

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 山崎 智彦

2. 養成カリキュラム名：

ヒト神経幹細胞特異的マーカーの検索ならびにヒト神経幹細胞の検出・分離方法の開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

本カリキュラムはヒト神経幹細胞(Neural Stem Cells: NSC)を神経変性疾患患者へ移植治療への利用ならびに *in vitro*での神経変性疾患の抑制物質、原因物質のスクリーニングするための細胞の供給を視野に入れた研究であり、ヒト NSC の大量培養技術を開発することを目的として研究を行う。本カリキュラムではヒト NSC の大量培養技術を確立するために、研究項目を (1) ヒト NSC に対する特異的マーカーの検索、(2) ヒト NSC 特異的マーカーに対するレセプター分子の検索、構築、(3) ヒト NSC の *in vitro*検出システムの開発、(4)ヘテロな細胞集団からのヒト NSC の分離用チップの開発、(5) ヒト NSC の効率的培養システムへの応用、の段階に分け、計画的に研究を行っている。平成 15 年度においては、上記の研究計画の(1) ヒト NSC に対する特異的マーカーの検索を中心に研究を行い、得られた成果をもとに(2) ヒト NSC 特異的マーカーに対するレセプター分子の検索ならびに構築を行う計画をしていた。

現在のカリキュラムの進行ならびに達成状況は、(1)についてはすでに一定の成果を得ており、数種類のヒト NSC に選択的に発現しているタンパク質を検索、同定しており、計画に従って目標がほぼ達成されている。

(2)については上記で得られたヒト NSC に選択的に発現しているマーカータンパク質に対するレセプター分子として、既存の抗体を検索するとともに、抗体の報告のないものについては、抗体ならびに DNA アプタマーなどの人工レセプター分子の開発を検討している。項目(2)は計画に従って平成 16 年度を中心課題として研究を行っていく。

上記を総括して、カリキュラムは順調に進行していると考えている。

4 . 成果

ヒト神経幹細胞(NSC)に対する特異的マーカーの検索

[目的]

本研究はパーキンソン病、アルツハイマー病に代表される神経変性疾患の神経幹細胞移植治療ならびに *in vitro*での神経変性疾患の抑制物質、薬剤のスクリーニングを視野に入れた研究であり、ヒト神経幹細胞(Neural Stem Cells: NSC)の大量培養技術を開発することを目的としている。ヒトNSCは、(1)増殖速度が遅い、(2)自己複製能と多分化能の両方を有することから培養された細胞はヘテロな集団であること、(3) 特異的マーカーがなくプロスペクティブな同定ができない、という問題点から大量にヒトNSCのみを増殖させることは現在の技術では困難である。本研究においては、ヒトNSCの特異的マーカーとなるペプチド・タンパク質を検索し、これらの抗体等のレセプター分子を検索ならびに開発することでレセプター分子を用いたヒトNSCの分離・検出方法の確立を目指す。

本研究開発によりヒトNSCを特異的に認識することが可能になる。また、ヘテロな細胞集団でのヒトNSCの存在のモニタリング技術と分離技術を開発することができる。これらの技術の開発により、ヒトNSCを大量かつ効率的に培養することが可能になる。その結果として神経変性疾患の患者に移植するヒトNSCを安定して供給できることが可能になり、従来は治療が困難であった神経変性疾患の治療を可能にする。また、ヒトNSCの安定供給により、ヒトNSCを用いた *in vitro*での神経変性疾患の抑制物質のスクリーニング、さらには弧発性の神経疾患の原因物質のスクリーニングが可能になり、本研究開発で得られる成果は神経変性疾患の解明、予防、治療、新規医薬品の開発に高く貢献する。

ヒトNSCのマーカータンパク質物質としては現在、ネスチン、ムサシ1が広く用いられているが、これらのマーカーはヒトNSC以外の中間前駆細胞にも発現が認められている選択的マーカーであり、ヒトNSCの検出は複数の選択的マーカーを用いた多重評価法が用いられている。ヒトNSCの効率的・大量培養を考えた場合、一種類のマーカータンパク質で認識することが可能なプロスペクティブな方法が求められており、ヒトNSCの特異的マーカータンパク質の検索が必須とされている。そこで、本研究開発では、ヒトNSCとヒトNSCから分化したアストロサイトならびにニューロン/アストロサイトのタンパク質発現プロファイルを比較することで、特異的マーカーの検索を試みた。タンパク質発現解析の手法としては、現在広く用いられている二次元電気泳動法と比較してハイスループットであり、低分子量(1-20kDa)のタンパク質を高感度に測定できる飛行時間型質量分析計(Surface Enhanced Laser Deposition / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry : SELDI-TOFMS)を用いることで、従来法では検索できなかった低分子量のマーカータンパク質の検索を行う。

[方法ならびに結果]

1, 細胞からのタンパク質サンプルの調整方法ならびにSELDI-TOFMS解析条件の検討

細胞からのタンパク質の抽出方法ならびにSELDI-TOFMS用のチップへのタンパク質の吸着条件、測定条件(強度ならびに感度)の検討、最適化を行った。

1-1, 細胞からのタンパク質の抽出方法の検討

細胞のタンパク質の発現を測定するためには、細胞から効率よく全タンパク質を抽出し、解析する必要がある。そのためヒト神経細胞からのタンパク質の抽出方法の検討を行った。ヒトのグリア芽細胞腫のセルラインであるU251株を用いて、テフロンホモジナイザー、超音波破碎装置を用いて細胞の抽出を行い、抽出したタンパク質画分をSELDI-TOFMSを用いてタンパク質の解析を行い、観察されタンパク質由来のピークの強度ならびに本数について比較を行った。その結果、超音波破碎装置を用いて5秒間のOn-OFFインターバルで2分間細胞を処理し、破碎した場合のほうがテフロンホ

ジナイザーを用いた場合と比較して、多種類のタンパク質のピークが観察されることが示された。また、上記の超音波破碎の条件においての再現性を検討したところ、SELDI-TOFMSで観察されるピークの本数ならびに強度は再現性が高かった。よって、細胞からのタンパク質抽出法として超音波破碎法を用いることにした。

1-2, SELDI-TOFMS用のチップへのタンパク質の吸着条件の検討

本研究開発においてはSELDI-TOFMS用のチップとして陰イオン交換基、陽イオン交換基が固定されているチップを用いることにより、タンパク質を等電点(pI)にしたがって選択的にチップに吸着させ、TOFMS測定により発現タンパク質の解析を行う。すなわち、吸着条件を穏和にすることによりNSCsに発現している多種のタンパク質チップ上に吸着させて測定することができ、また吸着条件を厳しいものにするにより微量に含まれる塩基性、酸性タンパク質を特異的に測定することができる。そこで、pH4.5-8.5における陽イオン交換基固定チップ(CM10)ならびに陰イオン交換基固定チップ(Q10)へのヒトNSCのタンパク質抽出液を用いた吸着ならびに発現タンパク質の解析を行い、測定する条件を検討した。CM10チップでは吸着させるpHが高くなるに従ってpIの低いタンパク質ピークが消え、pIの高いタンパク質の発現量が多く測定された。また、Q10チップではpHが低いほど、pIの高いタンパク質のピークが消え、pIの低いタンパク質の発現が確認された。CM10チップでは吸着条件としてpH4.5, 5.5, 7.5の3条件、Q10チップでは吸着条件としてpH8.5, 7.5, 5.5の3点条件を選択することにより、重複が少なく、多種類のタンパク質の発現のピークを測定できることが示された。

1-3, SELDI-TOFMSの測定条件(強度ならびに感度)の検討

TOFMSにおいてはレーザーの強度並びにディテクターの感度を最適化することが一度の測定で多くのタンパク質のピークを検出するために必要である。本研究開発において、今後ヒトNSCならびに分化細胞由来のタンパク質の発現プロファイルを測定するレーザーの強度、ディテクターの感度を測定分子量の範囲ごとに最適化し、決定した。最適化は、S/N比が3以上のピークがもっとも多く見え、またピークの高さ(Intensity)が高くなる条件を選択した。その結果、今後の測定では、分子量3-200kDaの範囲のタンパク質の発現を測定範囲(3-10KDa, 10-30KDa, 30-200KDa)に分けて測定し、それぞれのレーザーの強度並びにディテクターの感度をInt185, Sens7 (3-10K)、Int195, Sens8 (10-30K)、Int225, Sens10 (30-100K)を用いることにした。

2, NSCsに特異的に発現しているタンパク質の検索

上記の結果で最適化された実験条件に従い、ヒトNSCならびにヒトNSCを分化させたニューロン、ニューロン/アストロサイトの発現タンパク質のプロファイルをSELDI-TOFMSを用いて測定し、比較することでヒトNSCに特異的に発現しているタンパク質の検索を行った。分子量4-11kDaにおいては数種類のニューロン、アストロサイトと比較してヒトNSCにおいて高発現しているタンパク質が存在した。CM10、Q10チップで、吸着させるpHを3種類変えることにより10種以上のヒトNSCに特異的に発現しているタンパク質の存在が明らかになった。現在広く用いられているマーカータンパク質のスクリーニング法である二次元電気泳動法では検索が困難であった分子量10KDa以下の比較的低分子量のタンパク質がSELDI-TOFMSで多く検索された。分子量10KDa以下のNSCs特異的マーカーの報告は現在までなく、これらのタンパク質は新しいヒトNSCのマーカータンパク質となる可能性がある。また、ニューロン並びにアストロサイトに特異的に発現しているタンパク質も確認された。これら

のタンパク質は、現在ニューロン並びにアストロサイトマーカーとしても用いられているタンパク質とは分子量が異なることから、新たなニューロン並びにアストロサイトのマーカータンパク質となると可能性がある。

3, ヒトNSCのマーカータンパク質の精製ならびに同定

ヒト NSC に高発現しているマーカータンパク質の精製並びに同定を試みた。精製の条件は SELDI-TOFMS のチップを用いて決定した。方法としては陽イオン交換基の固定されているチップ CM10 に対してタンパク質を結合させるときに用いる緩衝液の pH ならびに塩濃度を変えていくことにより精製方法を検討した。SELDI-TOFMS を用いた精製条件の検討方法はチップの上ですべての操作ができる上、実験にかかる時間が非常に短く、また使用するサンプル量も数マイクロリットルであるという利点があり、ハイスループットな精製条件の検討方法として、今後の実験で用いる。SELDI-TOFMS を用いた精製条件の検討の結果を用いてマーカータンパク質の精製を行った。精製後、サンプルを SDS-PAGE に展開し、クマシー染色し、目的のタンパク質が精製されていることを確認し、このタンパク質のバンドを切り出し MS/MS 解析による同定を行った。

[まとめ]

本年度の研究においては SELDI-TOFMS を用いて、細胞のタンパク質発現プロファイルを測定し、細胞群間で比較することにより、ヒト NSC に特異的に発現しているタンパク質を検索し、その一部について同定を行った。今後は、これらのヒト NSC のマーカー蛋白質を検出する系を、マーカー蛋白質のレセプター分子とともに開発することにより、ヒト NSC の分離・検出方法を確立する。

また、今回比較検討したヒト NSC ならびに分化細胞の細胞のタンパク質発現プロファイルを利用することにより、ヒト NSC の分化状態をモニタリングが可能である。現在まで、各種既知分化マーカー分子の発現をウェスタンブロット法、免疫染色法ならびに RT-PCR 法などで検討する手法が広く用いられているが、これらの方法では使用可能なマーカー数の制限、コスト面、時間面で問題がある。今回の研究では、各細胞でのタンパク質発現プロファイルのデータと SELDI-TOFMS を用いることにより、細胞の分化状態の迅速な測定方法を開発できることが示された。このことは細胞工学分野において幹細胞培養技術、分化状態のモニタリングならびに制御への汎用的な利用が期待され、細胞移植治療のための目的細胞の大量培養ならびに分化制御への利用などの再生医療分野全体への貢献に結びつく。

5 . 成果の対外的発表等

(1) 論文発表

なし

(2) 口頭発表

山崎 智彦、金村 米博 “ 幹細胞を中心としたタンパク質発現プロファイル解析 ”
CIPHERGEN user meeting 2003、平成15年11月 横浜ビジネスパーク

(3) 特許等

なし