

## 臨床応用をめざした間葉系幹細胞の基礎と治療実験

Basic biology and therapeutic experiments for clinical application of mesenchymal stem cells



戸口田淳也 青山朋樹

Junya TOGUCHIDA and Tomoki AOYAMA

京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野

◎間葉系幹細胞とは骨髄間質に存在し、骨、軟骨、脂肪などの複数の組織を形成する細胞に分化可能な細胞であり、再生医療における細胞源として臨床応用への試みが進められている。しかし、間葉系幹細胞の本態および間葉系幹細胞から最終分化細胞に至る過程についてはいまだ不明の点が多い。真の間葉系幹細胞を同定し、その分化過程を遺伝子レベルで理解することが臨床応用に向けて必須の事項であり、また臨床サイドからどのような臨床病態が間葉系幹細胞を用いた再生医療を必要としているのかを見極めることも非常に重要な点である。



Key word : 間葉系幹細胞, 骨, 軟骨, 骨壊死

骨髄間質には、骨、軟骨、脂肪などの複数の組織を形成する細胞に分化可能な細胞が存在しており、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)と称せられている。採取および培養が比較的容易であることから、再生医療の材料として注目され、すでに骨あるいは軟骨再生への臨床応用が開始されている。

本稿ではまず MSC の基礎生物学に関する著者らの研究を紹介し、つぎにどのような病態が MSC を用いた治療の対象となり、どのようなアプローチが可能なのかを考察する。

### “*in vitro* での分化”とはどのような現象をみているのか

Pittenger らの報告が MSC 研究においてエポックメイキングな点は *in vitro* における多分化能を検証する系を確立したことであろう<sup>1)</sup>。以後この実験系は多くの研究者によって用いられてきた。しかし、*in vitro* での誘導に用いられる因子が *in vivo* における分化過程においても働いている役者であるかどうかはまったく不明である。たとえば、

骨誘導に関しては、デキサメタゾン、ascorbic acid および glycerophosphate が用いられる。後二者は石灰化に直接関与していることが判明している因子であるが、デキサメタゾンは濃度の差はあるものの、軟骨、脂肪への分化誘導にも用いられるものである。デキサメタゾンの役割は何であろうか。この課題に対するアプローチのひとつとして誘導前後での遺伝子発現変化をマイクロアレイなどを用いて網羅的に比較解析するという手法が考えられ、実際にいくつかの解析例が報告されている<sup>2,3)</sup>。

しかし、このようなアプローチは誘導因子(たとえばデキサメタゾン)の下流にある遺伝子のリストにすぎないのではないかという批判は当然成立するであろうし、たしかにリストアップされた膨大な数の変動遺伝子のなかから分化にとって本質的な因子を同定することはきわめて困難である。著者らはこの課題に対し図 1 のように、これまでに単離した分化能が限定した不死化 MSC クローン<sup>4)</sup>を用いることで標的遺伝子を限定する工夫を行っている。骨、軟骨、脂肪の 3 方向への分化能を有する AOC クローン(2 種類)、骨、脂肪に分化

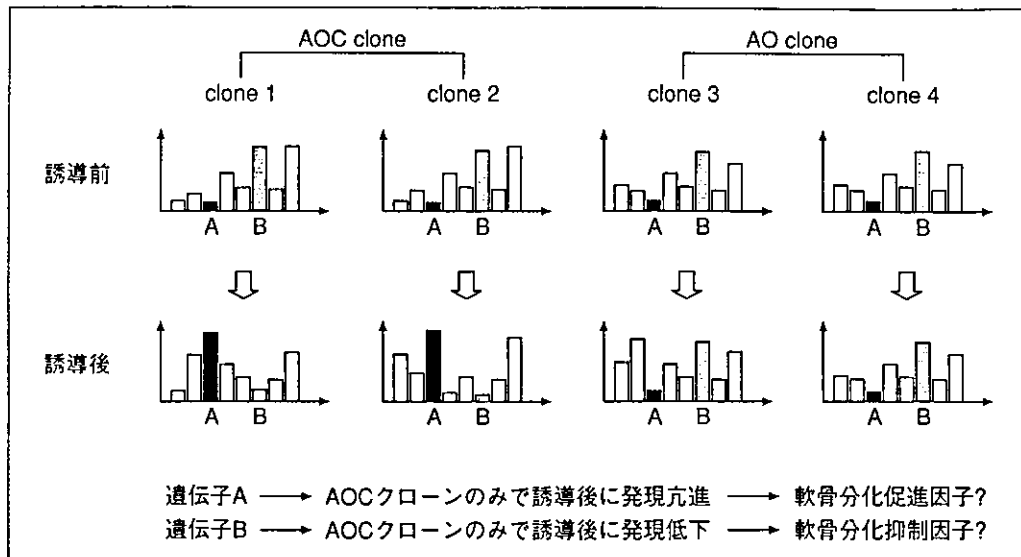


図1 不死化MSCクローンを用いた軟骨分化関連遺伝子の同定戦略  
 グラフは遺伝子発現プロファイルにおける各遺伝子の発現強度を示す。AOCクローン：骨、軟骨、脂肪に分化可能なクローン、AOクローン：骨、脂肪にのみ分化可能なクローン。

できるが、軟骨には分化できないAOクローン(2種類)の各細胞に対し軟骨分化誘導を行う。誘導前および誘導後(実際に軟骨細胞としての形質が誘導されるより前の段階)での遺伝子発現をゲノムワイドなマイクロアレイにより解析する。遺伝子AのようなAOCクローンでのみ誘導後に発現が亢進する遺伝子、あるいは遺伝子BのようにAOCクローンでのみ誘導後に発現が低下する遺伝子を抽出する。前者は軟骨分化に対し促進的に作用し、後者は抑制的に作用すると想定し、その機能を解析する。このようなアプローチで実際、単にAOCで軟骨誘導後に発現が変動したという定義で抽出した1,000個以上の遺伝子から10数個まで標的を絞ることに成功し、現在その発現の意義を解析している。

### MSCはどのような道筋を経て分化するのか？

MSCが未分化な状態から特定の形質をもつ細胞へ分化する過程はどのような遺伝子発現の変化を伴うのであろうか。著者らが行った不死化MSCのクローナルな解析や、その他の解析からも限定された複数の分化方向をもつ細胞が存在することは確かである<sup>4,5)</sup>。この中間に位置する細胞のモデルとして、著者らは骨肉腫の解析を進めている。骨肉腫は類骨を産生する悪性腫瘍として定義され

ることから、その起源はMSCから骨細胞へ至る過程におけるいずれかの分化段階の細胞であると考えられる。実際、形成される組織像も広範に類骨形成を示すものから、ほとんど類骨が認められないものまで非常に多様であり、骨軟骨関連遺伝子の発現パターンも同様に多様である(図2)。とくに興味深いタイプは軟骨形成型骨肉腫であり、骨・軟骨の分化マーカーが同時に検出され、*in vivo*では、ある部位では類骨を、他の部位では類軟骨を形成する。もしこのような中間細胞が正常組織中においても存在するならば最終分化決定段階で、不必要となった他方向への分化関連遺伝子のセットが効率よくいっせいに、かつ恒常的にOFFとなる機構が必要である。遺伝子発現調節領域のメチル化による転写抑制機構はその有力な候補のひとつである。

著者らは、軟骨形成型骨肉腫に特異的に発現している軟骨関連遺伝子であるchondromodulin-1(ChM-1)遺伝子に注目し、遺伝子発現調節領域のメチル化を解析した。その結果、予想されていたように、軟骨形成型以外の骨肉腫ではChM-1遺伝子のプロモーター領域は一様にメチル化を受けていることが判明し、さらに、Sp1/3結合部位のメチル化によりSp3の結合が阻害されることが発現抑制と密接に相関することが明らかになった

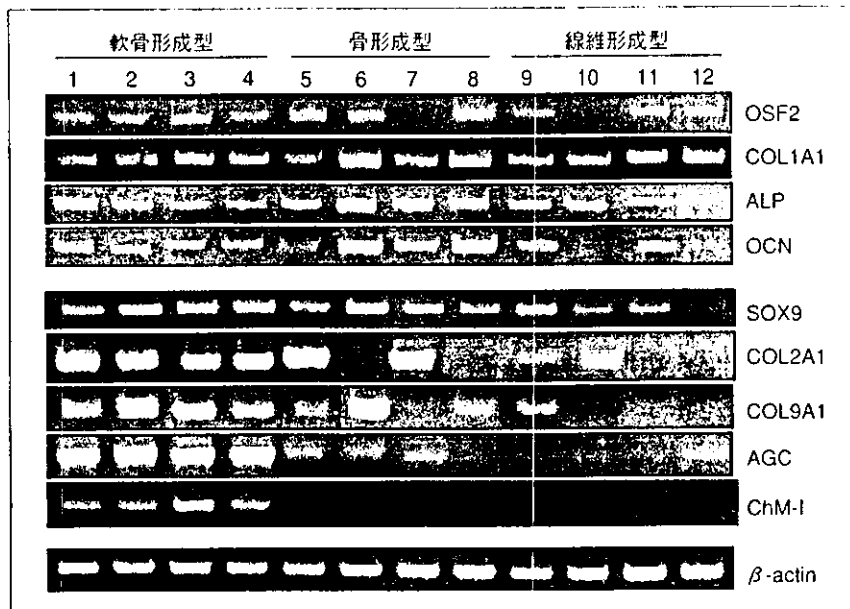


図 2 骨肉腫における骨軟骨関連遺伝子の発現  
RT-PCR 法により各遺伝子の mRNA 発現を検討した。

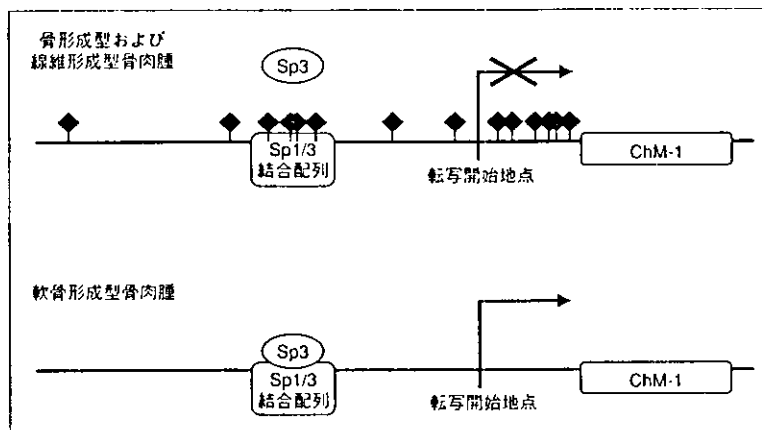


図 3 ChM-1 遺伝子の発現調節機構

ChM-1 遺伝子のプロモーター領域を表し、◆はメチル化を受けている CpG 部位を示す。骨形成型および線維形成型骨肉腫では広範囲にメチル化を受けており、その結果、転写因子 Sp3 が所定の部位に結合できず ChM-1 遺伝子は発現できない。軟骨形成型では脱メチル化されており、Sp3 が結合し、遺伝子発現が陽性となる。

(図 3)<sup>6)</sup> ChM-1 遺伝子以外の、いくつかの軟骨関連遺伝子でも同様な現象を確認できている。つまり MSC から最終分化細胞に至る過程で“分化形質関連遺伝子をなにも発現してない”MSC から“複数の分化形質関連遺伝子を発現している”中間細胞を経て“その他の分化方向に関連する遺伝子の発現が消失する”ことで、“特定の分化形質のみを発現する状態”になることで分化細胞となるという道筋が考えられる。

以上のような MSC の基礎生物学の研究により

“いろいろやってみたらこうなった”的な誘導法の根底にあるものが明らかになれば、簡便かつ高率な誘導法が開発でき、MSC を用いた再生医療に貢献するものと考えられる。

### MSC を用いてなにができるのか

#### — 難治性骨病態への応用

では MSC の臨床応用の対象としては、どのようなものが考えられるのであろうか。単純な骨の欠損であれば、現在開発されている骨誘導能をもつ

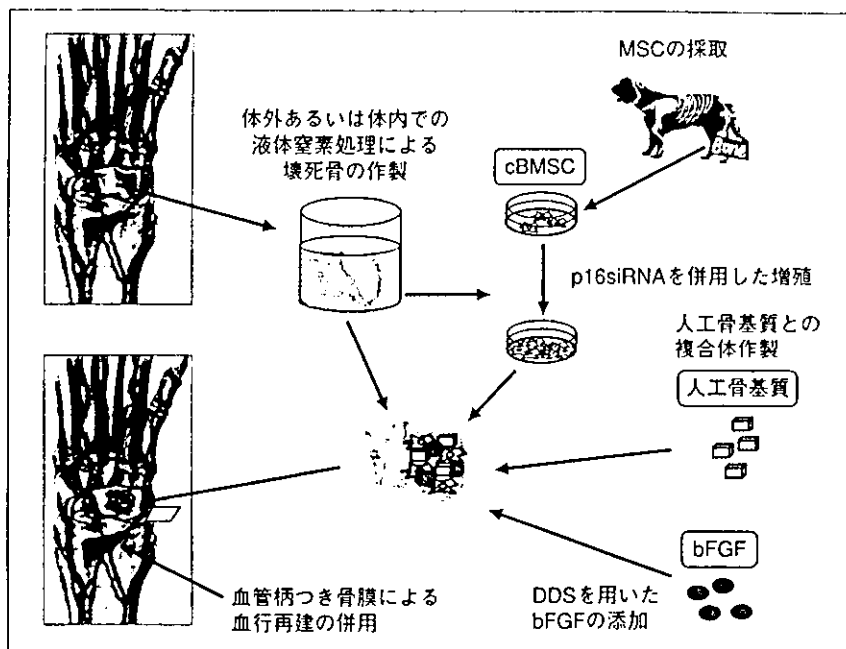


図 4 Kienbock 病モデルの作成と MSC を用いた治療実験

人工骨材料により十分修復可能である。問題は単純な骨移植では治療が困難な病態であり、その代表例が骨壊死であろう。骨壊死の原因および臨床病態は多様であるが、治療の基本的な考え方は、“陥没変形などの不可逆的な変形により軟骨まで病態が及ぶ前に骨組織を再生する”と定義できるかと思う。つまり臨床応用を考えるうえで、“再生速度”は非常に大きな意味をもち、その意味で組織

再生の源としての MSC の応用は意義があると考えられる。たとえば、Kienbock 病を考えてみると、発症要因に生体力学的因子が関与していることは明らかであり、メカニカルストレスにより生じた局所浮腫によるミクロの血行障害が主因であると想定されている。マクロの血行が靭帯を經由してしか入ってこないという手根骨の解剖学的特性も関与しているであろう。以上の問題点をすべて解決することがこの病態の本質的な治癒に結びつくと考えられる。現在、図 4 に示すアプローチで、イヌを用いた病態モデルを作成し、その治療実験を行っている。液体窒素処理により壊死骨モデルを作成し、腸骨より採取した MSC を細胞周期制御因子である p16 遺伝子の不活化(「サイドメモ」参照)などを応用し増殖させ、足場となる人工骨材料およびミクロの血行再建のために bFGF のような血管再生因子を添加、さらにマクロの血行再建として血管柄付き骨膜移植を併用することで、早期の骨再生をめざしている。

サイドメモ

small interfering RNA の応用

本特集、清野の「遺伝子導入によるヒト細胞寿命の延長」に詳しく解説されてあるように、細胞の増殖は細胞周期制御因子の活性と染色体末端の短縮で規定されている。とくに培養開始初期における細胞増殖停止には細胞周期制御因子の活性化の関与が大きいと考えられており、なかでもサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p16 遺伝子の発現亢進が主役であるとされている。MSC においても早期に発現が亢進し、増殖低下の一因となっている<sup>4)</sup>。近年、相補的配列をもつ small interfering RNA (siRNA) を用いて特定の遺伝子の発現を転写レベルで阻害することが可能となった。著者らは p16 遺伝子に対する siRNA を MSC に導入し、その発現を抑制することで増殖が促進されることを見出し、応用している。

MSC を用いてなにができるのか

— 複合体組織形成への応用

MSC の特性である多分化能を利用するアプローチとして複合組織の形成が考えられる。もっとも単純なモデルは骨軟骨複合体であり、離断性

骨軟骨炎に代表される関節軟骨損傷に対して, *ex vivo* で複合体を形成させて修復する試みが報告されている<sup>7)</sup>. より挑戦的な課題として人工材料への軟組織結合への応用がある. 臨床整形外科医, とくに著者のように骨腫瘍を扱っているものにとっては軟組織付着部の再建ということは大きな課題である. 大腿骨近位プロステシスへの中殿筋腱の付着, 脛骨プロステシスへの膝蓋靭帯付着が可能となれば, 患肢機能に対する影響は非常に大きい. チタン製材料をアルカリ処理などによる表面修飾することで, 高い骨親和性を獲得できることが判明している<sup>8)</sup>. この特性を利用してチタン製材料と生体軟組織の結合部位に未分化 MSC を播種することで, 靭帯-MSC 由来靭帯組織-MSC 由来骨組織-チタン製材料という複合組織の形成が可能ではないかと考え現在検討中である. このような応用は腫瘍疾患以外でも, たとえばハムストリングスを用いた十字靭帯再建において再建靭帯組織と骨組織の間に生体における骨靭帯付着部の構造が再建できれば, 骨内での滑動による靭帯組織の劣化などの問題も解決され, 応用は広い.

## おわりに

MSC は基礎生物学的にも臨床医学的にも魅力的な細胞であることは間違いないが, いまだ未解明な点も多いことも確かである. 本稿で提示したいくつかの課題が解明され, MSC から分化細胞へ

の誘導が錬金術から科学技術となることが今後の展開においてもっとも重要な点であろう.

## 文献

- 1) Pittenger, M.F. et al. : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284** : 143-147, 1999.
- 2) Sekiya, I. et al. : *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** : 4397-4402, 2002.
- 3) Maeda, S. et al. : Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. *J. Cell. Physiol.*, **193** : 73-79, 2002.
- 4) Okamoto, T. et al. : Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295** : 354-361, 2002.
- 5) Muraglia, A. et al. : Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.*, **113** : 1161-1166, 2000.
- 6) Aoyama, T. et al. : Methylation in the core-promoter region of the chondromodulin- I gene determines the cell-specific expression by regulating the binding of transcriptional activator, Sp3. *J. Biol. Chem.* (in press)
- 7) Gao, J. et al. : Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.*, **7** : 363-371, 2001.
- 8) Fujibayashi, S. et al. : Osteoinduction of porous bio-active titanium metal. *Biomaterials*, **25** : 443-450, 2004.

\* \* \*

## バイオマテリアルへの細胞播種，細胞分化誘導

Cell seeding into a hybrid scaffold of PLGA mesh with collagen micro-sponges



牛田多加志

Takashi Ushida

東京大学大学院工学系研究科附属疾患生命工学センター

◎生体外で組織を再構築するためには細胞ソースを適切な三次元培養担体に均一に播種する必要があるが、そのためには三次元培養担体の内部微細構造を最適設計し、さらにそれに沿った微細構造構築が必要である。しかしながら、現時点では的確な方法としては実現されていない。その基盤技術の確立のための中間的なステップとして、PLGA メッシュ・コラーゲンマイクロスポンジ複合シートのように生分解性高分子のメッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化させたものを用いる方法がある。この培養担体は、厚みが 200  $\mu\text{m}$  であることと、コラーゲンマイクロスポンジに細胞を接着、伸展させる機能があることから、均一播種を実現させることができる。このように、細胞に outside-in のシグナルを送ることができるバイオマテリアルを用い、そしてそのシグナルを細胞に対して三次元的に入れることができる構造を構築することにより脱分化した軟骨細胞の再分化、ひいては軟骨組織形成が実現される可能性がある。

**Key word** : 細胞播種，生分解性高分子，再生軟骨，細分化

再生医療においては骨髄細胞移植に代表される細胞移植 (cell transplantation) から培養皮膚を用いた皮膚再生に代表される組織再生 (tissue regeneration) まで、すでに臨床に応用されている技術が存在する。さらに、ターゲットとする組織の適用を広げるためにはより厚い、より大きな組織の再生を実現するための技術の確立が望まれている。そのためにはクリアしなければならないハードルがいくつも存在するが、そのひとつにバイオマテリアル (三次元培養担体) への細胞の均一播種の問題がある。細胞はフラスコ培養ではポリスチレンの二次元平面のうえで単層に培養され、正常細胞の場合はけっして三次元構造をとることはない。したがって、生体外で三次元生体組織様構造を構築するためには細胞を三次元的に配置し、その材料に接着した状態で細胞を培養することの可能な三次元培養担体が必須である。この三次元培養担体に細胞を三次元的に均一に配置することは予想

以上に困難なステップであり、現時点では洗練された方法では実現されていない。三次元培養担体に細胞を均一に播種するためには担体は当然ではあるが、多孔質体である必要がある。また、その孔は外部から内部まで連通している必要があり、独立空胞は細胞のアクセシビリティという観点からは存在しない孔と等しい。一方、孔の径についても、さらに孔の三次元的な構造についても最適に設計されないかぎり細胞を三次元的に均一に播種することは困難である。三次元培養担体の微細構造の最適設計、そしてそれを実現するための構造制御技術など、ティッシュエンジニアリングが今後解決すべき技術的問題が存在する。

本稿では、それに至る中間的な技術ステップとしてシート状の三次元培養担体について、著者らの研究を中心に概説する。

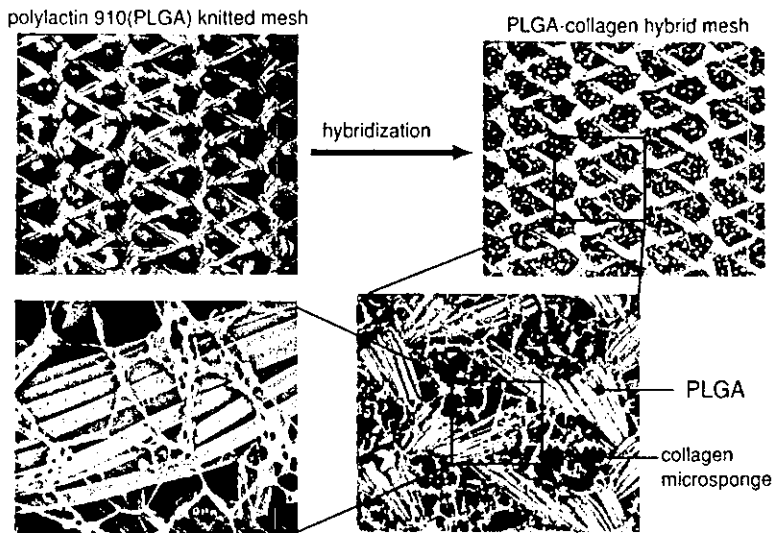


図1 PLGAメッシュ・コラーゲンマイクロ  
スポンジ複合シート(文献<sup>7)</sup>より改変)

## PLGAメッシュ・コラーゲンマイクロ スポンジ複合シート

再生医療においては、コラーゲン、ヒアルロン酸などの生体組織由来のマトリックスが用いられているが、これらのマトリックスは細胞膜のインテグリンやレセプターと相互作用するサイトを有しており、細胞にシグナルを送ることが可能であるが、機械的強度が十分でないという欠点をもつ。一方、ポリ乳酸(PLLA)、ポリグルコール酸(PGA)、そしてその共重合体であるPLGAに代表される生分解性高分子も再生医療において重要な材料である。これらの生分解性高分子は機械的強度があり、三次元培養担体のフレームとしては適当であるが、概して疎水性であり、細胞と相互作用するサイトがないという欠点がある。

そこで生体材料と生分解性高分子のそれぞれの欠点を補完し、長所を共有するひとつの解決法として両者のハイブリッド化が進められた。すなわち、オープンポアを有するPLGAの多孔体のポアの内部にコラーゲンマイクロスポンジを複合化させる方法<sup>1-3)</sup>や、PLGAメッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化させる方法<sup>4)</sup>(図1)、さらに多孔質アパタイトマイクロビーズと複合化させる方法<sup>5)</sup>、培養細胞を内包させたコラーゲンゲルと複合化させる方法<sup>6)</sup>などである。このうち、PLGAメッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化させる方法においてはそのフレームであるメッシュシートの厚さが約200 $\mu\text{m}$ であるため、細胞の均一播種という点においては、培養細胞を内包さ

せたコラーゲンゲルと複合化させる方法と並び、他の方法を凌駕している。200 $\mu\text{m}$ という厚さは細胞播種の均一性といった観点のほかに、細胞壊死を防ぐという観点からも優れている。血管構造が同時に再構築されない条件下では栄養拡散、酸素拡散の限度から2mm程度以上の厚さの組織再構築は一般に困難であると考えられている。したがって、このシートに播種した細胞は長期培養により細胞周囲に細胞外マトリックスを産生し、組織再生が行われたとしても中心部の細胞は壊死することはない。

図2はPLGAメッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化させた担体にウシ軟骨細胞を播種し、静置培養したときのSEM像である。PLGAメッシュの空隙に作成されたコラーゲンマイクロスポンジに軟骨細胞がトラップされ、接着、伸展している。そして培養とともに軟骨細胞が産生する細胞外マトリックスによりスポンジのつくる空隙が埋められ、培養後4週目にはメッシュとともに細胞外マトリックスにより担体全体が覆われている。一方、同様に図3はPLGAメッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化した担体にウシ軟骨細胞を播種し、1週間*in vitro*培養した後、ヌードマウス皮下にて8週間培養したときの切片のHE染色像である。PLGAメッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化した担体では、播種した軟骨細胞が深さ方向においても均一な分布を示しており、その中心部においても細胞の壊死はみられず、担体の空隙は軟骨細胞と軟骨細胞が産



図 2 PLGA メッシュ・コラーゲンマイクロスポンジ複合シートへの軟骨細胞播種，長期培養における SEM 像(文献<sup>8)</sup>より改変)

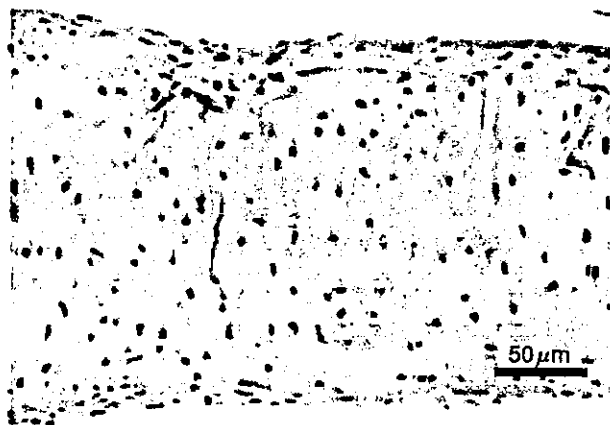


図 3 PLGA メッシュ・コラーゲンマイクロスポンジ複合シートへ軟骨細胞を播種し 1 週間培養後，ヌードマウス皮下にて 8 週間培養後の組織切片の HE 染色像(文献<sup>7)</sup>より改変)

生した細胞外マトリックスで占められていることがわかる。このシートを 5 枚重層させてインプラントしても中心部に壊死を起こすことなく軟骨組織形成が進むことがわかっている。したがって、厚さ 1 mm の軟骨組織を再生する場合、厚さ 200  $\mu\text{m}$  の PLGA メッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化した担体に軟骨細胞を播種し、それを重層させる方法は細胞の均一播種を実現する方法として有効であると考えられる<sup>7)</sup>。

### バイオマテリアルによる細胞分化誘導

バイオマテリアルより細胞の分化誘導ができるかについてはそれがけっして十分条件ではないことは確かである。一方で、細胞増殖因子などによる生化学的的刺激だけで細胞分化が達成されることはなく、インテグリンなどによる outside-in のシグナルや細胞-細胞相互作用によるシグナルなどの総合的な作用により分化誘導が達成されるこ

とが知られている。したがって、細胞にシグナルを送ることのできるサイトを有する細胞外マトリックスを用いること、そしてマテリアルを用いて三次元微細構造を構築することにより三次元的な細胞-細胞相互作用を実現すること、これらは細胞を分化誘導するための必要条件を具体化するための合理的な手段として有効であると考えられる。

軟骨再生においては非摺動部から軟骨片を採取し、そこから得られる自己軟骨細胞を細胞ソースとして関節軟骨組織を再生する試みがはじまっている。一方でモザイクプラスティを凌駕するためには採取した軟骨組織よりも大きな組織を再構築する必要があり、そのためには生体外での細胞増殖ステップが不可欠である。関節軟骨の基質を構築するコラーゲンは II 型であり、線維性軟骨組織のコラーゲンは I 型である。しかし、この増殖ステップにより関節軟骨細胞は脱分化し、産生するコラーゲンの型を II 型から I 型へ変換する。したがって、脱分化した軟骨細胞をいかに再分化させるか、その技術の確立がティッシュエンジニアリングに求められている。

それを実現するためのひとつのアプローチとして前項と同様に、PLGA メッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化した担体の可能性について概説する。前項で示されたように、担体に均一に播種された軟骨細胞は長期培養することにより自らの周囲に細胞外マトリックスを分泌し、生体関節軟骨組織と同様に軟骨細胞自体が自ら分泌した細胞外マトリックスで覆われる状態を実現することができる。この状態における軟骨細胞の形質は I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンの発現解析からみると再分化へと転換している可能性が示されている<sup>8)</sup>(図 4)。



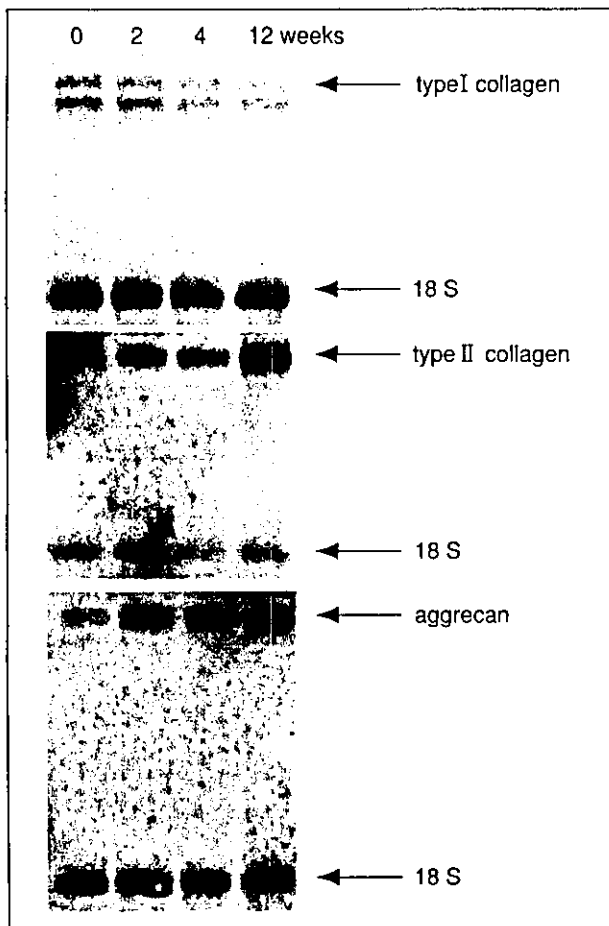


図 4 PLGA メッシュ・コラーゲンマイクロスポンジ複合シートへ軟骨細胞(2 継代目)を播種し、培養 0, 2, 4, 12 週後の I 型コラーゲン, II 型コラーゲン, アグレカンの Northern blot 解析(文献<sup>9)</sup>より改変)

このように、細胞播種時において軟骨細胞が接着し、進展するマトリックスとしてのコラーゲンのタイプは I 型ではあっても細胞外マトリックス分泌とともに直接的な接着は減少していくものと考えられる。また、I 型のコラーゲンでのみ構成されたスポンジおよび II 型のコラーゲンでのみ構成されたスポンジの両者に脱分化した軟骨細胞を播種し培養し、軟骨細胞の形質を同じく I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンの発現解析から探ったところ、両者には有意な差はみられなかった<sup>9)</sup>。関節軟骨組織を構成するコラーゲンのタイプは II 型であることから、担体のマテリアルも II 型コラーゲンを用いることは合理的であるが、これらの結果から脱分化した軟骨細胞の形質をコントロールするためにはかならずしも II 型を用いる必要はなく、むしろ取り扱いやすく性状のよく研究され

ている I 型を用いることは同等に有効であると考えられる。

しかし、組織形成と形質のコントロールを同時変更に進めるよりはやはり三次元培養担体に播種する前に、脱分化した軟骨細胞を再分化させておくことのほうが、十分な機械的性質をもつ関節軟骨組織の再生のためには有利であり、そのための方法を開発する必要はいぜんとしてあると考えられる。

### おわりに

本稿では細胞の均一播種、細胞分化誘導を実現するための、中間的な技術ステップとしてシート状の三次元培養担体について著者らの研究を中心に概説したが、より確実なそして洗練された細胞の均一播種、細胞分化誘導を実現するために、三次元培養担体の微細構造の最適設計、そしてそれを実現するための構造制御技術などが今後開発されることが強く期待される。

### 文献

- 1) Chen, G. et al.: Fabrication of PLGA-collagen hybrid sponge. *Chem. Lett.*, : 561-562, 1999.
- 2) Chen, G. et al.: A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. *J. Biomed. Mater. Res.*, 51(2) : 273-279, 2000.
- 3) Chen, G. et al.: Hybrid biomaterials for tissue engineering: A preparative method for PLA or PLGA-collagen. *Adv. Mater.*, 12(6) : 455-457, 2000.
- 4) Chen, G. et al.: A hybrid network of synthetic polymer mesh and collagen sponge. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 16 : 1505-1506, 2000.
- 5) Chen, G. et al.: Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) sponge hybridized with collagen microsponges and deposited apatite particulates. *J. Biomed. Mater. Res.*, 57 : 8-14, 2001.
- 6) Ushida, T. et al.: Three dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds. *Cell Transplant.*, 11(5) : 489-494, 2002.
- 7) Chen, G. et al.: The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *J. Biomed. Mater. Res.*, 67A : 1170-1180, 2003.
- 8) Chen, G. et al.: Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured *in vitro* in a PLGA-collagen hybrid mesh. *FEBS Lett.*, 542 : 95-99, 2003.
- 9) Ohno, T. et al.: Effect of type I and type II collagen sponges as 3D scaffolds for hyaline cartilage-like tissue regeneration on phenotypic control of seeded chondrocytes *in vitro*. *Mater. Sci. Eng., C*. 24(3) : 407-411, 2004.

## 間葉系細胞とバイオマテリアルを用いた臨床応用の検討

——ヒト間葉系細胞を用いての骨再生医療

Composites of mesenchymal cells and biomaterials in considering clinical application



大串 始

Hajime OHGUSHI

産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門

◎種々の細胞を用いて臓器・組織を構築する細胞へと分化させた後、生体外でその臓器・組織を再構築できれば、種々疾患にこの生体外で再構築された臓器・組織を用いることが可能となる。まさに、この方法は臓器・組織移植を回避できうる技術となりうる。著者らは、患者自身の骨髄に含まれる間葉系幹細胞を増殖した後、この幹細胞による骨組織(再生培養骨)を生体外で構築することを行い、この培養骨を用いての再生医療を開始している。この構築された組織を移植に用いるには、適当な培養担体、すなわちバイオマテリアルを必要とする。本稿では、間葉系幹細胞のヒドロキシアパタイトやアルミナセラミック上での骨芽細胞への分化ならびに骨基質生成過程について述べる。著者らが開発したこのバイオマテリアル上での再生培養骨を用いることにより、種々難治性の骨関節疾患の治療が可能となる。



骨髄、間葉系細胞、幹細胞、骨、セラミックス

### 骨関節疾患と骨髄間葉系幹細胞

骨髄には血球系細胞へ分化する造血系幹細胞以外に、骨組織を形成する能力のある骨芽細胞や軟骨組織の構成細胞である軟骨細胞へ分化可能な間葉系幹細胞が存在する。さらに、最近ではこの間葉系幹細胞は肝、神経などの従来では考えられなかった種々細胞へ分化可能なことが報告されている。この間葉系幹細胞は *in vitro* 培養により増幅可能であり、この培養幹細胞を用いた骨疾患の治療の試みが行われつつある。実際、著者らは培養ヒト間葉系細胞とセラミックの複合体が骨形成能を有することをはじめて報告した<sup>1)</sup>。しかし、一歩進んでこの幹細胞を再生しようとする目的の細胞へ分化させて治療に用いられないであろうか。たとえば、間葉系幹細胞を *in vitro* 条件下に骨芽細胞へ分化させ、その分化細胞を利用する試みである。さらに、この分化された細胞による細胞外基質をも産生させて、その細胞基質を移植により治療す

る、すなわちティッシュエンジニアリング技術による *in vitro* 骨組織を利用する考えもある。この方法はあらかじめ障害を受けた組織を *in vitro* で構築する方法であり、著者らが提唱する新規の治療である(詳しくは総説を参照されたい)<sup>2,3)</sup>。現在、著者らはヒト培養骨髄間葉系幹細胞を用いて、この *in vitro* 骨組織(再生培養骨)を人工骨や人工関節のうえに形成している。そして、それらを移植することにより種々骨関節疾患の治療を開始している<sup>4)</sup>。この再生培養骨は骨芽細胞が含まれるのみならず、種々のサイトカインなどが含まれ新生骨形成能を有することになり、種々骨疾患の治療には非常に優れている。

### 間葉系幹細胞由来再生培養骨

骨髄有核細胞に含まれる間葉系幹細胞の割合は非常に少なく、新生児では 1/10,000 で大人では 1/2,000,000 といわれている<sup>2)</sup>。しかし、新鮮ヒト骨

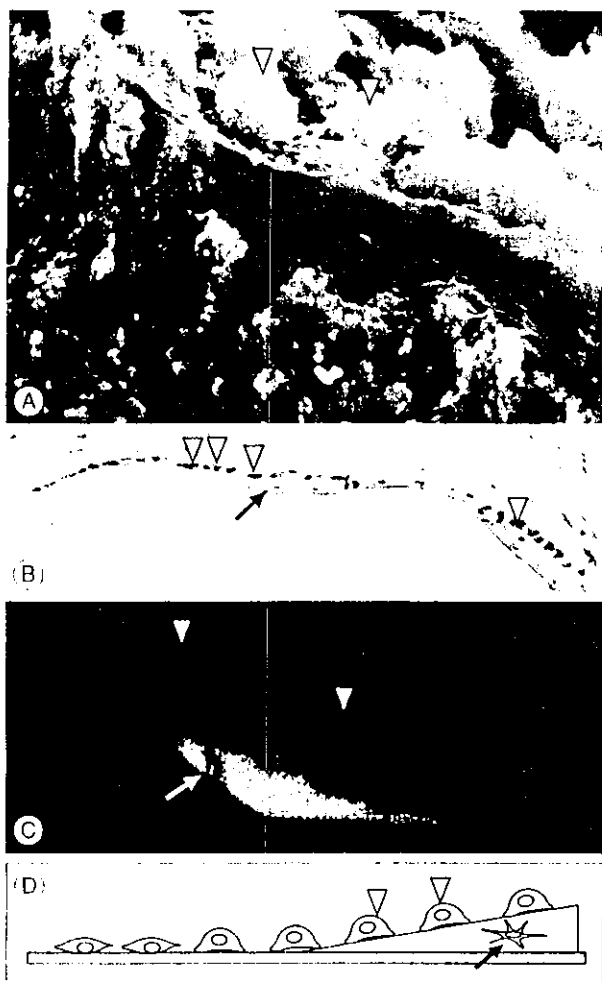


図1 骨髄間葉系細胞の *in vivo* ならびに *in vitro* 骨形成

A, B: 間葉系細胞とヒドロキシアパタイトセラミックの複合体は生体内で骨形成を引き起こす。

C: 間葉系細胞を骨分化因子の存在下で培養すると *in vitro* 骨形成を生じる。三角印は骨芽細胞、矢印は骨基質に取り囲まれる骨細胞を示す。

D: これらの骨形成のシエマを示す。詳細は文献<sup>6)</sup>を参照。

髓細胞を培養することにより間葉系幹細胞を増殖することが可能である。さらに、上記に述べたように、この培養幹細胞を用いて *in vitro* で再生培養骨を形成できうる。この点において、この再生培養骨がはたして *in vivo* での骨形成と同様の過程を経て形成され、形態的ならびに機能的に生体の骨と同等であるかの検証が必要である。また、これらの再生培養骨がバイオマテリアル上で効率よく形成されうることの確認も重要である。

### 1. 生体外での再生培養骨

図1に、間葉系幹細胞を用いての *in vivo* と *in vitro* での初期骨形成過程の組織図ならびに模式図

を示す。図1-A(走査電顕像)、図1-B(脱灰標本)はラットの間葉系幹細胞と多孔性ヒドロキシアパタイトセラミックの複合体を作製し、同系ラットの皮下移植後約4週後の組織像である<sup>5)</sup>。セラミック表面に間葉系幹細胞が接着し、このセラミック表面で間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞が直接骨形成を営むことが描写されている。図1-Cはこれら *in vivo* の骨形成ではなく、間葉系幹細胞をビタミンC、リン酸、デキサメタゾンなどの骨分化因子の存在下に約10日間培養した組織で、共焦点レーザー顕微鏡による三次元構造解析である。緑色に染まっている骨基質が青色(核染色)と赤色部分(アクチン染色)による骨芽細胞層の下に存在しているのがわかる<sup>6)</sup>。また、この骨基質には骨芽細胞より分化した骨細胞が骨小腔内に存在する。このように、*in vitro* においても図1-Dに示すように、培養間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞により正常の骨(図1-A, B)と同様の三次元構造を有する骨構造を培養プレート表面に形成することがわかる。さらに、一部の骨芽細胞は骨細胞へと最終分化過程を経る。また、細胞の活性や骨基質内に含まれるミネラルの物理的性質は生体の骨と同様であることもすでに報告している<sup>7)</sup>。

このように、生体外の培養操作によって間葉系細胞を用いることにより、生体内で起こる骨形成過程を再現できうる。また、大事な点であるが、著者らの経験により80歳を超える高齢者の骨髄でも間葉系幹細胞の増殖ならびに骨芽細胞への分化は可能である。さらに、この骨髄採取は少量で十分であり、また通常必要とされるウシ血清を用いず、患者自身の血清を用いてこの増殖・分化が可能である。実際、骨髄量は約10mlで十分であり、この方法を用いてこれまで30例を超す患者からの間葉系幹細胞の増殖ならびに再生培養骨形成に成功している。

### 2. バイオマテリアル上での再生培養骨

さて、このように再生培養骨作製が少量の骨髄を用いて可能であるが、本稿の主眼であるバイオマテリアル上で作製可能であるか、またその作製が可能なら、その効率も検定する必要がある。種々バイオマテリアルが骨関節疾患に用いられるが、人工骨として用いられているヒドロキシアパタイ

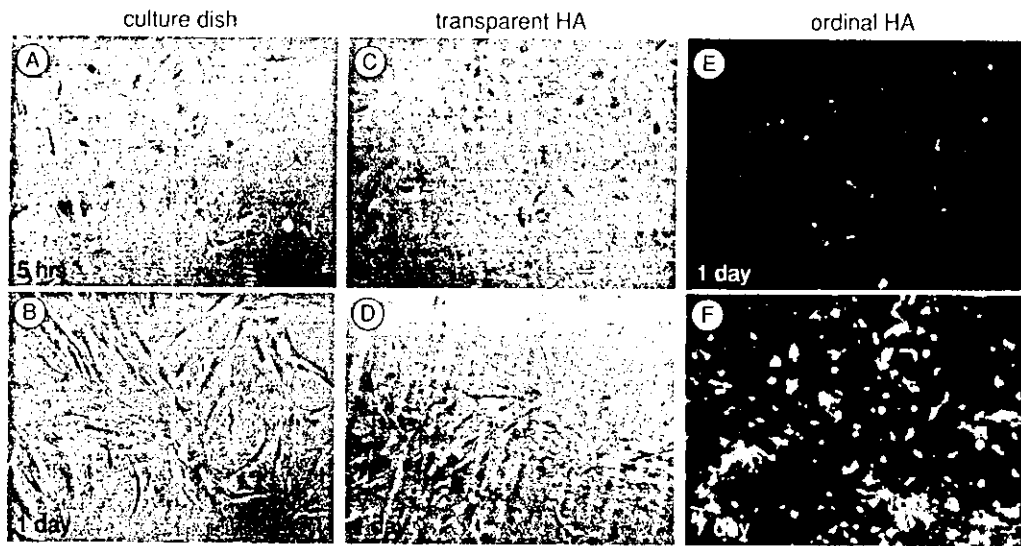


図 2 培養骨髄間葉系細胞の培養プレートならびにヒドロキシアパタイトセラミック上での細胞接着と増殖

A, B: 培養プレート

C, D: 透明ヒドロキシアパタイトセラミック

E, F: 通常のヒドロキシアパタイトセラミック上での GFP 遺伝子導入間葉系細胞(緑色)を示す。詳細は文献<sup>10)</sup>を参照。

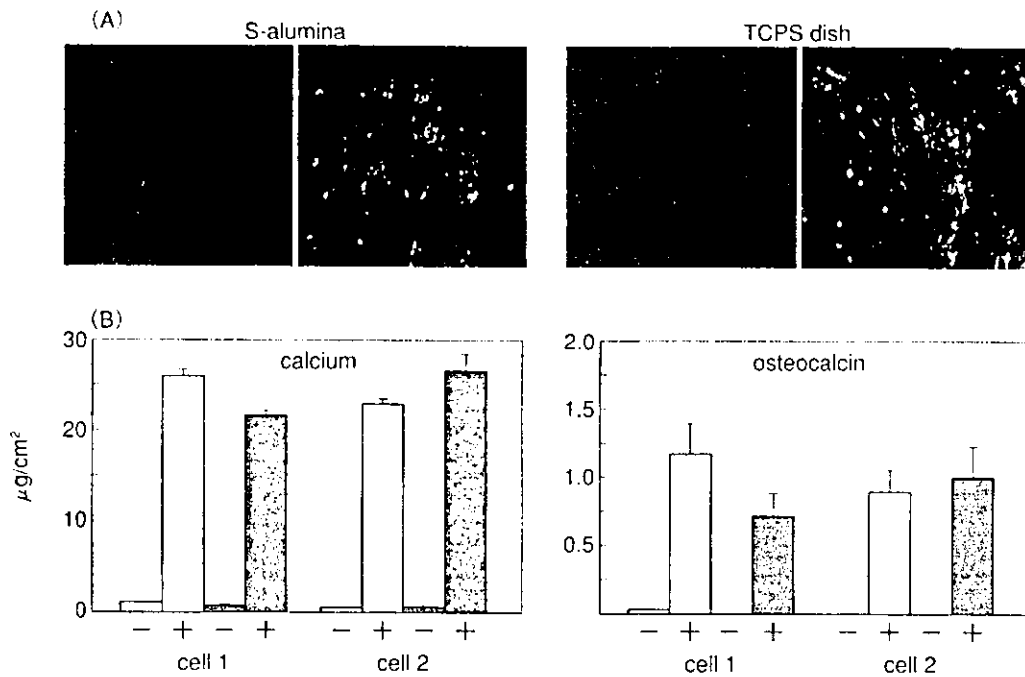


図 3 ヒト培養骨髄間葉系細胞のアルミナセラミック上での骨形成(再生培養骨形成)

A: 単結晶アルミナセラミックと培養プレート上でのミネラル化(左図は位相差顕微鏡, 右図は蛍光顕微鏡観察), 右図のカルセインの取込み(緑色)はミネラル化を示す。

B: カルシウム定量ならびに骨特異的蛋白のオステオカルシンの定量を示す。詳細は文献<sup>10)</sup>を参照。

トセラミック上での再生培養骨形成について述べる。上記に述べたように、再生培養骨は未分化間葉系細胞が骨芽細胞へ分化する過程を必要とす

る。この過程において重要なのは間葉系細胞の培養基盤における接着性である。通常、培養基盤における接着性は培養プレート上で観察される。組

織培養に用いられる培養用プレートはプラズマ処理を行い、炭酸基ならびにヒドロキシル基が導入されたポリスチレンからなり、表面が弱い親水性の性質を有する。この表面性質のため、疎水性の強い細菌培養に用いられるプレートと異なり、細胞接着性に優れている。このように、組織培養プレートは動物細胞の培養によく用いられる。このプレートは光透過性であり、細胞の観察に適している。しかし、ヒドロキシアパタイトセラミックなどのリン酸カルシウム系セラミックは通常不透過性であり、細胞の観察は困難である。最近、井奥らはSPS焼結法(spark plasma sintering process)を用いてこのヒドロキシアパタイトを透明化できうことを報告した<sup>9)</sup>。この透明セラミックを用いてラットの間葉系細胞の接着を観察したところ、播種後わずか1時間で細胞が接着性を示しはじめ、5時間ではかなりの数の細胞は伸展して強固に接着し、1日後にはほとんどの細胞が間葉系細胞としてのfibroblasticな細胞形態を示した(図2-A, B)。この過程は培養プレート上でも同様にみられた(図2-C, D)。

さらに、これらの接着細胞は骨分化因子存在の下に骨芽細胞まで分化し、骨基質をセラミック上で産生し、再生培養骨形成を示した<sup>10)</sup>。また、以上は透明セラミックを用いた解析であるが、通常ヒドロキシアパタイトセラミック上での細胞の接着をみるために、緑色蛍光蛋白質(green fluorescent protein: GFP)遺伝子を組み込んだ間葉系細胞を播種した。この場合、セラミックは不透明なため、通常の顕微鏡では観察できないが、落射型の蛍光顕微鏡により観察した。細胞はGFP蛋白質を発現するため、たとえセラミックが不透過性であっても容易に細胞の形態が観察できる。図2-E, Fにみられるように、通常セラミック上でも間葉系細胞は容易に接着し約7日でセラミック表面を覆うように増殖した。以上のように、ヒドロキシアパタイト表面は間葉系細胞の接着ならびに増殖に適していて、これらの細胞の挙動は組織培養プレート上に匹敵するものであった。

以上のように、ヒドロキシアパタイトは間葉系細胞の培養ならびに骨形成への分化過程に適したバイオマテリアルであるが、このセラミックは機

械強度に問題があり、脆性でもある。そのため、過度の荷重には耐えることができず、これらの部位に用いるには他のマテリアルを必要とする。たとえば、アルミナセラミックは優れた機械強度をもち、人工関節材料としても用いられている。しかし、このセラミックは生体活性を有さず、細胞との親和性はよくないとされている。とくに、*in vivo*において間葉系細胞の骨芽細胞への分化はヒドロキシアパタイトセラミックに比べ劣っている<sup>11)</sup>。そのため、上述したようにあらかじめ再生培養骨をこのアルミナセラミック上で形成することが考えられる。しかし、再生培養骨は*in vitro*での間葉系細胞の骨分化過程で形成される。すなわち、*in vitro*での間葉系細胞の増殖ならびに骨分化をこのアルミナセラミック表面が支持しなければならない。通常用いられるアルミナセラミックは多結晶のAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>で不透過であるが、単結晶のセラミックは透過性であり、容易に細胞を観察できうる。

図3-Aは単結晶アルミナ(S-alumina)と培養プレート(TCPS dish)上でのヒト間葉系細胞の増殖ならびに骨分化因子の存在下での骨分化を示している。左図(位相差顕微鏡像)で黒くみえるところがミネラル沈着(再生培養骨)を起こしたところで、その部位は右図(蛍光顕微鏡)の緑に光るところ、すなわち培地に添加したカルセインの取込み部位に一致している。このように、ミネラルの沈着、すなわち再生培養骨は培養プレートならびにアルミナセラミック上でも同様に形成された<sup>12)</sup>。さらに、このミネラルの沈着がたしかに再生培養骨であるかの確認のために、2例のヒト間葉系細胞を用いて骨基質に含まれる骨特異的蛋白質のオステオカルシン(osteocalcin)とカルシウムの定量を行った。図3-Bにみられるように、骨分化因子の存在の下(+)では因子の非存在下(-)に比べて明らかに、これらの量は増加した。さらに、これらの増加は培養プレートならびにアルミナセラミック上でも同様に増加した。以上より*in vitro*再生培養骨形成はアルミナセラミック上でも十分に形成されることがヒト間葉系細胞を用いての研究により明らかになった。

## おわりに

著者らは, *in vitro* で形成された骨芽細胞・骨基質, すなわち再生培養骨は生体への移植により, さらなる新生骨形成を生じることが報告されている。すなわち, 種々バイオマテリアル上で形成された再生培養骨は新生骨形成能を有する生体材料である。すでに, この患者自身の細胞由来の再生培養骨を用いた手術が2001年12月より奈良県立医科大学整形外科(高倉義典教授)で開始されている。現在, ヒドロキシアパタイトセラミック人工骨やアルミナ人工関節のうえに, この再生培養骨を形成させている。ヒト間葉系細胞は年齢を経るに従い, 骨髄中に含まれる数は減少する。さらに, 間葉系細胞の骨化能は症例により異なる。しかし, 著者らの経験では骨化能の差異は認められるも, 全例間葉系幹細胞の増殖に成功し, すべての症例に再生培養骨形成を確認している。すでに, これらの基盤のうえに形成された培養骨を用いて30数例の変形性足関節症, 関節リウマチ, 骨腫瘍, 大腿骨頭壊死などの治療が行われている。これらの治療効果についてはさらなる経過観察を必要とするが, 現在までに炎症や感染などの合併症はみられず, 非常に良好な経緯を示している。以上, 間葉系幹細胞を用いた組織工学技術が治療に用いられる時代に到達し, 骨関節疾患治療においてあらたな展開がはじまった。

謝辞: 再生培養骨を用いての治療は奈良県立医科大学整形外科と共同で行われ, 同教室諸先生方, とくに高倉義典教授に深謝致します。また, 産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門の寿典子, 木原隆典, 伊藤嘉奈子, 日本医科大学整形外科の北村繁行

先生のご協力, ならびに透明アパタイトセラミックを作製していただいた山口大学の井奥洪二, 川越大輔先生にこの場を借りて御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Ohgushi, H. and Okumura, M.: Osteogenic ability of rat and human marrow cells in porous ceramics. *Acta Orthop. Scand.*, **61**: 431-434, 1990.
- 2) Ohgushi, H. and Caplan, A. I.: Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *J. Biomed. Mater. Mat. Res.*, **48**: 913-927, 1999.
- 3) Ohgushi, H.: Bioceramics McGraw-Hill Yearbook of Science and Technology. McGraw-Hill, New York, 2002, pp.24-27.
- 4) Ohgushi, H. et al.: Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton. *Novartis Found Symp.*, **249**: 118-127, 2003.
- 5) Okumura, M. et al.: Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J. Biomed. Mater. Mat. Res.*, **37**: 122-129, 1997.
- 6) Kihara, T. et al.: Three-dimensional visualization analysis of *in vitro* cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**(3): 943-948, 2004.
- 7) Ohgushi, H. et al.: *In vitro* bone formation by rat marrow cell culture. *J. Biomed. Mater. Mat. Res.*, **32**: 333-340, 1996.
- 8) Okumura, M. et al.: Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J. Biomed. Mater. Mat. Res.*, **37**: 122-129, 1997.
- 9) Ioku, K. et al.: OH-designed transparent apatite ceramics prepared by spark plasma sintering trans. *Mater. Res. Soc. Jpn.*, **27**: 447-449, 2002.
- 10) Kotobuki, N. et al.: Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*. (in press)
- 11) Takaoka, T. et al.: Histological and biochemical evaluation of osteogenic response in porous hydroxyapatite coated alumina ceramics. *Biomaterials*, **17**: 1499-1505, 1996.
- 12) Kitamura, S. et al.: Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics. *Artif. Organs.*, **28**: 72-82, 2004.

## 骨形成と Msx2

——幹細胞誘導の試み

Bone formation and Msx2



渡辺 研

Ken WATANABE

国立長寿医療センター研究所運動器疾患研究部

◎高齢者の骨粗鬆症や骨折、骨欠損を対象とした細胞移植による再生治療において、自家移植を基本と考えた場合、その種となる幹細胞数の減少が問題となる。そこで、骨・軟骨の形態形成に重要な働きがある Msx2 の脱分化誘導作用に着目し、分化した細胞から多分化能を有する間葉系幹細胞の誘導への試みと蛋白質導入法 (protein transduction) の応用について概説する。



Key word : Msx2, ホメオドメイン蛋白質, 脱分化誘導, 蛋白質導入法, 骨形成

世界で有数の長寿国であるとともに、先がけて超高齢化社会という問題を抱えるわが国では老年病対策が急務である。高齢者の QOL を著しく損なう骨折のリスクを大きくしている老年病は骨粗鬆症である。閉経などに伴うエストロゲン低下による一次性骨粗鬆症は骨吸収の亢進をひとつの特徴とするが、二次性骨粗鬆症に分類される老人性骨粗鬆症は、加齢の影響を色濃く受ける骨髄機能の低下など、組織再生不良が原因と考えられている骨形成の低下が特徴である。骨吸収抑制についてはすでに創薬が進み、臨床の現場でも骨粗鬆症治療に使用されているが、骨形成を促進する効果的な方法はまだ少ない。ここでは骨粗鬆症ならびに骨折、骨欠損に対する細胞移植による再生医療に向けて骨形成と Msx2 の作用に着目し、最近の知見と試みについて概説する。

### 転写調節因子 Msx2

Msx は骨形成因子 (BMP) や線維芽細胞増殖因子 (FGF) などに誘導されるホメオドメインとよばれる領域をもつ転写調節因子で、ショウジョウバ

エの細胞周期関連遺伝子 Msh の哺乳類ホモログとして同定された<sup>1,2)</sup>。ヒトでは Msx1, Msx2 の 2 種類、マウスでは Msx3 を含む 3 種類が同定されており、そのうち、骨・関節で高い発現がみられるのは Msx2 である。Msx2 はヒトの先天疾患である頭頂孔異常 (enlarged parietal foramina) やボストン型頭蓋骨縫合 (Boston-type craniosynostosis) の原因遺伝子としても同定されており、常染色体優性の機能亢進型変異と haploinsufficiency が報告されていることから、その発現とともにその活性量 (dosage) が深く病態と関与していることが示唆されている<sup>3-5)</sup>。

Msx2 のノックアウトマウスについては新潟大学の里方らにより発表されているが<sup>6)</sup>、胎生致死でなく出生してくるものの、骨格系や脱毛症を含む外胚葉系組織などに多発性の異常がみられた。ヒト疾患と同様に頭蓋冠の形成不全とともに、歯牙の形成異常、軟骨形成や長管骨でも低形成の状態が観察されており、正常な骨格形成で必須の遺伝子であることが示されている。同グループは Msx1 と Msx2 のダブルノックアウトマウスも作

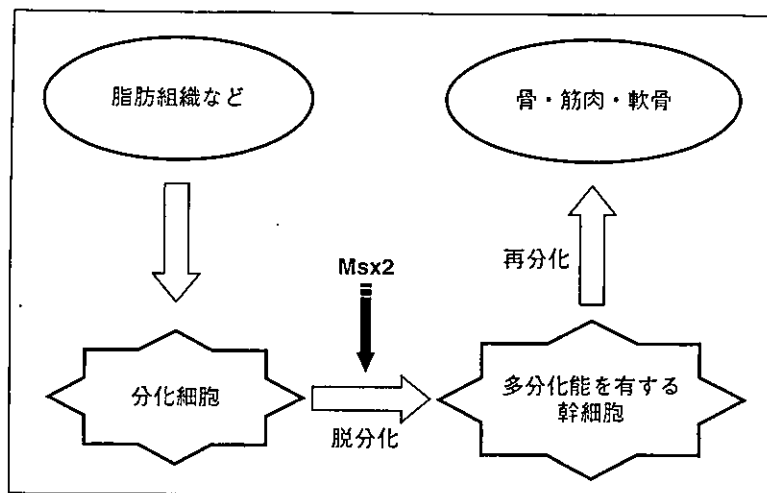


図 1 脱分化誘導による再生のストラテジー

製しており、そのマウスでは Msx2 での異常が増長していることから Msx1 とは部分的な機能相補の可能性が考えられている<sup>6)</sup>。Msx は指の形成にも深く関与し、発達段階の BMP 依存性の指間組織のアポトーシス(水かきの消失)に必須であるとされている。また、Msx2 が骨形成と深いかわりのある Wnt シグナルの下流因子として同定されていること<sup>7)</sup>や、乳腺や毛胞の発達など、ビタミン D や副甲状腺ホルモンなどの作用点という一致もあり<sup>8)</sup>、骨・軟骨の発達・形態形成だけでなく、実際の骨代謝とのかかわりが示唆される。

### Msx2 の機能と脱分化誘導

核に局在し、さまざまな遺伝子の発現を制御する転写調節因子 Msx は上述のように遺伝学的に形態形成でその重要性が示されているものの、実際の作用分子機構はあまりわかっていないのが現状である。しかし、いくつかの遺伝子の転写に対して抑制的である“サプレッサー”としての機能についてはいくつか報告がある。そのひとつに、基本転写因子 TATA-binding protein や CBP/p300, Sp1 を含む複合体に含まれていることから、発現抑制にはこれらの基本転写因子群との複合体形成が関係していると報告されている<sup>9,10)</sup>。また、このサプレッサー活性に DNA 結合能は必要ないとされており、Msx2 の作用の中心は直接的な転写因子というよりはむしろ、蛋白質-蛋白質相互作用による転写調節因子という考え方がされている<sup>11)</sup>。

一方で、Msx の作用で注目すべき論文が『Cell』誌に発表された<sup>12)</sup>。最終分化し、細胞融合した筋管細胞(myotube)においてテトラサイクリン依存性発現制御系により Msx を活性化すると、驚くことに多核の筋管が分断され、骨芽細胞、軟骨細胞や脂肪細胞に分化できる多分化能を有する細胞へと脱分化が誘導された。また、変異エストロゲン受容体との融合による機能発現調節系ならびにトランスジェニックマウスを用いて、Msx の脱分化誘導活性について検討を行ったところ、cyclin D1 の顕著な発現誘導により分化抑制を行っていることが明らかとなった<sup>13)</sup>。ただ、著者らは、この発現誘導においても、cyclin D1 プロモーターへの Msx 蛋白質の直接関与というよりは別の分子を介した間接的な調節であるとしている。また、残念ながら、その注目すべき脱分化誘導活性にかかわる分子機能についてはいまだ不明である。現在、DNA チップなどを用いた脱分化活性にかかわる Msx2 下流遺伝子の探索を行っている。

### 蛋白質導入法の利用

以上のことから Msx2 の脱分化作用を利用して多分化能を有する幹細胞を分化細胞(たとえば脂肪細胞)から誘導し、骨・筋肉組織などの再生に応用できないであろうか(図 1)。高齢者の抱える組織再生不良の問題はその幹細胞数の低下が一因となっている。実験段階で、てっ取り早いのは遺伝子導入による強制発現系である。ただ、脱分化誘



導・増殖能賦活化という活性は癌化と密接に関係しており、このような活性をもつ遺伝子のパーマナントな導入は人為的に活性調節できたとしても問題点も多い。また、昨今の遺伝子治療についてはその副作用も報告されるようになり、中断を避けられない状態になっているものもある。そこで、考えられるのが蛋白質の直接導入 (protein transduction: PT) である<sup>14)</sup>。蛋白質導入といった点から遺伝子導入に比べて外来遺伝子挿入による予期しない遺伝子発現変化などのレシピエントの染色体レベルでの副作用の可能性がきわめて低いと考えられる。また、短時間 (~2 時間) で細胞導入できることから *ex vivo* や局所での投与に向いていると思われる。その作用が導入蛋白質の安定性に依存するため、作用は一過性かつ可逆的である。このことは脱分化誘導・増殖能賦活化という作用の問題に対応するものであり、成功すれば、応用へのハードルも高くはないと期待される。また、興味深いのはショウジョウバエのホメオドメイン蛋白質である Antennapedia や Engrailed では蛋白質そのものが膜透過活性を有し、細胞間を移動できることが示されている<sup>15,16)</sup>。また、その膜透過にかかわる配列はホメオドメインにあり、この配列は Msx2 をはじめとする Msx/Dlx ファミリーや ES 細胞の多分化能維持に必須である Nanog などのホメオドメインにも保存されている。

最近、この Msx2 が発現レベルに応じて脂肪細胞分化抑制的かつ骨芽細胞促進の活性を示すとの論文が発表されている<sup>17)</sup>。このことは Msx2 による脱分化誘導に加えて、その量的な変化によって骨芽細胞を優先的に誘導できる可能性を示している。このような背景から Msx2 蛋白質を調製し、細胞導入を試みたが、数%の細胞への導入は確認されたものの、効率はけっして高いものではなかった。そこで、PT domain (PTD) に用いられている TAT の部分配列 (YGRKKRRQRRR) を付した蛋白質 (TAT-Msx2) を作製して細胞培養液に加えたところ、70%以上効率で細胞への導入が確認された。PTD 配列は、TAT の部分配列のほか、ポリアルギニン (poly-Arg) を用いる<sup>18)</sup> など、塩基性に富む配列が PT の効率がよいことから、細胞表面の酸性領域 (硫酸化を受けているプロテオグリカン

や膜脂質、表面蛋白など) との相互作用により細胞質内へと取り込まれると考えられている<sup>19)</sup>。

そこで、問題となるのは導入された Msx2 の脱分化活性であるが、顕著な増殖活性化はみられなかったものの、myotube や成熟骨芽細胞の形態変化や分化マーカーの消失が観察された。これらの活性は大腸菌の破砕液では観察されず、TAT-Msx2 蛋白質サンプルへの LPS などの活性不純物の混入でないことは確かめている。最近、応用例として、PTD を用いたホメオボックス転写因子 HOXB4 の導入によりヒト造血幹細胞の *ex vivo* での増殖誘導に成功したとの報告がされ<sup>20,21)</sup>、今後の発展に期待がもたれる。

## おわりに

事実、ノーベル賞受章対象ともなったホメオボックス転写因子による転写調節分子機構についてはいまだ詳細はわかっていない。しかし、細胞の増殖・分化・死などの運命に深くかかわり組織形態形成の軸となっていることはいうまでもない。ただ、ホメオドメイン間の DNA 認識配列の特異性が高くないことや、ホメオドメイン自体の DNA 結合能が作用と相関しない例もあり、これからの研究の発展が望まれる。また、PT は一過性の蛋白質導入という特徴から *ex vivo* や局所での細胞機能再生や賦活化・不活性化への応用に期待がもたれる。一方で、PT が棲み分けこそすれ、遺伝子治療にとってかわるほどの技術として発展するかどうか、低分子化合物より特異性などの点で大きなアドバンテージを得られるかについても、PT メカニズムの解明と技術革新が必須であると思われる。

## 文献

- 1) Davidson, D. : *Trends Genet.*, 11 : 405-411, 1995.
- 2) Bendall, A. J. and Abate-Shen, C. : *Gene*, 247 : 17-31, 2000.
- 3) Ma, L. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, 5 : 1915-1920, 1996.
- 4) Wilkie, A. O. M. et al. : *Nat. Genet.*, 24 : 387-390, 2000.
- 5) Wuyts, W. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, 9 : 1251-1255, 2000.
- 6) Satokata, I. et al. : *Nat. Genet.*, 24 : 391-395, 2000.
- 7) Willert, J. et al. : *BMC Dev. Biol.*, 2 : 8, 2002.

- 8) Hodgkinson, J. E. et al. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1216** : 11-16, 1993.  
 9) Zhang, H. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** : 1764-1769, 1996.  
 10) Shetty, S. et al. : *Biochem. J.*, **339** : 751-758, 1999.  
 11) Catron, K. M. et al. : *Mol. Cell. Biol.*, **15** : 861-871, 1995.  
 12) Odelberg, S. J. et al. : *Cell*, **103** : 1099-1109, 2000.  
 13) Hu, G. et al. : *Development*, **128** : 2373-2384, 2001.  
 14) Schwarze, S. R. et al. : *Science*, **285** : 1569-1572, 1999.  
 15) Joliot, A. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88** : 1864-1868, 1991.  
 16) Joliot, A. et al. : *Curr. Biol.*, **8** : 856-863, 1998.  
 17) Cheng, S. L. et al. : *J. Biol. Chem.*, **278** : 45969-45977, 2003.  
 18) Noguchi, H. et al. : *Nat. Med.*, **10** : 305-309, 2004.  
 19) Belting, M. : *Trends Biochem. Sci.*, **28** : 145-151, 2003.  
 20) Amsellem, S. et al. : *Nat. Med.*, **9** : 1423-1427, 2003.  
 21) Krosch, J. et al. : *Nat. Med.*, **9** : 1428-1432, 2003.

●お知らせ●

■財団法人持田記念医学薬学振興財団第21回(平成16年度)留学補助金交付対象者募集要項

留学補助の趣旨：

- ①生命科学と医療応用の研究
- ②薬物科学と医療応用の研究
- ③情報科学と医療応用の研究

上記の研究を助成し、もってわが国の医療及び国民の保健の向上に資することを目的とする。

留学補助の対象：下記の研究対象の領域に属する研究を行っていて、国内又は海外留学を、平成16年4月1日より平成17年3月31日の間に開始し、期間1年以上される方。但し、満45歳未満(誕生日が昭和34年4月1日以降)に限る。

①生命科学と医療応用の研究

- 1) バイオテクノロジーにより産生されるヒトに対して生理活性を有する物質に関する研究
- 2) 免疫抑制機構に関する研究(老化、免疫低下等を含む)

②薬物科学と医療応用の研究

- 1) 創薬の研究(医薬品の開発・評価等を含む)
- 2) 薬物動態の研究(薬力学学的研究を含む)

③情報科学と医療応用の研究

- 1) 心臓・血管疾患の本態解明に関する研究
- 2) 心臓・血管疾患の治療抑制に関する研究

留学補助金額：総額1,000万円 1件につき50万円とする

応募方法：

- ①所定用紙に必要事項を記入し、住所・氏名を記入した採否通知返信用封筒(長3サイズ：切手不要)を添えて「書留郵便」で当財団あてに送付する。
- ②採択された交付対象者の申請書は、研究内容をそのまま「持田記念財団年報」に写真製版で掲載するため、申請書の複写使用は不可とする。
- ③所属機関の長(学長、学部長、所長)あるいは所属部門の長(教授、部長)の推薦を必要とする。

なお、1推薦者は、1件に限る。

- ④受入機関の承諾書の写しを添付のこと。(A4サイズ) 締め切り：平成16年6月30日(水)当日の消印まで有効 ※採択された研究(研修)は、その抜粋を「持田記念財団年報」に掲載するため公知の事実となる。従って、研究(研修)内容を特許登録したい場合は、公知により特許が成立しない可能性があるため、特許出願してから応募するようにお勧めする。

申請書提出先及び問い合わせ先：

財団法人 持田記念医学薬学振興財団 事務局  
 〒160-8515 東京都新宿区四谷1丁目7番地  
 Tel (03)3358-7211(代表)  
 Fax (03)3357-1264  
 E-mail : zaidan@mochida.co.jp

## 骨粗鬆症と骨

——ビタミン D 受容体欠損マウス由来細胞株を用いた検討

Osteoporosis and bone cells

——Effect of vitamin D on adipogenesis using vitamin D receptor knockout mouse cell lines



東 佐由美

Sayumi HIGASHI

中外製薬(株)製品戦略部

◎閉経後の骨粗鬆症患者の動物モデルとして広く用いられている卵巣摘除ラットに活性型ビタミン D を投与すると、骨代謝亢進に伴う骨量の減少および骨髄内の脂肪細胞の増加を抑制することが観察された。一方、温度感受性 SV40T 遺伝子を導入したマウスとビタミン D 受容体(VDR)遺伝子欠損マウスとの交配マウスから条件的不死化細胞株を樹立し、ビタミン D の VDR を介する細胞分化に及ぼす影響を検討したところ、VDR 欠損細胞では脂肪化が亢進していること、さらに、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  が VDR 依存性に骨髄間質細胞の脂肪細胞への分化を抑制していることが明らかとなった。骨粗鬆症は“骨量減少および骨微細構造の悪化を特徴とし脆弱性骨折の危険性が大きい状態”と定義されるが、今後、さらに分子細胞レベルでの研究と治療薬の開発が推進されることが期待される。



Key  
word

骨粗鬆症, ビタミン D 受容体, SV40T, 活性型ビタミン D, アルファカルシドール

### 骨粗鬆症

骨粗鬆症は組織学的には正常に石灰化された骨が量的に減少をきたした全身性の代謝性骨疾患であり、この状態に至るにはライフスタイルに関連した因子や加齢に伴う内分泌環境の変化や潜在する基礎疾患が関与する。すなわち、“骨量減少および骨微細構造の悪化を特徴とし、脆弱性骨折の危険性が大きい状態”との定義が国際的に提唱されている<sup>1)</sup>。骨量が減少すること自体は何らかの症状を伴うものではないものの、骨構造が脆弱になるために、腰や背中が痛んだり背骨が圧迫されてつぶれて背中が曲がったりする。また、大腿骨頸部の骨折という、高齢者の寝たきりの原因となる骨折が起りやすくなり、“生活の質”に影響を及ぼす疾患である。

骨は、殻のように表面付近を覆っている“皮質骨”、およびその内部に存在するスポンジ状の“海

綿骨”からなり、中心部は骨組織が骨髄に置き換えられ、造血器官として重要な機能を担っている。骨髄と骨の接する面および皮質骨の外側面を覆う骨膜には新しく骨をつくる(骨形成という)骨芽細胞が存在する。また、骨髄では造血幹細胞由来の破骨細胞が存在して骨を壊し(骨吸収という)、骨芽細胞による新しい骨の形成とカップリングして“骨のリモデリング”が行われている。つまり骨はその構造と強度を保つことによって骨格をつくり内臓を支える組織として機能する一方で、毛髪や皮膚と同じように、つねに新陳代謝している組織なのである。

近年、破骨細胞は単球・マクロファージ系の造血前駆細胞(CFU-GM)由来であり、その増殖・分化、および活性化の機構が分子レベルで明らかにされつつあり、破骨細胞上に発現した receptor activator of NF- $\kappa$ B(RANK)は骨芽細胞上の RANK

ligand(RANKL)と結合して破骨細胞の形成と活性化において中心的な役割を演じることが明らかとなった<sup>2,3)</sup>。このような背景から RANK, RANKL, および RANKL に対するデコイ受容体の osteoprotegerin などが骨粗鬆症治療薬のターゲット分子として大きくクローズアップされてきている。一方、骨芽細胞は、軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞、腱細胞、線維芽細胞と共通の未分化間葉系細胞から分化してくるが、その分化制御機構にはいまだ解明されていない点も多く残されている。

## || ビタミン D とビタミン D 受容体

ビタミン D は、腸管からのカルシウム吸収、骨での破骨細胞や石灰化骨の形成、さらに腎尿細管のカルシウム再吸収の調節などを介してカルシウム代謝の調節に必須の役割を果たしている。さらに、多様な細胞に作用して強力な分化誘導作用を発現する。すなわち、皮膚細胞の分化への効果を介する乾癬の治療や、リンパ系細胞の増殖・分化への影響を介する免疫機能の調節、あるいは腫瘍細胞の増殖抑制に基づく抗腫瘍効果を示すことなどが知られている。これらのビタミン D の多様な作用は核内に存在するビタミン D 受容体(vitamin D receptor : VDR)が標的遺伝子群プロモーターの特異的エンハンサー DNA に結合することで、リガンド結合依存的に標的遺伝子を転写レベルで制御して発現すると説明されている<sup>4)</sup>。

個体レベルでのビタミン D の役割および VDR 固有の機能などを明確にする目的で作製された VDR 遺伝子欠損(VDRKO)マウスでは骨カルシウム代謝系の異常のほか、脱毛などの VDR 機構異常に基づくビタミン D 依存性 II 型患者と同様の異常が認められた<sup>5)</sup>。この VDRKO マウスは通常に飼育すると離乳後より著しい成長障害を伴った重度のくる病を発症し致命的となるが、高カルシウム・リン食を与えることで、脱毛にはまったく影響しないが、くる病の症状は改善されて長期生存が可能となる。また、主要なビタミン D 標的組織である骨組織を詳細に解析すると骨端軟骨層に障害が残ったことから、ビタミン D の VDR を介する作用は骨端軟骨と毛根形成細胞群において必須であると考えられている。

そこで、著者らはビタミン D の間葉系細胞の分化に及ぼす影響をさらに詳細に検討する目的で、骨粗鬆症モデルラットを用いてビタミン D 誘導体投与による骨髄細胞の変化を検討した<sup>6)</sup>。さらに、VDR 遺伝子を欠損した VDR ノックアウト(VDRKO)マウスと温度感受性 SV40T 抗原遺伝子(SV40T)トランスジェニック(tg)マウスとを合わせて作出したマウスの骨髄細胞を材料として、種々の分化段階にある間葉系細胞系の細胞を樹立し、骨髄細胞の分化に及ぼすビタミン D の VDR を介する作用について興味ある結果を得たので概説する。

## || 卵巣摘除ラットの作成とビタミン D 誘導体投与による骨髄細胞の変化

卵巣を摘除したラットは閉経後の骨粗鬆症患者の動物実験モデルとして広く用いられている。40 週齢の Wistar 系雌性ラットに両側卵巣摘除術を施し、術後の創傷治癒を待って 2 週間後より骨粗鬆症治療薬の活性型ビタミン D 誘導体であるアルファカルシドール(ALF)を 1 日当り 0.1 μg/kg にて週 5 回、12 週間の経口投与を行った<sup>7)</sup>。その結果、プラセボを投与された卵巣摘除ラットは偽手術ラットに比べて骨吸収と骨形成のいずれも明らかに亢進し、大腿骨の骨密度が有意に減少した。しかし、ALF を投与することにより骨吸収は抑制される一方で、骨形成は維持されるかむしろ促進され、その結果として骨量の減少抑制効果が示された。このとき、脛骨近位部の病理組織標本を注意深く観察すると、プラセボ投与群に比べて ALF を投与された群では海綿骨部位の骨梁が太く、かつ、密になったことに加え、骨髄内の脂肪細胞の減少が観察された。

以上のことから、ビタミン D は骨代謝関連細胞のみならず、骨髄細胞中の脂肪細胞の数に影響を及ぼした可能性が考えられた。

## || ビタミン D 受容体欠損細胞株を用いた、ビタミン D の骨髄細胞分化に及ぼす影響の検討

VDRKO マウスと SV40T tg マウスとを交配したマウスから種々の分化段階にある間葉系細胞株を樹立し、ビタミン D の VDR を介する細胞分化