

順天堂大学ブランディング研究

2019年度の進捗状況

学校法人番号	131025	学校法人名	順天堂		
大学名	順天堂大学				
事業名	脳の機能と構造を視る:多次元イメージングセンター				
申請タイプ	タイプB	支援期間	5年	収容定員	3803人
参画組織	大学院医学研究科老人性疾患病態治療研究センター、大学院スポーツ健康科学研究科スポーツ健康医科学研究所				
事業概要	順天堂大学の特色ある研究として脳の病態研究をあげることができる(clinical neurology分野での研究業績は国内トップクラス)。その飛躍・発展のため、医学・スポーツ健康科学部局横断的な先端的・学際的研究拠点の整備により「脳の構造と機能を視る」を事業テーマに設定する。病態脳から超健康脳までを対象に多次元イメージング技術を開発し、神経疾患の予防・診断・治療法の開発や高次脳機能の解明を目指す。				
①事業目的	<p>本事業は、大学院医学研究科老人性疾患病態・治療研究センターにおいて神経科学研究に携わる臨床(脳神経内科・脳神経外科・精神科・放射線科)・基礎研究室(生理学・形態学・再生医学)、大学院スポーツ健康科学研究科の健脳プロジェクトに携わる研究室が核となり、イメージング技術を駆使して細胞・神経回路・個体の一貫した解析が可能なシステム(多次元イメージング)を確立し、病態脳から超健康脳を表裏一体として研究する全学的な取り組みである。</p> <p>本学の共同利用研究施設の研究基盤センター形態解析イメージング研究室に整備された透過型および走査型電子顕微鏡、三次元電子顕微鏡(FIB-SEM)、従来型の共焦点走査型レーザー顕微鏡により、組織、細胞レベルから微細形態に至るまでの構造と物質の局在の解析を実施している。さらに、fMRIやPETによる脳神経回路網(拡散テンソルイメージング法による)や生理的あるいは病的物質の動態解析が実施されている。しかし、これらの機器を用いて、様々なレベルの脳神経回路網の形態と機能をマクロからミクロまでシームレスに解析し、理解できる状態には至っていない。</p> <p>今日の認知症や脳高次機能障害の病態研究は、超高齢化社会が目前に迫る我が国において大きな社会的・経済的意義を有する。本事業においては、これらの問題を解決するため、マクロ(患者/健常人/トップアスリート・動物)からミクロ(細胞)までのイメージングを連結させた高精度な神経回路の解析を可能にする多次元イメージングのセンター化を図る。さらに、順天堂大学の豊富なリソースによる一連のシステム=ヒト脳(患者-健常人-トップアスリート)、動物脳(疾患モデル(エイジング)動物-コントロール(若年)動物-高運動能力動物)、各種神経細胞(疾患iPS細胞-健常人iPS細胞-トップアスリートiPS細胞)をマクロからミクロまでシームレスに解析することで蓄積されたデータを基に、精神・神経疾患の診断に関わるバイオマーカー等を新たに同定することを目指す。</p> <p>本事業では、光学顕微鏡と電子顕微鏡を繋ぐ超解像顕微鏡、MRI像(マクロ)と光学顕微鏡を繋ぐ透明化脳標本の観察のためのライトシート顕微鏡を新たに導入することで、研究基盤センターに整備してきた既存の光学顕微鏡・電子顕微鏡観察技術と合わせることで、マクロとミクロの神経回路のシームレスな解析が可能となる。さらにこれらの複数の観察技術を組み合わせさせた実践的な相関観察法の開発を目指す。イメージング技術は国際的にも急速な発展を遂げていることを鑑み、本事業では米国国立衛生研究所(NIH)に在籍する研究者や欧州の最先端電子顕微鏡施設(ユトレヒト大学(蘭)他)との国際共同研究によるグローバルな展開を図る。さらに、本プロジェクト事業をコアとして、企業の枠を超えた意見交換が可能な多次元イメージングコンソーシアム体制の構築を目指す。</p>				
②2019年度の実施目標及び実施計画	<p><目標></p> <p>①多次元イメージングのための整備:MRIによって検出される機能的結合と、神経細胞レベルでの神経回路との対応を効率よく検証する実践的なフローの確立。</p> <p>②具体的な研究解析:1)各種モデルマウスの解析の継続、2)水頭症モデルラットと患者情報の比較、3)臨床応用に向けたMRIの利用法の確立、3)動物に移植されたiPS細胞由来神経系細胞のin vivoにおける線維連絡のイメージング法の確立。</p> <p>実施計画</p> <p>①多次元イメージングのための整備:グループ内の緊密な連携によりMRIによる機能的結合と、神経回路との対応関係を微細形態から回路レベルまでシームレスに関連づける多次元イメージングの実践的なフローを確立する。</p> <p>②具体的な研究解析:各種モデルマウスの解析を引き続き進める。独自に作製した他の家族性パーキンソン病(PARK1/PARK9/PARK14)モデルマウスの形態的解析を対応疾患患者脳MRI/PET所見と比較しつつ行い、併せて画像変化を反映する血漿成分をトランスレータブルなバイオマーカーとして確立する。高齢水頭症ラットモデルの脳の構造異常の解析結果と、正常圧水頭症患者のMRIの所見と対照し、認知症の発症機序を解明する。引き続きMRIにおいて、ヒトやマウスにおける課題遂行時の領域間結合と個体行動結果の比較を進める。擾乱因子投入による因果的インパクトの解析も検討する。NIHの藤田氏と共同で臨床PET画像をMRI画像と対応させる手法を開発し、臨床科の病態研究、健常人・トップアスリートの研究に基づく、画像評価の臨床的研究への応用への道筋をつける。患者由来のiPS細胞由来疾患感受性細胞やトップアスリート由来iPS細胞の各種相関観察法を駆使した評価に基づく創薬シーズ薬効検証実験への応用を図る。加えて、動物に移植されたiPS細胞のin vivoイメージング法を開発する。</p> <p>③各年度の目標の達成度の評価法:学内外の評価委員会に進捗状況を必要に応じて報告し、年1回の評価を受ける。</p>				

③2019年度の事業成果

【宮嶋】

①DNAH knock-downマウスの脳組織切片による評価で、脳室拡大が先天性ではなく、加齢に伴い出現することを証明した。迷路試験およびMorris水迷路試験により、認知機能障害も若齢では出現せず、加齢とともに出現・進行することを証明した。以上から、人間における正常圧水頭症と同様に、高齢発症の慢性水頭症モデルとして適していることが確認された。更に電子顕微鏡を用いた線毛および線毛ダイニンの観察、マイクロビーズおよびビデオ顕微鏡を用いた脳室線毛運動の観察において、脳室線毛に形態学的な異常を認めないものの、その運動機能の異常をきたしていることを確認証明した。以上のことからDNAH14 knock-downマウスにおいて、線毛運動機能障害に伴い遅発性水頭症および認知機能障害を呈することが確認され、正常圧水頭症モデルとして妥当と判断した。このモデルマウスと理科学研究所より譲渡されたアルツハイマー病のモデルマウスであるAPP knock-inマウスを組み合わせることにより、アルツハイマー病理を呈する正常圧水頭症モデルマウスを作製した。

②IVASによる蛍光物質の脳からのクリアランス測定法に加えて、共焦点顕微鏡を用いて蛍光物質のクリアランス経路を可視化した。先天性水頭症H-Tx ratの原因遺伝子として同定したPtpn20のknock-downマウスを作製した。このモデルマウスは高頻度に脳室拡大が起こる事を確認した。免疫組織染色によりPtpn20は主に上衣細胞と脈絡叢上衣細胞に発現する事を確認した。この事からPtpn20は、脳室と脳実質間、及脳室と脈絡叢上衣細胞間での水及物質の移動に関与していることが推定される。更に、このマウスにおける蛍光物質のクリアランスは、同齢の正常マウスと比較して遅延している事を証明した。

【小西】

前年度は、正常ラットの大脳皮質に対して領域境界マッピングを行い、感覚野や運動野などの機能領域を描出した。今年度はパーキンソン病モデルラットを対象として解析し、正常ラットの結果と比較した。パーキンソン病モデルラットでは、正常ラットでは描出された体性感覚野内の体部位領域構造が崩れていた。さらに、ヒトにおいても、反応抑制機能における下前頭皮質を含む大脳回路解析および視床下部の個々の核をベースにした研究を進め(Han et al., 2019, Tamura et al., 2019, Fujimoto et al., 2020)、生成された作業仮説としての神経回路候補を、磁気および電気刺激法により検証する予定である。

【小池】

①各種オルガネラ機能異常モデルの作出と解析

1)成熟オリゴデンドロサイト特異的p18cKOマウス脊髄において太い軸索における脱髄現象を明らかにした。

2)小脳神経系特異的GPHR欠損マウスの解析から、ゴルジ体内腔酸性環境不全是ゴルジ体の形態異常を引き起こし、小脳プルキンエ細胞の脱落に起因した協調運動障害や下肢反射異常を示すことを明らかにした。

3)THレポーターPARK2 iPS細胞の光顕電顕相関観察により、ドーパミン神経特異的なミトコンドリアの異常を見出した。さらに、ストレス処理によるミトコンドリアのスフェロイド化がパーキンソン病患者においてはほとんど認められないことも明らかにした。

②多次元イメージング実現のためのシーズの開発

1)新規Parkinson病モデルマウスの線条体神経細胞の樹状突起の経時的な変化について電子顕微鏡三次元立体再構築法を用いた比較検討を行った。

2)EGFPとペルオキシダーゼ活性を有するAPEX2の融合タンパクを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製し、マウス脳において検証実験を行った。化学固定したスライス標本を透明化処理し、共焦点レーザー顕微鏡で神経細胞の形態を観察した。その後、電子顕微鏡観察を行い、対象とする神経細胞へのシナプス入力部位を捉えることに成功した。

【青木】

神経変性疾患、脳腫瘍、多発性硬化症などの種々の神経疾患患者、モデルマウス、正常コホート、高い技量を持つスポーツ選手などにつき、多数のb値と多軸のMPGを用いた次世代拡散強調画像や3D synthetic MRI, Finger Printing, Double diffusion encoding, 灌流画像などの最新手法を撮像し、Diffusional Kurtosis imaging, Neurite orientation disversion and density imaging; NODDI, Free water extractionなどの解析を行い年間30編を超える査読のある英文論文を報告した。新しい撮像法については、定量的評価に必要な標準化も行った。拡散から微細構造に迫り、病態解明および、バイオマーカの探索、脳のマッピングを行った。

さらに機械学習・人工知能などを取り入れ、ノイズ除去、MRA作成、疾患判別の検討を行った。

スポーツロジコホートでの0.3T MRI研究と3T MRIを組み合わせ、脳MRIのコホート研究の精度向上を行うとともに、各種のマーカと脳の部位との関連を探った。

多くの研究発表を行うことで、機器メーカーから新たな撮像法の共同開発や臨床評価を依頼され、その手法を用いた新たな論文作成が可能となり、この分野での順天堂のブランド力が向上する。

【服部】

血液バイオマーカー; 遺伝性パーキンソン病に関するバイオマーカー探索について孤発性パーキンソン病については酸化ストレスマーカーである酸化型アルブミンに関して検討を行い報告した(Ueno SI et al Ann Clin Trans Neurol 2020 in press)。今後の研究計画として現在あるパーキンソン病バイオバンクに詳細な臨床情報を紐づけたパーキンソン病レジストリを立ち上げた。現在、運動症状と非運動症状について医師による診察及び質問指標を用いた網羅的な情報に加えて、遺伝子、血液、頭部画像(MRI、核医学検査)に関するデータを取得している。順天堂大学脳神経内科はパーキンソン病の医療センターであり、このブランド力を利用したレジストリの作成は多くの患者のエントリを可能とする。昨年開始して、すでに70症例を超えてデータを取得している。また、担当医はパーキンソン病診療に精通しており、正確な診断や治療を施しているため、精度の高いレジストリの作成が可能である。レジストリが完成すれば縦断的に臨床症状とバイオマーカーの推移を検討し進行と関連したマーカーの探索を行う予定である。

画像バイオマーカー; PARK2症例について拡散強調画像による検討を行い、白質の異常所見を同定した。この白質異常はメタボロミクスで得られた酸化ストレスマーカーと関連する可能性について解析を行っており、結果が得られたら論文投稿準備中である。孤発性パーキンソン病については現在のMRIレジストリから臨床症状を紐づけし白質の変化と臨床症状との関連をおこなった。薬剤誘発性である衝動制御障害およびL1ドパ誘発性ジスキネジアに焦点を当てて解析を行った。結果、衝動制御障害やL1ドパ誘発性ジスキネジアを有する症例はより白質の微小構造は保たれており、むしろこれらの副作用が出にくい症例は白質の微小構造が低下していることが判明した。つまり、薬剤による副作用はある程度脳の機能回路が保存されている事が重要であり、それらの回路を刺激することで症状が出現する事が推測される。現在論文を作成し

投稿準備中である。また、MRI画像と微小形態の構造変化の関連性を明らかにするためにジスキネジアラットモデルのMRI画像及び電子顕微鏡による組織変化の検討を行い、MRIによる微小構造障害の検出に成功した。今後は組織解析を行い論文化を目指す。順天堂大学放射線医学教室及び神経生物学・形態学教室はいずれも世界的な研究を行っており、順天堂ブランド力を利用した講座間での共同研究を進める。パーキンソン病の病態メカニズム解明;脂質代謝酵素であるPLA2G6の機能障害によりLewy小体を伴う家族性パーキンソン病(PARK14)が発症することに注目し、リン脂質代謝障害と α -シヌクレインの凝集について検討している。PLA2G6ノックアウトショウジョウバエモデルの脂質構成はアシル基が短鎖となり、運動障害、ドパミン神経細胞の脱落を認め、シナプス小胞の形態変化を引き起こす事が明らかになった。PLA2G6ノックアウトショウジョウバエに α -シヌクレイン過剰発現させると凝集しやすくなることを明らかにした。これらのPLA2G6 ショウジョウバエで生じる変化はリノール酸を投与することで改善された。上記の結果を報告した(Mori A et al Proc Natl Acad Sci USA 2019;116:20689-20699)また、独立した常染色体優性遺伝形式の家族性パーキンソン病家系からprosaposinの変異を同定した。いずれも異なる変異であるがサポシンDの機能低下を引き起こす変異であった。また、サポシンD領域のイントロンの変異は孤発性パーキンソン病の遺伝的危険因子になる可能性が示唆された。また、家族性PD患者由来線維芽細胞並びにiPS細胞ではリソソームの機能が障害されていた。iPS細胞では α -synucleinの凝集が認められ、マウスモデルでは黒質TH陽性神経細胞の脱落が認められた。本研究結果は2020年4月にBrain journalにeditorial choiceとして掲載される予定である(Oji Y et al Brain 2020 in press)。

【赤松】

- ①本研究で同定された低分子化合物を用いた老化誘導の手法は、iPS細胞由来神経細胞だけでなく、様々な細胞に対しても有用であることを見出した。また、この手法の作用メカニズムを同定した機序を同定した。この結果は、2019年国際幹細胞研究会議で発表を行った。この手法に関して米国特許出願を行った。グリア誘導方法に関しては前年度までに開発した高効率な誘導法において、iPS細胞株間の誘導効率の差が見られたため、すべての株で安定して誘導できるように最適化を行った。ニューロンでの α シヌクレイン検出技術は確立されているので、現在グリア細胞条件の最適化を行っている。
- ②パーキンソン病だけでなく、他の高齢変性疾患であるアルツハイマー病由来ニューロン・筋委縮性側索硬化症由来ニューロンにおいても、①に記した手法で病態特異的な表現型の検出期間を大幅に短縮することに成功した。
- ③ゲノム編集を用いたPARK1(A30P)iPS細胞の作製を行った。この結果は、第19回再生医療学会で発表した。また、現在では遺伝性パーキンソン病のうち、患者由来細胞を含めて9種類が使用できる状態になっている。

【岩田】

HDLに存在するmiRNAのスクリーニングのためQPCRアレイを用い、イベント有り(追跡期間中死亡)の群で発現量が増加または減少したmiRNAをそれぞれ3種類ずつ選択した。バリデーションのためループライマーを用いたQPCRを行ったが、両実験の結果が一致しなかった。また、高発現が確認されているmiRNAがQPCRアレイで検出できなかったこと、および予備検討に比べてQPCRにおけるCt値が増加したことから、サンプルの劣化の可能性が考えられた。一方、マイクロアレイを用いたスクリーニングでは、上記の懸念は無く、データ自体には信頼性があると判断した。そこで、マイクロアレイの結果とQPCRによるバリデーションの傾向が一致したmiR-1914-3pについて、更なる解析を行った。miR-1914-3pはmiRNAの中でもその機能や役割についての報告がなく、動脈硬化関連、ましてやHDLの機能に関する検討はなく、全く新しいバイオマーカーあるいは治療ターゲットの可能性もある。さらに、HDL上のmiR-1914-3p量が、HDLと組織(細胞)の相互作用によって変化するか否かを検討するため、ヒトマクロファージ様細胞株であるTHP-1とヒト血漿から単離したHDLを24時間インキュベートした。その結果、細胞無しでインキュベートしたHDLに比べ、THP-1とインキュベートしたHDLではHDL上のmiR-1914-3pの増加が認められたことから、細胞からHDLへmiRNAが輸送されたことが示唆された。一方、細胞内のmiR-1914-3p量については変化が認められなかった。HDLとマクロファージの間でコレステロールの輸送を担う膜蛋白の一つ、SR-B1をsiRNAを用いてノックダウンしたが、miRNAの輸送に影響は認められなかった。そのことは、miRNAの輸送にSR-B1以外の因子が関与していることを示唆すると考えられた。今後、miR-1914-3pの輸送機構を解明するとともに、心血管疾患におけるmiR-1914-3pの役割についても解析する。

【内藤】

昨年度に引き続き運動嗜好性を決定する神経科学的基盤について調べる研究を行った。その結果、1)パプロフ型条件づけ課題によって「運動ができる」条件を学習させたラットを用い、課題遂行中の線条体ドーパミン放出量をマイクロダイアリシス法により計測した結果、安静時と比べ、予測信号提示中および運動中により高いドーパミン放出量が観察された。2)自発性運動量の多いラットは側坐核におけるドーパミンD2受容体遺伝子発現水準が高いこと、一方側坐核におけるドーパミンD1受容体や腹側被蓋野におけるドーパミン合成系酵素(チロシン水酸化酵素およびドーパミン脱炭酸酵素)の遺伝子発現と運動量には関係がないことがわかった。すなわち運動モチベーションの個体差には側坐核のD2受容体が関与している可能性が示唆された。3)運動に対するモチベーションの低下を引き起こす中枢性疲労の原因を探る一助として、高強度運動時に賦活化する扁桃体に着目し、その破壊前後における運動パフォーマンスと自律神経性循環応答について調べた。その結果、扁桃体破壊は運動時間の延長と運動パフォーマンスの向上、さらには高強度運動で見られる過度の昇圧応答開始時間を遅延させる可能性が示された。以上の結果は高強度運動時の運動モチベーションの低下や中枢性疲労には、扁桃体による情動性循環調節機構が関与している可能性を示唆している。

運動トレーニングと脳の可塑性に関する研究も医学部と共同で実施した。体操競技選手の競技スキル(各種目のDスコア)と灰白質容積の関係について調べたところ、ほとんどの種目において、視覚、体性感覚、空間識等に関連した脳領域の容積と競技力の間に正の相関関係がみられた。これらの構造的な変化が、体操競技におけるアクロバティックな動作を可能にさせる重要な機序であることが示唆された(The Journal of Physiological Sciences, under review)。

以上のスポーツ競技力に関連した研究成果に加え、健康科学的側面からも運動と神経科学に関わる研究を行った。1)ラットの発育期の心理的・物理的ストレス(拘束ストレス)が、成熟期以降の自発性運動量に及ぼす影響や、2)アルツハイマー病モデルマウスを用いて、運動によるアルツハイマー予防効果の機序について探る研究も行った。結果の詳細については現在解析中である。

今期の当該事業の成果を日本生理学会、日本体力医学会などにおいて積極的に報告した。今後は研究成果

を論文として纏め、社会へ発信していく。また本事業の目的に沿った、適切かつ効果的な研究を実施するために、内外部の評価・指導を適宜受けながら、本研究を展開していく。

【和気】

運動時の中枢性循環調節の機序を探る研究では動物実験とヒトを対象とした実験を行った。1)ラット用オペラント拘束実験装置を用いたレバー運動課題において、運動に先立って予測的な昇圧反応と徐脈応答が記録された。結節乳頭核へのGABAA受容体作動薬(muscimol)等の微量注入はこれらの反応を修飾したことから、セントラルコマンド性循環調節における当該核の関与が示唆された。さらに遺伝性高血圧ラット(SHR)では異なる調節機序の存在が示唆された。2)運動に対するモチベーションも運動時の循環制御に影響を及ぼすと考え、側坐核の循環調節作用について調べたところ、側坐核の興奮は昇圧反応を引き起こすことが確認された。3)テレメトリーにより漸増負荷運動時の血圧変化をみると、オールアウト直前に血圧が大きく上昇することがわかった。4)3)でみられる高強度運動時の循環調節には情動性因子も関与すると考え、高強度で賦活化する大脳辺縁系(扁桃体中心核と尾側前障)に着目し、これらの循環調節作用を確認したところ、扁桃体中心核単独刺激により昇圧応答が観察され、尾側前障を同時刺激すると昇圧応答が増強された。以上より、これらの領域が高強度運動時の循環調節に寄与していること、さらに最大運動パフォーマンスを決める脳内機序の一部である可能性が示唆された(Neuroscience 2020, 432, 150-159)。5)ヒトを対象とした研究では、運動時の循環応答と脳活動の関係をfunctional MRI(fMRI)を用いて調べた。走運動の映像を視ることによって運動をイメージした際のfMRI応答を歩行運動イメージに対する反応と比較した結果、大脳のみならず自律機能の中核である脳幹部においてもより強く反応する領域の存在が明らかとなった。現在、これらの脳領域と血圧・心拍応答の関係、および陸上競技選手と一般人のfMRI応答の違いなどについて分析中である。

以上の運動パフォーマンスに関連した研究に加え、健康科学分野に関連した研究も行った。昨年度までに、ストレス性高血圧発症と運動による予防効果には扁桃体STAT3遺伝子が関与している可能性が示されていた。本年度の実験により、1)扁桃体中心核にリン酸化STAT3の発現が認められ、siRNAの導入は昇圧反応を引き起こす可能性が示された。これらの結果はストレス性高血圧と運動によるその予防効果に扁桃体STAT3が関与しているという仮説を支持するものである。さらに、2)ストレス性高血圧や運動による予防効果には扁桃体-孤束核経路が関与しており、孤束核における神経伝達関連因子の遺伝子発現変動もこれらの機序に関与している可能性が示唆された。

今後はこれらの研究成果を複数の論文として纏め、社会へ発信していく。また、内外部評価委員の助言をもとに今後の研究の見直しと展開を図りつつ、運動やスポーツによって構築される健康・超健康脳の構造と機能の解明を目指した研究を発展・拡充することで本事業の研究計画に関わり、スポーツ健康科学分野の発展と順天堂ブランド力の一層の強化に貢献していく。

5.ブランディング活動

年度後半に予定していた成果報告会は、コロナ禍のため次年度へ延期した。各種成果についてはメディア等を活用し積極的な情報発信を行った。

④2019年度の自己点検・評価

(自己点検・評価)

2019年度に設定した目標は、ほぼ計画通りに実施することができた。しかしながら、年度末の全学的なブランディング活動は、新型インフルエンザ蔓延のため見送ったが、期中の教育・研究・医療の諸活動について多様な職域を対象に公開講座等を多数開催した。また社会・地域への情報発信として4キャンパス、6医学部附属病院から多様なステークホルダーに対し公開講座等を多数開催した。特筆すべき研究内容については研究プレスリリースを実施し、本事業推進チームからの成果発表もあった。2020年度は、事業形態を見直し本事業を進展させ、更なるブランディング戦略を図る。

⑤2019年度の事業活動費の使用状況

事業経費 計 63,363,829円

1.備品:	15,841,338 円	(急性スライス標本作製装置 他)
2.消耗品費:	17,263,293 円	(試薬・実験動物等)
3.旅費:	1,135,213 円	(研究打合せ、学会参加旅費 他)
4.人件費:	13,190,980 円	(特任研究員 人件費他)
5.謝金:	779,375 円	(被験者謝礼、研究協力の謝礼 他)
6.その他:	15,153,630 円	(解析・分析費用 他)