

への大量培養系において、iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導した細胞集団から心筋細胞を精製し、心筋細胞の純度が異なる細胞シートを作製した。

(倫理面への配慮)

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

C. 研究結果

微小電極アレイ等により細胞外電位を測定したところ、低純度の細胞シートではシート全体が同期収縮することが確認でき、電位伝播速度は純度依存的に増加していた。一方、高純度の細胞シートの場合、細胞シートの形成が不安定であった。免疫染色、定量 PCR の結果より、高純度の細胞シートではコラーゲン、ラミニンなどの発現が低下しており、中程度の純度の細胞シートでは同発現が有意に高値であった。また、心室型ミオシン軽鎖や VEGF の発現が高い傾向にあった。

D. 考按

iPS 細胞由来心筋細胞シートにおいて、至適な心筋細胞純度が存在し、電気生理学的機能、細胞シート構造、液性因子の産生に優れていた。iPS 細胞由来心筋組織移植による再生治療においてより優れた再生効果をもつ可能性が示唆された。

E. 結論

臨床研究用細胞の培養プロセスにおいては、より単一の細胞を高純度に精製するこ

とが、より高い品質の安定につながる。一方で、心臓も含めて体内の臓器は複数種類の細胞群で構成されている。再生医療等製品においても、より生体内の状態に近い細胞集団を移植することが、高い生着率と高い治療効果をもたらす可能性がある。心筋細胞シート移植による至適細胞純度を明らかにすることで、より高い治療効果が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Functional and Electrical Integration of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Myocardial Infarction Rat Heart. Higuchi T, Miyagawa S, Pearson JT, Fukushima S, Saito A, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Yagi N, Astolfo A, Shirai M, Sawa Y. Cell Transplant. 2015, in press
2. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiya N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. PLoS One. 2014 Oct 30;9(10):e111064.

- 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

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

「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」

研究分担者	吉川 秀樹	大阪大学 整形外科学教室	教授
研究協力者	名井 陽	大阪大学 整形外科学教室	准教授
研究協力者	宮本 諭	大阪大学 整形外科学教室	大学院生
研究協力者	浜口 智志	大阪大学 アトミックデザイン研究センター	教授

【研究要旨】

本研究では、マウス多能性幹細胞から骨芽細胞系細胞を作製するための培養条件の最適化を行なった。時間経過および分化に沿った段階的な誘導法を検討した結果、種々のサイトカインと化合物を用いた誘導培地の最適化だけでなく、低酸素培養と表面処理された培養皿の併用効果が明らかになった。今後は現在までに行っている骨軟骨再生に関する動物実験、臨床研究と十分な連携を図りながら、新規誘導因子のスクリーニングを行い、より質の高い、臨床に根差した研究の実施を目指す。

本研究は、骨芽細胞系細胞の培養誘導に関わる種々の環境因子に配慮し、ヒト幹細胞を用いる前段階の技術開発を目的としている。

A. 研究目的

外傷や切除により生じた大きな骨欠損を補うためには、インプラントに代表される人工材料が多く用いられているが、生体組織に近い組成を有するハイブリット材料の開発が望まれる。このための細胞源として iPS 細胞は、間葉系幹細胞に並ぶ生体材料として期待されているが、多能性を有するが故に細胞系譜に沿った分化誘導が極めて難しいという問題点を残している。iPS 細胞による臨床応用を目指した培養誘導技術の開発は急務であるが、均一性と安全性を兼ね備えた高効率な誘導法を確立するまでには至っていない。とくに生体内で iPS 細胞が十分な骨形成能を示したという報告はされてない。本研究は、マウス iPS 細胞から EB

形成を経ずに、中胚葉系細胞、間葉系前駆細胞、骨芽細胞系細胞へと高効率に誘導可能な技術開発を目的としている。また、本誘導技術をさらに発展させるため新規誘導因子を含めた分子の探索も同時に実施する。

B. 研究方法

1. 骨芽細胞系細胞培養誘導培地の最適化
無血清下でサイトカインと化合物を組み合わせたカクテル誘導培地の最適化を行った。時間経過に沿った段階的な添加方法の検証を行うために培養誘導は、①誘導開始から day3 まで、②day4 から day6 まで、③day7 から day13 まで、④day14 から day21 まで、⑤day22 以降の 5 段階とし、フローサイトメトリーおよび遺伝子発現解析により

最適化条件を検討した。

2. 低酸素培養と表面加工処理された培養皿の応用

骨芽細胞系細胞を作製するためのさらなる高率化を目指し、段階的な低酸素環境での培養誘導を行った。この際、表面加工処理された培養皿を併用し、最適化のための条件を検討した。

3. 培養皿の表面解析とプラズマ照射の表面改質への応用

培養皿は初期段階の検討用として加工処理された市販品を用いて、コーティング剤を併用した。培養皿の表面改質は、プラズマや熱 CVD などが施されていることが考えられるが、加工処理方法を特定することは難しい。現在、XPS および FT-IR 解析により市販品の表面解析を行い、これらのデータをもとに本学工学部で開発された N₂/H₂ プラズマ照射の表面改質への応用を試みている。

4. 低分子化合物と新規誘導因子のスクリーニング

今後の臨床応用を目指すためにサイトカインフリーの誘導培地の最適化も進めている。各種阻害剤を含めた候補化合物の絞り込みは、本培養誘導系を用いて、マイクロアレイ解析と RNA シーケンスを併用し、網羅的遺伝子解析を行い、有用な新規分子を検討中である。

5. 本培養誘導技術の有用性および安全性の確認

最適化された条件を検証するためにヌードマウスを用いて、動物実験を行い、骨形成能および腫瘍性試験により評価、検討中である。

(倫理面への配慮)

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

C. 研究結果

骨芽細胞系細胞の培養誘導には、数種類のサイトカインと化合物の混合カクテルが必要であり、day21 までに高効率な誘導が可能となる無血清培地を考案した。また、さらなる効率化と均一性を高めるためには、段階的な低酸素培養と培養皿の表面加工処理の併用が欠かせないことも明らかになった。

D. 考按

培養誘導技術の開発には、誘導培地の最適化だけでなく、中胚葉系細胞、間葉系前駆細胞を経て、骨芽細胞系細胞へ誘導することが可能となる段階的分化を遂げるために必要な環境因子を考慮に入れることが重要である。従来から広く用いられている既存の骨形成誘導培地に類似した手法ではなく、臨床応用を見据えた均一性と安全性を兼ね備えた誘導法の検討が必要である。単に種々の培養環境要因を組み合わせるだけでなく、新しい技術導入を視野に入れた解析および評価法による培養技術の開発に努めるべきと考える。

E. 結論

iPS 細胞から高効率に骨芽細胞系細胞を作製することが可能になった。これには段階的な増殖および分化を調節、修飾可能な環境因子を考慮した培養誘導技術が必要で

ある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morimoto T, Kaito T, Kashii M, Matsuo Y, Sugiura T, Iwasaki M, Yoshikawa H.: Effect of Intermittent Administration of Teriparatide (Parathyroid Hormone 1-34) on BoneMorphogenetic Protein-Induced Bone Formation in a Rat Model of Spinal Fusion., J Bone Joint Surg Am. 2;96(13), 2014.
2. Kaneshiro, S., Ebina, K., Shi, K., Higuchi, C., Hirao, M., Okamoto, M., Koizumi, K., Morimoto, T., Yoshikawa, H., Hashimoto, J.: IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 32:378-392, 2014.
3. Minegishi, Y., Sakai, Y., Yahara, Y., Akiyama, H., Yoshikawa, H., Hosokawa, K., Tsumaki, N.: Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice. Biochem Biophys Res Commun, 454:12-18, 2014.
4. Sugiura T, Kashii M, Matsuo Y,

Morimoto T, Honda H, Kaito T, Iwasaki M, Yoshikawa H.: Intermittent administration of teriparatide enhances graft bone healing and accelerates spinal fusion in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis., Spine J. 15(2):298-306, 2015.

2. 学会発表

1. Dai Itsuki, Satoshi Sugimoto, Satoshi Miyamoto, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa, Satoshi Hamaguchi: Plasma Surface Modification of Cell Culture Plates, 2nd international symposium on non-equilibrium plasma and complex-system sciences (IS-NPCS), (October 2014, Germanay)
2. 齊宮大, 杉本敏司, 宮本諭, 名井陽, 吉川秀樹, 浜口 智志: 細胞培養プレートのパラズマ表面処理, 第75回応用物理学会秋季学術講演会(2014年9月, 札幌)
3. Dai Itsuki, Tomoko Ito, Satoshi Sugimoto, Yu Moriguchi, Satoshi Miyamoto, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa, Satoshi Hamaguchi: Modification of hydroxyapatite and polystyrene surface for cell culture by low-pressure plasmas, 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5) (May 2014, Nara, Japan)

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

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」

研究分担者	森 正樹	大阪大学 消化器外科学	教授
研究協力者	石井 秀始	大阪大学 癌創薬プロファイリング学	特任教授
研究協力者	今野 雅允	大阪大学 消化器癌先進化学療法開発寄附講座	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開発として、iPS/ES 細胞の品質保全に関わる学術的情報を整備する。具体的に高品質の 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的リン酸化の分子メカニズムを明らかにした。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。これらの成果は、高品質の iPS/ES 細胞の維持と管理に於いて重要な基盤を構築することが出来た。

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、私達は、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、ゲノム科学的に普遍性の高い情報に基づく高品質の iPS 細胞の管理を目的として、分子論的な究明を実施した。近未来の再生医療分野における医学応用を目指して、基盤を構築するのが目的であり意義である。

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质の高い 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。前年度に引き続き、比較ゲノム学的手法により、マウスの 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の抽出と、ヒトの相同領域の抽出を実施し、DNA の一次配列、単塩基置換、発現ユニット情報を統合した。

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。マイクロ RNA 導入

試験による下流分子の探索を発現アレイ解析およびプロテオミックス解析で実施した。得られた結果は、分子細胞生物学的な手法で確認し検討した。

(倫理面への配慮)

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

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という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的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。前年度に引き続いた研究により、胎生期のみで発現するインプリント領域に位置する特定のマイクロ RNA は、その成熟・プロセッシングの過程で Ago に加えて特徴ある蛋白質複合体を形成し、翻訳調節の制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

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。

前年度に引き続いた事業展開により、本研究で明らかにした制御系は人工合成されたマイクロ RNA 分子により細胞生物学および医療に於ける介入（検査、診断、および治療の展望）が可能であることから、近未来の医療として重要なシーズ情報を内包すると期待される。現在、特許整備中である。

E. 結論

幹細胞のストック実施と管理に於いて、開発中の上記の新技术の開発事業を展開し、単細胞ならびに iPS 等の高品質を担保した保存と維持を実現するために基本となる基盤を構築した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koseki, J., Colvin, S. H., Fukusumi, T., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Matsui, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associates with 2-HG-inactivating β -oxygenation pathway in colorectal cancer. Int. J. Oncol.

46(3):1181-1191. 2015.

2. Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mimori, K., Gotho, N., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* , 111(43):15526-15531, 2014.

3. Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., Ochiya, T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat. Commun.* , 7;5:3591, 2014.

4. Koga, C., Kobayashi, S., Nagano, H., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Ishii, H., Umeshita, K., Doki, Y., Mori, M. Reprogramming Using microRNA-302 Improves Drug Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Ann. Surg. Oncol.* , Suppl 4:S591-600, 2014.

5. Fukusumi, T., Ishii, H., Konno, M., Yasui, T., Nakahara, S., Takenaka, Y., Yamamoto, Y., Nishikawa, S., Kano, Y., Ogawa, H., Hasegawa, S., Hamabe, A., Haraguchi,

N., Doki, Y., Mori, M., Inohara, H. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* , 111(3):506-514, 2014.

6. Okano, M., Konno, M., Kano, Y., Kim, H., Kawamoto, K., Ohkuma, M., Haraguchi, N., Yokobori, T., Mimori, K., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Human colorectal CD24+ cancer stem cells are susceptible to epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Oncol.* , 45(2):575-580, 2014.

7. Wada, N., Kurokawa, Y., Nishida, T., Takahashi, T., Toyokawa, T., Kusanagi, H., Hirota, S., Tsujinaka, T., Mori, M., Doki, Y. Subgroups of patients with very large gastrointestinal stromal tumors with distinct prognoses: a multicenter study. *J. Surg. Oncol.* , 109(2):67-70. 2014.

8. Hamabe, A., Hirofumi, Y., Konno, M., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Combined evaluation of hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1 α in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. *Cancer Sci.* , 105(9):1100-1108, 2014.

9. Hasegawa, S., Eguchi, H., Nagano, H., Konno, M., Tomimaru, Y., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Nishimura, T., Gotoh, N., Ohno, S., Yabuta, N., Nojima, H., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *B. r J. Cancer*, 111(8):1572-1580, 2014.
 10. Hayashi, K., Tamari, K., Ishii, H., Konno, M., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Fukusumi, T., Kano, Y., Nishikawa, S., Miyo, M., Noguchi, K., Ogawa, H., Hamabe, A., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Visualization and characterization of cancer stem-like cells in cervical cancer. *Int. J. Oncol.*, 45(6):2468-2474, 2014.
 11. Tamari, K., Hayashi, K., Ishii, H., Kano, Y., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Fukusumi, T., Hasegawa, S., Ogawa, H., Hamabe, A., Miyo, M., Noguchi, K., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Identification of chemoradiation-resistant osteosarcoma stem cells using an imaging system for proteasome activity. *Int. J. Oncol.*, 45(6):2349-2354, 2014.
 12. Kawamoto, K., Yabe, S., Konno, M., Ishii, H., Nishida, N., Koseki, J., Fukuda, S., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Kobayashi, S., Eguchi, H., Tanemura, M., Ito, T., Lee, EY., Mukai, E., Miki, T., Doki, Y., Mori, M., Hamazaki, TS., Nagano, H., Okochi, H. NeuroD1 with conditioned medium efficiently induce ASC to insulin-producing cells both in vitro and in vivo. *J. Stem Cell Res. Ther.*, 2014. (in press)
 13. Ogawa, H., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Colvin, S. H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Marubashi, S., Kobayashi, S., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. The combination of the expression of hexokinase 2 and pyruvate kinase M2 is a prognostic marker in patients with pancreatic cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 2014. (in press)
 14. Miyazaki, S., Yamamoto, H., Miyoshi, N., Wu, Xin., Ogawa, H., Uemura, M. Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Konno, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2014. (in press)
2. 学会発表
 1. 森正樹：肝胆膵領域癌におけるマイクロRNA研究の意義、第26回日本肝胆膵外科学会学術集会、2014年6月11日～6月13日、和歌山
 2. 森正樹：骨転移の病態と最新治療、

第 23 回日本がん転移学会学術集会・総
会、2014 年 7 月 10 日～7 月 11 日、
石川

3. 森正樹：癌幹細胞研究の現状と展
望、第 52 回日本癌治療学会学術集会、
2014 年 8 月 28 日～8 月 30 日、神奈川

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

【発明の名称】多能性幹細胞の品質診断
方法及び診断キット、抗がん剤並びに
疾患モデル動物

【発明者】石井秀始、森正樹、土岐祐一
郎、今野雅允、川本弘一、西田尚弘、小
関準、新井貴博、佐藤暢彦、近藤礎、中
村眞

【出願人】ユニテック株式会社、株式
会社エバンス、国立大学法人大阪大学

【出願番号】特願 2014-266696

【出願日】平成 26 年(2014 年)12 月 26 日

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

「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」

研究分担者 大藁 恵一 大阪大学 小児科学教室 教授
研究協力者 北畠 康司 大阪大学 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）技術の発明は、本格的な再生医療の発達への期待を飛躍的に大きくした。ゲノムを傷つけることなく初期化を引き起こすエピゾーマルベクターならびにセンダイウイルスベクターの開発、血液細胞や神経細胞、心筋細胞などの各細胞系列への分化誘導方法

の確立などによってさらに臨床応用への道が開かれ、昨年はいよいよ加齢黄斑変性症患者に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シートの移植が世界ではじめて行われた。これからますます臨床応用症例が増えていくと考えられるとともに、そのリソースとしてもちいられる生体の組織・細胞の安定かつ安全な採取が大きな問題となってくる。

とくに小児科領域においては、採血手技や皮膚生検などの処置は大きな侵襲とストレスを加えるため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り、児に侵襲を加えることなく採取が可能である。そこで我々はこれら胎児組織をもちいたヒト iPS 細胞の樹立・保管・分化技術の確立を目指している。すでに昨年度の研究において、臍帯血検体から効率よくヒト iPS 細胞を作製することができ、分化能・増殖能を保持したまま安定的に保存可能であることを確認した。今年度はさらにこれら臍帯血由来 iPS 細胞が分化誘導能をもっているかどうかについて確認するため、まず造血細胞系列への分化誘導を行い、その確認を行った。

B. 研究方法

樹立されたヒト iPS 細胞は 7 日ごとに継代を行った。低吸着ディッシュをもちいて作製した胚様体 (Embryoid Body; EB) を血清不含培地 (BPEL) (Ng et al., 2008) ならびにサイトカインをもちいて分化誘導をおこなった (Grigoriadis et al., 2010)。サイトカインとしては BMP4、IL6、VEGF、IL11、SCF、IL3、TP0、EPO をもちいた。分化誘導した細胞については、フローサイトメトリーならびにメチルセルロースアッセイによって評価をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

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採取された 5 名からの臍帯血をもとに持続発現型センダイウイルスベクター SeV-KOSM-302L をもちいてヒト iPS 細胞を樹立した。これらの未分化性および多分化能を確認した後、血液分化誘導を行った。

分化誘導開始から 12 日目の胚様体 (EB) についてグロビン発現を見たところ、明らかに γ -type のグロビンが他の ϵ 、 β に比較して有意に発現しており、この血球分化誘導が胎児型 2 次造血を再現していることを確認できた。またフローサイトメトリーにより、KDR 陽性・CD31 陽性の造血前駆細胞ならびに CD235 陽性赤芽球系細胞、CD33 陽性骨髓球系細胞の出現が見られ、さらにメチルセルロースアッセイにより CFU-G/GM/M、E、GEMM の各コロニーの形成も確認することができた。

D. 考按

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から樹立されたヒト iPS 細胞が正常な血球系への分化誘導能を保持していることを確認することができた。今後さらにゲノム編集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り、かつ造血分化誘導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

1. Takeyari S, Yamamoto T, Kinoshita Y, Fukumoto S, Glorieux FH, Michigami T, Hasegawa K, Kitaoka T, Kubota T, Imanishi Y, Shimotsuji T, Ozono K. Hypophosphatemic osteomalacia and bone sclerosis caused by a novel homozygous mutation of the FAM20C gene in an elderly man with a mild variant of Raine syndrome. *Bone*, 67C:56-62, 2014 Jun 27
2. Kubota T, Kitaoka T, Miura K, Fujiwara M, Ohata Y, Miyoshi Y, Yamamoto K, Takeyari S, Yamamoto T, Namba N, Ozono K. Serum fibroblast growth factor 23 is a useful marker to distinguish vitamin D-deficient rickets from hypophosphatemic rickets. *Horm Res Paediatr*, 81(4):251-7, 2014
3. Kitaoka T, Miyoshi Y, Namba N, Miura K, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Takagi M, Hasegawa T, Jüppner H, Ozono K. Two Japanese familial cases of Caffey disease with and without the common COL1A1 mutation and

normal bone density, and review of the literature. *Eur J Pediatr*, 173(6):799-804, 2014 Jun

4. 大藺 恵一 軟骨無形成症 小児科診療, 77 増刊号: 613-615, 2014.

2. 学会発表

1. 北畠 康司、坂野 公彦、平田 克弥、大森 早也佳、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、大藺 恵一: ダウン症候群における病態発症メカニズムの解明、第 117 回日本小児科学会学術集会 (2014 年 4 月 11 日、名古屋)
2. 北畠 康司、坂野 公彦、大森 早也佳、平田 克弥、那波 伸敏、和田 和子、荒堀 仁美、谷口 英俊、大藺 恵一: 疾患特異的ヒト iPS 細胞をもちいたダウン症候群の病態解析、第 37 回日本小児遺伝学会学術集会 (2014 年 4 月 10 日、名古屋)
3. 北畠 康司、坂野 公彦、大森 早也佳、平田 克弥、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、橋井 佳子、大高 真奈美、中西 真人、佐久間 哲史、山本 卓、大藺 恵一: Analysis of transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome using gene editing technologies、第 76 回日本血液学会学術集会 (2014 年 10 月 31 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

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

「移植治療後の慢性期完全脊髄損傷患者のリハビリテーションと脳機能再構成
および脊髄再生との関連性についての評価法の開発」

研究分担者	吉峰 俊樹	大阪大学 脳神経外科講座	教授
研究協力者	岩月 幸一	大阪大学 脳神経外科講座	講師
	大西 諭一郎	大阪大学 脳神経外科講座	助教
	渡邊 嘉之	大阪大学 放射線統合医学講座	講師
	田島 文博	和歌山県立医科大学 リハビリテーション科	教授
	中村 健	和歌山県立医科大学 リハビリテーション科	講師

【研究要旨】

脊髄損傷に対する有効な神経再生療法は未だなく、完全脊髄損傷患者においては残存機能の強化リハビリテーションが唯一の治療法である。当グループは損傷後半年以上経過した慢性期完全脊髄損傷患者に対して自家嗅粘膜移植を行い、一定の機能回復を見ているが、慢性期では下肢筋肉の委縮による神経栄養因子の枯渇から脊髄前角細胞の変性・下位運動神経の不全が起こり、脊髄(上位)神経軸索再生のみでは十分な機能回復は得られないことが示唆される。また効果的なリハビリテーションプログラム開発には、脊髄の組織的再生や脳の神経活動の機能的回復を継続的に評価する必要がある。

本申請では慢性期完全脊損患者に術前・術後に積極的リハビリテーションを導入し、とうえで嗅粘膜移植を行い、より効率的な下肢機能回復を目指すことを目的とする。

A. 研究目的

申請者らはこれまでに慢性期完全脊損患者を対象に嗅粘膜移植を実施し、4 例のうち 2 例で随意的筋電図の発生を認めている。本申請は、移植によって再生した脊髄運動神経の機能を、より効果的に下肢運動機能に反映させるために、術前・術後に強力なリハビリテーションを行い、且つ神経の組織的・機能的再構築を脳 fMRI および脊髄 DTI で評価する系を開発することを目的とする。

慢性期では下肢筋肉の委縮により神経栄養因子が枯渇し、下位運動神経の変性が起こるため、上位神経が再生しても筋収縮しない可能性がある。本申請では移植前リハビリテーションを行い、下肢筋肉の収縮力・筋重量を増加させ、下位運動神経の保持を図る。

これまで DTI では、動物モデルで残存軸索と下肢運動機能の関連が報告されている (Kim et al. Exp Neurol, 2011 in press) が、ヒトでは報告がない。本研究で、移植手

術前後およびリハビリテーション継続中の軸索束の変化をモニターすることにより、脊髄の組織学的再生が三次元的に評価できる。一方、fMRI では健常者と慢性期脊損患者で脳活動パターンの相違が報告されている (Brain, 128, 2941, 2005 Steven C. Cramer et. al) が、下肢運動機能回復による変化は未解明である。本研究では脳の活動パターンと移植後の随意的筋電図・下肢運動機能との関連を明らかにし、機能回復の客観的指標とする。効果的リハビリテーションにフィードバックさせるために、上記画像データの蓄積および解析が必要である。

移植手術後は、正常とは異なるパターンの神経再生から不随意的筋反応が起こる可能性があるため、術後リハビリではバイオフィードバックにより随意筋放電を誘発させる (Clin Rehabil. 1998 Feb;12(1):11-22 Bradley L et. al)。長下肢装具の一つとして、導出筋電位をトリガーとしてロボットスーツ HAL を駆動させる歩行訓練も試みる。

慢性期の完全脊髄損傷を対象として大脳皮質から下肢筋肉までをターゲットとした包括的なリハビリテーション・移植医療・イメージングによる評価系は、これまでになかったものであり、より効率的な下肢機能の再建と患者の早期社会復帰が期待される。

B. 研究方法

本研究では機能保存的リハビリテーション・脊髄神経再生・脳神経機能の変化の観点から、下記 6 つの工程を設ける。

①術前に廃用下肢筋のリハビリテーションにより、筋肉由来神経栄養因子の産生と

下位運動神経の維持を図る。②自家嗅粘膜移植による脊髄神経軸索の再生。③術後のバイオフィードバックを用いた随意的筋放電の誘発。④長下肢装具装着による積極的歩行訓練。さらに、これら機能回復のプロセスの客観的指標として、下肢運動指標に加え、新たに ⑤DTI (Diffusion Tensor Imaging) で損傷脊髄移植部位の組織的再生を可視化する。⑥脳 fMRI で脳神経活動の再構築を解明する。

(倫理面への配慮)

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

C. 研究結果

2013 年末までに 8 例施行。これら 8 例において有害事象の発生を認めていない。5 例で随意性の筋電図の発現を認めている。うち 2 例で下肢筋において、Motor Evoked Potential (MEP) の発現を認め、電気生理学的に脊髄神経軸索の再構築を証明し得た。慢性期完全脊髄損傷に対する脊髄再生医療において、電気生理学的に脊髄神経軸索の再構築を証明し得たのは国際的にも初めてのことであり、自家嗅粘膜移植の有効性を示し得た。

D. 考按

リハビリテーションを担当している和歌山県立医科大学において、廃用下肢筋のリハビリテーションと筋肉由来神経栄養因子の産生に関するデータが蓄積されてきており、近々報告される予定である。

自家嗅粘膜移植による脊髄神経軸索の再生については、随意性筋電図の発現また MEP の検出に成功しており、またリハビリテーションにおいて、バイオフィードバックを用いた随意的筋放電の誘発に成功している。DTI(Diffusion Tensor Imaging)で損傷脊髄移植部位の組織的再生を可視化は、順次データを蓄積している。また脳 fMRI で脳神経活動の再構築についてもデータを蓄積しているが、統計処理に耐えうる症例数に達していない。完全脊髄損傷慢性期に対する有効な治療法はこれまでに報告されておらず、本法により随意性筋電図、また MEP を検出し得たことは、学術的に大きな壁を破ったと言える。これに伴い、中枢神経系の可塑性、またこれを引き出す有意義なリハビリテーションについての知見が蓄積されつつある。

E. 結論

本法の成功事例を通して、中枢神経系における回復への契機の創出、有効なリハビリテーションへの新しい知見が出されて、脊髄損傷のみならず、脳梗塞等の脳血管障害や脳外傷後の治療にその知見が応用され、患者の ADL の回復に寄与しうるものと考えられる。これによりこれら中枢神経疾患による後遺症が軽減され、要介護人口の減少に寄与することが見込まれる。

この分野における医学研究費は、そのほとんどが幹細胞を中心とした細胞療法に注がれる傾向があるが、慢性期に細胞療法は奏功せず、かつまた患者のほとんどは既に慢性期である。慢性期における治療法の開発は困難と考えられてきたが、本法はそこにひとつの可能性を見いだしたものである。

これによって中枢神経疾患後遺症のリハビリテーションにも新たな展開をもたらしており、学術的行政的意義ともに大きいと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koichi Iwatsuki, Toshiki Yoshimine et al. Cybernetics: Fusion of human, machine and information systems Chapter 6 Regenerative Medicine for Spinal Cord Injury Using Olfactory Mucosa Autografts Cybernetics, Springer Verlag 2014 2/28
2. Koichi Iwatsuki, Toshiki Yoshimine, Yoshiyuki Sankai, Fumihiko 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. 岩月幸一：自家嗅粘膜移植による脊髄再生医療. 日整会誌(J. Jpn. Orthop. Assoc.) 86:897-902, 2012
4. 岩月幸一；自家嗅粘膜移植による脊髄再生医療 脳神経外科ジャーナル vol.22 No.6 June 2013 p452-458
5. 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二

宮貢士、森脇 崇；嗅粘膜移植による脊
髄再生医療 Anesthesia 21 century,
vol 15, No. 3-47, 2013

2. 学会発表

1. 第 72 回日本脳神経外科学会総会
横浜 2013 年 10 月 16 日～19 日
脊髄損傷慢性期に対する自家嗅粘膜
移植術

大阪大学脳神経外科 岩月幸一、吉峰
俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、森脇 崇

2. 第 48 回日本脊髄障害医学会 2013
年 11 月 14-15 日 アクロス福岡

慢性期完全脊髄損傷に対する嗅粘膜
移植法大阪大学脳神経外科 岩月幸
一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、
森脇 崇

3. 第 13 回日本再生医療学会総会
2014 年 3/4-6 京都国際会議場

慢性期脊髄損傷に対する自家嗅粘膜
移植

大阪大学脳神経外科 岩月幸一、吉峰
俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、森脇 崇

4. 第 49 回日本脊髄障害医学会 2014
年 9/11-12 旭川

慢性期完全脊髄損傷に対する嗅粘膜
移植法：経過報告

大阪大学脳神経外科 岩月幸一、大西
諭一郎、二宮貢士、大川都史香

5. 第 73 回日本脳神経外科学会学術総
会 2014/10/9-11 品川

学術委員会企画 再生医療と細胞医
療

慢性期完全脊髄損傷に対する嗅粘膜
移植法

大阪大学脳神経外科 岩月幸一、吉峰
俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、大川都

史香

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

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

「間葉系幹細胞移植医療の基盤整備」

研究分担者	玉井 克人	大阪大学 再生誘導医学寄附講座	教授
研究協力者	菊池 康	大阪大学 再生誘導医学寄附講座	助教
研究協力者	片山 一朗	大阪大学 皮膚科学教室	教授
研究協力者	金倉 讓	大阪大学 血液・腫瘍内科学教室	教授

【研究要旨】

重症栄養障害型表皮水疱症患者に対し、母親由来骨髄間葉系幹細胞移植を実施した。生直後より右足背から足関節部に生じ、以後 25 年間閉鎖したことの無い難治性皮膚潰瘍周囲の皮下に培養間葉系幹細胞を移植した結果、移植 4 か月後には潰瘍面の上皮化が観察された。

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症に対する骨髄由来間葉系幹細胞移植治療を確立する。

B. 研究方法

25 歳男性の重症栄養障害型表皮水疱症患者に生直後から一度も閉鎖することなく続いている右足背から足関節部に及ぶ難治性皮膚潰瘍に対して、母親腸骨より採取した 20ml 骨髄血を培養して得た骨髄間葉系幹細胞を、2 cm 間隔で 1 箇所あたり 50 万個/250ml 生理食塩水で皮下移植し、以後経時的に潰瘍縮小効果を評価した。

（倫理面への配慮）

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

C. 研究結果

母親の腸骨骨髄血 20ml より培養した間葉系幹細胞は、2 継代、30 日間の培養で約 1500 万個の間葉系幹細胞を得ることが出来た。移植可能な細胞規格である生存率 70% 以上、CD105 陽性 CD34 陰性細胞 50% 以上を満たしたため、生直後から 25 年間閉鎖していない、右足背から右足関節前面に生じた難治性潰瘍周囲の皮下に 2 cm 間隔で 1 箇所あたり 50 万個の間葉系幹細胞を移植した。その結果、それまで閉鎖したことの無い難治性皮膚潰瘍が移植 4 か月後にはほぼ上皮化を示した。

D. 考按

今回の臨床研究においては、HLA マッチを考慮せず、免疫抑制剤も使用せずに母親由来骨髄間葉系幹細胞を表皮水疱症患者の難治性潰瘍周囲皮下に移植したため、経過と共に移植細胞は拒絶され、移植治療効果

の持続時間は比較的短いと予想していた。しかし、移植後4か月目頃より著明な潰瘍縮小効果が出現し、4か月目の終わりにはほぼ上皮化が完了したことから、他家骨髄間葉系幹細胞移植の治療効果は少なくとも数か月持続することが確認された。しかし、5か月目以降には再び水疱が生じ、以後潰瘍の拡大・縮小を繰り返している。間葉系幹細胞移植前には潰瘍のサイズに著明な変動はなかったことから、潰瘍縮小効果は間葉系幹細胞移植の効果であることはほぼ疑いない。

間葉系幹細胞は損傷部位で増殖しながらTSG-6 (TNF- α gene/protein 6) などの抗炎症分子を放出して局所の炎症反応を抑制的に制御するため、拒絶反応が生じにくいと考えられている。しかし、移植5か月目には水疱形成が再燃していることから、免疫寛容は誘導されていないと思われる。より長期の治療効果を得るためにはmyeloid-abrasion後のドナー由来骨髄細胞移植と併用する、免疫抑制剤を併用するなどの拒絶反応回避法開発が必要である。

E. 結論

重症表皮水疱症患者の難治性潰瘍に対する健常家族ドナー由来間葉系幹細胞移植は有効性が確された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iinuma S, Aikawa E, Tamai K, Fujita R, Kikuchi Y, Chino T, Kikuta

J, McGrath J, Ishii M, Iizuka H, Kaneda Y. Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFR $^{+}$ cells restore type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse skin graft. J Immunol, 2015 Feb 15;194 (4): 1996-2003. doi: 10.4049/jimmunol.1400914. Epub 2015 Jan 19.

2. Fujita R, Tamai K, Aikawa E, Nimura K, Ishino S, Kikuchi Y, Kaneda Y. Stem Cells Endogenous Mesenchymal Stromal Cells in Bone Marrow Are Required to Preserve Muscle Function in mdx Mice. 33: 962-975, 2014

3. Moritsugu R, Tamai K, Nakano H, Aizu T, Nakajima K, Yamazaki T, Sawamura D. Functional analysis of the nuclear localization signal of the POU transcription factor Skn-1a in epidermal keratinocytes. Int J Mol Med. 2014, 34(2): 539-44.

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