

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nishihira H, Kato K, Isoyama K, Takahashi TA, Kai S, Kato S, Takanashi M, Sato N, Sato H, Kitajima K, Naoe T, Saito H.	The Japanese cord blood bank network experience with cord blood transplantation from unrelated donors for haematological malignancies: an evaluation of graft-versus-host disease prophylaxis.	Br J Haematol	120	516-522	2003
Isoyama K, Ohnuma K, Kato K, Takahashi TA, Kai S, Kato S, Takanashi M, Sato N, Sato H, Kitajima K, Naoe T, Saito H, Nishihira H.	Cord Blood Transplantation from Unrelated Donors: A Preliminary Report from the Japanese Cord Blood Bank Network.	Leukemia and Lymphoma	44	429-438	2003
Murate T, Suzuki M, Hattori M, Takagi A, Kojima T, Tanizawa T, Asano H, Hotta T, Saito H, Yoshida S, Tamiya-Koizumi K.	Up-regulation of acid sphingomyelinase during retinoic acid-induced myeloid differentiation of NB4, a human acute promyelocytic leukemia cell line.	J Biol Chem	277	9936-9943	2002
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, 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.	Efficacy of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukemia: a multicentre randomized study.	Br J Haematol	116	103-112	2002
Yazaki M, Takahashi T, Mizutani K, Ito Y, Wakiguchi H, Inoue M, Kawa K, Kato T, Saito H, Togari H.	Human leucocyte antigen-Cw-specific cytotoxic T lymphocytes generated from naive cord blood used for cord blood stem cell transplantation.	Br J Haematol	117	893-898	2002
Li Y, Nagai H, Ohno T, Yuge M, Hatano S, Ito E, Mori N, Saito H, Kinoshita T.	Aberrant DNA methylation of p57KIP2 gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype.	Blood	100	2572-2577	2002
Hayakawa F, Imada K, Towatari M, Saito H.	Life-threatening human parvovirus B19 infection transmitted by intravenous immune globulin.	Br J Haematol	118	1187-1189	2002
Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H.	Aging and obesity augment the stress-induced expression of tissue factor gene in the mouse.	Blood	100	4011-4018	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nagamura-Inoue T, Shioya M, Sugo M, Cui Y, Takahashi A, Tomita S, Zheng Y, Takada K, Kodo H, Asano S and <u>Takahashi TA</u> .	Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank, Tokyo Cord Blood Bank.	Transfusion		in press	2003
Xiaohong Zhang, Takashi Nakaoka, Toshihide Nishishita, Nobukazu Watanabe, Koichi Igura, Ken-ichi Shinomiya, <u>Tsuneo A. Takahashi</u> , Naohide Yamashita.	Efficient Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells.	Microbiol. Immunol.	47	109-116	2003
Nagayama H, <u>Takahashi TA</u> , Yamashita N, Shimazaki S and Asano S et al.	Cord blood stem cells, Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim.	Bone marrow transplantation	29	197-204	2002
Hagihara M, <u>Kato S</u> , et al.	The in vitro generation of Ph1+ALL-specific HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes using a synthetic 16 mer minor bcr-abl peptide.	Luekemia Research	27	253-257	2003
Inoue H, <u>Kato S</u> , et al.	The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34-positive stem cell tansplantation in children; comparison with bone marrow transplantation.	International Journal of Hematology		in press	2003
Tsuchiya T, Hagihara M, Shimakura Y, Ueda Y, Gansuvd B, Munkhbat B, Inoue H, Tazume K, <u>Kato S</u> , Hotta T.	The generation of immunocompetent dendritic cells from CD34+ acute myeloid or lymphoid leukemia cell.	Int J Hematology	75	55-62	2002
Gansuvd B, Hagihara M, Ying Y, Inoue H, Ueda Y, Tsuchiya T, Masui A, Ando K, Nakamura Y, Munkhtuvshin N, <u>Kato S</u> , Thomas JM, Hotta T.	Human umbilical cord blood NK T cells kill tumors by multiple cytotoxic mechanisms.	Human Immunology	63	164-175	2002
Hagihara M, Gansuvd B, Ueda Y, Tsuchiya T, Masui A, Tazume K, Inoue H, <u>Kato S</u> , Hotta T.	Killing activity of human umbilical cord blood-derived TCRValpha24+ NKT cells against normal and malignant hematological cells in vitro: a comparative study with NK cells or OKT3 activated T lymphocytes or with adult peripheral blood NKT cells.	Cancer Immunology Immunotherapy	51	1-8,	2002
Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N, <u>Kato S</u> , Hotta T.	Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetes/Shi-scid, IL-2 receptor γ null mice.	J Immunol	169	204-209	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Ishikawa Y, <u>Kato S</u> , Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Kodera Y.	The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors.	Blood	99	4200-4206	2002
Li C, Ando K, Kametani Y, Oki M, Hagihara M, Shimamura K, Habu S, <u>Kato S</u> , Hotta T.	Reconstitution of functional human B lymphocytes in NOD/SCID mice engrafted with ex vivo expanded CD34 (+) cord blood cells.	Exp Hematol	30	1036-43	2002
Kojima S, Matsuyama T, <u>Kato S</u> , Kigasawa H, Kobayashi R, Kikuta A, Sakamaki H, Ikuta K, Tsuchida M, Hoshi Y, Morishima Y, Kodera Y.	Outcome of 154 patients with severe aplastic anemia who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program.	Blood	100	799-803	2002
Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, <u>Kato S</u> , Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.	Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACVr) herpes simplex virus type 1: emergence of Foscarnet-resistant virus originating from the ACVr virus.	Journal of Medical Virology	68	99-104	2002
Qiu F, Fujimori Y, Kai S, Fujibayashi Y, Nishioka K, <u>Hara H</u> .	Establishment of mouse embryonic fibroblast cell lines that promote ex vivo expansion of human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors.	J Hematotherapy & Stem Cell Res	12	39-46	2003
Tabata M, Satake A, Okura N, Yamazaki Y, Toda A, Nishioka K, Tanaka H, Chin M, Itsukuma T, Yamaguchi M, Misawa M, Kai S and <u>Hara H</u> .	Long-term outcome after allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies with non-remission statusResults of a single-center study of 24 patients.	Ann Hematol	81	582-587	2002
Fujimori Y, Yoshimoto T, Matsui K, Tsutsui H, Okamoto T, Kashiwamura S, Hada T, Okamura H, Kakishita E, <u>Hara H</u> and Nakanishi K.	Increased Expression of Interleukin-18 Receptor on T Lymphocytes in Patients with Acute Graft-versus-Host Disease After Allogeneic Bone Marrow Transplantation.	Journal of Interferon and Cytokine Research	22	751-754	2002
Wakae T, Takatsuka H, Seto Y, Iwata N, Mori A, OkadaM, Fujimori Y, OkamotoT, KakishitaE and <u>Hara H</u> .	Similarity Between Hepatic Graft-versus-host Disease and Primary Biliary Cirrhosis.	Hematology	7	305-310	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Luo JM, Yoshida H, Komura S, Ohishi N, Pan L, Shigeno K, Hanamura I, Miura K, Iida S, Ueda R, <u>Naoe T</u> , Akao Y, Ohno R, Ohnishi K.	Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia.	Leukemia.	17	1-8	2003
Hirose Y, Kiyoi H, Iwai M, Yokozawa T, Ito M, <u>Naoe T</u> .	Successful treatment with imatinibmesylate of a CML patient in megakaryoblastic crisis with severe fibrosis.	Int J Hematol	76	349-353	2002
Kiyoi H, <u>Naoe T</u> .	FLT3 in human hematologic malignancies.	Leuk Lymphoma	43	1541-1547	2002
Minami Y, Kiyoi H, Yamamoto Y, Yamamoto K, Ueda R, <u>Saito H</u> , <u>Naoe T</u> .	Selective apoptosis of tandemly duplicated FLT3-transformed leukemia cells by Hsp90 inhibitors.	Leukemia	16	1535-1540	2002
Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, <u>Saito H</u> , <u>Naoe T</u> .	Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain.	Oncogene	21	2555-63	2002
<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
Osumi K, Fukui T, Kiyoi H, Kasai M, Kodera Y, Kudo K, Kato K, Matsuyama M, Naito K, Tamimoto M, Hirai H, <u>Saito H</u> , Ohno R, <u>Naoe T</u> .	Rapid screening of leukemia fusion transcripts in acute leukemia by Real-time PCR.	Leuk Lymphoma	43	2291-2299	2002
Yamada Y, Oike Y, Ogawa H, Ito Y, Fujisawa H, Suda T, <u>Takakura N</u> .	Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development.	Blood		in press	2003
Yuasa H, <u>Takakura N</u> , Shimomura T, Suenobu S, Yamada T, Nagayama H, Oike Y, Suda T.	Analysis of human TIE2 function on hematopoietic stem cells in umbilical cord blood.	Biochem Biophys Res Commun	298	731-737	2002
Sano H, Ueda Y, <u>Takakura N</u> , Takemura G, Doi T, Kataoka H, Murayama T, Xu Y, Sudo T, Nishikawa S, Nishikawa S, Fujiwara H, Kita T, Yokode M.	Blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta pathway induces apoptosis of vascular endothelial cells and disrupts glomerular capillary formation in neonatal mice.	Am J Pathol	161	135-143	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ogawa T, Takayama K. Takakura N, Kitano S & Ueno H.	Anti-tumor angiogenesis therapy using soluble receptors: enhanced inhibition of tumor growth when soluble fibroblast growth factor receptor-1 is used with soluble vascular endothelial growth factor receptor.	Cancer Gene Ther	9	633-640	2002
Suenobu S, Takakura N, Inada T, Yamada Y, Yuasa H, Zhang XQ, Sakano S, Oike Y & Suda T.	A role of EphB4 receptor and its ligand, ephrin-B2, in erythropoiesis.	Biochem Biophys Res Commun	293	1124-1131	2002
Yasui K, Matsumoto K, Hirayama F, Tani Y, and Nakano T.	Differences between peripheral and cord blood in the kinetics of lineage-restricted hematopoietic cells Implications for delayed platelet recovery following cord blood transplantation.	Stem cells		in press	2003
Kitajima K, Tanaka M, Jie Z, Sakai-Ogawa E, Nakano T.	In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells to hematopoietic cells on an OP9 stromal cell monolayer.	Methods Enzymol		in press	2003
Kimura T, Ito C, Watanabe S, Takahashi T, Ikawa M, Yomogida K, Ikeuchi M, Asada N, Fujita Y, Matsumiya K, Okuyama A, Okabe M, Toshimori K, Nakano T.	Mouse Germ Cell-Less is an essential component for nuclear integrity.	Mol Cell Biol		in press	2003
Suzuki A, Itami A, Ohishi M, Inoue T, Komazawa N, Senoo H, Sasaki T, Takeda J, Manabe M, Mak TW, Nakano T.	Keratinocyte-specific Pten deficiency results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumor formation.	Cancer Res		in press	2003
Suzuki A, Kaisho T, Ohishi M, Tsukio-Yamaguchi M, Tsubata T, Koni PA, Sasaki T, Mak TW, Nakano T.	Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination.	J Exp Med		in press	2003
Kimura T, Suzuki A, Fujita Y, Yomogida K, Lomeli H, Asada N, Ikeuchi M, Nagy A, Mak TW, Nakano T.	Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production.	Development		in press	2003
Kishimoto H, Hamada K, Saunders M, Sasaki T, Nakano T, Mak TW and Suzuki A.	Physiological functions of PTEN in various tissues: analysis of the tissue specific PTEN mutant mice.	Cell Structure and Function.		in press	2003
Sato M, Kimura T, Kurokawa K, Fujita Y, Abe K, Masuhara M, Yasunaga T, Abe R, Yamamoto N, Nakano T.	Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells.	Mech Dev	113	91-94	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamamoto H, Kihara-Negishi F, Yamada T, Suzuki M, Nakano T, Oikawa T.	Interaction between the hematopoietic Ets transcription factor Spi-B and the coactivator CREB-binding protein associated with egative cross-talk with c-Myb.	Cell Growth Differ	13	69-75	2002
Tanigaki T, Han H, Yamamoto N, Tashiro K, Ikegawa M, Kuroda K, Nakano T, Honjo T.	Notch/RBPJ signaling is involved in cell fate determination of Marginal Zone B cells.	Nature Immunol	3	443-450	2002
Kitajima K, Masuhara M, Era T, Enver T, Nakano T.	GATA-2 and GATA-2/ER display opposing activities in the development and differentiation of blood progenitors.	EMBO J	21	3060-3069	2002
Lian RH, Maeda M, Lohwasser S, Delcommenne M, Nakano T, Vance RE, Raulet DH, Takei F.	Orderly and nonstochastic acquisition of CD94/NKG2 receptors by developing NK cells derived from embryonic stem cells in vitro.	J Immunol	168	4980-4987	2002
Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Bertoni A, Stuhlmann H, Nakano T, Leavitt AD, Shattil SJ.	Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling.	Proc Natl Acad Sci USA	99	12819-12824	2002
Tanaka J, Tutumi Y, Zhang L, Kato N, Sugita J, Mori A, Toyoshima N, Ota S, Kobayashi M, Kasai M, Asaka M, and Imamura M.	Induction of CD94/NKG2A expression on T cells in mixed lymphocyte culture by CD14+ cells for granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells.	Br J Haematol	117	751-754	2002
Tsutsumi Y, Tanaka J, Kato N, Zhang L, Mori A, Kobayashi R, Kasai M, Asaka M, and Imamura M.	Analysis of mixed chimerism in patients after allogeneic stem cell transplantation using a capillary electrophoresis system.	Acta Haematol	107	195-202	2002
Imamura M.	Immunological reconstitution and immunoregulatory cells in hematopoieitic stem cell transplantation.	Int J Hematol	76	191-194	2002
Izumiyama K, Hashino S, Takahata M, Chiba K, Mori A, Suzuki S, Kobayashi S, Tanaka J, Imamura M, and Asaka M.	Pneumococcal purulent genual arthritis after allogeneic bone marrow transplantation.	Ann Hematol	81	282-284	2002
Masauzi N, Tanaka J, Miyasaka D, Miyoshi H, Noto S, Matsushima T, Kasai M, Hashino S, Asaka M, Imamura M, and Kobayashi M.	Mean fluorescence intensity (MFI) of CD11b on CD34 positive (CD34+) cells derived from granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilized peripheral blood (PB) correlate conversely with the total amount of harvested CD34+ cells.	Ann Hematol	81	483-484	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Tsutsumi Y, Tanaka J, Sugita J, Kato N, Zhang L, Yonezumi M, Chiba K, Toyoshima N, Kondo T, Ohta S, Mori A, Hashino S, Asaka M, and <u>Imamura M.</u>	Analysis of T-cell repertoire and mixed chimaerism in a patient with aplastic anemia after allogeneic bone marrow transplantation.	Br J Haematol	118	136-139	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、他	Annual Review 血液2002	中外医学社	東京	2002	137-142
加藤俊一	造血幹細胞移植	堀田知光、他	血液・造血器疾患の治療と看護	南江堂	東京	2002	242-272

IV. 研究班会議発表者報告書（資料）

平成14年度厚生科学研究
「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班会議
日時：2002年6月21日（金）13:00-16:00
場所：国立名古屋病院 外来管理診療棟5F第1会議室
TEL:052-951-1111

*発表原稿はA4用紙で50部ご用意願います。

13:00-13:05

はじめに

国立名古屋病院 齋藤英彦

(13:05-14:00)

【司会：名古屋大学 直江知樹】

1. 臍帯血CD34陽性細胞からのB細胞分化（NOGマウス移植モデルでの解析）
名古屋大学医学部 廣瀬由佳、直江知樹
2. 免疫不全マウスを用いたTリンパ球系分化の解析 東海大学医学部 八幡 崇、堀田知光
3. マウスES細胞から分化誘導された造血細胞の機能改変
大阪大学微生物病研究所 松本加代子、仲野 徹
4. TIE2チロシンキナーゼの活性化による造血・血管形成の制御
金沢大学がん研究所 高倉伸幸

(14:00-15:00)

【司会：京都大学 中畑龍俊】

5. 臍帯血造血幹細胞の体外増幅を促進するマウス繊維芽細胞株の樹立
兵庫医科大学 仇 恵英、藤盛好啓、西岡啓介、甲斐俊朗、原 宏
6. 胎盤由来間葉系細胞の効率よい分取法と、細胞生物学的性状
東京大学医科学研究所 渡辺信和
7. ex vivo増幅臍帯血幹細胞移植に向けての基盤整備 京都大学医学部 中畑龍俊
8. ドナー由来と考えられる骨新生が観察された非血縁者間臍帯血移植症例
名古屋大学大学院 小島勢二

(15:00-16:00)

【司会：神奈川県厚木保健所 西平浩一】

9. 臍帯血移植成績向上のための戦略：臍帯血造血幹細胞のhoming能の改善と、NK/NKT細胞の増幅による免疫制御
東京大学医科学研究所 長村登紀子
10. 臍帯血移植後の免疫グロブリンの推移 東海大学総合医学研究所 加藤俊一
11. 兵庫さい帯血バンクの現況と移植成績
兵庫医科大学 甲斐俊朗、三澤真人、五熊丈義、原 宏
12. 今後の全国登録のあり方についての提案 東海大学総合医学研究所 加藤俊一

平成 14 年度厚生科学研究
「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班会議

2002 年 6 月 21 日

1. 臍帯血 CD34 陽性細胞からの B 細胞分化 (NOG マウス移植モデルでの解析)

名古屋大学医学部附属病院難治感染症部

廣瀬由佳、清井 仁、直江知樹

【目的】

我々はこれまで、臍帯血幹細胞よりの B 細胞分化過程を *in vitro* において検討してきた。しかし、*in vitro* ではクラススイッチ以降の成熟 B 細胞の分化過程の解析には限界があり、本研究では、成熟 B 細胞分化過程を NOG マウスを用いた移植系において検討した。

【方法】

NOG マウスに TBI 施行後、ヒト臍帯血より分離した lineage negative CD34 陽性細胞 $2\sim 10 \times 10^4$ 個を移植し、経時的に骨髓、脾臓細胞及び血清を採取し、B 細胞分化過程を検討した。

【結果】

1. NOG マウスを用いることによりヒト臍帯血幹細胞から T 細胞を含む免疫担当細胞の再構築が可能であった。
2. 移植後 12W までは、CD5 陽性 B1 細胞、及び CD10 陽性 pre-B 細胞が優位で、CD20 陽性成熟 B 細胞の割合は低い傾向にあった。
3. 移植後 14W 以降より、T 細胞の出現とともに成熟 B 細胞、形質細胞の出現を認めた。
4. 同時期より、免疫グロブリンのクラススイッチに必須の AID 遺伝子の発現と memory B cell への分化に必要な CD27 とそのリガンド CD70 の発現を認め、血清中にヒト IgG 蛋白と IgG transcript、Ig λ transcript を検出可能であった。
5. 免疫グロブリン遺伝子可変部領域の somatic mutation は移植週数に応じて増加したが、多くはアミノ酸置換を伴わない silent mutation であった。

【今後の検討課題】

1. 抗原刺激に基づく B 細胞の affinity maturation がみとめられるか？
2. T 細胞が特異的抗体産生を導く helper 機能を持つか？
3. 十分な抗原提示を行う樹状細胞の機能があるか？
4. 末梢血動員幹細胞及び骨髓幹細胞との比較検討。

2 免疫不全マウスを用いたTリンパ球系分化の解析

班員：東海大学医学部血液・腫瘍・リウマチ内科 堀田知光

協力者：東海大学医学部再生医学センター 八幡 崇、安藤 潔、中村嘉彦、加藤俊一

〔目的〕

臍帯血移植の大きな問題点として、臍帯血中に含まれる免疫担当細胞が未熟であり、造血幹細胞から誘導される免疫細胞の回復も遅いため、ウイルス感染症および腫瘍性疾患の再発の危険性が高い可能性が示唆されている。臍帯血移植のより安全な臨床応用へ向けてのさらなる課題としては、臍帯血中に含まれる造血幹細胞のリンパ球系細胞への分化能と抗体産生や細胞性免疫応答などの機能的成熟を伴う、免疫系の速やかな再構築が可能か否かについての生体モデル系を利用した基礎的検討が必須である。しかしながら、従来のNOD/SCIDマウスを利用して行われる研究で確認されるヒト造血幹細胞の生体内造血再構築能は骨髓球系とBリンパ球細胞に限られており、免疫応答の中心的役割を担うTリンパ球系への分化能を検討・解析することはできなかった。我々は実験中央動物研究所との共同研究によりNOD/SCIDマウスに残存しているマウスNK細胞を消失させることによりヒト移植細胞をマウス体内により受け入れ易くするため、IL-2やIL-7等の共通受容体である γ 鎖を欠損したNOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ マウス（NOGマウス）を作成した。このNOGマウスに臍帯血由来ヒトCD34陽性細胞を移植するとヒトTリンパ球の分化が観察され、さらにそのTリンパ球が活性化刺激に対して反応する機能的に成熟したTリンパ球であることを見いだした。このNOGマウスを用いた新しいヒト造血幹細胞測定系を報告する。

〔方法と結果〕

生後7週齢から9週齢のNOGマウスに250 cGyのX線を照射後、臍帯血より純化したCD34陽性細胞 10^5 個を尾静脈より移植した。移植に用いたCD34陽性細胞は99%以上の純度であり、臍帯血中に含まれるT細胞の混入はFACSでの検出限界以下である。NOGマウスに臍帯血由来ヒトCD34陽性細胞を移植後6, 8, 13, 16および19週目に採血し、ヒトリンパ球の再構築の経時的変化を解析したところ、移植後6週目にはすでにB細胞は末梢血中で検出されるがT細胞は検出されなかった。しかし、13週目に従来のNOD/SCIDマウスを用いた解析法では検出されなかったヒトT細胞の出現を認め、その後、末梢血中に含まれるT細胞の割合は増加していった。

移植後16から19週後にヒト造血幹細胞の生体内再構築を各種ヒト細胞分化抗原に対する抗体で染色し解析した。NOGマウスの骨髓においては、NOD/SCIDマウスを用いた測定法と同様に、すべての造血系細胞の再構築が確認された。一方、NOD/SCIDマウスでは造血幹細胞からのヒトT細胞の分化は非常にまれな確率でのみ観察される現象であるが、NOGマウスにおいては移植したすべての個体においてヒトT細胞の分化・増殖が胸腺および脾臓で確認された。さらに、その胸腺におけるヒトT細胞の分化様式をCD4およびCD8抗原の発現様式を指標として解析したところ、CD4-CD8-からCD4+CD8+の未分化

T細胞からCD4+CD8-およびCD4-CD8+の成熟T細胞のすべてが観察され、その発現様式はマウスおよびヒトで観察される正常胸腺と同様のものではなかった。脾臓においてはCD4+CD8-およびCD4-CD8+の成熟T細胞の状態が存在し、そのほとんどはTCR- $\alpha\beta$ 型のT細胞であった。またCD45RA陽性のいわゆるnaive T細胞とCD45RO陽性のいわゆるmemory T細胞共に確認された。さらに、TCR-V β 鎖の多様性を解析したところ、解析に用いた24種すべてのTCR-V β 鎖が検出された。以上の結果から、NOGマウスを用いて観察されたヒトT細胞の生体内分化は、移植したCD34陽性細胞中に混在したわずかなT細胞や、マウスに反応性の特異なT細胞クローンがGVH反応によって異常増殖したものではなく、ヒト造血幹細胞がNOGマウス胸腺環境内で正常なT細胞分化経路を経て増殖したものであることが示された。

脾臓T細胞培養系にPHAおよびIL-2を添加したところ、³H-thymidineの取り込みをもなう著しい増殖・活性化が認められた。さらに、マイトジェン刺激のみならず、同種異型の単核球に対する活性化反応も同様に確認され、NOGマウス体内で分化・増殖したヒトT細胞が機能的にも正常なT細胞であることが確認された。

移植後16週目のNOGマウスの胸腺組織を解析した。HE染色および抗CD3抗体を用いた染色により、胸腺皮質・髄質構造が構築されていることが観察された。また、抗CD80抗体で染色した結果、樹枝状突起を有したヒト樹状細胞の存在が確認された。この事実は、ヒトT前駆細胞がNOGマウスの胸腺内に存在するヒトの胸腺内抗原提示細胞によって正と負の選択をなされている可能性を示唆するものである。

臍帯血移植のもう一つの問題点は含有造血幹細胞数が限られており、臍帯血幹細胞移植の成人への適応が一部に限られていることである。この問題を解消するために、HLAのほぼ一致した複数ドナー由来の臍帯血を混合して移植する方策がとられている。しかし、その移植したそれぞれのドナー造血幹細胞由来の免疫系が同一個体内で分化・成熟していく過程においてお互い同士をどのように認識するのかについての検討はよいアッセイ系がなかったために不明であった。そこで、HLAの異なる2つの臍帯血をレンチウイルスを用いてGFPとYFPでそれぞれ遺伝子標識後混合しNOGマウスに移植し解析を行った。移植後の末梢血リンパ球の体内動態をFACSにて解析し、最後に骨髄を採取し、GFP由来の骨髄球系の割合とYFP由来の骨髄球系の割合をFACSにて検討した。その結果、GFP由来の造血系の割合とYFP由来の造血系の割合は常にほぼ一定に保たれており、それぞれの分化も正常に行われていることが明らかとなった。

[まとめ]

現在臍帯血移植の抱える大きな課題の一つに免疫系の早期再構築がある。しかしながら、臍帯血造血幹細胞の免疫系の再構築については有用なアッセイ法がないことから研究が進まず、有効な情報が得られなかったのが現状である。本研究により新しく開発されたヒトT細胞分化の生体モデル系を利用することによって、今日まで解明されなかったヒトT細胞の生体内分化に関する多くの重要な知見が得られるものと期待され、臍帯血造血幹細胞の臨床応用に向けたより安全な新しいシステムの開発を目指すことが可能になるものと考えられる。

3. マウスES細胞から分化誘導された造血細胞の機能改変

大阪大学微生物病研究所 松本加代子、仲野 徹

平成14年度厚生科学研究
「幹細胞を用いた移植・再生医療に関する研究」

マウスES細胞から分化誘導された造血細胞の機能改変

大阪大学 微生物病研究所
仲野 徹

OP9システムによる分化誘導

5日目 8日目 14日目

1/500 ~ 1/1000

中胚葉系細胞 → 多能性造血前駆細胞 → 血液細胞

赤血球、樹状細胞、巨核球、マクロファージ、 mast細胞、巨核球

Tet-off システム

Tetracycline Tet EGFP

CAG-P CMV-Enhancer + Chicken β -case promoter
TET Tetacycline response element + three tandem repeats of the VP-16 minimal transcriptional activation domain

未分化造血細胞と GATA-2

Hematopoietic stem cell → Myeloid precursor cell → Neutrophil
Hematopoietic stem cell → Lymphoid precursor cell → T cell, B cell
Hematopoietic stem cell → Erythroid precursor cell → Erythrocyte

GATA-2, GATA-1, TAL1, Fli-1, c-Myb

GATA-2 の機能: 文献的考察

<Loss of Function>
An early hematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2
Ohno SH et al. Nature 1994;371 (6494):221-4
GATA-2ノックアウト in vivo → 一次・二次造血の異常・未分化な造血細胞の増殖に関与
Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation
Ohno SH et al. Blood 1997 May 15;89(10):3638-43
GATA-2ノックアウト in vitro → 二次造血の造血前駆細胞の減少・一次造血の異常

<Gain of Function>
Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis
Niederhus AW et al. Blood 1998;93 (2):488-99
GATA-2のレトロウイルスによる強制発現 → 造血前駆細胞の減少・未分化な造血細胞の増殖と分化の阻害
Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner
Zinke M, et al. Genes Dev 1993;7 1087-109
GATA-2 ERのトランスジェニックマウスでの発現 → 赤血球系の分化抑制・赤血球系の増殖促進
A GATA-2/estrogen receptor chimera functions as a ligand-dependent negative regulator of self-renewal
Ever T, et al. Genes Dev 1999;13:1847-60
GATA-2 ERのFDOP細胞、マウス造血細胞での発現 → 増殖は停止するが細胞死は誘導されない・赤血球系への分化は抑制される

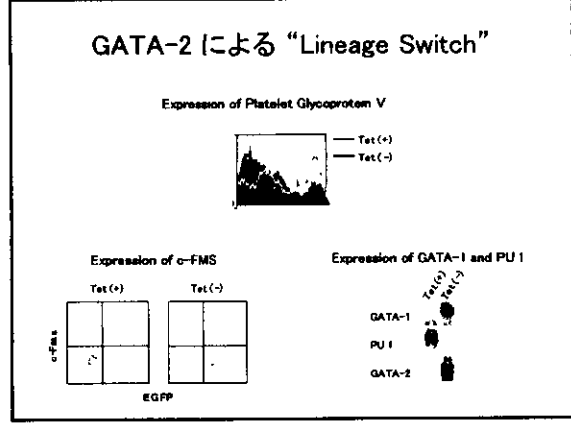
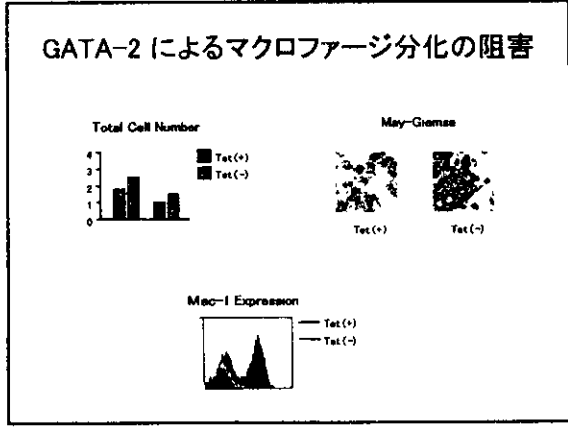
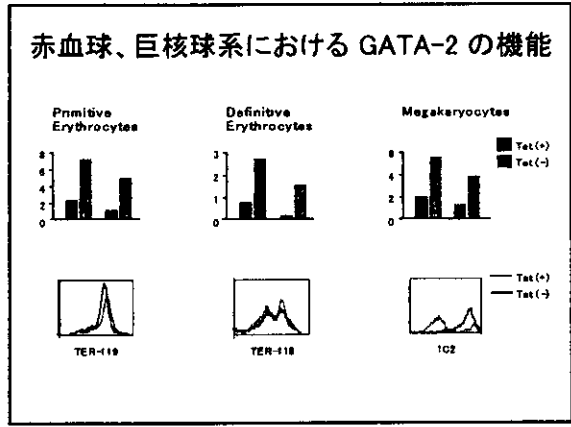
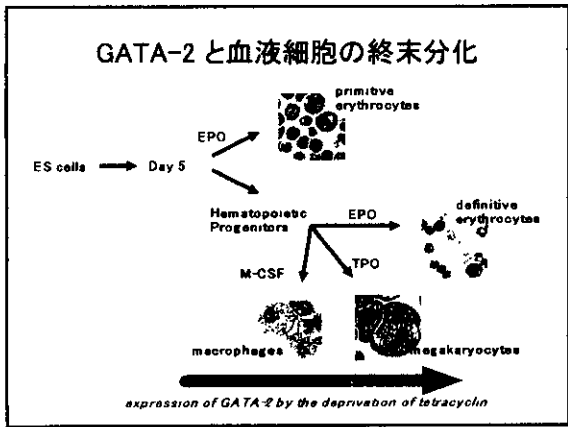
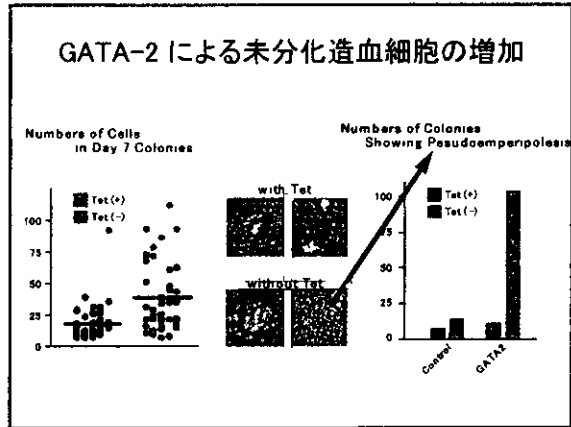
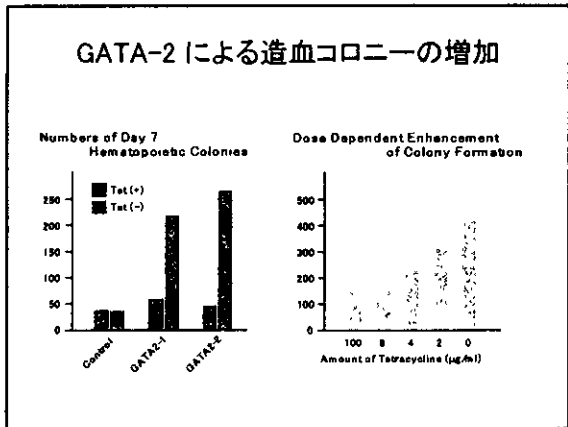
Tet-Off システムによる遺伝子制御

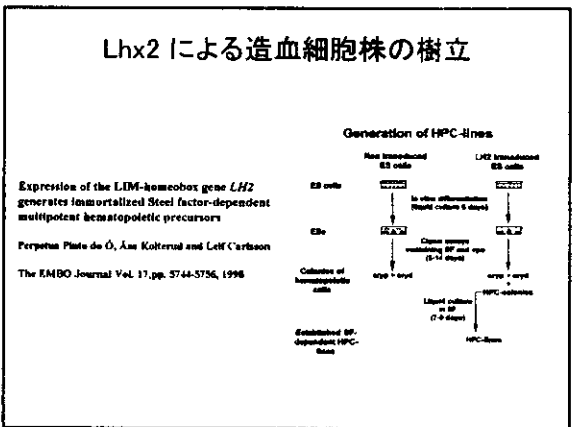
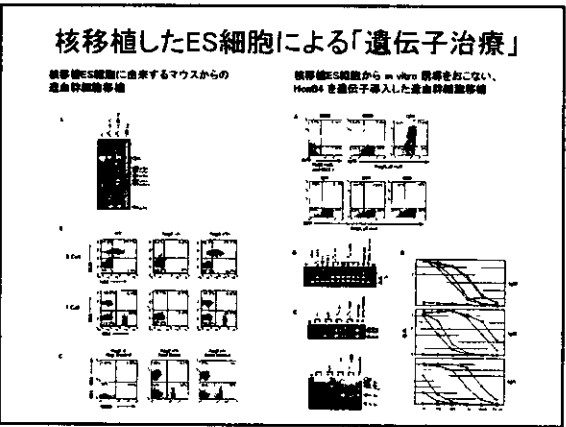
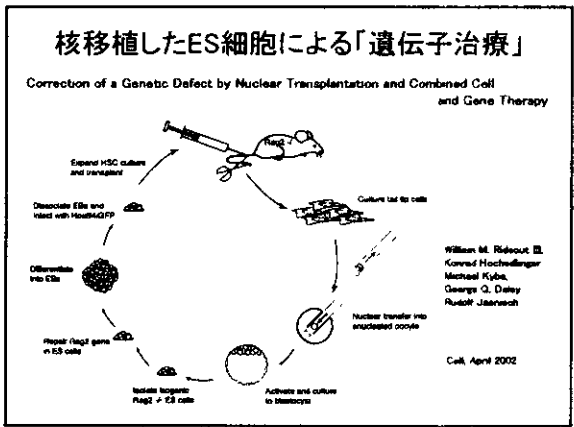
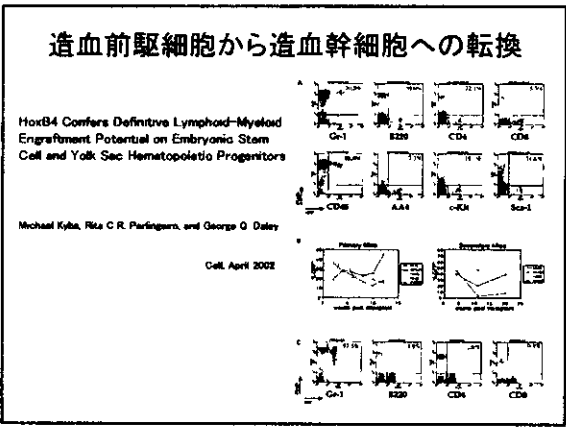
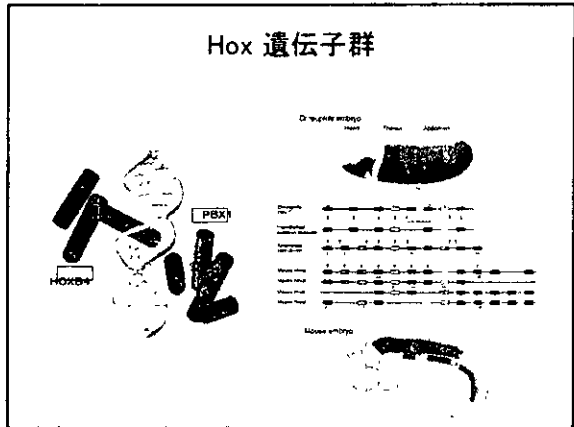
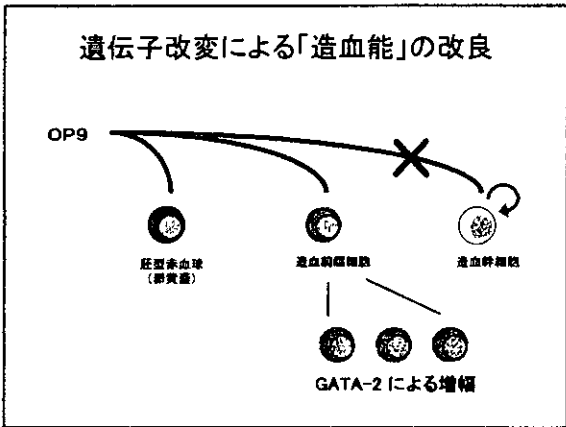
Expression of EGFP and GATA-2 in ES Cells

Control GATA-2-1 GATA-2-4 Tet

Expression of EGFP in Erythrocytes

TER-119 EGFP





厚生科学研究

「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班

平成14年度厚生科学研究第1回班会議

4. 演題名：「TIE2 チロシンキナーゼの活性化による造血、血管の制御」

演 者：高倉 伸幸

金沢大学がん研究所、細胞制御研究部門・細胞分化研究分野

近年造血幹細胞は自己複製、血球系多分化能を有する以外にも、心血管系をはじめ、胚葉を超えた分化能を有することが報告され、いわゆる骨髄不全の患者に対する骨髄移植だけでなく、種々の組織への再生医療にもその応用に期待が高まっている。実際下肢の虚血性疾患の患者に対する虚血局所への骨髄移植により、再生血管を形成させる治療は世界に先駆け我が国において開始され、その有用性もすでに報告された。しかし、造血幹細胞においてはこのような社会的貢献性が重視される中、その最も重要な機能である自己複製の分子メカニズムが不明であり、我々は造血幹細胞の試験管内増幅を可能にすべく、本自己複製の制御機構の解明を行ってきた。従来までの研究により、1) TIE2 受容体は胎生初期より最も未分化な造血幹細胞に発現すること、2) 本 TIE2 の欠損で造血幹細胞の発生が欠如すること、3) TIE2 陽性の造血幹細胞は自らの分泌する TIE2 のリガンド、アンジオポエチン-1 のオートクラインループにより造血幹細胞の造血支持細胞へのマトリックスを介した接着を誘導し、幹細胞の未分化性が維持されることなどを明らかにしてきた。今回、我々は造血器官では造血幹細胞が血管内皮細胞に接着する領域が高頻度に観察され、さらに血管内皮細胞にも TIE2 の発現が観察されることから、造血幹細胞は血管内皮細胞をニッチ構成細胞として局在し、さらに幹細胞の分泌するアンジオポエチン-1 が血管内皮細胞の TIE2 を活性化して、幹細胞の自己複製を支持すると仮説をたてた。そこで、恒常的活性化 TIE2 受容体を構築し、TIE2 プロモーター制御下に本受容体を発現するマウスを作成し、造血幹細胞の発生分化に関して観察した。TIE2 の造血幹細胞、血管内皮細胞における活性化増強により、胎仔肝において造血幹細胞は正常マウスに比べ、約10倍の造血幹細胞の濃縮が観察された。また試験管内における造血幹細胞の発生を観察する P-Sp 領域を用いた培養系でも、造血幹細胞の極めて著明な分化抑制が観察された。これらの研究結果に立脚し、今後 TIE2 の活性化制御によるヒト造血幹細胞の試験管内増幅を試みたい。

平成14年度 厚生科学研究 「臍帯血を用いた移植・再生医療
に関する研究」第1回班会議

5. 臍帯血造血幹細胞の体外増幅を促進するマウス胎児線維芽細胞株の樹立

仇 恵英¹⁾、藤盛好啓²⁾、西岡啓介³⁾、甲斐俊朗¹⁾、原 宏¹⁾²⁾³⁾

1)兵庫医科大学輸血部、2)先端医学研究所細胞移植部門、3)総合内科血液・腫瘍

目的 胎児線維芽細胞はES細胞の維持に重要であるが、造血幹細胞への影響は知られていないため、細胞株を樹立しその造血支持能を検討した。

方法 胎生12日のC57BL/6マウス胎児の体幹から、付着性のstroma細胞を得、X線照射により3つの細胞株を樹立し、その造血支持能を検討した。

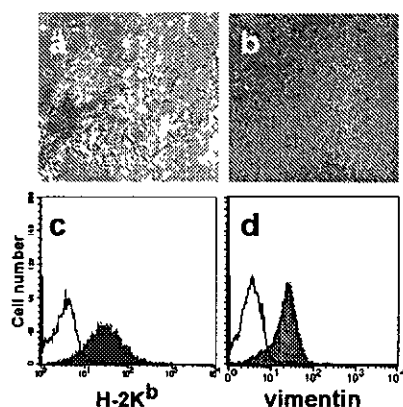


Fig. 1

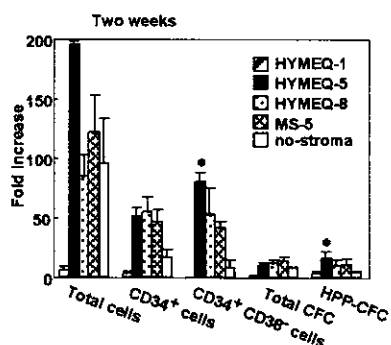


Fig. 2

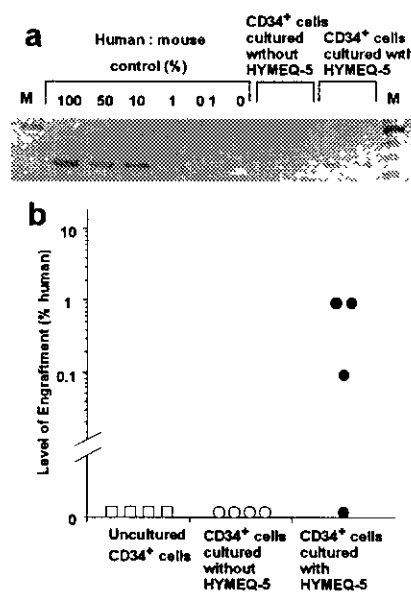


Fig. 3

結果 HYMEQ-1, -5, -8の3つの細胞株が得られ、これらの細胞は血球系マーカー陰性、血管内皮マーカー陰性、HLA class I 陽性、細胞内vimentin陽性およびその形態から、線維芽細胞と考えられた(Fig. 1)。3つの細胞株のうち、HYMEQ-5細胞をfeederすると、Dexter-typeの培養系で長期に臍帯血CD34陽性細胞からの造血を維持することができた。また、HYMEQ-5株は、TPO、FL、SCFの存在下に臍帯血CD34陽性細胞からのHPP-CFCやCD34+CD38-細胞の増幅を促進した(Fig. 2)。さらに、増幅した臍帯血CD34陽性細胞は、NOD/SCIDマウスで、SRCを増加した(Fig. 3)。

結語 HYMEQ-5株は、臍帯血CD34陽性細胞の増幅を支持した。この細胞株は、造血幹細胞の増幅の研究・開発に有用である。

6.

タイトル：胎盤由来間葉系細胞の効率よい分取法と、細胞生物学的性状

主任研究者氏名：高橋恒夫

分担研究者：渡辺信和、伊倉宏一、長村登紀子、岩元潮、三鶴亜矢子、田口淳史、高田圭
東京大学医科学研究所 細胞プロセッシング研究部門

臍帯血採取後の胎盤は、現在医療廃棄物として廃棄されている。しかしながら、バンクに登録された臍帯血は、感染性や主要組織適合抗原などの詳細が把握されており、臍帯血採取後の胎盤を再生医療の細胞のソースとして用いることが可能な場合、高い利用価値がある。

我々は、成熟胎盤の胎盤絨毛を細切し、trypsin 処理あるいは細切片からの outgrowth (explant 法) により胎盤構成細胞を単離した。trypsin 処理後得られた単離細胞を FACS で解析し、間葉系細胞と思われる CD34-CD45-SH2+細胞を sorting すると (trypsin/sorting 法)、短時間で接着して均一な線維芽細胞様の形態を示した。酵素処理で得られた細胞は、sorting せずにそのまま培養しても数週間後には均一な線維芽細胞様の形態を示した (trypsin 法)。一方、explant 法で得られた細胞は、当初から均一な間葉系細胞であった。trypsin 法、trypsin/sorting 法、および explant 法で得られた間葉系細胞の増殖速度を比較すると、explant 法で得られた細胞が最も高い増殖能を示した。

次に、胎盤由来間葉系細胞がどのような分化増殖因子に反応しうるか知る目的で、種々の分化誘導因子に対するレセプターの mRNA を、どのような臓器・組織に分化傾向を示す細胞かを知る目的で種々の分化関連マーカーの mRNA を解析した。その結果、分化誘導因子に対するレセプターでは、ACTRIIB、BMP4RII、c-Met および RAR の mRNA の発現がみられた。分化関連マーカーとしては cACT、keratin、renin のほか、骨芽細胞の分化に関連した分子の mRNA の発現がみられた。

さらに、胎盤由来間葉系細胞を種々の条件下で培養し、分化誘導の可能性を調べた。その結果、適切な培養条件の下で骨芽細胞、および軟骨細胞に分化誘導が可能で、それぞれ細胞外でのカルシウム、酸性ムコ多糖体の沈着が認められた。また、神経系細胞様の形態を示す細胞にも分化誘導が可能で、NSE などの神経系マーカーも発現していた。

今回我々は、胎盤由来間葉系細胞の効率よい分取法と、これらの細胞生物学的性状の解析結果を紹介し、再生医療への応用について考察する。

発表内容

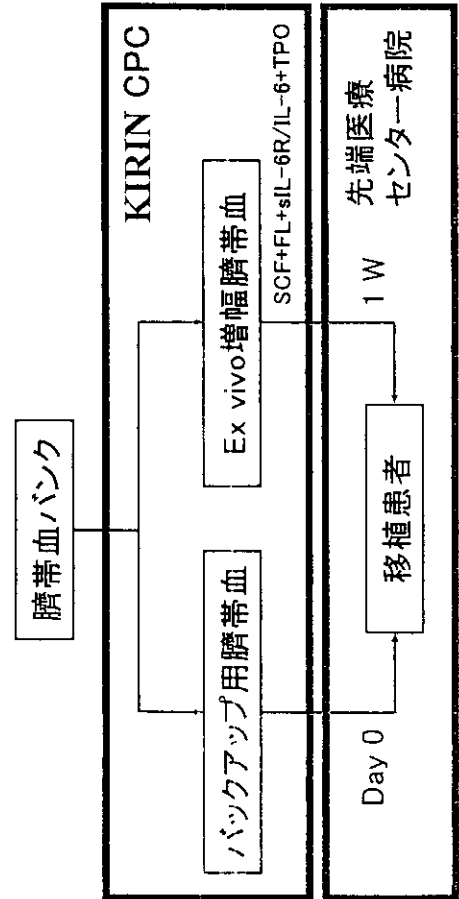
- 研究の概要
 - 神戸先端医療センター
 - 研究計画概要
- 培養条件の検討
 - 培養液の選択
 - サイトカインの組合せ
 - サイトカインの至適濃度
 - CD34とAC133の比較
 - 他グループとの比較
 - 大量培養に向けた検討
 - 細胞純度の影響
 - 凍結保存液の影響
 - 解凍試験
- 今後の予定

培養液の選択

- 目的
 - 臨床試験の使用に耐え得る、体外増幅に最適な培地を決定する
- 判断基準
 - 動物由来蛋白質を含有しないこと
 - 増幅活性に優れていること
- 候補培地
 - α-MEM(基準培地)
 - 中畑先生オリジナルの培地 (BSA, コレステロール, レシチン, トランスフェリン含有)。基本的には臨床では使用できない。ホジコンとして使用。
 - Ex vivo 10/15
 - 元来、リンパ球増幅用に関与された培地。McNieceらの臨床研究で使用。
 - StemSpan2000
 - StemCell Technology社の製品。ヒト血液幹細胞培養用に関与されたもの。IMDMベースであり、動物由来蛋白質は含まないが、ヒト由来成分を含有。詳細は不明。
 - QBSF-60
 - QualityBiochem社の製品。ヒト血液幹細胞培養用に関与されたもの。IMDMベースであり、動物由来蛋白質は含まないが、ヒト由来成分を含有。詳細は不明。

先端医療センターで予定している臨床試験の概要

CD34⁺ cell ex vivo expansionによる臍帯血移植



GMP 準拠基礎培地の選択

