

nephrologist care: the Gonryo study. Clin Exp Nephrol 2015; 19(5): 878-86.

- 3) Wakabayashi H<sup>1)</sup>, Matsushima M, Uwano R<sup>1)</sup>, Watanabe N<sup>1)</sup>, Oritsu H<sup>1)</sup>, Shimizu Y<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Yokohama City Univ). Skeletal muscle mass is associated with severe dysphagia in cancer patients. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2015; 6(4): 351-7.
- 4) Wakabayashi H (Yokohama City Univ), Matsushima M. Neck circumference is not associated with dysphagia but with undernutrition in elderly individuals requiring long-term care. J Nutr Health Aging 2016; 20(3): 355-60.
- 5) Wakabayashi H (Yokohama City Univ), Matsushima M. Dysphagia assessed by the 10-item Eating Assessment Tool is associated with nutritional status and activities of daily living in elderly individuals requiring long-term care. J Nutr Health Aging 2016; 20(1): 22-7.

### Ⅲ. 学会発表

- 1) 金子 惇 (むさし小金井診療所), 松島雅人. 高次医療機関へのアクセスが制限され高齢化率が高い地域における ICPC-2 を用いた年齢別の受診理由及び診断の分析. 第6回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会. つくば, 6月.
- 2) 金子 惇 (むさし小金井診療所), 松島雅人. 高次医療機関へのアクセスが制限され高齢化率の高い地域における受療行動の把握. 第6回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会. つくば, 6月.
- 3) 金子 惇 (むさし小金井診療所), 松島雅人. 高次医療機関へのアクセスが制限された地域における ICPC-2 を用いた小児の受診理由, 診断及び紹介の分析. 第6回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会. つくば, 6月.
- 4) 渡邊隆将, 松島雅人, 藤沼康樹<sup>1)</sup>, 阿部佳子<sup>1)</sup>, 稲田美紀<sup>1)</sup>, 菅野哲也<sup>1)</sup>, 喜瀬守人<sup>1)</sup>, 今藤誠俊<sup>1)</sup>, 高橋 慶<sup>1)</sup>, 富永智一<sup>1)</sup>, 西村真紀<sup>1)</sup>, 平山陽子<sup>1)</sup>, 増山由紀子<sup>1)</sup>, 村山慎一<sup>1)</sup>, 安来志保<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>医療福祉生協連家庭医療学開発センター). 研究中間報告第2報: EMPOWER-Japan Study (Elderly Mortality Patients Observed Within the Existing Residence). 第6回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会. つくば, 6月.

### V. その他

- 1) 松島雅人. Editorial: 学術大学, 学会誌, そしてプライマリ・ケアにおける研究. 日プライマリケア連合誌 2015; 38(3): 208.

## 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. 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, 核内においては標的 RNA のイントロンに結合し選択的スプライシングを制御することが知られている (Ince-Dunn G, et al. Neuron 2012)。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。順天堂大学内山教授らと詳細な電子顕微鏡解析を行った結果, 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。AIS はナトリウムチャネル, Ankyrin-G, 4 型スペクトリン, TRIM46 などにより構成され, サイズフィルターを形成する。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, 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考えられた。HuC KO マウス小脳を解析したところ,

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 のバリエーションが増加しており、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ことが示された (Ogawa Y. 10th Brain Research Conference にて発表)。同バリエーション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。胎仔型 Ankyrin-G の細胞内局在を調べるため、exon 34 に対する特異的抗体を作製し、免疫組織染色による解析を開始した。

## 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。近年、複数のグループから TDP-43 が家族性 ALS の原因遺伝子の一つであることが示され、さらに孤発性 ALS においても変異がある症例が報告された。

我々は慶應義塾大学、新潟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することがわかった。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、これまで報告された ALS モデル動物では全く観察されることがなかったシスタチン C 陽性のプイナ小体が、TDP-43 遺伝子ノックインマウスの運動ニューロンにおいて発見されたことから、極めてヒトの病態をよく反映した ALS モデルであることが示された (Okano HJ. 10th Brain Research Conference にて発表)。

## 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モデルの脳イメージングを行った。薬剤誘発性パーキンソン病モデルマウスの脳

に対して、拡散テンソル法により脳内の神経線維走行を可視化するとともに、VBM 法により神経核の容積比較解析を行った。その結果、パーキンソン病モデルマウスでは中脳黒質から線状体に投射する神経線維の密度が低下することが明らかになった (Hikishima K, et al. Radiology 2015)。同時に中脳黒質の容積が低下し、萎縮が起きていることが示された (Hikishima K, et al. Neuroscience 2015)。また、ヒト解剖献体頭頸部のイメージングを行った。拡散テンソル法により生体内の線維走行を可視化することが可能である。耳鼻咽喉科、慶應義塾大学と共同で、クライオプローブを用いてヒト内耳の蝸牛の構造解析を行い、蝸牛内外の神経線維走行の詳細な 3D 解剖マップを作製した。

再生医学研究部の原史子助教が開発した fLuc は極めて高い発光を誘発することから動物の組織深部の発光イメージングへの利用に適している。この技術に応用し内耳への drug delivery の可視化に成功した (Kanzaki S, et al. Hearing Res 2015)。

## 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。我々は米国 Mayo Clinic の Bu 教授らと共同で、Pallido-ponto-nigral degeneration (PPND) 患者由来 iPS 細胞を樹立し、細胞生物学的解析を行った。PPND は前頭側頭葉変性症 (FTLD-17) の主要なサブタイプで、MAPT (Tau タンパク質遺伝子) に N279K 変異の入った本疾患の患者から採取した皮膚線維芽細胞にエピソーマルベクターを用いて山中 4 因子を導入し iPS 細胞を樹立した。N279K 変異は MAPT 遺伝子のエクソン 10 の選択的スプライシングに影響を与え、Tau タンパク質の microtubule 結合ドメインの構造に変化をもたらすことが知られている。iPS 細胞から誘導した神経幹細胞を解析したところ、4-repeat Tau の発現が増加し、細胞内には stress granules が蓄積していることが観察された。さらに細胞内エンドソーム、エクソソームが増加し、逆にリソソームが減少していたことからエンドサイトーシス不全が起こっていることが示された。しかしこれらの細胞内小胞輸送障害は同患者の皮膚線維芽細胞においては観察されなかったことから、神経系細胞特異的な障害である可能性が強く示唆された。これらの知見は Mol Neurodegener に原著論文として発表された (Wren MC, et al. 2015)。

## 「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）、留学生1名、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、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共同研究の展開を目指している（Kondo T, et al. *Neurosci Res* 2015, Nishikawa R, et al. *Cytotechnology* 2015, Kanzaki S, et al. *Hearing Res* 2015）。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、学内の臨床講座や海外の大学とも活発な共同研究を遂行し、原著論文として発表した（Wren MC, et al. *Mol Neurodegener* 2015）。さらに今年度は、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。

また今年度は、本学に導入された小型霊長類マーマセットにおけるMRIイメージングの基礎実験をすすめるとともに、実験動物中央研究所と共同で疾患モデルマーマセットのMRI解析を行った（Hikishima K, et al. *Neuroscience* 2015, Hikishima K, et al. *Radiology* 2015）。再生医学研究部における研究プロジェクトはおおむね計画通りに進行している。

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) Nishikawa R<sup>1)2)</sup> (<sup>2</sup>Kurume Univ), Hotta R<sup>1)3)</sup> (<sup>3</sup>Massachusetts General Hosp and Harvard Med Sch), Shimojima N<sup>1)4)</sup> (<sup>4</sup>Tokyo Metropolitan Children's Med Ctr), Shibata S<sup>1)</sup>, Nagoshi N<sup>1)</sup>, Nakamura M<sup>1)</sup>, Matsuzaki Y<sup>1)</sup>, Okano HJ, Kuroda T<sup>1)</sup>, Okano H<sup>1)</sup>, Morikawa Y<sup>1)5)</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ, <sup>5</sup>Int Univ Health Welfare) Migration and differentiation of transplanted enteric neural crest-derived cells in murine model of Hirschsprung's disease. *Cytotechnology* 2015: 67(4): 661-70.
- 2) Hikishima K<sup>1)2)</sup>, Ando K<sup>2)</sup>, Yano R<sup>1)2)</sup>, Kawai K<sup>2)</sup>, Komaki Y<sup>1)2)</sup>, Inoue T<sup>2)</sup>, Itoh T<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Central Inst Experimental Animals), Yamada M (Fujita Health Univ), Momoshima S<sup>1)</sup>, Okano HJ, Okano H<sup>1)3)</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ, <sup>3</sup>RIKEN). Parkinson disease: diffusion MR imaging to detect nigrostriatal pathway loss in a marmoset model treated with 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Radiology* 2015: 275(2): 430-7.
- 3) Hikishima K<sup>1)2)</sup>, Ando K<sup>2)</sup>, Komaki Y<sup>1)2)</sup>, Kawai K<sup>2)</sup>, Yano R<sup>1)</sup>, Inoue T<sup>2)</sup>, Itoh T<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Central Inst Experimental Animals), Yamada M (Fujita Health Univ), Momoshima S<sup>1)</sup>, Okano HJ, Okano H<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ). Voxel-based morphometry of the marmoset brain: in vivo detection of volume loss in the substantia nigra of the MPTP-treated Parkinson's disease model. *Neuroscience* 2015: 300: 585-92.
- 4) Kondo T<sup>1)</sup>, Yoshihara Y<sup>1)</sup>, Yoshino-Saito K<sup>1)2)</sup> (<sup>2</sup>Japan Soc Promotion Sci), Sekiguchi T<sup>1)</sup>, Kosugi A<sup>1)</sup>, Miyazaki Y<sup>1)</sup>, Nishimura Y<sup>3)</sup>, Okano HJ, Nakamura M<sup>1)</sup>, Okano H<sup>1)</sup>, Isa T<sup>3)</sup> (<sup>3</sup>Natl Inst Physiological Sci), Ushiba J<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ). Histological and electrophysiological analysis of corticospinal pathway to forelimb motoneurons in common marmosets. *Neurosci Res* 2015: 98: 35-44.
- 5) Wren MC<sup>1)</sup>, Zhao J<sup>1)</sup>, Liu C-C<sup>1)</sup>, Murray ME<sup>1)</sup>, Atagi Y<sup>1)</sup>, Davis MD<sup>1)</sup>, Fu Y<sup>1)</sup>, Okano HJ, Ogaki K<sup>1)</sup>, Strongosky AJ<sup>1)</sup>, Tacik P<sup>1)</sup>, Rademakers R<sup>1)</sup>, Ross OA<sup>1)</sup>, Dickson DW<sup>1)</sup>, Wszolek ZK<sup>1)</sup>, Kanekiyo T<sup>1)</sup>, Bu G<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Mayo Clin). Frontotemporal dementia-associated N279K tau mutant disrupts subcellular vesicle trafficking and induces cellular stress in iPSC-derived neural stem cells. *Mol Neurodegener* 2015: 10: 46.
- 6) Kanzaki S<sup>1)</sup>, Watanabe K<sup>1)</sup>, Fujioka M<sup>1)</sup>, Shibata S<sup>1)</sup>, Nakamura M<sup>1)</sup>, Okano HJ, Okano H<sup>1)</sup>, Ogawa K<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ). Novel in vivo imaging analysis of an inner ear drug delivery system: drug availability in inner ear following systemic drug injections is dose dependent. *Hearing Res* 2015: 330(Pt.A): 142-6.

### III. 学会発表

- 1) Okano HJ, Hara-Miyauchi C, Hasegawa M, Takahashi-Fujigasaki J, Sakimura K (Niigata Univ), Itohara S (RIKEN), Okano H (Keio Univ). ALS/FTLD model of mutant TDP-43 knock-in mice. 10th Brain Research Conference: RNA Metabolism in Neurological Disease. Chicago, Oct.
- 2) Ogawa Y, Darnell RB (Rockefeller Univ), Okano H (Keio Univ), Okano HJ. Analysis of axonal degeneration in HuC KO mice. 10th Brain Research Confer-

ence: RNA Metabolism in Neurological Disease. Chicago, Oct.

- 3) 岡野ジェイムス洋尚, (シンポジウム 30: 幹細胞技術を応用した分子・病態解析) 霊長類疾患モデルの作製と解析, 治療戦略の開発, 第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, 3 月.

#### IV. 著 書

- 1) 岡野ジェイムス洋尚, 1 章: 神経科学の基礎 3. 学習と再学習に関わる領域 ②可塑性の実態 神経再生に関わる可塑性の分子基盤, 里字明元<sup>1)</sup>, 牛場潤一<sup>1)</sup> (<sup>1</sup> 慶應義塾大) 監修, 神経科学の最前線とリハビリテーション: 脳の可塑性と運動, 東京: 医歯薬出版, 2015, p.40-4.

### 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

#### 教育・研究概要

##### I. 抗腫瘍薬の分子薬理学的研究

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。

我々はその一つである, 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。I-BET で処理された細胞においてはさまざまな遺伝子の発現が変化する。とりわけ, c-MYC の発現抑制は顕著であり, この変化が増殖抑制に重要な働きを担っていると考えられる。我々は, 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。本耐性株細胞では I-BET151 の投与に伴い親株で認められる c-MYC や BCL2 の抑制は起こらない。ChIP 解析の結果よりこの耐性化の機構には, 細胞増殖に関与する MAPK, PI3K 及び NF $\kappa$ B が関与している可能性が示唆された。そこで, インヒビターを用いた薬剤感受性を評価した結果, 特に NF $\kappa$ B への依存性が強く認められた。また, U937R 細胞では BRD4 蛋白質が高度に発現していたことも明らかになり, I-BET151 に対する耐性能獲得にはプロモドメイン蛋白質が関与していた可能性も強く示唆された。

##### II. 発がんに関する分子腫瘍学的研究

我々は, 先天奇形症候群に合併した悪性腫瘍の発生メカニズムを解明するために, 次世代シーケンサーを用いた Cancer Panel による網羅的癌関連遺伝子の解析を進めている。特に, Maffucci 症候群