

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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  
(英語) Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies  
(Brain/MINDS)

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Translational research for neuronal circuitry pathologies of Parkinson's and cerebrovascular diseases

研究開発担当者 (日本語) 大学院医学研究科 臨床神経学 教授 高橋良輔

所属 役職 氏名： (英語) Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Prof. Ryosuke Takahashi

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

【和文】

村田美穂 (国立精神・神経医療研究センター) らのレム睡眠行動異常症 (REM sleep behavior disorder: RBD) 患者の追跡による、パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) 運動症状発症前コホート研究の結果から、PD 運動前駆症状とされる認知機能障害に至る睡眠障害および嗅覚障害は、独立した神経回路に責任を負うことが示唆された。この結果を受け、村田らの PD 運動症状発症前コホート研究を、動物モデルで補完する形で、高橋良輔 (京都大学 大学院医学研究科) らの開発した新規 PD モデルマウス研究の焦点を、PD 運動前駆症状の中でも、特に嗅覚神経回路へと集中させた。本体制の強化を目的とし、よりトランスレータブルな脳指標の開発へ向け、伊佐正 (京都大学 大学院医学研究科) らと共同で、嗅球に対する PD 関連タンパク質  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -syn) の微小注入をトリガーとする  $\alpha$ -syn 凝集伝播マーマセットモデルの開発を開始した。一方、これと対比する形で、大阪大学において、マーマセット線条体に  $\alpha$ -syn を微小注入し、凝集伝播促進による PD 運動症状のモデル化を試みた。PD の進行に付随する神経回路の再編機構を解明するため、京都大学において、線条体を中心とした新規脳深部 *in vivo* イメージング技術を開発した。

PD における運動症状に関しては、高橋琢哉 (横浜市立大学 大学院医学研究科) らの開発するシナプス機能分子を認識する PET プローブを、種間横断型研究へと発展させるため、高橋良輔らの PD モデルマウス・ラットに適用可能な状況を整えた。また、小池正人 (順天堂大学 大学院医学研究科)

らによる超微形態解析から、ドパミン作動性ニューロン選択的に障害を起こした際に、同ニューロン軸索内にて、ミトコンドリア変性が起こることが示された。これを新規指標とし、以後は、他の神経回路も含め、高橋良輔らの PD モデルマウスの解析を進める。さらに、吉峰俊樹（大阪大学 国際医工情報センター）らによる、脳磁図（magnetoencephalogram: MEG）を用いた解析から、PD 患者において、安静時／運動時ともに、電気生理学的指標に異常が現れることが示され、同指標の患者へのフィードバックによる新規治療法の開発にもつながる成果が得られた。今後は、同臨床指標を脳血管障害（cerebrovascular disease: CVD）に対し、拡張し、疾患横断的な電気生理学的指標の開発を行う。

CVD の動物モデルに関しては、主に京都大学および国立精神・神経医療研究センターを拠点とし、げっ歯類・マカクサル・マーモセットを用いて、新規脳梗塞および半側空間無視モデルの作製・解析を行った。マカクサルの血管閉塞による脳梗塞モデルの研究開発の結果、運動野表面に慢性留置した皮質脳波（electrocorticogram: ECoG）電極刺激による運動誘発閾値が、予後予測のバイオマーカーとして有望であるとの結果を得た。また、脳梗塞後直後の安静時 ECoG 信号に徐波化がみられ、デルタからシータ帯域の脳活動が優位に観察された。脳梗塞後の機能回復に伴い、ECoG 信号の徐波が消失し、ベータ波帯域の活動が優位に観察された。一方、マカクサルの右側の側頭連合野と前頭連合野を結ぶ白質の弓状束を構成する superior temporal gyrus を損傷した結果、単純な感覚・運動系の障害ではなく、「注意の障害」と考えられる行動が観測され、半側空間無視のモデル作製に成功した。このモデルにおける安静時 MRI 計測による領域間の結合関係の解析から、機能回復の回路機構と考えられる機能的結合の変化を観測した。さらに、マカクサルでの結果を、マーモセットのモデルに転用し、半側空間無視のメカニズムをより詳細に回路レベルで理解するため、ウィルスベクターを用いた回路標識・回路操作の技術開発を開始した。CVD のトランスレーショナル研究においても、シナプス機能分子を認識する PET プローブを広く利用し、種間横断型研究ならびに疾患横断型研究を進める予定である。

#### 【English】

From a cohort study of “Parkinson’s disease (PD) premotor symptoms” by following up patients of REM sleep behavior disorder (RBD), we hypothesized that disturbances in sleep and olfaction, both of which led to cognitive dysfunctions considered to be PD premotor symptoms, could be independent pathologies of neuronal circuitry in the brain. In response to this result of RBD cohort study, we focused rodent model study on a PD premotor symptom, especially on olfactory circuitry pathologies, in order to complement two modalities of the premotor symptoms. To develop more translatable animal model of PD premotor symptoms, we started establishing a marmoset model which replicated a propagation of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) aggregation of PD by injecting  $\alpha$ -syn fibrils into the olfactory bulb. In contrast to this  $\alpha$ -syn olfactory bulb injection model, we injected  $\alpha$ -syn fibrils into the striatum of marmosets to establish a marmoset model of “PD motor symptoms” replicating dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra. In order to elucidate a mechanism of neuronal circuitry rewiring which associates with PD progression, we developed a novel fluorescent imaging technique at deep brain regions.

In the motor symptoms of PD, we prepared research and development environments for applying newly developed PET probe of synaptic protein to our novel mouse model of PD, in order to expand the research into a species cross-study. In the drug-induced PD mouse model, we found

that dopaminergic neuron selective damage led to mitochondrial degeneration in the axon, and this phenomenon could be utilized as an ultrastructural biomarker. By using this technique, we are going to analyze the circuitry specific mitochondrial pathologies in the above PD mouse model including other neuronal circuitries. From the analysis of magnetoencephalogram (MEG), we found abnormalities electrophysiological indices in the resting and moving state of PD patients, which could be expanded to develop a novel therapy by providing feedback of the indices to those patients. These clinical biomarkers are going to be applied to cerebrovascular disease (CVD) to develop a diseases cross biomarkers.

In the studies of CVD, we analyzed animal models of stroke and spatial hemi-neglect, newly established in rodents, macaque monkeys and marmosets. In studies on the macaque model of stroke after clipping the major arteries of the brain, we obtained results showing that a motor threshold to evoke muscle twitches by stimulation with electrocorticogram (ECoG) electrodes chronically placed on a surface of the motor cortex can be a good biomarker of prognosis prediction. Resting state brain activity with ECoG in the monkey before and after the stroke showed slow waves and brain activity of delta to theta band was prominent, immediately after the stroke. Along with a recovery, the slow waves disappeared, and beta-band wave became more prominent in the resting-state ECoG signals. On the other hand, a lesion in the right superior temporal gyrus of macaque monkeys, which composes the arcuate fasciculus connecting the right temporal association cortex to prefrontal cortex, resulted in a deficit in attention rather than simple sensory-motor functional deficits. This can be regarded as a novel model of spatial hemi-neglect. Furthermore, resting state connectivity by fMRI scanning between two brain regions in this model was changed during the lesion and recovery process. To apply these results to a marmoset model and analyze the neuronal circuitry mechanism more in detail, we started to develop technologies of labeling and manipulating neuronal circuitry using viral vector systems. PET probes for synaptic proteins are also planned to apply to the CVD translational research, and we promote the overall project by the diseases and species cross studies.

### III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
  1. 遺伝的リスクファクターを用いた孤発性パーキンソン病モデルマウスの作成, ポスター, 生野真嗣, 山門穂高, 高橋良輔, 第 39 回神経科学大会, 2016/7/20, 国内
  2. 孤発性パーキンソン病の遺伝的リスク因子を利用した新しいパーキンソン病モデルマウス作製の試み, ポスター, 生野真嗣, 山門穂高, 高橋良輔, 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2016/10/6, 国内
  3. 孤発性パーキンソン病の遺伝的リスク因子を利用した新しいパーキンソン病モデルマウス作製の試み, 口演, 生野真嗣, 高橋良輔, 第 69 回日本自律神経学会総会, 2016/11/11, 国内
  4. Inoculation of  $\alpha$ -synuclein fibrils to  $\alpha$ -synuclein BAC transgenic mice did not accelerate Lewy-like pathology, ポスター, 奥田 真也, 上村紀仁, 高橋良輔, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/18, 国内

5. Inoculation of  $\alpha$ -synuclein fibrils to  $\alpha$ -synuclein BAC transgenic mice did not accelerate Lewy-like pathology, ポスター, 奥田 真也, 上村紀仁, 高橋良輔, 第 39 回神経科学大会, 2016/7/20, 国内
6. Does inoculation of  $\alpha$ -synuclein fibrils promote Lewy-pathology of  $\alpha$ -synuclein BAC transgenic mice?, ポスター, 奥田 真也, 上村紀仁, 高橋良輔, 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2016/10/6, 国内
7. Glucocerebrosidase deficiency accelerates the propagation of alpha-Synuclein pathology, ポスター, 上村紀仁, 長谷川成人, 高橋良輔, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/18, 国内
8. Memory process-dependent impairment in motor skill learning by dopamine depletion, ポスター, 畑中悠佑, 高橋良輔, 第 39 回神経科学大会, 2016/7/20, 国内
9. Memory process-dependent impairment in motor skill learning by dopamine depletion, ポスター, 畑中悠佑, 高橋良輔, 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2016/10/6, 国内
10. Does endogenous alpha-synuclein have protective property in human alpha-synuclein transgenic models?, 澤村正典, 上村紀仁, 高橋良輔, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/18, 国内
11. 内因性 alpha synuclein はヒト alpha synuclein transgenic 動物において表現型の出現を阻害するか?, 澤村正典, 上村紀仁, 高橋良輔, 第 39 回神経科学大会, 2016/7/20, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 模倣される病—神経回路の病的遷移, 畑中悠佑, 上村紀仁, 生野真嗣, 京都大学「京大アカデミックデイ 2016」, 2016/9/18, 国内

(4) 特許出願