

5-4 脳構成細胞の解析技術の基盤構築に基づく神経変性・修復機構の解明研究

主任研究者 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 部長 村松 里衣子

総括研究報告

1. 研究目的

超高齢化社会を迎える我が国において、持続可能な社会を実現するために、神経疾患の治療法や予防法の開発は重要な課題である。近年の科学技術の革新に伴い、シングルセルレベルでの網羅的遺伝子発現の解析や空間的な遺伝子発現解析等、疾患と関連するビッグデータの取得が進められている。それらのデータの解析手法にも一定の見解が得られ、従来からの仮説駆動型の研究の成果を強化するとともに、データ駆動型研究も推進されている。しかし、このような解析技術は未だ開発が続いており、専門性の高い情報学や工学研究者との連携が、基礎医学の知見を最大化するために有効と考えられる。本開発費では、ビッグデータを活用した神経疾患の病態解明研究を革新するために、疾患基礎研究者と情報学および工学の研究者との持続可能な連携を構築することを目的とする。特に、アルツハイマー型認知症等での神経変性および神経組織の修復を対象として、特定の標的細胞に限らないアンバイアスな解析を機能未知の分子を含め網羅的検討し、候補分子の機能評価のためのマイクロ流体デバイス等を用いた技術開発とその活用を通じて、神経疾患の病態形成において真に重要なメカニズムの発見につなげる。

2. 研究組織

＜主任研究者＞

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）

＜分担研究者＞

橋本 唯史（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）

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）

川内 大輔（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）

林 晋一郎（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）

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）

阿部 十也（国立精神・神経医療研究センター病院 病態統合イメージングセンター）

関島 良樹（信州大学 脳神経内科）

加藤 有己（大阪大学大学院 医学系研究科）

松永 行子（東京大学生産技術研究所）

＜研究協力者＞

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）

3. 研究成果

本研究班では、1) 神経変性および修復に関連するビッグデータの取得とその解析技術の共有と効率化、2) 新規のデータ取得技術の開発、3) 病態解明研究についての検討を実施している。今年度、橋本らはアルツハイマー病患者由来検体を用いて similarity network fusion (SNF)解析を行い、APOE e4/e4 のサブ

グループがあることを見出し、APOE e4 キャリア脳では A β 蓄積が促進している可能性を示唆した。また、新規アミロイド斑形成モデルマウスを作出し A β 蓄積依存的な遺伝子変動を検出した。青木は筋萎縮性側索硬化症モデルである SOD1-G93A マウスを用いて、腓腹筋の萎縮期を同定し、同時期における分子発現を検討した。川内らは悪性度の高い成人グリオーマにおいて新規の腫瘍標的機構である「腫瘍とシナプスを形成する抑制性ニューロン」に関する研究を実施した。林は金疾患における線維化原因細胞の同定のために snRNAseq を行い、有望なクラスターを見出した。岩崎・飯島は、てんかん原性病変における遺伝子発現解析を行い、複数の原因遺伝子とまれな遺伝子異常を検出した。さらに村松らとともに手術脳検体からヒトオリゴデンドロサイトの分離実験を行い、遺伝子発現を解析している。阿部は認知症コホート研究のデータから、アルツハイマー病とパーキンソン病の混合病理スペクトラムを観察し、同病理を有する症例における認知機能の特徴付けを行った。関島は ATTR アミロイドーシスおよび非アミロイドーシス患者において TTR C 末フラグメントの凝集体に対する自己抗体を検出し、アミロイドーシスの発症あるいはその予防に関与する可能性を考察している。加藤は村松とともに、肺機能の異常と脳機能異常の相関を機械学習により検出する手法を作成している。松永は村松と共同で、オリゴデンドロサイトのまきつきの評価に活用しうるデバイスの作成を実施した。

分担研究報告書

アルツハイマー病及びモデルマウス脳を用いたマルチオミクス解析と病態形成機序の解析

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
分担研究者 橋本唯史

緒言

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は初老期に発症し、認知症を呈する進行性の神経変性疾患である。AD 患者脳には線維化した amyloid β peptide (Ab) がニューロピルに老人斑として、また血管周囲腔に cerebral amyloid angiopathy (CAA) として蓄積することが病理学的特徴であり、近年抗 Ab 抗体を用いて蓄積した Ab を除去する Ab ワクチン療法が開発され、臨床試験において軽度認知症患者の認知機能低下を軽減したこと、Ab 蓄積は AD の有効な治療標的であると考えられている。しかし、AD の大多数を占める孤発性 AD において、どのような脳内要因が Ab 蓄積に影響を与えるのか、さらに Ab 蓄積がどのようにして神経変性を招来するのかその機序は明らかではなく、AD 治療開発の障害となってきた。

そこで本研究では AD 患者脳において Ab 蓄積の要因を明らかにするため、(I) AD 患者脳から得られたマルチオミクス解析を行い、AD 患者脳を層別化することで、サブグループごとの Ab 蓄積要因を明らかにする。また、分担研究者これまでに同定した Ab 蓄積の蓄積核として働く Ab 分子種の接種実験を行うことで、(II) 老人斑誘導マウスモデル、あるいは CAA 誘導マウスモデルを開発し、Ab 蓄積がどのように脳構成細胞を変容させ、神経

変性を引き起こすか明らかにする。

方法

(I) AD 患者脳の similarity network fusion を用いたマルチオミクス解析による層別化

単一の AD 患者脳より gene-chip 解析、DNA methylation、histone acetylation、RNA-seq の各データを取得し、similarity network fusion 解析を行うことで AD 脳を層別化する。各サブグループを特徴づける要因を抽出し、Ab タウ伝播モデル実験系で評価する。

(II) 病因タンパク質伝播モデルを用いた時間依存的な脳構成細胞の変容解析

AD 患者脳、あるいは APP トランスジェニック (tg) マウス脳から段階抽出、続けてゲルろ過カラム分離により、TBS 可溶で 100 kDa 以上の Ab オリゴマー "peak 1 Ab" を粗精製する。得られた peak 1 Ab を用い、APP tg マウス脳海馬へ注入する老人斑モデル、脳大槽へ注入する CAA モデルを作出し、RNA-seq 解析により b-amyloidosis の出現に伴う脳の変容を解析する。さらに、AD 患者脳ニューロピルから得た peak 1 Ab と脳髄膜組織から得た peak 1 A b と相互作用分子を IP-MS 解析し、老人斑あるいは CAA 形成に関与する分子を網羅的に解析する。

結果

(I) AD 患者脳の similarity network fusion を用いたマルチオミクス解析による層別化

20 例の AD 患者脳前頭葉を用いて similarity network fusion (SNF) 解析を行ったところ、APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ キャリアで、また病理学的に嗜銀顆粒を伴う患者 6 例がサブグループ化されることがわかった。そこで APOE $\epsilon 4$ が AD 発症に及ぼす影響を検討するため、ヒト APOE $\epsilon 2$ 、APOE $\epsilon 3$ 及び APOE $\epsilon 4$ をノックインした APP

トランスジェニックマウス脳で Ab 蓄積を評価したところ、いずれのヒト APOE をノックインしても、Ab 蓄積を抑制するが、APOE e4 をノックインしたマウスでは”seed”依存的な Ab 蓄積抑制能が他の genotype に比べ弱いことがわかった。今後さらに多くの AD 患者脳を用いて SNF 解析を進める。

(II) 病因タンパク質伝播モデルを用いた時間依存的な脳構成細胞の変容解析

Ab 蓄積を呈する高齢 APP tg マウス脳由来 peak 1 Ab を抽出し、若齢の APP tg マウス脳左海馬へ注入すると、2 ヶ月後左海馬歯状回分子層に沿って帯状の Ab 蓄積が出現することがわかった。そこで peak 1 Ab 接種後 1 ヶ月後、及び 3 ヶ月後の APP tg マウス左脳及び右能を採取し、RNA-seq 解析を行ったところ、1 ヶ月後には統計学的優位な遺伝子変動は認められなかった。一方 1 ヶ月後の左脳と、Ab 蓄積開始後 3 ヶ月後の左脳を比較したところ、22 遺伝子の発現が上昇し、10 遺伝子の発現が減少することがわかった。発現変動した遺伝子を公知の AD 患者脳 single-cell transcriptome データベースと比較解析したところ、発現上昇遺伝子は主に astrocyte (TMEM184B, POU2F1)、oligodendrocyte (AMER2, ACER3)、microglia (SKAP2)などで発現し、また AD 脳においても発現上昇していた。一方発現低下遺伝子は主に excitatory 或いは inhibitory neuron で発現しており、AD 脳の inhibitory neuron (NPTX2)でも発現が低下していた。

次に、peak 1 Ab を若齢の APP tg マウス脳大槽へ注入し、脳脊髄液中に peak 1 Ab を拡散させたところ、3 ヶ月後解析したところ、主に脳髄膜下や、血管周囲に Ab 蓄積を呈することが分かり、CAA を誘導するモデルの作出に成功した。

最後に、AD 患者脳において peak 1 Ab 量を定量したところ、CAA が豊富に存在する群 (CAA-rich, n=10)では、CAA が乏しい群 (CAA-minimal, n=8)に比べ有意に peak 1 Ab 量が多いことがわかった。さらに、CAA-rich 群の脳血管・髄膜組織を剥離して抽出したところ、脳実質よりも有意に peak 1 Ab が存在することがわかった。そこで、脳実質由来 peak 1 Ab と脳血管・髄膜組織由来 peak 1 Ab を用いて、抗 Ab 抗体による高感度 IP-MS 解析を行い、得られたタンパク質の enrichment 解析を行ったところ脳血管・髄膜組織由来 peak 1 Ab からは、ECM の構成、維持に関与する matrisome 分子が多く検出された。

考察

SNF を用い AD 患者脳をパイロット解析し、APOE e4/e4 のサブグループを同定した。また、ノックインマウスを用いた解析から APOE e4 は Ab 蓄積を促進する可能性があることを見出した。APOE e4 は AD 発症の最大の危険因子であることが知られ、本研究から APOE e4 キャリアは Ab 蓄積を促進することが AD 発症の driving force となっていることが考えられた。今後さらに SNF 解析を進め、非 APOE e4 群における AD 発症要因の解明を試みる。

また peak 1 Ab 脳内注入実験により、アミロイド斑、及び CAA それぞれの病態を再現するマウスモデルを開発し、RNA-seq 解析によりアミロイド斑蓄積によって生じた脳内構成細胞それぞれにおける遺伝子発現変動を見出した。今後さらにその意義について検討する。さらに、peak 1 Ab と相互作用して CAA 形成に関わる因子を網羅的に探索し、matrisome の関与を見出した。これまでに apoE や C1q、CLAC など複数の matrisome 分子が老人斑に蓄積していることが知られ、脳

内の Ab 蓄積とその多様性に細胞外マトリクスの関与が予想され、さらに詳細に検討する。

結論

SNF により AD に APOE e4/e4 のサブグループがあることを見出し、APOE e4 キャリア脳では Ab 蓄積が促進している可能性が示唆された

アミロイド斑, CAA それぞれを形成するマウスモデルを作出し、アミロイド斑形成モデルにおいて Ab 蓄積依存的な遺伝子変動が認められた

AD 患者脳において peak 1 Ab は CAA に濃縮しており、細胞外マトリクスとの相互作用が予想された

参考文献

1. Watanabe H, Murakami R, Tsumagari K, Morimoto S, Hashimoto T, Sonn I, Imaizumi K, Yamada K, Iwatsubo T, Okano H: Astrocytic APOE4 genotype-mediated negative impacts on synaptic architecture in human pluripotent stem cell model. *Stem Cell Rep*, 18(9), 1854-1869, 2023
2. Nakamura R, Tomizawa I, Iwai A, Ikeda T, Hirayama K, Chiu YW, Suzuki T, Tarutani A, Mano T, Iwata A, Toda T, Sohma Y, Kanai M, Hori Y, Tomita T: Photo-oxygenation of histidine residue inhibits α -synuclein aggregation. *FASEB J*, 37(12), e23311, 2023

分担研究報告書

筋萎縮性側索硬化症と加齢性の筋萎縮に共通する分子機構のオミクス解析

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
分担研究者名 青木吉嗣

緒言

家族性筋萎縮性側索硬化症 (SOD1-ALS) は、成人に発症する上位および下位運動ニューロンが選択的かつ進行性に変性・消失する難病である。本症は、SOD1 遺伝子の変異に関連している。他方、MuRF1 (muscle ring finger 1) をはじめとする筋萎縮原因遺伝子 (Atrogenes) は、運動神経の切断、不活動、および神経筋疾患など多様な筋萎縮モデルにおいて発現が増加する。特に、SOD1-G93A マウスモデルでは、筋萎縮発症時に MuRF1 の発現が増加し、運動による筋重量の増加に伴い、発現は減少することが報告されている。本研究では、SOD1-G93A マウスの萎縮骨格筋を対象にプロテオームの変動を詳細に調査し、正常加齢マウスの骨格筋とのプロテオーム変動との共通点及び相違点を明確にすることを旨とする。この研究は、筋萎縮疾患の治療に向けた新たなアプローチの提供を目的とする。

方法

1. 正常マウスを対象に、廃用性筋萎縮に対する siRNA 医薬の経静脈全身投与による MuRF1 発現抑制の効果を検証する
2. SOD1-G93A マウスを対象に、経時的に全身の骨格筋を採取のうえ、重量を測定し、筋萎縮および MuRF1 発現レベルの自然歴を明らかにする。

結果

1. 正常マウスを対象に、siRNA 医薬を用いた全身経静脈投与による MuRF1 の発現抑制が、廃用性筋萎縮に対して有意な改善効果を示すことが判明した。

2. 村松班長から雌雄個体の提供を受け、SOD1-G93A マウスコロニーを樹した。SOD1-G93A マウスを対象に、経時的に腓腹筋を採取のうえ、重量および MuRF1 発現レベル測定をした。この結果、70 日齢頃から同筋の萎縮は顕在化し、MuRF1 発現レベルは上昇することが分かった。実験の過程で、SOD1-G93A マウスの血清には、筋線維の萎縮を悪化させる疾患修飾分子 (リガンド) が含まれることを見出した。

考察

正常マウスにおける廃用性筋萎縮および SOD1-G93A マウスにおける筋萎縮の両方で、骨格筋における MuRF1 の発現増加を確認できた。R6 年度は、siRNA 医薬の全身経静脈投与により MuRF1 の発現を抑制することで、SOD1-G93A マウスの筋萎縮に対して有意な改善効果を示すか検討する計画である。一方、最適な治療時期を予測するための、SOD1-G93A マウスの骨格筋における MuRF1 発現レベルの経時的変化の確認、ヒト SOD1-ALS の骨格筋において、SOD1-G93A マウスと同様に骨格筋における MuRF1 発現レベルの上昇を認めるかについても確認する必要がある。

本研究で目指す骨格筋を対象にした MuRF1 の発現抑制は、アンメットメディカルニーズであるヒトの ALS における、骨格筋萎縮の直接的な治療法としての可能性を有する。本研

究の成果は、筋萎縮の複雑な分子病態を解明することに基づき、指定難病である ALS 及び社会的課題である加齢性筋萎縮の克服に寄与することが期待される。

本研究は、ALS 患者における骨格筋萎縮の治療選択肢を拡大し、生活の質の向上を目指すものである。また、加齢に伴う筋力の低下を緩和し、高齢者の自立支援と健康寿命の延伸にも貢献する可能性がある。

結論

SOD1-G93A マウスでは、70 日齢頃から腓腹筋の萎縮は顕在化し、MuRF1 発現レベルは上昇する。

参考文献

1. Neyroud et al. Blocking muscle wasting via deletion of the muscle-specific E3 ligase MuRF1 impedes pancreatic tumor growth. *Commun Biol*, 6(1), 519, 2023
2. Léger et al. Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogen-1. *FASEB J.* 20, 583–585, 2006

分担研究報告書

悪性脳腫瘍による神経変性・回路網破綻の理解を基盤とした新規がん治療法の開発

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
分担研究者名 川内大輔

緒言

脳腫瘍は致死率が最も高い疾患であり、腫瘍発生部位と分子解析データを元に分類されている。特に成人グリオーマは非常に悪性度が高く、効果的な化学療法が確立されていない。一方で、最近脳腫瘍と脳内細胞の相互作用が腫瘍増殖に影響を与えることが報告されつつあり、「腫瘍-ニューロン・コミュニケーション」の観点からグリオーマの腫瘍形成メカニズムを理解することにより、腫瘍増殖シグナルを見出し、それらを基盤とした新規の治療法の確立を目指す。

方法

成人グリオーマのがん幹細胞は培養下で維持可能である。まず、大阪医療センターとの共同研究で、レンチウイルスを用いて培養下で緑色タンパク質 EGFP とルシフェラーゼをコードする遺伝子を発現させる腫瘍細胞株を樹立した。さらに、狂犬病ウイルスの形成に必要な糖タンパク gp4 を発現させることにより、弱毒化狂犬病ウイルスの宿主細胞の能力を付加した株も樹立することに成功している。次に、gp4 発現グリオーマ細胞に mCherry をコードした弱毒化狂犬病ウイルスを感染させ、数日後に免疫不全マウスの脳内に移植し、一週間後に腫瘍とシナプスを介して相互作用する神経細胞群を mCherry で標識する。次に標識された細胞を分子マーカーで

同定し、それらの細胞に DREADD を特異的に発現させるアデノ随伴ウイルスを作成し、免疫不全マウスの脳内でグリオーマ細胞と共存させる。その後適切なタイミングで、CNO により DREADD 発現ニューロンの電気的な活動を操作し、その条件下で腫瘍細胞の増殖がどのように変化するかを解析する。

結果

狂犬病ウイルスによる経シナプス性逆光標識により、グリオーマが興奮性および抑制性神経細胞とシナプスを形成していることが明らかとなった。特に抑制性神経細胞とのシナプス形成は報告されておらず、その生物学的な機能の検証を開始した。まず、抑制生ニューロン特異的に M3Dq を発現させるアデノ随伴ウイルスを作成し、グリオーマとの共存下で神経細胞を活性化させると、腫瘍細胞で増殖マーカーである Ki67 陽性細胞の割合が低下した。

考察

現存する治療に使用可能なテモゾロミドは分子標的薬ではないため、腫瘍特異的な効果は得られないため、より特異的な機構を阻害する新しい抗がん剤の探索が望まれている。今回、アデノ随伴ウイルスを用いてグリオーマ細胞の増殖を抑制することに成功したことにより、シナプス伝達を制御することで脳腫瘍の増殖抑制する新しいアプローチの視野が広がったと考えられる。

結論

悪性度の高い成人グリオーマにおいて新規の腫瘍標的機構である「腫瘍とシナプスを形成する抑制性ニューロン」の寄与を明らかにした。

参考文献

1. Watanabe T, Mizuno HL, Norimatsu J, Obara T, Cabral H, Tsumoto K, Nakakido M, Kawauchi D*, Anraku Y*. Ligand installation to polymeric micelles for pediatric brain tumor targeting. *Polymers*. 15(7), 1808, 2023
2. Okonechnikov K, Joshi P, Sepp M, Leiss K, Sarropoulos I, Murat F, Sill M, Beck P, Chan CH, Korshunov A, Sahm F, Deng MY, Dominik Sturm D, Desisto J, Donson A, Green AL, Robinson G, Orr BA, Gao Q, Darrow E, Hadley JL, Northcott PA, Gojo J, Ryzhova M, Kawauchi D, Hovestadt V, Filbin MG, Zuckermann M, Pajtler KW, Kool M, Jones DTW, Jäger N, Kutscher LM, Kaessmann H, Pfister SM. Mapping pediatric brain tumors to their origins in the developing cerebellum. *Neuro Oncol*. 25(10), 1895-1909, 2023
3. Ghasemi DR, Okonechnikov K, Rademacher A, Tirier S, Maass KK, Schumacher H, Joshi P, Gold MP, Sundheimer J, Statz B, Rifaioğlu AS, Bauer K, Schumacher S, Bortolomeazzi M, Giangaspero F, Ernst KJ, Clifford SC, Saez-Rodriguez J, Jones DTW, Kawauchi D, Fraenkel E, Mallm J-P, Rippe K, Korshunov A, Pfister SM, Pajtler KW. Compartments in medulloblastoma with extensive nodularity are connected through differentiation along the granular precursor lineage. *Nat Commun*. Accepted.

分担研究報告書

シングル核解析による遺伝性筋疾患の病態 説明

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

分担研究者 林晋一郎

緒言

罹患組織を用いたオミックス解析は、分子病態ことのみならず、診断、予後、治療評価に対する分子マーカーの発見にとっても有効である。しかしながら、①骨格筋組織には様々な細胞種が存在すること、②罹患筋の病的変化はすべての場所で一様に起こるわけではないことから、これまでのような筋組織全体を解析する方法では十分な成果を上げられてこなかった。これらの問題を克服するために、本分担研究者は患者凍結筋を用いたシングル核トランスクリプトーム解析を確立し、骨格筋に存在する個々の細胞核毎に RNA 発現解析を行うことで、細胞毎に異なる発現応答かつ不均一な病態進行をも解析することに成功した。一方、空間的マルチオミックス解析は、シングル核トランスクリプトーム解析で失われる細胞同士の相互作用や罹患部位の“空間的”情報という必要不可欠な知見を与える。本研究課題では空間的マルチオミックス解析系を樹立し、シングル核情報と特徴的な空間的情報を直接的に結びつけることで、疾患病態を統合的に理解することを目指す。

方法

患者凍結筋組織（正常筋および各罹患筋）からセルソーターにより細胞核を単離し、10x Genomics 社 Chromium Controller およびライブラリ作製キットを用いてシングル核 RNA-

seq ライブラリを作製した。その後 R パッケージ Seurat により各細胞クラスターの同定と、罹患筋特異的に発現変動のある遺伝子を解析した。

結果

本年度はこれまで取得した snRNA-seq データに加え、新たに疾患筋から snRNA-seq ライブラリを作製し、計 19 の筋疾患、正常筋 4 例を含む 42 サンプルを統合して解析した。筋疾患病理では線維化が共通して見られ、進行度、重症度と相関することが多い。そこで、線維化の原因と考えられる間質に存在する Fibro Adipogenic Progenitor cell (FAP) に着目した。クラスター解析の結果、疾患共通あるいは特異的な DEG を取得した。ほぼ全ての筋疾患で共通するクラスター解析をした結果、線維症で発現が上昇するペリオスチンをコードする POSTN (1, 2) が高発現するクラスターを同定した。また、このクラスターには線維化の原因となるコラーゲンやファイブロネクチン(FN1)も高発現しており、筋疾患における線維化原因細胞と考えられた。一方、他の線維症、がんで線維化の原因とされる筋線維芽細胞のマーカーである α -平滑筋アクチン (ACTA2) の発現は見られず、この細胞集団は他の疾患とは異なることが示唆された。

考察

snRNA-seq によって、筋疾患で見られる線維化の原因細胞クラスターを同定した。興味深い事に、この細胞集団は ACTA2 を発現しておらず、他の疾患において線維化の原因とされる筋線維芽細胞とは性質が異なることが強く示唆された。今後は得られた DEG をもとに免疫組織化学的染色法あるいは in situ

hybridization 法によりこの線維化原因細胞の性質を詳細に解析するとともに、空間的な位置情報を取得し、線維化メカニズムを解明する。一方、線維化においては筋線維芽細胞の活性の上昇と協調して、マクロファージやその他免疫細胞の浸潤を伴う慢性炎症環境が形成される。この細胞環境では、線維化の過程の主要なエフェクターとして作用する TGF- β ファミリーや Wnt1 など、サイトカインと成長因子が多量に放出される。TGF- β と Wnt1 は細胞表面受容体に結合し、下流シグナルである Smad2/3 と CBP/ β -Catenin の核移行を引き起し、筋線維芽細胞の分化と、コラーゲン、ラミニン、ファイブロネクチンなどの ECM タンパク質の産生と分泌をさらに高める。今後は snRNA-seq のデータを活用し、FAP と線維化を促進する成長因子を放出する細胞との相互作用解析およびそのシグナルカスケードの解明を目指す。

結論

本研究により、筋疾患における線維化原因細胞クラスターを同定した。本研究の進展により筋疾患における線維化機序の解明と、新規バイオマーカーおよび治療法の発見が強く期待される。

参考文献

1. Buechler MB, Pradhan RN, Krishnamurty AT, Cox C, Calviello AK, Wang AW, Yang YA, Tam L, Caothien R, Roose-Girma M, Modrusan Z, Arron JR, Bourgon R, Müller S, Turley SJ. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature*. 593(7860), 575-579, 2021
2. Yamato H, Kimura K, Fukui E, Kanou T, Ose N, Funaki S, Minami M, Shintani Y.

Periostin secreted by activated fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis promotes tumorigenesis of non-small cell lung cancer. *Sci Rep*. 11(1), 21114, 2021

分担研究報告書

てんかん外科手術検体を用いたてんかん焦点病変の分子分類と脳画像との対応

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 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
研究協力者 飯島圭哉

緒言

本研究では、てんかん外科手術検体の分子生物学的な解析を行い、未知の分子病態を解明すること、および、新規分子標的薬の開発を目的とする。てんかん外科の治療対象となる難治てんかんは薬剤抵抗性であり、このような薬剤抵抗性てんかんに対する新規治療薬の創薬のために本研究は必要である。本研究で期待される成果は、てんかん原性病変の未知の原因を発見することであり、この結果は治療の標的になりうる。NCNP 病院脳神経外科は難治てんかんに対する外科治療を実施しており、毎年 20～30 検体をバイオバンクに登録し、研究への利活用を推進している。生体のヒト脳検体は脳科学研究において貴重な研究材料となる。てんかん外科手術検体の内訳は「海馬硬化症」「皮質形成異常」「低悪性度てんかん原性腫瘍」の 3 つが代表的である。本研究では、てんかん外科手術検体の分子生物学的な解析を行い、未知の分子病態を解明して、新規治療薬の開発へとつなげていく。

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。38 例に BRAF V600E 変異を、7 例に FGFR1 変異を認めた。その他は稀な遺伝子異常が 1～2 例ずつに認めた。17 症例では原因となる遺伝子変異が特定されなかった。

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。

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文化してく。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

今年度の研究成果の発表

原著論文

1. Senda, J., Tanaka, M., Iijima, K., Sugino, M., Mori, F., Jimbo, Y., . . . Iwasaki, M., Kotani, K. (2024). Auditory stimulus reconstruction from ECoG with DNN and self-attention modules. *Biomedical Signal Processing and Control*, 89, 105761, 2023
2. Firestone, E., Sonoda, M., Kuroda, N., Sakakura, K., Jeong, J. W., Lee, M. H., . . . Iwasaki, M., . . . Asano, E. (2023). Sevoflurane-induced high-frequency oscillations, effective connectivity and intraoperative classification of epileptic brain areas. *Clin Neurophysiol*, 150, 17-30, 2023
3. Iijima, K., Komatsu, K., Miyashita, S., Suyama, K., Murayama, K., Hashizume, K., . . . Iwasaki, M., . . . Hoshino, M. (2024). Transcriptional features of low-grade neuroepithelial tumors with the BRAF V600E mutation associated with epileptogenicity. *Genes to Cells*, 29(3), 192-206. 2024
4. Izumi, M., Kobayashi, K., Kajikawa, S., Kanazawa, K., Takayama, Y., Iijima, K., . . . Iwasaki, M., . . . Ikeda, A. (2023). Focal ictal

direct current shifts by a time constant of 2 seconds were clinically useful for resective epilepsy surgery. *Epilepsia*. 64(12), 3294-3306, 2023

5. Kosugi, K., Yoshitomi, M., Takayama, Y., Iijima, K., Kimura, Y., Kaneko, Y., . . . Iwasaki, M. (2023). Safety, Feasibility, and Efficacy of Additional Extraventricular Anterior Commissurotomy With Corpus Callosotomy. *Oper Neurosurg* (Hagerstown), 24(2), e68-e74. 2023
6. Roth, J., Bergman, L., Weil, A. G., Brunette-Clement, T., Weiner, H. L., Treiber, J. M., . . . Iwasaki, M., . . . Uliel-Sibony, S. (2023). Added value of corpus callosotomy following vagus nerve stimulation in children with Lennox-Gastaut syndrome: A multicenter, multinational study. *Epilepsia*. 64(12), 3205-3212, 2023

図書

なし

学会発表

1. 飯島圭哉 佐藤典子 木村有喜男 宮田元 鈴木博義 後藤雄一 村山久美子 木村唯子 金子裕 岩崎真樹
てんかん原性腫瘍における頭蓋内電極留置の必要性について 日本てんかん学会 2023年10月20日
2. 飯島圭哉 中島拓真 鈴木啓道 佐藤典子 木村有喜男 宮田元 鈴木博義 後藤雄一 村山久美子 木村唯子 金子裕 岩崎真樹
てんかん原性神経上皮腫瘍の遺伝子型分類と画像所見の相関 日本脳神経外科学会 2023年10月25日

3. Keiya Iijima, Noriko Sato, Hiromichi Suzuki, Yakuma Nakashima, Yuichi Goto, Hajime Miyata, Hiroyoshi Suzuki, Terunori Sano and Masaki Iwasaki. Correlation between molecular and neuroimaging classification in low-grade epilepsy-associated neuroepithelial tumors. 2023. Dec. 4, Orland, USA

研究成果による産業財産権の出願・取得状況
なし

分担研究報告書

脳画像コホートデータから観察したアルツハイマー病とパーキンソン病の混合病理像

国立精神・神経医療研究センター
病院 病態統合イメージングセンター
分担研究者 阿部十也

目的

高齢者認知症は加齢とともにアミロイド、タウ、 α シヌクレイン、TDP43などの異常タンパクが蓄積して引き起こされる神経変性疾患である。動物を用いた個々の異常タンパク病理モデルから病態回路の理解が進んでいる。しかし実際には複数の病理が組み合わさって病気が進行することが分かってきた。

例えばアルツハイマー病(AD)とパーキンソン病(PD)は前者が記憶障害、後者が運動障害の代表的疾患と考えられている。一見、両極をなす二疾患だが個々の症例を観察すると両者の間に症状スペクトラムが見て取れる。ADとPDの混合病理で症状スペクトラムが説明できるかの検証を目的に戦略的国際脳科学研究推進プログラム(AMED 国際脳)事業の認知症コホート研究(H30-R5 年度, 研究代表者 花川隆[現所属 京都大学])が実施された。

収集データをもとに AD/PD 病理の混合で症状表現がどのように修飾されるのか、回路の変調に交互作用が観察されるのか、を京都大学の連携下でコンセプト立証の解析を阿部が担当している。そこで得た結果を非公開の条件で提示する。

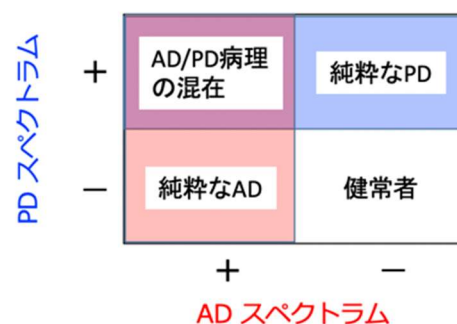
方法

AD/軽度認知機能障害、PD/レビー小体認知症、高齢健常者を対象に MRI 画像、核医学画

像(アミロイド PET、DAT-SPECT)、生体試料(血漿、髄液)、認知心理検査成績、その他臨床情報を多施設で収集した。AD 病理は髄液 A β 42/40 比もしくはアミロイド PET 集積値で評価した。PD 病理は線条体ドパミン神経変性を DAT-SPECT で評価した。

収集した DAT-SPECT、およびアミロイド PET 画像もしくは髄液アミロイド検査の多施設データの施設間補正を行い、データ駆動型に病理陰性症例のカットオフ値を設定した。これにより一つ一つの症例を下図のような AD-PD スペクトラム表現に当てはめることが可能になった。

結果および考察



従来の単一コホートではAD/PD病理の混在症例(図の左上パネル)を含んでおり、AD、PDの切り分けが困難であった。本課題では2x2のスペクトラム分類に成功し、この情報を基に責任回路の同定を進めている(結果は後述)。

国際脳終了時点で、登録 332 名の内訳は、AD 病理と PD 病理がともに陽性(重複病理) 31 例、AD 病理陰性で PD 病理陽性(典型的 PD スペクトラム) 88 例、AD 病理陽性で PD 病理陰性(典型的 AD スペクトラム) 59 例、AD 病理と PD 病理がともに陰性 100 例、分類不能または検査確定待ち)が 54 例であった。単独病理で表出する精神認知機能低下は、AD もしくは PD 単独病理の典型的な症状を認めた。例えば、記憶障害は AD、PD とともに

認めた。AD ではその低下が顕著であった。実行機能障害も AD、PD ともに認めたが PD で顕著であった。嗅覚障害も同じパターンを認めた。一方、覚醒度およびうつ症状は PD に特異的で AD では認めなかった。上記した AD、PD ともに低下する記憶、実行機能は混合病理によってさらに悪化する像を突き止めた。このような AD/PD 分類もとに責任回路の解析を京都大学と連携して行っている。混合病理の症状悪化を表現する回路変調を突き止める計画である。

結論

認知症コホート研究のデータから AD/PD 混合病理のスペクトラムを観察した。混合病理を有する症例は特に記憶、実行機能において症状の悪化を認めた。今後その回路理解を行う予定である。

分担研究報告書

脳および全身組織における ATTR アミロイドーシスの病態解明と治療法開発

信州大学脳神経内科
リウマチ・膠原病内科
分担研究者 関島良樹

緒言

ATTR アミロイドーシスは、トランスサイレチン (TTR) を前駆蛋白とするアミロイドーシスで、アミロイドの全身沈着により、末梢神経障害、脳アミロイドアンギオパチー (CAA)、心不全などの臓器障害を呈する致死性の疾患である。脈絡叢で産生され髄液中に分泌された TTR が脳組織に、肝臓で産生され血液中に分泌された TTR が脳以外の全身組織に沈着する。本研究では、脳および全身組織における ATTR アミロイドの分解除去機構を解明し、病態に基づいた新たな治療法を開発する。また、自然経過および疾患修飾療法による生体内のアミロイド沈着量の変化を定量的なアミロイドイメージングにより明らかにする。

方法

1. TTR 四量体安定化薬であるタファミジス内服中に末梢神経障害が悪化し siRNA 製剤であるパチシランに切り替えた遺伝性 ATTR (ATTRv) アミロイドーシス患者 12 名の血清中の Neurofilament light chain (NfL) を Simoa 法で解析した。
2. ATTRv アミロイドーシス患者 34 名で CAA の出現状況の解析と、¹¹C-PiB-PET による脳への ATTR アミロイド沈着の定量的な評価を行った。

3. 野生型 ATTR (ATTRwt) アミロイドーシス患者 35 名、非アミロイドーシス患者 68 名を対象に、血清中の TTR タンパクに対する自己抗体の存在を確認するために、TTR リコンビナントタンパクを SDS-PAGE し、PVDF メンブレンに転写して血清を一次抗体としてウェスタンブロットを行なった。

結果

1. タファミジスからパチシランへの切り替えにより、神経障害の血液バイオマーカーである NfL は有意に低下した 1。
2. ATTRv アミロイドーシスに関連した CAA は 34 名中 8 名でみられ、Transient focal neurologic episodes が 7 名、小脳出血と認知機能低下がそれぞれ 2 名で認められた。アミロイドーシス発症から中枢神経症状出現までの期間は平均 17.0 年で、PiB の集積は罹病期間に比例して増加し、SUVR の増加率は女性で有意に高かった。3D-SSP z-score 画像ではアミロイド沈着は発症約 10 年後に小脳上面から始まり、15 年後には小脳表面全体、シルビウス裂、大脳縦裂前部へと拡大した。発症 25 年後には大脳表面全体にアミロイド沈着を認めた 2。
3. ATTR アミロイドーシス患者および非アミロイドーシス患者の血清中に TTR C 末フラグメントの凝集体に対する自己抗体が検出され、加齢に従って抗体価が高くなる傾向を認めた。

考察・結論

1. NfL は ATTRv アミロイドーシスにおける治療反応性を評価する有用な血液バイオマーカーであり、パチシランはタフ

アミジスに比較し、末梢神経障害抑制効果が高いと考えられた。

2. ATTRv アミロイドーシス患者における脳アミロイドーシスの特徴的な分布と進行様式が明らかになった。また、罹病期間に加え女性も ATTR 型脳アミロイドーシス発症の危険因子であることが明らかになった。さらに、PiB-PET が ATTR 型 CAA の早期診断と治療評価のための有用なバイオマーカーになる可能性が示された。
3. ATTR アミロイドーシスおよび非アミロイドーシス患者に TTR C 末フラグメントの凝集体に対する自己抗体が存在することが明らかになり、この自己抗体がアミロイドーシスの発症あるいは発症予防に関与している可能性が考えられた。

参考文献

1. Sato M, Mochizuki Y, Takahashi Y, Takasone K, Aldinc E, Tica S, Jia G, Sekijima Y. Neurofilament light chain as a biomarker for monitoring response to change in treatment in hereditary ATTR amyloidosis. *Amyloid*. 30, 351-352, 2023
2. Takahashi Y, Oguchi K, Mochizuki Y, Takasone K, Ezawa N, Matsushima A, Katoh N, Yazaki M, Sekijima Y. Distribution and progression of cerebral amyloid angiopathy in early-onset V30M (p.V50M) hereditary ATTR amyloidosis. *Amyloid*. 30(1), 109-118, 2023

分担研究報告書

機械学習に基づく複合生体データのマルチ モーダル情報処理

大阪大学
大学院医学系研究科
分担研究者 加藤有己

格言

生物の脳の機能を解明することは重要な課題の1つである。特に、ヒトの脳の機能の解明を目指して、本研究では独自の切り口として肺機能から脳の老化状態を予測することを目指す。ここでは、脱髄がもたらす大脳皮質による呼吸中枢機能における調節機能の破綻から、呼吸機能の乱れが生じるものと仮定する。特に、ミエリンは脳機能の時間変化を捉える良い候補として期待されている[1]。脳の状態を予測するモデルが広く社会で利用されるためには、その入力データが簡単に入手できることが望ましい。本研究ではまず、比較的入手しやすい呼吸データから、脳の髄鞘の状態をある程度予測できる機械学習モデルを開発することを目指す。

方法

マウスの2週齢、4週齢、9週齢、9週齢でLPC注入、そして84週齢の5群全体の特徴を捉えるため、主成分分析を実行した。一方、9週齢でLPCを注入したサンプルをケース、9週齢をコントロールとしたケース・コントロール解析にはt検定を用いた。また、ケース・コントロールの二値分類にはサポートベクターマシン (SVM) を用いた。

結果

上述した条件で10秒間隔で取得したマウスの呼吸器データを解析の対象とした。なお、これらを時系列データとして機械学習で扱うにはサンプル数が少ないこと、および時系列として見ても各群の特異的なパターンを抽出することが困難であったため、各時刻のデータを独立した1単位として解析を行った。まず、全5群のデータセットを主成分分析によって教師なし次元削減を行った結果、定性的にある程度各群の特徴量を捉えられることを確認した。次に、LPCと9週齢マウスのケース・コントロール解析を行ったところ、2群間で有意差がある観測値(1呼吸あたりの吸気量や気管支収縮の指標など)を検出することができた。さらに、

RBF(動径基底関数)カーネルを用いたサポートベクターマシンによる二値分類を行った結果、平均分類精度(適合率と再現率のF値)が80-85%程度となり、比較的単純な機械学習モデルを用いても精度よく分類できることを確認した。

考察

上記ではすべての観測値を考慮したが、実際に分類に不可欠な観測値を同定することは重要である。実際、呼吸数と気管支収縮の指標だけで、線形分離ではあるものの9週齢と9週齢でLPC注入の2クラスをある程度分類できることを確かめている。今後はランダムフォレストモデルなどを使って、識別に寄与する観測値を絞り込むことが必要であろう。

結論

今回は呼吸器データのみで脳の状態を予測することに挑戦した。これにより、呼吸器データに加え、画像を組み込んだバイモーダルなデータを利用して、脳の状態を予測するマ

マルチモーダル情報処理に基づく研究への足掛かりになる。また、呼吸器データのみから学習したモデルと、脳の画像データを組み合わせて学習したモデルとの分類性能の差を明らかにすることが可能となる。現在まではマウスのデータを用いているが、ヒトのデータに関しては UK Biobank [2]から取得し、最終的にはヒトへの応用に展開する予定である。

参考文献

1. de Faria O Jr et al. Nat Neurosci 2021.
2. Sudlow et al. PLoS Med 2015.

分担研究報告書

微小空間制御による脳構成細胞の高精度細胞解析技術の開発

東京大学生産技術研究所

分担研究者 松永行子

緒言

オリゴデンドロサイトによる神経軸索への再髄鞘化（巻き付き）のメカニズムは未だ不明な点が多く、本研究では、人工軸索を模したナノファイバー状の足場を有する *in vitro* 評価系を構築し、再髄鞘化におけるオリゴデンドロサイトの巻き付を定量的に評価可能な *in vitro* 培養プラットフォームを開発する。本年度は、バイオマテリアルのナノファイバー形成と三次元プリンティングを組み合わせたパターン化ナノファイバー培養基板を試作した。生体適合性を有するポリ-ε-カプロラクトン(PCL)を用い、顕微鏡での細胞観察を容易にするため、透明なガラス基板上へのパターンニング条件について種々検討を行い、ヒトオリゴデンドロサイト細胞株 (MO3.13) によるミエリン様構造の形成について検討した。

方法

・エレクトロスピンニング法による配列を制御した人工軸索アレイ基板の作製
人工軸索を模したナノファイバー形成には、自作の走査型エレクトロスピンニング装置 (Direct-writing electrospinning: DWE) を用いた。装置は XYZ 軸に稼働する導電性ステージ、高圧電源に接続された注射針、注射針に PCL の高分子溶液を供給するシリンジポンプで構成される。一定の走査速度、印加電圧条件でカバーガラス上へ間隔 50 μm の平行

な配列の形成を試みた。人工軸索に対し、酸素プラズマ処理とラミニンコート処理を行い、表面処理によるミエリン様構造形成への影響について検討した。

・細胞培養

MO3.13 を人工軸索アレイ基板上に播種し、10%FBS 含有高グルコース DMEM で培養した。培養 24 時間後、細胞核およびアクチンを染色し、共焦点レーザー顕微鏡により画像を取得した。画像解析により人工軸索上に形成されたミエリン様構造を被覆率として評価した。

結果

湿度制御およびガラス基板と導電性ステージの間に導電性溶液を封入する帯電抑制を施すことで、ナノファイバー同士が融合することなく、50 μm 間隔の高精度でパターンニングすることに成功した。細胞培養評価においては、コントロールガラス表面では、細胞の配向性は確認されなかったが、人工軸索アレイ基板上で培養した MO3.13 はナノファイバーと同じ方向への配向が観察された。また、酸素プラズマ処理とラミニンコート処理は、ミエリン様被覆構造形成を有意に向上させることが示された。

結論

絶縁体ガラス基板上で、50 μm 間隔の高精度で高分子溶液のパターンニングを達成した。ヒトオリゴデンドロサイト細胞株による人工軸索アレイ基板上へのミエリン様構造形成について評価を行い、再髄鞘化におけるオリゴデンドロサイトの巻き付を定量的に評価可能な *in vitro* 培養プラットフォームの基盤技術を構築した。

Elucidating the mechanism of neurodegeneration and regeneration based on the communication of the brain constitute cells

Rieko Muramatsu

Director, Department of Molecular Pharmacology, National Institute of Neuroscience,
National Center of Neurology and Psychiatry

The development of treatments and preventive methods for neurological diseases is a crucial issue for achieving a sustainable society in Japan as well as in the world. With recent advancements in scientific technology, comprehensive gene expression analysis at the single-cell level and spatial gene expression analysis are being utilized to obtain large datasets related to diseases. These datasets have provided insights into analytical methods, reinforcing traditional hypothesis-driven research and promoting data-driven research. However, these analytical technologies are still in development, therefore, collaboration with highly specialized researchers in informatics and engineering is considered effective for maximizing fundamental medical research.

Our team aims to establish sustainable collaboration between disease-based researchers and those in informatics and engineering to revolutionize research into the pathology of neurological diseases using big data. Specifically, we aim to conduct comprehensive, unbiased analyses, including unknown molecules, without limiting ourselves to specific target cells, focusing on neurodegeneration and neuroregeneration in diseases such as Alzheimer's disease. By developing and utilizing technologies such as microfluidic devices for the functional evaluation of candidate molecules, we seek to uncover mechanisms that are truly critical in the pathogenesis of neurological diseases with the following aims: 1) acquiring and analyzing big data related to neurodegeneration and repair, and sharing and improving these analysis techniques, 2) developing new data acquisition technologies, and 3) investigating pathological research.

This year, each researcher advanced their studies on disease pathology and discussed the direction of joint research. Muramatsu (PI) collaborated with researchers in engineering and informatics to develop new culture systems and evaluation methods.