

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

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・企業との共同研究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目指した。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った。

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

研究成果

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、脳型ジストロフィンである DP140 の欠損を原因とする扁桃体・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り、Exon skipping 法による遺伝子治療によってこのフェノタイプが治療可能で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分担研究者の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、また分担研究者の野口らと神経突起形成制御に関する共同研究を開始したことを挙げる。開始した共同研究については研究費共同申請を進めている。

精神疾患・発達障害に関しては、研究代表者グループは、上記のほか、主要な 3 つの成果を挙げた。

①自閉症スペクトラム障害 (ASD) 発症リスクとしての Na-H Exchanger(NHE)5 の発現低下 : NHE5 は主として神経細胞の Endosome/Lysosome 膜上に発現し、小胞内部の

酸性度を調節する蛋白であり、NHE5 欠損マウスでは Lysosome の酸性化障害によって引き起こされるシナプス膜・シナプス関連蛋白のリサイクリング障害により、神経回路形成期のシナプス剪定異常・未熟なシナプスの過剰な残存が生じ、ASD 様とされる社会性行動異常が観察される。本研究では、神経細胞での Angiotensin II 受容体シグナルが NHE5 の分解を誘導することによって NHE5 発現低下を惹起するという機序により、出生前の母体の高血圧が ASD リスクとなり得ることを、遺伝的高血圧モデルマウスのフェノタイプ解析により示した（論文投稿中）。

②ユビキチン・プロテアソーム系（UPS）依存的蛋白分解の神経発達・回路形成への寄与：UPS によるシナプス構成蛋白の発現調節は、シナプスの形成維持に不可欠であり、シナプス領域に発現するいくつかの E3 ユビキチンリガーゼに関し、欠損による精神疾患・発達障害様のフェノタイプが生じることが報告されている。本研究では、ほぼ全ての神経細胞に発現する E3 である ZNRF1 の欠損モデルマウスが示す、不安様行動・恐怖条件付けにおける異常といった精神疾患様フェノタイプの発現機序として、生後発達過程における GSK3B 活性調節を介した電位依存性 Na channel の発現調節など軸索起始部の形成異常による活動電位の変化、ならびに胎生期における大脳皮質層構造の形成異常があることを明らかにした。

③シナプス形成機序を制御する新たな翻訳後修飾機序：ヒト染色体 16p11.2 領域の～600Kb の欠損は、ASD の遺伝的要因として最も高頻度であるとされている。この領域に存在する個別の遺伝子の欠損モデルの中で、脳発達における形態的異常が見つかった唯一の遺伝子は major vault protein (MVP) である。MVP は非常に大きな多量体を形成し、vault RNA と呼ばれる non-coding RNA と結合している。我々はこれまでに、シナプス形成期において MVP が Aurora A 依存的リン酸化による構造変化により vault RNA を放出すること、vault RNA はリン酸化酵素 MEK1 に結合することで MEK1 を活性化し、

MAPK 経路活性化によるシナプス形成誘導を行うことを示した。本研究では、Aurora A 活性化機序として、細胞内の酸化ストレス依存的なグルタチオン化修飾があることを示した。Aurora A の C290 グルタチオン化は、Aurora A の 2 量体形成による自己リン酸化による活性化を誘導し、シナプス形成を活性化すると考えられた。システイン残基のグルタチオン化は多くのシナプス関連蛋白に幅広く観察され、多くの酵素の活性制御においてリン酸化と類似した意義を持つ可能性が考えられた。

神経変性の分子機序に関する主要な成果としては、分担研究者である大木を中心とする、神経変性疾患の 2 段階細胞傷害機序の解明を挙げる。長鎖散在反復配列 (Long interspersed nuclear element-1, LINE-1, L1) は、トランスポゾン由来配列として、現生人類のゲノム中で転移を起こし得るエレメントであることが知られており、細胞増殖などゲノム複製が起こる際に転移が起こる可能性がある。神経細胞は一般に Postmitotic であるが、神経変性疾患などストレス下にある神経細胞では細胞周期の亢進が報告されている。

本研究において大木らは、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、これに伴って生じるゲノム DNA の架橋や二本鎖切断に対して、通常作動する Fanc ファミリーや Brcal などの DNA 修復関連因子が神経変性疾患では作動しないことから、L1 転移が神経細胞自律的な細胞死に繋がることを示した。また L1 転移はアルツハイマー病モデルである 5x FAD マウス脳や ALD モデルである変異 SOD1 過剰発現マウス脊髄にも認められることを明らかにした。これらのことから、神経変性疾患においても L1 転移による細胞死機序が働いているものと考えられた。

さらに、EAE マウスでは L1 がコードする ORF1 蛋白がプロトタイプ抗原となって、神経細胞障害性の Eomes 陽性 Th 細胞を活性化し、グランザイム B 依存性の神経細胞死を引き起

こす現象が観察されることを示した。この Eomes 陽性 Th 細胞の増加は、炎症性疾患モデルである EAE マウスのみならず、5x FAD マウス脳や変異 SOD1 過剰発現マウス脊髄、更には ALS 患者と AD 患者の末梢血でも増加が認められたことから、この炎症性細胞傷害機序についても広く神経変性疾患における意義が想定できる。実際、これらの機序に基づき、変異 SOD1 過剰発現へのレトロ転位阻害剤(3TC)投与、あるいは 5x FAD マウスにおけるグランザイム B 遺伝子欠損により、神経細胞障害が有意に改善することを見出した。また、L1 転移が惹起する別の炎症機序として、L1 転移により生じる RNA - DNA ハイブリッドが自然免疫系を活性化し、cGAS-STING 依存性の IFN-I 産生を強く誘導するが、これが T 細胞の Eomes 発現を誘導することを見出し、IFN-I シグナルの阻害により神経変性病態が改善することを示すデータを得た。この「L1 転移による運動神経細胞障害—Eomes 陽性 Th 細胞活性化による炎症性細胞障害」の二段階神経細胞障害機序は、AD、ALS といった異なる機序によると考えられてきた神経変性疾患に共通する病態機序として、新たな治療法開発に寄与する可能性がある。

野口は、ASD のシナプス病態の理解を目的とし、マーモセットもしくはマウスの妊娠母体へのバルプロ酸投与による産仔の ASD モデルの大脳皮質組織から、シナプス領域の蛋白・核酸を含む synaptoneurosome(SN)を取得する条件を最適化し、SN 中の蛋白・核酸の発現解析を開始した。この手法により、マーモセットでは、大脳皮質における発現が知られていなかったオキシトシン受容体がマウスと同様に発現していることを示した。また、2 光子顕微鏡を用いた観察に適する「シナプス活動検出プローブ」の作成を進めている。

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った。自身の研究としては、彼らが得意とする「ミクロト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 次元再構築技術」を活用し、髄鞘化機序と脱髄疾患に関する基礎的研究を実施した。具体的には、①単一のオリゴデンドロサイトの異なる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が、オリゴデンドロサイト毎に偏っており、またランビエ絞輪を隔てて隣接する髄鞘を比較した結果、隣り合う髄鞘の厚み、そしてその部位の軸索径には相関関係があることを示した。また、脳領域によってオリゴデンドロサイトは形態・機能的に異なる軸索を選好して髄鞘を形成する傾向が発生過程で確立されることを、小脳白質をモデルに示した。

②脱髄疾患における軸索障害と神経細胞内オルガネラ、特にミトコンドリアの動態の変化および役割についての解析を行った。、内包へのリゾレシチン注射による脱髄モデルでおこる運動機能の低下がミトコンドリア分裂抑制によって改善すること、電子顕微鏡画像上で軸索の Swelling 数が減少することを見出していた。③神経活動と髄鞘化の関連に関する検討を、視神経をモデルに行い、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し、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

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の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自閉症スペクトラム障害 (ASD) 発症リスクとしての Na-H Exchanger (NHE)5 の発現低下: NHE5 は主として神経細胞の Endosome/Lysosome 膜上に発現し、小胞内部の酸性度を調節する蛋白であり、NHE5 欠損マウスでは Lysosome の酸性化障害によって引き起こされるシナプス膜・シナプス関連蛋白のリサイクリング障害により、神経回路形成期のシナプス剪定異常・未熟なシナプスの過剰な残存が生じ、ASD 様とされる社会性行動異常が観察される。本研究では、神経細胞での Angiotensin II 受容体シグナルが NHE5 の分解を誘導することによって NHE5 発現低下を惹起するという機序により、出生前の母体の高血圧が ASD リスクとなり得ることを、遺伝的高血圧モデルマウスのフェノタイプ解析により示した (論文投稿中)。

②ユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) 依存的蛋白分解の神経発達・回路形成への寄与: UPS によるシナプス構成蛋白の発現調節は、シナプスの形成維持に不可欠であり、シナプス領域に発現するいくつかの E3 ユビキチンリガーゼに関し、欠損による精神疾患・発達障害様のフェノタイプが生じることが報告されている。本研究では、ほぼ全ての神経細胞に発現する E3 である ZNRF1 の欠損モデルマウスが示す、不安様行動・恐怖条件付けにおける異常といった精神疾患様フェノタイプの発現機序として、生後発達過程における GSK3B 活性調節を介した電位依存性 Na channel の発現調節など軸索起始部の形成異常による活動電位の変化、ならびに胎生期における大脳皮質層構造の形成異常があることを明らかにした。

③シナプス形成機序を制御する新たな翻訳後修飾機序: ヒト染色体 16p11.2 領域の～

600Kb の欠損は、ASD の遺伝的要因として最も高頻度であるとされている。この領域に存在する個別の遺伝子の欠損モデルの中で、脳発達における形態的異常が見つかった唯一の遺伝子は major vault protein (MVP) である。MVP は非常に大きな多量体を形成し、vault RNA と呼ばれる non-coding RNA と結合している。我々はこれまでに、シナプス形成期において MVP が Aurora A 依存的リン酸化による構造変化により vault RNA を放出すること、vault RNA はリン酸化酵素 MEK1 に結合することで MEK1 を活性化し、MAPK 経路活性化によるシナプス形成誘導を行うことを示した。本研究では、Aurora A 活性化機序として、細胞内の酸化ストレス依存的なグルタチオン化修飾があることを示した。Aurora A の C290 グルタチオン化は、Aurora A の 2 量体形成による自己リン酸化による活性化を誘導し、シナプス形成を活性化すると考えられた。システイン残基のグルタチオン化は多くのシナプス関連蛋白に幅広く観察され、多くの酵素の活性制御においてリン酸化と類似した意義を持つ可能性が考えられた。

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。ZNR1 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 ZNR1 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。

神経細胞内外の環境変化が細胞突起構造の変化に翻訳されるメカニズムとして、本研究で見出した酸化還元状態の変化による蛋白のグルタチオン化修飾の意義を引き続き検討し、シグナルとしての意義を明らかにする。

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 Dpl40 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 (Duchenne Muscular dystrophy: DMD) は X 染色体上にある DMD 遺伝子の変異により発症する難治性筋疾患である。ジストロフィン脳にも広く発現し、脳のジストロフィン欠失により約 30% の患者は不安障害といった中枢神経症状を呈する。DMD 遺伝子には複数のジストロフィン・アイソフォーム (Dp) が存在する。全長型の Dp427 を欠損する mdx マウスは恐怖応答の異常な亢進を示すことが報告されている (Sekiguchi et al., 2009)。しかしながら、Dp427 欠損に伴う中枢神経症状の発症機序については未だ不明である。

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。本研究では、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 欠損に伴う中枢神経症状を精査のうえ、発症分子機序を解明することを目標とした。

方法・結果

ウェ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、複数

の自律神経系のパラメータ異常が示唆された。以上から、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。現在、扁桃体におけるシナプトソーム解析により、情動行動異常に関与する分子の同定作業を行っている。並行して、健常者とデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の尿由来細胞から iPS 細胞を樹立する技術を確認した。

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 の中枢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.doi: 10.1016/j.pneurobio.2022.102288.
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
3. hyaprakash C, Kunitake K, Aoki Y :Editorial: Challenges and Opportunities for Neuromuscular Disease Modelling

Using Urine-derived Stem Cells. *Front
Physiol.* 13:848220, 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・疾病研究第六
部

緒言：神経変性疾患の病態機序は依然として不明であり、有効な治療薬も得られていないことを考えるに、病態機序の根本的な捉え直しが必要と考えられる。私たちは、神経変性を伴う二次進行型多発性硬化症 (SPMS) の神経細胞障害の病原性因子として Eomes 陽性 Th 細胞を同定した。神経変性病態の形成過程における同細胞のより普遍的な関与を示すために、筋萎縮性側索硬化症(ALS)やアルツハイマー型認知症(AD)のマウスモデル、およびそれらの患者を対象として同細胞の挙動を解析し、神経変性疾患に共通する病態機序の全容解明を行う。これまでに慢性炎症環境下の神経細胞が異所性に発現するレトロトランスポゾン LINE-1 由来の ORF1 タンパク質が、Eomes 陽性 Th 細胞の活性化抗原であることを見出した。ORF1 タンパク質の供給は先行する神経細胞死を必要とすることから、並行してこの自律的な神経細胞死と LINE-1 再活性化の関連を解析し、神経変性疾患の神経細胞障害が、自律的神経細胞死と免疫依存性神経細胞障害により生じるという二段階病態仮説を提唱している。本研究は、これまで個別の解析が主流であった神経変性疾患に共通する普遍的な病態機序を解明することで、いまだ有効な医薬品が存在しない神経変性疾患群の、画期的な治療法開発を可能にする病態理解と新規治療標的の同定と評価を目的とする。

方法・結果：

研究開始当初、NR4A2cKO マウスの EAE で認められる後期 EAE 病態の病原性細胞として、転写因子 Eomes を発現し、細胞障害性を獲得したユニークなヘルパーT(Th)細胞 (Eomes 陽性 Th 細胞) を同定したこと、およびこの後期 EAE 病態が神経変性を伴う二次進行型多発性硬化症(SPMS)相当であることを示したこと (Nat Commun 2015)を皮きりに、Eomes 陽性 Th 細胞による免疫依存性神経細胞障害の分子機序の解明を目指して研究を進めた。その後の MS 患者の大規模解析から、末梢血中の Eomes 陽性 Th 細胞頻度 (Eomes 頻度) が、SPMS 患者に局限して著増し、病態進行度 (EDSS の変化量) と相関することを明らかにし、疾患バイオマーカーとしての Eomes 頻度の意義を示した(PNAS2021)。SPMS 患者の死後脳では、normal appearing white matter(NAWM)を含む脳内の広範な領域に、Granzyme B 陽性 Eomes 陽性 Th 細胞が広く分布することが示され、病原性因子としての Eomes 陽性 Th 細胞の意義を示唆する結果が得られた。

そこでより広範な神経変性病態における Eomes 陽性 Th 細胞の機能を解明するため、ALS モデルマウス(mSOD1)および AD モデルマウス(5xFAD)を追加して、より普遍的な神経変性病態の病原性因子としての同細胞の役割を解析した。その結果、神経変性に伴う慢性炎症環境に長く晒された神経細胞では、レトロトランスポゾン LINE-1(Long interspersed nuclear element-1, L1)の顕著な脱抑制 (再活性化) が生じ、L1 由来の ORF1 タンパク質が Eomes 陽性 Th 細胞

胞を活性化するプロトタイプ抗原として作用することで、グランザイム B 依存性の神経細胞死を引き起こすことが示された (iScience 2022)。引き続くミクログリアの解析から、神経変性病態に関連するサブセットのうち、MHC II 分子を高発現するミクログリアが、神経細胞から Trem2 依存的に ORF1 タンパク質を取り込み、Eomes 陽性 Th 細胞に抗原提示することを明らかにした。一方、神経細胞における L1 由来核酸の蓄積が、核酸センサーを活性化して炎症性サイトカインである I 型インターフェロン (IFN-I) の産生を引き起こし、インターフェロン応答遺伝子を高発現するミクログリアを誘導することを明らかにした (Cells 2023)。IFN-I を過剰産生する遺伝子改変マウス (Trex1 欠損マウスあるいは UPS18 欠損マウス) で CNS への Th 細胞の集積が認められ、その多くが Eomes 陽性/グランザイム B 陽性であった (Yeh et al. unpublished observation) が、これは IFN 受容体欠損により Eomes 発現がキャンセルされたことから IFN-I 依存性であることが示された。ALS 患者あるいは AD 患者を対象とした Eomes 陽性 Th 細胞の解析が並行して進んでおり、SPMS と同様、患者末梢血中でもグランザイム B 陽性の同細胞が有意に増加すること、罹病期間や認知機能障害などと有意に関連することなどが示された (Kanazawa et al. under review)。

Eomes 陽性 Th 細胞依存性の免疫依存性神経細胞障害は、神経細胞が産生する ORF1 タンパク質の供給を必要とするため、先行する自律的神経細胞死の分子機序を並行して解析することにした。一般に、L1 再活性化は stochastic なレトロ転移を亢進させて

ゲノムストレスの原因となることから、L1 活性化、とくにレトロ転移と自律的神経細胞死の関連を詳細に解析した。その結果、L1 レトロ転移が、DNA ダメージの蓄積などにより部分的に細胞周期が亢進した神経細胞に生じる複製フォークを標的とすることを見出した。興味深いことに、5xFAD マウスの神経細胞では、複製フォークへの L1 アタックを抑制する作用を持つ一群の DNA 損傷修復因子の発現が顕著に低下しており、L1 RNA の結合領域に生じる 1 本鎖 DNA がヌクレアーゼにより切断されて、細胞死が生じる可能性が示された。とくにがん抑制遺伝子である Brca1 が、細胞死を回避する主要な L1 抑制因子であることがわかり、『細胞周期の亢進』、『L1 レトロ転移』、『DNA 修復機構の異常』の 3 条件が同時成立することで、意図しない神経細胞死が生じることが明らかとなった。

本研究の結果から、単純なタンパク質の蓄積だけでは説明できない神経変性疾患の複雑な発症機序の一端がはじめて明らかとなった。すなわち自律的神経細胞死と免疫依存性神経細胞障害の二段階の機序が神経変性疾患の原因となることが示され、神経細胞、ミクログリアと T 細胞で独立に生じる多様な事象が、意図せぬ相互作用を介して結果的に神経細胞死を導くことが示された。

考察： 自律的神経細胞死の詳細を引き続き解析し、提唱した分子機序の普遍性を検証する。神経変性における自律的神経細胞死と免疫依存性神経細胞障害の寄与度を解析し、早期に論文として発表することで本仮説の重要性を国内外にアピールする。全く新しい病態機序である二段階病態仮説か

ら、グランザイム B や L1 レトロ転移をはじめとする種々の新規治療標的分子/細胞が得られることから、各標的分子を標的とした治療的介入による神経変性病態の抑制効果を検証し、神経変性疾患に共通して適用可能な新規治療法の探索を行う。並行して ALS や AD に止まらず神経変性疾患の対象を拡大したヒト解析を進め、仮説の強化を図るとともに病態機序の全容解明を目指す。

参考文献：

1. Ben JE Raveney, Wakiro Sato, Daiki Takewaki, Chenyang Zhang, Tomomi Kanazawa, Youwei Lin, Tomoko Okamoto, Manabu Araki, Yukio Kimura, Noriko Sato, Terunori Sano, Yuko Saito, Shinji Oki, Takashi Yamamura, Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4+ T cells in secondary progressive multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118(11):e2021818118.(2021) DOI: 10.1073/pnas.2021818118
2. 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. doi: 10.1016/j.isci.2022.104278. eCollection 2022 May 20.
3. 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; e15864. doi: 10.15252/emmm.2022158

4. Chenyang Zhang, Ben Raveney, Fumio Takahashi, Tzu-wen Yeh, Hirohiko Hohjoh, Takashi Yamamura, Shinji Oki, Pathogenic Microglia Orchestrate Neurotoxic Properties of Eomes-Expressing Helper T Cells. *Cells* 12, 868 (2023) doi.org/10.3390/cells12060868

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(以下自閉症)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因と考えられている。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、疾患の理解に資する。

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という膜小胞として抽出し、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構成する核酸・タンパク質等を解析する方法論を開発する。

自閉症モデルマウスあるいはマーモセットにおける遺伝子発現変化や、社会性刺激を動物に加えた場合の発現変化の知見を得る。その知見をもとに社会性に関係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。母猿の妊娠期間中にバルプロ酸を経口投与して得られる自閉症モデルマーモセット・マウスとコントロール動物から、投射元-投射先既知のシナプトソームを抽出し、シナプスタンパク質の発現を比較する。これにより、特定の神経回路依存的な自閉症関連遺伝子の発現の変化を捉えることができる。候補遺伝子を絞り込んだのち、その遺伝子発現の2光子顕微鏡による可視化を試み、治療薬候補の評価等を実施する。

方法・結果：

1. Synaptoneurosome シナプトニューロソーム精製の最適化

ホモジナイズした脳をショ糖勾配密度遠心分離などによって精製することで、シナプスを構成していたシナプス前部とシナプス後部の一部がつながった膜小胞として得られることが1960年頃から知られており、synaptosome (シナプトソーム)と呼ばれていた。この方法では、シナプス後部は細胞膜とそれに付着するシナプス後部肥厚(post-synaptic density; PSD)が主に得られ、シナプス後部であるスパインの大部分はシナプトソームに含まれないと考えられた。その後、ビーズを用いた脳組織の破碎とその破碎液を5ミクロンの孔径のフィルターを通すことを組み合わせること等で、シナプス後部(樹状突起スパイン)の成分をより多く含むsynaptoneurosome (シナプトニューロソームというシナプトソームの変法; 以下 SN)が得られることが示された。我々は、PSDの主要な構成タンパク質であるPSD95や、樹状突起スパインのネック部分あるいは、スパインアパラタスに含まれるタンパク質であるsynaptopodinの収率を指標に、シナプス後部の成分をより保存するように方法を最適化した。

2. マーモセット大脳皮質シナプトニューロソーム分画のオキシトシン受容体の検出

我々は、マウスあるいはマーモセットのSN分画をフローサイトメトリー法で解析し、SNが高純度で精製できていることを確認した。次にWestern blotting法を用いて予想されるタンパク質が含まれるか確認した。PSD95やsynaptopodinに加えて、オキシトシン受容体をマウス・マーモセットにおいて検出するこ

とができた。特にマーモセットでは、大脳皮質におけるオキシトシン受容体の発現は放射性ラベルの実験からこれまでほとんど無いとされており、我々の実験によって、オキシトシン受容体がマウスと同様に大脳皮質に発現していることが示された。我々の2光子顕微鏡を用いた樹状突起スパインの観察実験では、オキシトシンの慢性的な投与によって、近接したシナプス新生が抑制されることを支持するデータが得られた。今回のSNを用いた実験結果は、オキシトシンの効果が大脳皮質のオキシトシン受容体を介して生じる可能性を示唆した。

3. シナプス活動を検出するシナプスプローブの準備

例えば、シナプスに局在しカルシウムとUV光依存的に蛍光色に変化するタンパク質プローブが知られている(SynTagMA; Perez-Alvarez et al. (2020) Nat. Commun.)。このようなプローブを用いて蛍光色でSNをソーティングすることで、活動シナプス由来のSNを精製可能なのではないかと考えている。これによって、特定のタスク(社会性に関連する経験など)の直後に、活動シナプスに含まれるタンパク質や核酸がどのように変化するかを調べる。動物個体におけるベクター発現の最適化を現在実施している。

4. シナプトニューロソームが含有するRNA, タンパク質の解析

SNから含有RNAを精製することが可能であり、またSNを質量分析を共同研究先に委託することによって含有するタンパク質等を解析できる。同一のSN分画からRNAの解析とタンパク質の解析の両方を行うことにより、それらの関連を分析し、タンパク質局所翻訳の解析等につなげる。バルプロ酸曝露自閉症

モデルマウスとコントロールマウスの比較解析を現在実施中である。

考察:

1. Synaptoneurosome シナプトニューロソーム精製の最適化

シナプスの大きさや投射元神経細胞、特定のシナプスタンパク質の発現等を指標に分画してそれぞれ含有する分子の特徴を明らかにする。

2. マーモセット大脳皮質シナプトニューロソーム分画のオキシトシン受容体の検出

オキシトシン投与によってシナプスを構成するRNAやタンパク質が変化するか否かを解析する。特にオキシトシン受容体の下流に存在するMAPK(ERK)シグナルに着目する。

3. シナプス活動を検出するシナプスプローブの準備

ベクター発現の最適化を完了させ、活動依存的な構成分子の変動の解析に移行する。また、cFosやArcといったタンパク質は神経活動依存的に発現が上昇することが知られている。これらのタンパク質の発現を指標として、フローサイトメーターのソーティング機能を用いて活動神経細胞のSNを特異的に精製することを試みる。

4. シナプトニューロソームが含有するRNA, タンパク質の解析

上記で示した、特定のSNから含有RNAを精製し、質量分析結果と比較解析を行い論文報告する。特定のシナプスを蛍光色を指標にフローサイトメーターのソーティング機能を用いて分離し、質量分析で特性解析を行った結果が最近報告された。(van Oostrum et al. (2023) Cell.)。我々も方法をより洗練して、自閉症モデル動物のシナプスにおける特徴的な

性質を明らかにする。

参考文献：

1. Noguchi J, Watanabe S, Oga T, Isoda R, Nakagaki K, Sakai K, Sumida K, Hoshino K, Saito K, Miyawaki I, Sugano E, Tomita H, Mizukami H, Watakabe A, Yamamori T & Ichinohe N. Altered projection-specific synaptic remodeling and its modification by oxytocin in an idiopathic autism marmoset model. *BioRxiv*. 2022: DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.08.24.505057>.
2. Ucar H, Watanabe S, Noguchi J, Morimoto Y, Iino Y, Yagishita S, Takahashi N & Kasai H. Mechanical actions of dendritic-spine enlargement on presynaptic exocytosis. *Nature*. 2021; 600: 686–689. DOI: [10.1038/s41586-021-04125-7](https://doi.org/10.1038/s41586-021-04125-7).
3. Watanabe S, Kurotani T, Oga T, Noguchi J, Isoda R, Nakagami A, Sakai K, Nakagaki K, Sumida K, Hoshino K, Saito K, Miyawaki I, Sekiguchi M, Wada K, Minamimoto, Ichinohe N. Functional and molecular characterization of a non-human primate model of autism spectrum disorder shows similarity with the human disease. *Nat. Commun*. 2021; 12: 5388. Doi: [10.1038/s41467-021-25487-6](https://doi.org/10.1038/s41467-021-25487-6).

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：

オルガネラの動態と機能、相互作用は神経・軸索変性に重要な役割を果たしている。しかし、その構造的な特性、病態下における変化と制御機構には、不明な点が多い。本研究では髄鞘関連疾患の軸索変性および再髄鞘化による組織再生に着目し、ミトコンドリアの動態と機能、そしてミトコンドリアと小胞体の相互作用 (Mitochondria associated membranes, MAM) の構造の制御と役割を、3次元超微形態解析技術や新たな標識・操作技術の開発と応用を通じて明らかにする。発達期の髄鞘形成あるいは加齢時の髄鞘形成・再生障害における検討も行い、組織の発達と再生におけるミトコンドリアと MAM を制御する機序の理解を目指す。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、KENG-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、ミクロト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：

これまでの研究で脱髄や髄鞘の遺伝子異常によって軸索のオルガネラ異常や変性を惹起することを見出してきたが、障害の影響を受けやすい軸索の特徴については、ほとんどわかっていなかった。そこで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ことを糸口に、2021 年度には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、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の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

オリゴデンドロサイト毎に偏っていることが分かった。そして、それらの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比較した結果、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。以上の結果を総合することで、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。2023 年度にかけて、髄鞘疾患における軸索障害とミトコンドリア動態の変化および役割についての解析を行ってきた小脳白質を対象にして、各オリゴデンドロサイトの軸索特異性および軸索の機能と生存への影響を明らかにするための研究を進めた (Battulga et al. 2023)。まず、弱毒化狂犬病ウイルスによるオリゴデンドロサイトのまばらな蛍光標識、軸索マーカーによる組織全体の免疫染色法および組織の透明化を組み合わせ、マウスの小脳白質内の単一のオリゴデンドロサイトとそのミエリン鞘、被覆される軸索の種類を観察する新規技術を開発した。この技術を使って観察した結果、成体マウスの小脳では約半数のオリゴデンドロサイトがプルキンエ細胞に由来する軸索を選好して髄鞘化していることが明らかになった。3次元免疫電顕も併用した解析の結果、プルキンエ細胞軸索への選好性は、小脳白質内での髄鞘形成が始まる発生期においてより顕著であり、その時期では90%以上のオリゴデンドロサイトがプルキンエ細胞軸索を選好して髄鞘化することが分かった。さらに、タモキシフェン注射の時期以前に分化したオリゴデンドロサイトだけを蛍光蛋白で標識できるトランスジェニックマウスを用いた解析から、初期にプル

キンエ細胞軸索を選好して髄鞘化するオリゴデンドロサイトは、成体まで継続してプルキンエ細胞軸索を選好して髄鞘を形成していた。こうした一連の結果から、脳領域によってオリゴデンドロサイトは形態・機能的に異なる軸索を選好して髄鞘を形成する傾向があること、そしてこうした髄鞘形成の軸索選好性は発生過程で確立されることが明らかになった。髄鞘の選好性を解明することは、これまでに作出した細胞種・時期特異的なミトコンドリア動態操作モデルなどを用いて、髄鞘疾患の軸索障害におけるオルガネラ変化の軸索種・神経回路特異的な役割を明らかにする上での重要な基盤となる。

また、2021 度には、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が示唆され、末梢神経における軸索障害、髄鞘再生の検討に資すると考えられた。

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 (シリンダーテスト) 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. 2023)。

2023 年度にかけてこの内包脱髄モデルと独自に開発してきた生体内の時期・細胞特異的ミトコンドリア分裂抑制モデルマウス (KENG-Tet-Drp1K38A マウス) を組み合わせた、ミトコンドリアの分裂が脱髄に伴う神経機能障害に及ぼす影響を解明する研究を継続した。既にこの KENG-Tet-Drp1K38A 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、同神経細胞で時期特異的にミトコンドリア分裂を抑制できるマウス (CaMKII-Drp1K38A マウス) を作出していた。実際、神経細胞におけるミトコンドリアの 3 次元再構築による比較を行うと、CaMKII-Drp1 マウスの神経細胞体では顕著なミトコンドリアの巨大化が確認されていた。そして、内包へのリゾレシチン注射によっておこる運動機能の低下がミトコンドリア分裂抑制によって改善すること、電子顕微鏡画像上で軸索の Swelling 数が減少することを見出していた。

本研究では実際に内包の有髄軸索において、ミトコンドリアのサイズの比較を行った。その結果、大脳皮質の神経細胞体ほど顕著ではなかったが、多数の軸索におけるミトコンドリアの比較を行うと、CaMKII-Drp1 マウスの軸索ミトコンドリアの体積はコントロールに比較して大きい傾向が観察された。一方で、リゾレシチン投与後の脱髄病巣において軸索障害のマーカー (SMI32) と髄鞘 (PLP) の多重染色を行ったところ、予想に反して CaMKII-Drp1 マウスにおいても軸索障害マーカーの染色がコントロールと同様に観察された。同時に興味深いことに、髄鞘マーカーの染色がより多く認められる可能性が示唆された。この結果と前述のクレマスチン投与の研究成果 (Yamazaki et al. 2023) から、CaMKII-Drp1 マウスでは髄鞘の再形成に変化が起こる可能性が示唆された。軸索障害と同時に脱髄および再髄鞘化を比較する上では、クプリゾン投与による脳梁脱髄モデルが有用であることから (Ohno et al. PNAS 2014)、CaMKII-Drp1 マウスにおいてクプリゾン投与モデルを作製し、軸索の変性および再髄鞘化の評価を行った。ク

プリゾンの投与下で確認された脳梁の脱髄病巣において透過型電子顕微鏡による解析を行うと、軸索変性は CaMKII-Drp1 マウスでは軽減傾向はみられたが、統計的有意差には至らなかった。またクプリゾン投与では投与中も再髄鞘化が起こることが知られているが、クプリゾン投与下で脳梁における有髄軸索数には有意差を認めなかった。以上の結果から、脳梁には大脳皮質由来の交連線維が多数走行するが、これらの軸索のクプリゾン脱髄モデルでは、CaMKII-Drp1 マウスにおける大きな変化がみられない可能性が示唆された。

2021 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、2022 度に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。そ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、この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。また、こうした技術によって、髄鞘疾患において解析が困難であった神経伝導制御の形態パラメーターの評価が可能になると期待される。

本研究では連続電子顕微鏡画像からオルガネラ動態・相互作用の変化の高精度な解析を目指したが、こうした解析では対象を画像から抽出するセグメンテーションという工程が不可欠であり、この業務を手動で行うために大きなコストが必要となっていた。こうした問題の解決の一つとして、オートセグメンテーションに加えて、オルガネラの特異的な標識方法が注目されているが、そのパイプラインや有効性は確立されていない。そこで、本研究の中で古典的な金属による染色法である ZIO 染色によるゴルジ体染色をモデルに用いて、連続電顕画像におけるオルガネラ特異的染色からのオルガネラ抽出・再構築パイプラインの確立を行った (Johkura et al. 2022)。その結果、自動抽出データにおける個々のオルガネラの 3D 分割技術を使うことで、極めて高い効率でセグメンテーションと構造的パラメーターの計測が可能であることが示された。こうした技術を応用することは、今後ミトコンドリアや小胞体の膜性オルガネラの高効率な解析に資すると期待される。

また、こうしたオルガネラ特異的標識、3D 分割技術に加えて、畳み込みニューラルネットワークを使用したオートセグメンテーションにおいても複数のモデルを組み合わせることで、精度を大きく向上させられる

ことが分かった。このアプローチを用いて、加齢組織におけるミトコンドリアなどのオルガネラや有髄軸索のセグメンテーションの高速化を実現しており、オートセグメンテーションが困難な細胞突起のマニュアルセグメンテーションと組み合わせて、加齢組織における細胞形態変化を明らかにしつつある。特に軸索とその髄鞘の形態学的パラメーターやオリゴデンドロサイトの突起先端の髄鞘形成率の加齢に伴う低下を見出した。

考察：

今後は、これまでの研究で確立した光顕および電顕レベルの軸索標識や (Nakamura and Ohno et al. eLife 2023)、自動セグメンテーション・解析パイプラインを細胞・時期特異的なミトコンドリア分裂の制御系と組み合わせ、内包を走行する運動野由来の軸索に注目した、ミトコンドリア動態・オルガネラ相互作用の変化とその制御による神経機能の改善機構の解明を継続し、成果発表につなげる。同時に、こうした技術・モデルを応用し、これまでの研究成果に基づいて (Nguyen et al. 2018)、脱髄病巣より遠位部のシナプスにおけるオルガネラ変化が機能再生に及ぼす影響についても検討を進める。

また、本研究の過程で見出した髄鞘の選好性が髄鞘疾患における選択的な軸索障害につながる可能性を検証するため、選好性を有するオリゴデンドロサイトを特異的に標識できる系統 (PLP-CreERT) を応用し、これらのオリゴデンドロサイト特異的に髄鞘形成異常を惹起するマウスモデル (Myrf コンディショナルノックアウト) と組み合わせ、

軸索障害の選択性を明らかにする。一方で、この選好性は脱髄後の髄鞘再生の際に失われることを見出しており、GABA をはじめとする神経伝達物質や細胞接着分子などを介した選好性のメカニズムを検証し、選好性回復の治療的介入法の開発やその効果の解明を目指す。

髄鞘再生能が加齢に伴い低下するメカニズムの解明に向けて、本研究で見出した異常な形態をもつオリゴデンドロサイトの出現に関わるマーカーをトランスクリプトーム解析から同定し、異常細胞出現のメカニズムの解明を目指す。さらに、加齢にミトコンドリアの機能異常は深く関わることから、ミトコンドリアの機能異常がオリゴデンドロサイトの形態異常や髄鞘形成能に果たす役割を検証するため、現在作製中のオリゴデンドロサイト特異的ミトコンドリア機能異常マウス (Mitochondrial transcription factor A (TFAM) コンディショナルノックアウト) におけるオリゴデンドロサイトの形態・髄鞘形成と髄鞘再生、軸索障害への影響を明らかにする。

参考文献 (研究成果)：

1. Yamazaki R, Osanai Y, Kouki T, Shinohara Y, Huang JK, Ohno N. Macroscopic detection of demyelinated lesions in mouse PNS with neutral red dye. Sci Rep. 2021 11:16906. doi: 10.1038/s41598-021-96395-4. 査読あり
2. Tanaka T, Ohno N, Osanai Y, Saitoh S, Thai TQ, Nishimura K, Shinjo T, Takemura S, Tatsumi K, Wanaka A. Large-scale electron microscopic volume imaging of interfascicular

oligodendrocytes in the mouse corpus callosum. *Glia*. 2021 69:2488–2502. doi: 10.1002/glia.24055.

3. 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.

4. Johkura K, Usuda N, Tanaka Y, Fukasawa M, Murata K, Noda T, Ohno N. Whole-cell observation of ZIO-stained Golgi apparatus in rat hepatocytes with serial block-face scanning electron microscope, SBF-SEM. *Microscopy (Oxf)*. 2022 71:262–270. doi: 10.1093/jmicro/dfac024.

5. Yamazaki R, Osanai Y, Kouki T, Huang JK, Ohno N. Pharmacological treatment promoting remyelination enhances motor function after internal capsule demyelination in mice. *Neurochem Int*. 2023 164:105505. doi: 10.1016/j.neuint.2023.105505.

6. Battulga B, Osanai Y, Yamazaki R, Shinohara Y, Ohno N. Axonal selectivity of myelination by single oligodendrocytes established during development in mouse cerebellar white matter. *bioRxiv*, 2023 doi: <https://doi.org/10.1101/2023.10.03.560586>.

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