

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、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ことが知られている。HuC 標的遺伝子の同定を目的に HITS-CLIP 法を行った結果、HuC は標的遺伝子の翻訳を調節するのみならず、少なくとも 37 個の標的 RNA の選択的スプライシングを制御することが明らかになった (Ince-Dunn G, Okano HJ, et al. *Neuron*. 2012)。また、Hu には複数のスプライシングバリエーションが存在し、そのうち sv1 は細胞質に局在し主に翻訳調節を行うのに対し、sv4 は核に局在し選択的スプライシングの制御を行うなど、バリエーション間の機能的分担があることがわかった。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。我々は小脳における HuC の標的 RNA として Kinesin を含む複数の標的候補遺伝子を同定した。KIF3A および KIF3C は HuC による翻訳調節を受け、HuC KO マウスのプルキンエ細胞では KIF3A の発現レベルが低下していた。また、HuC KO マウス由来培養プルキンエ細胞に KIF3A 遺伝子を強制発現させると部分的に軸索変性を是正できることがわかった。逆に、KIF3A、KIF3C に対する siRNA を作成し、野生型マウス由来プルキンエ細胞において強制発現させると軸索変性が誘導された。これらの知見は、HuC が複数の

モータータンパク質の発現量を統合的に調節しているため、HuC が欠失すると軸索輸送を担うそれらの Kinesin タンパク質のレベルが同調的に低下し、結果的に軸索輸送の障害が起こって軸索変性・シナプス脱落に至るという病態モデルを示唆している。

II. ALS の病態研究

RNA 結合タンパク質 TDP-43 は、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と考えられている。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、組織学的・細胞生物学的解析を行った。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が示されたが、同様の封入体が脳皮質ニューロンにも存在することがわかった。また、同マウスの封入体は SMN タンパク質も含むことから、ALS の組織像と極めて類似することが明らかになった。さらに理化学研究所と共同で動物の行動解析を行った結果、変異型 TDP-43 遺伝子ノックインマウスは運動障害を呈するのみならず、高次脳機能にも異常がみられることがわかり、同マウスは ALS および FTLD-U を含む TDP-43 proteinopathy モデル動物として有用であることが示された。

III. 非侵襲的生体イメージング技術の開発と応用

当研究部の原 央子助教が開発した発光・蛍光レポーター遺伝子 (fLuc) を応用し、生体発光イメージングにより同一固体における経時的・定量的な癌細胞転移の *in vivo* 評価法を開発した。この方法により乳癌および肺非小細胞癌において強発現する ADAM-28 が、vWF を分解することにより癌転移に対して促進的に働くことを明らかにした (Mochizuki S, et al. *J Natl Cancer Inst*. 2012 : 慶應義塾大病理学と共同研究)。また、GFAP プロモーター/fLuc トランスジェニックマウスを用いて、内耳への Drug Delivery を経時的に可視化し評価するシステムを構築した (Kanzaki S, et al. *PLoS One*. 2012 : 慶應義塾大耳鼻科と共同研究)。

7 テスラ動物用 MRI (実験動物中央研究所に設置) を用いた拡散テンソルトラクトグラフィ (DTI) によりマーモセット脊髄損傷モデルにおける神経線維評価システムを構築した (Konomi T, et al. *Neuroimage*. 2012)。さらに MRI を用いた DTI によりマーモセットの脳発達アトラスを作成し公表した (Hikishima K, et al. *Neuroscience*. 2012)。

Ⅳ. 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、エピソーム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て患者由来 iPS 細胞の作成を行っている。本年度は Mayo Clinic との共同研究で、前頭側頭葉変性症 (FTLD) 患者の iPS 細胞作成を開始した。

Ⅴ. ヒト疾患モデルマーマーモセットの開発と応用

実験動物中央研究所が小型霊長類コモン・マーマーモセット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・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ー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。さらに、本年度は新たに変異型 TDP-43 遺伝子を導入した家族性 ALS モデル霊長類の作成を行い、トランスジェニック動物の取得に成功した。

「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 6 名（うち 4 名は血管外科学、神経内科、腎臓・高血圧内科からの再派遣）、研究補助員 2 名、訪問研究員 1 名である。皮膚科、内科、外科をはじめとする学内臨床講座のみならず、慶應義塾大、星薬科大、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、Mayo Clinic、Rockefeller 大等の研究機関と積極的に共同研究を行っており、多角的な研究の展開を目指している。特に本年度は、慶應義塾大、ハーバード大と共同で内耳有毛細胞の再生を促す薬剤に関する研究成果を *Neuron* 誌に掲載した。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

- 1) Matsumoto K, Yokoo T, Matsunari H, Iwai S, Yokote S, Teratani T, Gheisari Y, Tsuji O, Okano H, Utsunomiya Y, Hosoya T, Okano HJ, Nagashima H, Kobayashi E. Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tis-

sue. *Stem Cells* 2012; 30(6) : 1228-35.

- 2) Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, Okano H, Okada Y. Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. *J Natl Cancer Inst* 1012; 104(12) : 906-22.
- 3) Imamura M, Okuno H, Tomioka I, Kawamura Y, Lin ZY, Nakajima R, Akamatsu W, Okano HJ, Matsuzaki Y, Sasaki E, Okano H. Derivation of induced pluripotent stem cells by retroviral gene transduction in Mammalian species. *Methods Mol Biol* 2012; 925 : 21-48.
- 4) Ince-Dunn G, Okano HJ, Jensen KB, Park WY, Zhong R, Ule J, Mele A, Fak, JJ, Yang C, Zhang C, Yoo J, Okano H, Noebels JL, Darnell RB. Neuronal Elav-like (Hu) proteins regulate RNA splicing and abundance to control glutamate levels and neuronal excitability. *Neuron* 2012; 75(6) : 1067-80.
- 5) Matsuda S, Kuwako K, Okano HJ, Tsutsumi S, Aburatani H, Saga Y, Matsuzaki Y, Akaike A, Sugimoto H, Okano H. Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis via the transcriptional repression of the Hes5 gene. *J Neurosci* 2012; 32(36) : 12543-57.
- 6) Takagi T, Kimura Y, Shibata S, Saito H, Ishii K, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Tabata Y, Nakamura M. Sustained bFGF-release tubes for peripheral nerve regeneration: comparison with autograft. *Plast Reconstr Surg* 2012; 130(4) : 866-76.
- 7) Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Yamamizu K, Morita M, Suzuki T, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK, Okano H, Narita M. Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the development of gefitinib-resistance in transforming non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE* 2012; 7(10) : e44368.
- 8) Konomi T, Fujiyoshi K, Hikishima K, Komaki Y, Tsuji O, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Conditions for quantitative evaluation of injured spinal cord by *in vivo* diffusion tensor imaging and tractography: preclinical longitudinal study in common marmosets. *Neuroimage* 2012; 63(4) : 1841-53.
- 9) Kanzaki S, Fujioka M, Yasuda A, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Ogawa K, Okano H. Novel *in vivo* imaging analysis of an inner ear drug delivery system in mice: Comparison of inner ear drug concentrations over time after transtympanic and systemic injections. *PLoS ONE* 2012; 7(12) : e48480.
- 10) Hikishima K, Sawada K, Murayama AY, Komaki Y, Kawai K, Sato N, Inoue T, Itoh T, Momoshima S, Iriki

A, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. Atlas of the developing brain of the marmoset monkey constructed using magnetic resonance histology. *Neuroscience* 2013; 230: 102-13.

- 11) Mizutani K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Edge ASB. Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. *Neuron* 2013; 77(1): 1-12.
- 12) Nishimoto Y, Okano HJ, Imai T, Poole AJ, Suzuki N, Keirstead HS, Okano H. Cellular toxicity induced by the 26-kDa fragment and amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant forms of TAR DNA-binding protein 43 in human embryonic stem cell-derived motor neurons. *Neurology and Clinical Neuroscience* 2013; 1(1): 24-31.
- 13) Imai S, Ikegami D, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura A, Araki A, Omi K, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T, Narita M. Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain. *Brain* 2013; 136(Pt.3): 828-43.

Ⅲ. 学会発表

- 1) 岡野ジェイムス洋尚, 角元恭子¹⁾, 吉田 哲¹⁾, ロバート・ダーネル (ロックフェラー大), 岡野栄之¹⁾ (慶大). 小脳プルキンエ細胞における HuC の機能. 第 35 回日本神経科学大会. 名古屋, 9 月.
- 2) 井上 賢¹⁾, 原 晃一¹⁾, 正島啓吾¹⁾, 小牧裕司¹⁾, 伊藤豊志雄 (実験動物中央研究所), 岩田祐士 (島津製作所), 塚田秀夫 (浜松ホトニクス), 岡野ジェイムス洋尚, 吉田一成¹⁾, 岡野栄之¹⁾ (慶大). マーモセットの MCAO モデルの作成と評価方法. 第 35 回日本神経科学大会. 名古屋, 9 月.
- 3) 正島啓吾¹⁾, 澤田和彦 (つくば国際大), 村山綾子¹⁾, 小牧裕司¹⁾, 川井健司²⁾, 佐藤菜名子²⁾, 井上貴史²⁾, 伊藤豊志雄²⁾, 百島祐貴¹⁾, 岡野ジェイムス洋尚, 佐々木えりか²⁾ (実験動物中央研究所), 岡野栄之¹⁾ (慶大). 高分解能 MRI によるマーモセット発達脳の画像解析. 第 35 回日本神経科学大会. 名古屋, 9 月.
- 4) 澤田和彦 (つくば国際大), 正島啓吾¹⁾, 岡野ジェイムス洋尚, 佐々木えりか (実験動物中央研究所), 岡野栄之¹⁾ (慶大). 高分解能 MRI によるマーモセット大脳の脳溝形成の解析. 第 35 回日本神経科学大会. 名古屋, 9 月.
- 5) 岡野ジェイムス洋尚. 幹細胞および先進的モデル動物を用いた再生研究. ナノメディスンフォーラム. 東京, 10 月.

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
講師: 白石 貢一 高分子化学, 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. 頭蓋内における雑音変調駆動による音場分布の均一化

ヒト頭蓋内部への超音波照射は超音波振動子の近距離における不均一さから, 頭蓋内部において音響分布の不均一さを誘起する。すなわち, 音響強度の強い部位では脳出血の危険性が高くなり, 弱い部位では血栓溶解効果が低くなる。この音響強度の不均一性を雑音変調法の導入により解消した。この際, ユニフォーミティインデックスという新たな基準を導入し評価を行った。

3. 超音波血栓溶解効果の 2D 評価法の開発

超音波血栓溶解療法は超音波照射により効果的に血栓を溶解させる必要がある。そのためには超音波照射による血栓溶解効果を精密に評価するシステムを確立し, 超音波と血栓溶解効果との関係をはかる必要がある。血栓の吸光度マッピングから超音波照射による溶解効果を評価する新たなシステムを確立した。本システムにおいて, 1MHz の超音波照射と t-PA との組み合わせにより血栓溶解作用を増強することができることが明らかとなった。

4. 超音波生体内音響作用の研究

既に腫瘍組織への超音波照射による一酸化窒素 (NO) 産生を NO 電極を用いることで実時間測定することに成功している。腫瘍組織への超音波照射によりによる NO 産生と腫瘍抑制との関係を示した。