

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 17 年度～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 金村 米博

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
--------------------------	----

平成 17 年度～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
	和田 昭盛	神戸薬科大学 生命有機化学研究室	教 授
	岡野 栄之	慶應義塾大学 医学部生理学教室	教 授
	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
	入江 康至	岩手医科大学 医学部薬理学講座	講 師
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）
総合研究報告書

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

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

和田 昭盛

神戸薬科大学 生命有機化学研究室
教授

岡野 栄之

慶應義塾大学医学部生理学教室
教授

山崎 麻美

国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究部
室長

入江 康至

岩手医科大学 医学部薬理学講座
講師

A. 研究目的

本研究は、難治性神経疾患に対する有効かつ安全な薬剤開発を効率化する支援技術として、ES細胞を用いた薬剤安全性の高感度評価システムの開発と毒性関連遺伝子・タンパク質データベースの構築を目指す。

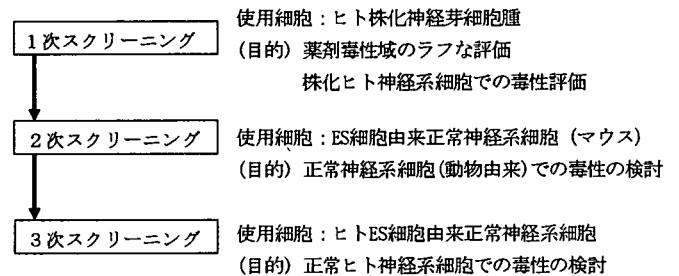
B. 研究方法

1) 安全性評価用基準神経系細胞の確立

①株化ヒト神経系細胞の特性解析と無血清培養系の開発、②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技術の開発、③ES細胞からの各種神経分化細胞作成技術の開発を実施

した。

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



使用する細胞の違いと取得目的情報の違いから、薬剤応答性評価試験は1～3次の段階的スクリーニングを基本として、1.薬剤種類、2.投与濃度、3.投与後時間のそれぞれを考慮して実施した。評価法としては、培養上清中の乳酸脱水素酵素（LDH）量を蛍光法(CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay、Promega社)で計測し、生細胞数は発光法を応用した細胞内総ATP量計測法（CellTiter-Glo Luminescent Cell viability Assay、Promega社）を使用して評価した。得られた細胞毒性曲線を元に50%生存阻害濃度（IC50）を算出した。

薬剤応答性評価試験に使用した細胞はヒトES細胞由来細胞を含む合計13種（表1）、使用薬剤は、抗けいれん薬、抗うつ薬、神経系への催奇性を有する薬剤、依存性を有する薬剤などからなる合計43種である（表2）。

	細胞名	由来	入手先(作成元)
神経系株化細胞	U251MG	ヒト神経膠腫	ヒューマンサイエンス振興財団
	SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫	ATCC
	Ntera2	ヒト精巢奇形腫	ATCC
非神経系株化細胞	Jurkat	ヒトT細胞白血病	ATCC
	HeLa	ヒト子宮頸部癌	理研バイオリソースセンター
	HepG2	ヒト肝臓癌	ATCC
正常線維芽細胞	WI38	ヒト(3か月齢胎児肺)	ヒューマンサイエンス振興財団
	NTI-4	ヒト(9週齢胎児体部)	ヒューマンサイエンス振興財団
	Hs68	ヒト(新生児皮膚)	ヒューマンサイエンス振興財団
神経幹細胞	mNSC	マウス脳(胎生14日)	初代培養
ヒトES細胞由来神経幹細胞/前駆細胞	EB52	ヒトES細胞(KhES-1)	慶應義塾大学医学部生理学教室
	EB53	ヒトES細胞(KhES-1)	慶應義塾大学医学部生理学教室
	EB71	ヒトES細胞(KhES-1)	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

既存薬剤種	数	薬剤名
抗がん剤	12	cytarbine (Ara-C), flulorouracil (5-FU), methotrexate, 6-mercaptopurine (6-MP), vincristine sulfate, Mitomycin C, neomicine (G418), cisplatin, etoposide, procarbazine-HCl, carboplatin, Nimustine-HCl
抗うつ薬	12	paroxetine, sertraline, fluoxetine, fluvoxamine, citalopram, imipramine, desipramine, clomipran, amitriptyline-HCl, venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine, milanacipran
抗けいれん薬	4	phenytoin, zonisamide, carbamazepine, sodium valproate
向精神薬	2	thioridazine-HCl, haloperidol
その他	13	cilostazol, all trans retinoic acid (ATRA), simvastatin, acetaminophen, ticlopidine-HCl, theophyllin, verapamil-HCl, aspirin, caffeine, DMSO, ethanol, lidocaine, Methamphetamine (METH)
合計	43	

表2:薬剤応答性評価試験に使用した薬剤リスト

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

薬剤応答性評価試験結果をベースに、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実施した。遺伝子発現解析は主に、マイクロアレイ (AceGene 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] および GeneChip®[Affymetrix 社]) と定量的 RT-PCR 法にて実施し、タンパク質発現解析はプロテインチップ (SELDI-TOFMS ; Bio-Rad 社) を用いて実施した。使用した薬剤は、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 つのレチノイン酸アナログ、向精神薬の Thioridazine-HCl、抗ガン剤 3 種 (AraC, Nimustine-HCl, Vincristine) である。レチノイン酸アナログに関しては、新規合成を実施して解析を行った。

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

産出されたデータに対し、数理統計学を用いて正規化を行い、遺伝子発現データを収集、データベースを構築した。さらに、構築されたデータベース情報を元に、Kolmogorov-Smirnov 検定等の手法 (図 1) を用いてクラスタリング解析による薬剤応答遺伝子の分類解析や、パスウェイ・機能などでの群としての変動を探索した。

5) 倫理面への配慮

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ヒト ES 細胞由来分化細胞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

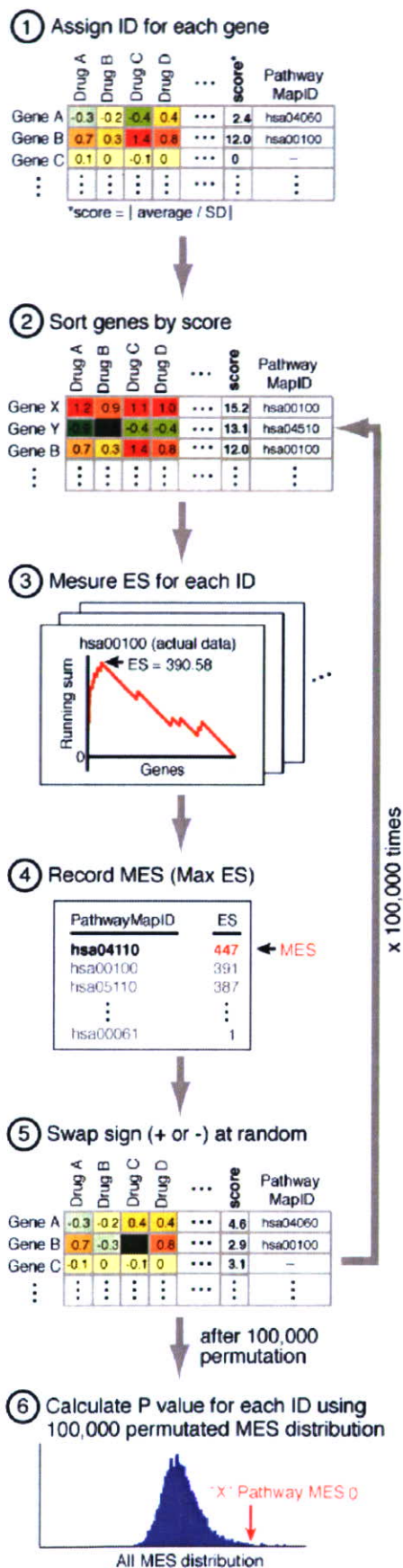


図 1 : Kolmogorov-Smirnov 検定等の手法を用いたクラスタリング解析による薬剤応答遺伝子の分類解析

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、ヒト ES 細胞由来分化細胞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. 研究成果

1) 安全性評価用基準神経系細胞の確立

①株化ヒト神経系細胞の特性解析と無血清培養系の開発

1 次スクリーニングに使用する株化ヒト神経系細胞の特性解析を実施し、ヒト SH-SY5Y 細胞株は汎神経細胞的性格を有する細胞で神経細胞のモデル細胞として活用する事は有効であるが、各種レセプター、神経伝達物質を重複して発現しており、特定の神経細胞のモデル細胞としては不向きであることを明らかにした。さらにヒト Ntera2 細胞株はヒト ES 細胞とヒト神経幹細胞の相互に類似の性格を有しする細胞であることを明らかにした。

各種株化ヒト細胞の無血清培養系の開発を実施し、Jurkat 細胞株(ヒト白血病細胞)やヒト U251 細胞株(グリア系細胞)は無血清状態に強く、無血清培養でも十分に使用可能であるが一方、SH-SY5Y、Ntera2 の増殖は血清依存性が強く、無血清状態で薬剤応答性評価試験を実施するためには無血清状態がもたらす細胞毒性を考慮した上でのプロトコル作製が必要であることを明らかにした。これら解析結果から合計 9 種類の株化ヒト細胞の無血清培養系の開発に成功し、確立したプロトコルは 1 次スクリーニングの実施に使用された。

②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技術の開発

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、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 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。

③ES 細胞からの各種神経分化細胞作成技術の開発

2 次・3 次スクリーニングで使用する ES 細胞由来神経系細胞を作製するための技術開発とし、マウス ES 細胞から神経幹細胞/前駆細胞(NS/PCs)を含む neurosphere を誘導する培養法、さらにマウス ES 細胞から神経幹細胞を誘導し、その過程で様々な分泌因子を加えることで特異性を制御し、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)で選択的に障害される前脳型コリン作動性ニューロンと運動ニューロンを誘導する培養法を確立した。誘導した細胞の in vitro、in vivo における性質を明らかにし、これら技術を応用してヒト ES 細胞(KhES-1)から神経幹細胞/前駆細胞(以下、hES-NS/PCs)(図 2)の作成に成功し、それを用いた薬剤応答性評価試験(3 次スクリーニング)の実施に成功した。

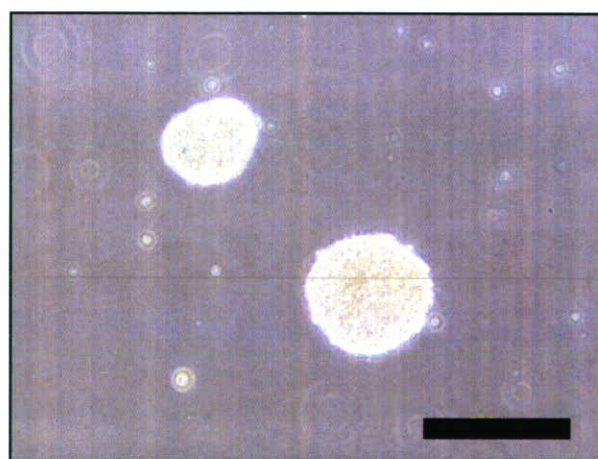


図 2 : ヒト ES 細胞由来神経幹細胞/前駆細胞
スケールバー : 200 μ m

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

①初期1次スクリーニング

2種類のパラメーター（細胞内総ATP量、培養上清中LDH量）を用いた単一ウェルでのマルチアッセイ系の開発に成功した。これを用いて、初期1次スクリーニングとして株化ヒト細胞（4種類）に対する抗がん剤（9種類）の毒性、さらに神経系細胞（SH-SY5Y細胞株）における薬剤投与後時間と細胞毒性の関連性を検討し、各薬剤の毒性の出方は神経系細胞間で大きく異なることと、薬剤濃度に加え薬剤投与後時間というパラメーターを考慮したスクリーニングが重要であることを明らかにした。このデータを基礎に、次項の1次・2次スクリーニングを実施した。

②1次・2次スクリーニング

前述の初期1次スクリーニングを更に進めて、ヒト細胞（9種）を用いた1次スクリーニングを行なうと同時に2次スクリーニングとしてマウス神経幹細胞を使用した解析を実施した。既存薬剤43種（表2）の細胞毒性を2種類のパラメーター（細胞内総ATP量、培養上清中LDH量）を用い

たマルチアッセイ系を用いて評価した結果、細胞毒性は、培地中の血清の影響を受ける場合があることを明らかにした。各薬剤のヒト細胞に対する毒性は様々であるが、ヒトEC細胞のNtera2に対して種々の薬剤の毒性が強く出やすい傾向があることを明らかにした。またマウス正常神経幹細胞は、薬剤毒性が出現する場合はヒト細胞より小さなIC50値を取る傾向が幾つかの薬剤において顕著であることを明らかにし、薬剤毒性の生物種差に関する考察を実施した。

③3次スクリーニング

前項の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た5薬剤（ATRA, Thioridazine-HCl, AraC, Nimustine-HCl, Vincristine）のhES-NS/PCsに対する細胞毒性の評価を実施した。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（表3）。

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 ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
投与時間	24hr	24hr	48hr	48hr	48hr
Ntera2	6.61	5.89	3.5	11.4uM	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

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

① Psychostimulant によるドーパミン神経終末毒性発現機構の解析

メタンフェタミン (METH) のドーパミン終末に対する毒性発現機構の解析を行う目的として、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。また、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を明らかにした。

② レチノイン酸アナログの合成と作用メカニズムの解析

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の解析解明を目的として、種々のレチノイン酸アナログの合成とその薬理作用の解析を実施した。まず 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、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た。

次に、嵩高いルイス酸である ATPH [aluminum tris(2,6-diphenylphenoxide)] の存在下、塩基として LTMP (lithium 2,2,6,6-tetramethylpiperadide) を用いる TES (triethylsilyl) 化ブテノリドあるいは TBS (tert-butyl dimethylsilyl) 化ブテノリドとアルデヒドとの位置選択的な交差アルドール反応を経由する γ -ヒドロキシブテノリドの新規合成法を確立し、この方法を利用して合成される β 位共役鎖

の末端に複素芳香環を有する種々の γ -ヒドロキシブテノリド誘導体が高い抗腫瘍作用と分化誘導作用を有する新規化合物であることを明らかにした。

さらに種々のシクロヘキサノンから誘導したノナフラートまたはトリフラートとスズオレフィンとのカップリング反応を鍵反応として、レチノイン酸のシクロヘキセン環上のメチル基を除去した 9 シス-レチノイン酸類を合成し、HL-60 細胞に対する細胞増殖抑制作用、分化誘導作用、アポトーシス誘導作用、および MG-63 細胞を用いて転写活性を検討した。その結果、シクロヘキセン環上のメチル基の数が少ないほどタンパク質との結合などの転写活性は良いものの、それ以外の作用は反対にメチル基の数が少なくなるにつれて減少することを明らかにした。

これらレチノイン酸アナログが神経系細胞に及ぼす細胞毒性の分子メカニズム解析として、神経幹細胞/前駆細胞に対する all-*trans* retinoic acid (ATRA) の細胞毒性に関連する遺伝子の解析を実施した。マウス神経幹細胞/前駆細胞に対する 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を明らかにし、ATRA の細胞毒性の分子メカニズムを解明した。

③ SELDI-TOFMS を用いた hES-NS/PCs の細胞毒性関連タンパク質の解析

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 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。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 (図3)。

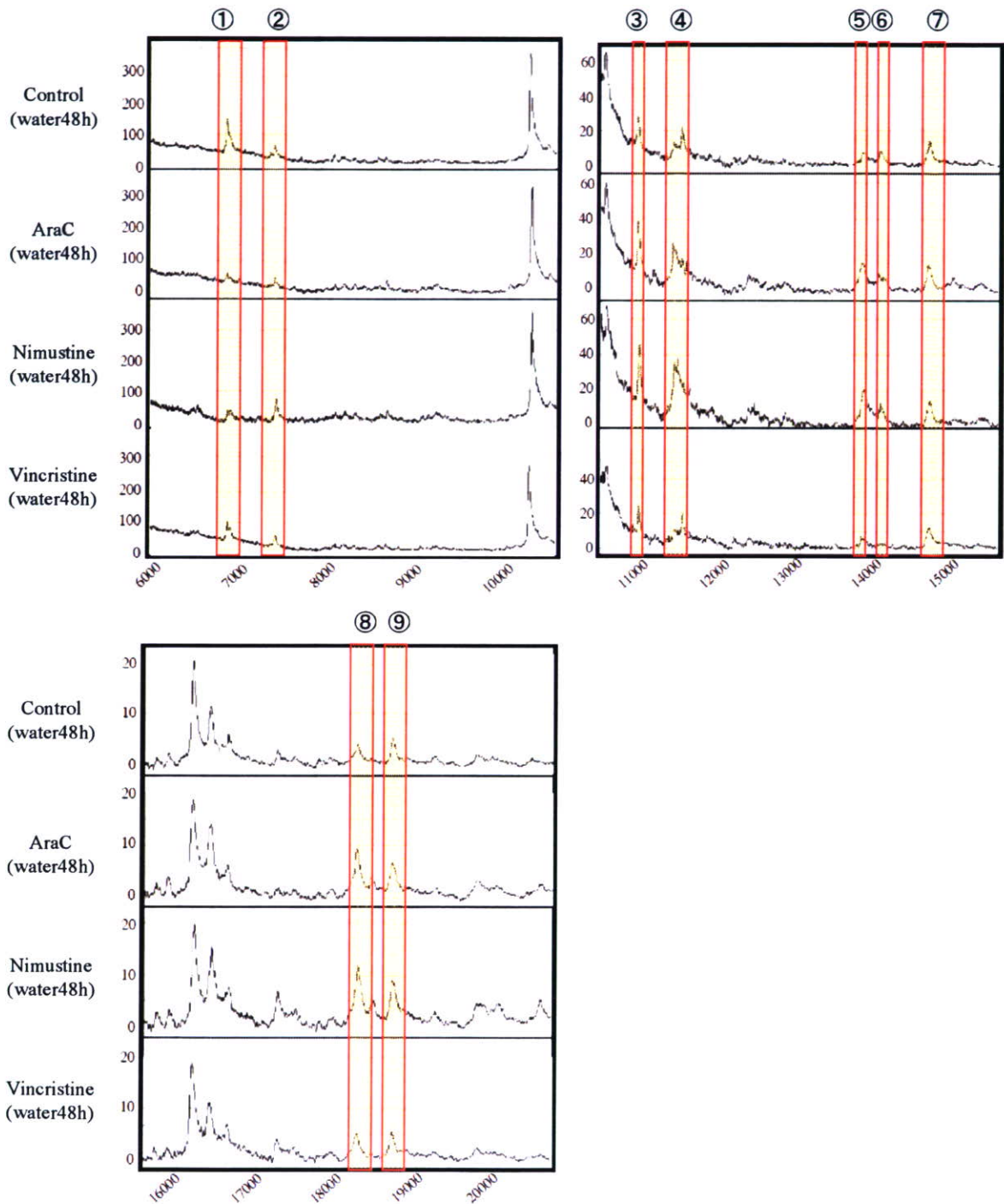


図3 : SELDI-TOFMS を用いた細胞毒性関連タンパク質の解析

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

①数理統計学に基づくマイクロアレイデータからの向精神薬微小応答遺伝子と関連機能群およびパスウェイの抽出法の開発

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の面から、数理統計学的手法を駆使した評価システムの完成を目的とし、ヒトアストロサイトに対しての抗うつ薬の影響をモデル系として使用して、遺伝子発現を機能分類あるいはパスウェイ（遺伝子ネットワーク）という群としての変動を捉えられるシステムを開発し、完成させた（図4）。これを用いて実際に抗うつ薬応答遺伝子の群としての変動を捉えることに成功した。

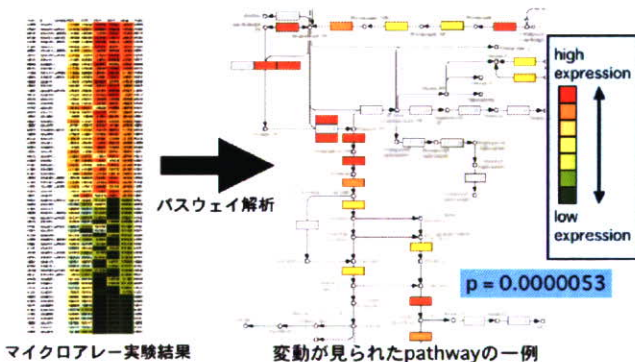


図4：数理統計学に基づくマイクロアレイデータから遺伝子ネットワークの抽出法

②hES-NS/PCs に対する薬剤応答性試験データ収集とトランスクリプトームデータベースの構築

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（図5）。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/>) (図6)。

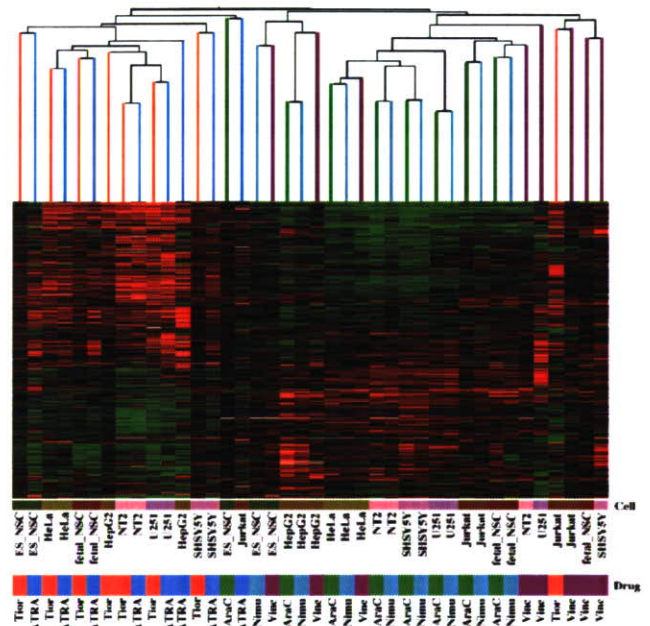


図5：hES-NS/PCs に対する薬剤応答性トランスクリプトームデータベース

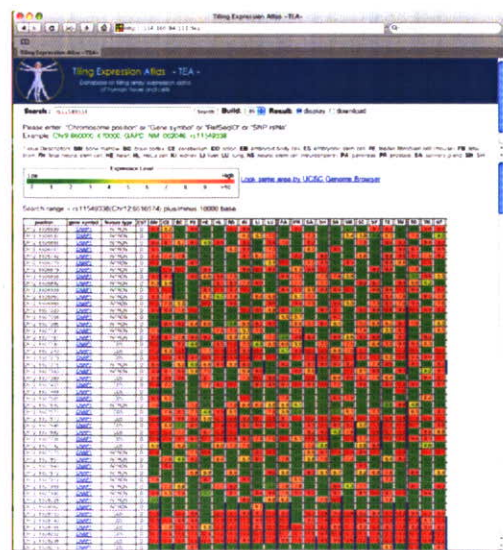


図6：ヒト組織トランスクリプトームデータベース

D. 考察

1) 安全性評価用基準神経細胞の確立

本研究プロジェクトでは3年間を通じて、各種ヒト神経系細胞を薬剤応答性試験に使用するために必要な項目である、使用するヒト細胞の特性解析、ES細胞の分化誘導・培養方法、および薬剤応答性試験プロトコルの作製、に関する検討を継続的に実施し、それらの成果を応用して、薬剤応答性試験に使用する多種のヒト細胞を選定した。そして最終年度には最大の目標であったヒトES細胞由来神経系細胞(hES-NS/PCs)を用いた薬剤応答性試験を実現することに成功した。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hES-NS/PCsを使用して薬剤応答性試験を実施した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を3年間の研究を通じて、また実際にヒトES細胞由来分化細胞を取り扱って初めて実感した。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。よって理想的にはヒトES細胞からこれら3種類の分化細胞を作成して、各々の細胞における薬剤応答性試験を実施し、その結果を相互比較することが望まれる。本プロジェクトにおいても研究計画立案段階では、ヒトES細胞から各種ヒト神経系分化細胞を作成

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実施した。しかし実際にはhES-NS/PCsの増殖力は予想外に小さく、当初計画の全てをヒト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た。最終的には使用する細胞に優先順位を付けて研究を実施する必要性が生じ、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。また取り扱いが難しいことが判明したヒトES細胞由来分化細胞を用いる解析を補完する技術が必要と判断し、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も並行して実施し、成功に至った。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、多種多様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

3年間のプロジェクトで、合計13種の細胞を使用して43種の薬剤に関して薬剤応答性試験を実施した。薬剤は、中枢神経疾患に対して使用する薬剤と中枢神経疾患以外に使用する薬剤の中で、一般臨床で使用頻度の高いものを中心に幅広く選定した。スクリーニングは3段階で実施し、最終的にhES-NS/PCsを用いた検討を行うまでに十分な情報の取得と薬剤の選択を実施した。その結果、最終年度では目標であった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。最終的にhES-NS/PCsを用いて解析した薬剤は5種類であるが、前項で指摘したhES-NS/PCs培養が困難であった事、さらに段階的に実施したスクリーニング過程で神経系細胞

に興味ある毒性を有する薬剤のみを十分に選別した上で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。また、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、事前に予測されなかった临床上、極めて重要な結果であった。この知見に関して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のと同時に、ヒト ES 細胞由来の hES-NS/PCs を応用した薬剤応答性試験は過去の試験方法では入手できない貴重な情報の取得に効果的な実験系であることが証明されたと考えられる。またマウス細胞とヒト細胞の薬剤応答性の比較の結果、マウス細胞においては薬剤種によってはヒト細胞の 10 分の 1 の低濃度で細胞毒性が出現することが判明した。従来からヒト細胞と動物細胞との間には薬剤毒性に関する生物種差があり、動物細胞での毒性試験の結果は必ずしもヒト細胞で当てはまらなると指摘されている。神経毒性に関して、とりわけ正常神経系細胞に関してのこの生物種差に関する情報は十分では無かったが、今回開発した hES-NS/PCs を応用した薬剤応答性試験システムは、当初の期待の通り、この細胞毒性における生物種差に関する情報を提供する有力な評価系となり得ることが判明した。

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

マイクロアレイおよびプロテインチップを用いた 3 年間の研究によって、各種薬剤の毒性関連遺伝子・タンパク質に関する種々の興味ある情報を得ることに成功した。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から、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

最終的に3年間の成果として、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、の2つの主要なデータベースの構築に成功した。これら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、かつヒト正常細胞・組織に関する情報を有するものである。従来の解析で多くみられるように動物細胞が主体のデータベースや癌細胞に由来する株化細胞のみを使用したデータベースとは一線を介する、極めて貴重な情報を含むデータベースであると考えられる。また内容的にも多数のヒト細胞・組織に関する情報を有し、充実したものとなっている。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、今回の研究プロジェクトの成果を社会還元するという点からも、価値あるデータベースを構築できたものと考ええる。

以上の成果から、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に関しては、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える。

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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori H, Kanemura Y, Onaya J, Hara M, Miyake J, Yamasaki M, Kariya Y: Effects of heparin and its 6-O- and 2-O-desulfated derivatives with low anticoagulant activity on proliferation of human neural stem/progenitor cells. *J Biosci Bioeng* 100(1):54-61, 2005
- 2) Suzuki T, Izumoto S, Wada K, Fujimoto Y, Maruno M, Yamasaki M, Kanemura Y, Shimazaki T, Okano H, Yoshimine T: Inhibition of glioma cell proliferation by neural stem cell factor. *J Neurooncol* 74(3):233-239, 2005
- 3) Kanemura Y, Mori H, Nakagawa A, Islam MO, Kodama E, Yamamoto A, Shofuda T, Kobayashi S, Miyake J, Yamazaki T, Hirano S, Yamasaki M, Okano H: In vitro screening of exogenous factors for human neural stem/progenitor cell

- proliferation using measurement of total ATP content in viable cells. *Cell Transplant* 14(9):673-682, 2005
- 4) Yokota T, Kouno J, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, Matsumoto K, Sugisaki Y, Onda M, Tsunoda T: Identification of histological markers for malignant glioma by genome-wide expression analysis: dynein, alpha-PIX and sorcin. *Acta Neuropathol* 111(1):29-38, 2006
 - 5) Wada A, Ieki Y, Nakamura S, Ito M: Palladium-Catalyzed Coupling Reaction of an Enol Nonafate with(Vinyl)tributylstannanes and Acetylenes: A Highly Stereoselective Synthesis of 8,18-¹³C₂-Labeled Retinal. *Synthesis* 10:1581-1588, 2005
 - 6) Sudo U, Furutana Y, Wada A, Ito M, Kamo N, Kandori H: Steric Constraint in the Primary Photoproduct of an Archaeal Rhodopsin from Regiospecific Petrurbation of Circular Dichroism Stretching Vibration of the Retinyl Chromophore. *J Am Chem Soc* 127(46):16036-16037, 2005
 - 7) 和田昭盛: Ramberg-Bäcklund 反応のカロテノイド合成への応用. *ビタミン* 79(3):172-173, 2005
 - 8) 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 *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Dev Biol* 278(2):587-606, 2005
 - 9) 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
 - 10) Saeki M, Irie Y, Ni L, Yoshida M, Itsuki Y, Kamisaki Y: Monad, a WD40 repeat protein, promotes apoptosis induced by TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun* 342(2):568-572, 2006
 - 11) Kasumi H, Komori S, Sakata K, Yamamoto N, Yamasaki T, Kanemura Y, Koyama K: Upregulation of macrophage migration inhibitory factor and calcizzarin by androgen in TM4 mouse Sertoli cells. *Asian J Androl* 8(5):549-554, 2006
 - 12) 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
 - 13) 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):384-387, 2007
 - 14) Kato T, Kanemura Y, Shiraishi K, Miyake J, Kodama S, Hara M: Early response of neural stem/progenitor cells after X-ray irradiation in vitro. *NeuroReport* 18(8):895-900, 2007
 - 15) 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
 - 16) Hirano T, Fujioaka 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 ¹³C- and ²H-Labeled Iodopsins. *Biochemistry* 45(4):1285-1294, 2006
 - 17) 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
 - 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) Wada A, Mizuguchi Y, Miyake H, Niihara M, Ito M, Nakagawa K, Okano T: Preparation and Biological Activities of Heteroarotinoids. *Lett Drug Des Discov* 4(6):442-445, 2007
- 25) 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
- 26) Yamano Y, Fujita Y, Mizuguchi Y, Nakagawa K, Okano T, Ito M, Wada A: Synthesis of γ -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
- 27) 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
- 28) 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. プロシーディング
- 1) Kobayashi S, Kanemura Y, Islam MO, Wada A, Tajria J, Miyake J, Hara M, Yamasaki M, Okano H, Ito M: Effect of all-trans retinoic acid and 13-substituted retinoic acids on human neural stem/progenitor cells' neurogenesis. *Carotenoid Science* 8:77-80, 2005
- 2) Kanemura Y, Yamazaki T, Kobayashi S, Yamada T, Shofuda T, Mori H, Yamasaki M, Tsunoda T, Miya F, Okano H, Ito M, Waka A, Irie Y, Miki N: Development of gene and protein expression screening-based toxicogenomics system using human primary normal neuronal cells. *J Toxicol Sci* 30:S116, 2005
- 3) Yamazaki T, Kobayashi S, Mori H, Kanemura Y: High-throughput screening of differentially expressed protein in drug treated cells using SELDI-TOFMS. *J Toxicol Sci* 30:S118, 2005
- 4) Wada A, Miyake H, Niihara M, Ito M, Uenishi J: Synthesis of Retinoic Acid Analog Containing Heteroaromatic Ring. *Carotenoid Science* 8:22-23, 2005
- 5) 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) 金村米博, 森 英樹, 正札智子, 山本篤世, 山

- 田登美子, 山崎智彦, 角田達彦, 山崎麻美, 岡野栄之: ヒト神経幹細胞/前駆細胞の生物学的特性の検討. 神経組織の成長・再生・移植研究会第20回学術集会, 2005年5月; 豊中
- 2) 山崎智彦, 小林 哲, 森 英樹, 金村米博: SELDI-TOFMS を用いた薬剤応答ユビキタス蛋白質のスクリーニング. 第32回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005年7月; 東京
 - 3) 金村米博, 山崎智彦, 小林 哲, 山田登美子, 正札智子, 森 英樹, 山崎麻美, 角田達彦, 宮冬樹, 岡野栄之, 伊藤允好, 和田昭盛, 入江康至, 三木直正: ヒト神経系細胞を用いた包括的遺伝子・蛋白質発現解析を主体としたトキシコゲノミクス手法の開発. 第32回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005年7月; 東京
 - 4) 金村米博, 児玉恵理, 山崎智彦, 森 英樹, 正札智子, 山本篤世, 山田登美子, 角田達彦, 宮冬樹, 山崎麻美, 岡野栄之: ヒト神経幹細胞/前駆細胞の生物学的特性の検討. 第28回日本神経科学大会(Neuroscience2005), 2005年7月; 横浜
 - 5) 森 英樹, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 金村米博: ヒト神経幹細胞の集塊形成による増殖促進メカニズムの解析. 日本生物工学会平成17年度大会, 2005年11月; つくば
 - 6) 森 英樹, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 金村米博, 山崎麻美: ヒト神経幹細胞のニューロスフェア形成が及ぼす増殖促進効果. 第5回日本再生医療学会総会, 2006年3月; 岡山
 - 7) 宮冬樹: AceGene Oligo chip を使用した遺伝子発現プロファイル解析について. DNAチップ研究所最新技術紹介シリーズ, 2006年1月(招待講演)
 - 8) 和田昭盛, 新免正基, 伊藤允好: トリフラート類のパラジウム触媒によるカップリング反応. 日本薬学会第125年会, 2005年3月; 東京
 - 9) 和田昭盛, 奥山顕義, 伊藤允好: 重水素化した(2E)-4-ヒドロキシ-2-ノネナールの合成研究-2-. 日本薬学会第125年会, 2005年3月; 東京
 - 10) 和田昭盛, 王 飛, 伊藤允好: デメチルゲラニルゲラノイン酸類の合成研究. 日本薬学会第125年会, 2005年3月; 東京
 - 11) 和田昭盛, 新原美樹, 三宅ひろみ, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫, 伊藤允好: 芳香環を有するレチノイン酸アナログの合成と生物活性. 日本ビタミン学会第57回大会, 2005年5月; 志摩
 - 12) 和田昭盛, 大村友泰, 辻田有紀, 伊藤允好, 上西潤一: ジヒドロおよびテトラヒドロレチノイン酸類の合成. 第19回カロテノイド研究談話会, 2005年9月; 東京
 - 13) 和田昭盛, 王 飛, 伊藤允好: 11Z-3,4-デヒドロレチナールの立体選択的合成研究. 第31回反応と合成の進歩シンポジウム, 2005年11月; 神戸
 - 14) 和田昭盛, 松浦直美, 伊藤允好, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫: 9Z-デメチルレチノイン酸類の生物活性について. 日本レチノイド研究会第16回学術集会, 2005年11月; 東京
 - 15) 和田昭盛, 三宅ひろみ, 新原美樹, 伊藤允好, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫: 複素環を有するレチノイン酸アナログの合成と構造活性相関. 第24回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2005年11月; 大阪
 - 16) 古谷祐詞, 須藤雄気, 和田昭盛, 伊藤允好, 加茂直樹, 神取秀樹: 重水素化レチナールを用いて帰属したファラオニスフォボロドプシンの初期異性化産物の水素面外変角振動. 日本生物物理学会第43回学術集会, 2005年11月; 札幌
 - 17) 岡田洋平, 松本有史, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之: ES細胞由来神経系前駆細胞の時間的・空間的特異性制御: マウス ES細胞から運動ニューロンへの分化誘導. 幹細胞シンポジウム, 2005年4月; 淡路島
 - 18) 岡田洋平, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之: ES細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異

- 性制御機構の解析. 第 46 回日本神経学会総会, 2005 年 5 月; 鹿児島
- 19) 松本有史, 岡田洋平, 中村雅也, 糸山泰人, 岡野栄之: ALS モデルラットに対するマウス ES 細胞由来神経系前駆細胞移植の試み. 第 46 回日本神経学会総会, 2005 年 5 月; 鹿児島
- 20) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: Regeneration of Motor Neurons with embryonic stem cells. 第 28 回日本神経科学大会, 2005 年 7 月; 横浜
- 21) 松本有史, 岡田洋平, 中村雅也, 糸山泰人, 岡野栄之: ALS モデルラットに対する ES 細胞由来神経系前駆細胞移植. 第 28 回日本神経科学大会, 2005 年 7 月; 横浜
- 22) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: Regulation of spatio-temporal identities in ES cell-derived neural stem/progenitor cells. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, November 2005; Washington DC
- 23) 岡田洋平, 松本有史, 石井聖二, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之: ES 細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異性制御. 第 28 回日本分子生物学会, 2005 年 12 月; 福岡
- 24) Irie Y, Gan Y, Taira E, Yamagata K, Miki M: Cell Cycle Regulation by Novel Nuclear Protein Amida. 第 78 回日本薬理学会年会, 2005 年 3 月; 横浜
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 森 英樹, 仁宮一章, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 金村米博: ヒト神経幹細胞集塊内の細胞分布の解析. 日本生物工学会平成 18 年度大会, 2006 年 9 月; 豊中
- 28) 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
- 29) 入江康至, 宮 冬樹, 角田達彦, 金村米博, 三木直正, 佐伯万騎男, 上崎善規: Analysis of gene expression in dopamine or methamphetamine treated dopaminergic neural cells. 第 28 回日本生物学的精神医学会・第 36 回日本神経精神薬理学会・第 49 回日本神経化学会大会合同年会, 2006 年 9 月; 名古屋
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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. 日本カロテノイド研究会第 17 回学術集会, 2006 年 11 月; 東京
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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
- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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
- 46) 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
- 47) Miya F, Kawaguchi T, Tsunoda T: Searching optimal parameter values in tiling-array data normalization. 第 30 回日本分子生物学会、第 80 回日本生化学会大会 合同年会 (BMB2007), 2007 年 12 月; 横浜
- 48) 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シフトとオプシシ構造の変化について. 日本薬学会第 127 年会, 2007 年 3 月; 富山
- 49) 山野由美子, 高崎絃臣, 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
- 50) 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
- 51) 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 β -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
- 52) 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
- 53) 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

- 54) 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
- 55) 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
- 56) 和田昭盛, 王 飛, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫, 伊藤允好: デヒドログ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
- 57) 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
- 58) 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
- 59) 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
- 60) 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
- 61) 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

- 62) 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
- 63) 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
- 64) 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
- 65) 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. 知的所有権の取得状況

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