

東京大学医科学研究所 教授

中内 啓光

「造血幹細胞の分化と自己複製の制御機構」

## 1. 研究実施の概要

現在、臓器不全症の治療として人工臓器や臓器移植による「臓器置換」が標準的な治療として行われているが、人工臓器は成体適合性や医療経済上の、また臓器移植は免疫拒絶、感染、ドナー不足など、ともに多くの問題を抱えている。研究代表者は今から10数年前に臓器移植に代わるより本質的な新しい治療概念として、自己の細胞が持つ遺伝情報をもとに組織・臓器を再生して治療に用いる、いわゆる臓器再生治療を考えた。臓器再生治療実現のための第一歩として、既に臨床応用されている骨髄移植に着目し、その本質である造血幹細胞を分離し、その性状を解析することを試みた。幹細胞は種々の細胞に分化できる能力「多能性」と多能性を維持したまま増殖できる能力「自己複製能」を兼ね備えた細胞と定義され、適切なフィードバック機構のもとで分化と自己複製を繰り返しながら各臓器・組織の発生、修復、維持を担っている。幹細胞の分化と自己複製の制御機構を明らかにすれば血液系だけでなく、幹細胞システムを持っている他の臓器についても臓器再生が可能になるのではないかと考えたわけである。我々は、約6年間の努力の末、マウスの骨髄中に2万5千個に1個の頻度で存在する造血幹細胞を純化することに成功した。本研究プロジェクトはこうして純化された造血幹細胞を材料として開始されたものである。

本研究プロジェクトの目標は造血幹細胞の分化と自己複製の制御機構を理解することであるが、より現実的な目標としては造血幹細胞を分化させることなく増殖させる方法を開発し、他人の骨髄細胞（造血幹細胞）に依存しているこれまでの骨髄移植の問題点を克服することにある。実際、造血幹細胞が自己複製することを信じて世界中の科学者が研究を続けているが、臨床レベルで使用可能な造血幹細胞の増殖法は未だに存在しない。そこで本プロジェクトでは、造血幹細胞の分化と自己複製の機構の解析を行うにあたり、造血幹細胞が無限の増殖能を持つのだという固定観念を捨て、造血幹細胞の自己複製能には限界があるという仮説の下、*in vitro*ならびに*in vivo*のクローナルな解析を行うことにより、個々の造血幹細胞の活性を定量的に解析することを試みた。

実際に1個の純化した造血幹細胞から培養を開始し、複数個に増殖した細胞を致死量放射線照射マウスに移植するという実験法を確立し、1個の造血幹細胞が分裂して2個になっても造血幹細胞としての活性を失っていないことから、*in vitro*における造血幹細胞の自己複製を世界で始めて厳密に証明した。また、分裂後の個々の娘細胞の造血活性を調べると、どちらか片方だけが造血幹細胞としての活性を示したことから、*in vitro*の条件下では非対称性の自己複製が主であることが示唆され、造血幹細胞数の*ex vivo* expansionが困難である理由と考えられた。さらにこのような非対称性の自己複製も無限に続くわけではなく、3回程程度の分裂で造血幹細胞の活性が失われることも明らかとなった。

造血幹細胞の自己複製が常に非対称性であるとする、造血幹細胞数を維持することはできても、造血幹細胞数を増加させることは不可能となる。そこでより良い環境を提供するために*in vivo*でのクローナルな解析を試みた。1個の純化した造血幹細胞を致死量放射線照射したマウスに移植し、4ヶ月後にそのマウスの骨髄中にあるドナー由来の造血幹細胞

胞の数と造血能を定量的に測定したところ、造血幹細胞の数は 300 倍から 1000 倍程度に増加しているが、個々の造血幹細胞の造血能は数分の 1 から数十分の 1 に減少していることが明らかとなった。つまり、*in vivo* の環境では造血幹細胞が対称性の自己複製をすることにより数が増殖するものの、造血幹細胞の自己複製が厳密には完全ではなく、分裂に伴って徐々に造血幹細胞 1 つ当りの造血能が低下するという事実を初めて明確に示すことができた。また、この実験結果から骨髄微小環境下では *in vitro* にはないシグナルが造血幹細胞に働き、対称性自己複製分裂を誘導することが示唆された。

このように、純化した造血幹細胞を用いたクローナルな解析は造血幹細胞の能力を定量的に解析することを可能にし、ようやく我々は自己複製の限界を規定する分子の機能を定量的に解析することができるようになった。沢山の候補分子のなかで、細胞の寿命を規定する分子の一つであるテロメアに注目し、テロメア長が造血幹細胞の造血能にどのような影響を与えるかを Flow - FISH という方法で定量的に解析した。その結果、造血幹細胞や造血前駆細胞は比較的強くテロメラーゼを発現しているにもかかわらず、移植後には著明なテロメアの短縮が観察された。テロメラーゼノックアウトマウスを用いた実験では、テロメアが正常の 80% 程度に短縮した時点で 10 個の造血幹細胞を移植しても移植は成立せず、テロメア長が造血幹細胞の造血能を規定する重要な分子であることが示された。現在、テロメラーゼを強制的に発現させることにより造血幹細胞活性の低下を防ぐことができるかどうかを検証しているところである。

もう一つ、造血幹細胞の未分化性の維持に関与すると思われる分子として我々は *bcrp-1/ABCG2* 分子を同定した。1996 年、Richard Mulligan 等は抗体を使わない新しい造血幹細胞の分離法として Side Population 法を開発した。これは細胞を生きたまま染色することのできる色素である Hoechst33342 を造血幹細胞が強く排出するという性質を利用した方法である。我々が開発してきた 4 カラー解析による造血幹細胞の分離方法と Hoechst 色素を用いた 2 カラーの SP 分画法を直接比較するため、6 カラーの解析とソーティングが可能な FACS をセットアップして調べたところ、我々が同定した  $CD34^{+}Kit^{+}Sca^{+}Lin^{-}$  細胞と SP 細胞の多くが重複しており、基本的には同じ細胞群を見ていることを確認した。

つぎに我々は高速 FACS で分離した 1 万個の SP 細胞から全長型 cDNA ライブラリーを作製し、ウズラの繊維芽細胞を使って発現クローニングを行うことにより、Hoechst 色素を排出する責任分子として ABC トランスポーターの一種である Bcrp-1 を同定することに成功した。造血幹細胞における *bcrp-1* の発現はマウスのみならずブタ、サル、ヒトなど、種を超えて造血幹細胞の性質として保存されており、造血幹細胞の未分化性維持機構解明のための重要な手がかりを得ることができた。

さらに、純化された造血幹細胞を材料として種々の分子生物学的手法を用いて遺伝子発現の解析を行った。骨髄微小環境等との相互作用を考え、造血幹細胞の細胞表面に発現されている分子を効率よく同定するため考案した Transmembrane Trap 法をはじめとして Signal Sequence Trap 法、Representational Difference Analysis 法、さらには high throughput

sequencing などにより造血幹細胞に特異的に発現されている遺伝子を多数同定した。また、これらの遺伝子の造血幹細胞における機能を同定するために、効率よく外来遺伝子を造血幹細胞に導入し、安定して発現させることが可能なレトロウイルス、レンチウイルスベクターも開発した。造血幹細胞の未分化性維持や数の制御に関与していると思われる遺伝子など、興味深い機能を持つ分子を見つけているが、造血幹細胞の機能アッセイは時間を要するものが多いため、解析にはまだ時間がかかる。

我々の研究の最終的な目標であるヒトの造血幹細胞のアッセイ系についても研究を行った。寿命の短い NOD/SCID マウスを使用した系では不十分であるため、大型で寿命も長いブタを用いた系を考え、ブタの胎仔への経子宮的造血幹細胞移植法を確立し、ヒト血液キメラブタの作製に成功した。現時点ではヒト血液細胞のブタ末梢血に占める割合は低いが、発生工学的に造血幹細胞に異常を持つブタを作出することによりヒトの造血幹細胞によって造血系が再構築されたブタを作製することを計画している。これらのブタはヒト造血幹細胞の増殖系として使用できるだけでなく、ドナーであるヒトに対して免疫寛容が成立していると考えられることから、将来的にヒト臓器のバイオリクターとして使用することが期待される。

造血幹細胞に関する研究は、他の臓器の幹細胞システムについても大きな影響を与えてきた。本研究プロジェクトにおいても、造血幹細胞の純化に用いたクローナルな幹細胞の解析方法を胎仔肝臓細胞に応用することにより、世界で始めて肝臓の幹細胞を同定することに成功した。造血幹細胞を *in vitro* で培養することは未だに困難であるが、肝幹細胞は神経幹細胞同様、*in vitro* で培養することが可能である。ヒトにおいても同様な肝幹細胞を分離培養可能かどうか注目される場所であるが、こういった細胞を成体肝臓から得ることができれば肝障害に対する画期的な治療法の開発が期待できる。

このように、我々が造血幹細胞の研究を通じて確立してきたプロスペクティブな幹細胞の同定法と *in vitro*, *in vivo* でのクローナルな解析手法は、他の組織幹細胞の解析にも重要な方法論を提供している。また、本研究で得られた知見は「多分化能」と「自己複製能」という幹細胞が持つ共通な性質の分子機構の解明に貢献するものと確信している。

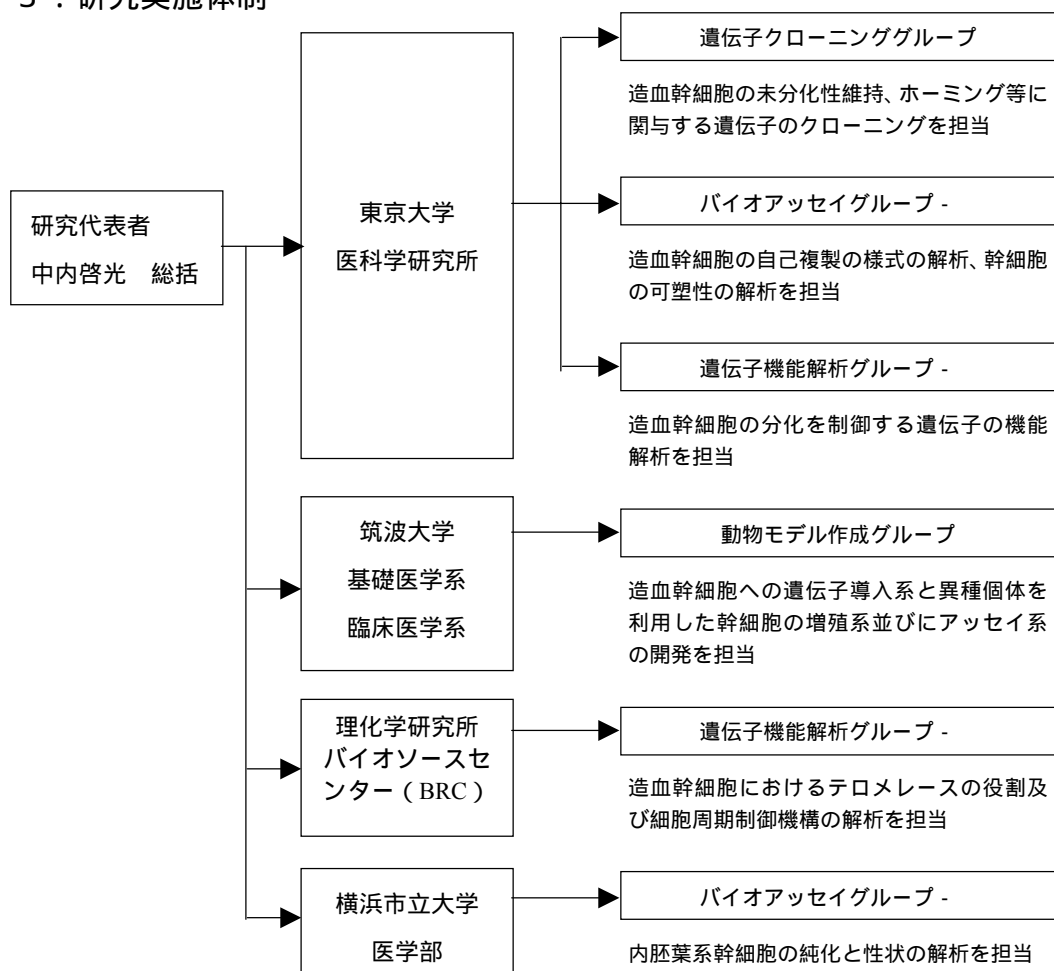
## 2 . 研究構想

幹細胞がそれ以外の体細胞と異なるのは多分化能と未分化性を維持したままで分裂できる自己複製可能という2点に集約することができる。1996年に報告した1個の造血幹細胞による長期骨髄再建のデータは造血幹細胞の多能性と高い増殖能を究極の形で証明したものであるが、はじめに移植した造血幹細胞の数が増加しているかどうか、言い換えれば造血幹細胞の自己複製の程度については示していない。本研究プロジェクトでは造血幹細胞の自己複製とはどのような現象なのかという疑問に答えることを目標とし、自己複製の様式とその限界について細胞生物学的、分子生物学的にアプローチすることを試みた。一方で、研究の最終目標であるヒト造血幹細胞を同定するためには、しっかりとアッセイ

系を確立することが必須と考えられ、これまでの *in vitro* コロニー形成法やマウスを用いたアッセイとは全く異なる、ブタを用いた *in vivo* のアッセイ系を確立することを試みた。また、多分化能と自己複製能は造血幹細胞だけでなくすべての幹細胞の共通な性質と考えられる。そこで造血幹細胞以外の組織幹細胞として肝臓、精巣、神経幹細胞などについてもプロスペクティブな同定法の確立を試みた。特に肝臓の幹細胞の分離同定法を確立することに成功したため、ここ2年間は実質臓器である膵臓、腸管など、内胚葉系臓器の幹細胞の分離同定にも力を入れた。

プロジェクトを推進するにあたり(1)造血幹細胞の生物学的な性状を解析するバイオアッセイグループ、(2)造血幹細胞の分化や自己複製に関与する遺伝子をクローニングする遺伝子クローニンググループ、(3)候補遺伝子の機能を解析する候補遺伝子機能解析グループ、(4)造血幹細胞の機能アッセイや、*in vivo* での増殖系として動物を利用する動物モデル作製グループの4つのグループを作り、互いに連携をとりながら研究を行なう体制を整えた。

### 3. 研究実施体制



#### 4 . 研究期間中の主な活動

##### (1) ワークショップ・シンポジウム等

#### 5 . 主な研究成果

##### (1) 論文発表 ( 海外 63 件 )

1. Osawa M., Yamaguchi T., Nakamura Y., Kaneko S., Onodera M., Sawada K., Jegalian A., Wu H., Nakauchi H and Iwama A. Erythroid expansion mediated by the Gfi-1B zinc finger protein: role in normal hematopoiesis. *Blood* 100:27969-2777, 2002
2. Hirasawa R., Shimizu R., Takahashi S., Osawa M., Tkyanagi S., Kato Y., Onodera M., Minegishi N., Yamamoto M., Fukao T., Taniguchi H., Nakauchi H., and Iwama A. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J. Exp. Med.* 195:1379-86, 2002
3. Tahara-H. S, Sudo K., Ema H., Miyoshi H., Nakauchi H. Lentiviral. vector-mediated transduction of murine CD34- hematopoietic stem cells. *Exp.Hematology* 30:11-7, 2002
4. Atsushi Suzuki, Yun-wen Zheng, Shin Kaneko, Masafumi Onodera, Katashi Fukao, Hiromitsu Nakauchi, Hideki Taniguchi. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *Journal of cell Biology* 156:173-84, 2002
5. Suzuki A, Oyama K, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Establishment of clonal colony-forming assay system for pancreatic stem/progenitor cells. *Cell Transplant.* 11:451-3,2002
6. Miyashita H, Suzuki A, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells in vitro. *Cell Transplant.* 11(5):451-3,2002
7. Shibuya A., Shibuya K., Yotsumoto K., Nakauchi H. DNAM-1 is a leukocyte adhesion molecule associated with LFA-1. *Leukocyte Typing VII Oxford University Press*, 2002
8. Shimizu Y., Honda S., Yotsumoto K., Tahara-Hanaoka S., Eyre HJ., Sutherland G., Endo Y., Shibuya K., Koyama A., Nakauchi H., Shibuya A. Fc $\alpha$ / $\mu$  receptor is a single gene-family member closely related to polymeric immunoglobulin receptor on chromosome 1. *Immunogenetics*, 53(8):709-11, 2001
9. Yutaka Sakai, Dong Ku Kim, Satoshi Iwasa, Teruo Watanabe, Masafumi Onodera, and Hiromitsu Nakauchi. Bone marrow chimerism prevents atherosclerosis in arterial walls of mice deficient in Apolipoprotein E. *Atherosclerosis* 161:27-34, 2002
10. Atsushi Iwama, Mitsujiro Osawa, Ryutaro Hirasawa, Noriko Uchiyama, Shin Kaneko, Masafumi Onodera, Kazuko Shibuya, Akira Shibuya, Charles Vinson, Danier G. Tenen, and Hiromitsu Nakauchi. Reciprocal Role for CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) and PU.1 Transcription Factors in Langerhans Cell Commitment. *J. Exp. Med.* 195:547-558, 2002.
11. Sousuke Miyoshi, Tsutomu Motohashi, Yukio Nakamura, Mitsujiro Osawa, Takashi Hiroshima, Dong-Ku Kim, Yasuhito Tokumoto, Hiromitsu Nakauchi. A transmembrane trap method for efficient cloning of genes encoding proteins possessing transmembrane domain. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 289: 1192-1198, 2001.
12. Tsutomu Motohashi, Yukio Nakamura, Mitsujiro Osawa, Takashi Hiroshima, Atsushi Iwama, Akira Shibuya, Hiromitsu Nakauchi. Increased cell surface expression of C-terminal truncated erythropoietin receptors in polycythemia. *European Journal of Haematology* 67:88-93, 2001.
13. Tokoro Y., Shibuya K., Osawa M., Tahara-Hanaoka S., Iwama A., Kitamura T., Nakauchi H.

- and Shibuya A. Molecular cloning and characterization of mouse Tspan-3, a novel member of the tetraspanin superfamily, expressed on resting dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 288: 178-183, 2001.
14. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H and Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 7:1028-34, 2001
  15. Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H and Taniguchi H. Clonal expansion of hepatic stem/progenitor cells following flow cytometric cell sorting. *Cell Transplant.* 10:393-6., 2001
  16. Hiromitsu Nakauchi, Kazuhiro Sudo and Hideo Ema. Quantitative assessment of the stem cell self-renewal capacity. *Stem Cell III. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 938:18-25, 2001.
  17. Takashi Hiroyama, Atsushi Iwama, Yukio Nakamura, and Hiromitsu Nakauchi. Fractalkine shares signal sequence with TARC: gene structures and expression profiles of two chemokine genes. *Genomics* 75:3-5, 2001.
  18. Osada H, Doi S, Fukushima T, Nakauchi H, Seki K and Sekiya S. Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery. *Transfusion* 41:499-503, 2001
  19. Norihisa Sakamoto, Kazuko Shibuya, Yoshio Shimizu, Katsumi Yotsumoto, Tomoyuki Miyabayashi, Seiji Sakano, Takao Tsuji, Eiichi Nakayama, Hiromitsu Nakauchi and Akira Shibuya. A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissue. *Eur. J. Immunol.* 31:1310-1316, 2001.
  20. Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H and Taniguchi H. Hepatic stem/progenitor cells with high proliferative potential in liver organ formation. *Transplant. Proc.* 33:585-586., 2001
  21. Kaneko S, Onodera M, Fujiki Y, Nagasawa T and Nakauchi H. Simplified retroviral vector GCsap with murine stem cell virus long terminal repeat allows high and continued expression of enhanced green fluorescent protein by human hematopoietic progenitors engrafted in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Hum. Gene. Ther.* 12:35-44, 2001
  22. Taniguchi H, Kondo R, Suzuki A, Zheng YW, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K and Nakauchi H. Clonogenic colony-forming ability of flow cytometrically isolated hepatic progenitor cells in the murine fetal liver. *Cell Transplant.* 9:697-700, 2000
  23. Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroyama, T., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Endo, Y., Fujita, T., Miyabayashi, T., Sakano, S., Tsuji, T., Nakayama, E., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Nakauchi, H. Fc $\alpha$ / $\mu$  receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nature Immunol.* 1:441-446, 2000
  24. Suzuki A, Taniguchi H, Zheng YW, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yazawa K, Otsuka M, Fukao K and Nakauchi H. Clonal colony formation of hepatic stem/progenitor cells enhanced by embryonic fibroblast conditioning medium. *Transplant. Proc.* 32:2328-2330, 2000
  25. Suzuki A, Taniguchi H, Zheng YW, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yazawa K, Otsuka M, Yoshiki A, Kusakabe M, Fukao K and Nakauchi H. Proliferative and functional ability of transplanted murine neonatal hepatocytes in adult livers. *Transplant. Proc.* 32:2370-2371, 2000
  26. Zheng YW, Taniguchi H, Suzuki A, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K and Nakauchi H. Effects of combined growth factors on clonal growth and albumin secretion of murine fetal hepatocytes in low density culture. *Transplant. Proc.* 32:2372-2373, 2000

27. Zheng YW, Taniguchi H, Suzuki A, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K and Nakauchi H. Effects of four extracellular matrices associated with growth factors on clonal culture and proliferation of murine fetal hepatocytes. *Transplant. Proc.* 32:2498-2499, 2000
28. Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, Nakauchi H and Taniguchi H. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32:1230-1239, 2000
29. Hsu HC, Ema H, Osawa M, Nakamura Y, Suda T and Nakauchi H. Hematopoietic stem cells express Tie-2 receptor in the murine fetal liver. *Blood* 96:3757-3762, 2000
30. Sudo K, Ema H, Morita Y and Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192:1273-80, 2000
31. Ema H, Takano H, Sudo K and Nakauchi H. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192:1281-1288, 2000
32. Nakauchi H, Osawa M, Sudo K and Ema H. Isolation and characterization of CD34<sup>low</sup>/negative mouse hematopoietic stem cells. In: "*Cell Therapy.*", Y. Ikeda, J. Hata, S. Koyasu, Y. Kawakami, Y. Hattori (eds), Springer-Verlag Tokyo. :95-103, 2000.
33. Hideo Ema and Hiromitsu Nakauchi. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 95:2284-8, 2000.
34. Kaneta M, Osawa M, Sudo K, Nakauchi H, Farr AG and Takahama Y. A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J. Immunol.* 164:256-64, 2000.
35. Watanabe N, Yamaguchi T, Akimoto Y, Rattner JB, Hirano H and Nakauchi H. Induction of M-phase arrest and apoptosis after HIV-1 Vpr expression through uncoupling of nuclear and centrosomal cycle in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 258:261-9, 2000.
36. Taniguchi H, Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K and Nakauchi H. Usefulness of flow-cytometric cell sorting for enrichment of hepatic stem and progenitor cells in the liver. *Transplant. Proc.* 32:249-51, 2000.
37. Fujiki Y, Onodera M, Yamaguchi T, Osawa M, Sudo K, Hamada H, Ema H, Shibuya A, Takiguchi M, Kubo T and Nakauchi H. Dominant expansion of human T cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice implanted with human bone fragments. *Exp. Hematol.* 28:792-801, 2000.
38. Hiroyama T, Iwama A, Morita Y, Nakamura Y, Shibuya A and Nakauchi H. Molecular cloning and characterization of CRLM-2, a novel type I cytokine receptor preferentially expressed in hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:224-9, 2000.
39. Tahara-Hanaoka S, Ushijima Y, Tarui H, Wada M, Hara T, Imanishi S, Yamaguchi T, Hattori T, Nakauchi H and Koito A. Differential level in co-down-modulation of CD4 and CXCR4 primed by HIV-1 gp120 in response to phorbol ester, PMA, among HIV-1 isolates. *Microbiol. Immunol.* 44:489-98, 2000.
40. Miyoshi H, Ehashi T, Ema H, Hsu HC, Nakauchi H and Ohshima N. Long-term culture of fetal liver cells using a three-dimensional porous polymer substrate. *Asaio J.* 46:397-402, 2000.
41. Mitsujiro Osawa, Sousuke Miyoshi, Neal G. Copeland, Debra J. Gilbert, Nancy A. Jenkins, Takashi Hiroyama, Tsutomu Motohashi, Yukio Nakamura, Atsushi Iwama, and Hiromitsu Nakauchi. Characterization of murine interleukin-13 receptor alpha 1 Gene. *Immunogenetics* 51:974-81, 2000.



42. Tun T, Miyoshi H, Ema H, Nakauchi H and Ohshima N. New type of matrix support for bone marrow cell cultures: in vitro culture and in vivo transplantation experiments. *Asaio J.* 46:522-6, 2000.
43. Motohashi T, Miyoshi S, Osawa M, Eyre HJ, Sutherland GR, Matsuda Y, Nakamura Y, Shibuya A, Iwama A and Nakauchi H. Molecular cloning and chromosomal mapping of a novel five-span transmembrane protein gene, M83. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:244-50, 2000.
44. I. Apostolou, Y. Takahama, C. Belmont, T. Kawano, M. Huerre, G. Marchal, J. Cui, M. Taniguchi, H. Nakauchi, J.-J. Fournie, P. Kourilsky and G. Gachelin. Murine natural killer cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5141-5146, 1999.
45. Nakauchi H, Takano H, Ema H and Osawa M. Further characterization of CD34-low/negative mouse hematopoietic stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 872:57-66; discussion 66-70, 1999.
46. Ken-ichi Matsuda, Masahito Koguma, Ryuhei Okuyama, Tomoko Nakazawa, Yumi Matsuzaki, Hiromitsu Nakauchi, Nobuaki Yanai, Tetsuya Terasaki, and Masuo Obinata. A novel stromal cell-dependent B lymphoid stem-like cell line that induces immunoglobulin gene rearrangement. *J. Biochem.* 125:602-612, 1999.
47. Taniguchi H, Kondo R, Suzuki A, Zheng Y, Ito S, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K, Yoshiki A, Kusakabe M and Nakauchi H. Evidence for the presence of hepatic stem cells in the murine fetal liver. *Transplant. Proc.* 31:454, 1999
48. Tomoyuki Yamaguchi, Nobumoto Watanabe, Hiromitsu Nakauchi, and Atsushi Koito. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr modifies cell proliferation via multiple pathways. *Microbiol. Immunol.* 43: 437-447, 1999.
49. Hideyuki Murata, Hiromitsu Nakauchi, and Takayuki Sumida. Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. *The Lancet* 354: 220, 1999.
50. S. Saitoh, M.Y. Momoi, T. Yamagata, H. Nakauchi, K. Nihei and M. Fujii. Single-cell analysis of mitochondrial DNA in patients and a carrier of the tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene mutation. *J. Inher. Metab. Dis.* 22: 608-614, 1999.
51. Dong Ku Kim, Yutaka Fujiki\*, Takashi Fukushma, Hideo Ema, Akira Shibuya, Hiromitsu Nakauchi. (\*These two authors contributed equally to this work.) Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *STEM CELLS* 17: 286-294, 1999.
52. Kazuko Shibuya, Lewis L. Lanier, Joseph H. Phillips, Hans D. Ochs, Kenji Shimizu, Eiichi Nakayama, Hiromitsu Nakauchi, and Akira Shibuya. Physical and Functional Association of LFA-1 with DNAM-1 Adhesion Molecule. *Immunity* 11: 615-623, 1999.
53. Naoko Minegishi, Jun Ohta, Naruyoshi Suwabe, Hiromitsu Nakauchi, Hajime Ishihara, Norio Hayashi, and Masayuki Yamamoto. Alternative Promoters Regulate Transcription of the Mouse GATA-2 Gene. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 3625-3634, 1998.
54. Dong Ku Kim, Masaharu Kojima, Takashi Fukushima, Masayuki Miyasaka, and Hiromitsu Nakauchi. Engraftment of human myelodysplastic syndrome derived cell line in transgenic severe combined immunodeficient (TG-SCID) mice expressing human GM-CSF and IL-3. *Eur. J. Haematol.* 61: 93-99, 1998.
55. Sinya Tamura, Takehiko Sugawara, Yayoi Tokoro, Hideki Taniguchi, Katashi Fukao, Hiromitsu

- Nakauchi and Yousuke Takahama. Expression and function of c-Met, a receptor for hepatocyte growth factor, during thymocyte development. *Scand. J. Immunol.* 47: 296-301, 1998.
56. Kazuhiko Igarashi, Hideto Hoshino, Akihiko Muto, Naruyoshi Suwabe, Shinichi Nishikawa, Hiromitsu Nakauchi, and Masayuki Yamamoto. Multivalent DNA binding complex generated by small Maf and Bach1 as a possible biochemical basis for  $\beta$ -globin locus control region complex. *The Journal of Biological Chemistry. The Journal of Biological Chemistry* 273: 11783-11790, 1998.
57. Takashi Fukushima, Ryo Sumazaki, Kazuhiko Koike, Masahiro Tsuchida, Akira Matsui, Hiromitsu Nakauchi. Multicolor flow-cytometric, morphologic, and clonogenic analysis of marrow CD10-positive cells in children with leukemia in remission or non-malignant diseases. *Journal of Pediatric Hematology / Oncology* 20: 222-228, 1998.
58. Takehiko Sugawara, Vincenzo Di Bartolo, Tadaaki Miyazaki, Hiromitsu Nakauchi, Oreste Acuto and Yousuke Takahama. An improved retroviral gene-transfer technique demonstrates inhibition of CD4-CD8- thymocyte development by kinase-inactive ZAP-70. *Journal of Immunology* 161: 2888-2894, 1998.
59. Yayoi Tokoro, Takehiko Sugawara, Hiroyuki Yaginuma, Hiromitsu Nakauchi, Cox Terhorst, Baoping Wang, and Yousuke Takahama. A mouse carrying genetic defect in the choice between T and B lymphocytes. *Journal of Immunology* 161: 4591-4598, 1998.
60. Yukio Nakamura, Hina Takano, Mitsujiro Osawa, Takashi Tomita, Dong-Ku Kim, Masaharu Kojima, Tsutomu Motohashi, Sousuke Miyoshi, Takashi Hiroyama, Yasuhito Tokumoto, Hiromitsu Nakauchi. Impaired erythropoiesis in transgenic mice overexpressing a truncated erythropoietin receptor. *Exp. Hematology* 26: 1105-1110, 1998.
61. H. Taniguchi, A. Sugioka, M. Morita, A. Hasumi, Y. Takada, K. Fukunaga, K. Yuzawa, M. Otsuka, K. Fukao, and H. Nakauchi. Is donor-derived long-term and multilineage hematopoiesis established after liver transplantation? *Transplantation Proceedings* 30, 3865-3866, 1998.
62. Hiromitsu Nakauchi. Hematopoietic stem cells: Are they CD34-positive or CD34-negative? News and View. *Nature Medicine* 4:1009-1010, 1998.
63. Akihiko Muto, Hideto Hoshino, Linda Madisen, Nobuaki Yanai, Masuo Obinata, Hajime Karasuyama, Norio Hayashi, Hiromitsu Nakauchi, Masayuki Yamamoto, Mark Groudine, and Kazuhiko Igarashi. Identification of Bach2 as a B cell-specific partner for small Maf proteins that negatively regulates the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer. *EMBO J.* 17:5734-5743, 1998.

(2) 特許出願 (国内 1 件、海外 1 件)

1 . 発明名称 : ヒト血液を含有するキメラ動物

発明者 : 中内、藤木、普川、工藤

出願番号 : 特願 2000-034276

出願日 : H12.02.10

国際出願番号 : PCT/JP01/00961

国際出願日 : H13.02.09

予定指定国：

国内 日本

海外 米国、カナダ、オーストラリア、EP（イギリス、フランス、ドイツ、イタリア、オランダ）

(3) 新聞報道等

新聞報道

- ・平成 11 年 8 月 31 日 東京新聞 夕刊  
「ブタの体で人の臓器育成」  
遺伝子治療に応用 血液や細胞なども
- ・平成 11 年 9 月 17 日 東京新聞 日刊  
「臓器再生、難病治療に光」  
肝幹細胞含む集団分離に成功
- ・平成 13 年 9 月 1 日 朝日新聞 夕刊  
「幹細胞」の秘密 日米チーム発見  
分化させぬ遺伝子特定

受賞

- ・金子 新 平成 14 年 日本血液学会奨励賞