

原

著

慢性骨髓性白血病における骨髓長期培養では 正常前駆細胞は付着細胞層に多く存在する

—— インターフェロンの効果 ——

新潟大学内科学第一教室

鈴木 訓充・岸 賢治・成田美和子
古川 達雄・高橋 益広・相澤 義房

Dominant Appearance of Normal Hematopoietic Progenitors in the
Adherent Layer of Long-Term Marrow Culture in Chronic
Myelogenous Leukemia—An Effect of Interferon- α

Noriatsu SUZUKI, Kenji KISHI, Miwako NARITA, Tatsuo FURUKAWA,
Masuhiro TAKAHASHI and Yoshifusa AIZAWA

*First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine*

As an alternative treatment with allogeneic bone marrow transplantation, a possibility of autologous stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia (CML) was studied. The most critical problem in this study is how to purify normal stem cells from autologous bone marrow or peripheral blood cells. Although normal stem cells are present in these patients in chronic phase, absolute amount of these cells are very small and difficult to detect by regular chromosome analysis. Concerning to a previous report, appearance of Philadelphia chromosome (Ph) negative clones was observed after long-term marrow culture (LTMC) of CML patients. Our previous studies had shown that addition of interferon- α (IFN α) in LTMC preferentially decrease Ph cells. In the present study, we investigated the frequencies of leukemic clones in suspending and adherent fraction of LTMC by reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) for *bcr-abl*, CML specific and chromosome analysis of a single progenitor derived colony. All colonies derived from suspending cells presented either *bcr-abl* and Ph chromosome in both cultures with and without IFN α .

Reprint requests to: Noriatsu Suzuki,
First department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学内科学第一講座 鈴木 訓充

In all 11 colonies derived from adherent-fraction of LTMC without IFN α , *bcr-abl* was detectable, whereas 2/2 CFU-mix and 3/11 CFU-GM were negative for *bcr-abl* from the culture with IFN α . Results from chromosome analysis of single colony was similar to that by RT-PCR. These results indicate the possibility of application of LTMC with IFN α to eliminate leukemic clones from CML marrow cells, however, there remains a problem that stem cell number decreases during LTMC with IFN α . Our investigation of ex vivo expansion for human hematopoietic stem cells is still experimental, and more progression is necessary for clinical application.

Key words: LTMC, IFN α , CML, *bcr-abl*, Philadelphia chromosome

はじめに

血液疾患の治療にサイトカインが用いられるようになったのはつい最近のことであるが、すでに多くの領域で不可欠な治療法として認められるようになっており、これらのほとんどは *in vivo* 投与による治療薬として使用されている¹⁾²⁾。一方、組織培養技術は遺伝子工学により生産されたこれらのサイトカインを用いることによりさらに発展し、リンパ球をサイトカイン添加で培養し抗腫瘍効果を増強した後輸注する LAK 療法³⁾ など、*ex vivo* 培養により処理した細胞による治療法が考案されている。

造血幹細胞の培養系でも、遺伝子工学的に純化された各種サイトカインが用いることができるようになり、これまで単に増殖因子として扱われていた CSF を特異的な物質としてその働きが理解され、また、造血幹細胞の動態の解明に用いられてきた。既に、これらの成績はサイトカインの臨床投与の成績から明らかである¹⁾²⁾。サイトカインの臨床応用の今後の課題として、造血幹細胞を *ex vivo* に処理し、これを治療に応用するという方法がある。

その方法の1つとして、ここでは慢性骨髄性白血病(CML)の骨髄細胞を長期培養(LTMC)し、Ph1 クローンを除去すること、さらにこれを用いて自家骨髄移植が可能かどうかについて検討した。

材料および方法

1. 正常および CML 患者よりヘパリン加採取した骨髄細胞を Ficoll-Hypaque 比重遠心法により分離し培養した。慢性期 CML 骨髄細胞の LTMC は、未治療の症例より行った場合骨髄中の顆粒球系細胞の著しい

増加のため良好な付着細胞層の形成に困難を示すことがあり、さらに、本研究は慢性期における自家骨髄移植を目指したものであることから、IFN α あるいは hydroxyurea などで治療を行い白血球数・貧血の改善がみられ、寛解期にあると思われる症例より採取した骨髄を用いた。

2. LTMC は Dexter らの方法に準じ⁴⁾⁵⁾、107 個骨髄単核を 12.5 % ウシ胎児血清 (FBS)、12.5 % 馬血清、10⁻⁷ M hydrocortisone 添加 α -MEM で 37°C・5 % CO₂ で培養した。培養液の 1/2 を 7 日目に交換した。IFN α は 100 U/ml の濃度で培養液に添加し、同様に交換した。14 日目に浮遊細胞と付着細胞を回収し clonal culture を行った。

3. 造血コロニー形成 (clonal culture) は Iscove らの方法に準じ⁶⁾ 1.2 % methylcellulose (1,500 cps, Sigma), 30 % FBS (Flow Lab.), 1 % ウシ血清アルブミン (Fraction V, Sigma), 5 \times 10⁻⁵ M2-mercaptoethanol, 5 U/ml リコンビナント・ヒト erythropoietin (Ep, Kirin), 20 ng/ml リコンビナント・ヒト IL-3 (provided by Dr. Schulz, Germany), 10 ng/ml リコンビナント・ヒト GM-CSF (Hoexist Japan), 50 ng/ml リコンビナント・ヒト G-CSF (Kirin), 50 ng/ml 天然型ヒト IL-6 (Torey) 添加 α -MEM にて行った。低酸素 (5 %)・5 % CO₂ 培養器にて 10~14 日間培養し、倒立顕微鏡下に顆粒球・単球コロニー (CFU-GM)、赤芽球バースト (BFU-E)、赤芽球混合コロニー (E-mix) に分類した。CML 例では以下の検討のため個々のコロニー (400~1,500 個細胞集塊) を Eppendorf ピペットで吸い上げ染色体および reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) による Ph1 クローンの検索を行った。RT-PCR 法による検討のため個々のコロニーは carrier RNA として 10 μ g yeast

RNA を含む 50 μ l の solution D (4M Guanidium Thiocyanate, 25mM Na-citrate pH7.0, 0.1M 2-ME, 0.5% Na-sarkosyl) に直接加え、攪拌後-70℃に凍結保存した。

4. *bcr-abl* 遺伝子の検索は、AGPC 法⁷⁾により抽出した RNA から *abl* exon 2 の配列より設計した antisense primer *a1* (5'-GCT TAG AGT GTT ATC TCC ACT GGC-3') を加え reverse transcriptase (RAV-2, Takara) により cDNA を合成した。PCR に使用した senseprimer は *bcr* exon b1, exon b2 の配列よりの primer *b1* (5'-TGA CTA TGA GCG TGC AGA GTG G-3'), *b2* (5'-GGA GCT GCA GAT GCT GAC CAA C-3'), *abl* exon 2 の *a1* 5'側から *a2* (5'-CAT ACA GTG CAA CGA AAA GG-3'), *a3* (5'-TCA GAC CCT GAG GCT CAA AGT C-3') の antisense primer を設計した。1回目 PCR (*b1-a2* 間), 2回目 PCR (*b2-a3* 間) による nested PCR を行い、アガロース・ゲル電気泳動と ethidium bromide 染色により判定した。

5. 造血幹細胞増幅の検討は正常ヒト骨髄 MNC あるいはこれを抗 CD33, 抗 HLA-DR 単クローン抗体および子兔血清(補体)で処理後、各種造血サイトカイン添加あるいは無添加にて6日間の培養後 CFU を測定した。

結 果

1. CML 骨髄 LTMC による造血幹細胞の動態

2例の寛解期 CML 骨髄細胞を2週間 LTMC 後の細胞数・コロニー形成細胞数は (Table 1, 2) IFN α 無添加で17~38%の細胞数・18~58%の前駆細胞数であった。一方 IFN α 添加 LTMC では、13~21%の細胞数・6~66%の前駆細胞数であった。LTMC 後は CFU-GM の比率がやや高く、BFU-E は減少傾向にあったが各群間に差はなかったが、CFU-mix は付着細胞に多く維持される傾向であった。

2. PCR 法による *in vitro* colony の *bcr-abl* transcript の証明

10 μ g yeast RNA を carrier RNA とした RT-PCR 法は 400~1,000 個の細胞からなるコロニーの *bcr-abl* transcript を検出するのに十分高感度であった。LTMC 前の骨髄細胞から形成されたコロニーはすべて 200 bp の PCR 産物が検出され (Fig. 1A), ほとんどの前駆細胞が CML クロンであることが明らかにされた。LTMC 後には CFU-mix の形成が少なく CFU-mix と CFU-GM により検討したが、IFN α 無添加 LTMC 付着細

胞では1つの CFU-mix (#3) で *bcr-abl* が検出できなかったのに対し (Fig. 1B-1), IFN α 添加 LTMC 付着細胞では CFU-mix (2/2)・CFU-GM (4/12) で *bcr-abl* が陰性であった (Fig. 1B-3)。これらの *bcr-abl* 陰性コロニーは false negative を否定するため、正常 *abl* transcript についての検討を行った。IFN α 無添加付着細胞由来 CFU-mix #3・IFN α 添加付着細胞由来 CFU-GM #6 では正常 *abl* が検出できず、*bcr-abl* 陰性は false negative と考えられた。この他はすべて正常 *abl* を認め、*bcr-abl* を持たない正常 clone であると考えられた。一方、浮遊細胞に由来する CFU-GM の RT-PCR では (Fig. 1B-2, 1B-4) 全ての CFU-GM で *bcr-abl* transcripts が検出された。すなわち、IFN α 無添加 LTMC では付着細胞にも浮遊細胞にも正常前駆細胞が検出できなかったのに対し、IFN α 添加 LTMC では付着細胞の CFU-mix の 2/2, CFU-GM の 3/11 が *bcr-abl* 陰性の正常前駆細胞と考えられた。1例に於いては、LTMC 後に正常前駆細胞由来コロニー形成は認められなかった (Fig. 2)。

3. CML 骨髄 LTMC 後に残存した stem cell の染色体分析

症例2では個々のコロニーの染色体による解析を行った。各群で10個の CFU-GM をつりあげ検討したが、5~6個のコロニーで解析可能な分裂像を認めたのみであった。その中の Ph1 染色体陰性率は PCR による検討と同様、IFN α 添加 LTMC で6/10 (浮遊細胞2/5, 付着細胞4/5) に Ph1 染色体が陰性となったのに対し、IFN α 無添加 LTMC では1/10 (浮遊細胞0/6, 付着細胞1/4) で Ph1 染色体が陰性となったのみであった。

4. *in vitro* culture による造血幹細胞の増幅

各種ヒト造血因子を組み合わせた正常骨髄細胞の培養から、 2.5×10^4 個の骨髄単核球を単独あるいは複数の造血因子を組み合わせで6日間液体培養を行った成績では、単独の因子では IL-3 が最も有効で培養により前駆細胞を約2倍に増加させ、さらにこれに IL-6 を併用することで約4倍に増加させた (Table 3)。この他に、IL-3・GM-CSF・G-CSF の組合せにより前駆細胞の増幅効果を認めた。さらに、CD33 および HLA-DR 単クローン抗体および補体処理により lineagepositive 細胞を除いた後、IL-3 あるいは IL-3+IL-6 を添加して培養すると、サイトカイン無添加時はコロニー形成細胞が検出できなかったが、IL-3 および IL-6 の添加培養により前駆細胞の増加が見られた。

Table 1 Numbers of hemopoietic progenitors before and after LTMC with or without IFN α in patient-1

+IFN α NCC(yield)		colonies(/2 \times 10 ⁴ cells)			
IFN α (U/ml)	(\times 106)(%)	GM	BFU-E	E-mix	Total (yield %)
LTMC 前	10.0(100)	80	21	4	105(100)
LTMC 後					
non-adherent cells					
0	1.5(15)	110	8	0	118(17)
100	1.2(12)	52	4	0	55(6)
adherent cells					
0	0.2(2)	51	10	1	62(1)
100	0.1(1)	20	4	1	24(0.2)

Patient-1 had been treated with hydroxyurea, and was in hematological remission with normal blood cell counts. Chromosomal analysis of the marrow showed 100% (20/20) Ph1 chromosome. Marrow MNC were cultured both in LTMC and in methylcellulose culture. Total number of adherent and non-adherent cells after LTMC decreased to 17% without IFN α and 13% with IFN α . Numbers of hemopoietic progenitors decreased more with IFN α than without IFN α in LTMC. Multipotential progenitors (E-mix) were only observed in the adherent fraction.

Table 2 Hemopoietic progenitors before and after LTMC with or without IFN α in patient-2

+IFN α NCC(yield)		colonies(/5 \times 10 ³ cells)			
IFN α (U/ml)	(\times 106)(%)	GM	BFU-E	E-mix	Total (yield %)
LTMC 前	30.0(100)	10	8	1	19(100)
LTMC 後					
non-adherent cells					
0	10.1(33)	16	0	0	16(28)
100	5.7(19)	40	0	1	47(47)
adherent cells					
0	1.6(5)	77	33	4	113(30)
100	0.7(2)	158	21	8	180(19)

Patient-2 was treated with hydroxyurea and in partial remission at this study. Total number of adherent and non-adherent cells after LTMC decreased to 38% without IFN α and 21% with IFN α . Decrease in the numbers of hemopoietic progenitors was more without IFN α than with IFN α in LTMC in this case. More E-mix were observed in the adherent fraction.

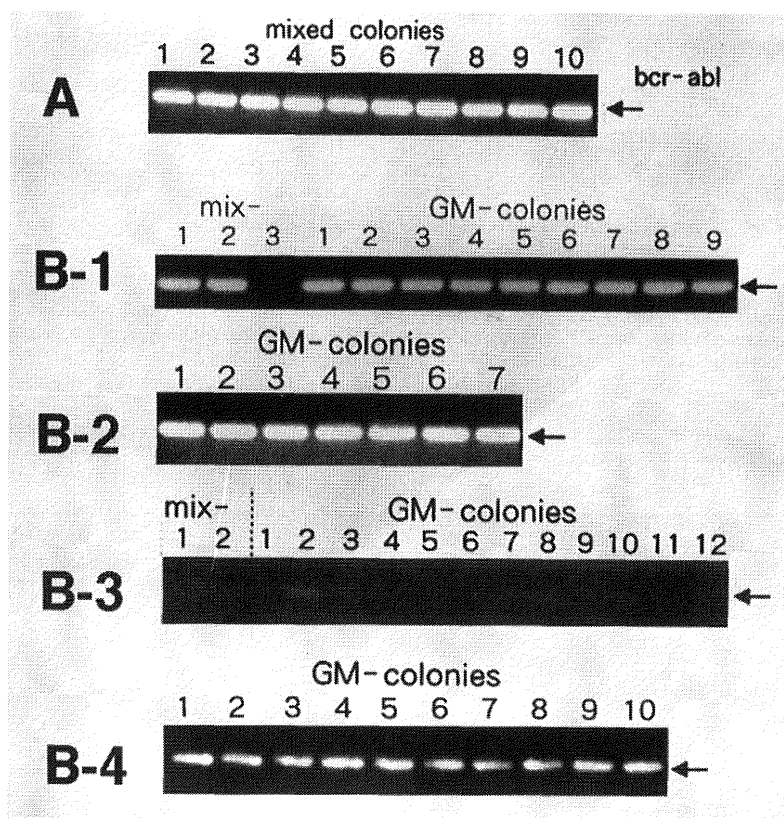


Fig. 1 PCR analysis of single hemopoietic colonies before and after LTMC in patient-1.

A : Nested PCR analysis for *bcr/abl* of 10 E-mix colonies from marrow culture of patient-1 before LTMC. All mixed progenitors were positive for *bcr/abl* transcript. B : PCR study of hemopoietic colonies from non-adherent and adherent cells after LTMC with or without IFN α . E-mix and GM-colonies derived from adherent cells (B-1) and non-adherent cells (B-2) from LTMC without IFN α , adherent cells (B-3) and non-adherent cells (B-4) from LTMC with IFN α were picked and analyzed for *bcr/abl* transcript. Complementary DNA from *bcr/abl* negative colonies were also amplified with normal *abl* primers. The *bcr/abl* negative E-mix colony in B-1 (lane mix-2) and GM-colony in B-3 (GM-colony #6) were negative for *abl* transcript, and these were false negative for *bcr/abl*. *bcr/abl* negative colonies were only detected in B-3 (mix-1, 2 and GM-1, 4, 5, 7, 9, 12). Because Southern blot-hybridization with *b3a2* probe showed faint bands in GM-4, 5, 7, 9, and this indicated the possibility that these 4 colonies were *bcr/abl* positive. Quantitative analysis of *bcr/abl* and *bcr/abl* should be necessary to exclude contamination of *bcr/abl* positive cells in *bcr/abl* negative colonies.

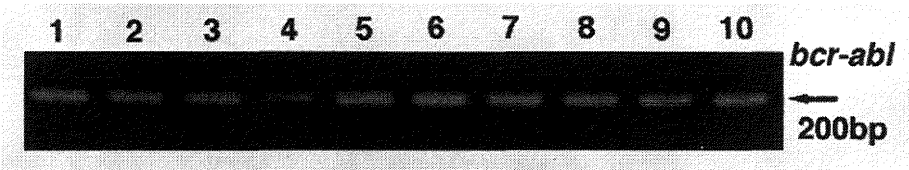


Fig. 2 *bcr/abl* transcript in single E-mix colony from the cells in adherent fraction after LTMC in patient-2.

Marrow cells were cultured as Table 2. E-mix colonies were picked from MTC culture of adherent cells of LTMC with IFN α . All 10 E-mix colonies were positive for *bcr/abl* transcript. In this case, LTMC with IFN α was not effective to reduce Rhl positive clones.

Table 3 Stem Cell Amplification by Several Hemopoietic Growth Factors

Growth Factors in Suspension Culture			Colonies(/5×103 BM-MNC)			
			GM	BFU-E	E-mix	Total
before	21	9	2	32		
after						
none	13	4	0	16		
G-CSF	22	2	0	24		
IL-6	13	2	0	14		
GM-CSF		30	3	2	35	
IL-3	70	15	4	89		
IL-3+IL-6		124	17	7	147	
IL-3+G-CSF		69	21	5	95	
IL-3+GM-CSF+IL-6			109	27	7	147
IL-3+GM-CSF+G-CSF			99	32	13	138

Table 4 Effect of liquid culture on hemopoietic progenitors

liquid culture	GM	BFU-E	E-mix	Total
—	1	2	0	3
IL-3	22	6	1	29
IL-3+IL-6	74	49	23	146

CD33 and HLA-DR negative marrow cells were cultured for 4 days with or without growth factors and plated in semi-solid methylcellulose medium.

考 察

CML は慢性骨髄増殖症候群の代表的な疾患で、慢性期に於いては主に好中球系の白血球増加を示し比較的軽微な抗腫瘍剤にて寛解状態を得ることができる⁸⁾。しかし、ほとんどの症例は4・5年の後未熟血液細胞が腫瘍性に増殖する急性白血球様の病態を示す急性転化となる⁹⁾。急性転化となった CML では、病型によっては一時的寛解を得ることができるものの、最後には治療抵抗性となり、急転後2年以内に感染あるいは腫瘍増大により死亡する。この様に予後不良の血液疾患では同種骨髄移植を併用した治療が絶対適応となり、慢性期 CML に対する成績は70%以上の治癒率が報告されている⁸⁾。しかし、近親者ドナーやバンクドナーが見つからない場合、移植後の合併症（感染症・GVHD など）に耐えられない様な高齢者では適応とならない。

同種骨髄移植に代わる治療法として、自己の造血幹細胞（骨髄あるいは末梢血由来）を保存しておき、超大量化学療法後に輸注する方法が注目されている¹⁰⁾。CML におけるこの治療法の問題点として、保存した自己造血幹細胞から CML クローンを除くことが困難な点である。CML の骨髄には Ph1 染色体を持つ白血病クローンが殆どで、正常クローンは僅かに認められるにすぎない。稀ではあるが、IFN α 治療が有効な症例では骨髄の Ph1 染色体の陽性率が低下し、正常染色体を持つ造血が回復（細胞遺伝学的寛解）することがある。この時期の骨髄を保存し自家移植に用いることが考えられるが、このような症例は一般に予後が良好であることから⁸⁾、造血幹細胞移植が必要とは言いがたい。そこで、IFN α 治療で細胞遺伝学的寛解が得られない慢性期の骨髄にわずかに含まれる正常造血幹細胞を分離・保存することが必要となる。

我々はこれまでに、CML 骨髄から腫瘍性前駆細胞を除く試みとして、温熱療法および薬剤の併用による CML 細胞の殺腫瘍効果（purgig）が正常前駆細胞に比較し感受性が高いことを示し、自家移植への応用の可能性を示唆してきた¹¹⁾。一方、Colombel ら¹²⁾ は CML で骨髄長期培養（LTMC）をおこなうと Ph1 クローンが減少するという成績を以前より示してきた。この方法の臨床応用に関する報告では¹³⁾、患者より採取した骨髄を10日間培養後自家骨髄移植を行ったが、一過性に Ph1 陰性クローンの出現を見たのみで早期に再発した。すなわち、CML クローンの除去には単なる LTMC のみでは

不十分であり、積極的に Ph1 クローンを除く方法を開発しなければ自家骨髄移植の成功は困難と考えた。我々はこれまでに、IFN α を添加した LTMC を行うことにより、Ph1 染色体の減少が促進されることを報告してきた¹⁴⁾。本研究では、さらに LTMC における付着細胞と浮遊細胞とを比較すると同時に、個々にコロニーを別々に染色体解析、PCR による *bcr-abl* transcript を検討することにより、造血前駆細胞の中に正常造血の出現を検出することができた。この結果から、単に LTMC を行うのみでは Ph1 陽性クローンの抑制は困難であるが、IFN α を添加することにより LTMC で Ph1 陽性クローンを減少させることが可能と思われた。

LTMC における付着細胞層の役割は、未分化造血幹細胞の生存と自己再生、さらに、浮遊細胞に含まれるやや分化した造血前駆細胞の供給源となることが知られている⁴⁾。今回の検討では、IFN α を添加して行った LTMC の付着細胞層により多くの Ph1 染色体陰性クローンが存在しており、IFN α を加えることにより未分化造血幹細胞のレベルではより早期に Ph1 クローンの purging がすすむことが示唆された。今後この方法を自家骨髄移植へ応用するためには、培養期間中の細胞の損失を減らすための培養条件の改善が必要であると同時に、未分化造血幹細胞の *ex vivo* expansion が必要とされる。マウスでは IL-3 と IL-6 の併用により移植可能な造血幹細胞が著増することが報告されている¹⁵⁾。我々はヒト骨髄において同様の検討を行ったが、IL-3+IL-6 あるいは IL-3+GM-CSF +IL-6 により CFU-mix を含むコロニー形成細胞の増加を認めた。また、CD33-、HLA-DR-未熟前駆細胞においても IL-3 および IL-6 刺激により CFU-mix を含むコロニー形成細胞の増加を認めた。最近はさらに可溶性 IL-6 リセプターおよび IL-6 併用による gp 130 系シグナル伝達の直接刺激および SCF の併用による未分化造血幹細胞の増幅の報告もされており¹⁶⁾、造血幹細胞移植の面でも *ex vivo* 培養の臨床応用が期待される。

以上本研究では骨髄長期培養を応用した CML 骨髄からの Ph1 クローンの除去の可能性につき報告したが、我々は一方、遺伝子の相同組換えによる腫瘍細胞の正常化を目指す方法も開発中である¹⁷⁾。自己の正常造血幹細胞を純化し、*ex vivo* expansion の方法を確立することにより、CML の新しい自己造血幹細胞移植には必要とされる。

参 考 文 献

- 1) **Peter, W.P.:** The myeloid colony-stimulating factors: introduction and overview. *Seminars in Hematol*, **28**: 1~5, 1991.
- 2) **Galvani, D.W. and Cawley, J.C.:** The current status of interferon alpha in haemic malignancy. *Blood Reviews*, **4**: 175~180, 1990.
- 3) **Van Haelst-Pisani, C.M., Pisani, R.J. and Kovach, J.S.:** Cancer immunotherapy: Current status of treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Mayo Clin. Proc.*, **64**: 451~465, 1989.
- 4) **Dexter, T.M., Allien, T.D. and Lajtha, L.F.:** Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.*, **91**: 335~344, 1976.
- 5) **Gartner, S. and Kaplan, N.S.:** Long term marrow culture of human bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**: 4756~4759, 1980.
- 6) **Iscoe, N.N., Sieber, F. and Winterhalter K.H.:** Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J. Cell. Physiol.*, **83**: 309~320, 1974.
- 7) **Chromczynski, P. and Sacchi, N.:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**: 156~159, 1987.
- 8) 岸 賢治, 柴田 昭: 慢性骨髓性白血病の治療. *nanoGIGA*, **2**: 150~156, 1993.
- 9) **Canellos, G.P.:** Clinical characteristics of the blast phase of chronic granulocytic leukemia. *Hematol-Oncol Clin. North. America.*, **4**: 359~367, 1990.
- 10) 岸 賢治, 酒井 力, 柴田 昭, 新潟骨髓移植チーム: 白血病に於ける自家骨髓移植の臨床応用. *低温医学*, **9**: 126~132, 1983.
- 11) **Osman, Y., Moriyama, Y. and Shibata, A.:** Enhanced elimination of Ph+chromosome cells in vitro by combined hyperthermia and other drugs (AZT, IFN- α , TNF, and quercetin): Its application to autologous bone marrow transplantation for CML. *Exp. Hematol.*, **23**: 444~452, 1995.
- 12) **Colombel, L., Kalousek, D.K., Eaves, A.D., et al:** Long term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patient with philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *New Engl. J. Med.*, **308**: 1493~1498, 1983.
- 13) **Barnett, M.J., Eaves, C.J., Phillips, G.L., et al:** Successful autografting in chronic myeloid leukemia after maintenance of marrow in culture. *Bone Marrow Transplantation*, **4**: 345~351, 1989.
- 14) 成田美和子: 慢性骨髓性白血病におけるインターフェロン- α 添加骨髓長期培養による Ph1 陽性クローンの選択的除去と自家骨髓移植への応用. *新潟医学会雑誌*, **104**: 508~517, 1990.
- 15) **Okano, A., Suzuki, C., Asano, S., et al:** In vitro expansion of the murine pluripotent hemopoietic stem cell population in response to IL3 and IL6. Application to BMT. *Transplantation*, **48**: 495~498, 1989.
- 16) **Sui, X., Tsuji, K., Tanaka, R., et al:** gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**: 2859~2863, 1995.
- 17) 鈴木訓充: 相同組換えによる異常遺伝子を標的とした遺伝子破壊の試み—造血器腫瘍への遺伝子治療の可能性. *新潟医学会雑誌*, 印刷中.

(平成9年2月6日受付)