

（総括・分担）研究報告書

「再生アソシエイト細胞による iPS 細胞移植時の免疫寛容治療研究」

研究代表者 浅原 孝之（東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科学 教授）

研究要旨：本プロジェクト事業は、再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果を確認・最適化し、iPS 細胞由来組織移植時における再生環境治療法を開発し、iPS 細胞由来心筋細胞シート（拠点大阪大学：澤グループ）治療への応用を目指すものである。東海大学・大阪大学・順天堂大学それぞれの研究進捗を調整し、製品再生アソシエイト細胞を用いた前臨床研究を目標としてきた。H26 年度の目標は、再生アソシエイト細胞の *in vivo* および *in vitro* での免疫寛容作用の証明、確立したヒト・マウス再生アソシエイト細胞培養法およびその評価法の治療実験への応用開発と、臨床検体での再生アソシエイト細胞培養データの集積である。同種同系移植実験から同種異系移植実験へと移行し、再生アソシエイト細胞の血管再生・抗炎症効果とともに免疫寛容作用が確認され、他の研究結果も合わせ、今年度の目標はほぼ達成している。来年度には、この移植実験を同種異系 iPS 細胞由来細胞移植実験に発展させていく。

研究分担者名

増田治史（東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学 准教授）

福嶋五月（大阪大学医学部心臓血管外科 助教）

田中里佳（順天堂大学医学部形成外科学 准教授）

果を検討した。Stimulator 細胞としてドナー C57BL/6 マウスの脾臓細胞（SPCs）、Responder 細胞としてレシピエント BALB/c マウス SPCs から CD4+/CD25-細胞、及び Treg（CD4+/CD25+細胞）を採取し、同種異型細胞混合による免疫賦活に対する Treg の免疫抑制効果を判定する。

A. 研究目的

平成 26 年度は、再生アソシエイト細胞の *in vivo* および *in vitro* での免疫寛容作用の証明、確立したヒト・マウス再生アソシエイト細胞培養法およびその評価法の治療実験への応用開発、同種同系移植実験から同種異系移植実験への移行、臨床検体における培養データの集積などが研究目的である。

B. 研究方法

1. 課題：再生アソシエイト細胞移植の免疫寛容研究

【 - 1 】 *in vitro* 免疫抑制効果の判定（東海大学）

in vitro 制御性 T 細胞（Treg）抑制アッセイによる再生アソシエイト細胞の免疫活性化抑制効

【 - 2 】 マウス同種異系移植実験

（A）マウス再生アソシエイト細胞培養条件の最適化（東海大学）

C57BL/6 及び BALB/c マウスの SPCs 及び末梢血液単核球（MNCs）を採取し、培養期間・培養方法などを比較するための再生アソシエイト細胞培養（QQ 培養）を実施し、FACS 試験・EPC コロニー試験などにより、免疫細胞分画・血管再生能・マクロファージ型などを判定した。

（B）骨格筋移植モデルの確立（東海大学）

C57BL/6 マウスから外側腓腹筋（GCM）を摘出し、同部位 GCM を摘出したレシピエントの野生型 C57BL/6 マウスへ同所性に GCM を移植し、組織生着の判定方法を確立した。さらに、C57BL/6 マウスからの培養再生アソシエイト細胞（QQ 細胞）の投与アプローチにおける移植片生着への

局所性貢献を確認するために、各移植アプローチ（尾静脈内投与、腹腔内投与、移植片近隣局所移植）を検討した。

（C）同種異系骨格筋移植モデル実験（東海大学）
移植用ドナー筋肉組織片を C57BL/6 マウスから摘出し、レシピエント BALB/c マウスの同部位に移植し、野生型 BALB/c マウスの SPCs より培養した再生アソシエイト細胞（QQ 細胞）の同時移植の有無で、生着移植片を定量的及び定性的に評価した。

（D）同種同系皮膚潰瘍移植モデル実験（順天堂大学）

C57BL6J マウス末梢血から MNC を採取し培養再生アソシエイト細胞を作成。潰瘍モデル BALB/C マウスに移植し同種異系潰瘍移植実験による細胞生着率、創傷治癒効果、血管新生を検証した。

2. 課題：iPS 組織移植のための再生アソシエイト細胞免疫寛容研究（大阪大学）

【 -1】同種異系 iPS 細胞移植実験

蛍光色素である Luciferase を恒常的に発現する BL6/J マウスの線維芽細胞由来の未分化 iPS 細胞をマウス腹部皮下に移植するモデルを作成し、再生アソシエイト細胞が移植された iPS 細胞の生存に与える影響を経時的に観察した。レシピエント側として、同種同系となる BL6/J マウスを Positive Control とし、同種異系である BALB/C マウスを対象として、BALB/C マウス由来の再生アソシエイト細胞混入の効果を検討した。IVIS を用いて移植細胞の残存を定量的に評価するとともに、再生アソシエイト細胞の同時移植が iPS 細胞の生存に与える影響を評価した。さらに、マウスの iPS 細胞由来心筋細胞シートの左心室表面への移植モデルを作成し、IVIS による移植細胞の生存を測定した。

【 -2】 $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET による同種異系細胞移植による免疫拒絶反応評価の確立

臓器移植においては移植片にたいする免疫拒絶反応は、主に移植片の機能および組織所見により評価され、免疫抑制療法の適正化が図られる。しかしながら、細胞移植においては、特に心臓へ移植された細胞の病理診断を行うことは困難であることから、組織診断に変わる免疫拒絶反応の評価法の確立が重要である。ここでは、活性型マクロファージを特異的に描出することが証明されている $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET 法を用いて、細胞移植における免疫拒絶反応が経時的に評価できるか否かを検証した。

Luciferase 発現 iPS 細胞由来心筋細胞を細胞シート化し、マウス左心室表面に移植するモデルを作成して、1) シャム手術群、2) 同種同系移植群、3) 同種異系移植群の 3 群に分けて拒絶反応を経時的に評価した。

3. 課題：再生アソシエイト細胞基盤・応用研究（東海大学）

【 -1】再生アソシエイト細胞免疫寛容メカニズムの最適化研究（東海大学）

制御性 T 細胞、マクロファージの分化増殖に必要と考えられる増殖因子（TGF- β 、IL-10、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、Prostaglandin E2、Adenosine）およびホルモン（ 17β -Estradiol、Progesterone、Trans-Dehydro Androsterone、Testosterone）を加え細胞培養を行った。培養方法の評価は、細胞の増殖率、FACS による分化マーカー解析、更には、血管内皮前駆細胞のコロニーアッセイなどを用い、必要とされる細胞群の増加割合、血管内皮前駆細胞に対する影響の有無を検証した。

【 -2】糖尿病マウス再生アソシエイト細胞の確立（順天堂大学）

糖尿病マウスを作成し、末梢血からの培養再生アソシエイト細胞の血管再生と抗炎症効果の指標となる細胞表面マーカーを FACS 解析にて、血

管再生能を EPC-colony forming assay にて解析した。

【 - 3 】糖尿病患者における再生アソシエイト細胞の確立（規格の設定、培養方法の確立、安全性検査）（順天堂大学）

糖尿病患者の末梢血液から再生アソシエイト細胞を作成し、血管再生と抗炎症効果の指標となる細胞表面マーカーを FACS 解析にて、血管再生能を EPC-colony forming assay, EPC Culture Assay にて解析をおこなった。臨床研究を目的とした移植細胞の規格を決定するため FACS 解析を行い、40 例の糖尿病患者における CD34 陽性細胞と CD206 細胞の移植可能細胞比率を調べた。また、移植細胞の安全性のため造腫瘍性試験、核型試験を実施した。

（倫理面の配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）、疫学研究に関する倫理指針（平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号）、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号）、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成 18 年厚生労働省告示第 425 号）、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守した。動物実験は、各施設の実験動物委員会承認のもと動物愛護法を遵守、臨床研究については各施設臨床研究委員会の承認のもとに実施している。

C. 研究結果

1. 課題 : 再生アソシエイト細胞移植の免疫寛

容研究

【 - 1 】in vitro 免疫抑制効果の判定（東海大学）

アッセイ培養上清中の TNF-alpha 及び INF-gamma 濃度の測定において、再生アソシエイト細胞由来 Treg は、非培養 SPCs の Treg と比較して、著名に Responder 細胞免疫賦活化サイトカインの発現抑制効果を認めた。結果、再生アソシエイト細胞の免疫寛容担当細胞の Treg は、質的にも、非培養 SPCs の Treg よりも、免疫抑制効果が強いと判定される。CSFE による Responder 細胞の増殖抑制効果について、現在解析中。

【 - 2 】マウス同種異系移植実験

(A)マウス再生アソシエイト細胞培養条件の最適化（東海大学）

(A-1) QQ 培養中の細胞数の変化

SPCs 及び MNCs からの再生アソシエイト細胞の確保について、培養期間中に採取可能な細胞数の MNCs に対する SPCs の比率は、両系統マウスで漸減するが 3 日までは 5 倍以上 SPCs が高値を示した。動物実験に利用する再生アソシエイト細胞の確保には、SPCs の方が有利であることが判明した。

(A-2) QQ 培養における細胞の経時的血管再生能

EPC-CFA によるコロニー産生性 EPC 数評価による血管再生能評価において、両系統マウスの総 EPC コロニー産生能は、SPCs、MNCs とともに漸増し、SPCs の方が MNCs よりも高かった。両系統マウスともに SPCs 及び MNCs において、day3 までは血管再生能は漸増することが判明した。

(A-3) QQ 培養における細胞の経時的サイトカイン産生能

再生アソシエイト細胞の QQ 培養期間各時点における抗炎症・免疫寛容機能サイトカイン

(IL-10)及び炎症性・免疫賦活性サイトカイン (TNF- α)の産生を CBA 法により測定したところ、SPC 再生アソシエイト細胞において、IL-10 発現は day3 まで培養前細胞の 30 倍以上に増加した。

QQ 培養においては、SPCs は、MNCs に比較して抗炎症・免疫寛容作用を有する IL-10 の産生が高く、day3 SPCs は MNCs よりも再生アソシエイト細胞源として優れている可能性がある。

(A-4) SPCs 由来再生アソシエイト細胞の含有細胞群評価

炎症性・免疫賦活性マクロファージ(M1)及び抗炎症・免疫寛容性マクロファージ(M2)の細胞分画を CD206-/CD11b+細胞及び CD206+/CD11b+細胞にて分画し、培養細胞中の含有率で算出したところ、M2 マクロファージの含有率は、C57BL/6 マウスで培養前細胞に比較して漸増し、day3 で 17 倍に増加した。BALB/c マウスでは、day3 以降、培養前細胞の 5 倍以上に増加した。制御性 T 細胞の含有率は、C57BL/6 マウスで漸増し、BALB/c マウスでは day3、day5 では day2、day4 よりも減少したが、培養前細胞中の含有率との比較では、2.4 倍、5.7 倍と増加した。SPCs の再生アソシエイト細胞の抗炎症・免疫寛容機能は day3 が高いと考えられる。

(B) 骨格筋移植モデルの確立 (東海大学)

同種同系マウスにおける外側腓腹筋 GCM 移植モデルの確立を行った。4 週目において移植 GCM 組織片が肉眼的にも、組織学的にも確認された。いずれの QQ 細胞移植方法においても、QQ 細胞が移植片内に確認され、QQ 細胞の移植片の生着に影響を及ぼす可能性が示唆された。本法によって、GCM 移植による組織移植及び QQ 細胞移植モデルは確立され、同種異系移植実験に利用可能となる。

(C) 同種異系骨格筋移植モデル実験 (東海大学)

tdTomato-GCM 移植後 1 週目において、移植片生着を観察したところ、再生アソシエイト細胞との共移植群において、GCM 移植片単独群及び非培養 SPCs 共移植群に比較して蛍光移植筋肉束が多く認められた。また、画像解析ソフトで定量的に評価したところ、tomato の蛍光陽性面積及び蛍光陽性領域の平均輝度において、GCM 移植片及び再生アソシエイト細胞の共移植群が、GCM 移植片及び間葉系幹細胞共移植群とともに高値を示した。HE 染色における GCM 移植片組織像の観察では、GCM 移植片単独及び SPCs 共移植群に比較して、GCM 移植片及び再生アソシエイト細胞の共移植群における浸潤細胞が少なく観察された。現在浸潤細胞の組織学的評価を進めている。再生アソシエイト細胞が異系マウスの移植組織片に対する免疫拒絶を抑制し、その生着に貢献したと考えられる。

(D) 同種同系皮膚潰瘍移植モデル実験 (順天堂大学)

GFP 陽性の C57BL6J マウス再生アソシエイト細胞を同種異系である BALBC マウス潰瘍モデルに移植し、潰瘍作成後 Day1, Day3, Day5, Day7, Day10, Day14 における局所の細胞生着率と創傷治癒効果、血管新生効果を評価した。C57BL6J マウス再生アソシエイト細胞は移植後 7 日目まで潰瘍組織に生着していたが、移植後 14 日目の潰瘍組織に移植細胞は認められなかった。しかし、同種異系細胞の再生アソシエイト細胞を移植した群のほうが PBS 移植のコントロールに比べ高い潰瘍縮小率と組織再生効果を示したことから同種異系細胞の再生アソシエイト移植は創傷治癒に対する効果が認められることが証明できた。

2. 課題 : iPS 組織移植のための再生アソシエイト細胞免疫寛容研究 (大阪大学)

【 -1】同種異系 iPS 細胞移植実験

再生アソシエイト細胞が他家移植された未分化 iPS 細胞の生存を向上させた。

IVIS での測定結果では、同種同系モデルにおける蛍光信号が次第に強くなるのに対して、同種異系モデルにおいては、7 日後以降次第に蛍光信号が減弱することが示された。一方、同種異系モデルに、再生アソシエイト細胞を混入させた群においては、同種同系ほどではないものの蛍光信号が維持された。同種異系移植によって生じる拒絶反応を、再生アソシエイト細胞が抑制することが示唆された。

【 -2】¹⁸F]-DPA714-PET による同種異系細胞移植による免疫拒絶反応評価の確立

活性型マクロファージを特異的に描出することが証明されている¹⁸F]-DPA714-PET 法を用いて、細胞移植における免疫拒絶反応が経時的に評価できるか、1) シャム手術群、2) 同種同系移植群、3) 同種異系移植群の 3 群に分けて拒絶反応を経時的に評価した。

結果、シャム手術群ならびに同種同系移植群が、第 1 日に比べて第 7 日において、PET 法での SUV max に変化が見られないのに対して、同種異系移植軍医においては、SUV max の増強が見られた。さらにこの SUV max は、摘出心の線量 (ARG) と有意な相関を認めた。また、第 7 日に摘出した心臓の病理組織標本において、同種異系移植群に CD68 陽性マクロファージの集積が見られた。以上より、¹⁸F]-DPA714-PET 法は細胞移植における拒絶反応の定量的評価に有用であることが示唆された。

3. 課題 : 再生アソシエイト細胞基盤・応用研究

【 -1】再生アソシエイト細胞免疫寛容メカニズムの最適化研究(東海大学)

A) 増殖因子添加による効果検証

6つの増殖因子(TGF- β 、IL-10、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、Prostaglandin E2、Adenosine)において、Total の細胞増殖への効果は(図 12A)増殖因子無添加群と有意差は見いだせなかった。FACS による分画別の解析を行ったところ、M2-マクロファージ分画において、TGF- β は、増殖抑制に働き、残りの 5 因子では、添加した Dose にもよるが増殖促進に働いていることが顕著に判明した。ただし EPC マーカーでは TGF- β は、わずかに増殖促進に働いていた。

B) ホルモン添加による効果検証

4つの性ホルモン(17β -Estradiol、Progesterone、Trans-Dehydro Androsterone、Testosterone)において、Total の細胞増殖への効果は、10 μ M の 17β -Estradiol、Progesterone 添加群で細胞増殖が抑制され、10nM の 17β -Estradiol、Progesterone 添加群で細胞増殖がわずかに促進された。また、1nM-Testosterone 添加群で細胞増殖が促進される傾向にあり、10nM を超えると、細胞増殖を阻害していた。一方、Trans-Dehydro Androsterone、添加群では、細胞増殖への顕著な効果は確認できなかった。

【 -2】糖尿病マウス再生アソシエイト細胞の確立(順天堂大学)

糖尿病マウス末梢血再生アソシエイト細胞は培養前に比べ培養後に細胞数は減少するが EPC の数は増加する傾向にある。EPC colony forming assay の結果、再生アソシエイト細胞は、primitive, definitive, および total-CFU 全てにおいて Colony 数は優位に増加し、高い血管再生能を有する細胞であることが判明した。糖尿病マウス末梢血単核球は培養を行うことで培養前の健常マウスに比べ有意に血管再生能の回復を示した。

【 -3】糖尿病患者における再生アソシエイト細胞の確立(規格の設定、培養方法の確立、安

全性検査) (順天堂大学)

40例のDM患者において再生アソシエイト細胞の組成を調べた結果、CD34陽性細胞が平均1.85%、CD206細胞が平均13.9%であった。これらの値は健常人比べ低下していたが、培養前と比べ有意に高くなっていた。臨床研究における細胞移植の規格として、CD34陽性細胞は0.1%以上、CD206陽性細胞は1%以上とした。Hera細胞と比較した造腫瘍性試験と実施したが、ヒト再生アソシエイトによる造腫瘍性試験は陰性であり、核型試験においても染色体異常を示す結果は得られなかった。昨年度実施した、ヒト再生アソシエイト細胞のヌードマウス潰瘍モデルに対する創傷治癒効果の結果を踏まえると、ヒト同種再生アソシエイト細胞移植は安全であり、高い創傷治癒効果を示すことが明らかになった。

D. 考察

本年度の成果は、【別添函】にまとめた。

その中で次の3点は、本プロジェクトを完成させるために大変重要である。

in vivo 同種異系 (アロ) 移植において、再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果を確認できた。 iPS細胞組織移植における再生アソシエイト細胞移植効果の実験方法を確立出来た。

糖尿病患者でも、再生アソシエイト細胞培養により血管再生能力を確保できる。

特に、の in vivo 同種異系 (アロ) 移植において、再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果を確認できたことは、本プロジェクトの中で最も証明が求められていた治療効果に直結する所見を得られたことになる。当然次年度は同種異系 iPS細胞由来心筋シート移植における再生アソシエイト細胞移植の効果判定を行う予定であり、このために の移植実験技術の確立は重要である。

また、再生アソシエイト細胞の移植方法についても検討したが、骨格筋移植の例では、局所・

全身投与とともに同等の効果が確認された。しかし治療方法によって、再生アソシエイト細胞の移植方法は精密に検討が必要と思われ、心筋シートの場合の投与方法について、大阪大学チームと検討中である。

もう一点大切なことは、の糖尿病患者でも本培養法が安定して効果を発揮できることにある。少なくとも動物の糖尿病モデルでの再生アソシエイト細胞、あるいは糖尿病患者再生アソシエイト細胞で血管再生効果が確認できた。順天堂大学では、細胞培養センターで本細胞群の培養を開始し、血管再生作用を利用した難治性潰瘍への臨床移植研究が開始された。しかし本プロジェクトにとっては、臨床検体での免疫寛容作用を示せたわけではないので、今後の臨床実験でのデータでの証明が必要で、来年度の課題となる。

成果はこれだけでなく、in vitro 免疫寛容効果も確認できるようになった点も重要である。再生アソシエイト細胞の in vitro 実験系の確立は予想外に難航していたが、移植時の免疫賦活作用を抑制する効果を、定量的及び定性的に評価できる目処がたち、次年度には必要なデータを揃えることが可能である。

E. 結論

in vivo 同種異系 (アロ) 移植における再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果、iPS細胞組織移植における再生アソシエイト細胞移植効果の実験方法の確立、糖尿病患者での再生アソシエイト細胞培養の確認、in vitro 免疫寛容判定が進められ、目標は達成された。同種異系移植実験の成果を iPS細胞由来心筋シート移植実験に繋げていく予定である。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1 論文発表

1. Masuda H, Tanaka R, Fujimura S, Ishikawa M, Akimaru H, Shizuno T, Sato A, Okada Y, Iida Y, Itoh J, Itoh Y, Kamiguchi H, Kawamoto A, Asahara T. Vasculogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes endothelial progenitor cell expansion and phenotype transition of anti-inflammatory macrophage and t lymphocyte to cells with regenerative potential. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3:e000743
2. Kuroda R, Matsumoto T, Niikura T, Kawakami Y, Fukui T, Lee SY, Mifune Y, Kawamata S, Fukushima M, Asahara T, Kawamoto A, Kurosaka M., Local Transplantation of Granulocyte Colony Stimulating Factor-Mobilized CD34+ Cells for Patients With Femoral and Tibial Nonunion: Pilot Clinical Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Jan;3(1):128-34.
3. Fujita Y, Kinoshita M, Furukawa Y, Nagano T, Hashimoto H, Hiramami Y, Kurimoto Y, Arakawa K, Yamazaki K, Okada Y, Katakami N, Uno E, Matsubara Y, Fukushima M, Nada A, Losordo DW, Asahara T, Okita Y, Kawamoto A., Phase II Clinical Trial of CD34+ Cell Therapy to Explore Endpoint Selection and Timing in Patients With Critical Limb Ischemia. *Circ J*. 2014 Jan 24;78(2):490-501. Epub 2013 Nov 21.
4. Masuda H, Asahara T. Clonogenic Isolation of Colony-forming Endothelial Progenitor Cells. *Manual of Research Techniques in Cardiovascular Medicine*, published from Willey Blackwell, 2014 p.71-93
5. Tanaka R, Masuda H, Kato S, Imagawa K, Kanabuchi K, Nakashioya C, Yoshiba F, Fukui T, Ito R, Kobori M, Wada M, Asahara T, Miyasaka M. Autologous g-csf-mobilized peripheral blood cd34+ cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer. *Cell Transplant*. 2014;23:167-179
6. Obi S, Masuda H, Akimaru H, Shizuno T, Yamamoto K, Ando J, Asahara T. Dextran induces differentiation of circulating endothelial progenitor cells. *Physiological reports*. 2014;2:e00261
7. Lee SH, Lee JH, Asahara T, Kim YS, Jeong HC, Ahn Y, Jung JS, Kwon SM. Genistein promotes endothelial colony-forming cell (ecfc) bioactivities and cardiac regeneration in myocardial infarction. *PLoS One*. 2014;9:e96155
8. Nakamura T, Torimura T, Iwamoto H, Kurogi J, Inoue H, Hori Y, Sumie S, Fukushima N, Sakata M, Koga H, Abe M, Ikezono Y, Hashimoto O, Ueno T, Oho K, Okamura T, Okuda S, Kawamoto A, Ii M, Asahara T, Sata M. Cd34 cell therapy is safe and effective in slowing the decline of hepatic reserve function in patients with decompensated liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014
9. Kuroda R, Matsumoto T, Niikura T, Kawakami Y, Fukui T, Lee SY, Mifune Y, Kawamata S, Fukushima M, Asahara T, Kawamoto A, Kurosaka M. Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized cd34+ cells for patients with femoral and tibial nonunion: Pilot clinical trial. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3:128-134

10. Fukui T, Mifune Y, Matsumoto T, Shoji T, Kawakami Y, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Kuroda T, Horii M, Yokoyama A, Alev C, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T. Superior potential of cd34-positive cells compared to total mononuclear cells for healing of nonunion following bone fracture. *Cell Transplant*. 2014
11. Fujita Y, Kinoshita M, Furukawa Y, Nagano T, Hashimoto H, Hiramami Y, Kurimoto Y, Arakawa K, Yamazaki K, Okada Y, Katakami N, Uno E, Matsubara Y, Fukushima M, Nada A, Losordo DW, Asahara T, Okita Y, Kawamoto A. Phase ii clinical trial of cd34+ cell therapy to explore endpoint selection and timing in patients with critical limb ischemia. *Circ J*. 2014;78:490-501
12. Fadini GP, Ferraro F, Quaini F, Asahara T, Madeddu P. Concise review: Diabetes, the bone marrow niche, and impaired vascular regeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2014
13. Kwon SM, Lee JH, Lee SH, Jung SY, Kim DY, Kang SH, Yoo SY, Hong JK, Park JH, Kim JH, Kim SW, Kim YJ, Lee SJ, Kim HG, Asahara T. Cross talk with hematopoietic cells regulates the endothelial progenitor cell differentiation of cd34 positive cells. *PLoS One*. 2014;9:e106310
- 発明者：浅原孝之、増田治史、田中里佳
本年度、国内国外移行手続き（USA, EU, China, India）

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願第 2012 - 218206 号「血管内皮前駆細胞を含む細胞群の生体外増幅方法」

基礎出願の番号：特願 2 0 1 2 - 2 1 8 2 0 6

P C T 出願番号：P C T / J P 2 0 1 3 / 7 6
6 1 8

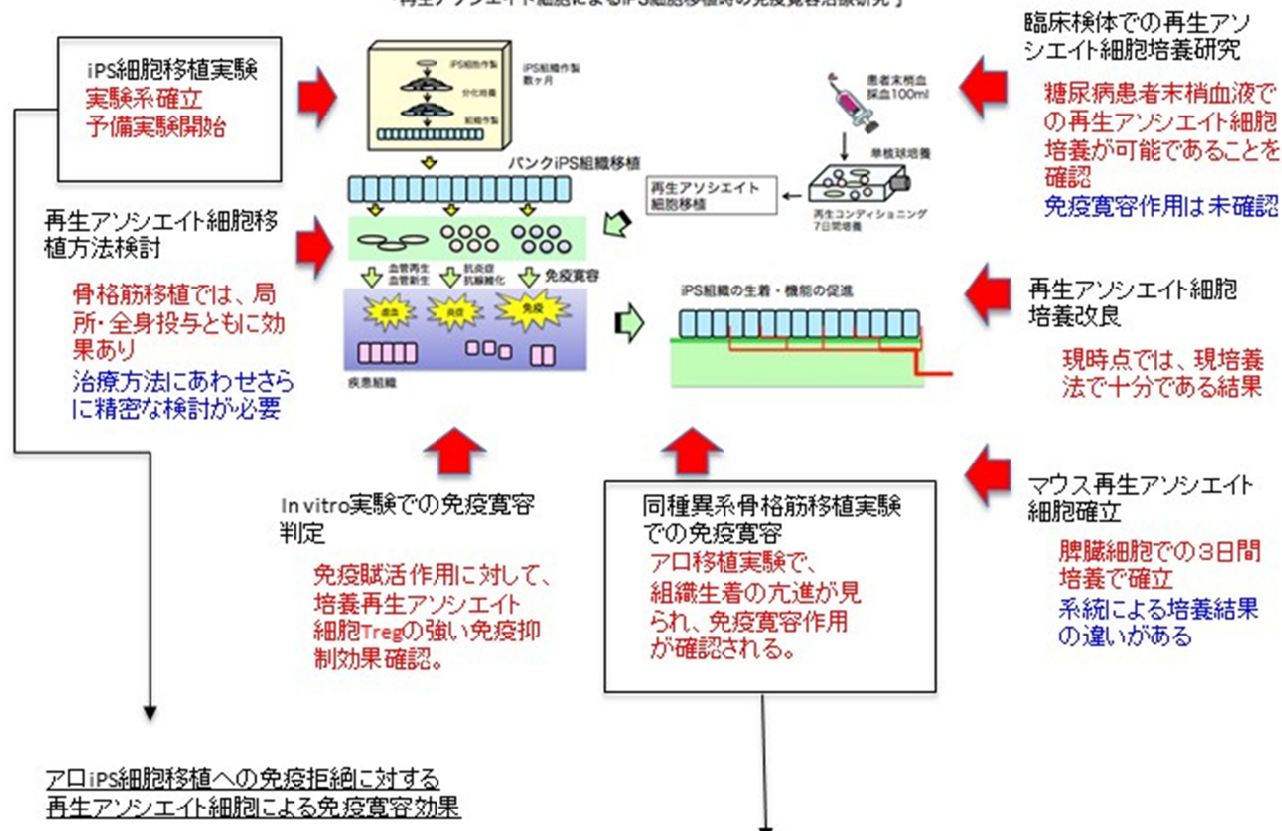
国際出願日：2 0 1 3 年 9 月 3 0 日（基礎出願日：2 0 1 2 年 9 月 2 8 日）

別添図表一覧

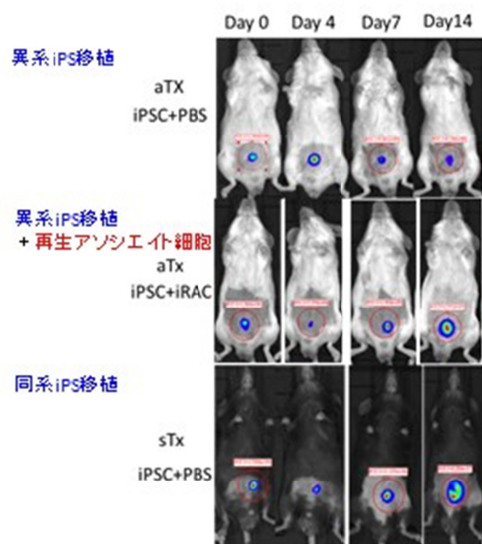
平成26年度・成果のまとめ

平成25年度厚生労働科学研究補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の高度化研究事業）

「再生アソシエイト細胞によるiPS細胞移植時の免疫寛容治療研究」



アロiPS細胞移植への免疫拒絶に対する再生アソシエイト細胞による免疫寛容効果



アロ骨格筋移植への免疫拒絶に対する再生アソシエイト細胞による免疫寛容効果

