

## 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NCNP 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)  
土肥 栄祐 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第三部)  
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更新し、この2年で作出したマウス系統数は200に迫っている(井上)。(2) NCNP 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つつ、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が整いつつある(岩崎)。

#### 2. 精神疾患研究

(3) イハラてんかんラットの原因遺伝子 DSCAML1 の類縁遺伝子 DSCAM の小脳シナプス形成における機能解析および精神疾患関連遺伝子 AUTS2 の大脳皮質発生における役割を明確にする研究(星野)、(4) 様々なストレスとうつ病や不安障害発症との連関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) McCP2 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) Vault 複合体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)、(12) 細胞外小胞の生体内での役割を様々な角度から検証する研究(土肥)を推進した。

#### 4. 筋疾患研究

(13) 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)、(14) ジストロフィン遺伝子のエキソ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

(15) 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)、(16) 小脳における Indirect neurogenesis 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

(17) 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5年11月8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 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。また、これらの動物モデルを用いて、新たな治療法の開発に道を拓くことを目的とする。

### 方法

Dcaml1 遺伝子の遺伝子改変マウス、Dscaml1 のファミリー遺伝子 Dscam の遺伝子改変マウス、および Auts2 遺伝子の遺伝子改変マウスを作成し、それぞれについて表現型を解析する。

### 結果と考察

(1) Auts2 遺伝子について。  
我々は、AUTS2 タンパク質が核内で働き、PRC1 非依存的な方法で様々な遺伝子の転写抑制に働くことを見出した。そして Robo1 遺伝子の発現を抑制し、それによって Intermediate Progenitors の分裂を促進し、浅層ニューロンの産生に関与することを見出した。この機能が失われると、結果として浅層ニューロンの産生が低下し、大脳皮質が薄くなる。これは、ヒト AUTS2 症候群で見られる小脳症の症状と類似であるため、ヒトでも同様な病態が背後にあることが示唆された。

(2) Dscam ファミリー遺伝子について  
我々は、IER (イハラてんかんラット) の原因遺伝子として Dscaml1 を同定し、その KO マウスの解析から、この遺伝子異常によるてんかん発症メカニズムについて報告してきた。今年度は、この遺伝子ファミリーの Dscam 遺伝子についても解析した。そこで DSCAM が神経細胞の後シナプスに局在し、アストロサイトで発現する GLAST をシナプス近傍へ局在させる機能を持つことを明らかにした (現在論文リバイズ中)。この機能が失われると、シナプスからのグルタミン酸除去がスムーズに行われなくなるため、脳内に遊離グルタミン酸が増えることになるため、E/I バランス異常による各種精神疾患やてんかんの原因・誘因となる可能性が考えられた。

### 結論

Auts2 及び Dscam ファミリー遺伝子の KO マウスを使った解析から、いくつかのてんかん病理の可能性が示唆されてきている。また、ヒト手術脳検体を使った解析を進めることにより、マウスモデルで得られた知見がヒト検体でも整合性が見られるかどうかについて、今後検証していく。

### 参考文献

1. Fujiyama T, Takenaka H, Asano F, Miyanishi K, Hotta-Hirashima N, Ishikawa Y, Kanno S, Seoane-Collazo P, Miwa H, Hoshino M, Yanagisawa M, Funato H. Mice Lacking Cerebellar Cortex and Related Structures Show a Decrease in Slow-Wave Activity With Normal Non-REM Sleep Amount and Sleep Homeostasis. Front Behav Neurosci. 2022, 16:910461.
2. 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, 216:102288.
3. Sano T, Kawazoe T, Shioya A, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Maruo K, Nishino I, Hoshino M, Murayama S, Saito Y. Unique Lewy pathology in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathology.* 2022, 42(2):104-116
  4. Inoue, Y.U., Miwa, H., Hori, K., Kaneko, R., Morimoto Y., Koike, E., Asami, J., Kamijo, S., Yamada, M, Hoshino, M. and Inoue, T.: Targeting Neurons with Functional Oxytocin Receptors: A Novel Set of Simple Knock-In Mouse Lines for Oxytocin Receptor Visualization and Manipulation. *eNeuro.* 9(1): 0423-21, Feb, 2022

## 分担研究報告書<sup>12</sup>

(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

(氏名) 井上 高良

## 緒言<sup>11</sup>

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* (Auts2)、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を行い、神経回路網形成に果たす新たな役割を見出した (論文投稿準備中)。また BAC システムを利用して巨大遺伝子 *Cdh6/8* や *Auts2* の非コード領域における転写

制御機序の詳細を解析し、大脳皮質領域特異性表出やヒト進化に関わるゲノム領域の網羅的抽出と機能解析を行った (論文投稿準備中)。さらにシナプストランスポーター *Vmat1* 遺伝子のヒト化マウス作出により不安・うつ傾向の進化仮説について初めて実験的に検証することに成功した (Sato DX et al, 2022)。

## 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. Sato DX et al. (2022) *iScience* 25, 104800. doi:10.1016/j.isci.2022.104800.
2. Inoue YU et al. (2021) *Cells* 10, 1076. doi:10.3390/cells10051076.

## 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 疾病研究第一部

(氏名) 野口 悟

## 緒言

これまでに我々は、小脳萎縮、運動失調を呈する2家系3患者(劣性遺伝家系)の全エクソーム解析を行い、新規遺伝子Xに両アレル性の複合ヘテロ接合変異を同定した。この遺伝子は、これまでいかなる疾患への関連も報告されていないものであった。これまでに、遺伝子Xの変異をマウスに導入し、疾患モデルマウスを作製したが、ヒト患者で示されているような小脳萎縮を再現した。さらに、この小脳萎縮は、小脳発生期のプルキンエ細胞の著しい形態変化と顆粒細胞数の減少によることを見出した。プルキンエ細胞の機能の変化のより、引き起こされているものと推察された。今年度の研究の目的は、変異遺伝子X産物の機能異常を明らかにすること、小脳プルキンエ細胞での変異遺伝子X産物がもたらす変化を明らかにすることである。この研究により、脊髄小脳萎縮症の新たな原因、発症メカニズムと治療標的が明らかとなることが期待される。

## 方法

### モデルマウス

遺伝子Xに両アレル性変異を複合ヘテロ接合性に有するマウスを用いた。

### 細胞培養

Hela細胞、HEK293細胞を用いて、GFP-遺伝子X変異体をトランスフェクションした。Cyclohexamideによるchase実験にて安定性を測定した。

### RNA-seq

6日齢の遺伝子改変マウス、コントロールマウス(ともにN=3)の全小脳を用い、定法に従ってRNA-seqを行った。スプライシングの解析にはMISOを用いた。

## 結果

遺伝子X産物の機能は、snRNPの核内輸送のためのアダプタータンパク質であることが

示されている。このため、遺伝子X産物は細胞質と核をシャトリングしている。ヒト患者で見出した2種類の変異は、一つが核への移動の異常であり、もう一つが核から細胞質への移動の異常であった。これは、それぞれの輸送タンパクとの結合の低下によるものであった。また、細胞質への移動の異常を示す変異体はタンパク質の安定性も減少していた。遺伝子Xは小脳プルキンエ細胞に強く発現していた。疾患モデルマウスの小脳プルキンエ細胞核のCajal bodyでのsnRNPの局在が顕著に低下していた。snRNPの減少はmRNAのスプライシング異常を引き起こすことが知られている。RNAseqのデータを用い、小脳プルキンエ細胞に特異的に発現する419遺伝子についてスプライシング変化の有無を解析した。165遺伝子が疾患モデルマウスの小脳でのスプライシングが変化し、主に選択的スプライシングによる変化であった。この165遺伝子には、小脳形成に関わる遺伝子や小脳失調の原因遺伝子が多く含まれていた。いくつかの転写物のスプライシング変化をRT-PCRにて確認した。さらに、そのうちの一つの遺伝子のタンパク質産物の機能異常をモデルマウスの小脳プルキンエ細胞にて解析した。この遺伝子はキナーゼをコードしているが、下流遺伝子のリン酸化が低下していることがわかった。さらに、プルキンエ細胞からサイトカインの分泌の減少と、顆粒細胞前駆細胞の減少を認めた。顆粒細胞が十分に増殖する前に、早期に移動することにより、顆粒細胞の数が減り、小脳全体が小さくなっていることを見出した。

## 考察

これまでの結果をまとめると以下の過程により、小脳萎縮が引き起こされるものと考えられた。

### 遺伝子X変異

- 核内外輸送体との結合低下
- プルキンエ細胞核へのsnRNP輸送低下
- 広範な遺伝子のスプライシング変化
- タンパク質産物の機能低下
- プルキンエ細胞の樹状突起形成不全
- サイトカインの分泌低下
- 顆粒前駆細胞の増殖不全/早期移動
- 小脳の形態形成異常

## 結論

遺伝子Xの変異は小脳細胞の広範なスプラ

イシング変化を引き起こすとともに、プルキンエ細胞、顆粒細胞形態異常、増殖低下を引き起こした。これにより小脳萎縮に至ると考えられた。

## 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) (国研) 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

他者の情動が表出するとき、その様子を観察することで同様の情動が生じる現象を情動伝染と呼ぶ。情動伝染は、霊長類からげっ歯類まで広く保存されており、他者との円滑な社会生活を築くために重要な機能であると考えられている。恐怖や痛み、ストレスを経験した個体からの情動伝染は、それを観察した個体(観察個体)の向社会行動を亢進させ、前者のストレス状態を軽減させる。一方、過度な負情動の伝達は、疼痛閾値の低下やストレス反応の惹起など、観察個体に不快な情動状態を誘発する。

我々はこれまでに、同種他個体が攻撃的な別種マウスから攻撃を受ける社会的敗北を目撃させることでストレスが伝達される心理的ストレスモデルを確立し、直接的な攻撃への曝露と目撃によるストレス伝達がマウスに及ぼす影響について比較した。その結果、社会的敗北の目撃による心理的ストレスは、攻撃による身体的ストレスとは一部異なる脳部位の活性化・免疫系の変化を誘発し、後に顕著なうつ様行動を引き起こすことを見出した。

本研究では、共感性に関わることが知られるオキシトシンに着目し、社会的敗北の目撃によりストレスが伝達され情動変容が生じる脳内基盤の解明を目指す。

### 方法

被験体マウスに社会的敗北を目撃させることで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 O<sub>xtr</sub>-PA-T2A-tdTomato および O<sub>xtr</sub>-PA-T2A-iCre マウ

スを用いた。ストレスによる脳活動とオキシトシン受容体の局在を評価するため、免疫染色を行った。ストレス伝達における特定の脳部位の関与を調べるため、オキシトシン受容体拮抗薬を局所投与し、ELISAで血中コルチコステロン値を測定した。AAV-DIO-NpHR-EYFPの局所投与と黄色光照射によりオキシトシン受容体発現細胞の活動を抑制した。また、社会的相互作用試験とスクロース嗜好性試験にてうつ様行動を評価した。

### 結果

社会的敗北の目撃時にのみ c-Fos 発現が増加した島皮質において、オキシトシン受容体発現細胞の活性化が観察された。また、島皮質においてオキシトシン受容体発現細胞の半数以上がグルタミン酸作動性神経であり、GABA 作動性神経はごくわずかであった。島皮質へオキシトシン受容体拮抗薬を投与すると、目撃によるすくみ反応の増加と血中コルチコステロン値の上昇が抑制された。一方、社会的敗北を経験した個体では拮抗薬投与の効果は観察されなかった。島皮質内のオキシトシン受容体発現細胞の活動を社会的敗北の目撃中にのみ抑制すると、社会性の低下や報酬感受性の低下が抑制された。

### 考察

島皮質におけるオキシトシンシグナルは社会的敗北の目撃によるストレス伝達を担う一方、身体的ストレスの処理には関与しないことが推察された。また、島皮質のオキシトシン受容体を発現する神経細胞からの興奮性の投射が、ストレスの伝達から抑うつ状態への移行に関与している可能性が示された。

### 結論

島皮質におけるオキシトシンシグナルがストレス伝達を仲介し、その後の情動変容を引き起こすことが示唆された。



参考文献

1. Nakatake Y. et al., An emotional stress model using witnessing social defeat scenes in mice. *Folia Pharmacol. Jpn.* 158, 39-42, 2023.

## 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

(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 において核酸のリソソーム内への移行を促進する因子として SIDT2 を見いだした。SIDT2 はタンパク質のリソソーム内への輸送も促進することを見いだした。本研究では、これら分解機構 (ここでは DUMP と呼ぶ) 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。

今回、DUMP に関与する可能性のある、SIDT2 以外の分子を探索した。

### 方法

タンパク質のリソソーム膜局在とインタラクトームの情報から、分子 C に着目した。分子 C を neuro2a 細胞に過剰発現させ、 $\alpha$ -synuclein や Tau を基質と、Tet-off システムによる分解実験を行なうことにより、タンパク質分解への C の影響を解析した。また、共焦点顕微鏡解析により、 $\alpha$ -synuclein が C 依存的にリソソーム

に取り込まれるか検討した。さらに、マクロオートファジーの起こらない Atg13 ノックアウト (KO) neuro2a 細胞を用いて、本研究の分解経路がマクロオートファジーか異なる経路かを決定した。

### 結果

Tet-off システムを用いた分解アッセイの結果、neuro2a 細胞における分子 C の過剰発現により、 $\alpha$ -synuclein や Tau のタンパク質分解が促進されることを見いだした。共焦点顕微鏡解析では、分子 C の過剰発現により、 $\alpha$ -synuclein のリソソームへの移行が促進された。Atg13 KO neuro2a 細胞においても、分子 C の過剰発現により、 $\alpha$ -synuclein のタンパク質分解が促進された。また、(野生型) neuro2a 細胞における C の過剰発現時には、マクロオートファジー活性化のマーカーである LC-3II の量に変化はなかった。以上の結果から、分子 C はマクロオートファジー以外のオートファジー経路を活性化することが明らかとなった。

### 考察

分子 C を介した分解機構はマクロオートファジー以外の経路であることから、リソソームによる直接的なタンパク質取り込み経路であることが示唆された。また、分子 C はリソソーム膜に存在することから、タンパク質取り込みに関与している可能性がある。

### 結論

分子 C はマクロオートファジーとは異なるオートファジー経路を活性化する。

## 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

(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では、神経ネットワークの形成・維持の破綻が発病の主因である可能性が指摘されている。「神経ネットワークがどのように形成・維持され、そして変容するのか」という問いの解を得ることは、疾患発病の分子基盤を明らかにすることに他ならず、予防や治療の手がかりを知る上でも極めて重要である。本研究では、神経ネットワークの形成・維持の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。そのために神経突起・シナプスの構造変化の経時的観察、マウス行動解析など様々な実験手法を取り入れ、得られた成果を新規治療方法の開発など発病を抑制する医学的な応用に繋げることを目指している。

## 方法と結果

昨年度に引き続き、本年度はリボヌクレオタンパク複合体ヴォールトに由来する細胞内反応に関する機能的解析を、主に初代培養細胞を用いたシナプス形成の培養モデルにより実施した。

ヴォールトはタンパク質分子である MVP や非コードな RNA 分子である vtRNA により構成される機能不明のリボ核タンパク質複合体である。これまでの研究で、タンパク質キ

ナーゼ Aurora A による MVP のリン酸化をきっかけに vtRNA がヴォールトからリリースされること、vtRNA がダイレクトに MAPK シグナルに作用してシナプス近傍の局所的なタンパク質合成を促進し、シナプス形成を促進すること、などを見出してきた (J Cell Biol. 2021 他)。これらの結果を受け、一連の反応の出発点となる Aurora A の活性制御機構について詳細な検討を行った。その結果、シナプス形成期に Aurora A がグルタチオン化修飾されることが、Aurora A の活性化に必要なことが明らかとなった。

## 結論と考察

Aurora A はリン酸化により活性化することが知られている。予備的な結果では、今回発見したグルタチオン化修飾はリン酸化に先立って生じ、グルタチオン化を無効にする変異を Aurora A に導入すると活性化に必要なリン酸化のレベルが低下し、シナプス形成を促進する活性が打ち消されることがわかった。今後は、シナプス形成におけるグルタチオン化修飾の生理的意義を Aurora A の活性制御機構を主軸に明らかにして行く。一方、vtRNA-MEK 複合体の構造解析を中心に MAPK シグナル制御機構についても検討を進めている。RNA 依存性の酵素活性制御は極めて稀な例であり、詳しく調べることで、RNA 依存性の酵素活性制御の新パラダイム創出に繋げたい。

## 参考文献 (業績)

1. [Wakatsuki S.](#), Takahashi Y., Shibata M., Araki T. Selective phosphorylation of serine 345 on p47-phox serves as a priming signal of ROS mediated axonal degeneration. *Exp Neurol.* 352: 114024. (2022)
2. [Wakatsuki S.](#) and Araki T.

Novel insights into the mechanism of reactive oxygen species-mediated neurodegeneration

Neural Regen Res. 4: 746–749. (2022)

3. Numata-Uematsu Y., Wakatsuki S., Kobahashi-Ujii Y., Sakai K., Ichinohe N., Araki T. In vitro myelination using explant culture of dorsal root ganglia: an efficient tool for analyzing peripheral nerve differentiation and disease modeling. PLoS One. in press.

## 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

(氏名) 青木 吉嗣

## 緒言

筋ジストロフィーに対する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、アンチセンス核酸医薬の薬効をスクリーニングする、リアルタイム *in vivo* イメージングシステムの確立である。

## 方法

Luc コード領域を *Dmd* のエクソン/イントロンゲノム配列で分断し、エクソンスキップの誘導により、Luc が発現する pCAGGS-Luc を構築する。pCAGGS-Luc を導入した Luc-Tg マウスを *mdx* マウスと交配のうえ、Luc-Tg/*mdx* マウスを作出した。Luc-Tg/*mdx* マウスを対象に、エクソン・スキップの薬効を、イメージング評価可能なアッセイ系を確立する。

## 結果

Luc-Tg マウスの作出に成功した。さらに、核酸医薬のキャリアであるユニットポリイオンコンプレックス (uPIC) を、宮田完二郎博士のグループと共同で開発した。uPIC は1分子の核酸医薬のみ搭載するため、既存の脂質分子を用いたナノ医薬品 (約 100 nm) と比べ

て、サイズを劇的に小さく調整することができる。骨格筋を標的とした受動的な薬物送達においては、11-32 nm サイズの中分子は DMD モデルである *mdx* マウスの骨格筋に効果的に取り込まれた<sup>1)</sup>。Luc-Tg/*mdx* マウスを対象に、エクソン・スキップ誘導用のアンチセンス核酸を搭載した uPIC を筋注後、アンチセンス核酸の単体投与と比べ、uPIC ではエクソン・スキップの誘導効果が向上することを示した。

## 考察と今後の展望

高分子薬を含むミセルのサイズは臓器の標的性に関与することを見出した点は、受動的な薬物送達キャリアを開発するうえで極めて重要な発見である。今後は Luc-Tg/*mdx* マウスを対象に、エクソン 23 スキップ誘導用のアンチセンス核酸を搭載した uPIC を経静脈全身投与後の薬効薬理、薬物動態等を、*in vivo* イメージングシステムにより詳細に評価する。

## 結論

Luc-Tg/*mdx* マウスの作出に成功した。Luc-Tg/*mdx* マウスを対象に、アンチセンス核酸を搭載した uPIC を筋注後の薬効を、IVIS Imaging System により評価出来た。

## 【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. *J Control Release*. 2022; 347: 607-614.

## 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) (国研) 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

種々の要因により脳と脊髄からなる中枢神経系が傷つくと、傷ついた部位に応じて様々な神経機能障害があらわれる。病巣では、たとえ神経細胞死を免れたとしても神経回路が破綻する様子が観察される。破綻した神経回路を修復させることで症状の緩和につながると考えられているが、現時点で神経回路を修復させる薬剤は上市されておらず、その理由の一つに神経回路の修復メカニズムには未だ不明な点が多いことが指摘されている。

個体発生期の神経回路形成や末梢神経系の神経修復と比較すると、成体での脳神経回路の自発的な修復力は弱い。しかし、疾患の種類や個人差はあるものの、わずかではあるが神経回路は自然に修復する。分担研究者らは、成体脳に残されている神経回路の修復力に着目し、どのように神経回路の修復力が維持されているか、またその機序を賦活化することで神経回路の修復力が高まり、神経機能障害から回復が促されるか、マウスの病態モデルを用いた解析を行っている。

昨年度までに、公開されているデータベースを活用し、脳の特に神経細胞に高発現し、神経機能の異常と関連づけられる機能を有する遺伝子を探索した。またその遺伝子の機能評価を、マウス大脳皮質神経細胞を用いた *in vitro* のスクリーニング系により実施した。その結果、検討した範囲内では、synaptotagmin (Syt)4 遺伝子が神経突起の伸長の維持に関わることがわかった。本年度は、Syt4 が *in vivo* での神経回路の修復やそれに関連する神経機能変化に与える作用を解析した。

### 方法

本研究では神経回路の修復と関連する機能解析のため、脊髄損傷モデルマウスを用いた。マウス下部胸髄を半切断して脊髄損傷を施し、マウスでは脊髄背側を走行する皮質脊髄路(下行性の運動神経回路)の損傷後の修復過程を研究対象とした。皮質脊髄路

を構成する大脳皮質第5層の神経細胞において Syt4 の発現を抑制させるため、大脳皮質の運動野へ Syt4 shRNA を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを感染させた。ウイルス感染後2週間のマウスから感染領域の脳組織を摘出し、Syt4 の発現抑制効果を評価した。マウスの行動解析のため、全身運動の評価を Basso Mouse Scale (BMS) で、後肢の歩行機能を ladder walk test で評価した。

### 結果

Syt4 shRNA によるの発現抑制効果の検討を、アデノ随伴ベクターを感染させた部位を含む大脳皮質運動野の組織を用いて検討し、mRNA レベルおよびタンパク質レベルで発現が抑制されることを確認した。また、Syt4 の発現を抑制させたマウスの行動試験では、Syt4 shRNA 群および対照群 (control shRNA 群) とともに脊髄損傷後の2週間にわたり BMS は同定度であった。一方で、その後に対象群で検出される BMS スコアの経時的な上昇が、Syt4 shRNA 群では検出されなかった。また、術後1カ月において ladder walk test で後肢の機能を評価したところ、Syt4 shRNA 群では対象群と比較し歩行異常が有意に多く、Syt4 発現抑制により運動機能の自然回復が阻害されることが示唆された。

### 考察

Syt4 発現抑制により非損傷群での運動機能には影響がないことから、Syt4 は正常状態での神経回路の機能には顕著な作用がないと推察された。Syt4 が損傷下で神経機能の調整を担う因子であることから、損傷による刺激を受けて発現量が増加し、その結果、神経回路の可塑的变化が誘導される可能性が推察される。今後、Syt4 の発現を増加させた際には神経回路の修復が促進するか、治療的な意義も検討していきたい。

### 結論

神経細胞に高発現する Syt4 は内在性の神経回路の修復力維持を支える分子である。

## 分担研究報告

(課題名) AI を用いた精神神経疾患の研究  
(所属) (国研) 国立精神・神経医療研究センター 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。

### 研究の目的

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。

### 研究の方法

本研究では、遺伝子・分子情報、脳波 (EEG)・皮質脳波 (ECoG)・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、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

深層ニューラルネットワークを用いた、教師あり・教師なし学習を用いて、ヒト構造 MRI、安静時機能的 MRI、およびヒト以外の霊長類皮質脳波 (ECoG) などの高次元データ・時系列データの解析手法の開発を行った。抽出した特徴量に対して、線形回帰モデルを用いて精神疾患の診断・症状の予測を行うことで、抽出特徴量の有効性を評価した。さらに、深層学習のスタイル変換技術を用いて、MRI 画像の施設間差を取り除く手法、および人工的に精神疾患画像を生成手法の開発を行った。

マカクザルの ECoG に対して、教師有り深層ニューラルネットワークを用いた麻酔状態・覚醒状態の判別学習を行い、説明可能 AI (XAI) 手法の一つである SmoothGrad 法を用いて、注目周波数領域の可視化手法を開発した。

### 考察

本研究で開発した高次元データからの特徴量抽出・解析技術は、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。

### 主な発表論文等

1. Wang C, Li Y, Tsuboshita Y, Sakurai T, Goto T, Yamaguchi H, Yamashita Y, Sekiguchi A, Tachimori H. A high-generalizability machine learning framework for predicting the progression of Alzheimer's disease using limited data. *Npj Digital Medicine*, 5(1), 1–10.
2. Uchida Y, Hikida T and Yamashita Y,

Computational Mechanisms of Osmoregulation: A Reinforcement Learning Model for Sodium Appetite. *Front. Neurosci.* 16:857009

3. Idei H, Ohata W, Yamashita Y, Ogata T, Tani J. Emergence of sensory attenuation based upon the free-energy principle. *Sci Rep* 12, 14542, 2022Aug. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18207-7>.
4. Noda K, Soda T, & Yamashita Y, Emergence of Number Sense in Deep Multi-modal Neural Networks. *PsyArXiv*.2022Aug.



## 分担研究報告

(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) (国研) 国立精神・神経医療研究センター病院 脳神経外科

分担研究者 (氏名) 岩崎 真樹

(所属) (国研) 国立精神・神経医療研究センター病院 病院脳神経外科

協力研究者 (氏名) 飯島 圭哉

## 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、45例に *BRAF*V600E 変異を、7例に *FGFR1* 変異を認めた。その他の稀な遺伝子異常を12例に認めた。18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

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) 精神神経疾患における、細胞外小胞 (EVs) の機能解明に向けての新技术創生  
(所属) (国研) 国立精神医療研究センター  
(氏名) 土肥 栄祐

### 緒言

精神神経疾患は、多くが症候群として臨床的に分類されており生物学的なメカニズムが不明な点が多い。理由の一つとして病態の首座である中枢神経系の機能は脳領域・脳回路によりもたらされており、機能的評価と同時に、分子や物質に基づく生物学的評価が困難な点にあると考えられる。近年、多くの疾患でバイオマーカーとしての有用性が注目を集めている細胞外小胞 (EVs) は、細胞から放出される脂質二重膜で構成されており、核酸、脂質、タンパクなど細胞構成要素を内包する。直接脳組織を取ることが困難な精神・神経疾患であるが、末梢循環中から中枢神経由来 EVs を検出・解析し、中枢神経の状態を推定が可能であれば、他の機能的評価法と相補的に用いることでより深い精神神経疾患の理解に繋げることができる。

本研究では、EVs のバイオマーカーとして応用する技術を開発するために、①末梢循環中 EVs 検出における内包物のターゲット選定、②EVs 一粒子解析技術の開発を行なった。

### 方法

#### ①末梢循環中 EVs 検出における内包物のターゲット選定

EVs の表面抗原を用いることで産生細胞を選定出来る可能性が指摘されている。そのため、既報の循環血液中 EVs の質量分析結果から膜貫通ドメインを持つ遺伝子の検討を行なった。また、内包物のターゲットとして EVs 内に豊富に存在することが知られている miRNA の選定を既報のデータセットを用い行なった。

#### ②EVs 一粒子解析技術の開発

EVs は General なマーカーが存在せず、同じ細胞から放出されたものでも、個々の粒子ごとの異質性が知られておりバルクでの解析では限界がある。そのため、一粒子解析技術を開発に取り組んだ。具体的には、miRNA をターゲットとした分子ビーコンを作成し、EVs の表面抗原の標識と、分子ビーコンによる内包物の同時検出を、NanoFCM を用い行なった。

### 結果

①これまでの既報の人の末梢血中の EVs 質量分析の結果から、精巣、中枢神経などの組織由来タンパクが末梢血中 EVs の上位に存在し、膜貫通ドメインを持つ遺伝子は組織ごとにカタログを作成した。また miRNA は、質量分析より報告数が多いものの、コントロール群であっても発現上位の miRNA に一貫性が乏しく複数のターゲットを設定した。

②Size-exclusion chromatography にてヒト血漿由来 EVs を収集し Ultrafiltration にて濃縮後に事前調査にて設定した miRNA に対し、分子ビーコンを用い一粒子レベルでの検出を NanoFCM にて行なった。当初のデザインでは EVs のうち 1%程度の検出であったが、EV 膜透過性の調整により 4%程度まで検出された。表面抗原と内部 miRNA の同時検出は可能であったが、条件検討を積める必要がある。

### 考察

質量分析の結果身よると血中を循環する EVs の由来組織には傾向があり、中枢神経由来タンパクが多く認められたことは中枢神経⇨末梢に向けてのシグナルが存在する事が示唆されるが、現状では生物学的な意義は現時点では明らかではない。また、miRNA の結果に関して一貫性がないのは既報のケースコントロール研究のバイオマーカー候補に関しても同様に一貫性に欠けている。これはサンプルの状態や miRNA の日内変動をなどの影響が考えられるが、Bulk 解析では観察が困難な

現象であると考えられる。

## 結論

血液循環中 EVs のタンパクに、miRNA の結果からは生物学的な意義が不明な点や、一貫性に乏しい結果がある。より深い EVs の臓器-臓器間の情報伝達を理解するためには、組織特異的な EVs のラベリングと共に、それらの一粒子解析技術などによる EVs の仔細な解析が求められる。またごく少量の生体サンプルからの EVs 解析も、日内変動の解析には重要な因子となりこの点も考慮に入れる必要がある。

## 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 *in vivo* 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・経費を要するため、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及びその抑制分子を同定することを目的に、ショウジョウバエモデルを用いて研究を行った。

## 方法・結果・考察

昨年度までに樹立した異常伸長 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。交配により異常伸長 GGGGCC リピート配列と候補 RBP を共に複眼に発現させ、

複眼変性に対する修飾効果を指標にスクリーニングを行った。その結果、ALS 関連タンパク質 FUS が複眼変性を顕著に改善させることを明らかにした。FUS はリピート RNA の発現量を減少させずに、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) の産生を抑制した。

次に、FUS がグアニン四重鎖構造 (G4 構造) を保持する RNA への結合親和性が高いことに着目し、GGGGCC リピート RNA が形成する G4 構造を標的とするその他の RBP の病態修飾効果について、同様に検証した。その結果、EWSR1, DDX3X, DDX5, DDX17 が FUS と同様に、リピート RNA の発現量を変化させずに DPR 産生を抑制し、疾患モデルショウジョウバエの複眼変性を改善させることを発見した。

## 結論

以上の結果から、FUS をはじめとする G4 構造を標的とした RBP は GGGGCC リピート RNA に結合し、RAN 翻訳を抑制し、複眼変性を抑制すると考えられた。

## 参考文献 (業績)

Fujino Y, et al. *eLife*, 12:RP84338, 2023.

## 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 マウス脳からミクログリアを単離し、シングルセル (sc) RNA-seq 解析を行った。

### 方法

野生型、MeCP2KO、TLR9/MeCP2WKO マウスとミクログリア特異的に EGFP を発現するトランスジェニックマウス (Iba1-EGFP マウス) との交配を行った。この交配により得られたマウスから脳を単離し、EGFP の蛍光を指標にミクログリアを単離し、scRNA-seq 解析を行った。

### 結果

scRNA-seq 解析の結果から、野生型マウスと比較し、MeCP2KO マウスではミクログリ

アの活性化に伴い炎症性サイトカインの発現が増加していることがわかった。さらに、MeCP2KO マウスと比較し、TLR9/MeCP2WKO マウスでは炎症性サイトカインの発現が減少していることがわかった。

### 考察

本研究により、TLR9 の欠損により MeCP2KO マウス脳内のミクログリアの異常活性化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、ミクログリアの活性を抑制するミノサイクリン、TLR9 阻害剤、ミクログリア機能性分子 (炎症性サイトカイン等) に対しての阻害抗体やシグナル阻害剤を MeCP2KO マウスに投与し表現型が回復するかを検討し、治療法の開発を目指す。

## 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 1q21.1 領域は、その欠失・重複が自閉スペクトラム症・統合失調症に関係することで知られている。共通の表現型の他に、1q21.1 欠失・重複は逆の表現型を有している。すなわち 1q21.1 欠失は小頭症、1q21.1 重複は大頭症を示す。しかしながら、その分子的・細胞的メカニズムは知られていない。

本研究目的は 1q21.1 欠失・重複の表現型の分子メカニズムを明らかにすることである。

### 方法

CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集技術を組み合わせた次世代染色体工学的手法を利用して、ヒト多能性幹 (ES) 細胞を用いて、ヒト染色体 1q21.1 欠失・重複 (CNV, copy number variation) 細胞モデルを作製した。また、本 ES 細胞モデルを用いて、2D 神経細胞及び 3D オルガノイドに分化させた。それらのサンプルを用いて、免疫組織化学を含む形態学的解析、MEA (マルチ電極アレイ) を用いた電気生理学的解析、さらにはシングルセル RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析を行った。

### 結果

1q21.1 上の約 840Kb の欠失・及び重複 ES 細胞モデルの構築に成功した。分化させて NPC(neural precursor cell) オルガノイド及び皮質オルガノイドにおいて、野生型に比べて 1q21.1 欠失では半径が小さく 1q21.1 重複では大きくなっていたが、細胞の大きさには違いがなかった。TBR2, NCAM1, MAP2 などの神経分化マーカーの発現を調べたところ、

1q21.1 欠失では分化マーカーの発現が高く、1q21.1 欠失では神経の成熟度が高く、1q21.1 重複では逆に成熟度が低いことが観察された。また、1q21.1 欠失・重複いずれにおいても、スパイク発火の上昇が見られた。さらに、シングルセル RNA-seq の結果では、1q21.1 欠失・重複のそれぞれが神経分化の速度と方向性に違いを示した。1q21.1 欠失では、GABA 神経関連遺伝子の発現が上昇し、成熟した状態にあり、1q21.1 重複ではグルタミン酸関連分子が多く、未分化で増殖状態にあることが明らかとなった。

### 考察

ヒト染色体 1q21.1 欠失・重複 (CNV) 細胞モデルは臨床表現型と相関する。

### 結論

CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集技術を組み合わせた次世代染色体工学的手法を利用して、ヒト染色体 1q21.1 欠失・重複 (CNV) 細胞モデルを作製し、解析した。

### 参考文献

1. Nomura Y et al, BioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.13.460033>

## 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 医生物学研究所

(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、神経幹細胞の性質がどのように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・改良し (Yamada et al. *Cell Reports*, 2018, Yamada et al., *iScience*, 2020, Nagasaki et al., 2023)、光操作技術を培養神経幹細胞に導入することで、分化運命決定因子 *Ascl1* の発現を光操作した。細胞増殖や細胞分化を誘導して 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 *Ascl1* 下流遺伝子の同定や遺伝子ネットワーク解析を実施した。また、Bone Morphogenetic Protein (BMP) によって培養神経幹細胞を休眠状態にし、*Ascl1* を光操作することで、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 システムを用いて、*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)。

### 結果

培養神経幹細胞において、*Ascl1* 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。様々なタイムポイントにおいて細胞を回収し、RNA シークエンス解析を行い、*Ascl1* 下流遺伝子の探索や遺伝子ネットワーク解析を実施した。また、BMP を用いて神経幹細胞を休眠状態にし、*Ascl1* を光操作して、活性化状態あるいはニューロン分化が促進できるかを検討した。また、*DCX-Cre* や *Tubb3-Cre* マウスと蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスとを掛け合わせて、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。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って *Ascl1* 下流遺伝子を探索し、*Ascl1* 発現に対する応答性の違いにより、*Ascl1* 下流遺伝子を分類した。*Ascl1* 下流遺伝子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。今後は *Ascl1* 下流遺伝子の発現パターンやこれらが構成する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することができるのではないかと考えられた。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 を用いて培養神経幹細胞を休眠状態にし、培養細胞レベルでの検証を行った。休眠状態の細胞においても、*Ascl1* 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、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同定、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. \*Nagasaki C. S., Fukuda D. T., Yamada M., Suzuki III. Y. Kakutani R., Guy. T. A., \*Imayoshi I., Enhancement of Vivid-based photoactivatable Gal4 transcription factor in mammalian cells. *Cell Structure and Function*, February 8,48(1):31-47, 2023.
2. \* Inoue U.Y., Morimoto Y., Yamada M., Kaneko R., Shimaoka K., Oki S., Hotta M., Asami J., Koike E., Hori K., Hoshino M., Imayoshi I. and \*Inoue T.; An Optimized Preparation Method for Long ssDNA Donors to Facilitate Quick Knock-In Mouse Generation, *Cells* 2021, 10, 1076.
3. Yamada M., Nagasaki C. S., Suzuki Y., \*Imayoshi I.; 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
4. Yamada M., Suzuki Y., Nagasaki C. S., Okuno H., \*Imayoshi I.; 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) マルチオミクスデータ解析による小脳発生・発達機構の解明

(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

脳は、進化の過程で複雑化・大型化した組織であり、その結果、高次機能などの能力の獲得につながったと考えられている。例えばヒトの場合、大脳皮質が著しく拡大したことが、特徴的な高次機能の獲得に寄与したと考えられている。しかしながら、複雑で拡大した脳がどのような分子メカニズムによって形成されたのかに関しては、未だに不明である。この問題を解決することは、生物進化の過程で高次機能がどのように獲得され、脳の多様性がどのように獲得されるのかという謎を解明する上で極めて重要である。小脳は、全神経細胞の70%以上が存在する脳領域である。近年、ヒトを対象とした脳機能イメージングやモデルマウスの研究結果から、小脳が報酬の予期・言語機能といった認知機能と密接に関連していることが明らかになっている。興味深いことに、小脳を構成する神経細胞の数や小脳皮質の大きさは、進化の過程で急速に増加することが明らかになっており、小脳の拡大が高次機能の獲得に重要な役割を担っていることが示唆されている。しかしながら、小脳を構成する細胞群がどのように発生し、機能しているかは未だ完全には理解されていない。

本研究では、最先端の遺伝子発現解析技術である single cell RNAseq の解析を通して、小脳を構成する神経細胞の発生に関わる分子メカニズムや、機能が未知の細胞の解析を行う。

## 方法

公共の成体マウスの single cell RNAseq(scRNAseq)データを取得し、発生ステージごとに、小脳顆粒細胞を抽出した。次に、小脳顆粒細胞において特徴的な遺伝子モジュールを決定し、それぞれのモジュールの発現を調べた。最終的に神経細胞の産生に関わるモジュールに着目し、GO 解析などを行なった。

## 結果

本年度は、小脳顆粒細胞の発生を制御する分子メカニズムを明らかにするために、公共の scRNAseq データから抽出した小脳顆粒細胞に対して、モジュール解析を行い、複数の遺伝子モジュールの同定を行なった。興味深いことに、そのうちの一つは、中間型神経前駆細胞を介した神経細胞産生においてのみ発現が見られるモジュールであった。これを Indirect module と呼ぶ。Indirect module はヒトにおいても類似した発現パターンを示した。Indirect module の GO 解析を行うと、neurogenesis に関係するモジュールを同定できた。

## 考察・結論

本年度に同定することができたモジュールは、中間型神経前駆細胞を介した神経細胞産生において機能するモジュールであり、進化的に高度に保存されていると考えられる。このモジュールの発現を制御する分子機構を調べることで、進化的な皮質拡大機構を制御する分子基盤が明らかになることが想定される。

## 参考文献(業績)

1. Nakamura Y, Miyashita S, et al. Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord. *Elife*. 2023
2. Nakata S, Miyashita S, et al., Epigenetic upregulation of *Schlafen11* renders WNT-

and SHH-activated medulloblastomas  
sensitive to cisplatin. *Neuro Oncol.* 2022

## 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 neurological, psychiatric and muscular 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 (1) valuable information accumulated in the bioresource bank of NCNP, (2) a novel platform for big data analyses, and (3) our advanced protocols for genome editing or transgenesis, our group aims at development of 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), Eisuke Dohi (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 hundreds of disease model mouse lines. Dr. Iwasaki's group surgically collected human brain samples from epileptic patients in the NCNP hospital in an ethically approved manner to establish the beneficial bioresource bank with RNA-seq and DNA methylation data for public.

As for studies and modeling of psychiatric diseases, Dr. Hoshino's group found novel synaptic function of DSCAM interacting with GLAST expressed among surrounding astrocytes. They also revealed the role of Auts2 to suppress Robo1 expressions, promoting cell divisions of cortical intermediate progenitors. Dr. Mi Yamada's group realized the role of oxytocin signaling in the insula for processing the social but not the physical stress. 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 MeCP2 dependent mechanisms of Rett syndrome. Dr. Takumi's group introduced the valuable methodology in editing huge genomic territory to recapitulate intricate ASD pathology and novel protocols to multi-dimensionally analyze the pathology.

Regarding studies and modeling of neurological diseases, Dr. Wakatsuki's group revealed the possible role of Vault complex in neural circuit formation, maintenance and modification. Dr. Muramatsu's group screened molecules involved in neural circuit repair processes to identify several candidates including Syt4. 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 CRISPR/Cas9 based genome editing methods to finally achieve the optical control of adult neurogenesis. Dr. Dohi's group tried to verify multiple roles of extra-cellular vesicles *in vivo*.

For muscular diseases, Dr. Noguchi's group comprehensively modeled mutations identified from various familial muscular diseases by using the CRISPR/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 big data 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 evaluate the mechanism of indirect neurogenesis in the mouse cerebellum.

We held the online annual meeting where the results of our research were reported on Nov. 8, 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.