

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名	革新的技術による脳機能ネットワーク全容解明プロジェクト	
研究開発課題名	大規模脳画像解析とヒトー霊長類トランスレータブル脳・行動指標開発にもとづく精神・神経疾患の病態神経回路解明	
機関名	国立大学法人東京大学	
研究開発	所属 役職	医学部附属病院 教授
担当者	氏名	笠井 清登

2. 研究開発成果の内容

①統合失調症の発症ステージングに対応した神経回路異常の解明

1)統合失調症発症ステージングに対応した MRI, EEG 計測

発症リスク期および初発期の統合失調症患者で脳波 (EEG) 計測を行った。ミスマッチ陰性電位 (MMN) の縦断経過を解析した結果、MMN は早期段階において素因を反映する指標であることを見出した。詳細な時間周波数解析を行い、聴性定常反応 (ASSR) 課題中の basal gamma が ASSR と関連することを見出した。聴覚オッドボール課題では δ 波の同期のパターンが統合失調症患者と健常者とで異なることを見出した。

統合失調症初発期における MRI 解析について、英国 King' s College London、中国四川大学との三施設連携研究を行った。4 文化圏から 126 名の統合失調症初発期患者と、年齢・性別・文化圏をマッチさせた健常対照者 126 名の脳構造を MRI T1 強調画像で検討した。右前部島皮質の脳体積減少が、すべての文化圏からのサンプルで一致して認められた。

国立大学法人富山大学、国立大学法人東北大学、学校法人東邦大学との合計 4 施設の連携により、統合失調症発症リスク期にある 107 名の患者、107 名の健常者を対象に、T1 強調画像データを用いて、FreeSurfer による全脳の皮質厚および脳回形成の程度を表す local gyrification index (LGI) の計測を行ったところ、発症リスク期では健常者群に比べて、両側前頭・側頭の皮質厚減少、左中心溝付近と右後頭の皮質厚増加、右半球優位の広範な LGI 増大がみられた。発症リスク期患者のうち、のちに発症した 21 名ではしていない 80 名に比べて、皮質厚に有意差はなかったが、左後頭皮質の LGI 増大がみられた。

EEG 指標のバイオマーカーとしての有用性を検討するため、健常双生児 86 名 (一卵性 33 組、二卵性 10 組) を対象として、204 チャンネル脳磁計を用いて、音素、及び純音 (周波数、持続時間) を変化させた MMNm (magnetic counterpart of MMN; MMNm) を測定した。MMNm ピーク強度の級内相関係数 (ICC) については、一卵性双生児ペアでは 0.38~0.76、二卵性双生児ペアでは 0.18~0.65 と、ともに比較的高い相関を示した。一方、MMNm 潜時は一卵性双

生児ペア-0.03~0.38、二卵性双生児ペア-0.75~0.85と条件や測定半球によって異なっていた。相関係数より算出した各条件別 MMNm ピーク強度の遺伝率 (h^2) は、音素条件：左半球 0.68、右半球 0.50、周波数条件：左半球 0.22、右半球-0.48、持続時間条件：左半球：0.15、右半球 0.33 であった。

2) トランスレータブル脳指標の開発

国立研究開発法人放射線医学総合研究所との密接な連携により、げっ歯類の MRI 解析を継続した。平成 26 年度に実施した野生型マウスと自閉症モデルマウスの横断的体積比較で開発された方法論をもとに、平成 27 年度は同一個体を非侵襲的に複数回撮像した MRI データを用いて 2 群間の縦断的体積比較を進めた。

ラット頭蓋における埋め込み電極より ASSR の記録を行った。周波数依存性試験 (10~80Hz, 公比 $\times 10$) を実施した結果、ERSP/ITC 共にヒト同様 40Hz 帯で高い反応を示した。この 40Hz の ASSR に対し NMDA 拮抗薬であるケタミンは、動物に健忘作用を示す用量で ERSP/ITC 共に増強効果を、過活動/麻酔作用を示す用量で有意な減少作用を示し、その作用が二相性であることが示唆された。これらの結果から、ラットでもヒト頭皮脳波と同様の ASSR が測定できることが明らかになった。

中核拠点におけるマーモセット EEG データとの比較検討を可能とするため、学校法人玉川学園玉川大学との密接な連携により、マカクザルの EEG 計測を行い、ECoG 計測技術を開発した。聴覚野内の複数の亜領域を網羅する ECoG 電極を留置する方法を開発し、覚醒下で 64ch 電極から MMN および ASSR を計測し、聴覚野内の局在を明らかにした。

3) マーモセットの行動解析

国立研究開発法人放射線医学総合研究所との密接な連携により、防音シールドルーム中に実験用ケージと赤外線による運動量測定装置を設置し、これに録音・録画用のビデオカメラ・集音マイクを加えた、poly I:C マーモセットに用いる行動解析システムを国立大学法人東京大学医学部に導入し、不安惹起物質投与マーモセット等を用いたセットアップを進めた。

4) マーモセットのエピゲノム解析

平成 26 年度に得られたマーモセット脳神経系や末梢組織のエピゲノムデータの解析を継続し、各組織において共通するエピゲノム状態、また、組織特異的なエピゲノム状態を同定した。国立研究開発法人放射線医学総合研究所との連携により生育段階を追ったエピゲノム解析を行い、生後初期段階と成体期におけるエピゲノム状態の変化を同定した。また、poly I:C マーモセット個体脳試料からゲノム DNA の抽出を行い、ビーズアレイによるエピゲノムデータの取得を行った。

5) 臨床に資するバイオマーカーの開発

健常者 17 名の安静時脳活動を、浅部と深部の信号を分離できる近赤外線スペクトロスコピー(NIRS)で測定し、偏相関解析の手法により皮膚血流の影響を軽減しつつ各脳部位間の機能的結合が検出できることを検証した。さらに、健常者 80 名の安静時脳活動を全頭型 NIRS で計測したところ、左右大脳半球相同部位間に高い機能的結合を認め、精神疾患における異常が指摘されてきた **default mode network** や **language network** 等の脳回路の安静時活動の一部を、臨床で簡易計測可能な近赤外線トポグラフィーでも測定できることを示した。

初回エピソード統合失調症患者 31 名を対象にのべ 77 回の NIRS 縦断計測・臨床評価を実施し、初回計測時ではなく、登録 6 か月の語流暢性課題施行中の前頭前野 NIRS 信号変化が登録 12 か月後の症状・機能、および登録 12 か月後の前頭前野信号変化が同時点での症状・機能を反映することを示した。

また、現在保険診療で実施されている NIRS を用いた精神疾患の客観的鑑別診断補助法を 3 つの統合失調症発症ステージング（ハイリスク群 47 名、初回エピソード群 30 名、慢性期群 34 名）に適応させ、年齢、性別を補正すれば、NIRS 鑑別診断補助法による客観的鑑別が 80%程度確保されることを示した。また、この判別率は、12 か月後の NIRS 計測を用いたデータでも保たれており、統合失調症早期診断補助法としての有用性を示した。

簡易型 EEG 計測データについては、解析を半自動化するための解析パイプラインを作成した。作成した解析パイプラインを脳波データに適用し、MMN と ASSR が適切に解析できることを確認した。

②候補遺伝子のスクリーニング研究

1) 平成 26 年度に確立したシナプス発達やシナプス伝達を指標にした機能スクリーニング系を用い、既報の精神疾患関連候補遺伝子のスクリーニングを継続した。子宮内電気穿孔法やウィルスベクターを用い、既報の遺伝子 A に対する miRNA を胎生マウスの前頭前野の 2/3 層神経細胞に、既報の遺伝子 G に対する miRNA を小脳のプルキンエ細胞に導入し、前頭前野のスライスあるいは小脳と脳幹の共培養標本からの電気生理学的記録を行った。その結果、遺伝子 A のノックダウンで前頭前野のシナプス発達の異常が見出され、遺伝子 G のノックダウンで小脳のシナプス刈り込みに異常が見出された。

2) 国立大学法人名古屋大学の尾崎グループが見出した新規の精神疾患関連候補遺伝子 D と P を解析した。上記 1 と同様の方法を用いて、これらの遺伝子を前頭前野の 2/3 層神経細胞においてノックダウンした結果、遺伝子 P のノックダウンでは異常が見られなかったが、遺伝子 D をノックダウンした時にシナプス発達の異常が見出された。

3) 平成 26 年度にシナプス異常が見出された CNTNAP2 をノックダウンしたマウスにおいて、社会的行動や情動行動を含めた一連の行動学的解析を行った。その結果、CNTNAP2 ノックダウンマウスでは社会性の異常とうつ様行動の亢進がみとめられた。

③精神疾患モデルマーマセットの作出

1) 精神疾患モデルマーマセットの作出

雌マーマセットより定期的に採血を行い、血中プロゲステロン濃度を ELISA 法で定量することによって、性周期を測定した。その結果、一部のマーマセットにおいて正常な性周期が確認された。排卵日を推定するために、これらの個体に対してプロスタグランジン F2 α の投与を行い、黄体退行を惹起した。その後、雄マーマセットと同居させ、自然交配により妊娠マーマセットを作出した。妊娠 80 日より poly I:C を腹腔内に 5 日間連続投与し、ウイルス感染の模倣を行った。平成 27 年度内に一部の poly I:C 投与妊娠マーマセットは出産し、5 匹の仔マーマセットを得ることができた。

2) 遺伝子変異マーマセットの作製

上記の雌マーマセットの血中プロゲステロン濃度測定により、性周期が確認できなかった個体に対して、卵胞刺激ホルモンの投与を行い、未受精卵の採卵を行った。未受精卵は *in vitro* で MI-MII 期まで成熟させ、雄マーマセットより得られた精子を用いて体外受精を行った。その結果、安定して受精卵を作製することができるシステムを構築することができた。得られた受精卵に TSC1 をターゲットとした CRISPR/Cas あるいは platinum TALEN のマイクロインジェクションを行い、*in vitro* で培養を行った。これらの操作胚よりゲノム DNA を抽出し、SURVEYOR アッセイによって変異導入を解析した結果、両者とも比較的効率的に変異が導入されていることを明らかにすることができた。

④モデル動物の形態解析

平成 26 年度に引き続き、マウス脳を用いてミクロレベルでの形態解析のための技術的基盤の確立を行った。電子顕微鏡による形態解析については、連続超薄切片自動回収装置 ATUM による切片回収法を昨年度までに確立した。そこで平成 27 年度は ATUM を用いて回収された連続超薄切片からの走査型電子顕微鏡による画像の最適化について検討を行った。さらに、得られた電子顕微鏡像から神経組織の三次元再構築する手法について検討を行った。

光学顕微鏡を用いた形態解析については、CLARITY 法による透明化法を平成 26 年度に確立した。そこで平成 27 年度は CLARITY 法により細胞膜の脂質を除去したマウス脳を用いて、脳深部の免疫組織化学染色法の条件の最適化を試みた。

さらに条件検討を終えた諸技術に関して、マーマセット脳を用いた予備的検討を行った。このうち電子顕微鏡による形態解析については、マウス脳を用いて確立した手法を適用することでマーマセットにおいてもシナプス小胞や後シナプス肥厚部などが確認され、神経組織の三次元再構築に供することのできる試料を作製することができた。

⑤疾患横断的脳画像データベースの構築、回路解析

1) MRI データベース構築

平成26年度にクオリティチェックを行った既存の統合失調症患者および健常成人のMRI データリソースについて、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センターの松田・花川グループとの連携により、神経回路解析に資するよう、データベースとして格納した。また、このデータベース格納の対象ではなく、平成26年度に定めた共通プロトコルにもとづき取得された、統合失調症患者、気分障害患者、発達障害患者、健常者のMRI データリソースを、特に皮質下領域の神経回路解析に資するよう、整備した。さらに、国立大学法人大阪大学の橋本・吉峰・望月グループ、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センターの村山・花川グループとの連携により、平成26年度に定めた共通プロトコルにもとづき、三領域でのMRI データを蓄積した。

2) 生理・行動データベース構築

眼球運動検査機器を使用し、国立大学法人大阪大学と共通のプロトコルを用いて、国立大学法人東京大学で健常者63名のデータを収集し、測定データより眼球運動特徴を抽出した。簡易型EEGデータ計測については国立大学法人大阪大学と連携してシステムとプロトコルを共有した。

⑥ヒト ECoG 研究

平成27年度中に新たに4例において、MMN/ASSR 誘発課題を用いた ECoG 計測を行った。Classical oddball task の施行回数を1200回、コントロールとしての flip-flop task、many standards task の施行回数をそれぞれ800回とした。両側の上側頭回を中心とした MMN が全例で確認された一方で、前頭葉で加算波形に変化が見られた症例は4例中2例(全6例中3例)であった。応答は、100-200ミリ秒で見られる MMN の成分に引き続き、P300 の成分が400ミリ秒程度まで観察された。ASSR は3例で解析を行い、20~160Hz の刺激周波数を用いて計測し2例で各周波数に対応する応答が確認された。

MMN, ASSR 誘発課題で計測した ECoG データを3次元脳表面画像上に重畳表示した。MMN については、一部の症例で上側頭溝における位相反転が観察された。時間周波数解析を行ったところ、MMN と P300 の潜時に対応して80-150Hz の高周波帯の信号増強が確認された。これは、単峰性で上側頭回に限局しており、局在性・定量性に優れていると考えられた。この高周波律動の早期成分(MMN に対応)は上側頭回に、後期成分(P300 に対応)は重複してやや狭い範囲に分布した。これに対して ASSR は両側の上側頭回を中心として比較的広い範囲に分布し、右優位の傾向が見られた。40Hz に対する応答が最大であったが、部位により周波数特性が異なった。潜時に特異的な分布は示さなかった。

MMN の局在を皮質電気刺激マッピングによる脳機能局在と比較した。全6例の内、1例では MMN の分布域で聴覚異常が誘発された。また MMN の後方部分が感覚性言語野と重複した。1例では、そのような重複関係は見られず、3例では MMN の分布域と感覚性言語野の重複が確認された。

⑦プロジェクトの総合的推進

プロジェクト全体の連携を密としつつ円滑に運営していくため、臨床研究グループ内の分科会を4度開催し、参画する各機関の連携・調整にあたりとともに、革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクトに参画する各機関と積極的に連携・情報共有にあたった。EUの**Human Brain Project**のMRI・インフォマティクス拠点を務める**Ferath Kherif**教授と意見交換を行った。また、P S、P O、P Lとの連携を密にし、上記分科会で助言を仰ぎながらプロジェクト全体の進捗状況を確認しつつ計画の合理化を検討し、プロジェクトの推進に資した。プロジェクトで得られた成果については、日本神経科学学会やNIH-AMED脳科学ワークショップ等で公表した。