

lavage fluids in patients with human idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (Burkhardt et al., 2012), suggesting that CXCL17 production may be associated with human pulmonary diseases.

References (PLEASE, see below and conform to the style) ----->

CXC chemokines in angiogenesis.

Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP.
Cytokine Growth Factor Rev. 2005; 16(6): 593-609
PMID: 16046180

Novel human dendritic cell- and monocyte-attracting chemokine-like protein identified by fold recognition methods.

Pisabarro MT, Leung B, Kwong M, Corpuz R, Frantz GD, Chiang N, Vandlen R, Diehl LJ, Skelton N, Kim HS, Eaton D, Schmidt KN
J Immunol. 2006; 176(4): 2069-2073
PMID: 16455961

VCC-1, a novel chemokine, promotes tumor growth.

Weinstein EJ, Head R, Griggs DW, Sun D, Evans RJ, Swearingen ML, Westlin MM, Mazarella R.
Biochem Biophys Res Commun. 2006; 350(1): 74-81
PMID: 16989774

Broad up-regulation of innate defense factors during acute cholera.

Flach CF, Qadri F, Bhuiyan TR, Alam NH, Jennische E, Lönnroth I, Holmgren J.
Infect Immun. 2007; 75(5): 2343-2350
PMID: 17307946

The role of CXC chemokines and their receptors in cancer.

Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S.
Cancer Lett. 2008; 267(2): 226-244
PMID: 18579287

Overexpression of VCC-1 gene in human hepatocellular carcinoma cells promotes cell proliferation and invasion.

Mu X, Chen Y, Wang S, Huang X, Pan H, Li M.
Acta Biochim Biophys Sin. 2009; 41(8): 631-637
PMID: 19657564

Gene expression profiling and cancer-related pathways in type I endometrial carcinoma.

Saghir FS, Rose IM, Dali AZ, Shamsuddin Z, Jamal AR, Mokhtar NM.
Int J Gynecol Cancer. 2010; 20(5): 724-731
PMID: 20973258

CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis.

Hiraoka N, Yamazaki-Itoh R, Ino Y, Mizuguchi Y, Yamada T, Hirohashi S, Kanai Y.
Gastroenterology. 2011; 140(1): 310-321
PMID: 20955708

CXCL17 is a mucosal chemokine elevated in idiopathic pulmonary fibrosis that exhibits broad antimicrobial activity.

Burkhardt AM, Tai KP, Flores-Guiterrez JP, Vilches-Cisneros N, Kamdar K, Barbosa-Quintana O, Valle-Rios R, Hevezi PA, Zuñiga J, Selman M, Ouellette AJ, Zlotnik A.
J Immunol. 2012; 188(12): 6399-6406
PMID: 22611239

CXCL17 expression by tumor cells recruits CD11b+Gr1 high F4/80- cells and promotes tumor progression.

Matsui A, Yokoo H, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Chun NA, Kadouchi I, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Semba K, Kobayashi E, Takahashi M, Murakami T.
PLoS One. 2012; 7(8): e44080
PMID: 22952881

VCC-1 over-expression inhibits cisplatin-induced apoptosis in HepG2 cells.

Zhou Z, Lu X, Zhu P, Zhu W, Mu X, Qu R, Li M.
Biochem Biophys Res Commun. 2012; 420(2): 336-42
PMID: 22425983

The chemokine superfamily revisited.

Zlotnik A¹, Yoshie O.
Immunity. 2012; 36(5): 705-716
PMID: 22633458

CXCL17, an orphan chemokine, acts as a novel angiogenic and anti-inflammatory factor.

Lee WY, Wang CJ, Lin TY, Hsiao CL, Luo CW.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013; 304(1): E32-E40.
PMID: 23115081

- Literature references should be included in the text:

by author's name followed by year of publication arranged chronologically and then alphabetically. When there are more than two authors, use the first author name and et al. e.g. "recent data indicates that teddy bears are very affectionate persons (Paddington and The Pooh, 2003; Paddington et al., 2009)."

- In the references list:

* classified by years, from the oldest to the most recent, and by alphabetical order within a year.

* style:

Title.
Author1 AB, Author2 CD, Author3 E.
Journal Year; Vol: first page-last page. (add: REVIEW if it is)
PubMed number

Example:

All teddy bears are gentle persons.
Paddington B, The Pooh W.
Int J Teddy Bears 2003; 12: 501-509. (REVIEW)
PMID 1642873591

- For Images, please:

* Send optimum visual quality iconography.

* Please use preferably Arial 9 point for lettering.

* Images should be sent by e-mail, preferably in PNG, JPG or PSD (for photographs: chromosomes, histo-pathology, radiographs, ...); PNG, PSD, PPT, SVG, EPS, WMF, JPG or GIF (for drawings); the desk may have problems with other formats.

* The Editor keeps the right to process drawings for them to conform with our editorial policies.

- Please, send your contribution preferably by e-mail (Copy-and-past directly in the mail, and/or as an attachment, in ClarisWorks or in Word). Please, no printed version solely.

- Please also, send copy of the main papers by traditional mail to speed up the refereeing process.

Send to:

Jean Loup HURET, Genetics,

Dept Medical Information, University Hospital,
F-86021 POITIERS FRANCE
phone +33 5 49 44 45 46 or +33 5 49 45 47 67

jlhuret@AtlasGeneticsOncology.org *AND* Copy Carbone

Editorial@AtlasGeneticsOncology.org *AND* Copy Carbone jlhuret@univ-poitiers.fr (for safety) tel +33 5 49 44 45 46 or +33 5 49 44 47 67

- 17) 厚生労働省, 医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について, 医政発0330第2号, 平成22年3月30日通知, http://www.mhlw.go.jp/bunya/iryuu/dl/tuuti_220330.pdf
- 18) 経済産業省, ヒト細胞培養加工装置についての設計ガイドライン〔改訂〕(2010)

第19章 品質評価

1 再生医療等細胞製剤の品質評価法：ウイルス・マイコプラズマ試験

清水則夫*¹, 渡邊 健*², 高橋秀行*³, 外丸靖浩*⁴, 森尾友宏*⁵

1.1 はじめに

安倍首相が提唱する「日本再興戦略-JAPAN is BACK-」の中の「第三の矢：新たな成長戦略」の柱の一つに再生医療の産業化の促進が掲げられている。国際競争を意識した規制・制度改革や研究開発及び海外展開支援の取り組みを加速することが計画され、その一環として成長戦略実行国会と銘打った平成25年秋の臨時国会では、同年4月に成立した「再生医療推進法」(表1の(1))の後を受けた形で「再生医療等安全性確保法」(表1の(2))と「薬事法の一部を改正する法律」が成立し、平成26年11月までには施行される予定である。「再生医療等安全確保法」では、再生医療をその人の生命および健康に与える影響の程度から第1種から3種に3分類し、それぞれ必要な手続さが定められた。また、再生医療等に使用する特定細胞加工物の製造を許可制(医療機関等の場合には届け)とし、医療機関が特定細胞加工物の製造を委託する場合には、許可等を受けた者又は届出をした者に委託しなければならないとされ、細胞加工の委受託が可能になった。現在、法律の施行規則を定める省令案が厚生労働省の専門家会議で討議されているが、本節の執筆時点ではその詳細が明らかとなっていないため、これまでに公布された指針や関連学会からのガイドラインなどを参考に、再生医療の微生物安全性の評価法を考えてみたい。従来の医療用具・機器であれば滅菌操作により感染リスクをなくすことができ、血液など生物材料を用いた生物学的製剤でも放射線照射、フィルター操作、加熱処理などによりそのリスクを十分に低下させることが可能である。しかし、再生医療に使用する細胞治療製剤は生きた細胞・組織を原材料とし、培養操作による増殖・分化誘導などの後に簡単な洗浄操作を行なったうえで患者に投与するのが一般

*1 Norio Shimizu 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 フロンティア研究室
ウイルス治療学 准教授

*2 Ken Watanabe 東京医科歯科大学 大学院歯学部総合研究科 発生発達病態学分野
特任助教

*3 Hideyuki Takahashi 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 フロンティア研究室
ウイルス治療学 技術補佐員

*4 Yasuhiro Tomaru 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 フロンティア研究室
ウイルス治療学 共同研究員

*5 Tomohiro Morio 東京医科歯科大学 大学院歯学部総合研究科 発生発達病態学分野
准教授

表1 再生医療のウイルス・マイコプラズマ安全性に関する指針など

(1)再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律（平成25年6月10日 法律第13号）
(2)再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成25年11月27日 法律第85号）
(3)ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成25年10月1日 厚生労働省告示 第317号）
(4)ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日 薬食発0907第2号）
(5)ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日 薬食発0907第3号）
(6)ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日 薬食発0907第4号）
(7)ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日 薬食発0907第5号）
(8)ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（平成24年9月7日 薬食発0907第6号）
(9)医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について（平成22年3月3日 医政発0330第2号）
(10)血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした 核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドライン（平成16年8月3日 薬食発第0808002号；平成26年1月21日に改正案が提示され意見募集中）
(11)ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について（ICHQ5A）（平成12年2月22日 医薬審第329号）
(12)免疫細胞療法細胞培養ガイドライン（平成25年11月12日制定 日本免疫学会・日本がん免疫学会・日本バイオセラピー学会・癌免疫外科研究会・血液疾患免疫療法研究会）

的であり、原材料、培養工程の中間体、最終製造物のいずれに対しても十分な消毒・滅菌処理を施すことが不可能との本質的な問題を抱えている。また、本文でも述べるように、ヒトには多くの微生物が持続感染しているため、特にウイルス・マイコプラズマ汚染に関する問題は治療の安全性確保において避けては通れない重要な課題であり、最終製品の全数検査が可能で性能を持つ新しい検査法を実用化することが求められている。本節では、再生医療のウイルス・マイコプラズマ安全性の考え方と筆者らが開発した新しい検査系を紹介する。

1.2 再生医療のウイルス安全性確保

再生医療を新しい医療として確立するためには、患者に投与される細胞製剤の品質を保証し治療の安全性を確保することが極めて重要である。培養細胞が直接患者に投与されることを考えれば、初期の臨床研究の段階から実用化段階と同等のウイルス・マイコプラズマ安全性確保策が講じられていることが必要である。再生医療の実用化が遅れている原因の一つとして細胞製剤製造の安全基準・規制が未整備なことが挙げられていたが、平成18年9月1日に再生医療の臨床研究に関する指針「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が公布され安全性管理の方向性が示

された。その後、本指針は平成22年11月1日および平成25年10月1日に全面改定され（以下、平成25年改訂版の指針を「ヒト幹指針」と記載）、対象とするヒト由来幹細胞として体性幹細胞に加えES細胞とiPS細胞が加えられた。ヒト幹指針には、原材料となる細胞・組織や調製細胞の安全性確保の基準が示されているが、同指針の「幹細胞」には、臨床研究に用いられるすべての培養細胞が含まれるとの解釈もあり、実際、免疫細胞療法細胞培養ガイドライン（表1の(12)）もそのような考え方に基づいている。

1.2.1 原材料のウイルス検査

厚生労働省の川崎班では、細胞組織加工医薬品を移植する際に患者への影響を排除しないウイルスとして138種類のウイルスをリスト化している¹⁾。その中でも、牛胎児血清・ブクトリブシン・フィーダー細胞からの混入が懸念されるウイルスを除くと、混入の危険性が大きいウイルスの多くはヒトに持続感染するウイルスと考えられる。ヒトには多くの持続感染ウイルスが存在することが知られている（表2）。すべての成人には多数の持続感染ウイルスが感染しており、その多くは末梢血からも検出される。再生医療の原材料となる細胞・組織には末梢血の混入が避けられないため、ウイルス汚染は事実上不可避の問題である。つまり、原材料の段階でウイルス汚染の可能性を排除して安全性を担保することが不可能なため、そのような認識に立って原材料のウイルス汚染の可能性を正しく評価し、安全性確保対策を講じることが必要となる。自己細胞を原材料とする際の指針（表1の(2)、(4)）ではドナーに対する留意点として、【採取細胞・組織を介して感染する可能性がある感染症に関する検査項目を定め、その妥当性を明らかにすること】とし、具体的には【特にB型肝炎（HBV）、C型肝炎（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症、成人T細胞白血病（HTLV）が留意すべきウイルス感染症として記載されている（表3）。一方、同種細胞を原材料とする際の指針（表1の(3)、(5)、(6)）では、ドナーの選択基準にパルボウイルスB19（B19）感染症が加わりHBV、HCV、HIV、HTLV、B19を【問診及び検査（血清学的試験や核酸増幅法等）により否定すること】が求められ、加えて【サイトメガロウイルス（CMV）感染、EBウイルス（EBV）感染及びウエストナイルウイルス（WNV）感染については必要に応じて検査により否定すること】とされている（表3）。ヒト幹指針では、第3章第2の1【提供者の選択基準及び適格性】に同様の規定があるが、ここでは【CMV、EBVおよびWNV感染】が必要に応じて検査により感染を否定するウイルスとして挙げられ、同種細胞を原材料とする場合を意識した規定となっている。細則では、【自己由来のヒト幹細胞を用いる場合は必ずしも提供者のスクリーニングを必要としないが、製造工程中の交差汚染の防止、製造者への安全対策等の観点からHBV、HCV、HIV等のウイルスに対する検査の実施を考慮すること】とされている。各々100万人以上存在するHBV、HCV、HTLVのキャリアを治療対象から外すことは患者の「治療を受ける権利」を侵害する恐れがあるため、自己由来の原材料を用いる場合には製造・医療従事者の危険に配慮したうえで培養を行うことが容認されている。また、ヒト幹指針及び同種細胞を用いる際の指針に記載されているCMV、EBVは大多数の成人に持続感染しているため、原材料にCMV、EBVが混入する危険性が非常に高い。したがって、CMV、EBVを含む原材料として

表2 主なヒトに持続感染する主なウイルス

ウイルス名	関連疾患	感染細胞 (存在部位)	成人の陽性率 (%)	備考
B型肝炎ウイルス (HBV)	B型肝炎	肝実質細胞 (肝臓、血液、体液)	0.9	輸血による感染および母子感染が減り、若年者の陽性率が低くなりつつある
C型肝炎ウイルス (HCV)	C型肝炎	肝実質細胞 (肝臓、血液)	1~1.5	医療行為による新たな感染が激減し、中高年層が主なウイルスキャリアーである
単純ヘルペス ウイルス1型 (HSV-1)	口唇ヘルペス、ヘルペス 脳炎	上皮細胞、神経細胞 (唾液、血液)	80~100	性器ヘルペスの原因にもなる(主な原因は2型)
サイトメガロ ウイルス(CMV)	先天性サイトメガロウ ウイルス感染症	マクロファージ (血液)	70~95	代表的な日和見感染症の原因ウイルスで、間質性肺炎、腸炎、網膜炎などの原因
水痘帯状疱疹 ウイルス(VZV)	水痘、帯状疱疹	上皮細胞、神経細胞 (滲出液、血液)	90~95	水痘発症時に体内に潜伏し、加齢などが誘引となり帯状疱疹を発症
EBウイルス (EBV)	伝染性単核症、パーキン ソン病、胃癌	B細胞、上皮細胞 (唾液、血液)	70~90	T細胞、NK細胞に感染することがある
ヒトヘルペス ウイルス6型 (HHV6)	突発性発疹	T細胞 (唾液、血液)	95~100	ほとんどが、乳幼児期に感染し、日和見感染症の原因となる
ヒトT細胞向性 ウイルス1型 (HTLV-1)	成人T細胞性白血病、 HTLV-1関連脊髄症	T細胞 (血液、母乳)	1	九州(特に南部)に多く5~7%が陽性、一部地域では90%以上が陽性
ヒト免疫不全ウ イルス1型(HIV-1)	エイズ、エイズ関連症 候群	T細胞、マクロファ ージ(血液、体液)	僅少	我が国では、感染者、エイズ患者ともに増えつつある
JCウイルス (JCV)	出血性膀胱炎、進行性 多巣性白質脳症	尿管上皮細胞 (尿、まれに血液)	70以上	無症状でも時々尿中からウイルスが検出され、ときに末梢血からも検出される
バルボウイルス B19型(B19)	りんご病、赤芽球瘰	赤芽球(血液)	—	通常は一過性に症状が出た後治療するが、持続感染患者は希にだが存在する

HBV, HCV, HTLV キャリア由来の原材料を製造施設に受け入れる事を前提に、受け入れ、細胞プロセッシング中や最終調製物のウイルス検査基準を定める必要である。再生医療のような新しい医療を実施するためには、利益と不利益のバランスを正しく評価することが大切である。原材料の受け入れ・培養過程で避けられないウイルス汚染の問題は、治療法の開発に際し原材料採取段階でのウイルス汚染の実態・製造段階でのウイルス増殖の有無・最終調製物への混入の有無などに関する定量的で科学的なデータを蓄積しておくことが望まれる。我々の研究室では、様々な医療機関との共同研究として、ウイルス汚染状況・培養中のウイルス動態・細胞との相互作用に

表3 指針などで検査が求められているウイルス

★自己細胞を用いる場合(表1の(2), (4))
・原材料となるヒト細胞・組織 HBV, HCV, HIV, HTLV
・最終製品 HBV, HCV, HIV, HTLV (患者の段階で否定し得ず、かつこれらのウイルスを増殖させる可能性がある細胞の場合)
★同種細胞を用いる場合(表1の(3), (5), (6))
・原材料となるヒト細胞・組織 HBV, HCV, HIV, HTLV, B19 (必要に応じて CMV, EBV, WNV)
・最終製品 HBV, HCV, HIV など (バンク化されておらず、ウインドウピリオドが否定できず、製造工程中で増殖させる可能性がある細胞を用いる場合)

関するデータ収集を目的として、ウイルス陽性検体のパイロット培養やウイルス添加試験を積極的に行っている。

1.2.2 製造工程におけるウイルス検査

製造工程におけるウイルス安全性に関しては、ヒト幹指針の「第4章 ヒト幹細胞の調製段階における安全性対策等」に記載されている。

細胞調製中のウイルス混入の可能性は、作業着、フィーダー細胞、トリプシンなどの細胞分散剤、培地・血清に由来のものが考えられる。フィーダー細胞として使用されるマウスなどげっ歯類由来の細胞株には内在性レトロウイルスの遺伝子が存在し、ウイルス粒子を産生している場合もある。また、トリプシンへのプタウイルス混入や牛胎児血清へのウシウイルス混入の危険性もあり、そのようなリスクに十分に配慮し、フィーダー細胞の選択、安全性に配慮して飼育されている動物からの採取、十分なウイルスクリアランスを行って安全性が保証された細胞分散剤・血清の使用、などを考慮することが重要である。さらに、新興・再興感染症の発生を念頭にいた対処法を予め考えておくことも必要であろう。一方、作業着からのウイルス混入は、細菌や真菌の汚染を起こさないような作業環境と作業手順を順守していれば問題とならないと考えられるが、作業着への感染事故が起きる可能性があるため(特にHBVなどの強い感染性を持つウイルス)、ドナーに持続感染しているウイルス種とその量に関する的確な情報を作業着に与えるとともに、ワクチン接種の励行や汚染事故および感染事故を防止できるような作業環境と作業手順を定めておくことが重要である。

ヒト幹指針の「第4章 品質管理システム」に、【(4)研究者等は、調製工程において複数の提供者からのヒト幹細胞等を同一培養装置内で同時期に扱わないこと、また、交叉汚染を引き起こすような保管方法を採らないこと等により、取り違えや微生物等の伝播の危険性を避けなければならない】と規定されており、同時に同一の作業空間で複数の提供者からの細胞を扱うことを禁じ、クロスコンタミネーションの危険性を排除することとしている(自己・同種細胞を用いる

際の際にも同様な記載がある)。また、「6 微生物等による汚染の危険性の排除」として、4つの方策を掲げ【適宜組み合わせることにより、微生物等による汚染の危険性を排除するものとする】と規定されている。4つの方策の中には、【(3)調製の各段階における必要性に応じた試験及び検査】とウイルス検査を求めると考えられる記述があるが、具体的な検査方法や対象ウイルスは明記されていない。

一方、血清から感染因子が混入する危険があり、自己および同種細胞を用いる際の指針には、第2章 第1の2(1)③に【異種血清及び異種もしくは同種の血清に由来する成分については、細胞活性化又は増殖等の加工に必須でなければ使用しないこと】とし、使用が避けられない場合の考慮点が5つ挙げられている。なお、自己血清の使用は問題とはされていないが、血清の使用に際しては血清にも持続感染ウイルスが含まれる可能性があることに十分に配慮して作業者の安全性を確保するとともに、血清の取り換えによる感染事故の発生を防止する管理体制の構築が求められる。さらに、血清を使用する前に加熱あるいは放射線照射などのウイルスの不活化工程を加えることも検討するべきであろう。

1.2.3 最終調製物のウイルス検査

調製工程が終了した細胞は、細胞浮遊液あるいは細胞シートとして患者へ投与されるが、細胞分散や洗浄などの工程を経るのが一般的である。治療の安全性を確保するためには、投与形態の細胞の一部を検査用として分取し投与前にウイルス検査を行なうことが理想である。しかし、自己細胞を利用したオーダーメイド型の再生医療では患者に投与される細胞はロットを形成せず、また、一般に投与形態にした細胞は出来るかぎり速やかに患者に投与する必要があるため、最終調製物を直接検査することは困難な場合が多い。次善の策として、細胞を回収する前日に一部の細胞を分取してウイルス検査を行う・細胞の一部を回収できない場合には培養液の検査を行うなどの取り組みが行われている。また、開発段階で投与形態にした細胞製剤の一部を分取してウイルス検査を行い、データを収集する取組みも行われている。検査結果が細胞の投与後に得られる場合には、検査陽性となった際の対処方法を予め決めておき患者の安全確保に適切に対処できる体制を構築しておくことが必要である。

ヒト幹指針には、「第4章 ヒト幹細胞等の調製段階における安全対策等」の第1の5(2)③に【ウイルス等の検査】としてウイルス検査が最終調製物の品質管理試験として例示されている。しかし、検査すべきウイルス種などの詳細は例示されておらず、自己・同種細胞を使用する際の指針を参考に検査項目を決めることになるだろう。自己細胞を使用する際の指針(表1の(4)、(6))では、第2章 第3の2(8)に【HBV、HCV、HIV、HTLVにつき、患者の段階で否定し得ず、かつこれらのウイルスを増殖させる可能性のある細胞の場合には、増殖可能性のあるウイルスについてその存在量に関する試験を実施し、体性幹細胞(iPS(株)細胞)加工医薬品等の投与が患者の不利にならないことを確認する必要がある】と記載されている。一方、同種細胞を使用する際の指針(表1の(5)、(7))では、同様に【バンク化されておらず、ウインドウピリオドが否定できず、HBV、HCV、HIV等を製造工程中に増殖させる可能性のある細胞を用いる際には、中間

製品、最終製品等についてもウイルス等の存在を否定する適切な試験を実施すること】と記載されており、「等」の文字が入ることにより、培養中のウイルス増殖に一層の注意を払うことを求めている。また、免疫細胞療法細胞培養ガイドライン(表1の(2))では、「第4章 第8の7 ウイルス等の試験」で上記指針と同様にHBV、HCV、HIV、HTLVに関しその存否と増殖の可能性のある細胞では存在量に関する試験の実施を考慮することを求めている。また、(補足)として【その他、培養中に増殖することが確認されているウイルス種について、臨床上で問題となる可能性が否定できていない場合は、十分留意した上で……】と可能な範囲での検査の実施とリスクなどについての説明と同意の取得の必要性が記載されている。筆者は免疫療法に使用する活性化T細胞の培養中にEBVやHHV6などが増殖する例を経験しており、自己細胞の場合でも試験培養やウイルススパイク試験によりその培養系におけるウイルス動態を把握し、大量のウイルスが投与されるような事態を避けるために適切な品質管理体制を整えておくことが望まれる。

1.3 再生医療のマイコプラズマ安全性確保

ヒト幹指針をはじめとした諸指針には【適切なマイコプラズマ否定試験を実施すること】と記載されており、マイコプラズマの否定試験は必須項目になっている。マイコプラズマ否定試験法は日本薬局方(日局)参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」に記載されており、試験法として、(A)培養法、(B)指標細胞を用いたDNA染色法、(C)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法の3つの試験法を提示している。しかし、A法、B法は試験結果を得るまでに1週間~1月間を要することから、オーダーメイド医療である再生医療のマイコプラズマ否定試験法には不向きである。また、C法として例示されているPCR法は2段階(ネステッド)PCR法であり、キャリアオーバーコンタミネーションの危険性が高く、欧州・米国薬局方に記載の*Acholeplasma laidlawii*を検出できない欠点が明らかになっている。一方、欧州薬局方(EP)では、適切なバリデーションを行うことにより、PCR法を含む核酸増幅検査(NAT)を培養法又はDNA染色法の代替法として使用可能とし、そのためのバリデーション条件が提示されている²⁾。EP準拠のバリデーションに適合するとされるマイコプラズマ検出用PCR検出キットが複数市販されており、欧州では市販のPCRキットを製造工程管理に用いた医薬品が承認されている。

免疫細胞療法細胞培養ガイドライン(表1の(2))にも【マイコプラズマ否定試験については、最終調製物で検証を行う場合は核酸増幅法を推奨する】と記載されている。実際、現行のような特定のPCR法を示すのではなく、EPに準じてバリデーションの条件を示すという方向で検討するのが適当との考えが主流になっており、次期薬局方はその方向で改正する準備が進められているようである。筆者の研究室では新しいマイコプラズマ検査系の開発を進めており、EPで求められる性能を持つことを確認している。

1.4 新しいウイルス・マイコプラズマ検査系の開発と再生医療への応用

1.4.1 ウイルス検査系

細菌・真菌と違いウイルスはその増殖に特定の生細胞を必要とするため、培養法により多くのウイルスを同時に検査することは事実上不可能であり（培養法が確立されていないウイルスも多数存在する）、核酸増幅法により検査が推奨される。筆者の研究室では、各種指針に記載されているウイルス9種類を含め表2に示す持続感染ウイルスの同時・網羅的検査を可能にする新しい検査系の開発を行った。

検査系の作成に当たっては、多くのサブタイプがあることが知られているHBV、HCV、HIV、HTLV検査系では可能な限り検出漏れを回避するため、より多くのサブタイプを検出できる共通プライマーの選定に留意するとともに1反応系に多くのプライマー・プローブを投入するマルチプレックスPCR法を採用した。また、試薬の入れ忘れを防止するとともに作業者の手間を省くため、試薬を8 well stripに安定化剤とともに固相化する手法を開発し（図1）、検査に当たっては検体とバッファー・酵素などを含むプレミックスとの混合液により固相化試薬を溶解するだけで検査を行うことが可能である（固相化試薬は室温で6ヶ月間以上安定）。測定項目にはDNAウイルス・RNAウイルス・レトロウイルスが含まれるためRT-PCRの条件で検査を実施するが、そのような条件でもPCRとRT-PCR反応が良好に進むための酵素の選択や反応条件の設定を行っている³⁾。

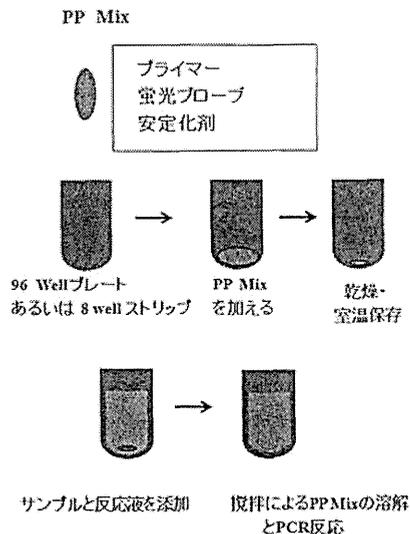
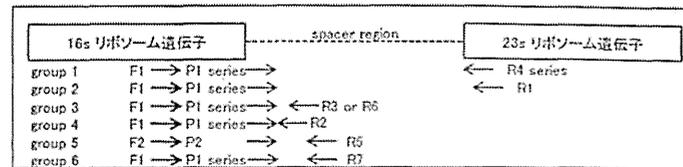


図1 固相化試薬の作成と検査実施



各グループの代表例

Group 1: *M. orale*, Group 2: *M. pneumoniae*, Group 3: *M. gallisepticum*, *U. urealyticum*, Group 4: *A. laidlawii*,
Group 5: *S. citri*, Group 6: *M. synoviae*

forward primer	probe	reverse primer	target
F1	P1-1 or P1-3	R4-1	<i>M. arginini</i> , <i>M. buccale</i> , <i>M. faucium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. salivarium</i>
F1	P1-1 or P1-3	R4-2	<i>M. fermentans</i> , <i>M. lipophilum</i> , <i>M. primatum</i>
F1	P1-1	R4-3	<i>M. hyorhinis</i>
F1	P1-3	R7	<i>M. synoviae</i>
F1	P1-4	R1	<i>M. genitalium</i> , <i>M. pneumoniae</i>
F1	P1-1	R2	<i>A. laidlawii</i>
F1	P1-1	R3	<i>U. urealyticum</i>
F1	P1-2	R6	<i>M. gallisepticum</i>
F2	P2	R5	<i>S. citri</i>

図2 開発した新規マイコプラズマ検査法

1.4.2 マイコプラズマ検査系

マイコプラズマはMollicutes綱に属し、同綱に属するAcholeplasma, Ureaplasmaや Spiroplasmaも培養系への汚染の原因となり、欧州や米国薬局方に記載されている9種類に含まれるため、マイコプラズマ検査系はこれらを網羅的に検出できる性能を持つことが求められる（本節ではこれらを総称してマイコプラズマと記す）。筆者らの研究室では、3極薬局方記載の9種類を含む142種類が検出可能（遺伝子配列からの推定）なりリアルタイムPCR検出法を開発した（図2）。本検査系はプライマー11種類とプローブ5種類を1つの反応系に投入するマルチプレックスPCR法で、局方記載の9種類に加えて合計17種類のマイコプラズマを10 cfu/mlの感度で検出可能なことを確認している。

1.4.3 ウイルス・マイコプラズマ同時検査系

作成したウイルス検査とマイコプラズマ検査を同時に実施することも可能である。図3に作成した同時検査試薬の1例を示す。16種類のプライマー・プローブを使用するマイコプラズマ検査系を1well目に、2well目から6well指針に記載されているウイルスを、7well目に類聚に検出されるヘルペスウイルス属のウイルスの検査系を配している。この検査系では最大3項目のマルチプレックスPCR検査系となっている。すでに記したようにウイルス検査系やマイコプラズマ検査系は複数のプライマー・プローブを含むマルチプレックスPCR/RT-PCR系であるが、使用する酵素・バッファー・反応条件を工夫することにより同時検査が可能である。本検査試薬や持続感染ウイルスを網羅した検査試薬（HHV1-8, BKV, JCV, AdV, B19, HBV）なども作成し、細胞製剤の安全性検査の他に移植患者の日和見ウイルス感染症の検査に用いている。

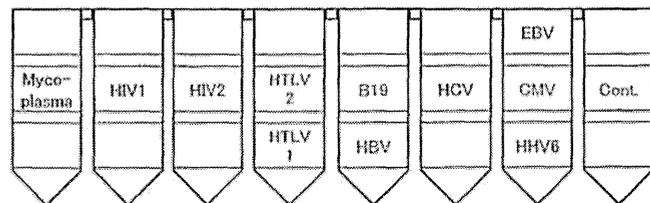


図3 ウイルス・マイコプラズマ同時検査試薬の1例

1.5 細胞培養工程におけるウイルス動態の検討

再生医療に用いる細胞製剤のウイルス検査項目が確定していないのは、様々な細胞を原材料とする培養系があり、その培養系へのウイルス混入の割合や混入ウイルスの培養系での動態などに関するデータが不足していることが原因の一つである。また、細胞製剤は、滅菌できない・自己細胞を使用する場合ロットを形成しないため抜き取り検査が出来ないなど、従来の医薬品製造の安全管理に対する考え方は対処できないため、臨床研究を行う前にウイルス混入の危険性や培養段階でのウイルス増幅の有無などを明らかにし、リスク情報として患者に十分に説明して同意を得ることが必要である。その為には、原材料のウイルス検査やウイルス陽性の原材料を積極的に培養し、ウイルスが細胞培養に与える影響やウイルス動態に関するデータを蓄積しておくことが重要である。

筆者の研究室では、再生医療の実用化を目指す医療機関や企業との共同研究として、原材料のウイルス検査・ウイルス陽性患者由来細胞の試験培養・培養系に積極的にウイルスを添加するウイルススパイク試験を実施し、ウイルス汚染の頻度、細胞培養に与える影響、培養系でのウイルス動態に関するデータを取得・蓄積する試みを進めている。これまでの研究では、原材料に混入するウイルスとしてEBV、HHV6、B19の頻度が多いこと、特に造血幹細胞培養系ではB19が、骨髄由来間葉系幹細胞培養系ではCMVの感染増殖に注意すべきこと、などが明らかになっている。

1.6 おわりに

すべての成人には様々な微生物が複数持続感染していたため原材料へ混入する危険性を排除できず、しかも最終製品を滅菌できない再生医療の特質をよく理解した上で再生医療の微生物安全性確保を考える必要がある。本節にも記したように、開発段階でのウイルス・マイコプラズマ検査データの取得と陽性ドナー由来の原材料の試験培養やスパイク試験などにより積極的にデータを蓄積する取り組みが重要である。再生医療のような新しい治療法を確立するためには、治療のリスクとベネフィットの比重を考慮することはきわめて重要であるが、そのためにも微生物混入のリスクを正しく評価するためのデータの蓄積が欠かせない。

筆者は、脳科学技術振興機構（JST）が実施中の再生医療実現拠点ネットワーク事業・再生医

療実現拠点ネットワークプログラム・技術開発個別課題「iPS細胞・体性幹細胞由来再生医療製剤の新規品質評価技術法の開発」（代表研究者 森尾友宏）の分担研究者として開発したウイルス・マイコプラズマ検査系の実用化を目指しており、近日中に大手試薬メーカーから検査キットをリリースする方向で調整している。また、再生医療実施施設との共同研究として、ウイルス・マイコプラズマ検査の受託とデータ蓄積、さらに、細胞の試験的培養とウイルス・マイコプラズマ検査やスパイク試験の実施や技術移転・検査試薬の提供も積極的に行なっている。

（共同研究の申し込みや検査系に関する質問などの連絡先：東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ウイルス治療学 清水則夫 nshivir@tmd.ac.jp）。

文 献

- 1) 小林哲, 佐佐敬介, 川崎ナナ, ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 131, 7-15 (2013)
- 2) European Pharmacopoeia: 2.6.7, *Mycoplasmas*, EP 7.0, p156 (2011)
- 3) 清水則夫, 渡邊健, 外丸靖浩, 原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド 最強のステップUPシリーズ, 北條浩彦編, 「実践編—プロトコルを中心に—IV章 遺伝子量解析15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」, p192-202, 羊土社 (2013)

Article

Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New *Grid2*-Deleted Mouse Line

Ayako Kumagai ^{1,†}, Akira Fujita ^{2,†}, Tomoki Yokoyama ^{2,†}, Yuki Nonobe ^{2,†}, Yasuhiro Hasaba ^{2,†}, Tsutomu Sasaki ³, Yumi Itoh ¹, Minako Koura ⁴, Osamu Suzuki ⁴, Shigeki Adachi ⁵, Haruko Ryo ⁵, Arihiro Kohara ⁶, Lokesh P. Tripathi ⁷, Masato Sanosaka ¹, Toshiki Fukushima ², Hiroyuki Takahashi ², Kazuo Kitagawa ³, Yasuo Nagaoka ⁸, Hidehisa Kawahara ⁸, Kenji Mizuguchi ⁷, Taisei Nomura ⁵, Junichiro Matsuda ⁴, Toshihide Tabata ^{2,*} and Hiroshi Takemori ^{1,*}

¹ Laboratory of Cell Signaling and Metabolic Disease, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mails: a-kumagai@nibio.go.jp (A.K.); y-itou@nibio.go.jp (Y.I.); m-sanosaka@nibio.go.jp (M.S.)

² Laboratory for Neural Information Technology, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, Toyama 930-8555, Japan; E-Mails: fujita0153@gmail.com (A.F.); m1371119@ems.u-toyama.ac.jp (T.Y.); weather4519@gmail.com (Y.N.); takegoshiyoshihiro45@gmail.com (Y.H.); fookun3@gmail.com (T.F.); m1471114@ems.u-toyama.ac.jp (H.T.)

³ Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan; E-Mails: sasaki@medone.med.osaka-u.ac.jp (T.S.); kitagawa@neuro1.med.osaka-u.ac.jp (K.K.)

⁴ Laboratory of Animal Models for Human Diseases, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mails: koura@nibio.go.jp (M.K.); osuzuki@nibio.go.jp (O.S.); jmatsuda@nibio.go.jp (J.M.)

⁵ Nomura Project, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mails: sadachi@nibio.go.jp (S.A.); hryo@nibio.go.jp (H.R.); n5nomura@nibio.go.jp (T.N.)

⁶ Laboratory of Cell Cultures, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mail: kohara@nibio.go.jp

⁷ Laboratory of Bioinformatics, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mails: lokesh@nibio.go.jp (L.P.T.); kenji@nibio.go.jp (K.M.)

⁸ Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University, Suita, Osaka 564-8680, Japan; E-Mails: t010034@kansai-u.ac.jp (Y.N.); t912436@kansai-u.ac.jp (H.K.)

† These authors contributed equally to this work.

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: takemori@nibio.go.jp (H.T.); ttabata@eng.u-toyama.ac.jp (T.T.); Tel.: +81-72-641-9834 (H.T.); Fax: +81-72-641-9836 (H.T.); Tel.: +81-76-445-6742 (T.T.); Fax: +81-76-445-6703 (T.T.).

Received: 14 October 2014; in revised form: 12 November 2014 / Accepted: 2 December 2014 /

Published: 11 December 2014

Abstract: Memantine is a non-competitive antagonist of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, and is an approved drug for the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. We identified a mouse strain with a naturally occurring mutation and an ataxic phenotype that presents with severe leg cramps. To investigate the phenotypes of these mutant mice, we screened several phenotype-modulating drugs and found that memantine (10 mg/kg) disrupted the sense of balance in the mutants. Moreover, the mutant mice showed an attenuated optokinetic response (OKR) and impaired OKR learning, which was also observed in wild-type mice treated with memantine. Microsatellite analyses indicated that the *Grid2* gene-deletion is responsible for these phenotypes. Patch-clamp analysis showed a relatively small change in NMDA-dependent current in cultured granule cells from *Grid2* gene-deleted mice, suggesting that GRID2 is important for correct NMDA receptor function. In general, NMDA receptors are activated after the activation of non-NMDA receptors, such as AMPA receptors, and AMPA receptor dysregulation also occurs in *Grid2* mutant mice. Indeed, the AMPA treatment enhanced memantine susceptibility in wild-type mice, which was indicated by balance sense and OKR impairments. The present study explores a new role for GRID2 and highlights the adverse effects of memantine in different genetic backgrounds.

Keywords: GRID2; GluR δ 2; memantine; NMDA receptor; cerebellum

1. Introduction

Memantine (3,5-dimethyl-1-adamantanamine) is an approved drug in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease (AD). Ca²⁺-mediated excitotoxicity in neurons is one proposed mechanism of AD, and the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is one of the major receptor channels responsible for glutamate-induced Ca²⁺ influx. Memantine binds and non-competitively inhibits NMDA receptors, which subsequently protects neurons from glutamate-induced excitotoxicity [1,2].

Glutamate is essential for excitatory synaptic transmission mediated by ionotropic glutamate receptors, which include NMDA receptors and non-NMDA receptors, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and kainate receptors [3]. NMDA receptor activation is dependent on the membrane potential that is evoked by non-NMDA receptor function [4]. Under pathological conditions, the voltage-dependent regulation of NMDA receptors is believed to be impaired, and memantine is thought to alleviate excitotoxicity by the unregulated NMDA receptor.

Unlike memantine, other NMDA receptor antagonists, such as MK-801 [5], are considered neurotoxins because they inhibit normal excitotoxic neurotransmission as well as pathological physiological neurotransmission. Although memantine is considered a relatively safe drug, some adverse effects, such as dizziness [6], have been reported. Such adverse effects are likely to result from individual differences among patients, especially in their genetic backgrounds. However, the causes of adverse effects to memantine have not yet been clarified.

The glutamate receptor ionotropic delta 2 (GRID2, also known as GluR δ 2) is abundantly expressed in cerebellar Purkinje cells, and shares sequence homology with other glutamate receptors. Despite its name and these homologies, GRID2 does not bind glutamate or other glutamate analogs [7–9]. Mice with an impaired *Grid2* gene exhibit a broad range of phenotypes, such as cerebellar ataxia, poor motor learning, and memory dysfunction. In addition to the known phenotypes in mice, new phenotypes presumably involving NMDA receptor dysfunction or memantine effects, such as nystagmus (in frogs) [10], oculomotor apraxia (in cats) [11,12], dementia (in humans) [13,14], have been observed in human patients with *GRID2* gene deletions [15–18]. However, there is not sufficient evidence to ascribe these complex symptoms in human patients to *GRID2* gene deletions.

Here, we report a new deletion in the mouse *Grid2* gene that is accompanied by ataxia. Administration of memantine led to impaired balance in ataxic mice, and the mutant mice showed deficits in the optokinetic response (OKR) and its learning. These optokinetic impairments were also sensitive to memantine. In addition, only a small population of cultured granule cells isolated from the mutant mice showed memantine-sensitive NMDA-induced currents. These phenomena were mimicked in wild-type (WT) mice following co-treatment with memantine and AMPA.

2. Results

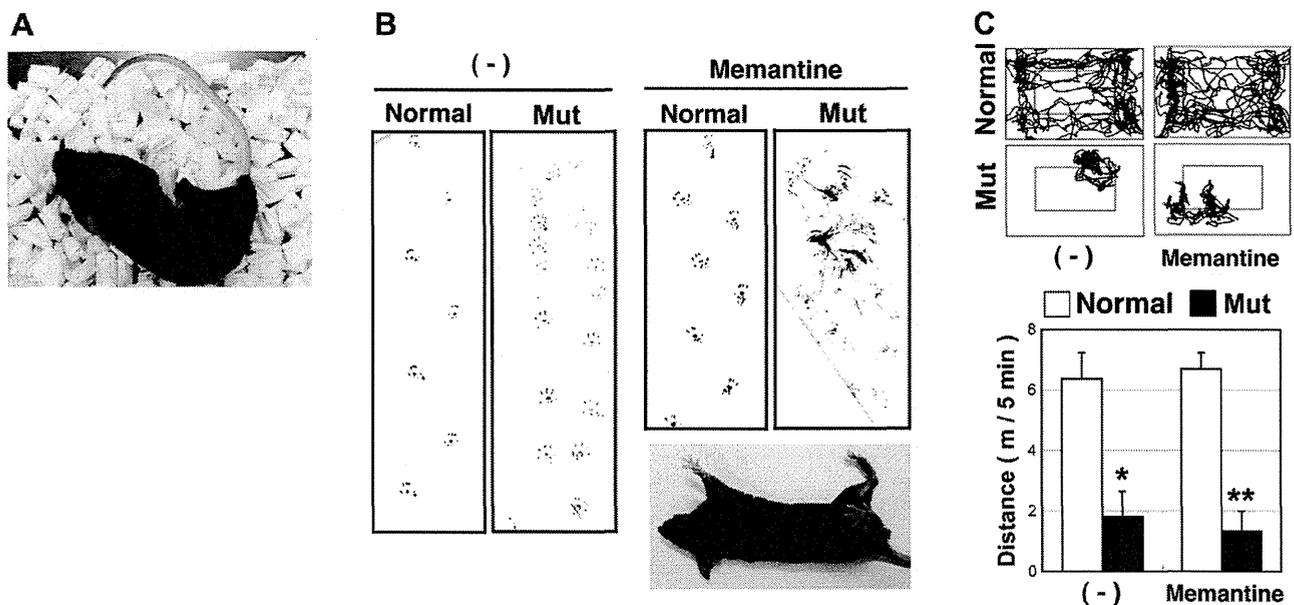
2.1. The Hereditary Ataxic Mouse is Sensitive to Memantine

Two ataxic (male and female) mice appeared spontaneously in the same litter from a mating pair of hetero mice with the knockout (KO) allele for Salt-Inducible Kinase 3 (*Sik3*: *Sik3^{tm1Htake/+}*) [19] on a C57BL/6J (B6) genetic background. The male was *Sik3^{+/-}*, but the female was *Sik3^{+/+}*. Because these ataxic mice failed to produce offspring by natural mating, we performed *in vitro* fertilization (IVF) using these ataxic mice and confirmed the heredity of the phenotype. To expound the mouse population, the original sperm of the ataxic male was also used for other IVF with the oocyte of normal B6 female, and offspring with the ataxic phenotype were obtained at the F2 generation (numbers of normal male, ataxic male, normal female, and ataxic female were 4, 1, 9, and 2, respectively), suggesting a recessively-inherited phenotype. Despite showing normal forelimb movements, the mutant offspring were characterized by a short-stepped gait and frequent falls due to suspected leg cramps (Figure 1A).

To examine whether the phenotype was caused by a neurogenic disorder, neuropharmacological compounds were tested in the normal and mutant mice. Because anesthesia (1% isoflurane) [20] alleviated leg cramps in the mutant mice, we first selected anticonvulsant drugs including gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor activators and NMDA receptor antagonists (Table 1). The GABA-A receptor activators felbamate and nitrazepam failed to modulate the phenotypes in the mutant mice. Whereas, memantine (10 mg/kg), an NMDA and 5HT $_3$ receptor antagonist which is also

reported to exert agonistic actions for the dopamine D2 receptor [21,22], impaired balance in the mutant mice, but not normal mice (Figure 1B and Supplementary Movie 1). Movement traces of the mice (Figure 1C) confirmed that 10 mg/kg memantine had no significant effect on walking in normal mice.

Figure 1. Isolation of ataxic mice with memantine susceptibility. (A) A mouse (6-month-old female) that exhibited an ataxic phenotype with rigid hind limbs. The phenotype became more severe with age; (B) Footprint analyses 10 min after memantine treatment (10 mg/kg, 12-week-old male). The soles of the hind limbs were labeled with India ink for a mouse that walked freely on paper. Rollover by the mutant mouse after memantine treatment is shown (lower right); (C) Monitoring mice walking after memantine treatment (10 mg/kg, 12-week-old male). The position of the mouse's head was tracked (left), and the walking distance was recorded for 5 min (right; expressed as the mean and SD; n = 6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Next, we tested other NMDA receptor modulators. Similar to memantine, the NMDA receptor antagonist MK-801 (10 mg/kg) led to balance disturbances in the mutant mice. However, the normal mice also showed balance disturbances at this dose (Table 1). (R)-CPP also produced balance disturbances only in the mutant mice (Supplementary Movie 2), whereas ifenprodil, Ro25-6981, or the AMPA receptor antagonist DNQX did not produce balance disturbances in the mutant or normal mice. However, slower movements were observed in mutant mice following administration of DL-AP7.

Because serotonin reuptake inhibitors are used to treat vertigo [23], and the 5HT₃ antagonist ondansetron causes headache and dizziness [24], we examined whether ondansetron affected the mutant mice. Both mutant and normal mice showed decreased activity with ondansetron (10 mg/kg; Supplementary Movie 3), but no effect that was specific to mutant mice was observed. Moreover, enhanced cholinergic signaling following donepezil treatment [21] and activation of dopamine signals by L-Dopa [21,22] had no significant effect on behavior in both normal and mutant mice (Table 1). These results suggest that, in addition to the ataxic phenotype, the mutant mice were characterized by enhanced memantine susceptibility, which was probably due to impaired NMDA receptor functions. The inconsistency in the efficacy of NMDA receptor antagonists on balance disturbance might result

from differences in NMDA receptor subunit subtype-specificity and/or effective dose among the antagonists; 10 mg/kg and 10–20 mg/kg might be the threshold doses to affect balance in the mutant mice for memantine and (*R*)-CPP, respectively.

Table 1. Pharmacological effectors on mutant mice phenotypes.

Chemical	Category	Dose (mg/kg)	Number of Mice	Movement of Normal Mice	Movement of Mutant Mice
Memantine	NMDA-R antagonist	2	2	NS	NS
		10	2	NS	Balance loss
MK-801	NMDA-R antagonist	2	2	NS	NS
		10	3	Balance loss	Balance loss
DL-AP7	NMDA-R antagonist	30	2	NS	Slow movement
(R)-CPP	NMDA-R antagonist (NR2A antagonist)	10	4	NS	Balance loss *
		20	2	NS	Balance loss
Ro25-6981	NMDA-R antagonist	2	3	NS	NS
		10	3	NS	NS
Ifenprodil	NMDA-R antagonist (NR2B antagonist)	2	3	NS	NS
		10	3	NS	NS
Felbamate	NR2B antagonist GABA-R activator	30	2	NS	NS
Nitrazepam	GABA-R activator	30	2	NS	NS
Isoflurane	GABA-R activator	1% in air	2	Slip	Slip
DNQX	AMPA/Kainate receptor antagonist	2	3	NS	NS
		10	3	NS	NS
Ondansetron	5-HT3 antagonist	5	2	NS	NS
		10	2	Not move	Not move
Donepezil	acetylcholinesterase inhibitor	10	3	NS	NS
L-Dopa	Dopamine precursor	20	3	NS	NS

NS: No significant effect was observed. *: 2 mice.

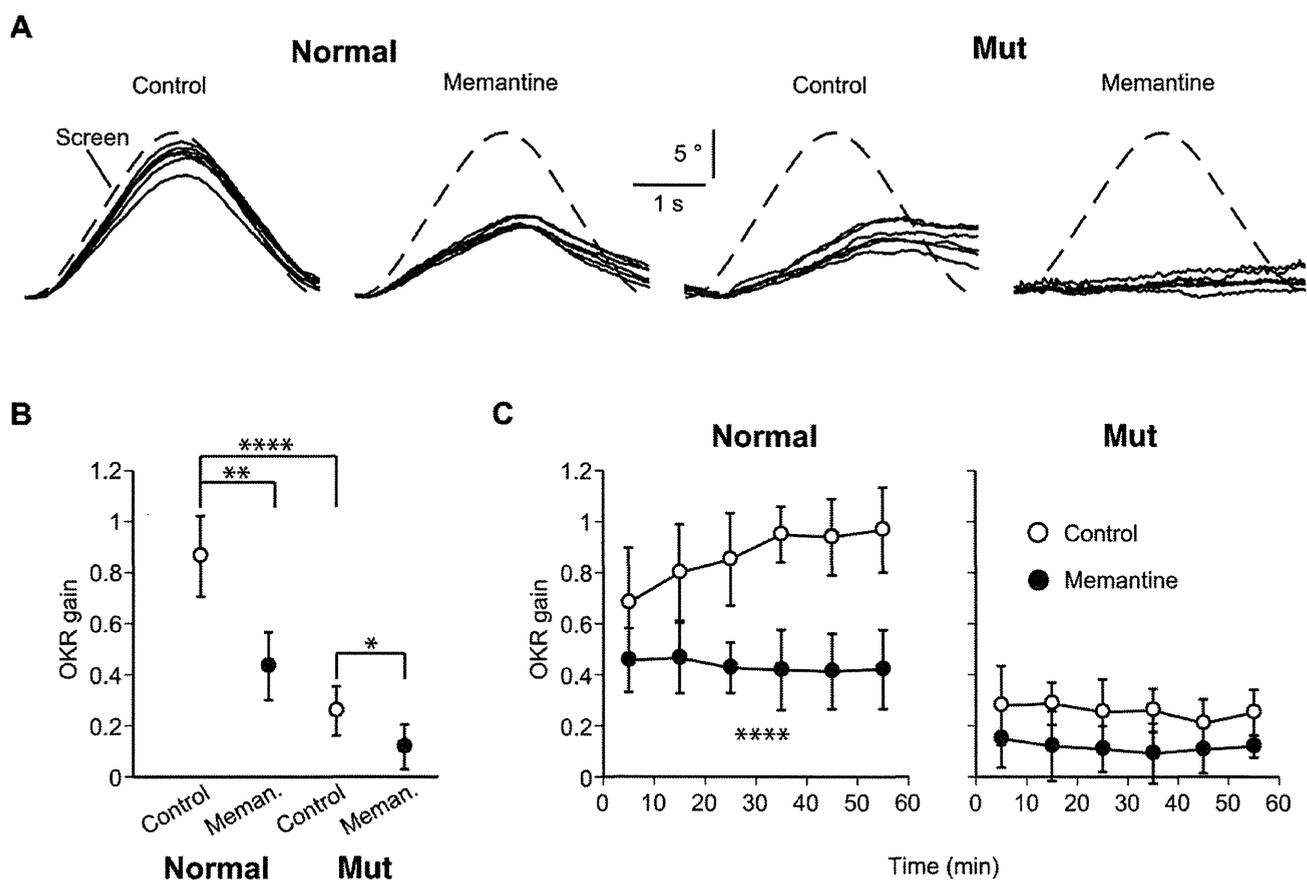
2.2. Impaired OKR and Learning in the Ataxic Mice

Gait disorders are a common pathology in patients with spinocerebellar degeneration, and are sometimes accompanied by vertigo resulting from oculomotor dysfunction [25,26]. Memantine also affects oculomotor functions in patients with cerebellar ataxia [27]. To examine whether our mutant mice also had oculomotor impairments, we measured the OKR and OKR adaptation, a form of cerebellum-dependent learning [28,29], and used the results from these assays to quantify memantine susceptibility (Supplementary Figure S1).

Normal and mutant mice were subjected to the OKR assay and horizontal visual pattern oscillations were given (Figure 2A). The normal mice could track the stimulus screen, whereas the mutant mice could not. Memantine (10 mg/kg) significantly lowered the overall OKR gain throughout a 1 h session in normal mice while the OKR in mutant mice was completely abolished (Figure 2B).

To evaluate OKR adaptation, the mean OKR gain was plotted for each 10-min interval (Figure 2C). Saline-injected normal mice (control) exhibited a time-dependent increase in the OKR gain, but no gain increase was observed in the mutant or the memantine-treated normal mice.

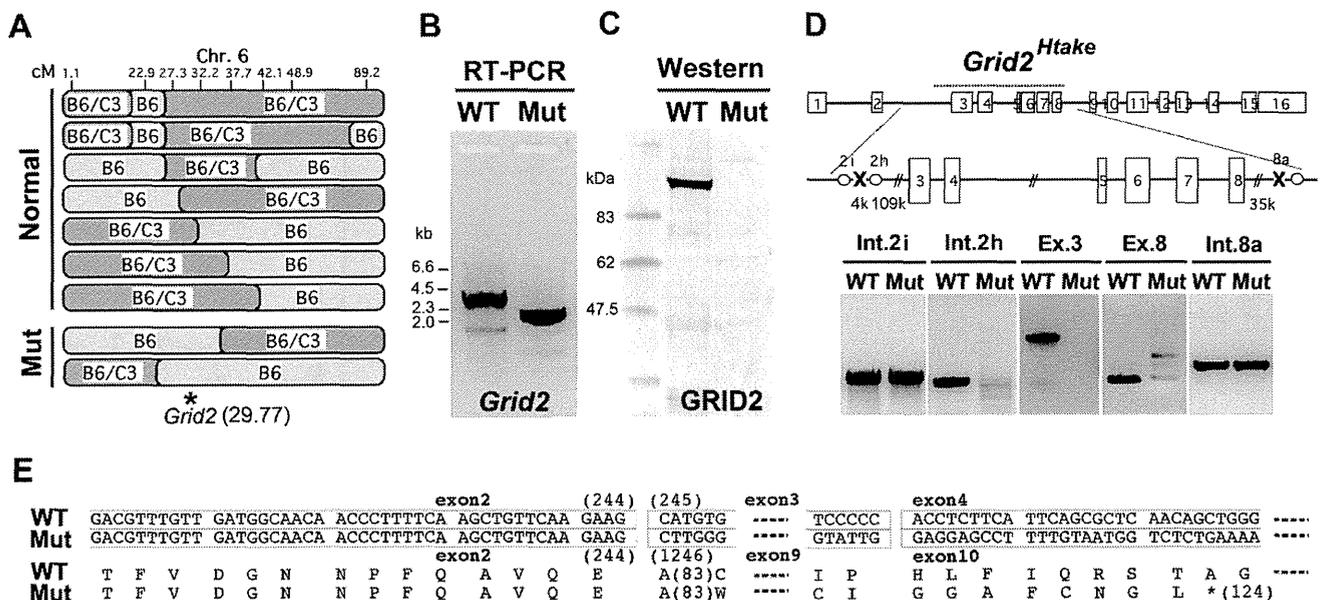
Figure 2. The optokinetic response (OKR) and its susceptibility to memantine. (A) The OKR of normal and mutant mice after intraperitoneal injection of saline (control) or memantine-containing saline (10 mg/kg). Measurements commenced 10 min after injection. Representative OKRs from normal and mutant mice are shown. The relative pupil azimuth is plotted against time. Each trace indicates the average over each 10-min period of a 1-h measurement session. Screen, movement of the stimulus screen; (B) Overall OKR gain throughout the 1-h session with or without memantine. Dots and error bars, mean \pm SD; $n = 5$ for each data point. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and **** $p < 0.0001$, multivariate ANOVA. The overall OKR gain was calculated by averaging the OKR gains for all 10-min periods in a single 1-h session (see panel C); (C) Time course of the mean OKR gain for normal ($n = 5$) and mutant ($n = 5$) mice. Each dot indicates the average over a 10-min period of a 1-h measurement session. Error bars indicate \pm SD. **** $p < 0.0001$ vs. the control for time \times drug interaction, repeated measures ANOVA.



2.3. Microsatellite Analysis in the Ataxic Mice

Because the pharmacological analyses were unable to predict the gene responsible for the ataxic phenotype, we performed a microsatellite analysis to identify the gene. Sperm were isolated from an ataxic mouse (N0: C57BL/6J[B6], B6/B6) and used to perform IVF with oocytes from C3H/HeN (C3) mice (normal: C3/C3). Oocytes were prepared from the N1 female (B6/C3 hetero-mice) and used for a second round of IVF using the original sperm from the N0 (B6/B6) ataxic mice, which produced 137 N2 mice (75 non-ataxic (the responsible genomic-region should be B6/C3) and 62 ataxic (the responsible genomic-region should be B6/B6)). Using 60 microsatellite markers and DNA from eight N2 non-ataxic mice, we screened heterogenic-regions composed of both B6 and C3 chromosomes. We observed that D6Mit149 (Chromosome 6, 48.93 cM) was amplified as the heterogenic-type in all eight mice. Next, we analyzed other markers near D6Mit149 using DNA from 70 mice (Figure 3A) and narrowed the responsible region to 27.3–32.2 cM (D6Mit384–D6Mit243), which was also associated with the phenotype of enhanced memantine susceptibility.

Figure 3. Identification of the responsible gene. (A) Microsatellite analyses of N2 mice. B6, parental allele of the ataxic mouse (C56BL/6J); C3, WT allele of C3H/HeN. N2 mice were produced following *in vitro* fertilization with oocytes from hetero N1 (B6/C3) and sperm from the original N0 ataxic B6 (B6/B6). Markers are described in the Experimental Section. Normal and Mut indicate mice with or without the ataxic phenotype, respectively. The *Grid2* gene is located 29.77 cM in chromosome 6; (B) The full-length open reading frame ORF of *Grid2* was amplified from cDNA prepared from the cerebellum of WT and Mut mice; (C) Western blotting for GRID2; (D) A diagram showing break points in the *Grid2* gene of ataxic mice; (E) Putative protein sequence of GRID2 in *Grid2^{Htake/Htake}* mice is predicted from diagram D and the direct ORF sequence.



When we searched for genes that have known associations with ataxic phenotypes, we noticed the *Grid2* gene at 29.77 cM [30]. To determine whether this gene was responsible for the observed

phenotype, the *Grid2* open reading frame (ORF) was amplified from cDNA prepared from the cerebellum. As shown in Figure 3B, the *Grid2* ORF was approximately 1 kb shorter in the mutant mice than in the WT mice. In addition, western blotting for GRID2 revealed that this protein was absent from the mutant cerebellum (Figure 3C).

Direct sequencing of the mutant ORF suggested that the region from exon 3 to exon 8 might be deleted, which is the longest deletion reported in *Grid2* mutant mice [31]. Chromosome walking (Figure 3D) identified the break points 110 kb upstream from exon 3 and 30 kb downstream from exon 8, which yielded a truncated GRID2 protein similar to that in the *Grid2*^{trp/trp}, *Grid2*^{ho8J/ho8J}, and *Grid2*^{ho13J/ho13J} mutants, but with different flanking peptides (Figure 3E). Our laboratory code for mutant mouse lines is Htake, thus the mutant allele is named *Grid2*^{Htake}.

2.4. Altered Sensitivity to NMDA in Cultured Granule Cells of *Grid2*^{Htake/Htake} Mice

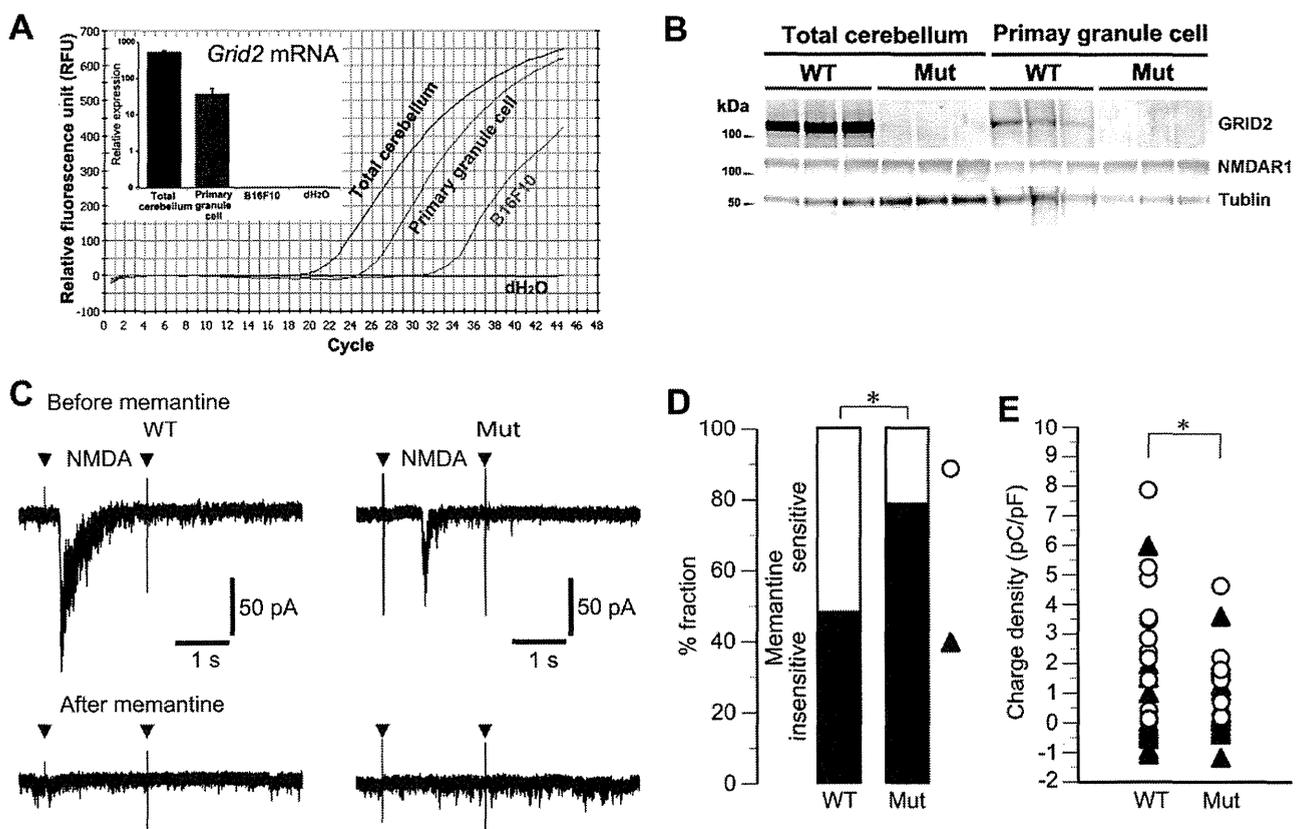
GRID2 is highly expressed in Purkinje cells, and disruption of GRID2 signaling impairs Purkinje cell functions. However, little or no expression of functional NMDA receptors in Purkinje cells of the adult cerebellum has been reported [32]. Thus, it is possible that *Grid2* gene deletion influences cerebellar function by affecting NMDA receptors on granule cells. We examined whether *Grid2*^{Htake/Htake} mice possessed memantine-sensitive NMDA receptors on cerebellar granule cells, using granule cell-enriched (Purkinje cell-free) primary cultures from P2 mice. Quantitative PCR (Figure 4A) and western blot analyses (Figure 4B) showed that cultured granule cells expressed low, but detectable, levels of *Grid2* mRNA and GRID2 protein. No significant difference in NMDAR1 protein level was observed between the cultures derived from normal and *Grid2*^{Htake/Htake} mice, which was consistent with the result of mRNA (microarray) analyses (Supplementary Table S1).

We have to note, however, that no significant interaction between GRID2 protein and NMDAR1 protein in the total cerebella or cultured granule cell lysate was observed (Supplementary Figure S2), despite the presence of PKC gamma binding to GRID2 protein [33].

Next, we monitored NMDA-induced currents in cultured granule cells using a whole-cell voltage-clamp technique. At cell densities as low as 1.25 million cells/mL and a holding potential of -90 mV, granule cells from both WT and mutant mice showed no baseline activity (Figure 4C). In the absence of memantine (before memantine), NMDA (20 μ M, 2 s) induced inward currents that were larger in WT cells than in mutant cells. Furthermore, NMDA-induced currents were reduced in the presence of memantine (after memantine: 10 μ M, 30 s). However, the magnitude of the memantine-dependent suppression of the NMDA-induced currents varied in the individual cells.

To accurately categorize the memantine-sensitive NMDA-induced currents, we divided the cells into two categories based on the ability of memantine to reduce the charge density of NMDA-induced currents by more than 75%. According to this classification, 51.9% of WT cells and only 21.4% of mutant cells were categorized as memantine-sensitive (Figure 4D). Moreover, the classification (only open circles) revealed that the values of charge density from the mutant cells fell into a lower range, which produced a significant difference in the variance of the charge density between the WT and mutant groups (Figure 4E). These results suggest that mutant mice might possess a poor variation of NMDA receptor with reduced function on their granule cell population.

Figure 4. NMDA-responsiveness of cultured cerebellar granule cells. **(A)** The raw data for quantitative PCR analyses and normalized levels (inset: $n = 4$) of *Grid2* mRNA are indicated. Total RNA was prepared from total cerebellum, 2-week-cultured cerebellar granule cells from neonates (P2), B16F10 melanoma cells (non-neuronal negative control); **(B)** Western blotting was performed using WT and *Grid2*^{Htake/Htake} (Mut) total cerebella or cultured granule cells. There is no significant difference in NMDAR1 protein level; **(C)** Whole-cell current responses of cultured granule cells derived from WT and Mut mice to local application of NMDA (20 μ M, 2 s) before and after treatment with memantine (10 μ M, 30 s). Representative currents recorded from single WT and Mut cells. Arrowheads indicate artifacts due to the opening and closure of the electromagnetic valve controlling delivery of NMDA-containing saline; **(D)** The examined cells were categorized into two groups by memantine susceptibility, and their populations are represented as % fractions. When more than 75% of NMDA-induced inward current was suppressed by memantine, the cells were categorized into the memantine-sensitive group (white area). Cells that experienced reduced inward current suppression after memantine treatment, or no significant inward current were categorized into the memantine-insensitive group (black area). * $p = 0.0178$, likelihood ratio test (WT, $n = 27$; Mut, $n = 28$); **(E)** Distribution of the total charge density of NMDA-induced inward currents. Open circles (white) and closed triangles (black) indicate the data from cells categorized as D. The magnitude of the total data (white and black) was not significantly different between the WT and mutant cells (medians, 1.01 and 0.64 pC/pF, respectively). However, in a comparison of the data from the memantine-sensitive cells (white), there was a significant difference in variance between the WT and mutant cells (* $p = 0.0120$, Brown-Forsythe test).



2.5. Mice Treated with Memantine and AMPA Were Unable to Walk Smoothly

GRID2 deficiency results in dysregulation of AMPA receptors [34,35]. To examine whether impaired AMPA receptor functions affected memantine susceptibility, mice were treated with memantine simultaneously with the AMPA receptor agonist AMPA or the antagonist DNQX [36], and the movements of these mice were monitored (Figure 5A). The mice treated with AMPA (20 mg/kg) walked slowly and sometimes crouched on the floor. However, mice treated with both memantine (10 mg/kg) and AMPA had increased activity and did not stop walking. In addition to these abnormal behaviors, the mice walked with a mild staggering gait and sometimes slipped (roll-over: Figure 5B, Supplementary Movie 4). These combined effects of memantine on mouse behavior were not observed when memantine was administered with DNQX (10 mg/kg), although the mice treated with DNQX were also sometimes crouched. Moreover, in the *Grid2^{Htake/Htake}* mice, co-treatment with AMPA and a low dose of memantine (5 mg/kg) caused more evident balance impairment than memantine treatment alone (Supplementary Figure S3), suggesting that GRID2 deficiency may augment the synergistic action of AMPA and memantine. The effect of AMPA co-treatment could not be evaluated with a higher dose of memantine (10 mg/kg) because the maximal effect was induced by this dose of memantine.

Figure 5. Effect of AMPA receptor modulators on memantine action in WT mice.

(A) Monitoring of walking mice (12-week-old WT male, $n = 6$) after memantine treatment (10 mg/kg) combined with AMPA (20 mg/kg) or the AMPA receptor antagonist DNQX (10 mg/kg). Ten minutes after the treatments, the walking distance for 5 min was expressed as the mean and SD, * $p < 0.05$ vs. the other conditions (unpaired t -test; $p < 0.0001$ for overall differences, one-way ANOVA); (B) Number of rollovers in 5 min was counted. NO indicates that rollover was not observed. $n = 6$ for Control and AMPA + memantine and $n = 3$ for the other conditions. The occurrence of rollover was significantly different between AMPA + memantine and the other conditions ($p < 0.05$, Fisher's exact test); (C) OKRs measured in female WT mice with sequential injections of the control saline, AMPA (10 mg/kg), or DNQX (5 mg/kg) and memantine (5 mg/kg). A set of traces indicates representative responses of individual mice. Dotted line, the movement of the stimulus screen; (D) Graph shows the mean and \pm SD of OKR gain ($n = 3$ for each condition). p value (without a bracket, one-tailed unpaired t -test; with brackets, paired t -test) is indicated when significance was observed.

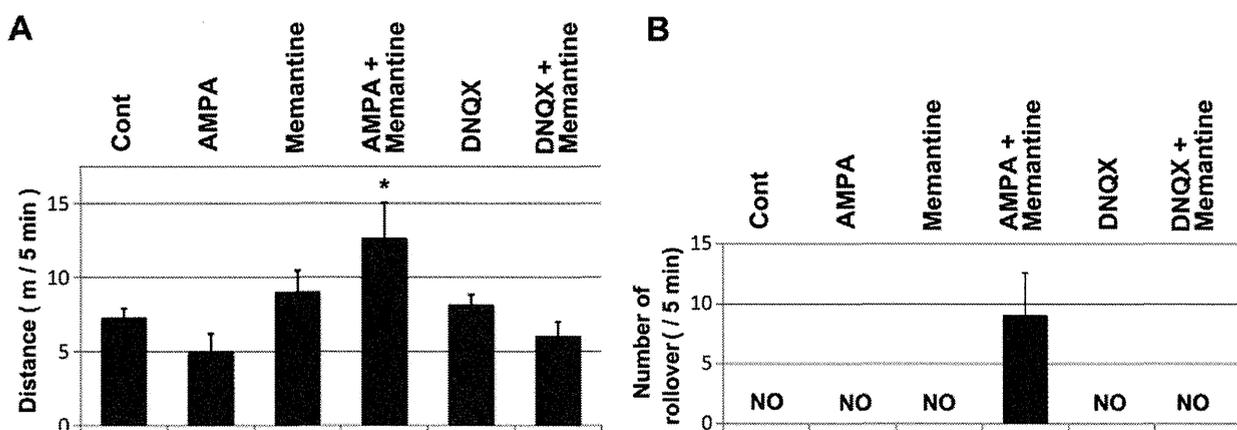
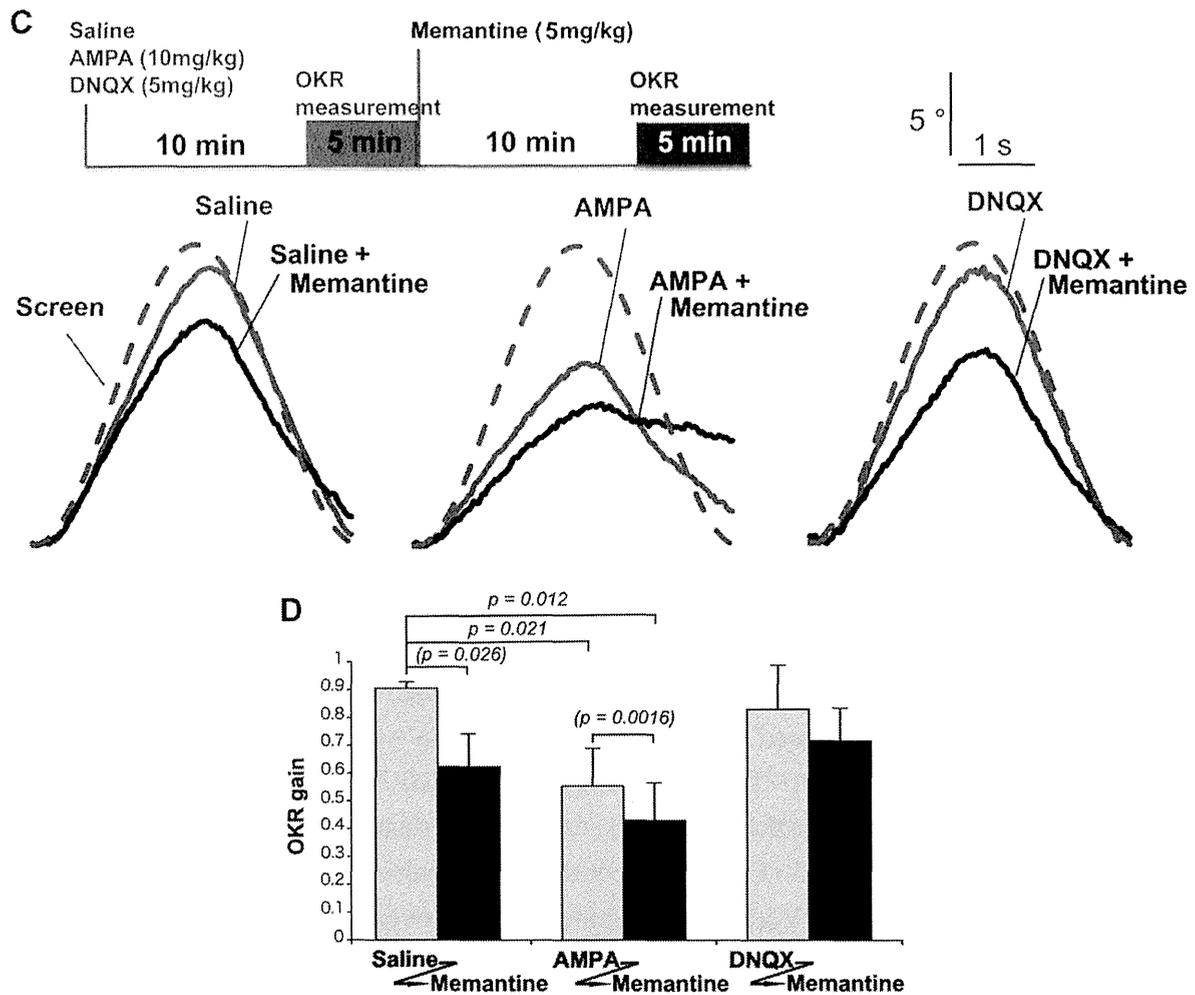


Figure 5. Cont.



Finally, the OKR was monitored after co-treatment with memantine and AMPA or DNQX (Figure 5C). Mice were first treated with AMPA, DNQX, or saline, and the OKR was subsequently monitored for 5 min (because some mice closed their eyes after treatment with higher doses, AMPA (10 mg/kg) and DNQX (5 mg/kg) were used for OKR measurement). To evaluate synergies between memantine and AMPA receptor modulators, the mice were further treated with a low dose of memantine (5 mg/kg), and again subjected to OKR measurements for another 5 min. AMPA significantly impaired the OKR, and the combined treatment with memantine further impaired the OKR (Figure 5D). These effects were not observed in mice co-treated with memantine and DNQX.

3. Discussion

Here, we report cross-talk between GRID2 signaling and memantine in mice, which may, in part, account for the adverse effects of memantine in patients with individual differences in congenital or acquired genetic factors, such as GRID2.

Major phenotypes have been identified in GRID2 mutant mice, including impaired motor coordination, learning, and memory. GRID2 is located on the postsynaptic membrane of Purkinje cells and binds to cerebellin precursor protein 1 (CBLN1) and neurexin 1 beta (NRXN1b) [7,8] on the parallel fibers of granule cells [7,37]. On the other hand, the memantine target, NMDA receptors, are also