

図3 細胞からの骨再生を利用した治療例

- A: 細胞の足場となる生分解生ポリマー (PLGA スポンジ)
- B: マウス大腿部に細胞を播いた足場を移植, 4 週後のレントゲン像(足場の形態と同様の不透過像を認める)
- C: 移植 4 週後摘出した骨組織 (低倍像)
- D: 移植 4 週後摘出した骨組織 (高倍像) 骨梁の形成と宿主由来の骨髄の形成を伴う
- E: マウス大腿骨欠損に対し, 細胞と足場によって形成した骨 (写真中央部) を適応した細胞治療モデル
- F: 移植骨 (写真左側) と宿主骨 (写真右側) の境界像 (一体となった骨性治療が認められる)

は、脂肪、骨、神経、骨格筋への分化能を保持し、細胞形態も正常に近いものであった。現在、これら寿命延長細胞の腫瘍化の有無について確認を行っている。

これらの方法は、分化能を有した細胞の移植医療において有用と期待される細胞である。こ

のように、細胞の寿命延長、腫瘍化、未分化能の維持は緊密に関連し、このコントロールが今後の鍵となっていくと考えている。また、われわれの用いているヒト細胞は、すべてインフォームド・コンセントを得た後に慶應義塾大学倫理委員会によって承認された細胞を用いて

## 【おわりに】

どのような細胞を用いることが細胞移植を用いた再生医療にとって最も有効であるか？

この問いに対する答えはいまだ確立していない。今後の展望として、再生医療はヒト ES 細胞、骨髄間質由来幹細胞がその中軸をなしていくものと考えられる。また体性幹細胞の核を移植することによって新たに作られるホスト由来の ES 細胞を用いることも将来的には行われるかもしれない。しかしながら現段階では、倫理面のコンセンサス、法律の整備などを考えても多くの問題を抱えており、採取しやすく増殖、分化誘導が可能である骨髄間葉系幹細胞を用いることが医療への適応において最も現実的であると考えている。

われわれは骨髄間質細胞を用いて骨を形成し、実際に臨床で必要とされる任意の形態の骨をポリ乳酸の足場を用いて再生した<sup>14)</sup> (図 3)。このように、実際の臨床応用へ向けての研究が進められている。米国では Osiris 社によって Allogen (造血幹細胞と併用して投与する抗がん剤の骨髄抑制障害治療薬)、Osteocell (骨の再生治療薬)、Fabrogen (ファブリー病の遺伝子治療薬) といった 3 つの細胞医薬として臨床治験が行われている (<http://www.osiristx.com>)。

わが国でも一部の病院において細胞治療の治験が始まっている。しかしながら現在は、治療後の評価法については機能以外の観点では全くといっていいほど確立していない。われわれは、治療に用いられる細胞が生体のなかでどのように存在し、機能しているかを正しく評価することが、再生医療の確立のために必須と考え、その評価法を模索している。そのためにも工学分野、ナノテクノロジーを併用した評価法が新しい道を開くのではないかと期待している。

- 1) Umezawa A, Maruyama T, Segawa K, *et al* : Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis in vivo. *J Cell Physiol* 1992 ; 151 : 197—205.
- 2) Reyes M, Lund T, Lenvik T, *et al* : Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001 ; 98 (9) : 2615—2625.
- 3) Gojo S, Takeda Y, *et al* : In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cell. *Exp Cell Res* (in press).
- 4) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, *et al* : Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000 ; 6 (11) : 1282—1286.
- 5) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al* : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002 ; 418 : 41—49.
- 6) Goodell MA, Brose K, Paradis G, *et al* : Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996 ; 183 : 1797—1806.
- 7) Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, *et al* : Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001 ; 189 : 54—63.
- 8) Krause DS, Theise ND, Collector MI, *et al* : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001 ; 105 : 369—377.
- 9) Terada N, Hamazaki T, Oka M, *et al* : Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002 ; 416 : 542—545.
- 10) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, *et al* : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999 ; 103 : 697—705.
- 11) Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, *et al* : Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998 ; 282 : 2095—2098.
- 12) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, *et al* : Brain from bone : Efficient “meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 2001 ; 68 : 235—244.
- 13) Kiyono T, Foster SA, Koop JI, *et al* : Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998 ; 396 : 84—88.
- 14) Ochi K, Chen G, Ushida T, *et al* : The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen sponge. *J Cell Physiol*, Publish online 24 sep 2002.

# 再生医学・医療のフロントライン

## 間葉系幹細胞

徳島大学・病理学/旭川医科大学・整形外科  
 徳島大学・旭川医科大学教授・整形外科  
 梅澤明弘 国立成育医療センター研究部長・生殖医療研究部

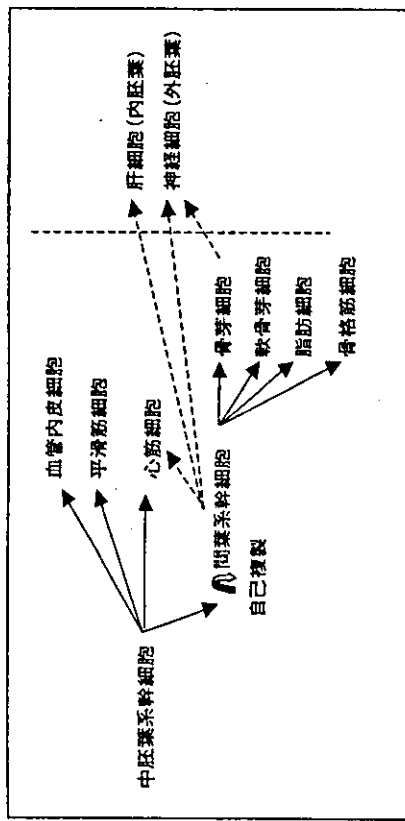
### 間葉系幹細胞の可塑性

再生医療・再生医学は次世代医療の柱として脚光を浴び、現実のものとなりつつある。現在、その治療戦略の中心に位置するのが幹細胞システムの利用である。発生の段階から老年に至るまで、生体にはさまざまなスチーマの幹細胞が存在している。すべての細胞に分化しうる全能性幹細胞を出発点とし、次第に分化方向を運命づけられ、いくつ前駆細胞群の中で、どの細胞を用い、その細胞をどのようにコントロールしていかかかか今後の臨床応用への大きな鍵となる。間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪、筋に分化可能な細胞として認識されていることが、実は驚くほど可塑性を持っていることが明らかにされつつあり、心筋、神経、皮

膚、肝臓など胚を越えた分化が示されている。この細胞は間葉系組織のある組織すべてに存在すると考えられているが、最も採取が容易で培養技術の確立しているのが骨髄間葉系幹細胞である。骨髄は造血の主要臓器であり、含まれる細胞の中心は造血細胞である。これらの細胞を支持するもの一つとして間質細胞が存在する。間質細胞は造血を維持するため、網状構造をとり、直接的には間接的に血液細胞の分化をサポートしている。この骨髄間質細胞の中に多分化能を持つ間葉系幹細胞が含まれている。

### 骨髄間質細胞中からの幹細胞の分離

骨髓液を採取し培養皿に付着した骨髄間質細胞は均一な集団ではなく、分化段階の



● 図1 発生における間葉系幹細胞の位置づけ

異なる細胞の集合体である。この中で多分化能を持つ細胞のみを選択することが可能であれば、さまざまな臓器再生の強力な細胞源となる。幹細胞の選別を可能とするためには細胞表面抗原発現の違いを利用するが有望な手段と考えられる。しかし特異的なマーカーは現時点では明らかではない。いくつかのマーカーの組み合わせで選別しているのが現状である。私たちはマウス骨髄由来間葉系幹細胞株を樹立し表面抗原による未分化マーカーの探索を行なって、セルソーターを用いた検討より現在ではSH-2 (CD 73), SH-3 (CD 105), STRO-1, CD 13, CD 45などが有力な未分化マーカーとして報告されているが、いまだコンセンサスは得られておらず、今後のさらなる解析が待たれる。

### 細胞寿命延長による細胞数の確保

試験管内・小動物において、間葉系幹細胞が多分化能を持つことは証明された。しかし臨床に用いるためには莫大な数の細胞が必要となる。現在の培養技術では採取した初期細胞の増殖には限りがあり、人体の欠損を修復するには不十分と考えられる。これに対応する戦略の一つとして細胞自身の寿命を延長し利用することが試みられている。細胞寿命のメカニズムにテロメア遺伝子の複製が関与しているが、このテロメアの修復を行なう酵素テロメラーゼの活性を上げる因子の選別を細胞に導入することで大量に細胞を増殖することが可能である。私たちの研究室においても、数種類の遺伝子を導入したヒト骨髄間質細胞を用い

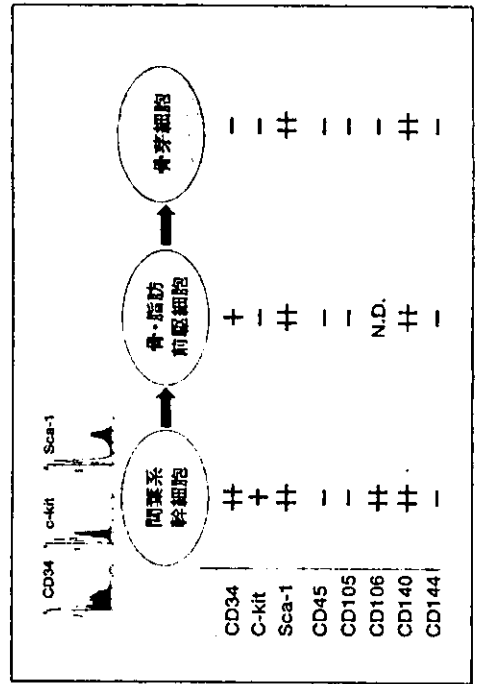


● 穂谷宏平氏

ており、多分化能が維持されていることが確認されている。この多数回の分裂を重ねた細胞が果たしてどこまで分化能を維持しているのか、また染色体異常を生じてこないのかを今後詳細に検討する必要がある。

### 将来的展望

間葉系幹細胞に関する研究は日々進歩しており、その可塑性が明らかになるたびに再生医療への夢が膨らむ。しかし、その一方でこの細胞を用いた現実的な“モノ”ができていないのも事実である。分化可能な細胞の単離・分化誘導法の確立、遺伝子導入による細胞量の確保のみならず、竹や草などの形を要求される組織作りには細胞の足場(培養担体)が必要である。足場や成長因子などを複合化することで細胞増殖や分化誘導をコントロールすることも可能であり、工学的手法が幹細胞生物学に新たな展開をもたらすことが期待される。



● 図2 間葉系幹細胞の分化系譜と表面マーカー

## 体性幹細胞(組織幹細胞)の分離,増殖,分化誘導

橋口明典 坂元亨宇 梅澤明弘

Methodologies for isolation, expansion and differentiation  
of somatic stem cells(tissue stem cells)

Akinori Hashiguchi, Michiie Sakamoto, Akihiro Umezawa  
Department of Pathology, Keio University School of Medicine

### Abstract

Recent studies have shown that pluripotent stem cells are also found in adult tissue. These adult stem cells has a great advantage over other stem cells sources, human embryos or human fetal tissue, that trouble many people on ethical grounds.

While the adult stem cells have great potential for use in the cell therapy, we must pass numerous technical hurdles to reach a goal.

Here we describe a subset of problems encountered in isolation and expansion of somatic stem cells for clinical application. As it is necessary to obtain the enough number of cells to supply the defect tissue and organ, we required purification and *ex vivo* expansion of stem cells, overcoming senescence. We also refer to the argument about plasticity of adult stem cells.

**Key words:** Mesenchymal stem cells, Regeneration, Cell transplantation, transdifferentiation, Adult stem cells

### はじめに

体性幹細胞の再生医療における可能性を広げたのは、体性幹細胞の可塑性(plasticity)を示唆した幾つかの論文であろう<sup>1-4)</sup>。

再生とは、傷害により失われた細胞・組織が、元の細胞・組織により修復されることをいう。しかしながら、人体、特に成人の分化した組織においては、傷害が大きい場合、このような完全再生が起こることは、ほぼあり得ない。これは、分化した細胞はその増殖能に制限があるためであり、成体における組織・臓器の再生には、

これらを補充するための起源になる細胞、より未分化な、ある程度の分化能と増殖能をもつ‘幹細胞’が必要と考えられる。

上記の論文は、これらの能力をもつ細胞が成体にも存在し、かつこれまで考えられた以上の分化における可塑性を有する可能性を示唆した。本稿では、体性幹細胞として特に骨髄由来間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)を例に、再生医療に用いるうえでの問題点を総論的に述べたい。

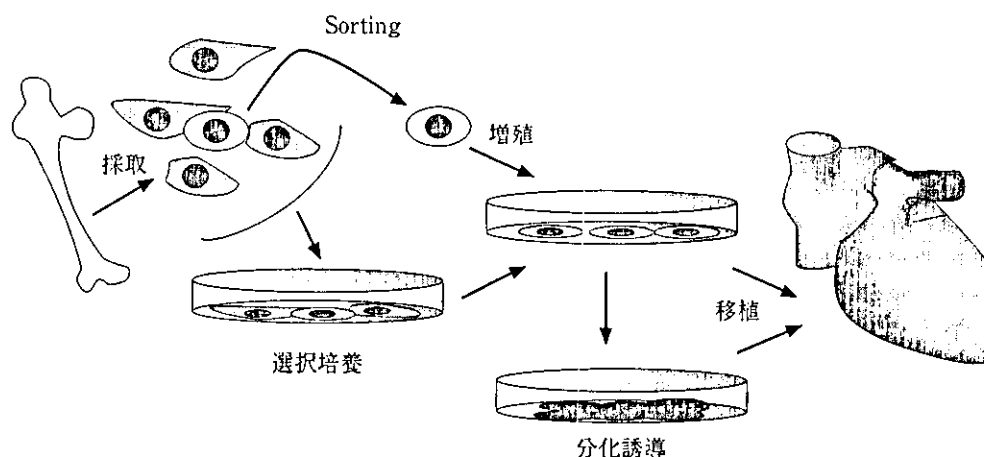


図1 体性幹細胞を用いた再生医療の概略

## I. 体性幹細胞の分離

体性幹細胞を実際再生医療に応用する過程を図1に示した。

細胞、組織の採取に関しては、胚性幹細胞に比して比較的容易であり、かつ倫理的制約を受けにくいという利点がある<sup>5,6)</sup>。反面、採取は容易であるものの、採取されたものがすべて移植に必要な細胞ではないことが、問題点である。多くの場合、採取された組織中の細胞は、ヘテロな集団であり、目的によっては、移植に必要な幹細胞を選別する必要がある。骨髄間質細胞中で、多分化能を示す骨髄間質細胞中の間葉系幹細胞の割合は、新生児では1/10,000で、加齢とともに徐々に低下し、50歳代では、1/400,000といわれている。

これらヘテロな細胞集団から幹細胞を精製するかどうかは、目的により必要性が異なるであろう。実際、体性幹細胞移植の成功例としてあげられる一般的な骨髄移植では、幹細胞精製は行っていない。しかし、これから我々が再生医療として行っていこうと考えているほとんどすべてのものに関しては、純度良く幹細胞を精製し、しかも十分量得ることが要求されるであろう。

特定の組織より、ある特定の幹細胞を得るためには、大きく分けて以下の方法があげられる。

- (1) 細胞の表面マーカーにより選別する方法
- (2) 造血幹細胞で、いわゆる side population

cell 採取に用いられた色素を用いた選別法

- (3) 一定の条件下で、長期間選択培養を行う方法

骨髄間葉系幹細胞の表面マーカーを図2に示す。実際、これらの情報を元に、間葉系幹細胞を cell sorting により分離することが可能かもしれない。しかし、前掲のとおり、間葉系幹細胞の骨髄中での頻度は非常に少なく、この手法の再生医療への応用は、現実的に不可能と考えられる。ただし、心筋梗塞(こうそく)の急性期で、迅速に細胞を得る必要がある場合、粗精製のような形での応用は可能と考えられる<sup>7)</sup>。

(2)にあげた方法は、目的の幹細胞が細胞内 transporter を有する特殊な場合に限られる<sup>8-10)</sup>。

あくまでも私見ではあるが、最も現実的な手法は(3)にあげる選択培養による幹細胞精製のように思える。

Reyesらは、2歳から50歳のドナーよりヒト骨髄細胞を一定条件下で選択培養することにより、*in vitro*で中胚葉系の各細胞に分化する幹細胞を精製することに成功し、これを‘中胚葉前駆細胞(mesodermal progenitor cell)’と呼称した<sup>11)</sup>。Jiangらは、この培養条件を一部改変、マウス骨髄より、更に多分化能を有する細胞を精製することに成功し、これを multipotent adult progenitor cell(MAPC)と呼んだ。MAPCは*in vitro*で、中胚葉のみならず神経外胚葉や内胚葉の性格をもつことが可能で、一つのMAPCがblastocystに導入されたとき、ほとんど



にマウスなどで、骨髄由来幹細胞をそのまま移植した場合、様々な臓器で分化、生着していることが確認されている<sup>12)</sup>。

しかし、医療として応用する場合、再生する臓器は限定されており、このような'広く、浅く'よりも、むしろ、'狭く、深く'、一定の分化した前駆細胞を多量に得ることが求められよう。骨再生を狙って移植した細胞が、脂肪細胞として生着しても用をなさないのである。

目的の細胞を大量に得るというゴールへの道筋は、様々であろう。留意しておくことは、細胞老化(senescence)の問題である。特に分化した体細胞は幹細胞と比較してその分裂能に制限があり、テロメラーゼ活性も低く *ex vivo* での増殖が難しいことである<sup>13,14)</sup>。前掲、選択培養法で得られた幹細胞に関しては、senescenceの問題はないとされている。むしろ、長期間培養し、増殖しない細胞を切り捨てているのだから、当然といえば当然である。Senescenceの解決策として、telomeraseを導入する方法が報告されている。ShiおよびSimonsenらは、ヒト telomerase reverse transcriptase (hTERT) を導入したヒト骨髄間質細胞は、長期間の継代培養後も *in vitro*, *in vivo* にて骨形成能があることを証明した<sup>15,16)</sup>。しかし、これらを移植した際、長期的にみて腫瘍の発生率がどうなるかはわかっていない。

幹細胞からの *in vitro* での分化誘導法は、各幹細胞について様々に研究されており、詳細は省略させて頂く。著者らの研究室で行っているマウス骨髄間質細胞株の神経細胞分化誘導の例を図3に示す。

### III. 幹細胞の可塑性

体性幹細胞がどの程度の可塑性を有するかが、大きな議論となっている。

冒頭にあげたように、ここ数年の体性幹細胞の研究は、成体においても多分化能を有する体性幹細胞が存在することを示唆してきた。しかし、これらの研究成果について疑問を呈する発表が幾つかなされ議論となっている。

Morsheadらは、Bjornsonらの神経幹細胞か

ら血液細胞への分化転換(transdifferentiation)を示唆する研究の再現を試みたが、期待する結果は得られず、Bjornsonなどの研究は *in vitro* での培養による genetic ないしは epigenetic な変化によるものと結論した<sup>17)</sup>。

また、Nature誌416号に同時に掲載されたTeradaおよびYingらの論文は、一連の可塑性を示す研究結果に、細胞融合による説明が考え得ることを示唆した。

Teradaらは、マウス骨髄細胞が、マウス胚性幹(ES)細胞(embryonic stem(ES) cell)とIL-3添加条件下で共培養すると、自然融合することを示し、融合した細胞がES細胞の表現形を有していることを示した<sup>18)</sup>。

同様にYingらは、マウス脳より採取した細胞とマウスES細胞を共培養後、神経細胞に導入されたマーカー遺伝子で選択培養し、得られた多分化能を示す細胞が神経細胞とES細胞の融合細胞であることを示した<sup>19)</sup>。

私見では、これらの混乱は、体性幹細胞における基礎的研究がまだまだ十分でないことに起因すると思われる。続々とセンセーショナルな研究成果が発表される反面、医療に応用する<sup>20)</sup>には、未知の部分が多すぎるというのが現状であろう。

### おわりに

ここ数年の体性幹細胞研究は、「成体に存在する体性幹細胞が、胚性幹細胞に劣らない多分化能を有している」という半ば決めつけられた目標に対して、ひたすら猛進してきたように思える。これらに対し、再考が求められているのが現況ともいえよう。

体性幹細胞を再生医療に用いるには、幹細胞の増殖、分化を精密に制御する必要がある。果たして、我々はこれらを行うだけの十分な知識、技術をもっているだろうか。

'癒えない傷'というのは、人間らしさの一面ともいえよう。傷がすぐ治ってしまう人間の映像がでてくると甚だ気味が悪い。ここで言いたいことは、完全再生というのは大変に困難であるということだ。'可塑性'を有していると思わ

## a xNoggin protocol

Suspend KUSA/A1 cells on non-coated dish  
in IMDM + 10%FBS



Transfect KUSA/A1 cells with xNoggin.



Cells start to aggregate and form clusters



Transfer cell cluster to dishes precoated with  
Ornithine/Fibronectin in 5% FBS supplemented  
DMEM F12 containing NGF, NT3, BDNF.  
Medium was replaced with DMEM F12 B27  
containing NGF, NT3, BDNF 5 days later,  
and medium was changed every 4 days.

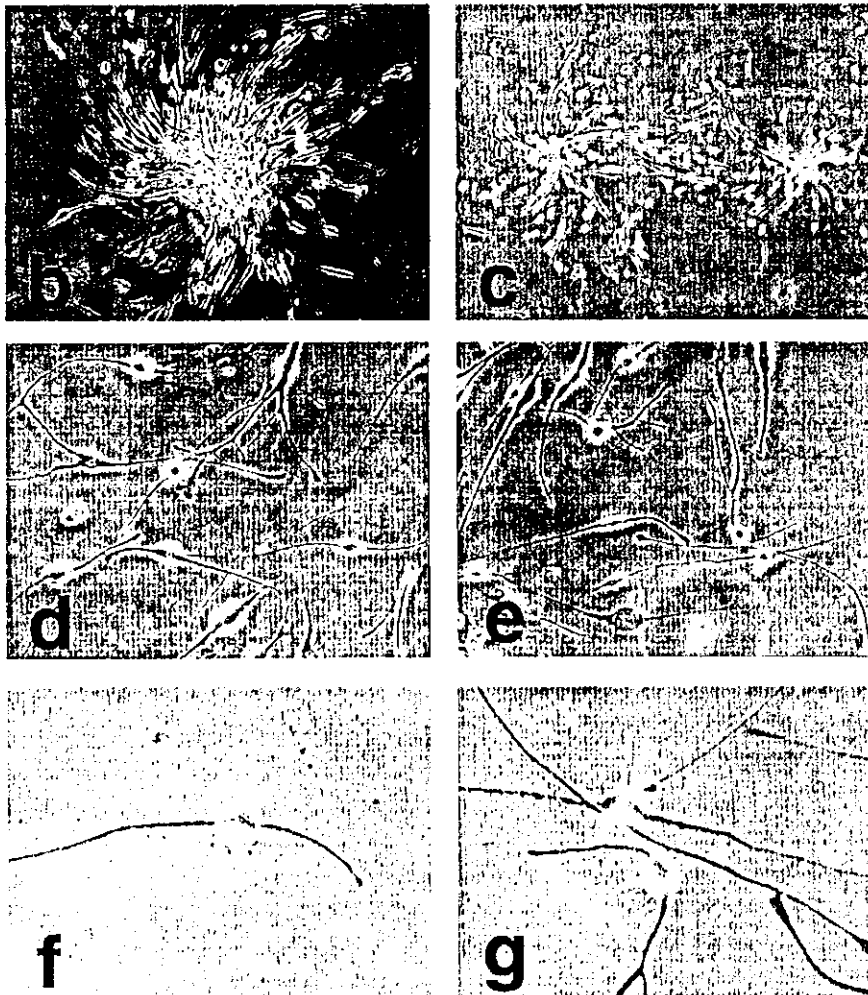


図3 骨髄間質細胞よりニューロンへの細胞転換

a: 骨髄間質細胞をニューロンへ細胞転換する方法

b, g: ニューロンに分化した骨髄間質細胞の位相差顕微鏡像(b, c: 低倍率, d, e: 中倍率, f, g: 高倍率)



れる心の傷でさえ、癒えないことが多い。

再生医療を一般医療へと導くには、更なる基礎的研究が必要であり、これらには、厳密な実

験結果と正確な解釈が求められよう。逆にこれらの基礎研究の充実こそが、再生医療の可能性を大いに広げることになる。

## ■ 文 献

- 1) Bjornson CR, et al: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283(5401): 534-537, 1999.
- 2) Pittenger MF, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147, 1999.
- 3) Mezey E, et al: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290(5497): 1779-1782, 2000.
- 4) Krause DS, et al: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105(3): 369-377, 2001.
- 5) Zuk PA, et al: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7(2): 211-228, 2001.
- 6) Toma JG, et al: Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3(9): 778-784, 2001.
- 7) Jackson KA, et al: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107(11): 1395-1402, 2001.
- 8) Zhou S, et al: The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7(9): 1028-1034, 2001.
- 9) Scharenberg CW, et al: The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99(2): 507-512, 2002.
- 10) Jackson KA, et al: Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(25): 14482-14486, 1999.
- 11) Reyes M, et al: Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98(9): 2615-2625, 2001.
- 12) Jiang Y, et al: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893): 41-49, 2002.
- 13) Potten CS, Morris RJ: Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* 10: 45-62, 1988.
- 14) Rubin H: The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotechnol* 20(7): 675-681, 2002.
- 15) Shi S, et al: Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol* 20(6): 587-591, 2002.
- 16) Simonsen JL, et al: Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20(6): 592-596, 2002.
- 17) Morshead, et al: Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* 8(3): 268-273, 2002.
- 18) Terada N, et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416(6880): 542-545, 2002.
- 19) Ying QL, et al: Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416(6880): 545-548, 2002.
- 20) Menasche P, et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357(9252): 279-280, 2001.

# 2 骨髄間質細胞

伊澤良兼<sup>1)</sup>・梅澤明弘<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 慶應義塾大学医学部病理学教室

<sup>2)</sup> 国立成育医療センター研究所生殖医療研究部

機能を失った組織あるいは器官を細胞移植によって修復しようとする再生医学において、修復に用いる細胞を得る供給源の一つとして神経幹細胞や血液幹細胞とともに注目されているのが、骨髄間葉系幹細胞である。骨髄間葉系細胞をもとにした、成体への移植の可能性を探る研究が始まりつつあり、臨床応用での効果が検証されつつある<sup>1)</sup>。ここでは、骨髄間質細胞に関するこれまでの知見を振り返りながら、今後の課題を模索する。

**Keywords** bone marrow stromal cell, cluster of differentiation (CD), mesodermal stem cell, stromal stem cell

## 骨髄間葉系細胞

### 1. 骨髄間葉系細胞とは

海綿骨稜を含めた骨髄移植は、臨床において日常的に行われている。骨髄細胞はこれらの造血を担う血液幹細胞、および骨髄間質細胞により構成され、骨髄間質細胞は造血細胞の支持細胞としての性格を有するとされてきた(図1A, B)。間質細胞は骨髄細胞の約1%を占めるにすぎず、一般に骨髄細胞あるいは骨髄幹細胞という場合、それぞれ血液細胞、または血液幹細胞を示すが、ここで述べる間葉系細胞あるいは間葉系幹細胞は骨髄間質由来である。

間葉系細胞は骨髄のみならず、骨格筋、心筋、皮下組織、肺、肝、乳房、腎といったほとんどの組織に存在する。間葉系細胞については、血球系

のように幹細胞を同定する方法をいまだもたないが、これまでの数々の実験から、その分化能や含まれる割合は不明であるものの、これらの組織に間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)の存在が強く示唆されている<sup>2-5)</sup>。最近も、腹部の脂肪組織内にも種々の間葉系細胞に分化できる幹細胞が存在することが示された<sup>6)</sup>。

近年のさまざまな報告により、間葉系幹細胞は、以前考えられていたより幅広い分化能を有することがわかってきた。なかでも骨格筋細胞、心筋細胞、脂肪細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、また肝細胞、神経細胞への分化を示す報告もなされてきている(図2)。しかし現在のところ、すべての間葉系細胞がそのような分化能を有するのではなく、その一部に少数の多分化能を有する間葉系幹細胞が含まれていると考えられている。

## Bone marrow stromal cells

Yosikane Izawa<sup>1)</sup> & Akihiro Umezawa<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Pathology, Keio University School of Medicine

<sup>2)</sup> National Research Center for Child Health and Development

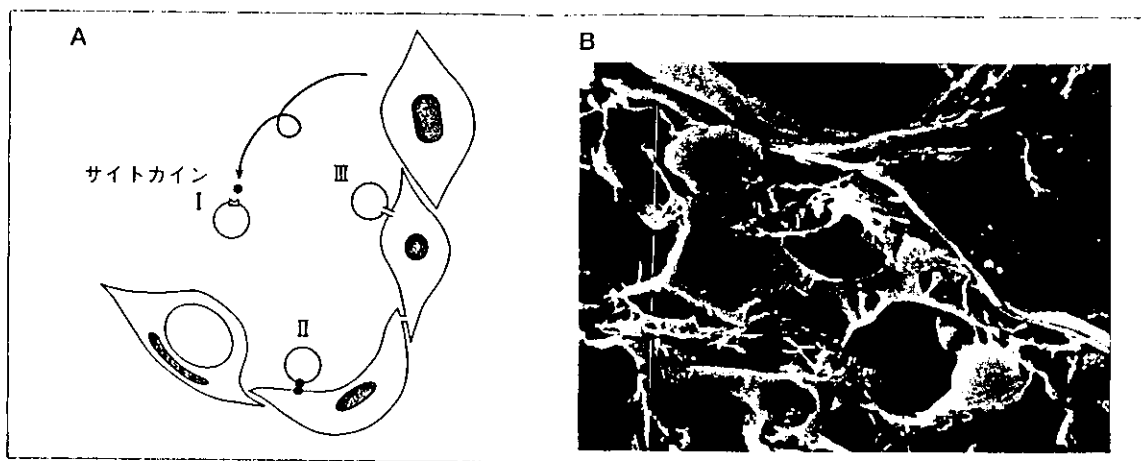


図1 骨髓間質の造血に対する役割のモデル図 (A) と電子顕微鏡写真 (B)

A : 骨髓間質細胞と血液細胞との細胞相互作用を表した。CSF-1をはじめとする液性因子を介する連携 (I)、膜状の分子を介した連携 (II)、ギャップ結合を介した連携 (III) の3通りが考えられる。ギャップ結合は主にコネキシン43を発現しており、脂肪細胞への分化過程ではその連絡は消失する。また、脂肪細胞へと分化すると液性因子も発現しなくなる。

B : 細胞がネットワークを形成して細網構造をとり、造血微小環境を形成する。

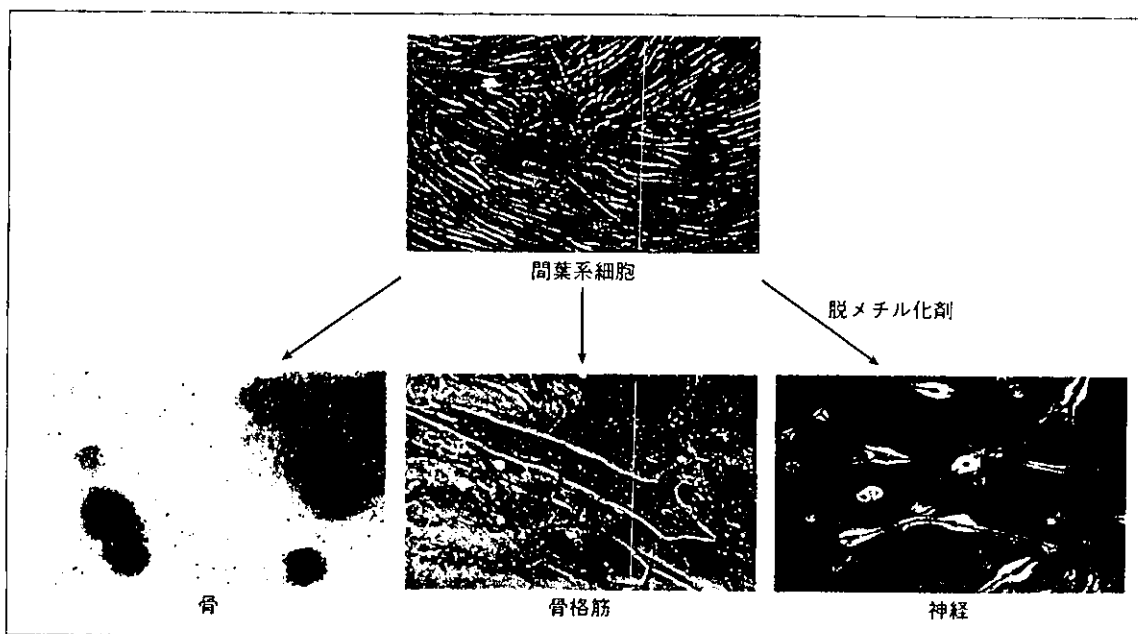


図2 骨髓間質由来の間葉系幹細胞

骨髓中の細胞の初期培養を行うと、壁に付着する間質細胞が得られる。この間質細胞自身が骨、脂肪、骨格筋、軟骨、心筋、神経に分化する能力を有する。つまり、多分化能を有する幹細胞としての性質を有していると考えられる。間質細胞は間葉系由来であるから、間葉系幹細胞といえることができる。

## 2. 間葉系細胞の同定

多能性をもつ間葉系細胞を得るうえで、その細胞に特異的な細胞表面抗原、あるいは細胞表面抗原の発現パターンを知ることは、間葉系細胞の性質を研究するうえでも、将来医療に応用すること

を視野においたうえでも大いに役立つ。

文献上では、血球系幹細胞と間葉系幹細胞はともに、 $CD34^+$ 、 $CD38^-$ 、 $HLA\ DR^-$ の表現型を有しており、 $CD50$ の発現によって区別され、 $CD50^+$ は血球系幹細胞であり、 $CD50^-$ は間葉系幹

細胞であると報告されている<sup>7)</sup>。また, Stro-1 というリガンドの同定されていない抗体を用いて間葉系幹細胞が分離されたとの報告があるが<sup>8)</sup>, 間葉系の未分化細胞の唯一の同定法であるコロニーアッセイ (CFU-F; colony forming units-fibroblastic, 骨髄間質より取得され血清中で増殖する細胞)<sup>9)</sup> との相関は乏しい。また, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) のコレセプターである endoglin の発現が間葉系幹細胞のマーカーであるとの報告もあるが, endoglin は血管再生に強く関与し血管内皮細胞にも発現している<sup>10)</sup>。

一方, phenotyping の他の方法として色素による分離が行われてきたが, Hoechst 33342 色素という DNA に結合する色素を用いた研究がなされ, これにより造血幹細胞が分離できることが報告された<sup>11)</sup>。Hoechst 33342 色素は紫外線により 675 nm, 450 nm の 2 つの波長により励起する特徴を有し, 細胞膜を貫通して DNA と結合する小さな色素である。この 2 つの波長を発現しない, またはごく少量のみを発現している細胞分画の細胞群を SP 細胞 (side population cell) と呼称している。

CD34<sup>low/negative</sup>, Sca1<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup> という細胞表面抗原パターンをもつ細胞集団を FACS (fluorescence-activated cell sorter) によって分離し, 放射線照射によって造血能を消失させたマウスに移植した結果, その lineage である血液細胞へ分化・増殖し, 維持されたという報告があるが<sup>12)</sup>, SP 細胞群内には CD34<sup>low/negative</sup>, Sca1<sup>+</sup> の細胞も含まれていることが確認されている。また, 同様に放射線照射により造血能を消失させたマウスに SP 細胞を移植することにより, その lineage である血液細胞への分化や, そのほかでは筋細胞への分化を認めたといた報告がなされている。

SP 細胞は骨髄だけでなく, 中枢神経系, 骨格筋といった全身の臓器に, 少数ながら存在していることも確認されている。さらに, マウス, ラット, ブタ, ヒトにおいても SP 細胞は同様に見出されている。しかしながら未分化な細胞であるはずの胎児細胞, ES 細胞では必ずしも SP 細胞が明

確ではないこともあり, この色素が幹細胞の同定手法を解決するマーカーにはなりえてはいない。

Marshak らはパーコールを用いた密度勾配遠心により密度 1.073 g/mL の細胞を回収後, 特定の血清の存在下で培養することで, 形態的に, また 50 以上の CD マーカーに対する抗体染色のパターンからも, 均一と考えられる細胞を分離・培養することに成功している<sup>2)</sup>。そして, 単一細胞分離によるクローン解析法により, 約 50 % の細胞が骨, 軟骨, 脂肪に分化する多分化能を有することを明らかにし, 彼らの取得した細胞が間葉系幹細胞であることを実証した。

### 3. 間葉系細胞の分化多能性と表現形質の変化

間葉系幹細胞とは間葉系の組織, すなわち骨, 軟骨, 脂肪細胞, 骨格筋, 靭帯, 腱, 真皮などの結合組織への多分化能を有する幹細胞として定義されてきた。しかし, 最近このような間葉系組織に加えて, 心筋, 平滑筋, 血管内皮などの臓側中胚葉系にも分化する中胚葉幹細胞 (mesodermal stem cell) が成体の骨髄ならびに骨格筋, 真皮に存在することが, 筆者らを含め 4 つのグループから独立して見出された。Verfaillie らは, ヒト骨髄から無血清培養により, 通常の間葉系幹細胞よりも小型の形態をもち, CD13・CD49b 強陽性, CD90 弱陽性, CD34・CD117・CD45 陰性のパターンをもつ細胞を取得した<sup>13)</sup>。本細胞は骨格筋, 骨・軟骨・脂肪・ストローマ細胞に加え, 血管内皮細胞, さらには内胚葉・外胚葉系に分化できる多能性をもち, レトロウイルスベクターを用いた単一細胞分離によりこれらの細胞が 1 つの細胞由来であることが示された。このような小型の多能性幹細胞は Prockop らによってもヒト骨髄から分離・培養されている<sup>14)</sup>。一方, Young らはヒト骨格筋や真皮から CD13・CD34 陽性, CD117・CD45 陰性の細胞を取得し, 骨格筋・骨・軟骨・脂肪・心筋・平滑筋・血管内皮細胞に分化することを示している<sup>15)</sup>。

筆者らは C3H/He マウスを用いて骨髄の初期培養を行った。マウスの大腿骨より抽出した骨髄

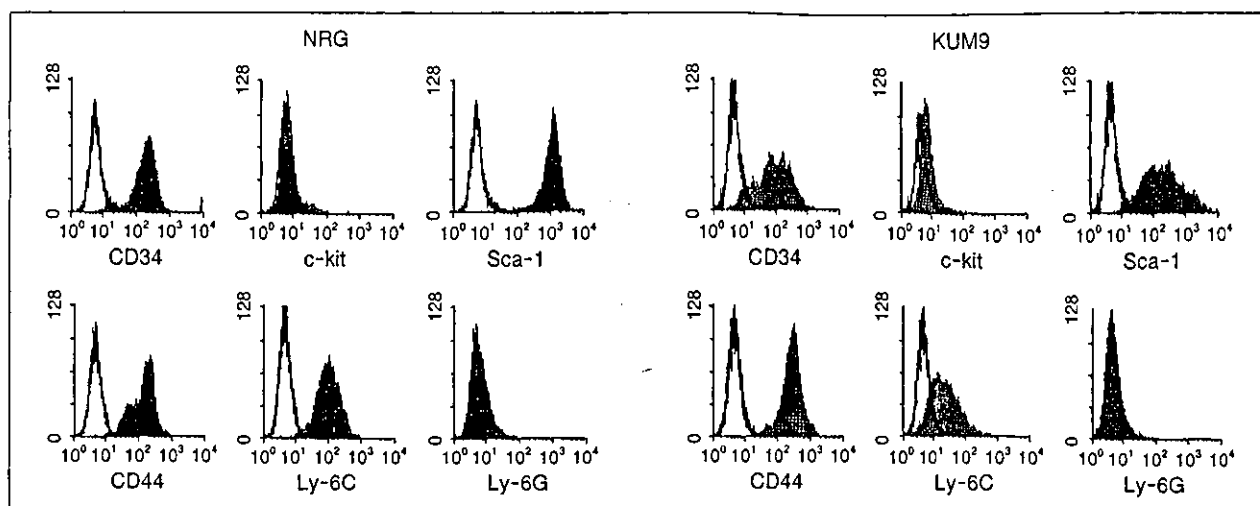


図3 細胞表面マーカー

筆者らのグループで樹立したマウス骨髄間質由来の細胞株NRG, KUM9のマーカー一覧。

内細胞液より培養を開始した。付着性細胞である間質細胞はシャーレに壁着するため血液細胞との分離は比較的容易であり、それらのヘテロな細胞群の継代培養を行い、不死化した間葉系細胞をクローニングしていった。さらに、目的の分化形質を有する細胞へとサブクローニングを行うことにより、骨前駆細胞、軟骨前駆細胞、脂肪前駆細胞、心筋前駆細胞株を得ることが可能となった。これらの細胞は腫瘍化することなく、*in vivo*, *in vitro*においてそれぞれの分化形質を有していた。

このうち骨・脂肪・骨格筋・心筋細胞に分化しうる多分化能をもった細胞株KUM2は、完全な自己複製能とはいえないが、試験管内での分化を目安にすると、継代を続けてもその分化能に変わりなく未分化な状態を維持している。また、心筋細胞への分化能を失った細胞株KUM9は、骨・脂肪・骨格筋細胞への分化能は保持しており、同様に継代しても未分化な状態を維持した。さらに、骨・脂肪細胞のみにしか分化しなくなった細胞株NRGおよびKUSA/A1を得たが、この2つの表面抗原パターンは異なっていた(図3, 表1)。

筆者らは、同じ由来である骨髄間質細胞を標的とした複数のモノクローナル抗体を作製し、分化傾向の確認された細胞を用いてその抗原性の差、また既知の抗体を用いてその細胞膜表面抗原の変

表1 細胞表面マーカーの比較

表面マーカー	KUM9	NRG	KUSA/A1
CD34	++	++	-
c-kit	-	-	-
Sca-1	+++	+++	+++
Flk-1	-	-	-
CD31	-	-	-
CD144	-	-	-
CD140	++	+	++
CD14	-	-	-
CD29	+	+	+
CD41	-	-	-
CD44	+++	+++	+++
CD45	-	-	-
CD49b	-	-	-
CD49d	-	-	-
CD54	-	-	-
CD90	-	-	-
CD102	-	-	-
CD105	-	-	-
CD106	++	-	-
Ly-6C	+	++	++
Ly-6G	-	-	-

NRG, KUM9ともに多分化能をもつが、KUM9の方が幅広く分化する能力を有する。KUSA/A1は骨芽細胞である。

化から細胞分化の指標を得る試みを始めている。すなわち、われわれが樹立した骨髄間質由来のあらゆる細胞株についてFACSによる表面抗原の分析を行い、培養で観察された分化能との比較から、 $c\text{-kit}^+$ ,  $CD34^+$ ,  $CD140^+$ が、多分化能を有する

間葉系細胞と分化の進んでいる細胞（前駆細胞）、および血球系幹細胞を含む血球系細胞とを区別するよいマーカーになると考えている。

## 骨髄間質細胞からの分化誘導

### 1. 神経細胞と心筋細胞への分化誘導

筆者らのグループでは、前述したようにC3H/He マウスから骨髄間質由来の細胞株を数種類樹立した。これらの細胞はそれぞれ分化能が異なっているが、特に骨組織を形成するKUSA/A1細胞は著しい骨形成能を示し、明らかに他の細胞と異なる性質を有していた。しかし一方で、KUSA/A1細胞を継代培養してみると、非常に低率ではあるが神経様の軸索を伸ばしたような細胞に変化する様子が観察されていたため、脱メチル化剤である5-アザシチジンを用いて骨髄間質細胞を神経に分化させる実験も行った。

まず、KUSA/A1細胞を10%血清入りの培養液中で増殖させ、5-アザシチジン、神経成長因子(nerve growth factor; NGF)を加えて4日間処理し、その後NGFが含まれたDMEM/F12/B27培地で30日間培養することで、神経伝達物質に反応する神経細胞が得られた<sup>16)</sup>。このとき、処理開始後4日目におけるニューロンのマーカー(Tuj-1)の陽性率は、最大で約10%であった。アストロサイトのマーカー(GFAP; glial fibrillary acidic protein, グリア細胞線維性酸性タンパク質)、オリゴデンドロサイトのマーカー(Gal-C; galactocere broside)もそれぞれ陽性となる細胞は出現したが、約3%ほどでニューロンよりも少なかった。さらには、神経幹細胞からニューロンへの分化を誘導する系を模倣したプロトコルで、KUSA/A1細胞に対し無血清状態でnoggin遺伝子を導入し、脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)、NGF、GDNF(glial cell-line derived neurotrophic factor)などを用いることにより、細胞の約50%がTuj-1陽性であった(図4)。

この骨髄間質細胞KUSA/A1細胞から神経を誘

導する実験においては、培養する際の細胞密度も重要な要素であった。つまり、高密度で培養した場合には、もとの形態を維持しながら最終的には脂肪細胞様に分化したのに対し、左記のプロトコルに従いながら低密度で培養した場合には、神経細胞様の形態へと変化することが多かった。

神経以外では心筋への分化誘導についても検討を行ってきた。KUSA/A1細胞と同様にC3H/Heマウスから樹立した細胞株CMG細胞を脱メチル化剤によって処理したところ、CMG細胞は心筋に特徴的な管状を呈するようになり、また自動能により拍動し、収縮はシンクロナイゼーションを伴っていた。

### 2. 細胞のゲノム修飾状態をどうするか

骨髄間質細胞が、自己増殖しながら目的とする細胞へと分化する能力をもともと初期能力としてもっているとするならば、わざわざ骨髄間質細胞の初期値を変更する必要はないが、心筋細胞、骨格筋細胞、神経細胞、血管内皮などを間質細胞から作る場合には、骨髄間質細胞の固有の状態(初期値)をリセットする必要があるかもしれない。

その細胞の固有の状態(初期値)は、その細胞の染色体上のクロマチンまたはメチル化といった修飾状態によっても決められていると考えられ、これまで筆者らが行ってきたように、5-アザシチジンなどの脱メチル化剤によって修飾状態を解除することも一つの手段といえるだろう。ただし、脱メチル化剤による修飾状態の解除は、確率的な要因が多分に含まれると考えられる。

また、もし脱メチル化剤、各種成長因子、あるいは何らかの因子によって修飾状態を解除することが可能だとするならば、分化誘導する以前の修飾状態に類似した修飾状態から発生する細胞種の分化誘導の方が、まったく修飾状態の異なった分化発生を逃げる細胞を誘導するよりも、成功する可能性は高いと考えられる。たとえば、筆者らのKUSA/A1細胞の実験例で述べたように、もし骨髄間質細胞に神経細胞へと分化する能力があるとするならば、神経系の遺伝子を発現しながら分化

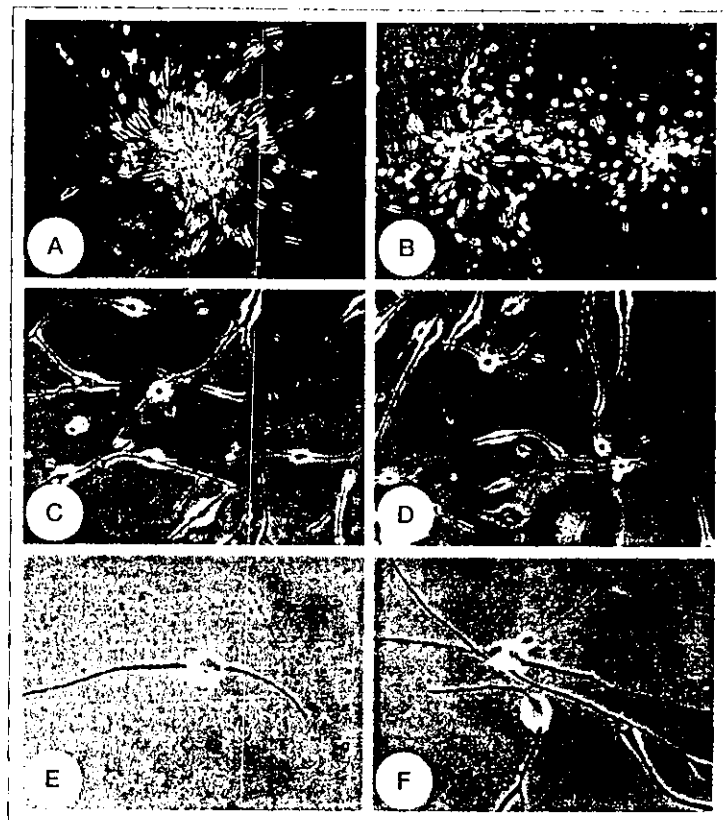


図4 noggin を用いた神経分化誘導プロトコール何もコーティングしていない培養皿で、血清含有IMDMを用いKUSA/A1細胞を培養する。あまり高密度すぎない適当な密度で、リポフェクション法でnoggin遺伝子を導入する。2～3日で細胞塊が形成され浮遊してきたら、それをオルニチン・フィブロネクチンでコートした培養皿に移行させ、無血清、NGF・NT3・BDNF含有DMEM/F12/B27培地で培養する。すると1週間ほどで神経細胞に特異的なマーカーを発現した細胞に分化する。

発生する細胞へと骨髄間質細胞を分化誘導することは、確率的にきわめて低いものの、可能ではないだろうか。神経系の発生に関連する遺伝子が多く発見されてきたが、それらがたまたま神経系の発生のみに関連づけられて検討がなされてきた可能性もあり、そうすると神経系の遺伝子を発現する能力をもつ骨髄間質細胞は、より多種多様な細胞へと分化させることも可能であるかもしれない。

ところで、Parkinson病に対して、ドーパミン産生ニューロンを移植する治療法が考えられているが、このように少量の分泌物を目的として細胞治療を行うことを考える場合、たとえば足場あるいは骨格（スキヤホールド）などを用いる必要性が高いと考えられる骨や軟骨などの移植に比較して、必要な細胞数は少なくともすむかもしれない。こうしたことから、骨髄間質細胞から目的とする細胞を分化させるとき、その効率、確率が低くても、目的とする細胞が比較的少量でよく、純粋な集団になるように選択的に回収することができれば、細胞治療を行うことも夢ではないと考える

(図5)。

### 間葉系幹細胞を用いた細胞治療

D. Marshakらは、ヒト間葉系幹細胞をヒツジ胎仔の腹腔内に移植し、数か月後にヒツジ胎仔の組織を解析した。その結果、移植した間葉系幹細胞は軟骨組織では軟骨に、骨格筋組織では骨格筋に、心臓では心筋に、脂肪組織では脂肪に分化するという組織特異性が観察された<sup>17)</sup>。筆者らも、マウス骨髄由来の多能性間葉系幹細胞KUM2を同系統の成体マウスに移植することにより、部位特異的に心筋細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨、軟骨、脂肪細胞に分化することを観察している<sup>18)</sup> (しかし、いずれの組織においても高濃度の細胞を移植すると骨および軟骨の形成がみられた)。一方、骨髄由来の間質細胞を用いた血管新生の誘導が心筋細胞の線維性置換と急性心筋梗塞後の心不全を防ぐなど、心筋梗塞における虚血病変部位の組織への血液再灌流の一助として、細胞治療が有効であることはいくつかの実験結果から示され

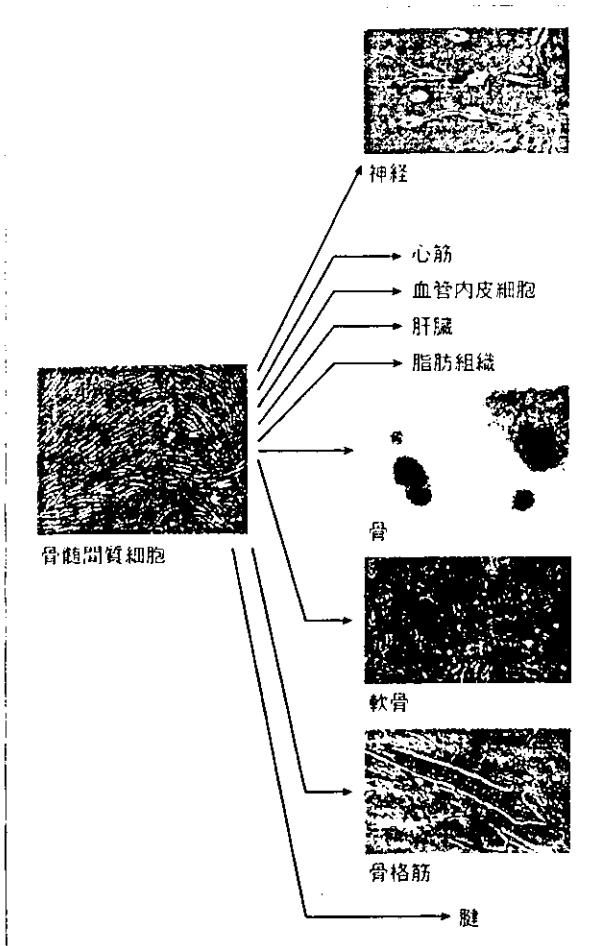


図5 骨髄間質細胞を用いた細胞治療のイメージ

骨髄間質細胞を心筋、神経、骨、軟骨などに分化させ、それを移植する。移植する細胞は自分の骨髄から採取した細胞であるため、免疫反応が起こる可能性は低い。目的とする細胞を選択的に分離する方法や、必要とされる莫大な細胞数を補うための人工物、すなわち足場・骨格（スキャフォールド）などが必要となる。

ている<sup>19, 21)</sup>。これらの結果は、間葉系幹細胞による細胞治療の可能性を示したものであり、骨髄間質細胞から誘導される心筋細胞は心筋梗塞などに、神経は各種麻痺や Parkinson 病における中脳

黒質の機能回復などに、骨・軟骨はリウマチ疾患、外傷、癌骨転移や変形関節症などの整形外科あるいは形成外科領域に応用することが可能性として考えられる。同時に、臨床応用を考えた場合、免疫学的な面、倫理的な面、採取の簡便さなどは、ES 細胞や胎児由来の細胞などに比較し、問題が少ないと考えられる。

だが、ようやく研究が各方面で展開され始めた現在、臨床応用を目標とした場合の課題も多い。先に述べたように、目的の組織あるいは臓器に目的の細胞を生着させる必要があるほかにも、巨大な病変・欠損部を補うだけの量的な問題は、特に年齢の増加に伴い多能性を有する幹細胞・前駆細胞が減少したり、幹細胞の分裂可能回数が減少していくとするならば困難な課題となる。さらに、確率は低いとしても、移植した細胞の腫瘍化、移植片による正常組織の機械的損傷や圧迫、免疫反応や分泌酵素による組織破壊に伴う炎症、先天的な遺伝子異常など、個体差による幹細胞の分化能の制限あるいは分化後の細胞の機能障害、移植片からの感染に関する安全性なども考慮しなくてはならないであろう。

謝辞

慶應義塾大学医学部福岡真理子博士、今林英明先生、協和発酵株式会社桜田一洋博士との骨髄間質細胞に関する共同研究で多くの示唆を受け、常に世界的な最新の潮流における情報の供与を授かりました。時間のある方は、骨髄間質から心筋への分化のアニメーションを下記のウェブサイトでご覧下さい。

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

文献 ●

- 1) Deans RJ & Moseley AB. Mesenchymal stem cells : Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28, 875-84 (2000)
- 2) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-7 (1999)
- 3) Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG et al. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 91, 335-44 (1977)
- 4) Umezawa A, Maruyama T, Segawa K et al. Multipotent marrow stromal cell line is able to induce



- hematopoiesis *in vivo*. *J Cell Physiol* **151**, 197-205 (1992)
- 5) Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ et al. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7841-5 (2001)
  - 6) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue : Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211-28 (2001)
  - 7) Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F et al. The "common stem cell" hypothesis reevaluated : Human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* **85**, 2422-35 (1995)
  - 8) Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A et al. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res* **389**, 271-80 (1994)
  - 9) Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* **47**, 327-59 (1976)
  - 10) Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P et al. Characterization of TGF- $\beta$ 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol* **93**, 507-14 (1996)
  - 11) Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* **3**, 1337-45 (1997)
  - 12) Osawa M, Hanada K, Hamada H & Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**, 242-5 (1996)
  - 13) Reyes M, Lund T, Lenvik T et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615-25 (2001)
  - 14) Colter DC, Sekiya I & Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7841-5 (2001)
  - 15) Young HE, Steele TA, Bray RA et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult and geriatric donors. *Anat Rec* **264**, 51-62 (2001)
  - 16) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T et al. Brain from Bone : Efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation (Stem cell issue)* **68**, 235-44 (2001)
  - 17) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* **6**, 1282-6 (2000)
  - 18) 五條理志, 梅澤明弘 : 間葉系幹細胞の分化制御機構. *炎症と免疫* **10**, 13-8 (2001)
  - 19) Gojo S, Kitamura S, Hatano O et al. Transplantation of genetically marked cardiac muscle cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* **113**, 10-8 (1997)
  - 20) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* **7**, 430-6 (2001)
  - 21) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-5 (2001)

# バイオ人

## THE NEWS OF BIO PEOPLE

### 科学哲学から日中バイオの掛け橋に

——中国上海国際展示会日本事務局 張 康生氏

☒ 「上海バイオの展示会が開かれます。日本の企業関係者、研究者の方も、ぜひ参加してください」。中国の上海で4月8～9日に開かれる「中国国際バイオ・分析機器・医薬工業等の展示会及びシンポジウム」への集客に奔走しているのは中国からやってきた張康生・中国上海国際展示会事務局代表。

中国は一昨年から本格的な薬事法が施行、知的財産権制度の整備も進むなど急速に先進国への脱皮を図ってきた。機械などの工業製品に続き、医薬品工業の近代化にも力を入れている。その最先端の姿を日本の学界、経済界の専門家に目にしてほしいとい

う。日本分子生物学会と交渉して、学会のホームページでシンポジウムを紹介してもらうことにも了承を得た。一方で、シンポジウム以外の中国の研究施設を見学してもらおうと、その手続きにも忙しい。参加が決まった日本の大学教授から中国での訪問先のアテンドを依頼されるなど、てんてこ舞いの毎日を送っている。

張代表の来日は1985年。それ以前は上海工業大学（現上海大学）の哲学講師を務めていて、東京都立大学大学院に籍を置いてからの専攻も科学論。テーマは「科学パラダイムのシフト」で有名なトマス・クーンだった。

論文を執筆した後も日本に残り、日中の技術交流の掛け橋となる仕事を選んだ。コンサルティング会社の代表も務め、日中の政府間交渉もサポートしている。「昔は、IT関係の仕事が多かったです」と張代表。「でも最近ではバイオの仕事がすごく増えました」



「視察団参加に興味ある方は電話してください(TEL 042-799-2856)」

### 骨折の再生医療に研究者人生をかけます

——国立成育医療センター研究所 梅澤明弘氏

☒ 骨髄由来の間葉系幹細胞の培養と分化を研究し、本誌の再生医療特集にも登場した慶応大学医学部病理学教室の梅澤明弘助教授が国立成育医療センター研究所生殖医療部長に転出した。GMP(優良製造規範)規格の培養室など新しい施設的设计図をながめる日が続いている。

慣れ親しんだ大学から国立研究所への転身に、戸惑うこともなくはないが、「いろいろとこちらの要望を聞いていただいている」と話す。

国立病院の統廃合の一環として誕

生した国立成育医療センターの前身は国立小児病院。生殖医療の専門家を数多く擁する研究所だ。梅澤部長が専門である再生医療は生殖医療とは近い関係にある。

「ある条件が整わなくて、精子形成不全になっている男性がいますけれど、その人の骨髄細胞から精子を作ることも不可能ではなくなりつつあるんですよ」と梅澤部長。となると、生殖医学への転身か？

「いやいや、今やろうとしている最も大きなテーマは骨髄間葉系幹細胞

と生分解性ポリマーを使って実際の骨折治療に使える生体デバイスを作ること」だと力説。「厚生労働省から補助金を受けていますし、これができないと私の研究者人生は終わるという気概を持ってやります」と笑う。



「施設も新しく、心機一転です」

# 間葉系幹細胞と生殖医療

— 生物学的特性からみた治療戦略を意識して —

梅澤明弘

◎再生医療における細胞の供給源のひとつとして注目されているものに、間葉系幹細胞がある。間葉系幹細胞は自己の骨髄間質から得ることができ、倫理的にも問題となることが少ないが、医療としての有効性はこれからである。一方、生殖補助医療が現実的に医療として確立していることは間違いないが、その是非や付随することにさまざまな論議を巻き起こしている。本稿では、現在行われている生殖補助医療とは違う形で生殖細胞系列を医療に用いた場合におけるポイントを、間葉系幹細胞をその比較対照として比べることで、より明確にしていきたい。

**Key word** 間葉系細胞, 生殖細胞, 幹細胞, エピジェネティクス

胚性幹細胞や組織幹細胞を利用してさまざまな機能細胞を作製し、障害を受けた組織の機能を補填しようとする考え方が再生医療として注目されている。神経、肝、心筋、骨格筋、腎、軟骨といった体細胞にその細胞治療の対象がおもに考えられているが、成人組織の細胞を用いて生殖系列の細胞をつくり出すことができるであろうかという考えがある(図1、「サイドメモ1」参照)。もちろん、現在そのような事実は報告されていないが、精子や卵子といった生殖細胞をつくり出すことができれば、“精子がない”“卵巣がない”といった絶対的の不妊因子を有している患者に対して福音となる。“精子や卵子をつくり出す供給源となる細胞はどのようなものがあるのか”という問いに対し、臨床的にはまったく行うことは許されないこと、法的に禁止されていること、または無意味であることを含めて考えてみる。

精子では精子のもととなる精祖細胞があり、また、その元である始原生殖細胞があり、これらの細胞から配偶子形成を生じさせる可能性が考えられる(図2)。さらに、胚盤胞由来の内部細胞塊ま

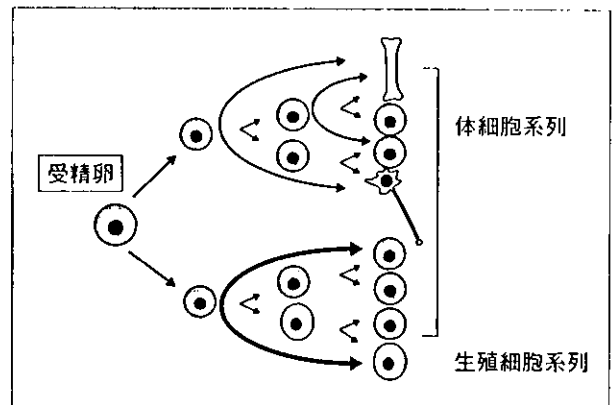


図1 細胞系列の互換性

たは胚性幹細胞があり、もし胚性幹細胞から配偶子形成が可能であり、さらに体中の成体細胞の核を未受精卵に核移植し胚盤胞まで発生させ、その内部細胞塊を取り出して細胞供給源とすることも可能であれば、どのような細胞でも精子になる可能性がある(図3)。無茶な発想かもしれないが、分化しきった細胞を生殖系列の細胞に転換することも魅力的なアイデアとして存在する。

再生医療における生殖細胞と体細胞である間葉系幹細胞の違い

生殖細胞がかかわる細胞医療では、多くの細胞

Mesenchymal stem cells and germ line stem cells  
Akihiro UMEZAWA  
国立成育医療センター研究所生殖医療研究部

を必要としないことが大きな特徴である。虚血性心疾患の治療のために心臓への間葉系幹細胞の細胞移植を行う場合、成人では300gある心臓の一部に入れる細胞は重量でいうと10gぐらいが必要となる可能性がある。心筋症ではさらに多くの細胞数が必要となるであろう。また、肺、肝、腎、脳を構成する細胞を用いた移植でもその臓器の大きさ、疾病における病巣の範囲から考えても相当数の細胞が必要である。比較的少ない細胞数でも治療効果があると予想されるホルモン産生細胞や黒質細胞でも1万以上の細胞数は必要であろう。一方、生殖細胞がかかわる細胞医療では、極端なことをいえば1個あれば成功する可能性がある点は特筆すべき点で、ほかの細胞系列とはまったく

異なる。

また、生殖細胞に関係する再生医療では自家移植しかありえない。他家移植となれば、精子、卵細胞を供与してもらえばよいことになるので、自分の細胞を用いて行う細胞移植以外に考える必要はない。自らの細胞を用いて生殖細胞を形成させる場合には、生殖細胞から精子形成させるか、または体細胞を生殖系列細胞に細胞転換させることが可能性として考えられる。生殖細胞の配偶子形成過程に異常をきたすような遺伝子変異を有する個体の細胞をドナーとして利用すると、生殖細胞系列に転換したとしてもやはり異常をきたしてしまふ。これは、筋ジストロフィーの患者より得られた骨髄由来の間葉系幹細胞を骨格筋細胞に転換させたとしても、その骨格筋細胞が機能しないのと同様である。

生殖系列における再生医療には動物実験で用いることが可能な手法が、ヒトでは限定されてしまふ。生殖細胞系列に遺伝子を導入することは許されていないので、遺伝子を導入することはできない。間葉系幹細胞の場合には、遺伝子を導入することで、①目的の細胞へ分化することの標的化がなされる、②細胞の寿命延長をはかることが可能である、③遺伝子の細胞特異的な*cis-element*を利用することで、分化した細胞を選択的に単離することが可能となるが、これらのことがいっさい許されなくなる。たとえば、心筋細胞を単離するにはcardiac troponin Iやmyosin light chainの転写調節領域を利用できる。生殖細胞の場合はOct-3, TNAP, Vasaの転写調節領域を用いて単離できるが<sup>2)</sup>、ヒトにおける場合は遺伝子を導入することはまったく許されない。したがって、生殖細胞系列を同定するには、遺伝子の転写調節領域を用いた方法ではなく、表面抗原を同定することがきわめて大事なこととなる(図4)。

4番目の違いとして、異種の細胞に存在するレトロウイルスの感染は生殖細胞の場合、厳密に管理されなくてはいけない。もともと間葉系幹細胞をはじめとした再生医療の場で完全ヒト型培養系が必要とされるのも、外来種のレトロウイルスがドナーの細胞に入り込み、宿主(患者)において最終的に生殖細胞に入り込むことが危惧されてい

### サイド メモ 1

#### 細胞系列の互換性

受精卵から各細胞系譜に至る発生過程ならびに成体における臓器に至る過程でさまざまなレベルで幹細胞が存在する。全能性を有する受精卵からはじまり、多分化能を有する幹細胞、3つから4つの細胞に分化することができる幹細胞、2つの細胞に分化できる幹細胞がある。ひとつの細胞に分化できない場合は前駆細胞というよび方になってしまう。このように、生命は1個の受精卵からはじまり分裂を繰り返すうちに、形態学的・機能的に異なったタイプの細胞をつくり出す。この現象は細胞分化として知られるが、ある特定の分化状態にある細胞はその状態が安定である。さらに、その安定状態というのは細胞外環境因子に支えられているのではなく、細胞の内に自身の分化状態を安定に保持しようとする働きがあると考えられる。それは数多くの遺伝子の発現調節機構が相互に依存しており、全体として一定のバランスを保った状態にあると言い換えることができる。培養系に移した細胞がその環境から切り離されているにもかかわらず、元の性質をある程度保つことがその根拠のひとつである。これら分化状態の安定性と、変化しやすいというさかさかパラドキシカルな事象が分化という現象の基本であり、転写因子のネットワーク、ゲノムのメチル化、クロマチン構造がその定常状態を産み出す。この定常状態を示す分化・発生段階が可逆性を有することが指摘されてきている。この可逆性が体細胞と生殖細胞との間にあるかどうかはまったく不明である。