

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の全容解明プロジェクト	
研究開発課題名	変性性認知症による脳機能ネットワーク異常の全容解明（前頭側頭葉変性症/筋萎縮性側索硬化症の神経回路破綻解明に基づく革新的治療開発）	
機関名	国立大学法人名古屋大学	
研究開発 担当者	所属 役職	大学院医学系研究科 特任教授
	氏名	祖父江 元

2. 研究開発成果の内容

① FTLD/ALS の疾患特異的なマクロ神経回路障害の同定と技術開発

・ FTLD/ALS マクロ神経回路解析

孤発性 FTLD/ALS であることを、臨床所見、画像検査、筋電図・誘発電位検査装置、遺伝子検査によって診断した症例を対象とし、MRI (tract based spatial statistics や probabilistic diffusion tractography 等)を用いて解剖学的脳内神経回路解析を行い、尾状核周囲の神経回路は、認知機能低下が明らかになる前から障害され、認知機能低下に伴い障害の程度が増悪していくことを見出した。尾状核は、病理学的にも認知機能低下を伴う前から細胞脱落が生じており、認知機能が高度になるにつれて細胞脱落が高度であることを確認した。一連の研究に基づき、尾状核ネットワークの障害に特異性の高い確率逆転学習を FTLD/ALS に行い、他の認知機能検査では明らかな異常を認めない段階から本検査では、高率に異常を検出可能であることを見出した。この結果は、尾状核ネットワークは、FTLD/ALS の認知機能に関連する初期病変であることを支持する。現在尾状核ネットワーク破綻の有無を画像的に示すため、症例を集積している。併せてゲノム解析による病態解明も併せて検討している。

・ 多施設共同研究体制基盤構築

多施設共同研究へ向け、国立大学法人名古屋大学において安静時機能的 MRI の再現性検証研究を行った。具体的には、32ch ヘッドコイル用 phantom を併用しつつ、20 名の健常ボランティアが複数回に渡って安静時機能的 MRI に加え、脳容積画像、拡散テンソル MRI を実施した。現在、その再現性結果を解析中である。

・ 疾患モデルとの対比

現在、モデルマーマーモセットの作成を進めており、ヒトにおける知見と突合していく予定である。またマウスモデル (AAV による海馬特異的 FUS-KD モデル) では老齢期 (18 ヶ月齢) で脳萎縮を呈することを MRI での脳容積測定と病理学的に神経脱落を認めることを明らかにした。このことにより部位特異的に FTLD/ALS の病態関連因子の機能障害によってマクロ神経回路異常が動物でも再現でき

ることを示した。

② FTL/ALS のマクロ神経回路障害の基盤となる分子病態とマイクロ神経回路の解明（マウスモデルおよびマーモセットモデルを用いる）

・高次脳機能に関する病態関連分子カスケードの解明

マウスモデル（前脳特異的 FUS-KO および AAV による海馬特異的 FUS-KD）について、ポストシナプスの異常（スパインの成熟度の低下）を免疫組織学的手法などによって明らかにした。これに関与する病態関連分子カスケードを同定するために、ポストシナプスで重要な役割を担う PSD-95 に着目したところ、FUS 抑制により PSD-95 の局在が変化することが明らかになった。

・マイクロ回路障害とマクロ回路障害の時系列的変化の解明

前述の研究と平行してマクロ神経回路障害の基盤となるシナプス異常などマイクロ回路障害を明らかにし、マクロ回路障害との関連を MRI による脳画像評価および免疫組織学的な解析を用いて時系列的に比較検討する。

・マーモセットモデル作成に向けた予備的実験

AAV によって shRNA を大脳に導入することで部位特異的な TDP-43-KD、FUS-KD マーモセットモデルを樹立するための準備に着手した。具体的には④に記載したように FUS-KD マーモセットモデルの予備実験として頭頂葉皮質への AAV による shRNA 導入を実施した。

③ ヒト疾患とマウス・マーモセット疾患モデルの比較に基づく、トランスレータブル脳病態

・脳病態・行動指標開発プロトコール作成

①で示した確率逆転学習は、齧歯類、マーモセットでも施行可能であり、ヒトにおける有用性を十分検討、確立し、トランスレータブル指標開発につなげる。

・ヒトと動物モデルの神経回路比較

マウスモデル（海馬特異的 FUS-KD モデル、海馬特異的 TDP-43-KD モデル）では線条体に特に変化はなく、線条体特異的な KD モデルの構築が必要と考えられた。このため、線条体特異的 FUS-KD モデル開発に着手した。マーモセットモデルの作成については④に記載してあるとおりである。

④ マウスあるいはマーモセットの神経回路特異的操作等による変性疾患モデルの作成と治療介入

・神経回路特異的操作に基づくマウスあるいはマーモセットモデルの作成

②に記載したようにマウスモデル（前脳特異的 FUS-KO および AAV による海馬特異的 FUS-KD）について、ポストシナプスの異常（スパインの成熟度の低下）を明らかにし、神経回路に異常があることを示した。以下のようにマーモセットモデルの作成に着手した。マーモセット内在性 FUS および TDP-43 のクローニングを実施、完了し、mRNA 配列を決定した。その上でマーモセット内在性 FUS と GFP との融合タンパク質を発現する vector を構築し、HEK293T 細胞に導入した後に、安定細胞株を樹立し、マーモセット内在性 FUS をターゲットにする複数の siRNA を導入して GFP シグナルと、WB における GFP-FUS の発現量の低下を指標に、最適な siRNA 配列を決定した。その上で、この配列を有

する AAV を作成し、大学共同利用機関法人自然科学研究機構基礎生物学研究所松崎研の協力の下で FUS-KD マーモセットモデルの予備実験として頭頂葉皮質への AAV による shRNA 導入を実施した。

- 神経回路特異的相殺に基づくマウスモデルに対する治療介入

マウスモデル（前脳特異的 FUS-KO および AAV による海馬特異的 FUS-KD）について、ポストシナプスの異常（スパインの成熟度の低下）に伴って変化する病態関連分子カスケードを元に戻すための AAV vector の作製に着手した。