

## 近赤外蛍光を用いた骨髄移植後超早期における 移植骨髄細胞の生体内動態解析

牛 木 隆 志

新潟大学大学院医歯学総合研究科 血液学分野

(主任：相澤義房教授)

### Noninvasive Tracking of Transplanted Cells in the Initial Phase After Bone Marrow Transplantation Using Near-infrared Fluorescence Imaging

Takashi USHIKI

*Department of Hematology,*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

*(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

#### 要 旨

【目的】近年の in vivo imaging の技術革新は著しく、これまで追跡困難であった骨髄移植後の造血幹細胞を体外よりイメージすることが試みられている。In vivo imaging に基づいた造血幹細胞の生体内動態解析は、骨髄移植に関連した病態を理解する上で重要な情報である。今回、我々は細胞数が少数であるため、in vivo imaging が特に困難であった骨髄再構築前の移植ドナー細胞の細胞動態について検討した。

【方法】BALB/c nu/nu (H-2<sup>d</sup>) に対し、Alexa Fluor<sup>®</sup> 750 により細胞外標識したドナー骨髄単核球を用いて、静注法による骨髄移植や骨髄内骨髄移植などの移植法を施行した。また、その近赤外蛍光を IVIS SPECTRUM (Xenogen) を用い、経時的に移植後 24 時間の観察を行った。

【結果】ドナー細胞の蛍光標識に際し、細胞膜を均一に標識することで、細胞種によらず 100 % の標識効率が得られた。骨髄移植モデルでは胫骨へのホーミングは移植後 1 時間より認められ、移植後 6 時間まで蛍光強度は増強した。また、これまで骨髄移植後の細胞動態が不明であった骨髄内骨髄移植においてもその移植後の生体内動態を可視化することに成功した。今回考案した近赤外蛍光色素標識を用いた細胞動態解析法は、これまで病理学的手法以外に評価図

Reprint requests to: Takashi USHIKI  
First Department of Internal Medicine  
Niigata University School of Medicine  
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757  
新潟大学医学部第一内科学教室 牛 木 隆 志

難であった移植細胞の骨髓内への移行及び網内系臓器での捕捉量の変化を real-time で観察することが可能であり、骨髓移植の病態解明に有用な手法である。

キーワード：光イメージング、近赤外蛍光、In vivo imaging、造血幹細胞移植

## 緒 言

## 対象と方法

同種造血幹細胞移植は白血病を初めとした造血器腫瘍の根治を目指す上で必要不可欠な治療である。一方で、造血幹細胞移植後に生ずる病態は移植骨髓細胞により引き起こされることが予想されるが、生着不全<sup>1)2)</sup>や移植片対宿主病<sup>3)</sup>などの合併症なども含め、その詳細な発生メカニズムは十分に解明されていない。

近年の分子イメージングにおける手法は革新的な進歩を遂げており<sup>4)</sup>、これまでよりもより高い精度で in vivo での移植血球を trace することを可能にしている。中でも magnetic resonance image<sup>5)–7)</sup>、positron emission tomography<sup>8)9)</sup>、二光子顕微鏡<sup>10)–12)</sup>、bioluminescent imaging (BLI)<sup>13)14)</sup>などは多くの成果を挙げている。特に BLI についてはマウス造血幹細胞移植モデルの病態検討に多く利用されてきた<sup>15)–19)</sup>。しかし、BLI を用いた骨髓移植 (BMT) 後のイメージングではホタルルシフェラーゼの発光のピークが 560nm 前後と短波長であることから、イメージングに際し相当数の細胞が必要である。このため、BLI では骨髓再構築後あるいは移植細胞増殖後の既に完成された病変を検出することは可能であったが、病態形成に強く関与していると考えられている BMT 後超早期の細胞動態を捕らえることは不可能であった<sup>20)</sup>。

BMT に関与する病態をさらに理解するためにこの BMT 後の超早期の細胞動態のイメージング法の開発が必要と考えられ、今回、我々はルシフェラーゼに比して励起光、蛍光共にはるかに組織透過性の高い近赤外蛍光を用い、移植骨髓細胞が骨髓及び全身臓器へのホーミングしていく様を移植直後より real-time に in vivo imaging を試みた。

### 1. マウス

Balb/c nu/nu (H-2<sup>d</sup>, Thy 1.2), Balb/c (H-2<sup>d</sup>, Thy 1.2) は日本 SLC より購入した。また、高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP) トランスジェニックマウスは CAAG-EGFP ベクターを ICR マウスの one-cell embryo に injection することで作成した (ICR/EGFP)<sup>21)</sup>。全てのマウスは SPF 環境下で飼育し、餌由来の自家蛍光を避けるため、我々の絶食プロトコル後 (図 1) に in vivo imaging を行った。尚、一連の実験は京都大学医学部動物実験倫理委員会の承認の下に行った。

### 2. 単核球分離

骨髓細胞は両上腕骨、大腿骨及び脛骨より採取した。また、脾細胞は脾臓を homogenization することにより得た。骨髓単核球及び脾単核球は Lympholyte-M solution (Cedarlane Labs) を用いて比重遠心法を用い分離した。

### 3. 近赤外蛍光標識

Cy 5.5 monofunctional dye (peak excitation: 675 nm, peak emission: 694 nm) (GE Healthcare UK Ltd) 及び Alexa Fluor 750 carboxylic acid, succinimidyl ester (peak excitation: 749 nm, peak emission: 775 nm) (Invitrogen) を用いて近赤外蛍光標識を行った。骨髓単核球及び脾単核球は Cy 5.5 (0.4 mg/ml) または AF750 (0.1 mg/ml) と共に 37 °C, 15 分培養した (5 % CO<sub>2</sub>)。標識細胞は PBS で 2 回洗浄後、10mM Tris-in-PBS にて再度洗浄し、蛍光色素の反応基を失活させた。

### 4. コロニーアッセイ

2 × 10<sup>4</sup> 個の骨髓細胞を Methocult GF M3434 (Stem Cell Technologies) にて manufacturer's

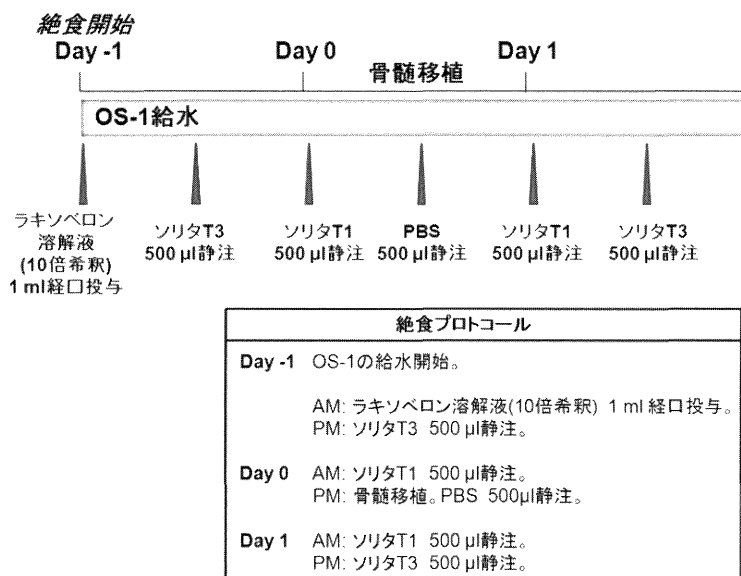


図1 絶食プロトコル

本プロトコルによる全身臓器での傷害性は観察されなかった。

instructionsに従い、培養した。7日間培養後、Granulocyte - macrophage colony forming units (GM - CFUs), erythroid - burst - forming units (BFU - Es) 及び granulocyte, erythrocyte, macrophage megakaryocyte colony forming units (GEMM - CFUs) をカウントした。

## 5. 細胞増殖試験

近赤外蛍光で標識した  $1 \times 10^5$  個の脾単核球を96穴プレートにて  $100 \mu\text{l}$  phenol - red - free RPMI 1640 (Wako Pure Chemical Industries), 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 100 units/ml penicillin,  $100 \mu\text{g/ml}$  streptomycin,  $50 \mu\text{M}$  mercaptoethanol 及び 10 % FCS と共に培養した。また、脾単核球刺激のため、mouse IL-2 (20 ng/ml, R&D Systems) と anti - CD3/CD28 anti - body - coated beads (Dynabeads mouse CD3/CD28 T - cell expander, Invitrogen Dynal AS) を培養液中に添加した。CD3/CD28 T - cell expander は 1 : 1 beads - to - cell ratio で用いた。生細胞数の測定は過去の報告<sup>22)</sup>を参照して生細胞

測定試薬添加後、3時間後の吸光度 (450nm) を測定することで計測した。

## 6. フローサイトメトリー

Canto II flow cytometer (Becton Dickinson) を用いてデータを取得した。また、データ解析は FACS Diva (Becton Dickinson) を用いて行った。AF750 及び Cy5.5 の励起には共に red Helium - Neon 633 - nm laser を用い、AF750 は APC - Cy7 フィルターで、Cy5.5 は APC フィルターを用いて解析した。Sub - G1 fraction の解析は以前の報告の通りに施行した<sup>23)</sup>。ICR/EGFP をドナーに用いたキメリズム解析では  $1 \times 10^7$  個の細胞を骨髄移植後、24, 48, 72 時間の経時的な脛骨内及び末梢血中の EGFP 陽性細胞の割合を計測した。赤血球は ACK lysis buffer (Invitrogen) を用いて除去した。

## 7. 骨髄移植

レシピエントには 7 - 9 週齢の Balb/c nu/nu を用いた。移植前処置は 8Gy の全身照射を  $^{137}\text{Cs} \gamma$  -

ray (Gammacell 40 Exactor; MDS Nordion International Inc.) を用いて単回照射で行った。骨髓移植モデルでは照射 6-8 時間後に  $1 \times 10^7$  個のドナー骨髓単核球を尾静注した。骨髓内骨髓移植 (IBM-BMT) モデルは以前の報告に若干の修正を加えて行った<sup>24)</sup>。簡潔に述べると、7-9 週齢の Balb/c nu/nu に移植 24 時間前に 8Gy の全身照射を行い、 $30 \mu\text{l}$  に希釈した  $1 \times 10^7$  個のドナー骨髓単核球を 26-G microsyringe ( $50 \mu\text{l}$ ; Hamilton) を用いて、膝蓋骨部より左脛骨内へ直接に骨髓内移植した。

## 8. 免疫染色

脛骨摘出後、10 %ホルマリンにて固定を行い、パラフィンに包埋した。 $3 \mu\text{m}$  の切片を作成し、脱パラフィン及び水和後に 1 % Block Ace (Dainippon Pharmaceutical Co.) を用いて室温で 15 分間ブロッキングを施行した。その後、1000 倍希釈ウサギ抗 EGFP ポリクローナル抗体 (Abcam) を  $4^\circ\text{C}$ , overnight で反応させ、30 倍希釈 FITC 接合豚抗ウサギ免疫グロブリンポリクローナル抗体 (Dako) を室温で 1 時間反応させた。洗浄後、VECTASHIELD with DAPI (Vector Laboratories) を用いて封入した。全ての観察は BZ-9000 microscope (KEYENCE) を用いて行った。

## 9. 生体イメージング

In vivo imaging は IVIS Spectrum system (Xenogen) を用いて、経時的に撮影を行った。また、撮影には以下のフィルター及び条件で撮影を行った (excitation/emission = 710/780 nm, exposure time = 5 秒, lamp level = high, binning = medium, field of view =  $12.9 \times 12.9 \text{ cm}$ , f/stop = 1)。Ex vivo imaging は骨髓移植後 24 時間で行い、撮影条件は in vivo imaging と同様の条件で施行した。

## 10. 統計解析

統計解析は Student's t test により検定し、差は  $p < 0.05$  をもって有意とした。

## 結 果

### 1. NIRF 標識法は細胞毒性が低く、均一な細胞標識が可能である。

Cy5.5 ( $0.4 \text{ mg/ml}$ ), AF750 ( $0.1 \text{ mg/ml}$ ) を用いて、骨髓単核球及び脾単核球の近赤外蛍光標識を行うと、顕微鏡下での観察で近赤外蛍光標識は細胞膜表面に均一にみられた (図 2A)。また、フローサイトメトリーを用いた解析では細胞種や細胞の大きさにかかわらず、100 %の標識効率が得られていることが確認された (図 2B)。本手法を用いた場合、progenitor cell への細胞毒性は殆ど見られず、標識直後のアポトーシスも誘導されないことが確認された (図 2C-E)。

### 2. マウス骨髓移植での骨髓再構築は 72 時間前後で始まる。

ICR/EGFP 骨髓単核球 (図 3A) を用いて移植実験を行った。脛骨内のキメリズム解析では移植骨髓細胞は移植 72 時間で急激に増殖し (図 3B)、ほぼ全ての白血球分画が再構築されていた (図 3C 上段)。更に骨髓内とほぼ同等の蛍光強度を持つ造血細胞の末梢血中への循環も確認可能であった (図 3D)。免疫染色解析では EGFP 陽性ドナー細胞は脛骨骨端部において 48 時間から 72 時間にかけて急激に増殖していた (図 4)。以上からマウス造血幹細胞移植における骨髓再構築は移植後 72 時間前後より開始していると考えられた。

またフローサイトメトリーの結果からは AF750 は細胞分裂に伴い、その蛍光強度の減衰を避けられないものの、移植骨髓細胞が分裂を開始し始める移植後 24 時間前後までは AF750 のシグナルは保たれており、正確な in vivo imaging が可能であると考えられた (図 3C 下段)。

### 3. AF750 細胞標識法による移植骨髓細胞の in vivo imaging.

骨髓再構築前の骨髓移植後超早期においては各臓器での細胞分布密度が極めて小さいことが予想されるが、AF750 標識法を用いた場合、各臓器での細胞分布は明瞭に観察可能であった (図 5)。

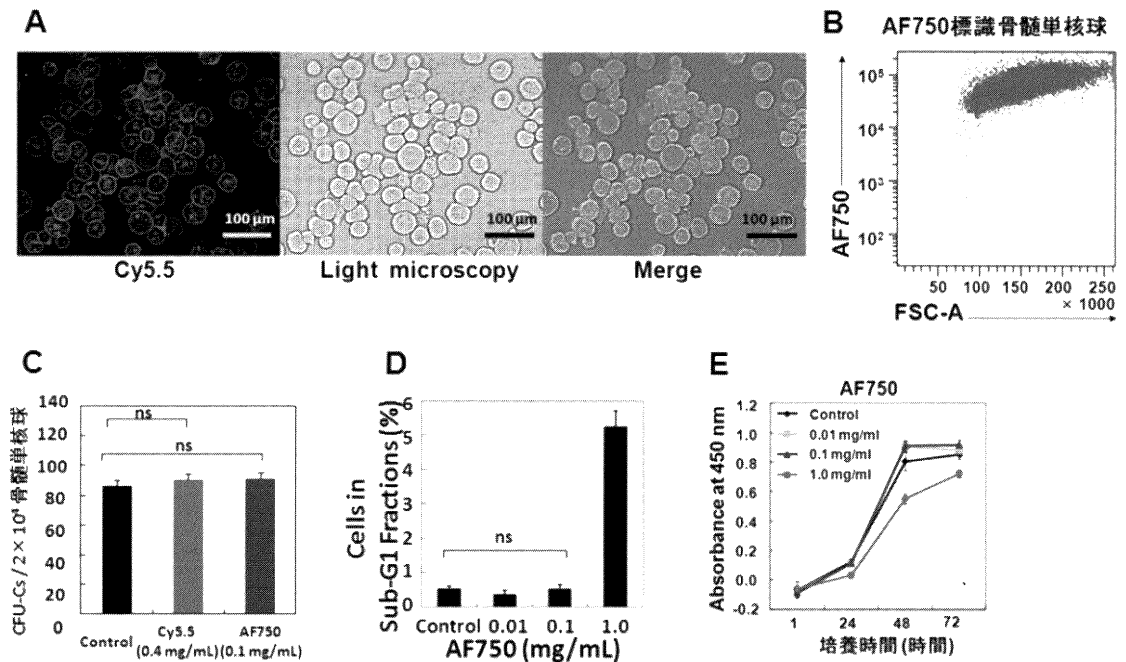


図2 近赤外蛍光色素の標識効率と細胞毒性

(A, B) 近赤外蛍光色素を用いた細胞外標識法では細胞の大きさ及び細胞種によらずほぼ均一な細胞標識効率を得られる。(C)  $2 \times 10^4$  個の骨髄単核球を7日間培養した際の平均コロニー (CFU) 数 ( $n = 5$ )。 (D) 近赤外蛍光標識後2時間での sub-G1 fraction の割合 ( $n = 5$ )。 (E) 脾単核球 ( $1 \times 10^5$ ) の modified methylthiazole tetrazolium (MTT) assay ( $n = 5$ )。

Congenic BMTでは移植5分後から両側脛骨でAF750のシグナルが観察され始め(図6A上段 white arrowhead), そのシグナルは移植後6時間前後まで上昇を続け, 24時間まで維持されていた。また, 肺や脾臓における移植細胞の捕捉も観察可能であった。IBM-BMTはこれまで移植後の生体内動態が不明瞭な移植法とされてきたが, 本手法では骨髄内移植5分後より多くの細胞が末梢循環に入り, その後, 肺に捕捉されている様が観察された。骨髄内移植後1時間では, 移植対側脛骨へのホーミングが観察された(図6A下段 open arrow)。また, 移植後24時間においても骨髄内移植を行った左脛骨では強いシグナルの残存が観察可能であった。

#### 4. AF750 細胞標識法による移植骨髄細胞の ex vivo imaging.

骨髄移植24時間後の ex vivo imaging (図6B)では, BMT群に比してIBM-BMT群で左脛骨内で強いシグナルの残存が観察されたが, 全身骨及び網内系臓器の有意なシグナルの低下が見られた。

#### 考 察

これまで骨髄移植では移植後早期の in vivo imagingを得ることは極めて困難であった。なぜならば, 網内系臓器での trap を免れた細胞はごく少数である上, 細胞が体内の各臓器に散在するようになることで, 細胞の分布密度がより小さくな

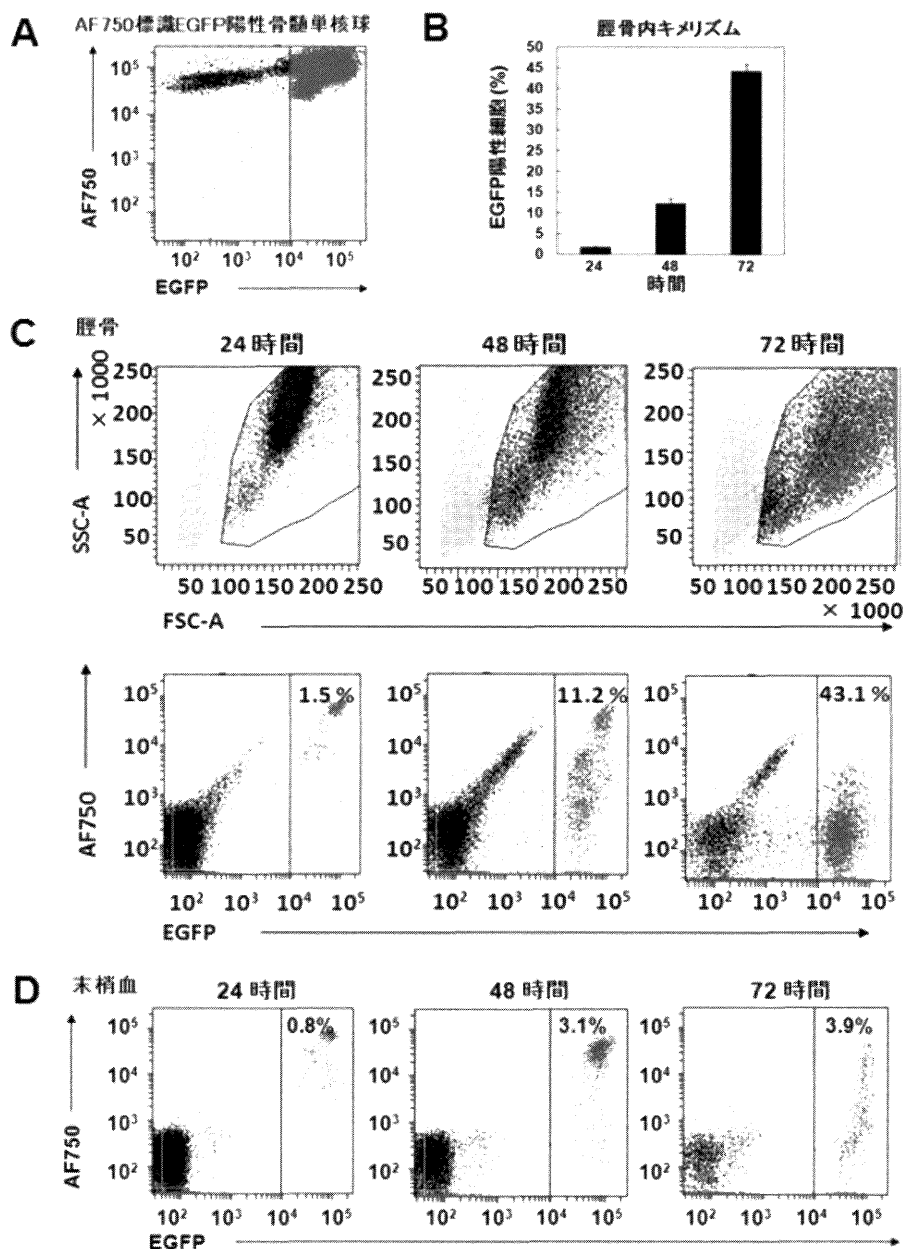


図3 FACSによる脛骨内キメリズムの経時的変化の観察

近赤外蛍光標識したICR/EGFP骨髄単核球をBalb/c nu/nuに骨髄移植することで、マウス骨髄移植における骨髄再構築開始時期を検討した。(A) AF750標識されたICR/EGFP骨髄単核球。(B, C) レシピエント脛骨内のキメリズム解析。移植後経時的なドナー由来のEGFP陽性細胞の急激な増加が確認可能である。また、移植後72時間ではほぼ全ての白血球の再構築が観察可能である(n=5)。(D) レシピエント末梢血中のキメリズム解析。移植後72時間で骨髄中とほぼ同程度の蛍光強度をもつドナー細胞が末梢血中に循環を開始している。

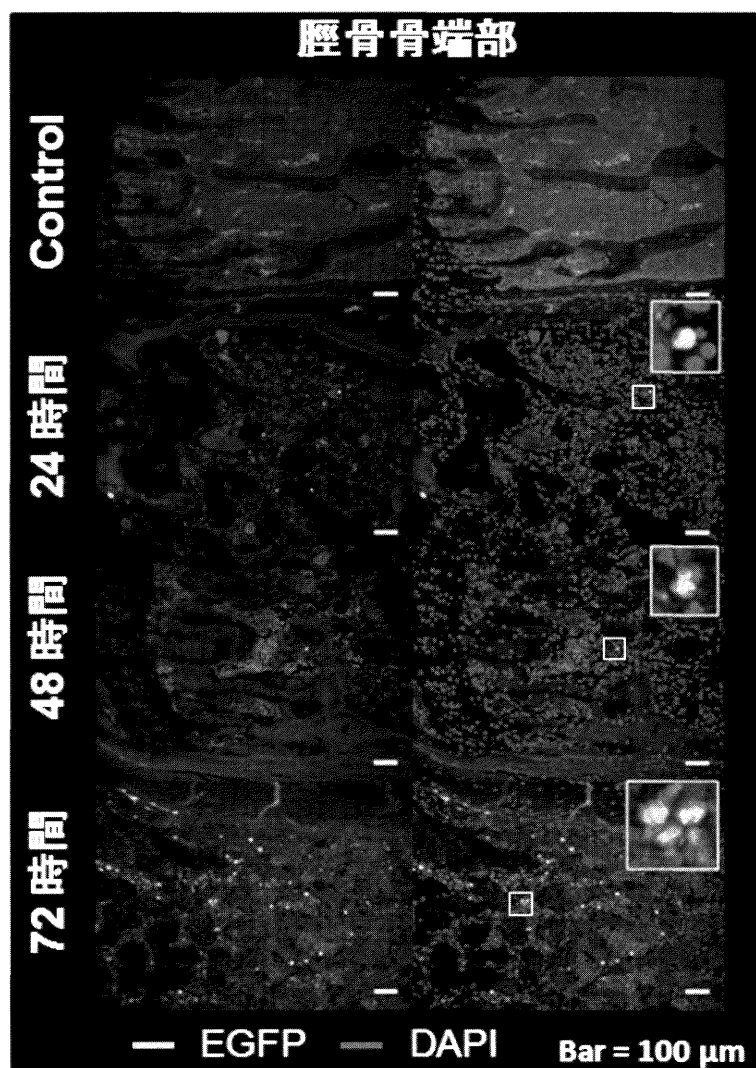


図4 免疫染色を用いた脛骨内キメリズムの解析  
脛骨骨端部で移植後48時間から72時間の間において急激なEGFP  
陽性細胞の増殖が認められる。

ってしまうためである。今回、我々は、近赤外蛍光色素を移植細胞表面に標識し、骨髄移植後の細胞動態をreal-timeイメージングで観察することにより、移植細胞が超急性期でダイナミックに変化していることを明らかにした。

我々の手法が、全身を循環する移植初期の移植

細胞を非侵襲的に観察する事ができた理由は、1) 励起光、蛍光共に組織透過性の高い近赤外蛍光を用いたこと<sup>25)</sup>、2) 骨髄細胞が多様な細胞集団であるにもかかわらず、その細胞表面に均一に蛍光標識する事ができたこと、3) 標識した蛍光色素が24時間は安定に細胞表面に留まっていた

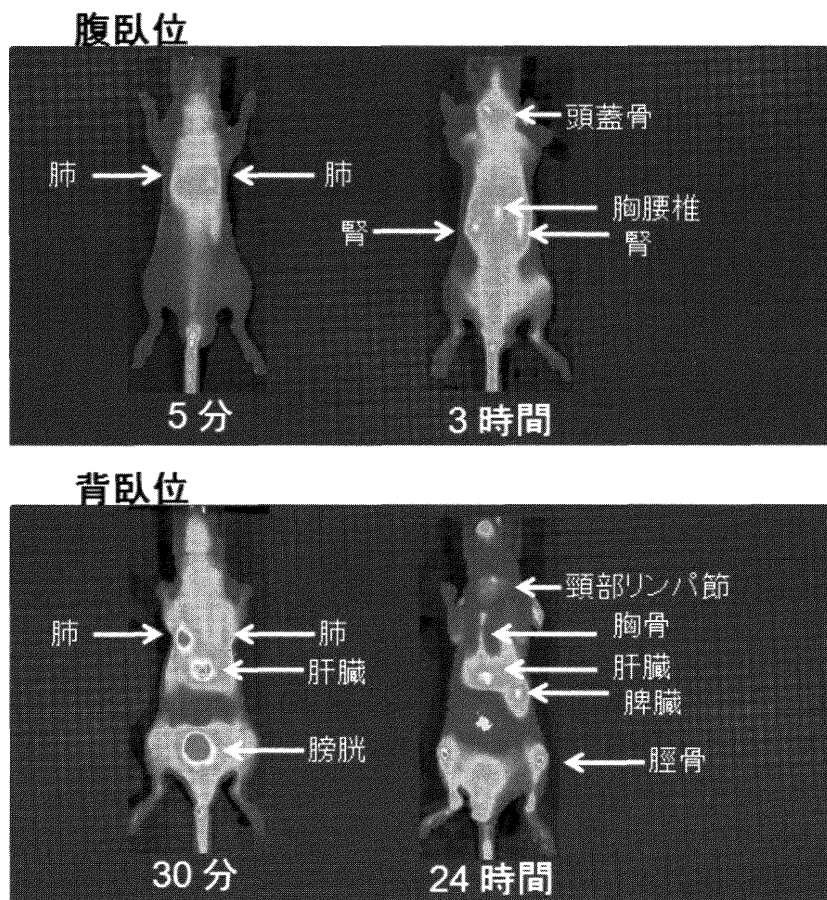


図5 近赤外蛍光シグナルの注解

近赤外蛍光色素による標識法を用いることで、これまでよりもより明瞭に多数の臓器を観察可能である。

こと、4) 近赤外蛍光シグナルの検出感度を高めるために Balb/c nu/nu マウスを用いたこと、5) 餌に由来する自家蛍光を除く事で腹部の移植細胞の観察が可能になったことなどによるものである。

今回は特に移植骨髓細胞の全身臓器へのホーミングに着目し、イメージングを行ったが、骨髓再構築はこれまで BLI では可視可が困難であった72時間以内に開始されていた。これは免疫染色の結果から、移植された EGFP 陽性細胞は脛骨あるいは大腿骨骨端部などにおいて48時間から72時

間にかけて急激に expansion した結果と考えられた。以上から、生着などの病態を理解する上で、これまで in vivo imaging が不可能であった移植後72時間以内の超早期イメージングを得ることが重要であると考えられた。

移植骨髓細胞の homing については congenic BMT において、移植5分後から両側脛骨で AF750 由来の蛍光シグナルが観察され始めた。その後、脛骨でのシグナルは移植後6時間前後まで上昇をつづけ、24時間まで維持されることが分かった。また、骨髓内骨髓移植は造血幹細胞や mes-



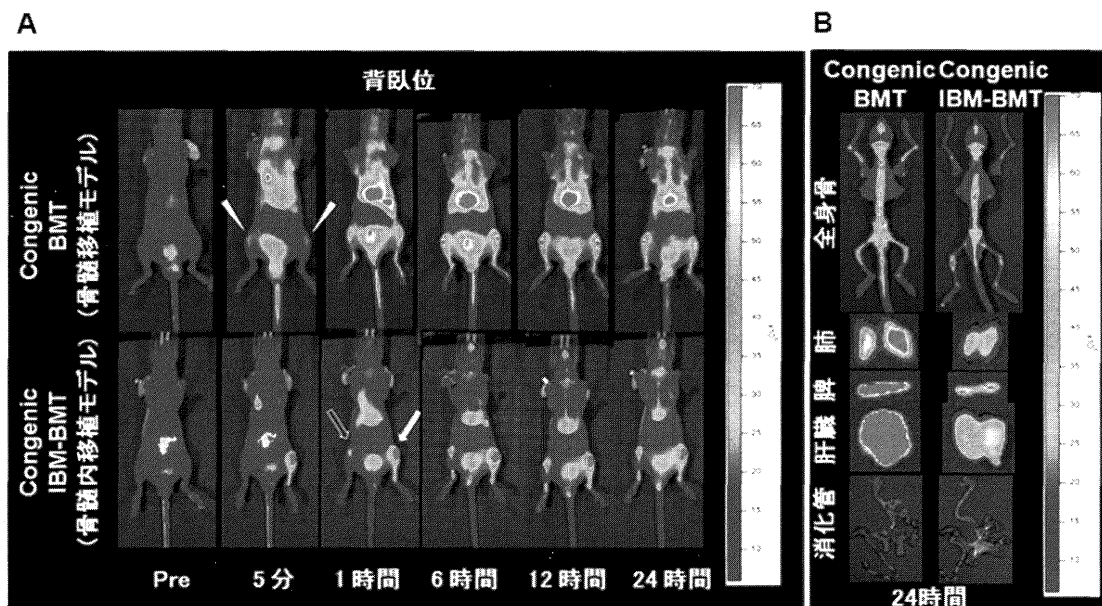


図6 マウス造血幹細胞移植後におけるドナー細胞の経時的追跡

(A) 移植ドナー細胞の in vivo imaging. 上段：尾静注による骨髓移植モデル. 移植後約5分で両側脛骨へのホーミングが観察可能である (white arrowhead). 下段：左脛骨への骨髓内移植モデル. 移植後約1時間後より移植脛骨 (white arrow) から対側脛骨への migration (open arrow) が観察可能である. (B) 移植後24時間の ex vivo imaging. 左列：骨髓移植モデルでは全身骨へ均一に移植ドナー細胞が分布していることが、観察可能である. 右列：骨髓内移植モデルでは左脛骨内に効率的に移植ドナー細胞が留まることから、全身骨や全身臓器へホーミングする細胞数は骨髓移植モデルに比して少数であることが観察可能である.

enchymal cell を直接ニッチに移植する方法として注目されている<sup>26)</sup>が、本研究により移植直後より骨髓内に移植した細胞は、尾静脈より行う骨髓移植とほぼ同様に末梢循環に入り、24時間後には全身骨へほぼ均一にホーミングしていることが解明された. 更に、骨髓内移植で多くの移植骨髓細胞が、移植後24時間を経ても脛骨内に残存することをイメージングすることに成功した.

上記のように in vivo imaging は骨髓移植に関する病態を解釈する上で非常に有用なツールであり、移植する細胞種類に応じ、異なるイメージング像を得ることが可能である. また、近赤外蛍光ラベリングは低毒性であり、移植細胞を変えることで多種多様な移植モデルの検討が可能である.

更に骨髓移植においては移植された多種多様な細胞が病態形成に関与していることから、これらを簡易に標識することの出来る近赤外蛍光色素による細胞膜標識法はイメージガイド下に骨髓移植に関連した病態を検討可能にし、骨髓移植治療成績の向上をもたらし得る有用な手法であると考えられた.

## 結 論

近赤外蛍光標識法はBMT直後の超急性期を in vivo imaging 可能とする手法である. 近赤外蛍光イメージングは骨髓移植に関連した病態や生着不全や移植片対拒絶病といった骨髓移植合併症の成

因にせまるイメージング法であり、本手法を用いて効率的にイメージガイド下に骨髓移植の病態検討を行うことで骨髓移植治療成績の改善に貢献できると期待される。

## 謝 辞

本研究においてご指導を賜りました京都大学医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学 特定教授 近藤科江先生、同教授 平岡真寛先生、京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部 教授 前川 平先生、同講師 芦原英司先生、同助教 平位秀世先生、佐賀大学医学部血液・呼吸器・腫瘍内科 教授 木村晋也先生、東京女子医科大学学生化学教室 助教 田中正太郎先生、新潟大学医学部第一内科 教授 相澤義房先生及び新潟大学医歯学総合病院高密度無菌治療部 助教 増子正義先生に深謝致します。

## 文 献

- 1) Chan KW, Grimley MS, Taylor C and Wall DA: Early identification and management of graft failure after unrelated cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 42: 35 - 41, 2008.
- 2) Stotler C, Bolwell B, Sobecks R, Dean R, Serafino S, Rybicki L, Andresen S, Pohlman B, Kalaycio M and Copelan E: Are backup BM harvests worthwhile in unrelated donor allogeneic transplants? *Bone Marrow Transplant*, 2009.
- 3) Ferrara JL, Levine JE, Reddy P and Holler E: Graft - versus - host disease. *Lancet* 373: 1550 - 1561, 2009.
- 4) Weissleder R and Pittet MJ: Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452: 580 - 589, 2008.
- 5) de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, Verdijk P, van Krieken JH, Boerman OC, Oyen WJ, Bonenkamp JJ, Boezeman JB, Adema GJ, Bulte JW, Scheenen TW, Punt CJ, Heerschap A and Figdor CG: Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol* 23: 1407 - 1413, 2005.
- 6) Ahrens ET, Flores R, Xu H and Morel PA: In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat Biotechnol* 23: 983 - 987, 2005.
- 7) Lee ES, Chan J, Shuter B, Tan LG, Chong MS, Ramachandra DL, Dawe GS, Ding J, Teoh SH, Beuf O, Briguet A, Chiu Tam K, Choolani M and Wang SC: Microgel iron oxide nanoparticles for tracking human fetal mesenchymal stem cells through magnetic resonance imaging. *Stem Cells* 27: 1921 - 1931, 2009.
- 8) Caveliers V, De Keulenaer G, Everaert H, Van Riet I, Van Camp G, Verheye S, Roland J, Schoors D, Franken PR and Schots R: In vivo visualization of <sup>111</sup>In labeled CD133+ peripheral blood stem cells after intracoronary administration in patients with chronic ischemic heart disease. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 51: 61 - 66, 2007.
- 9) Stelljes M, Hermann S, Albring J, Kohler G, Loffler M, Franzius C, Poremba C, Schlosser V, Volkmann S, Opitz C, Bremer C, Kucharzik T, Silling G, Schober O, Berdel WE, Schaefers M and Kienast J: Clinical molecular imaging in intestinal graft - versus - host disease: mapping of disease activity, prediction, and monitoring of treatment efficiency by positron emission tomography. *Blood* 111: 2909 - 2918, 2008.
- 10) Miller MJ, Wei SH, Cahalan MD and Parker I: Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two - photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2604 - 2609, 2003.
- 11) Xie Y, Yin T, Wiegand W, He XC, Miller D, Stark D, Perko K, Alexander R, Schwartz J, Grindley JC, Park J, Haug JS, Wunderlich JP, Li H, Zhang S, Johnson T, Feldman RA and Li L: Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real - time imaging. *Nature* 457: 97 - 101, 2009.
- 12) Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake - Lye S, Fujisaki J, Cote D, Rowe DW, Lin CP and Scadden DT: Live - animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 457: 92 - 96, 2009.
- 13) Creusot RJ, Yaghoubi SS, Chang P, Chia J, Contag CH, Gambhir SS and Fathman CG: Lymphoid tissue - specific homing of bone marrow - derived dendritic cells. *Blood* 113: 6638 -

- 6647, 2009.
- 14) Sheikh AY, Lin SA, Cao F, Cao Y, van der Bogt KE, Chu P, Chang CP, Contag CH, Robbins RC and Wu JC: Molecular imaging of bone marrow mononuclear cell homing and engraftment in ischemic myocardium. *Stem Cells* 25: 2677 - 2684, 2007.
  - 15) Negrin RS and Contag CH: In vivo imaging using bioluminescence: a tool for probing graft - versus - host disease. *Nat Rev Immunol* 6: 484 - 490, 2006.
  - 16) Beilhack A, Schulz S, Baker J, Beilhack GF, Nishimura R, Baker EM, Landan G, Herman EI, Butcher EC, Contag CH and Negrin RS: Prevention of acute graft - versus - host disease by blocking T - cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood* 111: 2919 - 2928, 2008.
  - 17) Nguyen VH, Zeiser R, Dasilva DL, Chang DS, Beilhack A, Contag CH and Negrin RS: In vivo dynamics of regulatory T - cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft - versus - host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 109: 2649 - 2656, 2007.
  - 18) Nishimura R, Baker J, Beilhack A, Zeiser R, Olson JA, Sega EI, Karimi M and Negrin RS: In vivo trafficking and survival of cytokine - induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity. *Blood* 112: 2563 - 2574, 2008.
  - 19) Zeiser R, Nguyen VH, Hou JZ, Beilhack A, Zambricki E, Buess M, Contag CH and Negrin RS: Early CD30 signaling is critical for adoptively transferred CD4+CD25+ regulatory T cells in prevention of acute graft - versus - host disease. *Blood* 109: 2225 - 2233, 2007.
  - 20) Wang X, Rosol M, Ge S, Peterson D, McNamara G, Pollack H, Kohn DB, Nelson MD and Crooks GM: Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 102: 3478 - 3482, 2003.
  - 21) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T and Nishimune Y: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313 - 319, 1997.
  - 22) Kizaka - Kondoh S, Itasaka S, Zeng L, Tanaka S, Zhao T, Takahashi Y, Shibuya K, Hirota K, Semenza GL and Hiraoka M: Selective killing of hypoxia - inducible factor - 1 - active cells improves survival in a mouse model of invasive and metastatic pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 15: 3433 - 3441, 2009.
  - 23) Zeng L, Kizaka - Kondoh S, Itasaka S, Xie X, Inoue M, Tanimoto K, Shibuya K and Hiraoka M: Hypoxia inducible factor - 1 influences sensitivity to paclitaxel of human lung cancer cell lines under normoxic conditions. *Cancer Sci* 98: 1394 - 1401, 2007.
  - 24) Kushida T, Inaba M, Hisha H, Ichioka N, Esumi T, Ogawa R, Iida H and Ikehara S: Intra - bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 97: 3292 - 3299, 2001.
  - 25) Kalchenko V, Shvitiel S, Malina V, Lapid K, Haramati S, Lapidot T, Brill A and Harmelin A: Use of lipophilic near - infrared dye in whole - body optical imaging of hematopoietic cell homing. *J Biomed Opt* 11: 050507, 2006.
  - 26) Li Q, Hisha H, Yasumizu R, Fan TX, Yang GX, Cui YZ, Wang XL, Song CY, Okazaki S, Mizokami T, Cui WH, Guo K, Li M, Feng W, Katou J and Ikehara S: Analyses of very early hemopoietic regeneration after bone marrow transplantation: comparison of intravenous and intrabone marrow routes. *Stem Cells* 25: 1186 - 1194, 2007.

(平成21年12月11日受付)