

## 30-5 神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究

荒木 敏之

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 疾病研究第五部

### 研究目的

多くの神経変性疾患においては、シナプス～軸索の変性が細胞体の死に先んじて見られ、軸索変性は神経細胞全体に及ぶ変性の初期変化であるとも考えられる。本研究課題は、神経保護的疾患治療の実現を目指し、研究代表者らが研究対象としてきたシナプス～軸索の変性をはじめとする神経疾患の初期過程における最適な治療標的の同定と治療モデル作出を目的とする。

研究代表者グループは、軸索構造の安定性維持・軸索変性の進行を司る細胞内反応機序に関して研究を進め、①NAD 代謝に着目した強力な神経保護法の開発、②神経変性の最初期反応の同定、③神経突起形態制御メカニズムの神経発達障害・神経変性疾患における意義に関する検討を行う。センター内参加者は、膜透過型オートファジー依存的核酸・蛋白分解系の関与 (株田)、Eomes 陽性ヘルパーT 細胞 (Eomes+Th 細胞) の病態への寄与 (大木) デュシェンヌ型筋ジストロフィー原因分子であるジストロフィンの中樞神経系における機能(青木)などそれぞれの側面から神経変性疾患の病態メカニズムの解明に基づく変性抑制による治療法開発を目指す。外部研究機関研究者 (大野) は3D 超微細構造観察に高い技術を有しており、共同研究・技術支援による研究開発の加速を図る。

### 研究組織

#### 主任研究者

荒木 敏之 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第五部 部

長

#### 分担研究者

青木 吉嗣 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 部長

大木 伸司 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部(免疫研究部) 室長

株田 智弘 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部 室長

大野 伸彦 自治医科大学医学部解剖学講座 教授

#### 研究成果

研究代表者グループは、NAD 代謝に着目した強力な神経保護法の開発課題については今年度からAMED 橋渡し研究(シーズA)にも採択され、ベンチャー企業・東京薬科大共同研究者とも協力し 130 以上の候補化合物の合成・神経保護活性測定を行うことにより、毒性が低く十分な有効性を示す化合物を同定した。

また、研究代表者グループは、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換体である NHE5 の欠損マウスが ASD 様社会性行動異常を示し、細胞レベルでも他の ASD モデルやヒト ASD 患者で観察される未熟な樹状突起形態を認めることを示した。さらに、妊娠マウスでのアンギオテンシン高値が、胎仔での

NHE5 の分解による活性低下を誘発し ASD 様フェノタイプに繋がることを示した。

大木らは多発性硬化症 (MS) 臨床サンプルを用いた解析から、二次進行型 MS 患者の末梢血における Eomes+Th 細胞の頻度が病態の進行度を反映するバイオマーカーとなることを示した。臨床サンプルを用いた解析から、SPMS 患者の末梢血における Eomes 陽性 Th 細胞の頻度 (Eomes 頻度) には多様性があり、Eomes 高頻度群と低頻度群に分類できる。Eomes 高頻度群では病態の進行が認められ、一方、低頻度群の病態は安定していたことから、末梢血中の Eomes 頻度が、SPMS 病態の進行度を反映するバイオマーカーとなることが示された。Eomes 陽性 Th 細胞の生成機序の解明を目的として、T 細胞と相互作用する機能的パートナーである抗原提示細胞に着目し、慢性炎症環境下における挙動の解析を進めた。その結果、持続する慢性炎症環境下に置かれた抗原提示細胞が、異所性にプロラクチンを産生することを見出した。抗原提示細胞由来のプロラクチンは、T 細胞の Eomes 遺伝子発現を誘導することが明らかとなり、Eomes 陽性 Th 細胞を介した神経細胞障害機序の上流に、抗原提示細胞由来の異所性プロラクチン産生が重要な役割を果たすことがわかった。細胞障害性因子である Granzyme B の放出に必要な Eomes 陽性 Th 細胞の活性化に、ミクログリアによる未知抗原の提示が重要である可能性が示された。株田らは、リソソーム膜タンパク質を介した膜透過型オートファジーによる  $\alpha$ -synuclein など神経変性疾患関連蛋白の分解メカニズム、当該蛋白の欠損モデルマウスのフェノタイプに関する検討を行った。

青木は今年度から本課題に加入し、筋ジストロフィーモデルマウス(mdx)が示す基底外側扁桃体錐体細胞ポストシナプスの興奮/抑制バランス異常による自閉症様恐怖応答・社会行動異常を見出した。

オートファジーのうち、RNautophagy は株田らが新たに見出した膜透過型オートファジー経

路であり、RNA が直接的にリソソームに取り込まれ分解される。SIDT2 はリソソーム膜タンパク質であり、RNautophagy において RNA 輸送体として機能する。株田らは、本研究において RNautophagy と神経変性疾患の分子メカニズムや病態との関連性を明らかにすることを目標としている。また、タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解されるという膜透過型オートファジー経路も見出しており、この経路に重要なリソソーム膜タンパク質 CMAT を同定した。また、 $\alpha$ -synuclein タンパク質はこの経路の基質となることを見いだした。マウス個体レベルにおいて、CMAT の過剰発現により脳内  $\alpha$ -synuclein タンパク質の量を低減させることに成功した (特許出願準備中)。CMAT KO マウスの脳内では  $\alpha$ -synuclein タンパク質量の上昇が観察された。以上の結果から、RNautophagy や新規タンパク質分解経路の活性化は、新たな神経変性疾患の治療法となる可能性がある。

大野らはミトコンドリアと小胞体の接触部 (MAM) の形成維持における MITOL (E3 リガーゼ) の役割を示し、更にミトコンドリア分裂融合が細胞内 Ca 濃度制御を介して神経突起の安定性を制御する機序を観察した。本年度は Mfn2 のオリゴマー化を介して、MAM の維持に関与する MITOL の神経細胞および軸索における役割についての検討を共同研究の中で行った。MITOL は Mfn2 をユビキチン化することで、そのオリゴマー化を促進することが知られており、過去の検討から胎児線維芽細胞において、MITOL の欠損が MAM の減少につながることを報告されていた。そこで神経特異的 MITOL 欠損マウスにおいて、MAM の変化を検討した。その結果、神経特異的 MITOL 欠損マウスでは、神経細胞体および軸索における MAM が顕著に減少することが示された。また、ミトコンドリアの形態異常と酸化ストレスのマーカーである蛋白のカルボニル化が観察された。これらの結果は、MITOL を介する MAM の維持はミトコンドリア機能の維持や酸化ストレスの防止に関与することを示唆していると考えられた。これらの結果の一部を原著論文として発表し

た[Nagashima et al. Life Sci Alliance 2019]。

昨年度から本年度にかけ、培養脊髄神経節細胞を用いて、光遺伝学的应用による軸索変性の惹起に関する検討を行った。チャンネルロドプシンの一種である oChIEF [Lin et al. Biophys J. 2009] をレンチウイルスベクターを用いて発現させ、その後光刺激を行うことにより、oChIEF 発現軸索の光刺激領域に特異的に軸索変性を惹起できることが分かった。Ca<sup>2+</sup>指示蛍光蛋白である GCaMP3 の共発現を行って観察すると、細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇がこの軸索変性に先行すると考えられたことから、Ca<sup>2+</sup>依存性の軸索変性を惹起している可能性が示唆された。実際、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの阻害薬である Cd<sup>2+</sup>処理により、軸索変性が抑制された。また、光刺激に伴って、ミトコンドリアの断片化と輸送の停止が認められた。このミトコンドリアの断片化には、ミトコンドリア分裂蛋白である Dp1 の活性化が伴っていると考えられた。実際、Dp1 のドミナントネガティブ変異蛋白である Dp1K38A を発現させると、ミトコンドリアの有意な伸長と同時に、光刺激時の断片化の抑制が観察された。さらに、この Dp1K38A の発現によって、軸索変性の抑制が観察されたことから、ミトコンドリアの分裂は、Ca<sup>2+</sup>の軸索内への流入と軸索変性の惹起に関わることが示され、本モデルの In vivo への適応について、今後検討を進める足掛かりを築くことができた。

上記の結果からミトコンドリア分裂の抑制と融合が小胞体との相互作用の修飾にも影響を及ぼすと考えられる。この可能性を in vivo で検討するため、KENGE-Tet システムを応用し [Aida et al. 2015 Genome Biol]、生体内においてミトコンドリアの分裂を細胞特異的かつ可逆的に抑制することが可能なマウスの開発を行った。これは Cre と tTA を発現する細胞特異的に、Dox 投与中断によって Dp1K38A を一過性に発現することのできるマウスである。このマウスを大脳皮質および海馬の興奮性神経細胞に特異的に tTA を発現する系統(CaMKII-tTA)と交配させた。得られたマウスでは、神経細胞において、通常餌投与下で、顕著な Dp1K38A の発現と、ミトコンドリアの分裂抑制による巨大ミト

コンドリアの出現が見られることが確認された。また DOX 投与の開始による Dp1K38A の発現低下とミトコンドリアの小型化、あるいは DOX 投与の中断による Dp1K38A の発現開始とミトコンドリアの巨大化が、2~3 週間の間に引き起こされることも確認できたことから、来年度に向けて、疾患モデルに応用する基盤を形成することができた。また、オルガネラの変化を電子顕微鏡画像から高い効率で検出するための深層学習を用いた自動抽出法の開発も進めており、既に核などの大きな構造では良好な予備データが得られつつあることから、こうした新技術の応用によるデータ解析の高速化の実現も目指す。

## 分担研究報告書

(課題名) 神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究

(所属) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第五部

(氏名) 荒木 敏之

### 緒言

筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患においては、シナプス～軸索の変性が細胞体の死に先んじて見られ、軸索変性は神経変性の初期変化であるとも考えられる。我々はこれまでに軸索構造の安定性を維持する細胞内機構と、軸索変性を進行させる細胞内反応機序に関して研究を行ってきた。また一方で、NAD 代謝に着目し、製薬化学者との共同で Nicotinamide 類縁化合物を用いた強力な神経保護法の開発を進めている。本研究では、神経保護的疾患治療のための最適な治療標的の明確化を目的として、これまでに行ってきた、軸索構造の安定性維持・軸索変性の進行を司る細胞内反応機序に関して研究を進め、①NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)代謝に着目した強力な神経保護法の開発、②神経変性の最初期反応の同定、③神経突起形態制御メカニズムの神経発達障害・神経変性疾患における意義に関する検討を行う。またこれまでに見出してきた神経保護化合物の最適化を進め、神経変性疾患のマウスモデルなど動物モデルにおける検証を行うことを目的とする。

### 方法

① Nicotinamide 類縁化合物による神経保護を目指した研究においては、東京薬科大学の共同研究者が合成した化合物の神経保護効果と NAD 分解酵素に対する阻害効果の検討をおこなった。

② Na-H 交換体蛋白ファミリーの一員である NHE5 の欠損モデルを用いて神経細胞内オートファジー制御を介した自閉症類縁疾患発

症における意義を検討した。

### 結果

① これまで取り組んできた「神経保護活性を有するニコチンアミド類縁化合物」の最適化を進めた。培養下のマウス後根神経節神経細胞を用いた神経損傷モデルにおける神経保護活性と、損傷しない培養神経細胞に対する毒性の評価を行い、高い保護活性・低い毒性を示す化合物を目指すことによりスクリーニングを行った結果、130 以上の候補化合物の中から、十分な保護活性を示す化合物を同定した。

神経保護メカニズムとして、ニコチンアミド類縁化合物が細胞内で代謝されて生成する化合物が、SARM1 (軸索変性開始に伴って NAD を分解する) と結合し、元のニコチンアミド類縁化合物よりも高効率に SARM1 の NAD 分解活性を阻害することを示した。

② NHE5 は主として神経細胞の細胞内小胞の膜上に発現する Na-H 交換体の一つであり、NHE5 ノックアウトマウスは自閉症様フェノタイプの一つであるとされる社会行動異常を示した。細胞レベルでは、NHE5 ノックアウトや機能抑制により、樹状突起スパインの未熟化が観察された。さらに、妊娠マウスでのアンジオテンシン高値が、胎仔での NHE5 の分解による活性低下を誘発し ASD 様フェノタイプに繋がる可能性を示した。

### 考察

① 上述のように、神経保護活性を持つ化合物が、神経細胞内で代謝を受けた結果生じる化合物が、SARM1 に結合して NAD 分解を阻害する、というのが、神経保護化合物の作用メカニズムである可能性が高くなった。神経保護化合物は、細胞内で多段階の代謝を受ける可能性があるため、どの段階の代謝物が最も高い SARM1 阻害活性を持つのかを、今後さらに検討し明らかにする。

② 自閉症類縁疾患のリスク因子として、妊娠高血圧があることが報告されているが、妊娠高血圧と自閉症類縁疾患発症とをつなぐメカニズムはこれまで明らかにはなっていない。我々の同定した、アンジオテンシンレベルの変化が誘導する NHE5 発現変化は、妊娠高血圧と自閉症類縁疾患発症とをつなぐメカニズムとなる可能性があり、今後さらにヒト由来検体を用いた解析を行う。また、NHE5 変異はこれまでのところ自閉症類縁疾患患者においては報告が無いため、NCNP バイオバンク検体を用いた検討を行う予定である。

#### 参考文献 (業績)

Bertoldo MJ, Listijono DR, Ho WJ, Riepsamen AH, Goss DM, Richani D, Jin XL, Mahbub S, Campbell JM, Habibalahi A, Loh WN, Youngson NA, Maniam J, Wong ASA, Selesniemi K, Bustamante S, Li C, Zhao Y, Marinova MB, Kim LJ, Lau L, Wu RM, Mikolaizak AS, Araki T, Le Couteur DG, Turner N, Morris MJ, Walters KA, Goldys E, O'Neill C, Gilchrist RB, Sinclair DA, Homer HA, Wu LE.

NAD<sup>+</sup> Repletion Rescues Female Fertility during Reproductive Aging.

Cell Reports 30(6) 1670 - 1681, 2020.

Nagashima S, Takeda K, Shiiba I, Higashi M, Fukuda T, Tokuyama T, Matsushima N, Nagano S, Araki T, Kaneko M, Shioi G, Inatome R, Yanagi S

Critical role of CRAG, a splicing variant of centaurin- $\gamma$ 3, in ELK1-mediated SRF activation during neuronal development.

Scientific Reports 9: 20107, 2019.

Kondo S, Takahashi K, Kinoshita Y, Nagai J, Wakatsuki S, Araki T, Goshima Y, Ohshima T  
Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation delays Wallerian degeneration after optic nerve injury.

Biochemical and Biophysical Research Communications 514(4) 1037 - 1039, 2019.

Tsubota M, Fukuda R, Hayashi Y, Miyazaki T, Ueda S, Yamashita R, Koike N, Sekiguchi F, Wake H, Wakatsuki S, Ujiie Y, Araki T, Nishibori M, Kawabata A

Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants.

Journal of Neuroinflammation 16: 199, 2019.

Kondo S, Takahashi K, Kinoshita Y, Nagai J, Wakatsuki S, Araki T, Goshima Y, Ohshima T  
Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation at serine 522 promotes axonal regeneration after optic nerve injury.

Scientific Reports 9: 7188, 2019.

## 神経変性病態の形成過程における免疫細胞の動態研究

国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
免疫研究部  
大木 伸司

### 緒言

神経変性疾患の病態機序の不明な点が多く、様々な疾患に生じる神経変性病態の異同すら明らかではない。私たちは、神経変性を伴う二次進行型多発性硬化症（SPMS）の病態形成過程に関わる神経細胞障害性の Eomes 陽性ヘルパーT細胞（Eomes+Th細胞）を同定した。Eomes+Th細胞の生成には、持続する中枢神経系（CNS）の慢性炎症が重要であることから、本研究では Eomes+Th細胞の体内動態と、炎症に伴って浸潤した抗原提示細胞およびミクログリアとの三者の相互作用に着目し、慢性炎症環境下における Eomes+Th細胞の生成機序の解明を行う。並行して種々の神経変性疾患とその動物モデルにおける Eomes+Th細胞の動態解析を進め、普遍的な免疫依存性の神経変性機序の解明と、画期的な治療法につながる成果の取得を目指す。

### 方法

SPMSモデルマウスと神経変性モデルマウスの病態形成に伴う Eomes+Th細胞の体内動態を解析し、病態との関わりを検証する。慢性炎症下の抗原提示細胞とミクログリアの遺伝子発現解析を行い、Eomes+Th細胞の生成に関わる分子群を同定する。ヒト神経変性疾患における Eomes+Th細胞の動態解析を行い、動物モデルのデータと比較解析した。

### 結果

慢性炎症環境下の抗原提示細胞が産生する異所性のプロラクチンが、Th細胞の Eomes 発現を誘導することを明らかにした（文献）。抗原提示細胞のプロラクチン産生には、自身が産生する炎症性サイトカイン（IL-1、IL-6、IL-12）の他、ミクログリア由来の Type I IFN が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

### 考察

慢性炎症を伴う神経変性病態における免疫応答の関与が示された。免疫細胞、グリア細胞（と恐らく神経細胞）の複雑な相互作用が重要な病態制御因子と考えられ、神経・免疫両側面からの横断的なアプローチが、いまだ有効な治療法が確立していない神経変性疾患の未知の病態機序解明に有効であると考えられた。

### 結論

Th細胞、抗原提示細胞とミクログリアの機能的相互作用が、神経変性病態の形成過程に重要な役割を果たすことが示された。プロラクチンが、種々の神経変性病態の新しい治療標的候補分子となることが明らかとなった。

### 参考文献

1. Chenyang Zhang, Ben J. E. Raveney, Hirohiko Hohjoh, Chiharu Tomi, Shinji Oki, Takashi Yamamura. Extrapituitary prolactin promotes generation of Eomes-positive helper T cells mediating neuroinflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116 (42) 21131–21139 (2019)

## 分担研究報告書

(課題名) 膜透過型オートファジー機構に基づく神経変性疾患の病態解明

(所属) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第四部

(氏名) 株田 智弘

### 緒言

多くの神経変性疾患においては、タンパク質や RNA の細胞内への蓄積が神経変性を引き起こすことから、病態解明や治療法開発のために細胞内分解の理解は極めて重要である。リソソームによる細胞内分解機構であるオートファジーのうち、RNautophagy は我々が以前新たに見出した膜透過型オートファジー経路であり、RNA が直接的にリソソームに取り込まれ分解される。SIDT2 はリソソーム膜タンパク質であり、RNA のリソソーム内への輸送において重要な分子である。SIDT2 は、RNA transporter として知られる線虫 SID-1 の脊椎動物オルソログであることから、RNautophagy において RNA transporter として機能すると考えられる。本研究では RNautophagy と神経変性疾患の分子メカニズムや病態との関連性を明らかにすることを目的とする。さらに、タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解されるという新規のオートファジー経路も見出しつつあり、これについても同様に解析を進める。

### 方法

培養細胞としては、Mouse embryonic fibroblast および Neuro2a 細胞を用いた。リソソーム膜に存在するタンパク質トランスポーター候補分子 (ここでは CMAT と呼ぶ) について、過剰発現および siRNA によるノックダウンを行なった。それぞれの細胞について、パルス・チェイス・アッセイや Tet-off システムを用いて単位時間におけるタンパク質の分解を追跡した。リソソームへのタンパク質の直接取り込みに関しては、上記細胞から調製

した単離リソソームを用いて実験を行なった。動物個体レベルの解析では、CMAT KO マウスおよび CMAT を過剰発現する Tg マウスを用いた。

### 結果

単離リソソームを用いた実験の結果、タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解され、新規のオートファジー経路を発見した。CMAT の過剰発現およびノックダウンにより、細胞内におけるタンパク質分解や単離リソソームにおけるタンパク質分解が、それぞれ増加、減少した。また、CAMT を介した分解は、マクロオートファジーやシャペロン介在性オートファジーなど、既知の分解経路とは異なることを確認した。これらの結果から、CMAT が新規経路に重要であることが判明した。また、パーキンソン病などの原因として知られる  $\alpha$ -synuclein タンパク質は新規経路の基質となることを見いだした。マウス個体レベルにおける解析では、CMAT の過剰発現 (Tg) により脳内  $\alpha$ -synuclein タンパク質の量を低減させることに成功した。また、CMAT KO マウスの脳内では  $\alpha$ -synuclein タンパク質量の上昇が観察された。

### 考察・結論

タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解されるという新規のオートファジー経路を発見した。この経路に重要なリソソーム膜タンパク質 CMAT を同定した。

新規タンパク質分解経路の活性化は、新たな神経変性疾患の治療法となる可能性がある。

### 参考文献 (業績)

Hirayama K, Fujiwara Y, Terada T, Shimizu K, Wada K, \*Kabuta T. Virtual screening identification of novel chemical inhibitors for aberrant interactions between pathogenic mutant SOD1 and tubulin. Neurochem Int. 2019;126:19-26.

## 神経・筋疾患の中樞神経障害に対する遺伝子治療法開発

国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部  
青木 吉嗣

### 緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、DMD 遺伝子の変異により筋細胞膜から完全長ジストロフィンの Dp427 が欠損し、進行性の筋萎縮・筋力低下をきたす X連鎖性の希少難病である。DMD 遺伝子からは、完全長の Dp427 に加えて、短い Dp140 アイソフォームが翻訳され、両者はいずれも脳に発現する。ゲノムワイド関連解析から、DMD 遺伝子は恐怖応答遺伝子としても知られる。特に Dp140 が欠損した DMD 患者は自閉症を有意に伴い<sup>1</sup>、Dp140 は胎児・幼少期に発現が高く、神経発達障害の遺伝子と関わる<sup>2</sup>ことから、DMD 遺伝子は自閉スペクトラム症の原因遺伝子候補と考えられる。これまで、DMD モデルマウスの行動や生理学実験では、Dp427 欠損の mdx23 マウスが主に解析されてきた。mdx23 マウスで認める恐怖・不安反応の増強や社会性行動異常は、扁桃体における錐体神経細胞の Dp427 欠損が原因と考えられている<sup>3,4</sup>。しかし、Dp140 の欠損により、認知・情動機能の異常が生じる神経生理基盤や分子病態の詳細は未だ明らかではない。

本研究では、DMD モデルの mdx および mdx52 マウスを用いる(両者とも Dp427 を欠損)。mdx マウス脳では Dp140 が発現し、mdx52 マウス脳では Dp140 が発現しないことから、両者を比較する事で、Dp140 の分子機能が明らかになると期待される。

### 方法

1. DMD モデルの mdx および mdx52 マウス、野生型 C57BL/6J マウスを用いる。
2. 前述のマウスを対象に、恐怖・不安や社会性を対象とした行動解析を実施する。

3. 前述マウスの扁桃体を対象に、Dp140 の発現解析を実施する。
4. 前述マウスを対象に、社会性に重要な神経核である扁桃体・基底外側核における錐体神経細胞での電気生理学的解析および分子生物学的解析を実施する。

### 結果

1. 恐怖・不安反応の試験では、mdx および mdx52 マウスでは野生型と比べて恐怖・不安反応の増強を示す有意な差があったが、mdx および mdx52 マウス間では差はなかった。
2. 社会性行動試験では、mdx52 マウスは、初めて出会うマウスに迫り寄る時間が mdx と比べて有意に増加し、社会的コミュニケーション障害が示唆された。
3. Dp140 は、野生型と mdx23 マウスの扁桃体では発現し、mdx52 マウスの扁桃体では発現しないことを確認した。
4. 扁桃体・基底外側核における錐体神経細胞を対象に、whole-cell パッチクランプを実施したところ、mdx52 マウスでは、mdx マウスあるいは野生型と比べて、錐体神経細胞における神経活動の興奮性・抑制性シナプス後電流の振幅の比 (E/I バランス) が有意に低下し、mEPSC の頻度異常を認めた。
5. mdx52 マウス扁桃体では、シナプス前終末に局在する小房型グルタミン酸トランスポーター発現レベルが有意に低下していた。
6. mdx52 マウスでは、mdx マウスあるいは野生型と比べて、扁桃体・基底外側核における paired-pulse ratio と微小興奮性シナプス電流の発火頻度が有意に低下していた。

## 考察

Dp140 を欠損する mdx52 マウスでは、自閉症様の社会的コミュニケーション障害を認め、扁桃体・基底外側核では、自閉症モデルマウスと同様に E/I バランス異常を認めることを見出した。

今後は、マウス扁桃体・基底外側核の錐体神経細胞を対象に、Golgi 染色により spine 密度の評価および電子顕微鏡によるシナプス構造評価（シナプス小胞数や大きさ、間隔の距離）を実施する。さらに、Dp140 がシナプス前終末からのグルタミン酸放出を制御する分子機構を明らかにするため、錐体神経細胞を標的にしたオプトジェネティクスを行う。最後に、次世代プライス・スイッチ核酸を、mdx52 マウスの脳室内あるいは髄腔内に投与する事により、Dp140 の発現を回復させ、Dp140 欠損に伴う社会性行動異常や電気生理異常が回復するかを確認する。併せて、成果の論文化準備を進める。

## 結論

Dp140 は、マウス扁桃体・基底外側核の錐体神経細胞シナプス前終末におけるグルタミン酸放出を制御することで、シナプスの興奮性バランスを保ち、社会的コミュニケーション能力の保持に関与する可能性が示唆された。

## 参考文献

1. Felisari G et al, Neurology. 2000
2. Doorenweerd et al, Sci Rep. 2017
3. Sekiguchi M et al, Brain. 2009
4. Ralph Adolphs, Nature Reviews Neuroscience. 2003

## 軸索変性に伴うオルガネラ相互作用の変化 とその制御機構の解明

自治医科大学医学部

解剖学講座組織学部門

大野 伸彦

### 緒言

軸索変性にミトコンドリアをはじめとするオルガネラの動態と機能が重要な役割を果たしている。しかしその動態の制御メカニズムや、機能維持を担うオルガネラ間の相互作用の軸索における生理的な分布と構造的な特性、そして軸索変性を伴う病態下における変化は、不明な点が多く残されている。本研究では、特にミトコンドリアと小胞体、そしてそれらの間の相互作用 (Mitochondria associated membranes, MAM)に焦点を絞り、マイクローム組み込み式走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)による3次元超微形態解析技術や分子標識、光遺伝学などを組み合わせ、脱髄を含む髄鞘疾患を中心として、病態における個々のオルガネラと相互作用の超微細構造変化とそれらの関連分子による制御機構を明らかにする。

### 方法

本年度は昨年度までの結果をふまえ、**Mfn2**のオリゴマー化を介して、**MAM**の維持に関与する**MITOL**の神経細胞および軸索における役割についての検討を共同研究の中で行った。**MITOL**は**Mfn2**をユビキチン化することで、そのオリゴマー化を促進することが知られており、過去の検討から胎児線維芽細胞において、**MITOL**の欠損が**MAM**の減少に

つながることが報告されていた。そこで神経特異的**MITOL**欠損マウスにおいて、**MAM**の変化を検討した。

また、昨年度の予備検討から引き続いて、ラット胎児より調整した培養脊髄神経節細胞にチャンネルロドプシンを発現させ、光刺激に伴う軸索変性の惹起に関する検討を行った。さらに、観察されたミトコンドリアの断片化にミトコンドリア分裂蛋白である**Drp1**の活性化が伴っていると考えられたため、**Drp1**のドミナントネガティブ変異蛋白である**Drp1K38A**を発現させ、ミトコンドリアおよび軸索変性への影響を観察した。

これまでの研究結果から、ミトコンドリア分裂の抑制と融合が小胞体との相互作用の修飾にも影響を及ぼすと考えられる。この可能性を *in vivo* で検討するため、**KENGE-Tet** システムを応用し[Aida et al. 2015 Genome Biol]、**Cre** と **tTA** を発現する細胞特異的に、**Dox** 投与中断によって **Drp1K38A** を一過性に発現することによって、生体内においてミトコンドリアの分裂を細胞特異的かつ可逆的に抑制することが可能なマウスモデル(**KENGE-Tet-Drp1K38A**)の開発を行った。

### 結果

神経特異的**MITOL**欠損マウスでは、神経細胞体および軸索における**MAM**が顕著に減少することが示された。また、ミトコンドリアの形態異常と酸化ストレスのマーカーである蛋白のカルボニル化が観察された。これらの結果の一部を原著論文として発表した[Nagashima et al. Life Sci Alliance 2019]。

チャンネルロドプシンの一種である oChIEF [Lin et al. Biophys J. 2009] をレンチウイルスベクターを用いて培養脊髄神経節細胞発現させ、その後に光刺激を行うことにより、oChIEF 発現軸索の光刺激領域に特異的に軸索変性を惹起できることが分かった。Ca<sup>2+</sup>指示蛍光蛋白である GCaMP3 の共発現を行って観察すると、細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇がこの軸索変性に先行すると考えられたことから、Ca<sup>2+</sup>依存性の軸索変性を惹起している可能性が示唆された。実際、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの阻害薬である Cd<sup>2+</sup>処理により、軸索変性が抑制された。また、光刺激に伴って、ミトコンドリアの断片化と輸送の停止が認められた。Drp1 のドミナントネガティブ変異蛋白である Drp1K38A を発現させると、ミトコンドリアの有意な伸長と同時に、光刺激時のミトコンドリアの断片化の抑制が観察された。さらに、この Drp1K38A の発現によって、軸索変性の抑制が観察された。

本年度は KENGE-Tet-Drp1K38A マウスを作出し、大脳皮質および海馬の興奮性神経細胞に tTA を発現する系統(CaMKII-tTA)と交配させた。得られたマウスでは、通常餌投与下(DOX 非投与下)で、大脳皮質と海馬の神経細胞で顕著な Drp1K38A の発現と、ミトコンドリアの分裂抑制による巨大ミトコンドリアの出現が見られることが確認された。また DOX 投与の開始による Drp1K38A の発現低下とミトコンドリアの小型化、あるいは DOX 投与の中断による Drp1K38A の発現開始とミトコンドリアの巨大化が、2~3 週間の間に引き起こされることも確認できた。

考察

MITOL 欠損マウスの解析によって得られた結果は、MITOL を介する MAM の維持はミトコンドリア機能の維持や酸化ストレスの防止に関与することを示唆していると考えられ、また、初年度の結果から軸索における Mfn2 の作用の増強が、脱髄に伴う軸索の MAM の増加に関与する可能性が示唆されていたが、MITOL の欠損による Mfn2 の活性の減弱が MAM の減少につながることは、この Mfn2 を介した軸索の MAM の制御機構を支持する所見と考えられる。

脊髄神経節細胞培養における oChIEF 光刺激に伴う軸索変性の実験から、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介した Ca<sup>2+</sup>濃度上昇と軸索変性には、ミトコンドリアの分裂が関与する可能性が示唆された。電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルは物理的ダメージなどの際の軸索障害にも関わる。したがって、髄鞘疾患や他疾患における神経・軸索変性とミトコンドリア分裂の相関性について、新たに作製したマウスモデルによる In vivo での検討を行う足掛かりを築くことができた。

本年度の研究で得られた生体内での細胞特異的ミトコンドリア融合の可逆的制御系は、MAM の形成・調節機構にミトコンドリアの分裂が一次的な刺激として関与するののかどうかについて、In vivo での検証を可能にすると期待される。また、実際に生体内において脱髄などによる神経軸索変性にミトコンドリア分裂が関わる可能性について、より詳細な検討を進める土台となることが期待される。

来年度はミトコンドリア分裂を抑制する薬剤に臓器保護作用の報告がみられることをふまえて[Nishimura et al. *Sci Signal* 2018]、神経組織におけるミトコンドリア分裂の抑制と神経軸索保護作用の有無について、Cuprizone 投与やリゾレシチンによる脱髄-再髄鞘化モデルなどを中心に、班内の他の軸索変性モデルも対象としながら、共同研究を進めたいと考える。また、今年度は神経発生期の神経細胞や腎臓の足細胞など、多様な細胞におけるオルガネラの変化を電子顕微鏡画像から高い効率で検出するための技術について検討を進め、深層学習を用いた自動抽出法の応用が視野に入りつつある。既に核などの大きな構造では良好な予備データが得られつつあることから、こうした新技術の応用によるデータ解析の高速化の実現も目指す。

#### 結論

今年度はMAMの維持がミトコンドリア機能の維持や酸化ストレスの防止に関与すること、ミトコンドリアの分裂がCa<sup>2+</sup>の軸索内への流入による軸索変性の惹起に関わることを示し、生体内でのミトコンドリア分裂抑制マウスモデルの開発および電子顕微鏡画像からの構造抽出法の開発を行った。これらの知見および技術は、来年度のミトコンドリア動態とMAM制御および神経軸索保護の関係性の検証における重要な基盤となると期待される。

#### 参考文献

1. Matsumoto M, Sawada M, García-González D, Herranz-Pérez V, Ogino T, Bang Nguyen H,

Quynh Thai T, Narita K, Kumamoto N, Ugawa S, Saito Y, Takeda S, Kaneko N, Khodosevich K, Monyer H, García-Verdugo JM, Ohno N, Sawamoto K. Dynamic Changes in Ultrastructure of the Primary Cilium in Migrating Neuroblasts in the Postnatal Brain. *J Neurosci*. 2019;39(50):9967-9988.

2. Nagashima S, Takeda K, Ohno N, Ishido S, Aoki M, Saitoh Y, Takada T, Tokuyama T, Sugiura A, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Yanagi S. MITOL deletion in the brain impairs mitochondrial structure and ER tethering leading to oxidative stress. *Life Sci Alliance*. 2019;2(4). pii: e201900308.

3. Takaki T, Ohno N, Saitoh S, Nagai M, Joh K. Podocyte penetration of the glomerular basement membrane to contact on the mesangial cell at the lesion of mesangial interposition in lupus nephritis: a three-dimensional analysis by serial block-face scanning electron microscopy. *Clin Exp Nephrol*. 2019;23(6):773-781.

4. Thai TQ, Nguyen HB, Sui Y, Ikenaka K, Oda T, \*Ohno N. Interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum in demyelinated axons. *Med Mol Morphol*. 2019;52(3):135-146.

5. Sui Y, Nguyen HB, Thai TQ, Ikenaka K, Ohno N. Mitochondrial Dynamics in Physiology and Pathology of Myelinated Axons. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1190:145-163.

Research for developing neuroprotective therapy against neurodegenerative diseases via elucidation of pathogenetic mechanism.

Toshiyuki Araki

Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry

### **Aims**

In many neurodegenerative diseases, synaptic and axonal degenerations are observed prior to the death of the cell bodies, and therefore axonal degeneration is considered as an early phenomenon in the entire mechanism of neuronal degeneration. This study aims to identify the optimal therapeutic target in the initial process of neurodegeneration including degeneration of synapses and axons, and to create a therapeutic model using model animals to combat against neurodegenerative disorders. The research leader's group has been conducting research on the subcellular signaling mechanism that governs the maintenance of axonal structural integrity and progression of axonal degeneration. They aim to 1) develop a neuroprotective method focusing on NAD metabolism, 2) to identify initial neuronal changes in the pathogenesis of neurodegeneration, and 3) to examine the role of neurite morphogenesis / fate determination mechanism in neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. Participants from NCNP aim to develop therapy against neurodegeneration by analysis of a novel type of autophagy to degrade nucleic acid (Kabuta), by analyzing contribution of Eomes-positive helper T cells (Eomes + Th cells) to the pathogenesis (Oki), and by analyzing the roles of dystrophin in the central nervous system neurons via phenotype analysis of mdx mice. A researcher from outside research institutes has high technology in 3D ultrastructural observation (Ohno), and aims to accelerate research and development through joint research and technical support.

### **Research Team**

-Leader

Toshiyuki Araki: Director, Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (leader of this team)

-Participants

Yoshitsugu Aoki: Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience,

National Center of Neurology and Psychiatry

Shinji Oki: Section chief, Department of Immunology, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry

Tomohiro Kabuta: Section Chief, Department of Degenerative Neurological Diseases,  
National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

Nobuhiko Ohno: Professor, Department of Anatomy, Jichi Medical University