

アフリカツメガエル造血における
TPO/c-Mpl 系の機能に関する研究

Studies on the TPO/c-Mpl system
in *Xenopus* hematopoiesis

2016 年 2 月

谷崎 祐太

Yuta TANIZAKI

アフリカツメガエル造血における
TPO/c-Mpl 系の機能に関する研究

Studies on the TPO/c-Mpl system
in *Xenopus* hematopoiesis

2016 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命理工学専攻 分子生理学研究

谷崎 祐太

Yuta TANIZAKI

目次

略語一覧	I
図表一覧	III
生物資源一覧	VI
第 1 章 緒論	1
1-1. 本研究の背景 I	1
1-1-1. 哺乳類における血球分化	
1-1-2. 赤血球	
(1) 赤血球の発見と歴史	
(2) 赤血球の機能と種類	
(3) 哺乳類以外の脊椎動物の赤血球	
1-1-3. 血小板	
(1) 血小板の発見	
(2) 血小板の機能	
(3) 非哺乳類動物の止血細胞	
1-1-4. 白血球	
(1) 白血球の発見の歴史と機能	
(2) 非哺乳類動物における顆粒球	
1-1-5. アフリカツメガエルにおける造血	
第 2 章 TPO/c-Mpl の機能解析	15
2-1. 本研究の背景 II	15
2-1-1. TPO	
(1) TPO の発見と臨床応用の歴史	
(2) TPO および Mpl の構造とシグナル伝達系	
(3) 様々な生物種における TPO	
2-1-2. 巨核球・血小板造血	
(1) 巨核球の起源	
(2) 巨核球・血小板造血に関与する造血因子	

(3) 巨核球から血小板の産生機序	
(4) 巨核球造血に関する要素（転写因子，miRNA）	
(5) 巨核球，血小板の <i>in vitro</i> 分化誘導	
2-1-3. 造血幹細胞	
(1) 造血微小環境	
(2) 造血幹細胞の自己増殖	
2-2. 本研究の目的と概要	30
2-2-1. 目的	
2-2-2. 概要	
(1) 末梢栓球の性質	
(2) ツメガエル TPO の生物活性	
第 3 章 ツメガエルにおける有核栓球の機能の解明	33
3-1. 背景	33
3-2. 材料および方法	33
3-2-1. 動物および採血	
3-2-2. 塗抹標本作製および化学染色	
3-2-3. 免疫染色	
3-2-4. T12 陽性細胞における巨核球，血小板マーカーの遺伝子発現解析	
3-2-5. 栓球における核相解析	
3-2-6. 栓球活性化実験	
3-3. 結果	37
3-3-1. ツメガエル末梢栓球の形態と染色性	
3-3-2. T12 モノクローナル抗体の認識細胞	
3-3-3. 末梢栓球の活性化	
3-3-4. ツメガエル肝臓，脾臓内における T12 陽性細胞の性質	
3-3-5. ツメガエル栓球における核相	
3-4. 考察	44
第 4 章 ツメガエルにおける有核栓球の産生	47
4-1. 背景	47
4-2. 材料および方法	48
4-2-1. <i>x/TPO</i> , <i>x/c-Mpl</i> cDNA のアミノ酸配列の解析	

4-2-2. 遺伝子発現解析	
4-2-3. <i>x</i> /TPO 大腸菌組み換え体の調整	
4-2-4. コロニーアッセイ法およびコロニー計数	
4-2-5. 肝臓, 脾臓細胞, 巨核球様細胞, 末梢栓球の液体培養及び計数	
4-2-6. 透過型電子顕微鏡による撮像	
4-2-7. ウェスタンブロッティング法	
4-2-8. 細胞染色	
4-3. 結果	54
4-3-1. アミノ酸配列と相同性の解析	
4-3-2. <i>x</i> /TPO の生物活性	
4-3-3. <i>x</i> /TPO 刺激により誘導された肝臓, 脾臓 T12 陽性細胞	
4-3-4. ツメガエルにおける巨核球の定義・同定	
4-3-5. 成熟栓球への分化	
4-3-6. 末梢栓球における TPO-Mpl シグナル	
4-4. 考察	67
第 5 章 <i>x</i>/TPO の造血幹/前駆細胞に対する機能	71
5-1. 背景	71
5-2. 材料および方法	71
5-2-1. ツメガエル肝臓細胞の <i>x</i> /TPO により誘導される長期培養細胞の性質	
5-2-2. <i>x</i> /TPO 誘導された培養細胞の再播種実験	
5-2-3. <i>x</i> /TPO 誘導された培養細胞の遺伝子発現解析	
5-2-4. ツメガエル肝臓部分切除モデルの構築	
5-2-5. ツメガエル自家細胞移植系の構築	
5-2-6. ツメガエル同種細胞移植系の構築	
5-3. 結果	75
5-3-1. ツメガエル <i>x</i> /TPO 刺激により誘導される長期培養細胞	
5-3-2. ツメガエルにおける <i>x</i> /TPO 誘導細胞の多分化能の解析	
5-3-3. ツメガエル自己細胞移植に向けた肝臓摘出モデルの作出	
5-3-4. TPO 誘導長期培養未熟細胞の生着能および生着細胞の特徴	
5-3-5. TPO 誘導長期培養未熟細胞の多分化能	
5-4. 考察	84

第6章 総括と展望	86
6-1. 本研究の総括	86
6-1-1. TPO/c-Mpl系における栓球造血	
6-1-2. TPO/c-Mpl系における多分化性前駆細胞	
6-2. 今後の課題と展望	87
6-2-1. TPO/c-Mpl系における栓球造血	
6-2-2. 多分化性前駆細胞の性状	
6-2-3. 多分化性前駆細胞の低温環境応答	
6-3. 結語	89
謝辞	90
参考文献	92
研究業績	105

略語一覧

ADP	Adenosine diphosphate (アデノシン二リン酸)
AChE	Acetylcholine esterase (アセチルコリンエステラーゼ)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BM	Bone marrow (骨髄)
BSA	Bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
CAR 細胞	CXCL12-abundant reticular cell
CD	Cluster of differentiation (表面抗原分類)
cDNA	Complementary DNA (相補的 DNA)
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CFU-S	Colony-forming unit-spleen
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DDSA	Dodecanyl succinic anhydride
DNA	Deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines (ダルベッコリン酸バッファー)
EDTA-Na	Sodium ethylenediamine tetra-acetic acid (エチレンジアミン四酢酸ナトリウム)
EPO	Erythropoietin (エリスロポエチン)
EPOR	Erythropoietin receptor (エリスロポエチン受容体)
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FCS	Fetal calf serum (ウシ胎児血清)
FL	Flk2/Flt3 ligand (Flk2/Flt3 リガンド)
FOG-1	Friend of GATA
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)
GWAS	Genome-wide association study (全ゲノム関連解析)
GP	Glycoprotein (グリコプロテイン)
HCG	Human chorionic gonadotropin (ヒト絨毛性ゴナドトロピン)
HCT	Hematocrit (ヘマトクリット)
HE	Hematoxylin and eosin stain (ヘマトキシリン・エオジン染色)
HGB	Hemoglobin (ヘモグロビン)

HLA	Human leukocyte antigen (ヒト白血球抗原)
HRP	Horseradish peroxidase (洋わさびペルオキシダーゼ)
IL	Interleukin (インターロイキン)
ITP	Idiopathic thrombocytopenic purpura (特発性血小板減少性紫斑病)
JAK	Janus kinase
MCH	Mean corpuscular hemoglobin (平均赤血球色素量)
MEP	Megakaryocyte/erythroid progenitor cell
miRNA	microRNA
MNA	Methylnadic anhydride
mRNA	messenger RNA (伝令 RNA)
NBT	Nitro blue tetrazolium
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern molecules
PF-4	Platelet factor-4 (血小板第 4 因子)
PHZ	Phenylhydrazine (フェニルヒドラジン)
REP 細胞	Renal Epo-producing cell (腎内 EPO 産生細胞)
RNA	Ribonucleic acid (リボ核酸)
RPL13A	Ribosomal protein L13a
SCF	Stem cell factor (幹細胞因子)
S.D.	Standard deviation (標準偏差)
TBC	Thrombocyte (栓球)
TBS	Tris-Buffered Saline (トリス緩衝生理食塩水)
TEPA	Tetraethylenepentamine
TFA	Trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)
TGF- β	Transforming growth factor β
TPO	Thrombopoietin (トロンボポエチン)
vWF	von Willebrand factor (フォン・ウィルブランド因子)
WBC	White blood cell (白血球)

図表一覧

第 1 章

図 1-1 哺乳類における血球分化系譜と造血因子

図 1-2 赤血球産生モデル

図 1-3 血小板の凝集モデル

図 1-4 各動物種における末梢血球像

図 1-5 ツメガエルにおける造血モデル

表 1-1 各動物種における栓球活性化因子

表 1-2 ツメガエルにおける造血様細胞の局在

第 2 章

図 2-1 TPO 様配列の系統樹

図 2-2 様々な動物における EPO 様配列と TPO 様配列の比較

図 2-3 ヒトにおける造血巣の移行

図 2-4 血小板産生モデル

図 2-5 ニッチ細胞の位置関係

図 2-6 血小板，有核栓球産生の比較

表 2-1 巨核球造血，血小板産生に関する論文報告（2000 年以降）1

表 2-2 巨核球造血，血小板産生に関する論文報告（2000 年以降）2

第 3 章

図 3-1 ツメガエル末梢栓球像

図 3-2 メガエル末梢栓球における T12 陽性細胞

図 3-3 ツメガエル末梢栓球の活性評価

図 3-4 ツメガエル脾臓, 肝臓における T12 陽性細胞

図 3-5 T12 陽性細胞の核相

表 3-1 アセチルコリンエステラーゼ染色液の組成

表 3-2 プライマーリスト

表 3-3 抗体陽性細胞の割合

第 4 章

図 4-1 TPO の血中濃度制御機構モデル (スポンジモデル)

図 4-2 x/TPO のベクターマップ

図 4-3 TPO のマルチプルアライメント

図 4-4 c-Mpl のマルチプルアライメント

図 4-5 ツメガエル TPO, Mpl の種間相同性

図 4-6 x/TPO , x/Mpl の組織における遺伝子発現

図 4-7 x/TPO 大腸菌組み換え体の生物活性

図 4-8 x/TPO の $x/Mpl-Fc$ による中和活性

図 4-9 貧血ツメガエル肝臓由来の血球コロニー

図 4-10 x/TPO 刺激による脾臓, 肝臓細胞の細胞数の推移

図 4-11 肝臓, 脾臓細胞の細胞増殖と分化

図 4-12 肝臓, 脾臓に含まれる T12 陽性細胞の性質

図 4-13 巨核球様細胞の性質

図 4-14 成熟栓急への分化

図 4-15 末梢栓球における TPO/Mpl 系の機能

図 4-16. ツメガエル栓球造血モデル

表 4-1 プライマーリスト

表 4-2 コロニーアッセイの培地組成

表 4-3 エポキシ樹脂の調合

第 5 章

図 5-1 ツメガエル自家細胞移植系

図 5-2 ツメガエル同種細胞移植系

図 5-3 *x/TPO* の長期培養細胞

図 5-4. *x/TPO* の長期培養細胞の挙動

図 5-5 *x/TPO* により誘導された細胞の多分化能

図 5-6 ツメガエル肝部分切除御隊における造血様式

図 5-7 ツメガエル肝部分切除モデルを用いた *x/TPO* 誘導細胞の移植

図 5-8 ツメガエル発生胚への *x/TPO* 誘導細胞の移植

表 5-1 プライマーリスト

第 6 章

図 6-1 ツメガエルにおける血球系譜

登録生物資源一覧

抗ツメガエル顆粒球栓球認識モノクローナル抗体 (T5 抗体)

参考文献 : Tanizaki Y *et al.*, Exp Hematol, 2015

抗ツメガエル栓球認識モノクローナル抗体 (T12 抗体)

参考文献 : Tanizaki Y *et al.*, Exp Hematol, 2015

アフリカツメガエルトロンボポエチン (*xITPO*)

アクセッション番号 : AB256538

参考文献 : Tanizaki Y *et al.*, Sci Rep, 2015

アフリカツメガエルトロンボポエチン (*xlc-Mpl*)

アクセッション番号 : AB272077

参考文献 : Tanizaki Y *et al.*, Sci Rep, 2015

第1章 緒論

1-1. 本研究の背景 I

血液学研究には臨床応用へ向けた長い研究の歴史があり、移植医療、遺伝子組み換え医療、分子標的薬の開発、幹細胞科学において、常に時代の最先端を走る研究分野の一つである。本研究では比較生物学的視点を持ち込んだ造血研究により、新規造血機構の解明を目的とした。本章ではヒト、マウス、アフリカツメガエルにおける血液学の歴史、血球の産生、各血球における機能について叙述した。

1-1-1. 哺乳類における血球分化

ヒトにおいて、末梢を循環する赤血球、血小板、顆粒球は骨髄中に存在する造血幹細胞を起源とする。成熟赤血球は赤血球造血因子であるエリスロポエチン (Erythropoietin : EPO) の刺激を受けて成熟し、ヘモグロビンを合成するようになり、最終的には脱核して無核の細胞となる。止血、血栓機能を担う血小板は血小板 (栓球) 産生因子であるトロンボポエチン (TPO) の作用により産生される。TPO は主に核の倍数性が増加した巨核球の成熟を促す。さらに、巨核球は胞体突起を形成し、断片化することにより血小板が産生される。

ヒトのモデルとして主にマウスを使った造血研究が進められ、造血幹細胞からの分化経路が調べられてきた。1961年に Till JE, McCulloch EA は致死量の放射線を照射した造血不全マウスに他個体の骨髄細胞を移植すると、マウスは脾臓にコロニー (Colony-forming unit-spleen : CFU-S) を形成し、造血機能を回復させて生存することを見出した (Till and McCulloch, 1961)。本実験が *in vivo* において造血幹細胞を実証した最初の報告である。その後、1977年に Metcalf らは骨髄細胞を半固形培地で培養して1個の骨髄に存在する造血幹、前駆細胞が様々な系譜の細胞に分化することを証明した (Johnson and Metcalf, 1977; Burgess et al., 1977)。1988年に Spangrude GJ らによりフローサイトメトリー法によるマウスの造血幹細胞の純化法が報告されると (Spangrude et al., 1988), 造血幹細胞の理解が急速に進められるようになり、ヒト、マウスにおける造血幹細胞の分化系譜の一端が明らかとなってきた。現在、

マウスにおいて一般化されている血球系譜のモデルでは, 造血幹細胞は多能性前駆細胞 (Multipotent progenitor : MPP) を介して骨髓前駆細胞 (Common myeloid progenitor : CMP) とリンパ球性共通前駆細胞 (Common lymphoid progenitor : CLP) に分化する。CMP はさらに, 巨核球・赤芽球共通前駆細胞 (Megakaryocyte-erythroid progenitor : MEP), 顆粒球マクロファージ前駆細胞 (Granulocyte-macrophage progenitor : GMP) に分化し, それぞれ成熟血球を生み出している (Ogawa, 1993; Akashi et al., 2000)。さらに, 実験機器, 技法が発達すると, より詳細な解析を可能とし, マウスやヒト造血幹細胞が MEP を介した巨核球前駆細胞への分化とは別に造血幹細胞から直接巨核球前駆細胞に分化する分化系譜の存在が明らかにされた (Sanjuan-Pla et al., 2013; Yamamoto et al., 2013; Nishikii et al., 2015; Notta et al., 2016)。また, 従来は造血幹細胞が末梢の全血球を産生していると考えられていたが, トランスポゾンを活用した細胞標識を施した正常個体での造血解析の結果, 造血幹細胞ではなく, MPP が一生に渡り主に末梢血球を産生し続けることが報告されている (Sun et al., 2014)。図 1-1 にマウスモデル, ヒトモデルに共通する血球系付図をまとめた。

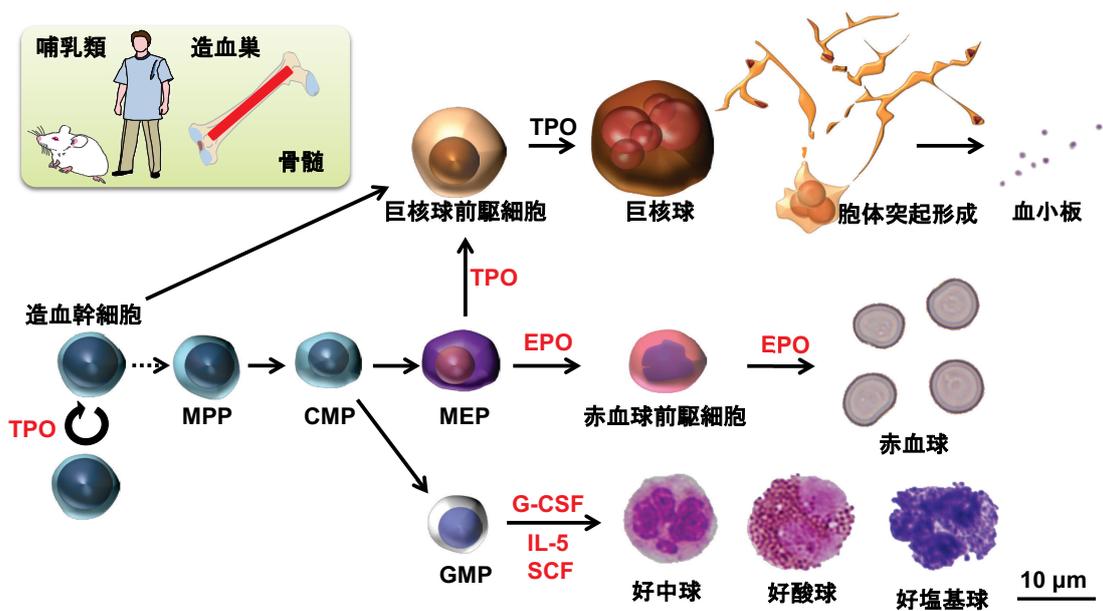


図 1-1 哺乳類における血球系譜

骨髄中に存在する造血幹細胞は種々の造血サイトカインの刺激を受け成熟血球へと分化する。造血幹細胞は自己増殖を繰り返しながら、一部の細胞は分化して多能性前駆細胞 (multipotent progenitor: MPP) となる。さらに、MPP は分化して骨髄球性共通前駆細胞 (common myeloid progenitor: CMP) を産生する。CMP は顆粒球単球前駆細胞 (granulocyte/monocyte progenitor: GMP) 巨核球赤血球共通前駆細胞 (megakaryocyte-erythroid progenitor: MEP) へと分化する。巨核球への分化には MEP を介した経路と造血幹細胞から直接分化する 2 通りの経路がある。細胞の生存、増殖、分化に関与する造血サイトカイン、成長因子は赤字で示した。トロンボポエチン (Thrombopoietin: TPO) は造血幹細胞の増殖と巨核球成熟を支持する。エリスロポエチン (Erythropoietin: EPO) は赤血球系の分化を誘導する。顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF) は好中球、IL-5 (Interleukin-5) は好酸球、SCF (Stem cell factor) は好塩基球にそれぞれ分化を誘導する。

1-1-2. 赤血球

哺乳類において、赤血球は酸素運搬を担う無核の細胞であり、赤血球内に持つヘモグロビンが体内の O_2 と CO_2 のガス交換を行う。赤血球は骨髄中に存在する造血幹細胞から、前期赤芽球系前駆細胞 (Burst-forming unit-erythroid : BFU-E)、前期赤芽球系前駆細胞 (Colony-forming unit-erythroid : CFU-E) と分化し (Stephenson et al., 1971; Heath et al., 1976), 脱核して網状赤血球が産生され、最終的に成熟赤血球となる (Palis, 2014)。本過程において、中心的な分化刺激を与える造血サイトカインがエリスロポエチン (Erythropoietin : EPO) である。BFU-E, CFU-E にはエリスロポエチン受容体 (EPO receptor : EPOR) が発現しており、腎臓で発現する EPO が血中を循環して骨髄中の BFU-E や CFU-E に作用して分化を誘導する (図 1-2)。脱核においては、脱核前の赤血球前駆細胞がマクロファージに結合した、赤芽球島を形成し、マクロファージの作用により脱核すると報告されたが (Chasis and Mohandas, 2008), 胚性幹細胞 (Embryonic stem cells : ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS 細胞) から分化誘導された成熟赤血球はマクロファージ非共存化でも脱核は起こることなどから (Ma et al., 2008; Hirose et al., 2013), 脱核機構に関しては未解決な課題として、議論されており (Sawada, 2011), 脱核に関わる

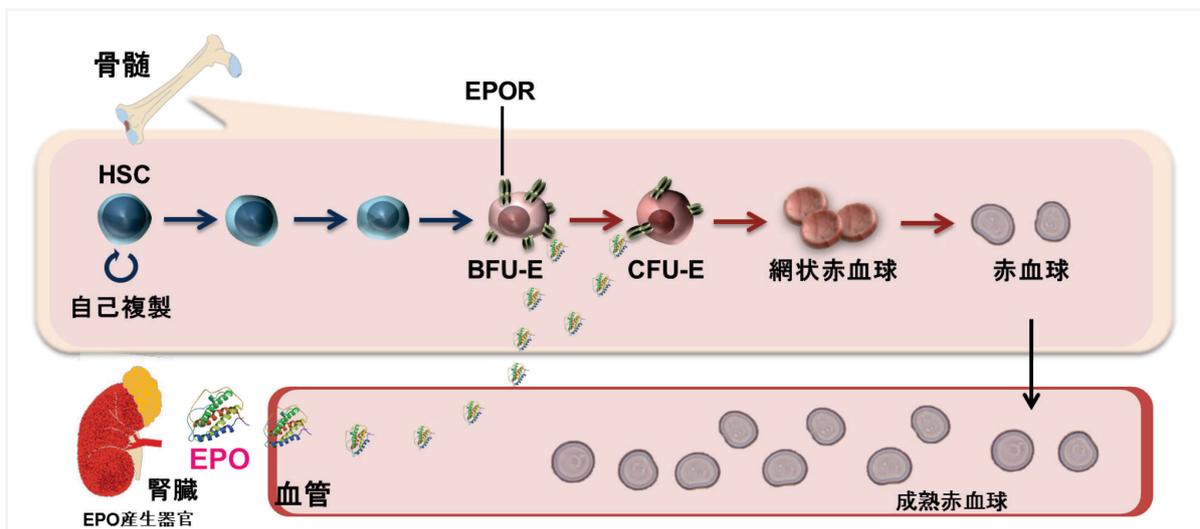


図 1-2 赤血球産生モデル

骨髄中に局在する造血幹細胞 (HSC) は造血サイトカインの刺激を受け、前期赤芽球系前駆細胞 (Burst-forming unit-erythroid : BFU-E) が産生される。腎臓で分泌された EPO が BFU-E に発現する EPO 受容体 (EPO Receptor : EPOR) に結合し、分化を促して前期赤芽球系前駆細胞 (Colony-forming unit-erythroid : CFU-E) となる。CFU-E は脱核し、RNA 含量の多い状態の網状赤血球となり、成熟して末梢を循環する成熟赤血球が産生される。

分子機序に関する報告も限られている (Ubukawa et al., 2012)。このように、赤血球造血における細胞分化, 増殖調節機構に関しては造血因子による制御だけではなく, 造血環境等の要因も考慮しなければならない。

(1) 赤血球の発見と歴史

顕微鏡が発明されると, 様々な細胞が観察されるようになり, 1658年にヤン・スワンメルダムにより, 単式顕微鏡でカエルの赤血球が観察された (Antonio van Leeuwenhoek, 1695; Steven I. Hajdu, 2003)。1674年になるとレーウエンフックにより, ヒトの赤血球が観察され, その大きさが $8.5 \mu\text{m}$ の円盤状の細胞であることが報告されている (Antonio van Leeuwenhoek, 1674)。1906年には貧血にしたウサギの血清を正常ウサギに投与すると赤血球が上昇することが示され, “ヘモポエチン” (現在では EPO) と名付けられた赤血球を増やす因子の存在が示唆された。その後, 欧米では 1948年に Bonsdorff らが初めて赤血球造血因子を Erythropoietin と提唱したとされているが, 本邦の小宮悦三は 1936年に Erythropoietin を提唱していた (小宮, 1938)。その後, 1976年になると宮家隆次らにより再生不良性貧血患者の 2.5 トンの尿から赤血球造血因子である EPO がクローニングされた (Miyake et al., 1977; 河北, 宮家, 2013)。EPO の発現臓器が腎臓であることが示されると (Beru et al., 1986), さらに, EPO 産生細胞は腎臓の近位尿細管周囲の間質に局在する, 繊維芽細胞, 神経細胞様の形態をした細胞 (Renal Epo producing cell : REP 細胞) であることが明らかにされた (Obara et al., 2008)。産生された EPO は末梢を循環し, 骨髄中の BFU-E, CFU-E に作用し, エンドクリン (内分泌) による赤血球造血制御が行われていると考えられている。

(2) 赤血球の機能と種類

赤血球に含まれるヘモグロビンは, 酸素を結合して全身に酸素を運搬する機能を担っている。脊椎動物ヘモグロビンは 2つの α グロビタンパク質, γ グロビタンパク質同士の 4 量体にヘムが結合した複合タンパク質である (Perutz et al., 1960)。ヒトにおいて, β グロビンには $\epsilon, \text{G}\gamma, \text{A}\gamma, \delta, \beta$ といった 5 つタイプ, α -グロビンには $\zeta, \alpha 1, \alpha 2$ といった 3 つの型が存在し, 赤血球は発生段階において異なるタイプのグ

ロビンを含有している (Maniatis et al., 1980; Higgs et al., 1989)。ヒトでは胚型、胎仔型、成体型の赤血球が存在する。卵黄嚢から発生する胚型赤血球は成体型赤血球と比べて 4-5 倍の大きさである。また、有核赤血球であり、 α -グロビンと ϵ -グロビンを有する。その後、 α -グロビンと $G\gamma$, $A\gamma$ 型のグロビンを有する胎仔型赤血球へと転換し、成体になると α -グロビンと β -グロビンが含まれる成体型赤血球へと転換していく。

(3) 哺乳類以外の脊椎動物の赤血球

大半の無脊椎動物に赤血球はなくヘモグロビンが体内を流動しているのに対し、大半の脊椎動物はヘモグロビンを含有する有核、無核の赤血球が循環している。哺乳動物では無核で円盤型の赤血球が体内を循環しているが、ラクダの無核赤血球は例外として、楕円型の特徴的な赤血球形態であることが知られている (Perk, 1963)。非哺乳動物の赤血球は全て有核であり、その多くは楕円型をしたものである。その大きさも様々であり、サンショウウオでは哺乳類の赤血球と比較すると 100 倍以上の大きさであることが知られている (Mueller et al., 2008)。また、コオリウオ科生物は赤血球を有さない脊椎動物として知られている (Johan T. Ruud, 1954)。

2004 年に硬骨魚類であるトラフグの EPO 遺伝子がクローニングされると、EPO の発現制御機構が哺乳類とは異なることが示された (Chou et al., 2004)。続いて、ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルにおける EPO の機能が解析され、それぞれ赤血球造血に EPO が中心的な機能を担うことが証明された一方、それぞれの造血様式においては多様性があることも同時に分かってきた (Paffett-Lugassy et al., 2007; Nogawa-Kosaka et al., 2010)。しかしながら、未だに哺乳類赤血球造血における CFU-E, BFU-E に相当する細胞は同定されておらず、血球系譜が哺乳類の血球系譜に一致するのかは不明である。

1-1-3. 血小板

血小板は主に骨髄中に存在する巨核球から産生される無核の細胞であり、細胞の大きさも $2\ \mu\text{m}$ – $10\ \mu\text{m}$ といった非常に小さな形態を示す。その大きさから他の血球種と比較すると、血小板の存在が知られるまでには時間がかかった。血小板は血球

の中でも赤血球に次ぐ細胞数を占めており、止血機能において中心的な役割を担っているが、がんや免疫系においても機能的な役割を担うことが分かってきた。

(1) 血小板の発見

1658年にヤン・スワンメルダム、レーウエンフックらにより、カエル、ヒトの赤血球がスケッチされた記録が残されている。一方、細胞の大きさが直径2-10 μm 程度しかない血小板の発見は遅く、赤血球が観察されてから約200年後の1842年にDonné (Donné, 1842) と Addison (Addison, 1842) が初めて血小板の存在を示唆した。続いて、1874年にWilliam Oslerにより初めて血小板に相当する細胞が観察された (Osler, 1873)。その後、1882年にイタリア人の病理学者であるGiulio Bizzozeroにより止血に対する血小板機能、さらには骨髄中での血小板産生が報告された (Bizzozero, 1882)。1904年、James Homer Wrightによる細胞染色技術(Wright-Giemsa染色)が確立されると、それまで顆粒球や赤血球の核片、蛋白質沈殿物、多能性前駆細胞、或は寄生虫だと考えられていた血小板の同定が容易になり、血小板が骨髄中に存在する巨大な細胞がちぎれて産生される恒常的に存在する細胞であることが示された (Wright, 1906)。

一方、血小板の前駆細胞である巨核球は1864年にRobin (Robin, 1864)によりその存在が報告され、1891年にHowell (Howell, 1891)により骨髄中に局在する大きな細胞は「巨核球」と名付けられた。骨髄中に含まれる巨核球数は0.1-0.5%程度と非常に少ないため (Bentfeld-Barker and Bainton, 1982)、分離、培養が困難であり血小板の産生機構は長らく未解明であった。しかし、1994年になると5つのグループから血小板産生因子トロンボポエチン (Thrombopoietin : TPO) が同時にクローニングされ (Sohma et al., 1994; Kuter et al., 1994; Kaushansky et al., 1994; Sauvage et al., 1994; Lok et al., 1994; Bartley et al., 1994)、*in vitro*において巨核球、血小板の産生が可能となり、それぞれの細胞の特徴及び、分化系譜の一端が解明されるようになった。

(2) 血小板の機能

脳梗塞や心筋梗塞といった血栓形成において中心的な機能を担う血小板の止血

機構は、詳細に解析が進められてきた。血栓構築において、血小板は中心的な役割を担っている。血小板は血管損傷部位に集積し、血小板血栓を形成する(一次凝集)。その後、血小板から放出された顆粒の作用により、フィブリン血栓と呼ばれる強固な血栓が形成される(二次凝集)。この血小板の活性化機構や凝集機構は複雑な過程を経ている。血小板の細胞膜上には細胞接着因子のグリコプロテイン IIb と IIIa の複合体 (GPIIb/IIIa) やフォン・ヴィルブランド因子 (von Willebrand Factor : vWF) の受容体である GPIb を発現している。血管損傷が起こると、露出したコラーゲンに血液中の vWF がコラーゲンに結合する。この vWF を血小板の GPIb, GpIIb が認識して、血小板が損傷部に集積する。さらに、血小板は活性化して形態を変化させ、球状の血小板は触手を伸ばしていく。最後に Ca^{2+} 、アデノシン二リン酸 (Adenosine diphosphate : ADP)、アデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate : ATP)、セロトニンを含む濃染顆粒、血小板第 4 因子 (platelet factor 4 : PF-4)、vWF を含む α 顆粒が血小板から放出される (McNicol and Israels, 1999; Rendu and Brohard-Bohn, 2001)。顆粒に含まれる ADP、セロトニン、 Ca^{2+} 等により血小板が活性化すると GPIIb/IIIa の高次構造が変化してフィブリノーゲンと結合して強固な血栓を構築する (Versteeg et al., 2013) (図 1-2)。体内において血栓が存続、拡大すると血管が閉塞し組織の壊死に繋がるが、繊維素溶解現象(線溶)により血栓が溶解される。本反応において、中心的な役割を担う因子がプラスミンである。組織型プラスミノゲンアクチベーター (Tissue plasminogen activator : t-PA) によりプラスミノゲンからプラスミンが産生され、フィブリンが分解される (Rijken and Lijnen, 2009)。一方、血小板は活性化に伴い、線溶阻害因子であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (Plasminogen activator inhibitor-1 : PAI-1) を放出し、血栓形成を促進していると考えられている (Booth et al., 1988)。

近年、血小板の止血能以外の機能も徐々に明らかとなってきた。血小板上に発現する Toll 様受容体は病原体関連分子パターン PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) を認識すると、好中球に結合して好中球の貪食促進、細菌を捕獲する細胞外構造体 (Neutrophil Extracellular Traps : NETs) の放出を促進させる (Andonegui et al., 2005; Clark et al., 2007)。また、肝臓中の洞様毛細血管に局在するクッパー細胞は、細菌を捕えると vWF を活性化させて血小板の接着を促す。このとき、血小板から

抗菌因子が放出される。このようにして、血小板が自然免疫防御系に寄与している (Wong et al., 2013)。他にも、直接固形がん細胞に接着した血小板中の TGFβ 作用により、相乗的ながんの転移に関与する TGFβ/Smad シグナルと NF-κB シグナルを活性化させるなど、がんと血小板の関わりも報告されている (Labelle et al., 2011)。

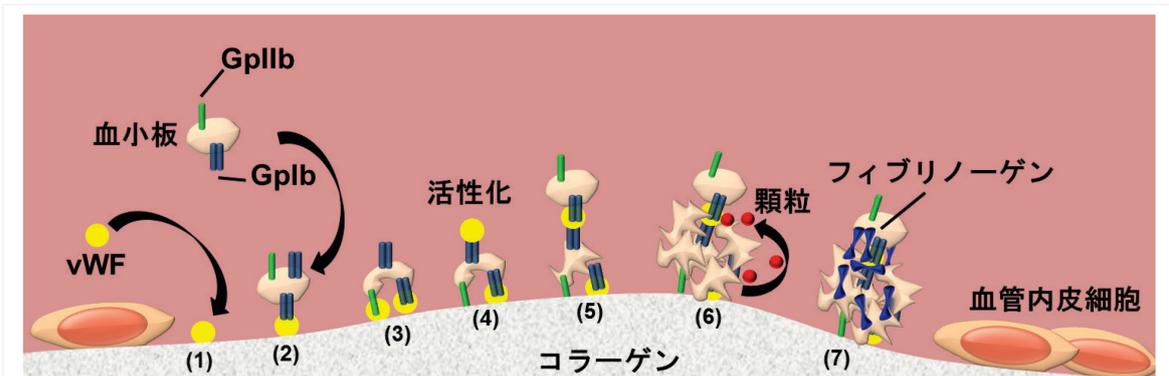


図 1-3 血小板の凝集モデル

血管内皮細胞で覆われていたコラーゲンがむき出しになると以下の反応が進行する。(1) 血中の vWF がコラーゲンに結合する。(2) 血小板の GpIb が vWF を認識する。(3) GpIIb も vWF を認識する。血小板が活性化し、形態を変化させる。(4) 血小板に新たに vWF 等が結合する。(5) 新たに血小板が結合する。(6) 血小板が ATP, ADP, PF-4, セロトニン等を含む顆粒を放出し、血小板同士の結合を誘導する。(7) フィブリノーゲンにより強固な結合が形成される。

(3) 非哺乳動物の止血細胞

多くの無脊椎動物において、血液に相当する体液中には多様な防御機構に關与する細胞が含まれる。カブトガニの体液には1種類のみ細胞が含まれている。本細胞は Amebocyte (アメーバ細胞) と呼ばれる有核細胞であり、細胞質中には多くの顆粒が存在することが知られている。アメーバ細胞は細菌内毒素により活性化されると伸展して、顆粒を放出して凝集塊を構築する。本特性よりも、血小板の起源となった細胞だと考えられている (Levin, 2012)。

脊椎動物の中でも血小板を有するのはヒトやマウスをはじめとする哺乳類だけであり、大半の脊椎動物は紡錘型で有核の栓球が止血機能を担っている。紡錘型の栓球は活性化するとその形態を変化させて、球状となることが *in vitro* を中心とした実験で明らかにされてきた。有核栓球の機能はこれまで、血小板活性化因子である ADP, コラーゲン, トロンピン, Ca^{2+} に対する評価が中心に進められ、動物種により活性化誘導を促す因子が異なることが報告されている (表 1-1)。ADP はゼブラフィッシュやニジマスといった魚類で栓球の活性化を促すが (Jagadeeswaran et al., 1999; Woodward et al., 1981), コイやホシザメといった魚類の他, 栓球機能が解析されている爬虫類や鳥類での活性化誘導は認められていない (表 1-1)。本知見は有核栓球の止血機構の多様性を示す他, 血小板への進化を考えていく上で重要なものとなる。上記で記したアメーバ細胞, 有核栓球の機能から, これらの細胞が血小板へ進化したと考えられるものの, 有核栓球に関する知見は乏しく, 結論づけるまでの結果は得られていない。

表 1-1 各動物種における栓球活性化因子

生物種	ADP	コラーゲン	トロンピン	Ca^{2+}	参考文献	
魚類	ゼブラフィッシュ	+	+	+	N.D	Jagadeeswaran P et al. Br J Haematol. 1999
	ニジマス	+	+	+	N.D	Woodward JJ et al. Comp Biochem Physiol A. 1981
	コイ	-	+	+	N.D	Belamarich FA et al. Nature. 1968 Nakayasu C. Vet Immunol Immunopathol. 1997
	ホシザメ	-	N.D	+	N.D	Shepro D et al. J Cell Sci. 1969
爬虫類	ウミガメ	-	+	+	N.D	Morgan DA et al. Tissue Cell. 2009
	アカミミガメ	-	N.D	+	N.D	Belamarich FA et al. Nature. 1968
	アメリカアリゲーター	-	N.D	+	N.D	Belamarich FA et al. Nature. 1968
両生類	アカハライモリ	N.D	N.D	N.D	+	Kawa K. J Physiol. 1987
鳥類	ニワトリ	-	+	+	N.D	Belamarich FA et al. Nature. 1968 Lacoste-Eleau AS. Exp Cell Res. 1994

N.D: Not done

1-1-4. 白血球

白血球は生体防御において中心的な機能を担っている。白血球は顆粒球と、リンパ球、単球に分類され、それぞれ作用の異なる生体防御機構を有している。ヒト成人男性において、白血球に占める顆粒球の割合は、それぞれ、好塩基球 0.2-0.9%、好酸球 2.4-3.7%、好中球 49.2-58.9%となっている。また、リンパ球は 30.3-40.5%、単球は 3.3-6.2%となっている（渡邊ら, 2000）。

(1) 白血球の発見の歴史と機能

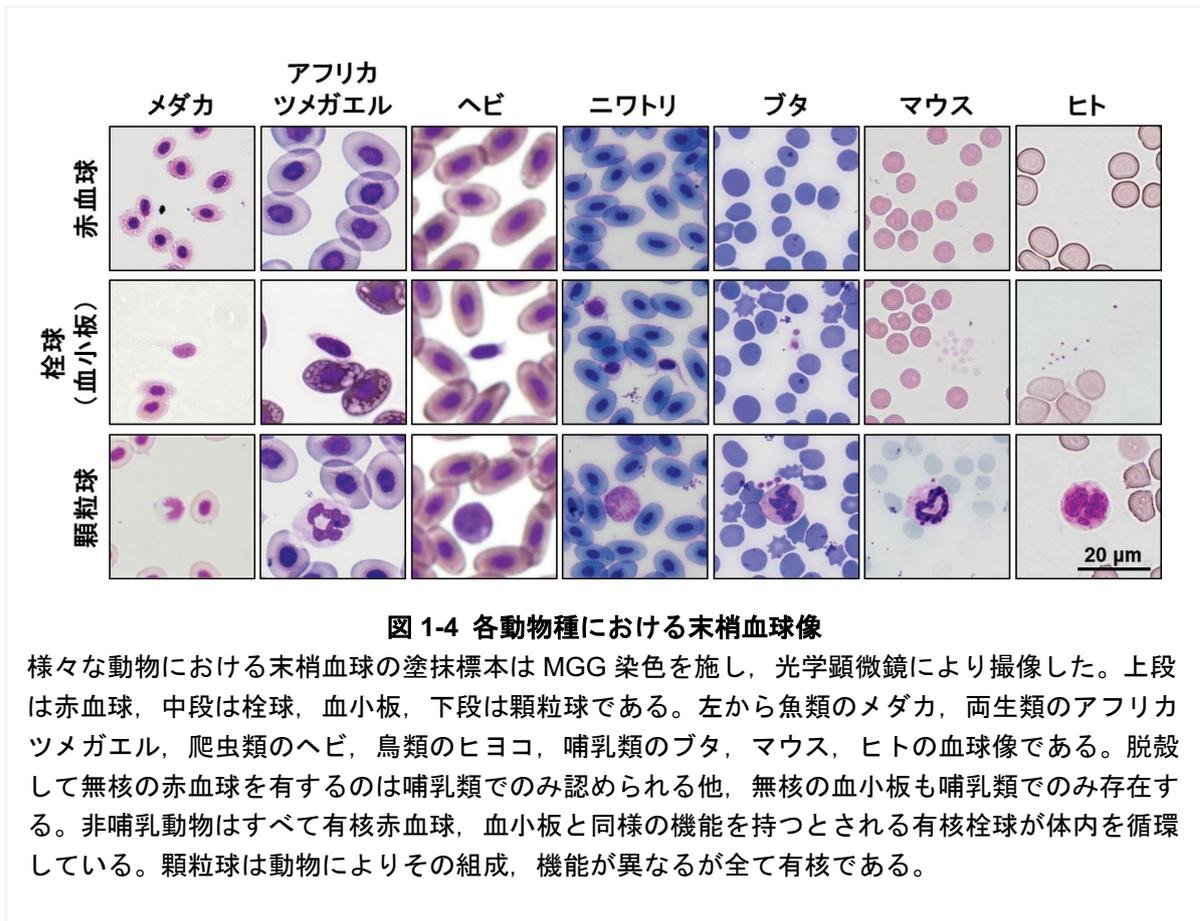
現在リンパ球、単球、好酸球、好中球に分類されている細胞は 1865 年に Schultze により初めて分類された（Schultze, 1865）。細胞数が少ない好塩基球は他の顆粒球から遅れて 1879 年に初めて存在が確認された（Ehrlich, 1879）。各種顆粒球はその後、機能解析が進められ、好中球は遊走、貪食、殺菌、消化機能があり、生体防御に中心的な機能を有することが示された（Witko-Sarsat et al., 2000）。好酸球は、好中球同様、遊走、貪食、殺菌能を有する他、炎症反応する関与も報告されている（Marone et al., 2005）。また、好塩基球はアレルギーや炎症に関与する他、生体防御に関する機能も担っている（Stone et al., 2010）。現在の造血幹細胞の移植系において、患者とドナーにおけるヒト白血球抗原（Human Leukocyte Antigen : HLA 抗原）の一致が幹細胞の生着に不可欠であるが、本抗原は 1954 年に同定された（Dausset, 1954）。

(2) 非哺乳動物における顆粒球

赤血球、栓球は哺乳類と非哺乳類で無核、有核といった違いがあったのに対して、顆粒球はそれぞれ白血球の中で占める割合こそ違うものの、形態は類似している。様々な動物種における末梢血球像は図 1-4 に示した。

ウシガエル、ヒキガエル、ツメガエルといった両生類が持つ顆粒球の割合は、哺乳類とは異なり好中球が必ずしも大半を占めるわけではなく、好酸球などの割合が高く（Mitruka BM, 1981; Hadji-Azimi et al., 1987）、生存環境に適した生体防御を行っていることが推察される。一方、魚類でもゼブラフィッシュでは好中球、好酸球、好塩基球を有しているが、ヨーロッパヘダイにおいて、好塩基球は稀な細胞であり

(Zuasti A and C, 1988), メダカなど 3 種類の顆粒球をもたない魚類も多く報告されている。



1-1-5. アフリカ ツメガエルにおける造血

アフリカツメガエル（ツメガエル）の血球造血に関しては 1987 年に Hadji-Azimi らにより初めてまとめられた。Hadji-Azimi らは末梢血球、臓器内の血球アトラスを作製し、血算値、臓器毎に分布する血球前駆細胞数を報告した (Hadji-Azimi et al., 1987)。形態学的な分類でしかないものの、赤血球系細胞、栓球系細胞、好酸球、単球系細胞は肝臓、好塩基球、B 細胞は脾臓、好中球は骨髄、T 細胞は胸腺で主に検出されている (表 1-2)。その後、ラット TPO がツメガエル TPO に作用して初期発生時において造血幹・前駆細胞に作用することが示唆された (Kakeda et al., 2002)。ツメガエルの造血因子については、2005 年に初めて EPO 受容体 (EPOR) がクローニングされた。ツメガエル EPOR (x/EPOR) の細胞外領域を大腸菌で発現させ、*in*

vivo 投与すると赤血球数が減少した。本知見は、*x*/EPOR が体内の EPO と結合することにより赤血球数が減少したことが考えられ、ツメガエル EPO (*x*/EPO) は赤血球造血を誘導することが示唆された。同時に、ツメガエルに溶血性貧血を誘導するフェニルヒドラジン (Phenylhydrazine : PHZ) を投与すると、ツメガエルは溶血性貧血を呈することが示されている (Aizawa et al., 2005)。EPO がクローニングされるとツメガエル組換え体 EPO (*x*/EPO) を用いたコロニーアッセイにより、哺乳類同様に *x*/EPO/*x*/EPOR シグナルを介した赤血球産生が肝臓、脾臓で行われていることが実証された (Nogawa-Kosaka et al., 2010, 2011)。一方、肝実質細胞から産生される *x*/EPO は哺乳類 EPO と異なり糖鎖を有さないため、安定的に血液循環するのが困難である (Nagasawa et al., 2015)。よって、ツメガエルではエンドクライン (傍分泌) による赤血球造血がおこなわれていると考えられている (Nogawa-Kosaka et al., 2011)。また、*x*/EPO を使ったコロニーアッセイでは、肝臓細胞から産生されたコロニーはヘモグロビン合成した赤芽球から構成される赤血球系コロニーが出来るのに対し、脾臓から形成されるコロニーはヘモグロビン合成した赤い細胞と、無色の細胞から構成されるヘテロな細胞集団であった。よって、分化段階が異なる細胞が臓器により局在していることが示唆された。その後、実際に未分化な細胞の特徴であるスローサイクリング細胞は脾臓ではなく、肝臓に局在していることが示された。本細胞は肝臓の類洞内壁に局在していたが、本細胞が造血系の細胞であるか今後の検証が期待される (Okui et al., 2013)。

ツメガエルの造血モデルの利点としては環境応答に敏感な点である。両生類は外温動物であり、常に環境刺激に曝されており、生理応答も同様に環境に応じて変化している (野川, 加藤, 2006; 前川, 加藤, 2014; 加藤, 2014a; b; Nunomura et al., 2015; Maekawa and Kato, 2015)。ツメガエルを通常飼育下の 23°C から 5°C に暴露すると、汎血球減少症が惹起される。赤血球減少は、赤血球前駆細胞の数は増加するが、肝臓外に流出しなく、同時に肝臓内での赤血球破壊が亢進することによる減少であることが報告された (Maekawa et al., 2012)。5°C 暴露個体の肝臓内で起こっている現象を LC-MS により検証すると、糖新生に関連するタンパク質群が同定された。グルコース量は肝臓では減少しているが、血漿のグルコース量が増加していたことから、5°C 環境下で肝臓ではグリコーゲンが分解されるがグルコース産生ではない目

的に使用されていることが推察された (Nagasawa et al., 2013)。本モデルは、機序こそ未解明な点が多く残されているが、造血の環境応答を解析していく上で有用なモデルとなることが期待される。ツメガエルの造血に関する知見は図 1-5 にまとめた。

表 1-2 ツメガエルにおける造血様細胞の局在

血球系譜	肝臓	脾臓	骨髓	胸腺
赤血球系細胞	+++	-	-	-
栓球系細胞	+++	-	-	-
顆粒球系細胞				
好中球	+	+	+++	-
好塩基球	+	+++	-	-
好酸球	+++	-	-	-
リンパ球系細胞				
B 細胞	+	+++	-	-
T 細胞	-	-	-	+++
単球系細胞	+++	+	-	-

+: 検出臓器, +++: 主要臓器, -: 陰性臓器

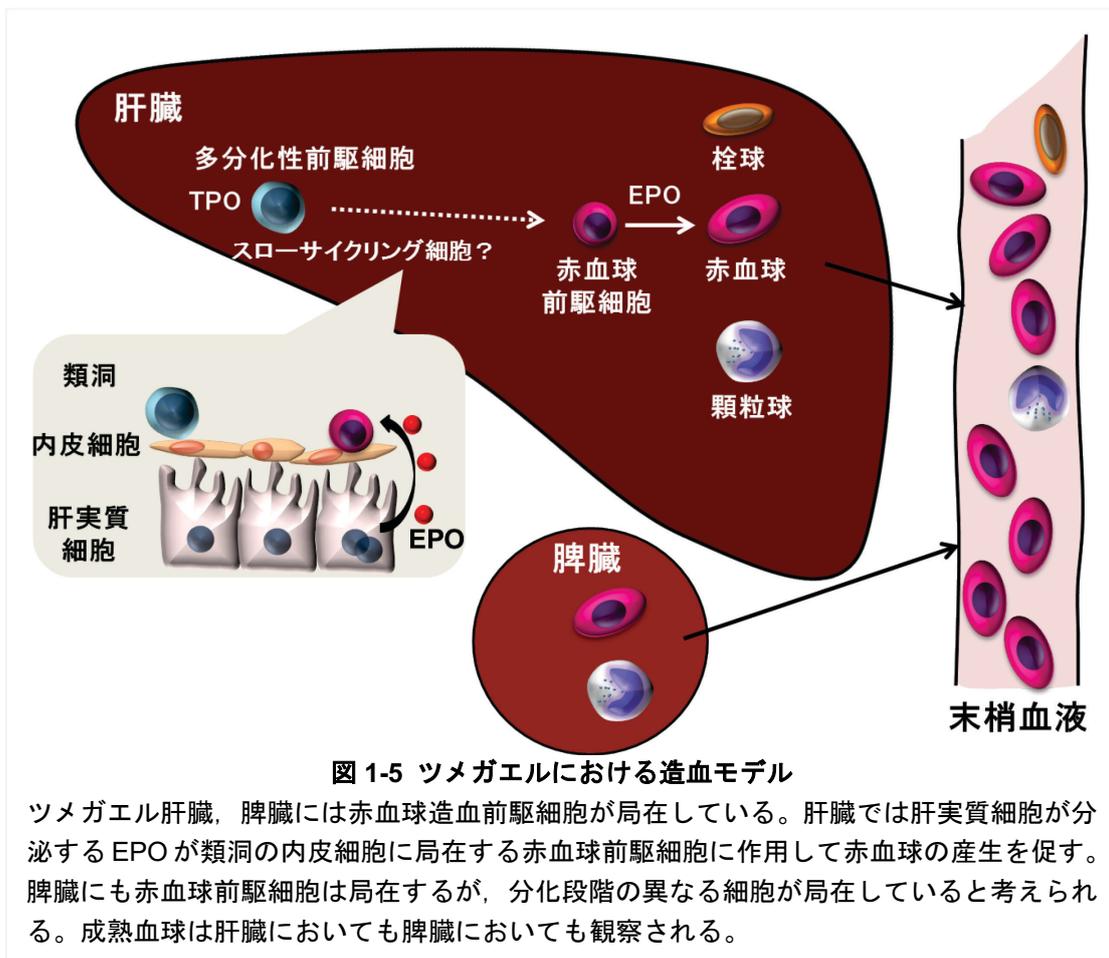


図 1-5 ツメガエルにおける造血モデル

ツメガエル肝臓、脾臓には赤血球造血前駆細胞が局在している。肝臓では肝実質細胞が分泌する EPO が類洞の内皮細胞に局在する赤血球前駆細胞に作用して赤血球の産生を促す。脾臓にも赤血球前駆細胞は局在するが、分化段階の異なる細胞が局在していると考えられる。成熟血球は肝臓においても脾臓においても観察される。

第 2 章 TPO/c-Mpl の機能

2-1. 本研究の背景 II

TPO は造血幹細胞の維持, 増幅, 血小板産生に至るまで幅広く造血に作用する造血サイトカインである (Kato, 2015)。本章では TPO/c-Mpl 系の発見から機能に至るまで叙述した。また, アフリカツメガエルにおける TPO の機能解析における有用性, 新規性について叙述した。

2-1-1. TPO

(1) TPO の発見と臨床応用の歴史

巨核球, 血小板造血に特異的に作用すると想定された造血因子であるトロンボポエチン (TPO) の存在は 1958 年に Kelemen により提唱されているが, 日本国内では Kelemen に先立ち, 1938 年に小宮悦造により, 「トロンボポエチン:Thrombopoëtin」といった言葉が使用されていた (小宮, 1938)。本分子の存在は 1957 年に山元が肝臓, 脾臓で産生される血清中の因子であることを報告しているが (山元, 1957), 1994 年に至るまで本分子の同定はなされなかった。TPO (c-mpl リガンド) 遺伝子は 5 つのグループから同時にクローニングされた。2 つのグループでは血小板減少症を誘導したラット (Sohma et al., 1994; Kato et al., 1995), ヒツジ (Kuter et al., 1994) の血漿から直接精製したタンパク質のアミノ酸配列情報を基に単離されたものであり, 3 つのグループでは TPO の受容体 Mpl に対するリガンドとして, TPO がクローニングされた (Sauvage et al., 1994; Lok et al., 1994; Bartley et al., 1994)。クローニングされたヒト TPO の N 末端側のドメインでは 2 か所のジスルフィド結合が存在し, 立体構造は 4- α -helix bundle である (Feese et al., 2004)。また, N 末端側ドメインは TPO の受容体である Mpl との結合領域を含む活性領域であり, C 末端側ドメインを欠失してもその活性は保たれる (Kato et al., 1997)。本分子の造血作用, 分子構造, 産生機序, シグナル伝達機構などが調べられた一方, 血小板を特異的に増加させる特徴から 1995 年にはヒトを対象とした臨床試験が開始された。臨床で用いられた TPO は全長を動物細胞で発現させた TPO (rHuTPO) と N 末端側ドメイン

を大腸菌で発現させたヒト TPO にポリエチレングリコールを修飾して *in vivo* 活性を増幅させた TPO 製剤 (PEG-rHuMGDF) の臨床試験が行われた。進行がん症例や悪性腫瘍症例を対象とした血小板減少症の患者に rHuTPO, PEG-rHuMGDF をそれぞれ投与すると両者血小板数を増加させることが示されたが (Vadhan-Raj et al., 1997; Basser et al., 1996), 1999 年に同製剤に対する中和抗体が産生された例が報告され, 臨床試験は中止となった (Li et al., 2001)。本製剤は現在第一世代受動態作動薬と呼ばれている。その後も TPO 受容体作動薬の開発が進められ, ヒト免疫グロブリン G1 (Immunoglobulin G1 : IgG1) の Fc 領域とヒト TPO 受容体結合配列を含むペプチドからなる融合タンパク質であるロミプロスチム (Romiplostin : AMG 531) (Cwirala et al., 1997), TPO 受容体の膜貫通領域に特異的な相互作用をして内部にシグナルを伝える低分子エルトロンボパグ (Eltrombopag : AKR-501) (Kuter, 2007) が第二世代受動態作動薬として開発された。第二世代 TPO 受動態作動薬は 2010 年, 2011 年に日本でもそれぞれ製造承認を得て, 現在特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic thrombocytopenic purpura : ITP) 及び再生不良性貧血の治療薬として使用されている。

(2) TPO および Mpl の構造とシグナル伝達系

TPO の受容体, c-Mpl は I 型サイトカイン受容体ファミリーに分類される一回膜貫通型受容体であり, 細胞内にはチロシンキナーゼである Janus Kinase 2 (JAK2) が会合している。c-Mpl は主に巨核球, 血小板, 血管芽細胞, 造血幹細胞に単量体で存在しているが, TPO が結合すると 2 量体を形成して構造を変化させ JAK2 のリン酸化を促す (Tortolani et al., 1995; Miyakawa et al., 1995)。2 量体の安定化にはコレステロール, TPO の結合が関与し, さらには多量体に移行していく (坂本ら, 2011)。リン酸化された JAK2 は Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1, 2 MAPK をリン酸化し, MAPK 経路を活性化させ, 巨核球の核内分裂に関与する (Rojnuckarin et al., 1999)。また, JAK2 の下流にある STAT5 は JAK2 のリン酸化に伴いリン酸化されると二量体を形成して核内へ移行し, cyclin D1, Bcl-xL, p27, p21 の発現を増幅させて生存や細胞増殖に関与する (de Groot et al., 2000; Matsumura et al., 1997)。細胞の生存に TPO/Mpl 系が関与することから, 輸血用血小板の寿命を伸ばすため

に血小板製剤に TPO を添加する試験が進められた。また, JAK2 に結合する SOCS1 や SOCS3 などは, TPO のシグナル伝達を抑制することにより巨核球造血を制御している他 (Wang et al., 2000; Chaligné et al., 2009), JAK-STAT 経路とは独立した PI3K 経路も活性化させシグナルを内部へと伝えている (Miyakawa et al., 2001)。巨核球前駆細胞は上記に記した, シグナル伝達経路により分化核の倍数性が増加した巨核球へと分化, 成熟していく。また, 末梢血小板にも Mpl が発現しており, 血小板凝集作用に対するプライミング効果がある事がわかり, TPO 投与による血栓症発症抑制の機序になっていることが示唆されている (Oda et al., 1996)。以上のように, TPO は巨核球の成熟と造血幹細胞の増幅, 血小板凝集作用のプライミング効果に関与するが, それぞれのシグナルにおける違いに関しては明らかになっていない。

(3) 様々な生物種における TPO

TPO はこれまでにニワトリ, ゼブラフィッシュでのみクローニングおよび機能評価がなされている。ニワトリ TPO は栓球赤血球共通前駆細胞の存在を示し (Bartunek et al., 2008), ゼブラフィッシュ TPO は哺乳類と同様に栓球造血を促すことを示した (Svoboda et al., 2014)。近年, 様々な動物においてゲノムの解読が進められ, 配列情報が蓄積されてきた。機能評価はされていないものの, 配列情報から TPO に相当する分子を抽出すると, 実に 79 種の TPO 様分子が得られる (図 2-1)。ヒト TPO の一次配列はヒト EPO と比較すると 23%一致する。この相同性の高さは分子進化上, 元々同一分子がそれぞれ進化してきたことが考えられる。よって, 下等動物では EPO と TPO の区別がなくなるのではないかといった仮説の元, それぞれの分子の系統樹を作成したところ, TPO の配列情報のある最も下等なゼブラフィッシュでも EPO と TPO はそれぞれ独立していた (図 2-2)。



図 2-1 TPO 様配列の系統樹

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) に公開されている TPO 配列は Clustal Omega and Clustal Phylogeny プログラムを用いて系統樹を作製した。EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) . Tanizaki *et al.* Sci Rep. 2015 より改変。

2-1-2. 巨核球・血小板造血

(1) 巨核球の起源

ヒト、マウスの造血巣は発生段階に伴い移行する。哺乳類の造血発生は発生生物学的に2段階に分かれ、発生初期に卵黄嚢から始まる一次造血と、大動脈-中腎-生殖原器領域 (AGM 領域)、胎盤で開始される成体型造血である二次造血に大別される (Mikkola and Orkin, 2006)。マウスにおいて、一時造血で産生される赤血球は有核であり、成体型赤血球と比較すると体積は4-5倍と大型である。また、胚型血小板においても成体型血小板と比較すると直径が1.6倍程大きくなっている。胚型血小板は微細構造も成体型血小板とは異なり、顆粒が少なく機能的にも未熟であることが推察される (Tober et al., 2007)。また、卵黄嚢内では核の多倍体化した巨核球に先行して2倍体の細胞から血小板が産生される (Potts et al., 2014)。マウスの発生に伴い、受精後7.25日後に赤血球前駆細胞が、9日後には巨核球前駆細胞およびMEPが卵黄嚢内に認められ、10.5日後には血小板の血液循環が観察される (Tober et al., 2008)。血小板が循環する時期において、AGM領域の背側と胎盤では造血幹細胞が出現し、二次造血が開始される。一方で胎児型血球は代謝され、成体型血球へと入れ替わっていく。その後、造血幹細胞は肝臓を経て骨髄へと移行し、生涯にわたり血液細胞を供給し続けるようになる (図2-3)。

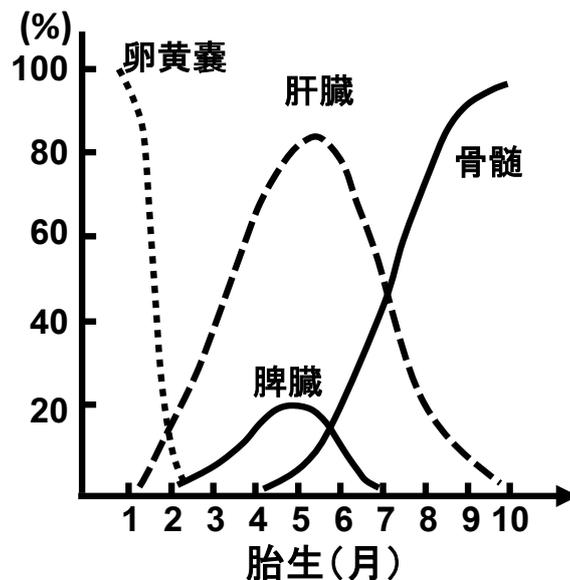


図 2-3 ヒトにおける造血巣の移行

卵黄嚢から始まる二次造血の造血巣の推移。造血巣は卵黄嚢から脾臓、肝臓に推移し、最終的には骨髄に移行して一生涯骨髄を造血巣とする。Williams Hematology, McGraw-Hill Medical 改変。

(2) 巨核球・血小板造血に関与する造血因子

TPO 以外にも巨核球や血小板産生に関与する様々な因子が存在する。造血幹細胞から巨核球前駆細胞への分化には IL-3 (Segal et al., 1988), GM-CSF (Ishibashi et al., 1990), 巨核球の成熟過程には EPO, IL-11 (Broudy et al., 1995), SCF, IL-6 (Debili et al., 1993) 等が関与する。このうち, IL-11 は米国では血小板減少の治療薬として使用されているが, 上記の因子は複数の血球細胞に作用し, 巨核球, 血小板系細胞に特異的に機能するわけではないために, 血小板減少症に対する臨床応用に困難な側面を持っていた。また, ヒトを対象とした血小板数, および容積に関連する全ゲノム関連解析 (Genome-wide association study : GWAS) が行われた。その結果, 従来の研究で血小板数に関与することが知られている TPO などの血小板造血関連因子に加えて, 11 個の新規の血小板数関連遺伝子が同定されるなど, 血小板産生には様々な分子の関与が考えられ, 今後の研究で機能の解明が期待されている (Kamatani et al., 2010)。

(3) 巨核球から血小板の産生機序

巨核球からの血小板産生に関しては非常に複雑な過程を経ている。巨核球は 4N から 156N に至る核が多倍体化した細胞であり, 巨核球の核相に関係なく血小板が産生される。核の倍数性が異なる培養巨核球の遺伝子発現が網羅的に解析されたが, 核の倍数性と血小板産生に連鎖する遺伝子群は見つからなかった (Raslova et al., 2007)。血小板の産生には巨核球が胞体突起を形成し, ちぎれることにより血小板が産生される Proplatelet formation による産生が主に *in vitro* 実験において実証されてきた (Horie et al., 1997)。さらにイメージング技術が高度化すると, 骨髄における *in vivo* での血小板産生方法が分かってきた。巨核球は骨髄の微小血管内に接着して血管内に突起を伸ばしていく。その後, 血流によるせん断力により血小板および包帯突起が末梢循環へと流れていくことが報告された (Junt et al., 2007)。血小板は核がないために分裂するのが不可能であると考えられてきたが, *in vitro* においてヒト血小板の分裂が認められた。分裂した細胞は末梢血小板と同様にタンパク質合成を行い, 機能的なものであることから, 血中に放出された未熟血小板は分裂すると考えられるようになった (Schwertz et al., 2010)。その後, 末梢血液中で球体の

proplatelet は可逆的にバーベル型をした preplatelet となり分裂することが明らかにされた (Thon et al., 2010)。肺繊維症など、肺の炎症時には巨核球は骨髄だけではなく血液中および肺においても観察されることから、肺も血小板産生臓器の一つであると考えられている。巨核球を移植するとマウスの血小板数は上昇し、移植した巨核球の多くは肺に生着していたことから、肺が血小板産生に適した臓器であることが伺える (Fuentes et al., 2010)。微小血管は肺において最も多く、巨核球が断片化する最適な環境であると考えられるものの正常時の造血における肺の血小板産生に関する機能に関しては今後の研究による発展が期待される。

また、血小板が放出される際、巨核球の形態変化がアポトーシスを行う細胞に類似する点が多くあることからアポトーシスと血小板放出との関連性が指摘されてきた。アポトーシスには Bcl-2 ファミリーが機能するミトコンドリアを介する内因性の経路、デスリガンドを介する外因性経路と 2 つの経路が存在するが、成熟巨核球内ではアポトーシス過程を開始させるカスパーゼ-9 およびカスパーゼ-3 の活性が確認されている (De Botton et al., 2002)。一方、アポトーシスを促進する Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) および Bax (Bcl-2-associated X protein) ノックアウトマウスによる解析では、血小板数に変化が見られない (Josefsson et al., 2011)。また、カスパーゼ-9 のノックアウトマウスの胎児肝臓を正常マウスに移植しても血小板産生量には変化がないことから (White et al., 2012)、アポトーシスシグナルと血小板産生との関連性は未解明な問題とされていた。しかし、近年巨核球が血小板の産生方法は 2 通りの報告がなされた (Kowata et al., 2014; Nishimura et al., 2015)。1 つは Proplateletformation であり、もう一つが破裂型血小板造血 (Rupture) である。Rupture による血小板産生はアポトーシスとは異なるもののカスパーゼ活性化を伴ったものであり、本研究により急性期における血小板数の維持機構の一端が解明された (Nishimura et al., 2015)。

(4) 巨核球造血に関与する要素 (転写因子, miRNA)

巨核球、血小板への分化、成熟は転写因子、miRNA が複雑に関与しながら調節されている (図 2-4)。MEP において、分化運命を決定する転写因子が c-Myb である。c-myb の発現は巨核球への分化を抑制することが知られており (Kasper et al.,

2002), 発現量が多いと赤血球系へと分化へ傾斜することが示された (Mukai et al., 2006)。c-myb は miRNA-150 の標的となっており, miRNA-150 を高発現させると c-myb の発現量が低下し MEP 細胞から巨核球が誘導される (Lu et al., 2008)。GATA1 欠損マウスでは前駆細胞が減少する他, 血小板産生を阻害する (Shivdasani et al., 1997)。本知見より, GATA-1 とコファクターである FOG-1 (Friend of GATA) も GATA1 同様に巨核球産生において重要な機能を担うことが明らかとなった (Tsang et al., 1997)。続いて, 転写因子 RUNX1, Fli-1 も欠損すると末梢血小板数が減少して骨髄中に未熟巨核球が認められることから, 巨核球の成熟には GATA-1 に加えて RUNX1, Fli-1 が関与することが分かった (Doré and Crispino, 2011; Hart et al., 2000)。また, CXCR4 を標的とする miRNA-146a の発現は巨核球の成熟を抑制する他, 巨核球が成熟しない 5q-症候群由来の細胞の解析からは Fli-1 や TIRAP を標的とする miRNA-145 の制御系が巨核球の成熟に関与することが報告された (Garzon et al., 2006)。血小板造血の最終段階である巨核球の胞体突起形成および断片化に関しては, NF-E2 (p45-MafG ヘテロ 2 量体) が必須の転写因子である。NF-E2 は Nrf-2 を制御することにより細胞内の活性酸素の蓄積を促進することから, 巨核球を成熟させる環境に酸化ストレスの関連性が指摘されている (Motohashi et al., 2010)。

(5) 巨核球, 血小板の *in vitro* 分化誘導

巨核球, 血小板はこれまでに MEP を介する系と造血幹細胞から直接誘導される系が報告されている (Akashi et al., 2000; Sanjuan-Pla et al., 2013; Yamamoto et al., 2013; Nishikii et al., 2015; Notta et al., 2016)。血小板はこれまでにヒト臍帯血由来幹細胞 (CD34 陽性細胞), マウス骨髄由来造血幹細胞 (CD34 陽性細胞), 巨核球系前駆細胞 (GpIIb/IIIa 陽性 CFU-MK), ES 細胞, iPS 細胞, 脂肪組織などから *in vitro* において誘導されてきた。様々な細胞から巨核球への分化誘導が可能である一方, 誘導された巨核球は出発材料により異なることが分かっている。臍帯血由来造血幹細胞は骨髄, 血液由来の造血幹細胞と比較して TPO に対する反応性が高く, TPO 単独で多くの巨核球系細胞を産み出すが, 成体における造血幹細胞を由来とする巨核球と比較して核の倍数性の低い未熟巨核球となる (Hagiwara et al., 1998)。骨髄および臍帯血由来の造血幹細胞は *in vitro* において維持が難しいこと, 採取できる細胞

数が少ないことから、他の細胞からの誘導方法が確立されてきた。ES 細胞を M-CSF を欠損した大理石病マウス骨髄間質細胞 OP9 細胞と TPO, IL-6, IL-11 含有培地で共培養することで巨核球の形成が促進され、効率よく巨核球を作成することが可能となった (Eto et al., 2002)。得られた ES 細胞由来の血小板は、臨床応用において倫理的な問題、血小板数の安定供給の面での問題があったが、iPS 細胞が作出されると (Takahashi and Yamanaka, 2006)、機能的な巨核球、血小板の産生法が報告された (Takayama et al., 2010)。さらに、iPS 細胞に c-MYC と BMI1 を過剰発現させることにより、巨核球様細胞株を作成し、安定的に大量の血小板が産生される系が立ち上げられた (Nakamura et al., 2014)。一方で、簡易的に大量の血小板を得る方法として、皮下脂肪前駆細胞の一部は巨核球に分化し、機能的な血小板を産生することが報告された (Matsubara et al., 2009)。更には、繊維芽細胞からの巨核球分化、血小板産生も報告された (Ono et al., 2012)。本細胞は患者本人から得られることもあり、再生医療の分野で着目される細胞の一つとなっている。

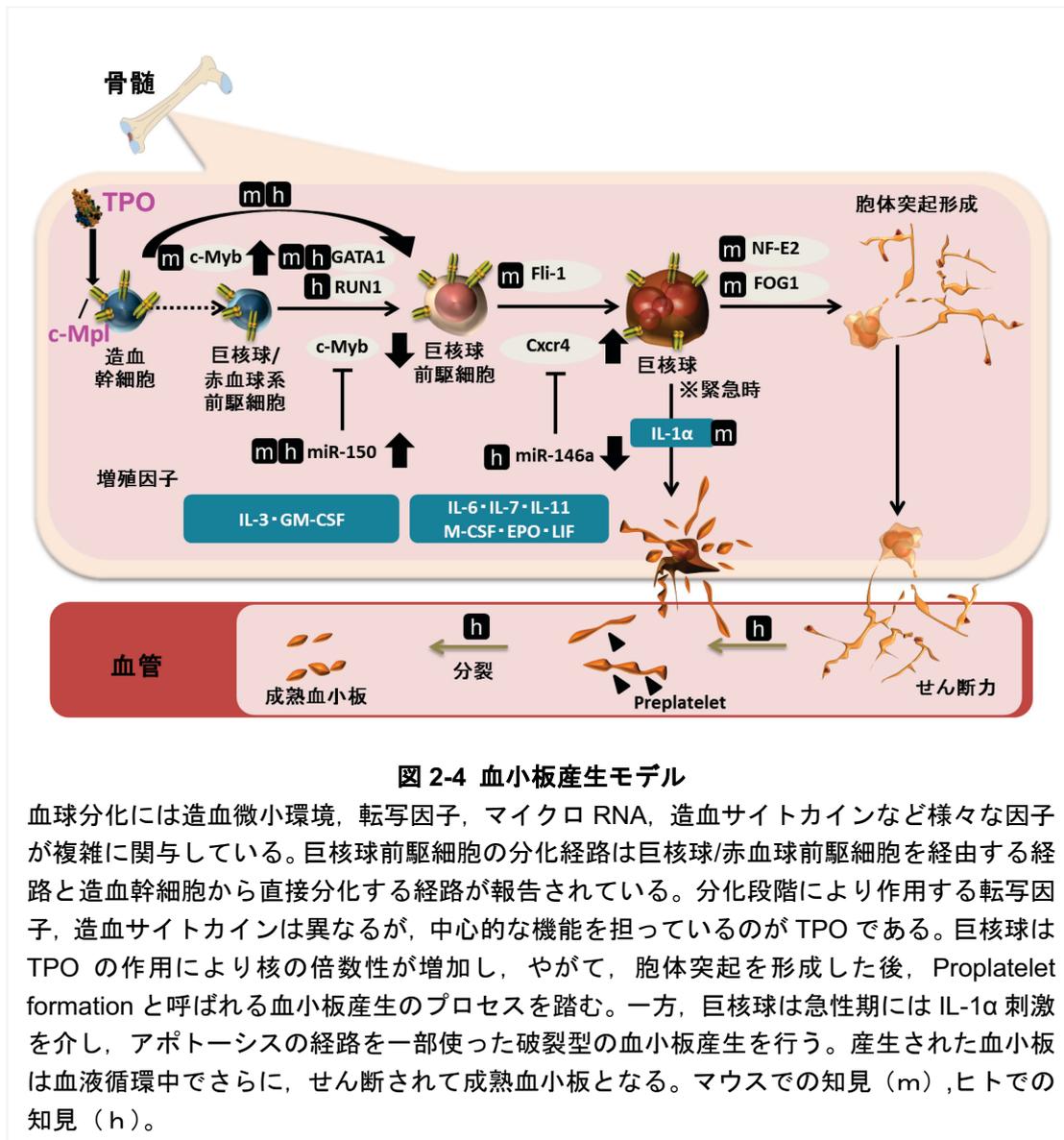


図 2-4 血小板産生モデル

血球分化には造血微小環境，転写因子，マイクロ RNA，造血サイトカインなど様々な因子が複雑に関与している。巨核球前駆細胞の分化経路は巨核球/赤血球前駆細胞を経由する経路と造血幹細胞から直接分化する経路が報告されている。分化段階により作用する転写因子，造血サイトカインは異なるが，中心的な機能を担っているのが TPO である。巨核球は TPO の作用により核の倍数性が増加し，やがて，胞体突起を形成した後，Proplatelet formation と呼ばれる血小板産生のプロセスを踏む。一方，巨核球は急性期には IL-1 α 刺激を介し，アポトーシスの経路を一部使った破裂型の血小板産生を行う。産生された血小板は血液循環中でさらに，せん断されて成熟血小板となる。マウスでの知見 (m)，ヒトでの知見 (h)。

表 1-2: 巨核球造血, 血小板産生に関する論文報告(2000 年以降) 1

トピック	キーワード	作用	動物種	解析動物・細胞等	文献
巨核球の起源	血管芽細胞	巨核球が血管芽細胞前駆体から出現	マウス	血管芽細胞	Tober J <i>et al.</i> Blood. 2007
	c-myb	一次造血に c-myb は関与しない	マウス	c-myb 欠損マウス	Tober J <i>et al.</i> Blood. 2008
網羅的解析	マイクロアレイ	巨核球の成熟度合いにより異なる遺伝子の発現様式をとる	ヒト	ヒト CD34 陽性細胞由来培養巨核球	Raslova H <i>et al.</i> blood. 2007
	GWAS	合計 89 の形質相互関連を抽出。46 の関連は新規, 43 の関連は TPO を含む既知		日本人約 14,700 人の血液学的 8 種・生化学的 12 種の形質	Kamatani Y <i>et al.</i> Nature Gen. 2010
	GWAS	血小板産生に関与すると考えられる 11 個の新規遺伝子を同定	ヒト	血小板	Gieger C <i>et al.</i> Nature. 2011
新規造血因子	低分子化合物	TPO と同様の細胞活性を示す低分子化合物の同定	-	-	Duffy KJ <i>et al.</i> K Med Chem. 2001
	SB-497115	低分子 SB-497115(エルトロンボバグ)の発見	-	-	Luengo JI <i>et al.</i> Blood. 2004
	AMG531 (ロミプレート)	ロミプレートは c-Mpl を介して巨核球造血を促す	マウス	骨髄細胞・BAF3・mTpoR	Broudy VC <i>et al.</i> Cytokine. 2004
	AMG531 (ロミプレート)	ロミプレートによる ITP 患者の血小板数の増加	ヒト	ITP 患者	Bussel JB <i>et al.</i> N Engl J Med. 2006
	エルトロンボバグ	エルトロンボバグによる ITP 患者の血小板数の増加	ヒト	ITP 患者	Bussel JB <i>et al.</i> N Engl J Med. 2007
	Butyramide	Butyramide は <i>in vitro</i> で TPO と同様のシグナルを活性化させ、 <i>in vivo</i> においても血小板数を上昇させた	ヒト マウス	Ba/F3-hMpl	Nogami W <i>et al.</i> Haematologica. 2008
	エルトロンボバグ	エルトロンボバグは JAK-STAT 経路と MAPK 経路を活性化	ヒト	BAF3/hTpoR・骨髄由来 CD34 陽性細胞	Erickson-Miller CL <i>et al.</i> Stem Cells. 2009
	エルトロンボバグ	エルトロンボバグは低リスクで MDS 患者の血小板数を上昇させた	ヒト	MDS 患者	Mavroudi I <i>et al.</i> Leuk Res. 2011
巨核球 血小板の <i>in vitro</i> 誘導法	TPO・IL-6・IL-11・OP9 細胞	αIIbβ3 を発現する巨核球を誘導	マウス	ES 細胞	Eto K <i>et al.</i> PNAS. 2002
	マウス ES 細胞	ストローマ細胞との共培養による血小板産生	マウス	ES 細胞	Fujimoto TT <i>et al.</i> Blood. 2003
	ヒト ES 細胞	ヒト ES 細胞から巨核球を産生	ヒト	ES 細胞	Gaur M <i>et al.</i> J Thromb Haemost. 2006
	メタロプロテアーゼ阻害剤	メタロプロテアーゼ阻害剤による <i>in vivo</i> 機能を有する血小板を産生	マウス	ES 細胞	Nisikii H <i>et al.</i> J Exp Med. 2008
	ヒト ES 細胞	ヒト ES 細胞から機能的血小板を誘導	ヒト	ES 細胞	Takayama N <i>et al.</i> Blood. 2008
	皮下脂肪	皮下脂肪組織から巨核球を分化させ、血小板産生を誘導	ヒト	皮下脂肪由来造血幹細胞	Matsubara Y <i>et al.</i> Biochem Biophys Res Commun. 2009
	c-MYC	c-MYC の一過性発現による機能的血小板の産生	ヒト	iPS 細胞	Takayama <i>et al.</i> J Exp Med. 2010
	c-MYC、BMI1	c-MYC と BMI1 の共発現により iPS 細胞から巨核球様前駆細胞を株化	ヒト	iPS 細胞	Nakamura S <i>et al.</i> Cell Stem Cell. 2014
巨核球造血と 転写因子	Fli-1	NF-E2 は初期の段階で巨核球分化、増殖を促進	マウス	NF-E2 欠損マウス・卵黄嚢	Hart A <i>et al.</i> Immunity. 2000
	GATA1	GATA1 変異を持つヒトは血小板数が減少	ヒト	末梢血球	Freson K <i>et al.</i> Blood. 2001
	p300、c-myb	p300 の KIS ドメインへの c-myb の結合が巨核球の成熟に関与	マウス	p300 変異マウス末梢血球	Kasper LH <i>et al.</i> Nature. 2002
	RUNX1 GATA1	RUNX1 は GATA1 と共発現することで巨核球分化を誘導	ヒト	K562 細胞株	Elagib K. E. <i>et al.</i> Blood. 2003
	c-myb	c-myb の発現量が高いと赤血球系細胞へと分化	マウス	c-myb 欠損マウス・胎児肝臓	Emambokus <i>et al.</i> EMBO J. 2003
	RUNX1	RUNX1 欠損骨髄は巨核球の成熟を阻害	マウス	RUNX1 欠損マウス・骨髄	Ichikawa M <i>et al.</i> Nat Med. 2004
	c-myb	MEP 細胞において、c-Myb が巨核球への分化を抑制	マウス	c-myb ノックダウンマウス・骨髄由来 MEP 細胞	Mukai, H.Y. <i>et al.</i> Mol Cell. 2006

谷崎 祐太, 加藤 尚志. トロンボポエチン受容体作動薬のすべて, 2012 より改変

表 1-3: 巨核球造血, 血小板産生に関する論文報告(2000 年以降) 2

トピック	キーワード	作用	動物種	解析動物・細胞等	文献
巨核球造血と miRNA	マイクロアレイ	巨核球の成熟には miRNA の転写因子への作用が関与	ヒト	骨髄 CD34 陽性細胞由来巨核球	Garzon R <i>et al.</i> PNAS. 2007
	miRNA-150	MEP 細胞の分化誘導に miR-150 が関与	ヒト マウス	骨髄 CD34 陽性細胞	Barroga CF <i>et al.</i> Exp Hematol. 2008
	miRNA-145	巨核球様細胞への分化誘導に miRNA-145 が関与	ヒト	骨髄 CD34 陽性細胞	Kumar MS <i>et al.</i> Blood. 2011 Labbaye C <i>et al.</i> Nat Cell Biol. 2008
	miRNA-125b-2	MEP 細胞、巨核球様細胞の自己増殖、巨核球様細胞への分化誘導に、miRNA-125b-2 が関与	ヒト マウス	胎児巨核球様前駆細胞	Ooi AG <i>et al.</i> PNAS. 2010
	miR-146a	巨核球様細胞への分化誘導に miRNA-146a が関与	ヒト	臍帯血 CD34 陽性細胞・K562 細胞株	Kumar MS <i>et al.</i> Blood. 2011 Hattangadi SM <i>et al.</i> Blood. 2011
巨核球造血と シグナル伝達	c-Mpl	c-Mpl 細胞内領域の C 末端側の 60 アミノ酸を欠失させると、巨核球の産生はされるが造血幹細胞の維持はされなくなる	マウス	c-Mpl-C 末端側 60 アミノ酸欠失マウス	Luoh SM <i>et al.</i> Mol Cell Biol. 2000
	STAT3	STAT3 は巨核球前駆細胞に機能するが、成熟には関与しない	マウス	Stat3 欠失マウス	Kirito <i>et al.</i> Blood. 2002
	LNK	LNK は TPO-Mpl シグナルを阻害し、巨核球産生を制御している	マウス	LNK 欠失マウス・骨髄細胞	Tong W <i>et al.</i> J Exp Med. 2004
	c-Mpl	c-Mpl の細胞内領域の膜に近い領域のシグナルは造血幹細胞の長期維持に機能	マウス	c-Mpl-C 末端側 60 アミノ酸欠失マウス	Tong W <i>et al.</i> Exp Hematol. 2007
	PI3K	PI3K/Akt/FOXO3a 経路が巨核球前駆細胞の細胞周期の進行に寄与	ヒト マウス	UT-7/TPO 細胞株・マウス骨髄由来巨核球	Nakao T <i>et al.</i> Cell Cycle. 2008
	SOCS3	SOCS3 が JAK2 に結合してシグナルを抑制	ヒト	ヒト白血病細胞	Chaligne R <i>et al.</i> Leukemia. 2009
巨核球造血と アポトーシス シグナル	Bcl-xL	Bcl-xL の発現が血小板産生時期に低下	マウス	c-kit+/Lineage- 幹細胞・UT-7/TPO 細胞株	Kozuma Y <i>et al.</i> J Thromb Haemost. 2007
	caspase, Bcl-2	カスパーゼ活性は早期巨核球の分化に関与し、血小板産生には影響しない	マウス	vav-bcl-2 トランスジェニックマウス	Kozuma Y <i>et al.</i> Leukemia. 2009
	Bcl-xL, Bak, Bax	巨核球はアポトーシスを抑制することで血小板を産生させる	マウス	Bak-Bax・BCL-XL 欠失マウス	Josefsson EC <i>et al.</i> J Exp Med. 2011
	Caspase-9	カスパーゼ 9 は巨核球、血小板のアポトーシスを誘導	マウス	Caspase-9 欠失マウス	White MJ <i>et al.</i> Blood. 2012
	Mcl-1, Bcl-xL	Mcl-1, Bcl-xL の組み合わせが巨核球の生存に必須	マウス	Mcl-1・Bcl-xL 欠失マウス	Debrincat MA <i>et al.</i> Blood. 2012
IL-1α	IL-1α により巨核球の破裂型 (Rupture) 血小板産生が誘導される	マウス	二光子顕微鏡	Nishimura S <i>et al.</i> J Cell Biol. 2015	
巨核球造血	vWF	血小板に priming された造血幹細胞が存在する	マウス	Vwf-eGFP BAC 遺伝子導入マウス	Sanjuan-Pla A <i>et al.</i> Nature. 2013
	単細胞移植	造血幹細胞が直接巨核球前駆細胞に分化する	マウス	Kusabira-Orange 遺伝子導入マウス	Yamamoto R <i>et al.</i> Cell. 2013
	CD41, CD42b	CD41+, CD42b+, LSK 細胞は巨核球に分化する造血幹細胞	マウス	1 細胞 PCR	Nishikii H <i>et al.</i> Stem cell. 2015
血小板産生	<i>in vivo</i> イメージング	巨核球は骨髄の微小血管内に接着し、胞体突起はせん断力に切断されて末梢循環へ移行する	マウス	CD41-RYFG ^{Ki+} マウス	Junt T <i>et al.</i> Science. 2007
	血小板	血小板を培養すると分裂し、機能的な血小板が産生される	ヒト	血小板	Schwartz H <i>et al.</i> Blood. 2010
	血小板	血小板は proplatelet と preplatelet と可逆的に変化しながら分裂する	ヒト	血小板	Thon JN <i>et al.</i> J Cell Biol. 2010

谷崎 祐太, 加藤 尚志. トロンボポエチン受容体作動薬のすべて, 2012 より改変

2-1-3. 造血幹細胞

(1) 造血微小環境

造血幹細胞は未分化性を維持させたまま自己複製を行う、多分化性をもつ細胞である。造血幹細胞は細胞周期が回っていない静止期の状態であるが、必要に応じ、自己複製を行い、末梢血球を産生する。この、造血幹細胞の維持や分化制御は造血ニッチと呼ばれる造血微小環境により厳格に制御されている (Morrison and Scadden, 2014)。2003年に骨芽細胞が初めて造血幹細胞のニッチ細胞として報告され、骨芽細胞ニッチの存在が示唆された (Zhang et al., 2003; Calvi et al., 2003)。その後、骨芽細胞の接着因子である N-cadherin, また Angiopoietin-1, Osteopietin といったサイトカイン産生を介して造血幹細胞の静止状態が維持されると報告された (Sugimura et al., 2012; Arai et al., 2004; Nilsson et al., 2005)。造血ニッチ解析が進むと *in vivo* イメージング実験において、ラベルした造血幹細胞、造血前駆細胞は骨芽細胞と接着している状態では観察されないことが分かった他 (Lo Celso et al., 2009)、骨芽細胞除去モデル、増多モデルにおける造血幹細胞数の変動は少ないことが報告された (Visnjic et al., 2004; Zhu et al., 2007; Lymperi et al., 2008)。このような知見から、現在では骨芽細胞ニッチは古典的ニッチとして捉えられているが、骨芽細胞ニッチを軸とした解析により多くの幹細胞の維持、分化に関与する分子の理解が進められた。一方、N-cadherin の造血幹細胞に対する影響に関しては、現在も議論されており結論は出されていない (Kiel et al., 2009)。その後、造血ニッチを構成する様々な細胞が同定されており、内皮細胞 (Kiel et al., 2005)、血管周囲細胞 (Ding et al., 2012)、骨髓間質細胞 (Sugiyama et al., 2006)、間葉系肝細胞 (Méndez-Ferrer et al., 2010)、CXCL12 を高発現する細網細胞 (CXCL12-abundant reticular cell : CAR 細胞) (Omatsu et al., 2014) がニッチを構成する細胞として同定されている。また、近年は巨核球が造血幹細胞のニッチを構成する細胞であることが複数のグループから報告されている (Ingmar Bruns et al. 2014; Meng Zhao et al. 2014; Nakamura-Ishizu et al. 2015)。造血幹細胞を制御する因子はニッチ細胞の同定と共に同定され、CXCL12, SCF, Angiopoietin-1, Osteopietin, さらには TPO (Qian et al., 2007) などが挙げられる。図 2-5 に現在同定されているニッチ細胞の位置関係を図示した。

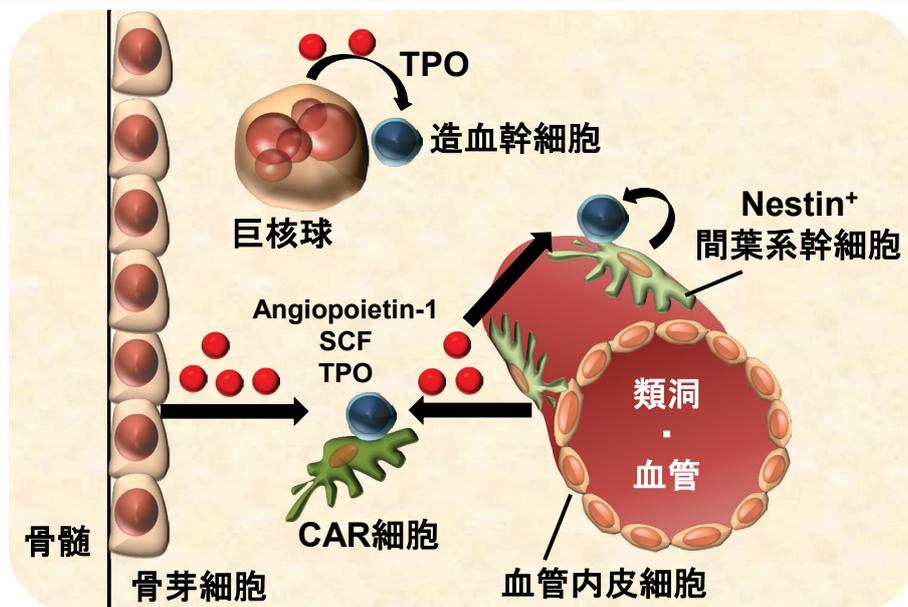


図 2-5 ニッチ細胞の位置関係

マウス骨髄における造血微小環境。造血幹細胞は間葉系幹細胞，内皮細胞，CAR 細胞，巨核球等直接接合して細胞相互作用による影響と骨芽細胞やニッチ細胞から分泌された因子による影響を受ける。

(2) 造血幹細胞の自己増殖

造血幹細胞は臨床への応用が期待され，体外での様々な増殖法が検討されてきた。ヒトの臍帯血由来造血幹細胞は TPO，Flk2/Flt3 リガンド (Flk2/Flt3 ligand : FL)，SCF，IL-6 含有培地で培養することにより，7 カ月以上も細胞を培養することが可能であることが示された (Piacibello et al., 1997, 1999)。また，間葉系幹細胞と造血幹細胞を共培養して増殖させた幹細胞を移植する臨床試験では，造血抑制からの早期回復が得られた (de Lima et al., 2012)。その他にも，SCF，TPO，G-CSF との共培養，Delta1，SCF，IL-6，IL-11，FL との共培養による造血幹細胞の増幅など様々な検討がなされてきた (Dahlberg et al., 2011)。しかしながら，現在までに，骨髄環境を長期に維持させる細胞の維持方法は確立されていない。一方，TPO，IL-6，FLT3，SCF に低分子銅キレート化合物 tetraethylenepentamine (TEPA) 含有培地で細胞を増殖させた後，細胞を移植する臨床試験も進められており (de Lima et al., 2008)，タンパク質以外にも低分子を加えることによる増幅も検討されている。また，ハイスループットなスクリーニングが可能なゼブラフィッシュを用いた研究からはプロ

スタグランディン E2 (PGE2) も造血幹細胞を増殖させる因子として同定されている (Reya et al., 2003)。このように、様々な方法により造血幹細胞の体外増幅研究が展開されている。

2-2. 本研究の目的と概要

本研究では、両生類アフリカツメガエルの造血における TPO/c-Mpl 系が「栓球分化」, 「造血幹/前駆細胞の制御」に与える影響に着目した。組換え体ツメガエル TPO による造血解析を進めた。

2-2-1. 目的

上述してきたように、様々なアプローチによる研究展開により、造血は複雑な過程を経ることが分かってきた。その中でも比較生物学的視点による研究はマウス等を用いた研究では解明できなかった問題を解決してきた。ゼブラフィッシュを用いた造血研究は世代交代が早く、遺伝子改変が容易に出来る特性をいかし、様々な造血疾患モデルが作出され、その発症機序を明らかにしてきた (Dooley, 2000)。ゼブラフィッシュゲノムが解読されると遺伝子の約 70%がヒト遺伝子のオルソログであることが判明し、ヒト疾患モデルを模倣した個体の作出が進められるようになった。このように、新規動物モデルの特性をいかすことで新たな知見が獲得されてきた。しかしながら、個体の小さいゼブラフィッシュモデルが常に生理学研究を行う上で最適なモデルであるとは限らない。アフリカツメガエル (ツメガエル) モデルでは造血の温度応答、新たな EPO の作用様式が観察されてきた。執筆者は有核血球造血の細胞生物学的研究は造血研究に新たな視点を持ち込めると考え、ツメガエル栓球前駆細胞に着目した TPO/c-Mpl 系の解析を進めた。ツメガエル栓球においては、ほとんど解析がなされておらず、本研究ではツメガエル TPO を用いて栓球の性質を明らかにし、その基となる細胞を同定し、栓球造血様式を明らかにすることを目的とした。

2-2-2. 概要

TPO/c-Mpl 系は造血幹細胞の維持、血小板を産生する巨核球の増殖・分化において非常に重要なサイトカインシグナルである。TPO/c-Mpl 系は様々な生物に広く保存されているが、その機能はニワトリ、ゼブラフィッシュで一部が明らかになったに過ぎない。ツメガエルといった細胞生物学的解析が容易な生物を用いることにより、哺乳類と比較して下等な生物における TPO/c-Mpl 系の解析をすることにより、新規の造血機構が明らかになることが期待される他、哺乳類での知見と比較することにより TPO 機能の多様性や普遍性を明らかにすることが期待できる。

(1) 末梢栓球の性質

ツメガエル栓球造血に関して解析を進めるのにあたり、末梢栓球の機能が明らかになっていないため、栓球活性化能力の評価系を構築し、その機能を血小板と比較した。血小板は活性化すると触手を伸ばし伸展するのに対し、末梢栓球は活性化すると紡錘型の形態から球状へ変化するため、リンパ球と混同しやすい問題を抱える。そのため、末梢栓球を検出する方法が必要であり、栓球を含む細胞群を抗原にしてマウスに細胞免疫して得た抗栓球特異的モノクローナル抗体 (T12 抗体) を用いることにより本問題を解決した。さらには、成熟栓球、栓球前駆細胞を認識する T12 抗体を用いて臓器に局在する栓球系細胞を解析し、肝臓の類洞、脾臓の脾洞に栓球前駆細胞が局在することを明らかとした。第 4 章ではさらにその細胞の特性を調べた。

(2) ツメガエル TPO の生物活性

TPO は哺乳類においては血小板産生、造血幹細胞の維持に関与する。一方、非哺乳動物における TPO は相同性が 30%以下と低いのに関わらず、栓球産生に関与することがニワトリ、ゼブラフィッシュで報告されている。しかしながら、その前駆細胞の特徴、さらには造血幹細胞に関する TPO/c-Mpl 系の機能に関する報告はない。よって、第 4 章では大腸菌組換え体 x/TPO を用いて、栓球造血に対する機能を解析した。 x/TPO で誘導した栓球前駆細胞は核の倍数性が増加した哺乳類では巨核球に相当する細胞が出現することが分かり、本細胞の特性、さらには成熟に至る

までの TPO の役割を解析した。核のあるツメガエル末梢栓球には Mpl が発現するため、TPO/c-Mpl 系を解析する上で良いモデルになると考え、TPO の末梢栓球に対する機能を調べた。第 5 章では造血幹細胞に類似する細胞が TPO 単独培養により得られたため、その細胞特性を *in vitro* および *in vivo* 実験において調べ、考察した。一般に造血幹細胞は、放射線照射したマウスモデルに造血幹細胞を移植して、その細胞性質が調べられるが、ツメガエルモデルにおいては系統化された個体が少なく移植実験をするのには困難であった。よって、他家細胞移植系と自家細胞移植系の 2 つの細胞移植モデルを構築し、細胞の生着能、分化能を評価した。

第3章

ツメガエルにおける有核栓球の機能

3-1. 背景

TPO は造血幹細胞の増殖，巨核球成熟に関与する造血サイトカインである。TPO はこれまで哺乳動物以外の脊椎動物ではニワトリとゼブラフィッシュにおいてクローニングされ，機能解析が進められた。ニワトリ TPO は栓球，赤血球共通前駆細胞の存在を示し (Bartunek et al., 2008)，ゼブラフィッシュ TPO は栓球造血においても TPO が中心的に機能していることを示した (Svoboda et al., 2014)。しかしながら，有核栓球に関する理解は乏しく，未解明な点が多く残されている。有核栓球は活性化すると紡錘型の細胞から球状への細胞へと形態を変化させる。活性化した栓球はリンパ球と形態が類似するため，細胞表面マーカーが求められるが (Ellis et al., 1976)，当研究室では栓球認識モノクローナル抗体 (T12) が作製されている (石田ら, 日本動物学会, 2005)。本研究章では，T12 抗体を用いてツメガエル末梢栓球の特徴を明らかにすることを目的とした。本章では T12 抗体を用いて栓球の活性化評価系を構築して栓球の活性化機序を調べ，さらに栓球産生臓器を決定した。

3-2. 材料および実験方法

3-2-1. 動物および採血

アフリカツメガエルは，野生型の成体 (オス，体重 30–40 g) を大内一夫氏 (埼玉県三郷市) より購入した。ツメガエルはプラスチック容器で水温 22°C の循環水，12 時間周期の明暗条件下で飼育し，餌として鯉用餌，成体ウナギ用餌を与えた。採血は網で保定した後，Mylar プラスチック・コートしたヘマトクリット毛細管 (Drummond Scientific Company) に 27G 注射針 (テルモ) を接続した自作の採血器具を使用し，心穿刺により血液を 10–70 μ l 採取する。この際，実験目的に応じ 0.5 M EDTA-2Na，0.5 M EDTA-2K，クエン酸ナトリウム水溶液で通液した採血器具を使用する。採取した血液には採血器具に通液した抗凝固液と同液を最終濃度約 3–5 mM となるように添加，混和する。血算はクリスタルバイオレット溶液 (10% クリスタルバイオレット，0.1 M クエン酸三ナトリウム二水和物，0.4% ホルマリン)

を用いて、トーマの血球計数盤（Hirschmann）により計数した。

3-2-2. 塗抹標本作製および化学染色

末梢血球および単細胞分散した細胞は 10%ウシ胎仔血清（Fetal calf serum; FSC, ベリタス）含有 0.8 × ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（Dulbecco's modified phosphate buffered saline : DPBS）に終濃度が $1-2 \times 10^6$ 細胞/mL になるように調整する。調整した細胞懸濁液 100 μ l を Cytopro 7620（Wescor）にセットし、400 rpm, 5 分の条件で遠心塗抹標本を作製した。May-Grünwald Giemsa（MGG）染色はプロトコルに従い、実施した。スライドガラス上にメイグリュンワルド染色液（和光）を添加し、3 分反応させた後、リン酸緩衝液を等量加え 3 分反応させる。反応液をスライドガラス上から除いた後、ギムザ染色液（和光）中で 10 分間反応させ、流水で洗浄した後、封入した。アセチルコリンエステラーゼ（AChE）染色は、Karnovsky MJ らの手法（Karnovsky and Roots, 1964）を参考に、固定液を 4% ホルマリンアセトン溶液（0.5 M リン酸緩衝液, 4% ホルマリン, 60% アセトン）に改変し、実施した。本染色は用事調整となっており、混合の順番と染色液の pH が重要となる。表 3-1 に従い、最終濃度 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液, 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液, 30 mM 硫酸銅水溶液, 5 mM フェリシアン化カリウム水溶液となるようそれぞれ調整する。アセチルコリンは 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液に溶解しておく。リン酸ナトリウム緩衝液にクエン酸ナトリウム緩衝液を加え、均一になったら硫酸銅水溶液を加える。その後、フェリシアン化カリウム水溶液を加え均一になったら、10 cm ディッシュに注ぐ。ホルマリンアセトン固定された塗抹標本を染色液に浸し、遮光下で反応させる。19 時間後に回収して封入し、観察した。

表 3-1: アセチルコリンエステラーゼ染色液の組成

試薬	(g)	H ₂ O (mL)
リン酸二水素ナトリウム 2 水和物	0.983	75
リン酸水素二ナトリウム 12 水和物	0.43	
アセチルチオコリン	0.05	-
クエン酸三ナトリウム 2 水和物	0.147	5
硫酸銅(II)	0.075	10
フェリシアン化カリウム	0.0165	10

3-2-3. 免疫染色

塗抹標本は 4% ホルマリンアセトン溶液で 30 秒間固定し、流水で洗浄した後、4%ブロックエース（雪印）により室温で 60 分もしくは、4°C で 12 時間反応させた。0.8×トリス塩酸緩衝食塩水（20 mM トリス塩 [pH7.5], 500 mM 塩化ナトリウム, Tris-Buffered Saline : TBS）で 5 分×3 回洗浄する。ゼブラフィッシュでの交叉活性が示されている（Jagadeeswaran et al., 1999）ヒツジ抗ヒト CD41 ポリクローナル抗体（Affinity Biologicals）は 0.4% ブロックエース/0.8×TBS で 1000 倍希釈して、室温で 60 分反応させる。0.8×TBS で 5 分×3 回洗浄した後、ビオチン化抗ヒツジ IgG 抗体（American Qualex）を 0.4% ブロックエース/0.8×TBS で 100 倍希釈して反応させた。洗浄後、1000 倍希釈した StrepTactin-アルカリフォスファターゼ（AP）複合体（Bio Rad）による反応後、発色には 5 mmol/L レバミゾール含有、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸（5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine salt : BCIP）/ニトロブルーテトラゾリウム（Nitro-BT : NBT, 同仁化学）溶液を用いた。また、当研究室で作成された T12 抗体は、T12 ハイブリドーマを CHO 培地（CHO-S-SFM II DPM medium）で培養した上清を回収し、SP sepharose Fast Flow カラム（Amersham Biosciences）を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。精製産物は 0.5 M NaCl 含有 20 mM クエン酸塩緩衝液（pH5.0）に溶解されている。T12 を用いた免疫染色では、0.8×TBS で 5 分間、3 回洗浄し、0.4% Block Ace により室温で 60 分間ブロッキングする。0.8×TBS で 5 分間、3 回洗浄し、T12 および陰性対称となるマウス IgG1 を 0.1 µg/ml となるように 0.4% Block Ace で調整し、スライドガラスに添加して常温で 1 時間、あるいは 4°C で終夜反応させる。TBS で 5 分間、3 回洗浄し、AP 標識抗マウス Ig 抗体（DAKO）を 0.8×TBS で 100 倍希釈して、室温で 1 時間反応させた後、TBS で 5 分間、3 回洗浄し、酵素反応基質液 NBT/BCIP を用いて発色させる。

3-2-4. T12 陽性細胞における巨核球、血小板マーカーの遺伝子発現解析

FACSAria II（BD バイオサイエンス）を用いたフローサイトメトリー法により血球の分離を行う。末梢血球懸濁液は 40 µm ナイロンメッシュ（セルストレーナー, Falcon）を通した後、FACS バッファー（0.8×DPBS, 2% FCS, 2 mmol/L EDTA）で 3

回洗浄し、T12 抗体 (10 µg/ml) と氷上で 30 分反応させる。FACS バッファーで 3 回洗浄後、FACS バッファーで 100 倍希釈したヤギ抗マウス IgG-phycoerythrin (PE) (BD バイオサイエンス) で 30 分反応させ、FACS Aria II により T12 陽性の栓球画分を得る。また、赤血球画分はパーコールを用いた不連続密度勾配遠心分離法により分画を行った。パーコールの終濃度 80%, 70%, 60%, 50%, になるように調整し、15 mL 遠沈管に重層する。0.8×DPBS で 2 倍希釈した血液を重層した後、室温で 500g, 15 分間スイングローターで遠心する。遠心後、沈殿した赤血球を赤血球画分として回収した。各血球は洗浄後、説明書に従って TriPure Isolation Regent (ロシュ・ライフサイエンス) を用いた RNA 抽出を行う。RNA は逆転写により cDNA にした後、PCR による遺伝子発現を解析した。用いたプライマーは表 3-2 に示した。

表 3-2 プライマーリスト

遺伝子	Forward プライマー	Reverse プライマー
<i>cd41</i>	5'-AGCACCGTCACCTTCC-3'	5'--TCCTCTCTTGTTCCAG-3'
<i>fli-1</i>	5'-GGGCTGACCATAATCGGG-3'	5'-GGGCTCTGCTCAACTCACA-3'
<i>epor</i>	5'-AAACTACAGCAATCCTGGGAAGATCC-3'	5'-GTAAACTCCAAGTCCAGCGATTAAGG-3'
<i>gapdh</i>	5'-ATGGTGAAGGTTGGAATTAACGG-3'	5'-GACAGGTGACAGTGCTTATTCC-3'

3-2-5. 栓球における核相解析

肝臓、脾臓細胞は 0.8×DPBS 中で単細胞分散し、細胞懸濁液を得る。5×10⁶細胞のツメガエル細胞は 10 µg/mL の Hoechst33342 (同仁化学) 溶液に 15 分反応させた後、0.8×DPBS で 3 回洗浄し、T12 抗体と反応させる。二次抗体には抗マウス IgG-PE を反応させ、セルストレーナーに細胞懸濁液を通した後、フローサイトメトリー法により T12 陽性画分に含まれる DNA 含量を解析した。解析結果は FlowJo (version7.6.5; Tree Star Inc.) を用いて再解析した。

3-2-6. 栓球活性化実験

5 µl のクエン酸加血液に 1 µl の 10 mmol/L CaCl₂ (ナカライテスク), 10 mg/mL ブタ皮膚由来コラーゲン溶液 (日本ハム), 10 mg/mL ニワトリ軟骨由来コラーゲン溶液 (日本ハム), 5 mg/mL ウシ皮膚由来 (高研), 1 mol/L ADP (Sigma), 10 units/mL トロンビン (Amersham Bioscience) をそれぞれ加える。また、陰性対象として活性

化阻害剤である prostaglandin E1 (Sigma) を 2.8 mmol/L の濃度で 1 μ l 添加する。20 分反応させた後、塗抹標本を作製し、T12 免疫染色を施した後、非活性型の紡錘型 栓球と活性型の球状の栓球の割合を算出した。統計は統計解析ソフト 4Steps エクセル統計 Statcel により処理した。

3-3. 結果

3-3-1. ツメガエル末梢栓球の形態と染色性

紡錘型のアフリカツメガエル栓球は活性化すると球状となり、リンパ球との判別が困難となる。そこで、細胞の形態を識別する基本的な染色法である、MGG 染色 哺乳類巨核球、血小板を染色する AChE 染色、ヒト CD41 ポリクローナル抗体による免疫染色を施した。採血の刺激により、紡錘型の栓球が活性型に変化することも考えられるので、採血による栓球活性化が起こっていないことを MGG 染色により確認した (図 2-1A)。マウス、ラット、ネコの巨核球を特異的に染色するアセチルコリンエステラーゼ染色 (Tranum-Jensen and Behnke, 1981) は、ツメガエルにおいても末梢栓球を特異的に認識した (図 3-1B)。さらに、活性化している栓球においても他の細胞と識別されることが明らかとなった (図 3-1C)。ヒツジ抗ヒト CD41 抗体はゼブラフィッシュ同様にツメガエル末梢栓球も認識し、CD41 の構造は種間において広く保存されていることが推察される (図 3-1D)。

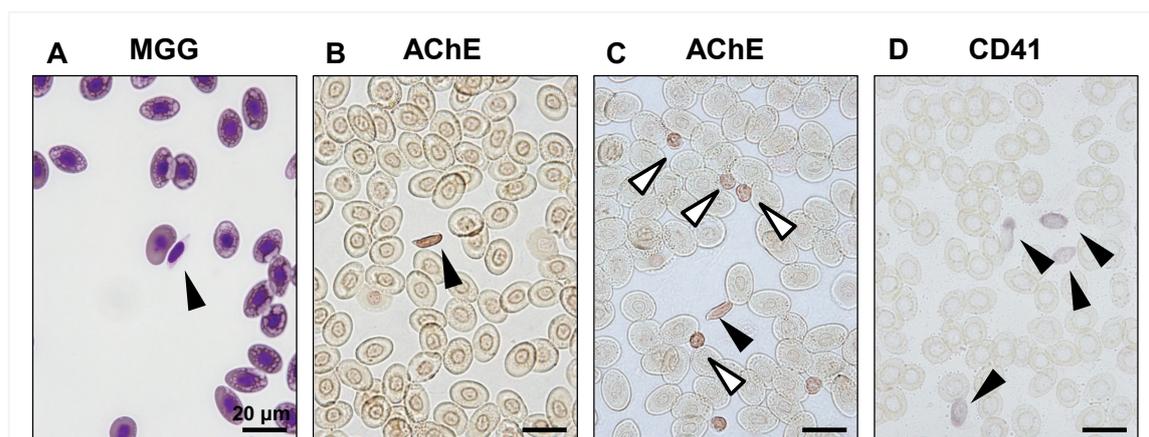


図 3-1 ツメガエル末梢栓球像

ツメガエル末梢血球の塗抹標本の (A) MGG 染色 (B,C) アセチルコリンエステラーゼ (AChE) (D) ヒト CD41 ポリクローナル抗体免疫染色。AChE 染色は、活性型、非活性型栓球を認識するが、成熟赤血球も染色される。CD41 による免疫染色は栓球を特異的に認識するものの、特異性が低い。黒矢印：紡錘型栓球，白矢印：球状栓球。Tanizaki *et al.* Exp hematol. 2015 より改変。

3-3-2. T12 モノクローナル抗体の認識細胞

当研究室で作成された栓球，顆粒球認識モノクローナル抗体（T5），抗ツメガエル栓球認識モノクローナル抗体（T12）で免疫染色を実施した。顆粒球を認識する T5 抗体で血液塗抹標本を免疫染色すると，活性化した栓球との判断が困難である（図 3-2A）。一方，T12 陽性細胞は末梢栓球の特徴である紡錘型の細胞を特異的に認識する（図 3-2B）。T12 陽性を示す血球が栓球であることを示すために巨核球，血小板に特異的に発現する遺伝子の発現解析を行った。T12 抗体を用いたフローサイトメトリー法で単離した T12 陽性細胞は CD41，*fli-1* 遺伝子を発現していた。一方，T12 陰性画分には上記の遺伝子発現は認められなかったが，赤血球特異的遺伝子である *EPOR* 遺伝子の発現が認められた（図 3-2C）。本結果より，T12 は末梢栓球を特異的に認識していることが明らかとなり，T5 抗体と組み合わせることにより，ツメガエル栓球，顆粒球，赤血球を識別，分画可能となった。

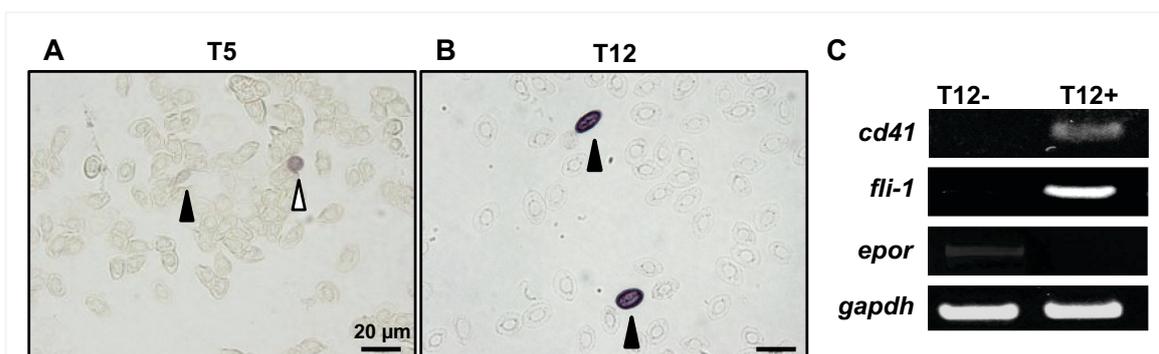


図 3-2 メガエル末梢栓球における T12 陽性細胞

(A) T5 抗体によるツメガエル末梢血球の免疫染色像 (B) T12 抗体によるツメガエル末梢血球の免疫染色像。黒矢印：栓球，白矢印：顆粒球 (C) ツメガエル末梢血球における T12 陽性細胞に発現する遺伝子解析。T12 陽性細胞には巨核球マーカーの CD41，*Fli-1* 遺伝子発現が認められ，赤血球マーカーの *epor* の発現は T12 陰性画分でのみ認められる。Tanizaki *et al.* Exp hematol. 2015 より改変。

3-3-3. 末梢栓球の活性化

T12 抗体が栓球を特異的に認識するため、本抗体を用いた有核栓球の機能を解析した。末梢栓球は温度、せん断応力、傷口への接着など様々な刺激により活性化され、球状の形態へと変化する。よって、栓球が活性化しないよう、注意を払い採血し、血液塗抹標本を作製した。T12 を用いて免疫染色したところ、全栓球数に対して $86\% \pm 7.1\%$ の栓球が紡錘型栓球であった。各種コラーゲン、トロンビン、 CaCl_2 、ADP を反応させると全てにおいてツメガエル栓球は活性化し、紡錘型栓球の割合は $10\% - 30\%$ となった (図 3-3A-B)。血小板活性化因子阻害剤である Prostaglandin E1 を加えると血小板活性化因子の作用が阻害され、紡錘型栓球の割合が Prostaglandin E1 非添加群と比べて優位に高いことが明らかとなった。本結果はツメガエル栓球の活性化機構が哺乳類血小板と類似することを示している。

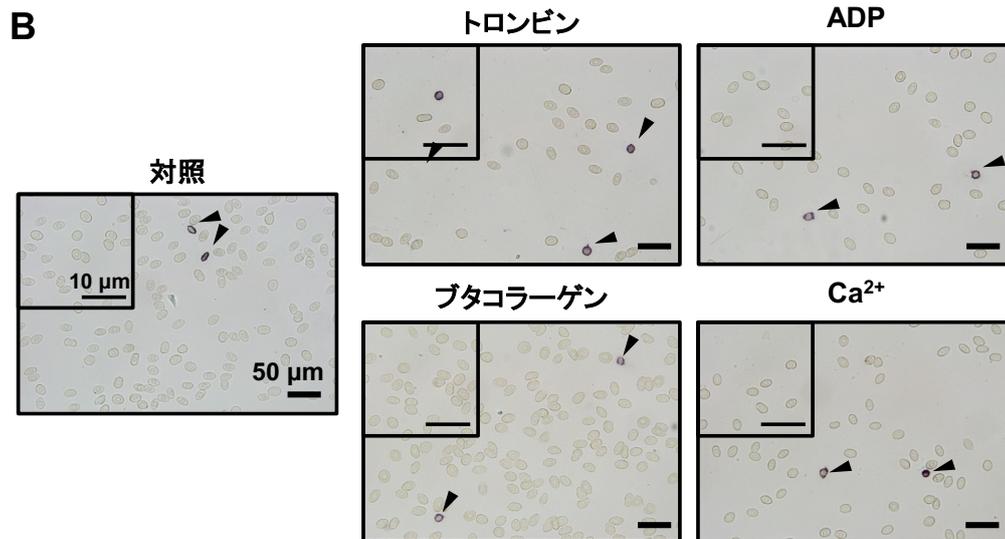
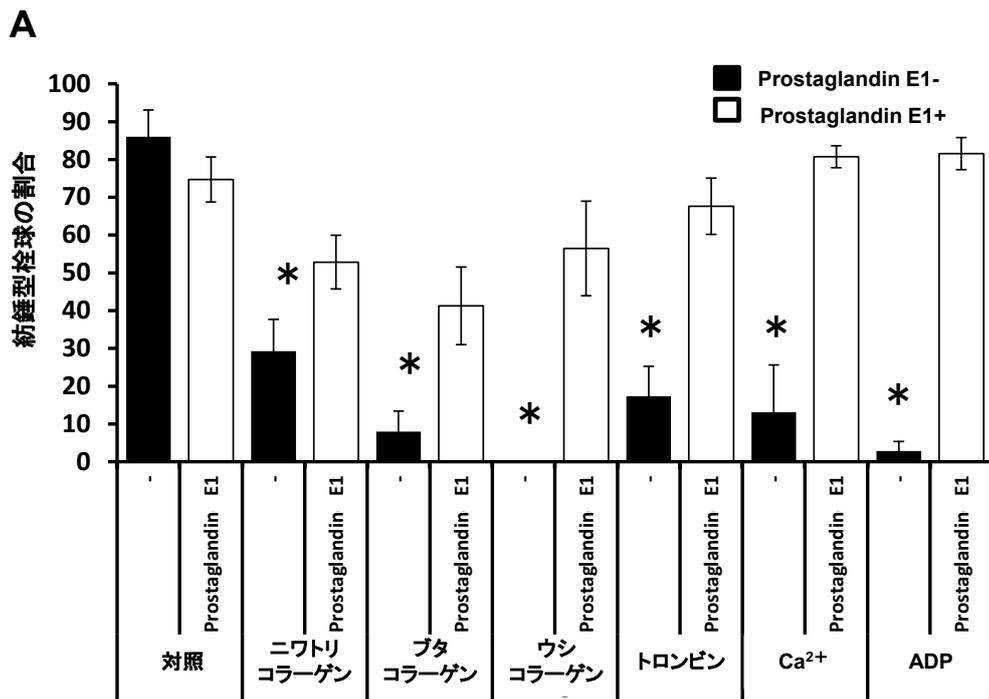


図 3-3 ツメガエル末梢栓球の活性評価

(A) ツメガエル栓球は活性化すると形態を変化させ、球状になる。形態を活性化の指標とした。ツメガエル血球は血小板活性化因子と 20 分反応させた後、塗抹標本を作製した。T12 による免疫染色を実施し、全栓球に対する紡錘型栓球の割合を算出した。Prostaglandin E1 添加群は白で、非添加群は黒で示した。CaCl₂、トロンビン、ADP、コラーゲンタイプの異なるブタ皮膚由来コラーゲン溶液、ニワトリ軟骨由来コラーゲン溶液、ウシ皮膚由来コラーゲン溶液全てにおいてツメガエルの栓球は活性化した。*p < 0.05 prostaglandin E1 添加群 vs prostaglandin E1 非添加群。(B) 血小板活性化因子 (ブタコラーゲン、トロンビン、Ca²⁺、ADP) 添加後の末梢栓球像。黒矢印：T12 陽性細胞。Tanizaki *et al.* Exp hematol. 2015 より改変。

3-3-4. ツメガエル肝臓，脾臓内における T12 陽性細胞の性質

ツメガエル T12 陽性細胞，T5 陽性細胞の分布を解析するため，単細胞分散した肝臓，脾臓由来の細胞を T12 免疫染色，およびフローサイトメトリー解析による割合を計数したところ，脾臓，肝臓と共に T12 陽性細胞が検出された。また，脾臓の大半の細胞は白血球，栓球系細胞で占められていることが明らかとなった（表 3-3）。続いて，ツメガエルの T12 陽性細胞の組織局在を解析するために脾臓，肝臓を免疫染色した結果，脾臓では脾洞，肝臓では類洞にそれぞれ陽性細胞が検出された（図 3-4A-B）。脾臓に存在する T12 陽性細胞を肝臓由来 T12 陽性細胞と比較すると，脾臓には形態の小さい T12 陽性細胞が局在し，肝臓には形態の大きい T12 陽性細胞が局在することが示された（図 3-4C）。脾臓，肝臓中の T12 陽性細胞に発現する遺伝子を解析した結果，T12 陽性細胞には栓球マーカーである CD41 の発現が認められ，T12 陰性画分には赤血球マーカーである EPOR 遺伝子の発現が認められた（図 3-4D）。本結果から，肝臓，脾臓に局在する T12 陽性細胞の形態は末梢栓球とは異なるものの，栓球系の細胞であることが示唆された。

表 3-3 抗体陽性細胞の割合

	免疫染色		FACS			
	T12+	T5+	T12+	T5+	T5low+	T5high+
末梢血球	2.4 ± 1.0	3.4 ± 0.6	1.5 ± 0.3	3.6 ± 0.6	2.7 ± 0.4	0.9 ± 0.2
脾臓	12.9 ± 0.6	75.7 ± 4.9	10.3 ± 1.1	83.8 ± 0.3	ND	ND
肝臓	3.3 ± 0.2	21.0 ± 2.4	2.0 ± 1.2	19.1 ± 6.7	ND	ND

N.D: Not done

Tanizaki et al. Exp hematol. 2015 より改変。

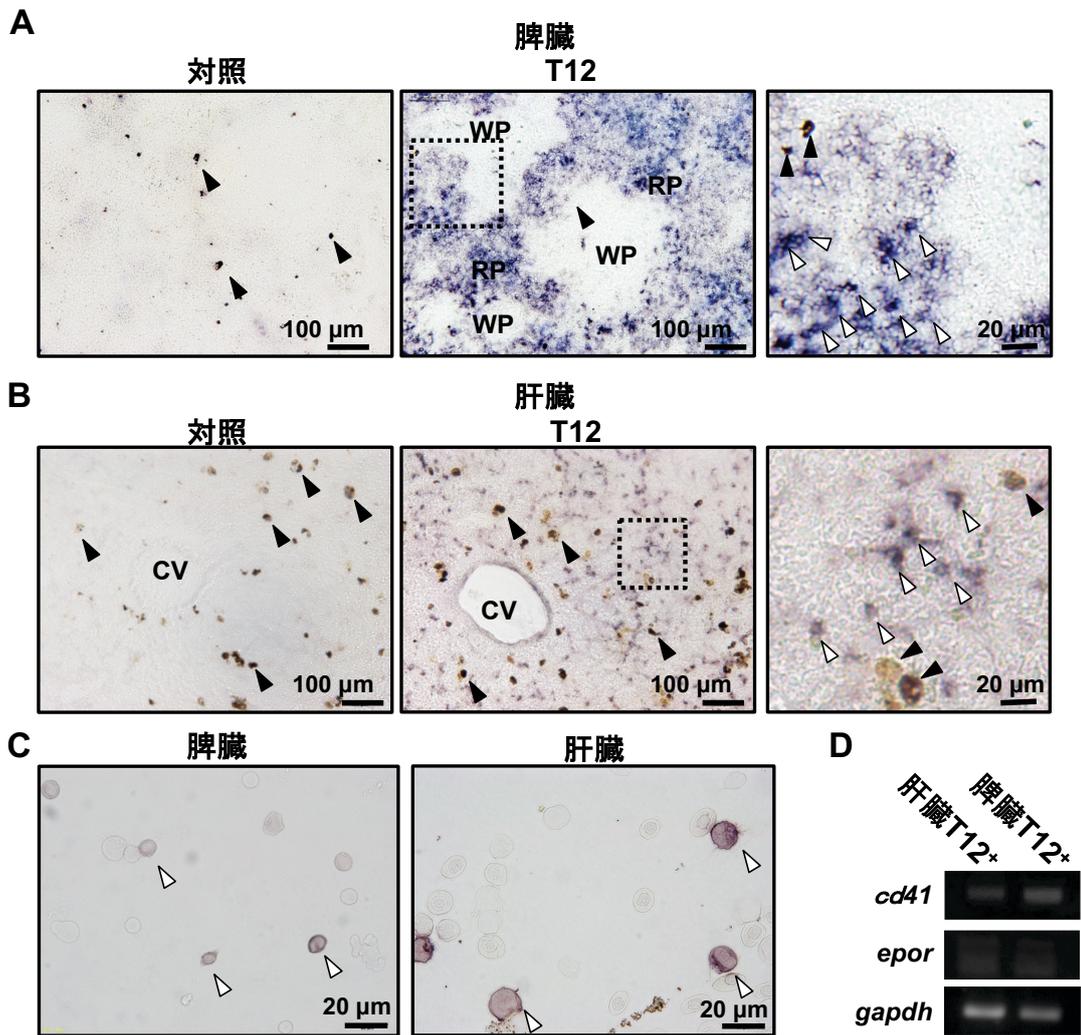


図 3-4 ツメガエル脾臓, 肝臓における T12 陽性細胞

(A, B) 脾臓, 肝臓における T12 陽性細胞の組織内局在。脾臓では T12 陽性細胞は脾洞に検出された。肝臓では類洞に陽性細胞が検出された。(左図) 対照群としてマウス IgG1 を用いた。(右図) 強拡大による撮像。切片: 7 μ m, WP: White pulp (白脾髄), RP: Red pulp (赤脾髄), CV: Central vein (中心静脈) (C) 脾臓, 肝臓内に局在する T12 陽性細胞像。脾臓には形態が小さい T12 陽性細胞が, 肝臓には大きい T12 陽性細胞が検出された。矢印: T12 陽性細胞 (D) 脾臓, 肝臓内 T12 陽性細胞の遺伝子発現解析。T12 陽性細胞は CD41 を発現しているが, epor は発現していない。Tanizaki *et al.* Exp hematol. 2015 より改変。

3-3-5. ツメガエル栓球における核相

有核の末梢赤血球を基準としてツメガエル栓球の核相を解析した。末梢血球は T12 抗体によりラベルを施し, Hoechst33342 による核の染色を行った。その後, フローサイトメトリー法により DNA 含量を測定すると, 栓球は赤血球よりも 2 倍 DNA 含量が多いことが明らかとなった (図 3-5A)。また, 肝臓や脾臓に局在する T12 陽性細胞数は少ないものの, 末梢栓球と比較して 2 倍以上の DNA 含量を有する細胞が存在した (図 3-5B-D)。末梢血球, 脾臓, 肝臓細胞に存在する T12 陽性細胞の核相を比較すると肝臓に核相の高い細胞が多く存在することが明らかとなった。本結果は栓球前駆細胞の性質, 分化段階が臓器により異なる可能性を示した。

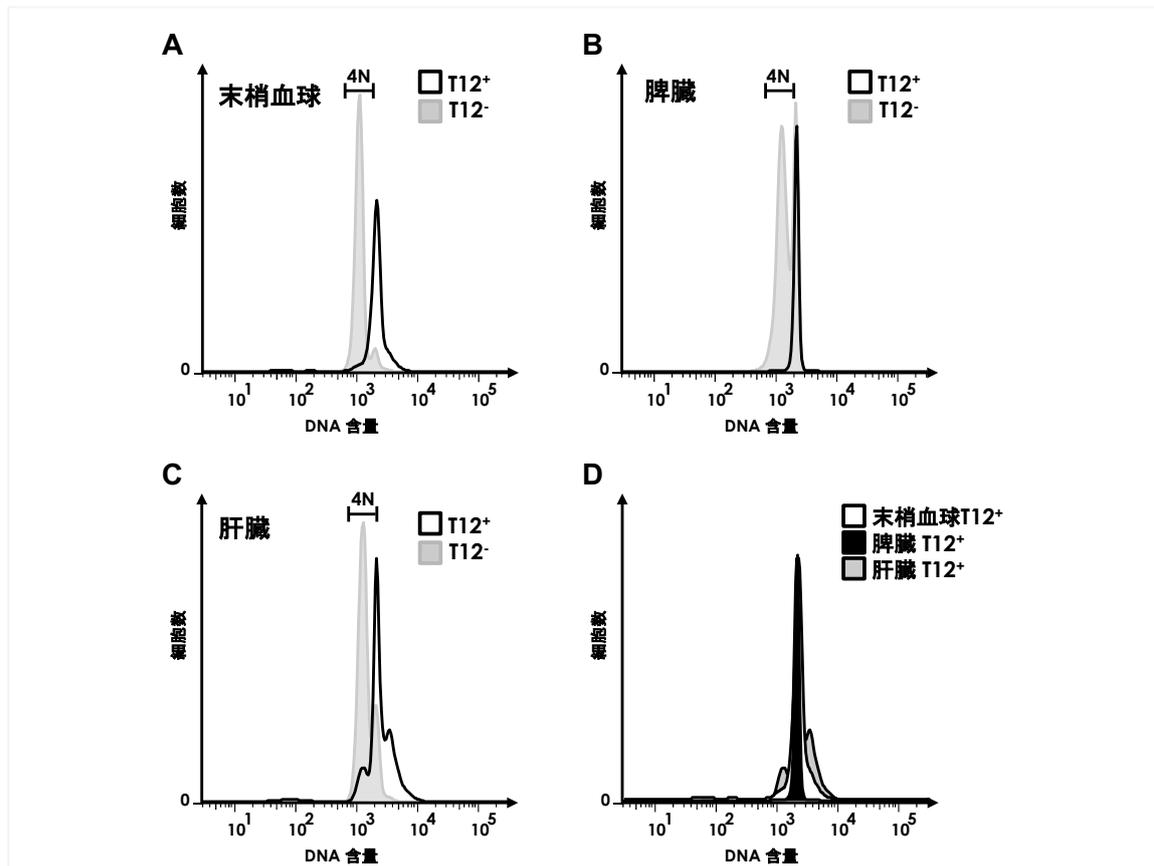


図 3-5 T12 陽性細胞の核相

(A-C) 末梢血球, 脾臓, 肝臓における T12 陽性細胞の DNA 含量。細胞は T12 によるラベルと Hoechst33342 により核を染色し, その蛍光量を DNA 含量とした。灰色: T12 陰性, 黒線: T12 陽性 (D) 末梢血球, 脾臓, 肝臓における T12 陽性細胞の比較。肝臓には脾臓や末梢血球と比較して 2 倍の DNA 含量を有する細胞が多く局在する。白: 末梢血球, 黒: 脾臓, 灰色: 肝臓。Tanizaki *et al.* Exp hematol. 2015 より改変。

3-4. 考察

本研究ではツメガエル栓球の哺乳類が有する、巨核球、血小板との相同性、相違性に着目し、栓球の性質を明らかにしようと試みた。大半の非哺乳動物は血小板の代わりに有核で紡錘型の栓球が止血能を担っている。今日までに、有核栓球機能は鳥類、爬虫類、両生類、魚類で解析が進められ、比較生物学的視点はマウスモデルだけでは解決出来なかった、血小板生物学的な問題を解決してきた (Brass, 2005)。脊椎動物における造血生理応答を理解する上で、血球動態を解析する際に有核栓球、前駆細胞の識別が必須である。実際、ツメガエルは 5°C 環境下に暴露すると、汎血球減少を示すことが報告されている (Maekawa et al., 2012; Nagasawa et al., 2013)。ツメガエル低温暴露モデルでは栓球数が正常値と比較して 60% も減少するが、栓球代謝の機序に関しては栓球、栓球前駆細胞を追跡する手段がなく解析が困難であった。CD41 の構造はゼブラフィッシュ、ナマズ、ニワトリ、ヒトに至るまで広く保存されており (Lacoste-Eleau et al., 1994; Passer et al., 1997)、ツメガエル栓球を検出する方法の一つに、CD41 ポリクローナル抗体を用いる方法が考えられた。ツメガエル CD41 に関してもアミノ酸のヒト CD41 との相同性は 44% あり (Klein et al., 2002)、実際ヒト CD41 抗体はツメガエル CD41 にも交差することが示された (図 3-1D)。しかしながら、CD41 抗体はツメガエル栓球に対する親和性が低く、高バックグラウンドになる問題を抱えた。栓球特異的な抗体はこれまでにニジマス、コイ、ニワトリにより作出されているが (Slierendrecht et al., 1995; Rombout et al., 1996; Horiuchi et al., 2004)、T12 抗体を含めて有核栓球認識モノクローナル抗体は有核栓球の研究を進展させる上で重要な道具になると期待される。

血小板は活性化すると触手を伸ばしていくのに対し、ツメガエル栓球は、血小板活性化因子の刺激により活性化し、形状を球状へと変化させた。鳥類、両生類、爬虫類、魚類の栓球の微細構造を観察すると、膜開放系と呼ばれる巨核球、血小板特有の構造、濃染顆粒と呼ばれる ADP、ATP、セロトニンなどを含む巨核球、血小板特有の顆粒を有している (Daimon and Uchida, 1978; Work et al., 1998; Daimon et al., 1979)。栓球活性評価試験において、ツメガエル栓球は各種コラーゲン、トロンビン、Ca²⁺、ADP で活性化した (図 3-3A)。一方、ADP に関しては爬虫類が有する栓球は活性化しないとの報告もあるが (Belamarich et al., 1968)、ツメガエルはゼブラ

フィッシュや、ニジマス同様に ADP での活性化が誘導された。本結果より、ツメガエル末梢栓球は巨核球、血小板と同様の膜開放系を有し、顆粒を放出することにより、血栓形成に寄与していることが示唆された。しかしながら、現在までに哺乳動物における止血機序に関して、*in vivo* により検証された例は乏しく、生体内における栓球機能に関しては未解明な点が多く残されている。

ツメガエル栓球は形態学的知見から栓球が脾臓で多く観察されることから、脾臓が造血巣だと考えられているが (Hadjj-Azimi et al., 1987), 前駆細胞は同定されておらず、明確になっていない。T12 抗体を用いて、造血臓器における T12 陽性細胞の分布を調べたところ、脾臓だけではなく肝臓でも陽性細胞が検出された。全細胞数に対する T12 陽性細胞の割合は脾臓で肝臓よりも高いものの、脾臓の臓器重量は肝臓の約 1/47 程度と低い。よって、T12 陽性細胞数は肝臓と脾臓で同等になる (Maekawa et al., 2012)。脾臓に局在する T12 陽性細胞の多くは主に紡錘型であるが、肝臓には形態が大きく球状の細胞が局在する。さらに、これらの細胞は CD41 を発現している。本結果より、赤血球造血と同様に脾臓も肝臓も栓球造血巣として機能していることが考えられた。核相の解析結果より、末梢栓球は赤血球よりも 2 倍量の DNA 含量を有する。ゼブラフィッシュの造血巣である腎臓中の CD41 発現量の少ない細胞は栓球前駆細胞だと考えられているが (Lin et al., 2005), 本細胞の核は比較的大きく、ニワトリの栓球前駆細胞も大きい形態の細胞である (Bartunek et al., 2008)。肝臓由来の T12 陽性細胞が末梢栓球の前駆細胞だと仮定すると、本細胞の核は多倍体化し、Proplatelet formation をおこなうことなしで、細胞分裂をして成熟栓球を産生することになる。執筆者は本結果より栓球前駆細胞は巨核球に類似する細胞であると仮説を立てた。

脾臓、肝臓を用いた免疫染色では脾洞、類洞に T12 陽性細胞が検出された。特に、類洞は赤血球前駆細胞や、分裂速度の遅い幹細胞に近い細胞が局在していることが報告されており (Okui et al., 2013), 栓球の前駆細胞も同様に類洞を造血微小環境としている可能性が考えられる。また、脾臓においては T12 陽性細胞の紡錘型を示す形態、DNA 含量が末梢栓球と同様であることを考慮すると、肝臓と脾臓には異なる分化段階の細胞が局在していることが推察された。

T5 抗体、T12 抗体はツメガエル栓球、顆粒球混合細胞をマウスに免疫して得ら

れたモノクローナル抗体であり，抗原は同定されていないが，本抗体を使い栓球を解析することにより，ツメガエル栓球は血小板と同様の活性化機構を有し，高いDNA含量を有すること，前駆細胞は肝臓や脾臓に局在することが明らかとなった。本研究により得られた知見は，巨核球の多倍体化機構，成熟血小板の産生機構など未解明な問題に対して，進化学的に貴重な結果をもたらすことが期待される。

第4章 ツメガエルにおける有核栓球の産生

4-1. 背景

造血サイトカイン TPO は、その受容体 c-Mpl を介して巨核球の自己増殖や成熟を促し、血小板産生を制御している (Kato et al., 1998)。哺乳類 TPO 遺伝子は、肝臓、骨髄、腎臓、脾臓で発現し、中でも肝実質細胞、骨芽細胞が TPO 産生細胞として同定されている (de Sauvage et al., 1994; Nomura et al., 1997)。TPO の主要産生細胞である肝実質細胞での TPO 発現量は常に一定であり、TPO の mRNA 量は末梢の血小板数に変動しても変化しない。しかし、血小板数の減少に伴い TPO の血中タンパク質量は上昇し、血小板数が多いと減少する。本知見より、TPO 血中濃度の調節は、血小板に発現する TPO 受容体 c-Mpl が担い、血小板が減少すると TPO と結合する c-Mpl が減少するため、血中の遊離 TPO が増加するといった「スポンジモデル」が提唱された (Kuter, 1996) (図 4-1)。一方、血小板減少モデルにおいて、骨髄や脾臓での TPO mRNA 発現量は増加する他 (McCarty et al., 1995)、TPO は翻訳後に C 末端領域が切断されることにより活性が調節されているため (Kato et al., 1997)、純粋に TPO の発現量だけでの活性評価は説明が困難であり、TPO の制御機構に関しては未だに多くの謎が残されている。

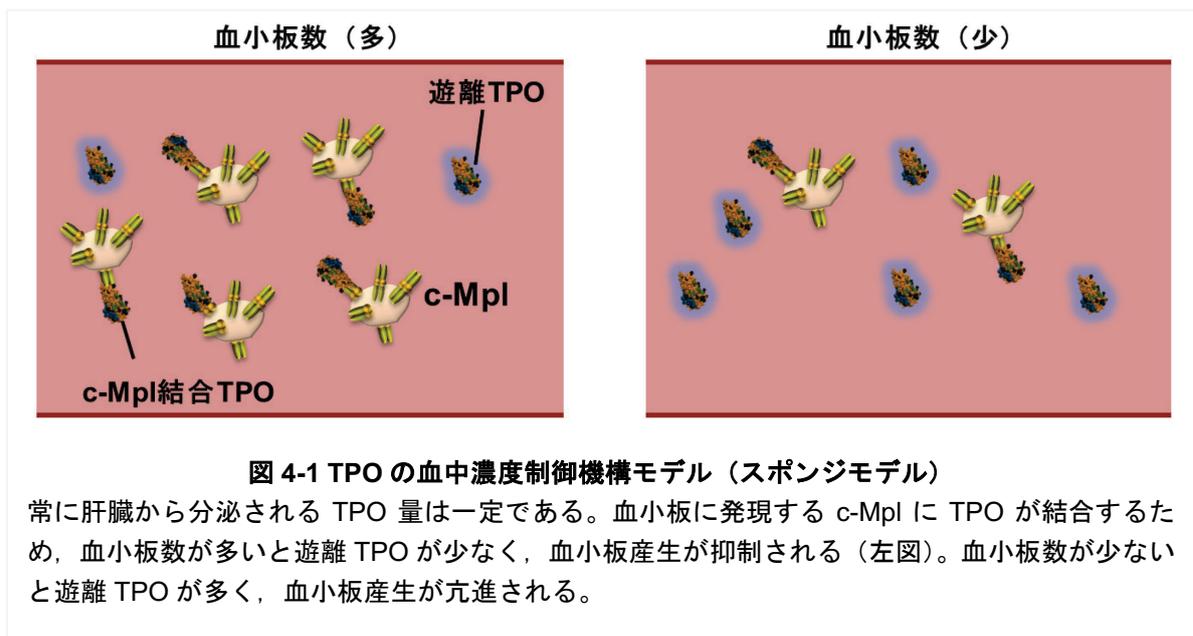


図 4-1 TPO の血中濃度制御機構モデル (スポンジモデル)

常に肝臓から分泌される TPO 量は一定である。血小板に発現する c-Mpl に TPO が結合するため、血小板数が多いと遊離 TPO が少なく、血小板産生が抑制される (左図)。血小板数が少ないと遊離 TPO が多く、血小板産生が亢進される。

非哺乳動物における TPO 遺伝子はこれまでニワトリとゼブラフィッシュでクローニングされており，それぞれ栓球造血に寄与する (Bartunek et al., 2008; Svoboda et al., 2014)。ツメガエル胚にラット由来 TPO を導入すると赤血球，顆粒球系細胞の増加が認められ，ツメガエルにおける TPO の造血機能，ラット TPO の交叉活性が示唆されている (Kakeda et al., 2002)。止血細胞の進化の過程により，無核の血小板を獲得したのには進化学的な有益性があつたと考えられるが，有核栓球に関する知見は乏しく議論が困難である (Brass, 2005)。例えば，有核栓球の前駆細胞は巨核球に相当する細胞なのか，また，有核栓球が巨核球に相当する細胞なのかは栓球の進化を考える上で重要な課題となる。非哺乳動物の栓球産生において，細胞生物学的解析は行われてきていない点に着目し，本章では当研究室でクローニングされたツメガエルリガンド/受容体 (TPO/Mpl) を用いた栓球造血に対する機能を明らかにすることを目的とした。筆者は，肝臓に局在する T12 細胞陽性が大きいことから (Tanizaki et al., 2015)，ツメガエル栓球前駆細胞は巨核球に相当するような大きな細胞であると仮説を立て，TPO の機能を解析した。

4-2. 材料および実験方法

4-2-1. *x*/TPO, *x*/*c*-Mpl cDNA のアミノ酸配列の解析

すでにクローニングされていた，*x*/TPO, *x*/*c*-Mpl cDNA は GENETYX ver.8 (ゼネティックス) により，翻訳領域をアミノ酸配列に変換して，CLUSTALW プログラム (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) を用いて，ヒト，ラット，マウス，ニワトリ，アフリカツメガエル，ゼブラフィッシュ TPO, *c*-Mpl の一次構造のマルチプルアライメントを作製した。また，*x*/TPO シグナル配列は SignalP4.1 Server プログラム (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) により推測した。

4-2-2. 遺伝子発現解析

ツメガエル臓器 (脳，肺，筋肉，心臓，血液，肝臓，脾臓，腎臓，胃，小腸，精巣)，赤血球，栓球，顆粒球における RNA は TRIZOL reagent (Invitrogen) を用いて抽出し，オリゴ dT プライマーにより逆転写して cDNA とした。プライマーは，表 4-1 に示したように設計し，RT-PCR による発現解析を行った。サイクル数は全

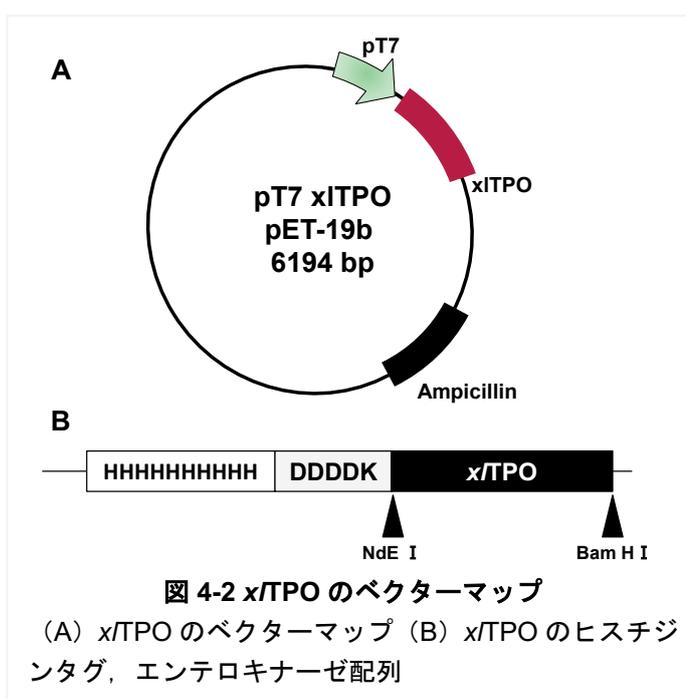
て 35 サイクルとした。PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後、LAS3000（富士フィルム）にて写真撮影を行った。

表 4-1 プライマーリスト

遺伝子	Forward プライマー	Reverse プライマー
<i>c-mpl</i>	5'-CCTTTGGATGGGTTTTGGG-3'	5'-TTATCCAGCCAGCACTTGCA-3'
<i>tpo</i>	5'-AGAGAAAATCGGCACAATGC-3'	5'-GGGCTCTGCTCAACTCACA-3'
<i>ache</i>	5'-TAACGATGCCCGTCAACAG-3'	5'-ATAGCGAATGACAGGAAACACC-3'
<i>mpo</i>	5'-CTTCCACGCTACACTTCTTACAA-3'	5'-CCTACGGAAGTGTCTCCAA-3'

4-2-3. x/TPO 大腸菌組み換え体の調整

大腸菌 (BL21 DE-3) に x/TPO 遺伝子を導入した pET19b ベクター (Novagen) (図 4-2) を Gene Pulser (Bio Rad) を用いたエレクトロポレーション法により形質転換し、LB 培地で培養する。得られた大腸菌は 50 mM Tris HCl (pH 8.0) で洗浄後、超音波破砕機 (INSONATOR 201M, KUBOTA) にて 200 W の条件で 5 分間超音波破砕し、不溶性画分を回収する。不溶性画分はさらに可溶化バッファー (6 M 塩酸グアニジン, 100 mM NaH₂PO₄ · H₂O, 10 mM Tris-HCl, pH 8) に溶解し、超音波破砕する (200 W, 5 分)。遠心後、上清を回収し、Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) を担体とする、ニッケルキレートカラムによるアフィニティー精製を実施する。精製した x/TPO はさらに、リフォールディングバッファー (100 mM リン酸二水素ナトリウム, 10 mM トリス塩酸, 2 M 尿素, 6 mM システイン, 6 mM シスタミン, pH 8.0) 50 mL に対して 5 mg を含む溶出画分を加えて 4°C にて最低一週間静置した。リフォールディング試料は分画分子量が 14,000 以下の透析チューブ (Viskase.) に入れ、2 L の逆相クロマトグラフィー開始溶媒 (20 mM トリス塩酸, 100 mM 塩化ナトリウム pH7.8) 中で 4°C にて一晩静置し



た。続いて、透析した試料は 0.45 μm のフィルター（ザルトリウス・ステディム）を用いてろ過して逆相クロマトグラフィー添加試料とした。逆相クロマトグラフィーのカラムは YMC-Pack PROTEIN-RP（150×4.6 mm ID Column）を使用し、逆相クロマトグラフィーの A 液に 0.02% トリフルオロ酢酸（Trifluoroacetic acid : TFA）含有超純水、B 液に 0.02% TFA 含有アセトニトリルを用いた。流速 1.0 mL/分で、40 分間で 1% B から 80% B までのリニアグラジエントで溶出した。試料はその後、遠心エバポレーターを用いて、溶媒を交換し 0.8×DPBS を溶媒とした。最後に、amicon Ultrafree-MC（メルクミリポア）を用いて無菌化した。

4-2-4. コロニーアッセイ法およびコロニー計数

ツメガエル造血前駆細胞が存在する、肝臓と脾臓を、酵素を使わずに単細胞化する。ペニシリン、ストレプトマイシン含有 0.8 × MEM を入れた 27G シリンジを臓器内に複数回注入し、内部の細胞を臓器外に流出させる。ある程度流出した時点で注射針の先端を 90 度になるように曲げ、ピンセットとシリンジによる物理的な分離作業の後、40 μm のセルストレーナー（コーニング）を通して細胞塊を除去した。その後、細胞はペニシリン、ストレプトマイシン含有 0.8 × α -MEM で最低 3 回洗浄する。細胞は肝臓、腎臓では最終濃度が 0.8 × 10⁵ 細胞/mL になるように、脾臓では 0.4 × 10⁵ 細胞/mL になるように調整しておく。最終濃度が 0.8 × α -MEM になるよう調整した 2.67%メチルセルロース（信越化学）溶液を作製する。0.8 × α -MEM に終濃度がそれぞれ、20% FCS, 0.8% メチルセルロース, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ グルコース, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン, カナマイシン（Invitrogen）になるように培地を調整する（表 4-2）。さらに、各種造血因子（貧血血清, 組換えサイトカイン等）、細胞懸濁液をよく混合し、1 ml シリンジを用いて 2.0 ml ずつ 35-mm ディッシュ（コーニング）に播種する。培地の調整に関しては表 4-2 にまとめた。播種した 35-mm ディッシュは 10 cm ディッシュに 2 枚収容し、培地の乾燥を避けるため、余ったスペースに滅菌水を入れた蓋を外した 35 mm ディッシュを共存させ、低温インキュベーター（和研薬）にて 23°Cにて 5% CO₂で培養した。

表 4-2 コロニーアッセイの培地組成

培地・細胞等	必要量(μl)
0.8×α-MEM	3333-A
10 mg/ml グルコース	80
100%FCS	1600
刺激因子	A
2.67% メチルセルロース溶液	2666
細胞	320
合計 (4.5 ディッシュ)	8000

* 肝臓細胞・腎臓細胞：2×10⁶細胞/mL

コロニーの観察及び計数は、倒立顕微鏡（オリンパス CKX41）にて 100 倍または 200 倍の拡大率にて行った。赤く着色した赤血球系細胞に分化していない 4 細胞以上の細胞塊になっているものをコロニーとして計数した。コロニーは培養 2 日から 18 日に至るまで 1 日毎に評価した。培養 4 日目に観察されるコロニーはマイクロピペットにて直接回収し、10% FCS 含有 0.8 × DPBS に浮遊させ、遠心塗抹標本作製し、T12 免疫染色を行った。また、HEK293 細胞で発現させた *x/Mpl* の細胞外領域 (aa 11–246) とマウス IgG2a の Fc 領域の融合タンパク質 (*x/Mpl-Fc*) を *x/TPO* の中和実験に用いた。1 ng/mL *x/TPO* は 500 ng/mL *x/Mpl-Fc* と 30 分反応させた後、肝臓細胞を用いたコロニーアッセイにより、*x/TPO* の活性を評価した。DPBS を加えた対照培地の他に、マウス IgG2a (Dako), *x/Mpl-Fc*, *x/TPO*, mIgG+ *x/TPO*, *x/Mpl-Fc*+ *x/TPO* をそれぞれ刺激因子として加えたものを評価した。コロニー数の平均値と標準偏差 (Standard deviation : S.D.) を算出し、Student's t-test にて統計処理した。

4-2-5. 肝臓, 脾臓細胞, 巨核球様細胞, 末梢栓球の液体培養及び計数

肝臓, 脾臓細胞は 4-2-4 で前述した手法で単細胞分散した後, *x/TPO* (5 ng/mL), 20% FCS, 100 μg/mL ストレプトマイシン, ペニシリン含有 0.8 × α-MEM に 5.0 × 10⁵ 細胞/mL になるように混合した。細胞懸濁液は 0.5 ml ずつ 24 穴細胞培養用プレート (コーニング) に播種し, 23°C, 5% CO₂ で培養した。2 日毎に 3 穴から細胞を回収し, 一部はトリパンブルー染色を行い, 生細胞数を計数した。また, 培地の液量をそれぞれ測定し, 1 穴あたりの細胞数を算出した。さらに, 回収した細胞から遠心塗抹標本作製し, それぞれ T12 免疫染色, MGG 染色を施した。T12 陽性細胞の形態の大きさごとに区分し (10-20 μm, 20-30 μm, 30-50 μm), その割合を算出

した。区分した細胞はそれぞれ image J ソフトウェア (Schneider et al., 2012) により、核/細胞質比 (N/C 比) を算出した。

x/TPO 刺激により誘導された液体培養 8 日目の巨核球様細胞は 80%, 70%, 60%, 50%, 40% のパーコールを用いた不連続密度勾配遠心分離を行うと、50% の層に濃縮される。濃縮細胞は、1.5 ml チューブに分取し、 $0.8 \times \alpha$ -MEM で 2 回洗浄する。洗浄した細胞は 20% FSC, 100 μ g/mL ストレプトマイシン, ペニシリン含有 $0.8 \times \alpha$ -MEM と混合し、24 穴細胞培養用プレートに *x*/TPO (10 ng/ml) 存在下, 非存在下で培養した。3 日後に細胞の形態を倒立顕微鏡により観察した。

末梢栓球は 2-2-4 で前述した手法で濃縮した後、*x*/TPO (10 ng/mL), 20% FSC, 100 μ g/mL ストレプトマイシン, ペニシリン含有 $0.8 \times \alpha$ -MEM に 1.0×10^5 細胞/mL になるように混合し、24 穴の細胞培養用プレートに播種し、23°C, 5% CO₂ で培養した。2 日毎に 3 穴から細胞を回収し、トリパンブルー染色による生細胞数及び液量を測定し、栓球数の推移を経時的に計数した。

4-2-6. 透過型電子顕微鏡による撮像

濃縮した巨核球様細胞は $0.8 \times$ DPBS を加え、遠心分離を行う (300g, 5 分)。上清を廃棄した細胞塊に直接ウサギ血清を添加し、終夜 4°C で反応させ、細胞ペレットを作る。ペレットは $0.8 \times$ DPBS により 2 回洗浄した後、 $2 \times$ DPBS で希釈した 2% グルタルアルデヒドを加え、72 時間固定した。ペレットを洗浄後、リン酸バッファーで希釈した 1% 四酸化オスミウムで、1 時間 4°C で固定する。四酸化オスミウムは有害であるため、ドラフト内で操作を行った。固定液を 50% エタノールに置換し、15 分 4°C で脱水させる。再度 50%, 60%, 70% エタノールで各 15 分、4°C で脱水をした後、常温に戻して 80%, 90%, 100% エタノールにそれぞれ同条件で脱水を行った。100% エタノールは計 3 回脱水液を変え、QY-1 (日新 EM) を 30 分 \times 2 回浸透させた。Quetol 812 (日新 EM), ドデセニルこはく酸無水物 (Dodecenyl succinic anhydride; DDSA : 日清 EM), 無水メチルナジン酸 (Methylnadic anhydride : MNA, 日新 EM) を表 4-2 に従い混合し型に流し込んだ後、細胞ペレットの一部を包埋し、終夜反応させる。その後、ダイヤモンドナイフ (日新 EM) で超薄切し、透過型電子顕微鏡 (H-7500, 日立ハイテクノロジーズ) により無染色で観察した。

表 4-3 エポキシ樹脂の調合

Quetol-812	1.824 mL
DDSA	1.234 mL
MNA	0.942 mL

4-2-7. ウェスタンブロッティング法

栓球に TPO シグナルが入るか、リン酸化 STAT5 を用いて解析した。濃縮した栓球は x /TPO, FCS を含まない $0.8 \times \alpha$ -MEM で 12 時間スタベーションする。12 時間後、細胞を回収し、2 分割する。培養上清を廃棄し、片方には $10 \mu\text{g/ml}$ x /TPO 含有 $0.8 \times \alpha$ -MEM を加え、もう一方の画分には $0.8 \times \alpha$ -MEM のみを加える。10 分後、 $0.8 \times \text{DPBS}$ で 1 回洗浄した後、プロテアーゼ、ホスファターゼ阻害剤 (Roche Applied Science) 含有タンパク質抽出試薬 (M-PER, ThermoFisher) によって全タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は吸光光度計 (e-spect, ビーエム機器) を用いて濃度を測定した後、 $3 \mu\text{g}$ を SDS ポリアクリルアミド電気泳動によりタンパク質の分離を行った。泳動したポリアクリルアミドゲルはポリビニルジフルオライド (Polyvinylidene difluoride : PVDF) 膜 (メルクミリポア) に転写した後、4% BSA で 1 時間ブロッキングする。メンブレンは、TBS-T (NaCl : 150 mM, Tris : 20 mM, Tween 20 : 0.1%) で 2 回洗浄した後、4% ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin : BSA) で 1200 倍希釈した STAT-5 抗体 (Santa Cruz), 1000 倍希釈したリン酸化 STAT-5 抗体 (BD バイオサイエンス) と室温で 1 時間反応させる。TBS-T で 3 回洗浄した後、それぞれ 2 次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase : HRP) 標識抗マウス抗体と室温で 1 時間反応させる。化学発光検出試薬 (ECL-Plus : Amersham Pharmacia Biotech) を反応させ、LAS3000 にて写真撮影を行った。

4-2-8. 細胞染色

アポトーシス細胞は細胞核の崩壊を観察することにより定量した。培養細胞は遠心塗抹標本を作製した後、4% ホルマリンアセトンを用いて固定し、 $50 \mu\text{g/ml}$ プロピジウムイオダイド (Propidium iodide : PI) 染色を室温で 30 分行い、蛍光顕微鏡 (Olympus BX51) により撮像し、核が崩壊している細胞の割合を算出した。

4-3. 結果

4-3-1. アミノ酸配列と相同性の解析

ツメガエル TPO, Mpl, ヒト, ラット, マウス, ニワトリ, ゼブラフィッシュ TPO, Mpl のアミノ酸配列でマルチプルアライメントを作成し, 一次構造を Clustal W により比較した (図 4-3, 4-4)。

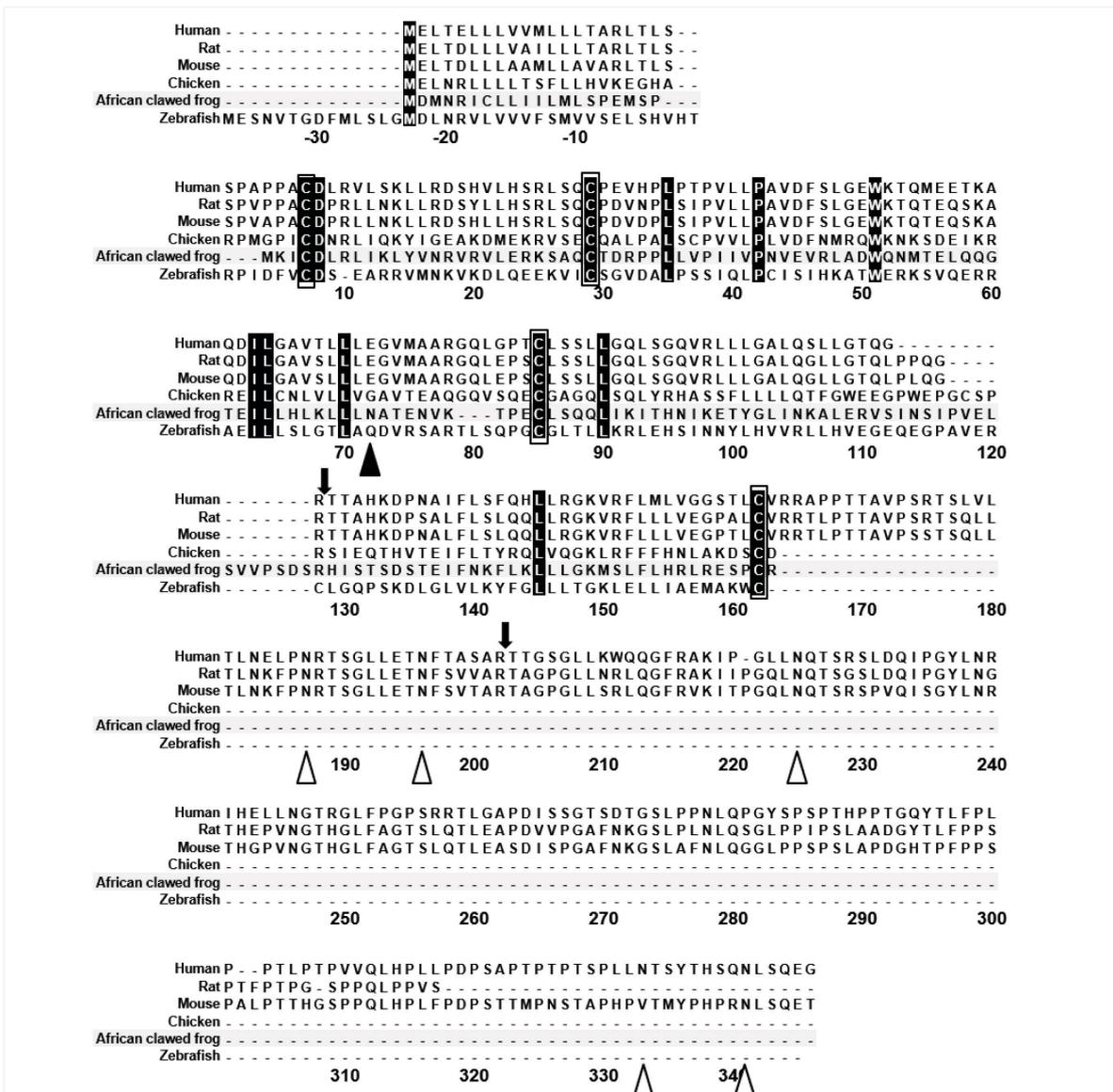


図 4-3 TPO のマルチプルアライメント

ヒト, ラット, マウス, ニワトリ, ツメガエル, ゼブラフィッシュ TPO のアミノ酸相同性。N-結合型糖鎖付加配列は哺乳類で保存されている。非哺乳動物における C 末端領域は全て欠失している。番号: N 末端からの番号, 上段, シグナルペプチド, ■: 完全一致アミノ酸, □: ジスルフィド結合形成システイン残基, ▲: ツメガエル TPO N-結合型糖鎖付加配列, △: ヒト TPO N-結合型糖鎖付加配列, ⇓: ヒト TPO におけるトロンビン切断部位, TPO 配列以下の配列を使用。GenBank (アクセッション番号: ヒト AAI30323; ラット, BAA06906; マウス, AAA40436; ニワトリ, AAT45554; ゼブラフィッシュ, NP_001137225) Tanizaki *et al.* 2015 より改変。

x/TPO は近縁種であるネツタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*; トロピカリス) TPO とは 83% といった高い相動性であるものの、ヒト (23%), マウス (23%), ラット (23%), ニワトリ (24%), ゼブラフィッシュ (18%) とはそれぞれ 30% 以下であり、非常に低い相動性である (図 4-5A)。*x/TPO* の全長配列は 153 残基のアミノ酸から成り立っており、ニワトリやゼブラフィッシュ TPO と同様に C 末端領域が欠失している。*x/TPO* にはヒト TPO においてジスルフィド結合を形成することが知られている 4 か所のシステイン残基 (Cys-7, Cys-29, Cys-85, Cys-151) と近い位置にシステイン残基 (Cys-4, Cys-24, Cys-78, Cys-9) が認められる (図 4-5B)。また、非哺乳動物は C 末端領域を欠失しているものの、哺乳動物での TPO 活性は第一システインから第 4 システイン間 (ヒト TPO では Cys-7 から Cys-151 間) に存在することから、ツメガエル TPO に関しても同様に活性領域が保存されていると考えられる。

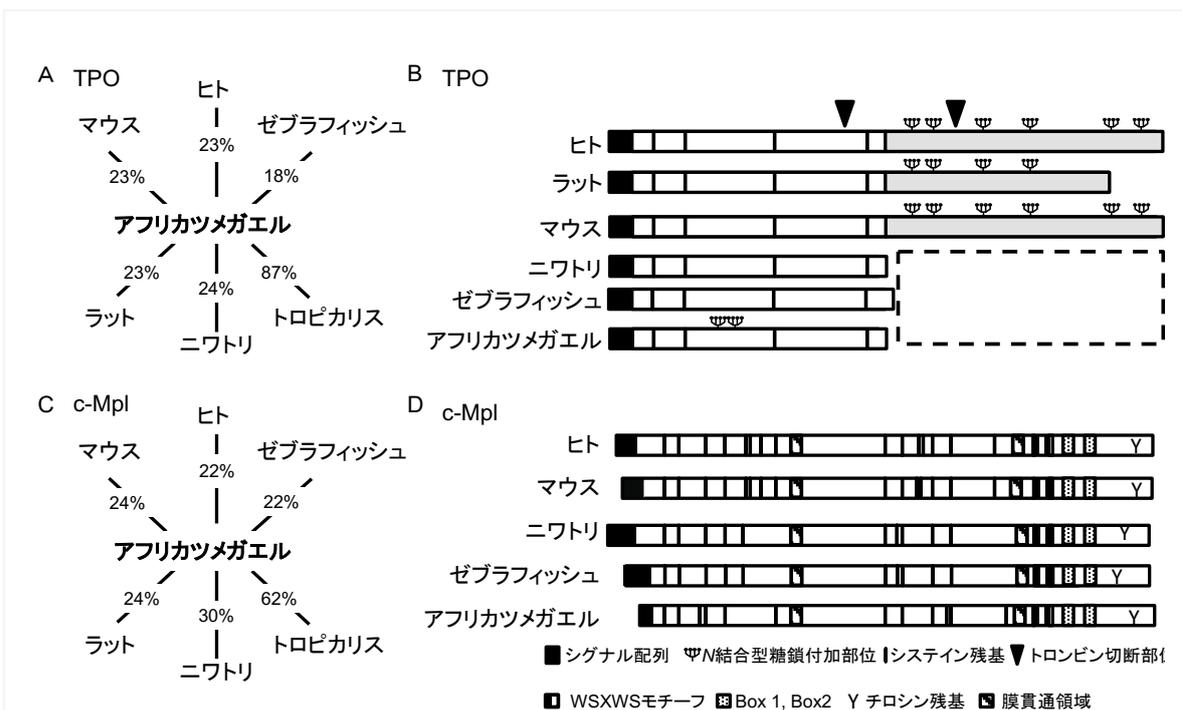
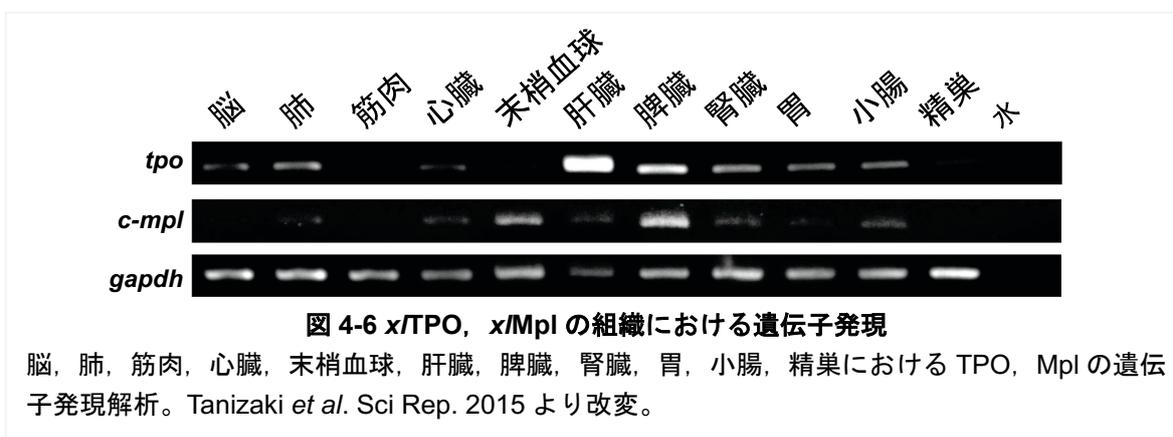


図 4-5 ツメガエル TPO, Mpl の種間相動性

(A) TPO の第一システイン残基から第 4 システイン残基までのアミノ酸配列の種間相動性。ツメガエルとの相動性：ヒト (23%), マウス (23%), ラット (23%), ニワトリ (24%), トロピカリス (87%), ゼブラフィッシュ (23%)。 (B) ヒト, ラット, マウス, ニワトリ, ゼブラフィッシュ, ツメガエル TPO の概略図。 (C) c-Mpl の細胞外領域におけるアミノ酸配列の種間相動性。メガエルとの相動性：ヒト (22%), マウス (24%), ラット (24%), ニワトリ (30%), トロピカリス (62%), ゼブラフィッシュ (22%)。 (D) ヒト, ラット, マウス, ニワトリ, ゼブラフィッシュ, ツメガエル c-Mpl の概略図。 Tanizaki *et al.* Sci Rep. 2015 より改変。

TPO と結合する c-Mpl の細胞外領域はツメガエルとの相同性はヒト (22%), ラット (24%), マウス (24%), ニワトリ (30%), ゼブラフィッシュ (22%) となっている (図 4-5C)。c-Mpl は種間でシグナル伝達に重要なチロシン残基, Box1, Box2 領域, 立体構造を形成するシステイン残基, サイトカイン受容体特異的な WSXWS モチーフは保存されている (図 4-5D)。TPO, Mpl の発現臓器を特定するため, 脳, 肺, 筋肉, 心臓, 末梢血球, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 胃, 小腸, 精巣におけるツメガエル TPO, Mpl の遺伝子発現を RT-PCR により解析した結果, TPO は造血巣である肝臓, 脾臓で主に発現しているが, 脳, 肺, 心臓, 胃, 小腸での発現も認められた。Mpl 遺伝子は末梢血球, 脾臓に発現していた他, 肺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 小腸に発現していた (図 4-6)。



4-3-2. x/TPO の生物活性

脾臓, 肝臓, 腎臓に c-Mpl 陽性細胞が存在することから, 肝臓, 脾臓, 腎臓細胞は x/TPO 大腸菌組み換え体含有メチルセルロースを用いた半固形培地で培養した (コロニーアッセイ)。2 日後, 肝臓と脾臓細胞を用いたコロニーアッセイにおいて, ヘモグロビン合成をしていないコロニーが観察され, その数は 4 日目にピークを向かえた (図 4-7A-B)。一方, 腎臓細胞中には x/TPO に応答してコロニーを形成する細胞は認められなかった。続いて, コロニーの x/TPO 依存性を調べるため, 肝臓, 脾臓細胞を用いたコロニーアッセイによる x/TPO 濃度依存試験を実施した。脾臓, 肝臓由来の細胞は濃度依存的にコロニーを形成し, 脾臓では 1 ng/ml, 10 ng/ml, 肝臓では 10 ng/ml の濃度で x/TPO を添加した際にコロニー数が最大になった。培養 4 日目の脾臓, 肝臓から得られたコロニーを回収した後 T12 による免疫染色を

施すと、T12 陽性を示した (図 4-7C)。本結果は、*x*/TPO により形成されたコロニーは栓球系の細胞であることを示している。また、T12 陽性を示すコロニーは *x*/EPO 含有培地では形成されなく、*x*/TPO の栓球造血に対する特異性が示唆された。

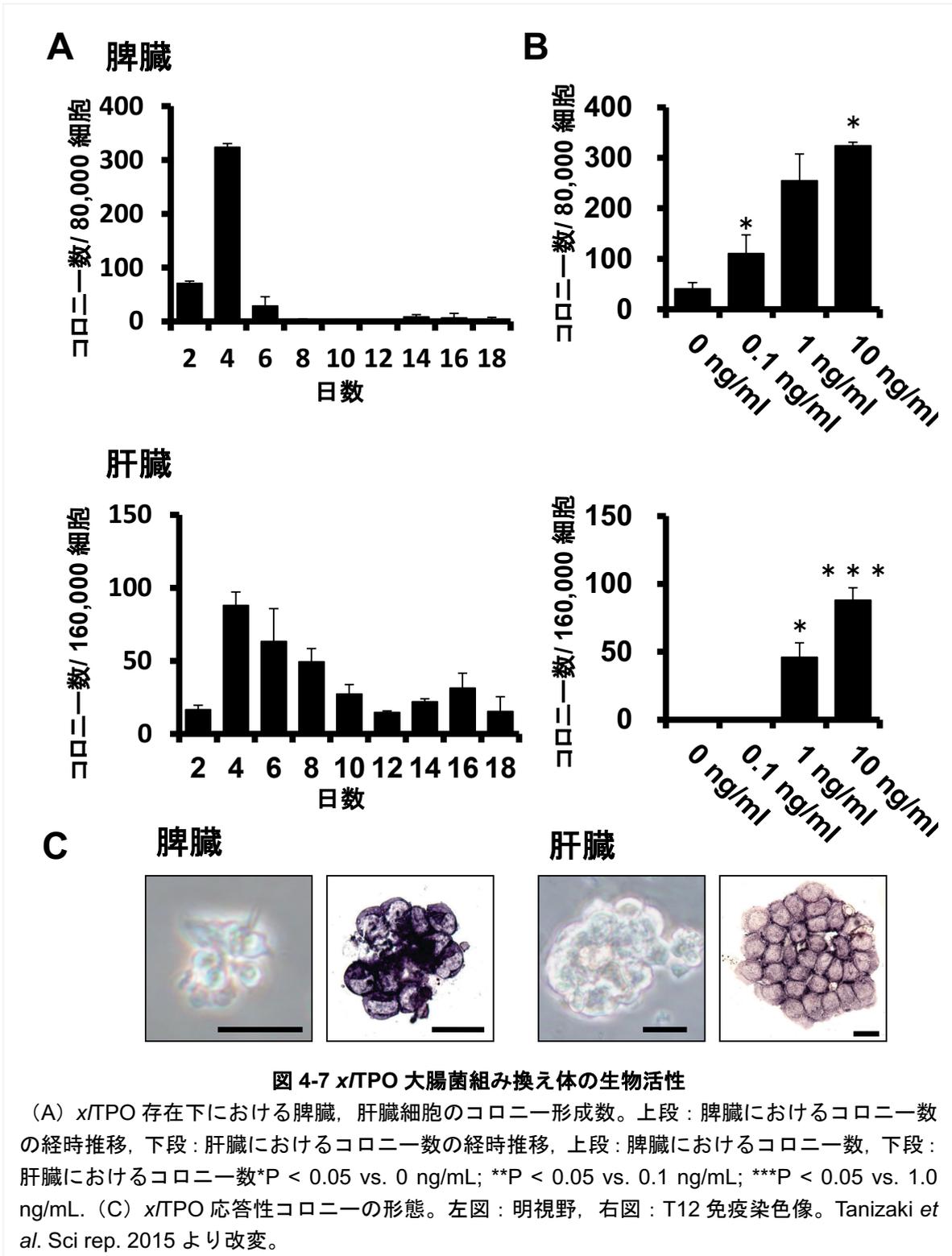
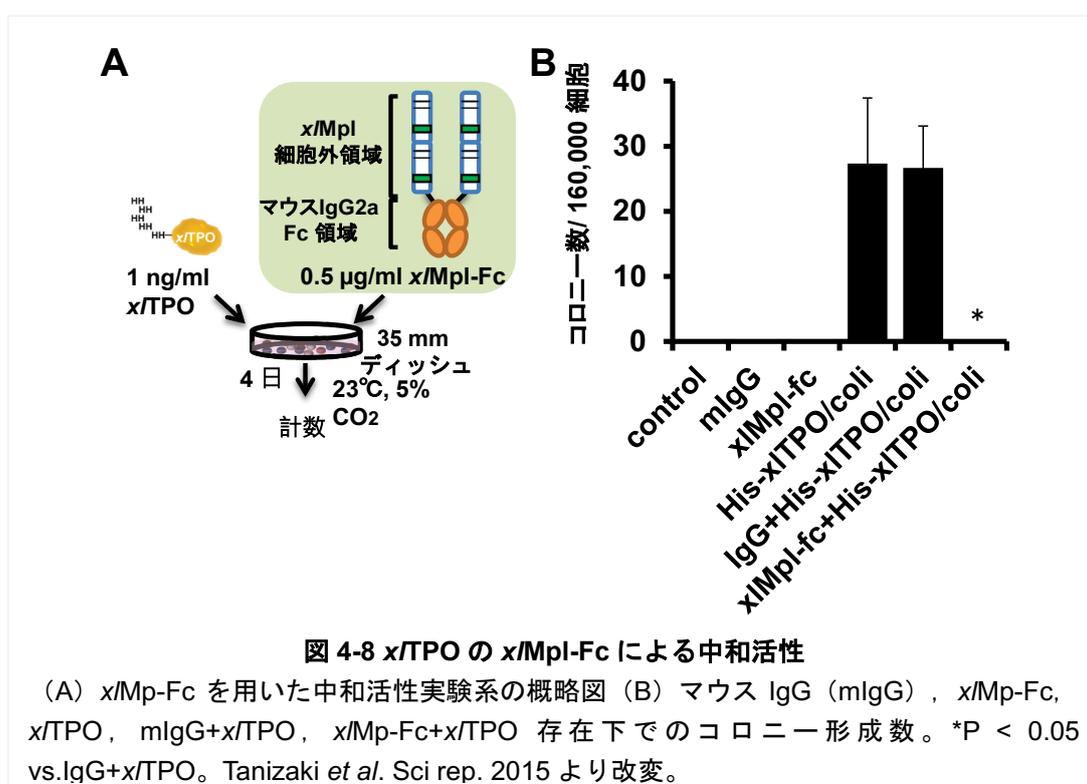


図 4-7 *x*/TPO 大腸菌組み換え体の生物活性

(A) *x*/TPO 存在下における脾臓、肝臓細胞のコロニー形成数。上段：脾臓におけるコロニー数の経時推移，下段：肝臓におけるコロニー数の経時推移，上段：脾臓におけるコロニー数，下段：肝臓におけるコロニー数* $P < 0.05$ vs. 0 ng/mL; ** $P < 0.05$ vs. 0.1 ng/mL; *** $P < 0.05$ vs. 1.0 ng/mL. (C) *x*/TPO 応答性コロニーの形態。左図：明視野，右図：T12 免疫染色像。Tanizaki *et al.* Sci rep. 2015 より改変。

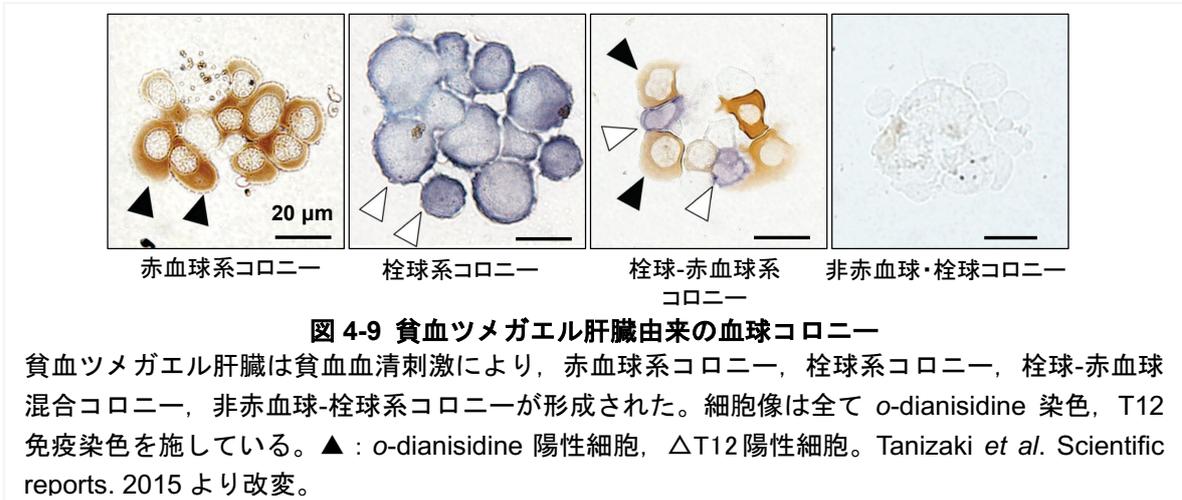
続いて、哺乳類と同様に TPO が Mpl を介してシグナルを伝えていることを示すため、Mpl の細胞外領域とマウス IgG2a の融合蛋白質を発現させ (x/Mpl-Fc), x/TPO と混合し、反応後にコロニーアッセイを行った (図 4-7A)。x/TPO と x/Mpl の結合を調べるため、x/TPO を x/Mpl-Fc と 30 分間反応させた。反応後の x/TPO, x/Mpl-Fc 含有培地で肝臓細胞を培養したところ、栓球系コロニーは形成されなかった。一方、x/TPO, x/TPO+マウス IgG2a 存在下でコロニーアッセイを行うと栓球系コロニーを形成した (図 4-7B)。本結果は x/TPO が x/Mpl に結合することを示しており、TPO/Mpl シグナルが栓球系コロニーの形成に必須であることを示した。



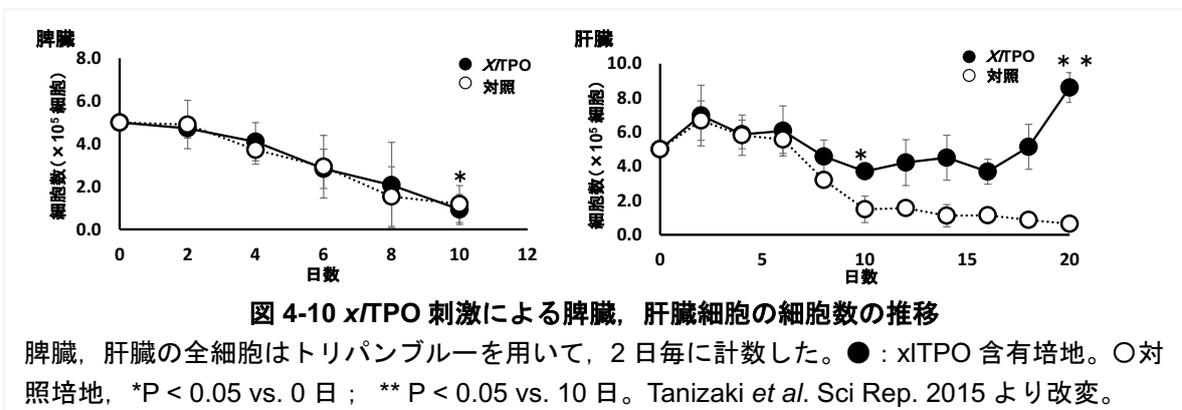
4-3-3. x/TPO 刺激により誘導された肝臓, 脾臓 T12 陽性細胞

ツメガエルに PHZ を投与すると溶血性貧血を呈し、投与後 8 日目に赤血球数が最低値に達する。このとき、肝臓や脾臓で造血が亢進して赤血球前駆細胞数が増加する (Aizawa *et al.*, 2005)。PHZ 投与後の血清中には造血因子が分泌され、4 日目に最もコロニー形成を刺激する血清が得られる (Nogawa-Kosaka *et al.*, 2011)。PHZ 投与 8 日後の肝臓, 脾臓細胞をそれぞれ貧血血清存在下で培養するとヘモグロビン合成した赤血球系コロニー, T12 陽性を示す栓球系コロニー, 赤血球系細胞と栓球系

細胞からなる混合コロニー，ヘモグロビン合成をせず，T12 陰性を示す非赤血球，栓球系コロニーが観察された (図 4-9)。栓球系細胞と赤血球系細胞から構成されるコロニーはニワトリ同様赤血球，栓球共通の前駆細胞が存在することを示唆する。



栓球前駆細胞の性質を明らかにするため，肝臓細胞，脾臓細胞を *x/TPO* 存在下で液体培養した。脾臓において，培養日数に伴い全細胞数は減少するのに対して，肝臓細胞は *x/TPO* 存在下で増殖した (図 4-10)。



さらに，1 日毎に細胞を回収して T12 陽性細胞数を計数した。末梢栓球は形態の大きさが長径約 $15 \mu\text{m}$ ，短径 $6 \mu\text{m}$ の紡錘型の細胞だが，培養 4 日目には分葉核を持つ直径 $25 \mu\text{m}$ 以上の大きな T12 陽性細胞が出現した。T12 陽性細胞を $10\text{-}20 \mu\text{m}$ ， $20\text{-}30 \mu\text{m}$ ， $30\text{-}50 \mu\text{m}$ に区別してそれぞれ計数したところ，脾臓において，形態の大きな T12 陽性細胞が 4 日目に検出され，培養 10 日には大半の細胞が死滅した。一方，肝臓由来の大きな T12 陽性細胞数は培養日数に伴い増加し，8 日目にピークを向かえた後，減少した。大きな T12 陽性細胞数の減少に伴い，形態の小さい T12 陽性細胞数は増加し，20 日後には培養前と比較して約 40 倍になった (図 4-11A-B)。

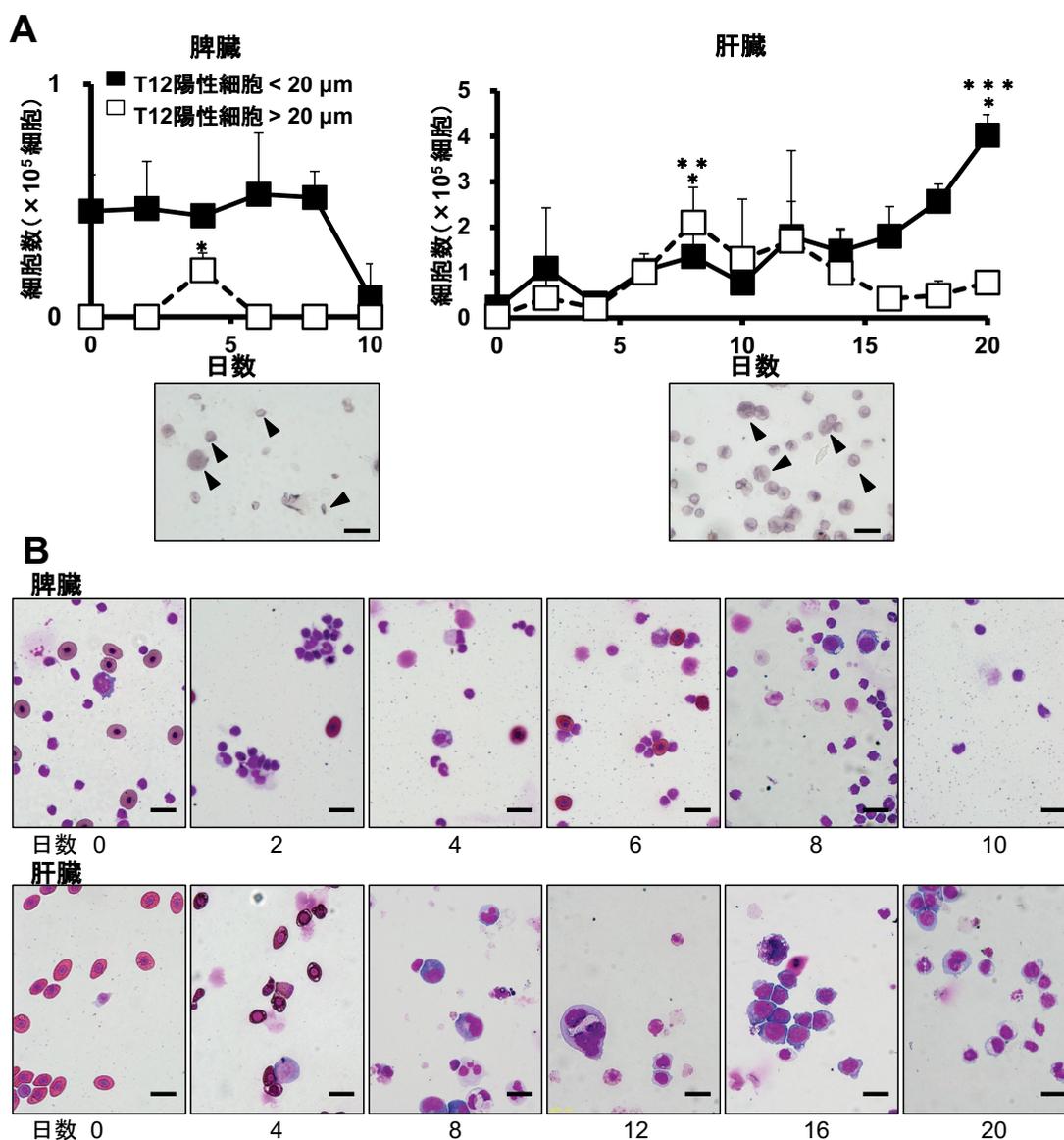
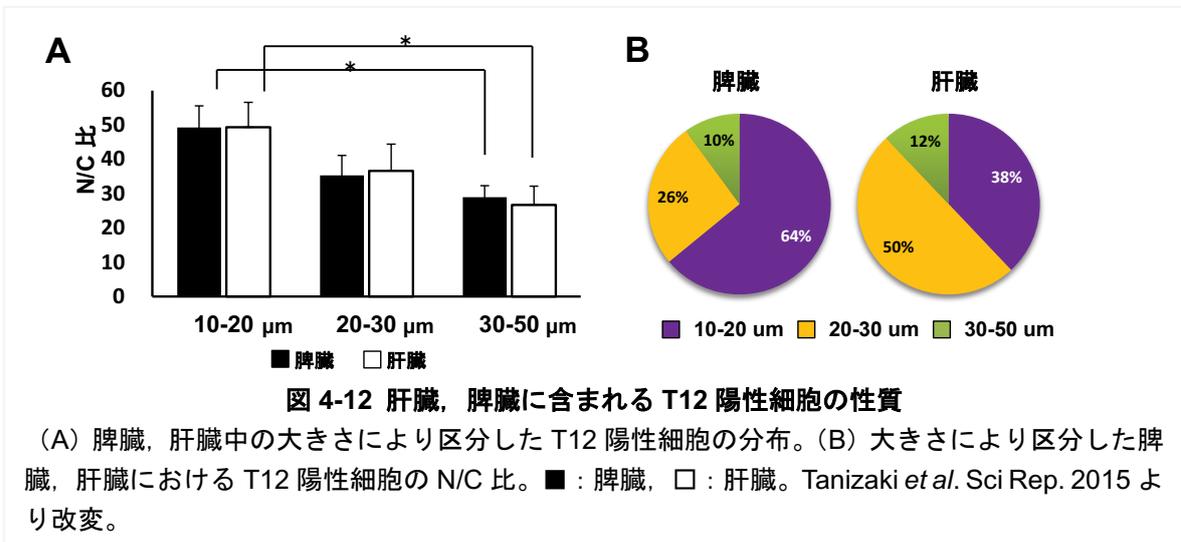


図 4-11 肝臓, 脾臓細胞の細胞増殖と分化

(A) 左図: 脾臓細胞における x/TPO 存在下液体培養による栓球系細胞数, 右図: 脾臓細胞における x/TPO 存在下液体培養による栓球系細胞数, 下段 (左図): 培養 4 日後の脾臓由来 T12 陽性細胞, 下段 (右図): 培養 8 日後の肝臓由来 T12 陽性細胞, 矢印: T12 陽性細胞, スケールバー: 20 μm, *P < 0.05 vs. 0 日; **P < 0.05 vs. 0 日, ***P < 0.05 vs. 20 日 (>20 μm T12 陽性細胞) (B) 培養 0 日から 10, 20 日までにおける細胞像 (MGG 染色)。スケールバー: 20 μm。Tanizaki *et al.* Sci Rep. 2015 より改変。

小型の細胞 (10-20 μm) における N/C 比を大型の細胞 (30-50 μm) と比較すると, 高い値を示す。よって, 大きさの異なる TPO 応答性細胞は分化段階の異なる栓球だと示唆された (図 4-12A)。脾臓に存在する T12 陽性細胞は 10-20 μm の T12 陽性の小さい細胞が主で, 大きい細胞は少数である。一方, 肝臓中に存在する T12

陽性細胞は 20 - 30 μm の比較的多さい細胞が占めている (図 4-12B)。本知見は肝臓, 脾臓で異なる分化段階の栓球が局在することを示唆する。



4-3-4. ツメガエルにおける巨核球の定義・同定

x/TPO により誘導された肝臓, 脾臓由来の巨核球様細胞は T12 だけではなく, CD41 も発現している (図 4-11A, B)。また, MGPY 染色により, RNA を染色した結果, ツメガエル巨核球様細胞は RNA 合成を盛んに行う未熟な細胞であることが明らかとなった (図 4-11C)。一方で, MPO 染色では染色されなかったことから, 好中球に形態が似ているものの異なる細胞であることを確認した (図 4-11C)。肝臓細胞を *x/TPO* 存在下で 8 日間培養した後, T12 抗体を用いたフローサイトメトリー法により巨核球様細胞を濃縮し, 透過型電子顕微鏡による撮像を行った。本細胞は哺乳類巨核球が有する膜開放系に類似する空胞を有している他, 血小板, 巨核球特有の濃染顆粒も観察された (図 4-11D)。RT-PCR により, 巨核球様細胞に発現する遺伝子を解析した結果, AChE の発現は認められなかったものの, 巨核球マーカーである *Mpl*, CD41, *Fli-1* を発現していた。また, 非栓球系マーカーである EPOR や MPO の発現は認められなかった (図 4-11E)。巨核球の特徴である核相は T12 抗体と Hoechst33342 により解析すると末梢栓球と比較して, 2-4 倍量の DNA 含量を有することが明らかとなった (図 4-11F)。以上の結果から, T12 陽性の大きな細胞は巨核球に相当する細胞であると定義づけ, 以後ツメガエル巨核球とした。

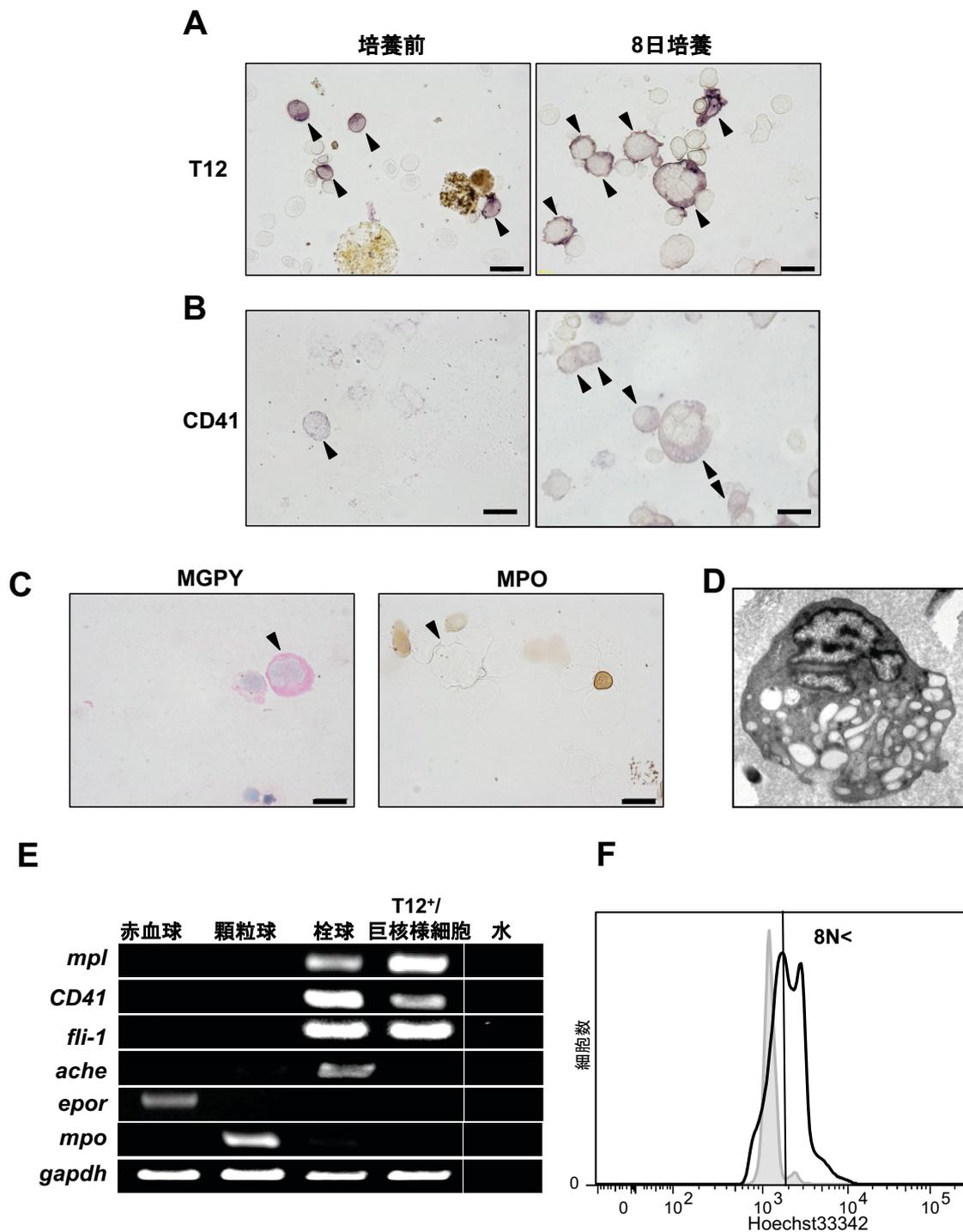


図 4-13 巨核球様細胞の性質

(A) ツメガエル肝臓細胞の x/TPO 培養前後における T12 陽性細胞の形態。スケールバー：20 μm (B) ツメガエル肝臓細胞の x/TPO 培養前後における CD41 陽性細胞の形態。スケールバー：20 μm (C) ツメガエル巨核球の MGPY 染色像 (左図) スケールバー：20 μm 。ツメガエル巨核球の MPO 染色像 (右図) スケールバー：20 μm 。(D) 透過型電子顕微鏡による巨核球様細胞の微細構造。(E) ツメガエル赤血球, 顆粒球, 栓球, 巨核球の *Mpl*, *CD41*, *Fli-1*, *AChE*, *EPOR*, *MPO* 遺伝子発現解析。(F) 巨核球様細胞の DNA 含量。Tanizaki *et al.* Sci Rep. 2015 より改変。

4-3-5. 成熟栓球への分化

ツメガエル末梢栓球の形態は 3-3-1 に示したように、紡錘型である。よって、紡錘型の形態を成熟栓球への分化指標として巨核球の分化誘導を行った後、形態を観察した。*x/TPO* 含有培地で培養した肝臓由来ツメガエル巨核球はパーコールを用いた不連続密度勾配遠心分離法により濃縮し (図 4-14A), *x/TPO* 存在下, 非存在下で培養した。2 日後の, 細胞形態を観察すると *x/TPO* 存在下では球状の細胞が大半を占めていたのに対し, *x/TPO* 非存在下で培養した細胞群には紡錘型の細胞が多数認められた (図 4-14B)。紡錘型の細胞は T12 陽性を示しており (図 4-14C), 末梢栓球の特徴を有していることがわかる。末梢栓球も同様に *TPO* 存在下で 4 日間培養し, 培養液中での形態を観察したところ, バーベル型の形態を示し, 末梢栓球を培養して得られた細胞に類似する形態であることが分かった (図 4-14D)。続いて, 肝臓細胞由来の培養栓球様細胞の機能を解析するため, 栓球の活性評価実験をおこなった。栓球活性化を誘導するトロンビンを追加して培養栓球様細胞の形態変化を継時的に観察したところ, 紡錘型の培養栓球様細胞は活性化して球状となった。さらに, 培養液中に存在する紡錘型の細胞数を計数するとトロンビン刺激により減少したことから, 培養により得られた紡錘型の細胞は機能的な栓球であることが判明した (図 4-14E)。

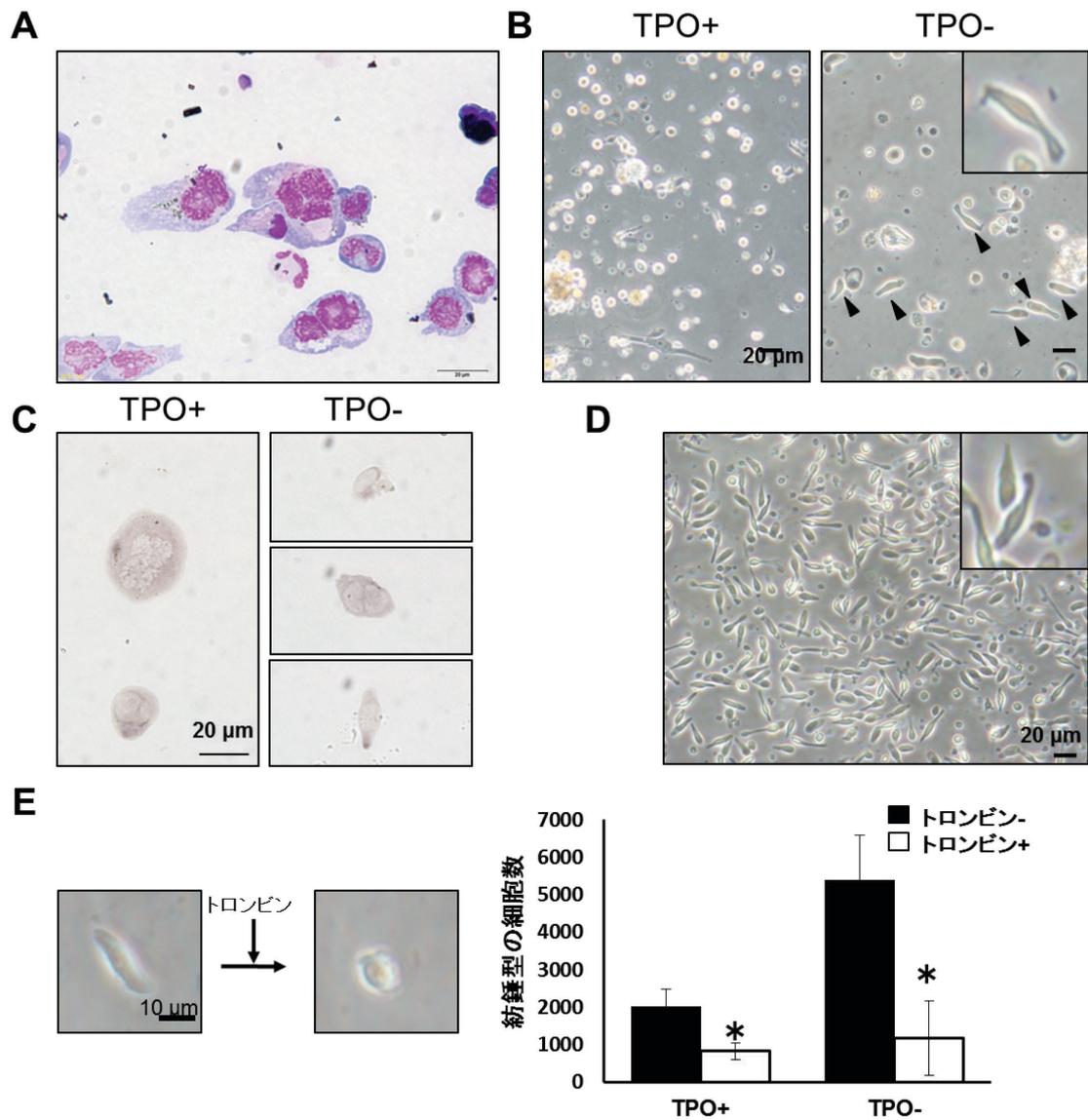


図 4-14 成熟栓急への分化

(A) 密度勾配遠心分離法により得られた巨核球濃縮画分 (MGG 染色) (B) ツメガエル巨核球の TPO 存在下, 非存在下における細胞培養による液相での細胞像, 左図: α TPO 存在下培養, 右図: α TPO 非存在下培養, 矢印: 紡錘型栓球様細胞, (C) 栓球様細胞の T12 免疫染色像 (D) 液相における末梢栓球像 (E) トロンビン添加前後の紡錘型細胞数の変化, 左図: トロンビン添加後における紡錘型細胞の形態変化, 右図: トロンビン添加後における紡錘型細胞数の変化。Tanizaki *et al.* Sci Rep. 2015 より改変。

4-3-6. 末梢栓球における TPO-Mpl シグナル

ツメガエル末梢栓球は Mpl を発現する。ツメガエル末梢栓球における TPO/Mpl シグナルの機能を調べるために、末梢栓球を *x*/TPO 存在下で培養した。*x*/TPO 非存在下で培養した栓球数は培養 10 日目までに約半数になったが、*x*/TPO 存在下で培養したところ、細胞数の減少は見られなかった (図 4-15A)。細胞の形態を観察すると、*x*/TPO 非存在下における栓球の形態は不均一であり、細胞死を起こしていることが分かる (図 4-15B)。アポトーシスの特徴である核の崩壊を PI 染色により検出した結果、*x*/TPO 非存在下で培養された栓球は核の崩壊が進んでいた (図 4-15C)。さらに、シグナルを調べると末梢栓球に *x*/TPO 刺激を与えると STAT5 のリン酸化が活性化された (図 4-15D)。本結果より、*x*/TPO は末梢栓球にシグナルを伝えて、アポトーシスの回避に機能していることが推察された。

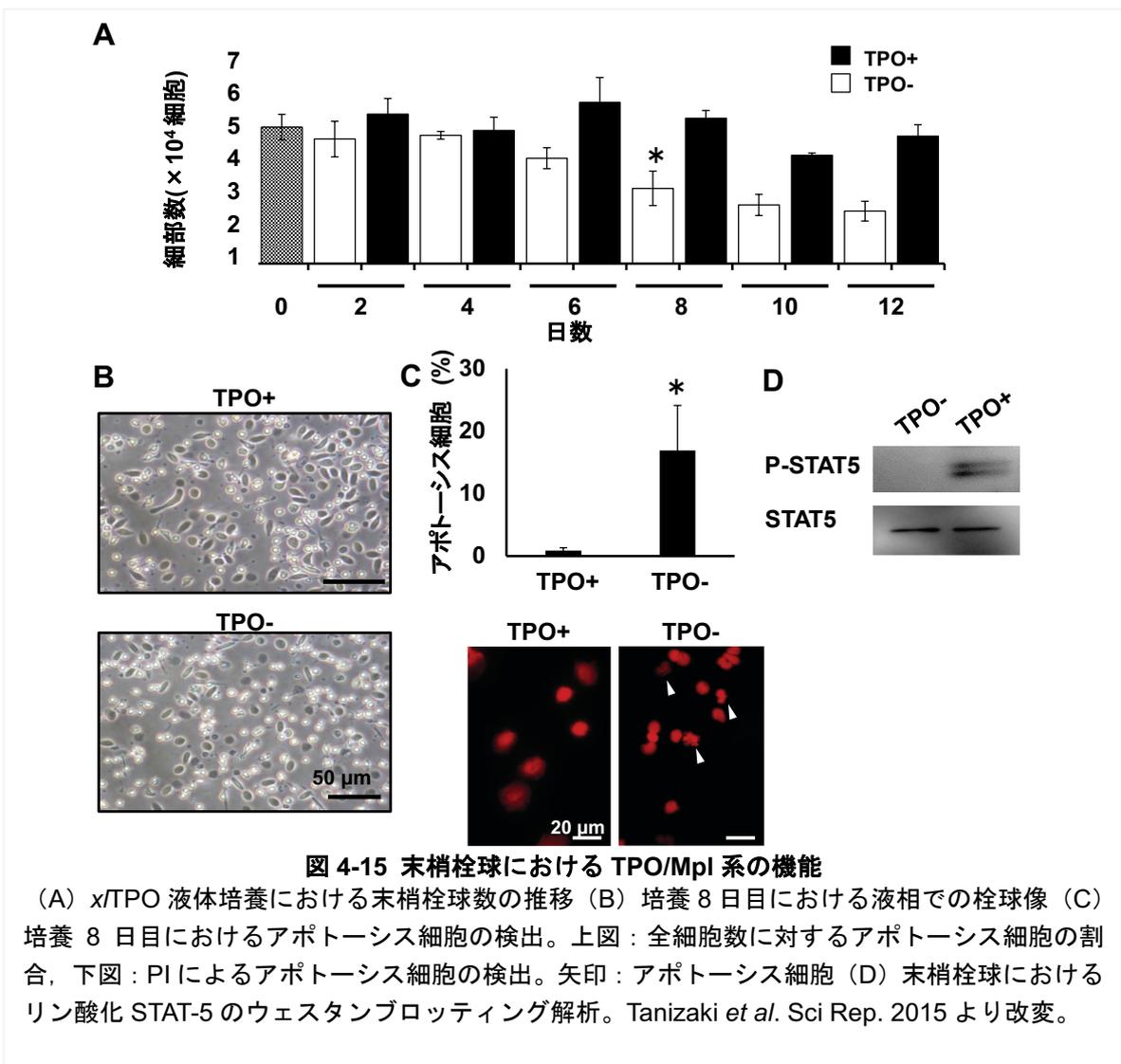


図 4-15 末梢栓球における TPO/Mpl 系の機能

(A) *x*/TPO 液体培養における末梢栓球数の推移 (B) 培養 8 日目における液相での栓球像 (C) 培養 8 日目におけるアポトーシス細胞の検出。上図：全細胞数に対するアポトーシス細胞の割合、下図：PI によるアポトーシス細胞の検出。矢印：アポトーシス細胞 (D) 末梢栓球におけるリン酸化 STAT-5 のウェスタンブロッティング解析。Tanizaki *et al.* Sci Rep. 2015 より改変。

4-4. 考察

哺乳類において、TPO は巨核球成熟から血小板産生、造血幹細胞の自己増殖において中心的な機能を担う造血サイトカインである。本章ではツメガエル TPO/Mpl システムの栓球前駆細胞における機能を調べ、末梢栓球の起源を探索した。ヒト TPO の N 末端領域はヒト EPO と 23% 相同領域が存在するため、TPO と EPO は同一分子を起源とすることが考えられる。下等動物であるツメガエルにおいても *x/TPO* と *x/EPO* の相同性は 30% を示すが、TPO は栓球造血を、EPO は赤血球造血を制御しており、両生類ではすでに分子進化を遂げていることが推察された。実際、*x/TPO* のシステイン部位は、哺乳類 TPO と一致しており、*x/TPO* はヒト Mpl を発現する UT-7/TPO にシグナルを伝える。よって、Mpl 結合領域を含む *x/TPO* の立体構造はヒトとツメガエルにいて保存されていることが推察される。

ヒト TPO の C 末端領域にはタンパク質の分泌に関与する N 結合型糖鎖が複数存在する。一方、*x/TPO* の N 末端領域には N 結合型糖鎖付加部位が存在するが、*x/TPO* は栓球前駆細胞の局在と同様に肝臓、脾臓で発現しており、*x/TPO* は傍分泌により栓球造血を制御していることが推測できる。また、Mpl 遺伝子の発現が認められない肺で *x/TPO* の mRNA が高発現しており (図 4-6)、N 結合型糖鎖が付加された *x/TPO* は血液中でも安定的に末梢を循環して、末梢栓球の抗アポトーシスに寄与することが考えられる。ヒト TPO は、末梢血小板に対してせん断応力や活性化因子による血小板凝集を刺激する他、循環 TPO 量を制御するが、本研究では、新たに *x/TPO* は STAT5 のリン酸化を促し、抗アポトーシスに作用することが明らかとなった (図 4-15D)。STAT5 のリン酸化は抗アポトーシス因子である *bcl-xL*、*pim-150* を活性化させるため (Nosaka et al., 1999)、末梢を循環する *x/TPO* は末梢栓球に作用して *bcl-xL* シグナルを活性化させることによりアポトーシスを回避し、末梢栓球の運命制御に関与することが推察される。ツメガエル栓球には核があり、末梢栓球に対する TPO の機能解析をする上で適したモデルだと考えられる。

x/TPO と *x/EPO* を用いたコロニーアッセイではツメガエル栓球、赤血球の前駆細胞は肝臓、脾臓に局在することが明らかとなった。末梢栓球と肝臓 T12 陽性細胞は末梢赤血球と比較すると 2-4 倍量の DNA 含量を有する一方で、脾臓 T12 陽性細胞の核相は末梢栓球と一致した。肝臓細胞は *x/TPO* 存在下で 2 週間以上培養出来る

のに対し、脾臓細胞は肝臓細胞程長期間の培養が出来ない（図 4-10）。加えて、10-20 μm の小さな T12 陽性細胞は肝臓よりも多く脾臓に存在する。本結果より、肝臓と脾臓には異なる分化段階の栓球前駆細胞が局在していることが考えられる。機能的な栓球は巨核球から産生されるが、形態の大きい細胞は肝臓に多く見られ、脾臓には形態学的に成熟に近い細胞が局在する。それ故、ツメガエル肝臓の造血微小環境は巨核球の成熟を制御し、脾臓にある造血微小環境は後期の分化段階である栓球前駆細胞において重要な機能を担っていると推察される。成体マウスにおいて、血管内皮細胞、間葉系幹細胞などから構成される造血微小環境が造血幹細胞の自己増殖や維持に関与している。マウス脾臓内では洞様血管周囲の間質細胞が造血ニッチ細胞の一つとして同定されているが（Inra et al., 2015）、造血発生に伴う造血微小環境の移行に関する知見はない。本研究により、ツメガエルは肝臓と脾臓で微小環境の機能が異なる動物であることが考えられるため、造血微小環境の機能を考察する上で面白いモデルになり得る。

マウス TPO は造血幹細胞の維持に関与しており（De Graaf and Metcalf, 2011）、Mpl 欠失マウスは造血幹細胞が欠失することが報告されている（Kimura et al., 1998）。Mpl の 60 残基のアミノ酸を欠失させたマウスを用いた実験からは膜貫通ドメイン隣接領域が造血幹細胞の自己増殖に関与することが報告されているが（Tong et al., 2007）、*x*/MPL も同様に膜貫通ドメインに隣接した領域が保存されている。ヒト TPO は *in vitro* において 2 週間以上造血幹前駆細胞の増殖を促すが、*x*/TPO も同様に肝臓細胞中の未熟な細胞を 2 週間以上細胞増殖させた（図 4-10）。本知見より、肝臓には造血幹細胞或いは造血幹細胞に近い未熟な細胞が存在することが示唆される。

本章では、ツメガエル栓球前駆細胞は血小板の前駆細胞と同様に巨核球であることが明らかになった。哺乳類とは異なり、ツメガエル網細血管は発達しておらず、細胞形態を小さくする Proplatelet formation は必要がなかったのかもしれない。哺乳類の巨核球の核相は 2 N から 126 N まで増加し、Proplatelet formation により、1 細胞の巨核球から 4000 – 8000 個の血小板が産生される（Tavassoli, 1980）。本研究では核が多倍体化して DNA 含量が 8 N から 32 N へ増加したツメガエル巨核球を同定した。本細胞は少なくとも 1 回分裂し、2 細胞から 4 細胞の栓球を産生することが推察される。成体ツメガエル（30 g）には約 3×10^7 細胞の末梢栓球が存在する。

ツメガエル栓球寿命は明らかになっていないものの、赤血球の寿命がツメガエルと近いギンブナでの栓球寿命は約 70 日であるため (Maekawa et al., 2012; Fischer et al., 1998), ツメガエル栓球寿命を 70 日と仮定すると, 1 日に 4×10^5 細胞の栓球が回転していることになる。さらに, 肝臓細胞が 5×10^8 細胞であることから肝臓内では 5000 細胞に 1 個の巨核球が存在する計算となり, 少数の細胞で有るが故, これまで発見されてこなかった可能性が考えられる。

アフリカツメガエルのゲノムデータベースが現在進行形で構築されており, 比較造血症領域において, ツメガエルモデルは新規の知見を生み出す優良なモデル動物になると期待されている [Horb M *et al.* Xenbase. 2014 Xenopus Community White Paper. Improvement of Xenopus antibody resources. 2014. Available at : <http://www.xenbase.org/community/xenopuswhitepaper.do>. アクセス日, 2015 年 6 月 10 日]。本研究結果において, *x/TPO* は肝臓, 脾臓で起こる栓球造血において, 栓球前駆細胞から成熟栓球に至るまで, 幅広く作用することを明らかとした。また, *x/TPO* は巨核球を成熟させるだけではなく, 末梢栓球においては抗アポトーシスに寄与することが示唆された (図 4-16)。*x/TPO* は哺乳類 TPO との相同性は低いが, 巨核球の形成と巨核球から止血細胞の最終分化抑制に関わる点で哺乳類と機能が一致することから, *x/TPO* が哺乳類 TPO の機能的なオルソログだと明らかとなった。また, 末梢栓球への抗アポトーシス作用はツメガエルで新たに判明した TPO 機能であり, 今後他種での検証をして, TPO の多様性と普遍性を解明することが求められる。

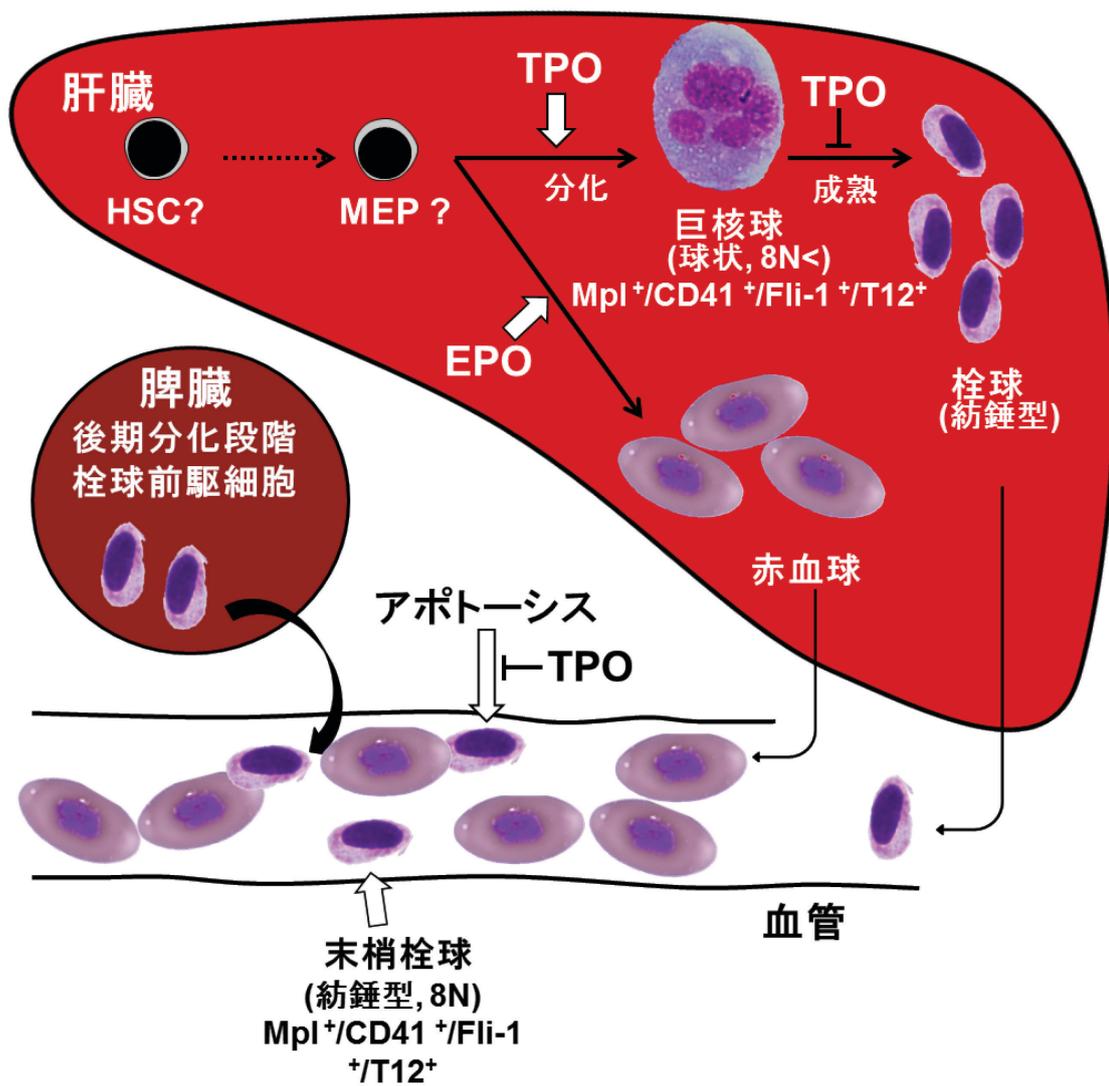


図 4-16. ツメガエル栓球造血モデル

x/TPO は肝臓，脾臓中の巨核球形成を促す。また，巨核球から栓球産生の過程において，x/TPO は負に制御している。成熟栓球において，x/TPO/Mpl シグナルは抗アポトーシスに寄与する。肝臓，脾臓には異なる分化段階の栓球細胞がそれぞれ局在していることが考えられる。Tanizaki *et al.* Sci Rep. 2015 より改変。

第 5 章

x/TPO の造血幹/前駆細胞に対する機能

5-1. 背景

成体マウスにおける骨髄造血幹細胞は $CD34^{-/low}$, $c\text{-Kit}^+$, $Sca\text{-}1^+$, $lineage^-$ 画分に濃縮される (Osawa et al., 1996), また, ヒトでは $Thy\text{-}1^+$, Lin^- , $CD34^+$ 画分に造血幹細胞が濃縮されることが報告されている (Baum et al., 1992)。造血幹細胞が Hoechst33342 染色により高度に濃縮されることが報告されると (Side population : SP 細胞) (Goodell et al., 1996), 本手法を用いて, ギンブナやゼブラフィッシュの腎臓から造血幹細胞が濃縮された (Kobayashi et al., 2007, 2008)。哺乳類において, 造血は卵黄嚢で始まり, AGM 領域, 胎仔肝臓に移行して最後は骨髄で造血が維持される (Orkin and Zon, 2008)。哺乳類成体造血とは異なり, 多くの非哺乳動物の骨髄には造血前駆細胞が認められない。ツメガエルや海水魚クロダイの骨髄はヒト再生不良性貧血患者の骨髄と同様に (Kaplan et al., 1987), 脂肪で満たされている (Okui et al., 2013; Hughes et al., 1994)。マウスにおいて, 骨髄中の脂肪は造血微小環境の構築を阻害するため (Naveiras et al., 2009), 非哺乳動物の骨髄造血は脂肪により阻害されていることが考えられる。本論文 4 章の結果を踏まえ, ツメガエル造血幹細胞は肝臓に局在する可能性が高いと判断して, TPO/Mpl 系を用いた肝臓内の未熟細胞の検出を行った。

5-2. 材料および実験方法

5-2-1. ツメガエル肝臓細胞の x/TPO により誘導される長期培養細胞の性質

ツメガエル肝臓細胞は 4-2-4 に従い, $10\text{ ng/mL } x/TPO$ 存在下の半固形培地で細胞培養した。2 週間に一度, コロニーのない領域から半固形培地を $300\text{ }\mu\text{l}$ 廃棄し, 同量の $10\text{ ng/mL } x/TPO$ 含有半固形培地をコロニーが崩れないよう少しずつ添加する。3 カ月間, 週に 1 度複数コロニーを回収し, 1 つのコロニーを構成する細胞数をトリパンブルー染色により計数した。

5-2-2. *x*/TPO 誘導された培養細胞の再播種実験

x/TPO 誘導された細胞は他の細胞がなくなる 21 日以降に回収し、ピペッティングにより単細胞分散した。*x*/TPO 誘導細胞は 100 ng/mL *x*/EPO, 10 ng/ml *x*/TPO 含有培地に再播種した。コロニーアッセイを 24 穴プレートで行い, 8 日後にコロニーを計数し, *x*/TPO 依存性を解析した。また, ツメガエル脾臓を単細胞分散した後, 20% FCS 含有 0.8 × α -MEM 中で, 5.0 × 10⁵ 細胞/mL の細胞 10 mL を 10 cm ディッシュで 4 日間培養する。培養上清は 15 ml 遠沈管に回収後, 900 g で遠心分離し, 上清を馴化培地とした。*x*/TPO 誘導された培養細胞 1.0 × 10³ 細胞を 100 μ l の馴化培地に再播種し, 96 穴プレート (コーニング) で培養する。3 日後に細胞を回収し, 遠心塗抹標本を作製し, MGG 染色した後, 細胞の形態を観察した。

5-2-3. *x*/TPO 誘導された培養細胞の遺伝子発現解析

コロニーから回収した細胞は 3-2-4 で前述した手法により cDNA を作成する。作製した cDNA と表 5-1 のプライマーを用いて RT-PCR を行った。

表 5-1 プライマーリスト

遺伝子	Forward プライマー	Reverse プライマー
<i>rpl13a</i>	5'-AAGAATGCCAGACAGGTTTTGA-3'	5'-CTCCGAAGTTTCCCAATGATC-3'
<i>esam</i>	5'- CAGCACCAACCACACAGATA-3'	5'- GACCCACCTCTTTTCATTTG-3'
<i>globin</i>	5'-CACCTGGGGCAAACCTATGTG-3'	5'-GCCTCATTGTGGAAGACGG-3'
<i>albumin</i>	5'-CCAAGCAAGATCCAGAGAGG-3'	5'-TGGCTGAGACAATTCAGCAG-3'
<i>c-kit</i>	5'-GCCCTAATGTCAGAACTGAAG-3'	5'-ATGCTCTCAGGAGCCATCCACTTC-3'
<i>gata1</i>	5'-CCTTAGGCCCTATAACTTCTC-3'	5'-ACTTGCCCTCTCTGTCTTCAG-3'

5-2-4. ツメガエル肝臓部分切除モデルの構築

30 g - 40 g のオスのツメガエルは MS222 w/V (シグマ) を溶かした水中にツメガエルを曝露する。15-30 分後に, ツメガエルの脚を伸ばし, 反応の有無により麻酔の状態を判断する。さらに, 氷上麻酔をかけ, 氷を張った発泡スチロール上に仰向けに保定する。左腹上部を 1 cm 程切り込み肝臓の左葉を体外に出し, 手術用メスを火で炙り左葉を切断する。その後, 100%エタノールに浸した外科用縫合絹糸 (新鋭工業) を用いて, 内膜, 表皮をそれぞれ縫合する。縫合したツメガエルは水を 1 cm 張った容器に移して麻酔が解けるまで静置する。さらに, 麻酔が解けたら 1 L 水槽に移し, 0.5%になるように塩を加える。その後, ツメガエル水槽の水は 1 週間

に1度半分量を変え、ツメガエルに与える負荷を軽減させる(図5-4A)。肝部分切除してから24日後、採血し、血球数を計数した。また、キャピラリー管に末梢血液を毛細管現象により採取した後、パテで蓋をし、1000g、15分の遠心を行い、血球成分と血漿成分の比率を算出し、ヘマトクリット値とした。プルシアンブルー染色は、フェロシアン化カリウム3水和物(和光)2gと超純水100mlを混合した溶液と、濃塩酸(和光)1mlと超純水100mlを混合した溶液を等量ずつ混合し、染色液とした。肝臓切片をプルシアンブルー染色液に浸し、30-60分の中で定期的に発色状態を観察しながら反応を停止した。また、赤血球前駆細胞は*o*-ジアニシジン、ギムザ重染色を行い、*o*-ジアニシジン弱陽性細胞を示す細胞を赤血球前駆細胞として計数した。

5-2-5. ツメガエル自家細胞移植系の構築

肝部分切除個体を用いた自家細胞移植系の構築を試みた。ツメガエル肝臓部分切除により、摘出した肝臓は4-2-4に従って半固形培地による培養を行う。24日後、コロニーを回収した後、PKH26(シグマ)を説明書に従い染色し、心臓から血流に細胞を移植した。1カ月後、ツメガエルから肝臓の右葉、脾臓を摘出し、一部を単細胞分散した。フローサイトメトリー法により肝臓、脾臓に局在するPKH26陽性細胞を分取し、MGG染色による形態観察を行った。また、肝臓、脾臓の組織片は固定液(4%パラホルムアルデヒド/0.8×PBS)に12時間4°Cで反応させ、7μmの厚さの凍結切片を作製した後、DAPI(同仁化学)を10分間反応させた。自家細胞移植系の概略は図5-1に示した。

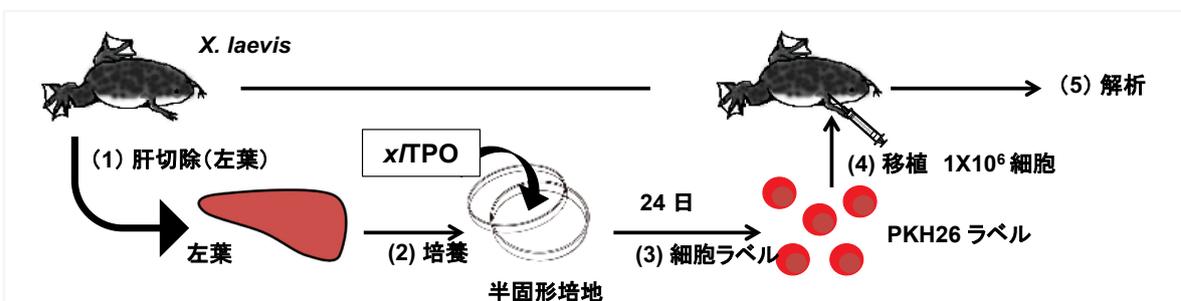
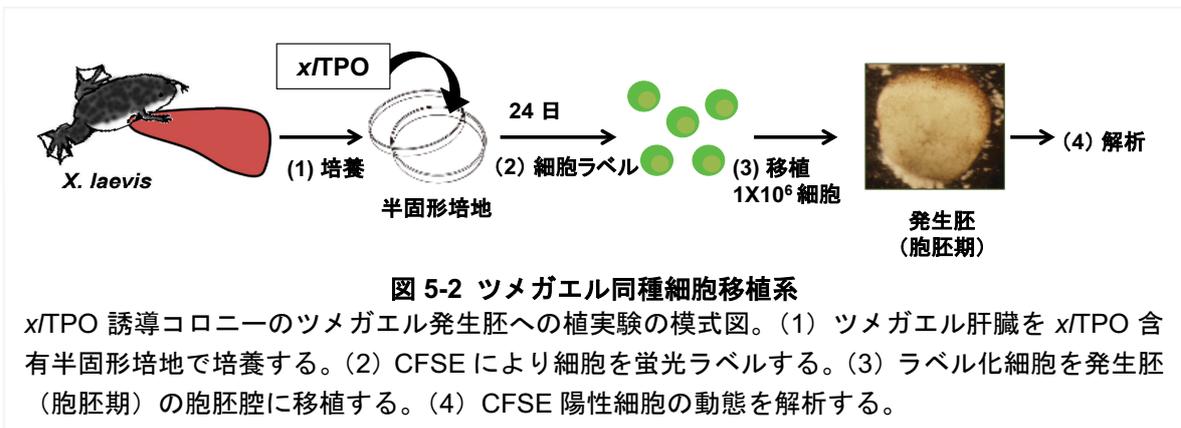


図 5-1 ツメガエル自家細胞移植系

x/TPO 誘導コロニーのツメガエル自家細胞移植実験の模式図。(1) ツメガエル肝臓(左様)を摘出し、縫合する。(2) 肝臓を x/TPO 含有半固形培地で培養する。(3) PKH26 により細胞を蛍光ラベルする。(4) 心臓よりラベル化細胞を移植する。(5) 臓器に生着した細胞を解析する。

5-2-6. ツメガエル同種細胞移植系の構築

夕方 (17-18 時), 80 g のメス個体に $0.8 \times$ DPBS に融解した性腺刺激ホルモン (HCG) を左右の脚に 400 U ずつ投与し, 200 U の HCG を皮下注射したオス個体と一緒に光の入らないケースに入れる。ケースには 10 cm 程の飼育水を加えて, 一晩静置する。翌日の 8-9 時に受精卵を回収する。受精卵は 2% システイン (シグマ) - $0.1 \times$ Marc's Modified Ringers (MMR) 溶液 (pH7.6 - 8.0) で 10 分間混和し, 50 μ g/ml ゲンタマイシン含有 $0.1 \times$ MMR 溶液で 5 回洗浄後, 6% フィコール (シグマ) - $0.1 \times$ MMR 溶液下で受精卵をシャーレに移し, 胞胚期になる受精卵を実態顕微鏡下で選別する。*x/TPO* 誘導された培養細胞は Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), または PKH26 によるラベルを行い, 1000 細胞 / 9.2 nL になるように細胞数を調整する。胞胚の胞胚腔にマイクロインジェクター (Nanoject-2, Drummond) を用いて調整した細胞を 9.2 nl 胞胚腔にインジェクションした。速やかに, 6% フィコール - $0.1 \times$ MMR 溶液の中に 1 細胞ずつ 24 穴プレートに発生胚を移し, 18°C の低温インキュベーター (三菱電機エンジニアリング) で発生させた。各穴の発生胚は 3 日間, 実体蛍光顕微鏡で経時観察し, 撮像した。さらに, 3 日後に胚を回収して凍結切片を作成した。自家細胞移植系の概略は図 5-2 に示した。



5-3. 結果

5-3-1. ツメガエル x/TPO 刺激により誘導される長期培養細胞

肝臓細胞は単細胞分散した後、 x/TPO 含有メチルセルロース半固形培地に播種し、培養した。培養 21 日後にはコロニー以外の細胞は全て死んでおり、 x/TPO 依存的なコロニーのみを見分けることができた。よって、24 日目に解析する一つのコロニーは他の細胞等のコンタミネーションの影響がない。本コロニーは最大約 3 mm にもなり、その構成細胞はヘテロな細胞集団であった (図 5-3A-B)。コロニー構成細胞は巨核球、紡錘型の栓球系細胞、顆粒球様細胞が含まれていた。さらに、本コロニーは培地を 2 週間に一度変えることにより、3 か月以上培養出来ることが明らかとなった (図 5-3C)。コロニー構成細胞数は 3 か月間増殖し続け、培養 3 か月後には 10^6 細胞に達し、3 か月の間に少なくとも 20 回は分裂したことになる。

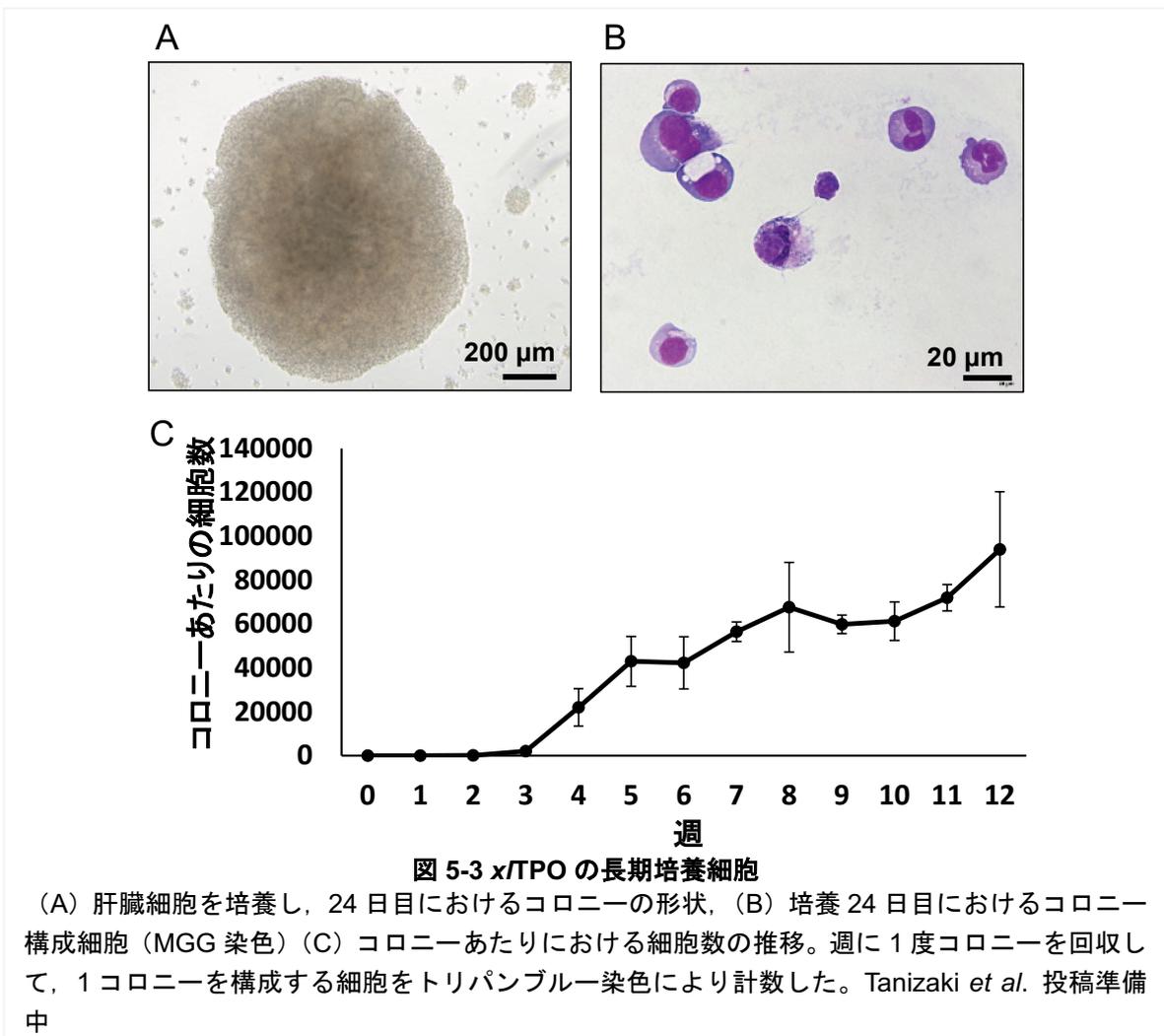
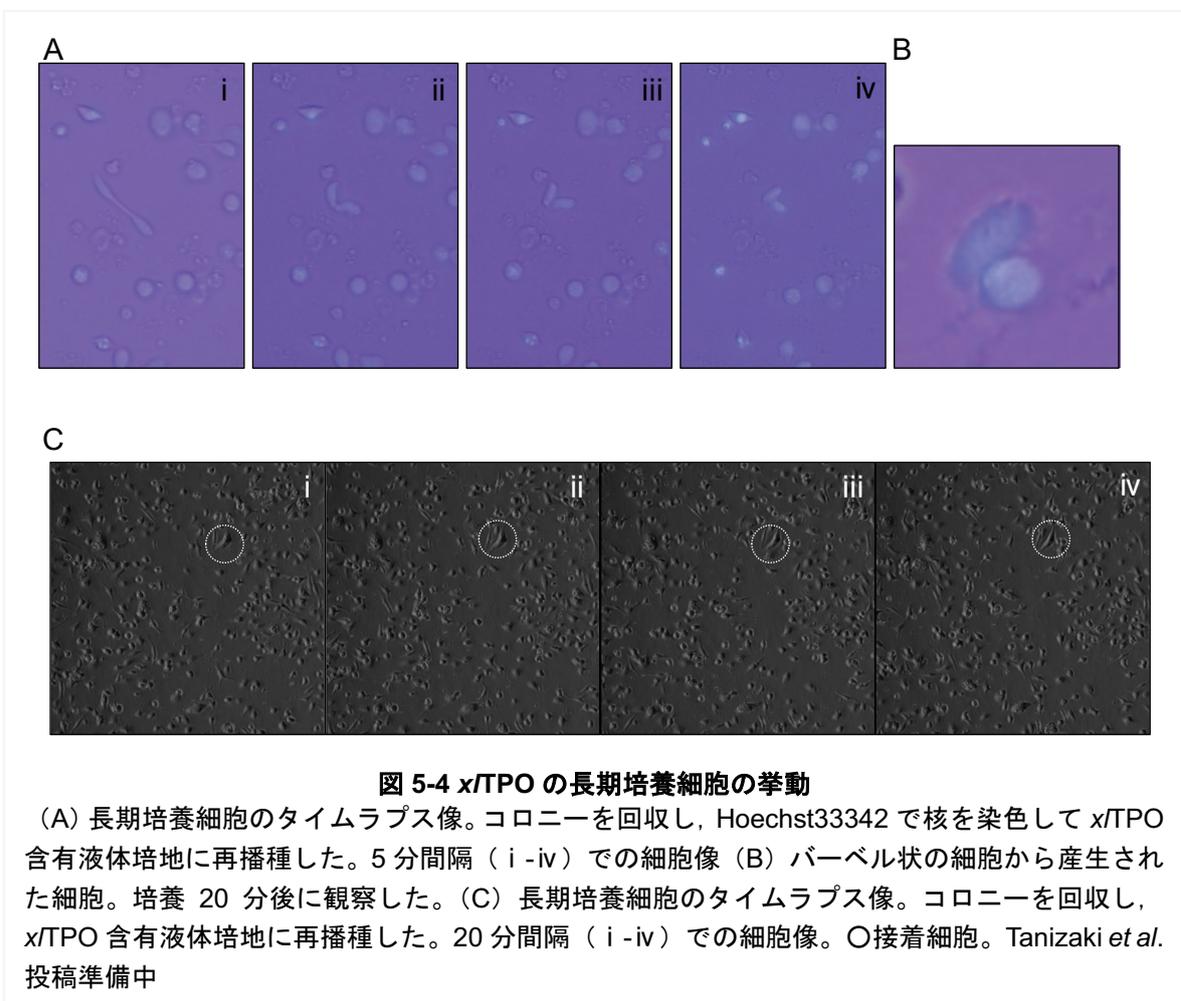


図 5-3 x/TPO の長期培養細胞

(A) 肝臓細胞を培養し、24 日目にけるコロニーの形状、(B) 培養 24 日目にけるコロニー構成細胞 (MGG 染色) (C) コロニーあたりにおける細胞数の推移。週に 1 度コロニーを回収して、1 コロニーを構成する細胞をトリパンブルー染色により計数した。Tanizaki *et al.* 投稿準備中

コロニーを回収し、*x/TPO* を添加した液体培養をおこない、タイムラプス撮影による経時的な変化を解析した。4-3-5 で示したように、巨核球は培養するとバーベル状に細胞の形態が変化していく。コロニーを回収し、再播種したところ同様にバーベル状の細胞が出現した。更に、本細胞を 5 分間隔で撮像した結果、バーベル状の細胞は分裂し、紡錘型の栓球様細胞と球状の細胞を産生した (図 5-4A-B)。また、長い間隔での細胞挙動を解析するため、10 分間隔で 8 時間タイムラプス撮影した。結果、静的な細胞、動的な細胞が観察され、ヘテロな細胞集団であることが明らかとなった (図 5-4C)。



5-3-2. ツメガエルにおける *x/TPO* 誘導細胞の多分化能の解析

本コロニーの *x/TPO* 依存性を解析するため、コロニーを回収後、*x/TPO* 含有半固形培地、*x/EPO* 含有半固形培地、対照培地に再播種した。8 日後に、*x/TPO* 含有半固形培地では播種細胞の約 10%の細胞が再度コロニーを形成したのに対し、*x/EPO* によるコロニー形成はほとんど見られない (図 5-5A)。本結果より、本コロニーは *x/TPO* 依存的に増殖していることが示された。続いて、本コロニーは長期培養出来るといった特徴とヘテロな細胞集団を構成するコロニーであるといった特徴から、多分化能を有する細胞だと仮説を立てた。コロニー構成細胞の分化能を解析するため、脾臓細胞を培養して得られた馴化培地にコロニー構成細胞を再播種し、細胞の分化誘導を行った (図 5-5B)。コロニー構成細胞を *x/TPO* 存在下で再度培養すると、MGG 染色した際、細胞質が好塩基性を示す未熟な細胞であった (図 5-3C)。一方、馴化培地で培養した細胞は細胞質が好塩基性を示すような未熟な細胞は減少し、代わりに *x/TPO* 存在下では観察が出来なかった好酸球が全細胞に対して約 5%、マクロファージが約 18%確認された (図 5-5C-D)。さらに、コロニーにおける栓球マーカー、赤血球マーカー、顆粒球マーカー、造血幹細胞マーカーの遺伝子発現を調べた。その結果、一つのコロニーから得られた細胞群は栓球マーカーである *mpl*, *fli-1*, *cd41*, 赤血球マーカーである *gatal*, *globin*, 顆粒球マーカーである *mpo*, *g-csfr*, を発現していることが明らかとなった。また、哺乳類では造血幹細胞マーカーとして使われている *c-kit*, *esam* といった遺伝子の発現も認められた。一方で、肝臓細胞のマーカーである *albumin* の発現は認められなかった (図 5-5E)。以上より、*x/TPO* は栓球系の分化系譜に限らず、多分化能を有する細胞を *in vitro* により長期維持することが示された。

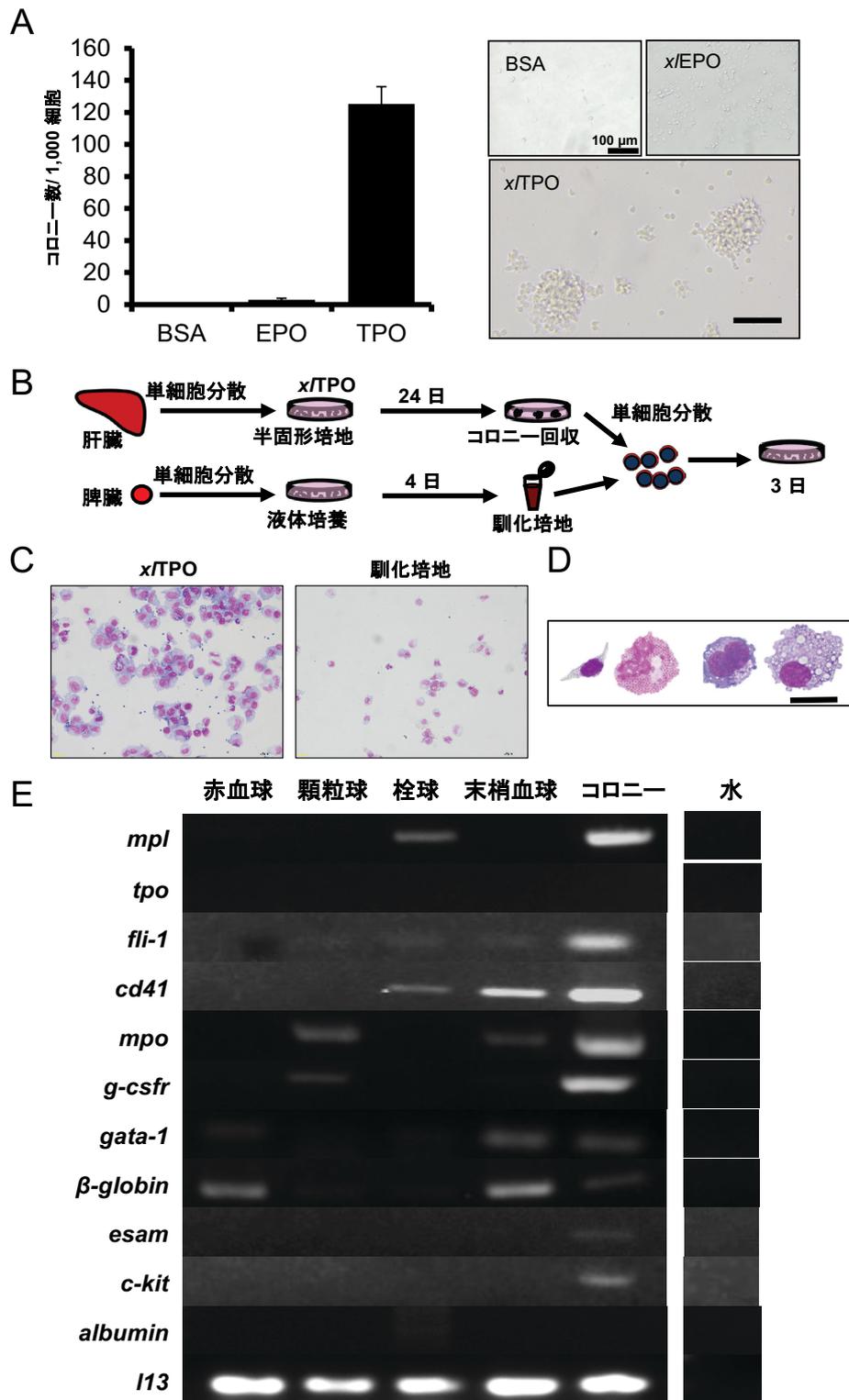


図 5-5 x/TPO により誘導された細胞の多分化能

(A) x/TPO 誘導コロニーの再播種実験。左図：培養 8 日目におけるコロニー数，右図：培養 8 日目におけるコロニー像 (B) x/TPO 誘導コロニーの分化能解析実験系の模式図。(C) x/TPO 誘導コロニーにおける脾臓馴化培地刺激実験。培養 3 日後の細胞形態 (MGG 染色)。(D) 脾臓馴化培地刺激により誘導された血球系細胞像。(E) コロニー構成細胞に発現する遺伝子。Tanizaki *et al.* 投稿準備中。

5-3-3. ツメガエル自己細胞移植に向けた肝臓摘出モデルの作出

一般的に幹細胞性は放射線照射し、造血前駆細胞を除去したマウスモデルに同一系統から得られる造血幹細胞を移植してその性質が解析される。一方、ツメガエルにおける造血細胞の移植系がないため、自己細胞移植系の構築を試みた。ツメガエルは肝造血のため、肝臓を一部切除した個体を作製し、切除した肝臓中から回収した造血細胞を移植する系を考案した。本実験を進めるにあたり、まずはツメガエル肝臓を半分摘出した後に起こる造血変動を解析した。肝臓摘出後、*x/TPO* 誘導細胞が得られる 24 日目に細胞移植することを想定し、肝切除後 24 日目における末梢赤血球、顆粒球、栓球の計数を行った。疑似手術個体では各血球における変動は見られなかった一方、肝部分切除個体における血球数は赤血球で減少するほか、顆粒球が増加した (図 5-6A)。ヘマトクリット値は肝切除個体で 1/3 以下に減少し、貧血を呈した。(図 5-6B) 貧血の原因を探索するため、疑似手術個体と肝部分切除個体の肝臓切片をそれぞれプルシアンブルー染色により、肝臓に含まれる貯蔵鉄を検出した。さらに、Image J を用いた画像解析から組織に対するプルシアンブルー染色陽性領域を計測したところ、肝部分切除個体モデルでは優位に貯蔵鉄が減少しており、肝部分切除個体は鉄欠乏性貧血が誘導されていることが示唆された (図 5-6B-C)。続いて、臓器内における赤血球前駆細胞数を解析した結果、肝部分切除個体で肝臓、脾臓、末梢血球、骨髄内における赤血球前駆細胞数が増加していることが明らかとなった (図 5-6D)。さらに、増加した赤血球前駆細胞の多くは類洞内皮細胞に結合していた (図 5-6E)。よって、肝部分切除個体では貧血を呈する一方、造血機能は亢進していることが考えられた。しかしながら、肝臓中に含まれる多分化能を有する細胞の数は *x/TPO* を用いたコロニーアッセイを用いて解析したところ、肝切除前後で変動はなかった (図 5-6F)。本知見により、肝部分切除個体は鉄欠乏性貧血を呈する一方、赤血球造血が特異的に亢進しているモデルであることが明らかとなった。

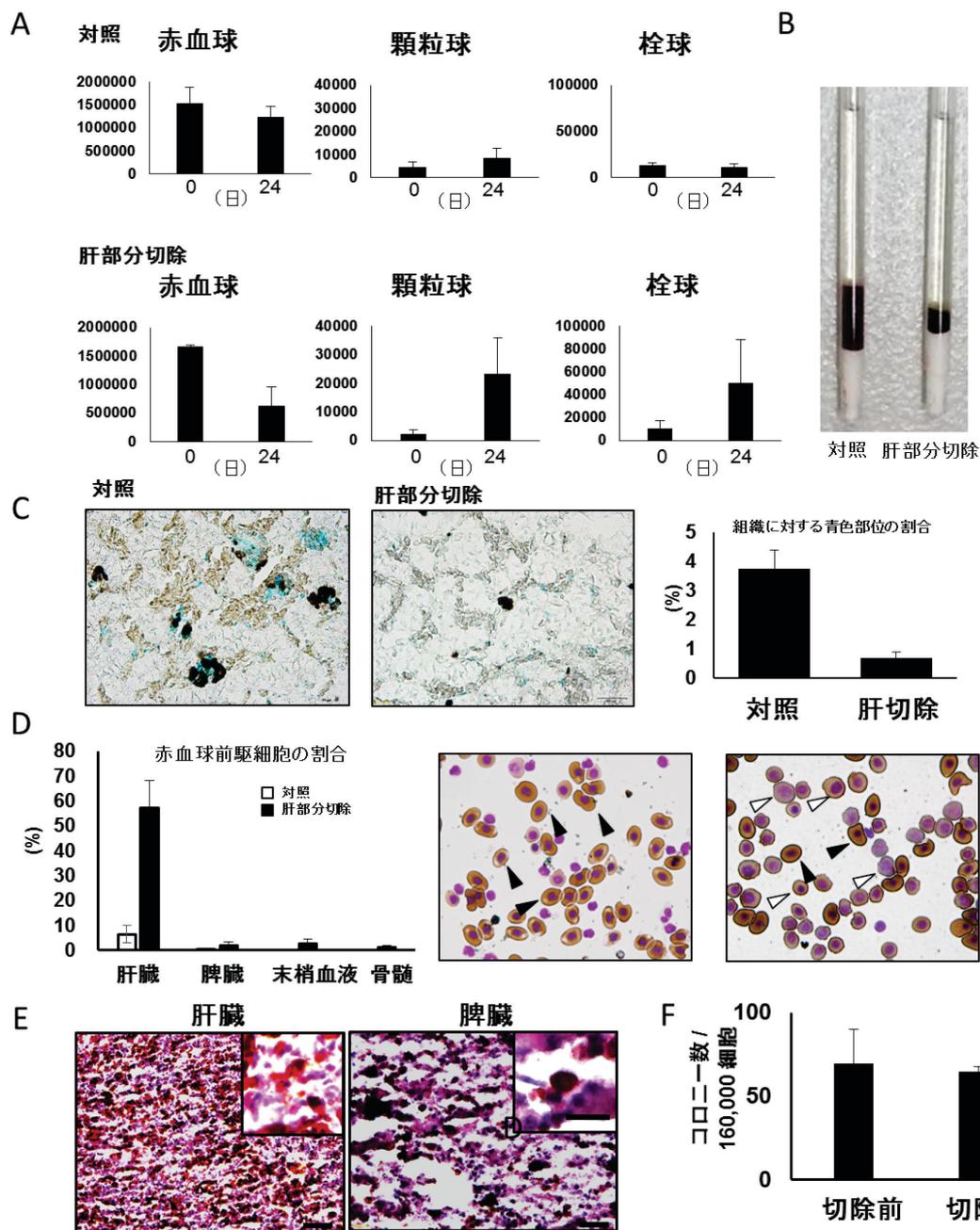


図 5-6 ツメガエル肝部分切除御隊における造血様式

(A) 肝臓部分切除前後における末梢血球数の変動。上段：疑似手術群における血算値。下段：肝部分切除個体における血算値 (B) 疑似手術個体，肝切除個体における 24 日目のヘマトクリット。(C) 肝部分切除個体におけるプルシアンブルー染色。左図：プルシアンブルー染色像，右図：視野における青色を呈する領域の割合 (Image J により算出)。(D) 肝切除後における各組織における赤血球前駆細胞 (o-dianisidine 弱陽性細胞) の割合。左図：疑似手術個体，肝切除個体における赤血球前駆細胞の割合，右図：疑似手術個体，肝切除個体における末梢血液像。▲：成熟赤血球，△未熟赤血球 (E) 肝切除個体における肝臓，脾臓の組織構造 (o-dianisidine 染色+エオシン染色)。スケールバー：20 μm (F) 肝臓切除前後における xTPO 誘導性多分化能を有する細胞数の推移。Tanizaki *et al.* 投稿準備中。

5-3-4. TPO 誘導長期培養未熟細胞の生着能および生着細胞の特徴

ツメガエルには片桐千明, 柘内新が樹立した Japan 系統 (J 系統) が存在し (Tochinai and Katagiri, 1975; Nakamura et al., 1985), 成体間の皮膚移植が可能である (Izutsu and Yoshizato, 1993)。ツメガエル造血前駆細胞の移植実験をする際には, 移植系の確立, 実証に必要となる J 系統の個体数は少なく見積もり 30 匹を超える。J 系統ツメガエルの数は限りがあるため, 本研究では, 肝部分切除モデルを用いた自家細胞移植系の構築を試みた。肝臓の左様を摘出した後, 摘出した肝臓細胞は α TPO 含有半固形培地で培養する。24 日後にコロニーを回収し, 細胞膜を染色する PKH26 で細胞染色をし, 肝切除したツメガエルの心臓から血中に細胞移植を行った。細胞移植してから 14 日目の肝臓, 脾臓細胞をフローサイトメトリーにより解析したところ, 両臓器において PKH26 陽性細胞が検出された (図 5-7A)。肝臓, 脾臓に局在する PKH26 陽性細胞をフローサイトメトリーにより解析した結果, 2 つのピークが存在しており, 移植した細胞が肝臓と脾臓に生着して, 少なくとも一度は分裂していることが確認できた。PKH26 陰性画分と比較して (図 5-7B), PKH26 陽性細胞を強度により 2 分画し, 細胞分裂が盛んでない PKH26 強陽性細胞 (PKH26⁺⁺細胞) と細胞分裂が盛んな弱陽性細胞 (PKH26⁺細胞) とした (図 5-7C)。続いて, 細胞をそれぞれ分取して, 形態を観察したところ, 肝臓, 脾臓に生着した PKH26⁺⁺細胞は細胞の形態が 10 μ m 程度と小さく, N/C 比の高い, 好塩基性を示す造血幹細胞様の特徴を示した。また, 肝臓, 脾臓と共に臓器に生着した生着細胞は FSC^{low}画分に濃縮された。一方, 分裂能が高い細胞については PKH26⁺⁺細胞と比較すると細胞の形態も大きく, N/C 比の低い細胞であることが示され, PKH26⁺⁺細胞は PKH26⁺より未分化な細胞であることが推察できる (図 5-7C)。続いて, PKH26 陽性細胞の局在を解析するために, 凍結切片を作製し, 臓器内局在を蛍光顕微鏡により観察した。その結果, 肝臓では類洞に PKH26 陽性細胞が類洞の内皮細胞に沿って局在することが示された。また, 脾臓においては脾洞の内皮細胞に結合するようにして局在していた (図 5-7D)。本知見より, 類洞内皮細胞はツメガエル造血において, 造血微小環境を構築する細胞であることが推察された。

以上の結果より, x/TPO により誘導された細胞の一部は N/C 比の高い幹細胞様の細胞であり移植後, 類洞内皮細胞に生着することが明らかとなった。しかしながら, 現行の細胞ラベル法では長期間細胞を追跡出来ないため, 細胞の分化能の解析には困難を伴う。

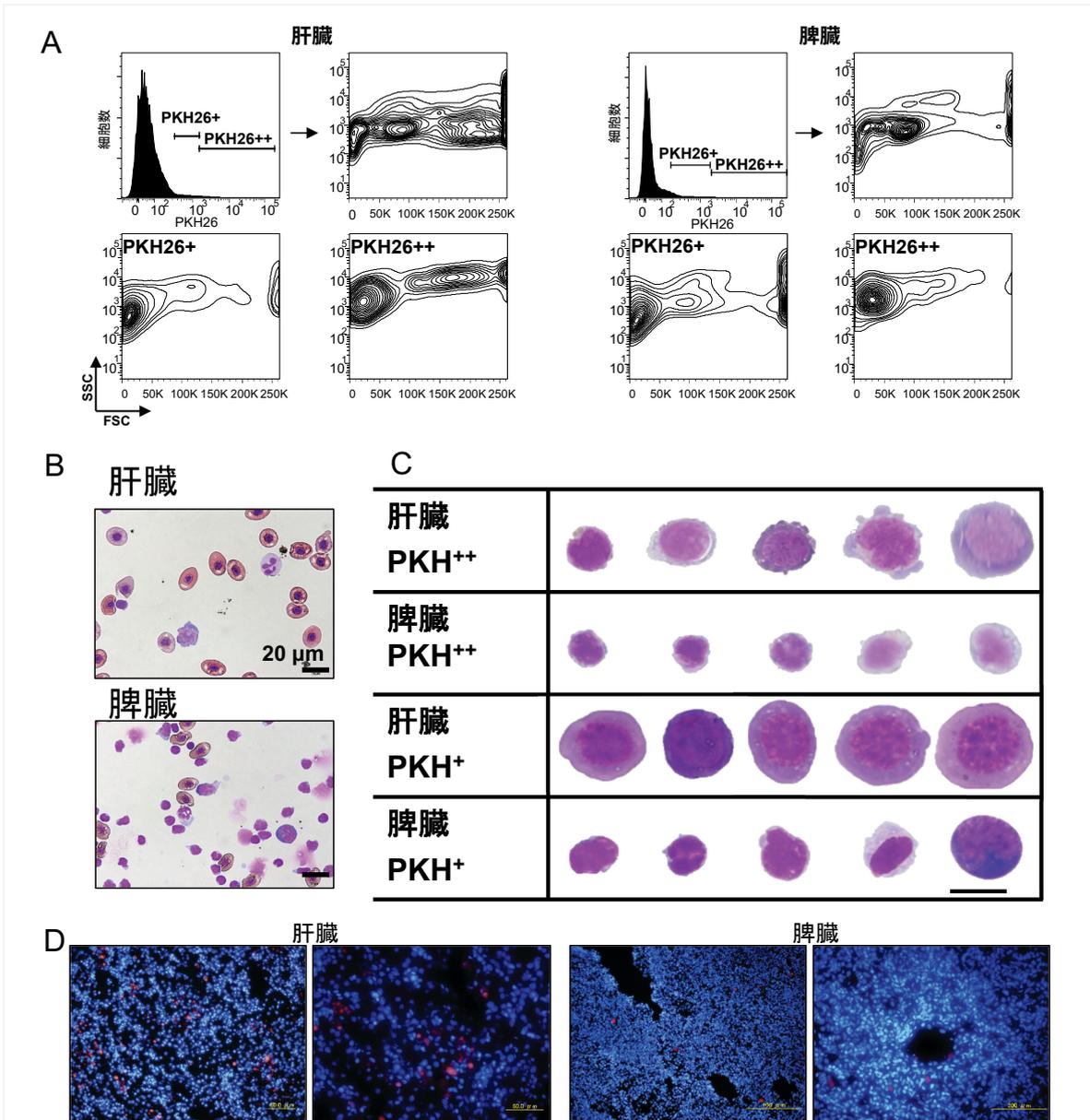


図 5-7 ツメガエル肝部分切除モデルを用いた x/TPO 誘導細胞の移植

(A) 細胞移植後 14 日後における肝臓, 脾臓での PKH26 陽性細胞のフローサイトメトリー解析。上段左: PKH26 陽性細胞のヒストグラム, 上段右: 全細胞における SSC, FSC 図, 下段左: PKH26⁺細胞における SSC, FSC 図, 下段右: PKH26⁺⁺細胞における SSC, FSC 図 (B) 肝臓, 脾臓における PKH26 陰性細胞像。(C) 移植後生着した PKH26⁺⁺細胞, PKH26⁺細胞の形態 (MGG 染色)。(D) 移植後 14 日目における肝臓, 脾臓における PKH26 陽性細胞の組織局在。赤: PKH26 陽性細胞, 青: DAPI。Tanizaki *et al.* 投稿準備中。

5-3-5. TPO 誘導長期培養未熟細胞の多分化能

造血幹細胞は、血球系以外に骨格筋細胞、繊維芽細胞、脂肪細胞への分化能を有する。PKH26 を用いたラベル法では長期間の細胞追跡が困難であるため、PKH26 もしくは CFSE で *x*/TPO 誘導性細胞をラベルした後、発生胚に移植をした。本手法は、胞胚期にある胞胚腔に細胞を移植することで、免疫拒絶の問題も回避が出来る他、短期間で多様な細胞に分化する利点がある。移植して2日後、発生胚を蛍光顕微鏡で観察すると、一部の個体では CFSE 陽性細胞が節状に観察された。観察された領域に存在する節状の構造は筋肉であり、CFSE 陽性細胞は骨格筋に分化していることが推察された (図 5-8A)。本個体を時系列に観察すると、移植直後には全体的に散在していた細胞が発生に伴い集積し、2日目になると腹部、背部に移植細胞群が観察された (図 5-8B)。胚の切片を観察したところ、CFSE 陽性細胞は体内部から外部にかけ集積しており、移植細胞が組織構造を構築していることが伺えた (図 5-8C)。さらに、PKH26 でラベルした細胞についても非造血系への細胞分化を確認した (図 5-8D)。よって、*x*/TPO により誘導された細胞は多能性を有することが示唆された。

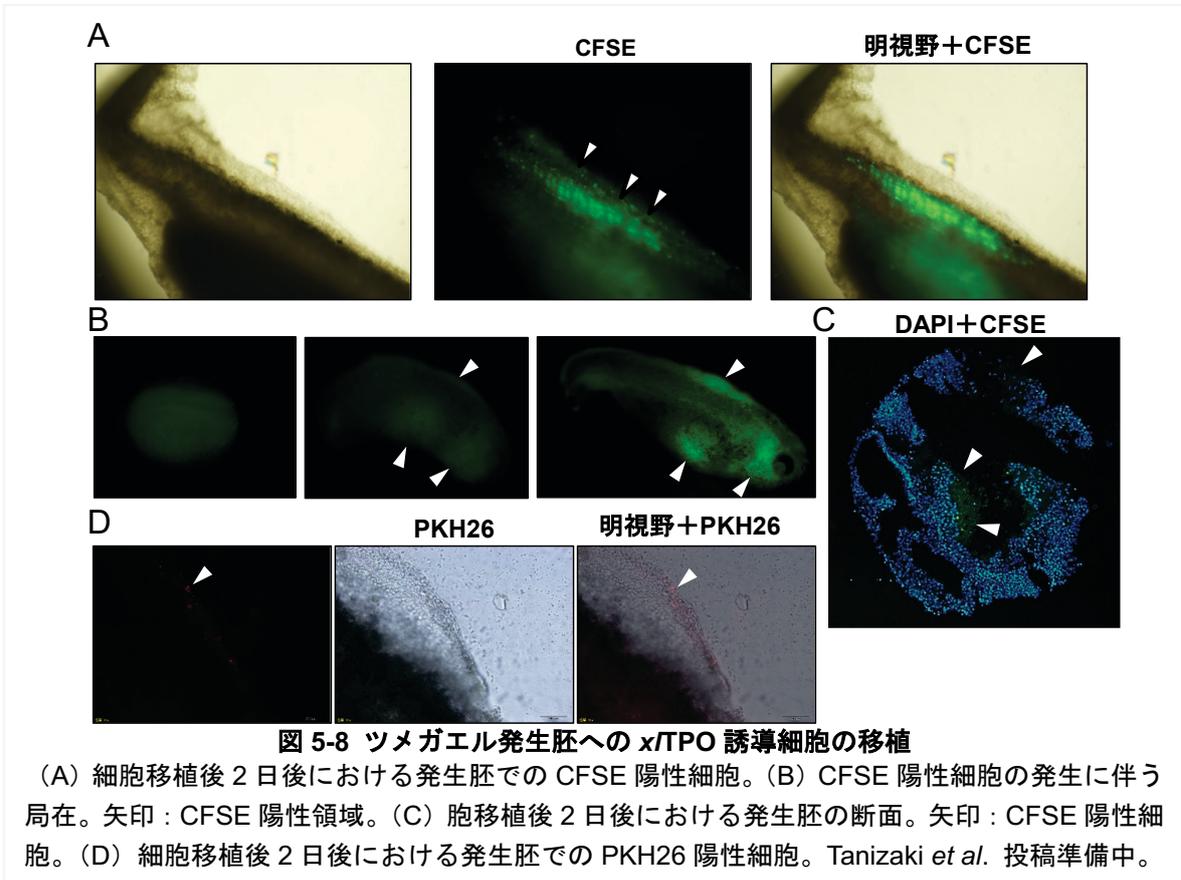


図 5-8 ツメガエル発生胚への *x*/TPO 誘導細胞の移植

(A) 細胞移植後 2 日後における発生胚での CFSE 陽性細胞。(B) CFSE 陽性細胞の発生に伴う局在。矢印：CFSE 陽性領域。(C) 胞移植後 2 日後における発生胚の断面。矢印：CFSE 陽性細胞。(D) 細胞移植後 2 日後における発生胚での PKH26 陽性細胞。Tanizaki *et al.* 投稿準備中。

5-4. 考察

体外での造血幹細胞増殖は臨床応用に向けた様々な研究が展開されてきた。本論文 2-1-3 (2) で述べたように、体外での哺乳類幹細胞は TPO, SCF, FL 等複数因子の含有培地において維持, 増殖されることが報告されている。一方, 本研究では *x*/TPO 単独で肝臓由来の造血前駆細胞を長期間増殖, 維持させた (図 5-1C)。哺乳類造血幹細胞は単独因子で 3 か月以上の培養は出来ておらず, 本培養系は幹細胞性の維持に関わる分子を探索する上で有用な実験系になり得る。また, 長期培養したコロニーを *x*/EPO 含有培地で培養したところ, 赤血球系への分化は観察されず, 細胞は死んだ (図 5-5A)。一方, 長期培養した細胞の中の一部は栓球系細胞へと分化することから (図 5-4A), MEP を介さない栓球産生経路がツメガエルに存在することが示唆された。

1957 年に造血幹細胞が初めてヒトに移植されて以来 (Thomas et al., 1957), 造血幹細胞の移植は血液疾患に対する治療法として確立されてきた。1988 年には顆粒球増殖因子として同定された G-CSF が造血幹細胞を末梢循環に動員することが示された (Dührsen et al., 1988)。その後移植医療が一般化し, 現在では造血幹細胞の移植には自身の造血幹細胞を移植する自家造血幹細胞移植と他者の造血幹細胞を移植する同種造血幹細胞移植が選択される。自家造血幹細胞移植では G-CSF の投与により末梢血中に動員された末梢血液由来の造血幹細胞を移植する。同種造血幹細胞移植は HLA 適合者の末梢血液由来造血幹細胞, 骨髄由来造血幹細胞, 臍帯血由来造血幹細胞が用いられている。また, 造血幹細胞は造血幹細胞を含む細胞集団を致死量の放射線を照射したマウスに移植することで, その性質が解析されてきた。移植した幹細胞は造血微小環境に生着し, 骨髄を再構築して造血能を回復させる。本研究では, まず野生型ツメガエルの自家細胞移植系の構築を目指した。ツメガエルは部分切除可能な肝臓が造血巣であるため, 部分切除した肝臓由来多分化性造血前駆細胞を切除した個体に移植したところ, 肝臓, 脾臓の内皮細胞に生着した (図 5-7D)。マウス脾造の赤脾髄の内皮細胞をニッチ細胞としており, 造血幹細胞は洞様血管周囲の間質細胞から分泌される SCF による制御を受けている (Inra et al., 2015)。ツメガエル TPO 応答性造血前駆細胞の局在は未同定ではあるが, 内皮細胞に生着していることはマウスと共通しており, 今後ニッチ細胞の同定を進めていく

必要がある。ツメガエルの造血ニッチモデルは哺乳類とは異なり軟組織で完結し、骨髄を造血巣とするマウスモデルと比較して実験操作が簡便な点で有用なモデルとなる。

自家細胞移植モデルでは長期間の追跡が困難であり、分化後の細胞を解析出来ないため、分化能を解析するためにラベルした細胞を発生胚の胞胚腔に移植する同種細胞移植系の構築を進めた。発生胚は短期間で様々な細胞に分化する他、胚の予定運命も既知のため、移植細胞の分化能を短期間に解析出来る利点がある。結果、移植細胞の一部は骨格筋の一部として検出された（図 5-8A）。哺乳類において、造血幹細胞は現段階で純粋な幹細胞を単離する方法はなく、議論もあるが造血幹細胞画分から繊維芽細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、肝実質細胞へと分化能を示した報告が多数ある（Gussoni et al., 1999; Corbel et al., 2003; Camargo et al., 2003; Ogawa et al., 2006; Ebihara et al., 2006; Sera et al., 2009; Lagasse et al., 2000）。よって、ツメガエル自家細胞移植実験に用いた細胞を今後さらに絞る必要があるものの、*x/TPO* により誘導された細胞は *in vivo* において体細胞への分化能をも有することが示唆された。

本研究により同定された *x/TPO* 応答性造血前駆細胞は、造血系、非造血系への分化能を示し、単独因子で3か月以上培養可能であった。よって、未分化性に関与するシグナル経路、造血幹細胞の分化系譜を探索する上でツメガエルモデルが最適なモデルになることが期待される。

第 6 章 本研究の総括

6-1. 結果の総括

哺乳類において、TPO/c-Mpl 系は巨核球産生、造血幹細胞の維持に関与する。哺乳類以外の動物における TPO/c-Mpl 系はニワトリ、ゼブラフィッシュで報告されており、栓球造血が TPO により産生されることが明らかとなっている。しかしながら、前駆細胞は同定されておらず、その機序は分かっていない。よって、本研究では両生類アフリカツメガエル TPO (*x*/TPO) を用いて末梢栓球、栓球前駆細胞、造血前駆細胞の性質を解析し、*x*/TPO/c-Mpl 系が巨核球産生、成熟栓球の抗アポトーシス、多分化性造血前駆細胞の維持に関与することを明らかとした。本研究の成果によって、ゼブラフィッシュなどで展開されている造血研究と合わせ、脊椎動物における造血制御、血球産生の仕組みにおける多様性や普遍性を議論するための端緒を切り拓くことが期待できる。

6-1-1. TPO/c-Mpl 系における栓球造血

ツメガエル末梢栓球の DNA 含量は赤血球と比較して 2 倍高い、倍数性の高い細胞であった。本研究により栓球の前駆細胞は哺乳類同様に核が多倍体化した巨核球であることが分かり、赤血球の DNA 含量を 4N とした場合、DNA 含量は 8 倍以上となり最大で 32N 程度の DNA 含量を示す。本知見は哺乳類以外の動物には巨核球がないといった従来の考えを覆すものである。また、*in vitro* 実験において、有核栓球を産生する際、TPO は阻害に働いた。本研究により、ツメガエル TPO/c-Mpl 系は、哺乳類と同様に巨核球分化、成熟血球産生の阻害に寄与することが明らかにされた。一方、巨核球から血小板は産生されない点は哺乳類巨核球との大きな違いであり、今後ツメガエル巨核球の性質解析は魅力的な課題となる。また、ツメガエル栓球には核があり、細胞内シグナルを解析出来る利点を持つ。末梢栓球に対する TPO の抗アポトーシス機能の存在が示唆され、哺乳類血小板を用いた研究では解析が困難であった末梢血液中での TPO/c-Mpl 機能の一端が本研究に明らかとなった。

6-1-2. TPO/c-Mpl 系における多分化性前駆細胞

TPO 単独培養することにより 3 カ月以上培養可能な多分化性前駆細胞が検出された。本細胞は培養後においても肝臓，脾臓に生着すること，多分化能を有することが分かっており，培養を経ても未分化状態を維持していることが考えられる。一方哺乳類において，造血前駆細胞を長期維持する報告はない。x/TPO 単独で培養している点で非常にシンプルな系で未分化性が維持されていることが考えられ，未分化性維持シグナルを研究する上でもツメガエルは有用なモデルとなり得る。また，多分化性造血前駆細胞は肝臓の類洞，脾臓の脾洞に生着した。脾臓における多分化性造血前駆細胞の局在は哺乳類の知見と一致する可能性があり，今後の解析が求められる。発生胚を用いた移植実験からは，多分化性造血前駆細胞は体細胞から造血細胞まで幅広く分化する可能性が示された。本細胞の性質は哺乳類で議論されている造血前駆細胞の多様性を考慮する上で重要な位置づけとなる。

6-2. 今後の課題と展望

6-2-1. TPO/c-Mpl 系における栓球造血

哺乳類においては造血幹細胞から MEP を介して巨核球を産生する経路と，直接巨核球を産生する経路が存在する (Sanjuan-Pla et al., 2013; Yamamoto et al., 2013; Nishikii et al., 2015) (図 1-1)。一方，ツメガエルにおける巨核球は MEP に相当する細胞が分化するのか，造血幹細胞から直接分化するか分からない。ツメガエルにおける血球系譜は哺乳類と比較すると単純であることが推察されるため，ツメガエル血球系譜を明らかにすることは血球系譜を俯瞰的に見る上で重要だと考えられる。また，現在までに哺乳類において，巨核球は胞体突起を形成し血小板を産生するが，機序は明らかにされていない。ツメガエルでは巨核球においても同様に最終分化時における巨核球から末梢栓球の産生方法は未解明な問題として残されている。巨核球の成熟機構における謎の解決は血小板産生機構にも関わるものであり，今後の進展が期待される。

6-2-2. 多分化性前駆細胞の性状

造血幹細胞は血球細胞の他にも体細胞にも分化する能力を有する。今回、*x/TPO* を使ったコロニーアッセイによる多分化性造血前駆細胞が造血幹細胞なのか、分化が進んだ細胞なのか、また、間葉系の細胞なのか未解明な点は多く残されている。造血幹細胞は通常は細胞周期が回っていない静止期状態であり、必要に応じて細胞周期を回し、自己複製または分化が進んだ細胞を生み出す。現在、マウスでは様々な細胞表現マーカーを用いて細胞が濃縮されており、マーカーにより分取される細胞の種類も少しずつ異なっている。本研究で同定された *Mpl* 陽性細胞は細胞形態が小さく、*N/C* 比が高い特徴がある。しかしながら、本研究では培養後の多分化性前駆細胞を解析しており、今後は肝臓内にある多分化性前駆細胞を直接調べることが求められる。本細胞は *Mpl* を発現する小型の細胞であることから、*Mpl* 抗体等を用いることによりフローサイトメーターによる細胞濃縮が期待される。

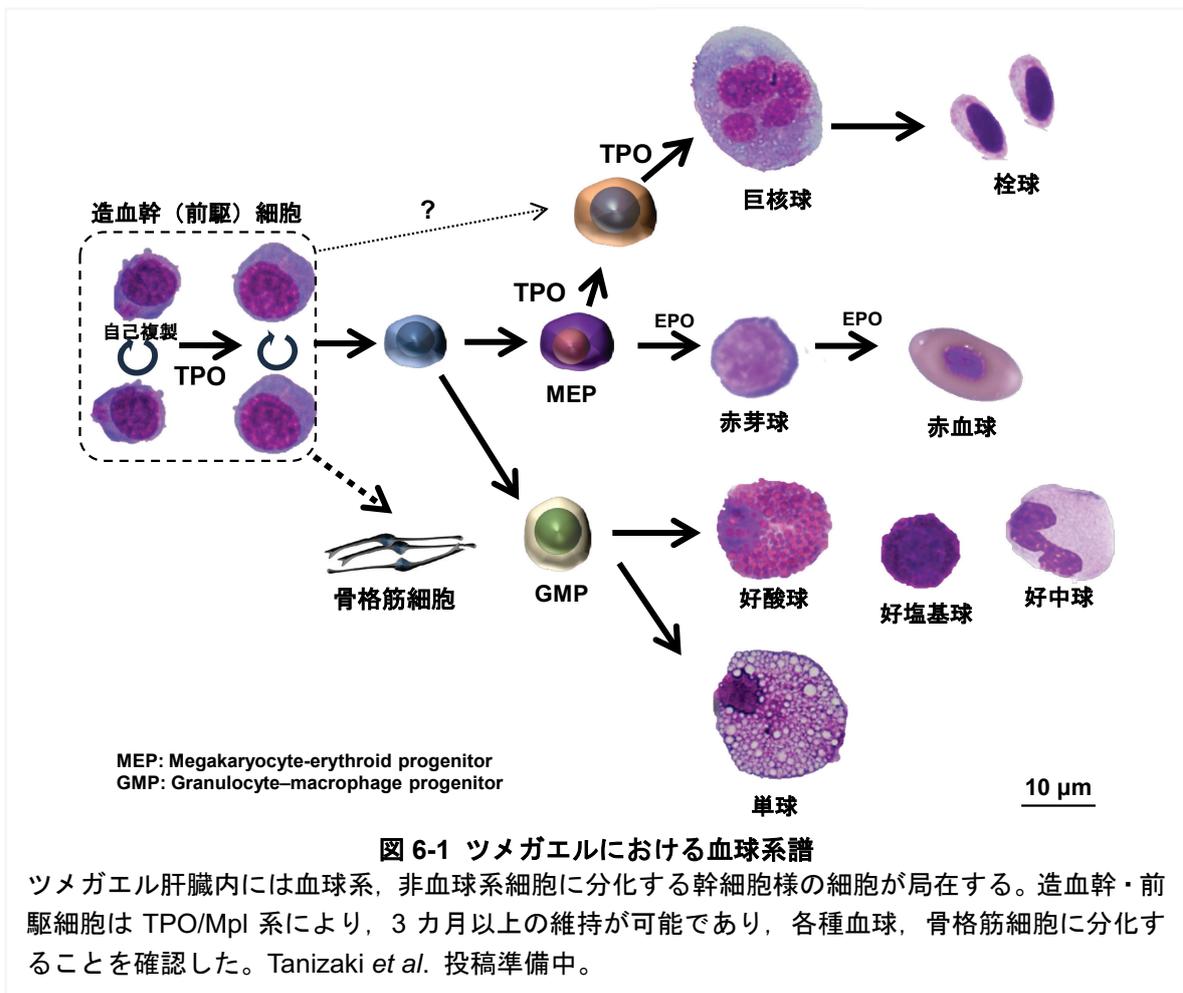
また、長期間培養した細胞に *x/EPO* を添加したところ、赤血球系細胞への分化は見られない一方、培養細胞の中には栓球様細胞が出現することから *MEP* を介さない栓球分化経路の存在が示唆された。ツメガエルの血球分化系譜は哺乳類における血球分化の起源となったものであると考えられ、今後詳細に分化段階を解析していく価値のある課題である。

6-2-3. 多分化性前駆細胞の低温環境応答

両生類モデルの特徴として環境応答に敏感であることが挙げられる。両性類は外温動物であり、外部の温度に適応するために生体内での生理応答も顕著である。ツメガエルを 5°C 環境に暴露すると、1 日以内に凡血球減少症になる。低温環境下における肝臓内では代謝系の変化が起こることが報告されているが、血球減少機序、または造血の低温応答に関しては明らかにされていない。よって、低温暴露時における造血応答を解析する上で、本研究で同定された多分化性造血前駆細胞や巨核球は造血指標としても有用だと考えられる。

6-3. 結語

本研究では、ツメガエルの TPO/Mpl 系のアフリカツメガエル成体造血における機能を調べた。まず、末梢栓球のマーカーとなる遺伝子を同定し、活性評価をしたところ、ツメガエル栓球は哺乳類血小板との類似点が多く見受けられた。さらに、*xTPO* を用いて、造血巣および、前駆細胞を調べたところ、造血巣は肝臓と脾臓を使い分けており、肝臓には栓球の前駆細胞である巨核球，多分化性造血前駆細胞が局在している。また、脾臓には分化段階が後期の栓球系細胞が局在していた。巨核球は従来哺乳類のみに存在する細胞であるとの認識だったが、本成果により哺乳類以外にも巨核球が存在することを明らかとした。ツメガエル多分化性造血前駆細胞は TPO 単独刺激により、3 カ月以上維持させることが可能であり、幹細胞で未解明な問題となっている未分化性維持機構の解明において、重要な糸口を得た。上記の結果を通して、生物間における造血の多様性と普遍性の一端が明らかとなった。本成果により得られた知見は図 6-1 にまとめた。



謝辞

本研究を遂行するにあたり、丁寧かつ厳しい御指導御鞭撻を頂いた早稲田大学大学院先進理工学研究科の加藤尚志教授に心より深謝申し上げます。多くの国内外の学会で発表する機会を与えて頂き、外部の先生を紹介してもらい、一流の研究者との交流の中から研究に対する考え方等学ばせていただきました。

学位論文審査において、貴重なご指導とご助言を賜りました早稲田大学 大学院先進理工学研究科 筒井和義教授および早稲田大学 大学院先進理工学研究科 園池公毅教授、日本医療研究開発機構 (AMED) 宮崎洋博士に深く感謝致します。加藤尚志教授、宮崎洋博士には TPO の発見の歴史から血小板産生に至るまでの、文献にはない多くの貴重な情報を提供して頂きました。深謝申し上げます。

研究を進めるのにあたり、日常的に議論を重ねて頂きました永澤和道博士には心より感謝致します。オックスフォード大学 小坂展慶博士には研究の指導, 助言, 様々な面で温かいご支援を頂き、私の研究者の指標とさせて頂きました。御礼申し上げます。また、国立がん研究センター 分子細胞治療研究分野 分野長 落谷孝広博士には2カ月間、国立がん研究センターでのプロの研究者のいる環境で研究生活を送らせて頂きました。甲田彩博士 (現 SBI ファーマ)、順天堂大学 血液内科教授の小松則夫教授には本研究におけるサイトカインのシグナル検出に関する実験手技のご指導をして頂きました。御礼申し上げます。発生胚に関する実験指導をして頂いた日本医科大学准教授 長谷部孝博士に心よりお礼申し上げます。東京医科大学 上田しのぶ博士には研究を始めた当初から、実験手技、実験生活など様々な指導をして頂きました。また、栓球, TPO, Mpl に関わる仕事を一緒に進め、議論を交わした岩田貴子氏、下地美也子氏、一杉芽美氏に心より感謝致します。

小坂菜美博士、山本雄介博士をはじめとする早稲田大学分子生理学教室加藤研究室の先輩、同期、後輩の皆さまには、研究に関する議論やご指導、熱心なご協力を頂きました。また、研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記すことができなかつた多くの方々に心より感謝申しあげます。

谷崎路子氏には、妻として常に最高の協力を頂き、応援をして頂きました。深謝申し上げます。また、義父、義母にも研究生生活を応援して頂き、心よりお礼申し上げます。

最後に、両親谷崎敏明氏、谷崎いち子氏に深謝します。私の研究生生活を応援、協力し、強く支えてくださり、研究に集中出来る環境を作って頂きました。心より御礼を申し上げます。

参考文献

(自著)

Yuta Tanizaki, Megumi Ichisugi, Miyako Obuchi-Shimoji, Takako Ishida-Iwata, Ayaka Tahara-Mogi, Mizue Meguro-Ishikawa and Takashi Kato. Thrombopoietin induces production of nucleated thrombocytes from liver cells in *Xenopus laevis*. *Sci Rep*, 5:18519, Dec 21, 2015.

Yuta Tanizaki, Takako Ishida-Iwata, Miyako Obuchi-Shimoji, Takashi Kato. Cellular characterization of thrombocytes in *xenopus laevis* with specific monoclonal antibodies. *Exp Hematol*. 43 (2):125-136, Feb 1, 2015.

Kazumichi Nagasawa, Mizue Meguro-Ishikawa, Kei Sato, **Yuta Tanizaki**, Nami Nogawa-Kosaka and Takashi Kato. The influence of artificially introduced glycosylation sites on the in vitro activity of *xenopus laevis* erythropoietin. *PLoS ONE*. 10, 4, e0124676, Apr 21 2015.

Kazumichi Nagasawa, **Yuta Tanizaki**, Takehito Okui, Atsuko Watarai, Shinobu Ueda, Takashi Kato. Significant modulation of the hepatic proteome induced by exposure to low temperature in *Xenopus laevis*. *Biology Open*, 2, 1057–69 2013, Aug 30, 2013.

Nami Nogawa-Kosaka, Tatsuhisa Sugai, Kazumichi Nagasawa, **Yuta Tanizaki**, Mizue Meguro, Yoichi Aizawa, Shun Maekawa, Motoyasu Adachi, Ryota Kuroki, Takashi Kato. Identification of erythroid progenitors induced by erythropoietic activity in *Xenopus laevis*. *J Exp Biol*, 214: 921-927, Mar 15, 2011.

谷崎 祐太, 一杉 芽美, 大淵-下地 美也子, 石田-岩田 貴子, 田原-茂木 彩香, 目黒-石川 瑞枝, 加藤 尚志. アフリカツメガエルにおいてトロンボポエチンは肝臓での有核栓球の産生を誘導する, 比較内分泌学会, Vol. 42 No. 157, 9-10, 2016年1月

谷崎祐太, 加藤尚志. 1.巨核球造血の最新知見から血小板産生機構を知る. 『トロンボポエチン受容体作動薬のすべて』. 編)池田康夫, PART1:血小板産生機構とトロンボポエチンの基礎をみる, 19-30頁, 先端医学社刊, 2012年10月

(その他)

Addison, W. 1842. On the colourless corpuscles and on the molecules and cytoblasts in the blood. *London Med. Gaz.* 30:144–146.

Aizawa, Y., N. Nogawa, N. Kosaka, Y. Maeda, T. Watanabe, H. Miyazaki, and T. Kato. 2005. Expression of erythropoietin receptor-like molecule in *Xenopus laevis* and erythrocytopenia upon administration of its recombinant soluble form. *J. Biochem.* 138:167–175.

Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I.L. Weissman. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404:193–197.

Andonegui, G., S.M. Kerfoot, K. McNagny, K.V.J. Ebbert, K.D. Patel, and P. Kubes. 2005. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 106:2417–2423.

Antonio van Leeuwenhoek. 1674. philosophical transactions of the royal society of london. *Philos. Trans. R. Soc. london*. 9:178–182.

Antonio van Leeuwenhoek. 1695. *Arcana Natura Detecta*.

- Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G.Y. Koh, and T. Suda. 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 118:149–161.
- Bartley, T.D., J. Bogenberger, P. Hunt, Y.S. Li, H.S. Lu, F. Martin, M.S. Chang, B. Samal, J.L. Nichol, and S. Swift. 1994. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*. 77:1117–24.
- Bartunek, P., V. Karafiat, J. Bartunkova, P. Pajer, M. Dvorakova, J. Kralova, M. Zenke, and M. Dvorak. 2008. Impact of chicken thrombopoietin and its receptor c-Mpl on hematopoietic cell development. *Exp. Hematol.* 36:495–505.
- Basser, R.L., J.E. Rasko, K. Clarke, J. Cebon, M.D. Green, S. Hussein, C. Alt, D. Menchaca, D. Tomita, J. Marty, R.M. Fox, and C.G. Begley. 1996. Thrombopoietic effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) in patients with advanced cancer. *Lancet*. 348:1279–1281.
- Baum, C.M., I.L. Weissman, A.S. Tsukamoto, A.M. Buckle, and B. Peault. 1992. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:2804–2808.
- Belamarich, F.A., D. Shepro, and M. Kien. 1968. ADP is not Involved in Thrombin-induced Aggregation of Thrombocytes of a Non-mammalian Vertebrate. *Nature*. 220:509–510.
- Bentfeld-Barker, M.E., and D.F. Bainton. 1982. Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood*. 59:472–481.
- Beru, N., J. McDonald, C. Lacombe, and E. Goldwasser. 1986. Expression of the erythropoietin gene. *Mol. Cell. Biol.* 6:2571–5.
- Bizzozero, G. 1882. Sur les petites plaques du sang des mammifères, desuixième note. *Arch. Ital. Biol.* 1:1–4.
- Booth, N. a, a J. Simpson, a Croll, B. Bennett, and I.R. MacGregor. 1988. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br. J. Haematol.* 70:327–333.
- De Botton, S., S. Sabri, E. Daugas, Y. Zermati, J.E. Guidotti, O. Hermine, G. Kroemer, W. Vainchenker, and N. Debili. 2002. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 100:1310–1317.
- Brass, L.F. 2005. Review series introduction Did dinosaurs have megakaryocytes ? New ideas about platelets and their progenitors. *Medicine (Baltimore)*. 115:3329–3331.
- Broudy, V.C., N.L. Lin, and K. Kaushansky. 1995. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood*. 85:1719–1726.
- Burgess, a W., J. Camakaris, and D. Metcalf. 1977. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J. Biol. Chem.* 252:1998–2003.
- Calvi, L.M., G.B. Adams, K.W. Weibrecht, J.M. Weber, D.P. Olson, M.C. Knight, R.P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F.R. Bringhurst, L.A. Milner, H.M. Kronenberg, and D.T. Scadden. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 425:841–846.
- Camargo, F.D., R. Green, Y. Capetanaki, K.A. Jackson, M.A. Goodell, and Y. Capetanaki. 2003. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.* 9:1520–1527.
- Lo Celso, C., H.E. Fleming, J.W. Wu, C.X. Zhao, S. Miake-Lye, J. Fujisaki, D. Côté, D.W. Rowe, C.P. Lin, and D.T. Scadden. 2009. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*. 457:92–96.
- Chaligné, R., C. Tonetti, R. Besancenot, C. Marty, J. Kiladjian, G. Socié, D. Bordessoule, W. Vainchenker, and S. Giraudier. 2009. SOCS3 inhibits TPO-stimulated, but not spontaneous, megakaryocytic growth in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 23:1186–1190.
- Chasis, J.A., and N. Mohandas. 2008. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*. 112:470–8.
- Chou, C.F., S. Tohari, S. Brenner, and B. Venkatesh. 2004. Erythropoietin gene from a teleost fish, Fugu rubripes. *Blood*. 104:1498–1503.

- Clark, S.R., A.C. Ma, S.A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M.M. Kelly, K.D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G.D. Sinclair, E.M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C.J. Doig, F.H.Y. Green, and P. Kubes. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 13:463–469.
- Corbel, S.Y., A. Lee, L. Yi, J. Duenas, T.R. Brazelton, H.M. Blau, and F.M. V Rossi. 2003. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat. Med.* 9:1528–1532.
- Cwirla, S.E., P. Balasubramanian, D.J. Duffin, C.R. Wagstrom, C.M. Gates, S.C. Singer, a M. Davis, R.L. Tansik, L.C. Mattheakis, C.M. Boytos, P.J. Schatz, D.P. Baccanari, N.C. Wrighton, R.W. Barrett, and W.J. Dower. 1997. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science.* 276:1696–1699.
- Dahlberg, A., C. Delaney, and I.D. Bernstein. 2011. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 117:6083–6090.
- Daimon, T., V. Mizuhira, I. Takahashi, and K. Uchida. 1979. The surface connected canalicular system of carp (*Cyprinus carpio*) thrombocytes: its fine structure and three-dimensional architecture. *Cell tissue Res.* 203:35–365.
- Daimon, T., and K. Uchida. 1978. Electron microscopic and cytochemical observations on the membrane systems of the chicken thrombocyte. *J. Anat.* 125:11–21.
- Dausset, J. 1954. Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox. Sang.* 4:190–198.
- Debili, N., J.M. Massé, a Katz, J. Guichard, J. Breton-Gorius, and W. Vainchenker. 1993. Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34+ cells. *Blood.* 82:84–95.
- Ding, L., T.L. Saunders, G. Enikolopov, and S.J. Morrison. 2012. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* 481:457–462.
- Donné, A.F. 1842. De l'origine des globules du sang, de leur mode de formatton et de leur fin. *Comptes rendus l'Académie des Sci.* 14:366–368.
- Dooley, K. 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:252–256.
- Doré, L.C., and J.D. Crispino. 2011. Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood.* 118:231–239.
- Dührsen, U., J.L. Villeval, J. Boyd, G. Kannourakis, G. Morstyn, and D. Metcalf. 1988. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood.* 72:2074–2081.
- Ebihara, Y., M. Masuya, A.C. LaRue, P. a Fleming, R.P. Visconti, H. Minamiguchi, C.J. Drake, and M. Ogawa. 2006. Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. *Exp. Hematol.* 34:219–229.
- Ehrlich, P. 1879. Ueber die specifischen Granulationen des Blutes. *Arch. fuer Anat. und Physiol. Physiol. Abteilung.* 571-579.
- Ellis, A.E., A.L.S. Munroe, and R.J. Roberts. 1976. Defence mechanisms in fish. 1. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J. Fish Biol.* . 8 :67–78.
- Eto, K., R. Murphy, S.W. Kerrigan, A. Bertoni, H. Stuhlmann, T. Nakano, A.D. Leavitt, and S.J. Shattil. 2002. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:12819–12824.
- Feese, M.D., T. Tamada, Y. Kato, Y. Maeda, M. Hirose, Y. Matsukura, H. Shigematsu, T. Muto, A. Matsumoto, H. Watarai, K. Ogami, T. Tahara, T. Kato, H. Miyazaki, and R. Kuroki. 2004. Structure of the receptor-binding domain of human thrombopoietin determined by complexation with a neutralizing antibody fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:1816–1821.
- Fischer, U., M. Ototake, and T. Nakanishi. 1998. Life span of circulating blood cells in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorffii*). *Fish Shellfish Immunol.* 8:339–349.

- Fuentes, R., Y. Wang, J. Hirsch, C. Wang, L. Rauova, G.S. Worthen, M.A. Kowalska, and M. Poncz. 2010. Infusion of mature megakaryocytes into mice yields functional platelets. *J. Clin. Invest.* 120:3917–22.
- Garzon, R., F. Pichiorri, T. Palumbo, R. Iuliano, A. Cimmino, R. Aqeilan, S. Volinia, D. Bhatt, H. Alder, G. Marcucci, G. a Calin, C.-G. Liu, C.D. Bloomfield, M. Andreeff, and C.M. Croce. 2006. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:5078–5083.
- Goodell, M.A., K. Brose, G. Paradis, A.S. Conner, and R.C. Mulligan. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* 183:1797–1806.
- De Graaf, C. a., and D. Metcalf. 2011. Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle.* 10:1582–1589.
- de Groot, R.P., J. a Raaijmakers, J.W. Lammers, and L. Koenderman. 2000. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3:299–305.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, C.D. Strickland, E.A. Buzney, M.K. Khan, A.F. Flint, L.M. Kunkel, and R.C. Mulligan. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 401:390–4.
- Hadji-Azimi, I., V. Coosemans, and C. Canicatti. 1987. Atlas of adult *Xenopus laevis laevis* hematology. *Dev. Comp. Immunol.* 11:807–874.
- Hagiwara, T., I. Kodama, K. Horie, T. Kato, and H. Miyazaki. 1998. Proliferative properties of human umbilical cord blood megakaryocyte progenitor cells to human thrombopoietin. *Exp. Hematol.* 26:228–235.
- Hart, a, F. Melet, P. Grossfeld, K. Chien, C. Jones, a Tunnacliffe, R. Favier, and a Bernstein. 2000. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity.* 13:167–177.
- Heath, D.S., a a Axelrad, D.L. McLeod, and M.M. Shreeve. 1976. Separation of the erythropoietin-responsive progenitors BFU-E and CFU-E in mouse bone marrow by unit gravity sedimentation. *Blood.* 47:777–92.
- Higgs, D.R., M.A. Vickers, A.O.M. Wilkie, I.M. Pretorius, A.P. Jarman, and D.J. Weatherall. 1989. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood.* 73:1081–1104.
- Hirose, S.I., N. Takayama, S. Nakamura, K. Nagasawa, K. Ochi, S. Hirata, S. Yamazaki, T. Yamaguchi, M. Otsu, S. Sano, N. Takahashi, A. Sawaguchi, M. Ito, T. Kato, H. Nakauchi, and K. Eto. 2013. Immortalization of erythroblasts by c-MYC and BCL-XL enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 1:499–508.
- Horie, K., H. Miyazaki, T. Hagiwara, E. Tahara, A. Matsumoto, T. Kadoya, K. Ogami, and T. Kato. 1997. Action of thrombopoietin at the megakaryocyte progenitor level is critical for the subsequent proplatelet production. *Exp. Hematol.* 25:169–176.
- Horiuchi, H., K. Tanaka, A. Shigeta, K. Yoshida, K. Kushima, H. Ohta, S. Furusawa, and H. Matsuda. 2004. A monoclonal antibody against chicken thrombocytes reacts with the cells of thrombocyte lineage. *J. Vet. Med. Sci.* 66:243–50.
- Howell, W. 1891. Observations upon the occurrence, structure and function of the giant cells of the marrow. *J. Morphol.* 4:117–130.
- Hughes, D.R., J.R. Bassett, and L.A. Moffat. 1994. Histological Identification of Osteocytes in the Allegedly Acellular Bone of the Sea Breems *Acanthopagrus-Australis*, *Pagrus-Auratus* and *Rhabdosargus-Sarba* (Sparidae, Perciformes, Teleostei). *Anat. Embryol. (Berl).* 190:163–179.
- Ingmar Bruns, Daniel Lucas, Sandra Pinho, Jalal Ahmed, Michele P Lambert, A.B. Yuya Kunisaki, Christoph Scheiermann, Lauren Schiff, Mortimer Poncz, and P.S. Frenette. 2014. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat. Med.* 20:1315–1320.
- Inra, C.N., B.O. Zhou, M. Acar, M.M. Murphy, J. Richardson, Z. Zhao, and S.J. Morrison. 2015. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature.* 527:466–471.
- Ishibashi, T., H. Kimura, Y. Shikama, T. Uchida, S. Kariyone, and Y. Maruyama. 1990. Effect of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on murine thrombocytopoiesis in vitro and in vivo. *Blood.* 75:1433–1438.

- Izutsu, Y., and K. Yoshizato. 1993. Metamorphosis-dependent recognition of larval skin as non-self by inbred adult frogs (*Xenopus laevis*). *J Exp Zool.* 266:163–167.
- Jagadeeswaran, P., J.P. Sheehan, F.E. Craig, and D. Troyer. 1999. Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. *Br. J. Haematol.* 107:731–738.
- Johan T. Ruud. 1954. Vertebrates without Erythrocytes and Blood Pigment. *Nature.* 173:848–850.
- Johnson, G.R., and D. Metcalf. 1977. Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74:3879–3882.
- Josefsson, E.C., C. James, K.J. Henley, M. a Debrincat, K.L. Rogers, M.R. Dowling, M.J. White, E. a Kruse, R.M. Lane, S. Ellis, P. Nurden, K.D. Mason, L. a O'Reilly, A.W. Roberts, D. Metcalf, D.C.S. Huang, and B.T. Kile. 2011. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J. Exp. Med.* 208:2017–31.
- Junt, T., H. Schulze, Z. Chen, S. Massberg, T. Goege, A. Krueger, D.D. Wagner, T. Graf, J.E. Italiano, R.A. Shivdasani, and U.H. von Andrian. 2007. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science.* 317:1767–1770.
- Kakeda, M., J.I. Kyuno, T. Kato, M. Nishikawa, and M. Asashima. 2002. Role of the thrombopoietin (TPO)/Mpl system: c-Mpl-like molecule/TPO signaling enhances early hematopoiesis in *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.* 44:63–75.
- Kamatani, Y., K. Matsuda, Y. Okada, M. Kubo, N. Hosono, Y. Daigo, Y. Nakamura, and N. Kamatani. 2010. Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat. Genet.* 42:210–215.
- Kaplan, P.A., R.J. Asleson, L.W. Klassen, and M.J. Duggan. 1987. Bone marrow patterns in aplastic anemia: observations with 1.5-T MR imaging. *Radiology.* 164:441–444.
- Karnovsky, M.J. and Roots, L. 1964. A "Direct-coloring" Thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* 12:219–221.
- Kasper, L.H., F. Boussouar, P.A. Ney, C.W. Jackson, J. Rehg, J.M. van Deursen, and P.K. Brindle. 2002. A transcription-factor-binding surface of coactivator p300 is required for haematopoiesis. *Nature.* 419:738–43.
- Kato, T. 2015. Handbook of Hormones. In Handbook of Hormones. Y. Takei, H. Ando, and K. Tsutsui, editors. 314–328.
- Kato, T., A. Matsumoto, K. Ogami, T. Tahara, H. Morita, and H. Miyazaki. 1998. Native thrombopoietin: structure and function. *Stem Cells.* 16:322–328.
- Kato, T., A. Oda, Y. Inagaki, H. Ohashi, A. Matsumoto, K. Ozaki, Y. Miyakawa, H. Watarai, K. Fujii, A. Kokubo, T. Kadoya, Y. Ikeda, and H. Miyazaki. 1997. Thrombin cleaves recombinant human thrombopoietin: one of the proteolytic events that generates truncated forms of thrombopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:4669–4674.
- Kato, T., K. Ogami, Y. Shimada, A. Iwamatsu, Y. Sohma, H. Akahori, K. Horie, A. Kokubo, Y. Kudo, E. Maeda, K. Kobayashi, H. Ohashi, T. Ozawa, H. Inoue, K. Kawamura, and H. Miyazaki. 1995. Purification and Characterization of Thrombopoietin. *J. Biochem.* 118:229–236.
- Kaushansky, K., S. Lok, R.D. Holly, V.C. Broudy, N. Lin, M.C. Bailey, J.W. Forstrom, M.M. Buddle, P.J. Oort, F.S. Hagen, G.J. Roth, T. Papayannopoulou, and D.C. Foster. 1994. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature.* 369:568 – 571.
- Kiel, M.J., M. Acar, G.L. Radice, and S.J. Morrison. 2009. Hematopoietic Stem Cells Do Not Depend on N-Cadherin to Regulate Their Maintenance. *Cell Stem Cell.* 4:170–179.
- Kiel, M.J., O.H. Yilmaz, T. Iwashita, O.H. Yilmaz, C. Terhorst, and S.J. Morrison. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 121:1109–21.
- Kimura, S., A.W. Roberts, D. Metcalf, and W.S. Alexander. 1998. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:1195–1200.

- Klein, S.L., R.L. Strausberg, L. Wagner, J. Pontius, S.W. Clifton, and P. Richardson. 2002. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev. Dyn.* 225:384–391.
- Kobayashi, I., T. Moritomo, M. Ootake, and T. Nakanishi. 2007. Isolation of side population cells from ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney hematopoietic tissues. *Dev. Comp. Immunol.* 31:696–707.
- Kobayashi, I., K. Saito, T. Moritomo, K. Araki, F. Takizawa, and T. Nakanishi. 2008. Characterization and localization of side population (SP) cells in zebrafish kidney hematopoietic tissue. *Blood.* 111:1131–1137.
- Kowata, S., S. Isogai, K. Murai, S. Ito, K. Tohyama, M. Ema, J. Hitomi, and Y. Ishida. 2014. Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow. *Thromb. Haemost.* 112:1–14.
- Kuter, D.J. 1996. The physiology of platelet production. *Stem Cells.* 14:88–101.
- Kuter, D.J. 2007. New thrombopoietic growth factors. *Blood.* 109:4607–16.
- Kuter, D.J., D.L. Beeler, and R.D. Rosenberg. 1994. The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:11104–8.
- Labelle, M., S. Begum, and R.O. Hynes. 2011. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell.* 20:576–590.
- Lacoste-Eleau, A.S., C. Bleux, P. Quere, F. Coudert, C. Corbel, and C. Kanellopoulos-Langevin. 1994. Biochemical and functional characterization of an avian homolog of the integrin GPIIb-IIIa present on chicken thrombocytes. *Exp Cell Res.* 213:198–209.
- Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I.L. Weissman, and M. Grompe. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6:1229–1234.
- Levin, J. 2012. The evolution of mammalian platelets. *In Platelets.* 3–25.
- Li, J., C. Yang, Y. Xia, A. Bertino, J. Glaspy, M. Roberts, and D.J. Kuter. 2001. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood.* 98:3241–3248.
- de Lima, M., J. McMannis, a Gee, K. Komanduri, D. Couriel, B.S. Andersson, C. Hosing, I. Khouri, R. Jones, R. Champlin, S. Karandish, T. Sadeghi, T. Peled, F. Grynspan, Y. Daniely, a Nagler, and E.J. Shpall. 2008. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.* 41:771–778.
- de Lima, M., I. McNiece, S.N. Robinson, M. Munsell, M. Eapen, M. Horowitz, A. Alousi, R. Saliba, J.D. McMannis, I. Kaur, P. Kebriaci, S. Parmar, U. Popat, C. Hosing, R. Champlin, C. Bollard, J.J. Mollndrem, R.B. Jones, Y. Nieto, B.S. Andersson, N. Shah, B. Oran, L.J.N. Cooper, L. Worth, M.H. Qazilbash, M. Korbiling, G. Rondon, S. Ciurea, D. Bosque, I. Maewal, P.J. Simmons, and E.J. Shpall. 2012. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N. Engl. J. Med.* 367:2305–15.
- Lin, H.-F., D. Traver, H. Zhu, K. Dooley, B.H. Paw, L.I. Zon, and R.I. Handin. 2005. Analysis of thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood.* 106:3803–10.
- Lok, S., K. Kaushansky, R.D. Holly, J.L. Kuijper, C.E. Lofton-Day, P.J. Oort, F.J. Grant, M.D. Heipel, S.K. Burkhead, J.M. Kramer, L.A. Bell, C.A. Sprecher, H. Blumberg, R. Johnson, D. Prunkard, A.F.T. Ching, S.L. Mathewes, M.C. Balley, J.W. Forstrom, M.M. Buddle, S.G. Osborn, S.J. Evans, P.O. Sheppard, S.R. Presnell, P.J. O’Hara, F.S. Hagen, G.J. Roth, and D.C. Foster. 1994. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature.* 369:565 – 568.
- Lu, J., S. Guo, B.L. Ebert, H. Zhang, X. Peng, J. Bosco, J. Pretz, R. Schlanger, J.Y. Wang, R.H. Mak, D.M. Dombkowski, F.I. Preffer, D.T. Scadden, and T.R. Golub. 2008. MicroRNA-Mediated Control of Cell Fate in Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitors. *Dev. Cell.* 14:843–853.
- Lymperi, S., N. Horwood, S. Marley, M.Y. Gordon, A.P. Cope, and F. Dazzi. 2008. Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells. *Blood.* 111:1173–1181.

- Ma, F., Y. Ebihara, K. Umeda, H. Sakai, S. Hanada, H. Zhang, Y. Zaike, E. Tsuchida, T. Nakahata, H. Nakauchi, and K. Tsuji. 2008. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am. F., Ebihara, Y., Umeda, K., Sakai, H., Hanada, S., Zhang, H., ... Tsuji, K. (2008). Gener. Funct. erythrocytes from Hum. embryonic stem cell-derived Defin. he.* 105:13087–13092.
- Maekawa, S., H. Iemura, Y. Kuramochi, N. Nogawa-Kosaka, H. Nishikawa, T. Okui, Y. Aizawa, and T. Kato. 2012. Hepatic confinement of newly produced erythrocytes caused by low-temperature exposure in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Biol.* 215:3087–3095.
- Maekawa, S., and T. Kato. 2015. Diverse of Erythropoiesis Responding to Hypoxia and Low Environmental Temperature in Vertebrates. *Biomed Res. Int.* 2015:Article ID 747052.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Lauer, and R. Lawn. 1980. The Molecular Genetics of Human Hemoglobins T Maniatis. *Annu. Rev. Genet.* 14:145–178.
- Marone, G., M. Triggiani, and A. De Paulis. 2005. Mast cells and basophils: Friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends Immunol.* 26:25–31. .
- Matsubara, Y., E. Saito, H. Suzuki, N. Watanabe, M. Murata, and Y. Ikeda. 2009. Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378:716–720.
- Matsumura, I., J. Ishikawa, K. Nakajima, K. Oritani, Y. Tomiyama, J. Miyagawa, T. Kato, H. Miyazaki, Y. Matsuzawa, and Y. Kanakura. 1997. Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5. *Mol. Cell. Biol.* 17:2933–2943.
- McCarty, J.M., K.H. Sprugel, N.E. Fox, D.E. Sabath, and K. Kaushansky. 1995. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood.* 86:3668–3675.
- McNicol, A., and S.J. Israels. 1999. Platelet dense granules: Structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* 95:1–18.
- Méndez-Ferrer, S., T. V Michurina, F. Ferraro, A.R. Mazloom, B.D. Macarthur, S. a Lira, D.T. Scadden, A. Ma'ayan, G.N. Enikolopov, and P.S. Frenette. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 466:829–834.
- Meng Zhao, J.M. Perry, H. Marshall, A. Venkatraman, P. Qian, X.C. He, J. Ahamed, and Linheng Li. 2014. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 20:1321–1326.
- Mikkola, H.K. a, and S.H. Orkin. 2006. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development.* 133:3733–44.
- Mitruka BM, R.H.M. 1981. Clinical, biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans. *New York Masson Publ.* 1.
- Miyakawa, Y., A. Oda, B.J. Druker, T. Kato, H. Miyazaki, M. Handa, and Y. Ikeda. 1995. Recombinant thrombopoietin induces rapid protein tyrosine phosphorylation of Janus kinase 2 and Shc in human blood platelets. *Blood.* 86:23–27.
- Miyakawa, Y., P. Rojnuckarin, T. Habib, and K. Kaushansky. 2001. Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J. Biol. Chem.* 276:2494–502.
- Miyake, T., C.K. Kung, and E. Goldwasser. 1977. Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252:5558–5564.
- Morrison, S.J., and D.T. Scadden. 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* 505:327–34.
- Motohashi, H., M. Kimura, R. Fujita, A. Inoue, X. Pan, M. Takayama, F. Katsuoka, H. Aburatani, E.H. Bresnick, and M. Yamamoto. 2010. NF-E2 domination over Nrf2 promotes ROS accumulation and megakaryocytic maturation. *Blood.* 115:677–86.
- Mueller, R.L., T. Ryan Gregory, S.M. Gregory, A. Hsieh, and J.L. Boore. 2008. Genome size, cell size, and the evolution of enucleated erythrocytes in attenuate salamanders. *Zoology.* 111:218–230.

- Mukai, H.Y., H. Motohashi, O. Ohneda, N. Suzuki, M. Nagano, and M. Yamamoto. 2006. Transgene insertion in proximity to the c-myc gene disrupts erythroid-megakaryocytic lineage bifurcation. *Mol. Cell. Biol.* 26:7953–65.
- Nagasawa, K., M. Meguro, K. Sato, Y. Tanizaki, N. Nogawa-Kosaka, and T. Kato. 2015. The Influence of Artificially Introduced N-Glycosylation Sites on the In Vitro Activity of Xenopus laevis Erythropoietin. *PLoS One.* 10.
- Nagasawa, K., Y. Tanizaki, T. Okui, A. Watarai, S. Ueda, and T. Kato. 2013. Significant modulation of the hepatic proteome induced by exposure to low temperature in Xenopus laevis. *Biol. Open.* 2:1057–69.
- Nakamura, S., N. Takayama, S. Hirata, H. Seo, H. Endo, K. Ochi, K.I. Fujita, T. Koike, K.I. Harimoto, T. Dohda, A. Watanabe, K. Okita, N. Takahashi, A. Sawaguchi, S. Yamanaka, H. Nakauchi, S. Nishimura, and K. Eto. 2014. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 14:535–548.
- Nakamura, T., H. Kawahara, and C. Katagiri. 1985. Rapid Production of a Histocompatible Colony of Xenopus laevis by Gynogenetic Procedure(Genetics). *Zoolog. Sci.* 2:71–79.
- Nakamura-Ishizu, A., K. Takubo, H. Kobayashi, K. Suzuki-Inoue, and T. Suda. 2015. CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J. Exp. Med.* 212:2133–2146.
- Naveiras, O., V. Nardi, P.L. Wenzel, P. V Hauschka, F. Fahey, and G.Q. Daley. 2009. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature.* 460:259–263.
- Nilsson, S.K., H.M. Johnston, G. a. Whitty, B. Williams, R.J. Webb, D.T. Denhardt, I. Bertoncello, L.J. Bendall, P.J. Simmons, and D.N. Haylock. 2005. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 106:1232–1239.
- Nishikii, H., Y. Kanazawa, T. Umemoto, Y. Goltsev, Y. Matsuzaki, K. Matsushita, M. Yamato, G.P. Nolan, R. Negrin, and S. Chiba. 2015. Unipotent megakaryopoietic pathway bridging hematopoietic stem cells and mature megakaryocytes. *Stem Cells.* 33:2196–2207.
- Nishimura, S., M. Nagasaki, S. Kunishima, A. Sawaguchi, A. Sakata, H. Sakaguchi, T. Ohmori, I. Manabe, J.E. Italiano, T. Ryu, N. Takayama, I. Komuro, T. Kadowaki, K. Eto, and R. Nagai. 2015. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J. Cell Biol.* 209:453–66.
- Nogawa-Kosaka, N., T. Hirose, N. Kosaka, Y. Aizawa, K. Nagasawa, N. Uehara, H. Miyazaki, N. Komatsu, and T. Kato. 2010. Structural and biological properties of erythropoietin in Xenopus laevis. *Exp. Hematol.* 38:363–372.
- Nogawa-Kosaka, N., T. Sugai, K. Nagasawa, Y. Tanizaki, M. Meguro, Y. Aizawa, S. Maekawa, M. Adachi, R. Kuroki, and T. Kato. 2011. Identification of erythroid progenitors induced by erythropoietic activity in Xenopus laevis. *J. Exp. Biol.* 214:921–7.
- Nomura, S., K. Ogami, K. Kawamura, I. Tsukamoto, Y. Kudo, Y. Kanakura, Y. Kitamura, H. Miyazaki, and T. Kato. 1997. Cellular localization of thrombopoietin mRNA in the liver by in situ hybridization. *Exp. Hematol.* 25:565–572.
- Nosaka, T., T. Kawashima, K. Misawa, K. Ikuta, A.L.F. Mui, and T. Kitamura. 1999. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.* 18:4754–4765.
- Notta, F., S. Zandi, N. Takayama, S. Dobson, O.I. Gan, G. Wilson, K.B. Kaufmann, J. McLeod, E. Laurenti, C.F. Dunant, J.D. McPherson, L.D. Stein, Y. Dror, and J.E. Dick. 2016. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science.* 351:aab2116.
- Nunomura, W., A.M. Cianciarullo, T. Kato, R. Shimizu, and M. Witeska. 2015. Phylogeny and Ontogeny of Erythropoiesis. *In BioMed Research Internationa.* 1–2.
- Obara, N., N. Suzuki, K. Kim, T. Nagasawa, S. Imagawa, and M. Yamamoto. 2008. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood.* 111:5223–5232.
- Oda, A., Y. Miyakawa, B.J. Druker, K. Ozaki, K. Yabusaki, Y. Shirasawa, M. Handa, T. Kato, H. Miyazaki, A. Shimosaka, and Y. Ikeda. 1996. Thrombopoietin primes human platelet aggregation induced by shear stress and by multiple agonists. *Blood.* 87:4664–4670.

- Ogawa, M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 81:2844–2853.
- Ogawa, M., A.C. LaRue, and C.J. Drake. 2006. Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications. *Blood*. 108:2893–2896.
- Okui, T., Y. Yamamoto, S. Maekawa, K. Nagasawa, Y. Yonezuka, Y. Aizawa, and T. Kato. 2013. Quantification and localization of erythropoietin-receptor-expressing cells in the liver of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res*. 353:153–164.
- Omatsu, Y., M. Seike, T. Sugiyama, T. Kume, and T. Nagasawa. 2014. Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation. *Nature*. 508:536–540.
- Ono, Y., Y. Wang, H. Suzuki, S. Okamoto, Y. Ikeda, M. Murata, M. Poncz, and Y. Matsubara. 2012. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf. *Blood*. 120:3812–3821.
- Orkin, S.H., and L.I. Zon. 2008. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 132:631–644.
- Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, and H. Nakauchi. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 273:242–245.
- Osler, W. 1873. An account of certain organisms occurring in the liquor sanguinis. *Proc. R. Soc. London*. 22:391–398.
- Paffett-Lugassy, N., N. Hsia, P.G. Fraenkel, B. Paw, I. Leshinsky, B. Barut, N. Bahary, J. Caro, R. Handin, and L.I. Zon. 2007. Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish. *Blood*. 110:2718–2726.
- Palis, J. 2014. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front. Physiol.* 5 JAN:1–9.
- Passer, B.J., C.H. Chen, N.W. Miller, and M.D. Cooper. 1997. Catfish thrombocytes express an integrin-like CD41/CD61 complex. *Exp. Cell Res*. 234:347–53.
- Perk, K. 1963. The Camel's Erythrocyte. *Nature*. 200:272–273.
- Perutz, M.F., M.G. Rossmann, A.F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, and A.C. North. 1960. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*. 185:416–422.
- Piacibello, W., F. Sanavio, L. Garetto, a Severino, D. Bergandi, J. Ferrario, F. Fagioli, M. Berger, and M. Aglietta. 1997. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood*. 89:2644–2653.
- Piacibello, W., F. Sanavio, a Severino, a Danè, L. Gammaitoni, F. Fagioli, E. Perissinotto, G. Cavalloni, O. Kollet, T. Lapidot, and M. Aglietta. 1999. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*. 93:3736–3749.
- Potts, K.S., T.J. Sargeant, J.F. Markham, W. Shi, C. Biben, E.C. Josefsson, L.W. Whitehead, K.L. Rogers, A. Liakhovitskaia, G.K. Smyth, B.T. Kile, A. Medvinsky, W.S. Alexander, D.J. Hilton, and S. Taoudi. 2014. A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo. *Blood*. 124:2725–2730.
- Qian, H., N. Buza-Vidas, C.D. Hyland, C.T. Jensen, J. Antonchuk, R. Månsson, L. a. Thoren, M. Ekblom, W.S. Alexander, and S.E.W. Jacobsen. 2007. Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 1:671–684.
- Raslova, H., A. Kauffmann, D. Sekkaï, H. Ripoche, F. Larbret, T. Robert, D.T. Le Roux, G. Kroemer, N. Debili, P. Dessen, V. Lazar, and W. Vainchenker. 2007. Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood*. 109:3225–34.
- Rendu, F., and B. Brohard-Bohn. 2001. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 12:261–273.
- Reya, T., A.W. Duncan, L. Ailles, J. Domen, D.C. Scherer, K. Willert, L. Hintz, R. Nusse, and I.L. Weissman. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 423:409–414.

- Rijken, D.C., and H.R. Lijnen. 2009. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J. Thromb. Haemost.* 7:4–13.
- Robin, C. 1864. Note sur les elements anatomiques appeles myeloplaxes. *J. Anat. Physiol.* 1:88–109.
- Rojnuckarin, P., J.G. Drachman, and K. Kaushansky. 1999. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood.* 94:1273–1282.
- Rombout, J.H.W.M., J.C.E. Koumans-van Diepen, P.M. Emmer, J.J. Taverne-Thiele, and N. Taverne. 1996. Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. *J Fish Biol.* 49:521–531.
- Sanjuan-Pla, A., I.C. Macaulay, C.T. Jensen, P.S. Woll, T.C. Luis, A. Mead, S. Moore, C. Carella, S. Matsuoka, T.B. Jones, O. Chowdhury, L. Stenson, M. Lutteropp, J.C. Green, R. Facchini, H. Boukarabila, A. Grover, A. Gambardella, S. Thongjuea, J. Carrelha, P. Tarrant, D. Atkinson, S.A. Clark, C. Nerlov, and S.E. Jacobsen. 2013. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature.* 502:232–236.
- de Sauvage, F.J., P.E. Hass, S.D. Spencer, B.E. Malloy, A.L. Gurney, S.A. Spencer, W.C. Darbonne, W.J. Henzel, S.C. Wong, and W.J. Kuang. 1994. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature.* 369:533–8.
- Sauvage, F.J. de, P.E. Hass, S.D. Spencer, B.E. Malloy, A.L. Gurney, S.A. Spencer, W.C. Darbonne, W.J. Henzel, S.C. Wong, W.-J. Kuang, K.J. Oles, B. Hultgren, L.A.S.J.D. V. Goeddel, and Dan L. Eaton. 1994. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature.* 369:533 – 538.
- Sawada, K. 2011. Guest editorial: the seven wonders of erythropoiesis. *Int. J. Hematol.* 93:1–4.
- Schneider, C. a, W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* 9:671–675.
- Schultze, J.S. 1865. Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Arch. Mikrosk. Anat.* 1:1–42.
- Schwartz, H., S. Köster, W.H.A. Kahr, N. Michetti, B.F. Kraemer, D.A. Weitz, R.C. Blaylock, L.W. Kraiss, A. Greinacher, G.A. Zimmerman, and A.S. Weyrich. 2010. Anucleate platelets generate progeny. *Blood.* 115:3801–3809.
- Segal, G.M., T. Stueve, and J.W. Adamson. 1988. Analysis of murine megakaryocyte colony size and ploidy: Effects of interleukin - 3. *J. Cell. Physiol.* 137:537–544.
- Sera, Y., A.C. LaRue, O. Moussa, M. Mehrotra, J.D. Duncan, C.R. Williams, E. Nishimoto, B.A. Schulte, P.M. Watson, D.K. Watson, and M. Ogawa. 2009. Hematopoietic stem cell origin of adipocytes. *Exp. Hematol.* 37:1108–1120.e4.
- Shivdasani, R.A., Y. Fujiwara, M.A. McDevitt, and S.H. Orkin. 1997. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* 16:3965–73.
- Slierendrecht, W.J., N. Lorenzen, J. Glamann, C. Koch, and J.H. Rombout. 1995. Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 46:349–60.
- Sohma, Y., H. Akahori, N. Seki, T. Hori, K. Ogami, T. Kato, Y. Shimada, K. Kawamura, and H. Miyazaki. 1994. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett.* 353:57–61.
- Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 241:58–62.
- Stephenson, J.R., A.A. Axelrad, D.L. McLeod, and M.M. Shreeve. 1971. Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68:1542–1546.
- Steven I. Hajdu. 2003. A note from history: The discovery of blood cells. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 33:327–328.
- Stone, K.D., C. Prussin, and D.D. Metcalfe. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:S73–S80.

- Sugimura, R., X.C. He, A. Venkatraman, F. Arai, A. Box, C. Semerad, J.S. Haug, L. Peng, X.B. Zhong, T. Suda, and L. Li. 2012. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell*. 150:351–365.
- Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda, and T. Nagasawa. 2006. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity*. 25:977–988.
- Sun, J., A. Ramos, B. Chapman, J.B. Johnnidis, L. Le, Y.-J. Ho, A. Klein, O. Hofmann, and F.D. Camargo. 2014. Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature*. 514:322–327.
- Svoboda, O., D.L. Stachura, O. Machoňová, P. Pajer, J. Brynda, L.I. Zon, D. Traver, and P. Bartůněk. 2014. Dissection of vertebrate hematopoiesis using zebrafish thrombopoietin. *Blood*. 124:220–228.
- Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 126:663–676.
- Takayama, N., S. Nishimura, S. Nakamura, T. Shimizu, R. Ohnishi, H. Endo, T. Yamaguchi, M. Otsu, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Sawaguchi, R. Nagai, K. Takahashi, S. Yamanaka, H. Nakauchi, and K. Eto. 2010. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J. Exp. Med*. 207:2817–2830.
- Tanizaki, Y., T. Ishida-Iwata, O.-S. Miyako, and T. Kato. 2015. Cellular characterization of thrombocytes in *Xenopus laevis* with specific monoclonal antibodies. *Exp. Hematol*. 43:125–136.
- Tavassoli, M. 1980. Megakaryocyte-platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood*. 55:537–545.
- Thomas, E.D., H.L. Lochte, W.C. Lu, and J.W. Ferrebee. 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med*. 257:491–496.
- Thon, J.N., A. Montalvo, S. Patel-Hett, M.T. Devine, J.L. Richardson, A. Ehrlicher, M.K. Larson, K. Hoffmeister, J.H. Hartwig, and J.E. Italiano. 2010. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J. Cell Biol*. 191:861–74.
- Till, J.E., and E. McCulloch. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. *Radiat. Res*. 175:145–149.
- Tober, J., A. Koniski, K.E. McGrath, R. Vemishetti, R. Emerson, K.K.L. de Mesy-Bentley, R. Waugh, and J. Palis. 2007. The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood*. 109:1433–41.
- Tober, J., K.E. McGrath, and J. Palis. 2008. Primitive erythropoiesis and megakaryopoiesis in the yolk sac are independent of c-myc. *Blood*. 111:2636–9.
- Tochinai, S., and C. Katagiri. 1975. Complete abrogation of immune response to skin allografts and rabbit erythrocytes in the early thymectomized *Xenopus*. *Dev. Growth Differ*. 17:383–394.
- Tong, W., Y.M. Ibarra, and H.F. Lodish. 2007. Signals emanating from the membrane proximal region of the thrombopoietin receptor (mpl) support hematopoietic stem cell self-renewal. *Exp. Hematol*. 35:1447–1455.
- Tortolani, P.J., J.A. Johnston, C.M. Bacon, D.W. McVicar, A. Shimosaka, D. Linnekin, D.L. Longo, and J.J. O’Shea. 1995. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of the Janus kinase, JAK2. *Blood*. 85:3444–51.
- Tranum-Jensen, O., and O. Behnke. 1981. Acetylcholinesterase in the platelet-megakaryocyte system. II. Structural localization in megakaryocytes of the rat, mouse, and cat. *Eur. J. Cell Biol*. 24:281–286.
- Tsang, A.P., J.E. Visvader, C.A. Turner, Y. Fujiwara, C. Yu, M.J. Weiss, M. Crossley, and S.H. Orkin. 1997. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*. 90:109–119.
- Ubukawa, K., Y.M. Guo, M. Takahashi, M. Hirokawa, Y. Michishita, M. Nara, H. Tagawa, N. Takahashi, A. Komatsuda, W. Nunomura, Y. Takakuwa, and K. Sawada. 2012. Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood*. 119:1036–1044.

- Vadhan-Raj, S., L.J. Murray, C. Bueso-Ramos, S. Patel, S.P. Reddy, W.K. Hoots, T. Johnston, N.E. Papadopolous, W.N. Hittelman, D.A. Johnston, T.A. Yang, V.E. Paton, R.L. Cohen, S.D. Hellmann, R.S. Benjamin, and H.E. Broxmeyer. 1997. Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer. *Ann Intern Med.* 126:673–681.
- Versteeg, H.H., J.W.M. Heemskerk, M. Levi, and P.H. Reitsma. 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* 93:327–58.
- Visnjic, D., Z. Kalajzic, D.W. Rowe, V. Katavic, J. Lorenzo, and H.L. Aguila. 2004. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood.* 103:3258–3264.
- Wang, Q., Y. Miyakawa, N. Fox, and K. Kaushansky. 2000. Interferon-alpha directly represses megakaryopoiesis by inhibiting thrombopoietin-induced signaling through induction of SOCS-1. *Blood.* 96:2093–2099.
- White, M.J., S.M. Schoenwaelder, E.C. Josefsson, K.E. Jarman, K.J. Henley, C. James, M. a. Debrincat, S.P. Jackson, D.C.S. Huang, and B.T. Kile. 2012. Caspase-9 mediates the apoptotic death of megakaryocytes and platelets, but is dispensable for their generation and function. *Blood.* 119:4283–4290.
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 80:617–653.
- Wong, C.H.Y., C.N. Jenne, B. Petri, N.L. Chrobok, and P. Kubes. 2013. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat. Immunol.* 14:785–92.
- Woodward, J.J., L. Smith, and E. Casillas. 1981. Thrombocyte aggregation in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 68:457–466.
- Work, T.M., R.E. Raskin, G.H. Balazs, and S.D. Whittaker. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *Am. J. Vet. Res.* 59:1252–1257.
- Wright, J.H. 1906. The Origin and Nature of the Blood Plates. *Bost. Med. Surg. J.* 154:643–345.
- Yamamoto, R., Y. Morita, J. Ooehara, S. Hamanaka, M. Onodera, K.L. Rudolph, H. Ema, and H. Nakauchi. 2013. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell.* 154:1112–1126.
- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.-G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J.Q. Feng, S. Harris, L.M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Linheng. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 425:836–841. .
- Zhu, J., R. Garrett, Y. Jung, Y. Zhang, N. Kim, J. Wang, G.J. Joe, E. Hexner, Y. Choi, R.S. Taichman, and S.G. Emerson. 2007. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood.* 109:3706–12.
- Zuasti A, and F. C. 1988. Granulopoiesis in the head kidney of *Sparus auratus*. *Arch. Histol. Cytol.* 51:425–431.
- 加藤尚志. 2014a. 赤血球産生と鉄恒常性における環境応答系の探索. *臨床血液.* 55:735–742.
- 加藤尚志. 2014b. 生物の進化と赤血球造血. *臨床血液.* 55:1777–1784.
- 河北誠, and 宮家隆次. 2013. エリスロポエチン物語. *臨床血液.* 54:1615–1624.
- 坂本明彦, 加藤尚志, and 船津高志. 2011. 細胞膜上におけるトロンボポエチン受容体の一分子ダイナミクス. *生化学.* 83:912–919.
- 山元重光. 1957. 瀉血に因る栓球増多の発生転機について. *Acta Haematol. Jpn.* 20:163–178.
- 小宮悦造. 1938. 腹部臓器ト血液ノ調節. *日消誌.* 37:443–456.
- 前川峻, and 加藤尚志. 2014. 低酸素および低温環境ストレスと赤血球造血. *In 血液フロンティア.* 549–557.
- 渡邊清明, 武内恵, 川合陽子, 猪瀬芳子, 石渡弓子, 熊澤寛子, 中山洋一, and 横尾ハル江. 2000. 慶應関連病院における血液検査の共通基準値. *慶應医学.* 77:257–262.

野川菜美, and 加藤尚志. 2006. 両生類における造血のニッチ～造血巣の多様性から探る. 分子細胞治療. 5:110-116.

研究業績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Yuta Tanizaki</u>, Megumi Ichisugi, Miyako Obuchi-Shimoji, Takako Ishida-Iwata, Ayaka Tahara-Mogi, Mizue Meguro-Ishikawa and Takashi Kato. Thrombopoietin induces production of nucleated thrombocytes from liver cells in <i>Xenopus laevis</i>. <i>Sci Rep</i>, 5:18519, Dec 21, 2015. 2. <u>Yuta Tanizaki</u>, Takako Ishida-Iwata, Miyako Obuchi-Shimoji, Takashi Kato. Cellular characterization of thrombocytes in <i>xenopus laevis</i> with specific monoclonal antibodies. <i>Exp Hematol.</i> 43 (2) :125-136, Feb 1, 2015. 3. Kazumichi Nagasawa, Mizue Meguro-Ishikawa, Kei Sato, <u>Yuta Tanizaki</u>, Nami Nogawa-Kosaka and Takashi Kato. The influence of artificially introduced nglycosylation sites on the <i>in vitro</i> activity of <i>xenopus laevis</i> erythropoietin. <i>PLoS ONE.</i> 10, 4, e0124676, Apr 21 2015. 4. Kazumichi Nagasawa, <u>Yuta Tanizaki</u>, Takehito Okui, Atsuko Watarai, Shinobu Ueda, Takashi Kato. Significant modulation of the hepatic proteome i nduced by exposure to low temperature in <i>Xenopus laevis</i>. <i>Biology Open</i>, 2, 1057–69 2013, Aug 30, 2013. 5. Nami Nogawa-Kosaka, Tatsuhisa Sugai, Kazumichi Nagasawa, <u>Yuta Tanizaki</u>, Mizue Meguro, Yoichi Aizawa, Shun Maekawa, Motoyasu Adachi, Ryota Kuroki, Takashi Kato. Identification of erythroid progenitors induced by erythropoietic activity in <i>Xenopus laevis</i>. <i>J Exp Biol</i>, 214: 921-927, Mar 15, 2011.
総説	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>谷崎 祐太</u>, 一杉 芽美, 大淵-下地 美也子, 石田-岩田 貴子, 田原-茂木 彩香, 目黒-石川 瑞枝, 加藤 尚志. アフリカツメガエルにおいてトロンボポエチンは肝臓での有核栓球の産生を誘導する, 比較内分泌学会, Vol. 42 No. 157, 9-10, 2016 年 1 月 2. <u>谷崎 祐太</u>, 加藤 尚志. 1.巨核球造血の最新知見から血小板産生機構を知る. 『トロンボポエチン受容体作動薬のすべて』. 編) 池田康夫, PART1: 血小板産生機構とトロンボポエチンの基礎をみる, 19-30, 先端医学社刊, 2012 年 10 月
講演 (国際)	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Yuta Tanizaki</u>, Ayaka Murase, Yoko Mochizuki, Takato Otani and Takashi Kato. Development of thrombocytes from the megakaryocyte induced by thrombopoietin in frog. 44th Annual Scientific Meeting of ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Kyoto, Japan, Sep, 2015. 2. <u>Yuta Tanizaki</u>, Yoko Mochizuki, Takato Otani, Takashi Kato. Characterization of immature multipotent progenitors by cell transplantation in frog model. 43rd Annual Scientific Meeting of ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Montréal, Canada, Aug, 2014. 3. <u>Yuta Tanizaki</u>, Ken Yasukawa, Takato Otani, Yoko Mochizuki , Kosuke Takeshima, Takashi Kato. Autologous transplantation of thrombopoietin derived Hepatic hematopoietic progenitor cells in <i>Xenopus laevis</i>. New Orleans, LA, USA, Dec, 2013. 4. <u>Yuta Tanizaki</u>, Megumi Ichisugi, Mizue Meguro, Hidetatsu Tamaki, Nao Kashiwase, Ken Yasukawa, Takashi Kato. Thrombopoietin maintains thrombocytic progenitors in liquid suspension cultures from <i>Xenopus laevis</i> liver or spleen. 2012 ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Amsterdam, Netherlands, Aug, 2012.

<p>講演 (国際)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 5. <u>Yuta Tanizaki</u>, Ayaka Tahara, Sayaka Kinoshita, Motoki Yamauchi, Mizue Meguro, Shun Maekawa, Kazumichi Nagasawa, Takako Ishida-Iwata, Miyako Obuchi- Shimoji, Nami Nogawa-Kosaka, Takashi Kato. Proliferation and differentiation of thrombocyte progenitors in the liver and the spleen in <i>Xenopus Laevis</i> under the stimulation of thrombopoietin. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology. Orlando, FL, USA, Dec, 2010. 6. <u>Yuta Tanizaki</u>, Nami Nogawa-Kosaka, Kazumichi Nagasawa, Ayaka Tahara, Shun Maekawa, Takehito Okui, Takashi Kato. Thrombocyte-Erythrocyte progenitors identified in african clawed frog <i>Xenopus Laevis</i>. 2009 ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Athens, Greece, Sep, 2009. 7. <u>Yuta Tanizaki</u>, Jun Nakashima, Takashi Kaburagi, Takahiro Takeuchi, Shun Maekawa, Makoto Fukushima, Haruka Miyachika, Yosuke Mano, Takashi Matsumoto, Toshiyuki Okano, Takashi Kato. Gene Expression Analysis of Photostimulated Hematopoietic Factors in <i>Xenopus laevis</i>. NTU-Waseda University Joint Symposium in Chemical and Life Science. Nanyang Avenue, Singapore, Nov, 2009. 8. Ayaka Murase, Nao Kashiwase, <u>Yuta Tanizaki</u>, Takato Otani, Yoko Mochizuki and Takashi Kato. Migration and characteristics of thrombocytes during cold-exposure in <i>Xenopus laevis</i>. 44th Annual Scientific Meeting of ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Kyoto, Japan, Sep, 2015. 9. Takashi Kato, Kazumichi Nagasawa, Takehito Okui, <u>Yuta Tanizaki</u>, Shun Maekawa. Environmental responses of hematopoiesis in <i>Xenopus laevis</i>. (Symposium 3 Adaptation, Organizers; Takashi Kato and Yumi Izutsu, Niigata University, Niigata, Japan). The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan, Nov, 2014. 10. Yoko Mochizuki, <u>Yuta Tanizaki</u>, Takato Otani, Kei Sato, Megumi Ichisugi, Ayaka Murase, Shunji Sakai, Takashi Kato. Properties of c-Mpl expression in thrombopoietin-derived hepatic hematopoietic progenitors of <i>Xenopus laevis</i>. 43rd Annual Scientific Meeting of ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Montréal, Canada, Aug, 2014. 11. Takato Otani, <u>Yuta Tanizaki</u>, Yoko Mochizuki, Ayaka Murase, Shunji Sakai, Takashi Kato. Thrombopoietin-induced differentiation and maturation of splenic and hepatic thrombocytes in <i>Xenopus laevis</i>. 43rd Annual Scientific Meeting of ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Montréal, Canada, Aug, 2014. 12. Sayaka Kinoshita, Yutaka Nagai, <u>Yuta Tanizaki</u>, Takashi Kato. The Cellular Classification and Separation of Nucleated Blood Cells by Supravital Cell Staining with Acridine Orange. Abstract 4907. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego Convention Center, San Ddiego, CA, USA, Dec, 2011. 13. Ayaka Tahara, <u>Yuta Tanizaki</u>, Takehito Okui, Mizue Meguro, Sayaka Kinoshita, Shun Maekawa, Motoki Yamauchi, Miyako Obuchi-Shimoji, Takako Ishida-Iwata, Yutaka Nagai, Ryota Kuroki, Takashi Kato. Characterization of <i>Xenopus laevis</i> thrombocytic cells stimulated by thrombopoietin in liquid culture. 2010 ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Melbourne, Australia, Aug, 2010. 14. Ayaka Tahara, Miyako Shimoji, <u>Yuta Tanizaki</u>, Motoki Yamauchi, Mizue Meguro, Takako Ishida, Shosuke Furukawa and Takashi Kato. Does thrombopoietin homologue in african clawed frogs stimulate thrombopoiesis? 2009 ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Athens, Greece, Sep, 2009.
--------------------	--

<p>講演 (国内)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Yuta Tanizaki, Ayaka Murase, Takato Otani, Yoko Mochizuki and Takashi Kato. Characterization of nucleated thrombocytes derived from megakaryocyte-like cells in <i>X. laevis</i>. 第77回日本血液学会学術集会, 金沢, 2015年10月 2. 谷崎 祐太, 望月 瑤子, 渡会 敦子, 大谷 崇仁, 村瀬 絢香, 加藤 尚志. ツメガエル肝臓由来多能性前駆細胞のタンパク質プロファイリング. 次世代両生類研究会 第一回会合, 岡崎, 2015年8月 3. Yuta Tanizaki, Takato Otani, Yoko Mochizuki, Takashi Kato. Establishment of cell transplantation model of TPO derived-hepatic hematopoietic progenitors in frog. 第76回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014年10月 4. 谷崎 祐太, 大谷 崇仁, 望月 瑤子, 佐藤 圭, 加藤 尚志. ツメガエル肝臓部分切除個体における赤血球前駆細胞の分布. 日本動物学会第85回大会, 東北大学, 2014年9月 5. 谷崎 祐太, 安川 賢, 望月 瑤子, 大谷 崇仁, 一杉 芽美, 加藤 尚志. アフリカツメガエル造血における TPO-c-Mpl システム. 第7回日本ツメガエル研究集会, 秋吉台国際芸術村, 2013年9月 6. 谷崎 祐太, 一杉 芽美, 柏瀬 奈央, 安川 賢, 加藤 尚志, ツメガエル有核栓球造血における TPO-c-Mpl システム, XCIJ-MA 研究集会, 和光, 2013年3月 7. Yuta Tanizaki, Megumi Ichisugi, Mizue Meguro, Ken Yasukawa, Takashi Kato. Long-term maintenance of thrombocytic progenitors supported by thrombopoietin alone. 第74回日本血液学会学術集会, 京都, 2012年10月 8. 谷崎 祐太, 柏瀬 奈央, 安川 賢, 加藤 尚志. アフリカツメガエル末梢栓球の起源と肝由来培養栓球様細胞の性質, 日本動物学会第83回大会, 大阪, 2012年9月 9. 谷崎 祐太, 安川 賢, 加藤 尚志. 造血前駆細胞の造血因子応答性の比較解析. 第5回東京女子医科大学・早稲田大学 TWIns ジョイントシンポジウム. 早稲田大学先端生命医科学研究所, 2011年12月 10. Yuta Tanizaki, Yusuke Yoshioka, Kazumichi Nagasawa, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya, Norio Komatsu, Takashi Kato. Global Gene Expression Profiling of Human Leukemia Cell Lines. 第73回日本血液学会学術集会. 名古屋, 2011年10月 11. Yuta Tanizaki, Ayaka Tahara, Mizue Meguro, Takako Ishida-Iwata, Miyako Obuchi-Shimoji, Kazumichi Nagasawa, Motoki Yamauchi, Shun Maekawa, Sayaka Kinoshita, Takashi Kato. Cellular features of thrombocytic progenitors responding to thrombopoietin-like molecule in <i>Xenopus</i>. 第72回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010年10月 12. 高野 仁志, 佐藤 圭, 谷崎 祐太, 平田 昭人, 望月 瑤子, 加藤 尚志. 組換えツメガエルトロンボポエチンの受容体への結合と生物活性の比較解析, 第40回 日本比較内分分泌学会, 広島, 2015年12月 13. Takashi Kato, Shun Maekawa, Takehito Okui, Yuta Tanizaki. Experimental exploration on erythropoiesis in aquatic amphibians: a comparative perspective. シンポジウム 02 「生物の進化から見た赤血球造血」 第77回日本血液学会学術集会, 金沢, 2015年10月
--------------------	--

講演 (国内)	<p>14. Ayaka Murase, Yuta Tanizaki, Takato Otani, Yoko Mochizuki, Kazumichi Nagasawa and Takashi Kato. The change of thrombocytes characteristics during cold-exposure in <i>Xenopus laevis</i>. 第77回日本血液学会学術集会, 金沢, 2015年10月</p> <p>15. Takato Otani, Ayaka Murase, Yuta Tanizaki, Yoko Mochizuki, Hitoshi Takano, Shunji Sakai and Takashi Kato. The maturation of splenic megakaryocytes/thrombocytes in splenectomized African clawed frogs. 第77回日本血液学会学術集会, 金沢, 2015年10月</p> <p>16. 松林 篤志, 村瀬 絢香, 石井 寛之, 佐藤 圭, 谷崎 祐太, 加藤 尚志. 低温刺激によるアフリカツメガエル赤血球の組織局在の変化. 日本動物学会第86回大会, 新潟, 2015年9月</p> <p>17. 平田 昭人, 佐藤 圭, 谷崎 祐太, 加藤 尚志. アフリカツメガエル赤血球分化におけるエリスロポエチン受容体発現量の変化. 日本動物学会第86回大会, 新潟, 2015年9月</p> <p>18. 蜷尾 はるか, 村瀬 絢香, 境 俊二, 谷崎 祐太, 加藤 尚志. 低温曝露後のネッタイツメガエル末梢血球数の変動. 日本動物学会第86回大会, 新潟, 2015年9月</p> <p>19. 境 俊二, 望月 瑤子, 大谷 崇仁, 谷崎 祐太, 加藤 尚志. ネッタイツメガエル肝臓, 脾臓, 腎臓由来細胞のトロンボポエチンの <i>in vitro</i> 細胞増殖活性. 日本動物学会第86回大会, 新潟, 2015年9月</p> <p>20. 上原 あずさ, 境 俊二, 佐藤 圭, 蜷尾 はるか, 谷崎 祐太, 加藤 尚志. ネッタイツメガエル赤血球の血算基準値と諸性質. 日本動物学会第86回大会, 新潟, 2015年9月</p> <p>21. 平田 昭人, 米塚 友香, 武藤 洋史, 藤山 真吾, 永澤 和道, 谷崎 祐太, 加藤 尚志. アフリカツメガエルエリスロポエチン受容体を認識するモノクローナル抗体による血球細胞のフローサイトメトリー解析. 日本動物学会関東支部第67回大会, 早稲田, 2015年3月</p> <p>22. 佐藤 圭, 細沢 咲湖, 永澤 和道, 谷崎 祐太, 加藤 尚志. アフリカツメガエルエリスロポエチンの酵素免疫学的測定法の構築. 日本動物学会関東支部第67回大会, 早稲田, 2015年3月</p> <p>23. 境 俊二, 望月 瑤子, 高野 仁志, 谷崎 祐太, 加藤 尚志. ネッタイツメガエルトロンボポエチンの動物細胞発現と生物活性の基礎的検討. 日本動物学会関東支部第67回大会, 早稲田, 2015年3月</p> <p>24. 高野 仁志, 佐藤 圭, 谷崎 祐太, 大谷 崇仁, 谷合 正光, 竹島 功将, 加藤 尚志. アフリカツメガエル組換えトロンボポエチンのジスルフィド結合の決定. 日本動物学会関東支部第67回大会, 早稲田, 2015年3月</p> <p>25. Gakuto Honda, Takato Otani, Ryo Kuriki, Nobuhiro Onda, Hidekazu Onodera, Takashi Kato, Yuta Tanizaki, Takashi Kato. The structure and biological activity of G-CSF in African clawed frogs. 第76回日本血液学会学術集会, 京都, 2014年10月</p> <p>26. 村瀬 絢香, 谷崎 祐太, 柏瀬 奈央, 望月 瑤子, 大谷 崇仁, 加藤 尚志. 低温曝露後のアフリカツメガエル末梢血球数減少の経時変化と臓器移行. 日本動物学会第85回大会, 仙台, 2014年9月</p>
------------	--

講演 (国内)	<p>27. 高野 仁志, 佐藤 圭, <u>谷崎 祐太</u>, 望月 瑤子, 大谷 崇仁, 清瀬 大貴, 加藤 尚志. 動物細胞で発現した組換えツメガエルトロンボポエチンの分子性状と生物活性. 日本動物学会第 85 回大会, 仙台, 2014 年 9 月</p> <p>28. 八木 美波, 永井 豊, 木下 紗也香, <u>谷崎 祐太</u>, 加藤 尚志. リポ多糖を投与したアフリカツメガエル末梢血球のフローサイトメトリー解析. 日本動物学会第 85 回大会, 仙台, 2014 年 9 月</p> <p>29. 加藤 尚志, <u>谷崎 祐太</u>, 前川 峻. 造血をツメガエルから俯瞰する: 血球はどこからやってくるのか?. シンポジウム 12 「生物実験材料としてのネッタイツメガエルの長所と有用性」, オーガナイザー: 加藤尚志, 柏木昭彦. 日本動物学会第 84 回大会, 岡山, 2013 年 9 月</p> <p>30. 大谷 崇仁, <u>谷崎 祐太</u>, 安川 賢, 望月 瑤子, 加藤 尚志. アフリカツメガエル肝臓及び脾臓における栓球系細胞産生能の差異. 日本動物学会第 84 回大会, 岡山, 2013 年 9 月</p> <p>31. 望月 瑤子, 一杉 芽美, <u>谷崎 祐太</u>, 安川 賢, 柏瀬 奈央, 大谷 崇仁, 加藤 尚志. トロンボポエチン依存性に増殖・分化するアフリカツメガエル肝臓細胞の特徴. 日本動物学会第 84 回大会, 岡山, 2013 年 9 月</p> <p>32. 竹島 功将, 永澤 和道, <u>谷崎 祐太</u>, 渡会 敦子, 加藤 尚志. アフリカツメガエルの赤血球膜蛋白質群の同定. 第 86 回 日本生化学会大会, 横浜, 2013 年 9 月</p> <p>33. Nao Kashiwase, <u>Yuta Tanizaki</u>, Shun Maekawa, Takashi Kato. Composition of cell surface glycans of thrombocytes in a cold-induced thrombocytopenic frog model. 第 75 回日本血液学会学術集会. 札幌, 2012 年 10 月</p> <p>34. Ken Yasukawa, <u>Yuta Tanizaki</u>, Ikki Nomura, Takato Otani, Yoko Mochizuki, Takashi Kato. Analysis of thrombopoiesis in an antibody-induced immune-thrombocytopenic <i>Xenopus</i> model. 第 75 回日本血液学会学術集会. 札幌, 2012 年 10 月</p> <p>35. 柏瀬 奈央, <u>谷崎 祐太</u>, 永澤 和道, 前川 峻, 加藤 尚志. 低温曝露によるアフリカツメガエル末梢栓球数減少における栓球膜糖鎖の変動. 日本動物学会第 83 回大会, 大阪, 2012 年 9 月</p> <p>36. 木下 紗也香, <u>谷崎 祐太</u>, 永井 豊, 加藤 尚志. 貧血応答時におけるアフリカツメガエル血球細胞の核酸量及び細胞構造の解析, 第 36 回 日本比較内分泌学会, 東京, 2011 年 11 月</p> <p>37. 永澤 和道, <u>谷崎 祐太</u>, 前川 峻, 加藤 尚志. ツメガエルにおけるプロテオミクスの試行と展望, 第 5 回日本ツメガエル研究集会, 静岡, 2011 年 10 月</p> <p>38. 一杉 芽美, <u>谷崎 祐太</u>, 田原 彩香, 栗城 遥, 目黒 瑞枝, 渡会 浩志, 加藤 尚志. 栓球造血における TPO/c-Mpl 系の生物種間の保存と生物活性の交叉, 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011 年 10 月</p> <p>39. 武藤 洋史, 廣瀬 崇行, 神保 杏林, 栗城 遥, 永澤 和道, <u>谷崎 祐太</u>, 加藤 尚志. アフリカツメガエル肺におけるエリスロポエチンの発現と作用, 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011 年 10 月</p>
------------	---

	<p>40. 永澤 和道, 前川 峻, 谷崎 祐太, 加藤 尚志. 低温環境に暴露したアフリカツメガエルの血漿プロテオミクス, 日本動物学会第 82 回旭川大会, 旭川, 2011 年 9 月</p> <p>41. 横田 直樹, 中嶋 泰三, <u>谷崎 祐太</u>, 小濱 聖佳, 蓮沼 至, 山本 和俊, 加藤 尚志. ウシガエル幼生の赤血球前駆細胞の同定と組織分布の解析, 日本動物学会第 82 回旭川大会, 旭川, 2011 年 9 月</p> <p>42. 目黒 瑞枝, 安達 基泰, 黒木 良太, <u>谷崎 祐太</u>, 田原 彩香, 別府 美穂, 永澤 和道, 加藤 尚志. 大腸菌組換えタンパク質発現における C 末端配列への変異導入の効果, 第 11 回 日本蛋白質化学会年会, 大阪, 2011 年 6 月</p> <p>43. 清瀬 大貴, 永澤 和道, <u>谷崎 祐太</u>, 田原 彩香, 栗城 遥, 渡会 浩志, 加藤 尚志. 組換えアフリカツメガエルトロンボポエチンの哺乳動物細胞発現と活性検証, 日本動物学会関東支部第 63 回大会, 神奈川, 2011 年 3 月</p> <p>44. 横田 直樹, 中嶋 泰三, 池田 磨希, <u>谷崎 祐太</u>, 遠藤 信康, 蓮沼 至, 山本 和俊, 加藤 尚志. ウシガエルの末梢血球数の測定と赤血球前駆細胞の検出, 日本動物学会関東支部第 63 回大会, 神奈川, 2011 年 3 月</p> <p>45. 永澤 和道, 須貝 龍久, <u>谷崎 祐太</u>, 前川 峻, 別府 実穂, 小坂 (野川) 菜美, 加藤 尚志. ツメガエルの血中に存在する赤血球産生活性の抗エリスロポエチン抗体による中和, 第 35 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム, 静岡, 2010 年 11 月</p> <p>46. 真野 陽介, 奥井 武仁, 小濱 聖佳, 前川 峻, 木下 紗也香, <u>谷崎 祐太</u>, 田原 彩香, 加藤 尚志. アフリカツメガエル造血器における細胞接着因子 ESAM の発現, 第 35 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム, 静岡, 2010 年 11 月</p> <p>47. 木下 紗也香, <u>谷崎 祐太</u>, 田原 彩香, 前川 峻, 松田 悠, 永井 豊, 加藤 尚志. アクリジンオレンジ染色によるアフリカツメガエル血球単離法の検討, 日本動物学会第 81 回大会, 東京, 2010 年 9 月</p> <p>48. 奥井 武仁, 前川 峻, 山本 雄介, <u>谷崎 祐太</u>, 小坂 (野川) 菜美, 會沢 洋一, 加藤 尚志. アフリカツメガエルの赤血球前駆細胞の組織分布, 日本動物学会第 79 回大会, 福岡, 2008 年 9 月</p>
そのほか	<p>1. <u>谷崎 祐太</u>, 小坂 展慶, 落谷 孝広, 加藤 尚志. UT-7/TPO 細胞株の核多倍体化に関する micro RNA の同定, 産学連携白血病診断研修会, 東京, 2013 年 4 月</p> <p>2. <u>谷崎 祐太</u>, 加藤 尚志. ヒト白血病 UT-7 細胞クロスオミクス解析をツメガエル栓球研究にフィードバックするには, 産学連携白血病診断研修会, 東京, 2012 年 4 月</p> <p>3. <u>谷崎 祐太</u>, 安川 賢, 加藤 尚志. 造血前駆細胞の造血因子応答性の比較解析, 早稲田大学先端生命医科学研究所 TWIns5 周年東京女子医科大学 早稲田大学 ジョイントシンポジウム, 東京, 2012 年 4 月</p> <p>4. 永澤 和道, 神保 杏林, 木下 紗也香, <u>谷崎 祐太</u>, 田原 彩香, 恩田 信洋, 栗城 遥, 清瀬 大貴, 前川 峻, 渡会 浩志, 永井 豊, 加藤 尚志. フローサイトメトリー法による血球解析: 抗体の作出と蛍光核酸染色の応用, 早稲田大学先端生命医科学研究所 第 4 回東京女子医科大学・早稲田大学 TWIns ジョイントシンポジウム, 東京, 2011 年 3 月</p>

- | | |
|--|---|
| | <p>5. 池田 磨希, <u>谷崎 祐太</u>, 田原 彩香, 山内 志毅, 加藤 尚志. One of the challenges in developing a new animal model for studying hematopoiesis: the restoration of production system for a mutated anti-thrombocyte monoclonal antibody. 早稲田大学先端生命医科学研究所 第3回 TWIns 合同ハイテクシンポジウム, 2009年1月</p> |
|--|---|