

D. 考察

最終年度の23年度は、前年度樹立に成功したてんかん患者由来 iPS 細胞の神経分化能の評価と、分化した細胞の特性解析を実施した。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ることが明らかになり、本研究課題の最大の目標を達成できたと考える。

前年度までの検討の結果から、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性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る。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と考えられる。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

てんかん患者由来 iPS 細胞の神経分化能の評価と、分化した細胞の特性解析を実施した。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉龍澄子, 金村米博: ヒト真皮線維芽細胞の分化能評価. 日本形成外科学会誌 31(7):453-461, 2011
- 2) Irie Y, Saeki M, Tanaka H, Kanemura Y, Otake S, Ozono Y, Nagai T, Kondo Y, Kudo K, Kamisaki Y, Miki N, Taira E: Methamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic cells. Cell Tissue Res 345(2):231-241, 2011
- 3) Kanematsu D, Shofuda T, Yamamoto A, Ban C, Ueda T, Yamasaki M, Kanemura Y: Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta. Differentiation 82(2):77-88, 2011

2. 総説

- 1) 福角勇人, 金村米博: ヒト ES/iPS 細胞の無フィーダー細胞培養技術の開発. 医学のあゆみ 239(14):11079-11085, 2011

3. 学会発表

- 1) 金村米博: ヒト iPS 細胞の実用化を支援する周辺技術開発. 次世代医療システム産業化フォーラム, 2011.5.25; 大阪市

- 2) Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, Yamasaki M, Sasai Y, Kanemura Y: Generation of human induced pluripotent stem cells using the extracellular matrix of human decidua-derived mesenchymal cells. ISSCR 9th Annual Meeting. 2011.6.16; Toronto, Ontario, Canada
- 3) Hirata M, Hayashida M, Tateyama D, Ozawa Y, Matsumura H, Iemura M, Shofuda T, Kanemura Y, Kohara A, Kawabata K, Mizuguchi H, Furue MK: Comparative analysis of characteristics among human iPS, ES and neuroblastoma cell lines. ISSCR 9th Annual Meeting. 2011.6.16; Toronto, Ontario, Canada
- 4) 金村米博, 山崎麻美: 難治性脳形成障害症の分子病態の解析と新規分子診断法および治療技術の開発. 社団法人日本脳神経外科学会第70回学術総会, 2011.10.14; 神奈川県横浜市
- 5) Kanemura Y, Shofuda T, Kanematsu D, Matsumoto Y, Yamamoto A, Nonaka M, Moriuchi S, Nakajima S, Suemizu H, Nakamura M, Okada Y, Okano H, Yamasaki M: In vitro chemosensitivity of human glioma stem cells compared with that of normal neural stem cells from human iPS cells. 2011 SNO 16th Annual Scientific Meeting, 2011.11.17-20; Orange County, California, USA
- 6) Kanemura Y: iPS in neurooncology. Taipei VGH and NYMU Brain Tumor Symposium 2011, 2011.11.30; Taipei, Taiwan
- 7) 金村米博: 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 (ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築). スーパー特区フォーラム in 大阪, 2012. 1. 19; 豊中市

なし

3. その他

なし

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

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

研究分担者 佐藤 薫

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第一室長

研究要旨

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 iPS 細胞由来 神経幹細胞塊 (neurosphere) から分化誘導した神経細胞について特性解析を行った。昨年度検討を行った健常人 細胞 iPS 由来 neurosphere と同様の培養・解析（細胞内カルシウム変動測定、免疫組織化学的解析）手法が、てんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere 由来分化誘導細胞の特性解析に有効であることを明らかとした。てんかん患者 iPS 細胞由来神経細胞は、健常人 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、また、radial glia 細胞数も多かった。これらの新知見は新たな抗てんかん薬開発に有用である。しかし、同一個体からの neurosphere の結果にばらつきがあることも明らかとなり、今後の課題となった。

研究協力者

小山隆太（東京大学大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 助教）

A. 研究目的

本研究班は難治性てんかん患者由来 iPS 細胞から作成した neurosphere から分化誘導した神経細胞の特性解析を行い、てんかんモデル細胞としての有用性を検証することで、抗てんかん薬開発に利用可能な新規生物資源の確立と新規創薬評価系の開発を目指している。今年度はてんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere が大阪医療センターより供与された。この neurosphere から分化誘導した神経細胞標本の特性解析を行い、抗てんかん薬開発への応用性、新規創薬評価系開発の可能性について検討した。

B. 研究方法

てんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere の特性解析

1. Neurosphere の増幅および分化誘導

てんかん患者 fibroblast 由来 iPS 細胞由来 neurosphere 2 株 (epiPFB0804-P11 [以降は、てんか

ん-04 株と表記]、passage 6; epiPFB0810-p11 [以降は、てんかん-10 株と表記]、passage 6) が、大阪医療センターより供与された。両 neurosphere は、同一患者に由来し、同一誘導法を用いて作成されているが、origin となる iPS 細胞コロニーが異なっている。Neurosphere は、basic FGF (peprotech)、EGF (peprotech)、human LIF (millipore) を添加した neurosphere 培地を用いて 12 日間浮遊培養後、accutase (sigma) により single cell にした後、100000 cells / 500 μ l / well の割合でポリオルニチン/フィブロネクチンコートした 8 well スライドチャンバー (nunc) に播種し、B27 supplement (gibco) を含む分化誘導培地に切り替え、分化誘導 20 日目の細胞を免疫組織化学的解析及び細胞内カルシウム変動測定に用いた。培養 30 日目 (4/13 現在) まで細胞の生育を確認している。継続して培養を続けている。

2. 免疫組織化学的解析

上記分化誘導条件で 20 日間培養後、Tuj1、GFAP、Nestin の発現を免疫組織化学的に検出した。

3. 細胞内カルシウム変動測定

上記分化誘導条件で 20 日間培養後、細胞内カルシウム変動測定を行った。細胞は還流装置により 50 μ M picrotoxin 2 min、50 μ M NMDA 2 min、100 μ M L-glutamate (L-Glu) 2 min、100 μ M ATP 2 min、80 mM KCl 2 min の順に刺激し、細胞内カルシウム濃度の変動を fura2-AM 法を用いて AQUACOSMOS/RATIO システムで測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験において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。なお、本実験におけるヒト 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において「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」として平成 21 年 12 月 25 日に承認を受けた。本細胞の個人情報に関して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匿名化を行った上 (2 重匿名化) で提供されているため国立医薬品食品衛生研究所には個人情報はない。ストックバイアルは施錠可能な国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室にて有人監視のもと液体窒素中保管している。実験に使用した細胞は実験終了後全てオートクレーブし廃棄した。

C. 研究結果

1. Neurosphere の増幅および分化誘導

てんかん-04 株、てんかん-10 株、両株ともに、浮遊培養 12 日目において、丸い形態を有する大きさが類似した neurosphere を得ることができた。しかしながら、accutase を用いて single cell にする過程において、てんかん-04 株では多くの single cells を得ることができたが (25T flasks から 6.0×10^6 個)、てんかん-10 株では、少量の single cells しか得ることができなかった (25T flasks から 3.0×10^5 個)。分化誘導 23 日後の位相差顕微鏡像では、てんかん-04 株、てんかん-10 株、両株ともに、神経細胞の特徴的な形態 (細胞体、長い突起等) を持つ細胞が観察された。細胞体の直径は、てんかん-10 株の方が大きかった (図 1)。

2. 免疫組織化学的解析

神経細胞マーカー Tuj1、アストロサイト・新生細胞マーカー GFAP、神経幹細胞マーカー Nestin の発現を免疫組織化学的に検出したところ、両株において Tuj1 陽性細胞 (図 2, 4)、Nestin 陽性細胞が数多く観察された (図 3, 5)。GFAP の発現に関しては、てんかん-04 株とてんかん-10 株では、大きな違いが観察された。てんかん-04 株では、1 well につき 1-2 cell 程度の長い fiber を有する GFAP 陽性細胞が見いだされたのに対し (図 2, 3)、てんかん-10 株では、多数の GFAP 陽性細胞が見いだされた (図 4, 5)。

3. 細胞内カルシウム変動測定

てんかん-04 株は、L-Glu 反応性 (35/46)、ATP 反応性 (8/46)、highK⁺ 反応性 (45/46) の細胞が観察された (図 6)。一方、てんかん-10 株は、L-Glu 反応性 (9/58)、ATP 反応性 (7/58)、highK⁺ 反応性 (12/58) の細胞が観察され、てんかん-04 株と比べて、L-Glu 反応率、highK⁺ 反応率が低かった (図 7)。

Differentiation Day 23

epiPFB0804-P11

epiPFB0810-P11

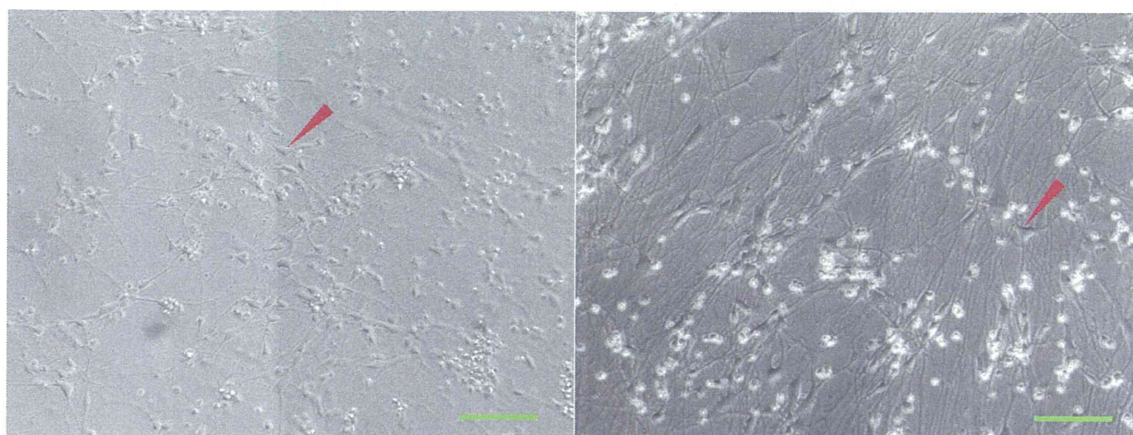


図1 てんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere 分化誘導 23 日目の位相差顕微鏡像

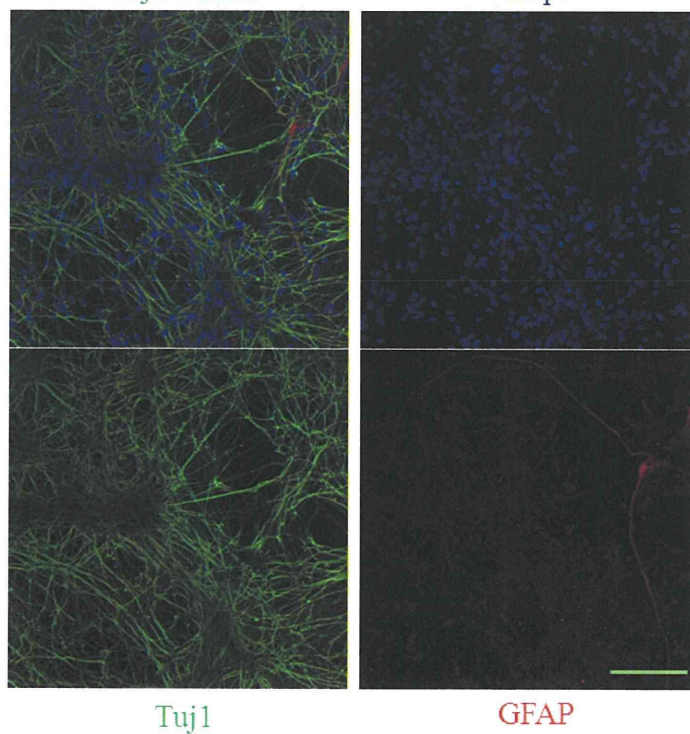
両株 (epiPFB0804-P11 株, epiPFB0810-P11 株) とともに分化誘導 23 日目において、神経細胞の特徴的な形態 (細胞体, 長い突起等) をもつ細胞が確認できた。

細胞体の直径は、epiPFB0810-P11 株の方が大きかった。Bar = 100 μ m

epiPFB0804-P11 Differentiation Day 19

Tuj1 / GFAP

Dapi



Tuj1

GFAP

図2 てんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere, epiPFB0804-P11 株, 分化誘導 19 日目の Tuj1, GFAP の発現
各分化マーカーの色については各写真の上下に示すとおり。epiPFB0804-P11 株では 多数の Tuj1 陽性細胞の中にごくまれに GFAP 陽性細胞が見いだされた。Bar = 100 μ m

epiPFB0804-P11 Differentiation Day 19

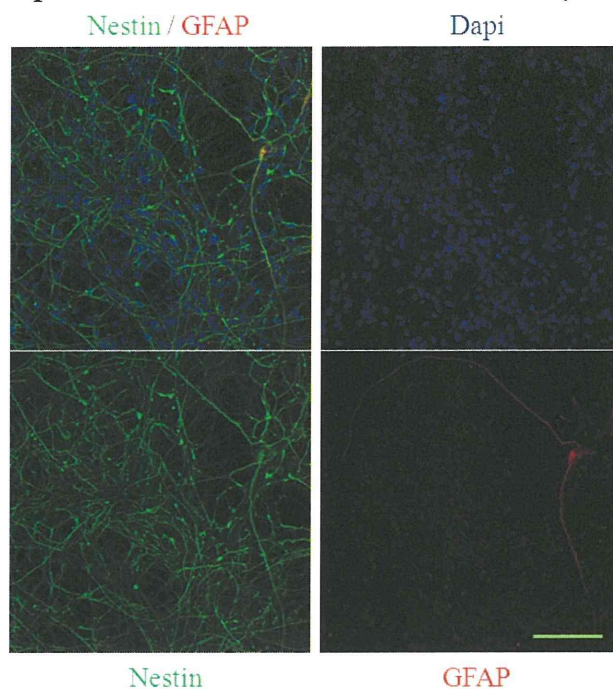


図3 てんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere , epiPFB0804-P11 株, 分化誘導 19 日目の Nestin, GFAP の発現
各分化マーカーの色については各写真の上下に示すとおり。epiPFB0804-P11 株では 多数の Nestin 陽性細胞の中に
まれに GFAP 陽性細胞が見いだされた。Bar = 100 μ m

epiPFB0810-P11 Differentiation Day 22

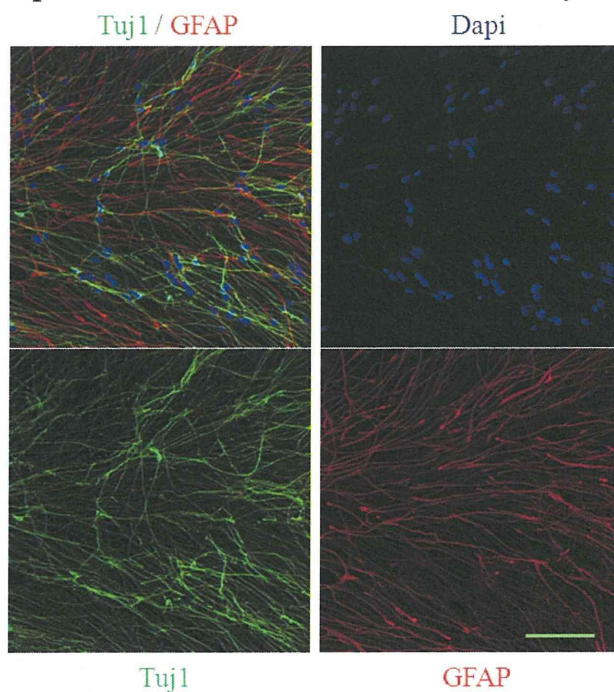


図4 てんかん患者 iPS 由来 neurosphere , epiPFB0810-P11 株, 分化誘導 22 日目の Tuj1, GFAP の発現
各分化マーカーの色については各写真の上下に示すとおり。epiPFB0810-P11 株では 多数の Tuj1 陽性細胞および
GFAP 陽性細胞が見いだされた。GFAP 陽性細胞の中には、長い fiber を有しているものが多く観察された。
Bar = 100 μ m

epiPFB0810-P11 Differentiation Day 22

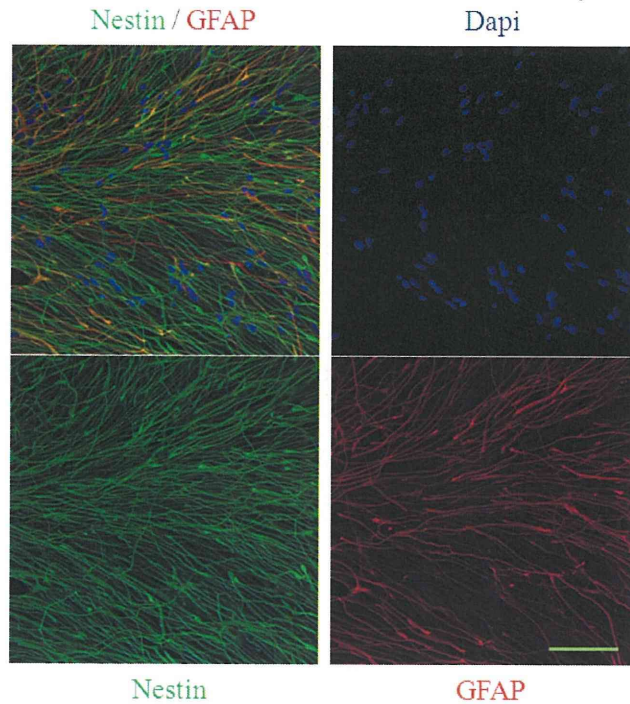


図5 てんかん患者 iPS 由来 neurosphere, epiPFB0810-P11 株, 分化誘導 22 日目の Nestin, GFAP の発現
各分化マーカーの色については各写真の上下に示すとおり。epiPFB0810-P11 株では 多数の Nestin 陽性細胞および GFAP 陽性細胞が見いだされた。GFAP 陽性細胞の中には、長い fiber を有しているものが多く観察された。また、Nestin / GFAP 陽性細胞も確認された。Bar = 100 μ m

epiPFB0804-P11 Differentiation Day 20

Analysis of $[Ca^{2+}]_i$

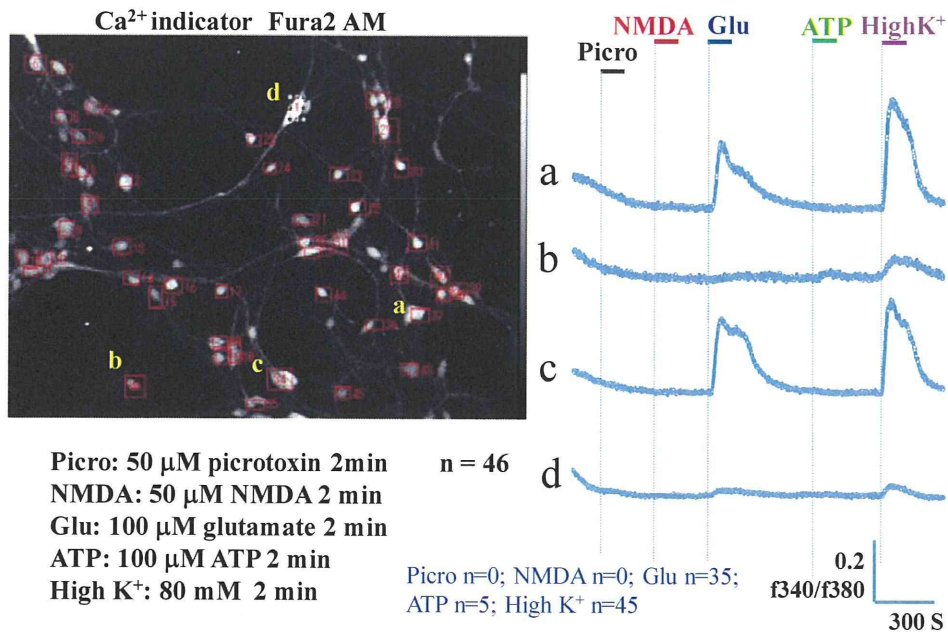


図6 てんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere, epiPFB0804-P11 株, 分化誘導 20 日目の各種刺激に対する細胞内カルシウム変動

50 μ M picrotoxin 2 min、50 μ M NMDA 2 min、100 μ M L-Glu 2 min、100 μ M ATP 2 min、80 mM KCl 2 min の刺激を行った。L-Glu 反応性 (35/46)、ATP 反応性 (8/46)、highK⁺反応性 (45/46)の細胞が観察された。

epiPFB0810-P11 Differentiation Day 20

Analysis of $[Ca^{2+}]_i$

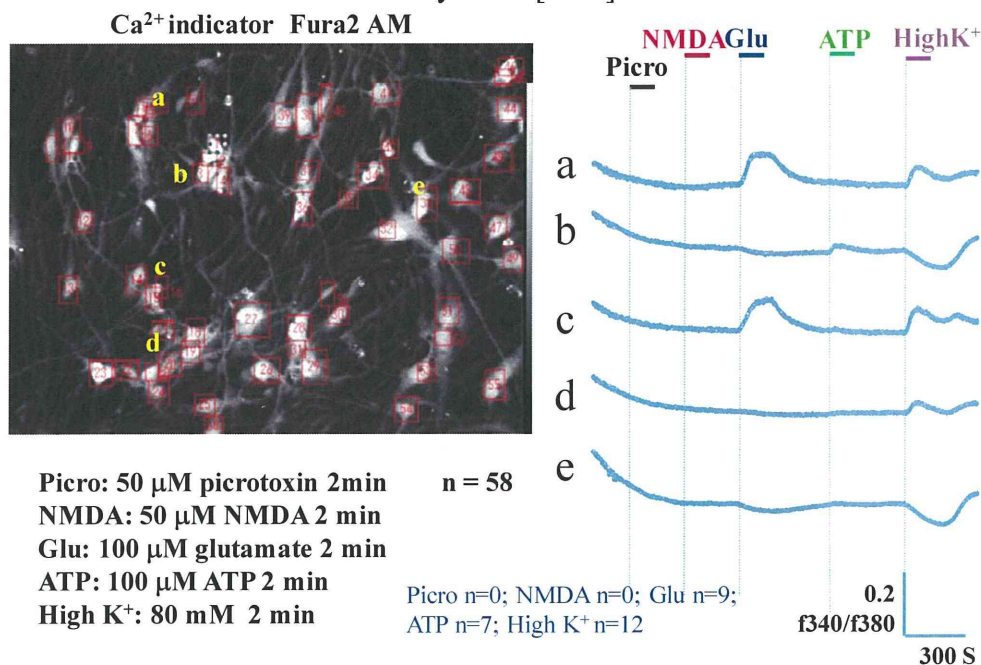


図7 てんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere, epiPFB0810-P11 株, 分化誘導 20 日目の各種刺激に対する細胞内カルシウム変動

50 μ M picrotoxin 2 min, 50 μ M NMDA 2 min, 100 μ M L-Glu 2 min, 100 μ M ATP 2 min, 80 mM KCl 2 min の刺激を行った。L-Glu 反応性 (9/58), ATP 反応性 (7/58), highK⁺ 反応性 (12/58) の細胞が観察された。

D. 考察

てんかん-04 株とてんかん-10 株は、neurosphere の形態、大きさは類似していたが、accutase に対する感受性は異なっていた。さらに、分化誘導細胞の性質も異なっていた。てんかん-04 株と比較すると、てんかん-10 株は、分化誘導 20 日目において、細胞体が大きく、長い fiber を有する GFAP/Nestin 陽性細胞を数多く発現していた。この細胞は、形態及び発現蛋白質より、radial glia 細胞であると推察される。両株は、同一患者、同一神経誘導法によって作成された neurosphere であるが、origin となる iPS 細胞コロニーが異なっており、コロニーの性質の相違が、これら結果に反映されているのかもしれない。また、コロニー pick up 後に神経誘導を行うまでに 11 回の継代を行っているが、その間に生じた相違が反映されているのかもしれない。いずれにしろ、同一患者由来の neurosphere 間にも特性の相違が存在する

ことが明らかとなったことから、同一個体由来の iPS 細胞を用いた検討においても、一定以上の例数をそろえて統計的なデータ解析が必要であることが示唆された。

昨年度、我々は、てんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere のコントロールとして、健常人 iPS 細胞由来 neurosphere を用いて同様の実験を行い、グルタミン酸作働性神経および GABA 作働性神経が分化することを報告した。カルシウム応答性獲得の順序としては、分化誘導 20 日目には、ATP (14/30) のみであったが、分化誘導 30 日目には、picrotoxin (37/66)、L-Glu (13/66)、NMDA (1/66)、ATP (66/66)、high K⁺ (66/66) に反応し、ATP に関しては、分化誘導日数依存的な反応率の上昇が確認された。一方、てんかん-04 株、てんかん-10 株は、分化誘導 20 日目においてすでに L-Glu, ATP, highK⁺ に対して反

応性を示し、健常人と比較すると、応答するリガンドの種類が多かった。てんかん患者において、健常人よりも分化の速度が速まっている可能性があるかもしれない。今後さらに分化誘導日数を上げた場合の、てんかん患者 iPS 細胞由来神経細胞標本の反応性獲得に興味を持たれる。

てんかん-10 株では、分化誘導 20 日目において、多くの radial glia 細胞が観察された。健常人標本においても、radial glia 細胞は観察されている。分化誘導 20 日目には、1 視野につき 1-2 cell 程度であったが、分化誘導 30 日目にはその数は増加し、分化誘導日数依存的な細胞数の増加が観察されている。そもそも radial glia 細胞は神経上皮を構成する細胞であり、大脳皮質錐体細胞の幹細胞として機能するだけでなく、移動の“足場(基質)”を提供しており、その線維は神経細胞が遊走する際、ガイドの役割を果たしていると考えられている。てんかん患者においては、大脳皮質神経細胞の発達異常に伴いてんかん症状を呈する症例も報告されており、radial glia 細胞の異常がてんかん発症の起因となっている可能性が示唆されている (Exp Neurol 203(2), 320-32 [2007])。従って、本細胞を用いて、てんかん発症と radial glia 細胞との関連について検討することが可能になるかもしれない。

以上の実験結果と供与元のてんかん症例との突き合わせにより、新たな抗てんかん薬開発への道が開ける可能性がある。

E. 結論

てんかん患者 iPS 細胞由来 neurosphere 由来神経細胞標本は、分化誘導 20 日目において、健常人 iPS 細胞由来神経細胞標本よりもカルシウム応答性を示すリガンドの種類が多く、また、radial glia 細胞数も多かった。これらの新知見は新たな抗てんかん薬開発に有用である。しかし、同一個体からの neurosphere の結果にばらつきがあることも明らかとなったため、今後、iPS 細胞の創薬応用においては、同一個体由来の iPS 細胞であっても、データの確実性が補償される例数を検証する必要があるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi K, Ishii-Nozawa R, Takeuchi K, Nakazawa K, Sato K: Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through different mechanisms. J Pharmacol Sci 112(1):113-117, 2010 (C.A.)
- 2) 佐藤 薫: グリア型グルタミン酸トランスポーター. 日薬理誌 138:127-128, 2011
- 3) Sato K, Kuriwaki J, Takahashi K, Saito Y, Oka J, Otani Y, Sha Y, Nakazawa K, Sekino Y, Ohwada T: Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without interaction with estrogen receptors. ACS Chem Neurosci 3:105-113, 2012 (C.A.)
- 4) Morizawa Y, Sato K, Takaki J, Kawasaki A, Shibata K, Suzuki T, Ohta S, Koizumi S: Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. Cell Mol Neurobiol, in press.

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 佐藤 薫, 重本一最上由香里, 大野泰雄, 関野祐子: ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生、オリゴデンドロサイト新生を誘導する. Neuro2010, 2010.9; 神戸市
- 2) 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤玲子, 竹内幸一, 関野祐子, 佐藤 薫: ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 substrate-gated conductance の調節. Neuro2010, 2010.9; 神戸市
- 3) 佐藤 薫, 重本一最上由香里, 大野泰雄, 関野祐子: 生後初期脳におけるミクログリアの役割. 内藤コンファランス, 2010.10; 神奈川県湘南市
- 4) 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤玲子, 竹内幸一, 関野祐子, 佐藤 薫: ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 コンダクタンスの調節. 内藤コンファランス, 2010.10; 神奈川県湘南市
- 5) 佐藤 薫, 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤玲

- 子, 竹内幸一, 関野祐子: ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーターEAAT1の基質依存的な調節. 第84回日本薬理学会年会, 2011.3; 横浜市
- 6) 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳之: パロキセチンはリポポリサッカライドによって引き起こされるグルタミン酸トランスポーター活性の低下を抑制する. 第84回日本薬理学会年会, 2011.3; 横浜市
- 7) 佐藤 薫, James E Goldman, 関野祐子: 生後初期脳のリスクアセスメントシステムの構築. 日本薬学会第132回年会, 2011.3; 静岡市
- 8) 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳之: 炎症時のグリア間コミュニケーションがグルタミン酸トランスポーター機能変化をもたらす. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011, 2011.8; 東京
- 9) 佐藤 薫, 高木淳平, 藤森康希, 鈴木岳之, 関野祐子: パロキセチンは新規メカニズムにより炎症下のグルタミン酸取り込み機能低下を抑制する. 第34回日本神経科学大会, 2011.9; 横浜
- 10) 鈴木岳之, 高木淳平, 藤森康希, 佐藤 薫, 炎症時グリア間コミュニケーションによりアストロサイトグルタミン酸トランスポーター機能低下が引き起こされる. 第34回日本神経科学大会, 2011.9; 横浜
- 11) 最上(重本) 由香里, 関野祐子, 大野泰雄, 佐藤 薫: 生後ラットの脳・SVZ 周辺において活性化ミクログリアは神経およびグリア細胞の新生・分化を制御している. 第34回日本神経科学大会, 2011.9; 横浜
- 12) 片山(小口) 敦子, 門間彰彦, 大友ゆき, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫: 胎生期および新生期バルプロ酸暴露によるラット扁桃体遺伝子発現変動の網羅的解析. 第34回日本神経科学大会, 2011.9; 横浜
- 13) 高橋由香里, 永瀬将志, 落合敏平, 安井 豊, 中尾彩乃, 渡部文子, 高木 聡, 佐藤 優, 奥津浩也, 守口 徹, 佐藤 薫, 加藤総夫: 胎生～新生期における化学暴露が扁桃体神経興奮性に及ぼす影響の多面的評価法. 第34回日本神経科学大会, 2011.9; 横浜
- 14) 中 誠則, 真嶋悠幾, 井手総一郎, 佐藤 薫, 南 雅文. 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響. 第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会合同年会, 2011.9; 東京
- 15) 真嶋悠幾, 中 誠則, 井手総一郎, 佐藤 薫, 南 雅文. 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響. 第62回日本薬理学会北部会, 2011.9; 仙台
- 16) 佐藤 薫: iPS細胞由来ニューロンの薬理的プロファイリング. 平成23年度厚生労働省科学研究費補助金医療品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム「ヒトiPS細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」, 2012.2; 東京
- 17) 佐藤 薫, 最上由香里, 関野祐子: 創薬標的としてのミクログリアの新しい可能性 日本薬学会第132回年会シンポジウム「次世代創薬に向けた新たなストラテジー」, 2012.3; 札幌
- 18) 高橋華奈子, 最上(重本)由香里, 岡田洋平, 大津香苗, 福角勇人, 正札智子, 金村米博, 岡野栄之, 関野祐子, 佐藤 薫: ヒトiPS由来神経細胞標本の薬効・毒性評価への応用可能性—最適iPS株探索と標準プロトコルの作成. 日本薬学会第132回年会, 2012.3; 札幌
- 19) 最上(重本) 由香里, 藤森康希, 五十嵐良明, 広瀬明彦, 関野祐子, 佐藤 薫: カーボンナノチューブが神経幹細胞に与える影響. 日本薬学会第132回年会, 2012.3; 札幌
- 20) 片山敦子, 門馬彰彦, 大友ゆき, 今井美鈴, 秋友孝文, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫: 胎生～新生期の化学物質暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー機能タンパク質遺伝子群の探索. 日本薬学会第132回年会, 2012.3; 札幌
- 21) 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳志: 炎症条件下グルタミン酸トランスポーター機能低下に対する抗うつ薬の作用. 第85回日本薬理学会

年会, 2012.3 ; 京都

- 22) 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 斉藤善郎, 岡淳一郎, 尾谷優子, 沙宇, 中澤憲一, 関野祐子, 大和田智彦 : エストロゲン受容体を介さずグリア型グルタミン酸トランスポーターを抑制するタモキシフェン関連化合物の発見. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012.3 ; 京都

(国際学会)

- 1) Sato K, Shigemoto-Mogami Y, Ohno Y, Sekino Y: Microglia instruct neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal SVZ (ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生、オリゴデンドロサイト新生を促進する) . ISN-ESN-2011 23rd Biennial Meeting, 2011.8-9; Athens, Greece ; アテネ市, ギリシャ国
- 2) Sato K, Shigemoto-Mogami Y, Ohno Y, Sekino Y: The role of activated microglia accumulated in the early postnatal SVZ (生後初期脳室下帯に集積しているミクログリアの役割) . ISN Satellite meeting, Glial cells in (patho)physiology, 2011.8; Ljubljana, Slovenia; リュブリャナ市, スロベニア国
- 3) Sato K, Takaki J, Fujimori K, Suzuki T, Sekino Y: Down-regulation of astrocyte L-glu transporters under inflammation is caused by glia-glia communication (炎症化のグルタミン酸トランスポーターの機能低下はグリア間コミュニケーションによって引き起こされる) . SfN2011, 2011.11; Washington D.C., USA ; ワシントン D.C., アメリカ合衆国

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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号：ページ 出版年
吉龍澄子, 金村米博.	ヒト真皮線維芽細胞の分化能評価.	日本形成外科学会 会誌	31(7):453-461, 2011
Irie Y, Saeki M, Tanaka H, <u>Kanemura Y</u> , Otake S, Ozono Y, Nagai T, Kondo Y, Kudo K, Kamisaki Y, Miki N, Taira E.	lMethamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic cells.	Cell Tissue Res	345(2):231-241, 2011
Kanematsu D, Shofuda T, Yamamoto A, Ban C, Ueda T, Yamasaki M, Kanemura Y.	Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta.	Differentiation	82(2):77-88, 2011
福角勇人, 金村米博.	ヒト ES/iPS 細胞の無フィーダー細胞培養技術の開発.	医学のあゆみ	239(14):11079-11085, 2011
Sakauchi M, Oguni H, Kato I, Osawa M, Hirose S, Kaneko S, <u>Takahashi Y</u> , Takayama R, Fujiwara T.	Mortality in Dravet syndrome: search for risk factors in Japanese patients.	Epilepsia	52 (Suppl 2): 50-54, 2011
Nomura Y, Aihara M, Matsukura S, Ikezawa Y, Kambara T, Aihara Y, <u>Takahashi Y</u> , 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
Sakauchi M, Oguni H, Kato I, Osawa M, Hirose S, Kaneko S, <u>Takahashi Y</u> ,	Retrospective multiinstitutional study of the prevalence of early death in Dravet syndrome.	Epilepsia	52(6):1144-1149, 2011

Takayama R, Fujiwara T.			
Kawashima H, Ishii C, Yamanaka G, Ioi H, Takekuma K, Ogihara M, Hoshika A, <u>Takahashi Y.</u>	A boy with non-herpes simplex acute limbic encephalitis and antiglutamate receptor antibodies.	Clin Med Insights Case Rep	4:43-47, 2011
Yamazaki E, <u>Takahashi Y.</u> , Akasaka N, Fujiwara T, Inoue Y.	Temporal changes in brain MRI findings in Rasmussen syndrome.	Epileptic Disord	13(3):229-239, 2011
Takano S, <u>Takahashi Y.</u> , 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
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, <u>Takahashi Y.</u> , Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T.	CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders.	Epilepsia	52(10):1835-1842, 2011
Ikeda H, Imai K, Ikeda H, Shigematsu H, Shishido T, Takayama R, Fujiwara T, <u>Takahashi Y.</u> , Inoue Y.	Lamotrigine is favourable for startle-induced seizures.	Epileptic Disord	13(3):277-283, 2011
Hashimoto N, Kagitani- Shimono K,	SLC2A1 gene analysis of Japanese patients with glucose transporter 1 deficiency syndrome.	J Hum Genet	56(12):846-851, 2011

Sakai N, Otomo T, Tominaga K, Nabatame S, Mogami Y, <u>Takahashi Y</u> , Imai K, Yanagihara K, Okinaga T, Nagai T, Taniike M, Ozono K.			
Shoji H, Kimura N, Kumamoto T, Ichiyama T, <u>Takahashi Y</u> .	Non-Herpetic Acute Limbic Encephalitis: A New Subgroup of Limbic encephalitis?	Pathogenesis of Encephalitis edited by Daisuke Hayasaka, InTech	Open Access Publisher, Dec. 2011
Iwasaki Y, Okamoto A, Shoda H, <u>Takahashi Y</u> , Fuji 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
Yamamoto Y, Inoue Y, Matsuda K, <u>Takahashi Y</u> , Kagawa Y.	Influence of concomitant antiepileptic drugs on plasma lamotrigine concentration in adult Japanese epilepsy patients.	Biol Pharm Bull	35(4):487-493, 2012
Aihara Y, Oyama Y, Ichikawa K, Takeshita S, <u>Takahashi Y</u> , 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.
Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, <u>Takahashi Y</u> .	Focal encephalopathy with recurrent episodes of epileptic status and cluster mimicking hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome.	Brain Dev	in press.
Mogami Y, <u>Takahashi Y</u> , 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.
Takayama R, <u>Takahashi Y</u> , Mogami Y, Ikegami M, Mukaida S,	Self-induced seizures presumably by peri-orbital somatosensory self-stimulation: A report of two cases.	Brain Dev	in press.

Ikeda H, Imai K, Shigematsu H, Suzuki Y, Inoue Y.			
Tohkin M, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E, Kurose K, Nishikawa J, Hasegawa R, Aihara M, Matsunaga K, Abe M, Furuya H, <u>Takahashi Y</u> , Ikeda H, Muramatsu M, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Ikezawa Z, the Japan Pharmacogenom ics 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.
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.
Takanashi J, <u>Takahashi Y</u> , 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.
Wakamoto H, <u>Takahashi Y</u> , 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.
Cao D, Ohtani H, Ogiwara I,	Efficacy of stiripentol in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy.	Epilepsia	in press.

Ohtani S, Takahashi Y, Yamakawa K, Inoue Y.			
齊藤利雄, 齋藤朋子, 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
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
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
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
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
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
原 典子, 平井光男, 小川恵吾, 大内秀高,	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

海部真美子, 富樫慎司, 山城巨央, 高橋幸利.			
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
小出泰道, 長尾雅悦, 福島克之, 宇留野勝久, 笹川睦男, 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
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
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
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
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
山下瑞穂, 森 英俊,	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

大野義雄, 美藤文貴, 河野洋二, 岸本伸人, 寺澤由佳, 高橋幸利.			
國吉保孝, 加村 梓, 安田すみ江, 田代 実, 高橋幸利.	F D G - P E T 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
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
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
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
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
高橋幸利, 九鬼一郎, 山口解冬.	てんかん.	病気と薬パーフェクトBOOK2012	薬局2012年3月増刊号, 印刷中
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
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
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
高橋幸利,	脳炎・脳症後てんかんの薬物治療.	Epilepsy	印刷中

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.			
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（セレニカ®R錠 200mg）の特定使用成績調査.	小児科臨床	印刷中
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
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
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
Takahashi K, Ishii-Nozawa R, Takeuchi K, Nakazawa K, Sato K.	Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through different mechanisms.	J Pharmacol Sci	112(1):113-117, 2010
佐藤 薫.	グリア型グルタミン酸トランスポーター.	日薬理誌	138:127-128, 2011
Sato K, Kuriwaki J, Takahashi K, Saito Y, Oka J, Otani Y, Sha Y, Nakazawa K, Sekino Y, Ohwada T.	Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without interaction with estrogen receptors.	ACS Chem Neurosci	3:105-113, 2012
Morizawa Y, Sato K, Takaki J, Kawasaki A, Shibata K, Suzuki T,	Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes.	Cell Mol Neurobiol	in press.

Ohta S, Koizumi S.			
-----------------------	--	--	--