

骨髓内骨髓移植とドナーリンパ球輸注法を用いた癌治療法の開発

所属機関 関西医科大学
研究者名 池原 進

《研究の概要》

癌の免疫療法としては、ドナーリンパ球輸注(DLI)が注目を集めているが、DLIの副作用である移植片対宿主病(GvHD)の予防策と治療方法がないため、根治には至っていない。

我々は、最近、骨髓内骨髓移植(IBM-BMT)という新しい骨髓移植(BMT)の方法を開発した(Blood 97: 3292, 2001)。この方法を用いると、ドナーの間葉系幹細胞(MSC)が移植されるので、GvHDが起りにくい(Stem Cells 22:125, 2004)。これは、MSCから免疫機能を抑制する cytokines が分泌されることによる。さらに、BMTの際の前処置として用いられる放射線量を減量しても生着不全が生じない。これは、ドナーのMSCが移植されるとドナーの造血幹細胞を nursing することによって、宿主側の免疫担当細胞の攻撃を protect することによる。従って、放射線量を減量することが可能になり、放射線の副作用が軽減できる。

以上の事実に基づいて、この方法を悪性腫瘍の治療に応用することを試みた。

まず、Meth A (線維肉腫)を用いたマウスの実験で、IBM-BMTとCD4+ T細胞を除去した脾細胞をDLIに用いること(CD4-DLI)によって、GvHDのみならず腫瘍の増殖をも抑制できることを発見した(Stem Cells 23:365, 2005)。次に、この方法が、マウスの系だけでなく、ラットの系でも有効

であること、さらに、肝転移の系に関しても適用できるかを明らかにするため、ラットの大腸癌 (ACL-15) を用いて解析した。IBM-BMT と CD4⁻DLI はいずれの系でも腫瘍の増殖を抑制すること、さらに、GvHD は発症せずに、延命効果があることが判明した (Stem Cells 25:385, 2007)。

さらに、Meth A を用いて、“IBM-BMT+CD4⁻DLI” の系に、Meth A で抗原刺激した樹状細胞 (DC) を皮下注射すると、強力な腫瘍の増殖抑制効果が発揮できることを見出した (Int. J. Oncology 30:1309, 2007)。一方、DC の pulus 療法の効果を増強するために、DC の投与方法を検討した。①皮下注入②静脈内注入③骨髄内注入の3者で比較した結果、静脈内注入では効果が少なく、骨髄内への DC の注入が皮下注入と同様の効果を示すことを発見した (投稿中)。これは、骨髄内へ注入した DC が骨髄内に存在する少量の T 細胞を活性化し、キラー T 細胞 (Tc) に TSA (腫瘍特異抗原) を認識させることにより、抗腫瘍効果をもたらすものと考えられる。

最近、DLI の代わりに young adult の胸腺移植が GvHD も発症せず、抗腫瘍効果があることを見出した (Bone Marrow Transplantation, in press)。移植する胸腺は、fetal, newborn, young adult mouse で比較し、young adult の胸腺移植が、一番効果があることが判明したが、これは、young adult thymus 中には、成熟 T 細胞も含まれているため、DLI 効果が加味されるためと考えられる。さらに donor の胸腺でなくても第三者の胸腺でも効果があることを見出している (Transplantation 85: 1151, 2008)。この事実は、人工流産した胎児胸腺移植が将来、IBM-BMT との併用で重要視されるものとする。ヒトの発癌も加齢と密接な関係があり、その原因としては、T 細胞機能の低下が考えられている。従って、胸腺移植の併用の重要性は、今後、益々高まるものとする。我々の開発した “IBM-BMT+DLI” というプロトタイプに、胸腺移植や種々の免疫療法を併用することにより、悪性腫瘍の根治療法を開発し、ヒトへの応用に役立てたい。

共同研究者

池原 進	関西医科大学教授 病理学教授	総括
稲葉宗夫	関西医科大学准教授 病理学准教授	間葉系幹細胞 (MSC) を用いた免疫学的寛容誘導法の開発
足立 靖	関西医科大学 病理学准教授	樹状細胞 (DC) パルス療法の併用による癌根治療法の開発
比舎弘子	関西医科大学 病理学講師	MSC を用いた GvHD の予防並びに治療法の開発
保坂直樹	関西医科大学 病理学講師	胸腺移植併用療法による癌根治療法の開発
槇 政彦	関西医科大学 病理学講師	移植後の免疫病理学的解析 (GvHD を含む)

研究報告

I. 研究目的

現在、癌の免疫療法としては、ドナーリンパ球輸注 (DLI) が注目を集めているが、DLI の副作用である移植片対宿主病 (GvHD) の予防策と治療方法がないため、根治には至っていない。

本研究の目的は、この DLI の副作用である GvHD を抑制しながら、抗腫瘍(GvT)効果を発揮する方法を開発することである。

最近、我々が開発した新しい骨髄移植の方法(IBM-BMT)はドナーの造血幹細胞(HSC)のみならず、ドナーの間葉系幹細胞(MSC)をも効率良く骨髄内に移植できることが判明した。このドナーの MSC から種々の免疫抑制サイトカインを放出するため、GvHD が抑制されるものと考えられる。

本研究では、小動物(マウス, ラット)を用いて、悪性腫瘍(癌や肉腫等)を移植し、DLI+IBM-BMT によって、いかなる腫瘍に対しても延命効果を認め得るかを検証することである。さらに、DLI に代わる胸腺移植の効果を比較して癌の根絶療法を確立することが本研究の目的である。

II. 研究計画および材料と方法

1. IBM-BMT+DLI という我々の開発した新しい癌治療法をプロトタイプとして以下の方法を併用し、癌の根治療法を開発する。

(1)DLI の modification (足立, 稲葉, 池原)

CD4⁺の spleen cells を DLI に用いると GvHD も起さず、腫瘍の増殖を抑制し、延命効果があることが判明している(Stem Cells 23:365-370, 2005)ので、追加 DLI の際、CD4⁺の spleen cells を少量加えることにより、根治が可能かを検討する。まだ少数例ではあるが、予備実験で根治が可能であることが明らかになっている(Stem Cells 23: 365-370, 2005)。

(2)Lymphokine-activated killer(LAK)療法の併用(稲葉, 池原)

in vitro, in vivo で IL-2 等のサイトカインでリンパ球を刺激する LAK 療法の併用効果を検討する。

(3)NKT 細胞の併用(足立, 池原)

マウスの系で V α 14⁺の NKT 細胞の相乗効果を検討する。

(4)Treg の抗腫瘍効果の解析と併用(稲葉, 池原)

我々のマウスの系では CD4⁺の spleen cells が、GvHD も起こさず、抗腫瘍効果を示しているが、CD4⁺/CD25⁺の Treg をこの系に加えて、抗腫瘍効果に対する Treg の役割を明らかにする。

(5)胸腺移植方法の併用(保坂, 槇, 池原)

胎仔胸腺, 新生時期胸腺よりも、若年齢(4週~8週)のマウス胸腺の方が成熟した胸腺細胞(T細胞)が混在しており、DLI の相乗効果も加わり、有効であることが判明している(Bone Marrow Transplantation in press)。

(6)骨髄内にドナーの T 細胞を輸注する方法(IBM-DLI)の併用(稲葉, 池原)

ドナーの T 細胞を直接骨髄内に注射すると骨髄内の間葉系幹細胞(MSC)が T 細胞を教育し、免疫学的寛容を誘導し、GvHD を起さないことを発見した(Stem Cells 22: 125-134, 2004)。

こ

の IBM-DLI と従来の経静脈の DLI(IV-DLI)を組合わせて、GvHD は抑制するが graft-versus-tumor(GVT)効果を温存できる系を開発する。

(7)MSC の併用療法(比舎, 槇, 池原)

GvHD が発症し始めた際には、ドナーの MSC を補充して、GvHD を抑制する。

(8)DC のパルス療法の併用(足立, 稲葉, 池原)

現在、Meth A を用いて、IBM-BMT+CD4⁺ DLI の系に、Meth A で抗原刺激した DC(骨髄細胞から GM-CSF, IL-3, IL-12, IFN γ により DC を誘導)を皮下注射すると、強力な腫瘍の増

殖抑制効果が発揮できることを見出している(Int. J. Oncology 30: 130-1315, 2007)。

2. 放射線, 化学療法による臓器傷害に対する IBM-BMT の修復効果 (足立, 稲葉, 比舎, 保坂, 槇, 池原)

IBM-BMT により造血幹細胞のみならず、MSC もドナーの正常のものと置換可能であるため、放射線, 化学療法によって傷害を被った消化管, 腎, 肝, 肺等の臓器傷害が IBM-BMT により修復される可能性がある。実際に、骨髄細胞を用いることにより、Cisplatin の副作用である腎尿細管の傷害が軽減できることを我々は明らかにしている(J. Am. Soc. Nephrol 16:658-666, 2005)。従って、放射線, 化学療法による臓器傷害の修復機序を MSC の再生能力と関連付けて解析し、IBM-BMT が再生治療としても有望であることを証明する。

III. 研究成果

我々が開発した骨髄内骨髄移植(IBM-BMT)という新しい骨髄移植(BMT)の方法 (Blood 97: 3292-3299, 2001)を用いて、悪性腫瘍の治療に応用することを試みた。

i) まず、Meth A (線維肉腫) を用いたマウスの実験で、IBM-BMT と CD4+ T 細胞を除去した脾細胞を DLI に用いること(CD4-DLI)によって、GvHD のみならず腫瘍の増殖をも抑制できることを発見した(Stem Cells 23:365-370, 2005)。

ii) 次に、この方法が、マウスの系だけでなく、ラットの系でも有効であること、さらに、肝転移の系に関しても適用できるかを明らかにするため、ラットの大腸癌(ACL-15)を用いて解析した。IBM-BMT と CD4-DLI はいずれの系でも腫瘍の増殖を抑制すること、さらに、GvHD は発症せずに、延命効果があることが判明した(Stem Cells 25:385-391, 2007)。

iii) さらに、Meth A を用いて、“IBM-BMT+CD4-DLI” の系に、MethA で抗原刺激した樹状細胞 DC (骨髄細胞から GM-CSF, IL-3, IL-12, IFN γ により DC を誘導) を皮下注射すると、強力な腫瘍の増殖抑制効果が発揮できることを見出した(Int. J. Oncology30:1309-1315, 2007)。

iv) 一方、DC の pulus 療法の効果を増強するために、DC の投与方法を検討した。①皮下注入②静脈内注入③骨髄内注入の3者で比較した結果、静脈内注入では効果が少なく、骨髄内への DC の注入が皮下注入と同様の効果を示すことを見出した(投稿中)。これは、骨髄内へ注入した DC が骨髄内に存在する少量の T 細胞を活性化し、キラー T 細胞(Tc)に TSA (腫瘍特異抗原) を認識させることにより、抗腫瘍効果をもたらすものと考えられる。

v) 我々は、DLI の代わりに young adult の胸腺移植が GvHD も発症せず、抗腫瘍効果があることを見出した(Bone Marrow Transplantation, in press)。

移植する胸腺は、fetal, newborn, young adult mouse で比較し、young adult の胸腺移植が、一番効果があることが判明したが、これは、young adult thymus 中には、成熟 T 細胞も含まれているため、DLI 効果が加味されるためと考えられる。

vi) さらに donor の胸腺でなくても第三者の胸腺でも効果があることを見出している(Transplantation 85: 1151-1158, 2008)。この事実は、人工流産した胎児胸腺移植が将来、IBM-BMT との併用で重要視されるものとする。何故なら、加齢に伴って発症する難病 (アルツハイマー病, 糖尿病, 感染症, メタボリック症候群等) の患者の数が増加しているから。

ヒトの発癌も加齢と密接な関係があり、その原因としては、T 細胞機能の低下が考えられている。従って、胸腺移植の併用の重要性は、今後、益々高まるものとする。我々の開発” IBM-BMT+DLI ” というプロトタイプに、胸腺移植や種々の免疫療法を併用することにより、悪性腫瘍の根治療法

を開発し、ヒトへの応用に役立てたい。

IV 考察

本研究によって、免疫療法の悪性腫瘍に対する効果が実証されたことになるが、腫瘍の根絶にまでは、現在のところ至っていない。免疫療法としては、アロのリンパ球の輸注(DLI)が、最も効果的であるが、アロのリンパ球による正常組織に対する反応(移植片対宿主反応: GvHD)が副作用として最も懸念される。われわれが開発した骨髓内骨髓移植(IBM-BMT)を DLI と併用すると GvHD は抑制するが、移植片対腫瘍反応(GvT)反応は温存されるため、担癌動物(マウスのみならずラットでも)の寿命の延長効果があることが判明した。ヒトでは、患者さんの良好な QOL を確保できるものと考えられ、臨床応用への道が拓かれるものとする。

この IBM-BMT で何故、GvT 効果を温存しつつ、GvHD を抑制できるかということに関しては、今の所、明解な解答は得られていないが、IBM-BMT で造血幹細胞(HSC)のみならず、ドナーの間葉系幹細胞(MSC)が効率良く移植されるためと考えられる。

将来、臍帯血や若い人の骨髓を用いると、より GvT 効果が得られる可能性がある。

さらに、発癌には、ホストの aging による胸腺の機能が大きく関係していることから、我々が開発した IBM-BMT+DLI+胸腺移植の系が副作用も少なく、抗腫瘍効果を充分発揮できる最良の方法と考えて、現在、種々の免疫療法との組合せにより、悪性腫瘍の根絶に向けて、努力している。

最後に、本研究事業に貴重な御支援を賜りました、財団法人車両競技公益資金記念財団に対して深謝の意を表します。

V 研究成果の発表

1. Takada K, Inaba M, Ichioka N, Ueda Y, Taira M, Baba S, Mizokami T, Wang X, Hisha H, Iida H, and Ikehara S: Treatment of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem Cells* 24:399-405, 2006.

2. Wang X, Hisha H, Taketani S, Adachi Y, Li Q, Cui W, Cui Y, Wang J, Song C, Mizokami T, Okazaki S, Fan T, Fan H, Lian Z, Gershwin ME, and Ikehara S: Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells* 24: 482-493, 2006.

3. Nakano K, Adachi Y, Minamino K, Iwasaki M, Shigematsu A, Kiriya N, Suzuki Y, Koike Y, Mukaide H, Taniuchi S, Kobayashi Y, Kaneko K, and Ikehara S: Mechanisms underlying acceleration of blood flow recovery in ischemic limbs by macrophage colony-stimulating factor. *Stem Cells* 24:1274-1279, 2006.

4. Zhang Y, Adachi Y, Iwasaki M, Minamino K, Suzuki Y, Nakano K, Koike Y, Mukaide H, Shigematsu A, Kiriya N, Li C, and Ikehara S: G-CSF and/or M-CSF accelerate differentiation of bone marrow cells into endothelial progenitor cells in vivo. *Oncology Reports* 15:1523-1527, 2006.

5. Hosaka N, Ryu T, Cui W, Li Q, Nishida A, Miyake T, Inaba M, and Ikehara S: Relation of p53, Bcl-2, Ki-67 and E-cadherin expressions in early invasive breast cancers with comedonecrosis (CN) as an accelerated apoptosis. *J. Clin. Pathol.* 59: 692-698, 2006.
6. Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, Minamino K, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, Mukaide H, Shigematsu A, Kiriya N, Li C, and Ikehara S: Synergistic effects of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) on recovery of donor hematopoietic cells in allogeneic bone marrow transplantation. *Oncology Reports* 16: 367-371, 2006.
7. Adachi Y, Oyaizu H, Taketani S, Minamino K, Yamaguchi K, Shultz LD, Iwasaki M, Tomita M, Suzuki Y, Nakano K, Koike Y, Yasumizu R, Sara M, Hirama N, Kubota I, Fukuhara S, and Ikehara S: Treatment and transfer of emphysema by a new bone marrow transplantation method from normal mice to Tsk mice and vice versa. *Stem Cells* 24: 2071-2077, 2006.
8. Li Q, Hosaka N, Cui W, Wang X, Cui Y, Cui Y, Song C, Li Q, Ryu T, Fan T, Kawamoto K, and Ikehara S: Lin⁻CD34⁻ bone marrow cells from adult mice can differentiate into neural-like cells. *Neuroscience Letters* 408: 51-56, 2006.
9. Andoh Y, Mizutani A, Ohashi T, Kojo S, Ishii T, Adachi Y, Ikehara S, and Taketani S: The antioxidant role of a reagent, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, detecting reactive-oxygen species and blocking the induction of heme oxygenase-1 and preventing cytotoxicity. *J. Biochem.* 140: 483-499, 2006.
10. Baba S, Iwai H, Inaba M, Kawamoto K, Omae M, Yamashita T, and Ikehara S: Transfer of accelerated presbycusis by transplantation of bone marrow cells from senescence-accelerated mice. *Brain. Res.* 1120: 93-99, 2006.
11. Ikebukuro K, Adachi Y, Suzuki Y, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, Mukaide H, Yamada Y, Fujimoto S, Seino Y, Oyaizu H, Shigematsu A, Kiriya N, Hamada Y, Kamiyama Y, and Ikehara S: Synergistic effects of induction in transplantation of allogeneic pancreatic islets. *Bone Marrow Transplantation* 38: 657-664, 2006.
12. Sakaguchi Y, Inaba M, Kusafuka K, Okazaki K, and Ikehara S: Establishment of animal models for three types of pancreatitis and analyses of regeneration mechanisms. *Pancreas* 33: 371-381, 2006.
13. Li C, He Y, Feng X, Inaba M, Adachi Y, Takada K, Zhang Y, Yamamoto Y, Wu X, Cui Y, Iwasaki M, Hisha H, Hosaka N, Taira M, Minamino K, Suzuki Y, Nakano K, Fukui J, Ueda Y, Koike Y, Tsuda M, and Ikehara S: An innovative approach to bone marrow collection and transplantation

in a patient with β -Thalassemia major: Marrow collection using a perfusion method followed by intra-bone marrow injection of collected bone marrow cells. *Int. J. Hematol.* 85: 73-77, 2007.

14. Okada T, Inaba M, Naiki M, Lian ZX, Gershwin ME, and Ikehara S: Comparative immunobiology of thymic DC mRNA in autoimmune-prone mice. *J. Autoimmun.* 28: 41-45, 2007.

15. Shigematsu A, Adachi Y, Koike-Kiriyama N, Suzuki Y, Iwasaki M, Koike Y, Nakano K, Mukaide H, Imamura M, and Ikehara S: Effects of low-dose irradiation on enhancement of immunity by dendritic cells. *J. Radiat. Res.* 48: 51-55, 2007.

16. Wang, X, Hisha H, Cui W, Song C, Mizokami T, Okazaki S, Li Q, Feng W, Kato J, Jiang S, Fan, H, and Ikehara S: Characteristics of hematopoietic stem cells of autoimmune-prone mice- Neural cell adhesion molecules may play a crucial role in abnormal proliferation of hematopoietic stem cells in MRL/lpr mice. *Haematologica* 92: 300-307, 2007.

17. Koike Y, Adachi Y, Suzuki Y, Iwasaki M, Koike-Kiriyama N, Minamino K, Nakano K, Mukaide H, Shigematsu A, Kiyozuka Y, Tubura A, Kamiyama Y, and Ikehara S: Allogeneic Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation plus Donor Lymphocyte Infusion Suppresses Growth of Colon Cancer Cells Implanted in Skin and Liver of Rats. *Stem Cells* 25: 385-391, 2007.

18. Hosaka N, Ryu T, Miyake T, Cui W, Bishida T, Takaki T, Inaba M, and Ikehara S: Treatment of autoimmune diseases in MRL/lpr mice by allogeneic bone marrow transplantation plus adult thymus transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* 147: 555-563, 2007.

19. Li Q, Hisha H, Yasumizu R, Fan TX, Yang GX, Li Q, Cui YZ, Wang X, 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 Between Intravenous and Intra-Bone Marrow Routes. *Stem Cells* 25: 1186-1194, 2007.

20. Mukaide H, Adachi Y, Koike-Kiriyama N, Suzuki Y, Minamino K, Iwasaki M, Tsuda M, Nakano K, Koike Y, Shigematsu A, Kamiyama Y, and Ikehara S: Immunotherapy for malignant tumors using combination of allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation, donor lymphocyte infusion and dendritic cells. *Int. J. Oncol.* 30: 1309-1315, 2007.

21. Sugiura K, Taketani S, Yoshimura T, Nishino T, Nishino N, Fujisawa JI, Hisha H, Inaba T, and Ikehara S: Effect of hepatocyte growth factor on long term hematopoiesis of human progenitor cells in transgenic-sever combined immunodeficiency mice. *Cytokine* 37: 218-226, 2007.

22. Ueda Y, Inaba M, Takada K, Fukui J, Sakaguchi Y, Tsuda M, Kushida T, Iida H, and Ikehara S: Induction of senile osteoporosis in normal mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation from osteoporosis-prone mice. *Stem Cells* 25: 1356-1363, 2007.
23. Fukui J, Inaba M, Ueda Y, Miyake T, Hosaka N, A-H K, Sakaguchi Y, Tsuda M, Mariko Omae, Kamiyama Y, and Ikehara S: Prevention of graft-versus-host disease by intra-bone marrow injection of donor T cells. *Stem Cells* 25: 1595-1601, 2007.
24. Inaba M, Adachi Y, Hisha H, Hosaka N, Maki M, Ueda Y, Koike Y, Miyake T, Fukui J, Cui Y, Mukaide H, Koike N, Omae M, Mizokami T, Shigematsu A, Sakaguchi Y, Tsuda M, Okazaki S, Wang X, Li Q, Nishida A, Ando Y, Guo K, Song C, Cui W, Feng W, Katou J, Sado K, Nakamura S, and Ikehara S: Extensive Studies on Perfusion Method Plus Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation Using Cynomolgus Monkeys. *Stem Cells* 25: 2098-2103, 2007.
25. Tsuda M, Inaba M, Sakaguchi Y, Fukui J, Ueda Y, Omae M, Mukaide H, Yabuki T, Nakatani T, and Ikehara S: Activation of granulocytes by direct interaction with dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 150: 322-331, 2007.
26. Koike-Kiriyama N, Koike Y, Adachi Y, Mukaide H, Minamino K, Shigematsu A, Kamiyama Y, Matsumura M, and Ikehara S: Intra-bone marrow injection of dendritic cells for treatment of malignant tumor in mice. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 26: 337-342, 2007.
27. Ikehara S: Innovative BMT methods for intractable diseases. *Immunol. Res.* 38: 251-260, 2007.
28. Ikehara S: My brilliant memories of Dr. Good. *Immunol. Res.* 38: 292, 2007.
29. Li M, Inaba M, Guo K, Hisha H, Abraham NG, and Ikehara S: Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in mice by intra-bone marrow-BMT plus portal venous injection of β cells induced from bone marrow cells. *Int. J. Hematol.* 86: 438-445, 2007.
30. Koike-Kiriyama N, Adachi Y, Minamino K, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, Yamada H, Mukaide H, Shigematsu A, Mizokami T, Matsumura M, Ikehara S: Human cord blood cells can differentiate into retinal nerve cells. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 67: 359-365, 2007.
31. Feng W, Cui Y, Song C, Zhan H, Wang X, Li Q, Cui W, Guo K, Maki M, Hisha H, and Ikehara S: Prevention of osteoporosis and hypogonadism by allogeneic ovarian transplantation in conjunction with intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Transplantation* 84: 1459-1466, 2008.

32. Guo K, Inaba M, Li M, An J, Cui W, Song C, Wang J, Cui Y, Sakaguchi Y, Tsuda M, Omae M, Li Q, Wang X, Feng W, and Ikehara S: Long-Term Donor-Specific Tolerance in Rat Cardiac Allografts by Intra-Bone Marrow Injection of Donor Bone Marrow Cells. *Transplantation* 85: 93-101, 2008.
33. Ikehara S: A novel method of bone marrow transplantation (BMT) for intractable autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 30:108-115, 2008.
34. Muraji T, Hosaka N, Irie N, Yoshida M, Imai Y, Tanaka K, Takada Y, Sakamoto S, Haga H, and Ikehara S: Maternal microchimerism as underlying pathogenesis of biliary atresia: Quantification and phenotypes of maternal cells in the liver. *Pediatrics* 121: 517-521, 2008.
35. Sakaguchi Y, Inaba M, Tsuda M, Guo K, Omae M, Ando Y, Uchida K, Okazaki K, and Ikehara S: The WBN/Kob Rat, A Unique Animal Model for Autoimmune Pancreatitis with Autoimmune Extrapancreatic Exocrinopathy. *Clin. Exp. Immunol.* 152: 1-12, 2008.
36. Miyake T, Inaba M, Fukui F, Ueda Y, Hosaka N, Kamiyama Y, and Ikehara S: Prevention of GvH disease by intra-bone marrow injection of donor T cells: Involvement of bone marrow stromal cells. *Clin. Exp. Immunol.* 152: 153-162, 2008.
37. Ryu T, Hosaka N, Miyake T, Cui W, Nishida T, Takaki T, Li M, Kawamoto K, and Ikehara S: Transplantation of newborn thymus plus hematopoietic stem cells can rescue supralethal irradiated mice. *Bone Marrow Transplantation* 41: 659-666, 2008.
38. Cui W, Hosaka N, Miyake T, Takaki T, Nishida T, Inaba M, and Ikehara S: Analysis of Tolerance Induction using Triple Chimeric Mice: MHC-Disparate Thymus, Hemopoietic Cells and Microenvironment. *Transplantation* 85:1151-1158, 2008.
39. Asada T, Kushida T, Umeda M, Oe K, Matsuya H, Wada T, Sasai K, Ikehara S, Iida H: Prevention of corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits by intra-bone marrow injection of autologous bone marrow cells. *Rheumatology* 47: 591-596, 2008.
40. Omae M, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Miyake T, Fukui J, Iwai H, Yaamashita T, and Ikehara S: Long-term maintenance of donor-derived hemopoiesis by intra-bone marrow transplantation. *Stem Cells and Development* 17: 291-302, 2008.
41. Suzuki Y, Adachi Y, Zhang Y, Minamino K, Iwasaki M, Mukaide H, Nakano K, Koike Y, Wang J, Koike-Kiriyama N, Shigematsu A, and Ikehara S: Administration of granulocyte colony-stimulating factor to recipients followed by intra-bone marrow transplantation.

transplantation accelerates acceptance of allogeneic bone marrow cells in mice. *Immunobiology* 213: 427-435, 2008.

42. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Guo K, Omae M, Okazaki K, and Ikehara S: Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Stem Cells Facilitate Colonic Mucosal Recovery from 2, 4, 6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)-Induced Colitis in Rats. *Inflamm. Bowel Dis.* 14: 826-838, 2008.

43. Mukaide H, Adachi Y, Taketani S, Iwasaki M, Koike-Kiriyama N, Shigematsu A, Shi M, Yanai S, Yoshioka K, Kamiyama Y, and Ikehara S: FKBP51 expressed by both normal epithelial cells and adenocarcinoma of colon suppresses colorectal adenocarcinoma. *Cancer Invest.* 26: 385-390, 2008.

44. Shigematsu A, Adachi Y, Matsubara J, Mukaide H, Koike-Kiriyama N, Minamino K, Shi M, Yanai S, Imamura M, Taketani S, and Ikehara S: Analyses of expression of cytoglobin by immunohistochemical studies in human tissues. *Hemoglobin* 32: 287-296, 2008.

45. Song C, Hisha H, Wang X, Li Q, Li M, Cui W, Guo K, Okazaki S, Mizokami T, Kato J, Cui Y, Feng W, Zhang Y, Shi M, Inaba M, Fan H, and Ikehara S: Facilitation of hematopoietic recovery by bone grafts with intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Immunobiology* 213: 455-468, 2008.

46. Li M, Kim DH, Tsenovoy PL, Peterson SJ, Rezzani R, Rodella LF, Aronow WS, Ikehara S and Abraham NG: Treatment of obese diabetic mice with an heme oxygenase inducer reduces visceral and adiposity, increase adiponectin levels and improves insulin sensitivity and glucose tolerance. *Diabetes* 57: 1526-1535, 2008.

47. Iwai H, Baba S, Omae M, Lee S, Yamashita, and Ikehara S: Maintenance of systemic immune functions prevents accelerated presbycusis. *Brain Res.* 1208: 8-16, 2008.

48. Peterson SJ, Drummond G, Kim DH, Li M, Kruger AL, Ikehara S and Abraham NG: L-4F treatment reduces adiposity, increases adiponectin levels and improves insulin sensitivity in obese mice. *J. Lipid Res.* 49: 1658-1669, 2008.

49. Okazaki S, Hisha H, Mizokami T, Takaki T, Wang X, Song C, Li Q, Kato J, Kamiyama Y, and Ikehara S: Successful acceptance of adult liver allografts by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Stem Cells Dev.* 17: 629-639, 2008.

50. Kato J, Hisha H, Wang X, Mizokami T, Okazaki S, Li Q, Song C, Maki M, Hosaka N, Adachi Y, Inaba M, and Ikehara S: Contribution of neural cell adhesion molecule (NCAM) to

hemopoietic system in monkeys. *Ann. Hematol.* 87: 797-807, 2008.

51. Shi M, Adachi Y, Sgigematsu A, Koike-Kiriyama N, Feng W, Yanai S, Yunze C, Lian ZX, Li J, and Ikehara S: Intra-bone marrow injection of donor bone marrow cells suspended in collagen gel retains injected cells in bone marrow, resulting in rapid hemopoietic recovery in mice. *Stem Cells* 26: 2211-2216, 2008.

52. Tatsumi K, Otani H, Sato D, Enoki C, Iwasaka T, Imanura H, Taniuchi S, Kaneko K, Adachi Y, and Ikehara S: Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circ. J.* 72: 1351-1358, 2008.

53. Umeda M, Kushida T, Sasai K, Asada T, Oe K, Sakai D, Mochida J, Ikehara S, and Iida H: Activation of rat nucleus pulposus cells by coculture with whole bone marrow cells collected by the perfusion method. *J. Orthop Res.* 27: 222-228, 2008.

54. Koike-Kiriyama N, Adachi Y, Iwasaki M, Amou Y, Shigematsu A, Koike Y, Minamino K, Mukaide H, Shi M, Yanai S, Matsumura M, and Ikehara S: High mortality rate of (NZW x BXXSB)F1 mice induced by administration of lipopolysaccharide attributes to high production of tumour necrosis factor- α by increased numbers of dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 154: 285-293, 2008.

55. Cui L, Yoshioka Y, Suyari O, Kohno Y, Zhang X, Adachi Y, Ikehara S, Yoshida T, and Taketani M: Relevant expression of drosophila heme oxygenase is necessary for the normal development of insect tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 1156-1161, 2008.

56. Takaki T, Hosaka N, Miyake T, Cui W, Nishida T, Inaba M, and Ikehara S: Presence of donor-derived thymic epithelial cells in [B6 \rightarrow MRL/lpr] mice after allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation (IBM-BMT). *J. Autoimmun.* 31: 408-415, 2008.

57. Mizokami T, Hisha H, Okazaki S, Takaki T, Wang XL, Song CY, Li Q, Kato J, Hosaka N, Inaba M, Kanzaki H, and Ikehara S: Preferential expansion of human umbilical cord blood-derived CD34-positive cells on major histocompatibility complex-matched amnion-derived mesenchymal stem cells. *Haematologica* 94:618-628, 2009.

58. Kushida T, Ueda Y, Umeda M, Oe K, Okamoto N, Iida H, Abraham NG, Gashing ME, and Ikehara S: Allogeneic intra-bone marrow transplantation prevents rheumatoid arthritis in SKG/Jcl mice. *J. Autoimmun.* 32: 216-222, 2009.

59. Ikehara S: Stem cell transplantation for autoimmune diseases: What can we learn from

experimental models? *Autoimmunity* 41: 563-569, 2008.

60. Miyake T, Hosaka N, Cui W, Nishida T, Takaki T, Inaba M, Kamiyama Y, and Ikehara S: Adult thymus transplantation with allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation from same donor induces strong graft-versus-tumor effects with mild graft-versus-host reaction with high thymopoiesis. *Immunology* In press.

61. Nishida T, Hosaka N, Takaki T, Miyake T, Cui W, Inaba M, Kinoshita H, Matsuda T, and Ikehara S: Allogeneic intra-BM-BMT plus adult thymus transplantation from same donor has benefits for long-term survival even after sublethal irradiation or low-dose BM cell injection. *Bone Marrow Transplant.* In press.

62. Petrini M, Pacini S, Trombi L, Fazzi R, Montali M, Ikehara S, and Abraham NG: Identification and purification of mesodermal progenitor cells (MPCs) from human adult bone marrow. *Stem Cells Dev.* In press.

63. Trombi L, Pacini S, Montali M, Fazzi R, Chiellini F, Ikehara S, and Petrini M: Selective culture of mesodermal progenitor cells (MPCs). *Stem Cell Dev.* In press.

64. Ikehara S: Intra-bone marrow-bone marrow transplantation: A new strategy for age-associated osteoporosis. *US Musculoskeletal Review.* In press.

65. Ikehara S: Most diseases originate from defects in bone marrow – A new therapy for replacing abnormal hemopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) with normal ones-. *Current Stem Cell Research & Therapy.* In press.

66. Ikehara S: A new BMT method for stem cell disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences.* In press.

67. Ikehara S: A revolutionary BMT method. *World Scientific Publishing.* In press.

68. Ikehara S: The future of stem cell transplantation in autoimmune disease. *Allergy and Immunology.* In press.

69. Tokuyama Y, Adachi Y, Minamino K, Shintaku H, Okigaki M, Takaki T, Hayashi K, Kitajima A, Koike N, Shima C, Imai Y, Shi M, Yanai S, and Ikehara S: Abnormal distribution of dendritic cells in (NZW x BXXSB)F1 mice. *Autoimmunity* In press.

70. Yanai S, Adachi Y, Fujisawa Jun-Ichi, Jiang Shiwen, Okigaki M, Shi M, Shima C, Imai Y, Kwon A-Hon, and Ikehara S: Anti-tumor effects of fusion cells of type 1 dendritic cells

and Meth A tumor cells using hemagglutinating virus of Japan-envelope. Int. J. Oncol. In press.