

しいご講演、ありがとうございます。

先生にお尋ねしたいのが2点あります。1点は、確かに僕も骨というのはどちらかと言うと馬鹿な細胞で、一番高等なのが軟骨だというふうに僕は思っているんですけども、自分たちの扱っている中で、

で、今日、先生がお見せいただいた骨は、確かに骨髓もありますので骨だと思えるんですけど、問題はやはり負荷、ロードにはたしてあれは耐えられるのか、もし耐えられなければあれは骨じゃなしにお骨と同じでなんにもならない。まあすみません、そういうことになってしまう。

それからもう1つは、軟骨ですけれども、現在のあれではやはり軟骨は培養してもやはりまあ肺炎にかかって…までいかないんで、肺プロカーテージじゃないのかなあというふうに僕は思うのですけれども、大変今日は軟骨のほうにはあまり先生お触れにならなかったのですが、将来的にその辺のことについてちょっとアドバイスをいただければなあと思います。よろしくお願いします。

梅澤 まず骨の加重の問題です。骨の加重につきましては、硬さから言います、ものすごく硬く、絶対にすり鉢なんかで壊れるようなものではありません。研究員からRNAをとる時には、「骨専用の切り刻み機を購入してくれ」という指示がくるぐらいです。硬さは“加重を支える”という点からは骨だというふうに認識しております。

また、骨梁が明らかであり、形態学的には完全に骨です。脱灰しない限り標本はつくれません。そういう意味では問題がないというふうに理解しております。

つくった骨については、1年間は出来上がったままです。よく整形外科の先生から、「加重のないところでもこの骨は骨のままでいられるのかどうか？」と質問を受けます。そこで、腹腔と背中に置いてみました。1年間、全く大きさは変わらずに残っておりました。

軟骨に関しましては、加重の検討をしております。軟骨から軟骨をつくった場合は、正常の軟骨の40%位加重を支えるクッションとしての力しかないというふうな結論を受けております。触ってみると完全な軟骨なんですけど、中途半端な軟骨ということになります。

私たちの検査では、トリジンブルーで陽性になります。プロから言わせると不十分ということです。

あともう1つの問題点は、軟骨は一時的に出来ますが、そのまま放っておくと全部骨になりました。ですので、軟骨に関してはまだお渡しできるようなものはない

というふうにご理解ください。どうやったら軟骨のままですと止まるのが今現在の課題です。

司会 ほかにございますか。ああどうぞ。

磯 すみません、第三内科の磯と申します。どうもすばらしいご発表ありがとうございました。

われわれの教室でも、骨髓細胞を使ってASOの患者さんに細胞移植による血管再生療法を行っているんですけども、再生医療を考える上で、骨髓というのは非常に採取しやすいですし、デバイスとしては非常に扱いやすいとは思いますが、ただ、うちの科とかそんなんですけども、比較的高齢者が多く、合併症がある患者さんがいて、そういう患者さんですと、どうしても骨髓の機能とか細胞の増殖能は個々の症例によって変わってくると思うんです。そうなってくると効果もケース・バイ・ケースになってしまう。どうにかその骨髓の機能とかが画一化できるような方法がないかなあと思ったんですけども、今、先生のご発表でhTERTの遺伝子導入されたんですか。

梅澤 私はテロメラーゼを入れていますが、それは臨床に使うのは好ましくないと言われております。けれども寿命は延びます。

磯 そのほかの方法で、臨床に近い形で…。

梅澤 先生は骨髓のどっちですか、間葉系ですか、骨髓単核球？

磯 単核球のほうで…

梅澤 単核球のほうですか。単核球のほうはhTERTで、寿命を延ばすんです。ですが、それを臨床に使うのは不適切ですね。私たちはそういう遺伝子を使わないでなんとか細胞の寿命を延ばせる、癒し系の培地と呼んでいます。また、ノンストレス培地と呼んで、ストレスがかからないものを使い、Rb/p16のパスウェイが動かなくなるようにすると細胞は増殖します。その増殖するような培地をつくっています。

磯 なるべく早めにわれわれにも使えるようになるといいんですけど…

梅澤 はい、必要があればちょっと試していただいて結構です。ノンストレス培地という形で、最終的には企業の方に出してもらいたいと思っています。当然、ウシ血清も使いません。

磯 その培地で例えば骨髓の細胞を高齢者の方からとった場合に、増殖能を取り戻すだけでなく、さきほどの心筋でANPとか内分泌機能を取り戻したっていうのがありましたが、ああいうようにファンクショナルリバー

スみたいなことも…

梅澤 私たちの使っている患者さんは91歳の方です。

磯 ああそうですか。

梅澤 1歳の子どもと91歳の方では差がないと理解しております。年齢は増殖能に全く差がありません。一番増殖能があるのは臍帯血です。次が中絶胎児です。これらの実験は倫理委員会の承認を得ています。

磯 もう1点だけよろしいでしょうか。

最近、さきほどの五条先生と先生方のほうから報告があったと思うんですけど、間葉系細胞をFACSである程度分け心筋に注入して分化したというふうな報告を拝見させていただきました。より心筋のほうにコミットしやすいラインというか、表面抗原を持った間葉系細胞というのは、先生方で同定されているのでしょうか。

梅澤 心筋にだけいくというのではないですね。ただ、c-kit陽性、CD34陽性が一番幼弱であるというのが、私たちの主張です。米国ではキャサリン・ファーフェリーたちが両方ともネガティブだと指摘しています。だから全く言っていることが逆ですけども、僕らは僕らが正しいと思っています。

磯 わかりました。どうもありがとうございます。

司会 もう予定の時間を約8分過ぎてしまいました。

最後、私のほうからちょっと先生簡単な質問ですけどいいですか。

この幹細胞を分化してこういう移植していく時に、特定の臓器にのみ分化するような今、そういうようななん

か研究の、今の状況というのとはどんなふうになっているかっていう…

梅澤 それは、非常に重要な課題でございます。というのは心筋の中に骨をつくったらこの領域は終わるだろうと言われてます。心筋に移植する時は、心筋のほうにしかいかないという保証を要求されております。

今、50例ほど注入して、実際には出来ないんですけども、理論的には出来ます。そういうものの保証が実験的には統計的にゼロだということを言っているだけです。例えば心臓だったら心臓、腎臓だったら腎臓、肝臓だったら肝臓というような前駆体まで単離出来ているかというところ、そういう状況ではございません。今後の課題とさせていただきます。

司会 今の問題、皆様も必死になってやられていらっしゃると思うんですけども、良いところを見つけたらそれで大金持ちになれるかもしれんということでございます。

もういろいろ興味尽きないんですけども、時間が10分オーバーしておりますので、これで梅澤先生の特別講演を終わりたいと思います。

最後にちょっとお礼を申し上げます。昔の本学の病院のレリーフですけども、この特別講演を毎年お願いした先生方に差し上げています。(拍手)

梅澤 どうもいろいろありがとうございます。

司会 ではそれではこれで特別講演を終わります。

どうもありがとうございました。

骨髄間質細胞の可塑性

梅澤明弘, 竹田征治

幹細胞には、さまざまなレベルの幹細胞が存在する。全能性を有しており、すべての細胞に分化できる全能性幹細胞がある。一方、部分全能性を示す間葉系幹細胞が、ヒト骨髄から単離されている。間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、腱、骨格筋、骨髄間質といった間葉系組織を司る前駆細胞を生み出す。同時に、神経系への分化も明らかにされ、間葉系幹細胞は予想以上の可塑性を有していることが次々と明らかになってきている。間葉系幹細胞は、グローバルな「臓器」再構築または細胞治療の生体マイクロデバイスとして事実上の標準となる可能性が出てきた。

キーワード ● 間葉系幹細胞, 骨髄間質, 再生医療, 細胞移植, メチル化, 膜性骨化, 神経堤

はじめに

大学生に向けた「骨の発生」に関する練習問題の1つに「[神経堤は頭蓋骨や四肢骨の骨原基となる]という文章の内容が正しければ○を、誤りであれば×を解答しなさい。」という問いがある。私にとってはたいへん新鮮な問いであった。4年くらい前になると思うけれども、研究室の大学生が「骨髄間質細胞がニューロンになっている。」と報告に来た。その根拠が細胞から長い突起を有する細胞が出現しているというものであったので、「細胞が長い突起を有するようになったものであって神経分化といえるものではなく、形態学的に似てはいるものの神経分化とは異なると思います。元々、骨髄間質細胞は中胚葉由来であって、ニューロンは外胚葉なのであるからそのような胚葉を越えた分化は生じません。」と答えたのをよく覚えている。先ほどの練習問題の問いは「外胚葉→中胚葉」は真か否かであり、研究室の大学院生の問いは「中胚葉→外胚葉」である。片や発生過程の現象であり、もう片方は試験管内で分化誘導したときの現象であるけれど

も、いずれも胚葉を越えた分化過程を示している。

1 発生の面からみた骨形成を復習する¹⁾

この骨の発生に関する事実を明確にすることはきわめて大事なことである。骨は、大部分は中胚葉（沿軸中胚葉、側板中胚葉）に由来するが、頭部の一部の骨は外胚葉（神経堤）に由来する（図1）。すなわち、頭部の神経堤の細胞は、間葉に分化し、頭蓋骨の一部をつくる。間葉系細胞は、その起源が中胚葉であれ神経堤（外胚葉由来）であれ、胎仔の結合組織を形成し、軟骨芽細胞、骨芽細胞など多様な細胞に分化できる能力をもつ。頭蓋は、脳を包む神経頭蓋と顔面頭蓋に分けられる。神経頭蓋はさらに膜性神経頭蓋と軟骨性神経頭蓋の2つに分けられる。膜性神経頭蓋は頭蓋冠となる部分であり、これらの骨は神経堤より発生する。一方、下垂体より前方の軟骨は神経堤由来で、それより後方の軟骨は沿軸中胚葉より発生する。これらの軟骨が融合して軟骨内骨化を行い、頭蓋底ができる。顔面頭蓋の発生の面からみると、第1・2鰓弓*

Multipotency of marrow stroma-derived mesenchymal stem cells

Akihiro Umezawa/Yukiji Takeda : Department of Reproductive Biology and Pathology, National Research Institute for Child Health and Development (国立成育医療センター研究所生殖医療研究部)

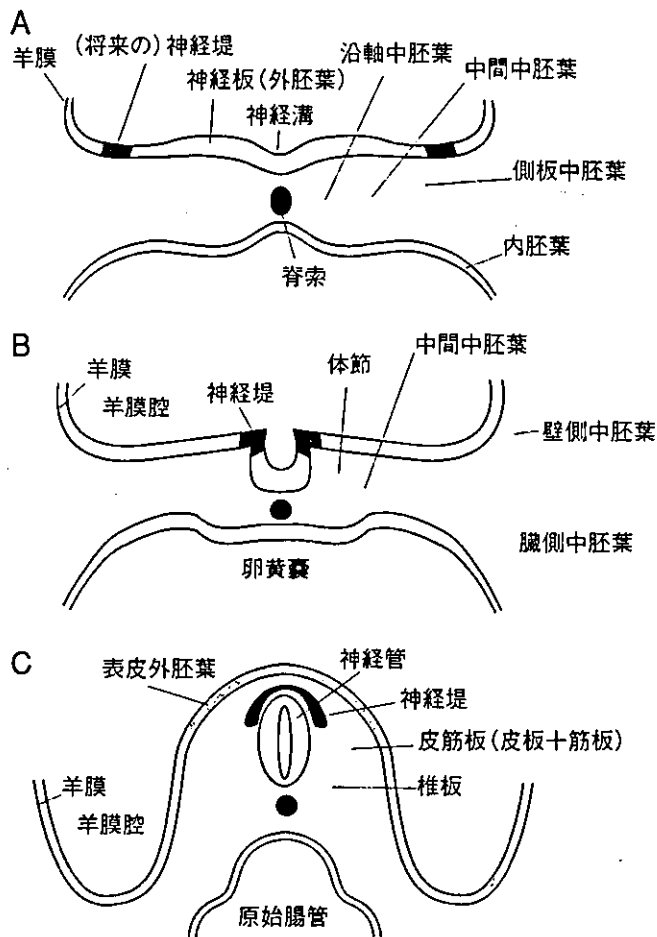


図1 神経堤（外胚葉）に由来する頭部の骨体節の分化を示し、外胚葉は青、中胚葉は黄緑、内胚葉は赤で塗られている。骨は大部分は沿軸中胚葉、側板中胚葉に由来する。しかし、頭部の骨は神経堤（外胚葉）に由来する。[A→C]は、発生が進む過程を示す

内部の間葉組織が顔面頭蓋の形成に大きく関与する。この鰓弓内部の間葉組織は神経堤由来、つまり外胚葉性であることが、大きな特徴である。通常の間葉組織は中胚葉性である。顔面頭蓋は、すべて神経堤由来の間葉細胞より発生する。膜性顔面頭蓋では、第1鰓弓の上顎突起内に間葉細胞が集積し、これが膜性骨化により上顎骨、頬骨、側頭骨鱗部を形成する。ただし側

※ 鰓弓、メッケル軟骨

脊索動物では、胎生初期に咽頭部の側壁に前後に並ぶ間葉の集塊を鰓弓 branchia という。各鰓弓は、その内部にそれぞれに固有の動脈、神経、骨格を含む。鰓弓は6対あり、番号で第一、第二、第三・・・とよぶ。第一は顎骨弓、第二は舌骨弓とも言われ、第一の骨格はメッケル軟骨である。

頭骨鱗部は神経頭蓋に分類される。また、第1鰓弓の下顎突起内部のメッケル軟骨周囲に間葉細胞が集積し、これが膜内骨化して下顎骨をつくるが、メッケル軟骨自体は退化する。

われわれは1980年代の後半に生体内で膜性骨化を示すことができる細胞を得て、足場の研究をはじめとした骨芽細胞の性格付けを行ってきた²⁾。その後、生体内において骨形成が可能な骨芽細胞が神経に分化転換するということを発表した³⁾。この報告は、私が知る限り3番目である。Sanberg博士のグループ⁴⁾、Prockop博士のグループ⁵⁾について発表された。現在ではヒトMAPC (multipotent adult progenitor cells) についても全く同様の発表があり⁶⁾、ヒト骨髄間質細胞においても森 泰昌が追試に成功している。

骨髄間質細胞をご存じでしょうか

'70年代の後半、造血臓器である骨髄において造血機能が円滑に行われるためには、造血環境を支持する造血微小環境の存在が必須であることが明らかにされ、はじめて骨髄間質が間を埋める細胞としてだけでなく機能的にも役に立っていることが示唆された⁷⁾。その後、この造血微小環境は試験管内の研究を中心として発展し、間質細胞のいくつもの不死化した細胞が得られた。それらは当初より、脂肪細胞への分化といった分化能は知られていたが、主に血液幹細胞と免疫細胞の支持能を有しているなどの造血への貢献で分類がなされ、より未分化血球細胞を維持する能力を有している間質細胞がもてはやされ、科学への貢献も多大なるものがあつた。

こんな中で、分化の研究は成体より単離した細胞の分化から、胚性幹 (ES) 細胞や胎児性癌 (EC) 細胞といった未分化多能性幹細胞にかかわる分化が注目を浴びた。これら未分化細胞は、生体内であらゆる細胞へ分化すると知られた。試験管内でもこの多分化能が次々と再現され、再生医療の供給源となる。一方、'90年頃に骨髄間質にも信じられない事実がみられた。造血微小環境の維持という高度の機能を有している骨髄

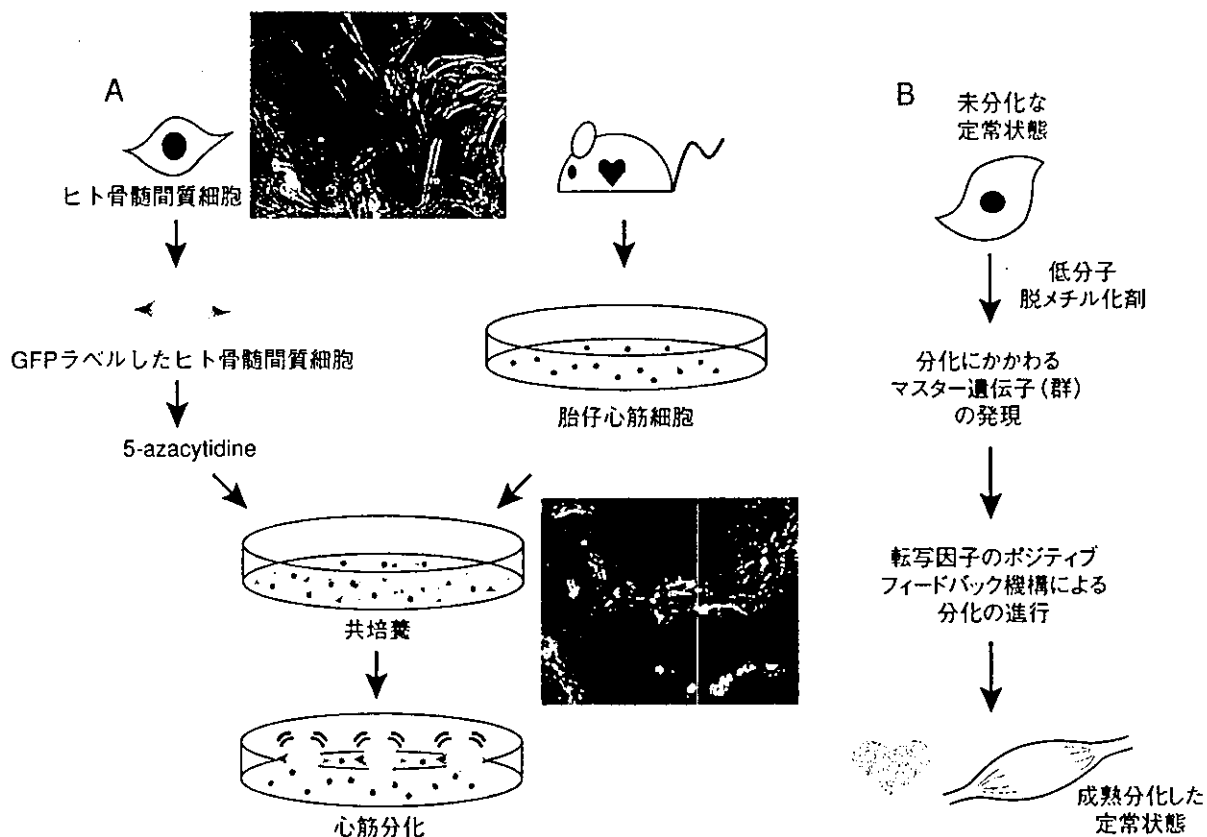


図2 ヒト骨髄間質細胞の心筋分化プロトコール

A) ヒト骨髄間質細胞を心筋細胞へ分化誘導するには、脱メチル化剤処理後に胎仔心筋細胞との共培養が必要となる。脱メチル化剤単独では心筋分化は全くみられず、胎仔心筋細胞との共培養単独ではごくわずかしかな分化しない。B) 未分化な定常状態で増殖する間質細胞が、成熟分化した定常状態になる過程のスキーム

間質細胞に、未分化細胞に特有な多分化能が存在するという事実がみられた⁸⁾。詳細には、成人から採取した骨髄間質細胞は間葉系由来であり、骨、軟骨、心筋、骨格筋、脂肪に分化し⁹⁾、心筋細胞に分化した際には拍動をはじめようになる^{10)~12)}。さらには胚葉を越えて、神経幹細胞のようにニューロンにまで分化することが明らかになってきた^{3)~5)}。

こうした研究成果は、必然的に骨髄間質細胞の再生医療への応用という、きわめて実証的な医療行為につながる動きがみられた⁸⁾。特にヒトへの応用という観点からすると、①骨髄細胞は、日常行われる骨髄穿刺液より容易に分離、培養することができるため、その利用が簡単であり、②自己細胞を用いることができるため、拒否反応を避けることができ、また倫理的問題が生じる余地も限られる。また、③前述のごとく、間質細胞の多分化能を利用すれば、心筋、骨、軟骨組織への広範な組織への利用への可能性が広がる。一言

付け加えれば、間葉系細胞であるがゆえに試験管内で増殖が盛んであり、大量の細胞を得ることが可能であり、遺伝子操作もしやすい。

多分化能を有する間質細胞を機能性細胞に転換するには、発生学の知識を利用している。さらに現実的なことを言えば、発生学の知識にしたがって、機能性細胞を作製するしか方法が思い付かない。分化した細胞核の初期化における実際の誘導方法を明らかにすることは、細胞移植を考えるうえで現実的な課題であり、発生学の知識からスタートする。このような現実には則した面が、細胞移植・再生の研究が錬金術的と指摘される所以であると考えられる。骨髄間質細胞の核を卵細胞に移植することで、クローン・ウシの作製に成功している¹³⁾。このような技術を利用して、ゲノムまたは核の「全能性」の分子機構を明らかにする必要があることは、間違いない。

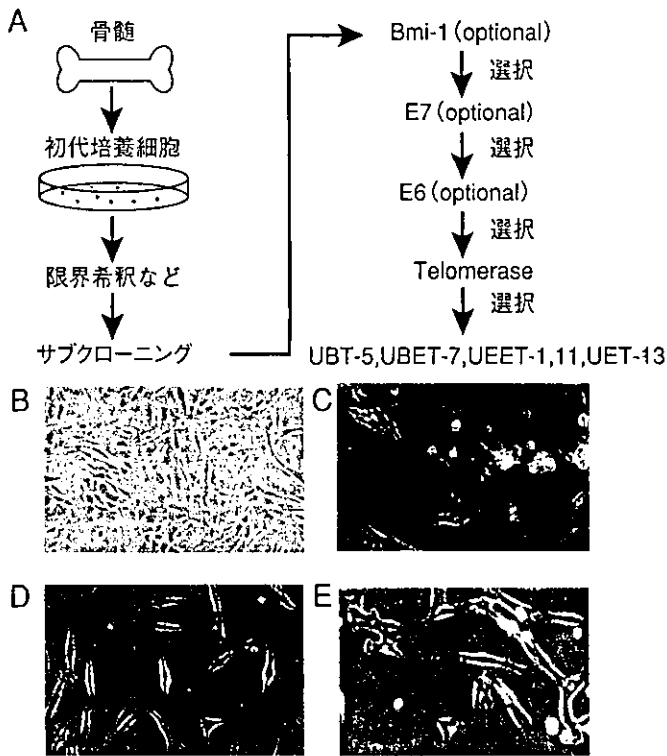


図3 ヒト骨髄間質細胞の寿命延長
 骨髄間質細胞に対して、Bmi-1、E7、E6、テロメラーゼのいずれかを導入することで寿命を延長できる (A)。遺伝子を導入されていない細胞 (H4-1) は、ある一定の回数分裂することで senescence に陥る (B, C)。一方、E7、E6、テロメラーゼを導入された細胞である UEET-1 (D) および Bmi-1、E6、テロメラーゼを導入された UBET-7 (E) は senescence に陥らず、寿命が延長される

③ DNA メチル化の改変による細胞の初期化と自己の喪失¹⁴⁾

間質細胞を用いて体を形成するすべての種類の細胞を生み出すという夢がある。しかし、現実的には間質細胞は部分全能性しか示さないことが多い。この部分全能性を示すためにも 5-azacytidine という低分子の脱メチル化剤を使わなくてはいけないのが現状である。例えば、ヒト骨髄間質細胞を拍動する心筋細胞に分化させるには、この 5-azacytidine は必須である。同時に、この低分子脱メチル化剤のみならず、分化誘導に際してはサイトカインも大事になってくる。どんなサイトカインをいれると目的の細胞に分化してくれるかがわかれば間質細胞の分化を制御できる。サイトカインだけでなく、細胞外物質でも分化をコントロ

ールすることが可能である。逆に分化させることができるサイトカインではなくて、特定の系統に分化するのを防いでくれる場合もサイトカインは有効ということになる。例えば、ヒト骨髄間質細胞を心筋細胞に分化誘導させる場合には、試験管内における心臓環境のシミュレーションが必要となってくる。胎仔心筋細胞の上にヒト骨髄間質細胞を共培養するだけのことであるけれども、たいへん有効である (図2)。脱メチル化剤と共培養系を組み合わせることによって、現在では約 2 割の細胞を心筋細胞へ分化させることが研究室の肥田直子によって可能となっている。

このプロトコールの特徴は、①脱メチル化剤による確率的な分化誘導ないしは分化にかかわる重要な遺伝子の発現とそのポジティブ・フィードバックによる分化誘導、②胎仔心筋というフィーダー細胞によるサイトカイン、マトリックス、膜上に存在する分子による骨髄間質細胞の誘導である。このフィーダー細胞の役割は、繰り返しになるけれどもサイトカインばかりでなく、マトリックス、膜上の分子が必要不可欠であることは間違いない。きわめて重要である、これらの分子の同定により、フィーダー細胞なしに化学的に規定された分子のみによる心筋細胞への分化を誘導することが可能となる。

④ 寿命を延長したヒト骨髄間質細胞においても可塑性は保たれた

ヒト骨髄間質細胞はマウス骨髄間質細胞と異なり不死化細胞の自然発生はまず認められない¹⁵⁾。造血幹細胞の複製に必要となる *Bmi-1* 遺伝子およびヒトパピローマウイルスの *E6* および *E7* 遺伝子を導入し、ヒト骨髄間質細胞の寿命を延長させる (図3)¹⁶⁾。これらの遺伝子では、細胞の分化能力は保持され、移植しても腫瘍を形成しない、すなわち形質転換はない。その細胞の1つである UBET7 は、脂肪、神経、骨格筋への分化能力を保持し細胞形態も比較的正常に近いものであった。さらに前述した方法で心筋細胞への分化誘導をなしえることが明らかになり、遺伝子導入という方法を用いてはいるものの分化能を保持したまま、細胞の寿命を延長させることが可能である。将来的には、

発現のデータベースを公開したうえで、寿命を延長させた骨髄間質細胞を公共の細胞バンク等に供与したい。

■ おわりに

世紀末と騒がれた2000年の暮れは遠い昔のように思える。その世紀末に、旧科学技術庁が「21世紀の展望とそのあり方」について、各分野の専門家に調査し、「こういうことが起こりうる」という視点にたった意見が発表された。その中の医療の改革に関する分野で「再生医療の普及」があった。「生体から分離した細胞をもとに、あらゆる機能性細胞を試験管内で大量に生産する技術が確立する。これにより、再生医療が一般化し、治療後の人体は、元々の身体部分、クローン臓器、人工組織で構成されるのが普通になるが、再生医療が脳にまで及ぶと本当の自分とは何なのかが問題となる。」とある。書いた本人はどのようなつもりかわからないが、最後のくだりは少しユーモアが感じられ、短い文章ながら的を得ている。もし、自分の骨髄間質細胞を用いて細胞転換してニューロンにし、脳内に移植することが可能となった場合においても脳の高次機能や意識についてまで再生するとは思えない。一方、神経以外の機能的細胞を間葉系幹細胞から作りだせることができれば、それは臓器固有の働きを補助することは十分可能である。

ヒト骨髄間質細胞が心筋細胞になることを発表する機会を与えてくれた医薬品機構に感謝します。また、その発表において多くの質疑が行われ、議論が深まった。時間のある方は、骨髄間質の心筋への分化アニメーションをウェブサイトでご覧いただければ嬉しいです (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/omezawa/HTML>)。

文献

- 1) <http://www.lib.kobe-u.ac.jp/products/anatomy/hassei/chap1.pdf>
- 2) Umezawa, A., Maruyama, T., Segawa, K., Shaddock, R. K., Waheed, A. & Hata, J.-I.: *J. Cell Physiol.*, 151: 197-205, 1992
- 3) Kohyama, J., Abe, H., Shimazaki, T., Koizumi, A., Nakashima, K., Gojo, S., Taga, T., Okano, H., Hata, J. & Umezawa, A.: *Differentiation (Special issue on stem cells)*, 68: 235-244, 2001
- 4) Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S.,

- Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R. & Sanberg, P. R.: *Exp. Neurology*, 164: 247-256, 2000
- 5) Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I. & Prockop, D. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282: 148-152, 2001
 - 6) Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., Verfaillie, C. M.: *Nature*, 418: 41-49, 2002
 - 7) 梅澤明弘: 骨髄間質細胞由来の間葉系幹細胞を用いた臓器再生・細胞移植およびその評価システムの確立 *実験医学*, 19: 151-158, 2001
 - 8) 桜田一洋, 梅澤明弘: 間葉系幹細胞と再生医学, わかる実験医学シリーズ「再生医学がわかる」(横田 崇/編), pp84-92, 羊土社, 2002
 - 9) 梅澤明弘: 骨髄間質による骨・軟骨形成, *実験医学増刊「再生医療へと動き始めた幹細胞研究の最先端」*, 21: 94-100, 2003
 - 10) Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A. & Ogawa, S.: *J. Clin. Invest.*, 103: 697-705, 1999
 - 11) Gojo, S., Gojo, N., Takeda, Y., Mori, T., Abe, H., Kyo, S., Hata, J. & Umezawa, A.: *Exp. Cell Res.*, 288: 35-50, 2003
 - 12) Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., Umezawa, A.: *J. Gene Med.*, in press (2003)
 - 13) Kato, Y., Imabayashi, H., Mori, M., Tani, T., Taniguchi, M., Umezawa, A. & Tsunoda, Y.: *Biology of Reproduction*, in press (2003)
 - 14) 梅澤明弘: 発生・細胞分化過程におけるクロマチン構造と遺伝子発現, *実験医学*, 20: 2206-2211, 2002
 - 15) 梅澤明弘: 細胞不死化・臓器再生・置換から寿命延長の可能性をさぐる, わかる実験医学シリーズ「老化研究が分かる」(井出利憲/編), pp114-120, 羊土社, 2002
 - 16) Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A. & Klingelutz, A. J.: *Nature*, 396: 84-88, 1998

参考図書

『幹細胞とクローン』(仲野 徹/著), 羊土社, 2002

Profile

筆頭著者プロフィール

梅澤明弘: 1985年慶應義塾大学医学部卒業, '89年慶應義塾大学医学部病理学教室助手, '91年米国カリフォルニア大学サンディエゴ校内科学教室, '92年米国バーナム研究所, '99年慶應義塾大学医学部助教授(病理学), 2002年国立成育医療センター研究所部長(生殖医療研究部), 骨髄間質細胞の分化の研究からはじまり, メチル化・クロマチン構造の改変の研究, そしてヒト胎児性癌細胞の多分化能に関する研究に進み, 研究テーマは一貫して「細胞の全能性と部分全能性」の問題に関することである, 間葉系細胞の予想以上の可塑性に驚いている, 生殖細胞, 体細胞を用いて, 生殖医療の世界に貢献したい。

E-mail: omezawa@1985.jukuin.keio.ac.jp

URL: <http://1985.jukuin.keio.ac.jp/omezawa/HTML>

間葉系幹細胞の基礎と臨床応用

梅澤明弘¹⁾, 五條理志²⁾

幹細胞にはさまざまなレベルの幹細胞が存在する。全能性を有しておりすべての細胞に分化できる全能性幹細胞がある。一方、部分全能性を示す間葉系幹細胞が、ヒト骨髄から単離されている。間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、腱、骨格筋、骨髄間質といった間葉系組織をつかさどる前駆細胞を生み出す。同時に神経系への分化も明らかにされ、間葉系幹細胞は予想以上の可塑性を有していることが次々と明らかになってきている。間葉系幹細胞は、グローバルな「臓器」再構築または細胞治療の生体マイクロデバイスとして事実上の標準となる可能性が出てきた。

Key words transdifferentiation, marrow stroma, bone marrow, mesenchymal stem cell, cell therapy

日本の製薬企業が、骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた細胞治療に関する多数の特許を有している米国オサイリス社の間葉系幹細胞技術の日本独占使用権を得たという発表があった。Web上の記事(時事新報)では、「米オサイリス社が、成体由来生理活性物質、遺伝子組換え技術の日本ケミカルリサーチ(JCR)とライセンス契約を締結したと発表し、オサイリスはJCRに造血系幹細胞移植による血液悪性腫瘍治療分野での間葉系幹細胞に関する技術の日本における独占使用権を供与する。契約額は公表されていないが、オサイリスは前払金を受領した。その後、所定の段階に達するごとに所定額の間金金を、提案製品の完全な商品化成功後はロイヤルティーを受け取る。オサイリスの技術では、これまで骨髄移植患者が経験してきた移植片対宿主病が少なくなるとさ

れている」と発表された。神戸におけるバイオビジネスフォーラムにおけるオサイリスのプレゼンテーションならびにその資料では、間葉系細胞は免疫拒絶を受けず、さらに免疫寛容を誘導するという。それらは論文上でも発表されていることではあるけれども、骨髄由来の間葉系細胞を研究対象としている者としては、真偽とは別に改めて大変感銘を受けた。

間葉系幹細胞を用いた、心疾患への細胞治療に関する議論

フランスのナントで今年の6月、第10回NATといわれる幹細胞に関する小さなミーティングに参加した。会場は1つしかなく、こぢんまりとした学会でシンポジウム形式をとっていた。そこで、MAPC (multipotent adult progenitor cell)¹⁾が神経の供給

Mesenchymal stem cells as a source of cell therapy

Akihiro Umezawa Satoshi Gojo

1) 国立成育医療センター研究所生殖医療研究部, 2) 埼玉医科大学総合医療センター心臓外科

うめざわ・あきひろ 1985年慶應義塾大学医学部卒業。89年慶應義塾大学医学部病理学教室助手, 91年米国カリフォルニア大学サンディエゴ校内科学教室, 92年米国バーナム研究所留学を経て, 99年慶應義塾大学医学部助教授(病理学), 2002年国立成育医療センター研究所部長(生殖医療研究部)。骨髄間質細胞の分化の研究から始まり, メチル化クロマチン構造の改変の研究, そしてヒト胎児性癌細胞の多分化能に関する研究に進み, 研究テーマは一貫して「細胞の全能性と部分全能性」の問題に関することである。間葉系細胞の予想以上の可塑性に驚いている。生殖細胞、体細胞を用いて、生殖医療の世界に貢献したい。

源として有効であり、ドーパミン、セロトニン、 γ -アミノ酪酸 (GABA) を産生するニューロンになることに矛盾しないとミネソタ大学のLow博士が発表した次の日には、心臓への細胞移植で知られるMenasché博士が控えめな声ではあるが、いくつかの細胞供給源について、明らかな非難を始めた。「MAPC! Nobody knows it.」前後の発言を含めたニュアンスを汲み入れれば「MAPCなんて有名だけど、誰もみたことないぞ」といったところであろうか。Menasché博士の主張は明確であった。「私は、骨格筋を心筋に移植しているけれども、骨格筋は骨格筋であり、心筋になることはない。幹細胞の可塑性なんていうけれども、分化転換なんていうけれども、その割合はとても小さく、臨床には使えない」「骨格筋を心臓に移植すると、骨格筋のままの形態を示し、その活動電位は骨格筋のそれである」と一つひとつ抑制のきいた口調で説明していった。その後も、「心臓移植で一番いいのは、胎児心筋に決まっている。でも（倫理的に）現実的ではなく、なんと胎児心筋細胞は、虚血に弱い」と続けていった。

「骨髄間質が心臓になるといってもごく一部ではないか^{2,3)}。一番いいところを見せているだけではないか」と話は続く。「分化誘導剤としての5-アザシチジン (5-azacytidine, 脱メチル化剤)⁴⁾？ 現実的である訳がない（処理することで癌化してしまうことだってあるじゃないか）」前日、私が、ヒト骨髄間質が5-アザシチジンを用いて心筋になることを示したばかりで、その会場でヒト骨髄間質細胞の動画まで見せて発表した東洋人のことは聴衆者の記憶に新しかったはずである。あまり、学会場で非難された経験のない私は、ドキドキすると同時に、ちゃんと聴いてくれたことをうれしく思った。「ヒト内皮細胞が、胎児心筋との共培養で心筋細胞になる」「ビンゴ！」と、声を大きくした後にこう続けた。「胎児組織を心筋細胞の支持細胞に使うなんて現実的でない。」胎児組織を支持細胞に使うと発表したのはSanberg博士と私だけである。繰り返しになるが、非難されて動揺すると同時に発表内容に対しコメントされたことがうれしかった。「心筋移植

の供給源は骨格筋しかない。移植したとしても骨格筋は骨格筋であり、心筋細胞との間にギャップ結合は生じなかった。移植した後に不整脈を生じたけれども、それが細胞移植によるものか、心筋梗塞によるものかどうかはわからない。おそらく細胞移植によるものだとは思いますが、わからない。」心筋への細胞移植により不整脈を生じたことは、遺伝子治療で白血病を生じたくらいに衝撃的であったが、細胞移植による不整脈を多少認めたくらいうえで、さらに骨格筋が、新規の収縮に対し有効であったことを動画で示した。このMenasché博士の魅力的でやや過激な発表に対し、フランスの実験心臓外科学者のTran博士が質問でいくつかの根拠のもとに反論したときには会場から拍手が出た。

間葉系細胞製剤

臨床の場に導入しようと進めている米国オサイリス社により、Allogen[®]（抗癌剤による骨髄抑制障害の治療薬として造血幹細胞と併用し投与する医薬品）、Osteocel[®]（骨の再生細胞治療薬）、Fabrogen[®]（Fabry病の遺伝子治療薬）といった3つの薬剤について細胞医薬としての可能性が検討されている（<http://www.osiristx.com>）。日本においても一部の医療施設にて骨・軟骨欠損の治療薬として骨髄間質細胞の検討が行われている。細胞移植における骨髄間質細胞のメリットとしては、骨髄穿刺で容易に細胞採取が可能であり培養法が比較的簡易であるということ、自家細胞として移植の際、拒絶反応が起こらないことがあげられる。

骨髄間質細胞を用いた細胞治療に関して、オサイリス社は38の特許を有していると発表している。そのオサイリス社が日本ケミカルリサーチと提携することである。これは、日本国内において骨髄間質細胞を利用した細胞治療や再生医療が仮に院内で順調にいった場合に、オサイリス社から知的財産権を取得した日本ケミカル社からロイヤルティーを主張されることも否定できない。骨髄間質細胞を用いた細胞治療により、疾患モデル動物を用いた研究結果から予想されるような素晴らしい結果が患者さ

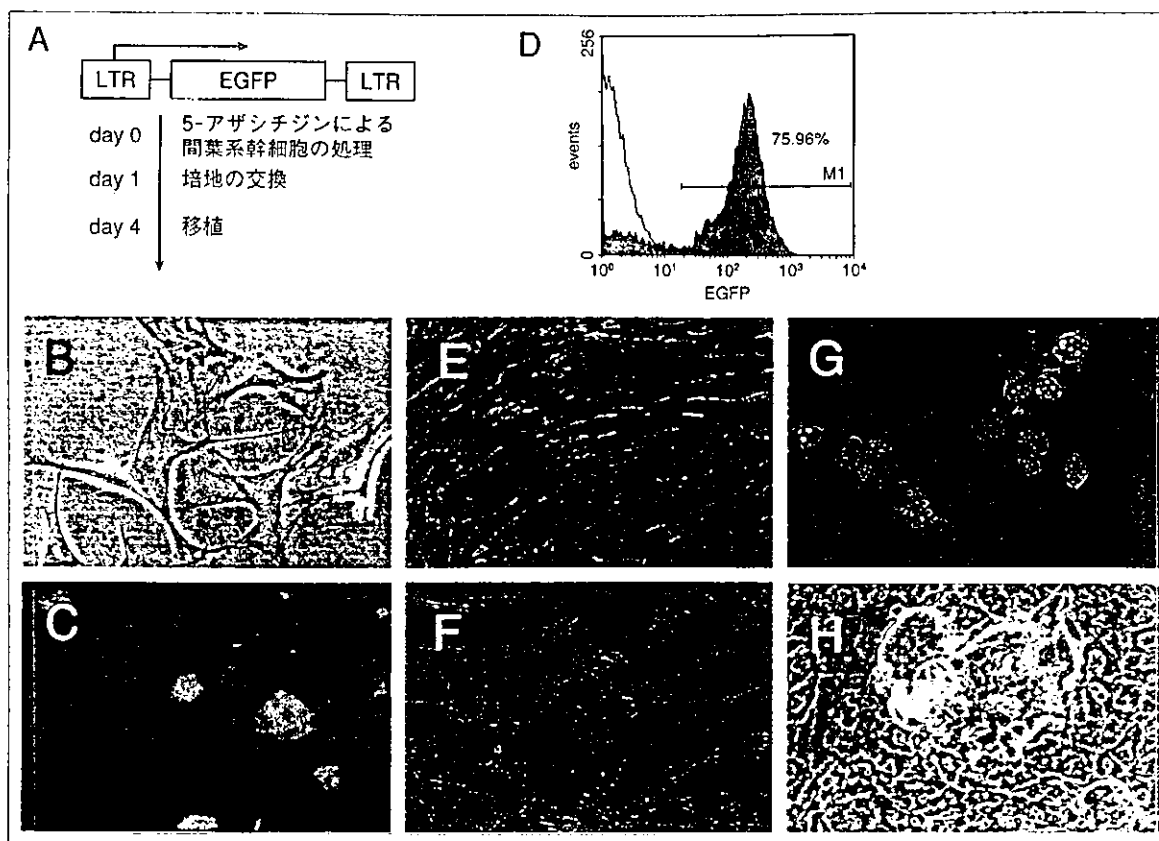


図1 多能性幹細胞としての骨髄由来の間葉系幹細胞

A: EGFPを有するレトロウイルスベクターと実験プロトコール。

LTR: long terminal repeat, EGFP: enhanced green fluorescent protein

B: 単離した間葉系幹細胞の位相差顕微鏡像。

C: 蛍光を発する間葉系幹細胞。このEGFPは核移行シグナルを有しているため、核も蛍光を発する。

D: 蛍光を発する間葉系細胞のフローサイトメトリー。

E: 心筋細胞に分化した間葉系幹細胞。分岐が認められる。

F: 骨格筋への分化。自動能を有しておらず、多核であり、拍動しない。

G: 脂肪細胞への分化。

H: 細胞から産生される骨結節。

んの疾病においても同様に得られ、社会的にも認知されるといふ最も素晴らしい展開になったときに、間葉系幹細胞技術の日本独占使用権をオサイリス社から得た企業がロイヤルティーを主張する可能性があるということである。

骨髄中に間葉系の幹細胞が存在することが明らかにされている(図1)^{5,6)}。このような多分化能を有する骨髄間質細胞は、年齢とともに減少してくる。オサイリス社は骨髄由来の単核細胞中に占める間葉系幹細胞の割合と年齢との関係に関するデータを発表した。新生児では骨髄単核細胞の1万分の1ぐらいに間葉系幹細胞が存在するが、10歳代の人では10万分の1に、35歳では25万分の1、50歳では40

万分の1、80歳では200万分の1に減少する。オサイリス社によると、年齢とともに数は変動するが性質には変化がないと報告されている。したがって、若い人のほうが取得は容易であると考えられる。この骨髄間質細胞に存在する幹細胞の同定は、その数が少ないこと、表面マーカーがいまだに明らかにされていないことから現在でも難しい。骨髄より間葉系の幹細胞を分離、精製してくるには、表面抗原とそれに対する抗体を準備する必要がある。さらに、抗体によって認識される抗原の有無によって規定された細胞系列をすべて明らかにすることは、今までにも多くの報告があるが、さらなる研究対象と考えられる。

「間葉系幹細胞を用いた心疾患における細胞移植」に関する倫理審査が日本国内において開始された

今年の9月末にWeb上で共同通信からの記事が目についた。記事は、間葉系幹細胞を分離し心臓に投与する治療を開始したいとする国立循環器病センターに関するものであった。直接、発表を聞いたわけではないので、共同通信の記事を簡潔にニュアンスを変えずにまとめてみる。間葉系幹細胞を心臓病患者の骨髄から分離し、患部に移植して心筋を再生させる新しい治療法を、永谷憲歳再生医療部室長らが開発、9月30日までに内部倫理委員会に申請した。幹細胞を含む骨髄の細胞をまとめて患部に投与する治療は試みられていたが、間葉系幹細胞だけを分離することで心筋梗塞や拡張型心筋症などをより効率よく治療することが期待できる。治療は、患者の腰から骨髄液10 mlを採取し、患者の血液中で約1か月間培養しながら幹細胞だけを分離し、血管から心臓の患部に投与する。マウスの研究では間葉系幹細胞は心筋に分化する(図2)ことが知られており、臨床試験に向けてラットとブタを使った実験を行い、それぞれ心筋への再生を明らかにした。筆者も、永谷博士の発表を8月中旬に聞き、大動物を用いた心疾患モデルで治療に成功していることに強く感銘を受けたことを思い出した。

その発表に前後して、大阪大学から筋肉の細胞を用いた心筋の細胞治療に関する倫理審査が内部倫理委員会に申請されたことを、やはり共同通信からのWeb上の記事で見た。大阪大の研究グループは、心筋梗塞の患者に患者自身の筋肉と骨髄の細胞をそのまま移植し、傷んだ心臓組織を再生する治療の臨床応用を、9月2日までに学内の医学倫理委員会に申請したとのことである。筋肉の細胞の心臓への移植は欧米ではMenasché博士をはじめ、成功例が報告されている。対象は人工心臓の装着が必要な重度の心筋梗塞患者であり、患者の太股から骨格筋の一部を採取し、筋肉のもとになる細胞を抽出、培養する。これをさまざまな組織に分化、成長する能力を秘め

た骨髄の幹細胞とともに患者の心臓に移植する。「筋肉のもとになる細胞は心筋に成長し、骨髄細胞は血管を新生するとみられている」と記事では記載されていたが、先ほど述べたフランスのナントではMenasché博士は骨格筋が心筋に分化転換することはないと発表している。倫理委員会では「心筋の中に骨格筋を作ると、不整脈を起こさないか」などの慎重な意見も出て結論は見送られ、継続審議となったとのことである。Menasché博士の発表でも3名の患者さんが不整脈を起こしたとされる。

さらに、間葉系細胞ではないが血管を作るもとになる血液中の幹細胞を体内で増やして取り出し、心筋梗塞などで血管が詰まった患者に移植して血管を再生させる治療の実施計画を、先端医療センターの浅原孝之博士が9月8日、明らかにした。これも共同通信のWeb上の記事である。同センターと東海大、米タフツ大の3か所で治療を始めたいとの考えを示した。浅原博士は、骨髄でできた血管幹細胞が血液に含まれているのを見つけ1997年に発表した⁷⁾。1%以下と微量であるが、成長因子を投与すると増えることも突き止めた。その後、そうした方法で増やした幹細胞を血管が詰まった部分に移植すると、心筋梗塞が改善することをブタを使った実験で確認した。血管再生には骨髄細胞や骨髄由来間葉系細胞を使う方法(図3)もあるが、骨や脂肪、筋肉などのもとになる細胞が含まれるため危険も考えられるので、血管の幹細胞だけを使った治療はより安全であるという考え方である。

先天性代謝性疾患に対する骨髄間葉系細胞の有用性

間葉系幹細胞を用いた細胞治療は、心疾患だけでなく、代謝性疾患もその対象となる(表1)。間葉系細胞の遺伝病であり、骨芽細胞においてコラーゲンI型の産生を認めないことにより骨の変形を伴う骨形成不全症の患者に間葉系幹細胞の細胞移植が試みられている⁸⁾。細胞移植は、allogenic combinationで行われた。3例全例での患者いずれも、間葉系幹細胞が骨に生着し、骨形成を促進し、成功例と

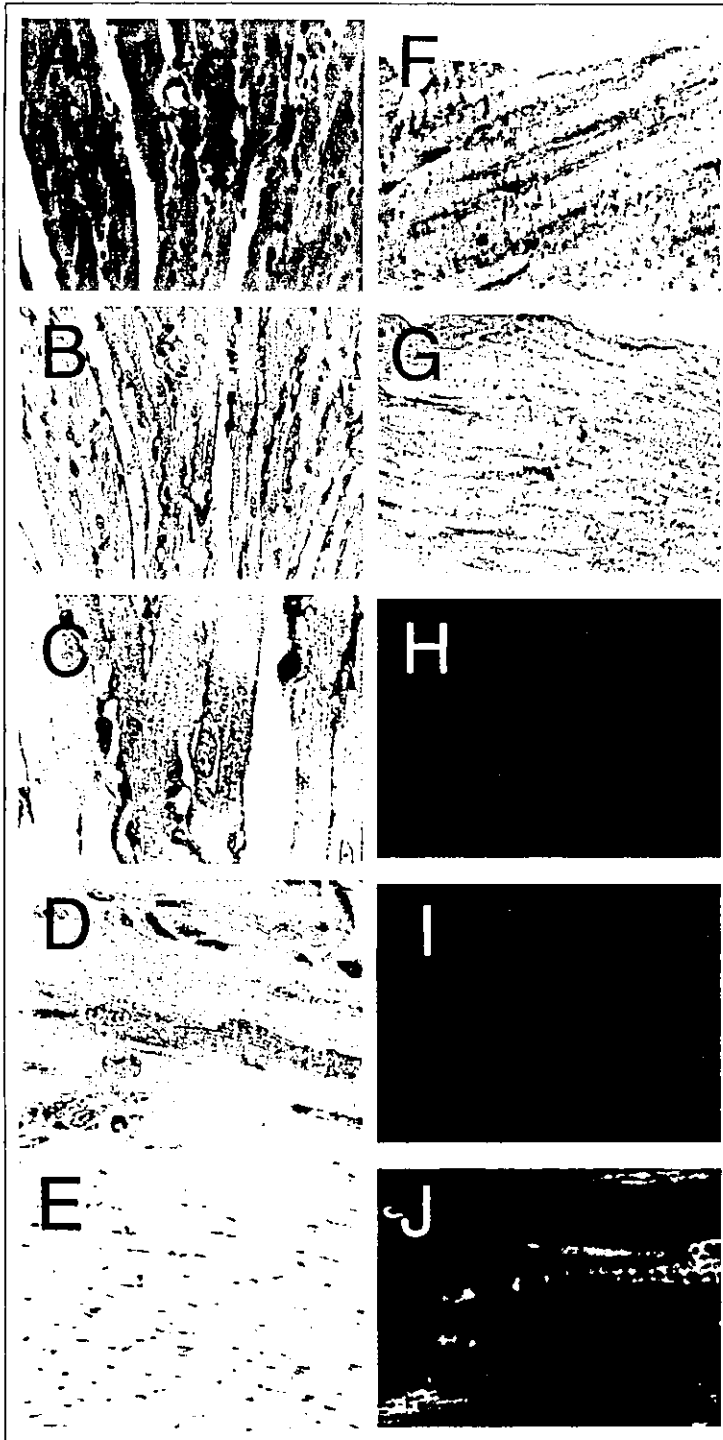


図2 マウスにおける間葉系幹細胞の心筋 (A～E) ならびに骨格筋 (F～J) への移植

A: ヘマトキシリン・エオシン染色。
 B～E: EGFP に対する免疫組織化学的染色 (B: 低倍, C: 高倍)。EGFP 陽性細胞に分岐が認められる (B, C)。骨格筋とは異なり、核が細胞質の中央に位置する (D)。一次抗体で処理していない陰性対照 (E)。
 F, G: 骨格筋に移植した骨髄間質細胞に対し、EGFP 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。アルカリホスファターゼにより、赤く発色している (F)。一次抗体で処理していない陰性対照 (G)。
 H～J: 移植した細胞は EGFP により蛍光を発する (H)。デスミン (I: 赤色) に対する免疫組織化学的染色を施行すると、移植した細胞はデスミン陽性であることがわかる [J: merge (画像を重ね合わせること)、黄色]。

して報告されている。癌の再発例や抗癌剤の大量投与例に対しても間葉系幹細胞が投与され、細胞治療への可能性が広がっている⁹⁾。まったく同様に、軟骨発育不全患者でも間葉系細胞が治療として役立つともいわれており、難治性骨折、軟骨欠損、腱修復への治療の可能性への希望が膨らんでいる¹⁰⁾。局所に細胞を注射するにせよ、静脈注射するにしろ、

自己 (autologous) の細胞を利用できる意味でも骨髄間質由来の間葉系幹細胞は、細胞治療における事実上の標準となると考える。

間葉系細胞に障害を伴う疾患である骨形成不全症および軟骨形成不全症では、同種由来の細胞を用いる。Fabry 病、血友病といった遺伝病では、細胞を欠損遺伝子の運び屋として利用することも可能であ

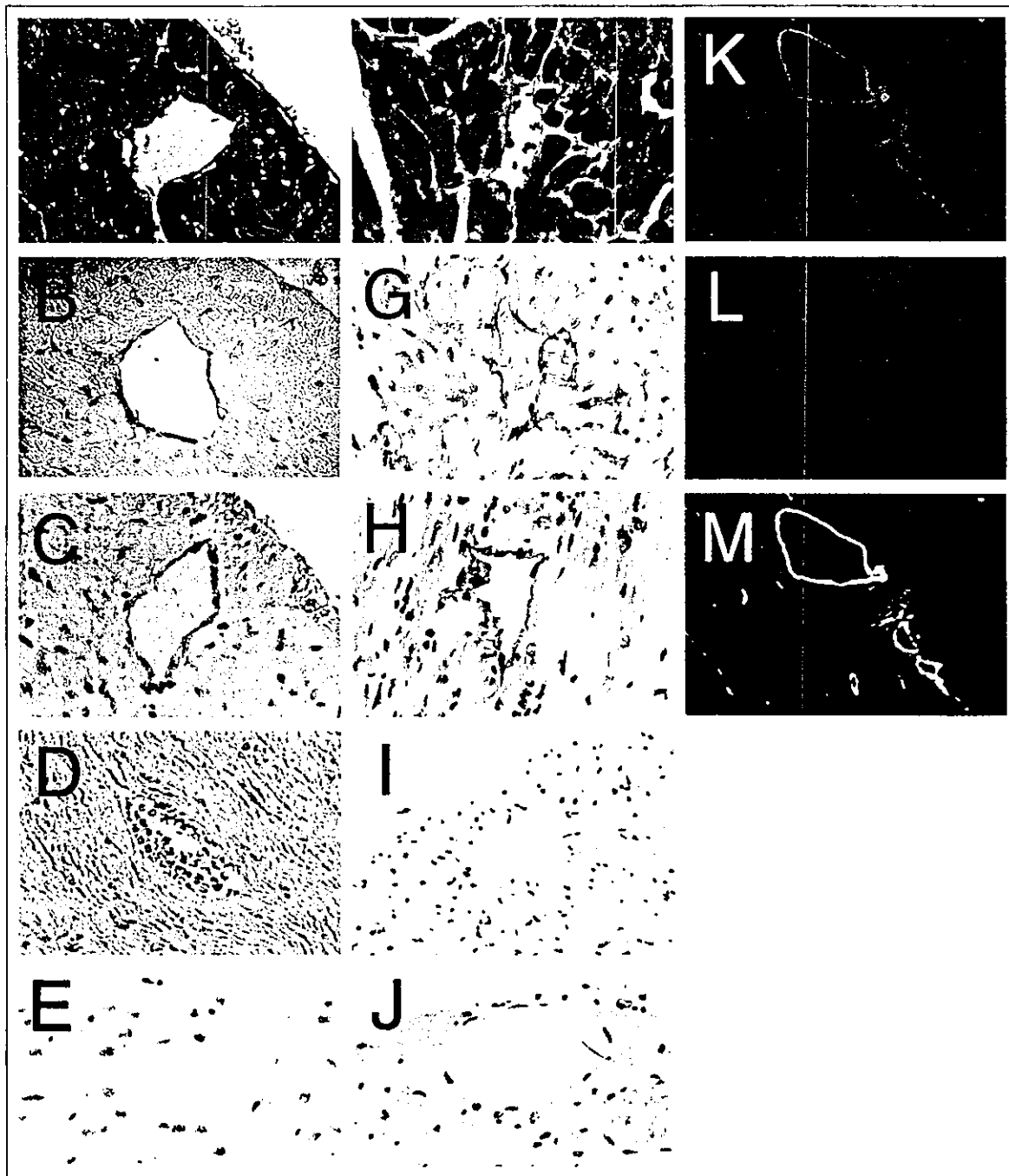


図3 骨髄間質細胞による血管形成

骨髄間質細胞移植1か月後 (A~E) と3か月後 (F~J) における血管形成. BとGはEGFPに対する免疫組織化学的染色であり, 陽性となる移植された細胞が血管腔を作り, これらは血管内皮のマーカであるCD31陽性である (C, H). D, E, I, JはそれぞれB, C, G, Hを一次抗体で処理していない陰性対照. さらに移植した細胞 (K: EGFPによる蛍光) は, CD31 (L: 赤) 陽性となる. merge (M) では, 血管内皮に分化した細胞は黄色となり, 分化していない細胞は緑 (蛍光色) のままである. 血管腔内には赤血球がみられ, なんらかの機序で宿主の血管と吻合し, 血液が流れ, 組織に栄養を供給し始めたと考えられる.

るし, また同種由来の細胞を導入することにより欠損酵素自体の補充ができる. 先天性代謝疾患では異染性白質萎縮症 (metachromatic leukodystrophy) やムコ多糖症に対しても, 間葉系細胞が産生する酵

素量は少ないものの供給源の一つとなる. 移植片対宿主病 (graft-versus-host disease ; GVHD) の予防および臓器移植での免疫寛容を誘導することも, 理論的に可能であることが指摘されている.

表1 骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた細胞治療の対象疾患

造血幹細胞移植の増強
自己 (リンパ腫, 骨髄腫, 白血病に対する移植)
同種 (臍帯血, unrelated, haploidentical)
<i>in utero</i>
間葉系細胞に障害を伴う疾患
骨形成不全症
軟骨形成不全症
遺伝病 (欠損遺伝子の運び屋として)
Fabry病
異染性白質萎縮症
血友病
ムコ多糖症
筋ジストロフィー症
心疾患
虚血性心疾患
心筋症
脳梗塞
糖尿病 (?)
パーキンソン病 (?)
免疫寛容の誘導
GVHD (graft-versus-host disease) 予防
臓器移植での免疫寛容の誘導

細胞治療に関する問題点

細胞治療が有効であると示された代表は、骨髄移植であり、表皮細胞の移植である。将来的には、糖尿病に対して膵Langerhans氏島の移植、パーキンソン病に対してドーパミン産生細胞の移植が有望と思われる。細胞移植後における移植された細胞の癌化についても議論が必要となる。齧歯類の細胞は容易に形質転換し不死化するが、ヒトの細胞はほとんど形質転換することはない¹¹⁾。胚性幹細胞が癌化する危険性が存在するということは繰り返し指摘されていたのとは対照的に、体性幹細胞は移植後に癌化する可能性は乏しいと考えられる。より正確に言えば、患者自身の細胞と移植した細胞の腫瘍化の可能性は同一である、ということになる。一方、移植する細胞に遺伝子を導入した場合には、その遺伝子が導入されるゲノムの部位がランダムであるために、癌化の可能性は否定できない。筆者らも、ヒト骨髄間質の寿命を延長するために、Bmi-1, E6, E7, TERTを導入している¹²⁾。これらの遺伝子を導入す

ることにより、形質転換を生じるという結果は*in vitro*, *in vivo*のいずれにおいても得られていないが、移植された細胞が将来的に腫瘍化する可能性はある。細胞を移植することによる利益と不利益のバランスをよく理解することが肝要である。

移植する場合の生着の有無に関する疑問も残る。生着したかどうかを明確にするには、患者自身の細胞と移植された細胞を区別する必要がある。ヒトの細胞移植では、それらの細胞を区別するために蛍光分子であるGFP (green fluorescent protein) や大腸菌由来の酵素であるβ-ガラクトシダーゼといったマーカーを入れることが禁じられていることは、当然と思われる。移植する細胞がY染色体を有し、患者が女性の場合のみ、検証が可能であるというのが結論であろう。

ナントにおけるミーティングの話に戻る。最初の演者であるフロリダのSanberg博士は、ヒト胎児の神経移植について言及し、シクロスポリンを6か月間投与することで、ドーパミン産生細胞が生き続けることを述べた。また、骨髄間質細胞および精巣のSertoli細胞が神経細胞の供給源になりうること、さらには精巣由来の胎児性癌細胞であるNT2までもが細胞のよい供給源になると指摘した。胎児の神経細胞を支持細胞にすることによって、生体内の脳と同じ環境を作り出す試験管内シミュレーションによる細胞転換の例を示した。

そのミーティングの2番目の演者であるミネソタ大学のLow博士は、MAPCが神経の供給源として有効であり、ドーパミン、セロトニン、GABAを産生するニューロンになることと矛盾しない結果を得たと発表した。さらに、MAPCが脳梗塞、パーキンソン病、リソソーム病の神経症状に効果があるとLow博士は指摘する。そもそも骨髄由来の間葉系細胞が神経に分化すると発表したのは前述のSanberg博士が最初であり¹³⁾、Prockop博士が続く¹⁴⁾。骨髄間質が神経になるという発表は、神山の論文が、私の知る限り3番目である¹⁵⁾。現在では、ヒト間葉系細胞さらにMAPSについても同様の発表があり¹⁾、

筆者らのグループでも森泰昌がヒト骨髄間質細胞を用いることで追試に成功している。

骨髄間質細胞とMAPCが同一種類の細胞か異なる細胞かについての議論がある。会場で、筆者がMAPCを扱い神経系への細胞転換に成功したミネソタ大学のLow博士にこの議論について質問を行ったところ、明確な返事があった。「Verfaillie博士のMAPCとProckop博士が発表した骨髄間質細胞について、キーストンで比較が詳細にされた。両方とも神経の分化を生じるけれどもその表面マーカーやその他の情報からもまったく異なる細胞と思われる」キーストンにおける詳細な議論はわからないが、骨髄間質細胞とMAPCは異なる細胞である。位相差顕微鏡下における細胞の大きさからして異なっている。筆者らが培養している骨髄間質細胞はMAPCと比較し、大型であると理解している。もっとも、東

京での招待講演において、Prockop博士は神経に分化しうる骨髄間質細胞は小型であり、細胞密度を低くすることで寿命が延長され、神経分化能を保持すると述べた。さまざまな細胞の供給源に関して議論がつきないように思える。間葉系細胞のなかでも、その是非が問われ、本文中にも述べたように現実に医療の現場で試される日が近づいていることは事実であり、最終的にはその優劣がはっきりすることになる。

謝辞 第10回NATにおいて、ヒト骨髄間質細胞が心筋細胞になることを発表する機会を与えてくれた医薬品機構に感謝します。また、その発表において多くの質疑が行われ、議論が深まりました。骨髄間質の心筋への分化アニメーションをWebサイトでご覧下さい (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/HTML>)。

文献

- 1) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-9 (2002)
- 2) 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)
- 3) Gojo S, Gojo N, Takeda Y et al. *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **288**, 35-50 (2003)
- 4) 梅澤明弘. 幹細胞とエピジェネティクス. *Mol Med* **39**, 816-22 (2002)
- 5) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-7 (1999)
- 6) Umezawa A, Maruyama T, Segawa K et al. Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J Cell Physiol* **151**, 197-205 (1992)
- 7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-7 (1997)
- 8) 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**, 309-13 (1999)
- 9) Gerson SL. Mesenchymal stem cells : No longer second class marrow citizens. *Nat Med* **5**, 262-4 (1999)
- 10) Deans RJ & Moseley AB. Mesenchymal stem cells ; Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **28**, 875-84 (2000)
- 11) Kiyono T, Foster SA, Koop JI et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**, 84-8 (1998)
- 12) Imabayashi H, Mori T, Gojo S et al. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res* **288**, 51-9 (2003)
- 13) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F et al. Adult bone marrow stromal cells differenti-

骨芽細胞から神経細胞への分化

Brain from Bone

Keywords

骨芽細胞
細胞転換
骨髄間質
骨形成因子
5-azacytidine

梅澤 明弘

国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部

Summary

Bone marrow stromal cells are able to differentiate into adipogenic, chondrogenic, myogenic, osteogenic and cardiomyogenic lineages, all of which are limited to mesoderm-derived origin. Neural differentiation of marrow stromal cells is induced by 5-azaC, a demethylating agent, capable of leading *de novo* gene expression. Neurons can also be generated from marrow-derived stromal cells by specific inducers, coating and cluster formation. Noggin, a BMP2/4 antagonist, is used as an inducer for generation of neurons. The neurons generated from marrow stroma formed neurites, express neuron-specific markers and genes, and start to respond to depolarizing stimuli as functional mature neurons. Among stromal cells, isolated mature osteoblasts which have strong *in vivo* osteogenic activity can be efficiently converted into functional neurons. Marrow stroma is therefore a potential source of cells for neural cell transplantation.

はじめに

9月中旬とはいえ、まだ暑い中、東京ドームホテルで二つの発表があった(2003年)。一つは、「骨軟骨の分化・老化と再生」、もう一つは、「小胞体ストレスと糖尿病」というタイトルの講演であった。いずれも大変興味深い内容であったが、一人目の発表者が話す骨形成に関する序論に驚いた。「神経堤(neural crest)から、膜性骨化(membranous ossification)よりなる頭蓋骨が形成される」という教科書から抜粋したと思われる図を示し、丁寧に骨形成における発生を説明してくれた。発表の趣旨とは異なるかと思ったが質問させていただき、神経堤は外胚葉であり、頭蓋骨は中胚葉であるから、外胚葉から中胚葉ができるのかと考えられるのかと問うた。「外胚葉である神経堤は、膜性骨化を示す頭蓋骨の原基となる」という発生学の知識からすると、

Umezawa, Akihiro

Department of Reproductive Biology and Pathology, National Research Institute for Child Health and Development

E-mail : umezawa@1985.jukuin.keio.ac.jp

「膜性骨化を生じる，中胚葉由来の骨芽細胞は，神経細胞に分化する」という私たちの実験結果は驚くべきことではないかという疑問である。

1999年に，神山淳氏が「骨髄間質細胞からニューロンが形成される」と

いう結果を得たときには，大変驚いた。形態，遺伝子発現，脱分極剤による反応，免疫組織学的解析のいずれの解析においても，中胚葉由来の骨髄間質細胞が外胚葉由来の神経細胞に分化していることが示され，ほぼ確実な事実と

なった時点においても共同研究者ですら疑っていたふしがある。自分自身も最初は信じておらず，突起を伸ばしただけであり，神経への分化を示しているわけではないと思っていた。中胚葉由来の細胞が心筋などの中胚葉に分化することは考えやすいが，外胚葉由来の細胞へ分化することは考えにくい。結果論であるが，神経系への分化を顕著に示す骨芽細胞は，軟骨性骨化(chondral ossification)を生じず，膜性骨化を生体内で生じる。発生における，「神経堤から，膜性骨化よりなる頭蓋骨が形成される」過程の全く逆であり，神経細胞への分化を示すのは膜性骨化を生じる細胞であった。

発生の面からみた骨形成を復習する¹⁾

この，骨の発生に関する事実を明確にすることは極めて大事なことである。骨は，大部分は中胚葉(沿軸中胚葉，側板中胚葉)に由来するが，頭部の一部の骨は外胚葉(神経堤)に由来する(図1)。すなわち，頭部の神経堤の細胞は，間葉に分化し，頭蓋骨の一部を作る。間葉細胞は，その起源が中胚葉であれ神経堤(外胚葉由来)であれ，胎児の疎性結合組織を形成し，軟骨芽細胞，骨芽細胞など多様な細胞に分化できる能力をもつ。

骨の形成には，二種類ある。膜性骨化による膜性骨(結合組織性骨)(membrane bone)と，軟骨内骨化(endochondral ossification)による置換骨(cartilage bone)である(図2)。

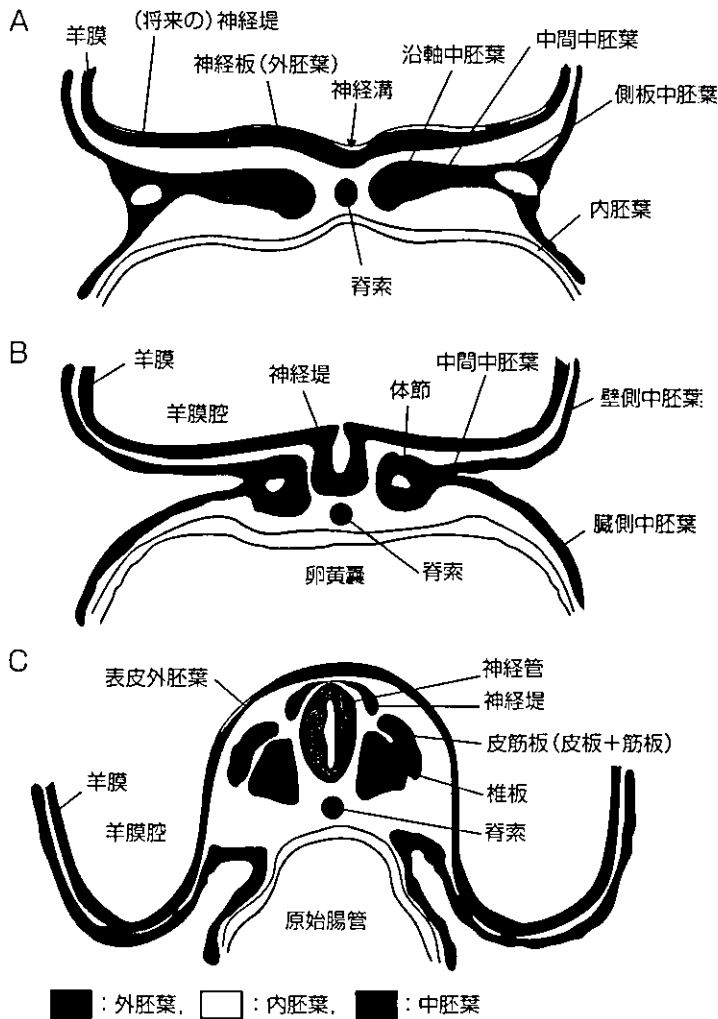


図1 体節の分化

膜性骨は、皮膚の直下に結合組織ができる。この組織の中心部に間葉細胞由来の骨芽細胞が出現し、膠原線維と骨基質を分泌する。これが骨化中心となり、周囲に向かって放射状に骨化が進む。このように結合組織が直接、骨に転換するのが膜性骨の特徴である。例としては、頭蓋冠を形成する頭頂骨、前頭骨などの扁平骨があげられる。一方、置換骨は、間葉細胞由来の軟骨芽細胞が、まず骨の原型となる軟骨の小塊を作る。この軟骨を包む膜より骨芽細胞が現れ、軟骨の幹部(将来の骨幹)に骨化が起こる。すると、将来の骨幹中心部の軟骨は変性し、同時に血管が侵入し、一次骨髓あるいは原始骨髓(primary bone marrow)が形成される。血管とともに破骨細胞や大食細胞が原始髓腔に侵入し、変性中の軟骨組織を貪食して大きな空間を作る(一次髓腔: primary marrow cavity)。さらに骨芽細胞が侵入し、骨質を作る。このように、まず軟骨の原基ができた後にそれが骨に入れ替わるのが置換骨の特徴であり、例として四肢の長管骨があげられる。

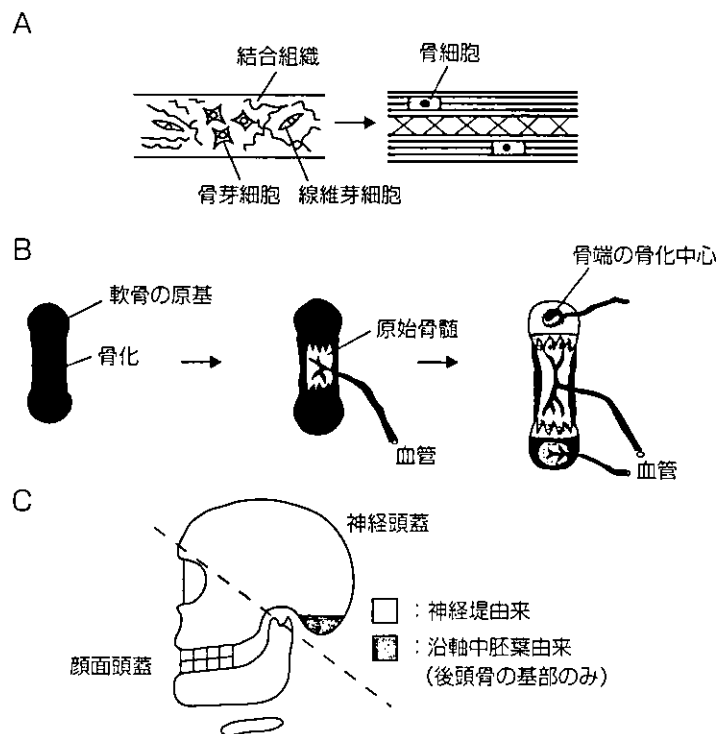
頭蓋骨の発生

頭蓋(skull)は、脳を包む神経頭蓋(neurocranium)と、顔面頭蓋(viscerocranium)(あるいは内臓頭蓋)に分けられる(図2)。神経頭蓋はさらに膜性神経頭蓋(membranous neurocranium)と軟骨性神経頭蓋(cartilaginous neurocranium)の二つに分けられる。

膜性神経頭蓋は頭蓋の天井(頭蓋冠)となる部分(将来の前頭骨、頭頂骨、後頭鱗)であり、これらの骨は神経堤より発生する。一方、軟骨性神経頭蓋は頭蓋底となる部分であり、いくつかの分離した軟骨組織が頭蓋底に前後に配列する。下垂体より前方の軟骨は神経堤由来で、それより後方の軟骨は沿軸中胚葉より発生する。これらの軟骨が融合して軟骨内骨化を行い、頭蓋底ができる。顔面頭蓋の発生(図3)の面からみると、第1・2咽頭弓(鰓弓

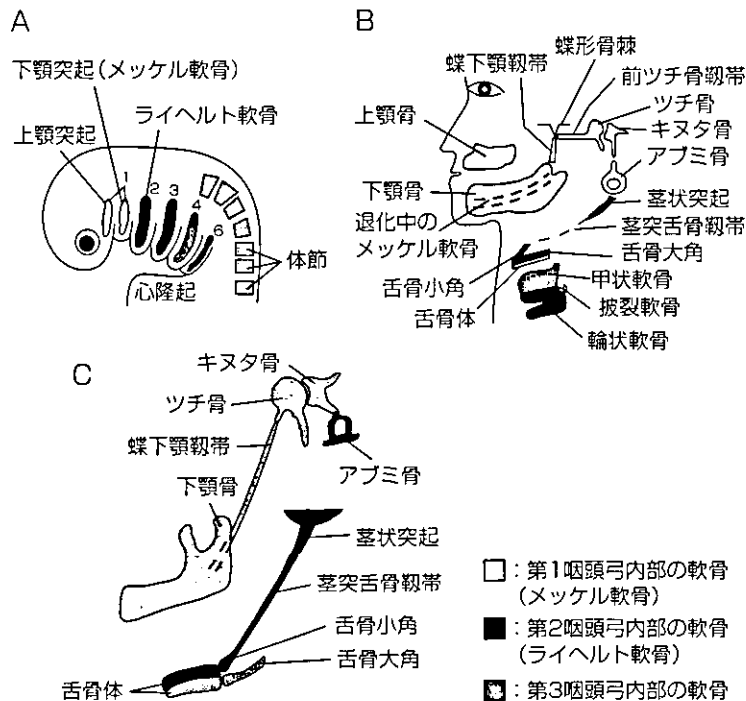
(エラ, branchia))内部の間葉組織が顔面頭蓋の形成に大きく関与する。この咽頭弓内部の間葉組織は神経堤由来つまり外胚葉性であることが、大きな特徴である。通常の間葉組織は中胚葉性である。顔面頭蓋は、すべて神経堤由来の間葉細胞より発生する。

膜性顔面頭蓋(membranous viscerocranium)では、第1咽頭弓の上顎突起内に間葉細胞が集積し、これが膜性骨化により上顎骨、頬骨、側頭骨鱗部を形成する。ただし側頭骨鱗部は神経



A: 膜性骨, B: 置換骨, C: 顔面頭蓋と神経頭蓋の発生

図2 膜性骨と置換骨



A : 脊索動物では、胎生初期に咽頭部の側壁に前後に並ぶ間葉の集塊を咽頭弓(鰓弓(エラ, branchia))という。各咽頭弓は、その内部に、それぞれ固有の動脈、神経、骨格を含む。咽頭弓は6対あり、番号で第1、第2、第3…と呼ぶ。第1は顎骨弓、第2は舌骨弓(ライヘルト軟骨)ともいわれ、第1の骨格はメッケル軟骨である。図中1~6; 第1~第6咽頭弓。第5咽頭弓は退化。B : 成体における咽頭弓由来の組織。C : 咽頭弓に由来する骨と靭帯

図3 神経堤由来の顔面頭蓋に関する発生

頭蓋に分類される。また、第1咽頭弓の下顎突起内部のメッケル軟骨(Meckel's cartilage)周囲に間葉細胞が集積し、これが膜性骨化して下顎骨を作るが、メッケル軟骨自体は退化する。軟骨性顔面頭蓋(cartilaginous viscerocranium)では、第1~6咽頭弓内部の間葉組織が凝集して軟骨となる。神経堤細胞は、脊椎動物の胚発生において、神経板の陥入過程でその両縁に生

ずる外胚葉由来の細胞集団で、自己再生能と多分化能を有する幹細胞としての性質を備えている。神経堤細胞の最も際立った特徴は、遊走によって胚に広く分布し、神経細胞やグリア細胞、皮膚色素細胞、副腎髄質細胞、顎顔面の間葉細胞(骨・軟骨など)、血管平滑筋細胞など実に多彩な細胞に分化する。こうした分化の運命は、発生する領域の位置情報とともに、遊走した先

の細胞外環境によって決定されると考えられている。

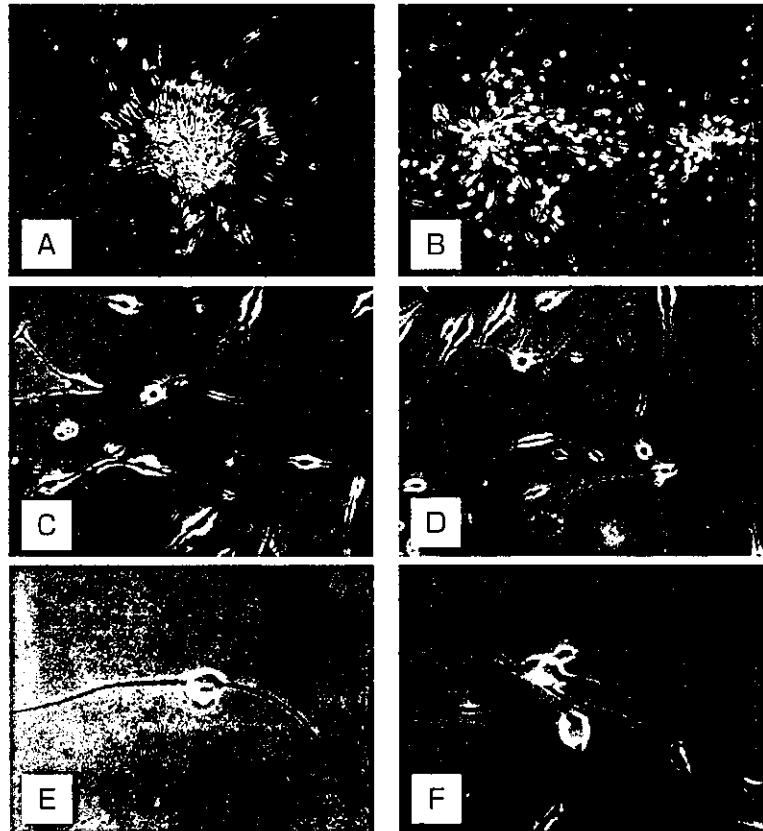
発生に基づいた「骨芽細胞から神経細胞への転換」プロトコル²⁾

今回の特集テーマは「細胞の狩人と錬金術からの脱却をめざして」である。錬金術師という言葉のニュアンスは挑発的であり、サイエンティストとは異なる意味を含んでいるのではないかと深読みしてしまう。細胞転換にしても、分化の可塑性にしても、基礎的なことは発生学に基づいて、この分野は始まっている。そして、間葉系幹細胞にかかわる実験も、発生生物学の知識を思いきり利用している。研究している人々が現代の錬金術師と揶揄されるのもそういった事情があるからだと推察され、サイエンティストというよりエンジニアと考えられているのも頷ける。それぞれの細胞への分化にかかわるプロトコルは、発生学の積み重ねのお陰である。培養に使用する培地、試薬にしる、目新しいものはないけれども、さまざまな手法を組み合わせている。

骨髄間質が、神経になるという私どもの発表³⁾は、私が知るかぎり三番目である。Sanchez-Ramosら(Sanberg博士のグループ)⁴⁾、Dengら(Prockop博士のグループ)⁵⁾に次いで発表された。現在では、ヒト多能性成体前駆細胞(multipotent adult progenitor cells: MAPC)についても全く同様の発表があり、ヒト骨髄間質細胞におい

でも森泰昌氏が追試に成功している。さらに、ごく最近では、臍帯血由来の間葉細胞を用いて、神経への分化に成功した報告³⁾があり、多数の論文が発表されはじめた。

低分子化合物を用いたプロトコルによる分化は、その誘導剤の作用である脱メチル化の機序から、ある一定の確率で生じ、その確率は決して高いものではない。一方、神経発生学の成果より、骨形成因子の阻害薬であるノギンを用いるプロトコルが開発されたが、この効率には目をみはるものがあった。間質細胞のうち、このプロトコルで効率よく神経に分化する細胞は骨芽細胞であった。骨芽細胞を通常の培養皿で増殖させ、ノギン遺伝子を導入する。そうすると、細胞は培養皿から剥離し、浮遊し、クラスターを形成するようになる。そのクラスターを位相差顕微鏡下においてピペットで吸い上げ、ファイブロン・オルニチンでコートした培養皿に移動する。移動した時点でクラスターは培養皿に付着するようになる。形態をみると、ほとんどの細胞は突起を進展させている(図4)。その時点で、神経増殖因子を含む低血清の培地(DMEM/F12)にて30日間培養する。ニューロンに特異的なマーカー分子の発現をみると、MAP2、Tuji1が50%以上の細胞において陽性になる。驚いたことに、5-azacytidineを用いたプロトコルとは異なり、分化した細胞はニューロンのマーカーは陽性となるが、アストロサイトやオリゴデンドロサイトのマ-



ノギン法により KUSA-A1 細胞を分化させたニューロン。A, B：低倍率, C, D：中倍率, E, F：高倍率。神経に特徴的な形態である、細長い突起、突起の末端が三角形になっていること、丸くて位相差顕微鏡下でピカピカ光る細胞体が、ニューロンとしての形態を示している。

図4 ニューロンに分化した骨髄間質細胞 KUSA-A1 の位相差顕微鏡像

カーが陽性となる細胞はほとんど認められなかった。分化した細胞は高カルウムおよびグルタミン酸に対して反応した(図5)。パッチクランプ法による活動電位の検出も試みたが認められなかった。

ノギンを用いると、骨芽細胞から神経へ転換する効率が極めて高いことより、一つの疑問が浮かび上がってきた。

骨芽細胞が神経になったのではなく、もともと神経細胞だったものが骨形成因子の高発現により骨芽細胞になっていて、それがノギンを処理することにより神経に戻ったのではないかという考えである。骨芽細胞は、神経細胞が変身した仮の姿ではないかという考えである。細胞の表現形質としての初期値または不履行状態が、骨芽細胞か神