

逢坂淳、平家俊男、前川平、金倉
謙、中畑龍俊：Ex vivo 増幅臍帯
血の非臨床試験（その1）：閉鎖
系培養法を用いたEx vivo 増幅臍
帯血の製造 第26回日本造血
細胞移植学会 平成15年12
月19、20日 東京

meeting of the American Society of
Hematology, 2003.

5. Hagiwara, T., Nagao, K., Ohta, T.,
Inagaki, Y., Heike, T., Nakahata, T.
and Nishikawa, M.: Hematopoietic
stem cell expansion and engraftment
potentials. 2004 Keystone Symposia,
Stem Cell (B2), 2004.

—国際学会—

1. Hiramatsu, H., Heike, T., Ueyama, Y.,
Ito, M. and Nakahata, T.: Successful
engraftment and full lineage
differentiation of ex vivo expanded
cord blood CD34+ cells in
NOD/SCID/gnull mice. The 45th
annual meeting of the American
Society of Hematology, 2003.
2. Umeda, K., Heike, T., Yoshimoto, M.,
Fujino, H., Shiota, M., Hiramatsu, H.,
Suemori, H., Luo, H.Y., Chui, D.H.K.,
Torii, R., Nakatsuji, N. and Nakahata,
T.: Development of primitive and
definitive hematopoiesis from
nonhuman primate embryonic stem
cells in vitro. The 45th annual meeting
of the American Society of
Hematology, 2003.
3. Kambe, N., Hiramatsu, H., Ito, M.,
Heike, T., Miyachi, Y. and Nakahata,
T.: Development of both human
connective tissue type and mucosal
type mast cells in mice from
hematopoietic stem cells. The 45th
annual meeting of the American
Society of Hematology, 2003.
4. Hagiwara, T., Nagao, K., Ohta, T.,
Inagaki, Y., Heike, T., Nakahata, T.
and Nishikawa, M.: Expansion of
adult murine hematopoietic stem cells
that accelerate short-term blood cell
recovery and maintain long-term
reconstitution. The 45th annual

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 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(3):516-522, 2003.
2. 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(3):429-438, 2003.
3. Hishida A, Yamamoto K, Kato C, Yokozawa T, Emi N, Tanimoto M, Saito H: Recovery of normal hematopoiesis after severe bone marrow aplasia induced by interferon- α in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol* 77: 55-59, 2003.
4. Hishida A, Yamamoto K, Matsushita T, Tanimoto M, Saito H, Emi N.: Trisomy X in Philadelphia chromosome-negative cells during the course of Philadelphia chromosome-positive chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 142: 83-85, 2003.
5. Nagai H, Li Y, Hatano S, Ohno T, Yuge M, Ito E, Utsumi M, Saito H, Kinoshita T: Mutations and aberrant DNA methylation of the PROXI gene in hematologic malignancies. *Genes Chromosomes & Cancer* 38:13-21, 2003.
6. Watamoto K, Towatari M, Ozawa Y, Miyata Y, Okamoto M, Abe A, Naoe T, Saito H: Altered interaction of HADC5 and GATA-2 during MEL cell differentiation. *Oncogene* 22(57): 9176-9184, 2003.
7. Li Z, Takakura N, Oike Y, Imanaka T, Araki K, Suda T, Kaname, T, Abe K and Yamamura K.: Defective smooth muscle development in qkI deficient mice. *Development Growth Differ.* in press
8. Yamada Y, Oike Y, Ogawa H, Ito Y, Fujisawa H, Suda T, Takakura N.: Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. *Blood* 101:1801-1809, 2003
9. Nakajima M, Yuasa S, Ueno M, Takakura N, Koseki H, Shirasawa T. Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1. *Mech Dev* 120: 657-667, 2003.
10. 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 as an essential component for nuclear integrity. *Mol Cell Biol* 23: 1304-15, 2003.
11. 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 63:674-81, 2003.
12. 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* 197: 657-67, 2003.
 13. 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* 130: 1691-1700, 2003.
 14. 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* 21:143-51, 2003.
 15. 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* 28:11-21, 2003.
 16. Ueno H, Sakita-Ishikawa M, Morikawa Y, Nakano T, Kitamura T, Saito M: A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nature Immunol* 4:457-63, 2003.
 17. 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* 365:72-82, 2003.
 18. Eto K, Lewitt AL, Nakano T, Shattil SJ: Development and analysis of megakaryocytes from murine embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 365: 142-157, 2003.
 19. Masuhara M, Nagao K, Nishikawa M, Kimura T, Nakano T: Enhanced degradation of MDM2 by a nuclear envelope component, mouse germ cell less. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 927-32, 2003.
 20. Nakano T: Hematopoietic stem cells: generation and manipulation. *Trends Immunol* 24: 589-594, 2003.
 21. Payer B, Saitou M, Barton SC, Thresher R, Dixon JPC, Zahn D, Colledge WH, Carlton MBL, Nakano T, Surani MA: Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Cur Biol* 13: 2110-2117, 2003.
 22. Okamura D, Kimura T, Nakano T, Matsui Y: Cadherin-mediated cell interaction regulate germ cell determination in mice. *Development* 130: 6423-6430, 2003.
 23. Takahashi K., Igura K., Zhang X., Mitsuru A., Takahashi AT. Effects of osteogenic induction on mesenchymal cells from fetal and maternal part of human placenta. *Cell Transplantation* (in press)
 24. Nagamura-Inoue T, Mori Y, Zheng Y, Watanabe N and Takahashi TA: Differential

- expansion of umbilical cord blood mononuclear cell derived natural killer cells dependent on the dose of Interleukin 15 with Flt3L. *Exp Hematol* 32:202-209, 2004.
25. Tsuneo A. Takahashi, Paolo Rebulla, Sue Armitage, Jacqueline van Beckhoven, Hermann Eichler, Riitta Kekomäki, Magdalena Letowska, Fawzi Wahab, Gary Moroff : Multi-laboratory evaluation of procedures for reducing the volume of cord blood: influence on cell recoveries, *Vox. Sanguinis* (in press)
 26. Zheng Y, Watanabe N, Nagamura-Inoue T, Igura K, Nagayama H, Tojo A, Tanosaki R, Takaue Y, Okamoto S, Takahashi TA: Ex vivo manipulation of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells with recombinant human stem cell factor can up-regulate levels of homing-essential molecules to increase their trans migratory potential. *Exp Hematol* 31: 1237-1246, 2003.
 27. Nagamura-Inoue T, Shioya M, Sugo M, Cui Y, Takahashi A, Tomita S, Zheng Y, Takada K, Kodo H, Asano S and Takahashi TA: 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* 43: 1285-1294, 2003
 28. Nagayama H, Sato K, Morishita M, Uchiaru K, Oyaizu N, Inazawa T, Yamasaki T, Enomoto M, Nakaoka T, Nakamura T, Maekawa T, Yamamoto A, Shimada S, Saida T, Kawakami Y, Asano S, Tani K, Takahashi TA, Yamashita N.: Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2, *Melanoma Res* 13: 521-530, 2003
 29. Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T, Watanabe N, Igura K, Shinomiya K, Takahashi TA, Yamashita N: Efficient Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells. *Microbiol. Immunol* 47: 109-116, 2003
 30. Kashiwakura I, Takahashi TA: Basic fibroblast growth factor-stimulated ex vivo expansion of haematopoietic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood. *Br J Haematol* 122: 479-88, 2003.
 31. 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.
 32. 塩谷美夏、長村（井上）登紀子、須郷美智子、崔硯、高橋敦子、平井雅子、高橋恒夫:凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法—ProCOUNT 法と 7-AAD 法による比較検討—。日本輸血学会雑誌(印刷中)。

33. 岩元潮、大石真人、高橋賢次、後藤三郎、高橋恒夫:国際臍帯血バンクネットワーク組織 NETCORD ウェブサイト登録のための東京臍帯血バンクコンピューターシステムの構築:日本輸血学会雑誌 49,559-564,2003
34. 高田圭, 長村(井上)登紀子, 須郷美智子, 塩谷美夏, 高橋敦子, 崔硯, 平井雅子, 田口淳史, 渡辺信和, 高橋恒夫: 臍帯血バンクにおける IS09002 品質保証システムの導入と運用, 日本輸血学会雑誌 49, 473-479, 2003
35. Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y, Miyawaki S, Kuriyama K, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Ohno R, Emi N, Naoe T. Biological and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. Blood in press
36. Watamoto K, Towatari M, Ozawa Y, Miyata Y, Okamoto M, Abe A, Naoe T, Saito H.: Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. Oncogene 22: 9176-84, 2003.
37. Kito M, Matsumoto K, Wada N, Sera K, Futatsugawa S, Naoe T, Nozawa Y, Akao Y.: Antitumor effect of arsenic trioxide in murine xenograft model. Cancer Sci. 94: 1010-4, 2003.
38. Matsuno N, Osato M, Yamashita N, Yanagida M, Nanri T, Fukushima T, Motoji T, Kusumoto S, Towatari M, Suzuki R, Naoe T, Nishii K, Shigesada K, Ohno R, Mitsuya H, Ito Y, Asou N.:Dual mutations in the AML1 and FLT3 genes are associated with leukemogenesis in acute myeloblastic leukemia of the M0 subtype. Leukemia 17(12): 2492-9, 2003.
39. Yanada M, Yamamoto K, Emi N, Naoe T, Suzuki R, Taji H, Iida H, Shimokawa T, Kohno A, Mizuta S, Maruyama F, Wakita A, Kitaori K, Yano K, Hamaguchi M, Hamajima N, Morishima Y, Kodera Y, Sao H, Morishita Y.: Cytomegalovirus antigenemia and outcome of patients treated with pre-emptive ganciclovir: retrospective analysis of 241 consecutive patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 32(8):801-7, 2003.
40. Kajiguchi T, Yamamoto K, Hossain K, Akhand AA, Nakashima I, Naoe T, Saito H, Emi N.: Sustained activation of c-jun-terminal kinase (JNK) is closely related to arsenic trioxide-induced apoptosis in an acute myeloid leukemia (M2)-derived cell line, NKM-1. Leukemia 17(11):2189-95, 2003.
41. Hirose Y, Kudo K, Kiyoi H, Hayashi Y, Naoe T, Kojima S.:Comprehensive analysis of gene alterations in acute megakaryoblastic leukemia of Down's syndrome. Leukemia 17(11):2250-2, 2003.
42. Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, Naoe T.: Different antiapoptotic

- pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood* 102(8):2969-75, 2003.
43. Ohbayashi K, Taniwaki M, Ninomiya M, Kiyoi H, Iida S, Ueda R, Naoe T: A xeno-transplantable plasma cell leukemia line with a split translocation of the IgH gene. *Cancer Genet Cytogenet* 144(1):31-5, 2003.
 44. Akatsuka Y, Nishida T, Kondo E, Miyazaki M, Taji H, Iida H, Tsujimura K, Yazaki M, Naoe T, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T: Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens. *J Exp Med* 197(11):1489-500, 2003.
 45. 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: Japanese Cord Blood Bank Network. Cord blood transplantation from unrelated donors: a preliminary report from the Japanese Cord Blood Bank Network. *Leuk Lymphoma*. 44(3): 429-38, 2003.
 46. Takeshita A, Shinjo K, Naito K, Matsui H, Shigeno K, Nakamura S, Horii T, Maekawa M, Kitamura K, Naoe T, Ohnishi K, Ohno R: P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) are induced by arsenic trioxide (As(2)O(3)), but are not the main mechanism of As(2)O(3)-resistance in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia* 7(3):648-50, 2003.
 47. 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(3):516-22, 2003.
 48. Luo JM, Yoshida H, Komura S, Ohishi N, Pan L, Shigeno K, Hanamura I, Miura K, Iida S, Ueda R, Naoe T, Akao Y, Ohno R, Ohnishi K: Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17(1):1-8, 2003.
 49. Qui H, Fujimori Y, Kai S, Fujibayashi Y, Nishioka K and Hara H: Establishment of mouse fibroblast cell lines that promote ex vivo expansion of human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors. *J Hematotherapy & Stem Cell Research* 12(1) :39~46, 2003.
 50. Nishioka K, Fujimori Y, Hashimoto-Tamaoki T, Kai S, Qui H, Kobayashi N, Tanaka N, Westerman KA, Leboulch P, Hara H: Immortalization of bone marrow -derived human mesenchymal stem cells by removable simian virus 40T antigen gene: Analysis of the ability to support expansion of cord blood hematopoietic progenitor cells. *International Journal of Oncology* 23: 925-932, 2003.
 51. Tanaka H, Kai S, Yamaguchi M, Misawa M, Fujimori Y, Yamamoto M, Hara H: Analysis

- of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood. *Eur J Haematol* 71: 29-38,2003.
52. Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Hukuyama N, Hino J, Harada-Dhiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H.: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*.108:889-895,2003.
 53. Wakae T, Takatsuka A, Mori A, Fujimori Y, Okamoto T, Hara H, Kakishita E.: Influence of *Helicobacter pylori* on platelets after bone marrow transplantation from unrelated donors. *Bone marrow Transplant* 31: 493-496,2003.
 54. Takatsuka H, Wakae T, Mori A, Okada M, Fujimori Y, Okamoto T, Kakishita E, Hara H. : Prognostic value of cyclic GMP in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation after conditioning with total body irradiation. *Bone Marrow Transplant* 31: 905-908, 2003.
 55. Yamaguchi N, Wakae T, Okada M, Fujimori Y, Okamoto T, Kakishita E, Hara H.: Idiopathic interstitial pneumonia following stem cell transplantation. *Clin Transplant* 17: 338-346, 2003.
 56. Muguruma Y, Nakamura Y, Sato T, Matsuzawa H, Akatsuka A, Yahata T, Miyatake H, Ando K, Kato S, Hotta T.: In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol* 31: 1323-1330, 2003.
 57. Yahata T, Ando K, Sato T, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T.: A highly sensitive strategy for scid-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 101: 2905-2913, 2003.
 58. C.Ito, H.Sato, K.Ando, S.Watanabe, F.Yoshiba, K.Kishi, A.Furuya, K.Shitara, S.Sugimoto, H.Kohno, A.Hiraoka, & T.Hotta.: Serum stem cell growth factor (SCGF) for monitoring hematopoietic recovery following stem cell transplantation (SCT). *Bone Marrow Transplant* 32: 391-398, 2003.
 59. Matsumura T, Kametani Y, Ando K, Hirano Y, Katano I, Ito R, Shiina M, Ito M, Motoyoshi K, Habu S. CD5+ B cells (B1 cells) develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/gnull (NOG) mice transplanted with human umbilical cord blood, bone marrow and mobilized peripheral blood CD34+ cells. *Exp Hematol* 31: 789-797, 2003.
 60. Yahata T, Kato S, et al.: A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 101:2905-13, 2003.
 61. Hagihara M, Kato S, 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. *Leuk Res* 27:253-7, 2003.

62. Hagihara M, Kato S, et al.: Increased frequency of CD3/8/56-positive umbilical cord blood T lymphocytes after allo-priming in vitro. *Ann Hematol* 82:166-70, 2003.
63. Gansuvd B, Kato S, et al.: Umbilical cord blood dendritic cells are a rich source of soluble HLA-DR: synergistic effect of exosomes and dendritic cells on auto logous or allogeneic T-Cell proliferation. *Hum Immunol* 64:427-39, 2003.
64. Inoue H, Kato S, et al.: The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34+ stem cell transplantation in children: comparison with bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 77:399-407, 2003.
65. Ueda Y, Kato S, et al.: The effects of alphaGalCer-induced TCR Valpha24 Vbeta 11(+) natural killer T cells on NK cell cytotoxicity in umbilical cord blood. *Cancer Immunol Immunother* 52:625-31, 2003.
66. Yoshida F, Kato S, et al.: Complete resolution of severe chronic active Epstein-Barr virus infection by cultured, activated donor T lymphocyte infusion after nonmyeloablative stem cells allografting. *Bone Marrow Transplant* 32:107-10, 2003.
67. Hagihara M, Kato S, et al.: Clinical effects of infusing anti- Epstein-Barr virus (EBV)- specific cytotoxic T- lymphocytes into patients with severe chronic active EBV infection. *Int J Hematol*. 78:62-8, 2003.
68. Tsuboi K, Kato S, et al.: Multivariate analysis of risk factors for hemorrhagic cystitis after hemato-poietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 32:903-7, 2003.
69. Ueda Y, Kato S, et al.: Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum Immunol* 64:1144-51, 2003.
70. Muguruma Y, Kato S, et al.: In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol* 31:1323-30, 2003.
71. Yasuda Y, Yabe H, Kato S, et al.: Comparison of PCR-amplified JC virus control region sequences from multiple brain regions in PML. *Neurology* 61(11):1617-9, 2003.
72. Tazume K, Hagihara M, Kato S, et al.: Induction of cytomegalovirus-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes from seropositive or negative healthy subjects or stem cell transplant recipients. *Exp Hematol* 32(1):95-103, 2004.
73. 小寺良尚・加藤俊一編集「必携造血細胞移植」: 執筆担当: 歴史: 2-7、治療原理: 8-14, 先天性疾患 379-390, 医学書院、2004.
74. 加藤俊一: 歴史。小寺良尚、加藤俊一編集、必携造血細胞移植。医学書院、東京、2004、p2-7。
75. 加藤俊一: 治療原理。小寺良尚、加藤俊一編集、必携造血細胞移植。医学書院、東京、2004、p8-14。
76. 加藤俊一: 先天性疾患。小寺良尚、加藤俊一編集、必携造血細胞移植。医学書院、東京、2004、

p379-390.

77. Itoh A, Okada T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Mizukami H, Kume A, Takatoku M, Komatsu N, Hanazono Y, and Ozawa K: A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells. *J Gene Med* 5: 929-940, 2003.
78. Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, and Hanazono Y: Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation* 76: 1061-1067, 2003.
79. Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, and Terao K: Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am J Primatol* 61: 3-12, 2003.
80. Mori M, Uchida M, Watanabe T, Kirito K, Hatake K, Ozawa K, and Komatsu N: Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol* 195: 290-297, 2003.
81. Noborio K, Muroi K, Izumi T, Toshima M, Kawano-Yamamoto C, Otsuki T, Nagai T, Komatsu N, and Ozawa K: Massive immune hemolysis after non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with minor ABO-incompatibility. *Leuk. Lymphoma* 44: 357-359, 2003.
82. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, and Hasegawa M: New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 170-176, 2003.
83. Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, and Ozawa K: In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med* 5: 175-181, 2003.
84. Kami M, Hamaki T, Miyakoshi S, Murashige N, Kanda Y, Tanosaki R, Takaue Y, Taniguchi S, Hirai H, Ozawa K, and Kasai M: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br J Haematol* 120: 304-309, 2003.
85. Komatsu N, Watanabe T, Uchida M, Mori M, Kirito K, Kikuchi S, Liu Q, Tauchi T, Miyazawa K, Endo H, Nagai T, and Ozawa K: A member of Forkhead transcription factor FKHRL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL expressing cells. *J Biol Chem* 278: 6411-6419, 2003.

86. Mitsui T., Watanabe S., Hanada S., Ebihara Y., Sato T., Nakahata T., Tsuji K.: Impaired neutrophil maturation in truncated G-CSF receptor transgenic mice. *Blood* 101:2990-2995,2003.
87. Hiramatsu H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Katamura K., Nakahata T.: Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using NOD/SCID/ γ_c^{null} mice model. *Blood* 102:873-880, 2003.
88. Yoshimoto M., Shinohara T., Heike T., Shiota M., Kanatsu-Shinohara M., Nakahata T.: Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicate the presence of a niche. *Exp Hematol.* 31:733-740,2003.
89. Imai T, Adachi S, Nishijo K, Ohgushi M, Okada M, Yasumi T, Watanabe K, Nishikomori R, Nakayama T, Yonehara S, Toguchida J and Nakahata T.: FR901228 induces tumor regression associated with induction of Fas ligand and activation of Fas signaling in human osteosarcoma cells. *Oncogene* 22:9231-9242, 2003.
90. Heike T. Nakahata T.: Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int Hematol.* 79:7-14,2003.
91. Adachi S., Leoni M., Carson DA, Nakahata T.: Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies. *Acta Haematol.* 111:107-123, 2004.
92. Kambe N., Hiramatsu H., Shimonaka M., Fujino H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Ueyama Y., Matsuyoshi N., Miyachi Y., Nakahata T.: Development of both human connective tissue-type and mucosal-type mast cells in mice from hematopoietic stem cells with identical distribution pattern to human body. *Blood* 103:860-867,2004.
93. Umeda K., Yoshimoto M., Heike T., Nakahata T.: Development of primitive and definitive hemayopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro. *Development* in press.

IV. 研究会議発表者報告書（資料）

平成15年度厚生労働科学研究費補助金
「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」班会議
日 時：2003年6月28日（土）13:00-16:30
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60部ご用意願います。

(13:00-13:10)

はじめに

国立名古屋病院 齋藤英彦

ご挨拶

厚生労働省疾病対策課臓器移植対策室 井内 努

(13:10-14:10)

【司会：大阪大学微生物病研究所 仲野 徹】

1. 骨髄および末梢血幹細胞における血管内皮前駆細胞定量化の試み

名古屋大学医学部 山本晃士

2. 胎盤間葉系細胞の再生医療への応用

東京大学医科学研究所 高橋恒夫

3. 臍帯血・骨髄・動員末梢血由来 CD34 細胞移植 NOG マウスにおけるヒトB細胞分化の解析

亀谷美恵、松村琢也、安藤 潔、加藤俊一、垣生園子

4. 複数臍帯血を用いた競合的 SRC アッセイ

東海大学医学部 安藤 潔

(14:10-15:10)

【司会：名古屋大学 直江知樹】

5. 転写因子の操作による巨核球分化の制御

大阪大学微生物病研究所 仲野 徹

6. 体外増幅造血幹細胞移植に向けて

京都大学 伊藤仁也

7. 臍帯血ミニ移植の試み

虎ノ門病院 宮腰重三郎、久住英二、湯地晃一郎、谷口修一

8. 臍帯血ミニ移植プロトコールの確定

加藤俊一、高上洋一、金成元、齋藤英彦

《Coffee break 15:10-15:30》

(15:30-16:30)

【司会：神奈川県厚木保健所 西平浩一】

9. 「非血縁者間臍帯血移植の安全性の検討」の準備状況

国立がんセンター中央病院 金 成元

10. 臍帯血移植における凍結解凍臍帯血の洗浄効果

東京大学医科学研究所 長村登起子

11. 複数さい帯血同時移植を施行した急性骨髄性白血病の1例

兵庫医科大学 三澤真人、戸田暁成、若江 武、田畑雅彦、高塚広行、原 宏、

藤盛好啓、甲斐俊朗、東海大学総合医学研究所 加藤俊一

12. 総合討論

平成 15 年度 臍帯血移植班会議 発表要旨
(平成 15 年 6 月 28 日)

1. 「骨髄および末梢血幹細胞における血管内皮前駆細胞定量化の試み」

名古屋大学医学部附属病院 輸血部 ○山本 晃士、高松 純樹
同 血液内科 恵美 宣彦、直江 知樹

【緒言】近年、胎生期だけではなく成人個体においても、骨髄中あるいは末梢血中に血管内皮細胞に分化することができる血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) が存在することが証明され、必要に応じて骨髄より血中に出現し、血管内皮細胞に分化して血管新生に寄与することが明らかとなった。このような幹細胞の可塑性を利用して、当院でも Buerger 病や ASO といった末梢閉塞性動脈疾患患者に対する血管新生治療の臨床応用を始めている。その過程で我々は、末梢血中および骨髄液中に含まれる血管内皮前駆細胞の定量化と質的な characterization を行い、血管内皮前駆細胞を用いた細胞療法最適化と、より効率のよい血管再生療法の確立に貢献することを目的として、血管内皮前駆細胞のマーカーとされる VEGF receptor (Flt-1, Flk-1) や VE-cadherin、さらに成熟血管内皮細胞の特異的マーカーである von Willebrand factor (vWf), PECAM-1 等の mRNA レベルでの遺伝子発現を、real time RT-PCR 法により定量的に解析する系を確立したので報告する。

【方法・結果・考察】健常人の末梢血および骨髄液より単核球を分離し、STAT60 を用いて Total cellular RNA を抽出した後、 β -actin を internal control として上記のマーカーにつき real time RT-PCR を行った。Flt-1, VE-cadherin の mRNA 発現は、骨髄液では末梢血の 4~5 倍であったが、Flk-1 の mRNA 発現は末梢血では感度以下で、骨髄液でのみ定量可能であった。また下肢虚血病変に対する血管新生療法として自己骨髄液輸注を行った患者では、輸注後に末梢血中で Flt-1, VE-cadherin mRNA 発現量の増加を認め、血管内皮前駆細胞の末梢への移行が示唆された。

一方、G-CSF の投与を受けた移植ドナーの末梢血においては Flt-1, VE-cadherin の発現が有意に増加し、G-CSF による血管内皮前駆細胞の末梢血への動員が示唆された。その発現パターンは骨髄での解析結果とは明らかに異なっており、末梢血幹細胞に含まれる血管内皮前駆細胞は、量的にも質的にも骨髄とは異なる可能性があると考えられた。今後さらに解析症例 (検体) をふやし、血管新生治療症例あるいは幹細胞移植症例における血管新生ポテンシャル、治療効果の評価に生かすと同時に、骨髄幹細胞動員のための前処置の最適化に寄与したいと考えている。また、臍帯血においても同様な検討を行い、血管新生治療のソースとしての可能性を追究していく予定である。

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金

齋藤班「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」班会議

2.

タイトル: 胎盤間葉系細胞の再生医療への応用

分担研究者: 高橋 恒夫

研究協力者: 伊倉 宏一、張 曉紅、高橋 賢次、森 有加、三鶴 亜矢子、長村 登紀子

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、臍帯血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と考えられる。

我々は、成熟胎盤の胎盤絨毛および脱落膜を細切し、細切片からの outgrowth(explant 法)により胎盤構成細胞を単離およびそれらの中胚葉系組織前駆細胞および神経細胞の分化能を解析してきた。これらの細胞のうち、絨毛由来の間葉系細胞から骨・軟骨および神経細胞に分化する細胞が存在することが見いだされた。骨分化誘導においてはカルシウム沈着だけではなく、アルカリホスファターゼの活性化も見られた。軟骨分化誘導は、その分化マーカーであるタイプ II コラーゲンの発現が RT-PCR 法と免疫染色によって確認された。また、神経分化誘導については、神経細胞に発現しているとされる trk ファミリーおよび GFR α -1 レセプターの mRNA 発現を検出したところ、誘導刺激以前においてもその発現が見られた。

一方、臍帯血移植において体重の大きな患者への移植では造血幹細胞の増幅の必要性があると考えられている。そこで、胎盤由来間葉系細胞のストローマ細胞としての機能を有するかどうか造血支持能について検討を行った。臍帯血由来 CD34 陽性細胞の ex vivo 増幅試験を実施したところ、SCF、TPO、Flt3-L、IL-3 のサイトカインとの組み合わせにおいて骨髄由来間葉系細胞と同等の増幅効果を示した。RT-PCR 法による造血関連サイトカインの mRNA 発現レベルを解析したところ、胎盤由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞のそれとほとんど同じ発現を示した。

今回我々は、胎盤絨毛由来間葉系細胞の分化誘導能および造血支持の研究経過を報告し、再生医療への可能性について考察する。

3. 臍帯血・骨髄・動員末梢血由来 CDC34 細胞移植 NOG マウスにおけるヒト B 細胞分化の解析

東海大学医学部 亀谷美恵・松村琢也・安藤 潔・加藤俊一・
垣生園子

〔目的〕我々はマウス体内においてヒト免疫系を再構築することによりヒト造血幹細胞の分化過程や免疫応答を解析し、造血幹細胞移植や免疫学的治療に有用な情報を得ることを目的としている。

本研究においては、移植効率のよい NOG マウスに臍帯血・骨髄・動員末梢血由来の造血幹細胞を移植し、これら造血幹細胞の移植効率や分化効率を比較し、特に B 細胞分化に焦点を当てて詳細な解析を行った。

〔方法〕9 週齢の NOG マウスに 2.5Gy の放射線照射を行い、各臓器由来の CD34+細胞を磁気ビーズ法及び FACSvantage によるソーティングにより単離して移植した。移植後 4 週間から 14 週間後にマウスの各リンパ臓器を摘出し、フローサイトメトリーにより細胞表面マーカーの発現を解析した。さらに、これらのマウスに移植後 4 週より DNP-KLH を免疫し、2 週間ごとに追加免疫を行った。これらマウス血液中の抗体価及びサイトカイン産生能は、ELISA 法を用いて測定した。

〔結果及び考察〕造血幹細胞移植した NOG マウスにおける各臓器由来の CD34+細胞の生着率は臍帯血由来のものがもっとも高く、どの臓器由来の CD34+細胞もリンパ球系・赤血球系・ミエロイド系すべてに分化することが明らかとなった。NOG マウス体内に検出される B 細胞は骨髄においては CD5 陰性細胞が優勢であり、脾臓においては CD5 陽性細胞が優勢であった。骨髄中の B 細胞はほとんどが IgD 陰性の未熟 B 細胞であり、末梢における IgD 陽性成熟 B 細胞の大部分は CD5 陽性であった。これらのマウスへの DNP-KLH の免疫により抗原特異的な IgM 産生は検出されたが、抗原特異的な IgG 産生は検出されなかった。また、これらのマウス脾臓には T 細胞及び B 細胞が検出されたが、ろ胞形成は観察されなかった。

以上の結果、NOG マウスを用いた造血幹細胞移植においては、成人由来・胎児由来に関わらず、CD5 陽性 B 細胞が分化し、これらは抗原特異的 IgM 抗体産生の機能を持つことが示された。その一方で、これらの細胞は正常な CD5 陰性の B-2 細胞ではなく、抗原特異的な IgG を産生することはできないことが示された。

平成 15 年度厚生科学研究補助金

「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」班会議

平成 15 年 6 月 28 日 於 国立名古屋病院 外来管理病棟 5 階第 1 会議室

4 複数臍帯血を用いた競合的 SRC アッセイ

班員：東海大学医学部血液腫瘍内科 堀田知光

協力者：東海大学医学部再生医学センター 安藤 潔、八幡 崇

【目的】

ヒト造血幹細胞の適切なアッセイは体外増幅幹細胞や複数臍帯血移植を評価する上でますます重要性が高まっている。近年、造血幹細胞の培養条件や細胞周期により移植後のホーミング能が影響を受けることが知られている。また、複数臍帯血移植の臨床においては最終的に単一ドナー由来の造血系が優勢になることが観察されているがその機序は不明である。更に、再構築された免疫能がどのような MHC 拘束性を持つようになるのかという問題も今後の課題である。

従来ヒト造血幹細胞は免疫不全マウスやヒツジ胎仔を利用した異種移植系により評価されてきている。これらのレシピエントはそれぞれの利点、欠点を持っており相互補完するが、現状では NOD/SCID マウスを用いた SRC アッセイが汎用されている。われわれは前々回の本会議において新たに開発された NOG マウスを用いることにより従来マウスでは評価が困難であった T 細胞系の再構築が可能になることを報告した。(J Immunol 169, 204-209, 2002) また、前回の本会議においては異種移植の障害となるホーミング能を回避できる骨髓直接注入法による SRC アッセイについて報告した。(Blood, 101, 2905-2913, 2003) 今回は上記問題を解決するために、生体内で 2 種類の造血幹細胞（例えば 2 個体由来の細胞、あるいは体外操作を受ける前後の細胞など）を相対的に評価可能な競合的 SRC アッセイの試みについて報告する。

【方法と結果】

臍帯血より純化した CD34 陽性細胞をドナー毎に GFP あるいは YFP 遺伝子でマーキングし、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、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。移植後 6, 9, 12, および 15 週目に採血し、ヒト造血細胞の再構築の経時的変化を解析した。移植後 6 週目以降 GFP および YFP 陽性細胞が確認された。9 週

目以降から GFP および YFP 陽性の T 細胞の出現も検出された。

移植後 15 週まで GFP および YFP 陽性細胞の存在比率は安定して維持された。15 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 マウスの骨髄および脾臓においては、GFP および YFP 陽性細胞のいずれにおいても CD3, 14, 19, 33, 34, 56 陽性造血細胞の再構築が確認された。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、GFP および YFP 陽性細胞のいずれにおいても 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あった。

【考察】

体外増幅前後における臍帯血幹細胞活性やホーミング能の比較、複数個体由来の臍帯血幹細胞により再構築される造血免疫系の比較などは今後の臍帯血移植において重要な検討課題である。本アッセイ系により生体内で 2 種類の造血幹細胞の評価が可能となる。今後複数臍帯血移植臨床にみられるドナーキメリズムの偏りがどのような effector cell によりもたらされるのかを検討したい。

5. 転写因子の操作による巨核球分化の制御

大阪大学微生物病研究所 遺伝子動態研究分野
仲野 徹

<目的>

臍帯血移植の際の一つの大きな問題点は、移植後の血小板数の回復遅延であることはよく知られているが、その理由は不明のまま残されている。我々は、マウスE S細胞から血液細胞への分化誘導過程において、いろいろな転写因子をコンディショナルに発現させ、血液細胞の増殖・分化における機能解析をおこなっている。今回は、GATA-1のco-factorであるFOG-1の巨核球分化における機能について報告する。

<方法>

マウスE S細胞をストロマ細胞OP9上で培養し血液細胞へと分化誘導をおこなう。その際に、トロンボポエチン(TPO)を添加し、巨核球への誘導を促進する。遺伝子発現には、テトラサイクリンを用いたコンディショナル発現系(Tet-offシステム)を用いた。いろいろな分化段階においてFOG-1を発現させることにより、巨核球系細胞の増殖・分化におけるFOG-1の機能解析をおこなった。

<結果>

1. 赤血球産生においてFOG-1を強制発現させたところ、どの分化段階においても、胚型赤血球、成体型赤血球ともに、その産生が抑制された。
2. TPO添加時に、比較的早い段階(分化誘導5~8日)にFOG-1を発現させたところ、巨核球の産生は抑制された。
3. しかし、比較的遅い段階(分化誘導8日目以降)にFOG-1を発現させたところ、巨核球の産生は促進された。また、ploidyの増加など、巨核球の分化も促進された。
4. FOG-1は転写のレプレッサーであるCtBP(c-terminal binding protein)と結合し、転写を抑制することが知られている。しかし、FOG-1のCtBP結合ドメインに変異を加えた Δ CtBP-FOG-1を用いても、赤血球ならびに巨核球分化における影響はFOG-1と同様に認められた。

<考察ならびに今後の方針>

FOG-1は、巨核球の分化過程において、多能性前駆細胞あるいは赤血球・巨核球系前駆細胞の段階では、その増殖を抑制した。これに対して、巨核球系前駆細胞以降の段階においては促進的に機能した。この結果は、細胞の分化段階によって、一つの転写調節因子が逆の働きを持ちうることを示している。今後、ヒト臍帯血と骨髄からの巨核球系分化において、いろいろな転写因子の発現が異なっているかどうかを解析する。また、その結果をふまえて、遺伝子導入による巨核球系細胞の増幅を目指したい。

6. 体外増幅造血幹細胞に向けての取り組み

神戸先端医療センター再生医療研究部 伊藤 仁也、
京都大学発達小児科学 中畑 龍俊

要旨

我々は SCF,FL,TPO,IL-6/sIL-6R といったサイトカインの組み合わせによって、臍帯血中の CD34 陽性細胞を NOD/SCID での SRC アッセイにおいて、4.3 倍増幅させる基礎的成果を得た。このような細胞加工を伴った細胞治療の臨床研究を行なうためには、製造施設の整備、GTP に則った培養法の開発、安全性を証明するための、品質管理法の確立、GCP に則った臨床プロトコルの作成が必要である。ex vivo 増幅臍帯血による移植へ向けた取り組みとして、これらの基盤の整備状況と閉鎖系培養システムの構築を中心に進捗状況と問題点を紹介した。

1. GTP に則った安全な細胞製造法の確立

細胞加工を伴う細胞治療製剤の安全性を阻害する要因として、contamination, cross contamination, mix up が 3 大阻害因子である。具体的にこれらの危険を予防するための最良の手段は、完全閉鎖系培養法を確立することであり、臍帯血の解凍、分離、増幅、洗浄、といったプロセスにおいてバッグ&チューブを用いて無菌的に細胞を製造することに成功した。臍帯血バンクに凍結保存された臍帯血 CD34 陽性細胞は

CliniMACS を用いて分離した。CD34 陽性細胞の回収率は $71.4 \pm 2.1\%$ 、純度は $63.1 \pm 10.2\%$ であった。分離後の細胞の Viability は $91.6 \pm 5.0\%$ で培養により十分増幅することが確認された。

CliniMACS を用いた凍結臍帯血からの CD34 陽性細胞分離

試料番号	・解凍直後の凍結臍帯血			CliniMACS 処理後の臍帯血			
	CD45 ⁺ 細胞数 (生細胞)	CD34 ⁺ 細胞数 (生細胞)	CD34 ⁺ 純度 (%)	CD34 ⁺ 細胞数 (生細胞)	CD34 ⁺ 細胞回収率 (%)	生存率 (%)	CD34 ⁺ 細胞純度 (%)
#1	4.7×10^4	8.2×10^5	0.17	5.9×10^5	72.2	83.2	72.7
#2	3.9×10^4	9.7×10^5	0.25	6.8×10^5	70.3	94.4	66.3
#3	4.6×10^4	2.2×10^6	0.47	1.5×10^6	68.3	91.5	65.7
#4	3.7×10^4	3.1×10^6	0.84	2.3×10^6	73.5	93.0	45.8
#5	5.9×10^4	2.2×10^6	0.38	1.6×10^6	72.5	95.8	65.1
平均 (±SD)	$4.6 \pm 0.9 \times 10^4$	$1.9 \pm 1.0 \times 10^6$	0.42 ± 0.26	$1.3 \pm 0.7 \times 10^6$	71.4 ± 2.1	91.6 ± 5.0	63.1 ± 10.2

CD34⁺細胞数は ISHAGE 推奨の方法に基づいて、フローサイトメーターを用いた絶対数測定を実施

また細胞治療における培地の選択は重要な問題であり、プリオンや病原性ウイルスの混入が否定できないため、無血清培養法の確立が急がれる。しかし、臍帯血のような primary cell における無血清培養は増幅が悪く困難なことが知られている。我々は現在、GMP 製造されている無血清培地を用いて臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅率、コロニー形成能を比較した。QBSF60 が現在のところ、CD34 陽性細胞増幅

Bag 培養による CD34 陽性細胞の増殖曲線

