

- 10) M. Takahashi, T. Tsunoda, M. Seiki, Y. Nakamura, and Y. Furukawa. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* 21, 5861-5867, 2002
- 11) C. Kitahara, T. Katagiri, T. Tsunoda, Y. Harima, and Y. Nakamura. Classification of Sensitivity or Resistance of Cervical Cancers to Ionizing Radiation According to Expression Profiles of 62 Genes Selected by cDNA Microarray Analysis. *Neoplasia* 4, 295-303, 2002
- 12) Y-M. Lin, Y. Furukawa, T. Tsunoda, C-T. Yue, K-C. Yang, and Y. Nakamura. Molecular Diagnosis of Colorectal Tumors by Expression Profiles of 50 Genes Expressed Differentially in Adenomas and Carcinomas. *Oncogene* 21, 4120-4128, 2002
- 13) M. Iizaka, Y. Furukawa, T. Tsunoda, H. Akashi, M. Ogawa, and Y. Nakamura. Expression Profile Analysis of Colon Cancer Cells in Response to Sulindac or Aspirin. *Bioc Biop Res Comm* 292, 498-512, 2002
- 14) A. Saito-Hisaminato, T. Katagiri, S. Kakiuchi, T. Nakamura, T. Tsunoda, and Y. Nakamura. Genome-Wide Profiling of Gene Expression in 29 Normal Human Tissues with a cDNA Microarray. *DNA Research* 9, 35-45, 2002
- 15) M. Nakamura, T. Tsunoda, and J. Obokata. Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responses light through an initiator. *The Plant Journal* 29, 1-10, 2002
- 16) T. Takei, A. Iida, K. Nitta, T. Tanaka, Y. Ohnishi, R. Yamada, S. Maeda, T. Tsunoda, S. Takeoka, K. Ito, K. Honda, K. Uchida, K. Tsuchiya, Y. Suzuki, T. Fujioka, T. Ujiie, Y. Nagane, S. Miyano, I. Narita, F. Gejyo, H. Nihei, and Y. Nakamura. Association between single-nucleotide polymorphisms in selectin genes and IgA nephropathy. *American Journal of Human Genetics* 70, 781-786, 2002
- 17) S. Dan, T. Tsunoda, O. Kitahara, R. Yanagawa, H. Zembutsu, T. Katagiri, K. Yamazaki, Y. Nakamura, and T. Yamori. An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Research* 62, 1139-1147, 2002
- 18) H. Zembutsu, Y. Ohnishi, T. Tsunoda, Y. Furukawa, T. Katagiri, Y. Ueyama, N. Tamaoki, T. Nomura, O. Kitahara, R. Yanagawa, K. Hirata, and Y. Nakamura. Genome-wide cDNA Microarray Screening to Correlate Gene Expression Profiles with Sensitivity of 85 Human Cancer Xenografts to Anticancer Drugs. *Cancer Research* 62, 518-527, 2002

## 2. 学会発表

特になし

## Ⅱ. 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

## レチノイド類の薬理作用と創薬の方向に関する研究

分担研究者 伊藤 允好  
神戸薬科大学薬学部機器分析学研究室 教授

### 研究要旨

研究目的達成のための薬剤（化合物）を調製するために、以下の合成を達成した。β-イオ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-レチノール、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、エノールトリフ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、その薬理活性を調べた。

### A. 研究目的

薬剤作用、副作用発現メカニズムに関連する遺伝子・蛋白質解析—薬剤の構造の違いに基づく副作用発現メカニズムの解析—

### B. 研究方法

神経系への催奇性を有する薬剤であるレチノイン酸アナログ（レチノイド）の合成方法を開発し、それを利用して種々のレチノイドを合成する。

### C. 研究結果

ビタミン A（レチノール）は、これまで哺乳動物の正常な成長や生命の維持に必須

の微量栄養因子と理解されてきたが、そのような作用を発揮する本体は主にレチノイン酸であることが判明してきた。レチノイン酸には二重結合による異性体が存在するが、全トランス-レチノイン酸と9シス-レチノイン酸が核内レセプターであるレチノイン酸レセプター（RAR）とレチノイド Xレセプター（RXR）のそれぞれのシグナル分子（リガンド）として、遺伝子発現転写制御作用に重要な役割を担っており、RAR 及び RXR は細胞の増殖、分化及び胚の発生等に寄与していることが判明してきた。そして、白血病細胞における生物学的反応から RAR 系が活性化されると細胞増殖や分化に変化が起こり、RXR 系が活性化されるとアポトーシスが誘導されることが明らかになってきた。その結果、RXR に特異的に結合

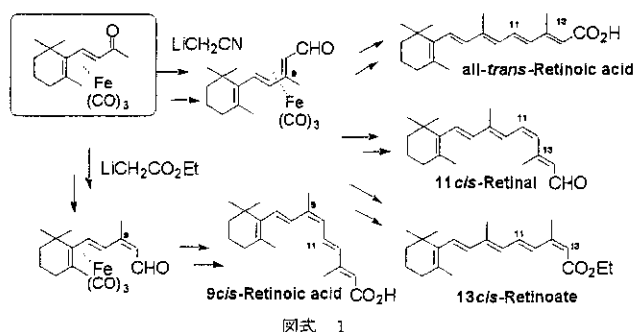
するリガンドがいくつか合成されそのうちの1つを用いた実験結果から、RXRに特異的に結合する化合物は発がん予防に応用できるのではないかという考え方が起こっている。現在、全トランス-レチノイン酸が前骨髄球性急性白血病の治療に用いられているが副作用である催奇性が問題になっている。

我々は、次の2つの方法でレチノイドの立体異性体を選択的に合成するルートを開発した。

### 1) 鉄カルボニル錯体を用いるレチノイドの立体選択的合成 (図式1)

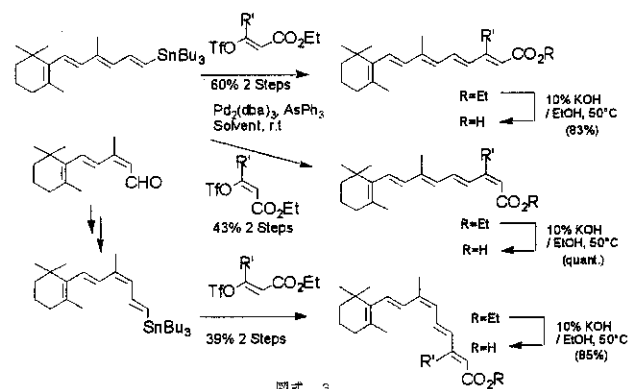
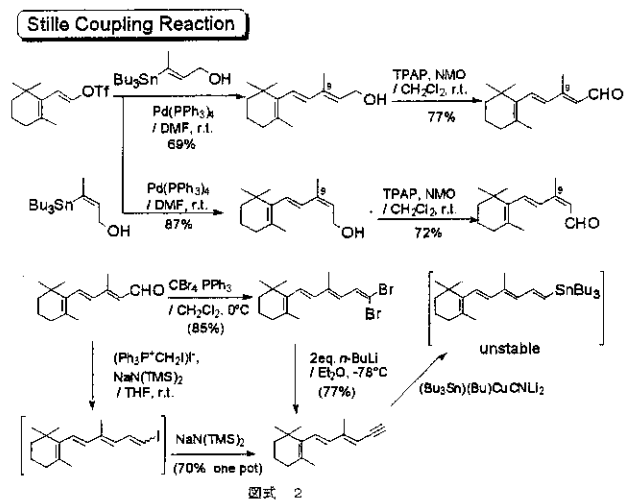
$\beta$ -イオン鉄カルボニル錯体を出発物質としてアセトニトリルのリチウム塩を反応させた後、官能基変換をして、9トランス- $\beta$ -イオニリデンアセトアルデヒドを高収率で合成した。これを用いて全トランス-レチノイン酸、11シス-レチナール、13シス-レチノイン酸エステル等を立体選択的に合成した。また、 $\beta$ -イオン鉄カルボニル錯体と酢酸エステルのリチウム塩との反応後、脱水反応と官能基変換により9シス- $\beta$ -イオニリデンアセトアルデヒドを優先的に得、これを用いて9シス-レチノイン酸を立体選択的に合成した。

#### 鉄カルボニル錯体を利用したレチノイドの立体選択的合成

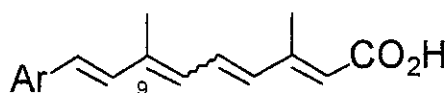
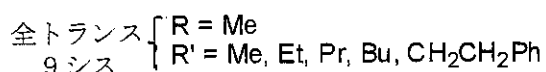
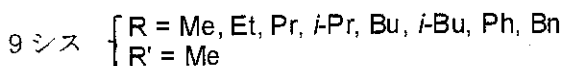
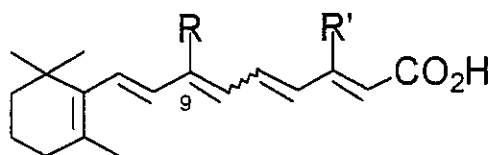


### 2) Stille カップリング反応を用いたレチノイドの立体選択的合成 (図式2, 3)

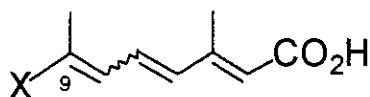
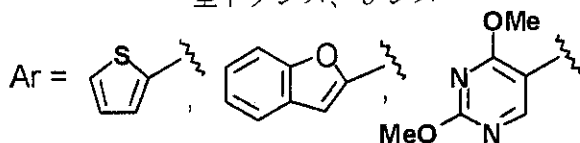
図式2及び3に示すようにエノールトリプレートとスズオレフィンとのカップリング反応を駆使してレチノイン酸異性体のアナログを立体選択的に合成した。



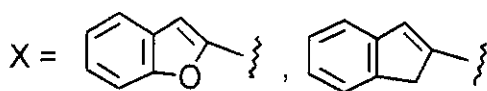
3) 1 及び 2 の方法で合成したレチノイン酸アナログ



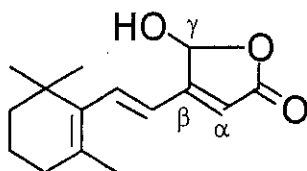
全トランス、9 シス



全トランス、9 シス

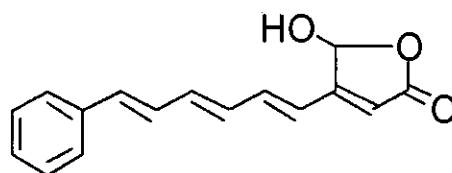


4) 新しいレチノイド・β-位置換 γ-ヒドロキシブテノライドとその薬理活性



上記ブテノライドはマウス神経芽腫瘍細胞及びラット神経膠腫 C6BU-1 細胞への殺細胞効果がレチノイン酸の 50-90 倍であることが判明した。

ヒト神経芽細胞種 GOTO 細胞の増殖阻害活性を示すことが明らかとなり下記ヒドロキシブテノライド誘導体が更に HGC-27 (ヒト胃がん由来の細胞株)、HeLa 細胞 (ヒト子宮頸部がん由来の細胞株) 及び COLO320DM (ヒト大腸がん由来の細胞株) 等の腫瘍細胞でも増殖阻害を示した。



そして、HeLa 細胞に対する活性は共役二重結合が 4 つのものが最大で、また、発がんプロモーション過程も抑制した。

#### D. 考察

全トランス-レチノイン酸と 9 シス-レチノイン酸の構造修飾を六員環部周辺を重点的に行い、RAR 及び RXR に対する特異的結合を示すものの開発を目指すと共に合成した化合物を用いてレチノイン酸の催奇形性発症メカニズム解明に向けて研究を進める予定である。

#### E. 結論

我々の合成方法が最近のレチノイド化学のブレイクスルーになっているので、このオリジナリティーを活かした新しいレチノイドのドラッグデザインを目標としたい。

## F. 健康危惧情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tode C., Yamano Y., and Ito M.  
Carotenoids and related polyenes. Part 8.  
Total synthesis of optically active  
mytiloxanthin applying the stereoselective  
rearrangement of tetrasubstituted epoxide. J.  
Chem. Soc., Perkin Trans. 1 13, 1581-1587,  
2002
- 2) Wada A., Ieki Y., and Ito M. Palladium  
Catalyzed Coupling Reaction of an Enol  
Nonafate with (Vinyl)tributylstannanes and  
Acetylenes. Synlett 7, 1061-1064, 2002
- 3) Yamano Y., Sakai Y., Hara M., and Ito M.  
Carotenoids and related polyenes. Part 9.  
Total synthesis of thermozeaxanthin and  
thermocryptoxanthin and the stabilizing  
effect of thermozeaxanthin on liposomes. J.  
Chem. Soc., Perkin Trans. 1 17, 2006-2013,  
2002
- 4) Suzuki M., Matsumoto S., Mizoguchi M,  
Hirata S., Takagi K., Hashimoto I., Yamano  
Y., and Ito M., Fleischmann P., Winterhalter  
P., Morita T., Watanabe N. Identification of  
(3*R*,9*R*)- and (3*R*,9*S*)-Megastigma-6,  
7-dien-3,5,9-triol 9-*O*-β-D-  
glucopyranosides as Damascenone  
Progenitors in the Flowers of *Rosa*  
*damascena* Mill. Biosci. Biotechnol.  
Biochem. 12, 2692-2697, 2002
- 5) Yamano Y., Watanabe Y., Watanabe N., and  
Ito M. Stereocontrolled Synthesis of

Glucosidic Damascenone Precursors. J.  
Chem. Soc., Perkin Trans. 1 24, 2833-2844.  
2002.

### 2. 学会発表

- 1) 和田昭盛, 福永康城, 伊藤允好, 上西  
潤一「13 位置換 11 シス-レチナール類  
の合成研究」日本ビタミン学会第 54 回  
大会 (2002. 4.25-26 東京).
- 2) 和田昭盛, 福永康城, 伊藤允好, 上西  
潤一「13 位置換 11*Z*-レチノイド類の  
立体選択的合成」第 16 回カロテノイド  
研究談話会 (2002. 9. 14 宮崎).
- 3) 山野由美子, 清水祐香, 伊藤允好 「C<sub>13</sub>-  
ノルイソプレノイドグルコシドの合成  
研究 その 2 -光学活性 3-ヒドロキシ-  
7,8-ジヒドロ-β-イオノールグルコ  
シドの立体選択的合成」第 16 回カロテ  
ノイド研究談話会 (2002. 9. 14 宮崎).
- 4) 平田 怜, 鈴木壯幸, 北山恵美子, 山  
野由美子, 伊藤允好, 渡邊修治 「緑  
茶熱水抽出物に含まれる damascenone  
香気前駆体の同定」日本農芸化学会中  
部支部第 136 回例会 (2002. 9. 28 名古屋).
- 5) 山野由美子, 清水祐香, 伊藤允好 「光  
学活性 3-ヒドロキシ-7,8-ジヒドロ-β-  
イオノールグルコシドの立体選択的合  
成」第 52 回日本薬学会近畿支部大会  
(2002. 10. 19 東大阪).
- 6) 和田昭盛, 中村佐栄子, 伊藤允好 「エ  
ノールノナフレートのカップリング反  
応を利用した 8,18-<sup>13</sup>C-二重ラベルレ  
チナールの合成」第 28 回反応と合成の  
進歩シンポジウム (2002. 11. 5 多摩).
- 7) 和田昭盛, 中村佐栄子, 石田晃史, 伊  
藤允好 「all-*E* および 9*Z*-デメチルレ

チノイン酸類の合成」日本レチノイド  
研究会第13回学術集会（2002.11.14  
東京）.

## 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

## 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

分担研究者 山崎 麻美  
国立大阪病院脳神経外科 医長

### 研究要旨

水頭症関連疾患とは単純性水頭症(中脳水道狭窄症)・脊髄髄膜瘤に伴う水頭症・Dandy Walker 症候群に伴う水頭症・全前脳胞症・X連鎖性遺伝性水頭症などに分けられ、その発生機序に関する研究の中で、危険因子・予防因子としていくつかの薬剤や物質が注目されている。そこで私たちはその中で最近、脊髄髄膜瘤の予防因子として注目されている葉酸について、その遺伝学的危険因子とされている葉酸代謝酵素のひとつである MTHFR 遺伝子の 2 つの SNP ( C677T と A1298C ) 異常について本邦ではじめ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 人を疾患群とした。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。しかし妊娠初期に葉酸を投与すると脊髄髄膜瘤の発症が優位に低下することはすでに実証されており、今後、脊髄髄膜瘤の発症との関連性が示唆されている薬剤と共に、その分子メカニズムに関して神経幹細胞を用いた in vitro での評価を実施していく予定である。

### A. はじめに

水頭症関連疾患は中枢神経系発生異常の中で臨床的意義の高い疾患である。水頭症関連疾患とは単純性水頭症(中脳水道狭窄症)・脊髄髄膜瘤に伴う水頭症・Dandy Walker 症候群に伴う水頭症・全前脳胞症・X連鎖性遺伝性水頭症などに分けられ、その発生機序に関する研究の中で、危険因子・予防因子としていくつかの薬剤や物質が注目されている。危険因子としては脊髄髄膜瘤における抗癌薬であるバルプロ酸ナトリウ

ム、全前脳胞症における抗コレステロール剤と、X連鎖性遺伝性水頭症におけるアルコールなどがあげられる。また予防因子としては葉酸があるが、今回は最近脊髄髄膜瘤の発症率の低減効果が認められている葉酸に注目した。

### B. 研究目的

1990 年代に欧米や中国から妊娠初期の妊婦への葉酸投与が脊髄髄膜瘤の発生率を有意に低下させるという疫学調査の結果が報



告された<sup>1-3)</sup>。その後その分子遺伝学的メカニズムに関しては葉酸代謝経路に関与する代謝酵素、5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (以下、MTHFR) 遺伝子の single nucleotide polymorphism (以下、SNP)の異常 (C677T と A1298C) に注目された。各国からその解析に関する報告が相次いだ。結果は人種・地域で異なり一致した結果には至っていない。そこで私たちは本邦における脊髄髄膜瘤患者およびその家族における MTHFR 遺伝子のこの2つの SNP の解析を行い、脊髄髄膜瘤発症との関連性について検証した。

### C. 研究方法

本遺伝子解析は、特定疾患対策研究事業 難治性先天性水頭症研究班と共同で実施した。難治性水頭症研究班により設置された先天性水頭症遺伝子バンク<sup>4)</sup> (国立大阪病院臨床研究部)に集積された、脊髄髄膜瘤患者 65 人 (年齢は0歳から15歳)、その母親 55 人、ならびに父親 21 人を対象とし疾患群とした。対照群は健常者 52 人を対象群とした。

末梢血を採取し、末梢血単核球より genomic DNA を抽出した。100ng の genomic DNA をテンプレートにして、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて MTHFR 遺伝子 C677T 領域 (198bp) ならびに A1298C 領域 (163bp) を含む断片をそれぞれ増幅した。電気泳動後、目的の PCR 産物をアガロースゲルより回収・精製し、それぞれの SNP のタイピングを行った。MTHFR 遺伝子 C677T のタイピングは、PCR 増幅した断片を制限酵素 (Hinf I) 処理し、その処理後の断片長のパターンに基き判定した。さらに一部サ

ンプルに関しては、アガロースゲルより回収・精製した PCR 産物をテンプレートにして、PCR ダイレクトシーケンス法で塩基配列の解析を行った。A1298C の解析に関しては、すべて PCR 産物をテンプレートにして、PCR ダイレクトシーケンス法で実施した。シーケンス反応は、ダイターミネーター法による蛍光シーケンス法にて行い、その後、キャピラリー型シーケンサー (ABI genetic analyzer 310) を用いて解析を実施した<sup>5)</sup>。得られた結果は、患者-対照関連解析の手法を用いて分析し、統計学的な検定にはカイ 2 乗検定を用いた。

(倫理面に対する配慮)

研究に先立ち、国立大阪病院医学倫理委員会の審査をうけ承認を得た。また研究対象者からは研究の内容を説明し、書面によるインフォームドコンセントを得た<sup>4)</sup>。

### D. 研究結果

それぞれの群における、SNP のタイピングの結果を表 1 に示す。677TT の遺伝子型の頻度は対照群 9.62% であるのに対して、患者群 16.9%、母親群 14.5%、父親群 14.3% であり、対照群と比較して患者群、母親群、父親群ともにいずれにおいても有意な差は認めなかった (表 1)。一方、1298AA の遺伝子型の頻度は、対照群 59.6%、患者群 60%、母親群 74.5%、父親群 52.4%、1298AC の遺伝子型の頻度は、対照群 32.7%、患者群 40%、母親群 23.6%、父親群 47.6%、1298CC の遺伝子型の頻度は、対照群 7.69%、患者群 0%、母親群 1.8%、父親群 0% であり、対照群と比較して母親群では 1298AA の遺伝子型の頻度が高い傾向が認められたが、統計学的

な有意差は認められなかった(表1)。

表1 遺伝子型頻度

	677			1298		
	CC	CT	TT	AA	AC	CC
<b>Patients (n=65)</b>	35.4(23)	47.7(31)	16.9 (11)	60 (39)	40 (26)	0 (0)
<b>Mothers (n=55)</b>	29.1 (16)	56.4 (31)	14.5 (8)	74.5 (41)	23.6 (13)	1.8 (1)
<b>Fathers (n=21)</b>	38.1 (8)	47.6 (10)	14.3(3)	52.4 (11)	47.6 (10)	0 (0)
<b>Controls (n=52)</b>	36.5 (19)	53.8 (28)	9.62 (5)	59.6 (31)	32.7 (17)	7.69 (4)

それぞれの遺伝子型の頻度[%] (症例数) で記載

次に、それぞれの SNP における各アレル頻度の結果を表2に示す。677Tのアレル頻度は対照群 36.6%であるのに対して、患者群 40.8%、母親群 42.7%、父親群 38.1%であった。対照群と他の3群を比較して、677Tのアレル頻度に有意差はなかった(表2)。一方、1298Aのアレル頻度は対照群 76%であ

るのに対して、患者群 80%、母親群 86.4%、父親群 76.2%であった。対照群に比べ母親群では1298Aのアレル頻度が高い傾向が認められたが、統計学的な有意差は認められなかった(表2)。

表2 アレル頻度

SNP	677		1298	
	C(%)	T(%)	A(%)	C(%)
<b>Patients (n=65)</b>	59.2	40.8	80	20
<b>Mothers (n=55)</b>	57.3	42.7	86.4	13.6
<b>Fathers (n=21)</b>	61.9	38.1	76.2	23.8
<b>Controls (n=52)</b>	63.4	36.6	76	24

C677TとA1298Cの組み合わせでできる9種類の遺伝子型の頻度に関する結果を表3に示す。9種類の遺伝子型の解析においては、いずれの群でも、一方のSNPが変異型のホモ接合体をとれば(677TTもしくは1298CC)、他方のSNPは必ず野性型のホモ接合体(1298AAもしくは677CC)をとり、3の塩基置換をもつ遺伝子型の組み合わせ(677TT/1298AC、677CT/1298CC)、もしくは

は4つの塩基置換をもつ遺伝子型の組み合わせ(677TT/1298CC)の例は認めなかった。C677TとA1298Cの組み合わせでできる9種類の遺伝子型について、患者群で677CC/1298AC、母親群で677CT/1298AAの遺伝子型の頻度が、それぞれ対照群と比較して高い傾向があったが、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(表3)。

表3 遺伝子型頻度 (C677T と A1298C の組み合わせ)

677	1298	Patients (n=65)	Mothers(n=55)	Fathers(n=21)	Controls(n=52)
CC	AA	12.3 (8)	18.2 (10)	23.8 (5)	17.3 (9)
	AC	23.1 (15)	9.1 (5)	14.3 (3)	11.5 (6)
	CC	0 (0)	1.8 (1)	0 (0)	7.7 (4)
CT	AA	30.8 (20)	41.8 (23)	14.3 (3)	32.7 (17)
	AC	16.9 (11)	14.5 (8)	33.3 (7)	21.2 (11)
	CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CC	CC	16.9 (11)	14.5 (8)	14.3 (0)	9.6 (5)
	CT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

### E. 考察

1995年、オランダの van der Put らは、677TT の割合が、コントロール群 (5%) と比較して、脊髄髄膜瘤患者 (13%)、その母親 (16%) で高率であったことと、MTHFR 遺伝子 C677T は、MTHFR の酵素活性の低下を引き起こすことを報告し、脊髄髄膜瘤発症の遺伝的危険因子とした<sup>6)</sup>。さらに、van der Put ら、Richter らは、酵素活性の低下につながるあらたな SNP として MTHFR 遺伝子の A1298C を報告し、この2種類の SNP の組み合わせが脊髄髄膜瘤の発症と有意な関連性を有すると報告した<sup>7,8)</sup>。さらにしかしその後のいろいろな人種や地域からの報告は、それを支持するものと<sup>9,10)</sup> 否定的なものに分かれる<sup>11-13)</sup>。

今回の解析での対照群の結果は、677TT の遺伝子型の頻度は 9.62% で、677T のアレル頻度は 36.6% であった。これら値は本邦での他の報告に類似した値である<sup>14)</sup> が、オランダ、ドイツからの報告と比べやや高い傾向にあった<sup>6,8)</sup>。また、1298AA の遺伝子型の頻度は 60% であった。この値は報告によって 44% から 66% と大きな開きがある<sup>14,15)</sup>。今回の検討に用いた対照群の結果は、日本人における MTHFR 遺伝子の SNP の傾

向を示すコントロール集団として妥当なものであり、その対照群での結果との比較において、日本人での脊髄髄膜瘤の発症と MTHFR 遺伝子型との間に、明確な関連性は存在しないと結論づけられる。これは韓国からの報告結果とも一致しており<sup>13)</sup>、アジア系人種において、MTHFR 遺伝子型は脊髄髄膜瘤発症の明確な危険因子ではないと考えられる。また MTHFR 遺伝子 C677T と A1298C の2箇所の SNP による9つの遺伝子型の組み合わせの頻度を検討すると、他の海外からの報告と同様に3つの塩基置換 (677TT/1298AC、677CT/1298CC) もしくは4つの塩基置換 (677TT/1298CC) の例は認めず、また、一方が変異型のホモ接合体の場合は他方は野生型のホモ接合体を呈した (677CC/1298CC、が 677TT/1298AA)<sup>6,8)</sup>。この結果は、3つあるいは4つの塩基置換が存在しないことは、その遺伝型が致死的であり、かつ2つの SNP は相補関係にあることを示唆するものである。

今回の解析結果を総合すると、現段階では MTHFR 遺伝子の二つの SNP の頻度はそれぞれ単独あるいはその組み合わせの割合のいずれにおいても、脊髄髄膜瘤疾患群、母親群のいずれにおいてもコントロール群と有意差は得られず、本邦における脊髄髄

膜瘤の発症の遺伝的危険因子とは断定できなかった。しかし妊娠初期に葉酸を投与すると脊髄髄膜瘤の発症が低下することはすでに実証されており、葉酸の代謝経路が何らかの関与をしている可能性は十分に考えられる。今後、その分子遺伝学的メカニズムの解明については、神経幹細胞などを用いた *in vitro* での研究で手がかりが得られていく可能性があり、そのことは脊髄髄膜瘤発症の分子遺伝学的メカニズムの解明およびその危険因子としての各種薬剤の影響を解析につながる可能性があると考えられ、その方向性で研究を継続していく予定である。

#### F. それ以外の薬剤の及ぼす影響

今回検討を行った葉酸以外でも水頭症関連疾患の発症に関与する可能性が示唆されている薬剤が存在する。抗けいれん薬の一種であるバルプロ酸ナトリウムは、ヒトでも動物モデルでも、神経管の癒合を阻止する作用があるとの報告がある<sup>17)</sup>。また、バルプロ酸ナトリウム投与によって脊髄髄膜瘤が誘発されやすい系のマウスは、それに抵抗性のマウスの系に較べて、バルプロ酸ナトリウム内服によって 5,10-methylene tetrahydrofolate の濃度が低下する傾向にあり、また誘発されやすい系では、発達に関与する転写因子や細胞周期のチェックポイント遺伝子などの発現低下すると報告されている<sup>18)</sup>。バルプロ酸ナトリウムが葉酸代謝経路の阻害剤となり、MTHFR を阻害するのであろうと予想されている<sup>19)</sup>。

また低コレステロールと全前脳胞症の発症との関連性を指摘する報告も多い。中枢神経の発生に重要な機能を有する遺伝子の

一つである Sonic hedgehog (Shh) は、種々の signal transduction system を有する Shh-N と Shh-C に分かれる。この Shh-N の C 末端にコレステロールが修飾されることによって Shh が Patched (Ptc) へ結合し、その機能を抑制していると考えられている<sup>20)</sup>。この Shh が Ptc へ結合する過程に Shh-N へのコレステロール修飾が重要な役割を担っている。動物実験で妊娠早期に抗コレステロール剤で低コレステロール状態にすると、全前脳胞症を呈するとの報告があり<sup>21)</sup>、またコレステロール合成経路の最終段階の酵素の欠損によって起こるとされている Smith-Lemli-Opitz 症候群は、しばしば全前脳胞症を合併する<sup>22)</sup>。これらの報告から、低コレステロール状態を作る抗コレステロール剤が中枢神経に対する催奇性薬剤として注目されている。

また、アルコールと水頭症関連疾患の発症の関連性に関して指摘した報告も存在する。Charness らは妊娠中のアルコール中毒によって発症する、精神発達遅滞、小脳萎縮、脳梁低形成、水頭症、小頭症などを呈する Fetal alcohol syndrome が、神経接着因子の L1CAM の異常による発症する X 連鎖性劣性先天性水頭症とその病態と良く似ていることから、エタノールは濃度相関的に L1 mediate cell-cell interaction を阻害するという現象を実験的に報告している。この報告は中枢神経の発生にアルコールが悪影響を及ぼす可能性を示唆するもので注目される。

葉酸以外のこれらバルプロ酸ナトリウム、抗コレステロール薬、アルコールなどは比較的一般的なものであり、それら薬剤が中枢神経の発生・発達に及ぼす作用とその副

作用予防の方法については今後、検討していく必要があると思われる。

### G. 結論

MTHFR 遺伝子の二つの SNP の頻度はそれぞれ単独あるいはその組みあわせの割合のいずれにおいても、脊髄髄膜瘤疾患群、母親群のいずれにおいてもコントロール群と有意差は得られず、脊髄髄膜瘤の発症の遺伝的危険因子とは断定できなかった。今後、神経幹細胞を用いた *in vitro* の研究において、その危険因子(薬剤)の影響を検証していく予定である。

### H. 文献

- 1) Berry RJ, et.al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *New Engl J Med* 341,1485-1490, 1999
- 2) Czeizel AE, et.al. Prevention of the first occurrence of neural-tube defect by periconceptional vitamin supplementation. *New Engl J Med* 327, 1832-1835, 1992
- 3) MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects. results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338, 131-137, 1991
- 4) 山崎麻美ほか. 水頭症バンク設立の経過と遺伝解析. 厚生省科学研究補助金特定疾患対策研究事業, 難治性水頭症調査研究班, 平成 11 年度研究報告書, pp43-56, 2000
- 5) 坂本博昭ほか. 脊髄髄膜瘤症例とその家系における葉酸代謝酵素 5,10methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR)遺伝子の 1 塩基置換 C677T と A1298C の解析. 厚生省特定疾患 難治性水頭症調査研究班、平成 13 年度総括・分担研究報告書、pp32-37, 2002
- 6) van der Put NMJ, et.al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor of spina bifida. *Lancet* 346, 1070-1071, 1995
- 7) van der Put NM, et.al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62, 1044-1051, 1998
- 8) Richter B, et.al. Interaction of folate and homocysteine pathway genotypes evaluated in susceptibility to neural tube defects (NTD) in a German population. *J Hum Genet* 46, 105-109, 2001
- 9) de Franchis R, et.al. The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 35, 1009-1013, 1998
- 10) Ou CY, et.al. 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 63, 610-613, 1996
- 11) Mutchinick OM, et.al. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico. a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 68, 461-467, 1999
- 12) Ubbink JB, et.al. Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural south africa blacks with a history of

- pregnancy complicated by neural tube defects. *Metabolism* 48, 269-274, 1999
- 13) Lee BH, et al. The effect of C677T mutation of methylene tetrahydrofolate reductase gene and plasma folate level on hyperhomocysteinemia in patients with meningomyelocele. *Child's Nerv Syst* 16, 559-563, 2000
  - 14) Morita H, et al. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 95, 2023-2036, 1997
  - 15) Volcik KA, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotypic risk in Hispanics. *Am J Med Genet* 95, 21-27, 2000
  - 16) Rady PL, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet* 86, 380-384, 1999
  - 17) Copp AJ, Brook FA, Estibeiro P, et al. The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Prog Neurobiol* 35, 363, 1990
  - 18) Finnell RH, Wlodarczyk BC, Craig JC, et al. strain-dependent alterations in expression of folate pathway genes following teratogenic exposure to valproic acid in a mouse model. *Am J Med Genet* 70, 303, 1997
  - 19) Nau H Valproic acid-induced neural tube defects. in book GM, March J (eds): *Neural tube defects*. CIBA Foundation Symposium No.181 Chicester, England John Wiley & Sons, p144, 1994
  - 20) Porter JA, Young KE, Beachey PA. Cholesterol modification of Hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255-259, 1996
  - 21) Lanoue L, Edhart DB, Hinsdale ME, et al. Limb, genital, CNS and facial malformations result from gene/environment-induced cholesterol deficiency; further evidence for a link to Sonic Hedgehog. *Am J Med Genet* 73, 24-37, 1997
  - 22) Tint OS, Irons M, Elias ER et al. Defective cholesterol biosynthesis associated with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *New Engl J Med* 330, 107-113, 1994
  - 23) Charness ME, Safran RM, Perides G, Ethanol inhibit neural cell-cell adhesion. *J Biol. Chemist* 269, 9304-9309, 1994

## I. 健康危険情報

特になし

## J. 研究発表

- 1) 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
- 2) 山崎麻美. 先天性疾患. 有田憲生編著 「New 脳神経外科手術マニュアル」 pp26-31, メディカ出版, 大阪, 2002

- 3) 山崎麻美. 小児脳神経外科疾患と遺伝子異常 CLINICAL NEUROSCIENCE 20, 263-266, 2002
- 4) 山崎麻美. 水頭症橋本信夫編著「脳神経外科臨床指針」 pp528-535, 中外医学社, 東京, 2002
- 5) 山崎麻美, 金村米博, 岡本伸彦. 先天性水頭症の遺伝子診断産婦人科の実際 51, 365-372, 2002
- 6) 金村米博, 山崎麻美. ヒト神経幹細胞、医学の歩み 201, 307-312, 2002
- 7) 木下章, 中谷進, 大槻秀夫, 山崎麻美, 森内秀祐, 北村文, 澤田憲治. 頸動脈 (lateral type) に対する covered stent の応用について. 日本血管内治療学会誌 3, 4-7, 2002

#### K. 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

研究成果の刊行に関する一覧表

著者名	題名	書名 (編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻 : 頁 西暦年号
Tode, C. Yamano, Y. <u>Ito, M.</u>	Carotenoids and related polyenes. Part 8. Total synthesis of optically active mytiloxanthin applying the stereoselective rearrangement of tetrasubstituted epoxide.	J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1		13:1581-1587, 2002
Wada, A. Ieki, Y. <u>Ito, M.</u>	Palladium Catalyzed Coupling Reaction of an Enol Nonaflate with (Vinyl)tributylstannanes and Acetylenes.	Synlett		7:1061-1064, 2002
Yamano, Y. Sakai, Y. Hara, M. <u>Ito, M.</u>	Carotenoids and related polyenes. Part 9. Total synthesis of thermozeaxanthin and thermocryptoxanthin and the stabilizing effect of thermozeaxanthin on liposomes.	J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1		17:2006-2013, 2002
Suzuki, M. Matsumoto, S. Mizoguchi, M. Hirata, S. Takagi, K. Hashimoto, I. Yamano, Y. Ito, M. Fleischmann, P. Winterhalter, P. Morita, T. Watanabe, N.	Identification of (3 <i>R</i> ,9 <i>R</i> )- and (3 <i>R</i> ,9 <i>S</i> )-Megastigma-6,7-dien-3,5,9-triol 9- <i>O</i> β-D-glucopyranosides as Damascenone Progenitors in the Flowers of <i>Rosa damascena</i> Mill.	Biosci. Biotechnol. Biochem.		66(12) : 2692-2697, 2002



Yamano, Y. Watanabe, Y. Watanabe, N., <u>Ito, M.</u>	Stereocontrolled Synthesis of Glucosidic Damascenone Precursors.	J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1		24:2833-2844, 2002
和田 昭盛 <u>伊藤 允好</u>	ビタミンAの化学と視覚作用.	ビタミン研究の ブレイクスルー -発見から最新 の研究まで- (日本ビタミン 学会編、編集委 員長; 谷 吉樹)	学進出版(吹 田)	4-8, 2002
山野 由美子 <u>伊藤 允好</u>	カロテノイド; 光合成における色素 としての機能.	ビタミン研究の ブレイクスルー -発見から最新 の研究まで- (日 本ビタミン学会 編、編集委員 長; 谷 吉樹)	学進出版(吹 田)	24-27, 2002
Sawamoto, K. <u>Okano, H.</u>	Direct isolation of mesencephalic precursor cells and dopamineergic neurons.	Recent Res. Devel. Mol. Cell. Biol.	Research Signpost, India	3:244-253, 2002
Shibata, M. Yamawaki, T. Sasaki, T. Hattori, H. Hamada, J. Fukuuchi, Y. <u>Okano, H.</u> Miura, M.	Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice.	Brain Res.		942:1-10, 2002

Shu,H.J. Saito,T. Watanabe,H. Ito,J.I. Takeda,H. <u>Okano,H.</u> 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
Cuadrado,A. Garcia-Fernandez, L.F. Imai,T. <u>Okano,H.</u> Munoz,A.	Regulation of tau RNA maturation by thyroid hormone is mediated by the neural RNA-binding protein Musashi-1.	Mol.Cell.Neurosci.	20:198-210, 2002
Shamloula, H.K. Mbogho, M.P. Pimentel, A.C. Chrzanowska-Lightowers, Z.M.A. Hyatt, V. <u>Okano,H.</u> Venkatech,T.R.	<i>rugose (rg)</i> , a <i>Drosophila</i> 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
Yagita,Y. Kitagawa,K. Sasaki,T. Miyata,T. <u>Okano,H.</u> Hori,T. Matsumoto,M.	Differential expression of Muashi1 and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia.	J. Neurosci. Res.	69:750-756, 2002
Ogawa,Y. Sawamoto,K. Miyata,T.	Transplantation of in vitro expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and	J. Neurosci. Res.	69:925-933, 2002

Miyao,S. Watanabe,M. Toyama,Y. Nakamura,M. Bregman,B.S. Koike,M. Uchiyama,Y. <u>Okano, H.</u>	functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats.			
Murayama,A. Matsuzaki,Y. Kawaguti,A. Shimazaki,T. <u>Okano,H.</u>	Flow cytometric analysis of stem cells in the developing and adult mouse brain.	J. Neurosci. Res.		69:837-847, 2002
Johansson,C.B. Lothian,C. Molin,M. <u>Okano,H.</u> Lendahl,U.	Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS.	J. Neurosci. Res.		69:784-794, 2002
<u>Kanemura,Y.</u> Mori,H. Kobayashi,S. Islam,O. Kodama,E. Yamamoto,A. Nakanishi,Y. Arita,N. <u>Yamasaki,M.</u> <u>Okano, H.</u> Miyake,J. Hara,M.	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
Kuranaga,E. Kanuka,H.	Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1	Nature Cell Biol.		4:705-710, 2002

Igaki,T. Sawamoto,K. Ichijo,H. <u>Okano,H.</u> Miura,M.	degradation results in activation of JNK in <i>Drosophila</i> .			
Sakakibara,S. Nakamura,Y. Koike,M. Takano,H. Uchiyama,Y. Noda,T. <u>Okano,H.</u>	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		99:15194-1519 9, 2002
Hirota,Y. Sawamoto,K. <u>Okano,H.</u>	<i>tincar</i> encodes a novel transmembrane protein expressed in the Tinman-expressing cardioblasts of <i>Drosophila</i> .	Gene Expression Patterns		2:323-327, 2002
Potten,C.S. Booth,C. Tudor,G.L. Booth,D. Brady,G. Hurley,P. Ashton,G. Clarke,G. Sakakibara,S. <u>Okano,H.</u>	Identification of a putative intestinal stem cell marker and early lineage marker: Musashi1.	Differentiation		71:28-41, 2003
Kayahara,T. Sawada,M. Takaishi,S. Fukui,H. Seno,H. Fukuzawa,H.	Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine.	FEBS Letter		535:131-135, 2003