

flowchart

記載の手法として、hESC からの網膜色素細胞製造工程をコアパッケージとし、このコアパッケージに原材料である hESC (ヒト受精胚由来) と MEF (マウス由来)、製剤化 (formulation) のコンパートメントを組み合わせた。hESC に関しては、複数クローンからより RPE に分化しやすい株を選択していると想定され、構築されたマスターセルバンクの受け入れ基準としての規格試験を設定している。MEF に関しては、管理飼育されたマウスの胎生期から線維芽細胞を培養し、2 継代でバンク化し、MMC 処理したのちに使用することとなっている。これら MEF はロット試験がなされており、受け入れ基準としての規格試験が設定されている。

hESC 由網膜色素細胞の規格試験として、細胞製造直後 (凍結前)、凍結溶解後、BSS に溶解後の製剤化後に規格試験を実施している。

Lancet 誌に公表されている MEF マスターバンク (表 1)、hESC マスターバンク (表 2)、および網膜色素細胞 (以下 RPE) (表 3) の規格試験を示す (一部様式を改変)。これらは、米国 FDA により IND として認められた治験薬 GMP としての規格 (細胞特性規格) である。

Test	Method	Specification	Lot MEF-08
hESCs規格試験	Characterization of MA09 hESC Master Cell Bank		
Yield	USP < 35 Inoculation method (WuXi SOP 30741)	Negative	Negative
Sterility	Indirect culture with Hoechst stain and direct culture (WuXi SOP 30055)	Negative	Negative
Mycoplasma	Co-cultivation with Mus dunali and PG-4 (54-L) cells for detection of retrovirus (WuXi SOP 30201)	Negative	Negative
Retroviruses:	PCR-based viral reverse transcriptase detection (WuXi SOP 30357)	Negative	Negative
In vitro detection of viruses on cells	Ultrastructural electron microscopy of cellular morphology and detection of viral particles (WuXi SOP 30610)	Negative	Negative
In vivo detection of inapparent viruses	Incubation with MRC-5, VERO, NIH3T3 and HeLa cells (WuXi SOP 31000)	Negative	Negative
Minute virus of mice (MVM)	Detection of MVM DNA by qPCR (WuXi SOP 30910)	Negative	Negative
Mouse antibody production	Antibody titer on inoculated mice for 19 viruses, lactate dehydrogenase elevating virus (LDHEV) and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) (WuXi SOP 30001)	Negative	Negative
XC plaque assay	In vitro detection of murine ectropic virus (extended duration) (WuXi SOP 30024)	Report results	Report results
Bovine viruses	Detection of adventitious bovine viruses (WuXi SOP 30234)	Negative	Negative
Porcine viruses	Detection of adventitious porcine viruses (WuXi SOP 30127)	Negative	Negative
Hepatitis B virus	Detection of HBV DNA by qPCR (WuXi SOP 32837)	Negative	Negative
Hepatitis C virus	Detection of HCV RNA by qPCR (WuXi SOP 30762)	Negative	Negative
Hepatitis Simplex A and B	Detection of human HSV-A and HSV-B DNA by qPCR (WuXi SOP 30553)	Negative	Negative
Human immunodeficiency virus (HIV)	Detection of HIV-1 DNA by qPCR (WuXi SOP 30544)	Negative	Negative
HTLV type 1	Detection of HTLV-2 DNA by qPCR (WuXi SOP 30776)	Negative	Negative
Human T-cell lymphotropic virus (HTLV) type 1	Detection of HTLV-1 DNA by qPCR (WuXi SOP 31491)	Negative	Negative
HTLV type 2	Detection of HTLV-2 DNA by qPCR (WuXi SOP 31492)	Negative	Negative
Human cytomegalovirus (HCMV)	Detection of HCMV DNA by qPCR (WuXi SOP 30235)	Negative	Negative
Human Epstein-Barr virus (EBV)	Detection of EBV DNA by qPCR (WuXi SOP 30233)	Negative	Negative
Human parvovirus B19	Detection of human parvovirus B19 DNA by qPCR (WuXi SOP 30761)	Negative	Negative
DNA fingerprinting	Short tandem repeat (STR) analysis (WuXi SOP 401)	Conforms to expected pattern	46, XX, normal
Karyotype with G-banding	Cytogenetic analysis of 20 G-banded metaphase cells (WuXi SOP 100)	Conforms to expected pattern	46, XX, normal female
FSM analysis	200 Interphase nuclei stained by FISH for chromosomes 11 and 17 (WuXi SOP 201)	Normal signal pattern	Normal signal pattern
Expression of hESC specific markers	Gene expression analysis of 20 G-banded metaphase cells (WuXi SOP 002)	WuXi 1 signature marker expression	WuXi 1 signature marker expression
Absence of residual degeneration gene mutations	Screening for mutant forms of ABCG4, ELO2A, VLDLR, BDNF, and CD33 genes by PCR and sequence analysis (Ophthalmic Molecular Diagnostic Laboratory at the University of California)	No mutations detected	No mutations detected
Morphology	Microscopic evaluation of cells and colonies (ACT BR 0004)	Conforms to hESC morphology	Conforms to hESC morphology

表 1 hESCs 規格

Test	Method	Specification	Lot MEF-08
Sterility	USP - Inoculation method (WuXi SOP 30741)	Negative	Negative
Mycoplasma	Indirect culture with Hoechst stain and direct culture (WuXi SOP 30055)	Negative	Negative
Retroviruses:	Co-cultivation with Mus dunali and PG-4 (54-L) cells for detection of retrovirus (WuXi SOP 30201)	Negative	Negative
In vitro detection of viruses on cells	Ultrastructural electron microscopy of cellular morphology and detection of viral particles (WuXi SOP 30610)	Negative	Negative
In vivo detection of inapparent viruses	Incubation with MRC-5, VERO and NIH3T3 cells (WuXi SOP 31000)	Negative	Negative
Minute virus of mice (MVM)	Detection of MVM DNA by qPCR (WuXi SOP 30910)	Negative	Negative
Mouse antibody production	Antibody titer on inoculated mice for 19 viruses, lactate dehydrogenase elevating virus (LDHEV) and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) (WuXi SOP 30001)	Negative	Negative
In vitro tumorigenicity	Colony formation in soft agar (WuXi SOP 30330)	Negative	Negative
Cell line ID testing	Isoenzyme electrophoresis mobility profiles (WuXi SOP 30330)	Mouse isoenzymes	Isoenzyme pattern representative of mouse cells
XC plaque assay	In vitro detection of murine ectropic virus (extended duration) (WuXi SOP 30024)	Report results	Positive: ectropic; MuLV Pass
MEF performance qualification	Test ability of MEF to support growth and attributes of MA-09 hESC cells in culture (ACT SOP QCS-0004)	Comparable to control MEF	Pass

表 2 MEF 規格

Test	Specification	Lot 0211-01A
Sterility	Negative	Negative
Mycoplasma	Negative	Negative
Cell density	1-2 million viable cells/mL (post dilution)	2 ± 100 viable cells/mL
Cell viability	Final harvest: > 85%	95%
Morphology	Post-thaw: > 90% confluent, cobblestone epithelium, medium pigmentation	Pass
Karyotype	46, XX, normal	46, XX, normal
DNA fingerprinting	Conforms with hESC MCB	Conforms
hRPE mRNA for: BEST-1	Up-regulated by a minimum of 1 log10 compared to hESC	RPE-G 1.32
PAX6	> 95% PAX6 and/or bestrophin	PAX6 2.80
MITF	> 95% ZO-1	MITF 3.83
hESC mRNA for: OCT-4	Down-regulated compared to hESC (log10)	BEST-1 3.81
NANOG	OCT-4 < 1.15	OCT-4 -3.19
SOX-2	NANOG 2 -1.55	NANOG -2.45
SOX-2 4 -0.63	SOX-2 -2.07	SOX-2 -2.07
Stainability by bestrophin staining	> 70% staining	71%
Purity by immunostaining	> 95% PAX6 and/or MITF	100%
hESC protein markers	> 95% PAX6 and/or bestrophin	100%
Residual murine DNA	> 95% ZO-1	100%
Murine viruses by Map	< 2 cells staining with OCT-4 and AP in 9 million cells examined	0
Retroviruses by Mus dunali co-cultivation	Negative	Negative
Ectopic murine viruses	Negative	Negative
Endotoxin	< 0.5 EU/mL	0.312 EU/mL
Potency by phagocytosis	Positive	Positive

表 3 hESCs 由来 RPE 規格

流れ図 (図 1) にて設定されているのは、コアパッケージである網膜色素細胞製造工程の原材料としての hESC 規格試験と MEF 規格試験、網膜色素細胞規格試験である。これら規格試験に共通する最低限の規格試験は、無菌

性、マイコプラズマ否定試験であり、出荷判定試験ではエンドトキシン測定は必須である。加えて、最終細胞製剤が細胞懸濁液である場合には、細胞濃度と細胞数の設定は不可避である。これらは細胞製剤規格試験の **minimum consensus** であるといえよう。意図するところのものは、感染症伝播リスクへの対処であるといえる。

Minimum consensus に加え、細胞製剤の製造工程で生物由来の原料を用いているのであれば、当該生物由来原料よりの感染症伝播のリスクについて検討し、検査すべき項目を列挙して規格試験として設定すべきである。hESC 由来網膜色素細胞の製造工程では、feeder 細胞としてマウス由来である MEF、出発原料である hESC を用いている。MEF と hESC に関しては、それらの製造工程で使用された原材料からの感染症の持ちこみ (carry over) を考慮して規格試験を設定しなければならない。MEF については、マウス由来ウイルスについての検討が中核的論点であろうし、hESC に関しては、ヒト由来細胞であることからヒト由来ウイルスの検討と、培養過程で使用されるウシおよびブタ由来ウイルスに関しての検討が必要である。ここで徹底的に検査検証され、ウイルスの存在が科学的合理性を持って否定されれば、以下の工程へのウイルス等の持ちこみ (carry over) はないものとして議論される。hESC 由来網膜色素細胞の規格試験としては、マスターセルバンクである hESC からの

拡大培養で用いた MEF の残存が議論される。

MEF マスターセルバンクでの規格試験について議論する (表 1)。無菌性とマイコプラズマ否定試験は、**minimum consensus** として必須である。細菌・真菌による汚染があれば、細胞製剤として投与はできないことは当然であるが、培養環境が適切でない状況に変遷してしまうという点も考慮されていると考える。マイコプラズマに関しては、その汚染により細胞培養の工程で細胞増殖速度が低下することが知られ、また細胞の形態にも異常をきたすことから、細胞製剤として投与できないことに加え、細胞製造の工程の一貫性と再現性の観点からも議論されるところである。MEF はマウス胎仔由来の線維芽細胞である。適切な環境で飼育、妊娠したメスマウスから出生前に可及的に無菌下に採材された胎仔マウスから、線維芽細胞を初代培養・拡大培養し、マスターセルバンク化するとの工程を経て、hESC 由来網膜色素細胞の製造に供される。本規格試験には明示されていないが、マウスの飼育状況の適切性 (ハード・ソフト含む) と個体追跡性・飼育関連記録が確保されていることは前提である。マウス由来の細胞であるため、MEF マスターセルバンク規格試験では、マウスが感染している可能性のあるウイルスについて、徹底的な解析が行われる。MEF でのウイルス試験の品質管理上の目的は、細胞製剤への持ち込みによる人畜共通

感染症伝播リスクの回避と、MEF の感染による期待される機能の低下リスクの回避である。そう考えると、マウスが内因性ウイルスとして保有するウイルスとしてレトロウイルス、マウスの有する未知の人畜共通感染ウイルスの否定試験が規格試験として設定されることは合理的である。レトロウイルスの否定は、易感染性細胞への感染試験、NAT法を用いる核酸検出試験、電子顕微鏡的観察でのウイルス様パーティクルの観察試験によりなされている。なお、マウスは、内因性に C 型レトロウイルス等を有していることは広く知られている。本規格試験の結果では陰性とされているが、感染性を有する C 型レトロウイルスのみを確認する SOP に基づいているのかもしれない。未知のウイルスに関しては、指標細胞への感染性を評価指標として実施される。細胞障害性、ヘマグルチニンの存在するエンベロープを有するウイルスを検出する血球吸着性、血液凝集性である。hESC 由来網膜色素細胞の原材料としての MEF では、ヒト由来細胞である MRC-5、アフリカミドリサル由来の VERO 細胞、マウス由来の NIH3T3 細胞を指標細胞として用いている。不顕性ウイルスの検出のために、哺乳期と成体マウス、モルモット、未成熟の孵化卵への接種を規格試験として設定、実施している。感染により線維芽細胞としての機能が低下するリスクを有するウイルスとして minute virus of mice (MVM) を NAT 法にて検出し、当

該 MEF を接種し、抗体値が上昇するか否かで 19 種類のウイルスについてその存在の検出を試みている。XC plaque assay は、人畜共通感染症ではないものの、マウスやラットに不顕性感染を起こすため、マウスの飼育状況をフォローするために設定された規格かもしれない。

ついで、hESC のマスターバンクでの規格試験に関し、感染症伝播のリスクの観点から議論する(表 2)。hESC のマスターセルバンクにおいては、minimum consensus としての無菌性、マイコプラズマ否定試験を実施されている。加えて、feeder 細胞としてマウス由来の MEF を用いていることから、マウス由来ウイルスの否定試験を行っている。マスターセルバンクの構築過程で FBS あるいは FBS 由来成分、トリプシンと想定されるブタ由来成分を用いていると思われ、牛由来ウイルスとブタ由来ウイルスの検証を行っている。hESC は、当然ヒト由来であるから、ヒトウイルスの確認を行っており、GTP 基準に適合させるため、HBV、HCV、HIV、HTLV に加え、CMV と EBV の検査が実施されている。米国では GTP で求められておらず、日本では求められるパルボ B19 の検査も実施されている。

次いで、最終製品である RPE にかかる規格試験について議論しよう(表 3)。RPE 規格試験でも、minimum consensus としての無菌性試験、マイコプラズマ否定試験が実施され、最終製品の規格として minimum

consensusとして細胞濃度、細胞生存率、エンドトキシン測定がおこなわれている。これらは、いかなる細胞製剤であっても検査が実施される。加えて、hESCはマスターセルバンクから拡大培養する過程でMEFをfeeder細胞として用いておるため、MEF由来マウスウイルスの否定も行われている。本理であれば、MEFの規格試験で徹底的に解析されているのであるから不要であるはずではあるが、MEFなどマウス由来細胞は、MMCあるいはradiation処理にて内因性レトロウイルスの活性化が知られているため、追加実施されているのであろう。ES細胞の培養工程で用いるMEFは、MMC処理しているために増殖しない事を前提としているが、MEFの残存はアレルギー反応など予期せぬリスクを惹起する可能性があるため、MEFが混入していない事を確認する必要がある。MEFの存在だけであれば、FACSのような光学的機器に検出も可能かもしれないが、FACSは検出感度が0.1%程度であり、PCR法にてマウスDNAの混入の否定を行っている。ここで興味深いことに、牛由来ウイルス、ブタ由来ウイルス、ヒト由来ウイルスの検査がなされていない。その理由は、hESCのマスターセルバンクにて、ウイルス感染性が徹底的に検査され否定されているためである。徹底的に解析されたマスターセルバンクで、これらウイルスが否定されれば、下流の工程でウイルスが新たに生じる可能性はないとされているためで

ある。ウシ、ブタ、ヒト由来の感染可能性のあるウイルスの試験がRPE規格試験にて行われていないのは、hESCからRPEの製造工程において、牛、ブタ由来の原材料が使用されていない事、またhESC以外のヒト由来原材料が用いられていないことによる。細胞培養工程で細胞を継代するために用いられる細胞分散剤は、多くの場合トリプシンである。トリプシンはブタ膵臓から抽出精製される場合が多かった。近年、インスリンの製造工程、Cペプチドをかい離させるために用いていたブタ膵臓由来トリプシンがブタ由来ウイルスの感染事故を惹起した。これ以降、特にEUではトリプシンを遺伝子組み換えに変更するという流れにある。RPEの規格試験から、細胞分散剤として用いられたであろうトリプシンは少なくとも生物由来ではなく（おそらく遺伝子組み換え）であるということも読み取れる。

これまでの議論で、hESC由来RPEの規格試験のなかで、minimum consensusたる無菌性とマイコプラズマ否定試験、感染症の伝播にかかる規格試験については議論がなされた。ついで議論すべきは、取り違えの防止と生物学的同一性である。

MEFの取り違えと細胞特性に変化がないことは、in vitro tumorigenicityとして軟寒天コロニー形成試験を実施している(表1)。軟寒天コロニー形成試験は、足場非依存性の細胞増殖能を観察するものであ

り、線維芽細胞には足場依存性の増殖能はないため、仮に細胞特性が変化した場合、あるいは細胞株の混入・取り違えがあれば、コロニー形成が検出されることとなる。Cell line ID testing は、細胞の有する isozyme の電気泳動パターンの観察により、細胞の取り違えがないことを検証するものである。実際、わがくの細胞バンクでも、deposition される細胞株のかなりの比率で HeLa 細胞との取り違えがあることが知られている。

hESCs に関しても、細胞特性の観察から、細胞株の取り違えがないことを確認している。取り違えに関しては、DNA finger print として STR、G-band 染色による核型解析、第 12 及び 17 染色体の FISH 解析を実施、hESCs 以外の細胞株との取り違えや細胞特性の変化を否定するために、hESCs 特異的発現マーカーとして oct-4, rex-1, nanog および sox-2 の発現を定量的 PCR にて検証している。また、細胞の形態も顕微鏡的に観察しコロニーの観察をしている。STR に関しては、hESCs では安定しているため細胞株が均一であれば、取り違えの否定にはもっとも有効な手段であるといえる。生物学的変化、すなわち細胞特性の変化に関しては、hESCs が均一 (homologous) であるという前提であれば、hESCs 特異的マーカーの発現解析がまずは有用である。一方、細胞株の細胞特性の変化は、細胞株集団の不均一性 (heterogeneity) によるところが想定される。これは、細胞特性が

変化した細胞が一部出現し、取って代わる過渡期にあるばあいには非常に有効な検出手段であるといえる。本規格試験では、G-band 染色により細胞特性としての染色体異常が生じた細胞の比率を検出し、この手法では検定細胞数が少ないことから、FISH による 200 細胞の検定を追加している。

RPE の細胞特性としては、培養工程での取り違えがないことを示すため、DNA finger print として STR を行い、hESCs の MCB と同一であることを確認している (表 3)。また、染色体が 46, XX で正常型かつ取り違えがないことを確認している。

これまで、細胞の取り違えや細胞特性の変化がないことをいかに検証するか、という議論を行ってきた。ここからは、機能試験について議論したい。

MEF に関する機能試験は、MEF performance qualification として、hESCs、特に今回使用されている MA-09 株が成長するかを試験を行っている (表 1)。MA-09 細胞株の細胞増殖を期待通りに支持するかという検証である。これは、MEF だけでなく、培養液のロットチェックあるいは受け入れ試験にも用いる発想であるといえる。

hESCs の機能試験としては、MA-09 株として RPE への分化誘導に特化させた MCB の構築を行っているわけであるから、機能試験としては RPE としての機能を期待させるものでなければならない (表 2)。本論文では、

網膜変性疾患遺伝子変異のスクリーニングを行い、RPE へ分化しない細胞株でないこと、RPE に分化しても投与後に機能しない可能性を見越して検証を行っている。具体的には、ABCA4、ELOVL4、VMD2、RPE-65 および CTRP5 の遺伝子について異常がないことを確認している。これは、「機能しないということはない」という機能試験としては negative な側面だけでなく、GCP 上の問題と捉えるべきかもしれない。

RPE の出荷時の規格は、再生医療等製品での細胞特性解析、品質規格、出荷規格を議論するのに、有用なツールである (表 3)。hESCs 由来 RPE 細胞の規格、あるいは細胞特性を理解するには、「RPE であること」と「hESCs が残存していないこと」、加えて「RPE として機能すること」の議論に尽きる。本論文では、「RPE であること」を示すため、RPE に特異的な遺伝子と蛋白発現を確認している。生体内の native RPE と同一のものであるかという疑問は、生物科学的には興味深い、細胞製剤として有用であるかということと同じ土俵で議論すべきではない。なんとなれば、native RPE そのものが細胞製剤として最善であるとの証左がないからである。実際、RPE は成熟するとメラニンが蓄積して黒褐色となるが、その手前の褐色の細胞のほうが移植後機能することが本論文でも示されている。RPE に特異的に発現する遺伝子として、BEST-1、RPE-65、Pax6 および

MITF を選択し、由来する ESCs である MA-09 株との比較で、10 倍以上と定義している。実測値は、各々 Log10 で 3.81、1.32、2.80、2.89 である。ここで興味深いのは、hESCs 由来 RPE のこれら遺伝子マーカーの発現が絶対値として規格設定されているのではなく、MA-09 株との比較として規格設定されていることにある。従前の低分子医薬品では、原薬のみが評価されることとは異なっていることを示している。細胞製剤では、絶対値ではなく、比較値 (分化誘導前後の比較) で細胞特性に規格設定が可能であることを示している。

RPE に特異的に発現している蛋白の検定として、bestrophin 陽性細胞比率が 70%以上、PAX6 and/or MITF 陽性細胞が 95%以上、95% PAX6 and/or bestrophin 陽性細胞が 95%以上、Zo-1 陽性細胞が 95%以上となっている。定量的 PCR では細胞 1 つ 1 つの特性を見分けることができないため、免疫染色にて検証をしているが、免疫染色の感度の問題もあり、bestrophin 陽性細胞としては 70%以上などと、純度が高くないようにも見える規格設定となっている。

ついで議論されているのは、未分化細胞すなわち hESC が残存しているかである。ESC に高発現している oct-4、nanog、sox-2 の定量的 PCR にての比較低減を規格値として設定している。望ましくは、Lin28 のように ESCs では発現しているが分化細胞では消失することが知られているマー

カーを選択すべきであるが、科学的知見の水準がそこまで追いついていなかったであろう。

RPE 機能試験 (MOA) としては、RPE が変性した錐体細胞や棹体細胞に対する食作用を有することから、phagocytosis assay を行っている。RPE に期待している作用が食作用であり、PEGF 分泌のようなサイトカイン分泌効果を MOA としては想定していないことを示すものである。機能試験は、細胞が有する特性のなかから、申請者らが MOA のロジック構築の中で中核的と考える機能を抽出して議論するものである。

D. 考察

これまでの議論をまとめると、今後の再生医療等製品の品質管理の方向性を示すことができる。品質規格試験・細胞特性試験は、minimum consensus、生物学的同一性試験、ウイルス否定試験ならびに生物学的同等性試験の4本の柱から構成される。生物学的同等性は、細胞特性での同等性を議論すべきだが、サイエンス (科学) 観点から見た同等性と、再生医療等製品で求められる同等性とに差があることが理解できる。切り口が、安全性と有効性であるということである。極論すれば、安全性と有効性に影響を与えないのであれば、当該品質試験は行う必要はないということでもあり。安全性試験・安全性関連試験については、特に腫瘍形成に関する議論が重要で、未分化細胞混入を検証している。加え

て、目的外細胞の分化・生着が議論される。この点は、非臨床動物試験でのデータを用いる必要性がでてくるかもしれない。

有効性に関しては、目的細胞であるのか、あるいは目的細胞としての機能を有するのか、という論点となろう。

E. 結論

上記研究成果と考察に鑑み、細胞特性に配慮した細胞規格試験について取りまとめた (表4)。脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる心筋再生細胞製剤の開発に、次年度以降反映させることとしている。

品質規格試験の柱 lesson from case study

Minimum consensus	無菌性関連試験	無菌試験 マイコプラズマ否定試験 エンドキシン測定試験
	取り換え否定試験	DNA finger print (STR), 核型試験
生物学的同一性試験	不変性確認試験	CGH, 軟変天コロニー形成試験 皮下腫瘍試験 (WHO TRS-87B)
ウイルス否定試験 (感染性ウイルス否定試験)	<i>in vivo, in vitro / species</i>	
生物学的同等性試験 (biocompatibility, biocomparability) (注: この取扱に議論あり)		
安全性関連試験	未分化細胞混入否定試験	ES 関連遺伝子・蛋白 発現確認
有効性関連試験	分化誘導確認試験	目的細胞関連遺伝子・蛋白 発現確認

表4 細胞規格試験 package の提案

F. 研究発表

1. 論文発表

【松山晃文】

1. Matsuyama A. Translational research in regenerative medicine: A translational gap. *Pharmaceuticals Policy and Law*. 2013;15:163-172.
2. Shudo Y, Miyagawa S, Okura H, Fukushima S, Saito A, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. Addition of mesenchymal stem cells enhances the therapeutic effects of skeletal

- myoblast cell-sheet transplantation in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Tissue Eng, part A*. 2013 Oct 29.
3. Okura H, Soeda M, Miyagawa S, Sawa Y, Ichinose A, Matsuyama A. *in situ* reprogrammed spermine treated adipose –tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model. *Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 39-42.
 4. Okura H, Soeda M, Morita M, Ichinose A, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells but not adipose tissue-derived stromal/stem cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 51-54.
 5. Okura H, Soeda M, Morita M, Ichinose A, Matsuyama A. Transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 51-46.
 6. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. *PLoS One*. 2013 Jun 12;8(6):e66274.
 7. Kawase R, Ohama T, Matsuyama A, Matsuwaki T, Okada T, Yamashita T, Yuasa-Kawase M, Nakaoka H, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Masuda D, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ohmoto Y, Nishihara M, Komuro I, Yamashita S. Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2013 Oct 1;100(1):125-33.
 8. Yuasa-Kawase M, Masuda D, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Nishida M, Ishigami M, Kawamoto T, Komuro I, Yamashita S. Patients with CD36 Deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(5):514-5.
 9. 大倉華雪・松山晃文 細胞医療での申請にあたっての注意点—品質の観点から— 先進医療 NAVIGATOR II 再生医療・がん領域の実用化への TOPICS 2014. pp5-8
 10. 松山晃文 再生医療とレギュラトリーサイエンス -早期実現にむけて合理的な理解を-」 *ヒューマンサイエンス* 2013: (7).28-31
 11. 松山晃文 再生医療の規制と今後の動向 リーガルマインド 2013:337.36-102
 12. 松山晃文 再生医療の早期実現化と国際展開に向けた研究開発支援 再生医療 2013:12(2).133-134.
 13. 松山晃文:「再生医療とレギュラトリーサイエンス -早期実現にむけて合理的な理解を-」 *ヒューマンサイエンス* 2013: (7).28-31.
 14. 松山晃文:「再生医療の規制と今後の動向」 *リーガルマインド* 2013:337.36-102.
1. 【早川堯夫】

2. Moriyama M, Moriyama, Uda J, Matsuyama A, Osawa M and Hayakawa T.: BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2014 134(6): 1627-35.
3. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T.: Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. *PLoS One.* 2013 Jun 12;8(6):e66274.
4. Takayama K, Nagamoto Y, Mimura N, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T., Kawabata K, Mizuguchi H.: Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin 111-Coated Dishes. *Stem Cell Reports.* 2013 Oct 3;1(4):322-335. PMID: 24319667 [PubMed - as supplied by publisher]
5. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T., Okano T, Furue MK, Mizuguchi H.: CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. *Development.* 2013 Nov 27. [Epub ahead of print]
6. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, Hayakawa T., Furue MK, Mizuguchi H.: 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials.* 2013 Feb;34(7):1781-9.X
7. Kinoshita M, Nakatsuji Y, Suzuki S, Hayakawa T., Kakehi K.: Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method. *J Chromatogr A.* 2013 Sep 27;1309:76-83.
8. Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, Kamisue K, Yamada K, Hayakawa T., Suzuki T, Kakehi K.: Free glycans derived from glycoproteins present in human sera. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013 Jun 1;928:16-21.
9. Yodoshi M, Iikeda N, Yamaguchi N, Nagata M, Nishida N, Kakehi K, Hayakawa T., Suzuki S.: A novel condition for capillary electrophoretic analysis of reductively aminated saccharides without removal of excess reagents, *Electrophoresis,* 2013, 34, 3198–3205 566)
10. Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, Hayakawa T., Kakehi K.: Common Glycoproteins Expressing Polylactosamine-Type Glycans on Matched Patient Primary and Metastatic Melanoma Cells Show Different Glycan Profiles. *J Proteome*

- Res. 2013 Dec 26. [Epub ahead of print] PMID: 24354860 [PubMed - as supplied by publisher].
11. Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Ozawa T, Matsuyama A and Hayakawa T.: Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *STEM CELLS & DEV* (2014) in press.
 12. 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫. 『ヒト脂肪由来間葉系幹細胞における効率的かつ厳密に発現制御可能なレンチウイルス発現システムの構築』 Sept, 18, 2013. *BioMed circus*).
2. 学会発表
【松山晃文】
1. 再生医療が拓く明日へー研究者の想いと産業界への願いー・松山晃文・東西合同薬事法規（研究）委員会・6月21日
 2. 高度医療とトランスレーショナルリサーチの実際・松山晃文・東大CRC講習会・6月27日
 3. 再生医療についての行政の取り組み・松山晃文・最高裁 再生医療研究会・7月3日
 4. iPS 細胞を用いた再生医療の現状と展望・松山晃文・DDS 学会・7月4日
 5. 再生医療研究と試薬・松山晃文・日本試薬協会講演会・7月9日
 6. 再生医療の動向・松山晃文・再生医療と法研究会・8月1日
 7. iPS 細胞で日本は21世紀の世界を切り拓く・松山晃文・経営道場・8月31日
 8. 再生医療の動向・松山晃文・厚労省全国薬務主管課長会議・9月20日
 9. 再生細胞治療と培地・松山晃文・FIRM 講演会・9月26日
 10. 非臨床試験 package の提案・松山晃文・MCP 策定会議・10月4日
 11. "Development of Regenerative Medicinal Products—From Bench—"・松山晃文・DIA 日本年会・11月7日
 12. 臨床薬理に期待すること—再生医療一介の研究者として—・松山晃文・第34回臨床薬理学会学術総会・12月6日
 13. 再生医療の倫理と規制（2）・松山晃文・東京大学生命倫理講習会・12月12日
 14. 臨床研究編臨床応用のためのiPS/ES/体性幹細胞の培養について・松山晃文・第10回医薬品RSフォーラム・12月14日
 15. 再生医療の動向・松山晃文・東京都薬事監視員協議会・1月29日
 16. アカデミアによる開発戦略「再生医療法制定下の医療技術開発」・松山晃文・国立大学附属病院臨床研究推進会議 第2回総会シンポジウム・2月7日
 17. 幹・前駆細胞の品質管理・松山晃文・3月4日
 18. 再生医療とレギュラトリーサイエ

ンスー品質管理の観点からー・松山晃文・第13回日本再生医療学会総会 ランチョンセミナー・3月4日

19. “Proposal of the preclinical safety study-pack age for the cell therapy products”・松山晃文・IABS-JST Joint symposium・3月7日
20. ヒト ES/iPS 細胞由来細胞製剤の品質管理・松山晃文・慶応義塾大学生命倫理講習会・3月26日

【早川堯夫】

1. 早川堯夫：再生医療製品・遺伝子治療薬等の品質評価の上での科学的妥当性とは. 第10回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム（基調講演）,東京（2013.12.12）
2. 木下充弘、三ツ井洋介、原沙也香、山田佳太、早川堯夫、掛樋一晃：ヒトメラノーマ細胞のグライコフォームフォーカストプロテオミクス, 2013年8月 第32回日本糖質学会年会（2013.8.）
3. 神末和哉、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃：シーズレスインターフェースを備えた CE-ESI-MS による糖タンパク質分析とその応用. 2013年11月 第33回キャピラリー電気泳動シンポジウム（2013.11.）
4. 木下充弘、鈴木茂生、早川堯夫、掛樋一晃：レーザー回折法を用いる Sub-visible 領域タンパク質凝集体の解析. 第134年回日本薬学会年会（2014.3.）
5. 岩本裕貴、安井裕太郎、岩塚欣也、鈴木茂生、早川堯夫、掛樋一晃：ウサギ角膜上皮細胞の糖鎖生合成に対する外的物理的ストレスの影響（2014.3.）
6. 桑原侑己、東江直樹、瀧川義浩、早川堯夫、角谷晃司：カンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* L.) のフラボノイド系ポリフェノール配糖化酵素遺伝子の単離と解析日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台 口頭), 2013.3.
7. 森川敏生, 二宮清文, 李 雪征, 西田枝里子, 山下千裕, 山田友視, 松田久司, 中村誠宏, 吉川雅之, 早川堯夫, 村岡 修：デイジーフラワー (*Bellis perennis*, 花部) 成分の脂質代謝改善作用. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台), 2013.3.
8. 高森康暢, 森川敏生, 二宮清文, 李 雪征, 西田枝里子, 松田久司, 中村誠宏, 吉川雅之, 早川堯夫, 村岡 修：デイジーフラワー (*Bellis perennis*, 花部) 成分のコラーゲン産生促進作用. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台), 2013.3.
9. 中西勇介, 森川敏生, 二宮清文, 松田久司, 中嶋聡一, 三木尚子, 宮下 優, 吉川雅之, 早川堯夫, 村岡 修：漢薬 蟬梅花 (*Chimonanthus praecox*, 花部) のメラニン産生抑制活性成分. 日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台), 2013.3.
10. 二宮清文, 高森康暢, 沖野健二, 王 立波, 中村誠宏, 松田久司, 呉 立軍, 早川堯夫, 吉川雅之, 村岡 修, 森川敏生：エバーラスティングフラワー (*Helichrysum arenarium*, 花部) の機能性成分 (5)-含有フラボノイドのコラーゲン産生促進活性-. 日本薬学会第133年会(横浜) 2013.3.
11. 二宮清文, 松本友里恵, 柿原なみ子, 赤木淳二, 王 立波, 中村誠

- 宏, 松田久司, 呉立軍, 早川堯夫, 吉川雅之, 村岡修, 森川敏生: エバーラスティングフラワー (*Helichrysum arenarium*, 花部) の機能性成分 (6) -含有フラボノイドの DPP-4 阻害活性-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
12. 森川敏生, 中西勇介, 二宮清文, 沖野健二, 高森康暢, 松浦豪之, 早川堯夫, 吉川雅之, 村岡修: 漢薬 胡黄連 (*Picrorrhiza kurrooa*, 根茎) の機能性成分 (4) -含有フェニルエタノイドおよびイリドイドのカラーゲン産生促進活性-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
13. 森川敏生, 金敷辰之介, 二宮清文, 早川堯夫, 吉川雅之, 村岡修: タイ天然薬物 *Mimusops elengi* L. 花部の機能性成分 (1) -新規フェニルプロパノイド配糖体の化学構造-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
14. 八幡郁子, 西田枝里子, 松田久司, 畑裕基, 菅原かおる, 吉川雅之, 二宮清文, 村岡修, 早川堯夫, 森川敏生: メース (*Myristica fragrans*, 仮種皮) の脱顆粒抑制作用成分. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 (名古屋), 2013.5
15. 森川敏生, 西田枝里子, 李雪征, 二宮清文, 松田久司, 山下千裕, 伊藤友紀, 中村誠宏, 村岡修, 早川堯夫, 吉川雅之: デイジーフラワー (*Bellis perennis*, 花部) の中性脂質上昇抑制作用成分. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 (名古屋), 2013.5.
16. Toshio Morikawa, Mayumi Sueyoshi, Saowanee Chaipech, Hisashi Matsuda, Yukiko Nomura, Mikuko Yabe, Tomoko Matsumoto, Kiyofumi Ninomiya, Masayuki Yoshikawa, Yutana Pongpiriyadacha, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka: Suppressive effects of prenylcoumarins from *Mammea siamensis* on iNOS synthase expression in RAW264.7 cells. 14th Tetrahedron Symposium, (Vienna, Austria), 2013.6.
17. 萬瀬貴昭, 二宮清文, 酒井千恵, 西亮介, 村岡修, 早川堯夫, Chaipech Saowanee, 森川敏生: 紅豆蔻 (*Alpinia galanga*, 果実) 由来フェニルプロパノイド成分の中性脂肪代謝促進活性. 第 30 回和漢医薬学会大会 (金沢), 2013.08.
18. 酒井千恵, 二宮清文, 中西勇介, 宮本陸平, 早川堯夫, 木下充弘, 掛樋一晃, 宮田信吾, 遠山正彌, 森川敏生: 川芎 (*Cnidium officinale*, 根茎) の脂肪代謝促進活性成分. 第 30 回和漢医薬学会大会 (金沢), 2013.08.
19. 二宮清文, 萬瀬貴昭, 西亮介, 酒井千恵, Chaipech Saowanee, 早川堯夫, 村岡修, 森川敏生: 紅豆蔻 (*Alpinia galanga*, 果実) の機能性成分 (2) -新規フェニルプロパノイドおよびジテルペン成分の構造と中性脂肪代謝促進活性-. 日本生薬学会第 60 回年会 (北海道), 2013.9.
20. 二宮清文, 八幡郁子, 西田枝里子, 尾関快天, 早川堯夫, 村岡修, 森川敏生: メース (*Myristica fragrans*, 仮種皮) の機能性成分 (3) -含有ネオリグナン成分の一酸化窒素産生抑制活性-. 日本生薬学会第 60 回年会 (北海道), 2013.9.
21. 森川敏生, 金敷辰之介, 牛尾名恵花, 二宮清文, 松田久司, 松本朋子, 一川怜史, 袴田祐里, 三宅史

- 織，吉川雅之，早川堯夫，Chaipech Saowanee，村岡 修：タイ天然薬物 *Melodrum fruticosum* 花部の機能性成分（2）－含有ブテノリド成分の一酸化窒素産生抑制活性－．日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
22. 二宮清文，中西勇介，木内恵理，赤木淳二，早川堯夫，村岡 修，森川敏生：漢薬 胡黄連 (*Picrorhiza kurroa*，根茎) の機能性成分（5）－含有フェニルエタノイド配当体のアルドース還元酵素新規阻害活性－．日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
23. 二宮清文，酒井千恵，中西勇介，宮本陸平，早川堯夫，木下充弘，掛樋一晃，宮田信吾，遠山正彌，森川敏生：川芎 (*Cnidium officinale*，根茎) の機能性成分（2）－含有フタリド成分の脂肪代謝促進活性－．日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
24. 二宮清文，居村克弥，坂本幸栄，十川慶太，早川堯夫，村岡 修，森川敏生：漢薬 女貞子 (*Ligustrum lucidum*，果実) の機能性成分（3）－含有トリテルペン成分のアロマターゼ阻害活性－．日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
25. 二宮清文，尾関快天，南野 享，早川堯夫，木下充弘，掛樋一晃，宮田信吾，遠山正彌，森川敏生：釣藤鈎の機能性成分（1）－含有アルカロイドおよびトリテルペンの抗 TNF- α 活性成分－．日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
26. 森川敏生，末吉真弓，松本 拓，Saowanee Chaipech，二宮清文，松田久司，野村友起子，梅山美樹子，吉川雅之，向井秀仁，木曾良明，早川堯夫，村岡 修：タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 由来プレニルクマリン *mammeasin* 類の iNOS 合成酵素発現抑制作用および好中球様細胞活性化抑制作用．第 55 回天然有機化合物討論会（京都），2013.9.
27. 森川敏生，萬瀬貴昭，二宮清文，西 亮介，酒井千恵，Chaipech Saowanee，早川堯夫，村岡 修：紅豆蔻 (*Alpinia galanga*，果実) の中性脂肪代謝促進活性成分－．第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会（埼玉），2013.10.
28. 森川敏生，金敷辰之介，二宮清文，牛尾名恵花，松田久司，松本朋子，一川怜史，袴田祐里，三宅史織，吉川雅之，早川堯夫，Chaipech Saowanee，村岡 修：タイ天然薬物 *Melodrum fruticosum* 花部の一酸化窒素産生抑制活性成分．第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会（埼玉），2013.10.
29. 二宮清文，南野 享，尾関快天，早川堯夫，木下充弘，掛樋一晃，宮田信吾，遠山正彌，森川敏生：釣藤鈎の機能性成分（2）－含有アルカロイドおよびトリテルペンの抗炎症作用－．第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会（京都），2013.10.
30. 森川敏生，二宮清文，Chaipech Saowanee，三宅荘八郎，坪山晃大，早川堯夫，村岡修：タイ天然薬物 *Kaempferia parviflora* 由来メトキシフラボノイド成分のメラニン産生抑制作用．第 5 回食品薬学シンポジウム（京都），2013.11.

31. 森川敏生, 二宮清文, Chaipech Saowanee, 三宅荘八郎, 坪山晃大, 早川堯夫, 村岡修: タイ天然薬物 *Kaempferia parviflora* 由来メトキシフラボノイド成分のメラニン産生抑制作用. 第5回食品薬学シンポジウム(京都), 2013.11.
32. 二宮清文, 奥村尚道, 村岡修, 許鳳鳴, 松田久司, 吉川雅之, 早川堯夫, 森川敏生: エジプト天然薬物 *Nigella sativa* の肝脂肪低減作用物質. 第31回メディシナルケミストリーシンポジウム(広島), 2013.11.
33. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. The 7th Notch meeting. Feb. 14-15, 2013. National Institute of Genetics, Mishima.
34. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 「脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法」関西8私大新技術開発説明会, Mar, 1, 2013. JST本部本館ホール, 東京.
35. 森山麻里子, 宇田純輝, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. Notch シグナルが皮膚を正しく構築する仕組み. 皮膚の会(総会), Mar, 16-17, 下呂, 岐阜.
36. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞のNotch シグナル亢進と解糖系調節機構の解明. Mar, 21-23, 2013. 第12回日本再生医療学会総会.
37. Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. May 8-11, 2013, 2013 International Investigative Dermatology Meeting, Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, Scotland
38. Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 12-15, 2013, 11th ISSCR at BOSTON, U.S.A.
39. Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. June 12-15, 2013, 11th ISSCR at BOSTON, U.S.A.
40. Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 13, 2013, CBRC, Harvard Medical School, Boston, U.S.A.
41. 野村昇吾, 森山麻里子, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「表皮分化過程における Forkhead box タンパク質の関与」 June 12-15, 2013, 第4回生命機能研究会, 滋賀.
42. 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由.

- 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いたインスリン産生細胞の作製」 June 12-15, 2013, 第4回生命機能研究会, 滋賀.
43. 大森重成, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いた効率的なドパミン産生細胞作製」 June 12-15, 2013, 第4回生命機能研究会, 滋賀.
44. 石原 慎, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「低酸素培養における Notch シグナルを介した解糖系調節機能の解明」 June 12-15, 2013, 第4回生命機能研究会, 滋賀.
45. 森山麻里子, ○宇田純輝, 北川綾弓, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
46. 古谷圭史, 村上健太, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床段階における指針について. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
47. 村上健太, 古谷圭史, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. ヒト幹細胞加工医薬品開発をめざしたヒト体性幹細胞樹立のための基準. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
48. 北川綾弓, 森山麻里子, 宇田純輝, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
49. Junki Uda, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. The 35th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Dec 3-6, Kobe, Japan.
50. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露を介する脂肪由来間葉系幹細胞のドパミン産生細胞分化. Mar, 4-6, 2013. 第13回日本再生医療学会総会. 京都.
51. Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch 進と解糖系調節機構の解明. Mar, 4-6, 2013. 第13回日本再生医療学会総会. 京都.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

「心筋指向細胞」

PCT 出願 (平成 25 年 4 月 24 日)

出願人: 大阪大学・理化学研究所・

(公財) 先端医療振興財団

発明者: 松山晃文・大倉華雪

2. 実用新案取得

該当なし

3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業(臨床研究・治験推進研究事業))
分担研究報告書

再生医療等製品にかかる知財戦略について
—特許出願公開情報を用いた **case study**—

研究分担者

松山晃文 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授

研究要旨

再生医療等製品の迅速かつ適正な社会還元をむけ、とくに特許申請の初期からの知財戦略の策定とその実践は、欠くべからざる要素である。本分担研究では、知財に関して議論しやすい肝細胞の再生技術に領域をしぼり、日本の特許出願公開情報のなかから、1つの出願を選び、その知財を **brush up** するにはどのようにしたらよいかを議論し、もって今後の脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる細胞製剤の開発に寄与したい。

A. 研究目的

脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる細胞製剤の開発において、その知財戦略(知財化)の議論は肝要である。本分担研究では、公表資料を用い、今後の脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる細胞製剤の開発に寄与するため、あえて心臓ではなく、肝細胞再生に着目し、特許申請時の請求項目の記載に関して **brain storming** することとした。

B. 研究方法

特許出願公開情報のなかから、水準が高くまとめられている「人工多

能性幹細胞の肝細胞へ分化誘導する方法」PCT/JP2013/065298(平成24年11月9日出願)を選択、議論に供することとした。

(倫理面への配慮)

該当せず

C. 研究成果

再生医療への知財の展開の観点から、そのものの細胞製剤としての展開に加え、創薬スクリーニング特許としての展開可能性を鑑み、あえて **iPS** 細胞由来肝細胞の再生にかかる

公開出願を涉猟、下記 PCT 出願を case study に用いることとした。

名称：人工多能性幹細胞の肝細胞へ分化誘導する方法

出願日：平成 24 年 11 月 9 日

出願番号：PCT/JP2013/065298

発明者：近藤祐樹・岩尾岳洋・松永民秀

出願人：公立大学法人名古屋市立大学

発明の名称：人工多能性幹細胞の肝細胞へ分化誘導する方法

発明の概要：ヒト人工多能幹細胞（iPS 細胞）を肝細胞に分化する際に低分子化合物を添加することで効率よく、安価に機能を有した肝細胞を得ることが可能となる

要約書

【課題】人工多能性幹細胞を肝細胞へ効率的に分化誘導するための新規な方法及びその用途を提供することを目的とする。【解決手段】人工多能性幹細胞を内胚葉様細胞へと分化させる工程と、該工程で得られた内胚葉様細胞を肝細胞様細胞へと分化させる工程であって、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下及び／又は酸化ストレス負荷条件下で少なくとも一部の培養を実施する工程によって、人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する。

【請求項】

- 以下の工程（1）及び（2）を含む、人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法：
 - 人工多能性幹細胞を内胚葉様細胞へと分化させる工程；
 - 工程（1）で得られた内胚葉様細胞を肝細胞様細胞へと分化させる工程であって、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下及び／又は酸化ストレス負荷条件下で少なくとも一部の培養を実施する工程
- ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がヒストン脱アセチル化酵素 1 阻害剤である、請求項 1 に記載の方法。
- ヒストン脱アセチル化酵素 1 阻害剤がバルプロ酸である、請求項 2 に記載の方法。
- 酸化ストレス負荷条件が、培地に過酸化水素、カタラーゼ阻害剤又はフリーラジカル生成剤が添加された条件である、請求項 1 に記載の方法。
- ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下及び／又は酸化ストレス負荷条件下での培養の期間は 1 日間～13 日間である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。
- 工程（2）が、以下の工程（2-1）及び（2-2）からなる、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法：
 - 工程（1）で得られた内胚葉様細胞を肝芽細胞様細胞

へと分化させる工程；

- (2-2) 工程(2-1)で得られた肝芽細胞様細胞を肝細胞様細胞へと分化させる工程であって、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下及び／又は酸化ストレス負荷条件下で少なくとも一部の培養を実施する工程。
7. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下及び／又は酸化ストレス負荷条件下での培養を、工程(2-2)の開始後168時間までに開始し、24時間～312時間、継続する、請求項6に記載の方法。
 8. 工程(1)における分化誘導因子としてアクチビンAを用い、工程(2-1)における分化誘導因子としてDMSOを用い、工程(2-2)における分化誘導因子として肝細胞増殖因子、オンコスタチンM及びデキサメタゾンを用いる、請求項6又は7に記載の方法。
 9. 工程(2)の初期と末期を除く培養期間を、糖源としてガラクトースを含有し、チロシン源としてフェニルアラニンを含有する選択培地を用いて培養する、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
 10. 選択培地による培養期間の開始が、工程(1)の開始時から数えて8日目～10日目の間であり、
選択培地による培養期間の終了が、工程(1)の開始時から数えて15日目～20日目の間である、請求項9に記載の方法。
 11. 選択培地による培養期間が、工程(1)の開始時から数えて9日目～16日目である、請求項10に記載の方法。
 12. 工程(1)の開始時から数えて10日目以降は、糖源としてガラクトースを含有し、チロシン源としてフェニルアラニンを含有し、アルギニン源としてオルニチンを含有する選択培地を用いる、請求項9～11のいずれか一項に記載の方法。
 13. 選択培地による培養期間は、FBSが添加された条件で培養する、請求項9～12のいずれか一項に記載の方法。
 14. FBSの添加濃度が1% (v/v)～10% (v/v)である、請求項13に記載の方法。
 15. 選択培地中のガラクトース濃度が450mg/L～900mg/Lである、請求項9～14のいずれか一項に記載の方法。
 16. 人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。
 17. 請求項1～16のいずれか一項に記載の方法で得られた肝細胞様細胞。
 18. 請求項17に記載の肝細胞様細胞を含む、細胞製剤。
 19. 以下の工程(i)及び(ii)を含む、被検物質の代謝を評価する方法：

(i) 請求項17に記載の肝細胞様細胞に被検物質を接触させる工程；

(ii) 被検物質の代謝を測定する工程。

20. 以下の工程(i)及び(ii)を含む、被検物質の毒性を評価する方法：

(i) 請求項17に記載の肝細胞様細胞に被検物質を接触させる工程；

(ii) 工程(i)後の肝細胞様細胞の状態を調べる工程。

これら請求項のなかでも、再生医療細胞製剤への展開および創薬スクリーニングに関して議論されている中核的請求項目を書き上げ、以後当該請求項に関して議論を進める。

1. 以下の工程(1)及び(2)を含む、人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法：

(1) 人工多能性幹細胞を内胚葉様細胞へと分化させる工程；

(2) 工程(1)で得られた内胚葉様細胞を肝細胞様細胞へと分化させる工程であって、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下及び／又は酸化ストレス負荷条件下で少なくとも一部の培養を実施する工程

17. 請求項1～16のいずれか一項に記載の方法で得られた肝細胞様細胞。

18. 請求項17に記載の肝細胞様細胞を含む、細胞製剤。

19. 以下の工程(i)及び(ii)を含む、被検物質の代謝を評価する方法：

(i) 請求項17に記載の肝細胞様細胞に被検物質を接触させる工程；

(ii) 被検物質の代謝を測定する工程。

20. 以下の工程(i)及び(ii)を含む、被検物質の毒性を評価する方法：

(i) 請求項17に記載の肝細胞様細胞に被検物質を接触させる工程；

(ii) 工程(i)後の肝細胞様細胞の状態を調べる工程。

これら請求項は比較的よく練られている。請求項1は、「分化誘導する方法」としてbiology特許としてオーソドックスに方法特許をおさえている。この上位概念の限定が請求項2以下請求項16まで続いている。上位概念で新規性・進歩性が否定されて縮減されても、実施例が確実に特許範囲を明示できる請求項16から上位請求項にむけてより広範囲の知財化が目指される。

ついで、低分子化合物であれば物質特許として強い知財となる「肝細胞」としての特許である。バイオ知