

## Оптимизация экспериментальных моделей заболевания лейкозом у человека (обзор литературы)

Д.Д. Панков<sup>1,2</sup>, А.Г. Румянцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва;

<sup>2</sup>Мемориальный онкологический центр им. Слоуна-Кеттеринга, Нью-Йорк

**Контакты:** Дмитрий Дмитриевич Панков [pankovd@mskcc.org](mailto:pankovd@mskcc.org)

Данный обзор литературы посвящен актуальной проблеме оценки перспективности иммунотерапии, в том числе антигенспецифической клеточной терапии, при помощи животных моделей. В обзоре рассматриваются разные группы животных моделей, существующих на данный момент, и описываются методы создания этих моделей от разных линий иммунодефицитных мышей до нескольких вариантов приживления опухолевых клеток в организм животного. В обзоре затрагиваются темы возможного изучения стволовых опухолевых клеток с использованием мышинных моделей для лечения лейкоза при помощи адоптивной клеточной терапии, в том числе WT1. Затрагивается вопрос миграции, пролиферации человеческих лейкозных клеток в разных линиях мышей с разной степенью иммунодефицита. Предлагается сравнивать мышиную модель по иммунодефициту с клинической ситуацией у человека после курса химиотерапии, из этого следует оценка возможной эффективности иммунотерапии.

**Ключевые слова:** иммунотерапия, антигенспецифическая клеточная терапия, животные модели иммунодефицитных мышей, NOD/SCID, NSG, WT1

### Optimization of experimental human leukemia models (review)

D.D. Pankov<sup>1,2</sup>, A.G. Romyantsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow;

<sup>2</sup>Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA

Actual problem of assessing immunotherapy prospects including antigen-specific cell therapy using animal models was covered in this review. Describe the various groups of currently existing animal models and methods of their creating – from different immunodeficient mice to several variants of tumor cells engraftment in them. The review addresses the possibility of tumor stem cells studying using mouse models for the leukemia treatment with adoptive cell therapy including WT1. Also issues of human leukemia cells migration and proliferation in a mice with different immunodeficiency degree are discussed. To assess the potential immunotherapy efficacy comparison of immunodeficient mouse model with clinical situation in oncology patients after chemotherapy is proposed.

**Key words:** immunotherapy, antigen-specific cell therapy, animal models, immunodeficient mice, NOD/SCID, NSG, WT1

Значительные шаги, сделанные в направлении понимания молекулярной основы онкогенеза, позволили наметить, а в ряде случаев и реализовать дифференцированные методы лечения этой патологии, проецирующиеся на молекулярный уровень, включая клеточную терапию [1]. Однако многие биологически активные средства, которые при испытаниях *in vitro* позволяли надеяться на заметный лечебный эффект, оказываются неэффективными при весьма затратных дальнейших клинических испытаниях, что подчеркивает значимость выбора оптимальной экспериментальной модели заболевания у человека при исследованиях *in vivo*. Особенно остро стоит вопрос об оптимальном, методически оправданном выборе преclinical экспериментальной модели для тестирования способов лечения онкологических заболеваний, планируемых для использования в детской практике, так как клинические исследования лекарственных препаратов у детей во многих странах ограничены или запрещены. А потребность в новых эффективных и малотоксичных препаратах, особенно когда

речь идет об онкологии, тем более лейкозе, очень высока [2, 3]. Одним из примеров такой терапии может быть антигенспецифическая адоптивная клеточная терапия, которая активно развивается на данный момент. Поэтому работа с преclinical экспериментальной моделью может дать результаты, которые могут помочь в ближайшем будущем с выбором приоритетного метода лечения в клинике [4]. Мышиные модели играют особенно важную роль для оценки эффективности иммунотерапии перед ее использованием в клинических условиях, таких как, например, адоптивная терапия WT1 Т-клетками для лечения лейкоза.

За последние десятилетия приживление человеческих лейкозных клеток мышам с разной степенью дефицита иммунитета проявило себя как очень эффективный инструмент в изучении патогенеза лейкоза. Мышиные модели могут быть в будущем одним из способов прогнозирования эффективности конкретного метода лечения лейкоза [5]. Это связано с рядом принципиальных обстоятельств:

1) схожесть функционирования костного мозга мышей и человека [6];

2) мышинная модель позволяет размножить опухолевые клетки *in vivo* для их дальнейшего изучения [7];

3) после приживления клеток острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) или острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) в мышинной модели можно наблюдать все клинические признаки, свойственные развитию заболевания у человека [8];

4) существует достаточное разнообразие мышинных моделей, отличающихся наличием или отсутствием цитокинов и макрофагов, Т- и В-лимфоцитов и натуральных киллеров (НК-клеток) [9].

Более 25 лет назад у мышей была обнаружена мутация, которая приводит к тяжелому комбинированному иммунодефициту (SCID) [10], что позволило производить им трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) без осложнения в виде отторжения трансплантата. Трансплантация таким мышам лейкозных клеток и лейкозных клеточных линий позволила наблюдать у них динамику развития лейкоза, схожую с человеческой [11, 12]. Однако остаточные иммунные механизмы ограничивали пределы роста опухоли. Тогда было осуществлено скрещивание мышей SCID с особями линии nonobese diabetic (NOD/Lt). В результате была генерирована новая линия мышей NOD/SCID с улучшенной приживаемостью опухолевых клеток (NOD/LtSz-scid/scid) [13].

Хотя трансплантация NOD/SCID мышам клеток ОЛЛ позволила создать модель распространения лейкоза, схожую с аналогичными процессами у человека, работа по совершенствованию данной модели заболевания была продолжена [14, 15]. Линия мышей (NOD/SCID) была модифицирована путем подавления роста и развития НК-клеток и за счет создания дефекта  $\gamma$ -цепей рецептора интерлейкина 2, обозначенная как линия NSG. У таких особей оказалось обеспечено почти 100 % приживление опухоли, и *in vivo* стала возможной дифференцировка трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток, в связи с почти полным отсутствием мышинных иммунных клеток. Иммунодефицитные мыши являются оптимальной моделью для исследования эффективности иммунотерапии. Это позволяет оценивать действие препарата, почти полностью игнорируя вспомогательное участие иммунной системы организма хозяина [16].

Метод приживления мышам лейкоэмических клеток пациента после курса химиотерапии обладает определенной прогностической ценностью [17]. Однако он не является абсолютно надежным в прогностическом плане [18]. При разработке терапевтического подхода к лечению лейкоза у конкретного пациента, при сравнительной оценке методических приемов моделирование на экспериментальных животных может быть очень полезным.

При использовании мышинной модели как инструмента для прогноза развития и исхода лейкоза у пациента необходимо учитывать, что мы следим за развитием процесса с самого начала, т. е. от момента введения нескольких миллионов лейкозных клеток до их экспансии до десятков и сотен миллионов. Такая же динамика может наблюдаться у пациента после спровоцированного курсом химиотерапии состояния иммунодефицита. Поэтому считается, что мышинная модель развития опухоли сопоставима по иммунодефициту с ситуацией, возникающей у человека, получившего химиотерапию. Однако необходимо учитывать, что это сопоставление не является адекватным по клону опухолевых клеток.

При обсуждении вопроса о целесообразности проведения конкретному пациенту антигенспецифической терапии необходимо знать: являются ли клетки, презентующие конкретный антиген, стволовыми опухолевыми клетками, которые обеспечивают поддержание опухолевой популяции. Если это так, то при помощи антигенспецифической терапии принципиально возможно остановить или значительно замедлить рост опухоли, которая является следствием патологического процесса, ведущего к возникновению новообразованной ткани с генетически измененным аппаратом клеток и нарушенной регуляцией их роста. При этом очень важно иметь в виду, что в опухоли имеются собственные стволовые клетки [19]. Их отличает нарушение принципа плюрипотентности [20]. Опухолевые стволовые клетки способны к самообновлению. Один из наиболее вероятных факторов, который может быть ассоциирован с этим процессом, это — экспрессия внутриклеточного белка WT1 [21–24].

Наиболее благоприятной для применения антигенспецифической терапии является ситуация, возникающая после активного и радикального (например такого, как химиотерапия) лечения больного лейкозом, когда зрелые клетки погибли, а рост новой опухоли (рецидив) может начаться за счет стволовых опухолевых клеток. И если антиген WT1 экспрессируется в достаточном количестве в этих клетках, то они становятся подходящей мишенью для антигенспецифической иммунотерапии [4, 25]. Так, в работах группы Е. Дубровиной, O'Reilly было показано, что антигенспецифичный лизис опухолевых клеток эффекторными WT1-специфичными Т-клетками коррелирует с пропорцией клеток, экспрессирующих этот белок в опухолевой популяции клеток [4, 20, 25].

Для изучения действия антигенспецифической терапии на стволовые опухолевые клетки необходима мышинная модель, в которой влияние НК-клеток будет незначительным, как это имеет место, например, в NSG-линии. Наличие мышей линии NSG, в организме которых подавлена активность НК-клеток, может дать новый импульс для исследований *in vivo* по такой еще мало изученной и весьма перспективной

теме, как антигенспецифическая иммунотерапия, направленная на опухолегенные стволовые клетки.

Исследования *in vivo* показали, что уровень приживления опухоли и ее развития на мышинной модели связан с агрессивностью опухоли. Приживление опухоли, трансплантированной мышам от пациента с ОЛЛ после химиотерапии, идет менее интенсивно, если у донора имеет место длительная ремиссия и благоприятное течение заболевания [14].

Биологическое и клиническое течение заболевания в мышинной модели зависит не только от вида мыши, но и от тактики получения клеток из костного мозга: используют свежеполученные клетки, т. е. забранные напрямую от пациента, которые приживаются быстрее, или размороженные, или прошедшие генную модификацию, представляющую собой процесс, требующий нахождения клеток несколько дней в пробирке для дальнейшего их использования в животных моделях [26–29].

Способ введения клеток определяет скорость приживления. При этом различают несколько способов введения клеток в организм мыши:

а) подкожное введение, особенностью которого является то, что можно достаточно быстро увидеть, как приживляется трансплантат, и определять его размеры по диаметру подкожного образования. Но при этом опухоль находится в неспецифичном для себя микроокружении, что может приводить к ложнопозитивному результату [16], т. е. опухоль может расти в подкожной клетчатке агрессивнее, нежели в естественном для себя окружении. Кроме этого, было продемонстрировано, что подкожное введение не приводит к метастатическому течению заболевания [16], в отличие от естественного развития онкопроцесса;

б) при внутривенном введении опухолевые клетки сначала устремляются в легкие, потом направляются в печень, где могут оставаться или полностью оттуда уйти, но основным моментом является активизация хоуминг-эффекта, т. е. миграция лимфоцитов в лимфатические узлы и костный мозг, где начинается их активная продукция и развитие заболевания [30];

в) введение напрямую в костный мозг обеспечивает самый быстрый способ приживления по сравнению с системным введением [31].

При оценке значения состояния самой мышинной особи для приживления лейкоза обращают внимание на следующее:

а) облучение иммуносупрессивных мышей перед трансплантацией может улучшить приживление за счет освобождения свободного пространства в костном мозге. Но, согласно последним данным, незначительно [15], к тому же в случае с ОЛЛ облучение может нарушать хоуминг-эффект лейкозных клеток [32];

б) остаточные мышинные клетки могут повлиять на приживление человеческих клеток на уровне продукции цитокинов [33];

в) у мышей, которые были трансдуцированы человеческими факторами роста, отмечается лучшая приживаемость клеток ОМЛ [34–36];

г) возраст мыши влияет на скорость и уровень приживления трансплантата. Чем моложе особь, тем больше шансов на приживление [37]. Новорожденные мыши используются для того, чтобы уменьшить влияние собственных мышинных иммунных клеток [38];

д) выбор мышинной линии. Сравнение мышинных линий NOD/SCID и NSG показал, что в мышинной группе NOD/SCID ОМЛ-образцы из криопрезервации, которые были трансплантированы напрямую в костный мозг, дали более быстрое приживление и на более продолжительный период [17]. Однако в случае с NSG мышами ситуация совсем другая, там имела место корреляция исходов у пациентов-доноров и исходов развития заболевания у мыши [9, 17].

В зависимости от цели исследования могут быть использованы разные мышинные модели. Если целью является экспансия клеток или исследование биологических свойств опухоли, то необходимо использовать модель, которая подразумевает наименее резистентный рост и наиболее удобное место введения клеток. Если целью стоит создание клинической ситуации у пациента, то необходимо осторожно и внимательно относиться ко всем факторам, начиная от выбора мышей и заканчивая способом введения опухолевых клеток.

Агрессивный рост опухоли и возможности для ее приживления в живом организме дают возможность не только для параклинических исследований, но также и для изучения биологических основ опухолевого процесса. На примере мышинных моделей мы можем проводить антигенспецифическую терапию, рассчитанную на атаку небольшого числа клеток, несущих на себе конкретный антиген, но если этот антиген находится на стволовой опухолевой клетке, то возможно подавить рост опухоли целиком [39]. Всегда считалось, что стволовые клетки ОЛЛ — это фенотипически незрелые и редко встречающиеся клетки, что было видно на примере NOD/SCID мышей; но в случае с NSG мышами было показано, что более зрелые и более часто встречающиеся клетки также обладают лейкогенным потенциалом [38, 40, 41].

Существуют факторы, которые заметно уменьшают возможность использования мышинных моделей в преclinical исследованиях. Например, иммуномодулирующие препараты не могут быть использованы при проведении исследований на иммунодефицитных мышях, так как их эффект может быть доказан только в иммунокомпетентном организме. Другим ограничением является факт того, что стромальное окружение опухоли является не человеческим, а мышинным. У препаратов, которым требуется наличие специфических человеческих факторов, смешение человеческих и мышинных факторов может привести к недостоверным результатам. Самой большой проблемой

является фундаментальная разница между метаболизмом человека и мыши. Это ярко продемонстрировано на примере талидомида [42]. Продукты его превращения в организме человека и мыши существенно различаются: будучи абсолютно безвредным у мышей, у человека талидомид приводит к повреждению цепей ДНК и множественным врожденным аномалиям. Поэтому создание новых «человекоподобных» мышинных моделей, в которых присутствие человеческих клеток и факторов максимально увеличено, является очень важной задачей.

В своих исследованиях Nomura Inaba из Химиотерапевтического центра в Токио (Япония) показал, что большое количество ложнопозитивных результатов, полученных при тестировании химиопрепаратов на мышах, связано с тем, что доза лекарственного средства, которую можно ввести мыши, в 4–5 раз выше, чем та, что можно дать человеку [43–46].

Скептицизм, связанный с результатами, полученными в исследованиях на мышах, направленных на использование новых лекарств в клинических испытаниях, связан с тем, что некоторые препараты, оказавшиеся эффективными на мышах, «не работают» у людей. Однако надо учитывать тот факт, что пациенты, которые участвуют в клинических испытаниях, чаще всего страдают далеко зашедшим, активно метастазирующим, иногда толерантным к стандартной химиотерапии онкологическим заболеванием, в то время как в экспериментах на мышах лечение начинается через 4–7 дней после трансплантации опухолевых клеток. Таким образом, терапия направлена на весьма небольшой по объему аналог опухоли человека, еще не успевший активно метастазировать и слабо организованный [16]. Следовательно, речь идет о попытке сопоставить эффективность лечения на раз-

личных стадиях заболевания, что может, соответственно, обусловить несоответствие результатов.

Таким образом, задача выбора оптимальной экспериментальной модели заболевания лейкозом у человека с целью разработки эффективных методов лечения на клеточном и молекулярном уровне является очень важной и актуальной. От ее решения зависит проблема повышения эффективности преคลินิกического этапа тестирования выбранной для пациента терапии.

Есть все основания считать, что на сегодняшний день именно мышинные модели заболевания лейкозом являются основой для преклинических исследований и прогнозирования эффективности выбранного метода лечения в каждом индивидуальном случае. Существующее разнообразие мышинных моделей позволяет использовать ту из них, которая в большей степени соответствует поставленной в каждом конкретном случае задаче.

При использовании мышинной модели как инструмента прогнозирования развития и исхода опухоли у пациента необходимо учитывать, что при создании этой модели животному пересаживается минимальное необходимое для приживания количество клеток, и в результате имеет место начальный процесс развития опухоли. Поэтому мы считаем, что мышинная модель развития опухоли более всего сопоставима с ситуацией, возникающей у человека, получившего химиотерапию.

Мышиная линия NSG может служить инструментом для оценки эффективности и перспективности антигенспецифической терапии, проводимой элиминации стволовых опухолевых клеток.

Мышиная модель может быть использована для изучения и понимания биологических характеристик не только лейкозов, но и при разработке лечения больных многими другими онкологическими заболеваниями.

## ЛИТЕРАТУРА

- Maschan A.A., Rumyantsev A.G. Transplantation of hematopoietic stem cells in children. Acad Mia, 2003.
- Houghton P.J., Adamson P.C., Blaney S. et al. Testing of new agents in childhood cancer preclinical models: meeting summary. Clin Cancer Res 2002;8:3646–57.
- Pui C.H., Relling M.V., Campana D., Evans W.E. Childhood acute lymphoblastic leukemia. Rev Clin Exp Hematol 2002;6:161–80; discussion 200–2.
- Dobrovina E.S., Dobrovin M.M., Sangyull L. et al. *In vitro* stimulation with WT1 peptide-loaded Epstein-Barr virus-positive B cells elicits high frequencies of WT1 peptide-specific T cells with *in vitro* and *in vivo* tumoricidal activity. Clinical Cancer Research 2004;10:7207–19.
- Gutmann D.H., Hunter-Schaedle K. and Shannon K.M. Harnessing preclinical mouse models to inform human clinical cancer trials. J Clin Invest 2006;116(4):847–52.
- Boxio R., Bossenmeyer-Pourie C., Steinckwich N. et al. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. J Leukoc Biol 2004;75(4):604–11. Epub 2003 Dec 23.
- Singh P., Hu P., Hoggatt J. et al. Expansion of bone marrow neutrophils following G-CSF administration in mice results in osteolineage cell apoptosis and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. Leukemia advance online publication 1 June 2012.
- Baersch G., Möllers T., Hötte A. et al. Good engraftment of B-cell precursor ALL in NOD-SCID mice. Klin Padiatr 1997;209(4):178–85.
- Meyer L.H., Debatin K.M. Diversity of human leukemia xenograft mouse models: implications for disease biology. Cancer Res 2011;71:7141–4. Published OnlineFirst November 16, 2011.
- Bosma G.C., Custer R.P., Bosma M.J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature 1983;301:527–30.
- Kamel-Reid S., Letarte M., Sirard C. et al. A model of human acute lymphoblastic leukemia in immunodeficient SCID mice. Science 1989;246:1597–600.
- Lücking-Famira K.M., Daniel P.T., Möller P. APO-1 (CD95) mediated apoptosis in human T-ALL engrafted in SCID mice. Leukemia 1994;8:1825–33.

13. Shultz L.D., Schweitzer P.A., Christianson S.W. et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 1995;154:180–91.
14. Lock R.B., Liem N., Farnsworth M.L. et al. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. *Blood* 2002;99:4100–8.
15. Yan Y., Salomon O., McGuirk J. et al. Growth pattern and clinical correlation of subcutaneously inoculated human primary acute leukemias in severe combined immunodeficiency mice. *Blood* 1996 Oct 15;88(8):3137–46.
16. Kerbel R.S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived – but they can be improved. *Cancer Biol Ther* 2003;2:134–9.
17. Schmitz M., Breithaupt P., Scheidegger N. et al. Xenografts of highly resistant leukemia recapitulate the clonal composition of the leukemogenic compartment. *Blood* 2011;118:1854–64.
18. Notta F., Mullighan C.G., Wang J.C. et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature* 2011 Jan 20;469(7330):362–7.
19. Allegrucci C., Wu Y.Z., Thurston A. et al. Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome. *Hum Mol Genet* 2007; 16:1253–68.
20. Knoepfler P.S. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* 2009 May;27(5):1050–6.
21. Kanato K., Hosen N., Yanagihara M. et al. The Wilms' tumor gene WT1 is a common marker of progenitor cells in fetal liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326:836–43.
22. Sugiyama H. WT1 (Wilms' Tumor Gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 2010;40(5):377–87.
23. Oji Y., Ogawa H., Tamaki H. et al. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 1999 Feb;90(2):194–204.
24. Abbruzzese J.L., Evans D.B., Willett C.G. et al. *Gastrointestinal Oncology* 2004. Oxford University press. Pp. 689–90.
25. Doubrovina E., Carpenter T., Pankov D. et al. Mapping of novel peptides of WT-1 and presenting HLA alleles that induce epitope-specific HLA-restricted T cells with cytotoxic activity against WT-1(+) leukemias. *Blood* 2012 Aug 23;120(8): 1633–46.
26. Pearce D.J., Taussig D., Zibara K. et al. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. *Blood* 2006;107:1166–73.
27. Meyer L.H., Eckhoff S.M., Queudeville M. et al. Early relapse in all is identified by time to leukemia in NOD/SCID mice and is characterized by a gene signature involving survival pathways. *Cancer Cell* 2011;19:206–17.
28. Malaise M., Neumeier M., Botteron C. et al. Stable and reproducible engraftment of primary adult and pediatric acute myeloid leukemia in NSG mice. *Leukemia* 2011;25:1635–9.
29. Yurasov S.V., Flasshove M., Vladimirovskaya E.B. et al. Low density mononuclear cells from umbilical cord blood as a target for retrovirally mediated gene transfer. *Russ J Immunol* 1996 Dec;1(1):35–40.
30. Fukuda S., Abe M., Onishi C. et al. Survivin selectively modulates genes deregulated in human leukemia stem cells. *J Oncol* 2011;2011:946936. doi: 10.1155/2011/946936. Epub 2010 Dec 23.
31. Mazurier F., Doedens M., Gan O.I., Dick J.E. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 2003;9:959–63.
32. Spiegel A., Kollet O., Peled A. et al. Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood* 2004;103:2900–7.
33. Manz M.G. Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity* 2007;26:537–41.
34. Wunderlich M., Chou F.S., Link K.A. et al. AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCIDIL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia* 2010;24:1785–8.
35. Bonnet D., Bhatia M., Wang J.C. et al. Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:203–9.
36. Feuring-Buske M., Gerhard B., Cashman J. et al. Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors. *Leukemia* 2003;17:760–3.
37. Ballen K.K., Valinski H., Greiner D. et al. Variables to predict engraftment of umbilical cord blood in to immunodeficient mice: usefulness of the non-obese diabetic – severe combined immunodeficient assay. *Br J Haematol* 2001;114:211–8.
38. Kong Y., Yoshida S., Saito Y. et al. CD34 $\beta$ CD38 $\beta$ CD19 as well as CD34 $\beta$ CD38-CD19 $\beta$  cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 2008;22(6): 1207–13.
39. Alberta J.A., Springett G.M., Rayburn H. et al. Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis. *Blood* 2003 Apr 1;101(7):2570–4.
40. Cox C.V., Evely R.S., Oakhill A. et al. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* 2004;104:2919–25.
41. le Viseur C., Hotfilder M., Bomken S. et al. In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell* 2008;14:47–58.
42. Parman T., Wiley M.J., Wells P.G. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 1999;5:582–5.
43. Inaba M., Kobayashi T., Tashiro T., Sakurai Y. Pharmacokinetic approach to rational therapeutic doses for human tumor-bearing nude mice. *Jpn J Cancer Res* 1988 Apr;79(4):509–16.
44. Tashiro T., Inaba M., Kobayashi T. et al. Responsiveness of human lung cancer/nude mouse to antitumor agents in a model using clinically equivalent doses. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24(3):187–92.
45. Inaba M., Kobayashi T., Tashiro T. et al. Evaluation of antitumor activity in a human breast tumor/nude mouse model with a special emphasis on treatment dose. *Cancer* 1989 Oct 15;64(8):1577–82.
46. Maruo K., Ueyama Y., Inaba M. et al. Responsiveness of subcutaneous human glioma xenografts to various antitumor agents. *Anticancer Res* 1990 Jan–Feb;10(1):209–12.