

- 13) 坪田昭人. (自由討論会: ラクトフェリンのこれから) Bovine lactoferrin の酸化ストレス状態における効果と作用機序. 第4回臨床ラクトフェリンシンポジウム. 東京, 3月.

V. その他

- 1) 坪田昭人. C型肝炎ウイルスキャリアへの対応. 柏市医師会 ウイルス肝炎対策研修会. 柏, 9月.
- 2) 坪田昭人. 今後の肝臓病学における臨床研究を考える. 東葛・城東地区肝臓病研究会. 東京, 10月.
- 3) 坪田昭人. B型・C型肝炎の今後. 中外製薬社員研修会. 松戸, 11月.
- 4) 坪田昭人. C型肝炎治療の現状について. プリストル・マイヤーズ研修会. 柏, 2月.

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, 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ことが知られている。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。軸索変性の分子メカニズムを解明するためには, 小脳において Hu タンパク質が結合する標的 RNA を同定する必要がある。我々は RIP-CHIP 法により成体小脳組織を用いて HuC の標的スクリーニングを行った。RIP-CHIP 法は免疫沈降法の応用技術であり, HuC が複合体を形成する RNA を検出することができる。その結果, Kinesin (キネシンスーパーファミリー, KIF) 含む多くの HuC 標的候補遺伝子が同定された。これまでの解析により複数の KIF タンパク質の mRNA が HuC による翻訳調節を受け, HuC KO マウスのプルキンエ細胞において発現レベルが低下していることがわかった。これらの結果は, 軸索輸送機構の障害が起こって軸索変性・シナプス脱落に至るといった病態モデルを示唆している。

軸索が球状に肥大する変性所見は様々な神経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序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年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。また、プルキンエ細胞が細胞死に至らないという観察結果は、軸索の変性・消失のメカニズムが単に「神経細胞死を引き起こす病態の一過程」に過ぎないのではなく、軸索の恒常性維持システムに特異的に起こる障害である可能性を強く示唆しており、このモデル動物の解析により神経変性疾患の病態の新たな側面が明らかになると期待される。

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。また、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。ALS の細胞内異常封入体の原因タンパク質には TDP-43 に加え、FUS が含まれることが示されているが、どちらも RNA 結合タンパク質であるという機能および構造上の共通点がある。最近の研究で、神経変性疾患の原因に RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の変異や RNA プロセッシング異常が関与する可能性が強く示唆されていることから、RNA 代謝調節を担う TDP-43 の解析が極めて重要であることは論を待たない。我々は 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標的

RNA の量的・質的变化を捉えるために探索を行っている。

III. 非侵襲的生体イメージング技術の開発と応用

高磁場動物用 MRI を用いた画像解析技術により小型霊長類マーマセットの胎仔における発達中の脳を経時的にイメージングし、脳発達に伴う脳回・脳溝の発生過程を解析した。研究結果は *Neuroscience* 誌に公表した (Sawada K, et al. *Neuroscience* 2014)。また同 MRI を用いて、慶應義塾大、実験動物中央研究所と共同でハダカデバネズミの脳構造を詳細に解析し、研究成果を発表した (Seki F, et al. *Front Neuroanat* 2013)。

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指し、我々は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て患者由来末梢血単核球に山中 4 因子を導入し、ヒト疾患 iPS 細胞を樹立した。本年度はパーキンソン病患者の iPS 細胞 (神経内科と共同) および異染性白質ジストロフィー患者の iPS 細胞の作成を行った。また、iPS 細胞から神経細胞への分化誘導プロトコルを確立し、患者由来 iPS 細胞の解析準備を行った。

V. ヒト疾患モデルマーマ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、変異型 TDP-43 遺伝子を導入したマーマセットが作成され、行動解析により神経症状発症のモニタリングを行っている。導入した TDP-43 遺伝子の変異は ALS モデルマウスの変異と同一であるため、マウスモデルで観察される形質とマーマセットモデルを比較しながら解析することが可能となった。

「点検・評価」

再生医学研究部の構成員は教授 1 名、助教 1 名、大学院生 11 名 (うち 5 名は、血管外科、神経内科、腎臓・高血圧内科、耳鼻咽喉科・頭頸部外科からの再派遣、2 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, 星薬科大, 東京大, 琉球大, 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。特に本年度は, 疾患 iPS 細胞の作成および解析を本格的に開始し, 臨床各講座との活発な共同研究を行った (Kawagoe S, et al. Mol Genet Metab 2013)。また, 本学が所有する 9.4T 高磁場 MRI を用いた実験の基盤整備が完了し, イメージング研究にも力を注いでいく計画である。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) Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M¹⁾, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M¹⁾ (¹AIST), Eto Y. Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). Mol Genet Metab 2013; 109(4) : 386-9.
- 2) Nishimoto Y¹⁾, Nakagawa S (RIKEN), Hirose T (AIST), Okano HJ, Takao M²⁾³⁾ (²Mihara Memorial Hosp), Shibata S¹⁾, Suyama S¹⁾, Kuwako K¹⁾, Imai T¹⁾, Murayama S³⁾ (³Tokyo Metropolitan Geriatric Hosp & Institute of Gerontology), Suzuki N¹⁾, Okano H¹⁾ (¹Keio Univ). The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. Mol Brain 2013; 6 : 31.
- 3) Seki F¹⁾²⁾ (²Central Institute for Experimental Animals), Hikishima K¹⁾, Nambu S³⁾, Okanoya K (Univ of Tokyo), Okano HJ, Sasaki E¹⁾, Miura K¹⁾, Okano H¹⁾³⁾ (¹Keio Univ, ³RIKEN). Multidimensional MRI-CT atlas of the naked mole-rat brain. Front Neuroanat 2013; 7 : 45.
- 4) Sawada K (Tsukuba International Univ), Hikishima K¹⁾²⁾, Murayama AY¹⁾³⁾, Okano HJ, Sasaki E²⁾ (²Central Institute for Experimental Animals), Okano H¹⁾³⁾ (¹Keio Univ, ³RIKEN Keio Univ Joint Research Laboratory). Fetal sulcation and gyrification in common marmosets (*Callithrix jacchus*) obtained by *ex vivo* magnetic resonance imaging. Neuroscience 2014; 257 : 158-74.
- 5) Fujioka M¹⁾, Okamoto Y²⁾³⁾ (²Inagi Municipal Hosp), Shinden S (Saiseikai Utsunomiya Hosp), Okano HJ, Okano H¹⁾, Ogawa K¹⁾ (¹Keio Univ), Matsunaga T³⁾ (³National Tokyo Medical Center). Pharmacological inhibition of cochlear mitochondrial respiratory chain induces secondary inflammation in the lateral wall: a potential therapeutic target for sensorineural hearing loss. PLoS One 2014; 9(3) : e90089.