

めには、理想的には無血清状態での培養が望まれる。そこで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。その結果、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、これら細胞を用いて適切な1次スクリーニングを構築していく予定である。

今回の成果を元に、株化ヒト細胞を用いた毒性試験を実施するためのプロトコール作製の手順を標準化した(図6)。今後、新たな細胞を加える際は、この流れに沿って細胞特性解析を実施した上で、細胞を毒性試験に使用する予定である。

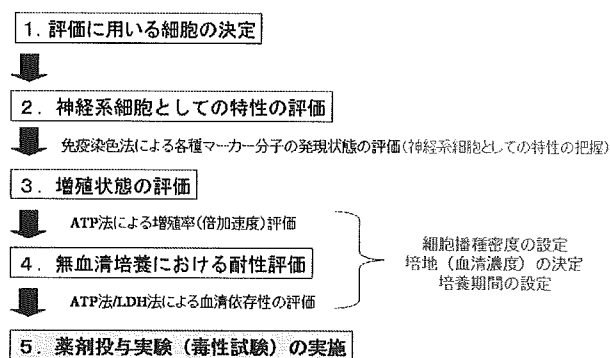


図6: スクリーニング用細胞の特性解析と毒性試験プロトコールの構築手順

## E. 結論

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。1次スクリーニングシステムの構築に必要な情報収集をほぼ終え、今後はこれら情報を元に、具体的な1次スクリーニングシステムを稼働させる予定である。

## 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. 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) 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
- 3) 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
- 4) 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

## デメチルレチノイン酸類の合成と薬理作用

分担研究者 和田 昭盛

神戸薬科大学 生命有機化学研究室 教授

### 研究要旨

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。

### A. 研究目的

神経系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。

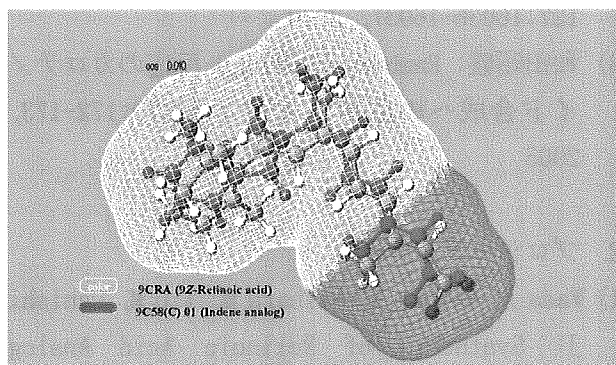
### B. 研究方法

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

#### 1) レチノイン酸アナログの合成

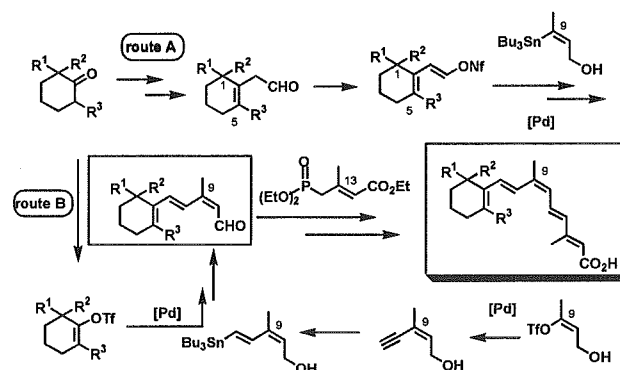
レチノイン酸のシクロヘキセン環と続く二重結合をインデン骨格にかえたアナログ化合物は、タンパク質との結合能が強いものの生理活性はほとんどみられなかった。そこでタンパク質とのドック



キング実験を行いレチノイン酸との重なり具合を検討したところ、リガンドの疎水性部分とタンパ

ク質アミノ酸残基との相互作用が影響していることが予想された。

そこで、シクロヘキセン環上のメチル基の置換様式の異なる9シス-レチノイン酸アナログ(デメチル体)を合成しその薬理活性を測定することにした。



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の反応は、スムーズに進行しカップリング体を収率よく与えた。生成したアルコール体をアルデヒドへ変換し、エモンズ-ホーナー反応で側鎖を延長後、アルカリ加水分解によりデメチルレチノイン酸類を得ることができた。

#### 2) レチノイン酸アナログの生物活性

生物活性は、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 RARE ならびに RXRE の転写活性と RXR  $\alpha$  に対する結合能を検討した。

生物活性は、メチル基が一個なくなると 9CRA の 2 割程度に減少し、なくなるメチル基の数が多くなるにつれて活性が大きく低下することが判明した。

表 1 9 シス-デメチルレチノイン酸類の生物活性

誘導体	デメチルの位置	細胞増殖抑制作用	分化誘導作用	アポトーシス誘導
9CRA		100	100	100
9C200	5 位	19	17	6
9C300	1 位	11	17	6
9C400	5 位と 1 位	1	2	1
9C500	1 位 2 個	2	1	1
9C600	5 位と 1 位 2 個	1	1	<1

表 2 9 シス-デメチルレチノイン酸類の転写活性

誘導体	デメチルの位置	RARE	RXRE	RXR $\alpha$
9CRA		100	100	100
9C200	5 位	135	1188	282
9C300	1 位	40	173	92
9C400	5 位と 1 位	7	404	500
9C500	1 位 2 個	6	158	380
9C600	5 位と 1 位 2 個	3	487	846

転写活性では、RARE に対しては 5 デメチル体 (9C200) を除いて 9CRA より弱い活性を示した。一方 RXRE では全てのアナログが 9CRA より強い活性を示し、デメチルの位置が活性に大きく影響を与えているように思われる。RXR  $\alpha$  に対する結合は、メチル基の数が少ないほど強くなりシクロヘキセン環にメチル基の無い 9C600 が最も大きな活性を示した。

## D. 考察

シクロヘキセン環上のメチル基の数が少ないほど立体障害が小さくなるため、タンパク質との結合能が良くなることが判明した。しかし、この結合能が生理活性の強さにはあまり反映されていないと思われる。

## E. 結論

リガンド分子のタンパク質との結合能がよければ生理活性が高いといえないことから、生理活性発現には、リガンド分子とタンパク質アミノ酸残基との相互作用が重要と思われる。これらの相互作用がヘテロ二量体の形成やコアクチベーターなどとの相互作用にも影響を与えているものと思われる。

## F. 研究発表

- 論文発表
  - Wada A, Ieki Y, Nakamura S, Ito M: Palladium-Catalyzed Coupling Reaction of an Enol Nonaflate with (Vinyl)tributylstannanes and Acetylenes: A Highly Stereoselective Synthesis of 8,18-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Labeled Retinal. *Synthesis* 10:1581-1588, 2005
  - Sudo U, Furutana Y, Wada A, Ito M, Kamo N, Kandori H: Steric Constraint in the Primary Photoproduct of an Archaeal Rhodopsin from Regiospecific Petrurbation of Circular Dichroism Stretching Vibration of the Retinyl Chromophore. *J Am Chem Soc* 127:16036-16037, 2000
  - 和田昭盛: Ramberg-Bäcklund 反応のカロテノイド合成への応用. *ビタミン* 79:172-173, 2005
- プロシーディング
  - Wada A, Miyake H, Niihara M, Ito M, Uenishi J: Synthesis of Retinoic Acid Analog Containing Heteroaromatic Ring. *Carotenoid Science* 8:22-23, 2005

2) 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

### 3. 学会報告

- 1) 和田昭盛, 新免正基, 伊藤允好: トリフラー  
ト類のパラジウム触媒によるカップリング反  
応. 日本薬学会第 125 年会, 2005 年 3 月; 東  
京
- 2) 和田昭盛, 奥山顕義, 伊藤允好: 重水素化し  
た (2E)-4-ヒドロキシ-2-ノネナールの合成研  
究-2-. 日本薬学会第 125 年会, 2005 年 3 月; 東  
京
- 3) 和田昭盛, 王 飛, 伊藤允好: デメチルゲラニ  
ルゲラノイン酸類の合成研究. 日本薬学会第  
125 年会, 2005 年 3 月; 東京
- 4) 和田昭盛, 新原美樹, 三宅ひろみ, 水口ゆか  
り, 中川公恵, 岡野登志夫, 伊藤允好: 芳香  
環を有するレチノイン酸アナログの合成と生  
物活性. 日本ビタミン学会第 57 回大会, 2005  
年 5 月; 志摩
- 5) 和田昭盛, 大村友泰, 辻田有紀, 伊藤允好,  
上西潤一: ジヒドロおよびテトラヒドロレチ  
ノイン酸類の合成. 第 19 回カロテノイド研究  
談話会, 2005 年 9 月; 東京
- 6) 和田昭盛, 王 飛, 伊藤允好: 11Z-3,4-デヒド  
ロレチナールの立体選択的合成研究. 第 31 回  
反応と合成の進歩シンポジウム, 2005 年 11  
月; 神戸
- 7) 和田昭盛, 松浦直美, 伊藤允好, 水口ゆかり,  
中川公恵, 岡野登志夫: 9Z-デメチルレチノイ  
ン酸類の生物活性について. 日本レチノイド  
研究会第 16 回学術集会, 2005 年 11 月; 東京
- 8) 和田昭盛, 三宅ひろみ, 新原美樹, 伊藤允好,  
水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫: 複素環  
を有するレチノイン酸アナログの合成と構造  
活性相関. 第 24 回メディシナルケミストリー

シンポジウム, 2005 年 11 月; 大阪

- 9) 古谷祐詞, 須藤雄気, 和田昭盛, 伊藤允好,  
加茂直樹, 神取秀樹: 重水素化レチナールを  
用いて帰属したファラオニスフォボロドプシ  
ンの初期異性化産物の水素面外変角振動. 日  
本生物物理学会第 43 回学術集会, 2005 年 11  
月; 札幌

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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

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ている。

### 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し、誘導した細胞の *in vitro*、*in vivo* における性質を明らかにする。また、ヒト ES 細胞から様々な機能を持った各種ニューロンの誘導法の開発を行う。

### 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 BMP シグナルを阻害する Noggin、または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 Noggin 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。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、Noggin 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を確立する。次に、誘導した細胞の性質を、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。

さらに、京都大学より分与を受けたヒト ES 細胞（KhES1-3）を用いて、様々な機能を持つ各種ヒト

ニューロンの誘導法の開発を行う。

#### (倫理面への配慮)

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。また、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、また平成 17 年 7 月 19 日に使用細胞株、研究者の追加についても承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。

### 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、Noggin 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、Noggin を用いると前方の、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が明らかにしてきた (Okada et al., *Dev Biol* 2004)。そこで比較的高濃度の Noggin または低濃度の 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を形成させたところ、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、一方で継代した二次、三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。また、ニューロスフェア形成時に腹側化因子である Shh を加えると、Noggin または低濃度 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)、または後脳、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。さらに、背側化因子である Wnt3a や BMP4 をニューロスフェア形成時に添加すると、背側の神経系前駆細胞が誘導され、神経堤細胞由来の細胞である、Peripherin 陽性の末梢神経細胞および SMA 陽性の平滑筋細胞が誘導されたことから、これらの分泌因子をニューロスフェア形成時に加えることで、背腹軸も制御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* の優れたモデルを構築できたと考えられた。

また *in vivo* における分化能を検討するため、EGFP で標識した ES 細胞由来のニューロスフェア (低濃度 RA を用いて誘導したもの) を、野生型ラット、または発症前の ALS ラット (mhSOD1 (G93A) 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 細胞由来の前駆細胞が *in vivo* で機能的な運動ニューロンに分化できる可能性が示唆された。

また、現在、京都大学より分与されたヒト ES 細胞 (KhES1, 2, 3) を用いて、神経系細胞の誘導システムの開発に着手している。現在のところ、少数ではあるが、HB9 陽性、Isl-1 陽性の運動ニューロンの誘導が観察されている。

## D. 考察

マウス ES 細胞から Noggin 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、さらに、*in vivo* においても、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得ることから、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を誘導できる培養法を確立できたと考えられた。今後は、ヒト ES 細胞を用いてさまざまなニューロンを誘導する培養系を構築していく予定である。

## E. 結論

マウス ES 細胞から神経幹細胞を誘導し、その時間的、空間的特異性を制御する培養法を確立した。特に、前脳型コリン作動性ニューロンと運動ニューロンの誘導法を確立した。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、毒性評価システムとして応用できる、有力な *in vitro* モデル系となり得ることが示唆された。

## F. 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

- 3) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H: Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83:119-133, 2006

### 2. 学会発表

- 1) 岡田洋平, 松本有史, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之: ES 細胞由来神経系前駆細胞の時間的・空間的特異性制御: マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導. 幹細胞シンポジウム, 2005 年 4 月; 淡路島
- 2) 岡田洋平, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之: ES 細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異性制御機構の解析. 第 46 回日本神経学会総会, 2005 年 5 月; 鹿児島
- 3) 松本有史, 岡田洋平, 中村雅也, 糸山泰人, 岡野栄之: ALS モデルラットに対するマウス ES 細胞由来神経系前駆細胞移植の試み. 第 46 回日本神経学会総会, 2005 年 5 月; 鹿児島
- 4) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: Regeneration of Motor Neurons with embryonic stem cells. 第 28 回日本神経科学大会, 2005 年 7 月; 横浜
- 5) 松本有史, 岡田洋平, 中村雅也, 糸山泰人, 岡野栄之: ALS モデルラットに対する ES 細胞由来神経系前駆細胞移植. 第 28 回日本神経科学大会, 2005 年 7 月; 横浜
- 6) 岡田洋平, 松本有史, 石井聖二, 島崎琢也, 岡野栄之: ES 細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異性制御. 「科学技術振興事業団 (JST) 戦略的基礎研究推進事業 (CREST) 研究領域」 「生物の発生・分化・再生」 第 4 回公開シ



ンポジウム, 2005年10月; 東京

- 7) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: Regulation of spatio-temporal identities in ES cell-derived neural stem/progenitor cells. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, November 2005; Washington DC
- 8) 岡田洋平, 松本有史, 石井聖二, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之: ES 細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異性制御. 第28回日本分子生物学会, 2005年12月; 福岡

#### G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得 (申請中)
  - 1) 発明の名称: 胚性幹細胞からの神経幹細胞、運動ニューロンおよびGABA作動性ニューロンの製造法  
発明者: 岡野栄之, 島崎琢也  
特許第3660601号  
申請日: 2001. 3. 30 (2005. 3. 25 登録)  
PCT出願: PCT/JP01/08703
  - 2) 発明の名称: 記憶障害治療剤  
発明者: 岡野栄之, 島崎琢也, 長尾省吾, 松本義人  
出願番号: 特願2002-002433  
申請日: 2002. 1. 11  
PCT出願: 無し
  - 3) 発明の名称: 記憶障害治療剤スクリーニング法  
発明者: 岡野栄之, 島崎琢也, 長尾省吾, 松本義人  
出願番号: 特願2003-6298  
申請日: 2003. 1. 14  
PCT出願: 無し
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## Psychostimulant によるドーパミン神経終末毒性発現機構の解析

分担研究者 入江 康至

大阪大学大学院医学系研究科 神経薬理学 助手

### 研究要旨

メタンフェタミン（以下 METH と表記）は、薬理的には脳のドーパミン（以下 DA と表記）終末に作用点を持ち、DA 終末に対する毒性と、行動変化の間に相関関係があることが知られている。本研究では、METH などの依存性薬物および関連薬剤の、DA 終末に対する毒性発現機構について、DNA チップ、プロテインチップを利用して網羅的な解析を行う。

第一段階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。ヒトアストロサイト系株化細胞（U251MG）、マウス DA 作動性神経細胞（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 2 $\mu$ M でわずかに細胞死を、METH 1mM、DA 4.5 $\mu$ M で半数程度に細胞死をきたした。U251MG 細胞は 20 $\mu$ M の METH および関連薬剤 5 種類、CATH. a 細胞は METH 0.2mM、1mM、DA 2 $\mu$ M、4.5 $\mu$ M 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。現在、さらに詳しい解析を進めている。

今回のマイクロアレイ解析の結果、CATH. a 細胞では細胞毒性濃度の METH 投与と DA 投与によって誘導される遺伝子発現の変化が異なることが示され、両者は上記のように別個の病態モデルであることが示唆された。また、定量的 PCR 法により確認された、METH 細胞死特異的に発現調節される遺伝子群は、DA 終末毒性前シナプスニューロン障害の指標として、今後さらに検討する必要があると考えられた。一方、U251MG については現在解析中であるが、METH や cocaine それに MDMA と同様にモノアミントランスポーターに作用する SSRI との比較を行う必要があると考えられた。

### A. 研究目的

メタンフェタミン（以下 METH と表記）乱用は、種々の凶悪犯罪の温床となり、また犯罪組織の資金源として社会的に大きな問題となっている。METH は、薬理的には脳のドーパミン（以下 DA と表記）終末に作用点を持ち、DA 終末に対する毒性と、行動変化の間に相関関係があることが知られている。本研究では、METH などの依存性薬物および関連薬剤の、DA 終末に対する毒性発現機構につ

いて、DNA チップ、プロテインチップを利用して網羅的な解析を行う。

### B. 研究方法

上記目的のため、第一段階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う。DA 終末を構成する細胞種として、DA 作動性前シナプスニューロン、DA 受容体を発現する後シナプスニューロンおよびシナプスを維持

するグリア細胞がある。ヒトアストロサイト系株化細胞 (U251MG) を用いてヒト神経系細胞への一般的な毒性・影響を把握し、同時にグリア細胞に対する影響についても検討する。またマウス DA 作動性神経細胞 (CATH. a) を用いて METH 投与により前シナプスニューロン、DA 投与により後シナプスニューロンに対する影響を検討する。

### C. 研究結果

上記 U251MG 細胞、CATH. a 細胞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。一方 CATH. a 細胞は、METH 0.2mM, DA 2 $\mu$ M でわずかに細胞死を、METH 1mM, DA 4.5 $\mu$ M で半数程度に細胞死をきたした。U251MG 細胞は 20 $\mu$ M の METH および関連薬剤 5 種類、CATH. a 細胞は METH 0.2mM, 1mM, DA 2 $\mu$ M, 4.5 $\mu$ M 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。現在、さらに詳しい解析を進めている。

### D. 考察

マウス DA 作動性神経細胞 (CATH. a) は、DA を生成・分泌し、また DA transporter を発現して METH 投与で細胞死する。一方、DA 投与により DA 終末毒性の後シナプスニューロンモデルともなる。両者を比較して、METH 投与と DA 投与を比較して、METH 投与にだけ特異的に起きる変化は DA 終末毒性の前シナプスニューロンモデルとなると考えられる。ヒトアストロサイト系株化細胞 (U251MG) については、現在マイクロアレイの結果について解析中であるが、本研究班の角田らの研究により、モノアミントランスポータに作用する SSRI が本細胞に及ぼす影響について興味深い結果が得られ

ており、METH のように同じくモノアミントランスポータに作用する依存性薬剤にも、共通する影響があるかも知れない。

### E. 結論

今回のマイクロアレイ解析の結果、CATH. a 細胞では細胞毒性濃度の METH 投与と DA 投与によって誘導される遺伝子発現の変化が異なることが示され、両者は上記のように別個の病態モデルであることが強く示唆された。また、定量的 PCR 法により確認された、METH 細胞死特異的に発現調節される遺伝子群は、DA 終末毒性前シナプスニューロン障害の指標として、今後さらに検討する必要があると考えられた。一方、U251MG については現在解析中であるが、METH や cocaine それに MDMA と同様にモノアミントランスポータに作用する SSRI との比較を行う必要があると考えられた。

### F. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Saeki M, Irie Y, Ni L, Yoshida M, Itsuki Y, Kamisaki Y: *Monad, a WD40 repeat protein, promotes apoptosis induced by TNF-alpha. Biochem Biophys Res Commun* 342:568-572, 2006
  - 2) Tanaka H, Okamura K, Sugiura H, Yasuda S, Tran U, Suzuki K, Takemiya T, DeRobertis EM, Irie Y, Yamagata K, Miki N: *The Arcadlin protocadherin regulates dendritic spine morphogenesis by interacting with N-cadherin. submitted*
2. 学会発表
  - 1) Irie Y, Gan Y, Taira E, Yamagata K, Miki M: *Cell Cycle Regulation by Novel Nuclear Protein Amida. 第 78 回日本薬理学会年会, 2005 年 3 月; 横浜市*

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号：頁 出版年
Mori H, <u>Kanemura Y</u> , Onaya J, Hara M, Miyake J, <u>Yamasaki M</u> , Kariya Y.	Effects of heparin and its 6- <i>O</i> - and 2- <i>O</i> -desulfated derivatives with low anticoagulant activity on proliferation of human neural stem/progenitor cells.	J Biosci Bioeng	100 (1): 54-61, 2005
Suzuki T, Izumoto S, Wada K, Fujimoto Y, Maruno M, <u>Yamasaki M</u> , <u>Kanemura Y</u> , Shimazaki T, <u>Okano H</u> , Yoshimine T.	Inhibition of glioma cell proliferation by neural stem cell factor.	J Neurooncol	74 (3): 233-239, 2005
<u>Kanemura Y</u> , Mori H, Nakagawa A, Islam MO, Kodama E, Yamamoto A, Shofuda T, Kobayashi S, Miyake J, Yamazaki T, Hirano S, <u>Yamasaki M</u> , <u>Okano H</u> .	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 (9): 673-682, 2005
Kobayashi S, <u>Kanemura Y</u> , Islam MO, <u>Wada A</u> , Tajria J, Miyake J, Hara M, <u>Yamasaki M</u> , <u>Okano H</u> , 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
<u>Kanemura Y</u> , Yamazaki T,	Development of gene and protein expression screening-based toxicogenomics system	J Toxicol Sci	30: S116, 2005

Kobayashi S, Yamada T, Shofuda T, Mori H, <u>Yamasaki M,</u> <u>Tsunoda T,</u> Miya F, <u>Okano H,</u> Ito M, <u>Wada A,</u> <u>Irie Y,</u> Miki N.	using human primary normal neuronal cells.		
Yamazaki T, Kobayashi S, Mori H, <u>Kanemura Y.</u>	High-throughput screening of differentially expressed protein in drug treated cells using SELDI-TOFMS.	J Toxicol Sci	30: S118, 2005
Yokota T, Kouno J, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, Matsumoto K, Sugisaki Y, Onda M, <u>Tsunoda T.</u>	Identification of histological markers for malignant glioma by genome-wide expression analysis: dynein, alpha-PIX and sorcin.	Acta Neuropathol	111 (1): 29-38, 2006
<u>Wada A,</u> Ieki Y, Nakamura S, Ito M.	Palladium-Catalyzed Coupling Reaction of an Enol Nonaflate with(Vinyl) tributylstannanes and Acetylenes: A Highly Stereoselective Synthesis of 8,18- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -Labeled Retinal.	Synthesis	10: 1581-1588, 2005
Sudo U, Furutana Y, <u>Wada A,</u> Ito M, Kamo N, Kandori H.	Steric Constraint in the Primary Photoproduct of an Archaeal Rhodopsin from Regiospecific Perturbation of Circular Dichroism Stretching Vibration of the Retinyl Chromophore.	J Am Chem Soc	127 (46): 16036-16037, 2005
<u>和田昭盛</u>	Ramberg-Bäcklund 反応のカロテノイド合成への応用.	ビタミン	79 (3): 172-173, 2005
<u>Wada A,</u> Miyake H, Niihara M, Ito M, Uenishi J.	Synthesis of Retinoic Acid Analog Containing Heteroaromatic Ring.	Carotenoid Science	8: 22-23, 2005
Iijima T, Imai T, Kimura Y, Bernstein A,	Hzf protein regulates dendritic localization and BDNF-induced translation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA.	Proc Natl Acad Sci U S A	102 (47): 17190-17195, 2005

Okano HJ, Yuzaki M, Okano H.			
Yamamoto S, Yoshino I, Shimazaki T, Murohashi M, Hevner RF, Lax I, Okano H, Shibuya M, Schlessinger J, Gotoh N.	Essential role of Shp2-binding sites on FRS2alpha for corticogenesis and for FGF2-dependent proliferation of neural progenitor cells.	Proc Natl Acad Sci U S A	102 (44): 15983-15988, 2005
Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K.	Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart.	J Cell Biol	170 (7): 1135-1146, 2005
Kohyama J, Tokunaga A, Fujita Y, Miyoshi H, Nagai T, Miyawaki A, Nakao K, Matsuzaki Y, Okano H.	Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling: live monitoring and significance in neural development.	Dev Biol	286 (1): 311-325, 2005
Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Kato H, Iwamoto Y, Nakamura M, Miyoshi H, Okano HJ, Contag CH, Toyama Y,	In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury.	Faseb J	19 (13): 1839-1841, 2005

Okano H.			
Islam MO, <u>Kanemura Y</u> , Tajria J, Mori H, Kobayashi S, Shofuda T, Miyake J, Hara M, <u>Yamasaki M</u> , <u>Okano H</u> .	Characterization of ABC transporter ABCB1 expressed in human neural stem/progenitor cells.	FEBS Lett	579 (17): 3473-3480, 2005
Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T, Mihara M, Ohsugi Y, Abe K, <u>Okano H</u> .	Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons.	J Neurochem	94 (2): 459-468, 2005
Akamatsu W, Fujihara H, Mitsuhashi T, Yano M, Shibata S, Hayakawa Y, Okano HJ, Sakakibara S, Takano H, Takano T, Takahashi T, Noda T, <u>Okano H</u> .	The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation.	Proc Natl Acad Sci U S A	102 (12): 4625-4630, 2005
Tamura M, Nakamura M, Ogawa Y, Toyama Y, Miura M, <u>Okano H</u> .	Targeted expression of anti-apoptotic protein p35 in oligodendrocytes reduces delayed demyelination and functional impairment after spinal cord injury.	Glia	51 (4): 312-321, 2005
Iwanami A, Kaneke S, Nakamura M, <u>Kanemura Y</u> , Mori H, Kobayashi S, <u>Yamasaki M</u> ,	Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates.	J Neurosci Res	80 (2): 182-190, 2005

Momoshima S, Ishii H, Ando K, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, <u>Okano H.</u>			
Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, <u>Okano H.</u> Okamoto H.	Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the <i>isl1</i> gene for motor and sensory neuron-specific expression.	Dev Biol	278 (2): 587-606, 2005
Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, <u>Okano H.</u>	Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats.	J Neurosci Res	83 (1): 119-133, 2006
Saeki M, <u>Irie Y.</u> Ni L, Yoshida M, Itsuki Y, Kamisaki Y.	Monad, a WD40 repeat protein, promotes apoptosis induced by TNF- $\alpha$ .	Biochem Biophys Res Commun	342 (2): 568-572, 2006