

201008016A

厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

難治性てんかん患者由来 iPS 細胞を用いた新規創薬基盤の構築

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金村 米博

平成 23 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

難治性てんかん患者由来 iPS 細胞を用いた新規創薬基盤の構築

平成 22 年度 総括・分担研究報告書 (1/2 冊)

研究代表者 金村米博

平成 23 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

難治性てんかん患者由来 iPS 細胞を用いた新規創薬基盤の構築 1
独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 金村米博

II. 分担研究報告

1. 培養ラット胎児神経細胞を用いたアポトーシス測定系の確立 5
独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター 高橋幸利

2. てんかん患者由来 iPS 細胞および神経幹細胞の樹立 17
独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 金村米博

3. てんかん患者由来分化細胞の作成とその特性解析
てんかんモデル神経細胞としての有用性評価と生物資源化 25
国立医薬品食品衛生研究所 佐藤 薫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 37

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

難治性てんかん患者由来 iPS 細胞を用いた新規創薬基盤の構築

構 成 員 名 簿

区 分	氏 名	所属施設名	職 名
研究代表者	金村米博	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 再生医療研究室	室長
研究分担者	高橋幸利	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター	臨床研究部長
	佐藤 薫	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部	第一室長

区 分	氏 名	所属施設名
研究協力者	正礼智子	独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター
	松田一己	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	馬場好一	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	西村成子	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	高尾恵美子	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	笠井理沙	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	山崎悦子	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	最上友紀子	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	福山哲広	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	鳥取孝安	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	臼井直敬	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	井上有史	独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター
	小山隆太	東京大学大学院薬学系研究科 薬品作用学教室

難治性てんかん患者由来 iPS 細胞を用いた新規創薬基盤の構築

研究代表者 金村米博

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 再生医療研究室 室長

研究分担者

高橋幸利

独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経
医療センター 臨床研究部長

佐藤 薫

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第一室長

A. 研究目的

難治性てんかん患者に由来するヒト iPS 細胞/神経幹細胞を樹立し神経細胞を作成し、てんかんモデル細胞としての有用性を検証し、抗てんかん薬開発過程に利用可能な新規生物資源の確立とそれを応用した新規創薬評価系の開発を目指す。

B. 研究方法

1. てんかん患者由来試料の採取と臨床症状解析

難治性てんかん患者として、内側側頭葉てんかん (MTLE; 海馬硬化、等)、および新皮質てんかん (皮質形成異常による部分てんかん、等) の診療上必要な外科的処置を介して摘出された神経組織の一部および皮膚組織 (頭皮) の一部を、書面を用いたインフォームド・コンセントを行い、試料提供を受ける。提供を受けた患者の臨床症状は詳細に解析する。

2. てんかん患者由来 iPS 細胞および神経幹細胞の樹立

提供を受けた各患者由来試料から、一般的な手法を用いて浮遊系細胞あるいは接着性細胞 (線維芽細胞、間葉系幹細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、等) を分離・培養する。ウイルスベクターを用いて山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) を細胞に遺伝子導入し、ヒト iPS 細胞樹立する。また、神経組織からは neurosphere 法を主体に Kanemura らの変法 (Kanemura et al. J Neurosci Res, 69, 869-879, 2002)

を用いて神経幹細胞を樹立する。樹立したてんかん患者由来ヒト iPS 細胞/神経幹細胞に関して、正常ヒト神経幹細胞 (iPS 細胞由来、ES 細胞由来、胎児神経組織由来) を比較コントロールに使用して、以下の in vitro 特性解析を実施する。

①細胞形態、増殖能の評価：増殖速度、増殖率 (分裂回数)、等

②細胞表面マーカー分子発現様式の評価：FACS を使用した解析、等

③ゲノム・遺伝子レベルでの評価：CGH アレイ、マイクロアレイ、等

④疾患関連遺伝子解析：てんかん発症と関連性を有する遺伝子異常 (例：SCN1A, ARX, CDKL5, 等)

3. てんかん患者由来分化細胞の作成とその特性解析
胚様体形成、等の手法を用いて、てんかん患者由来 iPS 細胞/神経幹細胞を分化誘導させ、神経細胞を作成し、正常ヒト神経幹細胞 (iPS 細胞由来、ES 細胞由来、胎児神経組織由来) に由来する神経細胞を比較コントロールに使用して、以下の特性解析を実施する。

①神経形態の特徴解析：微細構造の発達、細胞構造特異的マーカー蛋白質の免疫組織学的解析、等

②突起進展の特徴解析：軸索伸張、樹状突起発達の解析、等

③シナプス形成の特徴解析：シナプスマーカー蛋白質発現の免疫組織学的解析、FM1-43 を用いた神経伝達物質放出効率の解析、スパインなどシナプス特異的微細構造の形成能、等

④機能蛋白質の発現解析：各種チャンネル分子、トランスポーター分子などの RT-PCR 解析、ウエスタンブロット、等

⑤神経回路網形成能の評価：電気生理学的手法を用

いた検討、カルシウムイメージングによる神経回路機能のモニタリング、等

- ⑥異種細胞間の機能的相互作用の評価：神経細胞同様、グリア細胞の作製も実施し、上記①～⑥の解析を行い、さらに神経-グリア細胞連関といった異種細胞間の機能的相互作用についても検討する。

C. 研究成果

1. てんかん患者由来 iPS 細胞および神経幹細胞の樹立
金村は、20 症例の難治性てんかん患者から生体試料（神経組織、皮膚組織）の提供を受け、各患者由来神経組織から neurosphere 法を用いて神経幹細胞の樹立を、また血清含有培地を用いてアストロサイト様神経上皮細胞の樹立を各々実施した。さらに頭皮組織から線維芽細胞を樹立し、レトロウイルスベクターを用いて山中 4 因子遺伝子導入し、iPS 細胞を作成した。その結果、神経幹細胞（11 株）、アストロサイト様神経上皮細胞（13 株）、線維芽細胞（20 株）をそれぞれ樹立に成功した。また、2 症例の線維芽細胞から合計 8 クローンの iPS 細胞の樹立に成功した。これら神経幹細胞と iPS 細胞およびその分化細胞の in vitro における細胞特性解析を実施し、てんかん患者神経組織由来神経幹細胞の増殖は不良で、てんかんモデル細胞として創薬研究に応用できる生物資源化することは困難であり、線維芽細胞由来 iPS 細胞から分化誘導して神経系細胞を作成するアプローチの優位性が確認された。

2. 培養ラット胎児神経細胞を用いたアポトーシス測定系の確立

高橋は、胎生 15 日目のラット胎児大脳半球から細胞懸濁液を作成し、血清含有培地にて培養した。培養細胞は ApopLadder EX（タカラバイオ MK600）と Agilent 2100 バイオアナライザーにて DNA ラダー形成を検討した。その結果、培養ラット胎児神経細胞は 7-11DIV では neurofilament、GFAP が陽性で、Staurosporine を 3DIV に添加することにより Caspase-3 活性の増加、DNA ラダー形成の増加が起こり、自然経過の中で 10DIV 以降徐々に DNA ラダー形成増加を認めた。非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者の髄液を 3DIV に加えた場合、10DIV では DNA

ラダー形成が著増し、患者髄液中の IgG 分画を 3DIV に加えた場合、7DIV および 10DIV とともに DNA ラダー形成が抑制された。培養ラット胎児神経細胞の自然アポトーシスを利用して、患者髄液および髄液由来 IgG 分画のアポトーシスへの影響を簡便に評価することに成功した。

3. てんかんモデル神経細胞としての有用性評価と生物資源化

佐藤は、抗てんかん薬開発への応用、新規創薬評価系開発をめざし、てんかん患者由来アストロサイト様神経上皮細胞およびてんかん患者 iPS 由来 neurosphere のコントロール細胞として健常人 iPS 由来 neurosphere について特性解析を行った。その結果、てんかん患者由来アストロサイト様神経上皮細胞の特性解析において、いずれもアストロサイトマーカーの発現が非常に弱く、アストロサイトの主要な機能であるグルタミン酸取り込み能が見られず、てんかん患者由来アストロサイト様神経上皮細胞はてんかん病態を反映するアストロサイトである可能性が示された。また、健常人 iPS 由来 neurosphere から興奮性グルタミン酸神経および抑制性 GABA 神経の分化に成功し、薬理的解析が可能であることが示された。

D. 考察および次年度の方向性

研究 2 年目の 22 年度は、細胞樹立に関して、複数のおてんかん患者由来細胞の樹立に成功した。その中でまず、神経組織由来細胞の解析が進められ、てんかん患者由来神経幹細胞の細胞増殖は不良で大量培養は困難であることが明らかとなった。また、てんかん患者由来アストロサイト様細胞には機能障害が存在し、てんかん病態を反映する可能性が示唆された。さらに当面の最大の目標の一つであったてんかん患者由来 iPS 細胞の樹立に成功し、その分化能を確認することに成功した。細胞機能評価系に関しては、神経細胞のアポトーシス測定系および iPS 由来 neurosphere から分化した神経細胞の機能評価系の構築に成功した。

今年度までの研究成果により、神経組織由来神経幹細胞およびその分化細胞は、てんかん病態再現に

使用するモデル細胞としては生物学的には最も理想的な細胞であると考えられるが、必要細胞数確保の観点から大きな困難があり、現状の細胞培養技術においては、てんかんモデル細胞として生物資源化して創薬研究に使用することは非現実的なアプローチであることが判明した。一方、線維芽細胞は増殖能に優れ、iPS 細胞を樹立することも可能であることが明らかとなった。iPS 細胞は神経組織由来神経幹細胞と大きく異なり増殖力が良好であり、大量培養後に神経系細胞へ分化誘導して使用することが可能であると考えられ、てんかんモデル細胞として生物資源化して創薬研究に使用する細胞ソースとしては、増殖力に優れるてんかん患者由来 iPS 細胞とその分化細胞を応用するアプローチの優位性を再確認することができた。

最終年度は、てんかん患者由来 iPS 細胞とその分化細胞の特性解析を、てんかん患者神経組織由来神経幹細胞とその分化細胞を対照細胞として上手く活用して実施し、特に同一患者に由来する2つの異なる細胞の特性の比較検討を行い、てんかん患者由来 iPS 細胞のてんかんモデル細胞としての妥当性を検証し、抗てんかん薬開発過程に利用可能な新規生物資源としての有用性を評価する予定である。

E. 健康危険情報

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

培養ラット胎児神経細胞を用いたアポトーシス測定系の確立

研究分担者 高橋幸利^{1,2}

独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター 臨床研究部長

研究要旨

てんかんは神経疾患の中で第3位の有病率で、難治例や副作用に苦しむ症例が多く、より安全で有効な抗てんかん薬の開発が期待されている。2010年度の研究では、抗てんかん薬の開発過程にiPS細胞分化誘導神経系細胞のアポトーシスを用いたスクリーニングシステムを導入するための準備研究として、培養ラット胎児神経細胞を用いたアポトーシス測定系の確立を検討した。

培養ラット胎児神経細胞は、妊娠ラット（ウイスターラット、日本SLC）より胎生15日目の胎児を取り出し、大脳半球の懸濁液作成し、血清培地にて培養した。培養細胞はApopLadder EX（タカラバイオ MK600）とAgilent 2100 パイオアナライザーにてDNAラダー形成を検討した。

培養ラット胎児神経細胞は7-11DIVではneurofilament、GFAPが陽性で、Staurosporineを3DIVに添加することによりCaspase-3活性の増加、DNAラダー形成の増加が起こり、自然経過の中で10DIV以降徐々にDNAラダー形成増加を認めた。

非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者の髄液を3DIVに加えた場合、10DIVではDNAラダー形成が著増し、患者髄液中のIgG分画を3DIVに加えた場合、7DIVおよび10DIVともにDNAラダー形成が抑制された。

培養ラット胎児神経細胞の自然アポトーシスを利用して、患者髄液および髄液由来IgG分画のアポトーシスへの影響を簡便に評価することができた。

研究協力者 西村成子¹、高尾恵美子¹、笠井理沙¹、山崎悦子¹、最上友紀子¹、福山哲広¹、馬場好一¹、松田一己¹、鳥取孝安¹、白井直敬¹、井上有史¹（国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター¹、岐阜大学医学部小児病態学²）

間に試されるも、最終的には薬剤抵抗性と判断されており、より有効な新薬の必要性は大きい。また、これらの外科治療可能なてんかんでも、20%の症例は術後も発作が止まらず抗てんかん薬治療が継続され、てんかん外科治療の対象とならない難治性てんかん症例もあり、より有効な新薬を待ち望む声は大きい。

A. 研究目的

2009年度の研究で、静岡てんかん・神経医療センターでは26年間におおよそ26000例が初診し、1000例（38.5例/年）が手術に至っていた。内側側頭葉硬化（mesial temporal sclerosis, MTS）では発病から平均18年、皮質形成異常（cortical dysplasia, CD）では12年、Dysembryonic neuroepithelial tumor（DNT）では11年かかって手術に至っており、これらの代表的難治性てんかんでは多くの抗てんかん薬が10-20年

てんかん症例では、発作に有効な薬剤であっても副作用で中止せねばならないことがあり、そのために難治化している症例もある。最近開発された抗てんかん薬のひとつであるトピラマートでは、PMDAの添付文書データベースによれば、承認時までの国内第Ⅱ/Ⅲ相及び長期投与試験における安全性解析対象例303例中、副作用が228例（75.2%）に認められたと記載されている。主な副作用は傾眠 90例

(29.7%)、体重減少 75 例 (24.8%)、浮動性めまい 44 例 (14.5%)、無食欲及び大食症候群 32 例 (10.6%) 等であった。75%と高率に副作用があるのは患者にとっては大きな問題であり、開発段階での神経毒性のスクリーニング等により、副作用の少ない薬剤の開発が必要である。

我々は、抗てんかん薬の開発過程に iPS 細胞分化誘導神経系細胞のアポトーシスを用いたスクリーニングシステムを導入することを目標に、2010 年度は培養ラット胎児神経細胞を用いたアポトーシス測定系の確立を検討した。

B. 研究方法

1. 培養ラット胎児神経細胞の調製：妊娠ラット（ウイスターラット、日本 SLC）より胎生 15 日目の胎児を取り出し断頭、脳を取り出し大脳半球の懸濁液作成し、三種類のステンレスメッシュ（150、75、53 μm ）で濾過した後、血清培地にて培養した。
2. 培養ラット胎児神経細胞の抗体染色：Anti-neurofilament, medium, 160kDa, mouse-mono（フナコシ GTX27256）、Anti-GFAP, mouse-mono（フナコシ MAB360）、Anti-CD68, mouse-mono（フナコシ MS397-PO）による免疫染色、および HE 核染色を行った。
3. Staurosporine によるアポトーシス：Staurosporine, 3 μM および Caspase inhibitor (Z-VAD-FMK), 50 μM を用いて行った。
4. Caspase-3 活性：CaspACE assay system, colorimetric (Promega G7351) を用いた。
5. アポトーシス：培養ラット胎児神経細胞の 3DIV に血清培地から無血清培地へ変更し、患者髄液（髄液 0.2ml + 培養液 1.8ml）あるいは患者髄液由来 IgG（髄液 0.2ml 由来 IgG 分画 + 培養液 1.8ml）を加え、7DIV と 10DIV に ApopLadder EX（タカラバイオ MK600）を用いて培養細胞から DNA を分離し、Agilent 2100 バイオアナライザーにて DNA ラダー形成を判定した。

（倫理面への配慮）

静岡てんかん・神経医療センター倫理委員会にて承認された「自己免疫介在性脳炎・脳症に関する多施設共同研究 2011」の方法により同意を得た患者髄液を用いた。動物実験は、「ラスマッセン症候群等の自己免疫介在性中枢神経系疾患に関する研究」により動物実験委員会から承認された方法により行った。

C. 研究結果

1. 培養ラット胎児神経細胞の特徴：4DIV での免疫染色は neurofilament、GFAP、CD68 が陽性であったが、7DIV では neurofilament、GFAP が陽性で CD68 は染まらなかった。11DIV では neurofilament、GFAP が陽性であるが、GFAP 染色では染色性が低下した（図 1）。
2. Staurosporine による培養ラット胎児神経細胞のアポトーシス：培養ラット胎児神経細胞は Staurosporine を 3DIV に添加することにより Caspase-3 活性の増加、DNA ラダー形成の増加が起こり、Caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) により DNA ラダー形成が抑制された（図 2）。Staurosporine 添加により培養液の LDH の増加が経時的にみられたが、7DIV までは対照と同レベルで、Glutamate の濃度も同レベルであった。
3. 培養ラット胎児神経細胞の自然アポトーシス：培養ラット胎児神経細胞は、自然経過の中で 10DIV 以降徐々に DNA ラダー形成を認めた（図 3）。
4. 疾患患者髄液による培養ラット胎児神経細胞のアポトーシス：非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者（LE-1）の髄液を 3DIV に加えた場合、7DIV では対照に比べて DNA ラダー形成はやや少ないが、10DIV では DNA ラダー形成が著増していた。LE-1 の髄液中の IgG 分画を 3DIV に加えた場合、7DIV および 10DIV ともに DNA ラダー形成が抑制されていた。

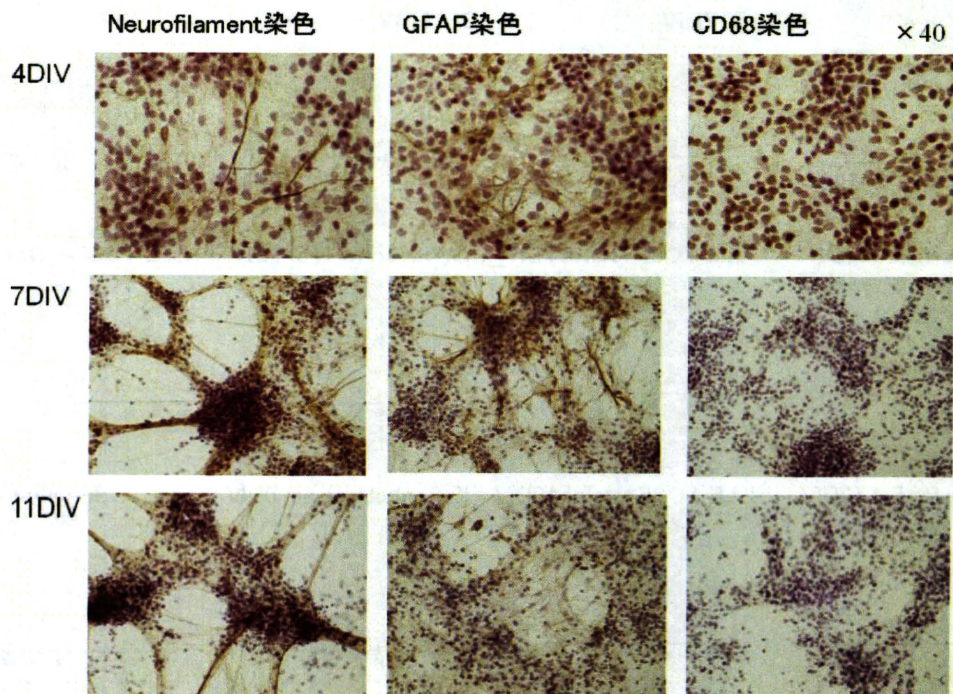
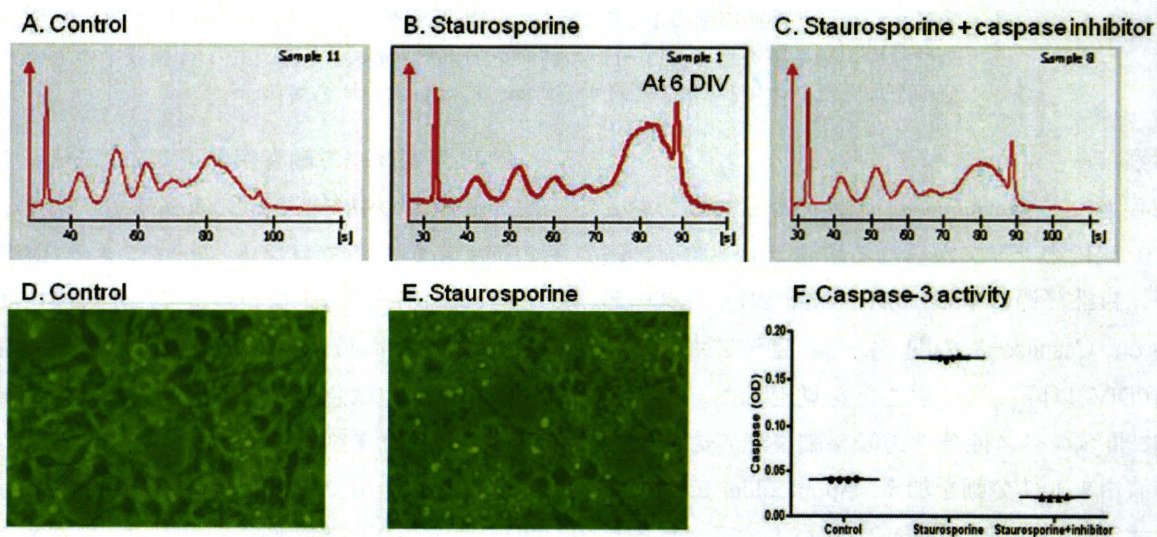


図1 培養ラット胎児神経細胞の免疫染色



•Staurosporine, 3 μ M
 •Caspase inhibitor (Z-VAD-FMK), 50 μ M

図2 Staurosporine による培養ラット胎児神経細胞のアポトーシス

- 6DIV における対照培養ラット胎児神経細胞のラダー形成。
- 2DIV に Staurosporine 3 μ M 添加培養ラット胎児神経細胞の 6DIV におけるラダー形成。
- 2DIV に Staurosporine 3 μ M + Caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) 50 μ M 添加培養ラット胎児神経細胞の 6DIV におけるラダー形成。
- 4DIV における対照培養ラット胎児神経細胞。
- 2DIV に Staurosporine 3 μ M 添加した 4DIV における培養ラット胎児神経細胞。
- 6DIV における培養ラット胎児神経細胞の caspase-3 活性。

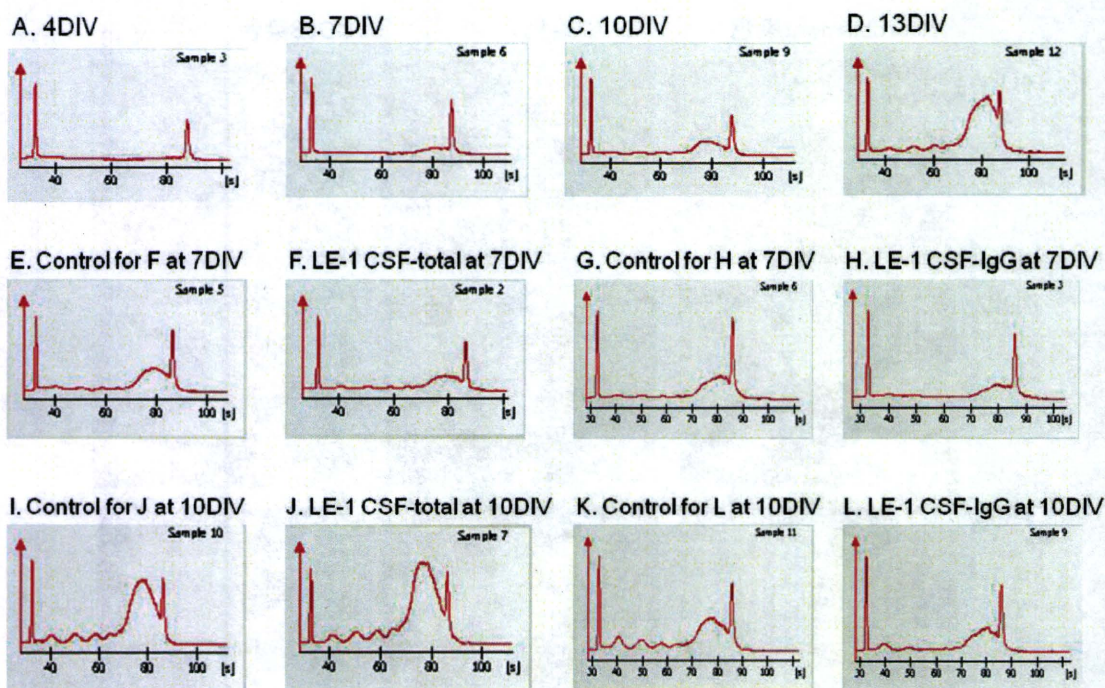


図3 培養ラット胎児神経細胞の DNA ラダー形成

A-D: 培養ラット胎児神経細胞の経時的 DNA ラダー形成。

E-H: 培養ラット胎児神経細胞の 7DIV における DNA ラダー形成で、F は 3DIV に非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者 (LE-1) の髄液を加えたもので、H は LE-1 の髄液中の IgG 分画を加えたもので、E は F に対する対照、G は H に対する対照。

I-L: 培養ラット胎児神経細胞の 10DIV における DNA ラダー形成で、J は 3DIV に非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者 (LE-1) の髄液を加えたもので、L は LE-1 の髄液中の IgG 分画を加えたもので、I は J に対する対照、K は L に対する対照。

D. 考察

今回我々は、neurofilament 陽性のニューロンおよび GFAP 陽性のグリアからなる培養ラット胎児神経細胞が、自然経過の中で 10DIV 以降 DNA ラダー形成を示し、Caspase-3 の関与から、自然アポトーシスを 10DIV 以降に起こすことを見出した。そして 3DIV に非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者の髄液および髄液由来 IgG 分画を加え、ApopLadder EX (タカラバイオ MK600) と Agilent 2100 バイオアナライザーにて DNA ラダー形成を見ることで、アポトーシスへの影響を簡便に評価することができた。

2010 年度の培養ラット胎児神経細胞でのアポトーシス評価システムを参考に、2011 年度以降、てんかん患者由来 iPS 細胞分化誘導神経系細胞のアポトーシスを用いたスクリーニングシステムを構築し、より安全でより有効な抗てんかん薬開発のためのシステムとし、創薬基盤の充実に寄与したい。

2008 年度厚生労働省疾患調査によると、てんかんは神経疾患の中で第 3 位の有病率で (図 4)、1 剤目の抗てんかん薬でコントロールできる症例は 47% とされ、治療終了すなわち抗てんかん薬中止できる症例は 6.5% に過ぎない。そのためより有効な抗てんかん薬の開発は急務である。治療は長期にわたり、難治症例では多剤併用となり、発作に有効な薬剤であっても副作用で中止せねばならないこともあり、開発段階での神経毒性のスクリーニング等により、副作用の少ない薬剤の開発が必要である。

E. 結論

培養ラット胎児神経細胞の Caspase-3 の関与する自然アポトーシスを用い、ApopLadder EX (タカラバイオ MK600) と Agilent 2100 バイオアナライザーにて DNA ラダー形成を見ることで、薬剤等のアポトーシスへの影響を簡便に評価するシステムを構築できた。

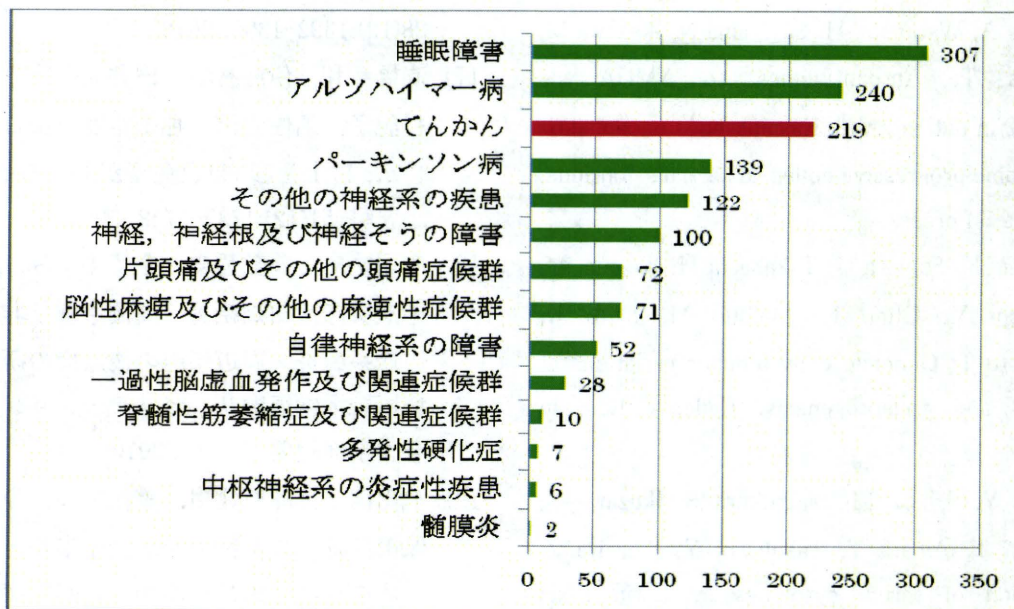


図4 2008年度厚生労働省患者調査 (単位: 千人)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakuma H, Awaya Y, Shiomi M, Yamanouchi H, Takahashi Y, Saito Y, Sugai K, Sasaki M: Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures (AERRPS): a peculiar form of childhood encephalitis. *Acta Neurol Scand* 21(4):251-256, 2010
- 2) Kashihara K, Ohno M, Takahashi Y: Twenty-one-year course of adult-onset Rasmussen's encephalitis and bilateral uveitis: case report. *J Neurol Sci* 294(1-2):127-130, 2010
- 3) Muto A, Oguni H, Takahashi Y, Shirasaka Y, Sawaishi Y, Yano T, Hoshida T, Osaka H, Nakasu S, Akasaka N, Sugai K, Miyamoto A, Takahashi S, Suzuki M, Ohmori I, Nabatame S, Osawa M: Nationwide survey (incidence, clinical course, prognosis) of Rasmussen's encephalitis. *Brain Dev* 32(6):445-453, 2010
- 4) Yoshikawa T, Asano Y, Takahashi Y: Detection of DNA of six human herpesviruses in the cerebrospinal fluid of immunocompetent non-herpetic acute limbic encephalitis patients. *Microbiol Immunol* 54(8):471-474, 2010
- 5) Tachibana N, Shirakawa T, Ishii K, Takahashi Y, Tanaka K, Arima K, Yoshida T, Ikeda S: Expression of various glutamate receptors including N-methyl-D- aspartate receptor (NMDAR) in an ovarian teratoma removed from a young woman with anti-NMDAR encephalitis. *Intern Med* 49(19):2167-2173, 2010
- 6) Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, Furuya H, Takahashi Y, Muramatsu M, Kinoshita S, Abe M, Ikeda H, Kashiwagi M, Song Y, Ueta M, Sotozono C, Ikezawa Z, Hasegawa R; JSAR research group: HLA-B*1511 is a risk factor for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Epilepsia* 51(12):2461-2465, 2010
- 7) Tojo K, Nitta K, Ishii W, Sekijima Y, Morita H, Takahashi Y, Tanaka K, Ikeda S: A Young Man with Anti-NMDAR Encephalitis following Guillain-Barré Syndrome. *Case Rep Neurol* 3(1):7-13, 2011
- 8) Takahashi Y, Mori H, Mishina M, Watanabe M, Kondo N, Shimomura J, Kubota Y, Matsuda K, Fukushima K, Shiroma N, Akasaka N, Nishida H,

- Imamura A, Watanabe H, Sugiyama N, Ikezawa M, Fujiwara T: Autoantibodies to NMDA-type GluR ϵ 2 in patients with Rasmussen's encephalitis and chronic progressive epilepsy partialis continua. *Epilepsia*, in press.
- 9) Shimojima K, Sugiura C, Takahashi H, Ikegami M, Takahashi Y, Ohno K, Matsuo M, Saito K, Yamamoto T: Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res*, in press.
- 10) Nomura Y, Aihara M, Matsukura S, Ikezawa Y, Kambara T, Aihara Y, Takahashi Y, Ikezawa Z: Evaluation of serum cytokines levels in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome in compared with other delayed-type adverse drug reactions. *J Dermatol*, in press.
- 11) 高橋幸利, 最上友紀子, 高山留美子: 神経疾患と抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体. *Clinical Neuroscience* 28(4):364-365, 2010
- 12) 高橋宏佳, 高橋幸利, 美根 潤, 向田壮一, 池上真理子, 池田浩子, 大谷英之, 下村次郎, 久保田裕子, 藤原建樹: Dravet 症候群における Topiramate の治療効果. *脳と発達* 42(4):273-276, 2010
- 13) 野口佐綾香, 加賀佳美, 高橋幸利, 青柳閑郎, 中村幸介, 神谷裕子, 中根貴弥, 金村英秋, 杉田完爾, 相原正男: 神経節神経腫による傍腫瘍症候群 (抗 GluR ϵ 2 抗体陽性) と考えられた反復性小脳失調症の一例. *脳と発達* 42(4):297-301, 2010
- 14) 高橋幸利, 最上友紀子, 高山留美子, 池田浩子, 今井克美: 辺縁系脳炎とグルタミン酸受容体抗体. *Brain and Nerve* 62(8):827-837, 2010
- 15) 高橋幸利, 伊藤智城, 臼井大介, 木村暢佑, 木村記子, 須佐史信, 那須裕郷, 福山哲広, 最上友紀子, 高山留美子, 池田浩子, 今井克美: 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎. *小児科診療* 73(12):2149-2154, 2010
- 16) 高橋幸利, 伊藤智城, 臼井大介: 神経疾患と分子マーカー、3. 脳炎. *Clinical Neuroscience* 28(12):1392-1395, 2010
- 17) 高橋幸利, 伊藤智城, 臼井大介, 木村暢佑, 木村記子, 須佐史信, 那須裕郷, 山口解冬, 福山哲広, 村上智彦: 自己免疫が関わる脳炎・脳症. *小児科* 51(12):1737-1748, 2010
- 18) 庄司紘史, 為数哲史, 金子めぐみ, 村岡範裕, 小池文彦, 田畑絵美, 高橋幸利: 非ヘルペス性辺縁系脳炎・周辺疾患の後遺症の研究. *国際医療福祉大学福岡リハビリテーション学部・福岡看護学部紀要* 6:7-12, 2010
- 19) 池田浩子, 藤原建樹, 重松秀夫, 今井克美, 久保田英幹, 久保田裕子, 高橋幸利, 井上有史: ミオクロニー欠神てんかんの臨床症状と経過. *脳と発達* 43(1):14-18, 2011
- 20) 臼井大介, 満田直美, 細川卓利, 藤枝幹也, 高橋幸利, 脇口 宏: 髄液中抗グルタミン酸受容体 δ 2 および ϵ 2 抗体陽性で転換性障害を合併した遷延性小脳失調症の 1 例. *脳と発達* 43(1):41-45, 2011
- 21) 浜野宣行, 高橋幸利, 岡本明久, 三木博和, 阪本幸世, 西憲一郎, 中尾慎一, 新宮 興: 誤嚥性肺炎を併発した非腫瘍性急性辺縁系脳炎の 1 症例. *日本集中治療医学会雑誌*, 印刷中
- 22) 高橋宏佳, 今井克美, 高山留美子, 美根 潤, 大谷早苗, 池田浩子, 久保田裕子, 高橋幸利, 井上有史, 藤原建樹: 修正ケトン食が著効した部分発作とスパズムの複合発作を有するてんかんの一例. *脳と発達*, 印刷中
- 23) 齊藤利雄, 斎藤朋子, 高橋幸利, 穀内洋介, 藤村晴俊: 脳 MRI で大脳基底核、視床枕、後頭・側頭葉皮質病変を呈し、抗グルタミン酸受容体抗体が陽性であった若年女性脳炎の 1 例. *臨床神経学*, 印刷中
- 24) 高橋幸利, 伊藤智城, 臼井大介, 木村暢佑, 須佐史信, 那須裕郷, 福山哲広, 藤原由美, 村上智彦, 山口解冬, 高山留美子, 大谷英之, 最上友紀子, 池田浩子, 今井克美, 重松秀夫: けいれんを主症状とするてんかん. *小児内科* 43, 2011, 印刷中
- 25) 高橋幸利, 山崎悦子, 最上友紀子, 高尾恵美子,

- 笠井理沙, 西村成子: 脳炎と興奮毒性, 細胞傷害性 T 細胞. *Neuroinfection*, 2011, 印刷中
- 26) 高橋幸利, 伊藤智城, 臼井大介, 木村暢佑, 須佐史信, 那須裕郷, 福山哲広, 藤原由美, 村上智彦, 山口解冬, 最上友紀子, 高山留美子, 池田浩子, 今井克美: 急性辺縁系脳炎. *小児科診療* 74(6), 2011, 印刷中
- 27) 高橋幸利, 久保田裕子, 池田浩子, 高山留美子, 最上友紀子, 池上真理子, 向田壮一, 大谷英之, 大谷早苗, 美根潤, 重松秀夫, 今井克美: 小児難治てんかん症例における Lamotrigine の併用使用経験. *日本小児科学会誌*, 印刷中
- 28) 山本吉章, 高橋幸利, 西村成子, 幾見泰洋, 三島信行, 賀川義之: CYP2C9 および CYP2C19 の SNP 迅速測定法の開発と小児てんかん患者への臨床応用. *YAKUGAKU ZASSHI*, 印刷中
2. 書籍刊行
- 1) 高橋幸利: 小児てんかん診療マニュアル (監修: 藤原建樹、編集: 高橋幸利), 診断と治療社
3. 学会発表
- 1) 仲村卓郎, 嶺間博隆, 桑江涼子, 下地圭, 砂川信, 宮里善次, 玉那覇榮一, 比嘉千明, 高橋幸利, 内藤悦雄: 回復期に髄液乳酸値の上昇を認めた Leigh 脳症の 1 例. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 2010.4.23-25; 盛岡
- 2) 古山秀人, 岡嶋真紀, 横堀雄太, 椿淳子, 岡嶋覚, 中山承代, 澤田博行, 高橋幸利: 精神神経症状に抑肝散が有効であった辺縁系脳炎の 1 例. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 2010.4.23-25; 盛岡
- 3) 高橋幸利, 美根潤, 最上友紀子, 池上真理子, 高山留美子, 向田壮一, 池田浩子, 久保田裕子, 今井克美: インフルエンザ脳症後てんかんの免疫病態の検討: 髄液サイトカインについて. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 2010.4.23-25; 盛岡
- 4) 向田壮一, 高橋幸利, 池田浩子, 重松秀雄, 大谷英之: カルバマゼピンにより Stevens-Johnson 症候群を発症した HLA-B*1502 をもつ在日中国人の 1 例. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 2010.4.23-25; 盛岡
- 5) 道下崇史, 重光幸恵, 桃木恵美子, 西口康介, 玉木久光, 大森多恵, 三澤正弘, 伊藤昌弘, 大塚正弘, 高橋幸利: 卵巣奇形腫による傍腫瘍性辺縁系脳炎の 1 女児例. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 2010.4.23-25; 盛岡
- 6) 小出泰道, 高橋幸利, 宍戸丈郎, 池田仁, 臼井桂子, 山崎悦子, 寺田清人, 小尾智一, 溝口功一, 井上有史, 森川建基: ガバペンチン (GBP)、トピラマート (TPM) の有効性と安全性についての調査研究. 第 51 回日本神経学会総会, 2010.5.20-22; 東京
- 7) 亀井聡, 森田昭彦, 平良直人, 石原正樹, 南正之, 水谷智彦, 高橋幸利: 単純ヘルペス脳炎における抗グルタメート受容体 (GluR) 抗体の検出と転帰との関連. 第 51 回日本神経学会総会, 2010.5.20-22; 東京
- 8) 長坂江理, 田代裕一, 水野裕司, 山崎恒夫, 成田耕介, 鈴木雄介, 高橋幸利, 岡本幸市: 脳血流変化を検討した自己免疫関連脳炎の 7 症例. 第 51 回日本神経学会総会, 2010.5.20-22; 東京
- 9) 岡崎敏郎, 荒川竜樹, 木村成志, 高橋幸利, 熊本俊秀: 急性脳炎・脳症に伴う画像変化の臨床病理学的検討. 第 51 回日本神経学会総会, 2010.5.20-22; 東京
- 10) 大石知瑞子, 長田純理, 内堀歩, 宮崎泰, 川嶋聡子, 岡田陽子, 高橋幸利, 千葉厚郎: 髄液グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎の 4 症例. 第 51 回日本神経学会総会, 2010.5.20-22; 東京
- 11) 田代裕一, 峰岸敬, 高橋幸利, 岡本幸市: 抗グルタミン酸受容体抗体関連脳炎症例における卵巣奇形腫の免疫組織学的検討. 第 51 回日本神経学会総会, 2010.5.20-22; 東京
- 12) 山崎悦子, 高橋幸利, 寺田清人, 溝口功一, 井上有史: 脳症後てんかんの治療—急性期と慢性期—. 第 51 回日本神経学会総会, 2010.5.20-22; 東京
- 13) 樋口雄二郎, 西平靖, 遠藤一博, 諏訪園秀吾,

- 楠 進, 高橋幸利, 末原雅人: Bickerstaff 型脳幹脳炎 4 例における抗グルタミン酸受容体抗体の検討. 第 51 回日本神経学会総会, 2010.5.20-22; 東京
- 14) 坂内優子, 小国弘量, 大澤真木子, 廣瀬伸一, 兼子 直, 高山留美子, 高橋幸利, 藤原建樹, 山川和弘: Dravet 症候群死亡例の全国調査. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 15) 池上真理子, 高橋幸利, 向田壮一, 高山留美子, 池田浩子, 今井克美, 大谷英之, 久保田裕子, 重松秀夫, 井上有史: West 症候群における ACTH 療法反復施行の検討. 第 2 報: 発病年齢時期, 治療開始時期, ACTH 投与年齢時期と有効性. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 16) 高山留美子, 高橋幸利, 最上友紀子, 池上真理子, 向田壮一, 池田浩子, 今井克美, 重松秀夫, 井上有史, 鈴木保宏: 眼周囲の知覚刺激によると思われる自己誘発発作の見られた 2 症例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 17) 高橋幸利, Meilia M. Suriadi, 久保田裕子, 美根潤, 山崎悦子, 高山留美子, 池上真理子, 向田壮一, 最上友紀子, 井上有史: 脳炎後難治性てんかんの血液脳関門透過性亢進と免疫病態の解明. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 18) 根岸 豊, 濱口貴代, 小林 悟, 安藤直樹, 伊藤哲哉, 戸莉 創, 高橋幸利: 抗 NMDA 受容体抗体陽性急性辺縁系脳炎の 13 歳女児例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 19) 泉 鉉吉, 高橋幸利: 緑膿菌感染症に罹患後, てんかん発作が消失した AERRPS (Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures) の 1 例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 20) 高野志保, 高橋幸利, 森 寿: NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニットに対する新たな自己抗体スクリーニング系の確立と患者血清を用いた検討. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 21) 向田壮一, 今井克美, 下島圭子, 山本俊至, 池上真理子, 池田浩子, 高山留美子, 最上友紀子, 高橋幸利: 点頭てんかんを発症した Williams 症候群の 2 症例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 22) 小野浩明, 高橋幸利: インフルエンザ感染を契機に非ヘルペス性辺縁系脳炎を発症した 1 例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 23) 小泉ひろみ, 高橋幸利: 地震後急性発症し, 精神病性障害と考えられた抗 NMDA 受容体抗体陽性脳症の 12 歳女児例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 24) 岩井明日香, 三浦良介, 寺澤厚志, 松波邦洋, 伊藤玲子, 高橋幸利, 木全かおり, 折居恒治, 今村淳: MRSpectroscopy (MRS) で解析した症候性 West 症候群の 2 症例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 25) 樋口 司, 西村貴史, 石田岳史, 福山哲弘, 稲葉雄二, 高橋幸利: 言語機能が徐々に回復した亜急性脳症の 1 例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 26) 島袋陽子, 大府正治, 崎原徹裕, 高橋幸利: 卵巣奇形腫を伴った抗グルタミン酸受容体 (GluR) 抗体陽性辺縁系脳炎の 1 例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 27) 崎原徹裕, 大府正治, 島袋陽子, 高橋幸利: ステロイドパルス療法が有効であった抗グルタミン酸受容体 (GluR) 抗体陽性脳炎の 1 例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 28) 中村康子, 松本浩, 高橋幸利: 難治性痙攣, 意識障害を呈し, 非ヘルペス性辺縁系脳炎と診断した 1 例. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010.5.20-22; 福岡
- 29) 福田美穂, 高橋幸利, 山本寿子, 橋本修二, 宮本雄策, 新井奈津子, 神山紀子, 村上浩史, 山本 仁: 強い精神症状を認めた非ヘルペス性辺縁系脳炎の 1 例. 第 46 回神奈川小児神経懇話会
- 30) 白井晴己, 有馬ふじ代, 後藤美和, 山本恭平,

- 平塚 恵, 岡田隆文, 松原啓太, 輿石 薫, 込山 修, 高橋幸利: インフルエンザ罹患後に辺縁系脳症が疑われた1例. 日本小児科学会東京都地方会, 2010.6.12; 東京
- 31) 最上友紀子, 高橋幸利, 那須裕郷, 須佐史信, 木村暢佑, 木村記子, 臼井大介, 伊藤智城, 福山哲広, 高山留美子, 池田浩子, 今井克美, 重松秀夫: 先天性中枢性肺胞低換気症候群にてんかんを合併した女児例. 第53回静岡小児神経研究会, 2010.6.19; 浜松
- 32) 松山裕文, 下竹昭寛, 松本理器, 池田昭夫, 高橋良輔, 松橋眞生, 福山秀直, 田中恵子, 高橋幸利: 抗NMDA受容体抗体陽性で病変以外に多焦点を獲得した難治部分てんかんの一症例. 日本神経学会近畿地方会, 2010.7.4
- 33) 大谷早苗, 今井克美, 高橋宏佳, 高山留美子, 最上友紀子, 大谷英之, 池田浩子, 重松秀夫, 美根 潤, 高橋幸利, 下島圭子, 山本俊至, 井上有史: CDKL5 遺伝子異常を有する乳児早期発症てんかんの検討. 第3回日本てんかん学会東海・北陸地方会, 2010.7.10; 名古屋
- 34) 市山高志, 庄司敏史, 高橋幸利: パネルディスカッション「ヘルペス脳炎と非ヘルペス脳炎の最近のトピックス」非ヘルペス性辺縁系脳炎の髄液サイトカイン解析 単純ヘルペス脳炎との比較検討. 第17回ヘルペス感染症フォーラム, 2010.8.20-21; 札幌
- 35) 杉山永見子, 鹿庭なほ子, 頭金正博, 黒瀬光一, 長谷川隆一, 松永佳世子, 高橋幸利, 古谷博和, 村松正明, 外園千恵, 木下 茂, 相原道子, 池澤善郎, 斎藤嘉朗: 日本人におけるスティーブンス・ジョンソン症候群及び中毒性表皮壊死症と相関するHLAタイプの探索(第三報). 免疫毒性学会, 2010.9.9-10; 筑波
- 36) 後藤昌英, 穂坂 翔, 佐藤未織, 加藤啓輔, 塩野淳子, 泉 維昌, 小池和俊, 土田昌宏, 高橋幸利: 難治頻回部分発作重積型急性脳炎(AERRPS)に血球貪食性リンパ組織球症(HLH)を合併した1例. 関東小児神経研究会, 2010.9.12
- 37) 曾我一將, 尾崎 心, 入岡 隆, 高橋幸利, 水澤英洋: 卵巣奇形腫を合併した抗GluR抗体陽性脳幹脳炎の36歳女性例. 第194回日本神経学会関東地方会, 2010.9
- 38) 古澤嘉彦, 小川雅文, 村田美穂, 高橋幸利: 急性小脳炎発症後、4年の経過で小脳性運動失調が緩徐に進行したGluR抗体陽性の40歳男性例. 第194回日本神経学会関東地方会, 2010.9
- 39) 高木謙太郎, 水谷真之, 向井信弘, 松村 謙, 大久保卓哉, 渡邊睦房, 高橋幸利, 鎌田智幸: Ramsay hunt 症候群に辺縁系脳炎を合併した87歳女性の1例. 第194回日本神経学会関東地方会, 2010.9
- 40) 南木康作, 荻野 悠, 川島弘彦, 村山真治, 宮内安澄, 岩田祐輔, 小松素明, 小出隆司, 有馬宏和, 中川博之, 高橋幸利, 田中恵子: 血清抗GluR δ 2抗体、髄液抗NMDAR抗体陽性であった非ヘルペス性辺縁系脳炎の一例. 内科学会関東地方会, 2010.10.2
- 41) 岸谷 融, 村松倫子, 横山広美, 三浦豊章, 小林康孝, 米田 誠, 高橋幸利: ステロイドが著効した非ヘルペス性辺縁系脳炎の1例. 第128回日本神経学会東海北陸地方会, 2010.10
- 42) 立花直子, 石井恵子, 高橋幸利, 田中恵子, 有馬邦正, 池田修一: 若年女性の卵巣におけるNMDAR関連抗原の発現に関する免疫組織化学検討. 第15回日本神経感染症学会, 2010.10.8-9; 福島
- 43) 池田浩子, 高橋幸利, 今井克美, 伊藤智城, 臼井大介, 木村暢佑, 木村記子, 近藤聡彦, 須佐史信, 高山留美子, 那須裕郷, 福山哲広, 最上友紀子, 井上有史: Turner 症候群に合併するてんかん. 第44回日本てんかん学会, 2010.10.14-15; 岡山
- 44) 最上友紀子, 高橋幸利, 那須裕郷, 須佐史信, 臼井大介, 木村暢佑, 木村記子, 伊藤智城, 福山哲広, 高山留美子, 池田浩子, 今井克美, 重松秀夫, 井上有史: 脳炎・脳症後てんかんと抗てんかん薬の副作用. 第44回日本てんかん学会, 2010.10.14-15; 岡山
- 45) 大谷早苗, 今井克美, 高橋宏佳, 高山留美子,

- 最上友紀子, 大谷英之, 池田浩子, 重松秀夫, 美根 潤, 高橋幸利, 下島圭子, 山本俊至, 井上有史: CDKL5 遺伝子異常を有する乳児早期発症てんかんの検討. 第 44 回日本てんかん学会, 2010.10.14-15; 岡山
- 46) 池上真理子, 高橋幸利, 向田壮一, 高山留美子, 最上友紀子, 池田浩子, 今井克美, 大谷英之, 久保田裕子, 重松秀夫, 井上有史: 難治再発 West 症候群における ACTH 療法反復施行の検討. 第 3 報: 投与時脳波所見と有効性. 第 44 回日本てんかん学会, 2010.10.14-15; 岡山
- 47) 操 徳智, 大谷英之, 萩原郁夫, 大谷早苗, 高橋幸利, 山川和弘, 井上有史: 乳児重症ミオクローニーてんかんのマウスモデルにおけるステイリペントールの効果. 第 44 回日本てんかん学会, 2010.10.14-15; 岡山
- 48) 中島絵梨花, 田中 学, 松浦隆樹, 菅谷ことこ, 菊池健二郎, 南谷幹之, 高橋幸利, 浜野晋一郎: 水痘脳炎後に難治性てんかんを示した 1 例. 第 44 回日本てんかん学会, 2010.10.14-15; 岡山
- 49) 宮田理英, 田沼直之, 林 雅晴, 高橋幸利: 水痘罹患を契機に発症した自己免疫性の脳症が疑われた West 症候群後難治てんかんの 8 歳男児例. 第 44 回日本てんかん学会, 2010.10.14-15; 岡山
- 50) 赤坂真奈美, 亀井 淳, 曾我菜海, 高橋幸利, 千田勝一: 抗グルタミン酸受容体抗体 (抗 GluR ϵ 2 抗体) 陽性の自己免疫介在性脳炎に残存するてんかん治療について. 第 16 回小児神経学会東北地方会, 2010.10
- 51) 細田直子, 坪内めぐみ, 横山勝利, 太田典子, 松村博史, 長田泉美, 岡田晋一, 渡辺保裕, 前垣義弘, 高橋幸利, 中込和幸: 慢性腎炎を合併し、ステロイドパルス療法により症状の改善を認めた自己免疫性脳炎の一症例. 中国地区 GHP 研究会, 2010.10
- 52) 細田直子, 坪内めぐみ, 横山勝利, 太田典子, 松村博史, 長田泉美, 岡田晋一, 渡辺保裕, 前垣義弘, 高橋幸利, 中込和幸: 慢性腎炎を合併し、ステロイドパルス療法により症状の改善を認めた自己免疫性脳炎の一症例. 精神科診断学会, 2010.10
- 53) 細田直子, 坪内めぐみ, 横山勝利, 太田典子, 松村博史, 長田泉美, 岡田晋一, 渡辺保裕, 前垣義弘, 高橋幸利, 中込和幸: 慢性腎炎を合併し、ステロイドパルス療法により症状の改善を認めた自己免疫性脳炎の一症例. 中四国精神神経学会・保健学会, 2010.10
- 54) 小俣 卓, 高梨潤一, 高橋幸利, 新井ひでえ, 田邊雄三, 本島敏乃: 脳炎後に重度の後遺症を残し 2 年以上経過した後、著大な回復をみせている女児例. 千葉県小児神経懇話会, 2010.11
- 55) 久保田裕子, 森川建基, 高橋幸利: 発作間欠時脳波の変化に伴い、発作型が変化した West 症候群の 1 例. 第 61 回名古屋臨床脳波検討会, 2010.11.6; 名古屋
- 56) 有馬宏和, 村山真治, 宮内安澄, 西村 修, 藤本喜展, 笠井健児, 中川博之, 持丸文雄, 南木康作, 小出隆司, 高橋幸利, 田中恵子: 血清抗 GluR σ 2 抗体、髄液抗 NMDAR 抗体陽性であった非ヘルペス性辺縁脳炎の一例. 第 392 回日本産科婦人科学会神奈川地方部会, 2010.11.14; 平塚
- 57) 飯田ちひろ, 平野恵子, 奥村良法, 渡邊誠司, 愛波秀男, 高橋幸利: 精神症状で発症し診断に苦慮した非ヘルペス性辺縁系脳炎の一例. 第 54 回静岡小児神経研究会, 2010.11.20; 静岡
- 58) 須佐史信, 高橋幸利, 藤原由美, 村上智彦, 最上友紀子, 高山留美子, 大谷早苗, 池田浩子, 久保田裕子, 重松秀夫: 小児期発病モヤモヤ病におけるてんかんの臨床的検討. 第 54 回静岡小児神経研究会, 2010.11.20; 静岡
- 59) 山本吉章, 幾見泰洋, 三島信行, 西村成子, 高橋幸利: 小児てんかん患者を対象としたクロバザムの固体内変動に関する検討. 第 64 回国立病院総合医学会学術集会, 2010.11.26-27; 福岡
- 60) 橋口俊太, 室橋洋子, 遠藤雅直, 上木英人, 高橋竜哉, 黒岩義之, 高橋幸利: 高齢男性にみられ悪性腫瘍の合併がない辺縁系脳炎の 67 歳男性例. 第 195 回日本神経学会関東地方会, 2010.11.27

- 61) 金塚陽一, 山本正博, 梁 成勲, 今関良子, 高橋 幸利: 非痙攣性てんかん重積状態を呈した抗 GluR ϵ 2 抗体陽性の 78 歳女性例. 第 195 回日本神経学会関東・甲信越地方会, 2010.11.27
- 62) 甲斐 太, 荒田 仁, 林 茂昭, 長堂竜維, 高橋幸利, 丸山芳一: 抗グルタミン酸受容体抗体が陽性であった可逆性脳梁膨大部病変を伴った脳炎の 2 例. 第 192 回日本神経学会九州地方会, 2010.11.27
- 63) 鹿庭なほ子, 頭金正博, 黒瀬光一, 長谷川隆一, 高橋幸利, 古谷博和, 松永佳世子, 村松正明, 木下茂, 相原道子, 池澤善郎, 斎藤嘉朗: カルバマゼピン関連スティープンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症の日本人における遺伝的危険因子. 日本臨床薬理学会, 2010.12.1-3; 京都
- 64) 大川真理, 森田ゆかり, 大崎康史, 清水祐司, 村田和子, 高橋幸利, 土居義典: 進行性脳萎縮、失語、片麻痺の経過中に筋萎縮を認め、ラスムッセン脳炎慢性期と考えられた 1 例. 第 89 回日本神経学会中国・四国地方会, 2010.12.4; 島根県出雲
- 65) 白久義久, 白井謙太郎, 金子節子, 菅原祐之, 荒木 聡, 林 雅晴, 高橋幸利: 激しい不随意運動と情動興奮を来し、髄液中の抗 GluR ϵ 2, δ 2 抗体が陽性であった非ヘルペス性急性辺縁系脳炎様経過を示した 12 歳女児例. 蔵王セミナー, 2011.2.11-12; 山形
- 66) 青山幸平, 宮地悠江, 佐藤有沙, 徳永博秀, 後藤志歩, 森田 誠, 渡邊一功, 長谷川真司, 高橋幸利: 5 年後に再発を認めた抗 NMDA 受容体脳炎の 11 歳男児例. 日本小児科学会東海地方会, 2011.2
- 67) 高橋幸利, 西村成子, 角替央野, 美根 潤, 久保田裕子, 今井克美, 松田一己, 今村 淳, 藤原建樹, 井上有史: Rasmussen 症候群とその類縁疾患の自己反応性細胞障害性 T 細胞・Th1 細胞の持続性活性化の病態解明から治療開発に向けた研究. てんかん治療研究振興財団第 22 回研究報告会, 2011.3.4; 千里
- 68) 金澤恭子, 松本理器, 高橋幸利, 池田昭夫, 高橋良輔: 抗 VGKC 抗体関連辺縁系脳炎が示唆された患者群の臨床像の検討. 第 52 回京滋てんかん懇話会, 2011.3.12; 京都
- 69) 油川陽子, 高橋幸利: 高齢男性に発症した抗 GluR ϵ 2 抗体陽性の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の一例. 日本神経学会北海道地方会, 2011.3.6
- 70) 福田明子, 高木 努, 木下郁夫, 上田康雄, 高橋幸利: 免疫療法介入前に速やかに改善した抗グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎の 1 例. 第 193 回日本神経学会九州地方会
- 71) 三木康生, 高橋幸利: 抗 Hu 抗体、抗 GluR ϵ 2 抗体がともに陽性であった辺縁系脳炎の 1 例. 第 88 回日本神経学会東北地方会
- 72) Ikezawa Y, Aihara M, Matukura S, Kanbara T, Takahashi Y, Ikeda H, Ikezawa Z: The efficacy of plasmapheresis in treatment of SCARs such as SJS/TEN and the probable action mechanism. the First Eastern Asia Dermatology Congress (EADC2010), 2010.9.30-10.3; Fukuoka, Japan.
- 73) Imai K, Takenami C, Takayama R, Mogami Y, Ikeda H, Takahashi Y, Inoue Y: Anti-epileptic drug level changes by the ketogenic diet. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE DIETARY TREATMENTS FOR EPILEPSY AND OTHER NEUROLOGICAL DISORDERS, 2010.10.5-8, 2010; Edinburgh, Scotland, UK.
- 74) Ihara Y, Tomonou Y, Fujita T, Ideguchi H, Inoue T, Yasumoto S, Takahashi Y, Hirose S: Steroid Pulse Therapy for a case of Frontal Lobe Epilepsy with antibodies to glutamate receptor (GluR). 8th Asian & Oceanian Epilepsy Congress, 2010.10.21-24; Melbourne, Australia.
- 75) Fukuda M, Yamamoto H, Takahashi Y. A case of Non-herpetic Acute Limbic Encephalitis with severe psychiatric symptoms. American Epilepsy Society's Annual Meeting 2010, 2010.12.3-7; San Antonio, Texas, USA.
- 76) Takayama R, Takahashi Y: Self-induced seizures probably by peri-orbital somatosensory

stimulation: a report of two cases. American Epilepsy Society's Annual Meeting 2010, 2010.12.3-7; San Antonio, Texas, USA.

77) Horigome Y, Ohtani H, Inoue Y, Sakai S, Ogiwara I, Yamakawa K, Takahashi Y: Ictal death in Dravet syndrome model mice. American Epilepsy Society's Annual Meeting 2010, 2010.12.3-7, San Antonio, Texas, USA.

78) Ikeda H, Imai K, Ikeda H, Takahashi Y, Inoue Y: Lamotrigine is favorable for startle-induced seizures. American Epilepsy Society's Annual Meeting 2010, 2010.12.3-7; San Antonio, Texas, USA.

79) Imai K, Otani S, Ikeda H, Takayama R, Takahashi H, Mine J, Mogami Y, Shigematsu H, Takahashi Y, Shimojima K, Yamamoto T, Inoue Y: Peculiar seizures in the infantile epilepsy with CDKL-5 (cyclin-dependent kinase-like 5) mutation/deletion. American Epilepsy Society's Annual Meeting 2010, 2010.12.3-7; San Antonio, Texas, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

てんかん患者由来 iPS 細胞および神経幹細胞の樹立

研究代表者 金村米博

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 再生医療研究室 室長

研究協力者 正札智子

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 幹細胞医療研究室 室長

研究協力者 松田一己

独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター 脳神経外科 医長

研究要旨

20 症例の難治性てんかん患者から生体試料（神経組織、皮膚組織）の提供を受け、神経幹細胞（11 株）、アストロサイト様神経上皮細胞（13 株）、線維芽細胞（20 株）をそれぞれ樹立に成功した。線維芽細胞を使用して iPS 細胞の樹立を試み、2 症例から合計 8 クローンの iPS 細胞の樹立に成功した。これら神経幹細胞と iPS 細胞およびその分化細胞の *in vitro* における細胞特性解析を実施した。その結果、てんかん患者神経組織由来神経幹細胞の増殖は不良で、てんかんモデル細胞として創薬研究に応用できる生物資源化することは困難であり、線維芽細胞由来 iPS 細胞から分化誘導して神経系細胞を作成するアプローチの優位性が確認された。

A. 研究目的

難治性てんかん患者に由来するヒト iPS 細胞/神経幹細胞を樹立し神経細胞を作成し、てんかんモデル細胞としての有用性を検証し、抗てんかん薬開発過程に利用可能な新規生物資源の確立とそれを応用した新規創薬評価系の開発を目指す。

B. 研究方法

1. てんかん患者由来試料の収集

てんかん患者由来試料を用いた研究は、大阪医療センター医学倫理委員会および静岡てんかん・神経医療センター倫理委員会の承認の下、実施した。静岡てんかん・神経医療センター脳神経外科にて外科的治療を実施され、書面を用いたインフォームド・コンセントにて研究利用に同意が得られて提供された難治性てんかん患者に由来する生体試料（神経組織、皮膚組織）を、大阪医療センター臨床研究センターに持ち込み、研究に使用した。

2. てんかん患者神経組織由来細胞の樹立

神経組織からは neurosphere 法 (Kanemura et al. J Neurosci Res, 69, 869-879, 2002) を用いて神経幹細胞を樹立した。外科的手術で摘出された難治性てんかん患者由来の神経組織（脳室周囲組織、海馬組織）をトリプシン-EDTA (0.05%; Invitrogen 社製) 中で細切し、DNaseI (0.01%; Invitrogen 社製) を加え、37°C で 30 分間トリプシン処理を行った。反応後、溶液を遠心分離して上清を除いて得た沈殿物を EGF (20ng/ml; PeproTech 社製)、FGF2 (20ng/ml; PeproTech 社製)、LIF (10ng/ml; Chemicon 社製)、heparin (5µg/ml)、B27 (Invitrogen 社製) を含む DMEM/F12 培地（神経幹細胞培養培地）に懸濁し、25T 細胞培養フラスコに播種し、CO₂ インキュベータにて 37 度、5%CO₂ の条件で培養をおこなった。数日～3 週間培養後、浮遊細胞塊は新しいフラスコに移し同じ方法で培養を続けた。底面に生着して成育する細胞に関しては、浮遊細胞塊を除去した後、