

分担研究報告書

5. 品質管理法の確立：真菌汚染の迅速検出法の開発

分担研究者：清水 則夫

（東京医科歯科大学准教授）

研究要旨

抗真菌剤は細胞毒性が強く培養液に添加しにくいこともあり、真菌汚染の危険性を排除することは再生医療の安全性を確保するため重要な研究課題である。本研究では、最終製品への真菌の混入を迅速に検出できる新しい検査系の構築を試み、様々な真菌で保存されている 18SrRNA 遺伝子共通領域を利用し、様々な種類の真菌を網羅的・迅速に検出することが可能な検査系の構築を行った。

A. 研究目的

生体由来組織・細胞を原材料として使用し、生きた細胞を治療に用いる再生医療・細胞治療では原材料および最終製品を滅菌処理することは不可能である。したがって、微生物汚染の問題を克服することが再生医療・細胞治療を実用化するために極めて重要である。生体材料には多くの微生物（細菌・真菌・ウイルスなど）が持続感染していることが知られており、培養工程中の外来微生物の混入の防止を徹底するだけでは不十分で、最終製品を全数検査することにより治療の安全性を担保することが求められる。

細菌に関しては培養液中に添加できる細胞毒性の低い抗生物質が数多く実用化されているため実質的な問題は少ないが、抗真菌剤は一般に細胞毒性が高いため培地に添加出来る量が限られていることもあり、真菌汚

染の問題は今後解決すべき重要な課題である。

本研究では、多くの真菌株で保存されている 18S rRNA 遺伝子の共通領域を標的とした真菌の網羅的・迅速検出系の作成を行った。また、作製する網羅的真菌検査系の性能の検証を行うため、細胞製剤製造管理上重要と思われる真菌の個別検出・定量系の作成もあわせて行った。

B. 研究方法

1. 個別検出系の対象真菌種

- a. *Aspergillus* sp (*A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.nidulans*,  
*A.niger*, *A.terreus*)
- b. *Candida* sp (*C.albicans* *C.parapsilosis* *C.tropicalis*  
*C.guilliermondii* *C.glabrata* *C.krusei*)
- c. *Pneumocystis carinii*

- d. *Cryptococcus neoformans*  
 e. *Trichosporon asahii*  
 f. *Acantamoeba* sp (*A.castellanii* *A.rhysodes*  
*A.lugdunensis* *A.polyphaga* *A.hatchetti*)  
 g. *Propionibacterium acnes*

## 2. 真菌からの核酸抽出

真菌の菌体から DNA を抽出する際、真菌の細胞壁を分解する目的で、リチカーゼ (ザイモリエース) を使用した。リチカーゼを添加後 37°C 1hr 静置して細胞壁を分解し、その後通常の DNA 抽出キット (キアゲン DNA mini kit) を用いて DNA 抽出を行った。

## 3. PCR

- a. 真菌定量用プライマー・プローブ配列 (*Aspergillus* sp、*Candida* sp、*Pneumocystis carinii* を検出可能)

Forward Primer: F-ttggtggagtgattgtctgct

Reverse Primer: R-tctaaggcatcacagacctg

Probe:

*Aspergillus*-FAM-tcggcccttaaatagcccgggtccgc-iowaBK

*Candida*1-FAM-ttaacctactaaatagtgStgctagc-iowaBK

*Candida*2-FAM-ttaacctgctaaataggctgtagc-iowaBK

*Carinii*-FAM-taacctgctaaatagccagattagct-iowaBK

- b. 18SrRNA 遺伝子検出用プライマー・プローブ配列

Forward Primer: F-gcaaggctgaactaaagRaattg

Reverse Primer: R-ccccgtgtgagtcaaattaagc

Probe : FAM-cggAagGgcAcca-TAMRA

(大文字は LNA: 高い結合親和性を有するため、プライマー・プローブの DNA 塩基を LNA で置換することにより、同じ Tm 値を維持しながらプローブの長さを短くできる)

- c. PCR 条件

Denature 95°C 0 秒

Ramp rate 20°C/sec

PCR (45cycle) 95°C 0 秒

Ramp rate 4°C/sec

60°C 20 秒 Ramp rate 20°C/sec

- d. 反応液組成

1mM dNTPs

3mM MgCl<sub>2</sub>

25ng/ul Non-acetylated BSA

0.5U taq DNA polymerase (theamo)

Anit-taq antibody (toyobo)

Total volume 20ul

(倫理面への配慮)

臨床検体は、匿名化した上で受け取り、患者の個人情報と解析結果との連結が不可能なように配慮した。また、病原体検査以外の検査 (遺伝子検査など) は一切行わないこととした。

## C: 結果

### 1. 真菌定量系の作成

合成 DNA を使用して作製したスタンダードを使用して作製した定量系の感度検定を行ったところ、*Aspergillus* sp, *Candida* sp, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii*, *Acantamoeba* sp, *Propionibacterium acnes* を 10 コピー/Tube 以上の感度で検出できることが示された。また、1 E+9~10 コピーの範囲で定量性があることが確認できた。

### 2. 特異性の確認

GenBank の BLAST 解析により、検査対象真菌間の交差反応性を確認し、交差反応性は無いことを確認した。

### 3. 真菌ブロードレンジ定量 PCR 系の構築

真菌の 18S リボソーム RNA 遺伝子には多くの真菌種に共通な領域が存在する。この領域にプライマー・プローブを設定して真菌のブロードレンジ定量 PCR 系の構築を試みた。代表

的な真菌の 18S rRNA 遺伝子領域をアライメントし、共通領域に下記に示すようなプライマー・プローブを設定した。

Primer F-gcaaggctgaaacttaaagRaattg

Primer R-cccctgtgtgagtcгааattaagc

Probe FAM-cggAagGgcAcca-TAMRA

(大文字は LNA)

PubMed による BLAST 解析により 30,000 個のデータをアライメントした結果、上記の配列は完全一致が 90%以上だった。

作製した真菌のブロードレンジ定量系の性能を検証した結果、10 コピーの真菌 DNA を検出でき定量性にも問題なかったが、真菌 DNA を含まない陰性コントロールからもわずかな陽性シグナルが検出されてしまう欠点があった。

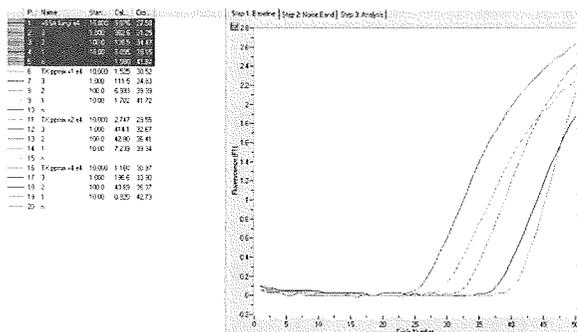


図1 作製した真菌ブロードレンジ検出系の検証結果：感度、ダイナミックレンジは良好だが、陰性コントロールでも 40 サイクル近辺から擬陽性シグナルが検出された。

#### 4. 真菌ブロードレンジ定量 PCR 系の改良

陰性コントロールが擬陽性になってしまう原因を追究するために、陰性コントロール由来の増幅産物を回収して遺伝子配列を決定したところ、プライマーダイマーや関係ない遺伝子領域が増幅しているのではなく、増幅産物は真菌 DNA 由来であることが確認され、使用している試薬に真菌 DNA が混入している可能性が考えられた。

そこで、PCR 反応の効率を上げ反応を安定化させることを期待して添加している Non-acetylated BSA への真菌 DNA の混入の有無の確認を行った。

すでに作製済みの *Aspergillus sp*, *Candida sp*, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii*, *Acanthamoeba sp*, *Propionibacterium acnes* の個別定量系により Non-acetylated BSA への真菌 DNA 混入の有無を件としたところ、使用している Non-acetylated BSA には *Candida* の定量系で検出される真菌 DNA がわずかに含まれていることが判明した(増幅産物の遺伝子配列の決定により確認)。

一方、Non-acetylated BSA を反応液から除くと PCR 反応の効率や安定性が大きく損なわれることから、Non-acetylated BSA と同様な効果があり真菌 DNA 混入の問題がない添加物の検討を行った。Non-acetylated BSA を添加する理由は、使用するガラスキャピラリーにプライマー・プローブ、DNA ポリメラーゼが非特異的に付着することにある。同様の効果が期待できる物質として、界面活性剤 TritonX100 が挙げられる。そこで、TritonX100 の添加による PCR 反応の効率・安定性改善効果の検証を行った。

濃度が 1%, 0.1%, 0.01%になるように反応液中に TritonX100 を添加し、PCR 反応の感度、安定性への影響を評価した。その結果、TritonX100 を添加しない場合と比較して 0.1%と 0.01%で PCR の感度と安定性が大きく改善することが示された。(図 2 参照)。

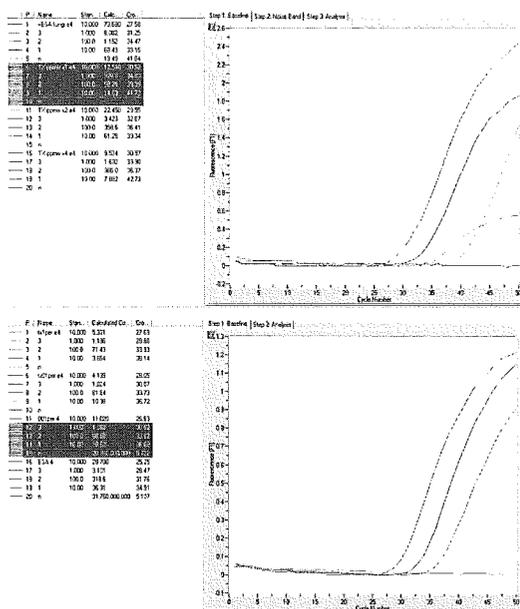


図 2：上段が TritonX100 非添加、下段が TritonX100 を 0.01% になるように添加。TritonX100 添加により PCR の感度が改善するとともに波形が整い、定量結果の安定性が増した。

さらにプライマー、プローブ濃度も検出系の感度に大きく影響することが知られているため、その至適濃度の検討を行った。その結果、プライマー濃度を 1  $\mu$ M、プローブ濃度を 0.4  $\mu$ M にすると最も感度が良い事が明らかとなった。

以上の結果から、真菌のブロードレンジ定量系を下記のように設定した。

プライマー・プローブ配列

Forward Primer: F-gcaaggctgaaactaaagRaattg

Reverse Primer: R-cccctgttgagtc aaattaagc

Probe : FAM-cggAagGgcAcca-TAMRA

PCR 条件

Denature 95°C0 秒

Ramp rate 20°C/sec

PCR (45cycle) 95°C0 秒

Ramp rate 4°C/sec

60°C20 秒 Ramp rate 20°C/sec

## 反応液組成

1mM dNTPs

3mM MgCl2

Primer 各 1  $\mu$ M

プローブ 0.4  $\mu$ M

0.01%TritonX100

0.5U taq DNA polymerase(theamo)

Anit-taq antibody(toyobo)

Total volume 20ul

## D: 考 察

再生医療用細胞製剤の製造過程で混入する可能性のある真菌種として、患者に感染しているため生体材料に混入する真菌および培養環境中に浮遊する真菌（孢子）が考えられる。真菌の検査に於いては培養法が繁用されるが、体外で簡単に培養できない真菌も多く、真菌を網羅的に検出し増幅産物の配列解析から菌種を特定する方法は魅力的である。

多くの真菌を網羅的に検出できるブロードレンジ真菌検査系を構築するため、おもな真菌種の個別定量系を作製し、それらの定量系を利用して作製したブロードレンジ真菌検査系の検証作業を行った。その過程で PCR 反応の感度上昇や安定性を確保するために反応系に添加される Non-acetylated BSA にカンジダあるいはその近縁種の真菌 DNA が混入していることが明らかとなった。本研究により TritonX100 を反応系に 0.01%の濃度になるように添加することで Non-acetylated BSA 添加と同様な効果を得ることが出来ることが示された。

ブロードレンジ真菌検査系の構築に用いたプライマー・プローブの組み合わせでは、TritonX100 の添加が有効であったが、他のプライマー・プローブの組み合わせでも同様な効果があるか否かは明らかではない。したがっ

て、TritonX100 添加の有用性を確立するとともに、様々なメーカーの Non-acetylated BSA へのカンジダ DNA の混入の有無を検討し、汎用性のある PCR 反応液組成の検討を続けていく必要がある。

#### E: 結論

再生医療用の細胞製品への真菌の混入を迅速に検出可能な検査系の開発を行った。真菌の 18SrRNA 遺伝子の共通領域を利用し、様々な種類の真菌を網羅的・迅速に検出することが可能な検査系を作製した。その際、PCR 反応の感度と安定性の改善のため添加している Non-acetylated BSA にカンジダあるいは近縁の真菌 DNA が混入している事を見出し、Non-acetylated BSA の代わりに TritonX100 の添加が有用であることを明らかにした。

F: 健康危険情報      なし

#### G: 研究発表

##### 論文発表

1. Nagasawa M., Ogawa K., Nagata K., Shimizu N. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm. *Br J Haematol.* 2009 Nov 13. [Epub ahead of print]

2. Yajima M, Imadome KI, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Yamamoto N, Fujiwara S. T Cell-Mediated Control of Epstein-Barr Virus Infection in Humanized Mice. *J Infect Dis.* 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]

3. Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene

Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol.* 2009 Sep 30. [Epub ahead of print]

4. Yamanaka Y., Tagawa H., Takahashi N., Watanabe A., Guo Y-M., Iwamoto K., Yamashita J., Saitoh H., Kameoka Y., Shimizu N., Ichinohasama R., and Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma /leukemia. *Blood* 114: 3265 – 3275, 2009

5. Moriai S, Takahara M, Ogino T, Nagato T, Kishibe K, Ishii H, Katayama A, Shimizu N and Harabuchi Y. Production of Interferon- $\gamma$ -Inducible Protein-10 and Its Role as an Autocrine Invasion Factor in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cells. *Clin Cancer Res.* 15(22):6771-6779, 2009

6. Miyagawa Y., Kiyokawa N., Ochiai N., Imadome K., Horiuchi Y., Onda K., Yajima M., Nakamura H., Katagiri Y., Okita H., Morio T., Shimizu N., Fujimoto J. and Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology* 128:405-419, 2009.

7. Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect.* 11(3):429-433, 2009 .

8. Ono Y., Terashima K., Liu A., Yokoyama M., Yokoshima K., Mizukami M., Watanabe K., Mochimaru Y., Furusaka T., Shimizu N.,

Yamamoto N., Ishiwata T., Sugisaki Y., Yagi T. and Naito Z. Follicular dendritic cell sarcoma with microtubuloreticular structure and virus-like particle production *in vitro*

*Pathol.Int.* **59**: 332–344, 2009

9. Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, Morio T, Miyata K, Maruyama K, Kinoshita S, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br. J. Ophthalmol.* 2009, in press.

10. 山本 紗也香、杉田 直、森尾 友宏、清水 則夫、望月 學 眼部帯状疱疹の涙液中の水痘・帯状疱疹ウイルスDNA量 臨床眼科 2009: 63: 707-710.

#### 国内学会発表

1. 清水一史、渡辺 哲、佐々木 裕、芝田敏克、井口晃史、下平義隆、田中寅彦、黒田和道、清水則夫、山本直樹、山本樹生、重度免疫不全NOGマウスにおけるインフルエンザウイルス感染「強毒変異ウイルスの出現」第57回 日本ウイルス学会 学術集会 10月、東京

2. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、清水則夫、中村浩幸、渡辺哲、寺嶋一夫、山本直樹、藤原成悦 EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と解析、第57回 日本ウイルス学会 学術集会 10月、東京

3. 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、清水則夫、山本直樹、藤原成悦 EBV感染ヒト化NOGマウスモデルにおけるT細胞応答、第57回 日本ウイルス学会 学術集

会10月、東京

4. 清水則夫、森尾友宏 造血幹細胞移植後微生物モニタリングシステムの改良と普及に向けて、平成21年度 第2回班会議「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有及びドナーとレピシエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」班 1月 東京

5. 杉田 直、堀江真太郎、山田由季子、望月 學、渡邊 健、片山未来、清水則夫 感染性眼内炎の眼内液を用いた細菌 Broad-range 定量PCRシステムの有用性の検討 第113回 日本眼科学会総会 4月東京

#### 国際学会発表

Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Takase H, Sugamoto Y, Mochizuki M. Use of broad-range quantitative polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. 10<sup>th</sup> International Ocular Inflammation Society Congress, Prague, 5/30-6/2, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

6. 分子基盤に基づいた増幅法、分化誘導法の開発

分担研究者：田中 宏和、金倉 譲

研究協力者：松村 到

（大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学）

研究要旨

本分担研究では、造血細胞の増殖、分化に重要な転写因子の一つである HOX/PBX1 複合体の活性を制御可能な合成ペプチドを用いることで、ヒト CD34 陽性造血幹/前駆細胞 (CD34+ hHSC/HPCs) を効率よくかつ安全に増幅できる可能性を示してきた。

本年度は新たな試みとして、細胞増殖の基盤をなす細胞周期制御機構に着目し、細胞周期の進行に対して正に作用する decoy ペプチドを合成、CD34+ hHSC/HPCs へ導入することでその増殖に及ぼす影響について検討を行った。

その結果、1. 細胞周期制御因子 CDK4 に対する膜透過型 decoy ペプチドは、臍帯血由来 CD34+ hHSC/HPCs に対してほぼ 100% の導入効率を得られ、導入直後も高い viability が保持されること、2. 導入量の調節が可能であり、その発現が 7 日間維持されること、3. 核移行シグナルの有無により細胞内局在を制御することができること、4. 核内で CDK4/INK4 複合体の活性を変化させること、5. より未分化な細胞においてその細胞周期を変化させることが明らかとなった。

以上の結果から、CDK4 に対する decoy ペプチドは、造血幹細胞の効率的な体外増幅に有用である可能性が示唆された。今後 ペプチド導入細胞の特性について詳細な検討を行うとともに、より効率的な増幅法の開発に向け内的因子操作法を組み合わせることによる至適増幅法の検討、系統特異的分化に及ぼす影響について検討を行う予定である。

## A : 研究目的

造血幹細胞を特徴付ける自己複製能及び多分化能は、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。本分担研究では、遺伝子導入やタンパク導入に変わる新たな造血幹細胞の体外増幅法として、合成ペプチドによる内的因子操作法の開発を行い、造血細胞の増殖、分化に重要な転写因子の一つである HOX/PBX1 複合体の活性を制御可能な decoy (おとり)ペプチドを用いることで、ヒト CD34 陽性造血幹/前駆細胞 (CD34+ hHSC/HPCs) を効率よくかつ安全に増幅できる可能性を示してきた (Stem cells, 24: 2592-2602, 2006)。さらに細胞透過型の decoy ペプチド(11R-decoy ペプチド)を合成し、導入効率の向上ならびに導入時の細胞障害の軽減を試みてきた。本年度は新たな試みとして、細胞増殖の基盤をなす細胞周期制御機構に着目し、細胞周期の進行に対して正に作用する decoy ペプチドを合成し、decoy ペプチドが CD34+ hHSC/HPCs の増殖に及ぼす影響について解析を行った。

## B : 研究計画・方法

1. 臍帯血(CB)より磁気ビーズ法にて CD34 陽性細胞を分離し、ヒト造血幹/前駆細胞(CB CD34+ hHSC/HPCs)を得た。臍帯血は兵庫帯血バンクより供与された実験用臍帯血を用いた。
2. CB CD34+ hHSC/HPCs をサイトカイン (SCF, FL, TPO, IL-6, sIL-6R)添加無血清培地 QBSF-60 (Quality Biological 社, MD) にて decoy ペプチドならびに control ペプチド存在下で 7 日間培養し、合成ペプチドの導入効率、細胞内局在、細胞生存率、及び増殖率について比較、検討した。
3. Paired daughter cells assay については、CB

CD34+ hHSC/HPCs をさらに CD38+, -に付けて上記サイトカイン添加無血清培地を 100 $\mu$ l 満たした 96 well プレート上に 1 細胞/well ずつソーティングし、1 個の細胞が 2 個に分裂するまでの時間を測定した。

(倫理面の配慮)

研究に用いた臍帯血は、インフォームドコンセントのもとに母親から提供され、臍帯血提供機関(兵庫さい帯血バンク)及び先端医療センターにおいて倫理審査が済んでいるものを用いた。

## C : 研究結果ならびに今後の方針

### 1. decoy ペプチドの設計、合成

細胞周期を正に制御する中心的な因子はサイクリン依存性キナーゼ(CDK)であり、細胞周期の進行に従いその活性は急激に変化し、下流に位置する様々な細胞周期制御因子に活性化をもたらす。CDK タンパクの細胞内濃度は細胞周期を通じて一定であり、その活性はサブユニットであるサイクリンの発現量に依存することが知られている。各細胞周期に特定のサイクリンが誘導され、Cdk-サイクリン複合体が形成される。細胞内外からの分裂刺激を受け、まず活性化するのは G1 サイクリンである D-type サイクリンと CDK4, 6 との複合体であり、CDK4, 6-サイクリン D 複合体は Rb タンパクをリン酸化することにより転写因子 E2F を Rb から解離させることにより転写因子 E2F を Rb から解離させ、活性化した E2F が S 期への進行に重要な遺伝子の発現を誘導し、細胞周期を正に進行させる。一方細胞周期に負に作用する因子が CDK inhibitor, CKI であり、CDK-サイクリン複合体に結合することでその活性を阻害する。CDK4, 6-サイクリン D 複合体に対する CKI として INK4 タンパクが知られており、哺乳類では p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup> の 4 種が存在する。ノックアウトマウスの解

析から、p18<sup>INK4c</sup> が強力な造血幹細胞の自己複製抑制因子であること(Nat Cell Biol.6(5): 436-442, 2004)、また p16<sup>INK4a</sup> が造血幹細胞の細胞老化を制御していること(Nature. 443: 421-426 2006)が明らかにされている。また結晶構造の解析から INK4 タンパクによる CDK4, 6-サイクリン D 複合体の活性阻害には INK4 タンパクの 2<sup>nd</sup> 3<sup>rd</sup> ankyrin repeat に存在する V44, M45, G48, D67, D76, R79Cdk4 と cdk4 の b シートに存在する R22, R24, G29 との結合が必須であることが報告されている (図 1)。

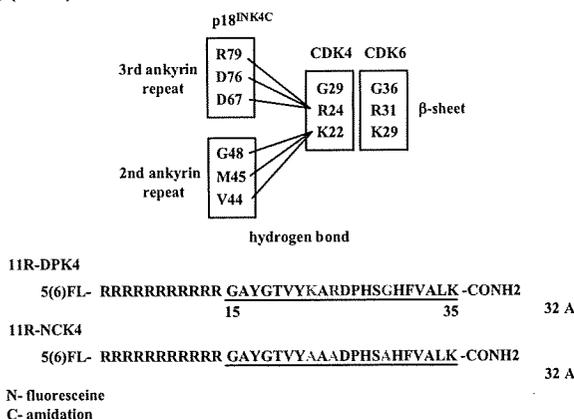


図 1. CDK-サイクリン D 複合体と INK4 タンパクの結合ならびに decoy ペプチドの構造

そこで我々は膜透過モチーフである 11R と R22, R24, G29 を含むモチーフを連結させたペプチド(11R-decoy peptide for CDK4, 11R-DPK4)、さらに 5'側に核移行シグナル(nuclear localization signal, NLS)を有するペプチド(NLS-11R-DPK4)を設計、合成した。これらのコントロールペプチドには R22, R24, G29 の 3 アミノ酸をアラニン(A)に置換したものを併せて合成し用いた(11R-normal control peptide for CDK4, 11R-NCK4, 及び NLS-11R-NCK4)。図 1 下段に 11R-DPK4 ならびに 11R-NCK4 のアミノ酸配列を示す。合成ペプチドは導入した細胞内で CDK4 タンパクの decoy として作用し、p18<sup>INK4c</sup> タンパクと結合することにより、CDK4 タンパクの活

性を変化させることが予想される。

2. decoy ペプチドの CD34+ hHSC/HPCs への導入効率、導入後の細胞生存率、及び細胞内局在

5'側を蛍光標識した各ペプチドを 1.0 $\mu$ M 添加した場合、いずれのペプチドもほぼ 100%の導入効率が得られ、導入後の生存率はほぼ 100%を維持していた。培地に添加するペプチドの濃度を 0.1-5.0 $\mu$ M まで変化させた場合、濃度依存的な平均蛍光強度の増加が認められた。また蛍光強度の推移から、添加後 24 時間で細胞内での発現量が最大となり、5 日間その発現が維持されていたが、添加 24 時間後に細胞を洗浄し培地からペプチドを除去した場合、速やかにその発現は減少し、CD34+ hHSC/HPCs における半減期は約 24 時間と推測された。また導入した細胞内での局在については 11R-DPK4, 11R-NCK4 は細胞質、NLS-11R-DPK4, NLS-11R-NCK4 は核内での集積が確認された。

3. decoy ペプチドが CD34+ hHSC/HPCs の増殖に及ぼす効果

造血幹細胞に decoy ペプチド及び control ペプチドを 0.1-5.0 $\mu$ M の範囲で導入し、サイトカイン添加無血清培地にて 7 日間培養後の総細胞増幅率について検討を行なった。11R-NCK4, NLS-11R-NCK4 を導入した場合 0.1-1.0 $\mu$ M の範囲では増殖への影響は認められず、約 60-70 倍の増幅が得られた。11R-DPK4 を導入した場合、0.1-1.0 $\mu$ M の範囲ではわずかに増殖が亢進したが、1.0 $\mu$ M 以上添加した場合にはむしろ導入量依存的な増殖抑制が認められた。一方 NLS-11R-DPK4 を導入した場合、導入量依存的に増殖が促進し、5.0 $\mu$ M 添加時コントロールと比較して約 2 倍の増幅が得られた。

次に NLS-11R-DPK4 を導入した場合の

CD34+細胞の細胞分裂に及ぼす影響を検討するために、Paired daughter cells assay を行った(n=2)。培養後 72 時間までの累積分裂頻度を計測した結果、control ペプチドを添加した場合、CD38-分画では約 60 時間後(66.5±3.3)に、CD38+分画では約 50 時間後(48.9±0.6)に 50%の細胞が分裂した。一方 NLS-11R-DPK4 を添加した場合 CD38+分画ではその分裂頻度に明らかな差は認められなかったが(41.9±4.9)、CD38-分画では有意に分裂までの時間が短縮していた(52.5±3.6)。

#### D : まとめ

以上の結果から 1. 細胞周期制御因子 CDK4 に対する膜透過型 decoy ペプチドは、臍帯血由来 CD34+ hHSC/HPCs に対してほぼ 100%の導入効率を得られ、導入直後も高い viability が保持されること、2. 導入量の調節が可能であり、その発現が 7 日間維持されること、3. 核移行シグナルの有無により細胞内局在を制御することができること、4. 核内で CDK4/INK4 複合体の活性を変化させること、5. より未分化な細胞においてその細胞周期を変化させることが明らかとなった。

今後ペプチド導入細胞の特性について詳細な検討を行うとともに、より効率的な増幅法の開発に向け内的因子操作法を組み合わせることによる至適増幅法の検討、系統特異的分化に及ぼす影響について検討を行う予定である。またヒト細胞を生着させたマウスに細胞透過型 decoy ペプチドを直接投与することによる造血幹細胞の自己複製能に及ぼす効果について検討を行なう予定である。また、細胞周期制御機構は血液細胞にとどまらず、種々組織の細胞においても共通であることから、これまでに同定されている組織幹細胞、さらには腫瘍幹細胞への効果について

もあわせて検討する予定である。

#### E : 健康危険情報

なし

#### F : 研究発表

##### 論文発表

1. Yokota T, Oritani K, Butz S, Kokame K, Kincade PW, Miyata T, Vestweber D, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice. *Blood* 113:2914-2923, 2009

2. Fukushima K, Matsumura I, Ezoe S, Tokunaga M, Yasumi M, Satoh Y, Shibayama H, Tanaka H, Iwama A, Kanakura Y. FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells. *J Biol Chem* 284:7719-7732, 2009

3. Akiyama M, Kashiwagi H, Todo K, Moroi M, Berndt, MC, Kojima H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Presence of platelet-associated anti-GPVI autoantibodies and restoration of GPVI expression in patients with GPVI deficiency. *J Thromb Haemost* 7:1373-1383, 2009

4. Tatsumi M, Sugahara H, Higuchi I, Fukunaga H, Nakamura H, Kanakura Y, Hatazawa J. Standardized uptake value on FDG-PET as a marker for disease activity in patients with non-Hodgkin's lymphoma: comparison with serum soluble interleukin-2 receptor values. *Int J Clin Oncol* 14:150-158, 2009

5. Wada N, Ikeda J, Kohara M, Ogawa H, Hino M, Fukuhara S, Kanamaru A, Sugiyama H, Kanakura Y, Morii E, Aozasa K. Diffuse large B-cell lymphoma with a high number of epithelioid histiocytes (lymphoepithelioid B-cell lymphoma): a study of Osaka Lymphoma Study Group. *Virchows Arch* 455:285-293, 2009

6. Ishikawa J, Maeda T, Matsumura I, Yasumi M, Ujiiie H, Masaie H, Nakazawa T, Mochizuki N, Kishino S, Kanakura Y. Antifungal activity of micafungin in serum. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4559-4562, 2009

7. Nakamichi I, Shimazu K, Ikeda J, Yamauchi A, Ishiko J, Mizuki M, Kanakura Y, Aozasa K. Intravascular lymphomatosis initially suspected from uterine cytology: a case report. *Acta Cytol* 53:198-200, 2009

8. Miyagawa S, Matsumiya G, Funatsu T,

Yoshitatsu M, Sekiya N, Fukui S, Hoashi T, Hori M, Yoshikawa H, Kanakura Y, Ishikawa J, Aozasa K, Kawaguchi N, Matsuura N, Myoui A, Matsuyama A, Ezoe S, Iida H, Matsuda H, Sawa Y. Combined autologous cellular cardiomyoplasty using skeletal myoblasts and bone marrow cells for human ischemic cardiomyopathy with left ventricular assist system implantation: report of a case. *Surg Today* 39:133-136, 2009

9. 金倉 讓. 発作性夜間血色素尿症の病態と治療. *日本内科学会雑誌* 98:275-280, 2009

10. 金倉 讓. 造血器腫瘍治療薬の作用と治療効果. *日本検査血液学会雑誌* 10:425-426, 2009

11. 金倉 讓. 造血細胞の分子シグナルと疾患 -チロシンキナーゼを中心として-. *分子細胞治療* 8:411-419, 2009

12. 金倉 讓. PNH の診断と治療. *臨床血液* 50:145-152, 2009

13. 松村 到. 急性骨髄性白血病の治療. *臨床血液* 50:65-76, 2009

14. 松村 到, 金倉 讓. 造血器腫瘍における miRNA の異常とその役割. *Annual Review 血液* 2009 (高久文磨, 溝口秀昭, 小宮山淳, 坂田洋一, 金倉 讓編), 中外医学社, 東京, 2009, pp110-116

15. 松村 到, 金倉 讓. 遺伝子発現からみた急性白血病の予後. *血液・腫瘍科* 58:8-13, 2009

16. 松村 到, 金倉 讓. 慢性好酸球性白血病/好酸球増加症候群における染色体・遺伝子異常. *血液・腫瘍科* 58:146-151, 2009

17. 松村 到, 金倉 讓. 過剰鉄と造血-生体内自由鉄とのかかわりをさぐる. *分子細胞治療* 8:26-31, 2009

18. 松村 到, 金倉 讓. MPD に対する新たな治療戦略. *細胞* 41:20-23, 2009

19. 松村 到, 金倉 讓. 血液製剤の種類と適応. *総合臨床* 58:385-389, 2009

20. 松村 到, 金倉 讓. CML に対する新規チロシンキナーゼ阻害薬. *総合臨床* 58:1708-1712, 2009

21. 松村 到, 金倉 讓. 分子遺伝学的完全寛解が得られた時点でイマチニブを減量・中

止することは可能か? EBM 血液疾患の治療 2010-2011 (金倉 讓, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸編), 中外医学社, 東京, 2009, pp191-195

22. 松村 到, 金倉 讓. 肥満細胞症. *血液フロンティア* 19:37-46, 2009

23. 松村 到, 金倉 讓. Imatinib 耐性・不応容の慢性骨髄性白血病に対する治療. *血液疾患エキスパート* (松村 到, 高橋 聡, 宮崎泰司編), 中外医学社, 東京, 2009, pp214-228

24. 松村 到, 金倉 讓. 造血の分子機構. *内科学書* (小川 聡編), 中山書店, 東京, 2009, pp8-9

25. 松村 到, 赤司浩一, 薄井紀子, 神田善伸, 宮崎泰司. 慢性骨髄性白血病治療の現状と病態に基づいた今後の治療. *Trends in Hematological Malignancies* 1:8-17, 2009

26. 水木満佐央, 金倉 讓. 慢性骨髄性白血病. *入門腫瘍内科学* (日本臨床腫瘍学会監修, 『入門腫瘍内科学』編集委員会), 篠原出版新社, 東京, 2009, pp244-246

27. 水木満佐央, 金倉 讓. 肥満細胞症. WHO 分類第 4 版による白血病・リンパ系腫瘍の病態学 (押味和夫監修, 木崎昌弘, 田丸淳一編), 中外医学社, 東京, 2009, pp47-55

28. 織谷健司, 金倉 讓. B リンパ球初期分化と制御機構. *臨床免疫・アレルギー科* 51:66-71, 2009

29. 織谷健司, 金倉 讓. ダサチニブ (スプリセル). *腫瘍内科* 4:79-84, 2009

30. 柴山浩彦, 金倉 讓. ヘアリーセル白血病(HCL). *造血器腫瘍アトラス* (阿部達生編), 日本医事新報社, 東京, 2009, pp309-313

31. 横田貴史, 織谷健司, 金倉 讓. 新たな造血幹細胞マーカーESAM. *血液・腫瘍科* 59:209-216, 2009

32. 田中宏和, 松村 到, 金倉 讓. 白血病幹細胞研究の動向. *Biotherapy* 23:364-370, 2009

#### 学会発表

1. Akiyama M, Kashiwagi H, Todo K, Moroi M, Berndt, MC, Kojima H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Presence of platelet-associated anti-GPVI autoantibodies and restoration of GPVI

- expression in patients with GPVI deficiency The XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2009.7.11-16, Boston, USA,)
2. Kanakura Y. Overview of the clinical presentation of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Interest Group Meeting-Asia (PIG-A) (2009.9.5, Seoul, Korea)
  3. Ichii M, Oritani K, Yokota T, Kanakura Y, Kincade PW. Human B lineage progenitor subsets can be resolved according to CD10 density 2009 ISEH 38th Annual Scientific Meeting (2009.9.9-12, Athens, Greece)
  4. Tomiyama Y, Akiyama M, Kashiwagi H, Todo K, Moroi M, Berndt M, Kojima H, Kanakura Y. Presence of platelet-associated anti-GPVI autoantibodies and restoration of GPVI expression in patients with GPVI deficiency XXth Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Asia (2009.11.14-18, Nagoya, Japan)
  5. Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, Okamoto S, Ando K, Ninomiya H, Kawaguchi T, Nakao S, Nakakuma H, Nishimura J, Kinoshita T, Bedrosian C, Valentine ME, Ozawa K, Omine M. Chronic renal insufficiency in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Improvement with Eculizumab treatment in the long-term follow-up of the AEGIS study The American Society of Hematology 51st Annual Meeting (2009.12.5-8, New Orleans, USA)
  6. Tomiyama Y, Miyakawa Y, Okamoto S, Katsutani S, Kimura A, Okoshi Y, Ninomiya H, Kosugi H, Nomura S, Ozaki K, Ikeda Y, Koh N, Katsura K, Kanakura Y. Six month treatment of low dose eltrombopag is efficacious in Japanese patients with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP) The American Society of Hematology 51st Annual Meeting (2009.12.5-8, New Orleans, USA)
  7. Satoh S, Matsumura I, Tanaka H, Harada H, Harada Y, Kanakura Y. C-terminal mutation of RUNX1 deteriorates DNA damage-repair response and promotes the development of acute myeloid leukemia The American Society of Hematology 51st Annual Meeting (2009.12.5-8, New Orleans, USA)
  8. Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Noji H, Nishimura J, Kanakura Y, Kinoshita T. Wnt pathway is upregulated in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria The American Society of Hematology 51st Annual Meeting (2009.12.5-8, New Orleans, USA)
  9. 前田哲生, 政家寛明, 岸野吏志, 望月伸夫, 山本正樹, 数藤孝雄, 清水一亘, 松井敬子, 中澤剛士, 釜江 剛, 江副幸子, 白鹿正通, 石川 淳, 松村 到, 金倉 譲 同種造血細胞移植患者におけるミカファンギンの血中抗真菌活性と真菌症予防効果の検討第 31 回日本造血細胞移植学会総会 (2009.2.5-6, 北海道)
  10. 政家寛明, 前田哲生, 数藤孝雄, 山本正樹, 清水一亘, 松井敬子, 一井倫子, 江副幸子, 白鹿正通, 松村 到, 金倉 譲 FluBu4 を前処置に用いた同種造血幹細胞移植症例における RRT、キメリズムの検討第 31 回日本造血細胞移植学会総会 (2009.2.5-6, 北海道)
  11. 松井敬子, 政家寛明, 前田哲生, 木島貴志, 江副幸子, 白鹿正通, 松村 到, 金倉 譲 閉塞性細気管支炎(BO)の診断・定量化に 3D スパイログラムによる air-trapping 測定が有用であった AML の一例第 31 回日本造血細胞移植学会総会 (2009.2.5-6, 北海道)
  12. 金倉 譲 発作性夜間血色素尿症の病態と治療 第 106 回日本内科学会総会・講演会 (2009.4.10-12, 東京)
  13. Ezoe S, Matsumura I, Tanaka H, Satoh Y, Kanakura Y. SIRT1 Deficiency Suppressed the Maintenance of Hematopoietic Stem Cell Pool 第 7 回幹細胞シンポジウム (2009.5.15-16, 東京)
  14. 柏木浩和, 國島伸治, 武 弘典, 金倉 譲, 富山佳昭  $\alpha$ Ib(R995W)変異を認めた先天性巨大血小板減少症例における  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 活性化に関する検討第 32 回日本血栓止血学会学術集会 (2009.6.4-6, 福岡)
  15. 佐多 弘, 石田尚子, 堀由美子, 前田哲生, 白鹿正通, 水木満佐央, 松村 到, 青笹克之, 金倉 譲 多発性骨髄腫の治療経過中 EBV 関連リンパ増殖性疾患を発症した 1 例 第 91 回近畿血液学地方会 (2009.6.20, 奈良)
  16. 金倉 譲 造血器腫瘍治療薬の分類 第 10 回日本検査血液学会学術集会 (2009.7.4-5, 山梨, 尾崎由基男)

17. 西村純一, 金倉 譲, 大屋敷一馬, 七島 勉, 岡本真一郎, 安藤 潔, 二宮治彦, 川口辰哉, 中尾真二, 中熊秀喜, 木下タロウ, Bedrosian C, Valentine ME, 小澤敬也, 小峰光博 本邦 PNH 症例における補体阻害剤 (Eculizumab) の安全性と有効性: AEGIS 第 2 相臨床試験第 46 回補体シンポジウム (2009.8.21-22, 福岡)
18. 松村 到, 田中宏和, 金倉 譲 組織鉄の功罪: 骨髄における過剰鉄がもたらす毒性 第 33 回鉄バイオサイエンス学会 (2009.9.12-13, 岡山)
19. 佐藤友亮, 松村 到, 原田浩徳, 金倉 譲 RUNX1 は Gadd45a の転写調節を介してスクレオチド除去修復を制御する第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3, 神奈川)
20. 金倉 譲 PNH の診断と治療 第 71 回日本血液学会学術集会 (2009.10.23-25, 京都)
21. Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, Okamoto S, Ando K, Ninomiya H, Kawaguchi T, Nakao S, Nakakuma H, Nishimura J, Kinoshita T, Bedrosian C, Valentine ME, Ozawa K, Omine M. Safety and efficacy of Eculizumab in Japanese PNH patients: AEGIS phase II clinical study results 第 71 回日本血液学会学術集会 (2009.10.23-25, 京都)
22. 松村 到 急性骨髄性白血病の治療第 71 回日本血液学会学術集会 (2009.10.23-25, 京都)
23. Yokota T, Oritani K, Sudo T, Butz S, Kokame K, Kincade PW, Miyata T, Vestweber D, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM marks hematopoietic stem/progenitor cells throughout ontogeny in mice 第 71 回日本血液学会学術集会 (2009.10.23-25, 京都)
24. 釜江 剛, 大塚欣敏, 中澤剛士, 秋山正夫, 田所誠司, 白鹿正通, 柏木浩和, 金倉 譲, 富山佳昭 血小板トロンボキサン受容体異常症における新規遺伝子異常 —nt.167-8 における 1 塩基挿入—第 71 回日本血液学会学術集会 (2009.10.23-25, 京都)
25. Satoh S, Matsumura I, Tanaka H, Harada H, Harada Y, Kanakura Y. RUNX1 controls nucleotide excision repair (NER) system through transcriptional regulation of Gadd45a 第 71 回日本血液学会学術集会 (2009.10.23-25, 京都)
26. 谷村 朗, 田中宏和, 松村 到, 松井敬子, 斉藤有理, 柴山浩彦, 金倉 譲 抗アポトーシス分子 Anamorsin の造血幹細胞における発現と機能解析 第 71 回日本血液学会学術集会 (2009.10.23-25, 京都)
27. 村上良子, 井上徳光, 金倉 譲, 西村純一, 七島 勉, 野地秀義, 木下タロウ 発作性夜間血色素尿症患者における HMGA2 の発現について第 71 回日本血液学会学術集会 (2009.10.23-25, 京都)
28. 藤田二郎, 水木満佐央, 大塚正恭, 松村 到, 金倉 譲 非炎症状態におけるマウス造血幹細胞/前駆細胞からの樹状細胞分化における急性骨髄性白血病関連遺伝子異常の役割 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (2009.12.2-4, 大阪)
29. 木田 亨, 植田康敬, 前田哲生, 白鹿正通, 水木満佐央, 松村 到, 金倉 譲 180 日以上を経て致命的な急性 GVHD を発症した HLA 不一致非血縁者間同種骨髄移植症例 第 92 回近畿血液学地方会 (2009.12.12, 京都)
30. 金倉 譲 チロシンキナーゼと造血器疾患 第 27 回埼玉先端血液懇話会 (2009.6.3, 埼玉)
31. 田中宏和 鉄代謝異常と内科系疾患 第 9 回内科系セミナー (2009.9.17, 大阪)
32. 松村 到 がん幹細胞 第 12 回香川血液疾患学術講演会 (2009.11.6, 香川)
33. 松村 到 分子標的療法 第 3 回臨床血液学セミナー (2009.11.20-22, 東京)
34. 田中宏和, 松村 到, 金倉 譲 生体内鉄過剰による造血障害の分子機構 第 15 回血液科学セミナー (2009.11.21, 東京)
35. 松村 到 造血器腫瘍の発症機構と治療への応用 第 8 回先端医療フォーラム (2009.11.27, 岡山)
- G: 知的財産権の出願・登録状況  
なし

分担研究報告書

7. 可溶性 Notch リガンド Delta1-Fc を用いて増幅した  
臍帯血造血幹・前駆細胞移植の臨床研究に向けて

分担研究者：千葉 滋

（筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授）

研究要旨

我々はヒト臍帯血 CD133 陽性細胞を可溶性 Notch リガンドである Delta1-Fc キメラ蛋白を固相化した条件で培養することにより、特異的に免疫不全マウスで長期間造血可能な細胞（SCID0repopulating cell, SRC）を増幅可能であることを示してきた。

今年度は、この成果に基づいて臨床試験を行うため、書類整備を進めた。すなわち、筑波大学附属病院内に設置された細胞プロセッシングファクトリー（CPF）で臨床試験を行うための培養が開始できるよう、標準作業手順書作成を遂行した。さらに、CPF 環境下における培養結果の再現性を確認する実験を行った。

#### A : 研究目的

増幅したヒト臍帯血を用いた移植法の開発が本研究班全体の目的であるが、この分担研究では、ヒト臍帯血中の造血幹細胞をより効率よく増幅するために見いだした新規方法論を基盤として、新たな臨床試験を行うための基盤整備を行う。

#### B : 研究計画・方法

Notch 受容体の可溶性リガンドである Delta1-fc を用いて培養し、別ユニットのフレッシュな臍帯血と同時に移植を行うという臨床プロトコールに向けた基盤整備である。Delta1-Fc を産生する細胞はマスターセルバンクを作製しており、GMP レベルの Delta1-Fc を大量に産生する基盤は整っている。筑波大学内に設置された細胞プロセッシングファクトリー (CPF) で培養を行うため、標準差手順書 (SOP) を作成する。秘密保持契約に基づいて、先端医療センターで用いられている SOP を入手し、これを参考として筑波大学内施設と Delta1-Fc を用いる培養によって GMP レベルに準じる輸注用細胞を調整できるようにする。

#### C : 研究結果ならびに今後の方針

筑波大学内施設と Delta1-Fc を用いる培養によって GMP レベルに準じる輸注用細胞を調整するための SOP が完成に近づいた。Delta1-Fc の GMP 製造をすすめ、臨床試験で行う培養法を完成させ、ヒト肝細胞の臨床応用するための倫理指針に基づいた臨床試験を実行に移す。

#### D : まとめ

ヒト臍帯血 CD133 陽性細胞を可溶性 Notch リガンドである Delta1-Fc キメラ蛋白を固相化した条件で培養して移植する臨床試験の

基盤整備を進めた。

#### E : 健康危険情報

該当なし。

#### F : 研究発表

(論文)

1. Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch Activation Induces the Generation of Functional NK Cells from Human Cord Blood CD34-Positive Cells Devoid of IL-15. *J Immunol* 182:6168-6178, 2009.
2. Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood* 113:6584-6592, 2009.
3. Lee S-y, Kumano K, Nakazaki K, Sanada M, Matsumoto A, Yamamoto G, Nannya Y, Suzuki R, Ota S, Ota Y, Izutsu K, Sakata-Yanagimoto M, Hangaishi A, Yagita H, Fukayama M, Seto M, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 100:920-926, 2009.
4. Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H,

Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. **Nature** 459:712-716, 2009.

5. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa S. **Nature** 460:904-908, 2009.
6. Masuda S, Kumano K, Suzuki T, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Tojo A, Shibutani M, Mitsumori K, Hanazono Y, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. Dual antitumor mechanisms of Notch signaling inhibitor in a T cell acute lymphoblastic leukemia xenograft model. **Cancer Sci**, in press
7. Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, in press

G : 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし。

#### IV. 班会議・合同研究カンファレンス

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金  
「新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の  
ex vivo 増幅技術の開発と応用」 班会議 議事録

第 1 回合同研究カンファレンス

1. 日時 平成 21 年 5 月 12 日 (火) 14:00～16:00
2. 場所 メルパルク京都 6 階 会議室 3
3. データカンファレンス

演者	演題名
初山 麻子 先端医療センター 技術研究員	サイトカインの組み合わせについての比較検討
田中 宏和 大阪大学大学院医学研 究科 特任研究員	製造練習 20 の結果報告

第 2 回合同研究カンファレンス

1. 日時 平成 21 年 7 月 21 日 (火) 14:00～16:00
2. 場所 先端医療センター 臨床棟 4 階 研修室
3. データカンファレンス

演者	演題名
伊藤 仁也 先端医療センター 細胞管理室 室長	「Ex vivo 増幅臍帯血移植前臨床試験」に向けた取り組み
千葉 滋 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 教授	「可溶性 Notch リカンド Delta1-Fc を用いて増幅した臍帯 血造血幹・前駆細胞移植の臨床研究に向けて」

### 第3回合同研究カンファレンス

1. 日時 平成21年11月17日(火) 14:00～16:00
2. 場所 メルパルク京都 4階 研修室1
3. データカンファレンス

演者	演題名
伊藤 仁也 先端医療センター 細胞管理室 室長	臨床研究に関する進捗状況

### 第4回合同研究カンファレンス

1. 日時 平成21年1月12日(火) 14:00～16:00
2. 場所 神戸臨床研究情報センター 研修室2
3. データカンファレンス

演者	演題名
田中 宏和 大阪大学大学院医学研 究科 特任研究員	分子基盤に基づいた造血幹細胞の増幅法の開発
初山 麻子 先端医療センター 技術研究員	製造練習21の結果報告

### 第5回合同研究カンファレンス

1. 日時 平成22年3月2日(火) 14:00~16:00
2. 場所 メルパルク京都 6階 会議室3
3. データカンファレンス

演者	演題名
伊藤 仁也 先端医療センター 細胞管理室 室長	新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の ex vivo 増幅技術 の開発と応用