

ヒト骨髓細胞由来間葉系幹細胞及び骨芽細胞による CD34陽性造血前駆細胞の増幅

柴 崎 康 彦

新潟大学大学院医歯学総合学研究科

機能再検医学講座血液学分野

(主任: 相澤義房教授)

**Human Osteoblasts and Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow
Support the Expansion of CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells**

Yasuhiko SIBASAKI

Hematology, Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

要 旨

【背景】近年さまざまな幹細胞において、増殖・自己複製に特徴的な場があることが明らかにされつつあり、その特徴的な場はニッチと呼ばれている。マウスの造血幹細胞ではニッチとして骨芽細胞や血管内皮細胞が注目を浴びておらず、いくつかの接着因子やケモカインの関与についての報告がなされている。しかしながらヒトにおいては造血幹細胞ニッチについての詳細な検討はなされていない。そこで今回我々はヒト骨髓細胞由来間葉系幹細胞及び骨芽細胞による骨髓由来ヒト CD34 陽性造血前駆細胞の増幅効果について検討した。

【方法と結果】正常ヒト骨髓より骨髓単核球を分離し専用の medium を用いて間葉系幹細胞及び骨芽細胞を培養した。また正常ヒト骨髓由来単核球より CD34 陽性細胞を分離し間葉系幹細胞及び骨芽細胞との共培養を 7 日間行った。さらに、PET メンブレンインサートを用いて非接触系の培養を行い接着因子の関与についても検討した。間葉系幹細胞との共培養では、Feeder free のコントロール群に比べ有意に CD34 陽性細胞の増殖が認められた。一方、骨芽細胞との共培養においても、コントロール群に比べ有意に CD34 陽性細胞の増殖が認められた。間葉系幹細胞と骨芽細胞との共培養においては CD34 陽性細胞の増殖に有意な差は認められなかった。一方で CD34 陽性細胞率については、間葉系幹細胞との共培養、骨芽細胞との共培養のいずれにおいても feeder free のコントロールと比べて有意差を認めなかった。非接触系においては接触系の培養に比べ間葉系幹細胞及び骨芽細胞との共培養による増殖効率が低下した。しかし feeder free のコントロールに比べ特に骨芽細胞との共培養において CD34 陽性細胞の増殖を認めた。

Reprint requests to: Yasuhiko SIBASAKI
Department of Internal Medicine
Shibata General Hospital
4-5-48 Ote-cho,
Shibata 957-8588 Japan

別刷請求先: ☎957-8588 新発田市大手町 4-5-48
新潟県立新発田病院内科 柴崎康彦

【結語】間葉系幹細胞、骨芽細胞との共培養において、共に CD34 陽性造血前駆細胞の増殖を促進することが確認された。このことは間葉系幹細胞、骨芽細胞による造血前駆細胞の増殖において正の制御機構が存在することが示唆された。また非接触系においてもコントロールと比べ増殖が促進されたことから CD34 陽性造血前駆細胞の増殖には接着因子からのシグナルと共に間葉系幹細胞や骨芽細胞が産生するケモカインなどの液性因子が関与している可能性が考えられた。

キーワード：造血幹細胞、ニッチ、骨芽細胞、間葉系幹細胞、ヒト CD34 陽性造血前駆細胞

はじめに

造血幹細胞 (hematopoietic stem cells) は自己複製能 (self-renewal) を持ち、全ての血液細胞に分化しうる (multi-potential) 能力を持つ。表面抗原による造血幹細胞の単離は多くの研究者によって試みられてきた。現在マウスにおいては表面抗原により c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 Lineage マーカー陰性の KSL 細胞が造血幹細胞にほぼ相当する細胞であることが示されているが¹⁾²⁾、ヒトにおいては KSL 細胞に該当する造血幹細胞を同定する有用な表面マーカーは明らかにされていない。CD34 陽性造血前駆細胞は比較的幹細胞に近いとされており臨床的にも応用されているが、自己複製能を持つ血液幹細胞はその一部を占めることに過ぎないことが明らかにされている。また、DNA 染色色素である Hoechst33342 にて細胞を染色し FACS にて二つの励起光を二次元に展開すると Hoechst 弱陽性の細胞集団が認められる。この集団を Side Population cell (SP 細胞) とよび、マウス KSL 細胞中の SP 細胞は quiescent な状態にあることが示されている³⁾。KSL SP 細胞は未分化能を維持したままの状態であると考えられ、分化・増殖を抑制する何らかのシグナルによって制御されていると考えられる。

近年ポリコーム遺伝子群 (PcG) が自己複製能に重要な役割を果たしていることが報告されている。マウスの報告では特に Bmi-1 が造血幹細胞の自己複製に最も重要な機能を有することが明らかになってきており Bmi-1 強制発現マウスにおいて自己複製能の増強を認めたとの報告がある⁴⁾⁵⁾。

造血幹細胞以外についてもさまざまな幹細胞の

研究が進められており、神経幹細胞や生殖幹細胞、色素幹細胞等が単離されつつある。近年幹細胞の自己複製・維持においてニッチと呼ばれる微小環境の重要性が明らかにされており、神経幹細胞⁶⁾や精子幹細胞⁷⁾等におけるニッチの詳細な研究が進められている。

造血幹細胞に対するニッチとしては骨芽細胞や血管内皮細胞といったストローマ構成細胞が注目されている⁸⁾⁹⁾。骨髄ニッチにおける血液幹細胞の維持、増幅には細胞間 interaction が重要であることがマウスを使った系で示してきた。マウス KSL SP 細胞と骨芽細胞間での Tie2/Angiopoietin-1 のシグナルが KSL SP cell の維持に重要な役割を果たしているとの報告¹⁰⁾¹¹⁾や、N-cadherin, β-catenin 等の接着因子の関与が報告されている¹²⁾。血液幹細胞では Wnt シグナル伝達を活性化すると、自己複製にかかわるとされる HoxB4 遺伝子と Notch1 遺伝子の発現が増大するとの報告がある¹³⁾。骨芽細胞上には Notch ligand である jagged1 が発現しており幹細胞の維持増殖に関わっているとの報告があり⁸⁾¹⁴⁾、Notch1/jagged1 における細胞間シグナル伝達の働きも重要であると考えられている。

一方ケモカインである SDF-1 が CD34 陽性造血前駆細胞の血管への遊走に関わっているとの報告があり、液性因子の関与も考えられている¹⁵⁾。

しかしながらヒトにおいては明確な骨髄造血細胞のニッチは同定されておらず、造血幹細胞のニッチにおける維持機構の詳細なメカニズムは明らかにされていない。骨髄移植時には骨芽細胞も傷害を受けると考えられるにもかかわらず造血は回復してくる。また、骨髄移植後も間葉系細胞は recipient 由来であるとの報告もあり、ヒトにおい

て骨芽細胞や間葉系幹細胞が造血細胞に対してどのような影響を与えていたかは充分に検討されていない。

近年ヒトでの間葉系幹細胞の培養系が確立しつつある。間葉系幹細胞は正常ヒト骨髄中に存在し、多分化能と自己増幅能を持つことが示されており、骨芽細胞、脂肪細胞、神経細胞等に分化することが確認されている¹⁷⁾¹⁸⁾。本研究ではヒト造血システムにおけるニッチの構成細胞を明らかにするため、骨髄細胞よりストローマ構成細胞を *in vitro* で培養し、CD34陽性細胞の維持、増殖支持能を検討した。

対象と方法

骨髓単核細胞の分離

書面によるインフォームドコンセントを行った後、血液学的に正常な成人より胸腔切開術時に肋骨を外科的切除し骨髓液を採取した。また、これとは別に正常成人より同様にインフォームドコンセントを行った後に全身麻酔下で腰骨より骨髓液を採取した。採取した骨髓液はヘパリンを加えた後、RPMI 1640 medium 10ml を加え 15ml falcon tube (Becton Dickinson) 内で Ficoll 5ml 上に乗せ 1500 回転 30 分遠心し骨髓単核球分画 (MNC) を分離した。

間葉系幹細胞の培養

6 well tissue culture dish (iwaki) 上で 1×10^7 /well の MNC を MesenCult™ Basal Medium for Human Mesenchymal Stem Cells (stemcell technologies) 5ml を用いて 14 日～21 日間、37 °C、5 % CO₂ 下で培養した。培養上清は週に 1 回交換し浮遊細胞を除去し接着細胞のみを培養継続した。

培養細胞が間葉系幹細胞であることを確認法として 2.5 % トリプシン EDTA にて 2 分間 37 °C、5 % CO₂ 下で培養しピペッティングにて付着細胞を浮遊させ回収した細胞を CD14PE (BD Biosciences), CD29PE (BD Biosciences), CD34PE (BD Biosciences), CD44FITC (BD

Biosciences), CD45FITC (BD Biosciences) で 30 分染色し Facscan で解析した。

骨芽細胞の培養

6 well tissue culture dish (iwaki) 上で 1×10^7 /well の MNC を Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Stimulatory Kit (stemcell technologies) 5ml を用いて 14～28 日間、37 °C、5 % CO₂ 下で培養した。培養上清は週に 2 回交換し浮遊細胞を除去し接着細胞のみを培養継続した。

培養細胞が骨芽細胞であることの確認法として ALP 染色を行った。

CD34 陽性造血前駆細胞の単離

骨髓単核球を CD34PE 抗体で 30 分染色後 RPMI 1640 medium 10ml を加え 1500 回転 5 分遠心し上清を廃棄した後、PE microbeads (miltenyi Biotec) で 20 分反応させ再度 1500 回転 5 分遠心し上清を廃棄した後 RPMI 1640 medium 2ml に浮遊させ MACS 磁気細胞分離システムにより MS column を用いて分離した。単離は 2 度行った。単離細胞はフローサイトメトリーにて 98 % 以上の純度であることが確認された。

共培養

confluent の間葉系幹細胞及び骨芽細胞上に 1×10^3 の CD34 陽性細胞を加え、10 % FBS 入り RPMI 1640 medium 5ml に、GM-CSF 2ng/ml, IL-3 5ng/ml, IL-6 15ng/ml, Flt3 ligand 50ng/ml, SCF 120ng/ml を添加し一週間培養した。コントロールとして feeder free の状態で 6well tissue culture dish 上に 1×10^3 の CD34 陽性細胞を加え同様の medium で 1 週間培養した。

非接触系の培養は間葉系幹細胞及び骨芽細胞、コントロール上に 0.4 μm の PET メンブレンインサート (Filcon) を乗せその上に CD34 陽性細胞を加え同様に培養した。

共培養後の造血細胞は feeder と接触していたため、2.5 % トリプシン EDTA にて 2 分間 37 °C、5 % CO₂ 下で培養しピペッティングにて feeder 細胞を浮遊させ、feeder 細胞ごと回収した。回

収した細胞は γ ブロック後 CD34PE (BD Biosciences), CD29PE (BD Biosciences) で 30 分染色し Facscan で解析した。

統計学的検定

数値は平均土標準偏差で表し統計学的検定には Student の t-検定を用いた。P < 0.05 を有意とした。

結 果

間葉系幹細胞の培養

培養 14 日以上で紡錘状の形態を持つ confluent な間葉系幹細胞が得られた（図 1）。培養細胞は CD14 陰性, CD45 陰性, CD34 陰性, CD29 陽性, CD44 陽性を示し間葉系幹細胞であることが確認された¹⁹⁾²⁰⁾（図 2）。

骨芽細胞の培養

培養 7 日以降で間葉系幹細胞に比べやや扁平上の形態に変化しつつ骨芽細胞へと分化していく様子が観察された。培養後の細胞は Alp 染色で陽性に染まり骨芽細胞であることが確認された（図 3）。

間葉系幹細胞、骨芽細胞との共培養

培養初期には feeder 細胞内に CD34 陽性細胞が入り込んでいく様子が観察された。その後日数が経つに従って増殖した細胞が feeder 上部にコロニーの様に出てくる様子が認められた。

間葉系幹細胞、骨芽細胞は共に造血前駆細胞に比べ FSC, SSC 共に大きく gate 調整にて造血細胞のみを評価することが可能であった。またこの評価した gate 内の細胞は CD29 陰性, CD45 陽性であることより造血細胞であることを確かめた。

間葉系幹細胞、骨芽細胞との共培養では、共にコントロールに比べ well 中の全血液細胞数の増加を認めた。増幅した全血液細胞に占める CD34 陽性細胞率はコントロールで 23.5 %, 間葉系幹細胞との共培養では 34.0 %, 骨芽細胞との共培養では 35.5 %と共にコントロールに比し増加傾向に

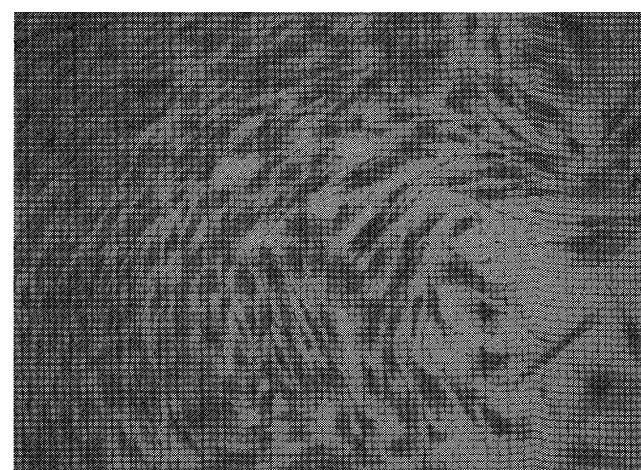


図 1 間葉系幹細胞の形態 (Gimsa 染色)

骨髓单核球を MesenCult™ Basal Medium for Human Mesenchymal Stem Cells (stemcell technologies) を用いて 21 日培養した後、付着細胞を Gimsa 染色し光学顕微鏡で観察 (100 倍) した。紡錘状の細胞形態を持つ間葉系幹細胞が規則正しく増殖している様子が観察された。増殖は well 全体に広がっており confluent な状態であった。

あったが有意差は認めなかった（間葉系幹細胞 p = 0.23, 骨芽細胞 P = 0.13, n = 6）（図 4）。

一方で CD34 陽性細胞数についてはコントロールで 1.3×10^3 , 間葉系幹細胞との共培養で 6.7×10^3 , 骨芽細胞との共培養で 9.2×10^3 と有意に増加を認めた（図 5）（間葉系幹細胞 P < 0.005, 骨芽細胞 P < 0.0005）。間葉系幹細胞と骨芽細胞との間には有意差を認めなかった（P = 0.22）が骨芽細胞との共培養において増加傾向にあった。

非接触系

接触系における間葉系幹細胞、骨芽細胞と共に培養した CD34 陽性細胞に比べ、非接触系における間葉系幹細胞、骨芽細胞との共培養では CD34 陽性細胞数はいずれも減少した。しかしながら、feeder free のコントロールと比べ特に骨芽細胞において CD34 陽性細胞数の増加を認めた（表 1）。接触系、非接触系のコントロールの間には差がなく PET メンブレンの影響は除外された。

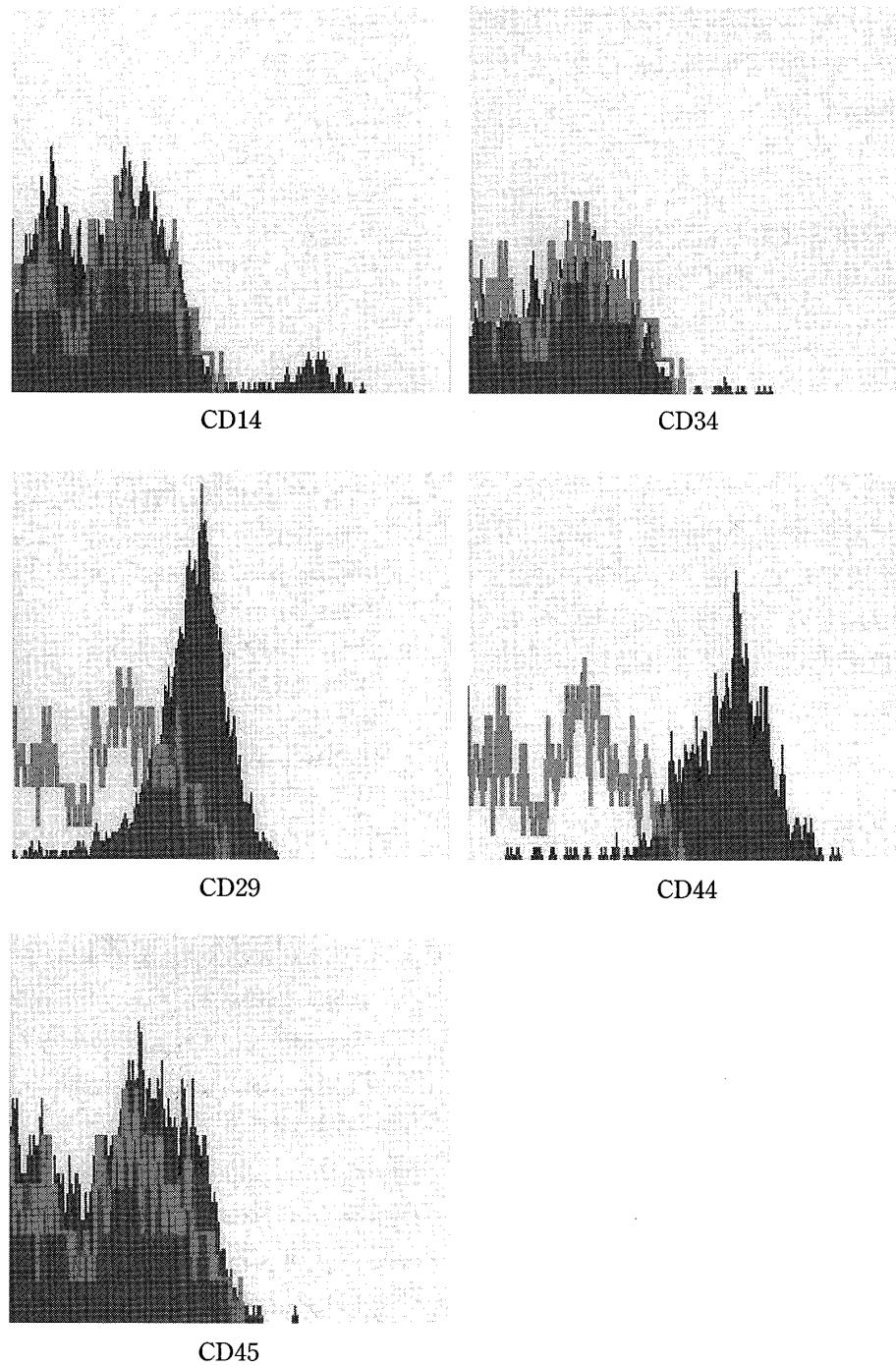


図2 付着細胞のフローサイトメトリー

2.5 %トリプシンEDTAにて2分間37℃, 5%CO₂下で培養しピペッティングにて付着細胞を浮遊させ回収した。回収した細胞はCD14PE (BD Biosciences), CD29PE (BD Biosciences), CD34PE (BD Biosciences), CD44FITC (BD Biosciences), CD45FITC (BD Biosciences)で30分染色しFacscanで解析した。CD14陰性, CD34陰性, CD29陽性, CD44陽性, CD45陰性であり間葉系幹細胞に特徴的な表面抗原を発現していた。

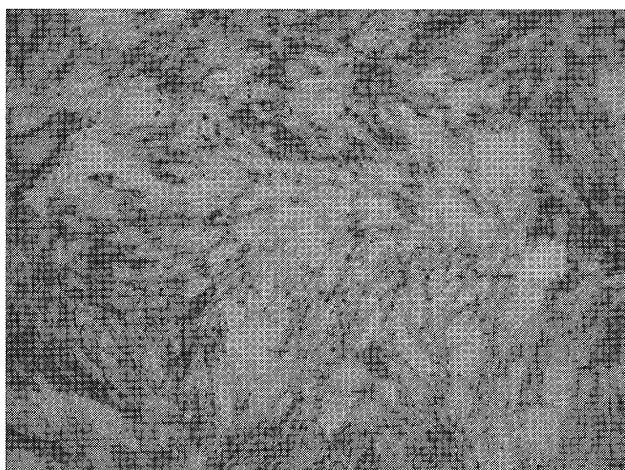


図 3 骨芽細胞 (Alp 染色)

骨髓単核球を Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Stimulatory Kit (stemcell technologies) を用いて 14 日間培養後、付着細胞を ALP 染色し光学顕微鏡で観察した (100 倍)。明らかに間葉系幹細胞とは異なる幅広い細胞質を持ち、複数の細胞が積み重なるように増殖している形態が観察された。付着細胞は ALP 染色で陽性に染まり骨芽細胞であると判断した。

考 察

今回の結果から、ヒト間葉系幹細胞及び骨芽細胞が CD34 陽性造血前駆細胞の増殖を促進することが示された。マウス KSL SP cell においては、骨芽細胞は造血幹細胞の分化、増殖の抑制に関わっていると考えられている¹⁰⁾。マウスの系において骨芽細胞が造血前駆細胞の増殖に関与しているという報告はなく、マウスとヒトとでは骨芽細胞の役割が異なる可能性が示唆された。CD34 陽性造血前駆細胞は造血幹細胞に比べて分化の進んだ細胞と考えるべきであり、本研究における骨芽細胞の働きはマウスにおける KSL SP cell の維持機構とは異なる可能性が考えられた。一つの骨芽細胞が造血幹細胞と造血前駆細胞の両方のニッチとして別な働きをしている可能性、或いは骨芽細胞にも異なる population があり、それぞれが別々に造血幹細胞と造血前駆細胞のニッチとして独立して存在している可能性が考えられる。

間葉系幹細胞が臍帯血由来造血先駆細胞の増幅に関わっているとの報告もあるが²¹⁾、今回の検討で間葉系幹細胞との共培養においても CD34 陽性造血前駆細胞の増殖が促進され、成人においても間葉系幹細胞は CD34 陽性造血前駆細胞の増殖に関わっていることが示された。間葉系幹細胞における接着因子の発現については知見が得られていない。今後間葉系幹細胞における Angiopoietin - 1 や Notch ligand 等の発現についても検討する必要がある。

CD34 陽性細胞率についてはコントロールと間葉系幹細胞、骨芽細胞との共培養との間に有意差を認めなかった。その理由としては造血前駆細胞の増殖・自己複製能の維持には feeder との接触が大きく関わっていると思われる。造血前駆細胞が増殖し相対的に間葉系幹細胞、骨芽細胞の数が少なくなると、維持できる未分化な状態の造血前駆細胞率は低下するためと考えられる。事実、培養初期においては造血前駆細胞が feeder の中にもぐりこんでいる状態が観察されたが、培養日数と共に feeder 上層に血液細胞がコロニー上に出てくる状態が観察された。恐らくは本研究に用いた系においては feeder の内部に潜り込んだ細胞のみがニッチとしての環境を得ることが出来、そこで増殖した細胞がニッチを離れ feeder 上層でニッチとは無関係な増殖、或いは分化を行っていると考えられる。

造血幹細胞におけるニッチはマウスでは骨芽細胞であると考えられている⁸⁾¹⁰⁾。造血幹細胞もしくはニッチ構成細胞に何らかの増殖分化のシグナルが入ると幹細胞はニッチから離れ、間葉系細胞間を移動した後に血管内皮細胞を通過して血管内に動員されるメカニズムが想定される。骨芽細胞によって増殖が促進される細胞集団と間葉系幹細胞によって増殖が促進される細胞集団は異なる population であることが予測され、それぞれ異なる因子によって制御されている可能性がある。in vivo での環境を考えると骨芽細胞によって増殖される細胞集団のほうがより幼若な細胞集団であることが考えられる。

マウスにおいて間葉系細胞のある特定の popu-

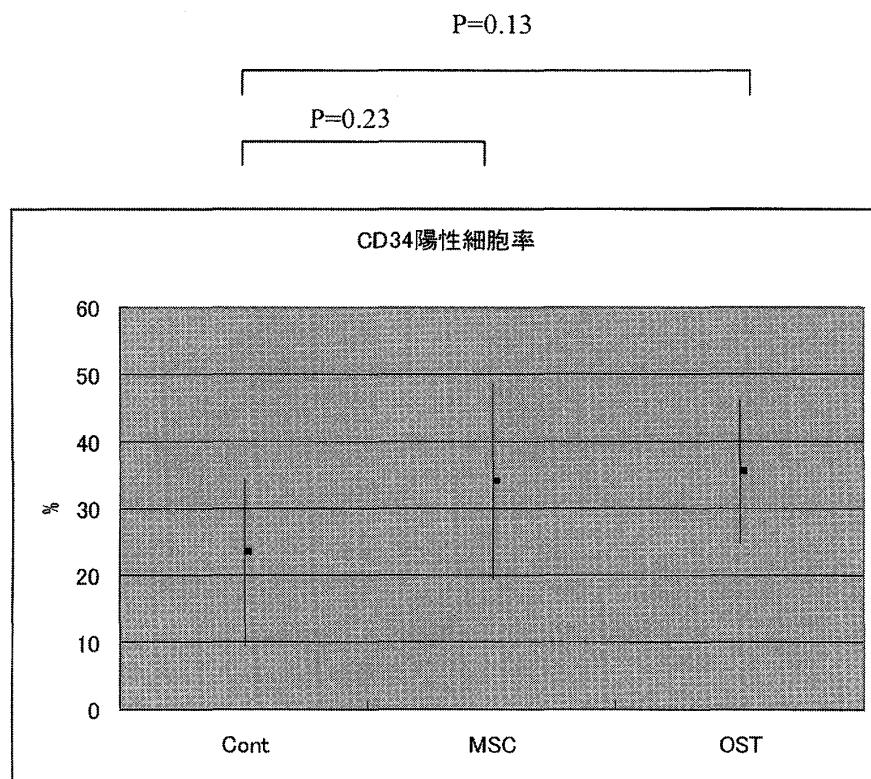


図4 共培養後のCD34陽性細胞率

間葉系幹細胞、骨芽細胞との共培養を1週間行った後に付着細胞ごと回収し、CD34PE (BD Biosciences) で30分染色後 Facscanのゲートを単核球分画に調整して評価した ($N = 6$)。平均値を点で示し上下に標準偏差を示した。コントロール (Cont) ではCD34陽性細胞率 $23.5 \pm 14.2\%$ 、間葉系幹細胞 (MSC) との共培養ではCD34陽性細胞率 $34.0 \pm 14.4\%$ 、骨芽細胞 (OST) との共培養ではCD34陽性細胞率 $35.5 \pm 10.8\%$ であった。

lation が B リンパ球のニッチとして働いているとの報告がある²²⁾。今回我々が使用した CD34 陽性造血前駆細胞は必ずしも単一の population ではない。従って CD34 陽性造血前駆細胞のある特定の population に対応するニッチがそれぞれ別に存在する可能性が考えられる。本研究において間葉系幹細胞によって増殖した細胞群と骨芽細胞によって増殖した細胞群が異なる population であることを調べるために、今後メチルセルロース法によるコロニーアッセイや LTC-IC アッセイなどを行い両群において増殖した細胞集団について詳細に検討する必要がある。

非接触系に比べ接触系のほうが細胞の増幅効率

が大きかったことから、何らかの接着因子が細胞増殖に関与していると考えられる。一方で非接触系においても増幅が促進されることからサイトカイン、或いはケモカインの関与も考えられた。ヒト成人由来の間葉系幹細胞がケモカインレセプター CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, CCR10 を発現しているとの報告もあり²³⁾、これらケモカインにより細胞増殖がコントロールされている可能性が示唆された。

今回使用した GM-CSF, IL-3, IL-6, Flt3 ligand, SCF は幹細胞の維持・増殖の系において比較的よく利用されるサイトカインであるが^{24)–26)}、このほか TPO が幹細胞の増殖に関わっていると

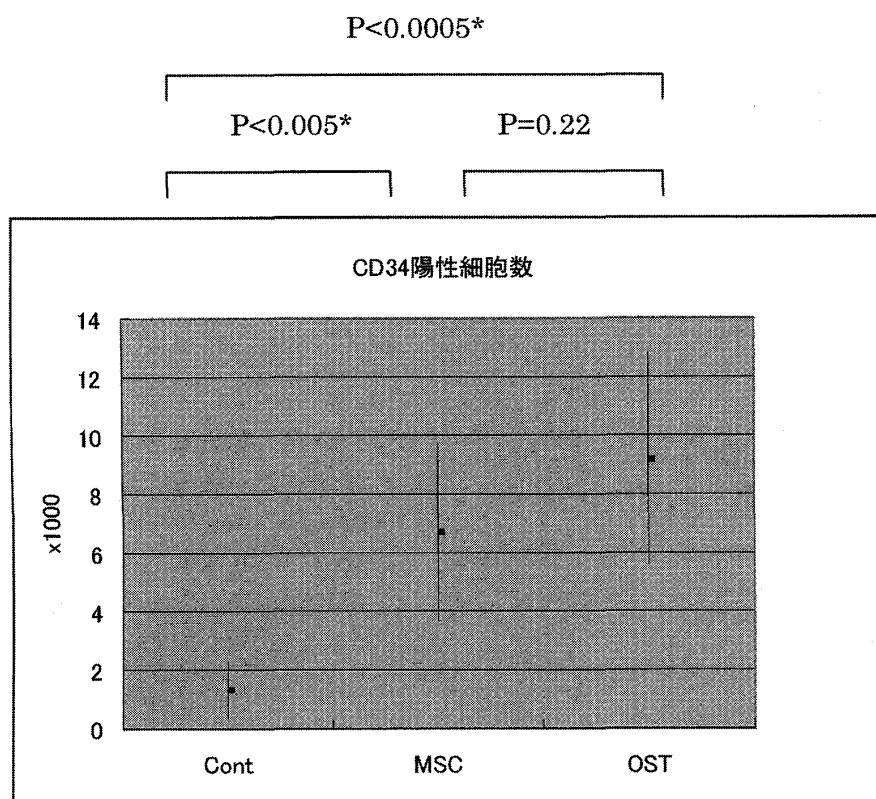


図 5 共培養後の CD34 陽性細胞数

間葉系幹細胞、骨芽細胞との共培養を 1 週間行った後に付着細胞ごと回収し、造血細胞数を細胞数計数用セルカウントプレートでカウントした後、CD34PE (BD Biosciences) で 30 分染色し Facscan のゲートを単核球分画に調整して評価した (N = 6)。コントロール (Cont) では CD34 陽性細胞数 $1.3 \pm 1.0 \times 10^3$ 、間葉系幹細胞との共培養では CD34 陽性細胞数 $6.7 \pm 3.0 \times 10^3$ 、骨芽細胞との共培養では CD34 陽性細胞数 $9.2 \pm 3.6 \times 10^3$ であった。student の t-検定で評価したところ間葉系幹細胞及び骨芽細胞との共培養において、コントロールに比べ有意に増加した。間葉系幹細胞と骨芽細胞との間には有意差は認められなかった。

表 1 接触系と非接触系における CD34 陽性細胞数

	コントロール	間葉系幹細胞	骨芽細胞
接触系	1.12×10^3	7.5×10^3	16.45×10^3
非接触系	1.4×10^3	1.53×10^3	6.4×10^3

非接触系の培養は間葉系幹細胞及び骨芽細胞、コントロール上に $0.4 \mu\text{m}$ の PET メンブレンインサートを乗せその上に CD34 陽性細胞 1×10^3 加え、接触系と同じ medium を用いて培養した。7 日後メンブレン上の細胞を回収し CD34PE (BD Biosciences) にて染色し Facscan にて解析した。非接触系においてもコントロールに比べ間葉系幹細胞、骨芽細胞との共培養で CD34 陽性細胞数の増加が見られた。しかしながら、接触系に比べその増幅効果は少なかった。

の報告もある²⁶⁾²⁷⁾。TPO (kirin) 10ng/ml を加えた系での共培養も試みたが、TPO (-) の系に比べ control においても 10 倍以上の増殖を示し間葉系幹細胞、骨芽細胞上での培養と有意な差を示さなかった (date not shown)。このことから TPO による造血前駆細胞の増殖刺激は極めて強いものであることが予測された。或いは間葉系幹細胞及び骨芽細胞との共培養において、活性化する分化抑制シグナルを TPO が解除する働きを持っている可能性も考えられる。

造血細胞の分化・増殖には確率的な要素が含まれていて外部には影響されない因子があるという説 (stochastic model)²⁸⁾²⁹⁾ と外部環境により完全に制御されているという説がある。現在主要な説である Stochastic model ではサイトカインは単に生存のシグナルを与えているだけであり、細胞の分化には関与せず、分化は細胞自身によってランダムに決められると考えられている。今回の結果は分化・増殖が外部因子によって制御されうることを示唆している。このことは造血細胞がどの微小環境へ移動するか自体は stochastic であり、その微小環境に入った後の分化増殖に関しては制御されているという mix model を支持する。造血幹細胞は骨芽細胞と接触しながら常に分化、増殖を抑制するシグナルを受け quiescent な状態にとどまっており、骨芽細胞からのシグナルを制御する何らかの因子によりシグナルが停止すると造血幹細胞は分化・増殖を行いニッチから出て行くが、一部は再び幹細胞のニッチに戻り quiescent な状態になる。一方でニッチを離れた造血幹細胞はその細胞に特異的な微小環境へ移り分化、増殖をする。分化、増殖した造血幹細胞は次の微小環境へと移る。このように分化、増殖を繰り返しながら各血液細胞へと分化をしていき血管内へ移動していく、というメカニズムが想定される。

特定の population の細胞を維持する微小環境の状態を制御することが可能であれば造血細胞の分化、増殖を自由に行える可能性を示唆しておりより効率的な造血細胞増殖、細胞療法への応用が期待される。また、白血病細胞特異的な微小環境が存在するならば、それらを制御することで新たな

白血病の治療戦略につながると考えられる。

謝 辞

研究を指導していただいた第一内科学教室の相澤義房教授、鳥羽 健講師、高密度無菌治療部の古川達雄助教授、増子正義助手、保健学科の高橋益広教授に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ema H, Takano H, Sudo K and Nakauchi H: In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine* 192: 1281 - 1288, 2000.
- 2) Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC and Okano H: Unexpectedly Efficient Homing Capacity of Purified Murine Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 20: 87 - 93, 2004.
- 3) Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS and Mulligan RC: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 183: 1797 - 1806, 1996.
- 4) Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y and Nakauchia H: Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal by polycomb group genes. *Int J Hematol* 81: 294 - 300, 2005.
- 5) Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamijo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, van Lohuizen M and Nakauchi H: Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* 21: 843 - 851, 2004.
- 6) Doetsch F: A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13: 543 - 550, 2003.
- 7) Ryu BY, Orwig KE, Avarbock MR and Brinster RL: Stem cell and niche development in the postnatal rat testis. *Dev Biol* 263: 253 - 263, 2003.
- 8) Calvi LM, Adams GB, Weibreht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT: Osteoblastic cells regulate the

- haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841 – 846, 2003.
- 9) Russell S: Taichman Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem - cell niche *Blood* 105: 2631 – 2639, 2005.
 - 10) Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY and Suda T: Tie2/Angiopoietin - 1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. *Cell* 118: 149 – 161, 2004.
 - 11) Suda T, Arai F and Hirao A: Hematopoietic stem cells and their niche. *TRENDS in Immunology* 26: 426 – 433, 2005.
 - 12) Chao JZ, Ye NL, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y and Li L: Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836 – 840, 2003.
 - 13) Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R and Weissman IL: A role for Wnt signalling in self - renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 409 – 414, 2003.
 - 14) Lemischka IR and Moore KA: Stem cells: interactive niches. *Nature* 425: 778 – 779, 2003.
 - 15) Dar A, Goichberg P, Shinder V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N, Margalit R, Zsak M, Nagler A, Hardan I, Resnick I, Rot A and Lapidot T: Chemokine receptor CXCR4 - dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF - 1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nature Immunology* 6: 1038 – 1046, 2005.
 - 16) Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, Ritter M, Thiede C, Neubauer A and Brendel C: Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol* 84: 722 – 727, 2005.
 - 17) Deans RJ and Moseley AB: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28: 875 – 884, 2000.
 - 18) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143 – 147, 1999.
 - 19) Wexler SA, Donaldson C, Denning - Kendall P, Rice C, Bradley B and Hows JM: Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal ‘stem’ cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 121: 368 – 374, 2003.
 - 20) Short B, Brouard N, Occhiodoro - Scott T, Ramakrishnan A and Paul J: Simmons Mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research* 34: 565 – 571, 2003.
 - 21) Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, Koc ON, Kozik MM, Szekely E, Daum - Woods K, Goethius GW, Fu P, Welniak LA, Murphy WJ and Laughlin MJ; Expansion of LTC - ICs and Maintenance of p21 and BCL - 2 Expression in Cord Blood CD34+/CD38. Early Progenitors Cultured over Human MSCs as a Feeder Layer. *Stem cells* 20: 573 – 582, 2002.
 - 22) Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi B - I and Nagasawa T: Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior within Bone Marrow during Development. *Immunity* 20: 707 – 718, 2004.
 - 23) Luttichaux IV, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, Djafarzadeh R, Huss R and Nelson PJ: Human adult CD34 - progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev* 3: 329 – 336, 2005.
 - 24) Chute JP, Muramoto GG, Fung J and Oxford C: Soluble factors elaborated by human brain endothelial cells induce the concomitant expansion of purified human BM CD34⁺ CD38⁻ cells and SCID - repopulating cells. *Blood* 105: 576 – 583, 2005.
 - 25) Panoskaltsis N, Mantalaris A and Wu JH: Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo. *J Biosci Bioeng* 100: 28 – 35, 2005.
 - 26) McNiece I, Harrington J, Turney J, Kellner J and

- Shpall EJ: Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 6: 311 - 317, 2004.
- 27) Ramsfjell V, Borge OJ, Cui L and Jacobsen SE: Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34+ CD38-) human bone marrow progenitor cells: distinct and key interactions with the ligands for c-kit and flt3, and inhibitory effects of TGF- β and TNF- α . *J Immunol* 158: 5169 - 5177, 1997.
- 28) Ohishi K, Varnum - Finney B and Bernstein ID: The notch pathway: modulation of cell fate decisions in hematopoiesis. *Int J Hematol* 75: 449 - 459, 2002.
- 29) Hoang T: The origin of hematopoietic cell type diversity. *Oncogene* 23: 7188 - 7198, 2004.

(平成17年12月28日受付)