

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08451

研究課題名(和文) 神経接着分子Caspr4を介した神経精神疾患における新規治療戦略

研究課題名(英文) Overexpression of Contactin associated protein (Caspr) 4 regulate neuronal differentiation of P19 embryonic carcinoma cells

研究代表者

武田 泰生 (Takeda, Yasuo)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・教授

研究者番号：60245462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Contactin associated protein (Caspr) 4は、マウス大脳皮質介在ニューロンのシナプス前膜に局在し、発現していることが報告された。また、我々はCaspr4が、マウス胎仔期から神経幹細胞に発現し、神経分化に関与することを明らかにした。そこで、マウス胚性腫瘍(EC)細胞であるP19細胞において、Caspr4を一過性に導入し、RA存在下において、Caspr4導入細胞およびコントロール細胞をsphere様の細胞塊を形成させた際に、Caspr4導入細胞は増殖を減少させ、さらに、Oct4のような幹細胞維持に必要な遺伝子発現を減少させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス胚性腫瘍(EC)細胞であるP19細胞は、レチノイン酸(RA)により分化誘導され、神経細胞およびアストロサイトに分化することが知られている細胞株である。Caspr4はマウス神経幹細胞において発現し、神経分化を正に調節しているが、細胞内の転写因子群の挙動を確認したデータはなかった。今回の研究で、マウス胎仔期の細胞培養より安価な株化細胞であるP19細胞株を研究に使用できたことから、今後、Caspr4の神経分化のメカニズムをさらに詳細に調べることができ、Caspr4の自閉症のメカニズムの解析、さらには、GABA性の介在性ニューロンの培養系を確立することへ貢献できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Contactin associated protein (Caspr) 4 is a transmembrane protein, belonging to the Caspr family. Caspr4 is one of the adhesion molecules associated with autism spectrum disorders (ASDs). We recently identified that Caspr4 regulated neuronal differentiation in cultured mouse NPCs. However the molecular function of Caspr4 has yet to be identified. In this report, we investigated the role of Caspr4 in neuronal cell differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. We have shown that quantitative RT-PCR revealed that Oct4 was down-regulated. Cell growth was reduced in Caspr4 overexpressing P19 cells by methylthiazolyltetrazolium (MTT) assay. Our study suggests that Caspr4 is involved in neural differentiation in P19 cells.

研究分野：医療薬学

キーワード：Caspr4 neuronal differentiation P19

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、精神疾患の病態に大脳皮質介在ニューロンの関連が示唆されており、神経接着関連分子 Contactin associated protein (Caspr)4 は、マウス大脳皮質介在ニューロンのシナプス前膜に局在すること、Caspr4 遺伝子ノックアウト(K/O)マウスは自閉症様症状を示すことが報告されている。Caspr4 遺伝子が、2010年に自閉症スペクトラムと関連のある遺伝子として初めて報告され、その後、2014年 Caspr4 タンパク質が GABA 性の介在ニューロンで発現していることが報告された。

我々は Caspr4 が、マウス胎仔期から神経幹細胞に発現し、PDZ ドメインタンパク質である

Ligand of numb X2(LNX2)と相互作用し、神経分化に関与することを明らかにした (Fig. 1、参考文献)。

### 2. 研究の目的

神経分化への Caspr4 の関与に関しては、詳細なメカニズムは解析されていない。本研究では、培養細胞における Caspr4 の機能および細胞内シグナルを解析し、新規治療候補分子を見出すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

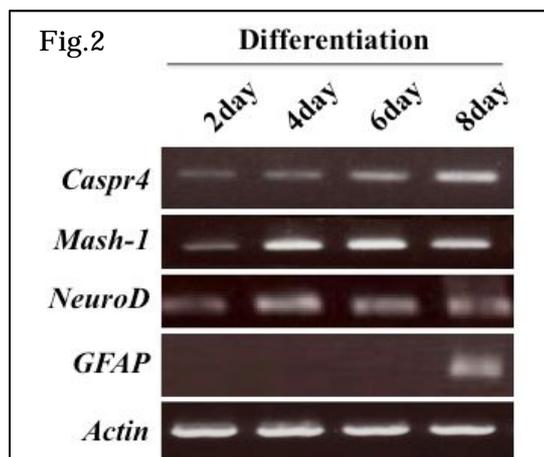
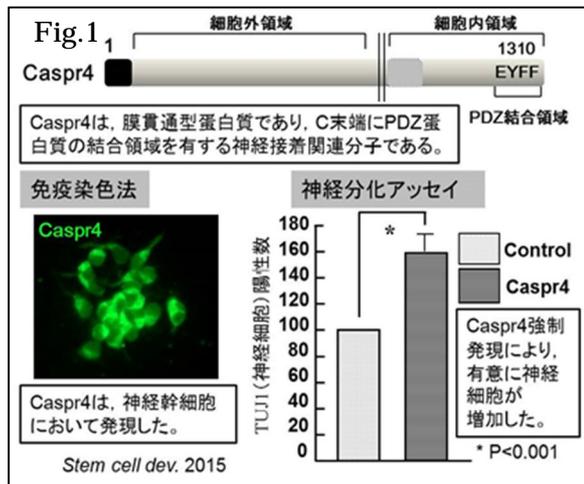
マウス胚性腫瘍(EC)細胞である P19 細胞は、レチノイン酸(RA)により分化誘導され、神経細胞およびアストロサイトに分化することが知られている。P19 細胞は RA 存在下で幹細胞と同じく sphere を形成する。Caspr4 の機能を調べるために、P19 細胞に Caspr4-pCDNA4 を一過性に導入し、RA 存在下において、Caspr4 導入細胞およびコントロール細胞に sphere 様の細胞塊を形成させた。Caspr4 が RA 誘導による分化過程にどのような影響を及ぼすかをマイクロアレイ解析(株式会社セルイノベーターへ委託、Agilent Technology 社: SurePrint G3 Mouse GE Microarray 8x60K (v1)/2.0 を使用)を用いて検討した。データベース DAVID により幹細胞の増殖に関わる pathway により遺伝子変動をみたところ、RA 処理した Caspr4 導入細胞株は、Nanog や Oct4 などの幹細胞維持に関与する遺伝子群の低下が見られた。

次に、Caspr4 強制発現株とコントロール細胞株との比較を、MTT アッセイ、定量的 PCR 法、ウェスタンブロット法を用い解析した。

### 4. 研究成果

P19 細胞株における RA 誘導分化系の構築は以前に構築しており、神経分化のマーカ、アストロサイトマーカなどの発現増加とともに Caspr4 の発現増加を確認した (Fig. 2)。

P19 細胞に Caspr4-pCDNA4 を一過性に導入し、RA 存在下において、Caspr4 導入細胞およびコントロール細胞について MTT (3-(4, 5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド)アッセイを行った結果、コントロール細胞



と比較して、Caspr4 導入細胞の増殖能が減少した。(Fig. 3)。コントロール細胞株と比較して、Caspr4 導入細胞株の細胞増殖能が低下したことから、細胞増殖に関わる遺伝子の変化がみられることを予想した。

次に、P19 細胞株に Caspr4-pCDNA4 を RA 存在下において一過性に導入し、Caspr4 が RA 誘導による sphere 形成過程に影響を及ぼすかに関する因子について、定量的 PCR 法を用いて検討した。

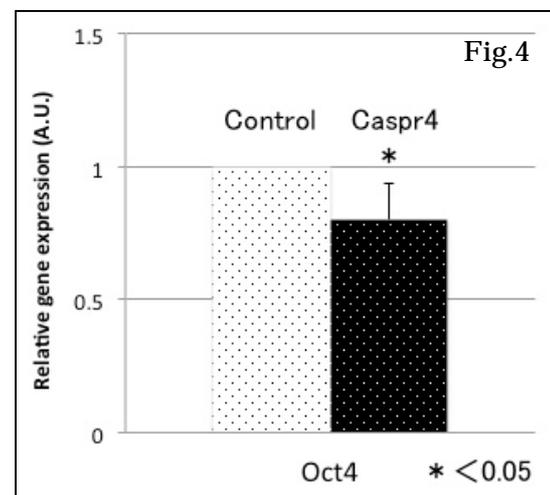
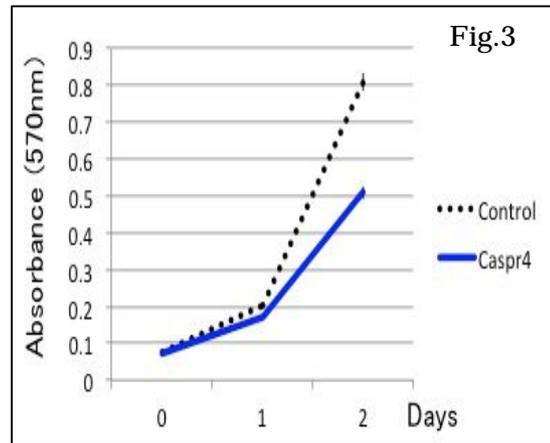
P19 細胞株の RA 処理神経分化誘導系において、sphere 様の細胞塊を形成させたところ、コントロール細胞と比較して、Caspr4 導入細胞において幹細胞マーカーである Oct4 mRNA が減少した(Fig.4)。同じく、Oct4 タンパク質量も減少した。

また、前述のマイクロアレイ解析の結果から、Caspr4-pCDNA4を一過性に導入した細胞を RA 処理し、sphere 様の細胞塊を形成させたところ、ゲノムのエピジェネティックな制御を司る Gene X が減少し、Gene Y が増加した(未掲載)。

これらのことから、P19 細胞において Caspr4 が神経分化を誘導する傾向にあり、その効果のメカニズムの一つとして、細胞増殖能が低下し、Oct4 や Nanog などの幹細胞維持に関与する遺伝子を減少させることにより、神経分化誘導へ調節されている可能性が考えられる。

Caspr4 はマウス神経幹細胞において発現し、神経分化を正に調節しているが、細胞内の転写因子群の挙動を確認したデータはこれまでにない。今回の研究で、マウス胎仔期の細胞培養より安価な株化細胞である P19 細胞株を研究に使用し、幹細胞と同じ挙動を示したことから、今後、Caspr4 の神経分化のメカニズムをさらに詳細に調べることができ、Caspr4 の自閉症のメカニズムの解析、さらには、GABA 性の介在性ニューロンの培養系を確立することへ貢献できるものと考えている。

(参考文献)Futagawa T et. al. Stem Cell Dev. 2015



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishizawa Y, Ikeda R, Yamamoto M, Kawahara K, Shinsato Y, Minami K, Nitta M, Terazono H, Akiyama SI, Furukawa T, Takeda Y	4. 巻 39(8)
2. 論文標題 5-Aza-2-deoxycytidine Enhances the Sensitivity of 5-Fluorouracil by Demethylation of the Thymidine Phosphorylase Promoter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4129-4136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Furutachi M, Ota K, Fujisaki F, Ikeda R, Yoshikawa N, Yokota T, Takeda Y, Yokomizo K, Zhou JR, Kashige N, Miake F, Sumoto K.	4. 巻 42(11)
2. 論文標題 Anti-proliferative Activities of Some Bivalent Symmetrical 5-Substituted Hydantoin Derivatives towards Human Brain Glioma U251 Cells (U251) and Human Carcinoma Cells (KB3-1).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1953-1956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Furutachi M, Gondo T, Ikeda R, Yoshikawa N, Yokota T, Takeda Y, Yokomizo K, Zhou JR, Kashige N, Miake F, Sumoto K.	4. 巻 42(5)
2. 論文標題 Anti-proliferative Activities towards Human Brain Glioma U251 Cells and Human Carcinoma Cells (KB3-1) of Some Twin-Drug Type Bivalent C2-Symmetrical Phenylboronic Acid Derivatives.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 833-836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishikawa T, Yamaguchi H, Ikawa K, Nakayama K, Higashi E, Miyahara E, Abematsu T, Nakagawa S, Kodama Y, Tanabe T, Shigemi A, Shinkoda Y, Okamoto Y, Takeda Y, Kawano Y.	4. 巻 61(6)
2. 論文標題 Influence of GST polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in Japanese children.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 558-565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nariaki Tomiyama, Ryuji Ikeda, Yukihiro Nishizawa, Shogo Masuda, Yusuke Tajitsu and Yasuo Takeda	4. 巻 15(6)
2. 論文標題 S100A16 up-regulates Oct4 and Nanog expression in cancer stem-like cells (CSCs) of Yumoto human cervical carcinoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 9929-9933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 二川俊隆、原田亜希子、永野聡、小賊健一郎、武田 泰生
2. 発表標題 腫瘍溶解性ウイルスを使用した第I相医師主導治験における院内実施体制の構築
3. 学会等名 第4回日本臨床薬理学会九州・沖縄地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥野真里、二川俊隆、益田将吾、中島茂人、武田 泰生
2. 発表標題 鹿児島大学病院における治験薬管理業務の標準化に向けた取り組み
3. 学会等名 第19回CRCと臨床試験のあり方を考える会議2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺園 英之、矢野 愛理、高橋 毅行、武田 泰生
2. 発表標題 異なる物性応答高分子を利用した希少細胞同定法の開発
3. 学会等名 医療薬学フォーラム 2018 / 第26回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西澤 由紀彦、池田 龍二、田實 裕介、南 謙太郎、新田 美奈、寺園 英之、古川 龍彦、武田 泰生
2. 発表標題 5-axa-2-deoxycytidine(5-Aza)による5-fluorouracil(5-FU)の抗腫瘍効果増強作用の機序解明
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺園 英之、高橋 毅行、菅原 英輝、新田 美奈、中嶋 洋生、水野 圭子、井上 博雅、武田 泰生
2. 発表標題 分子標的薬アファチニブの血中濃度測定による個別化医療
3. 学会等名 第139回日本薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺園 英之、小八重 薫子、高橋 毅行、武田 泰生
2. 発表標題 A novel method to identify proliferative cells in heterogenetic cell population
3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺園 英之、小八重 薫子、武田 泰生
2. 発表標題 希少神経細胞回収を目的にしたマイクロカプセル法の開発
3. 学会等名 第16回鹿児島ニューロフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田由香里、重久 友紀、畑 こず恵、井上 和啓、武田 泰生
2. 発表標題 院外処方箋に表示する臨床検査項目の検討
3. 学会等名 医療薬学フォーラム 2018 / 第26回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅原 英輝、有馬 純子、井上 和啓、寺園 英之、武田 泰生
2. 発表標題 がん患者における食欲不振と電解質異常
3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川畑 美穂、二川 俊隆、原田 亜希子、益田 将吾、畑鳥 律子、郡山 亜由美、櫻井 智子、奥野 真理、原田 さやか、吉満 美保子、奥園 寿江、井上 和啓、永野 聡、小賤 健一郎、武田 泰生
2. 発表標題 検査値CTCAE重症度評価表を活用した医師主導治験（第 相試験）の実施について
3. 学会等名 第3回 日本臨床薬理学会 九州・沖縄地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅原 英輝、満尾 明恵、金澤 直子、高橋 毅行、稲葉 るり、宇治野 礼美、有村 昂太郎、井上 和啓、池田 龍二、武田 泰生
2. 発表標題 オピオイド鎮痛薬に関するインシデント報告の解析結果からみた薬剤師の役割
3. 学会等名 第11回日本緩和医療薬学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Erika Watanabe, Kazuaki Matsumoto, Kazuro Ikawa, Yuta Yokoyama, Akari Shigeni, Yasuhiro Umezaki, Koyo Nakamura, Keiichiro Ueno, Norifumi Morikawa, Yasuo Takeda
2. 発表標題 Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of teicoplanin against Staphylococcus aureus in murine thigh infection model
3. 学会等名 15th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 重久 友紀、柴田 由香里、中目 順子、深水 知英、菅原 英輝、武田 泰生
2. 発表標題 ハイネイゲル使用患者におけるPPIの併用に関する調査
3. 学会等名 第27回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高濱 和弘, 二川 俊隆, 益田 将吾, 宮地 亜由美, 奥野 真理, 畑鳥 律子, 櫻井 智子, 川畑 美穂, 原田 さやか, 吉満 美保子, 井上 和啓, 武田 泰生
2. 発表標題 実施医療機関における治験薬の盲検化の実践と盲検性維持の手順に関する検討
3. 学会等名 第38回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮地 亜由美, 二川 俊隆, 高濱 和弘, 益田 将吾, 畑鳥 律子, 櫻井 智子, 川畑 美穂, 牛之濱 風見, 井上 和啓, 武田 泰生
2. 発表標題 病棟薬剤師による病棟業務記録と有害事象に関する調査
3. 学会等名 第17回CRCと臨床試験のあり方を考える会議 2017 in 名古屋
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 有馬 純子, 武田 泰生	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医薬ジャーナル	5. 総ページ数 6
3. 書名 医薬ジャーナル「新薬展望 2017」	

1. 著者名 武田泰生, 柴田由香里, 菅原英輝	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医薬品情報学会	5. 総ページ数 3
3. 書名 後発医薬品切り替えにおける医薬品情報について	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	池田 龍二  (Ikeda Ryuji)  (50398278)	宮崎大学・医学部・教授    (17601)	