

3-5 神経変性・発達障害の病因・病態・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

1. 研究目的

本研究代表者らは 2020 年度まで実施した開発費研究 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」において、ALS をはじめとする神経変性疾患を対象とし、治療法開発のための製薬企業との共同研究への導出、もしくは、競争的外部研究費による支援を得る形での治療法開発研究に発展させることを目指した。これに続く本研究では、既に外部研究費の支援に発展させることができた一部の研究内容を除外する一方、神経突起構造の改変を伴う疾患として新たに発達障害機序に関する研究を加え、神経突起構造の改変に至る病態の共通メカニズムと各疾患に特異的なメカニズムの理解、更に、神経変性に対しては神経保護的疾患治療、発達障害に対しては異常構造の正常化のための最適な治療標的の明確化を達成し、疾患動物モデルを用いた治療モデルの作出を行う。また疾患動物モデルの解析のための最先端技術を本グループ内で共有し、機能的解析を充実させることにより研究の加速を図る。

2. 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

野口 潤 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 微細構造研究部 室長

大野 伸彦 自治医科大学医学部解剖学講座 教授

3. 研究成果

本研究参加者は、班会議や個々の研究者間の議論を通して交流を深め、分担研究者間の共同研究・研究費共同申請が既に複数件開始・進行している。

研究班の共同成果として、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の神経発達障害の病態研究として、DMD モデルマウスにおける社会性行動異常の背景に、扁桃体・基底外側核のグルタミン酸トランスポーター発現低下に基づくと考えられる活動性変化があることを示す論文を出したこと、研究代表者グループが大木らと神経変性疾患における免疫的機序に関する共同研究を開始したことを挙げる。

また、精神疾患・発達障害に関しては、研究代表者グループは、Na-H Exchanger(NHE)5 の発現低下が自閉症類縁疾患 (ASD) 様社会性行動障害に繋がる背景として出生前の母体の高血圧があることを示すため、遺伝的高血圧モデルマウスの行動フェノタイプとNHE5発現レベル

の検討を行った。また、神経細胞に広範に発現するユビキチンリガーゼ ZNRF1 の欠損マウスが示す精神疾患様フェノタイプの発現機序の検討を行い、ZNRF1 が AKT-GSK3B リン酸化経路の活性調節を介して細胞膜上の Na イオンチャンネルサブタイプ、さらに NMDAR のサブユニットである GluN1 の発現調節を行うことで神経活動の調節に寄与している可能性を示した。青木らは、ジストロフィン遺伝子の全長を欠損するモデル犬では不安様行動の増加、副交感神経系の活動異常を認めることを明らかにした。野口らは、引き続き ASD モデルマーモセット脳の 2 光子顕微鏡観察による病態機序研究を行っており、ASD モデルマーモセット背内側前頭前野 L2/3 錐体細胞において、樹状突起スパインのターンオーバー亢進、新生スパインのクラスタリング亢進を見出した。

神経変性に関しては、大木らが多発性硬化症モデルである EAE マウスなどにおける神経変性に伴う慢性炎症環境下の神経細胞では、細胞周期の異所性亢進に伴うレトロトランスポゾン L1 の脱抑制(再活性化)が認められ、L1 がコードする ORF1 タンパク質が、プロトタイプ抗原として Eomes+Th 細胞を活性化し、神経細胞障害の引き金を引くことを明らかにした論文を発表した。さらにこれに続く研究として、アルツハイマー病モデルである 5xFAD マウスのグランザイム B 遺伝子欠損や、mSOD1 へのレトロ転位阻害剤(3TC)投与により、神経細胞障害が有意に改善することを明らかにした。さらに自律的神経細胞死に対するレトロ転位の影響を解析し、細胞周期が亢進した神経細胞が、選択的な L1 レトロ転位の標的となること、BRCA1 など DNA 損傷修復機構の有無が神経細胞の運命を決定づける重要な要因であることを明らかにした。

大野は、研究グループ全体に対する顕微鏡的形態観察支援を行うとともに、発達過程における神経活動依存的髄鞘形成変化を、視神経をモデルに明らかにした。

4. 研究成果刊行一覧

Hashimoto Y, Kuniishi H, Sakai K, Fukushima Y, Du X, Yamashiro K, Hori K, Imamura M, Hoshino M, Yamada M, Araki T, Sakagami H, Takeda S, Itaka K, Ichinohe N, Muntoni F, Sekiguchi M, Aoki Y. Brain Dp140 alters glutamatergic transmission and social behaviour in the mdx52 mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Prog Neurobiol* 216: 102288, 2022.

Wakatsuki S, Araki T. Novel insights into the mechanism of ROS-mediated neurodegeneration: selective phosphorylation of p47-phox serves as a priming signal of ROS-mediated neurite degeneration. *Neural Regeneration Research* 18(4): 746-749, 2023

Takahashi F, Zhang C, Hohjoh H, Raveney B, Yamamura T, Hayashi N, Oki S. Immune-mediated neurodegenerative trait provoked by multimodal derepression of long-interspersed nuclear element-1. *iScience*. 25(5): 104278, 2022.

Osanai Y, Battulga B, Yamazaki R, Kouki T, Yatabe M, Mizukami H, Kobayashi K, Shinohara Y, Yoshimura Y, Ohno N. Dark Rearing in the Visual Critical Period Causes Structural Changes in Myelinated Axons in the Adult Mouse Visual Pathway. *Neurochem Res*. 47:2815-2825, 2022.

Raveney B, El-Darawish Y, Sato W, Arinuma Y, Yamaoka K, Hori S, Yamamura T, Oki S. Neuropilin-1 (NRP1) expression distinguishes self-reactive helper T cells in systemic autoimmune disease. *EMBO Mol Med*. 14 : e15864, 2022

竹内絵理, 青木吉嗣. デュシェンヌ型筋ジストロフィーの脳症状に対するエクソン・スキップ治療, *Dementia Japan* 36: 265-270, 2022

大野伸彦, 齊藤百合花, 長内康幸, 山崎礼二, 篠原良章, 学際企画, 組織細胞化学, 165-176, 2022.

分担研究報告書

(課題名) 神経変性・発達障害の病因・病態・
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

本研究では、2020年度まで実施した「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」においては対象とした研究のうち、競争的外部研究費による支援を得る研究として発展させることができた、Nicotinamide 類縁化合物による神経保護に関する開発研究を除外する一方、神経突起構造の改変を伴う疾患として新たに ZNRF1 の発達期における機能に関する研究を加え、神経突起構造の改変に至る病態の共通メカニズムと各疾患に特異的なメカニズムの理解、更に、神経変性に対しては神経保護的疾患治療、発達障害に対しては異常構造の正常化のための最適な治療標的の明確化を達成し、疾患動物モデルを用いた治療モデルの作出を行う。

方法

開発費 30-8 研究を引継ぎ、本研究では特に疾患動物モデルを用い、動物個体レベルでの解析を通して、病態を理解することを目指した研究を行う。

1) NHE5 機能低下と ASD 様フェノタイプを関連付けるメカニズムの研究において、妊娠時高血圧が ASD リスク因子となる機序に関しては、renin-angiotensin 過剰発現による高血圧モデルマウスを用いた検討を進め、妊娠時高血圧による産仔の社会性行動異常をモデル動物レベルで示すとともに、分子機序に関する研究を更に進める。

2) 神経細胞に広範に発現し、特に発達期に高レベルの発現を示すユビキチンリガーゼ ZNRF1 に関して、その神経発達過程における機能を、特に ZNRF1 欠損マウスが示す行動異

常に着目しつつ明らかにする。

結果

1) Na-H 交換体ファミリーメンバーである NHE5 は、主として神経細胞に発現し、細胞内では Endosome/Lysosome の膜上に主としては限している。NHE5 欠損マウスは自閉症様と考えられる社会性行動異常を示す。今年度は、引き続き高血圧モデルマウスにおける社会性行動異常の検討を進めた。

2) ZNRF1 は神経細胞に広範に発現するユビキチンリガーゼであり、軸索損傷にともなって活性化し、Akt を基質として分解する機能を介して、細胞骨格の分解制御を行い、軸索構造の安定性維持・制御に寄与していると考えられている。一方、ZNRF1 欠損マウスは成長、生殖などに問題なく、脳の発生にも gross な異常を示さないが、行動解析バッテリーによる網羅的な行動解析を実施したところ、open field test、social interaction tests、acoustic startle response、prepulse inhibition、fear conditioning などの行動指標において異常を示したため、総合的には精神疾患様行動異常であると判断している。今年度、ZNRF1KO マウスの神経細胞において認められた興奮性の変化が電位依存性 Na チャンネル (Nav1.2; Nav1.6) の発現変化によるものであることを示し、それが ZNRF1-AKT-GSK3B リン酸化経路の調節がうしなわれたことによるものであることを示唆した。

考察

神経発達過程において観察される電位依存的 Na イオンチャンネル発現の変化は、神経の興奮性の調節に関与しているものと考えられる。ZNRF1 依存的変化は、今のところ GSK3B の活性化を介して起こっているものと考えているが、この場合の ZNRF1 の基質は Akt であることになる。一方、このような変化の分子機序が、Akt 以外の分子を基質とする反応によっ

て起こっている可能性がないかどうかについては引き続き検討を行っている。

参考文献（業績）

Hashimoto Y, Kuniishi H, Sakai K, Fukushima Y, Du X, Yamashiro K, Hori K, Imamura M, Hoshino M, Yamada M, Araki T, Sakagami H, Takeda S, Itaka K, Ichinohe N, Muntoni F, Sekiguchi M, Aoki Y. Brain Dp140 alters glutamatergic transmission and social behaviour in the mdx52 mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Prog Neurobiol* 216: 102288, .2022.

Wakatsuki S, Araki T. Novel insights into the mechanism of ROS-mediated neurodegeneration: selective phosphorylation of p47-phox serves as a priming signal of ROS-mediated neurite degeneration. *Neural Regeneration Research* 18(4): 746-749, 2023

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) の 30%程度に合併する自閉症スペクトラム様の脳症状については、ADL を著しく下げる一因であるにも関わらず、病態理解が不十分であり治療法が確立されていない。2019-2020年度は精神・神経疾患研究開発費「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」班 (班長: 荒木敏之) では、DMD で自閉症スペクトラム様の精神症状が発症する分子機序の一端を、DMD モデルマウスの扁桃体基底外側核における脳型ジストロフィン Dp140 の局在と機能に着目して明らかにした。

筋ジストロフィー犬 (canine X-linked muscular dystrophy in Japan: CXMDJ) は、mdx マウス同様に Dp427 を欠失する DMD の中型モデル動物である。mdx マウスと比較し、CXMDJ はヒトの DMD と酷似したより重症な筋障害を示す。本研究の目標は、Dp427 を欠損しマウスよりもヒトによく似た脳構造を持つ CXMDJ を対象に、Dp427 欠損に伴う中樞神経症状を精査のうえ、発症分子機序を解明することである。

方法・結果

ウエスタンブロットや免疫組織化学染色を用いて CXMDJ の脳内におけるジストロフィンの発現を調べたところ、CXMDJ では脳内に Dp427 が発現しないことを確認した。行動解析ではオープンフィールドテストにおいて、CXMDJ はテスト中の総移動距離、中心領域の滞在率、中心領域への侵入回数が野生型よりも減少した。また、オープンフィールドテスト中の心拍変動解析を行ったところ、

自律神経系のパラメータ異常が示唆された。

考察

これまでの結果から、CXMDJ では不安様行動が増加し、さらに副交感神経系の活動異常を認めることが示唆された。CXMDJ を対象に、扁桃体と迷走神経を対象にした電気生理学的検討、扁桃体のシナプトソーム解析を予定する。次に先端遺伝子治療による Dp427 の発現回復により、CXMDJ の中樞神経症状が改善するかと検討する方針である。

参考文献

1. Hashimoto Y, Kuniishi H, Sakai K, Fukushima Y, Du X, Yamashiro K, Hori K, Imamura M, Hoshino M, Yamada M, Araki T, Sakagami H, Takeda S, Itaka K, Ichinohe N, Muntoni F, Sekiguchi M, Aoki Y. Brain Dp140 alters glutamatergic transmission and social behaviour in the mdx52 mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Prog Neurobiol.*2022 Sep;216:102288.
2. 竹内絵理, 青木吉嗣. デュシェンヌ型筋ジストロフィーの脳症状に対するエクソン・スキップ治療, *Dementia Japan* 36: 265-270,2022

分担研究課題名：神経変性疾患の免疫応答
依存的な病態機序の研究

名前：大木 伸司

所属：神経研究所免疫研究部

緒言：神経変性疾患の病態解明はいまだ不十分であり、病態機序の根本的な捉え直しが必要である。近年、その原因の一つとして中枢神経系(CNS)内の神経炎症が注目されているが、炎症組織には常に免疫細胞が集積し、病態に干渉する。私たちは、二次進行型多発性硬化症 (SPMS) およびそのマウスモデルの神経変性過程に、Eomes 陽性ヘルパーT細胞 (Eomes+Th細胞) が中心的な役割を果たすことを見出した。その後、筋萎縮性側索硬化症(ALS)やアルツハイマー型認知症(AD)の患者や、対応するマウスモデルでも Eomes+Th細胞の有意な増加が確認され、同細胞による神経細胞障害が、広範な神経変性病態に関わることが予想される。本研究では、SPMS、ALS、ADのモデルマウスを用いて、Eomes+Th細胞による神経細胞障害の分子機序の全容解明を行う。既存の解釈の枠を超えた、全く新しい病態機序の解明と、画期的な治療法につながる基礎データの取得を目指す。

方法・結果：

これまでに、SPMSモデルマウス、ALSモデルマウス(mSOD1)およびADモデルマウス(5xFAD)の中枢神経系(CNS)に、発症に伴う Eomes+Th細胞の集積を認め、各マウスから得た Eomes+Th細胞がグランザイム B 依存性の神経細胞障害活性を示すことを明らかにしている。昨年度は、神経変性に伴う慢性炎症環境下の神経細胞では、細胞

周期の異所性亢進に伴うレトロトランスポゾン L1 の脱抑制 (再活性化) が認められ、L1 がコードする ORF1 タンパク質が、プロトタイプ抗原として Eomes+Th細胞を活性化し、神経細胞障害の引き金を引くことを明らかにした。本年度は、5xFAD マウスのグランザイム B 遺伝子欠損や、mSOD1 へのレトロ転位阻害剤(3TC)投与により、神経細胞障害が有意に改善することを明らかにした。さらに自律的神経細胞死に対するレトロ転位の影響を解析し、細胞周期が亢進した神経細胞が、選択的な L1 レトロ転位の標的となること、DNA 損傷修復機構の有無が神経細胞の運命を決定づける重要な要因であることを明らかにした。とくに DNA 二本鎖切断の修復に関与する Brca1 が、神経細胞において選択的に発現するにより、神経細胞死を決定づけることを示唆するデータが得られており、自律的神経細胞死における同因子の中心的な役割を明らかにすることができた。

考察：これまでの結果から、神経変性疾患における神経細胞障害が、自律的な神経細胞死と免疫依存性神経細胞障害の二段階の機序により生じることが明らかとなった、そこでまずグランザイム B や L1 レトロ転位の阻害を含めた免疫依存性神経細胞障害の抑制法を探索し、神経変性疾患の新規治療法開発を目指す。さらに、上記のモデル動物由来神経細胞と神経培養細胞の解析を並行して進めることにより、自律的神経細胞死における L1 転位の意義の解析を進め、研究期間内の L1 依存性神経変性疾患の病態機序の全容解明を目指す。

参考文献：

1. Fumio Takahashi, Chenyang Zhang, Hirohiko Hohjoh, Ben Raveney, Takashi Yamamura, Nobuhiro Hayashi, Shinji Oki, Immune-mediated neurodegenerative trait provoked by multimodal derepression of long-interspersed nuclear element-1., *iScience*. 2022;25(5):104278.

2. Ben Je Raveney, Yosif El-Darawish, Wakiro Sato, Yoshiyuki Arinuma, Kunihiro Yamaoka, Shohei Hori, Takashi Yamamura, Shinji Oki, Neuropilin-1 (NRP1) expression distinguishes self-reactive helper T cells in systemic autoimmune disease., *EMBO Mol Med*. 2022 Sep 7; 14 : e15864.

分担研究報告

分担研究課題名：樹状突起スパインの分子解析による自閉スペクトラム症病態の研究

名前：野口 潤

所属：神経研究所 微細構造研究部

緒言：自閉スペクトラム症(自閉症)はいわゆる「シナプス病」とも呼ばれ、シナプス機能の障害が病態を構成すると考えられる。どの脳部位のどのシナプスがどのような機能障害を生じて病態を構成しているかを理解することが、疾患の理解に貢献すると考えられる。

本分担研究者は、大脳皮質等の脳部位のシナプスをシナプトソーム(シナプス由来の小胞)として抽出し、包含するタンパク質や核酸などを体系的に解析する。特に、投射元と投射先を標識されたシナプトソームを解析する。自閉症モデルマウスあるいはマーマセットを用いて、社会性刺激を動物に加えた場合の遺伝子発現変化の知見を得る。その知見をもとに社会性に関するシナプスにおいて鍵となる分子を2光子顕微鏡を用いて可視化し、病態の理解や治療法の探索につなげる。3年間で自閉症モデル動物の社会性に関連するシナプスにおいて、機能・局在あるいは発現が変化している分子を同定する。

方法・結果：

1. マーマセット生体2光子顕微鏡画像の解析

自閉症モデルマーマセットの内側前頭前野2/3層錐体細胞の樹状突起あるいは軸索を断続的に2光子顕微鏡を用いて観察した。シナプス後部である樹状突起スパインのターンオーバー(生成・消去)がモデルマーマセットで亢進していることを既に見出していたが、今回は特にスパインの近接した(クラスター化)

生成あるいは消去について検討を実施した。シナプスのクラスター化は、非線型的な入力積算や、シナプス可塑性物質の拡散による相乗的な可塑性による記憶・学習における役割が理解されつつある。我々の解析の結果、自閉症モデル動物においては、クラスター化スパイン生成が亢進していることを、モンテカルロシミュレーションなども併用しながら示すことができた。また、このクラスター化スパイン生成は自閉症に対する治療が実施されているオキシトシンというペプチドホルモンの投与によって抑制されることを見出した。一方、近距離の軸索の前シナプス bouton のターナーオーバーは、モデルマーマセットで亢進していたが、この亢進は交連軸索では見られなかった。ヒト自閉症において、局所的な投射の亢進と長距離の投射の抑制がこれまでfMRI等の機能イメージングで提案されてきた。我々が今回見出した結果は、軸索の投射依存的なシナプス可塑性制御の変化が自閉症における脳領域間の機能的な結合の変化の基盤となっている可能性を示唆している。

2. シナプスを構成する物質の解析

昨年度は、シナプスをシナプトソームという小胞として抽出して、精製度を最適化する検討を実施した。シナプトソームに含まれる蛍光からフローサイトメーターのソーティング機能を用いて、選別・精製可能であることを示した。シナプス由来ではない小胞や蛍光を含んでいないシナプトソームを確実に分離するために、電子顕微鏡による確認等を実施することを計画中である。一方、PSD95といったシナプスで重要な働きを行うタンパク質への結合能とカルシウム感受性タンパク質を組み合わせることで、直近で活動したシナプスを標識する蛍光色素タンパク質が報告

されている。そのような機能プローブも用いて、社会的な経験を行なった時に活動するシナプスにおける分子的变化を検出する準備を実施している。

考察： マーモセット生体2光子イメージング画像の解析については、なるべく速やかに論文掲載されるように対応していく。シナプスを構成する物質の解析については、シナプスが包含する RNA とタンパク質の解析をコントロール動物とモデル動物で早期にまとめ解析検討する。また、カルシウム測定を用いた機能プローブに関して、ウイルスベクターの準備が整い次第、マウスに投与して発現等の確認を実施する。

参考文献：

1. Noguchi J, Watanabe S, Isoda R, Ichinohe N, et al. Imbalance of circuit plasticity and consolidation in autism model marmosets is adjusted by oxytocin. bioRxiv. Aug. 25. Doi: 10.1101/2022.08.24.505057.

分担研究課題名

軸索変性に伴うオルガネラ動態・相互作用の変化とその制御機構の解明

名前：大野伸彦

所属：自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門

緒言：

本研究では、これまでの研究で開発した内包脱髄マウスモデルに、KENGE-Tet システム[Tanaka et al. Cell Rep. 2012]による生体内の時期・細胞特異的ミトコンドリア分裂抑制技術を応用し、神経細胞およびグリア細胞のミトコンドリアの分裂が、脱髄に伴う運動機能障害に及ぼす影響を明らかにする。その過程で、脱髄に伴う上位運動神経軸索の変性および再髄鞘化において、軸索およびグリア細胞のミトコンドリア動態変化、MAM を含むその形態変化を、マイクローム組み込み式走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) による連続画像取得と 3 次元再構築により、明らかにし、さらにミトコンドリアの分裂の抑制による軸索変性の軽減と髄鞘再生の促進の可能性を検証する。さらに発達期および加齢時の髄鞘形成および髄鞘形成異常に伴う細胞形態とオルガネラ変化を検討し、ミトコンドリア動態抑制および薬剤による修飾が発達障害や加齢に伴う病態の改善につながる可能性も検証する。

方法・結果：

中枢神経系の髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトは突起を伸ばして複数の軸索に対して髄鞘を形成する。髄鞘の遺伝子異常は被覆された軸索のオルガネラ異常や

変性を惹起するが、どの軸索が髄鞘によって被覆され、そして障害の影響を受けるのかについては、ほとんどわかっていなかった。そこで 2021 年度に、オリゴデンドロサイトが髄鞘を形成する軸索の特性を電子顕微鏡による 3 次元再構築技術を用いて検討した (Tanaka et al. 2021)。マウスの脳梁から 2000 枚の連続電子顕微鏡画像を Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) を用いて取得し、これらに含まれるすべての細胞を同定し、11 個のオリゴデンドロサイトの細胞体、核、そして追跡可能な全ての突起を抽出した。その後、新たに開発した Outer tongue を使ったオリゴデンドロサイトの形成する髄鞘の同定法を用いて、各オリゴデンドロサイトが形成する髄鞘を正確に同定し、被覆される軸索、形成される髄鞘の形態学的特性を解析した。その結果、オリゴデンドロサイトはすべての細胞で明瞭な極性を有し、細胞体の一側にある、オルガネラが豊富な領域から太い突起を伸ばしていた。また、各突起によって形成される髄鞘の厚みとその被覆される軸索の径は、オリゴデンドロサイト毎に偏っていることが分かった。

各有髄軸索は、ランビエ絞輪を隔てられた複数の髄鞘によって被覆されている。本研究の観察から、1 本の軸索上の各髄鞘は異なるオリゴデンドロサイトによって形成されていることがほとんどであったことから、オリゴデンドロサイト毎にその形成する髄鞘の厚みや軸索の径に偏りがあれば、ランビエ絞輪を隔てた隣の髄鞘の厚みや軸索の径はばらつく可能性が考えられる。そこで、実際に連続電顕画像上で 3 次元再構築されたオリゴデンドロサイトの髄鞘にランビエ

絞輪を隔てて隣接する髄鞘を同定し、その厚みと軸索径を比較した。その結果、隣り合う髄鞘の厚み、そしてその部位の軸索径には明らかな相関関係が見られた。したがって、各軸索は異なるオリゴデンドロサイトによって被覆される領域間においても同様の径を有しており、またそれらの髄鞘の厚みも同様であると示唆された。これらの結果から、個々のオリゴデンドロサイトは同じような径と髄鞘厚を有する軸索群に選択的に髄鞘を形成していると考えられた。

また、2021 度はこれまでの研究で用いていた中枢神経系の脱髄病変検出法である Neutral red による染色法を始めて末梢神経へと応用し、末梢神経系の脱髄病変が目視で検出できることを示した (Yamazaki et al. 2021)。Neutral red は脱髄部位の反応性の Schwann 細胞とマクロファージを標識していると考えられたことから、これらの細胞がみられるその他の病変部位の検出にも応用できる可能性も示唆された。

これまでの研究で、一過性の脱髄を惹起することが知られているリゾレシチンを運動野からの神経路が通過する内包に注射することで、内包の脱髄と運動機能障害を惹起するモデルを開発していた。この内包脱髄モデルをオルガネラ動態への介入の処理に用いる準備段階として、2022 年度はこの内包脱髄モデルが再髄鞘化の促進による運動機能の改善を評価可能かどうか、検討を行った。リゾレシチン注射後に再髄鞘化を促進することが知られているクレマスチンを腹腔内投与し、運動機能および髄鞘と軸索の組織学的変化を評価した。その結果、クレマスチン投与群は Vehicle 投与群と比較し

て、リゾレシチン投与 10 日後の運動機能 (Wire hanging テスト、Grip strength テスト) が改善し、また運動機能の左右差 (シリンドertest) も改善していた。また、昨年度報告した Neutral red 投与による脱髄部位の検出法も併用した組織学的検討では、リゾレシチン投与部位におけるオリゴデンドロサイトの分化の促進、さらに有髄軸索数、髄鞘厚で評価される髄鞘の再形成が、クレマスチン投与によって優位に促進されていた。加えて、リゾレシチン投与部位における軸索障害マーカーの非リン酸化ニューロフィラメントの免疫反応性の改善も、クレマスチン投与により認められた。以上から、このリゾレシチンによる内包脱髄モデルは脱髄に伴う神経障害および病理学的変化と回復過程に加えて、再髄鞘化の促進を伴う介入による運動機能再生を評価する上でも、極めて有用なモデルになると考えられた (Yamazaki et al. submitted)。

昨年度の研究で、オリゴデンドロサイトによる髄鞘形成の選択性に軸索の径という構造特性が関与している可能性を見出した。しかし、髄鞘の形成や構造変化は軸索の性質に加え、環境刺激の影響を受けていることが報告されている。そこで、今年度はオリゴデンドロサイトの髄鞘形成に影響を及ぼす可能性が指摘されている視覚刺激に焦点を絞り、視覚臨界期における暗所飼育が有髄軸索に富む視神経および視交叉での有髄軸索の構造に及ぼす影響を検討した (Osanai et al. 2022)。まず、過去の報告で視覚刺激による変化が報告されており、神経伝導速度に影響する髄鞘長を検討した。これまでの研究では髄鞘長の計測はオリゴデンドロサイトのまばらな標識により行わ

れた。しかし、本研究では傍絞輪部に対する免疫染色と組織透明化を併用する方法を開発し、脳の様々な領域における髄鞘長の計測に成功した。その結果、暗所飼育によって、視神経および視交叉の髄鞘長が有意に減少することが分かった。さらに電子顕微鏡による観察から、髄鞘の厚みも厚くなったことから、視覚臨界期の暗所飼育は発達後にまで残存する構造的な影響を有髄軸索に及ぼすことが明らかになった。

考察：

本研究では昨年度および今年度の結果をふまえて、引き続き髄鞘形成細胞による髄鞘形成の異常、その形態学的特性が障害される可能性に注目して、引き続き脱髄・再髄鞘化モデルや加齢動物モデルを用いて研究を継続する。また、現在までにデータが蓄積されつつあるミトコンドリア分裂の新規制御モデルも併用し、オルガネラ動態変化の役割を明らかにすることを目指す。

また、これまで研究上のボトルネックとなっていた連続電子顕微鏡画像からの構造抽出において、深層学習によるオートセグメンテーションがかなり有効になりつつあることから、このワークフローを確立させ、3次元微細構造解析のスループットの向上を実現する。これにより、髄鞘疾患のミトコンドリア分裂制御と軸索変性・髄鞘形成や神経機能改善の関係性についても検討を進める。

参考文献（研究成果）：

1. Osanai Y, Battulga B, Yamazaki R, Kouki T, Yatabe M, Mizukami H,

Kobayashi K, Shinohara Y, Yoshimura Y, Ohno N. Dark Rearing in the Visual Critical Period Causes Structural Changes in Myelinated Axons in the Adult Mouse Visual Pathway. *Neurochem Res.* 2022 47:2815-2825. doi: 10.1007/s11064-022-03689-8.

2. Osanai Y, Yamazaki R, Shinohara Y, Ohno N. Heterogeneity and regulation of oligodendrocyte morphology. *Front Cell Dev Biol.* 2022 10:1030486. doi: 10.3389/fcell.2022.1030486.

3. 大野伸彦、齊藤百合花、長内康幸、山崎礼二、篠原良章、学際企画、組織細胞化学 2022、2022年7月10日、165-176

Etiology, pathogenic mechanism, and developing therapeutic approach for neurodegenerative diseases and neurodevelopmental diseases.

Toshiyuki Araki

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

Aims

In our former project for the Intramural Research Grant for Neurological and Psychiatric Disorders (30-5: Research for developing neuroprotective therapy against neurodegenerative diseases via elucidation of pathogenetic mechanism) lasted till 2020, our disease target was neurodegenerative diseases including amyotrophic lateral sclerosis, and we aimed to develop our research into collaboration with pharmaceutical companies for therapeutic development, or to be supported by external competitive research funding programs for development of therapeutics. In the current research project that follows 30-5, we excluded some research contents that have already acquired external research fund support successfully, and newly included research on mechanism of developmental disorders as another type of diseases involving alteration of neurite structures. In this research project, we aim to understand the pathogenic mechanisms shared by our target diseases as well as the mechanisms that are specific to certain type of diseases leading to the alteration of neurite structures. To develop therapeutic approaches against neurodegenerative diseases and neurodevelopmental abnormalities, we aim to clarify the optimal treatment targets and generate treatment model using diseased animal models. We will also share cutting-edge technologies for the analysis of diseased animal models within the group to expedite functional analysis and accelerate our research.

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

Jun Noguchi: Section Chief, Department of Ultrastructural Research, National Institute of
Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

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