 1975-1978 (2006).
3. Hamuro, J., Higuchi, O., Okada, K., Ueno, M., Iemura, S., Natsume, T., Spearman, H., Beeson, D. & Yamanashi, Y. Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J. Biol. Chem.*, **283**, 5518-5524 (2008).
4. Inoue, A., Setoguchi, K., Matsubara, Y., Okada, K., Sato, N., Iwakura, Y., Higuchi, O. & Yamanashi, Y. Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Science Signaling*, **2**, ra7 (2009).
5. Higuchi O., Hamuro J., Motomura M. & Yamanashi Y. Autoantibodies for LDL receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Annals of Neurology*, **69**, 412-422 (2011).

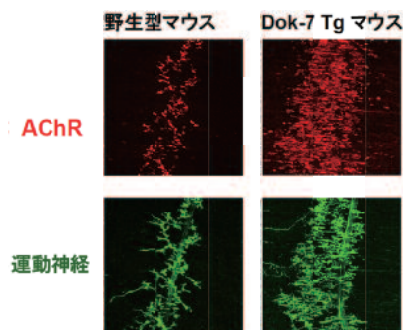


図1 逆行性シグナルによる NMJ 前シナプス領域の拡大
筋特異的に Dok-7 を高発現するトランスジェニックマウス (Dok-7 Tg) の NMJ におけるアセチルコリン受容体 (AChR) 凝集領域 (後シナプス領域) の拡大と、それにより誘導された前シナプス領域 (運動神経) の拡大



U12 依存性スプライシングと ALS サーキットパソロジー

小野寺 理

(新潟大学脳研究所・分子神経疾患資源解析学・教授)

公募 A02

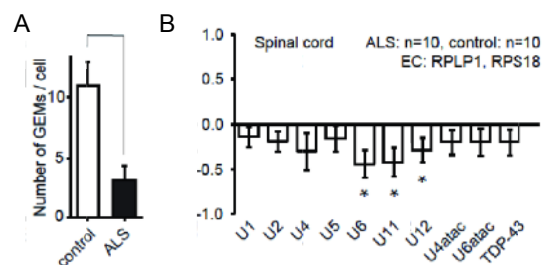
筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態研究は、孤発性 ALS (SALS) に認められるユビキチン陽性 skein-like inclusion の構成蛋白が TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) であることが発見され大きく進展した (Neumann et al. Science. 2006 314:130-3.)。しかし TDP-43 の蓄積は他の孤発性、遺伝性神経変性疾患でも認められたため、TDP-43 の蓄積は原因ではなく結果であるとする見解もあった。我々は SOD1 変異による家族性 ALS (FALS) では TDP-43 の蓄積を認めないことから結果ではないことを示した¹⁾。さらに SALS と同様の TDP-43 の蓄積を認める FALS にて TDP-43 遺伝子にミスセンス変異、さらに本患者の脊髄の生化学的解析で SALS と同様の変化を見いだした²⁾。時期を同じくして複数のグループから TDP-43 変異を伴う FALS、SALS が報告され、TDP-43 が ALS の原因であることが明確となった。

しかし TDP-43 は普く発現しており ALS のサーキットパソロジー、運動神経系への選択性の解明には至っていない。これに対し異常な TDP-43 を種としてシナプスを介し広げるとする説が唱えられている (プリオン仮説)。しかし TDP-43 病変は視床などにも広がっていること。また ALS には運動系に限局するタイプと、初期から広汎に広がるタイプがあること^{3,4)}。また C9ORF72 遺伝子の繰り返し配列の増大により frontotemporal lobar degeneration (FTLD)、FTLD/MND、ALS の 3 種類の疾患が発症すること⁵⁾。さらに、この遺伝子異常で FTLD で唱えられていた様々なタイプの TDP-43 病理像、生化学像を示すことが示された (つまり単一遺伝子異常が様々なタイプの生化学、病理変化を作る)。これらの事実は、プリオン仮説だけでは本症の選択性を説明できないことを示唆する。さらに、この説はその広がり方を説明できるが、何故初期変化が運動神経に選択的に起こるのかについては説明しえない。真の ALS の選択性、サーキットパソロジーの解決には別の視点が必要とされていた。

本症のサーキットパソロジーの解明には次の 2 点を説明する必要がある。1) TDP-43 病理像の錐体路への選択性、2) 細胞死の運動神経への選択性である。まず TDP-43 病理像の錐体路への選択性であるが、これに示唆を与えるのが TDP-43 遺伝子変異による ALS である。TDP-43 は発生段階から必須の遺伝子で、全ての細胞にて発現している。しかし TDP-43 遺伝子変異をもつ患者でも TDP-43 病理は神経系に限局し、さらに錐体路に強い。これは明らかに遺伝子側の問題ではなく、細胞側に要因があることを示す。さらに、昨年見いだされた C9ORF72 変異では、同じ遺伝子異常により様々な病理像、臨床像を示し、組織選択性が遺伝子のみでは左右されないことを示している。これより錐体路への選択性の鍵は、侵される細胞側にあることは明らか

である。我々は本研究班においてこれに挑む。

1. Tan, C.F. et al. TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta neuropathologica* **113**, 535-42 (2007).
2. Yokoseki, A. et al. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **63**, 538-42 (2008).
3. Nishihira, Y. et al. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration is associated with relatively mild TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* **117**, 45-53 (2009).
4. Nishihira, Y. et al. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol* **116**, 169-82 (2008).
5. Konno, T. et al. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **84**, 398-401 (2013).



ALS 運動神経細胞では核内小体、U12 snRNA が減少する

- A) 核内小体の運動神経細胞一個あたりの数
B) ALS 患者の脊髄での U snRNA の定量結果 U6, U11, U12 が低下



運動障害と認知障害を分離する パーキンソン病のサーキットパソロジー

高田 昌彦

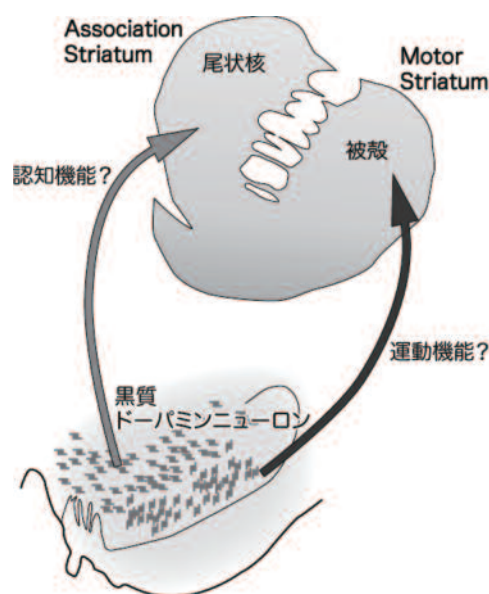
(京都大学霊長類研究所・教授)

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与するサーキットと認知機能に関与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、黒質外側部から被殻後方に投射する神経路は運動機能に、黒質内側部から被殻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というスキーマを描くことができる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）を用いて、黒質ドーパミンニューロンに細胞死や興奮抑制を誘導するような機能分子を発現させ、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あるいは活動阻害することにより、運動障害と認知障害を分離することができるパーキンソン病の霊長類モデルを作出し、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。まず、Creリコンビナーゼ遺伝子を組み込んだ逆行性LVベクターとFLEX配列を組み込んだAAVベクターを組み合わせ、Cre-loxPシステムを利用し、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である α -synuclein³⁾やLRRK2 (leucine-rich repeat kinase-2)^{4,5)}を発現させる。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製する。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評価し、運動機能と認知機能の障害の程度を行動学的に解析する。また、チロシン水酸化酵素や α -synucleinの抗体を用いた免疫組織化学染色により、ドーパミンニューロンの変性・脱落や封入体形成などの病理所見を解析し、個体間の差異を比較、検討する。次に、Tet-Onシステムを利用して黒質線条体ドーパミン神経路の選択的活動阻害をおこなうことにより、可逆的に運動障害と認知障害を発現するパーキンソン病のモデルザルを作出し、運動課題と認知課題の遂行能力の低下をより詳細に評価する。具体的には、導入遺伝子としてテトラサイクリン応答配列（TRE）の下流にテタヌストキシン軽鎖遺伝子を挿入した逆行性LVベクターを線条体に、テトラサイクリン応答因子（rtTA）を発現するAAVベクターを黒質に注入することにより、ドキシサイクリン投与依存的にドーパミン神経路の活動阻害を選択的に引き起こすモデルザルを作製し、その行動変化を解析する。このように、本研究では、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あるいは活動抑制したモデルザルを用いて、運動障害と認知障害を分離す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したいと考える。

1. Haber, S. et al. *J. Neurosci.* **20**, 2369-2382 (2000).
2. Kato, S. et al. *Hum. Gene Ther.* **22**, 1511-1523 (2011).
3. Polymeropoulos, M.H. et al. *Science* **276**, 2045-2047 (1997).
4. Paisán-Ruiz, C. et al. *Neuron* **44**, 595-600 (2004).
5. Zimprich, A. et al. *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



軸索変性の分子メカニズムの解明

山下 俊英

(大阪大学・大学院医学系研究科・教授)

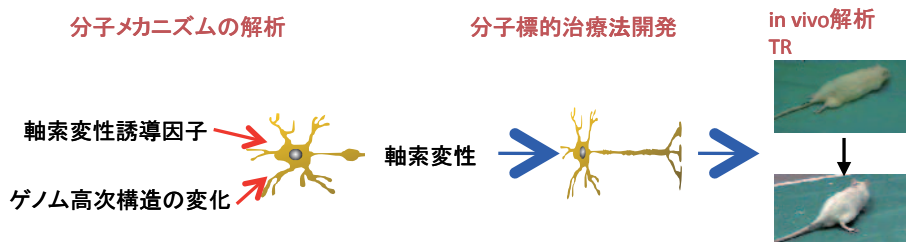
公募 A02

神経軸索の変性現象は、軸索切断時のワラー変性、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病などの神経変性疾患において広く認められる。たとえば筋萎縮性側索硬化症では、神経細胞死に先んじて、軸索変性による神経回路の破綻がおこるが、これに同期して神経症状が出現することが知られている。神経細胞死の抑制を目指した治療のみでは十分な治療効果を望むことはできない所以である。また脳血管障害や脊髄損傷などにより、神経ネットワークが破壊された後に、損傷を受けた軸索の近位部が変性し（軸索のdying back）、これが神経症状の増悪を招く。一方でアルツハイマー病において軸索に多発性の球形形成（spheroids）が認められ、これが病態に関与していることが示唆されている。したがって軸索変性の過程を適切に制御することができれば、神経疾患による神経症状の進行を止めることができる可能性がある。実際に筋萎縮性側索硬化症の動物モデルで、筋肉に発現しているNogoと呼ばれる軸索再生阻害因子が、運動ニューロンの軸索変性に関与しており、Nogoを抑制することで神経症状の進行を遅延できることが報告された（EMBO Rep., 2006）。このように軸索変性現象を制御する分子をターゲットとした治療法は、神経変性疾患による神経症状の発現および増悪を抑制する効果が期待できるが、その分子機構についての知見はいまだ断片的である。私たちはこれまで神経障害後の回路の修復機構について研究を行ってきたが^{1,2,3,4,5}、本研究では当研究室で構築した*in vitro*および*in vivo*のアッセイ系を用いて、軸索変性の分子メカニズムを解明し、軸索変性を抑制する手法を開発することを第一の目標とする。

一方で、最近ゲノム高次構造制御に関与するコヒーシスが軸索の脱落を惹起する因子であることが報告された。コヒーシスは染色体の接着にかかわるたんぱく質複合体で、4つのサブユニットから構成されるリング状の構造を形成する。近年、コヒーシスは転写制御において重要な役割を

担うことが報告されている。すなわちゲノムをループ状に束ね、一つの遺伝子発現制御単位を形成するとともに、離れたエンハンサーを空間的にプロモーターの近傍に配置し、適切な相互作用を可能にする。ショウジョウバエでは、神経回路の形成段階で、過剰に形成された軸索の刈り込み（axon pruning）にコヒーシスが必要であることが報告されている。この事実はコヒーシスによるゲノム高次構造の変化が、転写制御を介して軸索変性を惹起することを示唆するものであり、軸索変性に至る経路の最も上流でコヒーシスによるゲノム高次構造の制御が鍵を握っていることを示している。本研究では、コヒーシスコンディショナルノックアウトマウスを作製し、軸索変性時におけるゲノムの転写構造の解析を通じて、*in vivo*において軸索変性現象を惹起するマスタースイッチを見いだすことを第二の目標とする。

1. Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M. & Yamashita, T. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* **16**, 543-551 (2013).
2. Muramatsu, R., Takahashi, C., Miyake, S., Fujimura, H., Mochizuki, H. & Yamashita, T. Neovessels formed through CNS inflammation promote neural rewiring. *Nat Med* **18**, 1658-1664 (2012).
3. Ueno, M., Hayano, Y., Nakagawa, H. & Yamashita, T. Intraspinal rewiring of the corticospinal tract requires target-derived brain-derived neurotrophic factor and compensates lost function after brain injury. *Brain* **135**, 1253-1267 (2012).
4. Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. & Yamashita, T. RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* **17**, 488-494 (2011).
5. Fujita, Y., Endo, S., Takai, T. & Yamashita, T. Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *EMBO J* **30**, 1389-1401 (2011).



軸索変性の分子メカニズムを解明することにより、新たな分子標的を見いだす



ALS と脊髄小脳変性症に共通した発症病態の解明

河原 行郎

(大阪大学大学院・医学系研究科・遺伝子機能制御学・准教授)

公募 A02

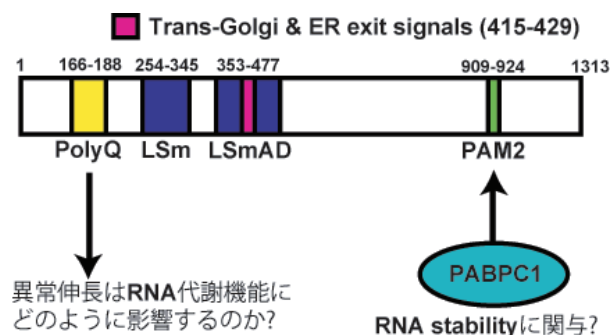
神経変性疾患は、高齢化社会の到来により今後益々患者数が増加すると考えられ、病態解明と治療法確立が社会的に強く望まれている。その1つであるALSは、運動ニューロンの選択的脱落によって全身の筋力が低下する神経難病であり、発症すると数年以内に死に至る。近年ALSでは、TDP-43, FUS, hnRNPA1などのRNA結合蛋白質が疾患病態に深く関与していることが明らかとなり、我々はRNA編集異常や、TDP-43を介したmicroRNA制御異常が、発症病態の一部に関与していることを報告してきた^{1,2)}。

一方、脊髄小脳変性症は、小脳および脳幹から脊髄にかけての神経細胞変性により運動失調を来す。その中でも常染色体優性遺伝型のSCA2は、Ataxin-2遺伝子のCAGリピートが異常伸長する(>35回; 健常者では15-27回)ことが原因である。これまで、SCAとALSは異なる疾患スペクトラム上にあると考えられてきたが、最近になってALSでは、Ataxin-2遺伝子のCAGリピートが有意に中等度伸長(28-34回)していることが報告された(Elden et al, Nature, 2010)。ハンチントン病など他のポリグルタミン病の原因となるCAGリピート長とは相関しないことから(Le et al, Neurology, 2011)、Ataxin-2自体の機能破綻が両疾患に共通した神経変性機構の根底にあると考えられる。

Ataxin-2は、mRNAポリA鎖結合タンパク質PABPと結合する(Kozlov et al, JBC, 2010)ことから、RNAの安定性などに関与するのではないかと考えられているが、詳細な生理的機能については依然として不明である。一方、我々はこれまでに、RNA修飾や機能を解析する様々なアプローチ法を確立してきた³⁻⁶⁾。最近では、RNA結合蛋白質に結合するRNAと、結合部位を1塩基レベルで同定可能なPAR-CLIP法(Hafner et al, Cell, 2010)を用いて、TDP-43やFUSが制御するRNAとその性状についての解析を進めている。

このため、本研究では、様々なアプローチ法を駆使して、特にRNA代謝の観点からAtaxin-2の生理的機能を詳細に明らかにすることを目指す。さらに、ポリグルタミン鎖異常伸長が、伸長度に応じて、どのようにAtaxin-2の機能破綻を引き起こし、結果として神経変性を誘導するのか、その詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究の結果、ポリグルタミン鎖伸長が、Ataxin-2が本来果たすRNA制御能を喪失する(loss of function)か、効果を増悪させる(gain of function)ことを実証できれば、神経変性疾患の発症に共通したメカニズムの解明に高く貢献することができる。また、神経細胞死を誘導する特定のRNAが同定できれば、これを標的とした治療法へ応用することも期待できる。

1. 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).
2. Kawahara, Y. & Mieda-Sato, A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 3347-52 (2012).
3. Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Sethupathy, P., Iizasa, H., Hatzigeorgiou, AG. & Nishikura, K. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* **315**, 1137-40 (2007).
4. Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Chendrimada, T.P., Shiekhattar, R. & Nishikura, K. RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO Rep* **8**, 763-9 (2007).
5. Kawahara, Y., Megraw, M., Kreider, T., Iizasa, H., Hatzigeorgiou, AG. & Nishikura, K. Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res* **36**, 5270-80 (2008).
6. Kawahara, Y. Quantification of adenosine-to-inosine editing of microRNAs using a conventional method. *Nat Protoc* **7**, 1426-37 (2012).



Ataxin-2の構造と予想される機能



ゲノム解読によるパーキンソン病の選択的神経変性の解明

佐竹 渉

(神戸大学・医学研究科・助教)

公募 A02

パーキンソン病は、シナプス病態と神経変性が発症・進展のキーとなる疾患である。本症を臨床遺伝学的な視点からみると、患者の約5%はなんらかの家族歴を有する一方で、ほとんどの患者は孤発性に発症する。孤発性パーキンソン病は、複数の遺伝子の、変異～まれな多型 (Rare variant) ～ありふれた多型 (SNP) が発症に関与する多因子遺伝性疾患である。患者個人により、遺伝因子の組み合わせもさまざまで、また各遺伝因子の疾患発症への寄与の度合いもことなる、遺伝的に不均一で複雑な疾患である。

わたしたちのグループでは、2003年からこれまで、孤発性パーキンソン病の遺伝背景の解明をめざして、ゲノム研究をおこなってきた。2006年には、家族性パーキンソン病の原因遺伝子である α -synuclein の 3'UTR 周辺の多型が、孤発性パーキンソン病発症のリスク遺伝因子となっていることを、初めてゲノム統計学的な絶対的有意水準で証明した⁵⁾。さらに、2009年には、一塩基多型 SNP をもちいたゲノムワイド関連解析により2つの新規遺伝子座 (PARK16, BST1) と、2つの家族性遺伝子座 (α -synuclein, LRRK2) が、孤発性パーキンソン病のリスク遺伝因子であることを明らかにした⁴⁾。これらはいずれも、その後の他人種での再現研究でも強い関連が再現されており、確固たるパーキンソン病リスク遺伝因子と考えられている。また、われわれの研究室では、国際コンソーシアムの中で、Rare variant として、ゴーシェ遺伝子 GBA ヘテロ変異が確実なパーキンソン病リスクであることを報告した。

このような成果から、全く未知であった孤発性パーキンソン病の遺伝背景の一部は明らかになってきたものの、これらだけでは、本症の遺伝力 ($\lambda s=6.7$) は説明できず、孤発性パーキンソン病のリスク遺伝因子 (変異～まれな多型 (Rare variant) ～ありふれた多型 (SNP)) は他にも存在する。また、遺伝学的に比較的解明されている単一遺伝性パーキンソン病患者においても、まだ半数以上は、原因遺伝子が発見されていない。

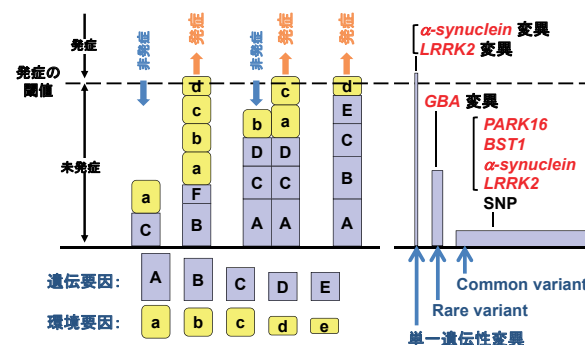
そこで、本研究では、

- エクソーム解読などの先端ゲノムで、患者ゲノムの全エクソン塩基配列を読み解き、孤発性パーキンソン病の強い発症リスクとなる rare variant の発見をめざす。
- 上記ゲノムワイド関連解析⁴⁾を拡大した第2期ゲノムワイド関連解析により、発症リスクとしては相対的に弱いが頻度は高く、孤発性パーキンソン病患者の多くがもつパーキンソン病病態の共通分子基盤である common variant (SNP) を発見する。
- シナプス関連遺伝子に着目して解析することにより、パーキンソン病発症のシナプス病態をゲノムの視点から解明する。

- 発見したパーキンソン病遺伝子について、ショウジョウバエモデルをもちいて本症病態を再現、新規のパーキンソン病遺伝子をまじえた遺伝子ネットワークを *in vivo* 解析する。

以上によって、パーキンソン病のシナプス・ニューロサークキット病態にせまりたい。

- Sharma M. *et al.* Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. *Neurology*. 79, 659-667 (2012).
- Lill CM. *et al.* Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genetics*, 8, e1002548 (2012).
- Tan EK. *et al.* Analysis of GWAS-linked loci in Parkinson disease reaffirms PARK16 as a susceptibility locus. *Neurology*. 75, 508-512 (2010).
- Satake W. *et al.* Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genetics*. 41, 1303-1307 (2009).
- Mizuta I. *et al.* Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*. 15, 1151-1158 (2006).



孤発性パーキンソン病の遺伝背景

(左) パーキンソン病は、複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和が、ある閾値を超えたとき発症する多因子遺伝性疾患である
(右) 遺伝因子は、患者内での頻度も、発症オッズ比の強さもまちまちであり、PARK16, BST1, α -synuclein, LRRK2, GBA などがある
本研究でさらなるパーキンソン病新規遺伝子の発見をめざす



Galectin-1 による筋萎縮性側索硬化症の発症と進行の二面的制御

中別府 雄作

(九州大学・生体防御医学研究所・教授)

公募 A02

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の剖検例において脊髄運動神経の腫大部にニューロフィラメントの凝集体とともにガラクトース結合レクチンの1つである galectin-1 の過剰な蓄積が報告されている。Galectin-1 は還元的环境下ではホモダイマーとして細胞増殖、細胞接着、腫瘍転移、T細胞のアポトーシス誘導に関わるが、酸化的环境下ではシステイン残基の酸化によりモノマーの酸化型 Galectin-1 に変換される。酸化型 galectin-1 は神経の軸索再生を促進する活性を有し、ALS モデルマウスへの長期投与により運動神経変性を抑制することが報告されているが、内在性の galectin-1 が ALS の発症にどのように関わるのかこれまで全く報告がない。

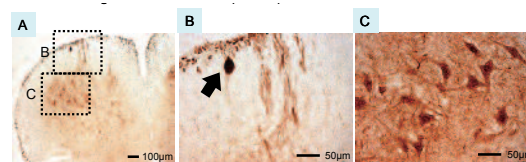
我々は、転写因子をコードする *fosB* 遺伝子の研究を進める過程で galectin-1 の発現が *fosB* の下流で制御されることを見出し、*fosB* による細胞増殖やアポトーシス誘導に galectin-1 が関わることを報告し、さらにアミノ末端の6アミノ酸を欠くバリエーション型 galectin-1 β の存在を報告した^{1,2)}。Galectin-1 β は酸化還元状態に関わらずモノマーで存在し、全長の酸化型 galectin-1 α と同等の神経軸索再生能を有する³⁾。さらに、ラットとマウス脳における発現解析から、galectin-1 は海馬歯状回の神経前駆細胞とアストロサイトに発現し、ストレス下に誘導される海馬歯状回における神経新生を促進的に制御することを明らかにした^{4,5)}。

我々は ALS の発症における galectin-1 の関与を明らかにする目的で、変異型 SOD1 トランスジェニックマウス (SOD1[G93A]-Tg) における galectin-1 の発現と局在を解析し、以下の事実を見出した。

- 1) SOD1[G93A]-Tg マウスでは、運動機能失調の発症以前より脊髄運動神経軸索の腫大部に galectin-1 がニューロフィラメントとともに過剰に蓄積した凝集体からなるニューロスフェロイド (axonal spheroid) が確認された。この知見は、ALS 患者の脊髄運動神経のニューロスフェロイドに認められる galectin-1 の過剰蓄積が、SOD1[G93A]-Tg マウスモデルで再現される ALS に普遍的な病理変化であることを世界で初めて明らかにしたものである。
- 2) 運動神経変性の進行期には軸索周囲に増生したアストロサイトに galectin-1 の高発現を認めた。
- 3) ALS の発症と進展における galectin-1 の関与と意義を明らかにする目的で、SOD1[G93A]-Tg と galectin-1 ノックアウトマウス (Gal-1 KO) を交配して SOD1[G93A]-Tg/Gal-1-KO マウスを樹立し、ALS 発症と進行を観察したところ、SOD1[G93A]-Tg/Gal-1-KO マウスでは SOD1[G93A]-Tg マウスよりも発症が遅延する傾向が認められた。

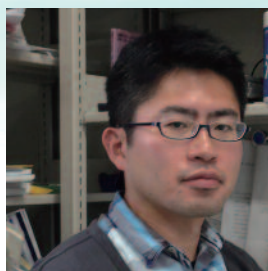
本研究において我々は、galectin-1 が脊髄運動神経のニューロスフェロイド形成と神経機能に及ぼす影響を SOD1[G93A]-Tg マウスと SOD1[G93A]-Tg/Gal-1-KO マウスの比較から明らかにするとともに、変性した運動神経の軸索周囲に増生したアストロサイトに発現する galectin-1 の役割を神経保護作用に注目して解析する。Galectin-1 が ALS の発症と進行に及ぼす影響とその分子機序を解明することで、ALS の治療法の開発に向けた新しい分子標的を提供できると考えている。

1. Nishioka, T., K. Sakumi, T. Miura, K. Tahara, H. Horie, T. Kadoya, and Y. Nakabeppu, *fosB* gene products trigger cell proliferation and morphological alteration with an increased expression of a novel processed form of galectin-1 in the rat 3Y1 embryo cell line. *J Biochem* **131**: 653-61 (2002).
2. Tahara, K., D. Tsuchimoto, Y. Tominaga, S. Asoh, S. Ohta, M. Kitagawa, H. Horie, T. Kadoya, and Y. Nakabeppu, Δ FosB, but not FosB, induces delayed apoptosis independent of cell proliferation in the Rat1a embryo cell line. *Cell Death Differ* **10**: 496-507 (2003).
3. Miura, T., M. Takahashi, H. Horie, H. Kurushima, D. Tsuchimoto, K. Sakumi, and Y. Nakabeppu, Galectin-1 β , a natural monomeric form of galectin-1 lacking its six amino-terminal residues promotes axonal regeneration but not cell death. *Cell Death Differ* **11**: 1076-83 (2004).
4. Kurushima, H., M. Ohno, T. Miura, T.Y. Nakamura, H. Horie, T. Kadoya, H. Ooboshi, T. Kitazono, S. Ibayashi, M. Iida, and Y. Nakabeppu, Selective induction of Δ FosB in the brain after transient forebrain ischemia accompanied by an increased expression of galectin-1, and the implication of Δ FosB and galectin-1 in neuroprotection and neurogenesis. *Cell Death Differ* **12**: 1078-96 (2005).
5. Kajitani, K., H. Nomaru, M. Ifuku, N. Yutsudo, Y. Dan, T. Miura, D. Tsuchimoto, K. Sakumi, T. Kadoya, H. Horie, F. Poirier, M. Noda, and Y. Nakabeppu, Galectin-1 promotes basal and kainate-induced proliferation of neural progenitors in the dentate gyrus of adult mouse hippocampus. *Cell Death Differ* **16**: 417-27 (2009).



SOD1[G93A]-Tg マウス脊髄: 20 週齢 (発症前)

ALS モデルマウスにおいて galectin-1 は運動神経の軸索腫大部 (B) とアストロサイト (C) に高発現する



統合失調症モデルにおける神経回路の動作原理

和氣 弘明

(基礎生物学研究所・光脳回路研究部門・助教)

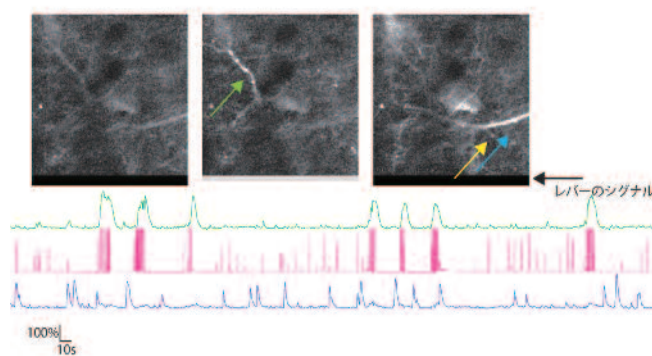
公募 A02

複雑に多様化する現代社会において、情動・認知といった高次脳機能に障害を呈する精神・神経疾患の病態解明、治療法の開発が早急に求められている。私たちはこれまでグリア研究を進める中でグリア細胞が神経回路の恒常性を維持する可能性について考察してきた。まずミクログリアが神経シナプスの活動をモニターし、障害時のシナプスのターンオーバーが亢進している領域ではその除去に関与していることを示した^{1,2)}。またさらにオリゴデンドロサイトが神経活動依存性に髄鞘化を促進することを示し、神経軸索を髄鞘化することで、神経伝導速度を調節し、神経回路の情報処理過程を修飾しうる可能性について考察してきた³⁾。これは神経活動そのものが髄鞘化を介して神経回路を修飾する可能性をもち、このことにより神経情報処理の効率化をはかり、神経回路の特性を、スパイクタイミングをずらすことにより変化させることができる。また神経伝導速度を調節することによりシナプス前終末の発火タイミングを変化させ、シナプス活動の同期性に寄与することができる。そこでこのメカニズムの破綻によってどのような疾患が生じるかという考えを着想するに至るようになった。つまり神経細胞の同期性は神経伝導速度によって規定され、神経伝導速度は軸索周囲の髄鞘化に規定される。髄鞘化による神経伝導速度の調節が破綻すれば、シナプス入力の時間的同期性が失われ、感覚入力として入るものの出力されない、もしくは実際の入力を伴わない際に入力として反応し、異常な感覚入力として認識される状態が起きると考えられる。これは若年であれば統合失調症に代表される精神疾患の異常感覚や異常行動につながり、高齢であれば加齢による認知機能の低下につながる。本課題では統合失調症モデルを使用し、神経伝導速度の恒常性維持の観点から遺伝子変異がどのようにサーキット変調をきたし、サーキット選択性をもたらせるかを神経回路レベルで考察することを目的とする。

これまでおこなわれた研究で統合失調症の遺伝子異常、細胞性質の変化、そして行動異常はよく調べられている。しかしながら、臨床症状としての表現型である行動異常がどのような神経回路基盤で生じるかは明らかになっていない。そこでその遺伝子異常と神経回路動作基盤および行動異常をつなげるため、統合失調症モデルを用いて認知学習課題を行い、認知運動学習課題下における2光子顕微鏡をもちいた *in vivo* 長期イメージングを組み合わせることで、行動異常と神経回路動作原理を遺伝異常のあるマウスを用いて調べることを可能にする。この方法を用いて、統合失調症モデルにおいて、認知運動学習課題下で、同一個体の同一部位を繰り返しイメージングすることにより1) 神経細胞、シナプスの発火パターンの解析、2) 電気生理学的手法を用いて入出力相関を解析、3) 神経伝導速度の

活動電位の伝搬に及ぼす影響と神経活動の同期性の相関、その消失による行動異常との相関を解析する。つまり入力の神経細胞およびシナプスの同期性の消失による非特異的な興奮性の増加による不適切な出力確率の増加を検討する。これらの結果より、若年では統合失調症をはじめとした精神・神経疾患へ、高齢では加齢による認知症のメカニズムを新しい角度から考察する。これらのアプローチにより統合失調症を新しく、神経回路の恒常性維持の破綻からくるサーキット変調から考察し、解明することを目的とする。

1. Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S. & Nabekura, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* **29**, 3974-80 (2009).
2. Wake, H., Moorhouse, A.J., Miyamoto, A. & Nabekura, J. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci* **36**, 209-17 (2013).
3. Wake, H., Lee, P.R. & Fields, R.D. Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science* **333**, 1647-51 (2011).



GCaMP3による覚醒運動学習下における神経樹状突起およびスパインの活性のイメージング

レバー引き前肢運動下の神経樹状突起およびスパインの活動
樹状突起およびスパインでレバー引きに同期したものと同期していないものが観察される
同一個体を日をまたいで観察することが可能である



脊髄損傷後機能代償回路の特定と新規回復促進戦略の開発

伊佐 正

(自然科学研究機構生理学研究所・認知行動発達機構研究部門・教授)

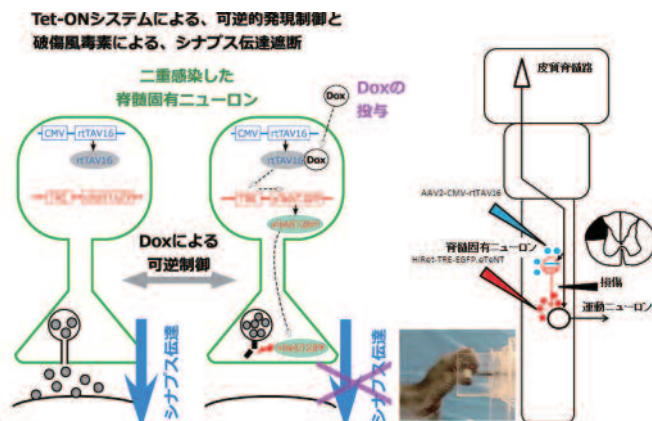
公募A02

中枢神経系の損傷後、リハビリテーション訓練などで機能に回復が見られるのは、残存する神経回路によって機能の一部が代償されることによるということが明らかにされてきている。そこで、本研究では、脳・脊髄損傷などの後にどのような神経回路が機能回復に関与しているかを明らかにし、その過程に選択的に介入することによって機能回復を促進する手法を開発することを目指す。

我々は、これまでマカザルのモデルを用い、皮質脊髄路を中一下部頸髄（C5）レベルで切断しても、訓練によって1～2か月以内に手指の精密把持運動が顕著に回復すること（Sasaki et al. *J Neurophysiol* 2004, Sugiyama et al. *J Neurophysiol* 2013）、他方、C2レベルで切断すると、指をまとめて握る握力把持は回復するが個々の指の独立制御は回復しないことを見出し（Alstermark et al. *J Neurophysiol* 2011）、この2種類の切断部位の間（C3-C4 髄節）にあるニューロン群が個々の指の独立把持運動の機能回復に関与する示唆を得た。一方、申請者らはこのC3-C4 髄節に細胞体があって、皮質脊髄路からの入力用手指筋の運動ニューロンに伝達する脊髄固有ニューロン（PN）の存在が知られていた（Alstermark et al. *J Neurophysiol* 1999, Isa et al. *J Neurophysiol* 2006）が、最近我々は、投射先に注入した高頻度逆行性レンチウイルスベクターと細胞体の存在する位置に順行性のアデノ随伴ウイルスベクターを注入することで、2重感染した特定の経路を構成するニューロン群にTet-ONシステムを用いてドキシサイクリン投与中に選択的かつ可逆的に破傷風毒素を発現させることで、シナプス伝達を遮断する方法を開発し、このPN群に適用し、これらが健常なサルにおいて手指の精密把持運動の制御に関与することを明らかにした（Kinoshita et al. *Nature* 2012）。そこで、本研究では、これらPN群が実際にC5レベルでの皮質脊髄路損傷からの回復に寄与す

ることを検証するために、この皮質脊髄路の切断後、回復した段階で、上記のウィルスベクターによる2重感染法を用いてPNの伝達を遮断し、回復した精密把持運動が再度損なわれるかを調べる。そしてこのようにしてPNが回復過程に関与していることが明らかになった場合には次のステップとして、同じくウィルスベクター2重感染法を用いて破傷風毒素の代わりに脳由来神経成長因子（BDNF）や肝臓由来成長因子（HGF）をPNに選択的に発現させ、機能回復をさらに促進することができるとかを明らかにし、脊髄損傷後の機能回復を促進する遺伝子治療法の開発を試みる。このような手法の開発が、今後特定の神経経路を標的とする遺伝子治療法の開発につながることを期待したい。

1. Kinoshita M, Matsui R, Kato S, Hasegawa T, Kasahara H, Isa K, Watakabe A, Yamamori T, Nishimura Y, 2. Alstermark B., Watanabe D, Kobayashi K, Isa T (2012) Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates. *Nature*, 487: 235-238.
2. Alstermark B, Isa T (2012) Circuits for skilled reaching and grasping. *Annual Review of Neuroscience*, 35:559-578.
3. Alstermark B, Pettersson L-G, Nishimura Y, Yoshino-Saito K, Tsuboi F, Takahashi M, Isa T (2011) Motor command for precision grip in the Macaque Monkey can be mediated by spinal interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 106: 122-126.
4. Nishimura Y, Morichika Y, Isa T (2009) A common subcortical oscillatory network contributes to recovery after spinal cord injury. *Brain*, 132: 709-721.
5. Nishimura Y, Onoe T, Morichika Y, Perfiliev S, Tsukada H, Isa T (2007) Time-dependent central compensatory mechanism of finger dexterity after spinal-cord injury. *Science*, 318: 1150-1155.



経路選択的・可逆的機能操作法を脊髄損傷サルに適用。把持運動回復への脊髄固有ニューロン系の寄与を検証



細胞内異常タンパク質の蓄積機構

長谷川 成人

(東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能分野長)

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、冒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方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、レビー病小体病、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^{3,4,5)} 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を、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、回路選択的な神経変性がおこり、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か所で形成さ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。

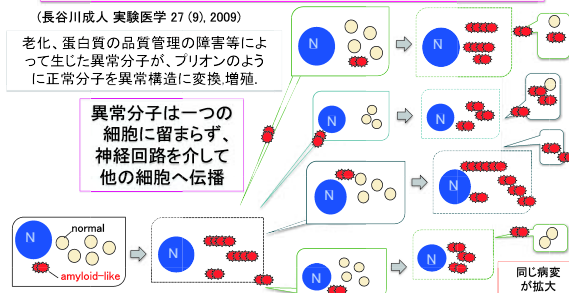
1. Fujiwara, H., et al. alpha-synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4, 160-164 (2002).
2. Hasegawa, M., et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 64, 60-70 (2008).
3. Nonaka, T., et al. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* 285, 34885-34898 (2010).
4. Tsuji, H., et al. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135, 3380-3391 (2012).
5. Masuda-Suzukake, M., et al. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 136, 1128-1138 (2013).

「プリオン様細胞内蛋白伝播仮説」「蛋白癌仮説」

(長谷川成人 実験医学 27 (9), 2009)

老化、蛋白質の品質管理の障害等によって生じた異常分子が、プリオンのように正常分子を異常構造に変換・増殖。

異常分子は一つの細胞に留まらず、神経回路を介して他の細胞へ伝播



最初に形成される異常分子の種類、構造、場所の違いにより、病理、病型、臨床像が決まると考えると、神経疾患の部位選択性や特異性の説明がつく。



ニューロサーキット異常型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)

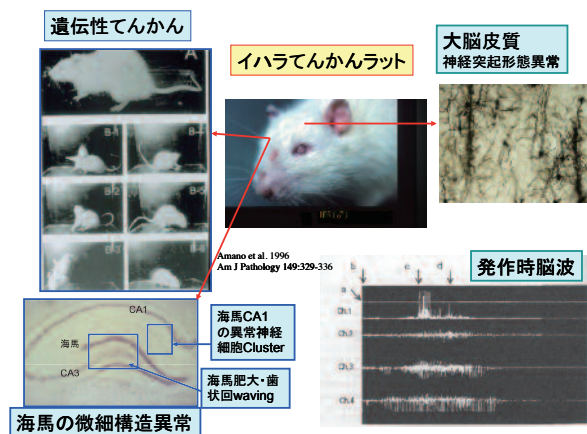
公募A02

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¹⁻⁵⁾。

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、数年前から、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・神経疾患についての研究にフォーカスしようとしており、そのために最近では、精神発達遅滞を伴うヒトてんかんの良いモデル動物である「イハラてんかんラット (IER; Ihara Epileptic Rat)」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・海馬・扁桃体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、連鎖解析などから、我々はこの原因遺伝子の同定にも成功いたしました。本研究では、原因遺伝子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と病態の理解に努めて行きたいと考えております。今までは、主として神経発生生物学的な研究に重点を置いていたため、ヒト疾患に関わる研究には未だに不案内です。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. Neuronal subtype specification in the cerebellum and dorsal hindbrain. *Dev. Growth. Differ.* **54**, 317-326 (2012).
2. 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).
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. Hoshino, M. et al. *Ptf1a*, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron*, **47**, 201-213, 2005





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



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・臨床応用研究部門・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 (Inoue, H., Yamanaka, S. The Use of Induced Pluripotent Stem Cells in Drug Development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89,655-661 (2011))。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 (Imamura, K., Inoue H. Research on neurodegenerative diseases using induced pluripotent stem cells. *Psychogeriatrics*, 12,115-119 (2012))。

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っています。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んでいます。

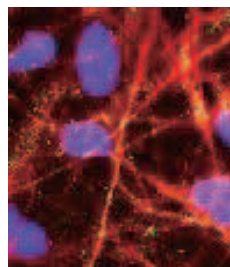
イメージング技術・ハイコンテンツアナリシス技術を導入し、疾患に罹患する神経細胞を経時的に観察することにより、これまで捉えることができなかったヒト神経細胞での神経細胞機能障害、構造異常タンパク質蓄積、神経細胞死、非神経系細胞による神経変性加速を正確に観察し、そのメカニズムを解明でき

る可能性があります (Egawa N, et al., Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med*, 4, 145ra104 (2012))。さらに、iPS 細胞を用いた患者層別化を行い、病態の早期診断、病態の予測に役立てることができれば、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予防医療へ繋がる可能性があります (Kondo T, et al., Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A β and Differential Drug Responsiveness. *Cell Stem Cell*, 12, 487-496 (2013))。

今後、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／成熟速度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 (Kitaoka S, Kondoh H, Inoue H. Induced Pluripotent Stem Cell Technology for the Study of Neurodegenerative Diseases. *Induced Stem Cells*, chapter V, Nova Science Publishers Inc, New York, p129-142 (2011))、本研究課題においては、技術の開発と平行し、上記の可能性の実現化を目指します。



アルツハイマー病 iPS 細胞由来神経細胞内の異常タンパク質 (A β) 蓄積 (緑色 (または黄色) が蓄積した A β オリゴマー、青が細胞核、赤が神経細胞)



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・チームリーダー)

計画A03

シナプス可塑性により神経細胞間の結合が強くなることにより同時発火する神経細胞の集合である神経細胞集成体（ニューロナルアセンブリまたはアンサンブル）が形成される。これは、ドナルド・ヘブが「ヘブ則」を記述した同じ著書で提唱され、シナプス可塑性によって形成される神経情報処理の高次単位と考えられてきた。しかしその動的な解明は遅れていた。これは、多数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。そのため、記憶する時と想起する時に同じ神経細胞集成体が活性化されるかに行った非常に基本的な情報に欠けていた。本研究では、新規の神経細胞観察技術を開発することで海馬の神経細胞集成体が学習行動に伴いどのような挙動を示すかを、行動下の動物の神経細胞活動を観察し、神経細胞集成体の動作原理を探っていく。

このため我々は二光子顕微鏡下の仮想現実空間に動物をおき、そこで空間学習を行わせる実験系を立ち上げた。ニューロン活動は埼玉大中井淳一教授が作成したGCaMP7をThy-1プロモーター下で発現するトランスジェニックマウスを用いて、カルシウムを指標に観察する。マウスは予め海馬を直接観察できるように大脳皮質の一部を取り除き光学窓を埋め込む手術を行っておく。観察にはマウスはトラックボール上に載せ、二光子顕微鏡下に頭部を固定しつつも体は固定せず、トラックボール上を自由に歩かせるようにする。トラックボールの動きを光学マウスを用いて読み取り、マウス前方においたLCDモニターに表示した仮想現実を動かす。仮想現実空間には壁や物体やランドマークとなるものをおき、空間や物体の学習を促し、それに伴う神経細胞集成体の活動を明らかにしていく。

これまで予備実験を行い、光学窓を介して慢性的に数百個の神経細胞の活動の経時変化を同時に捉える事が可能となった。これを仮想現実空間での場所情報と対比させて観察したところ、電気生理学的に観察された場所細胞に相当する神経活動が観察されることをしてきた。また、仮想現実空間内の特定の領域に静止した時にマウスに報酬を与える事で、マウスが表示されたランドマークを手がかりに対応した場所学習をしていることを確認した。

今後、検出した神経細胞集成体を解析する事により、場所に対応する神経細胞集成体が場所学習によって如何に変化して行くか、そこに置かれた「物体」に関する情報がどのように海馬神経回路の「認知地図」に貯蔵・表現されているかを解析する。このような、生理条件下の神経細胞集成体の動的特徴が明らかになればその上で他研究グループと共同で、種々疾患モデルに於ける神経細胞集成体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パロジの概念を確立する。

1. Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A. & Hayashi, Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* **7**, 1104-12 (2004).
2. Takao, K. *et al.* Visualization of synaptic Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activity in living neurons. *J Neurosci* **25**, 3107-12 (2005).
3. Kwok, S. *et al.* Genetically encoded probe for fluorescence lifetime imaging of CaMKII activity. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 519-25 (2008).
4. Mower, A.F., *et al.* Experience-dependent regulation of CaMKII activity within single visual cortex synapses in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 21241-21246 (2011).

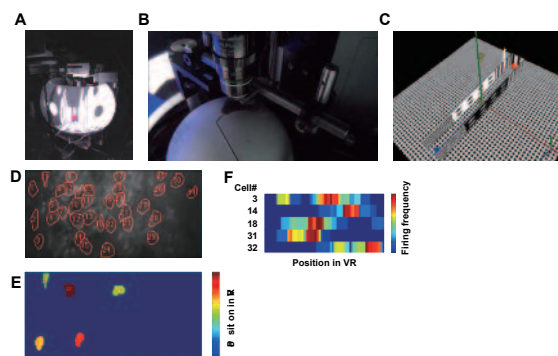


図 実験セットアップ

A-C 仮想現実空間の例

D-F 検出された場所細胞の例



シナプス後膜における受容体の局在・動態への アミロイド β の作用

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、小脳のシナプス可塑性の分子機構について研究を行い、そ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^{1,2)}。また、非神経細胞と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³⁾。その他、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⁴⁾。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てきました。

2012年度までの本新学術領域の研究では、シナプスにおけるタンパク質動態の詳細を解析する新実験手法の開発をめざしました。そして、ガラス面上にシナプス後膜を形成させ、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を確立しました⁵⁾。この方法では、カバーガラスをニューレキシンでコートして、その上で海馬神経細胞を培養し、シナプス後膜様構造をガラスに面して形成させました。そして、神経細胞で発現させた蛍光標識グルタミン酸受容体のシナプス後膜内外での動態を、全反射顕微鏡を用いて高時空間分解能で記録・解析しました。この研究により、シナプス可塑性の長期増強が発現する際に、サブユニット構成の異なる各 AMPA 受容体が異なる経路でシナプス後膜に集積することを明らかにできました(図参照)。

2013年度からの研究では、この新研究手法を用いて、アルツハイマー病にかかわるアミロイド β のグルタミン酸受容体動態への作用等を明らかにし、アルツハイマー病初期のシナプス病態解明に寄与することをめざします。アルツハイマー病においては、アミロイド β がシナプス後膜の NMDA 型および AMPA 型グルタミン酸受容体数を減少させ、長期増強発現を抑えることが報告されています。

1. Hirano, T. Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc. Japan Acad. Series B* **89**, 183-195 (2013)
2. Kawaguchi, S. & Hirano, T. Gating of long-term depression by CaMKII through enhanced cGMP signaling in cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* **591**, 1707-1730 (2013)
3. 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)
4. Muguruma, K. et al. Ontogeny-recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje cells. *Nature Neurosci.* **13**, 1171-1180 (2010)
5. Tanaka, H. & Hirano, T. Visualization of subunit-specific delivery of glutamate receptors to postsynaptic membrane during hippocampal long-term potentiation. *Cell Reports* **1**, 291-298 (2012)



ガラス面上でのシナプス後膜形成と長期増強時の AMPA 受容体動態
新実験手法で、長期増強時の各 AMPA 受容体動態を明らかにした。Tanaka & Hirano, 2012



トランスクリプトーム解析による移植神経幹細胞のシナプス再生過程の解明

岡田 誠司

(九州大学大学院・医学研究院・准教授)

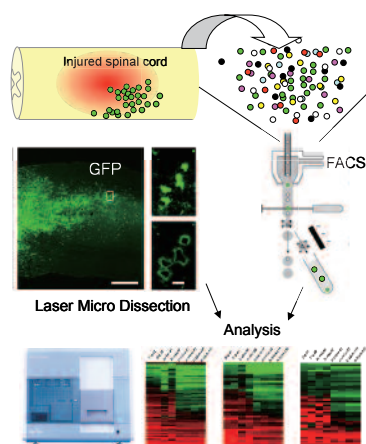
公募 A03

神経変性疾患や中枢神経外傷に於いては多数の神経細胞が死滅し、殆ど再生がなされないため、ニューロサーキットの欠落による麻痺等の病的症状は永続的に続くケースが多い。しかし、近年幹細胞生物学の発展により、幹細胞を移植することで失われた細胞を補充し、ニューロサーキットの再生を行うことが可能なのではないかと期待されている。実際に脳梗塞や脊髄損傷等で急性期の神経幹細胞移植の有効性が動物実験レベルで報告されており、我々も移植細胞のバイオイメーキングなどの新技術を応用するとともに多くの移植実験を行ってきた¹⁻⁴⁾。しかし、この細胞移植治療の有効性は損傷急性期移植のみでしか確認されておらず、その機能改善メカニズムも不明な点が数多く残されている。可能性としては、移植細胞がニューロンへ分化し、新たなニューロサーキットを再形成することによる効果とも考えられているが、一方では移植細胞自身が分泌する神経栄養因子による『神経保護効果』や『炎症反応制御』により損傷早期の病態を改善させ、治療効果に繋がっている可能性が高い^{5, 6)}。実際に、ニューロンには分化しない嗅粘膜細胞や骨髄細胞移植でも脊髄損傷急性期に移植した場合には神経幹細胞と同程度の効果が報告されている。さらに、損傷を受けて死滅した細胞や組織の代替として移植細胞自身が損傷部位に生着・分化し機能するのであれば、当然、慢性期の損傷組織に移植しても何らかの効果は認められるはずであるが、我々のマウス脊髄損傷モデルを用いた実験に於いても、損傷早期から亜急性期に移植した場合には、ごく僅かな機能改善効果が確認されるものの、慢性期の損傷に対して神経幹細胞を移植しても全く運動機能改善は認められなかった²⁾。

治療メカニズムを解明し、慢性期中枢神経外傷や変性疾患へ幹細胞移植を応用するためには、移植細胞が機能的なニューロサーキットを形成しているかどうかを評価する手法は必須である。しかし、従来の解析法では組織切片解析が中心であり、免疫染色による生着細胞の局在や分化 phenotype についてはある程度の断片的な情報が得られるものの、どのような分子がどの程度発現しているのかといった、定量的網羅的な解析は不可能であった。そのため、生着した細胞が実際に機能的なニューロサーキットの再形成にどの程度寄与しているのかは殆ど不明である。そこで、本研究課題に於いては、近年我々が確立したセルソーターを用いた生着細胞の選択的な回収と次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析¹⁻³⁾を行い、生着後の神経幹細胞の機能を定量化する実験を行う。また、移植された神経幹細胞がシナプスを形成する過程で発現する分子変化を明らかにし、生着した細胞が機能的なニューロサーキットを形成しているかを明らかにすることを目的とする。従来はニューロサーキットの形成は発生領域で主に研究さ

れていたが、本研究では病態修復・再生医療の観点からシナプス・ニューロサーキットの形成過程に関わる分子群の解明を試みる。本研究課題により再生過程のシナプス変化が明らかとなれば、病態分子メカニズムの解明に繋がるのみならず、神経変性疾患や外傷後の幹細胞移植治療の臨床応用に繋がる成果となるものと考えている。

1. Kumamaru, H., Ohkawa, Y., Saiwai, H., Yamada, H., Kubota, K., Kobayakawa, K., Akashi, K., Okano, H., Iwamoto, Y., & Okada, S. Direct isolation and RNA-Seq reveal environment-dependent properties of engrafted neural stem/progenitor cells. *Nat Commun.* **3**, 1140-6 (2012).
2. Kumamaru, H., Kobayakawa, K., Saiwai, H., Kubota, K., Yokota, K., Ohkawa, Y., Shiba, K., Iwamoto, Y., & Okada, S. The therapeutic activities of engrafted neural stem/progenitor cells are not dormant in the chronically injured spinal cord. *Stem Cells*. In press, (2013)
3. Harada, A., Okada, S., Konno, D., Odawara, J., Yoshimi, T., Yoshimura, S., Kumamaru, H., Saiwai, H., Tsubota, T., Kurumizaka, H., Akashi, K., Tachibana, T., Imbalzano, A.N., & Ohkawa, Y., Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate. *EMBO J.* **31**, 2994-3007 (2012).
4. Okada, S., Ishii, K., Yamane, J., Iwanami, A., Ikegami, T., Iwamoto, Y., Nakamura, M., Miyoshi, H., Okano, H.J., Contag, C.H., Toyama, Y., & Okano, H. *In vivo* imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J.* **19**, 1839-41 (2005).
5. Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Yamane, J., Yoshimura, A., Iwamoto, Y., Toyama, Y., & Okano, H. Conditional ablation of Stat3/Socs3 discloses the dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med.* **12**, 829-34 (2006).
6. Saiwai, H., Ohkawa, Y., Yamada, H., Kumamaru, H., Harada, A., Okano, H., Yokomizo, T., Iwamoto, Y., & Okada, S. The LTB4-BLT1 axis mediates neutrophils infiltration and secondary injury in experimental spinal cord injury. *Am J Pathol.* **176**, 2352-2377 (2010).



損傷脊髄に移植された神経幹細胞を FACS や LMD を用いて選択的に回収し、シナプス形成段階でのトランスクリプトーム解析を行う



AAVベクターを応用した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)

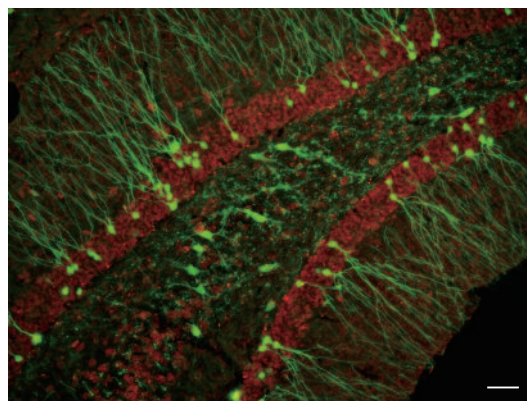
公募 A03

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。パーキンソン病に対しては、霊長類モデルを使用した前臨床試験を経て、2007 年から芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) 遺伝子を発現する AAV ベクターを被殻に注入する遺伝子治療の臨床応用を実施した¹⁾。さらに台湾で AADC 欠損症に対する遺伝子治療を開始し、著明な改善効果を得ている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 配列の間に含むトランスジェニックマウスの脳の特定部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。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³⁾。

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明する。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。これまでの研究で、Alzheimer 病モデルマウスにおいて A β 分解酵素の Neprilysin を脳内の広範な領域で発現させることにより認知機能の改善効果を得ている⁴⁾。また、球脊髄性筋萎縮症の病態に関連した miRNA をモデルマウスの筋肉内に投与することにより、脊髄の異常アンドロゲン受容体蛋白の発現を減少させ表現型が改善することを報告した⁵⁾。

1. Muramatsu, S. *et al.* A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol. Ther.* **18**, 1731-1735 (2010).
2. Hwu WL, *et al.* Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Sci Transl Med*, **4**, 134-161 (2012).
3. Krzy, osiak, A. *et al.* Retinoid X receptor gamma control of motivated behaviours involves dopaminergic signalling in mice. *Neuron*, **66**, 908-920 (2010).
4. Iwata N, *et al.* Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep*, **3**, 1472 (2013).
5. Miyazaki M, *et al.* Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med*, **18**, 1136-1141 (2012).



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 μ m



疾患特異的細胞 iPS 細胞を用いた ニューロマスキュラーパソロジーの解析

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、患者の病態を正確に反映する疾患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、患者由来体細胞から疾患特異的ヒト iPS 細胞を樹立し、神経系細胞を含む様々な疾患感受性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、実際のヒトの発生をよく反映することから、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。

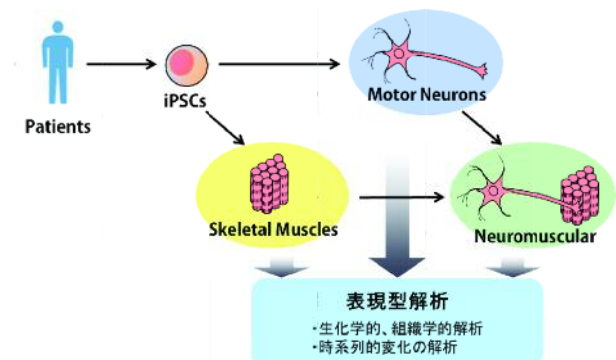
私たちは、これまでの研究で、マウス ES 細胞・iPS 細胞から神経幹細胞を効率的に誘導するシステムを確立し^{1,2)}、また、この培養法を応用することで、ヒト ES・iPS 細胞から、ヒト神経幹細胞や神経系細胞を高効率に誘導するシステムを開発してきた³⁾。この方法で誘導したヒト iPS 細胞由来神経幹細胞は、脊髄損傷モデルに移植することで運動機能の改善に寄与し、その機能性と神経再生治療への有効性が示された³⁾。さらに、パーキンソン病やアルツハイマー病患者の体細胞から樹立した疾患特異的ヒト iPS 細胞から、同様の方法で患者由来ニューロンを誘導することで、それぞれの疾患における病態モデルの開発を行ってきた^{4,5)}。

一方、近年、様々な神経変性疾患において、ニューロンの細胞自律的な病態のみならず、ニューロン以外の細胞との細胞間相互作用に基づく非細胞自律的な病態が、その発症と進行に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。しかし、従来のマウスモデルは、必ずしもヒトの病態を正確に反映しているとは限らない上に、これらのモデルを用いて、それぞれ細胞種を切り分けて、あるいは複数の特定の細胞種を取り出して、その相互作用を解析するのは困難であった。そこで、本研究では、ヒト ES 細胞・iPS 細胞が、ヒトの体を構成する様々な細胞種へと分化可能であることを利用し、運動ニューロン疾患（球脊髄筋萎縮症[SBMA]）を中心とする神経筋疾患の患者由来、および健常者由来ヒト iPS 細胞から運動ニューロンおよび骨格筋細胞を誘導して、個々の細胞種の細胞自律的な病態解析を行うのみならず、この両者を共培養することで、新たなニューロマスキュラーモデルを作成し、細胞間相互作用に基づく病態解析を行う。

これらの解析により、様々な神経筋疾患における新たな病態モデルの作成が可能になるのみならず、細胞間相互作用に基づく新たな視点での治療法開発が期待される。

1. Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, 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 lines. *Nat Biotechnol.* **27**, 743-745 (2009).
3. Nori, S*, Okada, Y*, Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., Toyama, Y., Yamanaka, S., Nakamura, M., Okano, H. Grafted human induced pluripotent stem cell-derived neurospheres promotes motor functional recovery after spinal cord injury in mice *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 16825-30. (2011)
4. Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., Yamanaka, S., Okano, H., Suzuki, N. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4530-4539. (2011)
5. Imaizumi, Y., Okada, Y., Akamatsu, W., Koike, M., Kuzumaki, N., Hayakawa, H., Nihira, T., Kobayashi, T., Ohyama, M., Sato, S., Takanashi, M., Funayama, M., Hirayama, A., Soga, T., Hishiki, T., Suematsu, M., Yagi, T., Ito, D., Kosakai, A., Hayashi, K., Shouji, M., Nakanishi, A., Suzuki, N., Mizuno, Y., Mizushima, N., Amagai, M., Uchiyama, Y., Mochizuki, H., Hattori, N., Okano, H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and α -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue *Mol. Brain.* **5**, 35 (2012)



ヒト iPS 細胞から運動ニューロンと骨格筋細胞を誘導し、細胞間相互作用に基づく病態を含めた解析を行う





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。平成25年7月10日に東京歯科大学で『基礎コース』、平成25年7月11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iPS技術講習会の開催を予定しています。

『脳疾患関連3領域合同シンポジウム』

2012年7月25日に『脳疾患関連3領域合同シンポジウム』を文部科学省「包括型脳科学研究推進支援ネットワーク」主催の夏のワークショップ（仙台国際センター）において行いました。

本シンポジウムは「シナプス病態」「脳内環境」「自己制御精神」の3領域合同で開催しました。多くの聴衆から活発な質疑が寄せられ、盛況のうちに終了いたしました。





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.2

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