

## 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著しく低下した。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。具体的にはまず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に導入することで、統合失調症、自閉スペクトラム障害、てんかん、Rett 症候群などの各種精神疾患、ALS、パーキンソン病等の各種神経変性疾患、遺伝性筋疾患などの各種神経筋疾患の動物モデルを、それぞれ作出した。次に、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、各種疾患の病態を理解し、これら疾患モデルの症状改善に有効な薬剤の体系的な探索などを通して、新たな治療法の開発をめざした。さらには医療新時代に対応するためにインシリコ解析・人工知能 (AI) 解析基盤をセンター内で醸成させることを目標とした。

#### 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 ~R5.3)

古家 宏樹 (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 R5.4~)

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)

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)

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)

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)

宮下 聡 (新潟大学脳研究所システム脳病態学分野 ~R5.5→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 R5.5~)

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所)

#### 3. 研究成果

##### 1. バイオリソース・技術開発研究・動物行動解析プラットフォームの提供

(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・修飾技術を用いた疾患モデルマウスの作出 (3 年間で遺伝子改変マウス 331 系統を作出完了) と解析基盤 (NCNP 内の網羅的動物行動解析実験の基盤整備も含む) のアップデートを進めた (井上高)。(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

に迫る基盤が整えられた（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 とその類縁遺伝子 Dscam の組織特異的ノックアウトや各種疾患型変異導入マウスを用いた解析（星野）、(4)うつ病発症の要因である心理的ストレスが行動変容を生じさせる過程における神経基盤を明確にする研究（山田光・古家）、(5) ミクロオートファジーによるタンパク質や 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) 次世代染色体工学的手法を用いて、自閉スペクトラム障害の原因となるコピー数多型 (CNV) の網羅的マウス ES 細胞モデルライブラリーを構築し、その病理神経基盤の解明に繋げる研究（内匠）、を進めた。

**3. 神経疾患研究** (8) 神経突起の変容機構の鍵分子として同定したユビキチンリガーゼ ZNF1 とナトリウム・プロトン交換輸送体 NHE5、非コード RNA である vault RNA の機能解析を通して神経回路の形成と維持、変容の分子基盤に迫る基礎研究（若月）、(9) 中枢神経障害後の神経回路修復メカニズムの探索から神経変性疾患の新規修復薬剤開発を行う研究（村松）(10) ALS で最も高頻度な遺伝的原因である *C9orf72* 遺伝子非翻訳領域内の GGGGCC リピート配列異常伸長現象をショウジョウバエで再現することからその病態解明を目指す研究（永井）、(11)マウス成体脳における神経細胞新生を支える転写カスケードの網羅的解析から新生過程の外因的制御をめざす研究（山田真）、(12)細胞外小胞を介した脳と末梢臓器間のコミュニケーションをマウスの遺伝学的手法により可視化し明確にする研究（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再現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) 生体内で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 (DMD) 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と DMD に付随する自閉スペクトラム症の病態解明（青木）、を進めた。

**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)NCNP 手術検体を用いたてんかん病理の解明や小脳における非直接的な神経細胞産生様式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. センター内研究の相互理解、共同研究の推進

(17)公表間近な成果を NCNP 内での研究報告会開催等によって共有し、それぞれの研究の相互理解と 30 課題に迫る共同研究が進んだ。

以上の成果は令和 5 年 10 月 19 日に AP 東京八重洲にて開催された班会議で統括報告された。

## 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やてんかん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

さまざまな Cre 系統や flox 系統等を用いた、*Dcam11* 遺伝子、*Dscaml1* のファミリー遺伝子 *Dscam*、および *Auts2* 遺伝子についてのゲノム編集・遺伝子改変マウスを作出し、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 *AUTS2* タンパク質が、*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。その後、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* タンパク質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。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り、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 cKO 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. Dewa K, Arimura N, Kakegawa W, Itoh M, Adachi T, Miyashita S, Inoue YU, Hizawa K, Hori K, Honjaya N, Yagishita H, Taya S, Miyazaki T, Usui C, Tatsumoto S, Tsuzuki A, Uetake H, Sakai K, Yamakawa K, Sasaki T, Nagai J, Kawaguchi Y, Sone M, Inoue T, Go Y, Ichinohe N, Kaibuchi K, Watanabe M, Koizumi S, Yuzaki M, Hoshino M. Neuronal *DSCAM* regulates the peri-synaptic localization of *GLAST* in Bergmann glia for functional synapse formation. *Nat Commun*. 2024 Feb 1;15(1):458.
2. Iijima K, Komatsu K, Miyashita S, Suyama K, Murayama K, Hashizume K, Tabé NK, Miyata H, Iwasaki M, Taya S, Hoshino M.

Transcriptional features of low-grade neuroepithelial tumors with the BRAF V600E mutation associated with epileptogenicity. *Genes Cells*. 2024 Mar;29(3):192-206.

3. Miyashita S, Owa T, Seto Y, Yamashita M, Aida S, Sone M, Ichijo K, Nishioka T, Kozo K, Kawaguchi Y, Taya S, Hoshino M: Cyclin D1 controls development of cerebellar granule cell progenitors through phosphorylation and stabilization of ATOH1. *EMBO J*. 40 (14) e105712, 2021.

## 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

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解明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探索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) など自閉スペクトラム症 (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 関連ゲノム変異を申請者固有の 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。

## 結果と考察

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。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調節活性の有無を検索し、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同定を行った。さらにはシナプストランスポーター *Vmat1* 遺伝子のヒト特異的変異を導入したマウスの作出からヒトの不安・うつ傾向の進化仮説について初めて実験的な検証を行うことに成功した。以上のように ASD に関連する分子群を複数同時にノックアウトしたり、多種多様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機序を体系的にスクリーニングしたりする技術が確立したことによって、これまでになく規模で遺伝子非コード領域の機能理解が深まることが見込まれるのに加え、複雑な ASD 病態を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個体の機動的作出によって多様な ASD 関連ゲノム変異の機能的意義が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分担研究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ことが見込まれる。

## 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. (2022) *eNeuro* 9, ENEURO.0423-21.2022.  
doi:10.1523/ENEURO.0423-21.2022
3. Inoue YU et al. (2021) *Cells* 10, 1076.  
doi:10.3390/cells10051076.

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

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

野口 悟

## 緒言

本研究では同定したヒト遺伝性筋疾患の患者変異について変異病因性とそこから引き起こされる分子機序の解明を目指している。①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* 遺伝子に片アレル性のミスセンス変異を認めた。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。②小脳萎縮、運動失調を呈する家系 3 患者で、*SNUPN* 遺伝子に両アレル性の複合ヘテロ接合変異を同定した。患者変異をもつモデルマウスを作製して疾患分子病態の解明を行った。③*LMNA* 顕性変異により拡張型心筋症を発症するモデルマウスを作製することに成功した。このマウスを用いて骨格筋病態の解析をすすめた。

## 方法

### モデルマウス

各遺伝子に同定した患者変異ノックインマウスを、ゲノム編集によって作製した。患者変異に合わせて、ヘテロ接合性マウスまたは、複合ヘテロ接合性マウスを用いた。

### 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。

### 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

### 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

①*DNAJB4* 遺伝子変異体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。一方で正常 TDP-43 による核内凝集形成を促進させた。この効果は、HSP70 との結合を抑制することで、キャンセルされた。*Dnajb4* 遺伝子変異疾患モデルマウスは、若齢においては異常がなかったが、高齢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。

②*SNUPN* 遺伝子変異体は、核への移動または、核から細胞質への移動の異常であった。これは、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。*Snupn* 変異疾患モデルマウスの解析では、小脳プルキニエ細胞核の Cajal body での U1snRNP の局在が顕著に低下していた。小脳プルキニ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的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。さらに、プルキニ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。

③*Lmna* E383K マウスは、約 30 週齢から致死を示し、心筋症を発症していた。心筋の電顕観察では、アポトーシスや mitophagy の所見が見られた。骨格筋ではヒラメ筋に顕著な単収縮の低下が観察された。しかし、筋ジストロフィーの所見(壊死、再生像)は観察されなかった。

## 考察

ヒト患者変異を有するモデルマウスを作製することで、変異の病因性を証明することができたとともに、患者病態の再現と分子病態機序を効率よく解析することが可能となった。

## 結論

ヒト変異を再現したマウスは遺伝性筋疾患の研究にとっても有用である。

## 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) 古家 宏樹

### 緒言

心理的ストレスへの慢性的な曝露はうつ病の主要な要因となっている。一方、前臨床試験に用いられるうつ病の動物モデルは、その作成過程において身体的ストレスを用いる点において、実際の疾患の発症過程とは大きく異なっている。このような実際の疾患とモデル動物との乖離が、うつ病の生物学的メカニズム解明の妨げになっていると考えられる。本研究課題では、身体的苦痛を排除した純粋な心理的ストレスをマウスに負荷する方法を確立し、心理的ストレスが情動に及ぼす影響とその神経機序を明らかにすることを目的とした。

### 方法

同種他個体が大型で攻撃的な ICR マウスに攻撃される社会的敗北場面を目撃させることにより C57BL/6J マウスに心理的ストレスを負荷し、情動行動への影響を評価した。また、オキシトシン受容体発現細胞に蛍光蛋白 tdTomato や DNA 組換え酵素 Cre を発現するマウスを用いて、組織学的手法および光遺伝学的手法により心理的ストレス負荷による行動変容過程におけるオキシトシンの役割を検討した。

### 結果と考察

同種他個体の社会的敗北場面の目撃による心理的ストレスへの曝露は、実際に攻撃を受けたことによる身体的ストレスと同様に、社会的

行動の減少やストレス感受性の亢進をもたらした。また、身体的ストレスが不安の亢進を引き起こした一方で、心理的ストレスのみが報酬感受性の低下を生じさせた。社会的敗北場面の目撃は、脳内報酬系の一部である腹側被蓋野を活性化させたことから、心理的ストレスは身体的ストレスとは異なり、報酬系により強い影響を及ぼすことでうつ病における快感消失と類似の症状を引き起こすことが示唆される。

社会的敗北場面の目撃により活性化する脳領域を探索した結果、前部島皮質 (aIC) のオキシトシン発現細胞が活性化することが判明した。また aIC のオキシトシン受容体発現細胞は大部分が興奮性ニューロンでありうつ様行動の発現に関連する側坐核に投射を持つことが明らかとなった。この経路を光遺伝学的に抑制した結果、社会的敗北場面の目撃による社会的行動の減少と報酬感受性の低下が生じなくなった。このことから、社会的敗北場面を目撃することによる心理的ストレスは、aIC のオキシトシニングナルを介して側坐核を繰り返し活性化することにより、うつ様行動を形成することが示唆された。

### 結論

心理的ストレスは、身体的ストレスとは異なる影響を個体に及ぼすものであり、特に報酬系に作用してうつ病の中核症状である快感消失をもたらすことが示唆された。また他個体からの情動伝染を介したうつ様行動の形成において、前部島皮質のオキシトシニングナルが重要な役割を果たすことが明らかとなった。本研究の成果は、心理的ストレスによって発症するうつ病の新規治療薬の開発に役立つものと期待される。

### 参考文献

1. Nakatake, Furuie, Yamada. An emotional stress model using witnessing social defeat scenes in mice. 2023. Folia Pharmacol. Jpn. 158, 39-42,

## 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 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などの蓄積は神経変性疾患の原因となると考えられている。細胞内分解を促進できれば、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、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。我々はこれまでに、リソソームが直接的に核酸、タンパク質や脂質を取り込み分解する機構を見いだした。本研究では、これら分解機構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分解機構の機能減弱動物を作製・解析する。以上により分解機構の生理・病態的役割を明らかにする。

我々はこれまでに、リソソーム膜タンパク質 SIDT2 が核酸とタンパク質のリソソーム内への取り込みに機能することを見いだした。また、ニューロパチーおよび縁取り空胞を伴うミオパチーの疾患家系において SIDT2 の c.2226delG 変異（ヘテロ）を見いだした。生化学的解析の結果、この変異はドミナント・ネガティブとして機能することがわかった。

### 方法

分解機構に関わる分子についてゲノム編集・遺伝子改変マウスを作出し、それぞれについて表現型を解析した。また、培養細胞を用いて細胞生物学・生化学的解析により分解機構の分子メカニズムについて解析した。

## 結果、考察と結論

### (1) SIDT2 の疾患変異について

ゲノム編集により SIDT2 の c.2226delG ノックインマウスを作出した。約 2 年齢の個体において握力が低下していた。現在病理学的解析について進めている。

### (2) RNautophagy/DNautophagy のメカニズム

RNautophagy における核酸のリソソームへの取り込みは、リソソームの酸性化に依存せず、しかし ATP 消費に依存することを示した（文献 2）。RNautophagy/DNautophagy の制御分子 SIDT2 や LAMP2C の発現が、核酸の自然免疫受容体シグナル活性化により上昇し、ウイルス核酸の分解やウイルス増殖抑制に寄与することを見出した（文献 1）。

### (3) 脂質分解について

リソソームによる直接滴な脂肪滴分解（ミクロリポファジー）を促進する分子を見だし、過剰発現するトランスジェニック・マウスおよび KO マウスを作出した。リピドーム解析の結果、脂質代謝が大きく変化しており、論文投稿の準備が整った。

## 参考文献

1. Fujiwara Y, Oroku K, Zhou Y, Takahashi M, Katayama T, Wada K, Tsutsumi N, Sato T, \*Kabuta T: Expression of RNautophagy/DNautophagy-related genes is regulated under control of an innate immune receptor. **RNA Biol** 21:1-9 (2024)
2. Contu VR, Sakai R, Fujiwara Y, Kabuta C, Wada K, \*Kabuta T. Nucleic acid uptake occurs independent of lysosomal acidification but dependent on ATP consumption during RNautophagy/DNautophagy. **Biochem Biophys Res Commun** 12;644:105-111 (2023)
3. Fujiwara Y, Kabuta C, Sano T, Murayama S, Saito Y, \*Kabuta T. Pathology-associated change in levels and localization of SIDT2 in

postmortem brains of Parkinson's disease and  
dementia with Lewy bodies patients.  
**Neurochem Int** 152:105243 (2022)

## 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

精神・神経疾患において、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した

### 方法

本研究では、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 とナトリウム・プロトン交換輸送体 NHE5、ならびに非コード RNA である vault RNA に着目し、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、精神・神経疾患発病の新しい分子基盤の整備に注力した。

### 結果と考察

#### 1) ZNRF1 について

ZNRF1 が酸化ストレスによって活性化する分子メカニズムの詳細を明らかにした。

#### 2) NHE5 について

神経細胞に偏在する NHE5 はリソソーム

や膜小胞内腔 pH 調節に関わり、この調節系が破綻したマウスが神経発達障害を呈すること、神経細胞における NHE5 発現レベルが液性因子によってプロテアソーム依存性に調節されることを見出した。

#### 3) vault RNA について

vault RNA は機能不明のリボ核タンパク質複合体 Vault の構成因子であり、MVP のリン酸化をきっかけにヴォールトからリリースされた 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、などを見出した (J Cell Biol. 2021 他)。また、シナプス領域において、Aurora A がグルタチオン化されることにより自己活性化することを見出した。

### 結論と考察

神経発達障害の要因は多岐に渡るが、それらが影響を及ぼす作用点は発達期のシナプス形成異常に収斂するため、シナプス形成を理解することは発症要因の解明に直結する。本研究により、神経発達障害に関連するシナプス形成・維持の新しい調節機構が複数提示された。今後、これらの調節機構にクロストークがあるのかなど、さらに詳細な検証を進める。

### 参考文献

1. Wakatsuki S., Takahashi Y., Shibata M., Adachi N., Numakawa T., Kunugi H., Araki T. Small non-coding vault RNA modulates synapse formation by amplifying MAPK signaling. **J Cell Biol.** (2021) 220: e201911078.
2. 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)
3. Nagayama T., Yagishita S., Shibata M., Furuno A., Saito T., Saido T. C., Wakatsuki S., Araki T. Transient sleep apnea results in long-lasting

increase in  $\beta$ -amyloid generation and tau hyperphosphorylation. **Neurosci Res.** in press.

## 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

中枢神経傷害により、様々な機能に重篤な  
症状があらわれる。個人差や疾患の種類によ  
る差はあるものの、わずかではあるが症状は  
自然回復し、それは傷ついた神経回路が修復  
したためと考えられている。神経回路の修復  
は内因性と外因性の機序から制御され、本研  
究では内因性の機序の探索を行った。従来か  
らの脳神経回路の修復研究から、複数の内因  
性機序に関わる分子が同定されているが、こ  
こでは特に対象となる神経細胞に対して選択  
性が高い機序を同定するため、神経細胞に高  
発現する分子の中から神経回路の修復を制御  
する分子を探索することとした。

## 方法

本研究では、脊髄損傷後の運動機能の回復を  
研究対象とし、その機能制御を担う皮質脊髄路  
の回路修復に関わる分子の探索を行った。ヒト  
での表現型情報を含む公開データベースから  
”motor dysfunction”で見出される遺伝子を抽出  
し、対象となる遺伝子について全身臓器での  
発現情報のデータベースから脳で高発現する  
遺伝子を選抜した。さらに、脳内の細胞種ご  
との発現量がまとめられたデータベースから、  
神経細胞での発現が豊富な遺伝子を選び、同遺  
伝子を対象とした siRNA ライブラリーを作成し  
た。マウス大脳皮質から採取した神経細胞の培  
養系に対して、siRNA ライブラリーを用いたス  
クリーニングを行い、培養後の神経突起長を計  
測し、神経突起の伸長を阻害する siRNA を探  
索した。効果が認められた siRNA を用いて、in

vivo での神経回路修復への作用を検討するた  
め、アデノ随伴ウイルスベクターに対象遺伝子  
の shRNA を組み込み、大脳皮質へ注入し、皮  
質脊髄路での遺伝子発現を抑制したマウスを  
作成した。同マウスに対して脊髄損傷を施し、  
神経回路の修復を組織的に評価した。同マウス  
の運動機能についても行動試験で検討した。

## 結果と考察

培養実験でのスクリーニングの結果、Syt4 遺  
伝子の発現を抑制すると大脳皮質培養神経細  
胞の突起長がコントロールと比較して短かつ  
たことから、内在性の Syt4 遺伝子は神経突起  
の伸長を促進させる働きがあることが示唆さ  
れた。同遺伝子の発現を抑制させた神経細胞を  
対象とした RNAseq の結果からも、神経突起伸  
長にアノテーションされる遺伝子発現の変動  
が見いだされ、分子的にも示唆が得られた。脊  
髄損傷マウスにおける神経回路の修復も、Syt4  
発現抑制群ではコントロールと比較して生じ  
にくく、また時間経過に伴う運動機能の回復も  
Syt4 発現抑制群では阻害された。これらの結果  
から、内在性の Syt4 は神経回路の自発的な修  
復と神経機能の自然回復を支持するものであ  
ることが示唆された。

## 結論

今後 Syt4 の発現を高めることで機能回復が  
促進するか、治療効果を検討する。さらに Syt4  
の発現制御により炎症など、神経回路の修復に  
関連する他現象には影響がないか精査し、神経  
細胞の内在性分子による回路修復作用を確認  
していきたい。

## 学会発表

樋口京香、田辺章悟、成田年、村松里衣子：  
Synaptotagmin 4 による脊髄損傷後の神経回  
路の修復、第 96 回日本薬理学会年会、神奈川、  
口演(2022. 12. 2)

## 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の創生

(所属) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第三部

(氏名) 土肥 栄祐

## 緒言

細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) はあらゆる細胞から分泌され、体液中から検出され、細胞特異性を持つ有望なバイオマーカーとして開発が急速に進んでいる。測定技術も発達しているが、新たな課題としてバイオバンク内に保存されている血漿に血小板が混入し、この混入した血小板から放出された血小板由来のEVsが下流の解析に影響を与えると報告された。またその他にも食事の影響や日内変動など、バイオマーカー解析に影響を与えうる様々な潜在的な交絡因子が推定されているが、詳細な検討は未だなされていない。また、これらの状況乗り越えるためには、EVsのバルク解析ではなく、一粒子レベルでの解析が求められている。そこで本研究では、細胞外小胞の内部にあるmiRNAをターゲットとした金粒子ビーコンを作成し、血清由来細胞外小胞のmiRNAを検出することで、細胞特異的なEVのmiRNAの検出系を樹立し、疾患を問わず詳細なバイオマーカー開発のための基盤技術を開発する。

## 方法

ヒト血液由来EVsおよびマウス血清由来EVsのmiRNAプロファイルを検討した既報文献に対しシステマティックレビューを行い、miRNAプロファイルの一貫性を検討する。また血小板の混入や血小板由来EVの混入を最小限にするサンプル調整法の開発を行う。また、ヒト血漿からEVsをSECにて抽出し、作成した金粒子分子ビーコンを処置し、NanoFCMにて計測することで、EV一粒子レベルでのmiRNA検出を試みた。

## 結果と考察

(1) 血中miRNAプロファイルについて  
ヒト血液由来EVsのmiRNAプロファイルでは

研究間で一貫性が無く、条件の整えやすいマウス血清由来EVsのmiRNAプロファイル研究においても研究間で一貫性が無かった。ここからは、調整が出来ていない潜在的な交絡因子の潜在が考えられた。

## 2) 血小板と血小板由来EVsの混入を抑えるサンプル調整法

血小板は活性化の際にEVsを放出する事が知られている。特に採取の際に用いる穿刺の針の太さ・速度、採取部位から混入する組織、低温、また遠心速度、これらにより活性化し、また抗凝固薬の種類も影響するため、これらの最適化を行った。これらの調整により、日内変動に関するプレリミナリーなデータを得ることが達成できた。

## 3) 金粒子分子ビーコンを用いたEV一粒子解析技術の開発

miR-223-3pに対する金粒子ビーコンを作成したEV内miRNAの検出では、当初既報の方法ではヒト血漿由来EVのうちの1%弱しか検出ができなかった。そこで、EV内へ金粒子分子ビーコン導入のためのDetergentの最適化を行い、10%前後のEVで検出が可能となった。EVは抽出法により膜のintegrityが変化するため、抽出法ごとにDetergentの調整が必要であることが明らかとなった。

## 結論

EV解析結果を評価するには、詳細な実験条件の把握が必要であり、未だ明らかでない交絡因子の同定が重要である。また、一粒子解析には、ビーコン開発に合わせ、EV抽出法と導入方法の開発が併せて必要になる。今後は、本研究で確立した、血小板と血小板由来EVsの混入を抑制する方法を活かし、血漿EVのmiRNAの日内変動の解明を行う。また、ここに開発した一粒子解析技術を併用し、詳細かつ精密なバイオマーカー開発を展開してゆく。

## 参考文献

なし

## 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 遺伝子疾患治療研究部

(氏名) 青木 吉嗣

## 緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 患者の約 30%には、自閉スペクトラム症

(ASD) などの脳症状が見られる。これは、脳において発現するジストロフィンの短縮型アイソフォームである Dp140 の欠損が関与しているとされる。我々の先行研究において、Dp427 (全長型) 及び Dp140 を欠損した DMD モデルマウスである mdx52 マウスが、ASD 様の社会性行動異常を示すことが明らかにされている (Hashimoto et al., *Prog Neurobiol*, 2022)。しかし、Dp140 の欠損がなぜ ASD 様の症状を引き起こすのかについては、未だ明らかになっていない。本研究では、DMD の脳症状を対象に mRNA 医薬などによる Dp140 の補充治療を将来的に実施することを見据え、Dp140 の欠損によって生じる DMD の脳病態の解明を目指す。これにより、DMD 患者における認知機能障害の治療法の開発に貢献することを目標とする。

## 方法

野生型マウス (C57BL/6J)、mdx マウス、mdx52 マウスを対象に、ジストロフィン欠損と関連する精神神経症状の表現型と、背景となる分子メカニズムを解析する。さらに、前述の精神神経症状が、先端遺伝子治療によりジストロフィンを回復させた際に、正常化し得るかについても検討する。

## 結果と考察

Dp427 に加えて Dp140 を欠損する mdx52 マウスは、野生型マウスや mdx マウスと比べて、社会性行動が亢進することが分かった。

DMD モデルの mdx52 マウスにおいて、Dp140 mRNA を扁桃体に直接投与し、Dp140 の発現を回復させた結果、興奮性シナプス応答及び社会性行動異常が改善されること、また ASD 様の症状にも同様の改善効果が見られることが明らかとなった。

## 結論

Dp140 の欠損により、mdx52 マウスでは社会性行動異常および扁桃体の興奮性シナプス応答異常が生じ、これらは Dp140 の発現回復により正常化する。

今後は、mdx52 マウスにジストロフィン関連タンパク質の一つである AQP4 の活性化剤 TGN-073 を腹腔内投与し、社会性行動異常が改善し得るかを検討する。

## 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.

## AI を用いた精神神経疾患の研究

国立精神・神経医療研究センター  
疾病研究第七部・山下祐一

### 1. 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。

### 2. 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 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。

### 3. 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。

### 4. 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 [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 [2]。

また、DNN を用いて、脳画像を含むバイオマーカーから軽度認知障害 (MCI) における認知機能の自然経過における変化を高精度で予測する AI を開発した。このような認知機能自然経過予測 AI を用いて治験における割り付けを是正することで、治療薬の効果の検出力が向上しうることを示した [3]。

### 4. 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。

### 5. 主な発表論文等

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, Hashimoto 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.
3. Wang C, Tachimori H, Yamaguchi H, Sekiguchi A, Li Y, Yamashita Y (2024) A multimodal deep learning approach for the prediction of cognitive decline and its effectiveness in clinical trials for Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*, 14, 105.

## 研究課題番号 3-9

手術脳組織検体を用いた精神神経疾患の研究

### 分担研究者

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・部長

### 協力研究者

飯島圭哉 国立精神・神経医療研究センター  
病院脳神経外科・医師

### 【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・ウェ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。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 例ずつに認められた。17 症例では原因となる遺伝子変異が特定されなかった。*BRAF* V600E mutant に特異度の高い画像所見、*FGFR1* mutant に特異的な画像所見を見出した。また、*BRAF* V600E mutant の一部は上記とは異なる画像所見を呈する少数の亜型があることが分かった。

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。特に *BRAF* V600E mutant の腫瘍において、エストロゲン関連遺伝子の発現上昇を認めた。

皮質形成異常の内、FCD type 2B with MTOR mutation の 6 症例の single nucleus RNA-seq 解析を行った。現時点では明らかな新規的データを見いだせていない。*PIK3CA* mutant の片側巨脳症例が 3 例、*SLC35A2* mutant の皮質形成異常の症例が 4 例蓄積されており、今後の single nucleus RNA-seq の解析につなげる予定である。海馬硬化症の手術の際に切除される正常な側頭葉先端部からのヒトオリゴデンドロサイトの分離実験を 6 例に行った。結果は解析中である。

### 【考察と結論】

低悪性度てんかん原性腫瘍の分子型のサブタイプを同定し、これを予測するための術前の MRI 画像の特徴を見出した。これにより最適な手術計画の立案に寄与することが可能となり、将来の分子標的薬の適切な選択にも寄与することができる。同様の手法を今後は皮質形成異常にも応用していくことで、適切な手術計画の立案および、分子標的薬に創薬、適切な分子標的薬の選択に寄与していく。

今後は低悪性度てんかん原性腫瘍の遺伝子変異の結果と画像解析の対応をまとめて論文化していく。皮質形成異常に対して sn-RNA seq の結果をまとめて論文化していく。海馬硬化症に関しては手術検体を蓄積し、分子生物学的な解析を進める

【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.
2. Iijima K, Komatsu K, Miyashita S, Suyama K, Murayama K, Hashizume K, Tabe NK, Miyata H, Iwasaki M, Taya S, Hoshino M. Transcriptional features of low-grade neuroepithelial tumors with the BRAF V600E mutation associated with epileptogenicity. *Genes Cells*. 2024 Mar;29(3):192-206.

## 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(R3.4～R5.5)

国立精神・神経医療研究センター 病態生化学研究部(R5.5～)

(氏名) 宮下 聡

### 緒言

てんかんは意識障害やけいれん発作を引き起こす神経疾患であり、その有病率は人口の0.5-1%である。全てんかん患者のうちの20-30%は、抗てんかん薬に抵抗性の難治てんかん(薬剤抵抗性てんかん)の病態を示す。難治てんかん患者は、日本国内だけでも約20万人程度存在すると推定されているが、未だに難治てんかんを発症する細胞・分子生物学的な背景は解明されていない。本研究では、難治てんかんの病態を示す神経疾患のうち最もメジャーな疾患である大脳皮質形成異常(MCD;Malformation of Cortical Dysplasia)を中心に研究を行った。特に単一細胞核 RNA-seq(snRNAseq)などのオミクス解析と MCD の病態をよく反映した新規モデルマウスの開発を行うことで、難治てんかん病態の背後にある細胞分子メカニズムの解明を目指した。

### 方法

(1) ヒト MCD 手術検体を用いたオミクスデータの収集と解析

NCNP バイオバンクと連携し、MCD の手術脳検体の提供を受ける。提供を受けた検体に関して、snRNA-seq, bulk RNA-seq, 空間トランスクリプトームなどのオミクス解析を実施した。

(2) MCD モデルマウスの開発

変異型 MTOR 遺伝子を胎生期マウスに導入し、てんかん脳波の測定やてんかん発作行動を観察した。

### 結果と考察

(1) ヒト MCD 手術検体を用いたオミクスデータの収集と解析

NCNP バイオバンクから提供を受けた限局性皮質異形成(FCD)患者の手術脳検体 8 症例(type II 6 例、type III 2 例)から細胞核を抽出し、snRNA-seq を実施した。海馬硬化症患者から取得した側頭葉部で正常な脳構造を示した3症例をコントロールとして用いた。snRNA-seq データのバイオインフォマティクス解析によって、興奮性神経細胞、抑制性神経細胞、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞における遺伝子発現の変化を詳細に解析し、数百の発現変動遺伝子を同定した。さらに、遺伝子発現変化と関連するシグナル経路についても探索し、mTOR 経路などシグナル活性が有意に亢進したシグナルを同定することができた。

(2) MCD モデルマウスの開発

胎生期マウスの神経幹細胞に対して、変異型 MTOR 遺伝子を強制発現させたところ、細胞の移動が阻害され、FCD と同様の形態異常が確認された。さらに出生後に脳波を測定するとてんかん様の脳波が観測された。

### 考察・結論

ヒト手術脳検体を使ったビッグデータ解析により、てんかんの発症メカニズムや治療標的候補を導出することができた。新たに開発した動物モデルを用いることで、導出した候補遺伝子の機能などの詳細をさらに解析することが可能となる。本研究成果をもとに、ヒトモデルマウスの間をシームレスに研究を行うことによって、難治てんかんの治療法開発に貢献する。

## 参考文献

1. Dewa K, Arimura N, Kakegawa W, Itoh M, Adachi T, **Miyashita S**, Inoue YU, Hizawa K, Hori K, Honjoya N, Yagishita H, Taya S, Miyazaki T, Usui C, Tatsumoto S, Tsuzuki A, Uetake H, Sakai K, Yamakawa K, Sasaki T, Nagai J, Kawaguchi Y, Sone M, Inoue T, Go Y, Ichinohe N, Kaibuchi K, Watanabe M, Koizumi S, Yuzaki M, Hoshino M. Neuronal DSCAM regulates the peri-synaptic localization of GLAST in Bergmann glia for functional synapse formation. *Nat Commun*. 2024 Feb 1;15(1):458.
2. Iijima K\*, Komatsu K\*, **Miyashita S\***, Suyama K, Murayama K, Hashizume K, Tabe NK, Miyata H, Iwasaki M, Taya S, Hoshino M. Transcriptional features of low-grade neuroepithelial tumors with the BRAF V600E mutation associated with epileptogenicity. *Genes Cells*. 2024 Mar;29(3):192-206.
3. Tran DM, Yoshioka N, Bizen N, Mori-Ochiai Y, Yano M, Yanai S, Hasegawa J, **Miyashita S**, Hoshino M, Sasaki J, Sasaki T, Takebayashi H. Attenuated cerebellar phenotypes in Inpp4a truncation mutants with preserved phosphatase activity. *Dis Model Mech*. 2023 Jul 1;16(7)
4. Nakamura Y, Kurabe M, Matsumoto M, Sato T, **Miyashita S**, Hoshina K, Kamiya Y, Tainaka K, Matsuzawa H, Ohno N, Ueno M. Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord. *Elife*. 2023 Feb 21;12:e83108.
5. Nakata S, Murai J, Okada M, Takahashi H, Findlay TH, Malebranche K, Parthasarathy A, **Miyashita S**, Gabdulkhaev R, Benkimoun I, Druillennec S, Chabi S, Hawkins E, Miyahara H, Tateishi K, Yamashita S, Yamada S, Saito T, On J, Watanabe J, Tsukamoto Y, Yoshimura J, Oishi M, Nakano T, Imamura M, Imai C, Yamamoto T, Takeshima H, Sasaki AT, Rodriguez FJ, Nobusawa S, Varlet P, Pouponnot C, Osuka S, Pommier Y, Kakita A, Fujii Y, Raabe EH, Eberhart CG, Natsumeda M. Epigenetic upregulation of Schlafen11 renders <sup>1</sup>WNT- and SHH-activated medulloblastomas sensitive to cisplatin. *Neuro Oncol*. 2023 May 4;25(5):899-912.
6. **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 Feb 18;11(4):726.
7. **Miyashita S**, Owa T, Seto Y, Yamashita M, Aida S, Sone M, Ichijo K, Nishioka T, Kozo K, Kawaguchi Y, Taya S, Hoshino M: Cyclin D1 controls development of cerebellar granule cell progenitors through phosphorylation and stabilization of ATOH1. *EMBO J*. 40 (14) e105712, 2021.

## 分担研究報告書

### 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

近畿大学医学部脳神経内科

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し、2) 疾患モデルショウジョウバエを用いて、神経疾患病態を解明することを目的とした。

#### 方法・結果・考察

##### (1) TDP-43 発現ショウジョウバエモデルを用いた ALS 病態研究

TDP-43 は DNA/RNA 結合タンパク質であり、通常は核内に分布するが、ALS 患者では神経細胞の細胞質に異常凝集して神経変性に関与する。一方、Dynactin (DCTN) 複合体は、微小管依存的な輸送に関与し、ALS 病態に関連することが示唆されている。我々は、TDP-43 を

発現する ALS ショウジョウバエモデルを用いて、微小管依存的輸送の障害が TDP-43 の動態や神経変性に与える影響を評価した。その結果、DCTN1 などの DCTN 複合体の構成分子やその他の微小管モータータンパク質のノックダウンにより ALS モデルショウジョウバエにおける TDP-43 細胞質内凝集が増加し、複眼変性や運動機能障害が増悪した。

以上の結果から、ALS において微小管依存的輸送の機能低下によって、TDP-43 が細胞質内凝集を形成し、神経変性を引き起こすという、新たな知見を得た。

##### (2) ショウジョウバエモデルによる *C9orf72* 遺伝子関連 ALS の病態修飾分子スクリーニング

*C9orf72* 遺伝子非翻訳領域内の GGGGCC リピート配列の異常伸長は、家族性 ALS の最も高頻度の遺伝的原因となる (C9-ALS)。我々は、異常伸長した GGGGCC リピート配列を発現する C9-ALS モデルショウジョウバエを樹立して病態修飾分子のスクリーニングを行った。その結果、hnRNPA3 と FUS が、変異遺伝子から転写された GGGGCC リピート RNA に結合し、GGGGCC リピート RNA による RNA foci の形成と、非古典的なリピート関連非 AUG 依存性翻訳によるリピートペプチドの産生を抑制することで、神経変性を改善することを発見した。その機序として、hnRNPA3 はリピート RNA の発現量を減少させて、FUS はリピート RNA が形成する高次構造を阻害することをそれぞれ明らかにした。

## 結論

疾患シミュレーションモデルを用いた解析から、ALS 病態に関与する複数の新規分子とそのメカニズムを明らかにした。これらの結果は、今後の治療戦略開発に向けた基盤的知見となることが期待される。

## 参考文献（業績）

1. Ueda T, Takeuchi T, Fujikake N, Suzuki M, Minakawa EN, Ueyama M, Fujino Y, Kimura N, Nagano S, Yokoseki A, Onodera O, Mochizuki H, Mizuno T, Wada K, Nagai Y. Dysregulation of stress granule dynamics by DCTN1 deficiency exacerbates TDP-43 pathology in Drosophila models of ALS/FTD. *Acta Neuropathol Commun*. 2024 Feb 4;12(1):20.
2. Fujino Y, Ueyama M, Ishiguro T, Ozawa D, Ito H, Sugiki T, Murata A, Ishiguro A, Gendron T, Mori K, Tokuda E, Taminato T, Konno T, Koyama A, Kawabe Y, Takeuchi T, Furukawa Y, Fujiwara T, Ikeda M, Mizuno T, Mochizuki H, Mizusawa H, Wada K, Ishikawa K, Onodera O, Nakatani K, Petrucelli L, Taguchi H, Nagai Y. FUS regulates RAN translation through modulating the G-quadruplex structure of GGGGCC repeat RNA in C9orf72-linked ALS/FTD. *elife*. 2023 Jul 18;12:RP84338.
3. Taminato T, Takeuchi T, Ueyama M, Mori K, Ikeda M, Mochizuki H, Nagai Y. Therapeutic reduction of GGGGCC repeat RNA levels by hnRNPA3 suppresses neurodegeneration in Drosophila models of C9orf72-linked ALS/FTD. *Hum Mol Genet*. 2023 May 5;32(10):1673-1682.

## 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。本研究では脳内免疫細胞であるミクログリアに着目し、ミクログリアの機能異常と RTT 発症との関与について検討し、そのメカニズムの観点から新たな治療法の開発を目指す。

## 方法

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 *MeCP2*KO マウスを交配して得た TLR9/*MeCP2* 二重欠損 (WKO) マウスを用いて、そのマウスの RTT 様の表現型を解析する。

## 結果と考察

*MeCP2*KO マウスと比較し、TLR9/*MeCP2*WKO マウスでは、RTT 様の行動スコアリングと寿命が著しく改善することが

わかった。また、*MeCP2*KO マウスと比較し、TLR9/*MeCP2*WKO 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り、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。scRNA-seq 解析の結果から、野生型マウスと比較し、*MeCP2*KO 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おり、TLR9/*MeCP2*WKO マウスではその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。本研究から TLR9 シグナルの活性化が RTT 発症に寄与している可能性が示唆された。

## 結論

本研究から、TLR9 シグナルを抑制することで RTT 病態が改善することが示唆された。今後は、TLR9 の内在性リガンドを同定するとともに、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. Irie T, Matsuda T, Hayashi Y, Nakashima K: Direct neuronal conversion of microglia/macrophages reinstates neurological function after stroke. *Proc Natl Acad Sci USA*, 120, 42, 2023.
2. Kasahara Y., Nakashima H. & Nakashima K. Seizure-induced hilar ectopic granule cells in the adult dentate gyrus. *Front Neurosci* 17, 1150283, 2023.
3. 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, Nakashima K: MeCP2 controls neural stem cell fate specification through miR-199a-mediated inhibition of BMP–Smad signaling. *Cell Rep*, 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

(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 K, Fukumoto K, Toya T, Nakai N, Awasthi JR, Tanaka S, Okabe S, Spitz F, Saitow F, Suzuki H, Takumi T. Genetic dissection identifies Necdin as a driver gene in a mouse model of

paternal 15q duplications. *Nat Commun*, 12, 4056, 2021.

2. Lin CW, Septyaningtrias DE, Chao HW, Konda M, Atarashi K, Takeshita K, Tamada K, Nomura J, Sasagawa Y, Tanaka K, Nikaido I, Honda K, McHugh TJ, Takumi T. A common epigenetic mechanism across different cellular origins underlies systemic immune dysregulation in an idiopathic autism mouse model. *Mol Psychiatry* 27, 3343-3354, 2022.

3. Lin CW, Ellegood J, Tamada K, Miura I, Konda M, Takeshita K, Atarashi K, Lerch JP, Wakana S, McHugh TJ, Takumi T. An old model with new insights: endogenous retroviruses drive the evolution toward ASD susceptibility and hijack transcription machinery during development. *Mol Psychiatry* 28, 1932-1945, 2023.

4. Nakai N, Sato M, Yamashita O, Sekine Y, Fu X, Nakai J, Zalesky A, Takumi T. Virtual reality-based real-time imaging reveals abnormal cortical dynamics during behavioral transitions in a mouse model of autism. *Cell Rep* 42, 112258, 2023.

5. Sato M, Nakai N, Fujima S, Choe KY, Takumi T. Social circuits and their dysfunction in autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 28, 3194-3206, 2023.

6. Kaizuka T, Hirouchi T, Saneyoshi T, Shirafuji T, Collins MO, Grant SGN, Hayashi Y, Takumi T. FAM81A is a postsynaptic protein that regulates the condensation of postsynaptic proteins via liquid-liquid phase separation. *PLoS Biol* 22, e30020006, 2024

7. Kaizuka T, Suzuki T, Kishi N, Tamada K, Kilimann MW, Ueyama T, Watanabe M, Shimogori T, Okano H, Dohmae N, Takumi T. Remodeling of the postsynaptic proteome in male mice and marmosets during synapse development. *Nat Commun* 15, 2496, 2024.

## 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

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。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* の発現を光操作する。細胞増殖や細胞分化を誘導して RNA シークエンス解析や ATAC-seq 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、クロマチン構造の変化を解析する。

### 結果と考察

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。光照射開始後から様々なタイムポイントにおいて細胞を回収して 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。*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、GO 解析を実施した。このような解析から、*Ascl1* 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。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、*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。

### 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。*Ascl1* の振動発現と蓄積発現の違いが、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。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。今後は脳全体を3次元画像で観察することにより、光操作あるいは薬剤投与を行なったマウス脳において新生ニューロンの分化、移動様式等を観察する必要があると考えている。

### 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

## 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), Hiroki Furuie (NCNP), Tomohiro Kabuta (NCNP), Shuji Wakatsuki (NCNP), Yoshitsugu Aoki (NCNP), Rieko Muramatsu (NCNP), Eisuke Dohi (NCNP), Yuichi Yamashita (NCNP), Masaki Iwasaki (NCNP), Satoshi Miyashita (Niigata University, NCNP), Yoshitaka Nagai (Kindai University), Kinichi Nakashima (Kyushu University), Toru Takumi (Kobe University), Mayumi Yamada (Kyoto 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 over three hundreds 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 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 and Furuie'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/DNA autophagy 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*, *NHE5* and vault RNAs 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 transcriptional 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 tried visualization of Extracellular Vesicles *in vivo* to elucidate the novel ways of brain-tissue communication machinery.

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 (DMD). They also tried to understand molecular pathology of DMD associated neuropsychiatric diseases.

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 human epileptic pathology from NCNP brain bank and composition of interneurons in the mouse cerebellum.

We held the annual meeting where the results of our research were reported on Oct.19, 2023. 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.