

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

山崎 智彦

産業技術総合研究所 ティノニューエンシニアリンク研究センター 客員研究員
主任研究者 金村 米博

産業技術総合研究所 ティノニューエンシニアリンク研究センター 研究員

研究要旨

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は、薬剤の安全性ならびに効果を評価する際に重要な情報となる。本研究では各種薬剤を添加したときのマウス胎児由来神経幹細胞のタンパク質発現プロファイルを SELDY-TOFMS を用いて測定し、比較することで薬剤の安全性評価の指標となるマーカータンパク質、ならびに薬剤の効果の指標となるマーカータンパク質の検索を行い、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。

A 研究目的

細胞に薬剤を添加したときのタンパク質発現の量的変動情報は、薬剤の効果ならびに安全性を評価する際に重要である。しかしながら現在までの薬剤評価の研究は特定の薬剤を添加した際の特定のタンパク質の発現をウェスタンブロット等で解析しているものかほとんどであり、多種の薬剤を比較した報告ならびに細胞内のタンパク質発現の網羅的な挙動を調べた報告はない。薬剤安全評価システムの開発を考えた場合、多種の薬剤の影響による細胞内のタンパク質発現のプロファイリングのデータの蓄積が必要である。

現在、タンパク質発現解析の手法として広く用いられているのは二次元電気泳動法であるが、二次元電気泳動法においては、作業工程が多く煩雑でありまた高い技術が必要であること、また操作に時間がかかる（1-2日）という点が問題となり、プロファイリングデータの蓄積への障害とな

っている。そこで、申請者らは薬剤添加によるタンパク質発現プロファイリングを迅速に行う方法として、操作が簡易であり、またサンプル調整から測定を迅速に行える方法である飛行時間型質量分析計（Surface Enhanced Laser Deposition / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry SELDY-TOFMS）の利用に着目した。

本年度の研究ではマウス胎児由来神経幹細胞を用いて各種薬剤を添加したときのタンパク質発現のプロファイリングの測定条件の最適化を行うとともに、安全性評価の指標となるマーカータンパク質、ならびに薬剤の効果の指標となるマーカータンパク質の検索を行うことで、SELDY-TOFMS の有用性を検討した。

B 研究方法

ATPアッセイ方法を用いてマウス胎児由来の神経幹細胞の各種薬剤に対する生存率を求めた。マウス胎児由来の神経幹細胞に対して、各種薬剤（レチノイン酸ならび

にその誘導体、VPA、シンハスタチン、エタノール)を添加し、24時間5%CO₂存在下、37°Cでインキュベートし、その後ATPアッセイ方法により生細胞数もとめ、薬剤耐性を調べた。

薬剤耐性の結果をもとに生存率100%、50%、0%になる薬剤濃度を算出し、神経幹細胞に添加し、24時間処理を行った。その後、神経幹細胞を集め、PBSで洗浄(五回)した後細胞溶解液(1(w/v)% CHAPS, 1mM DTT, 8M Urea)を添加し、超音波破碎装置を用いて細胞を破碎し、細胞破碎液を得た。次に、遠心(10,000 x g, 10min, 20°C)により細胞破碎液から未破碎画分を取り除き、タンパク質抽出液を得た。

得られたタンパク質抽出液をSELDY-TOFMS用のチップ(プロテインチップ)に添加することで、タンパク質の発現解析を行った。プロテインチップとしては陽イオン交換基、陰イオン交換基か修飾されたチップCM10ならびにQ10チップを用いた。CM10、Q10チップならびにpHの異なる緩衝液を用いることにより、タンパク質の等電点に従ってチップへの吸着をコントロールすることかできる。本申請研究ではpH4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5の緩衝液(50mM酢酸ナトリウム緩衝液、50mMリン酸ナトリウム緩衝液、50mM Tris-HCl緩衝液)を用いて薬剤処理した神経幹細胞由来のタンパク質をプロテインチップ上に吸着させて、エネルギー吸収マトリクスとしてシナピン酸を用いてMALDI-TOFMS解析を行った。

C 研究結果

TOFMSにおいてはレーザーの強度並びにディテクターの感度を最適化することか一度の測定で多くのタンパク質のピークを検出するために必要である。神経幹細胞のタンパク質の発現プロファイルを測定するレーザーの強度、ディテクターの感度を測定分子量の範囲ことに最適化し、決定した。

最適化は、S/N比が3以上のピークかもっとも多く見え、またピークの高さ(Intensity)か高くなる条件を選択した。その結果、今後の測定では、分子量3-200kDaの範囲のタンパク質の発現を3つの測定範囲(3-10kDa, 10-30kDa, 30-200kDa)に分けて測定し、それぞれのレーザーの強度並びにディテクターの感度をInt185, Sens7(3-10K)、Int195, Sens8(10-30K)、Int225, Sens10(30-100K)を用いることにした。

上記の条件を用いて薬剤処理した神経幹細胞由来のタンパク質抽出液のタンパク質の発現を解析した。レチノイン酸ならびにその誘導体、VPA、シンハスタチン、エタノールに対する神経幹細胞の耐性のデータをもとに生存率100%(stage B)、50%(stage C)、0%(stage D)になる薬剤濃度を算出し、神経幹細胞に添加したときのタンパク質の発現プロファイルを測定し、薬剤の濃度とタンパク質発現の関係を調べた。その際に、薬剤添加を行わなかった細胞のプロファイルをstage Aとした。得られた発現プロファイルを解析し、(1)ステーションかAからDに変化していくことに発現量か上昇、または減少するタンパク質のピーク、(2)ステーションB(生存率100%)において発現量か最大もしくは最低になるタンパク質、(3)ステーションC(生存率50%)において発現量か最大もしくは最低になるタンパク質に分類し、薬剤の種類に依存せずに変動するタンパク質、また薬剤種に依存して変動するタンパク質をスクリーニングした。

その一つとして、ステーションかAからDに変化していくことに発現量か減少するタンパク質のピーク、分子量13800±20(P13800)か得られた(図1)。

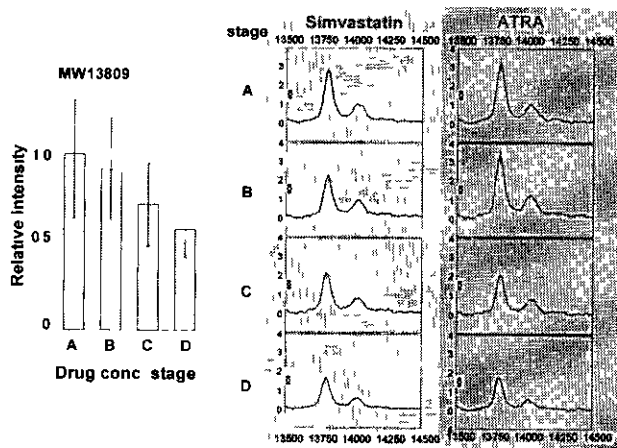


図1 P13800の発現プロファイル

P13800はスタチン系抗高脂血症薬のシンハスタチン、オールトランスレチノイン酸(ATLA)の濃度が増加するにしたがって発現量が減少していくタンパク質であり、各ステージでの変化は両薬剤に対して同様の傾向を示した。P13800は薬剤に依存せずに、細胞生存率が低下すると増加するタンパク質であることからP13800増減を指標とすることにより、薬剤安全性の評価がてきる可能性がある。現在、P13800の詳細については同定を行っている。

またステージC(生存率50%)において発現量が最大になり、薬剤濃度がそれ以上になり細胞毒性を示すようになると減少するピークの例として分子量4966±10のタンパク質(P4966)が得られた(図2)。

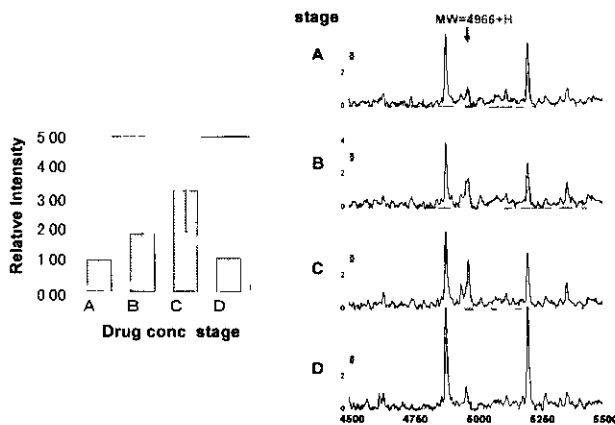
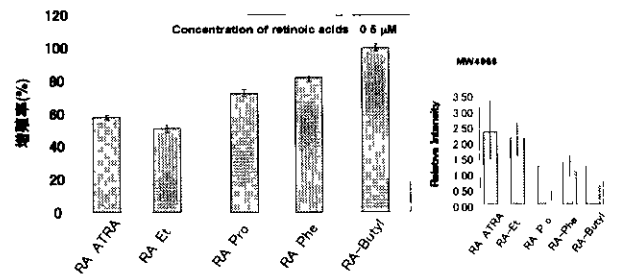


図2 マウス神経幹細胞にレチノイン酸を添加したときのP4966発現プロファイル

P4966はシンハスタチン、オールトランスレチノイン酸の両方において生存率50%のステージCでもっとも高い発現量を示し、薬剤を添加しないとき(stage A)ならびに生存率が0%(stage D)と比較して約3倍の発現量を示した。また、P4966の発現量を各種レチノイン酸誘導体において比較すると、誘導体によってその発現量に差があることが示された。発現量の差は、誘導体を添加したときの増殖と関連があった。その結果を図3に示す。



増殖率(%) = レチノイン酸誘導体添加時の増殖 / レチノイン酸無添加時の増殖

図3 レチノイン酸誘導体の増殖阻害とP4966の発現量の関係

図3から、0.5μMの各種レチノイン酸誘導体を添加したとき増殖率とP4966の発現量を比較すると、増殖を高く阻害するもの(ATRA, RA-ET)を添加したときにはP4966は高発現する傾向を示すことがわかる。すなわち、P4966は増殖を阻害するほどその発現量は高くなるか、増殖阻害がある一定よりも高くなったときには発現が抑制されることかわかった。このことからP4966は薬剤の効果と増殖の両方に関連して増減するタンパク質として考えら、今後は薬剤の効果と濃度の関連を調べる必要がある。

D 考察

本申請研究で検討を行ったSELDY-TOFMS方法は従来方法と比較して、サンプル中のタンパク質の発現情報を迅速に得ることかてきる方法であり、実際16サ

ンプルを1時間半以内に解析することかてきた。また、TOFMSの原理上の問題で、解析できる範囲が分子量15000以下ではあるか、分子量15000以下においても、薬剤による増殖阻害と関連して発現量が増加、減少していくタンパク質が複数発見された。このことは、分子量15000以下に薬剤安全性の指標となる新しいマーカータンパク質が存在することを示しており、今後、これらマーカータンパク質を同定することで、薬剤安全性との関連を明らかにしていく。また、SELDY-TOFMSを用いる場合、従来の抗体を用いて発現量を解析する方法と比較して、複数のマーカータンパク質の発現を同時に検出することか可能であることから、複数のマーカータンパク質を指標とした詳細な安全性評価か可能である。また、安定性のみならず、薬剤の効果についてもマーカータンパク質を用いて同時に評価かてきる。

E 結論

SELDY-TOFMSの薬剤安全性評価システムへの有用性を検討した結果、SELDY-TOFMSを用いることで、発現プロファイルを迅速に得ることかてき、また薬剤濃度、増殖阻害に対応するタンパク質をスクリーニングすることかてきた。今後、薬剤種を増やしてプロファイルのテーターヘース化を行い、タンパク質の発現量の変化を基準とする薬剤安全性評価システムの基礎テーターの蓄積を行うことで、多サンプルを用いたハイスループットな薬剤安全性評価システムの開発に利用する。

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, Mamu 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 タシリア、原正之、山崎麻美、岡野栄之、和田昭盛、伊藤允好、三宅淳「レチノイン酸及ひ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

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

分担研究者 伊藤 允好
神戸薬科大学薬学部生命有機化学研究室 教授

研究要旨

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-ヒドロキノン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。

A 研究目的

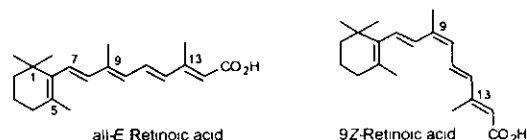
神経系への催奇性を有するレチノイン酸アナログ（レチノイト）の作用発現メカニズムを解析する。

B 研究方法

昨年度に開発した手法を応用して、レチノイン酸アナログ（レチノイト）を合成し、その薬理活性を調べる。

C 研究結果

1)レチノイン酸アナログの薬理活性と合成
これまでに2,6,6-トリメチルシクロヘキセンアセトアルテヒトから誘導したエノールトリフラートとススオレフィンとのカノプリック反応を鍵反応としてレチノイン酸9位あるいは1,3位のメチル基を種々の置換基に代えたアナログ化合物の合成を行ってきたが、1,3位置換レチノイン酸アナログについてヒト前骨髄性白血病細胞（HL-60）に対する細胞増殖抑制作用、分化誘導作用、



およびアポトーシス作用を検討した結果、下記の表に示す結果が得られた。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。分化誘導作用と細胞増殖抑制作用は、1,3位のメチル基がなくなると活性が著しく低下し、エチル基の場合にはメチル基の約半分程度の活性を示したか、置換基がそれより大きくなると活性がほとんど消失することが判明した。

9-シス体においては、分化誘導作用および細胞増殖抑制作用ともにいずれのアナログでも活性が認められなかった。アポトーシス作用については、フチル基の場合を除き全て活性を示した。

更なる詳細な活性発現機構を現在検討しているところである。

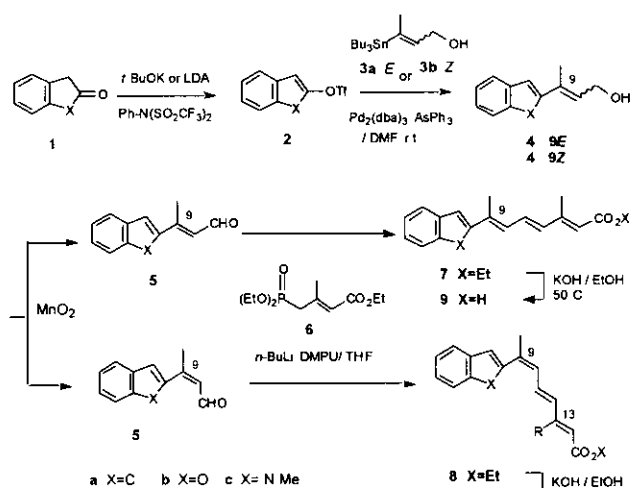
表1 全トランス13位置換レチノイン酸類の生物活性

誘導体	置換基	細胞増殖抑制作用		分化誘導作用	アトランス誘導
		相対活性 (Go G1)	相対活性 (S)		
ATRA	Me	100	100	100	×
AT 100	H	11	11	11	×
AT 102	Et	44	35	21	×
AT 103	Pr	1	1	6	×
AT 104	Bu	<0.3	<0.4	<0.4	×
AT 107	PhCH ₂ CH ₂	7	6	2	×

表2 9ノス13位置換レチノイン酸類の生物活性

誘導体	置換基	細胞増殖抑制作用		分化誘導作用	アトランス誘導
		相対活性 (Go G1)	相対活性 (S)		
9CRA	Me	100	100	100	○
9C 100	H	2	3	1	○
9C 102	Et	10	9	6	○
9C 103	Pr	1	1	<0	○
9C 104	Bu	<0.3	<0.3	<0.3	×
9C 107	PhCH ₂ CH ₂	0.5	0.6	<0	○

今回、トリフラートのカノプリンク反応を更に拡張することを目的として、ケトン、ラクトンあるいはラクタム等のカルボニル化合物より誘導したトリフラートを用いて、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を検討した。

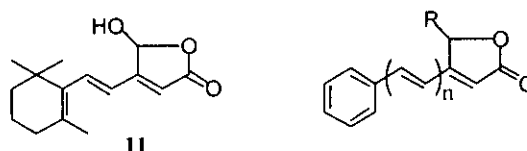


その結果、2-インタノン(1a)と、2-クマラノン(1b)及びN-メチルオキシイントール(1c)ともに、対応するトリフラート(2a,b,c)へ変換することかてき、続くE-およびZ-ススオレフィン(3a,b)とのカノプリンク反応、二酸化マンガンでの酸化、

Horner-Emmons 反応及びアルカリ加水分解により、対応するレチノイン酸アナログ(9,10)へと誘導することかてきた。

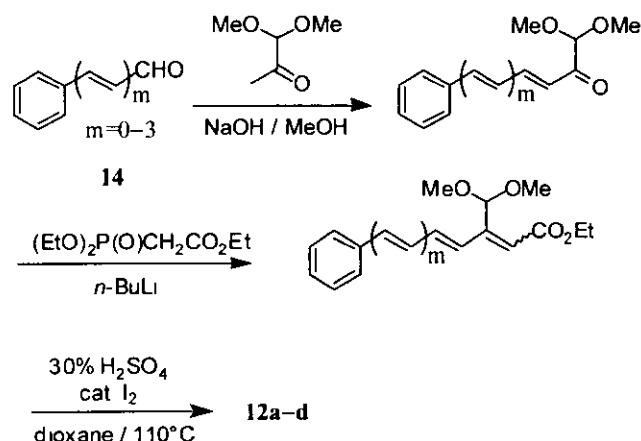
2) γ -ヒドロキシフテノリト類の合成と薬理活性

我々は、これまでの新しいレチノイト系抗腫瘍化合物の開発研究過程で、 γ -ヒドロキシフテノリト化合物(11)及び(12a)に強い抗腫瘍活性があることを見出した。しかし、その作用メカニズムについては調べていなかったため、今回(12a)に加えて共役系の長さか異なる化合物(12b-d)及び γ 位に水酸基を持たない13を新たに合成して、これらの抗腫瘍活性とその作用メカニズムについて調べることにした。



12a R=OH n=1 12d R=OH n=4
12b R=OH n=2 13 R=H n=3
12c R=OH n=3

化合物(12a-d)は、それぞれ対応するアルテヒト14から、ピルヒンアルテヒトシメチルアセタールとのアルトール反応、エステル側鎖の延長、酸処理によるフテノリト環の構築を経て合成した。また、化合物13は、化合物12cをヒトリト還元することにより合成した。



これらの抗腫瘍作用を HL-60 を用いて測定した結果、レチノイン酸と共役側鎖の長さか同し化合物 **12c** にのみ、非常に強いアポトーシス誘導作用が認められた。この作用は、濃度依存的なものではなく、高濃度 (10^6 M) においてのみ認められるものであった。また、転写活性試験の結果、このアポトーシス作用は、レチノイン酸のような RXR を介するものではないことがわかった。HL-60 細胞に対する分化誘導作用についても調べた結果、この場合も、**12c** にのみ、しかも高濃度 (10^6 M) において、単球への分化誘導作用が認められた。**12c** の γ 位に水酸基のない化合物 **13** には全く作用が認められなかったことから、これらの作用発現には γ 位の水酸基が必須であることがわかった。また、以前に抗腫瘍活性が認められた **12a** に、今回活性が認められなかったのは、活性試験に用いた細胞が今回は単球系癌細胞であるのに対し、以前は組織癌細胞であったためと推察している。

D 考察

レチノイン酸の共役系の長さを保持しながら、9 位及び 13 位の置換基変換体やシクロヘキセン部を芳香環に変換したものの合成を行い、その一部について薬理活性を検討した。今後の創薬の方向としては、共役系部の修飾を考えることも必要であると思われる。

E 結論

レチノイン酸アナログの 13 位置換体について、HL-60 に対する分化誘導作用と細胞増殖抑制作用を調べた結果、全トランス体では、13 位メチル基は必須であることが判明した。また 9-シス体では、活性が認められなかった。次にアポトーシス作用については、全トランス体では、活性がなく、9-シス体ではフチル置換体以外は全て

活性を示した。またアルテヒトから導いたトリフラートのカノプリンク反応は、ケトン、ラクトン等のカルボニル化合物から誘導したトリフラートにも応用可能であることを示した。次に、 γ -ヒドロキシフテノリト類の HL-60 に対する抗腫瘍活性は、 γ 位水酸基が必須で、**12c** にのみ高濃度で活性があることが判明した。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Jun'ichi Uenishi, Katsuaki Matsui and Akimori Wada, Trienylboronic Acid, a Versatile Coupling Tool for Retinoid Synthesis, Stereospecific Synthesis of 13-Aryl Substituted (11Z)-Retinal Tetrahedron Lett, 44 (15), 3093-6, 2003
- 2) Yumiko Yamano, Yuka Shimizu, and Masayoshi Ito Stereoselective Synthesis of Optically Active 3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol-glucosides Chem Pharm Bull, 51 (7), 878-82, 2003
プロシーディング
- 1) Akimori Wada, Kouki Fukunaga, Junichi Uenishi, Masayoshi Ito Stereocontrolled Synthesis of 13-Substituted 11Z-Retinoid Analogs Carotenoid Science, 6, 34-5, 2003
- 2) Yumiko Yamano, Yuka Shimizu, and Masayoshi Ito Synthetic Studies of C13-Norisoprenoid-glucosides Part 2 Stereoselective Synthesis of Optically Active 3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol-glucosides Carotenoid Science, 6, 36-7, 2003
総説
Akimori Wada Stereoselective Synthesis of Retinoids and Carotenoids by Carbon-Carbon Single Bond Formation Carotenoid Science, 6, 26-33, 2003

2 学会発表

- 1) 山野由美子、渡邊泰子、伊藤允好、渡邊修治「香気物質タマセノンの推定合成前駆体の立体選択的合成」第 299 回脂溶性ビタミン総合研究委員会 (2003 3 7 東京)
- 2) 和田昭盛、金城桂子、伊藤允好「5-ヘンシルレチノイン酸の合成」日本薬学会第 123 年会 (2003 3 28 長崎)
- 3) 山野由美子、伊藤允好「Vomifoliol 立体異性体の合成」日本薬学会第 123 年会 (2003 3 28 長崎)
- 4) 和田昭盛、中村佐栄子、松浦直美、伊藤允好「シクロヘキセン環の置換様式の異なる 9 シス-レチノイン酸類の合成研究」日本ビタミン学会第 55 回大会 (2003 5 29 出雲)
- 5) 和田昭盛、Govindarajulu Babu、下元さやか、伊藤允好「複素環を有するレチノイン酸アナログの合成」第 300 回脂溶性ビタミン総合研究委員会 (2003 6 20 神戸)
- 6) Xiaofeng Wang, Ritsuko Fujii, Yasushi Koyama, Yumiko Yamano, Masayoshi Ito, Seigo Ito and Shozo Yanagida "Building Solar Cells by the Use of Carotenoid Acid-TiO₂ Systems Dependence of the Conjugation Length" 第 17 回カロテノイト研究談話会 (2003 9 4 釜石)
- 7) Junfeng Xiang, Ritsuko Fujii, Yasushi Koyama, Ferdy S Rondonuwu, Yasutaka Watanabe, Yumiko Yamano, Masayoshi Ito, "Dependence of Conjugation Chain Length of Carotenoid Acid Analogues on Photoinduced Electron Injection from Their Excited Singlet States to TiO₂ Colloids" 第 17 回カロテノイト研究談話会 (2003 9 4 釜石)
- 8) 山野由美子、伊藤允好「エポキシトの開環反応を利用した cucurbitaxanthin A の合成研究」第 17 回カロテノイト研究談話会 (2003 9 4 釜石)
- 9) 和田昭盛、松浦直美、中村佐栄子、伊藤允好「エノールノナフラートのカップリング反応によるレチノイン酸アナログの合成」第 17 回カロテノイト研究談話会 (2003 9 4 釜石)
- 10) 古谷裕詞、岩本真幸、下野和実、和田昭盛、伊藤允好、加茂直樹、神取秀樹「赤外分光法によるファラオニスフォホロトプシンの光反応サイクルにおける構造変化の解析」第 41 回日本生物物理学会年会 (2003 9 23-5 新潟)
- 11) 和田昭盛、石田晃史、若林香織、伊藤允好「カルホニル化合物のエノールトリフラートのカップリング反応を利用したレチノイン酸アナログの合成」第 29 回反応と合成の進歩シンポジウム (2003 10 20 岐阜)
- 12) 山野由美子、伊藤允好「四置換エポキシトの開環反応を利用した capsanthin および cucurbitaxanthin A の全合成」第 29 回反応と合成の進歩シンポジウム (2003 10 21 岐阜)
- 13) 和田昭盛、石田晃史、若林香織、伊藤允好、水口ゆかり、中川公恵、岡野登志夫「芳香環を有するレチノイン酸類の合成と生物活性」日本レチノイト研究会第 14 回学術集会 (2003 11 13 東京)
- 14) 水口ゆかり、中川公恵、岡野登志夫、和田昭盛、伊藤允好、「ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) に対する新規レチノイト誘導体の分化誘導及びアポトーシス誘導作用」日本レチノイト研究会第 14 回学術集会 (2003 11 13 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

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

分担研究者 三木 直正
大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学 教授
入江 康至
大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学 助手

研究要旨

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ュハノクの機構に 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かわかった。今後は、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を用いて、同様の解析をおこなう必要があると考えられた。

A 研究目的

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を用いて、主として依存性薬物の毒性、依存形成に関わる遺伝子の発現について解析するため、そ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う。

B 研究方法

マウス神経幹細胞に種々の濃度のエタノールを培地に加え、細胞の成長に対する毒性について ATP アッセイ法により検討した。また、マイクロアレイ法により、エタノールによって発現量が変化する遺伝子を検索した。マウスにメタンフェタミンを急性あるいは慢性に投与し、遺伝子発現の変化について定量的 PCR 法により検討した。

（倫理面への配慮）

動物の取り扱いについては、大阪大学医学部動物実験カイトラインに従っておこなった。

C 研究結果

マウス神経幹細胞の成長に対するエタノールの毒性については、最終濃度 1% では有意な毒性は見られず、同 5% で明らかな毒性を認めた。また、マイクロアレイ法により、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かわかった。マウスにメタンフェタミンを投与し、急性投与群と慢性投与群で神経特異的最初期遺伝子 arc の遺伝子発現の変化について定量的 PCR 法により比較検討したところ、慢性投与群では全般的に発現量が低下しており、メタンフェタミン投与に対する発現誘導が

消失した。

D 考察

エタノールの毒性については、マウス神経幹細胞では最終濃度 1%では有意な毒性は見られなかったか、一方、ヒト神経幹細胞では 0.05%でも毒性があったという報告がある。このような大きな差は、単なる測定条件の違いではなく、種差によるものと考えられた。また、マイクロアレイ法により、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かわかった。メタンフェタミン慢性投与マウスで神経特異的最初期遺伝子 *arc* の遺伝子発現が全般的に低下しており、メタンフェタミン投与に対する発現誘導が消失したことは、耐性形成やフラノシユハックの機構に *arc* 産物かなんらかの役割を果たしている可能性が示唆された。

E 結論

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ックの機構に *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かわかった。今後は、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を用いて、同様の解析をおこなう必要があると考えられた。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) L-H Zeng, T Fujimoto, E Kumamaru, Y Irie, N Miki and C-H Kuo Characterization of novel Pura-binding proteins in mouse brain Neurochem Int, in press
- 2) T Fujimoto, H Tanaka, E Kumamaru, K Okamura and N Miki Arc interacts with microtubule/MAP2(microtubule-associated protein 2) and attenuates MAP2 immunoreactivity in the dendrites J Neurosci Res, in press
- 3) S Hiroi, Y Tsukamoto, F Sasaki, N Miki, E Taira Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in development and regeneration of chick sciatic nerve FEBS Lett, 554, 311-314, 2003
- 4) E Kumamaru, C-H Kuo, T Fujimoto, K Kohama, L-H Zeng, E Taira, H Tanaka, T Toyoda and N Miki Reticulon3 expression in rat optic and olfactory systems Neurosci Lett, 356, 17-20, 2004
- 5) E Taira, Y Tsukamoto, K Kohama, M Maeda, H Kiyama and N Miki Expression and involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in the development of chick optic tectum J Neurochem, 88, 891-899, 2004
- 6) E Taira, K Kohama, Y Tsukamoto, S Okumura and N Miki Characterization of gicerin/MUC18/CD146 in the rat nervous system J Cell Physiol, 198, 377-387, 2004

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

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

分担研究者 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室長・脳神経外科医長
山崎 智彦
産業技術総合研究所 ティノシュエンシニアリンク研究センター 客員研究員
主任研究者 金村 米博
産業技術総合研究所 ティノシュエンシニアリンク研究センター 研究員

研究要旨

水頭症関連疾患の中で全前脳胞症（Holoprosencephaly HPE）は最も予後不良の疾患として古くから注目されている。全前脳胞症発生機序に関する研究の中で、抗コレステロール剤が危険因子として注目されてきた。そこで私たちは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。薬剤安定性の評価あるいは特に催奇性の評価を行うに当たっては、評価システムとしてヒト幹細胞を用いたスクリーニング系の重要性が示唆された。

A 研究目的

全前脳胞症は胎生初期 3 脳胞期での前脳のパターンニングの異常と考えられている。その成因の研究の中で、低コレステロール血症あるいは、抗コレステロール剤の関与が指摘されてきた¹。また脳卒中や心筋梗塞などの予防にまた平滑筋細胞の移動や増殖を抑制することにより欠陥狭窄の予防効果があることなどから、近年抗コレステロール剤は最も広く汎用されている薬剤のひとつである^{2, 3}。抗コレステロール剤の安全性に対する評価および催奇性の危険因子としての検証を、神経幹細胞を用いた評価システムで行い、そのシステムの検討を行な

うことを目的とした。

B 研究方法

コレステロール合成過程の中で HMGCoA 還元酵素阻害剤である Simvastatin を神経幹細胞、ヒト細胞株（U251）、マウス神経幹細胞培養液の中に添加し、Simvastatin の増殖率に与える影響を比較検討した。細胞数は Promega CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay を用いて ATP 法により測定した。また、代謝産物であるメハロン酸やコレステロールを添加することによって Simvastatin によるヒト神経幹細胞の増殖阻害における

影響を検討した。また Simvastatin 添加によるたんぱく質発現量の変化を SELDY-TOFMS 方式のプロテインチップで検討した。

C 研究結果

(1) ヒト細胞株 (U251) の3日目での増殖率は Simvastatin 濃度か 1080ng/ml で無添加の場合の約 50%まで低下した (図 1)。

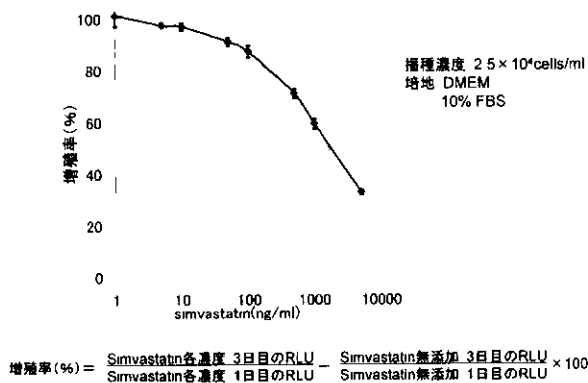


図 1 Simvastatin のヒト細胞株 (U251) の増殖における影響

マウス神経幹細胞の3日目での増殖率は Simvastatin 濃度か 85ng/ml で無添加の場合の約 50%まで低下した (図 2)。Simvastatin の影響は種によって異なり、ヒト細胞よりマウス神経幹細胞の方がより低濃度で増殖が阻害された。

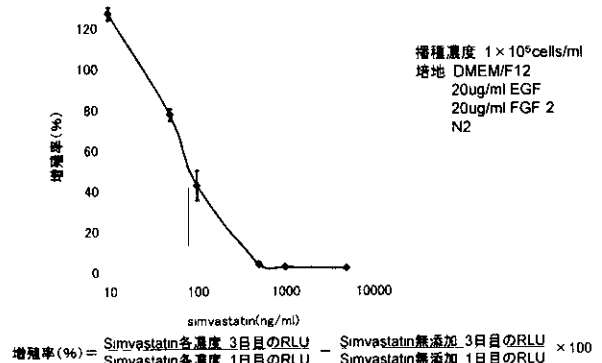


図 2 Simvastatin のマウス神経幹細胞の増殖における影響

(2) Simvastatin 無添加、10ng/ml 添加、70ng/ml 添加、250ng/ml 添加でのたんぱく質発現量の変化を見ると、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。(図 3) (Fig 6)

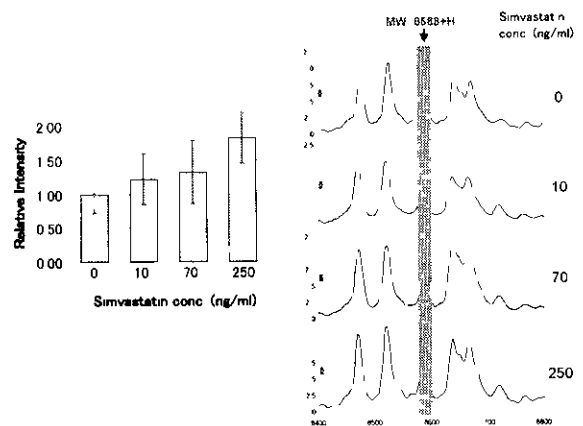


図 3 Simvastatin 投与により、濃度依存性に増加するタンパク質

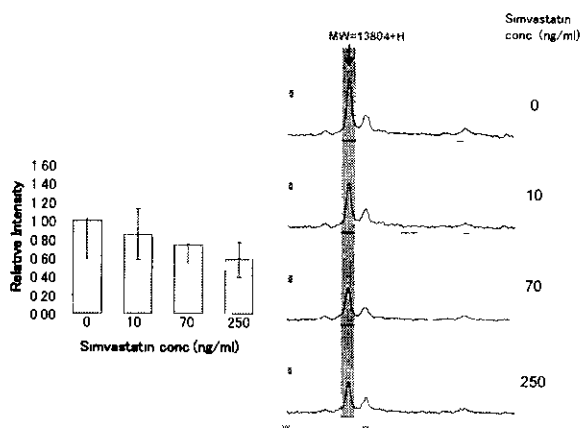


図4 Simvastatin 投与により、濃度依存性に減少するタンパク質

D 考察

近年食生活の欧米化による高脂血症の罹患率の増加にともない、高脂血症か虚血性心疾患や脳卒中の危険因子として注目されてきた。そのような中で HMG-CoA 還元酵素阻害薬を用いた大規模臨床試験により、コレステロールの低下か虚血性心疾患や脳卒中の発症予防に有効であるとの結果が示され、抗コレステロール剤は近年最も汎用されている薬剤のひとつである。全前脳胞症 (Holoprosencephaly HPE) は 10000 出生あたり 0.5 と発症頻度は高くはないが、予後の悪い中枢系先天異常疾患のひとつである。以前よりその成因については、けっ歯類の研究において胎生初期に低コレステロール状態を引き起こす薬剤の投与により HPE 様の表現型を呈することから、抗コレステロール剤はその危険因子として注目されていた¹。これまでに HPE の原因遺伝子として 6 種類の遺伝子の異常が報告されているか、その中で最も重要なものは 7q36 に存在する Sonic Hedgehog (SHH) gene である⁴。Sonic Hedgehog (Shh) は、発生初期に前脳の神経管腹側のパターンニングに重要な分子である。SHH の遺伝子異常は、家族性 HPE の 14~23%、孤発性 HPE の約 10% に見出されている。最近、Shh のレセプタ

ーである PATCHED-1 の 4 種類の遺伝子異常も HPE の 5 家系に同定されている⁵。Shh はレセプターである PATCHED (Ptc) と結合するとき、Shh-N の C 端で Cholesterol modification を受けることは知られている⁶。今回の研究の中で抗コレステロール剤か神経幹細胞の増殖を抑制する結果を得たか、この現象か Shh を介した系か関与しているのかどうかは、今回濃度依存的に増加あるいは減少する分子をプロテインチップをもちいて同定することによって明らかになっていくものと考えられる。

また、今回の結果の中でヒト細胞とマウス神経幹細胞として同じ薬剤の影響が異なっていたことを考えると、薬剤安定性の評価あるいは特に催奇性の評価を行うに当たっては、評価システムとしてヒト幹細胞を用いたスクリーニング系を構築することの重要性が示唆される結果であった。

E 結論

(1) 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た。ヒトよりマウスの神経幹細胞の方がより低濃度で増殖が阻害された。ヒト由来の細胞でも細胞種により作用濃度が異なった。

(2) 抗コレステロール剤添加の濃度依存的に増加する蛋白 (MW, 8588) と減少する蛋白 (MW, 13804) が見出された。

(3) 薬剤安定性の評価あるいは特に催奇性の評価を行うに当たっては、評価システムとして評価システムとしてヒト幹細胞を用いたスクリーニング系を構築することの重要性が示唆される結果であった。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- なし
2 学会発表
なし

a link to Sonic Hedgehog Am J Med
Genet73,24-37,1997

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

文献

- 1 Repetto M, Maziere JC, Citadelle D et al
Teratogenic effect of cholesterol synthesis
inhibitor AY9944 on rat embryos in vitro
Teratology 1990 611-618
- 2 Porter KE, Naik J, Turner NA et
al Simvastatin inhibits human saphenous
vein neointima formation via inhibition of
smooth muscle cell proliferation and
migration J Vasc Surg 2002,36-150-7
- 3 Sindermann JR, Fan L, Weigel KA et
al Differences in the effects of HMG-CoA
reductase inhibitor on proliferation and
viability of smooth muscle cells in culture
Atherosclerosis 150,331-341,2000
- 4 Roessler E, Bellone E, Gaudenz K et al
Mutations in the human sonic hedgehog
gene cause holoprosencephaly Nat
Genet 14 357-360,1996
- 5 Ming JE, Kaupas ME, Roessler E et al
Mutations in PATCHED-1, the receptor for
SONIC HEDGEHOG, are associated with
holoprosencephaly Hum Genet 110 2
97-301,2002
- 6 Lanoue L, Edhart DB, Hinsdale ME et al
Limb, genital, CNS and facial malformation
result from gene/environment-induced
cholesterol deficiency further evidence for

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍名 (編集者名)	出版社名 (出版地)	巻頁 出版年
Yamano, Y Shimizu, Y <u>Ito, M</u>	Stereoselective Synthesis of Optically Active 3-Hydroxy-7, 8-dihydro- β -ionol-glucosides	Chemical & Pharmaceutical Bulletin		51(7) 878-882, 2003
Wada, A Sawada, K Ono, N <u>Ito, M</u>	An Improved Synthesis of Benzocycloalkanone Derivatives	Chemical & Pharmaceutical Bulletin		52(1) 132-135, 2004
Hagiwara, K Wada, A Katadae, M <u>Ito, M</u> Ohya, Y Casey, P J Fukada, Y	Analysis of the Molecular Interaction of the Farnesyl Moiety of Transducin through Use of a Photoreactive Farnesyl Analog	Biochemistry		43(2) 300-309, 2004
Wada, A Takakura, Y Yamazaki, K Takahashi, T <u>Ito, M</u>	Synthesis of 8,16-Ethano-retinals and Their Interactions with Apoprotein of Phoborhodopsin from <i>Natronobacterium</i> <i>Pharaonis</i>	Letters in Organic Chemistry		1(1) 59-62, 2004
Wada, A Fukunaga, K Uenishi, J <u>Ito, M</u>	Stereocontrolled Synthesis of 13-Substituted 11Z-Retinoid Analog	Carotenoid Science		6 34-5, 2003
Yamano, Y Shimizu, Y <u>Ito, M</u>	Synthetic Studies of C ₁₃ - Norisoprenoid-glucosides Part 2 Stereoselective Synthesis of Optically Active 3-Hydroxy-7, 8-dihydro- β -ionol- glucosides	Carotenoid Science		6 36-7, 2003
Tonchev, A B Yamashima, T Zhao, L <u>Okano, H</u>	Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of adult primates	Glia		42 209-224, 2003

Tonchev, A B Yamashima, T Zhao, L Okano, H J <u>Okano, H</u>	Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys	Molecular and Cellular Neuroscience	23 292-301, 2003
Kuo, H -C Pau, F K Y Yeoman, R R Mitalipov, S M <u>Okano, H</u> Wolf, D P	Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages	Biology of Reproduction	68 1727-1735, 2003
Kayahara, T Sawada, M Takaishi, S Fukui, H Seno, H Fukuzawa, H Suzuki, K Hiai, H Kageyama, R <u>Okano, H</u> 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 Letters	535, 131-135, 2003
Sasaki, T Kitagawa, K Sugimura, S Omura-Matsuoka, E Tanaka, S Yagita, Y <u>Okano, H</u> Matsumoto, M Hori, M	Implication of Cyclooxygenase-2 on Enhanced Proliferation of Neural Progenitor Cells in the Adult Mouse Hippocampus After Ischemia	Journal of Neuroscience Research	72 461-471, 2003
Yuasa, Y Okabe, M Yoshikawa, S Tabuchi, K Xiong W-C Hiromi, Y <u>Okano, H</u>	Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors	Development	130 2419-2428, 2003

Uchida, K <u>Okano, H</u> Hayashi, T Mine, Y Taniguchi, Y Nomura, T Kawase, T	Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons	Journal of Neuroscience Research	72 661-669, 2003
Kokuzawa, J Yoshimura, S Kitajima, H Shinoda, J Kaku, Y Iwama, T Morishita, R Shimazaki, T <u>Okano, H</u> Kunisada, T Sakai, N	Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neural differentiation of neural stem cells from mouse embryos	Molecular and Cellular Neurosciences	24 190-197, 2003
Ishizuya-Oka, A Shimizu, K Sakakibara, SI <u>Okano, H</u> Ueda, S	Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling	Journal of Cell Science	116 3157-3164, 2003
Kanuka, H Kuranaga, E Hiratou, T Igaki, T Nelson, B <u>Okano, H</u> Miura, M	Cytosol-endoplasmic reticulum interplay by Sec61alpha translocon in polyglutamine-mediated neurotoxicity in Drosophila	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	100 11723-11728, 2003
Tamaki, T Akatsuka, A Okada, Y Matsuzaki, Y <u>Okano, H</u> Kimura, M	Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle	Experimental Cell Research	291 83-90, 2003

<p>Miyanomori, Y Kobayashi, H Imai, T Watanabe, M Nagata, T Uesugi, S <u>Okano, H</u> Katahira, M</p>	<p>Origin of higher affinity to RNA of the N-terminal RNA-binding domain than that of the C-terminal one of a mouse neural protein, musashi1, as revealed by comparison of their structures, modes of interaction, surface electrostatic potentials, and backbone dynamics</p>	<p>Journal of Biological Chemistry</p>	<p>278 41309-41315, 2003</p>
<p>Yoshida, T Tokunaga, A Nakao, K <u>Okano, H</u></p>	<p>Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas</p>	<p>Differentiation</p>	<p>71 486-495, 2003</p>
<p>Hu, QD Ang, BT Karsak, M Hu, WP Cui, XY Duka, T Takeda, Y Chia, W Natesan, S Ng, YK Ling, EA Israel, A Maciag, T Small, D Trifonova, R Kopan, R <u>Okano, H</u> Nakafuku, M Chiba, S Hirai, H Schachner, M Pallen, CJ Watanabe, K Xiao, ZC</p>	<p>F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation</p>	<p>Cell</p>	<p>115 163-175, 2003</p>
<p>Okada, S Nakamura, M Mikami, Y Ohsugi, Y Yoshizaki, K</p>	<p>Blockade of interleukin-6 receptor ameliorates functional recovery in spinal cord injury</p>	<p>Journal of Neuroscience Research</p>	<p>In press</p>

Kishimoto, T Toyama, Y <u>Okano, H</u>				
Yamashima, T Tonchev, B A Seki, T Sawamoto, K <u>Okano, H</u>	Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia	Hippocampus		In press
Matsuzaki, Y Kinjo, K Mulligan, RC <u>Okano, H</u>	Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cell	Immunity		20 87-93, 2004
Murata, J Murayama, A Hori, A Doi, K Harada, T <u>Okano, H</u> Kubo, T	Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochler of young adult mice	Neuroscience Letter		354 201-204, 2004
<u>Okano, H</u> Ogawa, Y Nakamura, M Kaneko, S Iwanami, A Toyama, A	Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury	Seminars in Cell and Developmental Biology		14 191-198, 2003
Hisahara, S <u>Okano, H</u> Miura, M	Caspase-mediated oligodendrocyte cell death in the pathogenesis of autoimmune demyelination	Neuroscience Research		46 387-397, 2003
Nakamura, Y Yamamoto, M Oda, E Yamamoto, A <u>Kanemura, Y</u> Hara, M Suzuki, A <u>Yamasaki, M</u> <u>Okano, H</u>	Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development	Laboratory Investigation		83 479-489, 2003

<u>Okano, H</u>	Making and repairing the mammalian brain Introduction	Seminars in Cell and Developmental Biology		14 159, 2003
<u>Okano, H</u>	Neural stem cells as therapeutic agents for CNS injuries and disorders	International Congress Series		1810, 1-6, 2003
<u>山崎 麻美</u> <u>金村 米博</u>	神経幹細胞の供給源 胎児脳成人脳	CLINICAL NEUROSCIENCE	中外医学社	21(10) 1119-1121, 2003
<u>岡本 伸彦</u> <u>金村 米博</u> <u>山崎 麻美</u>	小脳形成異常症における遺伝子異常の検索	臨床細胞分子遺伝	臨床細胞分子遺伝研究会	8 26-29, 2003
<u>金村 米博</u>	再生医療の産業化 国内外の現状と今後の問題点	実験医学	羊土社 (東京都)	21(8) 1134-1141, 2003
<u>金村 米博</u>	医療はサービス産業になり得るか	第2種基礎研究 (吉川弘之 内藤耕)	日経B P社 (東京都)	166-181, 2003
<u>金村 米博</u>	神経機能の回復に有望な神経再生	AIST Today	独立行政法人産業技術総合研究所 (つくば市)	4(3) 14, 2004
<u>Nagahata, T</u> <u>Onda, M</u> <u>Emi, M</u> <u>Nagai, H</u> <u>Tsumagari, K</u> <u>Fujimoto, T</u> <u>Hirano, A</u> <u>Sato, T</u> <u>Nishikawa, K</u> <u>Akiyama, F</u> <u>Sakamoto, G</u> <u>Kasumi, F</u> <u>Miki, Y</u> <u>Tanaka, T</u> <u>Tsunoda, T</u>	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