

# ActivinA/EDF (Erythroid Differentiation Factor) の ヒト造血幹細胞分化に及ぼす影響

新潟大学医学部第一内科学教室 (主任: 柴田 昭教授)

後 藤 隆 夫

Effects of ActivinA/EDF (Erythroid Differentiation Factor)  
on Differentiation of Human Hematopoietic Stem Cell

Takao GOTO

*The First Department of Internal Medicine,  
Niigata University School of Medicine  
(Director: Prof. Akira SHIBATA)*

ActivinA/EDF (Erythroid Differentiation Factor) purified from the culture fluid of human monocytic cells (THP-1 cells) has shown to be potential to a differentiation murine erythroleukemic cells (Friend cells). In this study, we demonstrated that ActivinA/EDF increases in the number of hemoglobin positive cells in human erythroleukemia cell lines without the reduction of cell proliferation. In addition, it enhances erythroid colony formation from human erythroid progenitors of normal and MDS (myelodysplastic syndrome) in vitro. On the other hand, cyclo-oxygenase (CO) mRNA levels increase in liquid culture of human erythroleukemia cell lines after incubation with ActivinA/EDF by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). These results suggest that ActivinA/EDF possibly acts as an important cytokine of erythropoiesis and megakaryocytic differentiation of human hematopoietic stem cell.

Key words: EDF (erythroid differentiation factor), erythropoiesis, megakaryocytic differentiation, cyclo-oxygenase, cytokine

EDF, 赤血球分化, 巨核芽球分化, サイクロオキシゲナーゼ, 造血因子

## は じ め に

各血液細胞の供給は自己再生能をもつ造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) が各系統へ分化し増殖するこ

とにより行われている. この中で赤血球の分化 (erythropoiesis) は, 多能性造血幹細胞 (multipotent stem cell) が赤血球系へ方向づけられ (commitment), 赤血球系前駆細胞へと分化する. この前駆細胞は BFU-E (burst

Reprint requests to: Takao GOTO,  
The First Department of Internal  
Medicine, Niigata University School  
of Medicine, 1-754, Asahimachi-dori,  
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町754  
新潟大学医学部第一内科学教室 後藤隆夫

forming unit-erythroid), CFU-E (colony forming unit-erythroid) と呼ばれる *in vitro* でコロニーを形成する細胞を経た後に形態学的に同定可能な前赤芽球 (proerythroblast) へ分化する。この erythropoiesis の early stage に作用し, BFU-E から赤芽球 burst 形成を促進する因子が BPA (burst promoting activity) として想定され, 現在 IL-3, SCF (stem cell factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) 等が BPA を持つとされている。また, CFU-E から前赤芽球への late stage では主として Epo (erythropoietin) が作用すると考えられている。

Eto らは, TPA 刺激ヒト白血病細胞株 (THP-1) 培養上清からマウス赤白血病細胞 (フレンド細胞) のヘモグロビン産生を促進させる作用を持つ蛋白を純化し EDF (erythroid differentiation factor) と名付けた<sup>1)</sup>。EDF は, マウス骨髓細胞における検討では, IL-3 等と共に BPA 活性を持ち更に Epo と協調し erythropoiesis の late stage にも作用すると報告されている<sup>2)</sup>。

一方下垂体からの FSH 分泌を促進する活性が卵巣中に存在し ActivinA と呼ばれていたが<sup>3)</sup>, 両者の構造比較から同一物質であることが判明した<sup>4)</sup>。

また Fujimoto らは, マウス巨核芽球細胞株 (L-8057) を分化させる蛋白をヒト fibrous histiocytoma cell line (KHM-5M) 培養上清より純化し, 更にこの蛋白が ActivinA と同一であったと報告している<sup>5)</sup>。

これらのことから ActivinA/EDF は, 生体内に存在し hematopoiesis において赤芽球・巨核球系分化に関与していることが示唆された。

近年, G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), Epo などの造血因子の臨床投与が行われるようになり, 白血病の治療現場においては, 急性前骨髓性白血病に対する ATRA (all-trans-retinoic acid) が臨床応用されるなど<sup>6)</sup>, 造血細胞の増殖分化を治療目的に制御することが可能となった。そこでヒト白血病細胞株を用いた液体培養で, ActivinA/EDF の赤芽球・巨核芽球系分化への影響と, ヒト骨髓細胞の赤芽球コロニー形成に及ぼす影響を検討し, ActivinA/EDF の持つ増殖刺激, 分化誘導効果の臨床応用における可能性を検討した。

## 材料および方法

### 1. ヒト白血病細胞培養

ヒト赤芽球系白血病細胞株 K562, HEL, KU812, KU812F, KH88・C2F8, KH88・B4D6, ヒト巨核芽球系白血病細胞株 CMK, CMK-11.5 (KU812, KU812F,

### A cDNA synthesis

template RNA	5 $\mu$ g
Random primer	100 pmol
dNTP	80 nmol
DTT	10 mmol
RNase	70 U
RT	9 U
reaction	42 °C 1hr

### B PCR

KCL	50mmol
Tris HCl (pH8.3)	10mmol
MgCl <sub>2</sub>	25mmol
dNTP	40nmol
Taq polymerase	2.5U
PCR primers	10pmol each + cDNA
γ - actin sense and antisense	
cyclo-oxygenase sense and antisense	
denaturation	94 °C 1min20sec
annealing	54 °C 2min
elongation	72 °C 3min

### C Primer

#### cyclo-oxygenase

sense 5' -CAATG AGTAC CGCAA GAGGT TTGG - 3'  
antisense 5' -GGATT CCCTA GGAGA CCCTT G - 3'

#### Y-actin

sense 5' -GTGCT CCTCC GGGGC GAC - 3'  
antisense 5' -GAAGA AGAGA TCGCC GCG - 3'

図1 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) for cyclo-oxygenase

KH88 は当科で樹立したもの, それ以外は JCRB より供与されたもの) を用いた。各細胞株  $5 \times 10^4$  個を10% FCS 加 RPMI-1640 または Iscove's Modified Dulbecco's Medium 5ml に浮遊させ, ActivinA/EDF (Ajinomoto) 100 ng/ml を添加し, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 存在下で1週間液体培養し赤芽球, 巨核芽球分化の検討に用いた。

### 2. 赤芽球・巨核芽球分化の評価

赤芽球系分化の指標としては, 液体培養後の各細胞株生存細胞200個中の Hb 産生細胞の割合を2,7-diaminofluorescein 染色<sup>7)</sup>により求めた。また同時に増殖曲線も経時的に求めた。

巨核芽球系分化誘導効果の検討は, 培養細胞における血小板凝集惹起物質である thromboxane (TX) B<sub>2</sub>, prostaglandine 合成に関与する血小板 cyclo-oxygenase (CO) を指標とし, RIA 法と RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法により比較検討した。CO 活性は, 0.2 mmol/l の arachidonic acid より産生される TXB<sub>2</sub> を TXB<sub>2</sub> RIA kit (Amersham

International Pic.) にて測定し求めた。RT-PCR 法は、培養細胞から AGPC<sup>8)</sup> 法により mRNA を抽出し cDNA を図 1-A により合成した。転写された cDNA を図 1-C に示す primer を用い PCR により増幅し同時に増幅した  $\gamma$ -actin との比較により CO 発現の指標とした。PCR のための primer は Yokoyama ら<sup>9)</sup> の報告の配列を用い exon 10 に sense を exon 11 に anti-sense を置き設計した。また血小板膜表面蛋白である glycoprotein (GP) I b, II b に対する monoclonal 抗体 (MoAb) の発現を指標として検討した。KH88 細胞を液体培養後抗 GP I b (SZ-1, IMMUNOTECH), II b (TP80, ニチレイ) 抗体を用い APAAP 法により検出した。

同様に K562, KU812, KH88C2F8, CMK11.5 を用い液体培養後の表面抗原 (glycophorinA, CD41) の変化を flowcytometry にて測定し ActivinA/EDF の効果を検討した。

### 3. ヒト骨髓細胞赤芽球系前駆細胞の colony assay

正常人と患者 (再生不良性貧血, MDS) 骨髓細胞をメチルセルロース法<sup>10)</sup> により培養し ActivinA/EDF のコロニー形成能に及ぼす影響を検討した。胸骨より採取した骨髓細胞から比重遠心法を用い単核細胞 (MNC) を分離し、正常骨髓 MNC は  $2 \times 10^4$ /ml, 貧血患者骨髓 MNC は  $5 \times 10^4$ /ml を、30% FCS 加 0.9% メチルセルロース半固形培地に Epo (キリンビール) 5 U/ml

を添加し ActivinA/EDF 10 ng/ml を初めとする各種造血因子の影響を検討した。7日間培養後に観察される赤芽球凝集塊を CFU-E 由来コロニー、14日間培養後の複数の赤芽球凝集塊よりなる集塊を BFU-E 由来コロニーとし、コロニー形成能を検討した。

## 結 果

### 1. 赤芽球系分化促進効果の検討

ActivinA/EDF 添加による細胞株の増殖への影響は (図 2), ActivinA/EDF 添加濃度 100 ng/ml で全ての細胞株で認められなかった。一方 1 週間培養後の Hb 染色では, ActivinA/EDF の添加により表 1 に示す様に K562, KU812, KU812F cell line で Hb 陽性細胞率

表 1 Hb 陽性細胞比率の変化 (%)

	EDF (-)	EDF (+)
K562	10.5	41.5
HEL	7.0	5.0
KU812	13.0	51.0
KU812F	7.0	62.0
KH88 C2F8	44.0	42.0
KH88 B4D6	9.0	6.5
CMK	10.0	14.0
CMK 11-5	4.5	3.5

液体培養 1 週間後の 2,7-diaminofluorene 染色による Hb 陽性細胞数の変化

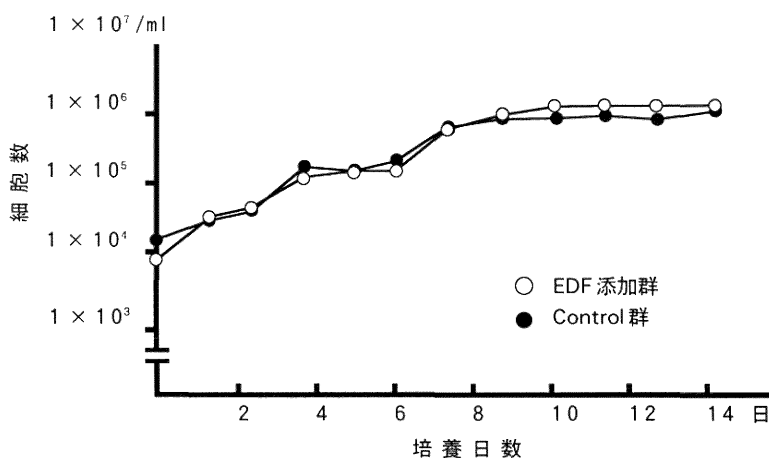


図 2 ActivinA/EDF 添加 (100 ng/ml), 無添加培養中の K562 細胞株増殖曲線。細胞増殖に両群間で有意差なく、他の細胞株 (HEL, KU812, KH88) にても同様であった。

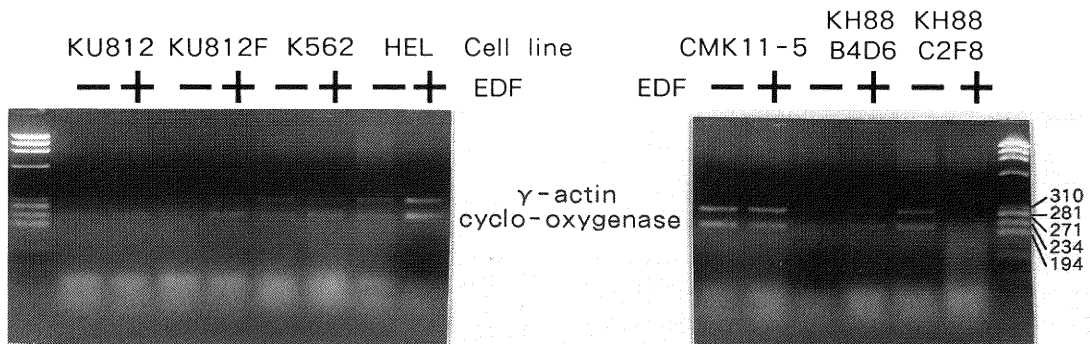


図3 RT-PCR 法による cyclo-oxygenase mRNA の発現

各細胞株は ActivinA/EDF (100 ng/ml) を添加培養 (7日) し, AGPC 法により RNA を抽出, RT-PCR により検討した. 25 cycle 増幅を行った結果は, 225 bp でのバンドの描出が, KU812F, K562 で ActivinA/EDF 添加により増強している.

表2 cyclo-oxygenase activity (pg/ml)

	EDF (-)	EDF (+)
K562	486	209
HEL	1333	1667
KU812	190	171
KU812F	189	191
KH88 C2F8	15714	16250
KH88 B4D6	66	67
CMK 11-5	2428	2783

液体培養1週間後の細胞浮遊液に arachidonic acid (0.2 mmol/l) を添加し37℃で3分間反応させ, その上清中の TxB<sub>2</sub> 濃度を RIA 法にて測定した.

の増加を認めたが, 形態学的には明らかな変化は認めなかった. また ActivinA/EDF による赤芽球系分化が報告されている HEL cell line では, Hb 陽性細胞の増加はみられず増殖抑制も確認されなかった.

KH88 では, ActivinA/EDF の添加無しでも Hb 陽性細胞比率の高値を示したが, ActivinA/EDF による増強効果はみられなかった (表1). しかしこの細胞株は hemin による Hb 陽性細胞の増加を認めている.

巨核芽球系 cell line CMK, CMK11.5 では Hb 陽性細胞の増加はみられず, 形態学的変化も認めなかった.

ActivinA/EDF により Hb 陽性細胞が増加する細胞株で, Epo あるいは hemin (4×10<sup>5</sup>/ml) の併用による影響を検討したが, Hb 陽性細胞は増加せず, flowcytometry による surface marker の解析でも, K562, KU812, KH88 では glycophorin が陽性であったが, ActivinA/EDF 添加による発現強度の増強やあらたな発現はみら

れず, ActivinA/EDF による赤芽球系分化刺激効果を確認できる結果は得られなかった.

## 2. 巨核芽球系分化刺激効果の検討

35サイクルの CO RT-PCR 法では HL60 を含むほとんどの骨髓系細胞株で CO mRNA の発現が検出されたが, 25サイクルでは HL60 で検出できず, 25サイクル CO RT-PCR により半定量が可能と考えられた. ActivinA/EDF 添加, 無添加で比較すると KU812F, K562 で CO mRNA に一致する 225 bp での描出バンドの明らかな増強を認めた (図3). HEL でもその傾向が伺われたが, KU812, CMK (11.5) では明らかな変化は認められなかった. 一方 RIA 法による CO 活性の測定結果 (表2) では, ActivinA/EDF 添加により有意な増加を示した細胞株はなく, CO mRNA 発現の増強の成績と一致しなかった.

また APAAP 法による GPI b, II b の発現も ActivinA/EDF 添加での増強は確認されず, surface marker の解析でも, CMK11.5 で CD41 が陽性であったが, ActivinA/EDF 添加による変化はみられなかった.

## 3. ActivinA/EDF の骨髓細胞赤芽球コロニー形成能に及ぼす影響

はじめに正常ヒト骨髓単核細胞を用い ActivinA/EDF 添加によるコロニー形成を観察した (図4). ActivinA/EDF 単独ではコロニー形成を認めないが, Epo 存在下では ActivinA/EDF, 10 ng/ml 添加にて CFU-E コロニー数は増加傾向を示し, BFU-E コロニーはわずかに増加した. また IL-3, GM-CSF, SCF 等の併用により比較したがいずれの組合せも顆粒球, マクロファージコロニーの増加は認めたが赤芽球系コロニーの増加は

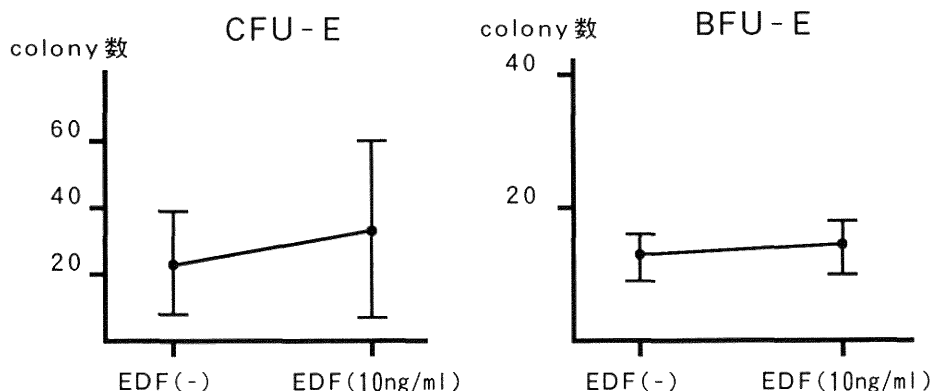


図 4 正常骨髄細胞におけるコロニー形成

正常ヒト BM MNC  $2 \times 10^4$  個/ml を methylcellulose 培養し、7日後の形成コロニーを CFU-E、14日後のコロニーを BFU-E として算定した。

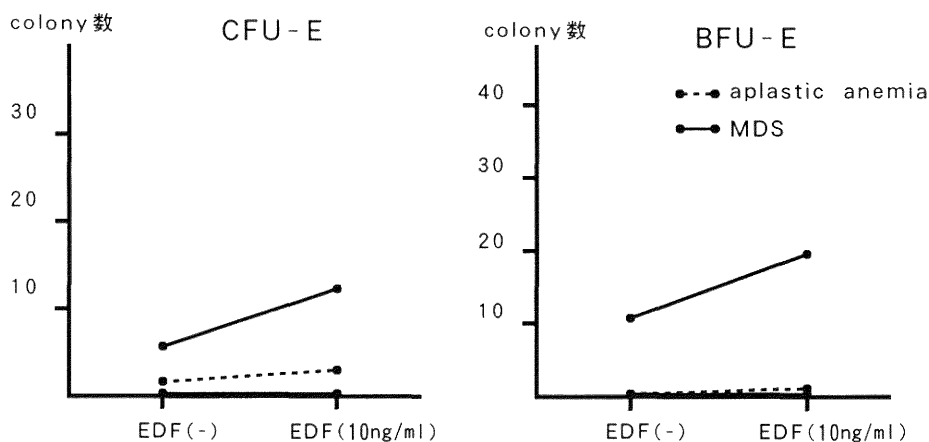


図 5 再生不良性貧血、MDS (RA) 患者骨髄細胞におけるコロニー形成

$5 \times 10^4$  個/ml の各患者 BM MNC を methylcellulose 培養し7日目に CFU-E、14日目に BFU-E を測定した。

見られなかった (成績省略)。

更に臨床応用を目的として難治性貧血 (再生不良性貧血および MDS) 骨髄により検討した (図 5)。コロニー形成の著減した重症例では ActivinA/EDF の添加は無効であったが、コロニー形成の見られる例 (MDS) では正常骨髄同様に ActivinA/EDF に促進効果を認めた。また他のサイトカインとの併用も正常骨髄と同様に影響しなかった。

## 考 察

ActivinA/EDF は、赤芽球系幹細胞に分化刺激効果を持つことが知られているが<sup>11)</sup>、最近の報告では巨核芽球系にも作用する可能性が示唆されている<sup>5)</sup>。

現在、白血病は正常な血液幹細胞の癌化に伴う分化増殖の調節機構の異常によると考えられているが、実験動物やヒトの白血病細胞にも分化能があり各種分化誘導剤 (DMSO<sup>12)</sup>、TPA、LIF etc.) に反応して分化成熟し、増殖能を喪失することが報告されている<sup>13)</sup>。一方正常

血液幹細胞は造血因子に反応して分化と増殖が随伴して進行する<sup>14)</sup>。今回の検討で ActivinA/EDF は、K562, KU812, KU812F などの赤芽球系白血病細胞株においてその添加培養により増殖抑制なしに Hb 陽性細胞を増加させた。このことは ActivinA/EDF は、細胞障害作用を伴わず Hb 合成を誘導することから、既知の分化誘導剤と作用機構が異なると考えられた。またこれまでの報告ではヒト細胞を含む多くの赤白血病細胞において ActivinA/EDF レセプターが発現していることが推測され<sup>15)</sup>、この ActivinA/EDF による分化誘導は単独作用であり、その誘導過程は Epo や Hemin と異なることが示唆されている。また ActivinA/EDF の白血病細胞に対する分化誘導作用は、in vivo でも発揮されることが示されている。フレンド細胞を移植した担癌マウスの腫瘍内投与実験において、ActivinA/EDF 投与により腫瘍内の細胞分化が確認され、腫瘍の生長抑制と生存日数の延長が認められている<sup>16)</sup>。しかし細胞株間で分化の程度が異なりその作用機序は複数と考えられる。

正常ヒト骨髓細胞に対する分化刺激効果の検討においては Epo 存在下で CFU-E コロニー形成を増加させた。この作用はT細胞または単球を介した間接的な作用と考えられており<sup>17)</sup>、直接分化を誘導する赤白血病細胞に対する作用と異なっている。一方成熟した赤芽球前駆細胞 (CFU-E) の分化、増殖に対する ActivinA/EDF の効果は、報告により異なっている。しかし Shaoらは、ActivinA/EDF が CFU-E に直接作用して、Hb 遺伝子の発現を促進すると報告している<sup>18)</sup>。今回の検討でも ActivinA/EDF 添加により BFU-E コロニーの増加を認めた。このように ActivinA/EDF は複数の機構により正常造血に作用し得るものと考えられる。

また ActivinA/EDF は脳下垂体、卵巣、等と共に骨髓や脾臓といった造血組織中にも内因性に存在することが見いだされ<sup>19)</sup>、最近の報告では組織中だけでなく血液中にも存在することが確認された<sup>20)</sup>。同時に ActivinA/EDF 活性中和能を持つ結合蛋白の存在が報告され、その投与でマウスの骨髓、脾臓中の赤芽球前駆細胞数が減少することから、内因性 ActivinA/EDF は in vivo で赤芽球造血に関与することが確認されている<sup>21)</sup>。

一方赤芽球系幹細胞異常によると考えられる再生不良性貧血、MDS 患者由来骨髓赤芽球造血幹細胞に対する効果の検討では、重症貧血例では ActivinA/EDF の効果は明らかではなかったが、貧血の軽い例では Epo の存在下で ActivinA/EDF 添加により CFU-E、BFU-E コロニー形成を増加させた。腎不全患者の血中 ActivinA/

EDF の解析の検討では、患者血中に ActivinA/EDF 活性に対するインヒビターの存在が報告されている<sup>21)</sup>。同様の物質が貧血患者の血中にも存在するとすれば、ActivinA/EDF はこの治療に有望であり、これらの貧血の病態解析等今後の検討が必要である。

ActivinA/EDF の巨核芽球系分化誘導効果の検討では、CO 活性の増加を示唆する所見を得た。これまでの報告ではマウスの megakaryoblastic cell line (L-8057) で acetylcholinesterase 活性の増加を確認したもの<sup>22)</sup>、マウスの erythroleukemia cell line (MEL) で TXA<sub>2</sub> 産生増加を示したもの等の報告<sup>23)</sup>はあるが、今回の検討を含め細胞表面抗原の変化や巨核球コロニー形成の増加等 Meg-CSF 活性を確認した報告はなく、その作用の存在を含め更に検討を加える必要があると考えられた。

いずれにせよこれまで述べた ActivinA/EDF の造血刺激効果は、Epo や他のサイトカインと比べ単独では充分とはいえない。しかし Epo などの作用とは異なることより、至適作用量の検討や他のサイトカインとの関係、レセプターとそれを介したシグナル伝達等の作用機序の解析により既知のサイトカインの無効な疾患に対して、ActivinA/EDF は有効な可能性があり、更に詳細な検討が必要である。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った新潟大学医学部第一内科学教室柴田 昭教授、新潟大学高密度無菌治療部森山美昭助教授、岸 賢治助手に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Eto, Y., Tsuji, T., Takezawa, M., Takano, S., Yokogawa, Y. and Shibai, H.: Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**: 1095~1103, 1987.
- 2) Shiozaki, M., Sakai, R., Tabuchi, M., Eto, Y., Kosaka, M. and Shibai, H.: In vivo treatment with erythroid differentiation factor (EDF/activinA) increases erythroid precursors (CFU-E and BFU-E) in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**: 1155~1161, 1989.
- 3) Vale, W., Rivier, J., Vaugham, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D. and Spiess, J.: Purification and characterization of

- an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature*, **321**: 776~779, 1986.
- 4) **Murata, M., Eto, Y., Shibai, H., Sakai, M. and Muramatsu, M.**: Erythroid differentiation factor is encoded by the same mRNA as that of the inhibin  $\beta$ A chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**: 2434~2438, 1988.
  - 5) **Fujimoto, K., Kawakita, M., Kato, K., Yonemura, Y., Masuda, T., Matsuzaki, H., Hirose, J., Isaji, M., Sasaki, H., Inoue, T. and Takatsuki, K.**: Purification of megakaryocyte differentiation activity from a human fibrous histiocytoma cell line: N-terminal sequence homology with Activin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**: 1163~1168, 1991.
  - 6) **Huang, M., Yu, C.Y., Shu, R.C., Jin, R.C., Jia, X.L., Lin, Z., Long, J.G. and Zhen, Y.W.**: Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, **72**: 567~572, 1988.
  - 7) **Kaiho, S. and Mizuno, K.**: Sensitive assay systems for detection of hemoglobin with 2, 7-diaminofluorene: histochemistry and colorimetry for erythrodifferentiation. *Anal. Biochem.*, **149**: 117~120, 1985.
  - 8) **Chomczynski, P. and Sacchi, N.**: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156~159, 1987.
  - 9) **Yokoyama, C. and Tanabe, T.**: Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**: 888~894, 1989.
  - 10) **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.
  - 11) **Broxmeyer, H.E., L, L., Cooper, S., Schwall, R.H., Mason, A.J. and Nikolics, K.**: Selective and indirect modulation of human multipotential and erythroid hematopoietic progenitor cell proliferation by recombinant human activin and inhibin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 9052~9056, 1988.
  - 12) **Friend, C., Scher, W., Holland, JG. and Sato, T.**: Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **68**: 378~382, 1971.
  - 13) **Hozumi, M.**: Fundamentals of chemotherapy of myeloid leukemia by induction of leukemia cell differentiation. *Adv. Cancer. Res.*, **38**: 121~169, 1983.
  - 14) **Sachs, L.**: The control of growth and differentiation in normal and leukemic blood cells. *Cancer*, **65**: 2196~2206, 1990.
  - 15) **Mathews, L.S. and Vale, W.W.**: Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell*, **65**: 973~982, 1991.
  - 16) **Shiozaki, M., Shioya, S., Izawa, M., Eto, Y. and Shibai, H.**: Differentiation-inducing and growth-inhibitory activities of erythroid differentiation factor (EDF/ActivinA) toward mouse erythroleukemia cells in vivo. *Int. J. Cancer.*, **45**: 719~723, 1990.
  - 17) **Yu, J., Shao, L., Vaugham, J., Vale, W. and Yu, A.**: Characterization of the effect of activin on human erythroid colony formation in vitro. *Blood*, **73**: 952~960, 1989.
  - 18) **Shao, L., Frigon, N.L.Jr., Young, A.L., Yu, A.L., Mathews, L.S., Vaughan, J., Vale, W. and Yu, J.**: Effect of Activin A on globin gene expression in purified human erythroid progenitors. *Blood*, **79**: 773~781, 1992.
  - 19) **Kogawa, K., Nakamura, T., Sugino, K., Takio, K., Titani, K. and Sugino, H.**: Activin-binding Protein is present in pituitary. *Endocrinology*, **128**: 1434~1440, 1991.
  - 20) **Shiozaki, M., Sakai, R., Tabuchi, M., Nakamura, T., Sugino, K., Sugino, H. and Eto, Y.**: Evidence for the Participation of endogenous ActivinA/erythroid differentiation factor in the regulation of erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 1553~1556, 1992.

- 21) **Shiozaki, M., Sakai, R., Tabuchi, M., Nakamura, T., Sugino, H. and Eto, Y.:** The existence of ActivinA/EDF (erythroid differentiation factor) and its inhibitor in human serum: normal and chronic renal failure sera. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**: 273~279, 1992.
- 22) **Nishimura, M., Kaku, K., Azuno, Y., Okafuji, K., Eto, Y., Shiozaki, M., Sasaki, H., Inoue, T. and Kaneko, T.:** Effect of erythroid differentiation factor on megakaryocytic differentiation of L8057, a murine megakaryoblastic leukemia cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**: 1042~1047, 1991.
- 23) **Yamashita, T., Shimizu, T. and Ogawa, E.:** ActivinA/erythroid differentiation factor induces Thromboxane A2 synthetic activity in murine erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **266**: 3888~3892, 1991.

(平成6年1月27日受付)

---