

## 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、神経系の外傷、虚血、変性疾患等の難治性神経疾患に対する新規治療法の開発を目標に、疾患モデル動物およびiPS細胞をはじめとする幹細胞システムを用いた研究を行っている。本年度は研究室の立ち上げ、研究費の獲得および以下のプロジェクトを行った。

#### 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

Hu 遺伝子ファミリーは神経特異的 RNA 結合タンパク質をコードしており、神経前駆細胞がニューロンに分化する際、p21, p27 等 CDK/Cyclin 抑制因子および GAP-43 などの神経分化関連因子の発現を転写後調節機構により上昇させることで神経分化を促進することが知られている。しかし、成体のニューロンにおける機能は不明であった。我々は Hu ファミリーのうち成体において発現が高い HuC 遺伝子のノックアウト (KO) マウスを作成した。HuC KO マウスは 7ヶ月齢において小脳失調症を呈し、小脳プルキンエ細胞の軸索においては球状に膨大する変性所見が観察された。この変性部位にミトコンドリア等が貯留していたことから軸索輸送の障害が疑われている。RIP-CHIP 法により HuC の標的 RNA を同定し、軸索変性と HuC との関連を解析した結果、HuC KO マウスでは複数のキネシンタンパク質の発現が低下していることが明らかとなった (科学研究費補助金 特定領域研究「脳内環境」代表研究者・岡野ジェームス洋尚)。また、ロックフェラー大の Bob Darnell 教授との共同研究により HuD KO マウスおよび HuC KO マウスを用いて、HITS-CLIP 法により Hu タンパク質に直接結合する標的 RNA を網羅的に検索した。その結果、Hu タンパク質がグルタミン酸生成過程に関わる因子の選択的スプライシングおよび翻訳の制御を介して、脳内の神経伝達物質のレベルを規定していることが明らかになった。

#### II. ALS の病態研究

TDP-43 は家族性 ALS の原因遺伝子の一つと考えられているが、遺伝子配列に突然変異がなくても

細胞内レベルが過剰になると封入体形成が起こり、細胞死を引き起こすことが知られている。ニューロンにおいて細胞内 TDP-43 レベルを決定する発現調節メカニズムの解明を目指し、翻訳調節に関わる RNA 結合タンパク質の遺伝子を欠失したノックアウトマウスを作成した (科学研究費補助金 基盤 B 代表研究者・岡野ジェームス洋尚)。その結果、TDP-43 の細胞内タンパク質量が翻訳レベルで制御を受けることが明らかになり、この発現調節機構の破綻が ALS のリスクとなる可能性が示唆された。また、慶應義塾大学と共同で変異型 TDP-43 遺伝子ノックインマウスを作成した。培養細胞において変異型 TDP-43 を強制発現し、高率に封入体形成および細胞死を引き起こす変異体を選択し TDP-43 遺伝子座へのノックインを行った。同ノックインマウスが運動障害を呈し、運動ニューロンの細胞質に変異型 TDP-43 を含む封入体が発現することを示した。

#### III. 幹細胞を用いた神経再生技術・非侵襲的生体イメージング技術の開発

神経外傷に対する細胞移植療法の確立を目指し、生体発光イメージングを用いた移植細胞の評価および神経再生の評価システムの開発を行った。マウスおよび小型霊長類であるマーモセットの脊髄損傷モデルを作成して、胎仔由来神経幹細胞 (ニューロスフェア) もしくは iPS 細胞から誘導した神経幹細胞の移植を行い、運動機能が改善することを示した (Yasuda et al. *Stem Cells*. 2011)。当研究室の原央子助教は新規の発光・蛍光レポーター遺伝子 (fLuc) を開発し、移植細胞に導入することにより生体発光イメージングを行い、同一固体における経時的・定量的な移植細胞の評価を可能にした (Hara-Miyauchi C. et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011)。この発光イメージング技術は癌の拡散および転移の評価にも利用でき、同技術を用いて、ホストの MMP-13 が局所エンドスタチンを形成し癌転移に対して抑制的に働くことが明らかにされた (Fukuda H. et al. *Br J Cancer*. 2011)。また、組織の容積変化、損傷軸索の再生を 7T 動物用 MRI (実験動物中央研究所に設置) による標準脳 VBM 解析および拡散テンソルトラクトグラフィにより非侵襲的に評価するシステムを構築した (Hikishima K. et al. *Neuroimage*. 2011)。同一個体において経時的に再生軸索を計測し、軸索伸張が運動能の回復と相関することを示した。

#### IV. ヒト疾患 iPS 細胞の作成

先天性の難治性神経疾患に対する再生研究に利用するために、患者由来 iPS 細胞の作成を行った。組み換えセンダイウイルスベクターを用いて異染性白質ジストロフィー (MLD) 患者由来線維芽細胞に山中 4 因子を導入し、アルカリフォスファターゼを発現する複数の iPS 細胞コロニーを得た。神経系細胞への分化誘導法の確立を進めるとともに、入手した 4 種類の MLD 患者由来線維芽細胞について順次 iPS 細胞の作成を行う。

#### V. ヒト疾患モデルマーマモセットの開発と応用

我が国において世界で初めて小型霊長類コモン・マーマモセットの遺伝子改変に成功し、トランスジェニック霊長類が誕生したことを受け、遺伝子改変による神経変性疾患モデルの作成を開始した。慶應義塾大・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、家族性パーキンソン病の原因遺伝子を導入したマーマモセットが作成され、PET 解析、MRI による VBM 解析、DTT 解析および行動解析により神経症状発症のモニタリングを行った。3 歳齢において中脳における組織萎縮が顕著であることが明らかになったが、現時点ではパーキンソン病症状は呈していない。また、本プロジェクトのために 7T MRI を用いた標準脳の作成 (正常マーマモセット 22 個体の平均 3D 画像データベース) および大型放射光施設 SPring-8 の Synchrotron Refraction Enhanced Tomography を用いた 3D CT/MRI 画像アトラスの作成を行った (Sera T. et al. *Open Journal of Radiology*. 2011)。

#### 〔点検・評価〕

再生医学研究部は平成 23 年 9 月に発足し、現在の構成員は教授 1 名、助教 1 名、大学院生 3 名 (うち 1 名は血管外科学から再派遣)、研究補助員 1 名、訪問研究員 1 名である。実験室、培養室のセットアップがほぼ完了し、学内外のグループと共同研究を開始した。再生医学は多くの臨床分野への応用が可能であり、今後、臨床教室との密接な共同研究により本学の研究の発展に寄与できるものと考えられる。

### 研究業績

#### I. 原著論文

- 1) Shiozawa S, Kawai K, Okada Y, Tomioka I, Maeda T, Kanda A, Shinohara H, Suemizu H, Okano HJ, Sotomaru Y, Sasaki E, Okano H. Gene targeting and

subsequent site-specific transgenesis at the  $\beta$ -actin (ACTB) locus in common marmoset embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20(9) : 1587-99.

- 2) Hosoya M, Fujioka M, Matsuda S, Ohba H, Shibata S, Nakagawa F, Watabe T, Wakabayashi K, Saga Y, Ogawa K, Okano HJ, Okano H. Expression and function of Sox21 during mouse cochlea development. *Neurochem Res* 2011; 36(7) : 1261-9.
- 3) Takagi T, Ishii K, Shibata S, Yasuda A, Sato M, Nagoshi N, Saito H, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Schwann-spheres derived from injured peripheral nerves in adult mice—their *in vitro* characterization and therapeutic potential. *PLoS ONE* 2011; 6(6) : e21497.
- 4) Fukuda H, Mochizuki S, Abe H, Okano HJ, Hara-Miyauchi C, Okano H, Yamaguchi N, Nakayama M, D'Armiento J, Okada Y. Host-derived MMP-13 exhibits a protective role in lung metastasis of melanoma cells by local endostatin production. *Brit J Cancer* 2011; 105(10) : 1615-24.
- 5) Yasuda A, Tsuji O, Shibata S, Nori S, Takano M, Kobayashi Y, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Hara CM, Miyawaki A, Okano HJ, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. *Stem Cells* 2011; 29(12) : 1983-94.
- 6) Sera T, Yokota H, Nakamura S, Uesugi K, Hoshino M, Yagi N, Ito T, Hikishima K, Okano HJ. Synchrotron Refraction Enhanced Tomography of an Intact Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Open Journal of Radiology* 2011; 1(2) : 28-37.
- 7) Hara-Miyauchi C, Tsuji O, Hanyu A, Okada S, Yasuda A, Fukano T, Akazawa C, Nakamura M, Imamura T, Matsuzaki Y, Okano HJ, Miyawaki A, Okano H. Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 419(2) : 188-93.
- 8) Lin Z YC, Imamura M, Sano C, Nakajima R, Suzuki T, Yamadera R, Takehara Y, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. Molecular signatures to define spermatogenic cells in common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Reproduction* 2012; 143(5) : 597-609. Epub 2012 Feb 8.
- 9) Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita M, Nagase H, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK, Okano H, Suzuki T, Narita M. Effect of  $\kappa$ -opioid receptor agonist on the growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *Br J Cancer* 2012; 106(6) : 1148-52.

- 10) Takahashi Y, Tsuji O, Kumagai G, Hara C, Okano HJ, Miyawaki A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. *Cell Transplant* 2011; 20(5): 727-39.
- 11) Hikishima K, Quallo MM, Komaki Y, Yamada M, Kawai K, Momoshima S, Okano HJ, Sasaki E, Tamaki N, Lemon RN, Iriki A, Okano H. Population-averaged standard template brain atlas for the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroimage* 2011; 54(4): 2741-9.

## II. 総 説

- 1) 岡野ジェイムス洋尚. 【最先端医療の進歩－臓器移植・再生医療・遺伝子治療】再生医療の進歩 脊髄損傷に対する多角的再生戦略. *小児診療* 2012; 75(1): 78-82.

## III. 学会発表

- 1) 岡野ジェイムス洋尚. 神経外傷に対する多角的再生戦略. 日本分析化学会第60年会. 名古屋, 9月.
- 2) 岡野ジェイムス洋尚. 遺伝子改変コモンマウスによるヒト神経疾患モデルの開発. 第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会合同年会. 東京, 10月.

## IV. 著 書

- 1) 角元恭子<sup>1)</sup>, 岡野栄之<sup>1)</sup>(<sup>1)</sup>慶應義塾大学), 岡野ジェイムス洋尚. 第1章: 運動系 第6節: 運動障害マウス 第3項: HuC ノックアウトマウス～遅発性小脳変性症モデル～. 三品昌美(東京大学)企画・編集. モデル動物利用マニュアル: 疾患モデル動物の作製と利用: 脳・神経疾患. 東京: エル・アイ・シー, 2011. p.111-6.

## 医用エンジニアリング研究室

教授: 古幡 博 超音波医学  
准教授: 横山 昌幸 バイオマテリアル, DDS

### 教育・研究概要

#### I. 超音波の医療応用

超音波照射による, 脳梗塞血栓溶解, 腫瘍縮退の臨床実現に関する研究を行った。特に, 先端医療開発特区に採択されている, 「急性脳梗塞系統的治療のための分野横断的診断・治療統合化低侵襲システムの開発」の実施に関し, 本学の各教室および他大学・施設と共同研究開発を実施した。

1. ラット急性脳梗塞モデルによる安全性評価 (神経病理との共同研究)

急性脳梗塞の非開通状態を招来した場合に, 血栓溶解剤 (rt-PA) と経頭蓋中周波数超音波 (500KHz) を照射したときの出血率, 浮腫, 梗塞領域の増減を評価した。超音波を照射することによる悪影響の増加は, 病理組織学的に認められなかった。

2. 頭蓋内における定在波抑制の抑制

超音波は, ヒト頭蓋内で多重反射と定在波を発生させる。ヒト頭蓋骨でのこの定在波をシュリーレン法によって画像化・定量化した。そして, 定在波を抑制するには, 超音波の変調を行うことが有効であることを明らかにした。

3. 超音波血栓成長抑制効果の研究

経皮的超音波照射が血管内血栓形成を阻害することを既に明らかにしてきた。その *in vitro* 定量法を改良して, 反射の影響のない評価システムを確立した。また, t-PA と組み合わせることでその血栓溶解作用を増強することができ, 超音波の粒子速度がその増強効果の支配的要因であることを示した。

4. 超音波生体内音響作用の研究

既に超音波による一酸化窒素 (NO) 産生をリアルタイム測定することに成功している。プローブを改良することで, 腫瘍内での NO 産生を正確に測定できるようになり, 腫瘍成長抑制との関係を示した。

#### II. 高分子ミセル薬物キャリアーシステム

薬物と造影剤をターゲティングする高分子ミセル型のキャリアーシステムを開発する。

1. 免疫応答評価

高分子ミセルはその外側にポリエチレングリコール (PEG) を有することから, PEG-修飾リポソームで知られている免疫現象である ABC 現象を引き