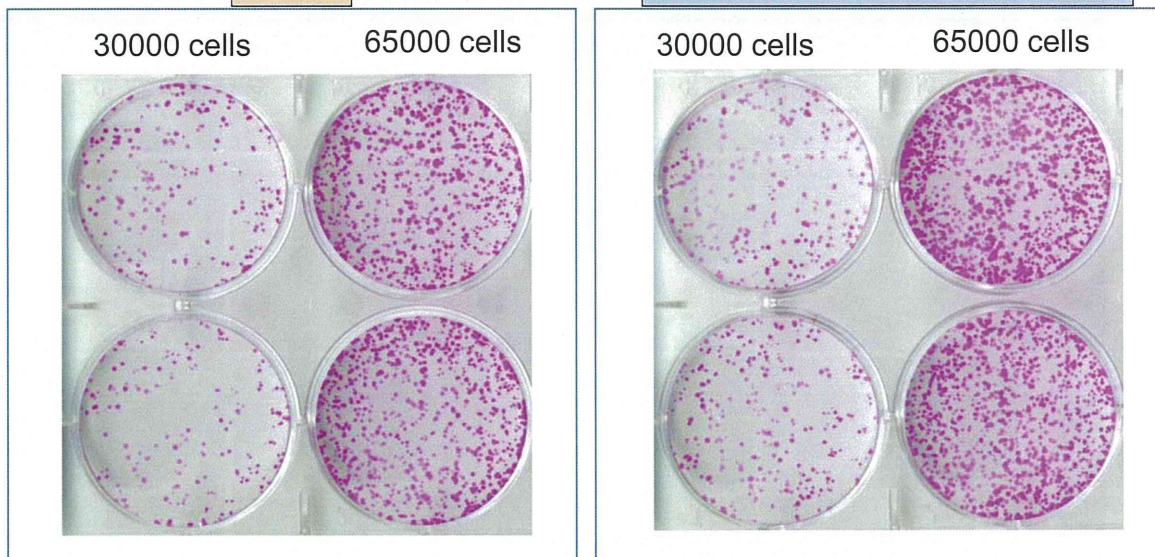


CFA結果

Ff-iPS 201B7

Control

クライオライブラリーで1週間保存後

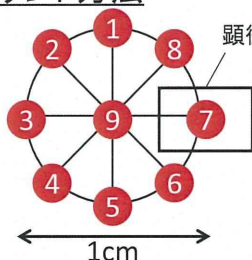


	Control				1週間保存後			
播種数	30000		65000		30000		65000	
コロニー数	261	272	732	704	345	328	792	852
CFE(%)	0.87	0.91	1.13	1.08	1.15	1.09	1.22	1.31
			Mean	0.996			Mean	1.193
			SD	0.110			SD	0.094

Oral epithelial cell line (OKF6/TERT)

8日間培養後の細胞数カウント結果

カウント方法



顕微鏡の視野(×5) 細胞を培養したウェルの中央を中心として直径1cmの円を描き、放射状に8か所点を取り中央と合わせて合計9か所の点を取る。それぞれの点を中央にして顕微鏡にて写真を撮り各視野に存在する細胞の数を数える。

	Control				Stock in the Cryolibrary				
播種数	1000		2000		1000		2000		
視野あたりの細胞数	1	2	39	266	176	47	361	91	0
	2	15	0	336	380	41	1	4	37
	3	49	78	35	600	86	3	144	181
	4	54	73	443	237	54	68	4	11
	5	158	31	96	1	445	0	0	534
	6	74	0	19	305	372	63	64	2
	7	36	146	233	20	83	416	193	87
	8	15	0	271	36	13	47	18	331
	9	55	209	250	438	19	98	131	780
9視野合計	458	576	1949	2193	1160	1057	649	1963	
1視野あたり平均	57		230		123		145		
播種数2000に換算	114		230		246		145		
平均/0.023cm ²	172				196				
1cm ² あたりの細胞数	7478				8522				

結 果

- クライオライブラリー中に1週間保存有無のサンプル間の比較試験において、iPSとOTERT細胞では、両者とも保管前後で生存率に影響はなく、細胞形状にも変化は見られず、免疫染色においても差異は全く認められなかった。またコロニー形成率は、ほぼ同様の結果となった。
- 以上のことから、ドライシッパーによる輸送とクライオライブラリーでの保管による細胞への影響はないと判断した。

		iPS 201B7		OTERT	
		Control	1週間保存後	Control	1週間保存後
細胞形状(位相差)		正常	正常	正常	正常
生存率		93.0%	95.5%	83.6%	81.1%
CFA		1.0%	1.2%	-	
1cm ² あたりの細胞数		-		差異無し	
免疫染色	Oct3/4	陽性	陽性	-	
	Nanog	陽性	陽性		
	P63	-		陽性	陽性
	K14			陽性	陽性

「iPS 細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備」

分担研究報告書

「体性幹細胞、iPS 細胞等を用いる臨床研究実施のための基盤技術」

研究分担者 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科学 教授
研究分担者 齋藤充弘 大阪大学医学部附属病院未来医療開発部 講師
研究協力者 宮川 繁 大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科学 講師

【研究要旨】

すでにヒト幹細胞臨床研究指針に適合した臨床研究として実施している、重症心不全に対する骨格筋筋芽細胞シート移植による再生細胞治療法の安全性・有効性を検証するとともに、細胞加工製品の安定生産のためのプロトコルを検討し、培養プロセスの安定化を図るため引き続きデータの蓄積を進める。さらに、高効率な心筋細胞誘導を目指した培養技術確立を目指し、最適と考えられるサイトカインあるいは薬剤の組み合わせ等の選択を行なった結果、Wnt 系シグナル調節と心筋細胞選択培地を用いることで高効率に心筋細胞が誘導可能な方法が確立できた。

A. 研究目的

我々は、50 例近い心臓移植と 200 例を超える補助人工心臓治療を経験する国内有数の重症心不全治療の拠点である。しかし、多数の重症心不全患者を目の前に置換型治療の限界と再生型治療の必要性を痛感し、自己骨格筋由来の筋芽細胞シートによる心筋再生治療法を開発することにより補助人工心臓離脱成功例を世界で初めて報告した。さらに 20 例以上の臨床例の経験から細胞シート移植技術を確立した。しかし筋芽細胞シートの機序は HGF 等によるパラクライン効果で、残存心筋細胞が少ない症例に対して有効性は低い。重症心不全例に対しては心筋と電気的に結合し直接心機能を向上しうる心筋細胞の大量補充が根治的治療につながると思われ、その細胞源として iPS 細

胞が最も期待されている。

研究分担者らは臨床研究で用いている筋芽細胞などの体性幹細胞ならびに iPS 細胞から心筋細胞、血管系細胞等の特定の組織細胞に分化誘導させたものについては、次年度に運用開始する予定のクライオライブラリで保存することを考えており、今年度は臨床研究の推進ならびに iPS 細胞からの心筋分化誘導法の確立や最適化について行った。

B. 研究方法

1. 臨床研究の推進と製造プロセスの確立

すでにヒト幹細胞臨床研究指針に適合した臨床研究として実施している、重症心不全に対する骨格筋筋芽細胞シート移植による再生細胞治療法の安全性・有効

性を検証するための試験を開始した。

2. iPS 細胞由来心筋細胞への分化誘導の確立

高効率な心筋細胞誘導を目指した培養技術確立を目指し、最適と考えられるサイトカインあるいは薬剤の組み合わせ、共培養系等の選択を研究分担者と共同で行なった。

C. 研究結果

1. 臨床研究の推進と製造プロセスの確立

本院を受診中の重症心不全患者で本臨床研究参加を希望する2名の患者およびその家族に対して試験内容の説明・同意取得後、骨格筋の採取を実施した。骨格筋筋芽細胞の培養は未来医療センター内細胞調整施設で標準手順書に従い実施した。規定細胞数まで増殖させた細胞は、凍結保存し移植日程に合わせて解凍・細胞シート化した。移植技術についてはこれまで実施してきた臨床研究を踏まえ、フィブリン糊で補強する方法で行った。引き続き、症例数を重ね本研究の安全性・有効性の検証を進める

2. iPS 細胞由来心筋細胞への分化誘導の確立

ヒトiPS細胞10000個/mlで浮遊培養し、4日目からWntシグナルを活性化して分化誘導開始、8日目からWntインヒビターによりシグナルを抑制した。10目以降より接着培養へ変更し、心筋細胞選択培地にて5日間培養することで、a-Actinin、NKX2.5、TNT染色でそれぞれ約90%の純度の心筋細胞を獲得できるプロトコルが確立できた。

D. 考察

これまで実施した臨床研究と今回新たに実施した2例での培養経験から、被験者の病歴等の背景因子と細胞増殖、純度等の相関が認められなかったことから、引き続き培養データを蓄積し製造プロセスの安定化を図る。さらに、筋芽細胞純度と有効性を比較検証できるデータの蓄積も合わせて進める。

iPS 細胞からの心筋分化誘導法は様々な方法が報告されているが、細胞株の状態や継代培養数等で分化誘導の効率が大きく異なる。本法においては、Wnt シグナルの ON-OFF のタイミングと添加量を調整することで、細胞株に適した分化誘導法が検討できる。

E. 結論

臨床研究用細胞の培養プロセスの安定化を図るため引き続きデータの蓄積を進める。さらに、iPS 細胞からの心筋分化誘導法において、Wnt 系シグナル調節と心筋細胞選択培地を用いることで高効率に心筋細胞が誘導可能な方法が確立できた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成 25 年度）

論文発表

1. Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart. Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Miki K, Ito E, Sougawa N,

Kawamura T, Daimon T, Shimizu T,
Okano T, Toda K, Sawa Y.
Circulation. 2013 Sep 10;128(11
Suppl 1):S87-94.

- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を
含む）
無し

分担研究報告書

「iPS 細胞からの骨・軟骨系細胞への培養技術を最適化するための基盤整備」

研究代表者 吉川秀樹 大阪大学大学院医学系研究科整形外科学教室 教授
研究協力者 名井 陽 大阪大学大学院医学系研究科整形外科学教室 准教授
研究協力者 宮本 諭 大阪大学大学院医学系研究科整形外科学教室 大学院生
研究協力者 浜口智志 大阪大学工学部アトミックデザイン研究センター 教授

【研究要旨】

マウス iPS 細胞株を用いて、無血清下でサイトカイングラディエント法による骨芽細胞系細胞への分化誘導法に関して基礎的検討を行った。iPS 細胞から骨芽細胞系細胞への分化誘導培養は、EB 形成を経ずに平面培養のみで行い、中内胚葉系細胞を経て、中胚葉系細胞、間葉系前駆細胞へと誘導を行った。目的細胞としては骨芽細胞系細胞への誘導を試み、誘導条件の検討を行った。間葉系前駆細胞誘導時の分化指向性および分化効率に最も重要であるのは、誘導開始時の播種密度であることが明らかになった。この際、無血清培地を基本として種々のサイトカインおよび低分子化合物を添加するだけでなく、誘導途中のある段階においては低酸素培養が欠かせないことが示された。また、目的細胞への高効率な増殖および分化誘導を行うためには、荷電処理された培養皿の併用が不可欠であり、骨芽細胞系細胞への分化誘導に有効に働くことが明らかとなった。

A. 研究目的

再生治療ならびに疾患研究の臨床応用へのソースとして、さまざまな体細胞から iPS 細胞を誘導・作製する技術が開発されてきた。今後は、iPS 細胞から種々の組織への培養誘導・再生技術の確立が急務とされている。iPS 細胞から目的細胞へ誘導する際、誘導効率を左右する目的細胞とは異なる系列細胞への分化、また腫瘍化の恐れがある未分化な多能性幹細胞を生じることが多く、分化多能性を有するがゆえに細胞系譜の制御がきわめて難しいという大きな課題がある。

本研究では、iPS 細胞を高効率に中胚葉系細胞、間葉系前駆細胞へ誘導し、あるいは

は体性幹細胞培養骨および軟骨を作製する基盤技術の開発を目的とする。

B. 研究方法

iPS 細胞から EB 形成を経ずに平面培養を行い、中内胚葉系細胞から中胚葉系細胞を経て、有血清あるいは無血清培地での種々のサイトカインおよび低分子化合物添加による間葉系前駆細胞への培養誘導条件を検討した。とくに目的細胞として骨芽細胞系細胞への分化誘導を行い、培養皿の表面処理と誘導培養条件の組み合わせについて、分化指向性および分化誘導効率に関して基礎的検討を行った。

C. 研究結果および考察

iPS 細胞から間葉系前駆細胞への誘導を高効率に行うためには、分化誘導を開始する時点での細胞の播種密度が最も重要であることが示された。ES 細胞の平面培養による分化誘導法で推奨されている培養皿の各種コーティングだけでは、培養誘導は不十分であり、低温プラズマ法をはじめとする表面加工処理が重要であることが示された。とくに荷電処理された培養皿と低酸素培養条件の組み合わせにより誘導効率が著しく向上することが明らかとなった。また、遺伝子発現解析により、誘導細胞は、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞や MC3T3-E1 細胞と骨芽細胞分化マーカーの発現が同傾向であったことを確認した。今後は、誘導細胞を実験動物生体内に移植した場合、骨組織への適切な分化を遂げるのか否か検証が必要である。また、造腫瘍性試験による安全性と *in vivo* での骨再生能を評価することが今後の課題である。

D. 結論

iPS 細胞から間葉系前駆細胞への分化誘導において、細胞の播種密度、低酸素培養および培養皿の表面加工処理などの因子が必須であることが明らかになった。これらの因子を組み合わせた技術により、高効率でかつ安全に分化誘導を行うことを可能にし、サイトカイングラディエント法による無血清培地での骨芽細胞系細胞の誘導が可能となった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Outani, H., Okada, M., Yamashita, A., Nakagawa, K., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. PLoS ONE, 8:e77365, 2013.
 - 2) Honda, H., Tamai, N., Naka, N., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in Rattus norvegicus calvaria defect model. Journal of Artificial Organs, 16:305-315, 2013.
2. 学会発表
 - 1) 宮本 諭、吉川秀樹、名井 陽 : iPS 細胞から骨芽細胞系細胞への分化誘導システムの確立、第 31 回日本骨代謝学会 (2013 年 5 月 30 日、神戸)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
（再生医療関係研究分野））

「iPS 細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備」

分担研究報告書

「幹細胞のストック実施と管理」

研究代表者	森 正樹	大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座消化器外科学 教授
研究協力者	石井秀始	大阪大学大学院医学系研究科 消化器癌先進化学療法開発学寄附講座 教授
研究協力者	今野雅允	大阪大学大学院医学系研究科 消化器癌先進化学療法開発学寄附講座 助教

【研究要旨】

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に準拠した形で、確実な保管、情報管理を達成するための基盤技術の整備として、iPS/ES 細胞の品質を保全した管理する技術の新構築する。具体的に iPS/ES 細胞の生殖細胞系列への寄与に関わる高度に保存されたゲノム領域を指標としてエピゲノム制御に基づく転写ネットワークを網羅的に解明し、その下流としてのメカニズムを明らかにした。その機構には iPS/ES 細胞の代謝制御に関わる一連の分子制御が解明され、嫌気性解凍系と酸化リン酸化の分子メカニズムを明らかにすることができた。ミトコンドリアの質を指標として iPS/ES 細胞の品質を評価するための基盤を構築した。

A. 研究目的

高品質の iPS/ES 細胞の構築と管理を目指して研究を進めることは、将来の再生医療の実現に向けて極めて重要である。一方、私達の研究から特定のゲノム領域に高度されているマイクロ RNA が iPS/ES 細胞の品質を規定する上で重要である知見を得てきた。そこで本事業ではマウス及び人の重要なゲノム領域に注目し高品質の iPS 細胞の管理を目的として分子論的な究明を行った。もって近未来の医学応用の具現化を目指して基盤を構築する。

B. 研究方法

1. マウスゲノムの解析

私達の従来の研究と合わせて比較的品質の高い iPS/ES 細胞のゲノムにおいて保存されている領域の網羅的な解析を進めた。重要ゲノム領域からマイクロ RNA を抽出した。

2. 機能解析

iPS/ES 細胞の試験管内での分化誘導の条件下において上記のマイクロ RNA を研究し、下流の分子を探索した。

C. 研究結果

1. マウスゲノムの解析

マウスと人のゲノム比較によって特定のマイクロ RNA を分子論的に究明した。

2. 機能解析

マイクロ RNA の顆粒の解析の結果、従来知られていなかった新しいパスウェイを明らかにすることができた。それらは既存の遺伝子のスイッチオン・オフに関わる機構であり細胞の代謝制御を通じて iPS/ES 細胞の質の維持に大きく関わることが明らかとなった。特に、マイクロ RNA によって制御される酸化リン酸化の鍵酵素がミトコンドリアの機能を介して iPS/ES 細胞の維持に重要な役割を果たす

ことを明らかにした。この技術は iPS/ES 細胞の効率の良い誘導と初期の発生分化誘導の制御にも重要であることが明らかとなった。

D. 考按

我々の研究によりゲノムのクロマチン状況から代謝制御にまで至る新しい分子メカニズムとしてマイクロ RNA を軸とした機構を明らかにすることができた。マイクロ RNA は探査の核酸であり人工合成可能であることから創薬展開が大きく期待される。

E. 結論

我々は開発中の上記の新技术を完成させることにより単細胞ならびに iPS 等の確実な保存を実現するための基盤を構築したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogino, T., Nishimura, J., Barman, S., Kayama, H., Uematsu, S., Okuzaki, D., Osawa, H., Haraguchi, N., Uemura, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Takeda, K., Doki, Y., Mori, M. Increased Th17-Inducing Activity of CD14+ CD163low Myeloid Cells in Intestinal Lamina Propria of Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 145(6):1380-1391, 2013.
- 2) Kawamoto, K., Konno, M., Nagano, H., Nishikawa, S., Tomimaru, Y., Akita, H., Hama, N., Wada, H., Kobayashi, S., Eguchi, H., Tanemura, M., Ito, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. CD90- (Thy-1-) high selection enhances reprogramming capacity of murine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Dis Markers*, 35(5):573-579, 2013.
- 3) Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Ohta, K., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M. CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int J Oncol*, 43(2):425-430, 2013.
- 4) Ohta, K., Haraguchi, N., Kano, Y., Kagawa, Y., Konno, M., Nishikawa, S., Hamabe, A., Hasegawa, S., Ogawa, H., Fukusumi, T., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Noguchi, Y., Ozaki, M., Kudo, T., Sakai, D., Satoh, T., Fukami, M., Ishii, M., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Depletion of JARID1B induces cellular senescence in human colorectal cancer. *Int J Oncol*, 42(4):1212-1218, 2013.
- 5) Ohtsuka, M., Yamamoto, H., Oshiro, R., Takahashi, H., Masuzawa, T., Uemura, M., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Yamasaki, M., Takemasa, I., Miyata, H., Mizushima, T., Takiguchi, S., Doki, Y., Mori, M. Concurrent expression of C4.4A and Tenascin-C in tumor cells relates to poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 43(2):439-446, 2013.
- 6) Okada, K., Fujiwara, Y., Takahashi, T., Nakamura, Y., Takiguchi, S., Nakajima, K., Miyata, H., Yamasaki, M., Kurokawa, Y., Mori, M., Doki, Y. Overexpression of forkhead box M1 transcription factor (FOXM1) is a potential prognostic marker and enhances chemoresistance for docetaxel in gastric cancer. *Ann Surg Oncol*, 20(3):1035-1043, 2013.
- 7) Suzuki, Y., Haraguchi, N., Takahashi, H., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Ishii, H., Doki, Y., Mori, M., Yamamoto, H. SSEA-3 as a novel amplifying cancer cell surface marker in colorectal cancers. *Int J Oncol*, 42(1):161-167, 2013.

- 8) Iwagami, Y., Eguchi, H., Nagano, H., Akita, H., Hama, N., Wada, H., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Mori, M., Doki, Y. miR-320c regulates gemcitabine-resistance in pancreatic cancer via SMARCC1. *Br J Cancer*, 109(2):502-511, 2013.
- 9) Nishikawa, S., Konno, M., Hamabe, A., Hasegawa, S., Kano, Y., Ohta, K., Fukusumi, T., Sakai, D., Kudo, T., Haraguchi, N., Satoh, T., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. Aldehyde dehydrogenase high gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy. *Int J Oncol*, 42(4):1437-1442, 2013.

2. 学会発表

- 1) 森正樹：消化器癌の癌幹細胞、第 25 回 関越 DIF 研究会、2013 年 1 月 28 日 埼玉
- 2) 森正樹：進行癌はなぜ治りにくいのか？、第 27 回大分「乳癌のつどい」、2013 年 3 月 16 日 大分
- 3) 森正樹：固形癌の癌細胞について、第 26 回 肝臓フォーラム〈東部〉、2013 年 7 月 6 日 東京
- 4) 森正樹：悪性腫瘍の外科的治療・放射線治療、第 13 回 日露医学交流国際シンポジウム、2013 年 10 月 31 日～11 月 1 日 大阪

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

「iPS 細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備」

分担研究報告書

「小児科領域におけるヒト iPS 細胞をもちいた再生医療を実現化するための
技術基盤の確立」

研究代表者 大藪 恵一 大阪大学大学院医学系研究科小児科学教室 教授
研究協力者 北畠 康司 大阪大学大学院医学系研究科小児科学教室 助教

【研究要旨】

ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）技術の発明により、ヒト難病の病態解析と再生医療への期待はますます高くなりつつある。しかしながらそのリソースとして多くもちいられる皮膚線維芽細胞では皮膚生検が必須であり、その侵襲ストレスは小児では大きな問題となる。また血液の採取については、とくに新生児の場合は容易に貧血を来すため、その適応について慎重な検討が必要となる。したがって新生児・小児において‘安全かつ非侵襲的な採取’を可能にする組織・細胞をリソースとした iPS 細胞の樹立法を確立することは、今後 iPS 細胞の安定供給と臨床利用の基盤整備に大きく資するものと思われる。

一方、臍帯血や臍帯・胎盤などは、胎児とおなじゲノム構造を持つ一方で、分娩後は廃棄される組織である。羊膜組織は眼科領域に於ける再生医療で活用され、また臍帯血幹細胞による移植療法も広く行われており、その有用性および安全性が確立している。これら胎児組織をもちいたヒト iPS 細胞の樹立・保管・分化技術を確立することができれば、児へ侵襲を加えることなくリソースを得ることができ、また疾患患者・健常児の検体を豊富に集めることができるであろう。そこで本研究では、これらの胎児組織のうち臍帯血に注目し、胎児組織由来ヒト iPS 細胞を安全に樹立・保管・分化させることのできる系の構築を目指す。これにより iPS 細胞を安定的に供給することが可能となり、小児のみならず成人を対象としたより広い臨床応用が可能になると期待され、今後の再生医療の発展に大きく寄与するものと考えられる。

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞（以下、iPS 細胞）技術の発明により、倫理的問題を克服しつつ免疫学的拒絶反応を回避した再生医療の可能性が開かれた。さらに近年の技術的進歩により iPS 細胞の樹立効率は向上し、癌化などのリスクは大きく低減されてきていることから、臨床応用への期待はいよいよ

高くなりつつある。しかし一方で、そのリソースとして多くもちいられる皮膚線維芽細胞や血液細胞の採取に関しては、皮膚生検や採血が不可避であることから、その侵襲性と時に与えるストレスについては、こと小児科領域において無視できない問題となる。

臍帯血や臍帯・胎盤などは、胎児とおな

じゲノム構造を持つ一方で、分娩後は廃棄される組織であるため、臍帯血幹細胞や羊膜組織などはすでに再生医療・移植医療領域において広く活用されている。これら胎児組織をもちいたヒト iPS 細胞の樹立・保管・分化技術を確立することができれば、児への侵襲を加えることなくリソースを得ることができ、また疾患患者のみならず健康児の検体も豊富に集めることができるであろう。そこで本研究では、これらの胎児組織のうち臍帯血に注目し、胎児組織由来ヒト iPS 細胞を安全に作成・保管・分化させることのできる系の構築を目指す。これにより iPS 細胞を安定的に供給することが可能となり、小児のみならず成人を対象としたより広い臨床応用が可能になると期待され、今後の再生医療の発展に大きく寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

1. 保護者からの同意に基づいた臍帯血の採取ならびにヒト iPS 細胞の樹立

臍帯血中に存在する単核球は、胎児と同じゲノム構造をもつ。分娩予定の胎児の保護者に対してあらかじめ説明を行い、同意を得られた場合にのみ分娩時に臍帯血の採取を行った。この臍帯血サンプルより単核球を精製し、山中 4 因子を搭載した持続発現型センダイウイルスベクター SeV-KOSM-302L (産業技術総合研究所 中西真人副研究センター長より供与) をもちいてリプログラミング因子の導入を行った。感染後 10-14 日目にコロニーをピックアップし、クローンの樹立を行った。

2. 樹立されたヒト iPS 細胞の未分化性・多能性の確認と再生医療リソースとしての有用性の確認

樹立された iPS 細胞クローンについて、未分化マーカーに対する免疫染色や

QRT-PCR による遺伝子発現の確認を行った。また免疫不全マウスの精巣への移植によって奇形腫 (テラトーマ) 作製実験を行い、その組織を監察することで、三胚葉への分化誘導能を確認した。

C. 研究結果

大阪大学医学部附属病院・総合周産期母子医療センターにて分娩予定の胎児の保護者に対して説明を行い、そのうち 5 名から臍帯血採取について同意を得た。分娩時に 7ml の臍帯血を採取し EDTA の入った採血管に入れ氷冷した。12 時間以内に単核球分離を行い、持続発現型センダイウイルスベクター SeV-KOSM-302L を MOI=2 で 2 時間、室温にて感染させた。感染後約 10 日でコロニーが出現し、さらに 1 週間ほどで十分な大きさとなったためコロニーをピックアップし、クローンの樹立を行った。この樹立時にセンダイウイルスに対する siRNA (L527 siRNA) を添加することにより、SeV ベクターの除去を行った。

各症例につき 30 個以上のコロニーが得られたが、そのうち各 5 クローンずつを iPS クローンとして樹立・保管を行った。またこれらすべてのクローンについて QRT-PCR を行い、センダイウイルスベクターが除去されていることを確認することができた。

このようにして樹立されたヒト iPS 細胞はいずれもアルカリホスファターゼ陽性であり、また Nanog, Oct-3/4, SSEA-3, E-cadherin, TRA-1-60 の各未分化マーカー陽性であることが確認できた。また QRT-PCR によって Nanog, Oct-3/4, Klf4, hTERT の発現を確認することができた。さらに SCID マウス (雄 8 週齢) の精巣へ iPS 細胞を移植し奇形腫形成を行い、三胚葉への分化を調べることで多能性を持つ

ていることを確認することができた。このように樹立された臍帯血由来ヒト iPS 細胞は、ガラス化法による凍結融解を繰り返しても細胞株の維持が可能であり、さらに ROCK 阻害剤をもちいることで細胞の生存率を向上することができた。

D. 考察

臍帯・臍帯血・胎盤・羊膜などの胎盤組織は、分娩後は廃棄される組織である。これらを利用することで痛みによる侵襲ストレスを回避することが可能となる。今回の研究により臍帯血由来ヒト iPS 細胞の樹立が可能であり、それらが未分化性・多能性を保持していることを確認することができた。今後さらに造血細胞系への分化誘導を行いその特性を詳細に解析することにより、再生医療・病態解析のリソースとしての可能性を調べる予定である。

E. 結論

我々が構築した臍帯血からのヒト iPS 細胞樹立法により、侵襲ストレスを考慮する必要がある小児においても効率よく iPS 細胞作製が可能であることを確認することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

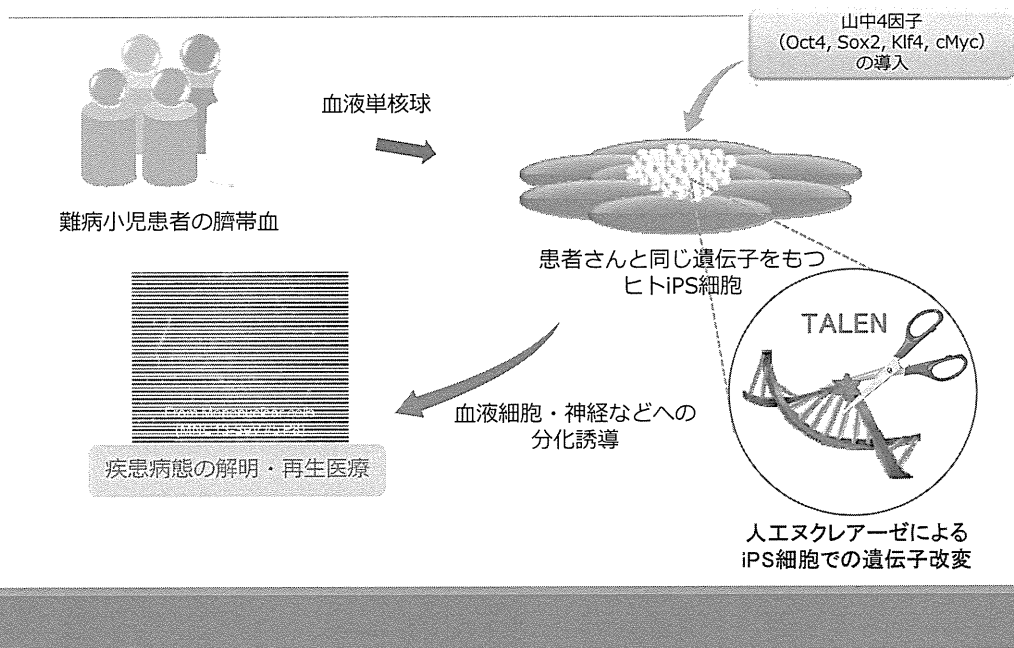
2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

iPS細胞をもちいた小児難病の病態解明



臍帯血からのiPS樹立

持続発現型センダイウイルス (産総研 中西ラボ作成)

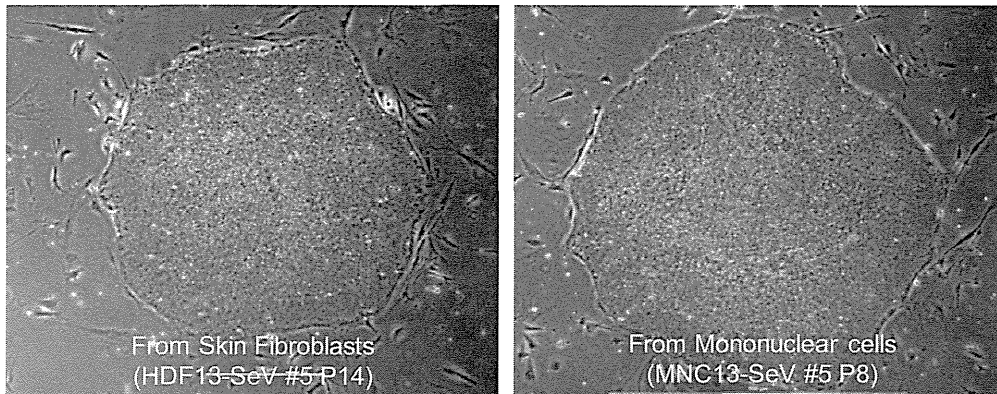
- SeV-KOSM302L vector



1. 細胞傷害性と持続性に関する変異・欠失を導入し持続感染型としたもの
2. 4つの初期化転写因子を同一ベクターに包含
3. iPS細胞樹立後のウイルス除去；
 - L遺伝子の末端にmiR302a 標的配列 (x4) を付加
 - L遺伝子に対するsiRNAを投与

臍帯血からのiPS樹立

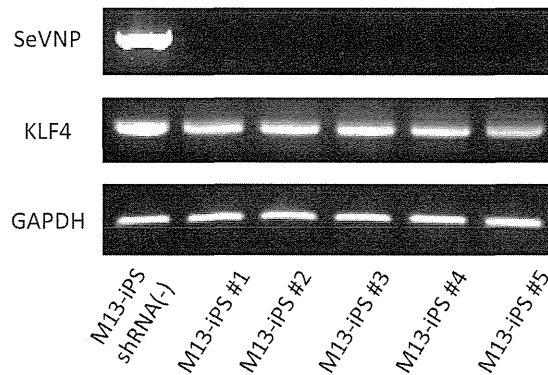
- 単核球分画の細胞 7.0×10^5 個 (IMDM培地; 凍結保存から起こして24h後)
- SeV-KOSM302LウイルスをMOI=3で2h感染
- 感染5日目前後にコロニー出現 (非常に早く、コロニー数も多い)
- 7日~12日でピックアップ可能



臍帯血からのiPS樹立

siRNA処理後のSeV除去

- siRNA処理 (-) / miR302a 標的配列 (-) ; 2ヶ月経ってもSeV消失せず
- siRNA処理 (+) / miR302a 標的配列 (+) ; ほぼすべてのコロニーでSeV消失



分担研究報告書

「慢性期完全脊髄損傷に対する自家嗅粘膜移植の臨床効果についての検討」

研究代表者 吉峰俊樹 大阪大学大学院医学系研究科脳神経外科学 教授

研究協力者 岩月幸一 大阪大学大学院医学系研究科脳神経外科学 講師

【研究要旨】

iPS 細胞をはじめとした幹細胞の開発が進む中、不治と考えられてきた脊髄損傷にも希望が見いだされてきた。しかしながら、各種の幹細胞の脊髄損傷への効果は、グリア瘢痕が形成されるまでの急性期または亜急性期に限定されており、慢性期であるほとんどの既存の脊髄損傷の患者さんに対する活路は見いだされていない。

生来脊髄は軸索伸長に拒絶的であり、すでに瘢痕組織化している慢性期脊髄損傷においては、軸索伸長のための足場を作ることが再生に必要である。嗅粘膜中には神経細胞を補填しうる神経幹細胞と神経軸索伸長作用を有する嗅神経鞘細胞が存在し、また嗅粘膜中で神経再生が活発に起こっていることから、嗅粘膜自身が神経軸索再生の足場として有用であると考えられる。ラットを用いた基礎的研究でもその有効性が確認されており、嗅粘膜は慢性期脊髄損傷に対する理想的な移植片であると考えられている。我々は脊髄損傷慢性期に対する自家嗅粘膜移植法を実施しており、2011 年には先進医療の指定を受け現在も基礎および臨床研究を継続している。4 症例中 1 例で不完全ながら歩行の再獲得に成功している。

本法の臨床研究は、その適応病態、至適リハビリテーションの解明とともに、本法の改良を目指して継続中である。

また本法は慢性期の完全脊髄損傷に対する再生療法として、現在のところ唯一その効果が確認されつつある方法であるが、本組織中に失った細胞の補填を期待される幹細胞はわずかであり、有効性を高める為には iPS 細胞をはじめとした幹細胞を組織に付加することが検討されている。これに先立ち、組織移植による各細胞間の三次元的評価系の確立と、本組織移植による経シナプスの神経接続の有無を調べる必要がある。

A. 研究目的

自家嗅粘膜移植法は、現時点で慢性期完全脊髄損傷に対して唯一有効性が確認されつつあるが、未だ至適適応症、至適リハビリテーションは不明であり、引き続き臨床研究の継続が必要である。筑波大学のロボット HAL を用いてのリハビリテーショ

ンもそのプログラムに入れている。また将来の iPS 細胞をはじめとした幹細胞の付加を想定した、評価系の確立に加え、シナプスを介した神経接続の有無の確認が急務である。

B. 研究方法

自家嗅粘膜移植法の臨床研究方法は、多施設における共同研究を構築している。術前・術後のリハビリテーションは和歌山県立医大、那智勝浦町立温泉病院にて行う。評価系の DTI, fMRI の画像取得・データ解析は阪大医学部附属病院にて行う。DTI については、すでに基礎的解析に着手している。

術前リハビリと嗅粘膜移植で約半年、術後リハビリを 1 年とするため、患者一人当たり 1.5 年を予定している。目標症例は、初年度と二年目は年間 5 名、最終年度は二年目後半の移植患者のリハビリを行う。

- I. 下肢完全運動麻痺を呈する、受傷後 6 カ月以上経過した脊髄損傷患者において、嗅粘膜移植適格基準をすべて満たす者で、本研究に対するインフォームドコンセントを行う。
- II. 移植前スクリーニング検査（診察項目；術前の運動、感覚機能の評価 ASIA scoring、バイタルサイン、検査項目；MRI whole spine；損傷部位の評価、頭部 CT Scan；嗅粘膜評価、嗅覚検査、血液検査、神経生理学的検査、精神心理学的検査、呼吸機能検査、鼻腔細菌検査）、リハビリテーション実施病院にて移植前リハビリテーション評価。
- III. 術前リハビリテーション；6 カ月実施。廃用した大腿四頭筋、大腿二頭筋を刺激し、収縮力回復と筋肉量増加を図り、脊髄前角細胞の変性・下位運動神経の荒廃を予防する。
- IV. 嗅粘膜移植術；全身麻酔下側臥位で、脊髄損傷部硬膜を切開し、癒痕損傷脊髄組織を摘出し移植床を作成する。自家嗅粘膜組織を内視鏡下に摘出し、

洗浄後、細切り、移植床に移植する。

- V. 術後リハビリテーション；移植後約 2 週後から開始。筋電位計を用い、バイオフィードバックを利用して、腸腰筋、大腿四頭筋、ハムストリング等で随意的な筋放電の誘発を行う。長下肢装着装具を用いた高頻度・高負荷の積極的歩行訓練を実施する。導出筋電位で駆動する HAL も活用する。装具使用で平行棒内歩行・歩行器歩行・ロフストランド歩行、さらに支持なし方位訓練、水中での膝歩行訓練、つりさげ型免荷装置も使用する。
- VI. DTI；脊髄移植部を含めた上下 3 椎体以上の DTI (MPR25 軸)を 3.0T GE 社 MRI を用いて撮影する。Diffusion Toolkit, TrackVis soft を用いて画像解析を行う。施行日は、術前スクリーニング検査、術前リハビリ終了時、術後 7 日、12,24,48 週に、阪大医学部附属病院放射線部にて実施する。
- VII. fMRI(機能的核磁気共鳴装置)；3.0T GE 社 MRI を用いて、右下肢運動、運動イメージタスクのブロックデザインを用いて阪大医学部附属病院放射線部にて実施。阪大脳外科で SPM8 soft を用いて画像解析を行う。脳賦活部位の経時変化と、下肢運動機能回復の相関を探る。施行日は、術前リハビリ終了時、術後 24,48 週に、阪大医学部附属病院放射線部にて実施する。
- VIII. 神経生理学検査（筋電図、体性感覚誘発電位、運動誘発電位）；術後 4,12,24,36,48 周に施行。Spine MRI；術後の出血、新生物の

発生の有無の検査。術後、7日、2,4,12,24,36,48週に施行。泌尿器科的観察；尿意、自排尿、膀胱機能検査を術後12,24,48週に施行する。運動、感覚機能評価(ASIA scoring)、術部局部観察、嗅覚検査は、術後入院中、および上記検査時に施行する。

C. 研究結果

臨床研究においては、現在データを蓄積中であり、下肢痙縮の有無などが良好な結果に關与する可能性が示唆され、これについては既に論文化している。

基礎研究については、三次元的評価系についてはこれを確立し、現在行っている幹細胞を嗅粘膜に付加する基礎実験の評価系に利用している。三次元評価系については、既に論文化した。経シナプスの神経接続の有無については、嗅粘膜移植においてこれが起こりうることを証明した。これも論文化した。

D. 考按

臨床研究において、慢性期完全脊髄損傷における治療法にはじめて可能性を示し得た。しかしながらその効果は限定的である。本法の改良に幹細胞付加が期待されており、これの基礎研究における評価法等が確立されつつある。今後iPS細胞、脂肪幹細胞、骨髄間質細胞などの幹細胞を付加して、本法の可能性を広げたい。

E. 結論

嗅粘膜移植法は一定の成果を上げつつある。これの改良を目指し、幹細胞付加の臨床応用に向けた準備を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koichi Iwatsuki et al.
Transplantation of olfactory mucosa as a scaffold for axonal regeneration following spinal cord contusion in rats. *Neuroscience & Medicine*, 2013, 4, p112-116
- 2) Koichi Iwatsuki, Toshiki Yoshimine, Yoshiyuki Sankai, Fumihiro Tajima, Masao Umegaki, Yu-Ichiro Ohnishi, Masahiro Ishihara, Koshi Ninomiya, Takashi Moriwaki. Involuntary muscle spasm expressed as motor evoked potential after olfactory mucosa autograft in patients with chronic spinal cord injury and complete paraplegia. *J. Biomedical Science and Engineering*, 2013, 6, p908-916
- 3) Yu-ichiro Ohnishi, Koichi Iwatsuki et al. Adult Olfactory Sphere Cells are a Source of Oligodendrocyte and Schwann Cell Progenitors *Stem Cell Research in Press*
- 4) Masahiro Ishihara, Noriko Mochizuki-Oda, Koichi Iwatsuki, Haruhiko Kishima, Yu-ichiro Ohnishi, Takashi Moriwaki, Masao Umegaki, Toshiki Yoshimine. Primary olfactory mucosal cells promote axonal outgrowth in a three-dimensional assay. *Journal of Neuroscience Research in press*
- 5) Takashi Moriwaki, Koichi Iwatsuki, Yu-ichiro Ohnishi, Koshi Ninomiya, and Toshiki Yoshimine. Presence of trans-synaptic neurons derived from olfactory mucosa

transplanted after spinal cord injury.
Spine in press

2. 学会発表

- 1) 第8回 International Society for Stem Cell Research in San Francisco
Regeneration of cortical axons into the three-dimensional gel containing olfactory cells. Masahiro Ishihara, Koichi Iwatsuki, Noriko Mochizuki-Oda, Haruhiko Kishima, Toshiki Yoshimine. Department of Neurosurgery, Osaka University Medical School, Osaka, Japan
- 2) 第8回 International Society for Stem Cell Research in San Francisco
TRANSPLANTATION OF OLFACTORY MUCOSA INCLUDING NEURAL STEM CELL GRAFTING FOLLOWING SPINAL CORD INJURY PROMOTES RECOVERY IN RAT. Koichi Iwatsuki, Toshiki Yoshimine, Masao Umegaki, Kazuhiro Yoshimura, Masahiro Ishihara, Yu-ichiro Ohnishi Department of Neurosurgery, Osaka University Medical School, Osaka, Japan
- 3) 7th Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration
2010 9/17-18、Yonsei Univ (ソウル) :
Olfactory mucosal cells promote axonal regeneration in a newly developed vitro model. 発表者：石原正浩(Masahiro Ishihara, Koichi Iwatsuki, Noriko Mochizuki-Oda, Haruhiko Kishima, Yuichiro Onishi, Masanori Aoki*, and Toshiki Yoshimine.)

- 4) 25th NASS annual meeting 2010 Oct 5-9, Orange country spine convention center-Orland, FL, USA Olfactory mucosa transplantation for spinal cord injury in rats, Koichi Iwatsuki et al.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし