

新学術領域研究 領域代表者からの報告

2. 研究の進展状況及び成果の概要

【領域番号】 3302

【領域略称名】 脳内環境

【領域代表者（所属）】 高橋 良輔（京都大学・医学研究科・教授）

本研究領域が設定した研究対象は、1) 既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域の創成、2) 異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により当該研究領域の発展、3) 多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により当該研究領域の新たな展開、を目指すものである。その目標達成のため、従来型の脳疾患研究を転換・発展させ、健康ないしは病的な脳内環境の解明という新たな視点で、脳疾患研究者と脳科学、神経科学、生命科学の基礎研究者との融合研究を可能にする新学術領域を構築、推進してきた。領域研究では、①脳内環境の破綻を引き起こす神経細胞内メカニズムの解明、②脳内環境の破綻と毒性転換・病態伝播メカニズムの解明、③イメージング技術の活用による脳内環境の解析に焦点を当てて、3つの研究項目（A01, 02, 03）を設定し、主に遺伝子改変マウスを用いたインビボ解析を進めてきた。領域全体として計画通り十分な進捗が得られている。

神経内環境グループ(A01)は、正常な脳活動を営む上で必要な細胞内の分子機構を解明するため、以下の3機能に着目し、その破綻状態と捉えることができる疾患脳や生理的神経系のモデル系を用いた研究を進めている。A01は、領域設計時の上記3つの研究対象の全てを含むが特に「2. 異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により当該研究領域の発展に資するもの」が該当する。例えば、病態神経科学（高橋、服部）と神経形態学（内山）、分子神経生物学（内匠）という神経内メカニズムを異なる観点から研究する研究者が互いに連携し、また A02、03 の研究者らと連携して行う共同研究によって「脳内環境」の理解を推し進めるものである。以下に代表例を提示するが、共同研究の実例（6 ページ）、主な研究成果（17 ページ）に示すように連携研究をはじめとした各班の研究が順調に進捗し、当初の目的に照らして予定通り十分な成果をあげている。

① **脳内環境維持におけるタンパク分解系の関与：高橋（計画）**は脊髄運動ニューロン特異的に、26S プロテアソーム必須構成分子である Rtg3 サブユニットをノックアウトさせたマウスの作製に成功し、新たな ALS マウスモデルを確立した。このマウスの脊髄およびレーザーマイクロダイセクションで切り出した運動ニューロンを回収し、cDNA マイクロアレイ解析によって転写産物を検討すると同時に、既に得られた脊髄全体の遺伝子プロフィールを A02 領域の山中（計画）の有する ALS 関連変動遺伝子との比較検討を開始した。マウス筋肉組織のプロテアソーム機能障害で異常蛋白質を特徴とする封入体筋炎を再現することを突き止めた。漆谷（計画・分担者）はプロテアソーム機能低下によって異常蓄積する TDP-43 の RNA 結合ドメイン RRM1 の異常会合によって ALS で見られる封入体形成と RNA スプライシング異常を再現することを突き止め、さらに下流の分子機構の解析を開始した。内匠（計画）は ALS 変異を持つヒト TLS/FUS をコンディショナルに発現するモデルマウスを作製中である。TLS/FUS ノックアウトマウス胎仔脳において野生型と異なるスプライシングのパターンを示す遺伝子を同定したので、その中でタンパクの機能に変化（異常）が期待される Enah と Tmem209 に着目し、これらの機能と TLS/FUS との関係を in vitro、特に培養細胞を用いた発現系を用いて解析中である。

② **ミトコンドリアを始めとするオルガネラの機能保持と品質管理：服部（計画）**らはミトコンドリアの品質管理に重要な parkin をノックアウト(KO)させたマウスが経口糖負荷試験にて耐糖能異常を呈し、原因として 1) 同マウス由来初代膵臓β細胞での actin 重合化による insulin 初期分泌の低下、2) 同マウス由来胚性線維芽細胞での lamellipodia 形成不全、insulin 刺激時の細胞極性障害を特定しており、現在詳細な分子メカニズムの検討を進めている。また PINK1/parkin 結合分子 FKBP38 を同定後、KO ショウジョウ

バエでの機能解析を行っており、KO マウスの作製も進行している。さらに PINK1/parkin 介在性 mitophagy 過剰状態により caspase-8 依存的アポトーシスが誘導されることを確認した。柳（公募）はミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL の神経組織特異的欠損マウスの作出に成功し解析を開始した。予備的な実験結果において顕著な神経細胞死が観察されており、神経変性疾患との関連性が示唆されつつある。

③ **神経細胞に特有である樹状突起と軸索の分子輸送・情報伝達**：内山（計画）は、小脳プルキンエ細胞特異的にカテプシン D(CD)が欠損しリソソームが蓄積する CTSD^{flax/flax};GluD2-Cre マウスを確立しオートファゴソームの軸索内局在を解析したところ、1) CD 欠損プルキンエ細胞では軸索にオートファゴソームが蓄積するが、細胞体ではリソソームの一種の GROD やこれを取り込んだオートファゴソームが多数形成され、生後 2 ヶ月で同細胞は脱落することが分かった。2) プルキンエ細胞で選択的オートファジーに関連する p62 と Nbr1 とのトリプル KO マウスや初代神経培養細胞を用いた解析から、軸索/シナプス前領域ではバルクでオートファゴソームを形成し、細胞体に逆行輸送してリソソームと癒合して分解に関与し、p62/Nbr1 がリソソームの神経細胞体内での局在に重要であることが示唆された。現在、リソソームが軸索に侵入しない機序を解明するため、KO とノックインマウスの作製を開始している。岡野（公募）は、軸索変性により遅発性小脳失調を呈する HuC ノックアウトマウスの解析を行った結果、神経特異的 RNA 結合タンパク質 HuC が翻訳調節により複数のモータータンパク質の発現量を統合的に調節し、軸索輸送を制御することによりニューロンの恒常性の維持に寄与することが明らかになった。

「**神経外環境**」グループ (A02) では、グリア細胞などの非神経細胞やそれらが放出するメディエーターによる神経細胞周囲環境の恒常性維持機構とその破綻時において周囲環境が毒性転換に至るメカニズムの解明を目指している。A02 は、領域設計時の 3 つの研究対象の全てを含むが特に「1. 既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域の創成」が該当する。具体的には、細胞外環境の破綻という視点から神経系の病態をとらえる試みや、また神経外環境が保護的環境から毒性転換に至る機序を「神経内メカニズム」「イメージング」との融合研究によって解明しようとするものであり、研究の発展により融合領域「脳内環境」の中核をなすものである。A02 では、これまでに以下に示すメディエーター（下線）の同定・解析を進め、下記の領域内共同研究に結びついている。当初の目的に照らし予定通り十分な進捗がみられ、その進捗状況は以下の通りである。

① **神経—ミクログリア・炎症の連関**：山中（計画）は、ALS マウスおよび孤発性 ALS 患者脊髄を用いた網羅的遺伝子発現解析により、ミクログリアにおける自然免疫反応の亢進を見いだした。その ALS 病態への関与を明らかにするため、自然免疫アダプターである MyD88 あるいは TRIF を欠失したマウスを変異 SOD1-ALS マウスと交配したところ、TRIF 欠損の場合にのみ ALS の疾患進行が加速し、病態が増悪した。TRIF 経路を遮断すると脊髄におけるケモカイン CCL5, CXCL10の低下と浸潤免疫細胞の減少を認め、現在これらの分子・細胞群が脊髄環境に保護的に働く機序を検討している（高橋、内山、三澤との共同研究）。

三澤（計画・分担）は、強力な免疫・炎症修飾物質として知られるオステオポンチン(OPN)が変性病態における神経-グリアメディエーターであることを見いだしており（成果参照）、さらに OPN の ALS 病態への関与を解析するため、OPN を欠失した SOD1-ALS マウスの発症が遅延することを見いだした。さらに OPN の受容体である CD44 の発現上昇を脊髄病巣で認めており、OPN が運動神経由来の局所環境修飾物質として、CD44 を介して ALS 発症過程に積極的に関与している可能性を考え研究をすすめている。川上（計画）は、自ら同定した ALS 原因遺伝子 Optineurin(OPTN)のノックアウトマウスを作成・解析し、予備的検討では脊髄運動神経の減少を認めている。さらに、変異 SOD1-ALS マウスと OPTN^{-/-}マウスの交配実験を行い、IRF3、TRIF 経路や神経炎症における OPTN の役割の解明と OPTN-ALS の発症機構解明を目指している（川上、山

中)。損傷運動ニューロン—ミクログリア連関の新たなメディエーターとして、木山（計画）はミクログリアに発現する遺伝子 DAP12, Trem2, Siglec-Hなどを同定した。現在、その機能解析を行うとともに、ALSモデル脊髄におけるミクログリア遺伝子発現プロファイルとの比較検討をすすめてつある（木山、山中）。富永（公募）は、温度感受性 TRPM2 チャンネルのマクロファージ機能への関与をすでに報告し、ミクログリアにおいても TRPM2 遺伝子の発現と、Ca²⁺イメージング法で、過酸化水素処理後に温度応答の著しい増大を確認している。

② **神経—シュワン細胞・オリゴデンドロサイト連関、軸索再生**：木山（計画）が同定した、神経損傷時に発現する**神経特異的プロテアーゼ DINE**は液性因子の放出を介してシュワン細胞の機能を制御し、軸索の分枝や神経筋接合部の形成に関与することが判明しつつある。竹居（公募）は内在性 Nogo 受容体アンタゴニストである LOTUSの機能および脊髄損傷モデル動物におけるその役割を解析した。LOTUSは Nogo 受容体の4種のリガンド分子（神経再生阻害因子）に対して拮抗作用を示し、軸索再生治療の標的となりうるということが判明した。

③ **神経—アストロサイト連関**：浅沼（公募）は中枢神経作用薬のスクリーニングにより神経保護候補薬として同定した8-OH-DPATが、アストロサイト上のセロトニン受容体(5-HT1A)に作用し、アストロサイトでの**メタロチオネイン**の発現・放出を介し、初代培養およびPDモデルマウスにおけるドパミン神経に対して保護効果を発揮することを見出した（投稿中）。加藤総夫（公募）は、細胞外グルコース、アストロサイトのグリコーゲン、および**乳酸**輸送がシナプス伝達維持において担う役割とその貢献度を延髄孤束核2次ニューロン、小脳プルキンエ・ニューロン、舌下神経核運動ニューロン、海馬CA1錐体ニューロン、扁桃体外側核ニューロンで評価し、シナプス近傍における**乳酸**輸送が、脳の広範な部位において興奮性シナプス伝達の維持に貢献している事実を明らかにした（in revision）。

④ **脳内環境研究に関するリソース、技術開発、その他研究進捗**：加藤秀政（計画・分担）は脳内環境を構成する種々の細胞にiPS細胞を効率的に誘導するため、DNAの脱メチル化に関わるとされるTET1をヒトiPS細胞に導入することにより、誘導効率を画期的に改善した。木山（計画）は、損傷運動ニューロンのミトコンドリアを選択的に標識できるTgマウスを作製し、損傷神経が再生・変性する過程でミトコンドリアの形態や動態を解析することが可能となった。

「イメージング」グループ（A03）では、毒性因子蓄積と伝播から、炎症性ミクログリア活性化、酸化ストレス、神経伝達異常に至る病態カスケードを網羅するイメージングが実現されてきており、これらの病的プロセス同士の相互作用の解析も進められている。A03は、領域設計時の3つの研究対象の全てを含むが特に「3. 多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの」が該当する。A03の各研究者による新たな手法である各種生体イメージングの樹立とその応用を通じて領域内共同研究を推進することが可能となり、A01, 02の研究者との融合研究により本領域の新たな展開を目指すことが期待される。当初の目的に照らし予定以上の進捗・成果がみられ、その進捗状況は以下の通りである。（主な研究成果欄も参照）

① **毒性因子蓄積と炎症性グリア活性化のイメージング：伝播と相互作用を可視化**

樋口（計画）は、タウタンパク凝集体のポジトロン断層撮影（PET）プローブを開発し、PETイメージングに成功した。武田（公募）により、 α シヌクレイン凝集体蓄積も、PETによりヒトで可視化されている。これらの技術により、タウや α シヌクレイン蓄積部位の経時的拡大が示され、プリオン様脳内伝播を支持する所見が得られつつある。神経炎症については、樋口により、トランスロケータータンパク（TSPO）をマーカーとした傷害性ミクログリアのPETが実現したが、TSPOはミクログリアの毒性転換制御因子であることも判明した。さらに、 $A\beta$ 蓄積と炎症性ミクログリア活性化の相互促進も経時的PETで証明された。船

曳（公募）は、新開発の蛍光顕微内視鏡によりミクログリア遊走の長期追跡も実現した。

② 酸化ストレスのイメージング：細胞レベルから個体レベルを網羅

柿澤（公募）は、細胞レベルで、リアノジン受容体を利用してレドックス環境の蛍光イメージングに成功した。米田（公募）により、個体レベルで神経疾患における酸化ストレスのPETが実現し、これを用いて家族性パーキンソン病のミトコンドリア障害評価などに取り組んでいる。

③ 神経伝達異常のイメージング：新たなモダリティやイメージング薬剤を駆使

樋口により、個体レベルでのグルタミン酸受容体のPETが実現した。分子レベルでは、林（公募）により全反射蛍光顕微鏡でグルタミン酸受容体の挙動が画像化された。