

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 16 年度 総括・分担研究報告書**

平成 17 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16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17(2005)年4月

平成 16 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 セルエンジニアリング研究部門	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	国立病院機構大阪医療センター 臨床研究部政策医療基盤技術開発研究室	室 長
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セルエンジニアリング研究部門 金村 米博

## II. 分担研究報告

1. 多能性幹細胞から各種神経細胞の作成に関する研究 .....9  
慶應義塾大学医学部生理学教室 岡野 栄之
2. マイクロアレーの網羅的遺伝子発現解析における統計数学的手法と  
包括的知識ベースに基づく微小変動遺伝子抽出法の開発に関する研究 ..... 13  
理化学研究所遺伝子多型研究センター 角田 達彦
3. 薬剤安全性評価システム開発における SELDI-TOFMS 法と  
二次元電気泳動法の利用法の検討 ..... 17  
産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門 山崎 智彦  
金村 米博
4. 新規レチノイン酸誘導体の合成と薬理作用 ..... 25  
神戸薬科大学薬学部生命有機化学研究室 伊藤 允好
5. 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 ..... 29  
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
6. ヒト羊膜上皮細胞からの神経系細胞への分化誘導の可能性の検討 ..... 33  
国立病院機構大阪医療センター臨床研究部 山崎 麻美  
産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門 金村 米博  
山本 篤世

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 37

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 セルエンジニアリング研究部門 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

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

ヒト神経系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系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、倫理性ならびに多数の異なる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-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・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) ヒト羊膜上皮細胞からの神経系細胞への分化誘導の可能性の検討

山崎は、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、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、安定的且つ恒常的に使用可能な細胞ソースとして、ヒト羊膜上皮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。羊膜上皮細胞は形態学的にはグリア様付着性細胞に分化し、GFAP を発現することが確認された。この結果、ヒト羊膜上皮細胞は少なくとも 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、羊膜上皮細胞由来グリア様細胞を用いた薬剤安全性評価システムの構築に道を開く成果と考えられる。

#### 2) 多能性幹細胞からの各種神経細胞の作成に関する研究

岡野は、多能性幹細胞の1つである胚性幹細胞 (ES 細胞) から神経幹細胞を誘導し、その過程で様々な分泌因子を加えることで、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) で選択的に障害される前脳型コリン作動性ニューロンと運動ニューロン及びその前駆細胞を誘導する培養法を確立した。具体的には、前方神経誘導因子および低濃度のレチノイン酸 (RA) を用いて形成させた胚様

体を分散し、線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 存在下で浮遊培養してニューロスフェアの形成を試み、その後必要に応じて腹側化因子である sonic hedgehog をニューロスフェア形成時に加えることで、前方神経誘導因子、および低濃度 RA を用いて誘導したニューロスフェア中の神経系前駆細胞を腹側化し、それぞれ、腹側の神経管より生み出される前脳型コリン作動性ニューロン (Isl-1 陽性、Choline acetyl transferase (ChAT) 陽性)、および後脳、脊髄より生み出される運動ニューロン (Isl-1 陽性、HB9 陽性、ChAT 陽性) を、より高率に誘導できることが明らかになった。またこれら作成された神経細胞の機能は電気生理学的手法 (パッチクランプ法) で検証された。

この分化誘導システムは *in vivo* でヒト幹細胞から神経系前駆細胞、さらに各種神経細胞が分化するメカニズムを *in vitro* で模倣するすぐれたシステムであり、ヒト幹細胞からの薬剤安全性評価システムの開発に応用することが有用な成果であると考えられる。

#### 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および数理解析手法の改良・開発、ゲノムデータベースおよびパスウェイデータベースをはじめとする各種データベース情報を統合させた検索システムの構築、そして新規な薬剤関連遺伝子および関連パスウェイの解析手法の確立を行った。

今年度は特に、2色法に基づくマイクロアレー法で問題となる蛍光色素依存的な偏りを改善するための色素交換実験 (DyeSwap) を行ない、そのデータから色素依存的な偏りを補正する数理解析手法を開発した。それにより、DyeSwap 実験の補正と各スライドでの正規化を施すことで、マイクロアレー上で1.33倍以上の発現量の差が認められれば、統計学的に 99.9%以上の信頼性で発現に差があると言えるまでの解析精度の向上が見られ

た。これによりゲノムワイドな遺伝子発現情報の解析に際し、薬剤に応答する個々の遺伝子のみならずネットワークという視点から応答経路を俯瞰的に捉えることが可能となった。実際に今回開発したシステムが有用であることを、ヒト間葉系幹細胞および羊膜上皮細胞由来の神経系細胞を用いた *in vitro* 系およびマウスを用いた *in vivo* 系において、向精神薬応答遺伝子群の探索、そして有意に変動が見られるパスウェイの抽出を行なうことにより実証した。本研究により薬剤作用・副作用点の解明、薬剤安全性評価システムへの応用、新規薬剤開発へと繋がる遺伝子発現解析システムが整備されたと考える。

#### 4) 薬剤安全性評価システム開発における SELDI-TOFMS 法と二次元電気泳動法の利用法の検討に関する研究

山崎、金村は、細胞内の蛋白質の発現挙動を調べる方法として SELDI-TOFMS 法ならびに二次元電気泳動法の検討を行った。両者の特性を生かすことで分子量 0-100kDa までの広い範囲を網羅的にカバーできることが示され、また薬剤添加により発現量の変化する蛋白質を同定した。多サンプル、少サンプル量、短時間かつ低コストにハイスループット解析を行う薬剤安全評価システムの開発では、一次解析は迅速な SELDI-TOFMS 法を用い、顕著な差のあるサンプルのみに二次元電気泳動法を二次解析として行い、基礎データの蓄積を行うことがもっとも効率的であることを見出した。

以上の成果は、プロテオーム解析を用いたトキシコゲノミクス技術の開発に大きく貢献するものと考えられる。

#### 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。

今年度は、ボロン酸を用いた鈴木カップリング反応で、レチノイン酸骨格構造の1位から8位までを複素環に代えたレチノイン酸アナログを合成し、HL-60 細胞に対する細胞増殖抑制作用、分化誘導作用、アポトーシス作用および RXR $\alpha$  への転写活性を検討した結果、転写活性で顕著な構造活性相関がみられた。即ち、レチノイン酸の8位までを芳香環に変えたアナログで9CRA よりも強い活性を示し、ベンゼン環がなくなるとその活性は著しく低下する。しかし、二重結合をいれると、転写活性が回復することがわかった。これら新規に合成されたレチノイン酸アナログを用いて、神経系細胞での毒性評価を行い、薬剤構造の違いに基づく遺伝子・たんぱく質発現解析を実施した。

#### 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、入江は、マウス神経幹細胞、マウス脳、マウス由来培養細胞株を用いてエタノール、メタンフェタミンなど依存性薬物の影響を検討した。マウス神経幹細胞については、毒性試験ではヒト細胞と比較して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が明らかになった。マウス脳において、METH 急性および慢性投与後、17種の遺伝子について発現変化を詳細に検討した。その結果、これらの遺伝子群の発現変化にはいくつかのパターンがあり、最初期遺伝子群やアポトーシス関連遺伝子群が逆耐性形成やフラッシュバックの機構になんらかの役割を果たしていることが示唆された。ドパミン作動性ニューロン様培養細胞株 CATH. a に種々の濃度の Methamphetamine を投与したところ、濃度依存的にアポトーシスをおこした。これは、METH 全身投与後の線条体におけるドパミン終末消失のモデル系と考えられ、遺伝子発現変化を含めた細胞毒性機序の解明は、薬物依存の機構解明に大きく寄与すると考えられた。

以上の研究成果はヒト神経系細胞での依存性薬物の影響を検討する点で有益な情報をもたらす成果であると考えられた。

#### D. 考察

最終年度である今年度は、主任研究者および各分担研究者の研究開発成果を取りまとめ、研究組織全体として有機的に連携し、当初の研究開発目標の達成を目指した。

##### 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

薬剤毒性試験用の *in vitro* 評価用基準ヒト神経系細胞として研究開発に利用するヒト細胞には、以下の3つの条件を満たすことが必要であると考えられる。

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ヒト細胞
2. 神経系細胞としての生理的機能を有するヒト細胞
3. 倫理的に社会的に受容されるヒト細胞であること

そして、これら3条件を満たした *in vitro* 評価用基準ヒト神経系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。

現在まで、神経系細胞への分化能力の報告があるヒト細胞は多岐に渡るが(表1)、それらにはそれぞれの特有の生物学的特性、倫理性を有する。

	利点	検討課題
胎児神経組織由来	神経幹細胞で大量培養可能 神経系細胞としての機能保持	倫理性 多数ロット獲得困難 (遺伝的ばらつきあり)
ES細胞由来	高い分化能、増殖能 神経系細胞としての機能保持	倫理性、 多数ロット獲得困難 (遺伝的ばらつきあり)
成人神経組織由来	神経幹細胞である 神経系細胞としての機能保持	増殖率わるく大量培養困難 倫理性 多数ロット獲得困難 (遺伝的ばらつきあり)
骨髄細胞(間葉系幹細胞)	細胞量の確保が比較的容易 一定量ロット獲得の可能性あり	分化能は長期培養では安定的ではない 神経細胞の代替としての有用性は未知 倫理性(同種を多数獲得の場合)
臍帯血細胞	多数ロット獲得の可能性あり	分化能は安定的ではない 神経細胞の代替としての有用性は未知
羊膜上皮細胞	多数ロット獲得の可能性あり	分化能は安定的ではない 神経細胞の代替としての有用性は未知
皮膚細胞	採取は比較的容易	分化能は安定的ではない 神経系細胞の代替としての有用性は未知
鼻粘膜上皮細胞	神経系細胞由来と考えられる	分化能は安定的ではない 神経系細胞の代替としての有用性は未知

表1 神経系細胞への分化の報告のあるヒト細胞ソース

純粋に神経系細胞への分化能力の点だけを考慮すると、ES細胞や神経組織由来神経幹細胞などが細胞の生物学的能力の点でもまた過去の基礎研究の成果の点でも実績があり、使用を考慮すべき細胞と考える。しかし、これら細胞は必ずしも上記3条件を満たすものではなく、細胞の使用に際し、厳しいガイドラインが存在したり(ヒトES細胞)、あるいはガイドラインそのものが未整備(胎児神経細胞など)で、一般的使用に耐える状態にはない。

本研究ではより普遍的に使用可能な細胞ソースの開発を目指し、平成14年度はヒト臍帯血細胞、15年度は長期培養したヒト間葉系幹細胞から、今年度はヒト羊膜上皮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(表1 灰色)。その結果、非神経細胞であるこれら3種類の細胞は少なくともGFAP陽性グリア様細胞を作成するための細胞ソースとして応用利用することが可能で



あることが示唆された。

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3種類のヒト細胞から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。実際に、これらヒト細胞に抗うつ薬 (SSRI) を添加し、マイクロアレー実験によって向精神薬応答遺伝子群を解析したが、この薬剤のヒト正常神経細胞に対する作用・副作用機序に関与するとみられるパスウェイが複数発見されるに至る成果を得ることが出来た。

以上から考えると、ヒト臍帯血細胞、長期培養したヒト間葉系幹細胞、ヒト羊膜上皮細胞は多数の異なる SNP を有する GFAP 細胞の作成を可能とし、社会的にも倫理的にも許容されやすいヒト細胞ソースであると結論づけられた。

問題点としては、これら3種類の細胞から作成した GFAP 陽性細胞は、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る。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、非神経系細胞から作製された GFAP 陽性細胞を用いた毒性スクリーニングの有用性と限界点を見極めて行く必要があると考えられる。そのためには今後、実際に多薬剤を用いた毒性スクリーニングを実施し、それらデータの整合性を検証していくことが必要と思われた。

また、神経細胞に対しての毒性試験を考えた場合は、毒性試験用細胞としての質の確保とその安定度、信頼性を考えると、現状の分化誘導法を用

いて品質の高いヒト神経細胞を非神経系細胞から安定的に作成することには困難があると考えられる。ヒト神経細胞をターゲットとした精度の高い毒性試験系を構築するためには、ES 細胞や神経組織由来細胞の利用方法なども検討する必要があると考えられた。

本テーマに関しては当初目標をほぼ満足させる成果を上げたものとする。

## 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

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ほぼ確立でき、本年度はその問題点の修正と、実際のヒト細胞を用いての毒性関連遺伝子、遺伝子ネットワークの抽出を試み、構築してきた評価技術の妥当性を最終検証した。

今年度は、前年度までに構築してきた2色の蛍光色素 (Cy3,Cy5) を用いてサンプルを標識し、約 32400 種類の合成オリゴがプリントされたガラススライドタイプのマイクロアレーを用いて解析を行う上で問題となることが判明した蛍光色素依存的な偏りを補正するために、色素交換実験 (DyeSwap) をおこない、そのデータから色素依存的な偏りを補正する数理解析手法を開発した。その結果、DyeSwap 実験の補正と各スライドでの正規化を施すことで、マイクロアレー上で1.33倍以上の発現量の差が認められれば、統計学的に99.9%以上の信頼性で発現に差があると言えるようになり、マイクロアレーの精度の大きな向上を達成することができた。

2色法に基づくマイクロアレーはケースとコントロールを同時スポットで比較するために実験誤差が出にくくコストも抑えられるというメリットがあり、トキシコゲノミックスの手法としては有益なものと考えられるが、蛍光色素依存的な偏りがあり、特に薬剤添加の有無のみが異なるサンプルのように遺伝子発現変化量が微少な場合や低発現遺伝子が多い場合、色素依存的な偏りは大きな

障害となる。この点を克服できたことは、マイクロアレーを用いたトキシコゲノミックス手法の確立に大きく貢献できたものとする。

実際に、ヒト神経系細胞を用いた毒性関連遺伝子、遺伝子ネットワーク抽出の試みでは、GFAP陽性細胞に対する抗うつ薬（SSRI）の作用・副作用機序に関与するとみられるパスウェイが複数発見されるに至った。このことから、今回構築したヒト細胞系、マイクロアレー実験系の組み合わせは、ヒト神経系細胞への薬剤毒性の評価システムとして有益な情報をもたらすものであると考えられた。今後、より多くの事例を重ねることで微修正を加えていくことでさらにシステムの改良が図れるものとする。

本テーマに関しては当初目標をほぼ達成した成果を上げたものとする。

### 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

タンパク質の解析に関しては、16年度は前年度同様、SELDI-TOFMS方式のプロテインチップを用いた解析とさらに2次元電気泳動法の両方を併用して実施し、それぞれの解析方法の特性の把握と、トキシコゲノミックスへの応用に関して包括的に検討した。

SELDI-TOFMS方式のプロテインチップを用いた解析は、主に分子量0-20kDaの範囲の低分子蛋白質マーカーを簡便に且つ、迅速にスクリーニングすることに優れた方法であることが判明した。実際にこの範囲で、複数の薬剤の影響で同じ挙動を示すユビキタスマーカーの同定に成功し、具体的な蛋白質の同定に至った物もあった。一方、2次元電気泳動法はSELDI-TOFMSより、より大きな分子量域の15-100kDaの毒性マーカー探索に適した方法であると思われた。1回の解析にかかる時間、コスト、労力はSELDI-TOFMSよりは大きいものがあるが、1回の解析で得られる情報量はSELDI-TOFMSより大きいものであった。以上を考えると、この両者のいずれかのみを利用して毒

性関連プロテオーム情報を取得するのではなく、両者の長所を上手く組み合わせた併用方法が最も適した解析方法であるとの結論に至った。

多薬剤を用いた蛋白質発現量の変化を基準としたトキシコゲノミックスシステムの開発を考えた場合、処理速度、サンプル数、コスト等を考慮すると、薬剤種類と添加濃度の条件を多く実験する必要のある一次解析は迅速なSELDI-TOFMS法を用い、一次解析で顕著な差のあったサンプルのみを選択して、二次元電気泳動法を行うことにより、ハイスループットに効率よくかつ低コストでプロテオーム解析ができると考えられた。

本テーマに関しては当初目標をほぼ達成した成果を上げたものとする。

### 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

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、14年度の設定したように、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。

今年度も前年度に継続して、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（バルプロ酸）、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が遺伝子、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、たんぱく質が同定されるに至った。またヒト神経系細胞を用いての解析も実施され、毒性・副作用関連候補遺伝子・蛋白質が複数同定され、今後の研究につながる成果を上げることが得られたものと思われる。

遺伝的多型情報の異なるヒト神経系細胞を用いての解析に関しては、最終的にどのヒト細胞を評価用細胞として用いることが妥当であるかの判断に最終年度まで要した関係で当初目標を十分に達成するには至らなかった。ただ、1) に示したとおり、比較的多数のロットの確保がしやすいヒト細胞（ヒト臍帯血細胞、長期培養したヒト間葉系幹細胞、ヒト羊膜上皮細胞）の使用が可能であることを示したことで、今後、SNP情報の異なるヒト細胞を適切な形（各種ガイドライン遵守）で用いた薬剤評価が実施できる可能性が示唆されたと考えられ、当初のゴールに向かうための方向性はこの3年間で示すことが出来たと考えられた。

#### E. 研究総括

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を目指した3年間のプロジェクトであったが、使用細胞の選定、マイクロアレー解析方法、評価方法、プロテオーム解析方法、評価方法に十分な成果を上げることが出来、ヒト正常神経系細胞（GFAP陽性細胞）を用いた薬剤安全性評価システムを構築することが達成できたと考える。



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

多能性幹細胞から各種神経細胞の作成に関する研究

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

胚性幹細胞（ES 細胞）から神経幹細胞を誘導し、その過程で様々な分泌因子を加えることで、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）で選択的に障害される前脳型コリン作動性ニューロンと運動ニューロン及びその前駆細胞を誘導する培養法を確立した。さらに、この神経系前駆細胞の *in vitro*、*in vivo* における性質を明らかにし、薬剤安全性評価システムの開発に応用する。

A. 研究目的

胚性幹細胞（ES 細胞）から未分化神経系前駆細胞を多く含む細胞塊であるニューロスフェアを誘導し、その過程で中枢神経の発生過程において領域特異性の決定に重要な役割を果たしている分泌因子を、発生過程と同様に添加することで、その時間的・空間的特異性を制御し、前脳型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する。さらに、誘導した細胞の *in vitro*、*in vivo* における性質を明らかにし、薬剤安全性評価システムの開発に応用する。

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。これまでの研究で、EB 形成時に神経組織の誘導と前脳の形成に重要な役割を果たす因子（前方神経誘導因子）、および神経誘導因子であり、かつ後方化因子でもあるレチノイン酸（RA）を低濃度で作用させることにより、未分化神経系前駆細胞を多く含む EB を形成し、EB 中に含まれる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できることを報告してきた（Okada et al., *Dev Biol* 2004）。そこで、

次のステップとして、これまでの解析結果を用いて前方神経誘導因子または低濃度 RA を用いて形成した EB から未分化神経系前駆細胞を豊富に含むニューロスフェアを効率よく誘導する培養系を確立し、その前駆細胞の持つ、時間的・空間的特異性を解析する。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。また、ニューロスフェア形成時に、腹側化因子として重要な Sonic hedgehog（Shh）を添加することで、前方神経誘導因子または低濃度 RA を用いて誘導したニューロスフェアを腹側化し、それぞれ前脳腹側より発生する前脳型コリン作動性ニューロン、および後脳、脊髄の腹側より発生する運動ニューロンの誘導法の確立を試みる。次に、誘導した細胞のニューロンとしての機能を、細胞培養や電気生理学的手法を用いて明らかにする。また、誘導した細胞の *in vivo* での動態と機能について解析を行う。特に運動ニューロンを生み出すニューロスフェアについては ALS モデル動物である変異型 SOD1（G93A）トランスジェニックラット：mSOD1 ラット）の脊髄に移植し、免疫染色法により移植細胞の性質を、さらに運動機能の改善についても解析する。また、これらの培養法をヒト ES 細胞に応用し、ヒト ES 細胞から様々な特異的なニューロンおよ

びその前駆細胞を誘導する培養法を確立する。

(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。また、モデル動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。

### C. 研究結果

これまでの研究で、RA は濃度依存的に神経分化を促し、前方神経誘導因子および低濃度 RA を用いて EB を形成させると、Nestin 陽性、Sox1 陽性の未分化神経系前駆細胞が高率に誘導されること、また RA は濃度依存的に EB 中の神経系前駆細胞を後方化し、前方神経誘導因子を用いると前方の、一方で低濃度 RA を用いると中脳および後脳の、高濃度 RA を用いると後脳および脊髄の領域特異性を獲得した神経系前駆細胞が誘導されることを明らかにしてきた (Okada et al., *Dev Biol* 2004)。そこで前方神経誘導因子および低濃度の RA を用いて形成させた EB を分散し、線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 存在下で浮遊培養してニューロスフェアの形成を試みたところ、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ニューロンおよびグリアを生み出した。この結果はまずニューロンが、後にグリアが生み出される中枢神経の発生をよく模倣していると考えられた。さらに、腹側化因子である Shh をニューロスフェア形成時に加えることで、前方神経誘導因子、および低濃度 RA を用いて誘導したニューロスフェア中の神経系前駆細胞を腹側化し、それぞれ、腹側の神経管より生み出される前脳型コリン作動性ニューロン (Isl-1 陽性、Choline acetyl transferase (ChAT) 陽性)、および後脳、

脊髄より生み出される運動ニューロン (Isl-1 陽性、HB9 陽性) を、より高率に誘導できることが明らかになった。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、いずれにおいても活動電位が記録された。また、運動ニューロンについては、筋芽細胞株由来の myotube と共培養すると *in vitro* で  $\alpha$ -BTX により標識される neuromuscular junction を形成し、また EGFP で標識した ES 細胞由来の運動ニューロン前駆細胞を、発症前の mSOD1 トランスジェニックラットの腰髄に移植したところ、生着し NeuN 陽性のニューロンに分化し、その一部は ChAT 陽性のコリン作動性ニューロンに分化していた。

これらの結果から、ES 細胞から神経系前駆細胞を誘導させる過程で、*in vivo* の発生を模して種々の分泌因子を作用させることで、時間的特異性、および前後軸、背腹軸に沿った領域特異性を *in vitro* で付与することができ、*in vivo* の発生を模した *in vitro* の優れたモデルとなり得ること、さらに薬剤スクリーニングや病態解析、再生医療にも応用できる、特異的な機能的ニューロンを自在に得られる可能性が示唆された。

### D. 考察

ES 細胞から前方神経誘導因子および低濃度 RA を用いて高率にニューロスフェアを誘導することに成功した。さらにそれぞれのニューロスフェアから、前脳型コリン作動性ニューロン、および脊髄、後脳の運動ニューロンを誘導することに成功した。これらのいずれのニューロンにおいても電気生理学的に活動電位が記録され、運動ニューロンについては myotube とのコンタクトや *in vivo* における生着も認められたことから、機能的な前脳型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、*in vitro* で誘導できる培養法を確立できたと考えられた。今後、*in vivo* におけるこれらのニューロンの機能をより詳細に明らかにし、さらにヒト ES 細胞へ同様のシステムを応用していく必要があると考えられる。

## E. 結論

マウス ES 細胞から前脳型コリン作動性ニューロンと運動ニューロンおよびそれらの前駆細胞を高率に誘導する方法を確立した。これらの前駆細胞は、電気生理学的に機能的なニューロンを生み出すことができ、*in vivo* でもコリン作動性ニューロンを含むニューロンに高率に分化できることが示された。ヒト ES 細胞へ同様の手法を応用することにより、前脳型コリン作動性ニューロンが変性するアルツハイマー病や、運動ニューロンが変性する ALS における病態解析、またこれらの疾患をターゲットとした薬剤スクリーニング (薬剤安全性評価システムを含む) にも応用できる、有力な *in vitro* モデル系となり得ることが示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 275: 124-142, 2004
- 2) Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, Okano H, Okamoto H. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isll* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Dev Biol*, 278: 587-606. 2005

### 2. 学会発表

- 1) 岡田洋平, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之. マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導: ES 細胞由来神経系前駆細胞の特性の解析. 第 45 回日本神経学会総会, 2004. 5, 東京
- 2) 岡田洋平, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之.

マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導: ES 細胞由来神経系前駆細胞の特性の解析. 第 37 回日本発生生物学会大会, 2004. 6, 名古屋

- 3) 岡田洋平, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之. マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導: ES 細胞由来神経系前駆細胞の特性の解析. 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会, 2004. 9, 大阪
- 4) Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Arifumi Matsumoto, Gen Sobue, Hideyuki Okano. Generation of motor neurons from mouse embryonic stem cells: analysis of ES cell-derived neural cells. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004. 10, San Diego

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

PCT 出願

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし





## マイクロアレーの網羅的遺伝子発現解析における統計数学的手法と 包括的知識ベースに基づく微小変動遺伝子抽出法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手法および数理解析手法の改良・開発、各種データベース情報を統合させた検索システムの構築、新規パスイ解析手法を確立した。これによりゲノムワイドな遺伝子発現情報から、薬剤に応答する個々の遺伝子のみならずネットワークという視点から応答経路を俯瞰的に捉えることが可能となり、薬剤作用・副作用点の解明、薬剤安全性評価システムへの応用、新規薬剤開発へと繋げるシステムが整備された。

### 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 の遺伝子をのせたマイクロアレー実験系を適用することで、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で、薬剤の作用点や副作用点へのパスイを発見する。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

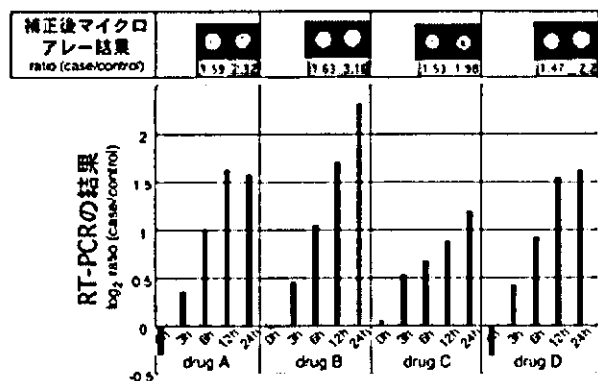
より、患者ごとに薬効や副作用を判定する個別化医療のシステムを構築する。

### C. 研究結果

2色法に基づくマイクロアレーはケースとコントロールを同時スポットで比較するために実験誤差が出にくくコストも抑えられるというメリットがあるが、蛍光色素依存的な偏りがある程度出てしまうことが問題になってくる。特に我々の研究における薬剤添加の有無のみが異なるサンプルのように遺伝子発現変化量が微少な場合や低発現遺伝子が多い場合、色素依存的な偏りは大きな障害となる。そこで昨年度までの解析手法に加え、色素交換実験（DyeSwap）をおこない、そのデータから色素依存的な偏りを補正する数理解析手法を開発した。それにより、DyeSwap 実験の補正と各スライドでの正規化を施すことで、マイクロアレー上で 1.33 倍以上の発現量の差が認められれば、統計学的に 99.9%以上の信頼性で発現に差があると言えるようになった。25 遺伝子について TaqMan RT-PCR 法にてマイクロアレーの結果と一致するかどうかを確認したところ、全遺伝子（100%）で、遺伝子発現量の上昇・下降が一致し

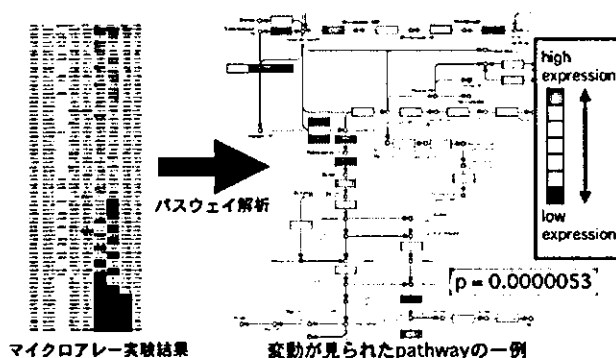
ていた（下図はその一部を示す）。

### マイクロアレーデータとRT-PCRデータの比較



微量変動遺伝子の検出が可能となったので、さらに遺伝子発現をネットワークの視点から俯瞰的に捉えるためパスウェイ解析をおこなった。KEGG データベース（京都大学）による pathway 情報とマイクロアレー情報を統合し、遺伝子の発現変動変化を数学的指標で並び替え、Kolmogorov-Smirnov running sum statistic を用いて ES value を算出、Permutation test を行うことで有意に変動が見られる遺伝子パスウェイネットワークを統計学的に導き出す手法を開発した。

この手法を用い、間葉系由来幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell; MSC) および羊膜由来幹細胞 (Amniotic Stem Cell; ASC) をアストロサイト様細胞に分化させた細胞に抗うつ薬 (SSRI; Fluoxetine) を添加し、マイクロアレー実験によって向精神薬応答遺伝子群を解析した。薬剤濃度は 0.5  $\mu\text{M}$  と 10  $\mu\text{M}$  の 2 種類 (ATP アッセイ・細胞障害アッセイにより毒性の生じないことを確認。生存活性 80~90% 程度の細胞毒性出現の境界付近の濃度) それぞれを用い、薬剤添加時 (0 時間) と薬剤添加後 24 時間後とで発現プロファイルを解析した。その結果、個々の微量変動遺伝子が捉えられるようになったことに加え、この薬剤のヒト正常神経細胞に対する作用・副作用機序に関与するとみられるパスウェイが複数発見されるに至った (図参照)。



### D. 考察

近年のマイクロアレーを取り巻く技術開発によりスライドの質は極めて均一で良好なものとなってきた。ここに今回開発した各種統計数学的な補正法を組み込むことで数年前とは比較にならないほど高検出感度で微量な変動遺伝子を捉えることが可能となった。

そこから個々の遺伝子に対して生物学的意味づけや追加実験を行っていくことは当然重要であるが、さらに、疾患や薬剤への応答に関する全体像を理解するためには、機能・発現変動・化学反応等が同調している遺伝子グループ群を基に俯瞰的にとらえることが極めて重要だと考えられる。今回我々が開発した pathway 解析をベースにした統計数学的手法はまさにそれを可能とした。

本研究で向精神薬応答解析に用いたグリア細胞 (アストロサイト) は神経回路網の中で神経支持細胞としてだけではなく、神経細胞と互いに様々な物質・シグナルを享受しあっていることが近年の研究で明らかにされてきており、うつ病や統合失調病などの死後脳ではプロテオーム解析により GFAP とその修飾物が主に変化を起こしていたという報告もある。またアストロサイトにはうつ病の仮説となっているモノアミンの受容体が広範囲に出現していることから、アストロサイトがうつ病に関与している可能性が高いと考えられる。うつ病に対する第一選択薬となりつつある SSRI を添加薬剤とし、有意に変動するパスウェイ群を検出した今回の研究は、薬剤の作用点・副作用点の反応経路を示していると考えられる。現在 in

vivo 系としてデータを実証するためマウスを用いて解析をおこなっている。

このように生物医学的な実験データと現在まで蓄積されてきたアノテーション情報を統合し解析することの重要性は益々高まっていくものと推測される。我々が開発したシステムは時々刻々と増加する各データベース上のアノテーション情報を常に取り込み続けることで世界中の研究者が発見した知見を即時にパスウェイ解析に反映させることができ、各種知見が増えれば増えるほど新規あるいはより明快で確かな遺伝子ネットワーク構造を明らかにすることが可能である。

本研究では一例として向精神薬の応答を解析したが、他の疾患や薬剤等においても同様の解析手法が用いることが当然可能である。今後、よりデータを増やしデータの信頼度を向上させつつ、他の疾患や薬剤についても解析をおこなう予定である。

## E. 結論

薬剤の作用・副作用点、疾患メカニズムの解明、薬剤応答マーカー探索、薬剤安全性評価システムへの応用、新規薬剤ターゲット開発への応用へとつながる薬剤応答遺伝子ネットワーク解析のシステムがここ3年間の研究により一つの完成系として立ち上げることができた。

今後はより精度が高く複雑なパスウェイ解析も可能としていくと共に、他の疾患に関しても研究を行っていく予定である。また、他機関がおこなってきたタンパク質の機能解析とも統合させていく予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Onda M, Emi M, Yoshida A, Miyamoto S, Akaishi J, Asaka S, Mizutani K, Shimizu K, Nagahama M, Ito K, Tanaka T, Tsunoda T.

Comprehensive gene expression profiling of anaplastic thyroid cancers with cDNA microarray of 25, 344 genes. *Endocr Relat Cancer*, 11: 843-854, 2004

- 2) Nagahata T, Onda M, Emi M, Nagai H, Tsumagari K, Fujimoto T, Hirano A, Sato T, Nishikawa K, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Miki Y, Tanaka T, Tsunoda T. Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25, 344 genes on a cDNA microarray. *Cancer Sci*, 95: 218-225, 2004
- 3) Onda M, Emi M, Nagai H, Nagahata T, Tsumagari K, Fujimoto T, Akiyama F, Sakamoto G, Makita M, Kasumi F, Miki Y, Tanaka T, Tsunoda T, Nakamura Y. Gene expression patterns as marker for 5-year postoperative prognosis of primary breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130: 537-545, 2004
- 4) Nishidate T, Katagiri T, Lin ML, Mano Y, Miki Y, Kasumi F, Yoshimoto M, Tsunoda T, Hirata K, Nakamura Y. Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: Identification of genes associated with progression and metastasis. *Int J Oncol*, 25: 797-819, 2004

### 2. 学会発表

- 1) 横田 隆, 江見 充, 足立好司, 寺本 明, 角田 達彦. cDNA マイクロアレイを用いた glioblastoma に関わる遺伝子発現解析と新規遺伝子の同定. 第 63 回日本癌学会学術総会, 2004. 9-10, 福岡
- 2) 音田正光, 長幡武光, 霞富士雄, 坂元吾偉, 三木義男, 江見 充, 角田達彦. 遺伝子発現プロファイルから見た乳癌予後予測マーカー. 第 63 回日本癌学会学術総会, 2004. 9-10, 福岡
- 3) 服部英典, 永田栄一郎, 加藤 護, 小笠原彩子, 鈴木重明, 清水利彦, 濱田潤一, 角田達彦, 相磯貞和, 鈴木則宏. 片頭痛患者末梢血リンパ

球における発現遺伝子プロファイリング,  
日本頭痛学会, 2004. 11, 鹿児島

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。ただし、各種薬剤応答遺伝子やそれに関与するネットワークは薬剤開発につながる知的財産的価値が高いと考えられるので知的財産権の出願も考慮に入れている。