

200400239 B

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事業

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

平成14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 中畑龍俊

平成17(2005)年3月

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事業

Health and Labour Sciences Research Grants, Translational research, Ministry of Health, Labour and Welfare

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

平成14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 中畑龍俊

平成17(2005)年3月

## はじめに

本報告書は厚生科学研究費補助金「基礎研究成果の臨床研究推進事業」の1つである「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」研究班における平成14年度から平成16年度の研究成果をまとめた総合研究報告書である。トランスレーショナルリサーチとは文字通り基礎研究成果を臨床応用するための架け橋にあたる研究であり、本研究においては、基礎研究で得られた造血幹細胞をサイトカインを用いて ex vivo で増幅する成果を実際の臍帯血移植に応用するまでの基盤整備を行うことを目的に本研究チームを発足した。本研究は臍帯血を用いた再生医療・細胞治療に分類され、臨床応用にあたっては、整備すべき問題も山積みされているのが現状である。ちょうどこの研究班の発足と同時に薬事法が改正され、細胞治療製剤の定義が明らかになり、細胞を加工した製剤の臨床研究は薬事法に規定されることになった。また幹細胞研究のあり方に関しても厚生科学審議会がガイドライン作りが開始された。我々の研究はこういった社会的ニーズを受け、細胞治療をいかに安全に臨床応用するか具体的に示す先駆的研究に位置づけられると考えられ、この3年間で一定の成果をあげられたと確信する。

平成 14～16 年度厚生科学研究「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」研究班

研究組織

	氏名	所属
主任研究者	中畑 龍俊	先端医療センター再生医療研究部
分担研究者	前川 平	京都大学医学部付属病院輸血部
	金倉 譲	大阪大学大学院医学系研究科C9分子病態内科
	平家 俊男	京都大学大学院医学研究科発達小児科
	清水 則夫	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス感染学分野
	村上 雅義	先端医療センター臨床研究支援部
	永井 謙一	先端医療センター診療管理部
	伊藤 仁也	先端医療センター再生医療研究部
	田中 宏和	先端医療センター再生医療研究部
	逢坂 敦	キリンビール株式会社
	佐藤 隆	日本ベクトン・ディッキンソン(株)
	白数 昭雄	ニプロ株式会社
	西川 茂道	和研薬株式会社
	桜田 洋	ヘモネティクスジャパン株式会社
	上遠野 延行	株式会社三菱化学ビーシーエル
研究協力者	平松 英文	京都大学大学院医学研究科発達小児科
	松村 到	大阪大学大学院医学系研究科C9分子病態内科
	鈴木 秀文	キリンビール株式会社
	小林 典孝	キリンビール株式会社
(平成 14 年度)	河合 弘行	キリンビール株式会社
(平成 14 年度)	菅谷 真二	キリンビール株式会社
	槻木 裕志	ニプロ株式会社
	開原 千春	日本ベクトン・ディッキンソン(株)
	廣瀬 弥保	日本ベクトン・ディッキンソン(株)
	田中 聡	日本ベクトン・ディッキンソン(株)
	松崎 正晴	日本ベクトン・ディッキンソン(株)
(平成 15 年度)	神谷 雅之	ヘモネティクスジャパン株式会社
	相澤 猛	ヘモネティクスジャパン株式会社
	井田 卓見	ヘモネティクスジャパン株式会社
	芦原 義久	株式会社三菱化学ビーシーエル
	松本 浩	株式会社三菱化学ビーシーエル
	島田 康司	株式会社三菱化学ビーシーエル
	鹿村 真之	先端医療センター再生医療研究部
	小林 健一郎	先端医療センター再生医療研究部
	橋本 尚子	先端医療センター再生医療研究部

研究協力者	氏名	所属
	初山 麻子	先端医療センター再生医療研究部
	多田 典子	先端医療センター再生医療研究部
	丸山 京子	先端医療センター再生医療研究部
	高田 のぞみ	先端医療センター再生医療研究部

## 目 次

I. 総合研究報告	1
中畑 龍俊	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
III. 実施計画書（急性骨髄白血病患者に対する同種臍帯血由来 ex vivo増幅CD34陽性細胞移植に関する臨床第I相／前期第II相試験）	31
IV. 代表的論文	111

# I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究）  
総合研究報告書

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  
主任研究者：中畑 龍俊  
(先端医療センター客員研究部長、京都大学発達小児科学教授)

**研究要旨**

臍帯血移植は血液悪性腫瘍患者の最適な病期に治療できることより、その需要は増し、2003年には非血縁者間骨髄移植とほぼ同数の移植がなされるようになってきた。また、そのうち75%は成人に行われるようになってきており、これに伴い新たな問題も明らかになってきた。採取できる細胞数が限られているため、生着不全、あるいは生着遅延は最大の問題点である。またこれに伴って難治性ウイルス感染症の頻度も高く、加藤らの集計では早期合併症死亡率の約40%は感染症によるものである。

我々はヒト臍帯血中に造血幹細胞が存在することを世界で初めての証明し (J Clin Invest 70:1324, 1982)、in vitroで測定しうる最も未分化な造血幹細胞の測定系の開発、ヒト造血幹細胞上のサイトカイン受容体の解析、サイトカインの作用機構の解析などを行い多くの基礎研究の成果を挙げてきた。さらに、SCF, FL, TPO, IL-6/可溶性IL-6リセプターを組み合わせたサイトカインにより、臍帯血中に含まれる造血幹細胞を自己複製能を保ちながら増殖させる方法を開発した。この培養法によりヒト造血幹細胞の自己複製能を最も評価しうるNOD/SCIDマウスの移植系において、増幅させない臍帯血と比較して4.3倍もヒト血球造血を再構築させることを証明した (J Clin Invest 105:1013, 2000)。この基礎技術を用いて数に限りある臍帯血の造血幹細胞を増幅することができれば臍帯血移植の合併症の頻度を減らし、治療成績を向上できると思われる。我々はこれらの基礎研究から得られた技術を臨床応用するために2002年から当厚生労働科学研究事業においてトランスレーショナルリサーチを行ってきた。無菌閉鎖系培養法の開発、培養の無血清化などのGood Tissue Practice (GTP)に準拠した培養法の開発や非臨床試験、前臨床試験としての動物を用いた安全性の検討、臨床効果の予測を行い、培養細胞の品質管理法を確立してきた。我々は現在の臍帯血バンクのシステムに則って臨床試験を行うために臍帯血バンクで保存された臍帯血を用いて実製造試験を行い、臍帯血中のCD34陽性細胞を20-30倍増幅させることに成功した。

本申請では、これら前臨床試験の成績をもとに臨床試験を行い、サイトカインで増幅した臍帯血CD34陽性細胞の造血再構築能力を評価したいと考えた。具体的には海外およびわが国で行われている臍帯血移植の成績から多変量解析によって導かれた生着および生存率で予後を改善させる因子であるCD34陽性細胞を $1.7 \times 10^5/\text{kg}$ 以上まで増幅させ、移植する臨床試験を行おうと計画した。

このような細胞治療の臨床試験を科学的な見地から評価する臨床プロトコルの作成、ヒトに使用する細胞治療製剤として品質の証明と安全で確実な製造法を確立させ、臨床試験により安全性を証明していく最終段階にある我々の研究テーマは当研究事業の目的に合致していると考えられる。また臍帯血移植では実現不可能とされていた臍帯血DLIの臨床応用は移植現場では待望されている技術であり、臨床応用したいと考えている。

我々は、これまで得られた成果を元にさらに細胞プロセッシングを体系的に整備し、培養機器の製品化、医療器具化などの実用化を目指し、本研究を推進させたいと考えている。



## 分担研究者

金倉 謙	大阪大学大学院医学系研究科C9分子病態内科
平家 俊雄	京都大学発達小児科学助教授
前川 平	京都大学医学部付属病院輸血部教授
伊藤 仁也	先端医療センター再生医療研究部主任研究員
田中 宏和	先端医療センター地域結集型事業特別研究員
村上 雅義	先端医療センター臨床研究支援部長
永井 謙一	先端医療センター診療管理部長
逢坂 敦	キリンビール株式会社医薬カンパニー主任研究員
佐藤 隆	日本ベクトン・ディッキンソン(株)BD バイオサイエンスカスタマーマネージャー
白数 昭雄	ニプロ株式会社第6研究開発部部長代行
西川 茂道	和研薬株式会社 R&D 部長
桜田 洋	ヘモネティクスジャパン株式会社開発室長
上遠野 延行	株式会社三菱化学ビーシーエル研究開発部長

### A. 研究目的

1) 臍帯血移植は白血病など血液悪性腫瘍の治療法としてドナーコーディネートの期間を要しないため、患者の病期に合わ

せた最適な時期に最適な治療を行える利点とGVHDの程度が軽いため、HLAの2座不一致まで移植が可能であることが明らかになり、その需要は高まり、現在では骨髄バンクからの非血縁者間骨髄移植と肩を並べるほどの移植数となってきている。しかし、その一方で、採取できる造血幹細胞に限りがあるため、現在小児や体重の軽い成人にしか適応がない。また生着不全率および生着までの期間が他の移植と比較して有意に長く、このため、感染症などの合併症の頻度も高いことが問題となっている。これらの問題点は臍帯血に含まれる造血幹細胞の数が少ないことによることが指摘されており、大規模な臍帯血移植の後方視的臨床試験においてWagnerらは、移植CD34陽性細胞数が $1.7 \times 10^5/\text{kg}$ で、Laughlinらは、 $1.2 \times 10^5/\text{kg}$ 以上移植された場合、生着率のみならず、生存率まで有意に改善されると報告している。我々は臍帯血中のCD34陽性細胞をサイトカインで増幅させ、体重の重い成人においてもCD34陽性細胞を $1.7 \times 10^5/\text{kg}$ 以上に体外増幅させ、増幅臍帯血移植の安全性の証明と生着率、生着期間の短縮効果の有無を確かめる目的で臨床試験を計画している。

2) GTP(Good Tissue Practice)に則った細胞治療製剤の製造法の確立、品質管理法の確立

再生医療企業が細胞治療製剤の確認申請を行うようになってきた。改正薬事法が施行されて細胞治療製剤の定義づけが

なされ、法的整備が進んではきたが、具体的な細胞プロセッシングや品質管理法のガイドラインは存在しないため、現場では情報が混乱しているのが現状である。品質管理に伴う非臨床試験においても細胞のがん化や体内動態など明らかにすることは難しい。我々はこのプロジェクトを通じてこれらの諸問題を具体的な試験系の確立を行うことにより、明確にしていきたいと考えている。また、培養液や培養装置に関しても現在、いわゆる基礎研究用試薬や装置を用いてヒト投与用の細胞を培養しているのが現状である。より安全でバリデートされた細胞プロセッシングを行うためにはこれら周辺機器や培養液の開発、製品化、医療用具化も急務であり、我々は研究チームにこれら開発が十分可能な企業も参画してもらい、産官学で開発を推し進めることを目的としている。

**【必要性と期待される成果】**

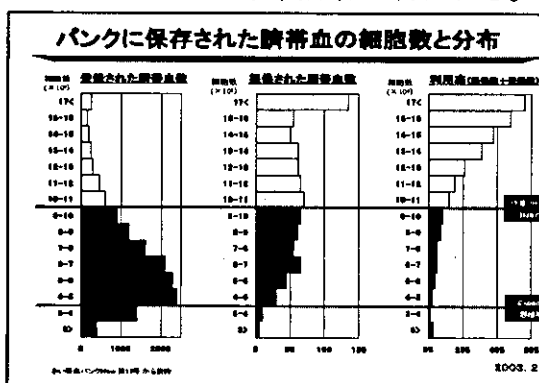
目的で述べたようにサイトカインで臍帯血CD34陽性細胞を増幅することにより、生着期間の短縮、生存率の改善感染症死亡率の減少が見込まれる。また現在臍帯血バンクネットワークから臍帯血の提供を受けるには臍帯血総細胞数が $2 \times 10^7/\text{kg}$ 以上HLA 4/6抗原以上が一致した場合のみ臍帯血移植を受けることができる。図に示したように現在臍帯血バンクに保存されている有核細胞数の分布は50kg以上の成人に対して移植できる量を満たして

いるものは下図に示す如く10%以下である。したがって大部分の臍帯血は利用されないまま保存された状況である。我々の方法を用いれば臍帯血CD34陽性細胞を有核細胞数の0.3%-0.5%と見積もっても増幅することにより全保存臍帯血の90%を有効利用できるようになる。

バンク事業での臍帯血保存コストの面からもHLAの検索に伴うドナープールの拡大の意味からしてもこの技術は有用であり、期待される。

臍帯血移植のもう一つの欠点は難治性感染症、再発に対してドナーリンパ球輸注(DLI)が行えないことである。我々の技術が臨床応用できれば臍帯血移植後も臍帯血バンクに品質管理用に保存されている少量の細胞を用いてDLIに必要なTリンパ球を数千倍に増幅し、DLIを行うことが可能になる。難治性ウイルス感染症の頻度が高い、臍帯血移植の欠点を補う標準的治療になりうることも考えられ、実用化が急務である。

また開発中のかびの発生源となる加湿用培養皿を排除し、取り違い防止用電磁ロック付のインキュベータや動物やヒト血清を用いない無血清培地の開発などは細胞プロセッシングをより安全に行うため、必要なものであり、製品化が待たれる。



## B. 研究方法

本研究を進めるにあたり以下の分担研究組織を組み研究にあたる。

### I. GMP に準拠した培養法の確立

平成 14 年 7 月に薬事法が改正され、細胞治療製剤が定義されるとともに GMP に準拠した製造を義務づけられた。この研究ではより安全な培養を行うため、無血清培養法の開発、培養原材料の検討、効果的な細胞融解法、分離法の検討、閉鎖系培養システムの構築などを開発する。

### II. Cell processing の基盤整備

医薬品 GMP においては、「薬局等構造設備規則」により製造を行う設備の規定などが詳細に規格化されている。これに対し、生物製剤においては、安全に細胞を加工するためのセルプロセッシングセンターの規格化はまだ行なわれていないのが現状である。本研究においては、科学的な観点からセルプロセッシングセンターでの培養操作に関する研究を行ない、安全な細胞製剤を作成する基準をつくることを目的にハード、ソフトの規格、検証を行なう。

### III. GMP に準拠した細胞製剤製造のためのデバイスの開発

細胞製剤製造において培養細胞を安全にしかもバリデーション、トレーサビリティの取れた状態で毎回規格どおりに培養を行うことは重要な課題である。これまで細胞製剤製造に特化したこれら培養デバイスはほとんど企業開発が行われていない。我々は閉鎖系システムとバリデ

ートできる機器開発を目指してこれら細胞治療製剤の製造に特化したデバイスの開発を行った。

### IV. 品質管理法の確立

体外増幅された臍帯血幹細胞の安全性のための品質管理基準を作成するとともに、増幅された臍帯血幹細胞の造血能力を評価することは重要な課題である。我々は、細胞の表面抗原、コロニー形成能、SCID マウスでの長期造血支持能などを総合的に評価する系を確立し、細菌などの混入を調べる安全性試験とともに効果の評価系システムを構築する。

### V. 新 GCP に準拠した臨床プロトコルの作成

細胞治療はオーダーメイド治療が中心となるため、効果および副作用の個体差が大きく、未だその評価を正確に行なう、臨床プロトコルの構築は研究途上であるといえる。これまでの海外での造血幹細胞の臨床研究を効果と安全性の観点から検証することに加え、分担研究で得られた品質管理のデータから安全で EBM を証明しうる臨床プロトコルを作成する。

### VI. 臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解明

造血幹細胞の性質は自己複製能と分化能の両方を兼ね備えるという特徴を持つ。これらの検証は造血幹細胞を増幅させることにおいては重要な要素である。我々はこれら内的因子である造血幹細胞の分化遺伝子やシグナル伝達機構を解析することにより、造血幹細胞の自己複製能、

分化能の機序を解明するとともにこれらを効率よく制御する方法を開発する。

## VII. 臍帯血 DLI に向けた取り組みと基盤整備

慢性骨髄性白血病においては、ドナーリンパ球輸注療法の治療成績は 80%以上の患者にて寛解に導入されると報告されている。また EB ウイルス感染症、CMV 感染症をはじめ、移植後免疫不全状態においてもこれらアロ細胞療法の有用性が示されている。

臍帯血移植においては、移植後免疫不全状態が同種骨髄移植と比較して長期化することが報告されており、これら重症ウイルス感染症の致死率も高い。しかし臍帯血移植においては、DLI は不可能である。我々は臍帯血移植後に残された少量のサンプルより、臍帯血の T cell を活性化させ、1000 倍以上に増幅する方法を開発した。活性化した臍帯血 T cell の特性を検証し、実用化を目指す。

### C. 研究結果

われわれは、従来から造血幹細胞の増殖・分化機構を中心に研究し、ヒト臍帯血中に造血幹細胞が存在することの初めての証明 (J Clin Invest 70:1324,1982)、in vitro で測定しうる最も未分化な造血幹細胞の測定系の開発 (Proc Natl Acad Sci USA 79:3843,1982、J Clin Invest 70:1324,1982)、造血幹細胞の自己複製と分化のモデル構築 (J Cell Physiol 113:455,1982,同139:647,1989など)、ヒト造血幹細胞上のサイトカイン受容体

の解析 (J Exp Med 184:1357,1996など)、サイトカインの作用機構の解析 (Nature 324:65,1986,J Exp Med 168:879,1988,同183:837,1996,Blood 90:3438,1997,同101:2990,2003など)、細胞内シグナル伝達の解析 (J Exp Med :183,1911,1996, J Clin Invest 106:263,2000など)、造血幹細胞の発生 (Blood 92:2032,1998,Immunity 8:105,1998, Proc Natl Acad Sci 96:7265,1999, Blood 98:6,2001)、造血幹細胞の増殖を支持するストローマ細胞の作成 (Blood 192:2032,1998,同98:6,2001)、霊長類 ES 細胞からの造血発生 (Development 131:1869-1879,2004)などを行い多くの成果を挙げてきた。また、従来ヒトの造血幹細胞を測定する in vivo 実験系が存在しなかったが、ヒト造血幹細胞によるマウス骨髄の再構築能を見る測定系を確立した (J Clin Invest 105:1013,2000,Stem Cells 18:204,2000)。さらに、より鋭敏にヒト造血幹細胞を測定可能な新しい免疫不全マウス (NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup>マウス: NOGマウス)を開発した (Blood 100:3175,2002,同102:873,2003,同103:860,2004)。ヒト造血幹細胞を体外増幅し、これを臨床に用いる目的で種々の検討を行い、最終的に SCF,FL,TPO,IL-6/可溶性IL-6リセプターを組み合わせたサイトカインにより、臍帯血中に含まれる造血幹細胞の自己複製能を保ちながら増殖させる方法を開発した。この細胞は現在、造血幹細胞の自己複製能を最も評価しうる NOD/SCID マウスの移植系において、増幅させない臍帯

血と比較して4.3倍もヒト血球造血を再構築させることを証明した(J Clin Invest 105:1013,2000)。

我々はこれらの基礎の成果を元に造血幹細胞の ex vivo expansion の技術を臨床応用するため、平成14年から厚生労働省科学研究『基礎研究成果の臨床応用推進事業』にて研究チームを発足させ、神戸先端医療センターを中心にトランスレーショナルリサーチを行ってきた。わが国においては、再生医療、細胞治療は始まったばかりの分野であり、まだきちんとした形での臨床試験が行われていないのが実情である。また基盤の整備も十分とはいえない。我々はこのプロジェクトを通じて細胞治療製剤の GMP(Good Manufacturing Practice)および米国 FDA から最終案が発表された GTP(Good Tissue Practice) (2005年5月から米国で施行予定) に基づいた製造方法の確立、品質管理法の確立、製造環境の基盤整備を行うとともに、2003年7月に施行された改正薬事法のなかで示された「細胞治療生物製剤の取り扱い」に準拠できるような取り組みを行ってきた。

### **I. GMP に準拠した培養法の確立**

全ての臍帯血移植を希望する成人に移植成績を有意に改善させるだけの臍帯血幹細胞を増幅させるためには現在保存されている臍帯血を10-20倍増幅させなければならない。しかも細菌の混入や動物由来のプリオンやアレルギー誘発蛋白の混入を防ぐために我々が目標としたのは閉鎖系培養の確立と

原材料からヒト、動物由来血清を排除した無血清培養法の確立である。我々はこの系の確立に成功し、現在の臍帯血バンクのシステムに則った移植が可能となった。また独自に培養バッグおよびリコンビナントアルブミンを用いた無血清培地を開発し、特許を申請した。

### **II. Cell processing の基盤整備**

医薬品 GMP においては、「薬局等構造設備規則」により製造を行う設備の規定などが詳細に規格化されている。これに対し、生物製剤においては、安全に細胞を加工するためのセルプロセッシングセンターの規格化はまだ行なわれていないのが現状である。本研究においては、科学的な観点からセルプロセッシングセンターでの培養操作に関する研究を行ない、安全な細胞製剤を作成する基準をつくることを目的にハード、ソフトの規格、検証を行った。ハードの整備においては、先端医療センターに Class10,000 の細胞操作室を2基を有するセルプロセッシングセンターを完成させた。室圧、室温、インキュベータ CO2 濃度、温度、湿度、冷蔵庫、冷凍庫の温度情報を集中管理し、アラーム情報は携帯電話により24時間通報システムを導入した。また、3管理規準書他、文書体系を整備し、GMP 教育などのソフトの整備も行った。

### III. GMP に準拠した細胞製剤製造のためのデバイスの開発

培養を安全かつ品質保証のトレイサビリティーが行えるデバイスとして、電磁ロック取り違え防止インキュベータに連動した細胞カルテシステムを開発した。これは、培養中の細胞の温度、湿度、CO<sub>2</sub>濃度の情報および、各操作過程、作業員の操作履歴が記録されるシステムで、特許申請を行った。

サイトカインなど増殖因子を含んだ培養細胞を最終製品にする際にはこれらサイトカインや培養液を除去する洗浄過程が必要である。これまでは、どうしても開放系の操作が必要であったが、我々は無菌閉鎖系細胞洗浄装置を開発し、99%以上のサイトカインの除去能を持ち、回収率も80%以上を保つ、機器を開発した。培養バッグの開発においては、ポリオレフィン・フッ素素材のガス透過性バッグにて12日間にCD34陽性細胞を38倍以上に増幅できることを確認し、特許申請した。

### IV. 品質管理法の確立

「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(医薬発第1314号、厚生省医薬安全局長通知)に必要な品質管理法の概要が示されており、我々はこれに従い安全性の検討を行なった。安全性を示す試験としては、培養前後における各種染色を組み合わせた形態観察、電顕での微細

構造の観察、染色体異常の確認を行なった。我々の培養方法で増殖した細胞には形態異常が認められず、また50%以上が非常に幼弱な芽球の形態を保っていることがわかった。さらにはがん化や染色体異常の検索には、G-band法による染色体検査、sky-FISHによる微小転座の有無を調べた。これらの解析においても異常は認められなかった。Ex vivoで増幅した細胞を実際に患者さんに移植する場合、それらの細胞が生体内でさまざまなサイトカインを産生し、思わぬ副作用を起こす可能性もあるため、我々はサイトカインアレイを行い、培養後の細胞について79種類のサイトカイン分泌の有無を網羅的に解析した。その結果、増幅臍帯血ではIL-1, MIP-1, SDF-1, FGF-4, IGFBP-1, IP-10, LIF, NAP-2, TIMP-1, IL-8の産生が確認された。このうち産生量の多かったIL-8に関しては、定量を行なったが、最終投与バッグ中の濃度は有効作用濃度以下であり、急性副作用の問題はないと考えられた。さらにはNOD/SCIDマウスを用いた増幅臍帯血の生着能、および体内分布、炎症や癌化の関与などを観察する移植実験を行なったが、臨床試験で予定している未処理の臍帯血と増幅臍帯血を等量混ぜて投与した群で未処理群をヒト細胞キメリズム解析で上回り有効性が確認できた。また、移植マウスの病理学的検討結果、炎症、変性、がん化などの変化は認められず一定の安全性を確認できた。また少量の検体から短時間で薬事法で規定

されたウイルスの検出を行う系をキット化し、特許出願した。また市販の培養液には増殖不良培地が含まれることを実製造試験を通じて原因の究明を行った。この対策として

細胞株を用いた ATP アッセイによる鋭敏で短期間に結果の出る、培地性能試験法を開発し、*ex vivo* 増幅臍帯血培養に応用した。

#### V. 新 GCP に準拠した臨床プロトコルの作成

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。

#### VI. 臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解明

造血幹細胞は自己複製能及び多分化能を有することで特徴付けられる。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り造血幹細胞を体外にて増殖させる試みが本研究を含め精力的に行われてきた。

本分担研究では、造血幹細胞をより効率良くかつ安全に体外にて増幅させる新たな方法を確立すべく、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得る合成ペプチドを作成し、造血幹細胞の *in vitro*、*in vivo* における自己複製能及び多分化能に及ぼす影響について検討を行なった。その結果、我々の開発した 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、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が明らかとなった(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))。合成ペプチドの造血幹細胞への導入効率は、従来の内的因子操作法である遺伝子導入の効率と比較

して高く、また合成ペプチド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。

#### VII. 臍帯血 DLI に向けた取り組みと基盤整備

臍帯血における T リンパ球の特性を明らかにし、成人 T リンパ球と比較して IL-2 レセプターの発現が低いこと、したがって、活性化させるには高濃度 IL-2 が必要なこと、okt-3 刺激も長期間必要なことを突き止め、培養法を完成させ、臍帯血バンクに保存されているサンプルチューブといった少量の血液からドナーリンパ球輸注に必要な細胞数を確保できる増幅率を達成し、米国において特許を取得した。過去3年間における『基礎研究成果の臨床応用推進事業』で臍帯血幹細胞の Ex vivo expansion の臨床応用に向けた基盤整備という目的は達成された。また臨床周辺技術の開発も進み、実製造に向けて医療用具化など更なる段階を迎えることになった。

#### D. 考察と今後の展望

本プロジェクト遂行のためには本分担研究で示したような様々な基盤整備が必要であるが、わが国において、不明瞭である細胞治療の整備すべき、具体的内容について、本研究を通じて見えてきた。具体的には製品概要書、培養に関わる、製造管理基準書、品質管理基準書、製造衛生管理基準書、製品標準書を完成させ

た。また臨床プロトコルの作成も行い、質の高い臨床試験を開始する予定である。

#### E. 健康危険情報

特記すべきことはない。

#### F. 研究発表

##### 1. 特許

『基礎研究成果の臨床応用推進事業』により開発され、特許出願した新技術

1. ウイルス標的核酸検出法：特願2003-164799

2. 抗癌、抗菌または抗ウイルス作用を有する医薬品組成物：特願2003-18321

3. 検体（細胞）取り違え防止および検体（細胞）管理システム：特願2003-009157

4. 組織培養装置：特願2002-165225

5. 転写因子操作による造血幹細胞の体外増幅法の開発：特願2003-392892、PCT/JP2004/017290

6. リコンビナントアルブミンを利用した造血幹細胞用無血清培地と培養法：特願2004-13291

7. 造血幹細胞培養システム：特願2004-102529

8. CORD BLOOD-DERIVED ACTIVATED LYMPHOCYTES, PREPARATIONS CONTAINING SAID LYMPHOCYTES AS MAIN INGREDIENT AND METHOD AND KIT FOR PRODUCING SAID PREPARATIONS. : US6,692,958,2004.2.17 OPEN

9. 臍帯血由来活性化リンパ球及び該リンパ球を主成分とする製剤ならびに当該製剤の製造法、該製剤調製用キット:特開2002-171966

##### 2. 論文発表

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T : NOD/SCID $\gamma_c^{null}$  mouse : an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood



100(9):3175-3182, 2002.

Umeda K, Adachi S, Watanabe K, Kimura N, Lin Y, Nakahata T : Successful hematopoietic stem cell transplantation for aplastic anemia following living-related liver transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 30:531-534, 2002.

Suzuki N, Ohneda , Takahashi S., Higuchi M., Mukai HY., Nakahata T., Imagawa S., Yamamoto M.: Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood* 100(7):2279-2288, 2002.

Heike T, Nakahata T : Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 1592:313-321, 2002.

Ebihara Y, Wada M, Ueda T, Xu M-J, Manabe A, Tanaka R, Ito M, Mugishima H, Asano S, Nakahata T, Tsuji K: Reconstitution of human haematopoiesis in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice by clonal cells expanded from single CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells expressing Flk2/Flt3. *Brit. J. Haematol.* 119:525-534, 2002.

Katamura K, Hattori H., Kunishima T., Kanagane H., Miyawaki T., Nakahata T.: Non-progressive viral myelitis in X-linked agammaglobulinemia. *Brain Develop.* 24:109-111, 2002.

Nakahata T, Toru H.: Cytokines Regulate Development of Human Mast Cells from Hematopoietic Progenitors. *Int. J. Hematol.* 75(4):350-356, 2002.

Iio J, Katamura K, Takeda H, Ohmura K, Yasumi T, Meguro T, Ohshima Y, Nakahata T: Lipid A analogue, ONO-4007, inhibits IgE response and antigen-induced eosinophilic recruitment into airways in BALB/c mice. *Int. Arch Allergy Immunol.* 127:217-225, 2002.

Hamahata K, Kubota M, Usami I, Lin Y-W, Shimizu K, Morimoto A, Nakahata T : Somatic cell mutation in pediatric patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Mutation Research,* 517:21-28, 2002.

Kusunoki T., Nakahata T. Miyanomae T., Inoue Y.: Possible dual effect of CD14 molecule on atopy. *Am. J. Res. Crit. Care Med* 165:551-552, 2002.

Han H., Tanigaki K., Yamamoto N., Kuroda K., Yamamoto M., Nakahata T., Ikuta K., Honjo T.: Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int. Immunol.*

14:637-645, 2002.

Yorifuji T., Kawai M., Muroi J., Mamada M., Kurokawa K., Shigematsu Y., Hirano S., Sakura N., Yoshida I., Kuhara T., Endo F., Mitsubishi H., Nakahata T.: Unexpectedly high prevalence of the mild form of propionic acidemia in Japan: presence of a common mutation and possible clinical implications. *Hum Genet.* 111:161-165, 2002.

Manabe A, Okamura J, Yumura-Yagi K, Akiyama Y, Sako M, Uchiyama H, Kojima S, Koike K, Saito T and Nakahata T.: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on the criteria of the International JMML Working Group. *Leukemia.* 16:645-649, 2002.

Kato T, Hattori H, Nagato M, Kiuchi T, Uemoto S, Nakahata T, Tanaka K : Subclinical central pontine myelinolysis following liver transplantation. *Brain & Development* 24 : 179-182, 2002.

Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M, Kaji M, Yamanaka C, Momoi T, Nakahata T : Parental Origin of Normal X Chromosomes in Turner Syndrome Patients With Various Karyotypes : Implications for the Mechanism Leading to Generation of a 45, X Karyotype. *American Journal of Medical Genetics* 111:134-139, 2002.

Yamanaka Y, Hamazaki Y., Sato Y., Ito K., Watanabe K., Heike T., Nakahata T., Nakamura Y : Mutational sequence of neuroblastoma revealed by molecular analysis on cDNA microarrays. *Int. J. Oncol.* 21:803-807, 2002.

Mitsui T., Watanabe S., Hanada S., Ebihara Y., Sato T., Nakahata T., Tsuji K.: Impaired neutrophil maturation in truncated G-CSF receptor transgenic mice. *Blood* 101:2990-2995, 2003.

Akizawa, Y., Nishiyama, C., Hasegawa, M., Maeda, K., Nakahata, T., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H. Regulation of human FcepsilonRI beta chain gene expression by Oct-1. *International Immunology,* 15: 549-556, 2003.

Kusunoki T., Sugai M., Katakai T., Omatsu Y., Iyoda T., Inaba K., Nakahata T., Shimizu A., Yokota Y.: Th2 dominance and defective development of CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset in Id2-deficient mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:136-142, 2003.

Umeda K., Adachi S., Ishihara H., Higashi Y., Shiota M., Watanabe K., Hishizawa M.,

- Ichinohe T., Kitoh T., Maruya E., Saji H., Uchiyama T., Nakahata T.: Successful T-cell-replete peripheral blood stem cell transplantation from HLA-haploidentical microchimeric mother to daughter with refractory acute lymphoblastic leukemia using reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 31:1061-1063,2003.
- Hiramatsu H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Katamura K., Nakahata T.: Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using NOD/SCID/<sup>c</sup> mice model. *Blood* 102:873-880, 2003.
- Yoshimoto M., Shinohara T., Heike T., Shiota M., Kanatsu-Shinohara M., Nakahata T.: Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicate the presence of a niche. *Exp. Hematol.* 31:733-740,2003.
- Ishida D., Kometani K., Yang H., Kakugawa K., Masuda K., Iwai K., Suzuki M., Itohara S., Nakahata T., Hiai H., Kawamoto H., Hattori M., Minato N.: Myeloproliferative stem cell disorders by dysregulated Rapl activation in SPA-1-deficient mice. *Cancer Cell* 4:55-65, 2003.
- Lin YW, Adachi S., Watanabe K, Umeda K, Nakahata T.: Serial Granulocyte transfusions as a treatment for sepsis due to multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa in a neutropenic patient. *J Clin Microbiol.* 41:4892-4893 (2003)
- Imai T, Adachi S., Nishijio K, Ohgushi M, Okada M, Yasumi T., Watanabe K, Nishikomori R, Nakayama T, Yonehara S, Toguchida J and Nakahata T. FR901228 induces tumor regression associated with induction of Fas ligand and activation of Fas signaling in human osteosarcoma cells. *Oncogene* 22:9231-9242 (2003)
- Manabe A., Nakahata T.: Experiences on MDS and JMML from Japan. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children (eds. Lopes L.F. & Hasle M) Tecmedd, pp. 317-324, 2003.
- Heike T. Nakahata T.: Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int. Hematol.* 79:7-14,2003.
- Matsubara H, Watanabe K, Sakai H, Chang H, Fujino H, Higashi Y, Kobayashi M, Adachi S., Seto S, Nakahata T. Rapid improvement of paraplegia caused by epidural involvements of Burkitt's lymphoma with chemotherapy. *Spine* 29:E4-6 (2004)
- Adachi S., Leoni M., Carson DA, Nakahata T.: Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies. *Acta Haematol.* 111:107-123, 2004.
- 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.
- Umeda K., Heike T., Yoshimoto M., Shiota M., Suemori H., Luo H.Y., Chui D.H.K., Shibuya M., Nakatsuji N., Nakahata T. : Development of primitive and definitive hemayopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro. *Development* 131:1869-1879,2004.
- Yagasaki H., Oda T., Adachi D., Nakajima T., Nakahata T., Asano S., Yamashita T.: Two common founder mutations of the Fanconi anemia group G gene FANCG/XRCC in the Japanese popuration. *Hum. Mutat.* 21:555 (DOI: 10.1002/humu.9142), 2003
- Yasumi T, Katamura K., Yoshioka T., Megurro T., Nishikomori R., Heike T., Inobe M., Kon S., Ueda T., Nakahata T.: Differential Requirement of the Cd40-CD154 costimulatory pathway during Th cell priming by CD8 + and CD8 - murine dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 172:4826-4833, 2004.
- Kawai N., Momoi T., Mamada M., Yorifuji T., Nakahata T.: Early initiation of GH therapy does not influence adult height but earlier start of pubertal induction in children with multiple pituitary hormone deficiency. *Clin.Endocrinology* 60:608-612, 2004.
- Okada M, Adachi S, Imai T, Watanabe K, Toyokuni S, Ueno M, Zervos AS, Kroemer G, Nakahata T.: A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL positive human leukemic cells - caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. *Blood* 103:2299-2397, 2004.
- Yorifuji T., Kurokawa K., Mamada M., Imai T., Kawai M., Nishi Y., Shishido S., Hsegawa Y., Nakahata T.: Neonatal diabetes mellitus and neonatal polycystic, dysplastic kidneys: phenotypically discordant recurrence of a mutation in the hepatocyte nuclear factor 1 gene due to germ-line mosaicism. *J. Clin. Endo. Metab.* 89:2905-2908,2004.
- Yorifuji T., Kawai M., Mamada M., Kurokawa K., Egawa H., Shigematsu Y.,

- Kohno Y., Tanaka K., Nakahata T.: Living-related liver transplantation for propionic academia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27:205-210, 2004.
- Nishikomori R., Akutagawa H., Maruyama K., Nakata-Hizume M., Ohmori K., Mizuno K., Yachie A., Yasumi T., Kusunoki T., Heike T., 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.
- Yagasaki H., Hamanoue S., Oda T., Nakahata T., Asano S., Yamashita T.: Identification and characterization of novel mutations of the major Fanconi anemia gene FANCA in the Japanese population. *Human Mutat.* 24:481-490, 2004.
- Xu Y., Arai H., Zhuge X., Sano H., Murayama T., Yoshimoto M., Heike T., Nakahata T., Nishikawa S., Kita T., Yokode M.: Role of bone marrow-derived progenitor cells in cuff-induced vascular injury in mice. *Arterioscl. Throm. Vas.* 24:477-482, 2004.
- 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.
- Matsubara H., Adachi S., Yano J., Kitamura N., Miyazaki M., Mizushima Y., Hiramatsu H., Kobayashi M., Nakahata T.: Successful allogeneic bone marrow transplantation in a patient with acute myelogenous leukemia and cytomegalovirus retinitis. *Int. J. Hematol.* 80:190-192, 2004.
- Harazaki M., Kawai Y., Su L., Hamazaki Y., Nakahata T., Minato N., Hattori M.: Specific recruitment of SPA1 to the immunological synapse: involvement of actin-bundling protein actinin. *Immunol. Letter* 92:221-226, 2004.
- 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.
- Yasumi T., Katamura K., Okafuji I., Yoshioka T., Meguro T., Nishikomori R., Kusunoki T., Heike T., Nakahata T.: limited ability of antigen-specific Th1 responses to inhibit Th2 cell development in vivo. *J. Immunol.* 177:1325-1331, 2005.
- Kanazawa N., Nishikomori R., Kambe N., Nakata-Hizume M., Okafuji I., Nagai S., Fuji A., Yuasa T., Utani A., Manki A., Sakurai Y., Nakajima M., Kobayashi H., Nishigori C., Heike T., Nakahata T., Miyachi Y.: Early-onset sarcoidosis and *CARD15* mutations: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood* 105:1195-1197, 2005.
- Tanaka A., Konno M., Muto S., Kambe N., Morii E., Nakahata T., Itai A., Matsuda H.: A novel NF- $\kappa$ B inhibitor, IMD-0354, suppresses neoplastic proliferation of human mast cells with constitutively activated c-kit receptors. *Blood* 105:2324-2331, 2005.
- Kimura S., Ito C., Jyoko N., Segawa H., Kuroda J., Okada M., Adachi S., Nakahata T., Yuasa T., Filho VC., Furukawa H., Maekawa T.: Inhibition of leukemia cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int. J. Cancer* 133:158-165, 2005.
- Kawamura T., Ono K., Morimoto T., Wada H., Hirai M., Hidaka K., Morisaki T., Heike T., Nakahata T., Kita T., and Hasegawa K.: Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J. Bio. Chem.* In press
- Hasegawa D., Manabe A., Kubota T., Kawasaki H., Hirose I., Ohtsuka Y., Tsuruta T., Ebihara Y., Goto Y., Yan Zhao X., Sakashita K., Koike K., Isomura M., Kojima S., Hoshika A., Tsuji K., Nakahata T.: Methylation status of the p15 and p16 genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Brit. J. Haematol.* In press.
- Kusunoki T., Okafuji I., Yoshioka T., Saito M., Nishikomori R., Heike T., Sugai M., Shimizu A., Nakahata T.: SPINK5 polymorphism is associated with disease severity and food allergy in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* In press.
- Nagato M., Heike T., Kato T., Yamanaka Y., Yoshimoto M., Shimazaki T., Okano H., Nakahata T.: Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using combination of the surface markers. *J. Neurosci. Res.* in press.
- Tsurusawa M., Manabe A., Hayashi Y., Akiyama Y., Kigasawa H., Inada H., Noguchi Y., Sawai N., Kobayashi R., Nagatoshi Y., Kawakami K., Nakahata T.: Therapy-related myelodysplastic syndrome in childhood: A retrospective study of 36 patients in Japan. *Leukemia Res.* in press.

- Tsuchiya A., Heike T., Fujino H., Shiota M., Umeda K., Yoshimoto M., Matsuda Y., Ichida T., Aoyagi Y., Nakahata T.: Characterization of mouse hepatic stem/progenitor cells in a novel culture system. *Gastroenterology* in press.
- Yoshimoto M., Heike T., Shiota M., Kobatashi H., Umeda K., Nakahata T.: Two different role of purified CD45+ hematopoietic stem cells after transplantation in muscles. *Stem Cells* in press.
- Tani, K., Azuma, M., Nakazaki, Y., Oyaizu, N., Hase, H., Ohata, J., Takahashi, K., Oiwa-Monna, M., Hanazawa, K., Wakumoto, Y., Kawai, K., Noguchi, M., Soda, Y., Kunisaki, R., Watari, K., Takahashi, S., Machida, U., Satoh, N., Tojo, A., Maekawa T., Eriguchi, M., Tomikawa, S., Tahara, H., Inoue, Y., Yoshikawa, H., Yamada, Y., Iwamoto, A., Hamada, H., Yamashita, N., Okumura, K., Kakizoe, T., Akaza, H., Fujime, M., Clift, S., Ando, D., Mulligan, R., Asano, S.: Phase I Study of Autologous Tumor Vaccines Transduced with the GM-CSF Gene in Four Patients with Stage IV Renal Cell Cancer in Japan: Clinical and Immunological Findings. *Mol Ther.* 10(4):799-816, 2004.
- Maekawa T., Kimura, S., Kasai Y.: Development of novel advanced cell and gene therapy and GMP-controlled cell processing. *JMAJ* 2005 (in press).
- Sonoyama J, Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Zhang X, Kataoka Y, Takai E, Mizuki M, Machii T, Wakao H, Kanakura Y.: Functional cooperation among Ras, STAT5, and phosphatidylinositol 3-kinase is required for full oncogenic activities of BCR/ABL in K562 cells. *J Biol Chem.* 277(10):8076-82, 2002.
- Nishimura Ji J, Hirota T, Kanakura Y, Machii T, Kageyama T, Doi S, Wada H, Masaoka T, Kanayama Y, Fujii H, Inoue N, Kuwayama M, Inoue N, Ohishi K, Kinoshita T.: Long-term support of hematopoiesis by a single stem cell clone in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 99(8):2748-51, 2002.
- Ueda S, Mizuki M, Ikeda H, Tsujimura T, Matsumura I, Nakano K, Daino H, Honda Z, Sonoyama J, Shibayama H, Sugahara H, Machii T, Kanakura Y.: Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood.* 99(9):3342-9, 2002.
- Kabutomori O, Kanakura Y, and Iwatani Y.: Movement of toxic granulation neutrophils and C-reactive protein in inflammatory processes. *Am J Med.* 112(7):595-6, 2002.
- Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Sakamaki T, Albanese C, Machii T, Pestell RG, Kanakura Y.: E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell.* 9(5):1017-29, 2002.
- Matsumura I, Kanakura Y.: Molecular control of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Int J Hematol.* 75(5):473-83, 2002.
- Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Kawasaki T, Machii T, Kitani T, Kanakura Y.: Acquired activated protein C resistance is associated with the co-existence of anti-prothrombin antibodies and lupus anticoagulant activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol.* 118(2):577-583, 2002.
- Ezoe S, Matsumura I, Nakata S, Gale K, Ishihara K, Minegishi N, Machii T, Kitamura T, Yamamoto M, Enver T, Kanakura Y.: GATA-2/estrogen receptor chimera regulates cytokine-dependent growth of hematopoietic cells through accumulation of p21WAF1 and p27Kip1 proteins. *Blood.* 100(10):3512-3520, 2002.
- Kabutomori O, Kanakura Y, Iwatani Y.: Induction of toxic granulation in neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor. *Eur J Haematol.* 2002 Sep;69(3):187-8.
- Kuratsune H, Yamaguti K, Lindh G, Evengard B, Hagberg G, Matsumura K, Iwase M, Onoe H, Takahashi M, Machii T, Kanakura Y, Kitani T, Langstrom B, Watanabe Y.: Brain regions involved in fatigue sensation: reduced acetylcarnitine uptake into the brain. *Neuroimage.* 17(3):1256-65, 2002.
- Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Kawasaki T, Machii T, Kitani T, Iwatani Y, Kanakura Y.: Acquired Activated Protein C Resistance Associated with Anti-Protein S Antibody as a Strong Risk Factor for DVT in Non-SLE Patients. *Thromb Haemost.* 88(5):716-22, 2002.
- Ueda S, Ikeda H, Mizuki M, Ishiko J, Matsumura I, Tanaka H, Shibayama H, Sugahara H, Takai E, Zhang X, Machii T, Kanakura Y. Constitutive activation of c-kit by the juxtamembrane but not the catalytic domain mutations is inhibited