

博士論文

組み換えアルブミンを用いた培養系による  
造血幹細胞の増殖制御因子の探索

家保 有希

## 目次

1. 略語	…3
2. 要旨	…7
3. 序文	…8
4. 材料と方法	…12
5. 結果	…17
6. 考察	…25
7. 図表	…35
8. 引用文献	…58
9. 謝辞	…67

## 1. 略語

ANGPTL3 : angiopoietin-like 3

APC : allophycocyanin

BMI1 : B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog

BMP7 : bone morphogenetic protein 7

BSA-FV : bovine serum albumin-fraction five

CAR cells : chemokine ligand 12 (CXCL12)-abundant reticular cells

cGMP : cyclic guanosine monophosphate

CLP : common lymphoid progenitor

CMP : common myeloid progenitor

CO : carbon monoxide

CXCL10 : C-X-C motif chemokine 10

DAPI : 4, 6-diamidino-2-phenylindole

DCF : 2',7'-dichlorofluorescein

DCF-DA : 2',7' -dichlorofluorescein diacetate

DLL-4 : delta like ligand 4

DNA : deoxyribonucleotide acid

EGF : epidermal growth factor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EPO : erythropoietin

EZH2 : enhancer of zeste, drosophila, homolog 2

FBS : fetal bovine serum

FGF : fibroblast growth factor

FITC : fluorescein isothiocyanate

G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor

GM-CSF : granulocyte/macrophage-colony stimulating factor

GFAP : glial fibrillary acidic protein

HOXB4 : homeobox B4

HO-1 : heme oxygenase-1

HPX : hemopexin

HSA : human serum albumin

HySOx : *N, N, N', N'*-Tetramethyl-spiro[benzo[*c*]thiophene-1(3H),9'-[9H]x-anthene]-3',  
6'-diamine

IGF : insulin like growth factor

IL : interleukin

MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1

M-CSF : macrophage-colony stimulating factor

MFI : mean fluorescence intensity

MIP-3 $\beta$  : macrophage inflammatory protein-3-beta

mRNA : messenger ribonucleic acid

MSA : mouse serum albumin

MyRP : myeloid-restricted progenitor

NO : nitric oxide

NOV : nephroblastoma overexpressed

one-way ANOVA : one-way analysis of variance

PB : pacific blue

PBS : phosphate buffered saline

PDGF : platelet-derived growth factor

PE : phycoerythrin

PFA : paraformaldehyde

PS/G : penicillin/streptomycin-glutamine

ROS : reactive oxygen species

RSA : recombinant serum albumin

Sca-1 : stem cell antigen-1

SCF : stem cell factor

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TNF : tumor necrosis factor

TNFSF14 : tumor necrosis factor superfamily member 14

TPO : thrombopoietin

VEGF : vascular endothelial growth factor

## 2. 要旨

造血幹細胞を生体外で増殖させる技術の開発は、様々な血液疾患を治療するうえで重要であると考えられている。しかし、造血幹細胞の安定的な増幅は未だ実現されておらず、造血幹細胞の移植研究において、造血幹細胞の供給量不足は大きな問題となっている。今日までに、造血幹細胞を *in vitro* で増幅させる研究は多くの研究グループによって行われ、多くの増殖因子が報告されてきた。しかし、研究グループごとに細胞培養技術に差異があり、再現性に関して問題が指摘されてきた。そこで本研究では、再現性を低下させる要因の1つとして、非科学的な要素を内包する **BSA-FV** に着目した。現在、造血幹細胞の培養系には **BSA-FV** を添加することが必須とされている。私は本研究において、**BSA-FV** の製造ロットにより、造血幹細胞の増殖を阻害もしくは促進する因子が含まれていることを明らかにした。また、造血幹細胞の培養系に、**BSA-FV** の代わりに組み換えアルブミンタンパク質を用いることによって、基準となりうる培養系を開発した。この組み換えアルブミンを用いた培養系を利用して解析を行ったところ、造血幹細胞の増殖制御因子として **IL-1 $\alpha$**  および **HPX** を見出した。本研究は、現在培養に広く用いられている **BSA-FV** には不確定要素が多分に含まれていることを示し、**BSA-FV** を造血幹細胞培養系から排除することで、研究グループ間の実験結果の再現性が向上する可能性を提示したと考える。

### 3. 序文

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を維持しつつ、一生涯にわたり必要な全血球系細胞を供給する源の細胞である[1]。造血幹細胞の自己複製能と多分化能を制御し、*in vitro* で造血幹細胞を増幅させようと、長年多くの研究者が試みてきた。造血幹細胞を *ex vivo* で増幅させるためのアプローチとして、細胞内在性因子と細胞外因子の大きく 2 つが挙げられる[2]。前者は、HOXB4 などの転写因子[3, 4] や、BMI1 [5, 6] や EZH2 [7] などのクロマチンリモデリング因子の発現を制御することで、造血幹細胞の *in vitro* 増幅を目指すものである。また、近年では microRNA に着目した研究も為されており、microRNA が造血系の分化を制御しているという報告[8]や、造血幹細胞の数を制御しているという報告[9]、造血幹細胞の増幅に関与しているという報告[10]もある。

一方、*in vitro* で造血幹細胞を増幅しようとする最初の試みは、細胞外因子を用いて行われた。液性因子などの細胞外因子は、骨髓ニッチとよばれる骨髓微小環境に存在する。骨髓ニッチは、造血幹細胞の休眠状態や分化、遊走など諸々の機能の維持に関わっていると考えられている[11]。骨髓ニッチを構成する細胞として、骨芽細胞[12-14] や血管内皮細胞[15]、CAR 細胞[16]、間葉系幹細胞[17]、非ミエリン性シュワン細胞[18, 19] など多くの細胞が報告されてきた。これら骨髓ニッチ細胞は、造血幹細胞の維持に必要だとされる様々な因子を分泌して



おり、造血幹細胞の細胞表面に存在する受容体を通してシグナル伝達される。

液性因子と受容体の代表的な研究例として、 $Sl/Sl^d$  マウス[20]と  $W/W^v$  マウス[21]が挙げられる。 $Sl/Sl^d$  マウスおよび  $W/W^v$  マウスは、ともに皮膚色素細胞欠損、貧血、不妊等の症状を示すと報告されていた。しかし、脾コロニー形成能に関しては対照的な結果を示した。具体的には、 $Sl/Sl^d$  マウス由来の骨髄細胞を野生型マウスに移植すると正常と同様の脾コロニーを形成するが、正常骨髄細胞を  $Sl/Sl^d$  マウスに移植しても脾コロニーは形成されなかった。逆に、 $W/W^v$  マウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植しても脾コロニーは形成されないが、 $W/W^v$  マウスに正常骨髄細胞を移植すると脾コロニーは形成された。これらの結果から、 $Sl/Sl^d$  マウスは骨髄環境に、 $W/W^v$  マウスは造血幹細胞に欠陥があると考えられていた。後に、 $Sl/Sl^d$  マウスの原因遺伝子として *Scf* [22, 23]が、 $W/W^v$  マウスの原因遺伝子として *c-kit* [24, 25]がクローニングされ、骨髄ニッチに存在する液性因子 SCF が、造血幹細胞の細胞膜表面に存在する受容体 c-KIT に結合することによって、造血幹細胞が制御されていることが明らかとなった。このように、骨髄ニッチと液性因子、造血幹細胞の受容体の研究は、新たな知見を相互に提供しつつ発展してきた。

SCF、TPO およびその他の液性因子は、単独もしくは組み合わせて培地に添加され、造血幹細胞の増殖能、骨髄再構築能について解析されてきた。一例を挙

げると、TPO は EPO と協調して赤血球形成を促進する[26]一方、SCF や IL-3 と組み合わせると *in vitro* における造血幹細胞の増殖を促進させると報告されてきた[27]。しかし、特に造血幹細胞を培養した実験結果に関して、研究グループ間で時折矛盾が生じてきた。このような結果の不一致は、「培養条件、実験条件の違い」として問題視されてこなかった。しかし、この実験結果の不一致を見過ごしたままで本当に良いのだろうか？

当初、造血幹細胞の培養は、ウシ胎児血清(FBS)を添加した液体もしくはメチルセルロース培地で行われていた。FBS は、無数の増殖因子・接着因子・低分子化合物の供給、培地の pH の調整、有害物質からの保護等、多くの役割を果たしていると考えられる。FBS を用いた培養系をもとに、赤芽球系細胞や巨核球を含む混合コロニーを形成するコロニーアッセイ系が開発され、造血幹細胞のヒエラルキーモデルが提唱された。その後も、CMP [28] や CLP [29]、MyRP [30] など複数の前駆細胞が報告されている。

FBS は非常に有用であったが、多くの未知物質を含有していた。この未知物質の影響を排除しようと、FBS の代わりにウシ血清アルブミン(BSA)を添加した無血清培地が開発された[31]。以来、BSA を用いた無血清培地は、造血幹細胞の *in vitro* 培養系として広く使われてきた。血清アルブミンは、血清中のタンパク質の約 60%を占め、脂肪酸・微量物質・不溶性物質の運搬、浸透圧の調整、pH

の緩衝など多くの役割を担っている。BSA は抗体精製、培養、免疫染色、ELISA やウエスタンブロッティングのブロッキング等、生物化学実験に広く用いられている。その中でも培養用 BSA は、70 年以上前にコーン博士が開発した分離法をもとに精製されている[32]。この分離法では、低温度で血清にエタノールを加え、pH や温度を変化させることで、生理的構造・機能を維持した血清アルブミンを分離精製する(図 1)。このエタノール分離法で精製される血清アルブミンは 5 番目の分画に含まれることから、”Fraction V”とも呼ばれる。以後、本研究では BSA を BSA-FV と表記する。

私は、長年多くの研究者が研究してきたにもかかわらず、未だに造血幹細胞の *in vitro* 増幅が限定的であるのは、研究グループ間の造血幹細胞培養実験結果の再現性が低いことに原因があるのではないかと考えた。そして、培養実験の再現性の低さは、BSA-FV を用いた現在の培養系にその一因があると仮説を立てた。この仮説を検証するために、まず BSA-FV を用いた今日の無血清培養系の問題点を明らかにし、BSA-FV に依存しない、基準となりうる新たな培養系を構築した。更に、この培養系を用いて、造血幹細胞の新たな増殖制御因子の同定を試みた。

## 4. 材料と方法

### (1)マウス

C57BL/6 系統マウス(以下 B6-Ly5.2)は日本 SLC 株式会社より購入したものを、同系統 Ly5 ローカスコンジェニックマウス(以下 B6-Ly5.1)は三協ラボサービス株式会社より購入したものを使用した。全ての動物実験は、東京大学医科学研究所の動物実験委員会において許可を得て、東京大学動物実験マニュアルに基づいて実施された。

### (2)造血幹細胞の純化

マウス造血幹細胞は8~12週齢のマウス大腿骨、脛骨および骨盤の骨髓より純化・分取した。25G針とシリンジを用いフラッシュアウトして得られた骨髓細胞をPBS (Sigma, St Louis, USA)に懸濁後、ビオチン化分化抗原抗体(Gr-1, Mac-1, CD4, Ter119, IL-7R抗体(eBioscience Inc., San Diego, USA)、B220, CD8抗体(BioLegend, San Diego, USA); Lin抗体)を加え、氷上で30分反応させた。PBSで洗浄後、Anti-Biotin Microbeads (Miltenyi Biotec Inc., Bergisch Gladbach, Germany)を加え、氷上で15分反応させた。PBSに懸濁、遠心後、MACS separation LS column (Miltenyi Biotec Inc.)に通し、Lin<sup>-</sup>細胞を得た。遠心後、FITC化CD34抗体(BD Bioscience, California, USA)、PE化Sca-1抗体(eBioscience)、APC化c-Kit抗体、

APC-Cy7化ストレプトアビジン(BioLegend)を加え、さらに氷上で90分反応させた。PBSで洗浄後、再度PBSに懸濁し、フローサイトメーター(FACS Aria; BD Bioscience)により造血幹細胞すなわちCD34<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>(CD34<sup>-</sup>KSL)細胞を分取した[33]。

### (3)造血幹細胞の培養

CD34<sup>-</sup>KSL造血幹細胞を、1 % BSA (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)またはRSA (Albumin Bioscience, Huntsville, Alabama)、 $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -メルカプトエタノール、1 % PS/G、液性因子(50 ng/mlマウスSCF、50 ng/mlヒトTPO)を含んだ無血清培地 S-Clone SF-03 (Sanko Junyaku, Tokyo, Japan) 200  $\mu$ lの入った96-wellプレート(U底)に分取し、5 % CO<sub>2</sub>、37°Cの条件下で培養した。

### (4)競合的骨髄再構築法(図 2)

B6-Ly5.1 マウス由来の CD34<sup>-</sup>KSL 造血幹細胞 40 個と、 $1 \times 10^6$  個の B6-Ly5.1/5.2 F1 由来の骨髄細胞(競合細胞)を混ぜ、9.8Gy の致死量の放射線照射を施した B6-Ly5.2 マウスの眼窩静脈叢より移植した。移植後 4～16 週目に眼窩採血した末梢血を、PE 化 Ly5.1 抗体(BioLegend)および FITC 化 Ly5.2 抗体(BD Bioscience)で染め分け、FACS Aria により解析した。解析結果より末梢血中のドナー細胞

(Ly5.1 単陽性)の割合を、CD34<sup>+</sup>KSL 細胞によって再構築された血液細胞の生着率とした。また同時に、移植細胞の分化系譜を明らかにするため、骨髓球系マーカーとして PE-Cy7 化 Gr-1・Mac-1 抗体、リンパ球系マーカーとして APC-Cy7 化 CD3 抗体、PB 化 B220 抗体(BioLegend)でそれぞれ染色を施し、FACS Aria により解析した。FACS Aria による分布結果は、解析ソフト FlowJo を用いて解析した。

#### (5)質量分析用サンプルの調製 (アルブミン除去)

BSA-FV 中のアルブミンタンパク質の除去は、Melon Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo Scientific)を用いて取扱説明書通りに行った。手短に述べると、500  $\mu$ l の 10 % BSA-FV を Melon Gel Purification Buffer で 1:10 に希釈し、Melon Gel スピンカラムに載せた。室温で 5 分間攪拌した後、スピンカラムを遠心し、素通り画分を質量分析に用いた(Medical & Biological Laboratories CO., LTD.)。

#### (6)ウェスタンブロッティング

500  $\mu$ g の BSA-FV を上述通りアルブミン除去し、全素通り画分をポリアクリルアミドゲルで電気泳動した(SDS-PAGE)。メンブレンへブロッティング後、ブロッキングを施し、ラビット抗 HPX 多クローン抗体(1:1000, Abcam)を 30 分間室

温で反応させた。2 次抗体を反応させた後、免疫反応物を Chemiluminescence and Image Quant LAS4000 (GE Healthcare Life Science)で検出した。

#### (7)活性酸素種(ROS)解析

CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞を 2 日間培養後、ROS の指示薬である HySOx (励起光: 555 nm, 蛍光: 575 nm; Goryo Chemical, Hokkaido, Japan)を用いて 37°C で 30 分間染色した。洗浄後、FACS Aria で ROS の蓄積を解析し、MFI で定量化した。同様に、CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞を 2 日間培養後、DCF-DA (Sigma)を用いて 37°C で 30 分間染色した。洗浄後、FACS Aria で DCF (励起光: 495 nm, 蛍光: 529 nm)の蛍光強度を解析した。

#### (8)免疫染色

骨髄の凍結切片の調整および免疫染色は、川本法に従い行った[34]。骨髄切片は、凍結乾燥エタノールまたは 4% PFA で固定した。免疫染色の解析は、コンフォーカル顕微鏡(TCS SP2 AOBS; Leica, Microsystems, Tokyo)を用いて行った。免疫染色解析では以下の抗体を使用した。Alexa 488 化ゴート抗ラビット IgG 抗体、Alexa 647 化ゴート抗チキン IgG 抗体(Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)、ラビット抗 GFAP 抗体(Dako, Glostrup, Denmark)、チキン抗 HPX 抗体(R&D systems)。

また DAPI で核を対比染色した。

#### (9) 3次元解析

先行研究の手順に従った[35, 36]。簡便に述べると、脛骨を 4% PFA で固定した後、骨から骨髄をフラッシュアウトした。DAPI の染色とともに、骨髄を ScaleCUBIC-1 (Reagent-1)で 1 週間処理し、ScaleCUBIC-2 (Reagent-2)で更に 1 週間処理した。GFAP および HPX は一晩かけて染色した。画像は ZEISS Z1 Lightsheet microscope (ZEISS)を用いて取得し、Imaris software (Bitplane)で解析した。

#### (10)統計解析

Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA)および GraphPad Prism 6 (Graphpad software)を用いて、標準偏差・標準誤差を求め、Student の両側 t 検定による有意差検定を行った。また、統計ソフト「R」を用い、一元配置分散分析 (one-way ANOVA)およびダネット分析を行った。



## 5. 結果

### (1) BSA-FV 製造ロットによる造血幹細胞の表現型の多様性

*in vitro* における造血幹細胞の増幅を目的として研究を開始するにあたり、製造ロットの異なる BSA-FV を用いると、コロニー形成に非常に大きな差異が見られることに着目した。

そこでまず、製造ロットの異なる 15 種類の BSA-FV を用いて単細胞コロニーアッセイを行い、各 BSA-FV で 11 日間培養した際の CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞のコロニー形成能を評価した。すると、15 種類中 5 種類の製造ロットでは、殆どコロニーが形成されなかった(図 3A)。次に、コロニーを形成した 10 種類の BSA-FV を用いて造血幹細胞を 1 週間培養し、競合的骨髄移植を行って骨髄再構築能を検証した。驚いたことに、造血幹細胞の骨髄再構築を促進する能力に関して、各 BSA-FV の製造ロット間で大きな差が見られた(図 3B)。移植後 12 週の末梢血の生着率を解析したところ、BSA-FV#1 では 50 %以上を超えていたのに対し、BSA-FV#15 では殆ど生着が確認されなかった。これらの結果は、BSA-FV の製造ロットが異なると、*in vitro* で造血幹細胞を維持する能力に大きな差があることを示した。私は、BSA-FV には製造ロットによって組成の異なる成分が含まれており、これらの不確定な因子によって培養した造血幹細胞の増殖能、骨髄再構築能に差異が生じているのではないかと考えた。

そこで、SDS-PAGE を行い、BSA-FV に含まれる未知因子を検出しようと試みた。BSA-FV#1, #8, #15 について血清アルブミンの大部分を除去して電気泳動したところ、主要タンパク質である血清アルブミン以外に多くのバンドが検出された(図 4A)。

面白いことに、製造ロット間でバントのパターンが異なる事実と一致して、高速液体クロマトグラフィー/質量分析を行った結果、各 BSA-FV に含まれるタンパク質の構成は大きく異なることが分かった(図 4B および表 1)。BSA-FV#1 において、血清アルブミンタンパク質を除いて最も多く含まれるのはトランスフェリンであり、その割合は 60%に及んだ(前駆体等を含む)。一方、BSA-FV#8, #15 に含まれるタンパク質の種類は BSA-FV#1 よりも多岐にわたり、BSA-FV#1 のトランスフェリンのように大部分を占めるタンパク質は存在しなかった。これらの結果から、培養した造血幹細胞の増殖能、骨髄再構築能の差異は、BSA-FV に含まれる微量タンパク質の種類および量比に起因すると考えられた。

## (2) BSA-FV を用いた造血幹細胞培養実験系の問題点

造血幹細胞の増幅を支持する BSA-FV の能力を評価するため、CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 細胞を、1 % BSA-FV, SCF, TPO および 1 種類の液性因子を添加して 1 週間培養し、致死量の放射線を照射したマウスに移植した。図 5 では、移植後

12 週の末梢血の生着率について、コントロール(SCF+TPO)の生着率を 1 とみなした時の各液性因子添加時の生着率比を示した。ここでは、BSA-FV の製造ロット以外、図 5A と図 5B の実験条件は同じである。にもかかわらず、BSA-FV の製造ロットが変わるだけで、各液性因子が造血幹細胞の維持に及ぼす影響は劇的に異なった。一例として IL-4 を挙げると、IL-4 は IL-11 と協調して造血前駆細胞の増殖を促進すると先行報告のある因子であり[37]、造血幹細胞の *in vitro* 培養に度々使われてきた。今回、IL-4 添加による生着率は、BSA-FV#1 使用時はコントロール(SCF+TPO)よりも低下した(図 5A)のに対し、BSA-FV#8 使用時は全く逆の結果が得られた(図 5B)。更に、BSA-FV#1 使用時は、CXCL10, EGF, IGF2, IL-1 $\alpha$ および PDGF 添加培養時も移植後の生着が確認された一方、BSA-FV#8 使用時は同条件で殆ど細胞を観察することが出来なかった(図 5C)。このように、使用する BSA-FV の製造ロットが変わるだけで実験結果が変わり得るという事態は、実験の再現性という観点から望ましくなく、造血幹細胞の *in vitro* 増幅を実現するためには BSA-FV を添加する現培養系を再考する必要があると思われる。

### (3)組み換えアルブミンを用いた造血幹細胞培養系の構築

造血幹細胞の培養実験の再現性を向上させるため、BSA-FV を排した、基準と

なりうる培養系の構築を試みた。まず BSA-FV 濃度を下げて造血幹細胞の培養を試みた。しかし、BSA-FV 濃度を 1%未満にすると細胞の増殖能は低下し、バラツキが見られた(図 6A-C)。また、BSA-FV を全く添加しないと、細胞は増殖しなかった(図 6D)。この問題を打破するため、酵母で産生された組み換えアルブミンタンパク質(RSA)に着目した。まず、造血幹細胞の培地に RSA を添加し、その有効性を BSA-FV#8 と比較した。すると、RSA は BSA-FV#8 と同等の増殖能を示した(図 7 A, B)。また、RSA を用いて CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞を 1 週間培養し、競合的骨髄移植を行って骨髄再構築能を評価した。その結果、移植後 12 週の骨髄における生着率は、BSA-FV#1 には劣るものの、BSA-FV#8 と同程度であることが分かった(図 7C)。更に、RSA を用いた際の最適な培養期間は 10 日間であり(図 7D)、これは BSA-FV を用いた場合と同じであった。

市販されている RSA には、mouse RSA (MSA)と human RSA (HSA)が存在する。MSA と HSA は約 70%の相同性を示す。マウス造血幹細胞に対する両者の有効性について解析したところ、増殖能および骨髄再構築能に有意な差異は認められなかった(図 8A, B)。

(4)組み換えアルブミンを用いた培養系において IL-1 $\alpha$ は造血幹細胞の増殖制御因子として働く

次に、上述の組み換えアルブミンを用いた培養系を利用して、造血幹細胞の増殖制御因子の探索を行った。CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞の DNA マイクロアレイデータをもとに、造血幹細胞の細胞膜表面に受容体が存在する 30 種類の因子を選択した。これら候補因子を 1 種類ずつ、基準となる培地(無血清培地に 1 % RSA, SCF, TPO を添加したもの)に添加し、それぞれ造血幹細胞を 1 週間培養した後、競合的骨髄移植を行って、培養した造血幹細胞の骨髄再構築能を評価した。移植後 12 週の末梢血を解析した結果、生着率が上昇する因子もあれば、低下する因子も存在した(図 9)。造血幹細胞の骨髄再構築能を有意に増強した因子として IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  があったが、今回私は IL-1 $\alpha$  に着目した。その理由として、*in vitro* において IL-1 $\alpha$  が造血幹細胞に与える影響に関し、先行研究で意見が割れていたからである[38-42]。今回、組み換えアルブミンを用いた培養系を利用した *in vitro* 培養後の競合的骨髄移植の結果、IL-1 $\alpha$  を添加することで、コントロール(SCF+TPO)と比較して生着率は著しく増加した(図 10A-C)。更に、1 次移植の 16 週後に 2 次移植を行ったところ、コントロールよりも非常に生着率が高いことが分かった(図 10D, E)。これらの結果より、IL-1 $\alpha$  は造血幹細胞の増殖制御因子の 1 つであると示唆された。

(5) BSA-FV より同定した HPX は造血幹細胞の増殖制御因子として機能する

BSA-FV#1, #8, #15 を用いた高速液体クロマトグラフィー/質量分析の結果(表 1)、BSA-FV に含まれる微量タンパク質の種類および量比には差が見られたと既に述べた。私は、タンパク質の構成比および造血幹細胞の骨髄再構築能(図 3B)において、BSA-FV の製造ロット間で大きな差異が見られるという事実に着目し、組み換えアルブミンを用いた培養系を利用して、BSA-FV に含まれると思われる未知の増殖因子の同定を試みた。具体的には、高速液体クロマトグラフィー/質量分析の結果に基づき、高い生着率を示す BSA-FV#1 特異的な因子に注目した。なお、血清アルブミンタンパク質を除いて BSA-FV#1 に最も多く含まれたトランスフェリンは、鉄輸送に必要不可欠であり既に培養液に含まれていたため、検討候補から除外した。

候補因子の有効性を解析するため、各合成タンパク質を用いて造血幹細胞を 1 週間培養し、競合的骨髄移植を行って培養した造血幹細胞の骨髄再構築能について調べた。その結果、ヘモペキシン(HPX)を見出した。HPX は BSA-FV#1 において、血清アルブミン以外で約 6 %の割合を占める。驚いたことに、HPX とともに培養した造血幹細胞は非常に高い生着率を示した(図 11A)。また、5 ng/ml の HPX 濃度で生着率は飽和した(図 11B)。

次に、BSA-FV#1 以外の製造ロットでも HPX が検出されるか調べるため、ウェスタンブロット法を用いて、8 種類の BSA-FV ロットにおける HPX の有無を

解析した。その結果、8 種類中 3 種類(#A, #B, #H)の BSA-FV では HPX が検出された(図 11C)。更に、競合的骨髓移植の結果、HPX 陽性の BSA-FV で培養した造血幹細胞の骨髓再構築能は、HPX 陰性 BSA-FV 使用時と比較して顕著に高かった(図 11D)。

HPX は、ヘムに最も高い結合性を示す血漿糖タンパク質である[43]。HPX は血中の遊離ヘムに結合することで、遊離ヘムによる酸性傷害を抑制している[44]。そこで、*in vitro* での HPX の効果を明らかにするため、培養した造血幹細胞における ROS の蓄積についてフローサイトメーターを用いて解析した。次亜塩素酸イオン蛍光プローブ(HySox) [45]を用いた解析では、HPX とともに培養した造血幹細胞は、HPX 非存在下と比較して ROS レベルが低下していると判明した(図 12A)。また、DCF-DA[46]という別の指標を用いて、細胞内の ROS レベルを測定したところ、DCF-DA の酸化産物である DCF の蛍光強度は、BSA-FV 使用時と比較して、RSA+HPX では低かった(図 12B)。また、HPX 陽性の BSA-FV は陰性の BSA-FV より DCF の蛍光強度が低かった。

HPX は主に肝臓、中枢神経、網膜、末梢神経で発現していると報告されている[47-49]。当研究室では非ミエリン性シュワン細胞が骨髓ニッチの 1 種であり、造血幹細胞の休眠状態を維持していると過去に報告しており[19]、HPX が末梢神経に発現している事実は非常に興味深く思われた。そこで、GFAP 抗体を用いて

骨髓切片の免疫染色を行い、HPX を発現している細胞種を明らかにしようと試みた。その結果、HPX は GFAP 陽性シュワン細胞と共局在または非常に近接して存在していることが分かった(図 13A, B)。更に、近年開発された透明化による臓器全体のイメージング技術を用いて、骨髓の 3 次元解析を行ったところ、免疫染色の結果と合致し、HPX と GFAP が非常に近接して存在していることが明らかとなった(図 13C)。これらの結果より、HPX は *in vitro* 培養で造血幹細胞の ROS 蓄積を抑制するだけでなく、*in vivo* で造血幹細胞の維持に関わっている可能性が示唆された。



## 6. 考察

### (1)組み換えアルブミンを用いた培養系の意義

研究・実験において、信頼性と再現性は必要不可欠である。世界中どこの研究グループにおいても、同様の実験を行えば同じ結果が得られることが望ましい。しかし、特に造血幹細胞の培養実験に関しては、結果を再現することが出来ないという事態が残念ながら起こってきた。その原因として、造血幹細胞自身の問題と培養系の問題の 2 種類に分けられると私は考えた(図 14A)。

前者に関しては、造血幹細胞自身の不均一性が挙げられる。造血幹細胞は主に  $CD150^{+}CD34^{-}Flt3^{-}c-Kit^{+}Sca-1^{+}Lineage^{-}$  ( $CD150^{+}CD34^{-}FL^{-}KSL$ ) [15, 33, 50-52]等の細胞表面マーカーを用いて濃縮される。しかし、この分画に含まれる、自己複製能と多分化能を併せ持つ造血幹細胞の割合は 20~30 %に過ぎない。そのため、フローサイトメーターを用いて分取した造血幹細胞の純度を、実験ごとに正確に揃えることは不可能である。更に、myeloid-biased, balanced, lymphoid-biased 造血幹細胞の概念[53]や、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  および  $\delta$  細胞[54]など、能力面においても造血幹細胞は不均一であると考えられている。このように、分取した造血幹細胞の純度およびその能力を人為的に制御することは難しく、培養する細胞の品質を研究グループ間で完全に統一することは出来ないと思われた。

一方、培養系に関しては改善の余地が大きいと私は考えた。私達は *in vitro* で

造血幹細胞を培養する際、BSA-FV を添加した無血清培地を用いる。培養に用いる”BSA”は、エタノール分画法で得られる「5 番目の分画」であり、図 4 で示したように血清アルブミン以外に多くの微量タンパク質を含んでいた。質量分析結果から推察すると、BSA-FV に含まれる夾雑タンパク質の種類が多岐にわたるほど BSA-FV の品質は低下する傾向があると考えられる(表 1)。そして、液性因子を添加して造血幹細胞を培養し移植した実験では、BSA-FV の製造ロットが異なると結果が再現されなかった(図 5A, B)。また先行研究の中には、ウサギの胚盤胞やハムスターの胎仔を用いた実験において、BSA-FV の製造ロットが異なると実験結果が変わってしまった事例が報告されている[55, 56]。

本研究では、BSA-FV の代わりに組み換えアルブミンタンパク質を用いることによって、培養系の不均一性を一部改善することが出来たと考える。この組み換えアルブミンを用いた培養系は、曖昧な要素を軽減することによって、*in vitro* における造血幹細胞の培養実験の再現性を向上させると期待される。

しかし、更なる再現性向上のためには、無血清培地の改良が必要となるだろう。図 14B に示したように、無血清培地といっても培地の種類によってその成分は大きく異なる。造血幹細胞の *in vitro* 長期培養にとって本当に必要な培地の成分を絞り込むことによって、研究グループ間の培養実験結果の再現性が一層高まり、知見の集積が加速することが期待される。

## (2)造血幹細胞における IL-1 $\alpha$ の機能についての再考

IL-1 は元々hemopoietin-1 と呼ばれており、しばしば他の液性因子や分子と協調して、ほとんど全ての細胞に影響を及ぼす多機能の液性因子である[39, 57, 58]。IL-1 $\alpha$ と IL-1 $\beta$ は、別の遺伝子産物であり、アミノ酸の相同性は約 25%と低い[59-63]、共通の IL-1 受容体に結合する[64]。IL-1 受容体は、通常、造血系細胞においては好中球で恒常的に発現している[65-67]ほか、マクロファージや B 細胞、T 細胞などで低レベルながら発現していると報告がある[68-70]。IL-1 は、ストローマ細胞など IL-1 受容体を発現している細胞に対し、GM-CSF や G-CSF、IL-6 などの造血因子を誘導し、細胞増殖や細胞活性化等、多くの生理的活性に影響を及ぼしていると考えられている。

また、IL-1はIL-6やTNF- $\alpha$ 等と同様に、炎症性液性因子として知られている。*in vivo*において骨髄抑制性薬剤処理もしくは致死量の放射線を照射したマウスにIL-1を投与すると、造血系の回復が促進され生存率が向上すると報告されている[71-75]。その機構として、IL-1投与によってGM-CSFやG-CSF、IL-6等の成長因子の発現が上昇した結果、骨髄細胞におけるIL-1受容体の発現が上昇するという先行研究がある[76]。また、IL-1は造血幹細胞自身に作用して、IL-3やGM-CSF等の受容体の発現を上昇させ、造血幹細胞の液性因子に対する感受性を向上さ

せている可能性も考えられる。このように、**IL-1**の*in vivo*先行投与により各細胞の**IL-1**または他液性因子の受容体の発現が上昇することで、放射線照射によって生体内で産生された[77] **IL-1**に効率的に反応することができ、**IL-1**の放射線耐性の効果が発揮されると考えられる。実際、**IL-1**受容体に対する抗体を投与すると、**IL-1**の放射線耐性効果が阻害されるという報告がある[78]。

一方、*in vitro*において**IL-1**が造血幹細胞に及ぼす影響に関しては、先行研究で意見が分かれていた。具体的には、**IL-1**は**IL-3**と協調してマウスおよびヒト骨髓細胞やマウス造血幹細胞の増殖を向上させるという報告[39-42]がある一方、**IL-1**は造血幹細胞のコロニー形成および骨髓再構築能を抑制するという報告があった[38]。このような意見の対立は、条件培地やFCS等の培養条件で実験が行われていたことに起因すると考えられる。

今回、**IL-1 $\alpha$** を添加して造血幹細胞を1週間培養すると、増殖能に差異は観察されなかったが(図10A)、移植後の骨髓再構築能に有意な差が認められた(図10B)。その機構として、**IL-1 $\alpha$** が造血幹細胞の幹細胞性維持に寄与した可能性も考えられるが、先行研究の知見を踏まえると、培養期間中に細胞に**IL-1**受容体が誘導された後移植することで、致死量の放射線を照射した被移植マウス内で**IL-1**に対する反応性が高まった結果、生着率の増加として検出された可能性も考えられる。

しかし、上述のように*in vivo*において**IL-1**は**IL-1**受容体の発現を直接的に増加

させておらず、*in vitro*培養下においても骨髓細胞のIL-1受容体の発現は、IL-1自身ではなくG-CSFやIL-3、IL-6等の液性因子によって誘導されるという報告がある[79]。一方、今回移植した結果では、IL-3やIL-6を添加培養した際は生着率に有意差が認められず、G-CSFやGM-CSFを添加した際は生着率が低下した(図9)。液性因子の濃度を一律20 ng/mlとして培養実験を行った点も考慮する必要があるが、IL-1 $\alpha$ が造血幹細胞に及ぼす影響の機構については更なる解析が求められるだろう。具体的には、IL-1 $\alpha$ の添加培養による細胞のIL-1受容体の発現の変化や、G-CSFやIL-6など成長因子の発現についての解析が考えられる。

### (3) HPX と造血維持機構

HPX は遊離ヘムに最も高い結合性を示す血漿中の糖タンパク質であり[43]、アルブミン、免疫グロブリン、血漿プロテアーゼに次いで血漿中に多く存在する。遊離ヘムに結合する性質から、血中の HPX 濃度は溶血性貧血の診断材料として用いられることもある[43, 80, 81]。HPX は、アミノ酸配列で約 25%の相同性をもつ構造的に類似した 2 つのドメインから成り[82]、ヘム 1 分子と結合する[83-85]。また、種によって異なるものの、4~5 箇所の N 型糖鎖結合配列をもっている[86]。

生体内における HPX の主要な機能は、血漿中の遊離ヘムに結合し、肝臓に存在する HPX 受容体に結合してヘムを肝臓に移送することである。ヘムは、プロトポルフィリンIXの中央に2価の鉄イオン1分子が結合した金属錯体である。血中の遊離ヘムは、溶血した赤血球のヘモグロビンやミオグロビン、損傷組織から放出された酵素に由来する[86]。生体にとって有害な遊離ヘムに強く結合することで、HPX は抗酸化物質として機能している[87]。また、血清アルブミンも低い親和性ながらヘムに結合することができ[88]、HPX の機能を一部補っている。また、ヘム/HPX 複合体が HPX 受容体に結合することによって、HO-1 などの発現が誘導されると報告されており[89, 90]、HPX は鉄代謝の一翼を担うだけでなく、遺伝子発現を制御していると考えられている。

HPX のその他の機能として、NO や CO と結合するという報告や[91, 92]、神経再生の場面において HPX の mRNA 量がシュワン細胞で増加するという報告がある[93, 94]。また、HPX はヘムと ROS による網膜の損傷を抑制するという報告もある[95, 96]。このように、HPX はヘム等の細胞傷害性分子に結合することで細胞を保護すると同時に、鉄代謝に寄与していると考えられる。

HPX 欠損マウスは、急性溶血後に重度の腎損傷を示すが、造血系に関しては正常であると報告されていた[97]。しかし今回、組み換えアルブミンを用いた培養系を利用して解析を行った結果、BSA-FV に含まれる増殖制御因子として HPX

を見出した。HPX を添加して造血幹細胞を培養すると、移植後の生着率が増加した(図 11A)。その機構として、HPX を添加することによって培養細胞の ROS 蓄積が抑制されたことが考えられる(図 12A, B)。ところが、組み換えアルブミンを添加した無血清培養系を用いているため、培地中にはヘムは存在しないはずである。では、HPX はどのような機構で造血幹細胞に影響を与えているのだろうか？

その仮説の 1 つとして、培養細胞由来の遊離ヘムへの結合が考えられる。先程述べたように培養に用いる培地中にはヘムは存在しないが、細胞内にはヘムが存在しており、チトクローム C 等の酵素としての生理的活性を担っている。しかし、造血幹細胞 1 細胞で培養を行うと一部は細胞死を起こす事が知られているように、1 週間の培養期間中に細胞死を起こしてしまった場合、細胞内のヘムは培養液中に放出される可能性がある。造血幹細胞には HPX 受容体は発現していないため、HPX は遊離ヘムと結合することで、遊離ヘムが造血幹細胞に細胞性傷害を与える事を抑制している可能性が考えられる。この仮説を検証するためには、まず培養後の培地中にヘムが存在しているか調べる必要があるだろう。

別の仮説として、HPX が NO と結合し、造血幹細胞の幹細胞性を維持した可能性も考えられる。NO は細胞内で、NO 合成酵素によりアルギニンと酸素から

合成される。NO は広い範囲に拡散して自己および周辺の細胞に作用し、cGMP を合成させることでシグナル伝達に関与している。NO が成体造血幹細胞に及ぼす影響に関しては複数の先行研究があり、*in vitro* で NO 合成酵素を阻害すると造血幹細胞の分化が抑制されるという報告や[98]、NO によって造血幹細胞の細胞周期が亢進し、前駆細胞の増殖が促進され顆粒球系への分化に寄与するという報告がある[99]。このことから、培養液中の HPX が NO と結合して造血幹細胞の維持に貢献した可能性も考えられる。この仮説は、培養系の NO を検出することが出来れば検証することができるだろう。今回 ROS の測定に用いた HySOx (図 12A)は過酸化水素から生じる次亜塩素酸イオンを、DCF-DA (図 12B) は複数種の ROS を検出するプローブのため、今後 NO 特異的なプローブで解析する必要があるだろう。

なお、NO と同じく HPX が結合する分子として CO が報告されている。しかし、CO は HO-1 によるヘム代謝の副産物として生じるため、HPX 受容体をもたない造血幹細胞ではヘム代謝は行われず、CO は産生されないため、影響は小さいと思われる。ただし、マクロファージでは HPX 受容体が発現しているという点は留意しなければならない。何故なら、CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞を 1 週間培養すると、一部の細胞はマクロファージ等に分化してしまうと考えられるためである。



図 11C のウェスタンブロットの結果では、一部の BSA-FV において複数の HPX バンドが検出された。上述のように、HPX には 4~5 箇所の糖鎖が付加されうるため複数のバンドが検出されたと考えられるが、糖鎖部分はヘムの結合には関与していないと報告されており[86]、機能への影響は少ないと考えられる。加えて、HPX を添加して培養した造血幹細胞の生着率は、ウェスタンブロット解析より HPX を含むと分かっている BSA-FV#A, #B, #H 使用時の生着率よりも低かった(図 11C, D)。これより、BSA-FV の製造ロットによっては、HPX 以外の増殖因子が含まれている可能性が高いと考えられる。

骨髄の免疫染色および 3 次元解析の結果では、HPX 陽性細胞と GFAP 陽性シュワン細胞は非常に近接して存在する様子が観察された(図 13)。先行研究では、神経損傷後のシュワン細胞において、HPX は mRNA、タンパク質ともに増加し、細胞外基質として蓄積すると報告されている[47, 93, 94]。神経損傷時における HPX の役割としては 3 つの可能性が考えられている。第一に、血清中と同様、遊離ヘムに対する抗酸化物質として機能している可能性[100]。第二に、細胞外基質の構造変化または細胞と細胞外基質の相互作用に寄与している可能性[101, 102]。そして、神経の脈管の透過性を高めているという可能性である[94]。

しかし、今回の解析では神経損傷は起こっていない。また、GFAP 陽性シュワン細胞と血管内皮細胞は骨髄において近接して存在している[19]。そのため、今

回の解析では HPX と GFAP の両者は共局在しているように見えるものの、血管中の HPX を検出している可能性も考えられる。今後、骨髄における、HPX とシェワン細胞、血管内皮細胞および造血幹細胞との位置関係について、更なる解析が必要だろう。

以上より、組み換えアルブミンを用いた培養系は、培養実験系の再現性向上という観点および造血幹細胞の増殖制御因子の探索系という観点から、非常に有用である。今後も、培養実験を含め実験系の不確実性を軽減しようという試みが継続され、将来的に再現性が向上していくことが望まれる。

## 7. 図表

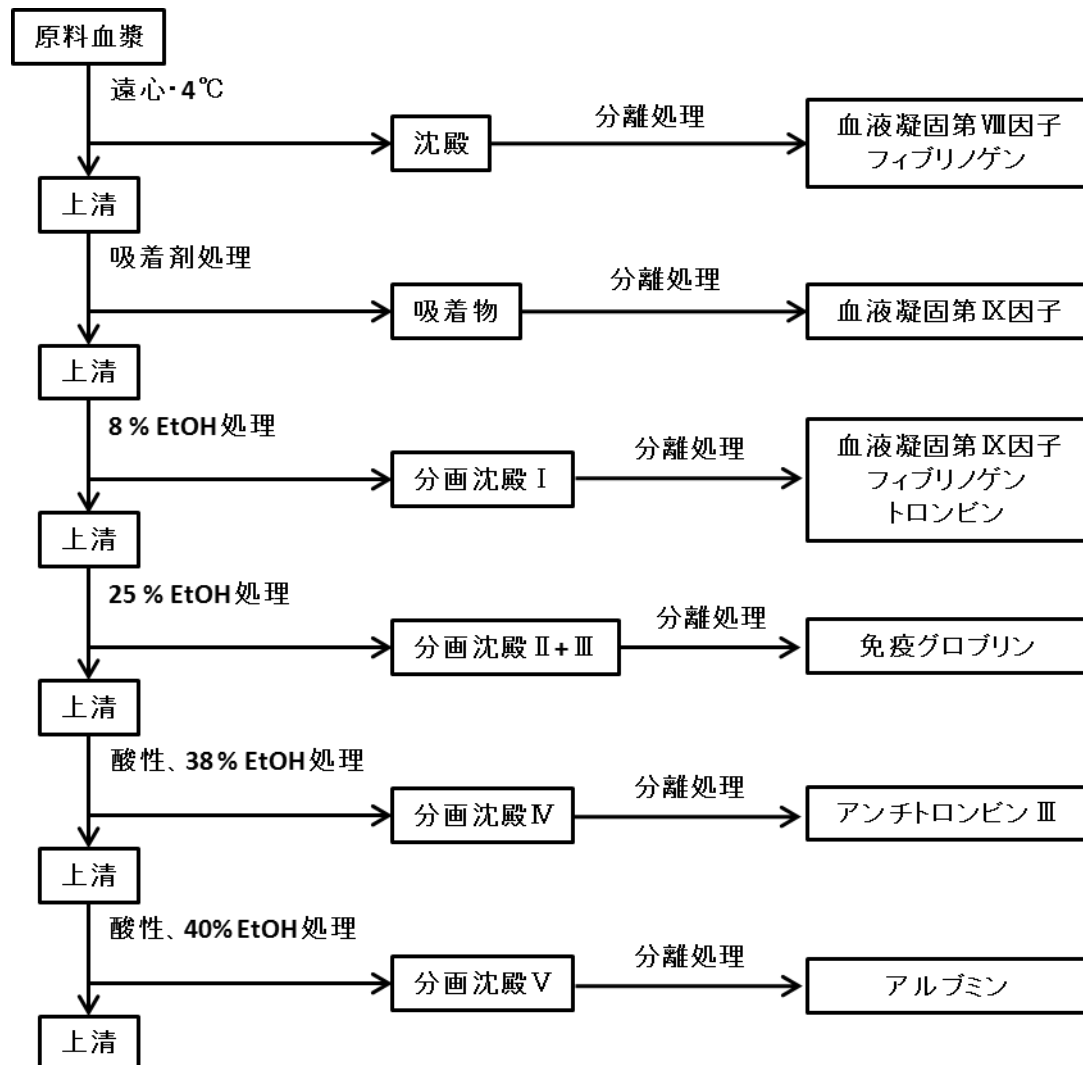


図 1. コーン分画法の一例(厚生労働省「血漿分画製剤の製造方法」[103]より一部改変)

分離処理とは、ろ過、イオンクロマトグラフィー等により、必要成分の分離を行う処理。

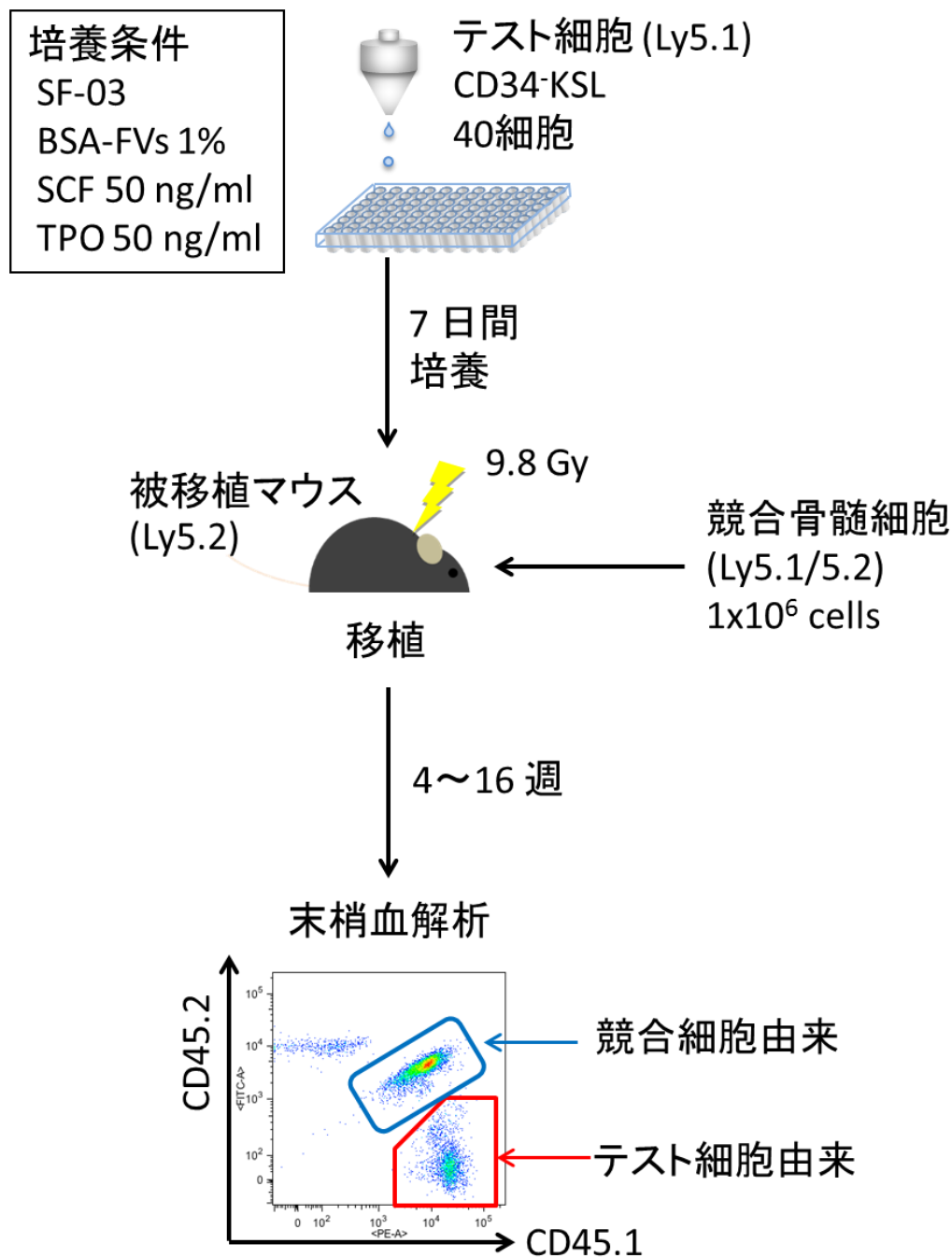
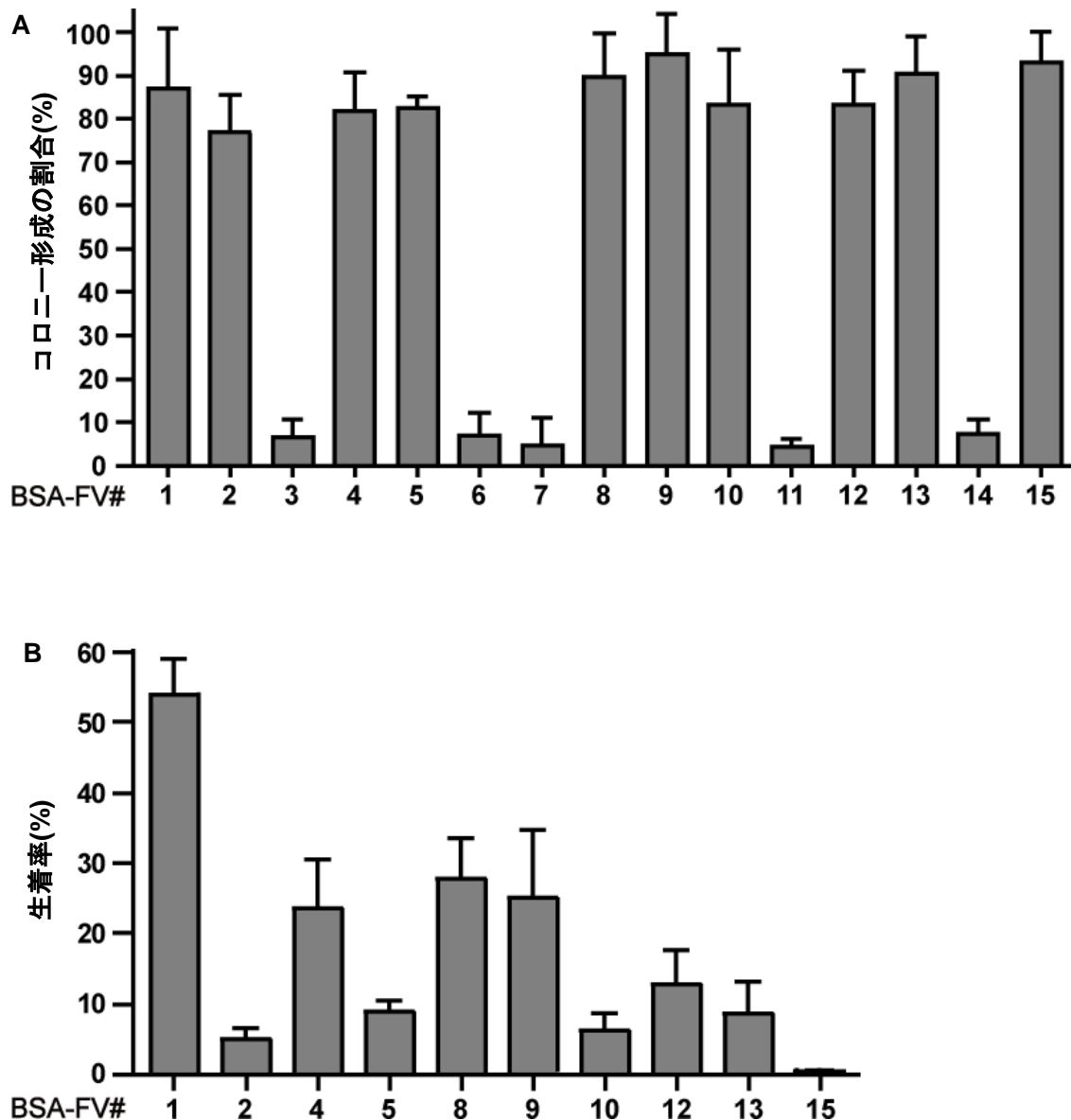
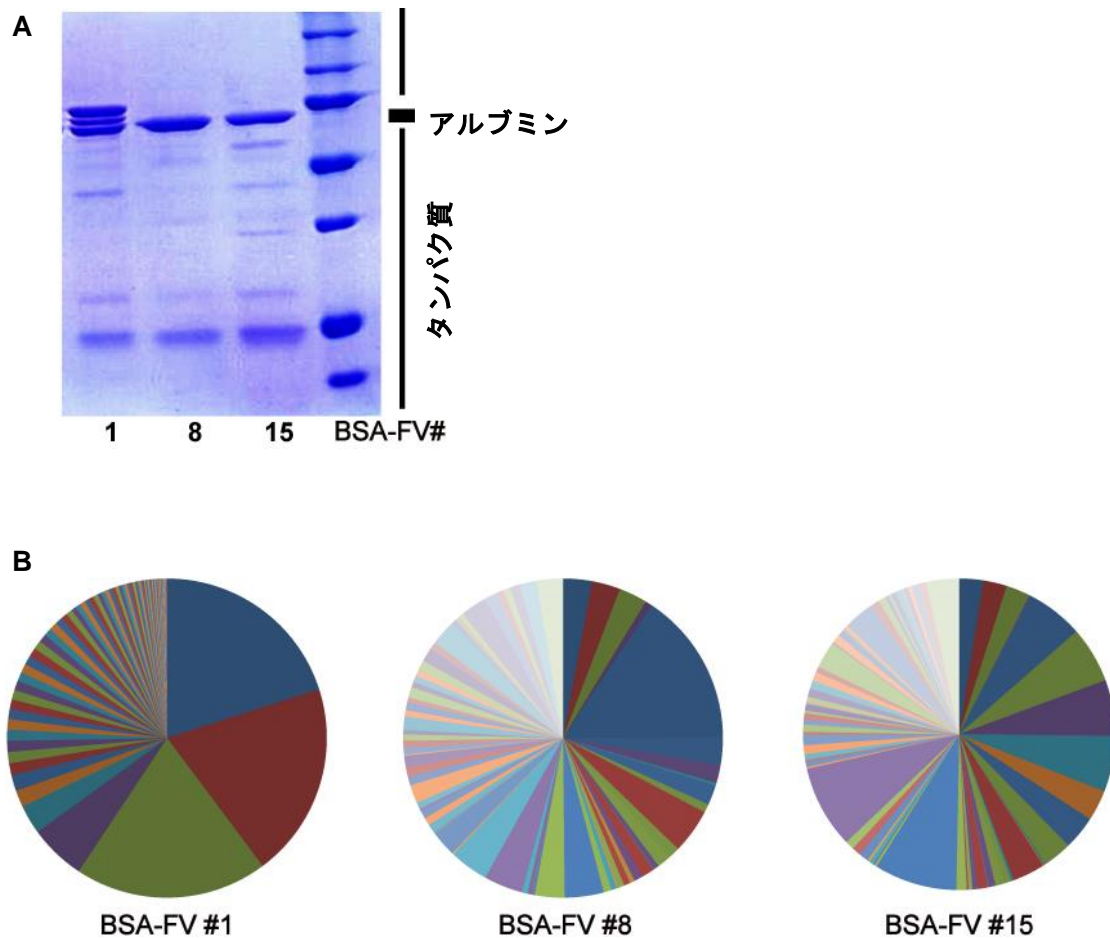


図 2. 競合的骨髄再構築法の模式図

Ly5.1 マウス由来の CD34-KSL 造血幹細胞 40 個と、 $1 \times 10^6$  個の Ly5.1/5.2 マウス由来の競合骨髄細胞を混ぜ、9.8Gy の致死量の放射線を照射した Ly5.2 マウスの眼窩静脈叢より移植した。移植後 4~16 週目に眼窩採血した末梢血を解析し、末梢血中の Ly5.1 単陽性細胞の割合を、造血幹細胞によって再構築された血液細胞の生着率とした。



**図 3. 各 BSA-FV で培養した造血幹細胞のコロニー形成能および骨髄再構築能**  
 (A) BSA-FV の製造ロットによって、造血幹細胞のコロニー形成能は異なった。造血幹細胞 1 細胞を SCF, TPO, 1 % BSA-FV 存在下で 11 日間培養した。データは平均値±標準誤差を示し、3 回独立試行を行った(n = 30)。  
 (B) BSA-FV で培養した造血幹細胞の骨髄再構築能にはバラツキが見られた。CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 個を SCF, TPO, 1 % BSA-FV 存在下で 7 日間培養し、 $1 \times 10^6$  の競合骨髄細胞とともに、致死量の放射線照射をしたマウスに移植した。データは、移植後 12 週の末梢血におけるテスト細胞由来生着率の平均値±標準偏差を示し、3 回独立試行を行った(n = 10)。



**図 4. BSA-FV に含まれる未知タンパク質の多様性**

(A) BSA-FV には、血清アルブミン以外に多くの未知タンパク質が存在した。アルブミン除去処理後の SDS-PAGE の結果を示した。BSA-FV の製造ロットによって、検出されるバンドに差異が見られることが分かる。各 BSA-FV の除去効率は、99.32 % (#1)、99.47 % (#8)、99.09 % (#15)。

(B) BSA-FV に含まれるタンパク質の種類および量比は、製造ロットによって異なった。高速液体クロマトグラフィー/質量分析の結果について、共通して含まれる血清アルブミンを除いて図示した(BSA-FV#1 で 4 番目に多い因子(紫色)は HPX)。

表 1. 質量分析解析データ

BSA-FV#1 (A), #8 (B), #15 (C)からアルブミンの大部分を除去した後、高速液体クロマトグラフィー/質量分析解析を行った。

A

BSA-FV#1

Accession number	Name	Peptides (95%)
gi 30794280	serum albumin precursor [Bos taurus]	1129
gi 154425704	ALB protein [Bos taurus]	971
gi 296490958	TPA: serotransferrin precursor [Bos taurus]	654
gi 2501351	RecName: Full=Serotransferrin; Short=Transferrin; AltName: Full=Beta-1 metal-binding globulin; AltName: Full=Siderophilin; Flags: Precursor	636
gi 77736171	hemopexin precursor [Bos taurus]	186
gi 114051225	protein HP-20 homolog precursor [Bos taurus]	96
gi 114050753	protein HP-25 homolog 1 precursor [Bos taurus]	55
gi 27806789	transferrin precursor [Bos taurus]	53
gi 114052108	protein HP-25 homolog 2 precursor [Bos taurus]	39
gi 6	beta-2-glycoprotein I [Bos taurus]	37
gi 2096965	Immunoglobulin light chain, lambda gene cluster [Bos taurus]	34
gi 116812902	hemoglobin subunit alpha [Bos taurus]	32
gi 27819608	hemoglobin subunit beta [Bos taurus]	31
gi 77735935	complement C2 precursor [Bos taurus]	30
gi 91982959	immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region [Bos taurus]	27
gi 59858077	aspartate aminotransferase 1 [Bos taurus]	26
gi 108750	Ig heavy chain precursor (B/MT.4A.17.H5.A5) - bovine	23
gi 270483766	beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein [Bos taurus]	22
gi 95147674	complement factor B precursor [Bos taurus]	21
gi 296475479	TPA: fumarylacetoacetase [Bos taurus]	17
gi 1699167	IgG2a heavy chain constant region [Bos taurus]	16
gi 343197026	immunoglobulin lambda light chain constant region 3 allotypic variant IGLC3c [Bos taurus]	15
gi 358422418	PREDICTED: WASH complex subunit 7-like [Bos taurus]	13
gi 156120479	fructose-bisphosphate aldolase A [Bos taurus]	12
gi 27807261	acidic mammalian chitinase precursor [Bos taurus]	11
gi 114051379	leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor [Bos taurus]	10
gi 2323386	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	10
gi 30038325	cathepsin C [Bos taurus]	9
gi 77735921	fructose-bisphosphate aldolase B [Bos taurus]	6
gi 296475228	TPA: serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, member 3 [Bos taurus]	6
gi 154425814	IGK protein [Bos taurus]	5
gi 397740864	vitamin D binding protein [Bos taurus]	5
gi 114052298	apolipoprotein A-II precursor [Bos taurus]	5
gi 358421409	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 1 [Bos taurus]	4
gi 194685481	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 10-like isoform 2 [Bos taurus]	4
gi 30466252	carbonic anhydrase 2 [Bos taurus]	4
gi 78369426	prostaglandin reductase 1 [Bos taurus]	4
gi 41386683	beta-2-microglobulin precursor [Bos taurus]	4
gi 83405800	Legumain [Bos taurus]	4
gi 302179501	epidermal growth factor receptor [Bos taurus]	4
gi 129277510	extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn] precursor [Bos taurus]	3
gi 114052314	plasma kallikrein precursor [Bos taurus]	3
gi 333360891	hepatocyte growth factor activator preproprotein [Bos taurus]	3
gi 84000195	phosphoglycerate mutase 2 [Bos taurus]	3
gi 94966763	haptoglobin precursor [Bos taurus]	3
gi 75812940	phosphatidylethanolamine-binding protein 1 [Bos taurus]	2

Accession number	Name	Peptides (95%)
gi 75812940	phosphatidylethanolamine-binding protein 1 [Bos taurus]	2
gi 61888856	triosephosphate isomerase [Bos taurus]	2
gi 375065868	ceruloplasmin precursor [Bos taurus]	2
gi 358421417	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 3 [Bos taurus]	2
gi 156120583	arylsulfatase G [Bos taurus]	2
gi 27806591	glutathione peroxidase 1 [Bos taurus]	2
gi 34538498	immunoglobulin heavy chain constant region [Bos taurus]	2
gi 15088675	immunoglobulin lambda light chain [Bos taurus]	29
gi 148744128	Unknown (protein for MGC:159455) [Bos taurus]	29
gi 343197018	immunoglobulin lambda light chain constant region 3 allotypic variant IGLC3b [Bos taurus]	9
gi 310893435	immunoglobulin light chain [Bos taurus]	7
gi 296487283	TPA: hyaluronan synthase 2-like [Bos taurus]	3
gi 187171271	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2 [Bos taurus]	2
gi 83764016	prepro complement component C3 [Bos taurus]	1
gi 148745450	Fibrinogen alpha chain [Bos taurus]	1
gi 300797661	transcription elongation factor SPT6 [Bos taurus]	1
gi 164452943	gelsolin isoform a precursor [Bos taurus]	1
gi 300795058	gamma-glutamyl transferase 5 precursor [Bos taurus]	1
gi 151554455	MSH3 protein [Bos taurus]	1
gi 157954059	Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32) [Bos taurus]	1
gi 77735465	complement factor D precursor [Bos taurus]	1
gi 1351907	RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor	1125
gi 74267962	ALB protein [Bos taurus]	978
gi 114326282	serotransferrin precursor [Bos taurus]	643
gi 2506196	RecName: Full=Beta-2-glycoprotein 1; AltName: Full=Apolipoprotein H; Short=Apo-H; AltName: Full=Beta-2-glycoprotein I; Short=B2GPI; Short=Beta(2)GPI; Flags: Precursor	37
gi 109939993	Apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I) [Bos taurus]	37
gi 74353860	IGL@ protein [Bos taurus]	33
gi 139948632	immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 precursor [Bos taurus]	32
gi 296474257	TPA: complement component 2 precursor [Bos taurus]	30
gi 111120280	complement component 2 precursor [Bos taurus]	30
gi 6006425	hemoglobin alpha chain [Bos taurus]	30
gi 122065117	RecName: Full=Aspartate aminotransferase, cytoplasmic; AltName: Full=Glutamate oxaloacetate transaminase 1; AltName: Full=Transaminase A	26
gi 154707900	fumarylacetoacetase [Bos taurus]	17
gi 154425761	FAH protein [Bos taurus]	17
gi 7547266	IgG1 heavy chain constant region [Bos taurus]	16
gi 119892690	PREDICTED: WASH complex subunit 7 [Bos taurus]	13
gi 343197004	immunoglobulin lambda light chain constant region 2 allotypic variant IGLC2b [Bos taurus]	13
gi 343197008	immunoglobulin lambda light chain constant region 2 allotypic variant IGLC2c [Bos taurus]	11
gi 2323380	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	10
gi 2323376	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	10
gi 2323374	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	10
gi 75812938	dipeptidyl peptidase 1 precursor [Bos taurus]	9
gi 359064628	PREDICTED: protein piccolo-like [Bos taurus]	9

# B

## BSA-FV#8

Accession number	Name	Peptides (95%)
gi30794280	serum albumin precursor [Bos taurus]	823
gi154425704	ALB protein [Bos taurus]	700
gi27806789	transferrin precursor [Bos taurus]	216
gi1699167	IgG2a heavy chain constant region [Bos taurus]	63
gi99028969	complement C3 preproprotein [Bos taurus]	55
gi94966811	alpha-1-acid glycoprotein precursor [Bos taurus]	42
gi296490958	TPA: serotransferrin precursor [Bos taurus]	41
gi74353860	IGL@ protein [Bos taurus]	40
gi296486756	TPA: complement factor I [Bos taurus]	37
gi77735367	ribonuclease UK114 [Bos taurus]	36
gi108750	Ig heavy chain precursor (B/MT.4A.17.H5.A5) - bovine	28
gi296478893	TPA: proteoglycan 4 [Bos taurus]	24
gi296487872	TPA: keratin 6A [Bos taurus]	19
gi343197018	immunoglobulin lambda light chain constant region 3 allotypic variant IGLC3b [Bos taurus]	18
gi27807007	insulin-like growth factor-binding protein 3 precursor [Bos taurus]	16
gi297461373	PREDICTED: complement factor H-related protein 2 [Bos taurus]	15
gi296484341	TPA: protein AMBP precursor [Bos taurus]	14
gi153791660	extracellular matrix protein 1 precursor [Bos taurus]	12
gi95147674	complement factor B precursor [Bos taurus]	12
gi310893435	immunoglobulin light chain [Bos taurus]	12
gi75812954	fibrinogen alpha chain precursor [Bos taurus]	11
gi296476317	TPA: keratin, type I cytoskeletal 14 [Bos taurus]	10
gi77736171	hemopexin precursor [Bos taurus]	10
gi358421409	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 1 [Bos taurus]	9
gi114051856	keratin, type II cytoskeletal 7 [Bos taurus]	9
gi358422499	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 10-like [Bos taurus]	9
gi160395544	RecName: Full=Keratin, type I cytoskeletal 17; AltName: Full=Cytokeratin-17; Short=CK-17; AltName: Full=Keratin-17; Short=K17	9
gi156120885	CD5 antigen-like precursor [Bos taurus]	8
gi358417209	PREDICTED: extracellular peptidase inhibitor-like [Bos taurus]	8
gi2323386	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	8
gi77735883	serum amyloid P-component precursor [Bos taurus]	7
gi358420619	PREDICTED: complement C4-A [Bos taurus]	6
gi296475228	TPA: serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, member 3 [Bos taurus]	5
gi27806741	beta-2-glycoprotein 1 precursor [Bos taurus]	5
gi59858077	aspartate aminotransferase 1 [Bos taurus]	4
gi27807341	cathelicidin-1 precursor [Bos taurus]	2
gi296480310	TPA: apolipoprotein A-I-like [Bos taurus]	2
gi375065868	ceruloplasmin precursor [Bos taurus]	2
gi78369352	complement component C9 precursor [Bos taurus]	2
gi300797776	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1 [Bos taurus]	1
gi91982959	immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region [Bos taurus]	25
gi148356276	keratin, type II cytoskeletal 4 [Bos taurus]	6
gi22773998	immunoglobulin delta heavy chain membrane bound form [Bos taurus]	4
gi75832116	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor [Bos taurus]	2
gi397740864	vitamin D binding protein [Bos taurus]	2

Accession number	Name	Peptides (95%)
gi291490675	CD44 antigen precursor [Bos taurus]	2
gi300795742	synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog [Bos taurus]	2
gi432134242	DNA excision repair protein ERCC-6-like 2 [Bos taurus]	1
gi329664128	protocadherin-17 precursor [Bos taurus]	1
gi164448719	sterile alpha motif domain-containing protein 3 [Bos taurus]	1
gi156120521	kinesin-like protein KIFC1 [Bos taurus]	1
gi27806751	alpha-2-HS-glycoprotein precursor [Bos taurus]	1
gi114051379	leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor [Bos taurus]	1
gi359070805	PREDICTED: collagen alpha-1(V) chain-like [Bos taurus]	1
gi1351907	RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor	821
gi74267962	ALB protein [Bos taurus]	702
gi83764016	prepro complement component C3 [Bos taurus]	55
gi4093220	complement component 3 [Bos taurus]	55
gi122697593	alpha-1-acid glycoprotein precursor [Bos taurus]	42
gi114326282	serotransferrin precursor [Bos taurus]	40
gi2501351	RecName: Full=Serotransferrin; Short=Transferrin; AltName: Full=Beta-1 metal-binding globulin; AltName: Full=Siderophilin; Flags: Precursor	40
gi84000165	complement factor I precursor [Bos taurus]	37
gi151556360	Unknown (protein for MGC:159378) [Bos taurus]	37
gi343197030	immunoglobulin lambda light chain constant region 3 allotypic variant IGLC3d [Bos taurus]	26
gi331284120	proteoglycan 4 precursor [Bos taurus]	20
gi343197008	immunoglobulin lambda light chain constant region 2 allotypic variant IGLC2c [Bos taurus]	20
gi134085706	keratin, type II cytoskeletal 6A [Bos taurus]	19
gi343197026	immunoglobulin lambda light chain constant region 3 allotypic variant IGLC3c [Bos taurus]	16
gi163190	insulin-like growth factor binding protein-3 [Bos taurus]	14
gi27806743	protein AMBP precursor [Bos taurus]	14
gi2323404	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	12
gi1276627	immunoglobulin lambda light chain variable region, partial [Bos taurus]	12
gi148745450	Fibrinogen alpha chain [Bos taurus]	11
gi3789962	fibrinogen A-alpha chain [Bos taurus]	11
gi262118301	keratin, type I cytoskeletal 14 [Bos taurus]	10
gi116004057	keratin, type II cytoskeletal 75 [Bos taurus]	10
gi297474460	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 1 [Bos taurus]	9
gi296476308	TPA: keratin, type I cytoskeletal 10 [Bos taurus]	9
gi27805977	keratin, type I cytoskeletal 10 [Bos taurus]	9
gi194685481	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 10-like isoform 2 [Bos taurus]	9
gi358416465	PREDICTED: immunoglobulin lambda-like polypeptide 5-like [Bos taurus]	9
gi343196996	immunoglobulin lambda light chain constant region 2 allotypic variant IGLC2a [Bos taurus]	9
gi157427776	keratin, type I cytoskeletal 17 [Bos taurus]	9
gi296489775	TPA: CDS molecule-like [Bos taurus]	8
gi2323380	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	8
gi2323376	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	8
gi358421417	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 3 [Bos taurus]	8

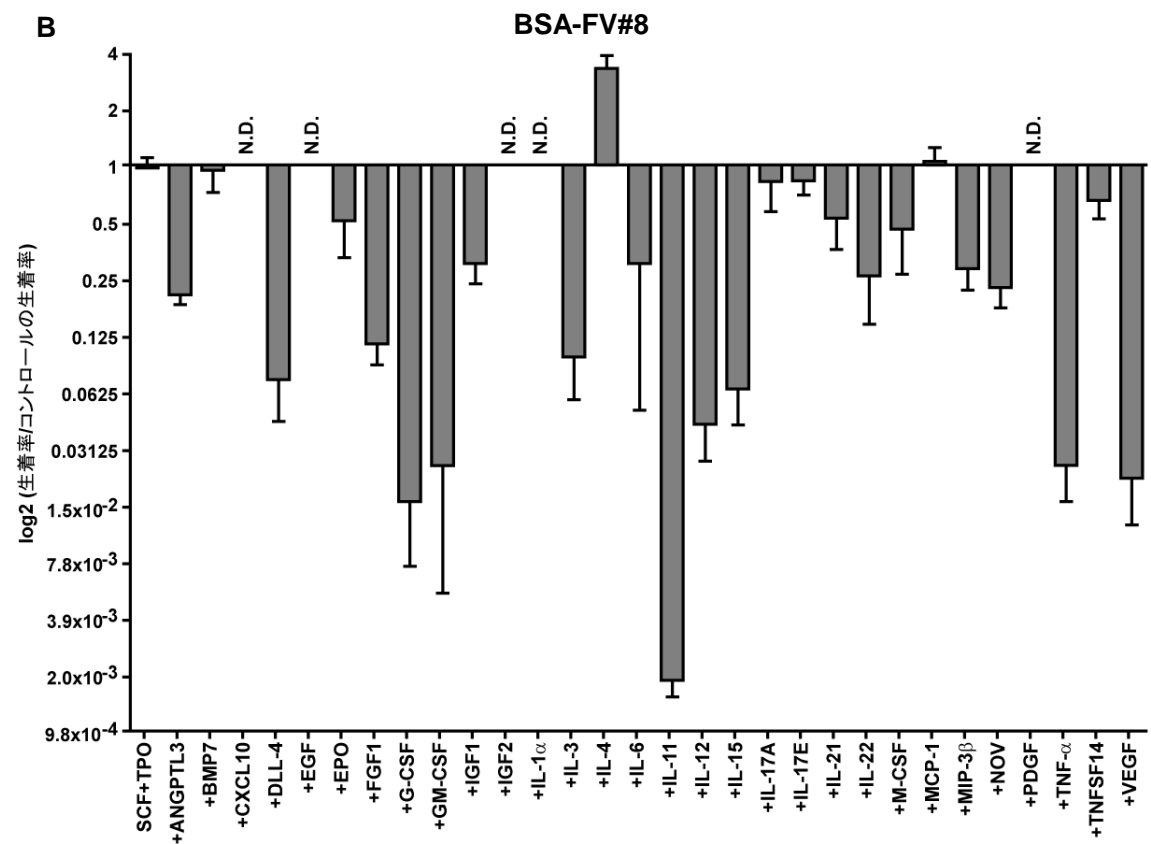
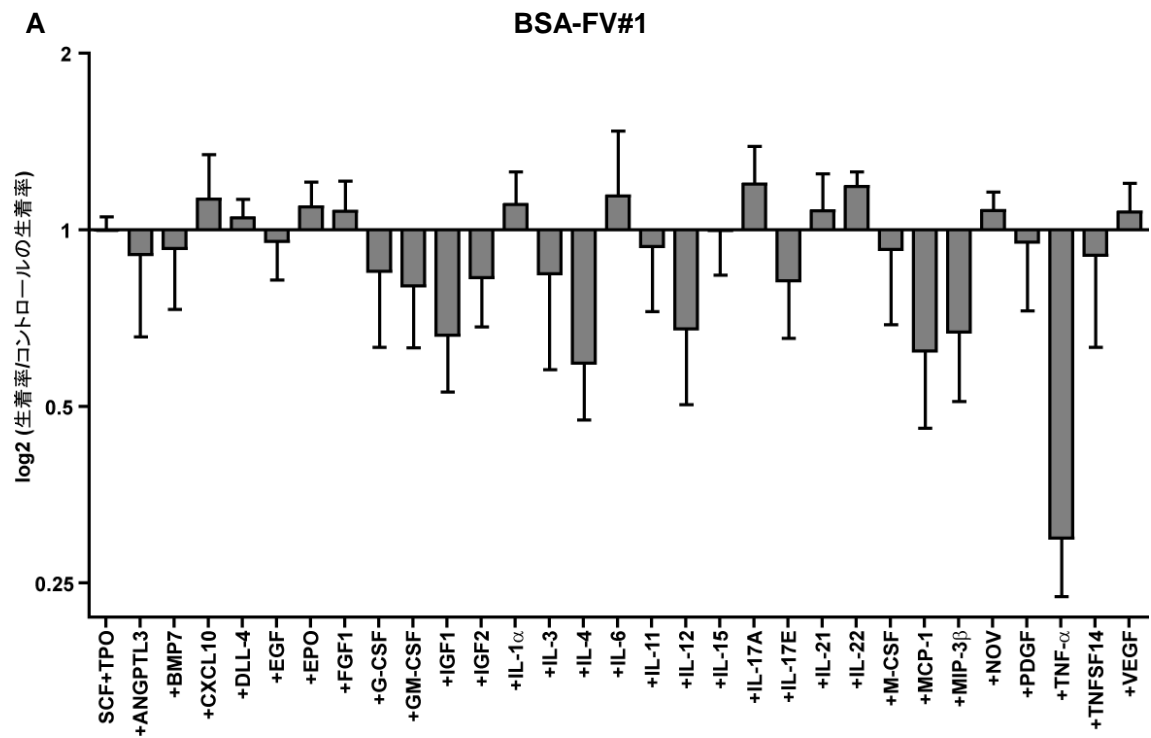


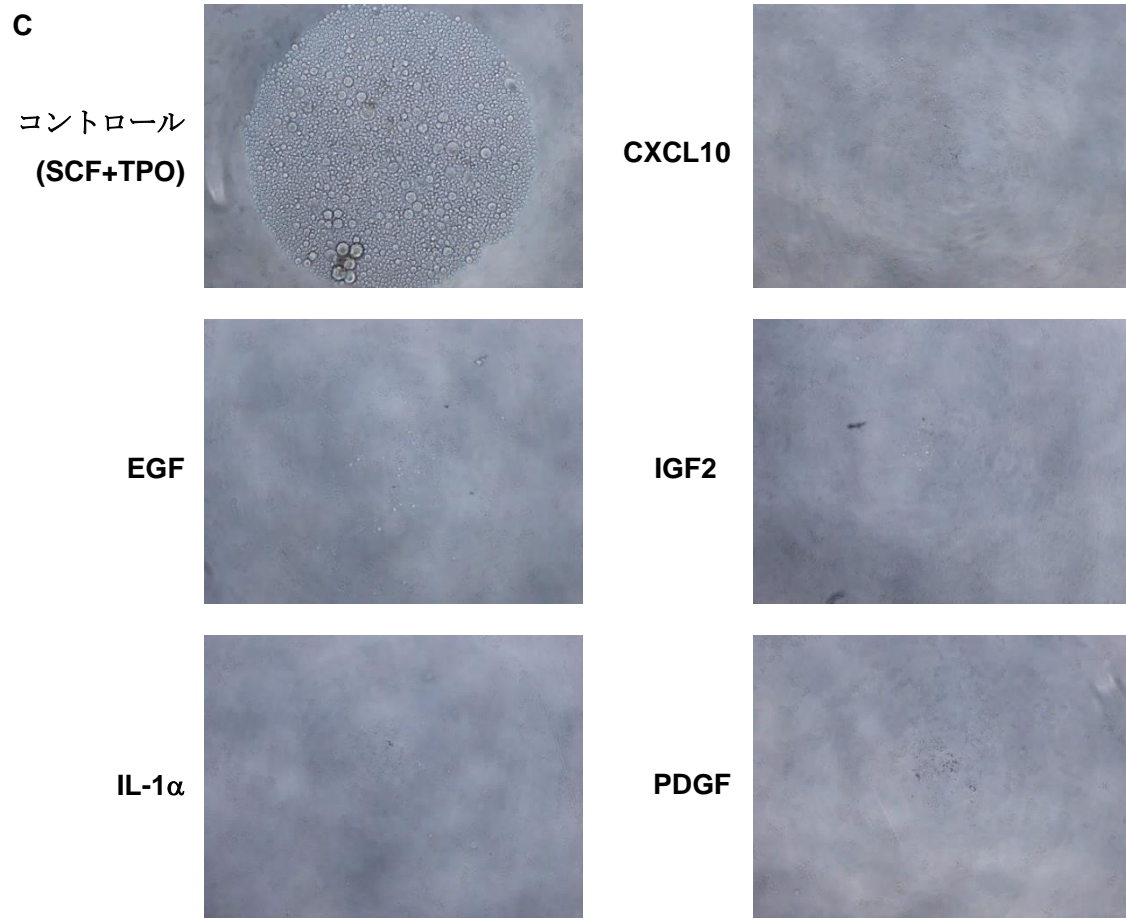
## C

## BSA-FV#15

Accession number	Name	Peptides (95%)
gi30794280	serum albumin precursor [Bos taurus]	686
gi74267962	ALB protein [Bos taurus]	575
gi99028969	complement C3 preproprotein [Bos taurus]	130
gi27806789	transferrin precursor [Bos taurus]	92
gi10993993	Apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I) [Bos taurus]	88
gi74353860	IGL@ protein [Bos taurus]	53
gi151556360	Unknown (protein for MGC:159378) [Bos taurus]	51
gi15088675	immunoglobulin lambda light chain [Bos taurus]	51
gi77735883	serum amyloid P-component precursor [Bos taurus]	49
gi297461373	PREDICTED: complement factor H-related protein 2 [Bos taurus]	42
gi296490958	TPA: serotransferrin precursor [Bos taurus]	38
gi75812954	fibrinogen alpha chain precursor [Bos taurus]	16
gi343197018	immunoglobulin lambda light chain constant region 3 allotypic variant IGLC3b [Bos taurus]	16
gi77404252	collagen alpha-1(I) chain precursor [Bos taurus]	15
gi164414427	collagen alpha-1(II) chain isoform 2 precursor [Bos taurus]	14
gi28189426	similar to ubiquitin-S27a fusion protein [Bos taurus]	12
gi330688394	folate receptor alpha precursor [Bos taurus]	11
gi2323380	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	11
gi27807007	insulin-like growth factor-binding protein 3 precursor [Bos taurus]	10
gi2323402	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	10
gi95147674	complement factor B precursor [Bos taurus]	10
gi153791660	extracellular matrix protein 1 precursor [Bos taurus]	9
gi358420619	PREDICTED: complement C4-A [Bos taurus]	9
gi84000165	complement factor I precursor [Bos taurus]	8
gi75832056	apolipoprotein A-I preproprotein [Bos taurus]	7
gi296485168	TPA: serine peptidase inhibitor, Kazal type 5 [Bos taurus]	7
gi164450479	kininogen-2 isoform I precursor [Bos taurus]	7
gi115497340	serum amyloid A protein precursor [Bos taurus]	6
gi255003702	fibrinectin precursor [Bos taurus]	5
gi8100793	insulin-like growth factor I [Bos taurus]	4
gi296484341	TPA: protein AMBP precursor [Bos taurus]	4
gi59858077	aspartate aminotransferase 1 [Bos taurus]	4
gi94966811	alpha-1-acid glycoprotein precursor [Bos taurus]	4
gi296487872	TPA: keratin 6A [Bos taurus]	4
gi296489775	TPA: CD5 molecule-like [Bos taurus]	4
gi395268	conglutinin [Bos taurus]	3
gi397740864	vitamin D binding protein [Bos taurus]	3
gi114051856	keratin, type II cytoskeletal 7 [Bos taurus]	3
gi78369352	complement component C9 precursor [Bos taurus]	3
gi27807009	insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor [Bos taurus]	2
gi126607	RecName: Full=Lysozyme C; AltName: Full=1,4-beta-N-acetylmuramidase C; Flags: Precursor	2
gi47564119	apolipoprotein C-III precursor [Bos taurus]	1
gi343197026	immunoglobulin lambda light chain constant region 3 allotypic variant IGLC3c [Bos taurus]	15
gi310893435	immunoglobulin light chain [Bos taurus]	8
gi2323384	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	7
gi358421409	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 1 [Bos taurus]	3

Accession number	Name	Peptides (95%)
gi77735935	complement C2 precursor [Bos taurus]	3
gi45429979	spleen trypsin inhibitor I precursor [Bos taurus]	3
gi41386685	thrombospondin-1 precursor [Bos taurus]	2
gi296487901	TPA: insulin-like growth factor-binding protein 6 precursor [Bos taurus]	2
gi27806907	clusterin preproprotein [Bos taurus]	2
gi194670528	PREDICTED: ribonuclease 4 [Bos taurus]	2
gi27806751	alpha-2-HS-glycoprotein precursor [Bos taurus]	2
gi157954059	Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32) [Bos taurus]	2
gi6006423	hemoglobin alpha chain [Bos taurus]	2
gi297488636	PREDICTED: protein phosphatase 1M [Bos taurus]	1
gi27807335	cathelicidin-7 precursor [Bos taurus]	1
gi114050753	protein HP-25 homolog 1 precursor [Bos taurus]	1
gi85681876	RecName: Full=Protein-lysine 6-oxidase; AltName: Full=Lysyl oxidase; Flags: Precursor	1
gi296487283	TPA: hyaluronan synthase 2-like [Bos taurus]	1
gi114051379	leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor [Bos taurus]	1
gi1351907	RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor	685
gi154425704	ALB protein [Bos taurus]	573
gi83764016	prepro complement component C3 [Bos taurus]	130
gi2506196	RecName: Full=Beta-2-glycoprotein 1; AltName: Full=Apolipoprotein H; Short=Apo-H; AltName: Full=Beta-2-glycoprotein I; Short=B2GPI; Short=Beta(2)GPI; Flags: Precursor	88
gi6	beta-2-glycoprotein I [Bos taurus]	88
gi92096965	Immunoglobulin light chain, lambda gene cluster [Bos taurus]	48
gi139948632	immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 precursor [Bos taurus]	45
gi2501351	RecName: Full=Serotransferrin; Short=Transferrin; AltName: Full=Beta-1 metal-binding globulin; AltName: Full=Siderophilin; Flags: Precursor	37
gi114326282	serotransferrin precursor [Bos taurus]	37
gi148745450	Fibrinogen alpha chain [Bos taurus]	16
gi164414425	collagen alpha-1(II) chain isoform 1 precursor [Bos taurus]	14
gi3789962	fibrinogen A-alpha chain [Bos taurus]	14
gi329665078	polyubiquitin-C [Bos taurus]	14
gi350537449	putative ubiquitin C variant 5 [Taeniopygia guttata]	13
gi296478548	TPA: ubiquitin C [Bos taurus]	13
gi28189917	similar to polyubiquitin [Bos taurus]	13
gi28189839	similar to polyubiquitin [Bos taurus]	13
gi27806505	polyubiquitin-B [Bos taurus]	13
gi163575	polyubiquitin, partial [Bos taurus]	13
gi163573	polyubiquitin, partial [Bos taurus]	13
gi110282963	RecName: Full=Folate receptor alpha; Short=FR-alpha; AltName: Full=Folate receptor 1; AltName: Full=Folate-binding protein 1; Short=FBP; AltName: Full=Milk folate-binding protein; Flags: Precursor	11
gi2323374	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	11
gi2323376	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	11
gi2323386	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	11
gi296478557	TPA: ubiquitin B-like [Bos taurus]	10
gi163190	insulin-like growth factor binding protein-3 [Bos taurus]	10
gi296479849	TPA: folate receptor I-like [Bos taurus]	10
gi2323400	immunoglobulin light chain variable region [Bos taurus]	10
gi296486756	TPA: complement factor I [Bos taurus]	8
gi975844	immunoglobulin lambda light chain variable region, partial [Bos taurus]	8





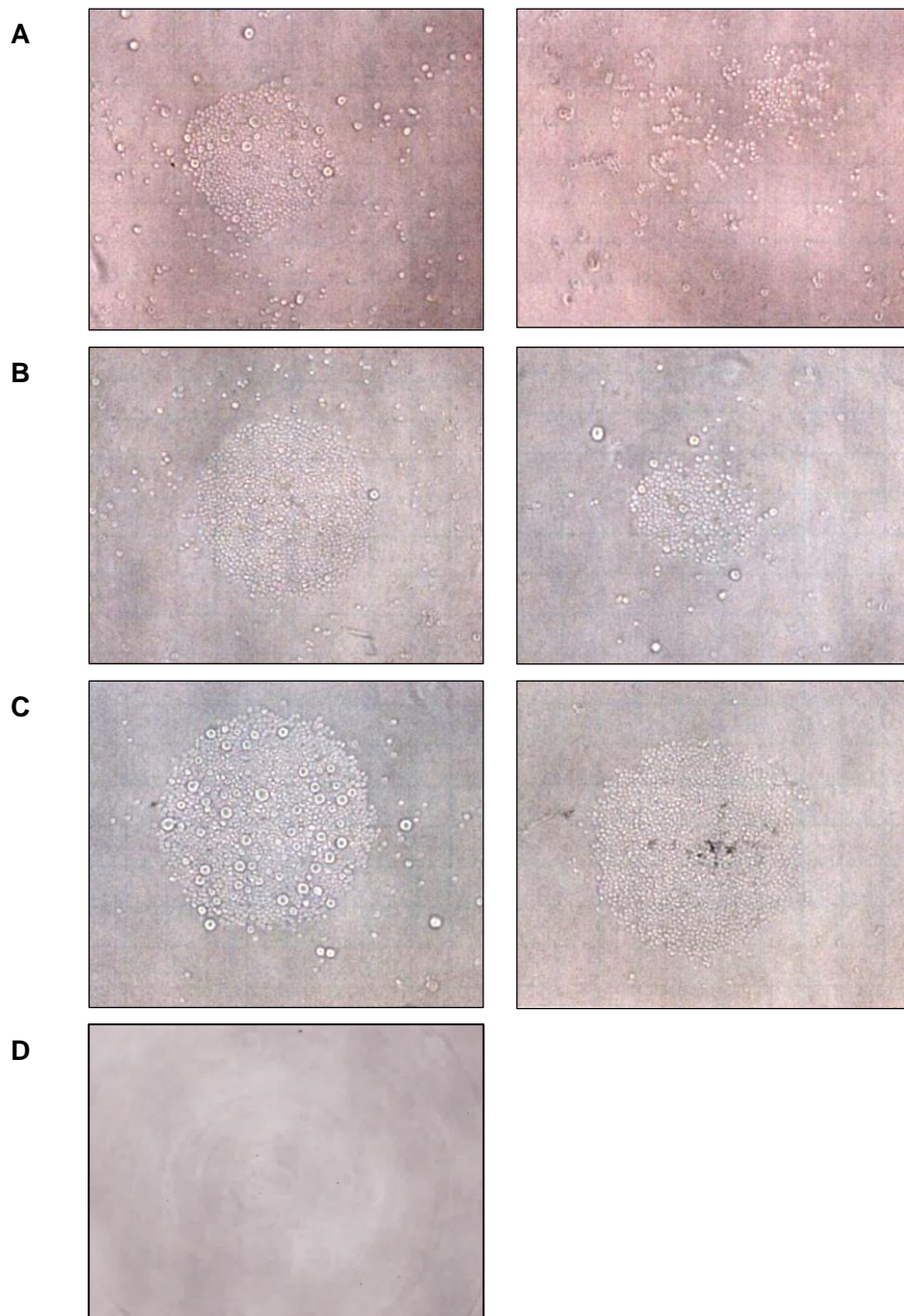
**図 5. BSA-FV を用いた培養実験系の低い再現性**

(A, B)造血幹細胞の培養に用いた BSA-FV の製造ロットが変わると、競合的骨髄移植の結果は一致しなかった。SCF, TPO および 1 % BSA-FV#1 (A)または#8 (B) という培養条件下で、CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 細胞を 1 週間培養し、 $1 \times 10^6$  個の骨髄競合細胞とともに致死量の放射線を照射したマウスに移植した。移植後 12 週の末梢血におけるコントロール(SCF + TPO)の生着率を 1 とみなした際に、各液性因子添加時の生着率を算出した。データは  $\log_2$ (各液性因子の生着率/コントロールにおける生着率)の平均値 $\pm$ 標準偏差を示し、2 回独立試行を行った(n = 5)。

(C) BSA-FV#8 使用時、一部の液性因子を添加すると造血幹細胞は殆ど増殖しなかった。図 5B における CXCL10, EGF, IGF2, IL-1 $\alpha$ , PDGF 添加培養時の代表的な様子。

表 2. 使用した液性因子の一覧

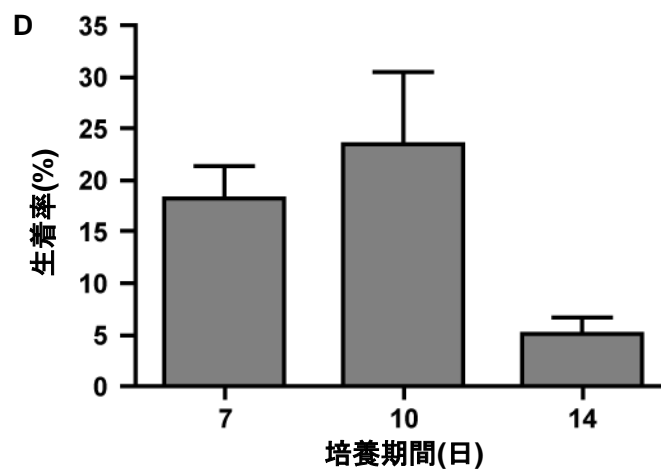
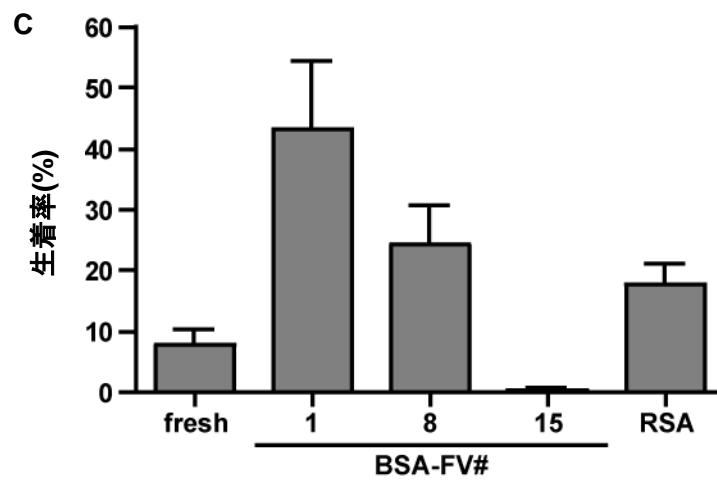
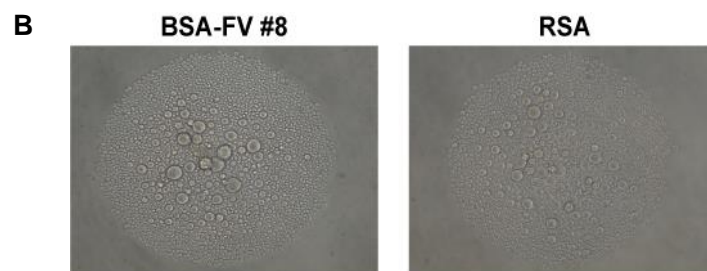
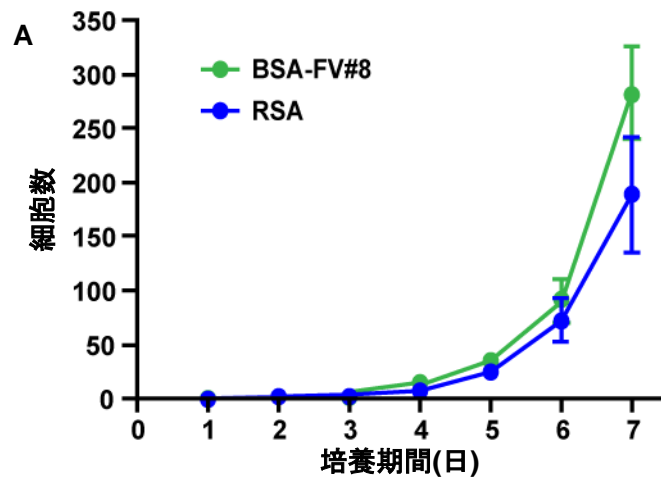
液性因子名	由来	濃度	購入先	ロット番号
ANGPTL3	マウス	20 ng/ml	R&D Systems	DOS1111111
BMP7	マウス	20 ng/ml	R&D Systems	5666-BP
CXCL10	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#1104153
DLL-4	マウス	20 ng/ml	R&D Systems	GOK1011111
EGF	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0808179
EPO	マウス	2 Unit	R&D Systems	EUP0411111
FGF1	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0907422
G-CSF	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#047103
GM-CSF	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#050755-1
IGF1	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0407170
IGF2	マウス	20 ng/ml	R&D Systems	DFK2112081
IL-11	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0408429
IL-12	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0307S97
IL-15	マウス	20 ng/ml	ABBIOTEC	600195
IL-17A	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#1206392
IL-17E	マウス	20 ng/ml	R&D Systems	HES1810121
IL-1 $\alpha$	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#080982
IL-21	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0807368
IL-22	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0602257
IL-3	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#120948
IL-4	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#061049
IL-6	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#090850
MCP-1	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0405126-1
M-CSF	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0707245
MIP-3 $\beta$	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0103280
NOV	マウス	20 ng/ml	R&D Systems	GUE0212021
PDGF	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0507CY420
SCF	マウス	50 ng/ml	PeptoTech	#031278
TNF- $\alpha$	ヒト	20 ng/ml	PeptoTech	#0906CY25
TNFSF14	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#0102248-S
TPO	ヒト	50 ng/ml	PeptoTech	#1202262-A
VEGF	マウス	20 ng/ml	PeptoTech	#010899



**図 6. 低濃度 BSA-FV 使用時の細胞増殖**

(A-C) BSA-FV 濃度を 1 %未満にすると、増殖能のバラツキが大きくなった。CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 30 個を、SCF, TPO および BSA-FV 0.1 % (A), 0.5 % (B) または 1 % (C)の培養条件で 1 週間培養した。1 % (C)と比較して、0.1 % (A)および 0.5 % (B)では増殖能のバラツキが大きかった。

(D) BSA-FV を全く添加しないと、細胞は増殖しなかった。CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 50 個を SCF, TPO 存在下で 1 週間培養した。



## 図 7. 組み換えアルブミンを用いた培養系の構築

(A, B) 造血幹細胞は、RSA 使用時も BSA-FV 使用時と同様に増殖した。SCF, TPO (ともに 50 ng/ml) および 1 % BSA-FV#8 (青色) または RSA (緑色) を添加した 200  $\mu$ l の無血清培地を用いて、CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 1 個を 96-well プレートで 1 週間培養した。

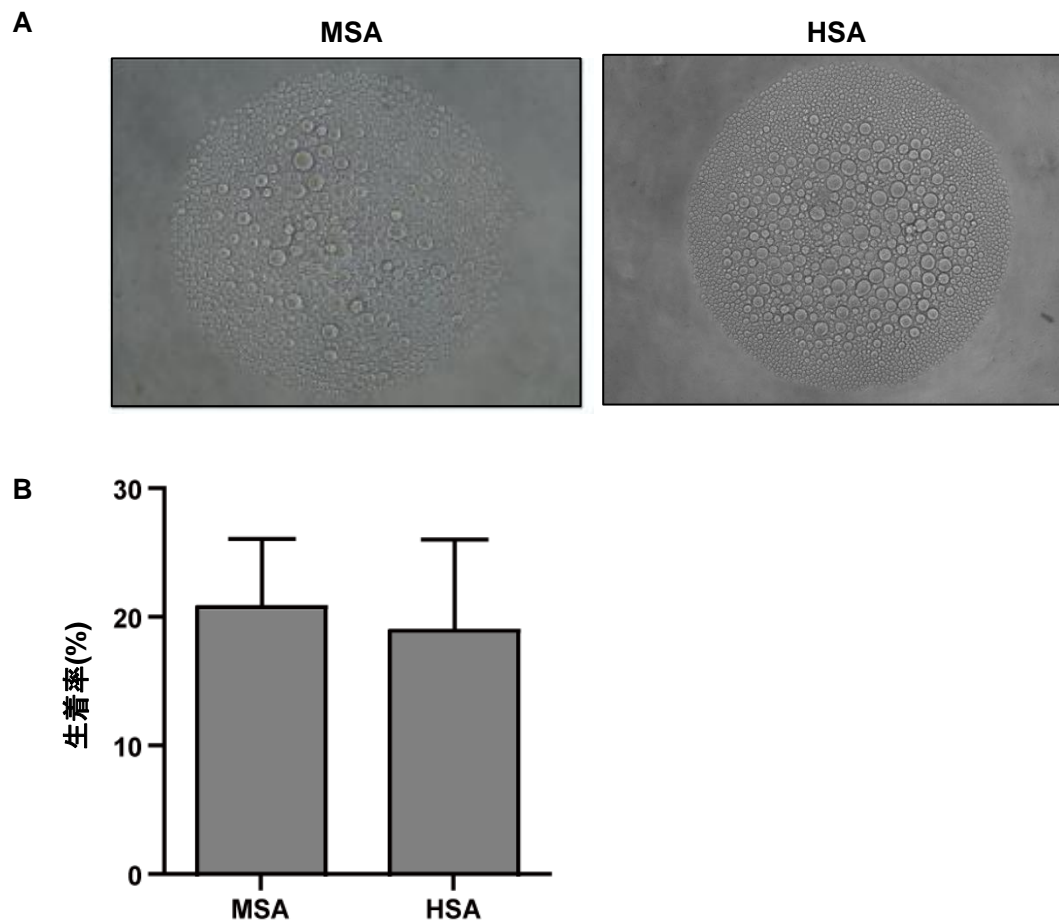
(A) 顕微鏡下で毎日細胞数を計測し増殖曲線を描いた。細胞数の平均値 $\pm$ 標準誤差を示した(n = 40)。

(B) 培養 7 日目の代表的な細胞の様子。

(C) RSA は BSA-FV と同様に造血幹細胞の骨髓再構築能を維持した。1 % BSA-FV#1, #8, #15 または RSA と SCF, TPO 存在下、CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 個を 1 週間培養し、致死量の放射線を照射したマウスに  $1 \times 10^6$  個の骨髓競合細胞とともに移植した。また、同日採取した CD34<sup>+</sup>KSL 細胞 40 個を同様に移植した (fresh)。被移植マウスの移植後 12 週の末梢血における生着率を解析した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差を示し、2 回の独立試行を行った(n = 10)。

(D) RSA を用いて培養した場合、最適な培養期間は 10 日間であった。CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 個を 1 % RSA, SCF および TPO とともに 7, 10, 14 日間培養し、致死量の放射線を照射したマウスに移植した。移植後 12 週の被移植マウス末梢血における、生着率の平均値 $\pm$ 標準誤差を示し、2 回の独立試行を行った(n = 10)。





**図 8. マウス造血幹細胞の培養に用いた組み換えアルブミンの比較**

(A)組み換えアルブミンとして MSA と HSA のいずれを用いても、マウス造血幹細胞は増殖した。SCF, TPO および 1 % MSA または HSA を添加した無血清培地で、CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 個を 1 週間培養した。写真は 7 日目の代表的な細胞の様子を示した。

(B)致死量の放射線を照射したマウスに、 $1 \times 10^6$  個の骨髓競合細胞とともに(A)の細胞を移植した。移植 12 週後の被移植マウス末梢血における生着率の平均値  $\pm$  標準誤差を示し、3 回の独立試行を行った(n = 8)。



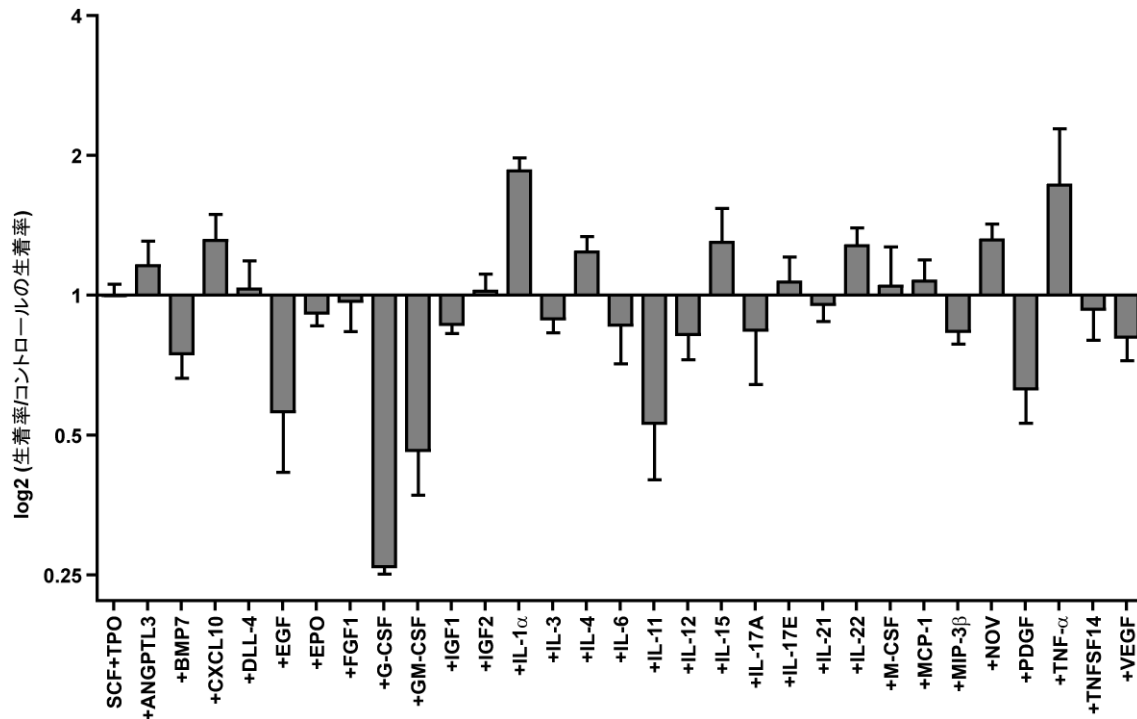
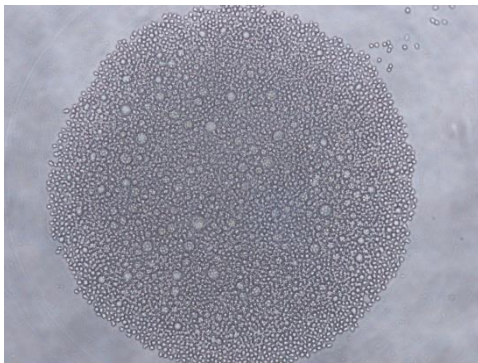


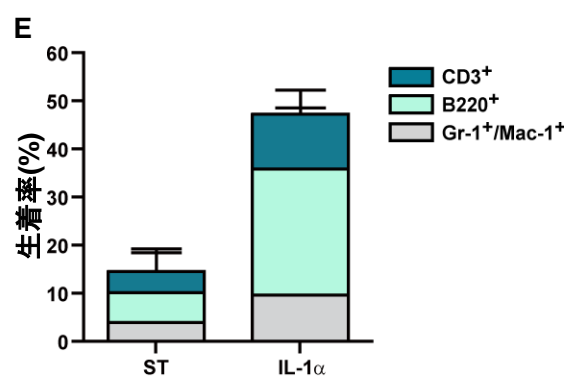
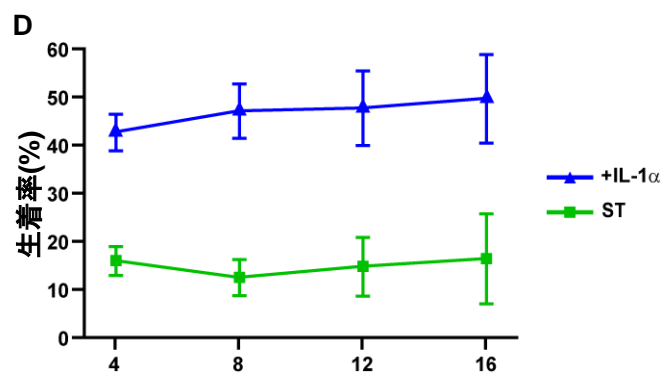
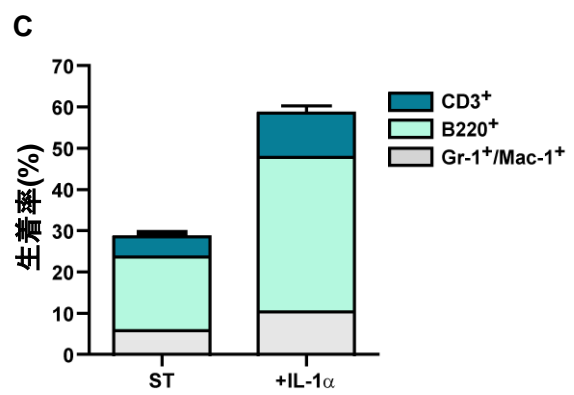
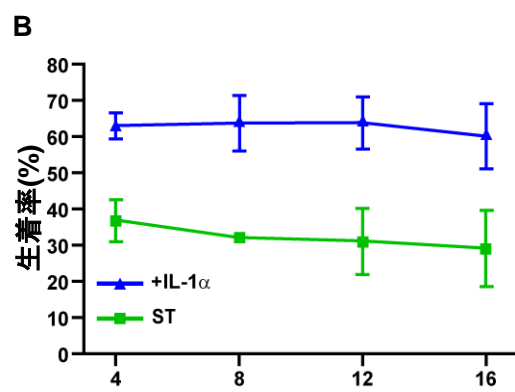
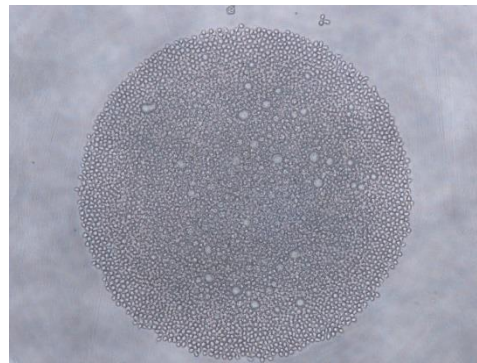
図 9. 組み換えアルブミンを用いた培養系を利用した造血幹細胞の増殖制御因子の探索

組み換えアルブミンを用いた培養系は、造血幹細胞の増殖制御因子探索に有用である。1 % RSA, SCF, TPO と各液性因子を添加した無血清培地で 1 週間培養した CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 個を、致死量の放射線を照射したマウスに、 $1 \times 10^6$  個の競合骨髓細胞とともに移植した。移植後 12 週の被移植マウス末梢血におけるコントロール(SCF + TPO)の生着率を 1 とみなした際に、各液性因子添加時の生着率を算出した。データは  $\log_2$ (各液性因子の生着率/コントロールにおける生着率)の平均値 $\pm$ 標準偏差を示し、2 回独立試行を行った(n = 5)。

**A**                      コントロール (SCF+TPO)



**ST + IL-1 $\alpha$**



#### 図 10. 造血幹細胞に対する IL-1 $\alpha$ の寄与

(A) IL-1 $\alpha$ を添加しても、増殖能に大きな差異は見られなかった。1 % RSA, SCF, TPO (50 ng/ml)および IL-1 $\alpha$  (20 ng/ml)存在下で、CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 個を 1 週間培養した。写真は代表的な 7 日目の細胞の様子。

(B, C) 1 次移植を行うと、IL-1 $\alpha$ は造血幹細胞の骨髓再構築能を増強した。(A)の細胞集団を回収し、 $1 \times 10^6$  個の競合骨髓細胞とともに致死量の放射線を照射したマウスに移植した。被移植マウス末梢血における移植後 4-16 週の生着率(B)および移植 16 週後の各分化細胞の割合(C)について、平均値 $\pm$ 標準誤差を示し、2 回の独立試行を行った( $n = 5$ )。

(D, E) 2 次移植でも、1 次移植と同様の結果が得られた。1 次移植後 16 週の被移植マウスから  $1 \times 10^6$  個ずつ骨髓細胞を採取し、致死量の放射線を照射したマウスに 2 次移植を行った。被移植マウス末梢血における移植後 4-16 週の生着率(D)および移植 16 週後の各分化細胞の割合(E)について、平均値 $\pm$ 標準誤差を示し、2 回の独立試行を行った(ST,  $n = 6$ ; IL-1 $\alpha$ ,  $n = 10$ )。



### 図 11. BSA-FV に含まれる HPX が造血幹細胞に及ぼす影響

(A) HPX を添加培養すると造血幹細胞の骨髓再構築能は増強した。致死量の放射線を照射したマウスに、1 % RSA, SCF, TPO (50 ng/ml) および HPX (10 ng/ml) 存在下で 1 週間培養した CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 個を、 $1 \times 10^6$  個の競合骨髓細胞とともに移植した。移植 12 週後の被移植マウス末梢血における生着率の平均値 $\pm$ 標準偏差を示し、2 回の独立試行を行った(n = 4)。

(B) 造血幹細胞の骨髓再構築能と HPX 濃度は比例しなかった。40 個の CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞を 1 % RSA, SCF, TPO および HPX 存在下で 1 週間培養した。培養後、競合的骨髓移植を行い、移植 12 週後の被移植マウス末梢血における生着率の平均値 $\pm$ 標準偏差を示し、2 回の独立試行を行った(n = 5)。

(C, D) 培養した造血幹細胞の骨髓再構築能と、BSA-FV 中の HPX の有無は相関した。(C) 大部分の血清アルブミンを除去した BSA-FV を電気泳動で分離した後、HPX 抗体で免疫反応させた。(D) 1 % RSA, SCF, TPO および HPX を添加した無血清培地で 1 週間培養した CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞 40 個を、 $1 \times 10^6$  個の競合骨髓細胞とともに、致死量の放射線を照射したマウスに移植した。移植 12 週後の被移植マウス末梢血における生着率の平均値 $\pm$ 標準偏差を示し、3 回の独立試行を行った(n = 5)。

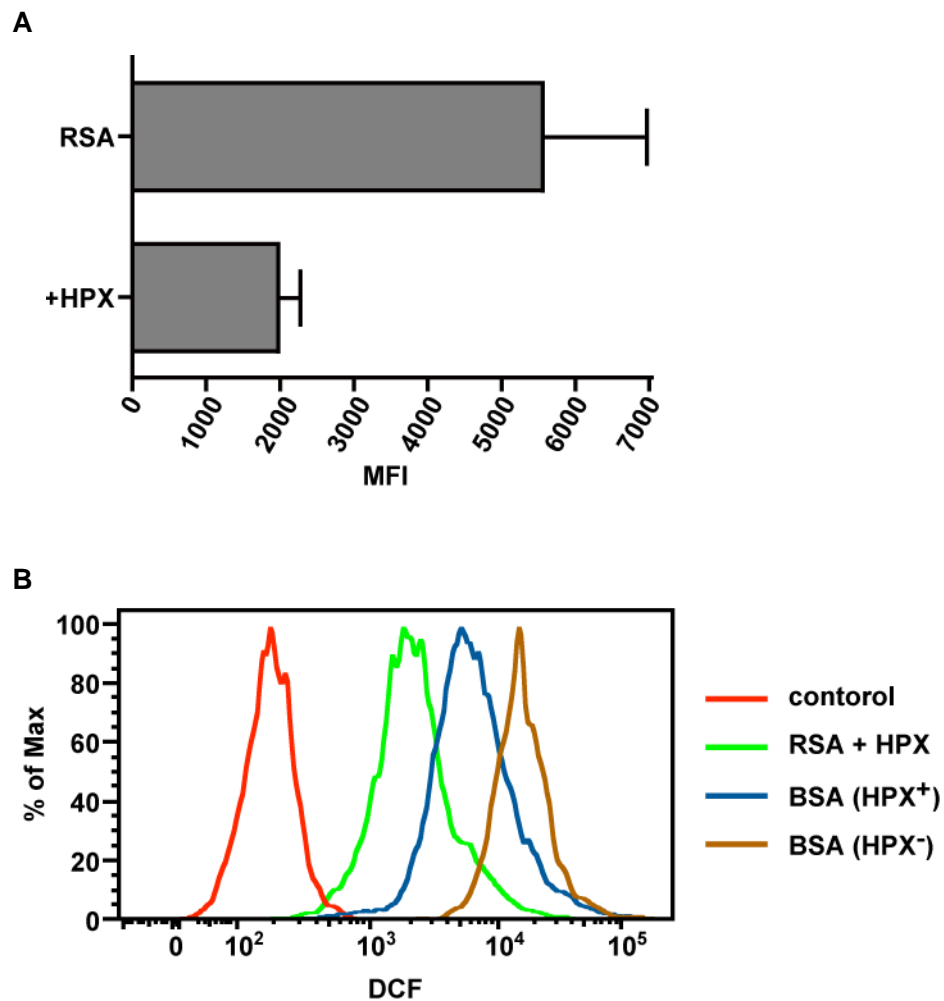
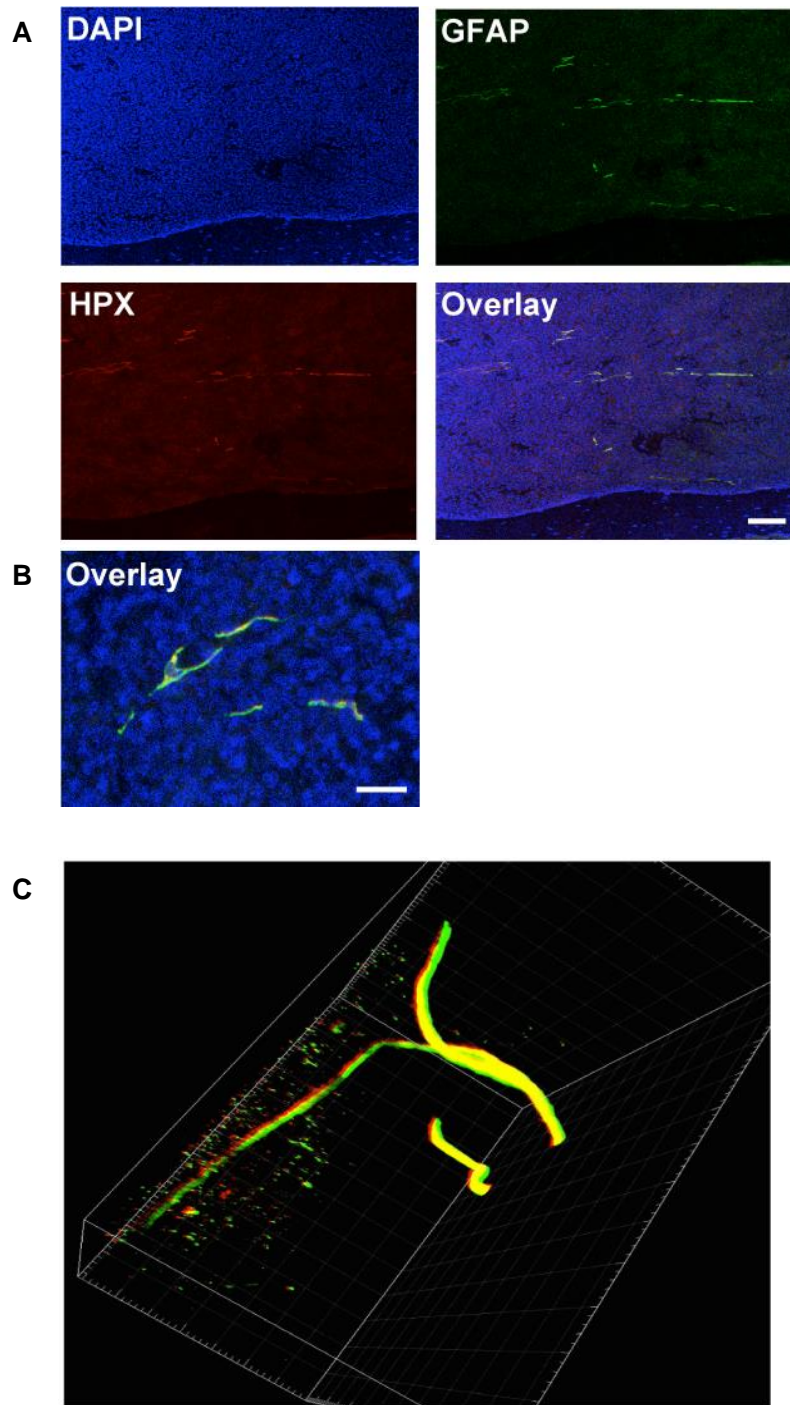


図 12. *in vitro* における HPX による ROS の抑制

(A, B) HPX の添加によって、培養した細胞の ROS の蓄積は抑えられた。(A) CD34<sup>+</sup>KSL 造血幹細胞を 2 日間培養後、HySOx を用いて染色した。フローサイトメーターで ROS の蓄積を解析し、MFI で定量化した。(B) DCF-DA を用いて細胞内の ROS レベルを評価した。DCF-DA は細胞内に浸透した後脱アセチル化され、ROS により酸化され DCF に変化する[46]。DCF の蛍光強度は細胞質の ROS レベルに比例する。赤色はネガティブコントロール(DCF-DA 不添加)を示す。



**図 13. 骨髄における HPX の局在**

(A-C) GFAP 陽性細胞と HPX 陽性細胞は共局在しているように観察された。(A, B)抗 GFAP 抗体(緑色)、抗 HPX 抗体(赤色)、DAPI(青色)を用いて、骨髄凍結切片を免疫染色した((A)200  $\mu\text{m}$  (B) 40  $\mu\text{m}$ )。 (C)脛骨から骨髄塊を採取し、透明化の処理を施した。十分透明化した後、抗 GFAP 抗体(緑色)および抗 HPX 抗体(赤色)で染色した。

A

## HSC培養実験の再現性を決める要素

### 培養細胞の品質

- HSC濃縮率  
現在は20～30 %の濃縮率
- HSCの能力  
myeloid-biased, myeloid bypass等

### 培養液

- 無血清培地 (サプリメント含む)
- BSA-FV → **RSA**
- 液性因子 (SCF, TPOなど)

B

- インスリン
- トランスフェリン
- エタノールアミン
- 亜セレン酸ナトリウム
- グルコース
- フェノールレッド
- ビルビン酸ナトリウム
- シチジン
- チミジン

#### 無機塩

- 塩化カルシウム
- 硫酸マグネシウム
- 塩化カリウム
- 炭酸水素ナトリウム
- 塩化ナトリウム
- リン酸水素二ナトリウム
- リン酸二水素ナトリウム
- 硝酸カルシウム
- 硫酸銅
- 硝酸鉄
- 硫酸鉄
- 塩化マグネシウム
- 硫酸亜鉛
- EDTA-Fe

#### ビタミン

- ビオチン
- 塩化コリン
- 葉酸
- イノシトール
- リボ酸
- D-パントテン酸カルシウム
- 塩酸ピリドキサル
- リボフラビン
- 塩酸チアミン
- ビタミンB12
- L-アスコルビン酸ナトリウム
- ナイアシンアミド
- グルタチオン
- HEPES
- ヒポキサンチン
- リノール酸
- コレステロール
- プトレッシン二塩酸塩
- ニコチン酸アミド
- P-アミノ安息香酸
- 塩酸ピリドキシン

#### アミノ酸

- L-アラニン
- L-アルギニン
- L-アルギニン塩酸塩
- L-アスパラギン
- L-アスパラギン水塩
- L-アスパラギン酸
- L-システイン塩酸塩
- L-シスチン二塩酸塩
- L-グルタミン酸
- L-グルタミン
- グリシン
- L-ヒスチジン
- L-ヒスチジン塩酸塩
- L-イソロイシン
- L-ロイシン
- L-リジン塩酸塩
- L-メチオニン
- L-フェニルアラニン
- L-プロリン
- L-セリン
- L-スレオニン
- L-トリプトファン
- L-チロシンナトリウム塩
- L-バリン



#### 図 14. 造血幹細胞の培養実験系における再現性向上に向けた展望

(A)造血幹細胞の培養実験系の再現性を左右すると考えられる要素について図示した。本研究では BSA-FV の代わりに RSA を用いることで再現性向上に一部寄与したと考えるが、培養液に関して改善しうる点が残されている。

(B)造血幹細胞の培養に用いられている 2 種類の無血清培地(S-clone SF-03 および  $\alpha$ -MEM)の成分について比較した。赤字は、S-clone SF-03 および  $\alpha$ -MEM の双方に含まれている成分、黒字は片方にのみ含まれる成分。無血清培地間でも成分の差異が大きいことが分かる。

## 8. 参考文献

1. Eaves, C.J., *Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality*. Blood, 2015. **125**(17): p. 2605-13.
2. Walasek, M.A., R. van Os, and G. de Haan, *Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1266**: p. 138-50.
3. Sauvageau, G., et al., *Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo*. Genes Dev, 1995. **9**(14): p. 1753-65.
4. Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, *HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo*. Cell, 2002. **109**(1): p. 39-45.
5. Park, I.K., et al., *Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 302-5.
6. Iwama, A., et al., *Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 843-51.
7. Kamminga, L.M., et al., *The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2170-9.
8. Chen, C.Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science, 2004. **303**(5654): p. 83-6.
9. Guo, S., et al., *MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(32): p. 14229-34.
10. Ooi, A.G., et al., *MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21505-10.
11. Kiel, M.J. and S.J. Morrison, *Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 290-301.
12. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
13. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control*

- of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
14. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
  15. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
  16. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.
  17. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
  18. Yamazaki, S., et al., *Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells*. EMBO J, 2006. **25**(15): p. 3515-23.
  19. Yamazaki, S., et al., *Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche*. Cell, 2011. **147**(5): p. 1146-58.
  20. McCulloch, E.A., et al., *The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype Sl-Sld*. Blood, 1965. **26**(4): p. 399-410.
  21. McCulloch, E.A., L. Siminovitch, and J.E. Till, *SPLEEN-COLONY FORMATION IN ANEMIC MICE OF GENOTYPE WW*. Science, 1964. **144**(3620): p. 844-6.
  22. Huang, E., et al., *The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus*. Cell, 1990. **63**(1): p. 225-33.
  23. Williams, D.E., et al., *Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene*. Cell, 1990. **63**(1): p. 167-74.
  24. Zsebo, K.M., et al., *Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor*. Cell, 1990. **63**(1): p. 213-24.

25. Zsebo, K.M., et al., *Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver--conditioned medium*. Cell, 1990. **63**(1): p. 195-201.
26. Kobayashi, M., et al., *Recombinant human thrombopoietin (Mpl ligand) enhances proliferation of erythroid progenitors*. Blood, 1995. **86**(7): p. 2494-9.
27. Ku, H., et al., *Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice*. Blood, 1996. **87**(11): p. 4544-51.
28. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
29. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. Cell, 1997. **91**(5): p. 661-72.
30. Yamamoto, R., et al., *Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells*. Cell, 2013. **154**(5): p. 1112-26.
31. Guilbert, L.J. and N.N. Iscove, *Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures*. Nature, 1976. **263**(5578): p. 594-5.
32. Cohn, E.J., *The Properties and Functions of the Plasma Proteins, with a Consideration of the Methods for their Separation and Purification*. Chem. Rev., 1941. **28** (2): p. 395–417.
33. Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell*. Science, 1996. **273**(5272): p. 242-5.
34. Kawamoto, T., *Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants*. Arch Histol Cytol, 2003. **66**(2): p. 123-43.
35. Susaki, E.A., et al., *Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging*. Nat Protoc, 2015. **10**(11): p. 1709-27.
36. Chen, J.Y., et al., *Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche*. Nature, 2016. **530**(7589): p. 223-227.

37. Jacobsen, F.W., et al., *Direct synergistic effects of IL-4 and IL-11 on proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells*. Exp Hematol, 1995. **23**(9): p. 990-5.
38. Yonemura, Y., et al., *Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4040-4.
39. Jubinsky, P.T. and E.R. Stanley, *Purification of hemopoietin 1: a multilineage hemopoietic growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(9): p. 2764-8.
40. Mochizuki, D.Y., et al., *Interleukin 1 regulates hematopoietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5267-71.
41. Heimfeld, S., et al., *The in vitro response of phenotypically defined mouse stem cells and myeloerythroid progenitors to single or multiple growth factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9902-6.
42. Srour, E.F., et al., *Relationship between cytokine-dependent cell cycle progression and MHC class II antigen expression by human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells*. J Immunol, 1992. **148**(3): p. 815-20.
43. Muller-Eberhard, U., *Hemopexin*. Methods Enzymol, 1988. **163**: p. 536-65.
44. Tolosano, E. and F. Altruda, *Hemopexin: structure, function, and regulation*. DNA Cell Biol, 2002. **21**(4): p. 297-306.
45. Kenmoku, S., et al., *Development of a highly specific rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(23): p. 7313-8.
46. Eruslanov, E. and S. Kusmartsev, *Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry*. Methods Mol Biol, 2010. **594**: p. 57-72.
47. Swerts, J.P., et al., *Hemopexin is synthesized in peripheral nerves but not in central nervous system and accumulates after axotomy*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10596-600.
48. Tolosano, E., et al., *Specific expression in brain and liver driven by the hemopexin promoter in transgenic mice*. Biochem Biophys Res Commun, 1996.

**218**(3): p. 694-703.

49. Chen, W., et al., *Expression of the protective proteins hemopexin and haptoglobin by cells of the neural retina*. Exp Eye Res, 1998. **67**(1): p. 83-93.
50. Christensen, J.L. and I.L. Weissman, *Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14541-6.
51. Morita, Y., H. Ema, and H. Nakauchi, *Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1173-82.
52. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
53. Muller-Sieburg, C.E., et al., *Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1302-9.
54. Dykstra, B., et al., *Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(2): p. 218-29.
55. Kane, M.T., *Variability in different lots of commercial bovine serum albumin affects cell multiplication and hatching of rabbit blastocysts in culture*. J Reprod Fertil, 1983. **69**(2): p. 555-8.
56. McKiernan, S.H. and B.D. Bavister, *Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos*. In Vitro Cell Dev Biol, 1992. **28A**(3 Pt 1): p. 154-6.
57. Bagby, G.C., Jr., *Interleukin-1 and hematopoiesis*. Blood Rev, 1989. **3**(3): p. 152-61.
58. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
59. Auron, P.E., et al., *Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(24): p. 7907-11.
60. March, C.J., et al., *Cloning, sequence and expression of two distinct human*

*interleukin-1 complementary DNAs*. Nature, 1985. **315**(6021): p. 641-7.

61. Clark, B.D., et al., *Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(20): p. 7897-914.
62. Furutani, Y., et al., *Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(8): p. 3167-79.
63. Gubler, U., et al., *Recombinant human interleukin 1 alpha: purification and biological characterization*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2492-7.
64. Kilian, P.L., et al., *Interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta bind to the same receptor on T cells*. J Immunol, 1986. **136**(12): p. 4509-14.
65. Chizzonite, R., et al., *Two high-affinity interleukin 1 receptors represent separate gene products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 8029-33.
66. Parker, K.P., et al., *Presence of IL-1 receptors on human and murine neutrophils. Relevance to IL-1-mediated effects in inflammation*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 537-42.
67. Hestdal, K., et al., *Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells*. J Immunol, 1991. **147**(1): p. 22-8.
68. Dower, S.K., et al., *Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1*. J Exp Med, 1985. **162**(2): p. 501-15.
69. Matsushima, K., et al., *Properties of a specific interleukin 1 (IL 1) receptor on human Epstein Barr virus-transformed B lymphocytes: identity of the receptor for IL 1-alpha and IL 1-beta*. J Immunol, 1986. **136**(12): p. 4496-502.
70. Uhl, J., et al., *Identification of IL-1 receptors on human monocytes*. J Immunol, 1989. **142**(5): p. 1576-81.
71. Neta, R., S. Douches, and J.J. Oppenheim, *Interleukin 1 is a radioprotector*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2483-5.
72. Moore, M.A. and D.J. Warren, *Synergy of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor: in vivo stimulation of stem-cell recovery and*

- hematopoietic regeneration following 5-fluorouracil treatment of mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(20): p. 7134-8.*
73. Benjamin, W.R., et al., *Regulation of hemopoiesis in myelosuppressed mice by human recombinant IL-1 alpha. J Immunol, 1989. 142(3): p. 792-9.*
  74. Moreb, J., et al., *Protective effects of IL-1 on human hematopoietic progenitor cells treated in vitro with 4-hydroperoxycyclophosphamide. J Immunol, 1989. 142(6): p. 1937-42.*
  75. Futami, H., et al., *Chemoprotective effects of recombinant human IL-1 alpha in cyclophosphamide-treated normal and tumor-bearing mice. Protection from acute toxicity, hematologic effects, development of late mortality, and enhanced therapeutic efficacy. J Immunol, 1990. 145(12): p. 4121-30.*
  76. Dubois, C.M., et al., *In vivo interleukin-1 (IL-1) administration indirectly promotes type II IL-1 receptor expression on hematopoietic bone marrow cells: novel mechanism for the hematopoietic effects of IL-1. Blood, 1991. 78(11): p. 2841-7.*
  77. Woloschak, G.E., et al., *Modulation of gene expression in Syrian hamster embryo cells following ionizing radiation. Cancer Res, 1990. 50(2): p. 339-44.*
  78. Neta, R., et al., *In vivo modulation with anti-interleukin-1 (IL-1) receptor (p80) antibody 35F5 of the response to IL-1. The relationship of radioprotection, colony-stimulating factor, and IL-6. Blood, 1990. 76(1): p. 57-62.*
  79. Dubois, C.M., et al., *Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. J Exp Med, 1990. 172(3): p. 737-44.*
  80. Muller-Eberhard, U., *Hemopexin. N Engl J Med, 1970. 283(20): p. 1090-4.*
  81. Muller-Eberhard, U. and R. Bashore, *Assessment of Rh disease by ratios of bilirubin to albumin and hemopexin to albumin in amniotic fluid. N Engl J Med, 1970. 282(21): p. 1163-7.*
  82. Paoli, M., et al., *Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. Nat Struct Biol, 1999. 6(10): p. 926-31.*



83. Solar, I., U. Muller-Eberhard, and N. Shaklai, *Serum proteins as mediators of heme efflux from red cell membranes: specificity of hemopexin*. FEBS Lett, 1989. **256**(1-2): p. 225-9.
84. Shipulina, N., A. Smith, and W.T. Morgan, *Heme binding by hemopexin: evidence for multiple modes of binding and functional implications*. J Protein Chem, 2000. **19**(3): p. 239-48.
85. Kuzelova, K., M. Mrhalova, and Z. Hrkal, *Kinetics of heme interaction with heme-binding proteins: the effect of heme aggregation state*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1336**(3): p. 497-501.
86. Delanghe, J.R. and M.R. Langlois, *Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine*. Clin Chim Acta, 2001. **312**(1-2): p. 13-23.
87. Gutteridge, J.M., *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clin Chem, 1995. **41**(12 Pt 2): p. 1819-28.
88. Bunn, H.F. and J.H. Jandl, *Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin*. J Biol Chem, 1968. **243**(3): p. 465-75.
89. Alam, J. and A. Smith, *Receptor-mediated transport of heme by hemopexin regulates gene expression in mammalian cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(30): p. 17637-40.
90. Alam, J. and A. Smith, *Heme-hemopexin-mediated induction of metallothionein gene expression*. J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16379-84.
91. Shipulina, N., et al., *Coordination of nitric oxide by heme-hemopexin*. J Protein Chem, 1998. **17**(3): p. 255-60.
92. Shaklai, N., et al., *The interaction of heme-hemopexin with CO*. J Biol Chem, 1981. **256**(4): p. 1544-8.
93. Madore, N., et al., *Regulation of hemopexin synthesis in degenerating and regenerating rat sciatic nerve*. J Neurochem, 1999. **72**(2): p. 708-15.
94. Camborieux, L., et al., *Respective roles of inflammation and axonal breakdown in the regulation of peripheral nerve hemopexin: an analysis in rats and in C57BL/Wlds mice*. J Neuroimmunol, 2000. **107**(1): p. 29-41.

95. Hunt, R.C., I. Handy, and A. Smith, *Heme-mediated reactive oxygen species toxicity to retinal pigment epithelial cells is reduced by hemopexin*. J Cell Physiol, 1996. **168**(1): p. 81-6.
96. Hunt, R.C., et al., *Hemopexin in the human retina: protection of the retina against heme-mediated toxicity*. J Cell Physiol, 1996. **168**(1): p. 71-80.
97. Tolosano, E., et al., *Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3906-14.
98. Tiribuzi, R., et al., *Nitric oxide depletion alters hematopoietic stem cell commitment toward immunogenic dendritic cells*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(3): p. 2830-8.
99. Nogueira-Pedro, A., et al., *Nitric oxide-induced murine hematopoietic stem cell fate involves multiple signaling proteins, gene expression, and redox modulation*. Stem Cells, 2014. **32**(11): p. 2949-60.
100. Muller-Eberhard, U. and M. Fraig, *Bioactivity of heme and its containment*. Am J Hematol, 1993. **42**(1): p. 59-62.
101. Zhu, L., et al., *Molecular cloning of a mammalian hyaluronidase reveals identity with hemopexin, a serum heme-binding protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32092-7.
102. Camborieux, L., N. Bertrand, and J.P. Swerts, *Changes in expression and localization of hemopexin and its transcripts in injured nervous system: a comparison of central and peripheral tissues*. Neuroscience, 1998. **82**(4): p. 1039-52.
103. 厚生労働省「血漿分画製剤の製造方法」  
([https://www.google.co.jp/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwj3PacxrLKAhXKlZQKHQK-C-MQFggbMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.mhlw.go.jp%2Ffile%2F06-Seisakujuhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku%2F03-8\\_2.pdf&usg=AFQjCNFhjVSnlMX5F2L75yfeJB8vm92r5A&sig2=cXI7c\\_D0FLzOMshyoChP5g&bvm=bv.112064104,d.dGo&cad=rja](https://www.google.co.jp/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwj3PacxrLKAhXKlZQKHQK-C-MQFggbMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.mhlw.go.jp%2Ffile%2F06-Seisakujuhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku%2F03-8_2.pdf&usg=AFQjCNFhjVSnlMX5F2L75yfeJB8vm92r5A&sig2=cXI7c_D0FLzOMshyoChP5g&bvm=bv.112064104,d.dGo&cad=rja))

## 9. 謝辞

当研究室で学ぶ機会を下さった東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野 中内 啓光 博士に謹んで感謝の意を表します。本研究を進めるにあたり、終始親身な御指導、御鞭撻を賜りました山崎 聡 博士に厚く御礼申し上げます。

日常の議論を通じて多くの貴重な御意見や実験技術指導を賜りました葛西 正孝 博士、依馬 秀夫 博士、大津 真 博士、木村 隆治 博士、頼 貞儀 博士、山本 玲 博士、伊藤 慶一 博士、中内 祐介 博士、石田 礼子 氏、大江原 淳 氏、田島 陽子 氏はじめ、中内研究室の皆様、またフローサイトメーター解析において多大なる御支援を頂きました山崎 祐治 氏、石井 有実子 氏、藤田 梓 氏に心から感謝申し上げます。研究を円滑に進めるに御尽力頂いた津久井 弘子 氏、岡田 京子 氏に深く感謝致します。

最後に大学院での研究生活を支援し応援してくれた家族に心から感謝します。