

# iPS 由来神経細胞タンパク質解析での薬効評価系創出

富山大学 学術研究部 薬学・和漢系 応用薬理学研究室  
久米 利明

## 【目的】

神経変性疾患や精神疾患を始めとする脳疾患において、満足できる治療が行われておらず、対症療法的な治療ではなく、病因を除去する治療法の開発が望まれている。それには病因の解明と適切な効果的な創薬ターゲットへ作用する薬物の探索が重要である。しかし、有用な生物活性を有する新規の化合物の作用点を同定するには、膨大な時間と手間のかかる操作が必要となる。しかし、より効果的で副作用の少ない疾患治療薬を開発するためには、その物質の生体内標的分子を明らかにすることは不可欠である。そこで、標的分子を同定するのに必要な労力を短縮することを目指し、次のような新規手法の着想に至った。すなわち、作用点が既知の多くの化合物をヒト iPS 由来細胞に処置し、2次元電気泳動を行い、取得した泳動パターンから細胞内タンパク質プロファイリングを行う。これらの結果をデータベースとして蓄積することにより、作用点が未知の化合物のタンパク質プロファイリングデータとの比較により作用点の予測が可能となる。また、疾患を誘発する神経毒などの薬物のプロファイリングパターンを無処置の正常状態に近づけるものは疾患の治療薬になりうると考えられる。そこで本研究では、これらの作業仮説を実証することを目指し、ヒト iPS 由来神経幹細胞を実験材料として新規に開発したタンパク質プロファイリングに供することにより、種々の細胞刺激におけるタンパク質の変動データの蓄積し、中枢神経系細胞における薬効および副作用予測系を確立することを目的として研究を実施した。

## 【実験方法】

### <神経幹細胞の培養>

理化学研究所より入手したヒト由来 iPS 細胞 (454E2) から分化させた神経幹細胞 (NSC) をマトリゲルコートした 6 well plate に播種し、Y-27632 を含む neural expansion medium (NEM) 中で 24 時間維持した。その後、NEM (Y-27632 を含まない) に交換し、100  $\cdot$  M 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を 24 時間処置した。その後、細胞を回収し、細胞質画分のサンプルを情報にしたがって調整した。

### \* NEM

12.25 mL Neuro basal と 12.25 mL Advanced DMEM/F12、500  $\cdot$  L neural induction supplement (NIS) を混合した培地

### <二次元電気泳動>

上記で得られた細胞質画分のサンプルを蛍光色素である Cy3 で標識し、膨潤液と混合した。ドライストリップゲルを膨潤液に浸し、IPG box 中にて 16 時間以上室温でインキュベートした。その後、プログラムに従って等電点電気泳動を行った。ストリップゲルを回収後、平衡化を行い、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。スキャナーを用いて、スポットの蛍光輝度を検出した。Sf9 昆虫細胞タンパク質を Cy2 で標識し、位置補正用内部標準とした。未処置および処置サンプルを等量混合したものを Cy5 で標識し、定量補正用内部標準とした。

## 【結果】

多くの疾患でその病因の一つとして考えられている危険因子に酸化ストレスがある。脳疾患においても酸化ストレスの関与が報告されている。そこで最初に酸化ストレス負荷時のタンパク質の変化について検討を行った。ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞への神経毒の一つである過酸化水素処置がどの程度の細胞毒性を発現するかを検討する目的で、1  $\mu$ M~1 mM の過酸化水素処置 24 時間後の細胞死を検討した。その結果、1~100  $\mu$ M までは細胞死は検

出されなかった。したがってこれ以降の検討では 100  $\mu\text{M}$  の過酸化水素を実験に用いた。100  $\mu\text{M}$  の過酸化水素を 24 時間処置したのちの細胞内のタンパク質を抽出し、2 次元電気泳動に供したところ、図 1 に示される電気泳動像を得た。

これらの画像からスポットとして同定できるシグナルを検出したところ、891 個のスポットが確認された。これらのうちコントロールと比較して過酸化水素処置により、そのシグナルが増強するものが複数観察された（表 1）。代表的なものとしては、スポット ID837 の 349.8 倍、スポット ID53 の 203.5 倍、スポット ID10 の 98.4 倍、スポット ID308 の 85.6 倍、スポット ID590 の 56.2 倍などが検出された。また、同様にそのシグナルが減少するものも複数観察された（表 2）。代表的なものとしては、スポット ID273 の 164.6 倍、スポット ID665 の 59.9 倍、スポット ID 351 の 46.9 倍、スポット ID346 の 17.4 倍、スポット ID267 の 10.7 倍などが検出された。

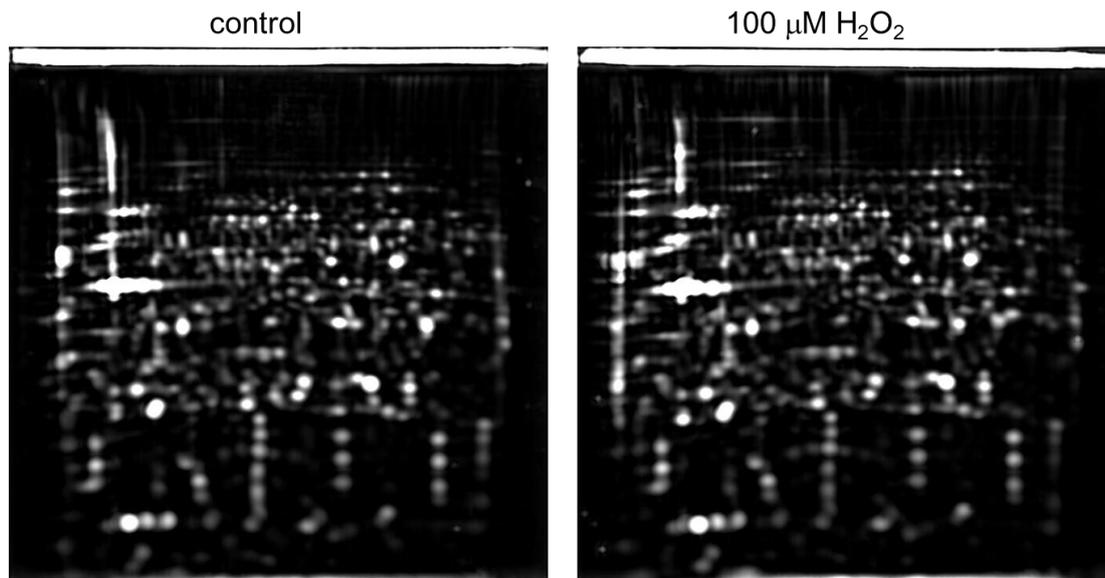


図 1 ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞から抽出した細胞質画分の 2 次元電気泳動パターン。各タンパク質は蛍光色素 Cy3 で標識されており、その蛍光像を示した。

表 1 過酸化水素処置によりシグナルが増加したスポット

スポット ID	コントロールとの変化量 (倍)
837	349.8
53	203.5
10	98.4
308	85.6
590	56.2
260	24.8
2	21.4
8	16.7
354	16.1
868	15.5
382	14.8
394	13.2
872	11.6
360	11.5

コントロールと比較して 10 倍以上増加したスポットを示した。

表2 過酸化水素処置によりシグナルが減少したスポット

スポット ID	コントロールとの変化量 (倍)
273	164.6
665	59.9
351	46.9
346	17.4
267	10.7
593	8.1
363	8.1
262	7.8
297	7.3
603	6.3

コントロールと比較してスポット強度が減少したスポットのうち上位 10 スポットを示した。

#### 【考察】

ヒト iPS 由来神経幹細胞に酸化ストレス負荷として過酸化水素を処置し、24 時間後のサンプルから得られたタンパク質のシグナルは 891 個であった。また、これらのデータ解析を行ったところコントロールと比較してそのシグナルが増加するもの、減少するものがそれぞれ複数観察され、最も増加の大きかったシグナルは 349.8 倍であり、また最も減少の大きかったシグナルは 164.6 倍であった。

これまで既存の 2 次元電気泳動システムとヒト由来の腫瘍細胞である HeLa 細胞を用いて、本研究と類似の方法で行った報告では、およそ 800 のタンパク質のスポットデータを検出でき、新たに 19 化合物の作用点の同定が可能であった (Muroi M, et al., Chem. Biol. 17, 460, 2010)。これらの既存技術と比較して今回用いた新規 2 次元電気泳動システムと解析手法を用いることにより、予備的検討は 4,000 以上のスポットデータの検出が可能であり、この報告と比較して 5 倍以上の検出感度を有していた (unpublished data)。しかし、今回の検討でヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を用いた検討では、スポットの同定が 891 個となり、既存技術と比較してわずかに多いのみにとどまった。これらの明確な原因については、現在のところ不明である。使用した細胞が予備検討の段階で用いたものと異なっていたことやサンプル調製の際にいくつかの問題点があることなどが可能性として考えられる。現在問題点についての改善点が得られており、これらの改善によって予備検討に近づくスポット数が得られると考えている。

また、当初の研究計画ではヒト iPS 由来ニューロンを用いた検討を計画していたが、神経幹細胞からニューロンへの分化において、その分化効率が想定値に達していないため、神経幹細胞を用いて検討を行った。現在、分化効率の向上に向けた検討を進めており、それらの解決のあと、ニューロンへ分化させたヒト iPS 由来細胞を用いてプロファイリングデータの蓄積を行う予定である。

いくつかの改善点が存在するが、本手法を用いることにより、神経毒処置時に生じるタンパク質発現のプロファイリングパターンを捉えることが可能であることを明らかにした。このパターンを活用することで疾患状態への変化を正常状態に近づける薬物が疾患の治療薬の候補となりえると考えられる。

#### 【References】

Muroi M, Kazami, Noda K, Kondo H, Takayama H, Kawatani M, Usui T, Osada H. Application of proteomic profiling based on 2D-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action. uroi M, et al., Chem. Biol. 17, 460-470 (2010)