別添1

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

ES細胞由来神経細胞を用いた薬剤の神経毒性評価システムの開発と神経毒性関連遺伝子・タンパク質データーベース構築

平成17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18（2006）年4月

平成17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

ES細胞由来神経細胞を用いた薬剤の神経毒性評価システムの開発と
神経毒性関連遺伝子・タンパク質データーベース構築

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	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　員
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
	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 先進医療部	室　長 部　長
	和田 昭盛	神戸薬科大学　生命有機化学研究室	教　授
	岡野 栄之	慶應義塾大学　医学部生理学教室	教　授
	入江 康至	大阪大学大学院医学系研究科　神経薬理学	助　手
研究協力者	内藤 猛章	神戸薬科大学　薬品化学研究室	教　授

別添２

目　　次

Ⅰ．総括研究報告

ES 細胞由来神経細胞を用いた薬剤の神経毒性評価システムの開発と
神経毒性関連遺伝子・タンパク質データーベース構築 ---------------------------------- 1
国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究部　金村 米博

Ⅱ．分担研究報告

１．正常神経細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データーベース化 ------------------- 5
国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究部　金村 米博

２．数理統計学に基づくマイクロアレイデータからの向精神薬微小応答遺伝子と
関連機能群およびパスウェイの抽出法の開発 ---------------------------------------11
理化学研究所 遺伝子多型研究センター　角田 達彦

３．安全性評価用基準神経系細胞の探索 ---15
国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究部　山崎 麻美

４．デメチルレチノイン酸類の合成と薬理作用 ---21
神戸薬科大学 生命有機化学研究室　和田 昭盛

５．ES 細胞を用いた薬剤安全性評価システムの開発
～ES 細胞からの各種神経細胞分化 --25
慶應義塾大学 医学部生理学教室　岡野 栄之

６．Psychostimulant によるドパミン神経終末毒性発現機構の解析 ------------------29
大阪大学大学院医学系研究科 神経薬理学　入江 康至

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表 ---31

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総括研究報告書

ES細胞由来神経細胞を用いた薬剤の神経毒性評価システムの開発と神経毒性関連遺伝子・タンパク質データーベース構築

主任研究者　金村 米博
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　室員

A. 研究の目的

本研究は、難治性神経疾患に対する有効かつ安全な薬剤開発を効率化する支援技術として、ES細胞を用いた薬剤安全性の高感度評価システムの開発と毒性関連遺伝子・タンパク質データーベースの構築を目指す。

B. 研究方法

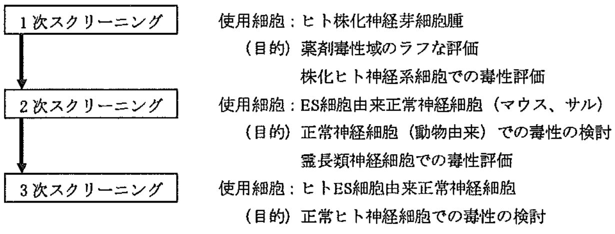
1）安全性評価用基準神経細胞の確立

ES細胞を用いて、各種神経細胞の分化誘導技術の開発、作製された細胞の生物学的特性評価、その安全性試験用培養技術の開発を実施し、安全性評価用基準神経細胞を確立させる。

1. 作製を目指す神経細胞の種類
   ドーパミン作動性、コリン作動性、セロトニン作動性神経細胞を中心に作製技術を開発。
2. 使用するES細胞の種類
   ES細胞のソースとしてはマウス由来ES細胞とサル由来ES細胞を併用した基礎研究を実施し、開発した技術の早期の霊長類細胞への応用を目指す。
3. 評価用細胞としての基準の設定
   作製された神経細胞の生物学的特性を詳細に検討し、評価用細胞としての使用基準（マーカー陽性率、電気生理学的特性、等）を決定し、標準化させる。
4. 毒性評価用標準培地の検討
   霊長類ES細胞から作製した各種神経細胞を薬剤安全性試験に用いるため、毒性試験等を干渉するタンパク質含有率の高い成分（主に血清）を極力排除した、標準培地での安定した霊長類神経細胞の培養技術とその培地開発を実施する。
5. ヒトES細胞を用いた開発
   上記得られた技術のヒトES細胞への応用を目指す。

2）正常神経細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データーベース化

ES細胞由来神経細胞を用いて、各種薬剤の毒性評価を行い、その情報をデーターベース化する。毒性評価は、1. 薬剤種類、2. 投与濃度、3. 投与後時間のそれぞれに分けて検討し、評価法は主に細胞内総ATP計測法で検討する。使用する細胞の違いと取得目的情報の違いから、毒性スクリーニングは以下の3段階で実施する。



得られたデータを相互比較して、各薬剤の毒性に関して、1. ヒト神経細胞での毒性特性、2. 生物種差、3. ヒト正常細胞と腫瘍細胞との毒性の違い、に関する情報を取得し、データベース化する。使用薬剤は、使用頻度が高い薬剤（抗けいれん薬、抗うつ薬、睡眠薬）、長期投与を行う薬剤、神経系への催奇性を有する薬剤、依存性を有する薬剤（覚

せい剤など)を中心に順次検討し、新規リード化合物の解析も加える。

3) 正常神経細胞に対する薬剤毒性に関連する遺伝子・タンパク質発現情報の包括的取得

毒性特性結果をベースに、薬剤毒性に関連する遺伝子・タンパク質発現情報の包括的取得を行う。遺伝子解析は主にマイクロアレーと定量的PCR法にて実施する。タンパク質解析は約10kDa以下の低分子量はプロテインチップで、それより大きなものは2次元電気泳動を用いて実施し、タンパク質の同定にはMS/MS解析を適宜併用する。マウスES細胞由来神経細胞での情報取得を第一に行い、その後、目的に応じてヒトES細胞由来神経細胞での検討を実施する。

4) 薬剤毒性関連遺伝子・タンパク質情報のデーターベース化と、毒性関連遺伝子ネットワークの検討

前項で取得する情報と毒性試験情報をあわせ、各薬剤の神経細胞への毒性と関連する遺伝子・タンパク質情報をデーターベース化する。同時に、毒性に関与する遺伝子ネットワークの抽出を試みる。

C. 今年度の研究成果

1) 安全性評価用基準神経系細胞の探索

山崎は、1次スクリーニングに使用する株化ヒト神経系細胞の特性解析と毒性試験を実施するための培養プロトコール構築を実施した。ヒトSH-SY5Y細胞株は汎神経細胞的性格を有する細胞であると確認し、神経細胞のモデル細胞として活用する事は有効であるが、各種レセプター、神経伝達物質を重複して発現しており、特定の神経細胞のモデル細胞としては不向きであると結論づけた。ヒトNtera2細胞株はヒトES細胞とヒト神経幹細胞の相互に類似の性格を有していることが判明した。4種類のヒト細胞の無血清培養に対する耐性を評価した結果、Jurkat細胞株(ヒト白血病細胞:コントロール細胞)やヒトU251細胞株(グリア系細胞)は無血清状態に強く、無血清培養でも十分に使用可能であることが判明したが、SH-SY5Y、Ntera2の増殖は血清依存性が強く、無血清状態での毒性試験を実施するためには、さらに何らかの因子を補充し、無血清状態がもたらす細胞毒性を考慮した上でのプロトコール作製が必要であることが判明した。

2) 正常神経細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データーベース化

金村は、神経系細胞を用いて各種薬剤の毒性評価を行いその情報をデーターベース化することを目的とし、細胞毒性評価プロトコールの構築と株化ヒト細胞を用いた1次スクリーニングを実施した。2種類のパラメーター(細胞内総ATP量、培養上清中LDH量)を用いた単一ウェルでのマルチアッセイ系を構築した。これを用いて、1次スクリーニングとして抗がん剤(9種類)の株化ヒト細胞(4種類)への毒性、さらに神経系細胞(SH-SY5Y細胞株)における薬剤投与後時間の細胞毒性に及ぼす影響を検討し、1次スクリーニングを開始した。その結果、神経系細胞間で薬剤に対しての感受性が大きく異なることと、薬剤濃度に加え薬剤投与後時間というパラメーターを考慮したスクリーニングが重要であることを検証した。

3) Psychostimulantによるドパミン神経終末毒性発現機構の解析

入江は、メタンフェタミン(METH)のドーパミン終末に対する毒性発現機構の解析を行う目的のため、1次スクリーニングとして株化細胞を用いた薬剤毒性域の評価と毒性発現機構モデルについて検討を行った。U251MG細胞株とマウスDA作動性神経細胞株(CATH.a)に種々の濃度の薬剤を添加し、毒性について検討した。U251MG細胞は、通常使用される濃度のMETHあるいは関連薬物によって生存率の減少を認めなかったが、CATH.a細胞は、METH 0.2mM, DA 2μMでわずかに細胞死を、METH 1mM, DA 4.5μMで半数程度に細胞死をきたした。U251MG細胞は20μMのMETHおよび関連薬剤5種類、CATH.a細胞はMETH 0.2mM, 1mM, DA 2μM, 4.5μMとそれぞれの対照サンプルについて

マイクロアレイ解析を行った。相関解析の結果、半分程度の CATH.a 細胞に細胞死を引き起こす濃度の 4.5mM DA と 1mM METH によって発現誘導あるいは抑制される遺伝子群の間に、有意な相関性は見いだせなかった。また、定量的 PCR 法により、25 種の遺伝子の発現を検討し、数種の METH 細胞死特異的に発現調節される遺伝子を見出した。

4) ES 細胞からの各種神経細胞分化の開発

岡野は、2 次・3 次スクリーニングで使用する ES 細胞由来の神経系細胞を作製するための技術開発を目的とし、マウス 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特異性を制御し、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を誘導する培養法を確立し、誘導した細胞の、*in vitro*、*in vivo* における性質を明らかにした。さらに、ヒト ES 細胞を用いた培養法の開発に着手した。

5) デメチルレチノイン酸類の合成と薬理作用

和田は、毒性試験で使用する各種化合物の合成を目的とし、種々のシクロヘキサノンから誘導したノナフラートまたはトリフラートとスズオレフィンとのカップリング反応を鍵反応として、レチノイン酸のシクロヘキセン環上のメチル基を除去した 9 シス-レチノイン酸類を合成し、HL-60 細胞に対する細胞増殖抑制作用、分化誘導作用、アポトーシス誘導作用、および MG-63 細胞を用いて転写活性を検討した。その結果、シクロヘキセン環上のメチル基の数が少ないほどタンパク質との結合などの転写活性は良いものの、それ以外の作用は反対にメチル基の数が少なくなるにつれて減少することがわかった。

6) 数理統計学に基づくマイクロアレイデータからの向精神薬微小応答遺伝子と関連機能群およびパスウェイの抽出法の開発

角田は、マイクロアレーを用いた遺伝子発現解析の面から、数理統計学的手法を駆使した評価システムの完成を目的とし、ヒトアストロサイトに対しての抗うつ薬の影響をモデル系として使用して、遺伝子発現を機能分類あるいはパスウェイ（遺伝子ネットワーク）という群としての変動を捉えられるシステムを開発し、完成させた。これを用いて実際に抗うつ薬応答遺伝子の群としての変動を捉えることに成功し、次年度以降のさらなるデータベース・評価システムの発展につながる基盤を作った。

D. 考察および次年度の方向性

1) 安全性評価用基準神経細胞の確立

本研究計画では、3 段階スクリーニングシステムの構築を目指すが、その中で今年度は主に 1 次スクリーニングに相当する部分に関して、スクリーニングを実施するための細胞選定、スクリーニングプロトコールの検討を行なったが、マウス由来ドーパミン作動性神経細胞と 4 種類のヒト株化細胞の特性解析を実施し、毒性評価用プロトコールの作製もほぼ終了した。今後、これら細胞を用いた 1 次スクリーニングを本格的に実施する準備はほぼ整ったと思われる。2 次スクリーニングに使用するマウス ES 細胞由来の神経系細胞に関しては、細胞作製プロトコールの検討を開始している。次年度はそれに加え、毒性試験用のプロトコールを構築し、早期に 2 次スクリーニングを開始できる体制を整えたいと考える。3 次スクリーニングに使用するヒト細胞に関しては、一部研究を開始できたが未だ準備段階であると考えられる。次年度、本格的な研究を実施するための技術的・倫理的な準備を行なって行きたいと考える。

2) 正常神経細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データーベース化

株化細胞を用いての 1 次スクリーニングが開始され、一部、毒性関連遺伝子の探索も開始した。今後、マイクロアレー・プロテインチップを用いた毒性関連遺伝子・タンパク質情報の取得を行う際、生物学的にどのような細胞毒性に関連する遺伝子・タンパク質発現情報であるか？ということを評価することが必要であり、今年度得られた情報を基礎に、情報取得に備えたプロトコールの作製を行い、1 次スクリーニングを確立していくと同時に、ターゲットとする遺伝子・タンパク質発

現情報の取得ポイントを検討していきたいと考える。

3) 正常神経細胞に対する薬剤毒性に関連する遺伝子・タンパク質発現情報の包括的取得および薬剤毒性関連遺伝子・タンパク質情報のデーターベース化と、毒性関連遺伝子ネットワークの検討

マイクロアレーを用いた遺伝子発現情報を機能分類あるいはパスウェイ（遺伝子ネットワーク）という群としての変動を捉えられるシステムの開発に成功している。次年度以降、1次・2次スクリーニングで上がってくる解析結果を元に、具体的に複数の薬剤の毒性関連遺伝子のデーターベース構築し、その毒性関連遺伝子ネットワークを同定して行きたいと考える。

E. 健康危険情報

なし

別添4

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

正常神経細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データーベース化

主任研究者　金村 米博
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　室員

研究要旨

神経系細胞を用いて各種薬剤の毒性評価を行い、その情報をデーターベース化することを目指し、細胞毒性評価プロトコールの構築と株化ヒト細胞を用いた1次スクリーニングを実施した。2種類のパラメーター（細胞内総ATP量、培養上清中LDH量）を用いた単一ウェルでのマルチアッセイ系を構築した。これを用いて、1次スクリーニングとして抗がん剤（9種類）の株化ヒト細胞（4種類）への毒性、さらに神経系細胞（SH-SY5Y 細胞株）における薬剤投与後時間の細胞毒性に及ぼす影響を検討した。その結果、同じ神経系細胞でも各薬剤の毒性が大きく異なることが判明した。今後、さらにマイクロアレー・プロテインチップを用いた毒性関連遺伝子・タンパク質情報の取得に備えたプロトコールの構築を実施し、1次スクリーニングを確立していく予定である。

A. 研究目的

神経系細胞を用いて各種薬剤の細胞毒性評価を行い、その情報をデーターベース化することを目指し、細胞毒性評価プロトコールの構築を行い、株化ヒト細胞を用いた1次スクリーニングを実施する。

B. 研究方法

1) 生細胞数評価（細胞内総ATP量計測）と死細胞数評価（乳酸脱水素酵素［LDH］量計測）の同時施行

96穴マイクロプレートの培養ウェルから、細胞培養後の培養上清の一部を別のプレートに回収し、LDH アッセイ試薬（CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega社）を加え、培養上清中のLDH量を蛍光法により測定した。一方、細胞を含むマイクロプレートにはATPアッセイ試薬(CellTiter-Glo Luminescent Cell viability Assay, Primega社）を加え、細胞内総ATP量を発光法により測定し、生細胞数を算定した。

2) 株化ヒト細胞を用いた抗がん剤の細胞毒性評価（1次スクリーニング）

株化ヒト細胞株は、U251MG 細胞株（human glioblastoma由来, ヒューマンサイエンス振興財団より購入)、SH-SY5Y細胞株(human neuroblastom由来, ATCCより購入)、Ntera2 細胞株（human精巣奇形腫由来, ATCC より購入)、Jurkat 細胞株（human Tcell leukemia由来, ATCCより購入)、の4種類を使用した。抗がん剤は、Ara-C（SIGMA社）、Fuluorouracil (5-FU)（SIGMA 社）、Methotrexate（SIGMA 社）、6-Mercaptopurine (6-MP)（SIGMA 社)、Vincristine（SIGMA 社)、Mitomycin C（ナカライテスク社)、Neomicine (G418)（GIBCO 社)、Cisplatin（SIGMA 社)、Etoposide（SIGMA社）の合計9種類を使用した。

96穴マイクロプレートで細胞を1日培養し、翌日（24時間後）9種類の抗がん剤について0μM～100μMの範囲で希釈系列を作製し(n=5で実施)、種々の細胞株に添加した。5% CO_2 存在下37℃で培養し、2日（48時間）後、ATP アッセイ法

（CellTiter-Glo Luminescent Cell viability Assay, Primega 社）により培養中の生細胞数を求め、シグモイドカーブを作成し、各薬剤濃度における種々の細胞株の増殖に与える影響を調べた。またSH-SY5Y 細胞株を用いて、2 薬剤（6-MP、5-FU）投与後 6 時間、24 時間、48 時間の時点での生細胞数と培養上清中の LDH 量を前述の方法を用いて同時測定した。

C. 研究結果

1）生細胞数評価（細胞内総 ATP 量計測）と死細胞数評価（培養上清中 LDH 量計測）の同時施行

96 穴マイクロプレートの単一ウェルから細胞内総 ATP 量と培養上清中 LDH 量を同時に評価することを試みたが、再現性よく実施することが可能であった。SH-SY5Y 細胞株を用いた薬剤投与後時間と生細胞数・死細胞数の評価においては、投与後 6 時間の地点では高濃度の薬剤投与において生細胞数（細胞内総 ATP 量）の軽度の減少が観察されたが、死細胞数（LDH 量計測）の有意な増加は見られなかった。一方、24 時間、48 時間と、投与後時間の経過に伴い、生細胞数の低下と死細胞数の増加が確認でき、また IC50 値の低下が観察された。特に薬剤投与後 48 時間の時点では生細胞数・死細胞数それぞれと投与薬剤の濃度との間に有意な関連性を見出すことができた（図 1、2）

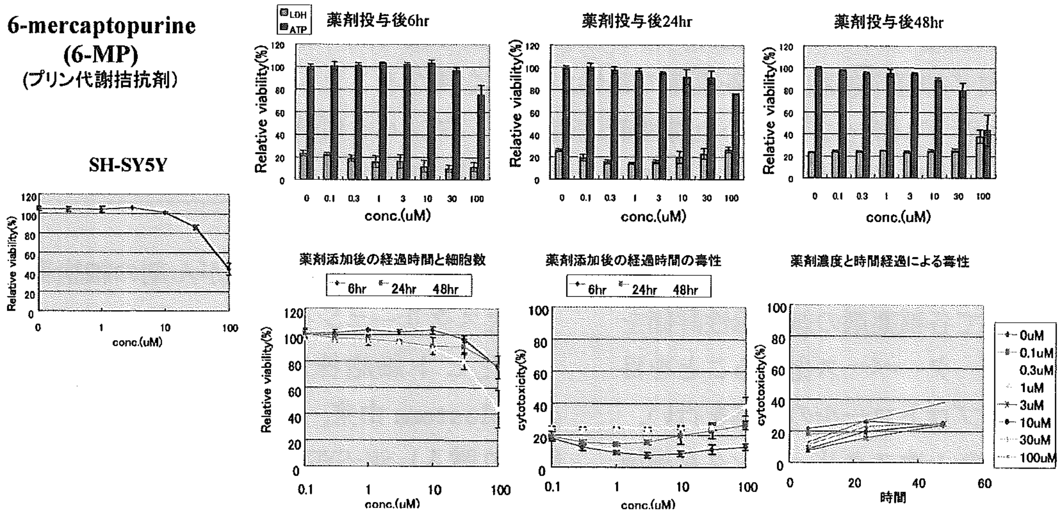


図 1：抗がん剤（6-MP） 投与後時間と細胞毒性の関連

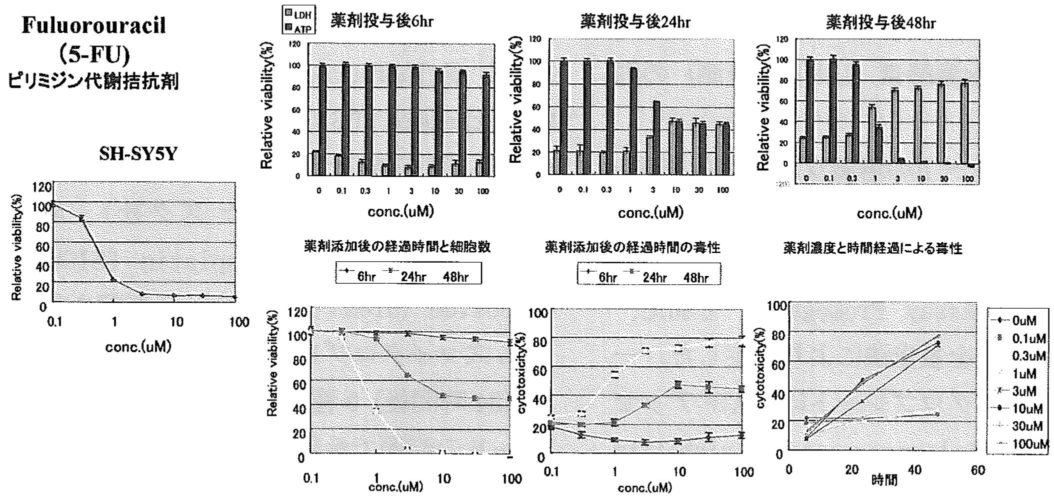


図 2：抗がん剤（5-FU） 投与後時間と細胞毒性の関連

2) 抗がん剤の株化ヒト細胞に対しての細胞毒性

毒性域は各細胞で大きく異なり、IC50 値も異なった。4 種類の中で特にグリア細胞のモデル細胞と考えられる U251MG 細胞株は各薬剤に対して耐性を示す傾向があった。また神経細胞のモデル細胞と考えられる SH-SY5Y 細胞株は未分化幹細胞に近い特性を持つと考えられる Ntera2 細胞株と同様の各薬剤に対しての感受性を持っていた (図 3)。

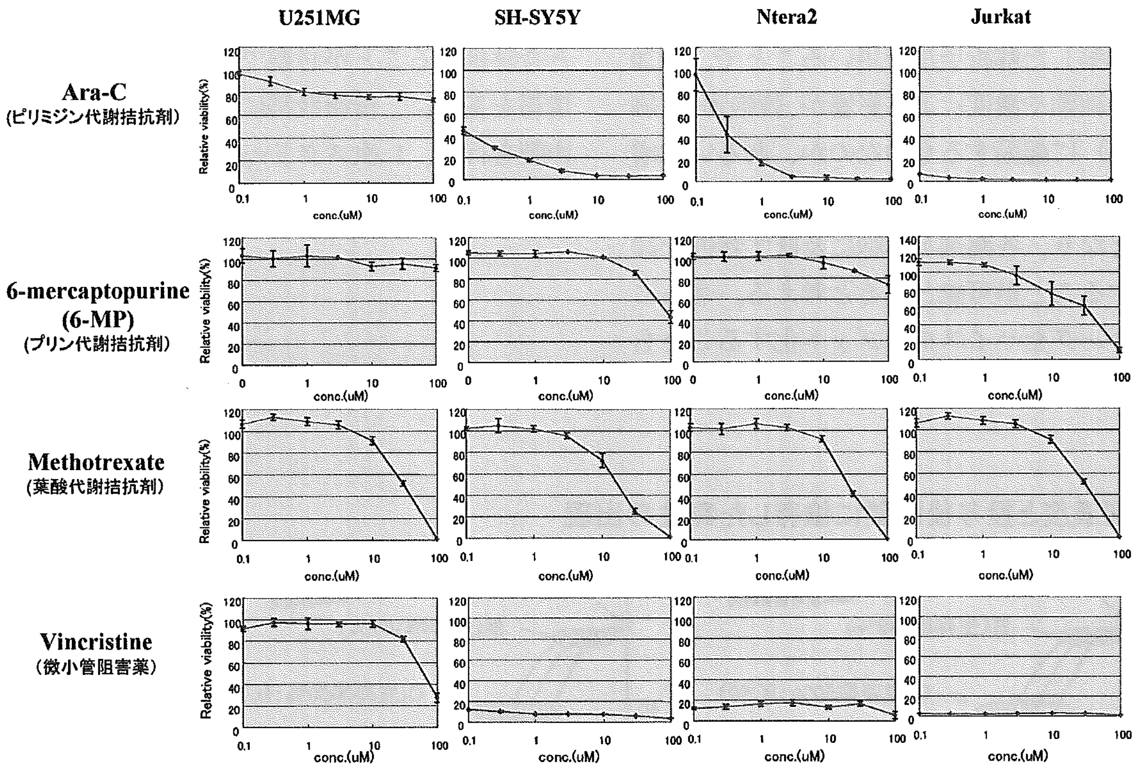


図 3：抗がん剤の株化ヒト細胞に対しての細胞毒性

D. 考察

薬剤の細胞毒性は、1. 投与薬剤の濃度、2. 薬剤投与後の時間、の 2 つのパラメーターの影響を受ける (図 4A)。よって各薬剤の毒性を正確に把握し、薬剤毒性のデーターベースを構築するためには、薬剤毒性の指標となる複数のパラメーターを用いた評価を行うことが効果的であると考えられる。今年度の検討では、同一サンプル (単一ウェル) で生細胞数 (細胞生存率) と死細胞数という 2 つの情報を同時に再現性良く取得できるプロトコールを開発した。単一培養ウェルから、培地中に放出される LDH 量と生存細胞内の総 ATP 量をマルチアッセイにより同時に計測することは、一度に生細胞数と死細胞数の 2 つのパラメーターについての情報を得ることを可能とし、薬剤の毒性特性の評価を向上させるのみならず、解析に必要な時間、細胞サンプル、試薬などの必要性を低減させる方法であるといえ、データーベース作成を目的とした毒性試験としては有用であると考えられた。

細胞死には apoptosis と necrosis の 2 種類が存在するが、実際のアッセイではこれらが混在した状態で細胞死が進行すると予測される。よって薬

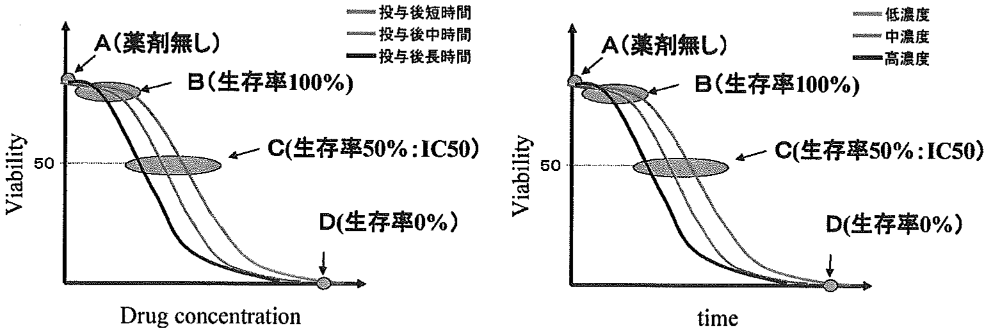
剤がもたらす細胞毒性のメカニズム（apoptosis 誘導？necrosis 誘導？）をより詳細に把握するためには、今回使用した2種類のパラメーター（細胞内総ATP量、培養上清中LDH量）に薬剤投与後時間のパラメーターを加えることが有効である（図4B)。実際、2種類の薬剤の投与後時間の影響を評価したが、投与後時間の違いによって結果は大きく異なることが確認され、今後は薬剤投与後時間の影響を考慮したスクリーニングを行なっていくことが必要であると考えられた。

今年度構築した解析手法を用いることで、添加する薬剤の種類や濃度による影響が、細胞毒性(細胞死の誘発）に起因するものなのか、あるいは増殖速度の低下による（増殖抑制）ものなのかの判別が可能となり、各薬剤が細胞に及ぼす毒性を詳細に理解することが可能となると考える。さらにスクリーニングをハイスループット化することも実現性があると考えられた。

4 種類の細胞を用いた薬剤の投与量と生細胞数との関係を表す示したグラフ（図 3）から、同じ神経系細胞でも毒性傾向が大きく異なることが判明した。これら正常ヒト神経系細胞を用いた解析を実施する際の参考データとして有用な情報を与えるものであると考えられる。

今後、マイクロアレー・プロテインチップを用いた毒性関連遺伝子・タンパク質情報の取得を行う際、生物学的にどのような細胞毒性に関連する遺伝子・タンパク質発現情報であるか？ということを評価することが必要であり、今年度得られた情報を基礎に、情報取得に備えたプロトコールの作製を行い、1 次スクリーニングを確立していく予定である。

A.薬剤濃度と投与後時間に依存した毒性の出現



B. ApoptosisとNecrosisによる細胞死

time	0	30min~4h	24h
LDH	0	+	+++
Caspase	0	+++	++
ATP	+++	++	0

Apoptosis

time	0	30min~4h	24h
LDH	0	+++	++
Caspase	0	0	0
ATP	+++	0	0

Necrosis

図4：薬剤濃度、投与後時間と細胞毒性との関連性

E. 結論

2 種類のパラメーター（細胞内総 ATP 量、培養上清中 LDH 量）を用いたマルチアッセイ系を構築した。これを用いて、1 次スクリーニングとして抗がん剤の株化ヒト細胞への毒性情報の取得を開始した。今後、さらにマイクロアレー・プロテインチップを用いた毒性関連遺伝子・タンパク質情報の取得に備えたプロトコールの構築を実施する予定である。

F. 成果発表

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 6-*O*- and 2-*O*-desulfated derivatives with low anticoagulant activity on proliferation of human neural stem/progenitor cells. *J Biosci Bioeng* 100:54-61, 2005
2) Suzuki T, Izumoto S, Wada K, Fujimoto Y, Maruno M, Yamasaki M, Kanemura Y, Shimazaki T, Okano H, Yoshimine T: Inhibition of glioma cell proliferation by neural stem cell factor. *J Neurooncol* 74:233-239, 2005
3) Kanemura Y, Mori H, Nakagawa A, Islam MO, 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* 14:673-83, 2005

2. プロシーディング

1) Kobayashi S, Kanemura Y, Islam MO, Wada A, Tajria J, Miyake J, Hara M, Yamasaki M, Okano H, Ito M: Effect of all-trans retinoic acid and 13-substituted retinoic acids on human neural stem/progenitor cells' neurogenesis. *Carotenoid Science* 8:77-80, 2005
2) Kanemura Y, Yamazaki T, Kobayashi S, Yamada T, Shofuda T, Mori H, Yamasaki M, Tsunoda T, Miya F, Okano H, Ito M, Waka A, Irie Y, Miki N: Development of gene and protein expression screening-based toxicogenomics system using human primary normal neuronal cells. *J Toxicol Sci* 30:S116, 2005
3) Yamazaki T, Kobayashi S, Mori H, Kanemura Y: High-throughput screening of differentially expressed protein in drug treated cells using SELDI-TOFMS. *J Toxicol Sci* 30:S118, 2005

3. 学会発表

1) 金村米博, 森 英樹, 正札智子, 山本篤世, 山田登美子, 山崎智彦, 角田達彦, 山崎麻美, 岡野栄之: ヒト神経幹細胞/前駆細胞の生物学的特性の検討. 神経組織の成長・再生・移植研究会第 20 回学術集会, 2005 年 5 月; 豊中
2) 山崎智彦, 小林 哲, 森 英樹, 金村米博: SELDI-TOFMS を用いた薬剤応答ユビキタス蛋白質のスクリーニング. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005 年 7 月; 東京
3) 金村米博, 山崎智彦, 小林 哲, 山田登美子, 正札智子, 森 英樹, 山崎麻美, 角田達彦, 宮冬樹, 岡野栄之, 伊藤允好, 和田昭盛, 入江康至, 三木直正: ヒト神経系細胞を用いた包括的遺伝子・蛋白質発現解析を主体としたトキシコゲノミックス手法の開発. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005 年 7 月; 東京
4) 金村米博, 児玉恵理, 山崎智彦, 森 英樹, 正札智子, 山本篤世, 山田登美子, 角田達彦, 宮 冬樹, 山崎麻美, 岡野栄之: ヒト神経幹細胞/前駆細胞の生物学的特性の検討. 第 28 回日本神経科学大会 (Neuroscience2005), 2005 年 7 月; 横浜
5) 森 英樹, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 金村米博: ヒト神経幹細胞の集塊形成による増殖促進メカニズムの解析. 日本生物工学会平成 17 年度

大会，2005 年 11 月；つくば

6）森 英樹，紀ノ岡正博，田谷正仁，金村米博，山崎麻美：ヒト神経幹細胞のニューロスフェア形成が及ぼす増殖促進効果．第 5 回日本再生医療学会総会，2006 年 3 月；岡山

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

数理統計学に基づくマイクロアレイデータからの向精神薬微小応答遺伝子と関連機能群およびパスウェイの抽出法の開発

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

本研究グループ全体においては、ヒト正常神経系細胞を用いた薬剤安全性評価システムの開発を目指しているが、その中で我々の研究室では、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の面から、数理統計学的手法を駆使した評価システムの完成を目指している。本年度においては、機能分類あるいはパスウェイ（遺伝子ネットワーク）という群としての変動を捉えられるシステムを開発し、完成させた。これを用いて実際にうつ薬応答遺伝子の群としての変動を捉えることに成功し、次年度以降のさらなるデータベース・評価システムの発展につながる基盤を作った。

A. 研究目的

近年、網羅的遺伝子発現解析の主要な方法として確立されつつあるマイクロアレイ法は、ある細胞、あるいはある組織における各々の約30,000 種の遺伝子発現変動を一度に捉えることを可能とした。現状では、変動の見られた遺伝子について、その後個々に検証していくというのが標準的な方法となっている。しかしながら、ある条件下における変動を包括的に理解するためには、個々の遺伝子という「点」だけではなく、機能群あるいはパスウェイ（遺伝子ネットワーク）という俯瞰的視点から「群」として応答を捉える必要性があると考えられる。

そこで、本研究での今年度の目的として、遺伝子発現データから変動の見られる機能群およびパスウェイ群を数理統計学的手法により抽出することを可能とするシステムの開発をおこなうことにした。網羅的遺伝子発現解析の対象の一つとして、薬理作用に未だ不明点の多い向精神薬（うつ薬）の応答経路を選択し、変動遺伝子を群として解析することで、その薬剤の作用・副作用の発生機序を捉えることを目指した。

B. 研究方法

実験対象細胞としては、神経細胞との様々なクロストーク、そしてうつ薬との関連性が近年注目されつつあるアストロサイト細胞を用いることにした。本研究ではヒト正常神経幹細胞から分化誘導されたヒト正常アストロサイト細胞を用いることで、ライン化細胞あるいはヒト以外の動物細胞では得られない、実際のヒトにより近い反応を得られることが期待される。

用いる薬剤は代表的な抗うつ薬 10 種（fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine, sertraline, citalopram, zimelidine, imipramine, clomipramine, indatraline, 6-nitroquipazine）とし、細胞への添加濃度はATP assay（細胞生存試験）およびLTP assay（細胞傷害試験）により毒性発生境界域濃度と設定した。

ヒト正常アストロサイト培養細胞に、各種の抗うつ薬を添加し、ある一定時間後（本研究では主に12時間後と24時間後）に細胞を回収、RNA を抽出・精製し、そのサンプルをマイクロアレイ実験に用いることで網羅的な遺伝子発現

データを収集した。

一方で、マイクロアレイ上の各遺伝子について、NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) を始めとする各種データベースからアノテーション情報を収集した上で、各遺伝子が属するパスウェイ情報および機能分類情報を KEGG データベース (http://www.genome.ad.jp) および GeneOntology データベース (http://www.geneontology.org)から収集し、マイクロアレイ上の遺伝子に注釈付けをおこなった。

その得られた遺伝子発現情報と分類アノテーション情報を元に、Kolmogorov-Smirnov running statistics および Permutation test を組み合わせることで、各種薬剤添加時に統計学的に有意に共通して変動が見られるパスウェイおよび機能分類群を同定するプログラムを作成し、解析をおこなった（図 1)。

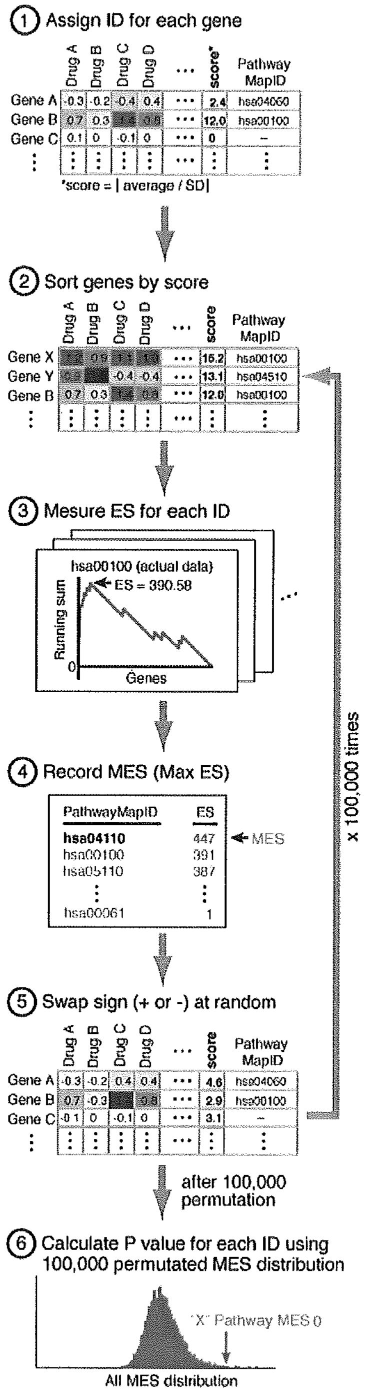


図 1：パスウェイおよび機能分類群同定方法の概略図

C. 研究結果

ATP assay および LDH assay から、各種薬剤共に、濃度を振ることで一定の濃度から急激に毒性が現れることが明らかとなった（図 2)。

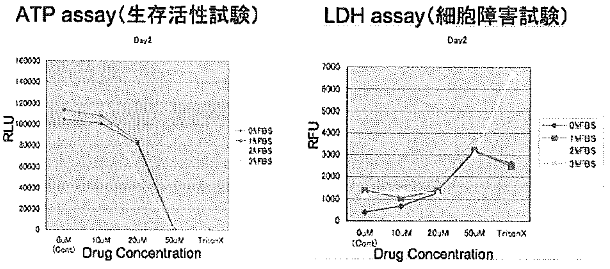


図 2：各種薬剤濃度における ATP assay および LDH assay の結果の一例

この毒性域濃度は薬剤種・細胞種・血清濃度などの種々の条件により大きく異なり、実験前に実験目的に合わせて薬剤濃度条件を正確に設定することが重要であると考えられる。

抗うつ薬 10 種、2 タイムポイント（薬剤添加 12 時間後および 24 時間後）において、統計学的に変動がみられた遺伝子数の平均は、12 時間後で 94 遺伝子、24 時間後で 141 遺伝子（それぞれ 30000 遺伝子中）と極めて数が少なかった。しかしながら、10 種薬剤、2 タイムポイントという 20 種の条件における各遺伝子変動の平均が大きい上位 100 遺伝子を見ると、薬剤間を通して同調して変動している遺伝子が少なからずあることが確認された（図 3)。

この異なる薬剤(抗うつ薬という点では同一)間で同調して変動する遺伝子に、機能分類あるいはパスウェイから見て群としての変動があるか、今回作製した Kolmogorov-Smirnov 検定を用いた解析プログラムにて検定したところ、統計学的に有意な群がいくつか見つかった。そのうちの一つのパスウェイについて TaqMan Real-Time RT-PCR にて確認実験をしたところ、マイクロアレイ実験との一致が確認され、確かにそのパスウェイ全体が変動していることが確かめられた（図 4、なおこのパスウェイの P 値は $P = 0.00005$ であった)。

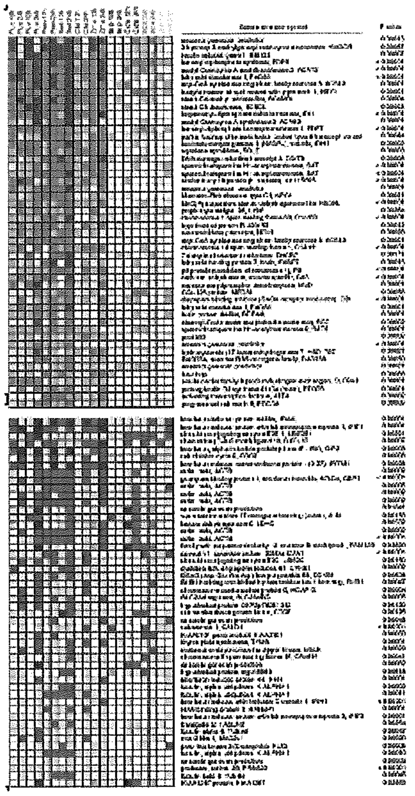


図 3：10 種薬剤、2 タイムポイントでの遺伝子変動の平均が大きかった上位 100 種の遺伝子の発現変動。赤色に近いほど薬剤により発現量が増加したことを、緑色に近いほど減少したことを示す。縦軸に薬剤種と採取時間、横軸に各遺伝子を示している。

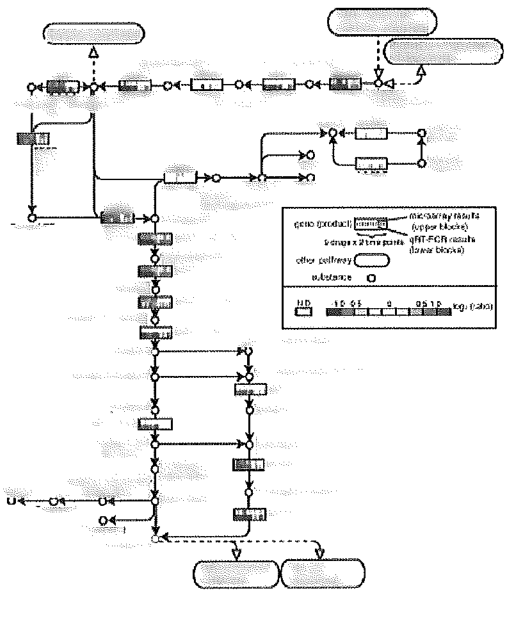


図 4：パスウェイ解析プログラムで統計学的に有意に変動が見られると判定されたあるパスウェイに属する遺伝子群の遺伝子発現変化を示す。色が付けられたそれぞれの長方形が各遺伝子を示し、上半分がマイクロアレイの結果を、下半分が TaqMan RT-PCR の結果を示し、それぞれ薬剤種の実験条件ごとに 20 分割されて色付けされている。発現量の色付け基準は図 3 と同じ。

D. 考察

抗うつ薬は未だに正確な作用機序が不明であり、また薬剤種により作用が現れる人とそうでない人がいたりすること、また臨床的な治療効果が現れるまで薬剤投与から最低 2 週間程度かかることなど、未解明な点が非常に多く残る。本研究で用いたアストロサイト細胞は神経細胞の周囲を囲む、脳内で最も存在量の多い細胞であるにもかかわらず長い間神経細胞のみが注目され、アストロサイト細胞のうつ薬に関わる機構に関しては全く知られていないのが現状であった。本研究結果から、少なくともアストロサイト細胞も抗うつ薬に応答していること、そしてそこには各種薬剤間で共通する機序が存在することが確かめられた。またその反応がある特定のパスウェイ・機能群に起こっていることを俯瞰的に捉えることに成功した。詳細なアストロサイトが関与する作用機序に関してはタンパク質の面からの機能解析を今後おこなっていく必要はあるが、新たな薬剤の作用機序の解明、および新薬開発のターゲット候補となる可能性があると考えられる。

本年度の研究により、各種マイクロアレイ実験データを元に、共通して変動する機能群あるいはパスウェイ群を抽出することが可能となった。今後はこれを、さらなる追加薬剤、他疾患等に広げていき、統合的なデータベースを構築していくことが課題となる。そのデータベースを作ることにより、薬剤等の作用・副作用機序の解明、そして安全性評価システムの構築が可能となるであろう。

本研究で示すように、日々膨大な知見が集約する各種データベース情報を元に解析をおこなうことは極めて有力な手法である。しかしながら、現状でも数万種に及ぶ機能分類情報等を解析する場合、32 個の CPU を並列にしたコンピュータ上で計算をおこなって数日を要している。この公共データベースと我々の実験情報に基づくデータベース双方のさらなる情報量の増加により計算量はさらに指数関数的に増加していく

と容易に予想される。これに対応するために、さらなるシステムの増強とプログラムの最適化も今後の課題の一つと考えられる。

E. 結論

マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析結果から機能分類あるいはパスウェイとして統計学的に有意に変動している群を探索するシステムを構築した。また、実際に抗うつ薬 10 種においてヒト正常アストロサイト細胞内で共通して変動している群を同定することにも成功し、システムの正確性を実証した。次年度以降はさらなる実験データベースの蓄積、プログラムの最適化による高速化、各種薬剤の作用・副作用予測および安全性評価システムの構築が課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yokota T, Kouno J, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, Matsumoto K, Sugisaki Y, Onda M, Tsunoda T: Identification of histological markers for malignant glioma by genome-wide expression analysis: dynein, alpha-PIX and sorcin. *Acta Neuropathol* 111:29-38, 2006

2. 学会発表

1) 宮 冬樹: AceGene Oligo chip を使用した遺伝子発現プロファイル解析について. DNA チップ研究所最新技術紹介シリーズ, 2006年1月（招待講演）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

安全性評価用基準神経系細胞の探索

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 政策医療基盤技術開発研究室　室長

研究要旨

正常神経系細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データーベース化を構築をめざして実施する3段階のスクリーニングに使用する細胞の選定と其の特性解析を目的とし、今年度は一次スクリーニングに使用する株化ヒト神経系細胞の特性解析と毒性試験を実施するための培養プロトコール構築を実施した。SH-SY5Y は汎神経細胞的性格を有する細胞であると確認し、神経細胞のモデル細胞として活用する事は有効であると考えられた。しかし、各種レセプター、神経伝達物質を重複して発現しており、特定の神経細胞のモデル細胞としては不向きであると考えられた。Ntera2 はヒト ES 細胞とヒト神経幹細胞の相互に類似の性格を有していることが判明した。4 種類のヒト細胞の無血清培養に対する耐性を評価した結果、Jurkat、U251 は無血清状態に強く、無血清培養でも十分に使用可能であることが判明した。一方、SH-SY5Y、Ntera2 の増殖は血清依存性が強く、これらの細胞の培養には、最低限、N2 supplement のような添加因子の補充が必須であることが判明した。しかしそれのみでも不十分で、無血清状態での毒性試験を実施するためには、さらに何らかの因子を補充し、無血清状態がもたらす細胞毒性をなくす必要があると考えられた。今後、これら細胞との特性を考慮して、適切な1次スクリーニングを実施していく予定である。

A. 研究目的

正常神経系細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データーベース化の構築をめざして実施する3段階のスクリーニングに使用する細胞の選定と其の特性解析を目的とし、今年度は一次スクリーニングに使用する株化ヒト神経系細胞の特性解析と毒性試験を実施するための培養プロトコール構築を実施した。

B. 研究方法

1）細胞特性の評価

株化ヒト神経系細胞としては、汎用されている SH-SY5Y 細胞株（human neuroblastom 由来，ATCC より購入）を選択し、また神経系前駆細胞のモデル細胞としては、Ntera2 細胞株（human 精巣奇形腫由来，ATCC より購入）を選択し解析を実施した。表1に挙げる種々のマーカータンパク質に対する抗体を用いて蛍光免疫細胞染色を行った。各細胞は、4%パラホルムアルデヒド/PBS で 4℃にて 30 分固定した後、ブロッキングを行い、一次抗体を 4℃にて一晩反応させた。反応終了後、洗いの操作を行い、二次抗体反応を室温にて1時間行った。二次抗体反応後、同様の洗いを行った後封入し、共焦点レーザー顕微鏡（LSM50, Carl Zeiss 社）を用いて観察した。

2）無血清培養における耐性評価

前述の SH-SY5Y 細胞株、Ntera2 細胞株に加え、グリア系モデル細胞として U251 細胞株（human glioblastoma 由来，ヒューマンサイエンス振興財団より購入）、非神経系コントロール細胞として Jurkat 細胞（human Tcell leukemia 由来，ATCC より購入）の合計4種類のヒト株化細胞を用いて

比較検討を実施した。

96穴マイクロプレートで細胞を1日培養し、翌日（24時間後）0～10%の範囲でウシ胎児血清（FBS）の希釈系列を作製し（n=5で実施）、各細胞株に添加した。FBS濃度が0%の時は、血清代替因子（N2 supplement, Invitrogen社）を加えた場合と加えない場合の両方の条件を作成した。5% CO_2存在下37℃で培養し、2日（48時間）後、上清の一部を別のプレートに回収し、LDHアッセイ試薬（CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega社）を加え、培養上清中のLDHを蛍光法により測定し、死細胞数の評価を行った。一方、細胞を含むマイクロプレートにはATPアッセイ試薬（CellTiter-Glo Luminescent Cell viability Assay, Promega社）を加え、細胞内総ATPを化学発光法により測定し、生細胞数を測定した。

表1：細胞特性解析に使用した抗体

抗原名	抗体種	希釈率	入手先
Nestin	Rabbit polyclonal	1:200	Nakamura et al. Lab Invest 83, 479, 2003
βⅢtubulin	Mouse IgG monoclonal	1:500	Babco, MMS-435P
PSA-NCAM	Mouse IgM monoclonal	1:500	順天堂大学　石先生より分与
Neurofilament (200KDa)	Mouse IgG monoclonal	1:100	CHEMICON, MAB5262
L1CAM	Mouse IgG monoclonal	1:250	BD Pharmingen, 554273
GABA	Rabbit polyclonal	1:200	SIGMA, A2052
ChAT	Rabbit polyclonal	1:200	CHEMICON, AAB144P
TH	Rabbit polyclonal	1:100	CHEMICON, AB-152
TrkA	Rabbit polyclonal	1:200	SantaCruz, sc-118
TrkB	Rabbit polyclonal	1:200	SantaCruz, sc-8316
TrkC	Rabbit polyclonal	1:200	SantaCruz, sc-117
Oct-4	Mouse IgG monoclonal	1:50	CHEMICON, MAB4305
SSEA-1	Mouse IgM monoclonal	1:50	CHEMICON, MAB4301
SSEA-4	Mouse IgG monoclonal	1:50	CHEMICON, MAB4304
TRA-1-60	Mouse IgM monoclonal	1:50	CHEMICON, MAB4360
TRA-1-81	Mouse IgM monoclonal	1:50	CHEMICON, MAB4381
TRA-2-49	Mouse IgG monoclonal	1:50	CHEMICON, MAB4349
TRA-2-54	Mouse IgG monoclonal	1:50	CHEMICON, MAB4354

C. 研究結果

1) SH-SY5Y細胞株

蛍光免疫細胞染色の結果、SH-SY5Y細胞株は分化神経細胞で発現が見られるneurofilament（200kDa）、βⅢtubulinを細胞体に発現し、細胞表面にはPSA-NCAM、L1CAMを発現していることが確認できた（図1）。また、神経成長因子のレセプター（TrkA, TrkB, TrkC）の発現も確認された。神経伝達物質としては、GABA、ChAT、THのいずれの発現も見られた（図2）。

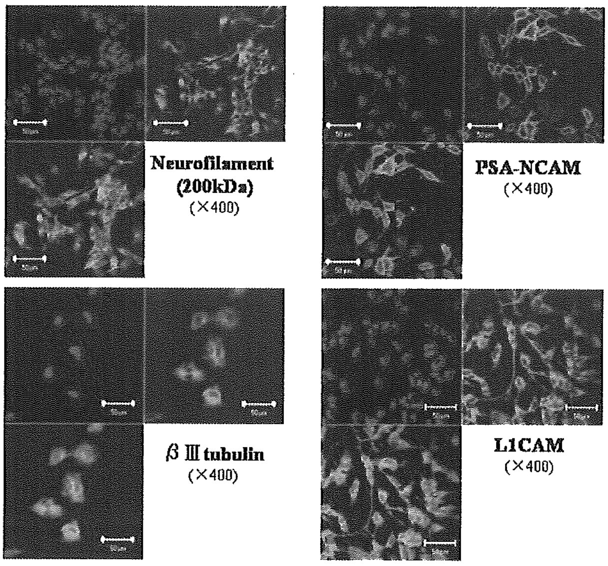


図1：SH-SY5Yにおける神経系マーカー分子の発現様式（緑）の検討
青：核染色

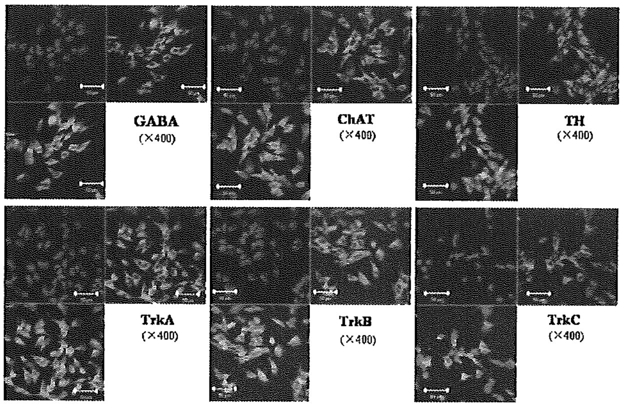


図2：SH-SY5Yにおける神経系マーカー分子の発現様式（緑）の検討
青：核染色

2) Ntera2細胞株

未分化幹細胞のマーカー分子であるSSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54が細胞表面に発現し、Oct-4の発現が確認された。SSEA-1、TRA-2-49の発現は見られなかった（図3）。神経幹細胞の選択的マーカーであるnestinを強く発現していたがvimentinの発現は見られなかった、神経細胞のマーカーであるL1CAM、βⅢtubulin、グリア細胞のマーカーであるGFAPのいずれの発現も見られた。神経成長因子のレセプターはTrkAの発現は見られたがTrkB, TrkCの発現は僅かであった（図4）。

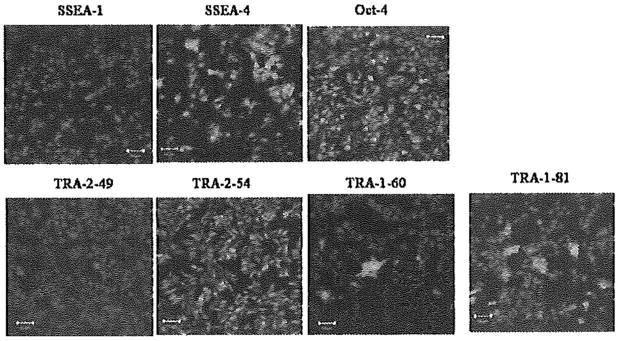


図 3：Ntera2 における幹細胞マーカー分子の発現様式（緑）の検討
青：核染色

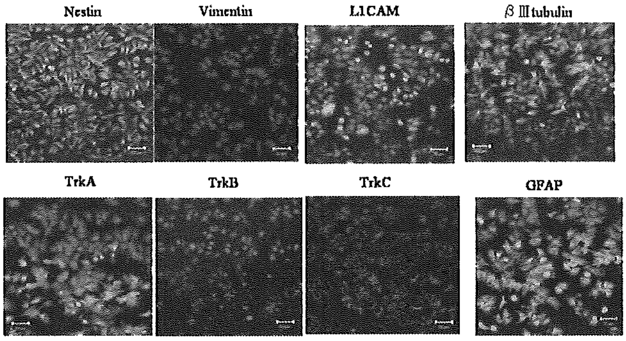


図 4：Ntera2 における神経系マーカー分子の発現様式（緑）の検討
青：核染色

3）無血清培養における耐性

4 種類の細胞のいずれも血清濃度の上昇に応じて生細胞数の増加が見られ、血清濃度依存性の増殖特性をしめした。Jurkat は無血清状態でも培養上清中 LDH 量は血清含培地の場合と大きな差は無かった。U251 は無血清培地では生細胞数は約 50%に低下したが、Jurkat と同様に培養上清中 LDH 量は血清含培地の場合と比較して大幅な上昇は無かった。一方、SH-SY5Y は完全無血清状態では殆ど生細胞が存在せず、培養上清中 LDH 量は有意に上昇した。N2 supplement を添加した培地では生細胞数の回復が見られたが、培養上清中 LDH 量は血清含培地の場合より大きい傾向があった。Ntera2 では、SH-SY5Y 同様、完全無血清状態では殆ど生細胞が存在せず、培養上清中 LDH 量は有意に上昇した。N2 supplement を添加した培養では生細胞数の回復が見られたが、培養上清中 LDH 量は有意に高く、この傾向は低血清濃度域（1%以下）でも確認された（図 5）。

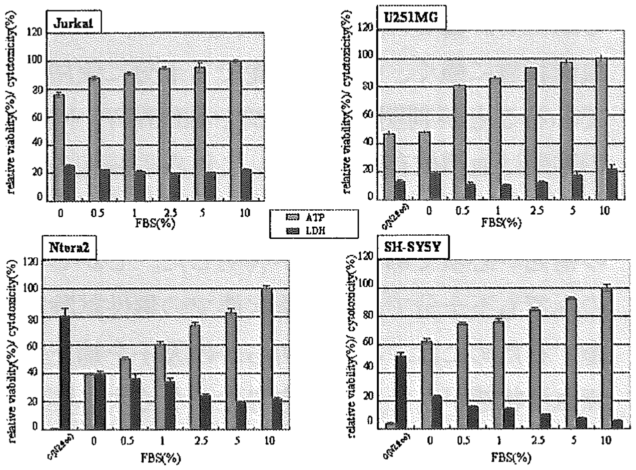


図 5：無血清培養における耐性評価

D. 考察

正常ヒト神経系細胞は、ヒト ES 細胞から作製するとしても大量に作製する事は技術的にも倫理的にも困難であると予測され、全ての毒性評価試験をヒト ES 細胞から作製した正常ヒト神経系細胞のみで実施する事は極めて困難であると予測される。よってヒト ES 細胞から作製した正常ヒト神経系細胞を用いたスクリーニングを有効的に活用するためにも、其の前段階のスクリーニング系を効果的に構築することが重要である。其の目的のため、今年度は 2 種類のヒト神経系細胞の特性解析を実施した。SH-SY5Y は汎神経細胞的性格を有する細胞であると確認し、神経細胞のモデル細胞として活用する事は有効であると考えられた。しかし、各種レセプター、神経伝達物質を重複して発現しており、特定の神経細胞のモデル細胞としては不向きであると考えられる。一方、Ntera2 はヒト ES 細胞とヒト神経幹細胞の相互に類似の性格を有していることが判明した。これら細胞を、各種正常細胞のモデル細胞として適切にスクリーニング系に取りいれていくことを今後実施していく。

毒性試験を実施する際の問題点の一つが試験中の培地に含まれる高蛋白成分（特に血清）のよる薬剤濃度の緩衝作用である。薬剤のタンパク質への結合能は薬剤ごとに異なっており、其の影響を最低限にして多薬剤間の毒性を相互に比較するた