

201324054B

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 24～25 年度 総合研究報告書

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 24～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 長村（井上）登紀子

平成 26（2014）年 3 月

平成 24 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	職名
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	講師
研究 分担者	角田 肇	N T T 東日本関東病院 分娩部	部長
	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	教授
	幸道 秀樹	献血供給事業団 東京臍帯血バンク部	部長
	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	教授
	麦島 秀雄	日本大学医学部 小児科	教授
	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	准教授
	辻 浩一郎	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	准教授
	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	助教

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	職名
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	講師
研究 分担者	角田 肇	N T T 東日本関東病院 分娩部	部長
	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	教授
	幸道 秀樹	献血供給事業団 東京臍帯血バンク部	部長
	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	教授
	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	教授
	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	准教授
	森田 育男	東京医科歯科大学大学院 分子細胞機能学分野	教授
	辻 浩一郎	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	准教授
	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	助教
	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	助教
	竹谷 健	島根大学 医学部 附属病院 輸血部	講師

目 次

I. 総括研究報告

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

II. 分担研究報告

1. 臍帯血と臍帯の効率的採取方法の研究	25
角田 肇（N T T東日本関東病院 分娩部）	
2. 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	27
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）	
3. 臍帯・臍帯血由来幹細胞臨床応用に必要な非臨床試験及び規制に関する研究	
長村 文孝（東京大学医科学研究所 先端医療開発推進分野）	36
4. 臍帯由来間葉系幹細胞の免疫制御作用の研究	40
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）	
5. 難治性疾患患者の臍帯血と臍帯採取システムの開発	47
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）	
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	51
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）	
6. 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希少性疾患に対する移植医療の技術確立に関する研究	55
麦島秀雄 日本大学医学部小児科学分野	
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	58
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. 臍帯由来間葉系幹細胞(hCMSC)の骨分化能解析と骨系統疾患治療への応用可能性検討	67
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	70
竹谷 健（島根大学 医学部 附属病院 輸血部）	
11. 臍帯血・臍帯の品質管理システムの確立	77
幸道 秀樹（献血供給事業団 東京臍帯血バンク部/昭和大学医学部）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	83

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. 総合研究報告書

総合研究報告書

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

研究要旨：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間葉系幹細胞(MSCs)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、それをを用いた希少・難治性疾患への臨床応用を目的として、基礎的検討を行った。

(1)系統的資源化；臍帯由来 MSCs の製品化においては、産婦人科での同意書、付随書類の取得から臍帯血・臍帯採取から東京大学医科学研究所(東大医科研細胞リソースセンター)にて細胞調製・凍結保管するまでの一連の流れをほぼ確立し、手順書を作成した。その過程でデバイスの開発や臍帯組織の凍結技術を開発し、プロセスの効率化が図られた。現在、バンキングに関しては東大医科研病院内の審査委員会に申請中であり、臍帯由来 MSCs の製剤化に向けて、PMDA の薬事戦略相談（事前面談）を受けた。今後は、対面助言・査察を受けるべく各課題に対して引き続き検討・準備することとした。

(2) 基礎的研究；各種難治性疾患に対して臍帯由来MSCsを用いた新規治療法の開発を目的として、基礎的検討と動物モデルの作成を行った。対象とする疾患または病態は①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）、②希少難治性疾患に対する臍帯血移植時の生着促進、③低フォスファターゼ症を含む骨軟骨形成不全症の治療、④脳性麻痺の原因ともなる脳室周囲白質軟化症である。GVHDにおいては3rd partyMSCsでも有効な結果が得られ、骨誘導においてAlp活性の上昇とマウス頭蓋骨への移植において類骨、皮質骨への分化を認めた。今後はこれら疾患マウスモデルを中心に、臍帯由来MSCs治療の非臨床試験を進める。

研究分担者：

氏名：角田 肇

所属：N T T 東日本関東病院・分娩部

氏名：東條 有伸

所属：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

氏名：幸道 秀樹

所属：献血供給事業団・臍帯血バンク部/昭和大学 医学部

氏名：長村 文孝

所属：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

氏名：麦島 秀雄

所属：日本大学医学部・小児科

氏名：松本 太郎

所属：日本大学医学部・機能形態学系細胞再生・移植医学分野

氏名：森尾 友宏

所属：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

氏名：森田 育男

所属：東京医科歯科大学大学院・分子細胞機能学分野

氏名：辻 浩一郎

所属：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

氏名：海老原康博

所属：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

氏名：縣 秀樹

所属：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

H25~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)

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治性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、本邦の製剤は海外の骨髄由来 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。前者は脳性麻痺等に対する自家使用や希少・難病疾患がある場合には患児由来細胞として病態解析用や遺伝子治療を含めた新規医療用を目的として採取する。後者は健常同種移植用細胞として製剤化を目指す。本研究は、疾患特異的検体や遺伝性疾患を対象とすることから、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することとした。さらに、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て検討した。

(2)基礎的研究；各種難治性疾患に対して臍帯由来 MSCs を用いた新規治療法の開発を目的として、基礎的検討と動物モデルの作成を行った。対象とする疾患または病態は

①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)、②希少難治性疾患に対する臍帯血移植時の生着促進、③低フォスファターゼ症を含む骨軟骨形成不全症の治療、④脳性麻痺の原因ともなる脳室周囲白質軟化症である。これらの疾患・病態への臨床応用のための基礎および動物実験を実施し、有用性を検証することとした。

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臍帯血と臍帯の効率的採取方法の研究

(角田)

NTT 東日本関東病院 帝王切開での分娩時に採取した胎盤、臍帯から臍帯血及び臍帯を採取し、本研究に必要な研究材料を提供するために安全で、効率的な採取方法を検討した。なお、針刺し防止の観点から、臍帯血採取後は、チューブシーラーによってチューブをシールした後に、採取針の切断廃棄を行う手順とした。H25 年度から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た。

②臍帯血・臍帯由来 MSC の分離培養・凍結方法の確立とバンキングの研究

(長村^登・幸道)

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 に細切し、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が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。

臍帯血は、HES 静置法および SEPAX の手順書を確認して、検査および調製を行った。

また、臍帯血・臍帯由来 MSCs の製剤化における課題を明らかにする目的で医薬品医療機器総合機構 (PMDA) にて薬事戦略相談 (事前面談) を受けた。

(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。

さらに、2014年2月に、臍帯血・臍帯バンクングについて、院内(治験)審査委員会にGVHD使用目的のバンクングについて申請した(2014年3月申請中)。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^文)

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。またバンクングの過程での知財関係の助言を行った。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と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。縣、竹谷らは基礎培地(α -MEM+FBS, β -glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethazone)にBMPやRA, PTH等の種々の分化誘導剤を添加し、その骨誘導効果を確認した。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*にて既報の方法を用いて分化誘導を行うとともに、関節軟骨障害モデル作成を試みた。

②臍帯由来 MSC による臍帯血移植における生着促進効果

(麦島・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⁺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週間

後に相当することを利用し、日齢4のラットにLPS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^登)

東條、長村らは、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) に対する臍帯血・臍帯由来 MSCs を用いた治療の開発を目的として以下の検討を行った。臍帯血ナイーブ CD4 陽性細胞から IL2/TGF- β /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、非臨床試験を行った。

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^登)

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^登・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^登らは、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TMとして、商品化の予定である。このメッシュにより、1g 当たりの臍帯から得られる MSCs 数は9-12 日間の培養にて、 $0.87 \pm 0.54 \times 10^6$ から $3.1 \pm 1.4 \times 10^6$ (n=4) と有意に増加した。培養期間は既報約21日であったが、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、 1.8×10^9 個の MSCs が得られた。これを Working cell として使用する手順とした。60kg 成人に 1×10^6 /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^登らは、ある試薬に数時間浸漬した後に凍結 (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 文)

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 文とともに 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 文は、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。

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。縣らも臍帯由来 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

BMP2,BMP3,BMP4,BMP5,BMP6,BMP7,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、縣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

(麦島・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⁺細胞 (1×10^4) 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⁺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⁺CD45⁻)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^登)

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- β /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思われた。

(2)基礎的研究：

骨髄に替わる MSCs の提供を目指し、臍帯由来 MSCs の幹細胞性、骨、神経系への再生能・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。骨形成能について、縣や竹谷らにより、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わかってきた。また、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比較的簡単で有用な方法と考えられ、今後の製剤の品質試験（ロットによる骨分化能力のサーベ

イ)に取り込める可能性がある。一方で、縣らが行ったヌードマウス頭蓋骨への臍帯由来 MSCs 移植実験において、骨形成が認められたことの意義は非常に大きい。すなわち、*in vitro* での骨分化誘導は難しいが、骨周囲への移植により自発的に骨分化した可能性が示唆された。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。竹谷らは、島根大学にて低フォスファターゼ症の患者に対して、母親からの骨髄移植および同じドナー骨髄由来 MSCs を移植後に輸注し、患児の骨形成が促進されることを報告している。しかし、母親は遺伝子学的に病的遺伝子に対してヘテロであり、フォスファターゼの活性が通常よりも低い。もし、HLA 拘束性がなく、正常な酵素を補充するという意味では健常児臍帯由来 MSCs は理想的のソースと思われる。但し、これまでは生着を目指して造血幹細胞移植+骨髄由来 MSCs であったが、結局は何度も MSCs の輸注が必要であった。臍帯由来 MSCs 移植の場合に、造血幹細胞としての臍帯血が必要か否かはバンクドナーサイズを考慮する上でも重要であり、今後の検討課題であろう。臨床試験としては、東大医科研にて調製凍結した臍帯由来 MSCs 土臍帯血を島根大学に空輸する体制を考えている。

海老原らは臍帯由来 MSCs の *in vitro* において軟骨へ分化能を証明した。現在、国内外で骨髄由来 MSCs (未分化状態) を直接損傷した膝へ注入する臨床試験が進められており、損傷部位の修復効果がある報告されている。今後非臨床試験を行うことによって、POC を得ることが重要である。

神経再生については、動物実験を主とし

て進められた。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。麦島・松本らは造血幹細胞増殖支持能について、臍帯、羊膜上皮および羊膜間質由来 MSCs を比較検討し羊膜にも造血幹細胞増殖支持能があること明らかにした。現在、生着不全マウスモデルを用いて、非臨床試験データを得つつある。

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 II 相試験) が進められている。東條・長村^登らは、臍帯由来 MSCs によるリンパ球増殖抑制活性は、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虎の門病院と連携して検

討する計画である。

以上、国産の安全な細胞性医薬品として臍帯由来 MSCs の臨床試験実施に向けて、非臨床試験を加速させる必要がある。

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・軟骨への分化能、造血幹細胞支持能が認められた。

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.*, 2013 (in press)
- 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.* in press, 2013
- 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(2):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.* 2013 (in press)
- 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, Mitsuiki 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, Wan J, 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(5):165-73.
- 23) 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*. 26,621-9, 2013
- 24) 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*. 88,446-6, 2013
- 25) Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, Naoe T, Taniguchi S, Kawa K, Nagamura T, Tabuchi K, Atsuta Y, Sakamaki H. Prognostic factors for acute myeloid leukemia patients with t(6;9)(p23;q34) who underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Leukemia*. 26,1416-9, 2012
- 26) Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, Naoe T, Taniguchi S, Kawa K, Nagamura T, Atsuta Y, Sakamaki H. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia with t(6;9)(p23;q34) dramatically improves the patient prognosis: a matched-pair analysis. *Leukemia*. 26,461-4, 2012
- 27) 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*. 2013 Jan 24. (印刷中)
- 28) Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. 19,e87-9,2013.
- 29) 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
- 30) Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kanda Y. Impact of the direction of HLA