

マウス造血幹細胞の *in vitro* 増幅の研究

新潟大学大学院自然科学研究科 博士後期課程 3 年

生物圏科学専攻 細胞生物科学大講座

F03L203F

中山 明美

目次

	page
略語	1
Abstract	2
要旨	7
Part 1 骨髄移植後のマウス血清と性ホルモンを用いた造血幹細胞の <i>in vitro</i> 増幅の試み	
緒言	10
材料と方法	13
結果	24
考察	40
Part 2 cDNA サブトラクションによる造血幹細胞増殖関連遺伝子の クローニングと発現解析	
緒言	44
材料と方法	45
結果	60
考察	70
今後の展望	78
謝辞	81
参考文献	82

略語

AGM	aorta-gonad-mesonephros
α -MEM	α -modified Minimum Essential Medium
ECD	phycoerythrin-Texas Red
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
Flt-3	FMS-like tyrosine kinase 3
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
HCG	human chorionic gonadotropin
HS	horse serum
IL	interleukin
mRNA	messenger RNA
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	phycoerythrin
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
<i>Sca-1</i>	stem cell antigen-1
SCF	stem cell factor

Abstract

In part1, we analyzed the recovery feature of murine hematopoietic stem cells (HSCs) in hematopoietic reconstitution, and tried to expand of HSCs *in vitro*. Mice which were transplanted bone marrow cells of syngenic mice after lethal irradiation, were analyzed the recovery of HSCs (Lineage maker negative, Sca-1 positive, c-kit positive cells, KSL cells) in bone marrow or spleen by flowcytometer. Flow-cytometric analysis revealed that KSL cells proliferated from day 3 after transplantation. This result suggested the existence of systems that could expand HSCs effectively in hematopoietic tissues after bone marrow transplantation. Because we expected that serum obtained from mice transplanted after day 3 (day 3 serum) include factors for expansion of hematopoietic stem cells, whole bone marrow cells were co-cultured with hematopoietic supportive cell line. Day 3 serum could expand HSCs among whole bone marrow cells approximately 25 times; however, HSCs were not expanded with normal mouse serum. These results indicated

that there were effective factors in day 3 serum for expansion of HSCs, not in normal serum. Although whole bone marrow cells were co-cultured in day 3 serum, HSCs were not expanded when direct contact between the whole bone marrow cells and supportive cell line was prevented. This result revealed that direct contact between the whole bone marrow cells and hematopoietic supportive cells was essential for proliferation of HSCs.

Gene expression of cytokines that were reported the relationship to proliferation of HSCs was up-regulated in hematopoietic supportive cell line that HSCs were expanded, compared to normal. In other words, factors included in day 3 serum lead gene expression of these cytokines.

The level of testosterone in the day3 serum was significantly higher than normal serum, measured by ELISA. The addition of testosterone in the co-culture with hematopoietic supportive cells expanded the HSCs among whole bone marrow cells. Furthermore, hematopoietic supportive cells stimulated by testosterone was also up-regulated the expression of some cytokines, as well as co-cultured in day 3 serum. These date

suggest that the one of these factors for expansion of HSCs in day 3 serum is testosterone.

In spite of whole bone marrow cells were cultured with day 3 serum, HSCs were not expanded without hematopoietic supportive cells. Thus, we expected that these factors in day 3 serum would influence to hematopoietic supportive cells, and produced when bone marrow cells were contacted. To clone these factors exhaustively, cDNA subtraction method was planed.

In part 2, we reported the cloning of genes that were significantly expressed in bone marrow 3 days after transplantation, by cDNA subtraction. We found that the expression of 237 genes were significantly higher in transplanted bone marrow cells than in normal bone marrow cells by screening about 2000 clones. Twenty clones (about 1%, 4 clones are duplicate) are functionally unknown. Other clones were enzyme related genes (about 15%), mitochondria related genes (about 15%), Immunogloblin related genes (about 15%), transport and secretion related

genes (about 15%), cytoskeleton related genes (about 10%), cytokine and chemokine genes (about 5%), ribosomal genes (5%). We analyzed the expression of 8 clones, which including 2 function-unknown genes. First, we analyzed gene expression quantitatively in bone marrow after bone marrow transplantation by Real-time PCR. It revealed that the expression of all 8 genes increased from day 1 to day 3 after transplantation, then decreased gradually at steady state till day 18. These gene expressions were prior to the recovery feature of HSCs after bone marrow transplantation. It suggested strongly that these genes were involved in recovery of HSCs.

By the way, it is not clearly understood about the regulation systems of expansion for HSCs in early embryogenesis. It was thought that regulation system of expansion for HSCs in early embryogenesis was common to in bone marrow transplanted mouse. Whole mount *in situ* hybridization analysis had revealed that 4 genes among 8 genes were specifically expressed in aorta-gonad-mesonephros (AGM) region of murine embryo on 10.5 days (E10.5), which site is thought to expand

HSCs in embryo. These results indicate that regulation systems of expansion of HSCs in bone marrow transplantation and in embryogenesis are alike.

要旨

まず Part 1 では、造血系再構築時の造血幹細胞の回復動態を解析し、*in vitro* における造血幹細胞増殖を試みた。マウスに致死量放射線照射後、同系マウスの骨髓細胞を移植し、継時的に骨髓、あるいは脾臓中の造血幹細胞分画である KSL 細胞（分化抗原陰性、*Sca-1* 陽性、*c-kit* 陽性細胞）の回復動態をフローサイトメーターで解析したところ、移植後 3 日目から造血幹細胞（KSL 細胞）が著しく増加していた。この結果は、骨髓移植後 3 日目の造血組織では造血幹細胞を効率良く増殖させるシステムが存在することを示唆していた。そこで、骨髓移植後 3 日目のマウス血清中に造血幹細胞増殖因子の存在を想定し、全骨髓細胞と造血支持骨髓細胞株との共培養を試みたところ、この移植後 3 日目のマウス血清を用いることによって、全骨髓細胞中の造血幹細胞を培養開始時の約 25 倍にまで増加させることができた。これに対し、正常マウス血清には造血幹細胞増殖効果は認められなかった。つまり、骨髓移植後 3 日目の血清中に、正常血清中には存在しない、造血幹細胞増殖に有効な因子が含まれていることが明らかとなった。ところが、移植後 3 日目の血清を用いても、全骨髓細胞と造血支持細胞株が接触できない培養条件下では、造血幹細胞は増殖できなかった。このことは、造血幹細胞の増殖には造血支持細胞との直接接触も重要であることを示す。ところで、造血幹細胞が増殖した造血支持細胞株においては、造血幹細胞増殖に関与することが報告されている複数のサイトカインの発現が、共培養前の造血支持細胞株に比べ上昇していた。つまり、骨髓移植後 3 日目の

血清中に含まれる因子は、造血支持細胞にこれらのサイトカインの発現を誘導したのである。

マウス血清中のテストステロン濃度を ELISA 法により測定すると、骨髓移植後 3 日目のマウス血清中で正常マウス血清に比べ有意に上昇しており、造血支持細胞株と全骨髓細胞の共培養系にテストステロンを添加すると、造血幹細胞の増殖を認めた。また、テストステロン刺激造血支持細胞株において、移植後 3 日目の血清を用いた時と同様なサイトカインの発現上昇を認めた。従って、骨髓移植後 3 日目のマウス血清中に含まれる造血幹細胞増殖に関わる因子の一つは、テストステロンであると考えられる。

さらに、骨髓移植後 3 日目の血清单独では、造血幹細胞増殖は誘導できなかったもので、血清中の因子が支持細胞に作用し、支持細胞が骨髓細胞と接触しているときに、造血幹細胞増殖に関わる因子が産生されるものと考えられた。

そこで、*in vivo* におけるこれらの因子を網羅的にクローニングすることを目的として、cDNA サブトラクションによる遺伝子クローニングを計画した。

次に Part 2 では、この cDNA サブトラクションにより骨髓移植後 3 日目の骨髓で顕著に発現の上昇している遺伝子をクローニングした結果を報告する。cDNA サブトラクションの結果、骨髓移植後 3 日目の骨髓で特異的に発現している遺伝子 2000 クローンをまず特定し、二次スクリーニングにより骨髓移植後 3 日目の骨髓で顕著に発現の高い遺伝子 237 クローンを絞り込んだ。このうち 20 クローン（およそ 10%、4 クローンは重複）は機能未知遺伝子だった。その他のクロンの構成は、酵素関連遺伝子; 15%、ミトコンドリア関連遺伝

子; 15%, Immunoglobulin 関連遺伝子; 15%, 輸送・分泌関連遺伝子; 15%, 細胞骨格関連遺伝子; 10%, サイトカイン・ケモカイン遺伝子; 5%, リボソーム遺伝子; 5%であった。この中から、機能未知遺伝子 2 クローンを含む 8 クローンを選りさらに詳細な発現解析を行った。まず、骨髄移植前後の骨髄での遺伝子発現を Real-time PCR により定量的に解析したところ、すべてのクローンは、移植後 1 日目から 3 日目にかけて顕著な発現増加を認め、移植後 18 日目には正常値と同程度まで戻った。この発現の様式は骨髄移植マウスにおける造血幹細胞数の回復動態に先行しており、これらの遺伝子産物が造血幹細胞の回復に関与することを強く示唆するものであった。

ところで、発生初期における造血幹細胞の増殖がどのような制御下に行われているかはまだ完全に明らかになっていない。発生初期における造血幹細胞の増幅システムは、骨髄移植時に認められる造血幹細胞の増幅システムと共通する部分がある可能性が考えられた。そこで、whole mount *in situ* hybridization を行い、胎生期の造血幹細胞の増幅が行われるとされる胎生 10.5 日目胚の AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域におけるこれらの遺伝子の発現を解析したところ、8 クローン中 4 クローンの発現が顕著に上昇している事を認めた。これらの知見は、骨髄移植時における造血幹細胞の増殖システムと、胎生期における造血幹細胞の増殖システムが類似していることを示唆するものと考えられる。

Part 1

骨髓移植後のマウス血清と性ホルモンを用いた造血幹細胞
の *in vitro* 増幅の試み

緒言

1961 年に Till と McCulloch は、放射線照射したマウスに骨髓細胞を静脈注射して、9 日目に脾臓に移植した細胞に由来する細胞集団（コロニー）ができることを発見した[1]。彼等は、この脾コロニーが骨髓中の造血幹細胞の存在を示すものであると考え、CFU-S (colony forming unit in spleen) の概念を提唱したことから造血幹細胞の研究が始まった。しかしながら、骨髓細胞中における存在頻度が極端に低いため、造血幹細胞を純化することは長い間困難とされてきた。1980 年台の始め頃から、細胞表面抗原に対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることで造血幹細胞のフローサイトメトリー解析が行われ[2]、マウス骨髓中に存在する造血幹細胞は $CD34^{low/-}$, $c-kit^+$, $Sca-1^+$, 分化抗原陰性 (Lin^-) 分画に高度に濃縮されていることが 1996 年に明らかとなった[3]。純化された造血幹細胞 ($CD34^{low/-}$, $c-kit^+$, $Sca-1^+$, Lin^- 細胞) は 1 個でも致死量放射線照射マウスに移植すれば、1 年以上にわたり移植を受けたマウスの殆ど全ての血球細胞を供給できる [3]。つまり、骨髓系細胞とリンパ球系細胞の両方に分化可能で、かつ自己複製しながら長期にわたり血球を供給できる能力を兼ね備えた造血幹細胞の存在が直接的に証明されたのである。最近ではさらに Hoechst 33342 という DNA 結合色素を組み合わせた解析も行われている。Hoechst 33342 は生細胞の核染色や細胞周期解析などに用いられてきた膜透過性色素であり、UV 励起により 2 波長（青色：460nm, 赤色：670nm）の蛍光を発する。大部分の細胞はこの色素を取り込むが、幹細胞は細胞内に取り込ん

だ色素を排出する性質を持つ。そのため、Hoechst 33342 で骨髓細胞を染色し、フローサイトメーターで蛍光を測定すると、色素を取り込み蛍光を強く発する陽性の細胞集団（Main population cells, MP cells）と、殆ど蛍光を発しない陰性の細胞集団（Side population cells, SP cells）の 2 群に分けられ、この陰性の細胞集団に造血幹細胞が濃縮されていることが報告されている[4, 5]。

ところで、造血幹細胞の自己複製と分化はサイトカインなどの液性因子や、骨髓間質細胞との細胞間相互作用によって厳密に制御されている[6, 7, 8]。種々のサイトカイン等の液性因子と、造血支持骨髓間質細胞株との共培養を組み合わせることによって、造血幹細胞の *in vitro* 増幅が多くの研究者により試みられている[9, 10, 11]。しかし、いずれの条件においてもサイトカインを生体内濃度の数百倍から数千倍の濃度で添加しており、*in vivo* での造血幹細胞増殖機構を正しく反映しているとはいえず、*in vitro* で生体の造血幹細胞増殖を完全に再現するには至っていない[12, 13]。さらに、我々がこれまでに行った研究では、致死量放射線照射マウスに骨髓細胞を移植し、造血系再構築時の血清中サイトカイン濃度を測定したところ、SCF, Flt-3 ligand, IL-6 とも正常時と比較して顕著な濃度差は無いことを明らかにしており[12]、*in vitro* で造血幹細胞の増殖に有効なシステムであっても骨髓内の増殖機構と合致しているわけではないことが示唆されている。

15Gy 程度の放射線照射は、血球細胞や骨髓細胞を含む各種体細胞の減少を引き起こし、個体の死をもたらすが、特に造血系の破壊による貧血、免疫障害が直接的な死亡要因となる場合が多い[12, 14]。しかし前述の Till の実験で示

されたように、照射後短時間の内に同系マウスの骨髄細胞を移植すると、移植した骨髄細胞中の造血幹細胞がマウス骨髄内で増殖し、骨髄提供マウス造血幹細胞由来の血球系細胞が産生されることで造血系は再構築され、マウスは生存できる[15, 16]。また、生物が強いストレス環境に曝露されると体内のステロイドホルモンの分泌が上昇し、素早くストレスに対応しようとすることが知られている[16, 17]。致死量放射線照射も生体にとっては強いストレスである。致死量放射線照射後に骨髄細胞を移植したマウスの骨髄内では、減少した末梢の成熟血球細胞、および骨髄内にあるそれらの前駆細胞を補充すべく造血幹細胞が盛んに増殖していることから、造血幹細胞の自己複製機構が正常時よりも強力に働いているのではないかと考えた。そこで本研究では致死量放射線照射後に骨髄移植したマウスの造血幹細胞の動態について解析し、骨髄移植後のマウス血清と性ホルモンを用いた造血幹細胞の *in vitro* 増幅を試みた。

材料と方法

マウス

実験に用いたマウスは C3H/HeN (雄/雌), 日本 SLC 株式会社より購入した。購入後, specific pathogen-free condition (SPF) で飼育し, 8 週齢~12 週齢のマウスを実験に用いた。

造血支持細胞株

造血支持細胞株 MS-5[18]は 10% (v/v) HS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ペニシリン, ストレプトマイシン, ネオマイシン) を含む α -MEM を用い, 5% (vol/vol) CO_2 , 37°C インキュベーターで培養し, 7 日毎に継代した。

骨髄細胞移植

SOFTEX (SOFTEX 株式会社, 東京, 日本) を用いてマウスに致死量放射線 (15Gy) を 1.1Gy/ min (140Kvp, 8mA) で照射し, 照射後 3 時間以内に正常マウスの有核骨髄細胞をマウスあたり $2 \times 10^5 \text{ cells}/0.2 \text{ ml}$ α -MEM で尾静脈注射により移植した。

末梢血細胞数の測定

骨髄移植後 7 日目までは毎日 3 匹ずつ, 7 日目以降は 2 日から 3 日ごとに 2 匹の末梢血細胞数を測定した。マウスの眼窩静脈より採血し, 自動血球計数機 (CELLTAC MEK-5180, 日本光電工業株式会社) を用いて, 末梢血中の白

血球数，赤血球数，ヘマトクリット数，血小板数を計測した。

血清の回収

末梢血細胞数を測定したマウスはエーテル麻酔下で心臓採血により屠殺した。採集した血液は室温で2時間静置し，遠心後血清を回収し， -70°C で保存した。

骨髓細胞の調整

マウス屠殺後，大腿骨，脛骨から骨髓細胞を 0.3% (v/v) FBS を含む α -MEM に懸濁し，その一部の懸濁液をチュルク染色液で染色後，位相差顕微鏡下で血球算定盤を用いて有核生細胞数を計測した。このうち 1×10^6 個の細胞はフローサイトメトリー解析に用い（フローサイトメトリー解析の項参照），残りの細胞は遠心して回収し，全 RNA 抽出に用いた（全 RNA の抽出と cDNA 化の項参照）。

メンブレンを介した共培養

まず cell culture insert (pore size $0.45 \mu\text{m}$ ，直径 23mm, #353493, Falcon, U.S.A.) を逆さまにし，メンブレンの部分に単細胞浮遊液とした MS-5 を播種する（図 1-①）。クリーンベンチ内で一時間ほどその状態で静置することにより，MS-5 をメンブレンに付着させる（図 1-②）。メンブレンを 10% (v/v) HS， $100 \mu\text{g/ml}$ 抗生物質を含む α -MEM を用いて 5% (vol/vol) CO_2 ， 37°C インキュベーターで培養し，7 日毎に培地交換を行い，メンブレンの裏に MS-5 を confluent に増殖させ，共培養実験に用いた。この状態で cell culture insert 内に骨髓細胞を播種，

培養すると、MS-5 がメンブレンの孔から仮足を伸ばしているため骨髓細胞は MS-5 と接触する (図 1-⑤)。しかしメンブレンの孔は細胞体を通さないで別々に細胞の回収が可能であり、共培養下での MS-5 の遺伝子発現解析が可能である。対照群として同じ培養液で骨髓細胞のみの浮遊培養、MS-5 を 6 ウェルプレート (直径 35mm, #353046, Falcon, U.S.A.) に通常どおり播種し、cell culture insert で隔てて MS-5 と接触しない条件での培養を行った (図 1-④)。培養液は正常マウス血清、骨髓移植後 3 日目のマウス血清を Ultrafree-CL (pore size 0.22 μ m, ミリポア社, 東京, 日本) でろ過滅菌してそれぞれ 10% (v/v) で α -MEM に添加したものを使用した。サイトカインとホルモンは表 1 の濃度で添加した。

それぞれ 1 ウェルあたり 1×10^6 個の正常マウス全骨髓細胞を播種した。培養開始から 7 日後に骨髓細胞を回収して 2%トリパンブルー添加 PBS で染色して生細胞数を計測し、フローサイトメトリー解析を行った。

表 1. 共培養実験に用いたサイトカインとホルモン

Factor	製造元	Concentration
SCF	PeptoTech (London, England)	500pg/mL
IL-6	PeptoTech (London, England)	100pg/mL
Flt-3 ligand	PeptoTech (London, England)	5ng/mL
17-beta estradiol	Sigma (東京, 日本)	5ng/mL
Testosterone	ナカライ (東京, 日本)	100ng/mL
Hydrocortizone	Sigma (東京, 日本)	10^{-5} M

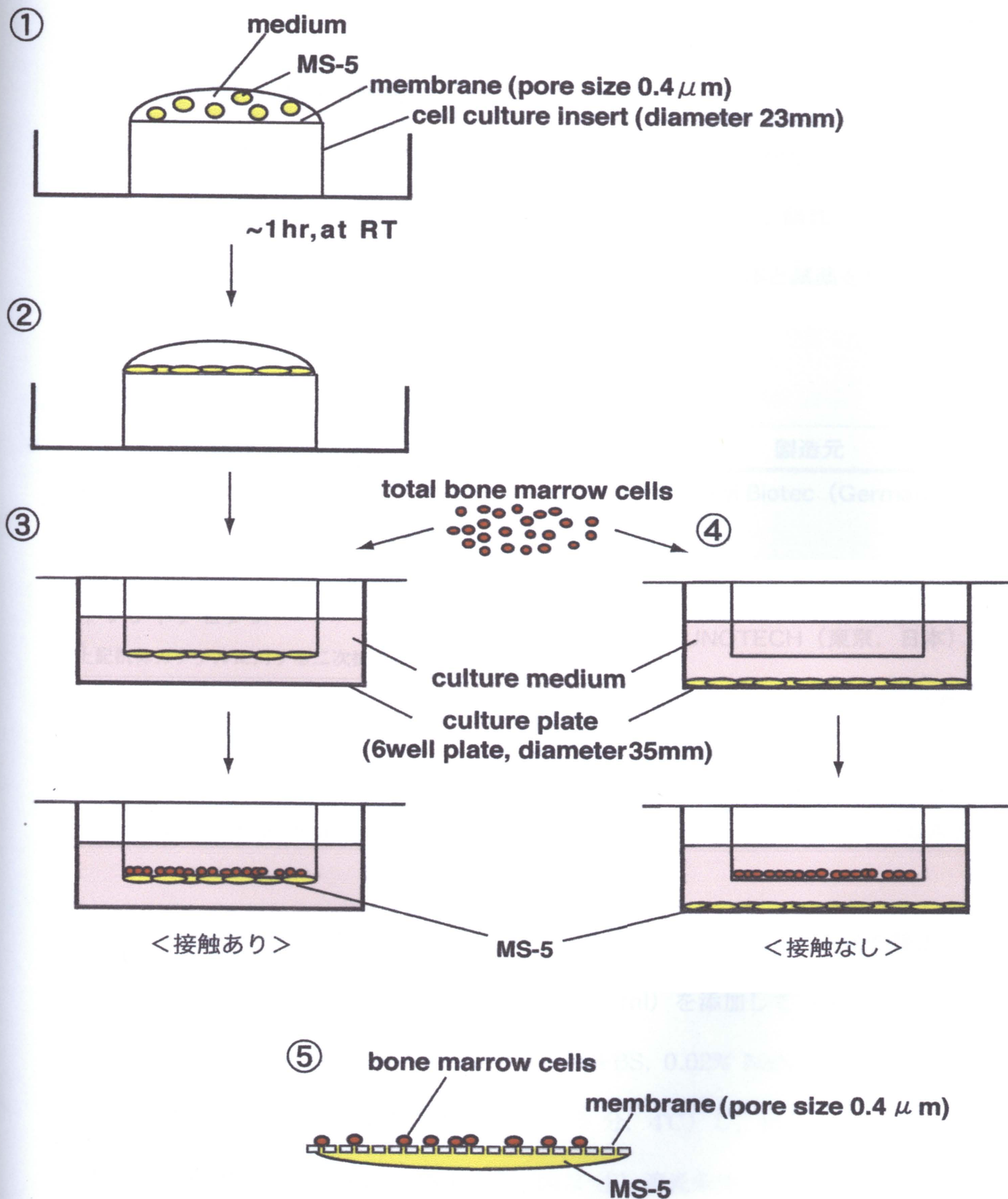


図1. メンブレンを介した骨髄細胞とMS-5の培養方法

- ① cell culture insertを逆向きに置き、MS-5を播種する。
- ② 1時間ほど静置するとMS-5がメンブレンに付着する。
- ③ MS-5がメンブレン上でconfluentになるまで培養し、cell culture insert内に骨髄細胞を播種する。骨髄細胞はMS-5と接触することができる。
- ④ controlとしてはMS-5を6well plateに播種しconfluentに増殖させたものを用いる。この場合、骨髄細胞はMS-5と接触しない。
- ⑤ メンブレン部分の拡大図

フローサイトメトリー解析

骨髓移植後のマウス骨髓細胞中の造血幹細胞 [KSL 細胞, 分化抗原 (Lineage) マーカー(-; 陰性), *Sca-1*(+; 陽性), *c-kit*(+; 陽性)] 細胞の動態をフローサイトメトリーで解析した。解析には以下の抗体と試薬を用いた。

表 2. フローサイトメトリー解析に用いた抗体と試薬

抗体または試薬	標識	製造元
Lieage cell delpetion kit (マウス分化抗原 : CD5, CD45R, CD11b, anti-Ly-6G, 7-4, Ter-119 に対する抗体カクテル)	ビオチン	Miltenyi Biotec (Germany)
ストレプトアビジン (上記抗体カクテルに対する二次抗体)	ECD	IMMUNOTECH (東京, 日本)
抗マウス <i>Sca-1</i> 抗体	PE	IMMUNOTECH (東京, 日本)
抗マウス <i>c-kit</i> 抗体	FITC	コスモバイオ (東京, 日本)
7-AAD viability dye (死細胞検出試薬)		IMMUNOTECH (東京, 日本)
ヤギγグロブリン (Fc 受容体のブロッキング液)		ICN Pharmaceuticals (U.S.A.)

細胞の染色は以下の手順で行った。まず, 1×10^6 個の細胞を遠心し上清を除去し (図 2-①), ここにヤギγグロブリン (4mg/ml) を添加して (図 2-②), 氷上に 10 分間静置した (図 2-③)。2% (v/v)FBS, 0.02% NaN_3 を含む PBS⁻ (染色用緩衝液) で洗浄後遠心 (3000r/m, 5 分, 4℃) し, 抗 *Sca-1* 抗体, 抗 *c-kit* 抗体, 抗 Lineage 抗体を加え (図 2-④) 遮光条件下で 30 分, 4℃に静置し, 抗体を結合させた (図 2-⑤)。次に緩衝液で洗浄後, 遠心 (3000r/m, 5 分, 4℃) し, phycoerythrin-Texas Red (ECD) 標識ストレプトアビジン

を添加し（図 2-⑥）、遮光条件下で室温に 15 分静置し、抗 Lineage 抗体に結合させた（図 2-⑦）。緩衝液で洗浄し、遠心（3000r/m, 5 分, 4℃）後、緩衝液 600 μ l に再懸濁し（図 2-⑧）、死細胞選別のための 7-AAD Viability Dye を最終濃度 1.6×10^{-4} % になるように添加して室温で 10 分静置し（図 2-⑨）、ただちに EPICS XL（BECKMAN COULTER, 東京, 日本）で測定した。得られたデータは解析ソフト EXPO32（BECKMAN COULTER, 東京, 日本）で解析した。

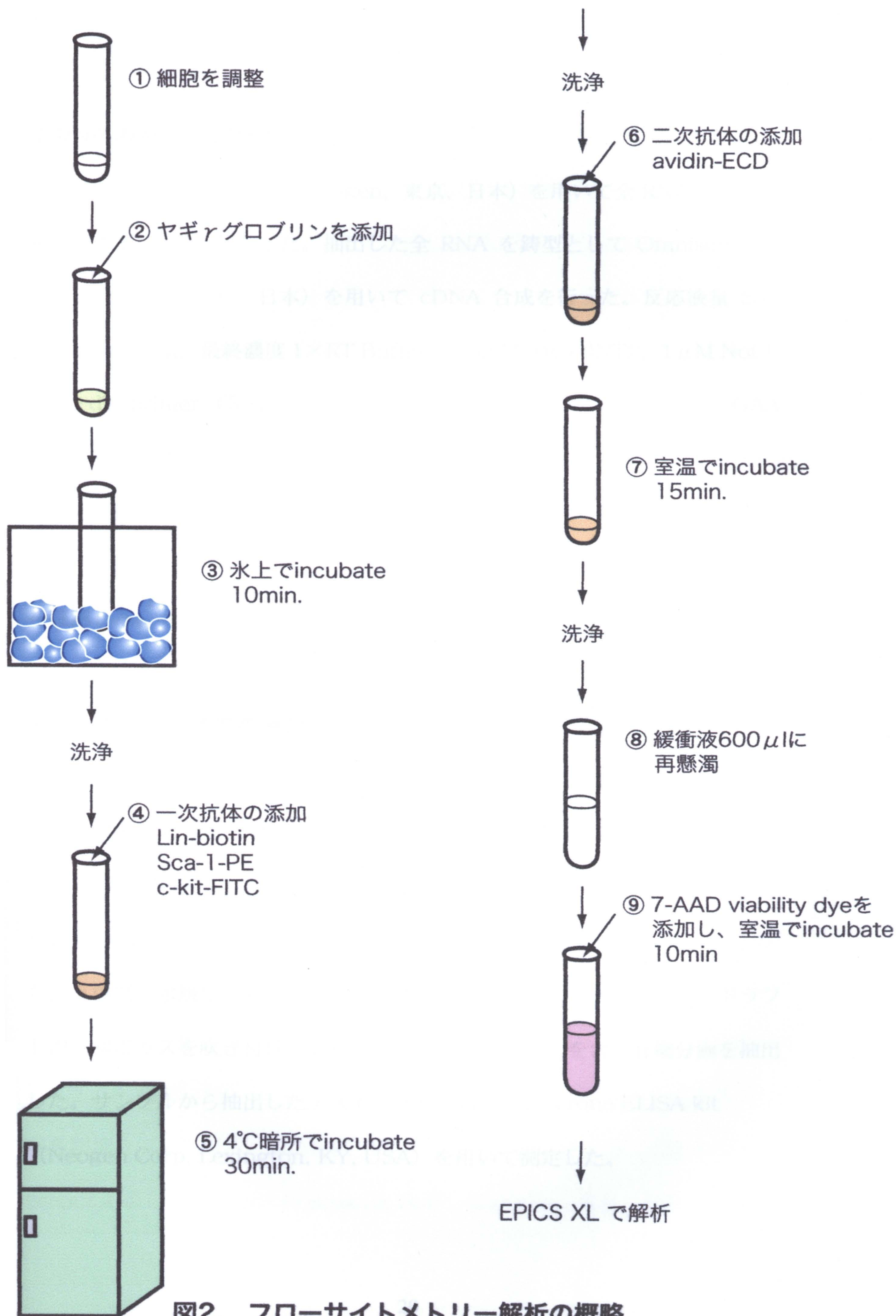


図2. フローサイトメトリ解析の概略

全 RNA の抽出と cDNA 化

TRIZOL LS Reagent (Invitrogen, 東京, 日本) を用いて全 RNA を抽出し, 使用前まで -70°C で保存した。抽出した全 RNA を鋳型として Omniscript RT Kit (QIAGEN, 東京, 日本) を用いて cDNA 合成を行った。反応液量 $20\mu\text{l}$ 中に RNA $2\mu\text{g}$, 最終濃度 $1\times\text{RT Buffer}$, 0.5mM each dNTP, $1\mu\text{M}$ Not I - oligo-dT primer ($5'\text{-AAC-TGG-AAG-AAT-TCG-CGG-CGG-CAG-GAA-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-3'}$), 4 unit の Omniscript Reverse Transcriptase を加え, 37°C で90分反応させてcDNAを合成した。Polymerase chain reaction (PCR) で β -actin の発現を確認することで cDNA 合成の成否を確認した。

テストステロン濃度の測定

血清中に含まれるテストステロン濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。詳細はキット付属のプロトコールに従った。 -70°C で保存してあった正常マウス血清, 骨髄移植後3日目のマウス血清 $100\mu\text{l}$ をガラス試験管に入れ, ジエチルエーテル 1ml を加え良く攪拌したのち, 有機層と水層に分離するまで静置後, 有機層を別の試験管に移し, ドラフト内で窒素ガスを吹き付けて乾燥させ, テストステロンを含む有機分画を抽出した。サンプルから抽出したテストステロンは testosterone ELISA kit (Neogen Corp, Lexington, KY, USA) を用いて測定した。

MS-5 での性ホルモン受容体の発現解析

MS-5 から全 RNA を抽出，cDNA を合成し，それを鋳型として性ホルモン受容体の発現を RT-PCR で解析した。マウスアンドロゲン受容体 (AR)，マウスエストロゲン受容体 α (ER- α)，マウスエストロゲン受容体 β (ER- β) に特異的なプライマーをそれぞれ設計し，PCR を行った。ポジティブコントロールとしてマウス卵巣由来 cDNA を用いた。PCR 条件は表 3 に示す。

表 3. PCR 条件

Gene	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Product size (base pairs)
<i>Androgen receptor</i>	CAGCAACAACAGCAGCAGCACCA ATACAGAGACAGAGAGGACGGGA	68	498
<i>Estrogen receptor-alpha</i>	CCCTACTACCTGGAGAAC CTAGGTTGGTCAATAAGCC	60	664
<i>Estrogen receptor-beta</i>	CAACTTCTGGACACCTCT ACTCTCTGCTTCCTGGCT	64	720
<i>beta-actin</i>	TCAGAAGGACTCCTATGTGG TCTCTTTGATGTACGCACGA	50	500

Real-time PCR 法による定量発現解析

マウス血清，あるいはホルモンを用いて共培養後の MS-5 でのサイトカインの発現解析を行うため，PCR プライマー設計 Software を用いて目的の遺伝子に特異的な PCR primer を設計し，骨髓細胞由来 cDNA を鋳型として Real-time PCR による定量発現解析を行った[20, 21]。PCR 反応は SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Kit (TaKaRa, 東京, 日本) を用い，反応液量 20 μ l 中に cDNA の 10 倍希釈液を 5 μ l 加え，最終濃度 0.2 μ M sense primer, 0.2 μ M antisense primer および 1 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa, 東京, 日本) を加え，

LightCycler（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社，東京，日本）を用いて，Denature 95℃，5 秒，各 Annealing 温度，20 秒，Extension 72℃，15 秒を 1 サイクルとして 45 サイクル行った。その後，LightCycler software version 3.5（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社，東京，日本）を用いて発現解析を行った。PCR 条件は表 4 に示す。

Real time PCR 法を行うにあたり，ほぼ全ての臓器で恒常的に発現している遺伝子である β -actin の発現を内部標準とした。各遺伝子に対して PCR を行った後，内部標準遺伝子に対する相対発現量を求め，正常血清を用いて骨髓細胞と接触させずに共培養した MS-5 での発現量を 1 として示した。

表 4. LightCycler を用いた定量発現解析のための PCR 条件

Gene	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Product size (base pairs)
<i>flt-3-ligand</i>	TTCCTCCCTGTTGCTGCTGT AATGTATCTCGGTGTTGACG	60	290
<i>SCF</i>	CTTGACTACTCTTCTGGACA TATTCTTCGGTGCGTTTTCT	55	128
<i>G-CSF</i>	GCTGTGGCAAAGTGCACTA ATCTGCTGCCAGATGGTGGT	66	419
<i>IL-6</i>	GTATGAACAACGATGATG CCAGAAGACCAGAGGAAA	60	129
<i>IL-11</i>	GGCAGACACACGGCAACT AGGCGAGACATCAAGAGC	69	291
<i>SDF-1alpha</i>	CCAAACTGTGCCCTTCA TTCTTCTGTCGCTTCTT	60	184
<i>Angiopoietin-1</i>	CATTCTTCGCTGCCATTC AGTTCCCGTCGTGTTCTG	63	138
<i>beta-actin</i>	CAGGGTGTGATGGTGGGAATGGG CAGGATGGCGTGAGGGAGAGCA	50	408

有意差検定

有意差検定は Student's t-test を用いて行った。 $p < 0.05$ の時、有意な差があると判定した。

結果

骨髄移植後の末梢血の動態

白血球数は、移植後 1 日目から減少しはじめ、3 日目には正常値の約 $1/15$, $3 \times 10^2 \text{cells}/\mu\text{l}$ にまで減少した。9 日目から細胞数は徐々に回復して 21 日目には $4 \times 10^3 \text{cells}/\mu\text{l}$ とほぼ正常細胞数に戻った (図 3-A)。赤血球数は、移植後 3 日目から減少しはじめ、12 日目には正常値の約 $2/3$, $7 \times 10^6 \text{cells}/\mu\text{l}$ にまで減少した。その後徐々に回復して 18 日目には $8.4 \times 10^6 \text{cells}/\mu\text{l}$ とほぼ正常細胞数に戻った (図 3-A)。血小板数は、移植後 1 日目から減少しはじめ、9 日目には正常値の約 $1/10$, $1 \times 10^7 \text{cells}/\mu\text{l}$ にまで減少した。その後徐々に回復して 27 日目には $6 \times 10^7 \text{cells}/\mu\text{l}$ とほぼ正常細胞数に戻った (図 3-A)。また、ヘマトクリット値は、移植後 3 日目から減少しはじめ、12 日目には 30% 程度にまで減少した。その後徐々に回復して 18 日目には 52.5% とほぼ正常値に戻った (図 3-B)。

骨髄中の KSL 細胞 (Lineage⁻, Sca-1⁺, c-kit⁺細胞) 数の変化

細胞数の変化

正常マウスの全骨髄細胞数 (2 本の大腿骨と 2 本の脛骨由来) は、マウス一匹あたりおよそ $4 \times 10^7 \text{cells}$ であるが、骨髄移植後 1 日目から減少し、4 日目にはおよそ $4 \times 10^6 \text{cells}$ まで減少した。その後徐々に細胞数は回復して 8 日目には $3.6 \times 10^7 \text{cells}$ とほぼ正常値に戻った (図 3-C)。

正常マウスの脾臓細胞数は、マウス一匹あたりおよそ 1.3×10^7 cells であるが、骨髄移植後 1 日目から減少し、3 日目にはおよそ 5×10^6 cells まで減少した。その後徐々に細胞数は回復して 14 日目には 1.1×10^8 cells とほぼ正常値に戻った（図 3-C）。

KSL (Lineage⁻, Sca-1⁺, c-kit⁺) 細胞数の変化

正常マウス骨髄中の KSL 細胞の割合は全骨髄細胞に対して約 0.06% で、マウス一匹あたり 2×10^4 cells 程存在するが、骨髄移植後 3 日目にはおよそ 1.2×10^3 cells まで減少した。その後 KSL 細胞は急激に増加し、7 日目には 4×10^3 cells まで回復した。その後は増減を繰り返しながら 15 日目にはほぼ正常値に戻った（図 3-D）。脾臓では、正常マウスにおいて KSL 細胞の割合は全脾臓細胞に対して約 0.025% で 3.4×10^4 cells 程存在するが、骨髄移植後 3 日目にはおよそ 4.2×10^3 cells まで減少した。その後脾臓中の KSL 細胞は徐々に増加し、10 日目には 2×10^4 cells まで増加し、骨髄中の KSL 細胞と同じような増減を繰り返しながら 15 日目にはほぼ正常値に戻った（図 3-D）。

なお、データは示していないが、骨髄移植を施さないマウスは致死量放射線照射後およそ 9～11 日に死亡する。

以上の結果から，骨髓移植後の骨髓と脾臓いずれの臓器においても KSL 細胞の移植後 3 日目からの急激な増殖を確認できた。これらのことから，骨髓移植後 3 日目のマウスには，造血幹細胞を盛んに増殖させる機構が存在し，血清中に造血幹細胞増殖因子が含まれるのではないかと考えた。

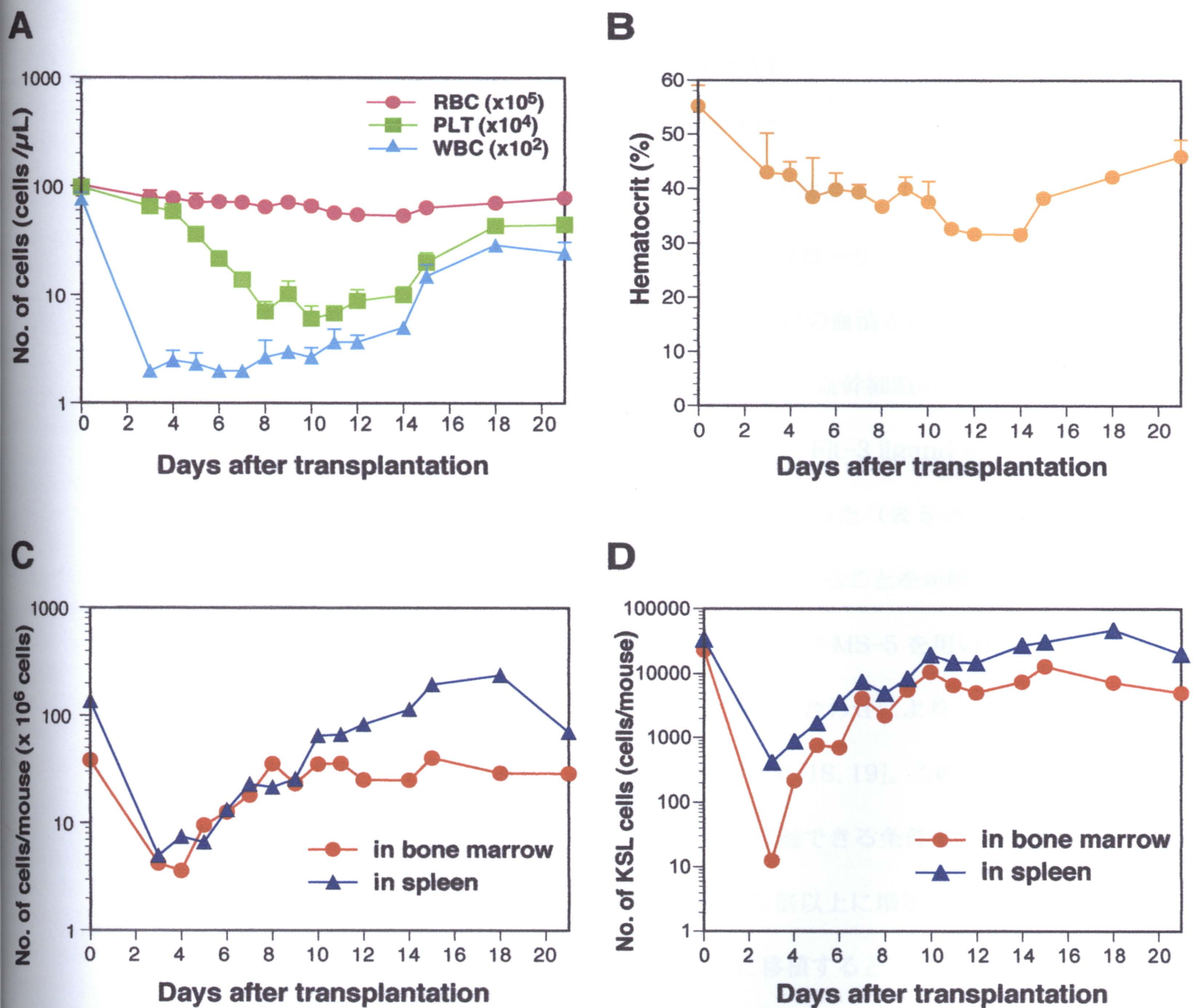


図3. 骨髄移植後の造血系の回復動態

- A) 赤血球 (RBC)、血小板 (PLT)、白血球 (WBC) 数
- B) ヘマトクリット値
- C) 骨髄、脾臓の細胞数
- D) 骨髄、脾臓の造血幹細胞 (KSL細胞) 数

MS-5 との共培養による全骨髓細胞中の造血幹細胞の増幅

骨髓移植マウスの骨髓中の KSL 細胞数が、移植後 3 日目以降に増加が認められたことから (図 3-D), 骨髓移植後 3 日目の血清中に、全骨髓細胞中の KSL 細胞を特異的に増幅させる因子の存在を想定した。そこで移植後 3 日目の血清を用いて骨髓細胞を培養した。培養 7 日目の骨髓細胞をフローサイトメーターで解析し、KSL 細胞数を求めた。ところが、移植後 3 日目の血清を添加しても KSL 細胞は増加しなかった (表 5-A)。正常マウス血清に造血幹細胞の *in vitro* 増幅に一般的に用いられるサイトカインである SCF, IL-6, Flt-3 ligand を添加した場合も培養した骨髓細胞中の KSL 細胞は増加しなかった (表 5-A)。

この結果は、造血幹細胞増殖には支持細胞の存在が重要であることを示唆する。

そこで次に骨髓細胞と MS-5 との共培養を行った。ここで MS-5 を用いたのは、これまでの報告で MS-5 が各種サイトカインとの組み合わせにより、造血幹細胞の増殖を支持することが報告されているためである[18, 19]。この場合、骨髓移植後 3 日目の血清を用いて MS-5 と骨髓細胞が接触できる条件で培養した骨髓細胞中の KSL 細胞は、7 日目に培養開始時の 25 倍以上に増加した

(表 5-B)。この細胞を致死量放射線照射したマウスに移植すると、移植した細胞数に応じて CFU-S (Day 9) が形成され、3 ヶ月以上の生存を支持した

(図 4-A, B)。従って増加した細胞は長期骨髓再構築能をもつ造血幹細胞であると判断された。これに対して、移植後 3 日目の血清を用いても、MS-5 と骨髓細胞が直接接触できない条件で培養した KSL 細胞は増加しなかった

(表 5-C)。

また、正常マウス血清を用いた場合は、MS-5 と骨髄細胞の接触を維持して共培養しても、培養した骨髄細胞中の KSL 細胞は殆ど増加しなかった

(表 5-B)。正常血清にサイトカインを添加した時には、MS-5 と骨髄細胞の接触が維持されている場合に、培養した骨髄細胞中の KSL 細胞は 7 日間の培養で培養開始時の約 5 倍に増加したが、移植後 3 日目の血清に比べると劇的な増加は起こらなかった (表 5-B)。

以上の結果は、① 骨髄中の KSL 細胞の増殖には、支持細胞との直接接触が重要であること、② 骨髄移植後 3 日目の血清には正常血清には存在しない造血幹細胞増殖因子が存在すること、③ そしてその因子は、支持細胞に何らかの作用をすることにより、ここに接触している造血幹細胞を増殖させることを示唆した。

A. Suspension culture (MS-5なし)

Culture condition	No. of total cells ($\times 10^4$ cells/well)	KSL cells (%)	No. of KSL cells (cells/well)	Fold Expansion
Inoculation	100	0.011	110	1
D3	11.04 \pm 4.13	0	0	0
NS+C	5.85 \pm 0.43	0	0	0
NS	5.6 \pm 0.2	0	0	0

B. Co-culture with MS-5 cells (MS-5とbmcが接触)

Culture condition	No. of total cells ($\times 10^4$ cells/well)	KSL cells (%)	No. of KSL cells (cells/well)	Fold Expansion
Inoculation	100	0.011	110	1
D3	411.4 \pm 33.6	0.07	2879	26.16
NS+C	208.1 \pm 4.3	0.0259	538	4.90
NS	186.1 \pm 7.7	0.0078	145	1.32

C. Co-culture with MS-5 cells (MS-5とbmcが接触しない)

Culture condition	No. of total cells ($\times 10^4$ cells/well)	KSL cells (%)	No. of KSL cells (cells/well)	Fold Expansion
Inoculation	100	0.011	110	1
D3	110.76 \pm 24.34	0.0053	58	0.53
NS+C	18.28 \pm 3.18	0	0	0
NS	21.74 \pm 3.22	0	0	0

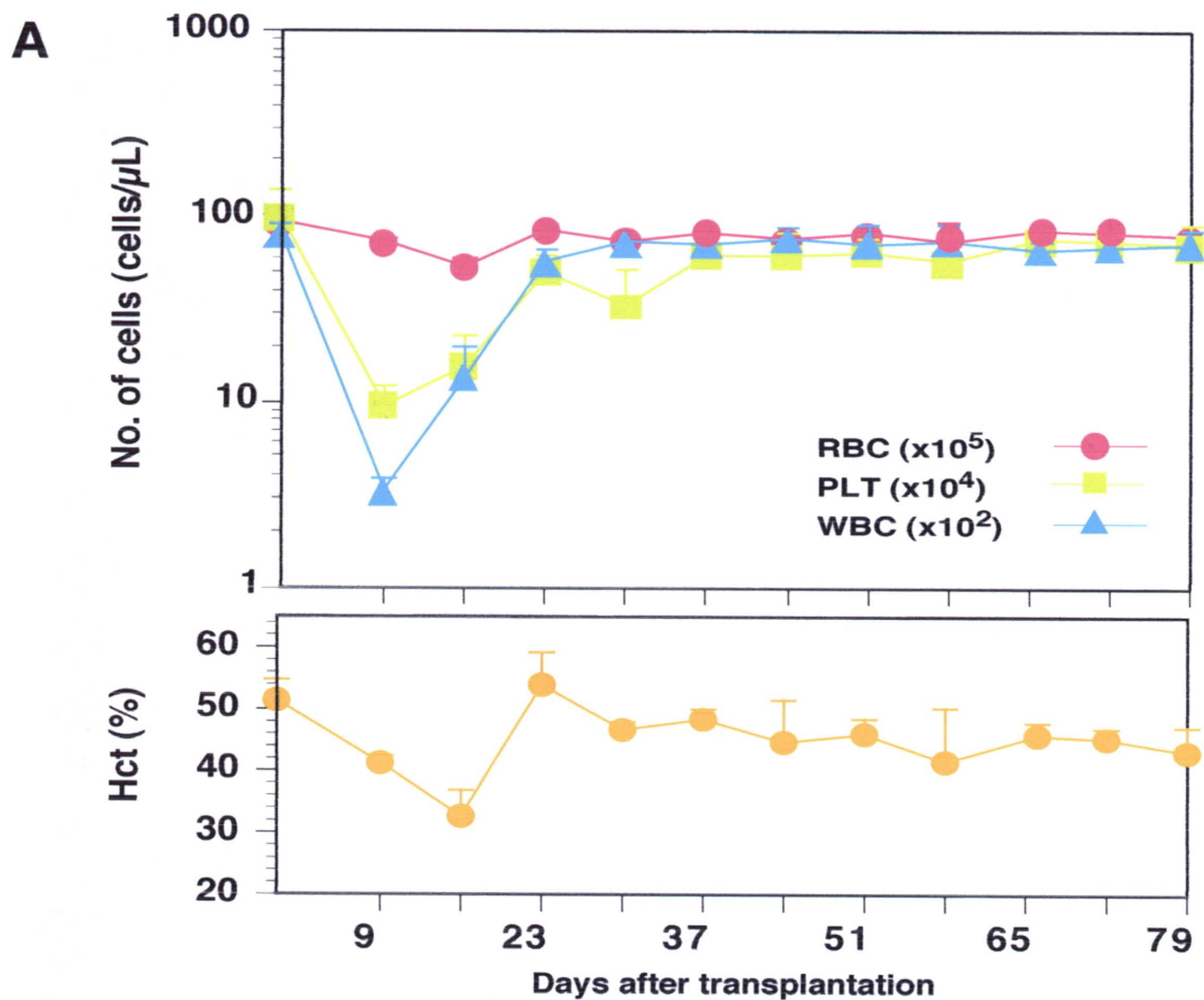
D3 . . . 骨髄移植後3日目のマウス血清

NS+C . . . 正常マウス血清にサイトカイン [Flt-3 ligand (5ng/mL), SCF (500pg/mL), IL-6 (100pg/mL)]を添加

NS . . . 正常マウス血清

表5. マウス血清を用いた骨髄細胞の培養

骨髄移植後3日目のマウス血清 (D3)、正常マウス血清 (NS)、正常マウス血清とサイトカイン (NS+C) を添加して、Suspension culture、MS-5と接触、MS-5と非接触の条件で全骨髄細胞を培養し、培養後の骨髄細胞中の造血幹細胞をフローサイトメーターで解析した。



B

Injected bone marrow cells	No. of CFU-S (mean \pm S.E.)	
2×10^5 cells	22.0 ± 5.3	
2×10^4 cells	5.7 ± 1.5	
2×10^3 cells	0.3 ± 0.6	
Not injected	0	

図4. 骨髓移植後3日目の血清を用いた培養で増加した細胞による造血系の再構築
 骨髓移植後3日目のマウス血清を用いて、MS-5と接触できる条件で7日間培養した骨髓細胞を致死量放射線照射したマウスに移植した。

A) 末梢血の回復動態

B) 移植後9日目のCFU-S

共培養後の MS-5 でのサイトカインの定量発現解析

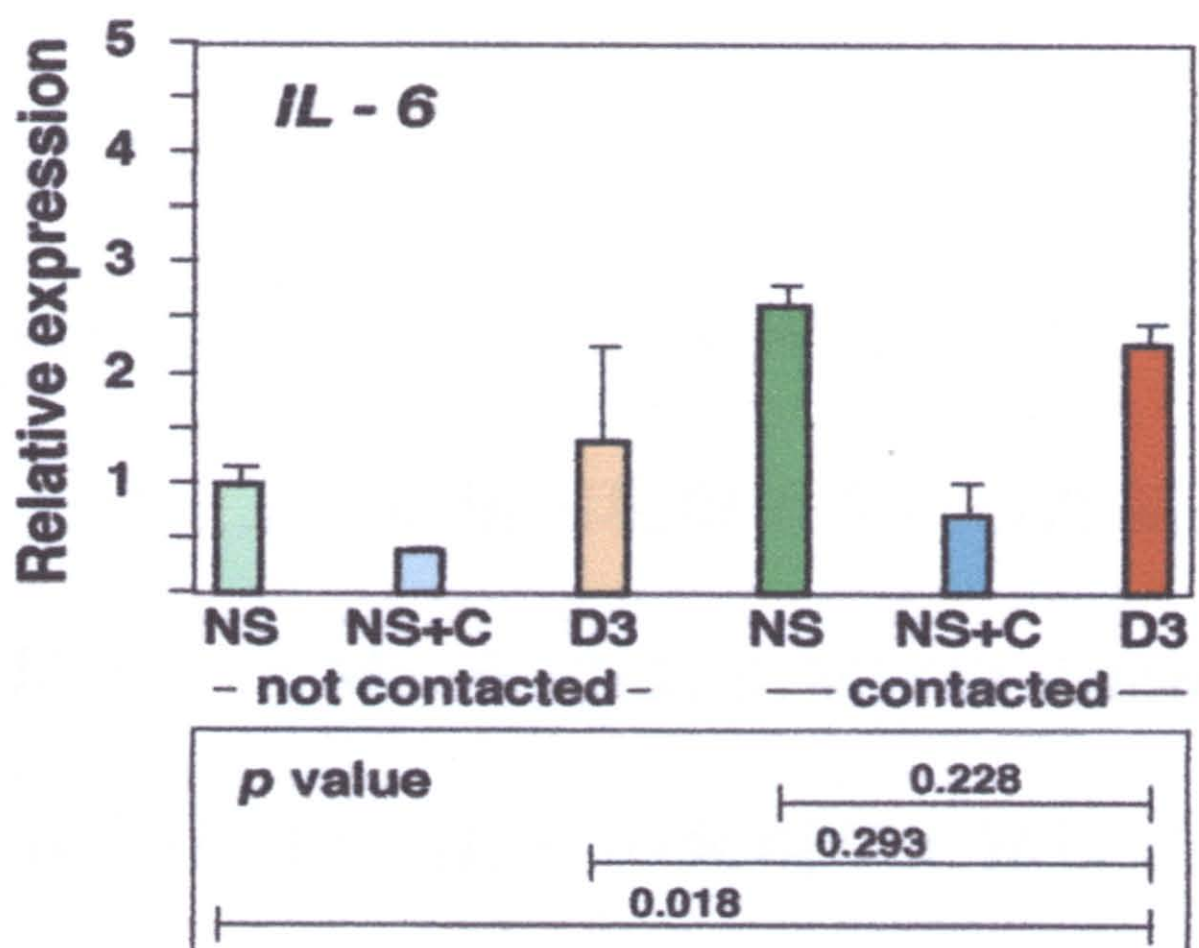
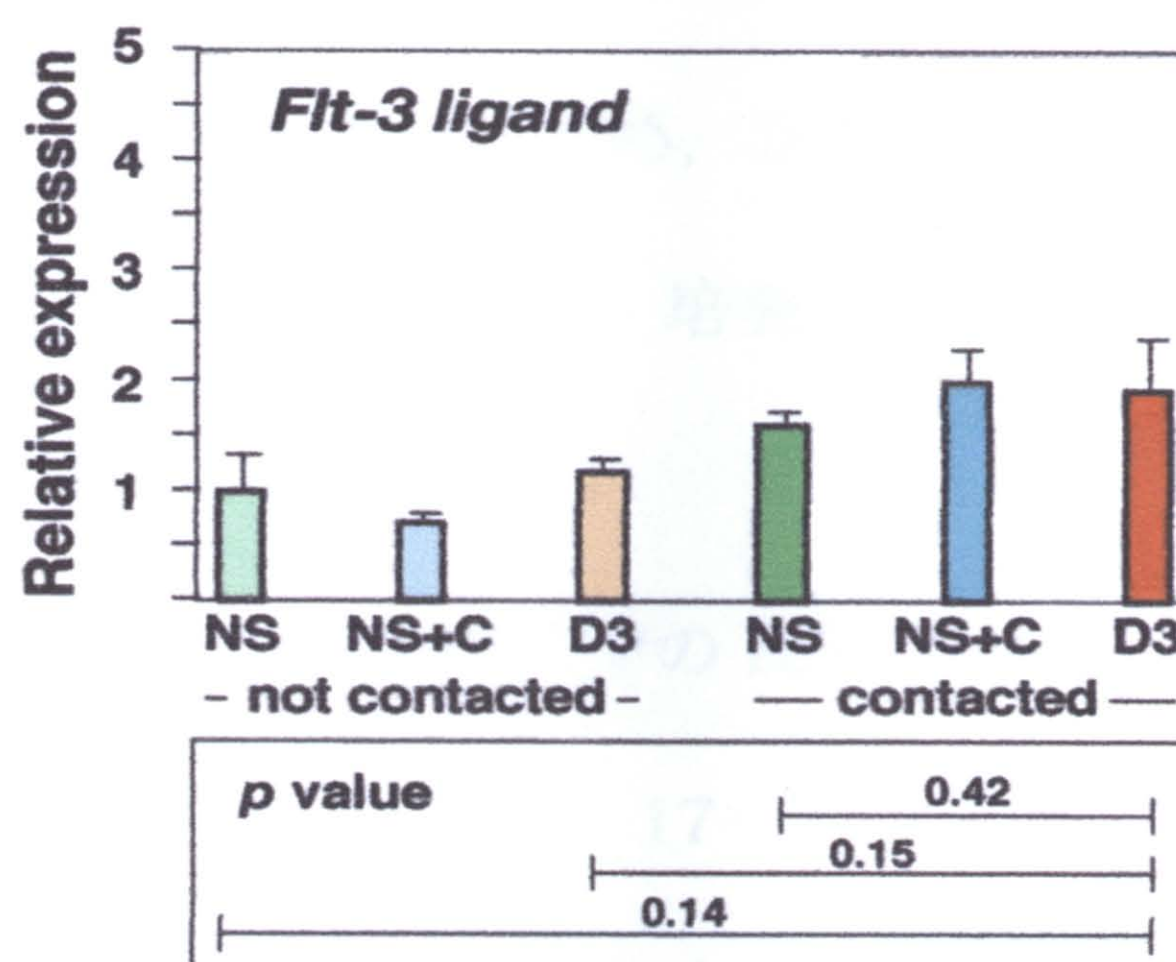
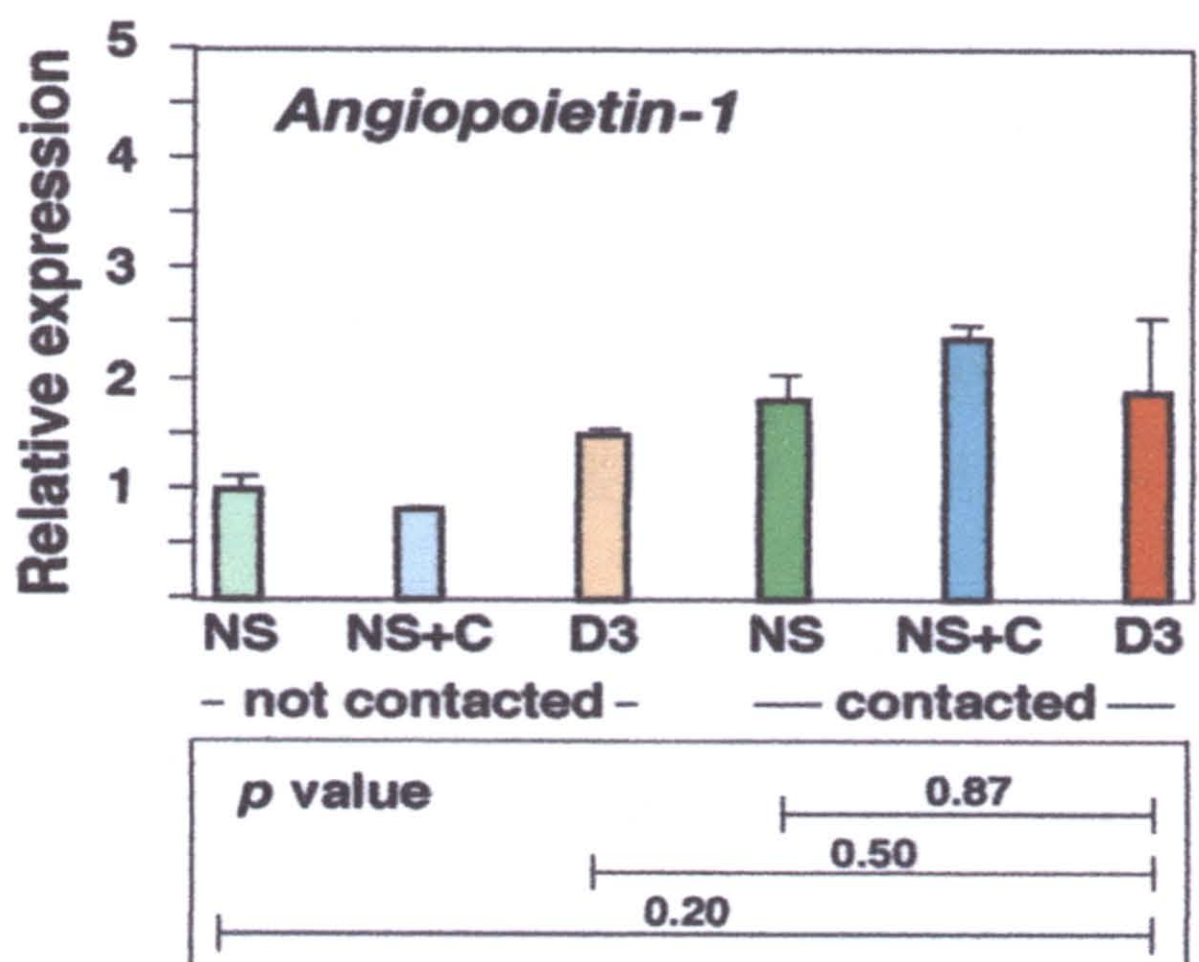
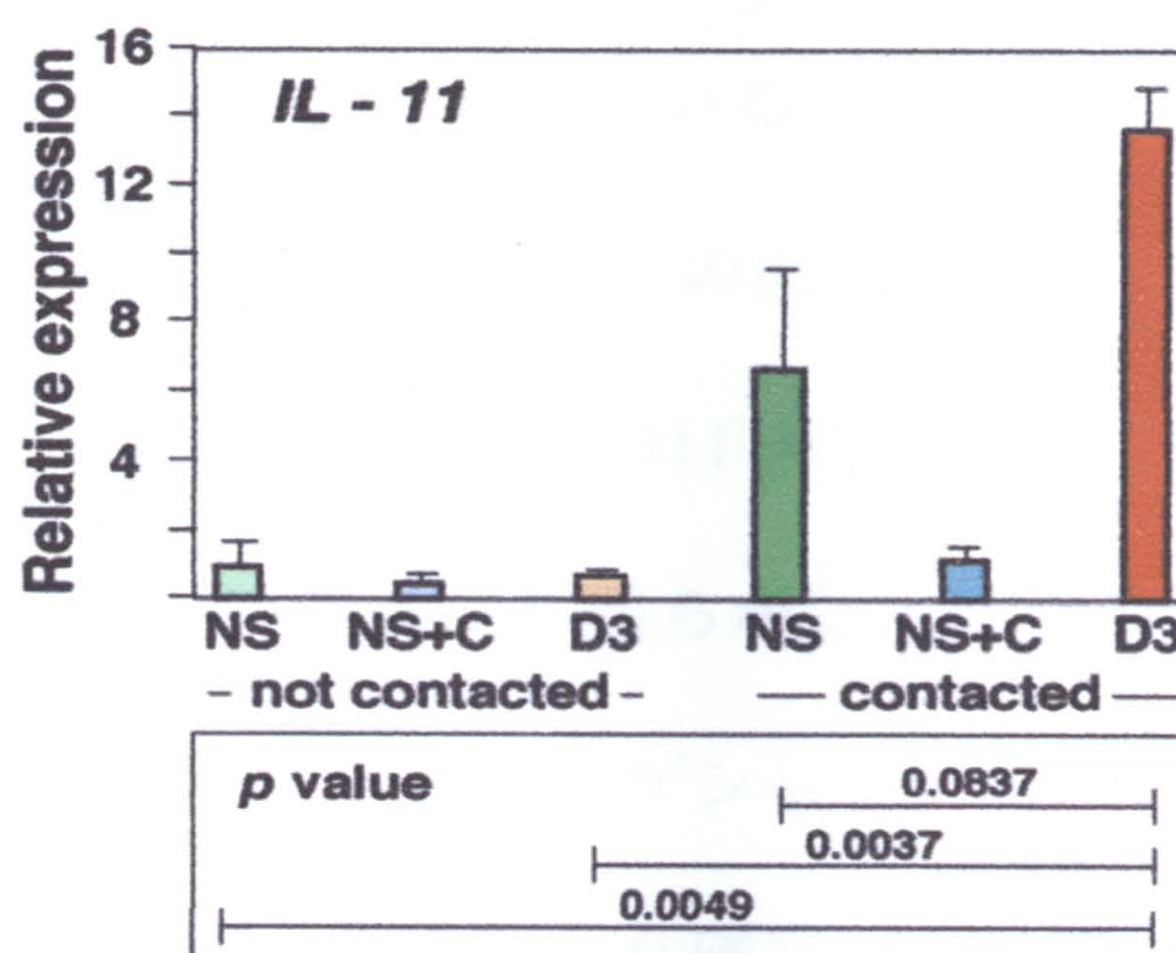
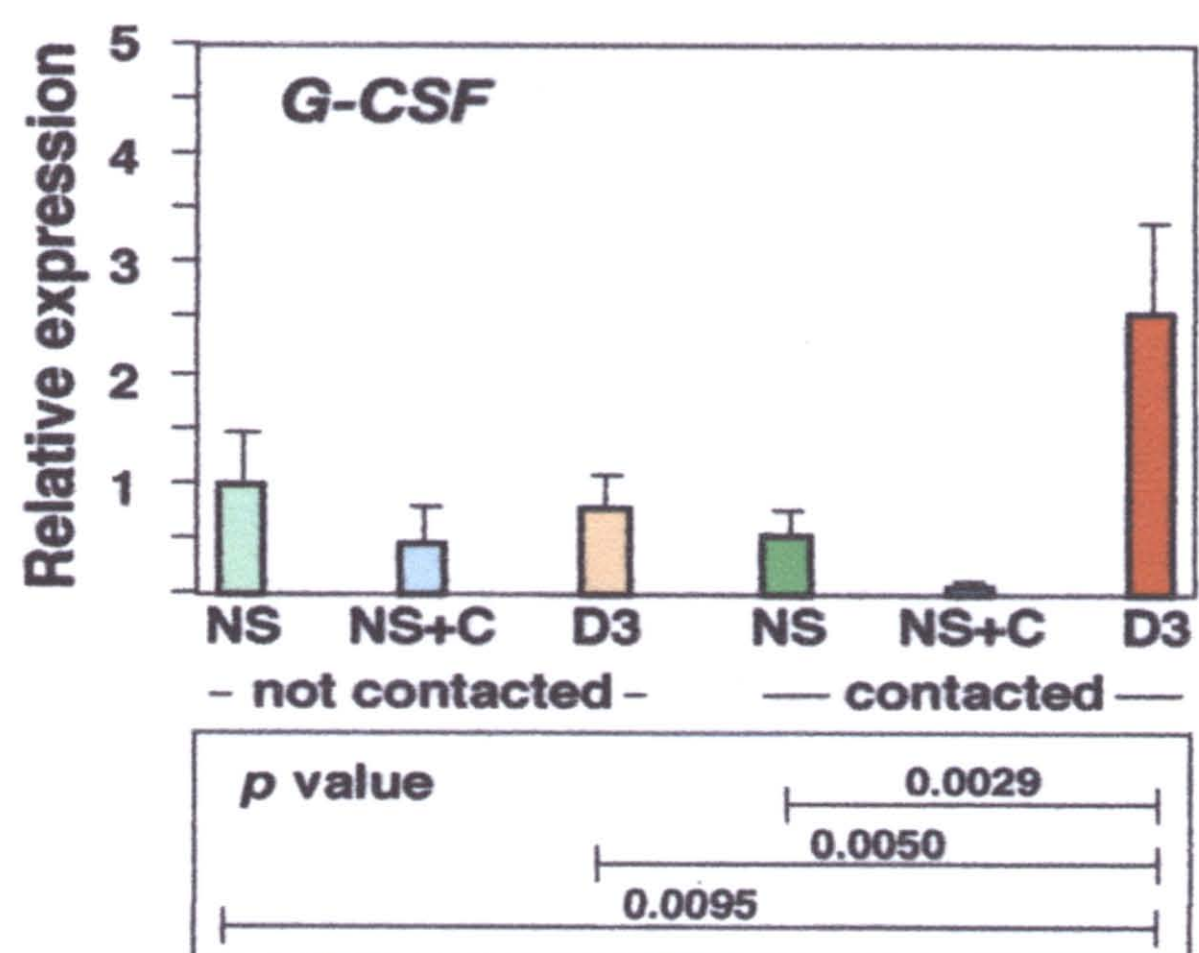
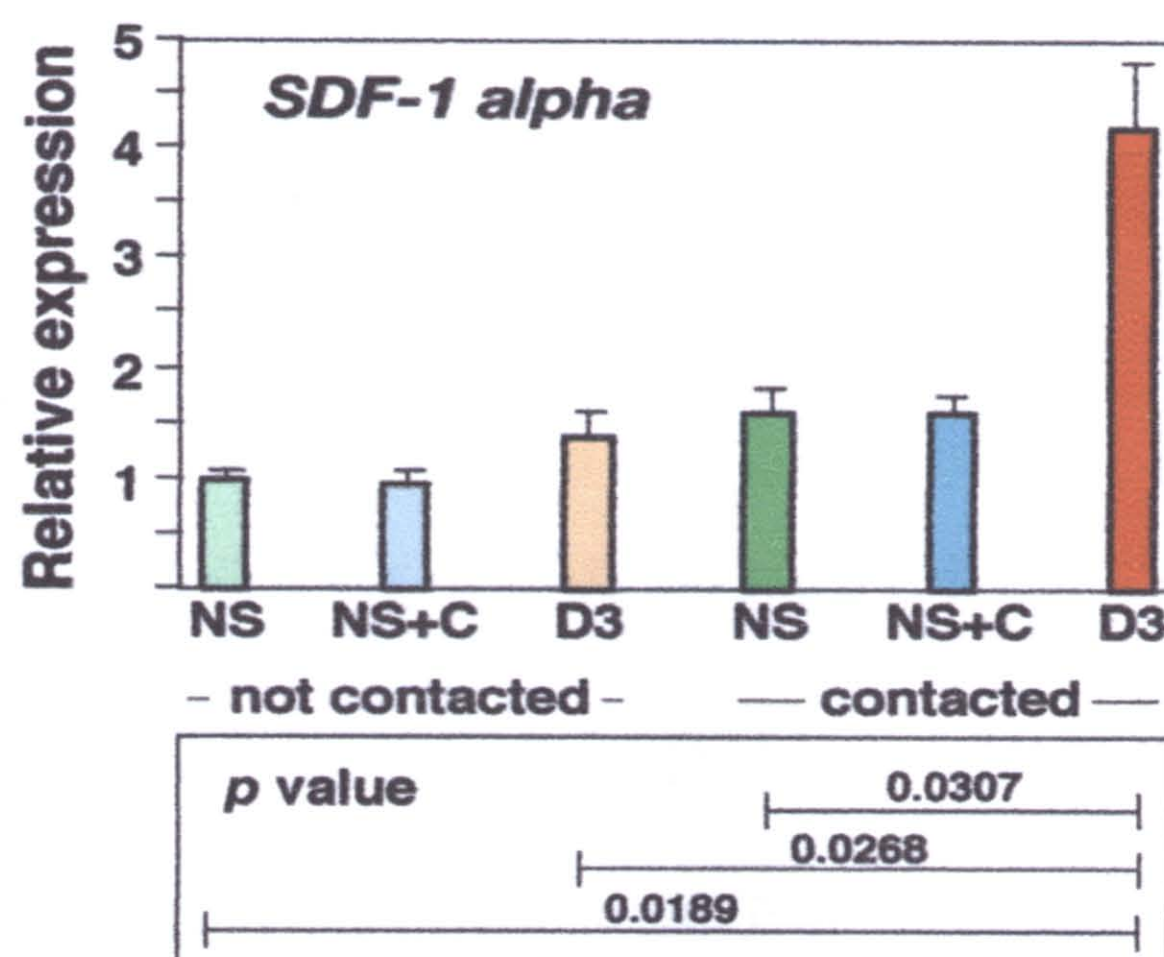
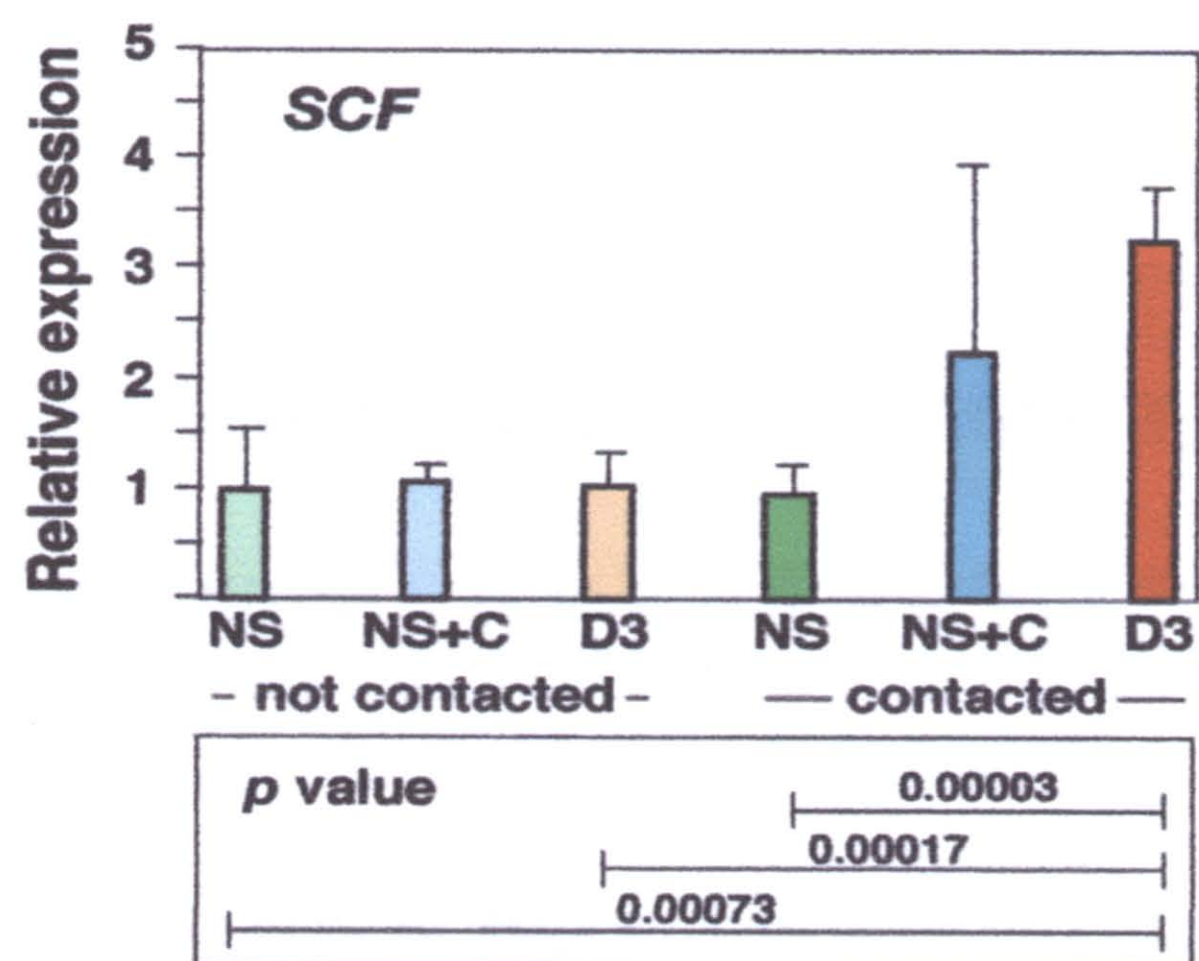
KSL 細胞の増加には① 移植後 3 日目の血清と、② MS-5 との直接接触の二つが重要であったことから、共培養後の MS-5 において造血幹細胞増殖に関与するサイトカインの遺伝子発現が上昇していることが予想された。そこで、共培養後の MS-5 における、造血に関与すると予想されるいくつかの既知のサイトカインの定量発現を Real-Time PCR により測定した。

KSL 細胞が著しく増殖した時の MS-5 では、*SCF*, *SDF-1 α* , *G-CSF*, *IL-11*, *IL-6* の発現が、正常時の MS-5 と比べ著しく上昇していた（図 5）。

移植後 3 日目の血清を用いて骨髓細胞と直接接触できない条件で共培養した MS-5 と比較すると、*SCF*, *SDF-1 α* , *G-CSF*, *IL-11* の発現が上昇していた。さらに、正常血清を用いて骨髓細胞と直接接触できる条件で共培養した MS-5 と比較すると、*SCF*, *SDF-1 α* , *G-CSF* の発現が上昇していた。

発現の上昇していた *SCF*, *SDF-1 α* , *G-CSF*, *IL-6* はいずれも造血幹細胞の増殖や骨髓移植後の骨髓への定着への関与が報告されているサイトカインである[22, 23, 24, 25]。

以上の結果から、MS-5 におけるこれらの造血幹細胞増殖に関与するサイトカインの発現誘導には、骨髓移植後 3 日目の血清と、骨髓細胞との直接接触が重要であることが示された。



骨髓細胞と接触なし (not contacted)

- NS : 正常マウス血清
- NS+C : 正常マウス血清+Cytokine
- D3 : 骨髓移植後3日目のマウス血清

骨髓細胞と接触あり (contacted)

- NS : 正常マウス血清
- NS+C : 正常マウス血清+Cytokine
- D3 : 骨髓移植後3日目のマウス血清

図5. 骨髓細胞を培養後のMS-5でのサイトカインの定量発現解析

正常マウス血清を用いて骨髓細胞と接触しない条件で共培養したMS-5での値を1とした相対発現量を示す。

造血幹細胞増幅における性ホルモンの効果

生物が強いストレス環境に曝露されると体内のステロイドホルモンの分泌が上昇し、素早くストレスに対応しようとすることが報告されている [13, 14]。致死量放射線照射も生体にとっては強いストレスである。また、ステロイドホルモンの一種である性ホルモンは、造血系への関与が報告されている [26, 27, 28, 29]。そこで、性ホルモンであるテストステロンの骨髓移植後の血清中濃度を ELISA 法により測定した。その結果、雌雄とも骨髓移植後 3 日目の血清中テストステロン濃度は、正常時と比較して上昇していることが明らかとなった (表 6)。また、造血支持骨髓細胞株である MS-5 は、アンドロゲンレセプター、エストロゲンレセプター α が発現していることを RT-PCR により確認した (図 6)。性ホルモンの造血幹細胞増殖への関与が予想されたため、正常マウス血清に性ホルモンを添加して MS-5 と骨髓細胞の共培養を行い、培養後の骨髓細胞中の KSL 細胞をフローサイトメーターで解析した (表 7)。

正常マウス血清にテストステロンを添加した場合、骨髓細胞中の KSL 細胞数は 7 日間の共培養で培養開始時の約 10 倍に増加した。一方、 $17-\beta$ エストジオールを添加した場合は、KSL 細胞の劇的な増加は認められなかった。同じステロイドホルモンであるヒドロコルチゾン添加した場合は、KSL 細胞は増加しなかった。Real-time PCR 法により共培養後の MS-5 におけるサイトカインの定量発現解析を行った結果、テストステロンを添加して骨髓細胞を培養した MS-5 では、正常マウス血清のみで培養した MS-5 と比較して、*SDF-1* α 、*IL-11*、*IL-6* の発現が上昇していた (図 7)。

これらの結果は、テストステロンは造血幹細胞増殖に有効であり、骨髄移植後3日目の血清中に含まれる造血幹細胞増殖関連因子の一つがテストステロンであることを示す。

Sample	Concentration of Testosterone (pg/mL)	
Normal male mouse	172.8±23.6	} $\rho = 0.01$
Transplanted male mouse (day 3)	360.6±99.3	
Normal female mouse	8.1±4.2	} $\rho = 0.52$
Transplanted female mouse (day 3)	13.8±13.4	

表6. マウス血清中のテストステロン濃度

正常時、骨髄移植後の血清中テストステロン濃度を、Testosterone ELISA kit (Neogen)を用いて測定した (n=3)。

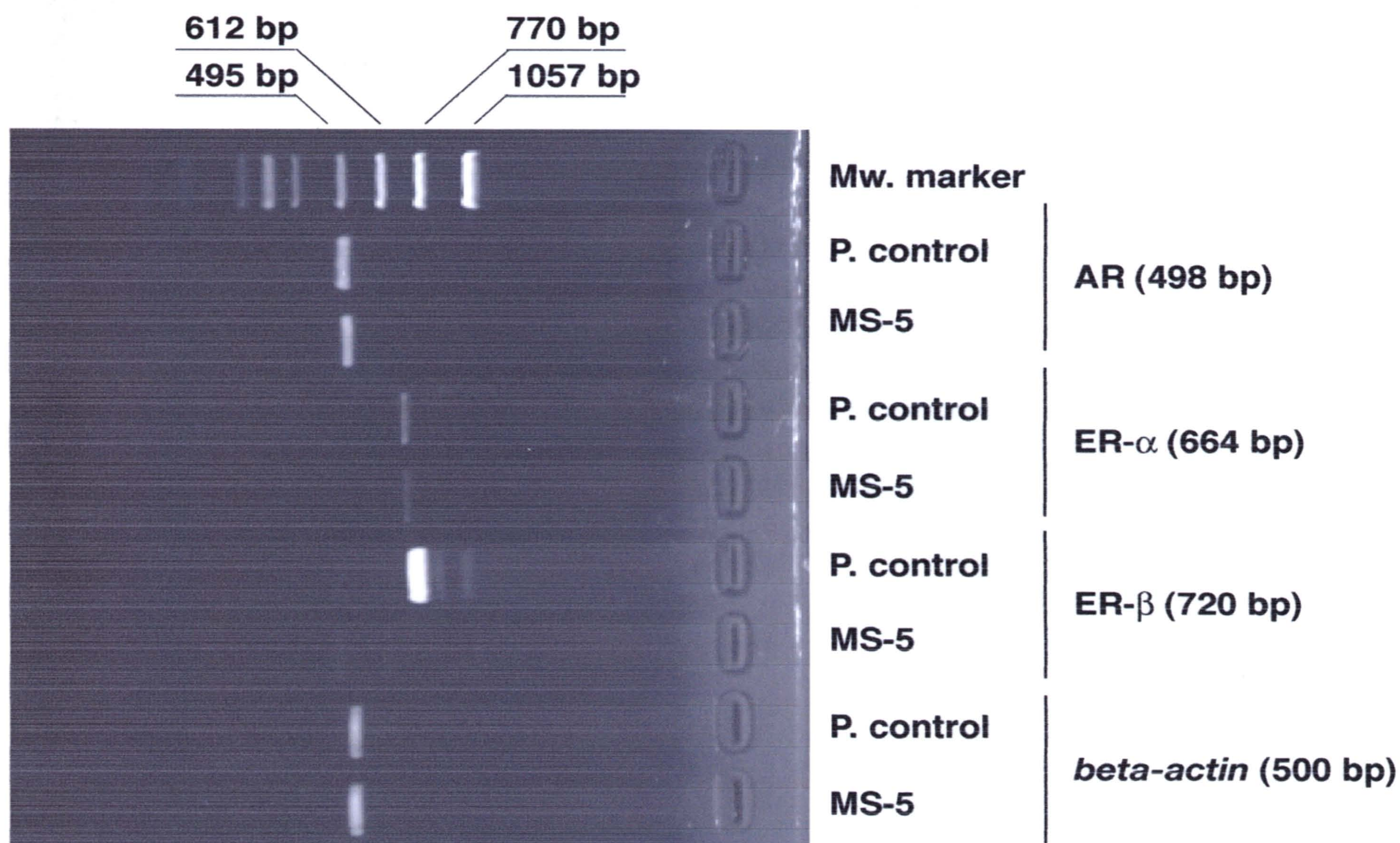
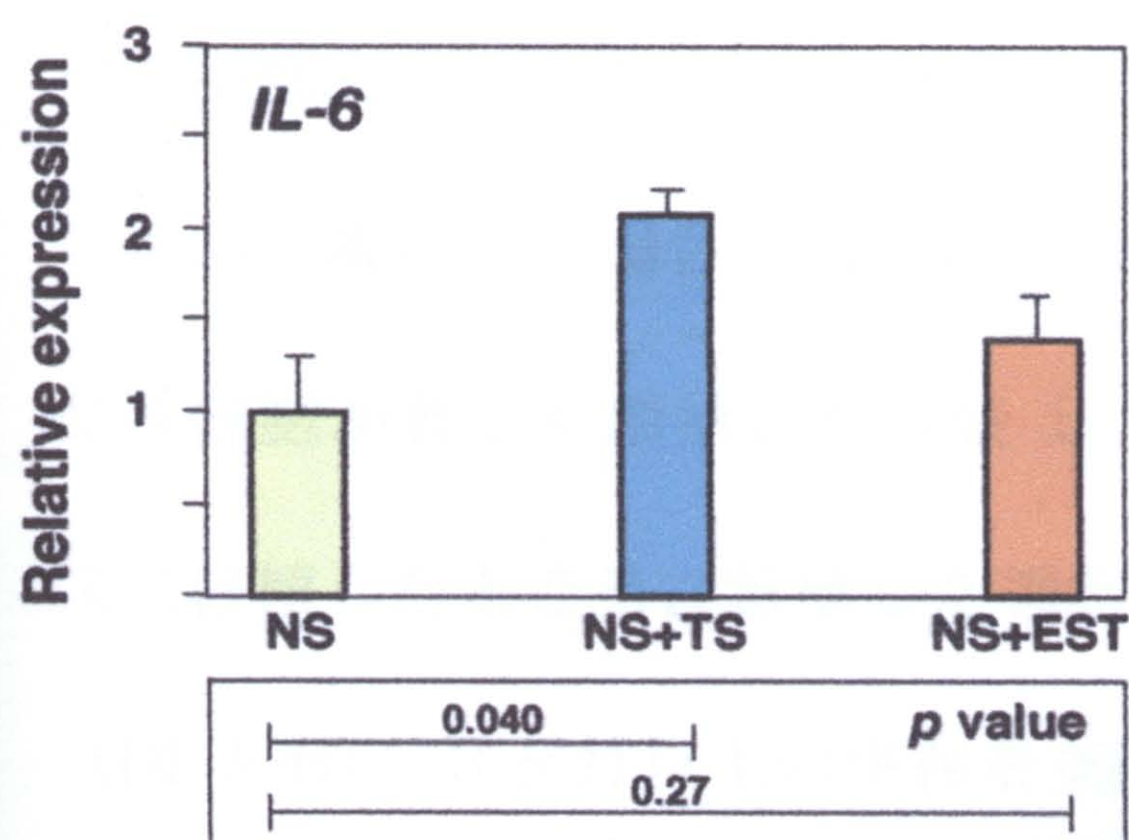
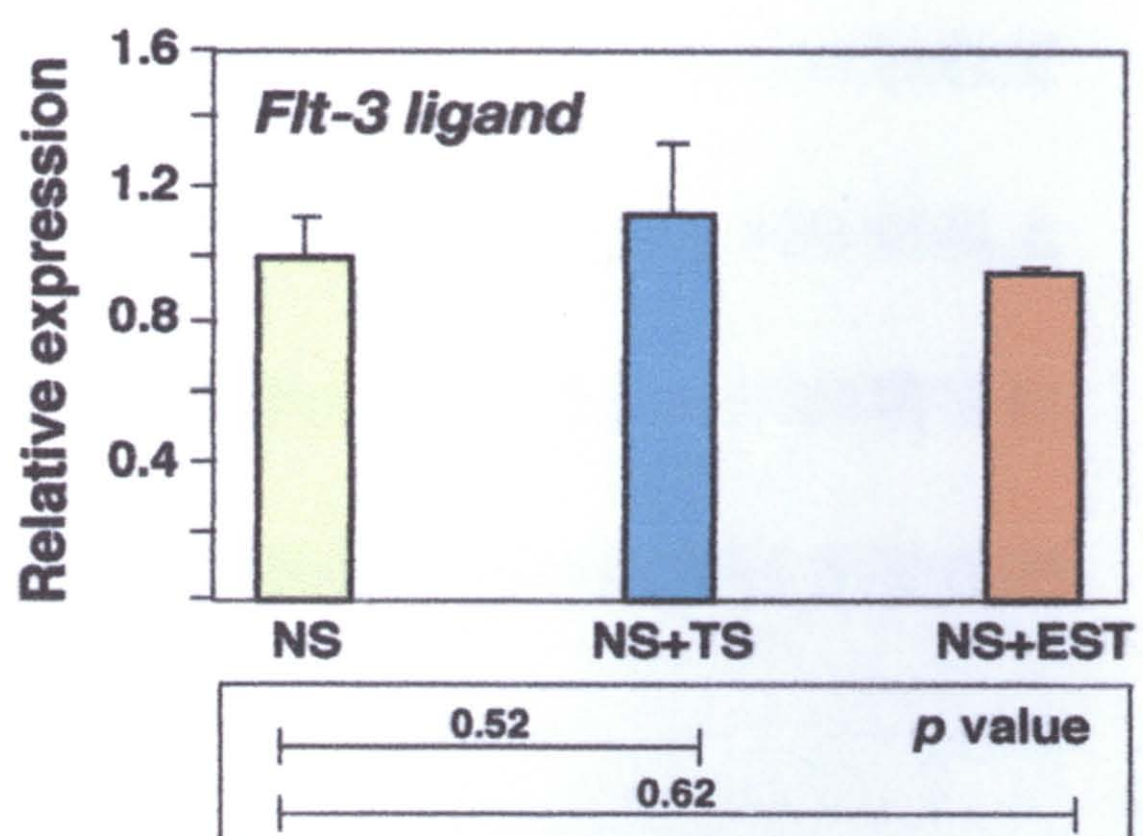
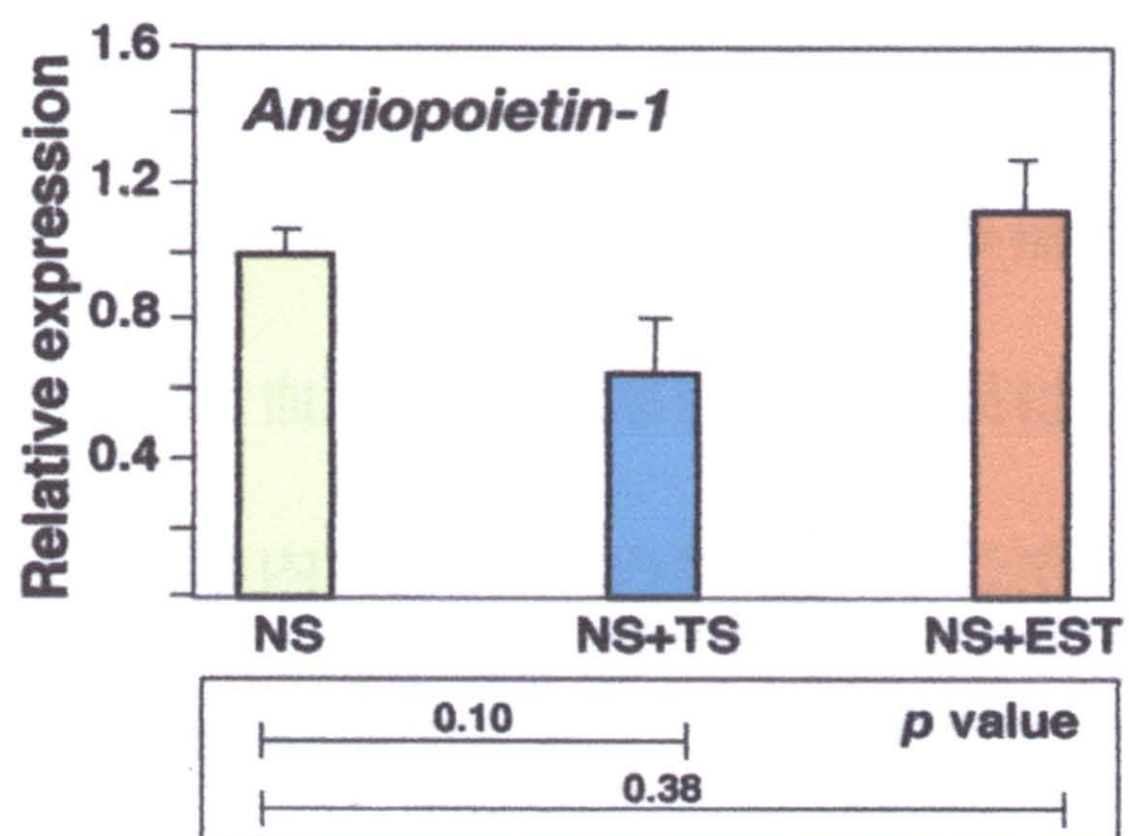
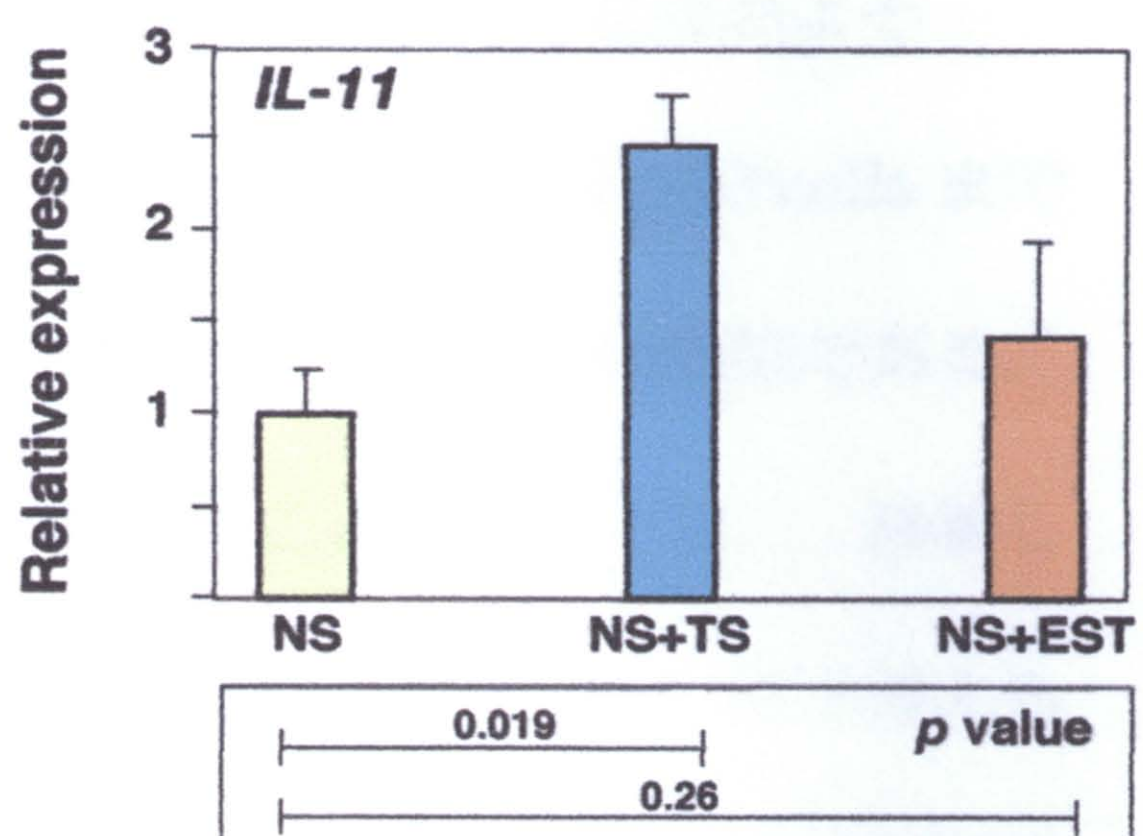
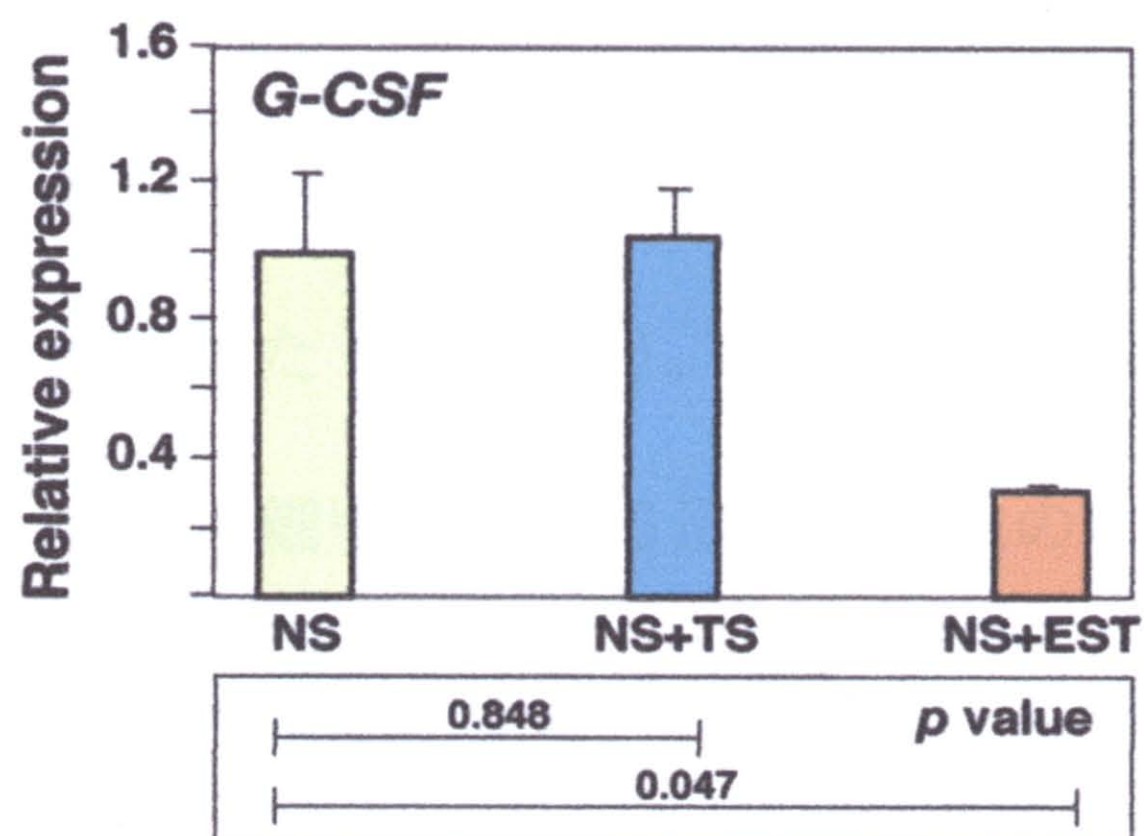
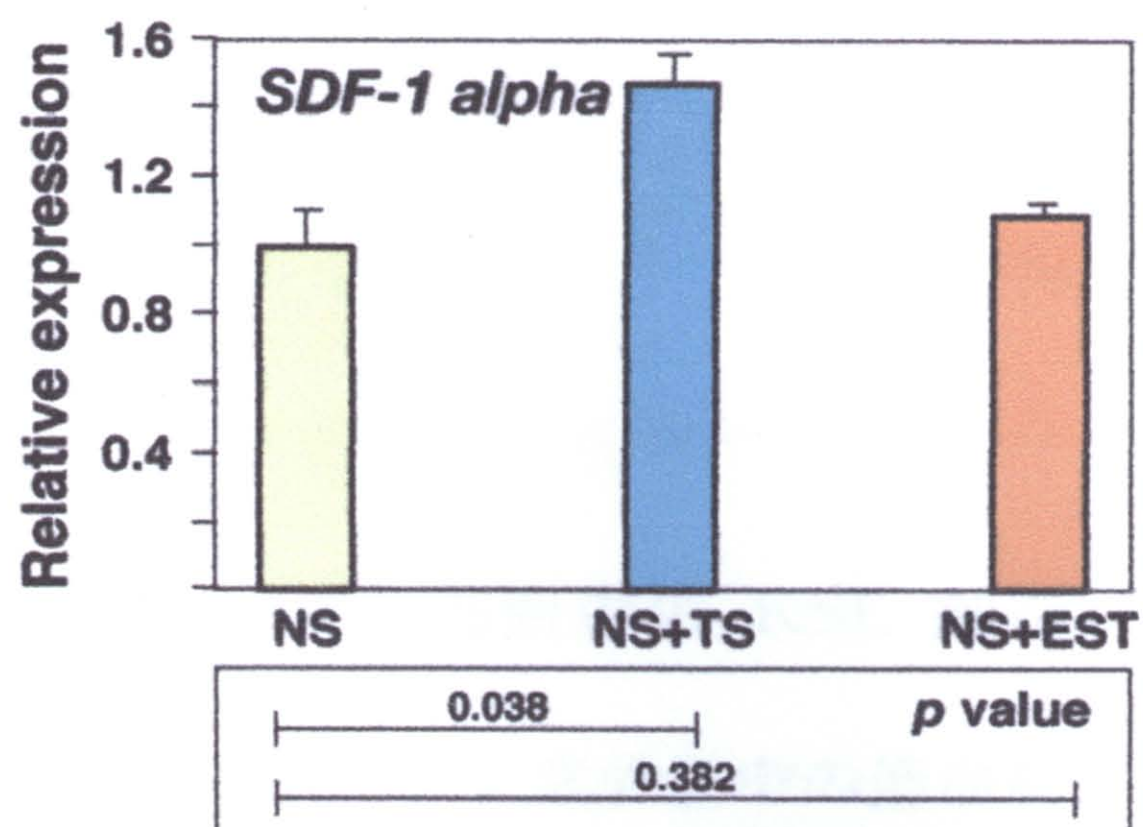
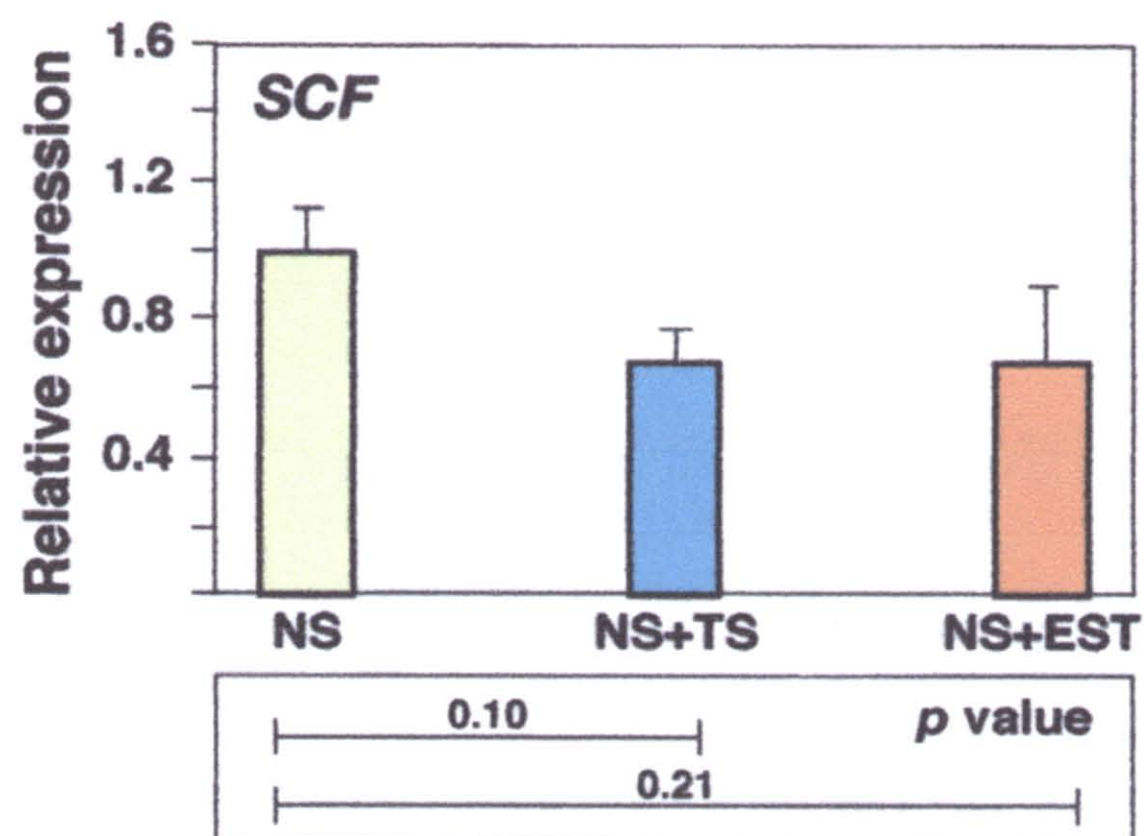


図6. MS-5の性ホルモンレセプターの発現

Culture condition	No. of total cells ($\times 10^4$ cells/well)	KSL cells (%)	No. of KSL cells (cells/well)	Fold Expansion
Inoculation	100	0.012	120	1
NS	98.6 \pm 35.5	0.0063	62	0.52
NS+Hydrocortisone (10^{-5} M)	98.4 \pm 32.6	0.0014	13	0.11
NS+Testosterone (100ng/mL)	182.1 \pm 0.8	0.0689	1253	10.41
NS+17- β Estradiol (5ng/mL)	159.9 \pm 74.6	0.0198	317	2.63

表7. ステロイドホルモンを用いた骨髓細胞の培養

性ホルモンのテストステロン、17- β エストラジオール、性ホルモンと同じステロイドホルモンのハイドロコルチゾンに正常マウス血清 (NS) に添加して、MS-5と接触できる条件で骨髓細胞を培養し、培養後の造血幹細胞をフローサイトメーターで解析した。



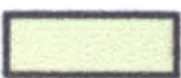


 NS : 正常マウス血清
 NS+TS : 正常マウス血清+テストステロン
 NS+EST : 正常マウス血清+エストラジオール

図 7. 性ホルモンを用いて骨髓細胞を共培養後のMS-5のサイトカインの定量発現解析
 正常マウス血清を用いて骨髓細胞を共培養したMS-5での値を1とした相対発現量を示す。

考察

致死量放射線照射マウスに骨髓細胞を移植後、骨髓細胞中の KSL 細胞 (Lineage⁻, Sca-1⁺, c-kit⁺細胞) の動態を解析すると、正常骨髓中の造血幹細胞は 2×10^4 cells (0.06%) であるのに対し、骨髓移植後 3 日目にはおよそ 1.2×10^4 cells まで減少した。その後急激に増加し、7 日目には 4×10^3 cells まで回復した (図 3-D)。本実験で移植している細胞は未分画の骨髓細胞である。全骨髓細胞に対する造血幹細胞の比率が極めて低いことを考慮すると、移植した骨髓細胞中の造血幹細胞が、移植後速やかに骨髓中で増殖していると考えられる。正常骨髓では、造血幹細胞が自己複製と分化を行うことができる場 (niche) が限定されていることで、その数が一定に保たれているといわれている [5, 6, 7]。しかし、骨髓移植後 3 日目から 7 日目の 4 日間で、300 倍以上にも造血幹細胞が増殖した結果は、致死量放射線照射により造血系が破壊された骨髓内では、その状況に応じて速やかに造血幹細胞を特異的に増幅させる制御機構が存在することを示唆する。

造血幹細胞が著しく増殖し始める骨髓移植後 3 日目のマウス血清と、造血支持骨髓細胞株である MS-5 を用いて骨髓細胞を培養すると、骨髓細胞と MS-5 の接触を維持した場合には、7 日間の共培養で培養開始時の 25 倍以上と、造血幹細胞が著しく増殖した (表 5-B)。増殖した細胞を致死量放射線照射マウスに移植したところ、移植した細胞数に応じて CFU-S (Day 9) を形成し (図 4-B)、3 ヶ月以上の生存を支持したことから (図 4-A)、増殖した造血幹

細胞は長期骨髓再構築能を有する造血幹細胞であることがわかる。同じ骨髓移植後 3 日目のマウス血清を用いた場合でも、MS-5 非存在下、骨髓細胞と MS-5 が接触できない条件では造血幹細胞は増加しなかった（表 5-A, C）。

以上の結果から、造血幹細胞増殖には支持細胞との接触が重要であること、骨髓移植後 3 日目の血清中には正常血清中には存在しない、造血幹細胞増殖を MS-5 に誘導する因子が存在することが示唆される。骨髓移植後 3 日目の血清を用いて骨髓細胞との共培養を行った MS-5 においては、骨髓細胞との接触を維持しながら共培養したもので、SCF, SDF-1 α , G-CSF, IL-11 の発現が、骨髓細胞との接触がない MS-5 に比べ顕著に上昇していた（図 5）。これに対して骨髓細胞との接触を維持しても、正常血清を用いた時には顕著なサイトカイン発現の上昇は認められなかった（図 5）。骨髓移植後 3 日目の血清を用いて、骨髓細胞との接触を維持しながら共培養した MS-5 で発現の上昇したサイトカインについて考察すると、SCF は造血幹細胞の *in vitro* 培養に一般的に用いられるサイトカインである[21, 22]。SDF-1 α は T 細胞, 単球, B 前駆細胞の遊走活性をもつケモカインだが、骨髓移植後の造血幹細胞の骨髓への定着に関与することが報告されている[23]。G-CSF は骨髓中の造血幹細胞を増殖させ、骨髓から末梢へ造血幹細胞を動員する作用があり[24]、臨床で自家末梢血移植の際に用いられている。発現の上昇したサイトカインが、いずれも造血幹細胞の増殖や遊走に関与する因子であることを考慮すると、骨髓移植後 3 日目の血清に含まれる、造血幹細胞増殖を MS-5 に誘導する因子は支持細胞のサイトカイン産生量を増加させ、造血幹細胞を増殖させると考えられる。また、正常マウ

ス血清と、造血幹細胞の体外増幅に用いられるサイトカイン（SCF, IL-6, Flt-3 ligand）を組み合わせた時には、骨髓細胞と MS-5 の接触を維持した共培養で、KSL 細胞数を約 5 倍に増加させた（表 2-B）。Sugimoto らは以前、致死量放射線照射マウスの SCF, IL-6, Flt-3 ligand の血清中濃度を測定し、造血幹細胞の体外増幅に一般的に用いられる濃度[7, 8]よりもはるかに低いことを報告している[11]。今回の共培養では、それぞれのサイトカインは生体内の濃度よりも高い濃度で添加しているが、骨髓移植後 3 日目のマウス血清を用いた場合ほど造血幹細胞が著しく増殖しなかった。この結果は、骨髓移植後 3 日目の血清中には、これらのサイトカイン以外にも、造血幹細胞増殖に関与する因子が含まれることを示唆している。

生体が強いストレスを受けると防御反応として血中ステロイドホルモン濃度が上昇することが報告されており[15, 16]、ステロイドホルモンの一種である性ホルモンは、造血系の細胞増殖への関与が報告されている[25, 26, 27, 28]。ここから、骨髓移植後 3 日目のマウス血清中のテストステロン濃度を ELISA 法により測定すると、雌雄いずれも正常時と比較して上昇していた（表 6）。また、造血支持細胞株である MS-5 が、ステロイドホルモンであるアンドロゲン、エストロゲンの受容体を発現していること（図 6）から、性ホルモンの造血幹細胞増殖への関与を予想した。そこで、性ホルモンを添加して MS-5 と骨髓細胞の共培養を行ったところ、正常マウス血清にテストステロンを添加した場合、共培養後の全骨髓細胞中の造血幹細胞は、培養開始時の約 10 倍に増殖した（表 7）。同じステロイドホルモンである $17-\beta$ エストラジオール、ハイドロ

コルチゾンを添加した場合は、造血幹細胞の著しい増殖は認められなかった（表 7）。テストステロンを添加して骨髓細胞を培養した MS-5 では、正常マウス血清のみで培養した MS-5 と比較して、複数のサイトカインの発現が上昇していた（図 7）。しかし、テストステロンを添加しても、MS-5 の非存在下では造血幹細胞は増殖しなかった（結果省略）。これらの結果は、テストステロンが MS-5 のサイトカイン産生能を上昇させ、造血幹細胞増殖を支持する因子であることを示すとともに、骨髓移植後 3 日目のマウス血清中に含まれる、造血幹細胞増殖に関与する因子の一つがテストステロンである可能性を示唆するものである。

Part 2

cDNA サブトラクションによる造血幹細胞増殖関連遺伝子のクローニングと発現解析

緒言

Part 1 の結果より，造血幹細胞の増殖には支持細胞との直接接触が重要であり，骨髓移植後 3 日目の骨髓中には，血清中に放出されない造血幹細胞増殖関連因子が発現していると予想された。そこで，それらの遺伝子のクローニングを part 2 では試みた。様々な遺伝子クローニングの方法が考えられたが，骨髓で発現している遺伝子を網羅的に解析するためには当研究室の Wu らが以前行った，cDNA サブトラクション法が適切であると考えた。そこで，骨髓移植後 3 日目のマウス骨髓細胞由来 cDNA を target，正常マウス骨髓細胞由来 cDNA を competitor として cDNA サブトラクションを行い，骨髓移植後 3 日目の骨髓で特異的に発現している遺伝子のクローニングを行った。

材料と方法

cDNA サブトラクション法

おおまかな cDNA サブトラクションの方法は, Wu らの方法に従った[30]。具体的には移植後 3 日目の骨髓細胞由来 cDNA を target, 正常マウスの骨髓細胞由来 cDNA を competitor とし, (target cDNA) – (competitor cDNA) の操作を行うことにより移植後 3 日目の骨髓細胞で特異的に発現している遺伝子のクローニングを試みた。おおまかな手順を図 8 に示す。

1) 全 RNA の抽出と mRNA 精製, cDNA 合成

正常マウスの骨髓細胞と骨髓移植後 3 日目の骨髓細胞は, TRIZOL LS Reagent (Invitrogen, 東京, 日本) を用いて全 RNA を抽出し, 使用前まで -70°C で保存した。抽出した全 RNA から, Poly A tract mRNA Isolation Systems (Promega, 東京, 日本) を用いて mRNA を精製し, 精製した mRNA を鋳型として Time Saver cDNA Synthesis Kit (Amersham Bioscience, 東京, 日本) を用いて cDNA を合成し, 使用前まで -30°C で保存した。合成した cDNA に ENB (EcoR I / Not I / Bam H I) adaptor (TAKARA, 東京, 日本) を付加後, 制限酵素 (*Bam H I*) で消化し, target 側 cDNA の両端には F/J アダプター (後述, 2) を付加し, competitor 側 cDNA の両端には K/M アダプター (後述, 2) を付加した。この操作により target 側の cDNA は F primer で, competitor 側の cDNA は K primer で増幅可能となる。target 側 cDNA

は F primer を用い, competitor 側 cDNA はビオチン化した K primer で polymerase chain reaction (PCR) 増幅し調整した。精製後, target cDNA と competitor cDNA をモル比 1 : 400 で混合後, エタノール沈澱し, 洗浄後超純水に溶解した。その後 95℃で 10 分間加熱して DNA を変性させた。変性させた DNA を 55℃で 24~48 時間インキュベートし, DNA を再会合させた。ビオチン化 K primer で増幅された competitor cDNA は, VECTREX Avidin D (フナコシ株式会社, 東京, 日本) を用いて除去した。この操作により target 側特異的な遺伝子を得て, F primer を用いて PCR で増幅した。

2) Adaptor の調整

①ENB adaptor (TAKARA, 東京, 日本): cDNA 合成後, 最初に付加する adaptor で, *Eco R I*, *Not I*, *Bam H I site* を持つ。

②F/J adaptor : target 側の cDNA に付加する adaptor。ENB adaptor 付加済みの cDNA を *Bam H I* 消化後に付加させる。この adaptor を付加した cDNA は F primer で増幅が可能である。外注した F primer と J primer の遺伝子配列は以下のとおりである。

F primer (23mer) 5'-AACAGCTATGACCATGTCCAACG-3'

J primer (27mer) 3'-TTGTCGATACTGGTACAGGTTGCCTAGp-5'

各 primer を超純水に溶解後, 適切なモル比で混合し, ミネラルオイルを加えて熱変性 (95℃, 3 分) の後, 自然放置により会合させて F/J adaptor を合成した。分注後, -30℃で保存した。

③K/M adaptor : competitor 側の cDNA に付加する adaptor。ENB adaptor 付加済みの cDNA を *Bam* *H* *I* 消化後に付加させる。この adaptor を付加した cDNA は K primer で増幅が可能である。また、K primer は 5'末端側がビオチン化されているため、この primer で増幅した cDNA はアビジンビーズに吸着する。外注した K primer と M primer の遺伝子配列は以下のとおりである。

K primer (23mer) 5'-ビオチン-GGAGTACGATGAAGCTCAAGGAG-3'

M primer (27mer) 3'-CCTCATGCTACTTCGAGTTCCTCCTAGp-5'

K primer と M primer から KM adaptor を合成した。合成手順は F/J adaptor と同じである。

3) Target cDNA の調整

致死量放射線照射マウスに、正常マウスの全骨髓細胞をマウスあたり 2×10^5 cells を尾静脈注射した。骨髓移植後 3 日目の骨髓細胞から全 RNA を抽出し、mRNA 精製後、cDNA 合成を行った。cDNA に F/J adaptor を付加し、F primer により PCR 増幅した。PCR のサイクル数は、以下のように決定した。cDNA を鋳型として 1st PCR を行った。PCR は反応液量 $10 \mu\text{l}$ 中に F/J adaptor を付加した cDNA を $0.125 \mu\text{l}$, 最終濃度 $1 \times \text{Ex Taq TM Buffer}$, $0.2 \text{ mM dNTP Mixture}$, 0.5 pM F primer , $0.5 \text{ units TaKaRa Ex Taq Polymerase}$ (TaKaRa 株式会社, 東京, 日本) を加え, Denature 94°C , 1 分, Annealing 50°C , 1 分, Extention 72°C , 1 分を 1 サイクルとして 10 サイクル行った。次に, 1st PCR と同様に反応液を作製し, 100 倍希釈した 1st PCR 産物を加え, Denature

94℃, 1 分, Annealing 50℃, 1 分, Extention 72℃, 1 分を 12~25 サイクル行い, 1%(w/v)Agarose gel で電気泳動する。電気泳動後の写真から判断して PCR による増幅が, 最大値のおよそ半分ぐらいになるサイクル数を決定する。決定したサイクル数に基づいてスケールアップした PCR を行い, PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, 東京, 日本) を用いて精製し, 使用するまで-30℃で保存した。また, 一部の target 側 cDNA には KM adaptor を付加して増幅したものを調整した (Southern hybridization による二次スクリーニングの項参照)。

4) Competitor cDNA の調整

正常マウスの骨髄細胞から全 RNA を抽出し, mRNA 精製後, cDNA 合成を行った。cDNA に K/M adaptor を付加し, Target cDNA の調整と同じ方法でビオチン化 K primer を用いた PCR により competitor cDNA の調整を行った。PCR 産物をフェノール・クロロフォルム処理後, エタノール沈澱し精製して, 使用するまで-30℃で保存した。

5) サブトラクション

調整した正常マウス骨髄細胞由来 cDNA (competitor cDNA) と骨髄移植後 3 日目の骨髄細胞由来 cDNA (target cDNA) を 400:1 で混合し, エタノール沈澱精製後, 超純水に溶解した。その後 95℃で 10 分間加熱し DNA を変性させ, 55℃で 24~48 時間インキュベートし, DNA を再会合させた。アビジン

ビーズを用いて competitor cDNA を除去し、フェノール・クロロフォルム処理後、イソプロパノール沈澱し、TE buffer に溶解した。F primer を用い、サブトラクション後の cDNA を PCR により増幅した。PCR のサイクル数の条件検討は、target cDNA の調整の方法と同じである。PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, 東京, 日本) を用いて精製し、使用するまで-30℃で保存した。

スクリーニング

1 次スクリーニング後の cDNA を TOPO vector (Invitrogen, 東京, 日本) に組み込み、大腸菌 XL-1Blue MRF' を形質転換し、LB プレート(Amp+)に播種した。37℃でおよそ 16~18 時間培養し、F primer を用いたダイレクト PCR 法によりインサートが組み込まれたプラスミドを持つバクテリアクローンを選別した。増幅されたインサート領域は個々にゲルから切り出して二次スクリーニング (Southern hybridization) のプローブ用に精製した。

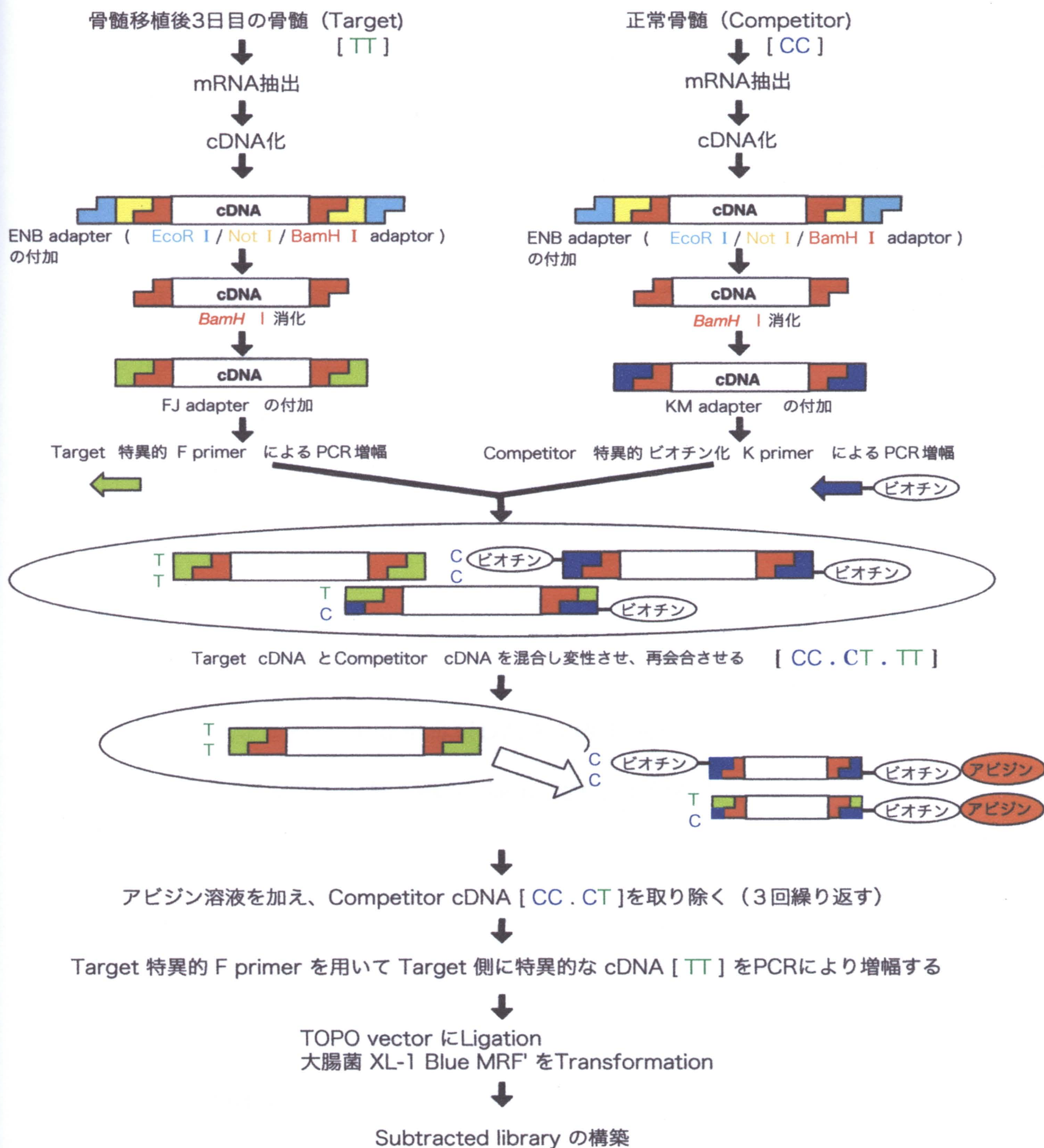


図8. cDNA Subtraction法の概略

骨髄移植後3日目の骨髄由来cDNAをtarget、正常骨髄由来cDNAをcompetitorとしてそれぞれ調整し、cDNA subtractionを行った。PCR後のcDNAをTOPO vectorに組み込み、大腸菌XL-1 Blue MRF'を形質転換し、subtracted libraryを構築した。

Southern hybridization による二次スクリーニング

1) ブロッティング

-30℃で保存してあった target cDNA を制限酵素 (*Bam* *H* *I*) で切断し, competitor 側特異的な K/M アダプターを付加させた。competitor cDNA と target cDNA を, とともに K primer を用いた PCR を行い, 増幅した。PCR の サイクル数の条件検討は, target cDNA の調整の方法と同じである。PCR は 反応液量 10 μ l 中に K/M adaptor を付加した cDNA を 0.125 μ l, 最終濃度 1 \times PCR buffer for KOD-plus-, 0.2mM dNTPs, 1mM MgSO₄, 0.5pM K primer , 1units の KOD-plus-DNA polymerase (東洋紡績株式会社, 東京, 日本) を加え, Denature 94℃, 1 分, Annealing 50℃, 1 分, Extension 72℃, 1 分 を 1 サイクルとして 10 サイクル行った (1st PCR)。次に, 1st PCR と同様に反応液を作製し, 100 倍希釈した 1st PCR 産物を加え, Denature 94℃, 1 分, Annealing 50℃, 1 分, Extension 72℃, 1 分を決定したサイクル数で行った。

PCR 産物はフェノール・クロロフォルム処理後, エタノール沈澱し精製した。精製した PCR 産物の濃度を測定後, 1% (w/v) Agarose gel で 3 μ g ずつ電気泳動した。その後, ゲルを加水分解溶液 (0.25M HCl) で加水分解し, 変性溶液 (1.5M NaOH, 0.5M NaCl) で変性させた。変性後, Vacuum Blotter (日本バイオラッド ラボラトリーズ株式会社, 東京, 日本) を用いてトランスファー溶液 (0.4M NaOH) 中でナイロンメンブレン (Hybond-N+, Amersham Biosciences, 東京, 日本) にトランスファーした。トランスファーは 1 時間

半 (5 inches Hg) 行い, 2×SSC (33.3mM NaCl, 33.3mM Trisodium citrate dehydrate) でリンス後, UV 照射によりメンブレンに核酸を固定した。

2) プロープの作製

1 次スクリーニング後の cDNA を TOPO vector に組み込み, 大腸菌を形質転換して F primer を用いたダイレクト PCR を行い, PCR 産物を 1% (w/v) agarose gel で電気泳動した。増幅されたインサート領域をゲルから切り出して, フェノールを加えて凍結/解凍をすることで DNA を水層にトラップした。その DNA を含む水層をフェノール・クロロフォルム処理後, エタノール沈澱し精製した。精製した遺伝子断片を鋳型として ALKphos Direct Labelling and Detection Kit (Amersham Biosciences, 東京, 日本) を用いてアルカリフォスファターゼで標識したプロープを作製した。

3) ハイブリダイゼーション

メンブレンを 55℃の Hybridization buffer [0.5M NaCl, 4%(w/v) blocking reagent (Amersham Biosciences, 東京, 日本)] 中で振とうしてプレハイブリダイゼーションを行ったのち, ラベルしたプロープを 10ng/ml で加え, 55℃で 12~16 時間振とうしながらハイブリダイゼーションを行った。十分なハイブリダイゼーションののち, メンブレンを 55℃に温めた primary wash buffer [2M Urea, 0.1% SDS, 50mM Na phosphate (pH 7.0), 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.2% Blocking reagent (Amersham Biosciences, 東京, 日本)]

で2回洗浄後, secondary wash buffer (50mM Tris base, 100mM NaCl, 2mM MgCl₂) で常温にて2回洗浄した。洗浄後, Detection Reagent (Amersham Biosciences, 東京, 日本) を 30 μ l/cm² で滴下して5分間反応させた。過剰な反応液を除き, サランラップで包んでX線フィルム (Bio Max MS Film, Kodak 株式会社, 東京, 日本) を重ねてカセットを閉じ, 室温で5分~12時間感光させたのち, 現像した。

プラスミド DNA の精製／塩基配列の決定

2次スクリーニングの結果, Target 側で有意な発現が認められたクローンをもつ大腸菌を 2×YT medium (Amp+) でおよそ18時間培養後, FlexiPrep Kit (Amersham Biosciences, 東京, 日本) を用いてプラスミド DNA を精製した。その後, ALF express™ Auto Cycle™ sequencing Kit (Amersham Biosciences, 東京, 日本) と ALFred Auto sequencer (Amersham Biosciences, 東京, 日本) でプラスミド DNA の塩基配列を決定した。塩基配列を BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) に送り既知遺伝子との相同性を検討した。

Real-time PCR 法による定量発現解析

サブトラクションにより得られたクローンの, 骨髄移植後のマウス骨髄における発現解析を行うため, PCR プライマー設計 Software を用いて目的の遺伝子に特異的な PCR primer を設計し, 骨髄細胞由来 cDNA を鋳型として

Real-time PCR による定量発現解析を行った[18, 19]。PCR 反応は SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Kit (TaKaRa 株式会社, 東京, 日本) を用い, 反応液量 20 μ l 中に cDNA の 10 倍希釈液を 5 μ l 加え, 最終濃度 0.2 μ M sense primer, 0.2 μ M antisense primer および 1 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] を加え, LightCycler (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京, 日本) を用いて, Denature 95°C, 5 秒, 各 Annealing 温度, 20 秒, Extension 72°C, 15 秒を 1 サイクルとして 45 サイクル行った。その後, LightCycler software version 3.5 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京, 日本) を用いて発現解析を行った。PCR 条件は表 8 に示す。

Real time PCR 法を行うにあたり, ほぼ全ての臓器で恒常的に発現している遺伝子である EF1- α (elongation factor 1- α) の発現を内部標準とした。各遺伝子に対して PCR を行った後, 内部標準遺伝子に対する相対発現量を求め, 正常マウス (Day0) での発現量を 1 としてグラフに示した。

表 8. LightCycler を用いた定量発現解析のための PCR 条件

Gene or clone No.	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Product size (base pairs)
3011	GAGTTTCTGGATGGTGGTT TGGGGTGGCTTGCTGGAG	60	341
3017	CACCATGAGGAGTGGACCTG TCAAAAGCTCCCACTACACAAA	62	334
3113	GGGGCTTTTACTTCAACA CTTCCTTTCCTTCTCCTT	55	253
3360	GCACGAGGAGAAAAACAGTAA GAAAAAGACAGGATGAGACG	60	198
3381	CCTTCTCGGGCTGGTATG CCTTCCTTCACGGCTTTCT	58	217
3395	CCTTGTGGCTGTCCTTG GTTCCCCTCCTGCTGAT	58	222
3451	GTCAGAAGTGCCAGAAGTGT ATGGGGAGGAACTATTTGGTA	60	294
3716	CACCATGCCGAAGCACGAG CTACTTGGGGCCAAGGTAG	60	211
<i>EF1-alpha</i>	ACTCACATCAACATCGTCGTAATC TTCACCAACACCAGCAGCAACAA	57	351

Whole mount *in situ* hybridization

1) 胚の摘出

10 週齢の C3H/HeN (雌) に PMSG (生化学工業株式会社, 東京, 日本, 50unit/mL) 0.1mL を腹腔注射し, その 48 時間後に HCG (生化学工業株式会社, 東京, 日本, 50unit/mL) 0.1mL を腹腔注射し, C3H/HeN (雄) と 1 対 1 で交配させた。交配翌朝に plug を確認したマウスを妊娠 0.5 日目として, 妊娠 10.5 日目に屠殺後, 開腹し子宮を取り出した。実体顕微鏡下で子宮を切り開いて胎仔を取り出し, 固定液 (4% Paraformaldehyde / PBS⁻) 中で 48 時間固定した。その後組織を 50%メタノール, 過酸化水素水混合液で 5~6 時間漂白し, 使用するまでメタノール中で-30℃で保存した。

2) プローブの作製

Real-time PCR 法を用いた定量発現解析の結果、顕著な発現増加が見られたクローンをもつプラスミド DNA を鋳型として T3 primer と T7 primer を用いて PCR で増幅した。PCR 産物を 1% (w/v) Agarose gel で電気泳動し、増幅された目的のバンドを切り出して Perfectprep[®] Gel Cleanup Kit (Eppendorf, 東京, 日本) を用いて精製した。この鋳型 DNA を用いて DIG RNA Labeling Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京, 日本) によりジゴキシゲニン標識の RNA プローブを作製した。具体的には PCR 産物精製後、インサートの入っている向きから判断して T3 または T7 RNA polymerase を用いて、反応液量 10 μ l 中に精製した DNA 断片 0.5 μ g, 1 \times Transcription Buffer, 1 \times NTP Labeling Mixture, T3 または T7 RNA Polymerase 10unit, RNase inhibitor 5unit を加え, 37 $^{\circ}$ C で 3 時間反応させた。反応終了後, DNase を 10unit 加え, 37 $^{\circ}$ C で 15 分反応させ鋳型 DNA を分解し, ジゴキシゲニン標識 RNA プローブを作製した。

3) ハイブリダイゼーション

メタノール中に固定した胚を、段階的にメタノール濃度を下げたバッファーに置換して加水し, [100%メタノール \rightarrow 75%メタノール, 25% T-PBS (0.05% Tween20 / PBS) \rightarrow 50%メタノール, 50% T-PBS \rightarrow 25%メタノール, 75% T-PBS \rightarrow 100%T-PBS] 100% T-PBS で 5 回洗浄した。20 μ g/ml のタンパク質分解酵素 (proteinase K) を 1ml 加えて 37 $^{\circ}$ C で 15 分間振とうし, 結合組織な

どを分解後、グリシン溶液 (2mg/mL グリシン/ T-PBS) で 2 回洗浄した。さらに T-PBS で室温にて 5 分間、2 回洗浄したのち、0.2% グルタルアルデヒド/ T-PBS 溶液中に室温にて 20 分浸し、再固定した。T-PBS を用いて室温にて 2 回洗浄後、ハイブリダイゼーション溶液 [(50% formamide, 0.75M NaCl, 10mM PIPES, 1mM EDTA, 100 μ g/mL tRNA, 50 μ g/mL heparin, 1% SDS) / DEPC water] 中で 63°C にて 1 時間振とうし、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション後、調整したジゴキシゲニン標識 RNA プローブを 100ng 加え、63°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、洗浄溶液 1 [(10mM PIPES, 1mM EDTA-2Na, 300mM NaCl, 1% SDS) / DEPC water] で 63°C にて 3 回洗浄した。さらに洗浄溶液 1.5 [(10mM PIPES, 1mM EDTA-2Na, 50mM NaCl, 1% SDS) / DEPC water] で 50°C にて 2 回洗浄し、プローブを除去した。次に RNase buffer [(100 μ g/mL RNase A, 10mM PIPES, 500mM NaCl, 0.1% Tween-20) / DEPC water] 中で 37°C にて 60 分間振とうし、RNA を分解した。洗浄溶液 2 [(50% formamide, 10mM PIPES, 1mM EDTA-2Na, 300mM NaCl, 1% SDS) / DW] 中で 50°C にて 30 分間洗浄、洗浄溶液 3 [(50% formamide, 10mM PIPES, 1mM EDTA-2Na, 150mM NaCl, 1% SDS) / DW] 中で 50°C にて 30 分間洗浄、洗浄溶液 4 [(50% formamide, 10mM PIPES, 1mM EDTA-2Na, 500mM NaCl, 0.1% Tween-20) / DW] 中で 70°C にて 2 回洗浄後、洗浄溶液 4 中で 70°C にて 20 分間温めた。その後 TBST [(150mM NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% Tween-20) / DW] で室温にて 5 回洗浄し

た。洗浄後の胚を 24 well plate に移し、抗体 hybridization buffer

[1% Blocking powder / (0.1M マレイン酸, 0.15M NaCl, pH7.5)] を加えて室温にて 60~90 分振とう後, 375mU/ml の抗 DIG-AP 標識抗体を添加して 4℃で一晩インキュベートした。TBST で室温にて 5 分間 4 回, 60 分間 5 回洗浄し, NTMT [(0.1M NaCl, 0.1M Tris-HCl (pH 9.5), 50mM MgCl₂, 1% Tween-20) / DW] 中で室温にて 5 分間, 2 回インキュベートした。AP buffer [(5% polyvinyl alcohol, 0.1M NaCl, 0.1M Tris-HCl (pH 9.5), 50mM MgCl₂, 0.01% Tween-20) / DW] 中でインキュベートした後, 発色基質液

[2% NBT/BCIP stock solution (Roche, 東京, 日本), 100mM Tris-HCl (pH9.5) , 100mM NaCl, 5% Polyvinyl alcohol, 50mM MgCl₂, 1% Tween-20] 中で発色させた。およそ 3~6 時間発色を行い, 濃く染まったところで PBST[(137mM NaCl, 8.1mM Na₂PO₄, 2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20) /DW] を加え発色を止め, PBST で洗浄後, 4℃で保存した。その後, 段階的にエタノール濃度を上げた溶液 (30%エタノール, 70% PBST→50%エタノール, 50% PBST→70%エタノール, 30%PBST→100%エタノール) に置換して脱色後, 段階的にエタノール濃度を下げた溶液 (30% PBST, 70%エタノール→50%PBST, 50%エタノール→70% PBST, 30%エタノール→100% PBST) に置換して透明化を行い, 写真撮影した。

有意差検定

有意差検定は Student's t-test を用いて行った。 $p < 0.05$ の時、有意な差があると判定した。

結果

cDNA サブトラクションの結果

cDNA サブトラクション法により構築したサブトラクテッドライブラリーの中から、骨髄移植後 3 日目で特異的に発現しているクローンをさらに絞り込むため、Southern hybridization による二次スクリーニングを行った。

サブトラクテッドライブラリー中の約 2000 クローンについて二次スクリーニングを行った結果、移植後 3 日目で顕著に発現が上昇している 237 クローンを得た。この 237 クローンについて遺伝子配列を決定し、データベース (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) で既知遺伝子とのホモロジーを検出した。その結果、機能未知遺伝子が 20 クローン (うち 4 クローンは重複) であった。その他、輸送・分泌・シグナル伝達・代謝関連遺伝子が 31 クローン、サイトカイン・ケモカイン遺伝子が 13 クローン、細胞骨格関連遺伝子が 21 クローン、リボソーム遺伝子が 13 クローン、転写因子遺伝子が 5 クローン、酵素関連遺伝子が 39 クローン、ミトコンドリア関連遺伝子が 39 クローン、Immunoglobulin 関連遺伝子が 34 クローン、その他の遺伝子が 22 クローン得られた (図 9)。得られたクローンの発現解析を行うにあたり、造血幹細胞増殖と直接的な関連が薄いと予想される、ミトコンドリア関連遺伝子やリボソーム関連遺伝子などを除外し、機能未知遺伝子 2 クローン、サイトカイン・ケモカイン遺伝子 2 クローン、輸送関連遺伝子 2 クローン、代謝関連遺伝子 2 クローンの計 8 クローンについて骨髄移植前後の骨髄での定量発現解析と、胎生 10.5 日目のマウス胚を用いた whole mount *in situ* hybridization を行った。

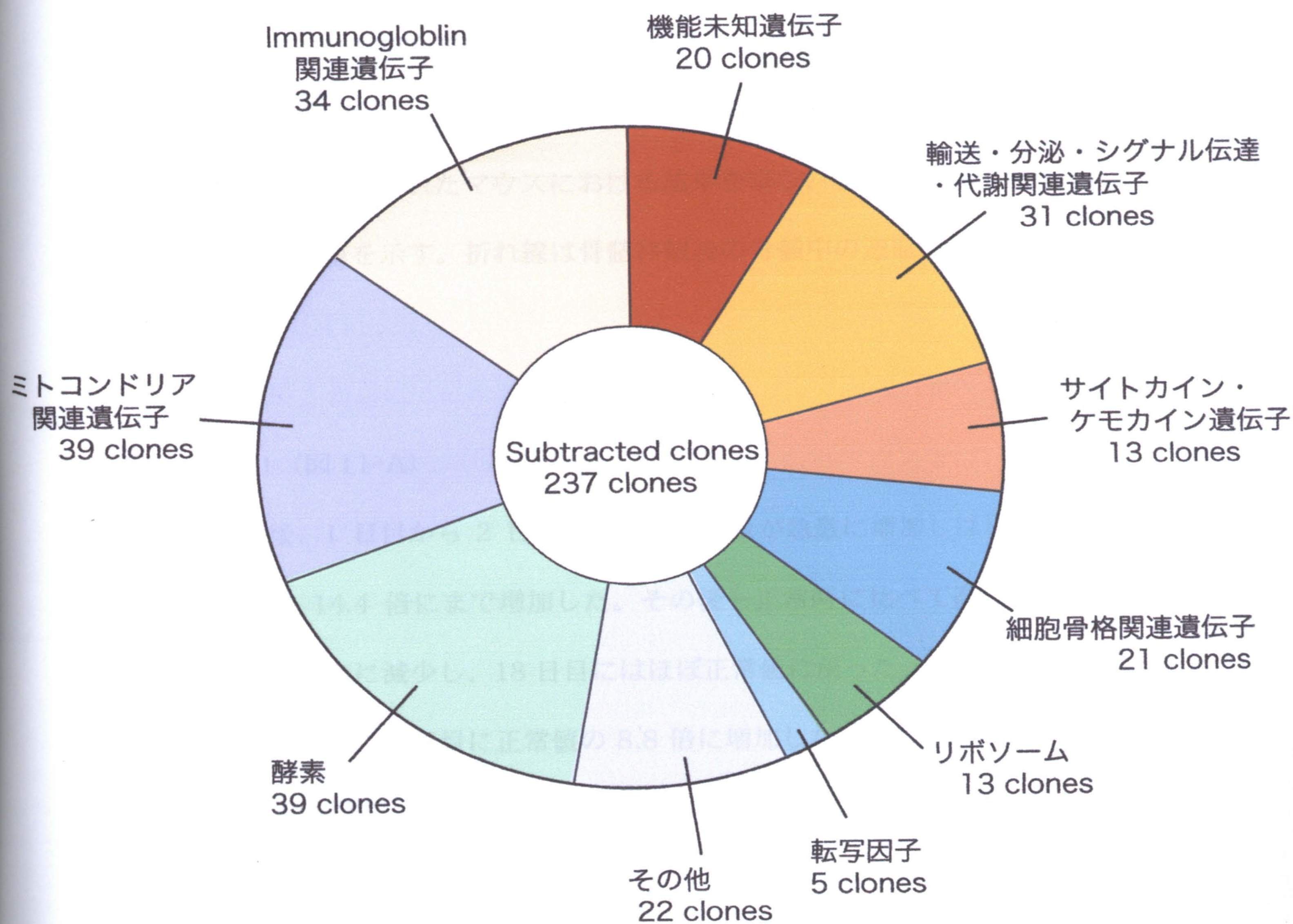


図9. Subtracted clonesの概要

cDNAサブトラクションにより得られた骨髓移植後3日目の骨髓で特異的に発現している遺伝子を機能により大別した。

Subtracted clone の定量発現解析

サブトラクションにより得られた、正常時よりも骨髄移植後 3 日目で発現が顕著なクローンのうち、機能未知遺伝子 2 クローンを含む 8 クローンについて Real-time PCR 法により骨髄移植後の骨髄での定量発現解析を行った。棒グラフの赤色は骨髄移植されたマウスにおける結果を示し、青色は骨髄移植を受けなかったものの値を示す。折れ線は骨髄移植後の骨髄中の造血幹細胞数の回復動態を示す。

Clone 3011 (図 11-A)

骨髄移植後、1 日目から 2 日目にかけて発現量が急激に増加しはじめ、3 日目に正常値の 14.4 倍にまで増加した。その後も正常時に比べて高い発現を保ったままゆるやかに減少し、18 日目にはほぼ正常値に戻った。骨髄移植をしていないマウスでは、3 日目に正常値の 8.8 倍に増加した。3 日目から 6 日目にかけて発現量が減少し、6 日目は正常値の 5.8 倍を示した。

Clone 3017 (図 11-B)

骨髄移植後 1 日目には正常値の 7.1 倍まで増加した。その後、徐々に減少し 9 日目にはほぼ正常値に戻った。これに対して骨髄移植をしていないマウスでは、3 日目、6 日目のいずれにおいても正常値とほぼ同じ発現量であった。

Clone 3113 (図 11-C)

骨髓移植後、1 日目から 2 日目にかけて急激に発現量が増加し、3 日目には正常値の 36 倍にも増加した。その後、徐々に減少し、移植後 18 日目にはほぼ正常値に戻った。骨髓移植をしていないマウスでは、3 日目に正常値の 14 倍に増加した。6 日目はさらに発現量が増加し、正常値の 17 倍を示した。

Clone 3360 (図 11-D)

骨髓移植後 1 日目には正常値の 53 倍にも増加した。その後、徐々に減少し、9 日目にはほぼ正常値に戻った。骨髓移植をしていないマウスでは、3 日目に正常値の 6.4 倍に増加した。3 日目から 6 日目にかけてさらに発現量が増加し、6 日目は正常値の 7 倍を示した。

Clone 3381 (図 11-E)

骨髓移植後 1 日目には正常値の 5 倍に増加した。その後、発現量は徐々に減少し、6 日目にはほぼ正常値に戻った。これに対して骨髓移植をしていないマウスでは、3 日目は正常値よりも低い発現量であったが、6 日目には正常値の 3 倍に増加した。

Clone 3395 (図 11-F)

骨髓移植後、徐々に発現量が増加し、3 日目には正常値の 4 倍に増加した。その後、6 日目にはほぼ正常値に戻った。これに対して骨髓移植をしていない

マウスでは、3 日目は正常値とほぼ同じ発現量であったが、6 日目には正常値の 3 倍に増加した。

Clone 3451 (図 11-G)

骨髓移植後 1 日目には正常値の 15.7 倍にも増加した。その後、すみやかに減少し、12 日目にはほぼ正常値に戻った。骨髓移植をしていないマウスでは、3 日目から 6 日目にかけて発現量が増加し、6 日目は正常値の 3 倍を示した。

Clone 3716 (図 11-H)

骨髓移植後ゆるやかに発現量が増加し、6 日目に正常値の 2 倍に増加した。その後、徐々に減少し、18 日目にはほぼ正常値に戻った。骨髓移植をしていないマウスでは、3 日目は正常値とほぼ同じ発現量を示したが、3 日目から 6 日目にかけて発現量が増加し、6 日目は正常値の 1.7 倍であった。

Whole mount *in situ* hybridization

骨髓移植後に急激に発現量が増加する遺伝子が、造血幹細胞の増殖（自己複製）を支持する因子ならば、マウス胚において成体型造血幹細胞が発生すると考えられている AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域で発現しているのではないかと考え、AGM 領域で造血が開始する胎生 10.5 日胚で、各遺伝子の発現を whole mount *in situ* hybridization により検討した。

機能未知遺伝子 2 クローンを含む 8 クローンについて検討した結果、機能未

知遺伝子 2 クローンを含む 4 クローンで、AGM 領域での発現が見られた。AGM 領域で発現している 4 クローンのうち 2 クローンは脳でも非常に強く発現していた。胎生 10.5 日胚の模式図を図 10 に示す。

各クローンの発現部位

Clone 3011 (図 11-A) : 耳胞、咽頭弓、心臓、肢芽先端、AGM 領域、

Clone 3017 (図 11-B) : 脳、耳胞、AGM 領域

Clone 3113 (図 11-C) : 耳胞、咽頭弓、心臓、AGM 領域

Clone 3360 (図 11-D) : 脳、耳胞、心臓、AGM 領域

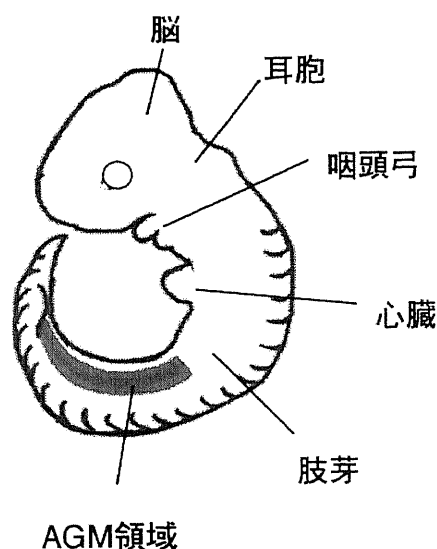
Clone 3381 (図 11-E) : 前脳、咽頭弓、耳胞、心臓、肢芽

Clone 3395 (図 11-F) : 耳胞、心臓、肢芽

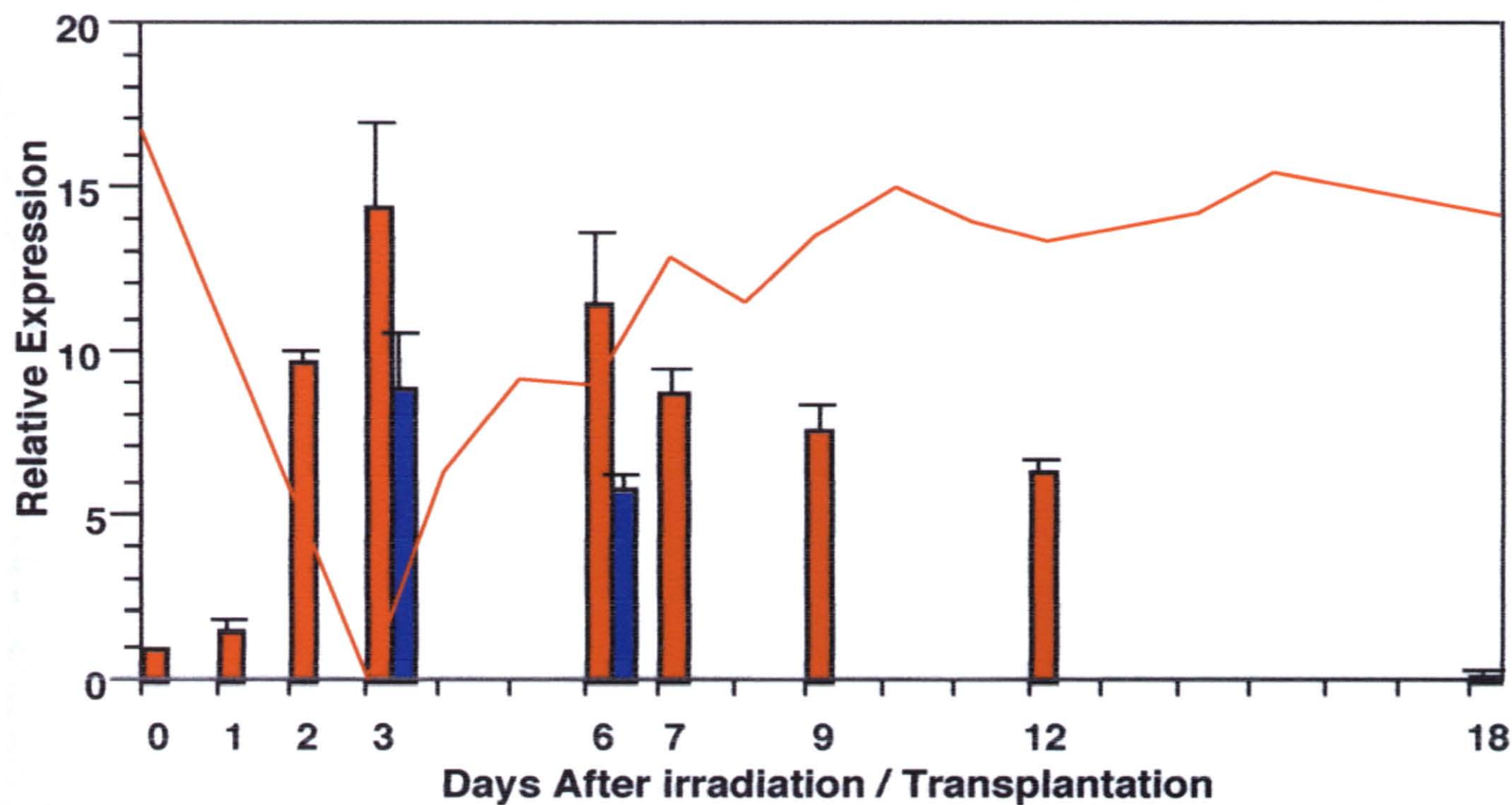
Clone 3451 (図 11-G) : 前脳、耳胞、咽頭弓、心臓、肢芽

Clone 3716 (図 11-H) : 耳胞、咽頭弓、心臓、肢芽

図 10. 胎生 10.5 日マウス胚の模式図



A. UNKNOWN-1 (clone 3011)



E10.5

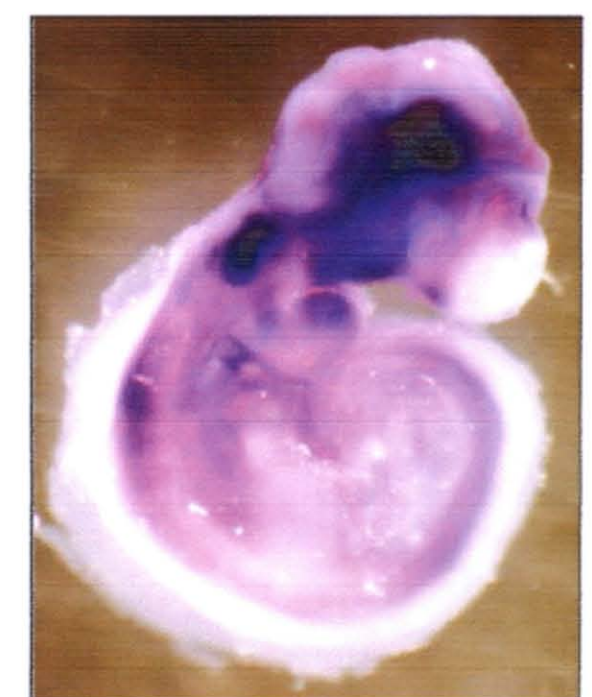
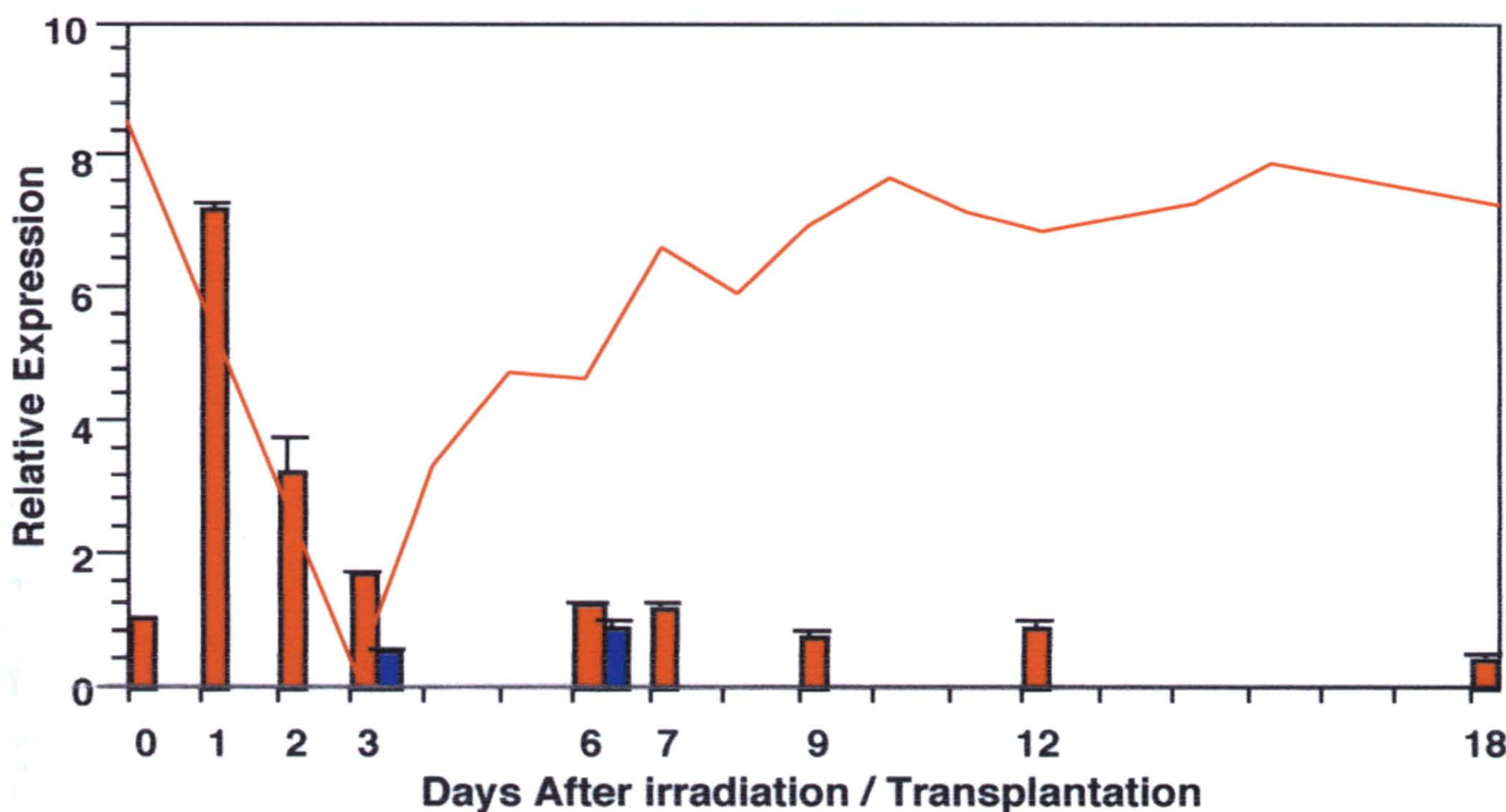
骨髄移植後の発現量

移植後1日目から2日目にかけて発現量が急激に増加し始め、3日目に正常値の14.4倍にまで増加した。その後も正常値に比べて高い発現を保ったままゆるやかに減少し、18日目にはほぼ正常値に戻った。

E10.5での発現部位

咽頭弓、耳胞、肢芽先端、心臓、AGM領域

B. blocked early in transport 1 homolog (clone 3017)



E10.5

骨髄移植後の発現量

移植後急激に発現量が増加し、1日目には正常値の7.1倍まで増加した。その後、徐々に減少し9日目にはほぼ正常値に戻った。

E10.5での発現部位

脳、耳胞、AGM領域

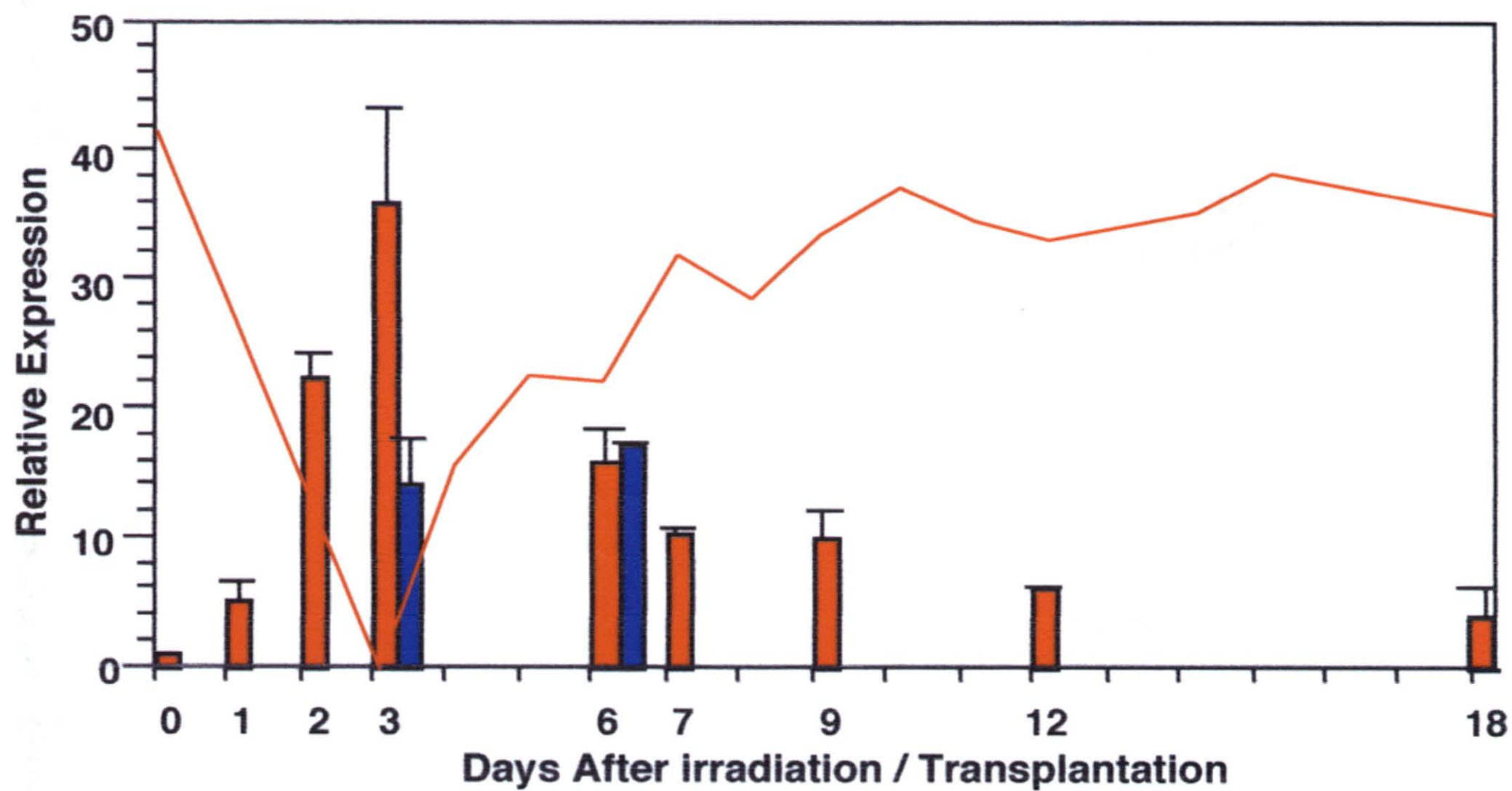
図11. Subtracted cloneの発現解析

左図 骨髄移植後の骨髄での定量発現解析

赤色は骨髄移植されたマウスにおける値、青色は骨髄移植を受けなかった（放射線照射のみ）マウスでの値を示す。赤い折れ線は骨髄移植後の造血幹細胞の回復動態を示す。

右図 胎生10.5日マウス胚でのWhole mount *in situ* hybridization

C. IGF-1 (clone 3113)



E10.5

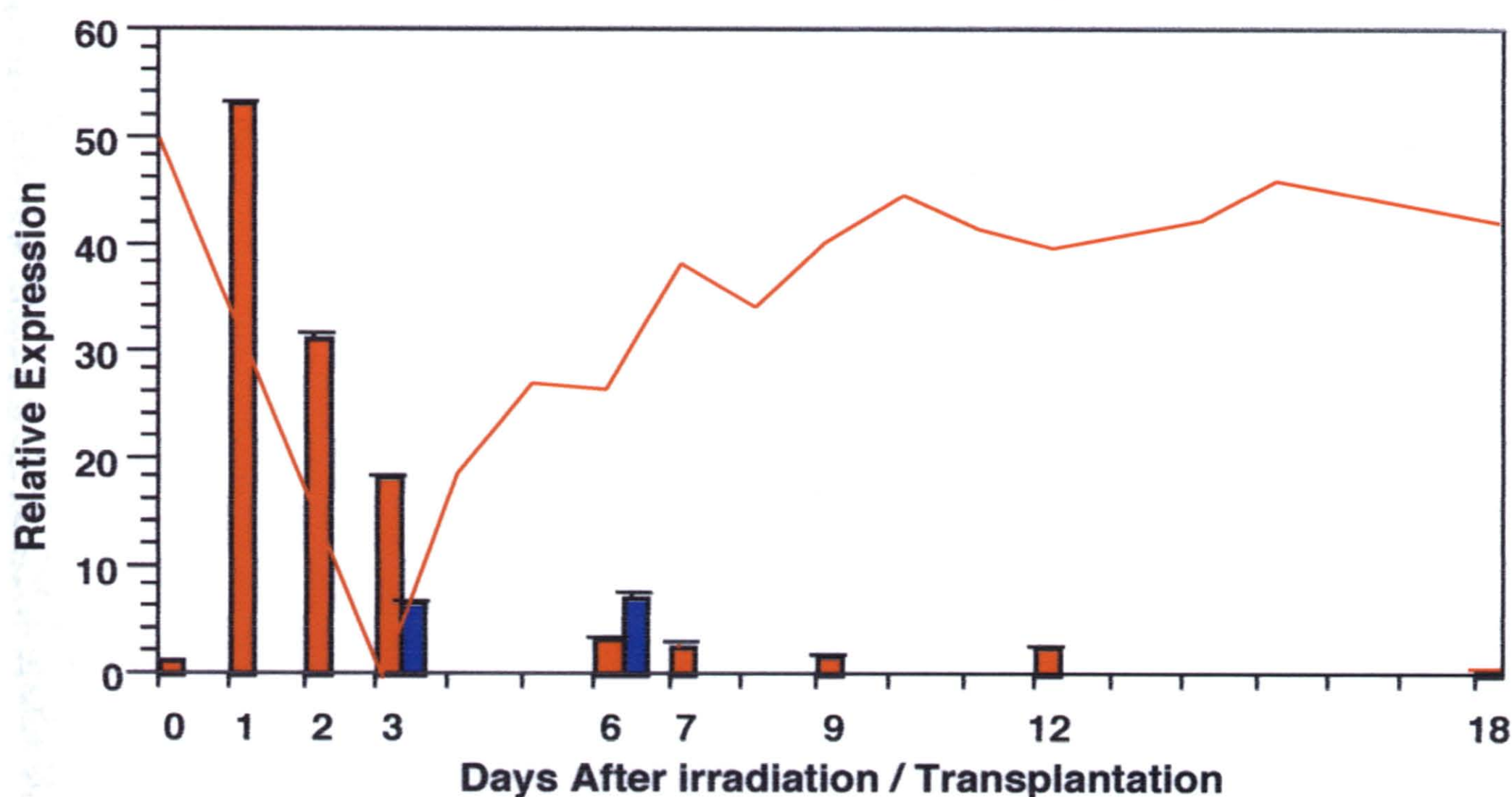
骨髄移植後の発現量

移植後1日目から2日目にかけて急激に発現量が増加し、3日目には正常値の36倍に増加した。その後徐々に減少し、18日目にはほぼ正常値に戻った。

E10.5での発現部位

耳胞、心臓、咽頭弓、AGM領域

D. UNKNOWN-2 (clone 3360)



E10.5

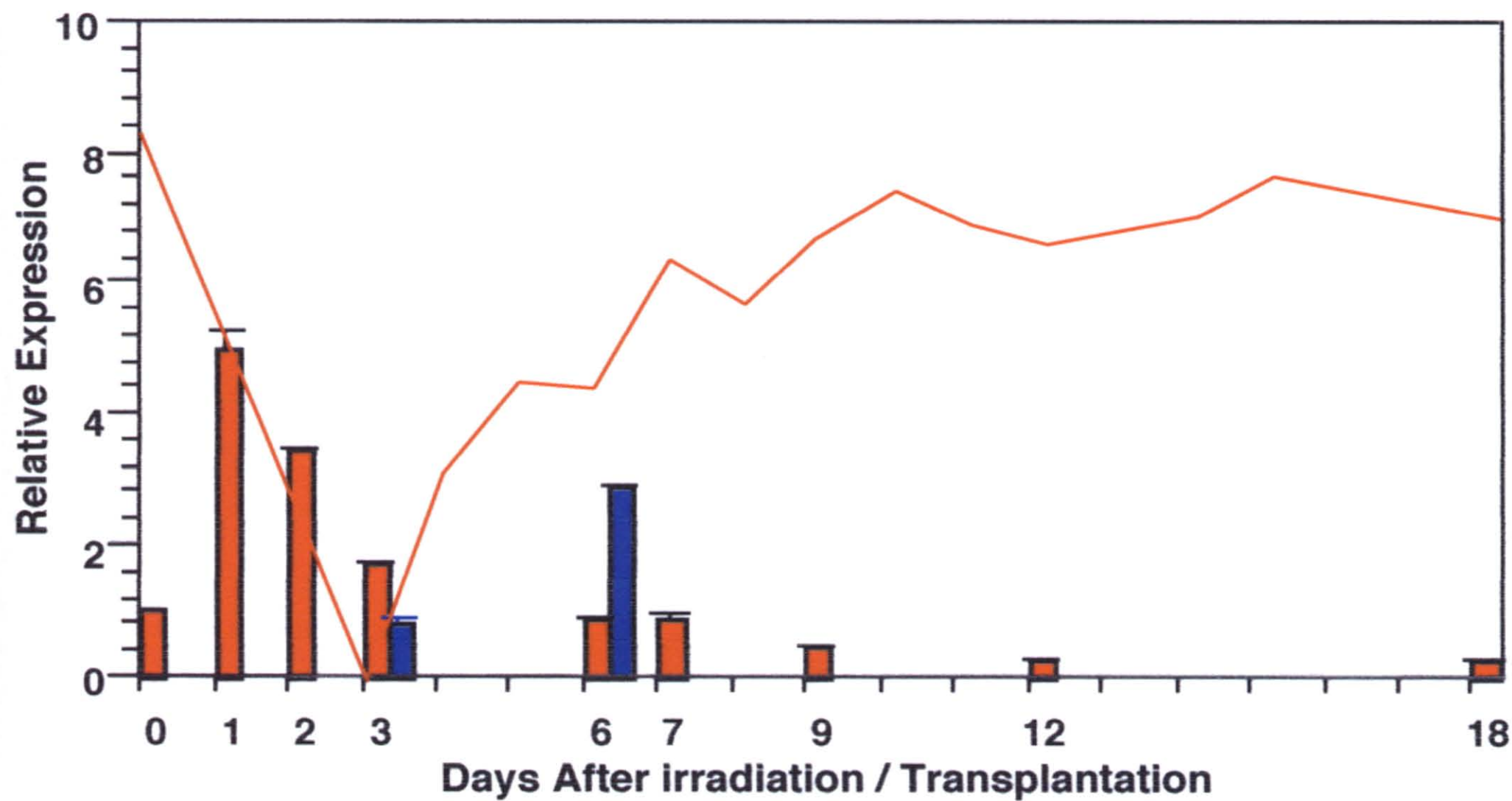
骨髄移植後の発現量

移植後ただちに発現量が増加し始め、1日目には正常値の53倍にも増加した。その後、徐々に減少し、9日目にはほぼ正常値に戻った。

E10.5での発現部位

脳、耳胞、心臓、AGM領域

E. cytoskeleton-associated protein 4 (clone 3381)



E10.5

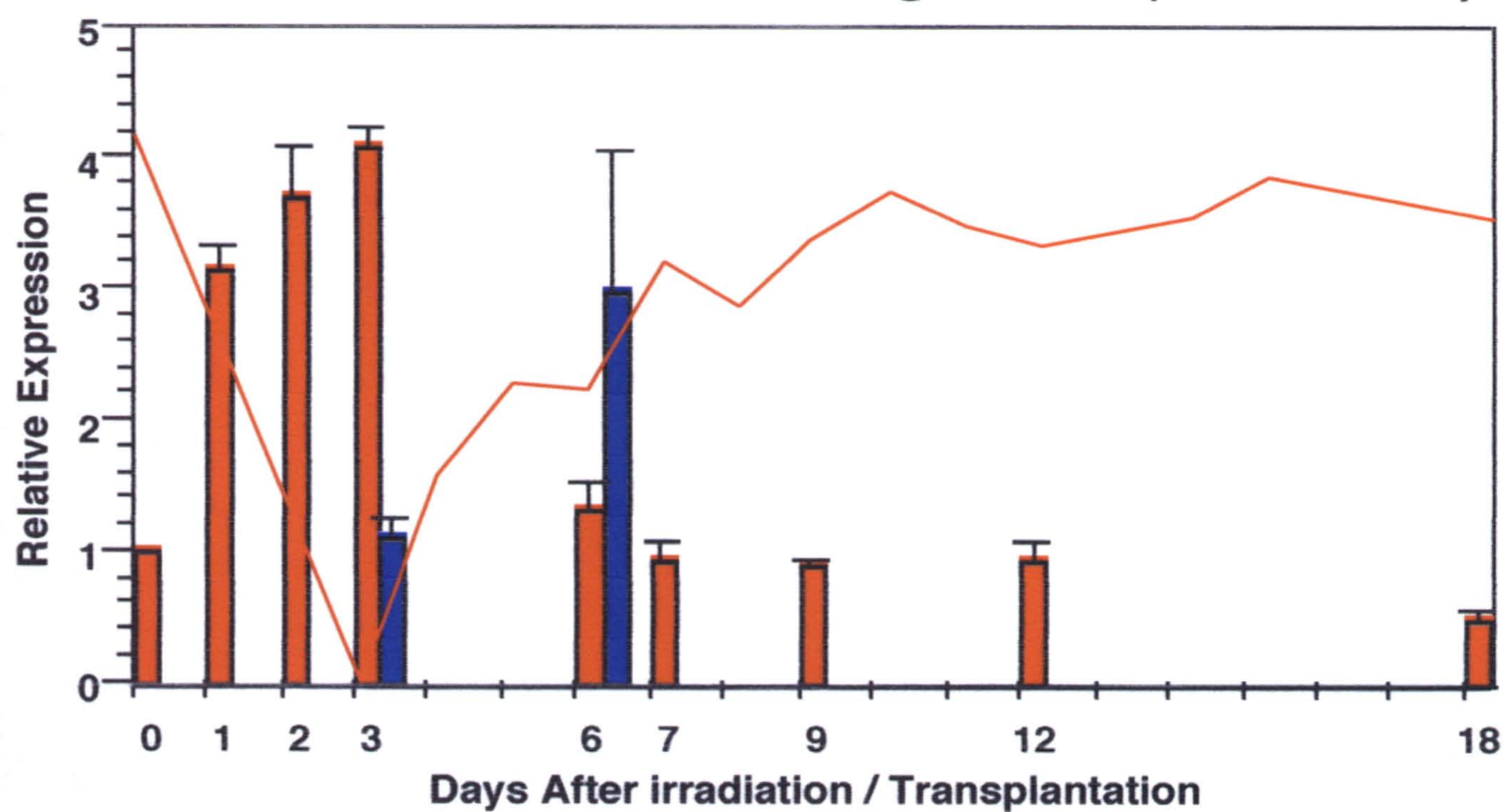
骨髓移植後の発現量

移植後ただちに発現量が増加し始め、1日目には正常値の5倍に増加した。その後発現量は徐々に減少し、6日目にはほぼ正常値に戻った。

E10.5での発現部位

前脳、咽頭弓、耳胞、肢芽、心臓

F. chemokine ligand 6 (clone 3395)



E10.5

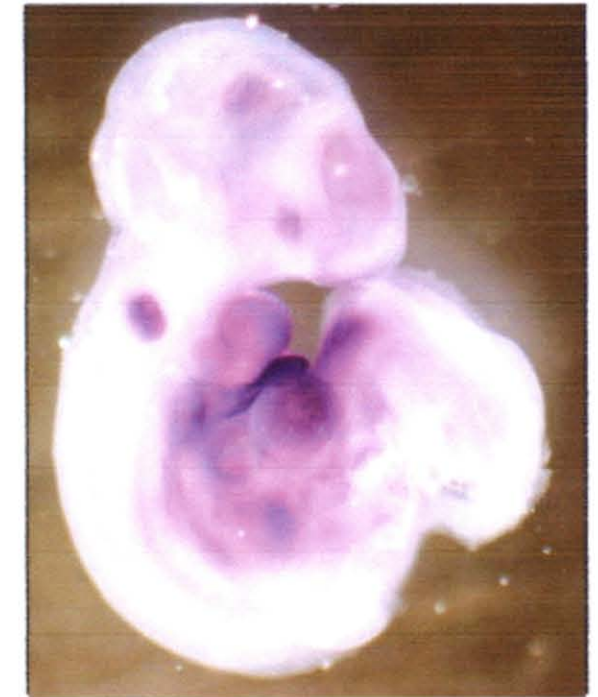
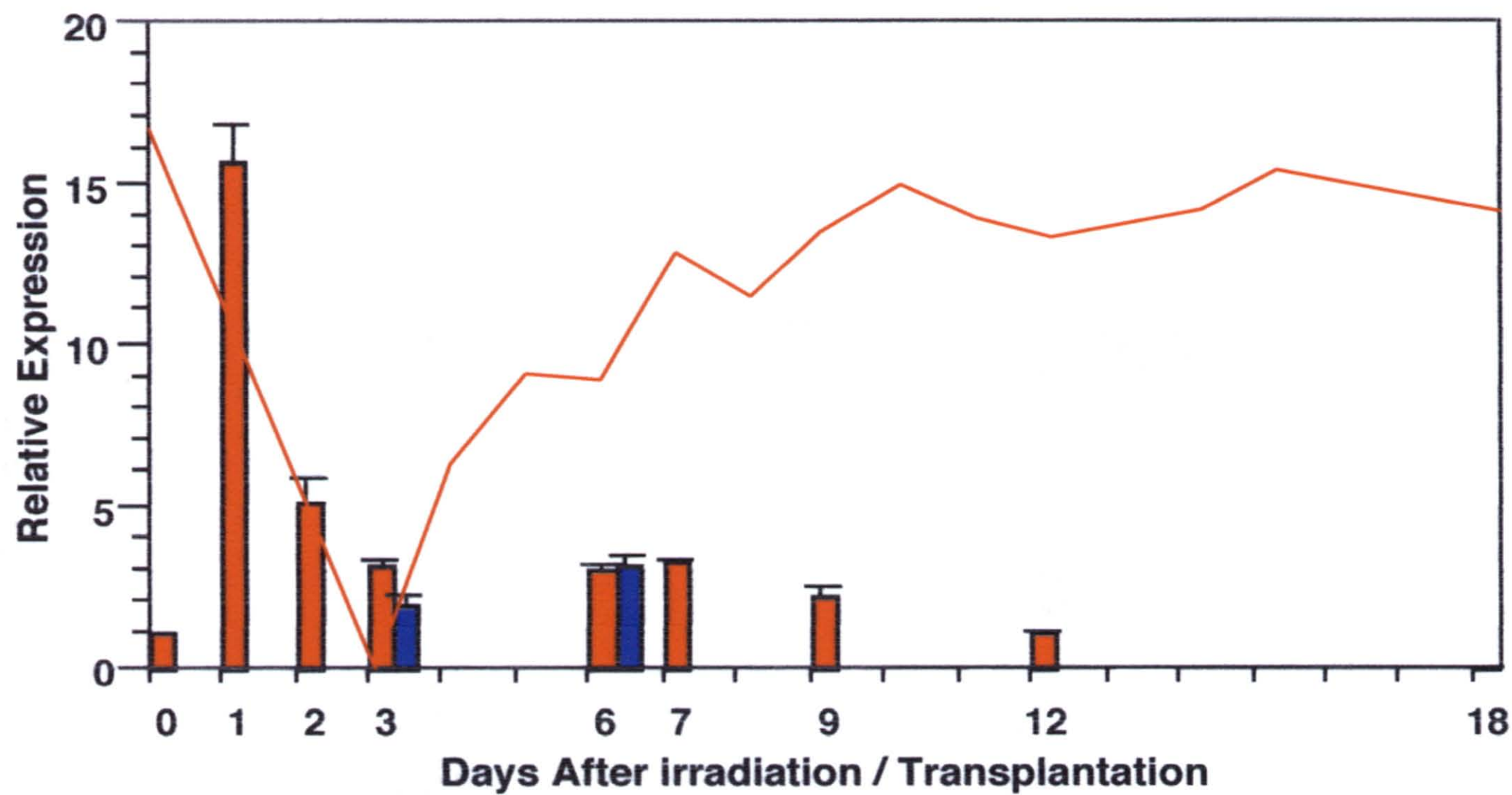
骨髓移植後の発現量

移植後徐々に発現量が増加し、3日目には正常値の4倍に増加した。その後、6日目にはほぼ正常値に戻った。

E10.5での発現部位

耳胞、心臓、肢芽

G. 28kD INF-alpha responsive protein (clone 3451)



E10.5

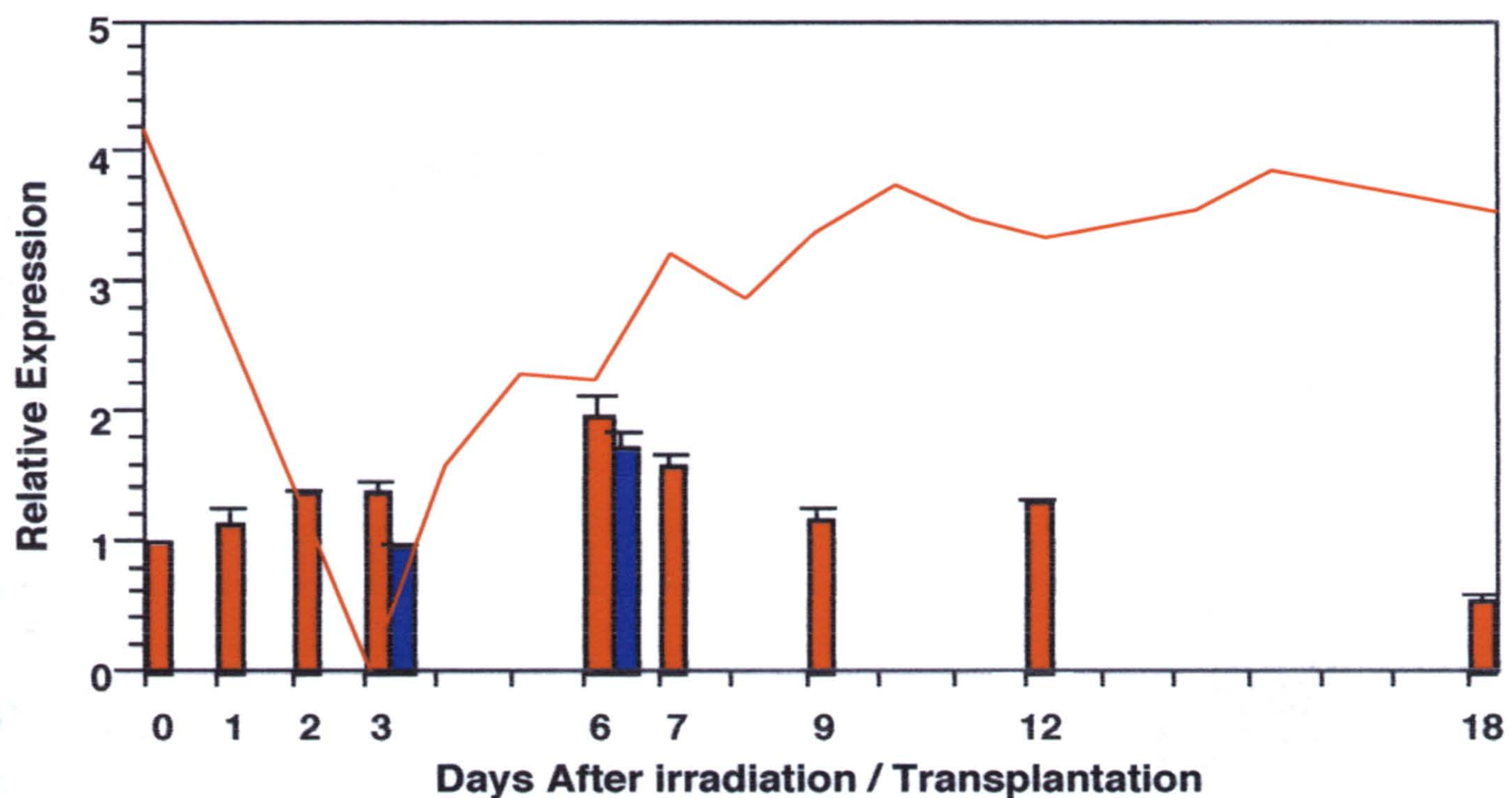
骨髓移植後の発現量

移植後速やかに発現量が増加し始め、1日目には正常値の15.7倍に増加した。その後速やかに減少し、12日目にはほぼ正常値に戻った。

E10.5での発現部位

前脳、耳胞、咽頭弓、心臓、肢芽

H. antioxidant protein 1 homolog 1 (clone 3716)



E10.5

骨髓移植後の発現量

移植後緩やかに発現量が増加し、6日目に正常値の2倍に増加した。その後徐々に減少し、18日目にはほぼ正常値に戻った。

E10.5での発現部位

耳胞、咽頭弓、心臓、肢芽

考察

Part 1 の骨髄移植後 3 日目の血清を用いた実験結果から、骨髄移植後 3 日目の骨髄中には、血清中に放出されない造血幹細胞増殖関連因子が発現していると予想された。Part 2 ではそれらの遺伝子をクローニングするため、骨髄移植後 3 日目のマウス骨髄細胞由来 cDNA を target, 正常マウス骨髄細胞由来 cDNA を competitor として cDNA サブトラクションを行った (図 8)。サブトラクテッドライブラリー構築後の約 2000 クローンについて二次スクリーニングを行った結果、237 個のポジティブクローンを得た (図 9)。うち 20 クローンは機能未知遺伝子 (4 クローンは重複) だった。機能未知遺伝子以外には、細胞輸送・分泌関連遺伝子、細胞骨格関連遺伝子、サイトカイン・ケモカイン遺伝子、リボソーム遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子、Immunoglobulin 関連遺伝子等が得られた。これらのクローンの発現解析を行うにあたり、造血との直接的な関連が薄いと予想されるリボソーム遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子、Immunoglobulin 関連遺伝子等を解析から除外した。造血への関与が予想される遺伝子の中から、機能未知遺伝子 2 クローンと、スクリーニングの結果、特に移植後 3 日目の骨髄での発現が著しかった遺伝子 6 クローン、計 8 クローンについて、詳細な発現解析を行った。

Real-time PCR 法を用いて骨髄移植後のマウス骨髄における定量発現解析を行ったところ、全てのクローンは、骨髄移植後 1 日目から 3 日目のあいだに正常値と比べて顕著に発現量が増加するが、移植後 18 日目頃には正常値と同程

度の発現量に低下していた(図 9-A~H)。また,胎生 10.5 日目胚を用いて whole mount *in situ* hybridization を行ったところ,成体型造血幹細胞が発生,増殖する AGM 領域(aorta-gonad-mesonephros, 腹部大動脈, 生殖隆起, 中腎で囲まれた領域)で発現している遺伝子が 4 クローンあった(図 9-A, B, C, D)。遺伝子発現解析の結果, 予想される機能について遺伝子ごとに考察する。

Clone 3011: *Mus musculus* RIKEN cDNA 2810405K02 gene (図 9-A)

機能未知遺伝子である clone3011 は, 定量発現解析において骨髄移植後 3 日目に正常時の 14 倍にも増加し, 放射線照射のみのマウスにおいても正常時の 9 倍に増加していた。骨髄移植によって発現量が増加していることから, 移植した造血幹細胞との接触によってこの遺伝子の発現が誘導されと考えられる。また, 胎生 10.5 日目胚の AGM 領域で発現していたことから, clone3011 は造血幹細胞の増殖に関わる因子である可能性が示唆される。また, この遺伝子についてドメイン検索を行ったが, 既知のドメインとの相同性は見られなかった。新規の造血幹細胞増殖支持因子であることが期待されるため, タンパク質レベルでの発現解析や, 組み換えタンパク質を作製し, *in vitro* で造血幹細胞増殖実験を行うなど, 詳細な機能解析が必要と考える。

Clone 3017: *Mus musculus* Blocked early in transport 1 homolog (*S. cerevisiae*)-like (図 9-B)

Blocked early in transport 1 homolog (*S. cerevisiae*)-like は、定量発現解析において骨髄移植後ただちに発現が増加し、1 日目に正常値の 7 倍に増加した。これに対して放射線照射のみのマウスでは、3, 6 日目ともに正常値と同程度に発現していた。以上のことから、この遺伝子は移植した骨髄細胞との接触により発現が誘導されると予想される。また、胎生 10.5 日胚の脳で非常に強く発現し、AGM 領域でも発現していた。胎生 10.5 日目は大脳半球の形成期にあたることから、この遺伝子は造血系の発生だけでなく、神経系の発生にも関与している可能性が示唆される。この遺伝子のドメイン検索を行ったところ、target SNARE coiled-coil 領域と trans membrane ドメインを持つことがわかった。小胞体とゴルジ体でのタンパク輸送への関与が関与も報告されているが[31]、造血系、発生における詳細な機能は不明であるため、今後の解析が必要であると考えられる。

Clone 3113: *Mus musculus* insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (図 9-C)

IGF-1 は、生体内では成長ホルモン依存的に肝臓、骨髄などで産生され、さまざまな細胞の増殖因子として機能する[32]。細胞周期の促進、アポトーシスの抑制など多様な作用をもつが、造血系においては血球系、リンパ球系のいずれの細胞にも働き、造血系を活性化させると報告されている[33, 34]。IGF-1 は、定量発現解析において骨髄移植後 3 日目に正常値の 36 倍と、著しく増加

していることから、造血系再構築に深く関与していることが示唆される。さらに、放射線照射のみのマウスにおいても 6 日目に正常値の 17 倍に増加していた。これは、放射線照射により障害を受けた血球を、アポトーシスから回避させるために IGF-1 の発現が急激に増加しているのではないかと考えられる。また、胎生 10.5 日胚の AGM 領域で発現していることから、IGF-1 が造血幹細胞の発生にも関与している可能性が示唆される。

Clone 3360: *Mus musculus* cDNA clone IMAGE: 5389116 (図 9-D)

機能未知遺伝子である clone3360 は、定量発現解析において骨髄移植後ただちに発現量が増えはじめ、1 日目に正常時の 54 倍にも増加した。骨髄移植によって発現量が顕著に増えることから、この遺伝子の発現には移植した細胞と骨髄間質細胞の接触が重要であると考えられる。また、胎生 10.5 日胚の AGM 領域で強く発現しているとともに、心臓や脳でも非常に強く発現していた。胎生 10.5 日目は心房中隔形成、大脳半球の形成期にあたることから、clone3360 が骨髄移植後の造血幹細胞の増殖に関わるだけでなく、胚発生においても非常に重要である可能性を示唆する。また、この遺伝子のドメイン検索を行ったところ、Binding-protein-dependent transport systems inner membrane comp. sign.ドメインをもつ遺伝子であることから、細胞内輸送や代謝に関連する遺伝子であると予想されるが、詳細は不明であるため、タンパク質レベルでの発現解析や、組み換えタンパク質を作製し、*in vitro* で造血幹細胞増殖実験を行うなど、詳細な機能解析が必要と考える。

Clone 3381: *Mus musculus* cytoskeleton-associated protein 4 (図 9-E)

cytoskeleton-associated protein 4 は膜タンパク質であり、小胞体と微小管を結合させ、細胞分裂を安定化させるために重要とされている[35]。定量発現解析において、骨髄移植後 1 日目には正常値の 5 倍に増加した。その後、発現量は徐々に減少し、6 日目にはほぼ正常値に戻った。これに対して骨髄移植をしていないマウスでは、3 日目は正常値よりも低い発現量であったが、6 日目には正常値の 3 倍に増加した。この結果から、移植した細胞が安定して細胞分裂し、生体の生存維持に必要な細胞数まで増加するために機能している可能性が示唆される。

Clone 3395: *Mus musculus* chemokine (C-C motif) ligand 6 (図 9-F)

Chemokine ligand 6 は単球、T 細胞の遊走活性をもつケモカインで、造血系細胞と繊維芽細胞で発現している[36]。定量発現解析において骨髄移植後、徐々に発現量が増加し、3 日目には正常値の 4 倍に増加した。その後、6 日目にはほぼ正常値に戻った。これに対して骨髄移植をしていないマウスでは、3 日目は正常値とほぼ同じ発現量であったが、6 日目には正常値の 3 倍に増加した。骨髄細胞移植により早期に発現が上昇するケモカインであることから、移植した造血幹細胞の骨髄への定着に関与している可能性も考えられる。

Clone 3451: *Mus musculus* RIKEN cDNA 5830458K16 gene product="28kD interferon alpha responsive protein (図 9-G)

28kD interferon alpha responsive protein はマウスでの解析は殆ど進んでいないが、ほぼ同じ配列をもつヒト遺伝子は嗅覚受容体としての機能が示唆されている[37]。定量発現解析において骨髄移植後 1 日目には正常値の 15.7 倍にも増加していることから、この遺伝子は移植した骨髄細胞との接触により発現が誘導され、造血系再構築に深く関与していると考えられる。また、10.5 日胚の AGM 領域での発現は認められなかったが、脳や心臓で発現していることから、胚発生に関与している可能性が示唆される。

Clone 3716: *Mus musculus* ATX1 (antioxidant protein 1) homolog 1 (yeast) (Atox1) (図 9-H)

Atox 1 は細胞内外の銅輸送に関与する金属輸送ペプチドであり、銅イオンの恒常性維持に重要である[38]。定量発現解析において、骨髄移植後ゆるやかに発現量が増加し、6 日目に正常値の 2 倍に増加した。その後、徐々に減少し、18 日目にはほぼ正常値に戻った。骨髄移植をしていないマウスでも同程度の発現が見られることから、放射線照射により細胞が減少することで発現量が増加したと考えられる。また、Atox 1 のノックアウトマウスでは銅代謝異常による成長遅延などが報告されている[39]ことから、正常な発達に重要であると考えられる。

Part 2 の考察

Part 2 では、骨髓移植後 3 日目の骨髓で特異的に発現の上昇する遺伝子を cDNA サブトラクションによりクローニングし、詳細な遺伝子発現解析を行った。cDNA サブトラクションにより、骨髓移植後 3 日目の骨髓で発現の上昇する 237 クローンを特定した。うち 20 クローンは機能未知遺伝子（4 クローンは重複）だった。機能未知遺伝子以外には、細胞輸送・分泌関連遺伝子、細胞骨格関連遺伝子、サイトカイン・ケモカイン遺伝子などが得られた。得られたクローンの発現解析を行うにあたり、造血系への直接的な関連が薄いと予想されるリボソーム遺伝子やミトコンドリア関連遺伝子等を除き、機能未知遺伝子 2 クローン、この他にスクリーニングの結果、特に移植後 3 日目の骨髓での発現が著しかった遺伝子 6 クローンを合わせて、計 8 クローンについて詳細な発現解析を行った。

骨髓移植前後の骨髓における定量発現解析の結果、解析した 8 クローンはいずれも移植後 1 日目から 3 日目までの造血幹細胞の減少時期に発現が増加し、造血幹細胞数が正常値近くまで回復した移植後 18 日目には、ほぼ正常値と同程度の発現量にまで戻った。この結果は、これらの遺伝子産物が骨髓移植後の造血幹細胞増殖に深く関与することを強く示唆する。また、8 クローン中 4 クローンは成体型造血幹細胞の発生、増殖部位と考えられている胎生 10.5 日目胚の AGM 領域で発現していた。骨髓移植後の造血幹細胞増殖に関与する遺伝子が発生時の造血幹細胞増殖部位でも発現していた結果から、骨髓移植後

の造血幹細胞増殖と，発生時の造血幹細胞増殖の制御機構が類似していることが示唆される。そしてさらにこれらの遺伝子について述べる。

今後の展望

まず Part 1 では、致死量放射線照射後に骨髓細胞を移植したマウスの造血幹細胞（KSL 細胞）の回復動態を解析した結果、骨髓移植後 3 日目の体内環境に造血幹細胞を効率よく増殖させるシステムが存在することが示唆された

（図 3-D）。この結果をもとに、骨髓移植後の血清中に造血幹細胞増殖因子の存在を想定し、骨髓移植後 3 日目の血清存在下で全骨髓細胞と造血支持細胞株である MS-5 との共培養を試みたところ、全骨髓細胞中の造血幹細胞は培養開始時の約 25 倍にまで増加した（表 5-B）。正常血清では造血幹細胞増殖は認められなかったことから（表 5-B）、骨髓移植後 3 日目の血清中には正常血清中には存在しない、造血幹細胞増殖に有効な因子が含まれていることが示された。また、骨髓移植後 3 日目の血清存在下でも、骨髓細胞と MS-5 が接触できない条件で培養すると、造血幹細胞増殖は認められなかったことから（表 5-C）、造血幹細胞増殖には、支持細胞との接触も重要であることが明らかとなった。

全骨髓細胞中の造血幹細胞が著しく増殖した MS-5 では、造血幹細胞増殖への関与が報告されている複数のサイトカインの発現が上昇していた（図 5）。この結果は、骨髓移植後 3 日目の血清中に含まれる因子が、これらのサイトカインの発現を誘導したためと考えられる。

生体が強いストレス環境下に曝露されるとステロイドホルモンの分泌が上昇することが報告されている[16, 17]、また、ステロイドホルモンである性ホルモンは造血系の細胞増殖との関連が報告されている[26, 27, 28, 29]。

マウス血清中のテストステロン濃度を ELISA 法により測定すると、骨髓移植後 3 日目のマウス血清中の濃度は正常血清中濃度に比べ、有意に上昇していた（表 6）。ここから、性ホルモンの骨髓移植後の造血幹細胞増殖への関与を想定し、MS-5 と骨髓細胞の共培養系に性ホルモンを添加した。テストステロンの添加により造血幹細胞が増殖したことから（表 7）、骨髓移植後 3 日目の血清に含まれる造血幹細胞増殖因子の一つがテストステロンであると考えられる。しかし、骨髓移植後 3 日目の血清单独では造血幹細胞増殖が誘導できなかったことから、骨髓移植後 3 日目の骨髓中には、血清中に放出されない造血幹細胞増殖関連因子が発現していると予想された。そこで次に、cDNA サブトラクションによりそれらの遺伝子クローニングを行った。

Part 2 では、cDNA サブトラクションにより得られたクローンの遺伝子発現解析を行った。cDNA サブトラクションにより、骨髓移植後 3 日目の骨髓で特異的に発現が上昇している遺伝子 237 クローンを特定した（図 9）。237 クローン中 20 クローン（4 クローンは重複）は機能未知遺伝子だった。得られたクローンのうち、造血幹細胞増殖への直接的な関連が薄いと想定される遺伝子（ミトコンドリア関連遺伝子、リボソーム関連遺伝子など）を除いたクローンのなかから、機能未知遺伝子 2 クローンを含む 8 クローンについて詳細な遺伝子発現解析を行った。骨髓移植前後の骨髓での定量発現解析を行った結果、8 クローンいずれも骨髓移植後 1 日目から 3 日にかけての造血幹細胞減少期に発現が高く、造血幹細胞数がほぼ正常値に回復した移植後 18 日目には、発現

が正常時と同程度に戻っていたことから、これらの遺伝子が骨髄移植後の造血幹細胞増殖に深く関与していることが示された（図 11-A~H）。胎生 10.5 日胚を用いた whole mount *in situ* hybridization の結果、8 クローン中 4 クローンはマウスの成体型造血幹細胞の発生、増殖部位である AGM 領域で発現していた（図 11-A, B, C, D）。これらの解析結果から、骨髄移植後の造血幹細胞増殖機構と、発生時の造血幹細胞増殖機構が類似することが示唆される。

今後は残りのクローンについても発現解析を行い、より造血幹細胞増殖に関連の強い遺伝子を絞り込む必要があるだろう。それらの遺伝子の機能を検討する方法の一つに、組み換えタンパク質を作製する方法がある。組み換えタンパク質が作製できれば、*in vitro* での造血幹細胞増殖実験や、骨髄移植時の *in vivo* における影響の解析などが可能となる。また、作製したタンパク質を抗原としてラットを免疫し、ラットミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製すれば、モノクローナル抗体を用いて骨髄移植マウスの造血組織におけるこれらの遺伝子産物のタンパク質レベルでの発現解析も可能となる。発現タンパク質の収量の多さからすると大腸菌を用いた発現系が簡便だが、大腸菌で作製する組み換えタンパク質は、ほ乳類のような翻訳後修飾が行われないため、生理活性物質としての機能解析に用いるには最適とはいえない。そこで、よりほ乳類に近い翻訳後修飾が行われる昆虫細胞を用いた発現系が、最も適切だろうと考える。

本研究でクローニングした遺伝子、ならびにそのタンパク質について詳細な解析を行うことにより、造血幹細胞の自己複製と分化の制御機構解明に繋がることが期待される。

謝辞

本研究の遂行ならびに博士課程の御指導と御助言をいただきました新潟大学
大学院自然科学研究科助教授 杉本 健吉先生、同自然科学研究科教授 細野
正道先生に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. J.E. Till and E.A. McCulloch
A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.
Radiat. Res. **14** (1961), pp. 1419-1430.
2. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL.
Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells.
Science. 1988 Jul 1; **241**(4861): 58-62.
3. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H.
Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.
Science. 1996 Jul 12; **273**(5272):242-5.
4. Leemhuis T, Yoder MC, Grigsby S, Aguero B, Eder P, Srouf EF.
Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123.
Exp Hematol. 1996 Aug; **24**(10): 1215-24.
5. Parmar K, Burdick D, Ethier M, Clyne J, Mauch P.
Murine side population cells contain cobblestone area-forming cell activity in mobilized blood.
Stem Cells Dev. 2005 Aug; **14**(4): 452-61.
6. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, Pasche AC, Knabenhans C, Macdonald HR, Trumpp A.
c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation.
Genes Dev. 2004 Nov 15; **18**(22): 2747-63.
7. Harvey K, Dzierzak E.
Cell-cell contact and anatomical compatibility in stromal cell-mediated HSC support

during development.

Stem Cells. 2004 ; **22**(3): 253-8.

8. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, Bertoncello I, Bendall LJ, Simmons PJ, Haylock DN.

Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells.

Blood. 2005 Aug 15; **106**(4): 1232-9. 5. 7.

9. Heike T, Nakahata T.

Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines.

Biochim Biophys Acta 2002 Nov 11; **1592**(3):313-21

10. Peters R, Leyvraz S, Faes-Van't Hull E, Jaunin P, Gerber S, Rollini P.

Long-term ex vivo expansion of human fetal liver primitive haematopoietic progenitor cells in stroma-free cultures.

Br. J. Haematol. 2002 Dec; **119**(3): 792-802.

11. Delaney C, Varnum-Finney B, Aoyama K, Brashem-Stein C, Bernstein ID.

Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells.

Blood. 2005 Oct 15; **106**(8): 2693-9.

12. Sugimoto K, Adachi Y, Moriyama K, Qiong W, Nakayama A, Hosono M, Mori KJ.

Induction of the expression of SCF in mouse by lethal irradiation.

Growth Factors 2001; **19**(4): 219-31

13. Klump H, Schiedlmeier B, Baum C.

Control of Self-Renewal and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells: HOXB4 on the Threshold.

Ann N Y Acad Sci. 2005 Jun; **1044**:6-15.

14. D J Kelly and J C Rees

Effect of sublethal gamma radiation on hostct of syngeneic marrow injection upon recovery in sub- and near-lethally irradiated mice.

Exp Hematol. 1989 Jun; **17**(5): 449-54.

15. Frasca D, Guidi F, Arbitrio M, Pioli C, Poccia F, Cicconi R, Doria G.

Hematopoietic reconstitution after lethal irradiation and bone marrow transplantation: effects of different hematopoietic cytokines on the recovery of thymus, spleen and blood cells.

Bone Marrow Transplant. 2000 Feb; **25**(4): 427-33.

16. Schwab CL, Fan R, Zheng Q, Myers LP, Hebert P, Pruett SB.

Modeling and predicting stress-induced immunosuppression in mice using blood parameters.

Toxicol Sci. 2005 Jan; **83**(1): 101-13.

17. Hayley S, Kelly O, Anisman H.

Corticosterone changes in response to stressors, acute and protracted actions of tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide treatments in mice lacking the tumor necrosis factor-alpha p55 receptor gene.

Neuroimmunomodulation. 2004; **11**(4): 241-6.

18. Itoh K, Tezuka H, Sakoda H, Konno M, Nagata K, Uchiyama T, Uchino H, Mori KJ.

Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow.

Exp Hematol. 1989 Feb; **17**(2): 145-53.

19. Annelise Bennaceur-Griscelli, Cristina Tourino, Brigitte Izac, William Vainchenker, and Laure Coulombel

Murine stromal cells counteract the loss of long-term culture-initiating cell potential induced by cytokines in CD34(+)CD38(low/neg) human bone marrow cells.

Blood 1999; **94**: 529-538

20. Broberg EK, Nygardas M, Salmi AA, Hukkanen V.
Low copy number detection of herpes simplex virus type 1 mRNA and mouse Th1 type cytokine mRNAs by Light Cycler quantitative real-time PCR.
J. Virol. Methods. 2003 Sep ; **112**(1-2): 53-65.
21. Leutenegger CM, von Rechenberg B, Huder JB, Zlinsky K, Mislin C, Akens MK, Auer J, Lutz H.
Quantitative real-time PCR for equine cytokine mRNA in nondecalfified bone tissue embedded in methyl methacrylate.
Calcif Tissue Int. 1999 Nov; **65**(5): 378-83.
22. P.W. Zandstra, E. Conneally, A.L. Petzer, J.M. Piret and C.J. Eaves.
Cytokines manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal.
Proc Natl Acad Sci U S A **94** (1997), pp. 4698–4703.
23. Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H.
In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells.
J Exp Med. 2000 Nov 6; **192**(9): 1281-8.
24. Dar A, Goichberg P, Shinder V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N, Margalit R, Zsak M, Nagler A, Hardan I, Resnick I, Rot A, Lapidot T.
Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells.
Nat Immunol. 2005 Oct; **6**(10): 1038-46.
25. Suzuya H, Watanabe T, Nakagawa R, Watanabe H, Okamoto Y, Onishi T, Abe T, Kawano Y, Kagami S, Takaue Y.
Factors associated with granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell yield in healthy donors.
Vox Sang. 2005 Nov; **89**(4): 229-35.
26. Viselli SM, Reese KR, Fan J, Kovacs WJ, Olsen NJ.
Androgens alter B cell development in normal male mice.

Mech Ageing Dev. 1999 Aug 30; **109**(2): 125-39.

27. Saitoh T, Morimoto K, Kumagai T, Tsuboi I, Aikawa S, Horie T.

Comparison of erythropoietic response to androgen in young and old senescence accelerated mice.

Cell Immunol. 1997 Dec 15; **182**(2): 99-104.

28. Medina KL, Garrett KP, Thompson LF, Rossi MI, Payne KJ, Kincade PW.

Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen.

Nat Immunol. 2001 Aug; **2**(8): 718-24.

29. Perry MJ, Samuels A, Bird D, Tobias JH.

Effects of high-dose estrogen on murine hematopoietic bone marrow precede those on osteogenesis.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000 Nov; **279**(5): E1159-65.

30. Wu Q, Sugimoto K, Moriyama K, Adachi Y, Nakayama A, J Mori K.

Cloning of hibernation-related genes of bullfrog (*Rana catesbeiana*) by cDNA subtraction.

Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2002 Sep; **133**(1): 85-94.

31. Zhang T, Wong SH, Tang BL, Xu Y, Peter F, Subramaniam VN, Hong W.

The mammalian protein (rbet1) homologous to yeast Bet1p is primarily associated with the pre-Golgi intermediate compartment and is involved in vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus.

J Cell Biol. 1997 Dec 1; **139**(5): 1157-68.

32. Stewart CE, Rotwein P.

Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors.

Physiol Rev. 1996 Oct; **76**(4):1005-26.

33. Welniak LA, Karas M, Yakar S, Anver MR, Murphy WJ, LeRoith D.
Effects of organ-specific loss of insulin-like growth factor-I production on murine hematopoiesis.
Biol. Blood Marrow Transplant. 2004 Jan; **10**(1): 32-9.
34. Burgess W, Jesse K, Tang Q, Broussard SR, Dantzer R, Kelley KW.
Insulin-like growth factor-I and the cytokines IL-3 and IL-4 promote survival of progenitor myeloid cells by different mechanisms.
J Neuroimmunol. 2003 Feb; **135**(1-2): 82-90.
35. Vedrenne C, Klopfenstein DR, Hauri HP.
Phosphorylation controls CLIMP-63-mediated anchoring of the endoplasmic reticulum to microtubules.
Mol Biol Cell. 2005 Apr; **16**(4): 1928-37.
36. Belperio JA, Dy M, Burdick MD, Xue YY, Li K, Elias JA, Keane MP.
Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 Oct; **27**(4): 419-27.
37. Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H.
RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors.
Cell. 2004 Nov 24; **119**(5): 679-91.
38. Hamza I, Prohaska J, Gitlin JD.
Essential role for Atox1 in the copper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Feb 4; **100**(3): 1215-20.
39. Hamza I, Faisst A, Prohaska J, Chen J, Gruss P, Gitlin JD.
The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jun 5; **98**(12): 6848-52.