



ムーンショット目標 2

2050年までに、超早期に疾患の予測・予防をすることができる
社会を実現

実施状況報告書

2021年度版

2021年4月～2022年3月

臓器連関の包括的理解に基づく認知症

関連疾患の克服に向けて

高橋 良輔

京都大学 大学院医学研究科

 **MOONSHOT**
RESEARCH & DEVELOPMENT PROGRAM



研究開発プロジェクト概要

新規イメージング・計測・操作技術の開発などにより、脳と全身臓器ネットワークの機能とその破綻を分子・細胞・個体レベルで解明します。それにより、2050年には、認知症関連疾患の超早期の発症予測法と予防法を開発し、先制医療を享受できる社会の実現を目指します。

https://www.jst.go.jp/moonshot/program/goal2/24_takahashi.html

課題推進者一覧

課題推進者	所属	役職
山中宏二	名古屋大学 環境医学研究所	教授
樋口真人	量子科学技術研究開発機構 量子医学・医療部門	部長
富田泰輔	東京大学 大学院薬学系研究科	教授
斉藤貴志	名古屋市立大学 大学院医学研究科	教授
佐藤荘	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科	教授
古川貴久	大阪大学 蛋白質研究所	教授
日比野浩	大阪大学 大学院医学系研究科	教授
津田誠	九州大学 大学院薬学研究院	教授
眞木崇州	京都大学 大学院医学研究科	講師
望月直樹	国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部	部長
久保田義顕	慶應義塾大学 医学部	教授
水谷清人	神戸大学 大学院医学研究科	特命准教授
松本理器	神戸大学 大学院医学研究科	教授
山門穂高	京都大学 医学部附属病院	特定准教授
服部信孝	順天堂大学 大学院医学研究科	教授
三宅幸子	順天堂大学 大学院医学研究科	教授

課題推進者	所属	役職
松井秀彰	新潟大学 脳研究所	教授
木下允	大阪大学 大学院医学系研究科	特任講師
日置寛之	順天堂大学 医学部	准教授
仁田亮	神戸大学 大学院医学研究科	教授
大塚稔久	山梨大学 大学院総合研究部	教授
渡部文子	慈恵大学 東京慈恵会医科大学 医学部	教授
丸岡久人	東京大学 大学院医学系研究科	助教
花房洋	名古屋大学 大学院理学研究科	准教授
本田直樹	広島大学 大学院統合生命科学研究科	教授
小島諒介	京都大学 大学院医学研究科	特定助教
松田孟留	理化学研究所 脳神経科学研究センター	ユニットリーダー
岡田随象	大阪大学大学院医学系研究科	教授
近藤洋平	自然科学研究機構生命創成探究センター	助教
中岡慎治	北海道大学 大学院先端生命科学研究院	准教授
武藤香織	東京大学 医科学研究所	教授

1. 当該年度における研究開発プロジェクトの実施概要

計画2年度として、3年目のマイルストーンを意識しつつR3年度から参画する課題推進者を含んだプロジェクト全体の連携体制の構築に努めた。生物学研究者とAI・数理解析研究者の連携を推進し、AI・数理解析を念頭においたデータ収集を開始・継続した。

研究開発項目1～3では、各グループとの協働により臓器間ネットワークの検証に必要な生体パラメータについて議論を行った。さらにその内容を踏まえ、認知症モデル動物を用いて、臓器関連検証の視点から必要な生体パラメータとその収集方法を検討・決定し、データ収集を開始した。

研究開発項目4では疾患グループと協働して臓器間ネットワークの検証に必要なバイオマーカーやイメージング・計測技術について議論し、予備検討を行うとともに新規イメージング・計測技術の開発を開始した。

研究開発項目5では既存のデータベースを活用した脳-臓器関連データリサーチを行った。さらに生物学研究者とAI・数理解析研究者の連携に当たっての課題を抽出し、データ連携システムの構築を開始した。また、生物学研究グループから提供される各種データに基づいて、生物物理学モデリングやデータ解析のための課題抽出を行った。

研究開発項目6ではELSIに配慮したレジストリ・コホート構築のための基本規則を作成しグループ内で共有した。社会実装に向けた基盤技術開発に向けて、認知症関連疾患の予測・予防に関するELSI面の重要事項を整理し、グループ内で共有した。

2. 当該年度の研究開発プロジェクトの実施内容

(1) 研究開発項目1: アルツハイマー病における脳-臓器関連の研究

研究開発課題1: 脳-末梢臓器関連に着目したアルツハイマー病における臓器間ネットワークの解明とヒトへのトランスレーションによるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

- ・ アルツハイマー病モデルマウス(ADマウス: App^{NL-G-F}マウス)の発症前から前駆期、発症に至る時系列の末梢での病理変化を免疫・炎症の観点から計測・解析するため、血清中炎症マーカー24種の網羅的発現解析を行い、発症前、前駆期に複数のマーカーの変動を認めた。数理グループと血清中炎症分子網羅的解析のデータ共有を行い数理解析について検討した。(山中)
- ・ ADマウス(App^{NL-G-F}マウス)から経時的に末梢組織(骨、脾臓、血液、リンパ節)及び脳を回収し、FACS解析にて病態の変化に伴って変化するマクロファージを含むミエロイド細胞について免疫細胞の変化を検討した。その結果、病態が発症した後では複数のミエロイド系の細胞の変化が確認されたが、超早期において特定のミエロイド細胞亜種が増加していることを発見した。(佐藤)
- ・ 野生型および変異タウTgマウスに対して麻酔誘導性低体温ストレス負荷を実施し、脳におけるタウのリン酸化が持続することを見出した。また、タウ病理加速因子としての神経炎症について検討し、マウスにおけるミクログリア特異的インフラマソーム欠損がリン酸化タウ陽性突起の形成に影響しないことを見出した。(斉藤)
- ・ 今後の解析に資するA β 依存性タウ蓄積・神経変性を生じるAD continuumモデルマウスの作出として、アミロイド蓄積モデルに凝集性を高めたタウを発現させるモデル

を樹立した(日置との連携)。また、 $A\beta$ 依存性タウ蓄積病態の進展にミクログリアが関与していることを見出した。さらに、脳内 $A\beta$ 蓄積の血液バイオマーカー関連分子 APP669-711 の産生機構を明らかとした。(富田)

- ・ 変異タウ Tg マウス(rTg4510)に対してタウ沈着、炎症性グリア細胞活性化、神経脱落(脳萎縮)を PET、MRI、二光子レーザー顕微鏡による生体イメージングで評価する系を確立するとともに、山中と連携して脳ミクログリア・アストロサイトを単離し RNAseq を実施した。本モデルでの脳からのタウ排出経路を明らかにするとともに、特定のアミノ酸投与により神経炎症・細胞死が改善することを見出した。(樋口)
- ・ ヒト認知症「未病」多施設コホート MABB の参加施設は17施設に増加した。量研機構では正常高齢者 52 名、軽度認知障害患者 15 名、アルツハイマー病患者 30 名、前頭側頭葉変性症患者 82 名、パーキンソン病患者 11 名の、計 190 名でタウ PET、アミロイド PET、MRI と紐づいた血液データを取得した。Simoa を用いた血中アミロイド β 、リン酸化タウ、総タウ、ニューロフィラメント L 鎖の解析を開始し、半数において定量を完了した。(樋口)

課題推進者:山中宏二(名古屋大学)、富田泰輔(東京大学)、斉藤貴志(名古屋市立大学)、樋口真人(量子科学研究機構)、佐藤荘(東京医科歯科大学)

研究開発課題2:脳-感覚器連関に着目したアルツハイマー病における臓器間ネットワークの解明と非侵襲的センシング・介入基盤技術の開発

当該年度実施内容:

- ・ 脳-視覚連関の検討に適した認知症モデル動物を複数検討し、App^{NL-G-F} マウスを選定した。App^{NL-G-F} マウスを用いて感覚器バイオマーカー同定に向けた予備検討を開始した(日比野、津田との連携)。12 ヶ月齢の APP^{NL-G-F} KI マウスおよび野生型コントロールマウスの視運動性応答(OKR)を測定し、解析を進めている。(古川)
- ・ 脳-聴覚(内耳)連関の検討に適した認知症モデル動物を検討し、App^{NL-G-F} マウスを選定した。App^{NL-G-F} マウスを用いて感覚器バイオマーカー同定に向けて内耳機能検査や聴覚機能検査などの予備的検討を開始した。App^{NL-G-F} マウスの大脳皮質聴覚野(側頭葉)の組織学的解析も実施し、AD マウスでは、顕著なアミロイド β の沈着とミクログリアの活性化が認められた。さらに、次年度に向けて、内耳細胞外液の質量分析法による予備解析を開始した。(日比野)
- ・ 脳-皮膚感覚連関の検討のため、認知症モデル動物を検討し、App^{NL-G-F} マウスを選定した。App^{NL-G-F} マウスを用いて感覚器バイオマーカー同定に向け、各種モダリティの皮膚感覚刺激に対する応答性や、脳や脊髄でのミクログリアを含む脳内免疫系細胞の組織学的変化に関するデータを取得した。さらに、神経障害性疼痛のモデル動物を用いた研究から、CD11c 陽性ミクログリアサブセットが痛みからの自然回復に必要であることを明らかにした。(津田)

課題推進者:古川貴久(大阪大学)、日比野浩(大阪大学)、津田誠(九州大学)

(2) 研究開発項目2:血管性認知症および混合型認知症における脳-臓器連関の研究

研究開発課題3:神経グリア血管単位-リンパ管系に着目した血管性認知症および混合型認知症における臓器間ネットワークの解明とヒトへのトランスレーションによるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

- 望月PI:アルツハイマー病モデルフィッシュとパーキンソン病モデルフィッシュとして、ゼブラフィッシュでは老化個体や成体では脳神経や血管構造が詳細に把握できないために、透明魚(Danio rerio)を使用する計画に変更した。まず透明魚の実験を効率的か集約的に実行するために透明魚の個体数増加を目的として、至適繁殖条件を決定した。ドイツから数十個体を輸入し、現在国立循環器病研究センターで3600タンクを目指して、本ムーンショット計画でも利用可能とするための繁殖につとめている。遺伝子改変技術の至適化については、
 - ① これまでゼブラフィッシュで用いられてきた最小プロモーターと蛍光蛋白質による細胞系譜追跡が可能かを検討する実験を実施した。
 - ② ノックインによる融合蛋白質の発現による局在検討と生体での機能の検討が可能かを実際に血管内皮細胞マーカー分子に蛍光蛋白質を付加する個体を作製して可視化ができることを確認した。
 - ③ イメージング技術特に透明魚の全体像イメージングと高解像度イメージングについての技術開発について今年度はパイロット研究を実施した。

とくに汎用されるCRISPR/CAS9による遺伝子挿入やhomologous recombination技術や欠失作製の可否について検討を行った。ゼブラフィッシュを用いた研究でのこれまでの蓄積が十分活用できることが明らかになった。

血液脳関門の解剖学的検討については、マウス脳の透明化(頭蓋骨をつけたまま)により、髄膜リンパ管から、脳室までの構造をイメージングする技術の至適化を京都大学Gと実施した。とくにイメージング拠点を活用した、ライトシート型顕微鏡による、高解像度な3次元画像の取得により、これまでに報告されていない前頭葉に近いリンパ管が存在することもProx1-GFPマウスの透明化により明らかにすることができた。

- 眞木PI:ADモデルマウスとして、APP-NL-G-Fマウスを理化学研究所から入手し2021年6月~繁殖を開始した。APP-NL-G-Fホモ×野生型の人工授精・胚移植後に、APP-NL-G-Fヘテロ×APP-NL-G-Fヘテロの人工授精・胚移植を行うことにより、APP-NL-G-Fホモと野生型のlittermatesを大量に作成予定である。血管性認知症モデルとして、従来の0.18mmの微小コイルを両側総頸動脈に装着するマウスに加えて、0.20mmの微小コイルを装着するモデルマウス(軽度の脳血流低下が慢性的に持続し認知機能障害までの未病期間が長い)の開発を進めた。また、多臓器の単一細胞・単一核RNAseq解析の至適条件の検討を進めた。イメージング解析のための各種遺伝改変マウス(リンパ管内皮細胞特異的GFP発現マウス、オリゴデンドロサイト特異的GFPマウス、ペリサイト特異的GFP発現マウスなど)を確立した。
- 久保田PI:今年度の研究開発においては、マウス頭蓋骨ホールマウント検体による髄膜リンパ管の可視化について、既報の方法(Louveau et al., Nature 2015; Antila

et al., J Exp Med 2017)では、強度や解像度が不十分であり、全体像を把握するのが難しかったため、抗体種や脱灰時間などを多面的に optimize し、既報よりも高い精度でその全体像を可視化する技術を開発した。また、リンパ静脈弁はこれまで世界的に可視化することは不可能とされてきたが、マウス静脈角ホールマウント検体を作成する技術を開発し、これによりリンパ静脈弁を単一細胞レベルで可視化にすることも成功した。海馬組織のscRNAについては、神経、グリア、血管細胞などあらゆる構成細胞のクラスタリングが行われ、中でもミクログリアの heterogeneity を包括的に理解することに成功した。これにより、次年度以降、免疫細胞を中心とした中枢神経系恒常性維持のメカニズムの解明について、大きな足掛かりを得た。

課題推進者：望月直樹(国循)、眞木崇州(京都大学)、久保田義顕(慶応大学)

研究開発課題4:免疫系に着目した血管性認知症および混合型認知症における臓器間ネットワークの解明

当該年度実施内容：

- 松本PI: 認知症動物モデルとしてアミロイド前駆体蛋白変異ノックインマウス(App^{NL}-G-F マウス)(他の課題推進者(斉藤)らが開発)を入手し繁殖を進めた。脳内に常在するT細胞の頻度やその表現系について解析を開始した。実際、野生型マウスや App^{NL}-G-F マウスにおいて脳内に一定数の常在性記憶 T 細胞様細胞を確認できた。さらに、脳・血管・末梢リンパ組織間ネットワーク異常の解析のため、他の課題推進者(水谷)が保有する神経細胞-アストロサイトを用いた二者共培養系に、ミクログリアを加えた三者共培養系の開発を開始した。未発症ないし軽度認知機能障害患者コホートである丹波未病コホート(200名)について、本学のバイオバンクを用いた高品質の血液保存及び、頭部MRI画像と脳波、心理検査の経時的な計測が可能となる体制を構築した。
- 水谷PI: 興奮性シナプス(A, Bシナプス)と抑制性シナプス(C, Dシナプス)の二種類のシナプスの計四種類のシナプスによって形成されているが、本年度は、マウス海馬の四種類のシナプスの中で、抑制性神経細胞上の抑制性シナプス(Dシナプス)のみ特異的に局在する細胞間接着分子 CAM-X を同定した。この遺伝子を欠損したマウスの海馬では、アルツハイマー型認知症と類似した、加齢依存的な神経細胞の変性と死が認められた。さらに、神経細胞の変性と死よりも先に、Dシナプスの異常変動が生じており、神経細胞の変性と死の引き金となっていることを明らかにした。神経細胞の変性と死を徐々に引き起こしてその過程を詳細に解析することができる低酸素・低グルコース培養法で神経細胞単独培養を行ったところ、CAM-Xの発現が低下し、低酸素・低グルコース条件下で認められる神経細胞の変性と死においても、Dシナプスの異常変動が生じていることを見出した。

課題推進者：水谷清人(神戸大学)、松本理器(神戸大学)

(3) 研究開発項目3:パーキンソン病関連疾患における脳-臓器連関の研究

研究開発課題5:パーキンソン病前駆期モデル動物を活用した臓器間ネットワークの解明とヒトへのトランスレーションによるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

- ・ コントロールおよびパーキンソン病患者の脳および全身臓器について、RT-QuIC 法を用いて α -シヌクレインシードが全身臓器に存在することを確認した。
- ・ パーキンソン病患者虫垂では LPS がコントロールと比較して上昇しており α -シヌクレイン凝集に関連する可能性を示した。
- ・ 血液 α -シヌクレイン RT-QuIC における凝集形成速度と血液中の炎症マーカーに相関を見出した。
- ・ パーキンソン病発症前駆期モデルを用いて、腸管を中心とした各臓器や末梢血の変化を検証した。
- ・ 免疫細胞を含む体液因子の変化を検出するための技術(凝集 α シヌクレイン蛋白あるいは抗体検出のための ELISA、QT-QUIC)を確立した。
- ・ パーキンソングループ(順天堂・大阪大学)へマウスの提供を行い、共同研究を開始した。

課題推進者:服部信孝(順天堂大学)、山門穂高(京都大学)

研究開発課題6:腸管免疫に着目したパーキンソン病における臓器間ネットワークの解明

当該年度実施内容:

- ・ 線条体および腸管に α シヌクレインフィブリルを投与する2種のパーキンソン病モデルマウスの作成を試みた。線条体投与モデルは樹立できたが腸管モデルについては作成が困難であり、条件検討を進めた。
- ・ 典型的な孤発性 PD 患者 18 例および健常者 4 例の末梢血単核球を用いた検討で、リン酸化 S129 を含むペプチド刺激に対する複数の cytokine 産生が上昇傾向であり、特にあるサイトカイン産生の倍率変化が顕著であることを示した。
- ・ パーキンソン病モデル動物(アフリカメダカ)を用いた腸管環境-パーキンソン病理予測モデルの確立を進めた。また腸管環境からパーキンソン病理にいたる個体レベルの分子病態を解析した。
- ・ 京都大学と連携し、腸管においてパーキンソン病最初期病変における α シヌクレイン凝集を認めるパーキンソン病発症前駆期モデルの SPF 化を進めた。
- ・ 数理モデル解析の基盤となる腸管神経細胞における α シヌクレイン発現機構の解析手法を確立した。

課題推進者:三宅幸子(順天堂大学)、松井秀彰(新潟大学)、木下允(大阪大学)

(4) 研究開発項目4: ネットワークの変容を超早期に発見可能とする新規イメージング・計測・操作技術の開発・応用

研究開発課題7: 臓器間ネットワークの変容を早期に観測可能な新規イメージング技術の開発とその応用による臓器間ネットワークの解明

当該年度実施内容:

仁田:

(1) α -Synuclein fibril の Seed 作製の実施

α -Synuclein の野生型およびパーキンソン病患者に認める変異 A53T 型の遺伝子を京都大学より拝受した。各々、大腸菌により蛋白質を発現し、GST タグによるアフィニティ精製およびゲル濾過クロマトグラフィーによる 2 段階精製を行い、高純度の蛋白質を得た。同精製蛋白質を 5mg/ml の濃度で 37 度にて継続的に Vortex を用いて振動させることにより、in vitro で Fibril を作製した。Fibril の形成速度は A53T 型の方が野生型より早く、また形成される Fibril の形態も野生型と A53T 型では異なることを確認した。そして、Fibril を超音波処理することにより、野生型および A53T 型の Seed を作製した。本 Seed は、(2)に記載する iPS 由来神経細胞への Fibril の取り込み過程の観察に用いる予定である。

(2) iPS 細胞の導入・分化の実施

京都大学 iPS 細胞研究所 井上治久教授より、パーキンソン病患者および健常者由来の iPS 細胞を各々 3 株ずつ導入した。導入するにあたっては、京都大学および神戸大学の倫理委員会の承認を得ている。同細胞株には、NGN2 を形質導入し、Doxycycline 投与により興奮性ニューロンへ分化するシステムが導入されている。同細胞株を神戸大学へ導入後、野生型の iPS 細胞から興奮性ニューロンへ高効率(>96%)で分化することを、神経細胞の種々のマーカーを用いて確認した。

(3) クライオ FIB-SEM の設置・導入の実施

クライオ電子線トモグラフィー法を効率的に施工するために、細胞内の目的分子の位置を蛍光標識し、あらかじめグリッド上の位置を確認する必要がある。そのため、クライオ CLEM(光電子相関顕微鏡)を神戸大学に導入・稼働させ、COS7 細胞を用いてグリッドの凍結→クライオ CLEM 観察→クライオ FIB-SEM による試料の菲薄化、そしてクライオ電子線トモグラフィー撮影の使用スキームを一通り確立した。

日置:

神経ネットワーク構造の変容を早期に観測可能な新規イメージング技術の開発を目指し、2021 年度は以下の研究開発に取り組んだ。

(1) 標識技術の開発

神経細胞を隅々まで標識する目的で、膜移行シグナルもしくは GPI-anchor 配列を赤色蛍光タンパク(RFP)に付加した新規レポータータンパクを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを開発して、野生型マウス脳で神経細胞の標識効率を検証した。マウス大脳新皮質および線条体に AAV ベクターを注入したところ、4 種の RFP (mRFP1, FusionRed, mScaret-i, Azalea)の全てにおいて細胞内凝集や神経突起変性などを認め、細胞毒性を引き起こしている可能性が考えられた。EGFP を用いた場合に

はそのような毒性は観察されなかったため、発色団に変異を導入して蛍光消失させた darkened GFP (DGFP) と V5 タグあるいは ALFA タグの融合タンパクに、膜移行シグナルや GPI-anchor 配列を付加する予備実験を開始している。

(2) 観察技術の開発

マクロからナノレベルへのシームレスなズームインを実現するために、光学顕微鏡観察だけでなく電子顕微鏡観察にも適した新規透明化技術 (ScaleSF; Furuta, Yamauchi et al., 2022) を開発した。厚さ 1 mm 程度のスライス標本を約半日で透明化することができる。界面活性剤を含まない新規透明化溶液の開発も進んでおり、電子顕微鏡観察を通じて超微細構造の保持について検討を進めている。また、従来の免疫組織化学法では検出が困難であった分子を捉える技術として、蛍光増感法の開発および glyoxal 固定法の開発も行った。

(3) 疾患モデルマウスの導入およびグループ内連携の推進

疾患モデルグループおよび基礎グループとの議論を通じて、アルツハイマー病 (AD) モデルマウスとパーキンソン病 (PD) モデルマウスを導入した。他の研究課題とのデータ統合を推進するために、本研究課題においても、主に 3・6・12ヶ月齢を解析対象とする。また、グループ内連携として渡部グループ・丸岡グループ・富田グループに AAV ベクターを提供した。引き続きウイルスベクターの提供を進めると同時に、透明化技術を中心とした形態解析技術の共有化も図っていききたい。

課題推進者: 仁田亮 (神戸大学)、日置寛之 (順天堂大学)

研究開発課題8: 臓器間ネットワークの変容を早期に検出可能な新規分子・バイオマーカーの探索とその応用によるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

大塚:

(1) 近位依存性ビオチン標識の発現システム構築

ビオチン標識の酵素システムは大腸菌のビオチンリガーゼを改良した TurboID を用いた。TurboID は野生型ビオチンリガーゼより優れた活性を示しており、比較的短い標識時間 (1 時間～数時間) でも、十分な標識産物が得られる利点がある。プレシナプス・アクティブゾーン周辺部を標識するため、アクティブゾーンの主な構成因子である CAST と ELKS の N 末端に 13 アミノ酸で構成される ALFA タグを付加し、CaMKII (0.3) プロモーターにより発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を構築した。一方、TurboID には ALFA-タグの高親和性ナノボディーを付加した AAV を作製した。

(2) 標識システムの特異性検証

ラット海馬初代培養系を用い、上記作製した AAV をそれぞれ感染させ、DIV21 で 3 時間ビオチン標識を行った。その後、細胞抽出液からビオチン標識タンパク質を Streptavidin-マグネットビーズを用い分離・精製した。標識特異性は、アクティブゾーンタンパク質およびシナプスに局在するタンパク質に対する抗体を用い、ウェスタンブロットにより評価した。その結果、アクティブゾーン構成因子は、Streptavidin ビーズにおいて高い濃縮率を示した半面、シナプスに非特異的に局在している因子に関しては濃縮

されなかった。これにより、アクティブゾーン周辺部を特異的に標識できる技術基盤が構築されたと判断した。今後、質量分析による検証を進める予定である。

(3) マウスへの実装・応用

PHP.eB serotype の AAV—EGFP を用い、眼窩静脈投与による全脳感染を試みた結果、良好な EGFP の発現を認めた。今後、CAST/ELKS の ALFA—タグノックインマウスにナノボディー TurboID の AAV を全脳感染させ、標識特異性を検討する予定である。

(4) グループ内連携の試み

月 1 回、遠隔ミーティングを開き、意見交換を行っている。

花房：

(1) エクソソーム生合成・放出機構解析

エクソソームは、多胞体 (Multi-vesicular body: MVB) 内部に形成される内腔小胞 (Intraluminal vesicle: ILV) が、細胞外に放出されたものである。今年度我々は、エクソソーム生合成機構の一端を明らかにするため、LRRK1 (パーキンソン病原因遺伝子 LRRK2 のファミリー分子) による積荷の ILV への取り込みについて解析した。その結果、ER—エンドソームコンタクトサイトにおける、上皮成長因子受容体 (EGFR) の ILV 取り込み機構を明らかにした。

またエクソソーム放出機構に関しては、エクソソームマーカーである CD63 を用いたライブイメージング (pHluorin-CD63-mScarlet レポーターを使用) から、エクソソームの放出に重要な細胞内トラフィック制御因子のスクリーニングを開始した。以上のことから、当該年度のマイルストーンは達成できたと考えている。

(2) 高純度エクソソーム単理法の開発

培養細胞上清及び、野生型動物の血清・血漿からエクソソームを高純度に精製・単離する技術基盤の開発を行った。その結果、既存の手法の中では PS アフィニティ法が効率よく高純度のエクソソームを単離できることが明らかとなった。以上のことから、当該年度のマイルストーンはほぼ達成できたと考えている。

丸岡：

当該年度マイルストーンを達成するために以下の(1), (2)を行った。また施設にまたがる多数の課題推進者との交流を図りグループ内連携を推進した。

(1) 大脳皮質からのデータ取得および解析の実施

In vivo カルシウムイメージングにより覚醒下の野生型マウスにおいて大脳皮質視覚野神経細胞の自発的神経活動、視覚刺激応答特性、および回路動態として細胞間の活動相関を数ヶ月に亘り経時的に計測する技術基盤を確立した。また本イメージング技術を用いて、2つの異なる皮質領野に2種類の異なるカルシウムインジケーター(すなわち GCaMP と R-CaMP)を発現させることにより、プレシナプスとポストシナプスの神経活動を同時に記録できる系も確立した。さらに本イメージング技術に光遺伝学的な介入を併用する技術も開発した。

電気生理学的手法により覚醒下の野生型マウスにおいて大脳皮質聴覚野神経細胞の神経活動、感覚刺激応答特性、回路動態として細胞間の活動相関を経時的に計測する技術基盤を確立した。

以上より、当初予定していた実施内容は全て達成できた。

(2) 免疫細胞・脈管からのデータ取得および解析の実施

脳内に常在する免疫細胞であるミクログリアの in vivo イメージングを(1)の in vivo カルシウムイメージングと同時に行うことの可能な系を立ち上げた。またミクログリアの3次元空間的な細胞配置や突起の運動性を評価する基盤も確立することができた。さらに蛍光色素を用いて、血管やリンパ管についても in vivo での描出を試み、免疫細胞との三次元的位置関係の評価を可能とした。

以上より、当初予定していた実施内容は全て達成できた。

渡部:

(1) 病態進行に伴うシナプス機能変容の生理学的解明

多様な脳領域における機能変容を捉えるための技術基盤の開発を目的として、野生型マウスを用いて、海馬、扁桃核、視床下部、腹側被蓋野、前頭前野、前帯状皮質、腕傍核（脳幹）などから電気生理学的記録を行った。まず、脳領域ごとに通過線維やグリア細胞の割合、酸素要求性などの至適条件が異なるため、各領域にあわせた急性脳切片の作製条件、神経細胞からの記録条件を最適化した。さらに、受動的膜特性、発火特性、基礎的なシナプス伝達の特性などを記録し、基礎的データを収集している。また、光遺伝学的手法を用いて、細胞種・経路特異的にシナプス特性を解析するために、ウイルスベクターの血清型、脳内インジェクション座標（脳幹、皮質、視床、扁桃核、視床下部、腹側被蓋野）、およびプロモーター等の条件検討をおこなった。神経細胞の微細形態を可視化するために、バイオサイチンを用いた染色方法を最適化し、急性脳片の透明化と細胞形態の定量的解析手法を検討した。

引き続き、各条件の最適化と各脳領域での基礎的データの解析を進めている。

(2) 病態進行に伴う行動変容を捉える新規行動解析技術の開発

行動学的変容を超早期に捉える行動タスクを検証するために、既存の行動実験システムの最適化を進めた。また、新規行動タスクとして、恐怖条件付け学習の弁別課題、観察的恐怖条件付け学習（Observational fear conditioning）などを検討し、同種他個体の恐怖体験を観察することによって、恐怖記憶形成の閾値が低下するような条件を見出し、実験系の確立を進めた。

また、アルツハイマー病モデルマウスの App^{NL-G-F} の導入手続きを進め、慈恵医大・柏動物実験施設にて飼育・繁殖を開始した。

課題推進者: 大塚稔久(山梨大学)、花房洋(名古屋大学)、丸岡久人(東京大学)、
渡部文子(東京慈恵会医科大学)

(5) 研究開発項目5:AI・数理研究による臓器間ネットワークの解明

研究開発課題 9: 数理モデルと AI・機械学習を用いた臓器間ネットワークの解明、およびヒトデータとの統合によるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

神経変性疾患で見られる異常タンパク質の蓄積量を、簡易に計測可能なバイオマーカーから推定する機械学習の開発を行い、5xFAD マウスの公開データ (Forner et al., Scientific Data, 2021) へと適用し、その有効性を評価した。また異なるモダリティの多次元データを統合するため、次元削減法である Variational Autoencoder をマルチモダリティデータかつ混合モデルを扱えるように拡張を行った。本手法を人工データへ適用し、その有効性の評価を行った。

課題推進者: 本田直樹

研究開発課題: 数理モデルと AI・機械学習を用いた臓器間ネットワークの解明、およびヒトデータとの統合によるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

国内外の大規模ゲノムコホート由来のオミクス情報・臨床情報の収集を行った。また日本人集団に特異的な細胞組織特異的オミクス情報やシングルセルシーケンズ情報、およびゲノム配列情報の収集も行った。特に、京都大学大学院医学研究科により運営されているながはま 0 次コホートのゲノム・臨床情報のデータ解析を進め、GWAS ジェノタイプデータの quality control や genome-wide genotype imputation を進めた。ゲノムワイド関連解析の実施と収集により認知症関連疾患や健康長寿を含む多彩なヒト疾患の遺伝的背景、生物学的パスウェイや臓器関連・細胞組織特異性に関する研究を進めた。

課題推進者: 岡田 随象

研究開発課題: 数理モデルと AI・機械学習を用いた臓器間ネットワークの解明、およびヒトデータとの統合によるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

非侵襲で取得可能かつパーキンソン病の発症にも関与があるとされる腸内細菌叢データから発症シナリオの推定のため、擬似時間再構成法である slingshot を適用し、発症過程の推定を行った。また、頭囲成長遅延を示す早産児における時系列腸内細菌叢データに対して DNB (Dynamic Network Biomarker) 理論を適応し、第30週目直前で変動する細菌種が発症前状態の予測に関わる因子の可能性を見出した。

課題推進者: 中岡 慎治

研究開発課題: 数理モデルと AI・機械学習を用いた臓器間ネットワークの解明、およびヒトデータとの統合によるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

データ駆動的に生化学・生物物理学メカニズムを推定する手法の設計・適用を行った。具体的には、ライブイメージング動画からメカニズムを推定する手法を実装し、人工データへと適用し本手法が有効であることを確認した。さらに、サンプリング頻度の低いオミ

クスデータから、メカニズムを推定する手法である CellBox を改良し、メラノーマ細胞 SK-Mel133 のシグナル伝達阻害剤処理時の Reverse Phase Protein Arrays による計測結果に適用することで、本手法の有効性を確認した。

課題推進者:近藤 洋平

研究開発課題:数理モデルと AI・機械学習を用いた臓器間ネットワークの解明、およびヒトデータとの統合によるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

深層時系列モデルの生体時系列データへの応用として、公開済みである深層カルマンフィルタのコードを用いて、医療データの解析を行い本手法の有効性を確認した。また、臓器関連ネットワークや既存モデルの調査、及び、ベースとする機械学習モデルの整備を行った。さらに、遺伝子・薬剤・疾患ネットワーク解析技術の臓器間ネットワークへの応用のために、公開した遺伝子・薬剤・疾患ネットワーク解析のためのグラフニューラルネットワーク技術を継続的に整備し、精度の向上を行った。

課題推進者:小島諒介

研究開発課題:数理モデルと AI・機械学習を用いた臓器間ネットワークの解明、およびヒトデータとの統合によるリスク予見法の創出

当該年度実施内容:

生体時系列データを解析するための時系列データの振動子分解手法を改良し、性能の向上を実現した。このプログラムの公開も行った。この手法を乳児 fNIRS データへと応用し、脳活動に由来する振動子、脈波に対応する振動子、ミラーリングノイズに対応する振動子の 3 種類の振動子の存在を明らかにした。また、それらの振動子からなる機能的結合ネットワークの推定を行い、脳活動に由来する振動子では半球間の結合が多く、脈波に対応する振動子では密に結合していて、ミラーリングノイズに対応する振動子では結合がほとんどないことを明らかにした。

課題推進者:松田孟留

(6) 研究開発項目 6:ELSI に配慮した新規医療の共同開発

研究開発課題 10:超早期に認知症関連疾患の予測・予防を可能にする社会実現に向けた ELSI 研究の推進

当該年度実施内容:

国内の法令・倫理指針の改正の状況を整理し、倫理面において留意すべき事項のポイントを抽出した。本課題に関連した既存の ELSI 研究の文献を調査し、ELSI の論点のマッピングに着手した。

具体的には、2021 年 6 月末に施行された「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」における、研究対象者への結果説明方針ならびに電磁的手法によるインフォームド・コンセントについての課題を検討した。さらに、令和 2 年・3 年改正個人情報保護法と、研究倫理指針の改正(2022 年 4 月施行)を控え、倫理面での配慮事項を整理した。本研究開発で予想される課題として、超早期介入の研究結果の本人への伝

達をめぐる最新の議論を把握し、今後の PPI の基盤づくりに向けた重要事項を整理した。

ELSI 研究の先行研究を検討し、認知症関連疾患の早期診断・予防的介入に関する倫理的問題、数理モデルを用いたシミュレーションや予測医療における科学者・医療者の責任問題、次世代イメージング・解析技術とセンシング技術の倫理的課題という 4 つに大別し、論点整理に着手した。古典的な共通課題として、プライバシー、ビッグ・データ倫理、二次的所見の説明と対処可能性、適時性、早期診断結果が社会的不利益につながるリスク等の論点を見出し、研究対象者本人だけでなく、家族・介護者の存在を考慮に入れることの重要性を指摘した。他方で、本プロジェクトの研究開発に特有の ELSI として、多臓器連関の包括的理解、数理モデルを含む複数の新規技術統合によるリスク予測とルールメイキング研究という論点を抽出した。

課題推進者：武藤香織(東京大学)

3. 当該年度のプロジェクトマネジメント実施内容

(1) 研究開発プロジェクトのガバナンス

進捗状況の把握

代表機関内に PM 支援体制チームを構築し、課題推進者と PM との間の重要事項の連絡・調整を研究者の観点から支援する若手研究者(生野特定助教)を PM 支援体制チームのチームリーダーとして雇用した。次にサブリーダーとして別の若手研究者(石本特定助教)を雇用し、本プロジェクトで特に重要なデータマネジメントおよび国民へのアウトリーチに専任させた。さらに多くの課題推進者を効率よく統括するためにグループ統括によるとりまとめ体制を敷き、多く発生する事務業務を事務局で行うための事務担当者を雇用した。また、進捗報告会議を経ての評価を受け、さらに代表機関の体制を強化するために PM 支援体制チームリーダーを課題推進者の一人でもある山門准教授へ交代させた。

R3 年度の第一四半期に、R3 年度から参画する多くの研究機関・課題推進者を含めた運営会議を R3 年度キックオフミーティングとして行った。進捗状況の把握と PI 評価については独自の書式(PI が年度途中で提出する課題年次報告書)を作成し、その提出と 9 月のクローズドかつ全課題推進者が出席する進捗報告会議をもって公平かつ適切な PI 評価が行えるよう留意した。その他、本プロジェクトで共通のマテリアルとして使用する動物モデルの理解を深め連携を推進するべく、R3 年 4 月にモデル動物ミーティングを開催した。

研究開発プロジェクトの展開

従来の個別の臓器・疾患に限定された研究と異なり、本研究開発プログラムは全身の臓器連関を解明するものである。そのため研究の進捗に伴い課題推進者間の研究内容が重複したり、いずれかの課題推進者の研究成果により他の推進者の研究計画の重要性が大きく変化したりする可能性が存在する。この点を R3 年度最初の全体ミーティングにおいて周知し、協調と競争を促した。一方で一人の課題推進者の開発した手法が別の課題推進者の研究のブレークスルーとなる可能性も高く、グループ内およびグループ間での情報共有を密にすることで課題推進者間の協働を支援している。特に3年目の中間評価段階で「マイルストーンの達成度等を勘案してステージゲートの開発課題の整理や再編成を検

討し、課題推進者の最適化を行う」旨を周知し、マイルストーンを意識した効率的な研究活動を推進させた。

ただし研究開発プロジェクト全体の戦略としては、当初より課題推進者を絞り込む方向に動くのではなく、共通イメージングプラットフォームの構築、若手研究者のトレーニングと最先端イメージング技術の普及・新規計測技術開発支援、そして若手の医学生物学研究者への数理科学研究能力育成体制の確立を通じて各推進者が十全なパフォーマンスを発揮できるよう支援している。

(2) 研究成果の展開

研究成果の展開方法については代表機関である京都大学において、知財運用に支障がないように各課題推進者との間で実施規約の確認・締結を進めた。また、運営会議・進捗会議において成果公表や知財を中心に課題推進時の注意点を繰り返し強調した。知財戦略およびそのための成果報告申請の管理や国内外の研究開発動向調査に関してはグループ統括によるとりまとめのもとに PM 支援体制チームが情報を整理し、PM が効率的に確認・判断できるようにした。

事業化戦略としては、課題推進者の属する研究機関の多くが産業界との連携体制を重視している。例えば順天堂大学の GAUDI では企業や研究者の開発シーズを出口、つまり社会実装までワンストップで支援する取り組みを行っている。他にも国内約10社と量研機構の連携によるアライアンス、感覚器研究のコンソーシアムなどがあり、将来の社会実装を見据えた産業界との連携体制を構築している。また、多くの課題推進者が多数の企業と共同研究を行っている。ムーンショットプロジェクト開始前の成果ではあるが味の素と量子研の共同研究で開発された Amino LP7 は既に商品化されている。また、順天堂大学の課題推進者のチームは 3D で行える遠隔診療システムについてマイクロソフト社と開発を行ない論文投稿している (Sekimoto T et al. *Mov Disord* 2020)。このような経験・基盤を活かし今後も産業界との連携を進めていく。

グローバル展開戦略については、本プロジェクトでは国際的に活躍する第一線研究者を多く擁するため、既に多数の国際共同研究に携わっている。また、国際プロジェクトの中核メンバーを擁することで迅速な情報共有が可能である。さらに国際的に評価の高い動物モデルを用いること自体が国際連携に繋がるのが期待される。海外の大規模コホートデータの活用も既に開始し、PPMI データの解析から得られたパーキンソン病関連認知症の発症予測に関してプレスリリース済みである。

(3) 広報、アウトリーチ

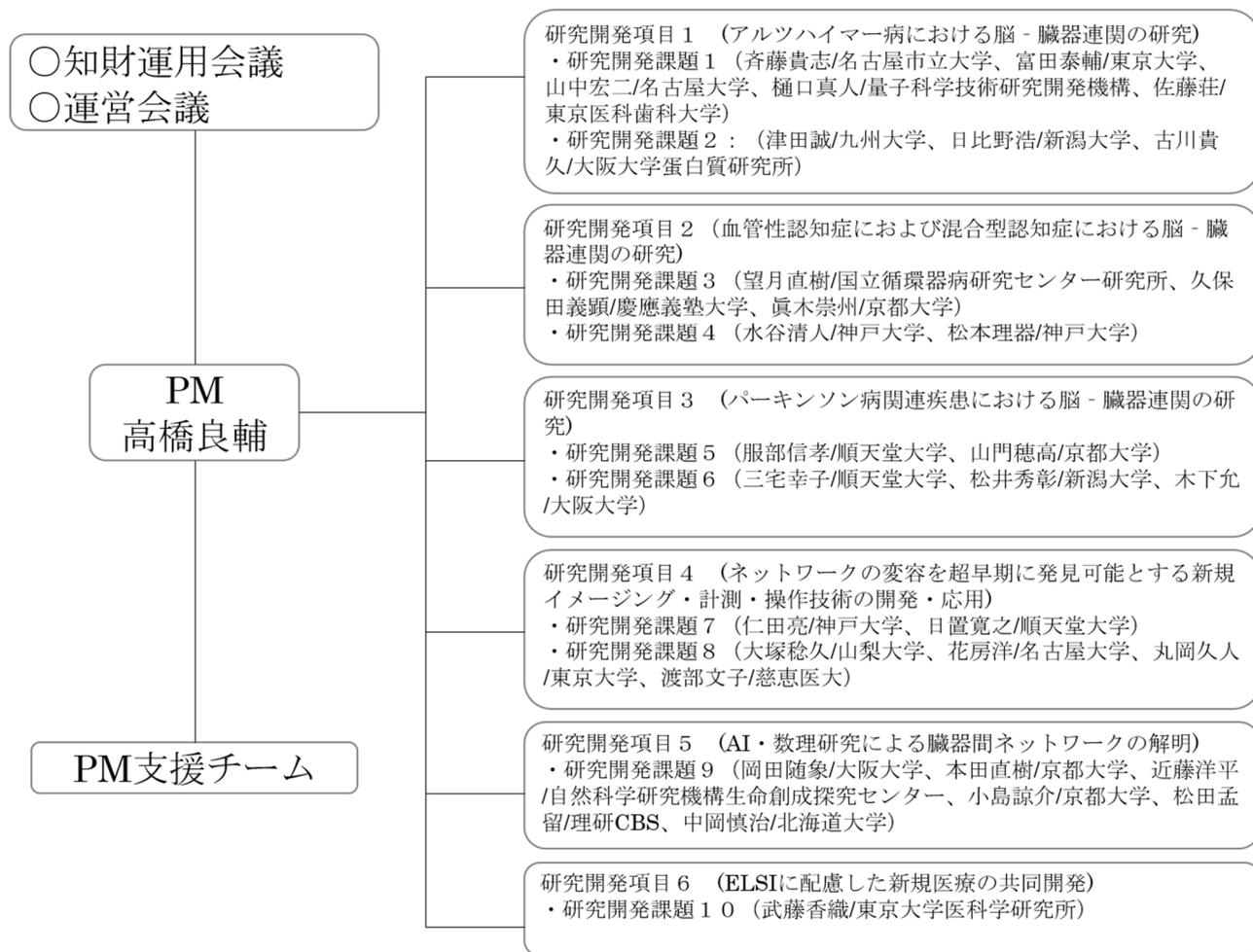
代表機関である京都大学学術研究支援室の支援を受け、コロナ禍の中で無理の無い範囲で安全に注意しつつ国民へのアウトリーチ活動を行った。PM 支援チームを中心に現代社会に適応した方法を用いたアウトリーチ活動の前例を収集し、必要な費用と課題を確認した上で、ホームページを開設した (<https://monad.med.kyoto-u.ac.jp/>)。現在、プレスリリース情報を中心に順次情報を更新している。また、PM としては、データマネジメント・アウトリーチに選任する若手研究者(石本特定助教)を事務局員として雇用し、一般国民との対話イベントであるアカデミックデイズで情報発信を行わせた。その他、基礎グループの大塚統括は市民公開

講座でムーンショットプロジェクトの紹介を行い、数理グループの本田統括は中学校でのアウトリーチ講義を行った。このように、国民への分かりやすい情報発信と双方向性のコミュニケーションを推進している。

(4) データマネジメントに関する取り組み

内閣府の研究DX(デジタル・トランスフォーメーション)推進施策に沿った運営を心掛け、数理・データマネジメント会議でプロジェクト横断的なデータベース構築・マネジメントに向け議論・連携し、GakuNin RDMでの共有へ向け準備を行っている。また、統合的数理解析へ向け合原PJとの連携を強化し、合同シンポジウムを行った。特に包括的なデータベース化のためには、「疾患モデル動物を用いた未病の解析」「経時的解析を可能とする革新的技術の開発」「異なるタイムポイント・モダリティデータの統合」が重要であり、祖父江PDの指揮の下、プロジェクト間をまたいだ議論とメタデータの整理を進めている。

4. 当該年度の研究開発プロジェクト推進体制図



知財運用会議 構成機関と実施内容

知財運用に支障が無いように、R3 年度から参画する課題推進者も含めプロジェクト全体で最終的な実施規約の確認および周知徹底を行った。

運営会議 実施内容

R3 年度の第一四半期に、R3 年度から参画する多くの研究機関・課題推進者を含めた運営会議を R3 年度キックオフミーティングとして行った。進捗状況の把握と PI 評価については独自の書式 (PI が年度途中で提出する課題年次報告書) を作成し、その提出と 9 月のクローズドかつ全課題推進者が出席する進捗報告会議をもって公平かつ適切な PI 評価が行えるよう留意した。その他、本プロジェクトで共通のマテリアルとして使用する動物モデルの理解を深め連携を推進するべく、R3 年 4 月にモデル動物ミーティングを開催した。

5. 当該年度の成果データ集計

知的財産権件数				
	特許		その他産業財産権	
	国内	国際(PCT含む)	国内	国際
未登録件数	2	1	0	0
登録件数	0	0	0	0
合計(出願件数)	2	1	0	0

会議発表数			
	国内	国際	総数
招待講演	62	15	77
口頭発表	11	6	17
ポスター発表	21	1	22
合計	94	22	116

原著論文数(※proceedingsを含む)			
	国内	国際	総数
件数	0	48	48
(うち、査読有)	0	38	38

その他著作物数(総説、書籍など)			
	国内	国際	総数
総説	14	4	18
書籍	0	3	3
その他	0	0	0
合計	14	7	21

受賞件数		
国内	国際	総数
1	0	1

プレスリリース件数
9

報道件数
12

ワークショップ等、アウトリーチ件数
29