

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。

【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)

Serikawa T, Nishiyama K, Tohyama J, Tazawa R, Goto K, Kuriyama Y, Haino K, Kanemura Y, Yamasaki M, Nakata K, Takakuwa K, Enomoto T. Prenatal molecular diagnosis of X-linked hydrocephalus via a silent C924T mutation in the L1CAM gene. *Congenit Anom (Kyoto)* 2014; 54:243-245 (2014年11月)

Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Yanagihara K, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K. KIF1A mutation in a patient with progressive neurodegeneration. *J Hum Genet* 2014; 59(11):639-641 (2014年11月)

Negishi Y, Miya F, Hattori A, Mizuno K, Hori I, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Truncating mutation in NFIA causes brain malformation and urinary tract defects. *Human Genome Variation* 2015; 2:15007 (2015年2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)

Harada A, Miya F, Utsunomiya H, Kato M, Yamanaka T, Tsunoda T, Kosaki K, Kanemura Y, Yamasaki M. Sudden death in a case of megalencephaly capillary malformation associated with a de novo mutation in AKT3. *Childs Nerv Syst* 2015; 31(3):465-471 (2015年3月)

Miya F, Kato M, Shiohama T, Okamoto N, Saitoh S, Yamasaki M, Shigemizu D, Abe T, Morizono T, Boroevich KA, Kosaki K, Kanemura Y, Tsunoda T. A combination of targeted enrichment methodologies for whole-exome sequencing reveals novel pathogenic mutations. *Sci Rep* 2015; 5:9331 (2015年3月)

A-2

山崎麻美、金村米博：X連鎖性遺伝性水頭症「日本臨牀 別冊 神経症候群（第2版）IV－その他の神経疾患を含めて－」pp.466-499、日本臨牀社、大阪、2014年9月

金村米博：小児疾患と iPS 細胞－神経・筋疾患の治療法開発への応用可能性「小児内科 第46巻増刊号 小児疾患診療のための病態生理1 改訂第5版」『小児内科』『小児外科』編集委員会共編、pp.26-32、東京医学社、東京、2014年11月

金村米博：幹細胞移植「再生医療用語ハンドブック」日本再生医療学会監修、pp.161-162、メディカルトリビューン、東京、2015年3月

A-3

佐々木貴浩、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大脳半球神経膠芽腫の小児例「Neuro-Oncology の進歩」21(2):27-30、2014年9月

A-4

金村米博：悪性グリオーマ治療における免疫療法の進歩「医学のあゆみ」293(3):267-269、2014年4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：髄芽腫，上衣腫「小児の脳神経」38(4):333-339、2014年6月

A-6

馬場庸平、金村米博：二分脊椎「脳科学辞典」<http://bsd.neuroinf.jp>、<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/二分脊椎>、2015年1月

佐々木奈都、金村米博：二分頭蓋「脳科学辞典」<http://bsd.neuroinf.jp>、<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/二分頭蓋>、2015年2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

Negishi Y, Hattori A, Hori I, Ando N, Miya F, Tsunoda T, Okamoto N, Kato M, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S: Truncating mutation of NFIA causes a brain malformation and urinary tract defect. ASHG 2014 Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2014年10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 iPS Cells for Regenerative Medicine. Osaka, Japan 2015 年 1 月

B-3

金村米博：髄芽腫分子遺伝学的診断。第 34 回日本脳神経外科コンgres総会、大阪、2014 年 5 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：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

金村米博：先天性水頭症の分子遺伝学的診断法。第 7 回日本水頭症脳脊髄液学会、東京、2014 年 10 月

B-4

金村米博：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遺伝子診断体制の構築。一般社団法人日本脳神経外科学会第 73 回学術総会、東京、2014 年 10 月

岡本伸彦、宮 冬樹、角田達彦、加藤光広、齊藤伸治、山崎麻美、金村米博、小崎健次郎：進行性小脳萎縮を伴う新規神経変性症における KIF1A 変異。日本人類遺伝学会第 59 回大会、東京、2014 年 11 月

原田敦子、宮 冬樹、金村米博、山中 巧、吉川大和、宇都宮英綱、埜中正博、岡本伸彦、角田達彦、加藤光広、齊藤伸治、小崎健次郎：難治性シヤント機能不全を呈した Dandy-Walker malformation における PLG 遺伝子変異。日本人類遺伝学会第 59 回大会、東京、2014 年 11 月

根岸 豊、服部文子、堀いくみ、安藤直樹、水野健太郎、宮 冬樹、角田達彦、岡本伸彦、加藤光広、山崎麻美、金村米博、小崎健次郎：NFIA 遺伝子変異は 1p32-p31 欠失症候群の中核症状を規定する。日本人類遺伝学会第 59 回大会、東京、2014 年 11 月

宮 冬樹、加藤光広、塩浜 直、岡本伸彦、齊藤伸治、山崎麻美、阿部哲雄、森園 隆、Boroevich KA、秋山真太郎、久保充明、小崎健次郎、金村米博、角田達彦：複合ターゲットエンリッチメント法による exome 解析と疾患原因変異の同定。日本人類遺伝学会第 59 回大会、東京、2014 年 11 月

原田敦子、山中 巧、加藤光広、宇都宮英綱、金村米博、山崎麻美：突然死を来した巨脳症の一例。第 32 回日本こども病院神経外科医会、静岡、2014 年 11 月

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

梅原 徹、沖田典子、埜中正博、中西克彦、金村米博、中島 伸：髄腔内播種を来した再発性膠芽腫に対して Bevacizumab が効果を示した一例。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、澁井壮一郎、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

B-6

梅原 徹、埜中正博、森 康輔、宮崎裕子、沖田典子、金村米博、山中一功、児玉良典、中島 伸：脳室内出血を契機に甲状腺濾胞癌の脳室内転移と診断された一例。第 67 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会・第 69 回近畿脊髄外科研究会、大阪、2014 年 4 月

山田修平、沖田典子、金村米博、森 康輔、梅原 徹、中西克彦、黒田淳子、埜中正博、山中一功、中島 伸：被殻出血による上下肢不全麻痺が同側に出現した HGPPS の 1 例。第 68 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会、大阪、2014 年 9 月

友渕匡紀、深井順也、北山真理、西岡和哉、藤田浩二、金村米博、上松右二、中尾直之：大脳膠腫症の進展・再発：脊髄播種した一例。第 68 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会、大阪、2014 年 9 月

B-8

金村米博：細胞治療の実用化に向けての取り組みー細胞免疫療法及び iPS 細胞を用いた再生医療の実用化に向けてー。肺がんセミナー、福岡、2014 年 6 月

金村米博：iPS 細胞を応用した脳梗塞治療法の開発研究ー大阪医療センターでの取り組みー。法円坂地域医療フォーラム、大阪、2014 年 6 月

金村米博：脳腫瘍の遺伝子診断研究の現状とその臨床的意義。第 5 回脳腫瘍患者と患者家族のための勉強会 in 関西、大阪、2014 年 7 月

金村米博：ヒト iPS 細胞の効率的神経分化誘導法と in vitro 安全性薬理試験への応用。第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム、東京、2014 年 12 月

金村米博：ヒト iPS 細胞の効率的神経分化誘導法の開発と神経再生治療への応用。第 1 回再生医療とリハビリテーション研究会、広島、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 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 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 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

合計56検体のグリオーマ腫瘍組織（grade 4：48例、grade 3：4例、grade 2：4例）から無血清培地を用いたneurosphere法を使用して培養細胞樹立を実施した。その結果、初代sphereが形成された後、数継代以内に維持培養が困難となった腫瘍細胞凝集塊（SC-TS）は41株（樹立成功率：73.2%）、長期培養可能な腫瘍細胞凝集塊（LC-TS）は11株（樹立成功率：11%）、各々樹立された。腫瘍組織gradeとSC-TSおよびLC-TCとの関連性の検討では、SC-TSおよびLC-TCの樹立成功率はそれぞれ、grade 4（75%、22.9%）、grade 3（100%、0%）、grade 2（25%、0%）で、SC-TSはgrade 4および3の腫瘍からは高率に樹立可能であるが、LC-TCは全例grade 4腫瘍からの樹立に限定され、grade 4でも初発例より再発腫瘍および2次性腫瘍でより樹立成功率が高い傾向が示唆された。LC-TC樹立成功率と分子遺伝学的特性との関連性の検討では、野生型IDH1/2、野生型TP53、TERTプロモーター変異、MGMTプロモーター低メチル化、の特性を有する腫瘍からLC-TCが樹立される割合が高い傾向が明らかになった。また、抗原Xを有する腫瘍からはLC-TCが樹立される割合が高い傾向が示唆された。これら同定された分子特性がLC-TS樹立に関与するマーカーになり得る可能性が示唆され、グリオーマ幹細胞の生存・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分子であると結論づけられた。

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.研究発表

〔雑誌論文〕 計(5)件 うち査読付論文 計(4)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			
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.			
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Clin Neurol Neurosurg		有	125	2 0 1 4	212-216
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1016/j.clineuro.2014.08.004					

著者名		論文標題			
金村米博		悪性グリオーマ治療における免疫療法の進歩			
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
医学のあゆみ		無	249	2 0 1 4	267-269
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
なし					

著者名		論文標題			
金村米博, 正礼智子, 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			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
小児の脳神経	有	38	2 0 1 4	333-339	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
なし					

著者名		論文標題			
佐々木貴浩, 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大脳半球神経膠芽腫の小児例			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Neuro-Oncologyの進歩	有	21	2 0 1 4	27-30	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.11452/neurooncology.21.2.27					

[学会発表] 計(14)件のうち招待講演 計(1)件 (最終年度分)

発表者名		発表標題	
梅原 徹, 埜中正博, 森 康輔, 宮崎裕子, 沖田典子, 金村米博, 山中一功, 児玉良典, 中島 伸		脳室内出血を契機に甲状腺濾胞癌の脳室内転移と診断された一例	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第67回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会・第69回近畿脊髄外科研究会	2014年04月05日～2014年04月05日	豊中市	

発表者名		発表標題	
金村米博		髄芽腫分子遺伝学的診断	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第34回日本脳神経外科コンgres総会	2014年05月18日～2014年05月18日	大阪市	

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	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	
学会等名	発表年月日	発表場所
第32回日本脳腫瘍病理学会	2014年05月24日～2014年05月24日	徳島市

発表者名	発表標題	
金村米博	細胞治療の実用化に向けての取り組みー細胞免疫療法及びiPS細胞を用いた再生医療の実用化に向けてー	
学会等名	発表年月日	発表場所
肺がんセミナー(招待講演)	2014年06月20日～2014年06月20日	福岡市

発表者名	発表標題	
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.	
学会等名	発表年月日	発表場所
16th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology	2014年06月30日～2014年07月01日	Singapore

発表者名	発表標題	
金村米博	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
第5回脳腫瘍患者と患者家族のための勉強会in関西	2014年07月19日～2014年07月19日	大阪市北区

発表者名		発表標題	
友刈匡紀, 深井順也, 北山真理, 西岡和哉, 藤田浩二, 金村米博, 上松右二, 中尾直之		大脳膠腫症の進展・再発: 脊髄播種した一例	
学会等名		発表年月日	発表場所
第68回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会		2014年09月06日～2014年09月06日	豊中市

発表者名		発表標題	
金村米博		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遺伝子診断体制の構築	
学会等名		発表年月日	発表場所
一般社団法人日本脳神経外科学会第73回学術総会		2014年10月10日～2014年10月10日	東京都港区

発表者名		発表標題	
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.	
学会等名		発表年月日	発表場所
19th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology		2014年11月14日～2014年11月14日	Miami, FL, USA

発表者名		発表標題	
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	
学会等名		発表年月日	発表場所
第32回日本脳腫瘍学会学術集会		2014年11月30日～2014年11月30日	浦安市

発表者名	発表標題	
梅原 徹, 沖田典子, 桒中正博, 中西克彦, 金村米博, 中島 伸	髄腔内播種を来たした再発性膠芽腫に対してBevacizumabが効果を示した一例	
学会等名	発表年月日	発表場所
第32回日本脳腫瘍学会学術集会	2014年11月30日～2014年11月30日	浦安市

発表者名	発表標題	
沖田典子, 桒中正博, 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	
学会等名	発表年月日	発表場所
第32回日本脳腫瘍学会学術集会	2014年12月01日～2014年12月01日	浦安市

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	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	
学会等名	発表年月日	発表場所
第32回日本脳腫瘍学会学術集会	2014年12月01日～2014年12月01日	浦安市

発表者名	発表標題	
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	
学会等名	発表年月日	発表場所
第32回日本脳腫瘍学会学術集会	2014年12月01日～2014年12月01日	浦安市

〔図書〕 計(0)件 (最終年度分)

著者名		出版社		
書名		発行年	総ページ数	
		年 月 日		

12.研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 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	出願年月日	国内・外国の別

〔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

(2) 研究の実績の説明

研究項目①：ヒトiPS細胞からの神経前駆細胞製造・管理工程の確立

【達成目標】

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3工程（凍結保管工程）および最終工程（治療用細胞準備工程）の最適化を実施する。

【研究方法】

平成25年度「iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷（亜急性期）に対する前臨床研究と臨床研究の開始」の項目で実施された検討結果を受け、凍結保存液、凍結方法、および凍結細胞の保管法の最適化を行い、GMP対応を実施する。同時に、凍結保管細胞を一定期間経過毎に順次、解凍・再培養を行い、その*in vitro*細胞品質の同一性・安定性を評価し、凍結保管における細胞の長期安定性及びその品質保証可能期間を検証する。最終工程は凍結細胞の解凍法とその後の細胞調製手法（培地、培養期間、培養法等）の検討を行い、複数の手法の中から最も細胞へのダメージの少ない手法を見出し、その最適化を実施する。また、培養終了後の最終製品を生細胞状態で一定期間保存し、安定的に輸送するための輸送用培地、輸送条件とその手法を検討する。

【成果の概要】

1) iPS細胞凍結保存試験の実施

標準操作手順書（SOP）に従って、京都大学iPS細胞研究所（以下、CiRA）から提供されたiPS細胞2株（1210B2および1231A3）を凍結し、3ヶ月後に解凍・再培養を行い、その品質試験（核型解析、表面抗原マーカー解析、遺伝子発現解析）を実施し、*in vitro*細胞品質の同一性・安定性の評価を実施した。

2) iPS細胞由来神経前駆細胞の凍結保管法、解凍・再培養の最適化

iPS細胞由来神経前駆細胞（1210B2およびFf-I01由来）の凍結解凍操作による生存率と、凍結時細胞数までに回復するために必要な解凍後培養時間を検討した。また、iPS細胞由来神経前駆細胞の凍結時細胞数減少を改善させる手法の開発として、解凍後の再培養時に用いる培養液の組成、凍結工程・解凍工程時の添加剤使用の有用性を検証した。

研究項目②：ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の品質評価項目の確定

【達成目標】

ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の品質評価項目と最終製品（移植用細胞）の暫定的品質規格値を設定する

【研究方法】

平成25年度に検討した各種試験項目および、別途、「iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷（亜急性期）に対する前臨床研究と臨床研究の開始」の項目で平成25-26年度に実施される*in vivo*での安全性評価試験の結果を合わせて、再生医療用細胞の品質評価に必要な品質評価項目を抽出し、それらを用いてヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の暫定的品質規格を策定する。同時に使用する各品質評価解析手法の確定を行う。

【成果の概要】

試験用細胞としてCiRAから提供された3クローン（1210B2, 1231A3, 1201C1）のiPS細胞を主に用いて、以下の検査手法の検討とその最適化を実施した。

1. 細胞数計測法

①トリパンブルー染色法+目視計測法、②トリパンブルー染色法+自動機械計測法③PI染色法+自動機械計測法、の3手法に関して、細胞計測手法の違いによる計測結果のばらつき、複数作業員間における誤差を評価し、品質評価解析手法としての適性と最適な手法の選定を実施した。

2. 細胞増殖曲線（倍加速度）評価法

生細胞ATP計測法を用いて、ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の増殖速度を測定し、細胞増殖曲線の作成および細胞倍加時間の算出手法を開発し、品質評価解析手法としての適性とその暫定

的品質規格値を検討した。

3. 細胞周期評価法

PI染色法とフローサイトメーター解析を用いて、ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の細胞周期評価手法を開発し、品質評価解析手法としての適性とその暫定的品質規格値を検討した。

4. 表面抗原マーカー発現解析法

iPS細胞マーカー（TRA1-60）および神経前駆細胞マーカー（PSA-NCAM、ABCB1）の発現をフローサイトメーター解析する手法を開発し、品質評価解析手法としての適性とその暫定的品質規格値を検討した。

5. 染色体核型解析法

ギムザ染色解析およびGバンド染色解析法を用いて、ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の染色体核型解析法を開発し、品質評価解析手法としての適性とその暫定的品質規格値を検討した。

6. 体細胞コピー数解析法

マイクロアレイ（Affymetrix社CytoScan HD Array）を用い、iPS細胞/神経前駆細胞最終製品の2セット解析を基本として体細胞コピー数解析を行う手法を開発し、品質評価解析手法としての適性とその暫定的品質規格値を検討した。

7. 遺伝子発現解析法

Real Time PCR法、マイクロアレイ法（Affymetrix社Human Genome U133 Plus 2.0 Array）およびNanostring法を用いた遺伝子解析手法の有用性を各々検討し、品質評価解析手法としての適性とその暫定的品質規格値を検討した。

8. DNAメチル化解析法

マイクロアレイ法（illumina社HumanMethylation450 BeadChip）を用い、iPS細胞および神経前駆細胞のゲノムDNAメチル化解析を実施し、品質評価解析手法への導入の妥当性を検討した。

9. 細胞分化能解析法

神経前駆細胞の分化能評価手法として、一定期間の接着培養後の分化細胞を用いて、細胞免疫染色法を用いた定性的評価法（神経細胞/グリア系細胞への分化能評価）、定量的評価法（神経細胞マーカー陽性細胞数）、および細胞分化関連遺伝子発現解析法を組み合わせた評価手法を開発し、品質評価解析手法としての適性とその暫定的品質規格値を検討した。

研究項目③：ドラフト標準操作手順書（SOP）の作成

【達成目標】

ヒトiPS細胞からの神経前駆細胞製造・管理工程に使用するドラフトSOPの作成を実施する。

【研究方法】

ヒトiPS細胞からの神経前駆細胞製造に使用する各種資材の規格設定、製造時工程管理値を設定し、慶應義塾大学と連携して各製造工程のドラフトSOPを作成する。併行し、各種品質評価法の実施プロトコルを確立し、そのドラフトSOPを作成する。

【成果の概要】

1. 製造工程に関わるドラフトSOP作成

iPS細胞の増幅工程に使用するドラフトSOPを作成し、セルプロセッシングセンター（CPC）内での培養実施体制を構築した。ヒトiPS細胞からの神経前駆細胞製造に使用する各種資材の規格設定を行い、ドラフトSOP作成に着手した。

2. 品質管理工程に関わるドラフトSOP作成

細胞数計測法、細胞増殖曲線（倍加速度）評価法、細胞周期評価法、表面抗原マーカー発現解析法、染色体核型解析法、体細胞コピー数解析法、遺伝子発現解析法、細胞分化能解析法に関して、検査実施時期、検査検体量、検査結果判定値（暫定基準）を各々策定し、ドラフトSOP作成に着手した。

研究項目④：GMP準拠ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞製造のプロセスバリデーション開始

【達成目標】

ヒトiPS細胞からの神経前駆細胞製造・管理工程に使用するドラフトSOPの作成を実施する。

【研究方法】

研究項目②で確定された品質評価項目による暫定的品質規格を安定的に達成できるように、研究項目③で作成する各工程のドラフトSOPを用いて、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）内でヒトiPS細胞からの神経前駆細胞の製造とその増幅培養を実践するプロセスバリデーションを実施し、製造工程の各SOPの妥当性と問題点を検証する。製造したiPS細胞由来神経前駆細胞の安全性試験、品質管理基準の策定、品質評価を行い、その結果に基づき、最終的にGMP準拠でのヒトiPS細胞由来神経幹細胞製造方法を確立させる。それら結果を基に、iPS細胞由来神経前駆細胞の製品標準書作成を開始する。

【成果の概要】

1) CPC内でのiPS細胞培養のプロセスバリデーション

CPC内に設置されたバイオハザード対策用キャビネットおよびアイソレータ（CPWS）の両システムを用いて、製造工程に関わるドラフトSOPに従いヒトiPS細胞の凍結解凍および2継代を含む増幅培養過程を経て細胞凍結保存を実施し、作業工程のプロセスバリデーションを実施した。

品質検査に関しては、培養後細胞を検査対象として、品質管理工程に関わるドラフトSOPに従い、品質試験（iPS細胞内マーカー発現解析、iPS表面抗原マーカーの発現解析、染色体核型解析、遺伝子発現解析）を実施し、CPCで製造したiPS細胞の品質を確認すると同時に、作業工程のプロセスバリデーションを実施した。また、無菌試験、エンドトキシン測定試験を実施し、製造工程の無菌性を検討した。

2) プロトコールA法を用いたHLAホモiPS細胞の分化誘導試験

CiRAから提供されたHLAホモiPS細胞6クローン（SNL細胞2クローン：SNL-J04, SNL-J06, Ff細胞4クローン：Ff-I01, Ff-I06, Ff-I07, Ff-I14）を使用して、前項までに検討を行った製造手法ならびに品質検査法を用いて、iPS細胞由来神経前駆細胞製造・品質管理工程のプロセスバリデーションを行うと同時に、臨床使用に最適なHLAホモiPS細胞の選定を実施した。

繰越
報告書
実績

平成27年4月3日

国立研究開発法人日本医療研究開発機構
契約担当職
理事長 末松 誠 殿

住 所 大阪府大阪市中央区法円坂二丁目1番14号
大学・企業名等 独立行政法人国立病院機構
大阪医療センター
契約代表者氏名 院長 楠岡 英雄 印

平成26年4月1日付委託研究契約に基づく下記委託業務に係る平成26年4月1日から平成27年3月31日までにおける実績を委託研究契約書（~~第10条~~・第11条）の規定により、下記のとおり報告します。

記

1 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. ヒト神経幹細胞の薬物毒性評価に使用可能なマスター遺伝子群の決定に関する研究

4年間の研究成果である種々の薬物毒性情報を基に、ヒト神経幹細胞の薬物毒性に強く関連するマスター遺伝子候補を同定する。具体的には、抗がん剤および抗けいれん剤を主たる評価対象として、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化合物が遺伝子発現に及ぼす影響から毒性関連マスター遺伝子群を同定し、それら遺伝子群の関連する遺伝子パスウェイを同定する。その中で、機能的に重要と想定される遺伝子に関して、分子生物学的手法を用いてその機能獲得系あるいは機能喪失系を構築し、マスター遺伝子候補のヒト神経幹細胞における薬物毒性発現における役割を検証する。解析結果を基に、ヒト神経幹細胞の薬物毒性評価を実施する際のマスター遺伝子群を決定する。さらに25年度に継続して、樹立済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。

(3) 委託業務の成果の概要

1. ヒト神経幹細胞の薬物毒性評価に使用可能なマスター遺伝子群の決定に関する研究

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から回収した転写産物(mRNA)を用いた網羅的遺伝子発現解析結果から、幹細胞特性、DNA修復、がん細胞特性等に関連する遺伝子群に焦点を当て、異なる薬剤の毒性で共通に発現上昇する遺伝子群の抽出を行

い、ヒト神経幹細胞の薬物毒性に関与するマスター遺伝子候補を同定した。

薬物毒性関与マスター遺伝子候補のヒト神経幹細胞における薬物毒性発現における役割の検証として、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を用いた遺伝子発現抑制系を用いて、2種類の候補遺伝子のヒト神経幹細胞における薬物毒性発現における役割を解析した。

(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

【論文】

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* 447(4):683-688, 2014

【学会発表】

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 iPS Cells for Regenerative Medicine. 2015. 1. 15-17; Suita, Osaka

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, 2015. 3. 18-20, 名古屋市

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, 2015. 3. 20; 横浜市

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, 2015. 3. 20; 横浜市

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, 2015. 3. 21; 横浜市

【講演】

金村米博: ヒトiPS細胞の効率的神経分化誘導法とin vitro安全性薬理試験への応用. 第11回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム「ヒトiPS細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて」, 2014. 12. 9; 東京都渋谷区

金村米博: ヒトiPS細胞の効率的神経分化誘導法の開発と神経再生治療への応用. 第1回再生医療とリハビリテーション研究会, 2015. 3. 14; 広島市

(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

2 委託費の使用状況

別紙のとおり

平成26年度厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究委託事業）
「小児脳腫瘍に対する多施設共同研究による治療開発」

研究分担者：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

業務結果説明書

1. 業務の実績

(1) 業務の実施日程

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
遺伝子解析		←										→

(2) 業務の実績の説明

【成果の目標】

小児脳腫瘍の中で髄芽腫の分子遺伝学的診断法を構築する。

【研究の方法】

髄芽腫を対象に、凍結組織試料あるいはホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE）組織試料から抽出されたDNA試料を用いて、キャピラリーシーケンサーによるサンガーシーケンス法にてβ-カテニン（CTNNB1: exon 3）、TP53遺伝子（exon 2-exon 11）、TERT promoter（C228およびC250）の塩基配列解析を実施した。同様に腫瘍組織試料から抽出されたRNA試料を用いて、Northcott らの手法（Acta Neuropathol 123, 615, 2012）を用いて遺伝子発現解析に基づく4分子亜群分類を実施した。

【成果の概要】

塩基配列解析においては、サンガーシーケンス法を用いたCTNNB1、TP53、TERT promoterの解析体制を確立した。また、凍結組織試料およびFFPE組織試料のいずれを用いても、遺伝子発現解析に基づく髄芽腫の4分子亜群分類が可能であることを確認し、その実施体制を構築した。