

- [2] Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999;283:534–7.
- [3] Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14482–6.
- [4] Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390–4.
- [5] Pang W. Role of muscle-derived cells in hematopoietic reconstitution of irradiated mice. *Blood* 2000;95:1106–8.
- [6] Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, et al. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* 2003;5:640–6.
- [7] Kawada H, Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 2001;98:2008–13.
- [8] Kawada H, Ogawa M. Hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:605–9.
- [9] Mahmud N, Weiss P, Li F, Hoffman R. Primate skeletal muscle contains cells capable of sustaining in vitro hematopoiesis. *Exp Hematol* 2002;30:925–36.
- [10] Jay KE, Gallacher L, Bhatia M. Emergence of muscle and neural hematopoiesis in humans. *Blood* 2002;100:3193–202.
- [11] Kawada H, Ando K, Tsuji T, Shimakura Y, Nakamura Y, Chargui J, et al. Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. *Exp Hematol* 1999;27:904–15.
- [12] Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Mugeruma Y, et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 2003;101:2905–13.
- [13] Kato S, Ando K, Nakamura Y, Mugeruma Y, Sato T, Yabe H, et al. Absence of a CD34⁺ hematopoietic precursor population in recipients of CD34⁺ stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:587–95.
- [14] Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N, et al. Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34⁺ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *J Immunol* 2002;169:204–9.
- [15] McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1341–6.
- [16] Issarachai S, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Cells with hemopoietic potential residing in muscle are itinerant bone marrow-derived cells. *Exp Hematol* 2002;30:366–73.
- [17] Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002;8:1011–7.
- [18] Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard JR, Steindler DA, et al. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 2004;363:1432–7.
- [19] Howell JC, Yoder MC, Srour EF. Hematopoietic potential of murine skeletal muscle-derived CD45(–)Sca-1(+)-c-kit(–) cells. *Exp Hematol* 2002;30:915–24.
- [20] Dell'Agnola C, Rabascio C, Mancuso P, Capillo M, Pruneri G, Gobbi A, et al. In vitro and in vivo hematopoietic potential of human stem cells residing in muscle tissue. *Exp Hematol* 2002;30:905–14.

2 成体多能性幹細胞 (MAPC)を用いた細胞治療

あんどう きよし
■ 安藤 潔

東海大学医学部 血液・腫瘍・リウマチ内科

安藤 潔
1983年慶應義塾大学医学部卒業。91年米国Harvard大学留学、2002年東海大学医学部血液・腫瘍・リウマチ内科助教授、現在に至る。研究テーマは血液幹細胞、MAPC。趣味は読書、散歩、音楽・美術鑑賞。

Key words : 造血幹細胞, 可塑性, 成体骨髄多能性幹細胞 (MAPC), 間葉系幹細胞 (MSC), 中胚葉系幹細胞 (MPC)

1. 骨髄細胞を用いた臓器再生

1998年にヒト胎児幹細胞 (ES細胞) が樹立されて以来, その分化の万能性 (どのような組織にもなることができる能力) から細胞治療による様々な臓器の再生医療が期待されている。しかしながら, 初期胚を操作することの倫理的問題, 腫瘍化しやすいこと, 同種移植による免疫学的排除など医療応用への障壁も多いのが現状である。

一方1999年頃から骨髄由来の細胞が血液以外の様々な組織の細胞に分化することがマウスのみならずヒトでも報告されている。臨床において骨髄細胞は造血・免疫系の再構築を目的とするだけでなく, 虚血性疾患を対象に血管新生療法としても利用されるようになってきた。実験的には現在まで骨髄移植により移入された細胞が骨格筋, 心筋, 神経, 骨, 軟骨, 皮膚, 脂肪, 肝, 腸管上皮, 血管内皮, 血管平滑筋などに分化することが報告されている。(図1) 従って骨髄細胞の能力を利用すれば, ES細胞を利用することなく自己の細胞で再生医療が可能となることが期待され

る。しかしながら, このような分化能を示す細胞は骨髄に含まれているどの細胞なのだろうか? 現状では, ①各種組織特異的幹細胞が骨髄に存在する, ②骨髄に多数存在する造血幹細胞が可塑性を示して他の組織細胞に分化転換する, ③多能性幹細胞が骨髄に存在する, という3つの可能性が考えられている。本稿では③の可能性の根拠となる成体多能性幹細胞(MAPC)に関して解説し, その細胞治療への応用について考察する。

2. 成体多能性幹細胞 (MAPC)

成体に存在する幹細胞は組織幹細胞である。組織幹細胞は発生過程の胚葉形成期以降に出現するものと考えられており, その分化能は胚葉内に限定されている。例えば間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は骨, 軟骨, 脂肪, 骨格筋, 靭帯, 腱など発生学的に沿軸中胚葉 (paraxial mesoderm) 由来の細胞に分化する幹細胞として骨髄に存在することが知られている。ところが2001年にミネソタ大学のグループがこれらの分化能に加えて臓器側

Cell therapy using multipotent adult progenitor cells : Kiyoshi Ando, Division of Hematology, Oncology, and Rheumatology, and Research Center for Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine

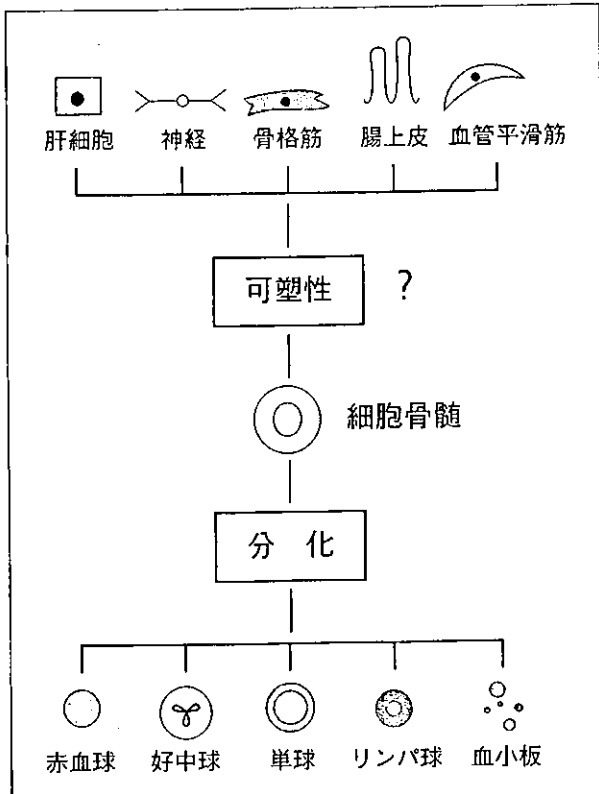


図1 骨髄細胞の分化と形質転換（可塑性）

中胚葉 (visceral mesoderm) 由来の血管内皮細胞にも分化する能力のある細胞として中胚葉系前駆細胞 (mesodermal progenitor cell: MPC) をヒト骨髄より分離した。さらにその後、同グループはこの細胞が外胚葉由来の神経細胞、内胚葉由来の肝細胞にも分化することを報告し、胚葉をこえて分化するこの細胞を成体多能性幹細胞：Multipotent adult progenitor cell (MAPC) と命名した。

(1) マウス、ラット骨髄多能性幹細胞の同定

通常の体細胞を培養すると分裂回数に限りがあり、これを Hayflick life span という。MAPC はこの細胞寿命を越えて培養を続けることができること、胚葉を越えた多分化能を示すこと、という2つの性質を兼ね備えた細

胞として分離される。2002年にはマウス MAPC (mMAPC) を用いて驚くべきデータが報告された (図2)。まず1個のMAPCを注入した胚盤胞から由来するマウスの7/15匹がMAPC由来の細胞よりなるキメラマウスであった。さらにその中の2匹では40%以上のキメリズムを示しており、すべての組織に分化していた。このことはMAPCがES細胞と同様成体のあらゆる組織に分化可能であることを示唆する。ただし生殖細胞への分化はこのキメラマウスの子孫を得る実験を行っていないので不明である。

さらに細胞療法への応用を考えて、 10^6 個のMAPCを照射あるいは非照射NOD/SCIDマウスに経静脈的投与した。その結果、数%のキメリズムであるが造血系、肝、肺、腸管などMAPCが生着した臓器環境に応じて分化することが示された。骨格筋、心筋、神経など細胞回転のない組織ではドナー由来の細胞は認められなかった。また、皮膚、腎臓でもドナー由来の細胞は認められなかった。MAPCの自己複製能を見るためにこれらのマウスの骨髄細胞を用いて2次移植を行ったところ1次移植と同様各種組織に分化することが示された。このようにMAPCはES細胞とほぼ同等の分化能を示していた。特筆すべきはES細胞は移植すると奇形種などに腫瘍化することがあるが、今回の実験ではMAPCの腫瘍化は認められていない。またES細胞は個体に経静脈的投与しても生着することはなく、組織環境に応じて分化することもないがMAPCでは上記のように分化したことである。

以上のようにほぼ全能性の細胞が成体の骨髄より分離された。このことにより骨髄移植によるドナー由来の各種組織細胞がMAPCに

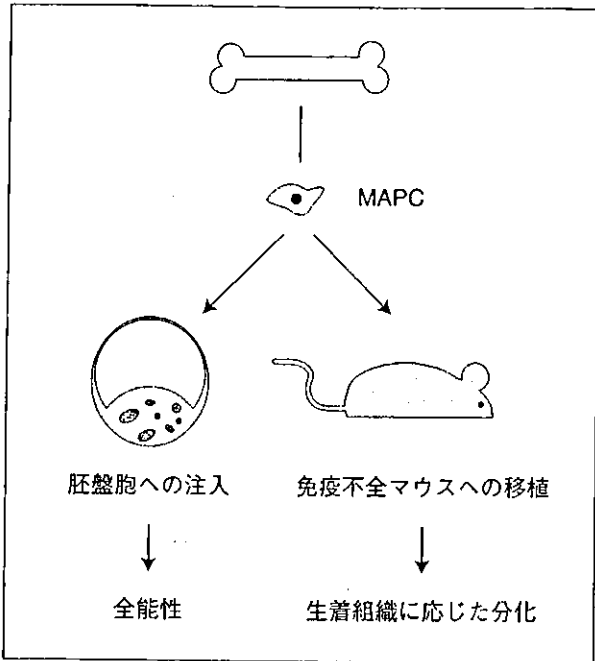


図2 マウス骨髄多能性幹細胞 (MAPC) は *in vivo* で全能性を示した

由来すると説明できるのだろうか？ 新たに多くの疑問も生じる。MAPCは生理的に存在する細胞なのであるだろうか？ MAPCの分離が低細胞密度での長期間培養による選択に依存しているため、培養操作による細胞形質の変化がMAPCを生み出す可能性も考えられる。例えば本来MSCであったものが長期培養の過程で染色体のリモデリングによる遺伝子発現調節領域の修飾の変化を来し、多分化能を獲得した可能性も考えられる。表面マーカーやsp形質などを利用してMAPC分画を濃縮するなどの工夫によりMAPCをプロスペクティブに同定する努力が必要である。次にMAPCが生体内に存在するのであれば、その本来の機能は何なのか？ 発生学的な由来は何なのか？ 成体の組織修復に関与しているのだろうか？ そのためには末梢へ動員されているのだろうか？ 成体で造血幹細胞は

MAPCから由来しているのでしょうか？ これらは今後の課題である。

(2) ヒト骨髄多能性幹細胞

MAPC様の細胞はヒト骨髄単核細胞中に $1/10^6$ 程度の頻度で存在する。これらの細胞は骨、軟骨、脂肪、骨格筋細胞だけでなく血管内皮細胞 (EPC) にも分化可能であった。この細胞は10%ウシ胎児血清 (FCS) 存在下や高細胞密度で培養すると血管内皮細胞への分化能を失うため、分化能を維持しながら培養するためには無血清あるいは低濃度のFCS存在下で低い細胞密度で培養することが必要である。血管内皮細胞への分化誘導のためにはこの細胞を高細胞密度 ($2 \times 10^4/cm^2$) の状態でVEGF (10ng/ml) 存在化に無血清培地で培養する。幹細胞マーカーであるAC133は培養3日以後消失し、血管内皮マーカーであるVE-cadherin, Flk-1, Flt-1は3日以後発現が増強してくる。CD34は9日以後に発現し、同時にvWFの発現とacetyl-LDLの取り込み能を獲得する。これらの誘導されたEPCはさらに20回の細胞分裂を繰り返すことができる。NOD/SCIDマウスを用いた *in vivo* の実験においても腫瘍増殖および創傷治癒過程における新生血管の30-45%にヒトMAPC由来のEPCによる血管内皮細胞を認めた。

またヒトMAPC様細胞を脳梗塞ラットに移植することによりアストログリア, オリゴデンドログリア, ニューロンのマーカーを持つそれぞれの神経細胞に分化することが観察された。従ってこの細胞は外胚葉由来の神経細胞に分化可能であり, 中胚葉を超える分化能を持つことが示された。

さらに内胚葉由来の組織である肝細胞へも

*in vitro*で分化誘導可能であった。ヒトMAPC様細胞をconfluent ($3 \times 10^4/\text{cm}^2$ の細胞密度)の状態では1%マトリゲル, FGF-4 (10ng/ml), HGF (20ng/ml) 存在化に無血清培地で培養すると、種々の肝細胞マーカーが発現し、尿素あるいはアルブミン産生、フェノバルビタールによるチトクロームP450活性化, acetyl-LDLの取り込み, グリコーゲン顆粒の産生などの機能を有する肝細胞が分化した。

以上よりヒトMAPC (hMAPC) は沿軸中胚葉由来の細胞の幹細胞としてのMSCの多分化能に加えて、臓側中胚葉由来の血管内皮細胞, 外胚葉由来の神経細胞, 内胚葉由来の肝細胞に分化することがクローンレベルで詳細に解析された。しかしながらヒト細胞を用いる限りマウスMAPCのような*in vivo*の実験ができないという制約があり、厳密にはマウスMAPCと同等の能力を持つか否かは不明である。今後異種移植系を用いて解明されることであろう。

③ 骨髄多能性幹細胞の細胞治療への応用

ES細胞と異なり倫理的問題のないこと、造腫瘍性の示されていないこと、生着環境に応じて分化することなどMAPCの再生医療への応用は期待が大きい。しかし一方でその前に解決しなければならない問題も多い。まず上述のようにmMAPCやrMAPCで示されたような多分化能がhMAPCでも示されるか否かが問題である。また、加齢によりMAPCの存在頻度がどれくらい低下するのであるか？ 自己移植が可能であっても多くの対象疾患は成人病なので、若いときに骨髄を保存しておく必要があるかもしれない。同種移植は可能なのだろうか？ 文献上は組織適合抗原(MHC)の発現がないとされており拒絶を受け

にくいことも考えられる。そうであれば医療応用の可能性が広がるであろう。また現状ではMAPCを得るためには長期間の培養が必要であるが、短期間に効率よくMAPCを得る技術が必要である。造血幹細胞のようにマーカーを利用してプロスペクティブに採取が可能だろうか？ また造血幹細胞のように骨髄から末梢への動員は可能なのか？ 可能であれば大量の採取が期待される。現状ではMAPCの細胞治療への利用は遠い将来のことに思えるが、これらの問題をひとつずつ解決することによりMAPCによる再生医療も夢ではなくなるであろう。

3. なぜ骨髄にはさまざまな幹細胞が存在するのか？

なぜ骨髄の中にはこのような未分化な細胞が多種類存在するのであるか？ 元々骨髄は造血幹細胞を分化させずに保持する環境を提供しているわけであり、幹細胞性stemnessを維持する装置を備えていることが示唆される。それが具体的に何なのかは現状では明らかではないが、造血幹細胞が骨髄ストローマ細胞と細胞間相互作用しながら細胞周期の静止期を維持していることなどがstemnessの維持と密接に相関していると推測される。一方、MAPCの実験からは組織環境に応じて幹細胞が分化することが示されている。今後stemnessの維持および組織特異的な分化を誘導する環境因子(niche)の分子機序を解明することが再生医学領域の最大のテーマとなるであろう(図3)。

一方われわれは骨格筋間質にも筋, 脂肪, 血管などの多能性を有するCD34陽性の幹細胞

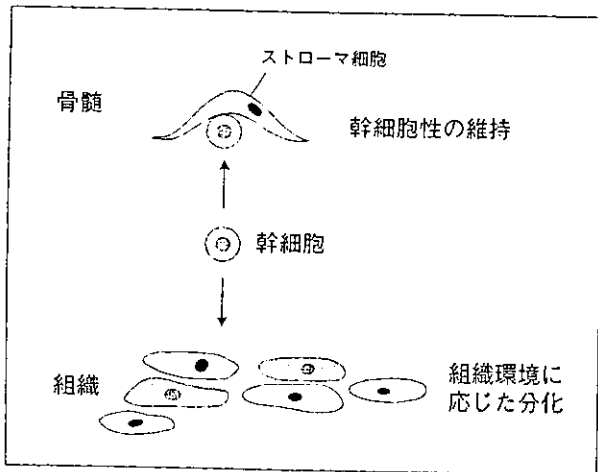


図3 幹細胞を維持する骨髄環境と特異的分化を誘導する組織環境

胞が存在し、この細胞を筋障害モデルに移植すると血管新生を伴う筋組織の再生がおこることを示した。同様に皮膚結合組織にもCD34陽性幹細胞が存在することが示されている。このように従来注目されて来なかった組織間質や結合織にさまざまな多能性幹細胞が存在している可能性がある。またMAPCも骨髄以外に骨格筋、脳からも分離可能であることが最近報告された。従ってstemnessを維持する装置は骨髄以外にも組織間質などに存在していると考えられる。

4. 今後の展望

従来造血幹細胞のソースと考えられていた骨髄に様々な幹細胞が存在することが示されるようになり、骨髄移植療法に新たな光が当たりつつある。すなわち、従来造血疾患や先

天性代謝疾患を対象としていた骨髄移植療法の適応が血管、循環器、肝臓など様々な領域の再生治療法として広がる可能性がある。従って、今後成体多能性幹細胞の表面形質、遺伝子発現プロファイル、自己複製・分化の調節メカニズム、成体における存在意義などが重要な研究分野となっていくと考えられる。また、骨髄に存在するそれらの幹細胞が成体の維持に役割を果たしているのであれば、当然末梢循環に動員されて組織にたどりつくはずであるから、造血幹細胞だけでなく様々な幹細胞が動員される可能性とそのメカニズムについて検討することがより侵襲の少ない再生医療法の開発に結びつくであろう。

まとめ

成体骨髄に多能性幹細胞が存在すること報告され、Multipotent adult progenitor cell (MAPC) と名付けられている。マウスのMAPCは胚盤胞に注入すると三胚葉にわたるほとんどすべての組織細胞に分化し、また経静脈投与すると造血系、肝、肺、腸管など生着した臓器環境に応じて分化した。さらに特筆すべきはES細胞に見られるような腫瘍化がMAPCでは認められないこと、またES細胞は経静脈的投与しても生着しないがMAPCでは生着し骨髄で自己複製しつつ生着環境に応じて分化することである。これらは倫理的問題を抱えるES細胞に代わって再生医療への応用に期待を抱かせるMAPCの特質である。

トピックス

造血幹細胞の体外増幅

- 問題点と展望 2003 -

安藤 潔*

はじめに

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞であり、個体の造血を生涯にわたって維持することが可能である。この能力を利用して、ヒトでも造血幹細胞移植が造血障害、悪性腫瘍、先天性酵素欠損症などの治療法として普及している。さらに造血幹細胞を体外で増幅することができるになれば、次のような臨床的有用性が期待される。

(1) 造血幹細胞増幅による臍帯血移植の成人への利用

臍帯血移植には、一部抗原不適合移植によるドナープールの拡大、ドナー負担の軽減、バンキングされた凍結細胞を用いるので速やかに移植が行える、などの利点があるが、体重の大きな成人の造血系を再構築するには臍帯血に含まれる幹細胞数が十分ではない。臍帯血幹細胞を増幅できれば成人例への利用が可能となる。

(2) ドナーの負担の軽減

少量の骨髓液や、末梢血を流れているごく少数の造血幹細胞を増幅することにより、ドナーや患者に負担の少ない造血幹細胞移植が可能となる。

(3) 体外での輸血用血液製剤の生産

現在輸血用血液製剤は献血制度により支えられているが、近い将来日本においては高齢化社会の訪れとともに、輸血需要人口の増大と輸血供給人口の減少による血液製剤の不足が懸念されている。人工赤血球、人工血小板の開発が進

められているが、造血幹細胞増幅と分化制御が可能になれば、試験管内で赤血球や血小板をはじめとする血液製剤の供給も夢ではなくなる。

このように造血幹細胞の体外増幅は有用な技術であるので、現在世界中でその技術開発が行われている。

造血幹細胞体外増幅の問題点と展望

1999年7月に、米国国立衛生研究所 (NIH) が造血幹細胞体外増幅の問題点に関するワークショップを開催した。そこで討論された内容を表1にまとめた¹⁾。その後の4年間で一部の問題は解決されつつある。以下ここで挙げられた問題点に沿って、2003年の現状と展望について概説する。

1. ヒト造血幹細胞はどのようなアッセイ系で測定されるのか?

造血幹細胞の自己複製能と多分化能、およびそれに基づく長期造血再構築能の評価は、致死量放射線照射にて自己造血能を廃絶された個体への移植によってなされる。しかしながらヒトではこのようなアッセイは不可能であるので、免疫不全マウス、ヒツジ胎仔などを用いた異種移植による代替アッセイが開発された。特に NOD/SCID マウスは従来の免疫不全マウスと比較してヒト造血細胞の生着率が格段に改善し、汎用されている²⁾。また、定量的 SRC (SCID-repopulating cells) アッセイが普及し、それぞれの方法による増幅効率が SRC の増幅効率として評価されるようになった。さらに長期間にわたる造血維持能は、ヒツジ胎仔への異種移植

* 東海大学医学部 血液・腫瘍内科 助教授

表 1 体外増幅臍帯血幹細胞移植の問題点 (1999 NIH Workshop より要約¹⁾)

1. ヒト造血幹細胞はどのようなアッセイ系で測定されるのか?
2. どの細胞群を増幅するか? 幹細胞か, 前駆細胞か?
3. 体外増幅の培養条件は? どのサイトカインを用いるか? 支持細胞は必要か?
4. 自己複製因子は存在するか? 自己複製に関与する遺伝子は何か?
5. 幹細胞あるいは増幅支持細胞に特有の遺伝子発現プロファイルはどのようなものか?
6. 体外増幅操作により幹細胞の生着, ホーミング能力は修飾されるか?
7. 増幅幹細胞により再構築された造血・免疫系の機能をどのように検討するか?
8. 臨床応用のための規制はどのようにすべきか?

により検討される。この結果、従来の体外増幅法の問題点が明らかとなってきた。また、最近 Ito らが開発した NOD/Shi-scid, IL-2R γ 欠損 (NOG) マウス³⁾では、以下で紹介するようにヒト造血幹細胞から T 細胞への分化も可能となり、今後ヒト造血幹細胞のアッセイ系として汎用されることが予想される。

2. どの細胞群を増幅するか?

造血前駆細胞は幹細胞が分化して多分化能および増殖能が制限された細胞であり、コロニーアッセイ法で検出される。サイトカインのみを用いた培養条件でも前駆細胞を増幅することは容易であり、移植医療への応用という観点からは増幅前駆細胞を移植することにより早期の造血回復が期待されている。現在までに報告されている造血細胞増幅の臨床応用はすべて前駆細胞増幅によるものであり、一定の生着促進効果が認められている⁴⁾。一方、長期の造血再構築は幹細胞によるものであり、これは幹細胞増幅によらざるをえない。幹細胞には CD34⁺ 幹細胞、CD34⁻ 陰性幹細胞などのサブpopulation が存在することが知られており、今後はどの幹細胞を増幅するかが問題となることも予想される。

3. 体外増幅の培養条件は? どのサイトカインを用いるか? 支持細胞は必要か?

さまざまなサイトカインの組み合わせによる培養条件が比較されたが、TPO, FL を含む

組み合わせで初めてヒト造血幹細胞の増幅が可能であることが示された。すなわち Dick, Eaves, Nakahata らは、これらのサイトカインを含む無血清培養系で、4日から8日の培養期間で2~4倍の SRC 増幅に成功している⁵⁻⁷⁾。ただし実際の臨床応用に際しては、凍結細胞を解凍したり、CD34⁺ 細胞を純化するなどの細胞プロセッシングの過程で50%以上の細胞の損失があるので、それを補うだけの増幅効率が必要とされる。どの程度の増幅効率が必要になるのか、今後の検討が必要である。また、SRC アッセイでは3~6ヵ月程度の期間しか造血維持能を見ることができないのが欠点であり、長期にわたる造血維持能を見るためにヒツジ胎仔を宿主とした異種移植が利用される。最近 McNiece らは、SCF, TPO, G-CSF を用いた無血清培養系で、7日、14日間培養した臍帯血 CD34⁺ 細胞をヒツジ胎仔に移植して長期観察した結果を報告している⁸⁾。この培養系では体外増幅された細胞は生着を促進する効果があるが、長期造血を維持する能力は失われることが示された。以上のように、現状のサイトカインの組み合わせのみでは体外増幅を行ううえで限界があることが示されている。

一方、骨髄ストローマ細胞⁹⁾¹⁰⁾、血管内皮細胞¹¹⁾¹²⁾、間葉系幹細胞¹³⁾などの支持細胞との共培養により、サイトカインのみで培養するより効率の良い増幅が得られることが報告されている。これら支持細胞が造血幹細胞を維持・増幅する分子メカニズムは今後の重要なテーマであ

り、以下に紹介するように現在精力的に研究が展開されている。

4. 自己複製因子は存在するか？ 自己複製に関与する遺伝子は何か？

既存の造血系サイトカインの組み合わせでは増幅効率に限界があるため、新たな造血幹細胞の自己複製因子が探索されている。この中で最近注目されているのが、骨形成因子 (BMP), hedgehog, Notch リガンド, Wnt などの初期発生過程で中胚葉誘導や器官形成に重要な働きを有する因子である¹⁹⁾。これらの因子は成体においても支持細胞により産生され、造血幹細胞の維持・増幅を担っているものと考えられる。

BMP-4 はカエル *Xenopus* では腹側中胚葉に発現し、造血細胞へのコミットメントを誘導する。ヒト CD34⁺CD38⁻細胞は、BMP タイプ I 受容体 activin-like kinase-3 (ALK-3) と ALK-6 およびその下流のシグナルトランスデューサーである SMAD-1, 4, 5 を発現している。Bhatia らは、臍帯血 Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞に対する BMP の作用を SRC アッセイにより検討し、ヒト BMP-4 が幹細胞の生存に対して効果があることを示した¹⁹⁾。

hedgehog はショウジョウバエの変異体の名前で、腹側の体節後部の表皮に剛毛を持ち、ハリネズミ (hedgehog) のようになる変異の原因遺伝子である。形態形成、左右軸の決定などに関与している。sonic hedgehog (Shh) は BMP-4 シグナルの上流に位置することが知られ、造血幹細胞にも増幅作用があることが示された¹⁹⁾。Shh は造血幹細胞自身でも産生されるが、骨髄ストローマ細胞からも産生され、オートクリンおよびパラクリンにより造血幹細胞に作用することが予想される。

Notch もショウジョウバエの変異体より見いだされた遺伝子で、未分化な腹側外胚葉 (神経外胚葉) の発生運命を制御する細胞間相互作用にかかわる受容体である。骨髄ストローマ細胞は Notch のリガンドである Jagged-1,

Delta-1, Delta-4 を発現し、造血幹細胞は Notch-1, 2 を発現している。しかしながら従来の可溶性 Jagged-1, Delta-1, Delta-4 を用いた研究では、造血幹細胞増幅活性は限られたものであった¹⁷⁾¹⁸⁾。Ohishi らは、Delta-1 をフィブロネクチンとともに固相化したプレート上で臍帯血 Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞を培養することにより、著明な幹細胞増幅を報告した¹⁹⁾。

Wnt 遺伝子ファミリーはもともとがん遺伝子として同定されたが、その後さまざまな器官の形態形成にも関与していることが明らかにされてきた (<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>)。Nusse と Weissman のグループは、Wnt3a およびそのシグナル伝達に関与する分子群がマウス造血幹細胞の自己複製に重要であることを示した²⁰⁾²¹⁾。このように、Wnt3a や上述の固相化 Delta-1 はすぐにも臨床応用が期待される自己複製因子であり、今後の展開が期待される。

一方、形態形成に関与する転写因子である HOX 遺伝子群の中で、HOXB4 を過剰発現させることにより造血幹細胞が増幅可能であることが報告されている²²⁾²³⁾。上述した Wnt のシグナルの下流に HOXB4 が存在することが示唆されており、自己複製因子のシグナルが HOXB4 に集約される可能性も考えられる。また自己複製因子を同定するためには、上記のように SRC アッセイなどの *in vivo* アッセイが行われ時間と労力を要しているが、今後は例えば HOXB4 などの発現誘導を分子指標として、より簡便な自己複製因子スクリーニング法の開発も期待される。

5. 幹細胞あるいは増幅支持細胞に特有の遺伝子発現プロファイルはどのようなものか？

幹細胞特有の性質 (幹細胞性 stemness) を明らかにするために、遺伝子発現プロファイルリングからのアプローチが報告されている。Ramalho-Santos らは、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞)、神経幹細胞、造血幹細胞の遺伝子発現

プロファイルと比較して、共通なものを「幹細胞性」を規定する遺伝子群として抽出した²⁴⁾。Ivanova らは、ヒトおよびマウスで造血幹細胞と前駆細胞の遺伝子発現プロファイルと比較して、「幹細胞分子記号 A stem cell signature」を報告している²⁵⁾。ポリコム遺伝子群は、染色体の高次構造を制御して遺伝子発現を調節する機能を有する。この中の *BMI-1* 遺伝子をノックアウトしたマウスの解析から、この遺伝子が造血幹細胞の自己複製に必須であることが明らかとなった²⁶⁾。このマウスの造血幹細胞では *p16ink4a* および *p18Arf* 遺伝子の発現が亢進しており、寿命の短縮が起こっていることが推察された。このように、幹細胞を維持する遺伝子群の解明も進んでいる。

幹細胞性を維持するために必要な造血支持細胞に特異的に発現している遺伝子の同定も進展している。Moore らは、マウス胎仔肝ストローマ細胞の中で造血支持能のある AFT024 と、支持能を持たない 2018 とのサブトラクションにより得られたクローンの中から、*dlk* (delta-like) を造血支持分子として同定している²⁷⁾。また Ueno らはマウス骨髄ストローマ細胞 OP9 より、シグナルシーケンストラップ法により造血幹細胞を支持する *mKirre* を同定した²⁸⁾。いずれの分子も、造血幹細胞をストローマ細胞の下に潜り込ませて敷石 (cobble stone) 様増殖を促進する機能が共通している。cobble stone area (CSA) 形成能は以前より造血幹細胞活性の測定に利用されてきたが、造血幹細胞が骨髄ストローマ細胞と直接細胞間相互作用しながら幹細胞性あるいは未分化性を維持していることを強く推察させる。

遺伝子発現プロファイリングを利用した幹細胞研究は、今後の進展が最も期待される領域である。

6. 体外増幅操作により幹細胞の生着、ホーミング能力は修飾されるか？

造血幹細胞活性は、自己複製能と多分化能に

よって得られる長期造血再構築能として測定されている。移植によりそれを測定する際には、静脈より移入した細胞が骨髄の造血微少環境 (ニッチ) にホーミングする効率が、見かけの造血幹細胞活性に影響することとなる。ホーミング受容体として CXCR4, あるいは接着分子として VLA4, 5 などが、この過程に関与していることが示されている²⁹⁾³⁰⁾。また、造血幹細胞の細胞周期動態もホーミングに影響することが報告されている³¹⁾³²⁾。したがって、体外増幅を受けた造血幹細胞を SRC アッセイする場合、これらのホーミング能の影響が無視しえないものとなる。Yahata らは NOD/SCID マウスの骨髄内に直接ヒト細胞を移植して従来の方法と比較したところ約 15 倍の生着率の向上を認め、ホーミング効率をほぼ 100% とすることができると考えられた。また、骨髄内での生着にも CXCR4 が重要な機能を果たしていることを見いだした³³⁾。したがって、骨髄内移植法を利用することにより真の幹細胞活性の増幅効率を測定することが可能となる。また、ホーミング効率を上げることも今後の重要な課題である。

7. 増幅幹細胞により再構築された造血・免疫系の機能をどのように検討するか？

臍帯血中の免疫担当細胞は未熟であり、一般的に臍帯血の免疫応答は成人血に比較して低いとされている。このような低免疫応答性は、臍帯血移植において移植片対宿主病 (GVHD) の程度が軽く、HLA 一致度が 4/6 まで移植可能という利点をもたらす一方で、移植後の重篤なウイルス感染、移植片対白血病 (GVL) 効果の低下が懸念されている。また一般に造血幹細胞移植後の免疫系再構築は緩やかであるが、特に純化した CD34⁺ 細胞を用いた移植においては、T細胞系の回復が著しく遅れることが明らかとなっている。したがって体外増幅幹細胞の移植を想定した場合、増幅幹細胞から免疫担当細胞への分化能の検討は重要な課題である。従来このような検討は、増幅幹細胞を移植した異

種動物中でヒト細胞の分化マーカーを解析しただけであり、機能的な検討はほとんど行われていなかった。

Liらは、Kawadaらの考案した体外増幅培養システム³⁴⁾により増幅された臍帯血 CD34⁺細胞のB細胞への分化能を検討するために、増幅後細胞を移植した NOD/SCID マウスを用いて検討を行った³⁴⁾。ヒト造血細胞の生着を確認後、移植後6週目より2週間ごとに DNP-KLH を腹腔内投与した。B細胞は骨髄、脾臓、末梢血で臓器特異的な分化過程を経ることが示され、ヒト型抗 DNP 抗体の産生も検出された。このことより、増幅された臍帯血 CD34⁺細胞は機能的B細胞までマウス体内で分化することが示された。

一方ヒト造血幹細胞からT細胞への分化は、従来ヒト胎児胸腺と造血幹細胞を免疫不全マウスに移植した SCID-Hu マウスあるいはマウス胎仔胸腺を用いた胎仔胸腺器官培養 (FTOC) により解析されてきた。しかしながら前者はヒト胎児組織を利用することが困難であること、後者は成熟T細胞まで分化させることが困難であるなどの問題点があった。Saitoらは、マウス胸腺上皮とヒト臍帯血 CD34⁺細胞の再凝集胸腺器官培養 (RTOC) をさらに NOD/SCID マウスの腎皮膜下に移植することにより、CD34⁺細胞を CD4⁺ および CD8⁺ 単独陽性の成熟T細胞まで分化させることが可能であることを示した³⁵⁾。Yahataらは、NOG マウスを利用することにより、臍帯血 CD34⁺細胞がマウス胸腺内で CD4⁺細胞あるいは CD8⁺細胞に分化し、さらにアロ特異的T細胞まで成熟可能であることを示した³⁶⁾。これらの系を利用することによって、体外増幅された臍帯血 CD34⁺細胞が機能的T細胞まで分化可能であることが示されている。

8. 臨床応用のための規制はどのようにすべきか?

増幅幹細胞のように体外で操作された細胞を

安全に臨床応用するために、細胞取り扱いのためのガイドラインが各国で作成されている。米国では、食品医薬品局 (FDA) より "Current Good Tissue Practice for Manufacturers of Human Cellular and Tissue-Based Products (1/8/2001)" (<http://www.fda.gov/cber/rules.htm>) が提案されている。我が国でも、厚生労働省より関連指針として 2001 年に「細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する基準」が告示され、2003 年 7 月 30 日より「薬事法及び採血及び供血あつせん業取締法の一部を改正する法律」(<http://www.mhlw.go.jp/qa/iyaku/yakujihou/index.html>) のうち、生物由来製品の安全確保対策の充実に係る部分が施行されている。現在、ヒト幹細胞を用いた臨床研究の在り方に関する専門委員会が設置され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針(案)」(<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2002/11/s1107-5b.html>) が作成されている。

おわりに

造血幹細胞の体外増幅研究は、近年のポストゲノム科学や初期発生学の進展による新たな局面を開きつつある。またヒト幹細胞の機能解析に関しても、NOG マウスや骨髄内移植法などが開発された。トランスレーショナルリサーチに必要な基盤整備も整いつつあり、今後の臨床応用に向けての展開が期待される。

文 献

- 1) Verfaillie CM: Meeting report on an NHLBI workshop on *ex vivo* expansion of stem cells, July 29, 1999, Washington, D.C. *Exp Hematol* 28: 361-364, 2000.
- 2) 安藤 潔: ヒト造血幹細胞の評価モデルマウス (NOD/SCID マウス). *分子細胞治療* 2: 62-68, 2001.
- 3) Ito M. et al: NOD/SCID/ γ (c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-3182, 2002.

- 4) 安藤 潔: ヒト造血幹細胞の *ex vivo* 増幅. 造血幹細胞のいまと医療への展開 (中内啓光 編), p125-142. 羊土社, 東京, 2001.
- 5) Bhatia M, et al: Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term *ex vivo* culture. *J Exp Med* 186: 619-624, 1997.
- 6) Conneally E, et al: Expansion *in vitro* of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9836-9841, 1997.
- 7) Ueda T, et al: Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 105: 1013-1021, 2000.
- 8) McNiece IK, et al: *Ex vivo* expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. *Exp Hematol* 30: 612-616, 2002.
- 9) Kawada H, et al: Rapid *ex vivo* expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. *Exp Hematol* 27: 904-915, 1999.
- 10) Lewis ID, et al: Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after *ex vivo* culture in a noncontact system. *Blood* 97: 3441-3449, 2001.
- 11) Brandt J E, et al: Bone marrow repopulation by human marrow stem cells after long-term expansion culture on a porcine endothelial cell line. *Exp Hematol* 26: 950-961, 1998.
- 12) Brandt J E, et al: *Ex vivo* expansion of autologous bone marrow CD34⁺ cells with porcine microvascular endothelial cells results in a graft capable of rescuing lethally irradiated baboons. *Blood* 94: 106-113, 1999.
- 13) McNiece IK, et al: *Ex vivo* expansion of CB cells without CD34 selection using coculture on MSC. *Blood* 98: 851a, 2001.
- 14) Zon L I: Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 86: 2876-2891, 1995.
- 15) Bhatia M, et al: Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 189: 1139-1147, 1999.
- 16) Bhardwaj G, et al: Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2: 172-179, 2001.
- 17) Karanu FN, et al: The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192: 1365-1372, 2000.
- 18) Karanu FN, et al: Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* 97: 1960-1967, 2001.
- 19) Ohishi K, et al: Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+) CD38(-) cord blood cells. *J Clin Invest* 110: 1165-1174, 2002.
- 20) Reya T, et al: A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 409-414, 2003.
- 21) Willert K, et al: Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423: 448-452, 2003.
- 22) Antonchuk J, et al: HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell* 109: 39-45, 2002.
- 23) Buske C, et al: Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* 100: 862-868, 2002.
- 24) Ramalho-Santos M, et al: "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298: 597-600, 2002.
- 25) Ivanova NB, et al: A stem cell molecular signature. *Science* 298: 601-604, 2002.
- 26) Park I K, et al: Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 302-305, 2003.
- 27) Moore K A, et al: Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4011-4016, 1997.

-
- 28) Ueno H, et al: A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 4: 457-463, 2003.
- 29) Peled A, et al: Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283: 845-848, 1999.
- 30) Peled A, et al: The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in trans-endothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95: 3289-3296, 2000.
- 31) Jetmore A, et al: Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. *Blood* 99: 1585-1593, 2002.
- 32) Cashman J, et al: Changes in the proliferative activity of human hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice and enhancement of their transplantability after *in vivo* treatment with cell cycle inhibitors. *J Exp Med* 196: 1141-1149, 2002.
- 33) Yahata T, et al: A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 101: 2905-2913, 2003.
- 34) Li C, et al: Production of antigen specific human immunoglobulin in NOD/SCID mice reconstituted by cord blood CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 30: 1036-1043, 2002.
- 35) Saito Y, et al: The *in vivo* development of human T cells from CD34⁺ cells in the murine thymic environment. *Int J Immunol* 14: 1113-1124, 2002.
- 36) Yahata T, et al: Functional human T lymphocytes development from cord blood CD34⁺ cells in NOD/Shi-scid, IL-2R γ null mice. *J Immunol* 169: 204-209, 2002.
-

Ex vivo Expansion of Hematopoietic Stem Cells – Current Status and Future Direction

Kiyoshi Ando

Division of Hematology and Oncology, Tokai University School of Medicine

骨髄多能性幹細胞と再生医療

安藤 潔¹⁾

要旨: 成体骨髄に多能性幹細胞が存在することが報告され、Multipotent adult progenitor cell (MAPC) と名付けられている。マウスの MAPC は胚盤胞に注入すると三胚葉にわたるほとんどすべての組織細胞に分化し、また経静脈投与すると造血系、肝、肺、腸管など生着した臓器環境に応じて分化した。さらに特筆すべきは ES 細胞に見られるような腫瘍化が MAPC では認められないこと、また ES 細胞は経静脈的投与しても生着しないが MAPC では生着し骨髄で自己複製しつつ生着環境に応じて分化することである。これらは倫理的問題を抱える ES 細胞に代わって再生医療への応用に期待を抱かせる MAPC の特質である。

索引用語: 造血幹細胞、可塑性、成体骨髄多能性幹細胞 (MAPC)、間葉系幹細胞 (MSC)、中胚葉系幹細胞 (MPC)

1 骨髄細胞による臓器再生

近年、骨髄由来の細胞が血液以外のさまざまな組織の細胞に分化することがマウスのみならずヒトでも報告され、再生医療のための細胞ソースとして注目を集めている (Figure 1)。すなわち、骨¹⁾、骨格筋²⁾³⁾、心筋^{4)~6)}、血管内皮⁷⁾⁸⁾、血管平滑筋⁹⁾、神経¹⁰⁾¹¹⁾、肝臓^{12)~14)}、消化管粘膜¹⁵⁾¹⁶⁾などの組織再生が報告されている。実際 2003 年にはわが国で骨髄細胞による閉塞性動脈疾患に対する血管再生療法が高度先進医療として認可されるに至っている¹⁷⁾。

これらの再生現象は骨髄内のどの細胞によりもたらされているのであろうか？ これらの細胞を同定してその能力を利用すれば、倫理性や同種移植の壁が問題となる胎児幹細胞 (ES 細胞) を利用することなく再生医療が可能となることが期待される。したがって骨髄に存在する各種組織幹細胞あるいは多能性の幹細胞を同定することはきわめて重要である。現状では骨髄細胞による多臓器再生現象の解釈として、(1) 骨髄に多数存在する造

血幹細胞が可塑性を示して他の組織細胞に分化転換する、(2) 各種組織特異的幹細胞が骨髄に存在する、(3) 多能性幹細胞が骨髄に存在する、という三つの可能性が考えられる。

(1) の可能性を示唆するデータが 2001 年にマウスで示された¹⁸⁾。一方で 1 個の造血幹細胞 (c-kit⁺ Thy 1.1^{low} Sca-1⁺ Lin⁻細胞) を移植して造血再構築したマウスで各組織のドナー由来細胞を調べた結果によれば、脳では 1/13200000、肝臓では 7/470000 の頻度でドナー由来の各組織細胞が認められたが、腎、腸、骨格筋、心筋、肺では全く認められなかった¹⁹⁾。さらに末梢循環している多能性幹細胞の意義を検討するために、血管吻合により互いに循環交流可能なパラビオーシスのマウスを作成して各組織のドナー由来細胞を調べた。結果はいずれの組織でもドナー由来の各組織細胞は認められなかった。この実験により少なくとも恒常的な状態の個体においては造血幹細胞の可塑性、末梢循環血中の多能性幹細胞の組織維持への関与はほとんどないことが示された。

1) 東海大学医学部血液・腫瘍内科

Multipotent adult progenitor cells and their application to regenerative medicine
Kiyoshi ANDO¹⁾

1) Division of Hematology and Oncology, Tokai University School of Medicine

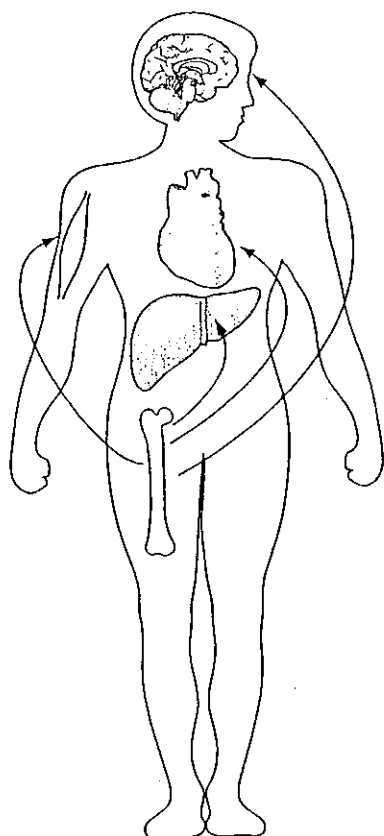


Figure 1. 骨髄細胞を用いた臓器再生の可能性

(2)の可能性を示すものとして血管内皮細胞は骨髄に血管内皮前駆細胞が存在することが報告されている²⁰。また、骨、骨格筋は骨髄に存在する間葉系幹細胞がこれらの細胞に分化することが報告されているのでこの細胞に由来する可能性がある²⁰。しかしながらその他の組織細胞については由来が不明である。本総説では(3)の可能性を示唆する骨髄多能性幹細胞について以下に概説する。

II ヒト骨髄多能性幹細胞

骨、軟骨、脂肪、骨格筋、靭帯、腱など発生学的に肢芽中胚葉(limb bud mesoderm)あるいは沿軸中胚葉(paraxial mesoderm)由来の細胞に分化する幹細胞として間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)が骨髄に存在することが報告されている^{20,21)}。2001年にVerfaillieらはこれらの分化能に加えて臓側中胚葉(visceral mesoderm)由来の血管内皮細胞にも分化する能力のある

細胞として中胚葉系幹前駆細胞(mesodermal progenitor cell: MPC)をヒト骨髄より分離したことを報告した²²⁾。さらにその後、同グループはこの細胞が外胚葉由来の神経細胞²³⁾、内胚葉由来の肝細胞²⁴⁾にも分化することを報告し、Multipotent adult progenitor cell (MAPC)と命名している。

MPCはヒト骨髄のCD45⁻Glycophorin A⁻細胞を2%FCS, EGF (10ng/ml), PDGF-BB (10ng/ml)存在下に $5\sim 10 \times 10^3/\text{cm}^2$ の細胞密度で30継代以上培養することにより得られた²²⁾。MPCの骨髄単核細胞における頻度は $1/10^6$ であった。これらの細胞は骨、軟骨、脂肪、骨格筋細胞だけでなく血管内皮細胞にも分化可能であった。MPCは10%FCS存在下や高細胞密度で培養すると血管内皮細胞への分化能を失った。

このMPCの脳梗塞ラットに移植することによりアストログリア、オリゴデンドログリア、ニューロンのマーカーを持つそれぞれの神経細胞に分化することが観察された²⁵⁾。したがってMPCは外胚葉由来の神経細胞に分化可能であり、中胚葉を超える分化能を持つためMAPCと命名された。

MAPCよりEPCが*in vitro*で分化する過程が詳細に解析されている²⁶⁾。MAPCをconfluent ($2 \times 10^4/\text{cm}^2$ の細胞密度)の状態ではVEGF (10ng/ml)存在化に無血清培地で培養すると、幹細胞マーカーであるAC133は培養3日以後消失し、血管内皮マーカーであるVE-cadherin, Flk-1, Flt-1は3日以後発現が増強してくる。CD34は9日以後に発現し、同時にvWFの発現とacetyl-LDLの取り込み能を獲得する。これらの誘導されたEPCはさらに20回の細胞分裂を繰り返すことができる。NOD/SCIDマウスを用いた*in vivo*の実験においても腫瘍増殖および創傷治癒過程における新生血管の30~45%にヒトMAPC由来のEPC由来の血管内皮細胞を認めた。

MAPCより機能を備えた肝細胞が*in vitro*で分化することも報告されている²⁴⁾。MAPCをconfluent ($3 \times 10^4/\text{cm}^2$ の細胞密度)の状態では1%マトリゲル, FGF-4 (10ng/ml), HGF (20ng/ml)存在化に無血清培地で培養すると、種々の肝細胞マーカーが発現し、尿素あるいはアルブミン産生、

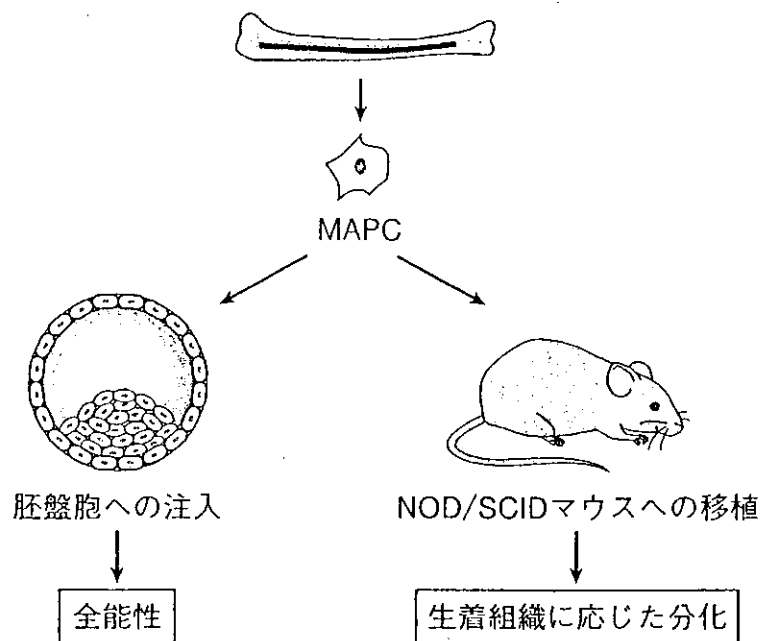


Figure 2. マウス骨髄多能性幹細胞 (MAPC) は *in vivo* で全能性を示した

フェノバルビタールによるチトクローム P450 活性化, acetyl-LDL の取り込み, グリコーゲン顆粒の産生などの機能を有する肝細胞が分化した。

以上よりヒト MAPC は沿軸中胚葉由来細胞の幹細胞としての MSC の多分化能に加えて, 臓側中胚葉由来の血管内皮細胞, 外胚葉由来の神経細胞, 内胚葉由来の肝細胞に分化することがクローンレベルで詳細に解析された。また最近われわれは NOD/SCID マウスにヒト MAPC を移植し *in vivo* での骨格筋分化を検討した²⁶⁾。しかしながらヒト細胞を用いる限り *in vivo* の実験には制約があり, これ以上の検討は困難であった。

III マウス, ラット骨髄多能性幹細胞の同定

ヒト MAPC (hMAPC) の培養条件を参考にして最近マウス MAPC (mMAPC) とラット MAPC (rMAPC) が分離された²⁷⁾。mMAPC は hMAPC 培養条件に加えて LIF (leukemia inhibitory factor) が必要であった。すなわち, 2%FCS, EGF (10ng/ml), PDGF-BB (10ng/ml), LIF (10ng/ml) 存在下にマウス骨髄単核球細胞をフィブロネクチンコートした培養プレート上で培養した。3~4 週後に CD45⁻Ter 119⁻細胞を分離してクローニングを行い, 以後細胞密度を $0.5\sim 1.5\times 10^3/\text{cm}^2$

に維持しつつ長期培養し mMAPC を得た。この細胞は Hayflic life span を超えて 120 継代以上培養可能であった。はじめに *in vitro* での分化誘導培養により多分化能を検討した。VEGF-B 存在下に培養すると血管内皮細胞, β FGF 存在下に培養するとアストロサイト, オリゴデンドロサイト, ニューロン, FGF-4, HGF 存在下に培養すると肝細胞にそれぞれ分化した。

次にヒトでは十分に調べることの出来ない *in vivo* での多分化能について検討した。驚くべきことに 1 個の MAPC を注入した胚盤胞から由来するマウスの 7/15 匹で MAPC 由来の細胞が個体形成に参加していた (Figure 2)。さらにその中の 2 匹では 40% 以上のキメラズムを示しており, 生殖細胞を除くすべての組織に分化していた。生殖細胞への分化はこのキメラマウスの子孫を得る実験を行っていないので不明である。

さらに細胞療法への応用を考えて, 10^6 個の MAPC を照射あるいは非照射 NOD/SCID マウスに経静脈的投与した。その結果, 数%のキメラズムであるが造血系, 肝, 肺, 腸管など MAPC が生着した臓器環境に応じて分化することが示された (Figure 2)。骨格筋, 心筋, 神経など細胞回転のな

い組織ではドナー由来の細胞は認められなかった。また、皮膚、腎臓でもドナー由来の細胞は認められなかった。MAPCの自己複製能を見るためにこれらのマウスの骨髄細胞を用いて2次移植を行ったところ1次移植と同様各種組織に分化することが示された。このようにMAPCはES細胞とほぼ同等の分化能を示していた。特筆すべきはES細胞はプラストシストに注入すると奇形種などに腫瘍化することがあるが、今回の実験ではMAPCの腫瘍化は認められなかった。またES細胞は経静脈的投与しても生着することはなく、組織環境に応じて分化することもない。

以上のようにほぼ全能性の細胞が成体の骨髄より分離された。このことにより骨髄移植によるドナー由来の各種組織細胞の由来が説明できるのだろうか？ 新たに多くの疑問も生じる。MAPCの分離が低細胞密度での長期間培養による選択に依存しているため、培養操作による細胞形質の変化がMAPCを生み出す可能性がある。たとえば本来MSCであったものが長期培養の過程で染色体のリモデリングによる遺伝子発現調節領域の修飾の変化を来し、多分化能を獲得した可能性も考えられる。表面マーカーやsp形質などを利用してMAPC分画を濃縮するなどの工夫によりMAPCをプロスペクティブに同定する努力が必要である。

IV 骨髄多能性幹細胞の再生医療への応用

ES細胞と異なり倫理的問題のないこと、造腫瘍性の示されていないこと、生着環境に応じて分化することなどMAPCの再生医療への応用は期待が大きい。しかし一方でその前に解決しなければならない問題も多い。まずmMAPCやrMAPCで示されたような多分化能がhMAPCでも示されるのであろうか？ 特にヒト細胞では*in vivo*の分化能を確認することが困難である。また、加齢によりMAPCの存在頻度がどれくらい低下するのであろうか？ 同種移植は可能なのだろうか？ 現状ではMAPCを得るためには長期間の培養が必要であるが、短期間に効率よくMAPCを得る技術が臨床応用のためには必須である。また、骨髄に存在するそれらの幹細胞が成体の維持

に役割を果たしているのであれば、当然末梢循環に動員されて組織にたどりつくはずであるから、造血幹細胞だけでなくさまざまな幹細胞が動員される可能性とそのメカニズムについて検討することがより侵襲の少ない再生医療法開発に結びつくであろう。

文 献

- 1) Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al: Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5: 309-313
- 2) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530
- 3) Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-394
- 4) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705
- 5) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al: Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-98
- 6) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705
- 7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967
- 8) Asahara T, Chen D, Takahashi T, et al: The Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2 modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998; 83: 233-240
- 9) Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, et al: Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med* 2001; 7: 738-741
- 10) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al: From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-1779

- 11) Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al : Turning blood into brain : cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000 ; 290 : 1779-1782
- 12) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999 ; 284 : 1168-1170
- 13) Lagasse F, Connors H, Al-Dhalimy M, et al : Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nature Medicine* 2000 ; 6 : 1229-1234
- 14) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al : Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2001 ; 32 : 11-16
- 15) Korblyng M, Katz RL, Khanna A, et al : Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 738-746
- 16) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, et al : Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002 ; 8 : 1011-1017
- 17) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002 ; 360 : 427-435
- 18) Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001 ; 105 : 369-377
- 19) Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al : Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002 ; 297 : 2256-2259
- 20) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 ; 284 : 143-147
- 21) Fridenshtein A : Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol* 1982 ; 44 : 3-11
- 22) Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al : Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001 ; 98 : 2615-2625
- 23) Zhao LR, Duan WM, Reyes M, et al : Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002 ; 174 : 11-20
- 24) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 1291-1302
- 25) Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al : Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 337-346
- 26) Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, et al : In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol* 2003 (in press)
- 27) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002 ; 418 : 41-49

〔 論文受領, 平成 15 年 9 月 4 日 〕
〔 受理, 平成 15 年 9 月 12 日 〕

成体骨髄多能性幹細胞

Multipotent adult progenitor cell (MAPC)

安藤 潔

東海大学医学部内科学系血液・腫瘍内科学

Key Words

multipotent adult progenitor cells (MAPC), mesenchymal stem cells (MSC), mesodermal progenitor cells (MPC)

■ はじめに

1998年にヒト胎児幹細胞 (ES細胞) が樹立されて以来, その分化の万能性 (どのような組織にもなることができる能力) から細胞治療による様々な臓器の再生医療が期待されている。しかしながら, 倫理的問題, 腫瘍化, 免疫学的排除など医療応用への障壁も多いのが現状である。

一方1999年頃から, 骨髄由来の細胞が血液以外の様々な組織の細胞に分化することがマウスのみならずヒトでも報告されている。臨床において骨髄細胞は造血・免疫系の再構築を目的とするだけでなく, 虚血性疾患を対象に血管新生療法としても利用されるようになってきた。従って骨髄細胞の能力を利用すれば, ES細胞を利用することなく自己の細胞で再生医療が可能となることが期待される。現状では, ① 各種組織特異的幹細胞が骨髄に存在する, ② 骨髄に多数存在する造血幹細胞が可塑性を示して他の組織細胞に分化転換する, ③ 多能性幹細胞が骨髄に存在する, という3つの可能性が考えられている。本稿では③の可能性の根拠となる成体多能性幹細胞 (MAPC) に関して解説する。

■ 1. 成体多能性幹細胞 (MAPC)

成体に存在する幹細胞は組織幹細胞である。組織幹細胞は発生過程の胚葉形成期以降に出現するものと考えられており, その分化能は胚葉内に限定されている。例えば間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は骨, 軟骨, 脂肪, 骨格筋, 靭帯,

腱など発生学的に沿軸中胚葉 (paraxial mesoderm) 由来の細胞に分化する幹細胞として骨髄に存在することが知られている。ところが, 2001年にミネソタ大学のグループがこれらの分化能に加えて臓側中胚葉 (visceral mesoderm) 由来の血管内皮細胞にも分化する能力のある細胞として中胚葉系前駆細胞 (mesodermal progenitor cell: MPC) をヒト骨髄より分離した¹⁾。さらにその後, 同グループはこの細胞が外胚葉由来の神経細胞, 内胚葉由来の肝細胞にも分化することを報告し, 胚葉をこえて分化するこの細胞を成体多能性幹細胞: Multipotent adult progenitor cell (MAPC) と命名した。

■ 2. マウス骨髄多能性幹細胞の同定

通常の体細胞を培養すると分裂回数に限りがあり, これをHayflick life spanという。MAPCはこの細胞寿命を越えて培養を続けることができること, 胚葉を越えた多分化能を示すこと, という2つの性質を兼ね備えた細胞として分離される。2002年にはマウスMAPCを用いてその万能性と治療応用の可能性が報告された (図1)²⁾。まず1個のMAPCを注入した胚盤胞から由来するマウスの7/15匹がMAPC由来の細胞よりなるキメラマウスであった。さらにその中の2匹では40%以上のキメリズムを示しており, 生殖細胞を除くすべての組織に分化していた。このことはMAPCがES細胞と同様成体のあらゆる組織に分化可能であることを示唆する。ただし生殖細胞への分化は, このキメラマウスの子孫を得る実験を行っていないので不明である。

さらに細胞療法への応用を考えて, 10⁶個のMAPCを照射あるいは非照射NOD/SCIDマウスに経

Kiyoshi Ando
Tokai University School of Medicine

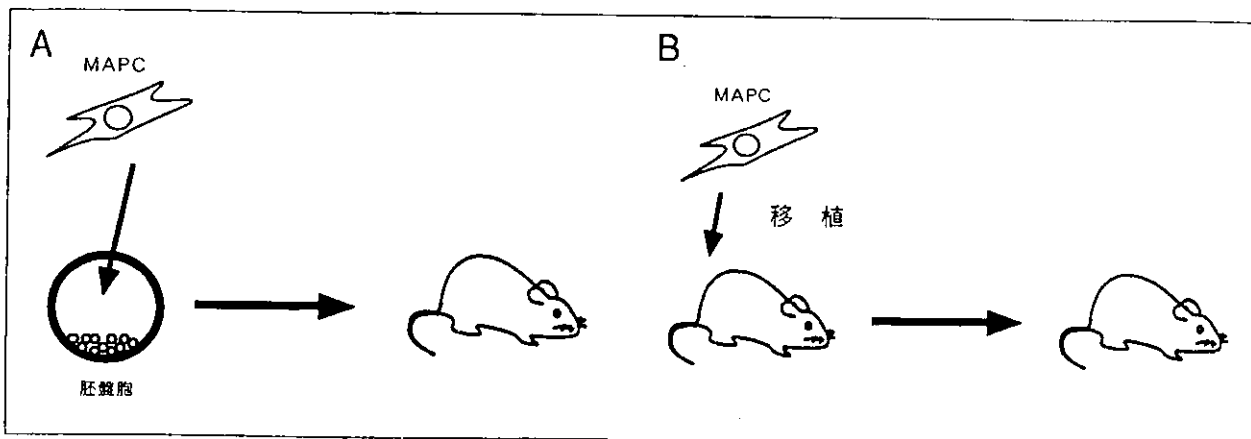


図1 マウス骨髄多能性幹細胞(MAPC)は*in vivo*で全能性を示した。

- A 1個のMAPCを注入した胚盤胞から由来するマウスではMAPC由来の細胞が生殖細胞を除くすべての組織に分化していた。
 B 10^6 個のMAPCをNOD/SCIDマウスに経静脈的投与したその結果、造血系、肝、肺、腸管などMAPCが生着した臓器環境に応じて分化することが示された。

静脈的投与した。その結果、数%のキメリズムであるが造血系、肝、肺、腸管などMAPCが生着した臓器環境に応じて分化することが示された。特筆すべきはES細胞は移植すると奇形種などに腫瘍化することがあるが、今回の実験ではMAPCの腫瘍化は認められていない。またES細胞は個体に経静脈的投与しても生着することはなく、組織環境に応じて分化することもないがMAPCでは上記のように分化したことである。

■ 3. ヒト骨髄多能性幹細胞

MAPC様の細胞はヒト骨髄単核細胞中に $1/10^6$ 程度の頻度で存在する。これらの細胞は血管内皮細胞への分化能を持ち、NOD/SCIDマウスを用いた*in vivo*の実験においても腫瘍増殖および創傷治癒過程における新生血管の30-45%にヒトMAPC由来のEPC由来の血管内皮細胞を認めた³⁾。

またヒトMAPC様細胞を脳梗塞ラットに移植することによりアストログリア、オリゴデンドログリア、ニューロンのマーカーを持つそれぞれの神経細胞に分化することが観察された⁴⁾。従ってこの細胞は外胚葉由来の神経細胞に分化可能であり、中胚葉を超える分化能を持つことが示された。

さらに内胚葉由来の組織である肝細胞へも*in vitro*で分化誘導が可能であった⁵⁾。種々の肝細胞マ

ーカーを発現するだけでなく、尿素あるいはアルブミン産生、フェノバルビタールによるチトクロームP450活性化、acetyl-LDLの取り込み、グリコーゲン顆粒の産生などの機能を有する肝細胞を誘導することが可能であった。

しかしながらヒト細胞を用いる限りマウスMAPCのような*in vivo*の実験ができないという制約があり、厳密にはマウスMAPCと同等の能力を持つか否かは不明である。今後異種移植系を用いて解明されることであろう。

文献

- 1) Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM.: Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98: 2615-2625, 2001.
- 2) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49, 2002.
- 3) Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109: 337-346, 2002
- 4) Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174: 11-20, 2002.
- 5) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109: 1291-302, 2002.