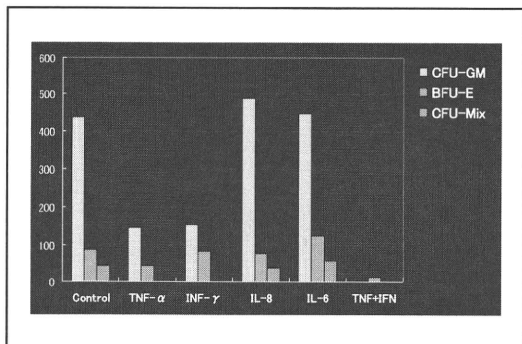


8.38x10⁸/kg, CD34 陽性細胞数 2.87x10⁶/kg を輸注した。Day1に Staphyrococcus epidermidis の敗血症を発症し発熱が持続したが Day10 には好中球>500 となった。しかし、1 回目の臍帯血移植同様に全身の浮腫、CRP の上昇 (18.9mg/dl) SpO₂ の低下、GOT (1302IU/ml), GPT (2200IU/ml), LDH (4416IU/ml) の上昇が認められた後、day21 には再び白血球は減少し、<1000 となり、骨髓所見も低形成となった。その後ステロイドの投与、ガンマグロブリンの投与を行い、血球は回復した。

【サイトカインパターンの解析】

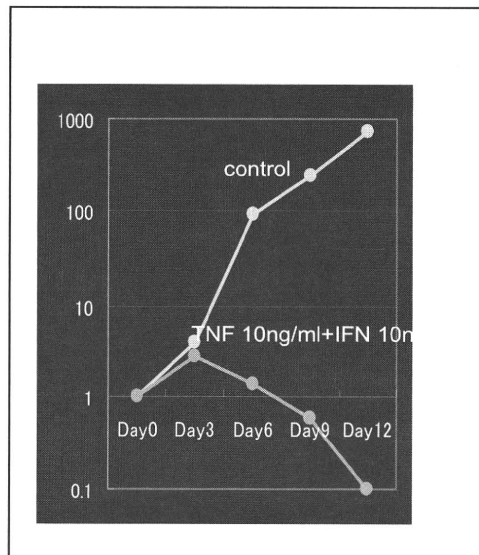
ウエスタンブロット法による網羅的解析において移植から拒絶までの期間に IL-5, IL-6, IL-8, IL-2、TNF- α 、INF- γ MCP-1, RANTES、NAP-2, TIMP-1, TIMP-2, IL-4, Ang, IGFBP-2 が発現していた。このうち拒絶前後に大きく産性パターンが変化したものは、IL-5, IL-8, MCP-1, IL-6, TNF- α 、INF- γ であった。定量的結果 TNF- α 、INF- γ は拒絶の直前にピンポイントで上昇した。

【サイトカイン添加によるコロニー形成能】



臨床的に今回の拒絶に関わったサイトカインを特定するため、コロニー形成に与える影響を調べたと。IL-8, IL-6 に関しては、コロニー形成を抑制せず、TNF- α 、INF- γ はコロニー形成を抑制した。TNF- α + INF- γ は全くコロニーを形成しなかった。

【ex vivo 増幅系でのサイトカインの影響】

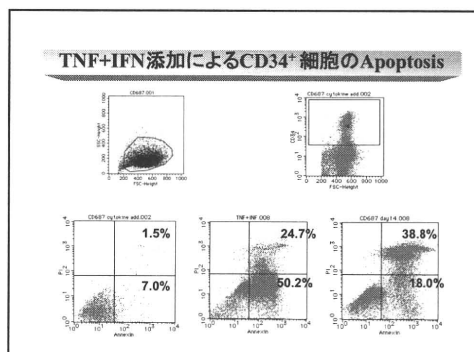


臍帯血 CD34 陽性細胞を SCF+TPO+FL+

IL-6/sIL-6Rにて増幅させる系に各種サイトカインを添加し、増幅曲線を比較した。

IL-8, IL-6 では増幅抑制はあまりなく、TNF- α 、INF- γ で抑制された。グラフに示すように両者を添加するとほとんどの細胞が死滅した。

【CD34 陽性細胞に対する炎症性サイトカインの作用】



図は TNF- α と INF- γ を臍帯血に添加し、CD34 陽性細胞で Gate した後、Annexine/PI 染色したものである。CD34 陽性細胞のほとんどが Apoptosis に陥っていることがわかった。

D: 考察

骨髓非破壊的前処置による臍帯血移植後の生着不全例の特徴について虎ノ門病院グループは、生着不全の一要因である hemophagocytic syndrome (HPS) 発症と移植

後 day10 以降の IL-8, MCP-1 高値との相関、pre-engraftment immune reaction (PIR) 発症と移植後 day10 以降の IL-5, IL-8 高値との相関、さらには血流感染症と移植後 day10 以降の IL-6, IL-8 高値との相関を報告している。PIR は生着日 6 日以前に起こる allo-immunization に起因する一連の症候群であり、非感染性の発熱、皮疹、下痢、黄疸、体重増加等を呈する。また PIR (+) 群では生着不全が多いことも報告されている。

本症例では、臍帯血移植とその後の拒絶のレスキューで行った PBSCT において、ともに移植早期に敗血症の発症に引き続き、IL-6, MCP-1, IL-8 の上昇が認められ、その後、発熱、皮疹、浮腫といった非感染性の免疫反応 (PIR) を発症した。また骨髄非破壊的前処置を行って残存したレシピエント T 細胞はほとんど活性化した状態で、AICD (Activation induced cell death) も欠如しており、制御不十分な状態で、サイトカイン、ケモカインを過剰に産生したと考えられる。これらのサイトカインに刺激された活性化マクロファージ、活性化 T 細胞から TNF- α などの炎症性サイトカインが産生され造血幹細胞などはミトコンドリアが豊富で細胞回転が速い細胞を Apoptosis に陥らせることが知られている。別の試験で ex vivo 増幅した臍帯血は、直接これらのサイトカインを産生していないことから Ex vivo 増幅臍帯血移植が原因とは考えにくく、敗血症に伴う高サイトカイン血症が引き金となり、Apoptosis 誘導性のサイトカイン、ケモカインが産生され、拒絶に至ったと考えた。

E: 健康危険情報

臨床研究にて拒絶症例が発生した。
別紙の有害事象報告を添付した。

F: 研究発表

1. 鹿村真之, 伊藤仁也, 大隈一興, 関根暉彬. リンパ球活性化培養中の細胞表面抗原の経時的变化, Biotherapy 23 257-262 2009
2. 伊藤仁也, 中畑龍俊 体外増幅造血細胞移植 医学のあゆみ vol.229 No.9 2009
3. Sumie Tabata, Sonoko Shimoji, Kimihiko Murase, Yoko Takiuchi, Daichi Inoue, Takaharu Kimura, Yuya Nagai, Minako Mori, Katsuhiko Togami, Masayuki Kurata, Kiminari Ito, Hisako Hashimoto, Akiko Matsushita, Kenichi Nagai, Takayuki Takahashi Successful allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome complicated by severe pulmonary alveolar proteinosis, The Japanese Society of Hematology 2009
4. Mori M, Togami K, Fujita H, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Nagai Y, Tabata S, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Kaji S, Takahashi T. Successful allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia complicated by refractory aortitis. Bone Marrow Transplant. 2009 Aug 31.
5. Inoue D, Nagai Y, Kimura T, Shimoji S, Mori M, Togami K, Tabata S, Kurata M, Matsushita A, Ito K, Hashimoto H, Maruoka H, Yamashita E, Nagai K, Imai Y, Shirane H, Takahashi T. Refractory de novo myeloid sarcoma: a case report and therapeutic strategy based on bone marrow minimal residual disease. Int J Hematol. 2009 Jul;90(1):120-3.
6. 永井謙一, 橋本尚子, 伊藤仁也, 松下章子, 下地園子, 木村隆治, 井上大地, 森美奈子, 永井雄也, 田淵淑江, 柳田宗之, 高橋隆幸 非血縁子通津伊移植後の再発に対する臍帯血移植後に、第1ドナーリンパ球による移植片対白血病効果が認められた T リンパ芽球性リンパ腫 臨床血液 第51巻 第6号 別冊, 2010
7. Sumie Tabata, Minako Mori, Yuya Nagai, Hisako Hashimoto, Hiroshi Arima, Seiji Nagano, Yoko Takiuchi, Daichi Inoue, Takaharu Kimura, Sonoko Shimoji, Soshi Yanagita, Kiminari Ito, Akiko Matsushita, Kenichi Nagai, and Takayuki Takahashi Succeeded successful allogeneic bone marrow

transplantation for Diamond-Blackfan
Anemia complicated by severe cardiac
dysfunction due to transfusion-induced
hemochromatosis
Internal Medicine 49 453-456, 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

新規培養法の効率、安全性の検証と cell processing におけるデバイスの開発

分担研究者：伊藤 仁也

（神鋼病院 血液病センター 細胞治療室）

研究協力者；初山 麻子

（先端医療センター細胞管理室）

研究要旨

本分担研究では、*ex vivo* 増幅臍帯血の製造法に関する研究の一環として、基盤整備を行ってきた。そこから開発された無血清培地ならびに培養バッグ (Nipro 社製) を製造に用いるために新たな培養法を確立した。

従来法は培養4, 7, 10日目に培地を 2 倍量ずつ追加し12日間の培養を行うのに対し、新規培養法は培養4日目に2倍量、7日目に4倍量の培地を追加し、培養期間を9日間に短縮した。

製造練習を重ねた結果、この新規培養法で有核細胞 400 倍、CD34 陽性細胞 60 倍の増幅が得られることを確認した。これは従来法と同等以上の結果で、新規資材によってより効率的に増幅できるようになった。

本年度は新規培養法の実製造への応用化を目的とした、安全性試験と品質管理試験を行った。実製造 IBRI-14 で、安全性試験として、原材料の臍帯血 (CB) と最終製品 (FP) の染色体検査を実施した。また、培養期間の変更に伴い一部内容を変更した品質管理試験を安定性及び安全性試験として実施した。

結果、安全性試験として行った染色体検査のみ異常が認められたが、原材料由来のもので増幅培養による異常ではなかった。品質管理試験による安全性・安定性試験においては製品の規格を満たす結果が得られている。

今後の課題として、安全性の再評価と製造及び品質管理の書類改定や周辺整備、実務者の熟練などが挙げられる。

A：研究目的

再生医療において安全性や安定性を恒常的に維持することは、最も重要な要素である。本邦においてもそれらを重視し、基盤整備として培養バッグや無血清培地、およびそれらを用いた培養法の開発に取り組んできた。

その結果、培養期間を従来の 12 日間から 9 日間に変更しても、同等以上の増幅効率が得られるまでになった。

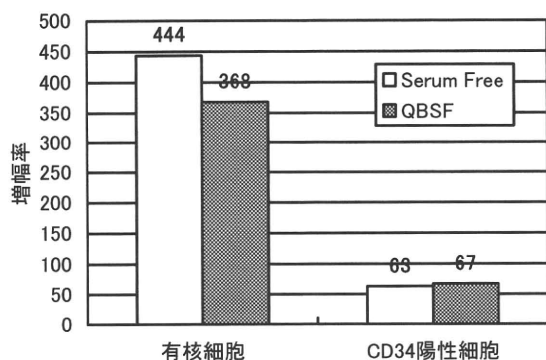


図 1：製造練習 21 増幅率

本年度は新たな培養法で製造された細胞が従来品と同等に細胞製剤としての基準を満たしているか確認するために安全性試験を行った。

B：研究計画・方法

NAKAHATA 法サイトカイン (SCF, TPO, FL, IL-6, IL-6r) を添加した無血清培地とニプロバッグを用い、臍帯血由来 CD34 陽性細胞の培養を行った。細胞密度は $1E+04/ml$ で 15ml/Bag から培養を開始、培養 4 日目に 15ml、7 日目に 90ml の培養液を追加し 9 日間の培養を行った。

検査は通常の品質管理試験に加え、安全性試験として、染色体検査 (G バンド分染法)、安全性及び安定性試験として品質管理試験の無菌試験、エンドトキシン試験を実施した。

C：研究結果ならびに今後の方針

培養の結果、増幅率は有核細胞で 161 倍、CD34 陽性細胞で 24 倍であった。

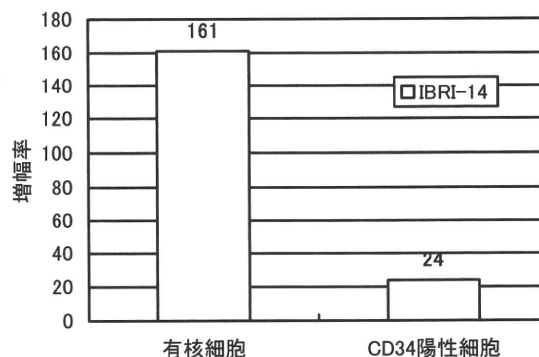


図 2：実製造 IBRI-14 増幅結果

また、コロニーアッセイでは、コロニー形成細胞の増幅も確認された。

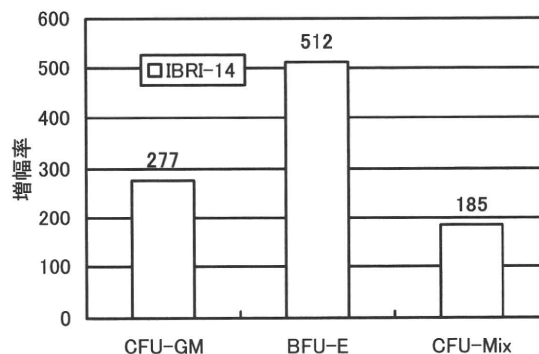


図 3：実製造 IBRI-14 コロニーアッセイ結果

製品の表面抗原解析では、顆粒球、赤芽球、単球系への分化が認められた。表面抗原に異常な傾向は認められなかった。

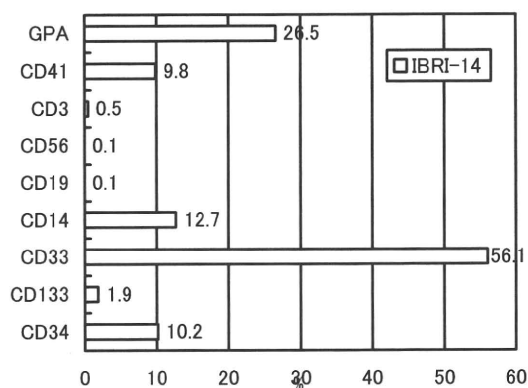


図 4：実製造 IBRI-14 表面抗原解析

以上のように、通常の品質管理試験では、製造工程及び製品に異常が認められなかった

め、安全性試験を実施した。

安全性試験では、染色体検査で異常が認められたが、増幅前の Day0 (CB) でも同様の異常が認められたので、増幅による影響ではないと考えられる。その他、無菌試験は Day0 (CB, EX0, NCB)、Day7 (EX7)、Day9 Final (EX9, FP) 計 6 件のサンプルを検査したが、菌の発育は認められなかった。最終製品 (FP) のエンドトキシン試験においては、添加回収試験成立下で検出限界以下 (0.12EU/ml 未満) であった。

D：まとめ

今回の安全性試験では、原材料に問題があったため、試験自体が成立しておらず、安全性を示すことは出来なかったが、品質管理試験に基づく製品の規格は満たしており、新規培養法による影響は認められなかった。

安全性試験に関しては、今後、改めて染色体異常のない検体で再検査することと、検査を重ねる必要がある。また、安定的に増幅が得られることが確認されたので、書類の改定及び周辺の整備を行う事が今後の課題となる。

E：健康危険情報

特筆すべき事項なし

F：研究発表

1. 鹿村真之, 伊藤仁也, 大隈一興, 関根暉彬. リンパ球活性化培養中の細胞表面抗原の経時的変化, *Biotherapy* 23 257-262 2009

2. 伊藤仁也, 中畑龍俊 体外増幅造血細胞移植 医学のあゆみ vol. 229 No. 9 2009

3. Sumie Tabata, Sonoko Shimoji, Kimihiko Murase, Yoko Takiuchi, Daichi Inoue, Takaharu Kimura, Yuya Nagai, Minako Mori, Katsuhiko Togami, Masayuki Kurata, Kiminari Ito, Hisako Hashimoto, Akiko Matsushita, Kenichi Nagai, Takayuki Takahashi
Successful allogeneic bone marrow

transplantation for myelodysplastic syndrome complicated by severe pulmonary alveolar proteinosis, *The Japanese Society of Hematology* 2009

4. Mori M, Togami K, Fujita H, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Nagai Y, Tabata S, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Kaji S, Takahashi T.
Successful allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia complicated by refractory aortitis.
Bone Marrow Transplant. 2009 Aug 31.

5. Inoue D, Nagai Y, Kimura T, Shimoji S, Mori M, Togami K, Tabata S, Kurata M, Matsushita A, Ito K, Hashimoto H, Maruoka H, Yamashita E, Nagai K, Imai Y, Shirane H, Takahashi T.
Refractory de novo myeloid sarcoma: a case report and therapeutic strategy based on bone marrow minimal residual disease.
Int J Hematol. 2009 Jul;90(1):120-3.

6. 永井謙一、橋本尚子、伊藤仁也、松下章子、下地園子、木村隆治、井上大地、森美奈子、永井雄也、田淵淑江、柳田宗之、高橋隆幸
非血縁子通津伊移植後の再発に対する臍帯血移植後に、第1ドナーリンパ球による移植片対白血病効果が認められたTリンパ芽球形リンパ腫
臨床血液 第51巻 第6号 別冊, 2010

7. Sumie Tabata, Minako Mori, Yuya Nagai, Hisako Hashimoto, Hiroshi Arima, Seiji Nagano, Yoko Takiuchi, Daichi Inoue, Takaharu Kimura, Sonoko Shimoji, Soshi Yanagita, Kiminari Ito, Akiko Matsushita, Kenichi Nagai, and Takayuki Takahashi
Successful allogeneic bone marrow transplantation for Diamond-Blackfan Anemia complicated by severe cardiac dysfunction due to transfusion-induced hemochromatosis
Internal Medicine 49 453-456, 2010

G：知的財産権の出願・登録状況

特開 2005-204539

「造血幹細胞および造血前駆細胞の培養方法」

分担研究報告書

Cell processing における GMP の構築とガイドライン作成に関する研究

分担研究者：前川 平

（京都大学輸血細胞治療部 教授）

研究要旨

細胞治療は、臨床応用に向けて技術開発が盛んに進められている新しい医療技術のひとつである。しかし、関連する法令や安全基準などの整備は遅れており、細胞治療が安全に実施出来るような環境を整えることが急務となっている。細胞治療や再生医療に使用されるヒト由来の細胞や組織の調整には、医薬品と同様に安全性の確保と高いレベルでの品質管理が求められており、質の高い細胞治療を実施し、その安全性を担保するには、十分な知識と豊富な経験をもつ人員によって細胞プロセッシングを行う必要がある。しかし、細胞や組織の調整を実施する際には、その特性を考慮し化学物質などを原料として製造される一般的な医薬品とは異なる基準が必要となる。治験においては被験者の安全性を保証することは最も重要なことであるが、大学や研究所レベルで行われることの多い細胞治療や再生治療に関する開発研究においては、一般の治験とは異なるレベルでの対応が必要である。研究成果を臨床の現場に還元し、細胞を用いた新しい治療法を広く国民に提供して行くには、先端医療開発の推進力を高めるとともに、開発の初期段階では安全性を確保しながら柔軟な規制の下で研究開発を支援していく環境の整備が不可欠である。開発段階に応じた GMP (Good Manufacturing Practice)が必要となってくる。現在、わが国では GMP に関するハードとソフトは整備されつつある。問題は、この GMP を細胞治療や再生治療の科学的基盤や特殊性を理解して、GMP 準拠のプロセッシングを行い、また治療用ヒト細胞を調製する施設をマネジメントできる人材の育成が喫緊の課題であり、京都大学での取り組みを紹介するとともに、今後の方向性に関して検討を行った。

A：研究目的

細胞治療とは、再生医療や遺伝子治療、細胞免疫療法などヒト由来の細胞や組織を利用して行われる治療方法の総称であり、Cell Processing Center（細胞プロセッシングセンター、以下 CPC）は、その細胞治療を実施する際に患者へ移植される細胞や組織の調製や加工を行うための専用の施設である（図1）。また、臓器から特定の機能を有する組織の分離作業や、細胞培養や遺伝子導入など様々な工程を「細胞プロセッシング」と呼んでいる。

細胞治療を目的として患者へ移植される細胞や組織は、その安全性を担保し高品質を保証するため、医薬品などと同じレベルでの製造管理や品質管理が要求される。そのため、細胞プロセッシングには製造管理や品質管理が厳密に行える環境が整った CPC が不可欠となる。わが国でも、様々な細胞や iPS 細胞を利用した細胞治療の基礎研究が盛んに進められており、既に医療用具として承認を受けた再生医療製品もある。しかし、基礎研究の成果を速やかに臨床応用するためには、関連する法令の改訂やインフラストラクチャーの整備、そして CPC の管理や細胞プロセッシングを行える人材の育成など多くの課題が山積している。

本研究は、わが国における細胞治療・再生治療開発を推進するために、どのような基盤整備が必要かを明らかにすることを目的とする。

B：研究計画・方法

分担研究者が、今までに取り組んできた細胞治療、遺伝子治療、再生治療など

を開発する探索的臨床試験研究（トランスレーショナル・リサーチ）のインフラストラクチャーの構築に関する多くの経験をもとに、産官学の研究者やエンジニア、さらに海外の研究者との議論をまとめるかたちで研究を遂行した。また、細胞プロセッシングセンターである京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部に隣接して設置された分子細胞治療センター (Center for Cell and Molecular Therapy)での経験をもとに、京都大学探索医療センター、大阪大学未来医療センター、および神戸先端医療センターとの共同作業を通じて、わが国における先端医療開発、とくに先端的細胞治療や再生治療を進めるうえで必要なインフラストラクチャーとはどのようなものであるかについて、人材育成も含めてどのような点に留意して基盤整備を進めて行くべきか検討を行った。

C：研究結果ならびに今後の方針

医薬品などの安全性を担保するために、その開発や製造における管理方法は薬事法や関連する省令などによって厳密に規制されている。しかし、盛んに開発が進められている細胞治療においては、その安全性や品質評価に関する基準が十分に整備されているとは言えないのが現状である。この分野に関連した厚生労働省からの最初の指針は、平成 18 年 7 月に施行された「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に係わる指針」である。わずか 4 年前の事であるが、この指針が施行された後に iPS 細胞を用いた研究も進展し、新しい技術に対応するために、現在この指針の見直しが進められている。

医薬品の製造管理や品質管理には GMP (Good Manufacturing Practice) という基準があり、現行の薬事法にも GMP の要求事項が組み込まれ運用されている。GMP は医薬品などを製造する際に起こりうる人為的な過誤を防止し、製品の品質を保証し、より良い製品の開発を進めていくことを目的として作られた国際基準である。現在は、医薬品だけでなく、医療機器や食品、化粧品などにもその範囲が広がられている。細胞治療も医薬品と同等の安全性と高い品質を保証するため、GMP の要求事項に沿って開発段階に対応した製造管理や品質管理を実施することが必要である³⁾。大学などで実施される細胞治療の臨床研究では、主に治験薬 GMP などに準拠した運用基準や施設基準が求められており、厚生労働省の承認を得て市場に出る際には薬事法によって運用が規制されることになる。

【GMP が要求する製造管理および品質管理】

CPC から出荷される細胞や組織（以下、細胞加工製品）の品質を保証し、その安全性を担保するためには、製造管理や品質管理を厳密に実施しなければならない。GMP の要求に準じて細胞プロセッシングを実施する際に必要とされる管理の概要は次のとおりである。

1. 製造管理

まず、すべての製造工程の手順について、事前にその妥当性を評価しておく。例えば、作業手順書に従って作業を行えば目的とする規格（無菌性や品質など）

の製造物が得られることを立証し、定められた品質の製造物を恒常的に製造できることを確認しておく必要がある。妥当性が確認された手順は、「標準作業手順書(SOP: Standard Operation Procedure)」として文書化し管理する。全ての作業は、標準作業手順書の指示内容に従って実施される。次に、作業を実施したら、その作業内容を記録し保管する。また、作業中に発生したトラブルなどもその内容を作業記録に残す。製造物の品質に影響を及ぼすトラブルが発生した場合には、原因を究明し再発防止ため是正を行う。

その他、製造施設内の無菌状態を管理し、交差汚染の防止を図る。また、施設内の設備や機器などが常に安定した状態で稼働していることを監視し、その記録を保管しておく。

2. 安全性の確保

製造物に混入する恐れがある異物については混入防止策を講じ、製造工程由来物質（製造過程で使用する薬剤などで、最終製造物には含まれない物質）などは適切な方法で除去する。微生物の感染やエンドトキシンなどが混入しないよう細心の注意を払う。

細胞加工製品の安全性と品質を高いレベルで保証するためには、完成した細胞加工製品を対象とした検査だけでは不十分である。例えば、微生物などが極少量混入していても、出荷判定で検出限界以下となれば製品はそのまま出荷されるが、出荷後にそれらが増殖する恐れがある。従って、最終製造物だけでなく、原材料の受入の際や、製造中の中間体に

対しても適時必要な品質管理を実施する必要がある。

3. 品質評価

細胞加工製品の品質の恒常性を保証するために、事前に妥当性が評価された試験方法を定めておく必要がある。細胞や組織は構造が複雑で、かつ変化しやすい物質であるため、その特性や品質について物理化学的、免疫学的あるいは生化学的手法などを駆使して品質評価方法や機能評価方法を確立しなければならない。また、測定値の正確さを保証するため、標準物質からのトレーサビリティも要求されている。

ここで必要とされている品質評価の方法は通常臨床検査とは目的が異なっている。細菌検査を例に上げると、臨床検査では病原菌の同定や感受性の検査などを行っているが、細胞プロセッシングでの品質評価では無菌試験やマイコプラズマ否定試験など微生物の感染がないことを厳密に評価する。すなわち、より高感度の検出方法で検査を行う必要がある。医薬品などの品質評価方法については日本薬局方⁶⁾に記載されている試験方法で実施しなければならないが、細胞や組織を試料とした場合、日本薬局方に記載されている試験方法では共存物質などの影響により正確に測定できない場合がある。今後、細胞や組織などを対象とした新たな品質評価法の開発も不可欠である。

【環境管理】

人へ移植される組織や細胞への細菌やウイルスの感染を防止し、異物などの

混入を防ぐためには、環境が整備されているCPCで細胞プロセッシングを実施しなければならない。まず、作業エリアの無菌状態を維持するためには、定期的な環境モニタリング（空中浮遊菌検査や落下菌検査、付着菌検査、空中浮遊微粒子の測定など）が必要であり、定期的に作業環境のサニテーション（清掃と消毒）も実施する。また、無菌作業を行う区域の清浄度は、**grade A**（ $0.5\mu\text{m}$ より大きな粒子が1立方フィート内に最大100個を超えない環境）が要求されている。この環境を維持するには、**grade D**から**grade A**へ段階的に清浄度を上げたゾーニングを施し、CPC外部からの塵や埃など異物の進入を防ぐ。さらに、保存している試薬や資材への汚染を防ぐための運用基準を定めたり、組織や細胞の取り間違いを防止するためにバーコードなどを利用した厳重な管理システムなどが必須となる。

【教育訓練】

人に移植される組織や細胞の安全性を担保し高いレベルでの品質を保証するには、高い技術力と豊富な経験を持つ技術者がCPCの管理運用に係わる必要がある。今後、CPCの管理運用を専門の業務とする技術者の需要は増加すると予測される。

臨床検査技師の教育制度は既に改組され、大学院への進学も可能となっている。より専門的な知識を学び、研究開発を行える環境を整えば、細胞や組織の品質評価方法や機能評価方法の開発も可能となるであろう。臨床検査技師は、医学の基礎知識と臨床検査に関する専門

的な知識を持っている。細胞や組織は人体を構成するものであり、細胞や組織の機能評価は臨床検査と共通する部分もある。これまでの「臨床検査」という分野で培われてきた経験や技術に新たな知識を融合させれば、先に述べた細胞治療に係わる開発の段階や臨床応用の場で、臨床検査技師も大いに活躍できるのではないであろうか。

既に京都大学では、平成 21 年度より医学部人間健康科学専攻の修士課程の学生（実際には他学部の学生や卒業生も参加していたようであるが）を対象にした研修コースを試験的に開始している。初年度は講義のみで GMP の概論や京都大学で実施している臨床研究の解説を行ったが、平成 22 年度からは細胞培養の実習や CPC の管理運営などのカリキュラムも予定している。しかし、このような教育環境が整っている施設はまだ少ない。今後は、学生だけでなく既に現場で活躍をしている技術者や、将来的には、薬学部、農学部など他の学部の卒業生も対象とした新たな研修システムの構築も予定されている。

D：まとめ

細胞治療は、臨床応用に向けて技術開発が盛んに進められてる新しい医療技術のひとつである。しかし、関連する法令や安全基準などの整備は遅れており、細胞治療が安全に実施出来るような環境を整えることが急務となっている。質の高い細胞治療を実施し、その安全性を担保するには、十分な知識と豊富な経験をもつ人員によって細胞プロセッシングを行う必要がある。

E：健康危険情報

なし

F：研究発表

(学会・研究会口頭発表 24件)

1. Tanaka R, Kimura S, Hosomi T, Hirai M, Nagao R, Takeuchi M, Yao H, Sakai K, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T : A Novel Automated Assay for the Detection of BCR-ABL Kinase Domain Mutations. 15th Congress of the European Hematology Association (EHA) (Fira Barcelona Gran Via, Barcelona, Spain) (June 12, 2010)
2. Ashihara E, Munaka T, Kimura K, Kanai M, Abe H, Hirai H, Shoji S, Maekawa T: Isopentenyl Pyrophosphate (IPP), a Metabolite produced in Myeloma Cells, Induces the Chemotaxis of $\gamma\delta$ T Cells. The American Society of Hematology 52st Annual Meeting and Exposition (Orlando, USA)(December 5, 2010)
3. Satake S, Hirai H, Shime N, Nagao R, Tanaka R, Yao H, Hayashi Y, Ashihara E, Inaba T, Fujita N, Imanishi J, Maekawa T.: Candidemia-Induced Emergency Granulopoiesis Consists of Successive Dual Waves Triggered by the Shift From C/EBP α to C/EBP β Dependency. The American Society of Hematology 52st Annual Meeting and

- Exposition (Orlando, USA)(December 6, 2010)
4. 前川 平：京都大学における先端医療開発への挑戦. 第62回佐賀ブルーアートイベント（佐賀市）平成22年2月12日(2010)
 5. 前川 平：ASH2009 Review in CML. 第9回京滋CMLフォーラム（京都市）平成22年2月26日(2010)
 6. 前川 平：慢性骨髄性白血病治療のあらたな課題（特別講演）. 北陸造血器腫瘍研究会 第50回記念講演会（福井）平成22年3月3日(2010)
 7. 前川 平：先端的細胞治療・再生治療開発と検査技師の役割（特別講演）第54回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会（愛知県）平成22年3月13日(2010)
 8. 前川 平：慢性骨髄性白血病のあらたな治療戦略とその課題（特別講演） Shizuoka Hematology Forum 2010（静岡市）平成22年4月24日(2010)
 9. 前川 平：慢性骨髄性白血病治療の進歩とあらたな課題（特別講演）. 三重血液研究会（津市）平成22年5月21日(2010)
 10. 万木紀美子、芦原英司、菱田理恵、丹羽紀実、平位秀世、前川 平：骨髄移植後、ドナー由来のHLA抗体により血小板輸血不能となった一例. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会（名古屋）平成22年5月28日(2010)
 11. 江川裕人、万木紀美子、菱田理恵、丹羽紀実、竹川良子、渡邊珠緒、辻博昭、平位秀世、芦原英司、前川 平、吉澤 淳、上本伸二：術前抗ドナー感作の問題点：肝移植とHLA抗体の臨床的意義. パネルディスカッション2「移植医療とHLA抗体／輸血療法. PD2-1」第58回日本輸血・細胞治療学会総会（名古屋）平成22年5月28日(2010)
 12. 前川 平：京都大学における生体肝移植時の輸血療法. パネルディスカッション2「移植医療とHLA抗体／輸血療法. PD2-3」第58回日本輸血・細胞治療学会総会（名古屋）平成22年5月28日(2010)
 13. 藤原晴美、竹下明裕、渡邊弘子、押田眞知子、友田 豊、万木紀美子、星 順 隆、高橋孝喜、前川 平、大戸 斉：大学病院輸血部技師の教育への関与と重要性. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会（名古屋）平成22年5月30日(2010)
 14. 木村晋也、前川 平：T315I遺伝子変異を持つCMLに対するオーロラキナーゼ阻害剤、AT9283の開発について. 平成22年度第1回合同班会議（名古屋）厚生労働省がん研究開発費「成人白血病の難治機構の分子レベルでの解明とそれに基づく分子標的治療の開発に関する研究」班（直江班）平成22年6月19日(2010)

15. 芦原英司、河田英里、前川 平 : 肺がんに対するRNA干渉療法の開発. 第4回iPUC-II (Integrated Pulmonary Circulation Research II) (東京) 平成22年6月26日 (2010)
16. Kamio N, Hirai H, Satake S, Tanaka R, Nagao R, Yao H, Hayashi Y, Takeuchi M, Ashihara E, Maekawa T: A flow cytometry-based method for screening of effective small interfering RNA target sequences. 第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会(栃木) 平成22年7月2日 (2010)
17. 武内美紀、芦原英司、木村晋也、長尾里奈、田中瑠璃子、八尾尚幸、平位秀世、山崎洋子、前川 平:低酸素環境適応により治療抵抗性を獲得した慢性骨髄性白血病(CML) 細胞に対する、低酸素標的薬剤Rakicidin A の有効性. 第14回日本がん分子標的治療学会学術集会(東京) 2010年7月7日(2010)
18. 田中瑠璃子、木村晋也、長尾里奈、横田明日美、武内美紀、平位秀世、芦原英司、前川 平 : イマチニブ耐性患者におけるBCR-ABL 点突然変異の全自動点突然変異解析法に関する検討. 第14回日本がん分子標的治療学会学術集会(東京) 平成22年7月8日 (2010)
19. 前川 平 : 血液がんに対する分子標的治療の動向 (特別講演) 第9回日本産婦人科がん分子標的研究会(大津) 平成22年9月10日 (2010)
20. 八尾尚幸、芦原英司、平位秀世、前川平 : 多発性骨髄腫に対する新規Wnt/ β -cateninシグナル阻害剤の抗腫瘍効果. 第69回日本癌学会学術総会(大阪) 平成22年9月22日 (2010)
21. Hirai H, Kamio N, Matsusue A, Ogino S, Kimura N, Satake S, Tanaka R, Nagao R, Yao H, Hayashi Y, Takeuchi M, Ashihara E, Huang G, Tenen DG, Imanishi J, Maekawa T: 「骨髄系細胞の分化と機能制御」「緊急」顆粒球造血時のC/EBP β の制御におけるCREBファミリー転写因子. Involvement of CREBs in the regulation of C/EBP β during "emergency" granulopoiesis. 第72回日本血液学会学術集会(横浜) 平成22年9月24日 (2010)
22. 佐竹早紀子、平位秀世、志馬伸朗、長尾里奈、田中瑠璃子、八尾尚幸、林嘉宏、武内美紀、芦原英司、稲葉亨、藤田直久、今西二郎、前川 平 : 「骨髄系細胞の分化と機能制御」敗血症における2相性”緊急”好中球造血のフローサイトメトリーによる解析. Candidemia-induced "emergency" granulopoiesis consists of successive biphasic waves. 第72回日本血液学会学術集会(横浜) 平成22年9月24日 (2010)
23. 前川 平 : 京都大学における先

端的細胞治療・再生治療開発への挑戦（特別講演）第10回静岡中部血液疾患研究会（静岡）平成22年11月6日（2010）

24. 前川 平：京都大学における先端的細胞治療・再生治療開発への挑戦 — 検査技師のあらたな活躍分野 —（特別講演）第54回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会（大津）平成22年11月27日（2010）

（原著論文 21編）

1. Yokota, A., Kimura, S., Tanaka, R., Takeuchi, M., Yao, H., Sakai, K., Nagao, R., Kuroda, J., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Ashihara, E., Maekawa, T.: Osteoclasts are involved in the maintenance of dormant leukemic cells. *Leuk Res.* 34; 793-799, 2010.
2. Taniguchi, K., Shimazaki, C., Ochiai, N., Maruya, E., Akatsuka, Y., Ashihara, E., Maekawa, T., Taniwaki, M., Saji, H.: Modified elispot assay may predict T-cell hyporesponsiveness to non-inherited maternal antigens in healthy individuals. *Int J Lab Hematol.* 32(1 Pt 1):e163-168, 2010.
3. Ohsaka, A., Kikuta, A., Ohto, H., Ohara, A., Ishida, A., Osada, K., Kimitamari, A., Iwai, A., Kai, T., Maekawa, T., Hoshi, Y.: Guidelines for safety management of granulocyte transfusion in Japan. *Int J Hematol.* 91(2):201-208, 2010.
4. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Kishida S, Kato T, Matsui A, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, Ikeda K, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H.: Bone marrow AT1 augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1a. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(1):60-67, 2010.
5. Tada, N., Hinotsu, S., Urushihara, A., Kita, F., Kai, T., Takahashi, S., Kato, S., Takanashi, M., Ito, K., Sawai, H., Maekawa, T., Kosugi, S., Kawakami, K.: The current status of umbilical cord blood collection in Japanese medical centers: survey from the obstetricians *Int J Hematol* (in press, 2010)
6. Ito, K., Aoyama, T., Fukiage, K., Otsuka, S., Furu, M., Jin, Y., Nasu, A., Ueda, M., Kasai, Y., Ashihara, E., Kimura, S., Maekawa, T., Kobayashi, A., Yoshida, S., Niwa, H., Otsuka, T., Nakamura, T., Toguchida, J.: A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by non-woven fabric. *Tissue Eng Part C Methods* 16(1):81-91, 2010.
7. Koto, K., Murata, H., Kimura, S., Horie, N., Matsui, T., Nishigaki,

- Y., Ryu, K., Sakabe, T., Itoi, M., Ashihara, E., Maekawa, T., Fushiki, S., Kubo, T.: Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. *Oncol Rep.* 24(1):233-239, 2010.
8. Sekimoto, M., Imanaka, Y., Shirai, T., Sasaki, H., Komeno, T., Lee, J., Yoshihara, K., Ashihara, E., Maekawa, T. : Risk-adjusted assessment of incidence and quantity of blood use in acute-care hospitals in Japan: an analysis using administrative data. *Vox Sanguinis*, 98:538-546, 2010.
 9. Takeuchi, M., Kimura, S., Kuroda, J., Ashihara, E., Kawatani, M., Osada, H., Umezawa, K., Yasui, E., Imoto, M., Tsuruo, T., Yokota, A., Tanaka, T., Nagao, R., Nakahata, T., Fujiyama, Y., Maekawa, T.: Glyoxalase-I induction during hypoxia adaptation in Bcr-Abl positive leukaemic cells. *Cell Death Diff*, 7:1211-1220, 2010.
 10. Takeuchi, M., Kimura, S., Ashihara, E., Maekawa, T. : Dual BCR-ABL/LYN tyrosine kinase inhibitor, INNO-406. *Drug of the Future* (in press, 2010).
 11. Kamio, N., Hirai, H., Ashihara, E., Tenen, D.G., Maekawa, T., Imanishi, J. : Use of bicistronic vectors in combination with flow cytometry to screen for effective small interfering RNA target sequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 393(3):498-503, 2010.
 12. Kawata, E., Ashihara, E., Nakagawa, Y., Kiuchi, T., Ogura, M., Yao, H., Sakai, K., Tanaka, R., Yokota, A., Takeuchi, M., Kimura, S., Hirai, H., Maekawa, T. : A combination of a DNA-chimera siRNA against PLK-1 and zoledronic acid suppresses the growth of malignant mesothelioma cells in vitro. *Cancer Lett*, 294(2):245-253.2010.
 13. Tanaka, R., Squires, M.S., Kimura, S., Yokota, A., Mallet, K., Smyth, T., Thompson, N.T., Nagao, R., Yamauchi, T., Ashihara, E., Ottmann, O.G., Lyons, J.F., Maekawa, T. : Activity of the multi-targeted kinase inhibitor, AT9283, in imatinib-resistant BCR-ABL positive leukemic cells. *Blood*, 116(12):2089-2095, 2010.
 14. Ushiki, T., Kondoh, S., Ashihara, E., Tanaka, S., Masuko, M., Hirai, H., Kimura, S., Aizawa, Y., Maekawa, T., Hiraoka M.: Noninvasive tracking of donor cell homing by near-infrared fluorescence imaging shortly after bone marrow transplantation. *PLoS One*, 5(6):e11114, 2010.
 15. Ryu, K., Murata, H., Koto, K., Horie, N., Matsui, T., Nishigaki, Y., Sakabe, T., Takeshita, H., Itoi, M., Kimura, S., Ashihara, E.,

- Maekawa, T., Fushiki, S., Kubo, T. : Combined effects of bisphosphonate and radiation on osteosarcoma cells. *Anticancer Res.* 30(7):2713-2720, 2010.
16. Hamaguchi, M., Seno, T., Yamamoto, A., Kohno, M., Kadoya, M., Ishino, H., Ashihara, E., Kimura, S., Tsubakimoto, Y., Takata, H., Yoshikawa, T., Maekawa, T., Kawahito, Y.: Loxoprofen sodium, a non-selective NSAID, reduces atherosclerosis in mice by reducing inflammation. *J Clin Biochem Nutr.* 47(2):138-147, 2010.
17. Sakai, K., Kawata, E., Ashihara, E., Nakagawa, Y., Yamauchi, A., Yao, H., Nagao, R., Tanaka, R., Yokota, A., Takeuchi, M., Hirai, H., Kimura, S., Hirashima, M., Yoshimura, N., Maekawa, T.: Galectin-9 ameliorates acute graft-versus-host disease through the induction of T-cell apoptosis. *Eur J Immunol* (in press, 2010)
18. Yamamoto, A., Ashihara, A., Nakagawa, Y., Obayashi, H., Ohta, M., Hara, H., Adachi, T., Seno, T., Kadoya, M., Hamaguchi, M., Ishino, H., Kohno, M., Maekawa, T., Kawahito, Y.: Allograft inflammatory factor-1 is overexpressed and induces fibroblast chemotaxis in the skin of sclerodermatous GVHD in a murine model. *Immunology letter* (in press, 2010)
19. Kitawaki, T., Kadowaki, T., Fukunaga, K., Kasai, Y., Maekawa, T., Ohmori, K., Maekawa, R., Takashige, K., Nieda, M., Yokokawa, K., Itoh, T., Shimizu, A., Tada, H., Kuzushima, K., Ishikawa, T., Uchiyama, T.: Phase I/IIa clinical trials of dendritic cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia in elderly patients using autologous apoptotic leukemic cells or a heteroclitic WT1 peptide as antigens. *Brit J Haematol* (in press, 2010)
20. Tada, N., Hinotsu, S., Urushihara, H., Kita, F., Kai, S., Takahashi, T.A., Kato, S., Takanashi, M., Ito, K., Sawai, H., Maekawa, T., Kosugi, S., Kawakami, K.: The current status of umbilical cord blood collection in Japanese medical centers: survey of obstetricians. *Transfusion and Apheresis Science* (in press, 2010)
21. Takeuchi, M., Ashihara, E., Yamazaki, Y., Kimura, S., Nakagawa, Y., Tanaka, R., Yao, H., Nagao, R., Hayashi, Y., Hirai, H., Maekawa, T.: Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells. *Cancer Sci* (in press, 2010)
- (その他、レビュー等 2編)
22. Ashihara, E., Kawata, E.,

Maekawa, T.: Future prospect of RNA interference for cancer therapies. Curr Drug Targets. 11(3):345-360, 2010. Review

23. Kawata, E., Ashihara, E., Maekawa, T.: RNA Interference against polo-like kinase-1 in advanced non-small cell lung cancers. J Clin Bioinformatics (in press, 2010), review

G：知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

臍帯血移植後の免疫機構再構築に関する研究

分担研究者：平家 俊男

研究要旨

我々は既に臍帯血 CD34+細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} 移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認した。さらに、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。また、sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を用いて検討した。その結果、ヒト造血細胞の出現、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認し、ヒト造血幹細胞活性を評価するモデル系としての妥当性を確認した。出現する T 細胞、NK 細胞の機能成熟も、TCR レパトア解析、サイトカイン反応性、細胞障害性の観点より確認した。

また、このマウスにおいては、骨髄、脾臓において、成熟した B 細胞の出現が確認でき、末梢血液においては、ヒト IgM, IgG の存在が確認できるが、特異抗体産生は確認できない。その改善に向けて、検討を進めている。

一方、末梢血に出現する T 細胞分画に、CD4+CD25+ regulatory T cell が存在することを見出した。今後、安全で効果的な造血幹細胞移植医療確立のため、ヒト regulatory T cell の発生機構を明らかとし、造血幹細胞移植に伴う種々免疫反応に及ぼす影響についても考察を進めている。

さらに、同マウスは、ヒト正常骨髄の機能評価に留まらず、ヒト白血病などの造血疾患を再構築できるプレリミナリーの結果を得ており、その病態解明、治療基盤の確立に向けた応用を進める。

A：研究目的

Ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用の為には、造血幹細胞の異種動物を用いた活性評価が不可欠である。異種動物への移植に際して、移植細胞の生着を許容するには、異種動物の持つ免疫機構が大きな障害となる。我々は、種々の免疫機構の障害を有する免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を作成し、ヒト臍帯血の生着が可能であることを確認している。本研究においては、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} が、ヒト造血幹細胞の幹細胞活性評価における有用性について検討を進める。また、ヒト regulatory T cell の出現も確認しており、造血幹細胞移植に伴う拒絶、GVHD 等の種々免疫反応制御に向けた基盤技術開発が可能となる。さらに、ヒト組織適合性抗原を発現する免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を用いた研究を進展させる。さらに、正常造血に加えて、白血病などの造血疾患の再構築を試み、病態解析、治療基盤開発研究の展開を模索する。

B：研究計画・方法

ヒト臍帯血由来 CD34+細胞を、放射線照射した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} に移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺への、ヒト細胞の生着の動態を検討する。従来の免疫不全マウス NOD/SCID においては、ヒト T 細胞の出現が明らかでなかったが、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いることにより、ヒト T 細胞を含むすべての系統への分化の検証がなされ、ヒト幹細胞活性評価のために、同マウスが有用であることが示された。本研究においては、IL-6/soluble IL-6R を含むサイトカインで ex vivo 増幅を行ったヒト造血幹細胞について、同様の方法にて造血幹細胞活性測定を行う。さらに、ヒト臍帯血 CD34+細胞移植を行

った NOD/SCID/ γ_c^{null} マウス由来骨髄細胞を用いて second transplantation を行い、骨髄再構築の有無について検討する。また、ヒトへの応用を視野に入れ、無血清培地で ex vivo 増幅したヒト臍帯血 CD34+細胞を用いて、同様の実験を行う。さらに、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスにおいて構築されるヒト免疫機構において、T 細胞、NK 細胞、B 細胞の機能評価を行う。一方、regulatory T cell に関しては、その発生機構の解析に加えて機能的な解析を行い、異種動物であるマウス、ヒト間において存在する免疫学的寛容状態の機構にせまり、ヒト造血幹細胞移植に伴う拒絶、GVHD 等の免疫現象回避に向けた方策を検討する。さらに、ヒト組織適合性抗原を発現する免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} の開発を進める。また、小児白血病患者からの末梢血を移植し、小児白血病のモデル化を行う。

C：研究結果ならびに今後の方針

我々は、既に臍帯血 CD34+細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} 移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認している。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。これらの T 細胞は、TCR の多様性を持ち、CTL 活性等の機能も有することを明らかにした。また、我々の見出したヒト造血幹細胞の増幅に対して有効である sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を用いて検討した。その結果、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認した。この結果により、我々のサ

イトカインを用いたヒト造血幹細胞増幅システムの有用性が、*in vivo* のシステムを用いて確認された。これらの結果を踏まえ、マウス骨髄に、移植可能なヒト造血幹細胞が生着、増幅していることを確認するため、*second transplantation* の実験を行った。その結果、*second transplantation* によっても、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} が、ヒト造血幹細胞活性測定に有用であることが、再確認された。

骨髄、脾臓においては、成熟した B 細胞の出現が確認できる。また、末梢血中には、ヒト IgM, IgG が確認できる。しかし、既知抗原の投与による特異抗体の産生は確認できなかった。今後、特異抗体産生が可能となる条件設定に向けて、さらなる検討を行う。

一方、このマウス末梢血には、ヒト CD4+CD25+ cell を認めることを既に報告している。特異抗体の産生、regulatory T cell の制御機構をより詳細に検討するために、ヒト組織適合性抗原を発現する免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} の開発を検討する。

また、小児白血病患者由来末梢血を免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} に移植することにより、その病態を再現できる結果を得ている。今後、症例の蓄積を行い、病態解明、治療基盤開発を行う。

D：まとめ

免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} は、ヒト造血細胞の生着を許容するのみでなく、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの、機能的血球細胞、免疫細胞の分化をも誘導することにより、*in vivo* での優れたヒト造血幹細胞活性系と成りうる事が明らかとなった。また、造血幹細胞移植に伴う免疫反応制御に向けた取り

組みも可能であることも明らかとなり、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスが、ヒト細胞を用いた再生医療の確立の為に必要な有効性、安全性の面より、多くの貴重な知見を提供してくれることが期待される。

E：健康危険情報

特記すべき事項なし。

F：研究発表

国内、海外を合わせた件数

口頭発表	28件
原著論文による発表	10件
それ以外（レビュー等）	1件
そのうち主なもの 論文発表	

- Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, Fukuda S, Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T: Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J* 24:2245-2253, 2010.
- Kaichi S, Hasegawa K, Takaya T, Yokoo N, Mima T, Kawamura T, Morimoto T, Ono K, Baba S, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. : Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovasc Res.* 88:314-323:2010
- Kaichi S, Takaya T, Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Ono K, Shimatsu A, Baba S, Heike T, Nakahata T, Hasegawa K. : Cyclin-dependent kinase 9 forms a complex with GATA4 and is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* 226:248-254:2010