

厚生労働科学研究費補助金 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

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年 4月

主任研究者 金村 米博

厚生労働科学研究費補助金
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

平成15年度 総括・分担研究報告書（1／2冊）

主任研究者 金村 米博

平成16（2004）年 4月

平成15年度 厚生労働科学研究費補助金 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」

構 成 員 名 簿

区 分	氏 名	所属施設名	職 名
主任研究者	金村 米博	産業技術総合研究所 ティノニュエンニアリング研究センター	研究員
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
	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
	伊藤 允好	神戸薬科大学薬学部 生命有機化学研究室	教 授
	三木 直正	大阪大学大学院医学系研究科 情報薬理学	教 授
	山崎 麻美	国立病院大阪医療センター 臨床研究部政策医療基盤技術開発研究室 脳神経外科	室 長 医 長
研究協力者	内藤 猛章	神戸薬科大学薬学部 薬品化学研究室	教 授

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、
 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----- 1
 産業技術総合研究所 ティンシュエンシニアリンク研究センター 金村 米博

II 分担研究報告

1 長期培養したヒト間葉系幹細胞からの神経系細胞への分化誘導の可能性の検討--- 7
 産業技術総合研究所 ティンシュエンシニアリンク研究センター 金村 米博
 山本 篤世

2 ES細胞を用いた中枢神経系の再生医学----- 11
 慶應義塾大学医学部生理学教室 岡野 栄之

3 マイクロアレーを用いた遺伝子発現解析と
 包括的知識ベースに基づく精神疾患治療の研究 -----14
 理化学研究所遺伝子多型研究センター 角田 達彦

4 プロテインチップを活用した薬剤安全性評価システムの開発----- 17
 産業技術総合研究所 ティンシュエンシニアリンク研究センター 山崎 智彦
 金村 米博

5 レチノイン酸誘導体の合成と薬理作用および創薬の方向 ----- 21
 神戸薬科大学薬学部生命有機化学研究室 伊藤 允好

6 アルコールおよび覚せい剤の神経系における薬理作用と
 遺伝子発現に関する研究-----25
 大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学 三木 直正
 入江 康至

7 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
 研究抗コレステロール剤について-----27
 国立病院大阪医療センター 臨床研究部政策医療基盤技術開発研究室・
 脳神経外科 山崎 麻美
 産業技術総合研究所 ティンシュエンシニアリンク研究センター 山崎 智彦
 金村 米博

III 研究成果の刊行に関する一覧表-----31

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総括研究報告書

**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 ティノシュエンノニアリンク研究センター 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・クリア細胞をin vitro評価用基準細胞として用いる投与薬剤の遺伝子・タンパク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ク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・ク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-MS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・ク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ヘルで、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、各々の副作用関連タンパク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き、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、タンパク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) 長期培養したヒト間葉系幹細胞からの神経系細胞への分化誘導の可能性の検討

金村は、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、クリア細胞) 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、安定的かつ恒常的に使用可能な細胞ソースとして、長期培養を行ったヒト間葉系幹細胞からの神経系細胞への分化誘導の可能性を検討した。各種方法で長期培養を行ったヒト間葉系幹細胞からの神経系細胞への分化誘導を試みたが、いずれの方法でも GFAP 陽性の付着性細胞が作成されることか確認された。しかし、形態的に明らかな神経細胞様形態をとる β III tubulin 陽性細胞の作成は困難であった。この結果、ヒト臍帯血同様、長期培養を行ったヒト間葉系幹細胞は少なくと

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か示唆された。

2) ES 細胞を用いた中枢神経系の再生医学に関する研究

岡野は、薬剤安定評価システムの開発の研究に利用することを目標に、マウス胚性幹細胞を用い、前脳型アセチルコリン作動性ニューロンと運動ニューロンおよびその前駆細胞を誘導する培養法を確立した。これら細胞の *in vitro*、*in vivo* における性質を明らかにした。

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、マイクロアレー発現情報解析に関する実験手法の改良・進展、より進んだ数値的解析手法、そしてケノムデータベース情報を統合し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に際し基盤をより精緻かつ大規模に発展させた。また細胞株やマウスでの実験により、薬剤投与系のアレー実験の確かさの検証を行った。

4) プロテインチップを活用した薬剤安全性評価システムの開発

金村らは、マウス胎児由来神経幹細胞を用いて、薬剤添加の影響による細胞内のタンパク質発現の量的変動情報、タンパク質発現プロファイルを SELDY-TOFMS を用いて測定し、SELDY-TOFMS の薬剤安全性評価システムへの応用の有用性を検討した。

5) 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

字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ト類の合成ならびにその薬理作用の解析を行った。1,3位置換レチノイン酸アナログ（全トランス体及び9-シス体）を合成し、ヒト前骨髄性白血病細胞（HL-60）に対する活性を調べた。その結果、全トランス体においては、いずれのアナログでもアポトーシス作用は見られなかった。1,3位のメチル基は、分化誘導作用と細胞増殖抑制作用には必須であることが判明した。更に、レチノイン酸の1位から8位までを芳香族環に変えたアナログ化合物の合成方法を開発した。またβ位置換γ-ヒドロキシフテノリト化合物を合成してHL-60細胞に対する薬理活性を調べた。その結果**12c**だけ、高濃度（ 10^{-6} M）でアポトーシス及び分化誘導活性を示すことが分かった。

6) アルコールおよび覚せい剤の神経系における薬理作用と遺伝子発現に関する研究

三木らは、神経幹細胞から特定の神経伝達物質作動性に分化誘導したヒト培養神経細胞の前段階としてマウス神経幹細胞、マウス脳を用いてエタノール、メタンフェタミンによる遺伝子発現の検討をおこない、毒性試験については種差の影響が大きいこと、16個の遺伝子でエタノールによって発現量が減少すること、耐性形成やフラノシユハノク機構に arc 産物かなんらかの役割を果たしている可能性があることが判明した。

7) 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抗コレステロール剤について

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指し、抗コレステロール剤がヒトおよびマウスの神経幹細胞の増殖に対していかなる影響を与えるかについて検証した。抗コレステロー

ル剤によりヒト及びマウス細胞の増殖が阻害され、ヒトよりマウスの方がより低濃度で増殖が阻害された。またその細胞増殖阻害作用は、コレステロールを高濃度で添加することによって回復した。抗コレステロール剤添加の濃度依存性に増加する蛋白（MW, 8588）と減少する蛋白（MW, 13804）が見出された。

D 考察および次年度の方向性

今年度は研究開発中間年度で、それぞれの分担研究者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。

研究体制に関しては今年度から、大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学 三木直正先生に分担研究者として参加していたとき、神経薬理学的観点からの検討をお願いした。

研究開発に関しては、14年度に着手した研究をさらに具体的に進行させ、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) 具体的な薬剤投与後の遺伝子およびタンパク質発現の包括的な取得の実施をおこなった。

1) 評価用ヒト神経系細胞の開発

平成14年度はヒト臍帯血細胞、今年度は長期培養したヒト間葉系幹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か、その結果、非神経細胞であるこれら両細胞は少なくとも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、大きな意味を持つ研究開発成果と考える。

今回の研究開発に利用する細胞としては、

以下の3つの条件を満たすことが重要であると考えられる。そして、これら条件を満たした評価用基準細胞として標準化された同種ヒト細胞を開発することが今回の研究の1つの目標である。

- 1 研究開発用細胞として恒常的に且つ安定的な使用に耐えうる細胞
- 2 神経系細胞としての生理的機能を有するもの
- 3 ヒト細胞でかつ倫理的に社会的に受容される細胞

現在までの研究成果と、これまでの報告とを考慮すると、評価用基準細胞として標準化することが可能な同種ヒト細胞の候補としては、以下の4つの細胞が想定される。

- ①株化されたヒト間葉系幹細胞
- ②ヒト臍帯血由来神経系細胞
- ③同種ヒト神経幹細胞
- ④ヒトES細胞

このうち、①、②が今回の研究で直接、検討を行っている細胞ソースであるか、それらを含め、現在までの研究成果から、それぞれの細胞ソースは以下の特徴を有すると考えられる。

- ①株化されたヒト間葉系幹細胞
 - ・長期培養で神経への分化能不安定
 - ・GFAP陽性細胞は比較的安定して分化
 - ・絶えず新鮮なロットを得る事は倫理問題生ずる可能性あり
- ②ヒト臍帯血由来神経系細胞
 - ・神経系細胞への分化能に関しては評価困難（再現性乏しい）
 - ・GFAP陽性細胞は産生可能
- ③同種ヒト神経幹細胞（成人由来あるいは胎児由来）
 - ・安定した分化能、生理的機能を有する神経細胞作成可能
 - ・倫理的問題（カイトラインなし）
- ④ヒトES細胞
 - ・多彩な分化能、生理的機能を有する神経細胞作成可能

・倫理的問題（カイトラインあり）

以上を考えると、われわれが目指す①および②の細胞ソースを用いた実験系の構築のためには、現在の分化誘導方法は必ずしも十分なものではなく、特に良質の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。また神経組織由来神経幹細胞との生物学的特性の比較・評価をさらに推し進めることが重要であると考えられる。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。

最終年度はこの点も考慮して、株化されたヒト間葉系幹細胞ならびにヒト臍帯血由来神経系細胞の応用利用をさらに確かなものにするため、平行して実践しているマウスES細胞を用いた基礎研究成果をヒト間葉系幹細胞ならびにヒト臍帯血由来細胞からの神経系細胞の分化誘導技術の改良に組み込みながら、*in vitro* 評価用ヒト神経系細胞の開発を行いたいと考える。

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

14-15年度で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は確立できたと考える。また15年度はそれに加えてTOF-MS方式のプロテインチップを用いたタンパク質発現情報の解析手法を確立した。

遺伝子、タンパク質の解析は、図1に示す流れで実施した。

① 薬剤毒性試験の実施

まず、ターゲット薬剤を目的の細胞に投与し、毒性試験を実施する。この段階でヒト細胞とマウス細胞の両方を用いることで生物種差の検討も実施する。そしてこの結果をグラフ化し、細胞の *viability* がほぼ100% (B点)、50% (C点)、0% (D点) の薬剤濃度を決定する (図1)。

② 薬剤濃度依存性発現情報取得

次にこの3点に薬剤添加か無い状態 (A

点)を加えた4点間で、遺伝子発現、タンパク質発現情報の取得を行う、1つの薬剤に関してA,B,C,Dの4点間で比較することで薬剤濃度依存性に変動する遺伝子、タンパク質が同定可能となると考えられる。また、多剤のテーターを相互比較することで、(たとえばD点)、薬剤種に関係なくユキキタスな変動を見せる遺伝子、タンパク質や、薬剤の影響による二次的影響(毒性による細胞死など)に関連する遺伝子、タンパク質を同定することが可能になると考えられる。

③ 時系列変動情報取得

そしてその後、ある濃度での薬剤投与後の時系列情報を取得し、経時変化が見られる遺伝子、タンパク質の同定を実施した。

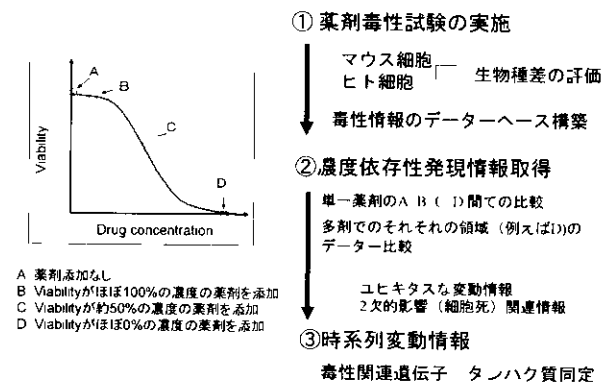


図1 遺伝子 タンパク質発現情報の取得プロトコール

具体的には、マイクロアレーに関しては、いくつかのシステムの検討の結果、32400種類の合成オリゴカプリントされた、クラススライトタイプのマイクロアレーを採用することとし、図2に示したプロトコールで解析を行うことと決定した。この方法でヒト全ゲノムレベルでの遺伝子発現を包括的に解析することが可能となると考える。

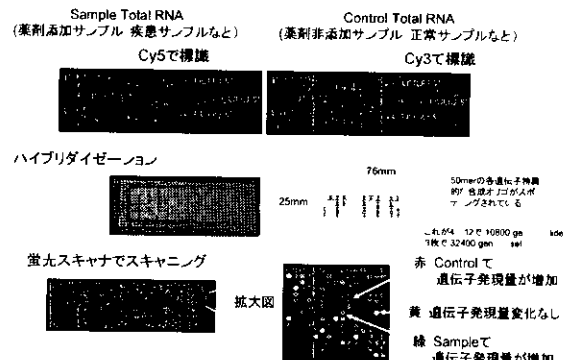


図2 マイクロアレーンシステムを用いた包括的遺伝子発現解析

取得されたテーターの解析は以下の図3に示すように流れて、正規化され、有意な発現変動のある遺伝子の同定を実施した。

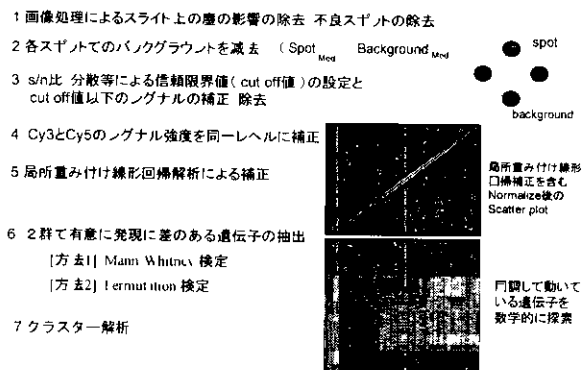


図3 マイクロアレーンシステムで取得した遺伝子発現情報の解析手法

タンパク質の解析に関しては、15年度はTOF-MS方式のプロテインチップを用いた解析を実施した。薬剤毒性試験の結果で設定した4地点(A,B,C,D)によって、図4のような各種変動パターンを示すタンパク質の同定を実践した。

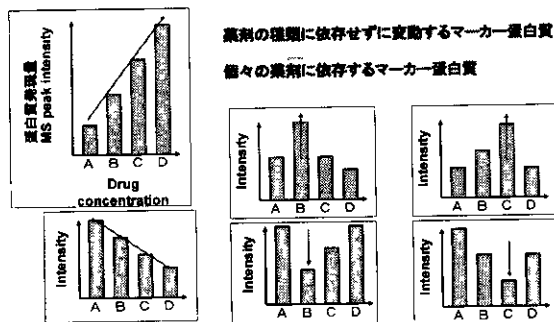


図4 プロテインチップシステムを用いた包括的タンパク質発現情報の取得

技術的に、遺伝子発現、タンパク質発現を包括的に取得する方法はほぼ確立され、15年度は次項に示す幾つかの薬剤に関して、具体的な発現情報の取得を行い、それぞれの解析系かうまく働くことを検証した。その結果、いずれの系も有効な解析手法であることが判明し、16年度は本格的な解析が可能であると判断された。

3) 具体的な薬剤投与後の遺伝子およびタンパク質発現の包括的取得

神経系に作用する薬剤のうち本プロジェクトで検討を行う薬剤としては、14年度に設定したように、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 各種リート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ト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 all-trans レチノイン酸、抗コレステロール剤、抗けいれん剤（ハルプロ酸）、抗うつ薬（SSRI）、エタノール、メタンフェタミンのそれぞれの薬剤か遺伝子、タンパク質発現に及ぼす影響を解析した。その結果、幾つかの副作用関連候補遺伝子、タンパク質が同定されつつある。

16年度は、15年度の解析結果をさらに詳細に検討して、上記薬剤の副作用関連遺伝子・タンパク質の同定をさらに進めると同時に、約100薬剤を目標に毒性試験ターゲットヘースを作成し、副作用候補遺伝子、タンパク質ターゲットヘース構築を行い、プロジェクトの目標を達成することを目指す。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

長期培養したヒト間葉系幹細胞からの神経系細胞への分化誘導 の可能性の検討

主任研究者 金村 米博
産業技術総合研究所 ティンニュエンシニアリンク研究センター 研究員
山本 篤世
産業技術総合研究所 ティンニュエンシニアリンク研究センター

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確立することを目標に、安定的且つ恒常的に使用可能な細胞ソースとして、長期培養を行ったヒト間葉系幹細胞からの神経系細胞への分化誘導の可能性を検討した。各種方法で長期培養を行ったヒト間葉系幹細胞からの神経系細胞への分化誘導を試みたか、いずれの方法でも GFAP 陽性の付着性細胞が作成されることか確認された。しかし、形態的に明らかな神経細胞様形態をとる tubulin β III 陽性細胞の作成は困難であった。この結果、ヒト臍帯血同様、長期培養を行ったヒト間葉系幹細胞は少なくとも 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か示唆された。

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確立することを目標とする。そのため、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か必要であること、且つ恒常的に使用可能であることを考慮して、同種ヒト細胞の中で、長期培養を行ったヒト間葉系幹細胞からの神経系細胞への分化誘導の可能性の検討と、その *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) ヒト骨髄細胞からの神経系細胞の作成
ヒト間葉系幹細胞 (Bio Whittaker 社より購入) は、基本培地 (Human Mesenchymal Stem Cell Basal Medium, Bio Whittaker 社) に増殖添加因子 (Mesenchymal Cell Growth Supplement, Bio Whittaker 社) を加えたものを増殖培地として用いて培養した。長期培養 (9 継代数以上) を行ったヒト間葉系幹細胞を用いて、以下の方法で神経系細胞の分化誘導を行った。
① 増殖培地を、1 %FBS、 1×10^{-6} M の all trans retinoic acid (ATRA)、B27 添加因子 (インヒトロシェン社) を含む無血清の DMEM/F-12 培地に変更し、14 日間分化誘導を行った。

- ② 増殖培地を、増殖因子（20ng/ml EGF, 20ng/ml FGF2, 10ng/ml hLIF）ならびに B27 添加因子を含む無血清の DMEM/F-12 培地中（以下、神経幹細胞用培地）に変更し2週間培養を行い、その後、神経幹細胞用培地中の増殖因子を除去して、分化誘導因子として1%FBS と $1 \times 10^{-6} \text{M}$ の ATRA を添加した培地で14日間分化誘導を行った。
- ③ 増殖培地に 1mM β -mercaptoethanol（BME）を添加して48時間分化誘導を行った。
- ④ 増殖培地に 1mM BME を添加して48時間分化誘導を行った後、1%FBS、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ の ATRA、B27 添加因子を含む無血清の DMEM/F-12 培地に変更し、14日間分化誘導を行った。
- ⑤ 増殖培地に 1mM BME を添加して24時間分化誘導を行った後、200 μM butylated hydroxyanisole（BHA）と2% DMSO の入った増殖培地に変更して、さらに24時間分化誘導を行った。
- ⑥ 増殖培地に 1mM BME を添加して24時間分化誘導を行った後、200 μM BHA と2%DMSO の入った増殖培地に変更して、さらに24時間分化誘導を行い、その後、1%FBS、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ の ATRA、B27 添加因子を含む無血清の DMEM/F-12 培地に変更し、14日間分化誘導を行った。

2) 蛍光免疫細胞染色

分化誘導の終了した細胞は、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、フロノキックを行い、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次抗体を含む10%正常ヤキ血清/0.01% 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® 568 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes）と TO-PRO-3® iodide（1 μM , Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA）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）

ヒト細胞を用いた研究計画は、産業技術総合研究所倫理委員会にて審査・承認を受け、研究を実施した。

C 研究結果

今回検討を行ったいずれの方法も、分化誘導後、細胞は紡錘形の形態に変化した。免疫染色の結果では、多くの GFAP 陽性細胞が存在することを確認された（図1, 2, 3）。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 tubulin β III を共発現していた（図1, 2, 3）。しかし、この tubulin β III を発現している細胞の多くは、形態的には神経細胞様形態とは異なる外観を呈していた（図1, 2, 3）。

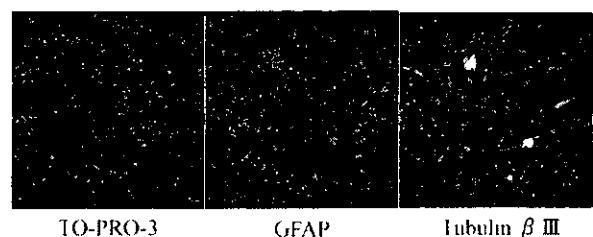


図1 1%FBS、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ の ATRA、B27 添加因子で14日間分化誘導を行ったヒト間葉系幹細胞

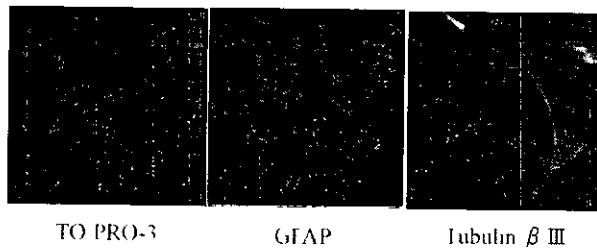


図2 1mM BME で48時間分化誘導を行った後、1%FBS、 1×10^6 Mの ATRA、B27 添加因子で14日間分化誘導を行ったヒト間葉系幹細胞

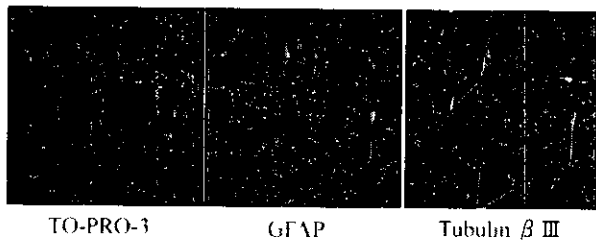


図3 1mM BME で24時間分化誘導を行った後、200 μM BHA、2%DMSO で24時間分化誘導を行い、その後 1%FBS、 1×10^6 Mの ATRA、B27 添加因子で14日間分化誘導を行ったヒト間葉系幹細胞

D 考察

今回の検討では、昨年検討したヒト臍帯血細胞と同様、長期培養したヒト間葉系幹細胞から少なくとも GFAP 陽性のク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である tubulin β III も同時に発現していることが確認された。このことは、ヒト臍帯血細胞と同様、長期培養したヒト間葉系幹細胞は少なくとも GFAP 陽性クリア用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 陽性のク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間葉系幹細胞から 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。さらに比較的長期培養を行った細胞からも GFAP 陽性細胞の作製が可能であるため、実験のために新鮮なヒト間葉系幹細胞を絶えず入手する必要は必ずしも無く、大量培養して保存した同一ロットの細胞を用いての研究を計画することか可能であると考えられた。このことはヒト細胞を用いる研究を実施するうえで、細胞の確保の点でより優位であると思われる。ただ、形態的に神経組織由来神経幹細胞から作製した GFAP 陽性細胞とは趣を異にする傾向があり、ヒト間葉系幹細胞から作製された GFAP 陽性細胞を用いた実験系の構築のためにはさらに、神経組織由来の GFAP 陽性細胞との生物学的特性の類似点、相違点を慎重に検討していく必要があると考えられる。

最終年度である平成16年度は、神経組織由来の GFAP 陽性細胞との生物学的特性の類似点、相違点を明確にした上で、ヒト間葉系幹細胞から作製された GFAP 陽性細胞

を用いた薬剤反応性の検討を実施する予定である。

E 結論

長期培養したヒト間葉系幹細胞から GFAP 陽性ク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長期培養したヒト間葉系幹細胞由来 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) Yasuhiro Nakamura, Munehiko Yamamoto, Eriko Oda, Atsuyo Yamamoto, Yonehiro Kanemura, Masayuki Hara, Akira Suzuki, Mami Yamasaki, Hideyuki Okano
Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development
Laboratory Investigation, 83(4), 479-489, 2003

2 学会発表

- 1) 山崎智彦、金村米博「幹細胞を中心としたタンパク質発現プロファイル解析」CIPHERGEN user meeting 2003 (2003 11 12 横浜市)

- 2) 小林哲、金村米博、モハメト イスラム、シャスミン タンリア、原正之、山崎麻美、岡野栄之、和田昭盛、伊藤允好、三宅淳「レチノイン酸及びレチノイト誘導体かヒト神経幹細胞/前駆細胞の分化誘導に及ぼす効果の検討」第 77 回日本薬理学会年会 (2004 3 10 大阪市)

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

ES細胞を用いた中枢神経系の再生医学

分担研究者 岡野 宋之
慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨

胚性幹細胞を用い、前脳型アセチルコリン作動性ニューロンと運動ニューロンおよびその前駆細胞を誘導する培養法を確立した。これら細胞の *in vitro*、*in vivo* における性質を明らかにし、薬剤安定評価システムの開発の研究に利用する。

A 研究目的

胚性細胞（ES 細胞）から前脳型アセチルコリン作動性ニューロンと運動ニューロンとその前駆細胞を誘導する培養法を確立し、誘導したニューロンの位置情報特異的遺伝子発現を検討し、これらのニューロンを薬剤スクリーニングに利用する。

B. 研究方法

我々はマウス ES 細胞から胚様体（Embryoid Body EB）を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立してきた。本研究では、EB 形成時に前方神経誘導因子および後方化因子であるレチノイン酸（RA）を作用させることにより、ES 細胞由来の神経系前駆細胞に前方あるいは後方の領域特異性を付与し、神経管前方より発生する前脳型アセチルコリン作動性ニューロン、あるいは後方より発生する運動ニューロン、さらにはこれらの細胞を産み出す前駆細胞を高率に生み出すニューロスフェアを誘導することを試みる。まず、前方神経誘導因子および RA の濃度が ES 細胞の分化に与える影響を検討する。

さらに、その結果を用いて EB から高率にニューロスフェアを誘導する培養系を確立する。これらの解析は、RT-PCR 法やウェスタンブロット法などの分子生物学的手法、免疫染色法を用いて行う。さらに誘導した細胞の *in vitro* での性質を、細胞培養や電気生理学的手法を用いて明らかにする。さらに、これらの *in vitro* での結果をもとに、*in vivo* での細胞の生着とその動態を確かめる。さらに、ヒト ES 細胞への応用を計画している。

（倫理面への配慮）

当研究室におけるヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成 14 年 11 月 7 日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認されており、研究計画はそれに準拠したものとなっている。

C 研究結果

前方神経誘導因子および様々な濃度の RA を用いて EB を形成させ、RT-PCR 法、免疫染色法により、種々の遺伝子の発現パターンの解析を行った。前方神経誘導因子

およひ RA は神経分化のみならず、前方化あるいは後方化を促した。特に RA は、濃度依存性に後方化活性を示した。前方神経誘導因子作用時は、後脳より前方の位置情報を示す神経系細胞が誘導された。低濃度の RA を用いたときに形成される EB 中には、Nestin 陽性、sox1 陽性の、未分化神経系前駆細胞が多く含まれかつ、これらの細胞は中脳、後脳の領域特異性を持つことが明らかとなった。そこで、前方神経誘導因子およひ低濃度の RA を用いて形成させた EB を分散し、FGF2 存在下で浮遊培養させたところ、高率にニューロスフェアを形成させることに成功した。この一次ニューロスフェアは接着培養で分化させるとニューロンを多く生み出し、一方で一度継代した二次ニューロスフェアからはクリアを多く生み出すことが明らかとなった。この結果は *in vivo* の中枢神経系の発生の *time course* をよく模倣していることから、中枢神経系の発生のモデルとしても有用であると考えられた。さらに、a) 前方神経誘導因子およひ b) 低濃度の RA を用いて誘導したニューロスフェアからは、それぞれ a) Sonic Hedgehog 蛋白質依存性に Islet-1(+), ChAT(+), HB9(-) の前脳型アセチルコリン作動性ニューロン、b) Islet-1(+), ChAT(+), HB9(+) の運動ニューロンやその前駆細胞が高率に誘導された。このようにして誘導したニューロンは、電気生理学的手法（パッチクランプ法）を用いて解析すると活動電位が記録され、生理的機能を有する細胞であると判断された。

D. 考察

ES 細胞から a) 前方神経誘導因子およひ b) 低濃度レチノイン酸を用いて高率にニューロスフェアを誘導することかてきた。領域特異性を決定するマーカー遺伝子群の発現解析により、これらのニューロスフェアは夫々、a) 後脳より前方あるいは b) 後脳タイプの領域特異性を獲得していると考えられた。誘導したニューロスフェアからは、

a) 前脳型アセチルコリン作動性ニューロンおよひ b) 運動ニューロンとその前駆細胞のマーカーである HB9 陽性細胞を高率に誘導した。これらのいずれも、電気生理学的に活動電位を発するニューロンが誘導されたことから、機能的な a) 前脳型アセチルコリン作動性ニューロンおよひ b) 運動ニューロンとその前駆細胞を、マウス ES 細胞から高率に誘導できる培養法を確立できたと考えられた。これらの細胞は、生体内に生着し、ニューロンに分化して機能し得ると考えられるか、生着した細胞の性質については今後さらに詳細に解析していく必要かあると考えられる。

E 結論

マウス ES 細胞から前脳型アセチルコリン作動性ニューロンおよひ運動ニューロンとその前駆細胞を高率に誘導する方法を確立した。誘導した細胞を用いた *in vitro* での機能や薬剤スクリーニングに加え、*in vivo* での機能解析、疾患モデル動物への移植等による新規治療法の開発が期待される。今後は、ヒト ES 細胞への応用（承認済み）を行っていく予定である。

F 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Tonchev, A B, Yamashima, T, Zhao, L, Okano, HJ and Okano, H Proliferation of neural and neural progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys *Mol Cell Neurosci*, 23, 292-301, 2003
- 2) Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai, H, Watanabe K, Xiao ZC et al, F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during

oligodendrocyte maturation Blockade of interleukin-6 receptor ameliorates functional recovery in spinal cord injury Cell, 115, 163-175 2003

3 その他
なし

- 3) Matsuzaki, Y, Kinjo, K, Mulligan, RC and Okano, H Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cell Immunity, 20, 87-93, 2004

2 学会発表

- 1) Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano Generation of Motor Neurons from mouse Embryonic Stem Cells, The 2nd CREST Symposium on Development, Differentiation and Regeneration, Tokyo, May 2003
- 2) Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano Generation of motor neuron progenitors from mouse embryonic stem cells, Keystone Symposia, Stem Cells (B2), Colorado, January 2004

H 知的財産の出願・登録状況

1 特許取得（申請中）

- 1) 発明の名称 胚性幹細胞からの神経幹細胞、運動ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンの製造法
発明者 岡野栄之、島崎琢也
出願番号 特願 2001-099074
申請日 2001 3 30
PCT 出願 PCT/JP01/08703
- 2) 発明の名称 記憶障害治療剤
発明者 岡野栄之、島崎琢也、長尾省吾、松本義人
出願番号 特願 2002-002433
申請日 2002 1 11
- 3) 発明の名称 記憶障害治療剤スクリーニング法
発明者 岡野栄之、島崎琢也、長尾省吾、松本義人
出願番号 特願 2003-6298
申請日 2003 1 14
PCT 出願 無し

2 実用新案登録

現時点では予定なし

マイクロアレーを用いた遺伝子発現解析と包括的知識ベースに基づく 精神疾患治療の研究

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手法の改良・進展、より進んだ数値的解析手法、そしてゲノムデータベース情報を統合し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に際し基盤をより精緻かつ大規模に発展させた。また細胞株やマウスでの実験により、薬剤投与系のアレー実験の確かさの検証を行った。

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。

B 研究方法

ヒト正常神経細胞培養系への薬剤投与・非投与群の並行時系列系の各サンプルから mRNA を抽出、増幅し、約 30000 の遺伝子をもつマイクロアレー実験系を適用することにより、両群の各遺伝子発現量を測定する。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って、発現が有意に上昇・下降する遺伝子を検出する。一方、各種データベース上に蓄積された遺伝子の配列情報、機能情報、ネットワーク情報等を集約する。これらとマイクロアレー

実験で検出された遺伝子の機能解析実験結果と統合することにより、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。

C 研究結果

培養ヒト神経細胞からは微量の RNA しか得られないため、これを増幅しマイクロアレー実験に用いるのに充分量確保するために増幅法を確立した。これにより mRNA を初期量の 4000 倍以上増幅させることが可能となり、ごく少量しか得られない培養細胞や臨床サンプルからもマイクロアレー実験をおこなえるようになった。またアレイスライトについても改良し、昨年度よりも 7000 遺伝子ほど多い約 30000 遺伝子を一度に網羅的に解析できるようにした。次に、得られたデータの正規化の過程においては、より実験誤差や蛍光色素依存的なノイズを除去するために、今までの正規化法に加え、局所重み付け線形回帰補正をお

こない、データの信頼度の向上を図ると共に、微少発現しか見られない遺伝子についても解析可能とした。この正規化法と permutation 検定等の各種統計解析プログラムを自動化することにより、迅速で強固な解析システムを実現させた。

一方、WEB 上に公開されている NCBI (National Center for Biotechnology Information) をはしめとする各種公共データベース内の情報を収集し統合するシステムを開発し、毎月自動で最新情報を更新する環境を整えた。この情報と実験結果を相互に補完しあうことで薬剤の作用点・副作用点を特定することを可能とした。実際に、ヒト培養神経細胞を用いて精神薬である SSRI を添加することで発現量が変化する薬剤応答遺伝子の候補を見つけることに成功し、現在解析中である。

D 考察

今回の実験法の改良により、27000 遺伝子程度 (マイクロアレイスライト上の 90% 以上) を有効なシグナルデータとして得られるようになり、これはヒトの全遺伝子をほぼ網羅していると考えられる。公共データベースに蓄積されるアノテーション情報は増大の一途を辿っており、このマイクロアレイによる網羅的な解析と統合することで、遺伝子の機能予測のみならずパスウェイ解析も今後可能となることか予想される。既にいくつかの精神薬を用いた実験で薬剤応答遺伝子候補が見つかってきているか、さらに今後は薬剤に関しても網羅的に解析をおこなっていく予定である。今回は数種の薬剤についてのみの解析であるか、同一疾病に対する薬剤で共通して発現量変化が見られる未知遺伝子も見られた。このことから、同一疾病治療に効果の見られる薬剤には同様の作用機序が存在することか予想され、今後のさらなる網羅的実験解析により、薬剤作用点・副作用点か解明されることと期待されることである。

また、同研究チームのプロテインチップ等を用いたタンパク質の側面からの解析と当研究チームのマイクロアレイを用いた遺伝子の側面からの解析を融合させることで、遺伝子からタンパク質までの一連の生物機構を解明できるものと考えられ、次年度の課題である。

E 結論

アレイ実験の技術および解析できる遺伝子数は日々進展しており、それに対応した実験手法、解析系やケノムデータベースの活用技術が求められる。今回はそれらの技術を発展・統合させ汎用かつ最新のものにした。そして *vitro* の系ではあるかヒトおよびマウスの神経細胞株により薬剤投与の予備実験を行い、上昇・下降した遺伝子群の網羅的解析を行った。その結果、既知遺伝子に関し妥当な遺伝子の変動が見られ、実際の評価系に向けての精度の検証を行うことかできた。今後、整備したケノムデータベース情報および時系列情報、そして複数の薬剤投与系の比較によるパスウェイ構築を行っていく予定である。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

- 1 論文発表
 - 1) T Nagahata, M Onda, M Emi, H Nagai, K Tsumagari, T Fujimoto, A Hirano, T Sato, K Nishikawa, F Akiyama, G Sakamoto, F Kasumi, Y Miki, T Tanaka, T Tsunoda
Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray
Cancer Science, 95, 218-225, 2004
 - 2) K Ochi, Y Daigo, T Katagiri, S Nagayama, T Tsunoda, A Myoui, N Naka, N Araki, I Kudawara, M Ieguchi, Y Toyama,

- J Toguchida, H Yoshikawa, and Y Nakamura
Prediction of response to neoadjuvant
chemotherapy for osteosarcoma by
gene-expression profiles International
Journal of Oncology, 24, 647-655, 2004
- 3) M Li, Y-M Lin, S Hasegawa, T Shimokawa,
K Murata, M Kameyama, O Ishikawa,
T Katagiri, T Tsunoda, Y Nakamura, and
Y Furukawa Genes associated with liver
metastasis of colon cancer, identified by
genome-wide cDNA microarray
International Journal of Oncology, 24,
305-312, 2004
- 4) K Okada, T Katagiri, T Tsunoda, Y Mizutani,
Y Suzuki, M Kamada, T Fujioka, T Shun,
T Miki, and Y Nakamura Analysis of
gene-expression profiles in testicular
seminomas using a genome-wide cDNA
microarray Int J Oncol, 23, 1615-1635,
2003
- 5) Y Kaneta, Y Kagami, T Tsunoda, R Ohno,
Y Nakamura, and T Katagiri
Genome-wide analysis of gene-expression
profiles in chronic myeloid leukemia cells
using a cDNA microarray Int J Oncol,
23, 681-691, 2003
- 6) K Ochi, Y Daigo, T Katagiri,
A Saito-Hisaminato, T Tsunoda, Y Toyama,
H Matsumoto, and Y Nakamura
Expression profiles of two types of human
knee-joint cartilage Journal of Human
Genetics, 48, 177-182, 2003
- 7) S Kakiuchi, Y Daigo, T Tsunoda, S Yano,
S Sone, and Y Nakamura Genome-wide
analysis of organ-preferential metastasis of
human small cell lung cancer in mice
Molecular Cancer Research, 1, 485-499,
2003
- 8) T Kikuchi, Y Daigo, T Katagiri, T Tsunoda,
K Okada, S Kakiuchi, H Zembutsu,
Y Furukawa, M Kawamura, K Kobayashi,
K Imai, and Y Nakamura Expression
profiles of non-small cell lung cancers on
cDNA microarrays Identification of genes
for prediction of lymph node metastasis and
sensitivity to anti-cancer drugs Oncogene,
22, 2192-2205, 2003
- 9) T Arimoto, T Katagiri, K Oda, T Tsunoda,

T Yasugi, Y Osuga, H Yoshikawa, O Nishi,
T Yano, Y Taketani, Y Nakamura
Genome-wide cDNA microarray analysis of
gene-expression profiles involved in ovarian
endometriosis International Journal of
Oncology, 22, 551-560, 2003

- 2 学会発表
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