

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06538

研究課題名(和文) 霊長類の2光子イメージングによる神経変性疾患の原因変性タンパク質の伝播過程の解明

研究課題名(英文) The study for propagation process of degenerative proteins responsible for neurodegenerative diseases by two-photon imaging in primates

研究代表者

松本 圭史 (Yoshifumi, Matsumoto)

公益財団法人実験動物中央研究所・ライブイメージングセンター・研究員

研究者番号：60513463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、異常アミロイドタンパク質が神経細胞内で発生し、近隣の細胞へ伝播する過程を2光子顕微鏡により観察することを目的としている。そのため1)同一細胞を長期間観察するための手技、2)神経細胞間の接続状況の同定、3)神経細胞の機能異常の同定の確立を行った。そこで、1)gore-tex社製の人工硬膜を使用することで、最長4ヶ月の観察に成功した。2)アミロイド伝播による機能的な影響を観察するため体性感覚野を対象にし、体性感覚野と運動野との接続を明らかにした。さらに、3) 大脳皮質体性感覚野の刺激への応答パターンを同定した。これにより、機能異常が見られた時の刺激応答の変化を比較することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病やパーキンソン病といった異常アミロイドタンパク質の伝播と蓄積により生じる疾患は、非常に多くの患者がいるにもかかわらず、現在のところ未だ根治治療薬がない。特に、アルツハイマー病などの認知症患者は、現在日本において数百万人規模であり社会問題化している。本研究でこれら疾患研究の、霊長類における基礎研究基盤を整えたことにより、今後これら疾患の治療に対する研究が推進すると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to observe the process of abnormal amyloid protein generation in neurons and its propagation to neighboring cells by 2-photon microscopy. For this purpose, we established 1) a technique for long-term observation of the same cells, 2) identification of the connection status between neurons, and 3) identification of functional abnormalities in neurons. Therefore, we succeeded in 1) using artificial dura made by Gore-tex for observation for up to 4 months, 2) targeting somatosensory cortex to observe functional effects of amyloid propagation, and 3) clarifying connections between somatosensory cortex and motor cortex. In addition, 3) we identified the response patterns of the somatosensory cortex to stimuli. This made it possible to compare the changes in stimulus responses when functional abnormalities were observed.

研究分野：脳神経科学

キーワード：マームセット 神経科学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD) に代表される神経変性疾患では、AD ではアミロイド (A β) やタウ (Tau) が、PD では α -シヌクレイン (α -Syn) といった繊維性異常タンパク質が神経細胞に凝集・蓄積し神経変性を引き起こす。これら異常タンパク質は、病気の進行に伴って脳の限局した部位から全体に広がっていくことが知られている (*Nature* 2006)。この定型的な進行様式のメカニズムは未解明の部分が多いが、それを解く鍵として「伝播説」が注目を集めている (*Nat Med* 2008)。伝播説とは、細胞内の正常型タンパク質が異常型に変換され、異常型タンパク質が細胞外に放出され、近傍の神経細胞に取り込まれることにより、病変が限局した脳部位から広範囲に拡大するというものであり、近年、この説を裏付ける研究結果が数多く報告されている (*Nat cell boil* 2009, *Science* 2010 など)。また、霊長類のマーモセット脳内に異常型 α -Syn を接種し、3ヶ月後にその異常型 α -Syn の脳内分布を免疫組織学的解析により観察した結果、異常型 α -Syn の伝播と神経変性の誘導が認められた (*Acta Neuro* 2017)。このように、神経変性疾患では、異常タンパク質が脳の広範囲に広がることと、病気の進行との間に密接な関係があると考えられているが、その伝播メカニズムは明らかになっていない。その理由の一つとして、これまで異常タンパク質の細胞間伝播を継時的に観察できていないことがあった。

2. 研究の目的

我々は、覚醒状態のマーモセットの脳神経活動を約1ヶ月間、安定に観察する技術を開発した。覚醒個体の拘束装置を独自に開発し、マクロ蛍光顕微鏡と2光子顕微鏡により、覚醒状態の神経活動を領野レベル (数 mm) から単一細胞レベル (数 μ m) までマルチスケールでマッピングすることに成功した (*Scientific Reports* 2016)。本研究ではこの技術を応用し、異常タンパク質の伝播の影響を、細胞レベルから行動レベルまで長期間・継続して観察することにより、神経変性疾患の進行過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(a) 異常タンパク質が神経細胞に取り込まれ、近接する細胞に伝播し、さらにその神経細胞が変性し、表現型を示すまでの全過程を明らかにするには、同一細胞の数ヶ月以上の観察が必要である。長期観察を妨げる要因の一つは、マーモセットで顕著に見られる組織新生による観察部位の光透過性の低下である。そこで本申請では、観察部位の手術方法の改良や、近年開発された組織新生を抑制する人工膜 (GORE 社製) の利用などにより長期観察を実現した。

(b) 異常タンパク質の伝播による、神経細胞の形態や活動の変化の観察

本研究では、隣接した脳領域である大脳皮質運動野と体性感覚野を観察対象とする。運動野に赤蛍光ラベルした異常型 α -Syn を注入し、その赤蛍光により伝播過程を観察する。さらに、体性感覚野の神経細胞の形態や神経活動を半年以上、継時的に観察した。

(c) 異常タンパク質の伝播による、個体レベルでの影響の観察システムの構築

アミロイドタンパク質の伝播による神経細胞への影響を、感覚応答という個体レベルでの反応に還元することができる。感覚応答を客観的に評価するために、野生型マーモセットの体性感覚応答を調べた。足の裏、脚、腹部などに電極を装着し、それらの応答領域をマクロ蛍光顕微鏡により同定した。マーモセットの個体間での差を考慮した体性感覚応答の刺激応答マップの作成に成功した。これにより、アミロイドタンパク質の伝播による感覚応答の異常が比較することが可能になった。

4. 研究成果

本研究では、異常アミロイドタンパク質が神経細胞内で発生し、近隣の細胞へ伝播する過程を2光子顕微鏡により観察するために、1) 同一細胞を長期間観察するための手技、2) 神経細胞間の接続状況の同定、3) 神経細胞の機能異常の同定の確立を行った。そこで、1) GORE社製の人工硬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

膜を使用することで、最長4ヶ月の観察に成功した。2)アミロイド伝播による機能的な影響を観察するため体性感覚野を対象にし、体性感覚野と運動野との接続を明らかにした。さらに、3) 大脳皮質体性感覚野の刺激への応答パターンを同定した。これにより、機能異常が見られた時の刺激応答の変化を比較することが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Lili Yue, Liuqing Wang, Yangchun Du, Wei Zhang, Kozo Hamada, Yoshifumi Matsumoto, Jin, Yandong Zhou, Katsuhiko Mikoshiba, Donald L Gill, Shengcheng Han, Youjun Wang	4. 巻 9(2)
2. 論文標題 Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor is a Crucial Regulator of Calcium Dynamics Mediated by Endoplasmic Reticulum in HEK Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 275-288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9020275.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshifumi Matsumoto, Shoji Oda, Hiroshi Mitani, Shoji Kawamura	4. 巻 12(6)
2. 論文標題 Orthologous Divergence and Paralogous Anticonvergence in Molecular Evolution of Triplicated Green Opsin Genes in Medaka Fish, Genus <i>Oryzias</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 911-923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/gbe/evaa111.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------