

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

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

サイトカインによる増幅培養臍帯血による
臍帯血移植の臨床試験

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中畑龍俊

先端医療センター 再生医療研究部
京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座

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、「サイトカインによる増幅培養臍帯血による臍帯血移植の臨床試験」研究班における平成 17 年度の研究成果をまとめた報告書である。本研究班は、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発足され、これまで平成 14 年から平成 16 年まで「基礎研究成果の臨床研究推進事業」の一つである「*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」研究班において細胞治療の基盤を整備してきた。トランスレーショナルリサーチとは文字通り基礎研究の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ことを目的としている。ヒト細胞を原料とする細胞治療・再生医療における臨床研究とは、治療の安全性、有効性を評価するだけにはとどまらず、加工した細胞治療製剤の安全性や有効性を証明していかななくてはならない。

本研究班では、*Ex vivo* 増幅臍帯血移植を通じて、GTP(Good Tissue Practice)に則った、製造法の確立、細胞治療製剤の品質管理、品質保証法の確立、オーダーメイド療法となる治療における安全性、科学性を証明しうる臨床プロトコルの作成と臨床研究の実施を柱に研究を進める計画である。また、研究班を通じて産学協同研究をすすめ、始まったばかりの細胞治療製剤の製造デバイスの開発も行っていく計画である。また幹細胞研究のあり方に関しても厚生科学審議会でガイドラインが作成され、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と認識し、臨床研究を推進していく予定である。

平成 18 年 3 月 主任研究者 中畑 龍俊

目 次

I. 研究組織	1
II. 平成17年度総括研究報告書	3
中畑 龍俊	
III. 平成17年度分担研究報告書	
1. GMPおよびGTPに準拠した培養法の確立	
1-1 <i>Ex vivo</i> 増幅臍帯血の製造バリデーション法の確立	15
伊藤 仁也	
1-2 治療用細胞の作製に特化したGMPシステム構築の必要性	41
前川 平	
2. 品質管理法の確立	
2-1 NOG mouse を用いた品質管理	51
平家 俊男	
2-2 ウイルススパイク試験法の開発	55
清水 則夫	
2-3 神戸バイオメディカル創造センターにおける品質管理試験の立ち上げ	63
島津 光伸 松本 浩 島田 康司	
3. 臍帯血由来CD34陽性細胞を用いた <i>ex vivo</i> 増幅臍帯血移植の臨床研究	
4. 臍帯血DLIに向けた培養法および品質管理法の開発	
4-1 免疫不全マウスを用いた活性化CD4輸注療法の有効性、安全性の評価	67
鹿村 真之	
5. 臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解明	
5-1 造血幹細胞の自己複製機構の解明	76
田中 宏和 松村 到 金倉 譲	

IV. 班会議記録・合同研究カンファレンス	85
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	95
VI. 研究成果の刊行物・印刷物	109
VII. (財)ヒューマンサイエンス振興財団 研究業績報告書	193

〈別紙 I〉

「急性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 実施計画書」

〈別紙 II〉

「臍帯血医薬品に関する調査研究他」

I. 研究組織

平成 17 年度厚生科学研究「サイトカインによる増幅培養臍帯血による
臍帯血移植の臨床試験」研究班

研究組織

	氏名	所属
主任研究者	中畑 龍俊	先端医療センター血液再生研究グループ
分担研究者	前川 平	京都大学医学部附属病院輸血部
	金倉 讓	大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科
	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	財団法人先端医療振興財団理事長 臨床研究情報センター長代行
	永井 謙一	先端医療センター診療開発部
	伊藤 仁也	先端医療センター血液再生研究グループ
	田中 宏和	先端医療センター血液再生研究グループ
	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
	島津 光伸	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
	逢坂 敦	キリンビール株式会社
	槻木 裕志	ニプロ株式会社
	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
	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	先端医療センター血液再生研究グループ
	橋本 尚子	先端医療センター診療開発部
	初山 麻子	先端医療センター血液再生研究グループ
	丸山 京子	先端医療センター血液再生研究グループ
	高田 のぞみ	先端医療センター血液再生研究グループ

Ⅱ. 平成17年度 総括研究報告書

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）

総括研究報告書

サイトカインによる増幅培養臍帯血による臍帯血移植の臨床試験

総括研究者：中畑 龍俊

（先端医療センター客員研究員、京都大学大学院発達小児科学教授）

研究要旨

現在の臍帯血移植の欠点である幹細胞の絶対数不足から生じる様々な諸問題（生着不全、感染、医療費の高騰など）を解決するために*ex vivo*増幅臍帯血移植および臍帯血DLIを臨床応用し、臨床試験でしか証明し得ない有効性、安全性を証明し、治療法の確立を行くことおよび、わが国で始まったばかりの細胞治療においてGMP(Good Manufacturing Practice)およびGTP(Good Tissue Practice)に準拠した細胞プロセッシングを行うため、培養の完全閉鎖系、無血清化、全自動化を目標に細胞治療製剤製造デバイスの開発、医療用具化を目指すとともに検体の少量化、迅速化、キット化を目標に品質管理システムの確立を目指すために本研究をスタートさせた。我々は基礎研究から得られた技術を臨床応用するために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。

また安全性の評価と増幅させた CD34 陽性細胞数が生着に及ぼす効果を評価する『急性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』を開始させた。

分担研究者

中畑 龍俊	京都大学大学院 発達小児科教授 先端医療センター 客員研究員
前川 平	京都大学輸血部教授
金倉 讓	大阪大学分子病態内科教授
平家 俊雄	京都大学発達小児科学 助教授
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助教 授
村上 雅義	先端医療センター臨床 研究支援部研究開発部長
永井 謙一	先端医療センター診療管理 部長
伊藤 仁也	先端医療センター血液再生 研究グループ主任研究員
田中 宏和	先端医療センター血液再生 研究グループ主任研究員
白数 照雄	ニプロ株式会社総合研究所 第6班研究開発部・部長代 行
西川 茂道	和研薬株式会社(株)R&D部・部 長
桜田 洋	ヘモネティクスジャパン 株式会社 開発室長
島津 光伸	株式会社三菱化学ビーマーセル 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。

また*ex vivo*で加工した細胞をヒトを対象とした臨床研究に用いる場合、GTP(Good

Tissue Practice)に則った細胞治療製剤の製造法の確立、品質管理法の確立は重要であり、基盤を整備する必要がある。

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。

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った。

I. GMPおよびGTPに準拠した培養法の確立

我々はこれまで臍帯血を原材料として *ex vivo* で閉鎖系、無血清下で培養する基礎検討を行ってきた。この基本技術を

臨床研究に応用するため、実際の臍帯血バンクに保存された臍帯血を用いて（兵庫臍帯血バンクおよび東海臍帯血バンクより提供）実製造試験を行い標準作業手順書、製品標準書、製造計画書、製造指図書、製造記録書、製造管理基準書を作成した。また一方、既存の培養液（Quality biotechnology 社製）はロット間差が著しかったり、安定性に問題があることが明らかになってきた。このような培養毎の原材料、手技による増幅率のばらつきを正確に評価して一定の安定した培養ができるように培養法のバリデーション試験を開発した。またセルプロセッシングの運用により、コストに見合った清掃、消毒法等の環境ソフトの構築を目指し、ガイドライン化に取り組みたいと考えている。

II. 品質管理法の確立

品質管理センターとして細胞治療製剤専用の品質管理を行う GLP(Good Laboratory Practice)に則った検査体制を確立させた。当プロジェクトの製造における規格試験、安全性試験、原材料受け入れおよび出荷判定試験を迅速かつ正確に行えるよう、検査法の改良、キット化を行った。また実製造試験を通じて標準作業手順書、品質管理基準書試験成績書、再検査基準書などの書類を完成させた。また細胞治療製剤のクリアしなければならぬ問題点の一つとして原材料となるヒト組織、細胞中に常在ウイルスが混入していることは

避けようのない現象であり、培養、加工に伴うそれらのウイルスの動態を調べることは重要である。今回、臍帯血にあらかじめウイルスを感染させ、*ex vivo* 培養に伴うウイルス増幅の有無および細胞機能への影響を検討した。

III. 臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いた *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

『急性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』プロトコルを作成した。本試験では、日本造血細胞移植学会の「造血幹細胞移植のガイドライン」に合致する患者で、骨髄移植および末梢血幹細胞移植において適切なドナーを得ることができない急性性白血病を対象として、臍帯血内の CD34 陽性細胞の一部を *ex vivo* 増幅して臍帯血移植を実施し、その安全性・効果を検討する。さらに、臍帯血内の CD34 陽性細胞および増幅培養した CD34 陽性細胞における輸注細胞数と生着率の相関を検討する。

IV. 臍帯血 DLI に向けた培養法および品質管理法の開発

少量の臍帯血から固相化 CD3 抗体と IL-2 を用いた培養法を確立し、特許を取得した技術を用いて培養法が GMP および GTP に準拠するように改良を行ない、作製されたリンパ球の品質を保証していく系を作成した。またこのように活性化、増幅させた系の安全性、効果の検証を

EBV-LCL を NOD/SCID マウスに移植し、白血化させた系を用いて解析した。

V. 臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解明

造血幹細胞の自己複製能の解明研究においては「合成ペプチド導入による内的因子操作法」を用いて、decoy ペプチド導入細胞の骨髄再構築能の詳細な検討、及び HOX 転写因子群の下流に位置する自己複製、分化制御因子の解析を中心に行った。

C. 研究結果

I. GMP および GTP 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。

平成 17 年度には、兵庫臍帯血バンク、および東海臍帯血バンクより、臍帯血の提供を受け、実際に先端医療センターに設置したセルプロセッシングセンターで実製造試験を行った。その結果、目標としていた臍帯血中の CD34 陽性細胞を 12 日間で平均 26.4 倍に増幅することが可能

となった。また GMP に向けた製造の基本となる、製造標準作業手順書、指図書、記録書などの文書体系を整備するとともに、繰り返し培養を行い、作業員のスキルも Clinical grade の製品を製造できるレベルまで向上した。

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。また先端医療センター内にセルプロセッシングセンターの管理チームを組織し、包括的に安全な製品が創造できるような基盤を整備した。

II.品質管理法の確立

製造プロセスにおける製品の安全性を担保するための規格値を設定し、製造規格試験に関する検査法標準作業手順書、試験成績書等の文書体系を整備した。またいきものである細胞治療製剤の出荷には迅速性が要求されることから、ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験に関しては迅速検査法の開発と試験体制を整備した。また原材料となる臍帯血 CD34 細胞には CMV、

Palvo-virus B19、EBV が感染しうることがわかり、スパイク試験により増幅の有無を確かめた。臍帯血の増幅培養によりウイルスが増幅されることはなかったが、Palvo-virusB19 が感染した CD34 陽性細胞からのコロニー形成は抑制された。

III.臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いた *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

また、本臨床研究を通じて以下の点を明らかにしようと考えている。

1. 主要解析項目

1. 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
2. 好中球生着日数と移植 CD34 陽性細胞数が相関するかどうか

2. 副次解析項目

1. 血小板生着日数の短縮効果
2. 赤血球生着日数の短縮効果
3. 現存のバンキングされた臍帯血が安定して総細胞数・CD34 陽性細胞数の増幅が得られるか
4. 培養移植細胞幹細胞マーカーの生着に及ぼす効果
5. 培養移植細胞コロニー形成細胞数と生着に及ぼす効果
6. 全生存期間、無病再発期間の延長効果
7. 治療完遂の有無（プロトコルの feasibility)
8. 移植関連合併症死の頻度(臍帯血移植後 100 日以内)

9. 臍帯血移植後 100 日時点での免疫学的回復能

IV 臍帯血 DLI に向けた培養法および品質管理法の開発

臍帯血の T 細胞機能は成人末梢血中に含まれる T 細胞と比較すると臍帯血 T 細胞はナイーブ T 細胞がほとんどであり、また IL-2 レセプターの発現も低い。機能的には二次 MLC の低下も認められ、活性化能も低いことが特徴である。ところが固相化 CD3 抗体と IL-2 で活性化させた活性化臍帯血 T 細胞はほぼ成人活性化 T 細胞と同等の機能を有した。また NOD/SCID マウスを用いた検討において、EBV-LCL で白血化させたマウスに活性化した LCL と同じ個体から採取した臍帯血活性化 T 細胞を輸注することにより、EBV-LCL の増殖を阻害した。

V. 臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解明

我々は昨年度までに、造血細胞の増殖や分化に重要な HOX 転写因子群の活性を変化させることにより、効率よくかつ安全に造血幹細胞を体外増幅しうるデコイペプチドを開発した。

骨髄再構築能の評価として行った限界希釈法の結果、デコイペプチドを導入し 7 日間培養することにより、造血幹/前駆細胞を増幅前の約 2 倍に増幅し得ることが明らかとなった。またデコイ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おり、半定量的 RT-PCR 法によりこれら遺伝子群の RNA レベルでの発現変化が確認された。

今後は、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を造血幹/前駆細胞に導入した際の細胞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、及び分化制御に関与する因子の同定を進めていく予定である。

VI. 臍帯血医薬品化に関する調査研究

臍帯血が輸血製剤と同レベルの品質保証を可能にするために以下の調査研究を行い、現在の問題点および今後、取り組むべき点を明らかにした。

①臍帯血の品質管理検査の検討：感染症スクリーニング、採取に関する家族歴等の問診項目、規格検査（総細胞数、CD34 陽性細胞数、コロニー形成細胞数）

②GMP 基準への対応：施設基準、製造組織、品質管理法、製造管理法

③コストシミュレーション：採取病院、バンク・製造者、医療機関、患者

④臍帯血移植以外の再生医療に発展させた医療の現状

を我が国の臍帯血バンクおよび海外（米国、EU、アジア）の動向と比較しながら検討した。

VII. 幹細胞治療臨床研究指針の策定に関する調査研究

国内および海外での幹細胞研究の動向を調査し、製造、品質管理、倫理的側面

において「細胞組織医薬品および細胞組織医療用具に関する基準」「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」の準拠の動向や、ヒト幹細胞特有の問題を洗い出し、指針策定に向けての品質管理法の検討を行った。

D. 考察と今後の展望

細胞治療および再生医療の実現のためには、本プロジェクトの分担研究で示したような様々な基盤整備が必要である。特に細胞治療製剤は生き物であるため、できるだけ品質や細胞が均一になるよう培養の規格を設けなければ、効果の科学的検証や臨床試験の科学性は保たれない。本年度の研究成果本年度の研究成果から、このような規格の整備や臨床試験を行なうために必要な安全性の検証は行なえたと考えられる。

臨床研究の結果が待たれる。

E. 健康危険情報

特記すべきことはない。

F. 研究発表

論文発表

Kimura, S., Ito, C., Jyoko, N., Segawa, H., Kuroda, J., Okada, M., Adachi, S., Nakahata, T., Yuasa, T., Filho, V.C., Furukawa, H., Maekawa, T.: Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int J Cancer*, 113(1):158-165, 2005.

Matsumoto, S., Kimura, S., Segawa, H., Kuroda, J., Yuasa, T., Sato, K., Nogawa, M., Tanaka, F., Maekawa, T., Wada, H. : Efficacy

of the third-generation bisphosphonate zoledronic acid alone and combined with anti-cancer agents against small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*, 47(1):31-39, 2005.

Kimura, S., Yurugi, K., Segawa, H., Kuroda, J., Sato, K., Nogawa, M., Yuasa, T., Egawa, H., Tanaka, K., Maekawa, T.: Rapid quantitation of IgG antibodies specific for blood group antigens A and B by surface plasmon resonance. *Transfusion*, 45(1):56-62, 2005.

Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Kuroda, J., Sato, K., Segawa, H., Maekawa, T.: Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models. *Cancer Lett*, 217(2):245-253, 2005.

Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Kuroda, J., Segawa, H., Sato, K., Koizumi, M., Maekawa, T.: Zoledronic acid mediates Ras-independent growth inhibition of prostate cancer cells. *Oncol Res*, 15(1):1-9, 2005.

Sato, K., Kimura, S., Segawa, H., Yokota, A., Matsumoto, S., Kuroda, J., Nogawa, M., Yuasa, T., Kiyono, Y., Wada, H., Maekawa, T.: Cytotoxic effects of gamma delta T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int J Cancer*, 116(1) : 94-99, 2005.

Maekawa, T., Kimura, S., Kasai, Y.: Development of novel advanced cell and gene therapy and GMP-controlled cell processing. *JMAJ*, 48(2):1-4, 2005

Yuasa, T., Tsuji, H., Kimura, S., Niwa, N., Yurugi, K., Egawa, H., Tanaka, K., Maruya, E., Saji, H., Asano, H., Maekawa, T.: HLA in Japanese patients with biliary atresia - a retrospective analysis in the patients with living donor liver transplantation -. *Hum Immunol* 66(3): 290-295, 2005

Segawa, H., Kimura, S., Kuroda, J., Sato, K., Nogawa, M., Yuasa, T., Yokota, A., Hodohara, K., Fujiyama, Y., Maekawa, T.: The anti-leukemic efficacy of the third generation bisphosphonate ONO5920/YM529. *Leuk Res*, 29(4):

451-457, 2005.

Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Tanaka, M., Kuroda, J., Sato, K., Yokota, A., Segawa, S., Toda, Y., Kageyama, S., Yoshiki, T., Okada, Y., Maekawa, T.: Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest*, 115(4): 978-985, 2005

Maekawa, T.: Establishment of institutional GMP is mandatory for the development of translational research in cell therapy. *J Pharmacol Sci*, 97:20, 2005

Yuasa, T., Nogawa, M., Kimura, S., Yokota, A., Sato, K., Segawa, H., Kuroda, J., Maekawa, T.: A third generation bisphosphonate minodronic acid (YM529), augments the interferon α/β -mediated inhibition of renal cell cancer cell growth both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 11(2 Pt 1):853-859, 2005

Yuasa, T., Niwa, N., Kimura, S., Yurugi, K., Tsuji, H., Egawa, H., Tanaka, K., Asano, H., Maekawa, T.: Intraoperative blood loss during living related liver transplantation: analysis of 635 cases at a single center. *Transfusion*, 45(6):879-884, 2005.

Matsumoto, S., Okitsu, T., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Nagata, H., Yonekawa, Y., Yamada, Y., Fukuda, K., Tsukiyama, K., Suzuki, H., Kawasaki, Y., Shimodaira, M., Matsuoka, K., Shibata, T., Kasai, Y., Maekawa, T., Shapiro, A.M.J., Tanaka, K.: Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allo-transplantation. *Lancet*, 365(9471): 1642-1644, 2005

Segawa, H., Kimura, S., Kuroda, J., Sato, K., Yokota, A., Kawata, E., Kamitsuji, Y., Ashihara, E., Yuasa, T., Fujiyama, Y., Ottmann, O.G., Maekawa, T.: Zoledronate synergizes with imatinib mesylate to inhibit Ph⁺ primary leukaemic cell growth. *Br J Haematol*, 130: 558-560, 2005

Kimura, S., Naito, H., Segawa, H., Kuroda, J., Yuasa, T., Sato, K., Yokota, A., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Ashihara, E., Nakaya, Y., Naruoka, H., Wakayama, T., Nasu, K., Asaki,

T., Niwa, T., Hirabayashi, K., Maekawa, T.: NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, is a novel agent for imatinib-resistant leukemia. *Blood*, 106(12): 3948-3954, 2005.

Okitsu, T., Matsumoto, S., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Nagata, H., Yonekawa, Y., Maekawa, T., Tanaka, K.: Kyoto islet isolation method: the optimized one for non-heart-beating donors with highly efficient islet retrieval. *Transplant Proc*, 37:3391-3392, 2005

Matsumoto, S., Okitsu, T., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Yonekawa, Y., Nagata, H., Yamada, Y., Fukuda, K., Seino, Y., Shibata, T., Kasai, Y., Maekawa, T., Tanaka, K.: Successful islet transplantation from non-heart-beating donor pancreata using modified Ricordi islet isolation method. (Transplantation, in press)

Horie, N., Murata, H., Nishigaki, T., Segawa, H., Yuasa, T., Kimura, S., Maekawa, T., Fushiki, S., Kubo, T.: The third-generation bisphosphonates inhibit tumor proliferation and induce apoptosis in murine osteosarcoma in vitro. (Cancer Lett, in press).

Kimura, S., Maekawa, T.: Stem cell transplantation for Ph⁺ leukemias in the imatinib and post-imatinib eras. In, "Bone Marrow Transplantation: New Research." (Nova Science Publishers, Inc. review, in press, 2005)

Naito, H., Kimura, S., Nakaya, Y., Naruoka, H., Kimura, S., Ito, S., Wakayama, T., Maekawa, T. and Hirabayashi, K.: *In vivo* inhibitory effect of NS-187, a dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, on the proliferation of leukemic cells harbouring Abl kinase domain mutations (Leuk Res, in press, 2006)

Kimura, S., Niwa, T., Hirabayashi, K., Maekawa, T.: Development of NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Chemo Pharmacol* (in press, 2006)

Maekawa, T.: Establishment of institutional GMP is mandatory for the development of

- translational research in cell therapy. *J Pharmacol Sci*, 97:20, 2005.
- Oritani K, Kanakura Y. IFN-zeta/ limitin: a member of type I IFN with mild lympho-myelosuppression. *J Cell Mol Med* 9:244-254, 2005
- Kashiwagi H, Shiraga M, Kato H, Honda S, Sako M, Kurata Y, Kanakura Y, Tomiyama Y. Expression and subcellular localization of WAVE isoforms in the megakaryocyte/platelet lineage. *J Thromb Haemost* 3:361-368, 2005
- 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. *Blood* 106:913-921, 2005
- Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Impaired platelet function in a patient with P2Y12 deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost* 3:2315-2323, 2005
- Ishida N, Oritani K, Shiraga M, Yoshida H, Kawamoto S, Ujiie H, Masaie H, Ichii M, Tomiyama Y, Kanakura Y. Differential effects of a novel IFN-zeta/limitin and IFN-alpha on signals for Daxx induction and Crk phosphorylation that couple with growth control of megakaryocytes. *Exp Hematol* 33:495-503, 2005
- Tanaka H, Matsumura I, Kanakura Y. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *J Biol Sci* 5:50-60, 2005
- Ezoe S, Matsumura I, Gale K, Satoh Y, Ishikawa J, Mizuki M, Takahashi S, Minegishi N, Nakajima K, Yamamoto M, Enver T, Kanakura Y. GATA transcription factors inhibit cytokine-dependent growth and survival of a hematopoietic cell line through the inhibition of STAT3 activity. *J Biol Chem* 280:13163-13170, 2005
- Ishiko J, Mizuki M, Matsumura I, Shibayama H, Sugahara H, Scholz G, Serve H, Kanakura Y. Roles of tyrosine residues 845, 892 and 922 in constitutive activation of murine FLT3 kinase domain mutant. *Oncogene* 24:8144-8153, 2005
- Ishiko E, Matsumura I, Ezoe S, Gale K, Ishiko J, Satoh Y, Tanaka H, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Enver T, Kanakura Y. Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem* 280:4929-4939, 2005
- Sakane-Ishikawa E, Nakatsuka S, Tomita Y, Fujita S, Nakamichi I, Takakuwa T, Sugiyama H, Fukuhara S, Hino M, Kanamaru A, Soma T, Tsukaguchi M, Igarashi K, Kanakura Y, Aozasa K. Prognostic Significance of BACH2 Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study of the Osaka Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 23:8012-8017, 2005
- Kabutomori O, Kanakura Y, Iwatani Y. Inflammation markers and liver dysfunction. *Ann Hematol* 84:136, 2005
- Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Iwatani Y, Kanakura Y. Acquired activated protein C resistance associated with IgG antibodies against beta2-glycoprotein I and prothrombin as a strong risk factor for venous thromboembolism. *Clin Chem* 51:545-552, 2005
- Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Komada F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood* 106:2627-2632, 2005
- Koma Y, Ito A, Watabe K, Hirata T, Mizuki M, Yokozaki H, Kitamura T, Kanakura Y, Kitamura Y. Distinct role for c-kit receptor tyrosine kinase and SgIGSF adhesion molecule in attachment of mast cells to fibroblasts. *Lab Invest* 85:426-35, 2005

- 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
- Yasumi, T., Katamura, K., Okafuji, I., Yoshioka, T., Meguru, 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
- Nagato , Heike T, Kata T., Yamanaka Y., Yoshimoto M., Shimazaki T., Okano H., and Nakahata T.: Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using a combination of surface markers. *J Neurosci Res* 80: 456-466, 2005
- T. Kusunoki, I. Okafuji, T. Yoshioka, M. Saito, R. Nishikomori, T. Heike, M. Sugai, A. Shimizu, T. Nakahata :SPRINK5 polymorphism is associated with disease severity and food allergy in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 115: 636-638, 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. Biolog. Chem.* *J Biol Chem* 280: 19682-19688, 2005
- Yoshimoto M., Chang H., Shiota M., Kobayashi H., Umeda K., Kawakami A., Heike T, and Nakahata T.: Two different roles of purified CD45+ c-kit+ Sca-1+ Lin-cells after transplantation in muscles *Stem Cells* 23: 610-618, 2005
- Saito, M., Fijisawa, A., Nishikomori, R., Kambe, N., Nakata-Hizume, M., Yoshimoto, M., Ohmori, K., Okafuji, I., Yoshioka, T., Kusunoki, T., Miyachi, Y., Heike T, and Nakahata T.: Somatic mosaicism of CIAS1 in a patient with chronic infantile neurogenic, cutaneous, articular syndrome. *Arthritis & Rheumatism* 52: 3579-3585, 2005.
- A neurosphere-derived factor, Cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells. Kato T, Heike T, Okawa K, Haruyama M, Shiraishi K, Yoshimoto M, Nagato M, Shibata M, Kumada T, Yamanaka Y, Hattori H, Nakahata T *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006 in press
- 木村晋也、黒田純也、前川平 : Ras 関連蛋白質シグナルを標的とした造血器腫瘍の分子標的治療. *Annual Review 血液* 2005 (高久史磨、溝口秀昭、坂田洋一、金倉 謙、小島勢二 編集)、中外医学社、東京、p.179-189, 2005.
- 木村晋也、黒田純也、前川平 : Ras superfamily シグナル伝達経路を標的とした白血病治療. 分子標的療法の基礎と臨床 (鶴尾 隆 監修)、篠原出版社、東京、pp. 175-184, 2005.
- 木村晋也、前川平 : 細胞内シグナル伝達系を阻害する薬剤. 3. Ras 阻害剤、2) Zoledronate. 分子標的治療薬—作用機序と臨床—. (元吉和夫、大野竜三編)、メディカル・レビュー社、東京、pp.143-151, 2005.
- 辻 博昭、湯浅 健、前川平 : 消化管出血の輸血療法. 消化器疾患診療実践ガイド (千葉勉、井廻道夫 編)、文光堂、東京、pp.266-269, 2005.
- 湯浅 健、木村晋也、前川平 : RNA を標的としたがん治療の可能性. 臨床腫瘍内科学入門 (金倉謙 編著)、永井書店、大阪、pp.117-121, 2005.
- 前川平 : 輸血療法の基礎と実際. 三輪血液病学 (浅野茂隆、池田康夫、内山 卓 監修)、文光堂、東京、pp.672-733, 2005.
- 木村晋也、前川平 : イマチニブ以後の白血病に対する分子標的療法薬. *Annual Review 血液* 2006 (高久史磨、溝口秀昭、坂田洋一、金倉 謙、小島勢二 編集)、中外医学社、東京、p.99-113, 2006.
- 湯浅 健、野河正輝、木村晋也、前川平 : 膀胱癌. 遺伝子医学 MOOK (中村義

一編)、メディカル ドゥ

前川 平：輸血・成分輸血. 内科学 (第九版). (矢崎義雄、小俣正男、水野美邦監修)、朝倉書店、東京 (印刷中)

湯浅 健、木村晋也、前川 平：Bisphosphonate の抗腫瘍作用. Cancer Frontier, 7:70-76, 2005.

笠井泰成、前川 平：これからの臨床検査技師教育を考える—期待される活動領域と技師教育：高度先進医療部門. 臨床検査、49(8):872-873, 2005.

万木紀美子、前川 平：ABO 血液型不適合移植と輸血—臓器移植看護を理解するためのキーワード—. 看護技術 (臨時増刊号「臓器移植看護の現在」)、51(12):15-19, 2005.

万木紀美子、木村晋也、前川 平：抗A、抗B抗体価測定法の検討—表面プラズモン共鳴を応用した新規測定法—. 日本臨床検査医学会誌 53(11):1011-1018, 2005.

前川 平：RNA 干渉—その基礎と臨床応用—. Front Wave in Hematology, 15:4-7, 2005.

木村晋也、上辻由里、前川 平：急性リンパ性白血病. 癌治療と宿主、18(1):69-80, 2005.

湯浅 健、丹羽紀実、辻 博昭、万木紀美子、江川裕人、田中紘一、木村晋也、前川 平：外科医のための輸血医学講座—肝移植における輸血—. 外科、67(5):555-558, 2005.

河田英里、芦原英司、木村晋也、前川 平：GVHD と腎障害. 腎と透析、59(6):970-976, 2005.

芦原英司、前川 平：結腸がん細胞に対するV γ 9V δ 2T細胞の腫瘍細胞認識機構. 分子細胞治療、5(2):98-100, 2006.

木村晋也、黒田純也、前川 平：Ab 点突然変異. 血液・腫瘍科 (印刷中)

黒田純也、木村晋也、前川 平：ビスフォスフォネート製剤の抗腫瘍作用. 感染免疫腫瘍 (印刷中)

木村晋也、芦原英司、前川 平：新規 dual Bcr-Abl/Lyn kinase inhibitor (血液・腫瘍科、2006 印刷中)

金倉 讓. 悪性リンパ腫 up-to-date 混沌よりあらたなエビデンスを求めて はじめに. 医学のあゆみ 212:291, 2005

金倉 讓. CLL の新たな予後推定因子 ZAP-70. Annual Review 血液 2005 (高久文磨、溝口秀昭、坂田洋一、金倉 讓、小島勢二編)、中外医学社、東京、2005、pp190-199

金倉 讓. 臨床血液学 進歩の軌跡と今後の展望. 総合臨床 54:1723-1724, 2005

金倉 讓、水木満佐央. 悪性リンパ腫に対する化学療法. インフォームド・コンセント—その理論と書式実例 (前田正一編)、医学書院、東京、2005、pp152-158

松村 到. Hyper eosinophilic syndrome (HES) の病態と新たな治療: Imatinib 療法と抗 IL-5 抗体療法. Annual Review 血液 2005 (高久文磨、溝口秀昭、坂田洋一、金倉 讓、小島勢二編)、中外医学社、東京、2005、pp151-162

松村 到、金倉 讓. ファルネシル化阻害剤. 血液・腫瘍科 50:42-52, 2005

松村 到、金倉 讓. ファルネシル化阻害剤. Mebio 22:74-80, 2005

松村 到. 新たな分子標的療法剤. 総合臨床 54:1799-1804, 2005

松村 到. JunB 欠損マウスに発症する CML 様病態における白血病幹細胞の起源. 分子細胞治療 4:98-99, 2005

松村 到、金倉 讓. 造血細胞における転写因子: 総論. 医学のあゆみ 血液疾患 Ver. 3 (坂田洋一、小澤敬也編)、医歯薬出版株式会社、東京、2005、pp48-51

松村 到、金倉 讓. ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤. 臨床腫瘍内科学入門 (金倉 讓編)、永井書店、大阪、2005、pp60-63

松村 到, プロテアソーム阻害剤. 臨床腫瘍内科学入門(金倉 讓編), 永井書店, 大阪, 2005, pp64-66

松村 到, 金倉 讓. Farnesyl transferase 阻害剤. 分子標的治療薬(元吉和夫, 大野竜三編), メディカルレビュー社, 東京, 2005, pp133-142

松村 到, 金倉 讓. 細胞周期の制御機構. 三輪血液病学(浅野茂隆, 池田康夫, 内山 卓監修), 文光堂, 東京, 2005, pp99-103

松村 到, 金倉 讓. 好酸球, 好塩基球および肥満細胞の異常. 三輪血液病学(浅野茂隆, 池田康夫, 内山 卓監修), 文光堂, 東京, 2005, pp1308-1320

松村 到, 金倉 讓. 急性白血病の分類(FAB分類とWHO分類). 三輪血液病学(浅野茂隆, 池田康夫, 内山 卓監修), 文光堂, 東京, 2005, pp1374-1408

松村 到, 金倉 讓. 白血病. 内科 96:1028-1036, 2005

松村 到, 金倉 讓. サイトカイン mimetics の臨床応用. 実験医学増刊 Vol. 23 No. 20(宮島 篤, 北村俊雄編), 羊土社, 東京, 2005, pp182-187

水木満佐央, 金倉 讓. シグナル伝達阻害分子による白血病の治療. 分子標的療法基礎と臨床(鶴尾 隆監修, 今村雅寛, 金倉 讓, 井上勝一編), 篠原出版社, 東京, 2005, pp15-28

水木満佐央, 金倉 讓. ファルネシル化酵素阻害剤. 今日の移植 18:520-525, 2005

水木満佐央, 金倉 讓. c-Kit と急性白血病. 医学のあゆみ 血液疾患 Ver. 3(坂田洋一, 小澤敬也編), 医歯薬出版株式会社, 東京, 2005, pp222-226

織谷健司, 金倉 讓. 新たなI型インターフェロン: IFN- γ /limitin とBリンパ球. 臨床免疫 43:535-541, 2005

田中宏和, 伊藤仁也. 臍帯造血幹細胞の体外増幅. 血液・腫瘍科 51:148-153, 2005

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

廣瀬 弥保, 田中 聡, 伊藤仁也. Ex vivo増幅培養にともなう臍帯血造血幹細胞のFACS解析; Cytometry Research 15(1);2005,1-6

伊藤仁也, 中畑龍俊. ex vivo 増幅造血幹細胞を用いた臍帯血移植 実験医学 24(2)p274-285, 2006

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145-158(分担執筆)

伊藤仁也. 臍帯血造血幹細胞の体外増幅と臨床応用 臍帯血移植 新興医学出版社(分担執筆)

G.学会発表

H.知的財産権の出願・登録状況

特許公開

・造血幹細胞及び造血前駆細胞の

増幅方法:特開 2005-204539(2005. 8. 4)

Ⅲ. 平成 17 年度 分担研究報告書