

喜瀬守人（久地診療所）、今藤誠俊（根津診療所）、高橋 慶（赤羽東診療所）、西村真紀（あさお診療所）、平山陽子（王子生協病院）、村山慎一（汐入診療所）、安来志保（上井草診療所）、青木拓哉（北足立医療生協診療所）、富永智一、永田拓哉。研究中間報告：EMPOWER-Japan Study (Elderly Mortality Patients Observed Within the Existing Residence)。第5回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会。岡山、5月。

## 再生医学研究部

教授：岡野ジェームス洋尚 分子神経科学、再生医学

### 教育・研究概要

再生医学研究部は、神経変性疾患等の難治性疾患に対する新規治療法の開発を目標に、遺伝子改変による疾患モデル動物、疾患 iPS 細胞、タイムラプス細胞イメージング技術、非侵襲的生体イメージング技術などを駆使して基礎研究を行っている。

### I. 遅発性小脳失調モデル動物を用いた軸索変性機序の解明

神経特異的 RNA 結合タンパク質 Hu ファミリーは標的 RNA の安定化や翻訳促進により神経前駆細胞からニューロンへの分化を促進する。また、核内に局在する Hu タンパク質は標的 RNA の選択的スプライシングを制御することが知られている (Hayashi S, et al. J Neurosci Res 2015)。

HuC ノックアウト (KO) マウスは正常に発育するが生後7ヶ月になると歩行障害などの運動失調症状を呈する。このマウスの小脳では神経回路が正常に形成されたのちに遅発性にシナプス脱落を伴ったプルキンエ細胞の軸索変性が起こるが、プルキンエ細胞は細胞死には至らない。球状に変性した軸索にはミトコンドリアや APP が貯留していることから軸索輸送の不全が疑われている。詳細な電子顕微鏡解析を行った結果、プルキンエ細胞の軸索膨大部に様々な細胞内小器官が蓄積し、細胞質の構成成分が軸索へと流出している所見が観察された。このことから、HuC KO マウスのプルキンエ細胞では軸索輸送の障害に加え、細胞体から軸索に細胞内小器官等の異常流出が生じている可能性が考えられた。通常、ニューロンでは細胞体と軸索の間に拡散障壁 (AIS) が形成されており、軸索へ移行できる細胞内小器官やタンパク質は制限されている。HuC KO マウス小脳では、AIS の最も重要な構成因子の1つである Ankyrin-G の発現量および選択的スプライシングのパターンが有意に変化していた。野生型に比べ HuC KO 小脳では exon 34 を有する Ankyrin-G のバリエントが増加しており、ZU5 ドメイン中に exon 34 が挿入されることにより Spectrin との結合親和性に変化が起こっている可能性が考えられる。同バリエントは胎生期に多く発現するものの成体脳では極めて少ないため、HuC KO 小脳では異時性

に“胎仔型 Ankyrin-G”が出現していると言える。我々はこれまでに HITS-CLIP 法を用いた標的探索により Ankyrin-G が Hu による選択的スプライシング制御を受けることを明らかにしており (Ince-Dunn G, Okano HJ, et al. Neuron 2012), Hu タンパク質の欠失により AIS 機能の低下が起こっている可能性が強く示唆される

軸索が球状に肥大する病理所見は様々な神経変性疾患で観察されるが、神経症状発症との関連性については不明な点が多い。球状変性が出現する分子機構も詳細はわかっていない。さらに、なぜ多くの神経変性疾患が加齢に伴って発症するのかという大きな疑問も残されている。ヒトの神経変性疾患と同様に高齢になってから発症する HuC KO マウスは、ヒトの疾患の病態を研究する上で極めてユニークかつ有用な小脳変性症モデル動物であり、HuC KO マウスを用いた研究により加齢に伴う軸索の変性に関する多くの分子生物学的知見が得られる可能性がある。

## II. ALS の病態研究

ALS は、50~60 代を中心に発症し、上位・下位運動ニューロンの特異的な障害により成人の呼吸機能を含む運動機能を全廃に至らしめる最も悲惨な神経疾患の一つである。近年、ALS 患者の運動ニューロンにおいて、RNA 結合タンパク質である TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) の異常な蓄積が見られることが報告され、滞りかけていた ALS 研究の大きなブレイクスルーとなった。さらに複数のグループから TDP-43 が家族性 ALS および前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) の原因遺伝子の一つであることが報告された。我々は慶應義塾大学と共同で変異塩基の異なる 2 種類の変異型 TDP-43 遺伝子ノックインマウスを作成し、組織学的・細胞生物学的解析を行った。このマウスは生後 7 ヶ月までは正常に発育するが、その後体重増加不全に伴う運動機能障害を発症して死に至る。脊髄前角運動ニューロンの細胞質には変異型 TDP-43 を含む封入体が見られ、神経細胞数の減少が観察された。我々は内因性および変異型 TDP-43 の発現量と TDP-43 の標的 RNA に注目し、ALS 発症の早期バイオマーカーとなりうる量的・質的变化を捉えるために探索を行った。2 種類の変異型 TDP-43 導入マウスのうち 1 つでは、野生型と比較して末梢血単核球における TDP-43 発現量が有意に高く、さらに Motor Neuron Disease に関連する遺伝子の選択的スプライシングに異常が検出された。これらの結果は、末

梢血の分析により ALS 発症の早期診断バイオマーカーを確立できる可能性を示唆している。

Hu タンパク質や TDP-43 などの RNA 結合タンパク質は、一般的に特異的な RNA 配列を認識して結合することが知られているが、RNA が形成する高次構造を認識するものもある。hnRNP K はなんらかの高次構造を認識することが予測されていたが、我々は構造計算により hnRNPK 結合エレメントが J-motif と命名した特殊な RNA 四重鎖構造を作ることを見いだした (Nakamura S, et al. J Biochem 2014)。さらに同構造をつくる RNA 配列をデータベース上で検索するソフトウェア「HIMAJA」を開発し公開した。

## III. 非侵襲的生体イメージング技術の開発と応用

9.4T 高磁場動物用 MRI を用いた画像解析技術により成体マウスの脳イメージングを行った。拡散テンソル法により脳内の神経線維走行を網羅的に可視化するとともに、神経科学研究部と共同で痛み経路の描出を行った。また、血管外科と共同で非造影での MRA による下肢血流の評価系を確立し、さらに作成した急性動脈閉塞モデル動物において MR Spectroscopy で下腿筋の虚血性変化により ATP-クレアチンリン酸代謝系を可視化する方法を確立した。

## IV. ヒト疾患 iPS 細胞の作成と解析

難治性疾患の病態解析および再生医療への応用を目標に、患者由来細胞を用いて iPS 細胞の作成を行っている。エピソーマルベクターもしくは組み換えセンダイウイルスベクターを用い患者由来末梢血単核球に山中 4 因子を導入してヒト疾患 iPS 細胞を樹立した。本年度は家族性パーキンソン病患者の iPS 細胞 3 ラインの樹立に成功した (神経内科と共同)。また、iPS 細胞からドーパミンニューロンへの分化誘導プロトコルを確立し、患者 iPS 細胞由来ニューロンを用いた解析を行った。

## V. ヒト疾患モデルマウスの開発と応用

実験動物中央研究所が小型霊長類コモン・マウスの遺伝子改変に成功したことを受け、遺伝子改変による神経変性疾患霊長類モデルの作成を開始した。慶應義塾大学・実験動物中央研究所と共同で進める神経変性疾患モデル霊長類作成プロジェクトの一環として、変異型  $\alpha$ -synuclein 遺伝子を導入したマウスが作成され、行動解析による神経症状発症のモニタリングおよび組織学的解析を行った。

理化学研究所, 放射線医学総合研究所において経時的 PET 解析を実施しており, 遺伝性パーキンソン病モデル霊長類としてライン化が可能か検討している。

また, マーモセット運動疾患モデルにおける上下肢運動障害を評価するための画像解析システムを慶應義塾大学医学部・理工学部と共同で開発した。頸髄損傷モデルマーモセットのエサ取り動作を複数の高速度カメラにより撮影し, マーカーを付けた上肢の三次元的な動作を軌道解析し運動障害の程度を評価することに成功した (Takemi M, et al. Behav Brain Res 2014)。本システムはパーキンソン病モデルの運動障害の評価にも適用できる可能性が高い。

### 「点検・評価」

再生医学研究部の構成員は教授 1 名, 助教 1 名, 大学院生 9 名 (うち 6 名は, 血管外科, 神経内科, 腎臓・高血圧内科, 耳鼻咽喉科・頭頸部外科, 小児科からの再派遣, 1 名は他学大学院生の再派遣), 研究補助員 3 名である。皮膚科, 内科, 外科, 小児科, 耳鼻咽喉科をはじめとする学内臨床講座のみならず, 慶應義塾大学, 星薬科大学, 東京大学, 琉球大学, 放射線医学総合研究所, 実験動物中央研究所, 理化学研究所, 産業技術総合研究所, Mayo Clinic, Rockefeller 大学, Monash 大学等の研究機関と積極的に共同研究を行っており, 専門科を越えた多角的研究の展開を目指している (Zhou Z, et al. Mol Brain 2014, Kuwako K, et al. Cell Rep 2014, Yamada A, et al. Human Cell 2014)。また, 患者細胞の解析や iPS 細胞の作成を積極的に行っており, 臨床講座との活発な共同研究を行っている (Yamanaka S, et al. PLoS One 2014, Izuohara L, et al. PLoS One 2015)。今年度は本学が所有する 9.4T 高磁場 MRI を利用した画像研究を本格的に開始したのに加え, 新たに本学の導入された小型霊長類マーモセットにおける MRI イメージングの基礎実験を行った。再生医学は多くの臨床分野への応用が可能であるため, 本学における臨床・基礎橋渡し研究の発展に貢献していきたいと考えている。

## 研究業績

### I. 原著論文

- Zhou Z<sup>1</sup>, Kohda K<sup>1</sup>, Ibata K<sup>1</sup>, Kohyama J<sup>1</sup>, Akamatsu W<sup>1</sup>, Yuzaki M<sup>1</sup>, Okano HJ, Sasaki E<sup>1,2</sup> (<sup>2</sup>Central Institute for Experimental Animals), Okano H<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ). Reprogramming non-human

primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors. Mol Brain 2014; 7: 24.

- Yamada A, Yokoo T, Yokote S, Yamanaka S, Izuohara L, Katsuoka Y, Shimada Y, Shukuya A, Okano HJ, Ohashi T, Ida H. Comparison of multipotency and molecular profile of MSCs between CKD and healthy rats. Human Cell 2014; 27(2): 59-67.
- Nakamura S<sup>1</sup>, Igarashi M<sup>2,3</sup> (<sup>3</sup>Sophia Univ), Kinoshita M<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Takeda Pharmaceutical), Okano HJ, Okano H<sup>2</sup> (<sup>2</sup>Keio Univ). Proposing a new RNA quadruplex structure: j-motif, with possible links to neural development. J Biochem 2014; 155(6): 385-92.
- Yamanaka S, Yokote S, Yamada A, Katsuoka Y, Izuohara L, Shimada Y, Omura N, Okano HJ, Ohki T, Yokoo T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term dialysis patients display downregulation of PCAF expression and poor angiogenesis activation. PLoS One 2014; 9(7): e102311.
- Takemi M<sup>1</sup>, Kondo T<sup>1</sup>, Yoshino-Saito K<sup>1</sup>, Sekiguchi T<sup>1</sup>, Kosugi A<sup>1</sup>, Kasuga S<sup>1</sup>, Okano HJ, Okano H<sup>1</sup>, Ushiba J<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ). Three-dimensional motion analysis of arm-reaching movements in healthy and hemispinalized common marmosets. Behav Brain Res 2014; 275: 259-68.
- Kuwako K<sup>1</sup>, Nishimoto Y<sup>1</sup>, Kawase S<sup>1</sup>, Okano HJ, Okano H<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ). Cadherin-7 regulates the circuit connectivity of the cerebellar mossy fiber. Cell Rep 2014; 9(1): 311-23.
- Hayashi S<sup>1,2</sup> (<sup>2</sup>Takeda Pharmaceutical), Yano M<sup>1</sup>, Igarashi M<sup>1</sup>, Okano HJ, Okano H<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ). Alternative role of HuD splicing variants in neuronal differentiation. J Neurosci Res 2015; 93(3): 399-409.
- Izuohara L, Tatsumi N, Miyagawa S (Osaka Univ), Iwai S (Kitasato Univ), Watanabe M<sup>1</sup>, Yamanaka S, Katsuoka Y, Nagashima H<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Meiji Univ), Okano HJ, Yokoo T. Generation of a felinized swine endothelial cell line by expression of feline decay-accelerating factor. PLoS One 2015; 10(2): e0117682.

### III. 学会発表

- Hara-Miyauchi C, Daté Y<sup>1</sup>, Hasegawa M, Kobayashi R<sup>1</sup>, Fujigasaki J, Kogo N<sup>2</sup>, Sano C<sup>2</sup>, Kobayashi Y<sup>2</sup>, Suzuki N<sup>1</sup>, Itohara S<sup>2</sup> (<sup>2</sup>RIKEN), Okano H<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ), Okano HJ. Multimodal and exclusive pathology between ALS and FTLT caused by TDP-43 mutations. Neuroscience 2014 (Society for Neuroscience 2014 Annual Meeting). Washington D.C., Nov.

2) Okano HJ. Impaired axonal transport in Purkinje cells of HuC knockout mice. Neuroscience 2014 (Society for Neuroscience 2014 Annual Meeting). Washington D.C., Nov.

#### IV. 著 書

1) 岡野ジェイムス洋尚. 第1章：神経細胞内病態と脳内環境 5. 遅発性小脳失調症モデル動物にみられる軸索変性の病態. 高橋良輔<sup>1)</sup>, 漆谷 真<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>京都大), 山中宏二 (名古屋大), 樋口真人 (放射線医学総合研究所) 編. 遺伝子医学 MOOK 26: 脳内環境-維持機構と破綻をもたらす疾患研究. 大阪: メディカルドゥ, 2014. p.48-52.

## 基盤研究施設 (分子遺伝学)

教授: 山田 尚 分子腫瘍学・血液学

### 教育・研究概要

#### I. 発がんに関する分子腫瘍学的研究

##### 1. 白血病の分子機構

骨髄増殖性腫瘍 (MPN) は慢性骨髄性白血病 (CML), 真性多血症 (PV), 骨髄線維症 (MF), 本態性血小板増多症 (ET) に代表される慢性の血球増殖をきたす疾患である。近年, 各病態に特徴的な遺伝子異常が報告されその発がん機構と共に, 分子治療薬の開発が成功している疾患群でもある。しかし, 各疾患間には相互のオーバーラップも知られ, 臨床病態の理解と治療の選択が難しい症例も存在する。この様な症例に対しても遺伝子検査が重要で, その結果は治療の選択や病態の理解に有用である。我々は JAK2V617F 変異を有する MF 症例に新たに BCR-ABL 変異を獲得した症例を経験した。本症例における変異クローンの出現過程および治療によるクローンの消失過程を検討し, MPN における疾患相互の関連および増殖性の特徴を明らかにした。

また, 我々は先天性疾患に合併した白血病に対して, 次世代シーケンサーを用いた腫瘍遺伝子の網羅的な変異解析を行っており, 診断の難しい疾患や病態の解析が難しい疾患に関して分子遺伝学的検討を加えている。

#### II. 抗腫瘍薬の分子薬理学的研究

##### 1. エピジェネティック機構と抗腫瘍効果

我々は白血病や網膜芽細胞腫について, ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 (HDACI) の単独および他の薬剤との併用における抗腫瘍作用を研究してきた。近年, 全ゲノム解析から多くの腫瘍においてエピジェネティックな変化が発がんにおいて重要であることが報告されている。アセチル化ヒストンを認識し転写やゲノムの安定性に重要な働きを担っている遺伝子としてプロモドメインを有する遺伝子群がある。このうちでも悪性腫瘍の領域では BRD4 の働きが注目されている。BRD4 はアセチル化ヒストンと会合するがこの会合を阻止する低分子化合物の開発が進んでいる。我々はその1つである I-BET151 について, 白血病, 多発性骨髄腫, 更に乳癌に対する増殖抑制効果を検討している。JAM911 は我々が樹立した MLL-AF9 の転座を有する白血病細胞株であ