

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

分担研究者 山崎 智彦

産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 客員研究員

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

研究要旨

薬剤添加時の細胞内のプロテオーム解析により、薬剤効果ならびに安全性を評価するための重要な情報を得ることができる。本プロジェクトでは細胞内の蛋白質の発現挙動を調べる方法として SELDI-TOFMS (Surface Enhanced Laser Deposition / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 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。多サンプル数、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必要のある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。

A. 研究目的

薬剤添加時の細胞内の蛋白質発現の量的変動情報は、薬剤効果ならびに安全性を評価する際に重要な情報となる。しかしながら、現在まで網羅的な蛋白質発現の量的変動情報の取得方法についての報告はない。薬剤効果ならびに安全性を評価には薬剤の安全性を蛋白質発現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構築が不可欠である。我々は薬剤添加による細胞のプロテオーム解析をハイスループットに行う方法として、SELDI-TOFMS (Surface Enhanced Laser Deposition / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) の利用に着目し、昨年度はサンプル調製条件、測定条件等の最適化を行った。

本年度の研究ではマウス胎児由来の神経幹細胞を用いて作用の異なる4種薬剤を添加したと

きの蛋白質発現の解析を行い、薬剤種類に依存せずに発現量の変化するユビキタス蛋白質マーカーの検索ならびに同定を行うことを目的に研究を行った。また、プロテオーム解析の汎用方法である二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析ならびに薬剤安全性評価システムに利用できる蛋白質のスクリーニングを行った。さらに、両方法の特性を比較検討することで、SELDI-TOFMS 法と二次元電気泳動法を組み合わせた網羅的な蛋白質の発現情報の基礎データの取得方法の検討を行った。

B. 研究方法

1. Viability Assay

マウス胎児 (E14, ICR) 由来のマウス神経幹細胞 (mouse neural stem cells; mNSC) に対して、エタノールならびに催奇形性の報告のあるレ

チノイン酸とバルプロ酸、抗コレステロール剤（シンバスタチン）の4薬剤を様々な濃度で添加した後、2日間培養を行い、CellTiter-Glo® Luminescent Cell viability Assay (Promega社)を用いて細胞内総ATPを計測することにより、薬剤濃度のmNSCの増殖に対する影響を調べた。その結果をもとにmNSCを増殖阻害が0-20%、50%付近、80-100%となるように調製した各薬剤存在下で24時間インキュベートした後に、細胞を回収した。細胞は10ml PBSで5回洗浄することで蛋白質解析に影響を与える培地中成分を完全に除去した。なお、細胞の分注、薬剤の添加ならびにATPアッセイ試薬の添加は自動分注装置を用いた。

2. SELDI-TOFMS

細胞溶解液 (1(w/v)% CHAPS、1mM DTT、8M 尿素) を細胞数 10^7 個に対して約 1ml 添加し、良く攪拌した後に、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, 25°C) により細胞破碎液から未破碎画分を取り除き、蛋白質抽出液を得た。各抽出液中の蛋白質濃度を DC Protein Assay (BioRad) を用いて測定し、蛋白質濃度が 500 ug/ml になるように細胞溶解液で希釈した。

昨年度の結果をもとに、ピークの本数が最も多く見られた条件である陽イオン交換基が表面に修飾されたチップ (CM10 Chip) を用い、結合バッファーとして 0.1% トリトン X-100、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.5 を用いて実験を行った。まず、結合バッファー 200 ul をチップに添加することでチップ表面を結合バッファーで平衡化 (計 2 回) した後に、細胞溶解液を結合バッファーで 5 倍希釈し、50 ul チップにサンプルを添加した。(終濃度 100 ug/ml) 30 分間室温で緩やかに攪拌し、サンプルを取り除き、再びチップ表面を結合バッファーで洗浄した後 (計 3 回) に、ミリ Q で洗浄 (計 2 回) した。エネルギー吸収分子であるシナピン酸を 0.1%TFA 50 % アセトニトリルに溶解し飽和溶

液を調製後、0.1%TFA 50 % アセトニトリルで 2 倍に希釈して 1ul をチップ表面に添加して室温、暗所で乾燥させた。この操作を 2 回繰り返えし、チップを作成した。なお、シナピン酸の添加を除く操作は自動分注装置を用いて行った。

MS の測定は昨年度の成果をもとに分子量 3-200kDa の範囲の蛋白質の発現を 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 (Int) 並びにディテクターの感度 (Sens) を Int185, Sens7 (3-10K)、Int195, Sens8 (10-30K)、Int225, Sens10 (30-100K) を用いた。

3. 二次元電気泳動法

二次元電気泳動用の細胞溶解液 (2(w/v)% CHAPS、2(w/v)% SB3-10、1(w/v)% DTT、5M 尿素、2M チオ尿素) を細胞数 5×10^6 個に対して約 250 ul 添加し、ピペッティングにより細胞を破碎した。次に細胞破碎液から遠心 (40,000 x g, 30min, 25°C) により DNA を取り除き、蛋白質抽出液を得た。

各抽出液中の蛋白質濃度を Protein Assay (BioRad) を用いて測定し、蛋白質 100 ug に細胞溶解液を加えて総量 400ul に調製し、二次元電気泳動に用いた。Immobiline DryStrip pH4.0-7.0 18cm (アマシャムバイオサイエンス社) にサンプルを添加し、一晚静置後した。膨潤した Immobiline DryStrip を Multiphor II Electrophoresis unit (アマシャムバイオサイエンス社) にセットし、500V で 10 分、3500V で 8 時間、一次元目の泳動を行った。泳動後、Immobiline DryStrip を平衡化した後に 9-18% アクリルアミドゲルに載せ、二次元目の泳動を行った (80V、16 時間)。

染色は Sypro Ruby で行い、蛍光スキャナーで画像を取り込み後、ImageMaster 2D platinum (ver5.0) (アマシャムバイオサイエンス社) で解析を行った。

C. 研究結果

1. Viability assay

自動分注装置を用いることにより、手動操作と比較して実験誤差は同等か少なく、かつハイスループットに行うことができた。また、実験誤差は手動操作と比較して、少なかった。図1から図3に ATRA, シンバスタチン、エタノールについてそれぞれ mNSC の培養液中に添加した濃度の濃度と薬剤を添加していない培養系の増殖率を 100%とした時の比細胞増殖率を示す。薬剤の種類によって比細胞増殖率が低下する濃度は異なっていることがわかり、また比細胞増殖率の低下が徐々に見られるものと、急激に見られるものが存在した。ATRA の場合は 10^{-8} M 付近から徐々に増殖率抑制がおり、 10^{-6} M を境界として急激に増殖が低下することが示された。シンバスタチンの場合は 1.5×10^{-7} M までは増殖にほとんど影響を与えないが、それ以上になると急激に細胞増殖が抑制されることが示された。エタノールの場合は、両者の中間の傾向を示し、0.8%付近から急激に細胞増殖率が低下することが示された。この結果をもとに、蛋白質発現解析を行う薬剤濃度を ATRA では 0.5 μ M (比細胞増殖率 79% \pm 3%)、2.5 μ M (比細胞増殖率 38% \pm 6%)、5.0 μ M (比細胞増殖率 15% \pm 3%)、シンバスタチンでは 0.024 μ M (比細胞増殖率 94% \pm 2%)、0.17 μ M (比細胞増殖率 90% \pm 1%)、0.60 μ M (比細胞増殖率 18% \pm 2%)、エタノールでは 0.1 % (比細胞増殖率 97% \pm 3%)、1.0 % (比細胞増殖率 72% \pm 2%)、5 % (比細胞増殖率 0.2% \pm 0.5%) を選択し、蛋白質発現の解析を行った。

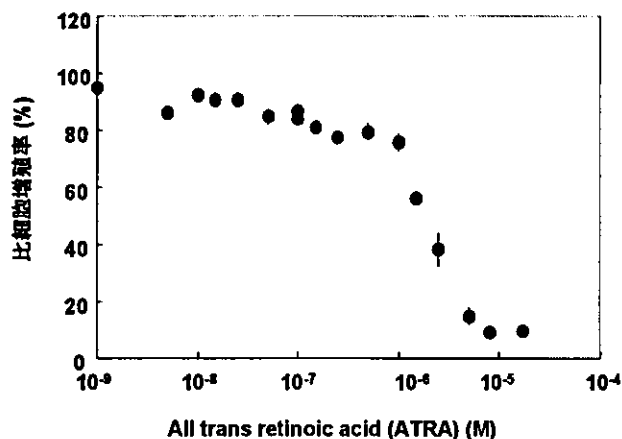


図1 培地中のATRA濃度の細胞増殖への影響

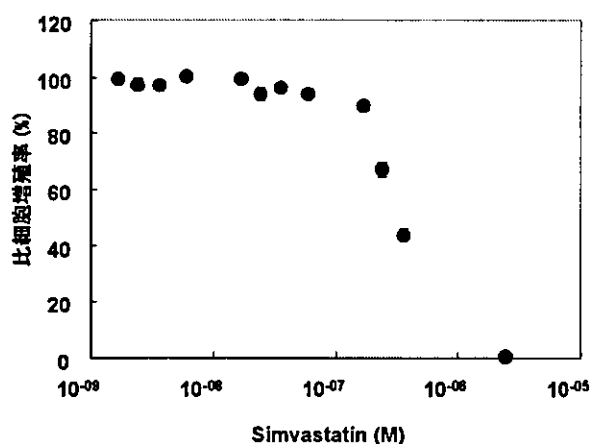


図2 培地中のシンバスタチン濃度の細胞増殖への影響

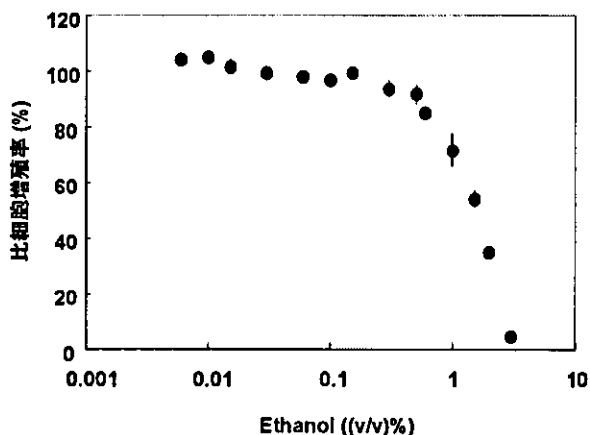


図3 培地中のエタノール濃度の細胞増殖への影響

2. SELDI-TOFMS

昨年度の成果であるプロテインチップへのサンプル添加条件、測定条件の最適化の条件に

従って、本年度は薬剤種類をシンバスタチン、ATRAの他にエタノールとVPAを加えて、4種類を増やしてSELDI-TOFMSによる蛋白質の発現解析を行った。また、本年度からは、市販の自動分注装置 (Multi-CHOT, ニチヨー社) にシェーカーを取り付け、洗浄、サンプル添加、平衡化、洗浄の4動作のプログラムを作成、最適化することにより測定チップ作成の自動化を行った。これにより、多サンプルの迅速な解析が可能となった。実際、96スポットに対してのサンプルの添加に要する時間はサンプルのチップ表面への吸着のための時間を含んで2時間から2時間半であった。また、MSの測定に要する時間は昨年度に最適化した条件に従い、測定時間は測定分子量の範囲を3つ (3-10kDa, 10-30kDa, 30-200kDa) に分けた場合、1スポットあたり4分、96スポットの場合は約7時間で測定が終了する。サンプルの希釈操作等を入れても、最大96サンプルの蛋白質発現解析を10時間程度で行うことができる。ただし、測定誤差 (CV値) が約10-30%であることを考慮に入れると、信頼性の高い発現解析を行うためには1サンプルにつき3もしくは4スポットでの測定が必要であり、現実としては32サンプルの蛋白質発現解析を10時間程度で行うことになる。

図4に薬剤としてATRAを用いた場合のSELDI-TOFMSで得られるデータを示す。

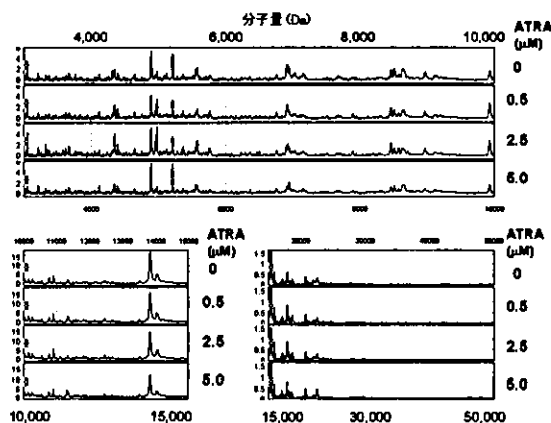


図4 培地中のATRA濃度を変化させた時のmNSCの蛋白質発現の比較

SELDI-TOFMSの原理はMALDI-TOFMSと同じであることから、低分子の蛋白質、イオン化しやすい蛋白質の解析に優れている。実際、図4に示されるように分子量3,000Daから分子量20,000Da程度までは非常にシャープなピークが得られるが、それ以上になるとピークがブロードになりまた観察できる蛋白質の数も大きく減少する。これは、分子量が大きくなるに従って蛋白質がイオン化しにくくなる傾向にあるためである。このように、SELDI-TOFMSを用いた蛋白質発現解析は分子量20,000Da程度までの制約がある。

次に、各薬剤について薬剤濃度の変化に依存して発現量の変化するピークを検索した。各サンプルに対して、3スポットずつ測定を行い、得られたMSの強度の平均値ならびに標準偏差をもとに、チェビシェフの不等式から、75%以上の信頼区間以上の差があるピークを選び出した。その結果、薬剤濃度依存的に発現量が変わる蛋白質が10ピーク前後見られた。薬剤の種類により、発現量の変化する蛋白質のピークは異なっていたが、他の薬剤においてピーク比較を行ったところ、4薬剤すべてに共通して発現量が増加するユビキタスな挙動を示すピークが2つ見つけられた。その結果を、図5ならびに図6に示す。

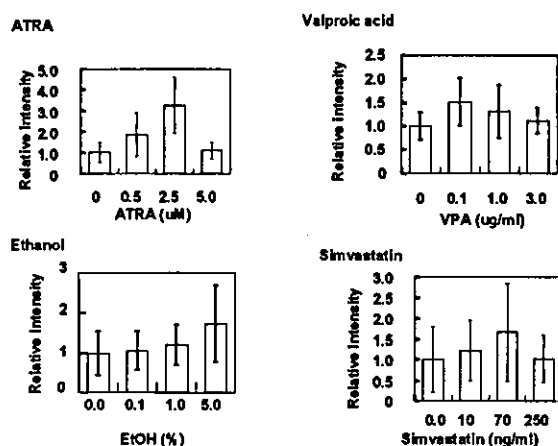


図5 各薬剤濃度と4.97kDaの蛋白質の発現量の比較

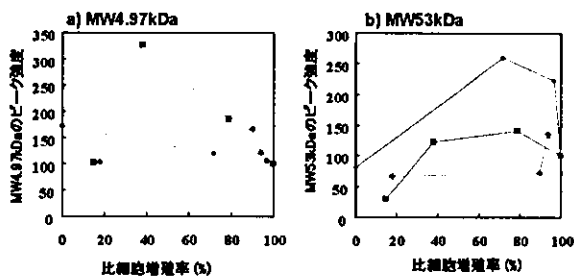


図6 薬剤の種類に依存せずユビキタスに変化している蛋白質の発現量と細胞増殖との関係

■ ATRA
 ◆ Simvastatin
 ▲ Ethanol

図5には分子量4.97kDaの蛋白質の各薬剤での濃度依存的に発現量が変化する挙動を示した。分子量4.97kDaの蛋白質は昨年度の成果でも変化の見られた蛋白質の一つであり、増殖が阻害されるに従って発現量が高くなるが、ある一定の阻害以上になると発現が抑制されることが示されている。今回の結果では、ATRA、VPA、シンバスタチンでは昨年度の考察と同様の挙動を示したが、エタノールでは発現量が増加するのみで、比細胞増殖率が0.3%の時まで増加傾向を示した。このことから、分子量4.97kDaの蛋白質は薬剤種類に関係無くユビキタスに発現量が変化するが、増殖阻害の単一指標とはいえ、同定ならびに細胞での昨日の解析が必要となる。そこで、分子量4.97kDaの蛋白質の同定を試みた。方法は、すでに数種類の蛋白質の同定が終了しているヒトNSC由来の蛋白質発現解析を行った時のMSデータとmNSCのMSデータの分子量ならびにピークパターンを比較することを行った。その結果、ヒトNSCのMSのピークにも分子量4.97kDaの蛋白質が存在しており、thymosin beta-4であった。BOX1に示すようにthymosin beta-4のヒトとマウスのアミノ酸配列は100%一致しており、アミノ酸配列から求められる分子量はN末端のアミノ基がアセチル化されているとすると4963Daであり、SELDI-TOFMSの分解能を考慮に入れると分子量は一致していることから、分子量

4.97kDaの蛋白質は、thymosin beta-4であると予想される。

BOX1 薬剤添加によりユビキタスに変動する4.97kDaの蛋白質

Thymosin beta-4

Mouse (SwissProt P20065)
 Length: 43 AA
 Molecular weight: 4921Da+42Da (N-acetylation) = 4963Da

Human	SDKPDMAEIE	KFDKSKLKKT	ETQEKNP LPS	KETIEQEKQA	GES
	*****	*****	*****	*****	***
Mouse	SDKPDMAEIE	KFDKSKLKKT	ETQEKNP LPS	KETIEQEKQA	GES

一方、分子量53kDaの蛋白質は薬剤濃度の増加により、mNSCの増殖が阻害されるに従って発現量が高くなり、ある一定の阻害薬剤濃度以上になると発現が抑制され、薬剤添加なしと比較して発現量が低下することが示された(図6(b))。本マーカー蛋白質の発現量の挙動は4薬剤すべてにおいて同一の傾向を示し、薬剤の影響を調べるユビキタスマーカーとして利用できる可能性がある。今後は、ピーク強度と細胞の状態の関係を調べることで、分子量53kDaの蛋白質の機能を明らかにし、薬剤安全性マーカーとしての有用性を調べる。

3. 二次元電気泳動法

二次元電気泳動法はプロテオミクスにおける解析方法の主流であり、SELDI-TOFMS法では解析の難しい分子量15kDa以上から100kDaの範囲の蛋白質発現解析に特化した方法である。我々も既存の方法に従って、ATRA 0uM、0.5uM、2.5uM、5.0uM存在下で24時間培養したmNSCの蛋白質の発現解析を行った。Immobiline DryStripの膨潤に一晚、一次元目の泳動に8時間、18cmの長さのゲルを用いた二次元目の泳動に16時間、染色に4時間、計40時間必要であった(2サンプル)。

今回は、ATRAを添加していないサンプルをコントロールとしてATRA 0.5uM、2.5uM、5.0uM存在下で培養したmNSCの蛋白質抽出液の二次元電気泳動画像を比較し、目視で発現量が上

がったものに対してマークした。結果を図7から9に示す。

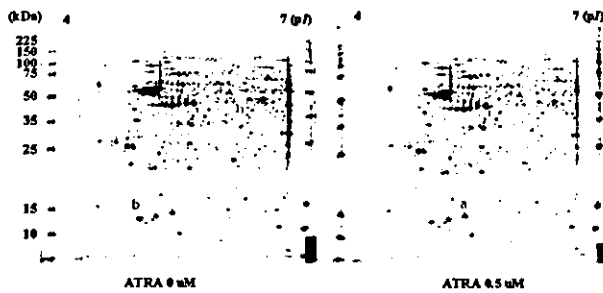


図7 2次元電気泳動画像ならびに発現量比較 (0μM vs 0.5μM)

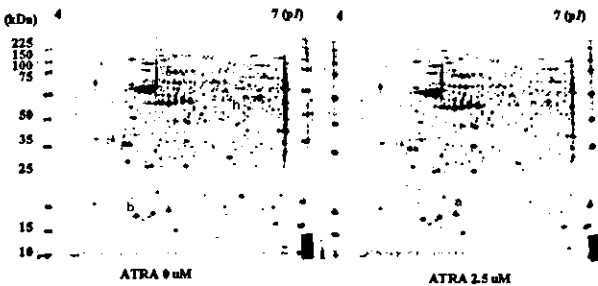


図8 2次元電気泳動画像ならびに発現量比較 (0μM vs 2.5μM)

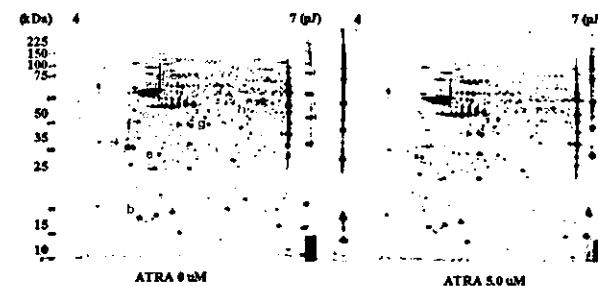


図9 2次元電気泳動画像ならびに発現量比較 (0μM vs 5.0μM)

その結果、ATRA 濃度が高くなるに従って発現量が低下するものが 15 スポット。培地中の ATRA 濃度が 0.5μM の時にのみ発現量が増えるものが 1 スポット、0.5μM、2.5μM の時に発現量が増えるものが 1 スポット、2.5μM、5.0μM の時に発現量が増えるものが 3 スポット、5.0μM の時に発現量が増えるものが 5 スポット見られ

た。すなわち、ATRA 添加で発現量が増加するスポットは計 8 スポットであった。これらのスポットのうち、ラットの 2 次元データベースとのゲルマッチングにより、計 8 種類の蛋白質を同定した。その結果を Table 1 に示す。

Table 1 ATRA濃度に依存して強度が変化したスポットとならびに同定結果

Spot	ATRA (μM)				Protein name
	0	0.5	2.5	5.0	
a	●	●	●	●	Retinol binding protein 1
b	●	●	●	●	Galectin 1
c	●	●	●	●	Kappa-B motif-binding phosphoprotein
d	●	●	●	●	Kappa-B motif-binding phosphoprotein
e	●	●	●	●	RHO GDP-dissociation inhibitor 2
f	●	●	●	●	Nucleolar phosphoprotein B23
g	●	●	●	●	60S Acidic Ribosomal protein PO
h	●	●	●	●	Aminoacylase 1

培地中の ATRA 濃度が 0.5μM、2.5μM の時に発現量が増える蛋白質として Retinol binding protein 1 が同定された (スポット a)。Retinol binding protein 1 は、DNA マイクロアレイを用いた mRNA の発現解析においても培地中の ATRA 濃度の増加に従って約 10 倍 mRNA の発現が増加することを本プロジェクトの分担研究員である角田らが報告しており、DNA マイクロアレイと二次元電気泳動による蛋白質発現解析の結果が一致している。スポット b から h までは培地中の ATRA 濃度が増加するに従い発現量が減少する蛋白質である。これらゲルマッチングから同定した蛋白質は、KEGG PATHWAY Database にはアポトーシス、ネクローシス関連の蛋白質としては登録されていない。これらの発現量の変化した蛋白質については、ATRA 以外の他の薬剤でも同様の発現量の変化をするユビキタスな挙動を示す蛋白質かどうかをウェスタンブロッティングもしくは二次元電気泳動法により解析する必要がある。

D. 考察

本プロジェクトでは蛋白質発現プロファイ

ルを解析しデータベース化することにより、蛋白質発現量を基準とする薬剤安全性評価システムの開発を目的として、その解析方法を検討した。SELDI-TOFMS 法は 32 サンプル (N=3) の蛋白質発現解析を 10 時間程度で行うことができる迅速な解析ができる方法であった。一方、二次元電気泳動法は 2 サンプル (N=1) の解析に計 40 時間要した。また、一回の解析に必要なサンプル量は SELDI-TOFMS 法の場合、1ug 程度であるのに対して二次元電気泳動法では 100ug の細胞から抽出した蛋白質が必要であった。二次元電気泳動法に必要な 100ug の蛋白質を抽出するには約 10^6 オーダーの細胞が必要であることから、単純計算すると SELDI-TOFMS 法では 10^4 オーダーの細胞があれば解析できるということになり、これは 96 ウェルプレートの 1 ウェル分の細胞量に相当する。このことから SELDI-TOFMS 法では少量の細胞で多くの薬剤の蛋白質発現への影響を解析することができるといえる。一方、SELDI-TOFMS 法においては得られる蛋白質由来の MS のピークは 150-200 個程度であるが、二次元電気泳動法の場合は 500-1000 個程度のスポットが得られたことから情報量は二次元電気泳動法の方が多かった。しかしながら、両者の解析できる分子量の範囲を比較すると SELDI-TOFMS 法では分子量 0-20kDa 程度、二次元電気泳動法では 15-100kDa 程度であることから、両者の得意とする分子量領域は異なり、低分子量の蛋白質発現解析には SELDI-TOFMS 法、高分子量の蛋白質発現解析には二次元電気泳動法を用いる区別が必要である。すなわち、両者を組み合わせることより分子量 0-100kDa までの広い範囲を網羅的にカバーできると言える。実際、本プロジェクトで培地中の ATRA 濃度に依存して発現量が変化する蛋白質のスクリーニングを SELDI-TOFMS 法と二次元電気泳動法の両者を用いることにより、広い分子量範囲での検索、同定が可能であった。上記に加え、それぞれの方法の特色をまとめたものを

table 2 に示す。

Table 2 二次元電気泳動法とProtein Chipの比較

	2D electrophoresis	ProteinChip	Antibody Arrays
サンプル量	△ (100ug)	◎ (0.5ug)	△
解析時間	△ (1日-2日)	◎ (1.5H)	○ (3時間)
得られる情報量(スポット, Peakの数)	◎ (700spot)	○ (100Peak)	○ (500Ab)
検出感度	数十ng 20-150kDa	f-pmolオーダー 1-15kDa	○
定量化	△ (50-200%)	○ (<20%)	△ (30-100%)
操作性	△ (技術必要)	◎ (容易)	○
ディフレンシャル解析の完全自動化	△	◎	◎
コスト	18,000円/24cm gel	2万円/8spot	22万円/1キット (500抗体)
(2サンプル比較に必要なコスト)	(n=3, 86,000円)	(n=3, 6万円)	(n=2, 44万円)
特記 (利点)	データベースが存在 PMF, MS/MS解析による 同定が行える	迅速	マーカー同定 アレイスキャナーが あれば解析可能
(問題点)		別途、マーカーの同定が必要	結果が抗体の有無、特異性に依存

多薬剤を用いた蛋白質発現量の変化を基準とした薬剤安全性評価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る。

E. 結論

本年度のプロジェクトでは昨年度にサンプル調製条件、測定条件を最適化した SELDI-TOFMS を用いた質量分析計による蛋白質発現解析を多薬剤に応用し、薬剤安全性評価の指標となる薬剤種類に依存せずユビキタスに変動する蛋白質のスクリーニングを行うと共に、プロテオーム解析の汎用方法である二次元電気泳動法を用いた蛋白質発現解析を行い、SELDI-TOFMS と二次元電気泳動法の比較を行った。その結果、SELDI-TOFMS 法を用いることで、作用の異なる 4 種類の薬剤の濃度変化に応じて発現量が変化する薬剤応答ユビキタス蛋白質が見つかった。また、二次元電気泳動法では発現量が変化するスポット計 23 を探し出し、そのうち 8 スポットについて既存のデータベースを用いたゲルマッチングにより同定

した。本結果ならびに本プロジェクトで得られた解析法のノウハウから SELDI-TOFMS 法と二次元電気泳動法を組み合わせることにより、より広範囲をカバーできるプロテオーム解析が可能であることが示された。また、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。今後は、本プロジェクトで最適化した薬剤安全評価システムの開発のためのプロテオーム解析方法を用いて、細胞を解析方法の検討段階で用いたマウスから実際のターゲットであるヒト由来の細胞に変え、多薬剤を用いた基礎データの蓄積を行い、薬剤安全性評価システムを構築する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori H, Kanemura Y, Onaya J, Hara M, Miyake J, Yamasaki M, Kariya Y. Effects of heparin and its low anticoagulant 6-O- and 2-O-desulfated derivatives on the proliferation of human neural stem/progenitor cells. *J Biosci Bioeng*, in press
- 2) Kanemura Y, Mori H, Nakagawa A, Islam O.M., Kodama E, Yamamoto A, Shofuda T, Kobayashi S, Miyake J, Yamazaki T, Hirano S, Yamasaki M, Okano H. In vitro screening of exogenous factors for human neural stem/progenitor cell proliferation using measurement of total ATP content in viable cells. *Cell Transplant*, in press

2. 学会発表

- 1) Yamazaki T, Kobayashi S, Nakagawa A, Kodama E, Miyake J, Kanemura Y. Comparison of protein expression profiles between human neural stem cells and their differentiated cells by SELDI-TOF-MS. 3rd International Proteomics Conference "IPC'03", 2004.5.14-17, Taipei, Taiwan
- 2) 山崎智彦, 小林 哲, 中川敦世, 児玉恵理, 三宅 淳, 金村米博. SELDI-TOF-MS を用いたヒト神経幹細胞/前駆細胞 (hNSPC) ならびに分化細胞における蛋白質発現プロファイルの解析. 第 19 回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会, 2004.6.19, 岐阜市
- 3) 山崎智彦, 小林 哲, 森 英樹, 三宅 淳, 金村米博. SELDI-TOFMS を用いた薬剤安全性評価. 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, 2004.9.22, 大阪市
- 4) 山崎智彦, 小林 哲, 中川敦世, 三宅 淳, 金村米博. ヒト神経幹細胞/前駆細胞ならびに分化細胞を識別する低分子量マーカー蛋白質のスクリーニング. 第 4 回日本再生医療学会, 2005.3.2, 大阪市

新規レチノイン酸誘導体の合成と薬理作用

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

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 α 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。

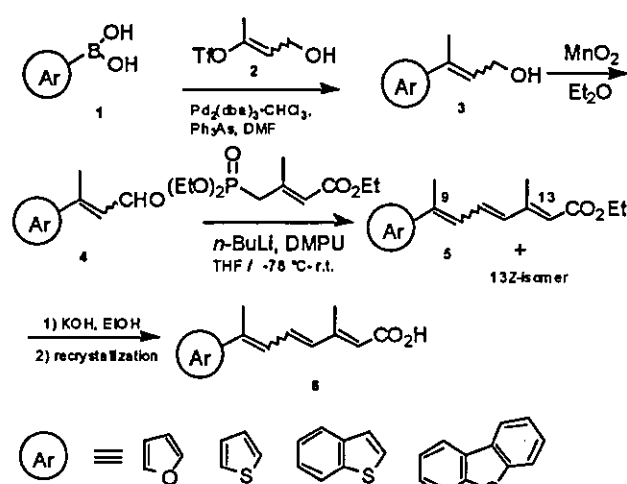
A. 研究目的

神経系への催奇性を有するレチノイン酸アナログの作用メカニズムを解明する。

B. 研究方法

レチノイン酸アナログを合成してそれらの薬理活性を調べる。

C. 研究結果



これまで合成したレチノイン酸アナログのうち、1位から8位までをベンゾフラン環に代えたアナ

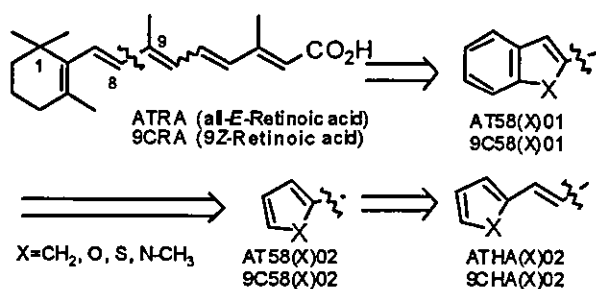
ログ化合物がアンタゴニストとなる可能性のあることが判明した。そこで今回、より強いアンタゴニスト化合物を探索するためにベンゾフラン環を他の複素環に代えたアナログ化合物の合成を検討した。

ボロン酸を用いた鈴木カップリング反応は、有機合成上非常に有用な反応であり、多くの天然有機化合物合成に利用されている。また最近では様々なボロン酸が市販され入手が容易になってきている。そこで、種々の複素ボロン酸類 (1) を原料として、鈴木カップリング反応を応用した標題化合物の合成を行った。(1) と *E*- または *Z*-ビニルトリフレート (2) とのカップリング反応は非常に効率よく進行し、得られたカップリング体 (3) の官能基変換と側鎖の延長、および加水分解により all-*E*- ならび 9*Z*-レチノイン酸アナログ (6) を合成することができた。

また、以前に合成したレチノイン酸アナログとともに、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 α への転写活性を検討した結果、下記のテーブルに示す結果が得られた。(いずれも9CRAを100とした相対活性として示した。)

全ランス体においては、いずれのアナログでも細胞増殖抑制作用、分化誘導作用およびアポトーシス作用は見られなかった。RXR α への転写活性は、9CRA よりも大きな活性を示すアナログは見られなかった。

9-シス体においては、9C58(C)01 が高濃度において若干の分化誘導作用および細胞増殖抑制作用を示した。アポトーシス作用については、いずれのアナログでも活性が認められなかった。転写活性では、顕著な構造活性相関が見られた。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判明した。

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 全トランス芳香族レチノイン酸類の生物活性

誘導体	X	細胞増殖抑制作用	分化誘導作用	アポトーシス誘導	転写活性
ATRA		85	70	×	50
AT58(C)01	CH ₂	inactive	inactive	×	0
AT58(O)01	O	inactive	inactive	×	66
AT58(S)01	S	inactive	inactive	×	83
AT58(N)01	N-CH ₃	inactive	inactive	×	100
AT58(O)02	O	inactive	inactive	×	0
AT58(S)02	S	inactive	inactive	×	0
ATHA(O)02	O	inactive	inactive	×	83
ATHA(S)02	S	inactive	inactive	×	100

表2 9-シス芳香族レチノイン酸類の生物活性

誘導体	X	細胞増殖抑制作用	分化誘導作用	アポトーシス誘導	転写活性
9CRA		100	100	○	100
9C58(C)01	CH ₂	5	6	×	345
9C58(O)01	O	inactive	inactive	×	187
9C58(S)01	S	inactive	inactive	×	155
9C58(N)01	N-CH ₃	inactive	inactive	×	115
9C58(O)02	O	inactive	inactive	×	10
9C58(S)02	S	inactive	inactive	×	6
9CHA(O)02	O	inactive	inactive	×	398
9CHA(S)02	S	inactive	inactive	×	263

D. 考察

RXR は、シス構造をリガンドとするためトランス構造のアナログではほとんど活性がみられなかったと思われる。

E. 結論

転写活性発現には、カルボキシル基からの共役二重結合の数と疎水性部分の大きさが微妙な関係にあると推察される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 論文発表
- 1) Wada A, Sawada K, Ono N, Ito M. An improved synthesis of benzocycloalkanone derivatives. Chem. Pharm. Bull., 52: 132-135, 2004.
- 2) Hagiwara K, Wada A, Katadae M, Ito M, Ohya Y, Casey PJ, Fukada Y. Analysis of the molecular interaction of the farnesyl moiety of transducin through the use of a photoreactive farnesyl analogue. Biochemistry, 43: 300-309, 2004.
- 3) Wada A, Takakura Y, Yamazaki K, Takahashi T, Ito M. Synthesis of 8,16- Ethanoretinals and Their Interactions with Apoprotein of Photorhodopsin from Natronobacterium

- pharaonis. *Lett. Org. Chem.*, 1: 59-62, 2004.
- 4) Furutani Y, Iwamoto M, Shimono K, Wada A, Ito M, Kamo N, Kandori H. FTIR spectroscopy of the O photointermediate in pharaonis phoborhodopsin. *Biochemistry*, 43: 5204-5212, 2004.
 - 5) Yamano Y, Ito M. First total synthesis of cucurbitaxanthin A applying regioselective ring opening of tetrasubstituted epoxides. *Chem. Pharm. Bull.*, 52: 780-782, 2004.
 - 6) Wada A, Fukunaga K, Ito M, Mizuguchi Y, Nakagawa K, Okano T. Preparation and biological activity of 13-substituted retinoic acids. *Bioorg. Med. Chem.*, 12: 3931-3942, 2004.
2. プロシーディング
 - 1) Wang XF, Fujii R, Koyama Y, Yamano Y, Ito S, Kitamura T, Yanagida S. Dye-Sensitized Solar Cells Using the TiO₂-Carotenoid Acid Systems: Dependence of Solar Energy-to-Electricity Conversion Efficiency on the Conjugation Length. *Carotenoid Science*, 7: 6-12, 2004.
 - 2) Xiang J, Fujii R, Koyama Y, Rondonuwu FS, Watanabe Y, Yamano Y, Ito M. Dependence of the Conjugation Chain Length of Carotenoid Acid Analogues on Photoinduced Electron Injection from Their Excited Singlet States to TiO₂ Colloids. *Carotenoid Science*, 7: 13-14, 2004.
 - 3) Yamano Y, Ito M. Synthetic Works of Cucurbitaxanthin A Applying Regioselective Ring Opening of Tetrasubstituted Epoxides. *Carotenoid Science*, 7: 32-33, 2004.
 3. 学会発表
 - 1) 和田昭盛, 奥山頭義, 伊藤允好. 重水素化した 4-ヒドロキシ-2-ノネナールの合成研究. 日本薬学会第 124 年会, 2004. 3. 31, 大阪
 - 2) 和田昭盛, 松浦直美, 金城桂子, 伊藤允好. 5-デメチル-5-置換レチノイン酸類の合成. 日本ビタミン学会第 56 回大会, 2004. 5. 29, 長岡
 - 3) 山野由美子, 藤田有美, 吉田真紀, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫, 伊藤允好. γ -ヒドロキシブテノリド化合物の合成と抗腫瘍効果. 日本ビタミン学会第 56 回大会, 2004. 5. 29, 長岡
 - 4) 和田昭盛, 三宅ひろみ, 新原美樹, 伊藤允好, 上西潤一. 鈴木カップリング反応を用いるレチノイン酸アナログの合成. 第 18 回カロテノイド研究談話会, 2004. 9. 9, 神戸
 - 5) 山野由美子, 伊丹祐子, 加藤久明, 伊藤允好. エポキシドの開環反応を利用した cycloviolaxanthin および capsanthin 3,6-epoxide の全合成. 第 18 回カロテノイド研究談話会, 2004. 9. 9, 神戸
 - 6) Junfeng Xiang, Yasushi Koyama, Yumiko Yamano, Masayoshi Ito. Spectroelectrochemical Properties of Carotenoids: Dependence on the Conjugation Length. 第 18 回カロテノイド研究談話会, 2004. 9. 10, 神戸
 - 7) Yasushi Koyama, Junfeng Xiang, Yumiko Yamano, Masayoshi Ito. Charge Recombination Reaction between TiO₂- and the Radical Cation of Carotenoid Acids to Form the T₁ State. 第 18 回カロテノイド研究談話会, 2004. 9. 10, 神戸
 - 8) 小林 哲, イスラムモハメド, タジリアジャスミン, 原 正之, 山崎麻美, 岡野栄之, 和田昭盛, 伊藤允好, 三宅 淳, 金村米博. レチノイン酸及びその誘導体を用いたヒト神経幹細胞/前駆細胞から神経細胞の分化誘導技術の開発. 第 18 回カロテノイド研究談話会, 2004. 9. 10, 神戸
 - 9) 和田昭盛, 松浦直美, 伊藤允好. エノールノナ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 30 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2004. 10. 19, 札幌
 - 10) 小林 哲, イスラムモハメド, タジリアジャスミン, 原 正之, 山崎麻美, 岡野栄之, 和田昭盛, 伊藤允好, 三宅 淳, 金村米博. 新規レチ

ノイド誘導体を用いたヒト神経幹細胞／前
駆細胞から神経細胞の分化誘導技術の開発.
日本レチノイド研究会第15回学術集会, 2004.
11. 18, 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脳、マウスおよびヒト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。研究方法としては毒性試験および定量的 PCR 法による遺伝子発現の検討をおこなった。ヒト由来アストロサイト株 U251 の成長に対する、各種依存性薬物の毒性については、最終濃度 20 μM では有意な毒性は見られなかった。SSRI の作用と比較するため、薬物処理した細胞の RNA を抽出し、現在マイクロアレイ法による解析を行っている。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。

以上の研究成果をふまえて、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、マウスおよびヒト由来培養細胞株を用いてエタノール、Methamphetamine（以下、METH）など依存性薬物による遺伝子発現変化、毒性の検討をおこなう。

B. 研究方法

1. ヒト由来アストロサイト株 U251 に種々の濃度の Methamphetamine, MDMA, Cocaine, Methylphenidate, 2C-B, Ketamine, を投与し、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。
2. マウス中枢神経由来で、ドパミン作動性ニューロンの性質を持つ培養細胞株 CATH. a に種々の濃度の Methamphetamine を投与し、同様に検討した。
3. マウスに METH を急性あるいは慢性に投与し、種々の遺伝子発現の経時的および部位特異的变化について定量的 PCR 法により

詳細に検討した。

(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ガイドラインに従っておこなった。依存性薬物の入手および管理については、法令に従って注意深くおこなった。

C. 研究結果

1. ヒト由来アストロサイト株 U251 の成長に対する、上記6種類の依存性薬物の毒性については、最終濃度 20 μ M では有意な毒性は見られなかった。SSRI の作用と比較するため、薬物処理した細胞の RNA を抽出し、現在マイクロアレイ法による解析を行っている。
2. 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 METH を投与したところ、0.2 mM では対照群とかわらないが、2 mM では 50 % 程度、3 mM では 85 % 程度の細胞がアポトーシスをおこした。この作用について、マイクロアレイ法および定量的 PCR 法による遺伝子発現変化の検討を行うと同時に、nNOS 特異的阻害剤 S-MTC、peroxynitrite catalyst FeTMPyP および Superoxide Dismutase 類似薬 EUK-8 による細胞保護作用について検討を行っている。
3. マウスに METH を投与し、METH による発現変化が報告されている遺伝子を中心に 17 種の遺伝子について発現変化を詳細に検討した。急性投与群と慢性投与群で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、METH 投与に対する発現誘導が消失した。最初期遺伝子群として c-fos, arc, arcadlin の発現を解析したところ、これらの遺伝子は METH 急性投与後急速に発現誘導され、慢性投与によって全般的に発現量が低下した。アポトーシス抑制に関わる遺伝子群として、Bcl-2,

Bcl-XL, metallothionein (以下 MT) 1, MT3, Grp78/Bip の発現を解析したところ、これらはいずれも METH 急性投与後の前脳皮質で発現誘導された。また、アポトーシス促進に関わる遺伝子である BAX および Chop/GADD153 も同じく発現誘導された。Arc 結合蛋白質である Amida の遺伝子発現は、METH 急性投与後 24 時間で減少した。一方、METH 急性投与に比較して、慢性投与による発現変化については、①反応性は変わらないが全般的に発現が減少した遺伝子 (c-fos, arc, arcadlin, MT1, BAX)、②発現が減少するようになった遺伝子 (Bcl-2)、③あらたに発現誘導されるようになった遺伝子 (MT3, Grp78/Bip, Chop/GADD153) があつた。④一方、DAT, tyrosine hydroxylase, ドパミン受容体 D2L, D5 の発現は METH 投与による著明な影響を受けなかった。現在、線条体、前脳皮質など、より詳細な部位特異的遺伝子発現の解析を進める一方、経時的变化についても、依存形成時の詳細なタイムコースをとって発現パターンの変化を検討している。また、in situ hybridization, 免疫組織科学形態学的など形態学的な解析も行っている。

D. 考察

METH など依存性薬物がアストロサイト株に対して毒性が見られなかったことについては、別のアストロサイト系細胞での 4 mM という高濃度処理、あるいは齧歯類への全身投与で METH がむしろアストロサイトの増殖を引き起こすことから、予測されたことであつた。これらの報告よりも高い濃度での検討は、覚醒剤乱用者の実態からもかけ離れることになるので行わなかった。METH および MDMA による遺伝子発現の変化は、同様にモノアミントランスポータを作用点とし、今回、本プロジェクトで詳細な検討を行った SSRI との比較で極めて興味深いものである。

ドパミン作動性ニューロン様培養細胞株 CATH. a は METH 投与によりアポトーシスが誘導される。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る。また、依存性薬物のモノアミントランスポータに対する特異性は種によって異なるので、CATH. a 細胞で得られた結果を神経幹細胞由来のヒトドパミン作動性ニューロンで確認することにより、ヒトにおける薬物依存の解析を行うことができる。このような研究を人体に薬物を投与することなく行うことができることは、倫理的にも極めて重要であり、本研究の大きな意義の一つである。

マウスに METH を投与し、METH による発現変化が報告されている遺伝子を中心に 17 種の遺伝子について発現変化を詳細に検討した。これらの遺伝子については多くのものがこれまでも METH による発現変動を報告されているが、解析に用いた脳内部位はまちまちであり、また定量性に問題の多い方法で測定を行っているものも多い。このため、信頼性の高い統一的手法で、このように多くの遺伝子発現について詳細に解析をおこなったのは今回が初めてである。METH 急性投与により、最初期遺伝子群だけでなく、アポトーシス抑制に関わる遺伝子群およびアポトーシス促進に関わる遺伝子群が発現誘導された。このことから、METH 投与により神経細胞にストレスがかかり、これに対する反応としてアポトーシス抑制および促進因子が誘導されて細胞の運命を決定する「綱引き」がおこなわれている可能性が示唆された。一方、METH 慢性投与によって、①反応性は変わらないが全体的に発現が減少した遺伝子 (c-fos, arc, arcadlin, MT1, BAX)、②発現が減少するようになった遺伝子 (Bcl-2)、③あらたに発現誘導されるようになった遺伝子 (MT3, Grp78/Bip, Chop/GADD153) があつたが、これは慢性投与によりこれらの遺伝子が発現する

細胞の性質が変わったり、細胞自体の数が増減してしまったりしたためと考えられた。このような機序について、現在、形態学的検討を含めた解析を行っており、(脳内の) どこで、どのような細胞が、どんな遺伝子が発現することが薬物依存形成に重要かが明らかになると思われる。

E. 結論

ヒト由来アストロサイト株 U251 の成長に対する、各種依存性薬物の毒性については、最終濃度 20 μ M では有意な毒性は見られなかった。SSRI の作用と比較するため、薬物処理した細胞の RNA を抽出し、現在マイクロアレイ法による解析を行っている。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 METH 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。

以上の研究成果をふまえて、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

問題なし

G. 研究発表

論文作成中

H. 知的財産権の出願・登録状況

予定も含めて無し

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

分担研究者 山崎 麻美

国立病院機構大阪医療センター 臨床研究部 室長

金村 米博, 山本 篤世

産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門

研究要旨

一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) 情報が異なる複数のヒト神経系細胞 (神経細胞、グリア細胞) を用いて *in vitro* で薬剤の副作用を評価するための技術を確認することを目標に、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た。

A. 研究目的

ヒトに対する安全性の確立された有用な薬剤開発を行うための支援技術として、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) 情報が異なる複数のヒト神経系細胞 (神経細胞、グリア細胞) を用いて *in vitro* で薬剤の副作用を評価するための技術を確認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が必要であること、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、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) 羊膜上皮細胞の分離

帝王切開にて娩出された胎盤組織から羊膜を採取し、以下の方法で羊膜上皮細胞を分離した。採取した羊膜をクリーンベンチ内で無菌的に洗浄後、機械的に細切した。その後、

collagenase type 4 (1.0 mg/ml; Worthington社)、DNase I (0.01%; Worthington社)、papain (0.01%; Worthington社) の混合液に入れ、37度で60分間反応させた。終了後、上清を回収しセルストレーナーを通し、単一細胞懸濁液を作成した。分離後の細胞は20%ウシ胎児血清 (FBS) 含有 DMEM (GIBCO社) で培養した。

2) 羊膜上皮細胞の神経系細胞への分化誘導^{1,2)}

羊膜上皮細胞の神経系細胞への分化誘導は以下の方法で実施した。20% FBS/DMEM で培養されている羊膜上皮細胞を、10% FBS/DMEM に培地を変更し8日間培養した (初期培養)。その後、20% FBS+FGF-2 (10ng/ml; PEPRO TECH社)+DMEMに変更して24時間培養し (分化プレ培養)、次に、N2 supplement (Invitrogen社)、BHA (100 μ M; WAKO社)、forskolin (10 μ M; SIGMA社)、K252a (5nM; CALBIOCHEM社)、DMSO (2%; ナカライテスク社)、heparin (5U/ml; SIGMA社)、KCl (25mM)、PDGF-BB (10ng/ml; PEPRO TECH社)、FGF2 (10ng/ml) 含有の

DMEM に培地を変更し、さらに 24 時間培養した (分化誘導処理)。

3) 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、ブロッッキングを行い、抗 β III tubulin (TuJ1) 抗体 (1:500; mouse IgG monoclonal, BAbCO, 社)、抗 GFAP 抗体 (1:80; rabbit polyclonal, SIGMA 社) の 2 種の 1 次抗体を含む 10%正常ヤギ血清/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 μ M, Molecular Probes 社) 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)

ヒト羊膜上皮細胞を用いた研究計画は、大阪医療センターならびに産業技術総合研究所倫理委員会で審査・承認を受け、研究を実施した。

C. 研究結果

今回検討を行った分化誘導方法では、分化誘導後、ヒト羊膜上皮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が確認された (図)。またこれらの細胞の多くは GFAP の発現に加えて神経細胞のマーカー分子である β III tubulin を共発現していた。しかし、 β III tubulin のみを発現し、形態的には神経細胞様形態と思われる細胞は殆ど存在しなかった。

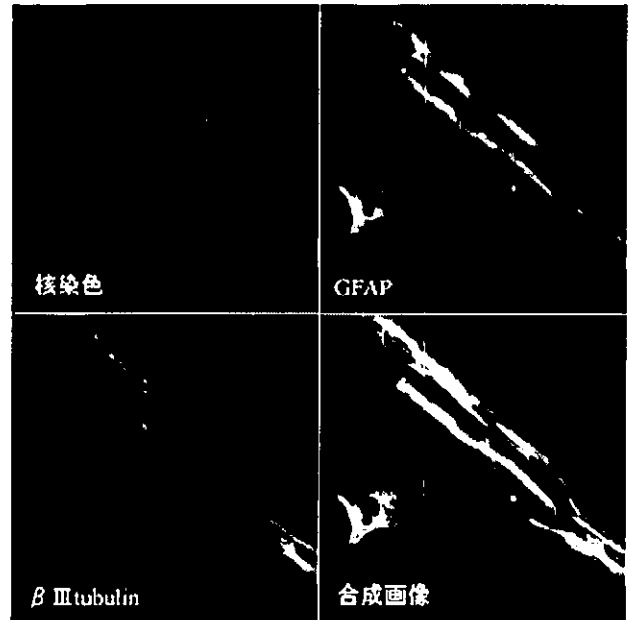


図 ヒト羊膜上皮細胞からのグリア様細胞の分化誘導

D. 考察

今回の検討では、平成 14-15 年度に検討したヒト臍帯血細胞や長期培養したヒト間葉系幹細胞と同様に、ヒト羊膜上皮細胞から少なくとも GFAP 陽性のグリア用細胞が作成できることが確認された。また接着性の細胞を確保する点では、ヒト臍帯血細胞よりその効率は高いと思われる。

羊膜上皮細胞、羊膜由来間葉系細胞、胎盤絨毛由来間質細胞などから神経系細胞が分離できることは既に幾つかの報告¹⁻³⁾がある。これら報告と今回の我々の成果から考えて、ヒト臍帯血細胞や長期培養したヒト間葉系幹細胞と同様に、ヒト羊膜上皮細胞は少なくとも GFAP 陽性グ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。薬剤評価用標準ヒト神経系細胞として使用するためには、細胞の倫理性に加え、標準化された品質 (細胞特性) をもつ標準細胞を安定的に供給するシステムの構築が重要である。この点では、臍帯血ならびにヒト羊膜上皮細胞は細胞量の確保の点から、またロット管理の点でも非常に魅力的な細胞ソースであると考えられる。接着性の GFAP 陽性細胞を大量に得るという点からは、ヒト臍帯血

よりも効率が良いと思われ、ヒト羊膜上皮細胞は薬剤評価用標準ヒト神経系細胞として有用な細胞ソースの1つになりうると考えられた。ヒト羊膜上皮細胞における薬剤毒性関連遺伝子の動きは、神経組織由来細胞と極めて近い傾向を示すデータが得られており、これら観点からも本細胞を用いた神経毒性スクリーニング系の構築は有用なものであると考えられた。

しかし、神経生物学的には、幾つかの今後の検討項目も存在する。羊膜上皮細胞から作成した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り、また多くの細胞はGFAPと同時に神経細胞のマーカーであるβIII tubulinも同時に発現していることが確認された。この傾向は過去の他のグループの報告と同様である¹⁾が、神経毒性のスクリーニング系としてより精度の高い標準用細胞を開発するためには、神経組織由来のGFAP陽性細胞との生物学的特性の類似点、相違点を慎重に検討し、ヒト羊膜上皮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。

E. 結論

ヒト羊膜上皮細胞からGFAP陽性グリア様細胞が作成可能であることが判明した。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があると考えられる。

F. 文献

- 1) Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, Okano H, Uchida S, Kamo I, Kobayashi M, Yokoyama Y. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res*, 78: 208-214, 2004

- 2) 桜川宣男. ヒト羊膜細胞. *CLINICAL NEUROSCIENCE*, 21: 1122-1123, 2003
- 3) 伊倉宏一, 高橋恒夫. ヒト胎盤. *CLINICAL NEUROSCIENCE*, 21: 1124-1126, 2003

G.健康危険情報

特になし

H. 研究発表

特になし

I. 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

