

## 07. 薬剤治療研究部

部長：田上 昭人

## 【ミッション・目標】

小児では遺伝性疾患を含む原因不明の難治性疾患が多く、原因の解明とともに治療法の開発が求められている。薬剤治療研究部では、成育医療におけるこれら難治性小児疾患の病因解明、治療法の開発や薬物療法に関する科学的根拠・情報を提供し、新たな薬物療法を開発することを目標としている。これらの目標を達成するために、治療法の確立していない疾患の薬物標的因子の探索ならびに機能解析、さらに新規治療法を開発を行い成育医療における薬物療法の確立を目指している。

## 【研究プロジェクト】

1. 手術摘出肝組織を利用した創薬研究および細胞治療法の開発
  - 1) 手術摘出肝組織・細胞の分離・保存
  - 2) 創薬研究に活用可能なヒト肝細胞の開発
  - 3) 肝臓移植の支援・代替医療としての肝細胞移植治療法の確立に向けた研究

## [研究体制]

部長：田上昭人  
室長：中村和昭  
研究員：Kyaw Htet Aung  
実験補助員：相澤和子

2. 小児肝胆道疾患関連因子の探索および薬物療法開発・創薬への応用

## [研究体制]

部長：田上昭人  
室長：中村和昭  
研究員：Kyaw Htet Aung  
実験補助員：相澤和子

3. 神経疾患関連因子の探索および薬物療法の開発
  - 1) 神経変性・発達障害関連因子の探索及び薬物療法の開発

## [研究体制]

部長：田上昭人  
室長：中村和昭  
研究員：Kyaw Htet Aung  
実験補助員：相澤和子

- 2) 末梢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療法の開発
- 3) 中枢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療薬の開発

【研究体制】

部長：田上昭人

室長：山内淳司

上級研究員：宮本幸

【研究体制（薬剤治療研究部、分子薬理研究室・実験薬理研究室）】

部長：田上昭人（平成 15 年 11 月～）

室長：山内淳司（分子薬理研究室、平成 17 年 5 月～平成 28 年 9 月）

中村和昭（実験薬理研究室、平成 22 年 4 月～）

上級研究員：宮本幸（平成 22 年 4 月～）

研究員：Kyaw Htet Aung（平成 25 年 10 月～平成 28 年 9 月）

実験補助員：水野悦子、相澤和子

事務補助員：大野素子

【共同研究体制】

1. 大学・研究機関

- 1) 東京薬科大学薬学部 田野中教授：血圧調節機構におけるバソプレッシン受容体の機能解明
- 3) 神戸大学医学部 佐藤准教授：低分子量 GTP 結合蛋白のシグナル伝達機構の解明
- 4) 国立医薬品衛生研究所 靛島室長：赤血球寿命に及ぼす可塑剤の影響評価に関する研究
- 5) 京都大学先端医学機構 上代機構長：低分子量 GTP 結合蛋白のシグナル伝達機構の解明
- 6) 東京工業大大学生命理工学 喜多村教授：小児性疾患の薬物のプロテオーム解析
- 7) 金沢大学医学部 小出助教授：低分子量 GTP 結合蛋白のシグナル伝達機構の解明
- 8) 首都大学東京都市計画 久永教授：神経軸索変性機構の解明
- 9) 東京理科大学ゲノム創薬センター 田沼センター長：神経変性の薬物標的分子の解明
- 10) 東京理科大学発生工学センター 友岡センター長：神経変性の薬物標的分子の解明
- 11) 杏林大学保健学部 高見教授：神経変性の薬物標的分子の解明
- 12) かづさ DNA 研究所 古閑室長：小児性疾患の薬物のプロテオーム解析
- 14) 兵庫医科大学腎臓内科 野々口助教授：腎機能における V1a 受容体の解析
- 15) 北里大学生理学 河原教授：V1a 受容体を介する RAS 系の調節機構の解析
- 16) 大阪歯科大学 今井教授：ES 細胞を用いた毒性試験
- 17) 京都大学 加藤准教授：神経軸索形成のメカニズムに関する研究
- 18) 岩手医科大学 三部教授：特発性心筋症のモデルマウスの作製とその病態解明
- 22) 国立環境研究所 前川主任研究員：環境化学物質曝露による神経発生・発達障害に関する研究
- 23) 埼玉大学 塚原准教授：環境化学物質曝露による神経発生・発達障害に関する研究
- 24) 東京大学 坪井准教授：グリア細胞からのバソプレッシン分泌機構に関する研究
- 25) 医薬基盤研究所 小原主任研究員：肝移植手術時に摘出される余剰肝組織由来肝細胞の研究資源化
- 25) 岡山大学 坂本准教授：脳内バソプレッシン産生細胞の超微細形態解析に関する研究
- 26) 帝京科学大学 近藤教授：下垂体後葉ホルモンによる行動制御に関する研究
- 27) 東京医科歯科大学 藤原教授：オキシトシン・バソプレッシンによる行動制御に関する疫学研究

## 28) 自治医科大学 興水準教授：バソプレシン受容体機能の解明

## 2. 企業

- 1) MBL：神経変性疾患のバイオマーカーの開発
- 2) IBL：神経変性疾患のバイオマーカーの開発
- 3) ニチヨー：細胞培養工程に使用する液体分注装置の改良

## 3. 海外研究室

- 1) スタンフォード大学 Shooter 教授：末梢神経脱ミエリン病の薬物標的分子の探索
- 2) 南カリフォルニア大学 Chan 助教授：中枢/末梢神経脱ミエリン病の薬物標的分子の機能解明
- 3) モントリオール臨床研究センター Cayouette 助教授：神経軸索極性の分子機構の解明
- 4) スクリニウム大学 Krüttgen 助教授：神経軸索輸送の分子機構の解明
- 5) シンシナティ大 長尾上級研究員：脱ミエリン病の薬物標的分子の探索
- 6) J. W. Goethe 大学 Ralf P. Brandes 教授：新規遺伝子 Dock6 の生理機能の解明
- 7) 上海大学 Wei-Lei Jin 准教授：癌抑制遺伝子 NF2 の分子機能の解明
- 8) シンシナティ大 中福教授：脱ミエリン病の薬物標的分子の探索

## 【研究の概要】

小児疾患には、遺伝性疾患など多くの難治性疾患があり、原因が不明の疾患や原因が明らかになっても有効な治療法が確立されていないものなど多数含まれている。近年のゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析等の進展に伴い、新たな疾患関連遺伝子や薬物標的因子も明らかになりつつあり、小児難治性疾患に関連した因子や薬物標的因子の解明も期待されている。

このような背景のもと、薬剤治療研究部では、成育医療における新規薬物標的分子の探索ならびに薬物療法の開発を目的に、分子生物学的・細胞生物学的・遺伝子工学的・薬理学的・組織学的手法を用い、標的分子の分子レベルから個体レベルにおける機能解析を行い、以下の研究を通して成育医療における疾患の病態解明・薬物療法の開発を目指している。

## 1. 手術摘出肝組織を利用した創薬研究および細胞治療法の開発

国立成育医療研究センターでは、年間約 4040 例の小児生体肝移植手術が行なわれている。薬剤治療研究部では、この手術の際に摘出された肝組織を用いて肝胆道疾患の病因・病態解明、薬物毒性発症機構の解明等を行うため、当センター病院臓器移植センター、病理診断部と連携し、病理診断に必要な部分を採取した後の廃棄予定のドナー側余剰肝組織およびレシピエント側摘出肝組織の保存ならびに細胞単離・保存を行い、研究への活用を行っている。

## 1) 手術摘出肝組織・細胞の分離・保存

平成 27 年の生体肝移植より 3939 例（胆道閉鎖症肝 13 例、先天代謝異常症 13 例、ドナー余剰肝 88 例、その他 55 例）の肝組織及び肝細胞の分離・保存を行った。平成 2727 年の生体肝移植 1717 例（胆道閉鎖症 99 例、ドナー余剰肝 33 例、その他 55 例）のより肝組織及び肝細胞の分離・保存を行った。平成 2222 年 4 月以降、約 300300 症例の肝検体について研究用に凍結組織として保存を行ってきた。単離細胞および凍結組織検体の一部はセンター内外の研究機関からの要請に応じて、当センター倫理委員会の承認を得て提供を行っている。

## 2) 創薬研究に活用可能なヒト肝細胞の開発

肝臓は体内における最大の臓器であり、生命維持に必須である代謝、解毒、胆汁の分泌、血清蛋白質の産生など多様な機能を担っている。したがって、肝機能発現・制御機構の理解は生体恒常性維持に基づく生命維持の機構を理解する上で極めて重要である。また、体内での薬物の代謝は主に肝細胞の薬物代謝機能に依存しており、創薬研究や薬物動態学においても肝機能発現に関する検討は極めて重要な研究課題である。他の臓器・細胞を対象とした研究と同様に、肝細胞/肝機能の研究においても培養系での検討が有効であると考えられるが、肝細胞は単離・培養により肝特異的機能が急速に減衰してしまい、初代培養系において肝機能を維持することは難しい。また、一般的に肝細胞株は肝特異的機能を有してはいるものの、その肝機能は著しく低い。したがって、培養系における肝細胞/肝機能に関する研究は他の組織・細胞に比べ極めて困難である。

培養過程における肝細胞の機能低下は組織分散・細胞単離による組織形態の崩壊と細胞間コミュニケーションの消失が原因と考えられている。培養系において肝機能を維持する試みとして、これまでにマトリゲルによるサンドイッチ培養法や細胞塊を形成させるなどの組織構造を模倣するような三次元培養系が検討されてきた。当研究部でもこれまでに肝機能亢進の為の三次元培養法の検討を行い、新規の三次元培養法によって肝細胞株 HepG2 細胞のアルブミン産生、薬物代謝酵素発現といった肝細胞機能の培養系における亢進を示してきた。しかし、これら三次元培養法は従来の単層培養に比べ初代培養肝細胞の肝機能を維持し、また肝細胞株の肝機能を亢進させるものの、生体の肝細胞と比較してその肝機能は低いと言わざるを得ない。当研究部では三次元培養法の検討に加え、培養条件を検討することにより培養肝細胞の肝機能を亢進させ得る高機能肝細胞培養系の検討を行い、DNA メチル化阻害剤であるゼブラリンを培養液に添加することにより、薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) 遺伝子発現が HepG2 細胞において亢進することを見出し、肝障害を示す薬物に対して HepG2 細胞の感受性が亢進することを見出した。また、その機序として、DNA メチル化阻害剤と double-stranded RNA (dsRNA)-activated protein kinase (PKR) が CYP 遺伝子発現に関与するという新規の知見を明らかにした。これにより、三次元培養、薬物添加、遺伝子導入などの手法を組み合わせることにより、培養肝細胞の機能亢進が可能であり、薬物毒性評価系への応用が可能であることを示した。

## 2) 肝臓移植の支援・代替医療としての肝細胞移植治療法の確立に向けた研究

これまでに、摘出肝組織から分離・保存した肝細胞を用いて、肝移植療法に代わる新規治療法となる肝細胞移植療法の臨床研究に向けた基礎研究を行い、病院臓器移植センターならびに研究所再生医療センターと連携して「重症高アンモニア血症を生じる先天代謝異常症に対する肝細胞移植治療に関する臨床研究」を実施してきた。平成 25 年 8 月ならびに平成 26 年 12 月 2 日には、他家余剰肝由来肝細胞を用いたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症により高アンモニア血症を呈する患児に対する肝細胞移植を実施した。一方、平成 26 年 11 月 25 日より再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年法律第 85 号）が施行され、肝細胞移植は第 11 種再生医療等として、当該法律の規制下に行うこととなった。したがって、これまでは国立成育医療研究センター倫理委員会にて承認された研究計画に基づいて行っていた肝細胞移植を再生医療等の安全性の確保等に関する法律に基づき、特定認定再生医療等委員会の審議を経て、厚生労働省再生医療等評価部会での審議により厚生労働大臣の確認を得て実施する必要性が生じた。再生医療等提供計画書「重症高アンモニア血症を生じる先天代謝異常症に対する肝細胞移植に関する臨床研究」を作成し、平成 27 年 9 月 22 日に国立成育医療研究センター特定認定再生医療等委員会へ提出した。平成 27 年 10 月 7 日の第 11 回特定認定再生医療等委員会での審議の際に、委員より指摘事項があり、指摘事項への回答・修正を行ったうえで、平成 27 年 11 月 5 日の第 22 回特定認定再生医療等委員会で審議を経て、平成 27 年 11 月 18 日付にて特定認定再生医療等委員会から意見書が提示された。本意見書により再生医療等提供計画書に対して承認の意見がなされたことか

ら、当該意見書とともに、平成 27 年 11 月 19 日付にて、再生医療等提供計画（受付番号：01C1503012）を厚生労働大臣に提出した。平成 28 年 11 月 15 日に厚生労働省再生医療評価部会において審議がなされ、委員からの指摘に基づき再生医療等提供計画の修正を行い、平成 28 年 11 月 28 日付で厚生労働大臣より、「第 11 種再生医療等提供計画の再生医療等提供基準への適合性の確認について」が通知された。これにより、再生医療等の安全性の確保等に関する法律に基づいて肝細胞移植を行う体制を整え、当センターにおける肝細胞移植の臨床研究を可能とした。

さらに、次世代の新規肝細胞移植療法と考えられる肝前駆細胞移植治療法の開発のため、肝前駆細胞の分離及びヒト肝臓型マウスの作成を行った。肝前駆細胞の分離培養は FACS により CD45 陰性、c-Met 陽性細胞の分離を行い、培養により肝細胞特異的なアルブミン陽性、HNF4 $\alpha$  陽性の細胞に分化することが確認できた。正常肝細胞及び肝前駆細胞を用いてヒト肝臓型マウスの作成を行った。胆道閉鎖症由来肝細胞を用いてヒト肝臓型マウスの作成を行ったところ、正常肝細胞と同様にヒト肝組織がマウス肝組織内に生着した。この結果より胆道閉鎖症由来の肝細胞は、マウスの生体内において肝組織に分化増殖すると考えられた。次に肝前駆（幹）細胞から肝細胞及び胆管上皮細胞への分化増殖を検討するために、胆道閉鎖症由来肝組織より、前駆（幹）細胞の分離を行った。前駆（幹）細胞は、MRD-1 遺伝子による染色剤の Hoechst33342 の排泄能が高い分画（SP (side population) 細胞）に存在することを見出し、このヒト肝細胞分画に由来する SP 細胞分画の肝障害免疫不全マウスへの移植を行っている。

## 2. 小児肝胆道疾患発症関連因子の探索および薬物療法・創薬への応用

### 1) 胆道閉鎖症の病因探索と新規薬物療法の検討

小児肝胆道疾患である胆道閉鎖症は原因不明の硬化性炎症による肝外胆管の閉塞によって肝臓から十二指腸への胆汁排泄ができなくなる疾患であり、手術なしでは多くが 2 歳までに胆汁うっ滞性の肝不全で死亡する難病である。本邦では出生児 9000 人～10000 人に一人の頻度で発生し、女児での発生率が男児に比べ約 2 倍高い。治療としては肝外胆管を切除し、肝門部と空腸を吻合する肝門部空腸吻合術（葛西手術）が有効である。しかし、肝内胆管も肝外胆管と同様に炎症性閉塞性病変によって進行性に消失するため、最終的に肝移植が唯一の治療法である。しかし、我が国の肝移植手術の特殊性として、大多数が両親などの近親者を臓器提供者とする生体部分肝移植であり、必然的にドナーのリスクも伴う。したがって、胆道閉鎖症患者の治療、QOL の向上はもちろん、移植による健常ドナーへのリスク回避の観点からも、肝移植に依らない胆道閉鎖症の治療法の開発が求められており、治療法開発のための胆道閉鎖症の発症、病態進行機序の解明が必要である。このため、薬剤治療研究部では生体肝移植により摘出される胆道閉鎖症肝を用い、胆道閉鎖症の発症・病態進行機構の解明を目的とし、胆道閉鎖症由来肝細胞を肝障害免疫不全マウスへ移植し、移植細胞が肝内へ生着しているヒト肝型マウスを作成し、生着した胆道閉鎖症由来肝細胞が正常な肝機能を示すことを見出した。本知見は、胆道閉鎖症においても肝細胞は正常に機能しており、葛西手術後の炎症性閉塞性病変・肝線維化を抑制し、正常肝に戻す治療法の開発がなされれば、葛西手術後は肝移植の実施なしに自己肝による生存が可能であることを示している。平成 28 年までに胆道閉鎖症患者由来の摘出肝検体より繊維芽細胞を単離し、センダイウイルスを用いた山中 4 因子（OCT3/4、SOX2、KLF4、cMYC）の導入による iPS 細胞の樹立を行い、胆道閉鎖症由来 iPS 細胞（BA-iPS 細胞）の作製に成功した。樹立した iPS 細胞はアルカリホスファターゼ染色陽性であり、未分化マーカーである Oct4 および Sox2 の免疫陽性像を示した。加えて、ヌードマウスへの移植により奇形腫の形成を確認し、その病理像には三胚葉に由来する構造が確認できた。以上の結果から、樹立した BA-iPS 細胞は未分化能ならびに多能性を有していると考えられた。次に、樹立した BA-iPS 細胞ならびに健常者由来 iPS 細胞を用いて、胆管上皮細胞への分化誘導を行った。iPS 細胞から胆管上皮細胞

胞への分化は、各種栄養因子の添加により胆管上皮細胞誘導系を構築し培養を行った。その結果、健常者由来 iPS 細胞を用いた培養系では、肝芽細胞マーカーである AFP および HNF4 $\alpha$  の発現とともに、胆管上皮細胞マーカーである CFTR および CK19 の発現が認められ、iPS 細胞から胆管上皮細胞への分化が確認できたのに対して、胆道閉鎖症患者由来の BA-iPS 細胞を用いた培養実験では、内胚葉までの分化は正常にみられたが、それ以降細胞の分化が見られず、細胞生存率も低下し、肝芽細胞マーカーや、胆管上皮細胞マーカーを発現する細胞も出現しなかった。本研究の結果は、in vitro の培養系においては、BA-iPS 細胞は肝芽細胞への分化が不全である可能性を示すものと考えられ、胆道閉鎖症の病因がウイルス感染などの外因性因子ではなく、遺伝的素因に基づく内因性因子に起因することを示唆し、原因不明の胆道閉鎖症発症機構の解明につながる知見が得られた。

### 3. 神経変性・発達障害関連因子の探索及び薬物療法の開発

#### 1) 発達障害、神経変性・障害関連因子の探索及び薬物療法の開発

現在、広汎性発達障害に対する薬物療法は基本的には対症療法であり、二次障害、パニックといわれる情動興奮、不安、不眠、抑うつ気分等に対する向精神薬や、てんかん発作が随伴する場合に用いられる抗けいれん薬等の投与が薬物療法として用いられる。一方、広汎性発達障害の中核的な症状である対社会性の障害やコミュニケーションの障害、限定された関心等に著効性のある薬剤は未だ販売されていない。そのような状況の中でオキシトシンは経鼻投与により発達障害の中核症状を軽減する作用が期待され治験が進められ、バソプレシンV1受容体拮抗薬も自閉症に対する治験が進められており、オキシトシン/バソプレシン関連因子を標的とした広汎性発達障害や自閉症に対する薬物治療への期待は大きい。また、虐待等の過度のストレス環境に曝されている幼児においては、オキシトシンの低値及びバソプレシンの高値が予測され、これらの指標が虐待を示すバイオマーカーとして有効である可能性があるとともに、オキシトシンおよびバソプレシンと養育行動との関連が明らかとなれば、虐待やネグレクトといった不適切な養育行動に対する医学的介入の選択肢としてオキシトシン/バソプレシン関連因子を標的とした薬物療法が考えられる。したがって、オキシトシン/バソプレシンの社会性行動調節に対する作用機序が明らかとなれば、その知見に基づき臨床現場にて早期に広汎性発達障害や虐待を診断し、介入の選択肢を増やすことが可能となる。

オキシトシン/バソプレシン機能を検討するため、当研究部ではこれまでにバソプレシン受容体 (V1a 受容体、V1 b 受容体) トランスジェニックマウス、バソプレシン受容体 (V1a 受容体、V1 b 受容体) 遺伝子欠損マウスを作成してきた。平成27-28年にはバソプレシン受容体 (V1a 受容体、V1 b 受容体) 遺伝子領域をCreリコンビナーゼ標的配列loxPで挟んだ遺伝子座を持つマウス (floxedマウス) を作出し、さらに共同研究等によりAVP-floxedマウス、オキシトシン受容体-floxedマウス、オキシトシン分泌制御因子であるCD38遺伝子のKOマウスを入手・維持し、同時に細胞選択的遺伝子欠損を生じさせるための各種Creリコンビナーゼマウスを入手し (これらマウスをOXT/AVP関連因子遺伝子改変マウスと総称する)、世界でも最も多くのオキシトシン/バソプレシン関連因子遺伝子改変マウスを有する体制を整えた。これらマウスを用いた検討により、野生型、V1aR-KOあるいはV1bR-KOマウスに比べ、V1abR-KOマウスでは新規環境への適応が著しく低下し、V1受容体欠損マウスで見られる社会性行動の障害は自閉症スペクトラムの主症状と一致することを見出した。また、アストロサイトでのバソプレシン発現、ならびにカイン酸誘導性海馬CA1/CA3領域変性モデルにおいてV1aR-KOマウスおよびV1bR-KOマウスのてんかん発作が野生型マウスに比べ重篤化することを見出した。これら知見は、バソプレシンによる神経細胞保護、アストロサイトからのバソプレシン分泌を示唆し、これらの不全が自制症スペクトラムの発症に関与していることを示唆する。引きつづき、バソプレシンと神経脆弱性との関連、グリア細胞におけるAVP作用、神経細胞—グリア細胞機能連関におけるAVPの関与等、脳内AVP機能の検討を継続的に行っている。

#### 4. 疾患関連因子の探索および薬物療法の開発

##### 1) 末梢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療法の開発

ミエリン形成の分子基盤は、その病態発症と密接な関係があると考えられるため、現在までに行った研究は多くの手掛かりを提供している。さらに、病態発症共培養系を確立することを目的として、病態モデルマウス（遺伝性の末梢神経変性症の 50%を占める IA 型シャルコ・マリー・トゥース (CMT) 病原因子 PMP22 の点変異を有する自然発症型のモデルマウスであるトランベラー (Tr) やトランベラーJ (TrJ)) からシュワン細胞と DRG 神経細胞を精製し、共培養を行った。この試験管内実験系は動物個体を用いる薬物投与実験とは異なり開放系で各種のスクリーニングに適している。我々の研究グループでは、この実験系の確立を試み、最近成功している。それは、より生体に近いかたちとして、座骨神経由来の繊維芽細胞を培養シャーレの底に一層生やすことにより、上層のシュワン細胞と神経細胞の安定した共培養が得られるという技術である。ここで観察される脱ミエリン現象は不完全なミエリンやミエリン層が薄いものが多く、それによってシュワン細胞が死滅に至るわけではないため、最終的な評価段階まで共培養を問題なく継続することができる。また、この病態ミエリンは電子顕微鏡レベルで生体内とほぼ同一であることを確認している。

一方で、ミエリン形成過程は、発生・形態学的に分類すると、3 期、すなわち神経軸索上でのシュワン細胞の増殖・遊走期（胎児中期～生後）、シュワン細胞の伸長期（胎児後期～生後）、軸索を幾重にも取り囲むミエリン形成期（生後から開始される）に分けられる。座骨神経では、座骨神経形成過程において、（1）マウスやラットの座骨神経への神経栄養因子の直接的インジェクションや神経栄養因子受容体の遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* の実験、さらにはグリア (Schwann cell) -神経細胞 (DRG neuron) 共培養系の *in vitro* の実験から、ミエリン形成過程 (Stage I～Stage III) が DRG 神経細胞からの放出される異なった 2 種類の液性の神経栄養因子（神経栄養因子-3 (NT3) と脳由来神経栄養因子 (BDNF)) により制御されていること、及び、（2）これらの因子が異なった時期に放出され互いに逆の作用を示すこと、を明らかにした。（3）さらに、その下流のシグナル伝達機構を明らかにし、神経栄養因子の関係と類似した相反するきわめてユニークな経路 (Rho ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質に属する数種類のシグナル伝達分子や極性因子) を介することを見出した。これらの研究は現在まで報告はなく、末梢神経ミエリン形成に関して重要な知見を与えるものと考えられる（代表的な参考文献：山内、田上ら *北米神経科学会誌* 2011；山内、田上ら *サイエンス姉妹誌* 2012；宮本、山内ら *サイエンス姉妹誌* 2013；宮本、山内ら *米国細胞生物学会誌* 2014, 2015）。

【具体的な I 型 CMT 病の創薬標的分子に関して】[目的] 髄鞘は、神経の跳躍電導を達成させ、さまざまな外部ストレスから神経軸索を保護する役割をもつ。したがって、遺伝性、免疫性、物理的などの要因で髄鞘変性がおこると、神経変性の原因になる。しかしながら、このような髄鞘変性を特異的に改善するような治療薬や治療方法はほとんど知られていない。その理由のひとつは、特異的な治療薬標的分子が明らかにされていないことに起因する。また、これは髄鞘発生の詳細な分子メカニズムが分かっていないことも、その原因のひとつである。一度、変性してしまった髄鞘を根本的に治療することは難しいかもしれない。しかし、すくなくとも病態初期においては全シュワン細胞が変性しているわけではない。したがって、もし髄鞘発生を抑制する分子を阻害するか、髄鞘発生を促進する分子を活性化できれば髄鞘変性が改善できると考えられる。本研究では前者のメカニズムをもつ可能性が高い治療標的候補分子 (Dock7) の解析を行った。[方法] (1) 治療標的候補である dock7 遺伝子産物をノックダウンするトランスジーン (マウス U6 プロモーターと Dock7 の線状型 RNA 干渉配列をもつオリゴヌクレオチド) を通常のトランスジェニックマウス作成要領と同様に、受精卵にインジェクションして Dock7 をノックダウンする「ノックダウンマウス」を作成した。(2) このノックダウンマウスと髄鞘形成不全モ

デルマウスを交配することで、病態モデルマウスの髄鞘形成不全が改善されるかを座骨神経の電子顕微鏡写真を用いて簡易的に判断する。[結果] (1) Dock7 は末梢神経の髄鞘発生を抑制する分子として同定され、そのノックダウンマウスの髄鞘は肥厚化していた。しかしながら、神経繊維等には異常は見られなかった。(2) ノックダウンマウスと病態モデルマウスを交配させたところ、モデルマウスの髄鞘形成不全が一部改善された。[考察] (1) Dock7 は低分子量 GTP 結合蛋白質 (Rac1, Cdc42) の交換因子 (活性化因子) である。これらは髄鞘発生初期で強く活性化されていることが判明しているため、Dock7 をノックダウンすると、この初期発生過程がスキップし、その後の髄鞘発生が促進されるため、ノックダウンマウスの髄鞘形成が促進していたのではないかと推定される。(2) ノックダウンマウスと病態モデルマウスを交配させることで、モデルマウスの髄鞘形成不全が改善できたのは、Dock7 がもつ髄鞘形成の抑制能力を阻害したためであると考えられる。今後、この詳細なメカニズムを明らかにするとともに、さまざまな病態モデルマウスの髄鞘形成不全が改善されるかを検討する必要がある。

【具体的な II 型 CMT 病の創薬標的分子に関して】[目的] 先天性の末梢神経変性症であるシャルコーマリーツース病 (Charcot-Marie-Tooth disease, CMT disease) は主要な病変箇所によって、シュワン細胞型と神経型に分けられる。本研究では、後者の CMT 病のなかで Rab7 遺伝子変異を原因にもつ 2B 型に属する CMT 病のインビトロモデルを作製し、変異型 Rab7 遺伝子による神経軸索形成阻害を改善する薬物として、抗てんかん薬であるバルプロ酸を明らかにした。[方法] (1) CMT2B 型変異でみついている 4 種類の変異 (L129F, K157N, N161T, V162M、アミノ酸変異とそのアミノ酸番号を記載する) をもつ Rab7 を作成し、それを末梢神経細胞モデル細胞であるマウス N1E-115 細胞にリポフェクション法で導入した。(2) CMT2B 型変異でみついている 4 種類の変異をもつ Rab7 をマウス初代後根神経節神経細胞にエレクトロフェクション法で導入した。(3) それぞれの細胞にバルプロ酸を添加し、その神経軸索伸長作用を調べた。[結果] (1) 4 種類の変異体すべてが、N1E-115 細胞の神経突起伸長作用を阻害した。(2) 4 種類の変異体すべてが、後根神経節神経細胞の神経軸索伸長作用を阻害した。(3) バルプロ酸添加によって、変異体発現で阻害された N1E-115 細胞の神経突起伸長がほぼ完全に回復した。

(4) バルプロ酸添加によって、変異体発現で阻害された後根神経節神経細胞の神経軸索伸長が部分的に回復した。[考察] (1) Rab7 は低分子量 GTP 結合蛋白質の一種であり、Rab7 に結合している GTP と GDP の状態 (グアニンヌクレオチド・スイッチ) で神経軸索内における蛋白質などの軸索輸送を仲介する。CMT2B でみついている変異はすべて Rab7 を活性化することが知られている。このことが原因で神経軸索伸長時に必要な蛋白質が適所に運ばれないため、その伸長が阻害されると推定された。(2) 神経軸索伸長は神経発生における基本的な現象であるため、CMT2B が原因で、変異型 Rab7 ができると、その伸長を阻害することで CMT2B の原因になるのではないかと考えられた。(3) バルプロ酸はこの効果を部分的に回復した。今後、さらにこの効果を詳細に研究するとともに、他の抗てんかん薬がこのような効果を示すのかどうか検討する必要がある。

【末梢グリア発生機構の解明】グリア細胞と神経細胞の共培養系を用いたスクリーニングによって明らかとなった末梢グリア細胞上に発現している受容体キナーゼに着目し、*in vitro*、*in vivo* の両面から詳細な解析を行った。その結果、Tyro3 と呼ばれるキナーゼ受容体が髄鞘発生の初期から後期にわたってグリア細胞膜上に特異的に発現しており、神経細胞からのシグナルを受容することにより、発生過程を綿密に制御していることが判明した。また、この受容体下流では、以前申請者らが明らかとした末梢の髄鞘発生過程において中核を担う Fyn キナーゼが介在しており、髄鞘形成過程を担う分子機構の一端が明らかとなったと同時に、本スクリーニング法がグリア細胞と神経細胞の複雑な相互作用を研究する上で適した手法であることが示された (宮本 山内ら、*Mol. Biol. Cell* 26, 3489-3503 (2015))、結果の一部が雑誌の表紙として採択された。これらの結果を踏まえ、今後は本受容体が脱隨時においても積極的な機能を果たしているか否かを新たな目標として研究を進めていく予定である。



## 2) 中枢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療薬の開発

中枢神経系においては末梢神経系のような発生過程を再現できる *in vitro* の実験系は未だに成功していない。従って、中枢神経の発達過程の回路形成を観察できるグリア-ニューロン共培養系を完成させることを優先し、基礎的なミエリン-神経回路形成のメカニズムを明らかにし、次に、そこから得られる知見をもとに中枢神経脱ミエリン病の発症機構の解明とその治療法の開発を行うという実験手順を踏まなければならない。研究成果としては、(1) ラット胎児大脳からオリゴデンドロサイト前駆細胞の単離・精製を試み、95%以上の純度でとる実験系を確立した。(2) 精製されたオリゴデンドロサイト前駆細胞は *in vitro* で、その後の分化過程 (*in vivo* では胎生後期から生後までの時期) を再現することができた。(3) レトロウイルスを用いて遺伝子導入を行い 50%以上の細胞での発現を確認し、さらに、それ以上の確率でノックダウンも可能になった。

実際に Pelizaeus-Merzbacher 病を引き起こす点変異を有する四回膜貫通型蛋白 PLP をオリゴデンドロサイト前駆細胞に導入し、部分的なミエリン形成が阻害されることを確認できた。現在、中枢神経細胞の単離・精製を行い、オリゴデンドロサイト前駆細胞との共培養系を確立し、*in vitro* で Pelizaeus-Merzbacher 病を改善する薬物スクリーニング系を開発している(代表的な参考文献: 山内、田上ら **北米神経科学会誌** 2011; 山内、田上ら **サイエンス姉妹誌** 2012; 宮本、山内ら **サイエンス姉妹誌** 2013; 宮本、山内ら **米国細胞生物学会誌** 2014)。

## 【中枢脱ミエリン病発症機構の解明】

中枢髄鞘形成不全疾患に関して、原因遺伝子の一つである HSPD1 の分子機能解析を進めたところ、変異型 HSPD1 を導入した細胞でミトコンドリアの機能異常が起きていることを突き止めた(宮本、山内ら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 462, 275-281 (2015))。これらの結果を発展させるため、変異型 HSPD1 を発現する病態モデルマウスの作製し、その表現型の解析を継続している。今後、病態共培養系と新たに作製されるモデルマウスを駆使し、中枢髄鞘形成不全疾患の新たな病態経路を明らかにすると共に、それに治療効果を示す臨床応用可能な生理活性物質の検出へと研究を発展させていく予定である。

## 【中枢グリア発生機構の解明】

グリア細胞の発生過程の mRNA マイクロアレイによる網羅的解析により、膜受容体の中に免疫細胞の遊走や接着に深く関わる接着分子受容体が、グリア細胞の発生初期に特異的に発現上昇していることをつきとめた。この受容体は、神経細胞上のリガンドとの相互作用によってグリア細胞の髄鞘形成初期を制御していた(宮本、山内ら、*Nat. Commun.* 7, 13478 (2016))。さらに、神経細胞上のリガンドは、多発性硬化症の抗体治療薬ナタリツマブの分子標的でもあった。多発性硬化症は血液中の炎症細胞が血管内皮から脳へ浸潤し、脳の髄鞘を破壊し、神経変性を引き起こす炎症性の脱髄疾患で、抗体薬であるナタリツマブは炎症細胞にあるインテグリン受容体をブロックすることで、炎症細胞の脳内への浸潤を抑制している。しかし、ナタリツマブが病態を進行させる(神経変性を促進する)という重篤な副作用があることが知られている。今回、ナタリツマブの分子標的であるインテグリン受容体が、脳の神経細胞にも存在し、それが神経細胞の成熟に重要な役割があることを明らかにした。また、インテグリン受容体の機能発現には脳内にある特異的分子(CD69)の活性化が必須であることが判明した。したがって、ナタリツマブの副作用は、脳内の神経細胞の成熟を阻害することで神経変性を促進すると考えられるが、これは脳内の CD69 を活性化することで、この副作用を減弱させることができると期待された(宮本、山内ら、*Nat. Commun.* 7, 13478 (2016))。

## 2) 末梢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療法の開発

ミエリン形成の分子基盤は、その病態発症と密接な関係があると考えられるため、現在までに行った研究は多くの手掛かりを提供している。さらに、病態発症共培養系を確立することを目的として、病態モデルマウス（遺伝性の末梢神経変性症の50%を占めるIA型シャルコ・マリー・トゥース（CMT）病原因遺伝子PMP22の点変異を有する自然発症型のモデルマウスであるトランペラー（Tr）やトランペラーJ（TrJ））からシュワン細胞とDRG神経細胞を精製し、共培養を行った。この試験管内実験系は動物個体を用いる薬物投与実験とは異なり開放系で各種のスクリーニングに適している。我々の研究グループでは、この実験系の確立を試み、最近成功している。それは、より生体に近いかたちとして、座骨神経由来の繊維芽細胞を培養シャーレの底に一層生やすことにより、上層のシュワン細胞と神経細胞の安定した共培養が得られるという技術である。ここで観察される脱ミエリン現象は不完全なミエリンやミエリン層が薄いものが多く、それによってシュワン細胞が死滅に至るわけではないため、最終的な評価段階まで共培養を問題なく継続することができる。また、この病態ミエリンは電子顕微鏡レベルで生体内とほぼ同一であることを確認している。

一方で、ミエリン形成過程は、発生・形態学的に分類すると、3期、すなわち神経軸索上でのシュワン細胞の増殖・遊走期（胎児中期～生後）、シュワン細胞の伸長期（胎児後期～生後）、軸索を幾重にも取り囲むミエリン形成期（生後から開始される）に分けられる。座骨神経では、座骨神経形成過程において、（1）マウスやラットの座骨神経への神経栄養因子の直接的インジェクションや神経栄養因子受容体の遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* の実験、さらにはグリア（Schwann cell）-神経細胞（DRG neuron）共培養系の *in vitro* の実験から、ミエリン形成過程（Stage I～Stage III）がDRG神経細胞からの放出される異なった2種類の液性の神経栄養因子（神経栄養因子-3（NT3）と脳由来神経栄養因子（BDNF））により制御されていること、及び、（2）これらの因子が異なった時期に放出され互いに逆の作用を示すこと、を明らかにした。（3）さらに、その下流のシグナル伝達機構を明らかにし、神経栄養因子の関係と類似した相反するきわめてユニークな経路（Rhoファミリー低分子量GTP結合蛋白質に属する数種類のシグナル伝達分子や極性因子）を介することを見出した。これらの研究は現在まで報告はなく、末梢神経ミエリン形成に関して重要な知見を与えるものと考えられる（代表的な参考文献：山内 田上ら **北米神経科学会誌** 2011；山内 田上ら **サイエンス姉妹誌** 2012；宮本、山内ら **サイエンス姉妹誌** 2013；宮本、山内ら **米国細胞生物学会誌** 2014）。

【具体的なI型CMT病の創薬標的分子に関して】[目的] 髄鞘は、神経の跳躍電導を達成させ、さまざまな外部ストレスから神経軸索を保護する役割をもつ。したがって、遺伝性、免疫性、物理的などの要因で髄鞘変性がおこると、神経変性の原因になる。しかしながら、このような髄鞘変性を特異的に改善するような治療薬や治療方法はほとんど知られていない。その理由のひとつは、特異的な治療薬標的分子が明らかにされていないことに起因する。また、これは髄鞘発生の詳細な分子メカニズムが分かっていないことも、その原因のひとつである。一度、変性してしまった髄鞘を根本的に治療することは難しいかもしれない。しかし、すくなくとも病態初期においては全シュワン細胞が変性しているわけではない。したがって、もし髄鞘発生を抑制する分子を阻害するか、髄鞘発生を促進する分子を活性化できれば髄鞘変性が改善できると考えられる。本研究では前者のメカニズムをもつ可能性が高い治療標的候補分子（Dock7）の解析を行った。[方法]（1）治療標的候補であるdock7遺伝子産物をノックダウンするトランスジーン（マウスU6プロモーターとDock7の線状型RNA干渉配列をもつオリゴヌクレオチド）を通常のトランスジェニックマウス作成要領と同様に、受精卵にインジェクションしてDock7をノックダウンする「ノックダウンマウス」を作成した。（2）このノックダウンマウスと髄鞘形成不全モデルマウスを交配することで、病態モデルマウスの髄鞘形成不全が改善されるかを座骨神経の電子顕微鏡写真を用いて簡易的に判断する。[結果]（1）Dock7は末梢神経の髄鞘発生を抑制する分子として同定され、そのノックダウンマウスの髄鞘は肥厚化していた。しかしながら、神経繊維等には異常は見ら

れなかった。(2) ノックダウンマウスと病態モデルマウスを交配させたところ、モデルマウスの髄鞘形成不全が一部改善された。[考察] (1) Dock7 は低分子量 GTP 結合蛋白質 (Rac1, Cdc42) の交換因子 (活性化因子) である。これらは髄鞘発生初期で強く活性化されていることが判明しているため、Dock7 をノックダウンすると、この初期発生過程がスキップし、その後の髄鞘発生が促進されるため、ノックダウンマウスの髄鞘形成が促進していたのではないかと推定される。(2) ノックダウンマウスと病態モデルマウスを交配させることで、モデルマウスの髄鞘形成不全が改善できたのは、Dock7 がもつ髄鞘形成の抑制能力を阻害したためであると考えられる。今後、この詳細なメカニズムを明らかにするとともに、さまざまな病態モデルマウスの髄鞘形成不全が改善されるかを検討する必要がある。

【具体的な II 型 CMT 病の創薬標的分子に関して】[目的] 先天性の末梢神経変性症であるシャルコーマリーツース病 (Charcot-Marie-Tooth disease, CMT disease) は主要な病変箇所によって、シュワン細胞型と神経型に分けられる。本研究では、後者の CMT 病のなかで Rab7 遺伝子変異を原因にもつ 2B 型に属する CMT 病のインビトロモデルを作製し、変異型 Rab7 遺伝子による神経軸索形成阻害を改善する薬物として、抗てんかん薬であるバルプロ酸を明らかにした。[方法] (1) CMT2B 型変異でみついている 4 種類の変異 (L129F, K157N, N161T, V162M、アミノ酸変異とそのアミノ酸番号を記載する) をもつ Rab7 を作成し、それを末梢神経細胞モデル細胞であるマウス N1E-115 細胞にリポフェクション法で導入した。(2) CMT2B 型変異でみついている 4 種類の変異をもつ Rab7 をマウス初代後根神経節神経細胞にエレクトロフェクション法で導入した。(3) それぞれの細胞にバルプロ酸を添加し、その神経軸索伸長作用を調べた。[結果] (1) 4 種類の変異体すべてが、N1E-115 細胞の神経突起伸長作用を阻害した。(2) 4 種類の変異体すべてが、後根神経節神経細胞の神経軸索伸長作用を阻害した。(3) バルプロ酸添加によって、変異体発現で阻害された N1E-115 細胞の神経突起伸長がほぼ完全に回復した。

(4) バルプロ酸添加によって、変異体発現で阻害された後根神経節神経細胞の神経軸索伸長が部分的に回復した。[考察] (1) Rab7 は低分子量 GTP 結合蛋白質の一種であり、Rab7 に結合している GTP と GDP の状態 (グアニンヌクレオチド・スイッチ) で神経軸索内における蛋白質などの軸索輸送を仲介する。CMT2B でみついている変異はすべて Rab7 を活性化することが知られている。このことが原因で神経軸索伸長時に必要な蛋白質が適所に運ばれないため、その伸長が阻害されると推定された。(2) 神経軸索伸長は神経発生における基本的な現象であるため、CMT2B が原因で、変異型 Rab7 ができると、その伸長を阻害することで CMT2B の原因になるのではないかと考えられた。(3) バルプロ酸はこの効果を部分的に回復した。今後、さらにこの効果を詳細に研究するとともに、他の抗てんかん薬がこのような効果を示すのかどうか検討する必要がある。

## 2) 中枢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療薬の開発

中枢神経系においては末梢神経系のような発生過程を再現できる *in vitro* の実験系は未だに成功していない。従って、中枢神経の発達過程の回路形成を観察できるグリア-ニューロン共培養系を完成させることを優先し、基礎的なミエリン-神経回路形成のメカニズムを明らかにし、次に、そこから得られる知見をもとに中枢神経脱ミエリン病の発症機構の解明とその治療法の開発を行うという実験手順を踏まなければならない。研究成果としてはまだ初期段階であるが、(1) ラット胎児大脳からオリゴデンドロサイト前駆細胞の単離・精製を試み、95%以上の純度でとる実験系を確立した。(2) 精製されたオリゴデンドロサイト前駆細胞は *in vitro* で、その後の分化過程 (*in vivo* では胎生後期から生後までの時期) を再現することができた。(3) レトロウイルスを用いて遺伝子導入を行い 50%以上の細胞での発現を確認し、さらに、それ以上の確率でノックダウンも可能になった。

実際に Pelizaeus-Merzbacher 病を引き起こす点変異を有する四回膜貫通型蛋白 PLP をオリゴデンドロサイト前駆細胞に導入し、部分的なミエリン形成が阻害されることを確認できた。現在、中枢神経細胞の単離・精製を行い、オリゴデンドロサイト前駆細胞との共培養系を確立し、*in vitro* で Pelizaeus-

Merzbacher 病を改善する薬物スクリーニング系を開発している（代表的な参考文献：山内 田上ら **北米神経科学会誌** 2011；山内 田上ら **サイエンス姉妹誌** 2012；宮本、山内ら **サイエンス姉妹誌** 2013；宮本、山内ら **米国細胞生物学会誌** 2014）。

【平成 27 年研究業績】

1. 論文発表

[原著論文 (欧文)]

- 1) Miyamoto Y, Torii T, Takada S, Ohno N, Saitoh Y, Nakamura K, Ito A, Ogata T, Terada N, Tanoue A, \*Yamauchi J. Involvement of the Tyro3 receptor and its intracellular partner Fyn signaling in Schwann cell myelination. *Molecular and Cellular Biology*, 2015, 26, 3489-3503. **Picked up as the cover photo**
- 2) Tezuka Y, Herai N, Inomata Y, Kagami K, Yamauchi J, Nishigori H, \*Sanbe A: Upregulation of inorganic pyrophosphatase 1 as a JNK phosphatase in hypothyroid embryonic chick cerebellum. *Life Sciences*. 2015, Mar 3., Doi: 10.1016/j.lfs.2015.02.019
- 3) Torii T, Ohno N, Miyamoto Y, Kawahara K, Saitoh Y, Nakamura K, Takashima S, Sakagami H, Tanoue A, \*Yamauchi J. Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-2 regulates myelination in nerves. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 460, 819-825.
- 4) Miyamoto Y, Eguchi T, Kawahara K, Hasegawa N, Nakamura K, Funakoshi-Tago M, Tanoue A, Tamura H, \*Yamauchi J. Hypomyelinating leukodystrophy-associated missense mutation in HSPD1 blunts mitochondrial dynamics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 462, 275-281.
- 5) \*Nakamura K, Nakabayashi K, Aung KH, Aizawa K, Hori N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A. DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces human cholangiocarcinoma cell death through alteration of DNA methylation status. *PLoS ONE* 2015, 10(3): e0120545. doi:10.1371/journal.pone.0120545.
- 6) Nishimura K, Ishikawa S, Matsunami E, Yamauchi J, Homma K, Faulker C, Oparka K, Jisaka M, Nagaya T, Yokota K, \*Nakagawa T: New Gateway compatible vectors for a high-throughput protein-protein interaction analysis by a bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay and their application to an Arabidopsis clathrin structure analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015. (doi/full/10.1080/09168451.2015.1060847)
- 7) Torii T, Miyamoto Y, Takada S, Tsumura H, Arai M, Nakamura K, Ohbuchi K, Yamamoto M, Tanoue A, \*Yamauchi J: Arf6 mediates Schwann cell differentiation and myelination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; 465(3): 450-457.
- 8) Nishimura K, Matsunami E, Yoshida S, Kohata S, Yamauchi J, Jisaka M, Nagaya T, Yokota K, \*Nakagawa T: The tyrosine-sorting motif of the Arabidopsis vacuolar sorting receptor VSR4, which is involved in the interaction between VSR4 and AP1M2, mu1-adaptin type 2 of clathrin adaptor complex 1 subunits, participates in the post-Golgi sorting of VSR4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015; 80: 694-705. (DOI: 10.1080/09168451.2015.1116925)
- 9) Torii T, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohbuchi K, Tsumura H, Kawahara K, Tanoue A, Sakagami H, \*Yamauchi J: Data supporting Arf6 regulation of Schwann cell differentiation and myelination. *Data in Brief (Elsevier)*. 2015; 5, 388-395.

## [総説 (欧文)]

- 1) Aung KH, Tsukahara S, Maekawa F, Nohara K, \*Nakamura K, Tanoue A. Role of Environmental Chemical Insult in Neuronal Cell Death and Cytoskeleton Damage. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2015;38(8):1109-12.

## [著書 (欧文)]

なし

## [原著論文 (和文)]

なし

## [総説 (和文)]

なし

## [著書 (和文)]

なし

## 2. 学会発表

## [国際学会]

- 1) 宮本 幸, 山内淳司: Disease-associated modification of hereditary demyelinating disorder-related protein dynamics. 第58回日本神経化学会国際シンポジウム (シンポジウム: 座長 竹林浩秀、山内淳司) (2015.9.11-13、大宮)
- 2) Yamashita T, Ono T, Miyamoto Y, Yamauchi J, Sato N: Establishment of the in vitro myelination model using human iPS cell-derived oligodendrocytes. Society for Neuroscience Annual Meeting 2015. Chicago, USA, 2015.10.18
- 3) Kyaw Htet Aung, Nakamura K, Tanoue A: Arginine vasopressin V1b receptor regulates cell growth and promotes neurite outgrowth in PC12 cells. 8th the Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress (2015.11.22-25, Bangkok).
- 4) Shigeta T, Enosawa S, Hirata Y, Sasaki K, Uchida H, Kanazawa H, Fukuda A, Nakamura K, Horikawa R, Nosaka S, Kasahara M: Two cases of hepatocyte transplantation for urea cycle disorders by using hepatocytes isolated from living donor reduced grafts Joint Congress of the International-Pancreas-and-Islet-Transplantation-Association, International-Xenotransplantation-Association and Cell-Transplant-Society (2015, Melbourne)

## [国内学会]

1. 中村和昭、中林一彦、相澤和子、Kyaw Htet Aung、秦健一郎、田上昭人: DNAメチル化阻害剤ゼブラリンの抗胆管癌作用の検討、日本組織培養学会第88回大会 (2015.5.26、広島)
2. Kyaw Htet Aung, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue: Role of vasopressin receptor (V1b) in the formation of neurites in PC12 cells、日本組織培養学会第88回大会 (2015.5.26、広島)
3. 中村和昭、相澤和子、Kyaw Htet Aung、田上昭人: DNAメチル化阻害剤ゼブラリンによるHepG2細胞のシトクロムP450遺伝子発現亢進、第42回日本毒性学会学術年会 (2015.6.29、金

沢)

4. 宮本 幸、山内淳司： ErbB3 is required for Schwann cell precursor migration. (ミニシンポジウム：グリア系前駆細胞の新しい分化メカニズムとその応用 企画/座長：長尾元史、山内淳司) 日本神経科学会、(2015.7.28-31、神戸)
5. 山下智子、土井綾乃、小林桜子、小野貴史、鈴木 豊、荒木利博、青木久範、佐藤直也、宮本 幸、山内淳司、板東良雄、吉田成孝： Derivation of oligodendrocytes from human iPS cells and monkey ES cells maintained in a single-cell and feeder-free culture. (ミニシンポジウム：グリア系前駆細胞の新しい分化メカニズムとその応用 企画/座長：長尾元史・山内淳司) 日本神経科学会、(2015.7.28-31、神戸)
6. Kyaw Htet Aung, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue. Vasopressin receptor 1b regulates cell growth and promotes neurite outgrowth in PC12 cells. 第30回日本下垂体研究会学術集会 (2015.8.6、富山)
7. 宮本 幸、山内淳司： Disease-associated modification of hereditary demyelinating disorder-related protein dynamics (国際シンポジウム：座長 竹林浩秀、山内淳司) 第58回日本神経化学会、(2015.9.12、大宮)
8. 中村和昭、坪井貴司 (学会シンポジウムオーガナイザー/座長)： 本能行動を制御するペプチドホルモンのはたらき～生殖・摂食・情動行動を司る分子機構～. 日本動物学会第86回大会、(2015.9.18、新潟市)
9. Kyaw Htet Aung, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue： Vasopressin receptor 1b (V1bR) regulates cell growth and neuritogenesis induced by nerve growth factor in PC12 cells. 第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 (2015.9.19、仙台)
10. 宮本 幸、山内淳司 (学会シンポジウムオーガナイザー) Tyro3 受容体と Fyn キナーゼは、ミエリン形成を司る新しいシグナル複合体を形成する (ワークショップ：企画/座長 加藤裕教、山内淳司) 第38回日本分子生物学会・第87回日本生化学会合同年会 (2015.12.3、神戸)
11. 前川文彦、チョウ・テツ・アウン、チョウ・チー・ター・トゥー、佐野一広、中村和昭、田上昭人、掛山正心、塚原伸治、野原恵子、発達期の無機ヒ素曝露による後発的行動異常の検出、第14回分子予防環境医学研究会 (2015、大阪)

#### 【その他の発表】 <講演会、研究会等>

1. 中村和昭、ヒト肝細胞を用いた基礎・臨床研究～肝細胞の高機能培養化を中心に～、次世代バイオ・医療技術研究会第3回研究会 (2015年3月23日東京大学生産技術研究所 (東京))
2. Kyaw Htet Aung (口演)、Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue： Vasopressin receptor 1b regulates cell growth and promotes neurite outgrowth in PC12 cells. 3NC合同リトリート、国際医療研究センター研究所 新宿 2015年8月18日～19日 (発表日18日)
3. 宮本 幸、山内淳司： 分子スイッチとしての低分子量GTP結合蛋白質は如何にしてミエリン形成を制御するのか (指定ワークショップ：発起人/座長 緒方 徹、三五一憲、板東良雄、山内淳司) 2015年9月・日本ミエリン研究会・大宮
4. 山内淳司： グリア研究会「末梢神経髄鞘形成の研究から変性疾患の創薬標的分子を探る」シンポジウムをオーガナイズした。2015年12月5日、第20回グリア研究会・名古屋

#### 【公的研究費】

平成27年 (2015)

- (1) 厚生労働省 成育医療研究開発費 27-13  
胆道閉鎖症の病因・治療標的因子の同定と治療薬・肝前駆細胞移植療法の検討  
代表研究者 田上昭人 1200万円
- (2) 厚生労働省 成育医療研究開発費 27-7  
稀少性の神経成育疾患のモデルを作製して治療標的を解明する  
代表研究者 山内淳司 780万円
- (3) 厚生労働省 成育医療研究開発費 27-9  
広汎性発達障害の薬物治療に向けたバソプレシン受容体機能の解析  
代表研究者 中村和昭 300万円
- (4) 厚生労働省 成育医療研究開発費 27-1 (主任研究者：笠原群生)  
小児臓器移植医療における新規治療方法の確立・次世代育成に関する研究  
分担研究者 中村和昭 100万円  
分担研究課題：安全な肝細胞移植方法の確立
- (5) 厚生労働省 成育医療研究開発費 26-2  
「グリア細胞はなぜ髄鞘を巻くのか？ー発生シグナルから創薬ターゲットへの応用ー」  
代表研究者 宮本幸 150万円
- (6) 厚生労働省 成育医療研究開発費 25-3 (主任研究者：絵野沢伸)  
肝細胞移植の高度先進医療化に向けた取り組み  
分担研究者 中村和昭 (主任一括：990万円の内の約540万円)  
分担研究課題：肝幹(前駆)細胞移植療法の開発
- (7) AMED 日本医療研究開発機構研究費 創薬基盤推進研究事業  
創薬・疾患研究のための細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究  
(主任研究者：小原有弘)  
分担研究者 中村和昭 200万円 (内、間接経費 461,532円)  
分担研究課題：肝臓組織の品質管理・供給体制整備
- (8) 文部科学省 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 挑戦的萌芽研究  
下垂体前葉からの分泌型 miRNA の同定と内分泌因子としての作用の解明  
研究代表者 田上昭人 182万円 (内、間接経費 42万円)
- (9) 文部科学省 科学研究費助成事業(科学研究費補助金) 新学術領域研究(研究領域提案型)  
脱ミエリン病で特異的に活性化される分子経路を制御することで、病態を改善する試み  
研究代表者 山内淳司 429万円 (内、間接経費 99万円)
- (10) 文部科学省 科学研究費助成事業(補助金及び助成金) 基盤研究(B)  
末梢神経のミエリン形成を制御する分子機構の解明  
研究代表者 山内淳司 429万円 (内、間接経費 99万円)
- (11) 文部科学省 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 基盤研究(C)  
肝細胞特異的機能発現機構の統合的理解と高度機能維持肝細胞/培養系の構築  
研究代表者 中村和昭 91万円 (内、間接経費 21万円)
- (12) 文部科学省 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 若手研究B

グリア細胞と神経の相互作用を起点に髄鞘形成および破綻の機序を解き明かす

研究代表者 宮本幸 104万円 (内、間接経費24万円)

(13) 公益財団法人 川野小児医学奨学財団 川野正登記念研究助成金

胆道閉鎖症の病因・治療標的因子の同定と治療薬の開発

代表研究者 中村和昭 240万円

(14) 公益財団法人 鈴木謙三記念医科学応用研究財団 平成27年度調査研究助成金

治療薬開発研究を開始するに当たり、その標的分子が未同定な中枢神経脱髄疾患モデルを作製する。

代表研究者 宮本幸 100万円

(15) 共同研究 (株)田辺三菱製薬 山内淳司 200万円

(16) 共同研究 (株)ツムラ 山内淳司 162万円

(17) 共同研究 (株)大日本住友製薬 山内淳司 10.8万円

(18) 共同研究 (株)大日本住友製薬 山内淳司 500万円

#### 【栄誉、表彰】

Kyaw Htet AUNG, Kazuaki NAKAMURA, Akito TANOUE: Role of vasopressin receptor (V1b) in the formation of neurites in PC12 cells. 日本組織培養学会大88回大会 English Presentation Award 受賞 (2015年5月26日)

#### 【特許】

なし

#### 【その他(教育活動・広報など)】

(教育活動)

中村和昭 東京大学教養学部非常勤講師

(社会貢献)

中村和昭 日本下垂体研究会評議員

中村和昭 日本組織培養学会評議員・教育研究システム委員・細胞培養指導士

中村和昭 日本毒性学会専任査読員

(研究所運営への貢献)

中村和昭 国立成育医療研究センター倫理委員会基礎研究部会委員

#### 【平成28年研究業績】

##### 1. 論文発表

[原著論文(欧文)]

- 1) Aung KH, Kyi-Tha-Thu C, Sano K, Nakamura K, Tanoue A, Nohara K, Kakeyama M, Tohyama C, Tsukahara S, \*Maekawa F: Prenatal exposure to arsenic impairs behavioral flexibility and cortical structure in mice. *Frontiers in neuroscience.*, 2016. doi:



10. 3389/fnins. 2016. 00137.

- 2) Miyamoto Y, Funakoshi-Tago M, Hasegawa N, Eguchi T, Tanoue A, Tamura H, \*Yamauchi J: Data supporting mitochondrial morphological changes by spastic paraplegia (SPG) 13-associated HSPD1 mutants. Data in Brief (Elsevier) . 2016, 6: 482-488.
- 3) Miyamoto Y, Torii T, Kawahara K, Tanoue A, \*Yamauchi J: Dock8 interacts with Nck1 in mediating Schwann cell precursor migration. Biochemistry and Biophysics Reports. 2016, 6; 113-123.:
- 4) Miyamoto Y, Tamano M, Torii T, Kawahara K, Nakamura K, Tanoue A, Takada S, \*Yamauchi J: Data supporting the role of Fyn in initiating myelination in the peripheral nervous system. Data in Brief (Elsevier). 2016, 7; 1098-105:
- 5) Niimi N, Tsukamoto M, Takaku S, Yamauchi J, Kawakami E, Yanagisawa H, Watabe K, Utsunomiya K, \*Sango K: Involvement of oxidative stress and impaired lysosomal degradation in amiodarone-induced Schwannopathy. European Journal of Neuroscience. 2016, 44; 1723-1733.
- 6) Sobczak M, Chumak V, Pomorski P, Wojtera E, Majewski L, Nowak J, Yamauchi J, \*Redowicz MJ: Interaction of myosin VI and its binding partner DOCK7 plays an important role in NGF-stimulated protrusion formation in PC12 cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research. 2016, 1863; 1589-1560.
- 7) Miyamoto Y, Torii T, Tanoue A, \*Yamauchi J: VCAM1 acts in parallel with CD69 and is required for the initiation of oligodendrocyte myelination. Nature. Communications. 2016, 7; 134178.
- 8) Makinodan M, Ikawa D, Miyamoto Y, Yamauchi J, Yamamuro K, Yamashita Y, Toritsuka M, Kimoto S, Okumura K, Yamauchi T, Fukami S, Yoshino H, Wanaka A, \*Kishimoto T: Social isolation impairs remyelination in mice through modulation of interleukin-6. FASEB Journal. 2016, 30; 4267-4274.

[総説 (欧文)]

- 1) Torii T, \*Yamauchi J : (2016) Gas6-Tyro3 signaling is required for Schwann cell myelination and possible remyelination. Neural Regeneration Research. 2016; 11: 215-216.

[著書 (欧文)]

なし

[原著論文 (和文)]

なし

[総説 (和文)]

なし

[著書 (和文)]

なし

## 2. 学会発表

## [国際学会]

- 1) Kyaw Htet Aung, Nakamura K, Tanoue A. Arginine vasopressin V1b receptor is involved in the regulation of cell growth and neurite outgrowth in PC12 cells. 44th Myanmar Health Congress (2016年1月, Myanmar).
- 2) Nakamura K. Regulation of Cell Death and Cell Specific Functions by Inhibition of DNA Methylation. Animal Symposium [Joyful Tissue Culture for Cancer and Aging - Intervention of Stress and Disease], The 2016 World Congress on In Vitro Biology (2016年6月, San Diego)

## [国内学会]

- 1) 中村和昭、Kyaw Htet Aung、田上昭人：、受容体欠損マウスを用いたバソプレシンの中枢神経系における生理作用の検討、シンポジウム「行動神経内分泌学の視点から捉える生理現象のメカニズム」第93回日本生理学会大会（2016年3月、札幌）
- 2) 齋島由二、河上強志、伊佐間和郎、福井千恵、柚場俊康、田上昭人、松岡厚子： PVC 製血液バッグの安全性及び有効性の再評価に関する研究 Reevaluation study on the safety and effectiveness of blood bag made of PVC. 2016年3月26日～3月29日、日本薬学会第136年会 横浜（パシフィコ横浜）
- 3) 中村和昭：高機能肝細胞培養系の検討と毒性評価系開発の試み、ワークショップ「培養細胞を用いたスクリーニング系の構築、毒性評価」日本組織培養学会第89回大会（2016年5月、大阪）
- 4) 大西一笠松礼、小阪拓男、中村和昭、小原有弘：日本人由来凍結肝細胞における解凍法の検討、Cryopreservation Conference 2016（2016、岡崎）
- 5) 宮本 幸、山内淳司： Tyro3 receptor and the binding partner Fyn promotes PNS myelination。  
（シンポジウム：企画/座長 大野伸彦、山内淳司）第39回日本神経科学大会、横浜市、2016.7.20～22.
- 6) 牧之段学、山室和彦、芳野浩樹、井川大輔、山下泰徳、宮本幸、山内淳司、岸本年史： Social experience-dependent glia development in the medial prefrontal cortex related to autism spectrum disorder. 第39回日本神経科学大会、横浜市、2016.7.20～22.
- 7) 宮本幸、山内淳司：中枢有髄神経の形成を負に制御する分子 Rab35 と、その創薬標的としての可能性 2016年9月・日本神経化学学会大会（シンポジウム）・福岡

## [その他の発表] &lt;講演会、研究会等&gt;

- 1) 山内淳司、宮本幸：「脱ミエリン病で特異的に活性化される分子経路を抑制することで、病態を改善する試み」第3回グリアアッセンブリ班会議成果発表（2016年1月、慶應義塾大学三田キャンパス）
- 2) 中村和昭：創薬における非臨床試験-毒性試験の観点から、東京バイオテクノロジー専門学校特別講義（2016年2月、蒲田）
- 3) 宮本 幸、山内淳司：神経細胞からシュワン細胞へのシグナルによるミエリン形成（ワークショップ：座長 緒方 徹、三五一憲、板東良雄、山内淳司、他2名）2016年7月・日本ミエリン研究会・横浜

- 4) 齊藤百合花、大野伸彦、山内淳司、寺田信生：膜骨格蛋白 4.1G 欠損マウスにおける末梢神経障害の検討（ワークショップ：座長 緒方 徹、三五一憲、板東良雄、山内淳司、他 2 名）2016 年 7 月・日本ミエリン研究会・横浜

### 【公的研究費】

#### 平成 28 年 (2016)

- (1) 厚生労働省 成育医療研究開発費 27-13  
胆道閉鎖症の病因・治療標的因子の同定と治療薬・肝前駆細胞移植療法の検討  
代表研究者 田上昭人 250 万円
- (2) 厚生労働省 成育医療研究開発費 27-7  
稀少性の神経成育疾患のモデルを作製して治療標的を解明する  
代表研究者 山内淳司 372 万円
- (3) 厚生労働省 成育医療研究開発費 27-1 (主任研究者：笠原群生)  
小児臓器移植医療における新規治療方法の確立・次世代育成に関する研究  
分担研究者 中村和昭 50 万円  
分担研究課題：安全な肝細胞移植方法の確立
- (4) 厚生労働省 成育医療研究開発費 26-2  
「グリア細胞はなぜ髄鞘を巻くのか？－発生シグナルから創薬ターゲットへの応用－」  
代表研究者 宮本幸 75 万円
- (5) AMED 日本医療研究開発機構研究費 再生医療実用化研究事業  
iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究  
(主任研究者：古江－楠田美保)  
分担研究者 中村和昭 200 万円 (内、間接経費 461,538 円)  
分担研究課題：培養細胞を用いた薬効・安全性評価系構築のためのガイドランスの作成
- (6) 文部科学省 科学研究費助成事業 (補助金及び助成金) 基盤研究 (B)  
末梢神経のミエリン形成を制御する分子機構の解明  
研究代表者 山内淳司 429 万円 (内、間接経費 99 万円)
- (7) 文部科学省 科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金) 若手研究 B  
グリア細胞と神経の相互作用を起点に髄鞘形成および破綻の機序を解き明かす  
研究代表者 宮本幸 104 万円 (内、間接経費 24 万円)
- (8) 共同研究 (株) 田辺三菱製薬 山内淳司 200 万円 (内、間接経費 461,538 円)
- (9) 共同研究 (株) ツムラ 山内淳司 168.48 万円 (内、間接経費 388,800 円)
- (10) 共同研究 (株) 東レ 山内淳司 400.4 万円 (内、間接経費 924,000 円)
- (11) 共同研究 (株) ニチリョー 中村和昭 20 万円 (内、間接経費 46,154 円)

### 【栄誉、表彰】

なし

【特許】

なし

【その他（教育活動・広報など）】

（教育活動）

中村和昭 東京大学教養学部 非常勤講師

中村和昭 埼玉大学理学部 非常勤講師

（社会貢献）

中村和昭 日本下垂体研究会評議員

中村和昭 日本組織培養学会評議員・教育研究システム委員会委員・培養指導士

中村和昭 日本毒性学会専任査読員

（研究所運営への貢献）

中村和昭 国立成育医療研究センター倫理委員会基礎研究部会委員