

【ミッション・目標】

成育医療分野には、遺伝性疾患等の難治性疾患が数多く存在し、病因解明とともに治療法の開発が期待されている。薬剤治療研究部では、成育医療におけるこれら難治性疾患の病因を解明し、薬物療法に関する科学的根拠・情報を提供することにより、新たな治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、難治性疾患の薬物標的因子の探索ならびに機能解析、薬物標的となるホルモン受容体の機能解明、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. 手術摘出肝組織及び培養細胞を利用した創薬研究
 - 1) 創薬研究に活用可能なヒト組織・細胞材料の開発
 - 2) 培養細胞を用いた薬効・安全性評価系構築のためのガイダンスの作成
2. 神経疾患関連因子の解明及び薬物療法の開発
 - 1) 下垂体後葉ホルモン機能の解明及び薬物療法の開発
 - 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法の開発

【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：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：相澤和子（平成 28 年 10 月～）

実験補助員：水野悦子、川原和子、川崎智恵

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
 - 2) 国立医薬品食品衛生研究所 靄島部長：赤血球寿命に及ぼす可塑剤の影響評価に関する研究
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 北里大学メディカルセンター 野々口部長：腎機能における V1a 受容体の解析
 - 6) 東京薬科大学 山内教授：神経変性疾患の解明
 - 7) 大阪歯科大学 今井教授：ES 細胞を用いた毒性試験
 - 8) 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

- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 自治医科大学 興水教授：バソプレッシン受容体機能の解明
- 17) 目白大学 青木教授：愛着関連障害診断の症例検討および被虐待乳幼児とその親のオキシトシン・バソプレッシン濃度（唾液中）及びそれら受容体の遺伝子多型についての研究

2. 企業

- 1) ニチリョー：細胞培養工程に使用する液体分注装置の改良
- 2) ライフバンクジャパン：胎盤組織及び同組織由来間葉系幹細胞のバンキング技術の開発
- 3) ソニー株式会社：ソニーのエンターテインメントロボット aibo による介入療法が慢性疾患を有する小児に与える癒し効果の検証

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) スキリニクム大学 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、遺伝性疾患等の難治性疾患が含まれ、原因不明の疾患や原因が明らかになっていても有効な治療法が確立されていないもの等多数存在する。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、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、薬理学・生理学的手法や分子生物学的手法等を用い、標的因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. 手術摘出肝組織及び培養細胞を利用した創薬研究

1) 創薬研究に活用可能なヒト組織・細胞材料の開発

これまではヒトに使う薬の薬物動態を調べる為には、動物細胞や動物個体を用いた実験を行い、薬理効果や副作用の有無等を解析してきた。しかしながら、動物を用いた評価はヒトへの外挿性の問題が指摘され、実際にヒトへ投与すると予期しない副作用が発現したり、複数の薬の相互作用による副作用が

発現することが、報告されてきている。特に、体内での薬物の代謝は肝細胞の薬物代謝機能に依存するものが多く、創薬研究や薬物動態学においてヒトの肝機能発現に関する検討は極めて重要な研究課題となっている。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ヒト肝細胞の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、初代培養系における培養細胞において肝機能を維持することは難しい。また、一般的に不死化した肝細胞株は肝特異的機能を有してはいるものの、その発現又は機能は著しく低い。

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。培養系細胞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等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。研究部でも、これまでに肝細胞株の一つである HepG2 細胞を用いてアルブミン産生、薬物代謝酵素の発現を亢進させる為、新規三次元培養法を開発してきた。しかしながら、この三次元培養法でも生体の肝細胞の細胞機能と比較するとその発現や活性は十分とは言えなかった。今回、研究部では、化合物を用いて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った。その結果、HepG2 細胞において培養液中に DNA メチル化阻害剤であるゼブラリンを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) 遺伝子発現が亢進することを見出した。CYP の発現が亢進することにより、薬物の代謝が亢進しその代謝産物による肝細胞毒性が増強した (Sci Rep. 2017)。その機序として、DNA メチル基転移酵素 (MNMTs) の阻害と double-stranded RNA (dsRNA)-activated protein kinase (PKR) が CYP 遺伝子発現に関与することを明らかにした。これらの知見により、三次元培養や遺伝子導入などに加えて化合物添加等の手法を組み合わせることにより、さらに培養肝細胞の機能を亢進させることが可能となり、より感度・特異性の高い薬物安全性評価系の構築が可能となることが考えられる。

2) 培養細胞を用いた薬効・安全性評価系構築のためのガイダンスの作成

近年、国内外においてヒト iPS 細胞由来神経細胞、肝細胞を用いた薬剤候補物質の薬効・安全性評価系への応用の期待が高まっている。一方で、創薬研究の推進の為に、研究者が効率よく分化細胞を活用できるよう取り扱い等に関する適切な方法や情報の提供が急務となっている。培養細胞を用いた薬効・安全性評価系構築の為の基本原則・留意点を作成することを目標として、研究者からなる専門家に加えて AMED、厚生労働省、経済産業省からのオブザーバー委員により構成されるワーキンググループを設置しガイダンスの作成を行った。当該ワーキンググループにおいて、細胞培養を用いた研究開発成果の適切性・再現性の担保には、細胞培養に関する基本的概念の共有が必要であるとの見解で一致した。2017 年は基礎研究、開発研究、応用研究を行う上で、細胞培養を用いる際に共通に重要と考えられる基本的な考え方を広く国内の研究者へ周知するために、「細胞培養における基本原則の提案」として日本組織培養学会誌で報告した。2018 年度は、細胞培養を行う上で基本的な手技となる細胞の観察に関して「培養細胞の観察の基本原則の提案」として日本組織培養学会誌で報告した。論文公開後は、日本組織培養学会、日本動物実験代替法学会のホームページより閲覧できるようにし、また関連学会のホームページにもリンクの設定をお願いし、広く研究者へ閲覧される環境を整えた。同時に、創薬・毒性評価の基本となる手技として「ヒト多能性幹細胞培養の留意点」をとりまとめ公表した。

2. 神経疾患関連因子の解明及び薬物療法の開発

1) 下垂体後葉ホルモン機能の解明及び薬物療法の開発

下垂体後葉ホルモンのオキシトシンとバソプレシンは、末梢作用に加えて中枢神経系においても学習・記憶や社会行動、愛情・不安・抑うつ、知覚・痛覚など様々な生理機能に関与していることが明らかになっている。オキシトシンは母性ホルモンとして抗不安、抗うつ効果を発揮し、バソプレシンは父

性ホルモンとして不安・抑うつ関連行動を増加させることが報告されている。幼少期に親子間の相互的な愛情やスキンシップのやり取りができていないと、オキシトシンの分泌が低下し、愛着障害が発症しやすくなると考えられている。オキシトシンの分泌低下は、不安感や孤独感を増悪し、ストレス耐性が弱く他者不信・攻撃性が強い傾向につながると考えられている。また、子育て中の母親はオキシトシンレベルが高く、不安感が減少するが、幼少期の虐待経験をもつ女性はオキシトシンレベルが低く、不安スコアが高い。一方、バソプレシンはオスのつがい形成や父性愛を生み出すホルモンとして知られ、バソプレシンの分泌とバソプレシン受容体の数・感度は、幼少期の親子関係・養育環境に大きく影響を受ける。オキシトシンはストレスや不安感を和らげて落ち着ける作用を持っているのに対して、バソプレシンは愛する妻や大切な子供を守るために攻撃性・行動力を高めるといった異なる作用も持っている。

母性/父性ホルモンとして知られるオキシトシン (OXT) /バソプレシン (AVP) 機能を検討するため、研究部ではこれまでにバソプレシン受容体 (V1a受容体、V1b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、V1b受容体) 遺伝子欠損マウスを作成してきた。さらに、バソプレシン受容体 (V1a受容体、V1b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 (floxマウス) を作出し、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・維持してきている。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てきており、世界で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てきている (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)。これまでに、これらのOXT/AVP関連因子遺伝子改変マウスを用いてバソプレシンによる社会行動に及ぼす影響について解析を行ってきた結果、V1a受容体及びV1b受容体の両方を欠損した動物 (V1a/V1bR-KOマウス) では、野生型やV1aR-KOあるいはV1bR-KOマウスに比べ新規環境への適応が著しく低下していることが明らかとなった。この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と考えられた。また、V1a/V1bR-KOマウスは性行動にも変化がみられていることから、バソプレシンはV1a受容体及びV1b受容体を介して性行動の調節にも関与していることが示唆された。

虐待とオキシトシン・バソプレシンとの関連も、最近注目される研究テーマとなっている。オキシトシン濃度が、劣悪施設で養育を受けた (従って愛着関連障害すら疑われる) 経験のある子どもや被虐待歴のある成人女性では低下していることより、虐待とオキシトシンとの関連性が示唆されている。研究部では、被虐待児を診断しているクリニックと連携し現在虐待を行っていると確認されている養育者とその被虐待乳幼児を対象としてオキシトシン・バソプレシンについて解析を行っている。唾液中のオキシトシン・バソプレシン濃度を解析し、これまでの測定では、オキシトシン・バソプレシンともに虐待児で低い傾向が見られている。

また、長期療育患者におけるロボットによる介在療法の効果について、バソプレシン、オキシトシンの測定を行い、評価の検討を開始している。ソニーのエンターテイメントロボットaiboによる介在療法が慢性疾患を有する小児に与える癒し効果の検証のため、株式会社ソニー、成育医療研究センター病院との共同研究により、「ソニーのエンターテイメントロボットaiboによる介在療法が慢性疾患を有する小児に与える癒し効果の検証～小児のコンサルテーション・リエゾン活動における新たな介入として～」を開始し、エンターテイメントロボットによる介入がバソプレシン、オキシトシンや各種サイトカイン等に及ぼす影響について解析を行っている。

さらに、バソプレシンの中枢作用の一つである痛覚作用についてもV1aR-KO及びV1bR-KOマウスを用いて解析を行っている。痛覚反応において延髄レベルでAVP/V1b受容体シグナルが痛覚刺激を増強し、モルヒネの鎮痛作用に対しては抑制的に働いていることを解明し、報告している (Nat Neurosci. 2018)。

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を解明することにより、病態発症の解明及び治療法の開発につながるものと期待されている。研究部では、ミエリン形成の分子基盤及び病態発症のメカニズム解明の為に、神経細胞とグリア細胞（シュワン細胞）の共培養系を確立した。さらに、病態モデルマウス（IA型シャルコー・マリー・ツース（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））から遺伝子異常を持つシュワン細胞と後根神経節（dorsal root ganglion：DRG）神経細胞を精製・共培養を行い、病態モデルとなる培養系を開発した。これらの共培養系を用いて病態の改善する可能性が期待される薬物のスクリーニングに応用を図っている。

ミエリン形成過程は、発生・形態学的に分類すると、(I)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）、(II)シュワン細胞の伸長期（胎児後期～生後）、(III)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）の3つのステージに分けられる。グリア細胞（シュワン細胞）-神経細胞（DRG神経細胞）共培養系の *in vitro* の実験等から、①座骨神経では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（Brain Derived Neurotrophic Factor；BDNF））がミエリン形成過程（ステージI～ステージIII）を制御していること、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、③制御機構には、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が関与していること、等を見出している。

(1) I型CMT病の創薬標的分子の探索・解析

髄鞘は、神経の跳躍電導を達成させ、様々な外部ストレスから神経軸索を保護する役割を有する。従って、遺伝性、免疫性、物理的などの要因で髄鞘変性が発生すると、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法は、現在まで殆んど報告されていない。その理由の一つには、特異的な治療薬標的分子が明らかにされていないことが挙げられる。これまで研究部では、グアニンスクレオチド交換因子（guanine nucleotide exchange factor, GEF）の一つであるDock7の遺伝子発現を抑制したマウスでは、髄鞘が肥厚化することを見出した。さらに、病態モデルマウスの髄鞘形成不全が、Dock7の発現抑制により改善されるかどうかについて、Dock7ノックダウンマウスと髄鞘形成不全モデルマウスの交配を行い、髄鞘形成について検討を行った。座骨神経の電子顕微鏡写真を用いて解析した結果、①Dock7の発現は、末梢神経の髄鞘発生を抑制するが神経繊維等には影響を及ぼさない、②Dock7ノックダウンマウスと病態モデルマウスの交配により、病態モデルマウスの髄鞘形成不全が一部改善された。以上の結果より、Dock7は低分子量GTP結合蛋白質（Rac1、Cdc42）の交換因子（活性化因子）として作用し、その発現により髄鞘形成は抑制され、ノックダウンマウスではその抑制能力が阻害されるために、髄鞘形成が促進されること、ノックダウンマウスと病態モデルマウスの交配により、Dock7がもつ髄鞘形成の抑制能力を阻害したため、病態モデルマウスでは髄鞘形成不全が改善すると考えられた。以上の結果より、Dock7の発現又は機能を阻害する化合物は、I型CMT病の髄鞘形成異常を改善する可能性が示唆された。

(2) II型CMT病の創薬標的分子の探索・解析

Rab7遺伝子変異をもつ神経型CMT病（IIB型CMT病）の病態モデルを培養細胞系を用いて構築し、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のスクリーニングを行った。その結果、抗てんかん薬であるバルプロ酸が、変異型Rab7遺伝子による神経軸索形成阻害を改善することが明らかとなった。培養系にIIB型CMT病で報告されている変異を持つRab7を導入すると神経細胞の神経突起伸長が阻害されるが、この阻害作用はバルプロ酸を添加することにより、改善が見られた。以上の結果より、Rab7遺伝子変異をもつ神経型CMT病では、バルプロ酸が神経変性を改善する可能性が示唆された。今後 *in vivo* でモデル動物等を用いてバルプロ酸の効果について検討していく予定である。

(3) 末梢グリア発生機構の解明

ミエリン形成時のグリア細胞内では、ミエリン膜を構成するタンパク質の合成や輸送が活発に行われていると考えられている。低分子量 GTP 結合タンパク質の Arf1 は、細胞内のタンパク質輸送に関与する分子として報告されてきているが、ミエリン形成時のグリア細胞内における Arf1 の機能については明らかになっていなかった。

今回、ミエリン形成時のグリア細胞内における Arf1 の機能を解明するために、グリア細胞の発生時期に発現している分子について mRNA アレイ解析を用いて探索を行った。その結果、グリア細胞の発生時において、細胞内シグナル伝達経路の中心で働くヌクレオチド交換因子の一つである BIG1 が特異的に高発現していることを見いだした。BIG1 は、Arf1 の活性を制御するヌクレオチド交換因子でミエリン形成時に高発現していたことより、グリア細胞特異的な BIG1 のノックアウトマウスを作製し解析を行った。BIG1 ノックアウトマウスでは、野生型と比較してミエリン膜の厚さが薄くなっており、特にミエリン形成初期にその表現型が強く現れた。さらに、BIG1 ノックアウトマウスでは、ミエリン膜の材料となるタンパク質や脂質のゴルジ体から細胞膜近傍への輸送が著しく阻害されていた。次に、BIG1 により活性制御を受けている Arf1 に関しても同様にノックアウトマウスを作製し、ミエリン形成に及ぼす影響を解析した。その結果、BIG1 ノックアウトマウスで観察されたのと同様の所見（薄いミエリン膜、およびミエリン膜形成タンパク質の輸送阻害）が Arf1 ノックアウトマウスでも確認された (Sci Adv. 2018)。以上の結果より、末梢グリア細胞の発生時において、BIG1 及び Arf1 の活性化によりミエリン形成が促進されることが明らかとなった。今後さらに BIG1 の上流、また Arf1 の下流に介在するシグナル分子を明らかにし、ミエリン形成時のシグナル経路の解明や、再ミエリン化や神経再生過程の分子基盤の解明及び病態解明、さらに治療法の開発を行っていく予定である。

3) 中枢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療法の開発

中枢神経系において、末梢神経系のような発生過程を再現できる *in vitro* の実験系は未だ開発されていない。本研究では、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の開発に取り組んでいる。確立した共培養系を用いて、ミエリン-神経回路形成のメカニズムを明らかにし、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に応用を図る。研究部では、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%以上の純度で分離可能な細胞実験系を確立した。②精製されたオリゴデンドロサイト前駆細胞は *in vitro* で、分化過程 (*in vivo* では胎生後期から生後までの時期) を再現することが可能となった。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、ノックダウンも可能となった。これらの実験系を用いて、ペリツェウス・メルツバッハー病 (Pelizaeus-Merzbacher 病; PMD) の原因となる点変異を有する四回膜貫通型蛋白プロテオリピドプロテイン 1 (proteolipid protein 1; PLP1) をオリゴデンドロサイト前駆細胞に導入したところ、異常な PLP 発現により部分的にミエリン形成が阻害されることが明らかとなった。さらに、中枢神経細胞とオリゴデンドロサイト前駆細胞との共培養系を用いて、*in vitro* で PMD を改善する薬物スクリーニング系を開発していく予定である。

(1) 中枢脱ミエリン病発症機構の解明

先天性中枢ミエリン変性症である Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) の原因遺伝子として、近年 *p1p1* 以外にも複数の遺伝子が明らかにされ、総称としてミエリン形成不全性白質ジストロフィー (Hypomyelinating leukodystrophy; HLD) と呼ばれる。原因遺伝子の異常により、HLD1 から HLD13 と命名されている。これらは希少疾病のため、現在までのところ有効な根治療法が開発されていない。研究部では、HLD4 および HLD6 について、そのモデル作製を行った。HLD の病変の原因は神経細胞ではなく、主にオリゴデンドロサイトにあると考えられているため、共培養システムにおいて、目的とする原因遺伝子の点変異体をコードするレトロウイルスを作製し、オリゴデンドロサイトに感染後、神経細胞との共培養を行うことで、*in vitro* での病態モデルを作製している (Data Brief. 2017)。

さらに、HLDを模倣する *in vivo* でのマウスモデルの作製のため、HLD4の原因遺伝子である heat shock 60kDa protein 1 (HSPD1)の点変異体のトランスジェニックマウスを作製した。点変異体としては、HSPD1の29番目のAspをGlyに置換したHSPD1(D29G)を用いた。作製したトランスジェニックマウスの新生児の脳を解析した結果、野生型マウスと比較し、トランスジェニックマウスの脳梁や嗅球などの領域において髄鞘形成率の減少が観察された (Mol Genet Metab Rep. 2018)。この結果よりHSPD1の異常によりミエリン形成の異常が生じることが明らかとなった。今後、病態共培養系と病態モデルマウスを用いて、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生理活性物質の探索を行う予定である。

(2) 中枢グリア発生機構の解明

グリア細胞を用いて mRNA マイクロアレイによる遺伝子の発現の網羅的解析を行った。その結果、グリア細胞の発生過程では、免疫系の細胞に発現し免疫システムで重要な働きをしていると考えられている vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) がグリア細胞のオリゴデンドロサイトにも発現し、ミエリン形成に重要な働きをしていることが明らかとなった (Nat. Commun. 2016)。VCAM-1 をノックダウンしたマウスやVCAM-1のリガンドである $\alpha 4$ インテグリンの機能を障害させると中枢神経系におけるミエリン形成が障害されることが、遺伝子改変動物の解析で明らかとなった。さらにVCAM-1をノックダウンした細胞でマイクロアレイを行い変動する遺伝子を探索してみたところ、CD69の発現が低下しており、さらにこのCD69をノックダウンしたマウスではミエリン形成が障害されていることから、 $\alpha 4$ インテグリンやVCAM-1がミエリン形成をコントロールしているばかりでなくCD69の発現も調節しミエリン形成を調節していることも明らかとなった。一方、この受容体は多発性硬化症の治療薬であるナタリツマブの標的分子でもあることが報告されている。ナタリツマブがオリゴデンドロサイトに発現しているVCAM-1と結合することにより、ナタリツマブの副作用である中枢神経系への副作用(炎症性リンパ球の侵入や神経変性等)が生じている可能性が指摘されている。これまでの研究でオリゴデンドロサイトに発現しているCD69がVCAM-1を調整しミエリン形成を行っていると考えられることより、オリゴデンドロサイトのCD69を活性化することでナタリツマブの副作用の一つである神経変性作用を減弱させる可能性がある。今後CD69を活性化する化合物の探索や解析を行い、治療法の開発を行っていく予定である。

【平成29年(2017年)研究業績】

1. 論文発表

[原著論文(欧文)]

- 1) Egashira N, Koushi E, Myose T, Tanoue A, Mishima K, Tsuchihashi R, Kinjo J, Tanaka H, Morimoto S, Iwasaki K. Role of vasopressin V1a receptor in $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol-induced cataleptic immobilization in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017 Dec;234(23-24):3475-3483.
- 2) Miyamoto Y, Torii T, Tanoue A, Kawahara K, Arai M, Tsumura H, Ogata T, Nagao M, Terada N, Yamamoto M, Takashima S, Yamauchi J. Neuregulin-1 type III knockout mice exhibit delayed migration of Schwann cell precursors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Apr 29;486(2):506-513.
- 3) Torii T, Miyamoto Y, Kawahara K, Tanoue A, Seki Y, Morimoto T, Yamamoto M, Yamauchi J. Data supporting the role of Fyn in embryonic sciatic nerve fasciculation. *Data Brief*. 2017 Feb 22;11:358-363.
- 4) Miyamoto Y, Torii T, Kawahara K, Hasegawa N, Tanoue A, Seki Y, Morimoto T, Funakoshi-Tago M, Tamura H, Homma K, Yamamoto M, Yamauchi J. Data on the effect of hypomyelinating leukodystrophy 6 (HLD6)-associated mutations on the TUBB4A properties. *Data Brief*. 2017 Feb 16;11:284-289.
- 5) Nakamura K, Aizawa K, Aung KH, Yamauchi J, Tanoue A. Zebularine upregulates expression of CYP genes through inhibition of DNMT1 and PKR in HepG2 cells. *Sci Rep*. 2017 Jan 23;7:41093.

- 6) Harada K, Kitaguchi T, Kamiya T, Kyaw Htet Aung, Nakamura K, Ohta K, Tsuboi T. Lysophosphatidylinositol-induced activation of the cation channel TRPV2 triggers glucagon-like peptide-1 secretion in enteroendocrine L cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2017, 292, 10855-10864.
- 7) Nakamura K*, Aizawa K, Aung KH, Yamauchi J, Tanoue A. *; corresponding author. Zebularine upregulates expression of CYP genes through inhibition of DNMT1 and PKR in HepG2 cells. *Scientific Reports*. 2017, 7:41093. doi: 10.1038/srep41093.
- 8) Ruri Tsuneishi, Naoto Matsumoto, Misa Itaoka, Yuki Urai, Minami Kaneko, Natsumi Watanabe, Shou Takashima, Yoichi Seki, Takako Morimoto, Hiroyuki Sakagami, Yuki Miyamoto, and Junji Yamauchi (2017) Data on the effect of knockout of cytohesin-1 in myelination-related protein kinase signaling. *Data Brief*. 15, 234-239
- 9) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Kazuko Kawahara, Masashi Inoue, Takako Morimoto, Masahiro Yamamoto, and Junji Yamauchi (2017) Data on the effect of in vivo knockdown using artificial ErbB3 miRNA on Remak bundle structure. *Data Brief*. 12, 313-319
- 10) Yuki Miyamoto, Kazuko Kawahara, Tomohiro Torii, and Junji Yamauchi (2017) Defective myelination in mice harboring hypomyelinating leukodystrophy-associated HSPD1 mutation. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 11, 6-7
- 11) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Akito Tanoue, Kazuko Kawahara, Miyuki Arai, Hideki Tsumura, Toru Ogata, Motoshi Nagao, Nobuo Terada, Masahiro Yamamoto, Shou Takashima, and Junji Yamauchi (2017) Neuregulin-1 type III knockout mice exhibit delayed migration of Schwann cell precursors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 506-513
- 12) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Kazuko Kawahara, Akito Tanoue, Yoichi Seki, Takako Morimoto, Masahiro Yamamoto, and Junji Yamauchi (2017) Data supporting the role of Fyn in embryonic sciatic nerve fasciculation. *Data Brief*. 11, 358-363
- 13) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Kazuko Kawahara, Nanami Hasegawa, Akito Tanoue, Yoichi Seki, Takako Morimoto, Megumi Funakoshi-Tago, Hiroomi Tamura, Keiichi Homma, Masahiro Yamamoto, and Junji Yamauchi (2017) Data on the effect of hypomyelinating leukodystrophy 6 (HLD6)-associated mutations on the TUBB4A properties. *Data Brief*. 11, 284-289
- 14) Tomoko Yamashita, Yuki Miyamoto Yoshio Bando, Takashi Ono, Sakurako Kobayashi, Ayano Doi, Toshihiro Araki, Yosuke Kato, Takayuki Shirakawa, Yutaka Suzuki, Junji Yamauchi, Shigetaka Yoshida, and Naoya Sato (2017) Differentiation of oligodendrocyte progenitor cells from dissociated monolayer and feeder-free cultured pluripotent stem cells. *PLoS One*. 12, e0171947

[総説 (欧文)]

- 1) Nakamura K, Velho G, Bouby N. Vasopressin and metabolic disorders: translation from experimental models to clinical use. *J Intern Med*. 2017 Jul 8. doi: 10.1111/joim.12649.

[著書 (欧文)]

- 1) Maekawa F, Nakamura K, Nakayama FS (Eds.). Chemicals in the environment and brain development: Importance of neuroendocrinological approaches. *Frontiers in Neuroscience*, 2017

[原著論文 (和文)]

なし

[総説 (和文)]

- 1) 諫田泰成、中村和昭、山崎大樹、片岡健、青井貴之、中川誠人、藤井万紀子、阿久津英憲、末盛博文、浅香勲、中村幸夫、小島肇、関野祐子、古江-楠田美保。「細胞培養における基本原則」の提案、*Tiss. Cult. Res. Commun.* 2017, 36, 13-19.

[著書 (和文)]

なし

学会発表

[国際学会]

なし

[国内学会]

- 1) 原田一貴、北口哲也、神谷泰智、チョー テツ アウン、中村和昭、太田邦史、坪井貴司、リゾリン脂質に対する小腸内分泌L 細胞の分泌応答機構、第 247 回 生理学東京談話会 (2017、新宿)
- 2) 菅原豪、山崎ちひろ、柳愛美、古川鈴恵、中村和昭、絵野沢伸、石田雄二、立野知世、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症患者由来肝細胞を用いたヒト肝細胞キメラマウスの作製、第 24 回肝細胞研究会 (2017、旭川)
- 3) 宮本 幸、山内淳司: alpha1 インテグリンリガンドと VCAM1 受容体による中枢神経系ミエリン形成機構 (ワークショップ)、 2017 年 12 月・生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ・神戸
- 4) 山内淳司、宮本 幸: VCAM1 regulates oligodendrocyte myelination (シンポジウム)、 2017 年 9 月・日本神経化学会・仙台
- 5) 宮本 幸、山内淳司: VCAM1 がオリゴデンドロサイトのミエリン形成を制御する (特定ワークショップ)、 2017 年 7 月・日本ミエリン研究会・東京

[その他の発表] <講演会、研究会等>

- 1) 中村和昭、バソプレシン V1 受容体欠損マウスからのバソプレシン作用へのアプローチ、特別シンポジウム「オキシトシン、バソプレッシン作用の新たな知見 -基礎と応用-」、第 32 回 日本下垂体研究会学術集会 (2017 年 8 月、日光)
- 2) 田上昭人、下垂体後葉ホルモンの中枢作用～最近の話題より～、熊本小児科懇話会 (2017 年 9 月、熊本)
- 3) Nakamura K. Lessons from vasopressin receptor knock-out models in metabolic disease. Vasopressin: novel roles for an old hormone Emerging therapies in cardiometabolic and renal diseases. JIM (Journal of Internal Medicine) symposium 2017 (2017 年 1 月, Paris)

【公的研究費】

平成 29 年 (2017 年)

- 1) 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
- 2) 厚生労働省 成育医療研究開発費 29-16
グリア細胞側から神経疾患の病態メカニズムを解く
代表研究者 宮本幸 100 万円
- 3) 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 300万円 (内、間接経費 692,307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

4) 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)

マイクロ RNA を介した下垂体ホルモン産生制御とホルモン産生細胞間情報伝達

研究代表者 田上昭人 156万円 (内、間接経費 36万円)

5) 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)

アストロサイトを中心とした脳内バソプレシンネットワーク機能の検討

研究代表者 中村和昭 156万円 (内、間接経費 36万円)

6) 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)

愛着関連障害診断および被虐待乳幼児とその親のオキシトシン濃度についての研究

(研究代表者：青木豊)

分担研究者 中村和昭 119.6万円 (内、間接経費 27.6万円)

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) 基盤研究 (C)

中枢ミエリン形成を司る分子ネットワークの解明

研究代表者 宮本幸 195万円 (内、間接経費 45万円)

8) 共同研究 (株)東レ 宮本幸 130万円 (内、間接経費 30万円)

9) 共同研究 (株)田辺三菱製薬 宮本幸 200万円 (内、間接経費 461,538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 埼玉大学理学部非常勤講師 (基礎生物学 II、基礎生体機能学、基礎生物学 IV、基礎生体情報学担当)、平成 28-30 年度

(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

中村和昭 JaCVAM in vitro 試験法の基本原則に関する資料編纂委員会 (GIVIMP)、2017 年～

中村和昭 杉浦医院治験審査委員会委員 (2017 年 6 月～)

中村和昭 杉浦医院認定再生医療等委員会委員 (2017 年 6 月～)

中村和昭 間葉系幹細胞の国内安定供給の実現に向けた検討委員会 (平成29年度)

(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30年(2018年)研究業績】

1. 論文発表

[原著論文 (欧文)]

- 1) Miyamoto Y, Torii T, Tago K, Tanoue A, Takashima S, Yamauchi J. BIG1/Arfgef1 and Arf1 regulate the initiation of myelination by Schwann cells in mice. *Sci Adv.* 2018 Apr 4;4(4):eaar4471.
- 2) Koshimizu TA, Honda K, Nagaoka-Uozumi S, Ichimura A, Kimura I, Nakaya M, Sakai N, Shibata K, Ushijima K, Fujimura A, Hirasawa A, Kurose H, Tsujimoto G, Tanoue A, Takano Y. Complex formation between the vasopressin 1b receptor, β -arrestin-2, and the μ -opioid receptor underlies morphine tolerance. *Nat Neurosci.* 2018 Jun;21(6):820-833.
- 3) Miyamoto Y, Torii T, Tanoue A, Yamamoto M, Yamauchi J. The promoter region of 46-kDa CNPase is sufficient for its expression in corpus callosum. *Mol Genet Metab Rep.* 2018 Mar 13;15:78-79.
- 4) Morishita Y, Nomura Y, Fukui C, Fujisawa A, Watanabe K, Fujimaki H, Kumada H, Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Kawakami T, Sakoda H, Mukai T, Yuba T, Inamura KI, Tanoue A, Miyazaki KI, Chung UI, Ogawa K, Yoshida M, Haishima Y. Alternative plasticizer, 4-cyclohexene-1,2-dicarboxylic acid dinonyl ester, for blood containers with protective effects on red blood cells and improved cold resistance. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018 Apr;106(3):1052-1063.
- 5) Shimizu K, Nakamura K, Yokosuka M, Kondo Y. Modulation of male mouse sociosexual and anxiety-like behaviors by vasopressin receptors. *Physiol Behav.* 2018 Dec 1;197:37-41.
- 6) Takizawa M, Harada K, Nakamura K, Tsuboi T. Transient receptor potential ankyrin 1 channels are involved in spontaneous peptide hormone release from astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2018 Jul 2;501(4):988-995.
- 7) Hiraoka Y, Hattori K, Takeuchi Y, Yamawaki M, Watanabe N, Matsumoto N, Homma K, Miyamoto Y, Yamauchi J: Effects of HLD-associated POLR1C mutant proteins on cellular localization and differentiation. *Mol. Genet. Metab. Rep.* in press. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2018.11.002
- 8) Tatsumi Y, Matsumoto N, Iibe N, Watanabe N, Torii T, Sango K, Homma K, Miyamoto Y, Sakagami H, Yamauchi J: CMT type 2N disease-associated AARS mutant inhibits neurite growth that can be reversed by valproic acid. *Neurosci. Res.* 2018 in press. DOI: 10.1016/j.neures.2018.09.016
- 9) Urai Y, Yamawaki M, Watanabe N, Seki Y, Morimoto T, Tago K, Homma K, Sakagami H, Miyamoto Y, Yamauchi J: Pull down assay for GTP-bound form of Sarla reveals its activation during morphological differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018 503:2047-2053
- 10) Miyamoto Y, Torii T, Inoue M, Morimoto T, Yamamoto M, Yamauchi J: Data on the effect of knockout of neruregulin-1 type III on Remak bundle structure. *Data Brief* 2018 18:803-807
- 11) Miyamoto Y, Torii T, Tago K, Tanoue A, Takashima S, Yamauchi J: BIG1/Arfgef1 and Arf1 regulate the initiation of myelination by Schwann cells in mice. *Sci. Adv.* (サイエンス姉妹紙) 2018 4:eaar4471
- 12) Matsumoto N, Kaneko M, Watanabe N, Itaoka M, Seki Y, Morimoto T, Torii T, Miyamoto Y, Homma K, Yamauchi J: Treacher Collins syndrome 3 (TCS3)-associated POLR1C mutants are localized in the lysosome and inhibits chondrogenic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018 499:78-85
- 13) Miyamoto Y, Torii T, Tanoue A, Yamamoto M, Yamauchi J: The promoter region of 46-kDa CNPase is sufficient for its expression in corpus callosum. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2018 15:78-79
- 14) Watanabe N, Itakaoka M, Seki Y, Morimoto T, Homma K, Miyamoto Y, Yamauchi J: Dystonia-4 (DYT4)-associated TUBB4A mutants exhibit disorganized microtubule networks and inhibit

neuronal process growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018 495:346-352

[総説 (欧文)]

なし

[著書 (欧文)]

なし

[原著論文 (和文)]

なし

[総説 (和文)]

- 1) 中村 和昭, 諫田 泰成, 山崎 大樹, 片岡 健, 青井 貴之, 中川 誠人, 藤井 万紀子, 阿久津 英憲, 末盛 博文, 浅香 勲, 中村 幸夫, 小島 肇, 伊藤 弓弦, 関野 祐子, 古江-楠田 美保. 「培養細胞の観察の基本原則」の提案、*Tiss. Cult. Res. Commun.* 2018, 37, 123-131.

[著書 (和文)]

なし

2. 学会発表

[国際学会]

- 1) Shimizu K, Nakamura k, Yokosuka M, Kondo Y. Enhancement of Sexual Behavior in v1a-v1b double KO Male Mice. 9th International Congress of Neuroendocrinology (2018, Toronto).
- 2) Maekawa F, Sano K, Kimura E, Nakamura K. Behavioral profile of mice genetically deficient in vasopressin 1a and/or 1b receptors in the IntelliCage. The 11th FENS Forum of Neuroscience. (2018 Berlin)

[国内学会]

- 1) 清水稀恵、岩倉未幸、佐藤咲希、中村和昭、山田一夫、近藤保彦、仔マウスにおける母親選好性の発達、第 29 回日本行動神経内分泌研究会 (2018、神奈川)
- 2) 菅原豪、山崎ちひろ、柳愛美、古川鈴恵、石田雄二、中村和昭、絵野沢伸、立野知世、Development of a novel chimeric mouse model using patient hepatocytes with ornithine transcarbamylase deficiency. 第 60 回日本先天代謝異常学会総会 (2018 年、岐阜)
- 3) 菅原豪、山崎ちひろ、柳愛美、古川鈴恵、石田雄二、中村和昭、絵野沢伸、立野知世、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症キメラマウスモデルの開発、第 14 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム (2018、広島)
- 4) 山崎ちひろ、菅原豪、中村和昭、絵野沢伸、石田雄二、立野知世、ヒト肝細胞キメラマウス作製技術により得られたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症患者由来ヒト肝細胞の性状解析、第 25 回肝細胞研究会 (2018、本郷)
- 5) 原田一貴、北口哲也、神谷泰智、チョーアウン、中村和昭、太田邦史、坪井貴司、リゾリン脂質によるグルカゴン様ペプチド-1 分泌機構の解明、第 95 回日本生理学会大会 (2018、高松)

[その他の発表] <講演会、研究会等>

- 1) 中村和昭、バソプレシン V1 受容体欠損マウスによるバソプレシン作用へのアプローチ、シンポジウム「神経ペプチドによる行動制御研究の最前線」、第 123 回日本解剖学会総会全国学術集会 (2018 年 3 月、武蔵野市)

【公的研究費】

平成 30 年（2018 年）

- 1) 厚生労働省 成育医療研究開発費 30-2（主任研究者：笠原群生）
小児臓器移植医療の標準化・次世代育成に関する研究
分担研究者 中村和昭 30 万円
分担研究課題：安全な肝細胞移植方法の確立
- 2) 厚生労働省 成育医療研究開発費 29-16
グリア細胞側から神経疾患の病態メカニズムを解く
代表研究者 宮本幸 104.5 万円
- 3) 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）
マイクロ RNA を介した下垂体ホルモン産生制御とホルモン産生細胞間情報伝達
研究代表者 田上昭人 156 万円（内、間接経費 36 万円）
- 4) 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）
アストロサイトを中心とした脳内バソプレシンネットワーク機能の検討
研究代表者 中村和昭 169 万円（内、間接経費 39 万円）
- 5) 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）
愛着関連障害診断および被虐待乳幼児とその親のオキシトシン濃度についての研究
（研究代表者：青木豊）
分担研究者 中村和昭 119.6 万円（内、間接経費 27.6 万円）
- 6) 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）
中枢ミエリン形成を司る分子ネットワークの解明
研究代表者 宮本幸 143 万円（内、間接経費 33 万円）
- 7) 名称；再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業（国内医療機関からのヒト（同種）体性幹細胞原料の安定供給モデル事業）
研究課題番号；18be0504004h0001
研究課題名；商業利用に対応した再生医療の産業化に向けたヒト間葉系幹細胞の安定供給事業のモデル構築と事業化に向けた体制の構築
研究代表者；梅澤明弘
期間；平成 30-32 年度
研究経費；5000 万円（直接経費、主任一括）
- 8) 名称；戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）第 2 期「AI（人工知能）ホスピタルによる高度診断・治療システム」
研究課題番号；SIPAIH18D01
研究課題名；小児・周産期病院における AI ホスピタル機能の実装に基づく実証研究
研究代表者；五十嵐隆
期間；平成 30-31 年度
研究経費；11739 万円（直接経費、主任一括）

9) 共同研究 (株)東レ 宮本幸 130万円 (内、間接経費 300,000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 埼玉大学理学部非常勤講師 (基礎生物学 II、基礎生体機能学、基礎生物学 IV、基礎生体情報学担当)、平成 28-30 年度

(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

中村和昭 杉浦医院治験審査委員会委員 (2017 年 6 月～)

中村和昭 杉浦医院認定再生医療等委員会委員 (2017 年 6 月～)

中村和昭 間葉系幹細胞の国内安定供給の実現に向けた検討委員会 (平成29年度)

(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