

Fig. 1. Morphology of hPDMCs. (A) Proliferated cells show fibroblast-like morphology. Magnification: 40 \times . (B) Phenotype of hPDMCs: FACS demonstrated that the hPDMCs were positive for CD29, CD44, CD105, CD90, CD73, and HLA-class I but negative for CD31, CD34, CD45, CD133, and HLA DR.

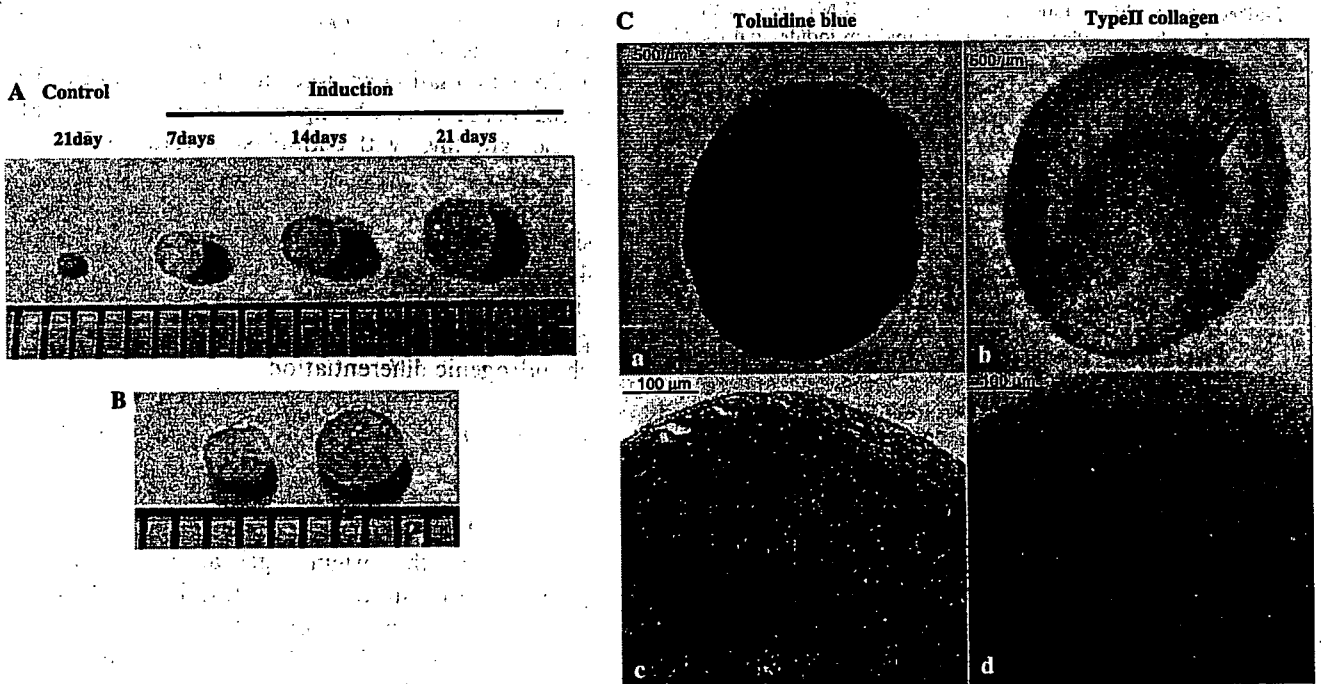


Fig. 2. Pellet culture of hPDMCs. (A) Differentiation of pellets on day 7, 14, and 21. The pellets increased in size up to 3 weeks and became white and opaque with glistening and transparency. A 1-mm scaled ruler is shown. (B) Three-week cultured pellets in the induction medium with BMP2 (right) and without BMP-2 (left). (C) Histological analysis of 3-week cultured pellets. The pellets were embedded in paraffin, sectioned, and stained with toluidine blue (a, c, and d) and the antibody for type II collagen (b). (a, b, and d) With BMP-2, (c) without BMP-2. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

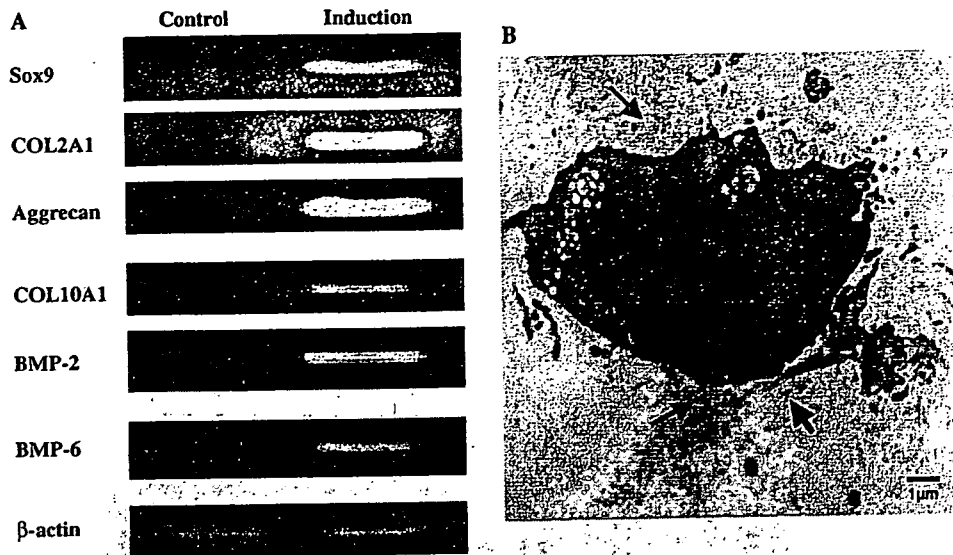


Fig. 3. RT-PCR analyses and TEM examination. (A) RT-PCR analyses for gene expression related to the chondrogenic lineage. Total RNA was extracted from pellets on day 14. Negative control was obtained from the non-induced hPDMCs. (B) TEM observation of 1-week cultured pellet. The cell is fibroblastic with an elongated, oblong phenotype having a large, euchromatic, and ovoid nucleus. The cell contains much endoplasmic reticulum. The cell produced a large number of extracellular fibers (indicated by arrows).

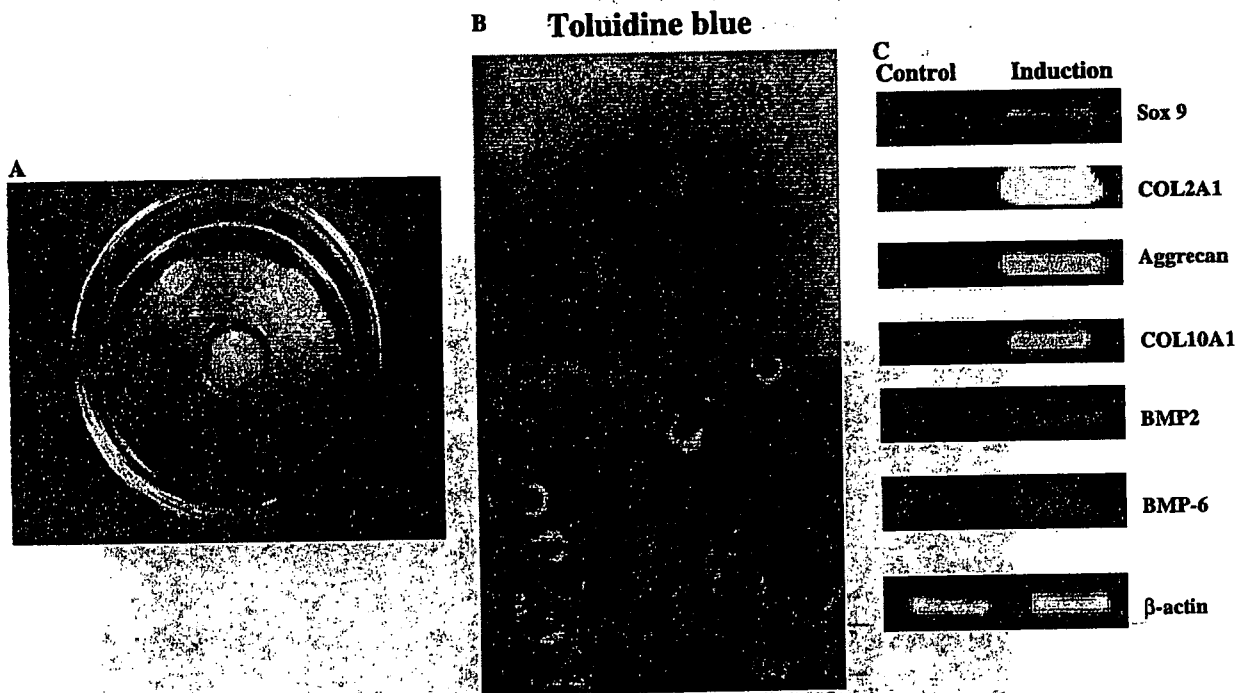


Fig. 4. Culture in atelocollagen gel. After 3-week induction, the cell–collagen gel composites (center of the picture, in a 30-mm dish) became harder than the original gel. (A) Paraffin-gel section stained with toluidine blue. Metachromatic matrix was stained by toluidine blue in atelocollagen gel. In the bottom picture, the magnification of the square part, chondrocyte-like cells with formation of lacunae are shown. Top: 10 \times , Bottom: 250 \times . (B) RT-PCR confirmed the expression of genes related to chondrogenic differentiation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

Chondrogenesis of hPDMCs in subcutaneous transplants

At harvest, 3 weeks after subcutaneous transplantation of the pre-induction hPDMC-loaded collagen sponges into nude mice, the composite was larger

than at implantation and had changed to white and glistening, transparent stiff tissue (Fig. 6A). Chondrocyte-like cells within lacunae and a large amount of extracellular matrix were observed in the composite (Fig. 6C).

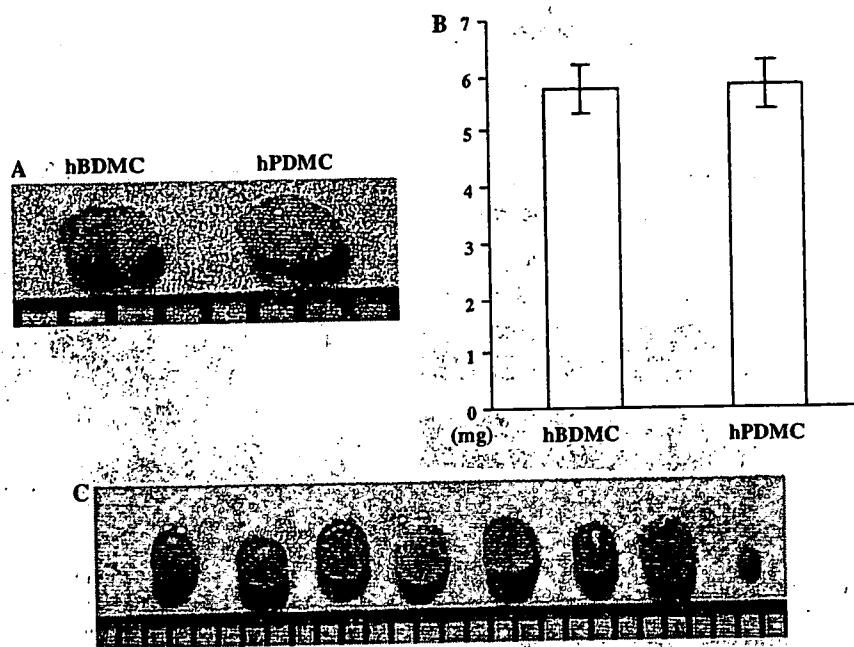


Fig. 5. Chondrogenic differentiation. (A) Pellets of hPDMCs and hBMDMCs were cultured for 21 days. A 1-mm scaled ruler is shown. (B) Weight of hPDMCs and hBMDMCs pellets on day 21. Data are showed as means \pm SD ($n = 3$). (C) The clones were cultured in the cloning medium with 10 ng/ml bFGF. Chondrogenic differentiation ability of clones was determined by the pellet culture at day 21. A 1-mm scaled ruler is shown. Pellets made from all 7 clones selected increased in size and showed a glistening transparent appearance. An hPDMC pellet cultured without induction medium (right) was used as a negative control. A 1-mm scaled ruler is shown.

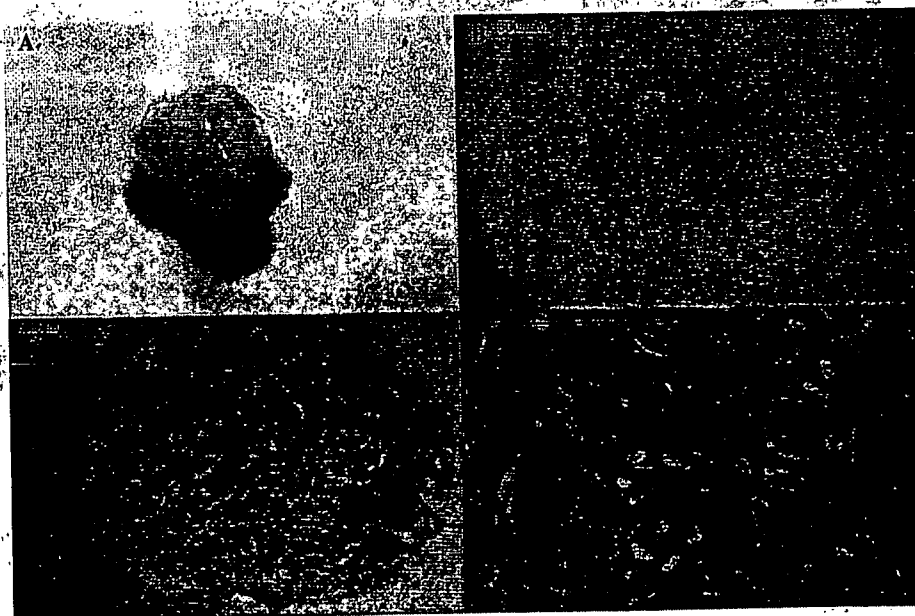


Fig. 6. In vivo chondrogenesis of hPDMCs loaded in collagen sponges in nude mice. The hPDMCs were loaded into a collagen sponge and cultured in vitro for weeks in chondrogenic medium. These sponges were implanted into subcutaneous pockets in nude mice for another 3 weeks. (A) After 3-week implantation, the PDMCs loaded in the sponge were removed from the mice. The composite was white and stiff-like cartilage tissue. (B) At 2 weeks in vitro culture, cells filled the pores of the collagen sponge. Some local spots showed the formation of extracellular matrix detected by toluidine blue staining. (C) Histological analysis showed a large quantity of extracellular matrix formed between collagen sponge fibers in the implanted cell/collagen composite. (D) High magnification of (C). The cells are round and polygonal within the lacunae and extracellular matrix is strongly stained by toluidine blue. Magnification: (A) 2 \times , (B,C) 10 \times , and (D) 250 \times . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

Chondrogenesis of hPDMCs in osteochondral defect transplantation

In the osteochondral defect transplantation, the original defect was covered with stiff reparative tissue, which was white, and had a smooth surface at 6 weeks after surgery (Fig. 7A). Histological analysis showed that the reparative tissue filled the defect and closely adhered to the residual part of bone (Fig. 7B). All reparative regions were positive for toluidine blue. Less intense metachromatic staining was observed at the edge of the reparative tissue indicating the formation of hypertrophic cartilage. In the bottom part, the strongest metachromatic staining and round cells showed hyaline cartilage appearance. Differentiating hPDMCs in the defect were confirmed by positive staining for an antibody specific for human β_2 -microglobulin (Fig. 7D).

Discussion

We isolated hPDMCs from chorionic villi of the fetal part of the human placenta at 38–40 weeks of gestation using the explant method. The surface epitopes of hPDMCs expressed mesenchymal progenitor-related antigens such as CD29, CD44, CD105, CD90, and CD73 [1,2,22,23], and were negative for hematopoietic and endothelial-related antigens such as CD31, CD45, CD34, Tie-2, and CD133. The cells expressed HLA-class I, but not HLA-DR. The hPDMCs could be differentiated into chondrocytes in induction medium with TGF- β_3 and dexamethasone, and combination with BMP-2 dramatically enhanced the production of cartilage extracellular matrix (Fig. 2B). These results were similar to those in a previous report using bone marrow and synovium-derived MSC [24,25]. RT-PCR showed expression of cartilage-specific extracellular matrix molecules (Fig. 3A), including COL2A1 and aggrecan, and the chondrogenic transcription factor Sox9 in the *in vitro* chondrogenesis of hPDMCs. BMP-2 and BMP-6 were expressed in culture after induction for 2 weeks, in spite of the fact that exogenous BMP-2 was provided continuously. The expression of BMP-2 and -6 has been reported in the chondrogenesis of BDMCs *in vitro* [24] but not in MSCs derived from synovium [25]. Endogenous BMP signals may be important for chondrogenesis of hPDMCs. Gene expression of COL10A1, a marker of hypertrophic chondrocytes, was found at 2 weeks. This was similar to the results observed during *in vitro* chondrogenesis of cells from bone marrow [24], adipose tissue [2], and synovium-derived MSCs in culture [25]. A similar result was also obtained from synovium-derived MSCs without BMPs [26,27]. The expression of COL10A1 seems to be characteristic of *in vitro* chondrogenesis of MSCs, regardless of the original tissue.

The hPDMCs could be differentiated into chondrocytes in atelocollagen gel under chondrogenic media. It has been reported that transplanting chondrocytes into a newly formed matrix of atelocollagen gel can promote restoration of the articular cartilage of the knee [28]. We attempted to

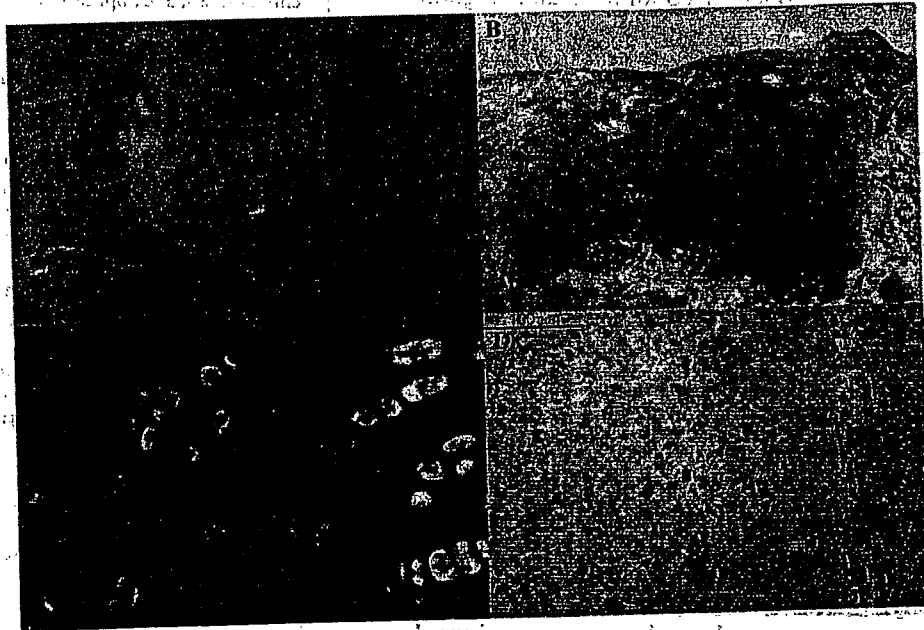


Fig. 7. Chondrogenesis of hPDMCs loaded on collagen sponge in osteochondral wound healing in a nude rat. (A) Left: The appearance of junctions of the nude rat. The hPDMCs loaded in the collagen sponge and transplanted to the defect the junction have a glass-like appearance with a smooth surface and stiffness (Arrows indicate the reparative tissue) Right: The junction where no composite was transplanted remains an empty hole. (B) Histological analysis showed that the reparative tissue filled the defect and closely adhered to the residual portion, covering all of the defect. Less intense metachromatic staining was observed at the edge of the reparative tissue. In the bottom part, round cells and high metachromasia can be observed. Arrow: junctional area between repair (left) and residual (right) part; arrowheads: collagen sponge fibers. (C) High magnification of the square in section B. Hyaline cartilage-like cells with strong metachromasia can be observed with a hyaline cartilage-like appearance. (D) Cartilage-like cells were stained with an antibody specific for human β_2 microglobulin. Arrows indicate positive cells. Magnification: (B) 10 \times , (C) 250 \times , and (D) 100 \times .

make cartilage-like tissue by culturing hPDMCs in atelocollagen gel and our results suggested the possibility that hPDMCs might be usable as an alternative cell source for this cellular therapy because the number of chondrocyte isolates from the knee is limited.

Transplantation of the preinduction hPDMC-loaded collagen sponge *in vivo* resulted in the production of cartilage with cells within lacunae surrounded by a large amount of metachromatic matrix compared to *in vitro* culture (Fig. 6). This indicated that differentiated hPDMCs could produce a substantial cartilage matrix in the *in vivo* environment. In transplantation into the osteochondral defect, reparative tissue had a cartilage-like surface and filled up the entire defect (Fig. 7A). The formation of hypertrophic repair cartilage was observed at the top part, but the bottom one had the strongest metachromasia staining and round cells, which indicated the formation of hyaline cartilage by hPDMCs (Fig. 7C). The formation of a hypertrophic cartilage surface in osteochondral defect has been reported in several clinical studies using BDMC (hypertrophic cartilage cannot function as normal hyaline cartilage and even ossification) [29,30]. Induction of mesenchymal progenitor cell differentiation into hyaline chondrocytes may be related to the potential for differentiation of the cells and induction conditions. In our investigation, the formation of hyaline cartilage in the bottom part of the reparative tissue indicated the possibility that hPDMCs could be used for repairing damaged articular cartilage. Therefore, appropriate induction conditions and a good experimental model are needed to examine the redevelopment of the articular surface as well as the formation of subchondral bone in osteochondral defect repair by hPDMCs.

According to a previous report, the pellet's size and weight are convincing indicators for *in vitro* chondrogenesis of MSCs [25]. Our data showed that the chondrogenesis potential of hPDMCs was comparable to that of hBDMCs (Figs. 4A and B). Clonal analysis showed that the population of hPDMCs was homogeneous after several passages, because the potential for chondrogenic differentiation was evident in the examined clones (Fig. 4C). However, we found that chondrogenic differentiation potential differed in individual hPDMCs, perhaps depending on the individual cell or primary cells that randomly migrated from placental tissue pieces. Thus, an effective method to isolate mesenchymal progenitor cells from the placenta and to identify specific surface markers of stem cells and progenitors of mesenchymal cells in hPDMC is necessary.

Recently, it has been reported that human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [31–33]. If so, and if hPDMCs can differentiate into chondrocytes *in vitro* and *in vivo*, they will be one of the possible cell sources for cartilage tissue engineering. However, further studies remain necessary to precisely analyze the chondrogenesis of hPDMCs and to explore potential methods for clinical application.

Acknowledgments

This work was partially supported by a research grant on Human Genome, Tissue Engineering (H17-014) from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare. We thank Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd. for the kind gift of rhBMP-2.

References

- [1] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284 (1999) 143–147.
- [2] P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim, M.H. Hedrick, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 4279–4295.
- [3] G. Kogler, S. Sensken, J.A. Airey, T. Trapp, M. Muschen, N. Feldhahn, S. Liedtke, R. Sorg, J. Fischer, C. Rosenbaum, S. Greschat, A. Knipper, J. Bender, O. Degistirici, J. Gao, A. Caplan, E.J. Colletti, G. Almeida-Porada, H.W. Muller, E. Zanjani, P. Wernet, A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential, *J. Exp. Med.* 200 (2004) 123–135.
- [4] N. Ochsnein-Kolble, G. Bilic, H. Hall, R. Huch, R. Zimmermann, Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair, *J. Perinat. Med.* 31 (2003) 287–294.
- [5] S. Fu, Y.C. Cheng, M.Y. Lin, H. Cheng, P.M. Chu, S.C. Chou, Y.H. Shih, M.H. Ko, M.S. Sung, Conversion of human umbilical mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro—potential therapeutic application for Parkinsonism, *Stem Cells* (2005), [Epub ahead of print].
- [6] D. Li, W.Y. Zhang, H.L. Li, X.X. Jiang, Y. Zhang, P. Tang, N. Mao, Isolation and identification of a multilineage potential mesenchymal cell from human placenta, *Placenta* (2005), Sep 17 [Epub ahead of print].
- [7] J. Kurtzberg, M. Laughlin, M.L. Graham, C. Smith, J.F. Olson, E.C. Halperin, G. Ciocci, C. Carrier, C.E. Stevens, P. Rubinstein, Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients, *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 157–166.
- [8] E. Gluckman, Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1860–1861.
- [9] J. Kang, J.E. Yeom, H.J. Lee, S.H. Rho, H. Han, G.T. Chae, Growth kinetics of human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord blood, *Acta Haematol.* 112 (2004) 230–233.
- [10] K. Bieback, S. Kern, H. Küter, H. Eichler, Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, *Stem Cells* 634 (2004) 625–634.
- [11] W. Wagner, F. Wein, A. Seckinger, M. Frankhauser, U. Wirkner, U. Krause, J. Blake, C. Schwager, V. Eckstein, W. Ansorge, A.D. Ho, Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood, *Exp. Hematol.* 33 (2005) 1402–1416.
- [12] A.P. Newman, Articular cartilage repair, *Am. J. Sports Med.* 26 (1998) 309–324.
- [13] V.E. Hoikka, H.J. Jaroma, V.A. Ritsila, Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4-year follow-up of 13 cases, *Acta Orthop. Scand.* 61 (1990) 36–39.
- [14] D. Amiel, R.D. Coutts, M. Abel, W. Stewart, F. Harwood, W.H. Akeson, Rib perichondrial graft for the repair of full-thickness articular-cartilage defects. A morphological and biochemical study in rabbits, *J. Bone Joint Surg.* 67 (1985) 175–180.

- [15] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, L. Peterson, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 889–895.
- [16] M.S. Rao, M.P. Mattson, Stem cells and aging: expanding the possibilities, *Mech. Ageing Dev.* 122 (2001) 713–734.
- [17] K. Igura, X. Zhang, K. Takahashi, A. Mitsuru, S. Yamaguchi, T.A. Takahashi, Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta, *Cytotherapy* 6 (2004) 543–553.
- [18] Y. Zhang, C. Li, X. Jiang, S. Zhang, Y. Wu, B. Liu, P. Tang, N. Mao, Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expression of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34⁺ cells, *Exp. Hematol.* 32 (2004) 657–664.
- [19] B. Johnstone, T.M. Hering, A.I. Caplan, V.M. Goldberg, J.U. Yoo, In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells, *Exp. Cell Res.* 238 (1998) 265–272.
- [20] T. Nishida, S. Kubota, S. Kojima, T. Kuboki, K. Nakao, T. Kushibiki, Y. Tabata, M. Takagawa, Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor), *J. Bone Miner. Res.* 19 (2004) 1308–1319.
- [21] K.W. Liechty, T.C. Mackenzie, A.F. Shaaban, A. Radu, A.B. Moseley, R. Deans, D.R. Marshak, A.W. Flak, Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep, *Nat. Med.* 6 (2000) 1282–1286.
- [22] P.A. Conget, J.J. Minguell, Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells, *J. Cell. Physiol.* 181 (1999) 67–73.
- [23] S. Gronthos, D.M. Franklin, H.A. Leddy, P.G. Robey, R.W. Storms, J.M. Gimble, Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells, *J. Cell. Physiol.* 189 (2001) 54–63.
- [24] I. Sekiya, J.T. Vuoristo, B.L. Larson, D.J. Prockop, In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 4397–4402.
- [25] S. Shirasawa, I. Sekiya, Y. Sakaguchi, K. Yagisha, S. Ichinose, T. Muneta, In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells, *J. Cell. Biochem.* (2005). Aug 8 [Epub ahead of print].
- [26] K. Nishimura, L.A. Solchaga, A.I. Caplan, J.U. Yoo, B. Johnstone, Chondroprogenitor cells of synovial tissue, *Arthritis Rheum.* 42 (1999) 2631–2637.
- [27] C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, F.P. Luyten, Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane, *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 1928–1942.
- [28] M. Ochi, Y. Uchio, K. Kawasaki, S. Wakitani, J. Iwasa, Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in treatment of cartilage defect of the knee, *J. Bone Joint Surg.* 84 (2002) 571–578.
- [29] S. Wakitani, K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata, M. Yoneda, Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees, *Osteoarthritis Cartilage* 10 (2002) 199–206.
- [30] M. Radice, P. Brum, R. Cortive, R. Scapinelli, C. Battalard, G. Abatangelo, Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors, *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 101–109.
- [31] O.N. Koc, J. Day, M. Nieder, S.L. Gerson, H.M. Lazarus, W. Krivit, Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH), *Bone Marrow Transplant.* 30 (2002) 215–222.
- [32] E.M. Horwitz, P.L. Gordon, W.K. Koo, J.C. Marx, M.D. Neel, R.Y. McNall, L. Muul, T. Hofman, Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 8932–8937.
- [33] K. Le Blanc, I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Gotherstrom, M. Hassan, M. Uzunel, O. Ringden, Treatment of severe acute graft-versus host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells, *Lancet* 363 (2004) 1439–1441.

ティッシュエンジニアリング 2006

監修 日本組織工学会

編集 田畑 泰彦
岡野 光夫

別刷

執筆者名

所属

論文タイトル

日本医学館

臍帯血と胎盤組織由来細胞を用いた再生医療の可能性

ティッシュエンジニアリング 2006

高橋恒夫・張 暁紅・伊倉宏一*

Umbilical cord blood and placenta derived cells for regenerative medicine

骨髄の血管内皮前駆細胞や間葉系細胞を用いた再生医療が進められているなか、非自己(アロ)の細胞ソースとして臍帯血や胎盤の細胞が注目されている。臍帯血の造血幹細胞移植は近年急速に進み、移植成績からも将来は骨髄移植に置き換わると予測される。

臍帯血の使用は、倫理上の問題が少なく安全性が高いことから臍帯血中の細胞を活かした再生医療への期待が高い。骨髄と同じように臍帯血にも多能性細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞が存在する。

間葉系細胞は、骨、軟骨、脂肪や筋細胞、また神経細胞、肝臓・脾臓細胞へと分化することが知られ、*in vivo*での動物レベルでの移植実験においても損傷した機能が回復することが報告されている。実際に、ヒトの脊髄損傷やその他の疾患に対して臍帯血が移植された報告もあり、その成績が注目されている。アロ細胞としての臍帯血のレシピエントに対する免疫反応についてはさらなる研究が必要である。

研究機関に臍帯血を供与する“研究用幹細胞リソースバンク”がスタートしており、再生医療研究が進展していくことが期待される。

*Tsuneo A. Takahashi · Xiaohong Zhang · Koichi Igura**

Key words: 臍帯血, 胎盤, 間葉系細胞, 臍帯血バンク, 再生医療

再生医療において、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)は究極の細胞として期待されている。しかし倫理面でのハードルは大きく、また、技術的な問題(マウスなどのフィーダー細胞の必要性、腫瘍の形成、無血清培地の開発など)を解決しなければならず、臨床応用が可能になるにはさらに時間を

要すると考えられる。一方、体性幹細胞は再生医療の細胞ソースとしてより使いやすいと考えられ、実際いくつかの臨床試験がスタートしている。再生医療に用いられる細胞は対象疾患によってさまざまであるが、これまで患者の自己の細胞が主に使われてきた。なかでも多分化能を持つ間葉系細胞が期待され、間葉系細胞を多く含む骨髄がよく使われている。しかし、自己の骨髄細胞は症例によっては採取ができないこともあり、骨髄

*Division of Cell Processing(CERES), The Institute of Medical Science, The University of Tokyo 東京大学医科学研究所細胞プロセッシングCERES寄附研究部門

中の間葉系細胞の数は年齢とともに低下することが知られている。アロ細胞が使用できるようになれば再生医療は大きく前進することが期待される。

胎盤と臍帯、また、臍帯血は医療廃棄物として処理されている。臍帯血は出産後に娩出される胎盤と臍帯を流れる血液であり、胎盤絨毛、羊膜、臍帯などそれぞれに間葉系細胞が存在する。これらの細胞についての研究の現況と、臍帯血や胎盤の細胞がどのような疾患に役立つことが期待されているのか、その概略を記す。

臍帯血

1. 臍帯血中の造血幹細胞

臍帯血には造血幹細胞、前駆細胞が多く含まれ、骨髄と同じように白血病を中心とする血液疾患に広く使われている¹⁾。わが国には全国11の臍帯血バンクが厚生労働省の補助金を受けて活動しており、全国で2万検体以上の臍帯血が血液製剤と同じレベルで検査をされ液体窒素下で凍結保存されている。臍帯血移植は、わが国ですでに2,300人以上の患者に移植されている²⁾。

臍帯血移植は初期には体重の軽い小児が対象であったが、最近では成人への移植が盛んに行われるようになり、骨髄に匹敵する移植成績が得られてきている³⁾。また、高年齢層も対象に移植が行われており、移植成績もしいに上がってきている。これはミニ移植といわれる、前処置(化学療法と放射線照射量)を軽くしてドナーとレシピエントの細胞が共存できるようにしたものである。臍帯血のなかの造血幹細胞は移植患者の体重当たり $2 \sim 2.7 \times 10^7 / \text{kg}$ とされる。最近では臍帯血の量を多くとる(細胞数が多い)ように採取施設で努力がつけられていることと、量が不足の場合は、HLA型が近い二つの臍帯血を移植する“複数臍帯血移植”が行われており、良好な成績が得られている⁴⁾。これまで試みられてきたなかでは、*ex vivo* 増幅は有効であるとの結果は得られていない。わが国では、京都大学の中畑教授のグループにより、可溶性IR-6Rを添加した増幅液により増

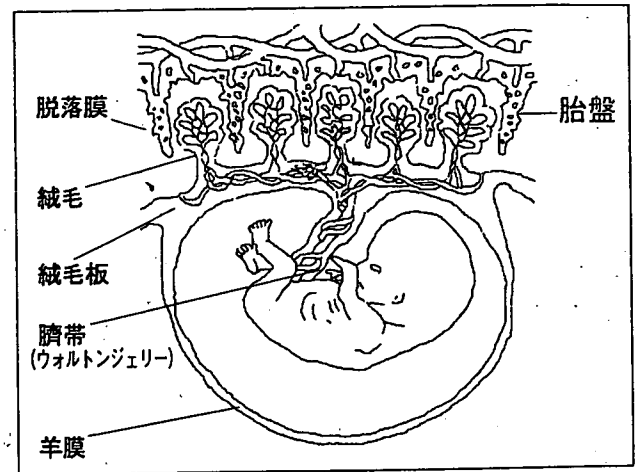


図1

ヒト胎盤は、胎児と母体由来の組織からなり、胎児由来の組織は主に絨毛板と絨毛、母体由来組織は脱落膜から構成される。

幅した臍帯血移植の臨床試験がはじまりつつあり期待が寄せられている⁵⁾。

臍帯血移植は確かな成果が上がる一方で、生着不全、感染症、血小板生着の遅れ、疾患によっては骨髄移植にくらべて劣るものもあり、また骨髄移植と同じくハイリスクの患者への移植成績はわるく、まだ改良すべき多くの課題を残している。

2. 臍帯血中の血管内皮前駆細胞

発生の初期に造血幹細胞と血管前駆細胞は起源を同じくし、ヘマンジオブラストから分化してきたと考えられており⁶⁾、造血幹細胞と同じくCD34抗原を、またCD133抗原を持つ。

Asaharaらは、成人の末梢血単核球成分から分離されたCD34陽性細胞が血管内皮成長因子などの培養下で血管内皮細胞に分化することを示した⁷⁾。血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)が血液中にあり、これまでの考えであった血管新生(angiogenesis)に対して血管再生に別の道があることを明らかにしてきた⁷⁾。冠動脈疾患や下肢虚血疾患(閉塞性動脈硬化症、パージャージャー病)などの重症虚血性疾患に対する血管再生療法、および冠動脈内ステント留置後術後の再狭窄予防を目的とした血管修復療法の臨床試験が開始され、下肢虚血への移植は高度先進医療とし

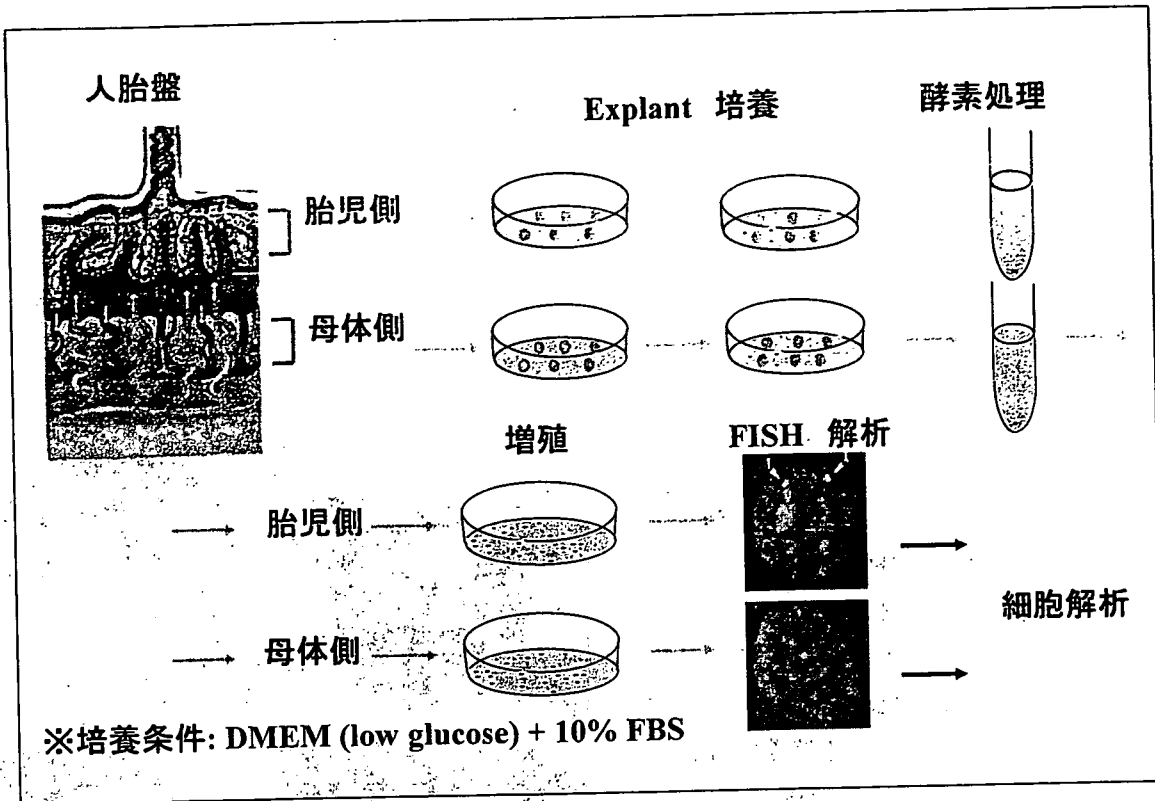


図2

母親からインフォームド・コンセントを得て、正常産に娩出された胎盤を用いた。胎児側絨毛からの間葉系細胞の単離は、臍帯と羊膜、絨毛板を除去したあと、絨毛から切り出した組織をメスで1~2mm³の小片にし、その組織を培養皿上に乗せて、培地を添加、植え付けた組織の周辺部から細胞をout-growthさせる培養法で行った。増殖させた細胞が、母親由来細胞を混入していないことを確かめるために、男子を出産した胎盤を用いて、FISH解析によりXY染色体を調べ、区別されていることを確認した。(Igura K et al., 2004⁹⁾より改変)

で行われている⁹⁾。

Muroharaらは、臍帯血のCD34陽性分画中にもEPCが含まれていることを明らかにし、臍帯血中のCD34陽性細胞を下肢結紮モデルマウスに臍帯血EPCを移植することにより、血流の回復を認めた⁹⁾。一方で、胎盤由来間葉系細胞においても同様な結果がみられており¹⁰⁾、血管再生は臍帯血や胎盤の有効利用の面で比較的早期に臨床応用が実現される可能性を持っている¹¹⁾。

3. 無制限体性幹細胞

ドイツのデュッセルドルフにあるハイネ大学の臍帯血バンクのWernetのグループは、Verfaillieら¹²⁾が骨髄で見いだした成人多能性細胞(MAPCs: multipotent adult progenitor cells)と同じ可能性を持つ細胞が臍帯血中に存在すること

を見だし、その細胞を無制限体性幹細胞(USSCs: unrestricted somatic stem cells)と名付けた¹³⁾。

この全能性細胞は、臍帯血の単核球のなかでCD45陰性で接着性を持つ細胞であり、約40%の臍帯血から得られた。ヒツジ胎児に移植することにより、造血細胞の20%が臍帯血由来であり、ヒトアルブミンの産生を認め、ラットへの移植では神経細胞に分化することから、胚葉の制限のない全能性に近い細胞と考えられる。また、この細胞は臍帯血CD34陽性細胞の増幅においてフィーダー細胞としての効果も示す¹⁴⁾。現在、USSCsの他のグループからの追試の報告が待たれるなかで、関連するグループはUSSCsをブタ心筋梗塞モデルに移植し、USSCs由来の血管新生と心筋の回復をみたとの報告がある¹⁵⁾。

4. 臍帯血中の間葉系幹細胞

間葉系細胞は中胚葉系の細胞であり、骨、軟骨、脂肪細胞に分化する。また神経細胞など胚葉の枠を越えて細胞が分化することが知られている。骨髄の間葉系細胞は成人から容易に採取でき、再生医療ではこの間葉系細胞の分化能を生かした治療が期待されている。臍帯血に間葉系幹細胞が存在するかこれまで議論はあったが、最近では存在を確認する報告が多く、30~40%の臍帯血ユニットから得られる^{16,17)}。

臍帯血中の間葉系細胞は骨髄にくらべて存在頻度が低く、分娩から単核細胞分離までの時間、臍帯血の量により採取頻度に影響することが報告されている。分離された間葉系細胞は典型的な分化能を示すが、筆者らの観察では特に軟骨への分化誘導がしやすく、ペレット法による培養では軟骨細胞の成長は骨髄よりも早い結果を得ている(未発表データ)。

臍帯血から間葉系細胞を確実に、かつ効率よく集める技術の開発が必要と考える。

胎盤組織

臍帯血のなかの間葉系細胞の存在頻度が少ないことから、胎盤、臍帯、羊膜といった臍帯血以外の細胞組織も注目されている(図1)。

1. 胎盤絨毛由来間葉系細胞

筆者らは、正期産に娩出された胎盤の胎児側絨毛部からout-growth法で間葉系細胞を分離した¹⁸⁾。胎児側を選んだのは、臍帯血バンクには新生児のHLA型を含めて移植に必要なデータがすべて保管されているからであり、母親に関するデータは新生児よりは完全ではないからである。母親由来細胞を混入していないことを確かめるために、男子を出産した胎盤絨毛由来細胞を増殖させ、FISH解析によりXY染色体を調べ、胎児側細胞が分離増幅していることを確認した(図2)。

単離した細胞は線維芽細胞様の形態を示し、この細胞を増幅させてFACSで細胞表面を解析した。CD44, CD90, CD73, CD105, HLA class 1を

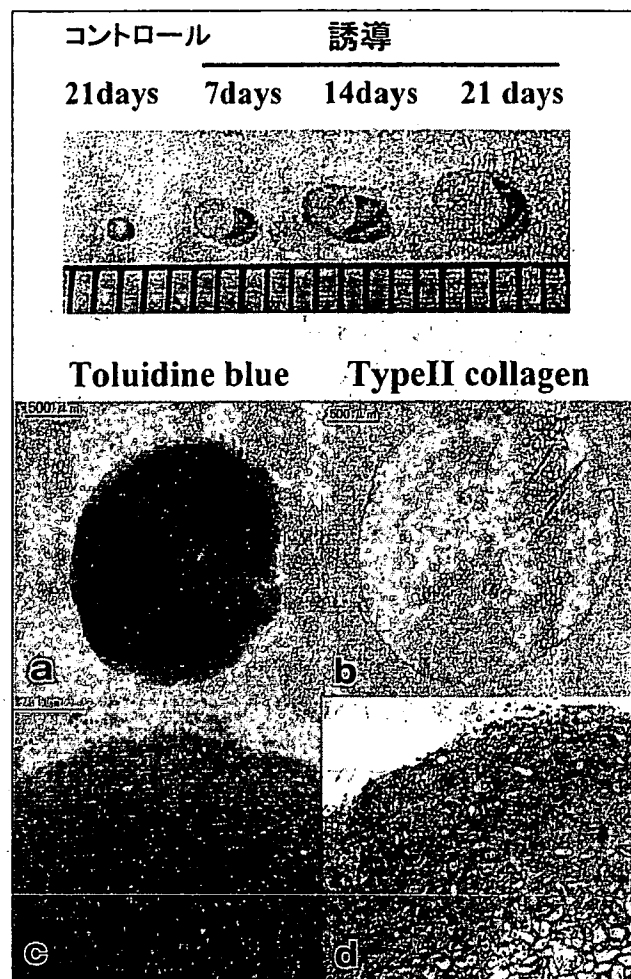


図3

*In vitro*での軟骨誘導はペレット培養法で軟骨誘導培地により3週間誘導の間、ペレットの大きさと重量の増大が確認された(上図)。トルイジンブルー染色では酸性粘液多糖類が赤紫色に、軟骨特異的のマーカであるII型コラーゲンの免疫染色では茶色に陽性であった(下図a~d)。(Zhang X et al, 2006²⁰⁾より改変)

発現していた。一方、CD31, CD34, CD133, CD45, TIE-II, HLA class 2は発現していなかった。*In vitro*でこのような細胞は誘導培養条件で、骨、軟骨、脂肪、さらに神経系細胞へ分化することが明らかにされた^{18,19)}。ペレット法で軟骨細胞に誘導すると半透明な軟骨が形成された(図3)。さらに、コラーゲンスポンジに包埋して誘導培地において2週間培養、ヌードラットの膝関節の骨軟骨欠損部位に移植したところ、欠損部位を補填した²⁰⁾(図4)。

胎盤絨毛由来間葉系細胞はまた遺伝子導入がし

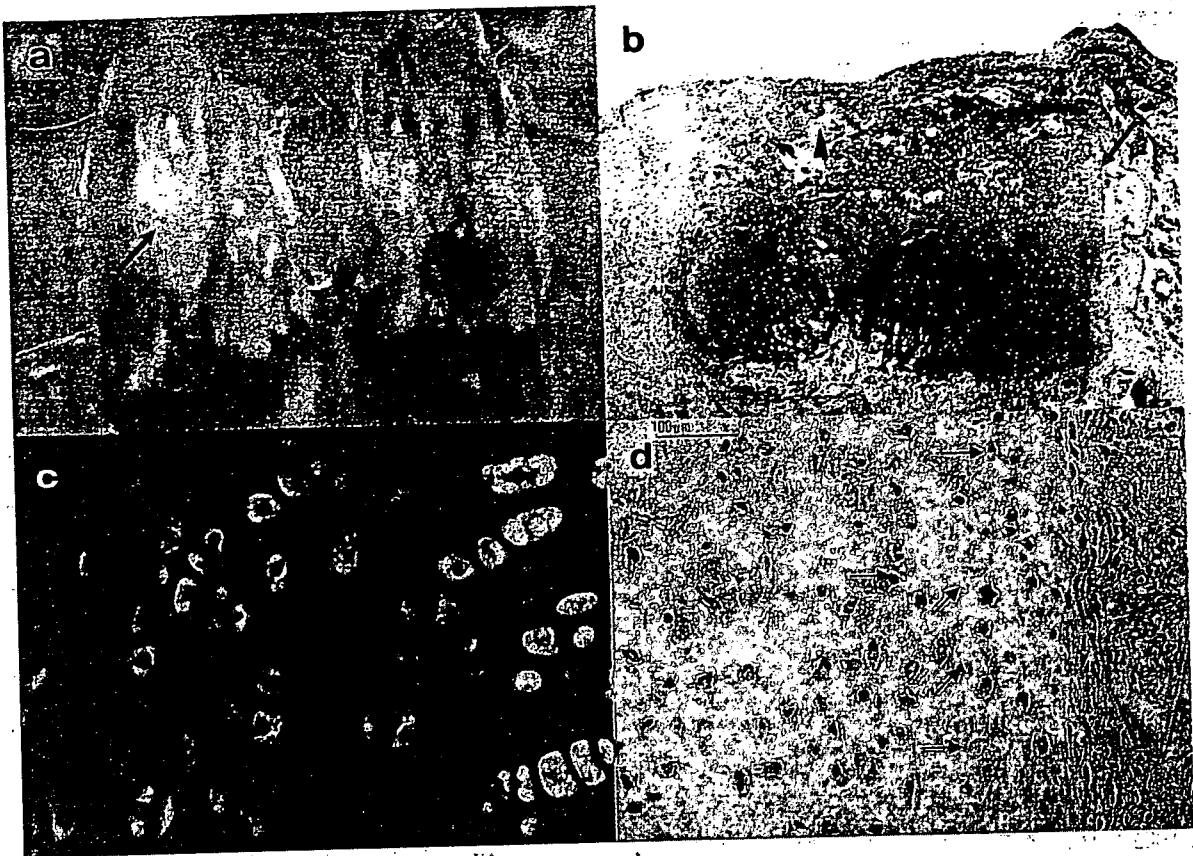


図4

*Iv vivo*における軟骨細胞への分化能を検討するため、細胞をコラーゲンスポンジに包埋し、誘導培地において2週間培養したあと、膝関節における骨軟骨欠損モデルをヌードラットで作製し移植実験を行った。移植後6週目に摘出し、欠損部に白く、円滑な軟骨様組織を形成した。

一方、移植されていない欠損部はそのままであった(a)。形成された組織はトルイジンブルー染色が陽性であり(b)(矢頭はコラーゲンスポンジのファイバー、矢印は移植片とラット骨の境界を示す)、特に、欠損の下部に強度なトルイジンブルー染色および円形な軟骨細胞を示して、硝子軟骨の形成を示唆された(c)。ヒト特異的 $\beta 2$ -ミクログロブリンの免疫染色を用いてヒト由来細胞を証明した(d)。(Zhang X et al., 2006²⁰⁾より改変)

やすく²¹⁾、VEGFなどのサイトカインを多く放出し、マウスの下肢虚血モデルにおいて胎盤間葉系細胞を移植すると血流の回復に効果を示すことが明らかにされている¹⁰⁾。

2. 臍帯

臍帯の結合組織であるウォルトンジェリー(Wharton Jelly)に間葉系細胞が存在し、神経細胞、グリア細胞に分化し²²⁾、また心筋細胞に分化することが報告され²³⁾、間葉系細胞の新しい供給源として期待されている。

臍帯の血管部位からも間葉系細胞が分離しうることが報告されている²⁴⁾。

3. 羊膜

ヒト羊膜は上皮細胞層とその下部に存在する羊膜間葉系細胞からなる。上皮細胞はドーパミンを産生し、パーキンソンモデルラットの脳内に移植することにより、一過性の臨床的治療効果が得られている²⁵⁾。培養上皮細胞を糖尿病マウスに移植することによりインスリン産生細胞に分化し、血糖値を下げることができ²⁶⁾、また、上皮細胞と下層の間葉系細胞を移植すると、肝細胞に分化することが知られている²⁷⁾。さらに、この細胞は、心筋細胞に分化することも報告されている²⁸⁾。また、羊膜細胞は、角膜の支持やES細胞のフィーダー細胞としての利用が報告されている。

臍帯血による再生の可能性

1. 骨, 軟骨細胞

骨・軟骨再生医療の標的となる疾患は数多く存在する。すなわち変形性関節症, 外傷や腫瘍切除後の骨, 軟骨の欠損, 先天性の変形, 奇形などである。骨, 軟骨の欠損に対して現在行われているのは自己組織移植である。しかし, 移植できる組織の量には限界がある。骨髄由来間葉系細胞は再生医療の細胞ソースとして最も注目されているが, 骨髄採取はドナーや患者本人への負担があり, また患者が遺伝性疾患を持っていた場合, 年齢が高い場合には自己の骨髄由来間葉系細胞を用いることは困難である^{29, 30)}。

臍帯血に骨, 軟骨細胞へ分化しうる間葉系細胞が存在することは数多く報告されている^{31~36)}。骨に関しては誘導培養条件でALP活性が上昇, 石灰化が起こり, ヌードマウスの骨折モデルに足場を組み合わせて移植後, 骨折癒合が促進された¹³⁾。軟骨はmicromass誘導培養法により, 軟骨特異的細胞外基質II型コラーゲンとプロテオグリカンが検出された。足場と組み合わせて2週間誘導培養後, ヌードマウスの皮下に移植すると, 大量の軟骨基質が合成されることが示された¹³⁾。

筆者らは, これまで白血病治療を主な目的とした臍帯血バンクを構築してきたが, そのシステムを活かして臍帯血由来間葉系細胞の単離・増殖・分化能の検討を行った。In vivoでの軟骨形成は確認されたが, 骨形成に関しては現在解析中である。軟骨細胞への分化に関しては, 臍帯血由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞と比較してより大量の軟骨基質を合成することから, 骨, 軟骨細胞再生のアロ細胞ソースとして期待される。

2. 心筋細胞

心臓は心筋梗塞, 心筋炎, 心筋症などにより障害が起こるが, 骨格筋, 肝臓, 皮膚などとは異なり, 組織を再生することができないために機能が低下して心不全へと移行する。わが国においては生活習慣の欧米化によって心筋梗塞が増えている。心臓移植の提供者が得られにくく治療例が増

えにくい現在, 自己骨髄中の幹細胞による心筋細胞の分化誘導が試みられている。マウス成体の骨髄細胞から自動収縮能を持つ心筋様細胞を*in vitro*にて誘導したことが報告された³⁷⁾。自己骨髄細胞を培養移植し, scar内に移植細胞由来のトロポニンI陽性の心筋様細胞, および新生血管の一部を形成する内皮細胞が確認され, 移植群はコントロール群にくらべ心機能は高値を示した³⁸⁾。

心筋梗塞患者において, 自己骨格筋より分離培養した筋芽細胞移植を開心術中に施行した有用性が報告されつつある^{39~41)}。温度感应性培養皿を用いて筋芽細胞シートを作製し, 心筋梗塞ラットモデルに移植し心機能の改善, 生存率の向上がみられたことが報告されている⁴²⁾。しかし, 自己筋芽細胞あるいは骨髄由来細胞の移植は患者の負担になり, 細胞品質, 緊急時対応の困難などいくつかの問題が存在する。臍帯血由来間葉系細胞から心筋細胞への分化誘導の報告は現時点ではまだ少ないが, 上述のUSSCsを*in vivo*にてヒツジの子宮内に移植, 産まれたヒツジの心臓にヒト由来細胞が存在していることが報告されていること¹³⁾, そしてブタへの移植結果からも¹⁵⁾, 臍帯血由来細胞の心筋梗塞治療への応用が期待される。

3. 肝細胞

臍帯血由来間葉系細胞は, *in vitro*において肝細胞誘導培地にて2週間培養後, 小型円型細胞へと変化, アルブミンmRNAの発現は経時的に増加し, 肝細胞関連マーカー α -fetoprotein, cytokeratin-18, tyrosine aminotransferase, glutamine synthetaseが培養後2~3週間発現していることが示され, 免疫染色とWestern blotでも確認された。

さらに分化した臍帯血由来細胞は, low-density-lipoprotein (LDL)を取り込む能力を持つことから, 機能的肝細胞であることも示された^{34, 39, 42~46)}。In vivoにおいて, NOD/SCIDマウスに一過性の肝障害を与え, 尾静脈あるいは門脈より臍帯血由来細胞を直接あるいは分化誘導して注入した。

その結果, 移植4週間後, ヒト肝細胞特異抗原

(human hepatocyte specific antigen : HAS)とヒトアルブミンの両方で陽性に染色された細胞が認められた。また長期的に臍帯血由来細胞は肝細胞として生着していることが示された。さらに、マウス血清中にはヒトアルブミンが検出された⁴⁷⁾。

以上の結果から、臍帯血由来細胞には肝細胞へ分化しうる細胞が存在することが示唆され、移植可能な肝細胞供給源として期待が持たれる。

しかしながら、臍帯血中のどの細胞分画が肝細胞になりうるのか、移植された細胞は肝全体の何割程度で置換、肝障害をサポートができるのか、不明の点が多く残されている。また、骨髄由来細胞について肝臓に移植後細胞融合 (cell fusion) である報告がなされており、その評価がさまざまであることから⁴⁸⁻⁵⁰⁾、今後も慎重な検討が必要である。

4. 臍帯血由来細胞からの膵臓細胞への分化誘導

*In vitro*において誘導分化した細胞にヒトインスリン産生がみられるとの報告は多いが⁵¹⁾、最近、Yoshidaらは、生後48時間以内のNOD/SCIDマウスへ臍帯血の単核球を移植、移植後1~2カ月後に0.65%の存在確率で膵臓部位にヒトインスリンを産生している臍帯血由来細胞が存在することを報告している⁵²⁾。FISH解析により、このアルブミン産生細胞はfusionによるものとfusionではないものの、両方のタイプの細胞が存在することを報告している。

5. 臍帯血由来間葉系細胞から神経系細胞への分化誘導

臍帯血から神経系細胞に分化する細胞が存在すれば、パーキンソン病や脊髄損傷などの難治性神経系疾患の治療として、基本的には細胞確保のためにドナーになら侵襲を加えることなく、自己細胞移植に準じる安全性の確保された細胞治療が実現できるものとして期待されている。近年、臍帯血には神経系細胞に分化しうる細胞が存在することが報告されている^{13,34,53-61)}。しかし、結果的には神経系マーカーを発現する細胞が存在するこ

とは示されているが、ニューロンやグリア、シュワン細胞特異的な分化誘導法や、サブタイプ別のニューロンへの分化誘導法など、機能的な解析を含めた詳細な検討はほとんどなされていない。また、臍帯血から単離した細胞の違いや培養条件などの違いにより、どのような特徴を持つ細胞が神経系に分化するかなど明らかにされていない。とりわけ注目されている細胞として間葉系細胞がその候補の一つである。

臍帯血由来間葉系細胞から神経系細胞に分化誘導することが報告されてきてはいるが^{13,16,34,58,66)}、主に間葉系細胞から神経系細胞への分化誘導については骨髄由来間葉系細胞を用いて検討されており、ドーパミン産生ニューロン⁶²⁾や感覚ニューロン⁶³⁾、シュワン細胞⁶⁴⁾に特異的な分化誘導法が確立されている。また、骨髄のMAPCsからも神経系の細胞に分化誘導することが報告されているが⁶⁵⁻⁶⁷⁾、臍帯血に存在するか否か明らかではない。一方、神経系に分化誘導する前の間葉系細胞で、すでに神経系マーカーを発現している間葉系細胞も存在することが報告されてきており⁶⁸⁻⁷²⁾、臍帯血同様に骨髄でもどのような間葉系細胞が神経系細胞に分化誘導するか明らかにされておらず、細胞生物学的な詳細な検討が必要とされる。

最近、臨床治験として韓国の研究グループから、脊髄損傷患者に臍帯血由来幹細胞を損傷部位に移植し、その後3週間後で歩行補助器具を使用し歩行可能になったことが報告された⁷³⁾。移植した臍帯血由来幹細胞には間葉系細胞を含めたさまざまな細胞が含まれており、どのようなメカニズムで損傷が軽減したのかは明らかにされていないが、難治性神経系疾患への臍帯血の利用に大きな期待が持たれる。

アロ細胞移植における免疫反応

アロ細胞を用いる再生医療にとって鍵となるのは、免疫反応の回避あるいは抑制である。臍帯血移植は免疫反応が低いことが特徴であり、骨髄移植においてはHLAが完全一致であったとしても、急性の移植片対宿主病 (graft versus host

disease: GVHD)が発症する頻度は高く、一座不一致であってもその発症頻度と発症は重篤である¹⁻⁴⁾。

一方、臍帯血はGVHDの発症頻度は格段に低く、またその治療は可能である。基本的に移植される免疫担当細胞が成人の細胞にくらべて未熟であると考えられている。リンパ球混合培養での反応性は低く、サイトカインの産生が低く抑えられている。また、制御性Tリンパ球が骨髄にくらべ高頻度に存在することも理由として考えられるが、これには臍帯血の単球由来の樹状細胞(dendritic cell: DC)が制御性リンパ球を誘導するとの報告もある⁷⁴⁾。

一方、間葉系細胞は、それ自体が免疫抑制作用を持つことが知られている。間葉系細胞はMHC class 1陽性、MHC class 2は陰性であり、CD4T細胞の認識を避けることが出来る。また、effector T細胞を誘導に必要なCo-stimulatory分子(CD40, CD40L, CD80, CD86)も発現していない⁷⁵⁾。また間葉系細胞はDC成熟を妨げ、NK細胞、CD8、CD4陽性細胞の反応を抑制する。間葉系細胞は細胞接触を通してDCの成熟を妨げて、また、単核細胞から炎症因子IFN- γ , IL-12, TNF- α の分泌を抑制する作用を持つ⁷⁶⁾。

臍帯血のヒトの臨床試験

これまで臍帯血を再生医療の視点から移植した例はいまだ多くない。注目されたのは、前述した韓国のグループが行った脊髄損傷の患者への移植であろう⁷³⁾。このグループは脊髄損傷をはじめ、アルツハイマー症、パーキンソン氏病、進行性筋萎縮症、脳梗塞、糖尿病、肝硬変、心筋梗塞などのさまざまな疾患に臍帯血(増幅したCD34陰性細胞)を移植している。医学的な検証が充分なされ、成績が公表されていくことが強く望まれる。

研究用幹細胞バンク

臨床用の臍帯血の利用は日本さい帯血バンクネットワークが厚生労働省から補助金を受けてすす

めており、多大な実績を上げてきている。

一方で、再生医療の視点からの臍帯血の利用は国内では基礎研究の段階であるが、この研究を推進するために、文部科学省は“再生医療の実現化プロジェクト”のサブテーマとして研究用幹細胞バンク整備領域を設け、“研究用幹細胞リソースバンク”を立ち上げた⁷⁷⁾。日本さい帯血バンクネットワークのなかで5バンクがこのプロジェクトに協力し、採取細胞数などの条件が臨床用に適合しなかった臍帯血検体について、感染症などの安全性を検査のうえ、理化学研究所バイオリソースセンター(理研 CELL BANK)を経由して国内の公的な研究機関に供給(無償、実費負担)するもので、2004年7月より供給をはじめた。これにより臍帯血を細胞ソースとした再生医療などの研究が国内で進むことが期待されている。

おわりに

臍帯血バンクが整備されているなか、胎盤組織はいまだ医療廃棄物として処理されている。臍帯血バンクに保存される臍帯血が遺伝性疾患、感染症検査をクリアし、またHLA型が調べられたうえで保存されていることから、臍帯血の間葉系細胞や胎盤組織の間葉系細胞が臍帯血バンクのシステムを活用することが出来れば、輸血に使われる血液製剤と同じレベル、すなわち最も安全性の高い再生医療のための細胞ソースとなりうる。臍帯血に含まれる細胞は、再生医療においてアロ細胞としては最も臨床に適した細胞である可能性が高い。

幹細胞の基礎研究、細胞プロセッシング、再生医療を視野に入れた臍帯血バンク、ティッシュエンジニアリングの各分野が協力し、臨床試験が速やかに進められるような環境を整えていくことが必要と考える。

文献

- 1) Gluckman E, Rocha V: Histoty of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy* 2005, 7: 219-227.
- 2) 日本さい帯血バンクネットワーク: <http://www.j-cord.gr.jp>

- 3) Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, Stevens C, Barker JN, Gale RP, Lazarus HM, Marks DL, van Rood JJ, Scaradavou A, Horowitz MM : Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004, 351 : 2265-2275.
- 4) Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE : Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005, 105 : 1343-1347.
- 5) 伊藤仁也, 中畑龍俊 : *In vitro* 増幅造血幹細胞を用いた臍帯血移植. *実験医学* 2006, 24 : 154-165.
- 6) Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC : Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human umbilical cord blood cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004, 104 : 2752-2760.
- 7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275 : 964-967.
- 8) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T : Therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) study investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002, 360 : 427-435.
- 9) Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T : Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000, 105 : 1527-1536.
- 10) Nishishita T, Ouchi K, Zhang X, Inoue M, Inazawa T, Yoshiura K, Kuwabara K, Nakaoka T, Watanabe N, Igura K, Takahashi TA, Yamashita N : A potential pro-angiogenic cell therapy with human placenta-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 325 : 24-31.
- 11) Zhang L, Yang R, Han ZC : Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells : a promising method of therapeutic revascularisation. *Euro J Hematol* 2006, 76 : 1-8.
- 12) Reyes M, Lund T, Lencic T, Auiar D, Koodie L, Verfaillie CM : Purification and *ex vivo* expansion of post natal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001, 98 : 2615-2625.
- 13) Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P : A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004, 200(2) : 123-135.
- 14) Kogler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV, Wernet P : Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 2005, 33 : 573-583.
- 15) Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, Wnendt S, Muhs A, Spitkovsky D, Li RK : Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction : a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 2005, 112 : 96-104.
- 16) Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH : Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004, 103 : 1669-1675.
- 17) Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H : Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004, 22 : 625-634.
- 18) Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA : Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytherapy* 2004, 6 : 1-11.
- 19) Takahashi K, Igura K, Zhang X, Mitsuru A, Takahashi TA : Effects of osteogenic induction on mesenchymal cells from fetal and maternal parts of human placenta. *Cell Transplant* 2004, 13 : 337-341.
- 20) Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Takahashi TA : Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 340 : 944-952.
- 21) Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T, Watanabe N, Igura K, Shinomiya K, Takahashi TA, Yamashita N : Efficient adeno-associated virus-mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. *Microbiol Immunol* 2003, 47 : 109-116.
- 22) Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM et al. : Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003, 21 : 50-60.
- 23) Wang HS, Hung SC, Peng ST, Hung CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC : Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004, 22 : 1330-1337.
- 24) Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN : Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003, 21 : 105-110.
- 25) Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N : Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease : a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 2000, 165 : 27-34.
- 26) Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, Kato K, Konishi I, Nikaido T : Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003, 12 : 545-552.

- 27) Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaïke T, Nikaido T : Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Structure Function* 2004, 29 : 73-84.
- 28) Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T : Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005, 79 : 528-535.
- 29) Rao MS, Mattson MP : Stem cells and aging : expanding the possibilities. *Mech. Aging Dev* 2001, 122 : 713-734.
- 30) Mueller SM, Glowacki J : Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cellular Biochem* 2001, 82 : 583-590.
- 31) Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H : Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004, 22 (4) : 625-634.
- 32) Lee MW, Yang MS, Park JS, Kim HC, Kim YJ, Choi J : Isolation of mesenchymal stem cell from cryopreserved human umbilical cord blood. *Int J Hematol* 2005, 81(2) : 126-130.
- 33) Yang SE, Ha CW, Jung M, Jin H, Lee M, Song H, Choi S, Oh W, Yang YS : Mesenchymal stem/progenitor cells developed in culture from UC blood. *Cytotherapy* 2004, 6(5) : 476-486.
- 34) Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KE, Sung KW, Koo HH, Oh W, Yang YS, Yang SE : Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for *ex vivo* expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 2006, 85 : 212-225.
- 35) Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H : *In vitro* mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 13 : 321(1) : 102-108.
- 36) Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM : Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004, 83(12) : 733-738.
- 37) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S : Cardiomyocyte can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999, 103 : 697-705.
- 38) Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DAG, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ : Autologous transplantation of bone marrow cell improves damaged heart function. *Circulation* 1999, 100 : 247-256.
- 39) Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Adergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D : Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41 : 1078-1083.
- 40) Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Sanchez PL, Canizo C, Rabago G, Marti-Climent JM, Hernandez M, Lopez-Holgado N, Gonzalez-Santos JM, Martin-Luengo C, Alegria E : Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in human : histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41 : 879-888.
- 41) Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozadowska N, Kurpisz M : Autologous skeletal myoblast transplantation for treatment of postinfarction myocardial injury : phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004, 148 : 531-537.
- 42) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezumi M, Okano T : Fabrication of pulsatile tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002, 90 : 40-48.
- 43) Kang XO, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ : Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005, 11 : 7461-7465.
- 44) Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H : *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 330 : 1153-1161.
- 45) Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK : *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004, 40(6) : 1275-1284.
- 46) Tanabe Y, Tajima F, Nakamura Y, Shibasaki E, Wakejima M, Shimomura T, Murai R, Murawaki Y, Hashiguchi K, Kanbe T, Saeki T, Ichiba M, Yoshida Y, Mitsunari M, Yoshida S, Miake J, Yamamoto Y, Nagata N, Harada T, Kurimasa A, Hisatome I, Terakawa N, Murawaki Y, Shiota G : Analyses to clarify rich fractions in hepatic progenitor cells from human umbilical cord blood and cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 324 : 711-718.
- 47) Sharma AD, Cantz T, Richter R, Eckert K, Henschler R, Wilkens L, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Ott M : Human cord blood stem cells generate human cytokeratin18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. *Am J Pathol* 2005, 167(2) : 555-564.
- 48) Nonome K, Li X, Takahara T, Kitazawa Y, Funeshima N, Yata Y, Xue F, Kanayama M, Shinno E, Kuwae C, Saito S, Watanabe A, Sugiyama T : Human umbilical cord blood-derived cells differentiation into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model. *AJP-Gastrointestinal and liver physiology* 2005, 289 : 1091-1099.
- 49) 柿沼 晴 : ヒト臍帯血細胞の肝細胞への誘導と細胞移植. *日本炎症・再生医学会雑誌* 2006, 26 : 44-48.
- 50) Willenbring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Y, Dorrel C, Olson S, Finegold M, Fleming WH, Grompe M : Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med* 2004, 10 :

- 744-748.
- 51) Pessoa A, Eletti B, Croera C, Savalli N, Diodovich C, Gribaldo L : Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells. *Biochem Biophys Research Commun* 2004, 323 : 315-322.
 - 52) Yoshida S, Ishikawa F, Kawano N, Shimoda K, Nagafuchi S, Shimoda S, Yasukawa M, Kanemaru T, Ishibashi H, Shultz LD, Harada M : Human cord blood-derived cells generate insulin-producing cells *in vivo*. *Stem Cells* 2005, 29 : 1409-1416.
 - 53) Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR : Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001, 171 (1) : 109-115.
 - 54) Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Yeon DS, Lee JJ, Kim HO, Cho YE : Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells *in vitro*. *Neuroreport* 2001, 16 : 12(16) : 3523-3527.
 - 55) Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA : Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood : expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001, 7(11) : 581-588.
 - 56) Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K : Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002, 115(Pt 10) : 2131-2138.
 - 57) Bicknese AR, Goodwin HS, Quinn CO, Henderson VC, Chien SN, Wall DA : Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplant* 2002, 11(3) : 261-264.
 - 58) Hou L, Cao H, Wang D, Wei G, Bai C, Zhang Y, Pei X : Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. *Int J Hematol* 2003, 78(3) : 256-261.
 - 59) Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon BH, Yang YS, Yang SE, Kim SU : Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 2004, 75(4) : 573-584.
 - 60) Jeong JA, Gang EJ, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H : Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Neuroreport* 2004, 15 (11) : 1731-1734.
 - 61) Sun W, Buzanska L, Domanska-Janik K, Salvi RJ, Stachowiak MK : Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2005, 23 (7) : 931-945.
 - 62) Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Garbuzova-Davis S, Jiang L, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR, Zigova T, Willing AE : Human umbilical cord blood progenitors : the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 2005, 23(10) : 1560-1570.
 - 63) Buzanska L, Habich A, Jurga M, Sypecka J, Domanska-Janik K : Human cord blood-derived neural stem cell line-Possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol in vitro*. 2005, 19(7) : 991-999.
 - 64) Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C : Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004, 113(12) : 1701-1710.
 - 65) Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, Romand R, Hashino E : Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102(13) : 4789-4794.
 - 66) Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H : Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001, 14 (11) : 1771-1776.
 - 67) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002, 418(6893) : 41-49.
 - 68) Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM : Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002, 30(8) : 896-904.
 - 69) Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM : Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 1 (Suppl 100) : 11854-11860.
 - 70) Wislet-Gendebien S, LePrince P, Moonen G, Rogister B : Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2003, 116(Pt 16) : 3295-3302.
 - 71) Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D : Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004, 72(7) : 319-326.
 - 72) Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED : Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture, and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 2005, (Epub ahead of print).
 - 73) Kang KS, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Song CH, Han H : A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically : a case study. *Cytherapy* 2005, 7(4) : 368-373.
 - 74) Broxmeyer HE : Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit. *Cytherapy* 2005, 7 : 209-218.

- 75) Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC : Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003, 75 : 389-397.
- 76) Ryan JM, Barry FP, Murphy JM and Mahon BP :

Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflammation* 2005, 2 : 8.

- 77) 研究用幹細胞リソースバンク : <http://scb.ims.u-tokyo.ac.jp/>, 理研CELL BANK : <http://www.bcr.riken.jp/lab/cell/hcb/>

- 3) Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, Stevens C, Barker JN, Gale RP, Lazarus HM, Marks DL, van Rood JJ, Scaradavou A, Horowitz MM : Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004, 351 : 2265-2275.
- 4) Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE : Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005, 105 : 1343-1347.
- 5) 伊藤仁也, 中畑龍俊 : *In vitro* 増幅造血幹細胞を用いた臍帯血移植. *実験医学* 2006, 24 : 154-165.
- 6) Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC : Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human umbilical cord blood cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004, 104 : 2752-2760.
- 7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275 : 964-967.
- 8) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T : Therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) study investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002, 360 : 427-435.
- 9) Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T : Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000, 105 : 1527-1536.
- 10) Nishishita T, Ouchi K, Zhang X, Inoue M, Inazawa T, Yoshiura K, Kuwabara K, Nakaoka T, Watanabe N, Igura K, Takahashi TA, Yamashita N : A potential pro-angiogenic cell therapy with human placenta-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 325 : 24-31.
- 11) Zhang L, Yang R, Han ZC : Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells : a promising method of therapeutic revascularisation. *Euro J Hematol* 2006, 76 : 1-8.
- 12) Reyes M, Lund T, Lencic T, Auiar D, Koodie L, Verfaillie CM : Purification and *ex vivo* expansion of post natal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001, 98 : 2615-2625.
- 13) Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P : A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004, 200(2) : 123-135.
- 14) Kogler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV, Wernet P : Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 2005, 33 : 573-583.
- 15) Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, Wnendt S, Muhs A, Spitzkovsky D, Li RK : Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction : a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 2005, 112 : 96-104.
- 16) Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH : Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004, 103 : 1669-1675.
- 17) Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H : Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004, 22 : 625-634.
- 18) Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA : Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004, 6 : 1-11.
- 19) Takahashi K, Igura K, Zhang X, Mitsuru A, Takahashi TA : Effects of osteogenic induction on mesenchymal cells from fetal and maternal parts of human placenta. *Cell Transplant* 2004, 13 : 337-341.
- 20) Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Takahashi TA : Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 340 : 944-952.
- 21) Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T, Watanabe N, Igura K, Shinomiya K, Takahashi TA, Yamashita N : Efficient adeno-associated virus-mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. *Microbiol Immunol* 2003, 47 : 109-116.
- 22) Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM et al. : Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003, 21 : 50-60.
- 23) Wang HS, Hung SC, Peng ST, Hung CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC : Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004, 22 : 1330-1337.
- 24) Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN : Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003, 21 : 105-110.
- 25) Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N : Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease : a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 2000, 165 : 27-34.
- 26) Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, Kato K, Konishi I, Nikaido T : Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003, 12 : 545-552.