

201324054A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血

由来細胞の系統的資源化と

その応用に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長村（井上）登紀子

平成26（2014）年 3月

# 厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血  
由来細胞の系統的資源化と  
その応用に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長村（井上）登紀子

平成26（2014）年 3月

平成 25 年度

希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化とその応用に関する研究

研究班名簿

区分	氏名	所属等
研究代表者	長村(井上)登紀子	東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部
研究分担者	角田 肇	N T T 東日本関東病院 分娩部
研究分担者	東條 有伸	東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野
研究分担者	幸道 秀樹	献血供給事業団 東京臍帯血バンク部
研究分担者	松本 太郎	日本大学医学部機能形態学系細胞再生 移植医学分野
研究分担者	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 発生発達病態分野
研究分担者	森田 育男	東京医科歯科大学 大学院 分子細胞機能学分野
研究分担者	海老原 康博	東京大学医科学研究所 幹細胞治療センター 幹細胞プロセッシング分野
研究分担者	縣 秀樹	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医療科学講座 顎口腔再生外科学分野
研究分担者	竹谷 健	島根大学 医学部 附属病院 輸血部
研究分担者	長村 文孝	東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 先端医療開発推進分野

## 目 次

<b>I. 総括研究報告</b>	
希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化とその応用に関する研究	1
長村（井上）登紀子（東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部）	
資料 1. 臍帯血・臍帯採取・細胞処理保存・検査・出庫までのフローチャート	
<b>II. 分担研究報告</b>	
1. 臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞の効率的分離とバンキング	17
長村登紀子（東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部）	
2. 臍帯血と臍帯の効率的採取方法の研究	26
角田 肇（NTT東日本関東病院 分娩部）	
3. 臨床試験のためのバンクシステム構築と海外の実態調査・規制対応	28
長村 文孝（東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 先端医療開発推進分野）	
4. 難治性疾患患者の臍帯血と臍帯採取システムの開発	31
森尾友宏（東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 発生発達病態分野）	
5. 臍帯由来間葉系幹細胞の免疫制御作用の研究	34
東條 有伸（東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法部）	
6. 臍帯由来間葉系幹細胞による臍帯血移植における生着促進効果の研究	40
松本 太郎（日本大学医学部機能形態学系細胞再生 移植医学分野）	
7. 先天性骨形成不全症、軟骨無形成症に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた治療法の開発	43
海老原康博（東京大学医科学研究所 幹細胞治療センター 幹細胞プロセッシング分野）	
8. 骨疾患モデルの評価系の検討	46
縣 秀樹（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医療科学講座 顎口腔再生外科学分野）	
9. 低フォスファターゼ症に対する臍帯由来間葉系幹細胞の臨床応用に向けた研究	49
竹谷 健（島根大学 医学部 附属病院 輸血部）	
10. 臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脳室周囲白質軟化症・気管支肺異形成症の治療法の開発	
森田育男（東京医科歯科大学医歯学総合研究科分子細胞機能学分野）	56
11. 臍帯血・臍帯の品質管理と搬送システムの確立(臍帯血移植における HLA 問題)	58
幸道 秀樹（献血供給事業団 東京臍帯血バンク部）	
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	63
<b>IV. 資料</b>	
1. 平成 25 年度第 1 回研究報告会	71
2. 平成 25 年度第 2 回研究報告会	83
3. AsiaCORD 2013 資料	94
4. 別冊	95

# 厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)

## I. 総括研究報告書

総括研究報告書

研究課題：希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化とその応用に関する研究

課題番号：H24 - 難治等(難) - 一般 - 016

研究代表者：長村登紀子 東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部

研究分担者：角田 肇 NTT東日本関東病院・産婦人科

研究分担者：東條 有伸 東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・分子療法分野

研究分担者：幸道 秀樹 献血供給事業団・臍帯血バンク部/昭和大学 医学部

研究分担者：松本 太郎 日本大学医学部・機能形態学系細胞再生・移植医学分野

研究分担者：森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・発生発達病態分野

研究分担者：森田 育男 東京医科歯科大学大学院・分子細胞機能学分野

研究分担者：海老原康博 東京大学医科学研究所・幹細胞治療センター  
・幹細胞プロセッシング分野

研究分担者：縣 秀樹 東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・分子療法分野  
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・顎口腔再生外科学分野(現)

研究分担者：長村 文孝 東京大学医科学研究所・先端医療研究センター  
・先端医療開発推進分野

研究要旨：間葉系幹細胞(MSC)は、分化再生能に加え炎症・組織障害部位へ集積して抗炎症・免疫抑制能、組織修復能を呈し、国内外で骨髄由来MSCを主とした臨床試験が行われている。しかし、ドナーへの肉体的負担と一部海外輸入製品であることから、安定供給と安全性の面で懸念がある。本研究では国内でドナーに負担のない方法で採取できる臍帯由来MSCを、骨髄に替わる国内初の新規細胞製品化に向けて必要な技術基盤を確立するとともに、それを用いた希少・難治性疾患への臨床応用を目的とし、基礎的検討を行った。

(1) 系統的資源化；臍帯由来MSCの製品化においては、従来の explant 法を改良し、細胞回収率の効率化とプロセス時間と培養期間の短縮を可能とした(特許出願)。また、臍帯組織ごと凍結・保存後に細胞を回収する技術を開発し(特許出願)、追跡調査と初期コスト削減が可能となり、よりバンキング化しやすい体制が整った。また、臍帯由来MSCs製剤化に向けて、PMDAの薬事戦略相談(事前面談)や厚労省関連部署との相談を行った。

(2) 基礎的研究；骨への分化能について、*in vitro*の系では種々の試薬により、アルカリフォスファターゼ活性の上昇を認めたが、骨髄由来MSCsに比べると骨化能自体は低かった。しかし、マウス頭蓋骨上への移植実験においては結合組織、血管組織、類骨、皮質骨への分化が観察され、*in vivo*では機能的に働く可能性が示唆された。また、*in vitro*での脂肪・軟骨細胞への分化能を認めた。難治性疾患への造血幹細胞移植後の重症移植片対宿主病(GVHD)への臍帯由来MSCs投与に関して、*in vitro*および*in vivo*での検討を行った。リンパ球混合反応(MLR)および活性化リンパ球を投与して誘導した異種GVHDマウスモデルにおいてドナー、レシピエントと異なる3rd partyドナーの臍帯由来MSCsでもリンパ球の増殖を抑制することがわかった。しかし、MSCsの前投与によるGVHD予防効果は認められなかった。神経再生に関しては、脳室周囲白質軟化症のラットモデルに対し臍帯由来MSCおよび上清を投与したが、有意差としては認められる、投与方法での課題が残った。

## A. 研究目的：

間葉系幹細胞(MSCs)は、分化再生能に加え炎症・組織障害部位へ集積して抗炎症・免疫抑制能、組織修復能を示すことが注目されている。また、骨形成不全症等の難病疾患への移植や造血幹細胞移植後の移植片宿主病(GVHD)に対して 3rd party の骨髄由来 MSCs の臨床試験が行われ効果を挙げているが、本邦では海外の骨髄由来 MSCs 製剤が主に用いられている。本研究は、骨髄に替わる新規細胞ソースとして臍帯血・臍帯由来 MSCs の国内初の製剤化と系統的資源化(バンキング)に必要な技術基盤を確立し、基礎的研究により早期に希少・難治性疾患への臨床応用を可能とする体制を整えることを目的とする。

(1)系統的資源化；自家及び同種臍帯血・臍帯由来 MSCs のバンキングを行う。前者は希少・難病疾患患児由来細胞として病態解析用に用い、後者は同種移植用細胞として製剤化を目指す。これまで臍帯血と臍帯の同時採取に関して、ゲノム解析にも対応した同意書の作成し、臍帯由来 MSCs の分離・初期培養・凍結手順について検討した。今年度は、製剤化に向けた大量培養系の検討や品質試験項目、児の健康調査等の実施に向けて、規制当局とも連携しながら、*Off-the-shelf* の供給体制を構築することを目的とした。

(2)基礎的研究：これまで臍帯由来 MSCs の幹細胞性、骨、神経系への再生能または修復能、免疫抑制能および細胞支持能について研究を進めてきた。平成 25 年度は、さらに疾患への臨床応用のための前臨床試験として骨再生、神経再生、GVHD における免疫抑制効果、造血幹細胞移植における生着

促進に関して、臍帯・臍帯血由来細胞を用いて動物実験を実施し、有用性を検証することである。

## B. 研究方法：

本研究では、臍帯血・臍帯由来 MSCs の系統的資源化(バンキング)と臨床応用に向けた前臨床試験までを含む基礎的研究を以下のように実施した。

### (1)系統的資源化

#### ①臍帯血と臍帯のバンキングと製剤化

品質を損なわずに清潔に臍帯血と臍帯を採取し、取り違いを防止することは、GMP の基本でもある。今年度は、バンキングに向けて採取施設から 2 次元コードラベルを用いた検体管理システムを導入し、試験運用を開始した。

臍帯からの MSCs 分離には、大きく explant 法とコラゲナーゼ法がある。H24 年度の検討にて、コラゲナーゼでの組織分解には異種生物由来の使用を余儀なくされること、コラゲナーゼと explant 法では細胞回収に有意差がなかったことから explant 法を採用した。すなわち、臍帯を 2-3mm に細切り、組織培養ディッシュに並べた後に、ゆっくり培養液を注ぎ、培養を開始する。しかし、Explant 法において、培養液組織片が浮遊し、細胞の回収に支障をきたすことがあった。この組織浮遊を防ぐためにステンレス製のメッシュ(cellamigo®)を組織片の上からかぶせて、培養を開始した。

さらに、臍帯組織には、現在分離できない幹細胞が含まれている可能性や目的とする細胞も将来的に変わる可能性、培養液等の費用が高いことを考慮し、臍帯の一部を臍帯組織ごと凍結が可能かについても種々

の凍害保護液を用いて検討した。

また、臍帯血・臍帯由来 MSCs の製剤化について医薬品医療機器総合機構（PMDA）にて薬事戦略相談（事前面談）を受け、特に臍帯由来 MSCs の製剤化の

（倫理面への配慮）

本研究は、東京大学医科学研究所（以下、「医科研」）および NTT 東日本関東病院の倫理審査委員会にて承認されたヒトゲノム倫理審査委員会承認の「臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化（バンキング）とその応用に関する研究」ヒトゲノム倫理委員会承認 No. 24-53）にもとづいて実施した。医科研内分担者および竹谷・縣研究分担者には「臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化（バンキング）とその応用に関する研究」において、医科研内外への試料提供の手続きに準じて、臍帯血・臍帯由来 MSCs の提供を行った。試料の提供を受けるにあたり、研究者の所属機関の倫理審査委員会の承認も得て実施している。それ以外の試料の採取の場合には、当該分担研究者が所属機関の倫理審査承認のもとに実施された。

なお、本研究においては必要に応じて遺伝カウンセリングができる体制も整えている。

### ③臨床試験のためのバンクシステム構築と海外の実態調査・規制対応（長村<sup>㊦</sup>）

医薬品医療機器総合機構（PMDA）、米国 FDA 及び EMA 等の規制当局の発出している法規・ガイドライン、審査報告書等の資料あるいは学会等での資料の収集と解析を行った。また PMDA との薬事戦略相談を通して、臍帯・臍帯血バンクの構築に向けた規制対応を進めた。

### ④難治性疾患患児からの臍帯血および臍帯

### の採取（森尾）

臍帯血・臍帯由来 MSCs は難治性疾患の病態解析や遺伝子治療のソースとして、また弟妹からの血縁者移植のソースとして非常に重要である。平成 25 年度は、原発性免疫不全症の診断と検体の資源化の体制を整備し、確立することを目的として、PIDJ ネットワークを通じて相談及び依頼を受けた患者について、PIDJ database への登録を行い、また免疫細胞亜群解析、B/T 新生能測定、候補遺伝子解析を実施した。これらのうち、今後新規患者の発生の可能性があるものについて検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では、遺伝子解析や免疫担当細胞の機能解析を実施するため、東京医科歯科大学医学部遺伝子解析に関する倫理審査委員会の承認を得て、十分な説明の元、同意を得て研究を実施した。

### (2)基礎的研究：

#### ①骨・軟骨再生能の検討（縣・竹谷・海老原）

低フォスファターゼ症を含む骨・軟骨形成不全症に対する臍帯由来 MSCs を用いた再生医療を目指し骨・軟骨再生能の検討を行った。従来より、臍帯由来 MSCs は *in vitro* における骨形成能は、骨髄由来 MSCs に比較して低いことが報告されている。前年度の当研究班の報告においても、ロット格差があること、石灰化に時間を要することを報告し、臍帯由来 MSCs に適した分化誘導剤の検討が課題であった。今年度は基礎培地 ( $\alpha$ -MEM に FBS, penicillin/streptomycin,  $\beta$ -glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethazone) に種々の分化誘導剤を添加し、その骨誘導効果を確認した。検討した

誘導剤は、recombinant human bone morphogenetic protein (BMP), 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (VitD), Parathyroid hormone (PTH), Platelet derived growth factor (PDGF)、retinoic acid (RA), cyclosporin A (CyA), tacrolimus (FK506)、sodium butyrate (SB)、LiCl 等である。評価系として、ALP 活性や発現を各々吸光度や組織染色、フロサイトメトリーで測定した。また石灰化能は、骨基質をカルセインの蛍光強度測定や Alizarin Red 染色で評価した。

縣らはさらに骨誘導に関して *in vivo* での検討を行った。すなわち、臍帯由来 MSCs をハイドロキシアパタイト顆粒 (APACERAM-AX, PENTAX) に播種し、ポリプロピレンチューブ内で DAG+BMP2 存在下で 1 週間培養し、上清を捨て、フィブリノゲン溶液とトロンビン溶液を加えゲル化させ、ヌードマウスの頭蓋骨上に移植した。10 週後にサンプルを取出し、固定、脱灰、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と免疫染色 (Anti-Human PCNA antibody) で解析した。

軟骨再生に関しては海老原らが中心となり、*in vitro* で既報の方法を用いて分化誘導を行った。

## ②臍帯由来 MSC による臍帯血移植における生着促進効果 (松本)

ストローマ障害を有する再生不良性貧血への応用を目指し、放射線照射した免疫不全 (NOD/SCID) マウスにヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup> 細胞を移植し、ヒト臍帯血生着不全モデルの作成を試みた。さらに、同一ドナー胎児付属物から①臍帯 Warlton's Jelly 由来 MSC (WJ-MSC)、②羊膜上皮由来幹細胞 (AEC)、③羊膜間質由来 MSC (AMC) を培養調製した。

これらの細胞に対し、造血ニッチマーカーの発現解析やヒト臍帯血 CD34 陽性細胞との共培養による造血幹細胞支持能の比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いた実験は、施設臨床研究委員会または東京臍帯血バンク倫理委員会にて承認を受け実施した。

## ③臍帯由来 MSCs を用いた脳室周囲白質軟化症・気管支肺異形成症の治療法の開発 (森田)

実験的子宮内感染症モデルを用いて、子宮内感染症に起因する脳室周囲白質軟化症における内在性幹細胞の障害と疾患成立への関与を検討するとともに、臍帯・胎盤絨毛の培養上清による治療効果を検討した。日齢 4 の新生仔ラットはヒトの妊娠 28 週前後に相当することを利用し、日齢 4 のラットに LPS15mg/kg を腹腔内投与した後、日齢 4、5、6、7 に MSCs の培養上清を腹腔内投与し、日齢 6、12 の脳を採取し評価した。

(倫理面への配慮)

研究計画は東京医科歯科大学倫理審査委員会の審査・承認を得て行った。

## ④臍帯血および臍帯由来 MSC の免疫学的効果の研究 (東條・長村<sup>登</sup>)

東條、長村らは、臍帯血ナイーブ CD4 陽性細胞から IL2/TGF- $\beta$ /mTOR 阻害剤 (everolimus) 存在下にて制御性 T 細胞の誘導増幅を行い、試験管内リンパ球混合培養試験 (MLR) において、同種抗原刺激による T 細胞増殖の抑制効果を検討した。同様に臍帯由来 MSCs についても、MLR を実施した。また、臍帯由来 MSCs が示す免疫抑制作用の機序解明のため、同種抗原刺激の有無により臍帯由来 MSCs において発現変化が誘

導される遺伝子群についてマイクロアレイを用いて検討した。同種抗原刺激により強く発現誘導される複数の遺伝子を同定し、さらに検討を進めた。臍帯血由来制御性 T 細胞および臍帯由来 MSCs の示す免疫抑制効果を生体において検証するため、免疫不全マウスにヒトリンパ球を移植して発症させた異種 GVHD を対象として、前臨床試験を行った。

### C.結果

#### (1)臍帯血・臍帯の系統的資源化；

##### ①臍帯血と臍帯のバンキングに向けた検体管理システムの構築（角田・長村<sup>登</sup>）

検体管理システムの導入；平成 25 年度は平成 24 年度に構築した 2 次元コードラベルを用いた検体管理システムを導入し、運用を始めた。PDA 端末を用いて母親氏名を入力し、自動付与された 2 次元コード付き ID ラベルを採取した臍帯血・臍帯バッグに貼付した。また提供記録、同意書等の書類にも 2 次元コードラベルを添付した。医科研に搬送後、臍帯血・臍帯および同意書等の書類に貼付された 2 次元コードを読み取り、2 次 ID を付与（ID のひもづき、置き換え）して連結可能匿名化とし、以降の細胞処理や品質検査はこの 2 次 ID にて運用した。なお、医科研外の研究目的の場合に提供する場合には 2 次 ID を削除し他の ID に置き換えた。本システムは臨床用バンクのプロトタイプであるが、検体照合においては十分機能的対応可能であった。今後、作業工程の確認照合作業にも対応できるように本システムの充実を図る。

##### ②バンキング・製剤化に向けた臍帯血・臍帯由来 MSCs の分離培養・凍結方法の検討

#### と手順書の整備（長村<sup>登</sup>・幸道）：

バンキングに当たって品質マニュアル・手順書の整備と記録の管理は重要である。東大医科研細胞リソースセンターの共通品質マニュアル部分は、既に他の再生プロジェクトで「ヒト幹細胞を用いた臨床試験に関する指針」に準拠して使用している。平成 25 年度は、臍帯血・臍帯由来 MSCs の製剤化に関する手順書を作成した。また製剤化やバンキングに必要なクリーンルームおよび使用機器の保守点検、品質検査方法（自施設および外注）について技術スタッフを教育養成し、記録の整備を行った。

長村<sup>登</sup>らは、臍帯から Explant 法で MSCs を培養分離する上で、組織片が浮遊するのを防ぐため、浮遊防止のメッシュを企業と共同開発し特許申請を行った。本メッシュはセルアミーゴ<sup>TM</sup>として、商品化の予定である。このメッシュにより、1 g 当たりの臍帯から得られる MSCs 数は 9-12 日間で培養にて、 $0.87 \pm 0.54 \times 10^6$  から  $3.1 \pm 1.4 \times 10^6$  (n=4) と有意に増加し、培養期間も既報 3 週間から約半分の日数で同等以上の細胞数を回収することができた。この細胞をマスター細胞として凍結した。このマスター細胞をさらに増幅し、P3 細胞にて 1g の臍帯組織から、 $1.8 \times 10^9$  個の MSCs が得られた。これを Working cell として使用することを考えた。60kg 成人に  $1 \times 10^6$ /kg の MSCs を輸注する場合、1g から約 30 回分、臍帯が大凡 20g と考えると、600 回分の MSCs が得られることになる。しかし、これまでの検討にて分化能にロット格差等があることを考え、やみくもに細胞を分離するより、「方法」の項で述べた通り臍帯組織の凍結することによってバンキングの効率化を目指し

た。長村<sup>登</sup>らは、ある試薬に数時間浸漬した後、凍結（2週間）後、解凍し、新鮮臍帯同様に細切し、エクスプラント法で分離培養して遊走した細胞を回収した。その結果、新鮮な臍帯をエクスプラント法で培養した場合と同等またはそれ以上の細胞数が得られた（特許出願中）。得られた細胞は、新鮮臍帯から得られた MSCs と同等の表面形質を示し、免疫抑制効果も同等に得られた。

### ③臨床試験のためのバンクシステム構築と海外の実態調査・規制対応（長村<sup>登</sup>）

医師主導治験実施のための製剤化・バンキングについて研究代表者 長村<sup>登</sup>とともに PMDA との薬事戦略相談・事前面談を実施した。これにより生物由来原料基準の確認等の必要資料作成に向けての助言を得て、対面助言に向けての準備を行うこととした。また、細胞調製施設に関しても薬事戦略相談の枠組の中で治験薬 GMP 準拠製造に問題がないか、設備・構造あるいは人的組織・手順書の整備の観点から助言を得ることとした。また、バンキングについては諸外国ではプライベートバンクが先行して実施されているが、特に欧州ではアカデミアを中心に整備が始まっており、EMA の積極的な支援も始まっていることが分かった。

また、長村<sup>登</sup>は、AsiaCORD の secretariat（<http://www.asiacord.umin.jp/>）として、AsiaCORD2013 Kobe を組織し、アジアにおける臍帯血バンク、臍帯・胎盤由来 MSCs を中心とした臨床応用について意見を交換した（巻末資料）。

### ④難治性疾患患児からの臍帯血および臍帯の採取（森尾）

平成 25 年度は 10 月までに 159 件の検体を収集した。これは全国に集まる免疫不全

症相談症例の内の約 27% を占めている。これらの患者について、説明と同意の上、責任遺伝子解析を実施した（理研、かずさ DNA 研究所との共同研究）。このうち特徴的な所見を呈する免疫不全症や、抗体産生不全症が 1 位、2 位を占めた。これらの患者では、2012 年生まれは 20 名、2013 年生まれは 17 名であり、年間では当該施設だけでも約 20 名程度の新規原発性免疫不全症の登録があり、全国的には 100 例程度であろうと予想された。一方、遺伝形式が明らかかなものはこの 2/3 程度であり、遺伝様式を鑑みると、今後の資源化については、ヘテロ異常や正常者を含めた資源となることが予想された。

### (2)基礎的研究；

#### ①骨・軟骨再生能の検討（縣・竹谷・海老原）

竹谷らは、臍帯由来 MSCs の ALP 発現および ALP 活性は、陽性コントロールである ALP 強発現骨肉腫細胞株である H-HOS と同程度に ALP 発現および ALP 活性が認められたことを示した。また骨芽細胞の ALP 発現および石灰化能に関して、基礎培地でも臍帯由来 MSC が骨芽細胞に分化して、石灰化能および ALP 活性を認めた。骨分化促進剤(RA, CyA, FK506, VD3, SB+LiCl, SB, BMP-2)、骨分化阻害剤(LiCl)で検討したところ、石灰化能は FK506, VD3, BMP-2 で認められ、ALP 活性化はすべての薬剤で認められた。しかし、MSC のロット間の差が認められた。縣らは臍帯由来 MSCs の *in vitro* での骨分化誘導に有効な試薬、成長因子の探索において、10%FBS を含有した上記誘導基礎培地に BMP 系, VitD, PTH または PDGF を加えて培養を行った。その結果、

ALP 活性はいずれの条件においても3週間の方が高く、中でも DAG+BMP2 の条件が比較的安定した ALP の上昇を示した。しかしながら、臍帯由来 MSCs の ALP 活性はいずれの条件においても骨髄由来 MSCsn よりはるかに低かった。

一方、懸らは方法で述べた手技を用いて、ヌードマウスに移植実験を行い、臍帯由来 MSCs の *in vivo* 分化能の解析を行った。その結果、ヌードマウスの頭蓋骨上に移植した臍帯由来 MSC は、HE 染色と免疫染色の結果、結合組織、血管組織、類骨、皮質骨へ分化していることが示された。

#### ②臍帯由来 MSC による臍帯血移植における生着促進効果 (松本)

NOD/SCID マウスに3 Gy の放射線照射を行った後、ヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞 (1 x 10<sup>4</sup>) を移植することにより、再現性のある臍帯血生着不全モデルを作出することができた。WJ-MSC、AEC、AMC は培養初期にはいずれも SDF-1、Nestin、SSEA4 の発現が認められ、その発現強度は、AEC>WJ-MSC>AMC の順であった。臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞との5日間の共培養において、WJ-MSC、AEC、AMC はそれぞれ臍帯血細胞を6.5倍、5.8倍、7.6倍増加させ、造血前駆細胞(CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>)の割合は、それぞれ27.3%、37.8%、38.8%であった。WJ-MSC、AEC、AMC 共培養後の臍帯血細胞はいずれもCFU-GMコロニー形成を認め、コロニー数はAEC>AMC>WJ-MSCの順に高値を示した。現在上記ヒト臍帯血生着不全モデルに対して、WJ-MSC、AEC、AMC を静脈内投与し、生着促進効果が得られるかを検討中である。

#### ③臍帯由来 MSCs を用いた脳室周囲白質軟化症・気管支肺異形成症の治療法の開発

#### (森田)

LPS 投与により日齢6の新生仔脳における炎症性サイトカインの上昇、日齢12における脳室周囲白質量の低下を確認した。MSC 培養上清投与により、炎症性サイトカインは減少し、脳室白質量は増加する傾向がみられた。

#### ④臍帯血および臍帯由来 MSC の免疫学的効果の研究 (東條・長村<sup>豊</sup>)

我々は臨床用臍帯血バンクと同様に HES 法にて凍結保存した臍帯血を解凍し、CD4 陽性細胞を分離し、IL2/TGF- $\beta$ /mTOR 阻害剤 (everolimus) 存在下にて誘導性制御性 T 細胞 (iTreg) の誘導/増幅に成功した。得られた iTreg は、同種樹状細胞抗原刺激を用いた MLR において、HLA 非拘束性にレスポンドの増殖を抑えた。なお、PMDA の薬事戦略相談・事前面談において、臨床試験においては、当院で iTreg を誘導・増幅した最終産物の状態で出荷することを求められた。

一方、臍帯由来 MSCs も iTreg 同様に、HLA 非拘束性に MLR におけるレスポンドの増殖を抑制した。この臍帯由来 MSCs の免疫抑制効果は細胞と直接接触した場合に最も高く、物理的に接触を阻害すると効果は減弱した。さらに、骨髄由来 MSCs による免疫抑制効果のメディエーターであるIDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) の役割を阻害剤 1MT (1-methyltryptophan) を用いて検討した。その結果、臍帯由来 MSCs の免疫抑制効果は 1MT の添加により容量依存性に阻害された。さらに、同種抗原刺激 (MLR) によって臍帯由来 MSCs に発現誘導される遺伝子についてマイクロアレイによる解析を行った。その結果、IDO を含めて複数の遺伝子が同定され、それらの遺伝

子について検討を進めている。また、異種 GVHD マウスモデルにおいて、臍帯由来 MSCs は GVHD の抑制効果を示した。

#### D. 考察

本研究は、骨髄に替わる新規細胞ソースとして臍帯血・臍帯由来 MSCs の国内初の製剤化と系統的資源化（バンキング）に必要な技術基盤を確立し、基礎的研究により早期に希少・難治性疾患への臨床応用を可能とする体制を整えることを目的としている。昨年末に JCR ファーマが米国 Osiris 社からの技術提供を受けて製造する骨髄由来 MSCs は、新たに細胞性医薬品という扱いで、希少疾病用医薬品（オーファンドラッグ）として厚生労働省より指定を受けた。このことより、MSCs 自体の認知度と期待は高まってきている。

##### (1)系統的資源化

臍帯血および臍帯は同時に採取することが可能であり、臍帯の一部は explant 法にて MSCs の培養を行い、一部は組織ごと凍結可能となった。特に組織凍結に関しては必要分の培養のみ開始することで、培養コストの削減ができる可能性と、種々の理由によりすぐには培養が開始できない場合に有効な手段と思われた。また explant 法においてもセルアミーゴ™を用いることによって、より多くの細胞が早く回収できることもバンキングにおいてはコスト的にも重要な要素となる。今後、初期培養 (Master cells) から P3 の Working cell までに細胞を増幅する MSC 用の培養液や、品質検査費用が高額

であることが運用上の課題である。なお、東大医科研細胞リソースセンターが細胞加工製造所として妥当か否かに関して、今年中に PMDA の査察を受ける予定であり、ソフト面を含めて PMDA との薬事戦略相談を進め、改善を図っていく。

健全な臍帯血・臍帯バンキングを樹立する一方で、先天性の難治性疾患においても自己および血縁者にとって臍帯血と臍帯は、病態解析用または治療用の細胞ソースとなりうる。東京医科歯科大学小児科においては、年間新規に 20 名弱の原発性免疫不全症（国内 4 分の 1 症例（100 例/10 万）が集積していることから、原発性免疫不全症例の臍帯及び臍帯血由来細胞の資源化の可能性について検討した。今後、弟妹を含めた血縁者の臍帯血・臍帯の採取をすることによって、理想的な診断手法の開発、責任遺伝子探索や治療用細胞の一つのモデルとなりうると考えられた。

##### (2)基礎的研究：

骨髄に替わる MSCs の提供を目指し、これまで臍帯由来 MSCs の幹細胞性、骨、神経系への再生能または修復能、免疫抑制能および細胞支持能について研究を進めてきた。平成 25 年度は、骨形成能については、骨髄由来 MSCs よりは *in vitro* での分化能は劣り、骨芽細胞への分化誘導に時間を要すること、ロット差があることが分かってきた。なお、竹谷、縣らの検討から、臍帯由来 MSCs の骨分化能の評価系として、Alp 活性陽性細胞の組織染色が最も確実な方法と考えられ、今後の製剤の品質試験に取り込む予定である。一方で、縣らが行った

ヌードマウスにおける *in vivo* での臍帯由来 MSCs による骨形成が確認された意義は非常に大きい。今後は前臨床試験として、積極的に *in vivo* での検討を進めたい。

神経再生や生着促進については、動物実験を主として進めている。特に神経再生に関して、森田らは臍帯・胎盤由来 MSCs の培養上清を用いて検討を行っているが、MSCs そのものを用いるのか、そこから分泌されるサイトカインやエクソソーム等をターゲットとするかについて検討が必要である。脳梗塞後の神経機能改善を目指して自家骨髄由来 MSCs 療法の臨床試験が進められており、臍帯由来 MSCs での検討が期待される。また、海外では、臍帯由来 MSCs を神経系疾患に投与報告もある (Dongmei et al, Cytotherapy, 2011)。MSCs の神経系への作用機序について、基礎的基盤を固めながら製剤の投与方法を検討していく。

再生不良性貧血において、海外では生着促進と GVHD 予防目的で造血幹細胞と臍帯由来 MSCs を同時移植する第 1 相臨床試験が行われ、その安全性が確認されている。

臍帯由来 MSCs において、最も有力な治療対象は GVHD を含めた炎症性疾患と考えられる。国内では骨髄由来 MSCs による臨床試験第 2 相試験が進められている。東條・長村<sup>登</sup>らの検討では臍帯由来 MSCs の免疫抑制効果は、HLA 非拘束性であり、最も臨床応用へ期待される分野である。造血細胞移植後の GVHD は、特に非悪性疾患である難治性疾患にとっては GVL (移植片対白血病) 効果を想定しないので、避けるべき有害事象である。現在、第 1 相臨床試験のデザインを検討している。

以上、海外においては、MSCs ソースと

して骨髄、脂肪組織、臍帯と 3 つが掲げているまでになっている。国産の安全な細胞性医薬品として研究をさらにまずは臨床試験の体制を加速させたいと考えている。

## E. 結論

臍帯血・臍帯は、再生医療・免疫細胞療法のソースとして有用である。今後は、細胞製剤として製剤化するために医薬品医療機器総合機構(PMDA)と薬事戦略相談(事前相談)結果を踏まえて、必要な検査、規格等についてさらに検討していく。

基礎的研究では、臍帯由来 MSCs は、*in vitro* または *in vivo* での免疫抑制効果、骨・軟骨分化能を認め、さらに非臨床試験にて有効性を確認する必要がある。

F. 健康危険情報 なし。

## G. 研究発表:

### 1. 論文発表:

- 1) Nagamura-Inoue T., and He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility, *World J Stem Cells* 2014, 6,195-202
- 2) He H. Nagamura-Inoue T., Tsunoda H., Yuzawa M., Yamamoto Y., Yorozu P., Agata H., Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Engineering.,Part A*, 20,1314-24,2014
- 3) Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, Takahashi S, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Sakamaki H, Kodera Y; Japan Society for

- Hematopoietic Cell Transplantation, Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol.* 25,435-41.,2014
- 4) Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Mori T, Kobayashi H, Nakaseko C, Yamagata N, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Allogeneic transplantation for primary myelofibrosis with BM, peripheral blood or umbilical cord blood: an analysis of the JSHCT. *Bone Marrow Transplant.* 49, 355-60,2014
  - 1) Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 49,228-35,2014
  - 2) Kanamori H, Mizuta S, Kako S, Kato H, Nishiwaki S, Imai K, Shigematsu A, Nakamae H, Tanaka M, Ikegame K, Yujiri T, Fukuda T, Minagawa K, Eto T, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Suzuki R, Sakamaki H, Tanaka J. Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for patients aged 50 years or older with B-cell ALL in remission: a retrospective study by the Adult ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 48,1513-8,2013
  - 3) Murata M, Nakasone H, Kanda J, Nakane T, Furukawa T, Fukuda T, Mori T, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Hino M, Inoue M, Ogawa H, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Yabe H, Morishima Y, Sakamaki H, Suzuki R. Clinical Factors Predicting the Response of Acute Graft-versus-Host Disease to Corticosteroid Therapy: An Analysis from the GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19,1183-9, 2013
  - 4) Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H, Fukuda T. Recent decrease in non-relapse mortality due to GVHD and infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in non-remission acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 48, 1198-22, 2013
  - 5) Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taguchi J, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Mori T, Murata M. A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.; GVHD Working Group of the Japan

- Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Transpl Int.* 26, 631-9, 2013
- 6) Nakasone H, Kurosawa S, Yakushijin K, Taniguchi S, Murata M, Ikegame K, Kobayashi T, Eto T, Miyamura K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Suzuki R, Fukuda T. Impact of hepatitis C virus infection on clinical outcome in recipients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol.* 88,144-6, 2013
  - 7) Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T, Kato K, Kanda Y. Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Haematologica.* 98, 814-22, 2013.
  - 8) Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in Cytokine Production in Human Macrophages and in Virulence in Mice Are Attributable to the Acidic Polymerase Protein of Highly Pathogenic Influenza A Virus Subtype H5N1. *J Infect Dis.* 207:262-71, 2013
  - 9) Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ogushi H, Fukuda S, Yamaguchi S. Therapy-related Ph+ leukemia after both bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation for hypophosphatasia. *Pediatr Int.* 55:e52-5, 2013
  - 10) Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Pretransplant hyperferritinemia has no effect on the outcome of myeloablative cord blood transplantation for acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol.* 90, 1071-2,2014
  - 11) Tomokuni A, Eguchi H, Hoshino H, Dewi DL, Nishikawa S, Kano Y, Miyoshi N, Tojo A, Kobayashi S, Gotoh N, Hinohara K, Fusaki N, Saito T, Suemizu H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Ishii H, Nagano H. Effect of in vivo administration of reprogramming factors in the mouse liver. *Oncol Lett.* 6, 323-8, 2013.
  - 12) Imashuku S, Shimazaki C, Tojo A, Imamura T, Morimoto A. Management of adult Langerhans cell histiocytosis based on the characteristic clinical features. *World J Hematol.* 2, 89-98, 2013
  - 13) Agata A, Sumita Y, Asahina I, Tojo A, Kagami H. Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. *Histol Histopathol.* 28, 955-64, 2013.
  - 14) Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transplant Infect*

- Dis. 15,181-6, 2013.
- 15) Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol.* 97,103-8, 2013.
  - 16) Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ogushi H, Fukuda S, Yamaguchi S. Therapy-related Ph+ leukemia after both bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation for hypophosphatasia. *Pediatr Int.* 55, e52-5, 2013
  - 17) Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Leukoc Biol.* 95, 667-76,2014
  - 18) Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* 98, 355-60, 2013.
  - 19) Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, Morio T, Candotti F, Yachie A. Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol.* 131, 587-90, 2013.
  - 20) Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination excision circles. *J Allerg Clin Immunol.* 131,1437-40, 2013.
  - 21) Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Characterization of time-course morphological features for efficient prediction of osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. *Biotechnology & Bioengineering.* 2014 in press.
  - 22) Xia D, Sumita Y, Liu Y, Tai Y, WanJ, Uehara M, Agata H, Kagami H, Fan Z, Asahina I, Wang S, Tran SD. GDFs promote tenogenic characteristics on human periodontal ligament-derived cells in culture at late passages. *Growth Factors.* 2013 31,165-73.
2. 学会発表  
(国内)
    - 1) 何海萍, 長村登紀子, 角田肇, 東條有伸ら. SSEA4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived MSCs, 臍帯由来間葉系幹細胞におけるSSEA4発現の意義について, 第75日本血液学会学術集会総会(北海道) 2013/10/11
    - 2) 長村登紀子, 内丸薫、高橋聡、大井淳、加藤せい子、河北敏郎、大野伸広、湯地晃一郎、東條有伸, 当院における輸血後鉄過剰症診療の現状Current Clinical Practice in Post-transfusion Iron Overload in IMSUT Hospital, 第75日本血液学会学術集会総会(北海道) 2013/10/12
    - 3) 長村登紀子、岸野光司、上村知恵, 造血細胞移植に必要な細胞処理・検査に関する技術講習会; こんな時どうする? Q and Aテクニカルセミナー第61回日本輸血・細胞治療学会(横浜)2013/5/16
    - 4) 長村登紀子、何海萍、東條有伸. 臍帯由

- 来間葉系幹細胞の分離とその応用について 第34回日本炎症・再生医学会(京都) 2013/7/2
- 5) 大串始、弓場俊輔、竹谷健。同種間葉系幹細胞を用いた骨再生治療。第86回日本整形外科学会(会長 越智光夫)、広島、2013年5月23-26日
  - 6) Nanya M, Yamamoto S, Ebihara Y, Shinji Mochizuki S, Otsu M, Tozuka M, Nakauchi H, Kohichiro Tsuji. Drug screening for the 8p11 myeloproliferative syndrome using patient iPS cells. 日本血液学会 札幌
  - 7) Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Nagamachi A, Takubo K, Ebihara Y, Sanada M, Ogawa S, Tsuji K, Suda T, Inaba T, Honda H. Generation and analysis of a novel model for CMML with acquired expression of CBL Q367P. 日本血液学会 札幌
  - 8) 戸澤 晃子(聖マリアンナ医科大学 産婦人科学), 清野 重男, 白山 岳史, 小林 則子, 田中 京子, 角田 肇, 仲村 勝, 高松 潔, 鈴木 直, 青木 大輔. 細胞診における精度管理と標準化にむけて 子宮頸部細胞診における精度管理 自動スクリーニング支援装置の有用性. 第52回日本臨床細胞学会, 2013/11/3(大阪)
  - 9) 田中 京子, 清野 重男, 白山 岳史, 小林 則子, 角田 肇, 鈴木 直, 戸澤 晃子, 高松 潔, 仲村 勝, 青木 大輔. 子宮頸部病変検出における自動スクリーニング支援装置と手動鏡検との比較検討., 第54回日本臨床細胞学会春季総会 2013/5/31 (東京)
  - 10) 森尾友宏: 悪性腫瘍を合併する免疫不全症、第54回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム)、福岡、2013年11月29日 - 12月1日
  - 11) 森尾友宏: 原発性免疫不全症候群から学ぶ Human Immunology、第41回日本臨床免疫学会総会、山口、2013年11月27日 - 29日
  - 12) 森尾友宏: 易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤としての原発性免疫不全症、平成25年度遺伝子病制御研究所研究集会、札幌、2013年10月25日
  - 13) 森尾友宏: 分類不能型免疫不全症(CVID)の多彩な病像と分子基盤、第75回日本血液学会学術集会、札幌、2013年10月11日 - 13日
  - 14) 西川英里, 石毛美夏, 麦島秀雄, 松本太郎: ヒト胎児付属物由来間葉系幹細胞の機能解析。第12回日本再生医療学会総会、横浜、2013
  - 15) 小高美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 麦島秀雄: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の造血細胞生着促進効果に関する検討。第11回日本再生医療学会総会、横浜、2012
  - 16) 小高美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 野呂知加子, 小林寿美子, 谷ヶ崎博, 鈴木孝, 麦島秀雄: 放射線照射が骨髄ストローマ機能に及ぼす影響と最大悦生着促進を目的とした新規細胞治療(ワークショップ)。第34回日本造血細胞移植学会総会、大阪、2012
  - 17) 松本太郎: 幹細胞に関する最近の知見を新しい再生医療用細胞ソースの開発(教育講演)。第35回日本呼吸器内視鏡学会学術集会、東京、2012
  - 18) 手塚里奈, 松本太郎, 石毛美夏, Al-Bakri Zena, 藤田英寿, 麦島秀雄: ヒト臍帯組織における間葉系幹細胞の局在および形質解析(ワークショップ)。第33回日本造血細胞移植学会総会、松山、2011
  - 19) 森丘千夏、滝玲子、森田育男「LPS 羊水腔内投与によるラット子宮内感染モデルにおける胎盤および新生児合併症の解析」第65回日本産科婦人科学会 札幌、2013年5月11日
  - 20) 海老原康博、平本貴史、山本将平、望月慎史、辻浩一郎、溝口洋子、中村和洋、小林正夫、重症先天性好中球減少症患者由来のiPS細胞の樹立とその分子生物学的解析、日本小児科学会 広島 (海外)

- 1) He H., T. Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yamamoto Y, Mori Y, and Tojo A, The Immunosuppressive Effect Of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells *in vitro*, 55<sup>th</sup> ASH annual meeting, New Orleans 2013/12/8,
  - 2) Tanosaki R, Okuyama Y<sup>2</sup>, Iseki<sup>3</sup> T, Handa M, Kino S, Kumazawa T, Yoshida S, Haraguchi K, Schimizu N, Sakai S, Watanabe N, Uemura T, Ikuta K, Kawahara Y, Muroi K, Nagamura-Inoue T, Takanashi M, for the HPC Study Group, the Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy (JSTMCT), The 55<sup>th</sup> ASH annual meeting, New Orleans 2013/12/8,
  - 3) H. Itonaga, M. Iwanaga, K. Aoki, J. Aoki, K. Ishiyama, T. Kobayashi, T. Sakura, T. Fukuda, T. Yujiri<sup>1</sup>, M. Hirokawa<sup>1</sup>, Y. Morishima<sup>1</sup>, T. Nagamura-Inoue, Y. Atsuta<sup>1</sup>, T. Ishikawa<sup>1</sup>, Y. Miyazaki<sup>1,2</sup> Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia, New Orleans, 2013/12/7,
  - 4) Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Kobayashi S, Yuzawa M, He H, Tsunoda H, and Tojo A. Impact of mTOR inhibitor, Everolimus on inducible regulatory T cells Derived from Cord Blood, International Society of Cellular Therapy (ISCT) Annual meeting, New Zealand, 2013
  - 5) Nagamura-Inoue T, Kodo H, Quality Control for New type of Cord Blood/ Cord Bank for HSCT and others, WS-1, AisaCORD 2013, Kobe, Japan. April 2013
  - 6) Nagamura-Inoue T, He H, and Tojo A. Wharton jelly is a rich source of mesenchymal stem cells Symposium 2-2, AisaCORD 2013, Kobe, Japan. April 2013
  - 7) Morio T. Cord blood transplantation for primary immunodeficiency in Japan. AsiaCORD2013. Kobe, Japan. April 2013.
  - 8) Taketani T, Mihara A, Oyama C, Tanabe Y, Kanai R, Fukuda S, Yamaguchi S, Katsube Y, Oda Y, Tadokoro M, Sasao M, Yuba S, Ohgushi H. Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Improved Osteogenesis in Patients with severe Hypophosphatasia-Three case reports of MSC infusions followed by bone marrow transplantation-. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research (President; Hank Kronenberg and Masaki Noda), Kobe, May 28-Jun 1, 2013
- 3.その他、  
 専門医、一般医等医療従事者への情報提供  
 (シンポジウムの開催、講演等での発表)  
 研究成果の普及、活用に関わる活動：
- 1) 松本太郎 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム (東京, 2013年1月29日, 研究者、学生、大学院生, 120名参加, 胎児付属物由来細胞を含む幹細胞生物学や組織医工学に関連する情報交換を趣旨とした研究会を主催した。)
  - 2) 松本太郎 平成25年度日本大学医学部

大学院特別講義（東京, 2013年10月19日, 研究者、大学院生、学生、55名参加、「ヒト幹細胞研究の現状と今後について」というテーマで講演会を主催した。）

- 3) 松本太郎 東京都保健医療公社豊島病院平成 24 年度臨床研修委員会主催講演会（東京, 2013 年 臨床医 35 名参加、「幹細胞、細胞治療に関する最近の話題を展望」というテーマで特別講演を行った。）
- 4) 川崎・横浜呼吸器フォーラム（横浜、2013 年 3 月 28 日 臨床医 30 名参加「成熟細胞を利用した細胞治療の試み」というテーマで特別講演を行った。）
- 5) 平成 24 年度日本大学獣医学部大学院特別講義（藤沢, 2013 年 6 月 28 日, 研究者, 大学院生, 80 名参加, 「再生医療の現状と展望」というテーマで講演会を行った。）

患者、家族、患者会や一般市民への情報提供（シンポジウムの開催、講演等での発表、マスコミでの発表など）

- 1) 松本太郎 平成25年度日本大学生物資源科学部市民講座（藤沢, 2013年6月22日 一般市民、200名参加、「細胞を使って病気を治す」といったテーマで特別講演を行った。）
- 2) 長村登紀子 造血幹細胞の病変と治療のための輸血について 公的骨髄バンクを支援する東京の会 2012/6/23
- 3) 患者さんに役立つ iPS 細胞. 海老原康博 市民医療懇談会、東京、2013

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 長村 登紀子、森 有加、大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎 発明の名称：生体組織切断用抑え具, 出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願, 出願日:2013/10/02 特許 2013-006923
- 2) 長村 登紀子、森 有加、大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎, 出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願, 発明の名称：培養組織剥離防止プレート 出願日:2013/10/04 特許 2013-209095 および登録商標;cellamigo®,セルアミオーゴ®
- 3) 長村 登紀子、森 有加、島津 貴久、佐瀬 孝一 出願人：国立大学法人東京大学 日本全薬工業との共同出願, 発明の名称：臍帯組織の凍結保存方法、特許出願日：2013/12/27, 特願 2013-273536