

厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 齋藤 英彦

平成17(2005)年 3月

「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」平成16年度名簿

(50音順)

	氏名	所属・職名
班長	齋藤英彦	国立病院機構名古屋医療センター 院長
班員	小澤敬也	自治医科血液学講座 教授
	加藤俊一	東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授
	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 教授
	高橋恒夫	東京大学医科学研究所細胞プロセッシング部門 教授
	直江知樹	名古屋大学大学院医学研究科病態内科学講座分子細胞内科学 教授
	仲野 徹	大阪大学大学院生命機能研究科時空生物学講座 教授
	中畑龍俊	京都大学大学院医学研究科発達小児科学 教授
	原 宏	兵庫医科大学内科学 教授
	堀田知光	東海大学医学部血液・腫瘍・リウマチ内科 教授
研究協力者	東 寛	北海道赤十字血液センター 研究部長
	石井榮一	佐賀医科大学小児科 助教授
	加藤剛二	名古屋第一赤十字病院小児科 副部長
	小島勢二	名古屋大学大学院医学系研究科発育・加齢医学 教授
	佐藤博行	福岡県赤十字血液センター 副所長
	高梨美乃子	東京都赤十字血液センター 研究二課長
	西平浩一	昭和大学藤が丘病院小児科 客員教授
	矢崎 信	名古屋市立東市民病院第一小児科 部長
事務局	齋藤英彦	国立病院機構名古屋医療センター 〒460-0001 名古屋市中区三の丸4-1-1 TEL:052-951-1111(2200) FAX:052-951-0559

## 平成 16 年度 総括・分担研究報告書

### はじめに

本報告書は、厚生科学研究費補助金「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」の一つである「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」班における平成 16 年(2004 年)度の研究成果をまとめたものである。本研究班は、平成 12 年(2000 年)に始まったミレニアム・プロジェクト「発生・分化・再生」事業の一環として臍帯血の自己修復能力を用いた治療法の実現を目的とするものである。

1997 年に始まった我が国の非血縁者間臍帯血移植は、日本さい帯血バンクネットワークを中心とする社会的基盤整備の支援をうけて、2005 年 3 月末には 2,000 例を超える急速な発展を見せている。今や骨髄移植と肩を並べて造血細胞移植の一翼を担っている。我が国で行われたすべての臍帯血移植症例の臨床成績を詳細に解析し予後因子を同定するとともに、prospective な無作為臨床試験を行い临床上の疑問に答えることは、日本人における EBM (根拠に基づく医療) を確立する意味でも、国際的な情報発信の点からも重要であると考えられる。また、造血幹細胞の体外増幅法の開発は国際的に競争の激しい分野であるが、我が国の研究者が先行している点もある。複数臍帯血同時移植は、細胞数の不足した臍帯血を有効利用して成人への適応を拡大するために、我が国においても試みる意味がある。さらに臍帯血幹細胞、間葉系細胞や免疫担当細胞に関する研究は今後臨床に結びつけていくことが必須である。

本報告書は各分担研究者の 16 年度の研究業績をまとめたものであり、精力的に研究を進めた班員および研究協力者の方々に厚くお礼を申し上げます。

2005 年 3 月

齋藤 英彦

# 目 次

I. 総括研究報告 .....	1
齋藤 英彦	
II. 分担研究報告	
1. 臍帯血造血幹細胞による血管新生誘導法の確立 .....	5
高倉 伸幸	
2. 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 .....	6
仲野 徹	
3. 胎盤由来間質細胞を用いた再生医療 .....	7
高橋 恒夫	
4. 臍帯血移植後の造血・免疫再構築促進に関する研究 .....	12
直江 知樹	
5. 臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究 .....	15
原 宏	
6. 臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究 .....	22
堀田 知光	
7. 臍帯血の保存年数と移植結果に関する検討 .....	23
加藤 俊一	
8. 臍帯血移植の安全性に関する検討 .....	26
小澤 敬也	
9. Ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用に関する研究 .....	29
中畑 龍俊	
10. 遺伝子型HLA適合度が臍帯血移植成績に及ぼす影響の検討 .....	31
西平 浩一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	34
IV. 研究班会議発表者報告書（資料） .....	43

# I. 総括研究報告

臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究

主任研究者 齋藤 英彦 国立病院機構名古屋医療センター院長

研究要旨

我が国における成人に対する非血縁者間臍帯血移植706例を追跡調査・解析し、非血縁者間骨髄移植の成績と比較したところ、一部の施設を除いては骨髄移植に劣ることが明らかとなった。複数臍帯血同時移植が安全にできることを示した。体外増幅法した臍帯血造血幹細胞による移植に向けて、GMPに準拠した基盤整備を進め、臨床プロトコールを完成した。臍帯血造血幹細胞の未分化性の維持、血管新生誘導能、幹細胞の生着に関する研究を進めた。

分担研究者

小澤敬也（自治医科大学血液学講座 教授）、加藤俊一（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授）、高倉伸幸（金沢大学がん研究所細胞分化研究分野 教授）、高橋恒夫（東京大学医科学研究所細胞プロセッシング部門 教授）、直江知樹（名古屋大学大学院医学研究科病態内科学講座 教授）、仲野 徹（大阪大学大学院生命機能研究科時空生物学講座 教授）、中畑龍俊（京都大学大学院医学研究科発達小児科学 教授）、原宏（兵庫医科大学内科学 教授）、堀田知光（東海大学医学部血液・腫瘍・リウマチ内科 教授）

研究協力者

東 寛（北海道赤十字血液センター 研究部長）、石井榮一（佐賀医科大学小児科 助教授）、加藤剛二（名古屋第一赤十字病院 副部長）、小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科発育・加齢医学 教授）、佐藤博行（福岡県赤十字血液センター 副所長）、高梨美乃子（東京都赤十字血液センター 課長）、西平浩一（昭和大学藤が丘病院小児科 客員教授）、矢崎 信（名古屋市立東市民病院第一小児科 部長）

A. 研究目的

造血幹細胞移植における臍帯血移植の位置づけを明らかにし、さらにその有効性と安全性の向上を図ることを目的とする。そのために以下のことを行う。

(1) 我が国における非血縁者間臍帯血移植例

の臨床成績の収集・解析、予後因子の同定

(2) 2つの前向き臨床試験「GVHD 予防法」、「臍帯血を用いたミニ移植」の推進

(3) 安全で効率的な GMP に準拠した臍帯血の体外増幅法の開発、および成人に対する複数臍帯血移植の実施

(4) 臍帯血造血幹細胞の未分化性の維持・増殖、移植後の免疫システムの再構築、血小板回復に関する研究

(5) 胎盤由来の間葉系細胞の再生医療への応用に関する研究の推進

(6) 臍帯血の医薬品としての有効性、安全性に関する基準の策定

B. 研究方法

(1) わが国で行われたすべての臍帯血移植の臨床成績を6ヶ月に一回の月例報告と年一回の詳細報告により全国調査し解析すると共に、検体収集のシステムを確立し前向き登録による臨床研究を推進する。臍帯血移植における「至適GVHD（移植片対宿主病）予防法」の臨床研究をひき続き行う。また、「複数ドナーからの臍帯血同時移植」の臨床研究を開始する。また、「臍帯血を用いたミニ移植」の多施設共同研究を国立がんセンターの高上洋一医長の研究班を共同で開始する。

(2) 臍帯血造血幹細胞の体外増幅法の臨床応用を目指した基盤整備を進める。造血幹細胞の未分化性の維持や血管新生誘導に必要な分子機

構を解明する。臍帯血 CD34 陽性細胞をマウスに移植して免疫システムの再構築を評価するモデルを確立する。

(3) ヒト胎盤から間葉系細胞を採取・分離して、in vitro にて分化能を検討する。

#### (倫理面への配慮)

(1) 臨床成績の収集・解析に際しては、患者やドナーに関わるプライバシーの保護に配慮し、データの匿名化を行う。一方、本研究で明らかになった結果や成果については、公開シンポジウムやインターネット等を通じ一般にも公開する。「GVHD 予防に関する前向き無作為比較試験」、「複数ドナーからの移植」、「臍帯血を用いるミニ移植」の臨床研究にあたっては、各施設の倫理委員会の承認と患者および患者家族から十分なインフォームドコンセントを得て行う。

(2) 臍帯血や胎盤を研究目的で使う場合には、ドナーに研究目的、期間、プライバシーの保護などにつき説明し同意を得た上で実施する。研究全般を通じて、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。ヒト胚性幹細胞に関しては、これを使用しない。

#### C. 研究結果

(1) 本年度は 2004 年 11 月までに施行された成人に対する臍帯血移植成績の解析をした。総計 706 例(フル移植 361 例、ミニ移植 345 例)が行われ、生着率はフル移植 76%、ミニ移植 65%であった。移植後 1,000 日における TRM (治療関連死亡率) はフル移植で 50%、ミニ移植では 64%と高く、再発率はそれぞれ 48%、67%であった。3 年後の無病生存率は standard risk では 40%、high risk では 15%であった。30 歳以下の年齢と急性 GVHD の重症度は予後に影響した。本研究班が発足した当時は臍帯血移植は小児のみが適用であったが、さい帯血バンクの努力により細胞数の多い臍帯血の保存が進んだために、成人へと適用拡大が急速に進み、また骨髄非破壊的前処置による移植 (RIST) も可能であることが明らかにされた。しかし成人における成績は一部の施設を除いては骨髄移植に比較して劣っている。その理由は臍帯血移植が主として病期の進んだ poor risk 患者に行われたことや施

設による前処置の違いによるものと推定される。今後、共通プロトコールによる臨床試験を推進する必要がある。

臍帯血幹細胞の保存期間の検討を行い、保存後 6 年目には有核細胞数回収率、CD34 陽性細胞回収率、細胞生存率が低下する傾向がみられた。臍帯血移植の特徴の一つは骨髄移植に比べて HLA 適合度の制限が少ないことである。しかし、一部の移植症例の予備的解析では 2-4/6 不適合群は 0-1/6 不適合群に比較して好中球、血小板生着が有意に遅延し EFS が低いことが明らかになった。このことは臍帯血移植に於いても HLA 遺伝子型がドナー選択の条件になる可能性を示す。

(2) 「至適 GVHD 予防法の無作為臨床試験」は 58 例の登録があったが、目標の 112 例まで達しなかった。高上班との合同研究「臍帯血を用いたミニ移植」は 8 施設で研究を開始したが、目標 37 例に対して 6 例の登録があった時点で、6 例中 4 例で治療不成功および条件を満たす患者が少ないという理由で登録を中止した。

(3) 体外増幅した臍帯血移植の臨床研究は欧米でも行われているが、その有効性の証明は未だされていない。本研究では、無血清培地や培養バッグの開発などの基盤整備を行い、GMP に準拠した臨床プロトコールを作成し倫理委員会の承認を得た。まもなく Phase I/II study を開始する。複数臍帯血同時移植は、大阪成人病センター、東海大学、東大医科研、兵庫医大の 4 施設において 11 例を行い、短期間の重篤な副作用は認めなかった。

(4) 基礎的研究では、造血幹細胞が、アングリオポエチン 1 を分泌して血管新生を誘導するのみならず、血管の安定化や成熟化に関与することを示した。転写因子 GATA-1 を欠損するマウス ES 細胞から血液細胞への分化誘導をしたところ、GATA-1 を欠損する前赤芽球様細胞は長期間にわたり培養できること、また他の細胞系列へも分化できることが明らかになった。マウス骨髄ストローマ細胞とヒトサイトカインを利用した体外増幅系により体外で幹細胞を増幅可能であることを示した。同種造血幹細胞移植における生着には、移植片中の T リンパ球数が影響することが知られている。そこで臍帯血から

CD4 陽性および CD8 陽性リンパ球を効率よく分離・増幅する方法を開発した。ヒト肝細胞増殖因子(HGF)の遺伝子治療により、急性 GVHD を抑制し移植片対腫瘍効果(GVL)を温存することがマウスでは可能であった。

(5) 胎盤絨毛由来の間葉系細胞(PDMPCs)は、テロメラーゼや Bmi-1 遺伝子導入による不死化後も、骨細胞及び軟骨細胞への分化能を維持していることを示した。

(6) 日本さい帯血バンクネットワークおよび欧米のバンクの実態、欧米各国における臍帯血の規制の現状の調査を行い、我が国のバンクの臍帯血はほぼ安全であることを確認した。

#### D. 結論

臍帯血を用いた造血細胞移植を確立するために、非血縁者間臍帯血移植の成績を集計・解析し、成人に対する移植成績は未だ非血縁者間骨髄移植に劣ることを示した。臍帯血の体外増幅法を開発し、GMP に準拠した基盤整備を終えて、臨床プロトコールの承認を倫理委員会で行った。また、複数臍帯血同時移植が安全に施行できることを少数例において示した。臍帯血幹細胞の血管誘導能、胎盤由来の間葉系細胞の再生医療への応用の研究を進めた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

代表的論文

1. Okada Y, Matsuura E, Tozuka Z, Nagai R, Watanabe A, Matsumoto K, Yasui K, Jackman RW, Nakano T, Doi T: Upstream stimulatory factor stimulates transcription through the E-box motif in the PF4 gene in megakaryocytes. *Blood* 104:2027-2034, 2004
2. Komazawa N, Matsuda M, Kondoh G, Mizunoya W, Iwaki M, Takagi T, Sumikawa Y, Inoue K, Suzuki A, Mak TW, Nakano T, Fushiki T, Takeda J, Shimomura I.: Enhanced insulin sensitivity, energy expenditure and

thermogenesis in adipose-specific Pten suppression in mice. *Nat Med* 10:1208-15, 2004

3. Igura K., Zhang X., Takahashi K., Mitsuru A., Yamaguchi S., Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 6: 543 - 553, 2004.
4. 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* 13: 337-341, 2004.
5. Nagamura-Inoue T., Mori Y., Zheng, Y., Watanabe N., Takahashi, TA. Differential expansion of umbilical cord blood mononuclear cell derived natural killer cells dependent on the dose of Interleukin 15 with Flt3L. *Exp. Hematology* 32: 202-209, 2004.
6. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Takahashi S, Hirabayashi N, Hiraoka A, Kanda Y, Tanosaki R, Okamoto S, Iwato K, Atsuta Y, Hamajima N, Tanimoto M, Kato S.: Tacrolimus instead of cyclosporine used for prophylaxis against graft-versus-host disease improves outcome after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors, but not from HLA-identical sibling donors: a nationwide survey conducted in Japan. *Bone Marrow Transplant* 34: 331-7, 2004
7. Imado T, Iwasaki T, Kuroiwa T, Sano H, Hara H : Effect of FK506 on donor T-cell functions that are responsible for graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Transplantation* 77: 391-398, 2004.
8. Imado T, Iwasai T, Kataoka Y, Kuroiwa T, Hara H, Fujimoto J, Sano H, : Hepatocyte growth factor preserves



- graft-versus-leukemia effect and T-cell reconstitution after marrow transplantation. *Blood* 104(5): 1542-1549, 2004.
9. Yahata T, Ando K, Miyatake H, Uno T, Sato T, Ito M, Kato S and Hotta T: Competitive repopulation assay from two cord blood units of CD34+ cells in NOD/SCID/ gennull mice. *Mol Ther* 10(5): 882-891, 2004
  10. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K: Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104: 3581-3587, 2004
  11. Tazume K, 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: 95-103, 2004.
  12. Peters C, Kato S, et al.: Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood* 104: 881-888, 2004.
  13. Yahata T, Kato S, et al.: Competitive repopulation assay of two gene-marked cord blood units in NOD/SCID/gammac(null) mice. *Blood* 105: 882-891, 2004.
  14. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, and Hasegawa M: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J Gene Med* 6: 22-31, 2004.
  15. 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.
  16. Iida M., Heike T., Yoshimoto M., Baba S., Doi H., Nakahata T.: Identification of cardiac stem cells with FLK1 expression during embryonic stem cell differentiation. *FASEB J.* 19:371-378, 2004.
  17. Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba T., Kazuki Y., Toyokuni S., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., Shinohara T.: Generation of multipotent stem cells from postnatal mouse testis. *Cell* 119:1001-1012, 2004.
  18. Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, Takahashi N, Sano H, and Takakura N: Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood* in press
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 該当するものなし
  2. 実用新案登録 該当するものなし
  3. その他 該当するものなし

## II. 分担研究報告

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

臍帯血造血幹細胞による血管新生誘導法の確立

分担研究者：高倉 伸幸 金沢大学がん研究所教授

以前我々は造血幹細胞は血管内皮細胞より無血管野に先に到達し、血管内皮細胞の発現する TIE2 受容体のリガンド、アンジオポエチン-1 (Ang1) を分泌して内皮細胞の遊走を促進し、血管新生を誘導する機能を有することを報告してきた。今回造血幹細胞が血管新生を誘導する機能以外に、血管構造の成熟化に貢献することが明らかになった。その様式は、1) 血管周囲に動員し、血管内皮細胞に接着した造血幹細胞が Ang1 を分泌することにより、血管径を拡張させる、2) 血管周囲に集合した造血幹細胞分画の細胞の一部は単球-マクロファージ系の細胞系譜に発現する CD11b 陽性細胞に分化した後に平滑筋アクチンを発現する壁細胞に分化して血管内皮細胞に接着して血管を構造的に安定化させる、である。また臍帯血の単核球細胞からも血管平滑筋細胞が分化することを確認した。以上から、従来から行なわれている骨髓細胞を用いた血管再生医療に加え、臍帯血を用いて血管形成を誘導することも理論的には可能であると考えられた。

#### A.研究目的

造血幹細胞には血管新生を誘導する機能があり、このような幹細胞の血管形成誘導能の詳細を解明するとともに、臍帯血中に存在する造血幹細胞あるいは血液細胞を用いて新規血管を誘導する血管再生医療に応用することを研究の目的とする。

#### B.研究方法

- 1) 造血幹細胞が血管新生を誘導した後にいかなる運命をたどるのかにつき、胎児期の血管形成の現場に存在する造血幹細胞をフローサイトメトリーを用いて分画採取し、試験管内で血管細胞への分化を観察した。
- 2) 成体で血管新生が旺盛に生じる腫瘍領域における造血幹細胞の局在を明らかにし、これら造血幹細胞が血管形成に対していかなる機能を有するのかを造血幹細胞に発現し、造血幹細胞の生存に関わる c-Kit の中和抗体を用いて解析した。  
(倫理面への配慮) 特記事項なし。

#### C.研究結果

1) マウスの胎児脳領域では胎生 11 日目後に、神経層内にまず造血幹細胞が侵入し、その後に血管内皮細胞が神経層に遊走して、血管が構築される。その際、血管壁細胞は、血管のリモデリングを誘導した後の造血幹細胞が血管内皮細胞に接着するのと時期を同じくして血管内皮細胞を裏打ちすることが判明した。造血幹細胞の欠損する AML1 遺伝子のノックアウトマウスでは、このような壁細胞による血管壁の裏打ちが観察されず、血管の破綻による脳内出血が観察された。また、胎生 11 日目に脳内に存在する Lin 陰性、CD45 陽性、c-kit 陽性の造血幹細胞分画をフローサイトメトリーで回収し、PDGF-BB の存在下で培養すると、平滑筋アクチン陽性の血管壁細胞が分化することが明らかになった。これらから、造血幹細胞は生理的な条件において血管壁細胞に分化することが明らかになった。また、大腿動脈の結紮により虚血の誘導されたマウスの末梢血においては、CD45 陽性で CD11b 陽性の細胞分画から血管壁細胞が発生することが明らかとなった。成体マウス骨髓から造血幹細胞分画を回収し、M-CSF の存在下で培養すると CD11b 陽性の細胞が誘導され、これらを PDGF-BB 存在下で再度培養を行なうと血管平滑筋細胞が発生することが判明した。

2) ノードマウスにヒト腫瘍細胞株 PC3 を移植する腫瘍モデルを解析したところ、腫瘍の発生早期に造血幹細胞が腫瘍周囲に集合し、腫瘍周囲間葉組織内に毛細血管が発生するとその周囲に動員され血管拡張ならびに血管のリモデリングが誘導されることが判明した。これら造血幹細胞の動員を c-kit の中和抗体で抑制すると、腫瘍周囲の血管のリモデリングや血管拡張が抑制されることが判明した。従来血管内皮細胞に発現する Tie2 受容体とそのリガンド、Ang1 によって活性化を受け続けると血管が拡張することが報告されている。このように腫瘍周囲に動員された造血幹細胞にも Ang1 の高発現が認められることから、造血幹細胞は Ang1 を分泌して血管拡張や血管のリモデリングを誘導していることが推測された。

#### D.考察および結論

造血幹細胞は Ang1 を分泌して血管新生を誘導するのみならず、血管の安定化や成熟化に関与することが判明した。従来より骨髓細胞注入による血管再生医療が行なわれているが、臍帯血内の造血幹細胞を血管再生に利用可能と考えられた。

#### E.健康危険情報 特になし。

#### F.研究発表

##### 1.論文発表

- 1.Okamoto R, et al. : Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. Blood in press.
- 2.Fukuhara S, et al. : Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. Mol Cell Biol, 25: 136-146, 2005

##### 2.学会発表

岡本里香、高倉伸幸：TIE2 の恒常的活性化による血管新生の制御機構の解析。第 63 回日本癌学会総会。平成 16 年 10 月 1 日、福岡、ほか 5 件。

G.知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）  
出願・取得：なし

厚生労働科学研究費補助金（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  
分担研究者 仲野 徹 大阪大学 微生物病研究所 教授

研究要旨 マウス胚性幹細胞から血液細胞への分化誘導において、転写因子の発現調節をおこない、多能性の造血前駆細胞を無限に増殖させることに成功した。

A. 研究目的

すべての血液細胞は、自己複製能を持った移植可能な造血幹細胞から、造血前駆細胞を経て、最終的に分化することにより産生される。造血前駆細胞に自己複製能を賦与する、すなわち「リモデリング」することができれば、臍帯血中に大量に存在する造血前駆細胞を移植に利用することが可能になる。今年度の研究では、マウス ES 細胞からの分化誘導システムを用いて、特定の転写因子を欠損させることにより、前駆細胞に自己複製能を獲得させるかどうかの検討をおこなった。

B. 研究方法

GATA-1 は、赤血球産生に必須な転写因子である。GATA-1 を欠損するマウス ES 細胞を作成し、ストロマ細胞 OP9 との共生培養をおこない、血液細胞へと分化誘導をおこなった。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮が必要な研究は施行していない。

C. 研究結果

GATA-1 を欠損する ES 細胞は、従来の報告では、前赤芽球の段階でアポトーシスにより死滅してしまうと考えられていた。しかし、我々が開発した培養法を用いた場合、少なくとも数週間以上、前赤芽球様の形態を示したまま増殖することができた。

この前赤芽球様細胞は、培養条件を変更することにより、顆粒球、マクロファージ、マスト細胞といった、赤血球以外の骨髄系細胞に分化することも可能であった。

D. 考察

転写因子を欠損させることにより、終末分化をブロックされた造血前駆細胞は、適当な環境を与えられることにより、分化形質を保ったまま、ほぼ無限に培養できることが明らかになった。また、この細胞は他の系列の細胞への分化能も保持したままであることが明らかとなった。このような現象は、他の細胞系列にもあてはまるのではないかと考えら得る。

E. 結論

造血前駆細胞に遺伝子改変を施すことにより、他の細胞系列にも分化する能力を持ち、かつ、無限に増殖できる細胞を作り出すことができた。この方法は、臍帯血の造血前駆細胞にも適用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

マウス細胞を用いた研究のため、特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表：

Okada Y, Matsuura E, Tozuka Z, Nagai R, Watanabe A, Matsumoto K, Yasui K, Jackman RW, Nakano T, Doi T Upstream stimulatory factor stimulates transcription through the E-box motif in the PF4 gene in megakaryocytes. *Blood*, 104:2027-2034, 2004

Tanaka T, Zheng J, Kitajima K, Kita K, Yoshikawa H, Nakano T. Differentiation Status Dependent Function of FOG-1. *Genes to Cells*, 9:1213-26, 2004

Kataoka TR, Komazawa N, Morii E, Ohboki K, Nakano T. Reduced expression of IL-12 receptor  $\beta$  and IL-18 receptor  $\alpha$  genes in natural killer cells and macrophages derived from B6<sup>mimi</sup> mice. *Lab Invest*, 85:146-53, 2005

Kataoka TR, Komazawa N, Morii E, Ohboki K, Nakano T. Involvement of connective tissue type mast cells in Th1 immune responses via Stat4 expression. *Blood*, 105:1016-20, 2005

他、原著論文による発表 8 件  
それ以外（レビュー等）の発表 5 件

2. 学会発表

Toru Nakano, PTEN/PI3K signal in stem cell systems. The Third International Symposium of Stem Cell (Shenyang, China 2004) 他

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）  
なし

平成 16 年度

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：胎盤由来間質細胞を用いた再生医療

分担研究者：高橋恒夫 東京大学医科学研究所 細胞プロセッシング研究部門

研究協力者：伊倉 宏一、張 暁紅、高橋 賢次、森 有加、渡辺 信和、  
長村（井上）登紀子 同研究部門

タイトル：胎盤由来間質細胞を用いた再生医療

研究要旨 臍帯血採取後の胎盤は医療廃棄物として処理されている。この胎盤組織中に幹/前駆細胞が存在すれば、臍帯血と同様に細胞を確保するためにドナーに侵襲を加えることなく、安全性や倫理面においても問題のない細胞供給源として期待される。我々は、胎盤の胎児側組織の絨毛から explant 培養法により間葉系前駆細胞 (PDMPs) の単離法を確立した。PDMPs はヘテロな細胞集団で、紡錘状および扁平な細胞形態を示した。その細胞集団の細胞表面抗原は CD13、CD44、CD73、CD90、CD105、HLA-class I を発現していたが、CD31、CD34、CD45、HLA-DR は陰性であった。これらの細胞は培養系で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞および神経系細胞に分化誘導可能であり、in vivo にも骨、軟骨様組織の形成が可能であった。また PDMPs との共培養により臍帯血由来造血幹細胞支持能に関して 骨髄由来 Stroma 同様の増幅率を認めた。これらより細胞治療や組織工学に利用可能な細胞ソースであると考えられた。一方、PDMPs は培養系で分裂能力に限界があり有限寿命(最終寿命 21 population doubling level; PDL) であるためクローナル解析が困難であった。そこで、我々は PDMPs の不死化を目的とし、レンチウイルスベクターを用いて、*ink4a* によりコードされた p16 腫瘍抑制遺伝子を抑制する Bmi-1 遺伝子および細胞分裂に伴うテロメア短縮を阻止する酵素であるテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子(hTERT)を PDMPs に導入した。Bmi-1 および hTERT 遺伝子を導入した PDMPs は 100PDL 以上(現在進行形) 分裂可能である。得られた数十のクローンに軟骨、骨、神経細胞へ分化可能のクローンが得られた。

I. PDMPs の単離法の確立および分化能の解析ならびに造血支持能の検討

A. 研究の目的

近年、骨髄間質細胞の集団には中胚葉由来の骨芽細胞や軟骨細胞、脂肪細胞、心筋細胞などに分化する他に、外胚葉由来の神経系細胞や内胚葉由来の肝細胞にも分化する多能性幹/前駆細胞が存在することが報告されてきた。我々は胎盤組織中に骨髄間質細胞同様な多能性幹/前駆細胞が存在について検討することを目的とした。なお胎盤は胎児および母体由来の組織から構

成されている。今回、われわれは胎児側組織である絨毛から間質細胞を単離し、骨芽細胞および軟骨細胞、脂肪細胞、神経系細胞への分化能について解析した。また単離した間葉系細胞の造血幹細胞支持能についても検討した。

B. 研究方法：PDMPs の単離および細胞表面抗原の解析：臍帯血採取後に提供された妊娠後 38-40 週の男児である胎盤から絨毛を切除し、DMEM-low glucose + 10% FBS で explant 培養法により PDMPs を単離・増幅

した。性別 FISH 解析により、単離した細胞集団中に母体由来の細胞が含有していないことを確認した。FACS により、CD13、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、HLA-class I、HLA-DR について解析した。PDMPCs の分化能：骨芽細胞への分化誘導は DMEM-low glucose 培地に FBS、デキサメサゾン、アスコルビン酸-2 リン酸、β グリセロフォスファターゼ活性、コッサ染色、カルシウムの定量を行った。軟骨細胞への分化誘導は DMEM-high glucose 培地にデキサメサゾン、インスリン、ピルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸-2 リン酸、プロリン、ITS+Premix、TGF-β、BMP-2 を加え培養した。RT-PCR 解析により Sox9、COL2A1、aggrecan、COL10A1 遺伝子の発現、トルイジンブルー染色、タイプ II コラーゲンについて免疫染色を行った。in vivo にヌードマウスとラットを用いて皮下と膝関節欠損モデルに2週間軟骨細胞へ誘導した胎盤由来間葉系細胞を移植し、その細胞は in vivo 環境に生存の可能性、また、軟骨組織の形成の可能性について検討した。脂肪細胞への分化誘導はデキサメサゾン、インスリン、インドメタシン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを加え培養し Oil Red 染色した。神経系細胞への分化誘導は DMEM/F12 (1:1)培地に B27 supplement、ブチルヒドロキシアニソール、ジメチルスルフォキシド、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、ジブチル cAMP、bFGF を加え培養した。神経系細胞マーカーの nestin、NSE、GFAP、MBP を免疫染色した。胎盤由来間葉系細胞の脳内分布を検討するために、マウス新生児の脳内に胎盤由来間葉系細胞を移植した。造血支持能の評

価は PDMPCs を feeder cell として、臍帯血から分離した CD34 陽性細胞と共培養し、SCF、TPO、Flt3L、IL3 存在下にて、共培養5日後の総細胞数、CD34 陽性細胞数を測定した。

C. 研究結果：PDMPCs は紡錘状および扁平な細胞形態から成るヘテロな細胞集団であった。その細胞表面抗原は CD13、CD44、CD73、CD90、CD105、HLA-class I を発現していたが、CD31、CD34、CD45、HLA-DR は発現しておらず、骨髄由来間質細胞と同様の細胞表面抗原を示した。骨芽細胞への分化能について骨芽細胞分化誘導培地にて培養2週目から骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性の増大を認めた。培養3週目から石灰分の沈着がコッサ染色により観察され、カルシウム沈着量も増大した。ヌードマウスの背部皮下にコラーゲンスポンジと移植、5週後に、移植した細胞とスポンジのパラフィン包埋切片を作製し、H.E. 染色、type-I collagen とヒト特異的 osteocalcin の免疫染色を行った。H.E. 染色で骨の基質を検出された、また、type-I collagen とヒト特異的 osteocalcin の免疫染色は陽性だった。ヌードマウス背部皮下における異所骨様組織形成を示唆された。軟骨細胞への分化能については、軟骨細胞分化誘導培地にて培養2週目で軟骨細胞関連遺伝子の Sox9、COL2A1、aggrecan、COL10A1 遺伝子の発現が確認され、培養3週目で軟骨細胞が産生する酸性ムコ多糖類がトルイジンブルー染色により観察され、Type II collagen が免疫染色により陽性反応を示した。in vivo 皮下移植に軟骨細胞へ誘導した胎盤絨毛由来間葉系細胞は生存を維持でき、さらに大量の軟骨細胞外 matrix を合成、分泌し

た。膝関節欠損モデルに軟骨組織形成を観察した。脂肪細胞への分化誘導は培養3週目からごくわずかな割合で Oil Red により染色された脂肪滴が観察された。神経系細胞への分化誘導では 培養後 24 時間には神経系様細胞形態を示し、神経系細胞マーカーの nestin、NSE、GFAP、MBP が免疫染色により陽性反応を示した。マウス新生児脳内に移植した胎盤由来間葉系細胞の脳内分布については解析中である。

また PDMPCs との5日間の共培養により臍帯血由来 CD34+細胞数  $58.3 \pm 17.9$  倍、CD38-CD34+細胞  $153.8 \pm 13.9$  倍、CFU-Mix  $17.7 \pm 14.4$  倍であり、骨髄由来 Stroma 細胞と同等の増幅率を認めた。

D. 結語：PDMPCs は培養系において骨髄由来間質細胞と同様に骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経系細胞へ分化誘導可能であることが明らかになった。また 造血細胞増幅支持能も確認された。我々が開発した PDMPCs はドナーへの負担が全くなく医学的にも倫理的にも安全な採取が可能であり、また骨髄由来間質細胞との比較において遜色なく分化誘導可能であり新たな同種 (Allo-) の細胞ソースとなる可能性があることが考えられた。

## II. PDMPCs への Bmi-1 および hTERT 遺伝子導入

A. 研究目的：我々はヒト胎盤絨毛から単離した PDMPCs が骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経系細胞に分化誘導が可能であり、さらに造血幹細胞支持能を有していることも明らかになった。しかしながら、PDMPCs はヘテロな細胞集団であり、約 21

PDL で分裂停止し細胞寿命に達する。そのため、分化能についてのクローナル解析が困難である。本研究では PDMPCs を不死化させるために、レンチウイルスベクターを用い、*ink4a* によりコードされた p16 腫瘍抑制遺伝子を抑制する Bmi-1 遺伝子および細胞分裂に伴うテロメア短縮を阻止するための酵素であるテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子 (hTERT) を PDMPCs に導入し、その細胞の分裂回数 (PDL)、テロメラーゼ活性、テロメア長を解析すると共にサブクローニングを行うことを目的とした。

B. 研究方法：レンチウイルスベクターを用い、Bmi-1 および hTERT 遺伝子を PDMPCs (7 PDL) に導入した。テロメラーゼ活性は TRAP assay を行った。テロメア長の測定は Telomere length Assay Kit を用いた。クローン作製は、6 cm 培養皿に 2,000 cells 播種し、クローニングカップを用いて Single cell から形成されたコロニーを回収し、増幅させた。

C. 研究結果：Bmi-1 および hTERT 遺伝子を導入した PDMPCs はテロメラーゼ活性が認められ、100 PDL に達してもいまだ分裂し続けている。また、テロメア長も遺伝子導入時に比べ伸長した。造血幹細胞支持能に関しては Stroma free における CD34 陽性細胞の増幅率は 1.8 倍であったのに対して Tert/Bmi-1 導入細胞との共培養では 5.5 であった。Bmi-1 および hTERT 遺伝子導入した PDMPCs から数十クローンを分離樹立し、軟骨、骨、神経細胞へ分化可能クローンがあった、但し、細胞増殖と共に分化能が落ちる傾向があった。

D: 結語: Bmi-1 および hTERT 遺伝子導入することにより PDMPCs の分裂回数が延長し、数十のクローンが分離樹立できた。寿命を延びた細胞は軟骨、骨、神経細胞へ分化可能であった。

(倫理面への配慮) 臍帯血の採取保存に関しては東京大学医科学研究所倫理委員会の承認を得、東京臍帯血バンク規定に準じ個人情報等機密保持を徹底した。

#### F. 健康危険情報

臍帯血に関しては、特に本研究において本項目に該当するものはない。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Igura K., Zhang X., Takahashi K., Mitsuru A., Yamaguchi S., Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 6, 543 - 553, 2004.
2. 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* 13, 337-341, 2004.
3. Nagamura-Inoue T., Mori Y., Zheng, Y., Watanabe N., Takahashi, TA. Differential expansion of umbilical cord blood mononuclear cell derived natural killer cells dependent on the dose of Interleukin 15 with Flt3L. *Exp. Hematology*, 32, 202-209, 2004.
4. Tsuneo A. Takahashi, Paolo Rebutta, 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).
5. Zheng Y, Watanabe N., Nagamura-Inoue T., Igura K., Nagayama H., Tojo A., Tanosaki R., Takaue Y., Okamoto S., Takahashi A.T.: The lack of homing-essential molecules on umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells can be reversed by recombinant human stem cell factor treatment to increase their in vivo homing potential. *Experimental Hematology*, 31, 1237-1246, 2003
6. Nagamura-Inoue, T., Shioya, M., Sugo, M., Cui, Y., Takahashi, A., Tomita, S., Zheng, Y., Takada, K., Kodo, H., Asano, S. and Takahashi, A.T.: 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
7. Nagayama H, Sato K, Morishita M, Uchimaru 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
8. Zhang X., Nakaoka T., Nishishita T., Watanabe N., Igura K., Shinomiya K., Takahashi T.A., and Yamashita N. Efficient Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells. *Microbiol. Immuno.* 47: 109-116, 2003.
9. Kashiwakura I, Takahashi TA, Kuwabara M. Basic fibroblast growth factor-stimulated ex vivo expansion of haematopoietic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, 122, 479-488, 2003.
10. 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.
11. ヒト胎盤由来間葉系細胞の軟骨への分化誘導：張曉紅、伊倉宏一、高橋賢次、高橋恒夫：日本炎症、再生医学会雑誌。(印刷中)
12. 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—：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：日本輸血学会雑誌(印刷中)
13. 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
14. 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

#### H. 知的財産権の出願/登録状況

特に本項目に該当する出願、登録および予定は無い。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

研究課題：臍帯血移植後の造血・免疫再構築促進に関する研究  
分担研究者 直江 知樹 名古屋大学大学院分子細胞内科学教授  
研究協力者 村田 誠 名古屋大学医学部附属病院血液内科

臍帯血中 T リンパ球を分離増幅し臍帯血幹細胞とともに移植することで、臍帯血移植における生着率を向上させることを目的とし、まず CD4 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球の分離法、増幅法の最適化を試みた。複数の候補の中から Dynal 社の kit を用いることで T リンパ球（CD4、CD8 とともに）の高効率な分離増幅が可能であることが示された。

#### A. 研究目的

臍帯血移植は保存されている臍帯血中の細胞数に限りがあり、血球回復の遅延や生着不全が問題となる。同種造血幹細胞移植における生着には、前処置法や移植片中の造血幹細胞数の他に、移植片中の T リンパ球数も大きな影響を与えることが知られている。即ち、臍帯血中から T リンパ球（CD4 陽性細胞あるいは CD8 陽性細胞）を分離し、体外増幅し、臍帯血移植と同時またはほぼ同時期に輸注することで、移植片の生着および血球回復の促進が得られる可能性がある。そこで我々は、増幅 T リンパ球併用臍帯血移植の開発を目的として、臍帯血中からの CD4 または CD8 陽性細胞の各種分離法・増幅法について比較検討し、その結果得られた増幅リンパ球の性格付け（細胞表面マーカーの変化や TCR repertoire の変化など）を行っており、これまで得られた結果を以下に報告する。

#### B. 研究方法

細胞は健常成人ボランティアより採取した末梢血単核球、不要となった臍帯血単核球を用いた。単核球からの CD4 陽性細胞分画および CD8 陽性細胞分画の分離は、Miltenyi human MicroBeads または Dynal positive isolation kit を用いて行った。細胞増幅はそれぞれの beads 法に続

いて MACS Human T Cell Activation/Exoansion Kit、Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander を用いて行った。培養液は 5-10% ヒト血清加 RPMI、または 5% ヒト血清加 Xvivo15 を用いた。また抗 CD3 抗体（OKT3）および IL-2 存在下に、第 3 者の末梢血単核球および EBV-transformed-LCL（いずれも <sup>60</sup>Co 照射）と共培養する増幅法（REP 法）でも増幅を行った。

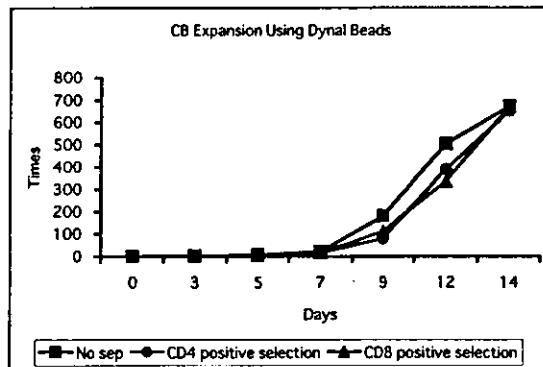
（倫理面への配慮）

この研究の実施にあたり、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。

#### C. 研究結果

健常成人末梢血単核球を採取し、一旦凍結保存し解凍した。その上で Dynal kit を用いて CD4 陽性分画、CD8 陽性分画に分離し、それら CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、および未分画（bulk）細胞 Dynabeads Expander を用いて増幅したところ、14 日後の増幅効率はそれぞれ約 160 倍、40 倍、5 倍だった。但し、このときの bulk 細胞には死細胞が混入しておりそれが不十分な増幅効率の原因と考えられた。次に保存臍帯血を解凍し同様に分離増幅を行った。図のごとく、CD4 陽性

細胞、CD8陽性細胞、bulk細胞のいずれもが、培養14日後に600倍以上に増幅された。このとき用いたIL2の濃度は50U/mLだが、75U/mL、100U/mLと濃度を高くしても増幅効率はほぼ同等だった。図には示さないが、REP法を用いて増幅した場合も500-1000倍と良好な増幅効率が得られた。現在Miltenyi kitを用いて臍帯血中CD4陽性細胞、CD8陽性細胞の増幅効率を様々な条件で検討中であるが、今のところDynabeads kitを上回る効率は得られていない。今後培養条件を最適化したのち、培養前後の細胞表面マーカーの変化やTCR repertoireについて評価を行い、またしばしば臍帯血移植で用いられるHLA 1座または2座不適合の細胞に対するallo-reactionについてもMLCや細胞刺激試験を用いて評価する予定である。



#### D. 考察

臍帯血移植における生着不全の問題を解決すべく臍帯血中のCD34陽性幹細胞の体外増幅法が研究され、既に海外からは臨床試験の結果が報告されている。しかし、期待に反して生着促進の効果は確認されなかった。真の造血幹細胞増幅は可能なのか、あるいは造血幹細胞を増幅・輸注することが本当に生着促進につながるのだろうか。近年、同種造血幹細胞移植における生着には、移植片中のCD8陽性リンパ球が重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。また生着促進に作用するCD8陽性リンパ球に細胞傷害活性は不要であるという。従って、臍帯血中のCD8陽性リンパ球はnaïveで

非活性状態のものが多いものの、それらを分離・増幅し、臍帯血幹細胞とともに移植することで、移植片の生着および血液回復を促進する可能性がある。

#### E. 結論

臍帯血中CD4陽性リンパ球、CD8陽性リンパ球の高効率な分離・増幅の可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Murata M, Emi N, Izumisawa Y, Inaki A, Saitoh M and Naoe T. Identification and frequency of a new HLA-A allele, A\*030104. Tissue Antigens, in press.
2. Terakura S, Murata M, Nishida T, Emi N, Akatsuka Y, Riddell SR, Morishima Y, Kodera Y and Naoe T. A UGT2B17-positive donor is a risk factor for higher transplant-related mortality and lower survival after bone marrow transplantation. Br J Haematol, in press.
3. Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, Komori K, Naoe T, Takamatsu J, Murohara T. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(12):e192-6. 2004.
4. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Takahashi S, Hirabayashi N, Hiraoka A, Kanda Y, Tanosaki R, Okamoto S, Iwato K, Atsuta Y, Hamajima N, Tanimoto M, Kato S. Tacrolimus

instead of cyclosporine used for prophylaxis against graft-versus-host disease improves outcome after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors, but not from HLA-identical sibling donors: a nationwide survey conducted in Japan. Bone Marrow Transplant 34(4):331-7.2004.

5. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Iseki T, Hirabayashi N, Karasuno T, Chiba S, Atsuta Y, Hamajima N, Takahashi S, Kato S. Allogeneic myeloablative transplantation for patients aged 50 years and over. Bone Marrow Transplant 34(1):29-35.2004.

## 2. 学会発表

1. 寺倉精太郎、村田 誠、西田徹也、恵美宣彦、赤塚美樹、森島泰雄、高久史麿、小寺良尚、直江知樹。同種骨髄移植における *UGT2B17* 遺伝子欠損の影響。第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 平成 16 年 9 月 於：京都
2. 寺倉精太郎、村田 誠、西田徹也、恵美宣彦、Warren E.H.、Riddell S.R.、直江知樹、*UGT2B17* 遺伝子は HLA-B\*4403 上に提示されるマイナー抗原をコードする。第 27 回日本造血細胞移植学会総会 於：岡山

- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
なし