

20020779

別添2

厚生労働科学研究研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

マイクロアレー、プロテインチップを活用した、ヒト正常神経細胞を用いた
薬剤安全性評価システムの開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金村 米博

平成15(2003)年 4月

目 次

I. 総括研究報告			
マイクロアレー、プロテインチップを活用した、	-----		1
ヒト正常神経細胞を用いた薬剤安全性評価システム			
の開発に関する研究			
産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター		金村 米博	
II. 分担研究報告			
1. ヒト臍帯血細胞からの神経系細胞への分化誘導技術の開発	-----		6
産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター		金村 米博	
2. 神経幹細胞の未分化維持機構とシグナル伝達に関する研究	-----		11
慶應義塾大学医学部生理学教室		岡野 栄之	
3. マイクロアレーによる遺伝子発現情報解析と精神疾患治療	-----		16
の開発に関する研究			
理化学研究所遺伝子多型研究センター		角田 達彦	
4. レチノイド類の薬理作用と創薬の方向に関する研究	-----		21
神戸薬科大学薬学部機器分析学研究室		伊藤 允好	
5. 水頭症関連疾患発症における危険因子・予防因子として	-----		26
の薬剤に関する研究			
国立大阪病院脳神経外科		山崎 麻美	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----		34

マイクロアレー、プロテインチップを活用した、ヒト正常神経細胞を用いた

薬剤安全性評価システムの開発

主任研究者 金村米博

産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター 研究員

A. 研究目的

本研究開発は、ヒトに対する安全性の確立された有用な薬剤開発を行うための支援技術として、1. ヒト神経幹細胞あるいはそこから人為的に分化誘導したヒト神経・グリア細胞をin vitro評価用基準細胞として用いる投与薬剤の遺伝子・たんぱく質発現に及ぼす影響を包括的に解析する手法の確立、2. 前述1の技術を駆使したヒト中枢神経細胞・組織に対する薬剤の副作用、催奇性を効率的、客観的にスクリーニングするための高感度安全性評価システムの開発、3. 一塩基多型（single nucleotide polymorphism; SNP）情報の明らかなヒト神経幹細胞を利用した、遺伝子素因の異なるヒト神経系細胞における薬効の差異の判定試験、およびSNP情報に基づくヒト神経系の副作用予測システムの構築、の確立を目指す。

B. 研究方法

研究目的を遂行するため、次の研究開発を実施する。

1) ヒト神経幹細胞からの効率的神経細胞ならびにグリア細胞作成技術の開発

ヒト神経細胞のソースとなる神経幹細胞の分離技術の開発、及び幹細胞からの各種神経細胞の分化誘導技術の開発を実施する。細胞ソースとしては、倫理性ならび多数の異なるSNPを有する神経細胞の作成を目指すことを考慮して、臍帯血細胞、骨髄細胞あるいは胎盤組織など、非神経組織に存在するヒト多能性幹細胞、もしくはヒト神経幹細胞の利用を第一に考え、必要な細胞分離技術および分化誘導技術の開発を実施する。

2) マイクロアレーシステムを主体とした、薬剤投与後の遺伝子発現の包括的解析システムの開発

マイクロアレーシステム等を駆使して、ヒト神経幹細胞もしくはそこから分化誘導したヒト神経・グリア細胞に薬剤投与した後の遺伝子発現プロファイルを包括的に取得する。そこで得られた遺伝子情報に基づき、薬剤の副作用関連遺伝子群を同定する。そして、それら遺伝子情報に基づき、薬剤の安全性を遺伝子発現のレベルで、短時間に

かつ大量に検討するための評価システムの開発を行う。最終的に、副作用関連遺伝子の解析に重点を置いた、新たなマイクロアレーセットの開発を目指す。

3) プロテインチップシステムを主体とした、薬剤投与後のタンパク質発現の包括的解析システムの開発

TOF-Mass方式を利用したプロテインチップシステムなどを駆使して、ヒト神経幹細胞もしくはそこから分化誘導したヒト神経・グリア細胞に薬剤投与した後のタンパク質発現プロファイルを、主に分子量2万以下のタンパク質に注目して包括的に取得する。得られた情報に基づき、薬剤の副作用関連タンパク質群を同定し、薬剤の安全性をタンパク質発現のレベルで、短時間にかつ大量に検討するための評価システムの開発を行う。最終的に、各々の副作用関連たんぱく質に対する抗体を基板上に貼り付けて作成される独自の抗体結合型プロテインチップシステムの開発を目指す。さらに、新たなプロテインチップシステムの開発を実施し、それを用いた薬剤評価システムを開発する。

4) 遺伝的多型情報の差異に基づく、薬剤の神経系に対する安全性の評価システムの開発

遺伝子素因 (SNP) が判明した、複数のヒト神経幹細胞、あるいは分化誘導したヒト神経細胞を用いて、各種薬剤投与後の遺伝子、たんぱく質発現の変化を包括的に解析する。その情報に基づき、SNP に応じた薬剤の神経組織に対する安全性の評価システムを開発する。

C. 今年度の研究成果

1) ヒト臍帯血細胞からの神経系細胞への分化誘導技術の開発

金村は、SNP 情報が異なる複数のヒト神経系細胞 (神経細胞、グリア細胞) を用いて *in vitro* で薬剤の副作用を評価するための技術を確立することを目標に、ヒト臍帯血細胞からの神経系細胞の分化誘導技術の開発に着手した。ヒト臍帯血から分離した単核球を 10% FBS、 β -mercaptoethanol (0.01mM) を含む DMEM (high glucose) で培養後、1% FBS と 1×10^{-6} M の all-trans retinoic acid を用いて分化誘導させた。その結果、ヒト臍帯血細胞から GFAP 陽性の付着性細胞が作成されることが確認された。

2) 神経幹細胞の未分化維持機構とシグナル伝達に関する研究

岡野は、神経幹細胞が未分化状態で維持されるメカニズムおよび神経幹細胞から神経細胞への分化制御メカニズムが、外界からのシグナル伝達によってどのように制御されているかについて知見を深め、*in vitro* 評価用のヒト神経系細胞のソースを的確にかつ効率的に得ることを目的に、哺乳類の神経幹細胞の未分化性維持機構とシグナル伝達に関する研究を実施した。その結果、RNA 結合蛋白質 Musashi ファミリーの神経幹細胞における強い発現が Notch シグナルを増強し、神経幹細胞の未分化性維持に寄与していることを発見した。

3) マイクロアレーによる遺伝子発現情報解析と精神疾患治療の開発に関する

る研究

角田は、in vitro 評価用ヒト神経系細胞に各種薬剤を投与した後の遺伝子発現を包括的に取得するため、マイクロアレーに関する実験系、解析系、そして評価系を確立させ、薬剤の作用点や副作用機序の発見および薬剤安全性評価システムを構築すること、また将来遺伝子多型解析へ発展させることにより個別化医療を目指すことを目標に、マイクロアレー発現情報解析に関する実験および数学的解析手法を用いたシステムの開発を行った。その結果、遺伝子発現情報という切り口による薬剤作用点の発見、副作用に至るパスウェイの発見、そして薬剤安全性評価が可能になった。

4) レチノイド類の薬理作用と創薬の方向性に関する研究

伊藤は、神経系に作用する薬剤の副作用に関連する遺伝子ならびにタンパク質を同定・解析するアプローチとして、薬剤の化学構造の相違に関連した副作用関連遺伝子・タンパク質の同定を行うことを目標に、神経系に対する催奇性があるレチノイド類の合成ならびにその薬理作用の解析を行った。 β -イオノン鉄カルボニル錯体を出発物質として、9トランス-及び9シス- β -イオニリデンアセトアルデヒドをそれぞれ立体選択的に合成した。これらを用いて全トランス-レチノイン酸、11シス-レチナール、13シス-レチノイン酸エステル及び9シス-レチノイン酸をそれぞれ立体選択的に合成した。また、エノールトリプレートとスズオレフィンとのStilleカップリング反応を駆使してレチノイン酸異性体のアナログを立体選択

的に合成した。更に、新しい骨格レチノイドとして β -位置換 γ -ヒドロキシブテノライド化合物類を合成し、おのこの薬剤の薬理活性を調べた。

5) 水頭症関連疾患発症における危険因子・予防因子としての薬剤に関する研究

山崎は、薬剤と中枢神経発生異常との関連性について解析することを目標とし、今年度は中枢神経発生異常の代表である脊髄髄膜瘤の予防因子として注目されている葉酸に着目し、その遺伝学的危険因子とされている葉酸代謝酵素の一つであるMTHFR遺伝子の2つのSNP (C677TとA1298C) 異常についての検討をおこなった。脊髄髄膜瘤患者65人、母親55人、ならびに父親21人での解析ではいずれの遺伝子型の組み合わせの頻度も、対照群との有意な差はみられなかった。

D. 考察および次年度の方向性

今年度は研究開発初年度であり、まず今後3年間の研究開発の方向性と具体的なアプローチ、さらに個々の分担研究者の役割に関して明確にし、共同研究開発グループとして、有機的に連携して研究開発を実施するための体制を構築した。

研究開発に関しては、提案時に想定した研究方法をより具体的にし、1) 評価用ヒト神経系細胞の開発、2) 遺伝子およびタンパク質発現の包括的な取得・解析・評価技術の開発、3) 検討を実施する薬剤の選定、そして4) 遺伝的多型情報の差異と薬剤の副作用との関連性の解析、の4本の柱で検討を行い、今年度の

研究を実施した。

1) 評価用ヒト神経系細胞の開発

ヒト臍帯血細胞からの神経系細胞の分化誘導の可能性について検討した結果、非神経細胞であるヒト臍帯血細胞は少なくとも GFAP 陽性細胞を作成するための細胞ソースになる可能性があることが示唆された。このことは倫理性ならびに多数の異なる SNP を有する神経系細胞を実際に作成できる可能性を示唆するものとして、次年度以降の開発に大きな意味を持つ研究開発成果と考える。しかし現在の分化誘導方法では必ずしも十分なものではなく、特に神経細胞を作成するためには更なる分化誘導技術の改良が必要と考えられる。そのためにはより基礎的な研究成果を盛り込んだ形での技術改良が必要と考えられる。次年度以降は、平行して実施している神経幹細胞の未分化維持機構の解析により得られる基礎的研究の知見を組み込みながら、更なる技術の開発を実施し、*in vitro* 評価用ヒト神経系細胞の開発を継続して行う予定である。そして作成されたヒト神経系細胞が当研究開発の目的を満たす品質であるかどうかに関しての検討も開始する予定である。

2) 遺伝子およびタンパク質発現の包括的な取得・解析・評価技術の開発

今年度はマイクロアレーを用いて薬剤投与後の遺伝子発現を包括的に解析するための評価系の確立をほぼ終了した。次年度は実際にヒト神経系細胞に薬剤を投与して、遺伝子発現情報の取得を開始する予定である。タンパク質の解析に関しては、プロテインチップを用いた解析を

行うための準備を開始した。次年度以降、遺伝子発現解析を同時系列でのタンパク質発現情報の取得を開始する予定である。

3) 検討を実施する薬剤の選定

神経系に作用する薬剤のうちで本プロジェクトで検討を行う薬剤としては、①使用頻度が高い薬剤（抗けいれん薬、抗うつ薬、睡眠薬など）②長期投与を行う薬剤（特に若年者あるいは高齢者）、③神経系への催奇性を有する薬剤（レチノイン酸、葉酸代謝経路関連など）、④依存性を有する薬剤（覚せい剤など）を中心に検討を加えることとした。そして具体的なアプローチ方法としては、1. 薬理作用が判明して、すでに各種用途で販売されている薬剤の原薬（各種配合剤の混入のある市販薬ではない）を用いた解析と、2. 各種リード化合物ならびにその異性体を用いて、薬剤の化学構造の違いに基づく副作用発現メカニズムの解析、の2通りで実施することとした。この2種類のアプローチを行う目的は、現在市販されている薬剤の評価を行うことはもちろん、今後開発される新薬の開発をより効率的に行うための技術の開発を目指すためにも、すでに販売されている薬剤の原薬とリード化合物の両方を用いた解析は有用であるとの結論からである。

今年度はその中で、中枢神経系に対して催奇性を有する代表的な薬剤であるレチノイド類の薬理作用に注目し、各種レチノイド類の合成とその薬理作用についての検討を行った。次年度以降、各種レチノイド類をヒト神経系細胞に投与し、遺伝子、タンパク質発現に及ぼす影響を解析する予定である。さらに、他のリード化合物を用いた解析も平行して行い、薬剤の化学構造と副

作用関連遺伝子、タンパク質との関連性について検討を行う予定である。

4) 遺伝的多型情報の差異と薬剤の副作用との関連性の解析

遺伝的多型情報と薬剤の関連性に関しては、今年度は脊髄髄膜瘤の発症を予防する作用があると報告のある葉酸と、その代謝酵素MTHFR遺伝子のSNPとの関連性について解析を実施した。今回の検討ではMTHFR遺伝子のSNPは遺伝的危険因子とならないと結論であった。しかし、妊娠初期に葉酸を投与することで脊髄髄膜瘤の発症を有意に予防することができるとの疫学的報告は複数あり、葉酸と脊髄髄膜瘤の発症に何らかの関連性があることは十分に予想される。次年度以降は他の遺伝的多型情報の検討に加えて、遺伝的多型情報が異なる複数のヒト神経系細胞を用いてのin vitroでの解析を実施していく予定である。

E. まとめ

研究開発初年度は、今後3年間の研究開発の方向性と具体的なアプローチ、さらに個々の分担研究者の役割に関して明確にし、実際の研究開発に着手した。次年度以降、より本格的に研究開発を遂行する予定である。

ヒト臍帯血細胞からの神経系細胞への分化誘導技術の開発

主任研究者 金村米博

産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター研究員

研究要旨

一塩基多型（single nucleotide polymorphism; SNP）情報が異なる複数のヒト神経系細胞（神経細胞、グリア細胞）を用いて *in vitro* で薬剤の副作用を評価するための技術を確立することを目標にヒト臍帯血細胞からの神経系細胞への分化誘導技術の開発に着手した。ヒト臍帯血から分離した単核球を 10% FBS、 β -mercaptoethanol (0.01mM) を含む DMEM (high glucose) で培養後、1% FBS と 1×10^{-6} M の *all-trans* retinoic acid を用いて分化誘導させた。その結果、ヒト臍帯血細胞から GFAP 陽性の付着性細胞が作成されることが確認された。この結果、ヒト臍帯血は少なくとも GFAP 陽性細胞を作成するための細胞ソースになる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

ヒトに対する安全性の確立された有用な薬剤開発を行うための支援技術として、一塩基多型（single nucleotide polymorphism; SNP）情報が異なる複数のヒト神経系細胞（神経細胞、グリア細胞）を用いて *in vitro* で薬剤の副作用を評価するための技術を確立することを目標に、倫理性の確保ならび多数の SNP をカバーする神経系細胞の作成が必要であることを考慮して、同種ヒト細胞の中で臍帯血細胞に存在することが示唆されているヒト多能性幹細胞もしくはヒト神経幹細胞からの神経系細胞への分化誘導

技術の開発と作成された細胞の *in vitro* 評価用基準細胞としての有用性を評価する。

B. 研究方法

1) ヒト臍帯血細胞からの神経系細胞の作成

ヒト臍帯血より単核球を分離し、10% FBS、 β -mercaptoethanol (0.01mM) を含む DMEM (high glucose) を基本培地にして、24well プレートに 2.8×10^8 細胞/well の細胞密度にて臍帯血由来単核球を播種した。CO₂ インキュベーター（5%CO₂、37度）内で 24~72 時間培養後、基本培地を増殖因子（20ng/ml EGF, 20ng/ml FGF2, 10ng/ml

hLIF) を含み、無血清の DMEM/F-12 培地に變更した。その後さらに 7 日間培養をおこなった。

分化誘導は、分化誘導因子として 1%FBS と $1 \times 10^{-6} \text{M}$ の *all-trans* retinoic acid (ATRA) を添加した DMEM/F-12 内にて 5 日間おこなった。

2) 蛍光免疫細胞染色

細胞は、4%パラホルムアルデヒド/PBS で室温にて 20 分間固定を行った後、ブロッキングを行い、抗 tubulin β III (TuJ1) 抗体 (1:500; mouse IgG monoclonal, BAbCO, Richmond, CL, USA), 抗 GFAP 抗体 (1:80; rabbit polyclonal, Sigma) の 2 種の 1 次抗体と TO-PRO-3® iodide (1 μM , Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) を含む 10% 正常ヤギ血清 / 0.1% Triton-X / PBS を 4 度にて一晩反応させた。反応後、2 次抗体 (Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor® Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes) を室温にて 1 時間反応させた。染色後の観察は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss) を用いて実施した。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血を用いた研究計画は、ティッシュエンジニアリング研究センターならびに共同研究施設である国立大阪病院の両方の倫理委員会で審査・承認を受け、研究を実施した。ヒト臍帯血は共同研究施設である国立大阪病院において、書面を用いたインフォームドコンセントを実施して提供を受けた。提供されたヒト臍帯血は提供者の個人情報を守るため、連結不可能匿名化を行った後、研究に利用した。

C. 研究結果

臍帯血から分離した浮遊性の単核球集団の 10% FBS、 β -mercaptoethanol (0.01mM) を含む DMEM (high glucose) での培養で附着性細胞が回収された。分化誘導 2 日後、細胞は紡錘形の形態に変化した。免疫染色の結果では、GFAP 陽性の細胞が散在性に存在することが確認された (図 1)。一部の細胞は、GFAP の発現に加えて神経細胞のマーカー分子である抗 tubulin β III を共発現していた (図 1 矢印)。

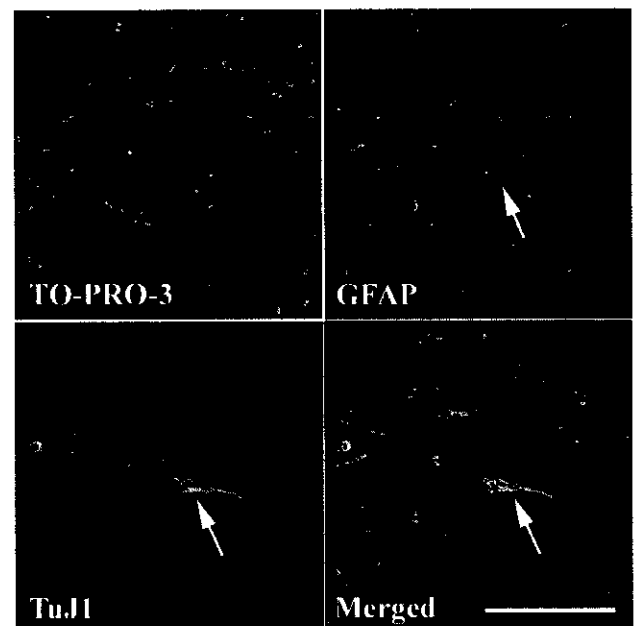


図 1 ヒト臍帯血細胞からの神経系細胞の分化誘導

D. 考察

現在まで、神経系細胞を *in vitro* で作成することができる複数の細胞源の報告が存在する (表 1)。その中でもっとも代表的な

	利点	問題点
胎児神経組織	神経幹細胞、増殖能がよい 動物実験の報告多（有効性）	倫理性、量、非自己（免疫抑制剤）
成人神経組織	神経幹細胞、自己細胞	増殖率、量、安全性（倫理性）
ES細胞	高い分化能、増殖能	倫理性、非自己（免疫抑制剤） 安全性（奇形腫形成）
骨髄細胞	自己細胞、量が確保できる	確実性、有効性
皮膚細胞	自己細胞	確実性、有効性
臍帯血細胞	量が確保できる（自己細胞）	確実性、有効性

表1 ヒト神経系細胞の作成が可能な細胞ソース

ものは胎児由来神経幹細胞とES細胞である。

この2種類の細胞から分化誘導した神経系細胞の生物学的特性に関する知見は多く、また胎児由来神経幹細胞あるいはES細胞の移植やそこから分化誘導した細胞の移植によって損傷神経の機能回復が可能であったとの報告が存在する。これら報告から、少なくとも胎児由来神経幹細胞とES細胞はin vivoで生理的な機能を有する神経系細胞を生み出す細胞ソースとして有用なものであると思われる。しかし、ヒト胎児由来神経幹細胞あるいはヒトES細胞を研究開発用細胞として広く一般的に利用することには倫理的な議論が存在し、国内ではコンセンサスはまだ十分には得られていない。また、倫理性が高い細胞ゆえに多数のロットを樹立することは困難であり、SNPの異なる神経系細胞のバリエーションを作成することは実質的には不可能である。そのような中で、非神経細胞である臍帯血からin

vitro 評価用基準細胞としての神経系細胞が作成できれば、その有用度は大きい。

今回の検討では、ヒト臍帯血から少なくともGFAP陽性のグリア用細胞が作成できることが確認された。また、一部のGFAP陽性細胞は神経細胞のマーカーであるTuJ1も同時に発現していることが確認された。このことは、ヒト臍帯血は少なくともGFAP陽性グリア様細胞の供給源となりうる可能性を有するものと思われる。

GFAP陽性のグリア細胞の代表はアストロサイトである。アストロサイトは中枢神経系内でシナプスやニューロンの表面を覆ったり、血管内皮細胞と脳血管関門

(blood-brain barrier)を形成するなど、中枢神経内での物質輸送において重要な役割を担っていることが予想される。神経細胞同様、様々な神経伝達物質のレセプターやグルタミン酸トランスポーター、セロトニントランスポーターなどを発現しているとの報告があり、中枢神経系に作用する薬剤の

薬理作用の発現に重要な役割を担っていると考えられる。今回のデータは、少なくとも非神経細胞であるヒト臍帯血細胞から、GFAP 陽性細胞を作成し、その細胞における薬剤反応性を検討する実験系の構築に可能性をもたらすものと考えられる。今後、神経組織由来の GFAP 陽性細胞との生物学的特性の類似点、相違点を明確にし、ヒト神経系細胞の *in vitro* 評価用基準細胞としての有用性を検証していく必要があると考えられる。

E. 結論

ヒト臍帯血細胞から GFAP 陽性グリア用細胞が作成可能であることが判明した。

GFAP 陽性アストロサイトは中枢神経系の薬剤の薬理作用の発揮に重要な役割を担っていると考えられ、その *in vitro* 評価用基準細胞として臍帯血由来 GFAP 陽性細胞が使用できる可能性があることを示唆するデータと考えられる。

今後、神経組織由来の GFAP 陽性細胞との生物学的特性の類似点、相違点を明確にし、その有用性を検証していく必要性があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, Suzuki A, Yamasaki M, and Okano H. Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor

cells and radial fibers during human fetal brain development. Lab Invest. In press.

- 2) Kanemura Y, Mori H, Kobayashi K, Islam O, Kodama E, Yamamoto A, Nakanishi Y, Arita N, Yamasaki M, Okano H, Hara H, and Miyake J. Evaluation of *in vitro* proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. J Neurosci Res. 69, 869-879, 2002
- 3) Mori K, Kanemura Y, Fujikawa H, Nakano A, Ikemoto H, Ozaki I, Matsumoto T, Tamura K, Yokota M and Arita N. Brain-specific angiogenesis inhibitor 1(BAI1) is expressed in human cerebral neuronal cells. Neurosci Res 43, 69-74, 2002
- 4) Kanemura Y, Sakakibara S and Okano H. Identification of Musashi1-positive cells in human normal and neoplastic neuroepithelial tissues by immunohistochemical methods. Methods Mol Biol. 198, *Neural Stem Cells: Methods and Protocol*. Edited Zigova T, Sanberg PR and Sanchez-Ramos JR. pp273-281, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002
- 5) 金村米博, 原正之, 三宅淳. 細胞工学の産業への応用、化学便覧 応用化学編 第6版 (日本化学会編, 丸善出版事業部, 印刷中
- 6) 金村米博, 三宅淳. 再生医学におけるトランスレーショナルリサーチ: 総論. 分子心血管病, 4, 34-40, 2003
- 7) 金村米博, 三宅淳. 神経の再生, THE BONE, 17, 67-71, 2003
- 8) 金村米博, 山崎麻美. ヒト神経幹細胞、

医学の歩み 201, 307-312, 2002

9) 金村米博, 原正之, 岡野栄之. 神経幹細胞とその医用応用, 生体材料 20, 91-97, 2002

2. 学会発表
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
現時点では予定なし
2. 実用新案登録
現時点では予定なし
3. その他
なし

神経幹細胞の未分化維持機構とシグナル伝達に関する研究

分担研究者 岡野 栄之
慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨

哺乳類の神経幹細胞の未分化性維持機構は、神経幹細胞が受ける外的シグナルに強く制御されていると考えられており、Notch シグナル、Wnt シグナル、gp130 シグナルなどが挙げられる。本研究では、神経幹細胞における Notch シグナルを修飾する内在的因子群について解析を行っているが、RNA 結合蛋白質 Musashi ファミリーの強い発現が Notch シグナルを増強し、神経幹細胞の未分化性維持に寄与していることを発見した。

A. 研究目的

神経幹細胞が未分化状態で維持されるメカニズム、神経細胞への分化制御メカニズムが、外界からのシグナル伝達によってどのように制御されているかについて知見を深め、移植療法などの再生医療への細胞ソースを的確にかつ効率的に得ることを目的としている。

および Notch シグナルの活性に Msi1 がどのような効果を及ぼすかを培養細胞系で検討した。また、*msi1* 遺伝子欠損マウスの神経幹細胞の培養細胞系を用いて、*msi2* の発現を抑制するアンチセンス核酸アナログを添加し、*msi1*, *msi2* 両遺伝子が欠損している神経幹細胞の性質をニューロスフェア法によって調べた。

B. 研究方法

神経幹細胞で強く発現する Musashi1 (Msi1), Musashi2 (Msi2) 蛋白質の機能を調べるために生化学的手法により両蛋白質の標的遺伝子の同定を行った。標的遺伝子が Notch シグナルの阻害因子である *m-numb* であったことから、*m-numb* の発現

C. 研究結果

1) RNA 結合蛋白質である Msi1 は、その標的である *m-Numb* mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、その発現を転写後レベルで調節していることが明らかになった。Msi1 の過剰発現は、*HES1* プロモーターの転写活性で示される Notch シグナル活性の増強を引

き起こした。

2) 胎児期のマウス線条体から採取した神経幹細胞は、EGF・bFGF 存在下で培養すると分裂をくり返して細胞塊(ニューロスフェア)を形成する。*msi1* 遺伝子欠損マウスにおいてはこのニューロスフェア形成能に異常は認められないが、*msi1* 遺伝子欠損マウスの神経幹細胞に対して *msi2* の発現を阻害するアンチセンス核酸アナログを導入したところ、Neurosphere 形成能が著しく低下した。

D. 考察

Musashi1 は、神経幹細胞の未分化状態および増殖活性を促進する Notch シグナルの阻害因子 m-Numb の mRNA に結合して、翻訳レベルで発現を抑制していると考えられる。その結果、Notch シグナルを正に制御している働きを有するものと考えられる。アンチセンス核酸アナログの導入によるもたらされた Musashi 遺伝子の欠損は、ニューロスフェア形成能の低下を引き起こしているが、これはすなわち、神経幹細胞の増殖能が低下していることを意味すると考えられる。

E. 結論

msi1, *msi2* 両遺伝子は、Notch シグナルを正に制御している働きを有するものと考えられ、神経幹細胞の自己増殖活性・多分化能といった未分化性の維持に寄与しているものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1 論文発表
- 1) Takasawa K-I, Kitagawa K, Yagita Y, Sasaki T, Tanaka S, Ohtsuki T, Miyata T, Okano H, Hori M, and Matsumoto M. Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab 22, 299-307, 2002
- 2) Iwai Y, Hirota Y, Ozaki K, Okano H, Takeichi M, and Uemura T. DN-cadherin-dependent synaptogenesis in the Drosophila visual system. Mol Cell Neurosci 19, 375-388, 2002
- 3) Shibata M, Yamawaki T, Sasaki T, Hattori H, Hamada J, Fukuuchi Y, Okano H, and Miura M. Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice. Brain Res 942, 1-10, 2002
- 4) Shu H-J, Saito T, Watanabe H, Ito J-I, Takeda H, Okano H, and Kawata S. Expression of the Musashi1 gene encoding the RNA-binding protein in human hepatoma cell lines. Biochem Biophys Res Com 293, 150-154, 2002
- 5) Cuadrado A, Garcia-Fernandez LF, Imai T, Okano H, and Munoz A. Neural RNA-binding protein Musashi-1 modulates

- tau pre-mRNA alternative splicing and is regulated by thyroid hormone in the developing rat brain. *Mol Cell Neurosci* 20, 198-210, 2002
- 6) Shamloula HK, Mbogho MP, Pimentel AC, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Hyatt V, Okano H, and Venkatech TR. *rugose (rg)*, a *Drosophila* A kinase Anchor Protein (DAKAP), is required for required for retinal pattern formation and interacts genetically with multiple signaling pathways. *Genetics* 161, 693-710, 2002
 - 7) Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, Miyata T, Okano H, Hori T, and Matsumoto M. *Musashi1* and *Nestin* as useful markers of neuronal progenitor cells in rat hippocampus after forebrain ischemia. *J Neurosci Res* 69, 750-756, 2002
 - 8) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Toyama Y, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, and Okano H. Transplantation of *in vitro* expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 69, 925-933, 2002
 - 9) Murayama A, Matsuzaki Y, Kawaguti A, Shimazaki T, and Okano H. Flow cytometric analysis of stem cells in the developing and adult mouse brain. *J Neurosci Res* 69, 837-847, 2002
 - 10) Johansson CB, Lothian C, Molin M, Okano H, and Lendahl U. *Nestin* enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS. *J Neurosci Res* 69, 784-794, 2002
 - 11) Kanemura Y, Mori H, Kobayashi K, Islam O, Kodama E, Yamamoto A, Nakanishi Y, Arita N, Yamasaki M, Okano H, Hara H, and Miyake J. Evaluation of *in vitro* proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res* 69, 869-879, 2002
 - 12) Kuranaga E, Kanuka H, Igaki T, Sawamoto K, Ichijo H, Okano H, and Miura M. Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 4, 705-710, 2002
 - 13) Sakakibara S, Nakamura Y, Koike M, Takano H, Uchiyama Y, Noda T, and Okano H. RNA-Binding Protein *Musashi* Family, Roles for CNS Stem Cells and a Subpopulation of Ependymal Cells Revealed by Targeted Disruption and Antisense Ablation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15194-15199, 2002
 - 14) Hirota Y, Sawamoto K, and Okano H. *Tncar* encodes a novel transmembrane protein expressed in the *Tinman*-expressing cardioblasts of *Drosophila*. *Gene Expression Patterns* 2, 323-327, 2002
 - 15) Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D,

- Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke G, Sakakibara S, and Okano H. Identification of a putative intestinal stem cell marker and early lineage marker; Musashi1. *Differentiation* 71, 28-41, 2003
- 16) Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, and Chiba T. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* 535, 131-135, 2003
- 17) Tonchev AB, Zhao L, Yamashima T, and Okano H. Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of adult primates. *Glia*, in press
- 18) Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, and Okano H. Increased proliferation of neural progenitors and neurogenesis in the postischemic brain of young adult primates. *Mol Cell Neurosci*, in press
- 19) Kuo H-C, Pau FKY, Yeoman RR, Mitalipov SM, Okano H, and Wolf DP. Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages. *Biol Reprod*, in press
- 20) Sasaki T, Kitagawa K, Sugimura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Yagita Y, Okano H, Matsumoto M, and Hori M. Implication of Cyclooxygenase-2 on enhanced neurogenesis in the adult hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res*, in press
- 21) Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, Suzuki A, Yamasaki M, and Okano H. Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Invest*, in Press
- 22) Uchida K, Okano H, Hayashi T, Mine Y, Tanioka Y, Nomura T, and Kawase T. Swine neuroepithelial stem cell-derived neurons can form synapses with xenogeneic Parkinsonian brain. *J Neurosci Res*, in Press
- 23) Okano H, Yoshizaki T, Shimazaki T and Sawamoto K. Isolation and transplantation of Dopaminergic Neurons and Neural Stem Cells. *Parkinson & Related Disorders* 9, 23-28, 2002
- 24) Okano H, Imai T and Okabe M. Musashi: a translational regulator of cell fates. *J Cell Sci* 115, 1355-1359, 2002
- 25) Okano H. The stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 69, 698-707, 2002
- 26) Okano H. Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J Med* 51, 115-128, 2002
- 27) Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S, Iwanami A, Toyama A. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Seminar in Cell &*

Developmental Biol in press

- 28) Sawamoto K and Okano H. Direct isolation of mesencephalic precursor cells and dopaminergic neurons. in "Recent Res. Devel. Mol. Cell Biol.", eds. Calne, DB and Mizuno, Y, pp 243-253, 2002, Research Signpost, India

2 学会発表

- 1) Okano H. The stem cell biology of CNS. Nobel Conference "Stem Cell Biology" June 3, 2002, Karolinska, Sweden
- 2) Okano H. Stem Cell Biology and Regeneratio of the Central Nervous System. Pharmacologicals Research Scientific Symposium "Private Functional Genomic Research: From Science to Medicine" November 25, 2002, Singapore

他 多数

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

マイクロアレーによる遺伝子発現情報解析と精神疾患治療の

開発に関する研究

分担研究者 角田 達彦

理化学研究所遺伝子多型研究センター チームリーダー

研究要旨

マイクロアレー発現情報解析に関する実験および数学的解析手法を用いたシステムの確立により、発現情報という切り口による、薬剤作用点の発見、副作用に至るパスウェイの発見、そして薬剤安全性評価が可能になった。

A. 研究目的

マイクロアレーに関する実験系、解析系、そして評価系を確立することにより、薬剤の作用点や副作用機序の発見および薬剤安全性評価システムを構築すること。また将来遺伝子多型解析へ発展させることにより、個別化医療を目指すこと。

って、発現が有意に上昇・下降する遺伝子を検出する。それらの遺伝子の機能をアッセイし解析することにより、薬剤の作用点や副作用点へのパスウェイを発見する。また検出された複数の遺伝子をマーカーとして扱うことにより、患者ごとに薬効や副作用を判定する個別化医療のシステムを構築する。

B. 研究方法

ヒト細胞培養系への薬剤投与・非投与別の並行時系列系の各サンプルから mRNA を抽出、増幅し、ヒトの遺伝子をのせたマイクロアレー実験系を適用する。そして得られた発現量の数値データを正規化することによって実験条件依存性を除く。複数のサンプルあるいは時系列点でのデータを統計的に解析することによ

C. 研究結果

まず、ヒト細胞サンプルからの mRNA 抽出、増幅、マイクロアレーへのハイブリダイゼーションまでの実験系を確立した。次に、発現キーピング遺伝子および全遺伝子による正規化、permutation 検定によるサンプル間の共通上昇・下降遺伝子の同定、そして Mann-Whitney 検定および permutation 検定によるサンプル群間で

発現に違いが有意に見られる遺伝子の同定を行う一連の方法を確立した。これらの系をまずヒト正常細胞および各種癌細胞その他の病理細胞に適用し、実験による検証を行うことによって、方法の正当性を検証した。

D. 考察

各種検定には万能というものはなく、状況に応じてより適切なものとそうでないものがあるため、一つの方法のみで結果を出すよりは、各種検定を組み合わせ絞り込む方が、誤りが少ないことがわかった。検定に際してはサンプル数が多いことが条件になるが、サンプル数が1の場合にはサンプル内の全遺伝子の分布を指標にして実験で検証するという方法をとらざるを得ない。また時系列のデータの解析には、生物学的な解釈を入れない場合には複数サンプルとして扱わざるを得ないが、生物学的解釈を行い、時系列の評価を行うシステムを確立することが妥当であろう。これができれば世界の先駆けとなる。また研究対象であるが、当分担研究者は精神薬の安全性評価システムの構築を目指しているが、神経系細胞は作動性に留意する必要がある。例えば社会的重要性のために第一に希望しているうつ薬のSSRIの場合、セロトニン作動性であるために、セロトニン作動性をもつ神経細胞培養系の樹立を提案する。その他研究を希望する統合失調病薬などはドーパミン作動性などが多く、それらの神経系の樹立は確認されている。最後に将来の遺伝子多型の解析に関しては、今回のマイクロアレーやプロテインチップ

による研究によって重要な遺伝子を絞込み、それらの遺伝子の周辺のSNPを調べるのが今回のような系では現実的であろうという提案を行った。

E. 結論

ヒトの遺伝子を扱うマイクロアレー実験系および発現情報解析系は数年前から技術の蓄積が見られ、重要な遺伝子の発見に多大な貢献をしてきた。今回の報告にもあるように、伝統的な統計的手法に加え、最新の解析方法が合わせて用いられている。薬剤安全性評価に関し遺伝子発現情報の解析という意味では、基本的な技術は揃ったところである。しかし時系列のデータなどをより適切に扱うには、より発展した方法が求められている。またタンパクレベルとの関係や、全体のシステムとしてのデザインはサンプルに関する現実的な問題を踏まえ、解決していきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Ozaki, Y. Ohnishi, A. Iida, A. Sekine, R. Yamada, T. Tsunoda, H. Sato, H. Sato, M. Hori, Y. Nakamura, and T. Tanaka. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature Genetics* 32,

- 650-654, 2002
- 2) S. Abe, T. Katagiri, A. Saito-Hisaminato, S. Usami, Y. Inoue, T. Tsunoda, and Y. Nakamura. Identification of CRYM as a candidate responsible for non-syndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *American Journal of Human Genetics* 72, 73-82, 2002
 - 3) S. Hasegawa, Y. Furukawa, M. Li, S. Satoh, T. Kato, T. Watanabe, T. Katagiri, T. Tsunoda, Y. Yamaoka, and Y. Nakamura. Genome-Wide Analysis of Gene Expression in Intestinal-Type Gastric Cancers Using a Complementary DNA Microarray Representing 23,040 Genes. *Cancer Research* 62, 7012-7017, 2002
 - 4) J. Okutsu, T. Tsunoda, Y. Kaneta, T. Katagiri, O. Kitahara, H. Zembutsu, R. Yanagawa, S. Miyawaki, K. Kuriyama, N. Kubota, Y. Kimura, K. Kubo, F. Yagasaki, T. Higa, H. Taguchi, T. Tobita, H. Akiyama, A. Takeshita, Y. Wang, T. Motoji, R. Ohno, and Y. Nakamura. Prediction of Chemosensitivity for Patients with Acute Myeloid Leukemia, According to Expression Levels of 28 Genes Selected by Genome-wide Complementary DNA Microarray Analysis. *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 1035-1042, 2002
 - 5) S. Nagayama, T. Katagiri, T. Tsunoda, T. Hosaka, Y. Nakashima, N. Araki, K. Kusazaki, T. Nakayama, T. Tsuboyama, T. Nakamura, M. Imamura, Y. Nakamura, and J. Toguchida. Genome-wide Analysis of Gene Expression in Synovial Sarcomas Using a cDNA Microarray. *Cancer Research* 62, 5859-5866, 2002
 - 6) F. Akiyama, T. Tanaka, R. Yamada, Y. Ohnishi, T. Tsunoda, S. Maeda, T. Takei, W. Obara, K. Ito, K. Honda, K. Uchida, K. Tsuchiya, K. Nitta, W. Yumura, H. Nihei, T. Ujiie, Y. Nagane, S. Miyano, Y. Suzuki, T. Fujioka, I. Narita, F. Gejyo, and Y. Nakamura. Single-nucleotide polymorphisms in the class II region of the major histocompatibility complex in Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *Journal of Human Genetics* 47, 532-538, 2002
 - 7) H. Ishiguro, T. Shimokawa, T. Tsunoda, T. Tanaka, Y. Fujii, Y. Nakamura, and Y. Furukawa. Isolation of HELAD1, a novel human helicase gene up-regulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 21, 6387-6394, 2002
 - 8) Y. Kaneta, Y. Kagami, T. Katagiri, T. Tsunoda, I. Jin-nai, H. Taguchi, H. Hirai, K. Ohnishi, T. Ueda, N. Emi, A. Tomida, T. Tsuruo, Y. Nakamura, and R. Ohno. Prediction of Sensitivity to STI571 among Chronic Myeloid Leukemia Patients by Genome-wide cDNA Microarray Analysis. *Jpn J Cancer Res* 93, 849-856, 2002
 - 9) M. Nishiu, R. Yanagawa, S. Nakatsuka, M. Yao, T. Tsunoda, Y. Nakamura, and K. Aozasa. Microarray Analysis of Gene-expression Profiles in Diffuse Large B-cell Lymphoma: Identification of Genes Related to Disease Progression. *Jpn J Cancer Res* 93, 894-901, 2002