

図6 造血幹細胞移植後の生着過程の模式図

場所の骨髄内に再び入り、分化・増殖することによって全身の造血再構築を行っているということが強く示唆された。

クローンの中にはそれぞれの部位にのみ特異的に存在しているクローンもあり、クローンそれぞれのマウス体内でのhoming能や増殖能の違いを表しているものと思われ、興味深い。以上の結果から、iBM移植法は移植した骨髄ではヒト造血幹細胞の生着能を、移植していない骨髄ではhoming能のそれぞれに焦点をあてて解析できる優れた移植法であることが示された。

IBM移植と生着関連分子

ここでもう一度、iv移植された造血幹細胞が生着する過程を考えてみたい。その過程は大きく3つの段階に分けられる。すなわち、①移植された造血幹細胞が骨髄静脈洞の血管壁にたどり着き、内皮細胞および細胞外マトリックスで構成される基底膜を通り抜けて骨髄内(血管外スペース)に進入する“homing”の過程、②骨髄内に入った造血幹細胞が骨髄微小環境中の造血を支持する場、いわゆるnicheにたどり着く“lodgement”の過程、そして、③nicheにおいて造血幹細胞が生存・増殖・分化を行い造血の再構築と維持を行うことによって、生着“engraftment”と呼ばれる状態になる(図6)。

ヒト造血幹細胞の細胞表面に発現する細胞接

着分子であるVLA-4およびVLA-5,そして骨髄ストローマ細胞などが産生する遊走因子SDF-1の受容体であるCXCR4分子がこの3つの過程において重要な役割を果たす分子として報告されている⁹⁾。PeledらはヒトCD34陽性細胞をVLA-4, VLA-5およびCXCR4に対する阻害抗体で処理後にNOD/SCIDマウスにiv移植し、数週間後に解析を行ったところいずれの阻害抗体で処理されたヒトCD34陽性細胞の“engraftment”は完全に阻害されることを示した(図7-A)⁷⁾⁹⁾。ところが、同じ研究グループがヒトCD34陽性細胞をVLA-4とVLA-5に対する阻害抗体で処理後にNOD/SCIDマウスに移植し、そのマウス骨髄内に“homing”した割合を調べてみると、優位に阻害されているものの完全ではなく、30%から50%程度の阻害効果であったことを報告している(図7-B)¹⁰⁾。

これらの結果はおそらくVLA-4とVLA-5のそれぞれはヒト造血幹細胞の“homing”から“engraftment”にいたる過程のいずれか1つではなく、それぞれに部分的に関与していることを示しているのではないだろうか。試験管内での解析ではそれを裏づけるような結果が多数報告されているが、生体内での解析はiv移植法では“homing”と“engraftment”を分けて解析することはできないので直接的な証明はできなかった。IBM移植法は“homing”の過程を省いて、生体内で造血幹細胞と骨髄微小環境中のストローマ細胞との相互

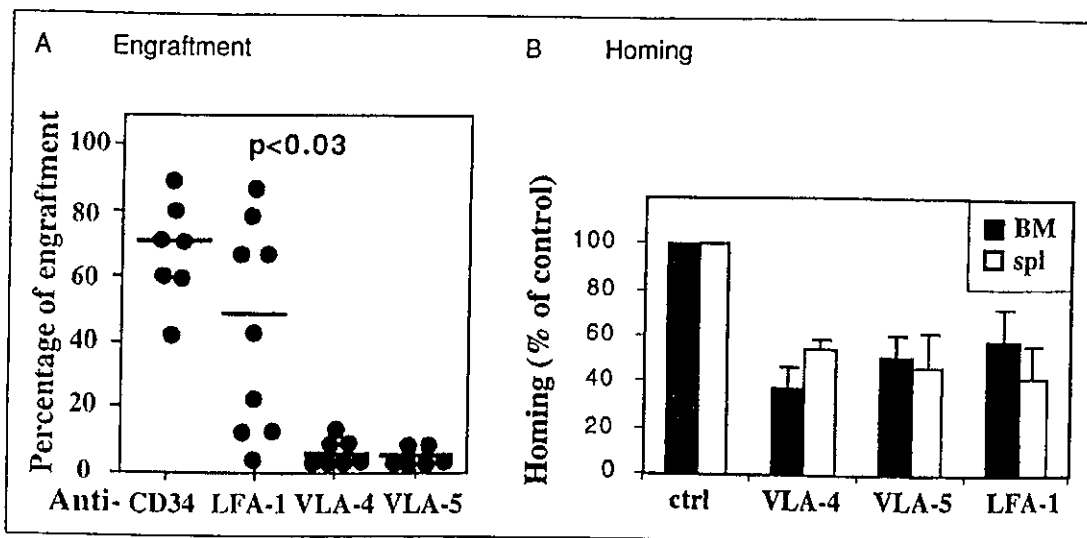


図7 Engraftmentとhoming (A: 文献⁹⁾, B: 文献¹⁰⁾より抜粋改編)

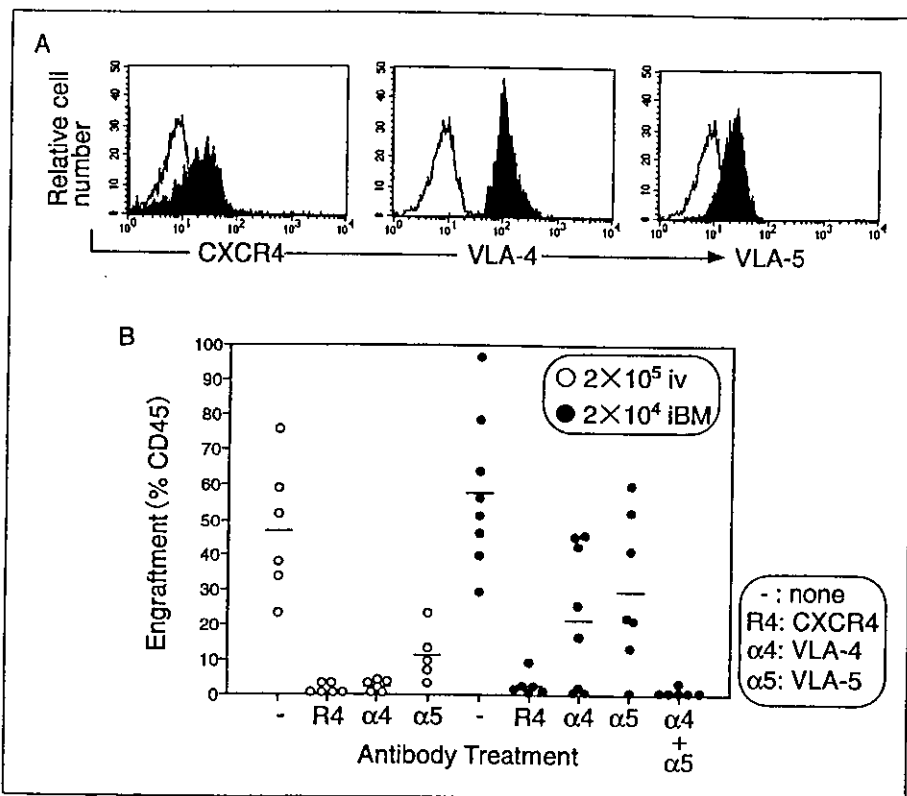


図8 ヒトCD34陽性細胞移植における生着関連抗原に対する阻害抗体の効果
 A: ヒトCD34陽性細胞上の生着関連抗原の発現. B: ヒトCD34陽性細胞をCXCR4, VLA-4, およびVLA-5それぞれの阻害抗体で処理後にiv移植(○)あるいはiBM移植(●)を行い, 6週間後にFACSでヒト造血細胞の生着における阻害効果を検討した.

作用に焦点をあてて解析することを可能とする手段である. そこで, われわれはヒトCD34陽性細胞をVLA-4, VLA-5およびCXCR4に対する阻害抗体で処理を行い, NOD/SCIDマウスにiv移植またはiBM移植を行い 6週間後にそれぞれの“engraftment”に対する阻害効果を検討した(図8). その結果, iv移植群ではPeledらの報告⁷⁾⁹⁾

と同様に, いずれの阻害抗体においても“engraftment”の著しい阻害効果が認められた. IBM移植群では抗VLA-4抗体および抗VLA-5抗体いずれにおいてもその阻害効果は不完全なものであり, 生体内でのVLA-4およびVLA-5の“engraftment”における役割は部分的なものであるということを確認することができた. 一方, 抗CXCR4抗体処

理群では、iv移植およびiBM移植の両群いずれにおいても完全な阻害効果を発揮した。SDF-1とCXCR4の相互作用は、造血幹細胞の生存において重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある¹¹⁾¹²⁾。今回の実験結果はSDF-1とCXCR4の相互作用が生体内において、造血幹細胞の“homing”のみならずその後の“engraftment”においても重要な役割を果たしていることを明らかにした初めての報告である。以上の結果から、iBM移植法が造血幹細胞の生着にかかわる分子機構を解析するための優れた手法であるということが出来る。

IBM移植法の有用性

IBM移植法の有用性として、①新たなヒト造血幹細胞の同定、②単一細胞レベルでの造血幹細胞の同定、③造血前駆細胞の生体内動態解析、④間葉系幹細胞、成体多能性幹細胞の移植、そして、⑤臨床応用が考えられる。以下順に述べる。

1. 新たなヒト造血幹細胞の同定

現在、多能性のヒト造血幹細胞はCD34抗原陽性の細胞集団として認識され、移植医療にも応用が進められている。一方、Bhatiaらは各分化抗原陰性でさらにCD34抗原陰性の細胞集団にヒト造血幹細胞活性があることを示した¹³⁾。さらにNakamuraらは、そのCD34抗原陰性の細胞集団を試験管内で培養することによって、SRC活性を有したCD34抗原陽性細胞を産生することを示した¹⁴⁾。長期造血再構築能を有したヒト造血幹細胞上のCD34抗原の発現の有無は多くの関心を集めているが、ヒトCD34陰性細胞はマウス体内では非常にhoming能が低いことが知られており、生体内での研究が困難な状況であった。そこでWangらは、ヒトCD34陰性細胞をNOD/SCIDマウスにiBM移植することによって効率よく生着させることに成功した¹⁵⁾。すなわち、iBM移植法はhoming活性の低い、より未分化な幹細胞の同定および解析に有用な手段であるということがいえる。

また、SRC活性が低いとされる骨髓細胞や動員末梢血の生体内造血再構築能の測定においても、iBM移植することにより、より効率のよい生着が期待できることから、今後の研究の進展に寄与する可能性が高い。

2. 単一細胞レベルでの造血幹細胞の同定

真に自己複製能と多分化能を兼ね備えた幹細胞ならば、OsawaらがマウスCD34陰性細胞の移植実験で示したように¹⁶⁾、数個さらには1個の細胞で生体の造血系を再構築できるはずであるが、ヒト造血幹細胞でそのようなレベルの解析に適した生体内測定系はまだ開発されていない。IBM移植法は非常に感度のよい測定法であることから、1個レベルでのヒト造血幹細胞活性の検討を実現できる可能性が高い。現在、われわれは種々の抗原に対する抗体を用いてヒト造血幹細胞の分離・同定を遂行中である。

3. 造血前駆細胞の生体内動態解析

Mazurierらは、移植後早期に造血の回復を担うヒト造血前駆細胞をNOD/SCIDマウスにiBM移植することによって、生着・解析することができることを報告した¹⁷⁾。ヒト造血前駆細胞はこれまで、NOD/SCIDマウスのβ2-microglobulinを欠損させたNOD/SCID-β2m^{-/-}でのみ生着可能な細胞集団であり、おそらくNOD/SCIDマウスに残存する末梢免疫機構によって排除されているのではないかと考えられていた¹⁸⁾。このことから、iBM移植法は短期造血再構築能を示す造血前駆細胞の生体内動態および移植における宿主の排除機構の解析においても有効な手法であることが示唆された。

4. 間葉系幹細胞(MSC)、成体多能性幹細胞(MAPC)の移植

間葉系幹細胞は骨、軟骨といった間葉系細胞に分化する細胞として定義されるが、さらに神経細胞や肝細胞などといった胚葉を超えて分化する能力を有する成体多能性幹細胞が骨髓内に存在することが報告された¹⁹⁾²⁰⁾。近年、心筋梗塞や肝傷害といった損傷部位の修復や機能改善に、骨髓由来の細胞が関与していることが多数報告され注目されている。しかしながら、骨髓細胞中のいかなる細胞群が、どのような機序でその機能を担っているのかについてはいまだ不明な点が多い。間葉系幹細胞や成体多能性幹細胞はその候補として有力であると思われるが、適切な移植系がないため解析が進んでいない。そこで、骨髓内に効率よく細胞を移入することが可能なiBM移植法を利用して、間葉系幹細胞や成人

多能性幹細胞を移植することによって、損傷治療における骨髄細胞のより詳細な動態解析が可能になるものと考えられる。

また、Allogeneicな移植を行う際に造血幹細胞と同時に間葉系幹細胞を共移植することによって、生着率が向上することが示唆されている²¹⁾²²⁾。間葉系幹細胞は骨髄へのhoming能が低いことが予想され、iBM移植法の適用により間葉系幹細胞の共移植による効果の向上が図れる可能性がある。さらに、iBM移植法は造血幹細胞を直接骨髄内に移植することから、造血幹細胞と骨髄内環境を構成するストローマ細胞などの造血支持細胞との相互作用を生体内で直接的に検討できる新しい測定法としても有用である。

5. 臨床応用

臍帯血造血幹細胞はその幹細胞活性の高さから、骨髄、動員末梢血に次ぐ第三の幹細胞供給源として期待されているが、臍帯血の最大の問題点は含有造血幹細胞数が限られており、臍帯血幹細胞移植の成人への適応が一部に限られていることである。IBM移植法の確立により、より少ない細胞数での移植が可能となれば、臍帯血幹細胞移植の成人への適応拡大、および最近確立されつつある骨髄非破壊移植への導入などその応用範囲は広い。

まとめ

ヒト造血幹細胞の骨髄内直接移植法は、より感度のよいヒト造血幹細胞の生体内造血再構築能の検討を実現した。また、造血幹細胞と骨髄環境との相互作用を直接的に解析できる手法であり、ヒト造血幹細胞の“homing”と“engraftment”の機序の解明においても有用な優れた移植法であることを示した。

謝辞：本研究の遂行にあたり、東海大学医学部再生医学センター・造血再生部門の諸氏に多くのご助力をいただきました。また、移植したマウスの管理を東海大学医学部動物飼育施設の諸氏にご協力いただきました。この場をお借りして感謝致します。なお、本研究に使用した臍帯血は東海大学臍帯血バンクより研究用として承諾を得たものを使用しました。

文 献

- 1) Dick JE, Guenechea G, Gan OI, et al. *In vivo* dynamics of stem cell repopulation in NOD/SCID mice. *Ann NY Acad Sci* 2001 ; 938 : 184.
- 2) Yahata T, Ando K, Sato 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* 2003 ; 101 : 2905.
- 3) Bhatia M, Wang JC, Kapp U, et al. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 5320.
- 4) Van Hennik PB, de Koning AE, Ploemacher RE. Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice : implications for stem cell frequency assessment. *Blood* 1999 ; 94 : 3055.
- 5) Cashman JD, Eaves CJ. High marrow seeding efficiency of human lymphomyeloid repopulating cells in irradiated NOD/SCID mice. *Blood* 2000 ; 96 : 3979.
- 6) Kushida T, Inaba M, Hisha H, et al. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells : a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 2001 ; 97 : 3292.
- 7) Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999 ; 283 : 845.
- 8) Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and $\beta 2m$ null NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann NY Acad Sci* 2001 ; 938 : 83.
- 9) Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells : role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 2000 ; 95 : 3289.
- 10) Kollet O, Spiegel A, Peled A, et al. Rapid and effi-

- cient homing of human CD34(+) CD38(-/low) CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/ β 2m(null) mice. *Blood* 2001 ; 97 : 3283.
- 11) Cashman J, Clark-Lewis I, Eaves A, et al. Stromal-derived factor 1 inhibits the cycling of very primitive human hematopoietic cells *in vitro* and in NOD/SCID mice. *Blood* 2002 ; 99 : 792.
 - 12) Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, et al. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells : evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood* 2002 ; 99 : 1117.
 - 13) Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 1998 ; 4 : 1038.
 - 14) Nakamura Y, Ando K, Chargui J, et al. *Ex vivo* generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells. *Blood* 1999 ; 94 : 4053.
 - 15) Wang J, Kimura T, Asada R, et al. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34⁻ cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood* 2003 ; 101 : 2924.
 - 16) Osawa M, Hanada K, Hamada H, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996 ; 273 : 242.
 - 17) Mazurier F, Doedens M, Gan OI, et al. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 2003 ; 9 : 959.
 - 18) Glimm H, Lee WE, Cashman J, et al. Previously undetected human hematopoietic cell population with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID- β 2 microglobulin-null mice. *J Clin Invest* 2001 ; 107 : 199.
 - 19) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002 ; 418 : 41.
 - 20) 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 ; 31 : 1323.
 - 21) Almedia-Porada G, Flake AW, Glimp AH, et al. Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero. *Exp Hematol* 1999 ; 27 : 1569.
 - 22) Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002 ; 30 : 870.

* * *

特集

細胞移植と再生医療—血管新生から心筋再生へ—

骨髄間葉系由来多能性 幹細胞(MAPC)による 心筋・血管再生治療の 可能性*

六車 ゆかり**
川田 浩志**
安藤 潔**

Key Words : multipotent adult progenitor cells, MAPC, MSC, HSC

はじめに

近年、臓器移植の長年の問題である提供者不足の解決案として、自己増殖能と分化能を兼ね備える幹細胞を利用した細胞移植による再生医療の開発が注目を集めている。本稿では、骨髄液中に含まれる幹細胞を用いた細胞治療の可能性について述べる。

骨髄細胞を利用した再生医療

骨髄細胞を移植することによって心筋や血管を再生する試みや報告が国内外で相次いでおり、骨髄の中に心臓や血管を構成する細胞に分化し、それらの再生を担う細胞が存在することが明らかにされつつある^{1)~3)}。骨髄にはいくつかの異なる種類の幹細胞が存在することが知られているが、すべての血液の源である造血幹細胞(hematopoietic stem cell : HSC)は古くから存在が確立されており、細胞表面マーカーの発現をもとに蛍光標示式細胞分離装置(fluorescence-activated cell sorter : FACS)を用いて均一な細胞集団の純化が可能であることから、もっとも研究が進んでいる幹細胞のひとつである。最近複数のグループが、純化したマウスのHSCを心筋梗塞作製後に

マウスの心臓に移植する方法や^{4)~6)}、HSCを移植されたマウスに心筋梗塞を作製する実験系で⁶⁾、HSCから心筋への分化能力を解析し、HSCが心筋に分化する可能性が低いことを示した。一方、近年になって血液以外の中胚葉組織に分化する間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell : MSC)が、骨髄付着細胞を血清の存在下で培養することにより分離された。MSCはHSCのようにFACSを用いた細胞表面マーカーによる純化はできないが、比較的容易な培養手技で大量の細胞を獲得することが可能であるので、*in vivo*と*in vitro*の両面でさまざまな分野での研究が進みつつある。牧野らは、マウス骨髄付着細胞にDNAの脱メチル化剤である5-アザシチジンを添加して培養し、自律的に拍動する細胞の誘導に成功している⁷⁾。またTomaらは、ヒトMSCを心筋梗塞を起こしたマウスの左心室に移植すると、MSCが心筋特異的な蛋白を発現するようになり、さらに心機能も改善したと報告しており、MSCが生体内で心筋に分化する可能性を示した⁸⁾。ところで、最近Verfaillieらによって、骨髄という分化した成体中胚葉組織に存在しながらも、内胚葉や外胚葉組織にも分化する能力をもった成体多能性幹細胞(multipotent adult progenitor cell : MAPC)の存在が報告された⁹⁾¹⁰⁾。成体組織にもES細胞のように高い増殖能力と多分化能をもつ細胞が存在するというのは大変興味深く、今後の細胞を利用

* MAPC : Potential in cell therapies for cardiovascular diseases.

** Yukari MUGURUMA, Ph.D., Hiroshi KAWADA, M.D. & Kiyoshi ANDO, M.D.: 東海大学医学部再生医学センター造血再生部門(〒259-1193 伊勢原市望星台); Division of Hematology, Research Center for Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine, Isehara 259-1193, JAPAN

した再生医療の開発にとって意義が大きいですが、MAPCは最初の報告から歴史が浅く、骨髄での存在頻度が低いことや培養技術の習得に時間がかかることから、再現に成功している研究室は少ない。われわれは、2000年11月からミネソタ大学と共同研究を開始し、2001年2月から独自にMAPCの培養を行っている。われわれの研究室では、過去の発表からMAPCは未熟な幹細胞であると示されているため、組織を凍結融解することにより成熟した細胞を取り除き、効率よくMAPCが誘導できるのではないかと考えた。これまで研究使用の承諾を得た健常人および患者の凍結保存骨髄を利用し、22例から25分裂回数以上増殖するMAPCの誘導に成功している。年齢情報が得られた15例について*in vitro*での分裂能力と年齢の相関関係を分析してみると、10~49歳の間ではまったく関連はみられず、心血管疾患の罹患率が高くなる中年以降でもMAPCの誘導が十分可能であることが示唆された。誘導したMAPCは*in vitro*で、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋といった沿軸中胚葉に由来する組織、側板中胚葉から形成される血管内皮細胞、そして内胚葉由来である肝細胞に分化することを、形態的特徴、免疫染色による細胞特異的蛋白の発現および細胞の機能解析により確認している¹³⁾。以下では現時点で得られている主にヒト由来MAPCに関する知見をもとに、MAPCを利用した心血管再生療法の可能性について述べたいと思う。

MAPCから血管内皮細胞への分化

MAPCは、未分化な状態ではCD31, CD34, CD36, VE-cadherin, von Willbrand Factor (vWF)などの血管内皮細胞特異的な分化マーカーは発現しないが、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)の受容体であるFlt-1やFlk-1を低レベルではあるが発現している⁹⁾。そこで、VEGF(10ng/ml)を添加した無血清培地で14日間培養すると上記の分化マーカーを発現するようになり、Ac-LDLの取込みや、ヒスタミン反応性のvWFの放出といった機能を示し、マトリゲル上で培養するとチューブを形成する。また、尾静脈から未分化MAPCを移植されたマウスでは、創傷治癒過程や腫瘍の移植によって誘導された

新生血管にMAPCから分化した血管内皮細胞が存在することが確認され、未分化MAPCが生体内の環境刺激により血管内皮細胞に分化することが示された¹²⁾。MAPCを血管再生療法に使用する利点として、その旺盛な増殖能力があげられる。MAPCは未分化な状態で30分裂回数以上増殖すると報告され、さらに血管内皮細胞に分化した後も20分裂回数、すなわち100万倍に増殖するという。細胞移植療法では、往々にして大量の移植細胞を確保することが困難であるが、MAPCは少量の自己骨髄から誘導でき、移植に適した数まで細胞を増幅させることが可能である。

血管は血管内皮細胞と血管壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)という2種類の細胞から形成される管腔構造体である。内腔側、すなわち血流と接触する面を血管内皮細胞が被い、その外側を平滑筋の層が囲んでいる。山下らはマウスES細胞由来のFlk-1陽性の細胞をFACSを用いて純化し、それらの細胞が血管内皮細胞と血管壁細胞の両方に分化する能力をもつことを*in vivo*と*in vitro*で証明し、発生過程における血管構成細胞の前駆細胞の存在を示した¹³⁾。MAPCは、VEGFの存在下では血管内皮に分化し、血小板由来増殖因子-BB (platelet derived growth factor-BB : PDGF-BB)添加(100ng/ml)無血清培地で培養すると平滑筋細胞に分化する。2003年アメリカ血液学会でReyesらは、MAPCを利用した組織工学的人工血管の試みとして、アガロースでコートした多孔質のポリエチレンチューブの外側にMAPCを埋め込んだフィブリンゲルを巻きつけた管腔構造物を作製したと発表した¹⁴⁾。ポリエチレンチューブ側はVEGF添加培地と接し、フィブリンゲルの外側はTGF-β1添加培地と接した状態で培養すると、内側に血管内皮が集合しその周りを平滑筋細胞が取り囲むという血管様構造物を形成した。両細胞系への分化を免疫組織学的に同定し、平滑筋細胞由来と思われるコラーゲンやエラスチンの産生も確認した。また、その血管様構造物のメカニカルな強さは大動脈に匹敵するものであったという。抗凝固作用などの詳細な解析はまだ行われていないが、MAPCを応用した生体適合性人工血管グラフトの作成も期待できる。

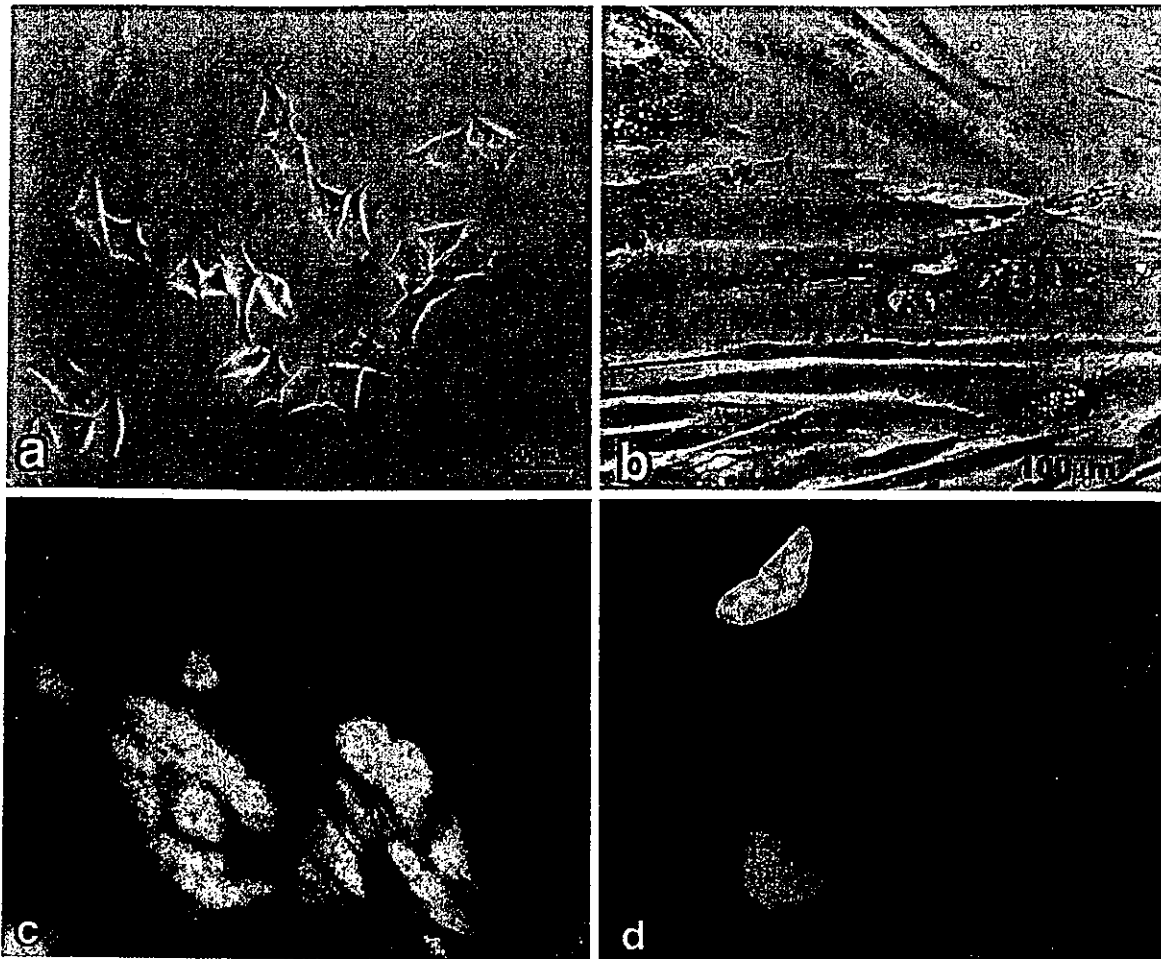


図1 ヒト凍結保存骨髄由来MAPCから筋肉への分化

a: 未分化MAPC. b: *In vitro*で形成された多核筋管細胞. c: 移植後9週のマウス筋肉. GFP陽性細胞が筋再生部位にクラスター状に存在する. d: 移植後27週. ラミニン陽性の細胞膜で囲まれたGFP陽性の成熟筋線維が確認できる.

MAPCから心筋への分化

心筋は血管内皮同様側板中胚葉から発達し、沿軸中胚葉から形成される骨格筋とは発生学的に由来を異にしている。最近、成体マウスの心臓には心筋、平滑筋、血管内皮細胞に分化する幹細胞が存在することが報告され、長年再生不可能と考えられてきた心筋も自己再生能力をもつ可能性が示された¹⁶⁾。ヒトの心臓にも同様な細胞が存在し、障害後の組織修復や再生にどれほど貢献しているかという疑問は解明されていないが、そうした細胞を障害後に効率的に活性化させることができれば画期的な治療方法となるだろう。骨格筋は再生が活発な組織であり、成人でも外傷などで筋線維が壊死した場合、局所のサテライト細胞や筋芽細胞が活性化し、新たな筋線維が形成される。そうした再生能力をもつ細胞を自己の筋肉から採取し、機能不全に落

ち込んだ心臓に移植して機能改善を図るという研究が数多くなされてきた¹⁶⁾。Reineckeらは、ラットの心筋と筋芽細胞を共培養すると、両細胞がギャップ結合を形成し、電気的な同期収縮をすると発表している¹⁷⁾。同グループは、最近*in vivo*でも移植された筋芽細胞と心筋細胞が融合することを証明した¹⁸⁾。また、ラットやウサギでは心筋梗塞後に筋芽細胞を移植すると、組織的な修復と心機能の改善がみられ^{19)~21)}、さらに心筋梗塞患者に自己筋芽細胞を移植するという試みでも今後の発展に期待できる結果が得られている²²⁾²³⁾。

残念ながら*in vitro*でMAPCが心筋に分化したという報告はまだない。われわれは、ヒト凍結保存骨髄から誘導したMAPCを5%FCSと塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)、インスリン様増殖因子1(insulin-like growth factor-1: IGF-1)、PDGF、およびVEGFの存在下で培養し、多核筋管細胞を形成さ

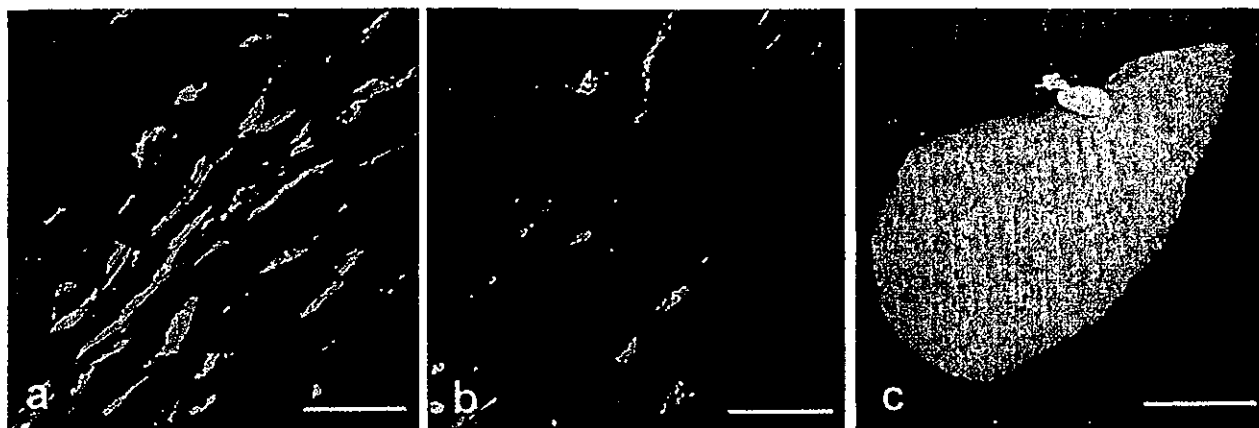


図2 G-CSFによる骨髄細胞の心臓への動員と心筋への分化促進

a : G-CSF投与マウスの心臓. 梗塞部位に骨髄由来GFP陽性細胞が多数存在する. b : G-CSF非投与マウスの心臓. GFP陽性細胞は少なく, それらは血液系の細胞である. c : α -アクチニン免疫染色(赤), GFP陽性細胞が横紋を示している.

せることに成功した¹¹⁾. 未分化の25~35分裂回数
のヒト骨髄由来MAPCを上記の条件に移してから
10日ほどで, 細胞融合により形成したと思われ
る多核のチューブ形態の細胞が観察され(図1-a,
b), それらの細胞は α -アクチニンやSK-ミオシン
などの筋肉特異的蛋白を発現した. 筋肉特異的
蛋白の発現の時間経過を免疫染色により解析す
ると, 最初にMyoD陽性の単核細胞が出現し, そ
れらが増殖してミオゲニン陽性となり, α -アクチ
ニン, SK-ミオシン陽性の多核筋管細胞が形成さ
れるという発生段階の筋肉の分化に非常によく
似たパターンを示した. そこで, GFPを遺伝子
導入した筋肉分化条件で3日間培養したMAPC
(MyoDが陽性になるころ)を, カルジオトキシン
を投与して筋肉壊死を誘導したNOD/SCIDマウ
スの下肢筋肉に移植し, *in vivo*での分化能力を
解析した. 移植後9週の病理切片を観察すると,
筋肉再生部位にGFP陽性細胞がクラスター状に
存在し(図1-c), それらは α -アクチニンやSK-ミ
オシンが陽性であった. さらに27週後では, GFP
陽性の成熟筋線維が存在した(図1-d). MAPCを
*in vitro*で心筋に分化させるためにはさらなる検
討が必要であるが, 上記のようにMAPCは*in vivo*
と*in vitro*で骨格筋に分化することから, 心筋の
再生にも貢献する可能性がある. しかしながら,
MAPCは誘導に少なくとも1か月以上必要であ
ることから, 急性心虚血疾患の治療への応用は
ハードルが高い.

一方Gallegosらは, 未分化なMAPCを慢性心虚

血疾患動物に移植することにより, 心機能の改
善に成功したと報告している²⁴⁾. 骨髄を採取した
成体イヌに左前下行枝冠動脈結紮により心虚血
を作製し, 4週間後に同一個体の骨髄から誘導し
たMAPCを心臓に移植した. 心虚血後1か月,
細胞移植後2, 4か月でMRIを用いて心血管動態
を解析したところ, 移植群で明らかな心筋力
の上昇がみられたという. これは, 大型動物にお
ける骨髄由来細胞を用いた心筋再生療法で, 初
めて心機能の改善がみられた報告である.

MAPCを利用した 心血管療法の開発に向けて

われわれは, 骨髄細胞をGFP陽性細胞に置き
換えたマウスを利用して, 心筋梗塞後の心筋組
織の再生が顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte
colony-stimulating factor : G-CSF)の投与によ
って促進されることを見出した²⁵⁾. GFPを発現する
骨髄細胞を移植されたマウスに心筋梗塞を作製
し, 翌日からG-CSFを10日間皮下注射し, 2か月
後に心臓の病理切片を作製して心筋の再生を評
価した. G-CSF投与群では, 梗塞部位に骨髄由来
のGFP陽性細胞の集積が認められ(図2-a), それ
らの細胞がアクチニンを発現するとともに, はっ
きりとした横紋を有して心筋を形成している所
見がしばしば認められた(図2-c). また, GFP陽
性の血管内皮細胞や平滑筋細胞も存在した. さ
らに, 心機能が回復していることも明らかにな
った. ところがG-CSF非投与群では, 心臓にGFP陽

性細胞はほとんど存在しなかった(図2-b)。以上より、骨髄からG-CSFによって動員された細胞によって心筋組織が再生されることが示されたのである。

これまで述べてきたように骨髄由来のMAPCは、*in vitro*で血管内皮、平滑筋および骨格筋細胞に分化し、*in vivo*でも血管や心臓を構成する細胞に分化することが明らかにされてきた。われわれも、今後はすでに確立されたマウスの実験系とGFPを発現するMAPCを使用して、MAPCの心筋および血管再生への関与を詳細に検討し、これからの安全で効果的な心血管再生療法の開発に不可欠である基礎的知見の蓄積に努めていくつもりである。

文 献

- 1) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999 ; 100 : II 247.
- 2) Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001 ; 107 : 1395.
- 3) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001 ; 410 : 701.
- 4) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004 ; 428 : 668.
- 5) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004 ; 428 : 664.
- 6) Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004 ; 10 : 494.
- 7) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999 ; 103 : 697.
- 8) 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.
- 9) Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001 ; 98 : 2615.
- 10) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002 ; 418 : 41.
- 11) 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 ; 31 : 1323.
- 12) Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 337.
- 13) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000 ; 408 : 92.
- 14) Reyes M, Ross JR, Clarkson C, et al. Coentrapment of MAPC-derived smooth muscle and endothelial cells for tissue-engineered arteries[abstract]. *Blood* 2003 ; 102 : 11a.
- 15) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003 ; 114 : 763.
- 16) Kessler PD, Byrne BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle : Cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 1999 ; 61 : 219.
- 17) Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, et al. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000 ; 149 : 731.
- 18) Reinecke H, Minami E, Poppa V, et al. Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells. *Circ Res* 2004 ; 94 : e56.
- 19) Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, et al. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996 ; 98 : 2512.
- 20) Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium : improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998 ; 4 : 929.
- 21) Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, et al. Cell

- therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001 ; 103 : 1920.
- 22) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001 ; 357 : 279.
- 23) Hagege AA, Carrion C, Menasche P, et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003 ; 361 : 491.
- 24) Gallegos RP, Jayaswal A, Clarkson CE, et al. Bone marrow induced myocardial restoration in the canine model[abstract]. *Blood* 2003 ; 102 : 334a.
- 25) Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al. Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. In press.

* * *

幹細胞の可塑性と多能性

Plasticity and pluripotency of stem cells

特集

安藤 潔
ANDO Kiyoshi

再生医学—クローン・幹細胞から医療へ—

Key words 組織幹細胞 分化 可塑性 多能性幹細胞

再生医学が「21世紀の医療」を担うものとして脚光を浴びている。「再生」現象はギリシャ神話の有名な「プロメテウスの火」でも描かれているように、古来より生命の神秘を象徴する現象と考えられてきた。再生能力の高いプラナリアやイモリは生物学者の魅惑的な研究対象とされ、「ヒトでも再生現象を医療に利用できないか」というアイデアが夢として語られた。近年再生医学が現実味を持ち始めた背景には、ドリーに代表されるクローン動物の誕生(1997)、ヒト胚性幹細胞の樹立(1998)、そして骨髄細胞を用いたさまざまな組織再生(1998～)などの画期的な研究の蓄積がある。特に骨髄細胞に代表されるような成体組織幹細胞は自己細胞を利用できるので、倫理的問題や免疫反応を考慮する必要がないことから再生医学への応用が期待されている。本稿では、再生医学を理解するための幹細胞、多能性、可塑性の概念と研究の現状を紹介する。

I. 幹細胞：可塑性と多能性

皮膚、腸管上皮、血液などでは常に細胞が分裂・分化して組織の恒常性が維持されている。また傷害時には肝臓も旺盛な再生能力を示す。これらの組織では生涯にわたり幹細胞が維持されており、それが分化して組織再生が起こること(幹細胞システム)が示されている。すなわち幹細胞が分裂する際に自己複製あるいは分化のいずれかの運命をたどることにより、幹細胞システムが長期に渡って維持される(図1)。

東海大学医学部内科 助教授・再生医学センター

皮膚では表皮幹細胞は角化細胞という単一の成熟細胞へ分化するのに対し、血液では造血幹細胞が顆粒球、リンパ球、単球、赤血球、血小板といったさまざまな機能細胞へ分化する能力を持ち、これを造血幹細胞の多分化能(multipotency)という。皮膚でも最近では毛囊のバルジ領域に毛髪、汗腺、表皮に分化できる幹細胞が存在することが示唆されている。これらの例のように特定の組織を構成する多様な機能細胞が固有の組織幹細胞から分化し、その分化能力は発生の系譜(図2)に従うものと考えられてきた。

ところが最近骨髄細胞の移植実験により、組織幹細胞がその組織を構成する細胞という枠組みを

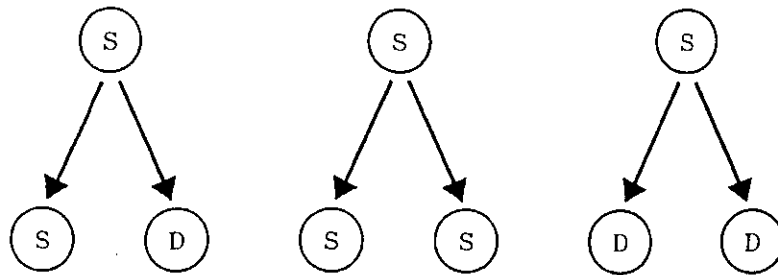


図1 幹細胞の分裂様式

幹細胞はいずれかの細胞分裂を行うことにより組織構築と維持を同時に行っていると考えられている。

S: 自己複製 D: 分化

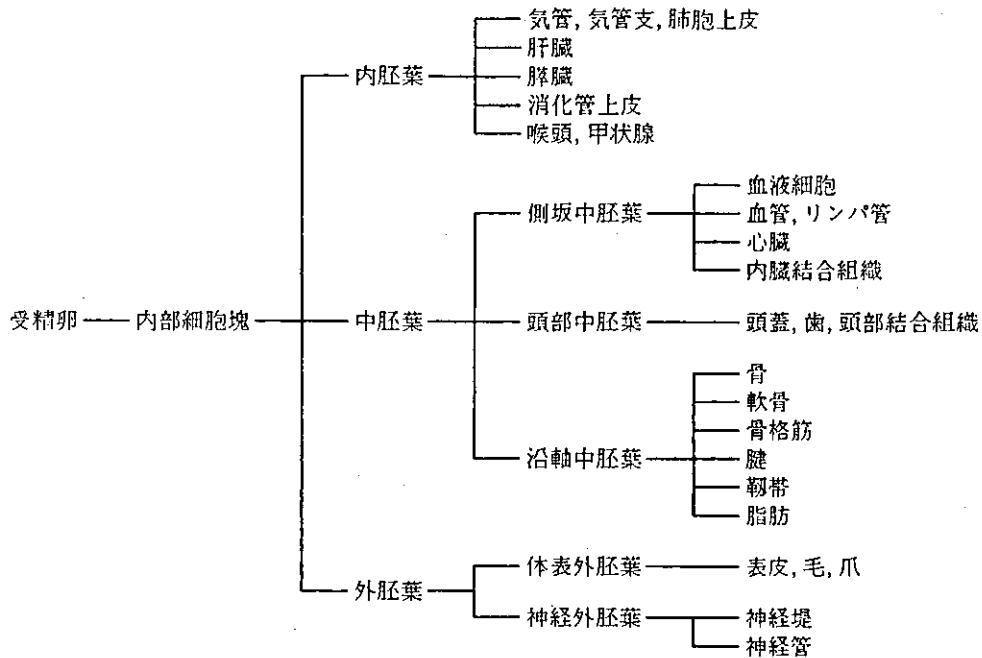


図2 器官形成と細胞系譜

超えた分化能を持つ、すなわち可塑性(plasticity)を持つことが報告されてきた。この現象のメカニズムとして、①多能性幹細胞(pluripotent stem cells)が骨髄に存在する、②さまざまな組織幹細胞が骨髄に存在する、③組織幹細胞が脱分化して新たな分化能を獲得する、④移植細胞が宿主細胞と融合してドナー形質を示す、という4つの可能性が考えられた(図3)。以下に骨髄細胞による組織再生の現状について総説し、それぞれの可能性につき検討する。

II. 骨髄細胞による組織再生

1. 骨髄細胞による骨格筋再生

Ferrari らは1998年に骨髄由来の筋前駆細胞により骨格筋再生が起こることを示した¹⁾。続いて Gussoni らは正常マウス骨髄中の sp 細胞という幹細胞を豊富に含む分画を筋ジストロフィーマウス(mdx マウス)に移植すると骨格筋に分化することを報告した²⁾。この結果を彼らは造血幹細胞が骨格筋細胞に分化(形質転換)したものと推測し、以後一連の造血幹細胞可塑性ブームを引き起こした。確かにここで用いられた sp 細胞は Lin⁻

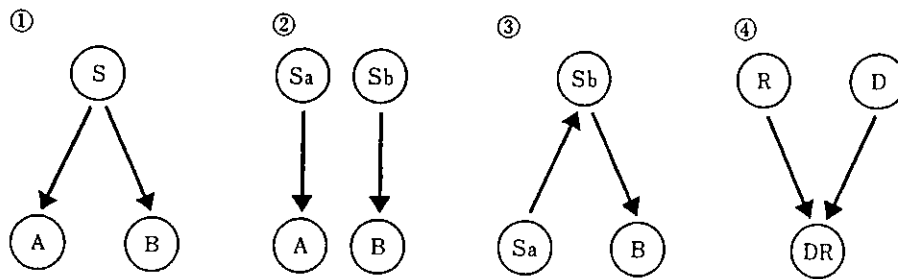


図3 可塑性はどのように説明されるか

- ①多能性幹細胞が骨髄に存在する。
 - ②さまざまな組織幹細胞が骨髄に存在する。
 - ③組織幹細胞が脱分化して新たな分化能を獲得する。
 - ④移植細胞が宿主細胞と融合してドナー形質を示す。
- S: 多能性幹細胞 Sa: 組織 A の幹細胞 Sb: 組織 B の幹細胞 R: 宿主細胞 D: ドナー細胞

Sca-1⁺ c-kit⁺ CD45⁺ CD34⁻の表面マーカーを示しており、Osawa らの示したマウス造血幹細胞と一致する。しかしながら骨格筋の場合、元来細胞融合を起こし多核化する細胞なので、ドナー血液細胞がレシピエント骨格筋細胞と融合する可能性も考慮しなければならない。実際、Corbel らは遺伝子導入マウスを用いて血液細胞と骨格筋細胞の融合をみごとに証明した³⁾。一方、LeBarge らは骨髄細胞が単核の骨格筋幹細胞になったのち多核骨格筋になることを示しており、血液細胞との細胞融合によらない分化経路も存在すると考えられる⁴⁾。骨髄間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) が骨格筋細胞に分化するので、再生現象が MSC によるものである可能性が示唆される。骨髄細胞による骨格筋再生では図3の①あるいは②と④のメカニズムが考えられることになる。

2. 骨髄細胞による心筋再生

Orlic らは、骨髄 Lin⁻ c-kit⁺細胞を心筋梗塞部位に直接移植したところドナー由来細胞による心筋再生がおこること⁵⁾、さらに心筋に分化可能な細胞はサイトカインにより動員される可能性を報告した⁶⁾。また骨髄 sp 細胞を心筋虚血マウスに経静脈的に投与すると心筋に分化することも報告された⁷⁾。これらの実験では当初造血幹細胞が心筋細胞に分化したと考えられたが、最近の報告で造血幹細胞から心筋への分化能は存在せず、細胞融合により説明されることが示された⁸⁾⁻¹⁰⁾。

一方、Dexter 培養により樹立したマウス骨髄由来細胞が *in vitro* で心筋細胞になることが1999年に Fukuda らのグループにより報告された¹¹⁾。Toma らもヒト MSC をマウス心筋内に注入する実験により *in vivo* で MSC が心筋細胞になる可能性を示している¹²⁾。したがって骨髄細胞による心筋再生でも図3の①②と④の可能性が存在している。

3. 骨髄細胞による肝再生

1999年に Petersen らは骨髄移植ラットの四塩化炭素肝障害モデルで、肝再生の幹細胞と考えられている卵円細胞(oval cell)がドナー由来であることを示した¹³⁾。Lagasse らは遺伝性チロシン血症1型のモデルマウスで肝不全を発症し死亡する FAH(fumarylacetoacetate hydrolase)欠損マウスに、純化した骨髄造血幹細胞(Lin⁻ c-kit⁺ Sca-1⁺ Thy-1^{low}細胞)を移植するとドナー由来の肝細胞が再生し肝機能と生存率を改善させることを報告した¹⁴⁾。その後このモデルもドナー由来再生肝細胞は血液細胞との細胞融合(図3④)により生まれることが示された¹⁵⁾¹⁶⁾。しかし治療効果が示されたことは新たな細胞治療の可能性を示唆する。

4. 骨髄細胞による神経再生

脳のミクログリア細胞が造血細胞由来であることは以前より知られていたが、2000年に Brazelton らのグループと Mezey らのグループは骨髄移植

マウスを用いてドナー由来の細胞が脳内に移行してニューロンに分化することを報告した¹⁷⁾¹⁸⁾。この実験では骨髄のどの細胞がニューロンに分化するのかは不明である。一方、小脳の Purkinje 細胞は細胞融合によりドナー型になることが示された¹⁹⁾(図3④)。

5. ヒト造血幹細胞移植におけるドナー由来非造血細胞

Theise らは男性ドナーから女性レシピエントへの骨髄移植2例および女性ドナーから男性レシピエントへの肝臓移植4例で肝臓の Y-FISH を行った。全例で Y-FISH 陽性の肝および胆管上皮細胞を認め、これらは骨髄細胞由来と考えられた¹⁹⁾。また Korblyng らは男性ドナーから女性レシピエントへの末梢血幹細胞移植6例を解析し、末梢に動員された幹細胞でも数パーセントのドナー由来の肝細胞、皮膚表皮細胞、腸管上皮細胞を認め、末梢に動員された幹細胞も多能性を示す可能性を報告した²⁰⁾。また Okamoto らは同じく男性ドナーから女性レシピエントへの骨髄移植4例を解析し、GVHD や潰瘍形成などの消化管障害に際してドナー由来の腸管上皮再生が認められることを報告した²¹⁾。Mezey らは乳児期に骨髄移植を行った症例で1年後に脳に神経様細胞が認められたことを報告している²²⁾。以上のようにヒトにおいても骨髄由来の細胞が肝、胆管上皮、皮膚、腸管上皮、神経などさまざまな組織細胞に分化することが示唆されているが、そのメカニズムは不明である。

以上のように造血幹細胞の可塑性と考えられた現象は多くの場合細胞融合によるものであることが明らかにされてきている。なお、現在まで図3の③の可能性は両生類では示されているが、ほ乳類では示されていない。

Ⅲ. 骨髄間葉系幹細胞

骨髄細胞による組織再生研究の成果の多くが細

胞融合で説明されている。造血幹細胞より由来する単球・マクロファージは炎症部位で融合し多核細胞を形成することは古くから知られており、造血幹細胞の「可塑性」が細胞融合によるものであったという結論は十分納得できるものである。一方、これまでの研究には移植細胞として全骨髄細胞を用いた実験と純化あるいは単一造血幹細胞を用いた実験が混在している。骨髄には造血幹細胞のほかに間葉系幹細胞が存在することが知られているが、間葉系幹細胞の役割については詳しく検討されていない。Horwitz らは3例の骨形成不全症 (osteogenesis imperfecta) 患児への骨髄移植の解析によりドナー由来の骨芽細胞を証明し患児の骨成長に貢献していることを報告したが、これは骨髄中の間葉系幹細胞が移植可能であることを示した最初の報告であった。

われわれは心筋梗塞後の心筋再生に関与する骨髄由来細胞の起源を明らかにするために図4に示す実験を行った。まず造血幹細胞、非造血幹細胞の関与を示すために全骨髄細胞移植と単一造血幹細胞移植後の心筋梗塞マウスを比較した(図4A)。心筋梗塞後に骨髄細胞を動員する目的で G-CSF を投与した。単一造血幹細胞移植マウスではほとんどドナー由来心筋は認められなかったのに対して全骨髄細胞移植マウスではドナー由来の心筋再生が認められた。この結果は心筋細胞が骨髄内の造血幹細胞以外の細胞に由来することを示している。間葉系幹細胞が心筋細胞に分化することが示されているので、次にその可能性を検討した(図4B)。骨髄内移植法により GFP でマーキングされた間葉系幹細胞を移植されたマウスでは心筋梗塞後に GFP 陽性の再生心筋を認めた。以上より骨髄細胞由来の心筋再生が間葉系幹細胞によることが初めて示された(図3②)。

間葉系幹細胞はすでに骨再生、先天性代謝疾患、造血幹細胞移植などに臨床応用されており、今後さまざまな再生治療での利用が期待されている。

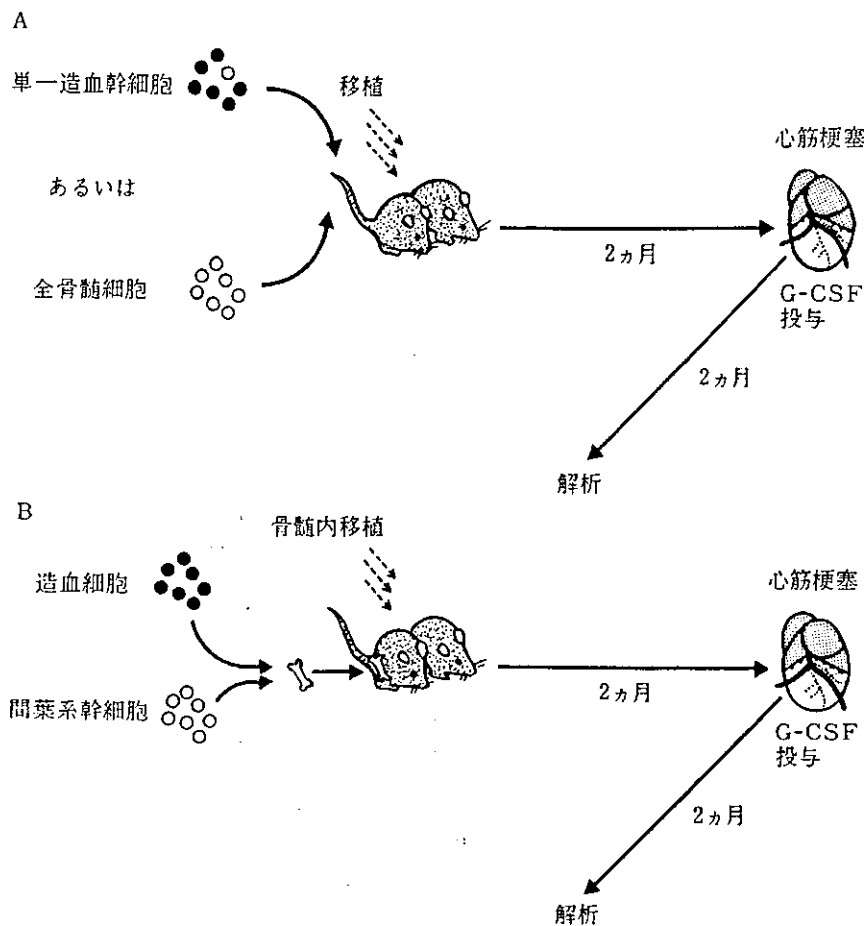


図4 骨髄由来心筋細胞の起源を明らかにする(文献24より)

- A 全骨髄細胞あるいは単一造血幹細胞を移植したマウスに心筋梗塞を作成し、心筋再生を比較する。
- B 骨髄内移植法により間葉系幹細胞を移植したマウスに心筋梗塞を作成し、心筋再生における骨髄由来間葉系幹細胞の貢献を検討する。

IV. 骨髄多能性幹細胞

胚性幹細胞が多能性を持つのは当然であるが、最近成体幹細胞の中にも多能性を持つ細胞が存在することが報告された。Jiangらは間葉系幹細胞の分化能を超えて多分化能を示す成体多能性幹細胞(Multipotent adult progenitor cell: MAPC)が骨髄に存在することを示した²⁵⁾。MAPCは*in vitro*で間葉系幹細胞の分化能を超えて血管内皮細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ニューロン、肝細胞に分化可能であった。*in vivo*では驚くべきことに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。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。また、 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すると、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。したがって骨髄移植による組織再生現象が多能性幹細胞による可能性も残されている(図3①)。

ヒトでもMAPCが分離されている²⁶⁾。われわれも日本人成人ドナー21例よりMAPC樹立を試み、13例よりMAPCを得た²⁷⁾。これらの細胞は25回以上の長期継代が可能で、*in vitro*で脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、肝細胞に分化可能であった。さらにNOD/SCID

マウスに移植することにより骨格筋再生を行うことを確認した。

MAPC の分離のためには長期間の培養が必要であり、培養による形質の変化が関与している可能性は否定できない。MAPC の生理的な機能を明らかにするためには生体内で prospective に MAPC を同定する研究が今後必要である。また、再生医学への利用のためにはより簡便な分離法と培養法が必要とされる。

V. 結 語

成体幹細胞の可塑性と多能性を骨髄細胞の例を

用いて解説した。骨髄移植実験によりさまざまな組織・臓器再生が示されたため、当初造血幹細胞の可塑性によるものと考えられた。しかしながら骨髄には造血幹細胞以外のさまざまな幹細胞が存在するので再生現象がどの細胞によるものか起源を同定することが重要である。造血幹細胞の可塑性と見られた現象はほとんどが細胞融合によるものであった。一方、間葉系幹細胞による組織・臓器再生も証明され、今後の再生医学での利用が期待される。多能性幹細胞は研究が開始されたばかりであり、今後の進展に期待が持たれる。

文 献

- 1) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al : Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279 : 1528-1530, 1998.
- 2) Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al : Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401 : 390-394, 1999.
- 3) Corbel SY, Lee A, Yi L, et al : Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat Med* 19 : 1528-1532, 2003.
- 4) LeBarge MA, Blau HM : Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111 : 589-601, 2002.
- 5) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001.
- 6) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 10344-10349, 2001.
- 7) Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al : Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107 : 1395-1402, 2001.
- 8) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al : Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428 : 664-668, 2004.
- 9) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al : Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428 : 668-673, 2004.
- 10) Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al : Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425 : 968-973, 2003.
- 11) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin. Invest* 103 : 697-705, 1999.
- 12) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al : Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105 : 93-98, 2002.
- 13) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 : 1168-1170, 1999.
- 14) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al : Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine* 6 : 1229-1234, 2000.
- 15) Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW : Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422 : 901-904, 2003.
- 16) Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al : Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422 : 897-901, 2003.
- 17) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM : From marrow to brain : expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290 : 1775-1779, 2000.
- 18) Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al : Turning blood into brain : cells bearing neuronal antigens

- generated in vivo from bone marrow. *Science* 290 : 1779-1782, 2000.
- 19) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al : Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32 : 11-16, 2000.
 - 20) Korbiling 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* 346 : 738-746, 2002.
 - 21) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, et al : Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 8 : 1011-1017, 2002.
 - 22) Mezey E, Key S, Vogelsang G, et al : Transplanted bone marrow generates new neurons in human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 1364-1369, 2003.
 - 23) 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* 5 : 309-313, 1999.
 - 24) Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al : Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104 : 3581-3587, 2004.
 - 25) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 : 41-49, 2002.
 - 26) Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al : Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98 : 2615-2625, 2001.
 - 27) Muguruma Y, Nakamura Y, Sato T, et al : In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol* 31 : 1323-1330, 2003.