

再生医学研究部

教授：岡野ジェイムス洋尚 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、霊長類疾患モデル、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. 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。ALSの診断は、筋力低下などの臨床症状と針筋電図により行われており、ALSリスクを早期に検出するバイオマーカーは存在しない。ALSを含む神経変性疾患の治療法開発が困難を極める原因の一つとして、バイオマーカーが存在しないために無症状期のリスクを捉えられないことが挙げられる。現在の医療では、診断がついた時点で既に多くのニューロンの脱落による症状が現れている状態であり、治療により運動機能を補うのは非常に困難である。このような背景から、自覚症状が現れる以前に神経変性の進行を阻止する為に、発症前から体内で起こっている異常な変化を是正することが重要である。近年、RNAスプライシングや翻訳調節不全が神経変性の病態と深く関わっていることが疑われている。実際に、これまでに報告されたALSの原因遺伝子の半数近くがRNAの成熟や分解課程などのRNA代謝を制御する因子である。ALSの原因遺伝子であるTARDNA binding protein 43kD (TDP-43)は、自己を含む標的RNAのスプライシングや安定性などの調節を行うRNA結合タンパク質である。家族性および孤発性ALS全体に占めるTDP-43変異を持つ患者の割合は5%に満たないものの、TDP-43タンパク質の蓄積を伴う運動ニューロン病理の異常所見はALS患者全体の9割以上に認められることが報告されている(Laferriere F, Polymenidou M. Swiss Med Wkly 2015)。このことからTDP-43がALS病態の発症において責任的役割を担っていることが強く示唆される。我々はこれまでの研究において、ALSモデルマウスと

してヒト変異型TDP-43: Venusノックイン(KI)マウスを利用して病態解析を行ってきた。生後7ヶ月齢頃までは正常に発育するが、その後体重増加不良に伴う運動障害を徐々に発症する。このKIマウスの白血球からRNAを抽出し、運動障害発症前にTDP-43, Snn1, Naip5のmRNA量の異常を検出できることを示す知見を報告した。また、KIマウスの大脳皮質においてTDP-43のスプライシング標的であるPyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit1 (Pdp1)のスプライスバリエーションの比率が野生型マウスと比較して明らかに異なることを発見した。これは、同じくTDP-43のスプライシング標的であるSortilin1 (Sort1)についても再現され、変化したスプライスパターンは、培養細胞を用いた過去の報告によりTDP-43のノックダウン時と同様のパターンであった。本結果より、TDP-43 KIマウスの脳内ではTDP-43の機能低下が引き起こされている可能性が高いことがわかった。さらに、同様の変化をKIマウスの白血球からも検出できることを確認した(Hasegawa M, et al. Neurosci Res 2016)。

II. 動物モデルによるヒト疾患のモデリング

多くの研究者が動物の尾静脈穿刺が困難な場合には尾を温めると成功しやすいと経験的に感じてきたが、我々はその原因を血管造影及び組織学的解析により明らかにした。ラットの頸動脈と尾動脈にカテーテルを留置し同時に動脈圧測定及び血管造影を行った。頸動脈は外環境によらず血管収縮は見られなかったが、尾動脈は冷却により著明な血管収縮が生じ、尾動脈末梢への血流低下が観察された。つまり、ラットの尾動脈は温度依存性に容易に血管収縮が生じやすいことが示された。また血管収縮を担う血管平滑筋細胞数が頸動脈と比較し多いことが組織学的解析により裏付けられた。尾動脈根部での血流低下に伴い静脈還流も低下し穿刺困難となっていた。この結果から、げっ歯類の血圧測定に多用される尾動脈圧測定の際には、尾の先端まで厳重に保温した環境下での測定でなければ正確な血圧モニタリングにならない可能性が高いことが判明した。降圧剤を含めた新規循環作動薬の創薬など、動物実験レベルからトランスレーショナルリサーチへの効率的な研究開発を行う上で、真の血圧を測定することは根本的に重要である。ラットの尾動脈の血管収縮現象を認知せずに行われる血圧モニタリングでは「見せかけの血圧」に惑わされ、不適切なデータに基づく結果から無効な臨床研究が行われてしまう可能性も否

めない。また、動物実験中の「見せかけの血圧」に対する不適切な治療により動物の身体への過度の負担や、最悪の場合不慮の死につながる可能性も高い。この知見を踏まえて実験を遂行することにより、世界的な基本理念である実験動物の3Rの原則の“Reduction”および“Refinement”に繋がることが期待される (Ohta H, et al. Sci Rep 2017)。

Ⅲ. 宇宙放射線の脳機能への影響に関する神経生物学的研究

宇宙放射線は宇宙空間を飛び交う高エネルギーの放射線で、高線エネルギー付与荷電粒子線をはじめとした多様な線質の放射線であるが、主な成分は陽子である。これまで宇宙に滞在した宇宙飛行士の約80%が、宇宙放射線が宇宙船を通過する際に閃光を見る「アイフラッシュ」と呼ばれる現象を経験したことが報告されている (Fuglesang C, et al. Aviat Space Environ Med 2006)。我が国の毛利, 向井, 野口, 土井宇宙飛行士も目をつぶると目の中の色々な場所に光が見え、白かったり色がついていたり軌跡が見えることもあったと報告している。特に、太陽活動期にフレア (爆発) が起こると大量の太陽粒子線 (99%が陽子・ヘリウムイオン, 1%が炭素イオン・鉄イオンなど重粒子) が放出され宇宙船に降り注ぐため、船内の宇宙飛行士が同時にアイフラッシュを見ることがある。

Narici らはマウスの網膜を使った実験により宇宙放射線が眼球を貫いた時、ラジカル再結合により発生する化学発光に網膜杆体細胞のロドプシンが反応したことが原因であると報告している (Narici L, et al. Int J Radiat Biol 2013)。一方、陽子線治療施設において、陽子線照射を頭部に受けることによってもアイフラッシュ, 幻聴, 異臭, 異常味覚を経験することがあると知られている (Narici L, et al. 未発表)。頭部への陽子線治療の際に見られる異常感覚が視覚のみに限定されているわけではなく、照射方向によって聴覚, 嗅覚, 味覚としても感知されるということから、脳内のニューロンが照射による直接の影響を受けている可能性が考えられる。そこで、培養ニューロンに陽子線・重粒子線を照射し、カルシウムイメージング法を用いて神経活動を可視化する実験により、神経活動に対する宇宙放射線の影響を地上実験で検証することができる可能性が考えられた。我々は細胞1個もしくは少数の細胞からなる神経回路を狙い撃ちして照射し観察できる放射線医学総合研究所のマイクロビーム細胞照射装置 (SPICE) を活用し、陽子線によって引き起こされ

る神経活動を経時的に観察した。マイクロビーム照射に用いることのできる薄膜の中から神経細胞培養に最適な膜の検討を行い安定的に培養可能な条件を検討した。またコーティングの種類, 神経分化を促進する新しい培養液, 神経栄養因子の添加などを検討し, 比較的速くニューロンが成熟する条件を決定した。細胞内カルシウムを可視化する蛍光色素を細胞内に導入し, 顕微鏡による経時的蛍光イメージングを行い, マイクロビーム照射時と非照射時のニューロンの活動を比較検討した。細胞はマウス大脳皮質由来一次培養ニューロンを使用した。その結果, 照射したニューロンは照射直後に活性化し, 逆に照射細胞周辺のニューロンでは活動の低下が再現性良く観察された。これらの観察から陽子線が神経活動・脳活動に影響を及ぼす可能性が強く示唆された (The 7th International Society of Radiation Neurobiology Conference. Yuzawa, 2016)。陽子線が神経活動に直接急性の影響を及ぼすことを示した世界ではじめての成果であり, また地上実験により宇宙放射線の脳への影響をシミュレーションできる実験系を確立したことが確認された。

「点検・評価」

再生医学研究部の構成員は教授1名, 助教1名, ポスドク1名, 大学院生8名 (うち7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), 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, 京都大学, 順天堂大学, 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を展開している。これらの共同研究の成果を原著論文として発表した (Katsuoka Y, et al. Clin Exp Nephrol 2016, Fujimoto E, et al. Clin Exp Nephrol 2016, Kobayashi R, et al. Neurosci Res 2016, Itoh M, et al. Stem Cell Res 2016, Inagaki Y, et al. PLoS One 2016, Komaki Y, et al. Sci Rep 2016, Hikishima K, et al. Sci Rep 2017)。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, 琉球大学と共同で遺伝的背景が極めて強い精神疾患の患者のiPS細胞を作製し, 誘導した神経系細胞を用いた細胞生物学的解析を開始した。

学内では神経科学研究部と共同で霊長類をモデルとした慢性疼痛に関する基礎研究を行った。再生医

学研究部では理化学研究所、京都大学霊長類研究所と共同で高磁場MRIを用いた霊長類における痛み経路の探索、痛みの表情の解析による他覚的疼痛測定系の構築を開始した。また実験動物中央研究所および慶應義塾大学と共同で、げっ歯類慢性疼痛モデルにおける機能的MRIを実施し活動が亢進する脳領域の同定を行った (Komaki Y, et al. Sci Rep 2016)。

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

- 1) Katsuoka Y, Ohta H, Fujimoto E, Izuhara L, Yokote S, Kurihara S, Yamanaka S, Tajiri S, Chikaraish T (St. Marianna Univ), Okano HJ, Yokoo T. Intra-arterial catheter system to repeatedly deliver mesenchymal stem cells in a rat renal failure model. Clin Exp Nephrol 2016; 20(2) : 169-77.
- 2) Kobayashi R¹⁾, Takahashi-Fujigasaki J, Shiozawa S¹⁾, Hara-Miyauchi C, Inoue T²⁾, Sasaki E²⁾ (²Central Inst Experimental Animals), Okano HJ, Okano H¹⁾ (¹Keio Univ). α -synuclein aggregation in the olfactory bulb of middle-aged common marmoset. Neurosci Res 2016; 106 : 55-61.
- 3) Hasegawa M, Hara-Miyauchi C, Ohta H, Sakimura K (Niigata Univ), Okano H (Keio Univ), Okano HJ. Analysis of RNA metabolism in peripheral WBCs of TDP-43 KI mice identifies novel biomarkers of ALS. Neurosci Res 2016; 106 : 12-22.
- 4) Itoh M, Kawagoe S, Okano HJ, Nakagawa H. Integration-free T cell-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient with Lymphedema-Distichiasis Syndrome (LDS) carrying an insertion-deletion complex mutation in the FOXC2 gene. Stem Cell Res 2016; 16(3) : 611-3.
- 5) Itoh M, Kawagoe S, Okano HJ, Nakagawa H. Integration-free T cell-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a healthy individual: WT-iPSC1. Stem Cell Res 2016; 17(1) : 22-4.
- 6) Itoh M, Kawagoe S, Okano HJ, Nakagawa H. Integration-free T cell-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a healthy individual: WT-iPSC2. Stem Cell Res 2016; 17(1) : 16-8.
- 7) Itoh M, Kawagoe S, Okano HJ, Nakagawa H. Integration-free T cell-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a healthy individual: WT-iPSC4. Stem Cell Res 2016; 17(1) : 19-21.
- 8) Itoh M, Kawagoe S, Okano HJ, Nakagawa H. Integration-free T cell-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) carrying two compound heterozygous mutations in the COL7A1 gene. Stem Cell Res 2016; 17(1) : 32-5.
- 9) Inagaki Y¹⁾, Fujioka M¹⁾, Kanzaki S¹⁾, Watanabe K¹⁾, Oishi N¹⁾, Itakura G¹⁾, Yasuda A¹⁾, Shibata S¹⁾, Nakamura M¹⁾, Okano HJ, Okano H¹⁾, Ogawa K¹⁾ (¹Keio Univ). Sustained effect of hyaluronic acid in subcutaneous administration to the cochlear spiral ganglion. PLoS One 2016; 11 : e0153957.
- 10) Komaki Y¹⁾, Hikishima K¹⁾, Shibata S¹⁾, Konomi T¹⁾, Seki F¹⁾, Yamada M (Fujita Health Univ), Miyasaka N (Tokyo Med Dent Univ), Fujiyoshi K¹⁾, Okano HJ, Nakamura M¹⁾, Okano H¹⁾ (¹Keio Univ). Functional brain mapping using specific sensory-circuit stimulation and a theoretical graph network analysis in mice with neuropathic allodynia. Sci Rep 2016 ; 6 : 37802.
- 11) Fujimoto E, Yamanaka S, Kurihara S, Tajiri S, Izuhara L, Katsuoka Y, Yokote S, Matsumoto K, Kobayashi E, Okano HJ, Chikaraish T (St. Marianna Univ), Yokoo T. Embryonic kidney function in a chronic renal failure model in rodents. Clin Exp Nephrol 2016; 21(4) : 579-88. Epub 2016 Sep 30.
- 12) Ohta H, Ohki T, Kaneoka Y, Koizumi M, Okano HJ. Pitfalls of invasive blood pressure monitoring using the caudal ventral artery in rats. Sci Rep 2017 ; 7 : 41907.
- 13) Hikishima K¹⁾, Komaki Y¹⁾, Seki F¹⁾, Ohnishi Y (Central Inst Experimental Animals), Okano HJ, Okano H¹⁾ (¹Keio Univ). In vivo microscopic voxel-based morphometry with a brain template to characterize strain-specific structures in the mouse brain. Sci Rep 2017 ; 7(1) : 85.

III. 学会発表

- 1) Okano HJ. Effects of high-energy particles on neural activity in primary cultured cortical neurons. The 7th International Society of Radiation Neurobiology Conference. Yuzawa, Feb.
- 2) 岡野ジェームス洋尚. RNA結合タンパク質HuC依存的軸索輸送機構と軸索変性との関連. 第59回日本神経化学学会大会. 福岡, 9月.
- 3) Okano HJ. (Neuroscience Symposium) Impaired RNA metabolism induces axonal degeneration. 3rd IBRO-APRC (International Brain Research Organi-

zation-Asia Pacific) Advanced School of Neuroscience. Bandar Sunway, Nov.

- 4) 岡野ジェイムス洋尚. (特別企画1:再生医学) 遺伝子改変霊長類によるヒト疾患モデルの作成と治療戦略の開発. 第115回日本皮膚科学会総会. 京都, 6月.
- 5) 岡野ジェイムス洋尚. (招待講演) 幹細胞システムと先進的モデル動物を用いた臓器再生戦略. 日本関節運動学的アプローチ (AKA) 医学会第38回学術集会. 東京, 10月.
- 6) 太田裕貴, 畑 純一, 岡野ジェイムス洋尚. 臨床的治療戦略を応用した低侵襲マーマーモセット研究. 第6回日本マーマーモセット研究会大会. 東京, 12月.

基盤研究施設 (分子遺伝学)

教授: 山田 尚 分子腫瘍学・血液学
准教授: 鐘ヶ江裕美 分子ウイルス学・遺伝子治療
講師: 鹿島 剛 RNA工学

教育・研究概要

I. 抗腫瘍薬の分子薬理学的研究

近年, 全ゲノム解析から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り, 特に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おり, 実践的な治療にも応用され始めている。しかし, 薬剤耐性機構の解析や耐性の克服に向けた取り組みは未だ行われていない。

我々は, BRD阻害薬の1つである Bromodomain and Extra-terminal domain protein (BET) 阻害薬のI-BET151について白血病, 多発性骨髄腫さらに乳癌に対する増殖抑制効果を検討している。単球系白血病細胞株U937細胞を用いてI-BET151に対する耐性株(U-937R細胞)の作製に成功した。この耐性株の分子生物学的特徴として, BRD2, BRD4, NFκB, IkappaBαタンパクの発現がみられた。BRDタンパクの増加は耐性を獲得する際に重要であり, 増加したBRDがNFκBシグナル経路を活性化することで耐性株における増殖を維持しているものと推測された。各種阻害薬を用いた薬剤感受性の検討から, IkappaB kinase (IKK) 阻害剤に対して親株と比べ耐性株U-937Rが強い細胞増殖抑制を示したことから, 耐性株におけるNFκBp65タンパクの核内移行が検出されたことから, U-937Rでは細胞増殖におけるNFκBシグナル経路への依存度が高まった結果, IKK阻害剤が強い細胞増殖抑制効果を示したことも整合性のある所見であると考えられた。本研究の結果は, BRD阻害剤耐性細胞を克服するために有用な所見であると考えられる。また, NFκBの活性化により抗アポトーシス作用が高まった耐性株に対するNFκB阻害薬を併用したI-BET151耐性の克服は, 今後のBRD阻害剤の可能性の拡大とその治療法の発展に寄与する成果であると考えている。