

3-9 ゲノム編集技術を用いたモデル動物作出による精神神経筋疾患の病態解明

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター
星野 幹雄

総括研究報告

1. 研究目的

CRISPR/Cas9 システムに代表される簡便なゲノム編集技術の登場で、動物個体への遺伝子欠損・変異導入が従来よりも遥かに迅速・安価・高効率で実現可能となり、疾患動物モデル作出に対するハードルは低下した。本研究課題ではNINP内で独自に導入・醸成されたこれら有用技術とバイオリソース・バンク、マウス行動解析ツールなどを各研究部で共有するプラットフォームを立ち上げ、数多くの疾患モデルを体系的に作出・解析することによって、各種精神神経筋疾患の統合的な病態解明とそれら診断、治療法の開発をめざした。

具体的には、バイオリソースから見出した疾患型の遺伝子欠損・変異・重複などを各種動物ゲノムへ導入することから、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、てんかん、Rett 症候群などの各種精神疾患、パーキンソン病などの各種神経変性疾患、遺伝性筋疾患を含む各種筋疾患の動物モデル作出を試み、得られたモデルを *in vitro*, *in vivo* で解析すると共に、実際の疾患症例と照応することによって、各種疾患の病態解明と新規診断法の開発を模索し、これら疾患モデルの症状改善に有効な薬剤の体系的探索等を通して新たな治療法の開発につなげる基盤研究を遂行した。さらには医療新時代に対応するため、インシリコ解析・人工知能 (AI) 解析基盤をセンター内に確立することを新たな目標とし、研究活動を開始した。また以上のように広範な課題を様々なレベルで効率良く相補・統合するような共同研究を推進することもセンターの発展に大きく寄与することが期待されるため、各研究部の優れた人材の相互理解と研究交流の機会を高頻度で持つことを重要な課題と位置づけ、研究目的の達成を後押しすることとした。

2. 研究組織

主任研究者

星野 幹雄 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・病態生化学研究部)

分担研究者

井上 高良 (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)

野口 悟 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第一部)

山田 光彦 (国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所・精神薬理研究部)

株田 智弘 (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)

若月 修二 (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)

青木 吉嗣 (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)

村松 里衣子 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・神経薬理研究部)

山下 祐一 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第七部)

岩崎 真樹 (国立精神・神経医療研究センター・病院・脳神経外科)

永井 義隆 (近畿大学医学部 脳神経内科)

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)

内匠 透 (神戸大学大学院 医学研究科)

山田 真弓 (京都大学大学院 生命科学研究科)

宮下 聡 (新潟大学脳研究所 システム脳病態学分野)

研究協力者

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所
(病態生化学研究部)

田谷 真一郎・堀 啓・大輪 智雄・

有村 奈利子・嶋岡 可純・橋詰 晃一・

足立 透真・白石 椋

(疾病研究第一部)

斎藤 良彦・大久保 真理子

(疾病研究第五部)

大野 萌馨

(疾病研究第六部)

井上 由紀子・浅見 淳子

(疾病研究第七部)

宗田 卓史・山口 博行・小島 大樹・

内田 裕輝

(遺伝子疾患治療研究部)

峰岸 かつら

(病院)

木村 唯子・高山 裕太郎・金子 裕・

飯島 圭哉・小路 直丈

国立精神神経医療研究センター・精神保健研究所

(精神薬理研究部)

古家 宏樹・中武 優子・三輪 秀樹・

小林 桃子・國石 洋・山田 美佐

近畿大学医学部脳神経内科

武内 敏秀・上山 盛夫・田港 朝也

東京都医学総合研究所

鈴木 マリ

九州大学大学院医学研究院

中嶋 秀行・笠原 由佳

3. 研究成果

1. バイオリソース・技術開発研究

(1) CRISPR/Cas9 に基づくゲノム編集技術や細菌人工染色体 (BAC) 改変・修飾技術を駆使した疾患モデル動物・細胞の作出や解析基盤のアップデートが順調に進み、本年度は 109 系統 (=前回開発費 30-9 の 3 年間の実績に迫る) の遺伝子操作マウスの作出を行なった (井上)。(2) NQNP 病院のてんかん手術検体のバイオバンクへの登録を進めるとともに、それら検体から核酸抽出を行い、未知のてんかん分子病態に迫る基盤を整備した (岩崎)。

2. 精神疾患研究

(3) 精神疾患関連遺伝子 *AUTS2* およびイハラてんかんラットの原因遺伝子 *DSCAML1* の破壊や各種疾患型変異導入マウスを作出し、病態との関連や治療薬の探索につなげる研究 (星野)、(4) 様々なストレスとうつ病や不安障害発症との関連を構成概念妥当性の高い動物モデルを用いることから検索する研究 (山田光)、(5) オートファジーによる RNA/DNA 分解系関連遺伝子を破壊もしくは過剰発現したマウス個体の解析に基づく病理解明 (株田)、(6) *MeCP2* 変異マウスにおけるミクログリア異常活性化機序の解析に基づく Rett 症候群病理の解明 (中島)、(7) ヒトゲノム解析から得られた自閉症関連遺伝子変異や染色体欠損をマウスに導入して体系的に病態を解析する研究 (内匠) を進めた。

3. 神経疾患研究

(8) ユビキチンリガーゼ *ZNRF1* と Na^+ 交換輸送体

NHE5 により調節される蛋白質分解系が神経回路の形成と維持、変容に果たす役割を探る研究 (若月)、(9) 神経回路を修復するメカニズムの探索から神経変性疾患の新規治療薬開発を行う研究 (村松)、(10) ショウジョウバエモデルを用いたポリグルタミン病発症の病理解明を目指す研究 (永井)、(11) マウス成体脳における神経細胞新生を支える分子カスケードの解明から新生過程の外因的制御をめざす研究 (山田真) を推進した。

4. 筋疾患研究

(12) ゲノム編集技術により患者変異を導入したマウスを体系的に作出し、多様な遺伝性筋疾患の分子病態解明をめざすのと同時にそれらモデルを用いて新規治療法開発につなげる研究 (野口)、(13) ジストロフィン遺伝子のエキソンスキッピングを可視化する遺伝子操作マウスを作出し、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する核酸医薬の網羅的スクリーニングに応用する研究 (青木)、を遂行した。

5. インシリコ・AI 研究

(14) 脳波や安静時機能的磁気共鳴画像などの高次元ビッグデータに対して、深層ニューラルネットワークを中心とする AI 技術を用いて解析し、各水準での特性を反映した特徴量を抽出可能とする技術を開発する研究 (山下)、(15) 小脳における介在神経の役割を各種バイオインフォマティクスやビッグデータ解析結果の効率的な次元圧縮を通して明白にする研究 (宮下) を推進した。

6. センター内研究員の相互理解、共同研究の推進

(16) それぞれの研究の相互理解を深める研究会議を行い 20 課題に迫る共同研究が進んだ。

令和 3 年 7 月 1 日 キックオフミーティング (Web 開催)

令和 4 年 2 月 24 日 班会議 (Web 開催)

分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集による精神疾患動物モデルの作出とその解析

(所属) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 病態生化学研究部

(氏名) 星野 幹雄

緒言

AUTS2 遺伝子および *DSCAML1* 遺伝子 (イハラてんかんラットの原因遺伝子) はさまざまな精神疾患に関与する可能性が示唆されている。本研究では、ゲノム編集技術を用いてげっ歯類モデルを作成し、これらの遺伝子・蛋白質の果たす役割とその破綻による疾患病理の解明に努める。

方法

今年度は、*Auts2* の終脳特異的 cKO マウスを作成し、特に大脳皮質形成、大脳皮質神経細胞発生について表現型を調べた。

結果と考察

終脳特異的な *Auts2* の cKO マウスでは、大脳皮質の厚みが薄くなっていた。さらに特異マーカーでの免疫染色から、深層神経細胞の数は変わらないが、浅層神経細胞の数が顕著に減少していることがわかった。*AUTS2* 遺伝子に変異を持つ *AUTS2* 症候群の患者では、小脳症を呈することがあるので、この表現型はそれを反映しているのかもしれない。また、発生途上のマウス脳において、神経細胞産生を調べたところ、ラディアルグリア (RGs) からの神経細胞産生には影響がないのに、Intermediate Progenitors (IPs, 中間神経前駆細胞) からの神経細胞産生が大きく低下していることがわかった。RGs からは深層神経細胞が、IPs からは浅層神経細胞が生まれることがわかっているので、*Auts2* cKO での浅層神経細胞の数の低下は、IPs からの神経細胞産生がうまくいかないことによると考えられた。IPs の細胞周期は、正常よりもかなり長く伸びていて、その結果として神経細胞の産生効率が悪いことが予想された。*Auts2* がないと、なぜこのような IPs の機能異常が引

き起こされるのかについて、これから詳細に研究していく。

結論

AUTS2 は IPs から神経細胞を生み出すところに関与する。この機能が失われると、結果として浅層神経細胞の数が減少し、*AUTS2* シンドロームの一部で見られる小脳症の原因となることが示唆された。

参考文献 (業績)

1. Adachi T, Miyashita S, Yamashita M, Shimoda M, Okonechnikov K, Chavez L, Kool M, Pfister SM, Inoue T, Kawauchi D, Hoshino M: Notch Signaling between Cerebellar Granule Cell Progenitors. *eNeuro*. 8(3) : 0468-20, May-Jun, 2021
2. Izumi R, Hino M, Nagaoka A, Shishido R, Kakita A, Hoshino M, Kunii Y, Yabe H: Dysregulation of DPYSL2 expression by mTOR signaling in schizophrenia: Multi-level study of postmortem brain. *Neurosci Res*. 175: 73-81, Feb, 2022

分担研究報告書

(課題名) CRISPR/Cas9 および BAC システムを用いた病態モデルマウスの作出
(所 属) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第六部
(氏 名) 井上 高良

緒言

精神・神経疾患に関わる網羅的ゲノム・エピゲノム情報の蓄積は近年飛躍的に進んだ一方、ゲノムの9割以上を占める遺伝子非コード領域の機能理解については解析技術基盤が未熟なため大きく立ち後れている。本研究ではヒト遺伝子の非コード領域に多数存在するゲノム欠失変異や SNP の機能的意義を、独自に醸成した細菌人工染色体 (BAC) システムや CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を駆使して体系的に究明することを目的とする。

方法

シナプス接着分子クラシックカドヘリン (Cdh) や *Autism susceptibility candidate gene 2* (Aut2)、オキシトシンレセプター (Oxtr) など自閉症スペクトラム障害 (ASD) 関連遺伝子に着目し、それらヒト遺伝子非コード領域に多数存在する ASD 関連 common variant 群を申請者固有の BAC を解析単位とした手法や CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いてマウスゲノムに導入し、それらヒト化マウスの表現型を探ることから、ASD の実状に即した病態モデリングを試みる。

結果

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて *Cdh6/8/11* 遺伝子座に異なるタグをノックインすることから、それら遺伝子発現様式の同時可視化に成功した (論文投稿準備中)。また Oxtr のマウスにおける発現局在を初めて正確に可視化するマウス系統を樹立すると同時に、それら Oxtr 発現細胞で自在なゲノム操作を可能とする有用マウス系統の作出にも成功した (Inoue YU et al., 2022)。さらに BAC システムを利用して巨大遺伝子 *Cdh6/8* や *Aut2* の非コード領域における転写制御機序の詳細を解析した。

考察

ASD に関連する分子群を複数同時にノックアウトしたり、様々なタグノックインによってそれら発現動態を同時可視化したり、それら遺伝子発現制御ダイナミクスを体系的にスクリーニングしたりする技術が確立した (Inoue YU et al., 2021) ことによって、これまで以上に非コード領域の機能理解が深まることが期待されるのに加え、複雑な ASD 病態を初めてモデリング可能とする解析基盤が整ったといえる。今後はヒト化マウスを体系的に作出することから ASD 関連 common variant 群の機能的意義が初めて明確になることが期待される。

結論

本研究によって得られた成果と申請者による独自技術や新規開発手法を効率的に組み合わせることで、多因子性 ASD の実態を正確に反映した病態モデリングが大きく進展するとともに、それらヒト化モデルマウスの積極的活用によって新規診断法や治療法開発の加速につながるが見込まれる。

参考文献 (業績)

1. Inoue YU et al. (2021) *Cells* 10, 1076. doi:10.3390/cells10051076.
2. Inoue YU et al. (2022) *eNeuro* 15, ENUERO.0423-21.2022. doi:10.1523/ENEURO.0423-21.2022. [Selected as a *Featured Article* of the issue and one of the *Cover Slides*]

分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集技術を応用した遺伝性筋疾患の診断、病態解析、治療法開発

(所 属) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第一部

(氏 名) 野口 悟

緒言

分子シャペロンは、ミスフォールドタンパク質のリフォールディングを助けたり、または分解に導いたりするタンパク質の総称である。ストレス臓器である骨格筋では分子シャペロンとその補因子が多く発現し、タンパク質の恒常性に寄与している。これまでに、低分子シャペロンタンパク質 *CRYAB*, *HSPB8*, *DNAJB6* 遺伝子やヌクレオチド交換因子をコードする *BAG3*, 及び *SIL1* 遺伝子などの変異が神経筋疾患を引き起こすことが見出されており、疾患病態として変性タンパク質の蓄積による筋線維の変性が提唱されているが、基質となるタンパク質の同定されておらず、また、筋線維に蓄積するタンパク質の種類とその性質、毒性については、十分に解明されているとは言い難い。最近、我々は、筋原線維性ミオパチー患者家系で低分子熱ショックタンパク質 HSP40 ファミリータンパク質をコードする *DNAJB4* 遺伝子にミスセンス変異を認めた。本研究では、変異病因性を細胞実験にて評価するとともに、疾患モデルマウスを作製することで病態の解明に迫った。

方法

マウスと筋力測定

ヒト患者変異を再現した *Dnajb4* 遺伝子変異ノックインマウス (KI)、1塩基欠失をもつノックアウトマウス (KO) を、ゲノム編集によって作製した。骨格筋の筋力測定、組織染色は定法に基づいて行った。

細胞実験

HeLa 細胞に、野生型および変異 DNAJB4 を、伸長ポリグルタミンタンパク質、変異デスミンともに発現させ、変異タンパク質集合体形成に対する変異 DNAJB4 の効果を測定した。また、野生型および変異 DNAJB4 を、正常型 TDP-43 とともに発現後、熱ショック処理による TDP43 の核内凝集物形成への効果を解析した。

結果

ヒト変異 DNAJB4 を導入した細胞では、ポリグルタミン伸長タンパク質および変異デスミンの細胞質集合体の形成を抑制した。一方、変異 DNAJB4 は正常 TDP-43 による核内凝集形成を促進させた。この効果は、変異 DNAJB4 の HSP70 結合能を抑制することで、キャンセルされた。*Dnajb4* 遺伝子変異疾患モデルマウス (KI ヘテロ、KO ホモマウスともに) は、若齢においては、全く異常を示さなかった。高齢マウスでは握力の低下が認められ、かつ、ヒラメ筋の筋力は優位に低下していた。ヒラメ筋の組織染色では、萎縮筋線維が認められるとともに、ヒト患者筋で観察されたような細胞内凝集物の蓄積が観察された。この蓄積物の中心は p62、FLNC 陽性であり、それを取り囲むようにデスミンが染色された。電子顕微鏡観察では、筋原線維の変性が広範囲に観察され、Z 線と同様の電子密度をもつ沈着物がそれを取り囲むように配置されていた。自己食空胞は観察されなかった。

考察

細胞実験では、変異 DNAJB4 は TDP-43 の核内凝集物の生成を促進し、機能獲得変異のように考えられた。しかし、*Dnajb4* 遺伝子変異マウスは、KI、KO ともに同様な表現型が観察され、むしろ変異はドミナントネガティブ効果をもつと考えられた。この骨格筋の表現型は、高齢マウスに見られたことから、老化に伴う骨格筋のタンパク質恒常性維持システムがだんだん低下していく中で、*DNAJB4* 変異により HSP70 システムの機能喪失がある場合、基質タンパク質のリフォールディングまたは分解の低下により、細胞質での基質タンパク質の蓄積と筋原線維の変性が生じたものと考えられた。

結論

DNAJB4 遺伝子変異は、ヒト及びマウスで高齢発症筋原線維性ミオパチーを引き起こす。

参考文献

1. Inoue M et al. A recurrent homozygous ACTN2 variant associated with core myopathy. *Acta Neuropathol* 142, 785-788, 2021.

分担研究報告書

(課題名) ストレス性精神疾患モデル動物の作成と評価

(所 属) 国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 精神薬理研究部

(氏 名) 山田 光彦

緒言

他個体の情動の表出がそれを目撃する個体に同様の情動を生じさせる現象を情動伝染と呼ぶ。情動伝染による他個体の負情動の伝達は、観察個体にストレス反応を惹起することが知られている。本研究では、共感を支える分子として知られるオキシトシンに着目し、情動伝染によりストレスが伝達される神経基盤の解明を目的とし、中武研究員と古家室長が中心となり、マウスを用いて行動神経科学的検討を行った。

方法

被験体マウスに、同種他個体が攻撃を受け社会的敗北場面を目撃させることによりストレスを負荷した。被験体には、疾病6部・井上室長らにより作出された、オキシトシン受容体を標識できる Oxtr-PA-T2A-tdTomato マウスと、オキシトシン受容体発現細胞を操作できる Oxtr-PA-T2A-iCre マウスを用いた。

結果

社会的敗北場面を目撃したマウスでは、血中コルチコステロン濃度が上昇しており、島皮質内のオキシトシン受容体発現細胞の活性化が観察された。そこで、ストレス伝達における島皮質の関与を検討するため、両側島皮質内へオキシトシン受容体阻害剤を局所投与した。その結果、社会的敗北の目撃によるすくみ反応の増加と、血中コルチコステロン濃度の上昇が抑制された。一方、実際に攻撃を受けた社会的敗北負荷マウスではオキシトシン受容体阻害剤投与の効果はみられなかった。次に、ストレス伝達の反復による情動行動の変化における島皮質内オキシトシンシグナルの関与を検討した。Oxtr-PA-T2A-iCre マウスの島皮質に AAV-DIO-NpHR-EYFP を投与し、反復的な社会的敗北場面の目撃中に島皮質に黄

色光を照射することでオキシトシン受容体発現細胞の神経活動を抑制した。行動試験の結果、ストレス伝達の反復は社会性の低下や報酬感受性の低下を誘発したが、島皮質内オキシトシンシグナルの抑制によりこれらの行動変化が抑制されることが示された。

考察

社会的敗北場面の目撃により島皮質のオキシトシン受容体発現細胞が活性化したことや、オキシトシン受容体拮抗薬の島皮質内投与が目撃によるすくみ反応を抑制したことから、島皮質内オキシトシンシグナルがストレスの伝達を担っていることが示唆された。実際に攻撃を受けたマウスではこれらの変化がみられなかったことから、島皮質のオキシトシンシグナルは身体的ストレスの処理には関与しないと考えられる。また、オキシトシン受容体発現細胞の活動抑制により、社会的敗北場面への反復曝露による社会性および報酬感受性の低下が妨げられた。このことから、他者の負情動への共感による抑うつ状態への移行に島皮質オキシトシンシグナルが主要な役割を果たしていることが示唆された。

結論

島皮質内オキシトシンシグナルがストレス伝達を仲介することが明らかとなった。また、共感を介して伝達されたストレスの処理には、身体的ストレスを直接経験した場合とは異なる神経回路が関与していることが示唆された。本研究の知見は、間接的なトラウマ経験により生じるストレス関連精神疾患の発症機序の理解と新規治療法の開発に役立つことが期待される。

参考文献

1. Inoue YU, et al. Targeting Neurons with Functional Oxytocin Receptors: A Novel Set of Simple Knock-In Mouse Lines for Oxytocin Receptor Visualization and Manipulation. *eNeuro*. 9(1):ENEURO.0423-21.2022.

分担研究報告書

(課題名) リソソーム分解系の分子機構と疾患との関連

(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

細胞内成分の適切な分解は神経細胞を含む多くの細胞・組織の恒常性維持に必須のプロセスである。神経細胞内のタンパク質やRNAの蓄積は神経変性疾患の原因となると考えられている。細胞内異常 RNA やタンパク質の分解促進をできれば、有効な治療法となり得ると期待されている。そのためには細胞内分解システムの理解が必要であるが、RNA 分解機構をはじめ細胞内分解機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。我々は近年、新たな細胞内核酸分解システム

RNautophagy/DNautophagy (RDA)を見いだした。また RDA における核酸輸送体として SIDT2 を見いだした。SIDT2 はタンパク質もリソソーム内に直接輸送することを見だし、RDA とあわせて我々は DUMP と呼んでいる。本研究では、DUMP のメカニズム解析を行うとともに、ゲノム編集技術などを用いて DUMP の機能減弱動物や機能活性化動物を作製・解析する。以上により脳神経系における DUMP の生理的役割を明らかにする。

これまでの疫学的研究から肥満、糖尿病高血圧などの生活習慣病がアルツハイマー病発症リスクを高めることが明らかとなっている。このように脂質分解機構の理解は、生活習慣病や認知症など様々な疾患の解明と予防・治療法開発のために重要である。現在 lipid droplet (LD) を分解する新規経路も発見しており、この経路の分子メカニズムと生理的意義についても解明を目指す。

方法

ミクロリポファジー (ミクロオートファジーによる LD 分解) の分子機構解明を行なった。仮説としてリソソーム膜タンパク質と LD 表面の脂質が結合し、この経路を仲介すると考えた。生化学的解析や細胞レベルの解析により研究を進めた。

結果

以前、我々はリソソーム膜タンパク質 LAMP2C の cytosolic domain (CD) が核酸結合能を有することを報告した。LAMP2A は核酸結合能をもたず、LAMP2B は結合能を有するが組織ライセート中では結合しないことか、LAMP2B の CD は核酸以外の物質と結合すると推測された。また、LAMP2B の CD は顕著なタンパク質結合能を示さなかったことか、LAMP2B と脂質が結合すると考え研究を進め、結果として LAMP2B の CD と LD 表面に存在するリン脂質が直接結合することを見いだした。さらに、LAMP2B がこの結合を介してミクロリポファジーを仲介することを示すデータを得た。また、ゲノム編集技術などを用いて LAMP2B KO マウス、LAMP2B transgenic マウスを作成し、現在脂肪蓄積への影響を動物個体レベルで解析中である。

考察

脂質分解の新たな分子メカニズムの理解により、アルツハイマー病や生活習慣病の予防・治療法開発に貢献する可能性がある。

結論

LAMP2B が LD リン脂質との結合を介してミクロリポファジーを仲介する。

分担研究報告書

(課題名) イオン恒常性の破綻による精神・神経疾患発病機構の解明
(所属) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第五部
(氏名) 若月 修二

緒言

アルツハイマー病などの神経変性疾患、自閉スペクトラム症などの精神疾患患者の脳では、神経ネットワークの破綻が発病の主因である可能性が指摘されており、神経ネットワークの形成と維持、変容の分子基盤を明らかにすることは、疾患発病の分子機構を理解し、予防や治療の手がかりを得る上でも極めて重要である。本研究では、神経突起の変容機構に着目し、神経ネットワークの形成と維持、破綻におけるさまざまな細胞内反応の寄与を総合的に評価することにより、精神・神経疾患発病の新しい分子基盤を解明することを目的とする。

方法と結果

上記の目的を達成するため、神経突起の変容機構の鍵分子として我々が独自に同定したユビキチンリガーゼ ZNRF1 (zinc and ring finger 1) とナトリウム・プロトン交換輸送体 NHE5 (Na⁺-H⁺ exchanger 5)、また新たにリボ核タンパク質複合体 Vault に着目し、これらにより調節される細胞内シグナル伝達系の破綻が発病のきっかけとなる精神・神経疾患発病の新しい分子基盤を調査した。本年度は神経突起の変容における ZNRF1 の活性制御機構について調べた。

これまでに、NADPH オキシダーゼにより生成した活性酸素種が EGF 受容体による ZNRF1 のリン酸化・活性化を誘導し、神経突起変性を促進することを報告した。本年度の研究では、*in vitro* 神経突起変性モデルを用いて活性酸素種による ZNRF1 の活性化機構の詳細を調べ、p38 MAPK による NADPH オキシダーゼサブユニット p47 -phox (以下、p47 と記す) のリン酸化が ZNRF1 を活性化を誘導する「開始シグナル」としてはたらくことを明らかにした。

結論と考察

リン酸化型 p47 は ZNRF1 に直接結合するが、非リン酸化型 p47 は ZNRF1 に結合できず、その過剰発現は ZNRF1 活性化と神経突起変性を抑制した。リン酸化型 p47 は EGF 受容体による ZNRF1 のリン酸化を増強する可能性が示唆された。これらの結果から、p47 のリン酸化は ZNRF1 介する神経突起変性を開始するための重要なチェックポイントである可能性が示唆された。この発見は、活性酸素種を介する神経変性の調節機構の一端を明らかにするとともに、神経変性を食い止めるための新しい分子標的を提示した。

参考文献 (業績)

1. [Wakatsuki S and Araki T.](#) Novel Molecular Basis for Synapse Formation: Small Non-coding Vault RNA Functions as a Riboregulator of MEK1 to Modulate Synaptogenesis. *Front Mol Neurosci.* (2021) 14:748721.
2. [若月修二](#) small non-coding vault RNA によるシナプス形成の調節機構. *生化学* (2022) 94:78-81.
3. Hagihira H., *et al.* ([Wakatsuki S.](#) as co-authors) Systematic analysis of brain lactate and pH levels in 65 animal models related to neuropsychiatric conditions. *bioRxiv.* doi:10.1101/2021.02.02.428362

分担研究報告書

(課題名) レポーター・マウス作製による神経筋疾患の遺伝子治療研究

(所属) 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

(氏名) 青木 吉嗣

緒言

筋ジストロフィーを対象に蓄積された核酸医薬開発基盤を他の難治性神経・筋疾患に応用するには、効率的な核酸配列のスクリーニングおよび薬物動態の評価系が必要である。本研究の目的1は、ルシフェラーゼ (Luc) と近赤外領域に発光波長を有する AkaLumine を利用した発光イメージングシステムにより、非侵襲的にエクソン・スキップの誘導効果を評価可能な新規トランスジェニック (Luc-Tg) マウスの作出である。目的2は、Luc-Tg マウスを対象に、リアルタイム *in vivo* イメージングシステムを用いて、デリバリー能を高めた次世代アンチセンス核酸医薬の薬効・薬理を詳細に検討することである。

方法

Luc コード領域をジストロフィンエクソン/イントロンゲノム配列で分断し、エクソン23スキップの誘導により、Luc が発現する pCAGGS-Luc を構築する。このコンストラクトをマウス初代筋芽細胞に導入し、エクソン・スキップの誘導効果をプレートリーダーで評価するアッセイ系を確立する。更に、pCAGGS-Luc を導入した Tg マウスを作出し、*in vivo* イメージングシステムの使用により、エクソン・スキップの薬効・薬理を評価可能なアッセイ系を確立する。

結果

pCAGGS-Luc をマウス由来初代筋芽細胞に導入し、PMO でエクソン23スキップを誘導したところ、PMO の濃度依存的にルシフェラーゼの活性の上昇が確認できた。次に、pCAGGS-Luc を導入した Tg マウスを作出した。この Tg マウスに対して PMO を筋注および全身投与したのち、IVIS imaging system により発光を解析したところマウスの体内に

において特異的にルシフェラーゼ による発光が確認できた。

考察

EGFP 蛍光は、短波長のため生体組織透過性が不十分であり、赤血球由来のヘモグロビンやメラノサイトに起因する生体バックグラウンドのため S/N 比が低い。それゆえ、EGFP レポーター Tg マウスを用いた IVIS *in vivo* イメージングは、組織を採取した *ex vivo* イメージングとならざるを得ない。これに対し、ルシフェラーゼ (Luc) と生体組織透過性に優れる近赤外領域に λ_{max} を有する AkaLumine を利用することにより、マウス生体内での薬物動態をライブで観察する系を確立できる。

結論

Luc-Tg マウスの作出に成功した。Luc-Tg マウスを対象に薬剤デリバリー能を高めた修飾アンチセンス核酸を全身投与し、IVIS Imaging System を用いた薬効評価および薬物動態評価を行う。

成果物：欧文原著

1. Naito M, Minegishi K, Aoki Y, Miyata K. Size-tunable PEG-grafted copolymers as a polymeric nanoruler for passive targeting muscle tissues. Under review.

分担研究報告書

(課題名) 神経回路の修復に関わる分子機構の解明

(所属) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 神経薬理研究部

(氏名) 村松 里衣子

緒言

炎症や外傷などで脳と脊髄からなる中枢神経系が傷つくと、様々な重篤な機能障害があらわれる。症状があらわれる理由の一つに、損傷部位を走行していた神経回路の破綻が挙げられる。成体の中枢神経回路は、個体発生前や末梢神経系と比較し、自然に修復する能力が低い。現時点で、臨床的に使用できる中枢神経回路の修復薬は存在せず、神経回路の修復薬の開発は患者やよりそう介護者から待ち望まれている。

分担研究者らはこれまでに、成体の中枢神経系にわずかに残存する神経回路の修復ポテンシャルに着目し、その作用を増強させる機序、特に細胞外環境に備わる修復促進作用を探求してきた。一方、発生過程での神経回路の形成は、外因性と内因性の機序により制御されるため、神経回路の修復に関しても内因性の機序が備わると予想される。神経回路の修復の内因性の分子メカニズムは、cAMP や Rho など普遍的に細胞の成長に促進的に作用する知見が蓄積しており、それらのシグナル伝達により制御される遺伝子発現の変動によって神経回路の発達が促進されると予想される。そこで、神経症状との関連が知られる遺伝子の中から、脳や神経細胞での発現量の高さ等の情報を組み合わせて抽出した遺伝子の中に、神経回路の修復を担う遺伝子を探索するに至った。

昨年度までの検討で、Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)で”motor dysfunction”とアノテーションされる遺伝子から Protein Atlas に掲載されたデータを基に、脳での発現量が他の臓器の発現量の平均値より2倍高い遺伝子を抽出し、さらに Brain-RNAseq において神経細胞で他の中枢神経系細胞と比較して高発現する遺伝子を抽出した。上位20種類に対する siRNA を作成し、大脳皮質神経細胞へ導入し、神経突起長の計

測を行い、Syt4 遺伝子の発現を抑制させることで神経突起の伸長効果が阻害される結果を得た。そこで、Syt4 が新規の神経回路の修復作用維持因子である可能性を考え、脊髄損傷マウスを用いて組織および行動解析を実施した。

方法

下部胸髄を半切断する脊髄損傷マウスを作成した。本モデルでは、下行性の運動神経回路である皮質脊髄路が損傷されるため、大脳皮質の運動野へ Yellow fluorescent protein (YFP) および Syt4 shRNA を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを局所投与し(両側)、皮質脊髄路を可視化し、頸髄内の代償性神経回路の形成に対する作用を評価した。また、損傷部周囲における神経回路の走行と瘢痕形成や免疫系細胞の浸潤を免疫染色により評価した。脊髄損傷後の神経症状に対する syt4 の寄与を検討するため、上述の処置を施したマウスを用いて運動機能の評価する行動試験を実施した。

結果

脊髄背側の皮質脊髄路走行領域において YFP で標識された軸索の数は、群間に差がない一方、頸髄を走行する YFP 陽性軸索数は、Syt4 shRNA 群ではコントロールと比較し有意に少なく、損傷に応答した皮質脊髄路の側枝形成に対して Syt4 が促進的に作用することが示唆された。損傷部位周囲の神経回路の走行および瘢痕の形成領域には群間の差はなかった。

考察

Syt4 発現抑制により皮質脊髄路の標識効率に差はないことから、Syt4 の発現抑制により顕著な神経変性効果は誘導されないと推察される。また損傷部位における神経回路の走行は瘢痕形成にも群間の差はなく、Syt4 は側枝形成に特異的に作用する可能性が推察された。

結論

Syt4 が神経回路修復に促進的に働くことが示唆された。

参考文献

なし

分担研究報告書

(課題名) AI を用いた精神神経疾患の研究
(所 属) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第七部

(氏 名) 山下 祐一

緒言・背景

医学・医療において AI 技術応用の必要性が高まっており、実際、世界中で様々な取り組みが行われている。AI 理論・技術は、一般的な医学研究におけるツールとしての有用性のみならず、精神・神経疾患における脳に固有の病態を理解し、治療法を開発するうえで、その他の医学領域とは一線を画する特異的な貢献が期待されるため、本研究の目指す脳病態研究に特化した AI 活用研究の必要性は非常に高い。

本研究班で集積する遺伝子・分子、神経生理、および認知・行動を含む多次元・多モダリティデータに対して、深層ニューラルネットワーク・AI 技術を用いて、その潜在特徴量を抽出するための技術を開発することは、重要な課題である。

目的

本研究は、遺伝子・分子情報、脳波 (EEG) ・皮質脳波 (ECoG) ・構造および安静時機能的磁気共鳴画像 (rsfMRI) などの高次元ビッグデータに対して、深層ニューラルネットワーク (DNN) を中心とする人工知能 (AI) 技術を用いて解析し、各水準での特性を反映した特徴量抽出技術を開発することを目的とする。

本課題によって、AI を用いた新しい解析技術が開発されれば、神経・精神疾患に関する分子生物学的、神経生理学的データの解析に応用できる可能性があり、当課題の研究が有機的に結びつくことにより、相互の研究を相補的に促進することが期待できる。

方法

本研究班で集積する遺伝子・分子、神経生理、および認知・行動を含む多次元・多モダリティデータに対して、深層ニューラルネットワーク・AI 技術を用いて、その潜在特徴量

を抽出するための基盤技術を開発する。

具体的には、深層ニューラルネットワークを用いた、教師なし特徴表現学習手法を用いた特徴量抽出法を探索的に検討する。抽出した特徴量に対して、回帰モデル、クラスタリング手法などを組み合わせることで、有効な特徴量抽出手法を探索的に構成する。

結果

高次元データから DNN を用いて特徴抽出するための基盤技術として、畳み込みネットワーク自己符号化器 (CNN-AE) を用いて脳の構造 MRI からの特徴量抽出方法の開発を行った。結果として、MRI に含まれる階層性と非線形性を伴いながら、15 万次元の超高次元 3D 画像を約 1000 次元 (0.7%) まで圧縮し、高い精度で再構成することに成功した。3 次元脳画像を AE により再構成することは、非常にチャレンジングな課題であり、通常 of 自然画像向けの CNN とは異なる、脳画像に特化したネットワークのアーキテクチャ構築によりこれを実現することができた。開発した CNN-AE は、テストデータに対しても十分小さいエラーで再構成が可能であり、汎化性能があることが示された[業績 1]。

続いて、開発した高解像度 (voxel-based) の MRI データを CNN で解析する技術を安静時機能的 MRI に適用することで、脳活動の個人特徴や認知的特性を反映しうる汎用特徴量抽出技術の開発を試みた。結果として、学習では経験していない未知のサンプル被験者の脳活動 (rsfMRI 画像) を、一人の個人に由来すると認識した上で、学習で経験した人の特徴の組み合わせとして表現できることが確認された。CNN によって抽出した特徴量を用いて、精神疾患 (統合失調症) の診断予測を行ったところ、従来の機能的結合解析に基づく特徴量と同等以上の有効性を持つことが確認できた[業績 2]。

考察

本研究で開発した高次元データからの特徴量抽出技術は、本研究班で集積する遺伝子・分子、神経生理、および認知・行動を含む多次元・多モダリティデータを解析するための基盤技術として役立つ可能性が期待される。

参考文献（業績）

1. Hashimoto Y, Ogata Y, Honda M, Yamashita Y* (2021) Deep Feature Extraction for Resting-State Functional MRI by Self-Supervised Learning and Application to Schizophrenia Diagnosis. *Front. Neurosci.* 15:696853.
2. Yamaguchi H, Hashimoto Y, Sugihara G, Miyata J, Murai T, Takahashi H, Honda M, Hishimoto A, Yamashita Y* (2021) Three-dimensional convolutional autoencoder extracts features of structural brain images with a diagnostic label-free approach: Application to schizophrenia datasets. *Front. Neurosci.* 15:652987.

分担研究報告書

(課題名) 手術脳組織検体を用いた精神神経疾患の研究

(所属) 国立精神・神経医療研究センター
病院脳神経外科・部長

(氏名) 岩崎 真樹

緒言

てんかんは様々な病態により脳内の神経回路が異常を起こし、それによって発作的に脳の神経細胞が異常に同期もしくは興奮して症状を発現する病気である。てんかんの有病率は全人口の1%とされており、重要な神経疾患である。

てんかんの主な治療は抗てんかん薬の内服であるが、薬剤抵抗性のてんかんには外科治療が行われる。今後、手術に代わる新しい低侵襲な治療法の開発を進めて行くに当たり、手術によって切除されたてんかん原性組織の分子生物学的解析は有用である。国立精神・神経医療研究センター病院の脳神経外科では国内最大規模のてんかん外科切除病変の蓄積がある。

本研究班では国内最大数のてんかん外科切除組織の分子生物学的な解析を行い、てんかん原性病変がてんかん発作を起こす機序を解明し、新規治療法開発に寄与することを目的とする。

方法

国立精神・神経研究センター病院に保存されている300症例のてんかん外科手術検体を使用する。

分子生物学的解析として、次世代シーケンサー・DNAメチレーション・RNA-seq・ウエスタンブロットを行う。

分子生物学的解析で得られた結果を臨床情報と照合し、てんかん発作との関連性を調べる。

結果

てんかん原性病変の内、腫瘍性病変の78例を対象に遺伝子解析を行ったところ、38例に *BRAF* V600E 変異を、7例に *FGFR1* 変異を認めた。その他は稀な遺伝子異常が1~2

例ずつに認めた。17症例では原因となる遺伝子変異を特定できなかった。

54症例でDNAメチレーション解析を行った。DNAメチレーションによる分類は、概ね遺伝子型と対応する分類となった。

52症例でRNA-seqを行った。てんかんに関連する遺伝子群と腫瘍に関連する遺伝子群の発現上昇を認めた。

皮質形成異常に分類される症例は190例の蓄積があり、上記の腫瘍性病変と同様に遺伝子解析とRNA-seqの解析を進めている。海馬硬化症に分類される症例は20症例の蓄積があり、こちらも解析中である。

考察と結論

てんかん原性病変の手術検体の分子生物学的解析は、遺伝子型による分類を基本とした上で、RNA-seqとDNAメチレーション解析を加えることで、さらに細かく分類されることが分かった。また、RNA-seqでは各分子分類に対応する特徴的な遺伝子発現パターンを抽出することで、新規治療法の開発につながる可能性がある。

参考文献

1. Louis DN et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*. 2021;23(8):1231-1251.

分担研究報告書

(課題名) ショウジョウバエモデルを用いた神経変性疾患のハイスループット病態解析・創薬研究

(所属) 近畿大学医学部 脳神経内科

(氏名) 永井 義隆

緒言

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、ポリグルタミン病など多くの難治性神経疾患において遺伝子レベルの異常が明らかになり、病態解明・治療法開発を目指した研究が進んでいる。しかし、マウスなどの哺乳類モデルを用いた解析には膨大な労力・時間・経費を要することから、より迅速で簡便に解析が可能な動物モデルが必要とされている。そこで、本研究ではハイスループット解析に適するショウジョウバエに着目して、1) 様々な神経疾患モデルショウジョウバエのバンクを構築し、広く一般ユーザーへ公開して全国的な共同研究を展開する。また、2) 疾患モデルショウジョウバエを用いて、神経疾患病態解析および治療研究を推進する。

今年度は、家族性 ALS の最も多い原因遺伝子変異 (C9-ALS) である *C9orf72* 遺伝子非翻訳領域内の GGGGCC リピート配列の異常伸長が引き起こす神経変性メカニズムおよびその抑制分子を探索することを目的として、ショウジョウバエモデルを用いた研究を行った。

方法・結果・考察

異常伸長 GGGGCC リピートを発現する C9-ALS ショウジョウバエモデルを用いて、候補遺伝子スクリーニングを行った。スクリーニング候補として GGGGCC リピート RNA に結合する RNA 結合タンパク質 (RNA binding protein: RBP) に着目した。交配により GGGGCC 異常伸長鎖と候補 RBP を共に複眼に発現させ、複眼変性に対する modifier 効果を指標にスクリーニングを行った。その結果、C9-ALS ショウジョウバエモデルの呈する複眼変性を改善させる RBP として、hnRNAP3、IGF2BP1、hnRNPA2B1、hnRNPR を同定した。リアルタイム PCR により RNA 発現量を定量した結果、これらの RBP は

GGGGCC リピート RNA の発現量を減少させることを明らかにした。さらに、hnRNPA3 は GGGGCC リピート RNA の RNA foci 形成とリピート関連非 ATG 依存性翻訳 (RAN 翻訳) によるジペプチドリピート (DPR) の産生を減少させることを明らかにした。

結論

以上の結果から、hnRNAP3 は GGGGCC リピート RNA に結合して発現量を減少させた結果、RNA foci 形成および RAN 翻訳による DPR の産生を減少させて、複眼変性を抑制すると考えられた。

参考文献 (業績)

論文投稿準備中

分担研究報告書

(課題名) 広汎性発達障害レット症候群の新規病態表出メカニズムの解明

(所属) 九州大学大学院医学研究院 応用幹細胞医科学部門

(氏名) 中島 欽一

緒言

MECP2 遺伝子変異は、Rett 症候群 (RTT) をはじめ、自閉症などを含めた種々の発達障害・精神疾患への関与が示唆されているものの、発症機序の詳細は不明である。これまで、MECP2 変異によるニューロンの機能異常が RTT 発症の原因と考えられてきたが、最近グリア細胞の機能異常が RTT 発症の一因である可能性が示唆され始めてきた。そのような状況の中、本分担研究者らはミクログリアで高発現し、細菌・ウイルス由来 DNA を認識することが知られる Toll 様受容体 9 (TLR9) の遺伝子欠損 (KO) マウスと MeCP2KO マウスを交配して得た TLR9/MeCP2 二重欠損 (WKO) マウスでは、寿命が著しく延長されることを発見した。そこで本研究では、MeCP2KO 及び TLR9/MeCP2WKO マウスの表現型解析を行った。

方法

MeCP2KO マウス脳ではニューロンのスパイン密度の減少とミクログリアの異常な活性化が報告されている。そこで、野生型、MeCP2KO、TLR9/MeCP2WKO マウス脳を用いて、活性化ミクログリアマーカーである CD68 抗体を用いて免疫染色を行った。また、ゴルジ染色を行いニューロンの形態変化を評価した。

結果

MeCP2KO マウスと比較し、TLR9/MeCP2WKO マウスでは海馬でのミクログリアの活性化が抑制されていることが明らかとなった。また、MeCP2KO マウスと比較し、TLR9/MeCP2WKO マウスの大脳皮質及び海馬ではニューロンのスパイン形成が改善していることが明らかとなった。

考察

本研究により、TLR9 の欠損により RTT 様の表現型が改善することがわかった。TLR9 は

DNA を認識することが知られているため、MECP2KO マウス脳では自己由来の DNA がリガンドとなることで TLR9 シグナルを活性化していることが考えられた。

結論

本研究から、TLR9 シグナルの活性化が RTT 病態発症に関与していることが示された。今後は、TLR9 シグナルの阻害剤投与などにより RTT 様の表現型が改善するかどうかについて検討し、治療法の開発を目指す。

参考文献 (業績)

1. Nakashima H, Tsujimura K, Irie K, Imamura T, Trujillo C, Ishizu M, Uesaka M, Pan M, Noguchi H, Okada K, Aoyagi K, Anodoh-Noda T, Okano H, Muotri A & [Nakashima K](#): MeCP2 controls neural stem cell fate specification through miR-199a-mediated inhibition of BMP-Smad signaling. *Cell Reports*, 35, 109124 (2021),

分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集技術を用いた自閉症モデル研究

(所属) 神戸大学大学院医学研究科

(氏名) 内匠 透

緒言

ヒト染色体 15q11-13 の重複は自閉症において高頻度に認められる染色体異常である。

我々はこれまで、本領域を重複させた自閉症モデルマウス (15q dup) の作製し、自閉症様の行動学的異常、縫線核におけるセロトニン神経の活動低下、幼少期におけるシナプス代謝亢進など、種々の特徴的な異常を見出してきた。

本研究目的は自閉症様行動異常、および樹状突起スパインの異常に対して、15q11-13 領域におけるどの遺伝子が重要であるかを同定すること、またその分子メカニズムを明らかにすることである。

方法

15q dup マウスの重複領域、6 Mb 内に新たに 1.5 Mb の micro-duplication マウスを *in vivo* chromosome engineering 法を用いて作製し、本マウスで自閉症症状に相当する行動試験各種を行った。次に標的候補遺伝子を蛍光タンパク質と共に大脳皮質に導入し、2 日間の樹状突起スパインの動態、形態を二光子顕微鏡にて解析した。さらに、ゲノム編集技術を用いて、Ndn を 15q dup マウスから 1 コピー欠失させるマウスを作製し、その行動、または神経異常を調べた。

結果

1.5 Mb の重複マウスの行動解析の結果、本マウスは元々の 6 Mb 重複マウス (既報の自閉症モデル) と異なり、野生型マウスとの差が認められなかった。このことから、本領域に存在する snoRNA や miRNA の自閉症への関与が否定された。次に、樹状突起スパインへの関与を指標にし、残された候補遺伝子のスクリーニングを行ったところ、Ndn 遺伝子が樹状突起スパインの数、および、その形態を制御することが明らかとなった。更に、Ndn 遺伝子

を CRISPR/Cas9 法により 6Mb 重複マウスから 1 コピー欠失させたマウスの表現型を調べると、行動学的異常だけでなく、大脳皮質の興奮/抑制バランス異常、樹状突起スパインの動態異常などが抑制された。

考察

ヒト染色体 15q11-q13 は数 Mb にもわたる領域であることから、特定の遺伝子が自閉症に寄与することを証明するのはこれまで技術的に難しかった。これを可能にしたのがゲノム編集技術であり、我々の行ったような解析パイプラインは他の染色体領域でも可能であり、特に範囲の広いコピー数多型においては強力なツールとなる。

結論

自閉症責任領域である 15q11-q13 の重複における原因遺伝子の一つとして、Ndn 遺伝子を同定した。

参考文献

1. Tamada et al, Nat Commun, 12, 4056, 2021

分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集技術を用いた、生後脳・成体脳における新生ニューロンの生理的意義の解析

(所属) 京都大学大学院 生命科学研究所
(氏名) 山田 真弓

緒言

中枢神経系の発生過程において、神経幹細胞から神経細胞やグリア細胞が順次生み出され、複雑な脳組織が構築されていく。ほとんどの神経細胞は胎生期あるいは出生後しばらくの時期にのみ、神経幹細胞から生み出されると考えられてきた。しかし、近年の研究によって、哺乳類の成体脳においても神経幹細胞が存在し、側脳室周囲の脳室下帯や海馬歯状回といった特定の領域では、ニューロン新生が継続的に続いていることが分かってきた。成体脳において生み出される多くの新生ニューロンは既存の神経回路に組み込まれるが、そのメカニズムについては不明な点が多く、また、ニューロン新生の生理的意義についてはほとんど明らかにされていない。成体脳に存在する神経幹細胞は大部分が休眠状態であり、どのように神経幹細胞の性質が制御されているかについても未だ不明な点が多い。本研究課題では、培養細胞を用いて神経幹細胞の制御メカニズムを明らかにし、新生ニューロン特異的に遺伝子操作可能な遺伝子改変マウスを用いて、マウス成体脳にて検証することを目的とした。

方法

遺伝子発現の光操作技術を開発し(*Yamada et al. Cell Reports, 2018, Yamada et al., iScience, 2020*)、培養神経幹細胞に導入することで、分化運命決定因子の発現変動を、光操作を用いて行なった。細胞増殖や細胞分化を誘導した細胞を用いて RNA シークエンス解析を行い、細胞増殖あるいはニューロン分化過程における遺伝子ネットワーク解析を実施した。Bone Morphogenetic Protein (BMP) を用いて、培養細胞レベルにて休眠状態の神経幹細胞を作製し、上述の光操作技術を用いて、神経幹細胞が活性化状態に変化する様子を観察した。また、CRISPR/Cas9 シ

ステム用いて、DCX や Tubb3 などの幼若ニューロンに特異的に発現する遺伝子の遺伝子座に、Cre や FLP などの組み換え酵素をノックインした遺伝子改変マウスを作製した

(*Inoue et al., 2021, Imayoshi and Yamada et al., 論文投稿中*)。

結果

培養神経幹細胞において、分化運命決定因子の遺伝子発現を光操作し、細胞増殖あるいはニューロン分化を促進させた。これらの細胞を用いて、RNA シークエンス解析を行い、下流遺伝子の探索、および、ネットワーク解析を実施中である。BMP を用いて神経幹細胞を休眠状態にし、さらに光操作技術を用いて、活性化状態あるいはニューロン分化を促進できる条件を検討した。また、DCX-Cre や Tubb3-Cre マウス等を、蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスと掛け合わせ、lineage trace 解析を行なった。マウス胎児脳において、蛍光タンパク質で標識された細胞は、内在性の DCX あるいは Tubb3 と発現パターンがほぼ完全に一致していることが確認できた(論文投稿中)。さらに、組換え酵素依存的に蛍光タンパク質を発現誘導できるようなアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを、これらの遺伝子改変マウスの成体脳海馬にインジェクションした。成体脳においては、新生ニューロンだけではなく、多くのニューロンで組換えが生じていた。そこで、Ascl1-CreERT2 マウスと蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスを用いて、成体脳の新生ニューロンだけを選択的に蛍光タンパク質で標識し、既存の神経回路への組み込み様式を解析した。その結果、成体脳の嗅球や海馬歯状回において、ニューロン新生が一生恒常的に起きていることを明らかにした。

考察

RNA シークエンス解析により、分化運命決定因子の下流遺伝子を探索し、まだ解析の途中であるが、分化運命決定因子の発現パターンの違いにより、下流遺伝子の発現モードが異なることが示唆された。この発現モードの違いが、細胞増殖と細胞分化の正確さやタイミングを制御しているのではないかと考えられた。今後さらに詳しく遺伝子ネットワークを解析することにより、神経幹細胞の制御メ

カニズムを明らかにしたい。また、哺乳類の成体脳において、多くの神経幹細胞は休眠状態であるため、BMPを用いて培養細胞レベルで休眠状態の神経幹細胞を作製することができる。休眠状態の細胞においても、分化運命決定因子の遺伝子発現の光操作を行ったが、遺伝子発現量、発現パターン、発現のタイミング等を詳細に検討する必要があると考えられた。また、遺伝子組み換えマウスを用いて、脳切片上にて新生ニューロンの神経回路組み込み様式を観察したが、細胞の移動様式を観察するのは困難であった。今後は脳全体を3次元画像で観察することにより、薬剤投与あるいは光操作を行なったマウス脳において新生ニューロンの移動様式を観察する予定である。

結論

遺伝子発現の光操作技術を用いて、培養神経幹細胞レベルにて、神経幹細胞の細胞増殖やニューロン分化を制御する遺伝子群の探索、および、遺伝子ネットワーク解析を行なった。また、遺伝子改変マウスを用いて、成体脳の新生ニューロンを特異的に標識し、その移動様式や既存の神経回路への組み込み様式を観察した。Cre等の組換え酵素依存的に機能性分子を発現誘導できるようなAAVベクターやレンチウイルスベクターの開発とともに、遺伝子発現の光操作技術の開発・改良にも取り組んだ。

参考文献

1. *Yukiko U. Inoue, Yuki Morimoto, Mayumi Yamada, Ryosuke Kaneko, Kazumi Shimaoka, Shinji Oki, Mayuko Hotta, Junko Asami, Eriko Koike, Kei Hori, Mikio Hoshino, Itaru Imayoshi and *Takayoshi Inoue; An Optimized Preparation Method for Long ssDNA Donors to Facilitate Quick Knock-In Mouse Generation, *Cells* 2021, 10, 1076.
2. Mayumi Yamada, Shinji C. Nagasaki, Yusuke Suzuki, *Itaru Imayoshi; Optimization of light-inducible Gal4/UAS gene expression system in mammalian cells. *iScience.*, 23, 101506, September 25, 2020.

DOI:10.1016/j.isci.2020.101506

3. Mayumi Yamada, Yusuke Suzuki, Shinji C. Nagasaki, Hiroyuki Okuno, *Itaru Imayoshi; Light control of the tet gene expression system in mammalian cells. *Cell Reports*, 25, p. 487–500, October 9, 2018, DOI:10.1016/j.celrep.2018.09.026

分担研究報告書

(課題名) Unipolar brush cells が小脳機能に果たす役割の解明

(所 属) 新潟大学脳研究所システム脳病態学分野

(氏 名) 宮下 聡

緒言

小脳は、運動機能のみならず高次機能への関与及び精神疾患に関わることが報告されている脳領域である。小脳が認知機能に関与する場合には従来解析されてきた神経細胞からなる回路システムでは説明できない複雑な神経活動パターンを示すことが、近年の研究によって明らかになっている。本研究では、小脳皮質における興奮性の神経細胞であり、機能がほとんど解明されていない単極性刷毛細胞(Unipolar Brush Cells; UBCs)に着目し、UBCs の生理機能の解明及び小脳皮質回路の情報処理システムの理解を深めることを目的とする。本年度は主に、小脳のシングルセル RNAseq 解析を行い、UBCs のサブポピュレーション及びそのマーカー分子を同定することに成功した。さらに、UBCs のみで Cre を発現するマウスラインを用いて、UBCs が関与する神経回路の可視化や UBCs 特異的な神経活動阻害実験を今後実施していく予定である。

目的

本研究ではこのような解析を通じて、UBCs が関与する神経回路の解析や UBCs の欠損による小脳形成やマウス行動への影響を明らかにする。本研究によって、UBCs が小脳形成や機能に果たす役割を明らかにするとともに、小脳の情報処理システムに関する新たな側面が解明されることが期待される。

方法

公共の成体マウスの single cell RNAseq (scRNAseq) データを取得し、ラベルされた UBCs のみを抽出後、subclustering を行い、UBCs をいくつかの細胞クラスターに分類した。さらに、クラスター間で有意に発現が変動している遺伝子を探索した。

結果

本研究では、scRNAseq データから得られた遺伝子発現情報によって分類することにより、

合計 5 つのサブタイプを見出した。そのうちの 2 つは既報のサブタイプであったが、それ以外の 3 つの細胞群は、これまでに報告のない新規のサブタイプであった。

考察・結論

UBCs は、機能のほとんどが解明されていないものの、進化的・電気生理学的な側面から、小脳機能に対して重要な役割を持っていると推測される細胞である。UBCs はこれまで機能が未知の細胞群であったが、本研究による新たなサブタイプの同定は、UBC の機能解明と特性把握のために重要な進展である。今後は、本研究で得られた分子プロファイルから、細胞機能の推定を行っていく

参考文献 (業績)

1. [Miyashita S](#), Hoshino M. Transit Amplifying Progenitors in the Cerebellum: Similarities to and Differences from Transit Amplifying Cells in Other Brain Regions and between Species. *Cells*. 2022, 11, 726. doi: 10.3390/cells11040726.
2. [Miyashita S](#), Owa T, Seto Y, Yamashita M, Aida S, Sone M, Ichijo K, Nishioka T, Kaibuchi K, Kawaguchi Y, Taya S, Hoshino M. Cyclin D1 controls development of cerebellar granule cell progenitors through phosphorylation and stabilization of ATOH1. *EMBO J*. 2021 40, e105712. doi: 10.15252/embj.2020105712.
3. Adachi T, [Miyashita S](#), Yamashita M, Shimoda M, Okonechnikov K, Chavez L, Kool M, Pfister SM, Inoue T, Kawauchi D, Hoshino M. Notch Signaling between Cerebellar Granule Cell Progenitors. *eNeuro*. 2021, 12, ENEURO.0468-20.2021. doi: 10.1523/ENEURO.0468-20.2021
4. Nogami K, Maruyama Y, Sakai-Takemura F, Motohashi N, Elhussieny A, Imamura M, [Miyashita S](#), Ogawa M, Noguchi S, Tamura Y, Kira JI, Aoki Y, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y. Pharmacological activation of SERCA ameliorates dystrophic phenotypes in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet*. 2021, 31, 1006-1019. doi: 10.1093/hmg/ddab100.

Systematic studies and modeling of neuropsychiatric and muscular diseases based on genome editing technology

Mikio Hoshino, M.D. Ph.D.

Department of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience,
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

[Purpose of the study]

The recent progress in genome editing technology allows us to rapidly and systematically generate animal models for diseases. Now that many of causative genetic elements for various muscular, neurological and psychiatric diseases have been identified in genome-wide association studies, it is highly expected that those elements, if evaluated in animal models, could stand as immediate targets for diagnosis and therapy. However, studies and modeling of neuropsychiatric and muscular diseases are still in an immature state and little is established to treat those diseases by regenerative means of medicine.

Based on useful information accumulated in the bioresource bank of NCNP, a novel platform for big data analyses, and our advanced protocols for genome editing, our group aims at development of various useful animal models for neuropsychiatric and muscular diseases to better understand the intricate pathology.

[Members]

Chief scientist: Mikio Hoshino (NCNP)

Shared scientists: Takayoshi Inoue (NCNP), Satoru Noguchi (NCNP), Mitsuhiro Yamada (NCNP), Tomohiro Kabuta (NCNP), Shuji Wakatsuki (NCNP), Yoshitsugu Aoki (NCNP), Rieko Muramatsu (NCNP), Yuichi Yamashita (NCNP), Masaki Iwasaki (NCNP), Yoshitaka Nagai (Kindai University), Kinichi Nakashima (Kyushu University), Toru Takumi (Kobe University), Mayumi Yamada (Kyoto University), Satoshi Miyashita (Niigata University)

[Results]

Regarding research for technology and bioresource development, Dr. Inoue's group drastically improved CRSIPR/Cas9 based genome editing methods as well as bacterial artificial chromosome mediated functional genome mapping strategies to generate plenty of disease model mouse lines. Dr. Iwasaki's group surgically collected human brain samples from epileptic patients in NCNP hospital in an ethically approved manner to establish the useful bioresource bank.

As for studies and modeling of psychiatric diseases, Dr. Hoshino's group revealed complex gene regulatory features for the autism spectrum disorder (ASD), schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder, substance dependence and mental retardation related gene locus, *Auts2*. They also found out novel three types of human disease associated missense mutations in *DSCAML1*, the causative gene for epilepsy and modeled the mutations by knock-in mice. Dr. Mi Yamada's group tried to generate various schizophrenic model mice based on the GABA hypotheses for effective drug screenings. Dr. Kabuta's group investigated the RN/DNautophagy system to find out the essential function of DNA/RNA transporters in lysosomes. Dr. Nakashima's group showed ideal ways in investigating complex mechanisms of neuropsychiatric diseases such as ASD, Rett syndrome, bipolar disorders and mental retardation. Dr. Takumi's group shared the useful information in editing huge genomic territory to recapitulate intricate ASD pathology with us.

Regarding studies and modeling of neurological diseases, Dr. Wakatsuki's group revealed possible roles of *ZNRF1* and *NHE5* in neural circuit formation, maintenance and modification. Dr. Muramatsu's group screened molecules involved in neural circuit repair processes to identify several candidates. Dr. Nagai's group established the useful fruit fly bank for the modeling of various neurodegenerative diseases and clarified the correlation between GGGGCC repeat elongation and amyotrophic lateral sclerosis pathology in the fly model. Dr. Ma Yamada's group focused on the molecular cascade for mouse adult neurogenesis and visualized the process *in vivo* by means of CRSIPR/Cas9 based genome editing methods to finally achieve the optical control of adult neurogenesis.

For muscular diseases, Dr. Noguchi's group comprehensively modeled mutations identified from various familial muscular diseases by using the CRSIPR/Cas9 system. Dr. Aoki's group successfully generated transgenic mouse lines to reliably monitor exon-skipping efficiency of *Dystrophin* gene *in vivo* and established the screening platform for nucleic acid medicine to treat Duchenne muscular dystrophy.

As for in-silico and artificial intelligence (AI) based studies, Dr. Yamashita's group established protocols allowing effective extraction of feature values in using the deep neural network-based AI from various high dimensional medical bigdata such as chronologically changing brain waves and fMRI images. Dr. Miyashita's group found out a new method for the dimensional compression in analyzing variety of single cell RNA-seq data to better specify the composition of interneurons in the mouse cerebellum.

We held the kick-off meeting on Jul. 1, 2021 on web. We additionally held the online annual meeting where the results of our research were reported on Feb. 24, 2022. We realized that the genome editing technology and AI based methodology indeed accelerates animal modeling and understanding of diseases. Our findings also suggested considerable cross-talks among causative genes for different neuropsychiatric diseases, such as ASD, Rett syndrome, bipolar disorders, schizophrenia and so on.