

# 再生医療研究室

室長 金村米博

## 【概要】

再生医療研究室では、各種ヒト細胞を応用した「細胞治療」を新しい先進的な医療として確立させることを目標に、治療に使用する各種ヒト細胞の培養・加工プロセスの開発、治療用ヒト細胞の品質管理並びに安全性評価に関する技術開発などの研究を行なっています。また、ヒト幹細胞を応用した薬剤毒性評価系の開発と新規治療薬候補化合物の探索を目指した基礎的研究を実施しています。

## 【主な研究テーマ】

### 1. 治療用ヒト細胞培養プロセスの開発

治療に使用する各種ヒト細胞を培養・加工するヒト細胞培養専用施設（セルプロセッシングセンター）の管理・運用を担当し、セルプロセッシングセンター内でのヒト細胞培養プロトコールの開発を行っています。また、細菌・真菌検査や遺伝子検査などを組み込んだ治療用ヒト細胞の品質検査法の開発などを行なっています。

### 2. 医療用ヒト幹細胞の品質管理技術の開発

再生医療に使用する細胞として、組織幹細胞であるヒト神経幹細胞および間葉系幹細胞さらにヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞などを主な研究対象として、細胞増殖能、染色体構造、細胞表面マーカー発現様式、細胞分化能等を詳細に解析してこれら細胞の生物学的特性を明らかにし、医療応用するための細胞の品質管理に必要な項目の策定とその検査方法の開発を行っています。

### 3. 悪性脳腫瘍に対する細胞免疫療法の開発

脳神経外科との共同事業として、悪性脳腫瘍の症例を対象に、末梢血中のリンパ球を抗CD3抗体とインターロイキン2を用いて活性化させて後に点滴投与する細胞治療（活性化リンパ球療法）を実施しています。また、悪性グリオーマの症例を対象に、樹状細胞（DC）ワクチンを用いた新たな免疫療法の実施を行っています。

### 4. ヒト幹細胞を応用した薬剤毒性評価系の開発と新規治療薬候補化合物の探索

ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を主に使用して、各種薬剤の毒性評価をハイスループットで評価するシステムの開発を行っています。また、ヒト神経前駆細胞やグリオーマ幹細胞を標的とする新規治療薬候補化合物の探索を実施しています。

## 【2013年度研究発表業績】

A-0

Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S: Hypoplasia of the spinal cord in a

case of fetal akinesia/arthrogryposis sequences. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013; 39(4):441-444 (2013年6月)

Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S: Brain malformation with loss of normal FGFR3 expression in thanatophoric dysplasia type I. *Neuropathology* 2013; 33(6):663-6 (2013年12月)

Numata R, Okumura N, Nakahara M, Ueno M, Kinoshita S, Kanematsu D, Kanemura Y, Sasai Y, Koizumi N: Cultivation of Corneal Endothelial Cells on a Pericellular Matrix Prepared from Human Decidua-Derived Mesenchymal Cells. *PLOS ONE* 2014; 9(2): e88169 (2014年2月)

#### A-2

金村米博: 第5章 iPS細胞を応用した in vitro 神経創薬・毒性研究. 「In vitro 毒性・動態評価の最前線」(小島肇夫 監修): pp.71-80, シーエムシー出版, 2013年9月

隅田美穂, 金村米博: 第2章 第2節[2] 細胞培養に用いる設備・器具とその管理. 「再生医療における臨床研究と製品開発」: pp.122-128, (株)技術情報協会, 2013年9月

#### A-4

金村米博: 上衣腫. 「脳21」17(1):77-85, 2014年1月

#### A-5

金村米博: 次世代シーケンス法を応用した先天性中枢神経奇形症候群患者の原因遺伝子探索. 厚生労働科学研究費補助金 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野)「分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と遺伝子診断ネットワークの形成」平成25年度総括・分担研究報告書、2014年3月

金村米博: 次世代シーケンス法を応用した先天性中枢神経奇形症候群患者の原因遺伝子探索. 厚生労働科学研究費補助金 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野)「分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と遺伝子診断ネットワークの形成」平成25年度分担総合研究報告書、2014年3月

#### B-1

Yamasaki M, Shofuda T, Bamba Y, Kanemura Y: Research using NSCs and iPS cells derived from patients with intractable brain malformation. 2013 East Asia Symposium: Rare Diseases of Childhood Nervous System, Seoul, Korea, 2013年5月

Yamasaki M, Shofuda T, Harada A, Yamanaka T, Bamba Y, Nonaka M, Kanemura Y: Molecular Basis of Csf Space Anomaly. 15<sup>th</sup> World Congress of Neurosurgery, Seoul, Korea, 2013 年 9 月

Yamasaki M, Shofuda T, Bamba Y, Harada A, Yamanaka T, Nonaka M, Kanemura Y: Molecular basis of CSF space anomaly. 台湾神経外科医学会 第 11 回第一次会員大会・学術検討会, 台中市, 台湾, 2013 年 11 月～12 月

## **B-2**

Sumida M, Yoshioka E, Yamamoto A, Kanematsu D, Furuya Y, Fukusumi H, Takada A, Nonaka M, Nakajima S, Mori K, Goto S, Kamigaki T, Maekawa R, Shofuda T, Moriuchi S, Yamasaki M, Kanemura Y: Clinical usefulness of adoptive immunotherapy using autologous lymphokine-activated killer cells for temozolomide-induced lymphopenia of glioblastoma patients. 19<sup>th</sup> ISCT Annual Meeting, Auckland, New Zealand, 2013 年 4 月

Kanemura Y, Sumida M, Yoshioka E, Yamamoto A, Kanematsu D, Takada A, Nonaka M, Nakajima S, Goto S, Kamigaki T, Takahara M, Maekawa R, Shofuda T, Moriuchi S, Yamasaki M: Vaccination of dendritic cells loaded by electroporation with autologous tumor lysate for patients with recurrent malignant glioma: evaluation of safety and immune response. 2013 SNO 18th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, 2013 年 11 月

Nonaka M, Nakajima S, Shofuda T, Kanemura Y: Relation between methionine uptake and molecular markers in glioma. 2013 SNO 18th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, 2013 年 11 月

## **B-3**

金村米博 : Neurosphere 法を応用した iPS 細胞の神経分化誘導と神経前駆細胞増幅。第 35 回神経組織培養研究会、吹田、2013 年 6 月

金村米博、正札智子、市村幸一、西川 亮、山崎麻美、渋井壮一郎、新井 一 : 小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築 I. 髄芽腫, 上衣腫 日本脳腫瘍学会&日本小児神経外科学会共同プロジェクト。第 41 回日本小児神経外科学会、大阪、2013 年 6 月

金村米博 : ヒト iPS 細胞由来神経系細胞を応用した in vitro 薬剤開発および毒性評価法の開発。日本動物実験代替法学会第 26 回大会、京都、2013 年 12 月

## **B-4**

芹川武大, 遠山 潤, 田澤立之, 西山健一, 後藤清恵, 栗山洋子, 生野寿史, 金村米博,

山崎麻美、中田 光、高桑好一、榎本隆之：X 連鎖性遺伝性水頭症の出生前診断。第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、神奈川、2013 年 6 月

服部文子、根岸 豊、戸川貴夫、宮 冬樹、安藤直樹、伊藤哲哉、角田達彦、金村米博、山崎麻美、小崎健次郎、齋藤伸治：AKT3 遺伝子変異による巨脳症の一例。第 55 回日本小児神経学会、大分、2013 年 6 月

埜中正博、金村米博、沖田典子、中島 伸：神経膠腫におけるメチオニン PET と分子マーカーとの相関についての検討。第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、宮崎、2013 年 12 月

金村米博、市村幸一、正札智子、西川 亮、山崎麻美、新井 一、渋井壮一郎：小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築。I. 髄芽腫、上衣腫。第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、宮崎、2013 年 12 月

市村幸一、福島慎太郎、十時 泰、松下裕子、武笠晃丈、斉藤延人、隈部俊宏、永根基雄、井内俊彦、溝口昌弘、田村 郁、中田光俊、杉山一彦、酒井圭一、金村米博、成田善孝、松谷雅生、柴田龍弘、西川 亮：頭蓋内胚細胞腫の網羅的ゲノム解析。第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、宮崎、2013 年 12 月

藤田浩二、深井順也、大林慎始、神波信次、金村米博、上松右二、中尾直之：神経性抗原発現を示した小児大脳半球に発生した神経膠芽腫。第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、宮崎、2013 年 12 月

梅原 徹、埜中正博、沖田典子、金村米博、宮崎裕子、山中一功、森 康輔、中島 伸：妊娠中に増大した神経膠腫の 2 例。第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、宮崎、2013 年 12 月

金村米博、隅田美穂、吉岡絵麻、山本篤世、兼松大介、高田 愛、埜中正博、中島 伸、神垣 隆、高原将司、才脇晶子、前川隆司、正札智子、森内秀祐、山崎麻美：再発悪性グリオーマ症例を対象としたエレクトロポレーション法を用いた自己腫瘍ライセート導入樹状細胞ワクチン療法の第 I / II 相臨床試験。第 11 回免疫治療学研究会学術集会、東京、2014 年 2 月

## **B-6**

森 康輔、山中一功、宮崎裕子、木谷知樹、金村米博、埜中正博、中島 伸：複雑な network を形成した前交通動脈に合併した破裂前交通動脈瘤の 1 例。第 65 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会・第 67 回近畿脊髄外科研究会、豊中、2013 年 4 月

## **B-8**

金村米博：iPS 細胞の総論・てんかん研究における現状と将来展望。第 19 回漆山てん

かんセミナー、静岡、2013年6月

金村米博：小児脳神経外科領域の遺伝子診断（先天性疾患、脳腫瘍）。小児神経外科教育セミナー2013、大阪、2013年6月

金村米博：先端医療技術の脳神経外科領域への応用可能性－次世代シーケンサーを応用した遺伝子診断と iPS 細胞を応用した神経再生治療－。大阪市立大学脳神経外科学教室同窓会〈曙会〉講演会、大阪、2013年6月

金村米博：グリオーマの分子診断研究の現状とその臨床的意義。第20回和歌山脳腫瘍研究会、和歌山、2013年7月

金村米博：当院における再生医療。探索医療薬物研究会合同シンポジウム第1回記念講演会、大阪、2013年10月

金村米博：グリオーマの分子診断研究の現状とその臨床的意義。第106回大阪脳神経外科研究会、大阪、2013年11月

金村米博：悪性脳腫瘍の遺伝子診断研究の現状とその臨床的意義。法円坂地域医療フォーラム、大阪、2014年2月

金村米博：当院における細胞加工施設の運用管理とがん免疫細胞療法の臨床応用について。第13回日本再生医療学会総会ランチョンセミナー18～今後求められる細胞医療と細胞加工のあり方について～、京都、2014年3月

## 実施した委託業務

### (1) 委託業務の名称

「ヒトiPS細胞由来神経幹細胞を応用した薬物安全性評価システムの開発」

### (2) 委託業務の概要

#### 1. ヒト神経幹細胞由来分化神経系細胞を用いた解析に関する研究

201B7株由来薬物安全性評価用標準ヒト神経幹細胞を、血清含有培地を用いた接着培養で分化誘導させて神経・グリア混合培養（N/G細胞）を作製し、さらにN/G細胞を複数回継代することで接着性のグリア細胞（G細胞）を作製する。これら分化細胞集団をコントロール細胞集団として使用し、24年度までに同定した201B7株由来薬物安全性評価用標準ヒト神経幹細胞に対して毒性を有する薬物の細胞毒性を評価し、ヒト神経幹細胞に対する毒性の選択性を評価する。これら情報を基に、分化細胞に対する毒性は低く、ヒト神経幹細胞に対して高い選択性を持つ毒性薬物に関するデータベースを構築する。さらに樹立した201B7株由来薬物安全性評価用標準ヒト神経幹細胞を国立医薬品食品衛生研究所へ提供し、神経細胞への終末分化に近いステージでの毒性評価系構築を支援する。

#### 2. 薬剤毒性に関連する遺伝子・タンパク質発現情報の包括的取得に関する研究

ヒト神経幹細胞に対して高い選択性を持つ毒性薬物に関して、薬物投与後の201B7株由来薬物安全性評価用標準ヒト神経幹細胞の転写産物（mRNA）の回収を行い、マイクロアレイシステム（アフィメトリックス社製）を用いて全ゲノムレベルでの遺伝子発現解析を実施し、細胞毒性と関連性を有する遺伝子に関する情報を収集する。

#### 3. 薬物毒性に関与する遺伝子ネットワークの同定に関する研究

前項までに得られた、ヒト神経幹細胞に対して高い選択性を持つ毒性薬物の遺伝子発現に関する情報の統計解析を行い、ヒト神経幹細胞の細胞毒性に強くかかわる遺伝子ネットワークを探索し、薬剤種との関連性を検討する。

### (3) 委託業務の成果の概要

#### 1. ヒト神経幹細胞由来分化神経系細胞を用いた解析に関する研究

201B7株由来薬物安全性評価用標準ヒト神経幹細胞を、無血清培地を用いた接着培養で分化誘導させ主に神経細胞からなる分化細胞（N細胞）と、血清含有培地を用いた接着培養で分化誘導させて神経・グリア混合培養（N/G細胞）を作製した。これら分化細胞集団をコントロール細胞集団として使用し、24年度までに同定した201B7株由来薬物安全性評価用標準ヒト神経幹細胞に対して毒性を有する薬物の細胞毒性を評価し、ヒト神経幹細胞に対する毒性の選択性を評価した。これら情報を基に、ヒト神経幹細胞に対する毒性薬物に関するデータベース構築を開始した。さらに樹立した201B7株由来薬物安全性評価用標準ヒト神経幹細胞を国立医薬品食品衛生研究所へ提供し、神経細胞への終末分化に近いステージでの毒性評価系構築を支援した。

#### 2. 薬剤毒性に関連する遺伝子・タンパク質発現情報の包括的取得に関する研究

ヒト神経幹細胞に対して毒性を有する薬物（NimustineおよびTemozolomide）に関して、薬物投与後の201B7株由来薬物安全性評価用標準ヒト神経幹細胞の転写産物（mRNA）の回収を行い、マイクロアレイシステム（アフィメトリックス社製）を用いて全ゲノムレベルでの遺伝子発現解析を実施し、細胞毒性と関連性を有する遺伝子に関する情報を収集した。

#### 3. 薬物毒性に関与する遺伝子ネットワークの同定に関する研究

前項までに得られた、ヒト神経幹細胞に対して毒性を有する薬物の遺伝子発現に関する情報の統計解析を行い、ヒト神経幹細胞の細胞毒性に強くかかわる遺伝子ネットワークを探索し、薬剤種との関連性を検討した。

(4) 研究担当者氏名

金村 米博

(5) 研究発表、講演、文献、特許等の状況

【講演】

金村米博：iPS細胞の総論・てんかん研究における現状と将来展望．第19回漆山てんかんセミナー，2013.6.8；静岡市

金村米博：先端医療技術の脳神経外科領域への応用可能性－次世代シーケンサーを応用した遺伝子診断とiPS細胞を応用した神経再生治療－．大阪市立大学脳神経外科学教室同窓会〈曙会〉講演会，2013.6.15；大阪市

金村米博：Neurosphere法を応用したiPS細胞の神経分化誘導と神経前駆細胞増幅（シンポジウム2：エキスパートに聞く培養法2）．第35回神経組織培養研究会，2013.6.29；吹田市

金村米博：当院における再生医療．探索医療薬物研究会合同シンポジウム第1回記念講演会，2013.10.19；大阪市

金村米博：ヒトiPS細胞由来神経系細胞を応用したin vitro薬剤開発および毒性評価法の開発（シンポジウム：iPS細胞を用いた薬効評価系構築を目指して）．日本動物実験代替法学会第26回大会，2013.12.20；京都市

【著書】

金村米博：第5章 iPS細胞を応用したin vitro神経創薬・毒性研究．In vitro 毒性・動態評価の最前線（小島肇夫 監修）：pp.71-80，シーエムシー出版，2013年9月

(6) 他の研究機関における類似研究及び協力関係状況

特記事項なし

(7) その他

特記事項なし

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成25年度）

1. 機関番号 8 4 4 1 4 2. 研究機関名 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター（臨床研究センター）

3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成24年度～平成26年度

5. 課題番号 2 4 5 9 2 1 8 1

6. 研究課題名 ヒトグリオーマ幹細胞の生存・増殖・未分化性維持に関わるニッチの解明

7. 研究代表者

| 研究者番号           | 研究代表者名             | 所属部局名             | 職名 |
|-----------------|--------------------|-------------------|----|
| 8 0 3 4 4 1 7 5 | カネムラ ヨネヒロ<br>金村 米博 | 先進医療研究開発部 再生医療研究室 | 室長 |

8. 研究分担者

| 研究者番号           | 研究分担者名             | 所属研究機関名・部局名        | 職名 |
|-----------------|--------------------|--------------------|----|
| 4 0 4 5 0 8 9 5 | ショウフダ トモコ<br>正札 智子 | 先進医療研究開発部 幹細胞医療研究室 | 室長 |
|                 |                    |                    |    |
|                 |                    |                    |    |
|                 |                    |                    |    |
|                 |                    |                    |    |

9. 研究実績の概要

神経膠芽腫患者由来腫瘍組織から無血清培地を用いたneurosphere法を使用して樹立し、その後3ヶ月以上の長期培養が可能であった腫瘍細胞凝集塊（LC-TS）の2株（GDC40およびGDC90）に関して、その詳細な特性解析を実施した。遺伝子発現解析の結果では、GDC40細胞と比較して、GDC90細胞では神経幹細胞で高発現するNESTIN、PAX6に加え、放射状グリア細胞で発現が見られるGFAPおよびBLBPが高発現することが明らかになった。iPS細胞由来神経前駆細胞とのin vitro共培養系を用いた解析では、GDC90細胞は神経前駆細胞の神経分化を強力に支援する特性を有し、逆にGDC40細胞にはそのような特性は見られないことが明らかになった。一方、NOGマウスの脳内への移植実験では、GDC40細胞は浸潤性の著明な大きな腫瘍塊を形成する特性を有したが、GDC90細胞からは大きな腫瘍塊形成は見られず、in vivoでの腫瘍塊形成能力が非常に小さいことが明らかになった。以上の結果から、膠芽腫組織から同様の手法を用いて樹立した2株のLC-TSにおいて、in vivoでの腫瘍形成能が大きく異なる細胞が存在することが明らかになり、その特性差に幾つかの遺伝子発現の差異が関与することが示唆された。今後、両細胞の特性差に関する検討をさらに詳しく実施することで、LC-TSの腫瘍形成能を解明する手がかりが得られる可能性が示唆された。



10. キーワード

- |           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| (1) 癌     | (2) 細胞・組織 | (3) 脳神経疾患 | (4) 発生・分化 |
| (5) 薬剤反応性 | (6)       | (7)       | (8)       |

11. 現在までの達成度

(区分) (2) おおむね順調に進展している。

(理由)

研究2年目の25年度は2株のLC-TCを主たる解析対象としてそのin vitroにおける詳細な特性解析とin vivoにおける腫瘍形成能評価を其々実施し、腫瘍形成能の差異に関与する可能性がある細胞特性とマーカー遺伝子に関して幾つかの知見を得ることができた。これら知見は、今後、本研究の目的であるLC-TSの生物学的意義とグリオーマ幹細胞 (GSC) の生存・増殖・未分化性維持に関わるin vitro ニッチの解明を行う上で重要な知見であり、中間年度の成果としては概ね順調に研究は進展したと判断する。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今年度得られた研究成果を基礎に、最終年度の26年度はより多くのLC-TC株を解析対象に加え、25年度得られた知見の普遍性の検討を行い、LC-TSの生物学的意義とGSCの生存・増殖・未分化性維持に関わるin vitro ニッチの解明につながる知見の探索を実施していきたいと考える。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

予定よりも消耗品費の支出が少なく済んだため、次年度使用額が生じた。

(使用計画)

平成25年度経費の中で532,717円の未使用分があり、これを次年度に繰り越し、26年度は合わせて1,332,717円を消耗品費を中心に使用して研究を実施する予定である。

13.研究発表(平成25年度の研究成果)

[雑誌論文] 計(0)件 うち査読付論文 計(0)件

| 著者名                     |       | 論文標題 |     |         |  |
|-------------------------|-------|------|-----|---------|--|
|                         |       |      |     |         |  |
| 雑誌名                     | 査読の有無 | 巻    | 発行年 | 最初と最後の頁 |  |
|                         |       |      |     |         |  |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) |       |      |     |         |  |
|                         |       |      |     |         |  |

[学会発表] 計(7)件 うち招待講演 計(0)件

| 発表者名   |                         | 発表標題  |  |
|--|-------------------------|---|--|
| Sumida M, Yoshioka E, Yamamoto A, Kanematsu D, Furuya Y, Fukusumi H, Takada A, Nonaka M, Nakajima S, Mori K, Goto S, Kamigaki T, Maekawa R, Shofuda T, Moriuchi S, Yamasaki M, Kanemura Y. |                         | Clinical usefulness of adoptive immunotherapy using autologous lymphokine-activated killer cells for temozolomide-induced lymphopenia of glioblastoma patients. |  |
| 学会等名   | 発表年月日                   | 発表場所  |  |
| 19th ISCT Annual Meeting   | 2013年04月22日～2013年04月25日 | Auckland, New Zealand   |  |

| 発表者名          |                         | 発表標題                                   |  |
|---------------|-------------------------|--|--|
| 金村米博          |                         | Neurosphere法を応用したiPS細胞の神経分化誘導と神経前駆細胞増幅 |  |
| 学会等名          | 発表年月日                   | 発表場所                                   |  |
| 第35回神経組織培養研究会 | 2013年06月29日～2013年06月29日 | 大阪府吹田市                                 |  |

| 発表者名          |                         | 発表標題                    |  |
|---------------|-------------------------|-------------------------|--|
| 金村米博          |                         | グリオーマの分子診断研究の現状とその臨床的意義 |  |
| 学会等名          | 発表年月日                   | 発表場所                    |  |
| 第20回和歌山脳腫瘍研究会 | 2013年07月20日～2013年07月20日 | 和歌山市                    |  |

| 発表者名            | 発表標題                    |      |
|-----------------|-------------------------|------|
| 金村米博            | グリオーマの分子診断研究の現状とその臨床的意義 |      |
| 学会等名            | 発表年月日                   | 発表場所 |
| 第106回大阪脳神経外科研究会 | 2013年11月19日～2013年11月19日 | 大阪市  |

| 発表者名   | 発表標題  |                    |
|--|---|--------------------|
| Kanemura Y, Sumida M, Yoshioka E, Yamamoto A, Kanematsu D, Takada A, Nonaka M, Nakajima S, Goto S, Kamigaki T, Takahara M, Maekawa R, Shofuda T, Moriuchi S, Yamasaki M. | Vaccination of dendritic cells loaded by electroporation with autologous tumor lysate for patients with recurrent malignant glioma: evaluation of safety and immune response. |                    |
| 学会等名   | 発表年月日   | 発表場所               |
| 2013 SNO 18th Annual Scientific Meeting  | 2013年11月23日～2013年11月23日   | San Francisco, USA |

| 発表者名              | 発表標題                                       |      |
|-------------------|--|------|
| 金村米博              | ヒトiPS細胞由来神経系細胞を応用したin vitro薬剤開発および毒性評価法の開発 |      |
| 学会等名              | 発表年月日                                      | 発表場所 |
| 日本動物実験代替法学会第26回大会 | 2013年12月20日～2013年12月20日                    | 京都市  |

| 発表者名         | 発表標題                     |      |
|--------------|--------------------------|------|
| 金村米博         | 悪性脳腫瘍の遺伝子診断研究の現状とその臨床的意義 |      |
| 学会等名         | 発表年月日                    | 発表場所 |
| 法円坂地域医療フォーラム | 2014年02月15日～2014年02月15日  | 大阪市  |

〔図書〕計(0)件

| 著者名 | 出版社 |       |  |
|-----|-----|-------|--|
|     |     |       |  |
| 書名  | 発行年 | 総ページ数 |  |
|     |     |       |  |

14.研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 出願年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
|          |     |     |             |       |         |

〔取得〕計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 取得年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
|          |     |     |             | 出願年月日 |         |
|          |     |     |             |       |         |

15.備考

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成25年度）

1. 機関番号 8 4 4 1 4      2. 研究機関名 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター  
（臨床研究センター）
3. 研究種目名 基盤研究(C)      4. 補助事業期間 平成24年度～平成26年度
5. 課題番号 2 4 5 9 1 5 3 8
6. 研究課題名 疾患iPS細胞を用いたL1症候群患者神経系細胞の機能障害の解析
7. 研究代表者

| 研究者番号           | 研究代表者名             | 所属部局名              | 職名 |
|-----------------|--------------------|--------------------|----|
| 4 0 4 5 0 8 9 5 | ショウフダ トモコ<br>正札 智子 | 先進医療研究開発部 幹細胞医療研究室 | 室長 |

8. 研究分担者

| 研究者番号           | 研究分担者名             | 所属研究機関名・部局名       | 職名 |
|-----------------|--------------------|-------------------|----|
| 8 0 3 4 4 1 7 5 | カネムラ ヨネヒロ<br>金村 米博 | 先進医療研究開発部 再生医療研究室 | 室長 |
|                 |                    |                   |    |
|                 |                    |                   |    |
|                 |                    |                   |    |
|                 |                    |                   |    |

9. 研究実績の概要

(1)L1CAM遺伝子異常を有する疾患ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の誘導と維持培養  
 神経接着因子L1CAMに、重症型L1症候群の表現型となる膜貫通ドメイン以下のC末端が欠損するClass III変異を持つヒト疾患iPS細胞2株（細胞外ドメインのナンセンス変異 c.2250C>A, p.Tyr750Stop と、スプライスドナー部位変異 c.400+5G>A によるフレームシフト）より、自己増殖能と神経系細胞に特化した多分化能を持つ神経前駆細胞の誘導を試みた。SMADシグナル阻害作用を持つ低分子化合物DorsomorphinとSB431542を用いた無血清凝集浮遊培養（SFEBq）法により神経分化誘導を実施した。誘導後、増殖因子FGF2/EGF/LIFを添加した神経幹細胞用培地で培養を継続した結果、神経前駆細胞の樹立に成功した。同様の方法で樹立した健常幼児iPS細胞由来神経前駆細胞と比較したところ、ほぼ同程度の細胞増殖能を持っていた。

(2)L1CAM遺伝子異常を有する疾患ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の特性解析  
 誘導後70日後の疾患ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞より全RNAを抽出し、アフィメトリクス社HG-U133 Plus 2 Arrayを用いて遺伝子プロファイルを取得した。比較対照として、健常幼児iPS細胞由来神経前駆細胞を使用し、L1CAM変異に伴い発現が変化する遺伝子（群）の抽出を行った。その結果、L1CAM異常を持つiPS細胞由来神経前駆細胞では、細胞外マトリックスや細胞接着因子、細胞周期制御に関する遺伝子などに発現差があることが示唆された。また抽出されたいくつかの遺伝子について、定量的RT-PCR法で確認を行った。神経系分化マーカーでは、グリア細胞マーカーS100βに顕著な発現低下が検出された。この結果は、患者脳組織より樹立した神経幹/前駆細胞の結果とも一致し、L1CAM変異がグリア系細胞の発現に影響を与えることが示唆された。

10. キーワード

- |                        |                       |     |     |
|------------------------|-----------------------|-----|-----|
| (1) L1CAM Class III 変異 | (2) 疾患ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞 | (3) | (4) |
| (5)                    | (6)                   | (7) | (8) |

11. 現在までの達成度

(区分) (2) おおむね順調に進展している。

(理由)  
 L1CAM細胞内ドメインの欠失となる、Class IIIタイプの遺伝子変異を持つ幼児線維芽細胞由来疾患iPS細胞より、自己増殖能と神経系に特化した分化能を持つ神経前駆細胞を樹立することに成功した。死亡症例でしか樹立できない脳組織由来神経幹細胞の代替となる生体マテリアルを確保し、各種特性解析を実施する目処を立てる事ができた。また、健常人コントロールとなる幼児線維芽細胞由来iPS細胞からも、同じ手法を用いて神経前駆細胞を樹立し、比較対照となるマテリアルも得ることができた。樹立した神経前駆細胞を用い、アフィメトリス HG-U133 Plus 2 Arrayによる遺伝子プロファイルを取得し、変異に伴い発現に影響を受ける遺伝子の抽出と確認作業に着手した。L1CAM異常を伴う神経前駆細胞の遺伝子プロファイルのデータマイニングに着手する事ができたことから、本研究の進捗は、概ね順調に伸展していると判断した。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)  
 現在までに、L1症候群患者由来線維芽細胞より、膜貫通ドメイン以下が欠損するClass III変異2例、細胞外ドメインのミスセンスによるClass II変異1例の疾患iPS細胞を樹立し、神経前駆細胞の樹立と遺伝子プロファイルの取得に着手している。L1CAMは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着因子で、細胞外ドメインは、L1CAM同士のホモフィリック結合や、RGD配列を介したインテグリンとの結合などに関与する。これら細胞接着は、プロテアーゼによる翻訳後修飾で機能制御を受けることも知られている。また細胞内ドメインは、アクチンやアンキリンなどの細胞骨格と結合し、ERK2 (extracellular signal-related kinase 2) などによりリン酸化修飾を受け、細胞内情報伝達やエントサイトーシスに関与する。以上のように、細胞接着分子としてだけでなく、シグナル伝達や細胞内輸送など生物学的機能は多岐にわたり、細胞接着の他、軸索の進展や神経細胞の移動、ミエリンやシナプスの形成にも関与する。今後は、L1症候群iPS細胞から誘導した神経前駆細胞や、それから週末分化させた神経細胞やグリア細胞の神経系譜細胞で、病態形質の再現を試みる。まずは遺伝子異常に起因する細胞接着機能の低下を再現する系を構築する。また遺伝子プロファイルの解析により、シグナル伝達関連のデータマイニングを行い、タンパクレベルでの検証を進める。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)  
 (理由)  
 情報収集・成果発表のため、国際学会参加に係る費用を計上していたが、本年度は参加をしなかったため、また予定よりも消耗品の支出が少なく済んだため、次年度使用額が生じた。  
 (使用計画)  
 平成25年度経費の中で1,205,137円の未使用分があり、これを次年度に繰り越し、26年度は合わせて2,005,137円を消耗品費を中心に使用して研究を実施する予定である。

13.研究発表(平成25年度の研究成果)

[雑誌論文] 計(0)件 うち査読付論文 計(0)件

| 著者名                     |       | 論文標題 |     |         |  |
|-------------------------|-------|------|-----|---------|--|
|                         |       |      |     |         |  |
| 雑誌名                     | 査読の有無 | 巻    | 発行年 | 最初と最後の頁 |  |
|                         |       |      |     |         |  |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) |       |      |     |         |  |
|                         |       |      |     |         |  |

[学会発表] 計(4)件 うち招待講演 計(0)件

| 発表者名  |                         | 発表標題   |  |
|---|-------------------------|--|--|
| Yamasaki M, Shofuda T, Bamba Y, Kanemura Y.                         |                         | Research using NSCs and iPS cells derived from patients with intractable brain malformation. |  |
| 学会等名  | 発表年月日                   | 発表場所   |  |
| 2013 East Asia Symposium: Rare Diseases of Childhood Nervous System | 2013年05月22日～2013年05月22日 | Seoul, Korea   |  |

| 発表者名  |                         | 発表標題                                  |  |
|---|-------------------------|---------------------------------------|--|
| Yamasaki M, Shofuda T, Harada A, Yamanaka T, Bamba Y, Nonaka M, Kanemura Y. |                         | Molecular Basis of Csf Space Anomaly. |  |
| 学会等名  | 発表年月日                   | 発表場所                                  |  |
| 15th World Congress of Neurosurgery   | 2013年09月12日～2013年09月12日 | Seoul, Korea                          |  |

| 発表者名   |                         | 発表標題  |  |
|--|-------------------------|---|--|
| Nonaka M, Nakajima S, Shofuda T, Kanemura Y. |                         | Relation between methionine uptake and molecular markers in glioma. |  |
| 学会等名   | 発表年月日                   | 発表場所  |  |
| 2013 SNO 18th Annual Scientific Meeting      | 2013年11月23日～2013年11月23日 | San Francisco, USA  |  |

|   |  |                                   |      |
|---|--|-----------------------------------|------|
| 発表者名                                      |  | 発表標題                              |      |
| 金村米博, 市村幸一, 正札智子, 西川 亮, 山崎麻美, 新井 一, 渋井壮一郎 |  | 小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築. I. 髄芽腫、上衣腫. |      |
| 学会等名                                      |  | 発表年月日                             | 発表場所 |
| 第31回日本脳腫瘍学会学術集会                           |  | 2013年12月08日～2013年12月08日           | 宮崎市  |

〔図書〕計(0)件

|     |  |  |       |  |  |  |  |
|-----|--|--|-------|--|--|--|--|
| 著者名 |  | 出版社  |       |  |  |  |  |
|     |  |  |       |  |  |  |  |
| 書名  |  | 発行年  | 総ページ数 |  |  |  |  |
|     |  | <table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;"> </td> </tr> </table> |       |  |  |  |  |
|     |  |  |       |  |  |  |  |

14.研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

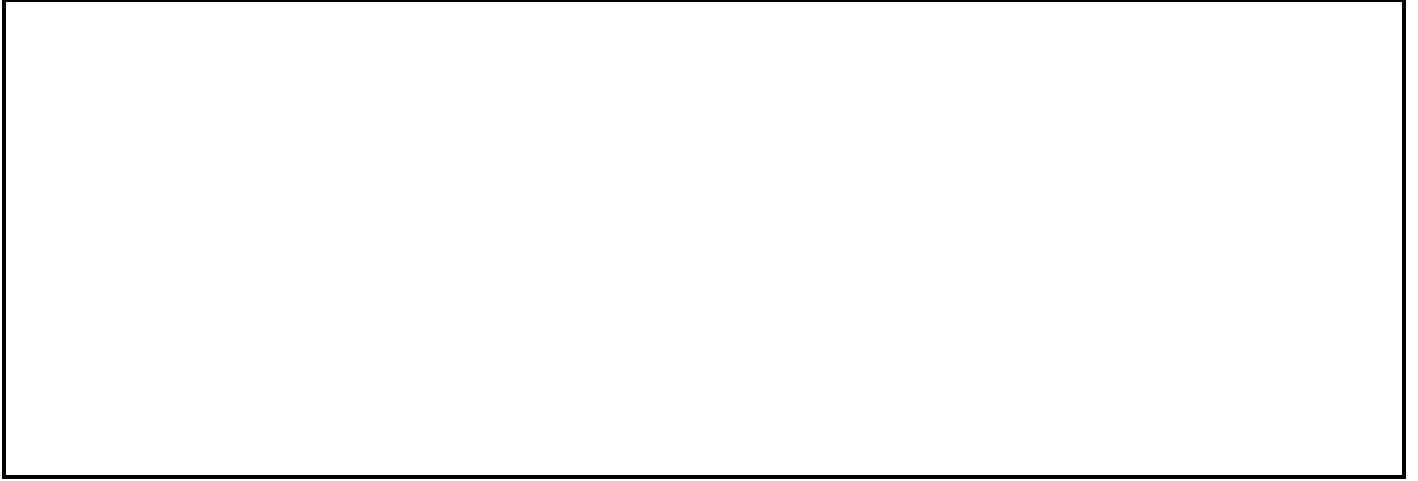
| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 出願年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
|          |     |     |             |       |         |

〔取得〕計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 取得年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
|          |     |     |             | 出願年月日 |         |
|          |     |     |             |       |         |



15.備考

A large, empty rectangular box with a black border, intended for the student to write their preparation notes for question 15.

## 京都大学委託研究費

研究分担者：金村米博

研究課題名：iPS 細胞技術の評価・検証会

### 【目的】

iPS 細胞は、再生医療への応用へ向け、その資源、樹立法、維持、増幅、保存法、評価・選抜法のいずれにおいても最適化に向けた検討を行うべき段階にある。これら多岐にわたる iPS 細胞技術の国際的な標準化を目指し、徹底した評価・検証作業を通じて戦略的に追及すべく、我が国の研究者がどのような共同作業を行うべきかを検討し、実行する。

### 【方法】

京都大学で樹立された複数のヒト iPS 細胞標準株を用いて、神経分化能評価を実施し、分化誘導後の細胞の特性を解析し、iPS 細胞の品質のバラツキを検証した。

### 【結果】

SNL フィーダー細胞を用いて樹立されたヒト iPS 細胞とフィーダー細胞無しで樹立されたヒト iPS 細胞は、いずれも神経分化が可能であったが、分化誘導後細胞の特性には一定のバラつきが生じることが明らかになった。その原因の一つとして、iPS 細胞の特性に一定のバラつきが存在することが推察された。

### 【意義】

複数のヒト iPS 細胞の分化能を共同解析できる体制を構築できたことは、iPS 細胞技術の国際的な標準化に向けた取り組みの前進に大きく貢献できる成果であったと考える。

## 研究結果説明書

平成25年度 再生医療実現拠点ネットワークプログラム  
疾患・組織別実用化研究拠点（拠点A）

委託研究題目名： iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療

実施機関：独立行政法人国立病院機構大阪医療センター

研究担当者：臨床研究センター 先進医療研究開発部 再生医療研究室 室長・金村 米博

### 1. 研究の実績

#### (1) 研究の実施日程

| 業務項目                                    | 実 施 日 程 |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |
|---|---------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|
|   | 4月      | 5月 | 6月 | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 12月 | 1月 | 2月 | 3月 |
| 達成目標①<br>研究項目：再生医療用iPS細胞由来神経前駆細胞ストックの構築 |         |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |
| ①再生医療用iPS細胞ストック受入れ体制の構築                 | ←       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    | →  |
| ②神経前駆細胞製造用原材料の品質適格性評価体制の構築              | ←       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    | →  |
| ③ヒトiPS細胞からの神経前駆細胞製造工程の最適化               | ←       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    | →  |

#### (2) 研究の実績の説明

達成目標①：亜急性期脊髄損傷に対する臨床研究を開始

1) 研究項目：再生医療用iPS細胞由来神経前駆細胞ストックの構築

①再生医療用iPS細胞ストック受入れ体制の構築（学校法人慶應義塾・岡野栄之・中村雅也、国立病院機構大阪医療センター・金村米博、大日本住友製薬株式会社・野口毅・岸野晶祥）

**【成果の目標】**

iPS細胞研究中核拠点で作製される再生医療用iPS細胞ストックを原材料として受入れ、iPS細胞研究中核拠点が確立した再生医療用iPS細胞の培養法を自施設内で適切に再現できる体制を構築する。

**【研究の方法】**

iPS細胞研究中核拠点が作成する2系統の再生医療用iPS細胞ストック（フィーダー細胞使用培養法、無フィーダー細胞培養法）に関して、再生医療用iPS細胞ストックと同じ手法で作成されたバリデーション用iPS細胞と培養関連SOPの提供を受け、実験室レベルでSOPに則りバリデーション用iPS細胞が適切に培養できる体制を構築する。その後、慶應義塾大学および大日本住友製薬と連携して、セルプロセッシングセンター（CPC）を使用して、同様にCPC内でSOPに則り適切に再生医療用iPS細胞ストックの培養が再現できる体制を構築する。

#### 【成果の概要】

iPS細胞研究中核拠点（京都大学iPS細胞研究所：以下、京都大学CiRA）において、再生医療用iPS細胞ストック作成に使用する手法と同等の方法を用いて樹立された2系統のバリデーション用ヒトiPS細胞合計10株（SNLフィーダー細胞使用培養法：5株、無フィーダー細胞培養法：5株）と、培養関連SOPの提供を受け、実験室レベルで各SOPに則りバリデーション用iPS細胞が適切に培養できる体制を構築した。さらに、慶應義塾大学および大日本住友製薬との連携体制を構築し、セルプロセッシングセンター（CPC）を使用して、SOPに則り適切に再生医療用iPS細胞ストックの培養が再現できる体制を構築するため、各SOPを自施設のCPCで運用できるように改訂作業を順次開始した。

②神経前駆細胞製造用原材料の品質適格性評価体制の構築（学校法人慶應義塾・岡野栄之・中村雅也、国立病院機構大阪医療センター・金村米博、大日本住友製薬株式会社・野口毅・岸野晶祥）

#### 【成果の目標】

iPS細胞研究中核拠点で実施される品質検査を再現できる体制を構築する。さらに、受け入れiPS細胞の神経分化能に関する品質適格性項目の策定。

#### 【研究の方法】

細胞の形態、FACSを用いた表面抗原発現様式、遺伝子発現解析、染色体核型解析、プラスミド残留性試験、微生物学的汚染検査の項目につき、iPS細胞研究中核拠点で実施される品質検査法の実施方法、評価方法の情報提供を受け、これらを自施設内で適切に再現できる体制を整備する。また、iPS細胞研究中核拠点から再生医療用iPS細胞ストックと同じ手法で作成された複数のバリデーション用iPS細胞を受け入れ、低分子化合物を用いた神経分化誘導法を使用してその神経分化能を総合的に評価し、分化誘導後の細胞形態、遺伝子発現様式、表面抗原発現様式を指標として神経前駆細胞製造用原材料としての品質適格性項目の策定を実施する。さらに、慶應義塾大学および大日本住友製薬と連携して、神経分化誘導前後での遺伝子配列解析、コピー数多型解析、DNAメチル化率解析を行い、同様に神経前駆細胞製造用原材料としての品質適格性項目の策定を実施する。

#### 【成果の概要】

京都大学CiRAで実施されるヒト細胞マーカー、未分化iPS細胞マーカー、神経分化マーカーのFACS発現解析検査法のSOPの提供を受け、自施設で実施するための体制整備と検査法のバリデーションを開始した。また、新規神経前駆細胞マーカー候補分子をピックアップし、各細胞での発現解析を実施し、品質管理用神経前駆細胞マーカー分子としての妥当性を検討した。染色体核型解析、プラスミド残留性試験に関しても同様に京都大学CiRAで実施される品質検査法のSOPの提供を受け、自施設で実施するための体制整備と検査法のバリデーションを開始し、微生物学的汚染検査法に関しては日本薬局方に準拠した検査体制整備を開始した。

京都大学CiRAから受け入れたバリデーション用iPS細胞10株に関して、低分子化合物を用いた神経分化誘導の後、浮遊培養（neurosphere法）により拡大培養を行った神経前駆細胞について特性解析を実施した。プロトコールA（低分子化合物を用いた胚様体形成後、浮遊培養法のみを用いて神経前駆細胞を拡大培養する手法）およびプロトコールB（低分子化合物を用いて形成した胚様体を一旦接着培養法に移行し、形成された神経ロゼットを単離した後、浮遊培養法にて神経前駆細胞を拡大培養する手法）、の2つの異なる誘導法により得られた神経前駆細胞に関して、分化誘導後のロゼット形成能、神経分化マーカー発現、neurosphereの形態、増殖および神経終末分化能を指標として、神経分化能を総合的に評価し、神経前駆細胞製造用原材料として各iPS細胞の品質適格性を評価し、その評価基準項目を考察した。

また、慶應義塾大学および大日本住友製薬と連携して、神経分化誘導前後での遺伝子配列解析、コピー数多型解析、DNAメチル化率解析を行い、同様に神経前駆細胞製造用原材料としての品質適格性項目の策定を試みた。

さらに、無フィーダー細胞培養法で樹立されたiPS細胞の中で最も優れた特性を示した株に由来する神経前駆細胞を免疫不全動物の神経組織内に移植し、in vivoでの造腫瘍能を評価した。

③ヒトiPS細胞からの神経前駆細胞製造工程の最適化（学校法人慶應義塾・岡野栄之・中村雅也、国立病院機構大阪医療センター・金村米博）

【成果の目標】

再生医療用iPS細胞ストックからの神経前駆細胞製造工程の中で、第1工程（神経分化誘導工程）、第2工程（神経前駆細胞増幅工程）の最適化を実施する。

【研究の方法】

第1工程（神経分化誘導工程）に関して、分化誘導培地の組成（基本培地、添加因子、増殖因子、その他試薬）、使用器材（仕様、器材表面コーティング条件等）、培養法（誘導日数、培地交換間隔等）、の各項目に関して、GMP化を実現する上での問題点を検討し、神経分化誘導効率とCPC内での作業効率性の両方の視点から最適な手法を選定する。第2工程（神経前駆細胞増幅工程）に関しても同様に、細胞増幅培地の組成（基本培地、添加因子、増殖因子、その他試薬）、使用器材（仕様、器材表面コーティング条件等）、培養法（誘導日数、培地交換間隔等）、継代法（継代手法、継代回数）の各項目に関して、GMP化を実現する上での問題点を検討し、神経前駆細胞増幅効率とCPC内での作業効率性の両方の視点から最適な手法を選定する。

【成果の概要】

プロトコールAおよびプロトコールBの第1工程（神経分化誘導工程）で使用する、分化誘導培地組成（基本培地、添加低分子化合物）、使用器材（仕様、器材表面コーティング条件）、培養法（誘導日数、培地交換間隔）、の各項目に関して、GMP化を実現する上での問題点を検討し、神経分化誘導効率とCPC内での作業効率性の両方の視点から最適な手法を選定し、その手法を用いて京都大学CiRAから受け入れたバリデーション用iPS細胞10株の分化誘導を実施した。第2工程（神経前駆細胞増幅工程）に関しても同様に、プロトコールAおよびプロトコールBいずれの手法において、細胞増幅培地組成（基本培地、添加因子、増殖因子）、使用器材（仕様、器材表面コーティング条件）、培養法（培養日数、培地交換間隔）、継代法（継代手法）の各項目に関して、GMP化を実現する上での問題点を検討し、神経前駆細胞増幅効率とCPC内での作業効率性の両方の視点から最適な手法を選定し、その手法を用いて京都大学CiRAから受け入れたバリデーション用iPS細胞10株の分化誘導を実施した。

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関連分野）  
分担研究報告書

次世代シーケンス法を応用した先天性中枢神経奇形症候群患者の原因遺伝子探索

研究分担者 金村 米博

<sup>1</sup> 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室 室長

<sup>2</sup> 国立病院機構大阪医療センター 脳神経外科

**研究要旨**

全エクソーム解析法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子探索を本格的に実施し、中枢神経奇形領域チーム全体で、健常コントロールを含む10カテゴリーの神経疾患を対象として、58家系163サンプルの全エクソーム解析を実施した。家族性脳梁無形成症の1家系からX染色体上の新規原因遺伝子の遺伝子Xの同定に至った。全エクソーム解析法は、標的遺伝子解析パネルでは同定困難な新規原因遺伝子同定に有用であることが明らかになり、今後は標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析法を上手く使い分けて研究と臨床に活用していくことが重要であることが示唆された。

**研究協力者**

正札智子<sup>3</sup>、吉岡絵麻<sup>4</sup>、高田 愛<sup>1</sup>、埜中正博<sup>2</sup>、  
山崎麻美<sup>5</sup>、原田敦子<sup>5</sup>、山中 巧<sup>5</sup>、寺元千佳<sup>5</sup>、  
宮 冬樹<sup>6</sup>

<sup>3</sup> 国立病院機構大阪医療センター  
臨床研究センター 幹細胞医療研究室

<sup>4</sup> 国立病院機構大阪医療センター  
臨床研究センター 分子医療研究室

<sup>5</sup> 社会医療法人愛仁会高槻病院  
小児脳神経外科

<sup>6</sup> 理化学研究所統合生命医科学研究センター  
医科学数理研究グループ

**A. 研究目的**

難治性神経疾患の中でも、X連鎖性遺伝性水頭症を代表とする遺伝性水頭症や大脳皮質形成異常などの先天性中枢神経奇形症候群は希少疾患であり、研究者人口も少なく、その対策・研究は他の神経疾患に比べて大幅に遅れている。これら先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明と根治的治療法の開発は、臨床神経科学領域における大きな研究テーマの一つと考えられる。近年の次世代シーケンス法の進歩によって、従来の解析手法では原因不明であった様々な難病の遺伝子異常が同定されつつあり、先天性中枢神経奇形症候群の病因検索にその解析手法を応用することが期待される。

そこで我々は、次世代シーケンス法を応用した先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子検

索として、先天性中枢神経奇形症候群との関連性が示唆される284個の標的遺伝子を選定して、その解析を実施した（標的遺伝子解析パネル）。さらに24年度からは全エクソーム解析法を導入し、25年度も引き続き次世代シーケンス法による全エクソーム解析を応用した先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子探索を実施し、その分子病態解明および新規診断・治療法開発につながる標的分子を探索した。

**B. 研究方法**

1. 解析対象

本研究班に属する、先天性中枢神経奇形症候群を研究対象とする山崎（社会医療法人愛仁会高槻病院）、斉藤（名古屋市立大学大学院医学研究科・新生児・小児医学分野）、加藤（山形大学医学部附属病院・小児科）、岡本（大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター・遺伝診療科）らと共同で研究チーム（以下、中枢神経奇形領域チーム）を形成して症例を集積した。各症例のゲノムDNAは末梢血単核球、分娩時に提供を受けた臍帯血あるいは臍帯から各々抽出し、解析に使用した。

1. 2. 全エクソーム解析

全エクソーム解析は宮（理化学研究所統合生命医科学研究センター・医科学数理研究グループ）が中心と成り、研究代表者の小崎（慶應義塾大学医学部・臨床遺伝学センター）並びに工藤（慶應義塾大学医学部・共同利用研究室・遺

伝子医学研究室)、清水 (岩手医科大学) らの研究チームと共同で実施した。

全遺伝子の exon 領域をターゲットとした SureSelect Human All Exon Kit (V.4 または V.5、Agilent Technologies 社) を用いて全遺伝子の変異を探索した。シーケンスは HiSeq2000 (Illumina 社) にて実施し、シーケンスデータからの原因遺伝子変異の探索には理化学研究所の宮が開発した解析プログラムを用いて、既知の多型を除外し家系条件に合致する変異を選出する等の探索を実施した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省) を遵守し、国立病院機構大阪医療センター医学倫理委員会の承認 (平成21年8月26日: 第1版承認、平成25年10月15日: 第8版修正承認) および研究チームの各施設内倫理委員会の承認に基づいて実施された。DNA試料の提供およびゲノム・遺伝子解析研究への使用に関しては、書面を用いたインフォームドコンセントを実施して同意取得を行い、提供されたDNA試料は連結可能匿名化状態で研究に使用した。試料提供者の個人情報および遺伝情報は、個人情報管理者および個人情報担当管理者によって細心で厳重な注意の下、管理された。

### C. 研究結果

#### (1) 遺伝子解析症例数

中枢神経奇形領域チーム全体で、健常コントロールを含む 10 カテゴリーの神経疾患を対象として、最終的に 58 家系 163 サンプル解析の全エクソーム解析を実施した (表 1)。

#### (2) 新規原因遺伝子同定

脳梁無形成症に臍ヘルニアを合併した兄弟症例を有し、家族性脳梁無形成症が疑われた 1 家系を対象として、2 名の患児とその母親の全エクソーム解析を実施した (図 1)。その結果、2 人の患者に共通に X 染色体上の遺伝子 X にミスセンス異常が認められ、母親は同変異をヘテロ接合体で有することが示唆され、Sanger シーケンス法によってこれら遺伝子 X 異常を確定させた。

同定された遺伝子 X は、文献上、家族性脳梁無形成症の発症との関連性の報告が無い新規遺伝子であり、今回同定されたミスセンス異常は、翻訳タンパク質の機能喪失に至ることが強く示唆される型の変異であった。以上の結果から、X連鎖性が強く疑われる家族性脳梁無形成症家系で同定された遺伝子 X の変異は、本症例の原

因遺伝子である可能性が高いと推察された (投稿準備中)。

表1: 中枢神経奇形領域チームで解析を実施した検体・家系数

| 疾患名        | 全エクソーム解析 |     |
|------------|----------|-----|
|            | サンプル数    | 家系数 |
| 先天性水頭症     | 11       | 4   |
| 脳梁欠損症      | 12       | 4   |
| 全前脳胞症      | 0        | 0   |
| 皮質形成異常症    | 46       | 16  |
| 小脳形成異常症    | 12       | 4   |
| 小頭症        | 41       | 13  |
| 大頭症        | 3        | 1   |
| 脳瘤         | 0        | 0   |
| 脊髄髄膜瘤      | 4        | 2   |
| アンジェルマン症候群 | 0        | 0   |
| てんかん       | 2        | 1   |
| その他        | 28       | 9   |
| 健常コントロール   | 4        | 4   |
| (小計)       | 163      | 58  |

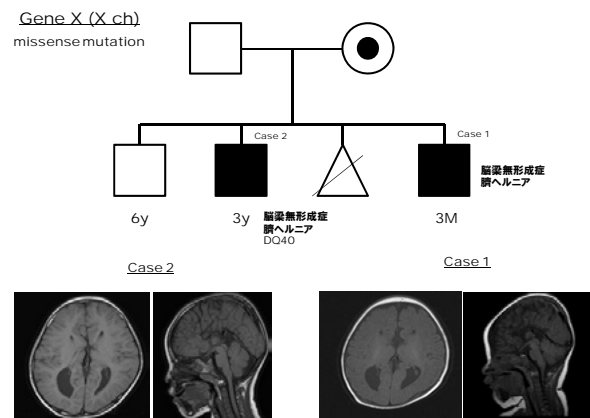


図 1: 家族性脳梁無形成症の 1 家系  
上段: 家系図、下段: 頭部MRI画像 (T1強調画像)

### D. 考察

最終年度の 25 年度は全エクソーム解析を本格的に実施した結果、中枢神経奇形領域チーム全体で、最終的に 58 家系 163 サンプル解析の全エクソーム解析を実施するに至り、希少神経疾患の全エクソーム解析としては、国内研究では有数規模の解析を実施することができたと判断する。

23-24 年度に実施した 284 遺伝子の標的遺伝子解析パネルは、解析対象家系の原因遺伝子とそのパネル中に存在する場合は、一度のシーケンス解析で多数の候補遺伝子の中から原因遺伝子を同定することが可能であり、効率的に原因遺伝子の同定に成功する解析手法であること

が示唆され、複数の家系で原因遺伝子の同定に成功した。臨床的には、1つの病気に複数の原因遺伝子が存在する場合などに、その遺伝子型を決定する際に使用することに適した解析アプローチであると考えられた。一方で、原因が全く未知の疾患・家系の場合、その原因遺伝子がパネル中に存在しない場合が十分想定され、そのような場合は限定された数の遺伝子の検索では、新たに原因遺伝子を同定することは不可能であり、全エクソーム解析を用いたアプローチが非常に有用な手法であることが予測された。今年度の解析の結果、X連鎖性家族性脳梁無形成症の原因遺伝子と推察される遺伝子Xを同定するに至り、原因不明の先天性中枢神経奇形症候群家系の原因遺伝子検索における全エクソーム解析の有用性を確認することができたと考えられる。

現在、標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析にコスト面では大きな差は無くなりつつあり、今後はこの両解析手法を目的に合わせて上手く使い分けて研究と臨床に活用していくことが、次世代シーケンシング法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の遺伝子研究の方向性であると考えられ、3年間の研究を通じてそれを明らかにすることに貢献できたと結論づける。

## E. 結論

全エクソーム解析法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子検索を本格的に実施し、標的遺伝子解析パネルでは同定困難な新規原因遺伝子同定に有用であることを明らかにした。今後は標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析法を上手く使い分けて研究と臨床に活用していくことが重要であることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shofuda T, Kanematsu D, Fukusumi H, Yamamoto A, Bamba Y, Yoshitatsu S, Suemizu H, Nakamura M, Sugimoto Y, Furue MK, Kohara A, Akamatsu W, Okada Y, Okano H, Yamasaki M, Kanemura Y: Human Decidua-Derived Mesenchymal Cells are a Promising Source for the Generation and Cell Banking of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Med* 4(3):125-147, 2013
- 2) Shofuda T, Fukusumi H, Kanematsu D, Yamamoto A, Yamasaki M, Arita N, Kanemura Y: A method for efficiently generating neurospheres from human-induced pluripotent stem cells using microsphere arrays. *Neuroreport* 24(2):84-90, 2013
- 3) Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D,

Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, Yamasaki M, Ohgushi M, Sasai Y, Kanemura Y: Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using Pericellular Matrix of Decidua derived Mesenchymal cells. *PLoS ONE* 8(1):e55226, 2013

- 4) Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S: Hypoplasia of the spinal cord in a case of fetal akinesia/arthrogryposis sequences. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39(4):441-444, 2013
- 5) Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S: Brain malformation with loss of normal FGFR3 expression in thanatophoric dysplasia type I. *Neuropathology* 33(6):663-666, 2013

### 2. 学会発表

- 1) 服部文子, 根岸 豊, 戸川貴夫, 宮 冬樹, 安藤直樹, 伊藤哲哉, 角田達彦, 金村米博, 山崎麻美, 小崎健次郎, 齋藤伸治: AKT3 遺伝子変異による巨脳症の一例. 第55回日本小児神経学会, 2013.6.1; 大分市
- 2) 芹川武大, 遠山 潤, 田澤立之, 西山健一, 後藤清恵, 栗山洋子, 生野寿史, 金村米博, 山崎麻美, 中田 光, 高桑好一, 榎本隆之: X連鎖性遺伝性水頭症の出生前診断. 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2013.6.21; 川崎市
- 3) Yamasaki M, Shofuda T, Harada A, Yamanaka T, Bamba Y, Nonaka M, Kanemura Y: Molecular Basis of Csf Space Anomaly. 15th World Congress of Neurosurgery, 2013.9.12; Seoul, Korea

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし