

厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

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・タンパク質データベース構築

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金村 米博

平成 20 (2008) 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. ヒト EC 細胞からの効率的なドーパミン作動性神経細胞作製 プロトコールの構築 .....	7
国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究部	山崎 麻美
2. ES 細胞由来神経幹細胞を用いた <i>in vitro</i> 神経毒性評価システムの開発 .....	11
慶應義塾大学 医学部生理学教室	岡野 栄之
3. ヒト ES 細胞由来神経幹細胞/前駆細胞に対する薬剤毒性情報の取得・ データベース化 .....	15
国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究部	金村 米博
4. 依存性薬物の毒性機構に関する網羅的解析 .....	25
岩手医科大学 医学部薬理学講座	入江 康至
5. 3 位置換インデン環を有するレチノイン酸類の合成と薬理作用 .....	29
神戸薬科大学 生命有機化学研究室	和田 昭盛
6. 神経幹細胞/前駆細胞に対する <i>all-trans</i> retinoic acid の細胞毒性に 関連する遺伝子の検索 .....	33
国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究部	金村 米博
理化学研究所 遺伝子多型研究センター	角田 達彦
7. マイクロアレイを用いた薬物応答性の薬効・毒性関連遺伝子の 網羅的解析法の開発とその解析 .....	43
理化学研究所 遺伝子多型研究センター	角田 達彦

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	49
---------------------------	----

平成 19 年度 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

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
	岡野 栄之	慶應義塾大学 医学部生理学教室	教 授
	和田 昭盛	神戸薬科大学 生命有機化学研究室	教 授
	入江 康至	岩手医科大学 医学部薬理学講座	講 師
	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	副院長 室 長
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（創薬基盤推進研究事業）  
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神経毒性関連遺伝子・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。

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。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。

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。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、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。

5) 倫理面への配慮

研究に使用したヒト ES細胞由来ヒト神経幹細胞/前駆細胞（以下、hES-NS/PCs）は分担研究者の岡野らによって慶応義塾大学医学部生理学教室で作成された。慶応義塾大学医学部でのヒト ES細胞の使用計画は文部科学省の「ヒト ES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、「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」（平成19年10月31日）として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。大阪医療センターへのhES-NS/PCsの持ち込みおよびそれを用いた研究に関しては、大阪医療センター医学倫理委員会の承認の元、実施された（課題名：ヒト ES細胞由来神経幹細胞の生物学的特性の解明とその操作技術の開発、及びそれを応用した各種化合物の作用・毒性スクリーニングシステムの開発、受付番号93、承認日：平成19年8月6日）。また、hES-NS/PCsに由来するトランスクリプトーム解析に関しては、独立行政法人理化学研究所倫理委員会承認の元、実施された。

## C. 今年度の研究成果

### 1) 安全性評価用基準神経系細胞の確立

#### ①ヒト EC 細胞からの効率的なドーパミン作動性神経細胞作製プロトコルの開発

山崎は、ヒト EC 細胞（胚性癌細胞）の Ntera2 細胞からの効率的なドーパミン作動性神経細胞作製法の開発を実施した。レチノイン酸および無血清培地を組み合わせた 3 種類の 3 日間の分化誘導プロトコルに連続して PA6 細胞の培養上清を用いた 18 日間の培養を行なう合計 21 日間の分化誘導法を用いた検討の結果、無血清培地を使用して neurosphere 様の浮遊性細胞凝集塊形成を組み込んだ分化誘導法によって 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。

#### ②ES 細胞からの各種神経細胞分化の開発

岡野は、ES 細胞から神経幹細胞/前駆細胞 (NS/PCs) を含む neurosphere を誘導する技術の開発を実施した。開発した技術を用いてマウス ES 細胞から作成した NS/PCs は ALS モデルラット (SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックラット) に移植すると *in vivo* での生着と分化が見られ、さらに脊髄損傷モデルマウスに移植したところ、*in vivo* でやはりニューロンおよびグリア細胞に分化し運動機能の回復に貢献することが確認された。本技術を応用して、京都大学再生医科学研究所で樹立されたヒト ES 細胞 (KhES-1) から hES-NS/PCs の作成に成功し、それを用いた薬剤応答性試験の実施に貢献した。

### 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、7 種類のヒト株化細胞および岡野が作製に成功した hES-NS/PCs を用いて、前年度までに実施した 1 次・2 次スクリーニング解析で選定された薬剤を中心に、神経系細胞に対する細胞毒性の出現が予測される 5 薬剤 (ATRA, Thioridazine-HCl, AraC, Nimustine-HCl, Vincristine) の hES-NS/PCs における薬剤応答性試験を実施した。その結果、5 薬剤はいずれも

hES-NS/PCs に対して細胞毒性を有し、とりわけ 3 種類の抗がん剤は各種ヒト株化細胞における毒性濃度の 10 倍以上の低濃度域で hES-NS/PCs に対して強い細胞毒性を示すことを明らかにした。

### 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

#### ①Psychostimulant 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をモデル細胞のマウス DA 作動性神経細胞 CATH.a とマイクロアレイを使用して解析した。その結果、METH 細胞死特異的に発現調節される遺伝子として、小胞体ストレスに関わる遺伝子 ddit3 (CHOP)、Grp78、細胞死に関わる遺伝子 BAX、Amida/tfpt を同定した。小胞体ストレスに関わる遺伝子 ddit3 の発現上昇とマウス個体を用いた解析から、METH の毒性機構に小胞体ストレスが関与することを明らかにした。一方、細胞死に関わる遺伝子 BAX、Amida/tfpt も発現誘導され、これら遺伝子が METH の毒性機構に関わることを明らかにした。

#### ② 3 位置換インデン環を有するレチノイン酸類の合成と薬理作用の解析

和田は、2-インダノンから誘導した 3 位に置換基を持つエノール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をインデン環に変えた 9 シス-レチノイン酸類を合成し、MG-63 細胞を用いて RARE および RXRE の転写活性を検討した。その結果、インデン環上に置換基がはいるとその大きさに関係なく、転写活性が大きくなることを明らかにし、レチノイン酸アナログの作用メカニズムを解明した。

#### ③神経幹細胞/前駆細胞に対する all-trans retinoic acid の細胞毒性に関連する遺伝子の検索

金村と角田は、all-trans retinoic acid (ATRA) が細胞毒性濃度域でマウス神経幹細胞/前駆細胞の及ぼす影響を解析するため、薬剤投与後の遺伝子発現情報をマイクロアレイを用いて取得・解析し

た。その結果、神経幹細胞/前駆細胞に対して細胞毒性を示す高濃度 ATRA は、神経分化関連遺伝子の異常な発現変動とアポトーシス誘発を同時に引き起こすことを明らかにし、ATRA の細胞毒性の分子メカニズムを明らかにした。

#### ④ SELDI-TOFMS を用いた hES-NS/PCs の細胞毒性関連タンパク質の解析

金村は、3種類の抗がん剤(AraC, Nimustine-HCl, Vincristine) のよって引き起こされる細胞毒性 hES-NS/PCs のタンパク質発現変動を SELDI-TOFMS を用いて解析し、細胞毒性に関連して変動した9種類のタンパク質を同定することに成功した。その9種類のタンパク質の発現パターンを抗がん剤間で相対的に比較検討した結果、AraC と Nimustine-HCl は類似の発現パターンを示したのに対して、Vincristine はコントロールとも異なる独自の発現パターンを示すことが明らかにし、各種薬剤が hES-NS/PCs に及ぼす細胞毒性の類似性、相違性を SELDI-TOFMS を応用してタンパク質レベルで簡便にスクリーニングすることが可能であることを証明した。

#### 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

角田は、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析と数理統計学的手法を駆使した評価システムの作製を目的とし、これまで作製してきた発現解析およびパスウェイ解析のハイスループットスクリーニングシステムを実際に稼働させ、hES-NS/PCs を含む複数のヒト細胞種における複数の薬剤応答性試験データの収集を実施し、そのデータを含めた多量のトランスクリプトーム解析データよりなる薬剤応答遺伝子データベースを作製するに至った。その結果、細胞種や薬剤種により細胞応答が異なることを確認し、ヒト ES 細胞由来の hES-NS/PCs においても独自の薬剤への応答感受性濃度が存在することを明らかにした。また、hES-NS/PCs を含めた各種のヒト細胞種における様々な薬剤への応答を網羅的に解析

し、そのトランスクリプトームデータベースを構築した。また同時に、薬剤応答性試験と相互に比較可能なデータベースとして、ヒト各種組織での網羅的転写産物解析を行い、データベースを構築すると共に、そのデータを公共データベースである NCBI の GEO (Gene Expression Omnibus) にて公開した (GSE8124; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。

#### D. 考察

##### 1) 安全性評価用基準神経系細胞の確立

最終年度である今年度の最大の成果は、ヒト ES 細胞から神経幹細胞/前駆細胞 (hES-NS/PCs) を作成して薬剤応答性試験に使用することに成功したことである。ヒト ES 細胞に由来する正常神経系細胞を応用した薬剤応答性試験系の構築に関する報告は国内からはほとんど無く、その観点からは今年度の解析結果は本研究プロジェクトの大きな成果の1つであると考えられる。しかし同時に、事前に予測されたヒト ES 細胞由来細胞の使用に際する倫理面での対応の難しさに加えて、技術面での問題として、最新の培養技術を使用してもヒト ES 細胞由来の神経系細胞を一定量作成して、多種多様な薬剤応答性試験に応用することはまだ容易でないことが実際にヒト ES 細胞由来分化細胞を取り扱って初めて判明した。その最大の理由の1つとして、hES-NS/PCs の増殖力は必ずしも高くなく、hES-NS/PCs を十分量まで安定的に増やし、各種アッセイに使用することは非常に困難なプロセスであったことが挙げられる。

ES 細胞を分化誘導させて作成することができる神経系分化細胞としては、神経幹細胞/前駆細胞、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、薬剤に対する応答性も異なることが予測される。よって研究計画立案段階では、ヒト ES 細胞から各種ヒト分化細胞を作成して、各種薬剤応答性試験を展開することを計画し、それに必要な基礎的技術開発を18年度までに終了した。しかし、hES-NS/PCs の増殖

力は予想外に小さく、当初計画のすべてをヒト ES 細胞由来細胞を使用して実施することは技術的にも時間的にも困難であることが判明し、使用する細胞に優先順位を付けて研究を実施する必要があるとの結論に至った。その結果として、薬剤毒性に関する知見が乏しく未知の部分が多い hES-NS/PCs を用いた薬剤応答性試験を優先的に実施した。また現状、取り扱いが難しいヒト ES 細胞由来分化細胞を用いる解析を補完する技術として、ヒト EC 細胞に由来する神経系分化細胞を作成する技術の開発にも成功した。これら3年間の研究成果の総和として、今回の研究プロジェクトにおいて、ヒト ES 細胞由来神経系細胞を核にして、多種多彩なヒト神経系細胞を複合的に使用した多面的な薬剤応答性試験を展開する技術体系を構築できたと結論づけられる。

以上の成果から、ヒト正常神経系細胞を用いた薬剤応答性試験の実施を想定した安全性評価用基準神経系細胞の確立という点において、十分な成果を上げることができたと考える。

## 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

今年度は、hES-NS/PCs に対する各種薬剤の毒性に関する情報を取得することに成功した。解析ができた薬剤は5種類であるが、前項で指摘した hES-NS/PCs 培養が困難である事、さらに前年度までに実施した1次・2次スクリーニングの結果を基礎に神経系細胞に毒性が見られる薬剤を事前に十分に選別して最終薬剤応答性試験を実施した事、などを考慮すると、科学的にも臨床的にも有益な情報として提供できる結果を出せたものと考えられる。得られた成果から、ヒト細胞種や薬剤種により細胞応答性が異なることが確認され、ヒト ES 細胞由来の hES-NS/PCs においても他の細胞と異なる独自の薬剤への応答感受性濃度が存在することが明らかになった。特に中枢神経腫瘍の治療の臨床標準薬である薬剤を含む各種抗がん剤が hES-NS/PCs に対して高い細胞毒性を有するという知見は、過去にほとんど報告が無く、ヒ

ト ES 細胞由来細胞を用いた解析によって初めて知り得た情報として、価値あるものと考えられた。

以上の成果から、正常神経系細胞に対する薬剤毒性情報の取得・データベース化を行うという当初の計画に対して、満足いく成果を上げることができたと考える。

## 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

最終年度はマイクロアレイおよびプロテインチップを用いて各種薬剤の毒性関連遺伝子・タンパク質情報の取得を本格的に実施し、解析した。特に、依存性薬剤の代表であるメタンフェタミン、催奇性を有する薬剤の1つのレチノイン酸誘導体の細胞毒性のメカニズムに関しては分子レベルまでの詳細な解析を加えることができた。その結果、これら薬剤の細胞毒性には、アポトーシス誘導、細胞分化プロセスの障害、小胞体ストレスなどが関与することを明らかにすることができた。

また、プロテインチップ (SELDI-TOFMS) を用いたタンパク質レベルでの細胞毒性評価が、簡便な毒性スクリーニングシステムとして有益であることを明らかにした。SELDI-TOFMS で得られる情報はタンパク質の分子量情報のみであり、この手法単独で具体的なタンパク質名の同定にまで至ることは困難であり、その後の詳細な解析の展開という点では遺伝子名まで同定可能なマイクロアレイ解析には劣ると考える。しかし比較的少ないサンプルで短時間での解析が可能であり、薬剤による細胞毒性の類似性、相違性を1次的にスクリーニングする手法としては低コストで簡便な手法であると考えられる。今後、新薬開発などの現場で、既存薬剤との薬剤応答性の比較試験を実施する際、有用な解析手法になり得ると考えられる。今回得られた成果は、そのレファレンスの1つになるものであり、有益な情報が得られたと考える。

以上の成果から、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の点においては、これら得られた知見は

今後、既存薬の神経毒性評価や新薬開発プロセスにおいて各薬剤の細胞毒性の分子メカニズムを評価するための基礎的知見と成り得るものであり、当初の計画に対して、価値ある成果を上げることができたと考える。

#### 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

本年度構築に成功した、①hES-NS/PCsを含む複数のヒト細胞種における複数の薬剤応答性に関するトランスクリプトームデータベース、②ヒト組織トランスクリプトームデータベース、はいずれもヒト細胞・組織を使用したデータベースであり、従来には無い、貴重な情報であると考えられる。またいずれのデータベースも公共データベースへの公開を前提に構築しており、研究成果の社会還元のため、十分貢献できる成果であり、当初の計画に対して、十分な成果を上げることができたと考える。

#### 5) 今後の方向性

近年の知見から、成体脳には神経幹細胞が生涯を通じて保持され、これら内在性の神経幹細胞からの神経新生は成体脳において重要な機能を有すると考えられている。しかし神経細胞やグリア細胞に対する各種薬剤の作用・毒性に関する情報量と比較して、これら内在性神経幹細胞、とりわけヒト神経幹細胞に対する各種薬剤の作用・毒性に関しては十分な知見が報告されておらず、研究展開も不十分である。本プロジェクトで使用したhES-NS/PCsは生体脳内に存在する内在性ヒト神経幹細胞のモデル細胞と成り得る細胞であり、今後の創薬研究の新しいターゲット細胞の1つになることが予測される。今回の研究プロジェクトによって得られたhES-NS/PCsの各種薬剤に対する応答性に関する基本情報とデータベースは、将来の内在性ヒト神経幹細胞に対する薬剤開発プロセスの発展に大きく貢献できるものと考えられる。

また、構築されたhES-NS/PCsを用いた薬剤応答性評価試験の技術体系は、近年開発された人工多能性幹細胞(iPS細胞)を応用した創薬研究への応用も十分可能なものであり、今後、ヒトiPS細胞を応用した創薬研究の加速と発展にも大きく貢献できるものと考えられる。

#### E. 総括

ヒトES細胞由来神経系細胞(hES-NS/PCs)を用いて薬剤応答性評価試験を実施するための技術体系を確立し、hES-NS/PCsを含む複数のヒト細胞種における複数の薬剤応答性に関するデータベースならびにトランスクリプトームデータベースの構築に成功した。得られた成果は、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有益なもので、最終的に研究プロジェクトの当初目標を達成できたものと結論づけられる。

#### F. 健康危険情報

なし



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

## ヒト EC 細胞からの効率的なドーパミン作動性神経細胞作製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、ヒト EC 細胞（胚性癌細胞）の Ntera2 細胞からの効率的なドーパミン作動性神経細胞作製法の開発を実施した。レチノイン酸および無血清培地を組み合わせた 3 種類の 3 日間の分化誘導プロトコールに連続して PA6 細胞の培養上清を用いた 18 日間の培養を行なう合計 21 日間の分化誘導法を用いた検討の結果、無血清培地を使用して neurosphere 様の浮遊性細胞凝集塊形成を組み込んだ分化誘導法によって NT2 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。今年度検討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補助スクリーニングを NT2 細胞由来神経細胞を用いて実施することが可能になると結論づけられた。

## 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効率的な使用方法の検討の一つとして、ヒト EC 細胞（胚性癌細胞）の Ntera2 細胞（以下 NT2 細胞）からの効率的なドーパミン作動性神経細胞作製法の開発を実施した。

## B. 研究方法

## 1) NT2 細胞からのドーパミン作動性神経細胞の作製（図 1）

NT2 細胞の維持培養は血清含有培地（DMEM, 10%ウシ胎児血清）を用いて実施した。細胞継代後、最初の 3 日間は以下の 3 つのプロトコールを用いて分化誘導を実施した。

プロトコール 1：レチノイン酸（RA;10 $\mu$ M）を含む培地で 5%CO<sub>2</sub>存在下、37 $^{\circ}$ C で 3 日間単層培養した。

プロトコール 2：無血清培地（Sph;DMEM/F-12, 15 $\mu$ M HEPES, 5 $\mu$ g/ml heparin, N2 supplement）に培地を置換し、5%CO<sub>2</sub>存在下、37 $^{\circ}$ C で 3 日間培養し、浮遊細胞塊を形成させた。

プロトコール 3：無血清培地（Sph）に置換し、5% CO<sub>2</sub>存在下、37 $^{\circ}$ C で 1 日間培養し浮遊細胞塊を形成させた。その後、培地中にレチノイン酸（RA;1 $\mu$ M）を添加し、さらに 2 日間培養した。

培養開始後 4 日目に、予め回収しておいた PA6 細胞の培養上清（PA6-CM：GMEM, 10% KSR, 1 $\times$ Sodium Pyruvate, 1 $\times$ NEAA, 0.1mM  $\beta$ -mercaptoethanol）に培地置換し、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-CM を交換し 3 週間培養を続けた。コントロールとして、PA6-CM に培地置換した後、21 日間培養した細胞を使用した。

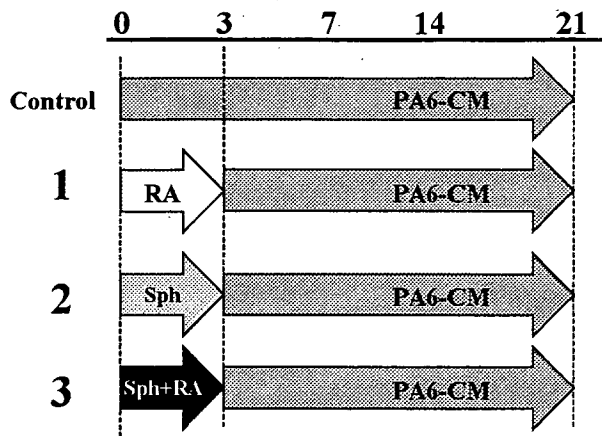


図1：NT2細胞の分化誘導プロトコール

## 2) 免疫細胞染色

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  $\beta$  III tubulin(Tuj1) 抗体 (1:500; mouse IgG monoclonal, Babco 社)、抗 tyrosine hydroxylase(TH) 抗体 (1:100; 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°C 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  $\mu$ 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。

## 3) 定量的 RT-PCR

分化誘導後 1, 4, 7, 11, 14, 18 日、および分化誘導前のコントロール細胞から total RNA を抽出し (RNeasy Kit, QIAGEN 社)、SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen 社) を使用して逆転写反応を行い cDNA を作成した。それをテンプレートとして Power SYBR® Green PCR Master Mix 試薬 (Applied Biosystems 社) と Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システムを用い、定量的 RT-PCR 法を用いて分化関連遺伝子の発現量を解析した (表 1)。遺伝子発現量は、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子を内在性コントロールとして比較 Ct 法を用いた相対的定量により算出した。

Gene	Official Full Name	RefSeq Transcript ID	Primer Set
POU5F1	POU class 5 homeobox 1	NM_002701	F ctctcgcagaagtggggaggaa R ctgcagtgagggttccggca
NANOG	Nanog homeobox	NM_024865	F gcagaagccctgcaccta R ggttccagtcgggttcc
SOX1	SRY (sex determining region Y)-box 1	NM_005986	F agcagttgttctggaagagctgt R aggccttatccggactaa
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	NM_003106	F atgcacgcctacgacgtga R ctittgcaaccctccattt
TH	tyrosine hydroxylase	NM_199292	F gtaagcagaaccggggaggtg R ggtaactctggtctgtaggg
SLC6A3	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3	NM_001044	F catctctctggcgacct R gccgctgcaaatggt
DDC	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	NM_001082971	F gccagaacgtttgagaca R agtgggaagtagccgaaga
DBH	dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monooxygenase)	NM_000787	F aaaccgacccgctcaa R cggcttctctggtagtaaaa
TUBB3	tubulin, beta 3	NM_006086	F aacacagggccatccaggag R ctggggccctgggctcga
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_006086	F ccacttgcacagcttctct R tctctctcttctctctct

表 1：定量的 RT-PCR に使用したプライマーセット

## C. 研究結果

### 1) NT2 細胞からのドーパミン作動性神経細胞の作製 (図 2)

コントロール並びにプロトコール 1 を用いた分化誘導では、NT2 細胞は接着状態のまま分化したのに対し、プロトコール 2 及び 3 を用いた分化誘導では Sph 培地を使用時、細胞は neurosphere 用の浮遊性細胞凝集塊を形成し、その後に PA6-CM を用いた培養過程で接着状態に移行して分化した。21 日間の分化誘導後、コントロール (図 2 A,E) と比較していずれのプロトコールを用いた分化誘導においても細胞数が多い  $\beta$  III tubulin 陽性細胞コロニーが出現する傾向を認めた。しかしそのコロニー形態には差異が見られ、特に RA の使用の有無によってコロニー形態が異なる現象が観察された (図 2)。RA を使用したプロトコール 1 (図 2 B,F) 及びプロトコール 3 (図 2 D,H) において、 $\beta$  III tubulin 陽性細胞コロニーを形成する細胞はコロニー中心部から外側へ分散して位置する傾向があり、かつその神経突起は比較的短いものに対して、プロトコール 2 においては、 $\beta$  III tubulin 陽性細胞は比較的細胞密度の高いコロニーとして存在し、かつ長い神経突起を伸ばす細胞が多く観察された (図 2 C,G)。

一方、TH 陽性細胞コロニーの形態もプロトコール間で差異が見られ、浮遊性細胞凝集塊形成を行なわないコントロール、プロトコール 1 に比較し、浮遊性細胞凝集塊形成プロセスを経たプロトコール 2 および 3 においては、高い細胞密度を有

する TH 陽性細胞コロニーが観察された。

2) NT2 細胞の分化過程における遺伝子発現様式 (図3)

コントロールを含むいずれのプロトコルを用いた分化誘導においても、ES 細胞や EC 細胞で高発現する遺伝子である POU5F1 (Oct-4)、NANOG の発現が分化誘導後早期から大幅に発現減少することが判明した。一方、神経分化の指標の1つである SOX1 発現は、プロトコル1以外の3つの方法において、分化誘導開始後の時間経過に合わせて上昇を示した。SOX2 の発現は、プロトコル1では分化誘導開始後に発現低下し

た後は上昇せず、逆にプロトコル3では分化誘導の時間経過に合わせて軽度増加傾向を認めた。他の2つのプロトコルでは分化誘導の全期間を通じて著明な変動は観察されなかった。

神経細胞の分化マーカー発現に関しては、プロトコル2及び3においては、分化誘導開始後の時間経過に合わせて  $\beta$  III tubulin (TUBB3) の発現上昇に加えて、ドーパミン作動性神経で発現が見られる TH、DDC 及び SLC6A3 (ドーパミントランスポーター) の発現上昇が認められた。一方、DBH はプロトコル3においては一定の上昇を見たが、他の3つの方法では著明な上昇は観察されなかった。

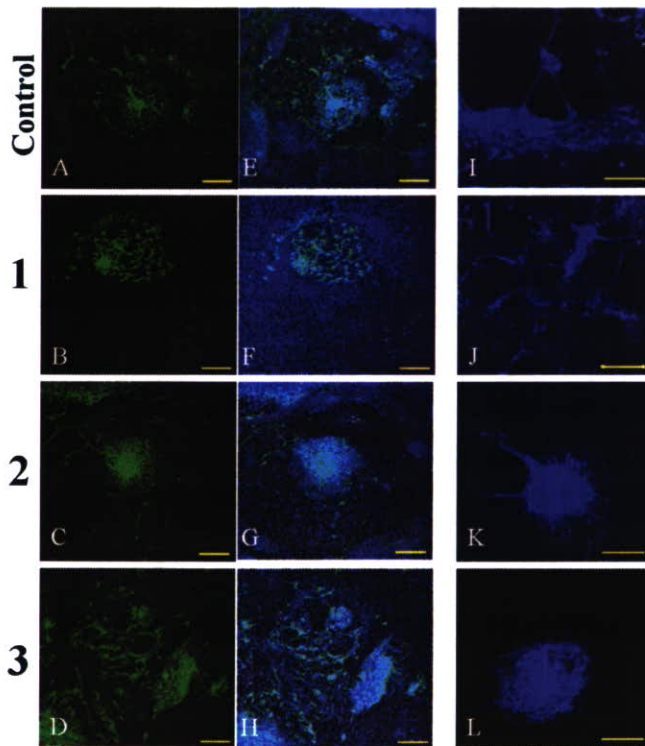


図2 : NT2 細胞からのドーパミン作動性神経細胞の作製 (蛍光免疫染色像)

A~D)  $\beta$  III tubulin, E~H)  $\beta$  III tubulin (緑) + 核染色 (青: TO-PRO-3 iodide), I~L) TH (青)  
1~3: プロトコル番号,  
スケールバー : 200 $\mu$ m (A~H)、100 $\mu$ m (I~L)

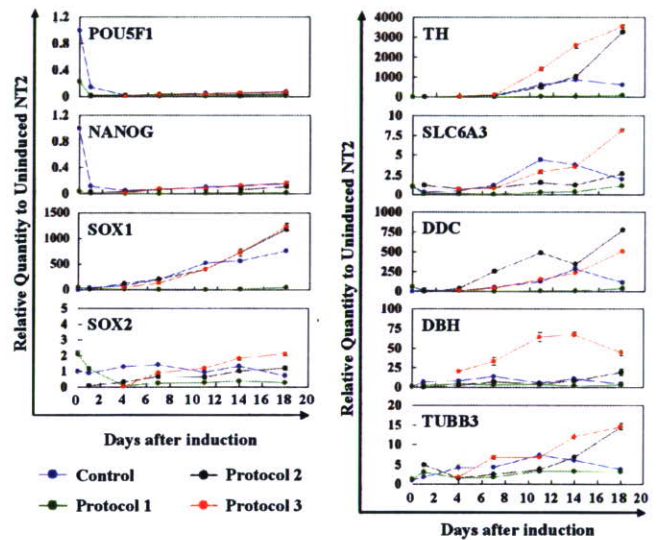


図3 : NT2 細胞の分化誘導開始後の遺伝子発現変動

## D. 考察

前年度及び今年度の検討の結果、ヒト EC 細胞の NT2 細胞から効率的にドーパミン作動性神経細胞を分化誘導させることが可能であることが判明した。特に分化誘導の初期に無血清培地を使用して neurosphere 様の浮遊性細胞凝集塊を形成させた後に分化誘導させるプロトコール 2 及び 3 の方法は TH 陽性細胞への高い分化効率を得られる優れた方法であると考えられた。一方、NT2 細胞の分化誘導に一般的に使用される RA は、一定の神経分化誘導作用を有するが、単独での使用では他の方法と比較して必ずしも神経細胞への分化誘導効率は高く無く、神経細胞以外の細胞への分化が平行して誘導されている可能性があり、分化誘導後の細胞を毒性評価試験に使用する上では注意が必要であると考えられた。

ヒト ES 細胞から神経幹細胞および神経細胞を作製する技術の報告は既に存在する。しかしいずれの手法を用いるにしても、現状、大量の正常ヒト神経系細胞をヒト ES 細胞から作製する事は技術的にも倫理的にも困難であり、ヒト ES 細胞由来細胞単独で意味ある毒性評価試験を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、其の前段階に細胞入手が容易で、使用しやすい株化細胞を用いたスクリーニング系を補助的に効果的に併用する手法は有益であると考えられる。ま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神経毒性試験では需要の高い細胞の 1 つである。今年度検討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補助スクリーニングを NT2 細胞由来神経細胞を用いて実施することが可能になると結論づけられた。

## E. 結論

無血清培地を使用して neurosphere 様の浮遊性細胞凝集塊形成を組み込んだ分化誘導法によって NT2 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, Kanemura Y, Yamasaki M, Kino-oka M, Taya M: Image cytometry for analyzing regional distribution of cells inside human neurospheres. J Biosci Bioeng 103(4): 384-387, 2007

### 2. 学会発表

- 1) 森 英樹, 正札智子, 山崎麻美, 金村米博: ヒト神経幹細胞/前駆細胞の neurosphere 形成が及ぼす増殖促進効果. 第 5 回幹細胞シンポジウム, 2007 年 5 月; 淡路
- 2) 金村米博, 正札智子, 山本篤世, 森 英樹, 岡野栄之, 山崎麻美: ヒト神経幹細胞/前駆細胞およびその分化細胞における遺伝子発現特性の検討. 第 5 回幹細胞シンポジウム, 2007 年 5 月; 淡路
- 3) Kanemura Y, Shofuda T, Yamamoto A, Mori H, Okano H, Yamasaki M: Gene expression profiling of human neural stem/progenitor cells and analysis of genes involved in differentiation. 5th ISSCR Annual Meeting, June 2007; Cairns, Queensland, Australia
- 4) 森 英樹, 正札智子, 山崎麻美, 金村米博: ヒト神経幹細胞/前駆細胞の neurosphere 形成過程の解析. 第 25 回日本ヒト細胞学会学術集会, 2007 年 8 月; 東京
- 5) 森 英樹, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 山崎麻美, 金村米博: ヒト神経幹細胞の分化率の評価. 第 59 回日本生物工学会大会, 2007 年 9 月; 東広島
- 6) 森 英樹, 山崎麻美, 金村米博: ヒト神経幹/前駆細胞の密度がニューロン分化に及ぼす影響. 第 7 回日本再生医療学会総会, 2008 年 3 月; 名古屋

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ES 細胞由来神経幹細胞を用いた *in vitro* 神経毒性評価システムの開発

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し、ALS モデルラット (SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックラット) に移植すると *in vivo* での生着と分化が見られたが、さらに、脊髄損傷モデルマウスに移植したところ、*in vivo* で、やはりニューロンおよびグリア細胞に分化し、また運動機能の回復が見られた。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、神経再生や、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

これまでの研究で、胚性幹細胞 (ES 細胞) から誘導した、発生早期の、運動ニューロンをも生み出すことのできる特異性を持つ神経系前駆細胞/幹細胞 (ニューロスフェア) を、発症直前の ALS モデルラットの脊髄に移植すると、生着し、*in vivo* でコリン作動性ニューロンに分化し得ることを示してきた。しかし、このモデルにおいては、十分な生存期間が得られず、機能回復までには至らなかった。そこで、この ES 細胞由来ニューロスフェアを脊髄損傷モデルマウスに移植し、*in vivo* における分化能、および運動機能改善へ寄与し得るかどうかを評価する。さらに、ヒト ES 細胞や iPS 細胞からのニューロスフェアの誘導を行い、*in vitro* における薬剤スクリーニングや毒性評価へ応用する。

### 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ことができる。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る。また、EB 形成時に後方化因子であるレチノイン酸 (RA) を低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、さらに後方化させた NS/PCs を誘導することができる。これまでの研究で、この発生早期の特異性を持ち、運動ニューロンをも生み出すことのできる一次ニューロスフェアを ALS モデルラットの脊髄に移植すると、生着し、コリン作動性ニューロンに分化しうることを示してきたが、運動機能の回復までは観察することができなかった。

そこで、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、低濃度 RA を作用させて作成した、主にニューロンを生み出す一次ニューロスフェア、またニューロンおよびグリア細胞を生み出す二次ニューロスフェアを移植し、

細胞の生着について *in vivo* imaging system (IVIS)、分化および動物の運動機能の改善について免疫組織化学、および BBB スコアを用いて評価を行う。

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 19 年 10 月 31 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、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

まず、生きたままで移植細胞を可視化するための *in vivo* imaging system (IVIS) を利用するために、改変型の luciferase (CBR/luc) と蛍光タンパク質の Venus を定常発現する ES 細胞株を樹立した (CAG-CBR/luc-IRES-Venus)。この細胞から低濃度 RA を用いてニューロンを主に生み出す一次ニューロスフェア、ニューロンおよびグリア細胞を生み出す二次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し、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) を行い、さらに組織学的評価を行った。IVIS を用いた解析では、一次ニューロスフェア、二次ニューロスフェアを移植した群において、それぞれ、最初の 1 週間で生着細胞数は減少するものの、6 週間には、約 20% 程度の細胞が生着し、異常な腫瘍性の増殖は見られなかった。また、組織学的解析においては、二次ニューロスフェアを移植した群では、一次ニューロスフェア移植群に比べて *in vivo* においてもグリア細胞への分化傾向が強く見られ、さらに、PBS 注入群や一次ニューロスフェア移植群に対し、脊髄の萎縮や脱髄の程度が軽減し、5-HT 陽性ファイバーが多く見ら

れた。さらに、BBB スコアを用いた運動機能解析では、二次ニューロスフェア移植群において優位な機能改善がみられた。これらの結果は、ES 細胞由来 NS/PCs、特に、そこから生み出されるグリア細胞が脊髄損傷の機能的な改善に対し 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) の誘導系を作成した。このヒト ES 細胞由来ニューロスフェアは、継代して二次、三次以降の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神経系の細胞 (主にニューロン) を生み出し、電気生理学的解析により、機能的なニューロンであることが示された。

今後は、さらにヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いて、同様に神経系細胞の誘導を行っていく予定である。

### D. 考察

マウス ES 細胞から誘導した主にニューロンを生み出すニューロスフェアと、ニューロンおよびグリア細胞を生み出す二次ニューロスフェアを脊髄損傷マウスに移植すると、二次ニューロスフェアを移植した群において、脊髄の萎縮や脱髄の程度が減少し、さらに運動機能の改善が見られた。これは、ES 細胞由来 NS/PCs の細胞移植が、神経系疾患において機能改善に寄与できることを示す結果であった。また、疾患や損傷における神経再生において、特にグリア細胞が、その機能改善に大きな役割を果たしている可能性を示唆していた。

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 細胞由来ニューロスフェアの性質をさらに解析し、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。

また、ES 細胞で培ってきた技術を、iPS 細胞に応用し、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞が誘導できれば、様々な疾患における患者ベースの薬効評価、

神経毒性評価などの、オーダーメイド医療につながると考えられ、今後、ヒト iPS 細胞を用いた研究が重要になってくると考えられる。

## E. 結論

マウス ES 細胞から誘導したニューロスフェアを脊髄損傷マウスに移植したところ機能改善がみられた。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た。このような *in vitro* 培養系はさらにヒト iPS 細胞へ応用していくことで、様々な疾患の病態解析、および薬剤スクリーニング、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、あるいは、オーダーメイド医療への応用が期待される。

## 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.-i, 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, 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/前駆細胞の時間的・空間的特異性制御. 第 28 回日本炎症再生医学会, 2007 年 8 月; 東京
- 2) 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/前駆細胞の時間的・空間的特異性制御. 第 25 回日本ヒト細胞学会, 2007 年 8 月; 東京
- 3) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Koizumi A, Enoki R, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H: Four-dimensional recapitulation of central nervous system development by ES cell-derived neural stem/progenitor cells. CDB Joint forum, September 2007; Kobe
- 4) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: Four-dimensional recapitulation of developing central nervous system by ES cell-derived neural stem/progenitor cells. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, November 2007; San Diego

## 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



## ヒト ES 細胞由来神経幹細胞/前駆細胞に対す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

正常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、ヒト ES 細胞由来神経幹細胞/前駆細胞 (hES-NS/PCs) に対する各種薬剤の毒性評価を実施した。7 種類のヒト株化細胞および hES-NS/PCs に対する 5 薬剤 (ATRA, Thioridazine-HCl, AraC, Nimustine-HCl, Vincristine) の細胞毒性を評価した。各薬剤はいずれも hES-NS/PCs に対する細胞毒性を有したが、とりわけ 3 種類の抗がん剤は各種株化細胞における毒性濃度の 10 倍以上の低濃度域で hES-NS/PCs に対して強い細胞毒性を示した。さらに SELDI-TOFMS を用いた解析において、hES-NS/PCs に対する抗がん剤の細胞毒性に関連する 9 種類の候補タンパク質の同定に成功した。得られた知見は、今後、既存薬剤の神経毒性評価および新規薬剤開発を行なう上で、ヒト神経幹細胞に対する作用・細胞毒性を検討するための基礎的知見と成り得るものであり、hES-NS/PCs を用いた薬剤応答性評価システムの有用性を示すものであると考えられた。

### A. 研究目的

正常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、前年までに実施した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 次スクリーニング結果を基礎に、ヒト ES 細胞由来神経幹細胞/前駆細胞（以下、hES-NS/PCs）に対する各種薬剤の薬剤応答性評価試験を実施した。さらに SELDI-TOFMS を用いて細胞毒性関連タンパク質の解析を実施した。

### B. 研究方法

#### 1) 倫理面への配慮

解析に使用した hES-NS/PCs は分担研究者の慶応義塾大学医学部生理学教室岡野栄之先生より分与を受けた。慶応義塾大学医学部でのヒト ES 細胞の使用計画は文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、「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」(平成 19 年 10 月 31 日)として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。大阪医療センターへの hES-NS/PCs の持ち込みおよびそれを用いた研究に関しては、大阪医療センター医学倫理委員会の承認の元、実施された（課題名：ヒト ES 細胞由来神経幹細胞の生物学的特性の解明とその操作技術の開発、及びそれを応用した各種化合物の作用・毒性スクリーニングシステムの開発、受付番号 93、承認日：平成 19 年 8 月 6 日）。

#### 2) hES-NS/PCs の培養

hES-NS/PCs として、京都大学再生医科学研究所で作成された KhES-1 を母細胞に、胚様体形成を用いた分化誘導後、neurosphere 法を用いて選択的に分離・培養して作成された合計 3 株のサブライン (EB52、EB53、EB71) を解析に使用した。維持培養は、基本培地 (MHM ; DMEM/F12 + Hormone Mix + 2mM L-Glutamine + 0.6%Glucose + 0.1125%NaHCO<sub>3</sub> + 5mM HEPES) に添加因子 (B27)

と増殖因子 (FGF2、LIF) を使用した neurosphere 法を用いて実施した。薬剤応答性評価試験用培地の選定を目的として、維持培養に使用した培地中、添加因子を N2 に、基本培地を DMEM/F12 単独に変更した培地を作成し、各々の hES-NS/PCs の増殖に及ぼす影響を細胞内 ATP 評価法を使用して評価した。

### 3) 薬剤応答性評価試験

スクリーニング用細胞としては合計 7 種のヒト株化細胞および 2 株 (EB53, EB71) の hES-NS/PCs を使用した (表 1)。薬剤は前年度までの 1 次・2 次スクリーニングで選定した薬剤を中心に既存薬剤 5 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 時間培養した後、毒性試験用無血清培地に置換し、各薬剤について 0 $\mu$ M-100 $\mu$ M の範囲で希釈系列を作製し (n=4 で実施)、細胞に添加した。5%CO<sub>2</sub> 存在下 37 度で培養し、薬剤投与後 24 時間あるいは 48 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 量を蛍光法により測定し、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。

4) SELDI-TOFMS を用いたタンパク質発現解析  
3 種類の抗がん剤 (AraC, Nimustine-HCl, Vincristine) を IC50 の薬剤濃度で hES-NS/PCs (EB71) に作用させた。48 時間後、細胞溶解液を用いて細胞を破碎し、蛋白質抽出液を作成した。陽イオン交換基が表面に修飾されたチップ (CM10 Chip) を用い、タンパク質発現プロファイルを SELDI-TOFMS (Bio-Rad 社製) を用いて取得した。蛋白質の発現は分子量 0-100kDa の範囲に絞って測定した。

	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	ヒト精巣奇形腫	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
ヒトES細胞由来神経幹細胞/前駆細胞	EB52	ヒトES細胞由来	慶應義塾大学医学部生理学教室
	EB53	ヒトES細胞由来	慶應義塾大学医学部生理学教室
	EB71	ヒトES細胞由来	慶應義塾大学医学部生理学教室

表 1 : 薬剤応答性評価試験に使用した細胞種

薬剤種	薬剤名	特性
抗がん剤	Cytarabine (Ara-C)	代謝拮抗薬
	Vincristine sulfate	微小管阻害薬
	Nimustine-HCl (ACNU)	アルキル化薬
向精神薬	Thioridazine-HCl	フェノチアジン系
その他	all-trans retinoic acid (ATRA)	レチノイド誘導体

表 2 : 薬剤応答性評価試験に使用した薬剤リスト

## C. 研究結果

### 1) hES-NS/PCs の増殖特性 (図 1)

我々が過去に十分な培養経験を有するヒト胎児神経組織由来神経幹細胞/前駆細胞 (以下、hF-NS/PCs) と比較して、hES-NS/PCs の増殖は同程度かやや遅い印象があり、技術的に大量培養することが困難であった。また hF-NS/PCs と異なる特性として、neurosphere 法を用いた培養を行っても細胞がプラスチック底面に接着する傾向が見られた (図 3A,C)。

hF-NS/PCs の培養に使用する培地組成 (DMEM/F12+B27+FGF+LIF) を用いた検討においては、hES-NS/PCs は維持培養に使用した培地使用時よりも良好な増殖を示した。一方、B27 の代わりに N2 を用いた培養においては、3 ラインいずれも維持培養よりも増殖が低下する傾向が見られた。しかしその変化はライン間での差が強く、EB71 は比較的培地変更の影響が小さいのに比較して、EB53 では大きな増殖低下が観察された (図 1)。

### 2) 各種薬剤の hES-NS/PCs に対する毒性 (表 3、図 2、3)

薬剤応答性評価試験用培地の検討結果から、hES-NSPC の毒性試験は、B27 を含む維持培養用培地を用いた EB53 を使用した解析と、N2 を用いた無血清低蛋白培地での EB71 を使用した解析、2 通りで実施した。

#### ①ATRA

株化細胞に関しては、4 種類の細胞 (SH-SY5Y, HepG2, U251MG, WI38) においては最高濃度の 100 $\mu$ M に至っても IC50 に到達しなかった。一方、Ntera2 および Jurkat に対しては比較的強い毒性を示した。薬剤の細胞毒性に影響を及ぼすウシ血清アルブミン (BSA) を含む B27 含有培地での EB53 を使用した解析で、ATRA は hES-NS/PCs に対してほとんど毒性を示さなかった。一方、N2 を用いた培地での EB71 を使用した解析では Jurkat に対する毒性とほぼ同程度の細胞毒性を示した。EB71 における IC50 での薬剤投与後 24 時間目の地点の細胞の形態は、コントロール (ATRA

の溶解に使用した溶媒である 8%EtOH/2%DMSO を使用した培養) で見られる細胞接着性が減少する傾向が観察された (図 3A)。

#### ②Thioridazine-HCl

解析を実施した全ての株化細胞において解析濃度範囲内で IC50 に到達した。その中で 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。一方、hES-NS/PCs における IC50 値は他の株化細胞と大きな差は見られなかった。また培地中の BSA の影響もほとんど見られなかった。EB53 における IC50 での薬剤投与後 24 時間目の地点の細胞形態は、コントロールと比較して大きな変化は見られなかった (図 3B)。

#### ③AraC

解析に使用した 7 種類の株化細胞中、Ntera2 と Jurkat 以外の 5 種類の細胞は最高濃度の 10 $\mu$ M に至っても IC50 に到達しなかった。一方、hES-NS/PCs に対しては、培地中の BSA の有無に関わらず全細胞中最高の強い細胞毒性を示した。EB71 における IC50 での薬剤投与後 48 時間目の地点の細胞形態は、コントロールと比較して大きな変化は見られなかった (図 3C)。

#### ④Nimustine-HCl

解析に使用した 7 種類の株化細胞では Ntera2 以外の 6 種類の細胞では最高濃度の 100 $\mu$ M に至っても IC50 に到達しなかった。一方、hES-NS/PCs に対しては、培地中の BSA の有無に関わらず全細胞中最高の強い細胞毒性を示した。EB71 における IC50 での薬剤投与後 48 時間目の地点の細胞形態は、コントロールと比較して大きな変化は見られなかった (図 3C)。

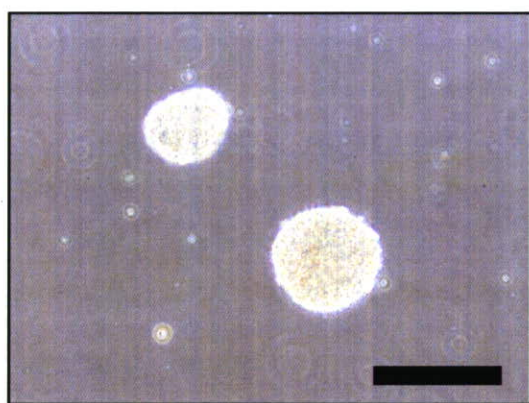
#### ⑤Vincristine

解析に使用した 7 種類の株化細胞中、2 種類の細胞 (HepG2, U251MG) 以外の細胞は IC50 に到達した。一方、hES-NS/PCs に対しては、培地中の BSA の有無に関わらず全細胞中最高の強い細胞毒性を示した。EB71 における IC50 での薬剤投与後 48 時間目の地点の細胞形態は、コントロールと比較して大きな変化は見られなかった (図 3C)。

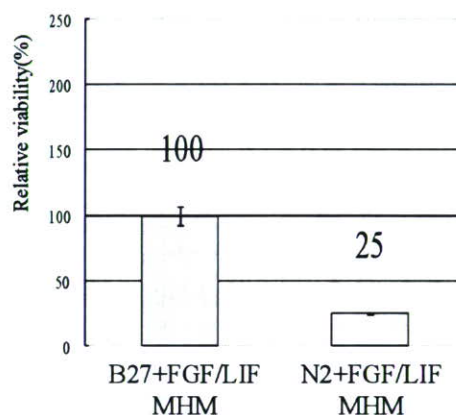
3) SELDI-TOFMS を用いた細胞毒性関連タンパク質の同定 (図4)

3 種類の抗がん剤 (AraC, Nimustine-HCl, Vincristine) を IC50 の薬剤濃度で hES-NS/PCs (EB71) に 48 時間作用させた後に回収したタンパク質の発現プロファイルをコントロールサンプルと比較した結果、コントロールと比較して変

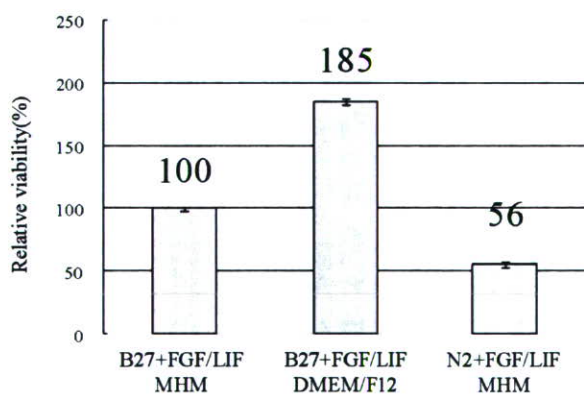
動が見られた9種類のタンパク質を同定することに成功した (図4)。その9種類のタンパク質の発現パターンを抗がん剤間で相対的に比較検討した結果、AraC と Nimustine-HCl は類似の発現パターンを示したのに対して、Vincristine はコントロールとも異なる独自の発現パターンを示すことが明らかになった (表4)。



EB53



EB52



EB71

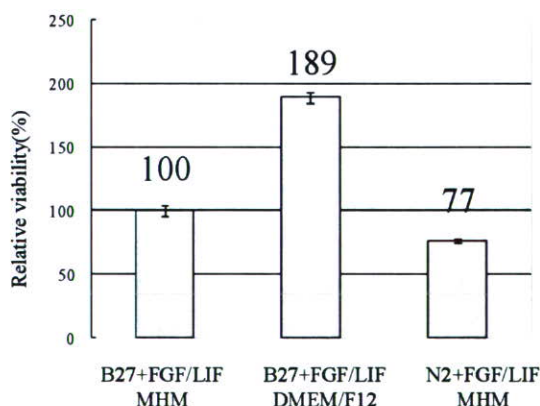


図1 : ヒト ES 細胞由来神経幹細胞/前駆細胞とその培地条件の検討

スケールバー : 200 $\mu$ m