

図2：各薬剤の各種ヒト細胞に対する作用

実線；細胞内総ATP量計測を用いた生細胞数評価、  
破線；培養上清中LDH量計測を用いた細胞毒性評価

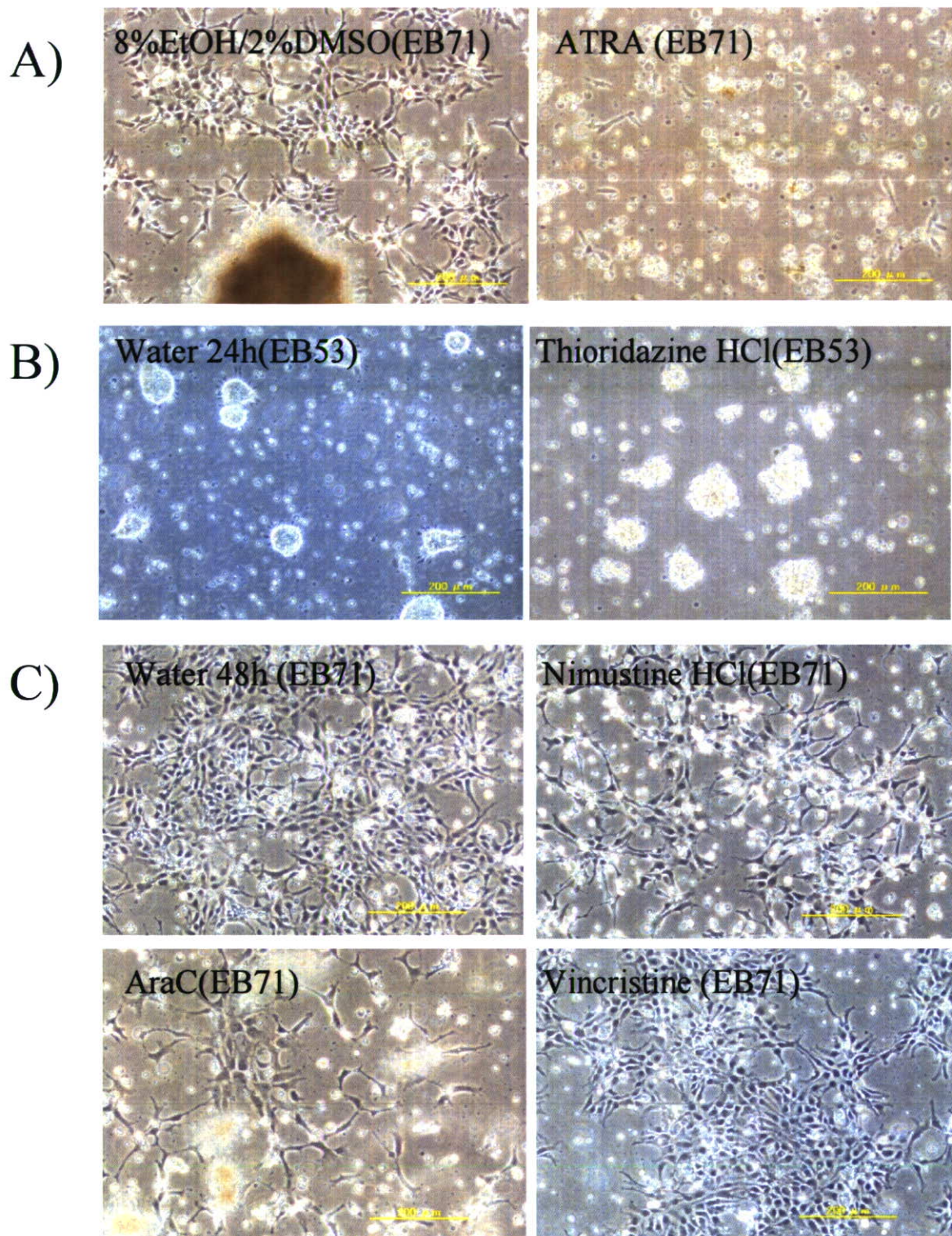


図3：各薬剤の IC50 地点におけるヒト ES 細胞由来神経幹細胞/前駆細胞の形態評価

表 3 : 各薬剤の各種細胞に対する IC50 値

	ATRA	Thioridazine	AraC	Nimustine	Vincristine
濃度域(μM)	0.1~100	0.1~100	0.01~10	0.1~100	0.001~1
溶媒	E/D	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
投与時間	24hr	24hr	48hr	48hr	48hr
Ntera2	6.61	5.89	3.5	11.4μM	0.016
SH-SY5Y	100 (68%)	7.7	10 (70%)	100 (57%)	0.3
HepG2	100 (71%)	13.6	10 (79%)	100 (92%)	1 (95%)
U251MG	100 (81%)	14.5	10 (85%)	100 (84%)	1 (80%)
Jurkat	27.2	14.5	4.23	100 (90%)	0.060
HeLa	75.5	15.2	10 (85%)	100 (96%)	0.032
WI38	100 (99%)	16.2	10 (97%)	100 (99%)	0.842
EB53	100 (94%)	15.4	0.16	1.13	0.0013
EB71	23.6	12.9	0.16	3.23	0.0021

赤字 : 解析濃度範囲では IC50 に到達しなかった場合で、最高濃度での細胞数を表記

E/D : 8%EtOH/2%DMSO

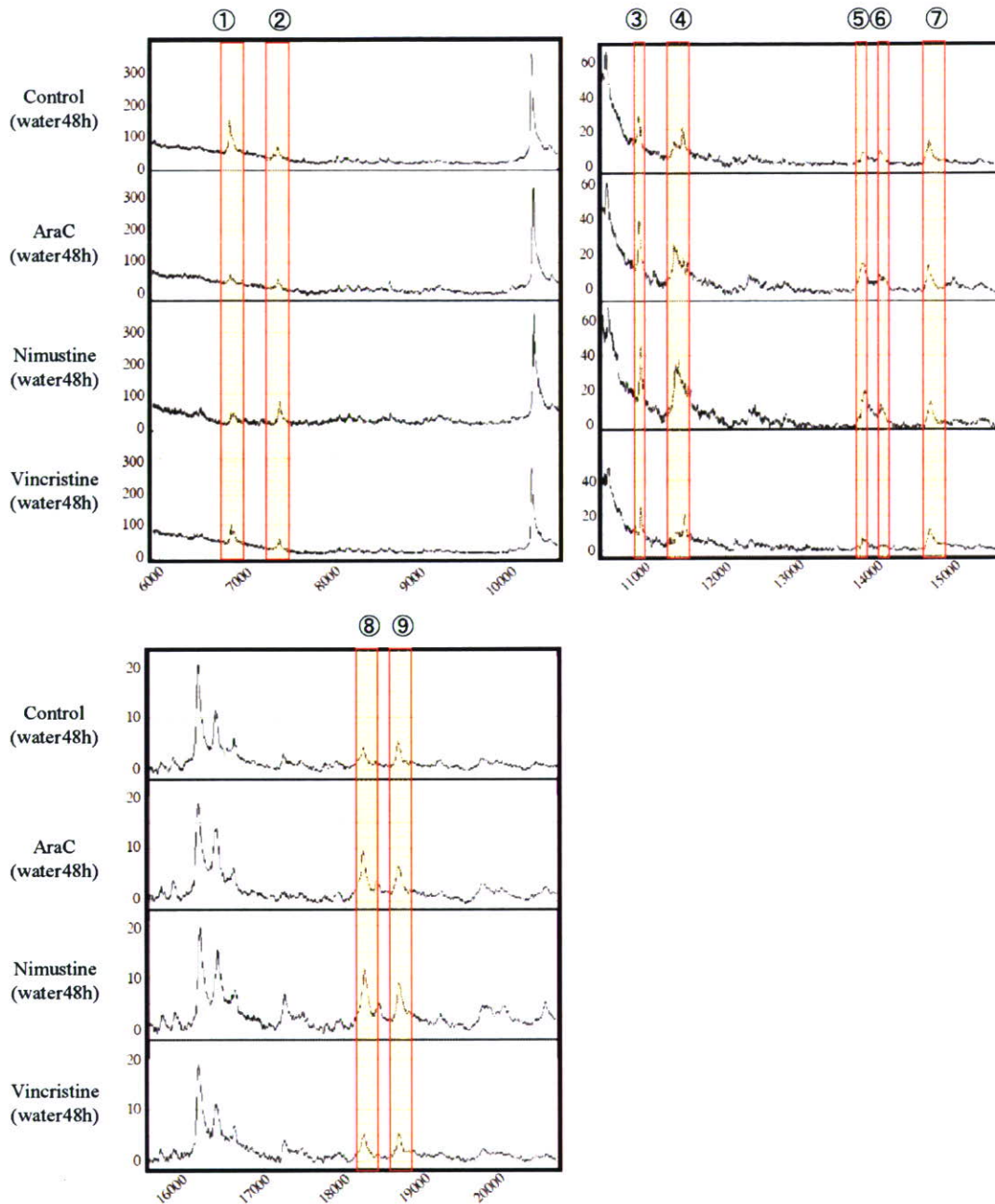


図4：SELDI-TOFMSを用いた細胞毒性関連タンパク質の同定

Point	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
MW	6805	7347	10880	11452	13802	14033	14663	18250	18690
control	high	low	mid	mid	low	mid	mid	mid	mid
AraC	low	low	high	mid	high	mid	high	high	high
Nimustin	low	mid	high	high	high	mid	high	high	high
Vincristin	mid	mid	mid	mid	low	low	mid	low	mid

表4：ヒトES細胞由来神経幹細胞/前駆細胞の細胞毒性に関連する候補タンパク質

## D. 考察

最終年度である今年度は、前年度までに開発した薬剤応答性評価試験プロトコールと1次・2次毒性スクリーニング結果で判明した各種薬剤の毒性データを基礎に、ヒトES細胞由来のhES-NS/PCsに対する各種薬剤の毒性を評価することに成功した。その結果、以下の幾つかの興味ある細胞毒性データを示すことができた。

### 1) 未分化細胞に対する薬剤毒性

ATRA および Thioridazine-HCl の両薬剤は、解析に使用した全9細胞の中でNtera2に最も強い細胞毒性を示した。このNtera2におけるIC50と比較して、hES-NS/PCsに対するIC50はいずれの薬剤でも2倍以上大きく、hES-NS/PCsはこの2薬剤が有する細胞毒性に対してNtera2以上の耐性を有することが判明した。Ntera2は一定の分化能を有するEC細胞であり、特性的にはhES-NS/PCsの母細胞のヒトES細胞に近い特性を有する細胞であると予測される。よって、hES-NS/PCsはヒトES細胞から分化した結果、これら2薬剤の有する細胞毒性に対して一定の耐性を有したと推察される。その逆に、ATRA および Thioridazine-HCl は他の細胞と比較して未分化細胞に対しては比較的強い細胞毒性を示す薬剤であると考えられた。これら結果は、この両薬剤を妊婦に投与する場合は、未分化幹細胞に対する細胞毒性が出現する可能性があり、慎重な使用が必要であることを示唆する解析結果であると考えられる。

### 2) 神経系細胞に対する薬剤毒性

Thioridazine-HCl の細胞毒性は、検討した細胞の中でNtera2とSH-SY5Yに比較的強く見られたのに対してhES-NS/PCsに対する細胞毒性は他の組織由来の株化細胞と大きな差は見られなかった。Thioridazine-HClは向精神薬の一種であるが、この薬剤は神経系細胞、特に神経細胞への分化傾向を有する細胞に一定の毒性を有する薬剤であると推察され、薬剤使用時の神経毒性出現に十分な注意が必要であることを示唆する結果と考える。

### 3) 抗がん剤のhES-NS/PCsに対する細胞毒性

今回の解析の中でもっとも注目すべき点は、抗がん剤のhES-NS/PCsに対する細胞毒性である。検討した3種類の抗がん剤はいずれも株化細胞で見られた毒性を大きく超える強い細胞毒性をhES-NS/PCsに対して示し、中でもほとんどの株化細胞ではIC50に到達しなかったNimustine-HClで見られた細胞毒性は特徴的な結果の一つであった。Nimustine-HCl および Vincristine は悪性脳腫瘍（グリオーマ）の治療に対して標準的に使用される薬剤で、脳血管関門（BBB）を超えて中枢神経組織内に到達することが期待される薬剤である。よってこれらの薬剤が癌細胞由来の株化細胞より10倍以上低濃度でhES-NS/PCsに対して強い細胞毒性を示すことは、これら薬剤の正常神経組織への毒性を考える上で、今後注目すべき重要な知見であると考えられる。

### 4) 抗がん剤のhES-NS/PCsに対する細胞毒性に関連するタンパク質

SELDI-TOFMSを用いた細胞毒性関連タンパク質の探索の結果、hES-NS/PCsの細胞毒性に関連する9種類の毒性関連タンパク質を同定することに成功した。この9種類のタンパク質の発現パターンを解析することで、hES-NS/PCsに対する他の薬剤の細胞毒性の類似性、相違性を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になると考えられ、毒性スクリーニングシステムの1つとして有用なものであると考えられた。SELDI-TOFMSの特性上、得られたタンパク質の具体名の同定は実施できていないが、今後これらタンパク質はhES-NS/PCsの細胞毒性に関連する候補タンパク質として、さらに解析を加える価値ある情報と考えられる。

### 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。しかしこれら内在性の神経幹細胞、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多くのことが不明である。今後、既存薬剤の神経毒性評価および新薬開発を考える上で、ヒト神経幹細胞に対する作用・細胞毒性を考慮することは安全な薬剤の開発ならびに薬剤使用方法を考える上で重要なことであり、今回の解析はそれに必要な基礎データを提示した有益なものと思われる。

## E. 結論

ヒト ES 細胞由来の hES-NS/PCs に対する 5 種類の薬剤の毒性を評価した。各薬剤はいずれも hES-NSPC 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 を用いた細胞毒性関連タンパク質の探索の結果、hES-NS/PCs の細胞毒性に関連する 9 種類の毒性関連タンパク質を同定することに成功した。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る。

## F. 成果発表

### 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) Mori H, Fujitani T, Kanemura Y, Kino-oka M, Taya M: Observational examination of aggregation and migration during early phase of neurosphere culture of mouse neural stem cells. *J Biosci Bioeng* 104(3):231-234, 2007
- 3) Hattori Y, Ohta S, Hamada K, Yamada-Okabe H, Kanemura Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kawakami Y, Toda M: Identification of a neuron-specific human

gene, KIAA1110, that is a guanine nucleotide exchange factor for ARF1. *Biochem Biophys Res Commun* 364(4):737-742, 2007

- 4) Kato M, Miya F, Kanemura Y, Tanaka T, Nakamura Y, Tsunoda T: Recombination rates of genes expressed in human tissues. *Hum Mol Genet* 17(4):577-586, 2008

### 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

## 依存性薬物の毒性機構に関する網羅的解析

分担研究者 入江 康至  
岩手医科大学 医学部薬理学講座 講師

### 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 チップを利用して網羅的な解析を行った。

マウス DA 作動性神経細胞 CATH.a 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。CATH.a 細胞を METH 0.2mM, 1mM, DA 2 $\mu$ M, 4.5 $\mu$ M で処理し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。この結果、METH 細胞死特異的に発現調節される遺伝子を見出し、定量的 PCR 法によりタイムコースなど、より詳細な遺伝子発現を検討した。その結果、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 が METH の毒性機構に関わることがわかった。

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、細胞死に関わる遺伝子 BAX、Amida/tfpt も発現誘導され、METH の毒性機構に関わることが示唆された。さらに、ヒト奇形癌腫由来の細胞株 NT2 を用いて、ドーパミン作動性ニューロンを誘導する系を確立し、これを用いてヒト胚細胞由来のドーパミン作動性ニューロンにより近い条件で METH の毒性を検討している。

### 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、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。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 毒性機構について解析を行う。また、METH 毒性により特異的に発現調節される遺伝子産物の機能を調べることにより、

毒性機構について解析を行う。

### C. 研究結果

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。CATH.a 細胞を METH 0.2mM, 1mM, DA 2 $\mu$ M, 4.5 $\mu$ M で処理し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。この結果、METH 細胞死特異的に発現調節される遺伝子を見出し、定量的 PCR 法によりタイムコースなど、より詳細な遺伝子発現を検討した。

そのうちの 하나가、昨年度にも報告した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。さらに、ddit3 (CHOP)の遺伝子産物を特異的抗体で検出することにより、蛋白質レベルでも METH の毒性時に発現誘導がみられることがわかった。また、Grp78 も小胞体ストレス時に発現誘導されることが知られているが、やはり CATH.a 細胞を METH によって細胞死を誘導した際に誘導された。また、ddit3 (CHOP)、Grp78 のいずれもが、METH 処理したマウス前脳で発現誘導されることがわかった。

BAX は細胞死を促進する蛋白質で、p53 によって遺伝子発現が誘導されることが知られている。定量的 PCR 法により、CATH.a 細胞を METH によって細胞死を誘導した際に BAX の発現が薬剤処理後 48 時間後をピークに誘導されることがわかった。

Amida/tfpt も過剰発現により細胞死を促進する遺伝子であるが、これも CATH.a 細胞を METH によって細胞死を誘導した際に発現誘導されることがわかった。生体における Amida/tfpt の機能には不明な点が多いため、発現調節機構および蛋白質の機能について検討した。Amida/tfpt は PKA および p32 MAP kinase を介して発現誘導されることもわかった。既知のヒト、ラット、マウスに加

え、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュの遺伝子を単離し、bZIP 構造、各局在シグナル、SUMO 化修飾のモチーフが保存されていることを見出した。

さらに、現在はヒト奇形癌腫由来の細胞株 NT2 を用いて、ドパミン作動性ニューロンを誘導する系を確立し、これを用いてヒト胚細胞由来のドパミン作動性ニューロンにより近い条件で METH の毒性を検討している。

### 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。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)、Grp78 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。また、BAX や Amida/tfpt といった細胞死関連遺伝子も METH の細胞毒性に関与すると考えられ、METH 依存症の形成にこれらの細胞死調節機構が関わっていることが強く疑われた。マウス中枢由来の DA 作動性神経細胞 (CATH.a)に比べて、多分化能を持つ奇形癌腫細胞株 NT2 を分化誘導して得られたドパミン作動性ニューロンは、よりヒト ES 細胞由来のドパミン作動性ニューロンに近いので、ES 細胞由来のドパミン作動性ニューロンの安定的供給が不十分な現状では最善の材料と考えられる。これを用いた分子生物学的研究を実験動物にフィードバックすることにより、新しい観点から覚醒剤依存機構の解明を図ることができると考えられる。



## E. 結論

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) および Grp78 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。また、BAX や Amida/tfpt といった細胞死関連遺伝子も METH により発現誘導され、METH の細胞毒性に関与すると考えられた。ヒト由来ドパミン作動性ニューロンを用いた解析も開始することができた。

## 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* 282(16):11786-11794, 2007
- 2) 入江康至 : 新規癌抑制蛋白質 Amida. *医薬品相互作用研究* 31(1):1-7, 2007

### 2. 学会発表

- 1) Irie Y, Miya F, Tsunoda T, Saeki M, Kanemura Y, Kato H, Tsukamoto Y, Kamisaki Y, Miki N: Analysis of gene expression in dopamine or methamphetamine treated dopaminergic neural cells. 日本薬理学会第 80 回年会, 2007 年 3 月 ; 名古屋
- 2) 入江康至, 佐伯万騎男, 上崎善規, 平 英一 : 新規細胞死関連蛋白質 Amida の機能解析. 第

58 回日本薬理学会北部会, 2007 年 9 月 ; 札幌

- 3) Irie Y, Saeki M, Kamisaki Y, Martin E, Taira E, Murad F: Searching a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. 21st Annual Symposium of the Protein Society, July 2007; Boston, MA
- 4) Irie Y, Saeki M, Kamisaki Y, Kondo Y, Taira E: The expression of novel growth suppressor Amida is induced in sympathetic neuronal cells in response to PACAP treatment. 5th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN 2007), October 2007; Kyoto
- 5) Irie Y, Saeki M, Kamisaki Y, Kondo Y, Tachikawa E, Mizuma K, Taira E: The expression of novel growth suppressor Amida is induced in sympathetic neuronal cells in response to PACAP treatment. 日本薬理学会第 81 回年会, 2008 年 3 月 ; 横浜

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### 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

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

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あれば、その大きさに関係なく、転写活性が大きく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。

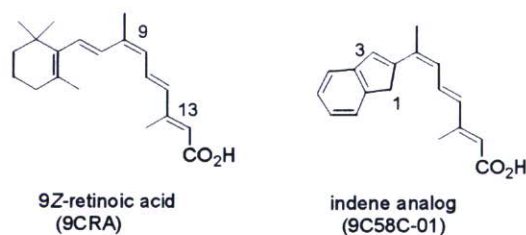
#### B. 研究方法

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。

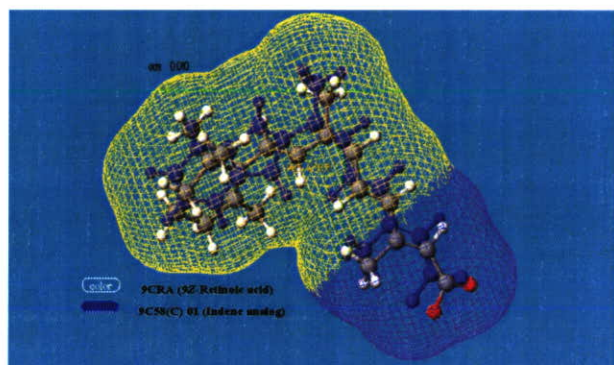
#### C. 研究結果

##### 1) レチノイン酸アナログの合成

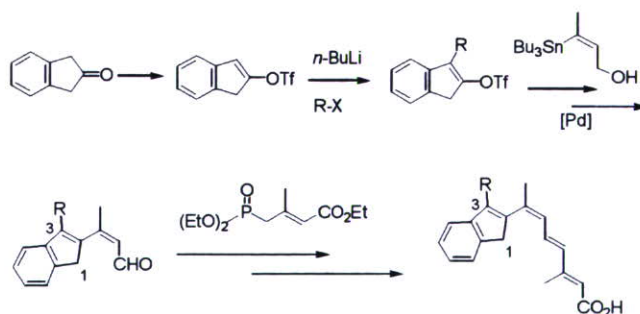
9シスレチノイン酸(9CRA)のシクロヘキセン環と続く二重結合をインデン骨格にかえたアナログ化合物(9C58C-01)は、タンパク質との結合能が強いものの生理活性はほとんどみられなかった。



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異なることが影響していることが予想された。



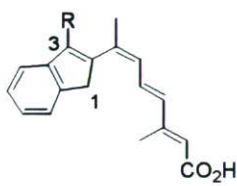
そこで、タンパク質とリガンドとの相互作用と生理活性について検討するため、インデン環上の3位に様々な置換基を導入した9シス-レチノイン酸アナログを合成しその薬理活性を測定することにした。



2-インダノンから誘導したエノールトリフラートに  $n\text{-BuLi}$  を反応後、ハロゲン化アルキルを反応させ置換基を導入することができた。得られたエノール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、エモンズーホーナー反応で側鎖を延長後、アルカリ加水分解により3位置換インデン環を有するレチノイン酸類を得ることができた。

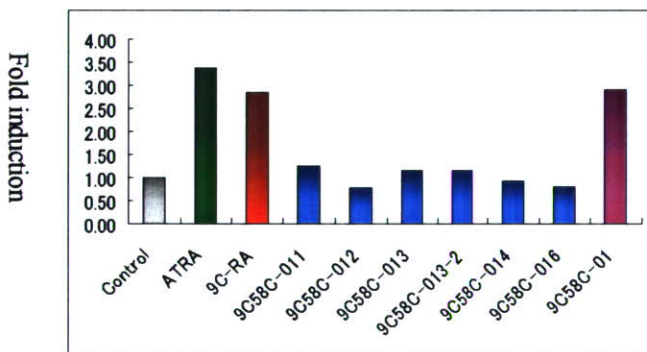
生物活性は、MG-63 細胞を用いて RARE ならびに RXRE の転写活性と RXR $\alpha$  に対する結合能を、All トランスレチノイン酸 (ATRA) および 9 シスレチノイン酸 (9CRA) と比較検討した。



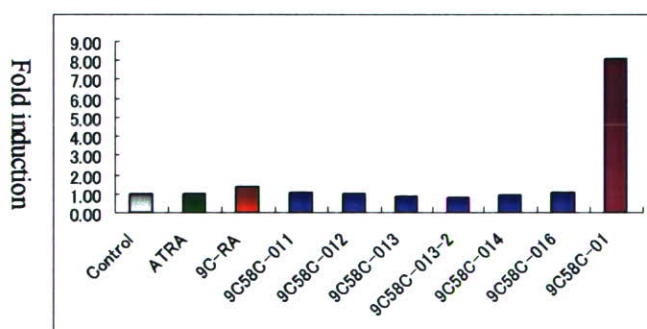
indene analogs

- 9C58C-011; R=CH<sub>3</sub>
- 9C58C-012; R=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- 9C58C-013; R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- 9C58C-013-2; R=CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- 9C58C-014; R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- 9C58C-016; R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph

(表 1) RARE



(表 2) RXRE

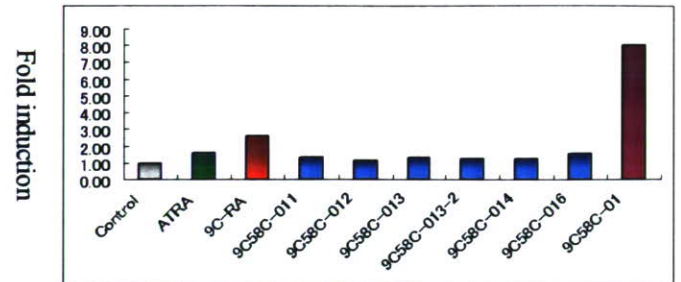


RARE の活性発現には、All-トランス構造が必要なため、今回合成したアナログは 9 シス構造であることから ATRA よりも強い活性のあるものがなかった。

RXRE の転写活性では、無置換のものが最も強

く、3 位に置換基を導入すると活性が著しく減少することが判明した。また、置換基が大きくなるにつれてその活性が低下する傾向がみられた。

(表 3) RXR $\alpha$ -Gal4



RXR $\alpha$  に対する結合能では、RXRE の時と同様、無置換のものが最も強く、3 位に置換基を導入すると活性が著しく減少することが判明した。

#### D. 考察

インデン環上の 3 位に置換基を導入すると RXR $\alpha$  に対する結合能が大きく減少したが、これは置換基による立体障害によるものと思われる。この結合能の現象のため RXRE にたいする転写活性も大きく減少することになったものと推察される。

#### E. 結論

インデン環の 3 位に置換基を導入することにより、レセプターとの結合能ならびに転写活性共に大きく低下したことから、3 位での置換基の導入が不適なことが判明した。今後、1 位での置換基を導入したアナログ化合物を合成し、今回の場合との比較検討をすることが重要と思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Wada A, Mizuguchi Y, Miyake H, Nihara M, Ito M, Nakagawa K, Okano T: Preparation and Biological Activities of Heteroarotinoids. *Lett Drug Des Discov* 4(6):442-445, 2007
- 2) Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Wada A, Mori T, Murata K, Nishino R, Ukita T, Uenishi K, Tanaka

- K, Okano T: Quantification of Fat-Soluble Vitamins in Human Breast Milk by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr B* 859(2):192-200, 2007
- 3) Yamano Y, Fujita Y, Mizuguchi Y, Nakagawa K, Okano T, Ito M, Wada A: Synthesis of  $\gamma$ -Hydroxybutenolides Applying Crossed Aldol Condensation in the Presence of a Bulky Lewis Acid and Their Anti-tumor Activity. *Chem Pharm Bull* 55(9):1365-1370, 2007
2. 学会発表
- 1) 井坂修久, 米田照代, 石黒正路, 今井啓雄, 七田芳則, 伊藤允好, 和田昭盛: レチナール 9 位置換誘導体のオプシンシフトとオプシン構造の変化について. 日本薬学会第 127 年会, 2007 年 3 月; 富山
- 2) 山野由美子, 高崎紘臣, 藤井理世, 矢崎一史, 和田昭盛: シコニン生合成中間体の合成研究. 日本薬学会第 127 年会, 2007 年 3 月; 富山
- 3) 沖津貴志, 岩本沙裕美, 岡本 舞, 和田昭盛: 11Z-12 位置換レチナールの合成. 日本薬学会第 127 年会, 2007 年 3 月; 富山
- 4) 和田昭盛, 伊藤允好: 重水素 6 個で標識したレチニルアセテートおよび  $\beta$ -カロテンの合成. 日本ビタミン学会第 59 回大会, 2007 年 5 月; 佐世保
- 5) 岩塚欣也, 沖津貴志, 和田昭盛: 9Z-レチノイン酸及びその誘導体の効率的短工程合成. 第 58 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2007 年 10 月; 高槻
- 6) 山野由美子, 岩塚欣也, 佐々木 俊, 松久保健太, 孝橋沙織, 和田昭盛: 太陽電池構築を目指した SH 基導入ポリエークロロフィルハイブリッド化合物の合成研究. 第 33 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2007 年 11 月; 長崎
- 7) 沖津貴志, 岩塚欣也, 和田昭盛: 9Z-レチノイン酸の効率的な合成法の開発. 第 27 回有機合成若手セミナー, 2007 年 11 月; 京都
- 8) 和田昭盛, 後藤友香里, 筆岡真実子, 伊藤允好, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫: 3 位置換インデン環を有する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 18 回学術集会, 2007 年 11 月; 東京
- 9) 和田昭盛, 王 飛, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫, 伊藤允好: デヒドロゲラニルゲラノイン酸類の合成と生物活性. 第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2007 年 11 月; 相模大野

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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

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

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

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

### 研究要旨

正常神経系細胞に対する各種薬剤の細胞毒性に関連する遺伝子発現情報の取得を目指し、神経幹細胞/前駆細胞に対する all-*trans* retinoic acid (ATRA) の細胞毒性濃度域での遺伝子発現プロファイルを取得し、解析した。マイクロアレイを用いて ATRA の神経幹細胞/前駆細胞に対する細胞毒性に関連する遺伝子を評価した結果、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が判明した。これら情報は今後、ATRA の内在性神経幹細胞に対する毒性を検討する上で、有用な情報をもたらすものを考えられた。

#### A. 研究目的

正常神経系細胞に対する各種薬剤の細胞毒性に関連する遺伝子発現情報の取得を目指し、神経幹細胞/前駆細胞に対する all-*trans* retinoic acid (以下、ATRA) の細胞毒性濃度域での遺伝子発現プロファイルを取得し、解析した。

#### B. 研究方法

##### 1) 神経幹細胞/前駆細胞

解析にはマウス由来神経幹細胞/前駆細胞（以下、mNS/PCs）を使用した。細胞は neurosphere 法を用いて選択的に分離・培養して作成された。

##### 2) 細胞毒性試験

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、ATRA について 0  $\mu\text{M}$ ~100 $\mu\text{M}$  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, Promega 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。

##### 3) マイクロアレイ解析

合計 3 点の ATRA 濃度 (0.5, 2.5, 4 $\mu\text{M}$ ) と薬剤未投与の 4 サンプルを作成し、薬剤投与後 24 時間の地点で細胞を回収し、RNA を抽出した。マイクロアレイ解析は Cy3 と Cy5 で蛍光標識されたサンプルを使用して、30,336 プロブの解析が可能な AceGene Mouse Oligo 30K Chip (日立ソフトウェアエンジニアリングおよび DNA チップ研究所) を用いて実施した。コントロールと比較して遺伝

子発現が有意に1.5倍以上に上昇あるいは0.67倍以下に低下した遺伝子群を選別した。

#### 4) 定量的RT-PCR

マイクロアレイと同じ4条件でサンプルを回収し、total RNAを抽出し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、マイクロアレイ解析で遺伝子発現の変動が見られた15遺伝子(発現上昇が見られた遺伝子9種、発現低下が見られた遺伝子6種)およびそれ以外で神経分化に関連する7遺伝子(表1)の合計25遺伝子の発現量を解析した。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。

### C. 研究結果

#### 1) mNS/PCsに対するATRAの細胞毒性(図1)

mNS/PCsはneurosphere法を用いた培養において、浮遊性の細胞凝集塊(neurosphere)を形成して増殖した(図1A)。mNS/PCsに対してATRAは0.3 $\mu$ Mから増殖抑制効果を示し、IC<sub>50</sub>(3 $\mu$ M)付近では培養上清中LDH値の上昇を伴う細胞死誘発作用を示した(図1B)

A)



B)

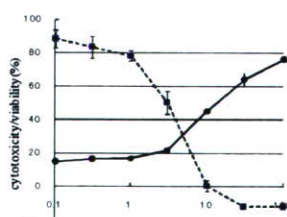


図1:

マウス神経幹細胞/前駆細胞に対するATRAの細胞毒性

A) neurosphere法で培養したマウス神経幹細胞/前駆細胞  
スケールバー: 200 $\mu$ m

B) 細胞毒性試験

実線: 細胞内総ATP量計測を用いた生細胞数評価、  
破線: 培養上清中LDH量計測を用いた細胞毒性評価

#### 2) マイクロアレイ解析

3種類のATRAの濃度のいずれかにおいてコントロールと比較して1.5倍以上に遺伝子発現上昇が見られた遺伝子は合計148遺伝子であった(表2)。一方、その逆に3種類のATRAの濃度のいずれかにおいてコントロールと比較して0.67倍以下に遺伝子発現低下が見られた遺伝子は合計67遺伝子であった(表3)。

#### 3) 定量的RT-PCR解析(図2)

ATRAの投与によって遺伝子発現の上昇が見られた遺伝子に関して、定量的RT-PCR解析を用いた解析においても解析を実施した計9種類の全ての遺伝子においてマイクロアレイ解析の結果に一致して発現上昇が確認された(図2A)。一方、ATRAの投与によって遺伝子発現の低下が見られた遺伝子中、計6種類の遺伝子の解析を実施したが、3種類(S100b, Cmtm5, Dll3)はマイクロアレイ解析の結果同様に遺伝子発現の低下が確認されたが、残りの3種(Rnd2, Cdkn1c, Bnip3)に関してはATRA濃度0.5 $\mu$ Mの地点で軽度の遺伝子発現上昇が観察され、マイクロアレイ解析と完全には一致しなかった(図2B)。

#### 4) 神経分化に関連する遺伝子の発現変動(図3)

神経幹細胞/前駆細胞で高発現する3遺伝子(Nes, Sox1, Sox2)の内、Nes, Sox1はATRAの濃度に依存した上昇傾向を示したが、逆にSox2は高濃度のATRAの投与で有意に発現が低下した。神経細胞への分化に関与する3遺伝子中、Tubb3はATRA濃度0.5 $\mu$ Mの地点で軽度の遺伝子発現の低下が見られ、逆にPax6とMtap2は高濃度のATRAの投与によって軽度の発現上昇が見られた。しかしいずれもその変動幅は1.5倍以内であった。一方、グリア細胞への分化マーカーであるGfapはATRAの濃度に依存した著明な上昇傾向を示した。

表 1 : 定量的 RT-PCR 解析を実施した遺伝子

Symbol	Description	RefSeq Transcript ID	Primer Set
Nes	nestin	NM_016701	F actctgctggaggctgagaac R ctgaggacagggagcacaga
Sox1	SRY-box containing gene 1	NM_009233	F gccgagtggaaggtcatgt R cttgagcagcgtcttggcttt
Sox2	SRY-box containing gene 1	NM_011443	F catgatggagacggagctga R cgggctgttcttctgggtg
Tubb3	tubulin, beta 3	NM_023279	F cgcttttgacacctattca R cacactcttccgcacgaca
MTap2	microtubule-associated protein 2	NM_001039934	F acgtacctggagggtgtaatgtg R tgcttggggactgtgtgatg
Pax6	paired box gene 6	NM_013627	F tccgcacatgcaaacaca R ggaactgacactccagggtgaaa
Gfap	glial fibrillary acidic protein	NM_010277	F cagcctggacaccaaacc R cgtccttgtctcctgctt
Rbp1	retinol binding protein 1, cellular	NM_011254	F tgtgcagaagggagagaagga R aaacactgtctgcagatcacac
Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	NM_029688	F acgggtgcacaacgtacca R ttgatccagaggacgtcgat
Atf5	activating transcription factor 5	NM_030693	F tggctcgttagactatgggaaactc R accgctcagtcacccaatc
Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	NM_025378	F gtctggccctgttcaatacactc R cacatcaccaccatcttcc
Hmox1	heme oxygenase (decycling) 1	NM_010442	F tgatgctgacagaggaacacaa R ttccctcgggggtgtctct
Metrn	meteorin, glial cell differentiation regulator	NM_133719	F gctgcatgcaccagtgtatt R gacacgagcaaccaccaca
Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	NM_207680	F gacgagttcaacgaaacttacacaa R tctccataccagacggaagataaag
Lgals1	lectin, galactose binding, soluble 1	NM_008495	F aaactgccttccccttcca R atccgccgcatgtagt
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	NM_007669	F ccgaaaacggaggcaga R tcctgaccacagcagaaga
Rnd2	Rho family GTPase 2	NM_009708	F gaggagctatccaagcagaga R gctcagaagatcgggaggaa
S100b	S100 protein, beta polypeptide, neural	NM_009115	F actgaaggagcttatcaacaacga R acactcccatacccctct
Cmtm5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	NM_026066	F atcatcctggtctcctgctttg R ggttccttgtctggtcgtg
Dll3	delta-like 3 (Drosophila)	NM_007866	F gtcataccagccccttcca R tcattcaggctccatctcca
Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	NM_009876	F cagggtgtccctctccaaac R gccagagttcttccatcgt
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 1, NIP3	NM_009760	F ttctgaagggtttcttccatctc R atcagaagggtctagtgaagtgt
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_008084	F tgggtaagggtcgggtgtgaaac R caatgaaggggtcgtttagt

表 2 : ATRA 投与によって遺伝子発現が上昇した遺伝子群  
 (ハイライト遺伝子 : 定量的 RT-PCR 解析を実施した遺伝子)

AccGene ID	UniGene	RefSeq Accession	Symbol	Description	RA(μM) ratio			
					0.5	2.5	4	
AGnmA041119	Mm.279741	NM_011254	Rbp1	retinol binding protein 1, cellular	10.5	8.642	8.635	
AGnmA021021	Mm.280230	AK005159	Cyb3r1	Cytochrome b5 reductase 1	ND	5.058	7.129	
AGnmA131419	Mm.110220	NM_007837	Ddit3	dna-damage inducible transcript 3	1.0555	2.439	5.185	
AGnmC191005	Mm.218639	NM_029688	Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	1.1457	2.189	4.727	
AGnmC190223	Mm.18742	NM_019738	Nupr1	Nuclear protein 1	0.9149	2.255	4.626	
AGnmC201421	Mm.40336	NM_177073	Relt	REL T tumor necrosis factor receptor	1.0374	1.671	4.377	
AGnmB120408	Mm.389890	NM_030693	Aif5	Activating transcription factor 5	1.11301	3.012	3.883	
AGnmB191521	Mm.141021	AK009407	ifitm5	interferon induced transmembrane protein 5	1.8192	2.545	3.874	
AGnmA241303	Mm.276389	NM_010442	Hmox1	heme oxygenase (cycling) 1	1.1478	1.741	3.835	
AGnmB071022	Mm.6700	NM_007918	Eif4ebp1	eukaryotic translation initiation factor 4e binding protein 1	1.1255	2.143	3.371	
AGnmB251108	Mm.419225	BC008695	Mef2n	MyoD related glial cell differentiation regulator	2.5572	3.237	3.334	
AGnmB040122	Mm.4114	NM_008577	Slc3a2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	0.963	1.586	3.317	
AGnmA100921	Mm.209419	NM_010481	Hspa9	Heat shock protein 9	1.0084	1.953	3.238	
AGnmA080404	Mm.195663	NM_007669	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (p21)	1.4513	1.791	3.026	
AGnmA151205	Mm.168	NM_013562	Irf1	interferon-related developmental regulator 1	0.7266	1.433	2.848	
AGnmA120614	Mm.443	NM_008638	Mthfd2	methyltetrahydrofolate dehydrogenase (nad <sup>+</sup> dependent), methyltetrahydrofolate cyclohydrolase	ND	2.089	2.699	
AGnmB250706	Mm.123714	AK020187	Triobp	TRIO and F-actin binding protein	1.8397	2.301	2.57	
AGnmB091401	Mm.182912	NM_078478	Ghitm	growth hormone inducible transmembrane protein	1.0414	1.628	2.46	
AGnmB181617	Mm.141083	AF032460	Bcl2l1	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	1.2664	1.908	2.418	
AGnmA090205	Mm.292676	NM_008129	Gclm	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	1.0069	1.443	2.41	
AGnmA071408	Mm.28196	NM_080557	Srx4	sorting nexin 4	2.2068	2.724	2.319	
AGnmA061114	Mm.5140	NM_007515	Slc7a3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y <sup>+</sup> system), member 3	1.087	2.015	2.317	
AGnmB061117	Mm.182574	BC016576	Isoe1	Isochorismatase domain containing 1	1.1099	1.589	2.272	
AGnmB250506	Mm.28688	M74012	Sars	Seryl-aminoacyl-tRNA synthetase	1.1615	1.666	2.269	
AGnmB111108	Mm.440086	NM_008183	Gstm2	glutathione S-transferase, mu 2	2.107	2.282	2.266	
AGnmA031222	Mm.9075	NM_010145	Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal	1.3593	1.702	2.224	
AGnmA071407	Mm.154994	AJ298841	Tor1a	Torsin family 1, member A (torsin A)	1.8107	2.358	2.188	
AGnmA100302	Mm.256035	NM_011826	Hax1	HCLS1 associated X-1	1.1406	1.427	2.161	
AGnmA151622	Mm.333406	NM_009829	Cnd2	cyclin d2	1.0793	1.982	2.127	
AGnmB191020	Mm.43831	BC002063	Lgals1	lectin, galactose binding, soluble 1	1.1553	1.595	2.091	
AGnmC070224	Mm.271222	NM_173363	Eif5	eukaryotic translation initiation factor 5	1.0723	1.616	2.071	
AGnmB210703	Mm.436622	AB033711	Rbp3	interphotoreceptor retinoid binding protein	1.3287	1.625	2.069	
AGnmA241307	Mm.314046	NM_012054	Aoah	acyloylase hydrolase	1.8707	2.195	2.066	
AGnmB161304	Mm.2445	AK018319	Acadl	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	1.2116	1.835	2.057	
AGnmC191403	Mm.271222	NM_173363	Eif5	eukaryotic translation initiation factor 5	1.0927	1.941	2.038	
AGnmB080714	Mm.440885	NM_008184	Gstm3	glutathione S-transferase, mu 3	1.9035	2.125	2.004	
AGnmA030511	Mm.89888	U85414	Gclc	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	1.8719	1.613	2.043	
AGnmC081403	Mm.154511	NM_029735	Eprs	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	0.8272	1.692	1.966	
AGnmB120909	Mm.2445	NM_007381	Acadl	acetyl-coenzyme A dehydrogenase, long-chain	1.1871	1.593	1.96	
AGnmB021318	Mm.279821	AB011595	Eif4a1	eukaryotic translation initiation factor 4A1	1.0044	1.823	1.958	
AGnmB190201	Mm.289387	NM_024207	Der1l	Der1-like domain family, member 1	1.365	1.599	1.955	
AGnmA010701	Mm.154511	NM_029735	Eprs	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	1.1061	1.647	1.922	
AGnmA170320	Mm.458189	NM_026672	Gstm7	glutathione S-transferase, mu 7	1.8818	1.922	1.915	
AGnmA070505	Mm.125659	AJ276796	Cars	Cysteinylyl-tRNA synthetase	1.0894	1.459	1.912	
AGnmC180714	Mm.297411	NM_207031	Tmem16g	transmembrane protein 16g	1.5695	1.812	1.869	
AGnmA070106	Mm.288733	AK006877	Tbcl d20	TBCL domain family, member 20	1.714	1.933	1.868	
AGnmB140914	Mm.223291	AY073213	Olfir1395	olfactory receptor 1395	1.6239	1.688	1.868	
AGnmA230409	Mm.204831	AK003553	1110007M04Rik	RIKEN cDNA 1110007M04 gene, homolog to human hrp40 short form	0.7703	1.481	1.865	
AGnmA050617	Mm.27804	AK005661	Zc3h15	Zinc finger CCCH-type containing 15	1.1398	2.053	1.825	
AGnmB251503	Mm.28520	AF435852	Ski	Sloan-Kettering viral oncogene homolog	1.3836	1.654	1.815	
AGnmC240815	Mm.219585	NM_028953	Tmc1	transmembrane channel-like gene family 1	1.8076	1.765	1.775	
AGnmB051516	Mm.27831	AK009896	Pno1	Partner of NOB1 homolog (S. cerevisiae)	0.8851	1.507	1.764	
AGnmB221313	Mm.219581	BC024690	Zfp598	Zinc finger protein 598	1.4427	1.612	1.762	
AGnmA080411	Mm.271784	NM_133900	Paph	Phosphoserine phosphatase	1.0385	1.557	1.757	
AGnmC100718	Mm.393405	AK206353	Cotl1	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	1.721	1.646	1.747	
AGnmA260501	Mm.20592	NM_053178	Acsbg1	acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1	1.3927	1.598	1.738	
AGnmB120522	Mm.334078	NM_053014	Agpat3	1-acylglycerol-3-phosphate o-acyltransferase 3; agpat3	1.0691	1.475	1.73	
AGnmC131324	Mm.29954	NM_001081116	Arhgef17	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17	1.5072	2.186	1.721	
AGnmA060917	Mm.44257	AK005865	Spats1	Spermatogenesis associated, serine-rich 1	1.6578	1.815	1.72	
AGnmA081408	Mm.27286	NM_023587	Ptpib	Protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member b	1.0023	1.483	1.706	
AGnmB081406	Mm.289936	BC005657	Psat1	Phosphoserine aminotransferase 1	1.076	1.554	1.698	
AGnmB011204	Mm.451668	AY073233	Olfir275	olfactory receptor 275	1.1946	1.529	1.691	
AGnmA201417	Mm.41877	AK017628	Slc25a33	Solute carrier family 25, member 33	1.2656	1.484	1.681	
AGnmB171512	Mm.1186	M81022	Car2	carbonic anhydrase 2	1.2929	1.419	1.67	
AGnmB230914	Mm.11545	BC023469	Rhbdf1	Rhomboid family 1 (Drosophila)	1.5205	1.533	1.655	
AGnmA211618	Mm.280254	NM_026179	Abhd5	Abhydrolase domain containing 5	1.5404	1.377	1.651	
AGnmB081514	Mm.440327	AK016015	Cdh23	Cadherin 23 (otodherin)	1.459	1.583	1.648	
AGnmA251005	Mm.29192	AK013880	Nars	Asparaginyl-tRNA synthetase	0.8552	1.565	1.634	
AGnmB090215	Mm.290251	NM_013493	Cnbp	cellular nucleic acid binding protein	1.0328	1.548	1.633	
AGnmA260515	Mm.2390	NM_007709	Cited1	cbp/p300-interacting transactivator with glu/asp-rich carboxy-terminal domain 1	1.2482	1.419	1.632	
AGnmB250302	Mm.3896	M83184	Dlx2	Distal-less homeobox 2	1.4589	1.559	1.627	
AGnmB220803	Mm.379188	AF302090	Trim69	tripartite motif-containing 69	1.1909	1.421	1.627	
AGnmB140103	Mm.397307	BC022945	Zmynd11	Zinc finger, MYND domain containing 11	1.5211	1.532	1.612	
AGnmB160714	Mm.223363	AY073118	Olfir1239	olfactory receptor 1239	1.7582	1.632	1.606	



AccGene ID	UniGene	RefSeq Accession	Symbol	Description	RA( $\mu$ M) ratio		
					0.5	2.5	4
AGmmB150818	Mm.98522	AK019101	Z310079F23Rik	RIKEN cDNA Z310079F23 gene	1.5768	1.568	1.593
AGmmA070122	Mm.2961	NM_009374	Tgm3	Transglutaminase 3, E polypeptide	1.5907	1.785	1.592
AGmmB220314	Mm.377298	U28769_1	Olf141	olfactory receptor 141	1.4555	1.614	1.587
AGmmC210301	Mm.248359	NM_173013	Mtap1s	microtubule-associated protein 1S	1.5486	1.525	1.587
AGmmB261421	Mm.1843	M36830	Hsp90aa1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	0.9642	1.618	1.584
AGmmA260508	Mm.377134	NM_026030	Eif2a2	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)	0.7161	1.558	1.577
AGmmB130719	Mm.290868	AK004063	Tom1	target of myb1 homolog (chicken)	1.4684	1.446	1.571
AGmmA091116	Mm.212446	NM_018763	Chst2	carbohydrate sulfotransferase 2	1.3224	1.443	1.566
AGmmB210304	Mm.157070	AK019268	Mem8	Minichromosome maintenance deficient 8 (S. cerevisiae)	1.7132	1.53	1.55
AGmmB240203	Mm.41993	AJ238309	Slc6a3	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3	1.45	1.478	1.549
AGmmC130517	Mm.212764	NM_001034878	Dnaic2	dynein, axonemal, intermediate chain 2	1.5441	1.597	1.541
AGmmB150715	Mm.223376	AY073103	Olf1270	olfactory receptor 1270	1.4311	1.483	1.531
AGmmC041301	Mm.34438	XM_484752	Zfp236	zinc finger protein 236	1.7174	1.75	1.526
AGmmA060501	Mm.390480	NM_022028	Savi1	Salvador homolog 1 (Drosophila)	1.5092	1.221	1.523
AGmmC111520	Mm.295736	NM_001033340	Lrrc30	leucine rich repeat containing 30	1.47	1.418	1.517
AGmmB260509	Mm.294007	AF008222	Pcsk6	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	1.5739	1.611	1.511
AGmmB110213	Mm.221181	S69352	Pou4f3	POU domain, class 4, transcription factor 3, Bm3c	1.3624	1.417	1.509
AGmmC140802	Mm.3644	NM_021272	Fabp7	fatty acid binding protein 7, brain	1.2294	2.091	1.507
AGmmA110107	Mm.44463	NM_021280	Plecgl	phospholipase C, gamma 1	1.2017	1.526	1.503
AGmmA220708	Mm.390319	AK009134	Acyp2	acylphosphatase 2, muscle type	1.0799	1.469	1.5
AGmmA190913	Mm.2379	NM_020561	Smpd3a	Sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	1.0198	1.493	1.499
AGmmA120421	Mm.235195	NM_007417	Adra2a	adrenergic receptor, alpha 2a	1.456	1.535	1.496
AGmmB250901	Mm.11233	BC019573	1810048J11Rik	RIKEN cDNA 1810048J11 gene	1.5249	1.49	1.488
AGmmB131413	Mm.1583	M18466	Ly6c1	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1	1.5632	1.371	1.482
AGmmC161206	Mm.302496	NM_153424	Nphp4	nephronophthisis 4 (juvenile) homolog (human)	1.2677	1.545	1.481
AGmmC100722	Mm.454051	NM_207273	Tdpoz5	TD and POZ domain containing 5	1.5233	1.652	1.475
AGmmA060913	Mm.216107	AK006382	Akap13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	1.496	1.309	1.474
AGmmA070510	Mm.75890	AK010524	2410017117Rik	RIKEN cDNA 2410017117 gene	1.3855	1.749	1.472
AGmmB101101	Mm.28514	BC026384	Adhfe1	Alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	1.1633	1.492	1.469
AGmmB230111	Mm.236553	BC006656	Csb	cathepsin B	1.2352	1.589	1.467
AGmmB171617	Mm.277831	BC003948	Rabggb	RAB geranylgeranyl transferase, b subunit	1.0734	1.416	1.466
AGmmB171019	Mm.270975	NM_011241	Rangap1	RAN GTPase activating protein 1	1.3657	1.424	1.461
AGmmB121602	Mm.21976	NM_020003	0610031J06Rik	kidney predominant protein ncu-g1; 0610031j06rik	1.4178	1.446	1.458
AGmmB251304	Mm.248950	AF102536	Olf58	Olfactory receptor 58	1.2915	1.417	1.456
AGmmB200409	Mm.438177	L32025	Syn1	synapsin I	1.4255	1.516	1.453
AGmmB100614	Mm.27764	NM_023270	Rnf128	ring finger protein 128	1.8838	1.445	1.453
AGmmB150103	Mm.218198	NM_021526	Psmd14	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	1.1197	1.414	1.452
AGmmB260422	Mm.41603	AK007352	Camk2n1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	1.7264	1.5	1.452
AGmmB211616	Mm.280103	BC025037	Atpl1a1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide	1.1456	1.534	1.451
AGmmB091009	Mm.215115	BC010793	Polr3h	Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H	1.3208	1.452	1.444
AGmmB090124	Mm.458581	NM_023546	Ssty2	Spermiogenesis specific transcript on the Y 2	1.4549	1.352	1.441
AGmmB151515	Mm.3217	NM_007494	Ass1	arginosuccinate synthetase 1	1.1105	1.636	1.44
AGmmC230424	Mm.233009	NM_024457	Rap1b	RAS related protein 1b	1.1047	1.658	1.439
AGmmB161619	Mm.148748	NM_022328	Mll1	Myeloid/lymphoid or mixed lineage-leukemia translocation to 1 homolog (Drosophila)	1.4254	1.28	1.436
AGmmA240414	Mm.250841	AK006617	Ddi4l	DNA-damage-inducible transcript 4-like	1.4571	1.265	1.435
AGmmA250920	Mm.12819	NM_199195	Bckdhd	branched chain ketoadic dehydrogenase E1, beta polypeptide	0.9526	1.417	1.435
AGmmA060217	Mm.18892	NM_007927	Emd	emerin	1.086	1.461	1.432
AGmmC141221	Mm.281343	NM_001039676	Slc39a2	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 2	1.2714	1.544	1.43
AGmmB161201	Mm.267078	D10212	Hgf	Hepatocyte growth factor	1.3661	1.436	1.43
AGmmB101020	Mm.196189	NM_020581	Angptl4	Angiopoietin-like 4	1.4068	1.632	1.425
AGmmB251204	Mm.271775	AK011371	Sh3glb1	SH3-domain GRB2-like B1 (endophilin)	1.1379	1.465	1.425
AGmmB091512	Mm.222993	AY073797	Olf437	olfactory receptor 437	1.4298	1.473	1.405
AGmmB060204	Mm.383737	NM_080643	Caskin2	cask-interacting protein 2	1.5783	1.535	1.402
AGmmB041019	Mm.223030	AY073107	Olf1260	olfactory receptor 1260	1.4772	1.496	1.39
AGmmC180505	Mm.219546	NM_138655	Tmc2	transmembrane channel-like gene family 2	1.5124	1.461	1.39
AGmmB170119	Mm.1791	NM_026268	Dusp6	dual specificity phosphatase 6	1.5213	1.487	1.377
AGmmC100302	Mm.238020	NM_175317	Eftud1	elongation factor Tu GTP binding domain containing 1	1.6408	1.521	1.364
AGmmA080212	Mm.332128	NM_010167	Eya4	eyes absent 4 homolog (Drosophila)	1.6786	1.491	1.356
AGmmB090512	Mm.359387	M30880		Cell-line RBLS T-cell receptor beta chain	1.527	1.537	1.354
AGmmB121220	Mm.377618	AY073435	Olf1112	olfactory receptor 1112, olfactory receptor mor264-6	1.4389	1.534	1.346
AGmmA070904	Mm.383702	BC027238	Sulf2	Sulfatase 2	1.4935	1.675	1.341
AGmmB180322	Mm.252171	NM_026386	Snx2	Sorting nexin 2	1.4853	1.51	1.337
AGmmA070102	Mm.13694	NM_016978	Oat	ornithine aminotransferase	1.4128	1.67	1.316
AGmmB161306	Mm.466488	AY073201	Olf1301	olfactory receptor 1301, olfactory receptor mor248-5	1.6395	1.424	1.301
AGmmA060707	Mm.30035	BC025939	Aldh1l1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	1.5579	1.464	1.246
AGmmB081111	Mm.218434	BC024858	Tprkb	Tp53rk binding protein	1.8471	1.76	1.228
AGmmB091501	Mm.13036	BC010796	Cml1	Camello-like 1	1.4448	1.56	1.217
AGmmA161504	Mm.229532	NM_007904	Ednrb	endothelin receptor type B	1.7327	1.418	1.205
AGmmB241422	Mm.32550	AK002649	Dnajc12	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	1.4139	1.49	1.188
AGmmC220401	Mm.259353	NM_172748	Fbx19	F-box and leucine-rich repeat protein 19	1.6117	1.547	1.185
AGmmC220803	Mm.389930	NM_001105184	Vmn2r71	vomer nasal 2, receptor 71	1.5327	1.432	1.12
AGmmB150908	Mm.273915	AC002397	Mboat5	membrane bound O-acyltransferase domain containing 5, c3f	1.8615	1.5	1.095
AGmmB111203	Mm.3914	U94518	Slc12a1	Solute carrier family 12, member 1	1.4684	1.704	ND
AGmmB220718	Mm.33864	AK005778	4930578I06Rik	RIKEN cDNA 4930578I06 gene	1.5341	1.53	ND

表3 : ATRA 投与によって遺伝子発現が低下した遺伝子群  
(ハイライト遺伝子: 定量的 RT-PCR 解析を実施した遺伝子)

AceGene ID	UniGene	RefSeq Accession	Symbol	Description	RA(μM) ratio		
					0.5	2.5	4
AGmmA130423	Mm.378883	NM_009708	Rnd2	Rho family GTPase 2	0.98	0.562	0.288
AGmmA200610	Mm.172346	AK003861	Tgfb2	Transforming growth factor, beta receptor II	0.65	0.593	0.321
AGmmB030811	Mm.439690	BC002219	Tuba1a	tubulin, alpha 1A	0.83	0.605	0.33
AGmmA140802	Mm.2015	NM_011228	Rab33a	RAB33A, member of RAS oncogene family	1.06	0.632	0.346
AGmmA210922	Mm.12886	NM_009136	Scrg1	scrapie responsive gene 1	0.88	0.608	0.365
AGmmA211217	Mm.235998	NM_009115	S100b	S100 protein, beta polypeptide, neutral	0.99	0.599	0.395
AGmmA100406	Mm.26040	AK011914	Rnaseh2b	Ribonuclease H2, subunit B	0.73	0.675	0.416
AGmmA211318	Mm.245154	NM_019790	Tmeff2	transmembrane protein with egf-like and two follistatin-like domains 2	0.87	0.579	0.425
AGmmA110102	Mm.41614	AK005168	Cmtm5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	0.99	0.629	0.429
AGmmA110221	Mm.10812	NM_008804	Pde9a	phosphodiesterase 9a	1.01	0.693	0.447
AGmmC091317	Mm.355700	XR_001840	EG666160	predicted gene, EG666160	0.66	0.695	0.469
AGmmB201321	Mm.12896	NM_007866	Dil3	delta-like 3 (Drosophila)	0.89	0.681	0.469
AGmmB200724	Mm.235538	NM_011271	Rnase1	Ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	0.57	0.548	0.482
AGmmA180919	Mm.12723	NM_007487	Arl4a	ADP-ribosylation factor-like 4A	0.8	0.643	0.483
AGmmA090511	Mm.157655	NM_023865	9530002B09Rik	RIKEN cDNA 9530002B09 gene	0.88	0.704	0.486
AGmmA101117	Mm.9648	AK009587	Mad2l2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	0.8	0.625	0.493
AGmmA111122	Mm.233903	AK003004	Nnat	Neuronatin	0.86	0.705	0.505
AGmmA061322	Mm.22665	NM_010412	Hdac5	histone deacetylase 5; hdac5	0.82	0.651	0.507
AGmmA261511	Mm.269649	NM_008826	Pfkf	Phosphofructokinase, liver, B-type	0.78	0.491	0.512
AGmmA160212	Mm.72959	AK016461	4931417G12Rik	RIKEN cDNA 4931417G12 gene	0.63	1.007	0.519
AGmmB110320	Mm.1451	AB021130	Mfge8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein	0.73	0.627	0.525
AGmmA110418	Mm.261676	NM_023422	Hist1h2bc	Histone cluster 1, H2bc	0.87	0.67	0.537
AGmmA240122	Mm.212991	AK009946	2310056P07Rik	RIKEN cDNA 2310056P07 gene	0.8	0.467	0.541
AGmmC130720	Mm.469908	NM_001105183	Vrmn2r70	vomer nasal 2, receptor 70	1	0.705	0.549
AGmmC190506	Mm.341948	NM_201518	Flrt2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	0.69	0.845	0.557
AGmmA020107	Mm.286127	AK018616	Elov17	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)	1.02	0.7	0.559
AGmmB100720		BC012207		unknown (protein for mgc:18977)	0.65	0.664	0.562
AGmmB090207	Mm.439711	BC012496	Acat2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	0.93	0.683	0.562
AGmmB031619	Mm.168789	NM_009876	Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1c (p37)	0.76	0.597	0.564
AGmmC040911	Mm.384946	AV493944		Transcribed locus, moderately similar to XP_001499085.1 PREDICTED: similar to Ac2-125 [Equus caballus]	1.02	0.683	0.565
AGmmB110605	Mm.39472	NM_134469	Fdps	farnesyl diphosphate synthetase	1.06	0.67	0.567
AGmmB190819	Mm.7729	BC004802	Aldoc	Aldolase 3, C isoform	0.67	0.578	0.567
AGmmC060723	Mm.39472	NM_134469	Fdps	farnesyl diphosphate synthetase	1.04	0.639	0.57
AGmmA140920	Mm.378990	NM_009760	Bmp3	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 1; NIP3	0.71	0.55	0.574
AGmmB191522	Mm.4263	NM_009976	Cst3	Cystatin C	0.8	0.666	0.574
AGmmA120103	Mm.25405	NM_018790	Arc	Activity regulated cytoskeletal-associated protein	0.7	0.813	0.593
AGmmB200515	Mm.179243	NM_029173	Nxn12	nucleoredoxin-like 2	0.72	0.641	0.604
AGmmB201604	Mm.89568	AF033664	Baz1a	Bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A	0.69	0.935	0.605
AGmmA130319	Mm.471602	NM_010191	Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	0.8	0.661	0.607
AGmmB230518	Mm.7729	X03796	Aldoc	Aldolase 3, C isoform	0.88	0.614	0.609
AGmmC040514	Mm.2395	NM_183250	Ccdc72	coiled-coil domain containing 72	0.64	0.714	0.612
AGmmC041005	Mm.13944	NM_029767	Rps9	ribosomal protein S9	0.71	0.791	0.613
AGmmB111410	Mm.269815	NM_016898	Cd164	cd164 antigen	0.7	0.765	0.616
AGmmC100524	Mm.72979	NM_172930	6430550H21Rik	RIKEN cDNA 6430550H21 gene	0.63	0.76	0.621
AGmmC010802	Mm.360537	AI853688	EG619719	Predicted gene, EG619719	0.7	0.794	0.629
AGmmB011016	Mm.387484	AF303453	ENSMUSG00000075496	predicted gene, ENSMUSG00000075496	0.89	0.537	0.629
AGmmB200205	Mm.29324	BC005509	Ldha	Lactate dehydrogenase A	0.8	0.461	0.633
AGmmA170206	Mm.3272	NM_016894	Ramp1	Receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	0.76	0.686	0.638
AGmmB201419	Mm.17932	NM_013632	Prnp	purine-nucleoside phosphorylase	0.88	0.678	0.638
AGmmC171001	Mm.317473	NM_172987	Nkain3	Na+/K+ transporting ATPase interacting 3	0.79	0.478	0.64
AGmmA251523	Mm.136586	BC004831	SmoX	Spermine oxidase	0.97	0.704	0.642
AGmmC030613	Mm.380518	NM_172485	Thsd7b	thrombospondin, type I, domain containing 7B	0.7	0.798	0.643
AGmmA130605	Mm.425204	AK006668	1700041C02Rik	RIKEN cDNA 1700041C02 gene	0.69	0.816	0.643
AGmmB020410	Mm.1761	X57186	Clk1	CDC-like kinase 1	0.65	1.165	0.644
AGmmA170920	Mm.282985	BC002232	App12	Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 2	0.58	0.801	0.654
AGmmA230322	Mm.336204	NM_008828	Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	0.79	0.665	0.664
AGmmC070618	Mm.276298	NM_027376	Fuz	fuzzy homolog (Drosophila)	0.7	0.87	0.664
AGmmB230403	Mm.151948	AF426464	Myo1d	Myosin ID	0.82	0.654	0.667
AGmmA261621	Mm.597	NM_008776	Pafah1b3	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha subunit	0.94	0.677	0.668
AGmmA230423	Mm.296169	NM_009270	Sqle	squalene epoxidase	0.73	0.667	0.674
AGmmA240114	Mm.461314	AK019817	4931433A01Rik	RIKEN cDNA 4931433A01 gene	0.52	1.028	0.677
AGmmC011118	Mm.210095	BM89592	Atp2b3	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 3	0.67	0.989	0.681
AGmmA151314	Mm.103638	NM_019714	Tle4	transducin-like enhancer of split 4, homolog of Drosophila E(spl)	0.85	0.689	0.689
AGmmC060101	Mm.129840	NM_001110163	Pde4dip	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	0.68	0.752	0.7
AGmmA211308	Mm.276041	AK013984	3110003A17Rik	RIKEN cDNA 3110003A17 gene	0.65	0.937	0.702
AGmmA070506	Mm.440321	NM_130883	Vamp5	Vesicle-associated membrane protein 5	0.67	0.696	0.742
AGmmB080802	Mm.220165	M29324	Zfp353	zinc finger protein 353	0.71	0.474	0.817

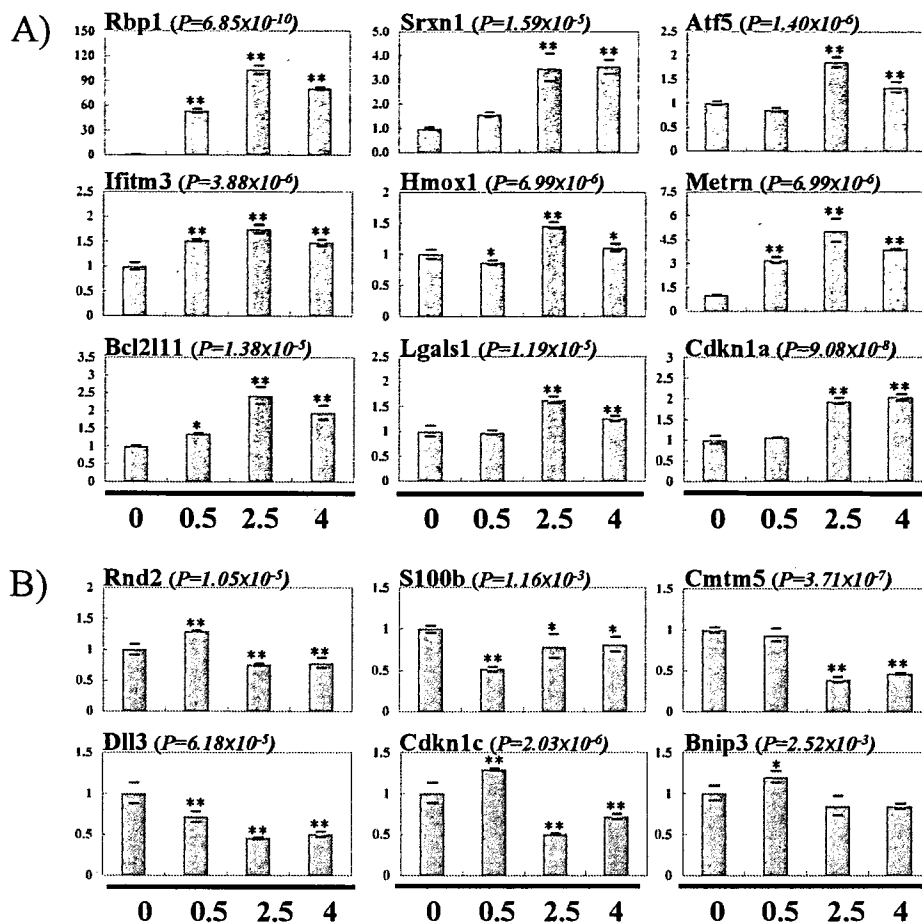


図2：定量的RT-PCRを用いたマイクロアレイ解析で発現変動が見られた遺伝子の発現解析

non-repeated measures ANOVAによる分散分析 (P 値),  
Dunnett's testによるコントロールとレチノイン酸添加群との多重比較の結果 (\*; P<0.05, \*\*; P<0.01)

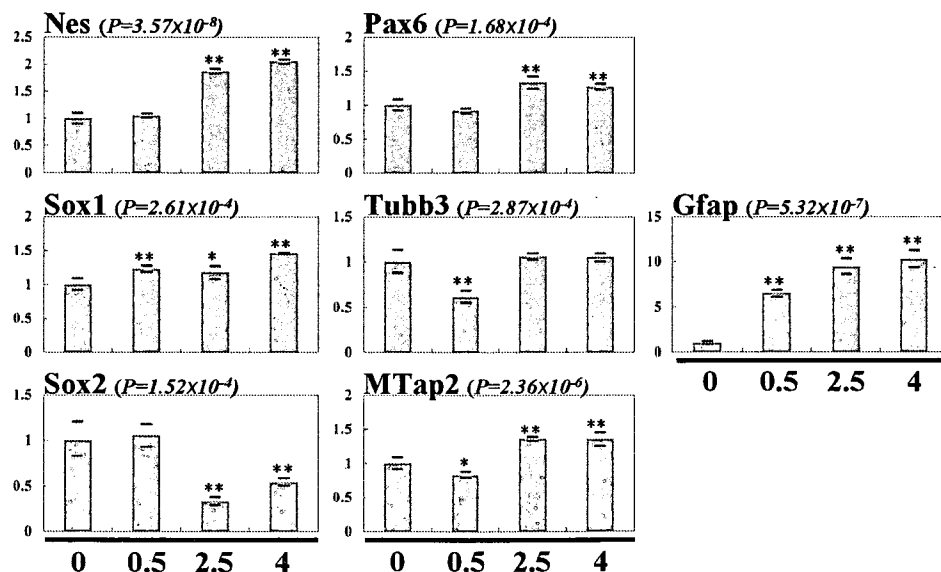


図3：定量的RT-PCRを用いた神経分化関連遺伝子の発現解析

non-repeated measures ANOVAによる分散分析 (P 値),  
Dunnett's testによるコントロールとレチノイン酸添加群との多重比較の結果 (\*; P<0.05, \*\*; P<0.01)

## D. 考察

前年度までの解析で、高濃度の ATRA が神経幹細胞/前駆細胞に対する細胞毒性を有することが判明していたが、今年度の解析でそれに関連する分子メカニズムと遺伝子発現の特性が明らかとなった。

まず ATRA の投与濃度に連動してレチノイン酸によって誘導されるマーカー遺伝子の 1 つである *Rbp1* の著明な発現上昇が観察されたことから、本実験系において ATRA は細胞に十分作用していると考えられ、得られた遺伝子発現情報は ATRA の作用を反映するものであると考えられた。次に、発現上昇した遺伝子群のマイクロアレイ解析の結果と定量的 RT-PCR 解析の解析結果の一致率は高く、ストレス誘導酵素の 1 種の *Hmox1* やアポトーシス関連遺伝子の *Bcl2l11*、*Cdkn1a* などが ATRA の投与濃度に連動して有意に発現上昇していた。これらの遺伝子群の発現上昇は ATRA による細胞死 (アポトーシス) の誘発を意味すると考えられた。一方、発現が減少した遺伝子群のマイクロアレイ解析の結果と定量的 RT-PCR 解析の解析結果の一致率はそれほど高くなく、データのバラツキが見られた。その理由として、発現上昇が見られた遺伝子と比較して、発現低下が見られた遺伝子の変動値は小さく、その結果がマイクロアレイ解析のデータに影響を及ぼしたと考えられた。

次に、神経分化に関連する遺伝子の発現変動解析では興味ある知見が得られた。ATRA の投与によって、神経細胞への分化に関与する遺伝子群の変動は顕著に観察されなかったのに対し、グリア細胞への分化指標である *Gfap* の著明な上昇が見られた。マイクロアレイ解析の結果からは同じくグリア細胞への分化に関連する *Metn* の発現上昇が確認され、これら結果から ATRA の投与によって細胞分化、特にグリア系細胞への分化プロセスが誘導されている可能性が否定できないと考えられた。しかし、この分化誘導作用は必ずしも正常な分化プロセスを誘導しているのではなく、複雑に修飾された作用であると推察された。それを表す他の現象として *Atf5* の発現上昇が挙げられ

る。*Atf5* は神経前駆細胞の神経細胞への分化プロセスに関与する遺伝子で、*Atf5* の発現が高い状態では *nestin* 発現が上昇し、細胞は未分化になる。逆に *Atf5* の発現が抑制されると *Gfap* 陽性細胞の割合が増え、アストロサイトへの分化が起こる。今回の解析では *Atf5* と *nestin* の発現上昇は一致したが、*Gfap* や *Metn* の発現から、*Atf5* が高発現した状態でもグリア系細胞への分化プロセスが進行している可能性があり、正常の分化プロセスとは異なる状態が発生していると考えられた。

以上の結果より、神経分化関連遺伝子の発現異常とアポトーシス誘発が同時に引き起こされるのが高濃度域 ATRA の神経幹細胞/前駆細胞に及ぼす細胞毒性の分子メカニズムの一つであり、今回の解析でそれに関連する遺伝子情報の取得が行えたと考えられる。これら情報は今後、ATRA の内在性神経幹細胞に対する毒性を検討する上で、有用な情報をもたらすものと考えられた。

## E. 結論

マイクロアレイを用いて ATRA の神経幹細胞/前駆細胞に対する細胞毒性に関連する遺伝子を評価した結果、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が判明した。これら情報は今後、ATRA の内在性神経幹細胞に対する毒性を検討する上で、有用な情報をもたらすものと考えられた。

## F. 成果発表

### 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) Mori H, Fujitani T, Kanemura Y, Kino-oka M, Taya M: Observational examination of aggregation and migration during early phase of neurosphere culture of mouse neural stem cells. *J Biosci Bioeng*