

これらの結果を踏まえ、マウス骨髄に、移植可能なヒト造血幹細胞が生着、増幅していることを確認するため、second transplantationの実験を行った。その結果、second transplantationによっても、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} が、ヒト造血幹細胞活性測定に有用であることが、再確認された。また、Fas抗体による劇症肝炎モデル、CC14による慢性肝炎モデル等、組織障害の加わった肝臓において、移植ヒト細胞の肝細胞への分化を確認した。さらに、免疫組織染色により、これらの細胞がヒトアルブミンを産生し、機能的にもヒト肝細胞として成熟していることが確認された。ヒトアルブミンは、マウス血清中においてELISA法を用いて測定可能量産生されており、治療基盤技術開発の面よりも、有用なシステムであることが示された。

D. 考察

免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} において、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりのT細胞を含む全血球への分化が証明された。マウス、ヒトの異種動物間において、免疫学的バリアーを超えて、ヒト血球細胞の出現が確認できたことは驚きに値する。NOD/SCID マウスと NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスで認める免疫障害の差異を鑑みるに、リンパ球に代表される獲得免疫系に加えて、NK細胞などの自然免疫系が生着に大きく寄与することが明らかとなった。さらに、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスに認める樹状細胞などの機能も、ヒト細胞の生着に大きく関与することが推測される。一方、

造血幹細胞よりの分化の過程には、サイトカイン、接着分子等の様々な分子が寄与することが判っている。今回、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} においてヒト造血幹細胞の分化が確認されたことにより、マウス、ヒト間において分化に必要な分子は redundancy を有することが明らかとなった。また、肝障害下において、移植ヒト臍帯血のヒト肝細胞への分化が確認され、既存の造血細胞供給システムを用いた、新しい治療体系の確立が期待される。

E. 結論

免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} は、ヒト造血細胞の生着を許容するのみでなく、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの、機能的血球細胞、免疫細胞の分化をも誘導することにより、*in vivo*での優れたヒト造血幹細胞活性系と成りうることが明らかとなった。また、造血細胞の持つ分化可塑性も評価できるシステムであることも明らかとなり、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスが、ヒト細胞を用いた再生医療の確立の為に必要な有効性、安全性の面より、多くの貴重な知見を提供してくれることが期待される。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. Kambe N, Hiramatsu H, Shimonaka M, Fujino H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Ueyama Y, Matsuyoshi N, Miyachi Y and 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
2. Heike T and Nakahata T : Stem cell plasticity in hematopoietic system *Int J Hematol* 79:7-14, 2004.
 3. Nishikomori,R., Akutagawa, H., Maruyama, K., Nakata-Hizume, M., Ohmori, K., Mizuno, A., Yasumi, T., Kusunoki, T., Heike, T., and Nakahata, T. : X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival *Blood* 103:4565-4572, 2004.
 4. Xu, Y., Arai, H., Sano, H., Murayama, T., Yoshimoto, M., Heike, T., Nakahata, T., Nishikawa, S., Kita, T. and Yokode, M.: Role of bone marrow-derived progenitor cells in cuff-induced vascular injury in mice *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 24:477-482, 2004.
 5. Umeda, K., Heike, T., Yoshimoto, M., Shiota, M., Suemori, H., Luo, H.Y, Ch.ui, D.H.K., Torii, R., Shibuya, M., Nakatsuji, N., and Nakahata, T.: Development of primitive and definitive hematopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro *Development* 131:1869-1879, 2004.
 6. Yasumi T, Katamura K, Yoshioka T, Meguro TA, Nishikomori R, Heike T, Inobe M, Kon S, Uede T, Nakahata T.:Differential requirement of the CD40-CD154 costimulatory pathway during T helper cell priming by CD8alpha+ and CD8alpha- murine dendritic cell subsets *J. Immunol.* 172:4826-4833, 2004.
 7. Kanazawa N, Okafuji I, Kambe N, Nishikomori R, Nakata-Hizume M, Nagai S, Fuji A, Yuasa T, Manki A, Sakurai Y, Nakajima M, Kobayashi H, Fujiwara I, Tsutsumi H, Utani A, Nishigori C, Heike T, Nakahata T, Miyachi Y. : Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kB activation: common genetic etiology with Blau syndrome *Blood* 105:1195-1197, 2005.
 8. Yasumi, T., Katamura, K., Okafuji, I., Yoshioka, T., Meguro, T., Nishikomori, R., Kusunoki, T., Heike, T. and Nakahata, T.:Limited ability of antigen-specific Th1 responses to inhibit Th2 cell development in vivo. *J. Immunol.* 174:1325-1331, 2005.
 9. Nanatsu-Shinohara, M., Inoue, M., Lee, J., Yoshimoto, M., Oganuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Toyoshima, M., Niwa, O., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A., and Shinohara, T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119:1001-1012, 2004.

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用研究事業）

分担研究報告書

5. 新 GCP に則った臨床プロトコルの作成

5-1 急性骨髄性白血病患者に対する同種臍帯血由 *ex vivo* 増幅臍帯血移植に関する臨床第 I 相／第 II 相試験

分担研究者：伊藤 仁也

（先端医療センター再生医療研究部主任研究員）

分担研究者：永井 謙一

（先端医療センター診療管理部長）

分担研究者：村上 雅義

（先端医療センター臨床研究支援部長）

研究要旨

細胞治療、再生医療において科学的根拠に基づいた臨床プロトコルを作成する研究は、歴史的にまだ浅く解析法などの体系が整っていないのが現状である。

体外増幅された臍帯血幹細胞移植を臨床応用するには、培養した細胞の安全性、効果の予測を行うことが必要となる。我々は、製品規格の確立を目的とし、

細胞の安全性と効果の検証から、規格試験として製造毎の品質管理規格項目を設定した。また臨床プロトコルの対象を急性骨髄性白血病患者として、主要評価項目を *Ex vivo* 増幅臍帯血移植の安全性と移植 CD34 陽性細胞数と生着日数に相関があるかどうかの Phase I/II 試験とした。また細胞治療における臨床試験を実際に実施するために、臨床研究実施計画書、同意説明文書、有害事象共通用語基準 v3.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版、使用薬剤情報、症例報告書(CRF)、*ex vivo* 増幅臍帯血の品質及び安全性に関する資料概要、製造管理基準書、品質管理基準書、製造衛生管理基準書、製造標準書(品名：*ex vivo* 増幅臍帯血)を作成し、平成 17 年 3 月 17 日に先端医療センター再生医療審査会（倫理委員会）で承認された。

A. 研究目的

臍帯血移植は最適な病期に移植ができるという最大の利点がある反面、採取細胞数に限界があるため、成人に対する適応が制限されることが最大の欠点である。これにより非血縁者骨髄移植と比較すると明らかに生着不全率が高いことや感染症のリスクが高いことも問題となっている。我が国の臍帯血バンクネットワークでは、細胞数の多い臍帯血が保存されるようになってきてから成人に対する臍帯血移植例も増加してきた。現在、造血細胞移植学会で発表された成人臍帯血移植はすでに700例に達しているが、1000日のEvent free survival(EFS)は、20%にとどまるのに対し、Transplant related mortality(TRM)は50%に達し、十分安全な治療とはいえないのが現状である。生着不全率も約20%報告されており、生着と移植CD34陽性細胞数に相関があることが多変量解析の結果証明された。海外のグループスタディーの成績においても生着、生存率ともに輸注されるCD34陽性細胞数ほもっとも大きなRisk factorとなっている。したがって、今後の臍帯血移植の成績改善には、できるだけ多くのCD34陽性細胞細胞を輸注することが必要と考えられ、臍帯血のCD34陽性細胞をex vivoで増幅させる臨床試験を計画した。臨床試験で明らかにしようとするのは、Ex vivoで増幅した臍帯血由来CD34陽性細胞移植の安全

性を評価することと生着に及ぼす臨床的効果を輸注CD34陽性細胞数と生着日数の相関を調べることで評価することを目的にプロトコルを作成した。

B. 研究方法

ヒトに対して臨床試験を行う前に平成14年度は増幅した臍帯血由来造血幹細胞の安全性と効果の検証を非臨床試験としてコロニー形成能、サイトカイン産生能、がん化の検索になどin vitroで解析を行い、平成16年度にはNOD/SCIDマウスへの移植系を用いてin vivoでの安全性試験、効果の検証を行い、至適な培養期間の決定、生着期間の類推、投与細胞数の類推を行ってきた。またすでに海外で実施されているex vivo増幅臍帯血移植の臨床研究をin vitroの系および免疫不全マウスへの移植系により、追試して効果の比較を行ってきた。平成17年度にはこれらの前臨床試験の結果より得られた知見を基に臨床プロトコルの作成を行った。

C. 研究結果

1) 対象疾患

造血幹細胞移植の適応となる急性骨髄性白血病で、血縁者および骨髄バンクによる非血縁者骨髄移植ドナーが見つからないか迅速なdonationが必要な患者に行う。

また臍帯血バンクにてHLAが2座不一致以内で $3 \times 10^7/\text{kg}$ 以上の有核細胞を有

する臍帯血が見つかった患者を対象とする。

a) 移植病期

急性骨髄性白血病 (AML)

Standard risk 群(小児は対象外)、
High risk 群の第1寛解期、全ての群
における第2寛解期以降、非寛解期

b) 急性白血病のリスク分類

【High risk 群】

染色体異常が unfavorable(abn(11q),
abn(5), and/or abn(7), hypodiploidy,
abn(3q), t(6;9), t(9;22) etc)である場
合、もしくは染色体異常が正常核形
を含む場合は複数の予後不良因子(初
診時白血球数 $\geq 50,000/\text{L}$ 、寛解到達
までのコース数 ≥ 2 、二次性白血病)
が存在する場合。

【Standard risk 群】

High risk 群に属さず、染色体異常が
favorable(Good risk 群)以外で、他の
予後不良因子がないか一つの場合。

【Good risk 群】

染色体異常が favorable(t(8;21),
abn(16), t(15;17))で、他の予後不良因
子がないか一つの場合。

2) 前処置および移植方法

Day-8 より移植前処置を開始する。移植
前処置は急性骨髄性白血病に対する標準的
治療として TBI 2Gy $\times 6$ (Day-8, -7, -6: 2分
割照射/日)+Ara-C 3g/m² $\times 4$ (Day-5, -4)+CY
60mg/kg $\times 2$ (Day-3, -2)を実施する。

移植は Day 0 に臍帯血バンクから入手した
3 $\times 10^7$ /kg 以上の有核細胞数のうち、2 \times

107/kg 分を通常の臍帯血移植を行い、残り
の分画を CD34 positive selection を行い、
SCF+TPO+FL+FP-6 の4種のサイトカイン
で増幅した分画を移植後 Day 12 に移植する。

【前処置・移植レジメン】

Day	-8	-7	-6	-5	-4
TBI (2Gy/回)	↓↓	↓↓	↓↓		
Ara-C (3g/m ² div)				↓↓	↓↓
rhG-CSF (5 μ g/kg/day civ)			⇔	⇔⇔	⇔⇔
CY (60mg/kg div)					
メスナ(24mg/kg)					
Expanded CB					
Unmanipulated CB					

Day	-3	-2	-1	0	12
TBI (2Gy/回)					
Ara-C (3g/m ² div)					
rhG-CSF (5 μ g/kg/day civ)					
CY (60mg/kg div)	↓	↓			
メスナ(24mg/kg)	↓↓↓	↓↓↓			
Expanded CB					↓
Unmanipulated CB				↓	

3) エンドポイント

3-1) 主要エンドポイント (Primary Endpoint)

a) 移植後 100 日(Day100)までの Grade3 以上
の有害事象の発現数及び頻度を NCI
CTCAE(National Cancer Institute Common
Terminology Criteria for Adverse Events) v3.0、
Glucksberg 規準、Bearman らの規準等で評価
する。

b) 好中球生着日数

好中球生着とは臍帯血移植後、好中球が
2日間連続した測定値でいずれも 500/ μ L
以上となることを指し、好中球生着日と
はその2日間のうち最初の測定日を生着
日とする。

したがって、好中球生着日数とは臍帯血移

植日を起算日として好中球生着日までとする。いずれのイベントも観測されない場合で、その後、生存した症例では最終生存確認日、追跡不能となった症例では追跡不能となる前の最も新しい外来受診日・入院中の診療日で打ち切りとする。

3-2) 副次エンドポイント (Secondary Endpoint)

a) 血小板生着日数

血小板生着とは臍帯血移植後、血小板数の測定値が 2 回連続した測定値でいずれも 50,000/ μ L 以上となることを指し、血小板生着日とはその 2 日間のうち最初の測定日を生着日とする。ただし血小板輸血後 7 日以上たった測定値を採用する。したがって、血小板生着日数とは臍帯血移植日を起算日として血小板生着日までとする。いずれのイベントも観測されない場合で、その後、生存した症例では最終生存確認日、追跡不能となった症例では追跡不能となる前の最も新しい外来受診日・入院中の診療日で打ち切りとする。

b) 赤血球生着日数

赤血球生着とは臍帯血移植後、網状赤血球数の 2 日間連続した測定値でいずれも 10% 以上となることを指し、しかも最終輸血終了後 7 日以上たっていることとする。赤血球生着日とはその 2 日間のうち最初の測定日を生着日とする。したがって、赤血球生着日数とは臍帯血移植日を起算日として赤血球生着日までとする。いずれのイベントも観測されない場合で、その後、生存した

症例では最終生存確認日、追跡不能となった症例では追跡不能となる前の最も新しい外来受診日・入院中の診療日で打ち切りとする。

c) 総細胞・CD34 陽性細胞増幅率

培養開始時、培養後 7 日目、12 日目の各時点での総細胞および CD34 陽性細胞の個数と培養前のそれらの個数の比とする。

d) 輸注総細胞数

増幅培養した CD34 陽性細胞における輸注総細胞数とする。

e) 培養移植細胞幹細胞マーカー

12 日間の培養で増幅される移植細胞に含まれる CD34 陽性細胞と共発現する CD133、CD90、CD117、CD184、CD135、HLA-DR、CD38 陽性細胞数とする。

f) 培養移植細胞コロニー形成細胞数

12 日間の培養で増幅される移植細胞に含まれるコロニー形成細胞数(CFU-GM、BFU-E、CFU-Mix)とする。

g) 全生存期間

移植日を起算日とし、すべての原因による死亡日までの期間とする。いずれのイベントも観測されない場合で、その後、生存した症例では最終生存確認日、追跡不能となった症例では追跡不能となる前の最も新しい外来受診日・入院中の診療日で打ち切りとする。

h) 無再発生存期間

移植日を起算日とし、すべての原因による死亡、再発のうち、最も早く生じたイベントの確認日までの期間とする。いずれのイベントも観測されない場合で、その後、

生存した症例では最終生存確認日、追跡不能となった症例では追跡不能となる前の最も新しい外来受診日・入院中の診療日で打ち切りとする。

i) 治療完遂の有無

治療完遂とは臍帯血移植＋増幅臍帯血移植が完遂できたことを指す。

j) 移植関連合併症死の頻度(移植後 100 日以内)

移植関連合併症死とは生着不全、感染症(ウイルス感染症を含む)、前処置に伴う臓器不全、GVHD、TMA、VOD による死亡とする。

k). 移植後 100 日時点での免疫学的回復能

移植後 100 日の時点での CD4 および CD8 リンパ球数、CD4/CD8 比、血中グロブリンレベル(IgG、IgA、IgM 濃度)を評価する。

4) 統計学的考察

4-1. 目標症例数の設定根拠

現在の成人臍帯血移植における移植後 42 日時点での好中球生着率は 0.76 である。したがって、帰無仮説を「本治療法における移植後 42 日時点での好中球生着率は 0.76 である」とし、対立仮説を「本治療法における移植後 42 日時点での好中球生着率は 0.95 である」とする。Brookmeyer-Crowley の方法に基づいて帰無仮説を片側有意水準 0.05、検出力 80%で棄却するために必要な解析対象症例数は 15 例以上

である。したがって、目標症例数は解析対象症例 15 例とした。

4-2). 主要エンドポイントの解析

a) 移植後 100 日(Day100)までの Grade3 以上の有害事象の発現数及び頻度

移植後 100 日までの有害事象の種類、Grade、発現頻度、及び有害事象発現までの期間等についてそれぞれ集計を行う。

b) 好中球生着日数

Kaplan-Meier 法により生着日数曲線を推定し、生着日数の中央値、移植後 42 日生着率とその 95%信頼区間を推定する。また、帰無仮説「好中球生着率が 0.76 である」に対して有意水準 0.05 の Brookmeyer-Crowley の検定を行う。

4-3) 副次エンドポイントの解析

a) 血小板生着日数

Kaplan-Meier 法により血小板生着日数曲線を推定し、各々の生着日数の中央値、臍帯血移植後 100 日生着率とその 95%信頼区間を推定する。

b) 赤血球生着日数

Kaplan-Meier 法により血小板生着日数曲線を推定し、各々の生着日数の中央値、臍帯血移植後 42 日生着率とその 95%信頼区間を推定する。

c) 総細胞数・CD34 陽性細胞数の増幅率

培養 4 日目、7 日目、10 日目、12 日目の総細胞・CD34 陽性細胞増幅率の中央値とその 95%信頼区間を算出する。さらに、総細胞数・CD34 陽性細胞数の増幅率と好中

球・血小板生着日数の Spearman の順位相関係数を算出する。このとき、CD34 陽性細胞数については臍帯血移植と増幅臍帯血移植に層別する。

d). 輸注総細胞数

輸注総細胞数の平均値と 95%信頼区間を推定する。さらに、輸注総細胞数と好中球・血小板生着日数の Spearman の順位相関係数を算出する。

e). 培養移植細胞幹細胞マーカー

各培養移植細胞幹細胞マーカーの個数の平均値と 95%信頼区間を推定する。さらに、培養移植細胞幹細胞マーカーの個数と好中球・血小板生着日数の Spearman の順位相関係数を算出する。

f) 培養移植細胞コロニー形成細胞数

各培養移植細胞コロニー形成細胞数の平均値と 95%信頼区間を推定する。さらに、各培養移植細胞コロニー形成細胞数と好中球・血小板生着日数の Spearman の順位相関係数を算出する。

g). 全生存期間

Kaplan-Meier 法により生存時間曲線を推定し、臍帯血移植後 1 年生存率とその 95%信頼区間を推定する。

h). 無再発生存期間

Kaplan-Meier 法により生存時間曲線を推定し、臍帯血移植後 1 年無再発生存率とその 95%信頼区間を推定する。再発とは血液学的再発をいい、末梢血血液検査、骨髄検査にて芽球が 5%以上出現した状態をいう。

i). 治療完遂の有無

治療完遂割合とその 95%信頼区間を推定

する。

j). 移植関連合併症死の頻度(移植後 100 日以内)

臍帯血移植後 100 日時点での移植関連合併症死の頻度を集計する。

k). 移植後 100 日時点での免疫学的回復能

臍帯血移植後 100 日時点での各血球数の平均値及び 95%信頼区間を算出する。

5) 説明・同意文書の作成と改訂

説明・同意文書および同意撤回文書は試験責任医師が作成する。ただし、主任研究者が見本として作成した「説明・同意文書」「同意撤回書」を修正して用いてもよい。また、作成した説明・同意文書は試験開始前に所属する医療機関の倫理審査委員会に提出し、その承認を得る。

説明文書には、少なくとも以下の事項が含まれていなければならない。ただし、被験者を意図的に誘導するような記載をしてはならない。

1) 試験が研究を伴うこと

2) 試験の目的

3) 試験の方法

4) 被験者の試験への参加予定期間

5) 試験に参加する予定の被験者数

6) 予期される臨床上の利益および危険性又は不便

7) 患者を被験者にする場合には、当該患者に対する他の治療方法の有無およびその治療方法に関して予想される重要な利益および危険性

8) 試験に関連する健康被害が発生した場

合に被験者が受けることのできる補償および治療

9) 試験への参加は被験者の自由意思によるものであり、被験者又はその代諾者は、被験者

の試験への参加を随時拒否又は撤回することができること。また、拒否・撤回によって

被験者が不利な扱いを受けたり、試験に参加しない場合に受けるべき利益を失ったりす

ることはないこと。

10) 試験への参加の継続について被験者又はその代諾者の意思に影響を与える可能性のあ

る情報が得られた場合には速やかに被験者又はその代諾者に伝えられること。

11) 試験への参加を中止させる場合の条件又は理由

12) モニタリングまたは監査担当者、倫理審査委員会および規制当局が原医療記録を閲覧で

きること。その際、被験者の秘密は保全されること。また、同意文書に被験者又はその

代諾者が記名捺印又は署名することによって閲覧を認めたことになること。

13) 試験の結果が公表される場合であっても、被験者の秘密は保全されること。

14) 被験者が費用負担する場合にはその内容

15) 被験者に金銭等が支払われる場合にはその内容

16) 試験責任医師又は試験分担医師の氏名、職名、連絡先

17) 被験者が試験および被験者の権利に関してさらに情報が欲しい場合又は試験に関連す

る健康被害が生じた場合に照会すべき又は連絡をとるべき実施医療機関の相談窓口

18) 被験者が守るべき事項

19) 当該臨床試験の成果により特許権等が生み出される可能性があることおよび特許権等

が生み出された場合の帰属先

20) 当該臨床試験に係る資金源、起こりうる利害の衝突および研究者等の関連組織との関り

21) 説明文書作成日、版

同意文書には、以下の事項を含まなければならない。

1) 臨床試験名

2) 説明文書作成日、版

3) 説明日、試験責任/分担医師の記名捺印もしくは署名欄

4) 同意日、被験者の記名捺印もしくは署名欄

5) 説明の内容を理解し、試験に参加することに同意する旨の記述

6) 実施医療機関名

同意撤回文書には、以下の事項を含まなければならない。

1) 臨床試験名

- 2) 試験責任医師または試験分担医師の記名捺印もしくは署名欄
- 3) 同意撤回日、被験者の記名捺印もしくは署名欄
- 4) 試験参加への同意を撤回する旨の記述
- 5) 実施医療機関名

試験開始後に試験責任医師が被験者の同意に関連する新たな知見を得、説明・同意文書の改訂が必要と判断した場合には、それを改訂する。被験者の同意に関連する新たな知見とは、例えば当該治療法等に関連する新たな有害事象の情報、あるいは当該疾患に関わる新治療法等の開発に関する情報などを指す。なお、改訂の内容を重大と判断する場合は所属する医療機関の倫理審査委員会に提出し、その承認を得る。

D. 結論

以上臨床プロトコルの概要を示した。臨床研究に必要な書類として、臨床研究実施計画書、同意説明文書、有害事象共通用語基準 v3.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版 (2004 年 10 月 27 日)、使用薬剤情報、症例報告書(CRF), *ex vivo* 増幅臍帯血の品質及び安全性に関する資料概要、製造管理基準書、品質管理基準書、製造衛生管理基準書、製造標準書(品名: *ex vivo* 増幅臍帯血)を作成し、平成 17 年 3 月 17 日に先端医療センター再生医療審査会(倫理委員会)で承

認された。

E. 健康危惧情報

特になし

F. 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 2004; 36: 48-51

(2)伊藤仁也 移植後免疫療法の多様化—活性化リンパ球輸注療法— 今日の移植17(1) 2004, p89-98

(3).伊藤 仁也 活性化T細胞の造血細胞移植への臨床応用 血液成分治療 医薬ジャーナル社 2004, p145-158(分担執筆)

2. 学会発表

(1). 伊藤 仁也、中畑 龍俊 造血幹細胞の体外増幅の基盤整備; 平成15年度厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業 合同公開シンポジウム シンポジウム 2004. 2. 28 東京

(2) 伊藤 仁也 造血幹細胞を用いた再生医療のための基盤整備; 第107回日本小児血液学会総合シンポジウム; 2004. 4. 9 岡山

(3) 伊藤 仁也 臍帯血造血幹細胞の体外増幅; 第27回日本造血細胞移植学会 シンポジウム 2004. 12. 16 岡山

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用研究事業）

分担研究報告書

6. 造血幹細胞の自己複製能の機序解明に関する研究

6-1 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

昨年度我々は、ヒト造血幹細胞を体外にて効率良くかつ安全に増幅させる新たな試みとして、造血細胞の増殖、分化に重要な HOX 転写因子群の活性を操作しうる HOX タンパクの decoy ペプチドを合成し、decoy ペプチドが HOX/PBX1 複合体の活性を変化させることにより、ヒト臍帯血由来造血幹細胞の自己複製を亢進させ得ることを明らかにした。

本年度は、同様の手法を用いて 1. decoy ペプチド導入細胞の骨髄再構築能、2. 系統特異的血球産生を誘導するシステム開発、3. HOX 転写因子群の下流に位置する自己複製因子の同定、4. 細胞透過型の改良 decoy ペプチドの合成についての検討を行った。

その結果、decoy ペプチド導入細胞は自己複製能、多分化能を有していること、また二次移植まで可能であり、長期間にわたり骨髄再構築能を有していること、decoy ペプチド導入により至適培養条件下でより効率良く巨核球前駆細胞への分化が誘導可能であること、decoy ペプチド導入により様々な既知の細胞内シグナル伝達経路の活性が変化していること、さらに decoy ペプチド導入後、ある濃度までは造血幹細胞自己複製を亢進させるが、高濃度導入により造血幹細胞に細胞死が誘導されることが明らかとなった。

以上の結果、合成ペプチド導入法は造血幹細胞の新たな体外増幅法として安全で有効な方法であるだけでなく、系統特異的な細胞への分化誘導法として、また転写因子による細胞の増殖、分化、死の制御機構の解明の手法として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は、ヒト造血幹細胞の新たな体外増幅方法として、造血細胞の増殖、分化に重要な HOX 転写因子群の活性を操作しうる合成ペプチドを作成、ヒト臍帯血由来造血幹細胞に導入することにより、その自己複製能及び多分化能に及ぼす効果及び安全性について検討を行っている。昨年度までに、我々の合成した HOX タンパクの decoy ペプチドは、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、造血幹細胞の自己複製を亢進させることを報告してきた。

本年度は、本法の有効性、安全性について

1. 合成ペプチド導入細胞の骨髄再構築能の検討を引き続き行うと共に、その応用として、
2. 系統特異的血球産生を誘導するシステム開発
3. HOX 転写因子群の下流に位置する自己複製因子の同定
4. 細胞透過型の改良 decoy ペプチドの合成

についての検討を行った。

B. 研究方法

1. 臍帯血より磁気ビーズ法にて 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。

2. 造血幹細胞を至適サイトカイン存在下無血清培地で 7 日間培養した細胞を NOD/SCID マウスに移植し、末梢血、骨髄におけるヒトキメリズムを測定した。また移植後 12 週のマウス骨髄を用いて二次移植を行い、骨髄におけるヒトキメリズムを測定した。
3. 造血幹細胞を至適サイトカイン存在下無血清培地で培養後、巨核球分化に関し、形態及び表面形質について解析した。
4. 市販の CD34 陽性造血幹細胞に、decoy ペプチド(DP)及び control ペプチド(CP)各々を導入、1 日後十分な導入が得られた分画を FACS Vantage によりソーティングし、total RNA を採取した。DNA chip には Intelligene DNA チップ (TaKaRa バイオ社)を用い、16,600 遺伝子の発現変化を比較解析した。

(倫理面の配慮)

研究に用いた臍帯血は、インフォームドコンセント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が済んでいるものを用いた。

C. 研究結果

1. 合成ペプチド導入細胞の骨髄再構築能について

DP 導入細胞及び CP 導入細胞を SCF, Flt-3 ligand, TPO, IL-6, 及び可溶性 IL-6 レセプター添加無血清培地にて 7 日間培養し、致死量の放射線照射した NOD/SCID マウスに移植した結果、末梢血、骨髄いずれにおいても DP 導入細胞移植群では、CP 導入細胞移植群に比しより早期から、また有意なキメラ率の増加が移植後 8 週までに認められた。移植後 12 週以降 CP 導入細胞移植群では骨髄でのヒト細胞キメラ率が減少するのに対し、DP 導入細胞移植群ではその後も維持され、移植後 1 年にわたりヒト細胞の生着が確認されたマウスも観察された。この観察期間中レシピエントマウスにおいて主要臓器での腫瘍形成は認められなかった。DP 導入細胞移植後 12 週のマウスにおける骨髄ヒト細胞の表面形質を解析した結果、多くが CD33 陽性、及び CD19 陽性細胞で占められており、CD41、GPA 陽性細胞もわずかに認められ、移植細胞が多分化能を有していることが示唆された。また CD34 陽性細胞も検出され、その多くは CD38 陽性、HLA-DR 陽性であったが、一部これらマーカー陰性の細胞が認められた。次に、移植後 12 週のマウス骨髄を用いた NOD/SCID マウスへの二次移植を試みた。マウスあたり総細胞数 0.5×10^7 個 (CD34⁺細胞: 約 4×10^5 個) を初回と同様のレジメンで移植した結果、移植後 6 週目に効率

は低いもののヒト細胞の生着が認められたことから、DP 導入細胞は、マウス生体内で自己複製することにより、長期間にわたり骨髄を再構築しうる能力を維持していると推測された。

2. 系統特異的血球産生を誘導するシステム開発

増幅させた造血幹細胞から系統特異的な血球産生を誘導するシステム開発のための基礎的検討として、至適サイトカイン下にて造血幹細胞を巨核球系細胞へ分化させる系の構築を試みた。SCF, FL, TPO 添加 QBSF-60 培地にてヒト臍帯血由来造血幹細胞を 7 日間培養した場合、約 10% が CD41, CD61 陽性の巨核球系細胞の表面形質を呈し、これらの細胞は 2N から 32N までの多倍体化の傾向を示した。これまでの解析の結果、HOX タンパクの decoy ペプチドは、造血幹細胞の骨髄球系細胞への分化を抑制し、巨赤芽球系細胞への分化を若干促進する効果を有していることが示唆されている。そこで DP 導入細胞、及び CP 導入細胞を上記条件で培養し、細胞数、表面形質、及び形態変化について解析を行った。7 日間の培養期間中、両者の生細胞数に明らかな変化は認められず、約 30 倍の増幅が得られた。一方、CD41, 61 陽性を示す巨核球系細胞の割合が、DP 導入細胞では、CP 導入細胞と比較して約 3 倍、30% 程度認められ、形態学的にも胞体が大きく、多核の細胞が認められ、各成熟段階の巨核球系細胞が認められた。胞体には顆粒の存在も認

められ、正常な巨核球に近い形態を示してはいたが、FACsを用いても培養液中には浮遊した血小板は確認できなかった。

以上の結果より、至適サイトカイン存在下で臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞を比較的効率良く巨核球系細胞へ分化誘導可能であり、decoy ペプチドを導入することで、より効率良く巨核球系細胞へ分化誘導出来る可能性が示唆されたが、最終分化である血小板産生のためには、新たな外的、内的因子操作法が必要であると推測された。

3. HOX 転写因子群の下流に位置する自己複製因子の同定

これまでに我々は、HOXB4 や Notch によるマウス造血幹細胞の自己複製が、主として c-Myc、E2F1 などの細胞周期制御因子により制御されていることを明らかにしてきたが、ヒト造血幹細胞における自己複製機序については未だ不明な点が多い。そこで DNA マイクロアレイを用いた、HOX 転写因子群の自己複製に関与する標的遺伝子の検討を行った。

DNA CHIP には Takara Bio 社の IntelliGeneHS Human Expression CHIP を用い、解析には Affymetrix 社の Array Scanner、Bio Discovery 社の発現データ解析ソフトを用いた。

CP 導入群を cy 3 標識、DP 導入群を cy 5 標識し、発現強度の比較を行った。遺伝子発現プロファイリングの結果、両群で 7,501/16,600 遺伝子の十分な発現が認

められた。DP 導入群では 101/7,501 遺伝子の発現が CP 導入群と比較して有意に増加しており、73/7,501 遺伝子の発現が有意に低下していた。これらの遺伝子には、PI3K、MAPK、BMP、Notch シグナルにおけるシグナル伝達分子、及び細胞周期(S期)制御因子が含まれていた。

以上の結果から、HOX 転写因子群による造血幹細胞の自己複製には、これら様々な因子が関与していることが推測された。

4. 細胞透過型の改良 decoy ペプチドの合成

より効率よく増幅させることを目的として、細胞透過型の decoy ペプチドを合成し、これまで問題となっていたペプチド導入時の細胞障害を軽減することを試みた。従来の decoy ペプチド内に 11 個の arginine を挿入することにより、培地に添加するだけでヒト臍帯血由来造血幹細胞にほぼ 100%のペプチドの導入が可能となり、さらに導入後の viability もほぼ 100%を維持することが可能となった。5'側を蛍光標識したペプチドを 1.0 μ M 添加した場合、蛍光強度の推移から、添加後 24 時間で細胞内での発現量が最大となり、5 日間その発現が維持されていたが、添加 24 時間後に細胞を洗浄し培地からペプチドを除去した場合、速やかにその発現は減少し、造血幹細胞内での半減期は約 24 時間と推測された。培地に添加するペプチドの濃度を 0.1-5.0 μ M まで変化さ

せた場合、蛍光強度もほぼ近似的に変化し、また細胞内での局在については核内での集積が確認された。造血幹細胞に decoy ペプチド(11R-DP)及びコントロールペプチド(11R-CP)を 0.1-5.0 μ M の範囲で導入し、サイトカイン添加無血清培地にて 7 日間培養した場合の総細胞増幅率、CD34 陽性細胞増幅率、及び colony 形成能について検討を行なった結果、0.1-1.0 μ M の範囲では造血幹細胞の増殖への影響は認められず、各々約 12 倍の増幅が得られたが、CD34 陽性細胞増幅率、及び CFU-Mix 形成細胞数は 11R-DP 導入量依存的に増加し、1.0 μ M 添加した場合にコントロールと比較して各々約 2 倍の増幅が得られた。一方 1.0 μ M 以上添加した場合、11R-DP 導入量依存的な増殖抑制が認められ、5.0 μ M 添加した場合には多くの細胞に apoptosis が誘導された。

D. 考察及び今後の展望

本分担研究の結果から、合成ペプチド導入法は造血幹細胞の新たな体外増幅法として安全で有効な方法であるだけでなく、系統特異的な細胞への分化誘導法として、また転写因子による細胞の増殖、分化、死の制御機構の解明の手法として有用である可能性が示唆された。今後は、遺伝子発現プロファイリングにおいて変化の認められた遺伝子群の発現を RT-PCR 法等で検証すること、及び遺伝子を導入した際の造血幹細胞の特性を検討

することにより、HOX 転写因子群の下流に位置する自己複製因子の同定を進めていく必要があると考えられた。また改良した 11R-DP が造血幹細胞の増殖及び細胞死に対する濃度依存性についての分子機序を詳細に解析すること、及びヒト細胞を生着させたマウスに細胞透過型 decoy ペプチドを直接投与することによる造血幹細胞の自己複製能に及ぼす効果について検討を行なうなどの必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Sugahara H, Mizuki M, Shibayama H, Ishiko E, Ishiko J, Nakajima K, Kanakura Y. Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* 279:24986-24993, 2004

Nakata S, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Satoh Y, Ishikawa J, Era T, Kanakura Y. NF- κ B Family Proteins Participate in Multiple Steps of Hematopoiesis through Elimination of Reactive Oxygen Species. *J Biol Chem* 279:55578-55586, 2004

Nojima J, Kuratsune H, Suchisa E, Kitani T, Iwatani Y, Kanakura Y. Strong correlation between the prevalence of cerebral infarction and the presence of anti-cardiolipin/beta2-glycoprotein I and anti-phosphatidylserine /prothrombin antibodies--Co-existence of these antibodies enhances ADP-induced platelet activation in vitro. *Thromb Haemost* 91:967-976, 2004

Sugahara H, Mizuki M, Matsumae S,

Nabetani Y, Kikuchi M, Kanakura Y. Footwear exchange has no influence on the incidence of febrile neutropenia in patients undergoing chemotherapy for hematologic malignancies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:51-54, 2004

Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, Decastro CM, Hall S, Kanamaru A, Sullivan KM, Mizoguchi H, Omine M, Kinoshita T, Rosse WF. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine(Baltimore)* 83:193-207, 2004

Hayashi S, Ichihara K, Kanakura Y, Iwatani Y. A new quality control method based on a moving average of 'latent reference values' selected from patients' daily test results. *Rinsho Byori* 52:204-211, 2004

Dai W, Ezoe S, Fujimoto M, Kimura A, Saito Y, Nagai H, Tachibana I, Matsumura I, Tanaka T, Kanegane H, Miyawaki T, Emi M, Kanakura Y, Kawase I, Naka T, Kishimoto T. Suppressor of cytokine signalling-1 gene silencing in acute myeloid leukaemia and human haematopoietic cell lines. *Br J Haematol* 126:726-735, 2004

Ishiko E, Matsumura I, Ezoe S, Gale K, Ishiko J, Satoh Y, Tanaka H, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Enver T, and Kanakura Y. Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J. Biol.Chem.* 280(6):4929-39, 2005.

Tanaka H, Matsumura I, and Kanakura Y. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *J. Biol.Sci.* 2005; 5(1): 50-60.

金倉 讓. 特集 クロマチン構造. 分子細胞治療 3:1-2, 2004

金倉 讓. 発作性夜間血色素尿症の病態. *The Word on Hematology* 2:2-3, 2004

金倉 讓(司会), DREW J. WINSTON, 吉田 稔, 福田隆浩, 一戸辰夫, 稲本賢弘, 太田健介, 小川誠司, 亀岡淳一, 菅原浩之, 田中祐次, 千葉 滋, 寺倉精一郎, 長藤宏司, 中前博久, 廣川 誠, 宮腰重三郎, 山崎 聡, 湯池晃一郎. 《ASH 座談

会》造血幹細胞移植後の真菌感染症予防. *The Japanese Journal of Antibiotics* 57:421-424, 2004

松村 到, 金倉 讓. 造血機構の制御. *内科診療Q & A* 38号:182-185, 2004

松村 到, 金倉 讓. ATL/L の分子標的療法. *総合臨床* 53:2071-2074, 2004

松村 到, 金倉 讓. 造血幹細胞とは. みんなに役立つ白血病の基礎と臨床 (大野竜三, 宮脇修一編), 医薬ジャーナル社, 大阪, 2004, pp22-28

松村 到, 金倉 讓. 血小板増多症. 血小板生物学 (池田康男, 丸山征郎編), Medical Review 社, 東京, 2004, pp521-528

水木満佐央, 金倉 讓. c-Kit と Gastrointestinal stromal tumor(GIST). *血液フロンティア* 14 S-1: 85-92, 2004

水木満佐央, 石河 純, 金倉 讓. c-Kit と Flt 3 のシグナル伝達を標的とした治療. *現代医療* 36:55-61(1381-1387), 2004

柴山浩彦, 金倉 讓. ヘアリーセル白血病(HCL)の病態・診断・治療. *血液フロンティア* 14:713-721, 2004

柴山浩彦, 金倉 讓. プリン誘導体によるヘアリーセル白血病治療. *血液・腫瘍科* 49:341-347, 2004

柴山浩彦, 金倉 讓. 造血細胞の発生と抗アポトーシス分子 Anamorsin. *臨床免疫* 42:588-591, 2004

川崎 輝, 金倉 讓. STAT3 と白血病. *血液・腫瘍科* 48:318-323, 2004

澤 芳樹, 中村憲正, 金倉 讓. トランスレーショナル・リサーチ入門 Chapter3-4. *バイオベンチャー* 4:72-73, 2004

正岡 徹, 林 邦雄, 長谷川稔, 陰山克, 椿尾忠博, 富永信彦, 森田隆子, 富山佳昭, 中川雅史, 田寫政郎, 高橋輝子, 玉置俊治, 金丸昭久, 長谷川廣文, 金倉讓, 菅原浩之, 片桐修一, 衣斐義高, 城崎潔, 太田健介, 日野雅之, 山根孝久, 阪神 FN-CZOP 研究会. *Cefozopran の febrile*

neutropenia 治療への予備的検討. 日本化学療法学会雑誌 52:219-222, 2004

村上博和, 半田 寛, 今井浩三, 金倉 譲, 小阪昌明, 澤村守夫, 島崎千尋, 鈴木憲史, 石井昭広, 高木敏之, 谷脇雅史, 戸川 敦, 畑 裕之, 若山聡雄, 高月 清. 日本骨髄腫研究会参加施設におけるサリドマイド治療の現状と成績. 臨床血液 45:468-472, 2004

2. 学会発表

Shiraga M, Miyata S, Kamae T, Kato H, Kiyoi T, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y
Unstable thrombus formation by platelets from a P2Y12-deficient patient under flow condition
The Japan-UK Platelet Conference (2004.9.2-3, Oxford, UK)

Kato H, Honda S, Yoshida H, Kashiwagi H, Kosugi S, Shiraga M, Kiyoi T, Honma N, Kurata Y, Kanakura Y, Tomiyama Y
SHPS-1 negatively regulates integrin α IIb β 3 function by disturbing downstream pathway of FAK through CD47
The Japan-UK Platelet Conference (2004.9.2-3, Oxford, UK)

Kashiwagi H, Shiraga M, Kato H, Kamae T, Yamamoto N, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y
Negative regulation of platelet function by a secreted cell repulsive protein, semaphorin 3A
The American Society of Hematology 46th Annual meeting (2004.12.4-7, San Diego, USA)

Shiraga M, Miyata S, Kamae T, Kato H, Kiyoi T, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y
Impaired platelet function in a P2Y12-deficient patient caused by a mutation in the translation initiation codon
The American Society of Hematology 46th Annual meeting (2004.12.4-7, San Diego, USA)

Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Honda S, Miyata S, Yamamoto J, Kurata Y, Funahashi T, Shimomura I, Tomiyama Y, Kanakura Y.
Enhanced platelet aggregation and thrombogenic tendency in adiponectin-deficient mice
The American Society of Hematology 46th Annual meeting (2004.12.4-7, San Diego, USA)

Nakata S, Matsumura I, Tanaka H, Satoh Y, Era T, Kanakura Y.
NF- κ B family proteins participate in multiple steps of hematopoiesis through elimination of reactive oxygen species (ROS)
The American Society of Hematology 46th Annual meeting (2004.12.4-7, San Diego, USA)

田中宏和, 松村 到, 伊藤仁也, 中畑龍俊, 金倉 譲
合成ペプチド導入による臍帯血造血幹細胞の体外増幅法の開発
第2回幹細胞シンポジウム (2004.4.26-27, 東京)

池亀和博, 川上 学, 村上雅樹, 藤岡龍哉, 升田知機, 谷口裕紀, 西田純幸, 高松漂太, 吉原 哲, 白方俊章, 金 義浩, 保仙直毅, 玉置広哉, 相馬俊裕, 坪井昭博, 尾路祐介, 岡 芳弘, 金倉 譲, 小川啓恭
未処理 haploidentical stem cell transplantation における検討
第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004.9.17-19, 京都)

柏木浩和, 白鹿正通, 本田繁則, 加藤恒, 田所誠司, 釜江 剛, 倉田義之, 金倉 譲, 富山佳昭
巨核球/血小板系における WASP family 蛋白、WAVEs の発現および局在部位に関する検討
第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004.9.17-19, 京都)

加藤 恒, 吉田 均, 柏木浩和, 白鹿正通, 田所誠司, 釜江 剛, 本田繁則, 倉田義之, 金倉 譲, 富山佳昭

SHPS-1のCD47を介した血小板機能抑制作用の検討
第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004.9.17-19, 京都)

佐藤友亮, 松村 到, 田中宏和, 水木満佐央, 金倉 譲
造血幹細胞の自己複製におけるc-Mycの役割
第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004.9.17-19, 京都)

中田壮一, 松村 到, 田中宏和, 柴山浩彦, 江良沢実, 金倉 譲
血液細胞の発生過程におけるNF- κ Bファミリー分子の機能解析
第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004.9.17-19, 京都)

石河江里, 松村 到, 江副幸子, 菅原浩之, 金倉 譲
Notchの標的分子HES1によるGATA-1の活性制御についての解析
第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004.9.17-19, 京都)

一井倫子, 前田哲生, 山本直子, 井上慎也, 山田昌秀, 松永一美, 吉田 均, 石川 淳, 富山佳昭, 金倉 譲
フルダラビンを主体とした前処置に低用量TBI(3Gy)を加えたRISTを施行した6症例の検討
第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004.9.17-19, 京都)

横田貴史, 織谷健司, 富山佳昭, 船橋徹, 下村伊一郎, 金倉 譲
造血組織におけるadiponectinの役割
第25回日本肥満学会総会 (2004.9.29-30, 大阪)

金倉 譲
血球分化・腫瘍化と抗アポトーシス分子Anamorsin
第63回日本癌学会総会 (2004.9.29-10.1, 福岡)

柏木浩和, 富山佳昭, 白鹿正通, 加藤恒, 本田繁則, 田所誠司, 釜江 剛, 山本直子, 倉田義之, 金倉 譲

Semaphorin 3Aによる血小板機能抑制
第27回日本血栓止血学会学術集会 (2004.11.18-20, 奈良)

吉田 均, 石川 淳, 前田哲生, 白鹿正通, 松永一美, 松村 到, 富山佳昭, 金倉 譲
末梢血Tリンパ球におけるCD27およびCD27リガンド(CD70)の発現と同種骨髄移植後の急性GVHDとの関連性
第27回日本造血細胞移植学会総会 (2004.12.16-17, 岡山)

福島健太郎, 前田哲生, 白鹿正通, 小杉智, 吉田 均, 柏木浩和, 石川 淳, 富山佳昭, 金倉 譲
造血幹細胞移植後呼吸器合併症における精密肺機能検査の意義
第27回日本造血細胞移植学会総会 (2004.12.16-17, 岡山)

初山麻子, 伊藤仁也, 田中宏和, 中畑龍俊

臍帯血造血幹細胞の増幅培養系における完全無血清培地の性能評価
第27回日本造血細胞移植学会総会 (2004.12.16-17, 岡山)

高田のぞみ, 伊藤仁也, 田中宏和, 中畑龍俊

臍帯血造血幹・前駆細胞のex vivo増幅培養日数の検討
第27回日本造血細胞移植学会総会 (2004.12.16-17, 岡山)

山本正樹, 木村真聡, 高井恵美, 田所誠司, 菅原浩之, 金倉 譲
巨大腹部腫瘍として発症した後腹膜パラガングリオーマの1例
第175回日本内科学会近畿地方会 (2004.12.18, 京都)

第22回大阪血液研究会 (2004.6.4, 大阪)
石河江里, 松村 到, 金倉 譲

Notch による造血細胞の未分化能の維持機構についての解析
第 22 回大阪血液研究会 (2004.6.4, 大阪)

なし

松村梨紗, 前田哲生, 福島健太郎, 藤田二郎, 田所誠司, 吉田 均, 石川 淳, 富山佳昭, 金倉 譲
治療抵抗性バーキットリンパ腫に対して、2 座不一致血縁者間骨髄移植を施行した 1 例
第 1 回 Osaka Clinical Hematology Conference (2004.9.25, 大阪)

中田壮一, 田所誠司, 前田哲生, 金倉 譲, 倉田義之, 濱野美奈, 山口允洋
Evans 症候群を合併した DLBCL の一例
第 28 回北摂血液疾患談話会 (2004.10.16, 大阪)

金倉 譲
造血器腫瘍の分子標的療法
第 54 回兵庫県白血病談話会 (2004.10.23, 兵庫)

石河 純, 金倉 譲
キナーゼ領域変異 FLT3 の恒常的活性化機構の解析
第 8 回キリン血液疾患セミナー (2004.11.13, 東京)

金倉 譲
造血シグナルと分子標的治療
第 20 回 Wako ワークショップ (2004.11.24, 大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願: 転写因子操作による造血幹細胞の体外増幅法の開発 (PCT/JP2004/017290)

2. 実用新案登録

なし

3. その他