

201110007A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金村 米博

平成 24 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金村 米博

平成 24 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金村米博

平成 24 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. 培養ヒトアストロサイト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	13
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	19
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	29
---------------------------	----

平成 23 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	統括診療部長
	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
	高田 愛	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
	高久保瞳	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
	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
	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

研究要旨

SMAD 阻害剤を用いた分化誘導法を使用して、てんかん患者由来 iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導を試み、てんかん患者由来 iPS 細胞は neurosphere 形成能を有する神経幹細胞/前駆細胞に分化誘導させることが可能であり、その神経幹細胞/前駆細胞から多数の神経細胞を作成することが技術的に可能であることが確認された。培養ヒトアストロサイトを用いたアポトーシス測定系の開発を行い、Staurosporine を培養 7 日目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引き起こされ、自然経過の中で培養 7 日目以降に加速度的に Caspase-3 活性が上昇し、培養 19 日目以降 DNA ラダー形成の増加を認めることを明らかにした。さらに、てんかん患者由来 iPS 細胞から作成した neurosphere に由来する神経系分化細胞の特性解析に、健常人由来 iPS 細胞から作成した neurosphere の培養・解析手法（細胞内カルシウム変動測定、免疫組織化学的解析）が応用可能であること、およびてんかん患者 iPS 細胞由来神経細胞は、健常人由来 iPS 細胞由来細胞よりもカルシウム応答性を示すリガンドの種類が多く、radial glia 細胞数が多いことを明らかにした。これら結果から、本研究課題の最大の目標であった、難治性てんかん患者に由来するヒト iPS 細胞/神経幹細胞および神経細胞の作成に成功し、さらにそれら細胞を用いた評価系の開発の両方に成果を上げることができ、当初目標は達成されたものと考えられる。

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 統括診療部長

佐藤 薫

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第一室長

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、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

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

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
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。

（倫理面への配慮）

本研究は、大阪医療センターにおいては、大阪医療センター医学倫理委員会にて承認を受けた「難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発」方法によ

り実施した。静岡てんかん・神経医療センターにおいては、患者由来髄液を用いた研究は、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、「ラスム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。国立医薬品食品衛生研究所においては、動物実験は国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。また、ヒト iPS 細胞の使用に関しては、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会から承認を受けた「ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築と創薬研究」の方法に従って実施され、研究に使用した細胞は静岡てんかんセンターにおいて匿名化した後、さらに大阪医療センターで再匿名化が実施され、2 重匿名化状態の細胞で国立医薬品食品衛生研究所に提供された。

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、てんかん患者由来 iPS 細胞から、SMAD 阻害剤を用いた分化誘導法を使用して神経系細胞への分化誘導を試み、さらに接着培養に移行させ、その細胞の神経分化能を解析した。その結果、てんかん患者由来 iPS 細胞は neurosphere 形成能を有する神経幹細胞/前駆細胞に分化誘導させることが可能であり、その神経幹細胞/前駆細胞から多数の神経細胞を作成することが技術的に可能であることが確認された。これら成果から、iPS 細胞を経由して、てんかん患者由来神経細胞を大量に作成するアプローチは十分な実用性を有する方法であり、てんかん患者由来 iPS 細胞およびその神経系分化細胞は、抗てんかん薬開発研究に利用可能な新規生物資源として将来性を有するものであると結論づけた。

2. 培養ヒトアストロサイトを用いたアポトーシス測定系の確立

高橋は、抗てんかん薬の開発研究に iPS 細胞由来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研究として、22年度に実施した培養ラット胎児神経細胞を用いた解析系を更に発展させ、培養正常ヒトアストロサイト (NHA) を用いて、DNA ラダー形成と Caspase-3 活性測定を用いたアポトーシス測定系の開発を実施した。その結果、NHA は、Staurosporine を培養 7 日目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引き起こされ、自然経過の中で培養 7 日目以降に加速度的に Caspase-3 活性が上昇し、培養 19 日目以降 DNA ラダー形成の増加を認めることを明らかにした。本成果により、培養ヒトアストロサイトの自然アポトーシスを利用して、薬剤のアストロサイトのアポトーシスへの影響を簡便に評価する系の開発に大きく前進できたと考える。

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

佐藤は、てんかん患者由来 iPS 細胞から作成された細胞の、抗てんかん薬開発への応用、それを応用した新規創薬評価系の開発をめざし、22年度に検討を行った、健康人由来 iPS 細胞から作成した neurosphere を用いての培養・解析手法（細胞内カルシウム変動測定、免疫組織化学的解析）の、てんかん患者由来 iPS 細胞から作成した neurosphere の特性解析への応用可能性を検討した。その結果、てんかん患者由来 iPS 細胞から作成した neurosphere に由来する神経系分化細胞の特性解析に、いずれの解析手法も応用可能であることを明らかとした。また、てんかん患者 iPS 細胞由来神経細胞は、健康人由来 iPS 細胞由来細胞よりも、カルシウム応答性を示すりガンドの種類が多く、また、radial glia 細胞数が多いことが明らかになった。これらの新知見は、新たな抗てんかん薬開発に有用な情報を与える成果であり、本成果により、てんかん患者由来 iPS 細胞に由来する神経細胞を用いた評価系の確立に大きく前進できたと考える。

D. 考察

最終年度の 23 年度は、細胞樹立に関して、てんかん患者由来 iPS 細胞から効率的に神経分化誘導を行

い、神経幹細胞/前駆細胞が作成可能であることが確認された。また、この細胞は更なる分化能を有し、生理的な反応を示す神経細胞に分化させることが可能であることが確認された。以上の成果から、てんかん患者由来細胞から iPS 細胞を樹立して、その後、神経系細胞に分化誘導を行うことで、てんかん患者由来神経細胞を作成することが技術的に可能であることが検証された。また、てんかん患者由来 iPS 細胞およびその分化細胞である神経幹細胞/前駆細胞を複数ライン樹立することに成功しており、新規生物資源化することの実現可能性を証明することができたと考える。更に、細胞機能評価系に関しては、ヒトアストロサイトおよびヒト神経細胞の細胞機能の評価するためのアッセイ系の構築に成功しており、てんかん患者由来 iPS 細胞から作成した神経幹細胞/前駆細胞を応用して、これらアッセイ系を用いた解析を実施することが可能になったと考える。3 年間の成果の総括としては、本研究課題の最大の目標であった、難治性てんかん患者に由来するヒト iPS 細胞/神経幹細胞および神経細胞の作成に成功し、さらにそれら細胞を用いた評価系の開発の両方に成果を上げることができ、当初目標は達成されたものと考ええる。

3 年間の研究成果により、てんかん患者神経組織由来神経幹細胞の増殖力は不良で、大量培養は極めて困難であることが明らかになった。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、本細胞を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、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非現実的なアプローチであり、別のアプローチを探索する必要があると判断された。一方、てんかん患者由来 iPS 細胞は増殖能に優れ、この iPS 細胞から作成された神経幹細胞/前駆細胞も増幅可能な細胞であり、これら大量培養が可能な細胞を資源化して、大量培養後に神経系細胞へ分化誘導して使用する手法は、増殖能に劣るてんかん患者神経組織由来神経幹細胞を直接使用する手法と比較して、てんかんモデル細胞

として創薬研究に使用する手法としては大きな優位性を有することを明らかにすることができた。従来、てんかん患者由来神経細胞を使用した研究はほとんど不可能であったが、本技術を応用することで、てんかん患者由来神経細胞を使用した創薬研究が実現可能になると考えられる。てんかん患者由来 iPS 細胞およびその神経系分化細胞は、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将来性を有するものであり、今後、当該分野の研究開発に応用されることに期待する。

E. 結論

3年間の成果の結果、本研究課題の最大の目標であった、難治性てんかん患者に由来するヒト iPS 細胞/神経幹細胞および神経細胞の作成に成功し、さらにそれら細胞を用いた評価系の開発の両方に成果を上げることができた。総括として、てんかん患者由来 iPS 細胞は増殖能に優れ、この iPS 細胞から作成された神経幹細胞/前駆細胞も増幅可能な細胞であり、これら大量培養が可能な細胞を資源化して、大量培養後に神経系細胞へ分化誘導して使用する手法は、増殖能に劣るてんかん患者神経組織由来神経幹細胞を直接使用する手法と比較して、てんかんモデル細胞として創薬研究に使用する手法としては大きな優位性を有することを明らかにすることができた。

F. 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

培養ヒトアストロサイト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 統括診療部長

研究要旨

てんかんは神経疾患の中で第3位の有病率で、難治発作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。2011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、培養ヒトアストロサイトを用いたアポトーシス測定系の確立を検討した。

ヒトアストロサイトは正常ヒトアストロサイト（NHA）（TAKARA BIO INC. 製品コード CC-2565、細胞数 $>1 \times 10^6$ cells/vial）を用いた。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、Caspase-3活性はCaspACE assay system, colorimetric（Promega G7351）を用いた。

培養ヒトアストロサイトは、Staurosporineを7DIV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11DIV以降加速度的にCaspase-3活性が上昇し、19DIV以降DNAラダー形成の増加を認めた。

培養ヒトアストロサイトの自然アポトーシスを利用して、薬剤のアストロサイトのアポトーシスへの影響を簡便に評価することができる。

研究協力者 高久保瞳¹、西村成子¹、高尾恵美子¹、笠井理沙¹、馬場好一¹、松田一己¹、鳥取孝安¹、臼井直敬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）

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、皮質異形成（cortical dysplasia, CD）では12年、dysembryoplastic 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、

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

とし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、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。2011 年度はヒト培養アストロサイト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. ヒトアストロサイト：正常ヒトアストロサイト (NHA) (TAKARA BIO INC. 製品コード CC-2565、細胞数 $>1 \times 10^6$ cells/vial) を用いた。
2. ヒトアストロサイトの培養：35mm 径ディッシュ (Nunc、#153066) に 44000 cells を播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーター中で培養を行った。
3. staurosporine によるアポトーシス：staurosporine, 3 μ M および caspase inhibitor (Z-VAD-FMK), 50 μ M を用いて行った。
4. LDH アッセイ：自動分析装置 BioMajesty (JCA-BM 6010、日本電子 (株)) を用いて、試薬はシカリキッド LDH J (7170) (関東化学 (株)) を用いた。
5. Caspase-3 活性:caspACE assay system, colorimetric (Promega G7351) を用いた。
6. アポトーシス：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. staurosporine による培養ヒトアストロサイトのアポトーシス：staurosporine を 7DIV 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、培養上清の LDH 濃度上昇が起こり、caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) により staurosporine による Caspase-3 活性の増加、DNA ラダー形成の増加、培養上清の LDH 濃度上昇が抑制された (図 1)。
2. 培養ヒトアストロサイトの自然アポトーシス：培養ヒトアストロサイトは、自然経過の中で 11DIV 以降加速度的に caspase-3 活性が上昇し、19DIV 以降 DNA ラダー形成の増加を認めた (図 2)。

D. 考察

我々の 2010 年度研究で、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 年度培養ヒトアストロサイトにおけるアポトーシスを検討し、11DIV 以降加速度的に Caspase-3 活性が上昇し、19DIV 以降 DNA ラダー形成の増加を認めた。ラット細胞に比べてヒトアストロサイトではアポトーシスの出現が 7 日くらい遅れるが、ヒト細胞に於いてもアポトーシスへの薬剤の影響を評価できるものと考えられた。

次年度以降、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。

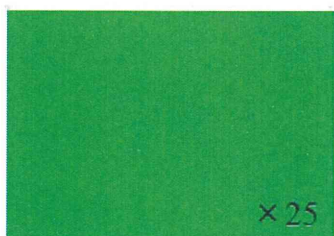
2008 年度厚生労働省疾患調査によると、てんかんは神経疾患の中で第 3 位の有病率で、1 剤目の抗てんかん薬でコントロールできる症例は 47%とされ、治療終了すなわち抗てんかん薬中止できる症例は 6.5%に過ぎない。そのためより有効な抗てんかん薬の開発は急務である。治療は長期にわたり、難治症例では多剤併用となり、発作に有効な薬剤であって

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。

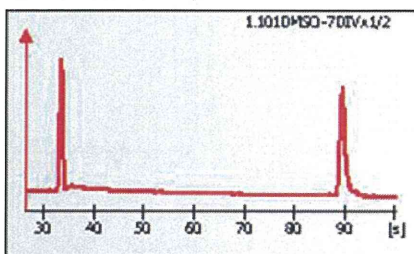
E. 結論

培養ヒトアストロサイトにおいて Caspase-3 の関与する自然アポトーシスを確認し、ApopLadder EX (タカラバイオ MK600) と Agilent 2100 バイオアナライザーにて DNA ラダー形成を評価することで、薬剤等のヒト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。

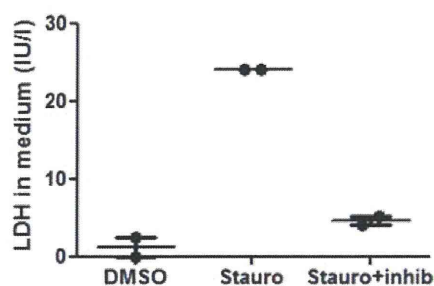
A. DMSO 7DIV



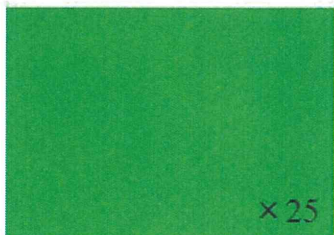
B. DMSO 7DIV



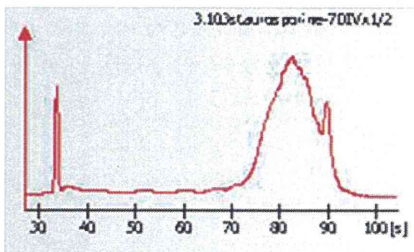
G. LDH assay



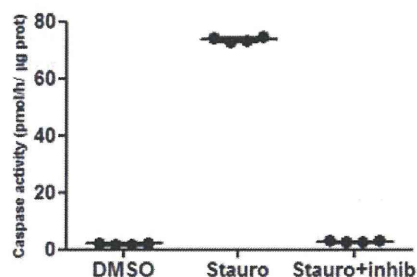
C. Staurosporine 7DIV



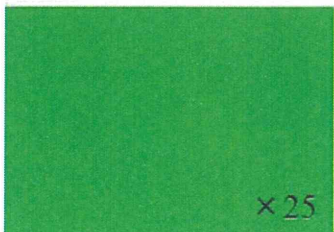
D. Staurosporine 7DIV



H. Caspase-3 assay



E. Staurosporine+inhibitor 7DIV



F. Staurosporine+inhibitor 7DIV

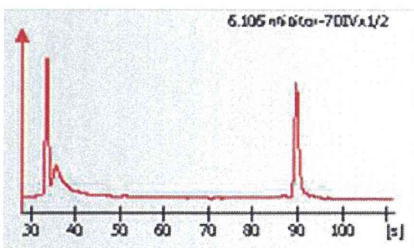


図 1 Apoptosis induced by staurosporine

7DIV おいて staurosporine を加えて観察されたアポトーシス。

A, C, E は培養細胞の顕微鏡写真、B, D, F はバイオアナライザーによる DNA フラグメンテーション解析、G は培養上清の LDH 濃度、H は培養細胞の Caspase 活性。

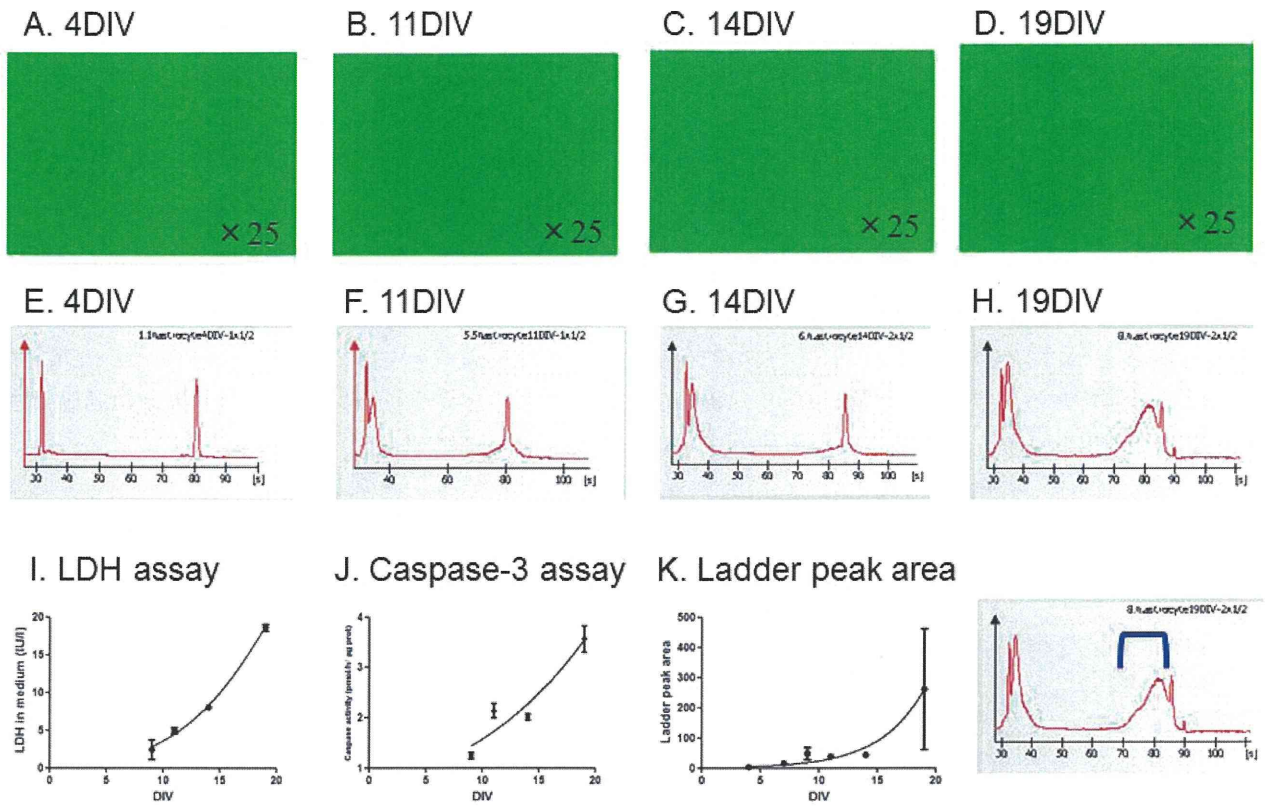


図 2 Natural apoptosis

自然アポトーシスの観察。A-D は培養細胞の顕微鏡写真、E-H はバイオアナライザーによる DNA フラグメンテーション解析、I は培養上清の LDH 濃度、J は培養細胞の Caspase 活性、K は青線で示すラダーピークの量を示す。I-K の横軸は培養日数 (DIV) を示す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakauchi M, Oguni H, Kato I, Osawa M, Hirose S, Kaneko S, Takahashi Y, Takayama R, Fujiwara T: Mortality in Dravet syndrome: search for risk factors in Japanese patients. *Epilepsia* 52 (Suppl 2): 50-54, 2011
- 2) Nomura Y, Aihara M, Matsukura S, Ikezawa Y, Kambara T, Aihara Y, Takahashi Y, Ikezawa Z: Evaluation of serum cytokine levels in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome compared with other delayed-type adverse drug reactions. *J Dermatol* 38(11):1076-1079, 2011
- 3) Sakauchi M, Oguni H, Kato I, Osawa M, Hirose S, Kaneko S, Takahashi Y, Takayama R, Fujiwara T: Retrospective multiinstitutional study of the prevalence of early death in Dravet syndrome. *Epilepsia* 52(6):1144-1149, 2011
- 4) Kawashima H, Ishii C, Yamanaka G, Ioi H, Takekuma K, Ogihara M, Hoshika A, Takahashi Y: A boy with non-herpes simplex acute limbic encephalitis and antiglutamate receptor antibodies. *Clin Med Insights Case Rep* 4:43-47, 2011
- 5) Yamazaki E, Takahashi Y, Akasaka N, Fujiwara T, Inoue Y: Temporal changes in brain MRI findings in Rasmussen syndrome. *Epileptic Disord* 13(3):229-239, 2011
- 6) Takano S, Takahashi Y, Kishi H, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Muraguchi A, Mori H: Detection of autoantibody against extracellular epitopes of N-methyl-D-aspartate receptor by cell-based assay. *Neurosci Res* 71(3):294-302, 2011
- 7) Liang JS, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, Imai K, Okanishi T, Mizuno S, Okumura A, Sugawara M, Ito T, Ikeda H, Takahashi Y, Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T: CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders. *Epilepsia* 52(10):1835-1842, 2011
- 8) Ikeda H, Imai K, Ikeda H, Shigematsu H, Shishido T, Takayama R, Fujiwara T, Takahashi Y, Inoue Y: Lamotrigine is favourable for startle-induced seizures. *Epileptic Disord* 13(3):277-283, 2011
- 9) Hashimoto N, Kagitani-Shimono K, Sakai N, Otomo T, Tominaga K, Nabatame S, Mogami Y, Takahashi Y, Imai K, Yanagihara K, Okinaga T, Nagai T, Taniike M, Ozono K: SLC2A1 gene analysis of Japanese patients with glucose transporter 1 deficiency syndrome. *J Hum Genet* 56(12):846-851, 2011
- 10) Shoji H, Kimura N, Kumamoto T, Ichiyama T, Takahashi Y: Non-Herpetic Acute Limbic Encephalitis: A New Subgroup of Limbic encephalitis? edited by Daisuke Hayasaka, Pathogenesis of Encephalitis (ISBN 978-953-307-741-3), InTech - Open Access Publisher, Dec. 2011
- 11) Iwasaki Y, Okamoto A, Shoda H, Takahashi Y, Fujio K, Kawahata K, Yamamoto K: Subacute cerebellar ataxia and atrophy developed in a young woman with systemic lupus erythematosus whose cerebrospinal fluid was positive for antineuronal cell antibody. *Lupus* 21(3):324-328, 2012
- 12) Yamamoto Y, Inoue Y, Matsuda K, Takahashi Y, Kagawa Y: Influence of concomitant antiepileptic drugs on plasma lamotrigine concentration in adult Japanese epilepsy patients. *Biol Pharm Bull* 35(4):487-493, 2012
- 13) Aihara Y, Oyama Y, Ichikawa K, Takeshita S, Takahashi Y, Kambara T, Aihara M: Toxic epidermal necrolysis in a 4-year-old boy successfully treated with plasma exchange in combination with methylprednisolone and i.v. immunoglobulin. *J Dermatol*, in press.
- 14) Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Takahashi Y: Focal encephalopathy with recurrent episodes of epileptic status and cluster mimicking hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome.

- Brain Dev, in press.
- 15) Mogami Y, Takahashi Y, Takayama R, Ohtani H, Ikeda H, Imai K, Shigematu H, Inoue Y: Cutaneous adverse drug reaction in patients with epilepsy after acute encephalitis. Brain Dev, in press.
 - 16) Takayama R, Takahashi Y, Mogami Y, Ikegami M, Mukaida S, Ikeda H, Imai K, Shigematsu H, Suzuki Y, Inoue Y: Self-induced seizures presumably by peri-orbital somatosensory self-stimulation: A report of two cases. Brain Dev, in press.
 - 17) Tohkin M, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E, Kurose K, Nishikawa J, Hasegawa R, Aihara M, Matsunaga K, Abe M, Furuya H, Takahashi Y, Ikeda H, Muramatsu M, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Ikezawa Z, the Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium: A whole-genome association study of major determinants for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. Pharmacogenomics J, in press.
 - 18) Fujita K, Yuasa T, Takahashi Y, Tanaka K, Hashiguchi S, Adachi K, Izumi Y, Kaji R: Detection of anti-glutamate receptor $\epsilon 2$ and anti-N-methyl-D: -aspartate receptor antibodies in a patient with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol, in press.
 - 19) Takanashi J, Takahashi Y, Imamura A, Kodama K, Watanabe A, Tominaga K, Muramatsu K, Barkovich AJ: Late Delirious Behavior With 2009 H1N1 Influenza: Mild Autoimmune-Mediated Encephalitis? Pediatrics, in press.
 - 20) Wakamoto H, Takahashi Y, Ebihara T, Okamoto K, Hayashi M, Ichiyama T, Ishii E: An immunologic case study of acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures. Brain Dev, in press.
 - 21) Cao D, Ohtani H, Ogiwara I, Ohtani S, Takahashi Y, Yamakawa K, Inoue Y: Efficacy of stiripentol in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. Epilepsia, in press.
 - 22) 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 51(3):192-196, 2011
 - 23) 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: 若年女性にみられた非腫瘍随伴性抗 N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体脳炎の 1 症例. 日本集中治療医学会雑誌 18:233-237, 2011
 - 24) 山本吉章, 高橋幸利, 西村成子, 幾見泰洋, 三島信行, 賀川義之: Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) 及び Cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) の Single Nucleotide Polymorphism (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 131(5):809-815, 2011
 - 25) 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):981-985, 2011
 - 26) 東本和紀, 和田啓介, 瀬島 斉, 岸 和子, 福田誠司, 安田謙二, 高橋幸利, 山口清次: 遷延する小脳失調症状にメチルプレドニゾロンパルス治療が奏功した急性小脳失調症の幼児例. 小児科臨床 64(5):925-929, 2011
 - 27) 池田修一, 高橋幸利, 飯塚高浩, 亀井 聡: 抗 NMDA 受容体脳炎における未解決の問題. 最新医学 66(5):941-952, 2011
 - 28) 原 典子, 平井光男, 小川恵吾, 大内秀高, 海部真美子, 富樫慎司, 山城亘央, 高橋幸利: 卵巣奇形腫の切除が有効であった自己免疫性辺縁系脳炎の一症例. 山梨産科婦人科学会雑誌 1(2):39-45, 2011
 - 29) 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: 緩和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 1 男児例. 脳と発達 43:305-308, 2011
 - 30) 小出泰道, 長尾雅悦, 福島克之, 宇留野勝久,

- 笹川陸男, 高橋幸利, 岡田 久, 渡邊宏雄, 星田徹, 井上美智子, 後藤一也, 馬場啓至, 石津棟暎, 井上有史: トピラマートの有効性と安全性についての多施設共同研究. てんかん研究 29:3-13, 2011
- 31) 山本吉章, 家田直幸, 三島信行, 松田一己, 高橋幸利, 賀川義之: 小児てんかん患者に対するトピラマートの治療継続率と安全性の検討; 成人を対照とした後ろ向きコホート研究. 医療薬学 37(7):411-418, 2011
- 32) 大江康子, 中里良彦, 大熊 彩, 田村直俊, 高橋幸利, 荒木信夫: 反復する視覚異常と頭痛で発症し、髄液抗 GluR ϵ 2 抗体を呈した後頭葉てんかんの 1 例. 臨床神経学 51(7): 505-509, 2011
- 33) 藤木陽平, 中嶋秀人, 伊藤 巧, 北岡治子, 高橋幸利: 抗グルタミン酸受容体抗体陽性を示した可逆性脳梁膨大部病変を有する脳症の 1 例. 臨床神経学 51:510-513, 2011
- 34) 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 16(1):96-104, 2011
- 35) 山下瑞穂, 森 英俊, 大野義雄, 美藤文貴, 河野洋二, 岸本伸人, 寺澤由佳, 高橋幸利: 卵巣成熟嚢胞性奇形腫に関連した自己免疫性辺縁系脳炎と考えられた一例. Kagawa J Obstet Gynecol 13(1):43-48, 2011
- 36) 國吉保孝, 加村 梓, 安田すみ江, 田代 実, 高橋幸利: FDG-PET が診断に有用であった非ヘルペス性亜急性脳炎の 1 例. 日本小児科学会誌 115(10):1554-1559, 2011
- 37) 原田聰志, 福田貴博, 前上里泰史, 東川上浩之, 村上 優, 高橋幸利: ムンプス感染を契機に発症し、15年間診断に苦慮された辺縁系脳炎の 1 例. 精神医学 53(9):887-890, 2011
- 38) 福山哲広, 池田浩子, 高橋幸利: けいれん重積に対してのミダゾラムの点鼻はダイアアップ坐剤より迅速に効くと報告されていますが、実際の使い方とその評価法を教えてください. 小児内科 43(増刊):407-409, 2011
- 39) 高橋幸利, 九鬼一郎: 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎. Herpes Management 15(2):8, 2011
- 40) 高橋幸利, 秋山麻里, 九鬼一郎, 山口解冬, 伊藤智城, 臼井大介, 木村暢佑, 那須裕郷, 福山哲広: 小児てんかんの診断-1989 分類と 2010 提案. Modern physician 32(3):296-301, 2012
- 41) 高橋幸利, 九鬼一郎, 山口解冬: てんかん. 病氣と薬パーフェクト BOOK2012. 薬局 2012 年 3 月増刊号, 印刷中
- 42) 高橋幸利, 高久保瞳, 西村成子, 高尾恵美子, 笠井理沙, 那須裕郷, 山口解冬: 脳症の臨床特徴・自己抗体 (抗グルタミン酸受容体抗体): 小児科領域. Neuroinfection, 印刷中
- 43) 高橋幸利, 那須裕郷, 山口解冬, 高山留美子, 大谷英之, 池田浩子, 今井克美, 重松秀夫: 偽発作などの非てんかん性発作に間違われやすいてんかん発作. 小児科診療, 印刷中
- 44) 高橋幸利, 山口解冬: 特集: 知っておきたい内科症候群 レノックス・ガストー症候群. 内科 109(6), 印刷中
- 45) 高橋幸利, 山崎悦子, 長尾雅悦, 遠山 潤, 岡田久, 渡邊宏雄, 白石一浩, 高田 裕, 夫 敬憲, 宮河真一郎, 田中滋己, 四家達彦, 田中茂樹, 中根俊成, 佐久間啓, 宇留野勝久: 脳炎・脳症後てんかんの薬物治療. Epilepsy, 印刷中
- 46) 高橋幸利, 久保田裕子, 重松秀夫, 大谷英之, 久保田英幹, 山崎悦子, 藤原建樹: 小児てんかん患者を対象としたバルプロ酸徐放製剤 (セレンニカ®錠 200mg) の特定使用成績調査. 小児科臨床, 印刷中
- 47) 山口佳剛, 和田 学, 栗田啓司, 高橋幸利, 加藤丈夫: SLE を背景とし、病態に抗グルタミン酸受容体抗体の関与が示唆された自己免疫疾患関連性辺縁系脳炎の一例. 臨床神経学, 印刷中
- 48) 高橋幸利, 植田佑樹: 小児疾患の診断治療基準: 部分てんかん. 小児内科, 印刷中
- 49) 高橋幸利, 保立麻美子: 光感受 (過敏) 性てんかん. Clinical Neuroscience 30(8), 印刷中
2. 学会発表
- 1) 高橋幸利: 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の臨床

と病態における抗 GluR 抗体の役割. 第 19 回信州小児神経研究会, 2011.5.14 ; 松本

- 2) 高橋幸利, 山崎悦子, 最上友紀子, 西村成子 : シンポジウム 2 小児免疫性中枢神経疾患の臨床ー最近の進歩ー非ヘルペス性辺縁系脳炎の免疫病態. 第 53 回日本小児神経学会, 2011.5.26-28 ; 横浜
- 3) 高橋幸利 : 新しいてんかん治療 : 現在・未来. 第 21 回福岡・久留米てんかん研究会, 2011.6.10 ; 福岡
- 4) 高橋幸利 : 脳炎後てんかんの臨床と免疫病態. 第 18 回福井県てんかん懇話会, 2011.7.8 ; 福井
- 5) 高橋幸利, 那須郷裕, 平野恵子, 星野恭子, 藤澤大輔, 坂京子 : 2 相性脳症(AESD)の病態の検討. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011.8.12-14 ; 東京
- 6) 高橋幸利, 西村成子, 高尾恵美子, 笠井理沙, 山崎悦子, 最上友紀子, 井上有史 : 培養神経細胞を用いた非ヘルペス性辺縁系脳炎の免疫病態の検討. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会, 2011.9.15-17 ; 東京
- 7) 高橋幸利, 高山留美子, 大谷英之 : シンポジウム 1 「小児を破局てんかんから救うためにはどうするか」乳幼児てんかん性脳症の病態と早期診断. 第 45 回日本てんかん学会, 2011.10.6-7 ; 新潟
- 8) 高橋幸利 : 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の臨床と免疫病態. 第 47 回摩耶神経カンファレンス, 2011.10.21 ; 神戸
- 9) 高橋幸利 : 脳炎後てんかんの臨床と免疫病態. 第 23 回信州脳神経シンポジウム, 2011.10.29 ; 松本
- 10) 高橋幸利, 山崎悦子, 最上友紀子, 西村成子 : シンポジウム 3 「急性脳炎脳症」脳症の臨床特徴・自己抗体 (抗グルタミン酸受容体抗体) : 小児科領域. 第 16 回日本神経感染症学会, 2011.11.4-5 ; 東京
- 11) 高橋幸利, 最上友紀子, 美根潤, 今井克美, 高尾恵美子, 笠井理沙, 西村成子, 井上有史, 赤坂紀幸, 今村淳 : Rasmussen 症候群の遺伝素因

解析 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) の SNP の検討. 第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会 共同大会, 2011.11.9-12 ; 千葉

- 12) 高橋幸利 : 非抗グルタミン酸受容体抗体の病態機能、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎を中心に. 第 1 回膠原病の難治性病変を考える会, 2011.11.24 ; 東京
- 13) 高橋幸利, 山崎悦子, 長尾雅悦, 遠山潤, 岡田久, 渡邊宏雄, 白石一浩, 高田裕, 夫敬憲, 宮河真一郎, 田中滋己, 四家達彦, 田中茂樹, 中根俊成, 佐久間啓, 宇留野勝久 : 脳炎・脳症後てんかんの薬物治療. 第 3 回 JEPICC ワークショップ, 2012.1.28-29 ; 京都
- 14) Takahashi Y, Yamasaki E, Mine J, Kubota Y, Mogami Y, Imai K, Inoue Y: HEMISPHERECTOMY FOR RASMUSSEN'S SYNDROME IN EARLY CHILDHOOD, CONS -IMMUNOTHERAPY-. International Symposium on Surgery for Catastrophic Epilepsy in Infants, 2012.2.18-19; Tokyo
- 15) 高橋幸利 : 抗グルタミン酸受容体抗体と脳炎・てんかん. 第 4 回愛宕小児神経精神研究会, 2012.3.14 ; 東京

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

研究要旨

てんかん患者由来 iPS 細胞から、SMAD 阻害剤を用いた分化誘導法を使用して神経系細胞への分化誘導を試み、さらに接着培養に移行させ、その細胞の神経分化能を評価した。その結果、てんかん患者由来 iPS 細胞は neurosphere 形成能を有する神経幹細胞/前駆細胞に分化誘導させることが可能であり、その神経幹細胞/前駆細胞から多数の神経細胞を作成することが技術的に可能であることが確認された。これら成果から、iPS 細胞を経由しててんかん患者由来神経細胞を大量に作成するアプローチは十分な実用性を有する研究手法であり、てんかん患者由来 iPS 細胞およびその神経系分化細胞は、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将来性を有するものであると結論づけた。

研究協力者

正札智子（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）

松田一己（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）

高田 愛（国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究センター）

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 iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導

てんかん患者由来 iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導は、SMAD 阻害剤を用いた分化誘導法を用いて実施した。セミコンフルエントの iPS 細胞をハーベス後、2 種類の SMAD 阻害剤（dorsomorphin,

SB431542）を含む培地中で 14 日間培養を行い、胚様体形成を実施した。その後、FGF2、EGF、LIF、B27 supplement を含む DMEM/F12 培地（神経幹細胞培養培地）に懸濁し、細胞凝集塊を形成させた（sphere 形成細胞）。

2. Sphere 形成細胞の分化誘導

てんかん患者由来 iPS 細胞から作成した sphere 形成細胞の分化誘導は、Poly-L-ornithine、フィブロネクチン、ラミニン（Sigma 社製）でコーティングしたチャンバースライド（Nunc 社）で実施した。B27 supplement と L-Glutamine を含む Neurobasal 培地（インビトロジェン社）にて sphere 形成細胞を接着培養し、分化誘導させた。

3. 細胞免疫染色

分化誘導後の細胞は、2 週間後に 4%パラホルムアルデヒド/PBS で 4℃にて 30 分固定した後、ブロッキングを行い、一次抗体を 4℃にて一晩反応させた。反応終了後、二次抗体反応を室温にて 1 時間行った。二次抗体反応後、封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。使用した抗体は以下の通りである：GFAP (rabbit polyclonal IgG, Sigma G9269)、 β III tubulin (mouse, monoclonal IgG, BABCO MMS-435P)。

2 次抗体 goat anti-rabbit Alexa Fluor IgG 568 (Molecular Probe)および、goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probe)。核染色は 1mM TO-PRO-3(1:1000, Molecular Probe)を用いて行なった。

4. RT-PCR 解析

cDNA の作成は RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を使用して抽出した RNA 0.5 μ g を用い、PrimeScript® 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ社) を使用して実施した。各遺伝子のトランスクリプト解析は PowerSYBR Green Master Mix (Applied Biosystems 社) で定量的 RT-PCR にて実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪医療センター医学倫理委員会で承認を受けた、「難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発」の方法に従って実施された。

C. 研究成果

前年度樹立に成功したてんかん患者由来 iPS 細胞

から、SMAD 阻害剤を用いた分化誘導法を使用して神経系細胞への分化誘導を試みた。その結果、てんかん患者由来 iPS 細胞から細胞凝集塊形成能を有する細胞 (sphere 形成細胞) への分化誘導に成功した (図 1)。この sphere 形成細胞の遺伝子発現を経時的に解析した結果、胚様体形成時点と比較して、神経幹細胞培養培地で培養を行った細胞においては、ES 細胞で発現するマーカー遺伝子の発現が低下し、逆に神経系細胞のマーカー遺伝子群の発現上昇が認められた (図 2)。さらに、sphere 形成細胞を接着培養に移行させ、分化誘導を試みた結果、多数の β III tubulin 陽性細胞と、わずかな GFAP 陽性細胞の分化が確認された (図 3)。 β III tubulin 陽性細胞は、突起を有し、その突起から構成される細胞ネットワークの構築が観察され、神経細胞へ分化していると推察された (図 3)。以上の結果から、てんかん患者由来 iPS 細胞から作成された sphere は神経幹細胞/前駆細胞が形成する neurosphere であり、てんかん患者由来神経幹細胞/前駆細胞を、iPS 細胞を経由して作成することに成功したと判断した。

Clone 11 (P10)

Clone 4 (P11)

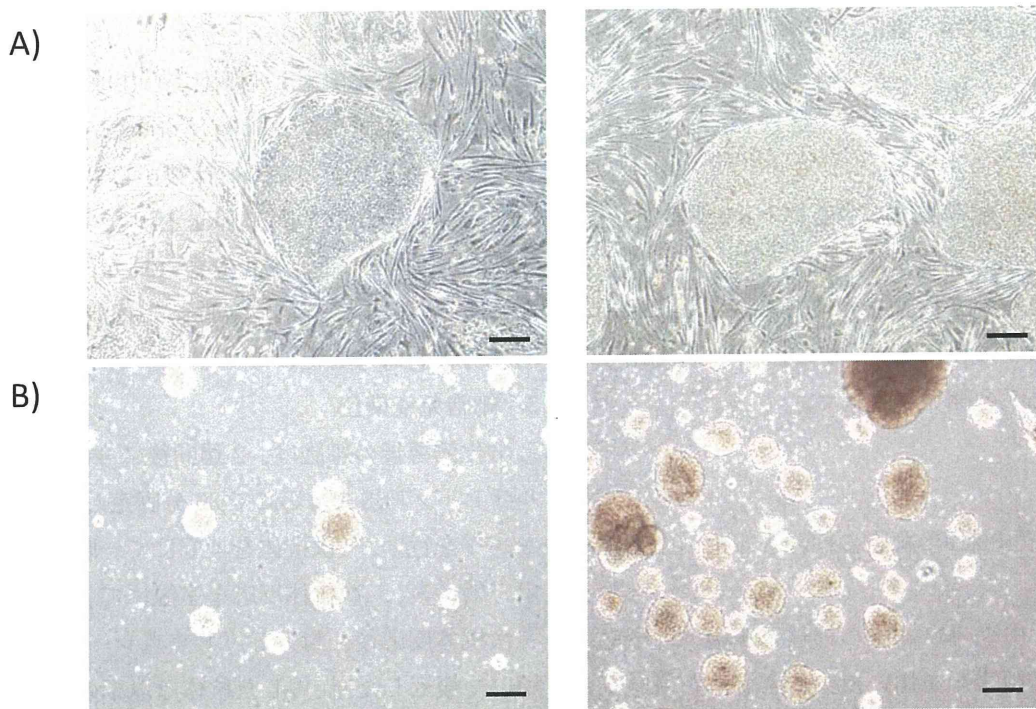


図 1 てんかん患者由来 iPS 細胞 (症例 8) の神経分化誘導 (位相差像)

A) 未分化 iPS 細胞, B) neurosphere 形成細胞, Scale bar=200 μ m

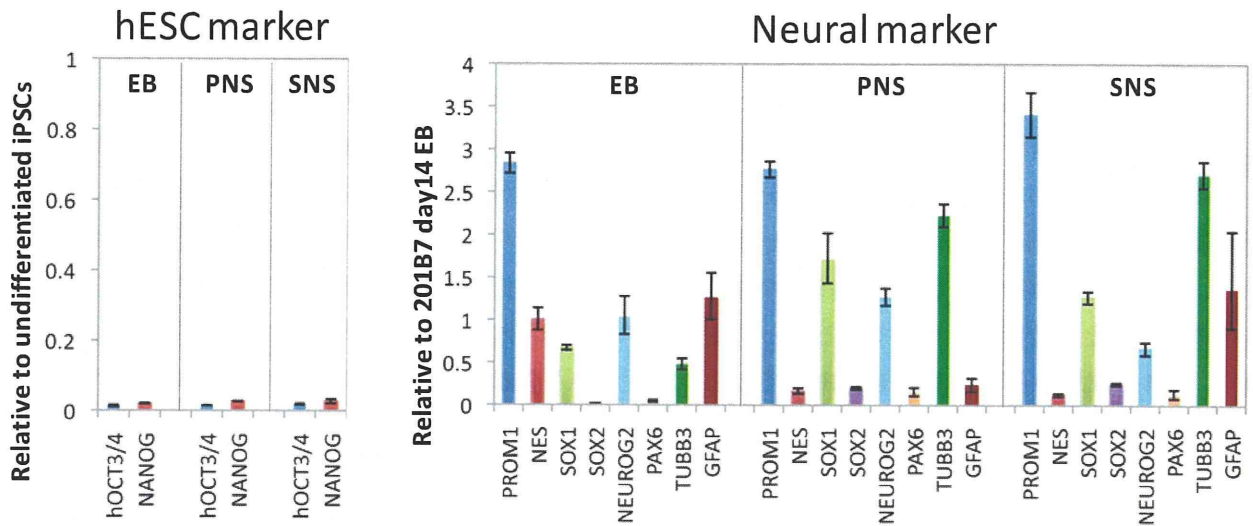


図2 てんかん患者由来 iPS 細胞 (症例 8, clone11) の分化誘導における遺伝子発現解析
 胚様体形成 14 日目の細胞 (EB) と、初代 neurosphere 形成細胞 (PNS) および 2 継代目 neurosphere 形成細胞 (SNS) における遺伝子発現を、201B7 細胞から作成した EB と比較。

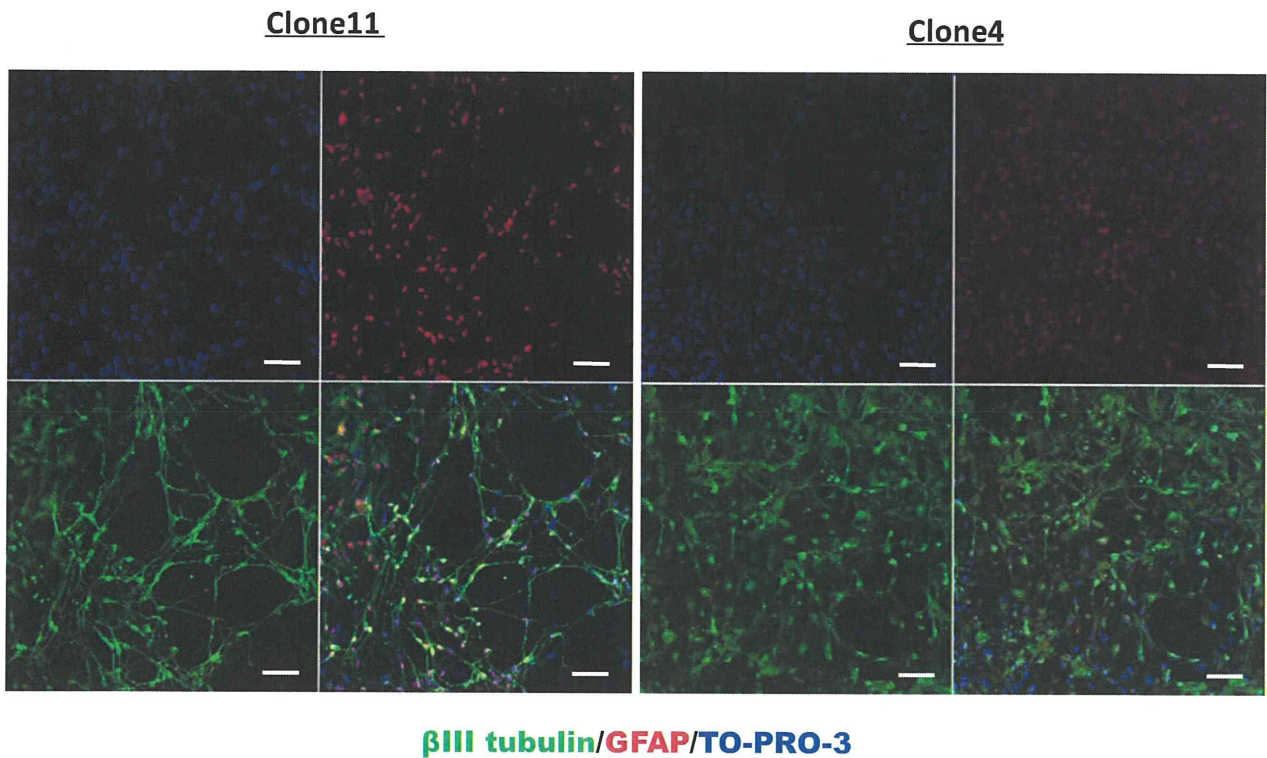


図3 てんかん患者由来 iPS 細胞 (症例 8) から作成した neurosphere 形成細胞の分化誘導
 Scale bar=50μm