

外科的領域の視点から見た検討

分担研究者 澤 芳樹 (大阪大学心臓血管外科教授・未来医療センター長)

研究要旨

基礎研究の成果を社会的経済的価値の創造に結びつける未来創薬や未来医療等のイノベーション実現のために、治験を含む精度の高い臨床研究の活性化が、わが国にとって国民の健康増進のみならず、とりわけ大きな国益にもつながる。しかし国際ハーモナイゼーションを謳いつつも、ヒトに対する有効性、安全性の審査環境整備不良の問題から、わが国の治験承認は円滑さを欠き医療産業化で、欧米諸国に圧倒的な遅れをもたらしており、再生医療においても、産業化、製品化についての遅延がすでに懸念されている。

たとえば心臓外科領域では新しい人工心臓が本邦でも開発され、これまで外国製しかなかったなかで新たな治験が推進されつつある。一方、重症心不全治療の解決策として新しい再生型治療法も展開が推進されつつあり、自己細胞による細胞移植の臨床試験や治験申請も開始されようとしているが、特に代替療法のない少数例を対象とするいわゆるオーファンの製品には、改正されたとはいえ製薬中心の現行薬事審査システムでは迅速性を欠くことは否めない。

そこで、外科領域において、特に重症心不全に対する再生治療および人工心臓に関する円滑な治験推進のために調査を行ったのでその結果を報告する。

A. 研究目的

基礎研究の成果を社会的経済的価値の創造に結びつける未来創薬や未来医療等のイノベーション実現のために、治験を含む精度の高い臨床研究の活性化が、わが国にとって国民の健康増進のみならず、とりわけ大きな国益にもつながる。しかし国際ハーモナイゼーションを謳いつつも、ヒトに対する有効性、安全性の審査環境整備不良の問題から、わが国の治験承認は円滑さを欠き医療産業化で、欧米諸国に圧倒的な遅れをもたらしており、再生医療においても、産業化、製品化についての遅延がすでに懸念されている。第3期科学技術基本計画では、治験を円滑に推進するために、支援体制整備、支援人材の確保育成、臨床研究推進や承認審査の環境整備等の「臨床研究推進のための橋渡し研究」による本邦の医療産業推進が提言されている。

そこで、外科領域において、特に重症心不全に対する再生治療および人工心臓等重症心不全の外科治療に関する製品等の円滑な治験推進の調査を行い、最終的に、外科領域の停滞している治験を推進展開できるような提言を行うことを目的とする。

B. 研究方法

重症心不全の外科治療の現況とともに、外科領域から見たこれまでの臨床試験と治験の現在の状況や今後の課題、治験推進の戦略基盤となる新たな戦略的プロ

セスについて、調査および研究を行った。

C. 結果

1. 重症心不全の外科治療の現況

心不全に対する治療法として、 β ブロッカーやACE-inhibitorによる内科治療が行われるが、それらも奏功しないほど重症化した場合には、補助人工心臓や心臓移植等の置換型治療が有効で、我々も本邦における臨床成績を報告し、その臨床的有用性を実証してきた。

重症心不全のうち、外科治療の対象となるものには、進行した弁膜症や高度の心筋虚血に起因するもの、急性心筋梗塞やその合併症、急性心筋炎、虚血性心筋症(ICM)や拡張型心筋症(DCM)などによる慢性心不全やその急性増悪など、多種多様な原因がある。これらの原因と重症度に応じて弁形成術や置換術、冠動脈バイパス術、左室形成手術、機械的補助循環などが適用される。

このうち、ICMやDCMによる高度の左室機能低下から心不全を来たしたものについては、長らく心臓移植のみが有効な治療法とされてきた。しかしながら、心臓移植ドナーの極めて限られた状況から、その他の外科治療が試みられるようになり、心臓移植の代替治療として大いに注目されるようになった。一方で、最近ではこれらの手術の限界もしだいに明らかにされる

ようになり、手術法の改良や適応の確立に努力が続けられている。

しかし、これら重症心不全に対する置換型治療はドナー不足や免疫抑制、合併症など解決すべき問題が多く、すべての重症心不全患者に対する普遍的な治療法とは言い難い。

一方、最近、重症心不全治療の解決策として新しい再生型治療法の展開が不可欠と考えられる。心筋細胞は、殆ど分裂しないため、不全心筋において障害を受けた心筋細胞は最終的に apoptosis 等によりその数は減少する。しかし、最近、心筋細胞等による心筋への細胞移植は心機能を改善する事が報告され、筋芽細胞による細胞移植の臨床応用が開始されている。

我々は、重症心不全に対する再生治療の臨床応用を目指して、自己細胞による再生治療法の前臨床試験や、臨床試験の準備を行うとともに、より広範囲の心筋再生治療法を目指した細胞シート工学による再生治療法の開発を行ってきた。このような心筋再生治療法のトランスレーショナルリサーチによる展開を報告する。

たとえば、自己筋芽細胞及び自己骨髄細胞による心筋再生については、心筋梗塞による慢性心不全犬に、自己骨格筋芽細胞及び骨髄単核球細胞の併用移植を行ったところ、それぞれの単独群に比し、心機能及び壁厚の回復と、リモデリングの抑制を認めた。この前臨床試験の結果より、ヒト筋芽細胞を GMP に準拠して培養する CPC を整備するとともに、GCP に準じた客観性の高い臨床試験プロトコールを作成した。現在、左室補助人工心臓を要する重症虚血性心疾患に対する自己細胞療法の前臨床試験を開始の予定である。

一方、最近自己筋芽細胞シートによる心筋再生に取り組んでいる。広範囲の心筋再生治療法を開発するため、温度感応性培養皿を用いて自己筋芽細胞シートを作成し、心筋症ハムスターの不全心に移植したところ、均一構造をとって生着し、心機能の改善、生存率の向上がみられた。現在、自己骨格筋細胞によるシートの有効性を、豚心筋梗塞モデルおよび拡張型心筋症モデルである高速ペーシングによる犬心不全モデルを用いた前臨床試験で良好な結果を得たので、倫理委員会の承認を経て、臨床試験の開始を予定している。

2. 実例による問題提示

外科領域において、たとえば人工心臓の場合、E 社のノバコア型は現在欧米で第 4 世代が使われているが、本邦では第一世代からの変更が不可能で、再治験を提示され、最終的には E 社はノバコアの販売を中止した。これにより、現在、埋め込み型人工心臓は、本邦では治験中のもの意外に使用できず、医療レベルの低下すなわち国民の健康に不利益をもたらすという大変厳しい結果を招いている。一方、生物由来製品における BSE の問題も過剰な審査が要求されており、2003 年

から米国はもとより中国を含めて全世界で使用されている E 社の牛心膜を使用したマグナと呼ばれる生体弁は弁口面積が大きく、高齢者の手術に有効であるが、その承認が大変遅れており、現在日本では有効面積の小さな旧型生体弁しか使われておらず、日本の高齢者はよりリスクが高く不利な手術を強いられているのが現状である。さらに、T 社の筋芽細胞移植の治験では、確認申請において 3 年以上の歳月を要し、再生医療の産業化に暗い影を投げかけている。このような事例は一端であって、治験の停滞が、わが国にとって国民の健康増進を妨げ、とりわけ大きな国民への不利益となっており、日本の医療レベルの低下と閉塞感をもたらしている。

3. 臨床試験と治験

ミレニアムプロジェクトとして再生医療・医学が開発されて以来、すでに 5 年以上の歳月がたつ。しかし、前述のように、種々の治験システムの問題から、再生医療として実現化されたものは 1 つとしてない。これまで、医師が主体的に行ってきた臨床研究には、高度先進医療、保険収載という出口があった。一方、薬剤のようないわゆるケミカル物には、治験、承認、保険収載、上市という出口があった。しかし、ミレニアムプロジェクトが開始された時点から制度に大きな変革があった。すなわち

(1) 高度先進医療の廃止、適応外・未承認薬剤の先進医療での使用が認められなくなった

(2) 医師主導型治験の導入である。

高度先進医療の廃止に伴い、これによる臨床応用を目指していた研究グループは

①臨床研究にのみを行い、治療法の一般化には背を向ける

②臨床研究の成果を治験に移行させる努力を行う

③臨床研究を行わず、治験を開始する

のいずれかを選択することとなった。

当初「医師主導型治験」は、薬剤の適応拡大を目的として創設されたと聞いているが、現在の再生医療製品の多くは大学発のシーズであるため、再生医療製品の出口にむけ、この制度が活用され方向性がある。企業は、当初より治験を行うため、システムとしての影響は従来から少なかったといえる。

再生医療に関する研究が進行するに伴い、期待がふくらむ一方で、何らかの規制が必要ではないか、という声が上がってきた。いわゆる「生もの」を用いる医療としては

(1) 臓器移植

(2) 細胞・組織移植

(3) 再生細胞・組織製剤

にわけられる。

米国においては、(1) 臓器移植は米国保健省

(HHS) が所管し、(2) 細胞・組織移植 (cGTP 準拠) と (3) 再生細胞・組織製剤 (cGMP 準拠) に関しては FDA が所管している。これらは法律 (Act) により明確に定義されている。

臓器の定義としては血管構築のあるヒト由来臓器であり、我が国との違いの具体例としては「角膜」が細胞・組織移植に割り当てられていることである。また、羊膜は (3) に割り当てられている。

我が国の規制状況は

(1) 臓器移植は「臓器の移植に関する法律」による規制を受け、(3) 再生細胞・組織製剤は、臨床研究では「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、治験と製造販売に関しては薬事法による規制を受ける。一方で、(2) 細胞・組織移植に関しては規制がなく、なし崩し的に行われている現状を嘆くものであり、是非とも規制の強化をお願いしたい。例えば、骨バンク、羊膜バンクは 1314 号を満たしているとはとうてい思えない。

平成 18 年 9 月 1 日、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が施行され、一定程度の安全性・有効性が担保されることとなった。現在、私ども阪大心臓血管外科では、本学倫理委員会の承認を受けヒト幹細胞研究の申請を行うべく、厚生労働省 (厚労省) の担当官に事前相談をしているところである。ヒト幹細胞指針に基づき臨床研究を行っても、それが臨床への出口につながらない、いわば「不連続性」がある。

以上より、課題として、臨床研究と治験の連続性の確保があげられる。

臨床研究と治験の不連続性を解決するための方策のとして、以下を提案する

提案 1

ヒト幹細胞臨床研究の資料を GLP 水準の申請資料とみなす

提案 2

ヒト幹細胞臨床研究プロトコルは、治験では第 II 相からの開始とする

提案 3

希少疾病用医薬品として取り扱う

提案 4

ヒト幹細胞臨床研究と治験確認申請の共通プラットフォーム化

である。これらを実現するには、ヒト幹細胞臨床研究の水準の向上を求める必要があり、国としてもこれをサポートするような施策をとる必要がある。

大阪大学未来医療センターは、細胞治療のプロトコルをヒト幹細胞指針施行前より 9 つ行っており、我が国で最も多くの経験があることから、我が国における TR の拠点として全面的な支援をお約束する。

また、国としても、審査ガイドラインを策定・明示し、安心して臨床研究・治験が行えるように社会基盤

の整備をお願いしたい。

ただ、これを実現するためにはヒト幹細胞臨床研究の実施において、GLP に対応できる施設が必要であろう。

課題として、

- ・ヒト幹細胞臨床研究 (アカデミアのシーズ) をいかに効率よく治験・承認につなげるか
 - ・医師主導型治験の限界 (承認までは行かない) → 企業が参入しやすい環境の整備が必要
- という点が挙げられる。

4. 臨床応用に向けて

この課題を克服し、スムーズな再生医療シーズの臨床応用にむけ、以下の提案を行う。

提案 1: 臨床研究は無償

臨床研究の位置づけとして、これまで以上に安全性の確認のため、ということが強調される。従って、有償となることはありえない。

提案 2: 有償治験制度の導入

米国で市販されている再生医療製品のほとんどは、実は IND は通っていても、BLA には至っていない。我が国でも有償治験の実例はあり (丸山ワクチン)、不可能ではない。また、治験にのれば一定の収入が見込めるようになれば、企業にとってもインセンティブとなると思われる。

提案 3: 二重盲検は必須でないこととする

二重盲検は、可能であれば望ましいが、例えば重症心不全の患者さんに二重盲検を行うなど、人倫にもとる行為と言わざるを得ない。従って、二重盲検は必須ではないことを明示すべきである。二重盲検でなく、皆実薬で治療してもらえ、ということであれば、患者さんのリクルートもしやすくなり、また有償治験も可能となると思われる。

さきほど、医師主導型治験に限界があることをお示しした。現行のまま医師主導型治験が進められる弊害と思われる点を列挙した。

医師主導型治験は現在研究費でまかなわれているため、国のシーズ開発のための予算枠が減る。やはり治験は、民間に任せられるところは任せるべきである。民間が可能なのは民間に任せるべきであり、それが国による研究費の有効利用というものである。

企業への引き渡しのめどがつかないままの医師主導型治験ばかりになる可能性が否定できない。産業化と普遍化は産業界でなければできないことであり、アカデミアには無理ではないかと思われる。

スムーズなのは、初期のリスクはあるが、プライオリティーがある部分は研究者による施行。ペイする見込みがあるが、研究としてはプライオリティーが低くなったプロトコルは、企業にスピンオフするのが順当ではないか。企業ができることは、積極的にベンチ

ヤーをふくめた企業にまかせることで産業界の育成も可能になるし、研究者は独創性のある研究に専念できる。実際、研究者は治験にメリットを感じていないと思われる。

5. 新しい審査体制に向けて

そこで、再生医療製品の臨床応用一般化にむけ、審査システムが必要になる。課題は、ヒト幹申請の確認申請化後の審査体制の確立・充実である。私は、日本オリジナルの審査システムが必要ではないか、と考えている。米国のシステムをそのまま移入しても機能しないのではないかと、ただし、米国やEUのシステムは非常に参考になる。和魂洋才の精神である。

純粋な意味での欧米のシステム導入は、以下の観点から難しい、すなわち科学者の気質の違いとして、日本ではアカデミアから離れることへの恐怖感があり、キャリアパスの点では、米国：キャリアパスとして認められるのにたいして、日本ではキャリアパスとしてとらえられておらずインセンティブの点で、FDAでは研究と審査職を両立できるが、日本では難しい。

故に、純粋な意味での日本版FDAは困難ではないか、これまでの経緯として、日本での指針策定は学会が主導してきた。従って、学会の活用を提案したい。

実際、米国でもASTMとFDAが協力して基準を策定している。学会（アカデミア）との協調により再生医療を推進するとしても、大前提として安全性の確保のためイニシアティブは厚労省が担うべきであろう。イメージとしては、入れ物（枠組）を国が策定（=GGP: Good Guidance Practice）し、中身（GLs: ガイドライン）を厚労省（+医薬品医療機器総合機構（PMDA））と学会（アカデミア）で作ると言うものである。このイメージを実践するに当たり課題となるのは、国（厚労省+総合機構）の役割と学会（アカデミア）の役割分担である。

厚労省（国）の役割として求めたいのは、GGP（Good Guidance Practice）の策定である。

GGPとは、ガイダンスやガイドラインの記載策定方法、策定手順を明記したいわば手順書である。これまで多くのガイドラインや指針が策定されてきたが、いろいろな指針のコピーペーストで、整合性がとれていなかったり、使いにくいものであった、という感想をもっている。ガイダンス・ガイドラインに整合性を持たせるために整合性をもってGL（ガイドラインやガイダンス）が策定するための手引き（GGP）を作ることと、体系的にGL（ガイダンスやガイドライン）を策定するための戦略設定が必要。本当に何が必要で、優先順位をつけ、資源を集中投下する必要があると考えている。

また、申請書作成・審査におけるいわば“共通言語”があれば、アカデミアも企業にとっても参入しやすい

分野となると考えられる。手始めに、製品標準書、標準手順書（SOP）、製造指図書、記録書の雛形、記載手引きをGGPとして公開してはどうか。現在、阪大未来医療センターでは、これらを整備しており、TRの拠点としてこれから再生医療にかかるTRを進めようとしている研究者、企業、また国に対しても何らかの寄与ができると信じているし、やぶさかではないが。

私は、当研究班をベースに策定考慮してはどうかと考えている。学会（アカデミア）の役割は、まさに「汗をかく」という点にあるのではないかと考える。提言だけだと、言いっぱなしになってしまっているのではないか。まず、PMDAとの人事交流の推進。これにインセンティブを与えるのは学会の仕事である。阪大は、再生医療を推進するためにヒトをだしている。非常勤で審査官に採用もありうる。学会あるいはアカデミアからの派遣として、常勤での出向はさすがに敷居がたかい。この場合、審査員・ガイドライン作成委員のブール化を行うことで、我田引水にならないようにできるのではないかと考える。

E. 参考文献

1. Miyagawa S. Sawa Y. Taketani S. Kawaguchi N. Nakamura T. Matsuura N. Matsuda H. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation*. 2002; 105(21): 2556-2561
2. Funatsu T. Sawa Y. Ohtake S. takahashi T. Matsumiya G. Matsuura N. Nakamura T. Matsuda H. Therapeutic angiogenesis induced by myocardial injection of naked cDNA plasmid encoding hepatocyte growth factor in ischemic canine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002; 124(6): 1099-1105
3. Kondo H. Sawa Y. Fukushima N. Matsumiya G. Miyagawa S. Kitagawa-Sakakida S. Memon IA. Kawaguchi N. Matsuura N. Matsuda H. Re-organization of cytoskeletal proteins and prolonged life expectancy caused by hepatocyte growth factor in a hamster model of late-phase dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg*. (in press)
4. Memon IA. Sawa Y. Miyagawa S. Taketani S. Matsuda H. A combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in the canine hearts for ischemic cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* (2005; 130: 646-653)

研究課題名 細胞・組織を利用した医療機器等の安全性評価基準の
作成等に関する研究

分担研究項目 理工学領域の視点からみた検討、並びに倫理的視点からみた検討

分担研究者 大和 雅之（東京女子医科大学医学部 助教授）

分担研究者 掛江 直子（国立成育医療センター 成育保健政策科学研究室長）

A. 研究要旨

本研究は、再生医療に使用される細胞・組織利用製品に関する現行規制を、急速に発展する学問・技術の進歩、倫理上の重要ポイント、国際的動向など反映したものとするための見直し策について検討し、必要ならばより適切な安全評価基準を作成するなど規制環境のさらなる充実を図ることにより、わが国の再生医療の適正な推進基盤とすることを目的としている。

B. 研究目的

細胞・組織利用製品による再生医療は、ヒトの臓器や組織の確保が難しいわが国の医療状況下において高く期待されており、研究の進歩に伴う技術的な実現可能性の高まりとともに、医療としての実用化を望む声がますます強くなっている。その一方で、これらの製品は新規性が高いためリスク予測が難しく知見も限られている。

本年7月の総合科学技術会議の「科学技術の振興及び成果の社会への還元に向けた制度改革について(中間報告)」において、再生医療などの細胞・組織利用製品についての安全評価基準の明確化や確認申請・治験計画届に係る調査における重複部分の簡素化について、早急に検討するよう求められており、至急対応する必要がある。(平成18年度中に検討を開始し平成19年夏までに結論を出すように求められている。)

また、先般、国会議員により、「自家細胞を用いた再生医療を推進する議員の会」が結成され、再生医療の議員立法化に向けた検討が開始さ

れたことなど、再生医療の規制の見直しに向けた動きが急速に進められており、これら社会的要請に基づく早急な対応が必要である。

現在、再生医療に使用される細胞・組織利用製品については、治験を開始する前に、品質・安全性に関する確認申請を行い、厚生労働大臣の確認を受ける必要があり、この諸手続きについては平成12年に示されているが、日進月歩の領域であるにもかかわらずその後の見直しがされていない。

また、この分野で先行する米国に続き、欧州においても細胞・組織利用製品の規制環境整備への動きがあり、わが国の規制を国際水準に整合させる観点から、欧米の動向を勘案した見直しも検討する必要がある。

これらの研究成果により、再生医療の規制の枠組みなど、制度のあり方を行政的に検討する際の基本的な資料として活用し、安全評価のためのガイドラインの整備を行う。確認申請資料の内容やガイダンスの整備を行うことにより、細胞・

組織利用製品等の申請や承認の円滑化が図られ、既存の医薬品や医療機器では治療が不可能であった疾患に対して、新たな治療法の開発が促進されるなど、わが国の再生医療の発展に寄与すると考えられる。その結果、ひいては国民の保健・医療の向上に大いに貢献する可能性につながるものと期待される。

C. 研究結果

新たな医薬品や医療機器の適用に関する規制に関する考え方として、患者の新たな治療を受ける権利を増大すること、安全性を確保すること、倫理的妥当性を確保すること、及び社会的認知や理解を得ることは極めて重要な要素であり、関係者はそれらの実現に向けての努力を絶えず行う必要がある。このために規制は、患者の新たな治療を受ける権利の増大と安全性の確保というせめぎ合う2要件をともに最大化する方向で満足させる必要がある。前者の要件を充たそうとすれば、行政による規制は最小限に設定し、運用される必要があるが、新規治療技術の適用に伴う患者の安全性に関する最低限の基本的要件は保証する必要がある。

確認申請の制度はこうした理念に沿って運用される必要がある。

確認申請に際して参照すべき公的文書としては、医薬発第1314号の別添1「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的な考え方」や別添2「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」がある。これらは、平成12年に通知されたものである。多種多様の製品や適応症を想定したもので、具体的な個々の事例に必ずしもすべてが当てはめられる訳ではないが、基本的な概念／原則や留意事項は網羅されていると考えられる。各国の

ガイドラインや考え方も個々の製品や臨床適応に応じたケースバイケースの原則でフレキシブルに対応する必要性から、本指針のような原則及び一般的留意事項というミニマムコンセンサスパッケージの提示に止めている。

しかし、現在、これらの文書の改訂を求める要請も少なからず寄せられている。再生医療等は個々の患者に対するオーダーメイド医療であるため、一般の医薬品等に比べ安全性、有効性の評価が難しい。そのため、再生医療では確実な有効性が未知数のまま、臨床試験から有効な結果が得られることを期待しているのが現状である。また、再生医療等に用いるヒト由来細胞・組織利用製品は一般の医薬品のように承認前例がなく、確認すべき必要最小限の項目を絞ることが困難である。さらに、研究の進歩の早いこの分野において、現時点での改訂は近い将来さまざまな新たな問題が発生することが容易に想定できる。とはいえ、後に述べるように、経験の蓄積や学問・技術の進歩を反映したミニマムコンセンサスパッケージの拡大や記述のわかりやすさは常に求められるところであり、こうした観点での規制のより一層の明確化が望まれているのも事実である。規制の明確化の方法については、形式や内容ともに今後の議論に待つべきところも多いが、内容面では以下のような点が検討事項となるかも知れない。

例えばエンドトキシンや生分解性高分子等のスキャフォールドを用いる際のように、具体的な方法や、数値に関して、盛り込めるところがあれば盛り込む、あるいは参照すべき通知等があれば、明記する。一方、CMC及び安全性確保に関する基準については、各国ともウイルス等の微生物及びプリオン制御、エンドトキシン等の明確なケースを除いて技術的に詳細なものは示していない。さまざまな製品及び臨床適応を考慮す

ると具体的な基準や試験方法を一律に定めることは一般には不合理であること、また臨床試験の進行状況、経験、関連する科学技術の進歩によっても必要なデータや情報の種類や量は変わる可能性があり、ケースバイケースの原則で、試験・評価し、その妥当性を示すのが最も合理的であるとの認識が各国では一般的であることによる。なお、わが国の確認申請においては、暫定基準値を設け、治験の進行に従って適切な規格値を設定していくとの考え方は、ガイドラインに盛り込まれてもよいと考えられる。

その他、以下の事項も検討事項とするべきとの意見もある。

1. 医薬発第 1314 号(別添 2)「第 2 章第 8 品質管理 2 ロットを構成しない製品の原材料及び最終製品等の品質管理法」において「——、各製品の使用目的や使用方法に適合する適切な品質規格、出荷基準等を設定し、管理すること」とあるが、ロットを構成し得る製品とほぼ同じ規格設定を求められていると考えられる。ロットを構成し得る製品とそうでない製品の区別に対する配慮がほとんどされていない。
2. ロットを構成し得る製品とそうでない製品は、一般的に、それぞれ Allogenic、Autologous と考えられているが、既に米国で治験が行われている中絶胎児脳を用いたパーキンソン病治療等では、Allogenic であってもロットを構成しない場合がありえる。国内での申請ではロットを構成しない場合が先行していることから、ロットを構成し得る製品の例外としてロットを構成しない製品を扱うのではなく、ロットを構成しない製品の申請がいかにあるべきかを書き込むことを検討する必要がある。
3. 自家細胞と他家細胞を用いた場合の区別

が不明瞭であるためにロット管理等が明確でない。

4. 別添 2「第 2 章第 8 品質管理(8)細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験」において「細胞由来の各種目的外生理活性物質について必要に応じて適切な許容量限度試験を実施すること」とあるが生理活性物質の種類が多すぎて何が重要なのか明確でない。
5. 別添 2「第 4 章細胞・組織加工医薬品等の非臨床安全性試験」において、「1. 加工細胞の性質の変化を、表現系、染色体検査等を行い解析すること」では解析方法に関し明確でない。

なお、規制のより一層の明確化の方法に関する今後の課題として、現行の医薬発第 1314 号そのものの改訂も考えられるが、不明瞭と判断される箇所の事例を入れたわかりやすい解説書や Q&A、確認申請を視野に入れた重要箇所の抜粋した解説書及び安全性ガイドライン等の「医薬発第 1314 号の補足ともいえるものの作成」が最も効率的な対応の一つであるかも知れない。ところで、審査者と申請者との関係については以下のような意見もあった。

1. 個別の審査基準に関して記載がときに抽象的であり、曖昧なため審査者の裁量権が不適切に増大し、審査者・申請者ともに迷うことがある
2. 審査の大体のタイムフレームが決まっていないため、これも審査者の裁量権の増大につながっている
3. 裁量権が不適切に大きいことと関連して、審査者の責任が重すぎる
4. 審査官の数が、米国などと比して圧倒的に少ない
5. 審査者と申請者のコミュニケーション不足

6. 一部の申請者における安全性に対する認識不足

これらが複合化して審査結果や所要時間に対する予測性を困難にし、企業が投資しにくい環境を造り出していると思われる。

その他以下の意見もあった。

1. 通知の理念が審査者・申請者に十分に伝わっていない
2. 部会に到達するまでの時間が長い
3. 申請の基本的な安全性や技術レベルの問題

D. 結論

臨床試験(臨床研究、トランスレーショナルリサーチ、治験)の開始にあたって重要な要素として、想定される臨床使用上の先端医療としての有用性に関する期待(救命・救急性、既存療法の限界を超える可能性)、及び期待される有用性とのバランスを考慮した製品の品質及び製造(CMC)の恒常性確保、安全性確保、倫理的妥当性の保持である。

品質及び安全性確保に関する基準について、ウイルス等の微生物及びプリオン制御、エンドトキシン等の明確なケースを除いて技術的に詳細なものを示すことは必ずしも適切ではない。さまざまな製品及び臨床適応を考慮すると具体的な基準や試験方法を一律に定めることは一般には不合理であること、また臨床試験の進行状況、経験、関連する科学技術の進歩によっても必要なデータや情報の種類や量は変わる可能性があり、ケースバイケースの原則で、試験・評価し、その妥当性を示すのが最も合理的であると考えられるからである。わが国における再生医療の推進のために確認申請においては、暫定基準値を設け、治験の進行に従って適切な規格値を設定していくとの考え方は、ガイドラインに盛り込まれてもよ

いかも知れない。

非臨床試験についても、技術的に可能な範囲で、臨床適応を目指す有効性及び安全性上の根拠とその妥当性を示すことが望まれる。

今後、さらに引き続き検討を重ね、再生医療に使用される細胞・組織利用製品について研究、開発、確認申請、評価等を効率的、効果的、合理的に行う上での基本的考え方、必要と思われる技術、データ、安全性評価指標の主要項目、倫理的遵守事項等についての考え方が整理されることが期待される。

E. 補遺

機構会議室でおこなわれた 2 度にわたる議論では、906 号および 1314 号に対する申請側(澤先生及び大和を指す)からの問題提議に関して、他の委員(厚労省側)からの説明という形で展開された部分が少なくなく、それなりに有意義であったと考えないわけではないが、委員の構成に大きな疑問を感じた。委員会は、その大半を厚労省系の人間が占めており、内輪の議論でしかないとの批判を否定できない。確認申請の経験のある企業のヒアリングに関しても、各企業から 1 名が参加し、20 名以上の委員会側を前にした弱腰のプレゼンに対して、委員会側から批判の集中砲火を浴びせるといった常規を逸したものであり、厚労省および機構に非なしとの結論を導くための儀式的域を出ていない。

1314 号に関して、具体的な方法や、数値に関して審査側の考えを盛り込むべきとの澤先生及び大和の指摘に対して、あえて具体的に書き込まないことが厚労省側の親心であるとの解答は、納得のいくものではなかった。素材等の他のガイドラインは、具体的な数値を書き込むことで、申請にあたって無用に煩雑な作業を省くための工夫として機能している。日本薬局方においても同様の精神である。この点に関しては、業界、学者、国立研究機関、患者など議論の輪を大きくした上で再度、検討すべきである。

1314 号に関する問題点として、議論でも指摘があったように、ロットを構成しうる製品とそうでない製品の区別に対する配慮がほとんどないことが大きい。前者がアロジェニックであり、後者がオートロガスであるような議論の流れであったが、すでに米国で治験が始まっている中絶胎児脳を用いたパーキンソン病治療等では、アロジェニックであってもロットを構成しない場合がありえる。国内での申請ではロットを構成しない場合が先行し

ていることから、ロットを構成しうる製品の例外としてロットを構成しない製品をあつかうのではなく、ロットを構成しない製品の申請がいかにあるべきかを書き込むべきであると考ええる。

担当とされた工学的側面からのコメントに関しては、繰り返しになるが具体的な検査方法、具体的な数値を書き込むべきと再度指摘したい。FDA のガイドラインで散見する科学的には無根拠と思われる数字(細胞生存率 70%など)は、もしも問題であるならば、今後、科学研究によって改善すればよいのであって、むしろテンタティブな数値を書き込む勇氣と気構えを評価すべきと考える。厚労科研費の少なくとも一部は、このような数値の科学的確立とその向上を目的に支出されるべきであるし、国立研究機関はこのような方法、数値の取得に努力すべきであり、得られた成果は国家のひいては人類の財産とすべきである。

生分解性高分子等のスキャフォールドを用いる際の留意すべき点に関する記述が、他に比して問題が少ないように見えるのは、平成 7 年 6 月 27 日薬機構第 99 号医療機器開発課長通知「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的試験のガイドラインについて」等の具体的な方法に関する参照を明記しているからである。他の項目の記述もこれにならう必要がある。また、同時にこれら方法について適切なアップデートが必要である。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号、頁	出版年
Kanayasu-Toyoda, T, Suzuki,T., Oshizawa,T., Uchida,E., Hayakawa,T., Yamaguchi T.	Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase Ci in Neutrophilic Differentiation Cells.	Journal of Cellular Physiology	211, 189-196	2007
Yamaguchi, T. Uchida,E.	Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products.	CCDT Journal	7, 203-208	2007
Mizuguchi H., Funakoshi N., Hosono T., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T.	Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs.	Hum. Gene Ther.	18, 74-80	2007
Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H.	Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice.	Gene Ther.	13, 1118-1126	2006
Minamisawa S, Uemura N, Sato Y, Yokoyama U, Yamaguchi T, Inoue K, Nakagome M, Bai Y, Hori H, Shimizu M, Mochizuki S, Ishikawa Y.	Post-transcriptional downregulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in the atrial myocardium.	FEBS Lett,	580, 2247-2252	2006
山口照英	ICH 遺伝子治療専門家会議シカゴミーティングと今後の展望	ファルマシア	42, 357-360	2006
山口照英	医薬品各条の改正点－生物薬品	薬局	57, 89-95	2006
山口照英	Gene Therapy Discussion Group の動向について	医薬品研究	38, 50-50	2007
Mizuho Harashima, Shingo Niimi, Hitomi Koyanagi, Masashi Hyuga, Seiji Noma, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa	Change in Annexin A3 expression by regulatory factors of hepatocyte growth in primary cultured rat hepatocytes.	Biol. Pharm. Bull.	29, 1339-1343	2006
Koizumi N., Yamaguchi T., Kawabata K., Sakurai F., Sasaki	Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production.	J. Immunol.	178, 1767-1773	2007

T., Watanabe Y., Hayakawa T., and Mizuguchi H.				
Kurachi S., Koizumi N., Sakurai F., Kawabata K., Sakurai H., Nakagawa S., Hayakawa T., and Mizuguchi H.	Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon.	Gene Ther.	14, 266-274	2007
Sakurai F, Murakami S, Kawabata K, Okada N, Yamamoto A, Seya T, Hayakawa T, and Mizuguchi H.	The short consensus repeats 1 and 2, not the cytoplasmic domain, of human CD46 are crucial for infection of subgroup B adenovirus serotype 35.	J. Control Release	113, 271-278	2006
Nukiwa M, Andarini S, Zaini J, Xin H, Kanehira M, Suzuki T, Fukuhara T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Saijo Y, Nukiwa T, and Kikuchi T.	Dendritic cells modified to express fractalkine/CX3CL1 in the treatment of preexisting tumors.	Eur J Immunol.	36, 1019-1027	2006
Kida S, Maeda M, Hojo K, Eto Y, Gao JQ, Kurachi S, Mizuguchi H, Hayakawa T, Mayumi T, Nakagawa S, and Kawasaki K.	Design and synthesis of a Tat-related gene transporter: A tool for carrying the adenovirus vector into cells.	Bioorg. Med. Chem. Lett.	16, 743-745	2006
Hama S., Akita H., Ito R., Mizuguchi H., Hayakawa T., and Harashima H.	Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems.	Mol. Ther.	13, 786-794	2006
Koizumi N., Kawabata K., Sakurai F., Watanabe Y., Hayakawa T., and Mizuguchi H.	Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, alphav integrin, and heparan sulfate binding reduce in vivo tissue transduction and toxicity.	Hum. Gene Ther.	17, 264-279	2006
Kawabata K., Sakurai F., Koizumi N., Hayakawa T., and Mizuguchi H.	Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells.	Mol. Pharm.	3, 95-103	2006
Takuo Suzuki, Tomoko Mogami,	Screening of novel nuclear receptor agonists by a	Phytomedicine	13, 401-411	2006

Hiroshi Kawai, Tetsu Kobayashi, Youichi Shinozaki, Yoji Sato, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi	convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives.			
Kawai, H., Suzuki, T., Kobayashi, T., Ishii-Watabe, A., Sakurai, H., Ohata, H., Honda, K., Momose, K., Hayakawa, T., and Kawanishi, T.	Caspase cascade proceeds rapidly after cytochrome c release from mitochondria in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death.	J. Pharmacol. Sci.	103, 159-167	2007
新見伸吾、原島 瑞、 日向昌司、野間誠司、 川西 徹、早川堯夫	血管新生療法の現状と展望	医薬品研究	37, 641-670	2006
福永悟史、鹿野真弓、 田中克平、早川堯夫	細胞組織利用製品の品質確保	再生医療	5, 27-32	2006
早川堯夫	局方の国際調和と日本薬局方の 今後の動向	医薬品研究	37, 676-696	2006
早川堯夫	第十五改正日本薬局方の概要、医 薬品各条（生物薬品）及び今後の 動向	医薬品研究	37, 769-788	2006
早川堯夫	第十四改正日本薬局方第二追補 について	医薬品研究	37,.27-4 1	2006
早川堯夫	Biotechnology（品質）に関する ガイドラインの動向について	医薬品研究	38, 14-23	2007

Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes the Translocation of Protein Kinase C ζ in Neutrophilic Differentiation Cells

TOSHIE KANAYASU-TOYODA,¹ TAKAYOSHI SUZUKI,¹ TADASHI OSHIZAWA,¹ ERIKO UCHIDA,² TAKAO HAYAKAWA,² AND TERUHIDE YAMAGUCHI^{1*}

¹Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

²National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Previously, we suggested that the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-p70 S6 kinase (p70 S6K) pathway plays an important role in granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-dependent enhancement of the neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells. While atypical protein kinase C (PKC) has been reported to be a regulator of p70 S6K, abundant expression of PKC ζ was observed in myeloid and lymphoid cells. Therefore, we analyzed the participation of PKC ζ in G-CSF-dependent proliferation. The maximum stimulation of PKC ζ was observed from 15 to 30 min after the addition of G-CSF. From 5 to 15 min into this lag time, PKC ζ was found to translocate from the nucleus to the membrane. At 30 min it re-translocated to the cytosol. This dynamic translocation of PKC ζ was also observed in G-CSF-stimulated myeloperoxidase-positive cells differentiated from cord blood cells. Small interfering RNA for PKC ζ inhibited G-CSF-induced proliferation and the promotion of neutrophilic differentiation of HL-60 cells. These data indicate that the G-CSF-induced dynamic translocation and activation processes of PKC ζ are important to neutrophilic proliferation.

J. Cell. Physiol. 211: 189–196, 2007. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Hematopoietic cell differentiation is regulated by a complex network of growth and differentiation factors (Tenen et al., 1997; Ward et al., 2000). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and its receptors are pivotal to the differentiation of myeloid precursors into mature granulocytes. In previous studies (Kanayasu-Toyoda et al., 2002) on the neutrophilic differentiation of HL-60 cells treated with either dimethyl sulfoxide (DMSO) or retinoic acid (RA), heterogeneous transferrin receptor (Trf-R) populations—transferrin receptor-positive (Trf-R⁺) cells and transferrin receptor-negative (Trf-R⁻) cells—appeared 2 days after the addition of DMSO or RA. The Trf-R⁺ cells were proliferative-type cells that had higher enzyme activity of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein 70 S6 kinase (p70 S6K), whereas the Trf-R⁻ cells were differentiation-type cells of which Tyr705 in STAT3 was much more phosphorylated by G-CSF. Inhibition of either PI3K by wortmannin or p70 S6K by rapamycin was found to eliminate the difference in differentiation and proliferation abilities between Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells in the presence of G-CSF (Kanayasu-Toyoda et al., 2002). From these results, we concluded that proteins PI3K and p70 S6K play important roles in the growth of HL-60 cells and negatively regulate neutrophilic differentiation. On the other hand, the maximum kinase activity of PI3K was observed at 5 min after the addition of G-CSF (Kanayasu-Toyoda et al., 2002) and that of p70 S6K was observed between 30 and 60 min after, indicating a lag time between PI3K and p70 S6K activation. It is conceivable that any signal molecule(s) must transduce the G-CSF signal during the time lag between PI3K and p70 S6K. Chung et al. (1994) also showed a lag time between PI3K and p70 S6K activation on HepG2 cells stimulated by platelet-derived growth factor (PDGF), suggesting that some signaling molecules also may transduce between PI3K and p70S6K.

Protein kinase C (PKC) is a family of Ser/Thr kinases involved in the signal transduction pathways that are triggered by numerous extracellular and intracellular stimuli. The PKC

family has been shown to play an essential role in cellular functions, including mitogenic signaling, cytoskeleton rearrangement, glucose metabolism, differentiation, and the regulation of cell survival and apoptosis. Eleven different members of the PKC family have been identified so far. Based on their structural similarities and cofactor requirements, they have been grouped into three subfamilies: (1) the classical or conventional PKCs (cPKC α , β ₁, β ₂, and γ), activated by Ca²⁺, diacylglycerol, and phosphatidyl-serine; (2) the novel PKCs (nPKC δ , ϵ , η , and θ), which are independent of Ca²⁺ but still responsive to diacylglycerol; and (3) the atypical PKCs (aPKC ζ and ι/λ), where PKC λ is the homologue of human PKC ζ . Atypical PKCs differ significantly from all other PKC family

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; fMLP-R, formyl-Met-Leu-Phe receptor; RA, retinoic acid; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; Trf-R, transferrin receptor; BSA, bovine serum albumin; FITC, fluorescein isothiocyanate; PBS, phosphate-buffered saline; PKC, protein kinase C; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; p70 S6K, protein 70 S6 kinase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; siRNA, small interfering RNA; PMN, polymorphonuclear leukocyte.

Contract grant sponsor: Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

*Correspondence to: Teruhide Yamaguchi, Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.
E-mail: yamaguch@nihs.go.jp

Received 31 May 2006; Accepted 22 September 2006

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com.), 28 November 2006.

DOI: 10.1002/jcp.20930

members in their regulatory domains, in that they lack both the calcium-binding domain and one of the two zinc finger motifs required for diacylglycerol binding (Liu and Heckman, 1998). Romanelli et al. (1999) reported that p70 S6K is regulated by PKC ζ and participates in a PI3K-regulated signaling complex. On the other hand, Selbie et al. (1993) reported that the tissue distribution of PKC ζ is different from that of PKC ι/λ , and that PKC ι/λ appears to be widely expressed. If the p70 S6K could be activated by aPKC, the regulation of p70 S6K activation would seem to depend on the tissue-specific expression of PKC ι and/or PKC ζ . In neutrophilic lineage cells, the question is which aPKC participates in the regulation of p70 S6K on G-CSF signaling.

In this study, we show that G-CSF activated PKC ι , promoting its translocation from the nucleus to the cell surface membrane and subsequently to the cytosol in DMSO-treated HL-60 cells. We also show the translocation of PKC ι using myeloperoxidase-positive neutrophilic lineage differentiated from cord blood, which is a rich source of immature myeloid cells (Fritsch et al., 1993; Rappold et al., 1997; Huang et al., 1999; Debili et al., 2001; Hao et al., 2001). We concluded that PKC ι translocation and activation by G-CSF are needed for neutrophilic proliferation.

Materials and Methods

Reagents

Anti-p70 S6K polyclonal antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-PKC ι polyclonal antibody and monoclonal antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology and from Transduction Laboratories (Lexington, KY), respectively. Anti-PKC ζ polyclonal antibody was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-myeloperoxidase antibody was purchased from Serotec Ltd. (Oxford, UK). GF 109203X, and Gö 6983 were obtained from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA). Wortmannin was obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Anti-Histon-H1 antibody, anti-Fc γ receptor IIa (CD32) antibody, and anti-lactate dehydrogenase antibody were from Upstate Cell Signaling Solutions (Lake Placid, NY), Lab Vision Corp. (Fremont, CA), and Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), respectively.

Cell culture

HL-60, Jurkat, K562, U937, and THP-1 cells were kindly supplied by the Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Osaka, Japan). Cells were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated FBS and 30 mg/L kanamycin sulfate at 37°C in moisturized air containing 5% CO $_2$. The HL-60 cells, which were at a density of 2.5×10^5 cells/ml, were differentiated by 1.25% DMSO. Two days after the addition of DMSO, the G-CSF-induced signal transduction was analyzed using either magnetically sorted cells or non-sorted cells.

Magnetic cell sorting

To prepare Trf-R $^-$ and Trf-R $^+$ cells, magnetic cell sorting was performed as previously reported (Kanayasu-Toyoda et al., 2002), using an automatic cell sorter (AUTO MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). After cell sorting, both cell types were used for Western blotting and PKC ι enzyme activity analyses.

Preparation of cell lysates and immunoblotting

For analysis of PKC ι and PKC ζ expression, a PVDF membrane blotted with 50 μ g of various tissues per lane was purchased from BioChain Institute (Hayward, CA). Both a polymorphonuclear leukocytes (PMNs) fraction and a fraction containing lymphocytes and monocytes were isolated by centrifugation (400g, 25 min) using a Mono-poly resolving medium (Dai-Nippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) from human whole blood, which was obtained from a healthy volunteer with informed consent. T-lymphocytes were further isolated from the mixture fraction using the Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol. T-lymphocytes, PMNs, HL-60 cells, Jurkat cells, K562 cells, and U937 cells (1×10^7) were

collected and lysed in lysis buffer containing 1% Triton X-100, 10 mM K $_2$ HPO $_4$ /KH $_2$ PO $_4$ (pH 7.5), 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl $_2$, and 50 mM β -glycerophosphate, along with 1/100 (v/v) protease inhibitor cocktail (Sigma Chemical) and 1/100 (v/v) phosphatase inhibitor cocktail (Sigma Chemical). The cellular lysate of 10^6 cells per lane was subjected to Western blotting analysis. Human cord blood was kindly supplied from the Metro Tokyo Red Cross Corc Blood Bank (Tokyo, Japan) with informed consent. Mononuclear cells, isolated with the Lymphoprep $^{\text{TM}}$ Tube (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway), were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in the presence of G-CSF for 3 days. Cultured cells were collected, and the cell lysate was subjected to Western blotting analysis.

A fraction of the plasma membrane, cytosol, and nucleus of the DMSO-treated HL-60 cells was prepared by differential centrifugation after the addition of G-CSF, as described previously (Yamaguchi et al., 1999). After the cells that had been suspended in 250 mM sucrose/10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1/100 (v/v) protease inhibitor cocktail (Sigma Chemical) were gently disrupted by freezing and thawing, they were centrifuged at 800g, 4°C for 10 min. The precipitation was suspended in 10 mM Tris-HCl (pH 6.7) supplemented with 1% SDS. It was then digested by benzonuclease at 4°C for 1 h and used as a sample of the nuclear fraction. After the post-nucleus supernatant was re-centrifuged at 100,000 rpm (452,000g) at a temperature of 4°C for 40 min, the precipitate was used as a crude membrane fraction and the supernatant as a cytosol fraction. Western blotting analysis was then performed as described previously (Kanayasu-Toyoda et al., 2002). The bands that appeared on x-ray films were scanned, and the density of each band was quantitated by Scion Image (Scion, Frederick, MD) using the data from three separate experiments.

Kinase assay

The activity of PKC ι was determined by phosphorous incorporation into the fluorescence-labeled pseudosubstrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). The cell lysates were prepared as described above and immunoprecipitated with the anti-PKC ι antibody. Kinase activity was determined according to the manufacturer's protocol. In the analysis of inhibitors effects, cells were pretreated with a PI3K inhibitor, wortmannin (100 nM), or PKC inhibitors, GF 109207X (10 μ M) and Gö6983 (10 μ M) for 30 min, and then stimulated by G-CSF for 15 min.

Observation of confocal laser-scanning microscopy

Upon the addition of G-CSF, PKC ι localization in the DMSO-treated HL-60 cells for 2 days was examined by confocal laser-activated microscopy (LSM 510, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The cells were treated with 50 ng/ml G-CSF for the indicated periods and then fixed with an equal volume of 4.0% paraformaldehyde in PBS(-). After treatment with ethanol, the fixed cells were labeled with anti-PKC ι antibody and with secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase. They were then visualized with TSA $^{\text{TM}}$ Fluorescence Systems (PerkinElmer, Boston, MA).

Mononuclear cells prepared from cord blood cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in the presence of G-CSF for 7 days. Then, for serum and G-CSF starvation, cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 1% BSA for 11 h. After stimulation by 50 ng/ml G-CSF, the cells were fixed, stained with both anti-PKC ι polyclonal antibody and anti-myeloperoxidase monoclonal antibody, and finally visualized with rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG and FITC-conjugated anti-mouse IgG, respectively.

RNA interference

Two pairs of siRNAs were chemically synthesized: annealed (Dharmacon RNA Technologies, Lafayette, CO) and transfected into HL-60 cells using Nucleofector $^{\text{TM}}$ (Amaxa, Cologne, Germany). The sequences of sense siRNAs were as follows: PKC ι , GAAGAAGCCUUUAGACUUUTA; p70 S6K, GCAAGGAGUCUAUCCGAUGAUU. As a control, the sequence ACUCUAUCGCCAGCGUGACUUU was used. Forty-eight hours after treatment with siRNA, the cells were lysed for Western blot analysis. For proliferation and differentiation assay, cells were transfected with siRNA on the first day, treated with DMSO on the second day, and supplemented with G-CSF on the third day. After cells were subsequently cultured for 5 days, cell numbers and formyl-Met-Leu-Phe receptor (fMLP-R) expression were determined.

fMLP-R expression

The differentiated cells were collected and incubated with FITC-conjugated fMLP; then, labeled cells were subjected to flow cytometric analysis (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t*-test. Values of *P* < 0.05 were considered to indicate statistical significance. Each experiment was repeated at least three times and representative data were indicated.

Results**The distribution of atypical PKC in various tissues and cells**

Previously, we reported that the PI3K-p70 S6K-cMyc pathway plays an important role in the G-CSF-induced proliferation of DMSO-treated HL-60 cells, not only by enhancing the activity of both PI3K and p70 S6K but also by inducing the c-Myc protein (Kanayasu-Toyoda et al., 2002, 2003). We also reported that G-CSF did not stimulate Erk1, Erk2, or 4E-binding protein 1. The maximum kinase activity of PI3K was observed 5 min after the addition of G-CSF, and that of p70 S6K was observed between 30 and 60 min after. It is conceivable that any signal molecule(s) must transduce the G-CSF signal during the time lag between PI3K and p70 S6K. Romanelli et al. (1999) suggested that the activation of p70 S6K is regulated by PKC ζ and participates in the PI3K-regulated signaling complex. To examine the role of atypical PKC in the G-CSF-dependent activation and the relationship between atypical PKC and p70 S6K, the protein expression of PKC ζ and PKC ι in various human tissues and cells was analyzed by Western blotting. As shown in Figure 1A, both of the atypical PKCs were markedly expressed in lung and kidney but were weakly expressed in spleen, stomach, and placenta. In brain, cervix, and uterus, the expression of only PKC ι was observed. Selbie et al. (1993) have reported observing the expression of PKC ζ not in protein levels but in RNA levels, in the kidney, brain, lung, and testis, and that of PKC ι in the kidney, brain, and lung. In this study, the protein expression of PKC ι in the kidney, brain, and lung was consistent with the RNA expression of PKC ι . Despite the strong expression of PKC ζ RNA in brain (Selbie et al., 1993), PKC ζ protein was scarcely observed. Although PKC ι proteins were scarcely expressed in neutrophils and T-lymphocytes in peripheral blood, they were abundantly expressed in immature blood cell lines, that is, Jurkat, K562, U937, and HL-60 cells (Fig. 1B), in contrast with the very low expression of PKC ζ proteins. In mononuclear cells isolated from umbilical cord blood, which contains large numbers of immature myeloid cells and has a high proliferation ability, the expression of PKC ι proteins was also observed. Since Nguyen and Dessauer (2005) have reported observing abundant PKC ζ proteins in THP-1 cells, as a positive control for PKC ζ , we also performed a Western blot of THP-1 cells (Fig. 1B, right part). While PKC ι was markedly expressed in both THP-1 and HL-60 cells, PKC ζ was observed only in THP-1 cells.

These data suggested that PKC ζ and PKC ι were distributed differently in various tissues and cells, and that mainly PKC ι proteins were expressed in proliferating blood cells.

Stimulation of PKC ι activity by G-CSF

Among the 11 different members of the PKC family, the α PKCs (ζ and ι) have been reported to activate p70 S6K activity and to be regulated by PI3K (Akimoto et al., 1998; Romanelli et al., 1999). As shown in Figure 1, although the PKC ζ proteins were not detected by Western blotting in HL-60 cells or mononuclear cells isolated from cord blood cells, it is possible that PKC ι could functionally regulate p70 S6K as an upstream

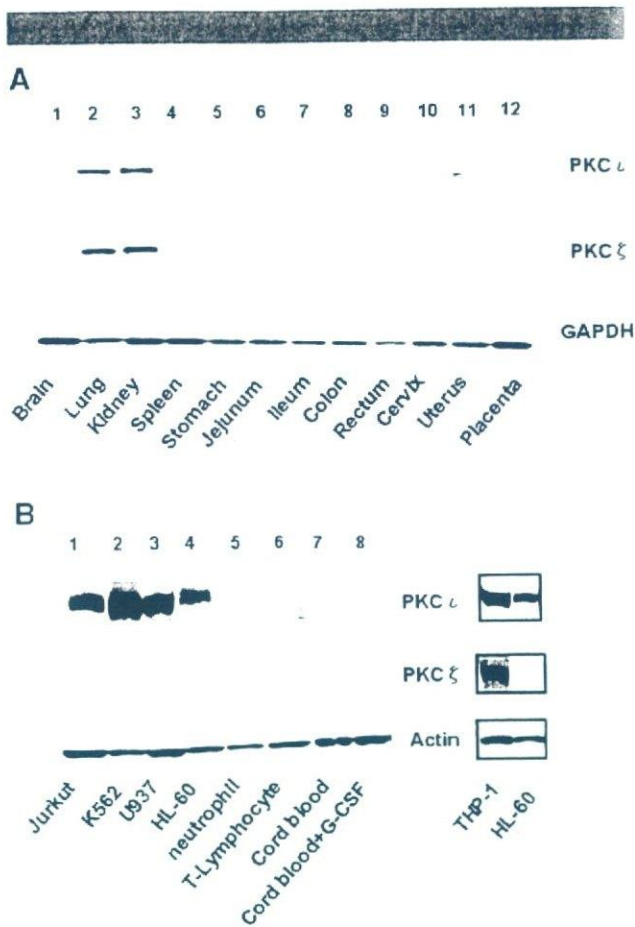


Fig. 1. Different distributions of PKC ζ and PKC ι . The protein expression of PKC ι appears in the upper part and that of PKC ζ in the middle part in various tissues and cells. **A:** 1, brain; 2, lung; 3, kidney; 4, spleen; 5, stomach; 6, jejunum; 7, ileum; 8, colon; 9, rectum; 10, cervix; 11, uterus; 12, placenta. Anti-GAPDH blot is a control for various tissues. **B:** 1, Jurkat cells; 2, K562 cells; 3, U937 cells; 4, HL-60 cells; 5, neutrophils; 6, T-lymphocytes; 7, mononuclear cells from cord blood in the absence of G-CSF; 8, mononuclear cells from cord blood in the presence of G-CSF. Anti-actin blot is a control. The right part shows immunoblots of PKC ι , PKC ζ , and actin of THP-1 cells as a positive control for PKC ζ . The cell numbers of THP-1 and HL-60 cells were adjusted in relation to other cells on the left parts.

regulator in these cells. Therefore, we focused on the role of PKC ι as the possible upstream regulator of p70 S6K in neutrophil lineage cells. First, we compared the expression of PKC ι in both Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells. PKC ι proteins were expressed more abundantly in Trf-R⁺ cells than in Trf-R⁻ cells (Fig. 2A, middle part), as with the p70 S6K proteins. A time course study of PKC ι activity upon the addition of G-CSF revealed the maximum stimulation at 15 min, lasting until 30 min. The G-CSF-dependent activation of PKC ι was inhibited by the PKC inhibitors wortmannin, GF 109203X, and Gö 6983. Considering the marked inhibitory effect of wortmannin on PKC ι and evidence that the maximum stimulation of PI3K was observed at 5 min after the addition of G-CSF, PI3K was determined to be the upstream regulator of PKC ι in the G-CSF signal transduction of HL-60 cells. The basal activity of PKC ι in Trf-R⁺ cells was higher than that in Trf-R⁻ cells, and G-CSF was more augmented. In Trf-R⁻ cells, PKC ι activity was scarcely stimulated by G-CSF. This tendency of PKC ι to be activated by G-CSF was similar to that of PI3K (Kanayasu-Toyoda et al., 2002).

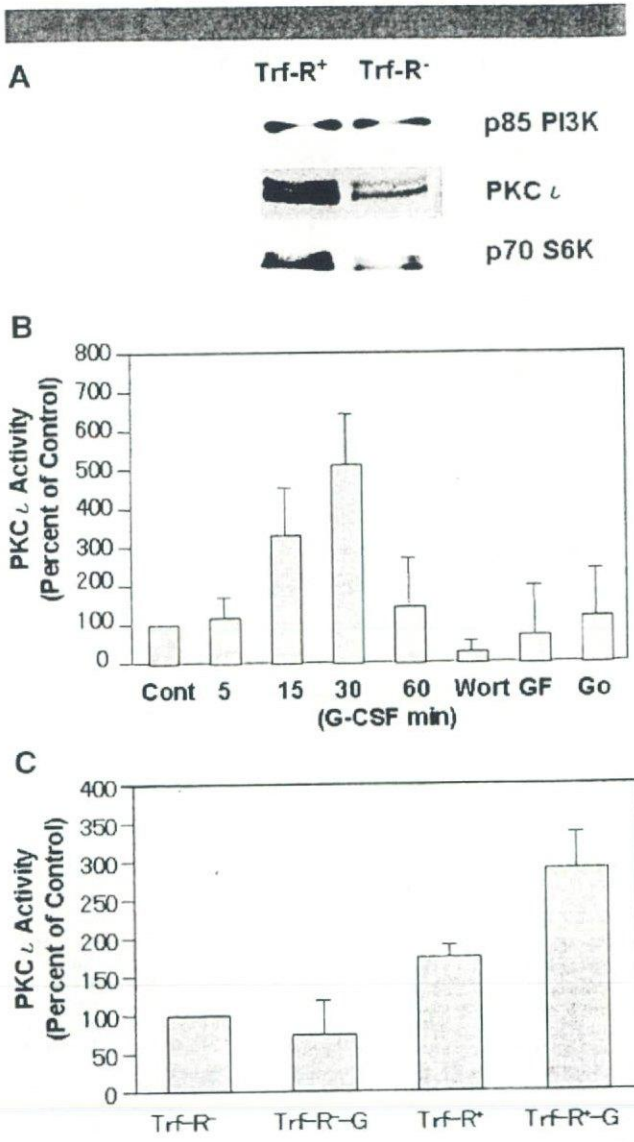


Fig. 2. Expression of PKC ι in Trf-R $^+$ and Trf-R $^-$ cells and effects of G-CSF on PKC ι activity. **A:** The expression of PKC ι in Trf-R $^+$ and Trf-R $^-$ cells was subjected to Western blot analysis after magnetic cell sorting. **B:** The G-CSF-dependent PKC ι activation of the DMSO-treated HL-60 cells was measured. The x-axis represents the time lapse (min) after the G-CSF stimulation and the y-axis percent of control that was not stimulated by G-CSF. Columns and bars represent the mean \pm SD, using data from three separate experiments. Wort: wortmannin (100 nM), GF: GF109207X (10 μ M), Go: Gö6983 (10 μ M). Cells were pretreated with each inhibitor and then stimulated by G-CSF for 15 min. **C:** The PKC ι activity in the Trf-R $^+$ and Trf-R $^-$ cells 30 min after the addition of G-CSF. The y-axis represents the percentage of control that was non-stimulated Trf-R $^-$ cells. Columns and bars represent the mean \pm SD, using data from three separate experiments.

Effects of G-CSF on PKC ι translocation

Muscella et al. (2003) demonstrated that the translocation of PKC ζ from the cytosol to the nucleus or membrane is required for c-Fos synthesis induced by angiotensin II in MCF-7 cells. It was also reported that high glucose induced the translocation of PKC ι (Chuang et al., 2003). These results suggest that the translocation of aPKC plays an important role in its signaling. To clarify the translocation of PKC ι , immuno-histochemical staining (Fig. 3) and biochemical fractionation (Fig. 4) in

DMSO-induced HL-60 cells were performed after the addition of G-CSF. In a non-stimulated condition, PKC ι in the HL-60 cells treated with DMSO for 2 days (Fig. 3, control) was detected mainly in the nucleus. Analysis of Western blotting (Fig. 4, left parts) and quantification of the bands (Fig. 4, right columns) also revealed that PKC ι was localized and observed mainly in the nuclear fraction (Fig. 4A). During the 5–15 min period after the addition of G-CSF, PKC ι was found to translocate (Figs. 3 and 4B) into the membrane fraction, after which it re-translocated into the cytosol fraction (Fig. 4C). In the presence of wortmannin, the G-CSF-induced translocation of PKC ι into the plasma membrane failed, but PKC ι was found to localize in the cytosolic fraction (Figs. 3 and 4B). Myeloperoxidase is thought to be expressed in stage from promyelocytes to mature neutrophils (Manz et al., 2002). In human cord blood cells (Fig. 3), PKC ι in the cells co-stained with anti-myeloperoxidase antibody was also localized in the nucleus after serum depletion (Fig. 3B top parts). Ten minutes after the addition of G-CSF, PKC ι was found to translocate into the membrane, and then into the cytosol at 30 min after the addition of G-CSF. In the presence of wortmannin, the G-CSF-induced translocation of PKC ι into the plasma membrane failed but PKC ι was found to localize in the cytosol. This suggested that the dynamic translocation of PKC ι induced by G-CSF is a universal phenomenon in neutrophilic lineage cells. Taken together, these data support the possibility that PI3K plays not only an important role upstream of PKC ι but also triggers the translocation from nucleus to membrane upon the addition of G-CSF.

In order to assess the purity of each cellular fraction, antibodies against specific markers were blotted. As specific markers, Histone-H1, Fc γ receptor 1a (CD32), and lactate dehydrogenase (LDH) were used for the nuclear, membrane, and cytosolic fractions, respectively. The purities of the nuclear, membrane, and cytosolic fractions were 82.0, 78.5, and 72.2%, respectively (Fig. 4D).

Effects of siRNA for PKC ι on proliferation and differentiation

To determine the role of PKC ι in neutrophilic proliferation and differentiation, PKC ι was knocked down by siRNA. When the protein level of PKC ι was specifically downregulated by siRNA for PKC ι (Fig. 5A), G-CSF failed to enhance proliferation of the cells during 5 days' cultivation (Fig. 5B). The effect of siRNA for PKC ι on neutrophilic differentiation in terms of fMLP-R expression was also determined. As shown in Figure 5C, fMLP-R expression was promoted by siRNA for PKC ι in either the presence (lower part) or absence (upper part) of G-CSF. These data indicate that PKC ι positively regulates G-CSF-induced proliferation and negatively regulates the differentiation of DMSO-treated HL-60 cells.

Discussion

We previously reported that PI3K/p70 S6K plays an important role in the regulation of the neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells. Akimoto et al. (1998) and Romanelli et al. (1999) reported that p70 S6K is regulated by aPKC and aPKC λ /PKC ζ , respectively. At first, we showed that the distribution of PKC ζ and PKC ι proteins in various human tissues and cells was not similar (Fig. 1A), and that PKC ι are more abundantly expressed in proliferating blood cells: Jurkat, K562, U937, and HL-60 cells (Fig. 1B). Moreover, PKC ι proteins were also observed in cultured mononuclear cells of cord blood, in which the myeloid progenitors were enriched in the presence or absence of G-CSF (Fig. 1B). The myeloperoxidase-positive cells as neutrophilic lineage cells, a myeloid marker, were also stained with the antibody of PKC ι (Fig. 3B). Although PKC ζ proteins are barely detected in

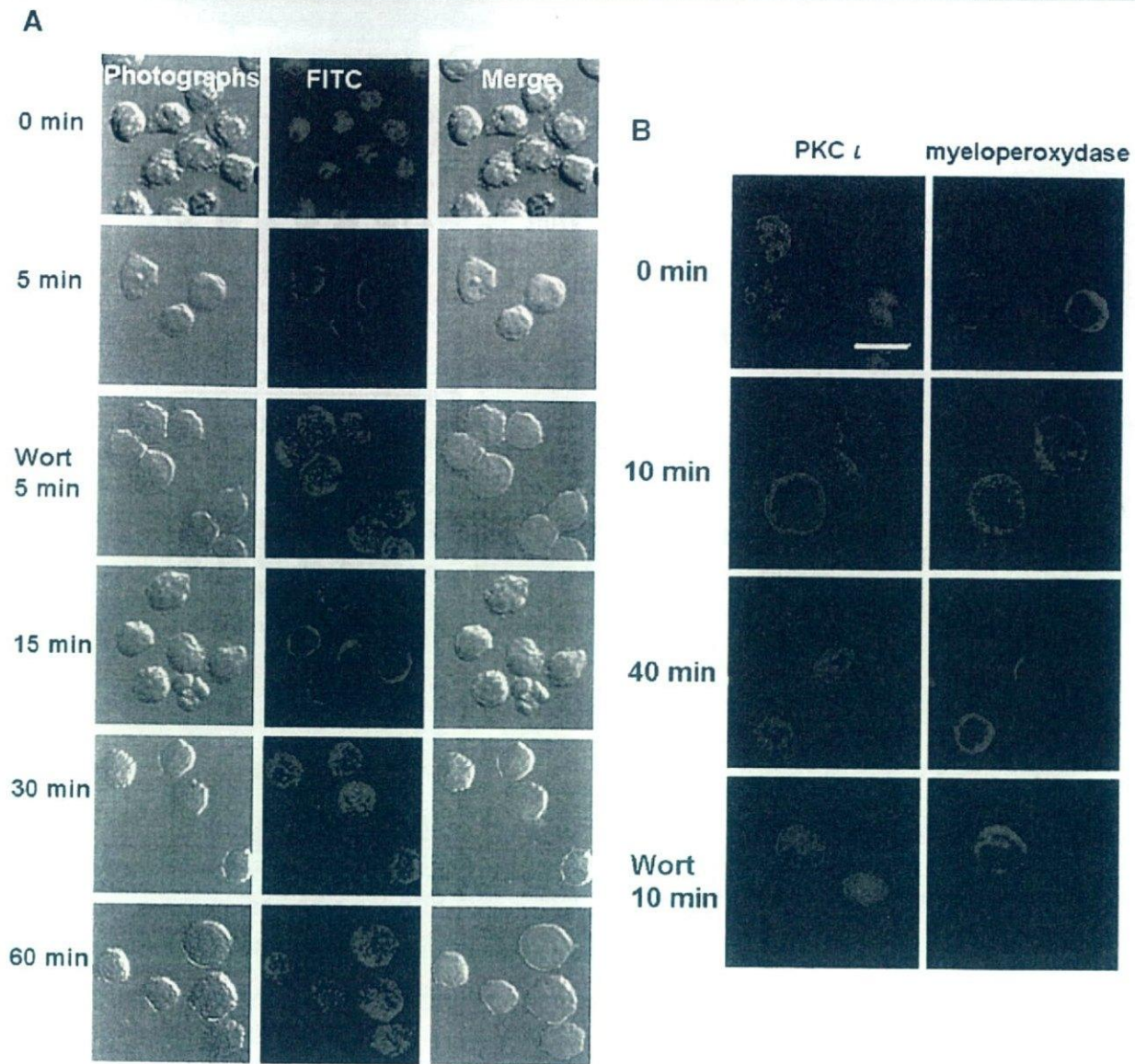


Fig. 3. Translocation of PKC ζ after the activation of G-CSF. **A:** 2 days after the addition of DMSO, HL-60 cells stimulated by G-CSF were fixed, incubated with anti-PKC ζ antibody, and visualized as described above. The photographs can be seen at the left part of the figure, the fluorescent photographs in the middle of the figure, and the merged images at the right. **B:** G-CSF-stimulated mononuclear cells from cord blood were stained with anti-PKC ζ antibody (red, left part) and anti-myeloperoxidase antibody (green, right part) after serum depletion. Under no stimulation, PKC ζ was observed in the nucleus. G-CSF promoted the translocation of PKC ζ to the membrane within 5–15 min, and then to the cytosol. Wort: wortmannin. White bar: 10 μ m.

neutrophilic HL-60 cells, PKC ζ proteins were markedly expressed in these cells (Fig. 1B). This study showed, for the first time, the stimulation of PKC ζ activity in G-CSF-treated HL-60 cells (Fig. 2B) at 15–30 min after the addition of G-CSF. Maximum activation from the addition of NGF in PC12 cells was also observed at 15 min (Wooten et al., 2001).

Atypical PKCs are lipid-regulated kinases that need to be localized to the membrane in order to be activated. PKC ζ is directly activated by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, a product of PI3K (Nakanishi et al., 1993). We previously reported that the maximum activation of PI3K was observed in HL-60 cells 5 min after the addition of G-CSF (Kanayasu-Toyoda et al., 2002). Most investigators have reported the translocation of aPKC in either muscle cells or adipocytes stimulated by insulin (Andjelkovic et al., 1997; Goransson et al.,

1998; Galetic et al., 1999; Standaert et al., 1999; Braiman et al., 2001; Chen et al., 2003; Kanzaki et al., 2004; Sasaoka et al., 2004; Herr et al., 2005). In response to insulin stimulation, aPKC ζ/λ is translocated to the plasma membrane (Standaert et al., 1999; Braiman et al., 2001), where aPKC ζ/λ is believed to be activated (Galetic et al., 1999; Kanzaki et al., 2004). In the present study, the addition of G-CSF induced PKC ζ to translocate to the membrane from the nucleus within 5–15 min (Figs. 3 and 4), and this translocation to the plasma membrane accompanied the full activation of PKC ζ (Fig. 2B). Previously we reported also that the maximum activation of p70 S6K in HL-60 cells was observed from 30 to 60 min after the addition of G-CSF (Kanayasu-Toyoda et al., 1999, 2002), suggesting that there was a time lag between the activation of PI3K and p70 S6K upon the addition of G-CSF in HL-60 cells. In the present study, PKC ζ was

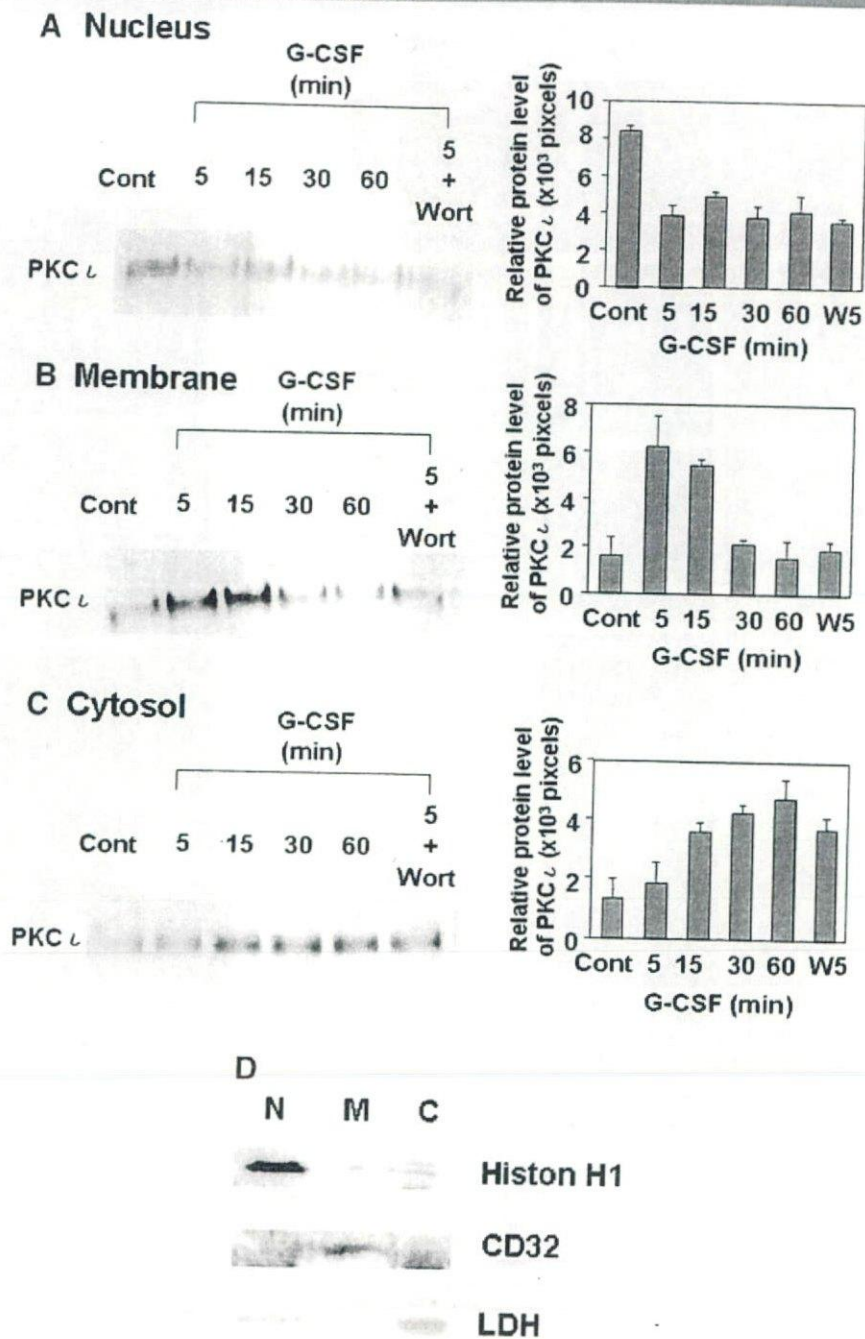


Fig. 4. Translocation of PKC ζ after activation by G-CSF on biochemical fractionation. The cells were differentiated as described in the Figure 3 legend. After stimulation by G-CSF, the amounts of PKC ζ proteins in the nucleus (A), plasma membrane (B), and cytosol (C), as fractionated by differential centrifugation, were analyzed by Western blotting (left parts). The right parts show the quantitation of the bands of PKC ζ proteins. Wort or W: wortmannin. PKC ζ protein was quantitated using data from three separate experiments. Columns and bars represent the mean \pm SD. D: Each cell fraction was immunoblotted with antibodies of specific marker. Histon-H1, Fc γ receptor IIa (CD32), and lactate dehydrogenase (LDH) are specific markers for nuclear (N), membrane (M), and cytosolic (C) fractions, respectively.

found to re-translocate from the plasma membrane to the cytosol (Figs. 3 and 4C). In the presence of wortmannin, an inhibitor of PI3K, PKC ζ failed to translocate into the plasma membrane, but instead translocated to cytosol directly from the nucleus upon the addition of G-CSF (Figs. 3 and 4B). PKC ζ translocation was also observed in myeloperoxidase-positive cells derived from human cord blood (Fig. 3B), indicating that G-CSF-induced dynamic translocation of PKC ζ occurred in not

only a limited cell line but also neutrophilic lineage cells. These data suggest that PI3K plays an important role in the activation and translocation of PKC ζ during the G-CSF-induced activation of myeloid cells. Furthermore, the translocation to the plasma membrane in response to G-CSF is wortmannin sensitive, but the translocation from the nucleus upon G-CSF stimulation is not affected by wortmannin, suggesting that the initial signal of G-CSF-induced PKC ζ translocation from the nucleus may be

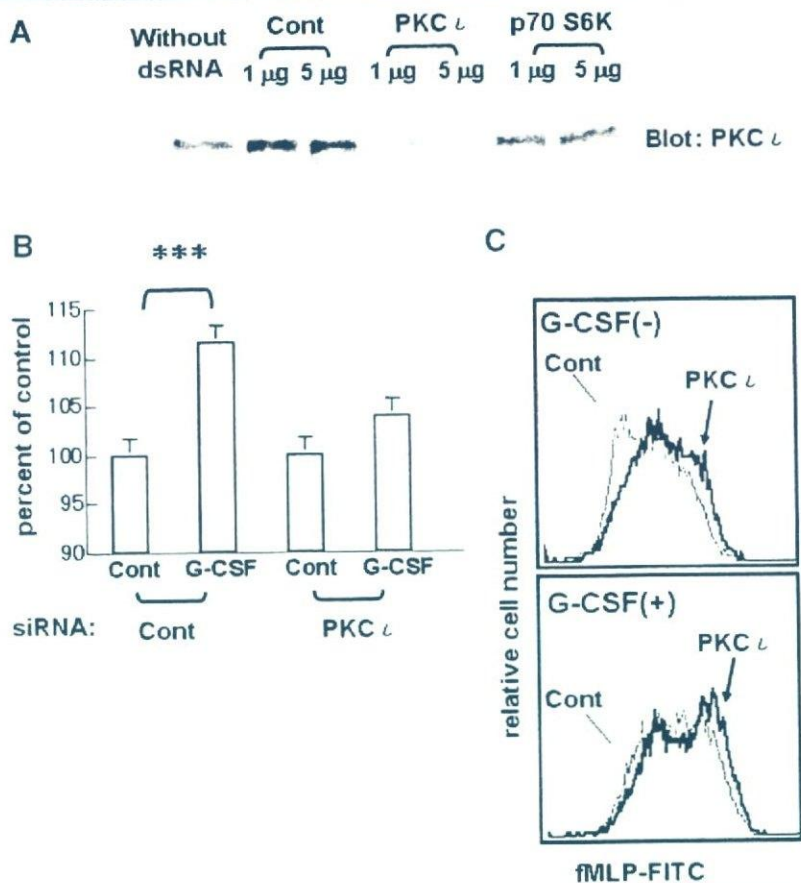


Fig. 5. Effects of siRNA of PKC ζ on proliferation, differentiation, and phosphorylation at various sites of p70 S6K. **A**: Forty-eight hours after transfection with siRNA of PKC ζ or p70 S6K, protein levels of PKC ζ were compared. **B**: Proliferation of the cells transfected with siRNA of PKC ζ or control (Cont) was measured 5 days after the addition of G-CSF. Columns and bars represent the mean \pm SD of triplicate wells (** $P < 0.001$). **C**: fMLP-R expression was analyzed by flow cytometry 5 days after the addition of G-CSF. The gray arrow indicates cells transfected with the control sequence of double-stranded RNA (Cont, gray lines), and the black arrow the cells transfected with siRNA for PKC ζ (black lines) in the presence (lower part) or absence (upper part) of G-CSF.

PI3K-independent, but association of PKC ζ with the plasma membrane could be mediated through a PI3K-dependent signal. Cord blood is an important material of blood transplantation for leukemia (Bradstock et al., 2006; Ooi, 2006; Yamada et al., 2006) or for congenital neutropenia (Mino et al., 2004; Nakazawa et al., 2004) because it contains many hematopoietic stem cells such as CD34-positive cells or CD133-positive cells, and also contains immature granulocytes. The neutrophilic differentiation and proliferation are necessary processes after transplantation.

Formyl-Met-Leu-Phe peptide evokes the migration, superoxide production, and phagocytosis of neutrophils through fMLP-R, a suitable marker for neutrophilic differentiation. In this study, the reduction of PKC ζ by siRNA inhibited G-CSF-induced proliferation (Fig. 5B) and promoted neutrophilic differentiation (Fig. 5C) in terms of fMLP-R expression. These data, however, suggest that PKC ζ promoted G-CSF-induced proliferation and blocked differentiation at the same time. The substrates of aPKC have recently been reported: namely, the cytoskeletal protein Lethal giant larvae (Lgl) was phosphorylated by *Drosophila* aPKC (Betschinger et al., 2003) and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was phosphorylated by PKC ζ (Tisdale, 2002) directly in both cases. While the direct phosphorylation of p70 S6K by aPKC was not observed (Akimoto et al., 1998; Romanelli et al.,

1999), the enzyme activity of p70 S6K was markedly enhanced by co-transfection with aPKC and PDK-1, the latter of which is recruited to the membrane due to the binding of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate to its PH domain (Anderson et al., 1998). The addition of G-CSF induced PKC ζ to increase phosphorylation at Thr-389, which is the site most closely related to enzyme activity among the multi-phosphorylation sites of p70 S6K (Weng et al., 1998). However, the mammalian target of rapamycin (mTOR), an upstream regulator, also phosphorylates Thr-389 of p70 S6K and markedly stimulates p70 S6K activity under coexistence with PDK-1 (Isotani et al., 1999). We could not rule out the possibility that other PKC isoforms can contribute to the activation of p70 S6K. We postulated that in G-CSF-stimulated HL-60 cells, PKC ζ contributes to p70 S6K activation as an upstream regulator.

Atypical PKC isoforms are reported to play an important role in the activation of I κ B kinase β (Lallena et al., 1999). In PKC ζ -deficient mice, impaired signaling through the B-cell receptor resulted in the inhibition of cell proliferation and survival while also causing defects in the activation of ERK and the transcription of NF- κ B-dependent genes (Martin et al., 2002). Moreover, Lafuente et al. (2003) demonstrated that the loss of Par-4, that is, the genetic inactivation of the aPKC inhibitor, led to an increased proliferative response of

peripheral T cells when challenged through the T-cell receptor. However, it has been reported that PKC λ -deficient mice have a lethal phenotype at the early embryonic stage (Soloff et al., 2004). Based on the present results and those of previous reports (Kanayasu-Toyoda et al., 1999, 2002), we postulate that PKC λ plays an important role in regulating G-CSF-induced proliferation in neutrophilic lineage cells.

Acknowledgments

We thank the Metro Tokyo Red Cross Cord Blood Bank (Tokyo, Japan) for their kind cooperation. This work was supported in part by a grand-in-aid for health and labor science research (H17-SAISEI-021) from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare, and in part by a grand-in-aid for Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation.

Literature Cited

- Akimoto K, Nakaya M, Yamanaka T, Tanaka J, Matsuda S, Weng QP, Avruch J, Ohno S. 1998. Atypical protein kinase C λ binds and regulates p70 S6 kinase. *Biochem J* 335:417–424.
- Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT. 1998. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* 8:684–691.
- Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. 1997. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272:31515–31524.
- Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. 2003. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* 422:326–330.
- Bradstock KF, Hertzberg MS, Kerridge IH, Sweeney J, McGurgan M, Huang G, Antonenas V, Gottlieb DJ. 2006. Unrelated umbilical cord blood transplantation for adults with hematological malignancies: Results from a single Australian centre. *Intern Med J* 36:355–361.
- Braiman L, Alt A, Kuroki T, Ohba M, Bak A, Tennenbaum T, Sampson SR. 2001. Activation of protein kinase C zeta induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 21:7852–7861.
- Chen X, Al-Hasani H, Olausson T, Wenthzel AM, Smith U, Cushman SW. 2003. Activity, phosphorylation state and subcellular distribution of GLUT4-targeted Akt2 in rat adipose cells. *J Cell Sci* 116:3511–3518.
- Chuang LY, Guh JY, Liu SF, Hung MY, Liao TN, Chiang TA, Huang JS, Huang YL, Lin CF, Yang YL. 2003. Regulation of type II transforming-growth-factor-beta receptors by protein kinase C λ . *Biochem J* 375:385–393.
- Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J. 1994. PDGF- and insulin-dependent p70 S6K activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370:71–75.
- Debili N, Robin C, Schiavon V, Letestu R, Pflumio F, Mitjavila-Garcia MT, Coulombel L, Vainchenko W. 2001. Different expression of CD41 on human lymphoid and myeloid progenitors from adults and neonates. *Blood* 97:2023–2030.
- Fritsch G, Buchinger P, Printz D, Fink FM, Mann G, Peters C, Wagner T, Adler A, Gadner H. 1993. Rapid discrimination of early CD34+ myeloid progenitors using CD45-RA analysis. *Blood* 81:2301–2309.
- Galetic I, Andjelkovic M, Meier R, Brodbeck D, Park J, Hemmings BA. 1999. Mechanism of protein kinase B activation by insulin/insulin-like growth factor-1 revealed by specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase—Significance for diabetes and cancer. *Pharmacol Ther* 82:409–425.
- Goransson O, Wijkander J, Manganiello V, Degerman E. 1998. Insulin-induced translocation of protein kinase B to the plasma membrane in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 246:249–254.
- Hao QL, Zhu J, Price MA, Payne KJ, Barsky LW, Crooks GM. 2001. Identification of a novel, human multilineage progenitor in cord blood. *Blood* 97:3683–3690.
- Herr HJ, Bernard JR, Reeder DW, Rivas DA, Limon JJ, Yaspelkis BB3rd. 2005. Insulin-stimulated plasma membrane association and activation of Akt2, aPKC zeta and aPKC lambda in high fat fed rodent skeletal muscle. *J Physiol* 565:627–636.
- Huang S, Chen Z, Yu JF, Young D, Bashey A, Ho AD, Law P. 1999. Correlation between IL-3 receptor expression and growth potential of human CD34+ hematopoietic cells from different tissues. *Stem Cells* 17:265–272.
- Isotani S, Hara K, Tokunaga C, Inoue H, Avruch J, Yonezawa K. 1999. Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro. *J Biol Chem* 274:34493–34498.
- Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Uchida E, Hayakawa T. 1999. Commitment of neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells coincides with expression of transferrin receptor. Effect of granulocyte colony stimulating factor on differentiation and proliferation. *J Biol Chem* 274:25471–25480.
- Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Kogi M, Uchida E, Hayakawa T. 2002. Role of the p70 S6 kinase cascade in neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells—a study of transferrin receptor-positive and -negative cells obtained from dimethyl sulfoxide- or retinoic acid-treated HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 405:21–31.
- Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T. 2003. The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 66:133–140.
- Kanzaki M, Mora S, Hwang JB, Saltiel AR, Pessin JE. 2004. Atypical protein kinase C (PKCzeta/lambda) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J Cell Biol* 164:279–290.
- Lafuente MJ, Martin P, Garcia-Cao I, Diaz-Meco MT, Serrano M, Moscat J. 2003. Regulation of mature T lymphocyte proliferation and differentiation by Par-4. *Embo J* 22:4689–4698.
- Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Bren G, Paya CV, Moscat J. 1999. Activation of I κ B kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol* 19:2180–2188.
- Liu WS, Heckman CA. 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 10:529–542.
- Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. 2002. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11872–11877.
- Martin P, Duran A, Minguet S, Gaspar ML, Diaz-Meco MT, Rennert P, Leitges M, Moscat J. 2002. Role of zeta PKC in B-cell signaling and function. *Embo J* 21:4049–4057.
- Mino E, Kobayashi R, Yoshida M, Suzuki Y, Yamada M, Kobayashi K. 2004. Umbilical cord blood stem cell transplantation from unrelated HLA-matched donor in an infant with severe congenital neutropenia. *Bone Marrow Transplant* 33:969–971.
- Muscella A, Greco S, Elia MG, Scorelli C, Marsigliante S. 2003. PKC-zeta is required for angiotensin II-induced activation of ERK and synthesis of C-FOS in MCF-7 cells. *J Cell Physiol* 197:61–68.
- Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH. 1993. Activation of the zeta isoform of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 268:13–16.
- Nakazawa Y, Sakashita K, Kinoshita M, Saida K, Shigemura T, Yanagisawa R, Shikama N, Kamijo T, Koike K. 2004. Successful unrelated cord blood transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen in a 6-month-old infant with congenital neutropenia complicated by severe pneumonia. *Int J Hematol* 80:287–290.
- Nguyen BT, Dessauer CW. 2005. Relaxin stimulates protein kinase C zeta translocation: Requirement for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production. *Mol Endocrinol* 19:1012–1023.
- Ooi J. 2006. The efficacy of unrelated cord blood transplantation for adult myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 47:599–602.
- Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino AC, Hill B, Neu S, Knapp W, Altalero R, Altalero K, Ullrich A, Kanz L, Buhning HJ. 1997. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 90:111–125.
- Romanelli A, Martin KA, Tokar A, Blenis J. 1999. p70 S6 kinase is regulated by protein kinase C λ and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex. *Mol Cell Biol* 19:2921–2928.
- Sasaoka T, Wada T, Fukui K, Murakami S, Ishihara H, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Kobayashi M. 2004. SH2-containing inositol phosphatase 2 predominantly regulates Akt2, and not Akt1, phosphorylation at the plasma membrane in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279:14835–14843.
- Selbie LA, Schmitz-Peiffer C, Sheng Y, Biden TJ. 1993. Molecular cloning and characterization of PKC λ , an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 268:24296–24302.
- Soloff RS, Katayama C, Lin MY, Feramisco JR, Hedrick SM. 2004. Targeted deletion of protein kinase C lambda reveals a distribution of functions between the two atypical protein kinase C isoforms. *J Immunol* 173:3250–3260.
- Standaert ML, Bandyopadhyay G, Perez L, Price D, Galloway L, Poplekovic A, Sajan MP, Cenni V, Sirri A, Moscat J, Tokar A, Farese RV. 1999. Insulin activates protein kinases C-zeta and C-lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J Biol Chem* 274:25308–25316.
- Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. 1997. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90:489–519.
- Tisdale EJ. 2002. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase C λ and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 277:3334–3341.
- Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok AA, Touw IP, Friedman AD. 2000. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia* 14:973–990.
- Weng QP, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, Avruch J. 1998. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *J Biol Chem* 273:16621–16629.
- Wooten MW, Vandenplas ML, Seibenhener ML, Geetha T, Diaz-Meco MT. 2001. Nerve growth factor stimulates multisite tyrosine phosphorylation and activation of the atypical protein kinase C's via a src kinase pathway. *Mol Cell Biol* 21:8414–8427.
- Yamada K, Mizusawa M, Harima A, Kajiwara K, Hamaki T, Hoshi K, Kozai Y, Kodo H. 2006. Induction of remission of relapsed acute myeloid leukemia after unrelated donor cord blood transplantation by concomitant low-dose cytarabine and calcitriol in adults. *Eur J Haematol* 77:345–348.
- Yamaguchi T, Mukasa T, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Hayakawa T. 1999. The role of STAT3 in granulocyte colony-stimulating factor-induced enhancement of neutrophilic differentiation of Me2SO-treated HL-60 cells. GM-CSF inhibits the nuclear translocation of tyrosine-phosphorylated STAT3. *J Biol Chem* 274:15575–15581.