

厚生労働科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

幹細胞機能のエンハンスメントによる
非破壊的造血幹細胞移植法の確定に関する研究

平成16年度 ～ 平成17年度

総合研究報告書

主任研究者 中内 啓光

平成17(2005)4年 10月

目 次

I. 総合研究報告

幹細胞機能のエンハンスメントによる非破壊的造血幹細胞移植法の確定--1

中内啓光

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----16

III. 研究成果の刊行物・別刷-----21

総合研究報告書

幹細胞機能のエンハンスメントによる
非破壊的造血幹細胞移植法の確定に関する研究

研究要旨

Lnk は c-Kit の下流に位置し、そのシグナルを抑制的に制御する機能を持つアダプター分子である。Lnk 遺伝子を破壊した Lnk ノックアウトマウス(Lnk KO)マウスにおいては造血幹細胞の数が増加しているだけでなく、正常マウス由来の造血幹細胞よりも強い造血能を持つことが示されている。そこで本研究では、Lnk ノックアウトマウス(Lnk KO)における骨髄造血活性の亢進を解析し、これを造血幹細胞の機能エンハンスメントに利用することを本研究の目的とした。まず Lnk KO マウスにおける造血能の亢進の詳細を検討し、Lnk KO マウスでは造血幹細胞の数ばかりでなくその自己複製能が増加していることを明らかにした (Ema et al., Dev. Cell, in press) (平成15年度、16年度)。そこで、Lnk を分子標的とした造血幹細胞操作法により、正常造血幹細胞に選択的増殖優位性を付与し最小限の前処置で骨髄移植を可能にする方法の開発を目指した (平成15年度、16年度)。まず、Lnk の機能抑制のためにドミナントネガティブ Lnk 変異体を開発したところ、SH2 変異に加えて、PH ドメイン欠損、C 末端領域欠損を組み合わせることにより、より効率の良いドミナントネガティブ Lnk 変異体として作用することがわかった。得られたドミナントネガティブ Lnk 変異体をマウス骨髄造血幹細胞・前駆細胞に感染導入した後、放射線照射したマウスへ移植したところ、造血系再構築能を著明に増強しうることを確認した。さらに、ドミナントネガティブ Lnk 変異体のプラスミド DNA による一過性発現によっても造血前駆細胞の生着能が亢進すること、非骨髄破壊的移植条件下で免疫不全マウスのリンパ球コンパートメントを効率よく再建できることを明らかにし、ドミナントネガティブ Lnk 変異体を応用することにより正常造血幹細胞に選択的増殖優位性を付与し最小限の前処置で骨髄移植を可能にする本研究の目的の一つが達成されたものと判断された。一方、「細胞の記憶システム」の一つとして機能し、クロマチン修飾であるポリコーム群遺伝子 Bmi-1 の強制発現の効果を検討したところ、in vitro におけるマウス骨髄 CD34⁺KSL 造血幹細胞の対称性分裂の確率が亢進し、細胞分裂を経た幹細胞形

質の維持が促進され、造血幹細胞活性が著明に増強されることが確認された。以上の所見は、Bmi-1 が Lnk とは対照的に自己複製を正に制御する分子であり、その発現を増強することによって造血幹細胞の増幅が得られることを示唆するものである (Iwama et al., Immunity 21:843, 2004)。これらの所見は、造血幹細胞制御の標的分子として Lnk と Bmi-1 が非常に良い候補であることを示しており、これら造血幹細胞制御分子を複合的に制御することにより、一層効率の良い造血幹細胞機能のエンハンスメントが可能となり、より安全で簡便な造血幹細胞移植法の確立に結びつくものと考えられた。今後は、ヒト造血幹細胞の系で検討するとともに、より安全で効率の良いドミナントネガティブ Lnk 変異体のデリバリー法の検討とともに、Lnk と Bmi-1 分子を標的とした低分子化合物の開発を進めていくことが臨床へのトランスレーションを進める上で重要と考えられる。

研究分担者

高木 智
東京大学医科学研究所
助教授
岩間厚志
東京大学医科学研究所
講師

A. 研究目的

骨髄移植の本質は造血幹細胞の骨髄ニッチへの生着とそこでの自己複製と分化にある。この機構を明らかにし、最小限の前処置で効率よく造血幹細胞を骨髄ニッチへ生着させることが臨床の現場から望まれている。しかしながら骨髄ニッチの本態は勿論のこと、造血幹細胞の分化と自己複製を制御する分子機構の詳細は依然として不明である。申請者らはこの問題に現実的な側面からアプローチすることを考え、Lnk ノックアウトマウ

ス (Lnk KO) における骨髄造血活性の亢進を解析し、これを造血幹細胞の機能エンハンスメントに利用することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

Lnk KO マウスにおける造血幹細胞活性の解析 (平成15～16年)

Lnk KO マウスにおける造血能亢進の原因を解明するため、造血幹細胞の数ならびに能力を in vivo 競合再構築法を基本にして Competitive repopulation unit (CRU) ならびに Repopulation unit (RU)等の指標を用いて定量的に解析した (中内、高木)。具体的には、B6 マウスの骨髄から造血幹細胞集団である CD34 陰性ないし弱陽性、c-Kit 陽性、Sca-1 陽性、Lineage 陰性 (CD34⁻KSL)細胞を FACS を用いて分離した。放射線照射後のマウス 1 匹に CD34⁺KSL 細胞 1 個を移植し (single cell

reconstitution assay)、再構築が成立したマウスの骨髄中の RU と CRU を二次移植を用いて測定した。一方、B6 マウスと Lnk KO マウスの骨髄細胞を用いて CRU の頻度を測定した。次に FACS を用いて骨髄中の CD34⁺KSL 細胞の頻度を比較した。また、1 個の CD34⁺KSL 細胞を移植し RU を算出するとともに、二次移植によって Lnk KO 造血幹細胞の自己複製能を測定した。

造血幹細胞における Lnk の発現操作に関する研究

Lnk は富プロリン部を含む N 末領域、PH、SH2 ドメイン、C 末端のチロシンリン酸化部位を持つ。これらの各部位にアミノ酸置換変異や欠失変異を導入して種々の Lnk 変異体を作製した。得られた各種 Lnk 変異体を c-Kit 依存性増殖を示す細胞株に発現させ、発現細胞の増殖能を親株と比較検討することにより Lnk の機能ドメインを同定した (平成 15 年)。また、種々の Lnk 変異体を c-Kit 依存性増殖を示す MC9 細胞株に発現させ、増殖能を親株と比較検討することにより内在性 Lnk に対するドミナントネガティブ効果を検定した。造血前駆細胞の造血能、骨髄再構築能に対する Lnk 変異体の効果についてレトロウイルスを用いた遺伝子導入とマウス骨髄移植モデルを用いて検討した。さらにプラスミドベクターとエレクトロポレーション法を用いた一過性発現による効果を検討した。正常マウスの

骨髄細胞に AMAXA 社の Nucleofector トランスフェクションシステムを用いてプラスミドを導入した。一過性に Lnk 変異体を発現した造血前駆細胞を Ly6 アロタイプで区別が可能な骨髄細胞と共に致死量の放射線照射したマウスに移入し、競合条件下での造血能を検討した。また、非骨髄破壊的な条件下での効果について、低量の放射線を照射した *scid* 免疫不全マウスへ移入し、生着能をリンパ球コンパートメントの再建を指標に検討した (平成 16 年)。

Lnk に対する RNAi を用いた造血幹細胞機能増強に関する研究 (平成 15 ~ 16 年)

Lnk の発現を抑制する siRNA を作製した (平成 15 年)。siRNA の機能解析のためために、レンチウイルスベクターに siRNA をクローニングし、レンチウイルスを用いて Lnk siRNA を細胞に強制発現した。効果判定には stem cell factor (SCF) 依存性肥満細胞株 MC9 を用い、内在性あるいは強制発現された Lnk に対する効果を判定した。この際、コントロールとしてドミナントネガティブ Lnk 変異体を用い、Lnk の機能抑制における効果を比較検討した。

Bmi-1 の造血幹細胞に対する効果 (平成 16 年)

ポリコム遺伝子 Bmi-1 の造血幹細胞機能あるいは自己複製能の増強作用につき、

レトロウイルスを用いた造血幹細胞への遺伝子導入の系を用いて解析した。具体的には造血幹細胞の自己複製能を評価する有効な解析法として知られる paired daughter cell assay を用いて Bmi-1 強制発現の効果を判定するとともに、遺伝子導入後の体外培養中に造血幹細胞・前駆細胞の維持・増幅効果を in vitro の培養およびマウス骨髄移植モデルを用いて検討した (平成16年)。

(倫理面への配慮)

全研究は、培養細胞系及びマウス骨髄移植モデルを用いて推進した。実験動物の取扱いは、「東京大学動物実験規則」及び「東京大学動物実験実施マニュアル」に基づき、「動物の愛護と管理に関する法案」を遵守して行った。

C. 研究成果

Lnk KO マウスにおける造血幹細胞活性の解析 (平成15～16年)

Lnk KO マウスと野生型マウスとの間で骨髄細胞の総数に大差はなかったが、Lnk KO マウスの骨髄細胞中の CRU の頻度は正常マウスの 10 倍以上に増加していることが明らかとなった。Lnk KO マウス骨髄中に占める CD34⁺KSL 細胞の頻度も平均して約 10 倍に増加していた。Lnk KO マウスの CD34⁺KSL 細胞 1 個を移植した際の生着率は野生型のそれとほぼ同等であり、約 5 匹に 1 匹の割合で再構築が成

立した。RU/cell の平均値の比較では Lnk KO 造血幹細胞を移植した群の方が野生型を移植した群より有意に高値を示した。また、2 次移植の結果は少なくとも一部の Lnk KO 造血幹細胞において自己複製能が増加していることを示した。以上の結果から、Lnk KO マウスでは造血幹細胞の数ばかりでなくその自己複製能が増加していることが明らかとなった。

造血幹細胞における Lnk の発現操作に関する研究

Lnk の各部位にアミノ酸置換変異や欠失変異を導入し種々の Lnk 変異体を作製した。これらの変異体を肥満細胞株 MC9 に感染導入し、c-Kit 依存性増殖におよぼす影響を検討した。N 末領域、PH ドメイン、チロシンリン酸化部位の変異では Lnk による c-Kit 依存性増殖の抑制に影響はなかったものの、SH2 ドメイン変異により抑制効果が全く消失した。次に Lnk 強制発現により c-Kit 依存性増殖を示さない MC9-Lnk トランスフェクタント細胞に SH2 変異 Lnk を導入したところ c-Kit 依存性増殖能が回復し、SH2 変異 Lnk がドミナントネガティブ変異体として働きうることがわかった (平成15年)。種々の Lnk 変異体の c-Kit 依存性増殖におよぼす影響を c-Kit 陽性 MC9 細胞株および c-Kit 依存性増殖を示さない Lnk 強発現トランスフェクタント細胞に導入し検討したところ、

SH2 変異に加えて、PH ドメイン欠損、C 末端領域欠損を組み合わせることにより、より効率の良いドミナントネガティブ効果を示すことがわかった。得られたドミナントネガティブ Lnk 変異体をレトロウイルスベクターを用いてマウス骨髄造血前駆細胞に感染導入した後、放射線照射したマウスへ移植した。Lnk 変異体を導入した造血前駆細胞を移植した群では、コントロール移植群に比し明らかに骨髄再構築活性が高いことが確認された。レトロウイルスベクターでは導入細胞の悪性転換が懸念されている。この使用を回避できないかどうか、プラスミドの一過性発現系による効果を検討した。ドミナントネガティブ Lnk を一過性発現させた骨髄細胞はコントロール細胞に比べ、致死量放射線を照射したマウスで高い造血能を示した。さらに正常細胞がなかなか生着しない条件で骨髄非破壊的前処置を施した免疫不全マウスにも生着し、免疫系を再構築することが確認できた (平成 16 年)。

Lnk に対する RNAi を用いた造血幹細胞機能増強に関する研究 (平成 15 ~ 16 年)

デザインした 12 種類の Lnk RNAi の中から Lnk の発現を抑制する RNAi を 2 種同定した。これらは、Lnk mRNA の発現を効率良く抑制した (平成 15 年度)。これらの造血に対する効果を

検討するために siRNA を 2 種レンチウイルス発現ベクターに組み込み、細胞に発現しその効果を検討した。細胞は c-Kit を発現し SCF 依存性増殖を示す肥満細胞株 MC9 細胞株と、Lnk を強発現することにより SCF 依存性増殖を示さない Lnk 強発現 MC9 細胞を用いた。siRNA を発現することにより、Lnk 強発現 MC9 細胞の Lnk の発現を蛋白レベルで約 1/5~1/10 に抑制し得ることを確認した。次いで、Lnk 強発現 MC9 細胞の c-Kit 依存性増殖の回復効果を指標に siRNA の効果を検定した。コントロールとして分担研究者の高木らが開発したドミナントネガティブ Lnk 変異体を用いた。ウイルス感染細胞の SCF 反応性増殖を比較したところ、ドミナント変異体が明らかに高い増殖能の回復を示し、意外にも siRNA の効果は有意ではなかった。蛋白レベルでは、約 1/5~1/10 程度まで抑えていたが、この程度の抑制では効果が十分に見られないものと判断された (平成 16 年)。

Bmi-1 の造血幹細胞に対する効果 (平成 16 年)

Bmi-1 を含めたポリコーム遺伝子の強制発現の造血幹細胞活性に対する効果を検討した。造血幹細胞の自己複製能を評価する有効な解析法として paired daughter cell assay がある。これは造血幹細胞 1 つが 2 つに分裂した際に

micromanipulation により別々の well に移してそれぞれの形成するコロニーを観察することにより、二つの娘細胞の形質を retrospective に評価するものである。造血幹細胞のほとんどが好中球・マクロファージ・赤芽球・巨核球の4系統の細胞を含む nmEM コロニーを形成するが、娘細胞両方が nmEM コロニーであれば、細胞分裂を経て両方の娘細胞に幹細胞としての形質が維持されたといえる。野生型造血幹細胞にレトロウイルスを用いて Bmi-1 を強制発現させると、細胞分裂を経て両方の娘細胞に幹細胞としての形質が維持される確率、すなわち nmEM/nmEM pair の数が有意に上昇することが示された。また、骨髄 CD34-KSL 造血幹細胞にレトロウイルスを用いて Bmi-1 を強制発現させ in vitro での培養系を用いて検討したところ、培養中に多能性前駆細胞は 56~81 倍にも増加しており、コントロールと比べ長期骨髄再構築活性は 35 倍に増強された。この効果は HoxB4 に匹敵するものであった。興味あることにこのような効果は Bmi-1 に特異的であり、他のポリコム遺伝子、Rae28/Mph1, M33, Ring1b では認められず、唯一、Bmi-1 と構造的に類似している Mel-18 が弱いながらも有意な増強効果を示した（平成16年）。

D. 考察

本研究で同定・開発したドミナントネガティブ Lnk 変異体を用いることで造血幹細胞・前駆細胞に内在性に発現する Lnk の機能を阻害することが可能であり、造血系再構築能を亢進させることができることを骨髄移植モデルで確認した。さらに、ドミナントネガティブ Lnk 変異体のプラスミド DNA による一過性発現によっても造血前駆細胞の生着能が亢進すること、非骨髄破壊的移植条件下で免疫不全マウスのリンパ球コンパートメントを効率よく再建できることを明らかにし、ドミナントネガティブ Lnk 変異体を応用することにより正常造血幹細胞に選択的増殖優位性を付与し最小限の前処置で骨髄移植を可能にする本研究の目的の一つが達成されたものと判断された。これらの知見を臨床へのトランスレーションに結びつけるため、ヒト造血幹細胞についてその効果を確認するとともに、より安全で効率の良いドミナントネガティブ Lnk 変異体のデリバリー法の検討が肝要である。また、Lnk は多量体を形成することにより機能を発揮すると考えられており、Lnk の多量体化を阻害するような低分子化合物が得られれば、効率良く Lnk の機能を阻害し得る可能性が考えられ、今後、このような低分子化合物のスクリーニングも行っていきたい。ポリコム遺伝子 Bmi-1 に関しては Lnk とは反対に自己複製を正に制御する分子であることが確認され、その発現を増強することに

よって造血幹細胞の増幅が得られるものと期待される。したがって、Bmi-1 に関してはその発現を増強する低分子化合物が有用であり、そのスクリーニングの系を確立し、有用な化合物を同定していきたい。Lnk の機能を阻害する変異体あるいは低分子化合物と組み合わせることにより、一層効率の良い造血幹細胞機能のエンハンスメントを実現し、より安全で簡便な造血幹細胞移植法の確立に結びつけていきたい。

E. 結論

Lnk KO マウスの詳細な解析より、Lnk KO マウスでは造血幹細胞の数ばかりでなくその自己複製能が増加していることが明らかとなった。Lnk の機能抑制のためにドミナントネガティブ Lnk 変異体を開発し、この変異体を用いることにより、造血幹細胞・前駆細胞に内因性に発現する Lnk の機能を阻害することが可能であり、造血系再構築能を増強しうることを骨髓移植モデルで確認した。一方、ポリコム遺伝子 Bmi-1 は自己複製を正に制御する分子であることが確認され、その発現を増強することによって造血幹細胞の増幅が得られることが示唆された。これらの所見は、造血幹細胞制御の標的分子として Lnk と Bmi-1 が非常に良い候補であることを示しており、これら造血幹細胞

制御分子を複合的に制御することにより、一層効率の良い造血幹細胞機能のエンハンスメントが可能であり、より安全で簡便な造血幹細胞移植法の確立に結びつくものと考えられた。

F. 研究危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano H, and Harada M. Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer binding protein a in G-CSF signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2005, In press.

Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, and Nakauchi H. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal by polycomb group genes. *Int. J. Hematol.* 81, No. 4, May 2005 in press.

- Ema H, Sudo K, Seita J, Maeda A, Osawa M, Takatsu K, Takaki S, and Nakauchi H. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Developmental Cell*. (in press)
- Kaneko S, Nagasawa T, Nakauchi H, and Onodera M. An in vivo assay for retrovirally transduced human peripheral T lymphocytes using nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice. 33:35-41, *Exp. Hematology*, 2005
- Iseki M, Kubo-Akashi C, Kwón SM, Yamaguchi A, Takatsu K, Takaki S. APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains, has a negative regulatory role in B cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 330:1005-1013, 2005
- Takano H, Ema H, Nakauchi H. Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med*. 199:295-302, 2004
- Ema H, Nakauchi H. "Homing to Niche," a new criterion for hematopoietic stem cells? *Immunity*. 20:1-2, 2004
- Miyagi S, Saito T, Mizutani K-I, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, and Okuda A. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Mol. Cell. Biol*. 24: 4207-4220, 2004
- Rosenbauer F, Wagner K, Zhang P, Knobloch K-P, Iwama A, and Tenen DG. pDP4, a novel glycoprotein secreted by mature granulocytes is regulated by transcription factor PU. 1. *Blood*. 103: 4294-4301, 2004
- Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamiyo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, Lohuizen van M, and Nakauchi H. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product, Bmi-1. *Immunity*. 21: 843-851, 2004
- Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, Ishii A, Ebihara Y, Osawa M, Honda K, Shinohara H, Sudo K, Tsuji K, Nakauchi H, Iwakura Y, Hirai H, Oda

H, Yamamoto T. and Yuji Yamanashi. Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J. Exp. Med.*

Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Kakeda S. Mac-1^{low} early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 321:1051-1060, 2004

Sumazaki R, Shiojiri N, Isoyama S, Masu M, Keino-Masu K, Osawa M, Nakauchi H, Kageyama R, Matsui A. Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nat Genet.* 6:83-7, 2004

Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes*. 53:2143-52, 2004

Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Liver

repopulation by c-Met-positive stem/progenitor cells isolated from the developing rat liver. *Hepatogastroenterology*. 51:423-6, 2004

Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, Ishii A, Ebihara Y, Osawa M, Honda K, Shinohara H, Sudo K, Tsuji K, Nakauchi H, Iwakura Y, Hirai H, Oda H, Yamamoto T and Yamanashi Y. Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J. Exp. Med.* 200, 1681-1687, 2004.

Kubo-Akashi C, Iseki M, Kwon SM, Takizawa H, Takatsu K, Takaki S. Roles of a conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B, and APS, for mast cell development, growth, and functions: APS-deficiency causes augmented degranulation and reduced actin assembly. *Biochem Biophys Res Commun*. 315:356-362. 2004

Iseki M, Kubo C, Kwon SM, Yamaguchi A, Kataoka Y, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. Increased numbers of B-1 cells and enhanced responses against TI-2 antigen in mice lacking

- APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains. *Mol Cell Biol.* 24:2243-2250, 2004
- Moon BG, Takaki S, Miyake K, Takatsu K. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J Immunol.* 172:6020-6029, 2004
- Moon BG, Takaki S, Nishizumi H, Yamamoto T, Takatsu K. Abrogation of autoimmune disease in Lyn-deficient mice by the deletion of IL-5 receptor alpha chain gene. *Cell Immunol.* 228:110-118, 2004
- Tamura T, Ariga H, Kinashi T, Uehara S, Kikuchi T, Nakada M, Tokunaga T, Xu W, Kariyone A, Saito T, Kitamura T, Maxwell G, Takaki S, Takatsu K. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int Immunol.* 16:1691-1699, 2004
- Ema H, Nakauchi H. Self-renewal and lineage restriction of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 13:508-12, 2003
- Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development.* 130: 2513-2524, 2003
- Yotsumoto K, Okoshi Y, Shibuya K, Yamazaki S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Osawa M, Kuroiwa A, Matsuda Y, Tenen DG, Iwama A, Nakauchi H, and Shibuya A. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and -II, regulate mast cell and macrophage myeloid activation, *J. Exp. Med.* 198: 223-233, 2003
- Nobuhisa I, Takizawa M, Takaki S, Inoue H, Okita K, Ueno M, Takatsu K, Taga T. Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein. *Mol Cell Biol.* 23:8486-8494, 2003.
- Takaki S, Tezuka Y, Sauer K, Kubo C, Kwon SM, Armstead E, Nakao K, Katsuki M, Perlmutter RM, Takatsu K. Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice

overexpressing Lnk adaptor protein.
J Immunol. 170:703-710, 2003.

2. 学会発表

Iwamori N, Iwama A, and Nakauchi H.
'Bmi-1 is essential for maintenance
of spermatogonial stem cell.'
Keystone Symposia 2005, 10-15 Feb,
2005 (Banff)

Nakauchi H. 'Regulation of Stem Cell
Self Renewal and Aging' Days of
Molecular medicine, 17-19 March,
2005 (La Jolla)

Nakauchi H. 'Massive Expansion of
HSC in Lnk-deficient Mice.' USA-
Japan Cooperative Cancer Research
Program, 22-26 March, 2005 (Maui)

Kato Y, Iwama A, Nakauchi H.
Selective activation of STAT5
maintains long-term bone marrow
repopulating hematopoietic stem
cells ex vivo. Keystone symposia,
"Hematopoiesis" 2004 (California)

Takaki S, Kubo C, Kwon SM, Sauer K,
Armstead E, RM Perlmutter RM,
Takatsu K. Impaired lymphopoiesis

and altered B cell subpopulations in
transgenic mice overexpressing Lnk.
American Association of
Immunologists annual meeting, May
2003.

Morita Y, Ema H, and Nakauchi H.
Non-side population hematopoietic
stem cells in adult mouse bone
marrow. ISAC International Congress,
Montpellier, France, 22-27 May,
2004

Nakauchi H. "Asymmetric division
and lineage commitment at the level
of hematopoietic stem cells"
International Society for Stem Cell
Research 2nd Annual Meeting (ISSCR),
(Boston), 10-13 June, 2004

Iwama A, Nakauchi H "Apolycomb gene
product, Bmi-1 plays a role in the
maintenance of hematopoietic stem
cells in a multi-potential stage"
International Society for Stem Cell
Research 2nd Annual Meeting (ISSCR),
(Boston), 10-13 June, 2004

Seita J, Ema H, Sudo K, Takaki S,
Takatsu K, Nakauchi H. "Massive
Expansion of Hematopoietic Stem
Cells in Lnk-Deficient Mice"

International Society for Stem Cell Research 2nd Annual Meeting (ISSCR), (Boston), 10-13 June, 2004

Nakauchi H "Control of hematopoietic stem cell self-renewal by a signal adaptor molecule, Lnk" 2004 Annual Symposium of Dental Research Institute, Seoul National University. Seoul, Korea. Oct, 2004

Yashiro Y, Bannai H, Yabiku T, Minaowa T, Osawa M, Iwama A, Miyano S, and Nakauchi H. "Transcriptional Profiling of Hematopoietic Stem Cells by High-Throughput Sequencing" The 11th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research. 4-5 Dec. 2004 (Taiwan)

Ema H, Kaneda M, Maeda A, Takano H, Nakauchi H. "Lymphoid Lineage Restriction in Hematopoietic Stem Cells Through Their First Division" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Maeda A, Iwama A, Eto K, Ema H, Kitamura T, Dietmar Vestweber, Nakauchi H. "Expression of Endomucin, a CD34-Like Sialomucin

Marks Definitive Hematopoietic Stem Cells throughout Development" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Oguro H, Iwama A, Nakauchi H. "Enhanced Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells Mediated by the Polycomb Gene Product, Bmi-1" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Takahashi S, Watanabe N, Ooi j, Tomonari A, Takasugi K, Uchiyama M, Konuma T, Futami M, Yamanishi Y, Takahashi K, Tojo A, Nagamura T, Takahashi A. T, Mori T, Okamoto S, Nakauchi H, Asano S. "Contribution of T-Cell Reconstitution during the Early Phase after Cord Blood Transplantation to Favorable Clinical Outcomes" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Takayanagi S, Hiroshima T, Yamazaki S, Iwama A, Nakauchi H. "*Tmtsp*, a Novel Gene Encoding a Cell Surface Protein Highly Specific to Hematopoietic Stem and Endothelial

Cells” American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Nakauchi H. Oguro H, Negishi M, and Iwama A. ‘A polycomb gene product, Bmi-1 is the critical determinant for hematopoietic stem cell self-renewal.’ 15th International Symposium on Molecular Biology of Hematopoiesis 2004 (Tokyo).

Kato Y, Iwama A., Nakauchi H. “Selective Activation of STAT5 Unveils Its Role on the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells and the Development of Myeloproliferative Disorder” American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Nakauchi H. ‘Lymphoid lineage commitment and asymmetric division at the level of hematopoietic stem cells’ 8th International Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens, 34th Annual Scientific Meeting of the Australasian Society for Immunology, 12-16 Dec, 2004 (Adelaide)

Nakauchi H. ‘Use of FACS for stem cell biology’ 7th Federation of Immunological Societies of Asia Oceania (FIMSA) and the Australasian Society for Immunology (ASI), 7-10 Dec, 2004 (Adelaide)

Kwon SM, Takizawa H, Iseki M, Takatsu K, Takaki S. Lnk regulates actin cytoskeleton as a molecular scaffold linking RTKs with Vav, Rac, PAK and filamin A, and controls cell division and migration. Keystone Symposia. Tahoe City, CA, USA. 2004 Mar.

Takizawa H, Kwon SM, Takatsu K, Takaki S. Enhancing repopulation ability of hematopoietic stem/progenitor cells by inhibiting intracellular adaptor protein, Lnk, Keystone Symposia. Tahoe City, CA, USA. 2004 Mar.

Kubo-Akashi C, Iseki M, Kwon SM, Takizawa H, Takatsu K, Takaki S. Roles of Lnk-family adaptor proteins, Lnk, SH2-B and APS in growth and functions of mast cells: APS-deficiency causes augmented degranulation and reduced actin

assembly. The 12th International Congress of Immunology. Montreal, Canada. 2004 Jul.

Iseki M, Takatsu K, Takaki S. Control of actin reorganization and B-1 cell compartment size by adaptor molecule containing PH and SH2 domains, APS. The 12th International Congress of Immunology. Montreal, Canada. 2004 Jul.

Takizawa H, Takatsu K, Takaki S. Enhancing repopulation ability of hematopoietic stem/progenitor cells by blocking functions of intracellular adaptor protein, Lnk. The 12th International Congress of Immunology. Montreal, Canada. 2004 Jul.

Takaki S, Moon BG, Takatsu K. Homeostatic regulation of mature B-1 cells and antibody production in mucosal tissues. The Awaji International Forum on Infection & Immunity. Hyogo, Japan. 2004 Aug.

Takaki S. Control of hematopoietic stem/progenitor cell expansion by Lnk adaptor protein. The 11th East

Asian Joint Symposium on Biomedical Research. Taipei, Taiwan. 2004 Dec.

Nakauchi H. :“In vitro and in vivo clonal analysis of hematopoietic and liver stem cells”, HUGO’s 8th ANNUAL GENOME MEETING, Cuncun(Mexico), April, 2003

Nakauchi H. : “Quantitative assessment of hematopoietic activity in lmk-deficient mouse bone marrow” International Stem Cell Conference, Singapore 2003, Singapore, Oct. 2003

Nakauchi H. : “Regeneration potentials of the hematopoietic stem cells” 2003, The 7th International Cord Blood Symposium, Tokyo(Japan) Oct. 2003

Nakauchi H. :“In vitro and in vivo clonal analysis of hematopoietic and liver stem cells”, Symposium on Stem Cell at Pusan National University, Pusan (Korea), Nov. 2003

Nakauchi H. :“Expression of CD34 and bcrp-1 in mouse hematopoietic stem cells” The 2nd Seoul International

Symposium on Stem Cell Research,
Seoul (Korea), Nov. 2003

Iwama A. Essential and instructive
roles of GATA factors in eosinophil
development. 3rd biennial symposium
of the International Eosinophil
Society (Colorado). 2003

Iwama A. Selective activation of
STAT5 maintains long-term bone
marrow repopulating hematopoietic
stem cells ex vivo. 32th Annual
Meeting of the international
Society for Experimental Hematology.
(Paris) 2003

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Ema H, Morita Y and <u>Nakauchi H.</u>	Phenotype of mouse hematopoietic stem cells.	Lanza R, Blau H, Melton D, Moore M, Thomas ED, Verfaillie C., Weissman I, West M	<i>Handbook of Stem Cells</i>	Elsevier Academic Press Inc.	U.S.A.	2004	323-328

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Takaki S</u> , Tezuka Y, Sauer K, Kubo C, Kwon SM, Armstead E, Nakao K, Katsuki M, Perlmutter RM, Takatsu K	Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice overexpressing Lnk adaptor protein.	<i>Journal of Immunology</i>	170	703-10	2003
Nobuhisa I, Takizawa M, <u>Takaki S</u> , Inoue H, Okita K, Ueno M, Takatu K, Taga T,	Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein.	<i>Mol. Cell. Biol</i>	23	8486-94	2003
Suzuki A, <u>Iwama A</u> , Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H	Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells.	<i>Development</i>	130	2513-24	2003
Yotsumoto K, Okoshi Y, Shibuya K, Yamazaki S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Osawa M, Kuroiwa A, Matsuda Y, Tenen DG, <u>Iwama A</u> , Nakauchi H, and Shibuya A.	Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and -II, regulate mast cell and macrophage myeloid activation,	<i>J. Exp. Med.</i>	198	223-33	2003
Ema H, <u>Nakauchi H.</u>	Self-renewal and lineage restriction of hematopoietic stem cells.	<i>Curr Opin Genet Dev.</i>	13	508-12	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaneko S, Nagasawa T, <u>Nakauchi H</u> , and Onodera M.	An in vivo assay for retrovirally transduced human peripheral T lymphocytes using nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice.	<i>Exp. Hematology,</i>	33	35-41	2005
Ema H, Sudo K, Seita J, Maeda A, Osawa M, Takatsu K, Takaki S, and <u>Nakauchi H</u> .	Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice.	<i>Developmental Cell.</i>		In press	2005
Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamijo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, Lohuizen van M, and <u>Nakauchi H</u> .	Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product, Bmi-1.	<i>Immunity.</i>	21	843-851	2004
Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, Ishii A, Ebihara Y, Osawa M, Honda K, Shinohara H, Sudo K, Tsuji K, <u>Nakauchi H</u> , Iwakura Y, Hirai H, Oda H, Yamamoto T. and Yuji Yamanashi.	Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. <i>J. Exp. Med.</i>	<i>J Exp Med.</i>	20	1681-1687	2004
Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, <u>Nakauchi H</u> .	Miyagoe-Suzuki Y, Kakeda S. Mac- ^{low} 1 ⁺ early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration.	<i>Biochemical and Biophysical Research Communications.</i>	321	1051-1060	2004
Takano H, Ema H, <u>Nakauchi H</u> .	Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs.	<i>J Exp Med</i>	199	295-302	2004
Ema H, <u>Nakauchi H</u> .	"Homing to Niche," a new criterion for hematopoietic stem cells?	<i>Immunity</i>	20	1-2	2004

Sumazaki R, Shiojiri N, Isoyama S, Masu M, Keino-Masu K, Osawa M, <u>Nakauchi H</u> , Kageyama R, Matsui A.	Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice.	<i>Nat Genet</i>	6	83-7	2004
Suzuki A, <u>Nakauchi H</u> , Taniguchi H.	Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting.	<i>Diabetes.</i>	53	2143-52	2004
Miyagi S, Saito T, Mizutani K, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, <u>Nakauchi H</u> , Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, Okuda A.	The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells.	<i>Mol Cell Biol.</i>	24	4207-20	2004
Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, <u>Nakauchi H</u> , Taniguchi H.	Liver repopulation by c-Met-positive stem/progenitor cells isolated from the developing rat liver.	<i>Hepatogastroenterology</i>	51	423-6	2004
Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, <u>Iwama A</u> , Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano H, and Harada M.	Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer binding protein α in G-CSF signaling pathway.	<i>J. Biol. Chem.</i>		In press	2005
Rosenbauer F, Wagner K, Zhang P, Knobloch K-P, <u>Iwama A</u> , and Tenen DG.	pDP4, a novel glycoprotein secreted by mature granulocytes is regulated by transcription factor PU.1.	<i>Blood</i>	103	4294-4301	2004
Kubo-Akashi C, Iseki M, Kwon SM, Takizawa H, Takatsu K, <u>Takaki S</u> .	Roles of a conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B, and APS, for mast cell development, growth, and functions: APS-deficiency causes augmented degranulation and reduced actin assembly.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	315	356-362	2004
Iseki M, Kubo C, Kwon SM, Yamaguchi A, Kataoka Y, Yoshida N, Takatsu K, <u>Takaki S</u> .	Increased numbers of B-1 cells and enhanced responses against TI-2 antigen in mice lacking APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains.	<i>Mol Cell Biol.</i>	24	2243-2250	2004