

厚生労働科学研究委託費（認知症研究開発事業）
委託業務成果報告（業務項目）

iPS 細胞の培養分化誘導に関わる研究開発

担当責任者 古江 美保

独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室 研究リーダー

研究要旨 近年、国内外でヒトiPS細胞を利用した創薬研究への応用が期待されているが、安定した品質を持つヒトiPS細胞由来アストロサイトおよび神経を安定供給するには至っていない。我々は、神経細胞エネルギー代謝制御に着目した内因性グルタミン酸による神経興奮毒性との相関を評価する新たなスクリーニング系にヒトiPS細胞由来アストロサイトを応用することを目的として、ヒトiPS細胞由来のアストロサイト及び神経細胞への安定な分化誘導法に関わる研究を推進している。本年度は、ヒトiPS細胞からアストロサイト及び神経細胞への分化誘導法について検討するとともに、誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価方法について検討を進めた。

A．研究目的

認知症の原因は様々ではあるが、多くは神経細胞のエネルギー代謝不全に密接に関係しており、ATP 産生の最大場であるミトコンドリアの機能異常を伴う。また、神経細胞内でのエネルギー代謝に加え、リポタンパク ApoE4 多型が認知症と高い相関を示すこと、アストロサイトによる神経伝達物質の回収及び神経細胞への再分配や、乳酸等の供給も記憶構築に重要であると示唆されており、神経細胞外からのエネルギー源等の供給制御方法の確立が、認知症治療の新戦略になるとされている。

本研究は、神経細胞エネルギー代謝制御に着目し、内因性グルタミン酸による神経興奮毒性との相関を評価する新たなスクリーニング系を用いて、漢方生薬エキスを網羅的にスクリーニングし、神経細胞内エネルギー代謝異常を改善する生薬及びその成分を同定し、及び老化（認知症）モデルマウスを利用した記憶能力を評価することを目標とする。

我々は、神経細胞エネルギー代謝制御に着目した内因性グルタミン酸による神経興奮毒性との相関を評価する新たなスクリーニング系にヒト iPS 細胞由来アストロサイトを応用することを目的と

して、ヒト iPS 細胞由来のアストロサイト及び神経細胞への安定的な分化誘導法に関わる研究開発を進めている。国内外でヒト iPS 細胞を利用した創薬研究への応用が期待されているものの、安定した品質を持つヒト iPS 細胞由来アストロサイトや神経を安定供給するには未だ至っていない。ヒト iPS 細胞から誘導したアストロサイトや神経細胞の機能や品質を評価する方法も未だ確立されていないのもその理由のひとつである。そこで、我々は、ヒト iPS 細胞からアストロサイトや神経への誘導方法について検討するとともに、誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価方法について、従来の細胞の遺伝子発現評価に加えて、酸素消費量による評価方法の検討をおこなった。

B．研究方法

免疫染色及び形態評価による誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価法の開発には、ヒト iPS 細胞 Tic (JCRB 細胞バンク JCRB1331) から誘導した神経幹細胞及び神経細胞を用いた。免疫染色及び形態評価の比較対象として、ヒトアストロサイトマ KINGS1 (JCRB 細胞バンク IF050435) を用いた。各種細胞を培養し、既知の神経幹細胞

マーカー、神経マーカー、及びアストロサイトマーカーの発現について蛍光免疫染色で検討した。既設の蛍光顕微鏡システム（ニコン Ti 蛍光顕微鏡）の改良を行い、画像取得・解析に用いた。

ISX-9 はCayman 社から購入した。その他の酸素消費量の検討は竹森の項目を参照。

（倫理面への配慮）

当該研究は、独立行政法人医薬基盤研究所の定める倫理規定に従って計画、遂行した。ヒト iPS 細胞 Tic (JCRB1331) は、既知の細胞より樹立された iPS 細胞であり、独立行政法人医薬基盤研究所・JCRB 細胞バンクより所定の手続きを経て入手した。将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、且つ、科学的知見に基づいて有効性及び安全性を確保できるよう努め、一般公開や学会発表などにおいて国民に説明を行った。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞からアストロサイトや神経への誘導方法の評価を行うために、まず、誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価方法について検討した。分化誘導した細胞の神経マーカー/アストロサイトマーカー遺伝子発現を細胞の免疫染色によって網羅的に評価する方法の構築をおこなった。今回は、ヒト iPS 細胞から神経幹細胞を経て神経細胞やアストロサイトを含むグリア細胞へと2次元培養にて分化誘導する実験を実施し、誘導中の各過程で固定し、蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡システムによる蛍光画像取得及び解析を行った（図1）。ヒト iPS 細胞から誘導した神経幹細胞とさらに誘導を進めた幼若神経細胞では、大脳皮質神経幹細胞マーカーである PAX6、神経幹細胞およびグリア細胞マーカー Nestin、神経マーカー Tuj1、MAP2 の発現が異なることが確認された。

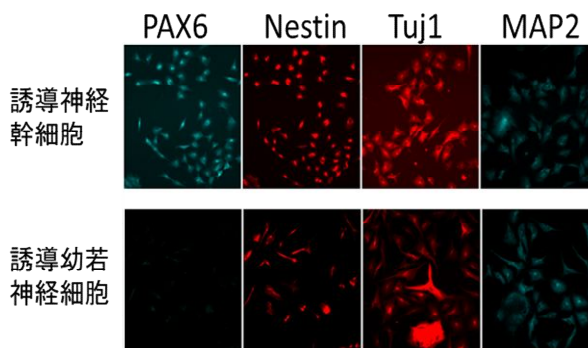


図1：誘導神経細胞の評価

ヒト iPS 細胞 Tic から分化誘導した誘導神経幹細胞集団（上）及び誘導幼若神経細胞集団（下）の蛍光免疫染色による評価例。各種神経細胞マーカーの発現を指標とし、誘導効率を判定した。

ヒト iPS 細胞から誘導したアストロサイトの情報は誘導神経細胞に比べて少なく、分化誘導評価の比較対象（コントロール）とする細胞が必要なため、ヒトアストロサイトマ KINGS1 の培養を行った。誘導アストロサイトの評価を行うにあたり、アストロサイトマーカー遺伝子の発現についてヒトアストロサイトマ KINGS1 を用いて検討した。

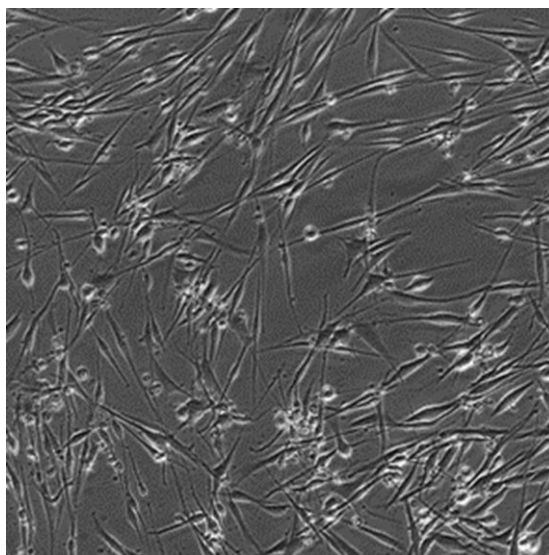


図2：ヒトアストロサイトマ KINGS1 の位相差顕微鏡像 培養は比較的容易であるため、コントロール細胞としても有用である。

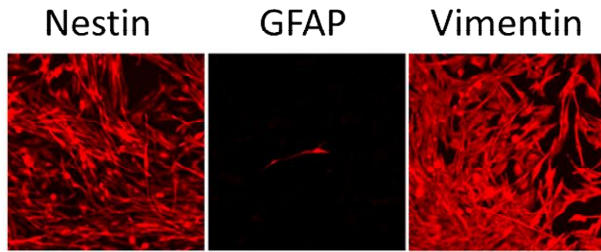


図3：ヒトアストロサイトーマ KINGS1 の評価例
ヒトアストロサイトーマ KINGS1 の各種アストロサイトマーカーの発現を蛍光免疫染色評価した。

このアストロサイトーマ KINGS1 の細胞株は、均一な細胞集団ではないことが、今回の検討で明らかとなった。JCRB 細胞バンクの細胞情報としては、アストロサイトのマーカーでもある GFAP 陽性、Nestin 陽性、Vimentin 陽性の細胞集団とうたわれていたが、実際に培養し、免疫染色で判定してみると、そのほとんどが GFAP 陰性、Nestin 陽性、Vimentin 陽性の細胞集団であり、一部が GFAP 陽性、Nestin 陽性、Vimentin 陽性であることが確認された(図3)。しかしながら、アストロサイトーマ KINGS1 は培養も比較的容易なことから、免疫染色による評価のコントロール細胞としては非常に有用であり、今後の検討にも使用可能であることが示された。

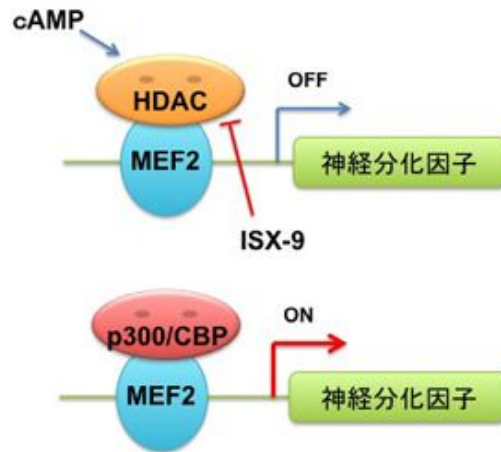
さらに、酸素消費量を利用し、神経細胞とアストロサイトの割合が異なる集団を評価可能か否かを検討した。今回は、神経細胞を確実に得るために、マウスの初代培養細胞を利用した。未分化神経細胞からの神経細胞とアストロサイトの分亜割合の変化には、神経細胞分化関連因子の転写を調節する MEF2 とその抑制因子である Class2-HDAC の活性を変動させることで確認した。

MEF2 の抑制が神経細胞の分化及び成熟を阻害することは報告されているが、MEF2 の抑制がアストロサイトへの分化を促進するかは不明である。一方、アストロサイトは cAMP で分化誘導され、cAMP は Class2-HDAC の活性化を介して MEF2 を抑制することが明らかにされている。そこで、今回

は、MEF2 活性の制御剤として、cAMP と ISX-9 を初代神経細胞の分化段階で処理し、成熟神経細胞集団内の細胞割合と酸素消費量を検討した。

その結果、ISX-9 は神経細胞割合を高め、cAMP はアストロサイトの割合を高めることが確認できた。

図4：転写因子 MEF2 による神経細胞分化促進。



MEF2 活性は Class2-HDAC により抑制されており、cAMP はその抑制を増強させる。一方、最近同定された低分子化合物 ISX-9 は、Class2-HDAC を阻害することで、MEF2 活性を上昇させ、神経細胞分化を促進させる。

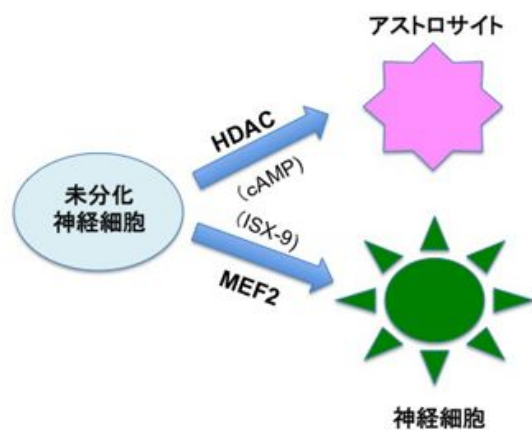


図5：Class2-HDAC/MEF2 による神経分化の方向性制御の作業仮説。

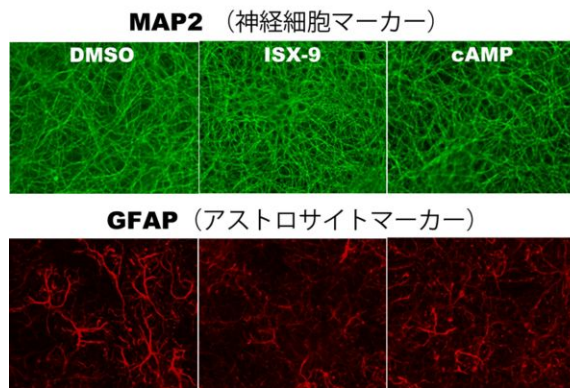


図6： ISX-9 と cAMP による神経細胞集団の分化割合変動。

このように、神経細胞とアストロサイトの割合が異なる集団を得ることができたので、それぞれの集団を酸素消費量で確認した。竹森の項目で確認されているように、神経細胞とアストロサイトではグルタミン酸添加後の酸素消費量変動が逆に反応することを利用して確認することにした。

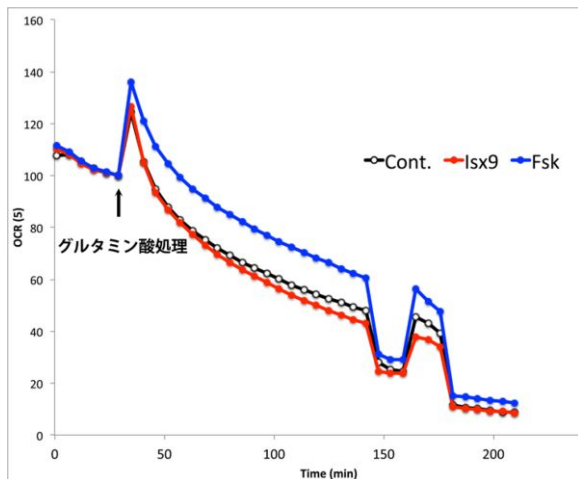


図7： 神経細胞とアストロサイトの割合の異なる集団の酸素消費量変化。神経細胞の多いISX-9処理群は、グルタミン酸に対する感受性が亢進しており、神経細胞死が高まっていた。反対に、アストロサイトの多い細胞集団では、神経保護に作用した。

予想どおり、ISX-9 処理群はグルタミン酸感受性が亢進しており、細胞死が増加する事で、酸素

消費量低下が促進していた。反対に、cAMP 処理群では、アストロサイトによるグルタミン酸利用が亢進するため、酸素消費量が高く推移し、その後のミトコンドリ機能試験でも神経保護作用を発揮した。これらのことは、アストロサイトの興奮毒性に対する重要性を示唆するものである。

D. 考察

誘導アストロサイトと誘導神経細胞を免疫染色により評価できる可能性が示された。現在、さらにスループット性を増し、正確且つ迅速に誘導細胞の評価を行うために、蛍光顕微鏡装置システムの改良を進めている。また、免疫染色では各種マーカー遺伝子の細胞ごとの発現量を細胞形態や細胞密度などと合わせて視覚的に評価できるというメリットがあるが、一度に評価できるのは、数種~十数種のマーカーのみであり、それ以上に多くの遺伝子について調べるには、コストと時間が問題となってくる。そこで、定量的 RT-PCR アレイ(網羅的 mRNA 発現解析などと組み合わせるとより多くの情報をスピーディーに得られる実験系の構築も視野に入れている。

また、神経細胞とアストロサイトの割合が異なる集団を酸素消費量と興奮毒性で評価することが可能性であることが示唆された。また、アストロサイトの神経保護作用を簡便に再確認できた。

E. 結論

ヒト iPS 細胞から誘導したアストロサイト及び神経細胞の品質を迅速に且つ正確に評価することは、誘導アストロサイトと誘導神経細胞が薬物スクリーニングに応用可能な、機能するものであるかどうかを評価する上でも、各々の誘導法が安定かどうかを評価する上でも、非常に重要である。

本研究では、誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価方法について、従来の細胞のマーカー

遺伝子発現評価に加えて、酸素消費量による評価方法を検討し、神経細胞とアストロサイトの存在割合や機能を簡便に確認する基本的な実験系を策定した。引き続き、これらの実験系を改良し、実用可能な評価系の構築を推進する。

F . 健康危険情報

特記事項なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suga M, Kii H, Niikura K, Kiyota Y and **Furue MK**. Development of a monitoring method for non-labeled human pluripotent stem cell growth by time-lapse image analysis. *STEM CELLS Translational Medicine* (in press)
- 2) Andrews P, Baker D, Benvinisty N, Miranda B, Bruce K, Brüstle O, Choi M, Choi YM, Crook J, de Sousa P, Dvorak P, Freund C, Firpo M, **Furue MK**, Gokhale P, Ha HY, Han E, Haupt S, Healy L, Hei Dj, Hovatta O, Hunt C, Hwang SM, Inamdar M, Isasi R, Jaconi M, Jekerle V, Kamthorn P, Kibbey M, Knezevic I, Knowles B, Koo SK, Laabi Y, Leopoldo L, Liu P, Lomax G, Loring J, Ludwig T, Montgomery K, Mummery C, Nagy A, Nakamura Y, Nakatsuji N, Oh S, Oh SK, Otonkoski T, Pera M, Peschanski M, Pranke P, Rajala K, Rao M, Ruttachuk R, Reubinoff B, Ricco L, Rooke H, Sipp D, Stacey G, Suemori H, Takahashi T, Takada K, Talib S, Tannenbaum S, Yuan BZ, Zeng F, and Zhou Q. Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCB). *Regen Med.* (2015) (2 Suppl): 1-44. DOI: 10.2217/rme.14.93.
- 3) Ozawa M, Ozawa Y, Iemura M, Kohara A, Yanagihara K, **Furue MK**. A simple

improvement of the conventional cryopreservation for human ES and iPS cells.

Protocol Exchange (2014)

DOI:10.1038/protex.2014.012

- 4) Ohnuma K, Fujiki A, Yanagihara K, Tachikawa S, Hayashi Y, Ito Y, Onuma Y, Chan T, Michiue T, **Furue MK**, Asashima M. Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations. *SCIENTIFIC REPORTS* (2014) 4, 4646 DOI: 10.1038/srep04646
- 5) Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Katayama K, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K, **Furue MK**, Mizuguchi H. HHEX promotes hepatic-lineage specification through the negative regulation of eomesodermin. *PLoS One* (2014) 9, e90791 DOI: 10.1371/journal.pone.0090791. eCollection 2014.

著書

- 1) **古江-楠田美保** (2014) 第15章 ヒト多能性幹細胞の利用技術開発、生命科学から創薬へのイノベーション 第部 **新たな創薬のための革新的技術開発** 南山堂 P105-112
- 2) 菅-三佳, **古江-楠田 美保** (2014) ヒト多能性幹細胞培養用培地の開発の現状と課題 **生物工学会誌** 第92巻9号 P487-490

2. 学会発表

国内学会：一般講演

- 1) 加藤竜司、岡田光加、長坂理紗子、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、**古江-楠田美保** コロニー形態情報を用いた iPS 細胞株の特性解析 第14回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2015年3月19日-21日

- 2) 加藤竜司、吉田啓、岡田光加、長坂理紗子、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、**古江-楠田美保** 細胞形態情報を用いた iPS 細胞培養手技の定量化 第 14 回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2015 年 3 月 19 日-21 日
- 3) 太刀川彩保子、菅三佳、**古江-楠田美保**、大沼清、二次元イメージングサイトメトリーは単層培養でのヒト多能性幹細胞コロニーの自己複製解析に適している 第 14 回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜(神奈川) 2015 年 3 月 19 日-21 日
- 4) 長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、**古江-楠田美保**、加藤竜司 細胞画像解析による iPS 細胞リアルタイム 品質評価法の開発 第 66 回日本生物工学会大会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2014 年 9 月 9 日-11 日

国内学会：シンポジウム・ワークショップなど

- 5) 吉田啓、長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、清田泰次郎、本多裕之、**古江-楠田美保**、蟹江慧、加藤竜司 コロニートラッキングを応用した iPS 品質 状態のモニタリング 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京) 2015 年 1 月 13 日
- 6) 太刀川彩保子、藤木彩香、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、**古江-楠田美保**、浅島誠、大沼清、2 価イオンの制御によるヒト細胞シートの回収と細胞間結合の遮断 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京) 2015 年 1 月 13 日
- 7) 長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、**古江-楠田美保**、加藤竜司 iPS 細胞培養手技標準化のための形態評価 モデル 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール (東京) 2015 年 1 月 13 日

招待講演

- 8) **古江-楠田美保** 再生医療に果たす工学の役割 - ヒト多能性細胞の培養において求められるマテリアル - 第 64 回日本歯科理工学学会 アステールプラザ (広島) 2014 年 10 月 4 日-5 日
- 9) **古江-楠田美保** ヒト多能性幹細胞の品質管理と精度管理 第 41 回日本毒性学会学術年会 神戸コンベンションセンター (兵庫) 2014 年 7 月 2 日-4 日

学会座長

- 10) 柳原佳奈 Recent developments of Stem Cell Applications-leaders in industrialization JAACT2014 国際会議北九州大会 北九州国際会議場 (福岡) 2014 年 11 月 11 日-14 日
- 11) **古江-楠田美保** 再生医療に求められる細胞培養 第 14 回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2015 年 3 月 19 日-21 日
- 12) **古江-楠田美保** 臨床応用を目指したヒト多能性幹細胞用培地の品質管理 iPS 細胞ビジネス協議会 京都リサーチパーク (京都) 2014 年 11 月 26 日

国際学会：一般講演

- 13) Yanagihara K, Okamura M, Kanie K, Kato R, **Furue MK.** *Prediction of differentiation tendency of human pluripotent stem cells toward endoderm* International Society for Stem Cell Reserch (ISSCR) 12th Annual Meeting, 2014.6.18-21 Vancouver, Canada
- 14) Suga M, Kii H, Uozumi T, Kiyota Y, **Furue MK.** Establishment of a noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by live cell imaging. ISSCR 12th Annual Metting 2014.6.18-21 Vancouver, Canada

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許出願

PCT/JP2014/08221 判定装置、観察システム、
観察方法、そのプログラム、細胞の製造方法、お
よび細胞 株式会社ニコン 清田 泰次郎、紀
伊 宏昭、古江 美保、菅 三佳、志賀 正武

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

生薬エキス調整低分子分析・構造解析

担当責任者 湊野 裕之

独立行政法人医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 栽培研究室 室長

研究要旨 薬用植物スクリーニングを行うための植物エキ斯拉イブラリーの構築を行った。本研究事業に対してはシダ植物を中心に多くの植物を採取し、それらのメタノール抽出エキスを作成し、DMSO溶液でのライブラリーを構築した。最終的にそれらライブラリーのアッセイプレートへの自動分注を行うための分注プログラムを作成し、アッセイプレートでの分注態勢を整え、今年度は4413種類の植物エキスについて本研究事業へのアッセイプレートでの供出を行った。生薬チョウトウコウからATP産生に影響を与える化合物として2種の化合物を特定するに至った。

A. 研究目的

高齢化社会において、認知症は未だ根本治療薬が存在しない深刻な疾病である。神経シグナル伝達の不全・過剰は、ともに神経障害作用を惹起することから、認知症治療薬には、神経保護作用を示すこと及び正常な神経伝達シグナル(神経発生を含む)を障害しないことが求められる。本研究では、正常な神経伝達シグナルを阻害することなく、認知症の最終病態である神経細胞死を、神経エネルギー代謝を制御することで回避させる技術開発を行うことを目的とする。

20世紀には多くの医薬品開発において天然物を創薬資源として用いてきた歴史があるが、近年のゲノム創薬の台頭により下火になってきた感があったが、最近になり combinatorial chemistry や High-through put screening) HTS において主体となっていた合成化合物の骨格の限界が指摘されるなど、奇異な骨格を有する天然有機化合物に回帰する傾向がみられるようになった。現在国内にはそのような理由もあり、いくつかの研究機関において天然有機化合物ライブラリーが構築されるようになってきた。コック内に存在する天然物ライブラリーにおいて微生物抽出エキスを元にしたライブラリーは存在するが植物抽出エキスを元にしたライブ

ラリーは存在しない。その理由として、このような植物エキ斯拉イブラリーを構築するためには、厳格な植物同定が必要であり、被子、裸子などの高等植物とは異なり羊歯、地衣類などの下等植物の場合、花がないために同定には極めて高度な知識を要するため、容易には手掛けられないのである。本分担研究においてはそのような創薬現場の現状を鑑み、本研究課題に直結した植物エキ斯拉イブラリーの構築において、比較的奇異な骨格を有する二次代謝産物を生成するシダ類を重点的に収集し、エキス作成を行うこととした



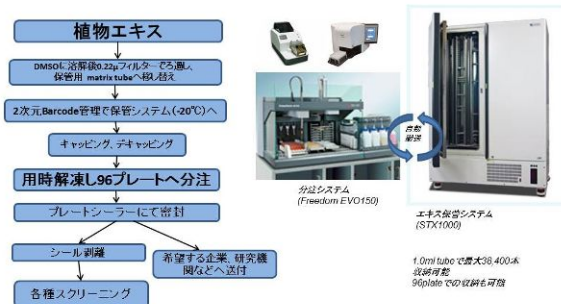
B. 研究方法

独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターには国内に3つの研究部(種子島、北海道、筑波)を有している。それぞれの拠点においてはそ

の地域特有の気候に合った植物資源の栽培・保存が行われている。北海道研究部においては北方系植物、例えばモッコウ、センキュウ、ホッカイトウキ、ゲンチアナなど冷涼な気候を好む植物を栽培・保存しており、特に近年文字文化を有しないアイヌ民族が歴史的に薬用として利用していた薬用植物の収集を行っている。また種子島研究部においてはウコン類、インドジャボクなどの熱帯・亜熱帯植物の栽培・保存を行っているほか、近年はソロモン諸島と契約を結び、多くの貴重なソロモン諸島産植物資源の導入を図っている。筑波研究部においては、標本園・温室においてミシマサイコ、オケラ、オウゴン、ハトムギ、ヤクモソウ、カンゾウなど多くの薬用植物の栽培を行っている。これらの多くの植物資源（創薬資源）をスクリーニング用試料として供した。また、各研究部において毎年行っている種子交換業務における植物調査でも近隣の野生植物を採取し今回のスクリーニング用試料とした。さらに筑波研究部においては生薬の市場流通品のコレクションを保有しているため、例えば同じ生薬名であっても産地や調製法や等級の異なる多くの生薬を保管しているため、これらについてもスクリーニング用試料として用いることが可能となる。また植物の特性としては、産地や採取時期により成分含量が異なるために、野生植物の採取の際には、採取場所（GPSを記録）、採種日の記録を行っている。さらに、例えば葉、樹皮、花など部位により成分が全く異なってくるために、極力さまざまな部位に分離することを行っている。

保存、あるいは採取した植物は各部位に分け、乾燥し、粉碎を行う。粉碎後はメタノールで熱時抽出を行う。メタノールは極性有機溶媒であるが、その抽出溶媒の性質として、低極性から高極性に至るまで広い極性成分の抽出を行うことが可能であるためである。メタノールで抽出後、濾過を行いそのろ液はエバポレーターにて濃縮乾固させ最終的な抽出エキスを作成する。作成したエキスには管理番号が付与され（MPSC 番号）、一定濃度になるようにDMSOに溶解される。その後滅菌フィルターを通し、底に二次元バーコードの付いた保存用チューブに

入れ-20の保管庫に保存される。必要に応じて保管庫から取り出され解凍されたのちにデキャップを行い96穴アッセイプレートに指定したマップに従って分注され、シーラーでシーリングされ、そのアッセイプレートも保管庫に保管されて要事に取り出される。上記の二次元チューブの保管庫取出しからの一連の作業は自動分注機により行われる。



植物エキスからスクリーニング前段階まで

また、代謝疾患関連タンパクPでの細胞内ATP産生に影響を与える化合物の探索において、脳神経保護作用を有する創薬の評価法の開発を行っているが、ミトコンドリアのエネルギー代謝に影響を与える化合物として、今回データベース用モデル生薬のチョウトウコウにATP産生におけるGlutamate（神経興奮毒性）耐性活性が見いだされた。そこで、チョウトウコウに含まれるこれらの活性を示す化合物を、モデル試料生薬の熱水抽出エキスを用いた多変量解析手法を用い推定し、最終的に化合物を単離し化学構造の解明を行った。

多変量解析は、チョウトウコウ熱水抽出エキスのLC/MSデータ(ThermoFischer Scientific社製 Orbitrap MS：イオン源 ESI)とそれらエキスの活性値データを変数としSIMCA P+ ver.12 (Umetrics社製)を用いて多変量解析を行った。LC/MSデータはSIEVEを用いてアライメントを行った。

分析条件

セミ分取 HPLC

Shimadzu 10AD vp システム

column: Waters Bridge Prep Phenyl 10x250mm

solvent: 0.1%TFA/H₂O-30%AcCN gradient

分取 LC/MS

Waters 2545 送液ポンプに MS 検出器 SQD2 を連結

Column: Cosmosil C18 MS-II, 4.6x250mm

Solvent: 0.1%AcOH/H₂O- 100% AcCN gradient

分析 LC/MS

ThermoFischer Scientific Orbitrap MS

イオン源: ESI (positive, negative)

Column: Phenomenex Kinetex 1.7u C18 100A (50x2.1mm)

ColumnTemp.. 25.0 °C

Solvent: 0.1%FA/H₂O - 100%AcCN gradient

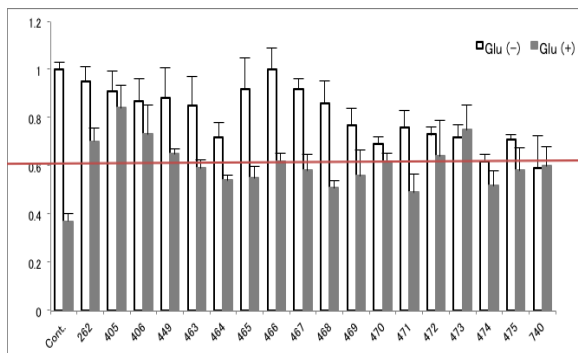
Flow rate: 0.2 ml/min

(倫理面への配慮)

該当せず

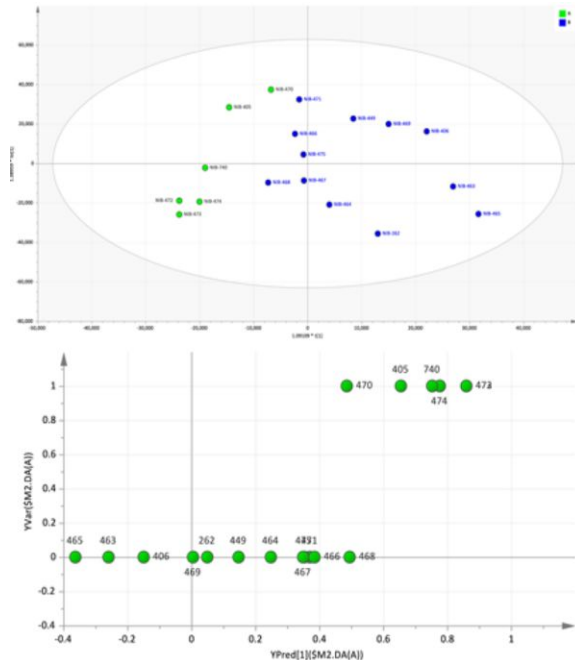
C. 研究結果

平成 26 年度は各研究部より送付された多くの野生植物を中心に抽出を行った。また北海道研究部内の樹木園、アイヌ園などの保存系統植物、種子島研究部より提供されたソロモン諸島産植物も抽出を積極的に行った。野生植物においては、本研究課題を意識し、特異的な骨格を有する二次代謝物を生合成するシダ植物を積極的に採取した。現在までのところ、5982 種類のエキス作成を終了し、分譲態勢の構築を行った。最終的に今年度は 4413 種類のエキスの 96 穴アッセイプレートへの分注を終了し、本研究課題での供出を行った。



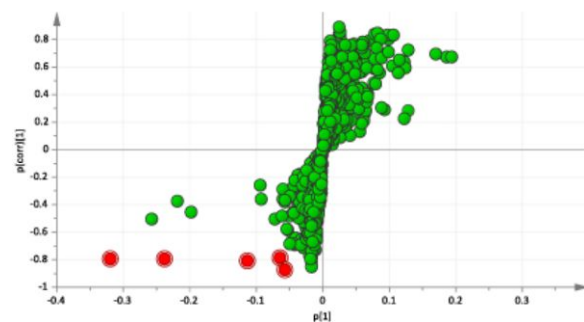
差が小さいグループと大きいグループをそれぞれ A、B とした判別分析 (白: 神経細胞毒性無し、灰色: 神経細胞毒性有り)

また生薬チオウトウコウの ATP 産生に影響を与える化合物の探索においては、Glutamate (神経興奮毒性) を入れた場合と入れていない場合で差が小さいグループと大きいグループをそれぞれ A、B とした判別分析 (OPLS-DA) を行った。

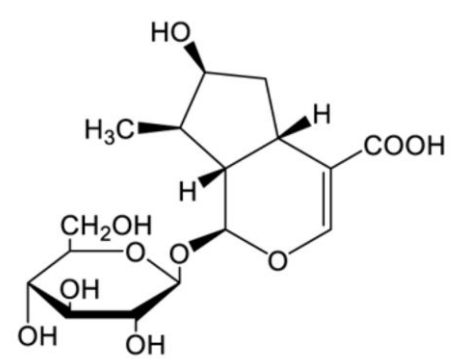
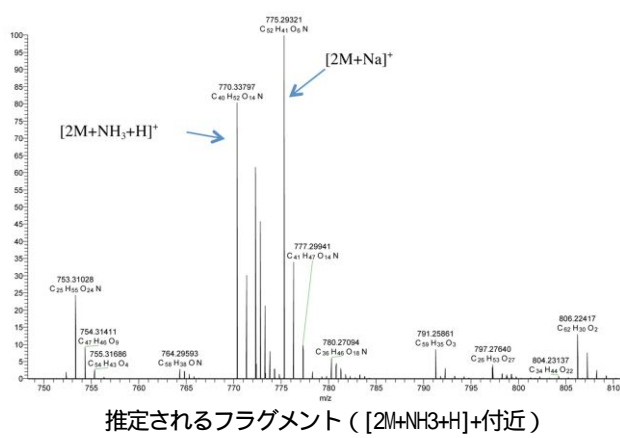
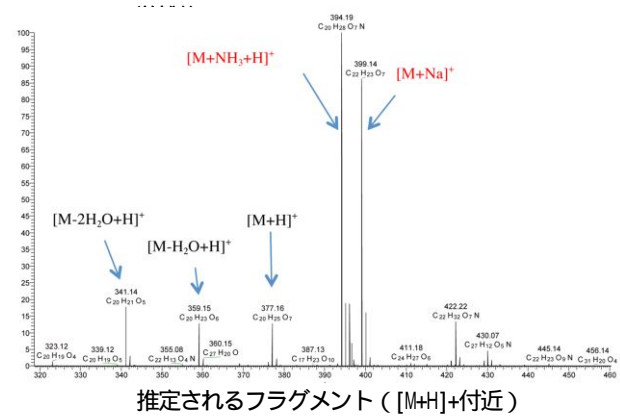
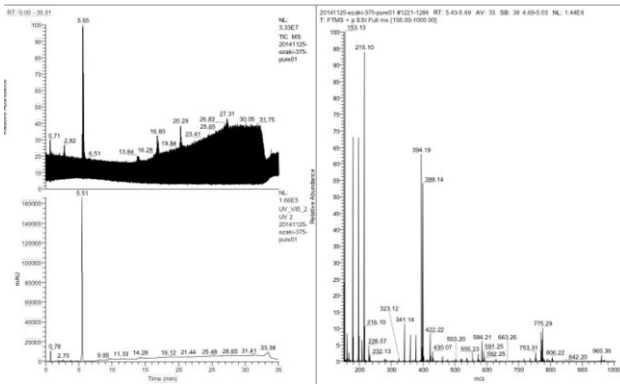


判別分析 OPLS-DA スコアプロット (negative)

その場合のローディング S-plot において、マーカー化合物、すなわち A、B を判別していると考えられる部分の LC/MS における保持時間と m/z の組み合わせから 2 つの化合物が活性化化合物と推定された。



ローディング S-plot



Loganic acid の化学構造式

D. 考察

今年度は植物抽出エキス作成と分譲態勢の構築を念頭に行ったが、抽出溶媒の選択、効率的な抽出方法の確立に時間を要してしまった。また自動分注機におけるプログラム開発では不具合が生じるなどアッセイプレートへの分注が遅れるなどの問題があったが、現在は安定しており安定な供給は可能と考えられる。

チョウトウコウから ATP 産生に影響を与える化合物として loganic acid と chlorogenic acid を得たが、植物エキスのような多成分系の状態から活性化化合物を特定するために多変量解析は有効であることが分かった。

E. 結論

今年度は薬用植物資源研究センター全研究部の協力のもと、多くの植物資源の積極的採取を行い、それらの本研究事業に対する効率的抽出法の確立と自動分注機によるアッセイプレートでの分譲態勢の構築を行った。また生薬チョウトウコウからは効率の良い活性化化合物の特定手法として多変量解析を検討し、最終的に2つの活性化化合物を特定するに至った。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

虚血及び血管性認知症モデルマウス評価

担当責任者 佐々木 勉

大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学 講師

研究要旨

認知症はアルツハイマー型認知症、脳血管性認知症などに分類され、amyroid 仮説などが提唱されてきたが、糖尿病などの生活習慣病の関与、社会心理学的側面の寄与など、極めて多様な因子が関与している。認知症における神経細胞におけるamyroid 障害性については、多くの報告があるが神経細胞 グリア細胞間のエネルギー代謝に関する報告は少ない。そこで本研究においては、これらのエネルギー代謝に寄与する因子を抽出し、大規模生薬ライブラリーをスクリーニングし、神経保護効果を検討する。又、高血圧に寄与するSIKs並びにSIKs-CREBシグナルの神経障害への関与を検討する。

A．研究目的

神経細胞、神経 アストロサイト共培養系において虚血性、或いはamyroid 毒性を検討する。また、SIKs 並びに SIKs-CREB シグナルの神経障害への関与を SIK 遺伝子改変マウスを用いて検討する。

B．研究方法

In vitro ラット初代神経培養系、初代神経培養アストロサイト共培養系を作成。

SIK 遺伝子欠損マウスよりの初代神経細胞培養系を作成し、検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、大阪大学実験動物委員会規程の承認のもと行った。

C．研究結果

SIK2 遺伝子欠損マウスにおいては、SIK2 ノックアウトにおいて、神経保護効果、梗塞サイズの縮小を認めたことは既に報告している（Sasaki et.al. *Neuron*. 2011 Jan 13;69(1):106-19）。他方、本研究により SIK1 遺伝子欠損マウスでは、神経障害的であった。本現象は、神経細胞の酸素消費量変化でも再現できた（図1）。

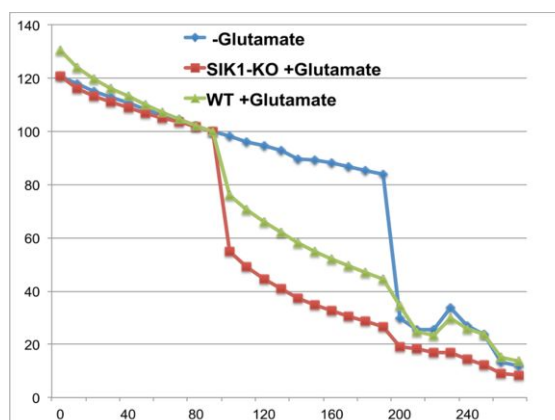


図1 酸素消費量変化を活用した SIK1-KO マウスのグルタミン酸に対する感受性の亢進。縦軸は酸素消費量(%)、横軸は時間(分)

SIK1-KO マウス由来の神経細胞にグルタミン酸を作用させると、細胞が一気に死滅することで酸素消費量の低下に繋がった。ミトコンドリアストレステスト（200分以降）でもミトコンドリアが機能していないことが判明した。今回は、アストロサイトの影響を除外するために、アストロサイトのグルタミン酸トランスポーター-EAAT2 の阻害剤存在下で試験した。今後はアストロサイト側の反応も検討する必要がある。

以前の報告より SIK1 が Na/K ATPase 活性を調節していることが報告されていたため、SIK1KO マウ

ス、野生型マウスより初代神経細胞培養系を作成し、Na/K ATPase の機能の電気生理学的検討を whole-cell patch clamp 法を用いて行った。しかしながら、両群間で、Na/K ATPase を介した電流に差異はなく、その上流のシグナル伝達の差異であることが示唆された。一方、SIK1K0 マウスと SIK2K0 マウスでは炎症性因子の差異を認めた。

D. 考察

従来の報告、本年度の報告より、神経病態下での SIK1 と SIK2 の役割が大きく異なることが示唆された。また SIK1 の Na/K ATPase に与える影響は細胞種、組織により異なり、今後、初代内皮細胞などでの検討も必要である。また SIK1K0 マウスと SIK2K0 マウスでは炎症性因子の差異も認め、神経病態時におけるマクロファージの極性への寄与、並びに分泌されるサイトカインのプロファイルの違いが、各神経病態により異なることが示唆された。

E. 結論

神経病態時においては、SIK1 と SIK2 の役割が大きく異なることが示唆され、今後、さらに amyloid 毒性の違い、in vivo モデルでの検討が重要である。

F. 参考文献

Sugiyama Y, Yagita Y, Yukami T, Watanabe A, Oyama N, Terasaki Y, Omura-Matsuoka E, **Sasaki T**, Mochizuki H, Kitagawa K. Granulocyte colony-stimulating factor fails to enhance leptomeningeal collateral growth in spontaneously hypertensive rats. **Neurosci Lett.** 564: 16-20 (2014)

G. 研究発表

1. 論文発表

Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, **Sasaki T**, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H,

Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H. Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. **Genes** (2014) 5: 1095-1114.

2. 学会発表

熊谷 彩子、伊東 祐美、賀川 舞、松田 潤一郎、**佐々木 勉**、田端 俊英、竹森 洋
GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

望月秀樹、**佐々木勉**、Choong Chi-Jing、上里新一、平田佳之（発明人）国立大学法人大阪大学、学校法人関西大学（出願人）「アイソフォーム特異的新規 HDAC 阻害剤による神経疾患治療法の開発」特願 2014-183239

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

電気生理学的解析

担当責任者 田端 俊英

富山大学大学院理工学研究部 神経情報工学研究室 准教授

研究要旨

認知症治療薬メマンチンに対して鋭敏に行動変調を示す突然変異マウス *Grid2*^{Htake/Htake} から採取した小脳顆粒細胞にパッチクランプ法を適用して解析したところ、NMDAに対して大きなNMDA型グルタミン酸受容体(NMDAR)介在性内向き電流を発生するものと、発生しないものがあり、後者の割合が野生型マウスに比して優位に高かった。*Grid2*^{Htake/Htake} マウスでは顆粒細胞のNMDAR機能低下により小脳が関与する運動協調等が障害され、またメマンチンの影響を受けやすくなっていると考えられた。このように認知症治療薬応答機序が明らかとなったマウスをツールとして用いることで、認知症治療薬の探索の促進が期待される。

A. 研究目的

メマンチン（NMDA 型グルタミン酸受容体(NMDAR)遮断薬、アルツハイマー病治療薬）に鋭敏に反応して行動変調を示す突然変異マウス *Grid2*^{Htake/Htake} において（図1）小脳皮質で高発現するGRID2をコードする *Grid2* の欠損が見つかった。*Grid2*^{Htake/Htake} マウスのメマンチン高応答性の機序を明らかにすべく、NMDAR 発現ニューロンである小脳顆粒細胞の NMDAR シグナリングを解析した。

顆粒細胞の NMDAR は、上位中枢からの運動命令と身体各部位の感覚情報を小脳皮質に中継する役割を担っている。小脳皮質はとくに短期間に起こる運動学習に関与していることが分かっている。したがって *Grid2* の欠損が NMDAR シグナリングに何からの影響を与えているとすれば、小脳皮質依存的運動学習に影響が現れると考えられる。そこで小脳皮質依存的運動学習の一種である視機性動眼反射（OKR）順応（動いている物体の画像が網膜上でぶれないように補正する反射性の眼球運動の精度がトレーニングにより向上する現象）を *Grid2*^{Htake/Htake} と野生型マウスで比較するとともに、メマンチン等の影響を解析した。もし遺伝子変異とメマンチンの NMDAR シグナリングと OKR 順応に相関関係があれば、OKR 順応の成

績を指標として認知症治療薬候補物質を行動学的にスクリーニングする手法が確立できる可能性が期待される。

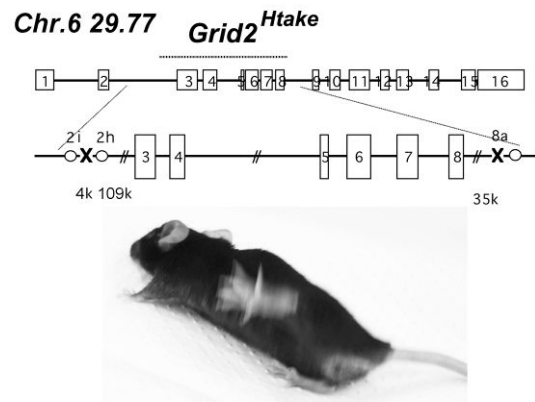


図1：Grid2 変異マウスの遺伝子欠損部位と歩行失調

B. 研究方法

NMDAR シグナリングの解析：幼齢マウスから採取した小脳顆粒細胞を分散培養した。顆粒細胞にパッチクランプ電位固定法を適用し、NMDA を急速投与して、NMDAR 介在性内向き電流を記録した。

OKR 順応の測定：解析装置および原理の概念図を図2に示す。成熟マウスを予め頭蓋に

設置した金具を用いて定位台に固定し、円筒形の市松模様刺激スクリーンの中に置いた。刺激スクリーンを 0.25Hz の周期で往復回転させた(点線プロット; 横軸は時間、縦軸は方位角)。マウスの眼球は刺激スクリーンを追尾して OKR を起こすので、赤外線カメラにより瞳孔の位置を検出し、眼球の方位角(実線プロット)を推定した。長時間トレーニングにより最大回転振幅(Ap)が刺激スクリーンのそれ(17°)に近づいていく。OKR 順応の学習成績は OKR ゲイン(Ap/17°)によって定量化した。コントロール群には生理食塩水を、テスト群にはメマンチン含有生理食塩水を腹腔投与してから OKR 順応測定を行った。

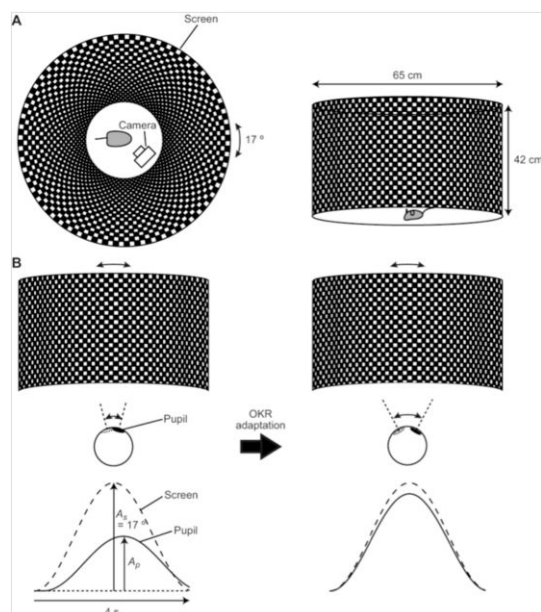


図2: OKR 測定装置と原理。OKR は、マウスが刺激スクリーンの動きに眼球を追従させる能力と、トレーニングによる学習効果(OKR 順応)を評価できる。

(倫理面への配慮)

富山大学実験動物委員会の承認を受けた手続きに沿って、幼齢マウスを低温麻酔してから断頭によって安楽死処分を行い、小脳を採取した。成熟マウスへの固定具の設置手術はイソフルラン吸入による深麻酔で実施した。

C. 研究結果

WT、*Grid2*^{Htake/Htake} マウスともに、数十 pA の内向き電流が発生する顆粒細胞と、発生しない顆粒細胞が存在した。しかし、大きな内向き電流を発生しない顆粒細胞の割合は *Grid2*^{Htake/Htake} マウス (Mut) の方が優位に高かった。メマンチン処理を行った後に再度 NMDA を投与して測定すると、内向き電流の振幅が減少した(図 3)。この減少は大きな内向き電流において顕著であった。このことから、*Grid2* 機能消失は、NMDAR 機能低下に繋がることを示唆された。メマンチンが NMDAR 阻害剤であることを考慮すると、*Grid2*^{Htake/Htake} マウスの解析は、学習・記憶の生物学的素過程であるシナプス可塑性に重要とされる NMDAR 機能を細胞と生体レベルの両方で研究できる有用な戦略であると期待される。

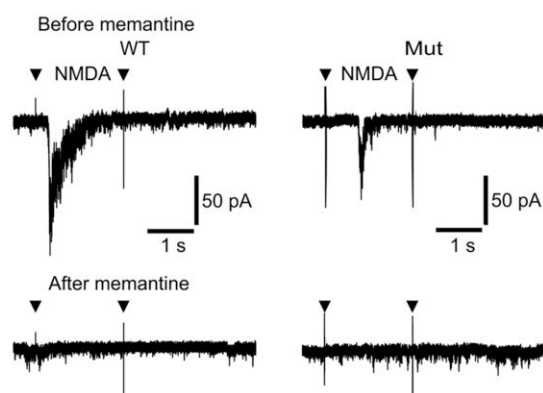


図3 野生型及び *Grid2* 変異マウスの小脳顆粒細胞の NMDAR 活性とメマンチンの影響

そこで、*Grid2* 変異マウスの記憶のうち、小脳皮質依存的運動学習に着目し、*Grid2* 変異及びメマンチンの OKR 順応に対する作用を検討した(図 4)。WT マウスは高い OKR ゲインを示し、*Grid2*^{Htake/Htake} マウスは著しく低い OKR ゲインを示した。

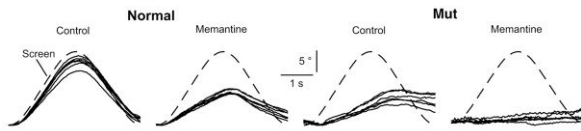


図4: OKR 順応測定。刺激スクリーンの動き(方位角の時間変化)が破線で示され、眼球の動きが実線で示されている。OKR 順応の学習が進めば(6本の実線は1時間のトレーニングのうち10分毎の平均)、実線の振幅と位相が破線に近づいていく。

OKR 順応を評価するため、1時間にわたるトレーニング期間中 OKR ゲインを測定し、10分間ごとに平均を算出した(図5)。WT マウスはトレーニング期間が長くなるにつれ OKR ゲインが顕著に上昇し、顕著な OKR 順応を示した。Grid2 変異マウスでは OKR ゲインの上昇が観察されず、OKR 順応が起こらないことが分かった。

また、WT マウスではメマンチン処理は OKR およびその順応を著しく障害した(図4,5)。および Grid2^{Htaker/Htaker} マウスでは、メマンチン処理は OKR およびその順応を完全に消失させた。

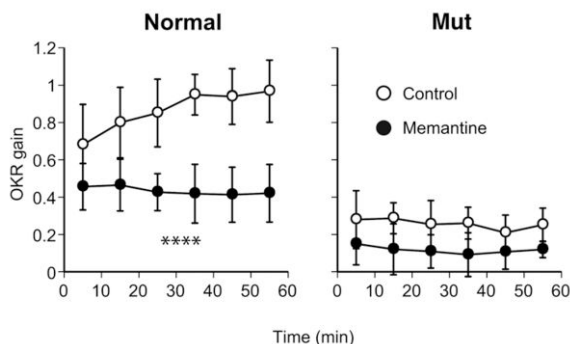


図5: OKR 順応。WT (Normal) マウスではトレーニング時間とともに、OKR ゲイン(学習成績)が上昇した。一方、メマンチンや Grid2 変異は OKR および OKR 学習を障害した。

最後に、メマンチンのグルタミン酸依存的神経興奮に対する神経保護作用を竹森の項に記載の神経細胞呼吸量の変動で検討した。まずは、WT と Grid2 変異マウス由来の神経細胞で比較した(図6)。

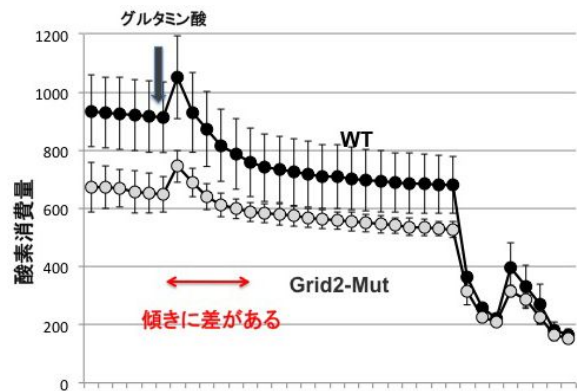


図6: 培養神経細胞の呼吸流量変化。横軸は時間

Grid2 変異マウス由来の呼吸量は WT よりも低かった。一方で、グルタミン酸刺激後の呼吸量低下率(グラフの傾き)は低く、グルタミン酸に反応していないことが示唆された。次に、メマンチンの影響を検討した(図7)。

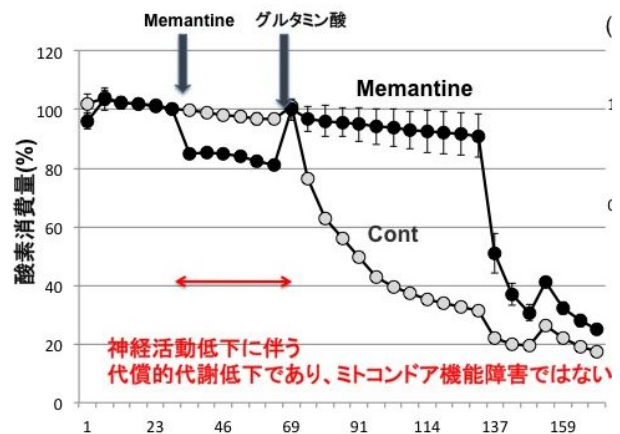


図7: 培養神経細胞の呼吸流量変化。横軸は時間

通常の神経細胞にメマンチンを投与すると、一端、呼吸量が低下する。これは、神経活動の低下に伴う、過剰な ATP によるミトコンドリア機能の抑制である。次にグルタミン酸を投与すると、通常の神経は死滅するため、呼吸量が定垂するが、メマンチンはその呼吸低下(神経興奮毒性)を抑制した。

このことは、神経保護作用のうち、神経活動を低下させるものは、神経のエネルギー活動量指標で評価できることを示唆する。また、神経活動低下は、記憶構築においてはマイナスに作用するため、本研究における認知症根本薬の探索において、神経活動を低下させないことを検証する必要があることを再確認できた。

D. 考察

Grid2^{Htaka/Htaka} マウスでは小脳顆粒細胞における NMDAR 機能低下が示唆された。顆粒細胞の NMDAR は上位中枢からの運動命令および身体各部からの感覚情報を小脳皮質に中継するのに重要な役割を果たしており、その機能低下は小脳が関与する運動協調等の障害に繋がる。またメマンチンはもともと貧弱な *Grid2*^{Htaka/Htaka} マウスの NMDAR シグナリングを阻害して行動障害を促進すると考えられた。

OKR 順応の成績には NMDAR シグナリングとの平行性が見られた。すなわち小脳皮質依存的学習である OKR 順応は顆粒細胞 NMDAR シグナリングを低下させる *Grid2* 変異で障害され、さらに *Grid2* 変異にメマンチンの作用が加わると OKR 順応が完全に消失した。

また以上の結果から、学習・記憶のパフォーマンスの指標として OKR 順応の成績が利用できることが示唆され、認知症薬探索の各ステップで電気生理学的測定による作用機序の確認が重要であることが再認識できた。

E. 結論

Grid2^{Htaka/Htaka} マウスでは小脳顆粒細胞の NMDAR 機能低下がメマンチン高応答性に繋がっていると考えられた。このように認知症治療薬応答機序が明らかとなった *Grid2*^{Htaka/Htaka} マウスをツールとして用いることで、認知症治療薬の探索の促進が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, **Tabata T**, Takemori H. Altered actions of memantine and NMDA-induced currents in a new *Grid2*-deleted mouse line. **Genes** (2014) 5: 1095-1114.

2. 学会発表

熊谷 彩子、伊東 祐美、賀川 舞、松田 潤一郎、佐々木 勉、**田端 俊英**、竹森 洋
GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

白井義啓、**田端俊英**（発明者） 国立大学法人富山大学（所有）「保定装置」(2014) 特許第 5577486 号

白井義啓、**田端俊英**（発明者） 国立大学法人富山大学（所有）「刺激装置、視機性動眼反射測定装置および視機性動眼反射測定方法」(2014) 特許第 5582494 号

田端俊英、巽俊二（発明者） 国立大学法人富山大学、株式会社旭化成せんい（出願人）「振動減衰ケーブル」特願 2014-243088

2. 実用新案登録

該当無

3. その他

無

細胞保護効果のある低分子の抽出と修飾

担当責任者 上里 新一

関西大学化学生命工学部 生命・生物工学科 医薬品工学研究室 教授

研究要旨 ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害は、その作用スペクトラムから抗癌剤への応用が評価され、既に複数が治療薬として承認されている。一方、最近の遺伝子工学技術の進歩から、クラス1に属するHDACのアイソフォームごとの阻害が神経保護作用を発揮することが示されている。既に、欧米の製薬企業を中心に3種あるクラス1HDACの特異的阻害剤が合成されているが、未だ臨床試験には進んでいない。今回は、HDAC2に特異性を発揮する阻害剤の部分構造のうち、ジケトピペラジン基の重要性に着目し、必要な修飾を加えた低分子化合物を合成した。

A. 研究目的

ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）の阻害が神経保護作用を示すことが古くから指摘されており、最近、遺伝子改変マウス等を利用して個別のs HDAC の寄与が報告される様になった。HDAC は大きく分けると3つのクラスに分類され、クラス1 HDAC 阻害が神経保護に重要と考えられている。

しかし、クラス1 HDAC はさらに3種のHDAC から構成されており、それらを特異的に制御する方法は RNAi 等の神経疾患には利用が困難な方法しか存在しない。そこで、クラス1を標的とす低分子化合物を複数作成し、評価チームに提供することを目的とする。

B. 研究方法

低分子化合物の合成に利用する試薬は和光純薬から購入した。合成確認は、Thermo Fisher 社の Orbitrap を活用した。最終化合物は再結晶にて精製した。

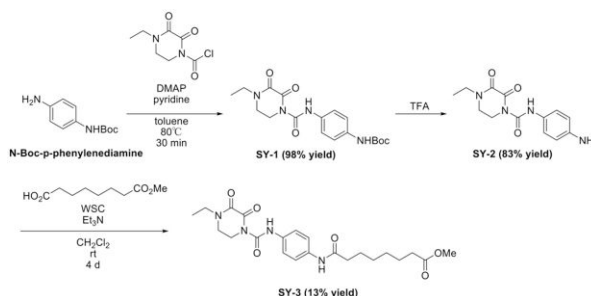
（倫理面への配慮）

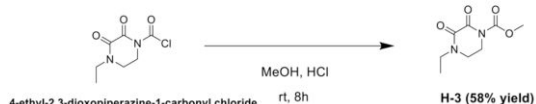
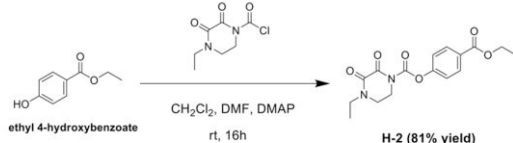
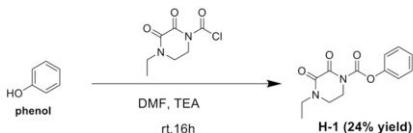
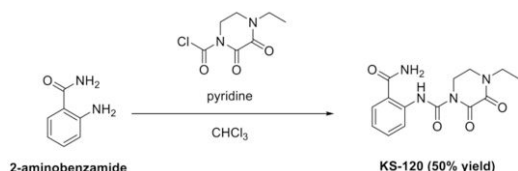
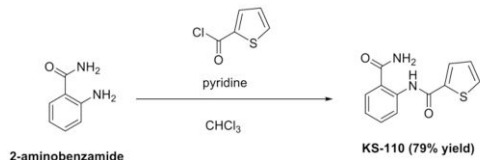
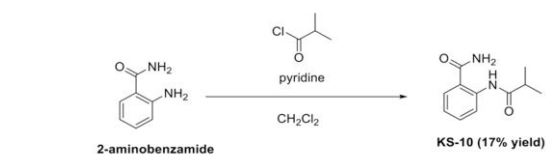
該当せず

C. 研究結果

ジケトピペラジン基を有する新規神経保護作用候補化合物の合成---

我々は、N-エチルジケトピペラジン基を有する HDAC1,2 選択的阻害剤 K-560 が神経細胞保護作用を有することを見出した。一方、ジケトピペラジン基以外の官能基（例えば N-エチルピペラジン基）を有する HDAC1,2 選択的阻害剤には、特段の神経保護作用が見られなかったことから、N-エチルジケトピペラジンを主骨格とする誘導体に神経保護作用がある可能性はないかと推定し、N-エチルジケトピペラジンを基本骨格とする化合物（SY-1、SY-2、SY-3、KS-120、H-1、H-2、H-3）並びに関連化合物（KS-10、KS-110）をそれぞれ合成した。以下にそれら化合物の合成スキームを示す。





D . 考察

これまでに報告した HDAC 阻害剤のうち、ジケトピペラジン骨格を有する HDAC 阻害剤が神経保護に作用する傾向にあったため、ジケトピペラジン骨格を中心に化合物を合成した。今後は、特許出願が確認されていない類似構造化合物も調べる必要がある。

E . 結論

神経保護に機能することが期待される HDAC 阻害剤をジケトピペラジン骨格を中心に合成できた。構造活性相関検討で、有用性構造が見出されることを期待する。

F . 参考文献

- 1) Uesato S, Yamashita H, Maeda R, Hirata Y, Yamamoto M, Matsue S, Nagaoka Y, Shibano M, Taniguchi M, Baba K, Juichi M. Synergistic antitumor effect of a combination of paclitaxel and carboplatin with nobiletin from Citrus depressa on non-small-cell lung cancer cell lines. *Planta Med.* 2014 80(6):452-7.
- 2) Kawaratani Y, Matsuoka T, Hirata Y, Fukata N, Nagaoka Y, Uesato S. Influence of the carbamate fungicide benomyl on the gene expression and activity of aromatase in the human breast carcinoma cell line MCF-7. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015 39(1):292-9.

G . 研究発表

1. 論文発表
該当無し
2. 学会発表
該当無し

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し