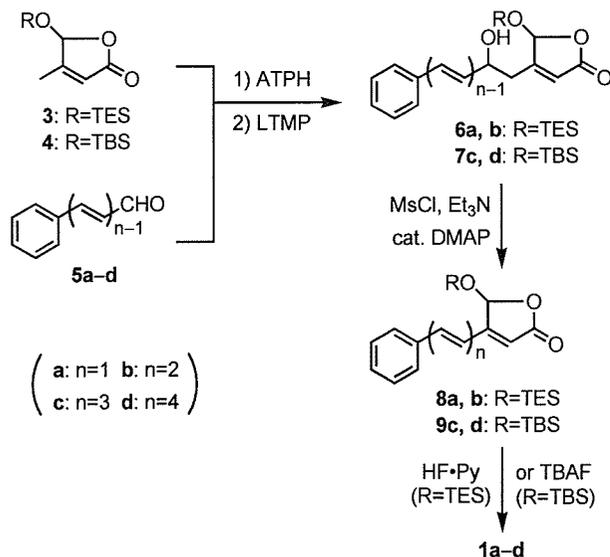
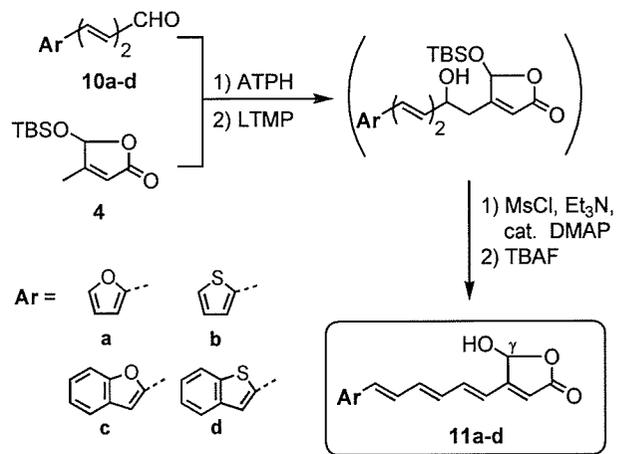


1999) により開発された嵩高いルイス酸 ATPH と塩基 LTMP を用いる位置選択的なアルドール反応を、ピルビンアルデヒドジメチルアセタールより誘導した TES 化ブテノリド (3) あるいは TBS 化ブテノリド (4) とアルデヒド (5a-d) との反応に応用した。その結果、目的の位置で選択的に反応が進行したアルドール体 (6a, b) および (7c, d) を経由して、ポリエン系 γ -ヒドロキシブテノリド (1a-d) を効率よく合成することに成功した。共役鎖が長くなると保護基である TES 基が不安定となるため、より安定な TBS 基を保護基として用いた方が良かったことがわかった。この方法は、これまでの方法に比べて収率が良いだけでなく、結晶性の高い最終化合物の精製が、反応抽出液を濃縮して得られる粗結晶をエーテルとヘキサンの混合溶媒で洗浄するだけで行える点で極めて優れた方法である。



(図 1)

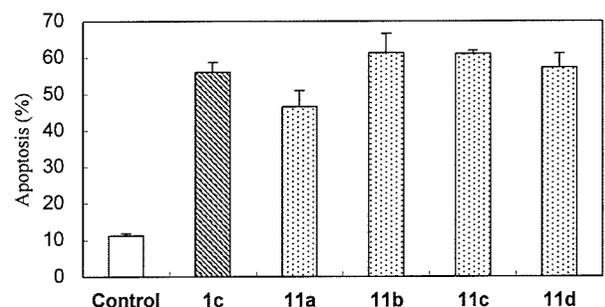
そこで、この方法を応用して、TBS 化ブテノリド (4) とジエナール類 (10a-d) とのアルドール反応を行い、続いて脱水反応と脱保護を行って、末端に様々な複素芳香環を有するポリエン系 γ -ヒドロキシブテノリド (11a-d) を合成することができた。



(図 2)

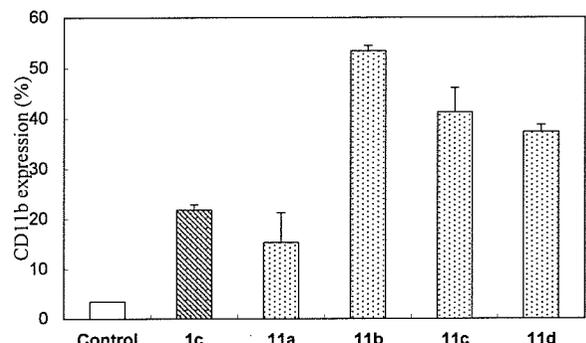
次に、合成した誘導体 (11a-d) の HL-60 に対する抗腫瘍作用を測定した結果、これらはいずれも (1c) に匹敵するアポトーシス誘導作用を示すことが明らかとなった (表 1)。また、これらはいずれも (1c) と同様に単球系への分化誘導作用を示したが、これらのうち、(11b-d) の作用は、(1c) よりもかなり強いことが判明した (表 2)。

(表 1) HL-60 に対するアポトーシス誘導作用

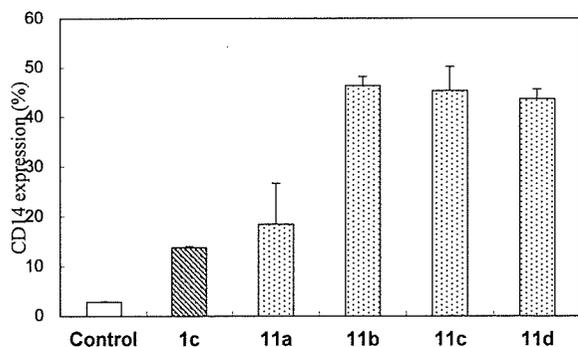


(表 2) HL-60 に対する分化誘導作用

(A) 単球・マクロファージ・顆粒球系



(B) 単球系



D. 考察

前回合成したベンゼン環を持つ γ -ヒドロキシブテノリド (1a-d) の場合、(1c) のみが抗腫瘍作用を示したが、今回合成した複素芳香環をもつ化合物 (11a-d) のすべてに抗腫瘍作用が認められたことから、作用発現には構造全体的な共役系の長さではなく、ブテノリド環と芳香環を繋ぐ共役鎖の長さが重要であることが示唆された。

E. 結論

今回新たに開発した ATPH と LTMP を用いる TBS 化ブテノリド (4) とアルデヒド類とのアルドール反応を経由するポリエン系 γ -ヒドロキシブテノリドの合成法は、様々な複素芳香環を持つ誘導体 (11a-d) の合成にも有用であることを示すことができた。また、これらの抗腫瘍作用を測定した結果、先に報告した (1c) よりも活性の強い化合物があったことから、 β 位に共役鎖を持つ γ -ヒドロキシブテノリドを母核として末端環構造を修飾することは、新たな抗腫瘍化合物の開発へ繋がるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wada A, Mizuguchi Y, Shinmen M, Ito M, Nakagawa K, Okano T: Preparation and Biological Activity of Retinoic Acid Analogs Containing an Aromatic Ring. *Lett Drug Des Discov* 3(2):118-122, 2006

- 2) Hirano T, Fujioka N, Imai H, Kandori H, Wada A, Ito M, Shichida Y: Assignment of the Vibrational Modes of the Chromophores of Iodopsin and Bathiodopsin: Low-Temperature Fourier Transform Infrared Spectroscopy of ^{13}C - and ^2H -Labeled Iodopsins. *Biochemistry* 45(4):1285-1294, 2006

- 3) Furutani Y, Sudo Y, Wada A, Ito M, Shimono K, Kamo N, Kandori H: Assignment of the Hydrogen-Out-Of-Plane and -in-Plane Vibrations of the Retinal Chromophore in the K Intermediate of *pharaonis* Phoborhodopsin. *Biochemistry* 45(39): 11836-11843, 2006

- 4) Mizuguchi Y, Wada A, Nakagawa K, Ito M, Okano T: Antitumoral Activity of 13-Demethyl or 13-Substituted Analogues of All-*trans* Retinoic Acid and 9-*cis* Retinoic Acid in the Human Myeloid Leukemia Cell Line HL-60. *Biol Pharm Bull* 29(9):1803-1809, 2006

- 5) Wada A, Shinmen M, Uenishi J, Ito M: A Novel Synthesis of 2-Substituted Indole Derivatives: A Palladium Catalyzed Cross-coupling Reaction of Enol Triflate Derived from *N*-Methyl-2-Indolone with (Alkenyl) tributylstannane and Acetylene. *Lett Org Chem* 3(11):817-819, 2006

2. プロシーディング

- 1) Wada A, Ohmura T, Tsujita Y, Uenishi J, Ito M: Synthesis of Dihydro- and Tetrahydro-retinoic Acids. *Carotenoid Science* 10:61-63, 2006

3. 学会報告

- 1) 和田昭盛, 大村友泰, 辻田有紀, 伊藤允好: ジヒドロおよびテトラヒドロレチノイン酸類の合成. 日本薬学会第126年会, 2006年3月; 仙台
- 2) 和田昭盛, 王飛, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫, 伊藤允好: 非環式デヒドロお

よびデメチルレチノイン酸類の合成と生物活性. 日本ビタミン学会第 58 回大会, 2006 年 5 月; 徳島

- 3) 和田昭盛, 王 飛, 伊藤允好: A Highly Stereoselective Synthesis of 11Z-3,4-Didehydroretinal. 12th International Conference on Retinal Proteins, 2006 年 6 月; 淡路
- 4) 和田昭盛, 新免正基, 伊藤允好: カルボニル化合物のエノールトリフラートのカップリング反応を利用したレチノイン酸アナログの合成. 第 20 回カロテノイド研究談話会, 2006 年 9 月; 沖縄
- 5) 和田昭盛, 王 飛, 伊藤允好, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫: デメチルゲラニルゲラ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 17 回学術集会, 2006 年 11 月; 東京
- 6) 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: デメチルレチノイン酸類の合成と構造活性相関. 第 25 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2006 年 11 月; 名古屋
- 7) 和田昭盛, 奥山顕義, 伊藤允好, 黒野 定, 松本博行: 重水素標識した (*E*)-4-ヒドロキシ-2-ノネナールの合成とペプチドとの反応. 第 32 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2006 年 12 月; 広島
- 8) 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: シクロヘキセン環を修飾したレチノイン酸類の生物活性. 第 314 回脂溶性ビタミン総合研究委員会, 2006 年 12 月; 熱海

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ES 細胞の神経分化について

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

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 vivo* でもニューロンに分化した。現在、ヒト ES 細胞からもニューロスフェアを誘導する方法を構築し、神経毒性評価システムへの応用を検討している。

A. 研究目的

マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) から神経系前駆細胞/幹細胞 (ニューロスフェア) を誘導する培養法を確立する。また誘導したニューロスフェアを疾患モデル動物に移植して神経の再生を行う。さらに、ヒト ES 細胞や核移植 ES 細胞からのニューロスフェアの誘導を行い、神経毒性評価システムに応用する。

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。この方法を用いて神経幹細胞/前駆細胞 (NS/PCs) を培養する過程で様々な因子 (Noggin, RA, Shh, Wnt3a, BMP4 など) を作用させることで、NS/PCs の時間的・空間的特異性を制御し、様々な領域で生み出されるニューロンやグリア細胞の誘導を行う。

次に誘導した ES 細胞由来ニューロスフェアを野生型および 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) の腰髄に移植し、その *in vivo* における生着および分化能を免疫染色法にて解析する。

また、脊髄損傷モデルマウス (C57/BL6) を作成し、損傷による炎症が収まり、グリア瘢痕を形成する前の損傷後 9 日目に ES 細胞由来ニューロスフェアを移植し、*in vivo* imaging system (IVIS) を用いて細胞の生着および増殖について、組織化学的手法を用いて分化能を、また動物の運動機能の改善について BBB スコアを用いて評価する。

また、将来的な再生医療への応用を念頭に置き、同様の手法を用いて、ヒト ES 細胞からの EB を介したヒト NS/PCs (ニューロスフェア) の誘導を、また免疫学的拒絶反応を回避するために、核移植 ES 細胞からも同様に NS/PCs (ニューロスフェア) の誘導を行う。

(倫理面への配慮)

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、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

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誘導する培養法を確立してきた。この培養法では、最初に形成した一次ニューロスフェアからはニューロンのみが生み出され、一方で継代して得られる二次、三次ニューロスフェアからはニューロンのみならずグリア細胞が生み出された。また、EB 形成時に前脳形成に重要な Noggin または後方化因子であるレチノイン酸 (RA) を様々な濃度で作用させることにより、ニューロスフェアの形成効率を上昇させ、ES 細胞由来 NS/PCs の前後軸に沿った領域特異性を制御することができた。またニューロスフェア形成時に腹側化因子である Sonic hedgehog (Shh) や背側化因子である Wnt3a や BMP4 を添加することで、背腹軸に沿った領域特異性を付与することができた。このような時間的・空間的特異性を制御したニューロスフェアからは、神経管前方腹側の前脳型コリン作動性ニューロンや、脊髄腹側より発生する運動ニューロンなど、様々な領域で生み出されるニューロンが誘導された。

そこで、これらの ES 細胞由来ニューロスフェアの *in vivo* における分化能を検討するため、EGFP で標識した ES 細胞から低濃度 RA を用いてニューロスフェアを誘導し、野生型、および発症前 (約 90 日) の ALS モデルラット (mSOD1 トランスジェニックラット) の腰髄に移植を行った。移植後それぞれ 2 週間、4 週間で還流固定し、免疫染色法により解析したところ、ES 細胞由来の細胞は脊髄内に生着し、NeuN 陽性のニューロンに分化し、また、その一部は Choline acetyl transferase (ChAT) 陽性のコリン作動性ニューロンに分化していた。しかし、移植後の生存期間が短いため運動機能の改善を観察することはできなかった。

そこで、もうひとつの疾患モデルである脊髄損傷モデルマウスへの移植を行った。まず、生きたままで移植細胞を可視化する *in vivo*

imaging system (IVIS) を利用するために、改変型の luciferase (CBR) と蛍光タンパク質である Venus を定常発現する ES 細胞株を樹立した (CAG-CBR-IRES-Venus)。この細胞から低濃度 RA を用いてニューロスフェアを誘導し、脊髄損傷後 9 日目のモデルマウスに移植を行い、手術後 6 週間まで IVIS による解析、および運動機能評価 (BBB スコア) を行った。その結果、ES 細胞由来ニューロスフェアを移植した群では、PBS 注入群に比べて運動機能の改善傾向がみられ、ES 細胞由来 NS/PCs が脊髄損傷の機能的な改善に対し何らかの positive な役割を果たしていると考えられた。

また、京都大学より分与されたヒト ES 細胞を用いて、マウス ES 細胞と同様に胚様体を介したニューロスフェア (神経系前駆細胞) の誘導系を作成している。このヒト ES 細胞由来ニューロスフェアは、継代して二次、三次ニューロスフェアを形成することができ、接着細胞で分化させるとニューロンおよびグリア細胞を生み出した。

さらに、細胞移植治療における免疫学的拒絶反応を回避するために、理化学研究所の小倉博士より核移植 ES 細胞 (ntES 細胞) の供与を受け使用を検討している。ntES 細胞からも通常の ES 細胞とほぼ同様の条件でニューロスフェアの形成を行うことができ、やはり接着培養でニューロンおよびグリア細胞が生み出された。

D. 考察

マウス ES 細胞から高率にニューロスフェアを誘導する培養法を作成した。この培養法では、種々の因子を培養中に添加することにより、時間的・空間的特異性を制御することができ、*in vivo* の中枢神経の発生をよく模倣していることから、中枢神経発生の *in vitro* モデルとして有用であると考えられた。さらに、これらの細胞を野生型及び ALS モデルラットの腰髄に移植したところ、NeuN 陽性、ChAT 陽性のニューロンに分化し、*in vivo* における分化能も示された。

さらに脊髄損傷マウスに移植するとコントロール群と比して運動機能の改善が見られた。これは、神経系疾患において、何らかの機能改善に寄与できる可能性を示唆する結果であった。

また、ヒト ES 細胞、ntES 細胞から *in vitro* におけるニューロスフェアの誘導も行っている。これらは、ヒト細胞を用いたり、さらに免疫学的拒絶反応に対応したりするための重要なツールになると考えられる。

今後は、脊髄損傷マウスにおける機能改善のメカニズムを明らかにすると同時に、ヒト ES 細胞、ntES 細胞からのニューロスフェアの培養法をさらに確立し、またそれらを用いた *in vivo* における実験も進めていく予定である。

E. 結論

マウス ES 細胞から NS/PCs を作成し、時間的・空間的特異性を制御できることを示した。この ES 細胞由来 NS/PCs は *in vivo* でもコリン作動性ニューロンを含むニューロンに分化することができた。また、この細胞を脊髄損傷マウスに移植したところ機能改善を促進した。さらにヒト ES 細胞からも NS/PCs を誘導する培養法を作成している。このような *in vitro* 培養系は様々な疾患の病態解析、薬剤スクリーニング、および神経毒性評価などを *in vitro* で行うためのモデルとして有用であるのみならず、再生医療における移植細胞のドナー細胞として期待される。

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(1):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(2):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(1):119-133, 2006
- 4) Tada H, Ishii S, Kimura H, Hattori H, Okada Y, Suzuki N, Okano HJ: Identification and evaluation of high-titer anti-Sox Group B antibody in limbic encephalitis. *Inflammation and Regeneration* 27(1):37-44, 2007

2. 学会発表

- 1) 岡田洋平, 仲 勇人, 島崎琢也, 岡野栄之: ヒト ES 細胞を用いた研究体験談. 第 1 回ヒト ES 細胞研究交流会, 2006 年 3 月; 京都
- 2) 石井聖二, 岡田洋平, 島崎琢也, 岡野栄之: ストローマ細胞の分泌因子が ES 細胞由来神経系前駆細胞に及ぼす効果. 第 29 回日本神経科学大会, 2006 年 7 月; 京都

G. 知的財産権の出願・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

毒性スクリーニング試験プロトコールの構築

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ール構築を実施した。9種類のヒト細胞の無血清毒性試験系を構築し、確立したプロトコールは1次/2次スクリーニングに使用され、細胞毒性評価に有用な情報を与えた。また Ntera2 細胞からドーパミン作動性神経細胞を効率よく作成するプロトコールの開発に成功した。

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・データベース構築を目標に実施される3段階の毒性スクリーニングシステムの確立を目的とし、今年度は前年度に引き続き、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ール構築を実施した。

B. 研究方法

1) 毒性試験用無血清培地の開発

前年度に検討した4種類の細胞（SH-SY5Y細胞株、Ntera2細胞株、U251細胞株、Jurkat細胞株）に非神経系コントロール細胞として HepG2（ヒト肝臓癌細胞由来）、HeLa（ヒト子宮頸癌由来）の細胞株と3種類のヒト正常線維芽細胞（WI38、NTI-4、Hs68）を加えた合計9種類のヒト細胞を用いて検討を実施した。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。無血清培地として、前年度の培地の改良を試み、血清代替因子（N2 supplement、Invitrogen社）と各種脂質酸およびコレステロールを含む脂質混合添加因子（chemically-

defined lipid concentrate、Invitrogen社）の両方を加えた培地を作成して使用した。また一部の細胞には細胞外基質（EHS-laminin）、増殖因子（EGF、FGF2）、hydrocortisoneを追加添加し、その細胞増殖に及ぼす影響を検討した。5%CO₂存在下37℃で24時間培養し、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。

2) Ntera2細胞からのドーパミン作動性神経細胞の作製

Ntera2細胞の継代時にDMEM/F-12培地、HEPES（最終濃度15μM）、Heparin（最終濃度5μg/ml）、N2 supplement（Invitrogen社）、の無血清培地に置換し、5%CO₂存在下、37℃で3日間培養した。3日経過後に予め回収しておいたPA6細胞の培養上清（GMEM, 10% KSR, 1×Sodium Pyruvate, 1×NEAA, 0.1mM β-mercaptoethanol）

に培地を置き換えゼラチンコートディッシュに播きなおし、以後2日毎にPA6培養上清と交換し3週間培養を続けた。分化誘導の終了した細胞は、4%パラホルムアルデヒド/PBSで室温にて20分固定を行なった後、ブロッキングを行ない、抗 β III tubulin(Tuj1)抗体(1:500; mouse IgG monoclonal, Babco社)、抗tyrosine hydroxylase(TH)抗体(1:500; rabbit polyclonal, CHEMICON社)の2種の1次抗体を含む10%正常ヤギ血清/0.01% TritonX-100/PBSを4℃にて一晩反応させた。反応後、2次抗体(Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG)とTO-PRO-3 iodide(1 μ M, Molecular Probe社)を室温にて1時間反応させた。染色後の観察は共焦点レーザー顕微鏡(LSM510; Carl Zeiss)を用いて実施した。

C. 研究結果

1) 毒性試験用無血清培地の開発(図1)

9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示した。完全無血清状態にN2 supplementと脂質混合添加因子を加えた培地を用いることでNtera2とHeLa以外の細胞は良好な増殖を示した。Ntera2ではN2 supplementと脂質混合添加因子に加え、細胞外基質(EHS-laminin)の添加が細胞増殖に有用であった。一方、HeLaでは増殖因子(EGF、FGF2)、hydrocortisoneの添加によって良好な細胞増殖を得ることができた。3種類のヒト正常線維芽細胞(WI38、NTI-4、Hs68)に関しては、N2 supplementと脂質混合添加因子を加えた無血清培地で概ね良好な増殖を示した。

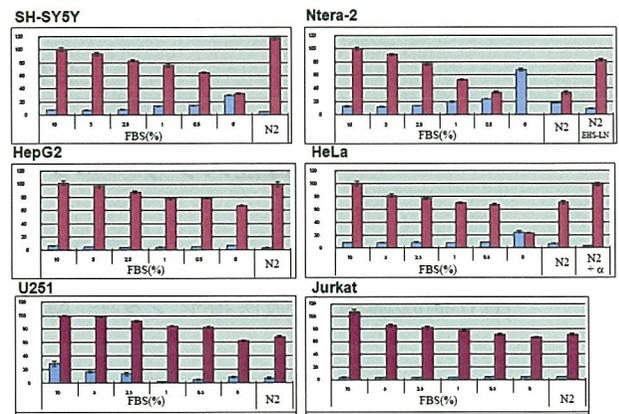


図1: ヒト細胞における血清含有量の違いにおける細胞増殖率の評価
N2: N2 supplement、EHS-LN: EHS-laminin、 α : EGF+FGF2+ hydrocortisone

2) Ntera2細胞からのドーパミン作動性神経細胞の作製(図2)

分化誘導処理後、Ntera2細胞から小さな細胞体に長い突起を有する細胞が分化することが観察された。蛍光免疫染色での解析では、この細胞は β III tubulinとTHを共発現していることが判明し、ドーパミン作動性神経に分化したと判断された。

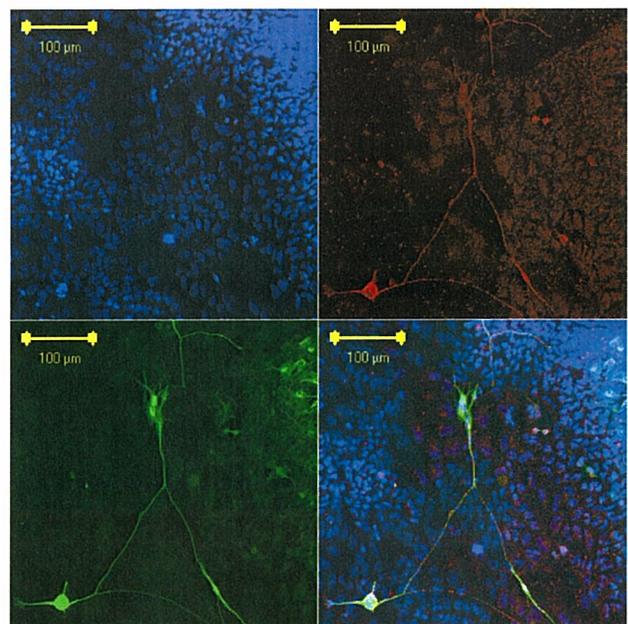


図2: Ntera 2細胞からのドーパミン作動性神経細胞の作製(蛍光免疫染色像)
左上: 核染色(青: TO-PRO-3 iodide)、
左下: β III tubulin(緑)、右上: TH(赤)
右下: 合成像、スケールバー: 100 μ m

D. 考察

毒性試験を実施する際の問題点の一つは試験中の培地に含まれる毒性緩衝物質である。血清に高濃度に含まれるたんぱく質（主にアルブミン）に対する薬剤の結合能は薬剤毎に異なり一様でない。また、血清中には薬剤毒性を修飾する既知・未知因子が存在し、それらすべての影響を考察することは容易でない。このような血清使用に伴う不定の毒性緩衝作用の影響を最低限にした上で多薬剤間の毒性を相互に比較するためには、理想的には無血清状態での毒性試験の実施が望まれる。そこで昨年度に継続してスクリーニングに使用する9種類のヒト細胞の無血清培養に対する耐性を評価した。今年度は昨年度より培地の改良を試みたがその結果、いずれの細胞も無血清培地を用いた培養においても、血清含有培地使用時と比較して大きな差が無い範囲で維持・増殖させることが十分可能であることが判明した。この結果から、無血清培地を用いた毒性試験を一定の精度で実施することは技術的に可能であると判断された。

毒性試験に無血清培地を用いるか血清含有培地を用いるかに関しては、前述の考察以外の事項にも考慮する必要性である。特に、*in vivo* 毒性を *in vitro* 試験の結果から推察するためには、より *in vivo* の環境に近い実験系が有益であり、その観点からは *in vitro* 試験系に一定量の血清成分が存在することは合理的であると考えられる。しかし、神経組織は他の組織と異なり血液脳関門 (BBB) が存在し、血清中のたんぱく質など多くの物質は血液脳関門を通過できず、神経組織内に移行できない。よって、実際の神経組織内の生理的環境により近い実験系はそれらをすべて考慮した上で構築されるものであり、複雑な条件設定が必要であると考えられる。今回開発した無血清培養系および通常の血清含有培養系も厳密にはいずれも生体の生理的環境とは異なるものである。よってこれら2方法に優劣を付けるのでは無く、独立した対等の実験系として取扱い、両者を上手く併用する手法によ

って、薬剤の *in vitro* における細胞毒性情報を取得するプロトコールが有効であると結論づけられた。今年度得られた知見は、実際の1次/2次スクリーニング実施に対し有用な情報を提供し、スクリーニングに貢献することができ、有用であると判断された。

一方、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と考えられるが、今年度の検討で Ntera2 から効率にドーパミン作動性神経細胞を分化誘導させることに成功した。ドーパミン作動性神経は向精神薬や覚醒剤のターゲット細胞として毒性試験では需要の高い細胞の1つである。今年度作成した方法を用いることで、ヒト ES 細胞由来神経細胞を用いたスクリーニングの前段階のスクリーニングをヒト細胞を用いて実施することが可能になると考えられ、最終年度にかけてこの細胞を活用したスクリーニングを展開していきたいと考える。

E. 結論

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ール構築として9種類のヒト細胞の無血清毒性試験系を構築した。確立したプロトコールは1次/2次スクリーニングに使用され、細胞毒性評価に有用な情報を与えた。また Ntera2 細胞から効果的にドーパミン作動性神経細胞を分化誘導させることに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

- 2) 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

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, 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

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

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 μ M でわずかに細胞死を、METH 1mM、DA 4.5 μ M で半数程度に細胞死をきたした。U251MG 細胞は 20 μ M の METH および関連薬剤 5 種類、CATH. a 細胞は METH 0.2mM、1mM、DA 2 μ M、4.5 μ 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 4.5 mM DA と 1 mM 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、30 種以上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のうち、小胞体ストレスに関わる遺伝子 *ddit3* 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。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。

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 DA 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。ま

た妊産婦の乱用が胎児に影響することも懸念されている。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い、METH による依存や毒性の機構を解明する。

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。さらに、両者の比較により想定される METH 毒性機構について、マウス個体を用いた検証も行う。

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 μ M でわずかに細胞死を、METH 1mM、DA 4.5 μ M で半数程度に細胞死をきたした。U251MG 細胞は 20 μ M の METH および関連薬剤 5 種類、CATH. a 細胞は METH 0.2mM、1mM、DA 2 μ M、4.5 μ 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 4.5 mM DA と 1 mM 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、30 種以上の遺伝子発現を検討し、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。そのうちの 하나가、小胞体ストレスに関わる遺伝子 *ddit3* (CHOP) である。*ddit3* は、細胞死を引き起こす濃度の METH によって、薬剤処理後 24~48 時間で特異的に発現誘導された。このことから、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た。

小胞体ストレスを軽減することが知られている化学シャペロンの 4-PBA を前投与したマウスでは、低用量 METH 5 日間連日投与による逆耐性現象および高用量 METH 投与時の自傷行動の減弱が認められた。

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。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。このような解析の結果、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。METH 毒性機構解明の研究の分野において、このような観点からのアプローチはほとんどなされておらず、本研究による一つの成果であるといえる。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。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。このような解析の

結果、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。METH毒性機構解明の研究の分野において、このような観点からのアプローチはほとんどなされておらず、本研究による一つの成果であるといえる。今後はマウス個体を用いた解析を進めるとともに、ヒト由来ドパミン作動性ニューロンを用いた解析も行う必要がある。また、ddit3以外に定量的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も、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トに作用する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, Itsuki Y, Terao Y, Kawabata S, Kamisaki Y: Calcineurin potentiates the activation of procaspase-3 by accelerating its proteolytic maturation. *J Biol Chem*, 2007 Feb 26
- 2) Irie Y, Saeki M, Miya F, Tsunoda T, Kato H, Tsukamoto Y, Tanaka H, Ozono Y, Kanemura Y, Nagai T, Kamisaki Y, Miki N: Toxic dose of methamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic neural cells. submitted

2. 学会発表

- 1) Irie Y, Saeki M, Kamisaki Y, Taira E, Miki N: Functional analysis of novel growth suppressor Amida. 第79回日本薬理学会年会, 2006年3月; 横浜
- 2) Irie Y, Miya F, Tsunoda T, Kanemura Y, Miki N: 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

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
Kasumi H, Komori S, Sakata K, Yamamoto N, Yamasaki T, <u>Kanemura Y</u> , 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
Mori H, Ninomiya K, Kino-oka M, Shofuda T, Islam MO, <u>Yamasaki M</u> , Okano H, Taya M, <u>Kanemura Y</u> .	Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells.	J Neurosci Res	84(8): 1682-1691, 2006
Mori H, Ninomiya K, <u>Kanemura Y</u> , <u>Yamasaki M</u> , 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
Kato T, <u>Kanemura Y</u> , Shiraishi K, Miyake J, Kodama S, Hara M.	Early response of neural stem/progenitor cells after X-ray irradiation in vitro.	NeuroReport	in press
<u>Wada A</u> , Mizuguchi Y, Shinmen M, Ito M, Nakagawa K, Okano T.	Preparation and Biological Activity of Retinoic Acid Analogs Containing an Aromatic Ring.	Lett Drug Des Discov	3(2): 118-122, 2006
Hirano T, Fujioka N, Imai H, Kandori H, <u>Wada A</u> , Ito M, Shichida Y.	Assignment of the vibrational modes of the chromophores of iodopsin and bathiodopsin: low-temperature fourier transform infrared spectroscopy of ¹³ C- and ² H-labeled iodopsins.	Biochemistry	45(4): 1285-1294, 2006

Furutani Y, Sudo Y, <u>Wada A</u> , Ito M, Shimono K, Kamo N, Kandori H.	Assignment of the hydrogen-out-of-plane and -in-plane vibrations of the retinal chromophore in the K intermediate of <i>pharaonis</i> phoborhodopsin.	Biochemistry	45(39): 11836-11843, 2006
Mizuguchi Y, <u>Wada A</u> , Nakagawa K, Ito M, Okano T.	Antitumoral activity of 13-demethyl or 13-substituted analogues of all- <i>trans</i> retinoic acid and 9- <i>cis</i> retinoic acid in the human myeloid leukemia cell line HL-60.	Biol Pharm Bull	29(9): 1803-1809, 2006
<u>Wada A</u> , Shinmen M, Uenishi J, Ito M.	A Novel Synthesis of 2-Substituted Indole Derivatives: A Palladium Catalyzed Cross-coupling Reaction of Enol Triflate Derived from <i>N</i> -Methyl- 2-Indolone with (Alkenyl)tributylstannane and Acetylene.	Lett Org Chem	3(11): 817-819, 2006
<u>Wada A</u> , Ohmura T, Tsujiita Y, Uenishi J, Ito M.	Synthesis of Dihydro- and Tetrahydro-retinoic Acids.	Carotenoid Science	10: 61-63, 2006
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
Tada H, Ishii S, Kimura H, Hattori H, Okada Y, Suzuki N, Okano HJ.	Identification and evaluation of high-titer anti-Sox Group B antibody in limbic encephalitis.	Inflammation and Regeneration	27(1): 37-44, 2007
Saeki M, <u>Irie Y</u> , Ni L, Itsuki Y, Terao Y, Kawabata S, Kamisaki Y.	Calcineurin potentiates the activation of procaspase-3 by accelerating its proteolytic maturation.	J Biol Chem	Feb 26, 2007