

参考文献

1) Elizabeth F Shapall, Ralph Quinones, Ian K McNiece, et al Transplantation of Ex Vivo Expanded Cord Blood
Biol Blood Marrow Transplant
2002,8(7) 368-76

2) Jennifer Jaroscak, Kristin Goltry, Joanne Kurtzberg et al Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells results of a phase 1 trial using the AastromReplisell System
Blood 2003 Jun 15, 101(12) 5061-7

F 健康危険情報

特記すべきことはない。

G 研究発表

1 論文発表

1 伊藤 仁也、中畑 龍俊、臍帯血造血幹細胞の ex vivo 増幅細胞 36(2), P48-51, 2004

2 学会発表

1 丸山 京子、伊藤 仁也、田中 宏和、鈴木 秀文、槻木 裕志、初山 麻子、多田 典子、高田 のそみ、中畑 龍俊
臍帯血造血幹細胞の増幅培養法の比較
第 26 回 造血細胞移植学会 横浜 2003

1 伊藤 仁也、渋谷 和憲、井手 陽一、

後藤 真澄美、鈴木 秀文、平家俊雄、前川 平、金倉 譲、中畑龍俊
ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験（その 3）NOD/SCID 移植モデルにおける評価
第 26 回日本造血細胞移植学会 横浜 2003

3 鈴木 秀文、伊藤 仁也、田中 宏和、渋谷 和憲、河合 弘行、菅谷 信二、平家 俊雄、金倉 譲、中畑 龍俊
サイトカインを用いた臍帯血 CD34 陽性細胞の体外増幅培養に関する基礎的検討 第 65 回日本血液学会総会 大阪 2003

4 伊藤 仁也

臍帯血を用いたトランスレーショナルリサーチ（特別講演）
第 11 近畿臍帯血移植研究会 大阪 2003

2 伊藤 仁也 中畑 龍俊
Ex vivo 臍帯血移植の基盤整備
厚生労働科学研究合同シンポジウム 東京 2004

H 特許 なし

分担研究報告書

5・造血幹細胞の自己複製能の機序解明に関する研究

造血幹細胞の自己複製機構の解明

分担研究者 田中 宏和、松村 到、金倉 譲
（先端医療振興財団 再生医療研究部、大阪大学大学院
医学系研究科分子病態内科学講座（血液・腫瘍内科学）

研究要旨

造血幹細胞の自己複製因子として知られている HOXB4 などの HOX 転写因子群は、同じホメオボックス型転写因子 PBX1 とヘテロ複合体を形成し、種々の遺伝子発現を正または負に調節することか知られている。今回我々は、内因性の HOX/PBX1 複合体の活性を変化させ得る PBX1 との結合領域部分の HOX タンパクの decoy ペプチトを設計、合成し、ヒト臍帯血造血幹細胞に導入することにより、decoy ペプチトが造血幹細胞の自己複製能や多分化能に及ぼす影響について検討を行なった。

In vitro 及び In vivo での解析の結果、HOX タンパクの decoy ペプチトは造血幹細胞において、HOX/PBX1 複合体の活性を変化させることにより、細胞周期制御因子の発現調節を介して造血幹細胞の自己複製を元進させることか推測された。

合成ペプチトの造血幹細胞への導入効率は遺伝子導入効率と比較して高く、また、合成ペプチトは細胞内で分解され、しかも導入細胞の染色体に影響を与えないことから、本法は造血幹細胞の体外増幅法として遺伝子導入法より安全で有効な方法と考えられた。

今後は合成ペプチト導入細胞の骨髄再構築能の詳細な評価、自己複製に関与する HOX 遺伝子群の新たな標的因子の同定、さらには他の転写因子群の活性を変化させる合成ペプチトを設計、合成し同様の検討を行なうことと、より効率の良いかつ安全な体外増幅法の確立を目指すことを予定している。

A 研究目的

造血幹細胞は自己複製能及び多分化能を有することによって特徴付けられる。各々は種々のサイトカインなどの外的因子及び転写因子などの内的因子により調節されている。これまでにこれら外的及び内的因子を操作することによる造血幹細胞を体外にて増幅させる試みか精力的に行われてきた。外的因子操作法においては造血幹細胞上に発現している受容体の解析から、造血幹細胞の体外増幅に有用な種々サイトカインの組み合わせか検討され、ある程度一定の見解か得られている。一方造血幹細胞の自己複製に関与する様々な内的因子すなわち転写因子、細胞内シグナル伝達分子か同定され、遺伝子導入実験によりその効果か期待されている。これまでの造血幹細胞の体外増幅における内的因子操作は、レトロウィルスやアテノウィルスをもちいた遺伝子導入法か中心であり、導入効率が低い上に最近報告されたように白血病の発症など染色体レベルでの影響か不可避である。この点を克服するため近年遺伝子産物であるタンパクを直接導入する方法か行われているか 発現させたタンパク質か活性を有する立体構造をとれない場合かあるなど問題点も多い。

そこで本分担研究では 新たな内的因子操作法として、合成ペプチドによる臍帯血造血幹細胞の体外増幅法の開発を行い、合成ペプチドか造血幹細胞の自己複製や多分化能に及ぼす影響について解析を行

った。

B 研究方法

臍帯血より磁気ヒース法にて CD34+に分離し、ヒト造血幹細胞を得た。臍帯血は兵庫臍帯血バンクより供与されたものを用いた。遺伝子発現解析は、市販のヒト臍帯血由来 (CD34 陽性造血幹細胞を用い行なった。

造血幹細胞を至適サイトカイン存在下で 7 日間培養し 細胞数、表面形質、コロニー形成能を測定した。さらに 7 日間培養した細胞を NOD/SCID マウスに移植することにより骨髄再構築能を測定した。

(倫理面の配慮)

研究に用いた臍帯血は、インフォームト consent のもとに母親から提供され、臍帯血提供機関 (兵庫臍帯血バンク) 及び先端医療センターにおいて倫理審査か済んでいるものを用いている。

C 研究結果

1 decoy ペプチドの設計 合成

造血幹細胞の自己複製因子として知られている HOXB4 などの HOX 転写因子群は、同じホメオボックス型転写因子 PBX1 とヘテロ複合体を形成し、種々の遺伝子発現を正または負に調節していることが知られている。近年、PBX1 は造血幹細胞の自己複製過程において HOXB4 の活性を負に制御していること、骨髄球系への分化過程においては別の HOX ファミリー遺伝子 HOXA10 の活性を正に制御していることが報告されている。HOX タンパクと PBX1 タンパクとの結合には各々のホメオトメインだけでなく、HOX タンパクによく保存された YPWM モチーフが必須であることが結晶構造の解析などから明らかにされている。そこで我々は YPWM モチーフを有し 核内に移行するペプチドを設計 合成した。合成ペプチドは導入した細胞の核内で、HOX タンパクの decoy (おとり) として作用し PBX1 タンパクと結合することにより、HOX タンパクの活性を変化させ得ることが予想される。decoy ペプチドは 27 アミノ酸からなり、特性値は分子量 3400Da、酸性度 3.7%、塩基性度 33.33%、中性度 14.8%、疎水性度 48.15%、等電点は 11.60 であった。

2 decoy ペプチドの In vitro での評価

2-1 合成ペプチドと PBX1 との結合についての検討

Biacore システム (Biacore 社) を用い decoy ペプチドと PBX1 タンパクとの直接

的な結合について解析を行なった。decoy ペプチドは、PBX1 全長及びホメオトメインのみからなる変異体とは結合したか、ホメオトメインを欠いた変異体とは結合しなかったことから、decoy ペプチドは PBX1 の

ホメオトメインと直接結合すると考えられた。

2-2 合成ペプチドが HOX/PBX1 複合体の転写活性に及ぼす影響

293T 細胞を用い Luciferase assay にて検討した。c-myc プロモーターは HOXB4 導入により約 3 倍活性化されるか、PBX1 を共発現させることにより HOXB4 による活性化は完全に抑制された。この系であらかしめ decoy ペプチドを Profect Reagent System (Tagetting System 社) を用い導入しておいた場合、PBX1 による HOXB4 の活性化阻害は、導入した decoy ペプチドの容量依存性に解除されたことから decoy ペプチドは細胞内において PBX1 と結合し HOXB4 に対する抑制作用を解除しうると考えられた。

2-3 合成ペプチドが臍帯血造血幹細胞に及ぼす生物学的効果

臍帯血より磁気ヒース法にて分離した CD34 陽性造血幹細胞へ、末端を蛍光標識した decoy ペプチドを前述のシステムを用い導入した。細胞内の蛍光強度を FACS にて解析した結果、decoy ペプチドの導入効率は約 70% であり、decoy ペプチドの造血幹細胞内における半減期は約 72 時間と推定された。次に decoy ペプチドか

HOX/PBX1 複合体の標的遺伝子の発現に及ぼす影響について半定量的 RT-PCR 法にて解析した。HOXB4 は c-myc の発現を誘導し、p21waf1/cip1 の発現を抑制することか報告されているか、decoy ペプチト導入細胞では、c-myc の発現上昇と、p21waf1/cip1 の発現低下が認められた。この結果から、decoy ペプチトは造血幹細胞内において HOX タンパクに対する PBX1 の作用を変化させ得ると考えられた。

次に decoy ペプチト導入並びに非導入細胞をサイトカイン（SCF Flt-3 ligand TPO IL-6 可溶性 IL-6 レセプター）添加無血清培地にて 7 日間培養し、細胞数、表面形質、コロニー形成能を測定した。decoy ペプチトは、培養後の生存細胞数にほとんど変化を及ぼさなかったか、decoy ペプチト導入細胞では分化が抑制され、対照に比し未分化なコロニー形成細胞が約 2 倍増加していた。

3・decoy ペプチドの In vivo での評価

前述のサイトカイン添加無血清培地にて 7 日間培養した細胞を、致死量の放射線照射した NOD/SCID マウスに移植し 8 週後の骨髄におけるヒト細胞キメラ率を測定したところ、decoy ペプチト導入細胞移植群では、非導入細胞移植群に比し有意にキメラ率が増加していた。また移植後 8 週の時点でレシピエントマウスにおいて腫瘍形成は認めない。

D 考察及び今後の展望

本分担研究の結果から、HOX タンパクの decoy ペプチトはヒト臍帯血造血幹細胞において、HOX/PBX1 複合体の活性を変化させることにより、細胞周期制御因子の発現調節を介して造血幹細胞の自己複製を亢進させることか推測された。合成ペプチトを用いた方法は、遺伝子を導入する場合と比較して、細胞への導入効率が高く、また合成ペプチトは細胞内で分解され導入細胞の染色体に影響を与えないことから安全な方法と考えられる。

今後 限界希釈法及び 2 次移植により合成ペプチト導入細胞の骨髄再構築能をより詳細に評価すること、合成ペプチト導入細胞における遺伝子発現プロフィールを、マイクロアレイを用いて解析することにより、自己複製に関与する HOX 遺伝子群の新たな標的因子の同定を試みる。さらには造血幹細胞の自己複製に重要な他の転写因子群の活性を変化させる合成ペプチトを設計、合成し同様の検討を行うことを予定している。

E 健康危惧情報

特になし

F 研究発表

論文発表

1 Matsumura I Tanaka H Mizuki M, Sugahara H, Kanakura Y Molecular mechanisms of E2F1- and c-Myc-enhanced apoptosis *Recent Res Devel Mol Cell Biol* 2003 Jan, 4 311-324

2 Mizuki M, Ueda S, Matsumura I, Schwable J, Ishiko J, Serve H, Kanakura Y Constitutive active receptor tyrosine kinase in hematological neoplasia *Recent Res Devel Mol Cell Biol* 2003 Jan, 4 85-100

3 Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y, Kanakura Y, Iwatani Y Total iron-binding capacity calculated from serum transferrin concentration or serum iron concentration and unsaturated iron-binding capacity *Clin Chem* 2003 Jan, 49(1) 175-8

4 Kimura S, Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y, Kanakura Y Enzymatic assay for determination of bicarbonate ion in plasma using urea amidolyase *Clin Chim Acta* 2003 Feb, 328(1-2) 179-84

5 Hashimoto K, Matsumura I, Tsujimura T, Kim DK, Ogihara H, Ikeda H, Ueda S, Mizuki M, Sugahara H, Shibayama H, Kitamura Y, Kanakura Y Necessity of tyrosine 719 and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated signal pathway in constitutive activation and oncogenic potential of c-kit receptor tyrosine kinase with the Asp814Val mutation *Blood* 2003 Feb, 101(3) 1094-102

6 Kimura S, Iyama S, Yamaguchi Y, Kanakura Y New enzymatic assay for serum urea nitrogen using urea amidolyase *J Clin Lab Anal* 2003 Mar, 17(2) 52-6

7 Mizuki M, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Bohmer FD, Muller-Tidow C, Berdel WE, Serve H Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations *Blood* 2003 Apr, 101(8) 3164-73

8 Zhang X, Machii T, Matsumura I, Ezoe S, Kawasaki A, Tanaka H, Ueda S, Sugahara H, Shibayama H, Mizuki M, Kanakura Y Constitutively activated Rho guanosine triphosphatases

- regulate the growth and morphology of hairy cell leukemia cells *Int J Hematol* 2003 Apr. 77(3) 263-73
- 9 Kawasaki A, Matsumura I, Kataoka Y, Takigawa E, Nakajima K, Kanakura Y. Opposing effects of PML and PML/RARalpha on STAT3 activity *Blood* 2003 May, 101(9) 3668-73
- 10 Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y, Kanakura Y, Iwatani Y. Modification of the Colorimetric Assay for Serum Unsaturated Iron-binding Capacity *Clin Chem* 2003 Jun, 49(6) 1023-1025
- 11 Kabutomori O, Kanakura Y, Iwatani Y. Marked Decreases of Total and Immature Reticulocytes in Myelodysplastic Syndrome among Patients with Pancytopenia *Acta Haematol* 2003 Jun, 109(4) 212-213
- 12 Matsumura I, Tanaka H, Kanakura Y. E2F1 and c-Myc in cell growth and death *Cell Cycle* 2003 Jul-Aug, 2(4) 333-8
- 13 Kabutomori O, Kanakura Y, Iwatani Y. Incorrect measurement of leukocyte counts in post-bone marrow transplantation (P-BMT) patients *Ann Hematol* 2003 Aug, 82(8) 529-30
- 14 Mizuki M, Ueda S, Matsumura I, Ishiko J, Schwable J, Serve H, Kanakura Y. Oncogenic receptor tyrosine kinase in leukemia *Cell Mol Biol* 2003 Sep, 49(6) 907-22
- 15 Saeki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Ohshima S, Ishida T, Tabunoki Y, Kitayama H, Mizuki M, Katada Y, Asaoku H, Kitano M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda M, Kon S, Kinoshita N, Ueda T, Kawase I. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathogenic implications *Br J Haematol* 2003 Oct, 123(2) 263-70
- 16 Takakuwa T, Luo WJ, Ham MF, Mizuki M, Iuchi K, Aozasa K. Establishment and characterization of unique cell lines derived from pyothorax associated lymphoma which develops in long-standing pyothorax and is strongly associated with Epstein Barr virus infection *Cancer Sci* 2003 Oct, 94(10) 858-63
- 17 Okawa Y, Takada K, Minami J, Aoki K, Shibayama H, Ohkawa K. Purification of N terminally truncated histone H2A monoubiquitin conjugates

from leukemic cell nuclei probable proteolytic products of ubiquitinated H2A *Int J Biochem Cell Biol* 2003 Nov 35(11) 1588-600

18 Kataoka Y, Matsumura I, Ezoe S, Nakata S, Takigawa E, Sato Y, Kawasaki A, Yokota T, Nakajima K, Felsani A, Kanakura Y. Reciprocal inhibition between MyoD and STAT3 in the regulation of growth and differentiation of myoblasts *J Biol Chem* 2003 Nov; 278(45) 44178-87

19 Ueda Y, Matsui M, Hayashi S, Yamaguchi Y, Kanakura Y. New homogeneous HDL-cholesterol assay without the influence of high TG sample using the selective detergent to lipoproteins *J Clin Lab Anal* 2003 Nov; 17(6) 201-8

20 Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Tanaka H, Kanakura Y. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells *Res Adv in Blood* 2003 Dec; 2 39-49

21 Ezoe S, Matsumura I, and Kanakura Y. Cell Cycle Regulation in Hematopoietic Stem/Progenitor Cells *Cell Cycle*, *Cell Cycle* 2004 Mar; 3 (3) 314-318

22 Shibayama H, Takai E, Matsumura I, Kouno M, Morii E, Kitamura Y, Takeda J, and Kanakura Y. Identification of a cytokine induced anti-apoptotic molecule Anamorsin essential for definitive hematopoiesis *J Exp Med*, 2004 Feb 16; 199(4) 581-92

2 学会発表

1 Hirokazu Tanaka, Kiminari Itoh, Itaru Matsumura, Tatsutoshi Nakahata, and Yuzuru Kanakura. The Peptide Decoy for HOX Proteins Enhances Ex Vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells. The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology, 2003. The Peptide Decoy for HOX Proteins Enhances Ex Vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells

2 Jun Ishiko, Masao Mizuki, Shuji Ueda, Itaru Matsumura, Hubert Serve, and Yuzuru Kanakura. Critical Regulatory Roles of Tyr892 and Tyr922 in Constitutive Receptor Activation of FLT3 Kinase Domain Mutant. The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology, 2003

- 3 Eri Ishiko Itaru Matsumura, Yusuke Satoh, Jun Ishiko, Hiroyuki Sugahara Masao Mizuki, and Yuzuru Kanakura HES1 inhibits megakaryocytic and erythroid differentiation by suppressing GATA-1 activities The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology, 2003
- 4 金倉讓 造血細胞の生存・死と腫瘍化の分子機構 第9回 新潟血液疾患 サイトカイン研究会
- 5 高井恵美、柴山浩彦 抗アポトーシス分子 Anamorsin と造血制御 第19回 大阪血液学研究会
- 6 水木満佐央、松村到、上田周二、石河純、金倉讓、Joachim Schwaeble、Hubert Serve 急性骨髄性白血病の予後不良因子、internal tandem duplication 変異 Flt3 による STAT 標的遺伝子の発現誘導と骨髄系転写因子の発現抑制 第100回 日本内科学会講演会
- 7 金倉讓 血液細胞の癌化分子病態 第26回 日本医学会総会
- 8 金倉讓 白血病と新たな治療戦略 平成15年度第2回 現代医学講座
- 9 柴山浩彦、高井恵美、金倉讓 抗アポトーシス分子 Anamorsin と造血制御 第1回 幹細胞シンポジウム
- 10 高井恵美、柴山浩彦、松村到、森井英一、河野道良、北村幸彦、竹田潤二、金倉讓 抗アポトーシス分子 Anamorsin と造血制御 第65回 日本血液学会総会・第45回 日本臨床血液学会総会
- 11 石河純、水木満佐央、上田周二、松村到、金倉讓 Activation loop 変異 Flt3 の恒常的活性化機構の解析 第65回 日本血液学会総会 第45回 日本臨床血液学会総会
- 12 川副幸子、松村到、菅原浩之、水木満佐央、柴山浩彦、金倉讓 PML か Ras/MAPK のシグナル伝達に及ぼす影響についての解析 第65回 日本血液学会総会 第45回 日本臨床血液学会総会
- 13 張弦、待井隆志 松村到、菅原浩之、柴山浩彦、水木満佐央、金倉讓 Rho ファミリー分子によるヘアリーセル白血病細胞の増殖と形態制御についての解析 第65回 日本血液学会総会・第45回 日本臨床血液学会総会
- 14 松村到 血液細胞の増殖・生存 腫瘍化における NF- κ B の機能解析 第26回 分子生物学研究会

15 片岡良久、松村到、水木蒔佐央、金倉讓 筋肉芽細胞の増殖 分化制御における MyoD と STAT3 の拮抗作用とその分子機構の解析 第 62 回 日本癌学会総会

16 松村到 血液細胞の増殖・生存における NF- κ B の機能解析 第 2 回 造血分子研究会

17 佐藤友亮、松村到、金倉讓 細胞周期制御分子を用いた造血幹細胞の体外増幅の試み 血液疾患セミナー

18 田中宏和、伊藤仁也、多田典子、佐藤友亮、中畑龍俊、金倉讓 転写因子 PBX1 によるヒト臍帯血造血幹細胞の増殖、分化制御機構の解 第 24 回 日本炎症・再生医学会

G 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

転写因子操作による造血幹細胞の体外増幅法の開発（出願中）

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

IV. 班会議記録・合同研究カンファレンス

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
「基礎研究成果の臨床応用推進研究」 班会議記録

第 1 回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成 15 年 1 月 16 日 (木) 18 00～20 30
- 2 場所 先端医療センター医療機器棟 5 階、カンファレンスルーム
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題名
田中宏和 先端医療センター + 任 研究員	・ HOXB4 導入臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅効率
多田典子 先端医療センター 特別技術員	・ 細胞閉鎖系遠心洗浄機開発のための細胞に与える遠心力 洗浄液の組成検討と遠心後の培養効率について
栗城 秀起 日本ヘクトン ティキンソ ン (株)	サイトカイン増幅臍帯のマーカーの変化と SP 分画の検出
渋谷 和恵 キリンヒール (株)	・ 増幅 CD34 陽性細胞の評価系について

第2回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成15年3月25日(火) 15:00~17:00
- 2 場所 先端医療センター臨床棟4階、会議室1
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題
梶木裕志 先端医療センター 特別研究員 ニフロ株式会社	・CD34陽性細胞の接着因子による増幅効率の影響
初山麻子 先端医療センター 特別技術員	・無血清培地による臍帯血造血幹細胞の増幅 ---レコンヒナントアルフミントヒューマンアルフミンの培養に与える影響の比較---

第3回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成15年5月6日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 先端医療センター臨床棟4階、大会議室
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題
平松英文 京都大学大学院 医学系研究科 発達小児科 助手	NOGマウスを用いた造血再構築能の評価
田中弘和 先端医療センター 主任研究員	・PBA-1によるHOXB-1の調節機構
廣瀬弥保 日本ヘクトン・ティキンソン (株)	・臍帯血CD34陽性細胞の測定法の検討
鈴木秀文 先端医療センター 特別研究員	凍結臍帯血のサイトカインによる増幅能の検討

第4回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成15年6月10日(火) 14:00～16:00
- 2 場所 先端医療センター臨床棟4階、研修室
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題
多田典子 先端医療センター 特別技術員	・閉鎖系濃縮洗浄回収システムの培養リンパ球に及ぼす影響
初山麻子 先端医療センター 技術員	元全無血清培地の開発
槻木裕志 先端医療センター 特別 研究員・ニフロ株式会社	・ハノク培養による臍帯血造血幹細胞の ex vivo expansion の検討
清水則夫 東京医科歯科大学、助教授	・東京医科歯科大学における細胞治療の取り組みとウイルス検査を中心とした細胞の品質管理

第5回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成15年7月11日(金) 14:00～17:00
- 2 場所 ばるるプラザ京都 5階会議室2
京都市ト京区東洞院通七条ト東塩小路676-13
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題
丸山 京子 先端医療センター 技術員	細胞治療製剤における品質管理 - 増幅細胞の形態検査 -
鈴木 秀文 先端医療センター 特別 研究員 キリンヒール (株)	・ Ex vivo 増幅臍帯血移植に向けての進捗 - 通し運転試験の結果について

第6回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成15年8月19日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 先端医療センター臨床棟4階、研修室
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題
廣瀬 弥保 日本ヘクトン・ティ キンソン	・増幅後のCD34陽性細胞の計数法の確立
初山 麻子 先端医療センター・ 技術員	・元全無血清培養系で増幅した臍帯血造血幹細胞の特徴
田中 宏和 先端医療センター 主任研究員	・転写因子PBX1結合型合成ヘプチドが臍帯血造血幹細胞の増殖、自己複製に及ぼす影響についての検討

第7回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成15年9月18日(木) 14:00~16:00
- 2 場所 京大人学医学部 第 臨床研究棟 地下1階 セミナー室1
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題
丸山 京子 先端医療センター 技術員	臍帯血造血幹細胞の増幅培養法の比較
清水 則人 東京医科歯科大学 助教授	細胞製品の安全保障 ウイルス検査系開発の現状

第8回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成15年10月21日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 先端医療センター臨床棟4階 研修室
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題
廣瀬 弥保 日本 BD 島田のそみ 先端医療センター 特別技術員	造血幹細胞マーカーの検討
鈴木 秀文 先端医療センター 特別研究員 キリンヒール(株)	Ex vivo 増幅臍帯血の製造法に関する検討

第9回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成15年11月18日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 ばるるフラサ京都 6F会議室 6番
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題
丸山 京子 先端医療センター 技術員	臍帯血造血幹細胞の増幅培養法の比較
栗城 秀起 日本 BD	臍帯血中 SP cell 測定における、励起レーザー波長に関する検討

第 10 回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成15年12月16日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 先端医療センター臨床棟4階、研修室
- 3 テーマカンファレンス

演者	演題
藤田 亓 和研薬株式会社	細胞培養における取り違い防止装置の開発 細胞カルテ管理システムの概要説明
平松 英文 京都大学人子院医学 研究科発達小児学 助手	NOG マウスを用いた臍帯血由来 CD34 陽性細胞の 体外増幅効果の検討
初山 麻子 先端医療センター 技術員	MOD/SCID Mouse への無血清培養細胞の移植
渋谷 和志 キリンヒール(株) 医薬開発研究所	NOD/SCID 移植モデルにおける ex vivo 増幅臍帯血の評価

第 11 回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成 16 年 1 月 13 日 (火) 14 00~16 00
- 2 場所 ばるるプラサ京都 4F
- 3 テータカンファレンス

演者	演題
高田 のそみ 先端医療センター 特別技術員	臍帯血造血幹細胞の培養日数検討 ～長期培養～
槻木 裕志 先端医療センター 特別研究員 ニプロ (株)	・造血幹細胞培養ハノクの開発
伊藤 仁也 先端医療センター 主任研究員	活性化 CD34 陽性細胞の造血刺激作用の検討

第 12 回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成 16 年 3 月 9 日 (火) 14 00~16 00
- 2 場所 先端医療センター臨床棟 4 階、研修室
- 3 テータカンファレンス

演者	演題
高田 のそみ 先端医療センター 特別技術員	臍帯血増幅培養で出現する CD117 陽性細胞の検討
伊藤 仁也 先端医療センター 主任研究員	・H15 年 研究総括

平成 15 年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業
基礎研究成果の臨床応用推進研究

トランスレーショナル研究成果発表会

1・日時

平成 16 年 2 月 23 日 (月) 13:00-17:10

2 場所

(財) がん研究振興財団内 国際研究交流会館

演者	演題
・京都大学大学院発達小児科教授 ・先端医療センター再生医療研究部 各員研究員 中畑 龍俊	Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレー ショナル リサーチ

ex vivo 増幅臍帯血を用いたトランスレーショナルリサーチ

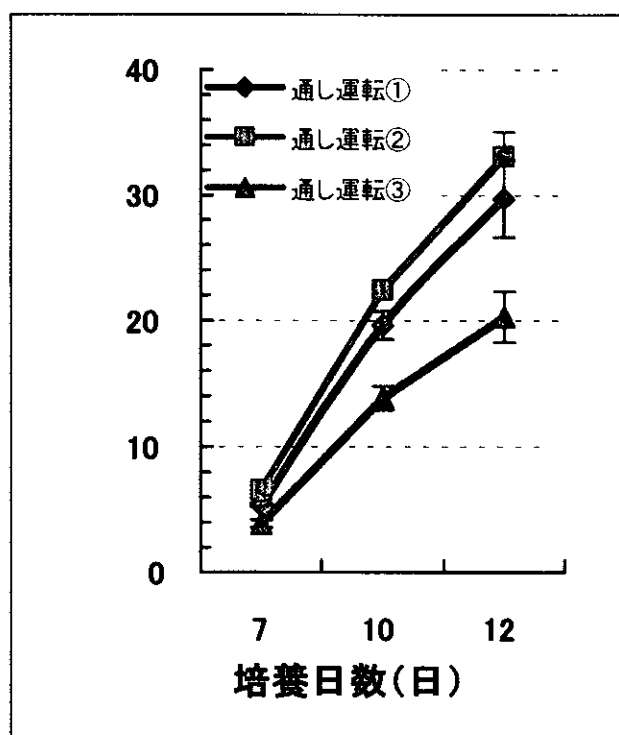
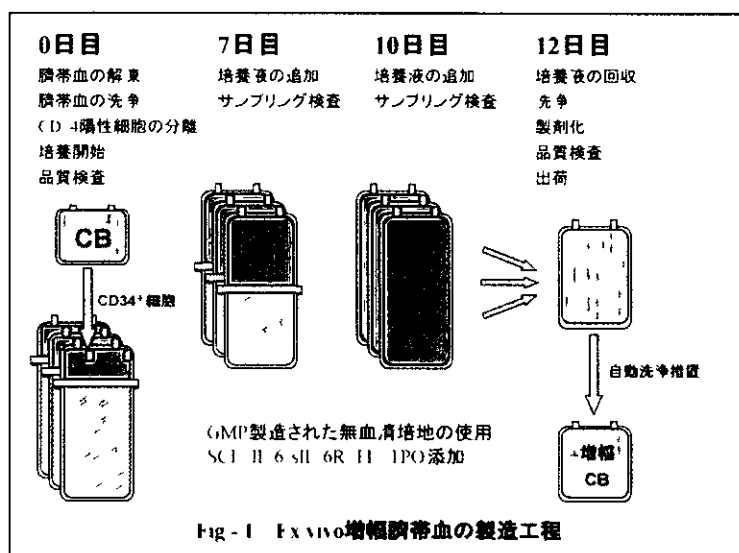
主任研究者 中畑 龍俊

1 はしめに

我々は造血幹細胞のサイトカイン受容体の解析から SCF, FL, TPO, IL-6/sIL-6R による臍帯血 CD34 陽性細胞の ex vivo 増幅を行い、NOD/SCID マウス体内でヒト造血を再構築させることのできる能力 (SRC 活性) が増幅しない臍帯血に比べ、4.3 倍増幅されていることを証明した。これらの基礎研究の成果を臨床応用することを目的にこの研究班にて研究を進めている。我々の臍帯血 ex vivo expansion に関するトランスレーショナルリサーチのこれまでの成果を報告する。細胞治療製剤によるトランスレーショナルリサーチの実践は、わが国においても始まったばかりの分野であり、我々は 1) 安全な培養法の確立 2) 細胞の品質管理法の確立 3) cell processing における製造環境の基盤整備 4) 科学的に証明しうる臨床試験の確立という目標をたて、分担研究により研究を開始した。

2 臍帯血の ex vivo 増幅培養法の確立

現行の臍帯血バンクのシステムを利用して ex vivo 増幅臍帯血をすべての患者に臨床応用するためには、臍帯血中の CD34+細胞を 30 倍増幅する必要がある。同時に閉鎖系培養法および無血清培養法の確立を達成することか課題であった。我々は基礎検討を繰り返しながら Fig-1 に示すような閉鎖系無血清培養法を確立した。



培養液は GMP 製造されている QBSF-60 を用いた。サイトカインは SCF 100ng/ml FL 100ng/ml, TPO 100 ng/ml, FP-6 (IL-6 と可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) の融合蛋白) 100ng/ml を加え、12 日間ガス透過性バック中で培養した。牛胎児血清 (FCS) を含む異種動物蛋白および人血清は用いなかった。この方法により、総細胞数で約 110 倍、CD34 陽性細胞数で 30 倍の増幅が得られた。