

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した
血液生成技術の開発研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 平井 久丸

平成 15 年 (2003) 3 月

目 次

I.	総括研究報告書		
	胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した血液生成技術の開発研究		
	平井 久丸	1	
II.	分担研究報告書		
	胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した血液生成技術の開発研究		
	千葉 滋	5	
	造血幹細胞の増幅および血球への分化誘導技術の開発に関する研究		
	寺村 正尚	8	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	10	
IV.	研究成果の刊行物・別刷	11	

I . 総括研究報告

胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した血液生成技術の開発研究

主任研究者 平井 久丸（東京大学医学部附属病院無菌治療部 助教授）

研究要旨

体性造血幹細胞および胚性幹細胞から血球への分化を誘導する技術を開発することを目的として研究を行い、以下の成果を得た。(1)造血支持細胞を温度応答性培養皿でシート状に培養し、3-4層からなる三次元培養系を作製した。この上にヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を播種して培養後、別の骨髓支持細胞シートを重層する系において、造血幹細胞が定着することを確認した。(2)Notch リガンドによりシグナルを導入しつつ、無血清条件でヒト臍帯血 CD133 陽性細胞中の未熟造血前駆細胞を増殖させ得ることを明らかにした。(3)Notch1 及び Notch2 のノックアウトマウスを解析し、胎生期に血管内皮細胞から造血幹細胞に分化する過程に、Notch1 受容体からのシグナルが必須であることを見出した。(4)科学技術会議ヒト生殖・クローン専門委員会（ES 細胞研究専門委員会）での承認を受け、ヒト ES 細胞の無血清培養を開始した。

分担研究者

千葉 滋

東京大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科 講師

黒川 峰夫

東京大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科 助手

小川 誠司

東京大学医学部附属病院
造血再生医療 助教授

高橋 強志

東京大学医学部附属病院
輸血部 助手

寺村 正尚

東京女子医科大学
血液内科 講師

量的質的な供給の不安定性、感染の危険性などの問題を孕んでいる他、高コストであることから医療経済にも影響を及ぼしている。本研究ではこうした現状に対し、臍帯血や骨髓中に存在する体性造血幹細胞、および、樹立された培養胚性幹細胞（ES 細胞）の自己複製能と多分化能を利用して、体外で赤血球、白血球、血小板など各血球細胞の分化・増殖による人工血液の産生法の開発を行い、供血者に依存する輸血医療を抜本的に再構築することを目指すものである。これらの人工血液が実用化されれば、管理された条件の下に計画的な生産が可能になり、安定供給と安全性の問題が解決するのみならず、大規模な生産系の稼働により、輸血医療のコスト低減につながる。一方、様々な理由により現時点では不可能である白血球の自由な輸血が可能になると、悪性腫瘍や難治性感染症に対する新しい強力な免疫治療法や細胞療法の開発に発展する可能性も見込まれる。さらに本研究では、造血幹細胞そのものや、これに由来する前駆

A. 研究目的

血液製剤の需要は、医療の高度化に伴いますます増大している。現在血液製剤は献血事業に依存しているが、献血による輸血医療は、

細胞の利用も対象とする。本研究の成果により、造血幹細胞移植療法を実施する上でネックとなっている、ドナー細胞入手の問題も解決される。

B. 研究方法

体性造血幹細胞は、その供給が有限であるため、幹細胞としての未分化性を維持することが肝要である。これにあたって本年度は、次の2つの異なるアプローチを用いて、目的とする培養細胞から血球生成の開発研究にあたった。すなわち、(1) Poly (N-isopropyl acrylamide) (PIPAAm) を重合させることにより、温度に应答して細胞の接着性を变化させる培養皿（東京女子医大先端生命科学研究所の岡野光男教授らが新たに開発）で造血支持細胞（骨髄間質細胞）をシート状に培養し、シート状の支持細胞を重層培養した。この上に、蛍光色素 PKH-26 で標識した造血幹細胞を播種して共培養し、これらをシートとして取り出すことが可能かどうかを検討した。さらに共培養したこれらの細胞の上に別の骨髄間質細胞シートを重層し、造血幹細胞を支持細胞で挟み込むことで三次元的な培養系を構築し、これが造血幹細胞の生存や増殖に与える影響について検討した。(2) ヒト臍帯血から、CD133 陽性細胞を純化し、一旦凍結後液体窒素中に保存した。融解後、SCF、TPO、Flt3 リガンドなどのサイトカインの組み合わせをベースとして、2種類の可溶性 Notch リガンド (Delta1 及び Jagged1) を作用させ、無血清条件で培養した。1週～4週後に FACS 解析を行い、また、未熟造血前駆細胞の増加をコロニー形成法により評価した。

一方、ES 細胞から血球を生成する技術の開発においては、ES 細胞から血球へ効率よ

く分化させる方法論の確立が重要である。ES 細胞からの分化は、個体発生を模倣すると考えられる。胎生期造血の機構を明らかにするため、Notch1 及び Notch2 のノックアウトマウス（肝臓で二次造血を行う前の胎生 11 日前後に死亡する）を用いて、卵黄嚢および胎児側造血発生部位 (P-Sp あるいは AGM 領域) における造血発生を解析した。解析には、OP9 ストローマ細胞株との共培養による組織培養法、コロニー形成法、母親マウスへのブスルファン注射後の新生児肝臓への移植法を用いた。一方、科学技術会議ヒト生殖・クローン専門委員会 (ES 細胞研究専門委員会) で承認を受けた後、米国 WiCell 研究所から提供を受けたヒト ES 細胞株 H9 の培養を開始した。提供者の方法に習い、CF-1 マウス胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) と FGF2 を用いて培養した。

C. 研究結果

(1) 温度应答性培養皿上で造血支持細胞をシート状に培養し、これを重層培養することにより、3-4 層からなる三次元培養系の作製に成功した。この上にヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を播種して培養後、培養温度を 37℃ から 20℃ に下げると造血幹細胞とともにシート状に剥離し、別の培養皿に移して培養可能であることを確認した。さらに、こうして得た造血幹細胞を播種した骨髄支持細胞シートの上に、別の骨髄支持細胞シートを重層した。重層化した骨髄支持細胞シートの中に、予め蛍光色素 PKH-26 で染色した造血幹細胞が定着することを、共焦点レーザー顕微鏡で確認した。(2) ヒト臍帯血から CD133 陽性細胞を分離し、SCF+TPO+Flt3 リガンド+IL-6+IL-6 レセプターのカクテルを無血清条件

下で用いることにより、1 週間で混合コロニーを形成する未熟造血前駆細胞を培養前の 15 倍に増加させ得た。しかし、この条件では 3 週間後には培養前の 10 倍程度でしかなく、培養 1 週間後よりむしろ減少した。一方、Notch リガンドの一つ Delta1 の可溶性蛋白をこの系に加えて 3 週間培養することにより、未熟コロニー形成細胞は、培養前の約 200 倍まで増加した。(3)Notch1 及び Notch2 ノックアウトマウスの胎生期造血発生について解析した結果、胎生期に血管内皮細胞から造血幹細胞に分化する過程に、Notch1 受容体からのシグナルが必須であることを突き止めた。(4) CF-1 ストレインマウス初代培養胎児線維芽細胞と FGF2 を用いることにより、H9 細胞を無血清培養法により未分化状態を維持したまま培養し、大量に増殖させ得た。

D. 考案

(1)生体内の骨髓組織は支持組織の柱帯により形成された三次元空間であり、そこに造血幹細胞が付着して自己再生および分化がおきている。本研究で検討中の三次元培養法は生体により近い生体外培養システムである。今年度の研究では、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞がこの培養系に定着することを示したが、次年度はこの細胞を増幅できるかを検討する。(2)Notch シグナルを用いることにより、ヒト臍帯血由来未熟造血前駆細胞を効率よく増幅することが明らかになり、仮説の正しさを検証することができた。この培養法により、造血幹細胞が増幅され得るかは未知である。しかしながら、3 週間という長期間の培養後に、これまで造血幹細胞の体外増幅法として確立された方法に比べて極めて高い未熟前駆細胞増幅効果を認めたことから、造血幹細胞

も増幅されていることが期待される。(3)個体発生時の造血発生の分子機序は、ES 細胞からの血球分化過程を効率よく誘導するために重要な情報となる。今回の、Notch1 シグナルが造血発生にとって必須であるという発見は、ES 細胞からの血球生成技術の開発にとって重要な方法論を提供する。この情報を元に、ES 細胞の培養系のどの時点かで、Notch リガンドを加えることを次年度に計画する。(4)ヒト ES 細胞の培養を開始した。ヒト ES 細胞は、マウス ES 細胞と培養法が大いに異なるだけでなく、形態、細胞表面抗原の発現、増殖速度など、多くの点で相違があることを確認した。これまでのマウス ES 細胞からの血球分化の研究を応用するにあたり、これらの相違点を踏まえて研究を進める必要がある。

E. 結論

(1)造血支持細胞と造血幹細胞による生体外 3 次元培養法開発の継続し、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞の定着を確認した。(2)ストローマ細胞を用いず、また無血清条件下で、既知のサイトカインとともに Notch リガンドの一つ Delta1 の可溶性蛋白を用いることにより、臍帯血中の未熟造血前駆細胞の効率よい体外増幅に成功した。(3)Notch1 及び Notch2 ノックアウトマウスを用いた胎生期造血発生機構の解析により、胎生期造血発生には、Notch1 シグナルが必須であることを見出した。今後 ES 細胞から血球生成への応用を目指す。(4)ヒト ES 細胞の研究を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, Hirai H. HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood* 101:1777-1783, 2003
2. Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Hirai H. Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. *Immunol Lett* 81:59-64, 2002
3. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Takahashi T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H. Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain. *EMBO J* 21:294-302, 2002
4. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H. Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 291:775-779, 2002
5. Takahashi T, Chiba S, Nieda M, Azuma T, Ishihara S, Shibata Y, Takeo J, Hirai H. Analysis of human V α 24+CD8+ natural killer T cells activated by α -galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 168:3140-3144, 2002
6. Hangaishi A, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, Hirai H. Mutations of Chk24in primary hematopoietic neoplasms. *Blood* 99:3075-3077, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した血液生成技術の開発研究

分担研究者 千葉 滋（東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科 講師）
黒川 峰夫（東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科 助手）
小川 誠司（東京大学医学部附属病院造血再生医療 助教授）
高橋 強志（東京大学医学部附属病院輸血部 助手）

研究要旨

体性造血幹細胞および胚性幹細胞から血球への分化を誘導する技術を開発することを目的として、次の研究成果を得た。(1)Notch リガンドによりシグナルを導入しつつ、無血清条件でヒト臍帯血 CD133 陽性細胞中の未熟造血前駆細胞を増殖させ得ることを明らかにした。(2) Notch1 及び Notch2 のノックアウトマウスを解析し、胎生期に血管内皮細胞から造血幹細胞に分化する過程に、Notch1 受容体からのシグナルが必須であることを見出した。(3)科学技術会議ヒト生殖・クローン専門委員会（ES 細胞研究専門委員会）での承認を受け、ヒト ES 細胞の無血清培養を開始した。

A. 研究目的

臍帯血などの体性造血幹細胞ソース及びヒト胚性幹細胞（ES 細胞）から得られる造血幹細胞を用いて、体外で大量に造血幹細胞あるいは造血前駆細胞を産生する技術を開発することを目的とした。自在に造血幹細胞が得られれば、造血幹細胞移植における最大の問題点である、ドナーに過剰な負担を強いるという点の解決につながる。また、このようにして得られた造血前駆細胞から、血球へ効率よく分化させることも目的とした。

B. 研究方法

(1)ヒト臍帯血から、CD133 陽性細胞を純化し、一旦凍結後液体窒素中に保存した。融解後、SCF、TPO、Flt3 リガンドなどのサイトカインの組み合わせをベースとして、2 種類の可溶性 Notch リガンド（Delta1 及び Jagged1）を作用させ、無血清条件で培養した。1 週～4 週後に FACS 解析を行

い、また、未熟造血前駆細胞の増加をコロニー形成法により評価した。(2)胎生期造血の機構を明らかにするため、Notch1 及び Notch2 のノックアウトマウス（肝臓で二次造血を行う前の胎生 11 日前後に死亡する）を用いて、卵黄嚢および胎児側造血発生部位（P-Sp あるいは AGM 領域）における造血発生を解析した。解析には、OP9 ストローマ細胞株との共培養による組織培養法、コロニー形成法、母親マウスへのブスルファン注射後の新生児肝臓への移植法を用いた。(3)科学技術会議ヒト生殖・クローン専門委員会（ES 細胞研究専門委員会）で承認を受けた後、米国 WiCell 研究所から提供を受けたヒト ES 細胞株 H9 の培養を開始した。提供者の方法に習い、CF-1 マウス胎児線維芽細胞（MEF 細胞）と FGF2 を用いて培養した。

C. 研究結果

(1)ヒト臍帯血から CD133 陽性細胞を分離

し、SCF+TPO+Flt3 リガンド+IL-6+IL-6 レセプターのカクテルを無血清条件下で用いることにより、1 週間で混合コロニーを形成する未熟造血前駆細胞を培養前の 15 倍に増加させ得た。しかし、この条件では 3 週間後には培養前の 10 倍程度でしかなく、培養 1 週間後よりむしろ減少した。一方、Notch リガンドの一つ Delta1 の可溶性蛋白をこの系に加えて 3 週間培養することにより、未熟コロニー形成細胞は、培養前の約 200 倍まで増加した。(2)Notch1 及び Notch2 ノックアウトマウスの胎生期造血発生について解析した結果、胎生期に血管内皮細胞から造血幹細胞に分化する過程に、Notch1 受容体からのシグナルが必須であることを突き止めた。(3) CF-1 ストレインマウス初代培養胎児線維芽細胞と FGF2 を用いることにより、H9 細胞を無血清培養法により未分化状態を維持したまま培養し、大量に増殖させ得た。

D. 考察

(1)Notch シグナルを用いることにより、ヒト臍帯血由来未熟造血前駆細胞を効率よく増幅することが明らかになり、仮説の正しさを検証することができた。この培養法により、造血幹細胞が増幅され得るかは未知である。しかしながら、3 週間という長期間の培養後に、これまで造血幹細胞の体外増幅法として確立された方法に比べて極めて高い未熟前駆細胞増幅効果を認めたことから、造血幹細胞も増幅されていることが期待される。(2)個体発生時の造血発生の分子機序は、ES 細胞からの血球分化過程を効率よく誘導するために重要な情報となる。今回の、Notch1 シグナルが造血発

生にとって必須であるという発見は、ES 細胞からの血球生成技術の開発にとって重要な方法論を提供する。この情報を元に、ES 細胞の培養系のどの時点かで、Notch リガンドを加えることを次年度に計画する。(3)ヒト ES 細胞の培養を開始した。ヒト ES 細胞は、マウス ES 細胞と培養法が大いに異なるだけでなく、形態、細胞表面抗原の発現、増殖速度など、多くの点で相違があることを確認した。これまでのマウス ES 細胞からの血球分化の研究を応用するにあたり、これらの相違点を踏まえて研究を進める必要がある。

E. 結論

(1)ストローマ細胞を用いず、また無血清条件下で、既知のサイトカインとともに Notch リガンドの一つ Delta1 の可溶性蛋白を用いることにより、臍帯血中の未熟造血前駆細胞の効率よい体外増幅に成功した。(2)Notch1 及び Notch2 ノックアウトマウスを用いた胎生期造血発生機構の解析により、胎生期造血発生には、Notch1 シグナルが必須であることを見出した。今後 ES 細胞から血球生成への応用を目指す。(3)ヒト ES 細胞の研究を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, Hirai H. HES-1 preserves

purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood* 101:1777-1783, 2003

2. Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Hirai H. Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. *Immunol Lett* 81:59-64, 2002
3. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Takahashi T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H. Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain. *EMBO J* 21:294-302, 2002
4. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H. Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 291:775-779, 2002
5. Takahashi T, Chiba S, Nieda M, Azuma T, Ishihara S, Shibata Y, Takeo J, Hirai H. Analysis of human V α 24+CD8+ natural killer T cells activated by α -galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 168:3140-3144, 2002
6. Hangaishi A, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, Hirai H. Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms. *Blood* 99:3075-3077, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

造血幹細胞の増幅および血球への分化誘導技術の開発に関する研究

分担研究者 寺村 正尚 (東京女子医科大学血液内科 講師)

研究要旨

造血幹細胞を安全に体外で維持増幅し、一定の血球への分化を誘導する技術を開発することを目的として、造血支持細胞と造血幹細胞による生体外3次元培養法の新規開発に取り組んだ。その結果、重層化した造血支持細胞シートの上に造血幹細胞が定着することを確認した。現在、この系における造血幹細胞の増幅能について検討中である。

A. 研究目的

現代医療において血液製剤の必要性和需要は高いがその供給は献血事業に頼っており、安全性や経済性などの問題をはらんでいる。一方、従来医療廃棄物として破棄されていた臍帯血中の造血幹細胞は、骨髄や動員による末梢血造血幹細胞にくらべて免疫学的に寛容で、感染暴露の危険性が少なく、かつ提供者である母体や児への影響もない。このような利点をもつ臍帯血造血幹細胞から人為的に血液製剤を製造する事が可能となれば、現行の輸血事業が抱える諸問題を解決することができると思われる。本研究は、臍帯血造血幹細胞を安全に体外で維持増幅し、一定の血球系への分化を誘導する技術を開発することを目的とした。

B. 研究方法

Poly (N-isopropyl acrylamide) (PIPAAm) を重合させることにより温度に应答して細胞の接着性を変化させる培養皿 (東京女子医大先端生命科学研究所の岡野光男教授らが開発) を用いて、造血細胞と造血支持組織の三次元培養系の開発を試みた。具体的には造血支持細胞 (骨髄間質細胞) を温度应答性培養皿でシート状に培養し、それらを重ねあわせることにより、重層培養することができるかを検討した。次に造血支持細胞 (骨髄間質細胞) の上に造血幹細胞を播種して共培養した

後にこれらをシートとして取り出すことが可能かどうかを検討した。さらに共培養したこれらの細胞の上に別の造血支持細胞 (骨髄間質細胞) シートを重層し、造血幹細胞を支持細胞で挟み込むことで三次元的な培養系を構築し、これが造血幹細胞の生存や増殖に与える影響について検討している。

(倫理面への配慮)

臍帯血の提供はあらかじめ文書を用いて説明を行い、同意を得た上で受けた。胎盤娩出後、臍帯静脈血を採取した。

C. 研究結果

造血支持細胞 (GFP ラット骨髄間質細胞) を温度应答性培養皿でシート状に培養しそれにそれを重ね合わせ、3-4 層からなる三次元培養に成功した。

次に、この造血支持細胞に造血幹細胞 (ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞) を播種し温度应答性培養皿で培養した。造血幹細胞を植え込んだ造血支持細胞は培養温度を 37℃ から 20℃ に下げるとシート状に剥離し、別の培養皿に移して培養可能であることを確認した。

さらに、こうして得た造血幹細胞を埋め込んだ骨髄支持細胞シートの上に別の骨髄支持細胞シートを重層した。造血幹細胞はあらかじめ PKH-26 という蛍光色素で染色したものを使用した。重層化した骨髄支持細胞シート

の間に造血幹細胞が定着することを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。現在、この造血幹細胞の増幅能を検討中である。

D. 考察

生体内の骨髄組織は支持組織の柱帯により形成された三次元空間であり、そこに造血幹細胞が付着して自己再生および分化がおきていると推測される。本研究で検討中の三次元培養法は生体により近い生体外培養システムであり、従来の培養法より造血幹細胞の増幅、分化の効率が高まる可能性があると考えられる。

E. 結論

造血支持細胞（骨髄間質細胞）と造血幹細胞を用いた生体外三次元培養の開発が可能であると考えられた。

三次元培養による造血環境の変化と造血能との関連性について解析を進めている。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, Hirai H.	HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo	Blood	1001	1777-1783	2003
Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Hirai H.	Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice.	Immunol Lett	81	59-64	2002
Shimizu K, Chiba S, Saito T, Takahashi T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H.	Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain.	EMBO J	21	294-302	2002
Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H.	Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors.	Biochem Biophys Res Commun	291	775-779	2002
Takahashi T, Chiba S, Nieda M, Azuma T, Ishihara S, Shibata Y, Takeo J, Hirai H.	Analysis of human V α 24+CD8+ natural killer T cells activated by α -galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells.	J. Immunol.	168	3140-3144	2002
Hangaishi A, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, Hirai H.	Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms.	Blood	99	3075-3077	2002

20021052

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.10の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。