

## 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	脳血管障害とパーキンソン病における脳神経回路障害とその機能回復に関わるトランスレータブル脳・行動指標の開発	
機関名	国立大学法人京都大学	
研究開発 担当者	所属 役職	大学院医学研究科 臨床神経学 教授
	氏名	高橋 良輔

## 2. 研究開発成果の内容

## ①MPTP 投与マウスの作製と解析

MPTP 急性および亜慢性投与モデルを作成し、これらが再現性良くドパミン作動性ニューロンの細胞死と運動症状を示すことを確認した。ロータロッドによる協調運動学習後の MPTP の急性投与により、運動学習過程における、運動技能の保持または想起を選択的に障害できることを示した。一方で、急性投与後に協調運動学習課題を施しても、顕著な運動障害は認められないことから、この際に何らかの代償機構が作用していると考えられる。一方で、亜慢性投与モデルでは、協調運動学習過程における、技能の獲得過程が障害され、その後の反復運動学習により、その障害が回復することを示した。これらを以って、運動障害の発症・代償機構の作用・障害の回復モデルとする。この際、分子レベルでの生化学的な回復は認めなかった。したがって、発症・回復に至る分子機構（ドパミン産生に関わるチロシン水酸化酵素や前初期遺伝子の変動）よりも、脳神経回路の再編機構に焦点を当て、今後の研究を推進することとした。ゆえに、若干の計画変更に伴うマイルストーンの未達成項目はあるものの、MPTP モデルの作成と評価および今後の研究計画に繋がるプロトコルの樹立は概ね達成されたと考える。

## ②げっ歯類パーキンソン病マウスモデルの作製と解析

まず、human  $\alpha$ -syn BAC Tg; GBA +/- を作成し、その病理学・生化学的解析を行い、異常リン酸化  $\alpha$ -syn の脳領域特異的蓄積を明らかにした。次に、当該マウスの網羅的行動解析を行い、非運動症状の GBA 変異による増悪を示した。また、平成 28 年度に予定しているオミクス解析のサンプリングを終了した。ドパミン作動性ニューロンの早期機能異常を検出するため、抗 DAT（ドパミントランスポーター）抗体を用いたドパミン作動性ニューロン選択的シナプトソーム抽出を行う実験系を確立した。また、より強力な表現型を示す PD モデルマウスの作製を目的とし、変異型 human  $\alpha$ -syn BAC Tg マウスと変異型 GBA ノックインマウスのダブル Tg マウスを作製した。変異型 human  $\alpha$ -syn BAC Tg マウスの予備検討から、 $\alpha$ -syn の truncation やオリゴマー化を認めた。

また、野生型マウスを用いて、 $\alpha$ -syn injection モデルを作製し、Lewy 病理の伝播を確認した。さらに、GBA 変異によりこの伝播が促進される可能性について検証した結果、有意ではないものの、Lewy 病理の伝播が促進される傾向は観察された。一方で、Braak 仮説に沿った  $\alpha$ -syn の伝播や進展様式の

モデル化のため、嗅球や消化管壁に対する  $\alpha$ -syn フィブリル接種による、Lewy 病理の経時的進展と行動解析が可能な体制を確立した。

以上のことから、平成 27 年度研究開発計画に挙げた本項目のマイルストーンは全て達成された。

#### ③PD 患者体液を用いたトランスレータブル脳指標の開発

ヒト髄液から高純度エクソソームを抽出する手法の検討を行い、最適化した。また、本研究項目を推進するにあたり、国立大学法人京都大学附属病院倫理委員会からの承認が不可欠であり、その申請手続きを、およそ 1 年がかりで行い、平成 28 年 4 月に学内倫理委員会の承認を得ることができた。そのため、平成 27 年度内では、PD 患者髄液の採取・解析には至っていない。したがって、研究計画に掲げたマイルストーンの達成率は、およそ 50%であると考ええる。

#### ④プロジェクトの総合的推進

平成 27 年 5 月に、第 2 回脳血管障害・PD チームミーティングを開催し、意見交換を行った。本会議には、6 月より赴任予定であった革新脳担当の特定助教も出席し、研究計画への円滑な参加を促した。また、国立大学法人京都大学と公立大学法人横浜市立大学との共同研究 (MPTP 投与 PD モデルマウスにおける、新規 PET プローブを用いた AMPA 型グルタミン酸受容体分布の遷移解析) について、研究計画の企画立案、共同研究体制の確立を行った。

#### ⑤行動中の脳機能計測技術の開発

平成 27 年度の「⑤行動中の脳機能計測技術の開発」については、平成 27 年 10 月より、臨床研究グループ・疾患研究チームに参画した渡邊が担当した。平成 27 年度の研究開発計画に掲げたマイルストーンとして、ヒト・サルに対してもトランスレータブルな認知行動課題実施中に単一細胞の精度で神経活動のみならず細胞内シグナル動態をイメージングにより評価するために、各バイオセンサーの発現手法や内視顕微鏡の光学系について最適化を行うこと、さらに行動中のファイバーバンドルの振動やねじれに対処するために、ファイバーバンドルの頭部固定法やファイバーのねじれ防止のためのコンピューターについても検討することを設定している。内視顕微鏡に関しては、線条体での単一細胞レベルの  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングによる神経活動計測および FRET バイオセンサーによる細胞内シグナル動態計測に成功している。さらにファイバーのねじれや振動への対策として、マイクロドライブによりファイバーを頭部へ固定することで、長期間安定してイメージングが可能となっている。タッチスクリーン、レバープレスによるオペラント学習の条件検討は順調で、「衝動性」や「注意力」、さらに複雑な動作シーケンスの学習プロセスの解析も可能な状況である。従って、平成 27 年度の研究開発項目について、当初予定したマイルストーンを十分達成したと考える。平成 28 年度は、これまでに以上に高橋 G と渡邊 G が密接に協議し、予定通りに PD モデルマウスを対象に研究を進めていく。