

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14年度～16年度 総合研究報告書

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 14 年度～16 年度 総合研究報告書 (1/2 冊)

主任研究者 金村 米博

平成 17 (2005) 年 4 月

平成 14 年度～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. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 25
--------------------	----------

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）
総合研究報告書

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

研究要旨

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実施した。非神経系ヒト細胞（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）からGFAP陽性グリア様細胞を作成することが可能であることが確認され、オリゴプローベをのせたマイクロアレーを用いた2色法による高感度遺伝子発現解析方法の構築とそれを用いた薬剤応答性関連遺伝子パスウェイ解析技術、SELDI-TOFMSを応用した高感度迅速プロテオーム解析方法と2次元電気泳動法との併用による包括的薬剤応答性蛋白質発現情報の取得方法、に関して各々検討を加え最適な方法を開発した。それら評価技術を用いて 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、候補遺伝子、蛋白質の同定に成功した。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。

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

室長

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

1) - 1 ヒト臍帯血細胞からの神経系細胞への分化誘導の可能性の検討

ヒト臍帯血単核球の神経系細胞への分化能の評価を目的とし、分離細胞を分化誘導培地 [DMEM/F-12+EGF (20ng/ml)+FGF2 (20ng/ml)+hLIF (10ng/ml)] で7日間培養をおこない評価した。

1) - 2 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

長期培養 (9継代数以上) を行ったヒト間葉系幹細胞 (Bio Whittaker 社より購入) の神経系細胞への分化能の評価を目的とし、①DMEM/F-12+1%FBS+ 1×10^{-6} M all-trans レチノイン酸 (ATRA)+B27 添加因子で14日間 ②DMEM/F-12+EGF (20ng/ml) +FGF2 (20ng/ml) +hLIF (10ng/ml) +B27 添加因子 (以下、神経幹細胞用培地) で2週間培養、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+ 1×10^{-6} M ATRA を添加し14日間培養 ③増殖培地+1mM β -mercaptoethanol (BME) で48時間培養 ④増殖培地+BME (1mM) で48時間培養後、DMEM/F-12+1%FBS+ 1×10^{-6} M ATRA+B27 添加因子で14日間培養 ⑤増殖培地+BME (1mM) で24時間培養後、増殖培地+200 μ M butylated hydroxyanisole (BHA) +2% DMSO で24時間培養 ⑥増殖培地+BME (1mM) で24時間培養後、増殖培地+BHA (200 μ M) +2% DMSO で24時間培養、その後 DMEM/F-12+1% FBS+ 1×10^{-6} M ATRA+B27 添加因子で14日間培養、の各々を実施して評価した。

1) - 3 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

帝王切開にて娩出された胎盤組織から羊膜を採取し、羊膜上皮細胞を分離培養し、その神経系細胞への分化能評価を以下の方法で実施

した。DMEM+10% FBS に培地を変更し8日間培養後 (初期培養)、20% FBS+FGF2 (10ng/ml) +DMEM に変更して24時間培養し (分化プレ培養)、次に、N2 添加因子+BHA (100 μ M) +forskolin (10 μ M) +K252a (5nM) +DMSO (2%) +heparin (5U/ml) +KCl (25mM) +PDGF-BB (10ng/ml) +FGF2 (10ng/ml) +DMEM に培地を変更し、さらに24時間培養 (分化誘導処理) し、羊膜上皮細胞の神経系細胞への分化能を検討した。

1) - 4 多能性幹細胞からの各種神経細胞の分化誘導技術の開発

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検討した。また、前方神経誘導因子、および様々な濃度の ATRA が ES 細胞の分化に与える影響、さらにその結果を用いて EB から高率に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誘導する培養系を確立し、さらに、腹側化因子である Sonic hedgehog (Shh) を培養系に加えて、ES 細胞由来神経系前駆細胞の持つ、時間的・空間的 (前後軸、背腹軸) 特異性を解析した。

2) マイクロアレイ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

2) - 1 薬剤毒性試験

各神経系細胞 (動物細胞およびヒト細胞) に対して薬剤を様々な濃度で添加した後、CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて細胞内総ATPを計測することにより、薬剤濃度の細胞増殖に対する影響を検討した。その結果をもとに細胞増殖阻害が0-20% (B点)、50%付近 (C点)、80-100% (D点) をコントロール (A点) に対して設定した (図1)。各薬剤の毒性検討はこれら設定した薬剤濃度を用いて、各濃度の各薬剤存在下で24時間インキュベートした後に、細胞を回収し、各実験に使用した。

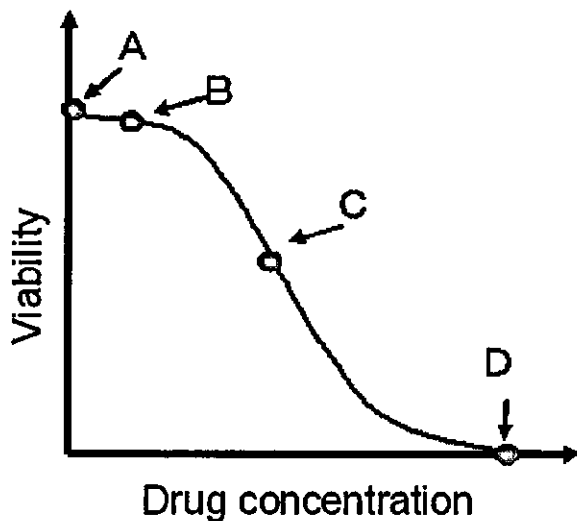


図1 薬剤毒性試験と設定濃度の決定

2) - 2 マイクロアレーを用いた遺伝子発現解析

各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 の遺伝子に対するオリゴプローブをのせたマイクロアレー実験系を用いて、両群の各遺伝子発現量を測定したデータを取得した (図 2)。

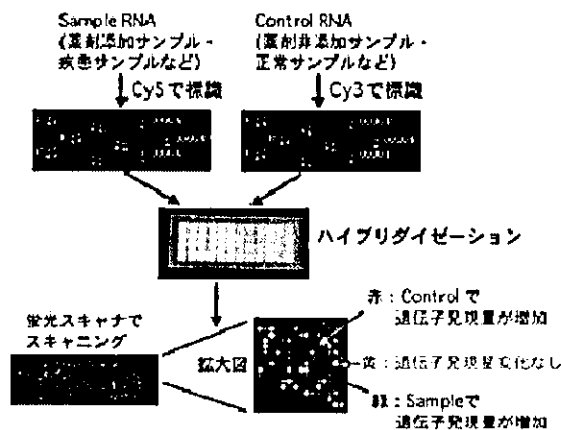


図2 マイクロアレー法の概要

得られた発現量の数値データを適正に正規化することによって実験条件依存性を除き、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手法の開発と、それを

用いて、発現が有意に上昇・下降する遺伝子群の検出を実施した。

抽出を試みた遺伝子群は、1. 薬剤濃度依存性変動 (毒性試験で設定した A~D の薬剤濃度間での変動)、2. 薬剤投与後時間依存性変動、3. 薬剤構造依存性変動、の各々を示す遺伝子群である。

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し、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ウェイを検討した。

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

3) - 1 SELDI-TOFMS を用いた解析

2) と同様、細胞毒性試験の結果を参考に、各薬剤を細胞に投与し、投与後、各細胞を溶解し、蛋白質抽出液を作成した。その後、プロテインチップ (CM10, Q10; サイファージェン・バイオシステム社) に添加した。洗浄後、プロテインチップリーダー (サイファージェン・バイオシステム社) にて解析を実施した。

3) - 2 2次元電気泳動を用いた解析

2次元電気泳動用の細胞溶解液で細胞を破碎し、蛋白質抽出液を作成し、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、Immobiline DryStrip を Multiphor II Electrophoresis unit (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて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。泳動後の蛋白質は Sypro Ruby を用いて蛍光染色し、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。

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

4) - 1 レチノイン酸アナログの影響の検討
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。レチノイン酸アナログ（レチノイド）の合成方法を開発し、その方法を利用して種々のレチノイドを合成した。更に合成したレチノイドの薬理作用を各種方法にて解析した。また作成したレチノイン酸アナログの神経系細胞の遺伝子・蛋白質発現に及ぼす影響を検討した。

4) - 2 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

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をATPアッセイ法により検討し、発現量に変化する遺伝子をマイクロアレーを用いて検索した。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。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。さらにマウスに 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。

4) - 3 抗コレステロール剤の影響の検討

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 Simvastatin 添加による遺伝子・蛋白質発現量の変化を検討した。

4) - 4 葉酸代謝酵素 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の SNP 解析

脊髄髄膜瘤患者 65 人 (年齢は 0 歳から 15 歳)、その母親 55 人、ならびに父親 21 人を対象とし疾患群とした。健常者 52 人を対象群とした。葉酸代謝酵素のひとつである MTHFR 遺伝子の 2 つの SNP (C677T と A1298C) 異常について検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞 (臍帯血、間葉系幹細胞、羊膜上皮細胞) を用いた研究は、産業技術総合研究所ならびに国立病院機構大阪医療センター倫理委員会の承認を受け実施した。遺伝子解析研究については、大阪医療センター医学倫理委員会の審査をうけ承認を得て実施した。

C. 研究成果

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

1) - 1 非神経系ヒト細胞からの神経系細胞への分化誘導の可能性の検討

検討した 3 種類の非神経系ヒト細胞 (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) が、少なくとも GFAP 陽性グリア様細胞へ分化誘導させることが可能であることを検証した (図 3)。これら細胞ソースを応用利用して、主にヒトグリア細胞 (アストロサイト) をターゲットとした薬剤毒性試験系を構築することが可能であることが示唆された。またこれら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考えられ、本研究目的を満たす細胞であると結論づけられた。



図3 非神経系ヒト細胞からのGFAP陽性細胞の分化誘導

1) 1-2 多能性幹細胞からの各種神経細胞の作成に関する研究

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 acetyltransferase (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た。

2) マイクロアレイ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

まず、ヒト細胞サンプルからの mRNA 抽出、増幅、マイクロアレイへのハイブリダイゼーションまでの実験系を確立した。この段階で約 23000 遺伝子分の発現プロファイルが取得可能となった。次に、発現キーピング遺伝子および全遺伝子による正規化、permutation 検定によるサンプル間の共通上昇・下降遺伝子の同定、そして Mann-Whitney 検定および permutation 検定によるサンプル群間で発現の違いが有意に見られる遺伝子の同定を行う一連の方法を確立した。これらの系をまずヒト正常細胞および各種癌細胞その他の病理細胞に適用し、実験による検証を行うことによって、方法の妥当性を検証した。さらに遺伝子の発現シグナルから同調して変動する遺伝子群を解析するために clustering 解析手法を開発した。ここから上記の癌細胞サンプルにおいて予後良好あるいは予後不良群に特有の遺伝子発現パターンを示す遺伝子群を同定し、さらに癌腫を予測するシステムを開発した (図4)。

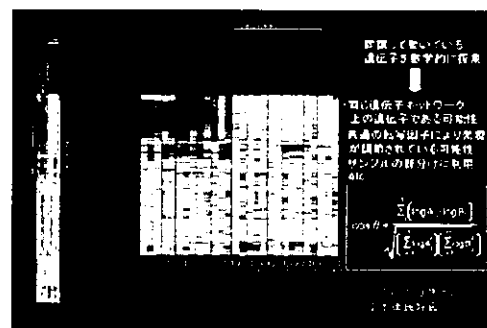


図4 Clustering 解析

次に、培養ヒト神経系細胞からは微量の RNA しか得られないという問題を克服するため、RNA を効率良く増幅しマイクロアレイ実験に用いるのに充分量確保するための増幅法を新

たに確立した。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イ実験が行えるようになった。またアレイスライドについても改良し、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、実験誤差や蛍光色素依存的なノイズをより精密に除去するために、今までの正規化法に加え、局所重み付け線型回帰補正を行い、データの信頼性の向上を図ると共に、微小発現しか見られない遺伝子についても解析可能とした (図 5)。

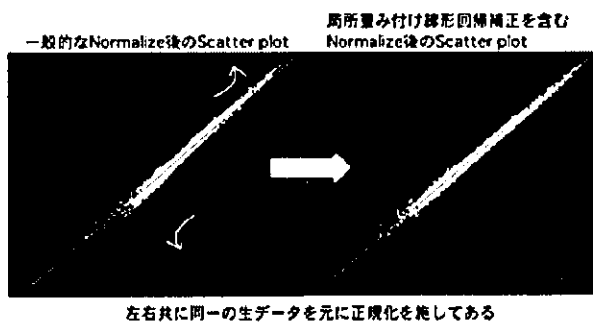


図 5 局所重み付け線型回帰補正による効果

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、迅速で頑健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) をはじ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、さらに検索も可能な WEB ツールを作製した。これによりマイクロアレイ等で統計学的に有意な候補遺伝子がある程度絞り込んだ後に、生物学的な見地からさらなる絞り込みや薬剤応答における有用な知見を得ることが迅速に行なえるようになった (図 6 a, b)。

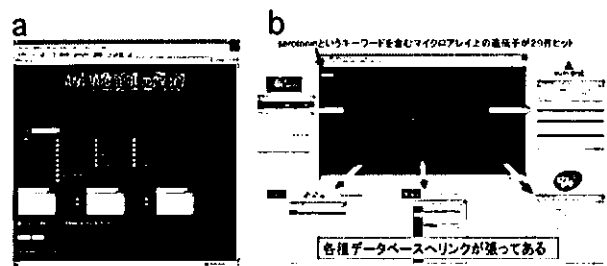


図 6 アノテーション情報検索・閲覧ツール
(a: 検索画面、b: 検索結果画面例)

2 色法に基づくマイクロアレイ (図 2) 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、それまでの解析手法に加え、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。これにより、DyeSwap 実験の補正と各スライドでの正規化を施すことで、マイクロアレイ上で 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 RealTime-PCR 法にてマイクロアレイ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 (図 7 はその一部を示す)。

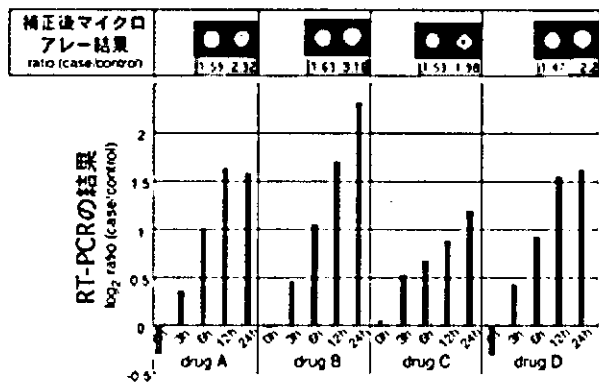


図7 マイクロアレーデータとRT-PCRによる確認実験データとの比較

薬剤応答における微少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行なった。KEGGデータベース（京都大学 GenomeNet）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 値を算出、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（図8）。

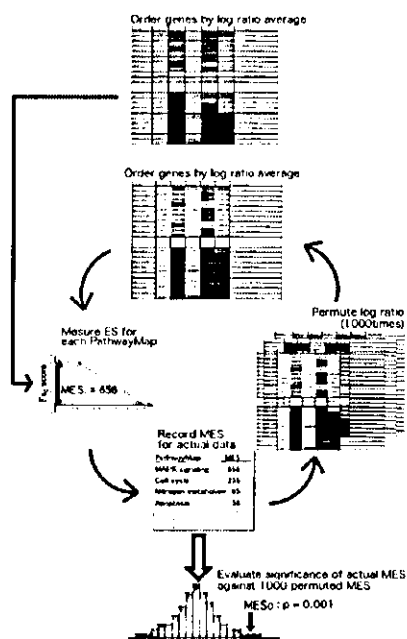


図8 Pathway 解析図

この手法を用い、間葉系幹細胞および羊膜上皮細胞を GFAP 陽性の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。その結果、個々の微少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系細胞に対する作用・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9）。現在行なっている *in vivo* 系としてのマウスを用いた実験においてもこの解析で変動が見られたパスウェイ上の遺伝子群が変動していることが一部確かめられている。

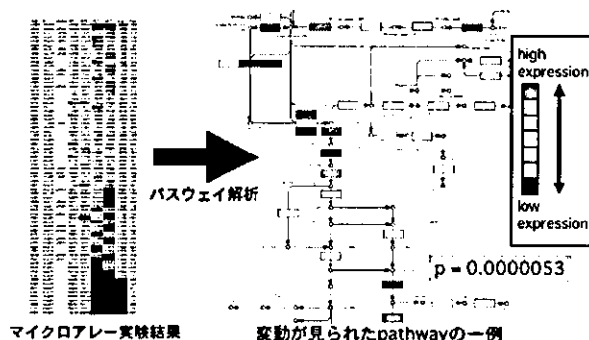


図9 パスウェイ解析による薬剤作用機序の解析例

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

SELDI-TOFMS を用いたタンパク質の解析に関しては、2) と同様、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10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。

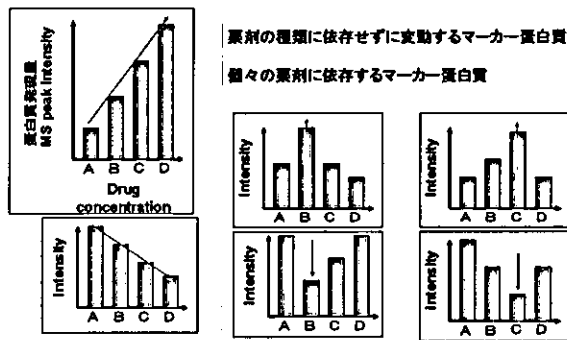


図10 SELDI-TOFMSを用いたタンパク質発現解析

薬剤濃度：コントロール (A点)、細胞増殖阻害が0-20% (B点)、50%付近 (C点)、80-100% (D点)

ATRA、バルプロ酸、エタノール、シンバスタチンの4薬剤に関して、薬剤濃度の変化に依存して発現量の変化するマーカー蛋白質を SELDI-TOFMSを用いて検索した。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を2つ (4.97kDa、53kDa) 同定した (図11)。

分子量4.97kDaの蛋白質は各薬剤での濃度依存的に発現量が増加する挙動を示し、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、その本体はthymosin beta-4であると予想された (図11)。また本マーカー蛋白質の発現量は、同一薬剤の濃度依存性に変動するもみならず、各種レチノイン酸誘導体を用いての比較結果から、薬剤誘導体の構造の違いによってもその発現量に差があることが示された。

分子量53kDaの蛋白質は薬剤濃度の増加により、細胞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11)。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と考えられた。

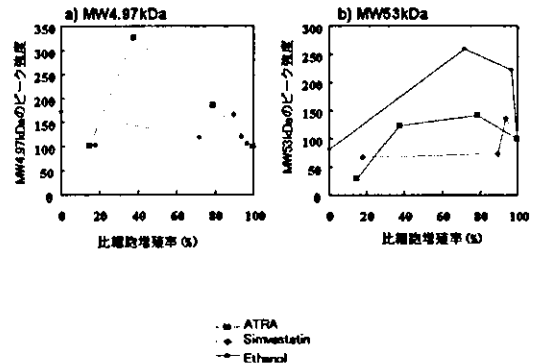


図11 薬剤の種類に依存せずにユビキタスに変動しているマーカー蛋白質の発現量と細胞増殖との関係

以上の成果より、薬剤濃度の変化に依存して発現量が増加するマーカー蛋白質、並びに薬剤構造の違いにより発現変動するマーカー蛋白質を SELDI-TOFMSを用いて、高感度にかつ迅速に検索することが可能であることが判明した。

2次元電気泳動では、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時間必要であり (2サンプル)、解析速度では SELDI-TOFMS より長い時間を要することが判明した。ATRAを用いて、その濃度依存性に変動する蛋白質発現を解析したが、分子量が15-100kDaの範囲で多数のスポットが検出され、その中から 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。その1つの Retinol binding protein 1 は、マイクロアレイを用いた mRNA の発現解析と結果が一致していた。本解析結果から、2次元電気泳動を用いて、分子量15-100kDaのマーカー蛋白質の同定が可能であることが判明した。

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

4) - 1 レチノイド類の薬理作用と創薬の方向性に関する研究

研究目的達成のための化合物(薬剤)を調製するために、レチノイン酸骨格構造の立体選択的合成法を開発した。一つはβ-イオン鉄カルボニル錯体を出発物質として、全トランス-レチノイン酸、11 シス-レチナール、13 シス-レチノイン酸エステル及び9 シス-レチノイン酸をそれぞれ立体選択的に合成した。二つ目はエノールトリフラートとスズオレフィンとの Stille カップリング反応を駆使してレチノイン酸異性体のアナログを立体選択的に合成した。13 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)の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。13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。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RXRαへの転写活性を検討した結果、全ト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。RXRα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。更に、新しい骨格レチノイドとしてβ位置換γ-ヒドロキシブテノリド化合物を合成してHL-60細胞に対する薬理活性を調べた。その結果18c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。

4) - 2 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

マウス神経幹細胞、マウス脳、マウス由来培養細胞株、ヒト神経系細胞を用いてエタノール、メタンフェタミン(METH)など依存性薬物の影響を検討した。

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がわかった

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、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実施した。

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。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つた。

4) - 3 抗コレステロール剤の影響の検討

ヒト細胞株 (U251)、マウス神経幹細胞での増殖率は Simvastatin 添加により低下したが、その影響は種によって異なり、ヒトよりマウス細胞の方がより低濃度で増殖が阻害された。増殖率はコレステロール合成経路の産物であるメバロン酸添加により増加した。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。

4) - 4 葉酸代謝酵素 MTHFR の SNP 解析

MTHFR の C677T および A1298C の SNP 解析を行った。それぞれの野生型・ヘテロ・ホモの遺伝子型の頻度は、対照群と比較して母親群では 1298AA の遺伝子型の頻度が高い傾向が認められた以外は、患者群、母親群、父親群とも対照群と差はなく、いずれにおいても有意な差は認めなかつた。C677T と A1298C の組み合わせでできる 9 種類の遺伝子型の頻度に関しては、3 の塩基置換をもつ遺伝子型の組み合わせ (677TT/1298AC, 677CT/1298CC)、もしくは 4

つの塩基置換をもつ遺伝子型の組み合わせ (677TT/1298CC) の例は存在しなかつたが、いずれの遺伝子型の組み合わせの頻度も、対照群との有意な差はみられなかつた。

D. 考察

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、16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、マイクロアレイ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。そのために必要な、ES細胞からの特定神経細胞の分化

誘導技術とその生物学的特性解析に関しても今回の研究で将来につながる成果を上げることが出来たものと考ええる。

全体として、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考ええる。

2) マイクロアレイ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

平成 14 年度の研究開始当初に比べ、マイクロアレイを取り巻く技術開発の進歩により、一度に解析できる遺伝子数は増加し、スライドの質も極めて均一で良好なものとなってきた。そこに当研究で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少な変動遺伝子を捉えることが可能となった。それらの改良により、27000 遺伝子程度（マイクロアレイスライド上の 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。

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が当然重要であるとともに、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。特にサンプル数が比較的小さい場合には、個々の遺伝子を検定することに対し今回のように遺伝子グループ群を同時に検定することで統計学的にも生物学的にも信頼性が確実に高まると考えられる。

本研究で用いたグリア細胞（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あると考えられる。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から得られた結果は、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。現在行なっているマウスを用いた *in vivo* 系実験においてもデータが実証されつつある段階であり、パスウェイ解析の有用性が確かめられている。

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確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行なう予定である。今回は数種の薬剤についてのみの解析であるが、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が予想され、今後のさらなる網羅的実験解析により、薬剤作用点・副作用点が解明されることが考えられる。

今後の課題の一つとして、時系列のデータの解析方法があげられる。生物学的な解釈を入れられない場合には複数サンプルとして扱わざる

を得ないが、今回開発に成功したパスウェイ解析のように生物学的解釈を行い、時系列の評価を行うシステムを確立することが妥当であると考えられた。将来の遺伝子多型の解析に関しては、今回のマイクロアレイやプロテインチップによる研究によって重要な遺伝子を絞り込み、それらの周辺の SNP を調べるのが今回のような系では現実的であると考えられた。さらに各疾患や薬剤に応答性のある遺伝子群を本研究の方法で調べた上で、新規の多検体を同時にスクリーニング可能な高密度マイクロアレイスライドを作製し、薬剤開発時のドラッグディスカバリーや個々人の薬剤応答性の差異に基づくオーダーメイド医療へと繋げていくことも今後、可能と考えられた。

全体として、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

本プロジェクトでは薬剤毒性に関連する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、2種類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の場合、1 μ g程度であるのに対して二次元電気泳動法では100 μ g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100 μ gの蛋白質を抽出するには約10⁶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10⁴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。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程度であるが、二次元電気泳動法の場合は500-1000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表2に示す。

	2D electrophoresis	ProteinChip	Antibody Arrays
サンプル量	△ (100 μ g)	◎ (0.5 μ g)	△
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	○
定量性	△ (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	16,000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, 96,000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

表2 SELDI-TOFMS法と2次元電気泳動法の比較

多薬剤を用いた蛋白質発現量の変化を基準としたトシキ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。

全体的に、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、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。

3年間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(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やりやすいヒト細胞(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

マイクロアレイ、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、マイクロアレイ解析方法、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。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Tode C, Yamano Y, Ito M. Carotenoids and related polyenes. Part 8. Total synthesis of optically active mytiloxanthin applying the stereoselective rearrangement of tetrasubstituted epoxide. J Chem Soc, Perkin Trans 1(13): 1581-1587, 2002
 - 2) Wada A, Ieki Y, Ito M. Palladium Catalyzed Coupling Reaction of an Enol Nonaflate with (Vinyl) tributylstannanes and Acetylenes. Synlett, 7:

- 1061-1064, 2002
- 3) Yamano Y, Sakai Y, Hara M, Ito M. Carotenoids and related polyenes. Part 9. Total synthesis of thermozeaxanthin and thermocryptoxanthin and the stabilizing effect of thermozeaxanthin on liposomes. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*(17): 2006-2013, 2002
 - 4) Suzuki M, Matsumoto S, Mizoguchi M, Hirata S, Takagi K, Hashimoto I, Yamano Y, Ito M, Fleischmann P, Winterhalter P, Morita T, Watanabe N. Identification of (3*S*,9*R*)- and (3*S*,9*S*)- Megastigma-6,7- dien-3,5,9-triol 9-*O*- β - D- glucopyranosides as Damascenone Progenitors in the Flowers of *Rosa damascena* Mill. *Biosci Biotechnol Biochem*, 12: 2692-2697, 2002
 - 5) Yamano Y, Watanabe Y, Watanabe N, Ito M. Stereocontrolled Synthesis of Glucosidic Damascenone Precursors. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*(24): 2833-2844, 2002
 - 6) Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, Shibata S, Koike M, Takano H, Ueda S, Uchiyama Y, Noda T, Okano H. RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 15194-15199, 2002
 - 7) Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Islam O, Kodama E, Yamamoto A, Nakanishi Y, Arita N, Yamasaki M, Okano H, Hara H, Miyake J. Evaluation of *in vitro* proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res* 69, 869-879, 2002
 - 8) Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, Yue CT, Yang KC, Nakamura Y. Molecular Diagnosis of Colorectal Tumors by Expression Profiles of 50 Genes Expressed Differentially in Adenomas and Carcinomas. *Oncogene*, 21: 4120-4128, 2002
 - 9) Kitahara O, Katagiri T, Tsunoda T, Harima Y, Nakamura Y. Classification of Sensitivity or Resistance of Cervical Cancers to Ionizing Radiation According to Expression Profiles of 62 Genes Selected by cDNA Microarray Analysis. *Neoplasia*, 4: 295-303, 2002
 - 10) Okutsu J, Tsunoda T, Kaneta Y, Katagiri T, Kitahara O, Zembutsu H, Yanagawa R, Miyawaki S, Kuriyama K, Kubota N, Kimura Y, Kubo K, Yagasaki F, Higa T, Taguchi H, Tobita T, Akiyama H, Takeshita A, Wang YH, Motoji T, Ohno R, Nakamura Y. Prediction of Chemosensitivity for Patients with Acute Myeloid Leukemia, According to Expression Levels of 28 Genes Selected by Genome-wide Complementary DNA Microarray Analysis. *Mol Cancer Ther*, 1: 1035-1042, 2002
 - 11) Nishiu M, Yanagawa R, Nakatsuka S, Yao M, Tsunoda T, Nakamura Y, Aozasa K. Microarray Analysis of Gene-expression Profiles in Diffuse Large B-cell Lymphoma: Identification of Genes Related to Disease Progression. *Jpn J Cancer Res*, 93: 894-901, 2002
 - 12) Kaneta Y, Kagami Y, Katagiri T, Tsunoda T, Jin-nai I, Taguchi H, Hirai H, Ohnishi K, Ueda T, Emi N, Tomida A, Tsuruo T, Nakamura Y, Ohno R. Prediction of Sensitivity to STI571 among Chronic Myeloid Leukemia Patients by Genome-wide cDNA Microarray Analysis. *Jpn J Cancer Res*, 93: 849-856, 2002
 - 13) Hasegawa S, Furukawa Y, Li M, Satoh S, Kato T, Watanabe T, Katagiri T, Tsunoda T, Yamaoka Y, Nakamura Y. Genome-Wide Analysis of Gene Expression in Intestinal-Type Gastric Cancers Using a Complementary DNA Microarray Representing 23,040 Genes. *Cancer Res*, 62: 7012-7017, 2002
 - 14) Nagayama S, Katagiri T, Tsunoda T, Hosaka T, Nakashima Y, Araki N, Kusuzaki K, Nakayama T, Tsuboyama T, Nakamura T, Imamura M, Nakamura Y, Toguchida J. Genome-wide Analysis of Gene Expression in Synovial Sarcomas Using a cDNA Microarray. *Cancer Res*, 62: 5859-5866, 2002
 - 15) Iizaka M, Furukawa Y, Tsunoda T, Akashi H,

- Ogawa M, Nakamura Y. Expression Profile Analysis of Colon Cancer Cells in Response to Sulindac or Aspirin. *Biochem Biophys Res Commun*, 292: 498-512, 2002
- 16) Uenishi J, Matsui K, Wada A. Trienylboronic Acid, a Versatile Coupling Tool for Retinoid Synthesis; Stereospecific Synthesis of 13-Aryl Substituted (11Z)-Retinal. *Tetrahedron Lett*, 44: 3093-3096, 2003
 - 17) Yamano Y, Shimizu Y, Ito M. Stereoselective Synthesis of Optically Active 3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol- Glucosides. *Chem Pharm Bull*, 51: 878-882, 2003
 - 18) Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng YK, Ling EA, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster JC, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC. F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell*, 115: 163-175, 2003
 - 19) Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci*, 23: 292-301, 2003
 - 20) Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano H. Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex, and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. *Glia*, 42: 209-224, 2003
 - 21) Abe S, Katagiri T, Saito-Hisaminato A, Usami S, Inoue Y, Tsunoda T, Nakamura Y. Identification of CRYM as a candidate responsible for non-syndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *Am J Hum Genet*, 72: 73-82, 2003
 - 22) Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, Tsunoda T, Okada K, Kakiuchi S, Zembutsu H, Furukawa Y, Kawamura M, Kobayashi K, Imai K, Nakamura Y. 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
 - 23) Ochi K, Daigo Y, Katagiri T, Saito-Hisaminato A, Tsunoda T, Toyama Y, Matsumoto H, Nakamura Y. Expression profiles of two types of human knee-joint cartilage. *J Hum Genet*, 48: 177-182, 2003
 - 24) Okada K, Katagiri T, Tsunoda T, Mizutani Y, Suzuki Y, Kamada M, Fujioka T, Shuin T, Miki T, Nakamura Y. Analysis of gene-expression profiles in testicular seminomas using a genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol*, 23: 1615-1635, 2003
 - 25) Kaneta Y, Kagami Y, Tsunoda T, Ohno R, Nakamura Y, Katagiri T. Genome-wide analysis of gene-expression profiles in chronic myeloid leukemia cells using a cDNA microarray. *Int J Oncol*, 23: 681-691, 2003
 - 26) Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y, Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol*, 22: 551-560, 2003
 - 27) Hiroi S, Tsukamoto Y, Sasaki F, Miki N, Taira E. Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in development and regeneration of chick sciatic nerve. *FEBS Lett*, 554: 311-314, 2003
 - 28) Wada A, Sawada K, Ono N, Ito M. An Improved Synthesis of Benzocycloalkane Derivatives. *Chem Pharm Bull*, 52: 132-135, 2004
 - 29) 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 Use of a Photoreactive Farnesyl Analog. *Biochemistry*, 43: 300-309, 2004
 - 30) Wada A, Takakura Y, Yamazaki K, Takahashi T, Ito M. Synthesis of 8,16-Ethano-retinals and Their Interactions with Apoprotein of Photorhodopsin from