

ヒト間葉系幹細胞用無血清培地:STK[®]シリーズ (STK[®]1, STK[®]2, STK[®]3)の開発

Development of chemically defined serum-free media: STK[®] series (STK[®]1, STK[®]2, STK[®]3) for human mesenchymal stem cell

邵 金昌 Jinchang Shao (General Manager)

株式会社ツーセル 研究本部 本部長
Head Office of Research & Development, TWOCELLS COMPANY, LIMITED.

長谷川 森一 Shinichi Hasegawa (Vice Manager)

株式会社ツーセル 研究本部 副本部長
Head Office of Research & Development, TWOCELLS COMPANY, LIMITED.

加藤 幸夫 Yukio Kato (Vice President)

株式会社ツーセル 取締役副社長
TWOCELLS COMPANY, LIMITED.

辻 紘一郎 Tsuji Koichiro (President and Chief Executive Officer)

株式会社ツーセル 代表取締役社長
TWOCELLS COMPANY, LIMITED.

キーワード ■■ Chemically Defined Serum-free Media, Mesenchymal Stem Cell (MSC), Regenerative Medicine

01 はじめに

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: 以下MSC) は、骨、軟骨、靱帯、筋肉、脂肪など中胚葉由来組織へ分化するのみならず、外胚葉および内胚葉由来組織 (神経、肝臓など) へも分化する。しかもMSCは、成体ドナーの各組織 (骨髄、脂肪、滑膜、臍帯、歯髄など) から容易に分離できる¹⁻³⁾。MSCは胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: 以下ES細胞) より癌化リスクが小さく、iPS細胞 (induced Pluripotent stem cell) の様な遺伝子レベルの操作を必要としないため、臨床応用上の安全性が高く、倫理学的問題も少ない細胞である。そのため、近年国内外において、MSCを用いた細胞移植治療の研究が進められており、骨・関節疾患、循環系疾患、脳卒中、自己免疫疾患、移植片対宿主病 (Graft versus host disease: 以下GVHD) など、すでに多くの臨床例がある⁴⁻⁶⁾。一方、従来のMSC培養系には、通常培地に患者自己血清またはウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: 以下FBS) が添加されているが、血清には下記の3つの問題点がある。

①血清添加培地で培養したMSCの品質は一定しない;血清はおよそ1万種以上の成分を含むため複雑で、その中には未知物質が含まれる。また、血清成分はロットによって性能が変化したり、蛋白質分解酵素によって変性したりする。

②血清添加培地で培養したMSCの安全性は担保できない;FBS添加培地は各種病原体、例えばBSE (Bovine spongiform encephalopathy) プリオンやウイルスなどによる感染、異種蛋白によるアレルギー、動物型シアル酸産生などのリスクがある。また、患者の自己血清は同種になるため、FBSより免疫拒絶反応などのリスクが少なく安全だが、小児や重症患者からの大量採血は困難であるという問題もある。

③血清の成分はMSCに対して最適でない;血清はMSCに特異的な増殖因子を必ずしも十分に含有するとは限らない。また、血清中にはMSCの増殖を阻害する酵素や未分化性を損なう因子がある。

再生医療の移植用MSCの培養に無血清培地を用いると、血清ロットチェックが不要;培養期間の短縮;ウイルス、細菌、マイコプラズマなどの血清由来成分からの感染リスクの減少;効率的に品質の高い細胞を増幅できるなど、多くの利点が期待できる。

したがって、安全性及び品質の高いMSCを再生医療に提供できるようにするため、無血清培地 (完全合成培地) の開発は必要である⁷⁾。

本稿では、ヒトMSC用無血清培地:STK[®]シリーズ (STK[®]1, STK[®]2, STK[®]3) の開発経緯及びMSCの無血清培養技術について概説する。

02 初期の無血清培地

動物細胞の無血清培養は容易ではない。1980年頃、Gordon Satoらは、成長因子を添加した無血清培地を開発した⁸⁾。彼らの無血清培地は、株化(不死化)細胞の増殖を支持したが、動物やヒト組織から分離したプライマリ細胞の増殖を十分に支持しなかった。その後、Denis Gospodarowiczらは、細胞外基質(Extracellular matrix: 以下ECM)コート培養皿や血漿リポ蛋白質画分を用いて、各種のプライマリ細胞を長期間無血清培養した⁹⁻¹¹⁾。ただしECMや血漿リポ蛋白質画分には、未知物質が含まれている。そして、2000年頃から、再生医学の研究が盛んになるとともに、MSCを含む幹細胞用の無血清培地の開発が始まった。

03 ヒト間葉系幹細胞用無血清培地:STK[®]シリーズ(STK[®]1, STK[®]2, STK[®]3)の開発

3.1 ヒトMSC継代培養用(大量培養用)無血清培地:STK[®]2

STK[®]2は国内初のMSC用無血清培地として2008年に開発された。

我々の目標は、単に無血清で安全であれば良いのではなく、従来法よりも高品質のMSCを効率的に増幅できるような、臨床で有効性を示せる培地を開発することにある。STK[®]2の開発実験には、ヒト腸骨骨髓由来MSCを使用した。我々は、10%FBS含有培地に添加したFibroblast growth factor-2 (FGF-2)が骨髓由来MSCの増殖を促進し、軟骨、脂肪、骨への分化能を高レベルに維持することを報告した(超増幅培養法)¹²⁾。現在では、FGF-2添加法/超増幅培養法は、全世界で定着している。そこで、STK[®]2でもFGF-2を基軸成分とした。通常FGF-2は非常に不安定であるが、無血清培地中では低濃度でも安定であった。おそらく血清中のFGF分解酵素やFGF結合蛋白がないためである。Hepatocyte growth factor (HGF)はMSC増殖を抑制すると報告されていた¹³⁾。またTransforming growth factor (TGF- β)は、一般には細胞増殖抑制因子であり分化促進因子でもある。しかし、これらの因子は、無血清条件下でMSCの未分化状態を維持しつつ増殖を促進した。さらにVascular endothelial growth factor (VEGF)、Connective tissue growth factor (CTGF)などもMSCの増殖を促進した。STK[®]2にはこれらの成長因子を組み合わせで添加した。またアルブミンは、ES細胞などの細胞の生存と増殖に必須でないが¹⁴⁾、MSCの生存と増殖には必須であった。各種の脂肪化合物は、低濃度で細胞増殖を促進し高濃度で抑制したので、それらの組み合わせと濃度を最適化してからSTK[®]2に加えた。

細胞を培養容器に単層で接着させた単層培養系でSTK[®]2を用いた場合は10%FBS含有培地以上にヒト骨髓MSCの増殖を促進した(図1)。さらにSTK[®]2はリン酸カルシウム担体(ハイドロキシアパタイト)存在下でもMSCの増殖を促進し、ハイドロキシアパタイトを足場とする培養骨の作成においても細胞増殖の面

で有効性があった¹⁵⁾。また初期のSTK[®]2には、ウシ血清由来アルブミンを含有していたが、現在は製造から管理された安全性の高い遺伝子組換えヒト血清アルブミンに置き換えている(図1)。次に、STK[®]2中の各成分の役割を明らかにするために、同培地から成分を一つだけ除去した培地をそれぞれ作製した。STK[®]2から各因子を一つ除去することで、細胞の生存率あるいは増殖率が低下した。そして、STK[®]2中にはMSCの生存に必須である化合物(インスリンなど)、増殖を促進するのに必要な化合物(FGF-2など)、未分化性を保つのに欠かせない化合物(TGF- β など)の必要性を明らかにした。

MSCは、様々な組織(骨髓、脂肪、滑膜、歯髄、臍帯組織など)から分離されている。これらのMSCの多分化能は類似しているが、滑膜MSCの軟骨分化能や、歯髄MSCの神経分化能は他のMSCと比較して高い。STK[®]2は、いずれのMSCに対しても、10%FBS含有培地より高レベルに増殖を促進した¹⁶⁻¹⁸⁾。

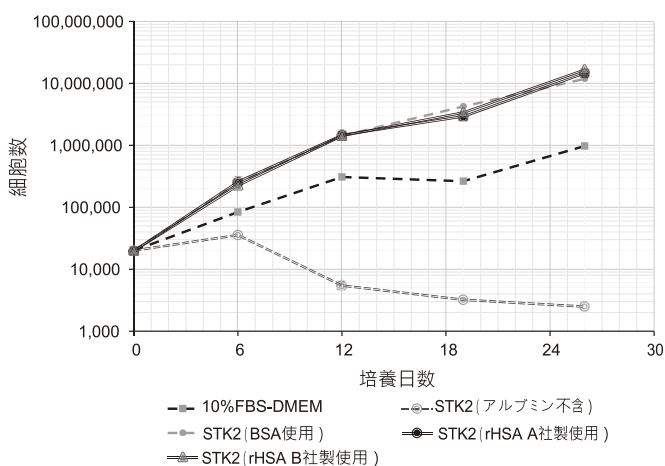


図1 ヒトMSCの長期培養に及ぼす遺伝子組換えヒト血清アルブミンの影響

3.2 ヒト初代MSC用(組織より初代細胞樹立培養用)無血清培地: STK[®]1

全培養プロセスを無血清化するには、初代培養系でも無血清培養が必要である。しかし、初代ヒト骨髓MSCの培養系では、STK[®]2培地を用いた培養は細胞の増殖をほとんど促進しなかった。特に、細胞の培養皿への接着能が低下した。骨髓から分離直後のMSCは接着力が弱いため、無血清培地中では増殖しないが、継代培養系で人工的環境に馴化すれば、STK[®]2中でも増殖できるようになるのかもしれない。一方、血清には接着因子が存在するため、初代、継代に関わらず、MSCの接着と増殖を支持するものと推察される。いずれにせよ、初代MSCの無血清培養系では、培養環境への馴化と細胞接着の促進が必要である。これらのことを考慮しSTK[®]2中に初代細胞の接着を阻害する成分などを除去することで、2010年にMSCの初代培養用無血清培地STK[®]1を開発した。

STK[®]2はヒト各組織MSCの大量培養をいずれも支持するが、

それに対して、各組織由来初代MSCのSTK[®]1への適応能は多様であった。滑膜由来初代MSCはSTK[®]1中でも最も高レベルの増殖を示した。次いで、歯髄由来初代MSCと脂肪由来初代MSCが、10%FBS含有培地よりもSTK[®]1中で活発に増殖した¹⁶⁾。しかし、これらの組織と比較して、骨髄由来初代MSCは特に接着能が低いため、ドナーによっては骨髄液から分離したMSCは、STK[®]1存在下で樹立培養できないことがある。

3.3 ヒトMSC骨分化誘導用無血清培地: STK[®]3

骨欠損の治療に自家骨移植がよく用いられているが、骨採取には長期間の疼痛をもたらす。しかも採取できる骨量は少ない。したがって大量に作製可能であるMSC由来培養骨への期待は社会的に大きい。ところが、従来のMSC用骨分化誘導培地¹⁹⁾(β -グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメタゾンなど含有:以下OS-medium)には10%FBSが含まれているので、前述の全培養プロセス無血清化のためにはMSC骨分化誘導用の無血清培地が求められていた。

各種化合物を検討した結果、いくつかの成長因子はMSCの増殖を促進する一方で、骨分化を抑制することが明らかになった。

そこで、STK[®]2から骨分化抑制因子を除去して、 β -グリセロリン酸、アスコルビン酸を追加したことにより世界初のMSC骨分化誘導用無血清培地:STK[®]3を開発した。STK[®]3の組成には骨形成蛋白質(Bone morphogenetic protein: BMP)などの骨誘導、促進因子を配合していないにもかかわらず、従来の血清含有OS-mediumよりも強力にかつ短期間に骨分化を誘導した。これは、血清中には骨分化を抑制する因子が存在することを示唆している。しかも、STK[®]2で前培養したMSCは、血清含有培地で前培養した細胞よりもSTK[®]3添加後により早く相乗的に骨分化した(図2)。従来法では、骨分化に3週間から4週を要するが、STK[®]3を用いれば1週間に短縮できるので、培養の省力化に役立つ。

3.4 STK[®]シリーズ培地の共通成分と追加成分

無血清培地の成分は7つのカテゴリー(栄養素、アルブミン、成長因子、脂質、低分子化合物、抗酸化剤、その他)に分類可能であり、すべての成分は化学的に既知である。STK[®]シリーズの全成分数は65~86個化合物である。STK[®]シリーズで最も成分数が多いのは、栄養素(無機質を含む)であり54~60個の化合物からなる。血清中には1万種以上の化合物が存在すると考えられるの

4日目		10%FBS培地で培養した細胞			STK2で培養した細胞		
培地の種類／細胞株(継代数)		株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)	株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)
10%FBS含有骨分化誘導培地							
STK3							

7日目		10%FBS培地で培養した細胞			STK2で培養した細胞		
培地の種類／細胞株(継代数)		株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)	株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)
10%FBS含有骨分化誘導培地							
STK3							

14日目		10%FBS培地で培養した細胞			STK2で培養した細胞		
培地の種類／細胞株(継代数)		株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)	株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)
10%FBS含有骨分化誘導培地							
STK3							

21日目		10%FBS培地で培養した細胞			STK2で培養した細胞		
培地の種類／細胞株(継代数)		株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)	株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)
10%FBS含有骨分化誘導培地							
STK3							

図2 ヒトMSCの骨分化に及ぼす無血清培地の影響:
骨分化誘導培地で培養したMSCの骨分化染色結果 (Alizarin red染色)

で、百個以下の化合物で細胞の長期間の生存と増殖を維持できる理由はまだ解明されていない。無血清培地中では、血清中に含まれる細胞内で必要な化合物が合成されるかもしれないし、微量分子は最初の持ち込みだけで十分かもしれない。

STK[®]1～3には共通成分(60個化合物)以外に、追加化合物(5～26種類)が配合されている。共通成分は生存を維持し、STK[®]1への追加成分は馴化と接着、STK[®]2への追加成分は増殖、STK[®]3への追加成分は骨分化を支持する。

3.5 臨床用STK[®]シリーズ(STK[®]1, STK[®]2)の開発

近年、再生医療の臨床研究の進展や実用化に伴い、「生物由来原料基準」(厚生労働省告示第210号、平成15年5月20日)に適合する原料のみを使用している、臨床用グレードの培地が求められていた。

我々は前述の研究用のSTK[®]シリーズの開発を通じて培ってきた培地の原料・組成等の開発技術を強みに、PMDAに再生医療等製品の材料適格性の相談をした上で、「生物由来原料基準」に適合する原料のみを使用した臨床用STK[®]シリーズ(STK[®]1, STK[®]2)を開発した。研究用STK[®]シリーズと比較して、臨床用STK[®]シリーズは、培地の高い性能を保ちながら培養した細胞の

安全性が担保できる。

現段階では臨床用STK[®]シリーズは、すでに自社開発したMSC由来細胞治療製品の研究開発に活用している。

04 MSCの無血清培養で使用する酵素液

脂肪、骨膜、歯髄、滑膜組織からMSCを分離、分散するのにコラゲナーゼなどが用いられるが、同酵素の生産過程では血清を使用していない製品を使用すべきである(Collagenase-A, animal origin free, Worthington Biochemical Co.など)。

継代のための細胞剥離剤としては、従来法ではブタやウシ由来トリプシンが使われているが、ウイルスやプリオンによる感染リスクがあり、動物由来成分フリーでなくなるという問題がある。また無血清培地には血清由来の蛋白分解酵素インヒビターが不在のため、動物由来成分が含まれているトリプシンを使用した場合、剥離後に精製トリプシンインヒビターの添加が必要である(無血清培養ではこれを怠ると細胞が死滅する)。一方、近年、cGMP(Current Good Manufacturing Practices)対応

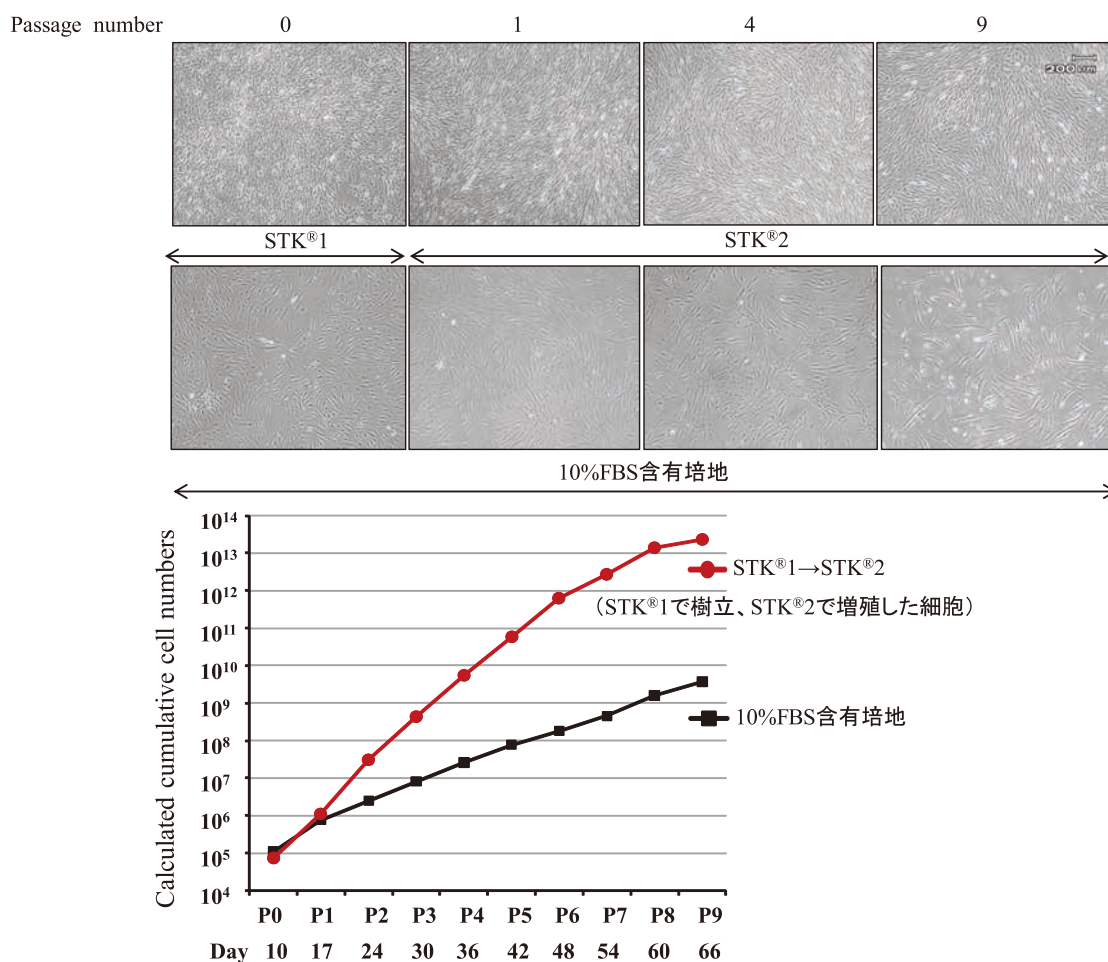


図3 STK[®]1, STK[®]2を用いたヒト滑膜MSCの長期連続的な継代培養・大量増殖:10%FBS含有培地との比較

の設備で、動物由来成分を使用せず製造された遺伝子組換え体トリプシン様酵素(TrypLE™ Select CTS™, Thermo Fisher Scientific; TrypZan™ Solution, Sigmaなど)が発売され、これらは、ヒトMSCの無血清培養に適用できる。動物由来成分が含まれているトリプシンより純度が高く細胞に優しい。多くの場合、洗浄すれば精製トリプシンインヒビターの添加は不要であるが、いずれの酵素を用いても細胞剥離後の十分の洗浄は必要である。また、無血清培地を用いた細胞継代では、機械的刺激(過度の攪拌や遠心など)による細胞にダメージを与えてしまうため、酵素濃度および酵素反応時間を最小にしなければならない。

05 STK®1、STK®2を用いた 関節疾患治療用他家滑膜MSCの増幅

滑膜由来のMSCは、他組織由来MSCと比較して、高い軟骨分化能を有するので、関節疾患治療での細胞ソースとして優れている。しかし、FBSや患者自己血清を用いる従来の培養法では、移植に必要とする数千万ないし億単位の細胞数を確保するのは難しい。そこで、我々はSTK®1とSTK®2を用い、ヒト滑膜組織から

MSCを分離して連続的に継代培養した。

Collagenase-A(animal origin free)の処理により組織から単離した初代滑膜MSCをSTK®1で培養すると、血清含有培地より多くの細胞が接着・増殖した。またSTK®1とSTK®2を用いた完全な無血清の培養条件下で連続的に継代培養(9継代以上)ができた。そして、10%FBS含有培地と比較して、細胞を1万倍まで増幅させる時間が約半分に短縮した(図3)。無血清培地で得られたMSCは、血清含有培地と比較して、細胞集団として均質であり、同様の細胞表面マーカーを発現した(図4)。また、すべての株で5継代後も染色体異常がなかった。さらに無血清培養したMSCは、血清含有培地よりも顕著に高レベルの軟骨、骨、脂肪分化能を示した(図5)。

従来の血清培養法を用いて増殖したMSCの数は最大でも数十人分程度しか得られないので自家移植は可能であるが、商業利用が可能な他家移植の安定供給は困難であった。しかし、STK®シリーズを利用することにより、ドナー一人分のヒト滑膜組織(湿重量0.5~1g)から、千人から一万人の関節疾患を治療するための高性能MSC(10^{13} 個)を増幅することができるようになった。

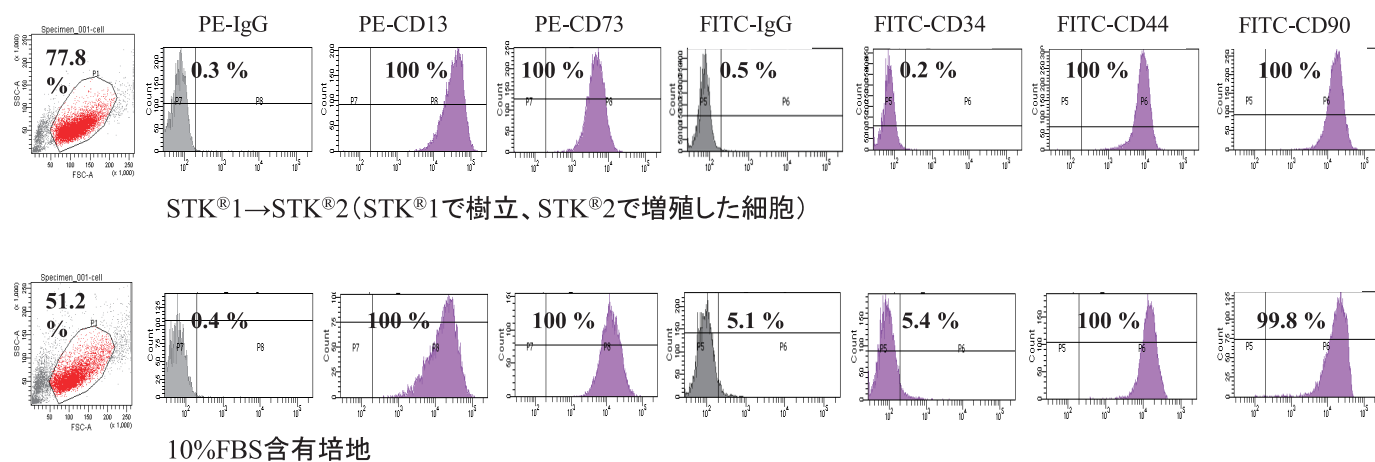


図4 STK®1, STK®2で増殖したヒト滑膜MSCの表面抗原マーカーの解析:10%FBS含有培地との比較

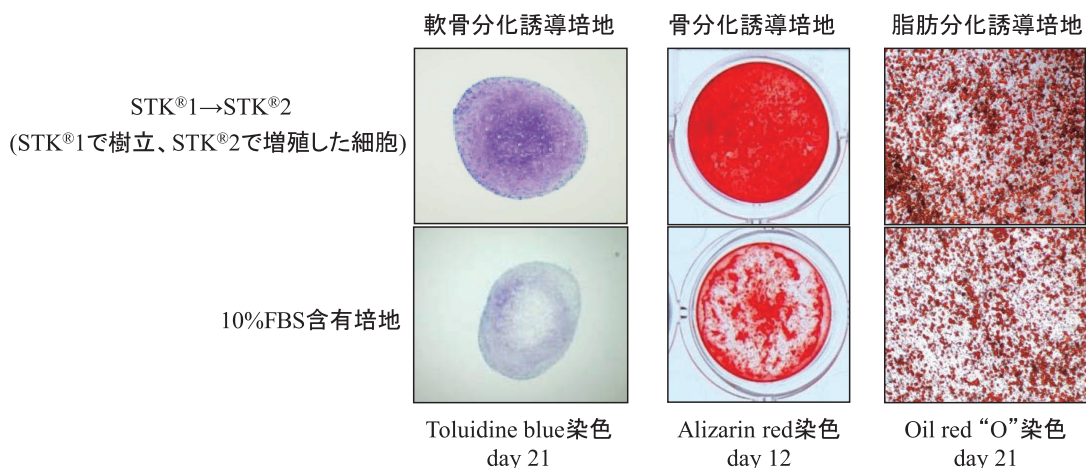


図5 STK®1, STK®2で培養したヒト滑膜MSCの軟骨・骨・脂肪への分化能:10%FBS含有培地との比較

06

MSC用無血清培地が直面している課題

MSC用無血清培地には細胞の増殖性および未分化性を保つため、数種類の遺伝子組換え成長因子を配合している。そのため、血清含有培地より高価になっている。最近のヒトES細胞用の無血清培地では、これまで必須とされてきたbFGFやTGF β を低分子化合物に置換することができた²⁰⁾。STK[®]シリーズについても、将来は遺伝子組換え成長因子などのコストが高い成分を低分子化合物に置換する必要がある。

無血清培地の開発には、培養皿への考慮も必要である。生体内で、幹細胞はニッチに存在するが、ニッチでは、液性因子以外にECMや他細胞との接触によりstemness(幹細胞らしさ)が維持される。培地は液性因子、培養皿はECM、フィーダー細胞は他細胞の影響を模倣する。ECMは、細胞の接着、遊走、増殖、分化を制御するが²¹⁻²²⁾、未知物質を含むことが問題である。したがって、生体内のニッチを再現するには、無血清培地とECMの機能をもつ培養皿との組み合わせが不可欠である。

血清含有培地を使用すれば、血清蛋白が培養皿に付着して、ECMと類似した機能を発揮するのに対して、無血清培地では血清からのECM効果が期待できない。したがって、無血清培養用の培養皿が必要であり、各社が開発を進めている。従来のプラズマ処置したプラスチック培養皿の表面化学組成は一定でなく、しかも保管中にその化学性状が変化することが問題である。近年、ECMの一部機能が代替できる遺伝子組換えヒトフィブロネクチン、ビトロネクチンなどが発売されたが、コストが高く患者への経済負担を増加させるため再生医療には今のところ適合しない。今後、無血清培地と高機能の培養皿の併用が必要となるが、効果とコストのバランスを考慮しなければならない。

また、他家移植法では、移植するMSCの品質が十分管理されていないといけない。所謂MSCには共通分化レパートリーや共通の細胞表面抗原が知られているものの、ES細胞のように均質な細胞としてMSCを規定化できていない。我々は、現在各種MSCマーカーの開発にも着手しており、今後MSCの仕様を規定するのに役立つかもしれない²³⁻²⁵⁾。

参考文献

- 1) R. Secunda, R. Vennila, A.M. Mohanashankar, M. Rajasundari, S. Jeswanth, R. Surendran. *Cytotechnology* **67**(5), 793-807 (2015).
- 2) C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, F. P. Luyten. *Arthritis and Rheumatism* **44**(8), 1928-1942 (2001).
- 3) A. H. Huang, Y. K. Chen, L. M. Lin, T. Y. Shieh, A. W. S. Chan. *J. Oral Pathol. Med.* **37**(9), 571-574 (2008).
- 4) A. Andrzejewska, B. Lukomska, M. Janowski. *Stem Cells* **37**(7), 855-864 (2019).
- 5) C. Brown, C. McKee, S. Bakshi, K. Walker, E. Hakman, S. Halassy, D. Svinarich, R. Dodds, C. K. Govind, G. R. Chaudhry, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **13**(9), 1738-1755 (2019).
- 6) J. Galipeau, L. Sensébé, *Cell Stem Cell* **22**(6), 824-833 (2018).
- 7) F. Mannello, G.A. Tonti, *Stem Cells* **25**(7), 1603-1609 (2007).
- 8) D. Barnes, G. Sato, *Anal. Biochem.* **102**(2), 255-270 (1980).
- 9) D.K. Fujii, J. Cheng, D. Gospodarowicz, *J. Cell. Physiol.* **114**(3), 267-278 (1983).
- 10) Y. Kato, D. Gospodarowicz, *J. Cell. Physiol.* **120**(3), 354-363 (1984).
- 11) Y. Kato, D. Gospodarowicz, *J. Biol. Chem.* **260**(4), 2364-2373 (1985).
- 12) S. Tsutsumi, A. Shimazu, K. Miyazaki, H. Pan, C. Koike, E. Yoshida, K. Takagishi, Y. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**(2), 413-419 (2001).
- 13) G. Forte, M. Minieri, P. Cossa, D. Antenucci, M. Sala, V. Gnocchi, R. Fiaccavento, F. Carotenuto, P. Di Vito, P. M. Baldini, M. Prat, P. Di Nardo, *Stem Cells* **24**(1), 23-33 (2006).
- 14) G. Chen, DR. Gulbranson, Z. Hou, JM. Bolin, V. Ruotti, MD. Probasco, K. Smuga-Otto, SE. Howden, NR. Diol, NE. Propson, R. Wagner, GO. Lee, J. Antosiewicz-Bourget, JM. Teng, JA. Thomson, *Nat Methods* **8** (5), 424-429 (2011).
- 15) 石川 格, 澤田留美, 加藤幸夫, 辻紘一郎, 邵 金昌, 山田貴史, 加藤玲子, 土屋利江, *薬学雑誌* **129**(3), 381-384 (2009).
- 16) 加藤幸夫, 藤井紗貴子, 五藤紀子, 北山和子, 金輪真佐美, 河本 健, 藤本勝巳, 邵 金昌, 桂 由紀, 潘 海鷗, 長谷川森一, 辻紘一郎, *広島歯科医学雑誌* **39**(1), 1-8 (2011).
- 17) M. S. Lee, C. Youn, J. H. Kim, B. J. Park, J. Ahn, S. Hong, Y. D. Kim, Y. K. Shin, S. G. Park. *Int J Mol Sci.* **18**(8), 1779-1796 (2017).
- 18) S. Fujii, K. Fujimoto, N. Goto, Y. Abiko, A. Imaoka, JC. Shao, K. Kitayama, M. Kanawa, A. Sosiawan, K. Suardita, F. Nishimura, Y. Kato. *Biomed Rep.* **8**, 350-358 (2018).
- 19) M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak, *Science* **284**(5411), 143-147 (1999).
- 20) S. Yasuda, T. Ikeda, H. Shahsavarani, N. Yoshida, B. Nayer, M. Hino, N. Vartak-Sharma, H. Suemori, K. Hasegawa, *Nat. Biomed. Eng.* **2**(3), 173-182 (2018).
- 21) Y. Kato, D. Gospodarowicz, *J. Cell Biol.* **100**(2), 486-495 (1985).
- 22) T. Matsubara, S. Tsutsumi, H. Pan, H. Hiraoka, R. Oda, M. Nishimura, H. Kawaguchi, K. Nakamura, Y. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**(3), 503-508 (2004).
- 23) H. Kubo, M. Shimizu, Y. Taya, T. Kawamoto, M. Michida, E. Kaneko, A. Igarashi, M. Nishimura, K. Segoshi, Y. Shimazu, K. Tsuji, T. Aoba, Y. Kato, *Genes Cells* **14**(3), 407-424 (2009).
- 24) M. Ishii, C. Koike, A. Igarashi, K. Yamanaka, H. Pan, Y. Higashi, H. Kawaguchi, M. Sugiyama, N. Kamata, T. Iwata, T. Matsubara, K. Nakamura, H. Kurihara, K. Tsuji, Y. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**(1), 297-303 (2005).
- 25) A. Igarashi, K. Segoshi, Y. Sakai, H. Pan, M. Kanawa, Y. Higashi, M. Sugiyama, K. Nakamura, H. Kurihara, S. Yamaguchi, K. Tsuji, T. Kawamoto, Y. Kato, *Tissue Eng.* **13**(10), 2405-2417 (2007).