

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

**「iPS細胞等の安定供給と臨床利用のための
基盤整備」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 西田 幸二

平成26（2014）年5月

目 次

I.	班員構成 -----	1
II.	総括研究報告	
	iPS細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備 -----	3
	西田 幸二	
III.	分担研究報告	
	1．体性幹細胞ならびにiPS細胞等の確実な保管を実現するための基盤整備 -----	7
	西田 幸二	
	2．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 -----	19
	澤 芳樹	
	3．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 -----	23
	吉川 秀樹	
	4．幹細胞のストック実施と管理 -----	25
	森 正樹	
	5．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 -----	29
	大園 恵一	
	6．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 -----	35
	吉峰 俊樹	
	7．遺伝性皮膚難病に対する骨髄間葉系幹細胞の臨床利用 -----	39
	玉井 克人	
	8．体性幹細胞、iPS細胞等を用いる臨床研究支援技術開発 -----	41
	齋藤 充弘	

9 . 幹細胞等の確実な保管および機能解析を実現するための基盤整備 -----	45
高島 成二	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	47
V. 研究成果の別刷 -----	49

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」

総括研究報告書

研究代表者 西田幸二 大阪大学医学部眼科学教室 教授

【研究要旨】

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針において、移植を受ける被験者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取したヒト幹細胞又はヒト分化細胞の一部等の適当な試料について、適切な期間保存しなければならないと定められている。しかしながら、移植した細胞の保管や情報管理を各臨床施設に任せただけの場合、不確実な保管や情報の損失の可能性が危惧され、再生医療の発展の障壁となりうる。本研究では確実な保管・情報管理を達成するための基盤整備として、移植された体性幹細胞を統合的に管理・保存するシステムを構築することとする。

今後再生医療が日本で発展することを想定すると、これらの再生医療用材料を確実に保管するための保管施設は必須のインフラと言える。しかしながら各大学や臨床施設毎に保管設備を設置するというのは、施設の運営予算や施設の設備などを考慮すると現実的とは言えない。設備、予算的に余裕のある、ある程度限られた範囲の施設において質の高い管理を行うというのはいずれの解決法であると言える。

本研究では、本研究の実施に必要な設備の整備として、1、体性幹細胞ならびに iPS 細胞等の細胞凍結保存装置細胞ストックルームの整備、2、細胞保存のためのセキュリティシステムの整備、3、細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築を行うこととする。また本研究がクリアすべき倫理的事項について議論を行い、現在までに行っている臨床研究と密接な連携を行うことでより質の高い、臨床に根差した研究を実施する。

また研究分担者が臨床研究で用いる体性幹細胞ならびに iPS 細胞から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実際に保存していくことを予定しており、今年度は臨床研究の推進ならびに iPS 細胞からの誘導法の確立や最適化について行った。

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針において、移植を受ける被験者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取したヒト幹細胞又はヒト分化細胞の一部等の適当な試料について、適切な期間保存しなければならないと定められている。しかしながら液体窒素保管庫における出納

管理は通常人の手で行っており、human error による管理ミスが発生が危惧される。human error を減らすための対策としては、高額なコンピュータ管理の液体窒素保管庫を専任のオペレータにより管理運営することなどが考えられるが、初期設備投資や年間の人件費、ランニングコストなどを考慮すると全国の各大学に設置することは現実

的に難しい。そこで本研究ではコンピュータ管理の液体窒素保管庫を専任のオペレータとともに大阪大学に設置して、全国から再生医療に使用した体性幹細胞ならびにiPS細胞を受け入れ、厳密に管理することとする。本研究により再生医療の品質管理や追跡に関する体制が整備できれば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

研究代表者の西田は、体性幹細胞ならびにiPS細胞等の確実な保管を実現するための基盤整備としてクライオライブラリの運用開始に向けた様々の検討を、特に以下の1~3の点について検討した。

1. 体性幹細胞ならびにiPS細胞等の細胞凍結保存装置細胞ストックルームの整備

体性幹細胞ならびにiPS細胞等貯蔵をおこなうために、平成24年度に当機関内に電子錠を備えた専用のストックルームの設置、コンピュータと連動した自動入出庫管理システムを実現する細胞凍結保管庫(クライオライブラリ)の設置および、既存の液体窒素タンクとの配管整備を行い、クライオライブラリに液体窒素が自動注入される環境を構築した。また作業者の安全確保のための環境整備を行った。

保管庫そのものは細胞バンクなどで使用されているものと同じの機器であり信頼性は高いと言えるが、ある程度の時間をかけて設置機器固有の問題がないかどうかを検証する必要がある。また配管や液体窒素の自動注入機能についても問題がないかどうかの検証が必要である。さらに試験運転を試験サンプルで行い、問題が生じないことを確認する。これらを平成26年上半期中に終える予定である。

2. 細胞保存のためのセキュリティシステムの整備

細胞保管と取り出しに関しては、ハードおよびソフト両面で確実性の向上を目指す。具体的には平成25年度下半期に2人のオペレータを本研究の専従研究員として配し、保管庫のオペレーションと細胞管理および細胞付帯情報管理ソフト運用の際の最適化を徹底的に図る。

3. 細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築

全国の体性幹細胞ならびにiPS細胞の保管が本研究の目的であるが、確実な運搬システムの構築は確実な保管システムの構築とともに本研究達成のための重要な要素である。運搬には液体窒素を吸収する担体が保管容器内部に仕込まれているドライシッパーと呼ばれる専用の液体窒素保管容器を用いる。ドライシッパーはたとえ転倒しても液体窒素がこぼれる心配はなく、運搬業者に対して安全性を担保できる。また容器の大きさのある程度以上のものにすれば最大で2週間程度の保管が可能であり、たとえ自然災害等で細胞の到着が遅れたとしてもほとんどのケースで問題が発生しないと言える。また細胞の由来元の個人情報の漏洩防止策として、細胞保存チューブにはバーコードシールを貼り、バーコード情報と個人をリンクする対応表は鍵のかかる保管庫で保管することとする。これらのシステム構築を平成25年度中に完成させる。

4. 体性幹細胞を用いた臨床研究の推進ならびにiPS細胞からの誘導法の確立や最適化

研究分担者が臨床研究で用いる体性幹細胞ならびにiPS細胞から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

リで実際に保存していくことを予定しており、今年度は臨床研究の推進ならびにiPS細胞からの誘導法の確立や最適化について行った。

C. 研究結果

平成24年度に設置したクライオライブラリについては平成25年11月より液体窒素の充填を開始し、配管漏れや液体窒素タンクの漏れがないことを確認した。またストックルームにおいて酸素濃度不足が生じる危険性を排除し作業者の安全確保を図るために、酸素濃度計とそれに連動したパトランプを設置した。また業者立会のもと、正常動作することを確認した。さらにランダムに振り分けた100個のストック部位(ケーンとケーン内の部位をランダムに設定)について、クライオライブラリへの入庫と出庫作業を行い、すべての作業でハードおよびソフトの両面でエラーが発生しないことを確認した。またワケンビーツ社製の検体管理システムであるSample Conductor Proをクライオライブラリのシステムに連動させ、より高機能のサンプル管理が可能となったほか、液体窒素にて冷凍中のクライオチューブにもラベルを貼ることが可能で、運用の幅を広げることが可能となった。

またクライオライブラリで使用可能なクライオチューブについても検討し、機械のトラブルが発生しないように、基本的には固有のチューブのみを用いることに決定した。そのため、運用面ではあらかじめサンプル送付予定の施設にチューブを送ることとした。

また購入したドライシッパーの機器固有の問題の可能性をみるため、液体窒素をマニュアル通りにしみこませた後の温度変化を記録した。結果、メーカーの公表よ

りはやや短かったものの、10日間にわたって-190以下の低温維持が可能であった。

また送られてきたサンプルをバーコードリーダーで読み取らせる際に、デスク脇にて簡便に低温維持ができるように、ステンレス容器にアルミビーズを敷き詰めたものを作成した。周りに液体窒素を加えると、12分程度でアルミビーズの温度は-100に達した。アルミビーズはクラッシュアイスのようにクライオチューブを刺すことが可能で、安全でかつクロスコンタミネーションがないため本研究で有用であると考えられた。

またドライシッパーで3日間保管し、その後8日間クライオライブラリで保管した後に細胞を融解、培養したことによる影響を調べた。その結果、これらの操作による細胞生存率は90%前後と良好で、また細胞形態、細胞増殖能、コロニー形成能、遺伝子発現には影響は見られなかった。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での保管による細胞への影響はないものと考えられた。

研究分担者の澤は体性幹細胞、iPS細胞等を用いる臨床研究実施のための基盤技術についての検討を行い、研究分担者の吉川は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を行った。また研究分担者の森は幹細胞のストック実施と管理についての検討を行い、研究分担者の大園は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についての検討を行った。また研究分担者の吉峰は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を行い、一定の効果を得た。また研究分担者の玉井は遺伝性皮膚難病に対する骨髄間葉系幹細胞の臨床利用について検討し、研究分担者の斎藤

は体性幹細胞、iPS 細胞等を用いる臨床研究支援技術の開発を行った。また研究分担者の高島は幹細胞等の確実な保管および機能解析を実現するための基盤整備について検討を行った。これら研究で将来的に用いられる体性幹細胞については次年度の下半期から運用を予定しているクライオライブラリにて保管する予定である。さらに将来的には分担研究者が検討しているような iPS 細胞から分化誘導した組織細胞についても同様にクライオライブラリで保管していく予定としている。

D. 考按

国内で行われる再生医療治療のサンプルを保管するシステムとして、最低限のハードおよびソフトのシステムとしては今回の検討で確認できた。しかし人が介在するポイントは随所にあると考えられ、human error による管理ミスの可能性を完全に払拭できたとは言えない。来年度上半期中に、human error をゼロにするためのルール作り(SOP の作成)と、臨床データを管理する REDCap ベースのデータベースの構築を行う予定で、来年度下半期には現在大阪大学で行っている臨床研究で用いている体性幹細胞の受け入れを手始めに、日本全国のサンプル受け入れを開始する予定である。また将来的には iPS 細胞から分化誘導した組織細胞に対しても対応する予定である。

E. 結論

我々が構築した細胞輸送システムとクライオライブラリによる保管システムは問題なく動作しており、今後国内で行われた再生医療サンプルを確実に保管・管理するのに適したシステムであると言える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

巻末研究成果一覧表参照

2. 学会発表

各分担者の項を参照

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

「体性幹細胞ならびにiPS細胞等の確実な保管を実現するための基盤整備」

研究代表者 西田幸二 大阪大学大学院医学系研究科眼科学教室 教授
研究協力者 川崎 諭 大阪大学大学院医学系研究科眼科学教室 特任講師
研究協力者 林 竜平 大阪大学大学院医学系研究科眼科学教室 助教
研究協力者 小林由紀 大阪大学大学院医学系研究科眼科学教室 研究員
研究協力者 本田 愛 大阪大学大学院医学系研究科眼科学教室 研究員

【研究要旨】

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針において、移植を受ける被験者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取したヒト幹細胞又はヒト分化細胞の一部等の適当な試料について、適切な期間保存しなければならないと定められている。しかしながら、移植した細胞の保管や情報管理を各臨床施設に任せただけの場合、不確実な保管や情報の損失の可能性が危惧され、再生医療の発展の障壁となりうる。本研究では確実な保管・情報管理を達成するための基盤整備として、移植された体性幹細胞を統合的に管理・保存するシステムを構築することとする。

今後再生医療が日本で発展することを想定すると、これらの再生医療用材料を確実に保管するための保管施設は必須のインフラと言える。しかしながら各大学や臨床施設毎に保管設備を設置するというのは、施設の運営予算や施設の設備などを考慮すると現実的とは言えない。設備、予算的に余裕のある、ある程度限られた範囲の施設において質の高い管理を行うというのはいずれの解決法であると言える。

本研究では、本研究の実施に必要な設備の整備として、1、体性幹細胞ならびにiPS細胞等の細胞凍結保存装置細胞ストックルームの整備、2、細胞保存のためのセキュリティシステムの整備、3、細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築を行うこととする。また本研究がクリアすべき倫理的事項について議論を行い、現在までに行っている臨床研究と密接な連携を行うことでより質の高い、臨床に根差した研究を実施する。

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針において、移植を受ける被験者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取したヒト幹細胞又はヒト分化細胞の一部等の適当な試料について、適切な期間保

存しなければならないと定められている。しかしながら液体窒素保管庫における出納管理は通常人の手で行っており、human errorによる管理ミスが発生が危惧される。human errorを減らすための対策としては、高額なコンピュータ管理の液体窒素保管庫

を専任のオペレータにより管理運営することなどが考えられるが、初期設備投資や年間の人件費、ランニングコストなどを考慮すると全国の各大学に設置することは現実的に難しい。そこで本研究ではコンピュータ管理の液体窒素保管庫を専任のオペレータとともに大阪大学に設置して、全国から再生医療に使用した体性幹細胞ならびにiPS細胞を受け入れ、厳密に管理することとする。本研究により再生医療の品質管理や追跡に関する体制が整備できれば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. 体性幹細胞ならびにiPS細胞等の細胞凍結保存装置細胞ストックルームの整備

体性幹細胞ならびにiPS細胞等貯蔵をおこなうために、平成24年度に当機関内に電子錠を備えた専用のストックルームの設置、コンピュータと連動した自動入出庫管理システムを実現する細胞凍結保管庫(クライオライブラリ)の設置および、既存の液体窒素タンクとの配管整備を行い、クライオライブラリに液体窒素が自動注入される環境を構築した。また作業者の安全確保のための環境整備を行った。

保管庫そのものは細胞バンクなどで使用されているものと同じの機器であり信頼性は高いと言えるが、ある程度の時間をかけて設置機器固有の問題がないかどうかを検証する必要がある。また配管や液体窒素の自動注入機能についても問題がないかどうかの検証が必要である。さらに試験運転を試験サンプルで行い、問題が生じないことを確認する。これらを平成26年上半年中に終える予定である。

2. 細胞保存のためのセキュリティシステムの整備

細胞保管と取り出しに関しては、ハードおよびソフト両面で确实性の向上を目指す。具体的には平成25年度下半期に2人のオペレータを本研究の専従研究員として配し、保管庫のオペレーションと細胞管理および細胞付帯情報管理ソフト運用の際の最適化を徹底的に図る。

3. 細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築

全国の体性幹細胞ならびにiPS細胞の保管が本研究の目的であるが、确实な運搬システムの構築は确实な保管システムの構築とともに本研究達成のための重要な要素である。運搬には液体窒素を吸収する担体が保管容器内部に仕込まれているドライシッパーと呼ばれる専用の液体窒素保管容器を用いる。ドライシッパーはたとえ転倒しても液体窒素がこぼれる心配はなく、運搬業者に対して安全性を担保できる。また容器の大きさのある程度以上のものにすれば最大で2週間程度の保管が可能であり、たとえ自然災害等で細胞の到着が遅れたとしてもほとんどのケースで問題が発生しないと言える。また細胞の由来元の個人情報の漏洩防止策として、細胞保存チューブにはバーコードシールを貼り、バーコード情報と個人をリンクする対応表は鍵のかかる保管庫で保管することとする。これらのシステム構築を平成25年度中に完成させる。

C. 研究結果

平成24年度に設置したクライオライブラリについては平成25年11月より液体窒素の充填を開始し、配管漏れや液体窒素タンクの漏れがないことを確認した。またストックルームにおいて酸素濃度不足が生

じる危険性を排除し作業者の安全確保を図るために、酸素濃度計とそれに連動したパトランプを設置した。また業者立会のもと、正常動作することを確認した。さらにランダムに振り分けた100個のストック部位(ケーンとケーン内の部位をランダムに設定)について、クライオライブラリへの入庫と出庫作業を行い、すべての作業でハードおよびソフトの両面でエラーが発生しないことを確認した。またワケンピーテック社製の検体管理システムであるSample Conductor Proをクライオライブラリのシステムに連動させ、より高機能のサンプル管理が可能となったほか、液体窒素にて冷凍中のクライオチューブにもラベルを貼ることが可能で、運用の幅を広げることが可能となった。

またクライオライブラリで使用可能なクライオチューブについても検討し、機械のトラブルが発生しないように、基本的には固有のチューブのみを用いることに決定した。そのため、運用面ではあらかじめサンプル送付予定の施設にチューブを送ることとした。

また購入したドライシッパーの機器固有の問題の可能性をみるため、液体窒素をマニュアル通りにしみこませた後の温度変化を記録した。結果、メーカーの公表よりはやや短かったものの、10日間にわたって-190以下の低温維持が可能であった。

また送られてきたサンプルをバーコードリーダーで読み取らせる際に、デスク脇にて簡便に低温維持ができるように、ステンレス容器にアルミビーズを敷き詰めたものを作成した。周りに液体窒素を加えると、12分程度でアルミビーズの温度は-100に達した。アルミビーズはクラッシュアイスのようにクライオチューブを刺すことが可能で、安全でかつクロスコンタ

ミネーションがないため本研究で有用であると考えられた。

またドライシッパーで3日間保管し、その後8日間クライオライブラリで保管した後に細胞を融解、培養したことによる影響を調べた。その結果、これらの操作による細胞生存率は90%前後と良好で、また細胞形態、細胞増殖能、コロニー形成能、遺伝子発現には影響は見られなかった。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での保管による細胞への影響はないものと考えられた。

D. 考按

国内で行われる再生医療治療のサンプルを保管するシステムとして、最低限のハードおよびソフトのシステムとしては今回の検討で確認できた。しかし人が介在するポイントは随所にあると考えられ、human errorによる管理ミスの可能性を完全に払拭できたとは言えない。来年度上半期中に、human errorをゼロにするためのルール作り(SOPの作成)と、臨床データを管理するREDCapベースのデータベースの構築を行う予定で、来年度下半期にはサンプル受け入れを開始する予定である。

E. 結論

我々が構築した細胞輸送システムとクライオライブラリによる保管システムは問題なく動作しており、今後国内で行われた再生医療サンプルを確実に保管・管理するのに適したシステムであると言える。

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

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

「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日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、 α -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ールが確立できた。

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

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。

I. 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。

J. 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。

K. 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。

L. 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となった。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。

M. 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。

N. 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。

O. 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。

P. 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与す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。

Q. 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。

R. 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。

S. 健康危険情報

なし

T. 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⁺ CD163^{low} 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

U. 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

「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。

V. 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か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。

W. 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。

X. 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。

Y. 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。

Z. 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。

AA. 健康危険情報

なし

BB. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

CC. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

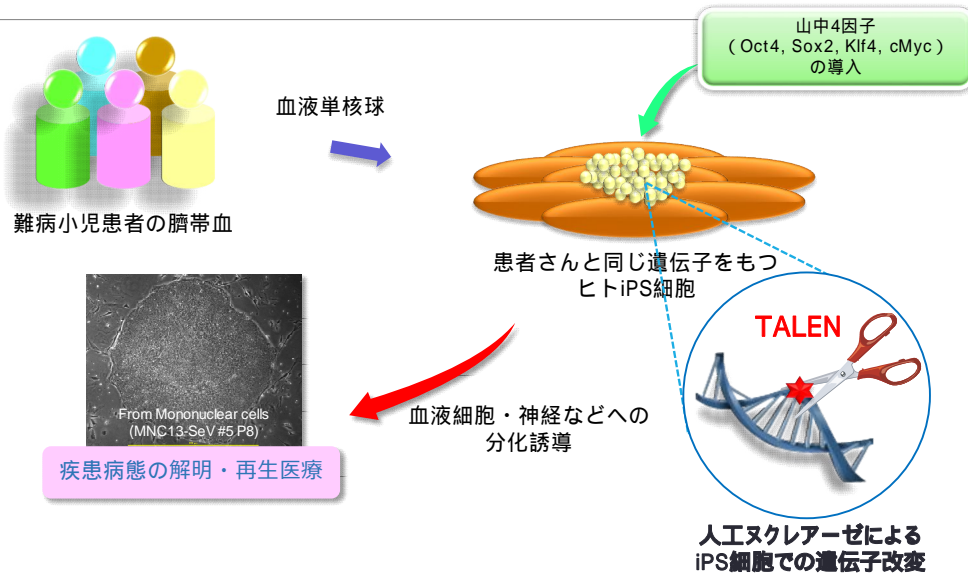
2. 実用新案特許

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)

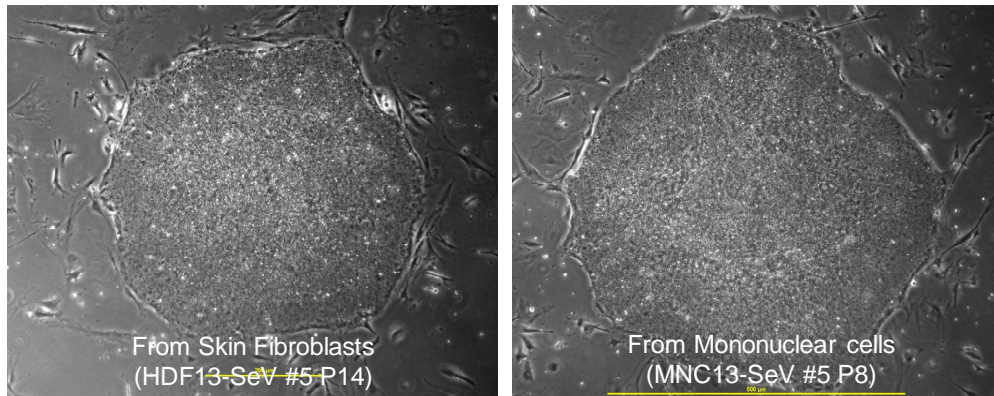
・ SeV-KOSM302L vector



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

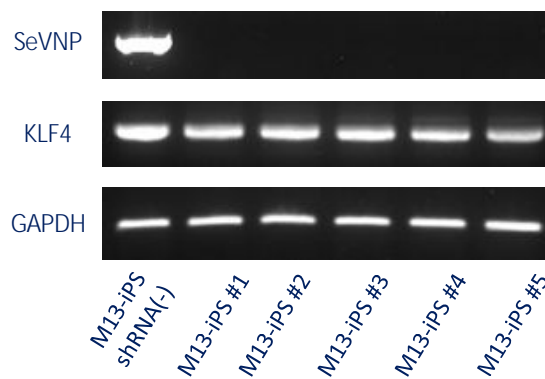
- 単核球分画の細胞 7.0×10^5 個 (IMDM培地;凍結保存から起こして24h後)
- SeV-KOSM302LウイルスをMOI=3で2h感染
- 感染5日目前後にコロニー出現(非常に早く、コロニー数も多い)
- 7日~12日でピックアップ可能



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



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

「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、有効性を高めるためには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、瘢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、細切し、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。長下肢装着装置を用いた高頻度・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。装置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 週に施行。

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, 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) 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

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

「遺伝性皮膚難病に対する骨髄間葉系幹細胞の臨床利用」

研究分担者 玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科再生誘導医学 教授
研究協力者 片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授
研究協力者 金倉 譲 大阪大学大学院医学系研究科血液内科学 教授

【研究要旨】

遺伝性皮膚難病である表皮水疱症に対する骨髄間葉系幹細胞の臨床利用の有用性について検討した。具体的には、栄養障害型表皮水疱症モデルマウスである VII 型コラーゲンノックアウトマウスを用いた骨髄間葉系幹細胞移植による皮膚症状改善効果に関する基礎研究成果を基に「表皮水疱症患者を対象としたヒト幹細胞移植臨床研究」をヒト幹細胞移植臨床研究として申請し、ドライラン、コールド・ランの結果を踏まえて実施計画書の改訂を進め、平成 25 年 5 月に改訂版実施計画書の実施承認を得た。6 月に患者および家族内ドナーの臨床研究エントリーを開始、9 月に 1 例目の骨髄間葉系幹細胞移植を実施した。以後、平成 25 年度内に 3 例に対する移植を終了し、経過観察中である

A. 研究目的

我々は、表皮水疱症の病態において、骨髄内間葉系幹細胞が剥離表皮部特異的に集積して皮膚再生に寄与していること、骨髄間葉系幹細胞移植が表皮水疱症治療に有効であることを明らかにした。これらの基礎研究成果を基に、平成 25 年度は表皮水疱症に対する骨髄間葉系幹細胞移植の安全性および有効性を評価することを目的として「表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究」を開始した。

B. 研究方法

平成 25 年 6 月に承認を得た最終版実施計画書に従って、大阪大学附属病院皮膚科を受診した表皮水疱症患者に対する臨床研究を開始した。

C. 研究結果

1) 臨床研究参加者のエントリー

大阪大学附属病院皮膚科表皮水疱症外来を受診中の、本臨床研究参加を希望する栄養障害型患者およびその家族に対して、本年 7 月より最終版臨床研究プロトコル内容の説明を開始した。本臨床研究参加を希望し、かつ参加基準を満たす患者およびその性が異なる

家族内ドナーそれぞれ3名ずつエントリーを進めた。

2) 骨髄間葉系幹細胞移植の実施

平成25年8月に38歳女性の劣性栄養障害型表皮水疱症患者および家族内ドナー（弟）、9月に27歳男性の劣性栄養障害型表皮水疱症患者およびし、家族内ドナー（母）、11月に40歳劣性栄養障害型表皮水疱症患者および家族内ドナー（兄）から、それぞれ文章による同意を得て同意書を手交し、臨床検査によりドナーの貧血、感染症を否定した後に骨髄血20mlを採取して間葉系幹細胞の培養を開始。3症例共に1ヶ月以内に必要細胞数（CD105陽性、CD34陰性細胞を50%以上含む骨髄由来付着性細胞 1×10^7 個、但し70%以上の生細胞を含む）を得た。エントリー時に1

箇所選択した6週間以上持続する難治性皮膚潰瘍に対して、1箇所50万個の培養間葉系幹細胞を2cm間隔で全周性に移植した。

現在、3症例ともに安全性（主評価）および有効性（副次評価）について定期評価中である。平成26年度10月までに全6症例のエントリーを終了する予定。

D. 考察

ドナー由来間葉系幹細胞は、腸骨より骨髄穿刺針を用いて20mlの骨髄血から培養を開始し、いずれの症例においても30日以内に、2継代で移植実施に必要な最低細胞数（ 1×10^7 個）を得て移植を完了した。移植後に残存した間葉系幹細胞は本臨床研究における再利用は無いが、液体窒素内凍結保存し、今後の基礎的研究に用いる予定である。

本臨床研究の主要評価項目は安全性の評価であるが、本稿執筆時点でいずれの症例においても重篤な有害事象は認められていない。副次評価項目である潰瘍治療効果については、3症例共に移植後の潰瘍面積縮小効果が観察されている。今後、1年間の観察期間後に安全性、有効性に関する評価をまとめる予定である。

E. 結論

栄養障害型表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究を開始し、3症例への移植を終了した。

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）

1. 論文発表
2. Furumoto T, Ozawa N, Inami Y, Toyoshima M, Fujita K, Zaiki K, Sahara S, Akita M, Kitamura K, Nakaoji K, Hamada K, Tamai K, Kaneda Y, Maeda A. [Mallotus philippinensis bark extracts promote preferential migration of mesenchymal stem](#)

- [cells and improve wound healing in mice](#). Phytomedicine. 2013 Oct 29. pii: S0944-7113(13)00360-7. doi: 10.1016/j.phymed.2013.09.003. [Epub ahead of print]
3. Umegaki-Arao N, Tamai K, Nimura K, Serada S, Naka T, Nakano H, Katayama I. [Karyopherin Alpha2 Is Essential for rRNA Transcription and Protein Synthesis in Proliferative Keratinocytes](#). PLoS One. 2013 Oct 3;8(10):e76416. doi: 10.1371/journal.pone.0076416.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

無し

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

「体性幹細胞、iPS 細胞等を用いる臨床研究支援技術開発」

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】

細胞加工製品の安定生産のためのプロトコルを検討するため、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おいて、臨床研究用筋芽細胞の培養プロセスにおける組織処理方法の最適化が製造プロセス確立に重要である可能性が示唆された。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

大阪大学医学部附属病院未来医療センターでは、基礎研究の早期実用化を目指したトランスレーショナルリサーチ実践の場として、2003 年に医学部附属病院の中央診療施設の一部門として開設され、ヒト幹細胞臨床研究や遺伝子治療臨床研究について、審査評価委員会への申請や臨床研究の実施に必要な書類作成から臨床研究終了までの総合的なサポートを行っている。さらに6ユニットの細胞培養調製施設を保有し、国内最多の承認件数を誇るヒト幹細胞臨床研究は国内随一の実施経験で多彩な幹細胞臨床研究の支援を提供できることに加え、GMP 対応施設として治験での利用も可能である。さらに、将来予定されている iPS 細胞由来細胞加工製品の製造を見据えて、細胞調整ユニットの増設を行うとともに、製造支援体制の強化を行った。

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支援ならびに iPS 細胞からの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において、様々な被験者の筋芽細

胞の倍加時間や筋芽細胞純度変化を精査し、細胞加工製品の安定生産のためのプロトコールを検討した。

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

これまでの臨床研究用筋芽細胞培養の経験から、被験者の年齢や病歴、投薬状況等の背景と筋芽細胞の倍加時間やCD56を指標とした筋芽細胞純度に相関が認められなかった。さらに、製造プロセス中の凍結作業における細胞の影響についても、筋芽細胞純度との相関が認められなかった。一方で、組織の細切処理にかかる時間と組織の大きさ、酵素処理時間と初期獲得細胞数に関連性が示唆された。

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日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ールが確立できた。

D. 考察

被験者毎で異なる組織（原材料）から、細胞加工製品を安定に製造するためには、原材料基準の統一と豊富な製造経験からのデータのフィードバックによる製造プロセスの最適化が必須である。今後の臨床研究の製造で得られる知見も精査し、細胞加工製品の安定生産のためのプロトコール確立を目指す。

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における組織処理方法の最適化が製造プロセス確立に重要である可能性が示唆された。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

4. 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

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

「幹細胞等の確実な保管および機能解析を実現するための基盤整備」

研究分担者 高島成二 大阪大学大学院医学系研究科医化学教室 教授

【研究要旨】

本研究においてはヒト幹細胞の臨床応用に向けた細胞保存設備の整備および、保存される、あるいは保存されている細胞が適切に維持され、安全に再生医療に応用できる施設および細胞解析基盤を構築することを目的とする。本研究分担者は、実際の保存施設の設計および細胞機能評価のためのゲノム・タンパク質解析の基盤構築を行った。本研究においては「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」ほか関連指針等を遵守し、各施設の倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進めた。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った。

DD. 研究目的

ヒト幹細胞等の適切な保管は、再生医療等の実現に最も必要な事業の一つである。これらの細胞を受け入れ、細胞ストックとして適切な管理を行うためには、保存細胞の性格を正確に把握する必要がある。そのためには微生物感染の有無以外にも、予測しない遺伝子変異による細胞動態の変化や、タンパク質発現変化の動態解析を初期にあるいは定期的に行っていくことが非常に重要である。分担者はこれらが適切に行われるための細胞保存施設の環境整備と、細胞からの遺伝子情報・タンパク質情報の解析基盤の構築を行うことを目的として本事業に参画した。

EE. 研究方法

1. 体性幹細胞ならびに iPS 細胞等の細胞凍結保存装置細胞ストックルームの整備
体性幹細胞ならびに iPS 細胞等貯蔵を

おこなうために、平成 24 年度に当機関内に電子錠を備えた専用のストックルームの設置、コンピュータと連動した自動入出庫管理システムを実現する細胞凍結保管庫（クライオライブラリ）の設置および、既存の液体窒素タンクとの配管整備をおこなった。分担者はこの設計に携わり、特にクリーンでセキュリティの高い保存環境を整える設計に従事した。

2. ヒト幹細胞等の遺伝子・タンパク質解析技術の確立

さまざまな種類の細胞等から、効率よく遺伝子・タンパク質を抽出し、超高速シーケンサーや質量分析等を駆使した解析を行い、幹細胞等の迅速で・的確な機能評価を行う系を確立する。また種々の細胞機能解析し手法も用いて幹細胞等の機能評価も合わせて実行した。

FF. 研究結果

分担者が設計した図面に基づき前室を

含めた細胞貯蔵室が完成し H25 年 11 月より液体窒素の充填を開始し、運用を開始した。さらに高速シーケンサーを含めた細胞解析環境を整え、実際に幹細胞等の DNA およびタンパク質の解析の高度化をおこなった。さらに細胞機能にかかわる種々のアッセイ系を利用して幹細胞等の保存処理等による経時変化を解析し、保存方法・状態によってエネルギー代謝系の変化などが生じることが明らかとなった。

GG. 考按

幹細胞等はウイルスを含めた遺伝子操作も行われていることが多く単にその保存を行うだけでなく、一つ一つの細胞においてその機能を含めた遺伝子・タンパク質等の発現が常に一定の形質を保っているか正確にモニターしていかなければならない。そのためには保管施設と併設された細胞解析施設においてこれらの解析が的確に行われる環境を作ることの重要性がますます増加すると思われる。幹細胞の機能維持のための細胞機能解析としてどのような系が最も適しているかを今後も追及していくことが再生医療の安全な実現には必須と思われる。

HH. 結論

クリーンで安全性の高い細胞輸送システムとクライオライブラリによる保管システムの確立と保存細胞の解析基盤の構築をおこなった。

II. 健康危険情報

なし

JJ. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

KK. 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

論文一覽

1. Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Miki K, Ito E, et al. 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. *Circulation*. 2013;128(11 Suppl 1):S87-94.
2. 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*. 2013;8(10):e77365.
3. 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 : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs*. 2013;16(3):305-15.
4. Kawamoto K, Konno M, Nagano H, Nishikawa S, Tomimaru Y, Akita H, et al. CD90-(Thy-1-) high selection enhances reprogramming capacity of murine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Disease markers*. 2013;35(5):573-9.
5. Nishikawa S, Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Kano Y, Ohta K, et al. Aldehyde dehydrogenase high gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy. *International journal of oncology*. 2013;42(4):1437-42.
6. Robinson JW, Dickey DM, Miura K, Michigami T, Ozono K, Potter LR. A human skeletal overgrowth mutation increases maximal velocity and blocks desensitization of guanylyl cyclase-B. *Bone*. 2013;56(2):375-82.
7. Miura K, Kim OH, Lee HR, Namba N, Michigami T, Yoo WJ, et al. Overgrowth syndrome associated with a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) gene. *American journal of medical genetics Part A*. 2014;164A(1):156-63.
8. Ishihara M, Mochizuki-Oda N, Iwatsuki K, Kishima H, Ohnishi YI, Moriwaki T, et al. Primary olfactory mucosal cells promote axonal outgrowth in a three-dimensional assay. *Journal of neuroscience research*. 2014.
9. Nakayama J, Takao T, Kiuchi H, Yamamoto K, Fukuhara S, Miyagawa Y, et al. Olfactory mucosal transplantation after spinal cord injury improves voiding efficiency by suppressing detrusor-sphincter dyssynergia in rats. *The Journal of urology*. 2010;184(2):775-82.
10. Iwatsuki K, Yoshimine T, Kishima H, Aoki M, Yoshimura K, Ishihara M, et al. Transplantation of olfactory mucosa following spinal cord injury promotes recovery in rats. *Neuroreport*. 2008;19(13):1249-52.
11. Furumoto T, Ozawa N, Inami Y, Toyoshima M, Fujita K, Zaiki K, et al. *Mallotus philippinensis* bark extracts promote preferential migration of mesenchymal stem cells and improve wound healing in mice. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2014;21(3):247-53.
12. Umegaki-Arao N, Tamai K, Nimura K, Serada S, Naka T, Nakano H, et al. Karyopherin alpha2 is essential for rRNA transcription and protein synthesis in proliferative keratinocytes. *PloS one*. 2013;8(10):e76416.
13. Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, et al. Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(1):273-8.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
梅垣昌士 岩月幸一 吉峰俊樹	先進医療治療の 実際	奥村 康 中島 正治 大坪 修	先進医療 NAVIGATOR	日本医学 出版	東京	2013	第2章
玉井克人	表皮水疱症に対す る再生医療の現状 と未来	天谷雅行	皮膚科臨床アセ ット：19巻、水 疱性皮膚疾患	中山書店	東京	2014	196-201
玉井克人	表皮水疱症の再生 医療	宮地良樹	WHAT'S NEW in 皮膚科学	メディカ ルレビュー 社	東京	2014	26-27