

図 4 拍動する間葉系細胞の活動電位

A. 拍動する UBET-7(矢じり)とその隣接する細胞(矢印)は同期した拍動を示す。B. 拍動する UBET-7 より活動電位が得られた(下段)。微細電極を介した iontophoresis により, Alexa568 が注入されたことにより, 拍動する細胞に電極が刺さっていることがわかる。C. 心筋細胞への分化誘導後 1 週間では, 不規則なリズムが認められる。D. 分化誘導後 3 週では, リズムは規則的になる。上段と下段は時間軸のスケールを異なるものとしている。

である竹田征治は, 現在, 奈良県立医科大学第 1 内科学教室(斎藤能彦教授)に所属する。

マウス骨髄間質から拍動する心筋細胞への分化を示したサイトは,

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

ヒト骨髄間質から拍動する心筋細胞への分化を示したサイトは,

<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/jgm/ubet7>

ヒトとマウスの骨髄間質細胞のカatalogを以下のサイトに示す。

<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/kum/kumh.html>

<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/cells/name.html>

●文 献

- 1) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al : *Science* 284 : 143-147, 1999
- 2) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al : *Nature* 418 : 41-49, 2002
- 3) Umezawa A, Maruyama T, Segawa K et al : *J Cell Physiol* 151 : 197-205, 1992
- 4) Takeda Y, Mori T, Imabayashi H et al : *J Gene Med*, DOI : 10. 1002/jgm. 583.
- 5) Gojo S, Gojo N, Takeda Y et al : *Exp Cell Res* 288 : 35-50, 2003
- 6) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al : *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1999
- 7) Imabayashi H, Mori T, Gojo S et al : *Exp Cell Res* 288 : 51-59, 2003

骨髄間葉系幹細胞を用いた再生医療

梅澤 明 弘

*国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部

キーワード：再生医療，骨髄，間葉系細胞，細胞転換，細胞移植

はじめに

間葉系細胞が、再生医療の細胞に関する供給源として注目を浴びている。間葉系細胞は間充織由来の細胞であり、さまざまな組織に間葉系細胞が存在する。骨髄由来間葉系細胞は、骨髄間質細胞とも呼ばれる。ここでは、骨髄間質細胞の分化形質について、形態学的な側面から検討した。

1. 骨髄間質細胞

骨髄間質の生体内における主な働きは造血幹細胞の維持、赤芽球、骨髄球、リンパ球の分化コントロールである。また、骨髄間質細胞はさまざまな細胞により構成され、骨芽細胞や脂肪前駆細胞、軟骨細胞といった細胞の総称である。総称であるが故に、正確に機能の面から分類し、脂肪前駆細胞 (Adipocytes)、骨芽細胞 (Osteoblasts)、軟骨細胞 (Chondroblasts) と呼ぶべきであり、間質細胞 (Stromal cells) という言い方は止めるべきであるという意見がある。形態学的には、細網細胞と呼ばれ、その存在する場所から、細動脈周囲細網細胞、細静脈周囲細網細胞、洞周囲細胞という名称も存在する¹⁾。細網細胞 (Reticular cells) という呼称自体あまり聞くことは少ない。また、単に線維芽細胞 (Fibroblasts) と呼び、皮下線維芽細胞と言った他の組織に存在する線維芽細胞と区別をつけないことがある。機能の面からみれば、他の組織に由来する線維芽細胞と大きな違いはないという指摘も聞くけれども、表面マーカー分子を含め、機能的に骨髄間質細胞は他の線維芽細胞と大きく異なっていると理解している。ここでは骨髄間質細胞と呼ぶ場合とそれぞれの機能別に分類し骨芽細胞と呼ぶ場合がある。間質という言葉に慣れてしまっていることと、総称であり骨髄以外の線維芽細胞と区別する場合に呼びやすいことがその理由である。骨髄間質に存在する細胞を広い意味でとらえ、1) 骨芽細胞、2) 脂肪細胞、3) 軟骨細胞、4) 血管内皮細胞の4種

類の細胞が存在すると考え、その他のものは何の分化能も有していないと言う意味であり、やはり総称になってしまうけれども線維芽細胞ということになる。試験管内で骨髄の初期培養を行うと、齧歯類の骨髄間質細胞からなるコロニーができる。CFU-F (Colony-forming-unit in fibroblasts) と呼び、ここでも Fibroblasts という言葉を用いる。

骨髄間質細胞の主な働きは造血細胞の支持機能である (図1)。造血細胞を育てる緑の下の方力持ち的な機能より、長年、2級市民として扱われてきたことは事実である。1980年代に液性因子 (サイトカイン) ならびに膜状の分子に関する遺伝子が単離する過程で注目されてきた。骨髄に対する超微形態学的な解析も主に血液細胞に対してなされ、その解析が飽和したところで間質細胞に研究が移動した時期もある。間質細胞の最も注目に値することは、造血における微小環境またはニッチそのものを構成する細胞であることである²⁾。造血に対しては、間質細胞が有するまたは産生する液性因子、膜状の分子、ギャップ結合、マトリックス (細胞外基質) により貢献することになる。このような支持作用は、造血細胞だけにとどまらず、転移してきた乳癌細胞や前立腺癌細胞に対しても存在すると思っている。原発巣においては化学療法

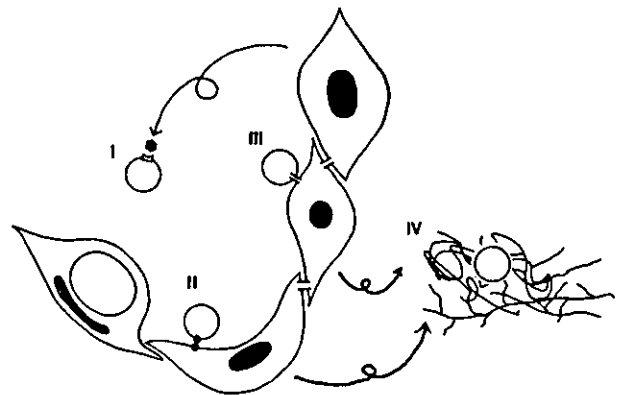


図1 骨髄間質の造血に対する役割のモデル図。骨髄間質細胞と血液細胞との細胞相互作用を表す。液性因子を介する交流 (I)、膜状の分子を介した連絡 (II)、ギャップ結合を介した交流 (III)、マトリックスを介する調節 (IV) の四通りが考えられる。ギャップ結合は主にコネキシン 43 を発現しており、脂肪細胞への分化過程ではその交流は消失する。また、脂肪細胞へ分化すると液性因子も発現しなくなる。

Akihiro Umezawa: Regenerative medicine using bone-marrow-derived mesenchymal stem cells

*〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1

TEL: 03-3416-0180(代); FAX: 03-3416-2222

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

2004年3月23日受付

によって明らかに治癒しているにもかかわらず、剖検時、全身の骨髄内において癌細胞が増殖しているのは、化学療法が骨髄内で効果がないとか転移した癌細胞が化学療法に抵抗性であるというよりも、骨髄内に存在する間質細胞が癌細胞に対する増殖因子を産生していると考えられる。ヒト間質細胞に対して、その遺伝子発現をランダムに解析したり、AffymetrixのGene Chip解析を行うことにより、興味深い増殖因子を高度に発現していることが明らかになっている (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/chip/ubet7/index.html>)。

2. 超微形態学的アプローチ＝骨髄間質細胞の分化形質に対して

2.1 骨芽細胞

骨髄間質細胞のひとつに骨芽細胞がある。成熟した骨芽細胞の形質を保っている KUSA-A1 細胞は、マウスに移植すると骨を形成する³⁴⁾。骨形成は3週間くらいで認められる。再現性が高いことと容易に培養できることから、多くの研究者に利用していただいて来た。試験管内において極めて増殖能力が高いことから、実験に使いやすい(図2)。また、コンフルエントになると増殖が止まり、腫瘍としての性質は試験管内においても生体内においても存在しない。コンフルエント後、培養を継続するとマトリックス産生をみる。このように、マトリックスを高度に産生する細胞は、この KUSA-A1 細胞しか知らない。電子顕微鏡的解析では、細胞の上にマトリックスを産生していることがよく分かる。electron-denseな部分が見られ、同部はリン酸カルシウムの沈着がみられ、von Kossa 染色で陽性になる⁵⁾。

このマトリックスは細胞上部だけではなく、細胞と培養皿底との間に認められることも多い(図3上段、中段左)。こちらの方がリン酸カルシウムの沈着は高度であり、von Kossa 染色で強陽性になる。このことより、筆者はこの結節を骨結節と呼んでいる。KUSA-A1 細胞の細胞質にはミエリン様構造を認める。この構造は KUSA-A1 細胞だけに限られるものではなく、他の骨芽細胞にも認められる。また、細胞上部に認められることになるのか、骨結節のようになるのかは不明であるけれども、一つの細胞からマトリックスを産生する像も見られる。このようなマトリックスは、コンフルエント後培養を継続するとその数が増えることになる。この超微形態学的な観察から言えることは、マトリックスを産生する細胞はひとつであり、そこから大量のマトリックスが産生されることになり、マトリックスや骨結節が増加するのは産生する量が増えるというよりも、産生する細胞の数が増えるからであると思う。

2.2 心筋細胞

CMG (9-15c) 細胞は、心筋細胞への分化を呈する(図4)。この分化は脱メチル化剤により、誘導されるものである⁶⁾。拍動を始め、細胞質内に横紋構造を認める。核は細胞質の中央に存在し卵円形をしており、分岐構造をみる。サルコレンマ構造、心房顆粒、豊富なグリコーゲン顆粒、多く



図2 骨髄間質細胞 KUSA-A1 による試験管内でのマトリックス産生。骨髄間質細胞 KUSA-A1 は、培養器の中では線維芽細胞となら変わらない位相差顕微鏡像を示す (a: 増殖期, b: コンフルエント期)。コンフルエント後、細胞上部にマトリックス産生を認める (c)。超微形態学的には、KUSA-A1 細胞の上にマトリックスが産生され、そのマトリックス内に electron-dense な部を伴う (d)。スケールバー: a=60 μ m, b=60 μ m, c=30 μ m, d=2 μ m

のミトコンドリアがある。これらは、心筋細胞に特徴的である。遺伝子発現の面、活動電位の面からも心筋細胞への分化であることが示されている。また、拍動する心筋細胞は、ミオシン、アクチニン、デスミンが免疫組織学で陽性となる。心筋細胞への分化ばかりでなく、骨格筋細胞、平滑筋細胞

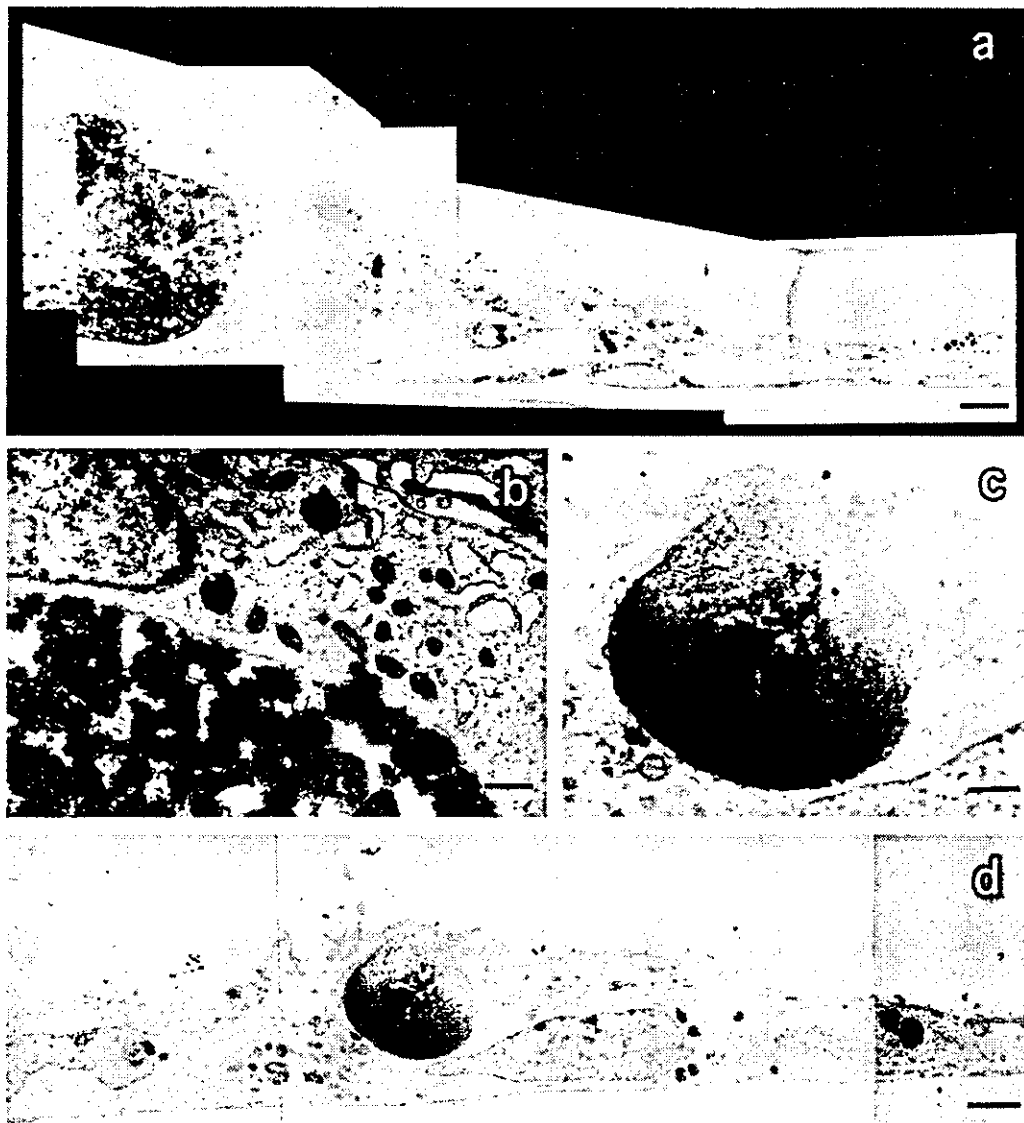


図3 骨髄間質細胞 KUSA-A1 による骨結節ならびにマトリックス形成. KUSA-A1 細胞は、培養細胞と培養皿底との間に骨結節を形成する (a: 低倍, b: 高倍). 骨結節には、カルシウム塩が沈着し、von Kossa 染色陽性となる. マトリックス形成過程と思われる像 (d: 低倍, c: 高倍) もみられる. 低倍で不明瞭であるけれども、細胞質内にミエリン様構造をみる. このようなマトリックス形成は細胞がコンフルエントになり、増殖が停止した状態においてのみ認められ、増殖期には見られない. また、全ての細胞がマトリックスを産生するのではなく、あるひとつの細胞からマトリックスが形成されることがこの電子顕微鏡像からうかがわれる. スケールバー: a=6µm, b=0.6µm, c=1µm, d=2.35µm

への分化も確率的に生じる. 遺伝子発現の面からみれば、それぞれの細胞に特異的な遺伝子が発現することより、区別することは可能である. しかし、位相差顕微鏡下では、横紋筋でも収縮弛緩を試験管内で示し、明確に区別できない.

2.3 ギャップ結合

骨髄間質細胞のひとつである骨芽細胞間には、ギャップ結合が豊富に存在することが知られている. 成熟骨芽細胞である KUSA-A1 細胞間にも明らかなギャップ結合を介した連絡が色素注入法で認められる (図5 上段). これらの間質細胞はギャップ結合を構成する蛋白質をコードする connexin43 遺伝子を発現する. この connexin43 遺伝子は、心筋細胞、骨格筋細胞を初めとする間葉系細胞に発現される. 生体内

において、このギャップ結合を間質細胞間に見つけるのは、容易ではない. フリーズフラクチャー法、TEM によって、ギャップ結合を認めたという報告¹⁾があるけれども、その報告数は少ない.

もうひとつの興味は、間質細胞と血液細胞間にギャップ結合を介した連絡の有無である. 図1の模式図に含めてしまったが、実際に存在するかどうかは不明である. 図5 下段には、間質細胞に色素を注入した場合、ギャップ結合を介した連絡を通じて円形の血液細胞に移行した像を蛍光顕微鏡下でみる. 隣接する間質細胞にも移行している像もみられている.

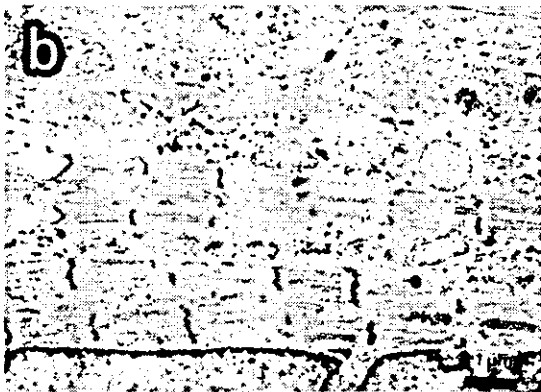
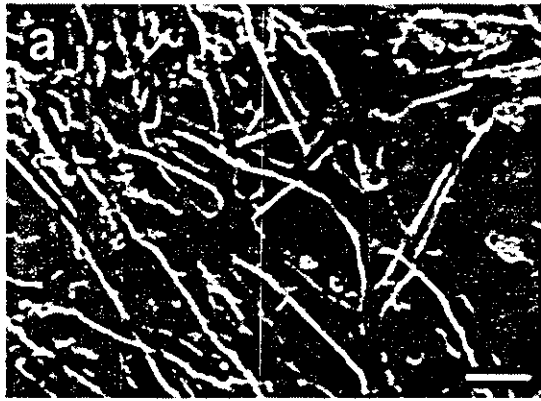


図4 骨髄間質細胞 9-15C の心筋細胞への転換。骨髄間質細胞 9-15C は、脱メチル化剤である 5-azacytidine により心筋に分化する (a: 位相差顕微鏡像)。心筋へ分化した骨髄間質細胞は、一分間に約 200 くらいである。超微形態学的には、明らかな横紋構造を認める (b)。スケールバー: a=210 μ m, b=1 μ m

おわりに

骨髄間質細胞の研究は、ふたつの理由で始めた。ひとつは、研究室内のテーマが骨髄間質に対する超微形態学であったことである¹⁾。もうひとつは、骨髄間質細胞株を用いた先駆的な仕事である^{7,8)}。多分化能の研究は、ヒト精巣由来胎児性癌細胞を用いた研究からはじまっている⁹⁾。細胞転換に関する研究は、イモリのレンズを介した研究だけでなく、病理学会に多くの実験的報告がある。

謝辞

この総説論文に使用させていただいた電子顕微鏡像は、慶應義塾大学医学部病理学教室の技師の方々のお陰である。心筋細胞の電子顕微鏡像は、防衛医大大学長の鳥嶋親雄氏に直接撮影していただいた。

骨髄間質から拍動する心筋細胞への分化を示したマウス・サイトは、

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

ヒト・サイトは、

<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/jgm/ubet7>

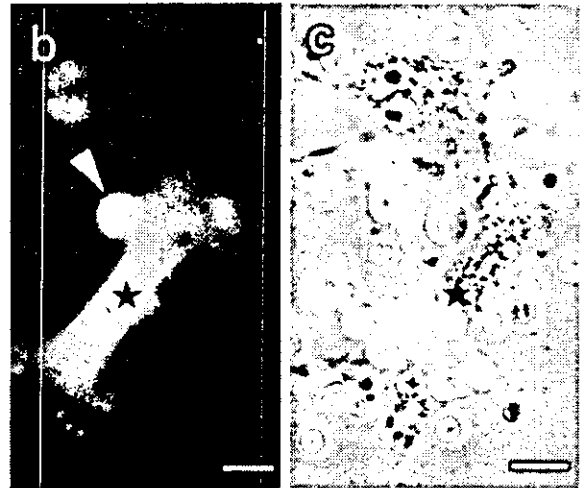
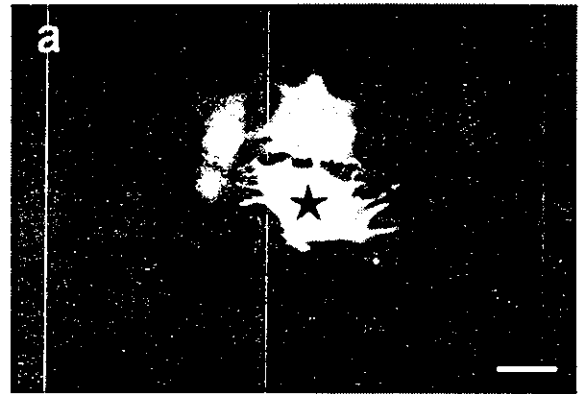


図5 ギャップ結合を介した連絡。(a) 間質細胞同士のギャップ結合を介した連絡。壁に付着した間質細胞に蛍光色素を注入した。星印は、蛍光色素を注入した細胞を示す。蛍光色素は、ギャップ結合を介し、隣接する間質細胞に移行する。

(b, c) 間質細胞と血液細胞との間に認められるギャップ結合を介した連絡。壁に付着した間質細胞に蛍光色素を注入した(星印)。蛍光色素は、ギャップ結合を介し、血液細胞(白い矢頭)に移行した。(b) 蛍光顕微鏡写真, (c) 位相差顕微鏡写真。スケールバー: a=25 μ m, b=4 μ m, c=4 μ m

文 献

- 1) Watanabe, Y.: *Acta Haematologica Jpn.*, 48, 1688-1700 (1985)
- 2) Dexter, T.M., Allen, T.D. and Lajtha, L.G.: *J. Cell Physiol.*, 91, 335-344 (1977)
- 3) Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H., Ueno, K., Ohkawa, H., Mori, T., Yamaguchi, A., Toyama, Y., Hata, J. and Umezawa, A.: *J. Cell Physiol.*, 194, 45-53 (2003)
- 4) Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M. and Umezawa, A.: *Cell Tissue Res.*, 316, 141-153 (2004)
- 5) Umezawa, A., Maruyama, T., Segawa, K., Shadduck, R.K., Waheed, A. and Hata, J.: *J. Cell Physiol.*, 151, 197-205 (1992)
- 6) Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A. and Ogawa, S.: *J. Clin. Invest.*, 103, 697-705 (1999)
- 7) Harigaya, K. and Handa, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 82, 3477-3480 (1985)
- 8) Harigaya, K., Cronkite, E.P., Miller, M.E. and Shadduck, R.K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 78, 6963-6966 (1981)
- 9) Hata, J.-I., Fujimoto, J., Ishii, E., Umezawa, A., Kokai, Y., Matsubayashi, Y., Abe, H., Kusakari, S., Kikuchi, H., Yamada, T. and Maruyama, T.: *Acta Histochem. Cytochem.*, 25, 563-576 (1992)

精子形成にかかわるエピジェネティクス

梅澤 明弘

Summary

生殖細胞では配偶子形成過程で、正確なエピジェネティクスが保たれていることが必要となる。生殖細胞の発生、成熟過程とゲノムメチル化との関連を明確にすることは、配偶子形成機構におけるゲノムメチル化の意義を追求することに繋がる。また、ゲノム・エピジェネティクスを基準として、その生殖細胞の機能を評価できる。

Key words

精子●生殖細胞●幹細胞
エピジェネティクス

はじめに

「体細胞から正常な精子や卵子を作ることはできるか？」という質問はいつも自分自身に問いかけているものである。精子や卵子を体細胞から作り出すことができれば、精子や卵子のドナーに係わる問題も解決する。この質問に対して、専門家の野瀬俊明博士(三菱化学生命科学研究所)にご教示いただく機会を得た。

簡単にいえば、2通りある(図1)。自分自身の体細胞を単離してきて核移植し、胚盤胞まで発生させ、内部細胞塊をとり、胚性幹細胞を作製し、精子・卵子を作る¹⁾²⁾。胚性幹細胞のくぐりには野瀬氏自身の研究成果そのものでもある³⁾。もう1つの方法は、体細胞を核移植することなく、生殖細胞に分化転換させるものである。体細胞から直接生殖細胞にすることは困難であろうから、体細胞を一度脱分化させ、多能性幹細胞ないしは胚性幹細胞「様」とする。その後の手順は1つ目の方法と同じである。

また、1つ目の答は理論的には整合性がとれているが、2つ目の方法で体細胞から精子や卵子を得ることははたして可能であろうかとさらなる質問をさせていただいた。これに対しては「核移植することにより体細胞の核が発生することを始めるわけであるから、全く同じことである。体細胞の細胞質を卵子と同じようにすれば、生殖系列への分化が可能になるわけであり、論理的には可能である」という明快な答を頂戴した。

Akihiro Umezawa

国立成育医療センター研究所
生殖医療研究部部長

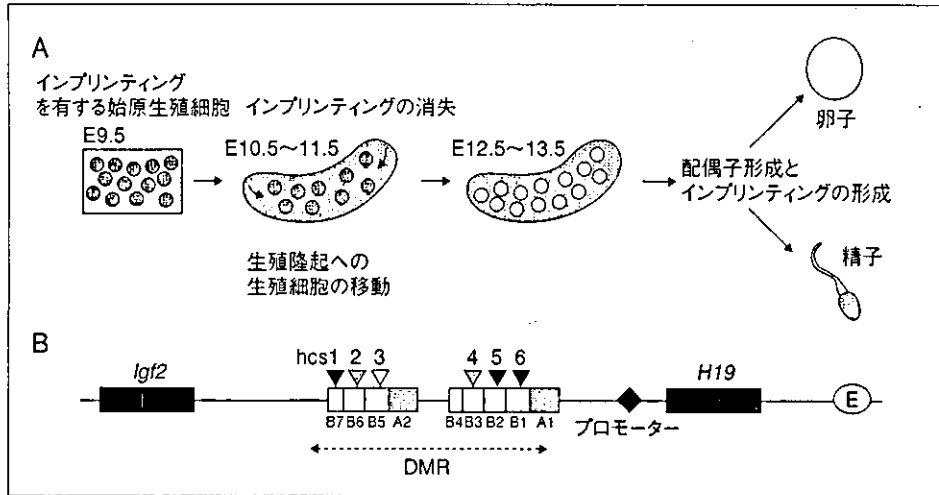


図1 インプリンティングを受ける *H19* 遺伝子の転写調節領域におけるエピジェネティクスの精子での重要性

A: 始原生殖細胞におけるインプリンティングの保持, 消失, 再形成。「E」は, マウス胎仔の日齢を示す。

B: ヒト *H19* 遺伝子は, 成人臓器において母由来のゲノムからのみ転写が生じる。転写されている母由来のプロモーターはメチル化は全くみられないのに対し, 父由来のゲノムの *H19* 遺伝子プロモーターはメチル化されている。ところが, 父由来のゲノムの供給源となる精子においては, *H19* 遺伝子プロモーターはメチル化は全く認められない。このことは精子のゲノム上に正確なエピジェネティクスを決定する「しるし」があることを意味している。プロモーター上流に存在する DMR (differentially methylated region) においては, 驚くべきことに成人臓器と全く同様のゲノムメチル化が精子でみられた⁴⁾。ヒトにおける父由来(精子)であるゲノムの「しるし」付けを明確にしたことで, DMR がヒトゲノム上の1つのインプリンティングセンターであることを示唆した。

精子形成にかかわる エピジェネティクス

体細胞から生殖細胞系列を形成させ, そこから精子を作りだし, 生殖医療への応用するという考えはある意味で, クローン動物を作製する⁴⁾際に多くの奇形が生じることと同様の危惧がある。体細胞から精子を作り出すことは可能であっても, そのゲノムのメチル化の状態が正常でなければ, 正常の発生および臓器形成が生じることにはならない⁵⁾。発生過程において, インプリンティング遺伝子をはじめとする遺伝子転写調節領域のメチ

ル化は正確に調節されている(図2)。核移植により作製するクローン動物では, 体細胞のゲノムのメチル化が生殖細胞のゲノムのメチル化と異なるために, 胎児の奇形を生じたり, 巨大な胎盤が形成されたり, 出生直後に死亡するといったことが報告されている。体細胞のゲノム・メチル化は精子のそれとは異なっており, メチル化が異なれば遺伝子の発現パターンが変化してしまう。

それゆえに, 生殖系列を誘導する際には, 間葉系幹細胞を心筋細胞, 骨格筋細胞, ニューロンへ細胞転換させるのに用いた低分子の脱メチル化剤⁶⁾⁻⁸⁾は好ましくない。低分子の脱メチル化剤を用いれば, 細胞のメチル化状態は確率的な状態に

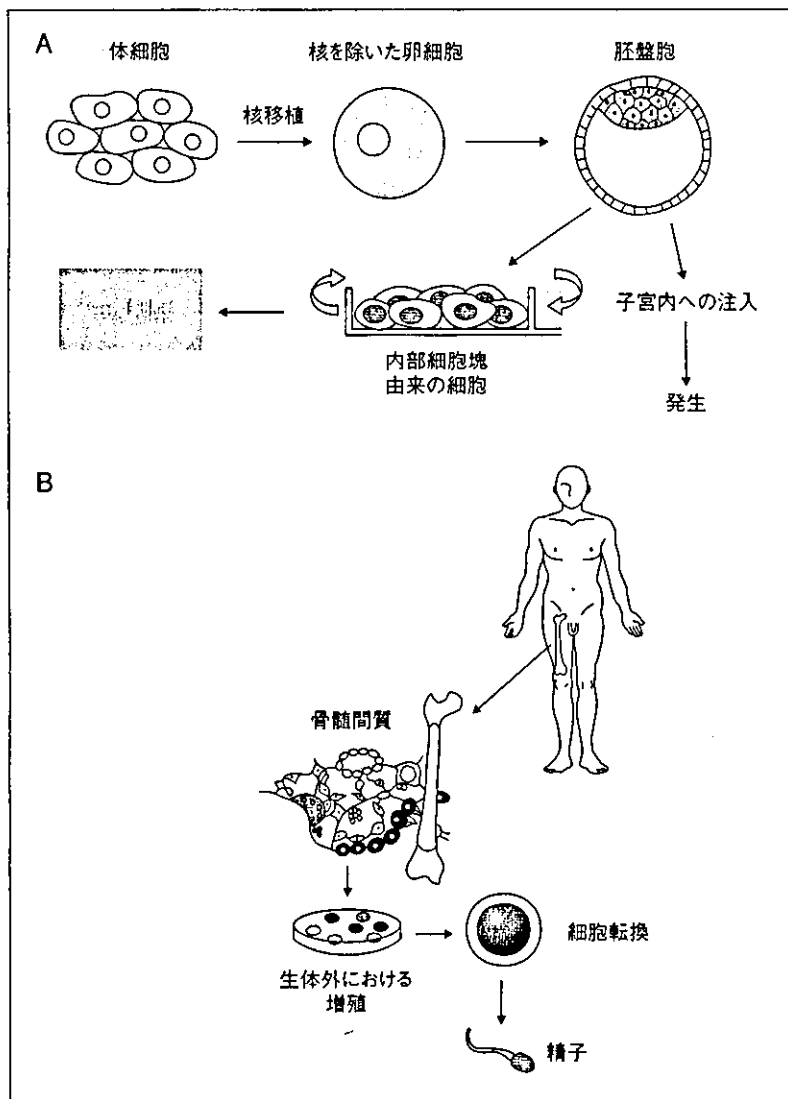


図2 生殖細胞を形成させるための細胞の供給源

A: 核移植技術を用いた体細胞からの生殖細胞作製。体細胞の核を利用して、未受精卵に核移植し発生させ、胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚性幹細胞から、生殖細胞が形成する可能性が考えられる。

B: 可能性の1つとして、骨髄間質由来の体細胞からの精子形成を示す。

なり、一定の状態は作りだせない。体細胞から精子を作り出す技術が確立していない現時点において、メチル化の状態をはじめとしたエピジェネティクスの話をしていても仕方がないかもしれない。

精子の形まで、より正確に言えば減数分裂を生じさせる形にまで作ることが先決ではあるが、先の先まで考えればゲノムのメチル化は無視できない。

まず、発育途中にある原始胚細胞核の機能およびゲノムの発生支持能をそれぞれ評価することが重要となる。生殖細胞の発生、成熟過程とゲノムのエピジェネティクスとの関連を明確にしなくてはならない。この生殖細胞の機能評価の1つとして、ゲノムの「成熟」度を1つの評価基準として、その配偶子形成機構における意義を追求できる。

再生医療における精子形成

生殖細胞に係わる細胞医療では、多くの細胞を必要としないことが大きな特徴である。心臓への間葉系幹細胞の細胞移植となれば、成人では300gある心臓の一部に細胞を入れる場合には、虚血性心疾患では細胞は重量にして約10gの細胞が必要となる可能性がある⁹⁾。心筋症ではさらに多くの細胞数が必要となるであろう。また、肺、肝、腎、脳を構成する細胞を用いた移植でもその臓器の大きさ、疾病における病巣の範囲から考えても相当数の細胞が必要である。比較的少ない細胞数で治療効果があると予想されるホルモン産生細胞や黒質細胞でも、1万以上の細胞数は必要であろう。一方、生殖細胞に係わる細胞医療では、極端に言えば1個の細胞があれば成功の可能性があることは特筆すべき点で、他の細胞系列とは全く異なる。

また、生殖細胞に関係する再生医療では、自家移植しかありえない。他家移植となれば、精子、卵細胞を供与してもらえばよいことになるので、自分の細胞を用いて行う細胞移植しか考える必要はない。自らの細胞を用いて生殖細胞を形成させる場合には、生殖細胞から精子形成させるか、または体細胞を生殖系列細胞に細胞転換させることが可能性として考えられる。生殖細胞の配偶子形成過程に異常をきたすような変異が遺伝子を有する個体の細胞をドナーとして利用すると、仮に生殖細胞系列に転換してもやはり異常をきたしてし

まう。これは、筋ジストロフィーの患者より得られた骨髄由来の間葉系幹細胞を骨格筋細胞に転換させたとしても、その骨格筋細胞が機能しないのと同様である。

生殖系列における再生医療では、動物実験で用いることが可能な手法がヒトでは限定されてしまう。生殖細胞系列に遺伝子を導入することは認められておらず、遺伝子を導入することはできない。間葉系幹細胞の場合には、遺伝子を導入することで、①目的の細胞へ分化することの標的化がなされる、②細胞の寿命延長を図ることが可能である、③遺伝子の細胞特異的な *cis*-element を利用することで、分化した細胞を選択的に単離することが可能となる。これらのことが一切、許されなくなる。たとえば、心筋細胞を単離するには *cardiac troponin I* や *myosin light chain* の転写調節領域を利用できる。生殖細胞の場合は、*Oct-3*、*TNAP*、*Vasa* の転写調節領域を用いて²³⁾単離できるが、ヒトにおける場合は遺伝子を導入することは全く許されない。ゆえに、生殖細胞系列を同定するには、遺伝子の転写調節領域を用いた方法ではなく、表面抗原を同定することがきわめて重要なこととなる。

さらに、異種の細胞に存在するレトロウィルスの感染は、生殖細胞の場合、厳密に管理されなくてはならない。もともと、間葉系幹細胞を初めとした再生医療の場で、完全ヒト型培養系が必要とされるのも外来種のレトロウィルスがドナーの細胞に入り込み、宿主(患者)において最終的に生殖細胞に入り込むことが危惧されている。ウシ、ブタ、マウスといった外来種の内在性レトロウィルスがヒト生殖系列の細胞のゲノムに入り込むのは困るという考えである。

ここでは、おもに体細胞による再生医療と生殖細胞系列による医療において、異なる点を比較してみた。研究上のことではあるが、類似点もある。発生初期に出現する始原生殖細胞は精子、卵

子という単一細胞種のみへの分化が運命づけられた単能性の前駆細胞である。面白いことに、この単能性の配偶子形成への運命決定を受けたはずの始原生殖細胞から、胚性幹細胞と同様の全能性をもつ胚性生殖細胞が樹立される。一方、骨髄間質から取り出したひとつひとつの細胞は、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞といった単能性の前駆細胞のことが多い。これらの細胞は生体外 (*in vitro*) で増殖させると多能性の中胚葉性幹細胞として多分化能を有するようになる。間葉系幹細胞を胚盤胞移植することによってキメラ形成能すらある。始原生殖細胞も間葉系幹細胞もいずれも特定の分化段階¹⁰⁾にあることは間違いないが、この分化状態は不可逆的に固定化されたものではなく、環境要因—ここでは生体外で培養することによって柔軟性を有し、本来有していない多能性を獲得するのかもしれない。

おわりに

生殖細胞における再生医療においては、体細胞にはない厳密性が要求される。間葉系幹細胞をはじめとする体細胞の場合では、心筋細胞、骨格筋細胞、骨細胞、軟骨細胞に分化する場合、ゲノムのエピジェネティクスは重要ではあるが、厳密に制御されていなくとも心筋、骨格筋、骨、軟骨ができてしまえばよい。一方、生殖細胞では上記のように配偶子形成過程で細胞の供給源を問わず、正確なエピジェネティクスが保たれていることが必要となる。

謝辞

執筆の機会を与えていただいた吉村泰典教授に深謝いたします。

文献

- 1) 野瀬俊明：ES細胞と生殖医療。医のあゆみ 204：927-932, 2003
- 2) 野瀬俊明：蚕・核・酵 49：616-624, 2004
- 3) Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, et al: Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 11457-11462, 2003
- 4) Hamatani T, Sasaki H, Ishihara K, et al: Epigenetic mark sequence of the H19 gene in human sperm. Biochim Biophys Acta 1518: 137-144, 2001
- 5) 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
- 6) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, et al: Brain from Bone; Efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with noggin or a demethylating agent. Differentiation (Stem cell issue) 68: 235-244, 2001
- 7) Takeda Y, Mori T, Imabayashi H, et al: Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? J Gene Med, DOI: 10.1002/jgm. 583.
- 8) Gojo S, Gojo N, Takeda Y, et al: *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 288: 51-59, 2003
- 9) Kato Y, Imabayashi H, Mori M, et al: Developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal; Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells. Biol Reprod 70: 415-418, 2004
- 10) Sharov AA, Piao Y, Matoba R, et al: Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. PLoS Biol 1: 410-419, 2003

骨髄間葉細胞の現状と展望

梅澤明弘

うめざわ あきひろ：国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部

● はじめに

医療に用いられる骨髄由来の間葉細胞は、①一般に市販されている培養皿に付着し、②増殖し、③形態学的に線維芽細胞「様」細胞を呈するものを指す。改めて記載するのは、「間葉細胞とは？」という問いに対する答は、発生学、組織学に基づくものであるのに対し、一般に専門家を含めて、培養上増えてくる線維芽細胞「様」細胞を間葉細胞と呼ぶためである。さらに誤解を恐れずにいえば、間葉細胞と間葉系幹細胞の区別も明確にしているわけではなく、また区別をすること自体、むずかしい場合が多い。

しかしながら、間葉細胞の同定には、このような抽象的な事柄を分子レベルでの定量的な指標として定めることが肝要となることは間違いない。できればその指標の測定は、各医療施設ないしは cell processing center において容易に行われることが要求される。また、医療の現場において必要となる機能細胞に分化しうる間葉細胞に共通する指標となるべきである。さらに、これらの指標は、発生生物学的に妥当であり、神経幹細胞、上皮細胞、血液細胞といった他の系統の細胞との差別化が可能であることが必要とされる。このことを念頭においたうえで、積極的に間葉細胞の指標をあげる。さらに、骨髄間葉細胞と他の組織に由来する間葉細胞を比較し、現状と展望とともに特徴をあげていく。

● 表面分子または表面マーカー

血液幹細胞を規定する表面マーカーとして

は CD34, CD133 が有名であり、臨床にこの知見が用いられることもある。また、神経幹細胞のマーカーとしては CD133, LeX/SSEA-1 が有名である。その意味でも間葉系幹細胞ないしは間葉細胞を規定するマーカーを明確にすることはきわめて重要であり、それに関する論文も多い。

表面マーカーによるヒト間葉系幹細胞の分離の具体例を一つあげれば、「骨髄細胞に対して、CD29, 44, 73, 105, 166 を陽性抗体として、CD14, 34, 45 を陰性抗体として使用することによる間葉系幹細胞分画の認識」がある。この場合は、間葉細胞を一度も培養することなく、骨髄穿刺によって得られた骨髄細胞から直接、間葉細胞を分離する。

培養した間葉細胞のマーカーは、培養しない場合の間葉細胞と同一かどうかは不明である。これは他の幹細胞においても同様のことかもしれないけれども、細胞が生体内に存在する場合と生体外で増殖した場合では異なるマーカーの発現パターンを示すことは容易に予想できる。骨髄由来の培養した間葉細胞における重要なマーカー^{1~8)}として、CD29 (インテグリンβ1), CD44 (ヒアルロン酸受容体), CD140 (血小板由来増殖因子受容体) があげられる。移植抗原である HLA-DR は陰性であり、HLA class I は陽性である。一方、臍帯血由来の間葉細胞では、CD90 (Thy-1) が強陽性である。

● 細胞骨格

中間径線維であるビメンチンは、間葉細胞のマーカーとして知られる。ケラチン 8, 18, 19 は上皮系マーカーであり、ニューロフィラメントは神経系マーカーである。これらの中間径線維は発現量が多く、抗体を用いた免疫組織化学で容易に認識され、多くの良い抗体も作製されている。

● 転写因子

転写因子は、キーマスター遺伝子発現の有無が細胞系譜決定に直接かかわるわけであり、本質的なマーカーとなる。ゆえに「間葉細胞とは何か？」という問いに対してもっとも正確に答えられるものは、間葉細胞にかかわるキーマスター遺伝子であり、中胚葉系譜の決定にかかわる、bHLH 型転写因子である mesogenin 1, T box 型転写因子である brachyury, また HNF-3 β があげられる。一方、HNF-4 は内胚葉マーカーとして知られる。

● 産生するマトリックスなど

間葉細胞は、線維芽細胞「様」細胞の形態をとると記載したとおり、膠原線維（1 型コラーゲン）を産生する。また、骨芽細胞はオステオカルシン（osteocalcin）を産生する。

● ゲノム・エピジェネティクス

ある特定の分化状態にある細胞は、その状態が安定である。すなわち、細胞のおかれている環境の因子が変化しない限り、細胞がその分化状態を変化させることはない。これはすでに骨格筋細胞、神経細胞のように終末分化を遂げてしまった細胞についてではなく、発生の途上のどの段階にある細胞についてもいえる。免疫系の B リンパ細胞は抗原刺激があるまで分化の途上にとどまっていることや、造血幹細胞から血球細胞が分化してくるときに、ある特殊な因子がないと次のステップに進まないことがこの考えを支持している。さらに、その安定状態というのは、細胞外環境因子に支えられているのではなく、細胞のうちに自身の分化状態を安定

に保持しようとする働きがあると考えられる。それは数多くの遺伝子の発現調節機構が相互に依存しており、全体として一定のバランスを保った状態にあるといい換えることができる。培養系に移した細胞がその環境から切り離されているにもかかわらず、元の性質をある程度保つことがその根拠の一つである。例の一つとしてあげた間葉系幹細胞は、試験管内において容易に培養することが可能である。この培養過程で分化形質が変化することは基本的にはなく、細胞は継代を重ねても多分化能は保持される。同時に培養を繰り返したからといって、新たな分化形質を獲得する訳ではない。間葉細胞から血球細胞が出現することはない。このような分化形質の保持が細胞株において年余にわたることの分子基盤の一端を担うと思われる事実がある。

これら、分化状態の安定性と変化しやすいという、いささかパラドキシカルな事象が分化という現象の基本であり、転写因子のネットワークであり、ゲノムのメチル化であり、ゲノムのメチル化がその定常状態を産み出す。逆に定常状態が、転写因子のネットワーク、メチル化、ゲノムのメチル化を固定してしまうことも考えられ、その状態を観察すれば分化の定常状態がどのレベルにあるかを指摘できることになる。究極のことをいえば、特定の分化した細胞でその機能や形態、そして組織の構築が決定されるのは、それらに必要な転写因子が発現し、他の不必要な遺伝子の発現が抑制されることによって行われている。一定の分化した細胞の個性は、発現している遺伝子のセットによって決まる。これらの理由から、「本質」的な転写調節領域のメチル化をみることは重要となる。なぜなら、本質的である CpG 配列のみが幹細胞を区別でき、そうでないところはあらゆる細胞で同じパターンをとることで区別することができないからである。神経系において、その分化マーカーの本質的な転写調節領域の研究で特異的なメチル化が存在することが指摘され、注目をあびた⁹⁾。また、上皮細胞においても分化マーカーの特異的メチル化が報告されている¹⁰⁾。間葉細

胞においては、そのようなメチル化はまったく報告されておらず、明らかにする必要があると考える。

● 間葉細胞が示す分化形質による分類

骨髄に由来する間葉細胞が示す分化形質として、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、神経細胞、肝臓細胞、膵β細胞があげられる。間葉細胞とか間質細胞といった抽象的な名称であるので、その分化形質で細胞を呼ぶのが正しいという指摘があり、もっともな考えである。細胞を形態学で分類するよりも、生物学的特性で分類することは正しい。問題は、骨芽細胞は一般に脂肪細胞への分化能を有しており、ニューロンへの分化能も有していることがあり、試験管内においては細胞の初期値で名称をつけることがむずかしいことである。心筋細胞になる間葉細胞は多分化能を有しており、一つの形質のみで名称をつけることはむずかしい。多分化能を有しているからといって、間葉系幹細胞といえれば再び抽象的となる。

● 間葉細胞の供給源

1 骨髄

再生医療を念頭においた場合、もっとも有名な間葉細胞の由来は骨髄である。造血細胞を支持する細胞として造血微小環境そのものを構成する細胞である。骨髄中に存在する幹細胞として注目されている細胞の一つに MAPC がある。「MAPC なんて有名だけど、誰もみたことないぞ」という意見もあるけれども、骨髄由来の寿命の長い多分化能細胞は魅力的である。マウス骨髄の初期培養をすると、小型で接着性がきわめて強く、お互いが接着していない MAPC 様細胞を認めるけれども、私は増殖させることに成功したことはない。

2 臍帯血

臍帯血から間葉細胞が単離できるという発表が次々となされている。得られた間葉細胞は胎児由来であり、きわめて増殖能力が高い。また、骨髄由来の間葉細胞に比較しても寿命が長いと思われ、分裂回数が多い。臍帯血バンクに使う

ことができない血液を今後は研究用に使用することが可能になる手続きが進められており、臍帯血は間葉細胞の重要な供給源の一つとなりうる。臍帯血を採取するときに、臍帯中に含まれる Wharton jelly に存在する間葉細胞が採取されてしまっている可能性は否定できず、本当に血液中に含まれているのかどうかは疑問が残る。

3 胎盤

胎盤の魅力は、その大きな組織量である。組織内には、母親由来の脱落膜組織がみられるであろうし、さらに胎児由来の絨毛組織がある。脱落膜は母親の子宮内膜の間葉細胞が上皮様になったものである。絨毛組織でも、間葉細胞がみられる。得られた間葉細胞は、母親由来の細胞か胎児由来の細胞かで寿命の面で大きく異なると予想される。医療廃棄物として扱われてきた胎盤を有効活用できることになり、それ自体素晴らしいことである。もし胎盤を利用できるのであれば、HLA をすべて揃えることができるばかりでなく、自分自身の細胞が保管されることになり、費用のことを度外視すればたいへん便利である。

4 月経血

月経血には大量の間葉細胞が含まれる。月経血には、月経期に剝離した子宮内膜細胞が組織量として多いために大量の間葉細胞が得られると考えている。ゆえに月経血中の間葉細胞は大部分は子宮内膜に由来する。月経血由来の間葉細胞には、子供の遺伝病に対し間葉細胞を用いる際に免疫学的に有利な点がある。たとえば、先天性代謝異常の患者に間葉細胞を移植する際には、母親の月経血由来の細胞は免疫学的に拒絶されにくい可能性がある。子宮内で胎盤を介して、胎児の中に母親の細胞が混じり合うこと (microchimerism) によって、母親の細胞は免疫寛容になっていると理解されている。

5 子宮内膜

ここでいう子宮内膜とは、手術検体から採取する場合、生検・掻爬によって採取する場合を指す。月経血が子宮内膜に由来する考えからすると、子宮内膜と月経血は同じ組織に由来する

間葉細胞ということになる。しかし、ここでは採取方法が異なることより、別組織として考えた。子宮内膜は、増殖期、分泌期、月経期では性格の異なる間葉細胞が存在する可能性がある。

6 胎児由来の心筋と線維芽細胞

胎児心筋と胎児由来の線維芽細胞は、まったく別の細胞である。胎児由来線維芽細胞は、一般に皮下に存在する未熟な間葉細胞由来と考えられる。胎児心筋が細胞治療の供給源となる可能性は決して高くはないと思われるけれども、具体的に自分たちが治療を行う可能性のある細胞は列挙していく。心臓移植で一番いいのは、胎児心筋に決まっている。しかし（倫理的に）現実的ではなく、胎児心筋細胞は虚血に弱いと考えられている。

死亡胎児に由来する細胞の臨床応用について議論が続いており、これらの細胞は脊髄損傷やパーキンソン病の治療に効果が期待されている。厚生労働省の専門委員会は平成 16（2004）年 6 月 17 日に厳しい条件付きで利用を認めた。条件は、①人工妊娠中絶を誘発しないよう、中絶手術と細胞提供の手続きを完全に分離する、②胎児の細胞提供に関する説明は、産婦人科医、幹細胞研究者以外の助産師、看護師などの第三者が行う、③提供施設の選定にあたっては、対象施設と厚労省の審査の二重審査体制にする、である。同委員会は 2002 年 11 月、いったん容認を決めたが、議論不足との批判を受け、再検討していた。

7 真皮由来の間葉細胞

真皮由来の間葉細胞または線維芽細胞に関する研究も進んでいる。試験管内において増殖が早いことが知られており、陰茎包皮をその供給源とする。

8 脂肪細胞

美容目的に行っている、吸引した脂肪や乳癌の手術材料に付着する脂肪組織に由来する間葉細胞に対しても注目が集まっている。細胞治療を行うために脂肪組織を採取すると、脂肪を切除することにより肥満解消にもなるという一挙両得といったニュアンスである。

9 末梢血

末梢血より間葉細胞を単離しようとする試みをよく聞く。もちろん、末梢血は患者より採取する際も痛みが軽微で、採取は容易であり、意義はよくわかる。分化能は他の組織由来と何ら変わることはないと考えられる。しかし、細胞の分裂能は乏しく、寿命は短いのではないか。末梢血由来の間葉細胞が増殖する研究成果を聞くことがあるけれども、臍帯血同様、採血時に皮下織の間葉細胞が採取されている可能性も否定できない。

10 腎臓¹¹⁾

腎臓の間質細胞と知られている細胞は、脂質の小滴に富む星形の細胞がみられる。これらの細胞から、降圧作用を有するプロスタグランジン E₂およびリン脂質である血小板活性因子が産生されると考えられている。

11 精巣¹¹⁾

精巣における間質細胞は一般にライディッヒ細胞と呼ばれ、精細管の間質に集団で容易にみられる。多角形ないし球形であり、紡錘形のものもある。線維芽細胞様細胞から転化した上皮様細胞の一例である。これらの細胞は細長い線維芽細胞様細胞から分化するにもかかわらず、細胞の形と配列は上皮様であり、細胞間に結合織が存在しない。

12 卵巣¹¹⁾

卵胞閉鎖の際に内卵胞膜細胞（internal theca cells）が間質中に残存することに由来する卵巣の間質細胞は、テストステロンを分泌する。

● おわりに

間葉細胞とは骨、軟骨、脂肪、骨格筋、真皮、靭帯、腱といった結合織細胞を総称しており、発生学的に中軸中胚葉（paraxial mesoderm）由来の細胞である。また、この中軸中胚葉の他に、心筋、平滑筋、血管内皮といった発生学的に臓側中胚葉（visceral mesoderm）由来の細胞がある。骨髄由来の間葉細胞のなかに臓側中胚葉にも分化できる幹細胞が見出された。間葉系幹細胞は試験管内においても分化能に応じて階層構造を形成しているという作業仮説は、検証され

るべきものであるけれども、間葉系細胞の分化を説明するにはたいへん便利である。

謝辞 執筆の機会を与えていただいた小室一成教授に深謝いたします。

文献

- 1) Takeda Y, Mori T, Imabayashi H, Kiyono T, Gojo S, Miyoshi S, et al. J Gene Med 2004 ; 6 : 833-45.
- 2) Kato Y, Imabayashi H, Mori M, Tani T, Taniguchi M, Umezawa A, et al. Biol Reprod 2004 ; 70 : 415-8.
- 3) Sharov AA, Piao Y, Matoba R, Dudekula DB, Qian Y, VanBuren V, et al. PLoS Biol 2003 ; 1 : 410-9. E 74. Epub 2003 Dec 22.
- 4) Imabayashi H, Mori T, Gojo S, Kiyono T, Sugiyama T, Irie R, et al. Exp Cell Res 2003 ; 288 : 35-50.
- 5) Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, et al. Exp Cell Res 2003 ; 288 : 51-9.
- 6) Gojo S, Umezawa A. Hum Cell 2003 ; 16 : 23-30.
- 7) Allan EH, Ho PW, Umezawa A, Hata J, Makishima F, Gillespie MT, et al. J Cell Biochem 2003 ; 90 : 158-69.
- 8) Ochi K, Chen G, Ushida T, Gojo S, Segawa K, Tai H, et al. J Cell Physiol 2003 ; 194 : 45-53.
- 9) Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, et al. Dev Cell 2001 ; 1 : 749-58.
- 10) Umezawa A, Yamamoto H, Rhodes K, Klemsz MJ, Maki RA, Oshima RG. Mol Cell Biol 1997 ; 17 : 4885-94.
- 11) 藤田恒夫, 藤田尚男. 標準組織学 各論. 第3版. 医学書院 ; 1992.

◎日本図書館協会選定図書◎

わかりやすい透析食

新生会第一病院院長 小川洋史 監修

日本の血液透析技術は世界最高水準といわれ、長期に透析治療を続けている方もたくさんいらっしゃいます。日常生活のなかで、1日3回の食事管理を透析療法と合わせ、どう日常化させ、定着させていくのかは安定した透析生活を送る上で重要なキーポイントになります。

本書は、透析食の基本としての栄養バランスや水分・塩分・カリウム・リンのとり方に加え、高齢者の場合の工夫や、貧血・胃腸不快感・便秘・正月料理の注意点・外食の選び方までを紹介しました。また、簡単に作れる料理を40組、作り方と栄養量、糖尿病性腎症でエネルギーコントロールが必要な場合の応用パターンとして「透析糖尿病食への展開」も示しました。



B5判、164頁(カラー80頁)
定価 1,575円(本体1,500円+税5%)
[ISBN4-89775-175-6 C3047]



ライフサイエンス出版

〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町11-7

TEL 03 (3664) 7900 FAX 03 (3664) 7734 / 7735 URL <http://www.lifescience.co.jp>

[座談会] 細胞移植

細胞移植の現状と課題

—基礎から臨床へ—

ES 細胞研究の最前線／間葉系幹細胞研究の現状／体性幹細胞研究と応用

■出席者■ (発言順)

(司会) 小室一成 こむろ いっせい：千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学
山下 潤 やました じゅん：京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター
桜田一洋 さくらだ かずひろ：協和発酵工業（株）先端バイオ研究所
梅澤明弘 うめざわ あきひろ：国立成育医療センター研究所生殖医療研究部



左から 山下 潤・桜田一洋・小室一成・梅澤明弘の各氏

2004年6月29日・東京

ES 細胞研究の最前線

小室 再生医療はマスコミにも取り上げられるようになり、研究者のみならず、一般の方にも大変注目されています。再生医療にもいろいろな手法がありますが、今日はそのなかでも細胞を移植することによって治療を行うという試みについて、専門の先生方にお話を伺いたと思います。

■研究はマウスからヒトに移りつつある

小室 細胞移植で最も注目されている ES 細胞 (embryonic stem cell) は、万能細胞ということでマスコミにもよく登場し、いまにも臨床へ応用されるかのように伝えられています。ES 細胞

の研究の現状と、臨床へどの程度近づいているのかということについて、山下先生からお話を伺いたと思います。

山下 マウスの ES 細胞は 1981 年に樹立され、心臓に関しては、拍動する細胞が ES 細胞から分化するということが 80 年代にすでにわかっていました。しかし、それから 20 年近くたった現在でも心筋細胞移植研究はまだ進んでいません。

分化誘導した ES 細胞の移植には、目的の細胞を取り出して集めるところに一つの難しさがあります。ES 細胞の分化誘導は、胚様体を用いる方法が広く用いられています。この方法は、浮遊培養を行い、未分化 ES 細胞の塊をつくるというものです。そうすると、この塊内で胎仔様の細胞間相互作用が起き、いろいろな細胞が



小室一成 氏

誘導されるのです。血管や心臓などはこの方法によって誘導されますが、そのメカニズムや分化の経路はわかっていません。ですから、この細胞の塊から目的細胞をどのように回収し、移植できるような形にもっていけるか、という問題がありました。

私たちはこういった問題をクリアするために、分化メカニズムの解析と、集めてきた細胞を純化して移植できるかたちにする研究を行っています。

ここ数年、主に心臓と血管の分化について、マウスのES細胞を用いた研究を行ってきました。現在はヒトのES細胞の研究に着手したところです。具体的には、胚様体を用いるのではなく、2次元培養下でES細胞を分化誘導し、心臓や血管へ分化する途中の細胞をFACS (fluorescence-activated cell sorter) を使って選り集めています。現在、ES細胞を心臓と血管に分化させ、血管を動物モデルに移植し、体内で新生血管を増やすところまでは成功しています。ようやく、分化できるというだけのところから、移植への応用が進みかけている段階です。

臨床面に関しては、治療のターゲットとして、成人の体の中ではいったん死んでしまったらもう増えることができないとされていた細胞、すなわち神経細胞と心筋細胞、それからインスリンをつくる膵臓のβ細胞の三つが注目されてい

ます。心筋や神経の分化誘導はずいぶん前にできるようになっていましたが、神経に関しては細胞同士がネットワークをつくってしまうので、これを単離することが非常に難しいようです。膵β細胞などの内胚葉系の細胞に至っては、系譜を追った分化そのものができていない状況です。外胚葉系、中胚葉系の細胞は比較的容易に誘導できますが、分化誘導の容易さと、それを材料に移植できるようにすることとは違う難しさがある。内胚葉系、とくに膵β細胞は分化そのものがまだあまりうまくいっていません。

小室 外胚葉系、中胚葉系に関しては目的の細胞に分化することができ、そのメカニズムもわかってきた。ただ、内胚葉に関してはまだ分化させることも難しいということですね。
山下 そうですね。ES細胞から膵β細胞の分化誘導を行ったという報告はありますが、それは主にインスリンの産生を指標にして膵β細胞と判断をしているものが多いのです。しかし神経細胞などでも分化初期にはインスリンを産生するものが多い。血糖を感知して、それに対してインスリンを十分に産生できる膵β細胞を分化させることは今のところまだできていないと思います。

小室 神経に関してはいろいろな種類の神経細胞に誘導できるようになっているのですか。

山下 それに関しては慶応大学の岡野栄之先生が述べられていましたが、ES細胞で分化しやすい細胞と、生体由来の神経幹細胞から誘導されやすい細胞とは、多少傾向が違うようです。

■移植に適する分化ウインドウのタイミング

桜田 ES細胞を移植の材料として使うときに、完全に分化した細胞を移植するのか、それとも前駆細胞の段階でうまく止めて移植するのかという移植方法の最適化が一つの課題だと思います。血管系についてはどういう段階で移植するのが効率がよいのでしょうか。

山下 私たちはES細胞を分化させる途中で、体内の中胚葉レベルの細胞を回収し、そこからさらに血管をつくる方法をとっています。*in vitro*ではこの中胚葉レベルの細胞から血管だけをきれいに作り出すことに成功しました。

しかしこれを体内に移植すると、血管以外の細胞も増えてきてしまうのです。しかし、いったん*in vitro*で血管内皮細胞のマーカールを出し始めるくらいまで分化誘導した細胞を移植してみたところ、血管特異的に分化させ、血流をある程度増やすこともできました。つまり、ES細胞に由来する前駆細胞を移植するときには、移植される組織側が要求する分化レベルに見合ったステージのものを移植する必要があるのです。さらにその狭い分化ウィンドウに該当するステージの細胞を効率よく増やすことも必要ですね。

梅澤 ウィンドウの狭い分化能をもったES細胞は、体細胞的でもあります。マウスのESやEC(embryonal carcinoma cell: 胚性癌腫細胞)については心臓になりやすいもの、神経になりやすいものがみつかっています。多くの種類のES細胞を用意することが重要なのではないのでしょうか。多分化能をもたない体細胞的なES細胞でも、無限大の増殖能をもっていますので、非常に重要な細胞と考えることができます。

小室 では、完全に分化しきったものを植えるというのはどうですか。

山下 それはほとんど生着しないといわれています。だからといって分化初期の細胞を単純に植えればよいというわけではないのです。*in vitro*で血管にしか分化しないのは、培養系が細胞に与えることができるシグナルが非常に制限されていて、血管に分化する可能性しか残されないためです。しかし、生体内では多くのシグナルを受けるため、血管以外の分化能が出てきてしまいます。

梅澤 しかし臨床の現場では、血管以外のもの



山下 潤氏

ができることが問題なのかというのを一度考えてほしいのです。前に学会でESを使ったら血管腫をつくったと聞いたが、あれはあれでいい。ESを使ってきちんと血管ができるという事実はきわめて重要なことだと思います。目的の組織が作製され、患者の要求が満たされるものができればある程度のデメリットは目をつぶってもいいのではないのでしょうか。たとえば血液がきちっと虚血組織に流れれば多少の骨や軟骨ができて問題はないという考え方もありうると思います。

小室 そういう考えもあるかもしれませんが、心臓に骨ができるとまずいですよね。

山下 でも虚血肢であれば、部分的に骨ができてさほど問題ではないですね。そのときどきで患者にとってリスクとベネフィットを明確にすることが必要ですね。

■免疫拒絶と腫瘍化の回避

小室 ES細胞の移植の大きな問題として、免疫的な拒絶をまだクリアできていませんが、解決法としてはどのようなことが考えられているのですか。

山下 可能性としては四つあると思います。一つ目は、つい先日ヒト胚のクローンを川いた基礎研究を許可する方向性が示されましたが、自分自身の細胞の核移植をして、my ESのような



桜田一洋 氏

ものをつくる方法です。二つ目は、ES細胞はいろいろな株が樹立され、遺伝子の操作などできますから、種々雑多なES細胞をつくり、ESバンクを作るのもよいと思います。三つ目は、免疫的な攻撃を受けないような遺伝子操作を行い、万人に移植可能なES細胞、ユニバーサルESをつくることも一つの方法だと思います。四つ目は、ES細胞と自分の体細胞を融合させる方法です。融合させた細胞は4倍体のままですが、ES細胞のような分化能を獲得することが報告されています。4倍体の細胞が移植できるかどうかという別な問題がありますが、大きなストラテジーとしては、少なくともその四つぐらいはあるのではないかと考えています。

小室 臨床応用に最も近いのはどれですか。

山下 将来性があるのは、ユニバーサルESだと思います。これは心臓用、神経用というように、適切な分化傾向をもつよう分化させた細胞をアンプルに入れ、工場のようなところで品質管理しながら製品化するのです。たとえば心臓のカテーテルをするとき一緒にそのアンプルを溶かして打てばいい。そうすると日常の診療レベルで使え、産業としての展開が可能です。

梅澤 ユニバーサルESの際、免疫の拒絶の問題で、移植抗原についてはいくつ潰せばよいのでしょうか。

山下 それはまったくわかりません。潰しただ

けでは駄目かもしれないという話もありますし、逆に細胞レベルの移植でバラバラと入ったものにはあまり免疫は働かないのではないかとという話もあります。

桜田 あまり潰し過ぎるとウイルス感染に対する防御が効かなくなる危険性があるので、どこを潰すかという問題も出てきます。ウイルス感染があまり問題にならない組織であればよいのですが、組織適合性抗原はウイルスに対する防御の機構もあると思うので、安全性と有効性に関しては今後の研究課題だと思います。

小室 未分化な細胞が移植されると、良性とはいえ腫瘍をつくるという問題があります。これに対してはどのような研究がなされているのですか。

山下 山中伸弥先生（京大再生研（奈良先端医大））のグループは、ES細胞のERasという因子の機能を阻害することで、分化全能性を維持しつつ、腫瘍形成能を抑えることに成功しています。ERas遺伝子を潰したES細胞を移植することも可能かもしれません。また、未分化な細胞だけに機能する自殺遺伝子を導入することも一つの方法です。

いずれにしろ、現在のES細胞ではそのまま移植することは難しく、造腫瘍性をなくしたものをつくる必要があります。

■臨床応用に最も近い疾患

小室 ES細胞を臨床に最も早く応用できるのは、どんな疾患だと思われますか。一般的にはパーキンソン病といわれていますが。

山下 パーキンソン病か糖尿病だと思います。膵β細胞は分化させることさえできれば、臨床に使う日は近いような気がします。膵β細胞をカプセルに入れ、完全に隔離した状況で体の中に埋め、それが血糖を感知してインスリンを適切に出してくれればいい。問題が起これば取り出すことができますので、体の中に完全に取り

込ませる方法よりは安全です。

桜田 カプセルの中に入れるという方法は、パーキンソン病の治療にも使える可能性があります。パーキンソン病の治療で今いちばん有力なのは、脳内にドパミンを補充するというものですので、戦略としてはβ細胞の場合と似ていますね。



梅澤明弘氏

間葉系幹細胞研究の現状

■間葉系細胞とは何か

小室 ES細胞は、移植する細胞の分化ウィンドウ、拒絶や腫瘍性という課題が残されていますが、それに対して、それらの問題が比較的少なく、また多分化能をもった細胞として間葉系の幹細胞が注目されています。そもそも間葉系とはどういった細胞なのでしょう。研究の現状など梅澤先生からお話いただけますか。

梅澤 教科書には間充織を合成する細胞と書かれています。ですからほとんどの組織に存在します。たとえば心臓では心筋の間に存在している線維芽細胞は間葉系です。肺では、肺胞上皮の基底膜下に存在し、血管以外の細胞は間葉系の細胞です。また皮膚については、表皮の基底膜の下、真皮に存在する細胞は、脂肪細胞を含めて全部を間葉系と呼びます。

小室 オリジンは何ですか。

梅澤 オリジンは中胚葉です。ところで、神経の間に存在するマイクログリアは中胚葉由来なのですか。

桜田 それは現在議論されているところですが、最近、理研の西川伸一先生のグループが間葉系の幹細胞を中胚葉とは別に誘導できるということを報告されています。ですから、間葉系が独自に分化する可能性も示唆されています。

梅澤 間葉系細胞はいくつかの組織から得るこ

とができます。いま臨床で主に使われているのは骨髄間質由来の間葉系で、今年度にはフェーズIの安全性試験が厚生労働省へ申請されるだろうといわれています。

一方、研究段階としては、ペニスの包皮に存在する真皮の間葉系細胞、臍帯血由来の間葉系細胞があります。また、胎盤の間葉系細胞は非常にたくさんの量を得ることができますし、今まで廃棄されてきた臍帯血や胎盤が臨床で使えるとなると、すべてのHLAをカバーできるほどの種類が得られるだろうと予想されています。また、間葉系細胞で最も増殖能が高いのは、死亡胎児由来のもので、2004年7月、再生医療に死亡胎児を利用する治療が公式に認められました。今後死亡胎児については倫理的なことを含めて、間葉系細胞を用いた治療に非常に重要な意味もつことになると思います。

また、脂肪組織については、美容形成で吸引し、その脂肪組織を使って骨、軟骨、脂肪、骨格筋、心臓、神経、さらに肝臓までつくろうという研究者もいます。

もう一つ注目したいのは子宮内膜、月経血です。子宮内膜は生検で取ってくる必要がありますが、月経血は痛みを伴わないというメリットがあります。もちろん倫理的にはきわめて慎重を要します。また、大量に得られるお母さんの子宮内膜や月経血を、子供の酵素欠損、筋ジス