

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。

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。

【2015年度 研究発表業績】

A-0

Okita Y, Nonaka M, Umehara T, Kanemura Y, Kodama Y, Mano M, Nakajima S. Efficacy of temozolomide and bevacizumab for leptomeningeal dissemination of recurrent glioblastoma. *Oncol Lett* 2015; 9(4):1885-1888、2015年4月

Umehara T, Okita Y, Nonaka M, Mori K, Kanemura Y, Kodama Y, Mano M, Kudawara I, Nakajima S: Choroid Plexus Metastasis of Follicular Thyroid Carcinoma Diagnosed due to Intraventricular Hemorrhage. Intern Med 2015; 54(10):1297-1302、2015年5月15日

Nakamura K, Inui T, Miya F, Kanemura Y, Okamoto N, Saitoh S, Yamasaki M, Tsunoda T, Kosaki K, Tanaka S, Kato M: Primary Microcephaly With Anterior Predominant Pachygyria Caused by Novel Compound Heterozygous Mutations in ASPM. Pediatr Neurol 2015; 52(5):e7-8、2015年5月

Takami H, Fukushima S, Fukuoka K, Suzuki T, Yanagisawa T, Matsushita Y, Nakamura T, Arita H, Mukasa A, Saito N, Kanamori M, Kumabe T, Tominaga T, Kobayashi K, Nagane M, Iuchi T, Tamura K, Maehara T, Sugiyama K, Nakada M, Kanemura Y, Nonaka M, Yokogami K, Takeshima H, Narita Y, Shibui S, Nakazato Y, Nishikawa R, Ichimura K, Matsunami M: Human chorionic gonadotropin is expressed virtually in all intracranial germ cell tumors. J Neurooncol 2015; 124(1):23-32、2015年8月

Yamasaki M, Kanemura Y: Molecular Biology of Pediatric Hydrocephalus and Hydrocephalus-related Diseases. Neurol Med Chir (Tokyo) 2015; 55(8):640-646、2015年8月

Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Shimizu A, Torii C, Kanemura Y, Kosaki K: Targeted next-generation sequencing in the diagnosis of neurodevelopmental disorders. Clin Genet 2015; 88(3):288-292、2015年9月

Yokoi S, Ishihara N, Miya F, Tsutsumi M, Yanagihara I, Fujita N, Yamamoto H, Kato M, Okamoto N, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Kojima S, Saitoh S, Kurahashi H, Natsume J: TUBA1A mutation can cause a hydranencephaly-like severe form of cortical dysgenesis. Sci Rep 2015; 5:15165、2015年10月23日

Takano K, Kinoshita M, Arita H, Okita Y, Chiba Y, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Kanemura Y, Nonaka M, Nakajima S, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T: Diagnostic and Prognostic Value of 11C-Methionine PET for Nonenhancing Gliomas. AJNR Am J Neuroradiol 2016; 37(1):44-50、2016年1月

A-2

金村米博：遺伝子レベルからみた小児脳腫瘍の分類・予後因子「小児脳神経外科学 改訂2版」山崎麻美、坂本博昭 編集、P.514-521、金芳堂、京都、2015年10月1日

A-3

金村米博、市村幸一、正札智子、山崎麻美、渋谷壮一郎、新井 一、西川 亮：髄芽腫の分子遺伝学的診断とその標準化「脳神経外科ジャーナル」24(7):P.436-444、三輪書店、2015年6月20日

A-4

山崎麻美、正札智子、金村米博：X連鎖性遺伝性水頭症「Clinical Neuroscience」33:P.414-417、

中外医学社、2015年4月1日

B-1

Ichimura K, Fukushima S, Totoki Y, Yamashita S, Matsushita Y, Otsuka A, Tomiyama A, Niwa T, Nakamura H, Kato M, Sakai R, Ushijima T, Nakamura T, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Mishima K, Nakazato Y, Hosoda F, Narita Y, Shibui S, Yoshida A, Takami H, Mukasa T, Aihara K, Saito N, Kumabe T, Kanamori M, Tominaga T, Kobayashi K, Shimizu S, Nagane M, Iuchi T, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Tamura K, Maehara T, Sugiyama K, Nakada M, Sakai K, Kanemura Y, Yokogami K, Takeshima H, Kawahara N, Nonaka M, Asai A, Takayama T, Ueki K, Yao M, Matsutani M, Shibata T, Nishikawa R: Molecular Pathogenesis of Intracranial Germ Cell Tumors. 4th International CNS Germ Cell Tumor Symposium, Tokyo, Japan, 2015年4月13日 (Special Seminar)

B-2

Saitoh S, Miya F, Shiraishi H, Negishi Y, Tsunoda T, Kanemura Y, Kosaki K: Two siblings with Vici syndrome diagnosed by whole exome sequencing. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Taipei, Taiwan, 2015年5月14-17日

Fukusumi H, Shofuda T, Bamba Y, Yamamoto A, Kanematsu D, Handa Y, Takahashi K, Okita K, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H, Kanemura Y: Simple, efficient and robust method for generation of human neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells. ISSCR 2015 Annual Meeting, Stockholm, Sweden, 2015年6月25日

Shofuda T, Handa Y, Yamamoto A, Kanematsu D, Fukusumi H, Bamba Y, Kanemura Y: Human neural progenitor cells from neural tissues and those from iPS cells show different chemosensitivity against alkylating agents. ISSCR 2015 Annual Meeting, Stockholm, Sweden, 2015年6月26日

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. American Society of Human Genetics Annual Meeting 2015, Baltimore, MD, USA, 2015年10月8日

Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K: A novel neurogenetic disorder with STARD9 mutation. American Society of Human Genetics Annual Meeting 2015, Baltimore, MD, USA, 2015年10月8日

Sugai K, Shofuda T, Isoda M, Ota S, Kohyama J, Iwanami A, Matsumoto M, Okano H, Kanemura Y, Nakamura M: Safety assessment of NS/PCs induced from human PBMC-derived iPS cells. Society for Neuroscience 2015 annual meeting, Chicago, USA, 2015年10月20日

Mori K, Kanemura Y, Okita Y, Terakawa Y, Tsuyuguchi N, Fukai J, Tomogane Y, Moriuchi S, Taki T, Nonaka M, Ishibashi K, Kinoshita M, Hashimoto N, Nishida N, Nakajima Y: Molecular characteristics and clinical outcome of glioma patients.: experience of Kansai network for molecular diagnosis of central nervous system tumors. SNO 2015 Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA, 2015年11月21日

Kanemura Y, Shofuda T, Handa Y, Yamamoto A, Kanematsu D, Fukusumi H: Anti-glioma alkylating agents show different chemosensitivity against human neural progenitor cells from neural tissues and those from iPS cells. SNO 2015 Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA, 2015年11月21日

Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, Nakamura T, Shirahata M, Tamura K, Terakawa Y, Fukai J, Mukasa A, Suzuki H, Shibuya M, Kanemura Y, Yoshimine T, Saito N, Nagane M, Ueki K, Komori T, Nishikawa R, Narita Y, Ichimura K: Molecular classification based on IDH1/2 and TERT promoter well-defines subgroups with different outcome in adult diffuse gliomas: A report from Glioma Molecular Classification Consortium. SNO 2015 Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA, 2015年11月22日

Sugai K, Shofuda T, Fukuzawa R, Fukusumi H, Isoda M, Ohta S, Kohyama J, Iwanami A, Matsumoto M, Kanemura Y, Okano H, Nakamura M: Safety Assessment of NSCS Induced from Human PBMC-Derived IPS Cells for Transplantation Therapy for Spinal Cord Injury. 2015 CSRS Instructional Course and Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2015年12月2-5日

B-3

金村米博：小児脳腫瘍分子遺伝子診断による治療。第35回日本脳神経外科コンgres総会、横浜市、2015年5月8日

金村米博：X連鎖性遺伝性水頭症の遺伝子診断と出生前診断への応用。一般社団法人日本脳神経外科学会第74回学術総会、札幌市、2015年10月14日

金村米博：日本小児神経外科学会との合同プロジェクト「髄芽腫」。－小児神経外科学会とのジョイントセッション「小児悪性脳腫瘍の新しい潮流」－第33回日本脳腫瘍学会学術集会、京都市、2015年12月6日

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43回日本小児神経外科学会、下関市、2015年6月13日

金村米博、正札智子、市村幸一、山崎麻美、澁井壮一郎、西川 亮、新井 一、日本小児分子脳腫瘍グループ：国内髄芽腫症例の分子遺伝学的特徴。第43回日本小児神経外科学会、下関市、2015年6月13日

B-4

深井順也、上松右二、金村米博、正札智子、吉岡絵麻、兼松大介、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33回日本脳腫瘍病理学会、高松市、2015年5月29日

原田敦子、金村米博、宮 冬樹、才津浩智、山中 巧、埜中正博、西山健一、岡本伸彦、宇都宮英綱、加藤光広、斎藤伸治、角田達彦、藤井幸彦、松本直通、山崎麻美：PI3K-AKT-mTOR

シグナル伝達系の遺伝子変異を認める巨脳症の臨床像。第 57 回日本小児神経学会学術集会、大阪市、2015 年 5 月 30 日

原田敦子、宇都宮英綱、金村米博、宮 冬樹、山中 巧、角田達彦、山崎麻美：大頭症の臨床放射線学的検討。第 43 回日本小児神経外科学会、下関市、2015 年 6 月 12 日

堀いくみ、宮 冬樹、中島光子、根岸 豊、白石秀明、野々田豊、遠山 潤、岡本伸彦、服部文子、安藤直樹、加藤光広、角田達彦、才津浩智、松本直通、金村米博、小崎健次郎、西野一三、齋藤伸治：全エキソーム解析で診断された Vici 症候群 6 例の臨床的多様性。第 38 回日本小児遺伝学会学術集会、横浜市、2015 年 7 月 25 日

Kimura Y, Kanemura Y, Shofuda T, Onodera M, Oda M, Nakamori M, Nakano T, Mochizuki H: CRISPR/Cas9-mediated targeted insertion of a safety switch in an extragenic safe harbor of induced pluripotent stem cells. 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会、大阪市、2015 年 7 月 25 日

金村米博：Identification of propagation system using α -syn in PARK4 iPS cells. 脳タンパク質老化と認知症制御 第 1 回国際シンポジウム、名古屋市、2015 年 10 月 10 日

木下 学、有田英之、酒井美緒、香川尚己、金村米博、藤本康倫、中西克之、吉峰俊樹：MRI による神経膠腫の網羅的画像解析法大規模コホート解析に向けての提案。第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会、京都市、2015 年 12 月 8 日

福角勇人、半田有佳子、正札智子、金村米博：マイクロスフェアアレイを用いた neurosphere の非破壊的毒性試験系の開発。第 15 回日本再生医療学会総会、大阪市、2016 年 3 月 18 日

隅田美穂、吉岡絵麻、大倉浩和、松澤篤史、橋本一男、佐藤正昭、正札智子、金村米博：治療用凍結細胞の無菌搬送及び無電源搬送を目的とした極低温保冷容器の開発。第 15 回日本再生医療学会総会、大阪市、2016 年 3 月 18 日

吉岡絵麻、正札智子、兼松大介、福角勇人、半田有佳子、稲沢佑衣、山本篤世、隅田美穂、金村米博：ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞のサイズに関する品質検査法の検討。第 15 回日本再生医療学会総会、大阪市、2016 年 3 月 19 日

菅井桂子、正札智子、福澤龍二、福角勇人、磯田美帆、大多茂樹、神山 淳、岩波明生、松本守雄、金村米博、中村雅也、岡野栄之：移植治療用ヒト末梢血由来神経幹/前駆細胞の安全性評価。第 15 回日本再生医療学会総会、大阪市、2016 年 3 月 19 日

B-6

梅原 徹、沖田典子、埜中正博、山田修平、中西克彦、黒田淳子、金村米博、児玉良典、中島 伸、藤中俊之：妊娠を契機に増大し手術加療を要した Pilocytic astrocytoma の一例。

Neurosurgery Kinki 2015 Spring Meeting 第 69 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会・第 71 回近畿脊髄外科研究会合同開催、豊中市、2015 年 4 月 18 日

山田修平、黒田淳子、金村米博、中川智義、梅原 徹、沖田典子、中島 伸、藤中俊之、吉峰俊樹：再発性多発脳出血を契機に診断された先天性第 XI 因子欠乏症の 1 例。Neurosurgery Kinki 2015 Autumn Meeting 第 70 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会・第 2 回日本脳神経血管内治療学会近畿地方会学術集会合同学術集会、豊中市、2015 年 9 月 5 日

B-8

金村米博：小児脳腫瘍の遺伝子解析。第 20 回脳腫瘍レビュー、東京都港区、2015 年 6 月 6 日

金村米博：小児脳腫瘍遺伝子診断体制の構築について。先端脳腫瘍治療シンポジウム、仙台市、2015 年 6 月 10 日

金村米博：小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築。特別講演：小児脳腫瘍研究の現状と展望、東京都中央区、2015 年 12 月 9 日

事業名	医薬品等規制調和・評価研究事業
研究開発課題名	ヒト iPS 分化細胞技術を活用した医薬品の次世代毒性・安全性評価試験系の開発と国際標準化に関する研究
研究開発担当者 所属 役職 氏名	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター再生医療研究室 室長 金村 米博

1. 研究開発の実績

(1) 研究開発の実施日程

研究開発項目	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	
4. 次世代評価法開発と他施設間検証 (中枢神経系) ・プロトコルの整備 ・大規模検証試験													
5. 評価法用標準細胞の開発 (中枢神経系) ・分化誘導法の最適化 ・成熟化													

(2) 研究開発の実績の説明

研究開発項目 4：次世代評価法開発と多施設間検証 (中枢神経系/肝臓)

[1] 毒性・薬理試験用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた毒性試験プロトコル開発

Neurosphere 法を用いて拡大培養された毒性・薬理試験用ヒト iPS 細胞 (201B7 細胞) 由来神経前駆細胞を使用して、96 ウェルプレートを用いた毒性試験法の考案し、総数 346 種類の化合物を用いてその妥当性の検証を実施した。その結果、薬剤濃度依存性にヒット化合物数の上昇が認められた。得られた試験結果に基づき、凍結保存された供給用細胞 (Working cell bank: WCB) から試験用細胞 (Working cell: WC) を作成し、1 本の WCB から約 100 化合物程度の毒性スクリーニングが実施可能となる毒性・薬理試験用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた毒性試験法プロトコルを考案し、そのドラフト標準作業手順書 (SOP) を作成した。これら成果の結果、28 年度以降、新規に考案した毒性試験法の有用性の検証試験を実施できる体制が構築され、標準的安全性薬理試験法のための試験プロトコルの整備・施設間検証実験のための実験技術の基盤が整備された。

研究開発項目 5：評価法用標準細胞の開発 (中枢神経系/肝臓)

[1] 毒性・薬理試験用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞作成方法の開発

ヒト iPS 細胞 (201B7 細胞) から、Dorsomorphin (DSM) を単独使用する Single SMAD 法、および DSM と

SB431542 を併用する Dual SMAD 法を用いた神経分化誘導を行ったのち、無血清浮遊培養を用いて神経前駆細胞を増幅し、3 継代後培養終了時点の細胞を Master cell bank(MCB)として、さらに5 継代後培養終了時点の細胞を WCB として凍結保存し、作成細胞の品質試験を細胞免疫染色、FACS 解析、定量的 RT-PCR 法を用いて実施した。その結果、 4×10^6 細胞/tube の細胞量で WCB を Single SMAD 法で 25 本、Dual SMAD 法で 54 本それぞれ作成・凍結保存実施した。品質試験の結果、作成された 2 種類の WCB はいずれも神経前駆細胞としての十分な特性を有し、神経細胞への終末分化が可能な細胞であり、毒性・薬理試験用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞としての基準を満たす細胞であると判断し、これら結果に基づき、ヒト iPS 細胞を分化誘導して、毒性・薬理試験用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞 (MCB/WCB) を作成するためのプロトコルを作成し、その実施に必要なドラフト標準作業手順書 (SOP) を作成した。これら成果の結果、毒性・薬理試験用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞 WCB を多施設に提供することで、28 年度以降、分化の最適化、分化細胞の成熟化法の開発と標準化を進める多施設検証試験を実施できる体制が構築された。

事業名	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）
研究開発課題名	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
研究開発担当者 所属 役職 氏名	金村 米博 室長

1. 研究開発の実績

(1) 研究開発の実施日程

研究開発項目	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	
1. 亜急性期脊髄損傷に対する臨床研究を開始 ・再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの構築													
3. 亜急性期脳梗塞に対する臨床研究を開始 ・ iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた脳梗塞に対する細胞移植療法の前臨床研究													

(2) 研究開発の実績の説明

1. 亜急性期脊髄損傷に対する臨床研究を開始

1-1 再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの構築

1-1-1 脊髄損傷治療用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの製造開始

平成 26 年度までの研究成果を基礎にして策定された特定細胞加工物標準書および関連標準操作手順書 (SOP) に従って、大阪医療センターセルプロセッシングセンター (CPC) を使用して、脊髄損傷治療用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞ストック製造の第 1 回目ベリフィケーションを実施した。京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) から分与された HLA-ホモ再生医療用 iPS 細胞 (QHJI01s01 株) を原材料として、iPS 細胞培養後に 2 ラインに分割し、アイソレータとバイオハザード対策用キャビネット (グレード A) を設置した細胞調製室 (グレード B) の 2 箇所それぞれ独立して神経分化誘導工程を実施し、アイソレータを用いた培養にて、最終製品として規定量 (2×10^6 細胞/tube) の細胞数で 16 本の脊髄損傷治療用ヒト iPS 細

胞由来神経前駆細胞ストックが凍結保存された。

1-1-2. 脊髄損傷治療用神経前駆細胞ストックの品質評価試験の実施

前項で製造した細胞に関して、neurosphere 形態解析、遺伝子発現解析、フローサイトメーターを用いたマーカー分子発現解析、細胞免疫染色法を用いたマーカー分子発現解析、戻し培養試験、染色体核型解析、細胞増殖特性解析、細胞周期解析、工程内エンドトキシン試験、無菌試験、マイコプラズマ試験、神経分化能評価および凍結融解試験をそれぞれ SOP に則って実施した。その結果、ベリフィケーションにて製造された QHJ101s01 株由来神経前駆細胞は、規定された品質を満たす細胞であることが確認された。以上の結果から、品質管理の観点からもベリフィケーションは問題なく実施されたと判断された。

1-1-3 脳梗塞治療用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの細胞規格調整

脳梗塞治療用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの規格を検討するため、現時点で脊髄損傷治療用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞ストック製造に使用されている無フィーダー培養法で樹立・維持されているヒト iPS 細胞 (Ff-I01 細胞) とは別に、SNL フィーダーを用いて樹立・維持されているヒト iPS 細胞 (SNL-J06 細胞) から作成されたヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の治療用細胞としての特性を評価した。その結果、Ff-I01 細胞由来細胞と SNL-J06 細胞由来細胞では、in vitro 段階では同等の特性を有しても、in vivo 移植後にはその特性に差異が生じる可能性が示唆された。今後、今年度確認された in vivo での細胞特性の差異が神経機能回復に及ぼす影響をさらに検討し、引き続き脳梗塞治療用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの細胞規格を検討していく必要性が判明した。

3. 亜急性期脳梗塞に対する臨床研究を開始

3-1-1. げっ歯類脳梗塞モデルにおける iPS 細胞由来神経前駆細胞移植療法の有用性の検証

7週齢雄ラット (Crj: WI ラット) の一過性 (2時間) 左中大脳動脈閉塞脳梗塞モデル (MCAO) を作成して、3種類の異なる細胞 (Ff-I01 由来神経前駆細胞、SNL-J06 由来神経前駆細胞、神経組織由来神経幹細胞) を、虚血7日後に脳梗塞部位に2か所 (線条体及び大脳皮質) 定位移植した。機能評価として、神経症状スコア、ロータロッドテスト、ステップテスト、テープはがしテストを虚血7日、14日、21日及び28日後で実施し、MRI撮影を虚血28日後にそれぞれ実施し、その細胞移植治療の有用性を経時的に検証した。その結果、細胞移植群において、一部神経機能回復傾向、梗塞病巣面積縮小効果が認められたが、虚血28日までの段階では有意差を認める明らかな改善効果は認められず、移植効果の検証にはより長期の観察期間が必要であることが示唆された。

3-2-2. げっ歯類脳梗塞モデルに移植された iPS 細胞由来神経前駆細胞の安全性の検証

虚血28日後に脳組織を採取してパラフィン包埋永久標本を作製し、HE染色および免疫染色を実施して、移植細胞のラット組織内での定着率、分化率、異常 (腫瘍) 細胞の出現の有無を病理組織学的に評価した。その結果、移植された2種類の異なるヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞はいずれも虚血28日後の時点でラット脳組織内に定着しているが、それらは未分化状態を維持したまま存在し、かつその分化能に差異があることが示唆され、移植細胞の in vivo での安全性評価には、より長期間での評価が必要であると同時に、in vivo における細胞分化能の差異と治療効果との関連性に関して、確認していくことが必要であると考えられた。

事業名	革新的がん医療実用化研究事業	
研究開発課題名	小児脳腫瘍に対する多施設共同研究による治療開発	
機関名	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター	
研究開発 担当者	所属・役職	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
	氏名	金村 米博
実施期間	平成 27 年 4 月 1 日 ～ 平成 28 年 3 月 31 日	

I. 研究開発目的及び内容

小児髄芽腫の遺伝子発現に基づく亜分類の決定

II. 実施内容

1. 研究開発の概要

進行中の髄芽腫介入試験および前方視的観察研究で保存された腫瘍検体を用いて随時解析を行う。

2. 成果（研究開発計画書の II.2. 担当別 研究開発概要に対応）

（1）研究開発分担者 所属：国立病院機構大阪医療センター

研究開発分担者 役職 氏名：室長 金村米博

分担研究開発課題名（実施内容）：中央病理診断と遺伝子解析、検体保存システムの確立と運用

①研究開発成果の内容

【成果の概要】

髄芽腫を解析対象として、遺伝子発現解析に基づく 4 分子亜群分類、サンガーシーケンス法を用いた CTNNB1 塩基配列解析体制を確立し、小児固形腫瘍観察研究に登録されている髄芽腫の 4 分子亜群分類を実施した。

②研究開発項目の実施状況及びマイルストーンの達成状況

【研究の実施状況】

小児固形腫瘍観察研究に登録されている髄芽腫 14 症例を対象に、凍結組織試料から抽出された RNA 試料を用いて遺伝子発現解析に基づく 4 分子亜群分類、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）の塩基配列解析をそれぞれ実施し、結果報告を行った。

その結果、各分子亜群の比率は、WNT 亜群 2 症例（14.3%）、SHH 亜群 5 症例（35.7%）、Group3 亜群 1 症例（7.1%）、Group4 亜群 6 症例（42.9%）であり、海外報告と比較して Group3 亜群が少なく、Group4 亜群が多い傾向が明らかになった。年齢との関連性においては、3 歳未満の乳幼児症例は全例 SHH 亜群であり、組織型との関連性においては、Desmoplastic/nodular 髄芽腫は全例 SHH 亜群であった。CTNNB1 変異は WNT 亜群の 2 例全例にミスセンス変異が認められたが、他の症例には変異は同定されなかった。

【マイルストーンの達成状況】

27 年度実施予定のマイルストーンは全て達成された。

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27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 挑戦的萌芽研究 4. 補助事業期間 平成27年度～平成29年度
5. 課題番号 1 5 K 1 5 5 3 4
6. 研究課題名 成人低悪性度グリオーマ関連ドライバー遺伝子変異とグリオーマ幹細胞発生の関連性検証
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

成人低悪性度グリオーマ関連ドライバー遺伝子変異を正常ヒト神経幹/前駆細胞で発現させてその機能を評価するため、正常ヒト神経幹/前駆細胞を作成する元になるヒトiPS細胞にTet-onシステムを用いた外来遺伝子誘導系を導入した。ヒトiPS細胞（409B2株）をSNLフィーダー細胞上で拡大培養した後、遺伝子導入用にフィーダーフリー培養システムへの馴化培養を実施した。フィーダーフリー化したセミコンフルエントのヒトiPS細胞409B2株に対して、Lipofectamine[®]; 3000試薬（Thermo Fisher Scientific社）を用い、TET3G vector（Clontech社）を遺伝子導入し、抗生剤G418を用いたセレクションにてTET3G導入株をセレクションした。次に、クローニングしたTET3G導入株に、Lipofectamine[®]; 3000試薬を用いてcontrol response plasmid（pTRE3G-Luc）を遺伝子導入し、Doxycycline添加/非添加の培養液に置換して24時間培養後、Luciferase活性を測定してTET3G導入株選定を実施した結果、候補クローン6株よりDoxycycline添加/非添加ウェルの発光量比が10倍以上あることが確認されたクローンが2株選択され、それらを拡大培養し凍結保存した。以上の結果から、Tet-onシステムを用いた外来遺伝子誘導が可能となるヒトiPS細胞株の樹立に成功したと判断される。

10. キーワード

- | | | | |
|---------------|------------|----------------|----------------|
| (1) 低悪性度グリオーマ | (2) 神経前駆細胞 | (3) Tet-onシステム | (4) ドライバー遺伝子変異 |
| (5) | (6) | (7) | (8) |

11. 現在までの進捗状況

(区分) (2) おおむね順調に進展している。

(理由)
 正常ヒト神経幹/前駆細胞へ成人低悪性度グリオーマ関連ドライバー遺伝子変異を導入し、その機能を評価するための実験系の構築が初年度の目標であったが、Tet-onシステムで外来遺伝子の発現制御が可能なシステムを組み込んだヒトiPS細胞の樹立に成功した。このヒトiPS細胞を分化誘導させることで正常ヒト神経幹/前駆細胞を作成することが技術的に可能であり、正常ヒト神経幹/前駆細胞において成人低悪性度グリオーマ関連ドライバー遺伝子変異の機能を評価するためのプラットフォームの構築は達成されたと判断する。具体的な遺伝子変異導入は現在進行中であり、全体の進捗としてはおおむね順調に進展していると判断する。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)
 研究開始時点では、樹立済正常ヒト神経幹/前駆細胞にエレクトロポレーション等を用いて外来遺伝子を導入する手法を計画し、その実施を試みたが、効率が十分でなく、別アプローチとしてヒト神経幹/前駆細胞作製の元になるヒトiPS細胞に先行してTet-onシステムを導入し、Tet-onシステム導入iPS細胞を神経分化誘導させることで遺伝子導入ヒト神経幹/前駆細胞を作成する手法に変更した。その結果、目的とする遺伝子導入ヒトiPS細胞の作成に成功し、結果的にはより汎用性の高い実験系を構築することができたと判断する。次年度以降は、このシステムを利用して、発生段階および領域特異性の異なるヒト神経幹/前駆細胞を作成し、そこに主に低悪性度グリオーマ発生との関連性が報告されている融合遺伝子を導入し、グリオーマ発生に及ぼす機能を解析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)
 物品費において予定より支出が少なく済み、次年度使用額が生じた。

(使用計画)
 研究に必要な細胞培養関連、遺伝子解析関連、動物実験関連の資材等の消耗品購入のための物品費、遠方の連携研究者との共同研究を円滑に実施するため会議に関わる国内旅費、国際学会での情報収集・成果発表のための国際旅費、および論文作成に関わるその他経費を計上した。これらは研究を円滑に実施し、かつ研究成果を世界に発信するために必要なものと考え、妥当な範囲内のものとする。

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

[雑誌論文] 計(4)件/うち査読付論文 計(4)件/うち国際共著 計(0)件/うちオープンアクセス 計(3)件

著者名		論文標題				
Okita Y, Nonaka M, Umehara T, Kanemura Y, Kodama Y, Mano M, Nakajima S.		Efficacy of temozolomide and bevacizumab for the treatment of leptomeningeal dissemination of recurrent glioblastoma: A case report.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Oncol Lett	有	9	2015	1885-1888	—	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.3892/ol.2015.2940						
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)						

著者名		論文標題				
Umehara T, Okita Y, Nonaka M, Mori K, Kanemura Y, Kodama Y, Mano M, Kudawara I, Nakajima S.		Choroid Plexus Metastasis of Follicular Thyroid Carcinoma Diagnosed due to Intraventricular Hemorrhage.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Intern Med	有	54	2015	1297-302	—	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.2169/internalmedicine.54.3560						
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)						

著者名		論文標題				
Takami H, Fukushima S, Fukuoka K, Suzuki T, Yanagisawa T, Matsushita Y, Nakamura T, Arita H, Mukasa A, Saito N, Kanamori M, Kumabe T, Tominaga T, Kobayashi K, Nagane M, Iuchi T, Tamura K, Maehara T, Sugiyama K, Nakada M, Kanemura Y, et al.		Human chorionic gonadotropin is expressed virtually in all intracranial germ cell tumors.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
J Neurooncol	有	124	2015	23-32	—	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.1007/s11060-015-1809-y						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

著者名		論文標題				
Takano K, Kinoshita M, Arita H, Okita Y, Chiba Y, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Kanemura Y, Nonaka M, Nakajima S, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T.		Diagnostic and Prognostic Value of 11C-Methionine PET for Nonenhancing Gliomas.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
AJNR Am J Neuroradiol	有	37	2016	44-50	—	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.3174/ajnr.A4460						
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)						

[学会発表] 計(4)件/うち招待講演 計(1)件/うち国際学会 計(0)件

発表者名		発表標題	
梅原 徹、沖田典子、壘中正博、山田修平、中西克彦、黒田淳子、金村米博、児玉良典、中島 伸、藤中俊之		妊娠を契機に増大し手術加療を要したPilocytic astrocytomaの一例	
学会等名	発表年月日	発表場所	
Neurosurgery Kinki 2015 Spring Meeting 第69回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会・第71回近畿脊髄外科研究会合同開催	2015年04月18日～ 2015年04月18日	豊中市	

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、兼松大介、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33回日本脳腫瘍病理学会	2015年05月29日～ 2015年05月29日	高松市	

発表者名		発表標題	
金村米博		小児脳腫瘍の遺伝子解析	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第20回脳腫瘍レビュー(招待講演)	2015年06月06日～ 2015年06月06日	東京都港区	

発表者名	発表標題	
Kimura Y, Kanemura Y, Shofuda T, Onodera M, Oda M, Nakamori M, Nakano T, Mochizuki H.	CRISPR/Cas9-mediated targeted insertion of a safety switch in an extragenic safe harbor of induced pluripotent stem cells.	
学会等名	発表年月日	発表場所
第21回日本遺伝子治療学会学術集会	2015年07月25日～ 2015年07月25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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: ー

17.備考

--