

Fig. 3. Bisulfite-treated hAR DNA of lymphocytes or spinal cord from unaffected people. Circles and squares represent each CAG and CTG repeat, respectively. Open circles and squares represent bisulfite-unmodified triplets while closed circles and squares represent bisulfite-modified triplets. The first triplet of an amplified CTG repeat was taken as 1. In each clone, the number of amplified triplets are shown in the parentheses after clone number.

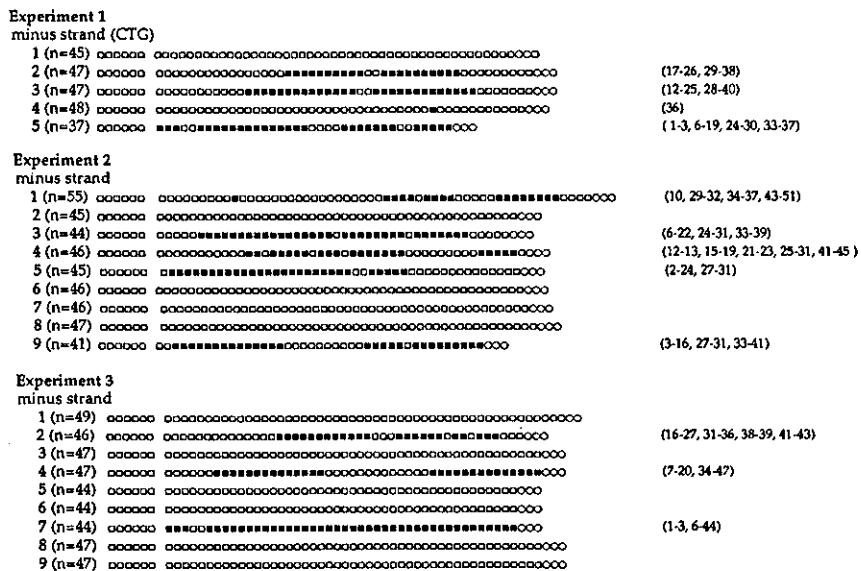


Fig. 4. Bisulfite-treated plasmid containing triplets of the hAR gene. Circles and squares represent each CAG and CTG triplets, respectively. Open circles and squares represent bisulfite-unmodified triplets while closed circles and squares represent bisulfite-modified triplets. In certain cases, the numbers of unmodified triplets are shown in the parentheses on the right hand side. The first triplet of an amplified CTG repeat was taken as 1. In each clone, the number of amplified triplets is shown in the parentheses after the clone number. Three independent bisulfite and PCR modification experiments were performed.

To examine the possible effect of CTG triplet methylation on the minus strands, the bisulfite modification reaction was performed on amplified CTG repeats that were subcloned into plasmids, which are methylation-free. A certain percentage of CTG repeats were not modified by bisulfite in non-methylated DNA (Fig. 4) as seen on genomic DNA from SBMA patients. We performed three different series of PCR experiments and obtained consistent results in all the experiments. Therefore, this loss of bisulfite modification of minus strand CTG repeats was not a result of methylation.

DISCUSSION

SBMA has been reported as an androgen insufficient disease, but no other known hAR mutations, even those that cause complete androgen insensitivity, show motor neuron symptoms. It has been reported that the expression levels of both hAR mRNA and protein in spinal cords were decreased (6, 12-14). To elucidate the mechanism of down-regulated expression in the hAR gene in SBMA patients, we employed bisulfite reaction to analyze DNA methylation status in amplified CTG repeats. This analysis was based on the evidence that CCG triplets in the FMR1 gene in fragile X syndrome are extensively methylated and methylation of the CCG triplets in the 5' flanking sequence results in decreased FMR1 expression.

In this study, we have coincidentally observed unique bisulfite modification of the CTG repeats in the androgen receptor gene, which is associated with the triplet repeat disease, SBMA. The unexpected bisulfite modification was found to be predominately restricted to CTG repeats, and was thus strand-specific. If alkaline denaturation is insufficient, it is possible that bisulfite modification may not be complete. However, we do not believe that this unexpected modification is an artifact because of the following reasons. 1) In our bisulfite experiments with other genes such as the enhancer of mouse keratin 8, promoter and enhancer of human keratin 18, enhancer of the murine keratin 18, and two different parts of the promoter of the human H19 gene, we did not observe any such interesting pattern of bisulfite modification in more than a thousand clones tested (data not shown). 2) CTG triplets were differentially modified by bisulfite in the plus and minus strands. Furthermore, shorter CTG stretches in both the minus strands (n=6) and the plus strands (n=3) were modified in all the clones, providing an internal control for complete bisulfite modification, while amplified CTG repeats were protected from bisulfite modification. 3) We repeated experiments and obtained consistent results, and treatment of genomic DNA by bisulfite for longer periods gave the same results. 4) The same result were detected in DNAs of different tissues or cells. 5) To eliminate PCR bias, we prepared primers which are not affected by methylation on the 3' end. The PCR bias was also probably negligible because of the bisulfite modification of

shorter CTG stretches. 6) The transforming efficiency of plasmids may depend on the sequences that have undergone both the bisulfite and PCR reactions. To eliminate this possibility, we determined that both bisulfite-sensitive and insensitive sequences had similar transforming efficiencies (data not shown).

Therefore, this particular bisulfite modification of the hAR gene is not the result of PCR bias (15), but rather result of expanded (CTG) triplet repeats itself. CTG/CAG DNA structure is known to take specific DNA secondary structures such as bent/kinked DNA or slipped-strand DNA structure and non-B structure (16-18). If the expansion of (CAG/CTG) triplet repeats may induce some specific DNA structure which defense DNA from bisulfite reaction, this structure may play a critical role in pathogenesis of CAG triplet repeat diseases.

The authors are grateful to J. Ozawa, N. Izawa, S. Kusakari, and H. Abe for their technical assistance, and Drs. T. Yamada, H. Kikuchi, F. Urano, H. Okita, A. Hashiguchi, S. Tajima and M. Sano for discussion. This work was supported in part by a grant from the Ministry of Education, Science and Culture to J. H. and A. U., by Keio University Special Grant-in-Aid for Innovative Collaborative Research Project to J. H. and A. U., by Keio Gijuku Fukuzawa Memorial Funds for the Advancement of Education and Research from Keio University, and by a National Grant-in-Aid for the Establishment of a High-Tech Research Center at Private Universities.

REFERENCES

- 1) La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 1991; 352, 77-79.
- 2) Sobue G, Hashizume Y, Mukai E, Hirayama M, Mitsuma T, Takahashi A. X-linked recessive bulbospinal neuronopathy. A clinicopathological study. *Brain*, 1989; 112, 209-232.
- 3) Bates G, Lehrach H. Trinucleotide repeat expansions and human genetic disease. *Bioessays*, 1994; 16, 277-284.
- 4) Kennedy WR, Alter M, Sung JH. Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology*, 1968; 18, 671-680.
- 5) Mhatre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, Pinsky L. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet*, 1993; 5, 184-188.
- 6) Nakamura M, Mita S, Murakami T, Uchino M, Watanabe S, Tokunaga M, Kumamoto T, Ando M. Exonic trinucleotide repeats and expression of androgen receptor gene in spinal cord from X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurol Sci*, 1994; 122, 74-79.
- 7) Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl Acid Res*, 1994; 22, 2990-2997.
- 8) Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molly PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89, 1827-1831.

- 9) Umezawa A, Yamamoto H, Rhodes K, Klemsz MJ, Maki RA, Oshima RG. Methylation of an ETS site in the intron enhancer of the keratin 18 gene participates in tissue-specific repression. *Mol Cell Biol*, 1997; 17, 4885-4894.
- 10) Raizis AM, Schmitt F, Jost JP. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Anal Biochem*, 1995; 226, 161-166.
- 11) Tanaka F, Sobue G, Doyu M, Ito Y, Yamamoto M, Shimada N, Yamamoto K, Riku S, Hshizume Y, Mitsuma T. Differential pattern in tissue-specific somatic mosaicism of expanded CAG trinucleotide repeats in dentatorubral-pallidoluysian atrophy, Machado-Joseph disease, and X-linked recessive spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurol Sci*, 1996; 135, 43-50.
- 12) Hornstra IK, Nelson DL, Warren ST, Yang TP. High resolution methylation of the FMR1 gene trinucleotide repeat region in fragile X syndrome. *Hum Mol Genetics*, 1993; 2, 1659-1665.
- 13) Clark SJ, Harrison J, Frommer M. CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat Genet*, 1995; 10, 20-27.
- 14) Siegfried Z, Cedar H. DNA methylation: a molecular lock. *Curr Biol*, 1997; 7, R305-307.
- 15) Warnecke PM, Stirzaker C, Melke JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. Detection and measurement of PCR bias quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucl Acid Res*, 1997; 25, 4422-4426.
- 16) Pearson CE, Wang Y-H, Griffith JD, Sinden RR. Structural analysis of slipped-strand DNA (S-DNA) formed in (CTG)_n(CAG)_n repeats from the myotonic dystrophy locus. *Nucl Acid Res*, 1998; 26, 816-823.
- 17) Kohwi Y, Wang H, Kohwi-Shigematsu T. A single trinucleotide, 5'AGC3'/5'GCT3', of the triplet-repeat disease genes confers metal ion-induced non-B structure. *Nucleic Acids Res*, 1993; 21, 5651-5655.
- 18) Dekker J, Kanellopoulos PN, van Oosterhout JA, Stier G, Tucker PA, van der Vliet PC. ATP-independent DNA unwinding by the adenovirus single-stranded DNA binding protein requires a flexible DNA binding loop. *J Mol Biol*, 1998; 277, 825-838.



Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells

Yumi Fukuchi¹, Masahiro Kizaki*¹, Kenji Yamato², Chiharu Kawamura¹, Akihiro Umezawa¹, Jun-ichi Hata¹, Tatsuji Nishihara³ and Yasuo Ikeda¹

¹Division of Hematology, Department of Internal Medicine and Pathology, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan; ²Section of Molecular Cellular Oncology/Microbiology, Department of Oral Function, Division of Oral Health Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113-8519, Japan; ³Department of Oral Microbiology, Kyushu Dental College, Kitakyushu 803-8580, Japan

Activin A, one member of the transforming growth factor (TGF)- β superfamily, is known to be a commitment factor for cell death and differentiation. In the present study, we demonstrate that human chronic myeloid leukemia (CML) cell lines, KU812 and K562 cells, either induced apoptosis or differentiation, respectively, by treatment with activin A. During these cell fate decisive events caused by activin A, rapid and transient up-regulation of Mcl-1 was observed in both cell lines. In activin A-induced apoptosis of KU812 cells, continuous up-regulation of Bax was observed. After the decrease in Mcl-1 expression had occurred, activation of caspase-9 and caspase-3 and cleavage of DFF45 were shown to take place in KU812 cells, resulting in the fragmentation of the genomic DNA of the cells. In contrast, the down-regulation of Mcl-1 without up-regulation of Bax caused accumulation of hemoglobin (Hb) contents in activin A-treated K562 cells. Interestingly, erythropoietin (EPO) prevented activin A-induced apoptosis with continuous expression of Mcl-1 and caused KU812 cells to undergo erythroid differentiation. To address the role of Mcl-1 in activin A-treated CML cells, KU812 and K562 cells were stably transfected with cDNA encoding Mcl-1 (designated as KU812/mcl and K562/mcl cells). As in combined effect of activin A and EPO on the parental KU812 cells, activin A induced differentiation, but not apoptosis, of KU812/mcl cells without modulating Bax levels. Activin A-treated K562/mcl cells, as well as parental cells, were only differentiated to erythroid cells. These results suggest that Mcl-1 is an early inducible gene activated by the activin A signaling pathway for both cellular differentiation and apoptosis, and continuous expression of Mcl-1 may be contributed to differentiation signals to the erythroid lineage in CML cells. *Oncogene* (2001) 20, 704–713.

Keywords: activin A; CML; apoptosis; differentiation; Mcl-1

Introduction

Activin A is highly homologous with transforming growth factor (TGF)- β and consists of two β A subunits (Vale *et al.*, 1986; Ling *et al.*, 1986). It was initially recognized as a gonadal protein that stimulates the release of follicular-stimulating hormone (FSH) from the pituitary gland (Vale *et al.*, 1986; Ling *et al.*, 1986). Several studies have shown that activin A carries out a variety of functions including regulation of hematopoiesis (Eto *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1989; Yamashita *et al.*, 1991). Activin A induces differentiation of murine Friend leukemia cell line and human leukemia cell line K562 cells into hemoglobin (Hb)-containing cells (Murata *et al.*, 1988; Miyamoto *et al.*, 1990); it also modulates differentiation and proliferation of immature erythroid progenitor cells (Broxmeyer *et al.*, 1988; Shao *et al.*, 1992; Mizuguchi *et al.*, 1993). We have recently isolated an inhibitory factor for mouse B cell hybridoma cells from the culture media of activated mouse macrophages and identified this molecule as being identical to activin A (Nishihara *et al.*, 1993). In addition, we have found that activin A induces cell cycle arrest during the G1 phase. Moreover, it induces apoptosis in mouse plasmacytic cells and human myeloma cells (Koseki *et al.*, 1995; Yamato *et al.*, 1996, 1997). It has been shown that activin A might act as a commitment factor for inducing cellular apoptosis and differentiation as a manner of induction or suppression of gene expression (Shiozaki *et al.*, 1998). However, the mechanism of growth inhibitory effects of activin A in hematopoietic cells has not been elucidated.

The Bcl-2 family of proteins are key regulators of apoptosis in many cell types. This family of proteins consists of pro-apoptotic (Bax, Bad, and Bak) and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-X_L, and Mcl-1) subfamilies (Yang and Korsmeyer, 1996; Kroemer, 1997; Gross *et al.*, 1999). Pro- and anti-apoptotic family members can heterodimerize with each other and the balance of these members may act as a rheostat for the suicide program that determines the activities of cell fate (Peters *et al.*, 1998; Moulding *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2000; Kroemer and Reed, 2000). Mcl-1, one of the

*Correspondence: M Kizaki, Division of Hematology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Received 31 July 2000; revised 3 October 2000; accepted 29 November 2000

anti-apoptotic Bcl-2 family members, heterodimerizes with Bax, and neutralizes the cytotoxicity induced by Bax (Sato *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1997). Mcl-1 is also able to protect CHO cells from apoptosis induced by *c-myc* overexpression (Reynolds *et al.*, 1994). This protein was originally identified as a novel gene induced early in the induction of differentiation of the human myeloid leukemia cell line ML-1. Expression of Mcl-1 mRNA is rapidly up-regulated with the treatment of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) during the differentiation process in ML-1 cells; this process is followed by rapid degradation of Mcl-1 (Kozopas *et al.*, 1993). Mcl-1 contains two PEST motifs which probably leads itself to a labile protein with a short half-life (Kozopas *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1995). Mcl-1 is thus thought to be a rapidly inducible, short-term effector of cell viability (Yang *et al.*, 1996; Moulding *et al.*, 1998; Chao *et al.*, 1998). However, the physiological function of Mcl-1 in leukemic cells is still unclear.

In the present study, we examined the role of Mcl-1 during the induction of apoptosis and differentiation of CML cells in the treatment of activin A. In both activin A-induced apoptosis and differentiation pathways of CML, Mcl-1 is rapidly induced, and subsequent molecular events may affect the cell fate.

Results

Effects of activin A on cellular proliferation of KU812 and K562 cells

The effects of activin A on the proliferation of human CML cells were examined using KU812 and K562 cells. The cells were cultured with activin A (50 ng/ml) for the indicated durations or treated with various concentrations of activin A (0–100 ng/ml) for 96 h (Figure 1a–d). Activin A decreased the number of viable cells in both cell lines in a time- and dose-

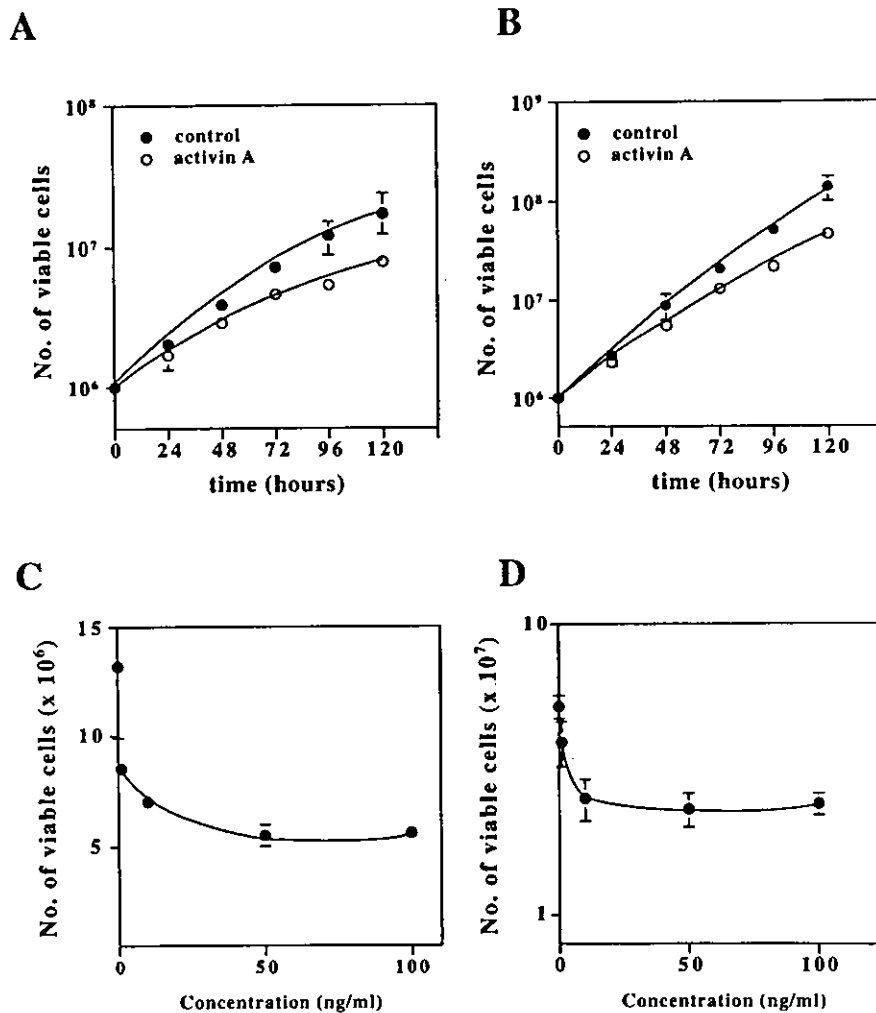


Figure 1 Time- and dose-dependent effects of activin A on the cellular proliferation of CML cells. KU812 cells (a,c) and K562 cells (b,d) were cultured with 50 ng/ml of activin A for various durations (0–120 h) (a,b) or in various concentrations of activin A (0–100 ng/ml) for 96 h (c,d). Cell viability was estimated by Trypan blue dye exclusion test. These experiments were performed 3–5 times. Results were expressed as the mean ± s.d.

dependent manner (Figure 1a-d). Both cell lines were sensitive for activin A and the growth inhibition was observed at a low concentration or a short-term culture. However, activin A was not able to induce complete growth arrest of both cell lines.

Activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells

To elucidate the mechanism of activin A-induced growth suppression of KU812 and K562 cells, we next examined the biological events of these cells. Exposure of KU812 cell to activin A (50 ng/ml) for 96 h resulted in an increase of annexin V-positive and PI-negative cells (Figure 2a) and exhibited a striking DNA ladder

formation (Figure 2b). Moreover, treatment of KU812 cells with activin A did not induce the dianisidine-positive and hemoglobin (Hb) containing cells (Figure 2c,d). These results indicate that activin A inhibits the cellular growth of KU812 cells via the induction of apoptosis, but not differentiation. In contrast, treatment with activin A (50 ng/ml) for 96 h did not increase a number of annexin V-positive cells (Figure 2a), and increased the ratio of dianisidine-positive cells from 17-19% to 57-68% of K562 cells (Figure 2c). In addition, expression of Hb in K562 cells was increased by activin A in a time-dependent manner (Figure 2d), suggesting that activin A induced differentiation of K562 cells as previously reported (Yu *et al.*, 1987; Frigon *et al.*, 1992).

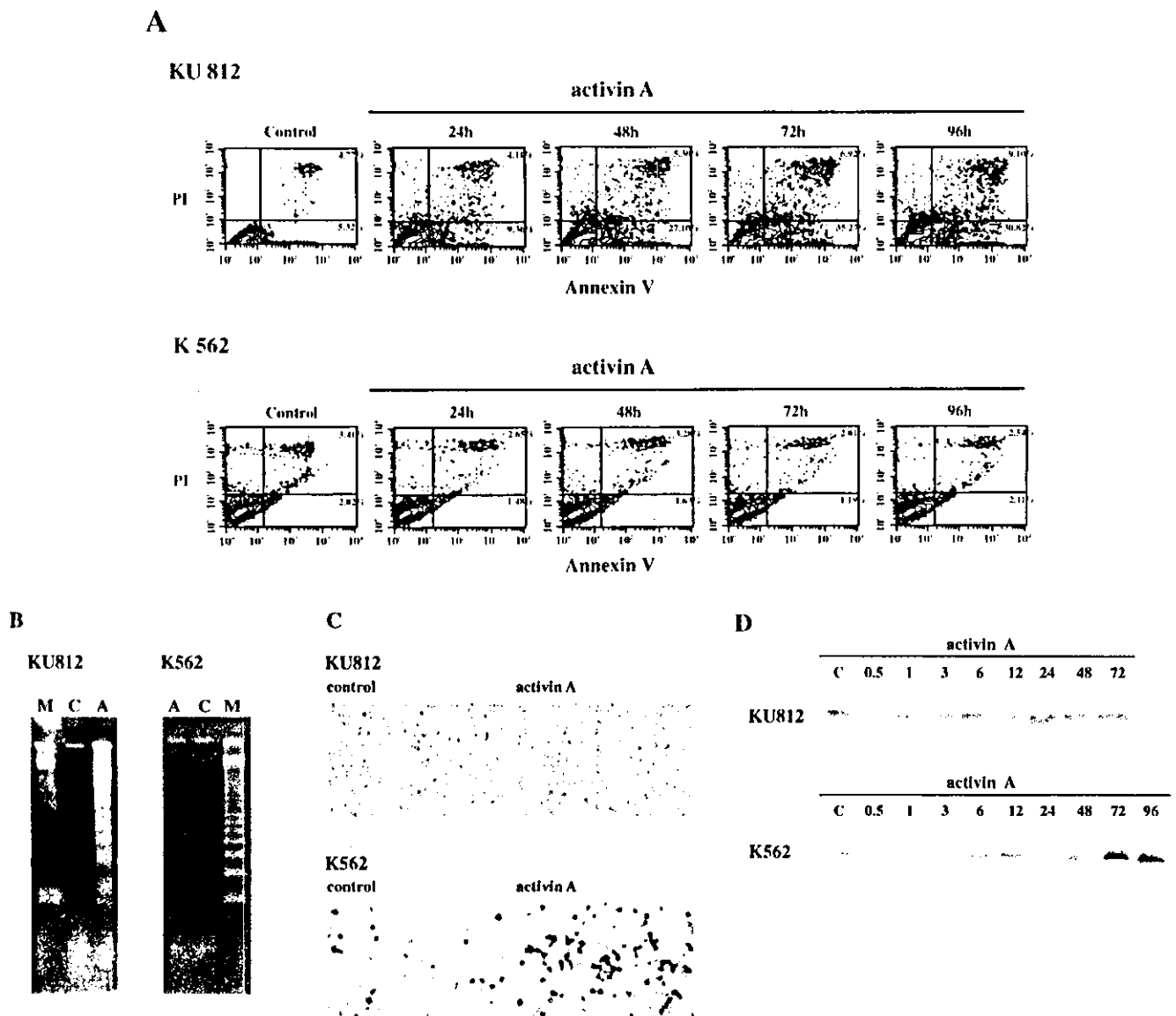


Figure 2 Activin A induces apoptosis and differentiation of KU812 and K562 cells, respectively. Activin A-induced (50 ng/ml, 96 h) apoptosis in both cells was estimated with Flow cytometry using annexin V-FITC and PI double staining (a) and with DNA fragmentation analysis (b). Activin A-induced (50 ng/ml, 96 h) erythroid differentiation in CML cells was estimated with dianisidine staining (c) and with the expression of Hb by Western blot analysis (d). M, marker; C, control; A, activin A. (c): original magnification, $\times 200$ (KU812), $\times 400$ (K562)

apoptosis of KU812 cells, a series of specific caspase inhibitors were evaluated for their ability to inhibit activin A-induced apoptosis. Boc-D-FMK (a general caspase inhibitor), Ac-LEHD-CHO (caspase-9 inhibitor), and Ac-DEVD-CHO (caspase-3 inhibitor) were considered. These inhibitors (1 μM and 50 μM) were added to KU812 cells and incubated with activin A (50 ng/ml) for 72 h. As shown in Figure 4, all of these caspase inhibitors inhibited activin A-induced apoptosis in a dose-dependent manner.

Effect of EPO on activin A-induced apoptosis and differentiation in CML cells

EPO is a survival factor for erythroid cells; it protects them from apoptosis and supports lineage-specific differentiation (Shiozaki *et al.*, 1998). To clarify the effects of EPO on activin A-induced growth suppression, KU812 and K562 cells were cultured for 96 h with activin A (50 ng/ml), EPO (2 IU/ml) and with both agents. In KU812 cells, EPO alone increased the number of viable cells by 1.5-fold, as compared to the increase in the control cells (Figure 5a). In addition, EPO also blocked activin A-induced apoptosis (Figure 5b). Interestingly, EPO alone and the combination of activin A and EPO, both induced prolonged expression of Mcl-1 for 72 h, inhibited the induction of Bax, and resulted in inducing differentiation of KU812 cells with accumulation of Hb contents (Figure 5c,d). In activin A-treated KU812 cells, DFF45 was degraded in a time-dependent manner, however, the combination of activin A and EPO did not modulate the expression of DFF45 and increased the levels of Hb contents by 72 h (Figure 5d). In contrast, EPO did not affect activin A-induced differentiation of K562 cells (Figure 5a–c). The use of activin A alone and both activin A and EPO induced transient up-regulation of Mcl-1 without modulating Bax, Hb levels accumulated at

72 h of treatment (Figure 5c). These findings indicate that EPO does not exert additional effects on activin A-induced differentiation of K562 cells.

Effects of Mcl-1 overexpression on activin A-induced apoptosis in KU812

Transient up-regulation of Mcl-1 is important for cell fate decision of differentiation or apoptosis (Yang *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1997; Moulding *et al.*, 1998). As regards our results, they suggest that treatment with activin A and EPO resulted in prolonged expression of Mcl-1 in KU812 cells, which in turn induced differentiation to Hb synthesizing cells. Therefore, KU812 and K562 cells that expressed high levels of exogenous Mcl-1 in a stable manner were established by introduction of Mcl-1 plasmid, driven by the SR α promoter, these cells were designated as KU812/mcl and K562/mcl. We have established 13 clones of KU812/mcl cells and individual levels of Mcl-1 are shown in Figure 6a. KU812/mcl clone 7 and clone 9 were highly expressed Mcl-1 protein, therefore, we used these clones for the following experiments. KU812 and K562 cells transfected with control plasmid (SR α -neo) were used as control cells (KU812/neo and K562/neo, respectively). Activin A did not modulate the expression of Bax protein at 72 h of treatment and maintained the expression of the DFF40/DFF45 complex for 72 h in KU812/mcl cells (clone 7 and clone 9), whereas prolonged expression of Bax and low DFF complex levels were observed in activin A-treated parental and control KU812/neo cells (Figure 6b). In addition, activin A induced the accumulation of Hb in both clones of KU812/mcl cells at 72 h (Figure 6c), suggesting that activin A induced differentiation into erythroid cells, but not apoptosis, of KU812 cells that expressed high levels of Mcl-1. These findings are similar to the results of the study of EPO combined activin A-treated KU812 cells (Figure 5a–d). The expression pattern of these proteins, as well as the biological effects of activin A in KU812/neo cells, was similar to that of the parental KU812 cells (Figure 6b,c and data not shown). K562/mcl cells showed similar sensitivity to activin A-induced growth suppression, as compared to that of the control K562/neo cells. Moreover, both control and Mcl-1-expressing K562 cells were induced to differentiate by treatment with activin A (50 ng/ml) for 72 h (data not shown).

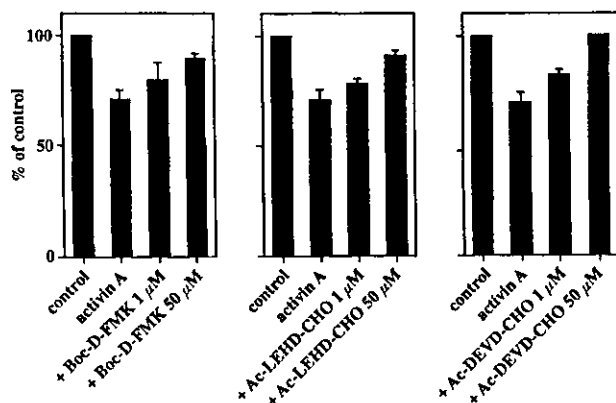


Figure 4 Effect of caspase inhibitors on activin A-treated KU812 cells. Inhibition of activin A-induced (50 ng/ml, 72 h) apoptosis of KU812 cells was estimated in a co-culture with a series of specific caspase inhibitors (1 μM and 50 μM). These experiments were repeated 3–5 times. Results were expressed as the mean \pm s.d. Left: a general caspase inhibitor, Boc-D-FMK. Center: caspase-9 inhibitor, Ac-LEHD-CHO. Right: caspase-3 inhibitor, Ac-DEVD-CHO

Discussion

Activin A is a member of the TGF- β superfamily that may exert a broad range of effects on growth, differentiation, and maturation in various cell types, including hematopoietic cells (DePaolo *et al.*, 1991; Nishimura *et al.*, 1991; Bilezikjian and Vale, 1992; Mather *et al.*, 1992). Activin A was identified as being identical to erythroid differentiation factor (EDF), which is known to inhibit proliferation of murine Friend erythroleukemia cells and human CML cell line

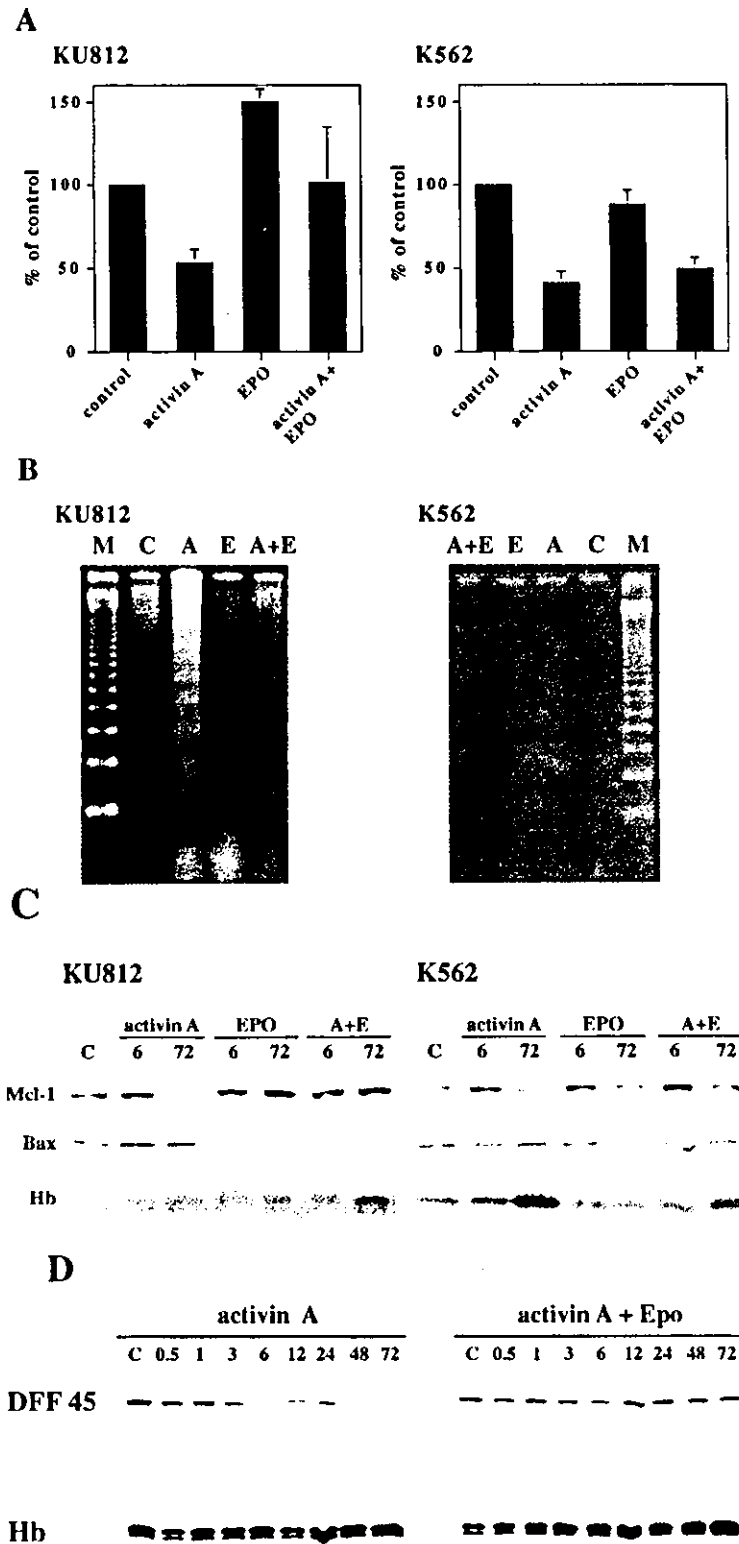


Figure 5 Effect of EPO on activin A-induced apoptosis and erythroid differentiation of CML cells. KU812 and K562 cells were cultured with 50 ng/ml of activin A (A), 2 IU/ml of EPO (E), or both agents (A + E) for 96 h. Cell growth and viability were examined with Trypan blue dye exclusion test (a), and apoptosis was confirmed by DNA fragmentation analysis (b). Expression of Mcl-1, Bax, and Hb contents were analysed by Western blot analysis in the presence of activin A (50 ng/ml)-, EPO (2 IU/ml)-, or both (A + E)-treated KU812 and K562 cells for 6 or 72 h (c). In addition, levels of DFP45 and Hb contents were examined in KU812 cells for 72 h with treatment of activin A (50 ng/ml) and the combination of activin A and EPO (2 IU/ml) (d). M, marker; C, control; A, activin A; E, EPO

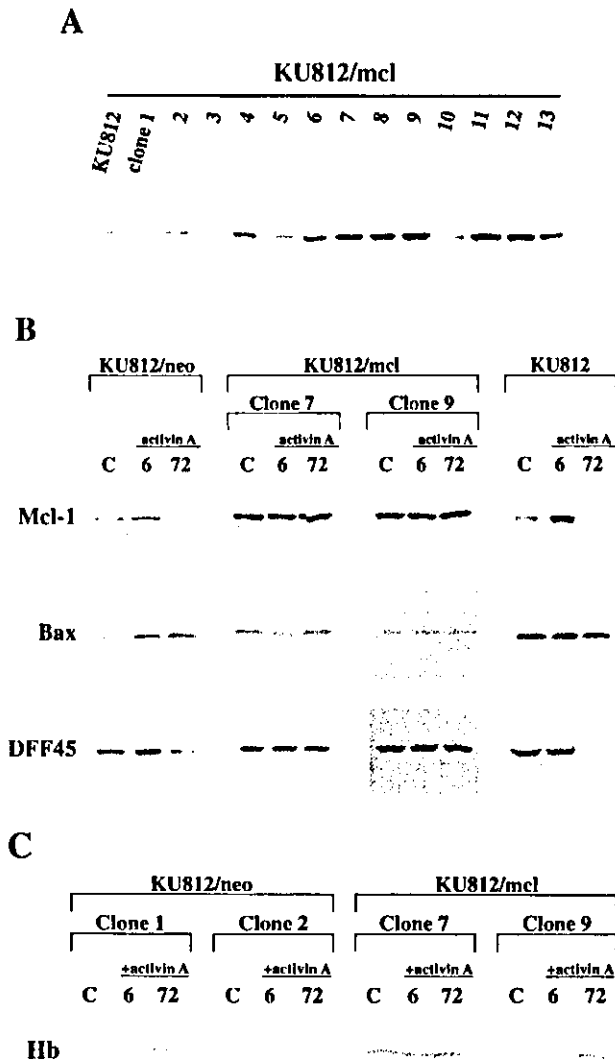


Figure 6 Effect of Mcl-1 overexpression on activin A-induced apoptosis in KU812 cells. pSR α -neo-EAT/mcl-1 and pSR α -neo were transfected in KU812 cells by the Effectine transfection method. Thirteen clones of *mcl-1* transfected KU812 cells were established (a). After *mcl-1*-overexpressed KU812 cells (KU812/mcl) were selected (clone 7 and clone 9), they were stimulated with activin A (50 ng/ml, 6 and 72 h). The cell lysate was analysed by Western blot analysis for apoptosis-associated proteins (b) and Hb expression (c)

K562 (Eto *et al.*, 1987; Murata *et al.*, 1988) and induce differentiation into Hb synthesizing erythroblasts (Yu *et al.*, 1987; Frigon *et al.*, 1992; Lebrun and Vale, 1997). In addition, activin A was able to directly or indirectly modulate the proliferation of human erythroid progenitor cells (Shao *et al.*, 1992; Mizuguchi *et al.*, 1993). In the present study, we demonstrate that activin A can inhibit the proliferation of CML cell lines by both inducing apoptosis in KU812 cells and differentiation of K562 cells. We found for the first time that rapid and transient up-regulation of Mcl-1 by the treatment of activin A was observed in both cases, and a subsequent increase of Bax protein resulted in

inducing apoptosis in KU812 cells. Therefore, Mcl-1 seems to be an early-inducible molecule in the signaling pathway of activin A-induced growth suppression of CML cells.

Mcl-1 has sequence similarity to Bcl-2 family members, and originally was identified as a gene induced early in the process of differentiation of ML-1 myeloid leukemia cells in the treatment with TPA (Kozopas *et al.*, 1993), and prevent apoptosis in *c-myc*-overexpressing CHO cells (Reynolds *et al.*, 1994). Mcl-1 has two PEST motifs that can be degraded rapidly (Kozopas *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1995). Thus, one possible role of this protein could be to function as a rapid turnover effector that controls the rate of apoptosis and the fate of certain cells. After transient up-regulation of Mcl-1, activin A induced continuous increase of Bax protein and finally led to the apoptosis of KU812 cells. In contrast, activin A induced differentiation of K562 cells into Hb-containing erythroid cells without induction of Bax protein. Moreover, co-stimulation with a survival factor, EPO, maintained the increased Mcl-1 expression and induced differentiation, but not apoptosis, of KU812 cells. To elucidate the role of Mcl-1 in inducing apoptosis or differentiation by activin A, we constructed a stable transfection of the *mcl-1* gene in both KU812 and K562 cells, and examined the effects of activin A on cellular proliferation and differentiation. Interestingly, *mcl-1*-overexpressing KU812 cells (KU812/mcl) inhibited the induction of Bax protein, resulting in protection of apoptosis and induction of differentiation into Hb-positive cells. Both *mcl-1* expressing and control K562 cells (K562/mcl and K562/neo, respectively) were induced to differentiate into Hb-positive cells by treatment with activin A. Furthermore, the modulation of Bax protein was not observed as being similar to that of the parental K562 cells. These results suggest that prolonged expression of Mcl-1 may support activin A-induced cellular differentiation towards erythroid cells in CML cells.

The difference between activin A-induced apoptosis and differentiation may depend on the continuous induction of Bax protein followed by transient up-regulation of Mcl-1 protein. In KU812 cells, activated caspase-9 and caspase-3, induced by treatment with activin A, were expressed from 24 h after the down-regulation of Mcl-1 protein had occurred. In contrast, Hb was induced to accumulate in KU812 cells after 72 h exposure to activin A and EPO, a survival factor for erythroid cells. Therefore, apoptotic signals induced by activin A via the induction of Mcl-1, is faster and probably stronger than the corresponding differentiation signals; the continuous expression of Bax protein may be important for the course that leads to apoptosis of the cells. Moreover, direct interaction between continuous up-regulated Mcl-1 and Bax protein, or indirect association of both proteins through the regulation of the mitochondrial apoptotic change, may defeat the subsequent apoptotic signals (Zhou *et al.*, 1997; Vander Heiden and Thompson, 1999; Kroemer and Reed, 2000). In contrast the

mechanism of KU812 cells, activin A induced differentiation of K562 cells into erythroid cells without modulating the Bax protein. A recent investigation showed that one murine cell line, ELM-I-1, required both activin A and EPO to achieve erythroid differentiation, however, in that study, apoptosis was induced by treatment with activin A alone. On the contrary, in another murine cell line, F5-5, differentiation was sufficiently induced by activin A alone to achieve an erythroid lineage (Shiozaki *et al.*, 1998). One possible explanation for these differences in activin A reactivity in these two cell lines was the state of the EPO receptor. Namely, it has been reported that the EPO receptor is constitutively activated in F5-5 cells, whereas it is not activated in ELM-I-1 cells (Li *et al.*, 1990; Shiozaki *et al.*, 1998). These results suggest that the survival signaling molecules and pathways, including the STAT5 or PI3K/Akt pathway (Smithgall *et al.*, 2000; Haseyama *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999), may differentiate among cell lines. However, the present results indicate that overexpression of Mcl-1 may inhibit activin A-induced apoptosis, and subsequent inhibition of apoptosis may support cellular differentiation of CML cells. Therefore, overexpression of Mcl-1 can protect against apoptosis. Moreover, Mcl-1 plays a role in the survival function of the activin A signaling pathway.

CML is a clonal stem cell disorder characterized by increased proliferation of myeloid cells at all stages of differentiation (Champlin and Golde, 1985). Interferon- α and hematopoietic stem cell transplantation have been clinically introduced and established as a standard therapy for patients with CML. However, higher dosages of interferon- α often are accompanied by troubling side effects; in addition, patients in the blastic phase of the disease do not respond to this treatment (Talpaz and Kantarjian, 1995). Stem cell transplantation often causes serious clinical side effects and elderly patients undergo the risk of early mortality. Therefore, a novel therapeutic approach is strongly desired. Further studies using clinical materials and *in vivo* studies will be necessary for establishing the appropriate clinical application of activin A for patients with CML. Nonetheless, activin A remains a possible candidate for a novel therapeutic agent that mediates apoptosis and the differentiation of leukemic cells.

In summary, we report here for the first time that activin A can induce both apoptosis and the differentiation of CML cells with transient up-regulation of Mcl-1. Mcl-1 is an early-inducible molecule in the signaling pathway of activin A, and contributes to the cell fate decision.

Materials and methods

Cells and cytokine

Human CML cell lines (KU812 and K562 cells) were obtained from the Japanese Cancer Research Resources

Bank (JCRB; Tokyo, Japan) and were maintained in RPMI 1640 medium (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO-BRL), 100 U ml⁻¹ penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Recombinant human activin A was kindly provided by Dr Y Eto (Ajinomoto Co., Inc., Tokyo, Japan) and recombinant human erythropoietin (EPO) was a gift from Kirin Brewery Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Both agents dissolved in RPMI 1640 medium at a stock concentration of 250 mg/ml and 1000 IU/ml, respectively.

Assays for cellular proliferation

Cellular proliferation was evaluated by Trypan blue dye exclusion test. Cells (1×10^6) were cultured with various concentrations of activin A (0–100 ng/ml) for 96 h or with 50 ng/ml of activin A for various amounts of time (0–120 h). Moreover, cells (1×10^6) were cultured with 50 ng/ml of activin A with or without EPO (2 IU/ml) for 96 h. These experiments were performed 3–5 times.

Analysis of apoptotic cells

The number of apoptotic cells was estimated with annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining and DNA fragmentation analysis. Activin A-stimulated (50 ng/ml, 0–96 h) KU812 and K562 cells were stained with annexin V-FITC and PI double staining by using a staining kit purchased from PharMingen (San Diego, CA, USA) and the stained cells were analysed by a FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). In the DNA fragmentation analysis, cells (1×10^6) were washed twice with ice-cold PBS and incubated in a lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% Triton X-100] at 4 C for 10 min. After centrifugation, supernatants were incubated with RNase A (50 mg/ml, Sigma) for 1 h and with proteinase K (100 mg/ml, Sigma) for an additional hour at 37 C. After isopropanol-precipitation, DNA was subjected to electrophoresis on 2% agarose gel and then it was stained with ethidium bromide.

Dianisidine staining

Hemoglobin concentrations were estimated with dianisidine staining. Activin A (50 ng/ml, 96 h)-stimulated KU812 and K562 cells (1×10^6) were incubated in PBS containing 0.2% 3,3'-dimethoxybenzidine, fast blue B (dianisidine, Sigma), 0.3% H₂O₂ for 30 min at room temperature without light. After incubation, cells were washed and resuspended (1×10^6 /ml) with PBS.

Cell lysate preparation and Western blotting

After stimulation with activin A (50 ng/ml), EPO (2 IU/ml), or with both agents for various incubation times, cells were washed and suspended in lysis buffer [1% NP-40, 1 mM PMSF, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl] at 4 C for 15 min. After centrifugation, supernatants were collected and protein concentrations were determined using a Bio-Rad protein assay system (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Cell lysates (20 μ g of protein per lane) were fractionated in 12.5% SDS-polyacrylamide gel prior to transfer to the membrane (Immobilon-P membranes, Millipore, Bedford, MA, USA) using the standard protocol. Membranes were blocked overnight with 10% defatted milk in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBS-T) at 4 C. Antibodies were used at

1:500–2500 dilution in 5–10% defatted milk in PBS-T for 1 h at 25 °C. Subsequently, membranes were incubated with anti-rabbit Ig conjugated with horseradish peroxidase (-HRP) (1:1000, Amersham, Buckinghamshire, UK), anti-mouse Ig-HRP (1:1000, Amersham) or anti-goat IgG-HRP (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 1 h at 25 °C. Antibody binding was detected by using an enhanced chemiluminescence kit for Western blotting detection with Hyperfilm ECL (Amersham). Blots were stained with Coomassie brilliant blue and confirmed to contain a similar amount of protein extract on each lane. Antibodies used in this study were as follows: anti-Mcl-1 (S-19), -Bax (H-20), -Bcl-XL (S-18), -caspase-8 [Mch5 p20 (c-20)] (Santa Cruz), anti-Bcl-2 (clone 124) (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA), anti-caspase-9, -caspase-3 (PharMingen), anti-DFP (CT) (Millennium Biotechnology, Ramona, CA, USA), and anti-Hemoglobin (DAKO A/S, Glostrup, Denmark).

Caspase inhibitory assay

KU812 cells (1×10^6) were cultured with 50 ng/ml of activin A containing 1 or 50 μ M of caspase inhibitors [caspase Inhibitor III (Boc-D-FMK), caspase-9 Inhibitor II (Ac-LEHD-CHO), caspase-3 Inhibitor I (Ac-DEVD-CHO); CALBIOCHEM, La Jolla, CA, USA] for 72 h. Cellular proliferation of activin A plus each inhibitor was evaluated by Trypan blue dye exclusion test. These experiments were performed 3–5 times.

References

Ando T, Umezawa A, Suzuki A, Okita H, Sano M, Hiraoka Y, Aiso S, Saruta T and Hata J. (1998). *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 1326–1333.

Bilezikjian LM and Vale WW. (1992). *Trends Endocrinol. Metab.*, **3**, 218–223.

Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Schwall RH, Mason AJ and Nikolics K. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9052–9056.

Champlin RE and Golde DW. (1985). *Blood*, **65**, 1039–1047.

Chao JR, Wang JM, Lee SF, Peng HW, Lin YH, Chou CH, Li JC, Huang HM, Chou CK, Kuo ML, Yen JY and Yen HFY. (1998). *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 4883–4898.

DePaolo LV, Biesak TA, Erickson GF, Shimasaki S and Ling N. (1991). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **198**, 500–512.

Eto Y, Tsuji T, Takezawa M, Takano S, Yokogawa Y and Shibai H. (1987). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 1095–1103.

Frigon Jr NL, Shao L-E, Young AL, Maderazo L and Yu J. (1992). *Blood*, **79**, 765–772.

Gross A, McDonnell JM and Korsmeyer SJ. (1999). *Gene Dev.*, **13**, 1899–1911.

Haseyama Y, Sawada K, Oda A, Koizumi K, Takano H, Tarumi T, Nishio M, Handa M, Ikeda Y and Koike T. (1999). *Blood*, **94**, 1568–1577.

Koseki T, Yamato K, Krajewski S, Reed JC, Tsujimoto Y and Nishihara T. (1995). *FEBS Lett.*, **376**, 247–250.

Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P and Craig RW. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3516–3520.

Kroemer G. (1997). *Nat. Med.*, **3**, 614–620.

Kroemer G and Reed JC. (2000). *Nat. Med.*, **6**, 513–519.

Lebrun JJ and Vale WW. (1997). *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1682–1691.

Li JP, D'Andrea A, Lodish HF and Baltimore D. (1990). *Nature*, **343**, 762–764.

Plasmid and transfection

pSR α -neo-EAT/mcl-1 containing the full-length coding region of the human Mcl-1 cDNA was originally constructed in our laboratory (Ando *et al.*, 1998). The control plasmid pSR α -neo was constructed by cloning the neomycin resistant gene-containing fragment into *EcoRI/HindIII*-digested pBR322-SR α . Exponentially growing KU812 and K562 cells (1×10^6 cells/60 mm dish) were transfected with either 0.4 μ g of pSR α -neo-EAT/mcl-1 or pSR α -neo by the Effectine transfection method (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Forty-eight hours after transfection, cells were suspended in RPMI 1640 medium containing 600 μ g/ml of G418 (GIBCO-BRL) for approximately 4–6 weeks. Stable transfectants were screened for Mcl-1 expression by Western blot analysis, and single-cell clones expressing high levels of Mcl-1 were obtained by limiting dilution.

Acknowledgments

The authors thank Dr Y Eto (Central Research Laboratory, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki, Japan) for providing recombinant human activin A, and J Ozawa for technical assistance. This study was supported by grants from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, and the National Grant-in-Aid for the Establishment of a High-Tech Research Center in a Private University.

Ling N, Ying SY, Uemo N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M and Guillemain R. (1986). *Nature*, **321**, 779–782.

Los M, Wesselborg S and Schulze-Osthoff K. (1999). *Immunity*, **10**, 629–639.

Mather JP, Woodruff TK and Krummen LA. (1992). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **201**, 15.

Miyamoto Y, Kosaka M, Eto Y, Shibai H and Saito S. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 1149–1156.

Mizuguchi T, Kosaka M and Saito S. (1993). *Blood*, **81**, 2891–2897.

Moulding DA, Quayle JA, Hart CA and Edwards SW. (1998). *Blood*, **92**, 2495–2502.

Murata M, Eto Y, Shibai H, Sakai M and Muramatsu M. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2434–2438.

Nishihara T, Okahashi N and Ueda N. (1993). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 985–991.

Nishimura M, Kaku K, Azuno Y, Okafuji K, Etoh Y, Shiozaki M, Sasaki H, Inoue T and Kaneko T. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 1042–1047.

Peters R, Leyvraz S and Percy L. (1998). *Blood*, **92**, 2041–2052.

Reynolds JE, Yang T, Qian L, Jenkinson JD, Zhou P, Eastman A and Craig RW. (1994). *Can. Res.*, **54**, 6348–6352.

Sato T, Hanada M, Bodrug S, Irie S, Iwama N, Boise LH, Thompson CB, Golemis E, Fong L, Wang H-G and Reed JC. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9238–9242.

Shao L-E, Frigon Jr NL, Young AL, Yu AL, Mathews LS, Vaughan J, Vale W and Yu J. (1992). *Blood*, **79**, 773–781.

Shimizu S, Konishi A, Kodama T and Tsujimoto Y. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3100–3105.

Shiozaki M, Kosaka M and Eto Y. (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**, 631–635.

- Smithgall TE, Briggs SD, Schreiner S, Lerner EC, Cheng H and Wilson MB. (2000). *Oncogene*, **19**, 2612–2618.
- Talpaz M and Kantarjian H. (1995). *Ann. Intern. Med.*, **122**, 728–729.
- Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Wood W, Karr D and Spiess J. (1986). *Nature*, **321**, 776–779.
- Vander Heiden MG and Thompson CB. (1999). *Nat. Cell Biol.*, **1**, E209–E216.
- Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ and Yang-yen HF. (1999). *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6195–6206.
- Yamashita T, Shimizu T and Ogata E. (1991). *J. Biol. Chem.*, **266**, 3888–3892.
- Yamato K, Koseki T, Kizaki M, Ikeda Y and Nishihara T. (1996). *Jpn. J. Clin. Hematol.*, **37**, 564–567.
- Yamato K, Koseki T, Ohguchi M, Kizaki M, Ikeda Y and Nishihara T. (1997). *Mol. Endocrinol.*, **11**, 1044–1052.
- Yang E and Korsmeyer SJ. (1996). *Blood*, **88**, 386–401.
- Yang T, Kozopas KM and Craig RW. (1995). *J. Cell. Biol.*, **128**, 1173–1184.
- Yang T, Buchan HL, Townsend KJ and Craig RW. (1996). *J. Cell. Physiol.*, **166**, 523–536.
- Yu J, Shao L, Lemas V, Yu AL, Vaughan J, Rivier J and Vale W. (1987). *Nature*, **330**, 765–767.
- Yu J, Shao L-E, Vaughan J, Vale W and Yu AL. (1989). *Blood*, **73**, 952–960.
- Zhou P, Quan L, Kozopas KM and Craig RW. (1997). *Blood*, **89**, 630–643.

第50回昭和医学会総会特別講演

ヒト幹細胞を用いた再生医療

国立成育医療センター研究所部長 (生殖医療研究部)

梅澤 明弘

はじめに

再生医療 (または再生医学) という新しい医療分野がマスコミをにぎわしている。ここ数年、この分野が劇的ともいえる進展をみせているのは、幹細胞 (stem cell) に関する学問が大きく進んだこと、生分解性プラスチックなど細胞を生体に移植する際の足場になる材料としてよりよいものができてきたこと、増殖因子やマトリックスなど補助的材料も容易に入手できるようになったことなどが大きな促進要因になっていると思われる。

再生というのは欠損した臓器あるいは組織が自分の力で元に戻る現象だが、もともと臓器の中には再生しやすいものと、再生しにくいものがある。一方、現在の再生医療は自己の再生能力を高めるといよりは、外から細胞を移植してやり、増殖因子やマトリックスを入れてやることによって元の臓器と同じ形で同様な機能をもつものをつくるという戦略をとっている。

では再生しやすい臓器は何かというと、最も代表的なものは肝臓である。プロメテウスが火を盗んだ罪によって、毎日ワシに肝臓をついばまれる罰をゼウスから課せられたというギリシャ神話の中の有名な寓話からもわかるように、肝臓の再生能力がきわめて高いことは非常に古くから知られていた。実際に、肝臓がんの手術で肝臓全体の2/3を大きく切除したような場合でも、失われた部分がきちんと再生して、元の機能を取り戻すので患者にとってはそれほど大きなダメージにはならない。

一方、再生しにくい臓器の代表は心臓である。私が経験した心筋梗塞で亡くなった患者の例を示すと、左心房の前壁に大きな梗塞巣がみられる。この梗塞巣は心筋が死んでしまった名残で、これは肝臓とは異なり元に戻ることは決してない。そこには膠原線維がたまる一方で、収縮能を完全に失い事実上心臓としての機能が完全に消失している。また、その梗塞巣がべらべらに薄くなって

破れ、心破裂を引き起こすという場合もある。腎臓も同様に再生能力は弱い。

胚性幹細胞 (ES細胞) と体性幹細胞

さて幹細胞には大きく分けて2つの種類がある。1つは有名なES細胞 (embryonic stem cell) で、もう1つは全身の組織・臓器にある幹細胞である。ES細胞は日本語では胚性幹細胞または胎児性幹細胞、全身の臓器にある幹細胞は成体幹細胞あるいは体性幹細胞と呼ばれる。

ではES細胞とは何か。受精卵は卵割を繰り返し、桑実胚を経て胚盤胞になるが、その胚盤胞の内部細胞塊由来の細胞株として樹立されたものがES細胞である。ES細胞はマスコミなどでよく「万能細胞」として報じられているように、さまざまな細胞に分化し得る多分化能 (pluripotency) を有しており、受精卵と同等の分化全能性をもつという意味で、toti-potencyという言葉も用いられている。このES細胞を筋肉、肝臓、血液、骨、心臓、神経などの細胞に分化させて患者に移植し、失われた機能の回復を図るというのが、現在研究が進められている再生医療の1つの戦略であると理解していただきたい。

一方、体性幹細胞は、由来する体細胞によってごく限られた範囲の細胞にしか分化できないものから、かなり広範囲な細胞に分化し得るものまでさまざまであり、それぞれの分化能に応じてbi-potencyとかoligo-potency, multi-potencyといった言葉が使われる。というわけで一口に幹細胞といっても、いろいろなレベルのものがあることになるが、胚性幹細胞と体性幹細胞を区別する考え方は医療の現場にとっては意味のあることである。

腫瘍由来のEC細胞

実はES細胞や体細胞性幹細胞の研究に先駆けてマウ

スの初期胚に由来する胚性（胎児性）腫瘍細胞（embryonalcarcinomacell=EC細胞）に多分化能があり、このEC細胞を胚盤胞に入れると全身の臓器・組織になるという実験結果がキメラマウスなどの研究で有名なB・ミンツ博士らによって報告されていた。そしてヒトの場合でも、このようなEC細胞を精巣や卵巣の腫瘍から分離することができ、ヒト初期発生の実験モデルとして使えるということもわかっていた。

われわれも32歳の男性の精巣にできた胎児性腫瘍からEC細胞株を樹立し、これにG3という名前をつけた。このG3はビタミンAを処理すると神経細胞、筋肉、胎盤などに分化し得ることが、それぞれの細胞に特有のマーカー（たとえば胎盤ではhCG=ヒト絨毛ゴナドトロピン）を検出することによって明らかになった。つまり、この細胞はかなり広い分化能をもっているということになるわけだが、この分化はかなり確率的でこれをコントロールできたことはない。

骨髄間質細胞を用いる戦略

以上を前置きにして、本日の主題、骨髄中の幹細胞である間質細胞の話に移ることにしたい。この細胞は本来骨髄における造血機能を補助するという役割を担っている。電子顕微鏡で観察すると、一種の網目構造をとっていることがわかるが、この網目のところに血液が生み出されてくる。どちらかという二次的な役割しかない細胞ということになるが、本日の話ではこれが主役である。われわれはこの細胞を大腿骨の骨髄から採取して用いている。

従来、細胞を移植する医療で最も成功しているのは疑いもなく骨髄移植だと思われる。骨髄移植の場合は、ドナーの腰骨から500ccの血液を採取し、その日のうちに患者に静注して全身的に造血を促す。われわれがやる細胞移植では採取した細胞を体外で1回培養して必要な量を増やしたり、適当な処理によって変身させたりして、骨や心臓などの目的の臓器に局注する。この培養することと目的の臓器に直接打ち込むという点が、骨髄移植と大きく違っている。そして変身させるための細工に関してはいままでに得られたサイエンスの知見をできる限り利用するという戦略をとる。

骨、軟骨、脂肪などへ変身させる

さて、われわれはこの骨髄間質細胞から骨、軟骨、脂肪、骨格筋、心筋、神経などの細胞に分化させることに

成功した。順を追って簡単に紹介していくことにする。

骨髄間質細胞は通常の条件で培養すると、線維芽細胞とほとんど区別がつかない。これに分化誘導処理を施してマウスの背中の皮下に移植すると、2週間で早くも骨が形成されてくる。移植後4週間の時点で標本をつくって顕微鏡で観察すると、新たに形成された骨の中に宿主由来の顆粒球、赤血球、巨核球という3系統の細胞が浸潤している様子が見られる。つまり移植した細胞はきちんと骨をつくることが確認できたわけである。

そこで、次にこの細胞の骨をつくる能力を治療に利用できるかどうか調べてみた。マウスの大腿骨（全長約1cm）の骨幹部を5mmにわたって大きく切除し6週間後に観察すると、患部は肉芽が形成されただけで骨軟骨形成がみられず全く治癒していない。これに対して先の骨髄間質細胞を移植すると、4週間後には移植した細胞から新しい密な骨ができ、それと残っていたマウスの骨が完全に結合してほとんど治癒している所見が得られた。

ただし、当初の実験ではできた骨があまりにも歪であったので、次に目的の形の骨をつくることを試みた。産業技術総合研究所の専門家をお願いして、生分解プラスチックのポリ乳酸を四角い形のスポンジ状に加工してもらい、そのスポンジの穴に間質細胞を入れて、マウスに移植すると、こんどはちゃんと四角い骨ができたこのように工学分野の専門家の協力と指導によって適当な生体適合性の材料を使えば、目的の形の骨をつくるのが可能になる。われわれは単に細胞だけでなく、そのようなことまで視野に入れて研究を進めているということをおきたい。

次は軟骨である。実は患者自身の軟骨細胞を培養して移植し、損傷した軟骨を部分的に回復させるという治療法はすでに実地に行なわれている。しかし、われわれは骨髄間質細胞を使っているのだから、この細胞から軟骨をつくるを行っている。間質細胞を軟骨になるような処理を行った上で、マウスの皮下に移植するとそこに軟骨が形成されたことが肉眼でも観察できるが、その際軟骨に特異的なマーカーであるコラーゲン・タイプIとアグリカンの遺伝子の発現がみられ、この点からも確かに軟骨が形成されたことが証明できる。

われわれがなぜ骨髄間質細胞に固執しているかという点、病院の外で簡単に採取できるという便利さがあるからである。その際、痛みを感じるかどうかは人によってまちまちだが、いずれにしても簡単に採取でき傷跡も残らない。これは医療の現場にとってはかなり大きなメリッ

トである。

次は脂肪だが、実は骨髄間質細胞は非常に脂肪になりやすい。血清中から脂肪を取り込んでくるのではなく、この細胞自身が脂肪を合成するのである。ただ骨や軟骨にくらべて脂肪の移植に対する需要が少ないために、あまり利用されていない。乳房再建術に脂肪が使われることもあるが、ダイエットをすると形が崩れてしまうことがあるので、筋肉を使うほうが良いと言われている。

われわれは間質細胞を $\text{TNF}\alpha$ (腫瘍壊死因子 α) で処理して脂肪細胞への分化を阻害し、脂肪へ分化するときには造血機能が失われるので、それを顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) やマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) などのコロニー刺激因子などによって復活させるといったコントロール方法を開発した。何故そういうことを考えたかという、骨髄の中に脂肪髄ができて造血機能が全くなり、そのことと骨粗鬆症が密接に関連していることが知られているからである。たとえば、寝たきりの人とか、閉経後の女性、ダイエットをやりすぎた人、特殊なケースとしては宇宙飛行をした人などでは、脂肪髄ができて造血機能が衰えたために骨粗鬆症になりやすい。それを防ぐ意味でこのようなコントロールが重要になるというのが、われわれの考え方である。

遺伝子発現調節による分化の誘導

以上、骨、軟骨、脂肪と紹介してきたが、間質細胞がこれらの細胞に分化するのは、ある程度は当然のことだともいえる。そこで次は、これをもっと別の細胞に分化させることができないかということになる。

ここで私自身が米国の研究所で行った研究を簡単に紹介しておく。ケラチン 18 の遺伝子は 1 万塩基対からなるかなり長大な遺伝子であるが、そのエンハンサー領域は GCGGATG…… という 48 塩基の配列からなっており、この配列はヒトとマウスで完全に保存されている。私はこのエンハンサー領域がメチル化されると、ケラチン 18 遺伝子の発現が抑えられ、メチル化されていなければ発現するという現象がヒトでもマウスでも共通に見られることに気付いた。そして、このエンハンサー領域にメチル化されないような変異を入れてやるとマウスの全身の臓器でケラチン 18 遺伝子が発現することを証明した。このことから転写調節領域のメチル化の有無によって、遺伝子の発現をコントロールできることに気づいた。

その後、UCSD においてコラーゲン $\alpha 1$ (1) 遺伝子

の研究を行った。この遺伝子の場合はその 3' 末端領域に強力なエンハンサー活性があるが、5' 末端のメチル化によってその活性は消失する。つまりメチル化のほうがエンハンサー活性より強いということを見出したわけである。さらに慶應に帰ってから、Beckwith-Wiedemann 症候群という小児科領域の病気の研究を行い、この病気の患者では H19 という遺伝子の転写調節領域がメチル化されているために、肝臓の一部に本来の肝細胞よりはるかに幼若な、または別の細胞に分化する細胞が生じるということを明らかにした。

以上の 3 つの研究データから、私は遺伝子のメチル化の状態を変えてやれば、ある細胞を別の細胞に変身させることができるはずだという考えに行きついた。

骨格筋、血管、心筋への分化

この考えのもとに、骨髄間質細胞に対して脱メチル化剤である 5-azacytidine を処理したところ、通常は線維芽細胞と同様の形をした細胞が長く伸び、収縮はしないが横紋構造が見られるようになった。この細胞をマウスの大腿四頭筋中に移植すると、横紋構造をもった骨格筋がきれいに形成されることがクラゲの GFP と抗体を用いた免疫組織学的検査などから証明された。この結果にはわれわれはかなり満足している。

次は血管である。前と同様の処理をした間質細胞をマウスの皮下に移植すると血管腔をもつ血管が形成されるが、われわれが一番うれしく思ったのは、この血管の中に赤血球が見られたという点である。われわれの間質細胞は赤血球には分化できない。したがって、新たに形成された血管中に赤血球が見られたということは、詳しい機序は不明だがこの血管にマウス本来の血管が吻合して血液が流れはじめたことを示している。

次は骨髄間質細胞を心臓に分化させた。実はわれわれはかなり早い段階で骨髄間質細胞が 1 分間に 60 から 100 回の割合でピクピクと動くことを観察していた。培養しはじめの頃は線維芽細胞と同じ形だが、分化誘導剤を処理して 2 週間たち、細胞が丸くなって伸びて分岐を生じて全体が 3 ミリぐらいの塊になると動きだすのである。そして最初は不整脈のような乱れが生じるが最終的には一定のリズムを刻んで拍動するようになる。後に、この拍動する細胞は心筋に特異的にみられるマーカーや転写因子が陽性になることがわかり、われわれは骨髄間質細胞が確かに心筋に変身したと結論づけた。

そこで次に実際にこの拍動する細胞を心臓に移植した

いと思い、心臓外科のプロに頼んでマウスの心臓に打ち込んでもらった。β-ガラクトシダーゼで青くラベルした細胞を、32ゲージという細い針でマウスの心臓に移植したところ、この細胞は右心室の中隔前1/3から前壁にかけてきれいに分布して植え付けられていた。ではというので、こんどは分化誘導剤処理をしたばかりの骨髄間質細胞を同様に心臓外科の手を借りてマウスの心臓に移植してもらった。すると骨格筋とは完全に違って、核が真ん中であって分岐構造をもつ心筋細胞ができることがわかった。これによって、骨髄間質細胞は試験管の中でも心臓の細胞になるし、生体内でも心臓に変身させることができることが確かめられたわけである。

神経細胞への変身も

さいごの例として、骨髄間質細胞を神経に変身させる試みを紹介する。あるとき、必要があって手持ちの間質細胞の細胞株を横一線に並べて、それらがどのような細胞に分化しやすいかを調べていったところ、移植すると骨になる細胞株がときとして長い突起を出すことがわかってきた。これを報告した研究者は、これは神経細胞になったという意見だったが、骨髄間質細胞は中胚葉由来であり、神経は外胚葉由来であるので、そのような胚葉を超えた変身は有り得ないのではないかと私は考えていた。しかし、彼があまり強く主張するので、3人の神経発生学者に鑑定してもらったところ、全員がこれは神経細胞であるという判定を下したのである。

そこで、神経への分化をより確実なものにするために、この細胞のプロファイリングを米国のNIHに依頼した。その結果にもとづいて改良を加え、さらに神経細胞との接着活性のあるファイブロネクチンをコートした培養皿にこの細胞を移してやったところ、全ての細胞が非常に長い突起を伸ばしてその突起の先端が三角形になる様子が観察できた。そしてニューロンのマーカーであるMAP2やTuJ1が陽性であり、グリア細胞を構成するアストロサイト（星状膠細胞）とオリゴデンドロサイト（稀突起膠細胞）のマーカーはほとんど陰性であった。つまり、われわれの骨髄間質細胞はまさしくニューロンに変身したということである。別の実験で、この神経細胞に変身した細胞が神経伝達物質であるグルタミン酸に反応しカルシウムの流入が高まることも明らかになった。

骨髄間質細胞の変身についての話は、大体以上で終りであるが、われわれがこのような成績について学会などで発表すると決まって出てくる質問がある。

第1は、骨髄間質細胞から骨ができたのも、また神経細胞ができたのも発表のとおりだろう。しかし、この実験に使われた細胞にはもともと神経になる幹細胞がコンタミしていて、それが分化しただけではないか。

第2は、間質細胞が1回、元の始原的な細胞に戻ってから、神経に分化したのではないか。第3は、第1と第2ではなく、間質細胞が完全に神経に変身したのか、この3点である。

第1の質問については、10数年にわたって何度もサブクローニングを繰返して、分化誘導処理をしなければ骨にしかならない細胞であることを確認しており、すべての細胞には骨のマーカーが現れていることから、神経の幹細胞がコンタミしている可能性は絶対はない。したがってこの質問に対してはいつも「そんなことはありません」という一言で片付けている。第2の質問については、われわれはこれまで中間体の細胞を観察することがないので、私の考えは否定的である。そしてわれわれいつも第3の変身説をとっている。つまり、骨の細胞が一気に神経になったという考え方である。

胚葉を超えた分化は例外的

最近この細胞はいろいろなことですぐに神経になってしまうので、本来は神経の細胞で骨形成因子を出して骨の細胞として振る舞っているのは、実は仮の姿ではないかという考えをもっている。といってもとくに証拠があるわけではないので、あくまでも1つのアイデアであるが……。

本日紹介した骨髄間質細胞は中葉胚由来の細胞であり、骨、軟骨、脂肪、骨格筋、心臓いずれも中葉胚由来である。神経だけは外葉胚由来であり、その意味ではこの細胞は胚葉を超えて変身することもあり得ることになるが、これはあくまでも例外だと考えている。内胚葉系の細胞に変身させられるかという質問を受けることがよくあるが、何回となく試みてもそういうことはできない。肝臓はつくれないし、皮膚もできないし、髪の毛も眼もできたことはない。逆に言うとほとんどのものはできないということで、私たちはできた少数の例だけを皆さんに紹介しているのだと、理解していただきたい。

間質細胞の変身できる範囲が狭いならそれをもっと広げる方法はないか、というのでわれわれはクローン技術を利用して変身能力を上げることを試みている。日本では体細胞のクローン牛の研究や生産が進んでいるが、その専門家をお願いして骨髄間質細胞の核を除核卵細胞に

移植して胚盤胞をつくり、その内部細胞塊由来の細胞を使って変身能力が上るかどうかが調べている。

実際にやってみると、まずこの内部細胞塊由来の細胞を培養すると、はじめ線維芽細胞様だったものが丸くなって塊をつくって増殖するようになる、つまり先に示した胎児性がん細胞（EC細胞）と同じような未分化の細胞になることがわかった。このEC細胞様の細胞を使って最初に試みたのは、これを胎盤に変身させることである。胎盤をつくって具体的に何をしようという気はないのだが、とにかく胎盤ができれば骨髄間質細胞の変身ぶりを示すことができるだろうという科学的興味から行っている。マウスに移植してみると、骨とか軟骨に分化するという様子は全くみられず、多核の巨細胞が生じてくる。もしかしたら胎盤ができたのではないかと考えているが、まだ確実ではない。

体性幹細胞移植による再生医療の問題点

体性幹細胞移植による再生医療の問題点あるいは今後の課題について若干考えてみたい。まず、この方法は自己の細胞を使うことができ、しかも細胞の採取も外来で簡単に行うことができるという大きな利点がある。ただし、いったん体外で培養する必要があるので、この間たとえば骨折した患者をそのまま待たせるわけにはいかず、医療の現場では最初は他家移植ということになる。

そこで問題点の第1は拒絶反応で、この問題は普通の臓器移植と同様に、再生医療とか細胞移植の現場でもやはり困ることである。

第2は、移植した細胞が予期せぬ分化をしないかという問題。これは今後より詳細に検討する必要がある。

第3には腫瘍化の問題がある。これまではあえて申し述べなかったが、われわれがこれまで行った実験では全く腫瘍化は観察されていない。ただいったん体外で培養するので、この間に何か起きないかという懸念がないわけではない。その可能性は全く否定することはできない、というのがわれわれの見解である。

実際に移植したマウスでは、1年間経過しても腫瘍は発生していないことを確かめているが、ヒトでは、とくに移植がうまくいった場合、その人は30年、40年と生きるわけで、その間に腫瘍化しないかどうかは全く予想もつかない。もう1つ、われわれは移植用の細胞数を確保するために、とくにヒトの場合にはテロメラーゼを使って細胞の寿命を伸ばすことをやっている。このような処理を行ったために、移植してすぐに腫瘍はできないにし

ても、長い間にはLow grade malignancy、つまり悪性腫瘍の中でも非常に悪性度が低い腫瘍ができる可能性はないかという問題があるが、これも実験的に証明できない。また、テロメラーゼを用いることについて社会の理解が得られるかどうかは、現在のところ全く不明である。

以上のように幹細胞移植による再生医療には、まだいろいろな問題点があることは確かだが、何が利益で、またどういう不利益があるかを絶えず意識しながら、この医療を進めることが非常に大事だと思う。つまり、たいしたことの無い病気の治療に再生医療を適用する必要はないということである。現在のわが国の移植医療では臓器不足が深刻で、移植に適した臓器を待ち切れずに亡くなる方が非常に多く、私は病理解剖を通じてそのような現実を日常的に肌で感じている。このような中で利益と不利益を明確にし、一定の手続きをきちんととった上で、何をやってその結果がどうなったかが公開されて社会的に検証され認知されるという過程をふんで、この再生医療とその基盤となるサイエンスを進めることができれば、祝福された形で世に送り出せるのではないかと考えている。

福田恵一博士（慶應義塾大学）、戸山芳昭博士（慶應義塾大学）、今林英明先生（慶應義塾大学）、桜田一洋博士（協和発酵工業株式会社）、岡野栄之博士（慶應義塾大学）との骨髄間質細胞の分化に関する共同研究で多くの示唆を受け、多くの世界的な潮流について最新情報の供与を受けました。草刈悟氏、阿部仁氏は、魅力的な骨髄間質細胞をたくさん樹立し、数々の発見は彼らに帰属するべきものが多い。時間のある方は、骨髄間質細胞の心筋への分化アニメーションをウェブサイトで見てください。

司会 どうも面白いお話、ありがとうございました。（拍手）

質疑応答

司会 最先端の話を非常にわかりやすく、ウイットに富んだ話をしていただきました。梅澤先生のほうから、「質問を4つ5つ受けていいぞ」というご許可いただいていますのでご質問などございましたら、はい、それでは阪本先生、どうぞ。

阪本 僕は整形外科の阪本ですが、貴重な大変すばら

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ますけれども、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…までいかないで、肺ブロー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、トリジンプ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れども、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。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ーパー