

厚生労働科学研究費補助金 トキシコゲノミクス研究事業

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・タンパク質データベース構築

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

平成 19 年 4 月

主任研究者 金 村 米 博

厚生労働科学研究費補助金 トキシコゲノミクス研究事業

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・タンパク質データベース構築

平成 18 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 19 (2007) 年 4 月

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. 正常神経系細胞における薬剤毒性情報の取得・データベース化	7
国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究部	金村 米博
2. マイクロアレイを用いた向精神薬応答性の薬効・毒性関連遺伝子の 網羅的解析法の開発とその解析	13
理化学研究所 遺伝子多型研究センター	角田 達彦
3. 複素芳香環を有するポリエン系 γ -ヒドロキシブテノリドの 合成と抗腫瘍活性	17
神戸薬科大学 生命有機化学研究室	和田 昭盛
4. ES 細胞の神経分化について	21
慶應義塾大学 医学部生理学教室	岡野 栄之
5. 毒性スクリーニング試験プロトコールの構築	25
国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究部	山崎 麻美
6. 依存性薬物および関連薬剤の毒性発現機構に関する研究	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	33
---------------------------	----

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金 トキシコゲノミクス研究事業

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 統括診療部	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

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）
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系細胞の確立

ES 細胞を用いて、各種神経系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系細胞を確立させる。

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

作製された神経系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系細胞を薬剤安全性試験に用いるため、毒性試

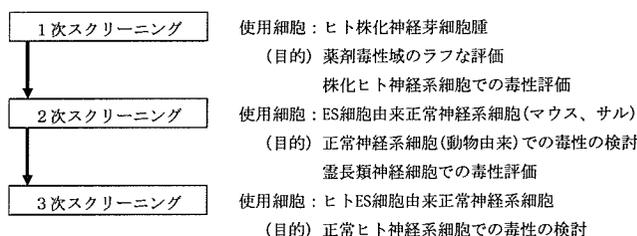
験等を干渉するタンパク質含有率の高い成分（主に血清）を極力排除した、標準培地での安定した霊長類神経系細胞の培養技術とその培地開発を実施する。

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) 正常神経系細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データベース化

ES 細胞由来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. ヒト神経系細胞での毒性特性、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) 正常神経系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細胞由来神経系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細胞由来神経系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) 毒性スクリーニング試験プロトコルの構築

山崎は、正常神経系細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データベース構築を目標に実施される毒性スクリーニングシステムの確立を目的とし、スクリーニングに使用する株化ヒト細胞の毒性試験プロトコル構築を実施した。9種類のヒト細胞の無血清毒性試験系を構築し、確立したプロトコルは1次/2次スクリーニングに実施に使用され、細胞毒性評価に有用な情報を与えた。又Ntera2細胞からドーパミン作動性神経細胞の作成に成功した。

2) 正常神経系細胞における薬剤毒性情報の取

得・データベース化

金村は、神経系細胞を用いて各種薬剤の毒性評価を行い、その情報をデータベース化することを目指し、ヒト細胞（9種）およびマウス神経幹細胞を使用して、既存薬剤41種の細胞毒性を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用いて評価した。その結果、細胞毒性は、培地中の血清の影響を受ける場合があることが判明した。各薬剤のヒト細胞に対する毒性は様々であるが、ヒトEC細胞であるNtera2が種々の薬剤の毒性が強く出やすい傾向があった。またマウス正常神経幹細胞は、薬剤毒性が出現する場合はヒト細胞より小さなIC50値を取る傾向が幾つかの薬剤において顕著であることを明らかにした。

3) Psychostimulantによるドー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。マウスDA作動性神経細胞（CATH.a細胞）を用いた検討において、マイクロアレー解析の結果、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のうち、小胞体ストレスに関わる遺伝子ddit3（CHOP）の発現上昇から、METHの毒性機構に小胞体ストレスが関与することが示唆され、さらにマウス個体を用いてこのことが検証された。

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細胞から神経系前駆細胞/幹細胞（NS/PCs）を含むニューロスフェアを誘導する培養法を確立した。このニューロスフェアは、成体脊髄に移植すると生着し、*in*

in vivo でもニューロンに分化することが確認された。また、ヒト ES 細胞からニューロスフェアを誘導する方法を同様に確立させた。

5) 複素芳香環を有するポリエニ系 γ -ヒドロキシブテノリドの合成と抗腫瘍活性

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、嵩高いルイス酸である ATPH [aluminum tris(2,6-diphenylphenoxide)] の存在下、塩基として LTMP (lithium 2,2,6,6-tetramethylpiperadide) を用いる TES (triethylsilyl) 化ブテノリドあるいは TBS (tert-butyl dimethylsilyl) 化ブテノリドとアルデヒドとの位置選択的な交差アルドール反応を経由する γ -ヒドロキシブテノリドの新規合成法を確立した。この方法を利用して、ヒト株化細胞 (HL-60) に対する高い抗腫瘍作用と分化誘導作用を有する新規化合物である β 位共役鎖の末端に複素芳香環を有する種々の γ -ヒドロキシブテノリド誘導体の合成に成功した。

6) マイクロアレイを用いた向精神薬応答性の薬効・毒性関連遺伝子の網羅的解析法の開発とその解析

角田は、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的とし、実際の評価システム系でハイスループットにスクリーニングをおこなう際に最適な条件を検証し、最終年度における網羅的薬剤応答データベース構築の基盤を完成させた。同時に前年度に作製した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るシステムについて、実際にいくつかのヒト株化細胞に各種薬剤を添加したときの変動を探索し、システムが稼働することを確認した。

D. 考察および最終年度の方向性

1) 安全性評価用基準神経細胞の確立

ES 細胞を分化誘導させて作成することができる神経系細胞としては、神経幹細胞、神経細胞、グリア細胞の 3 種が存在する。それぞれ生

物学的特性は異なり、薬剤に対する毒性の出方も異なることが予測される。これら神経系細胞を毒性試験に効果的に応用するためには、どのような目的で使用するのか? *in vivo* における何のモデルとして使用するのか? (ターゲットは何か?) を十分考慮してスクリーニング系を構築する必要があると考える。当研究開発では 2 年間の研究の成果として、技術的にも実現可能でかつ実用上有益なシステムとして、図 1 に示した各種分化細胞を併用するスクリーニングシステムを構築することが現時点では最も効果的な方法であるとの結論に至った。

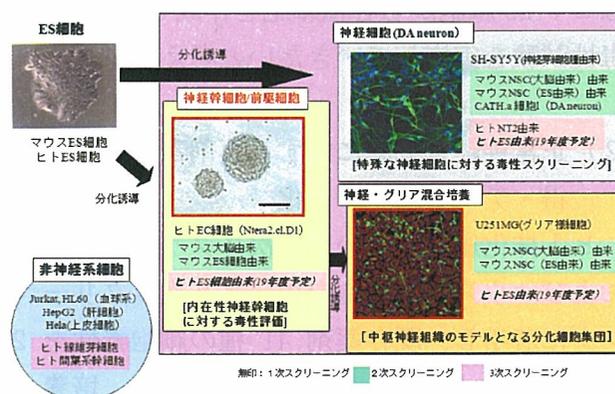


図 1: 神経系細胞に対する毒性スクリーニングに使用する細胞群

このスクリーニングシステムでは、ES 細胞から作成される①神経幹細胞/前駆細胞は、生体脳内に存在する内在性神経幹細胞のモデル細胞となり、内在性神経幹細胞に対する薬剤毒性の評価系として使用される。次に、ES 細胞から効率よく分化誘導させることが可能な②神経細胞 (例: ドーパミン[DA] 作動性神経細胞) は、特殊な神経細胞のモデル細胞として有用であり、特定の神経細胞に対する薬剤毒性スクリーニングに使用される。そして、ES 細胞由来神経幹細胞を分化誘導して作成される③神経・グリア混合培養は、神経細胞とグリア細胞の相互作用が存在する中枢神経組織のモデルであり、広い意味で中枢神経組織に対する薬剤毒性スクリーニングに使用される。これら 3 種の分化細胞を ES

細胞から各々作成し、それらにおける薬剤毒性を評価し、そのデータを相互比較することで、各薬剤の神経系細胞に対する毒性を広範囲に評価することが可能となると考えられる。また、ヒトES細胞由来細胞での検討に先だって1次/2次スクリーニング用細胞として株化細胞、動物細胞を組み入れた3段階のスクリーニングを採用することで、ヒトES細胞由来細胞を用いたスクリーニングを効率的に行うことが可能になると考えられる(図1)。

今年度までの研究で毒性試験に使用する細胞の選定、分化誘導・培養方法、および毒性評価用プロトコルの作製は終了した。最終年度はヒトES細胞から各種細胞を作成して、実際の毒性試験を実施していきたいと考える。

2) 正常神経系細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データベース化

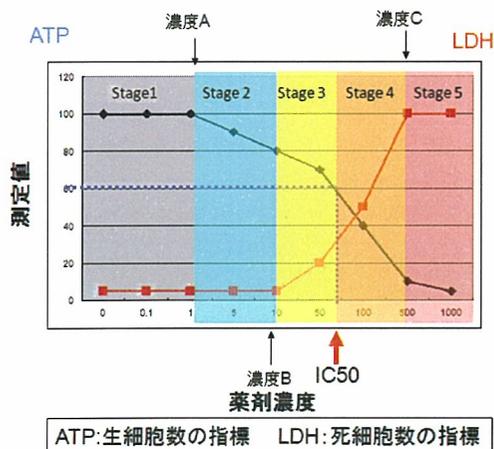
ヒト株化細胞を用いた1次スクリーニング、およびマウス正常細胞を用いた2次スクリーニングに着手し、既存薬剤41種の細胞毒性を2種類のパラメーター(細胞内総ATP量、培養上清中LDH量)を用いたマルチアッセイ系を用いて評価した。この41種類の薬剤は、中枢神経疾患に対して使用する薬剤と中枢神経疾患以外に使用する薬剤の中で、一般臨床で使用頻度の高いものを中心に幅広く選定した。それらのスクリーニングの結果から得られた知見の中で特に注目されるものは、ヒトEC細胞であるNtera2に対する薬剤毒性とマウス神経幹細胞に対する薬剤毒性の特徴である。Ntera2は神経細胞へ分化する能力を有するヒト細胞であり、生物学的にはヒト神経前駆細胞に近い性質を有する細胞である。今回詳細な解析を実施した薬剤の中に、このNtera2に対して比較的強い毒性を有する薬剤が複数存在した。神経幹細胞や神経前駆細胞に対する薬剤毒性のデータ、とりわけヒト細胞における情報は十分に存在しない。今回得られたデータからこの点に関する新しい知見が得られる可能性があり、最終年度、解析を進

めていきたいと考える。一方、マウス神経幹細胞を用いた検討では、薬剤種によってはヒト細胞の10分の1の低濃度で細胞毒性が出現することが判明した。従来からヒト細胞と動物細胞の間には薬剤毒性に関する生物種差があり、動物細胞での毒性試験の結果は必ずしもヒト細胞で当てはまらないと指摘されている。神経毒性に関して、とりわけ正常神経系細胞に関してのこの生物種差に関する情報は十分ではない。今回開発した毒性スクリーニングシステムは、当初の期待の通り、この細胞毒性における生物種差に関する情報を提供する有力な評価系となり得ることが判明した。この点も最終年度、さらに情報を増やし、最終目標である正常神経系細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データベースを構築していきたいと考える。

3) 正常神経系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ベース化と、毒性関連遺伝子ネットワークの検討

今年度は前述のスクリーニング結果を基に、一部、毒性関連遺伝子の探索を開始した。今後、最終年度にかけてマイクロアレイ・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本格的に実施する予定であるが、それに先立ち、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を取得するのか?という点を十分に考察した。薬剤による細胞毒性は薬剤濃度に依存して図2に示したように幾つかの段階を経て出現することが想定される。この中で、50%生存阻害濃度(IC50)を超える領域(図2、Stage4)およびほとんどの細胞が死滅する薬剤濃度(図2、濃度C)を超える領域(図2、Stage5)では薬剤によって1次的に誘発された細胞毒性に関連する遺伝子変動と細胞死自身によって2次的に引き起こされる遺伝子変動が複雑に絡み合った状態になっていると予測され、この段階における遺伝子・タ

タンパク質発現情報を取得しても薬剤毒性に関連する遺伝子・タンパク質発現情報の取得という点からは適切ではないと考えた。よってマイクロアレイ・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段階としては、もっと早い段階、図2におけるStage1～Stage3の段階にターゲットを絞り、とりわけ、細胞分裂抑制作用(cytostatic effect)が出現する濃度(図2、濃度A)から殺細胞作用(cytotoxic effect)が出現する濃度(図2、濃度B)の間であるStage2およびStage2～Stage3の境界域が各薬剤固有の毒性を評価するという観点から適切であると判断した。今年度までに開発した2種類のパラメーター(細胞内総ATP量、培養上清中LDH量)を用いたマルチアッセイ系ではこの領域設定が可能であり、今後、この領域を中心にターゲットとする薬剤の遺伝子・タンパク質発現情報の取得を行っていきたいと考える。



Stage 1 (無毒性域: $C < \text{濃度A}$)	<ul style="list-style-type: none"> 薬剤の毒性が無い濃度域 治療に用いる薬剤濃度 (e.g. Cmax) は基本的にこの領域
Stage 2 (増殖抑制作用: $\text{濃度A} < C < \text{濃度B}$)	<ul style="list-style-type: none"> 生細胞数の低下は見られるが死細胞数の有意な増加は見られない領域 増殖抑制効果に關与する遺伝子群の変動を予測
Stage 3 (細胞死誘発作用: $\text{濃度B} < C < \text{IC50}$)	<ul style="list-style-type: none"> 生細胞数の低下と死細胞数の有意な増加が見られ、細胞死が誘発される毒性域のなかでIC50より作用が小さい領域 主に細胞毒性に關与する遺伝子群の変動を予測
Stage 4 (細胞死誘発作用: $\text{IC50} < C < \text{濃度C}$)	<ul style="list-style-type: none"> 生細胞数の低下と死細胞数の有意な増加が見られ、細胞死が誘発される毒性域のなかでIC50より作用が大きい領域 細胞毒性に關与する遺伝子群と細胞死により誘発される2次的遺伝子変動の混合
Stage 5 (細胞死領域: $\text{濃度C} < C$)	<ul style="list-style-type: none"> Over killの領域 細胞死により誘発される遺伝子変動

図2: 薬剤濃度と細胞毒性の関連性

毒性関連遺伝子ネットワークの同定に関しては、マイクロアレイ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既に成功している。今後、スクリーニングで上がってくる解析結果を基に、前述の解析ターゲットを同定し、具体的に複数の薬剤の毒性関連遺伝子のデータベース構築し、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

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）
分担研究報告書

正常神経系細胞における薬剤毒性情報の取得・データベース化

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、その情報をデータベース化することを目指し、ヒト細胞（9種）およびマウス神経幹細胞を使用して、既存薬剤41種の細胞毒性を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用いて評価した。細胞毒性は、培地中の血清の影響を受ける場合があることが判明した。各薬剤のヒト細胞に対する毒性は様々であるが、ヒトEC細胞であるNtera2が種々の薬剤の毒性が強く出やすい傾向があった。またマウス正常神経幹細胞は、薬剤毒性が出現する場合はヒト細胞より小さなIC50値を取る傾向がいくつかの薬剤において顕著であった。今後、得られた毒性データベースを基本にして、ヒトES細胞由来神経系細胞における毒性関連遺伝子・タンパク質情報をマイクロアレイ・プロテインチップを用いて取得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、その情報をデータベース化することを目指し、株化ヒト細胞を用いた1次スクリーニングおよびマウス正常神経系細胞を用いた2次スクリーニングを実施する。

B. 研究方法

スクリーニング用細胞としては合計9種のヒト細胞およびマウス神経幹細胞を使用した（表1）。薬剤は薬理効果の判明している既存薬剤41種（表2）を使用した。96穴マイクロプレートを使用して各細胞を24時間培養した。その後、無血清培地に置換し、各薬剤について0 μ M～100 μ Mの範囲で希釈系列を作製し（n=5で実施）、細胞に添加した。5%CO₂存在下37°Cで培養し、薬剤投与後24時間の時点で、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、乳酸脱水素酵素（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。得られた細胞毒性曲線を元に50%生存阻害濃度（IC50）を算出した。薬剤によっては無血清培地を用いた試験に加えて10%ウシ胎児血清（FBS）含有培地を用いた試験も実施した。

表 1 スクリーニングに使用した細胞種

	細胞名	由来	入手先
神経系株化細胞	U251MG	ヒト神経膠腫	ヒューマンサイエンス振興財団
	SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫	ATCC
	Ntera2	ヒト精巢奇形腫	ATCC
非神経系株化細胞	Jurkat	ヒト T 細胞白血病	ATCC
	HeLa	ヒト子宮頸部癌	理研バイオリソースセンター
	HepG2	ヒト肝臓癌	ATCC
正常線維芽細胞	WI38	ヒト(3 か月 齢胎児肺)	ヒューマンサイエンス振興財団
	NTI-4	ヒト(9 週 齢胎児体部)	ヒューマンサイエンス振興財団
	Hs68	ヒト(新生児皮膚)	ヒューマンサイエンス振興財団
神経幹細胞	mNSC	マウス脳(胎生 14 日)	初代培養

表 2 スクリーニングに使用した既存薬剤リスト

既存薬剤種	数	薬剤名
抗がん剤	11	cytarbine (Ara-C), flurouracil (5-FU), methotrexate, 6-mercaptopurine (6-MP), vincristine sulfate, Mitomycin C, neomicine (G418), cisplatin, etoposide, procarbazine-HCl, carboplatin
抗うつ薬	12	paroxetine, sertraline, fluoxetine, fluvoxamine, citalopram, imipramine, desipramine, clomipran, amitriptyline-HCl, venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine, milnacipran
抗けいれん薬	4	phenytoin, zonisamide, carbamazepine, sodium valproate
向精神薬	2	thioridazine-HCl, haloperidol
その他	12	cilostazol, all trans retinoic acid (ATRA), simvastatin, acetaminophen, ticlopidine-HCl, theophyllin, verapamil-HCl, aspirin, caffeine, DMSO, ethanol, lidocaine

C. 研究結果

1) 全体的な傾向

毒性試験用培地に含まれる血清の影響に関しては、血清含有培地、無血清培地のいずれを用いた試験においてもほぼ同じ IC50 値であった薬剤も存在したが（図 1、2）、血清含有培地の使用によって毒性が大幅に軽減された薬剤も存在した（図 3、4）。全体的に無血清培地を用いた試験のほうが小さな IC50 値となる傾向が見られた。細胞間の毒性差に関しては、薬剤毎に細かな毒性差は存在したが、全体的な傾向として、ヒト EC 細胞である Ntera2 が種々の薬剤の毒性が強く出やすい傾向があった。またマウス正常神経幹細胞は、薬剤毒性が出現する場合はヒト細胞より小さな IC50 値を取る傾向が幾つかの薬剤において顕著であった（図 5）。

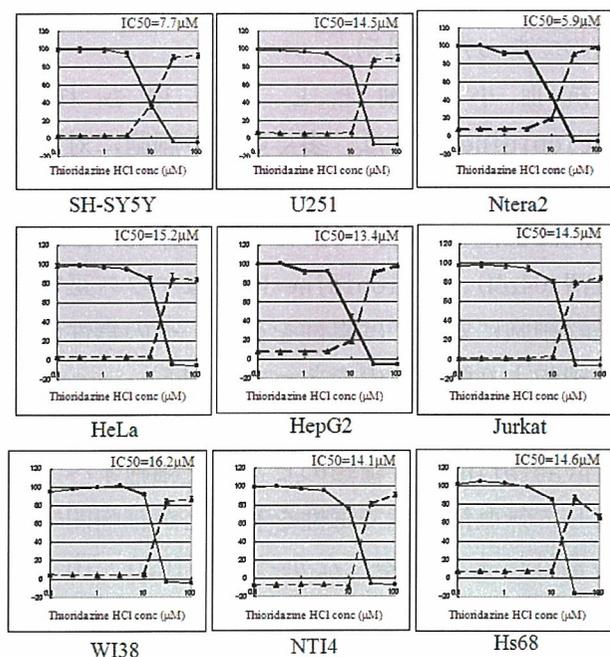


図 1： Thioridazine-HCl 投与後 24 時間の細胞内総 ATP 量と培養上清中 LDH 量（無血清培地使用）

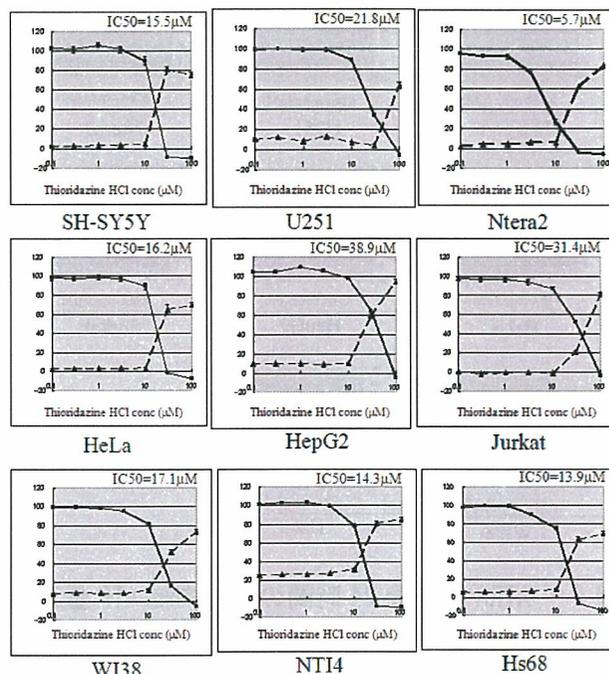


図 2： Thioridazine-HCl 投与後 24 時間の細胞内総 ATP 量と培養上清中 LDH 量（10%FBS 含有培地使用）

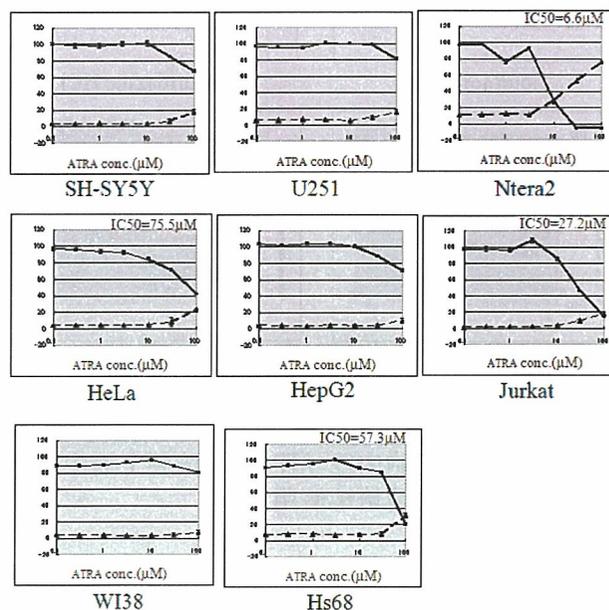


図 3： ATRA 投与後 24 時間の細胞内総 ATP 量と培養上清中 LDH 量（無血清培地使用）

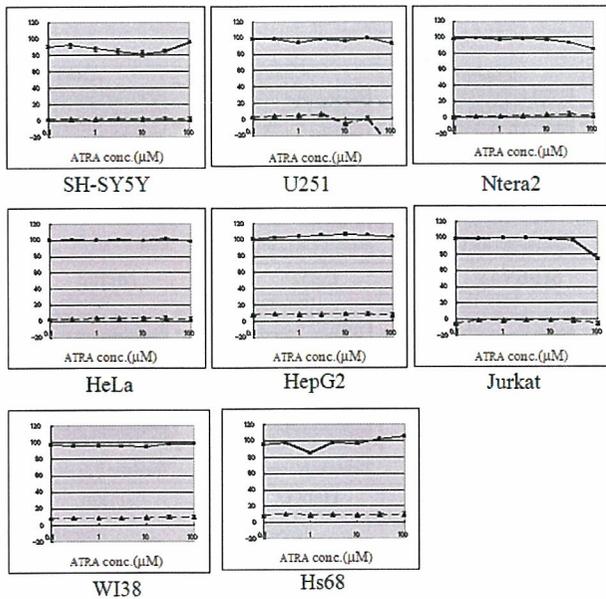


図 4： ATRA 投与後 24 時間の細胞内総 ATP 量と培養上清中 LDH 量 (10%FBS 含有培地使用)

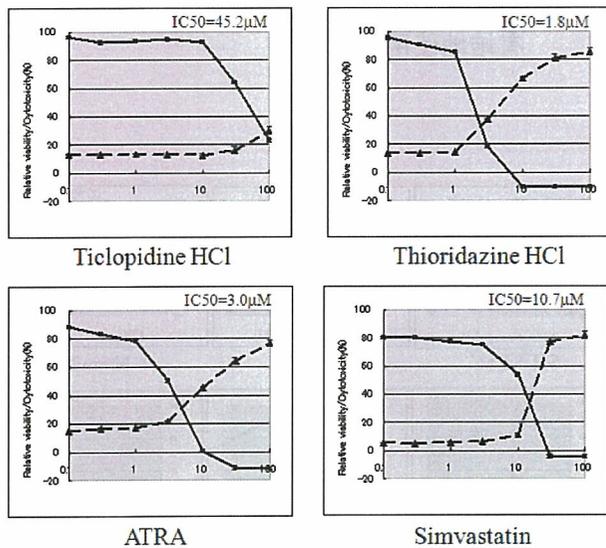


図 5： マウス神経幹細胞における薬剤投与後 24 時間の細胞内総 ATP 量と培養上清中 LDH 量 (無血清培地使用)

2) 代表的な薬剤の毒性の特徴

向精神薬の一種である thioridazine-HCl の細胞毒性は、多くの細胞において培地中の血清の影響を大きく受けなかった (図 1、2)。6 種類のヒト株化細胞および 3 種のヒト正常線維芽細胞のいずれに対しても細胞毒性を有したが、そ

の IC50 値は細胞間で差があり、神経系細胞である Ntera2 および SH-SY5Y に比較的強い毒性を有することが判明した (図 1、2)。ヒト細胞同様、thioridazine-HCl はマウス細胞に対しても毒性を有したが、マウス正常神経幹細胞における IC50 値はヒト細胞の数倍以下で、マウス細胞に対しては強い毒性を有することが明らかになった (図 5)。

抗癌剤として使用される ATRA の細胞毒性は培地中の血清の影響を強く受け、血清含有培地では 100 μ M の高濃度でもすべての細胞に対して大きな毒性を示さなかった (図 3、4)。無血清状態での ATRA の細胞毒性は細胞間での違いが大きく、ほとんど毒性を示さない細胞から、強い毒性を示す細胞 (Ntera2、Jurkat) まで存在した。マウス正常神経幹細胞に対しても ATRA は毒性を示したが、その IC50 値は ATRA に対して毒性を示したヒト細胞より 10 倍以上小さなものであった (図 5)。

抗血小板剤として使用される ticlopidine-HCl は、多くのヒト細胞に対して毒性を有さなかったが、SH-SY5Y に対しては例外的に毒性を有した (IC50: 無血清 85.8 μ M、有血清 64 μ M)。ticlopidine-HCl はマウス正常神経幹細胞に対しては毒性を有し、その毒性はヒト細胞より強いものであった (図 5)。

抗コレステロール剤として使用される simvastatin は 6 種類のヒト株化細胞すべてに対して無血清環境で毒性を有したが細胞間でその毒性に大きな差はなかった (IC50: 10.5~15.6 μ M)。simvastatin はマウス正常神経幹細胞に対しても毒性を有したが、ヒト細胞に対する毒性と大きな差は見られなかった (図 5)。

D. 考察

前年度までに開発した、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ルを用いて、今年度は種々の薬剤がヒト細胞に及ぼす毒性のスクリーニングを開

始し、毒性データベースの構築に着手した。

先ず始めに、無血清培地と血清含有培地のいずれが毒性試験用培地として適切であるか？という問題が存在する。細胞毒性試験は通常、細胞を維持培養するとき使用する 10%程度の血清を含む培地を用いて実施されることが多い。この血清含有培地は細胞維持・増殖の環境としては適したものであり、それを用いた毒性試験は細胞に対する影響を最小限にした環境下での毒性評価であるという観点からは適当な実験系であると考えられる。しかし、血清中には既知・未知の種々の因子が豊富に存在し、血清に含まれるたんぱく質（主にアルブミン）に対する薬剤の吸着度の差や、血清中に存在する毒性干渉物質の影響で、細胞毒性が種々の程度に修飾されることが予測される。よって薬剤間での毒性比較データベース構築においては、この血清の毒性干渉作用が無視できない場合があると予測された。そこで別途開発された無血清培地を用いた毒性試験と通常の 10%血清含有培地での毒性試験を並列で実施したが、予測通り、薬剤種によっては培地中の血清によって細胞毒性が修飾されることが判明した。全体的な傾向として、各薬剤は無血清培地の環境でより強い細胞毒性を有する傾向があると思われた。

細胞毒性評価に最適な試験法の決定は種々の因子を考慮した上での判断が必要であり、今回のデータのみでは結論づけることは困難であると考えられる。しかし、最終的なターゲット細胞の1つである神経幹細胞は無血清培地で培養されるため無血清環境での薬剤毒性データが必要であること、および1次-2次スクリーニングと段階的にスクリーニングを実施した上で最終スクリーニング候補薬剤を選定するという当初のコンセプトを考慮すると、最上流（入口）でおこなうスクリーニングは高感度のもの（毒性が強く出る傾向があるスクリーニング）のほうが候補薬剤の選定に有利であると、考えられることから、スクリーニング方法として、①まず無血清培地を用いた毒性試験を実施し、②毒性

が見られた薬剤に関して次のステップとして血清存在下での毒性試験を追加実施する、という順序が妥当であると判断し、以後はこの方針でスクリーニングを実施していくこととした。

今年度、薬理効果の判明している合計 41 種の薬剤の毒性スクリーニングに着手したが、その中の幾つかの薬剤は神経系細胞に対して興味ある細胞毒性を有することが判明した。またマウス細胞とヒト細胞間での毒性比較から、薬剤によって細胞毒性に大きな生物種差が存在することが判明した。このことは本スクリーニングシステムを考案する上で予測した点であるが、やはり動物細胞のみでの毒性スクリーニングでは、毒性評価が困難な場合があることが確認され、本研究のように種々のヒト細胞を用いたスクリーニング系の構築が有用であることが確認されたと思われる。今年度検討した細胞毒性を有した薬剤の幾つかは、既にマイクロアレイ等を用いてその毒性関連遺伝子およびタンパク質の同定に着手している。最終年度は、ヒト ES 細胞から作成した細胞を用いて、検討を進めていきたいと考える。

E. 結論

9 種のヒト細胞およびマウス神経幹細胞を使用して、既存薬剤 41 種の細胞毒性を、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用いて評価した。今後、得られた毒性データを基に、マイクロアレイ・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実施する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasumi H, Komori S, Sakata K, Yamamoto N, Yamasaki T, Kanemura Y, Koyama K: Upregulation of macrophage migration inhibitory factor and calgizzarin by androgen in TM4 mouse Sertoli cells. *Asian J*

Androl 8(5):549-554, 2006

- 2) Mori H, Ninomiya K, Kino-oka M, Shofuda T, Islam MO, Yamasaki M, Okano H, Taya M, Kanemura Y: Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *J Neurosci Res* 84(8):1682-1691, 2006
- 3) Mori H, Ninomiya K, Kanmura Y, Yamasaki M, Kino-oka M, Taya M: Image cytometry for analyzing regional distribution of the cells inside human neurospheres. *J Biosci Bioeng*, 103(4), 2007, in press
- 4) Kato T, Kanemura Y, Shiraishi K, Miyake J, Kodama S, Hara M: Early response of neural stem/progenitor cells after X-ray irradiation in vitro. *NeuroReport*, in press

2. 学会報告

- 1) Mori H, Ninomiya K, Kino-oka M, Shofuda T, Islam MO, Yamasaki M, Okano H, Taya M, Kanemura Y: Aggregate size affects the proliferation rate of human neural stem/progenitor cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 2006; Kyoto, Japan
- 2) 金村米博, 正札智子, 有田憲生, 岡野栄之, 山崎麻美: マイクロアレーを用いたヒト神経幹細胞/前駆細胞における遺伝子発現の検討. 第7回日本分子脳神経外科学会, 2006年9月; 東京
- 3) 森 英樹, 仁宮一章, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 金村米博: ヒト神経幹細胞集塊内の細胞分布の解析. 日本生物工学会平成18年度大会, 2006年9月; 豊中
- 4) 森 英樹, 仁宮一章, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 山崎麻美, 金村米博: ヒト神経幹細胞が形成するニューロスフェア内細胞分布の解析. 第6回日本再生医療学会総会, 2007年3月; 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

マイクロアレイを用いた向精神薬応答性の薬効・毒性関連遺伝子の 網羅的解析法の開発とその解析

分担研究者 宮 冬樹

独立行政法人 理化学研究所 遺伝子多型研究センター 研究員

角田 達彦

独立行政法人 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、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、実際の評価システム系でハイスループットにスクリーニングをおこなう際に最適な条件を検証し、最終年度における網羅的薬剤応答データベース構築の基盤を完成させた。同時に前年度に作製した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るシステムについて、実際にいくつかのヒト株化細胞に各種薬剤を添加したときの変動を探索し、システムが稼働することを確認した。最終年度は薬剤種を増やすと同時に、マウスおよびヒトの正常神経系細胞においても薬剤応答試験を行い、データを追加・補完することでデータベース・評価システムの完成を目指す。

A. 研究目的

本研究の目的は、細胞内での薬剤応答（毒性／薬効）遺伝子を網羅的に解析し、その中から各種細胞に共通しているもの、あるいは細胞により異なるもの、種間での差異、等を捉えると同時に、そこで得られた情報をデータベース化し、新規の薬剤応答反応と比較可能な薬剤安全性評価システムを構築することである。

今や網羅的遺伝子発現解析の主要な方法として広く認知されてい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30,000を超えるゲノムからの転写産物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スタンダード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、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とした。これにより複数の実験データ間で同調するパスウェイ・機能群、あるいはそうでないものを検出可能となる。この解析手法を用いて、各種薬剤および細胞間での応答を網羅的に解析し、薬剤安全製評価システムとなるデータベースを構築することを目指している。

しかし、薬剤応答を調べる時、同一薬剤濃度でも細胞種が異なると応答が大きく異なり、毒性濃度域も細胞種により異なることが知られている。また培養条件の違いによっても応答は大

大きく異なる。そこで、本年度は評価システムとしてデータベースを構築することに適する反応条件を複数種の細胞・薬剤について調べ、それと共にいくつかのヒト株化細胞について実際のデータ収集を開始した。これは最終年度への基盤を作製することを目的としている。

B. 研究方法

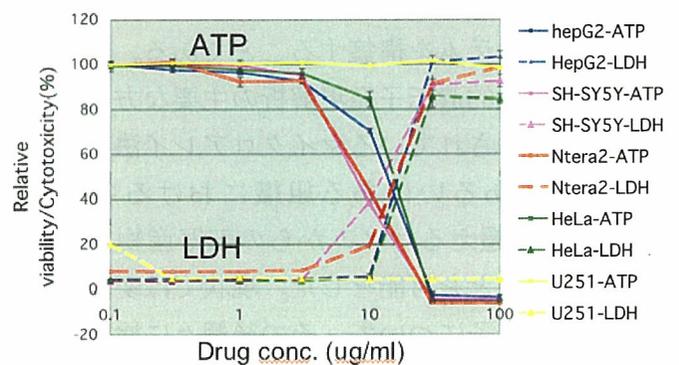
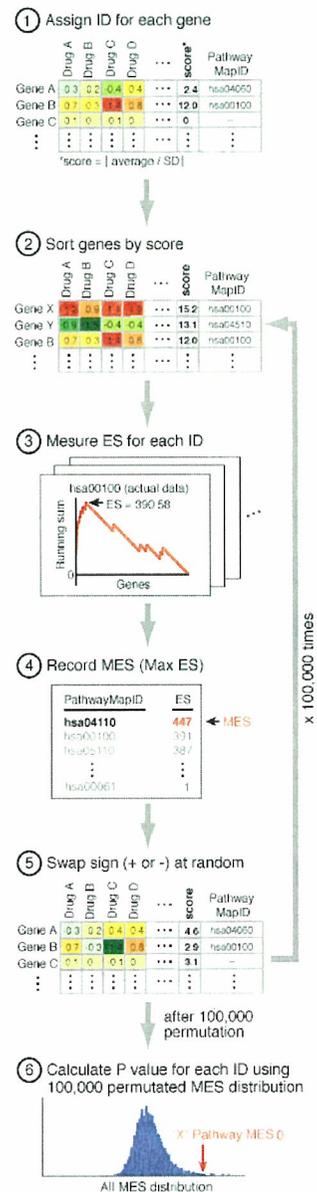
まず、各種細胞における各薬剤への耐性（生存活性）を網羅的に解析した。具体的には ATP assay（生存活性測定）と LDH assay（毒性度試験）を様々な薬剤濃度下において網羅的に調べた。また、血清タンパクと薬剤は結合することが知られていることから、実際の実験培養下における血清タンパク結合率を LC/MS/MS を用いることで測定し、臨床的に知られている結合率と比較検討し、薬剤添加実験条件が適切であるかを調べた。

その結果をもとに、薬剤濃度を決定し、各種ヒト株化細胞（HepG2, SH-SY5Y, Ntera2, HeLa, U-251 の 5 種）を用いて薬剤添加実験をおこない、その RNA を回収後マイクロアレイ実験をおこない、遺伝子発現データを収集し、右図で示す Kolmogorov-Smirnor 検定をもちいたパスウェイ・機能群解析をおこなった（検定方法については昨年度の報告に詳しい）。

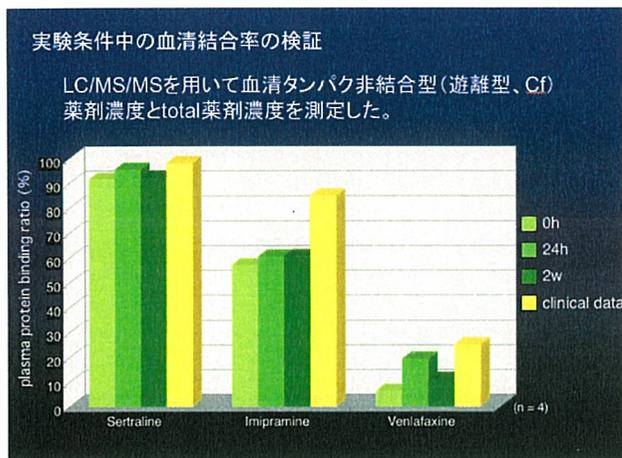
C. 研究結果

各種細胞における各種薬剤濃度条件下で生存活性（ATP）および毒性（LDH）を調べた結果、細胞種により応答する薬剤濃度に差があることがわかった（右図はその結果の一部）。すなわち、細胞種により毒性の出る薬剤濃度が異なり、耐性度も異なるということが明らかになった。またこれは薬剤によっても大きな差が見られた。

一方、実験条件下における血清タンパクと薬剤の結合率を調べた結果、血清を含む培地においては、臨床的に知られている血清結合率とほぼ同様の結合率となっていることが確かめられ



た（下図）。



5種のヒト株化細胞に付いて、薬剤濃度を臨床的に知られているCmax濃度と、ATP/LDH assayにより導かれた毒性濃度境界域（毒性の指標であるLDHが正常培養状態とほぼ差のない境界濃度）の2種に振り、いくつかの薬剤についてマイクロアレイ実験をおこなった結果、明らかな毒性遺伝子として知られるものはほとんど発現していないことを確認した。さらにこれらのデータについて、同調して変動しているパスウェイ／機能群が存在しないかを上記の手法で統計解析をおこなったところ、いくつかの同調候補グループ遺伝子群が検出された（データ数がまだ少ないためデータは未掲載）。

D. 考察

得られた結果のように、細胞種により薬剤濃度変化への応答が異なることは、薬剤応答を調べる際に非常に重要なポイントとなる。すなわち、同一薬剤濃度では、ある細胞においては薬効反応を、ある細胞においては過剰な毒性反応を見ている、というようなことになりかねず、詳細な実験条件を最初に設定しないで比較実験をおこなうことは危険である。また、細胞ごとの培地条件により血清濃度も異なることから、血清タンパクへの薬剤結合率も考慮に入れる必要があるだろう。これらの詳細な条件検討は

過去の様々な実験においておざなりにされてきた感も一部あるが、網羅的に解析し、その各実験データを比較する際には無視できない重要な検証項目であると考えられる。

本研究においては、上記の結果を元に、細胞毒性境界域と臨床的に知られている体内薬剤作用濃度等の数種に薬剤濃度をそれぞれの細胞・薬剤ごとに調整して実験をおこなうことで、各実験間を比較可能とすることとした。これにより、薬剤濃度は異なるが近似した細胞状態での反応を細胞間で比較できるものと考えている。

既に数種のヒト株化細胞でパスウェイ・機能群解析をいくつかおこない、特異的な変動群候補が得られていることから、これを最終年度にさらに拡大し、マウスあるいはヒトの正常神経幹細胞由来の細胞群、ヒトの正常神経細胞群についても解析し、薬剤／細胞種で同調あるいは差異のあるパスウェイ・機能群の抽出と、データベースの補完による薬剤安全製評価システムが構築されるものと期待できる。

E. 結論

- ・ 細胞に対する薬剤の毒性および生存活性をハイスループットで調べるシステムを完成させた
- ・ 細胞種や薬剤種により細胞応答が異なることを確認した
- ・ 実験条件下での血清タンパク結合率が臨床で知られる結合率と類似していることを確認した
- ・ いくつかのヒト株化細胞で、変動が見られる薬剤応答パスウェイ・機能群を抽出するプログラムが稼働することを確認した
- ・ 最終年度に完成させるデータベースの一部を作製し、薬剤安全製評価システムの基盤を作った

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) 入江康至, 宮 冬樹, 角田達彦, 金村米博, 三木直正, 佐伯万騎男, 上崎善規: Analysis of gene expression in dopamine or methamphetamine treated dopaminergic neural cells. 第 28 回日本生物学的精神医学会・第 36 回日本神経精神薬理学会・第 49 回日本神経化学会大会合同年会, 2006 年 9 月; 名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

複素芳香環を有するポリエン系 γ -ヒドロキシブテノリドの合成と抗腫瘍活性

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

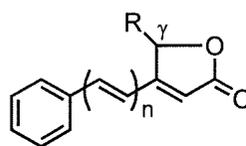
嵩高いルイス酸である ATPH [aluminum tris(2,6-diphenylphenoxide)] の存在下、塩基として LTMP (lithium 2,2,6,6-tetramethylpiperadide) を用いる TES (triethylsilyl) 化ブテノリド (3) あるいは TBS (tert-butyl dimethylsilyl) 化ブテノリド (4) とアルデヒド (5a-d) との位置選択的な交差アルドール反応を経由する γ -ヒドロキシブテノリド (1a-d) の新規合成法を確立した (図1)。

この方法を利用して、 β 位共役鎖の末端に複素芳香環を有する種々の γ -ヒドロキシブテノリド誘導体 (11a-d) を合成し (図2)、ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) に対する抗腫瘍作用を測定した。その結果、これらにはいずれも、既に活性が認められていた (1c) に匹敵する強いアポトーシス誘導作用が認められた。また、これらにはいずれも (1c) と同様に単球系への分化誘導作用を示し、これらのうち、(11b-d) の作用は、(1c) よりもかなり強いことが判明した。

A. 研究目的

既に我々は、新しいレチノイド系抗腫瘍化合物開発研究の一環として、ポリエン系 γ -ヒドロキシブテノリド (1a-d) を合成し、HL-60 に対する抗腫瘍作用を調べた結果、レチノイン酸と側鎖の長さが同じである (1c) のみに、単球系への分化誘導作用と非常に強いアポトーシス誘導作用が認められることを明らかにした。また、その作用はレチノイン酸のように、核内レセプターである RAR や RXR を介する作用ではないことを明らかにした。さらに、(1c) の γ 位に水酸基のない化合物 (2) には、抗腫瘍作用が全く認められなかったことから、作用発現には γ 位の水酸基が必須であることも明らかにした。

そこで、より抗腫瘍作用の高い化合物の開発を目指して、作用の認められた (1c) のベンゼン環を様々な複素芳香環に変換した γ -ヒドロキシブテノリド誘導体を合成し、その生物活性を検討することにした。



- 1a: R=OH n=1
- 1b: R=OH n=2
- 1c: R=OH n=3
- 1d: R=OH n=4
- 2: R=OH n=3

B. 研究方法

これまでの (1a-d) の合成法には、収率および最終化合物の分離精製の点で改良の余地が残されていた。そこで、まず、誘導体合成に応用可能なポリエン系 γ -ヒドロキシブテノリドの新規合成法を開発することにした。続いて、その合成法を利用して (1c) のベンゼン環を様々な複素芳香環に変えた γ -ヒドロキシブテノリド誘導体を合成し、生物活性を測定した。

C. 研究結果

山本ら (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, 1769,