



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の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イ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 ウイ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つ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用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衛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衛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が、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インドウ、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が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

トロフィー、リソソーム病のほか、ちょっと聞き慣れないかもしれませんが、異染性脳白質異常症、ニューロゴーシェ、ムコ多糖症、ハンター症候群、ハーラー症候群などの子供たちの酵素補充の供給源として使うことができます。

小室 いろいろな供給源から取ってきた間葉系の細胞は同じものなのでしょうか。

梅澤 形態学的にはとてもよく似ており、すべて線維芽細胞のように見えますが、実際はまったく違います。増殖期における細胞の遺伝子発現を DNA チップで網羅的に調べると、取ってきた元の組織の形質を見事に維持しています。たとえば子宮内膜に由来するものは、ホルモンの受容体の発現が高く、骨髄由来の細胞は骨形成因子である BMP の発現が高い。軟骨の場合は DNA チップだけではなく、ランダムシーケンスによる解析を行っても、遺伝子発現のトップ 10 は基質に由来するものばかりです。

しかし、間葉系の細胞は *in vitro* では多分化能をもっています。たとえば脂肪細胞由来であっても脂肪のほかに骨、骨格筋に分化させることができます。ただ、増殖期においては元の組織の形質を保持しているのです。

間葉系の細胞が元の組織の形質を保持しているのは、おそらくメチル化で規定されているためだと考えられます。つまり、ゲノム上にきちっとしたエピジェネティクスが刷り込まれていて、たとえ分裂しても同じメチル化が維持されるため、決してほかの細胞になることはありません。ですから元の組織の枠には入っているけれども、その枠の中では多分化能をもっているのです。

#### ■間葉系幹細胞の起源と治療におけるメリット

小室 いろいろなところから間葉系の細胞が取れるというお話でしたが、その中に間葉系の幹細胞がごく一部入っているという理解でいいの

ですか。

梅澤 これは二つの可能性があります。幹細胞がごく一部存在しているのだとしたら、混ざった状態で培養すると分化が進んだ前駆細胞は増殖できませんので、最終的には増殖能をもつ間葉系幹細胞が集団のほとんどを占めるようになると考えられます。

もう一つは、試験管の中ではある程度コミットした細胞が脱分化し、多分化能を有しているだけで、結局どの細胞も一緒に、間葉系幹細胞という細胞自体はまったく存在しないという説もあります。

桜田 起源細胞についての研究はまだあまり進んでいないのです。非造血系の幹細胞を組織から分離し、そのまま FACS で同定するという研究は非常に遅れています。これは、たとえば骨髄中では血液系の細胞と比較して非造血系の比率が非常に小さいからです。その起源になる細胞はいったい何なのかというのは間葉系の幹細胞の今後の研究でもとくに重要なポイントだと思います。

梅澤 そうですね。間葉系のよい点は、大量に増やすことができることです。骨髄由来の間葉系幹細胞は 1 回成功すれば 30 回は分裂しますので、1 つの細胞から  $10^9$  ( $=2^{30}$ ) 以上の細胞を得ることができます。

小室 ヒト由来の骨髄幹細胞でも可能なのですか。

梅澤 ヒトでもまったく問題なく増えます。ただし、最初の分裂が起こるかどうかがかなり重要です。たとえば臍帯血由来の間葉系は、4 検体に 1 検体ぐらいしか増えてこない。一方、月経血などは 100% 増えてきます。骨髄由来の間葉系細胞に関しては、産業技術総合研究所の培養技術は非常に進んでいて、患者の血清濃度 15% の条件下で失敗なく増やすことができます。臨床においては培養した細胞が 100% 分裂できることが要求されます。

従来、骨の欠損に対しては、腸骨を取り出して砕いたものを欠損部に入れる方法がとられてきました。腸骨を採取することは非常に痛みを伴います。ですから骨髓由来間葉系細胞が培養できて増やすことができるのであれば、大変大きなメリットになります。にもかかわらず、この治療が遅れているのは、間葉系幹細胞の骨への分化能が完璧ではないからです。骨のマーカーはあるけれども見事な骨、硬い骨ができるかということなかなか難しい。

これは軟骨においても同様です。たとえば、お相撲さんの軟骨が壊れているので新たにつくって入れてあげる場合、軟骨は弾性が重要ですが、荷重に耐えられるような軟骨ができない現状なので間葉系幹細胞ではなく、ほとんど増えない軟骨細胞が使われているのです。

さらに形成外科の領域で間葉系を移植すると、傷の治りが非常にいいという説も知られています。

小室 それはどうして治りがよいのですか。血管ができるからではなくて、皮膚ができるからですか。

梅澤 皮膚の場合、治りがよいというのは瘢痕ができないということです。周りの膠原線維の産生が低下すると見た目がきれいに治癒します。これは、移植した骨髓の間葉系細胞自体がきれいな真皮をつくるという説と、間葉系が出しているサイトカインが傷の治りをよくするという説があります。間葉系細胞を打たなくても、bFGF といったサイトカインを打てば傷がきれいに治るのは研究レベルで知られています。

#### ■どこまで臨床応用されているか

小室 間葉系幹細胞は ES 細胞のように何にでも分化するのではなく、部分全能性しかありません。いまのところ、分化するとわかっている細胞にはどういうものがありますか。

梅澤 骨、軟骨、脂肪、骨格筋、心臓、神経で

す。肝臓については、 $\alpha$ フェトプロテインは出るけれども、アルブミンは出てこないという理由から、肝様細胞とされています。また、 $\beta$ 細胞は ES 細胞と同じ問題点がありまして、インスリンを産生するものの、グルコースに反応せず、神経のマーカーはいつも同時に出ているというのが現状です。

小室 そのようにかなり多くの細胞に分化することはわかっているけれども、骨も軟骨も完全ではないわけですね。臨床に使われている例ではどんなものがありますか。

梅澤 米国ではリソソーム病の治療に、酵素の補充を目的に間葉系細胞が使われています。この場合は他家移植ですので、ユニバーサル ES に対してユニバーサルな間葉系幹細胞といわれています。異染性白質ジストロフィーやムコ多糖症 VII 型の患者にも、酵素補充を目的に、ユニバーサルな間葉系幹細胞が使われています。

小室 その幹細胞はどこから取ってきたのですか。

梅澤 骨髓です。骨髓由来の幹細胞は、患者が必要とする酵素もレベルは非常に低いけれども出しています。現在は酵素補充療法でやっていますが、もともとの細胞が生着するだけで酵素を産生してくれるので助けることが可能です。ユニバーサル細胞にするために特別に行うことはありませんが、品質管理規則 (GMP) の基準を満たす必要はあります。

小室 米国 Osiris Therapeutics 社が樹立した細胞はユニバーサルではないのですか。Osiris 社の間葉系幹細胞は、アロ抗原による拒絶反応は問題にならないのですか。

梅澤 Osiris 社の細胞はユニバーサルな間葉系細胞です。また、ご指摘通り、アロ抗原による拒絶反応は問題になります。間葉系の細胞表面に HLA-DR は出ていませんが、クラス I 抗原が出ていますので、私は拒絶されると思います。しかし Osiris 社の発表では「拒絶されにくい」

ということにはなっています。免疫抑制薬は必要になります。

リスクとベネフィットのバランスを考えてみたいと思います。たとえば先天性代謝疾患の子供たちは致死的で、日本では代替治療がありません。免疫抑制薬が必要だとしても、間葉系幹細胞による酵素補充療法を行うことができるのであれば、これはきわめて重要な第一歩になる。

また、筋ジストロフィーも非常に重篤な疾患です。もし、細胞治療が筋ジストロフィーに有効であるならば、最終的には全身の筋肉に対して細胞が必要です。ですから、無尽蔵に得られるES細胞や間葉系幹細胞による治療は大きなベネフィットだと思います。

ここで重要なのは、移植した細胞そのものが筋肉になる必要はないことです。ES細胞が骨格筋と融合し、ES細胞側の正常なジストロフィー遺伝子が発現するようになればジストロフィン蛋白の補充になります。融合さえしてくれればよいのです。

#### ■細胞治療の発展していく方向

**小室** もうすでに Osiris 社からユニバーサルな間葉系細胞が売られています。梅澤先生としては間葉系による細胞治療はどの方向に進むと思いますか。ユニバーサルなものが主流になるのか、それとも先生が最初に言われたようにいろいろなところから間葉系が取れるので、本人、家族のものを使う方向にいくのか。どちらでしょうか。

**梅澤** ユニバーサルな間葉系幹細胞は、規格化されていることにメリットがあつて、後々の臨床でも同じ基準で行うことができます。つまり、細胞を化合物の薬と同じように使うことができます。一方、各個人の細胞を取って増やすオーダーメイド医療は、細胞を GMP 基準のセルプロセッシングセンターで増やして体内に戻

すことにはなりますが、これはなかなか普及しにくいのではないかと予想しています。

**小室** Osiris 社の細胞はほとんど使われているのですか。

**桜田** 臨床試験の最終段階にきていますが、実際には市場に出るのはもう少し先になりそうですね。

**小室** 2、3年前には骨にかなり移植していて、2年前のアメリカ心臓学会 (AHA) では心臓に応用すると、Osiris 社の社長自身が言っていましたね。

**桜田** 今後 FDA の基準に従った臨床試験をクリアしていかないと最終的には難しいと思います。

**小室** 拒絶反応はないと断言していましたが、本当ですかね。

**桜田** 先日ボストンで開催された ISSCR (International Society for Stem Cell Research) では、プロスタグランジンや、免疫抑制のサイトカインが間葉系幹細胞から産生されるためだろうといわれていました。ただ、分化した後、その状態が維持できるかどうかについては、今後の課題だと思います。

## 体性幹細胞研究と応用

#### ■心臓疾患での現状

**小室** 心臓では骨格筋芽細胞を心臓に移植するという試みが行われています。骨格筋では、分化しきっていないサテライト細胞が存在しているので、患者の大腿の筋肉を 10~20g 取ってきて培養すれば、骨格筋芽細胞を増やすことができます。これを患者の心臓に植えて、同じ横紋筋としての作用を期待するという治療法です。欧米数カ国で 10 例以上行われていますが、一応は心臓の機能がよくなったという結

果が出ています。ただ、骨格筋芽細胞は心臓という環境においても骨格筋にしか分化しないので、不整脈という問題があり、ほとんどの人が抗不整脈薬を飲まなければなりません。または心室細動が起こるので除細動器を植え込まざるをえないという状態です。ですからやはり心筋に分化する細胞が望まれているのです。

われわれを含めて世界で3カ所が、心臓から一種の幹細胞様の細胞をSP細胞やSca-1というマーカーを使って取ることに成功しています。これらの細胞をある種の条件下で培養すると、心筋に分化し、体に戻すといろいろな細胞に分化することを確認しました。しかし、心臓から細胞を取って心臓に植えるのは臨床的にどうかと思い、われわれは移植というより、生体内の心筋幹細胞の性質を明らかにして生体内で治す方向で研究しています。

#### ■神経研究の現状と問題点

小室 心臓に比べてもっと進んでいると思われる神経のほうはいかがでしょうか。

桜田 臨床的なニーズは病気によってすごく違いがありますが、神経の再生医療では、最終的には脳の機能を回復させることが目的です。この場合は単に神経、あるいは神経系の細胞ができていただけでは不十分で、回路を再構築しないといけないという大きな問題があります。しかし神経回路と脳の機能の関係はまだ完全には明らかにされていないのです。

また、脳がもっている再生の力を理解し、それが不足するところを治療によって補おうという戦略は非常に重要視されています。実際、成人の脳の中にある神経幹細胞自体もある程度再生する力があることは、少なくともげっ歯類では報告をされていて、実際に障害を治す力もあることも報告されています。それではなぜ病気は治らないのかといいますと、次の三つの説があげられています。一つは、元 東京大学の中福

先生(現 オハイオ大)が実証されていることですが、非常に大きな障害の場合には、内的な力だけでは治しきれない。しかしこの場合、サイトカインを補充することで内的再生力を高めることにより治すことができる可能性はあります。二つ目は、神経変性疾患では、神経の再生能を抑えてしまうという説です。アルツハイマーの場合は $\beta$ アミロイドの蓄積が、パーキンソン病の場合はドパミンの欠乏が脳内の神経再生を非常に顕著に抑制することが知られています。ですから、単に細胞治療を行うだけではなく、再生を抑制する部分を解除する必要があります。三つ目は幹細胞自体が老化すると、その機能が徐々に落ちてくるという説です。この場合は細胞治療が必須となると考えられます。

臨床上用いられている薬剤による内的な神経再生の促進という観点では、抗うつ薬、スタチン系の薬剤、それからPDE-5の阻害薬(バイアグラ\*)にニューロン新生促進活性があることが注目されています。なかでも抗うつ薬に関しては神経再生促進活性が薬効と直接関係することが2003年の夏に報告されました。この報告は、言い換えるとヒトの成人でも神経再生活性をある程度保持していることを示していて、今後新しい薬剤の開発により、内科的な神経再生のアプローチが可能になるのではと考えています。

小室 抗うつ薬による神経再生促進はとてもおもしろいと思いますが、どのようなメカニズムなのか。

桜田 抗うつ薬はセロトニン作動性あるいはアドレナリン作動性の神経を活性化させる効果があり、これらの神経が活性化しますと現時点では仮説ですが、BDNFやFGFといった神経再生活性のあるサイトカインが海馬の近くに誘導され、神経再生を誘導するのではないかとわれています。ですから、間接的に神経幹細胞の再生を促進していると考えられています。



小室 バイアグラとスタチンはどうですか。

桜田 バイアグラは PDE-5 阻害薬なので細胞内情報伝達系で NO の産生の促進などが背景になっていると考えられます。スタチン系については VEGF (血管新生促進因子) の産生を促進することで神経再生や増殖、分化を促進している可能性が考えられています。

#### ■神経再生に向けた臨床試験

桜田 死亡胎児の脳を移植する治療はすでに臨床応用されています。スウェーデンを中心に実施された非盲検試験では多数の有効例が報告されましたが、最近米国で実施された二つの二重盲検試験では無効との報告がなされました。もちろん本試験の結果は中枢神経系の細胞治療のコンセプトを否定するものではなく、米国を中心にさまざまな細胞治療の開発が進められています。たとえば、マイクロビーズに培養したヒトの網膜色素上皮細胞を付着させてパーキンソン病患者に移植する試験や、培養神経幹細胞や間葉系幹細胞を神経再生に応用しようという研究・開発が実施されています。

梅澤 死亡胎児の脳を移植した臨床試験では、免疫抑制薬を使っているのでしょうか。

桜田 従来スウェーデンなどで行われた非盲検試験では免疫抑制薬を使っていたが、アメリカの二重盲検試験では免疫抑制薬をいりませんでした。しかし、生着率が非常に悪いわけではないので、効かなかった原因として、細胞の処理法や移植の方法が議論されています。ただ、去年 (2003 年) 報告されたアメリカの臨床試験では、最初の 6 ヶ月は非常に効いています。しかし 2 年たつと効果がなくなっているのです、今後その原因を解明する必要があると思います。

ただ、これはあくまで死亡胎児の脳を入れる方法で、ES 細胞や神経幹細胞を用いた試験とは明らかに違いますから、これを ES 細胞とか神経幹細胞を用いた治療と同じように考える必要

はまったくなく、あくまで臓器移植のようなかたちでの移植の結果だと解釈しています。

#### ■細胞治療が有効な脳疾患

小室 脳の細胞移植としては、対象疾患は現在パーキンソン病だけなのですか。

桜田 多発性硬化症に神経幹細胞が有効だというのは去年報告されていますし、ハンチントン舞蹈病においても有効だという報告もあります。脊髄損傷における有効性も慶応大学の岡野先生のグループから報告されています。

小室 その場合は移植するのですか。

桜田 そうですね、移植します。多発性硬化症は脳全体に広がる疾患ですが、成人の神経幹細胞の末梢血投与が有効であることが、昨年報告されました。多発性硬化症の場合は脱髄といって神経回路とは違う面がありますので、移植によって回路が形成されたとはいえません。しかも自己免疫疾患的な特徴がありますので、やはり疾患によって違いがあると思います。

ただ、ラットとヒトの脳は明らかに違うでしょうから、将来どうやって動物試験の結果を外挿していくかが問題です。サルなどの試験などで、前臨床試験を行う必要もありますね。

小室 心臓の場合は、心筋梗塞で心筋がなくなったところに心筋を植えるという単純な発想です。しかし脳では神経回路をつくることに問題があるのですね。

桜田 それに関してもやはり多様で、それぞれの疾患別に最適な方法は違うと思います。パーキンソン病のように、回路のいらぬ、ドパミン補充を目的とした治療もありますので。

梅澤 Verfaillie 博士 (ミネソタ大学医学部幹細胞研究所) が成体万能幹細胞 (MAPC) と呼ばれる、骨髄に存在する非血球系の体性幹細胞を脳梗塞治療に使われたそうですが、これは有効なのでしょうか。

桜田 動物試験のデータでは MAPC の移植が

脳梗塞に効くことが示されています。また、間葉系幹細胞の移植が効くという報告もさまざまなグループから出ています。脳梗塞は、ある程度機能を回復する例が報告されている疾患ですので、脳内における神経幹細胞による再生だけではなく、骨髄や末梢血由来の細胞による再生の仕組みが生理的に存在している可能性があります。このような末梢由来細胞による治療効果は、神経に分化して保護しているのか、再生因子分泌というパラクライン作用なのかは今後の研究課題だと思います。少なくとも GFP で標識した間葉系細胞が大量に脳内に入るとするのは確かなようです。

**小室** 心筋梗塞の場合、骨髄を移植しても心筋になる率は非常に低いといわれていますが、脳梗塞の場合は骨髄が神経細胞になるということはあるのですか。

**桜田** 神経細胞になるという報告はたくさんあるのですが、このようにしてできた神経細胞が長期間維持されるのかどうかは不明です。末梢血由来の細胞が組織修復に働くのかどうかは、150年前ドイツの Julius Cohenheim が提案して以来、喧々諤々で今も結論は出ていません。心筋梗塞についても骨髄は心筋にならないとされていますが、なるという報告をされている方もいます。骨髄からの心筋分化を報告されている研究でも、造血系からの分化は否定されています。移植のタイミングや炎症の状態によって分化の効率が変わるのかもしれませんが、また、すべての病態で同じように骨髄が寄与していると解釈する必要はないと思います。

#### ■細胞移植のいちばんの成功例は虚血下肢例

**梅澤** いま細胞治療で注目を浴びているのは、虚血下肢における骨髄と末梢血の移植であると理解しております。心臓に対して骨髄を移植しても骨髄細胞が心筋にならないとしたら、血管になるのかもしれないし、あるいはただ単に誘

導しているだけかもしれないですね。

**小室** おっしゃるように細胞移植でいちばん進んでいて、有効性が最も認められているのは下肢虚血に対してといえますね。いまは骨髄の単核球を移植する方法がよいとされています。われわれは末梢血の単核球を移植しているのですが、それもかなり有効で、われわれの成績でも7、8割の方が足の切断を免れています。下肢虚血は血管を増やせばいいわけですが、心臓に関しても虚血性の心疾患は血管を増やせばいいので、同じ手法が使えるのではないかと思います。

あと、骨髄を打つことによって心筋ができるかどうかに関しては、私はかなり否定的です。しかし、血管ができることで、間接的に再生が促進される可能性はあると考えています。

**山下** 心臓の機能回復に関しては、心筋そのものができればいちばんいいのかもしれませんが、心筋ができなくても血管ができれば機能は回復することもありますし、さらには線維芽細胞ができればカチカチの結合織の弾性を回復することもあると思います。心筋が再生できて動くようになるのが理想的ですが、治療効果としては心臓の回復が得られ、それが安全かつ簡単に効果的であれば治療としては非常に有効です。治療の効果があればいいのであって、メカニズムがどれであっても問題ないと考えています。

**小室** そうですね。ただ、メカニズムを誤解していると進歩がなかったり、違う方向に進んだり、また違ったものをつくったりということがあるので、やはり正しい理解は必要だろうと思います。


**山下** そうですね。どういうメカニズムで治っているかというのは理解しないといけません。が、よくなった理由がはっきりわかれば心筋ができていなくてもよいと思います。

**桜田** 確かに必ずしも心筋を100%すべてに目的としなくてもいいかもしれない。ただ、心筋

[座談会]

の再生が必要な疾患も必ずあると思います。  
小室 ES細胞, 間葉系の幹細胞, また体性幹細胞の現状と課題についてもよく理解できました。これから研究が進歩して, 実際に臨床に使

われる日も近いと思いますので, 皆さんの研究の発展を期待しています。どうもありがとうございました。



Hope for all people's health

人に、環境に、やさしい医薬品づくり。

肝臓疾患用剤・アレルギー用薬 (健保略称 強ミノC)

**強力ネオミノファゲン錠**®

グリチルリチン製剤 STRONGER NEO-MINOPHAGEN C [薬価基準収載]

包装 20mL×10管、20mL×30管、5mL×5管、5mL×50管

---

肝臓疾患用剤・アレルギー用薬

**グリチロン錠** [薬価基準収載]

グリチルリチン製剤 GLYCYRON® Tab.

包装 100錠(PTP)、300錠(PTP)、500錠(PTP)、1,000錠(バラ)  
2,100錠(PTP)、5,000錠(PTP)

「効能・効果」、「用法・用量」、「禁忌を含む使用上の注意」等は、現品添付文書をご参照ください。\*資料は当社学術部担当者にご請求ください。

---

**WAT** 株式会社 **ミノファゲン製薬**

資料請求先 〒107-0052 東京都港区赤坂8-10-22  
TEL 03(3402)6201(代)

03.12

## 筋ジストロフィーに対する再生治療

Cell therapy of muscular dystrophy

竹田征治<sup>1</sup> 梅澤明弘<sup>2</sup> (慶應大学医学部病理学教室<sup>1</sup>, 国立成育医療センター研究所生殖医療研究部<sup>2</sup>)

Yukiji TAKEDA and Akihiro UMEZAWA

◎筋ジストロフィーは遺伝性疾患で、進行性の筋壊死が進行し最終的には呼吸不全に至る難治性の疾患であり、現在のところ有効な治療法はない。近年、生体内の組織幹細胞を用いた再生医療が注目されており、筋ジストロフィーにおいても例外ではない。筋芽細胞に加えて最近になり、骨髄細胞中に ES 細胞とよく似た形質を有する MAPC (multipotent adult progenitor cell) という多分化能を有する細胞が発見された。これらの細胞を用いた細胞治療が筋肉再生の新しい戦略として注目されている。

**Key word** 筋ジストロフィー, 細胞移植, 組織幹細胞

## 背景

筋ジストロフィーは筋線維の変成・壊死を主病変とし、進行性の筋力低下を呈する遺伝性疾患と定義されており、病因としてジストロフィンの形成不全が指摘されている。筋ジストロフィーの代表的な病型である Duchenne 型筋ジストロフィーを例にあげると、早ければ3歳ごろから筋力低下が出現し、10歳で歩行不能、さらに20歳で呼吸不全のために人工呼吸器なしでは生きられないという非常に悲劇的な疾患である。薬物療法として最近ステロイドホルモンが使用されているが、症状の進行を遅らす程度の効果しか得られず、対症療法が中心である。最近、組織幹細胞を用いた障害組織に対する再生医療が注目されており、筋ジストロフィーにおいても例外ではない。細胞源としては、筋芽細胞、骨髄細胞などがあげられるが、それぞれについて失われた筋細胞の供給源として期待されている。とくに、骨髄では MAPC (multipotent adult progenitor cell) という内胚葉、外胚葉、および中胚葉の3系統に分化する ES 細胞に近い細胞まで発見されており<sup>1)</sup>、細胞移植の有用性が期

待される。

## 筋ジストロフィーにおける筋細胞の再生

筋細胞は、何らかの起序により傷害を受けると、筋衛星細胞が活性化されて増殖を開始する。筋衛星細胞は筋芽細胞を経て筋管細胞に分化し、筋管細胞はたがいに融合を繰り返して筋組織が形成される(図1)。

Duchenne 型筋ジストロフィーはジストロフィンの形成不全のために筋細胞が壊死に陥るが、筋細胞は再生能力が高いために筋ジストロフィーの筋生検所見では再生筋線維が全体の15~20%も認められる。筋細胞の再生能力が高いにもかかわらず筋力低下が進行する原因として、壊死に陥った筋細胞と再生する筋細胞のバランスが崩れ、壊死筋肉細胞数が再生筋細胞数を上まわった状態であることが考えられている<sup>2)</sup>。また、筋ジストロフィー患者の筋芽細胞は健常人に比べてテロメア長が有意に短縮しており、分裂、増殖を繰り返すことで再生能力に限界があることが示されており、このことも筋力低下が進行する原因のひとつ

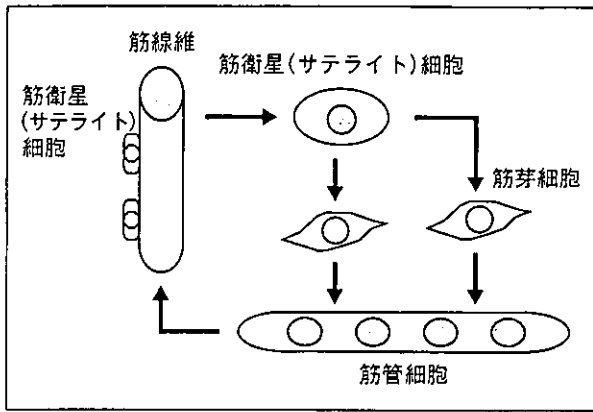


図1 骨格筋の再生

筋組織の障害により筋衛星細胞が活性化されて増殖を開始する。筋衛星細胞は筋芽細胞を経て筋管細胞に分化し、筋管細胞はたがいに融合を繰り返して筋組織が形成される。

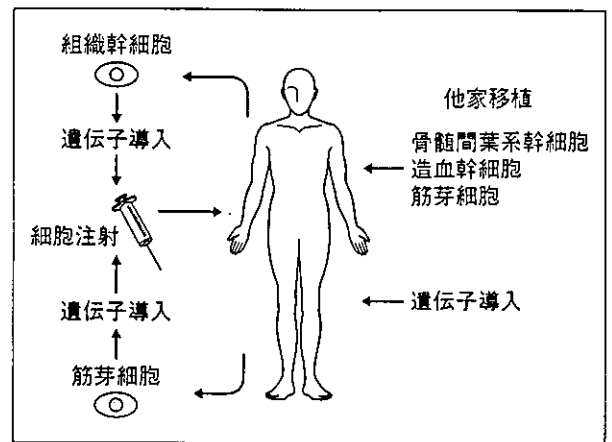


図2 筋ジストロフィーの治療戦略

自己の細胞を移植する場合、筋ジストロフィーは遺伝性疾患であるので、遺伝子治療を併用する必要がある。他家移植の場合は免疫抑制療法の併用が不可欠である。

として考えられている<sup>3)</sup>。

### 幹細胞を用いた細胞移植療法

細胞移植療法は、多能性幹細胞、および組織幹細胞を移植し、本来の筋再生能力を補うことによって筋ジストロフィー患者の筋力低下の進行停止が期待される。現在、細胞源として筋芽細胞<sup>4-6)</sup>、骨髄間葉系幹細胞<sup>7)</sup>、骨髄造血幹細胞、骨髄 SP 細胞、筋 SP 細胞<sup>8)</sup>、筋組織から得られた Sca-1<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> 細胞<sup>9)</sup>などが考えられる。筋ジストロフィーは遺伝性疾患であるので、自己の細胞を使用する場合は免疫抑制剤が不要となるが、ジストロフィン遺伝子の異常を改善させるために遺伝子導入療法を併用しないと移植細胞が分化に伴い壊死に陥る可能性がある。非自己の細胞を使用する場合は遺伝子の問題はなくなるが、免疫抑制剤が必須であり、免疫抑制療法を軽減する方法としてヒト腫瘍適合抗原の発現の少ない、より未熟度の高い細胞あるいは骨髄間質細胞を使用することなどが考えられる。また、投与方法として経静脈投与と目的とする筋肉内に直接注射する方法がある。経静脈投与は患者への侵襲が少なく非常に安全な方法であり、全身の筋肉への分布が期待されるために筋ジストロフィーのように全身の筋肉の障害には打ってつけの方法である。しかし、やや侵襲的ではあるが、局所に大量の細胞を確実に移植するためには筋肉内への直接注射が有利である。ただ、手術時には全身麻酔を必要とする、全

身の筋肉に注射が必要であることなどの欠点がある(図2)。

### 細胞移植源としての幹細胞

#### 1. 筋芽細胞

筋芽細胞は筋組織再生に重要な役割を果たす組織幹細胞であり、筋芽細胞の移植は古くから研究されてきた。動物実験においては、正常新生仔マウスの筋から分離した単核細胞をジストロフィン遺伝子を欠損させた mdx マウスに移植することでジストロフィン陽性細胞が多数認められたとの報告があり<sup>4)</sup>、マウスにおいては良好な結果が得られたので、その結果に基づき臨床応用が行われた。Karpati ら<sup>5)</sup>は、免疫抑制療法を併用した他家筋芽細胞移植を行ったところ、わずかなジストロフィン陽性筋線維を認めるのみであり、筋力増加もなかったために明らかな有効性は示すことができなかった。しかし、その後の Gussoni らの検討によると<sup>6)</sup>、ヒト筋芽細胞移植において10%を超える筋芽細胞の生着率が得られたが、その半数が宿主由来の筋細胞と融合しており、ジストロフィンを発現していた。このように臨床応用において従来の検討よりも良好な成績が得られており、さらなる検討が待たれている。

#### 2. 骨髄幹細胞

骨髄幹細胞には2種類の幹細胞が存在し、骨髄間葉系幹細胞と骨髄造血幹細胞に分類される。骨

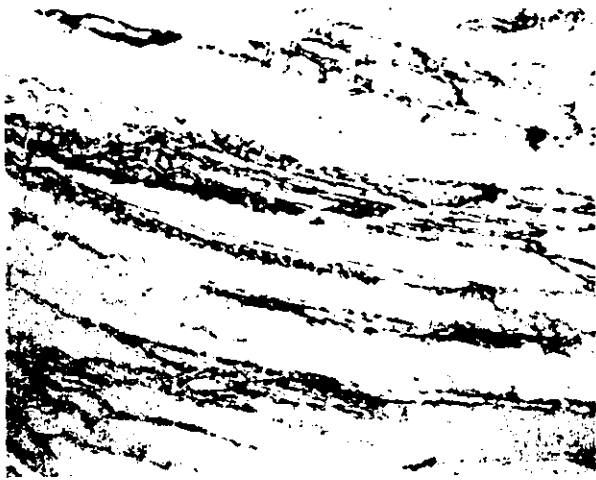


図3 マウス骨髄間葉系幹細胞移植

正常マウスに GFP を遺伝子導入したマウス骨髄間葉系幹細胞を直接筋肉内に移植した。未熟な形態ではあるが、筋管構造を示す細胞が抗 GFP 抗体で陽性に染色されている。

髄間葉系幹細胞は多能性をもつと考えられており、最近、Jiang らにより MAPC (multipotent adult progenitor cell) という ES 細胞に近い多能性を有する細胞が分離された<sup>1)</sup>。MAPC は採取された骨髄細胞を濃度勾配遠心法で単核球を分離し、FACS で分離した CD45-glycophorin-A-の分画を EGF, PDGF, および LIF 存在下に 2% の低血清培地を用いてフィブロネクチンコーティングのディッシュで培養することにより得られる細胞であり、内胚葉、外胚葉、中胚葉の 3 系統に分化することができ、ES 細胞に近い形質を有する細胞であると考えられている。筋ジストロフィーは遺伝性疾患であるために他の組織の細胞移植のように骨髄幹細胞の利点とされる自家移植の効果は期待できないが、骨髄間葉系幹細胞は筋芽細胞よりも抗原性が低いと考えられており、他家移植においても他の細胞源よりも有力である。また、いずれの細胞を移植する際にも臨床症状を改善させるに十分な細胞量が必要と考えられるが、著者らの検討ではマウスの骨髄間葉系幹細胞を用いて下腿筋に直接細胞を移植し大量の GFP 陽性筋細胞が得られており、十分な量の細胞が筋肉に分化しうることが示された(図 3)。骨髄間質細胞が筋肉に分化することは多くの研究からほぼ確実視されており、機能的にどこまで改善させることができるか、今後の研究が期待される。

骨髄造血幹細胞を用いた細胞移植では Gussoni らの報告があり<sup>8)</sup>、雌 mdx マウスに雄由来の骨髄造血幹細胞を骨髄移植し、筋肉における Y 染色体の発現を検討したところ、ジストロフィンを発現する筋細胞が Y 染色体にも染まる像が確認された。

また、Ferrari らも<sup>10)</sup>骨髄細胞にミオシン軽鎖プロモーターを組み込んだ  $\beta$ -GAL 発現ベクターを用いて分離した筋前駆細胞による筋再生を示しており、骨髄は筋細胞の重要な移植源であると考えられる。

### 3. その他の細胞

筋芽細胞と骨髄細胞以外の細胞で筋細胞へ分化するとされているものとして神経幹細胞<sup>11)</sup>、皮膚幹細胞<sup>12)</sup>などがある。しかし、これらが、実際の幹細胞移植に用いることができるかどうかは今後の検討課題である。

## 遺伝子治療の併用

上述したように筋ジストロフィーに自己の細胞移植を施行する際には遺伝子治療の併用が必要である。現在、有力な遺伝子治療としてアデノ随伴ウイルスベクターに短縮型ジストロフィン遺伝子を用いる方法であるが、幹細胞のように分裂する細胞に *ex vivo* 遺伝子導入する場合にはレトロウイルスを用いることも可能であり、細胞移植療法との併用でさらなる効果が期待できる<sup>13)</sup>。

## おわりに

筋ジストロフィーは治療困難な疾患であり、細胞移植は有効な治療法と考えられる。とくに、骨髄細胞中に認められた MAPC は ES 細胞なみの分化能と増殖能を有しており、今後の研究結果が期待される。また、今後臨床応用に向けて細胞源、投与方法、安全性、有効性など詳細に検討していく必要がある。

## 文献

- 1) Jiang, Y. et al.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 20: 1-9, 2002.
- 2) 埜中征哉: 筋肉の再生機構. 医学のあゆみ, 199: 1045-1048, 2001.

- 3) Decary, S. et al. : Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscular disord.*, **10** : 113-120, 2000.
- 4) Partridge, T.A. Et al. : Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to-positive by injection of normal myoblast. *Nature*, **337** : 176-179, 1989.
- 5) Karpati, G. et al. : Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, **34** : 8-17, 1993.
- 6) Gussoni, E. et al. : The fate of individual myoblast after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat. Med.*, **3** : 970-977, 1997.
- 7) Reyes, M. et al. : Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, **98** : 2615-2625, 2001.
- 8) Gussoni, E. et al. : Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, **401** : 390-394, 1999.
- 9) Torrente, Y. et al. : Intraarterial injection of muscle-derived CD34<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J. cell bio.*, **152** : 335-348, 2001.
- 10) Ferrari, G. et al. : Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, **279** : 1528-1530, 1998.
- 11) Galli, R. et al. : Skeltal muscle potential of human and mouse neuronal stem cells. *Nature. Neurosci.*, **3** : 986-991, 2000.
- 12) Breton, M. et al. : Myotube driven recruitment of cells during *in vitro* myogenesis. *Dev. Dyn.*, **202** : 126-136, 1995.
- 13) 鈴木友子, 武田伸一 : 筋衛星(サテライト)細胞と遺伝性筋疾患の遺伝子治療. *神経研究の進歩*, **45** : 54-62, 2001.

●お知らせ●

■ (財)循環器病研究振興財団 第11回(2003年度)  
バイエル循環器病研究助成募集

1. 研究テーマ : 不整脈の治療
2. 研究助成金 : 500万円 1件, 250万円 2件
3. 応募資格  
昭和34年(1959年)4月1日以降に生まれた, わが国に在住する研究者
4. 応募期間  
平成15年1月6日から同年2月28日(同日の消印有効)
5. 応募方法  
申請書および承諾書に必要事項を記入し, 推薦者および所属機関長の署名・捺印の上, (財)循環器病研究振興財団宛に送付して下さい。
6. 選考方法および決定と発表  
応募研究の審査および選考については, (財)循環器病研究振興財団の理事長から任命された当該研究テーマの

専門家で構成される選考委員会で厳正に行います。

なお, 選考結果については, 平成15年5月末頃に発表の予定です。

7. 研究成果および発表

- (1) 研究助成を交付された者は, 年度終了後3か月以内に, 実績について当財団に報告して下さい。
- (2) 研究成果の発表に際しては, 当財団の助成による旨を明確にして表示して下さい。
- (3) 研究助成を交付された者は, 翌年(2004年)に研究テーマに関連した学会で研究発表をしていただきます。

8. 問い合わせ・応募先

(財団法人)循環器病研究振興財団  
「バイエル循環器病研究助成」宛  
〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5の7の1  
TEL (06)6872-0010 FAX (06)6872-0009  
E-mail : jcrf@jeans.ocn.ne.jp





## 再生医学と幹細胞—成体幹細胞

森 泰昌\* 今林英明\*\* 梅澤明弘\*\*\*

キーワード◎ 骨髄間質細胞 間葉系幹細胞 細胞治療 細胞寿命延長

### はじめに

近年、胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES細胞) に対し成体幹細胞 (somatic adult stem cell) が注目されている。これまで体性幹細胞については、造血幹細胞がよく知られ、実際の治療として確立されている。同様に、肝細胞や骨格筋のサテライト細胞、腸上皮細胞など臓器固有の細胞による再生も、以前からよく知られている。

これらの成体を構成する細胞は、分化能力は限られていると考えられており、その組織以外の分化能を有するものではない。しかしながら近年、成人の体細胞のなかに体性幹細胞と考えられる細胞の存在が確認され、これらはES細胞のように胚葉を超える分化能を有している。われわれの研究室でも、マウスおよびヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いて胚葉を超えた分化形質を示してきた<sup>1)</sup> (図1)。

また Verfaillie らによる最近のレポート<sup>2)</sup>でも、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を分離し、*in vitro* で内胚葉、中胚葉、神経外胚葉への分化を示している。このほかでは、*in vivo* でも骨、軟骨、

骨格筋、肝臓、心臓、上皮、血管、中枢および末梢神経への分化を示すさまざまなレポートが報告されている<sup>3)</sup>。

### I. 骨髄由来間葉系幹細胞

骨髄由来の間葉系幹細胞は、歴史的には造血幹細胞研究のなかで発見された。1970年代にFridensteinらによって、細胞培養のプラスチックシャーレに付着し、容易に分離可能な線維芽細胞様のコロニーを形成する細胞集団から、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化が報告された。その後、80年代に造血幹細胞の feeder cell として、サイトカインの分泌だけではなく、細胞接着による造血幹細胞の未分化能を維持するなどの重要な働きを有することが理解されてきた。また損傷された部位へ遊走、定着し、損傷部位の再生に関わるといった仮説を、骨髄間葉系幹細胞のもつ驚くべき多分化能が支えている。

Liechty らの論文では、ヒツジの子宮内の胎児腹腔に骨髄間質細胞を注入し、その際尻尾の先を切除しておく、その損傷部位に移植した細胞が集まっていることが示された。また、そのほかのほぼすべての臓器に移植した細胞の存在を認めていた<sup>4)</sup>。また Verfaillie らは、骨髄間葉系幹細胞を胚盤胞へ移植しキメラを作製すると、ほぼすべての臓器にドナー由来の細胞の組織が観察されたと報告している<sup>5)</sup>。

骨髄間質由来の間葉系幹細胞以外にどのような細胞が存在しているのであろうか？



\*もり・たいすけ (写真)：慶應義塾大学医学部大学院 (病理学)。平成7年東京歯科大学卒業。主研究領域/Stem cell biology, 主に骨髄間質細胞による再生。

\*\*いまばやし・ひであき：慶應義塾大学医学部整形外科。

\*\*\*うめざわ・あきひろ：慶應義塾大学医学部助教授 (病理学)。

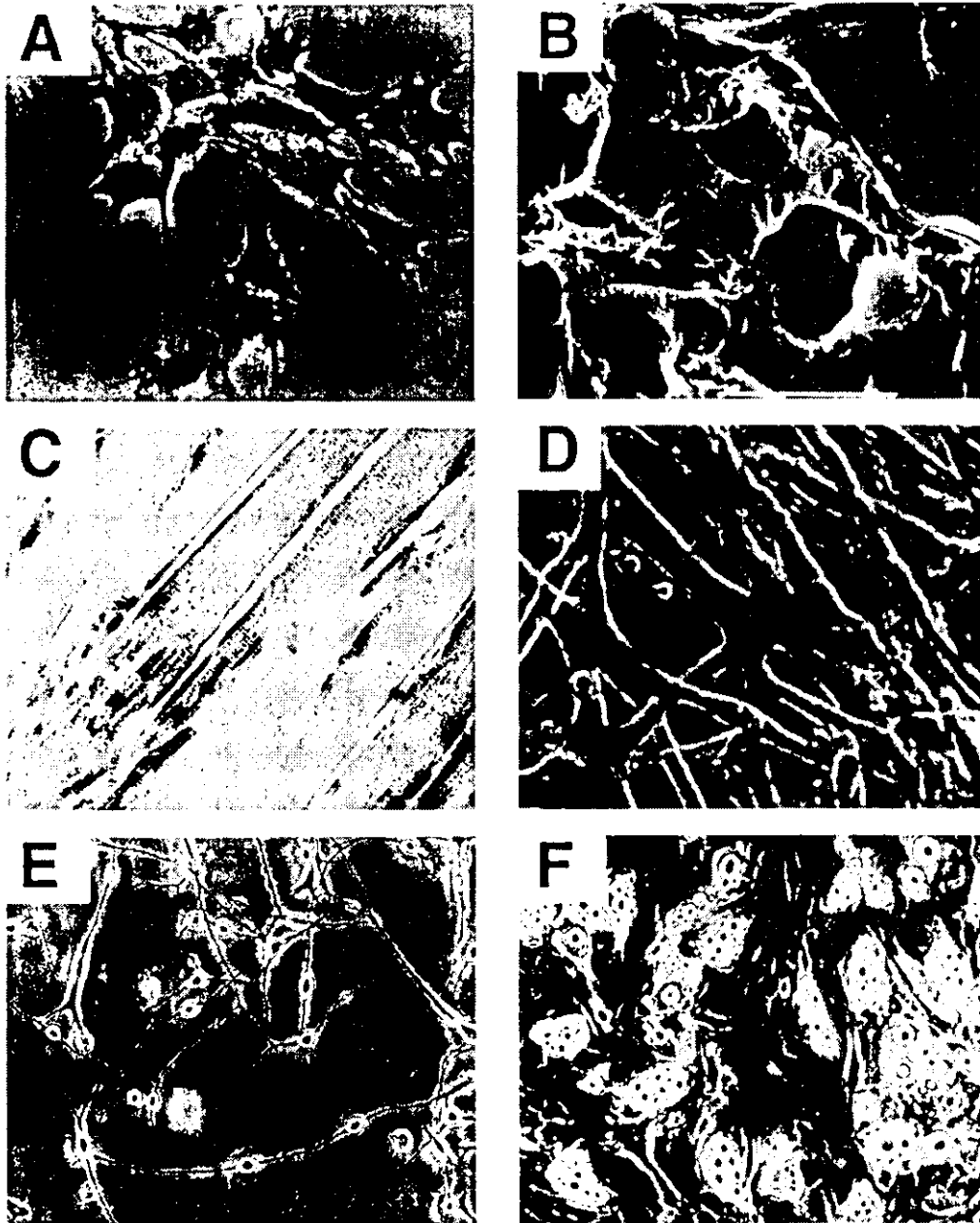


図1 骨髄由来間葉系幹細胞による多分化能

- A: 骨髄間質細胞株 (KUSA/A1)
- B: 電子顕微鏡による骨髄間質細胞像 (SEM)
- C: 骨格筋細胞分化 (GFP 標識骨髄間質細胞を抗 GFP 抗体により染色)
- D: 心筋細胞分化 (協調して拍動する分岐した心筋様細胞)
- E: 神経細胞分化 (突起を伸ばした神経様細胞)
- F: 脂肪細胞分化 (細胞質内に多数の脂肪滴を有す脂肪細胞)

## II. そのほかの体性幹細胞の候補

骨髄間質細胞以外の体性幹細胞の候補として、造血幹細胞、Goodell らの提唱する SP (side population) 細胞<sup>6)</sup>、成熟脂肪組織より分離された間質細胞<sup>7)</sup>などがある。

例として、男性からの CD34 陽性造血幹細胞の性別不一致なドナー細胞移植例で、移植後各臓器を Y 染色体特異的なプローブを用いた FISH 法で調査すると、多くの臓器の一部に Y 染色体が認められる<sup>8)</sup>。SP 細胞についても、TBI (total body irradiation) を実施したマウスに

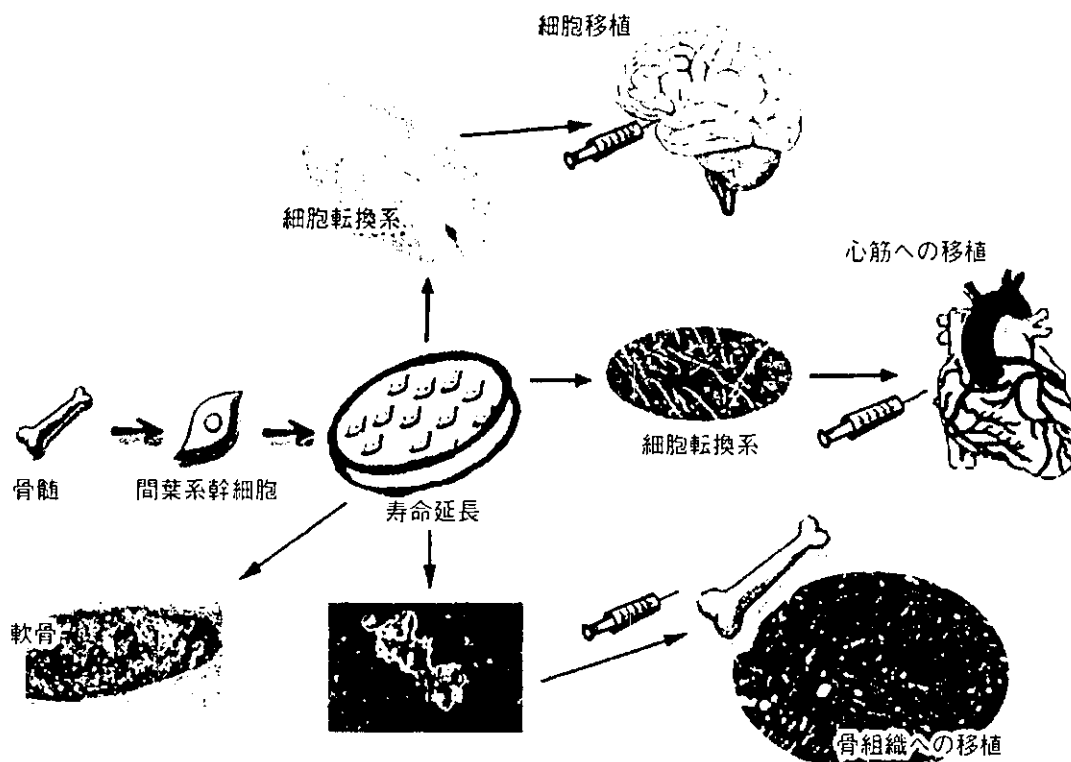


図2 骨髓由来間葉系幹細胞を用いた細胞治療

きわめて少量の SP 細胞を移植することによって、造血の再生を認めている。また筋肉から SP 細胞を分離し、進行性筋ジストロフィー症モデルマウスに移植を行うことによって筋の再生を認めたといった報告もなされている。

しかしながら、造血のみならず実質臓器の再生がなされているかどうかについては、細胞同士の融合 (fusion) による  $4n$  の 2 倍体細胞である可能性は否定できず<sup>2)</sup>、さらなる研究を待つ必要がある。またわれわれのデータとして、骨髓間質細胞にも SP 分画が存在していることも確認している。

脂肪組織由来の間質細胞も多分化能を有しているといわれ、現在研究が進められている。

### III. 体性幹細胞の可能性と限界 (図2)

ES 細胞と間葉系幹細胞はどのように異なり、どのような点で近いものなのであろうか？

ES 細胞は基本的に全能性を有していると考えられている。それに対し、間葉系幹細胞は生

殖細胞への分化はないと考えられている。また骨、脂肪、神経、肝細胞へはほぼ同様に胚葉を超えた分化能を有していると考えられているが、心筋細胞への分化においては、ES 細胞では比較的容易に分化するのに対し、骨髓間質細胞では 5-アザシチジンなどの低分子化合物によって脱メチル化を行うなどのエピジェネティックな変化を必要としている<sup>3)</sup>。

さらに、ES 細胞には依然問題となるさまざまな要素が山積されている。特に、移植によって奇形腫を形成する可能性が否定できないことや倫理的問題を、臨床応用に向けて解決しなければならない。しかしながら、今後も ES 細胞が最も重要な研究テーマの 1 つであることは変わらないであろう。

またクローン作製に関し、エピジェネティックな安定性はその研究を行ううえで重要な要素である。骨髓間質細胞は比較的未分化な状態の細胞ながら、エピジェネティックな安定が保たれている。このことは、骨髓間質細胞は核の初

期化にとって寛容である可能性が考えられている<sup>11)</sup>。また増殖、培養が容易であることからドナーとして骨髄間質細胞が有用と考えられる。実際にわれわれは、共同研究を行っている角田、加藤らと共に、牛骨髄間葉系幹細胞をドナーとしてクローン牛を誕生させている。(論文投稿中)

#### IV. マウス骨髄間質細胞株

細胞株は、均一かつ大量の細胞を確保することができるため、実験に用いるのに有効であることはいうまでもない。われわれは、C3H/He マウス骨髄からいくつかの分化形質を有す細胞株を分離、樹立した。

##### (1) KUM 2 : 中胚葉系幹細胞株

骨、脂肪、心筋に分化し、*in vivo* においても骨格筋細胞、骨と多分化能を有する細胞である。骨、脂肪、骨格筋、心筋という沿軸および臓側中胚葉への分化能を有す幹細胞であり、最も未分化な細胞株である。

##### (2) KUM 9 : 間葉系幹細胞株

骨、脂肪、骨格筋への分化能を有していたが、心筋への分化能を認めなかった。すなわち沿軸中胚葉への分化能を保持している間葉系幹細胞株である。

##### (3) KUSA/O : 骨、脂肪前駆細胞株

骨、脂肪の2つの細胞への分化能を有している。

##### (4) KUSA/A1 : 骨前駆細胞株

通常の培養方法では、成熟骨芽細胞としての性質を有し、骨芽細胞として知られる MC 3T3-E1 と比較すると、カルシウム含蓄量、アルカリフォスファターゼ活性は培養 10 日で約 100 倍、20 日で約 300 倍の活性を示している。またマウス皮下への移植で骨髄を有する骨組織を形成する。さらに、一定の培養条件において神経細胞への分化を示した。

##### (5) H1 : 脂肪前駆細胞株

脂肪細胞のみへの分化能を有している。

前述してきたように、骨髄間質細胞株には驚くべき可塑性が存在している。その一例として骨前駆細胞からの神経細胞分化があげられる。われわれは、BMP のアゴニストであるノギンを投与することにより、KUSA/A1 の神経細胞への分化を認めた<sup>12)</sup>。

本来、細胞の性質は遺伝子発現によって規定され、その発現はゲノム DNA のメチル化やクロマチン構造といった修飾状態により規定されている。それぞれの修飾状態は分裂過程では変化しないため、骨格筋細胞は骨格筋細胞であり続ける。この修飾状態を変えるためには、メチル化をそれぞれの細胞から除くことにより、新たな遺伝子の発現を誘導する。または、クロマチンの構造を緩くすることでも遺伝子の発現を誘導することができる。新たな遺伝子を誘導することで、その遺伝子が上流で細胞分化を決めるような遺伝子をコードしていれば、細胞は予期せぬ方向に分化する。

メチル化を減らすために用いる試薬として脱メチル化剤の 5-アザシチジンがあり、クロマチンを変化させる試薬としてヒストン脱アセチル化酵素がある。

#### V. ヒト骨髄間質細胞株

ヒト骨髄間質細胞はマウス骨髄とは異なり、通常の条件では不死化細胞の出現は認められない。不死化遺伝子である SV40T 抗原、ヒトパピローマウイルス遺伝子 E6, E7 といった癌遺伝子を導入すると、細胞はその寿命を延長し、不死化の細胞株を樹立することが可能となる<sup>13)</sup>。しかしながら SV40T 抗原は genomic instability を誘発し、染色体異常を引き起こす。このことは、細胞の腫瘍化を意味するものである。

われわれは、TERT (ヒトテロメラーゼ遺伝子)、細胞周期の活性化遺伝子、p53 不活性化遺伝子などを導入し細胞の分化能を保ち、移植しても腫瘍を形成しないヒト骨髄間質細胞株の樹立を行っている。そのなかの1つの細胞株 U7