

死亡したことより以後の症例から TBI を 12Gy から 10Gy に減量した。以後 grade 3 以上の重篤な毒性はみられず、この前処置は耐えうるものと考えられた。

生着は早期死亡の 1 例を除く 11 例中 10 例に得られ、day21~35 までに 100%ドナータイプの完全キメラ状態になった。好中球数が  $500/\mu\text{l}$  以上に到達するまでの期間は 20.5 日であり、米国の 5 施設共同研究の 27 日、Eurocord の 32 日報告のよりも早かった。わが国のさい帯血バンクが  $2.0 \times 10^7/\text{kg}$  以上の細胞数を含むさい帯血ユニットの供給を原則的にしているため、移植細胞数が欧米における成人移植例よりも若干多かったこと、また Sanz GF からも報告しているように、前処置のより強力な免疫抑制作用が生着率を高め、生着までの期間を短縮している可能性等が考えられる。血小板の回復はやはり遷延し、 $50000/\mu\text{l}$  以上に達するまで中央値で 56 日を要したが、最終血小板輸血日は 34 日であった。自己造血回復が 1 例に認められたがこの症例は骨髄非破壊的前処置 (2GyTBI/Flu) で移植施行した例であった。2GyTBI/Flu の前処置を行った他の一例は生着が得られたがこの例は Hodgkin 病の自家末梢血幹細胞移植後のさい帯血移植であり前処置開始前から免疫不全状態が存在していた可能性があり、2 例の経験ではあるが骨髄や末梢血幹細胞を用いて行われている骨髄非破壊的幹細胞移植の 2GyTBI/Flu の前処置は成人さい帯血移植に対しては適さない印象を受けた。

さい帯血移植における急性および慢性 GVHD の発症率は HLA 不一致移植に関わらず HLA 一致非血縁骨髄移植と比較して低いといわれているが、成人では小児と比較してその頻度は高いようである。今回の FK506 単独による GVHD 予防を用いた成績では 9 例中 4 例に 3 度以上の AGVHD

が発症したが、その内 2 例は FK506 を早期に中止した後の発症であった。2 例は steroid の追加投与で、1 例は FK506 と steroid の再開で GVHD は容易に治癒、また脳症併発により FK506 を早期に中止した 1 例はその後 steroid 剤単独投与にも関わらず 1 度 GVHD を併発しただけで自然に軽快した。評価可能症例が 5 例と少ないが CGVHD は 4 例に発症しておりその内 3 例が全身型であった。

臍帯血移植では移植後 100 日までの早期の移植関連死の頻度が高く、その死因として AGVHD は少ないものの生着不全や遷延に起因する感染症や出血・前処置関連臓器障害が多く、その頻度は 43~54%と報告されている。今回の成績でも、死亡 5 例中 4 例は 100 日以内の死亡であり感染症・臓器障害がその死因であった。

臍帯血移植では GVHD の発症頻度が低い故に移植片対白血病効果が弱く移植後の再発率が高くなることが懸念されていたが、血縁者間・非血縁者間における臍帯血および骨髄移植の比較成績から両者における再発率に差はないとの報告がみられる。今回の少数かつ短期間の観察からは何もいえないが、12 例中 1 例が再発、7 例が移植後 45~451 日 (中央値; 199 日) で生存、その内 MRD を検索できた 2 例は、両例共分子学的寛解状態であった。米国の 5 施設共同研究、Eurocord の多数例の解析では 26% (移植後 40 ヶ月) および 21% (移植後 1 年) (標準危険群では 39%) の無病生存率が得られている。単施設からの報告では、移植後 1 年で 53%、特に 35 歳以下の症例では 73%の無病生存、またわが国でも東大医科研から 53% (27 ヶ月) の生存率と良好な成績の報告がみられ、成人に対しても臍帯血移植は有望な治療法である。今回の成績も EFS は 1.5 年で 44.4%、予想生存率は 55.6%であり、TBI/FLAG は成人

造血器悪性腫瘍に対する臍帯血移植の前処置として有用であると考えている。

#### E, 結論

成人造血器悪性腫瘍 12 症例に対して Fludarabine を組み入れた前処置により非血縁臍帯血移植を施行した。12GyTBI/FLAG により重篤な RRT により 1 例が死亡し、以後 10GyTBI/FLAG に変更したがこの前処置は耐えうるものであった。

移植後早期の感染症の合併、早期死亡率の高さ、GVHD の頻度、治療に対する良好な反応は、少数例ではあるが他の報告と同様であった。観察期間が短い、進行期移植例 6 例を含め 44.4% の EFS が得られており、TBI/FLAG は抗腫瘍効果の面からも有望な前処置と考えられ、今後も症例を蓄積していく必要がある。早期死亡例の多くは病期の進行した状態での移植例であり、今後十分な細胞数がある臍帯血が見つければ移植時機を失することなく移植を行うべきと考える。

#### F, 研究発表

##### 1, 論文発表

1) 甲斐俊朗, 原 宏: 臍帯血移植の現況, 産婦人科治療 Vol 82; 387-392. 2001.

2) 甲斐俊朗, 原 宏: 臍帯血移植の現状と今後の方向, 血液・腫瘍科 Vol 42; 117-123, 2001.

##### 2, 学会発表

1) S.KAI, H.HARA, K.KAWA (2001) Umbilical cord blood transplantation from unrelated donors (UCBT); A report from Kinki Cord Blood Bank. 第 63 回日本血液学会総会、アジア血液セッション, 4.19-21, 名古屋.

2) S.KAI, H.HARA, K.KAWA (2001) Cord blood transplantation from

unrelated donors (UCBT); A report from Kinki Cord Blood Bank. 30th Annual Meeting of the Society for Experimental Hematology, 8.25-28, Tokyo

3) 甲斐俊朗(2001) 臍帯血移植.(教育プログラム、臨床 update シリーズ)第 49 回日本輸血学会総会, 5.31-6.2, 東京.

4) 甲斐俊朗 (2001) 成人に対する臍帯血移植. (シンポジウム) 第 43 回日本臨床血液学会総会, 11.13-15, 神戸.

5) 佐竹敦志、戸田暁成、大倉伸彦、山崎裕美子、西岡啓介、田中英久、五熊丈義、山口雅生、三澤真人、甲斐俊朗、原 宏; フルダラビンを含む前処置によるさい帯血移植を行った成人造血器悪性腫瘍の 2 症例 (2001). 第 43 回日本臨床血液学会総会, 11.13-15, 神戸.

厚生科学研究費補助金研究報告書 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
分担研究報告

遺伝子導入によるヒト臍帯血 CD34(+)細胞由来内皮細胞株の樹立に関する研究

分担研究者 原 宏 兵庫医科大学教授

研究要旨 さい帯血 CD34(+)細胞に由来する血管内皮細胞の可逆的不死化を試みた。さい帯血 CD34(+)細胞に SV-40T 遺伝子を導入し、血管内皮細胞株 HYCEC-1 を樹立した。HYCEC-1 は血管内皮前駆細胞としての性格を有し in vitro で血管様構造形成可能であった。HYCEC-1 は、Cre-loxP recombination により SV-40T を除去することができた。この細胞は、血管内皮障害の治療に応用できる可能性がある。

A. 研究目的

さい帯血血管内皮前駆細胞より血管内皮の再生を目指して、さい帯血 CD34(+)血管内皮前駆細胞に由来する血管内皮細胞の不死化を試みた。

B. 研究方法

さい帯血 CD34(+)細胞を VEGF、bFGF 存在下で培養後、レトロウイルスベクター SSR#69 を用いて、SV-40T 遺伝子を導入した。

(倫理面への配慮)

遺伝子導入は倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

さい帯血 CD34(+)細胞より血管内皮細胞が誘導できるものの、その頻度は低く、初代培養は 1-3 代で継代不能となった。SV-40T 遺伝子導入することにより細胞株 HYCEC-1 を得た。HYCEC-1 は、VEGF、bFGF 存在下に増殖し、ganciclovir により増殖が抑制された。HYCEC-1 は、acetylated LDL を取り込み、vWF 陽性であった。CD29、CD31、CD44、CD105 陽性であり、CD34、CD49 は弱陽性であった。また、マトリゲル上に血管様構造を形成した。Cre-loxP recombination により SV-40T を除去することができた。さい帯血 CD34(+)細胞由来血管内皮細胞株

HYCEC-1 は in vitro で血管様構造形成可能であり、血管内皮前駆細胞と考えられた。

D. 考察

In vitro で血管様構造形成可能であり、in vivo での効果を検討している。この細胞株より増殖させ、SV-40T を除去した血管内皮前駆細胞を用いて血管内皮障害の治療に応用できる可能性がある。

E. 結論

さい帯血 CD34(+)細胞由来血管内皮細胞株 HYCEC-1 は血管内皮の再生可能な血管内皮前駆細胞と考えられる。

F. 健康危険情報

SV-40T は除去可能である。

G. 研究発表

平成 13 年度 厚生科学研究 「さい帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班会議 遺伝子導入によるヒトさい帯血 CD34(+)細胞由来血管内皮細胞株の樹立

H. 知的財産権の出願・登録状況

まだ考慮していない

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班  
分担研究報告書

遺伝子導入によるヒト間葉系幹細胞株の樹立とその造血支持能に関する研究  
分担研究者 原 宏 兵庫医科大学教授

### 研究要旨

ヒト間葉系幹細胞にレトロウイルスベクター SSR#69 を用いて遺伝子導入し、可逆的に不死化する事によってヒト間葉系幹細胞細胞株を作製しその造血支持能を調べた。

#### A.研究目的

間葉系幹細胞は骨髄間質細胞中に存在する線維芽細胞様の細胞であり、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞など様々な種類の細胞に分化する能力を持っている細胞であり、再生医療や細胞移植などの面からもその可塑性が注目されている。また血液の領域では間葉系幹細胞は骨髄内で造血を支持することができ、*in vitro* においてもその性質を再現することができる。

レトロウイルスベクター SSR#69 を導入することにより哺乳類の細胞を可逆的に不死化することができる。SSR#69 は自殺遺伝子である HSV-TK を有し、アデノウイルスベクター AxCANCre を用いて Cre-loxP 遺伝子再構築により不死化遺伝子の除去が可能であり安全弁が2つあることから将来における臨床応用を前提としてデザインされたレトロウイルスベクターである。これを間葉系幹細胞に導入する事によりこれを可逆的に不死化することが可能である。正常の間葉系幹細胞は継代していくと約 10 代目までは継代が可能だがそこで成長が止まってしまう。この SSR#69 を用いると不死化が起り、長期にわたって生存、増殖する。SSR#69 を利用して間葉系幹細胞株を作製しそれを大量培養し、間葉系幹細胞より発生させることができる臓器を再生させること、また間葉

系幹細胞株の造血支持能についても調べるのがこの研究の目的である。

#### B.研究方法

##### レトロウイルスベクター SSR#69 の産生と純化

これらの実験は、学部内の組み換え DNA 委員会の承認を得ており、P2 レベルの実験室で行った。

SSR#69 を産生する amphotrophic  $\psi$  Crip packaging cell line は T75 flask で 37 °C、5%CO<sub>2</sub> incubator にて培養した。細胞が 80% confluent に成った時点で 5ml の新鮮な培養液と交換し、32 °C、5% CO<sub>2</sub> に移し替えて 100%になるまで培養を続けた。上清のウイルス液を集め、0.45  $\mu$  m のフィルターを通して、超遠心器をもちいて 6000  $\times$  g、4 °C、16 時間の遠心かけた、約 2ml を残して上清を捨て、ペレットをほぐしてそれをウイルス液として用いた。使うまではウイルス液は -80 °C に冷凍保存された。

##### 間葉系細胞株の樹立

正常ヒト骨髄間葉系幹細胞と間葉系細胞培養液 MSCGM は Bio Whittaker 社より購入した。間葉系幹細胞を T75 flask に confluent になるまで培養し、0.25% trypsin+2mM EDTA ではがしたあとに3つの flask に分割し継代した。何代か継代した後にはフラスコに MSCGM と 10%のウイ

ルス液を加えて、24 時間培養した後、新鮮なウイルス液の入った MSCGM に交換し再度 24 時間培養した（計 2 回感染）。Medium を MSCGM に hygromycin 300mg/ml を加えたものに交換し、さらに 48 時間培養した。新鮮な MSCGM に交換し、ほとんどの細胞は死滅するが約 7～10 日後にコロニーが立ち上がってくるのでそれを trypsin でしめらせた清潔な濾紙で pickup した。12well～T25 で培養を続け、半年以上継代が可能であったものを間葉系幹細胞株とした。今回もっとも増殖力のあった HMSC-1 を用いて実験を行った。

#### 脂肪細胞への分化

脂肪細胞への分化は Bio Whittaker 社の脂肪細胞分化用培地 (PT-3004) を用いた。これには Adipogenic Induction Medium と Adipogenic Maintenance Medium を含んでおり、前者には h-Insulin, L-glutamine, MCGS (mesenchymal cell growth supplement), Dexamethazone, Indomethacin, IBMX (3-isobuty-1-methyl-xanthine), Pen/Strep をふくんでおり、後者には h-Insulin, L-glutamine, MCGS, Pen/Step を含んでいる。HMSC-1 が confluent になったあと、Induction medium と交換し、3 日後に Maintenance medium に交換する。また 3 日後に Induction Medium と交換しこれを 3 週間繰り返す。

#### RT-PCR

HMSC-1 における各種サイトカインの発現について RT-PCR を用いて調べた。

#### 表面抗原の解析

HMSC-1 を 0.25% trypsin で single cell にしたあと下記の抗体で染色、PI で染色したあと PI(-)の細胞を解析した。

CD 11a, CD 14, CD 18, CD 31, CD 45, CD 49, CD 54, CD 105FITC, CD 34, CD 90 CD

106PE

#### 不死化解除

1) アデノウイルスベクター AxCANCre の産生と感染

これらの実験も学内組み換え DNA 委員会の承諾を受けており P2 レベルの実験室で行っている。アデノウイルスベクター AxCANCre (理研ジーンバンク) による Cre-loxP recombination を用いた不死化解除を行った。293 細胞に AxCANCre を感染させて MEM+10% horse serum を用いて培養しすべての細胞が死んでから上清と細胞塊を集め、冷凍と解凍を 6 回繰り返し、3000rpm 10min で遠心し、上清を集めて分注しそれをウイルス液とした。-80 °C に保存し、適宜これを用いた。T75 flask で培養した 100% confluent の HMSC-1 の medium を 2ml 残し、AxCANCre のウイルス液を 200  $\mu$  l 加えて 1 時間感染させたあと通常の medium を加えてさらにさらに 48 時間培養し、この細胞を Western blotting にて SV40T の存在の有無につき調べた。

2) Western blotting

細胞を PBS(-)で洗浄し、lysis solution を加え蛋白を抽出し、濃度を測定した。95 °C で熱変性させ、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、メンブレンへ blotting した後、skin milk buffer にて blocking を行った。間接免疫染色 (SV40T) を行い、発色剤で染めた後水洗・乾燥した。Positive control としては Actin を用いた。

さい帯血 CD34 陽性細胞との共培養

1) 共培養

HMSC-1 を 12 well で培養し、100% confluent に成った時点で 25Gy の放射線照射を行った。CD34+ MACS で純化された CD34+さい帯血を 1000/well で開始した。

培養液は  $\alpha$  MEM+10% FCS とサイトカイン (SCF 100  $\mu$  g/ml, TPO 100  $\mu$  g/ml, FL 100  $\mu$  g/ml) もしくは無血清培地 StemPro 34 にサイトカインを加えたものを 1ml 用いて 12 well で培養した。2 週間培養する場合は 1 週後にサイトカインが入った medium を 1ml 追加した。

## 2) flowcytometer

CD34+細胞が expansion を測定するのに flowcytometer を用いて検討した。培養細胞を取り出し、CD34 PE, CD38 FITC, PI で染色し PI(-)の細胞を解析した。

## 3) CFU

各時期における CFU を測定するのにメチルセルロース法を用いた。2 週後に各コロニー (CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix, HPP) をカウントした。サイズが 1mm 以上のコロニーを HPP とした。

## 4) SRC

共培養により、さい帯血 CD34+細胞中の SCID repopulating cells を増幅させることができるかどうかを検討した。CD34+MACS により得られたさい帯血 CD34+細胞 2000 個を用いた。300cGy の放射線照射をした NOD/SCID mice に同細胞もしくは同細胞を培養した細胞を i.v.、anti Asialo GM1 antibody を i.p.し、8 週間無菌室で飼育した。8 週後に骨髓を取り出し、flowcytometer で抗ヒト CD45 抗体をもちいてヒト細胞を検出し、flowcytometer で検出できなかったものは DNA を抽出しヒト特異的な 17  $\alpha$  satellite gene (primer pair: 5'-ACGGGATAACTGCACCTAAC-3' , 5'-CCATAGGAGGGTTCAACTCT-3') を PCR により検出した。PCR の検出感度は <0.1% であった。

## C. 研究結果

### HMSC-1 の表面抗原

CD90, CD105, CD106 を表面に持っており、CD11a, CD14, CD18, CD31, CD34, CD45, CD49, CD54 をもっていなかった。これは間葉系幹細胞と同様の表面抗原であった。

### HMSC-1 の RT-PCR

FL, BMP-4, jagged-1, IL-6, OSM, SCF, TGF- $\beta$  1, を発現していた。M-CSF, G-CSF, GM-CSF, IL-3, TPO, LIF は発現していなかった。

### 脂肪細胞への分化

HMSC-1 を脂肪細胞分化させると Oil red で染色される脂肪細胞へ分化した。

### 不死化解除

HMSC-1 を不死化解除すると RT-PCR および Western blotting において、解除後は SV40T は検出できなかった。

### さい帯血 CD34+細胞との共培養

細胞増幅倍率は 7 日目では 181  $\pm$  94 倍、14 日目では 394  $\pm$  194 倍であった。CD34 増幅倍率は 7 日目では 40  $\pm$  24 倍、14 日目では 193  $\pm$  81 倍であった。CD34+CD38- の増幅倍率は 7 日目では 59  $\pm$  37 倍、14 日目では 479  $\pm$  244 倍であった。HPP の増幅倍率は 7 日目では 85  $\pm$  21 倍、14 日目では 218  $\pm$  82 倍であった。Total CFU の増幅倍率は 7 日目では 114  $\pm$  31 倍、14 日目では 336  $\pm$  80 倍であった。SRC は CD34+さい帯血 2000 個を培養せずに NOD/SCID に移植した場合は 3/5 のマウスで生着したが HMSC-1 と共培養した場合は 5/5 のマウスが生着した。一方サイトカインと無血清培地のみでは生着しなかった (0/5)。

## D. 考察

小林らはレトロウイルスベクター SSR#69 を用いて肝細胞を可逆的に不死化させ、ヒト肝細胞株を作製し、急性肝不全モデルラットに対する治療として同細胞の肝細胞移植を施行する事によって、延命し得たことを報告した。(Science, 2000 : Vol 287, 1258) この実験から、このシステムの臨床応用の可能性が示された。

SSR#69 を用いることによって、ヒト間葉系幹細胞株 HMSC-1 を作製することができた。この細胞はアデノウイルスベクター AxCANCre を感染させ、SV40T を Cre-loxP recombination により除去することが可能であった。この細胞は SV40T を除去しなくても脂肪細胞に分化することが可能であった。近年、この間葉系幹細胞の可塑性が注目されており、このシステムを用いることによってさらに間葉系幹細胞の大量培養が可能であり、骨や軟骨、心筋等、臓器再生においても有効な手段であると思われる。

今回は間葉系幹細胞の造血支持能について調べた。間葉系幹細胞が造血を支持することは多くの報告があり、明らかである。この実験でも、細胞数、CD34+細胞数、CFU 数を増幅させることができた。さらにこの実験で HMSC-1 が SRC の増幅を補助することができそうである事がわかった。Bhatia らによって BMP-4, Jagged-1 等は SRC を増幅させることが報告されており、この細胞が BMP-4 や Jagged-1 を発現していることは SRC の増幅に関与しているかもしれない。これらの事実は、このような多分化能を有する細胞がなぜ骨髄間質に存在するのかという疑問に対する答えのヒントになるかもしれない。

また間葉系幹細胞は造血幹細胞と同時に移植することにより生着率が上昇するという報告もある。この細胞をこのように利用するためには大量培養してから不死化を

解除し、腫瘍性を完全に無くしてから造血幹細胞とともに投与するという方法が考えられる。

#### E. 結論

レトロウイルスベクター SSR#69 をもちいることにより、ヒト間葉系幹細胞を可逆的に不死化することができ、その解除も可能であった。またできた細胞株は造血支持能があることがわかった。

#### G. 研究発表

##### 学会発表

ヒト間葉系幹細胞の可逆的不死化の試みおよび造血支持能の検討 (2001/12/20、日本造血細胞移植学会、札幌)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

研究課題：臍帯血中の血液幹細胞から免疫細胞への分化、増殖と養子免疫法の開発

分担研究者：直江知樹 名古屋大学大学院臨床感染統御学教授

研究協力者：清井 仁 名古屋大学医学部難治感染症部講師

廣瀬由佳 名古屋大学医学部難治感染症部

臍帯血移植後には他の造血幹細胞移植後に比較して、免疫学的再構築が遅延している可能性が示唆されている。我々は、これまでに *in vitro* の B 細胞分化の系における研究結果より、臍帯血移植後初期に抗体産生可能な成熟 B 細胞の割合が少ないために液性免疫の回復が遅延している可能性を報告してきた。現在はこれらの知見をもとに、*in vivo* モデルの系を用い、臍帯血移植後の免疫系再構築に関する研究を進めている。今回は、NOD/shi-scid マウスにヒト臍帯血移植を行い、生着したヒト B 細胞における IgHCDR3 レパトアー解析を施行した。この *in vivo* モデルにおいて、マウスにおけるヒト臍帯血移植後の B 細胞再構築過程はヒト出生後の初期 B 細胞構築過程を反映すると考えられた。今後は抗原刺激に基づく特異抗体産生能など B 細胞の成熟過程の検討と、T 細胞、NK 細胞を含めたヒト免疫系再構築モデルにおける検討が必要である。また、この *in vivo* モデルにおいてヒト特有の感染症の発症機構や、それに対する免疫応答機構の解明への応用が可能であろうと考え現在進行中である。

#### A. 研究目的

臍帯血移植後には他の造血幹細胞移植後に比較して、免疫学的再構築が遅延している可能性が示唆されている。これは臍帯血が免疫学的に未熟であるがための移植ソースに特有に生じる合併症であるのか、GVHD や GVL の成立とどのように関連しているのか、そもそも造血幹細胞移植後の免疫系の再構築とはいかなるものなのか、それらの詳細な検討はいまだ十分に成されているとは言い難い。

我々はこれまで臍帯血移植後の免疫系再構築に関し、*in vitro* の B 細胞分化の系を用い、特に免疫グロブリン重鎖 CDR3 レパトアー解析と B 細胞分化関連遺伝子発現の検討を行い、臍帯血移植後初期に抗体産生可能な成熟 B 細胞の割合が少ないために液性免疫の回復が遅延している可能性を報告してきた。しかし、免疫系の個体発生的発達を理解し、造血幹細胞移植後の免疫系再構築、GVHD、GVL のシステムを解析し、感染症を含めたコン

トロールをしようとするにあたっては *in vivo* モデルの確立が不可欠である。今回は、その手始めとして、NOD/shi-scid マウスへのヒト臍帯血移植を施行し、経時的に得られた骨髄および末梢血における FACS、IgHCDR3 レパトアー解析、B 細胞分化関連遺伝子、ヒト免疫グロブリン遺伝子発現を検討するとともに、マウス末梢血中のヒト免疫グロブリン定量を行った。

#### B. 研究方法

6~8 週齢の NOD/shi-scid マウスに 3Gy の TBI を施行し、 $1\sim 2 \times 10^5$  個のヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup> 細胞を移植、経時的に骨髄および末梢血を採取した。得られた細胞において FACS、IgHCDR3 レパトアー解析、RT-PCR 法による B 細胞分化関連遺伝子発現、ヒト免疫グロブリン遺伝子発現を検討するとともに、ELISA 法によるマウス末梢血中のヒト免疫グロブリン定量を行った。



(倫理面への配慮)

臍帯血は、東海臍帯血バンクより各種条件によりバンク登録不可となったものを、東海臍帯血バンク運営委員会の承認の上、研究用として供与戴いている。マウスの実験は、名古屋大学動物実験ガイドラインに従って行った。

### C. 研究結果

①TdT 発現；移植後6週目までの骨髄細胞では発現が確認できないが、6.5週以降では RT-PCR において発現が確認された。

②移植後5週 (TdT 発現前) と8週 (TdT 発現後) の骨髄細胞における IgHCDR3 レパトアの解析、比較；

1) V<sub>H</sub>-D 間、D-J<sub>H</sub> 間、および合計の N-nucleotide 挿入数は、5週が、8週に比較し、少ない傾向にあった。

2) D segment, J<sub>H</sub> segment の使用頻度に有意差は認めなかった。

3) IgHCDR3 長は、5週が8週に比べ、有意に短い傾向にあった。

③ヒト免疫グロブリン遺伝子発現；移植後6.5週のマウス骨髄細胞および末梢血において、IgH(μ), IgL(κ, λ) mRNA 発現が確認できるが、5週の段階では IgH(μ) のみが確認された。また、移植後12週までには IgH(γ) 発現は確認されなかった。

④マウス末梢血中ヒト免疫グロブリン定量；ELISA 法を用い、マウス末梢血中のヒト IgM, IgG 定量を施行した。ヒト IgM は移植後6週を過ぎた頃から、マウス末梢血中に出現し、次第に増加する傾向を示した。IgG は、観察しえた期間 (移植後22週目まで) に、マウス血中への発現を確認できなかった。

### D. 考察

生体内での免疫系システムの検討をするためには *in vivo* モデルの確立は不可欠である。これまでの他者の研究においても NOD/SCID マウスへ臍帯血移植をした後、ヒト B 細胞の出現が確認されることは報告されてきたが、実際に免疫グロ

ブリン遺伝子の再構成の有無やレパトアに関して検討したものは見られない。今回の我々の検討で、*in vitro* における結果同様に TdT の発現により、N-nucleotide の挿入数が増加する傾向があることや、*vitro* と異なり、*vivo* では out of frame の再構成のものは排除 (apoptosis or rearrangement?) されていく可能性が強く示唆された。また、IgHCDR3 長が、移植後5週から8週にかけて伸長していくことは、これまでに、他者からの報告にもある「ヒトにおいて、出生後2ヶ月までに IgHCDR3 長が増加し、以後は plateau に達する」という結果と一致するものである。更にヒト新生児において、母体からの移行免疫が消え、自己産生 IgG が認められるようになるためには、出生後約6ヶ月の期間を必要とすることを併せて考慮しても、マウスを用いた *in vivo* の臍帯血移植モデルにおける B 細胞再構築過程は、ヒト出生後の初期 B 細胞構築過程を反映すると考えられる。今後は T 細胞や NK 細胞を含む免疫系システム全体の研究が必要であり、免疫グロブリン構造解析等を利用した臍帯血移植後免疫系再構築に関する研究を進めるとともに、ヒト特有感染症の発症や免疫応答システムの研究のために、より良い臨床研究モデルとなりうる *in vivo* システムの確立を目指したいと考え、研究を推進中である。

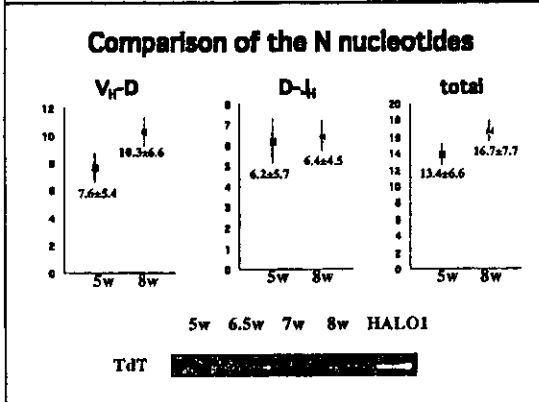
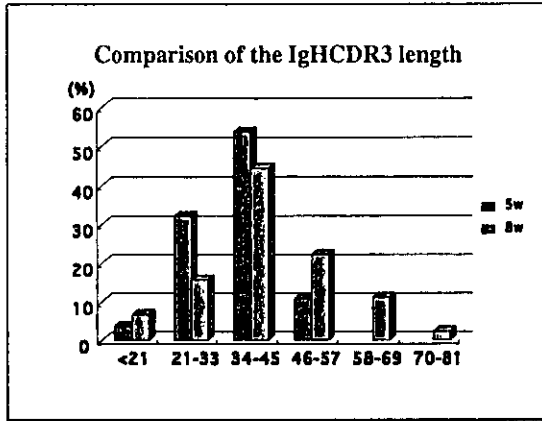
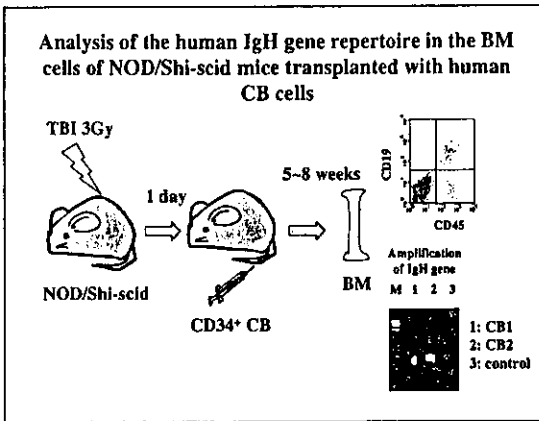
### E. 結論

①マウスにおけるヒト臍帯血移植後の B 細胞再構築過程はヒト出生後の初期 B 細胞構築過程を反映すると考えられる。

②抗原刺激に基づく特異抗体産生能など B 細胞の成熟過程の検討が必要である。

③T 細胞、NK 細胞を含めたヒト免疫系の再構築モデルが必要である。

④マウスを用いた *in vivo* の臍帯血移植モデルは、ヒト特有の感染症の発症機構や、それに対する免疫応答機構の解明への応用が期待できる。

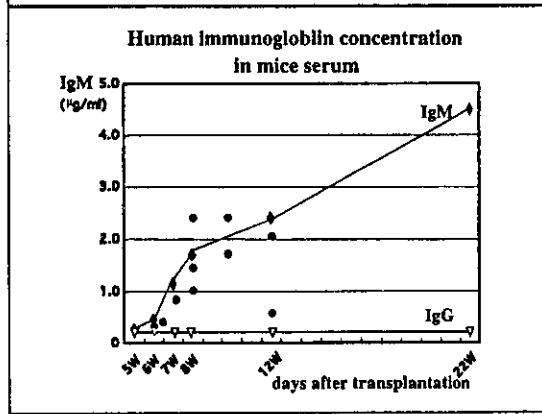
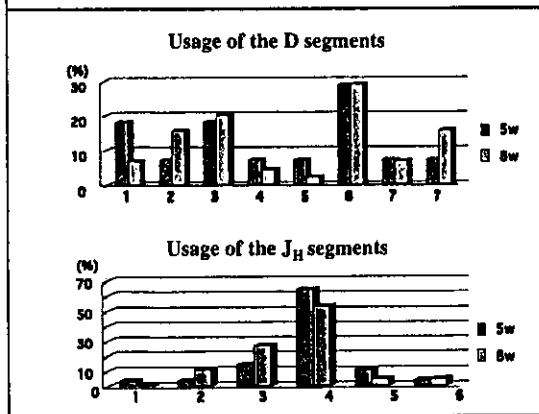
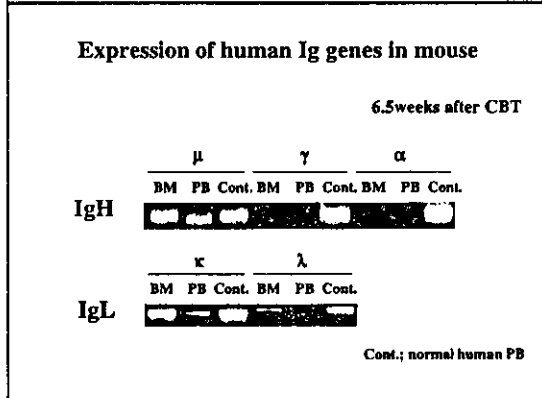
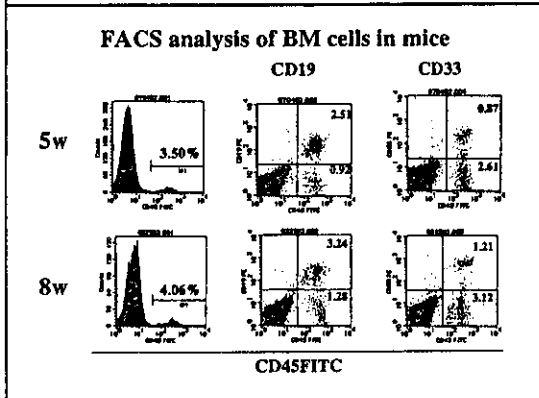


**Comparison of the in/out of frame ratio of the IgH gene rearrangement**

	3W	4W	6W
CB	12 / 35 (25.5%)	11 / 16 (40.7%)	21 / 19 (52.5%)
PB	15 / 5 (75.0%)	10 / 7 (58.8%)	14 / 10 (58.3%)

P=0.0003

mouse 5w	26 / 28 (92.9%)
mouse 8w	45 / 45 (100%)



F. 健康危険情報  
該当なし

G. 研究発表

H. 1. 論文発表

1) Kiyoi H, Naoe T. Immunoglobulin variable region structure and B cell malignancies. Int J Hematol. 73:47-53. 2001.

2) Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematological malignancies. Blood. 97. 2434-2439. 2001.

3) Kosugi H, Ito M, Yamamoto Y, Towatari M, Ito M, Ueda R, Saito H, Naoe T. In vivo effects of a histone deacetylase inhibitor, FK228, on human acute promyelocytic leukemia in NOD / Shi-scid/scid mice. Jpn J Cancer Res. 92:529-536. 2001.

4) Hirose Y, Kiyoi H, Itoh K, Kato K, Saito H, Naoe T. B cell precursors differentiated from cord blood CD34<sup>+</sup> cells are more immature than those derived from G-CSF mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells. Immunology. 104. 410-417. 2001.

5) Naoe T., Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Kusumoto S, Shimazaki C, Saito K, Akiyama H, Motoji T, Nishimura M, Shinagawa K, Ueda R, Saito H, Ohno R. Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. Leukemia. 16. 203-208. 2002.

2. 学会発表

1) 廣瀬由佳, 清井 仁, 伊藤 守, 直江知樹: CD34 陽性造血幹細胞による B 細胞免疫の再構築に関する検討. 第 31 回日本免疫学会総会, 2001.12. 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

臍帯血造血幹細胞の血管内皮細胞の共存下における相乗的増殖効果の検討

分担研究者：高倉 伸幸 金沢大学がん研究所教授

臍帯血造血幹細胞の試験管内増幅には、造血幹細胞の未分化性を長期に試験管内で維持可能にすることが先決である。本研究では造血幹細胞が造血器官では、血管網を構築する血管内皮細胞を支持細胞として未分化性が維持されることを解析し、さらに本造血器官における緻密な血管網は血液細胞が分泌する様々な成長因子により誘導されるという造血と血管形成の両方向性の相互作用が存在することを明らかにした。特に造血幹細胞の未分化性の維持においては、造血幹細胞に発現する TIE2 受容体が重要であり、幹細胞は自ら TIE2 の結合因子であるアンジオポエチン-1 を分泌して、オートクラインループによる刺激により、血管内皮細胞の基底膜構成細胞外マトリックスに強固に接着して幹細胞の分化が抑制されていることが示唆された。本概念を利用して、今後造血幹細胞の試験管内における未分化性の誘導にアプローチする。

A. 研究目的

臍帯血中に存在する造血幹細胞を効率良く増幅させ、種々の再生医療に応用する為に、造血幹細胞が骨髄内で自己複製を営む分子機序を明らかにし、本機序を試験管内で展開可能にすることを研究の目的とする。

B. 研究方法

造血がいかなる構成細胞により支持され、いかなる分子基盤により誘導されるのかを、造血組織構成細胞である血液細胞と血管内皮細胞との相互作用に焦点を絞り解析する。本細胞間相互作用の中で、幹細胞の自己複製を誘導する分子機序に関して、それを試験管内で増強させ、造血幹細胞の自己複製を誘導する。

（倫理面への配慮）

臍帯血提供者の個人情報保護、及び解析結果の本人への報告等に関して、事前に十分なインフォームドコンセントを行なう。

C. 研究結果

血管網の形成に重要な役割を持つ血管内皮細胞に発現する TIE2 受容体は、真の造血幹細胞にも発現し、さらに自らその結合因子アンジオポエチン-1（以下 Ang1）を分泌することが明らかとなった。本造血幹細胞上の Ang1 は血管内皮細胞の遊走を誘導して局所に血管網を形成する機能を持つことを明らかにしていたが、最近様々な血液細胞には neuropilin-1 が発現し、本受容体は血管内皮細胞成長因子 (VEGF) に結合して、VEGF-neuropilin-1 複合体を形成し、血管内皮細胞に発現する VEGF 受容体の Flk-1/VEGFR2 に本 VEGF を供給して、極めて強力な内皮細胞の増殖作用を誘導するこ

とが明らかとなった。このように血液細胞によって誘導された緻密な血管網上で、今度は造血幹細胞は自ら分泌する Ang1 のオートクラインループにより、血管基底膜に強く接着し、造血幹細胞の未分化性が維持されることが判明した。また、我々は恒常的活性化型 TIE2 受容体を作成し、本遺伝子を TIE2 プロモーター制御下にマウスに導入し、トランスジェニックマウスを作成し、造血幹細胞の分化や自己複製に与える影響を観察した。本研究は現在進行中であるが、これまでのところ、胎児期の血管内造血の現場である AGM 領域の造血幹細胞の増殖が遷延化し、さらに胎仔肝における造血幹細胞の分化抑制が観察されている。

D. 考察および結論

TIE2 受容体の機能活性化により、造血幹細胞の未分化性が誘導可能であると推測される。ヒト臍帯血中の造血幹細胞にも本 TIE2 受容体が発現し、さらに Ang1 も発現することを確認しており、試験管内でヒト血管内皮細胞を支持細胞として、さらに造血幹細胞の TIE2 の活性化を誘導して、骨髄にて観察される造血幹細胞の未分化性および自己複製を試験管内で展開可能ではないかと考えられる。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Zhang XQ, Takakura N, Oike Y, Inada T, Gale NW, Yancopoulos GD, Suda T. Stromal cells

expressing ephrin-B2 promote the growth and sprouting of ephrin-B2(+) endothelial cells. Blood 98:1028-1037, 2001.

Yamada Y, Takakura N, Yasue H, Ogawa H, Fujisawa H, Suda T. Exogenous clustered neuropilin 1 enhances vasculogenesis and angiogenesis. Blood 97:1671-1678, 2001.

他、原著論文2遍、それ以外（レビュー）  
1遍

2.学会発表

Hematopoietic stem cell and hematopoietic microenvironment. Takakura, N. ISEH plenary session, 2001. 他5件

G.知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）  
なし。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

臍帯血あるいは胚性幹細胞培養による造血幹細胞や血管内皮細胞への増殖・分化に関する研究

研究者 仲野 徹大阪大学 微生物病研究所 教授

研究要旨 ヒト臍帯血の造血前駆細胞と末梢血の造血前駆細胞を比較することにより、臍帯造血幹細胞移植において血小板数の回復が遅延する機構の一端を明らかにした。

A. 研究目的

未分化な造血細胞に発現する AC133 抗原の発現を手がかりに、臍帯血の造血前駆細胞と末梢血の造血前駆細胞の赤血球・顆粒球系および骨髄球系への分化過程の差異を明らかにする。

また、臍帯血と末梢血の前駆細胞からの巨核球の最終分化、多倍体化における差異を明らかにする。

B. 研究方法

臍帯血、末梢血の造血前駆細胞を AC133 抗原と CD34 抗原の発現パターンから分画する。AC133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>という最も未分化な分画から赤血球・巨核球系および骨髄球系への分化過程における AC133 抗原と CD34 抗原の発現パターンを追跡する。

また、同様に分画した細胞を巨核球系へと選択的に分化させ、巨核球分化に要する時間、ならびに、多倍体化の状態を検討する。

(倫理面への配慮)

臍帯の採取は十分なインフォームドコンセントに基づいている。

C. 研究結果

AC133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>から AC133<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>への分化において、臍帯血の場合 AC133<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>を経て分化したのに対して、末梢血の場合は AC133<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>を経ずに直接分化する細胞が大半であった。

巨核球系への分化において、臍帯血造血前駆細胞からの分化は末梢血造血前駆細胞からの分化に比較して遅延した。また、この遅延は AC133 抗原の発現の有無との相関が認められなかった。

末梢血造血前駆細胞からは 10% 近くの細胞に 8n 以上の多倍体化が認められたのに対して、臍帯血造血前駆細胞からはほとんど認められなかった。

D. 考察

本年度の研究において、臍帯血と末梢血の造血前駆細胞を比較することにより、①未分化な造血前駆細胞からの分化動態の違い、と、②巨核球の多倍体化における違い、が臍帯血

幹細胞移植における血小板回復遅延の一因であることが明らかとなった。また、この違いは、臍帯血と末梢血に含まれる細胞分画の違いでなく、造血前駆細胞そのものの性質が異なっていることに起因するものであった。

E. 結論

本研究の成果は、臍帯血の移植による血小板の回復遅延機構の一端を明らかにするものである。今後、臍帯血造血前駆細胞と末梢血造血前駆細胞の違いを分子レベルで明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表：

Suzuki A, Tsukio-Yamaguchi M, Ohteki T, Sasaki T, Kaisho T, Kimura Y, Yoshida R, Wakeham A, Higuchi T, Fukumoto M, Tsubata T, Ohashi P, Koyasu S, Penninger J M, Nakano T. (*corresponding author*), Mak T W. T-cell specific loss of PTEN leads to defects in central and peripheral tolerance.

*Immunity*, 14:523-34, 2001

Iwai N, Kitajima K, Sakaj K, Kimura T, Nakano T. Alteration of cell adhesion and cell cycle properties of ES cells by an inducible dominant interfering Myb mutant

*Oncogene*, 20:1425-34, 2001

Kuramochi-Miyagawa S, Kimura t, Yomogida K, Kuroiwa A, Tadokoro Y, Fujita Y, Sato M, Matsuda Y, Nakano T. Two mouse *piwi*-related genes: *miwi* and *mili*

*Mechanisms of Development*, 108:121-33, 2001

他、原著論文による発表 5 件

それ以外（レビュー等）の発表 5 件

2. 学会発表

CBとHUVECのHLA適合性と生体外増幅効率についての検討 松本加代子ら、第63回日本血液学会総会（名古屋） 他

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kuno Y, Abe A, Emi N, Iida M, Yokozawa T, Towatari M, Tanimoto M, <u>Saito H.</u>	Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12).	Blood	97	1050-1055	2001
Hirose Y, Kiyoi H, Itoh K, Kato K, <u>Saito H, Naoe T.</u>	B-cell precursors differentiated from cord blood CD34+ cells are more immature than those derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood CD34+ cells.	Immunology	104	410-417	2001
Usuki K, Urabe A, Masaoka T, Ohno R, Mizoguchi H, Hamajima N, Miyazaki T, Niitsu Y, Yoshida Y, Miura A, Shibata A, Abe T, Miura Y, Ikeda Y, Nomura T, Nagao T, <u>Saito H, Shirakawa S, Ohkuma M, Matsuda T, Nakamura T, Horiuchi A, Kuramoto A, Kimura I, Irino S, Niho Y, Takatsuki K, Tomonaga M, Uchino H, Takaku F and the Gran AML study group</u>	Efficacy of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukemia: a multicentre randomized study.	Br J Haematol	116	103-112	2002
Enomoto M, Nagayama H and <u>Takahashi TA.</u>	Enhancement of migratory and aggregate activities of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells by stimulation with RANTES.	Microbiology and Immunology			2002 in press
Kashiwakura I, Murakami M, Inanami O, Hayase Y, <u>Takahashi TA, Kuwabara M and Takagi Y.</u>	Effects of amifostine on the proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitor cells.	Eur J Pharmacol			2002 in press
Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, <u>Takahashi TA.</u>	Chemokine receptor expressions and responsiveness of cord blood T cells.	J Immunol	166	1659-1666	2001
Murakami M, Kashiwakura I, Hayase Y, <u>Takahashi TA and Takagi Y.</u>	Inhibitory Effect of Murine Kidney Extracts on Human Mast Cells derived from Human Placental and Umbilical Cord Blood.	Renal Failure.			2002 in press
Enomoto M, Nagayama H, Sato K, Xu Y, Asano S <u>Takahashi TA.</u>	In vitro generation of dendritic cells derived from cryopreserved CD34+ cells mobilized into peripheral blood in lymphoma patients.	Cytotherapy	2	95-104	2000
Tokushima Y, Sasayama N, <u>Takahashi TA.</u>	Repopulating activities of human cord blood cells separated by a stem cell collection filter in NOD/SCID mice: a comparative study of filter method and HES method.	Transfusion	41	1014-1019	2001



著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Takahashi Y, Sukeyawa K, Aoki M, Ito A, Suzuki K, Sakaguchi H, Watanabe M, Isogai K, Mizuno S, Hoshi H, Kuwata K, Tomatsu S, <u>Kato S</u> , Ito T, Kondo N, Orii T.	Evaluation of accumulated mucopolysaccharides in the brain of patients with mucopolysaccharidoses by 1H-magnetic resonance spectroscopy before and after bone marrow transplantation.	Pediatric Research	49	349-355	2001
Shinagawa T, Tomita Y, Ishiguro H, Matsumoto M, Shimizu T, Yasuda Y, Hattori K, Kubota C, Yabe H, Yabe M, <u>Kato S</u> , Shinohara O.	Final height and growth hormone secretion after bone marrow transplantation in children.	Endocrine Journal	48	133-138	2001
Sato T, Ando K, Oki M, Miyatake H, Matsuzawa H, Hotta T, <u>Kato S</u> .	Acute lethal injury of lung and liver in mice transplanted with ex vivo-expanded CTLs.	Cell Transplantation	10	409-412	2001
Masaoka T, Hiraoka A, Ohta K, Tatsumi N, Watanabe S, Hotta T, Yabe H, <u>Kato S</u> , Ohara T, Hasegawa A, Tanabe K, Toma H, Yasuoka A, Oka S.	Evaluation of the AMPLICOR CMV, COBAS AMPLICOR CMV monitor and antigenemia assay for cytomegalovirus disease.	Jpn J Infect Dis	54	12-16.	2001
Hagihara M, Shimakura Y, Tsuchiya T, Ueda Y, Gansuvd B, Munkhbat B, Chargui J, Ando K, <u>Kato S</u> , Hotta T.	The efficient generation of CD83 positive immunocompetent dendritic cells from CD14 positive acute myelomonocytic or monocytic leukemia cells in vitro.	Leukemia Research	25	249-258	2001
Rocha V, Comish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, Remberger M, Michel G, Arcesa W, Dallorso S, Tiedemann K, Busca A, Chan KW, <u>Kato S</u> , Ortega J, Vowels M, Zander A, Souillet G, Oakill, Pay AL, Green A, Garnier F, Ionescu I, Wernet P, Sirchia G, Rubinstein, Chevret S, Gluckman E.	Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia.	Blood	97	2962-2971	2001
Hagihara M, Tsuchiya T, Ueda Y, Masui A, Gansuvd B, Munkhbat B, Inoue H, Hyodo O, Ando K, <u>Kato S</u> , Hotta T.	Successful in vitro generation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes from severe chronic active EBV patients.	Med Microbiol Immunol	189	137-145	2001
Matsumoto M, Katoh Y, Nakamura Y, Shimakura Y, Hagihara M, Yabe H, Yabe M, Inokuchi S, <u>Kato S</u> , Shimamura K.	Injection of CD4+ and CD8+ cells with donor or host accessory cells induces acute graft-versus-host disease in human skin in immunodeficient mice.	Experimental Hematology	29	720-727	2001

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hagihara M, Changwen L, Gansuvd B, Munkhbat B, Inoue H, Shimakura Y, Tsuchiya T, Ueda Y, Oki M, Ando K, <u>Kato S</u> , Hotta T.	Extensive and long-term ex vivo production of dendritic cells from CD34 positive umbilical cord blood or bone marrow cells by novel culture system using mouse stroma.	Journal of Immunological Methods	253	45-55	2001
<u>Kato S</u> , Ando K, Nakamura Y, Muguruma Y, Sato T, Yabe H, Yabe M, Hattori K, Yasuda Y, Hotta T.	Absence of a CD34- hematopoietic precursor population in recipients of CD34+ stem cell transplantation.	Bone Marrow Transplant	28	587-595	2001
Oki M, Ando K, Hagihara M, Miyatake H, Shimizu T, Miyoshi H, Nakamura Y, Matsuzawa H, Sato T, Ueda Y, Gansuvd B, <u>Kato S</u> , Hotta T.	Efficient lentiviral transduction of human cord blood CD34+ cells followed by their expansion and differentiation into dendritic cells.	Experimental Hematology	29	1210-1217	2001
加藤俊一	造血器腫瘍に対する臍帯血移植	medicina	38	251-253	2001
加藤俊一	骨髄バンクと臍帯血バンク	内科	88	418-422	2001
甲斐俊朗, 原宏	臍帯血移植の現況	産婦人科治療	82(4)	387-392	2001
甲斐俊朗, 原宏	臍帯血移植の現状と今後の方向	血液・腫瘍科	42(4)	117-123	2001
Kiyoi H, <u>Naoe T</u> .	Immunoglobulin variable region structure and B-cell malignancies.	Int J Hematol	73	47-53	2001
Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, <u>Saito H</u> , Ueda R, Ohno R, <u>Naoe T</u> .	Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies.	Blood	97	Sep-34	2001
Kosugi H, Ito M, Yamamoto Y, Towatari M, Ito M, Ueda R, <u>Saito H</u> , <u>Naoe T</u> .	In vivo effects of a histone deacetylase inhibitor, FK228, on human acute promyelocytic leukemia in NOD / Shi-scid/scid mice.	Jpn J Cancer Res	92	529-36	2001
<u>Naoe T</u> , Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Kusumoto S, Shimazaki C, Saito K, Akiyama H, Motoji T, Nishimura M, Shinagawa K, Ueda R, <u>Saito H</u> , Ohno R.	Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy.	Leukemia	16	203-208	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Zhang XQ, <u>Takakura N</u> , Oike Y, Inada T, Gale NW, Yancopoulos GD, Suda T	Stromal cells expressing ephrin-B2 promote the growth and sprouting of ephrin-B2(+) endothelial cells.	Blood	98	1028-1037	2001
Yamada Y, <u>Takakura N</u> , Yasue H, Ogawa H, Fujisawa H, Suda T.	Exogenous clustered neuropilin 1 enhances vasculogenesis and angiogenesis.	Blood	97	1671-1678	2001
Sano H, Sudo T, Yokode M, Murayama T, <u>Kataoka H</u> , Takakura N, Nishikawa S, Nishikawa SI, Kita T.	Functional blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta but not of receptor-alpha prevents vascular smooth muscle cell accumulation in fibrous cap lesions in apolipoprotein E-deficient mice.	Circulation	103	2955-2960	2001
Koga K, Todaka T, Morioka M, Hamada J, Kai Y, Yano S, Okamura A, <u>Takakura N</u> , Suda T, Ushio Y.	Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis.	Cancer Res	61	6248-6254	2001
Suda T, <u>Takakura N</u> .	Role of hematopoietic stem cells in angiogenesis.	Int J Hematol	74	266-271	2001
Iwai N, Kitajima K, Sakai K, Kimura T, <u>Nakano T</u> .	Alteration of cell adhesion and cell cycle properties of ES cells by an inducible dominant interfering Myb mutant	Oncogene	20	1425-1434	2001
Suzuki A, <u>Nakano T</u> . ( <i>corresponding author</i> ), Mak T W, and 14 authors.	T-cell specific loss of PTEN leads to defects in central and peripheral tolerance.	Immunity	14	523-534	2001
Shirane M, Sawa H, Kobayashi Y, <u>Nakano T</u> , Shinkai Y, Nagashima K, Negishi N.	Deficiency of phospholipase C-g1 impairs renal development and hematopoiesis.	Development	128	5173-5180	2001
Kuramochi S, Kuroiwa A, Tadokoro Y, Fujita Y, Sato M, Matsuda Y, <u>Nakano T</u> .	Two mouse piwi-related genes: miwi and mili.	Mechanisms of Development	108	121-133	2001
Hemmi H, Yamane T, <u>Nakano T</u> , Yamazaki H, Kunisada T, Hayashi S-I.	Temporal and spatial localization of osteoclasts in colonies from embryonic stem cells.	Biochem Biophys Res Commun	280	526-534	2001
Suzuki A, <u>Nakano T</u> .	Development of Hematopoietic Cells From Embryonic Stem Cells.	Int J Hematol	73	51-55	2001
Sato M, <u>Nakano T</u> .	Embryonic stem cell.	Internal Medicine	40	195-200	2001
Sato M, Kimura T, Kurokawa K, Fujita Y, Abe K, Yasunaga T, Abe R, Yamamoto N, <u>Nakano T</u> .	Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells.	Mechanisms of Development		in press	2002

## 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
加藤俊一	先天性免疫不全症に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植	高久史麿、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉譲	Annual Review 血液 2002	中外医学社	東京	2002	137-142
仲野 徹	胚性幹細胞 (ES細胞) の分化とサイトカイン	元吉和夫	造血サイトカイン研究の進歩と臨床応用	メディカルビュー社	東京	2001	64-73