

# 幹細胞医療研究室

室長 正札智子

## 【概要】

幹細胞医療研究室では、ご理解をいただいた患者様の各種検体より、正常及び疾患ヒト iPS 細胞（人工多能性幹細胞）の作製と、神経幹細胞（神経系細胞を供給する能力を持つ幹細胞）への分化誘導を行い、再生医療や薬剤毒性評価系の構築に向けた技術開発研究と、疾患発症メカニズムの解析を実施しています。また、当センター脳神経外科及び再生医療研究室と共同で、グリオーマ腫瘍の遺伝子解析と新規腫瘍マーカーの探索を実施しています。

## 【研究テーマ】

### 1. ヒト iPS 細胞樹立と品質評価

iPS 細胞は、個々のクローンごとに腫瘍化のリスクや、分化の方向性と能力に大きな差があることが知られています。通常よく用いられる線維芽細胞のほか、胎盤組織由来細胞や血液細胞など、各種の細胞検体を使用して iPS 細胞を作製し、各種の特性解析を実施し、安全性や分化能の観点から品質評価を行っています。この評価は、iPS 細胞の再生医療応用を視野に入れ、治療用細胞の品質検査を目的とした評価項目の策定を進めています。

### 2. ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の作製と培養法の検討

神経幹細胞は、自己増殖能と神経系細胞に特化した分化能を保持しながら、長期に維持・培養することができるため、再生医療研究や創薬研究での有用性が高い細胞です。iPS 細胞から神経幹細胞を誘導し、医療応用や神経毒性評価系の構築を目指し、iPS 細胞、及び iPS 細胞由来神経幹細胞の品質評価方法の策定と、より効率的な分化誘導法の研究・開発を実施しています。またこれらの研究から得た知見は、難治性脳形成障害症などの神経疾患 iPS 細胞の作製と神経幹細胞への誘導にも適用し、発症メカニズムの解明を進めています。

### 3. グリオーマ患者の摘出手術検体の遺伝子解析と新規腫瘍マーカーの探索

大阪医療センター及び近隣施設のグリオーマ患者様よりご提供いただいた摘出腫瘍組織を用い、発症原因や予後との関連が示唆されている遺伝子を検査し、遺伝子変異や異常分子の検出を行い、診断や治療方針の参考にして戴いています。また腫瘍組織から樹立し、長期培養に成功したグリオーマ由来細胞の生物学的特性解析を行い、iPS 細胞由来神経幹細胞の腫瘍化リスクの指標となるマーカーの探索を実施しています。

【2014 年度研究発表業績】

**A-0**

Bamba Y, Shofuda T, Kanematsu D, Nonaka M, Yamasaki M, Okano H, Kanemura Y.  
Differentiation, polarization, and migration of human induced pluripotent stem cell-derived  
neural progenitor cells co-cultured with a human glial cell line with radial glial-like  
characteristics. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 447(4):683-688 (2014 年 5 月)

Okita Y, Nonaka M, Shofuda T, Kanematsu D, Yoshioka E, Kodama Y, Mano M, Nakajima S,  
Kanemura Y. (11)C-methinine uptake correlates with MGMT promoter methylation in  
nonenhancing gliomas. *Clin Neurol Neurosurg* 2014; 125:212-216 (2014 年 10 月)

Yamada S, Okita Y, Shofuda T, Yoshioka E, Nonaka M, Mori K, Nakajima S, Kanemura Y.  
Ipsilateral hemiparesis caused by putaminal hemorrhage in a patient with horizontal gaze palsy  
with progressive scoliosis: a case report. *BMC Neurology* 2015; 15:25 (2015 年 3 月)

**A-4**

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：髄芽腫，上衣腫「小児の脳神経」38(4):333-  
339、2014 年 6 月

**B-2**

Kanemura Y, Ichimura K, Shofuda T, Nishikawa R, Yamasaki M, Shibui S, Arai H:  
Establishment of a nationwide molecular diagnostic network for pediatric malignant brain  
tumors in Japan. 16th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology, Singapore, 2014  
年 6 月

Kanemura Y, Ichimura K, Shofuda T, Nishikawa R, Yamasaki M, Taylor MD, Arai H, Shibui  
S: Japanese Pediatric Molecular Neuro-oncology Group (JPMNG): establishment of a  
nationwide molecular diagnostic network for pediatric malignant brain tumors in Japan. 19th  
Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, Miami, FL,  
USA, 2014 年 11 月

Sato K, Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Kanemura Y, Shofuda T, Fukusumi H, Okada Y,  
Okano H, Shirao T, Sekino Y: An attempt to establish non-clinical experiments for nervous  
system using human iPSC-driven neurons. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on  
Bioscience iPSC Cells for Regenerative Medicine. Osaka, Japan 2015 年 1 月

### B-3

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：日本小児分子脳腫瘍グループ：小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築。1. 髄芽腫、上衣腫。第 32 回日本脳腫瘍病理学会、徳島、2014 年 5 月

### B-4

深井順也、上松右二、金村米博、正札智子、吉岡絵麻、藤田浩二、中尾直之：ラブドイド・グリオブラストーマの臨床・病理学的検討：自験例報告と文献的考察。第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、千葉、2014 年 11 月

沖田典子、埜中正博、正札智子、兼松大介、吉岡絵麻、児玉良典、眞野正幸、中島伸、金村米博：非造影神経膠腫における 11C-methionine PET での MGMT プロモーターメチル化率の予測。第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、千葉、2014 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：日本小児分子脳腫瘍グループ：全国レベルでの小児頭蓋内悪性腫瘍の分子診断体制の構築。第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、千葉、2014 年 12 月

福岡講平、福島慎太郎、山下 聡、正札智子、中村大志、山崎夏維、高見浩数、松下裕子、牛島俊和、成田善孝、金村米博、山崎麻美、渋井壮一郎、新井 一、西川 亮、市村幸一：上衣腫のメチル化解析による分子遺伝学的分類。第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、千葉、2014 年 12 月

佐藤 薫、高橋華奈子、重本一最上由香里、金村米博、正札智子、福角勇人、岡田洋平、岡野栄之、白尾智明、関野祐子：ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた薬理評価系確立の試み。第 88 回日本薬理学会年会、名古屋、2015 年 3 月

木村康義、金村米博、小田昌朗、中森雅之、正札智子、仲野 徹、望月秀樹：  
CRISPR/Cas9 システムを用いたヒト iPS 細胞への抗腫瘍自殺遺伝子の導入。第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月

福角勇人、正札智子、兼松大介、山本篤世、山崎麻美、金村米博：神経分化指向性の劣るヒト iPS 細胞を用いた神経前駆細胞誘導法の検討。第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月

正札智子、半田有佳子、稲澤佑衣、山本篤世、兼松大介、吉岡絵麻、福角勇人、隅田美穂、馬場庸平、金村米博：ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた神経毒性評価系の構築。第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月

高橋華奈子、最上（重本）由香里、中條かおり、干川和枝、金村米博、正札智子、福角勇人、岡田洋平、岡野栄之、白尾智明、関野祐子、佐藤 薫：ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞の非臨床試験への応用の試み。第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実績報告書（研究実績報告書）

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 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 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細胞の特性解析  
 神経接着因子L1CAMにミスセンス変異 (Exon16, c. 2135C>T, p. Arg712Val: フィブロネクチン様リピード (III 型) のdomain1と2の境界)を持つヒト線維芽細胞より、疾患iPS細胞の作成を行った。コロニー形態や免疫染色等でスクリーニングを行い、解析対象として5クローンを樹立した。各クローンよりゲノムDNAを抽出し、遺伝子変異を持つことを確認した。これらのiPS細胞クローンの自己増殖能やES細胞マーカー発現に、正常コントロールとの差は見られなかった。また、先に樹立し、in vitro分化能を確認済のL1CAM変異iPS細胞（膜貫通ドメイン以下のC末端が欠損するClass III変異）2株（ナンセンス変異 c. 2250C>A, p. Tyr750Stop と、スプライドナー部位変異 c. 400+5G>A によるフレームシフト変異）について、実験動物中央研究所において奇形腫形成を実施し、in vivoでも三胚様分化能を持つことが確認された。

(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  
 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、神経分化を誘導し、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て神経前駆細胞を作成した。接着因子であるL1CAM遺伝子の変異が、細胞遊走能に与える影響をボイデンチャンパー法で検討した。同様の方法で作成した正常コントロールと比較したところ、L1CAM変異により、細胞遊走能は10-20%に低下していることが明らかとなった。この結果より、遺伝子変異の表現型を再現することに成功した。

10. キーワード

- |                        |                       |           |           |
|------------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| (1) 細胞・組織              | (2) 神経科学              | (3) 脳神経疾患 | (4) 発生・分化 |
| (5) L1CAM Class III 変異 | (6) 疾患ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞 | (7)       | (8)       |

## 11.研究発表

〔雑誌論文〕 計(2)件 うち査読付論文 計(2)件 (最終年度分)

著者名		論文標題			
Bamba Y, Shofuda T, Kanematsu D, Nonaka M, Yamasaki M, Okano H, Kanemura Y.		Differentiation, polarization, and migration of human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells co-cultured with a human glial cell line with radial glial-like characteristics.			
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Biochem Biophys Res Commun		有	447	2 0 1 4	683-688
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1016/j.bbrc.2014.04.070					

著者名		論文標題			
Yamada S, Okita Y, Shofuda T, Yoshioka E, Nonaka M, Mori K, Nakajima S, Kanemura Y.		Ipsilateral hemiparesis caused by putaminal hemorrhage in a patient with horizontal gaze palsy with progressive scoliosis: a case report.			
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
BMC Neurology		有	15	2 0 1 5	25
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1186/s12883-015-0286-4					

〔学会発表〕 計(3)件 うち招待講演 計(0)件 (最終年度分)

発表者名		発表標題	
Sato K, Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Kanemura Y, Shofuda T, Fukusumi H, Okada Y, Okano H, Shirao T, Sekino Y.		An attempt to establish non-clinical experiments for nervous system using human iPSC-driven neurons.	
学会等名		発表年月日	発表場所
The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience iPS Cells for Regenerative Medicine		2015年01月15日～2015年01月17日	Suita, Osaka



[取得] 計(0)件 (最終年度分)

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	

13.備考

--