

表1 骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた細胞治療の対象疾患

造血幹細胞移植の増強
自己（リンパ腫、骨髄腫、白血病に対する移植）
同種（臍帯血, unrelated, haploidentical）
<i>in utero</i>
間葉系細胞に障害を伴う疾患
骨形成不全症
軟骨形成不全症
遺伝病（欠損遺伝子の運び屋として）
Fabry病
異染性白質萎縮症
血友病
ムコ多糖症
筋ジストロフィー症
心疾患
虚血性心疾患
心筋症
脳梗塞
糖尿病（?）
パーキンソン病（?）
免疫寛容の誘導
GVHD (graft-versus-host disease) 予防
臓器移植での免疫寛容の誘導

## 細胞治療に関する問題点

細胞治療が有効であると示された代表は、骨髄移植であり、表皮細胞の移植である。将来的には、糖尿病に対して膵Langerhans氏島の移植、パーキンソン病に対してドーパミン産生細胞の移植が有望と思われる。細胞移植後における移植された細胞の癌化についても議論が必要となる。齧歯類の細胞は容易に形質転換し不死化するが、ヒトの細胞はほとんど形質転換することはない<sup>11)</sup>。胚性幹細胞が癌化する危険性が存在するという事は繰り返し指摘されていたのとは対照的に、体性幹細胞は移植後に癌化する可能性は乏しいと考えられる。より正確に言えば、患者自身の細胞と移植した細胞の腫瘍化の可能性は同一である、ということになる。一方、移植する細胞に遺伝子を導入した場合には、その遺伝子が導入されるゲノムの部位がランダムであるために、癌化の可能性は否定できない。筆者らも、ヒト骨髄間質の寿命を延長するために、Bmi-1, E6, E7, TERTを導入している<sup>12)</sup>。これらの遺伝子を導入す

ることにより、形質転換を生じるという結果は*in vitro*, *in vivo*のいずれにおいても得られていないが、移植された細胞が将来的に腫瘍化する可能性はある。細胞を移植することによる利益と不利益のバランスをよく理解することが肝要である。

移植する場合の生着の有無に関する疑問も残る。生着したかどうかを明確にするには、患者自身の細胞と移植された細胞を区別する必要がある。ヒトの細胞移植では、それらの細胞を区別するために蛍光分子であるGFP (green fluorescent protein) や大腸菌由来の酵素であるβ-ガラクトシダーゼといったマーカーを入れることが禁じられていることは、当然と思われる。移植する細胞がY染色体を有し、患者が女性の場合のみ、検証が可能であるというのが結論であろう。

ナントにおけるミーティングの話に戻る。最初の演者であるフロリダのSanberg博士は、ヒト胎児の神経移植について言及し、シクロスポリンを6か月間投与することで、ドーパミン産生細胞が生き続けることを述べた。また、骨髄間質細胞および精巣のSertoli細胞が神経細胞の供給源になりうること、さらには精巣由来の胎児性癌細胞であるNT2までもが細胞のよい供給源になると指摘した。胎児の神経細胞を支持細胞にすることによって、生体内の脳と同じ環境を作り出す試験管内シミュレーションによる細胞転換の例を示した。

そのミーティングの2番目の演者であるミネソタ大学のLow博士は、MAPCが神経の供給源として有効であり、ドーパミン、セロトニン、GABAを産生するニューロンになることと矛盾しない結果を得たと発表した。さらに、MAPCが脳梗塞、パーキンソン病、リソソーム病の神経症状に効果があるとLow博士は指摘する。そもそも骨髄由来の間葉系細胞が神経に分化すると発表したのは前述のSanberg博士が最初であり<sup>13)</sup>、Prockop博士が続く<sup>14)</sup>。骨髄間質が神経になるという発表は、神山の論文が、私の知る限り3番目である<sup>15)</sup>。現在では、ヒト間葉系細胞さらにMAPSについても同様の発表があり<sup>1)</sup>、

筆者らのグループでも森泰昌がヒト骨髄間質細胞を用いることで追試に成功している。

骨髄間質細胞とMAPCが同一種類の細胞か異なる細胞かについての議論がある。会場で、筆者がMAPCを扱い神経系への細胞転換に成功したミネソタ大学のLow博士にこの議論について質問を行ったところ、明確な返事があった。「Verfaillie博士のMAPCとProckop博士が発表した骨髄間質細胞について、キーストンで比較が詳細にされた。両方とも神経の分化を生じるけれどもその表面マーカーやその他の情報からもまったく異なる細胞と思われる」キーストンにおける詳細な議論はわからないが、骨髄間質細胞とMAPCは異なる細胞である。位相差顕微鏡下における細胞の大きさからして異なっている。筆者らが培養している骨髄間質細胞はMAPCと比較し、大型であると理解している。もっとも、東

京での招待講演において、Prockop博士は神経に分化しうる骨髄間質細胞は小型であり、細胞密度を低くすることで寿命が延長され、神経分化能を保持すると述べた。さまざまな細胞の供給源に関して議論がつきないように思える。間葉系細胞のなかでも、その是非が問われ、本文中にも述べたように現実に医療の現場で試される日が近づいていることは事実であり、最終的にはその優劣がはっきりすることになる。

謝辞 第10回NATにおいて、ヒト骨髄間質細胞が心筋細胞になることを発表する機会を与えてくれた医薬品機構に感謝します。また、その発表において多くの質疑が行われ、議論が深まりました。骨髄間質の心筋への分化アニメーションをWebサイトでご覧下さい (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/HTML>)。

## 文献

- 1) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-9 (2002)
- 2) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* **103**, 697-705 (1999)
- 3) Gojo S, Gojo N, Takeda Y et al. *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **288**, 35-50 (2003)
- 4) 梅澤明弘. 幹細胞とエピジェネティクス. *Mol Med* **39**, 816-22 (2002)
- 5) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-7 (1999)
- 6) 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)
- 7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-7 (1997)
- 8) Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* **5**, 309-13 (1999)
- 9) Gerson SL. Mesenchymal stem cells : No longer second class marrow citizens. *Nat Med* **5**, 262-4 (1999)
- 10) Deans RJ & Moseley AB. Mesenchymal stem cells ; Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **28**, 875-84 (2000)
- 11) Kiyono T, Foster SA, Koop JI et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**, 84-8 (1998)
- 12) Imabayashi H, Mori T, Gojo S et al. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res* **288**, 51-9 (2003)
- 13) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F et al. Adult bone marrow stromal cells differenti-

### 城西放射線・医療同窓会40周年記念式典・祝賀会報告

40周年実行委員長 鮎川 幸雄

城西放射線・医療同窓会40周年記念式典・祝賀会は、平成14年11月16日(土)私学会館アルカディア市ヶ谷において、全国各地同窓生の参加のもと盛大に開催されました。計画から実行、事後処理まで関係各位のご協力により、無事行うことが出来ました。実行委員長として大変感謝致しております。

当日の内容について下記の通り40周年記念事業を報告いたします。

40周年記念式典・祝賀会次第実施内容  
一、支部長会議 15時-15時30分  
10支部長参加5支部欠席

二、記念式典 15時45分-16時30分  
司会進行 鮎川幸雄

来賓挨拶 (来賓参加者9名)  
城西放射線技術専門学校・城西医療専門学校 校長 新藤 宜夫様  
東京放射線技術師会 会長 中澤 靖夫様

日本放射線技術学会東京部会 副部長 伊藤 博美様  
業界感謝状贈呈 31社  
功労者役員表彰 3名

中西忠勝様・高橋邦夫様・遠藤勝治郎様

三、記念講演「再生医療」  
国立成育医療センター 梅澤明弘 先生

四、記念祝賀会  
参加者 合計144名

会員89名(放射線73名 理学11名 作業5名)、業界15名、学校31名、来賓9名

会員特別原稿執筆表彰(8名)  
中島正則様・高須賀正章様・加藤京一様・伊藤博美様・石川邦秀様・山下淳史様・河本敦夫様・菅沼一男様

以上の内容にて無事盛大に開催されました。今後は50周年に向けて、城西放射線・医療同窓会がますます発展していくことを、記念して報告いたします。

城西放射線・医療技術専門  
創立40周年記念式典



功労者表彰 高橋邦夫氏

功労者表彰 中西忠勝氏

叫れやかな式典会場

### 40周年記念特別講演から

#### 再生医療

国立成育医療センター  
生殖医療研究部長  
梅澤明弘 先生

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うよりは、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、最も代表的なのは肝臓である。プロメタ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セウスから課せら



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三分の二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りで、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(E<sub>3</sub>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E<sub>3</sub>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。E<sub>3</sub>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E<sub>3</sub>細胞とは何か。受精卵は卵割を繰り返して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E<sub>3</sub>細胞である。E<sub>3</sub>細胞はマウスミマなどでよく「万能細胞」として紹介されているように、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、totipotencyという言葉も用いられている。このE<sub>3</sub>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ったのが、現在研究が進められている再生医療の1つの戦略であると思われる。

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なものであり、それぞれの分化能に応じてmultipotencyとかoligopotency、multipotency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E<sub>3</sub>細胞

実はE<sub>3</sub>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(embryonal carcinoma cell)E<sub>3</sub>細胞に多分化能があり、このE<sub>3</sub>細胞を胚盤胞に入れたら全身の臓器・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E<sub>3</sub>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た。

わねわれも32歳の男性の精巣にできた胎児性腫瘍からE<sub>3</sub>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

目的とところで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髓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程度の血液を採取し、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。それを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下で培養すると、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週間でも早く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の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。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強調しておきたい。

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。この細胞から軟骨をつくることを行っている。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、その際軟骨に特徴的なマーカーであるコラーゲン・タイプ2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、病院の外来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な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き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3αR(腫瘍壊死因子α)で処理して脂肪細胞への分化を阻害したり、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、骨髄の中に脂肪細胞ができるという造血機能が全くなくなり、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、脂肪細胞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えるのが、われわれの考えである。

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、これをもう少し別の細胞に分化させることができる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CCATC...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い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R(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で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

遺伝子に付くから、Berkowitz-Wetzelman症候群という小児科領域の病気の研究を行った。この病気の患者ではHCG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示した。

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ケラチンの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回割合でビクビクと動くことを観察していた。培養しはじめ

め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3mm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。マダラクトシゲイ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三分の一から前壁にかけてきれいに分布して植え付けられた。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、核が真ん中にあつ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

さいこの例として、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、必要があつ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たところ、移植すると骨になる細胞株がきた。これを突起を出すことがわかった。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。

# Trends in Molecular Biotechnology

## 多能性幹細胞としての間葉系幹細胞研究

竹田征治\* 梅澤明弘\*\*

### はじめに

近年、間葉系幹細胞が骨・軟骨・脂肪・靭帯・腱などの間葉系組織への多分化能と自己複製能を有することが明らかになり、組織の再生維持に重要な役割をになっている。さらに、MAPCs (Multitotent adult progenitor cells)<sup>1)</sup>という中胚葉系の幹細胞が骨髄から分離された。特筆すべきことは、MAPCはES細胞に匹敵する胚葉を超えた分化能と増殖能を有しており、有効な移植医療の細胞源として注目されている。

本稿では、現在までの間葉系幹細胞研究により明らかになった知見および、問題点について述べていきたい。

### 1. 骨髄間質細胞

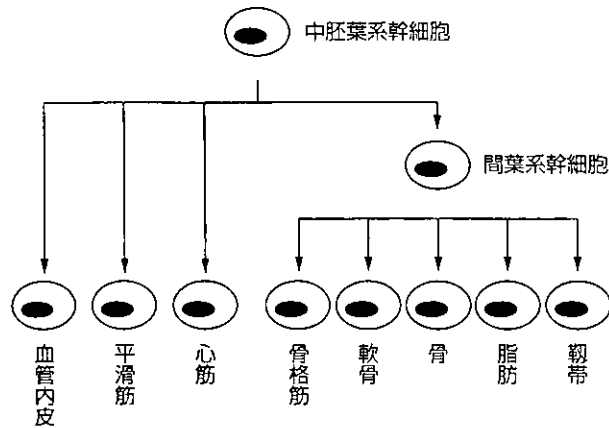
骨髄間質はさまざまな細胞により構成される組織であり、造血幹細胞の維持、赤血球、骨髄球、リンパ球の分化をコントロールする役割がある。骨髄間質細胞は採取した骨髄液を培養皿上で単層培養することで得られた接着細胞のことであり、現在までに培養技術が確立している<sup>2)</sup>。骨髄間質には多分化能を示す間葉系細胞があることがわかっていたが、

Pittingerら<sup>3)</sup>により、ヒト骨髄中に骨・軟骨・脂肪に分化する単一な細胞群が存在し、間葉系幹細胞の存在が示された。骨髄細胞は骨髄移植と同様の方法で採取できること、ES細胞と違い倫理的な問題がないこと、腫瘍化の心配がないこと、自己の細胞であるので移植時に免疫抑制剤の使用が不要であることなどから最も現実的な細胞源となり得る。現在、骨髄間葉系幹細胞は胚葉を超えた分化能を示すことが認められており、骨、軟骨、脂肪以外にも、骨格筋、心筋<sup>4)</sup>、神経<sup>5)</sup>、などにも分化しうることがわかっている。さらに、MAPCsとよばれる3胚葉すべての胚葉に分化しうる細胞も認められ、骨髄間葉系幹細胞の中にはES細胞に匹敵する能力をもつ細胞が存在する可能性が示された(図1)。

### 2. ヒト骨髄間質細胞

MAPCsという素晴らしい能力をもつ細胞の存在が報告されたにもかかわらず、通常そのような細胞を得ることはなかなか困難である。また、マウス細胞は継代中に自然に不死化する細胞を得ることができ、ヒトにおいては困難である。当研究室でも、ヒト骨髄から多分化能を有する間葉系幹細胞の単離に成功しているが、20継代程度でsenescenceに陥

\* TAKEDA Yukiji/国立成育医療センター生殖医療研究部, 慶応義塾大学病理学教室, 奈良県立医科大学第1内科学教室  
\*\* UMEZAWA Akihiro/国立成育医療センター生殖医療研究部



図① 骨髄間質細胞の階層性  
骨髄間質細胞は中胚葉系幹細胞を頂点に間葉系幹細胞・前駆細胞と層状構造を呈している。



図② 寿命延長ヒト骨髄間質細胞  
A. 細胞培養におけるヒト骨髄間質細胞  
B. ヒト寿命延長遺伝子を導入したヒト骨髄間質細胞 (E 6, E 7, TERT)  
Population doublings 80 を超えても線維芽細胞様の形態を維持している。

り、増殖を停止する。骨髄間葉系幹細胞を移植細胞に使用するにあたり、機能不全に陥った臓器を再生させるためには相当の細胞数が必要になる。そこで、細胞寿命を延長することで必要な細胞数を得ることが、細胞移植医療を進展させるためには必須条件になりうる。以前より、SV 40 T 抗原遺伝子を導入することで細胞を不死化させる研究がなされてきたが、遺伝子導入細胞の腫瘍化がたえず問題になってきた<sup>9)</sup>。そこで当研究室ではヒトパピローマウィルスの遺伝子である E 6, E 7, また TERT (Teromerase reverse transcriptase) 遺伝子をヒト骨髄間葉系幹細胞にレトロウィルスを用いて導入することで寿命延長することを試みた。得られた細胞は繊維芽細胞様の形態を維持しており、100 継代を超えても senescence に陥ることなく良好な増殖能を示した

(図②)。また、分化能も維持しており、継代を重ねた後においても脂肪・神経・骨格筋・心筋への分化能を有していた(図③)。さらに、現在まで多くの移植実験をおこなっているが SV 40 T 抗原で認められたような腫瘍形成は認めていない。この細胞は移植医療に新しい可能性を示すものである。

### 3. 体性幹細胞を用いた肺胞再生

肺胞上皮細胞の再生に関するさまざまな研究がなされているが、今までのところ肺胞細胞の幹細胞は発見されていない。最近、骨髄細胞を用いた肺胞再生が試みられており、マウス造血幹細胞が気道上皮細胞や肺胞上皮細胞に分化するという興味深い報告がなされた。この報告では驚くべきことに肺胞上皮細胞の 12% が移植細胞に置換されているという

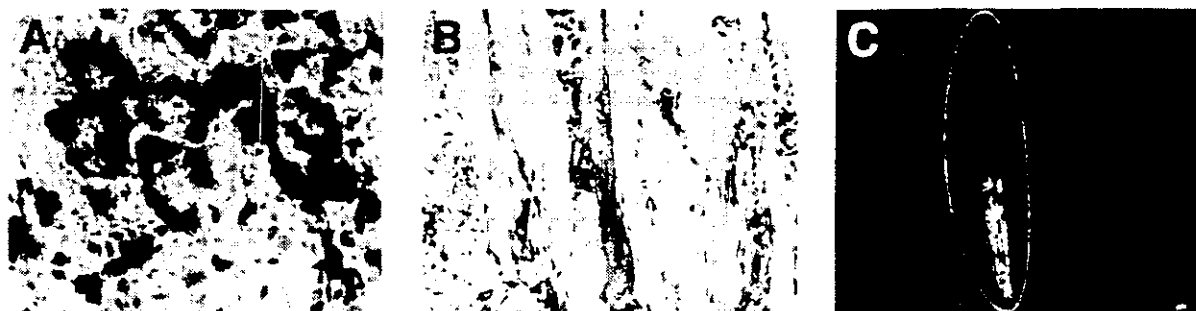


図3 骨髄間質細胞の多分化能  
 A. 脂肪分化 (oil red-O 染色)  
 B. 節分化 ビメンチン陽性のヒト由来骨髄間質細胞が筋管細胞構造を呈している。  
 C. 心筋細胞への分化 (枠内: GFP, 枠外: 心筋トロポニン I), GFP 陽性ヒト骨髄間質細胞が心筋細胞に分化している。

結果が得られた<sup>7)</sup>。さらに、骨髄間質細胞をプレオマイシンによる肺胞障害モデルマウスに静脈注射することで肺胞 I 型細胞に分化したという細胞も認められた<sup>8)</sup>。ヒトにおいては骨髄細胞から肺胞上皮細胞に分化したという報告はまだ認められていないが、MAPCs などでは内胚葉への分化も示されていることから、骨髄間葉系幹細胞が間質性肺炎や COPD などにおいても十分な移植細胞源となりうる可能性があると考えられる。

## おわりに

骨髄間葉系幹細胞は細胞移植医療において有効な細胞源であるが、現時点では、内胚葉系への分化能力はまだ完全なものではない。さらに、肺にはさまざまな細胞を再生する必要があり、複雑な肺胞構造を構築するという難しい問題も存在する。しかし、骨髄間葉系幹細胞は十分可能性を秘めた細胞であり、今後の研究が待たれるところである。

## 文 献

- 1) Jiang Y *et al* : Pulripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 20 : 1-9, 2002
- 2) Dexter TM *et al* : Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Phys* 82 : 461-470, 1997

- 3) Pittenger MF *et al* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 1461-1472, 1999
- 4) Makino S *et al* : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1999
- 5) Kohyama J *et al* : Brain from bone : efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68 : 235-244, 2001
- 6) Harigaya K *et al* : Generation of functional clonal cell lines from human bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 3477-3480, 1985
- 7) Krause DS *et al* : Multi-organ multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105 : 369-377, 2001
- 8) Kotton DN *et al* : Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 128 : 5181-5188, 2001

竹田 征治 : TAKEDA Yukiji

生年月日 : 昭和 48 年 2 月 6 日

生誕地 : 奈良県

専門 : 循環器

研究テーマ : 骨髄間葉系幹細胞

からの心筋再生

趣味 : 阪神タイガースの応援



### 3) 骨髄由来の多能性細胞

## 1. 骨髄間質による骨・軟骨形成

梅澤明弘

骨髄間質細胞は近年その多分化能が注目され、再生医療の重要な移植細胞として脚光を浴びている。実際、米国ならびに日本において骨髄間質細胞を一部の医療施設にて骨・軟骨欠損の治療薬として臨床試験が行われている。細胞移植における骨髄間質細胞のメリットとしては骨髄穿刺で容易に細胞採取が可能であり培養法が比較的簡易であるということ、自家細胞として移植の際拒絶反応が起きないことがあげられる。骨芽細胞および軟骨細胞と同様に、骨髄間質に由来する間葉系幹細胞は、骨・軟骨における再生医療の供給源となる。

#### はじめに

骨髄間質はさまざまな細胞により構成される組織であり、造血幹細胞の維持、分化をコントロールする働きが知られている<sup>1)2)</sup>。また、骨髄間質にはマクロファージや樹状細胞などの造血単核細胞、骨芽細胞や脂肪前駆細胞などの間葉系細胞、血管前駆細胞などが存在している。骨髄を採取し単層培養を行うとコロニーを形成する線維芽細胞が出現する。この細胞こそ、試験管内における骨髄間質細胞といわれる細胞である。この細胞の中に自己複製能と複数の間葉系細胞へと分化する多分化能を有する幹細胞が存在している。間葉系細胞とは骨、軟骨、脂肪、骨格筋、真皮、靭帯、腱といった結合組織細胞を総称しており、発生学的に沿軸中胚葉 (paraxial mesoderm) 由来の細胞である。1999年、ヒト骨髄間質細胞から骨、軟骨、脂肪に分化する多分化能を有する間葉系幹細胞を同定したという報告をPittengerらが行った<sup>3)</sup>。また、この沿軸中胚葉の他に、心筋、平滑筋、血管内皮といった発生学

的に臓側中胚葉 (visceral mesoderm) 由来の細胞があり、骨髄間質細胞のなかに臓側中胚葉にも分化できる幹細胞が見出された。Verfaillieらのグループは骨、軟骨、脂肪、骨格筋、血管内皮細胞に分化する中胚葉に由来する幹細胞の存在を提唱している<sup>4)5)</sup>。

現在のところ骨髄間質細胞においては、中胚葉系幹細胞が一番未熟な多分化能・自己増殖能を有する幹細胞でありその次に間葉系幹細胞、前駆細胞と階層構造を形成しているものと考えられている<sup>1)2)</sup>。さらに、細胞形態が小さく多分化能、増殖能を長期継代にて維持するRS (recycling stem) 細胞の存在をProckopらのグループは示している<sup>6)</sup>。

しかし実際、骨髄間質細胞の多くは20継代から多くて40継代程度の増殖能力をもつものの、継代を重ねるにつれ増殖能、分化能の低下を認め細胞死 (senescence) を迎える<sup>7)</sup>。骨髄間質細胞を採取し実験系に用いる場合、多分化能を有した状態を保ちかつ細胞数を確保する点で難渋し、再現性のある結果が得られにくい。それに対し、細胞株は、単一細胞由来で細胞数を十分確保でき、実験系に用いるに有用であることは言うまでもない。われわれはC3H/Heマウスから、KUSA/A1, KUSA/O, KUM2, KUM9といったマウ

[キーワード]

骨髄間質, 骨, 軟骨, 細胞転換, 分化, 細胞移植

Osteogenesis and chondrogenesis by marrow stromal cells

Akihiro Umezawa : National Research Institute for Child Health and Development, Department of Reproductive Biology and Pathology (国立成育医療センター研究所生殖医療研究部) E-mail : umezawa@1985.jukuin.keio.ac.jp



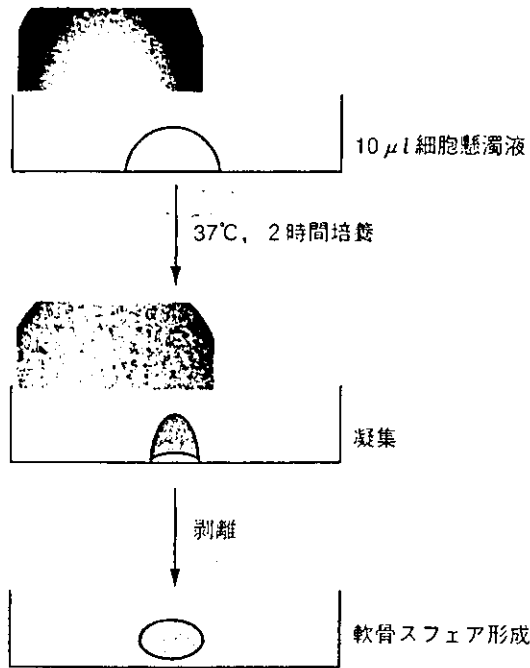
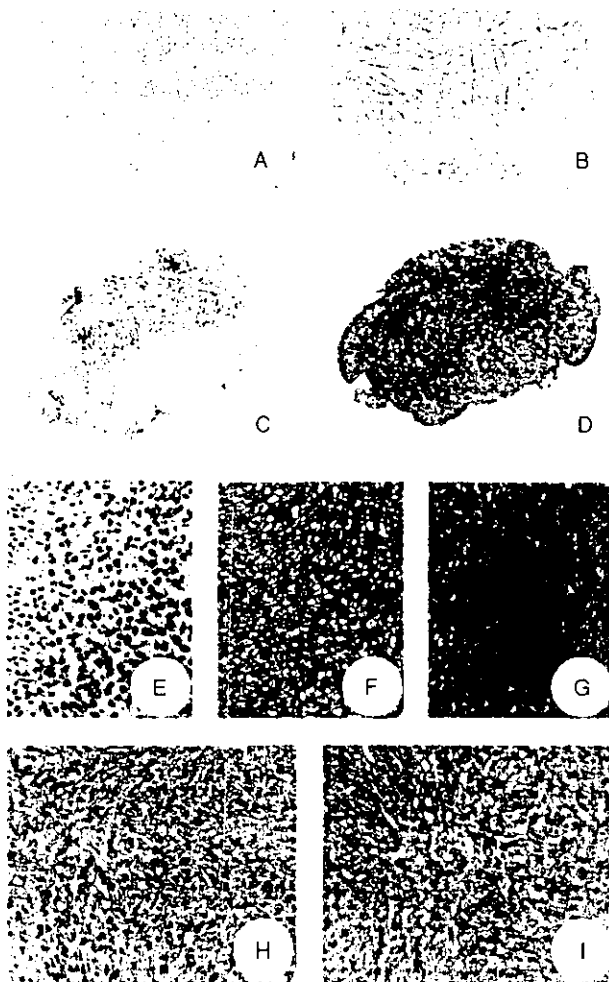


図1 骨髄間質による軟骨形成プロトコール  
骨髄間質細胞を凝集させ、細胞密度を高くし、最終的に軟骨スフェアを形成させることが大事となる



ス骨髄間質細胞株の樹立に成功している<sup>8)9)</sup>。

## ■ ヒト骨髄間質細胞による軟骨への分化

軟骨より単離した軟骨細胞が軟骨を形成できるように、骨髄間質から単離した間葉系細胞は軟骨への分化を示す(図1)。凝集を起こさせ、細胞密度をあげることが軟骨への分化のポイントとなる<sup>10)</sup>。細胞を遠心することにより細胞密度を上昇させるペレット法と同様に、軟骨スフェア法も軟骨細胞への分化に有効である。細胞密度をあげる点は全く同様である。細胞密度をあげるために凝集をさせ、スフェアを形成させる。TGF-βがここで必要な細胞もある。また、細胞の継代を重ねるうちに凝集が生じなくなることもある。

試験管内でできあがる軟骨スフェアで最も特徴的なことは、なんら足場を用いていないにもかかわらず、大量の基質を産生することである(図2)。大量の基質を産生することで細胞自体はその基質の中に埋め込まれたようになる。細胞の形態は丸くなり、軟骨における特徴の一つであるトルイジンブルー(toluidine blue)染色で異染性を示すようになる。異染性とは、本来、青く染色されるものが、軟骨基質の硫酸基により吸光度が変化し、赤く見えることである。また、これらの細胞には軟骨特異的な遺伝子であるアグリカン、Ⅱ型コラーゲンの発現を認める。少なくとも骨髄間質細胞を用いた場合は、紡錘形の形態を示すペレット法に比べると軟骨スフェア法の方が軟骨細胞らしい丸い形態を示すようになる。

## 図2 寿命を延長させたヒト骨髄間質細胞による軟骨形成

寿命を延長させたヒト骨髄間質細胞の形態(A:低倍、B:高倍)。図1で示した軟骨スフェア法による試験管内における軟骨形成(C:低倍のH.E.染色、D:低倍のアルシアンブルー(alcian blue)染色、E:高倍のH.E.染色、F:高倍のアルシアンブルー染色、G:高倍のトルイジンブルー染色)。ペレット法による試験管内における軟骨形成(H:低倍のH.E.染色、I:アルシアンブルー染色)。軟骨スフェア法ならびにペレット法いずれにおいても、アルシアンブルー陽性の基質を多く産生する。軟骨スフェア法によって生じた軟骨では細胞が丸くなり、基質が豊富であり、その基質はトルイジンブルー染色で異染性を示す。

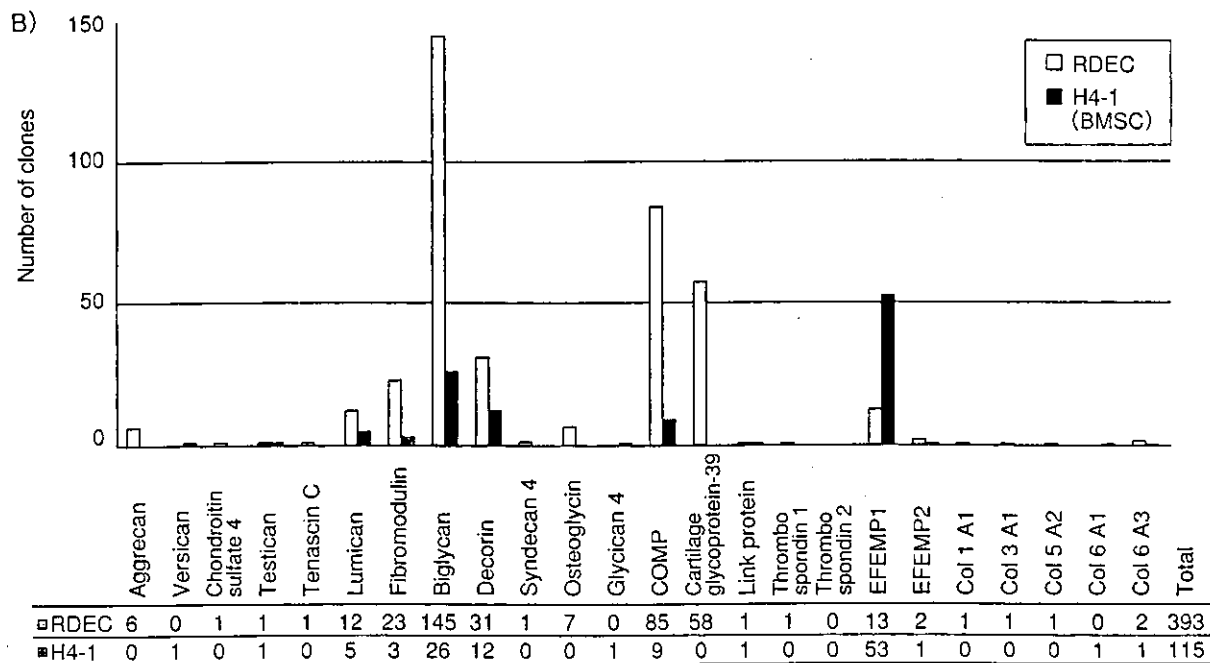
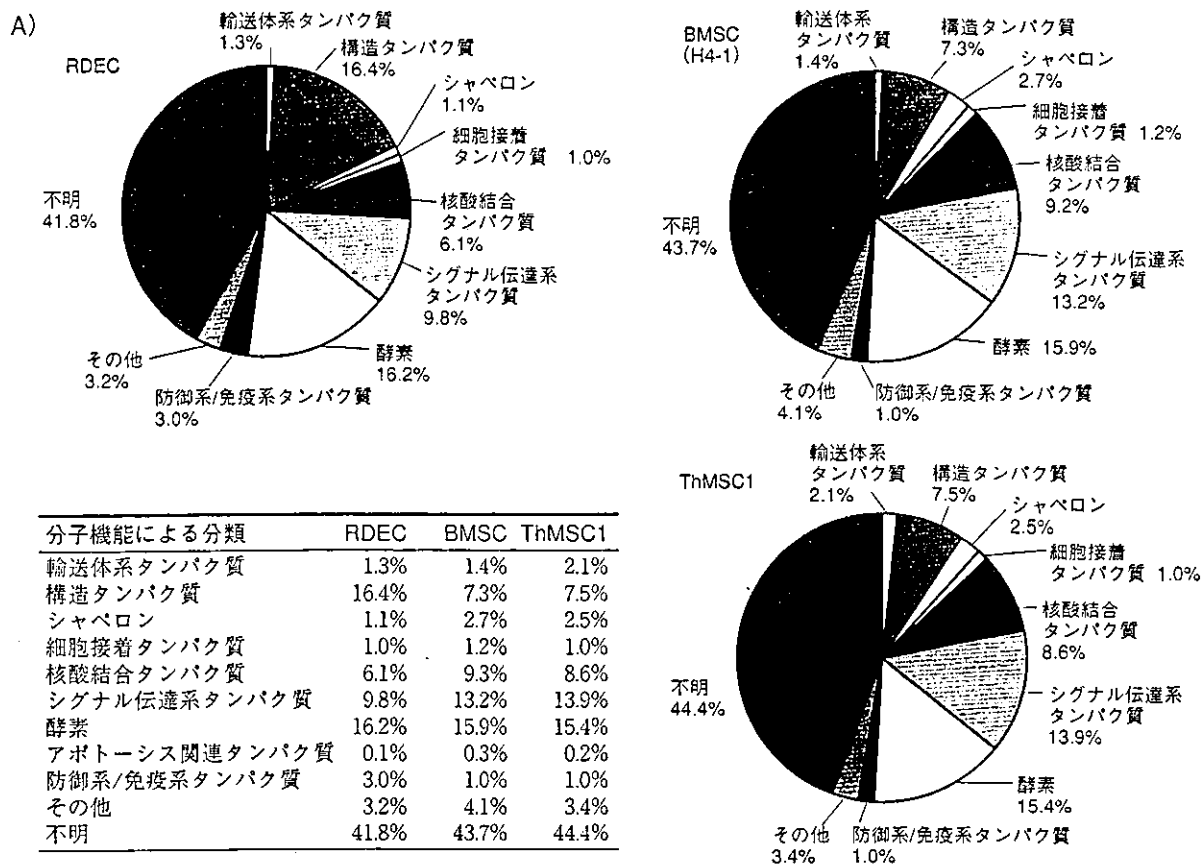


図3 ヒト細胞の遺伝子発現プロファイリング

A) ヘリックス研究所・杉山友康博士によって行われたランダム塩基配列解析の結果である。RDECは脱分化したヒト軟骨細胞を再分化させた後のプロファイルであり、BMSC (H4-1) はヒト骨髄間質細胞、ThMSC1は寿命を延長させたヒト骨髄間質細胞のプロファイルである。一見して、軟骨細胞 (RDEC) では基質となる構造タンパク質をコードする遺伝子の発現が高い。B) 軟骨細胞 (RDEC) とヒト間質細胞 (H4-1: BMSC) が発現する基質遺伝子のレベルを表わす。軟骨細胞に特異的な基質となる遺伝子の発現に差があるのが、明らかである

## 2 ヒト細胞の遺伝子発現プロファイル

ヒト細胞の遺伝子発現プロファイルは、その細胞の性格を知るうえできわめて貴重な情報となる。発現プロファイルを検討する場合に、DNAチップやアレイを用いることが多いがここではランダム塩基配列法による発現レベルの解析を行った(図3A)。ランダム塩基配列法は、作製したcDNAライブラリーにおける、それぞれのクローンの数から発現レベルを決定するものである。DNAアレイやDNAチップと比較すると、高価で手間もかかり解析も面倒であり感度も低い。逆に利点は、その発現量が正確にわかり、発現していることに関しては間違いがない。この利点は、細胞移植や分化の研究をするうえで大きい。SAGE法と同様であるが、このランダム塩基配列法の方が確実である。一度、できあがったデータベースは宝であり、実験するうえでの辞書がわりとなっている。例えば、フローサイトメトリーで検索する骨髄間質細胞の表面マーカーの結果と、ランダム塩基配列決定法によるプロファイリングは全く同じ結果となる(表)。

もちろん、正確度はフローサイトメトリーが優れるが、抗体のないものから新規のものまですべての表面抗原の発現量が感度は低いが確実に予想できる点が良い。すなわち、サイトカイン、構造タンパク質、酵素、細胞接着、転写因子、アポトーシス関連、シャペロンといった遺伝子の発現量がある程度の正確さで予想できる。発現において、このランダム塩基配列法では、発現における偽陽性はない。感度が低いために偽陰性は多い。軟骨に特異的に発現する基質遺伝子の発現量(実際にはクローン数)を見てみると、予想通りに軟骨細胞では多くの軟骨特異的な遺伝子の発現をみることができる。意外な結果がでている場合は、ノーザン解析法や定量的RT-PCRで確認すればよい。実はアレイも同様に行っているが、偽陽性が多い、すなわち発現していないのにシグナルとして出ているように見えることが多く、発現の辞書として利用するには不便である。

## 3 ヒト骨髄間質細胞の寿命延長

ヒト骨髄間質細胞はマウス骨髄間質細胞と異なり不死化細胞の自然発生はまず認められない<sup>7)</sup>。そこでヒトパピローウイルスのE6およびE7遺伝子を導入し、

寿命を延長させる<sup>11)</sup>。これらの遺伝子では、細胞の分化能力は保持され、移植しても腫瘍を形成しない、すなわち形質転換はない。しかし、染色体異常を引き起こし、細胞の継代を重ねた場合には形質転換する可能性は否定できない。寿命延長を目的に、テロメアの延長を図るテロメラーゼ(hTERT)遺伝子、細胞周期に関連するBmi遺伝子などいくつかの遺伝子を導入しヒト骨髄間質細胞の寿命延長を行っている。その細胞の1つであるUBET7は、脂肪、神経、骨格筋への分化能力を保持し細胞形態も比較的正常に近いものであった。現在腫瘍化の有無の確認を行っており、ヒト骨髄間質細胞の細胞数確保として有効な手段と考えている。将来的には、前述した発現のデータベースを公開したうえで、寿命を延長させた骨髄間質細胞を公共の細胞バンクなどに供与したい。

## 4 骨再生システムの供給源としての骨髄間質細胞

発生過程において、骨形成は全く異なる2つの経路をとる。頭蓋骨、下顎を除き、骨格を形成する骨は前もって軟骨によって形づくられる。その後には血管の侵入に伴い、軟骨細胞はアポトーシスに陥り、骨芽細胞に置き換わる。この過程は内軟骨性骨化といわれる。

表 ヒト骨髄間質細胞と脱分化したヒト軟骨細胞の表面マーカーの違い

マーカー	H4-1	H3-4	RDEC
CD14	-	-	+
CD29	+	++	++
CD34	-	++	-
CD44	++	++	++
CD45	-	-	-
CD105	+	++	++
CD144	-	-	-
CD31	-	-	-
CD50	-	-	-
CD117	-	-	-
CD104a	-	+	+
CD90	+	++	++
CD106	+	+	+
CD166	++	++	++

ヒト骨髄間質細胞であるH3-4細胞は、CD34マーカーが陽性となっている。このフローサイトメトリーによる結果は、ランダム塩基配列の結果と完全に一致している。ゆえにランダム塩基配列の結果からすべての表面マーカーを予想することが可能である。マーカーの発現強度はコントロールとの対比の概算である。++：強陽性(コントロールの10倍以上の発現量)、+：弱陽性、-：陰性(コントロールの2倍以下の発現量)

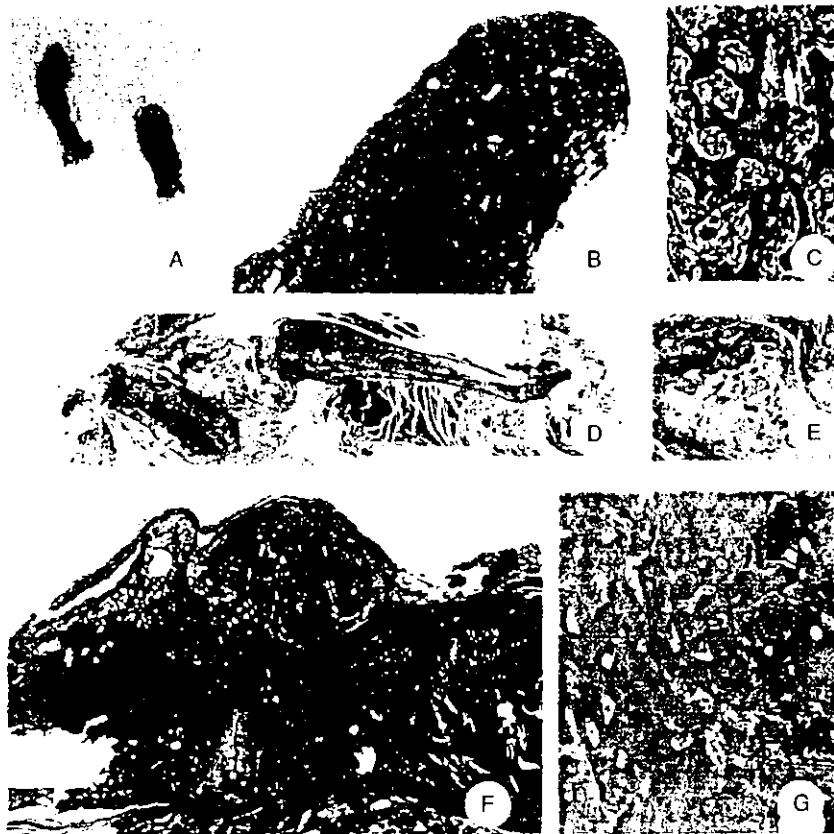


図4 マウス骨髄間質細胞による骨形成

コラーゲン・ゲルの中に間質細胞を入れ、骨形成を図った (A:肉眼所見, B:低倍, C:高倍)。骨梁がきわめて豊富であることがみてとれる。できあがった骨組織をマウス難治骨折モデル (D:低倍, E:肉芽のところの高倍) に対し、移植すると4週間でみごとな骨癒合ができる (F:低倍, G:癒合部の高倍)。間質細胞によって作製された骨梁が、宿主の骨に比較して密であることがわかる。

一方、頭蓋骨や下顎骨では、軟骨形成を経ることなく、直接に骨芽細胞が骨を形成し、この過程は膜性骨化と呼ぶ。

骨髄由来の間質細胞を集めることによってこの骨発生を模倣する再生の過程を促進し、細胞治療ならびに臓器再生のソースとすることが検討されている。骨髄間質細胞は、骨の中に存在するので、そこにもともとある組織または分化形質を示す。分化形質として、骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞が知られている。単一細胞のマーキングにより、1つの細胞が分裂し異なる分化形質を示すことより、多分化能を有する細胞であることがわかる。このような多分化能は、分裂を繰り返してもまた不死化しても保持されることは、特記すべきことである。

もともとの骨髄間質細胞の性質として、脂肪細胞への分化、軟骨への分化、骨芽細胞への分化は本来備わっている分化能と考えられる。そのうち、骨芽細胞への分化能については最も多くの研究がなされている<sup>12)</sup>。骨髄間質から単離した骨芽細胞は生体内において、効率的に骨を形成する (図4)。骨形成は再現性が高く、すべての注入部位で骨を形成する。同細胞の骨細胞と

しての特徴は際だっており、報告されている骨芽細胞とは本質的に異なる細胞である。驚くべきことに、骨を生体内で形成し、ある大きさをもった骨梁からなる骨組織をつくるにもかかわらず、その周辺に肉腫などの腫瘍を形成しない。その事実、骨芽細胞がすべての細胞製剤を考えるうえでの貴重なモデルとなることを意味する。

## 5 難治性骨折・骨欠損に対する骨再生の挑戦

Osiris社も骨修復を促すために、欠損している部に間葉系幹細胞を直接、移植している (<http://www.osiristx.com/>)。これらの研究は、ラット、ウサギ、イヌで行われ、今日ではヒトに対して間葉系幹細胞を用いた研究が集中して進められている。その際に細胞だけを注入するだけでなく、同時に足場 (scaffold) をおき、その中に骨芽細胞を植え、骨を形成させている<sup>13)</sup>。足場には、コラーゲン・ゲルから始まり、穴のあいたカルシウムを含んだセラミック、ハイドロキシ・アパタイトなどが利用されている。われわれは、整形性、生分解性、細胞との親和性といった観点から、PLGA (poly DL-lactic-co-glycolic acid) コラーゲンハイブ

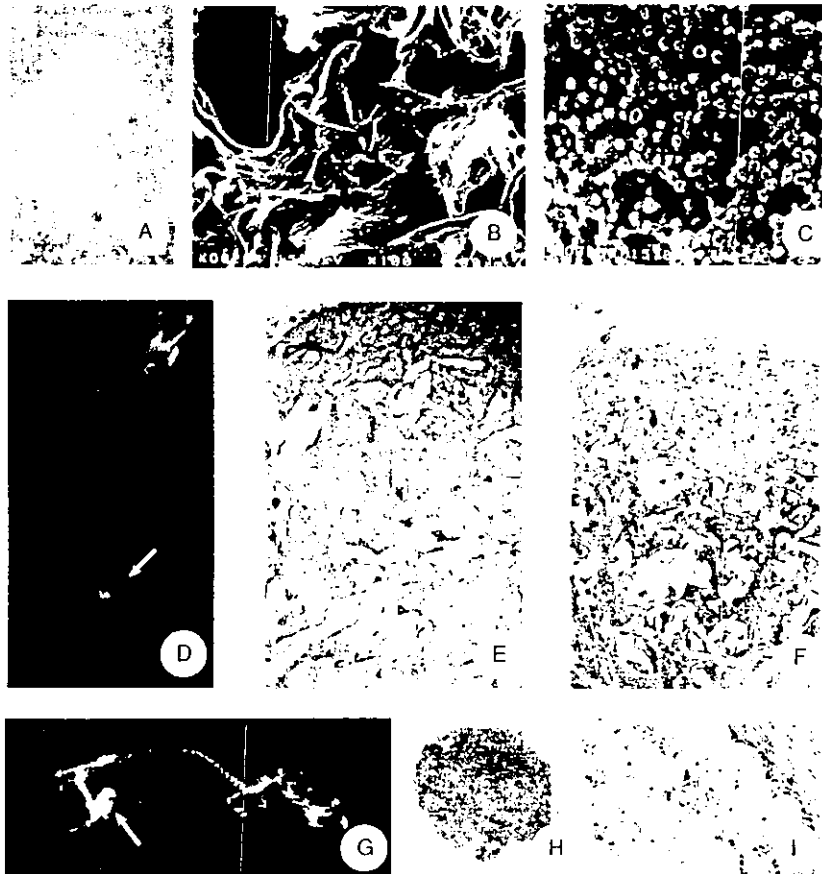


図5 骨髄間質細胞による、目的の形状をもつ骨形成

コラーゲン・ゲルで作製された骨組織の形は、コラーゲン・ゲルが軟らかいためその形状はさまざまであり、いびつである(図4参照)。そのため、骨髄間質細胞による骨形成は、適切な形状ならびに材料による足場が必要となる。適切な足場が多く存在するなかで、ここではPLGAを利用する(A:肉眼所見、B:位相差顕微鏡写真、C:細胞を入れたところの位相差顕微鏡写真)。スポンジ状にし、100 μmの穴が存在するスポンジの中に細胞を注入する。骨髄間質細胞を注入するとスポンジと同じ形状の骨が形成される(DとG:マウス内にできた骨のエクソ線写真、EとHとI:骨形成の顕微鏡像)。細胞を注入せずに、スポンジだけを移植するとPLGAに対する異物反応のみが認められる(F)

リッド・スポンジを用いている(図5)。

一番の臨床における問題は、骨髄間質細胞による骨形成の時間的な遅れである。現在のプロトコルでは、治療を受けたいと思っている患者さんから骨芽細胞を単離してきて、それを一回培養することで増殖させ、患者さんに移植することで戻すという手順をとるが、これらは治療の開始を意味する細胞移植まで数週間を要する。緊急時では、全く通用しないばかりか、プロトコルが培養を介するためにかかる費用もばかにできない。これらを解決するために、自家移植ではなく他家移植も検討されている。使用する間葉系細胞が免疫細胞に認識されず、拒絶が生じないようにしておけば、あらかじめ細胞を凍結して保持しておき、整形外科医が欲しいときに欲しいだけの細胞を使用できるという作戦である。

## ⑥ 胚葉を超えた間葉系幹細胞の可塑性

中胚葉という枠組みを超え、骨髄間質細胞のKUM2、KUM9、KUSA AIにおいて外胚葉系の組織である神経への分化を認めている。脱メチル化剤である5アザ

シチジン、BMPアンタゴニストであるNogginを投与することにより骨髄間質細胞からニューロンへの分化が認められている<sup>31)</sup>。また、骨髄由来の間葉系幹細胞は生殖系以外の造血細胞、肝、肺、腸管上皮細胞といった外胚葉・内胚葉に分化可能であることを示している<sup>32)</sup>。このことは、まさに骨髄間質細胞のなかに生殖系以外の分化能を有するものとしてES細胞に相当する分化能をもつ細胞が存在することを意味している。ただしこの発生学とは異なる現象の実態は明らかでない。培養過程で脱分化という現象が生じ多分化幹細胞が誘導される可能性、分化転換により異なる系列の細胞へ分化している可能性などが考えられるものの確固たる証明はなされていない<sup>33)</sup>。

## おわりに

臨床的な骨移植の最初の記載は、1682年のMeekrenに始まるとされる。その後自家骨移植は19世紀前半より盛んに行われるようになった。また同種骨移植は1912年のInclanにより始められている。しかし自家骨移植では骨の大欠損への対応の問題、また同種骨移

植では移植骨に対する抗原性や病原性、骨の生着率の問題などが残されている。このように骨移植は未だ解決されない、古くて新しい問題を抱えている。われわれは移植細胞の培養条件、継代数、移植細胞数および細胞密度、移植部位といったさまざまなことを考慮しなければならない。多分化能をもつ細胞であるだけに目的とした組織以外の分化をすることに注意せねばならず、他方向への分化が決まった前駆細胞を含まないよう幹細胞を純化する培養法、細胞採取法を開発することも必要となってくる。また、実際移植細胞を選択するほど細胞の確保が困難になると予想される。さらに長期継代した細胞は増殖能、分化能が低下することがわかっている。その解決のため、形質転換を生じさせず、分化能を維持した形での寿命を延ばす方法の開発が望まれる。

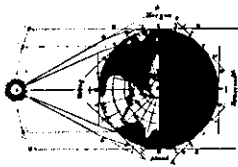
今林英明先生（指導：戸山芳昭教授）との議論は、この総説の元となっています。発想の元となった細胞は、丸山達也博士、草刈 悟氏、阿部 仁氏により樹立され、クローニングされたものです。

## 文献

- 1) 桜田一洋, 梅澤明弘: わかる実験医学シリーズ【再生医学がわかる】(横田 崇/編), pp84-92, 羊土社, 東京 2002
- 2) 梅澤明弘: 実験医学, 19: 151-158, 2001
- 3) Pittenger, M. F. et al.: Science, 284: 143-147, 1999
- 4) Reyes, M. et al.: Blood, 98: 2615-2625, 2001
- 5) Jiang, Y. et al.: Nature, 418: 41-49, 2002
- 6) Colter D. C. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 7841-7845, 2001
- 7) 梅澤明弘: わかる実験医学シリーズ【老化研究がわかる】(井出利憲/編), pp114-120, 羊土社, 東京, 2002
- 8) Kohyama, J. et al.: Differentiation, 68: 235-244, 2001
- 9) Gojo, S. et al.: Exp. Cell. Res., in press, 2003
- 10) Imabayashi, H. et al.: Exp. Cell. Res., in press, 2003
- 11) Kiyono, T. et al.: Nature, 396: 84-88, 1998
- 12) 梅澤明弘: 実験医学, 20: 2206-2211, 2002
- 13) Ochi, K. et al.: J. Cell. Physiol., 194: 45-53, 2003

## <著者プロフィール>

梅澤明弘: 1985年慶應義塾大学医学部卒業, '89年慶應義塾大学医学部病理学教室助手, '91年米国カリフォルニア大学サンディエゴ校内科学教室, '92年米国バーナム研究所, '99年慶應義塾大学医学部助教授(病理学), 2002年国立成育医療センター研究所部長(生殖医療研究部). (URL: <http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/HTML>). 骨髄間質細胞の分化の研究から始まり, メチル化・クロマチン構造の改変の研究, そしてヒト胎児性癌細胞の多分化能に関する研究に進み, 研究テーマは一貫して「細胞の全能性と部分全能性」の問題に関することである. 間葉系細胞の予想以上の可塑性に驚いている. 生殖細胞, 体細胞を用いて, 生殖医療の世界に貢献したい.



# 間葉系幹細胞による臓器再生

その表面マーカーに着目する

梅澤明弘

再生医療・細胞移植の基礎となる「幹細胞の可塑性」については10年以上前から知られていた。そこで使用された胎児性幹細胞や様々なレベルの組織幹細胞は、発生の過程を試験管内で再現できるため、さわめて重要な位置を占め、発生に関わる分子機構の解明に多大な貢献をし、サイエンスを押し進める上で確固たる地位を得た。その中でも、間葉系幹細胞は再生医療分野で最も現実的な細胞の一つとして考えられている。社会的認知を受けるために必要な手続きのステップを一つ一つ踏み、祝福される形で「間葉系幹細胞」を世に送り出したい。

ヒトの身体は60兆の細胞の集合体である。もとはたった1つの受精卵が、分化・増殖を繰り返し身体を構成している。この仕組みやプロセスを解明できれば、病気やけがで失われた組織や器官を、部分的ではあるにせよ、元通りに修復することも不可能ではない。その供給源の一つとして間葉系幹細胞があり、これを人体に細胞移植することが考えられる。

間葉系幹細胞は、骨、脂肪、軟骨、骨格筋、心筋、神経を、生体内および試験管内でつくる。ヒトの間葉系

幹細胞に関する研究も進み、近年では分化形質や機能を喪失させることなく生体外で増やすことが可能となった<sup>(1-3)</sup>。この生体外で増殖させた間葉系幹細胞は様々な治療に試みられており、その効果が検証されつつある<sup>(4)</sup>。

たとえば、骨髄には血液細胞と間質細胞の2種類の細胞があり、間質細胞は網様のネットワーク構造で存在する。この細胞をもとにして、成体への移植の可能性を探る研究が始まりつつあり、少しずつ現実味を帯びてきたといったところである。間質細胞は結合組織や軟骨、骨などをつくる間充織の一種で、間葉系幹細胞としての性格をもつものが存在することが明らかになっている。骨髄間質由来の間葉系幹細胞に関する研究は、齧歯類のみならず、ヒトにおいて同定された間葉系幹細胞によっても行なわれつつある。本稿では、間葉系幹細胞を規定する表面マーカーなどの特徴的な分子に注目することで、脂肪組織、皮膚真皮などの臓器に存在する間葉系幹細胞を単離する方法について考えてみたい。ここで紹介するアプローチは、従来血液幹細胞や免疫細胞に対して研究されてきたものだが、同様に間葉系幹細胞、神経幹細胞を含む種々の成体臓器幹細胞や胎児性幹細胞、胎児性胚細胞に対しても用いられ、成功を取っている<sup>(5-7)</sup>。

Mesenchymal Stem Cells

Akihiro UMEZAWA, 慶應義塾大学医学部

## 間葉系幹細胞の取得、増殖そして分化

間葉系幹細胞を取得するための供給源としては、間葉系細胞が存在するすべての組織ならびに臓器が考えられる。どんな組織にも間葉系細胞は存在し、間葉系細胞が存在すれば、その中にある割合で間葉系幹細胞が含まれていると思つてよい。骨髄のみならず、骨格筋、心筋、皮下組織、肺、肝臓、結合組織、乳房、腎といったすべての組織に間葉系幹細胞は存在する。しかし、その分化能や含まれる割合については不明である。また、再生医療を考える上で、どの組織から間葉系幹細胞を取得するかについては、取得の際の痛みがどの程度かとか、取得後の培養方法が簡便かなどの比較的現実的な条件が優先されるため組織選択に制約が生じる。その中で脂肪組織は現代では美容上の理由から必要とされないことから、脂肪組織由来の間葉系幹細胞を単離し、その表面マーカーを明らかにした研究成果に、世界中のマスコミが飛びついたこともある(表1)。

間葉系細胞に対し分化誘導を行なった場合、現在ある割合でしか分化誘導ができない。たとえば、最も良い条件にしたとしても間葉系細胞から約30%の細胞しか心筋細胞を形成することができない。心筋細胞のみを取り出し、それらを細胞治療の「薬」として使用するためには、ある程度の純度をもった細胞が必要である。

間葉系細胞から心筋細胞と脂肪細胞へと分化した場合、この間葉系細胞が心筋細胞と脂肪細胞の前駆細胞の混合物なのか、1つの間葉系細胞が心筋と脂肪細胞の両方に分化する能力を有するのか科学的には明らかではない。心臓の再生治療を行なうには、幹細胞から心筋細胞への分化を特異的にコントロールする必要がある。この課題を解決するために1つの細胞をマークし、間葉系細胞が心筋細胞と脂肪細胞の混合物か、多分化能幹細胞なのかを区別している。心筋細胞と脂肪細胞の混合物であ

### 用語解説

**間葉系細胞と間葉系幹細胞：** 間葉系細胞は、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血から採取できる。より正確に言えば、あらゆる組織で初期培養を行えば、間葉系細胞が培養されてくる。これは最も適切な条件で、多くの培養装置ならびに培地、血清が選択されているからにほかならない。特に、通常の培養皿の底にコートされているマトリックス上では間葉系細胞がよく増殖する。この間葉系細胞の中には、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などの多分化能を有する間葉系幹細胞が存在する。この間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞とともに、再生医療という治療戦略において重要な一翼を担うと考えられている。

表1 ■ 脂肪組織に認められる間葉系細胞の表面抗原(フローサイトメトリーによる解析)

抗原	別名	分類・機能	発現
HLA-ABC	クラス I		陽性
HLA-DR	クラス II		陰性
CD9	テトラスパン	接着	陰性 (一部陽性)
CD10	CALLA	メタロプロテイナーゼ	陽性
CD11a	インテグリン $\alpha$ L/LFA-1	インテグリン	陰性
CD11b	インテグリン $\alpha$ M/Mac-1	インテグリン	陰性
CD11c	インテグリン $\alpha$ X	インテグリン	陰性
CD13	アミノペプチダーゼ N	メタロプロテイナーゼ	陰性
CD14		血液関連	陰性
CD18	インテグリン $\beta$ 2	インテグリン	陰性
CD29	インテグリン $\beta$ 1	インテグリン	陽性
CD31	PECAM-1	受容体	陰性
CD34		血液関連	陰性 (一部陽性)
CD44	Pgp-1(ヒアルロン酸)	受容体	半陽性
CD45	LCA	血液関連	陰性
CD49d	インテグリン $\alpha$ 4	インテグリン	陰性
CD49e	インテグリン $\alpha$ 5	インテグリン	陰性
CD50	ICAM-3	受容体	陰性
CD54	ICAM-1	受容体	半陽性
CD55	DAF		半陽性
CD56	NCAM	受容体	陰性
CD59	complement protection		陽性
CD62e	E-セレクトイン	受容体	陰性
CD105	endoglin	受容体	陰性 (一部陽性)
CD166	ALCAM	受容体	陰性 (一部陽性)

ることが明らかになれば、「混合物から均一物を分離する」作業が必要となる(図1)。一方、多分化能幹細胞であることが示された場合には、オシリス社のような米国のベンチャー企業が報告している多能性幹細胞と表面マーカーで異なる点はないのか、表面マーカーが異なるならば分化能との間に関連はないのかどうかは重要な点である(図2)<sup>6)</sup>。また、液性因子やマトリックスの添加により、心筋細胞の割合を増加させることができるかどうかをもきわめて興味深い。

### 間葉系細胞を規定する分子

血球系のように幹細胞を同定する方法がない間葉系では、間葉系のある細胞群に幹細胞という用語を使うことは不適切であり、現在のところ、いかなる細胞群であろうと、多分化能を有する間葉系細胞と呼ぶほうが正確である。しかし、間葉系幹細胞の存在は強く示唆されており、本稿でも間葉系幹細胞という用語を概念的に用いることとする。

筆者らは、マウス骨髄の付着系細胞よりいくつかの



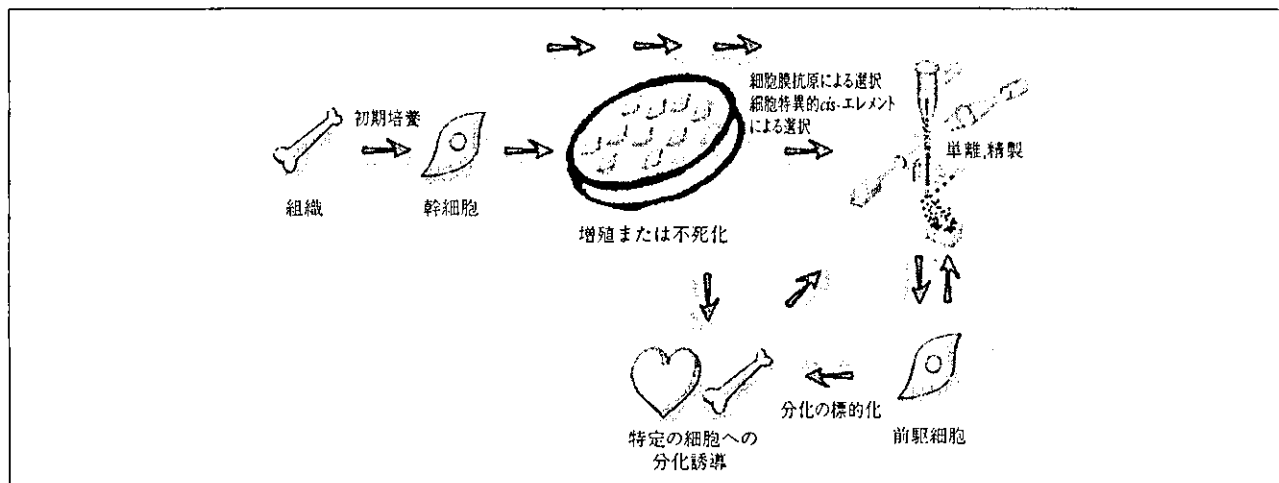


図 1 ■ 骨髓初期培養により間葉系幹細胞を得て、その後目的の形質を有した細胞を得るまで

骨髓由来細胞中から初期培養によって間葉系幹細胞を単離する。その細胞を増殖させることにより一定の細胞数を得る。細胞表面マーカーによる選択、または細胞特異的な転写調節領域による選択を行ない、目的の細胞またはその前駆細胞を得る。さらに、液性因子を処理するか、適切なマトリックス上で培養することで、特定の細胞へ分化誘導する。

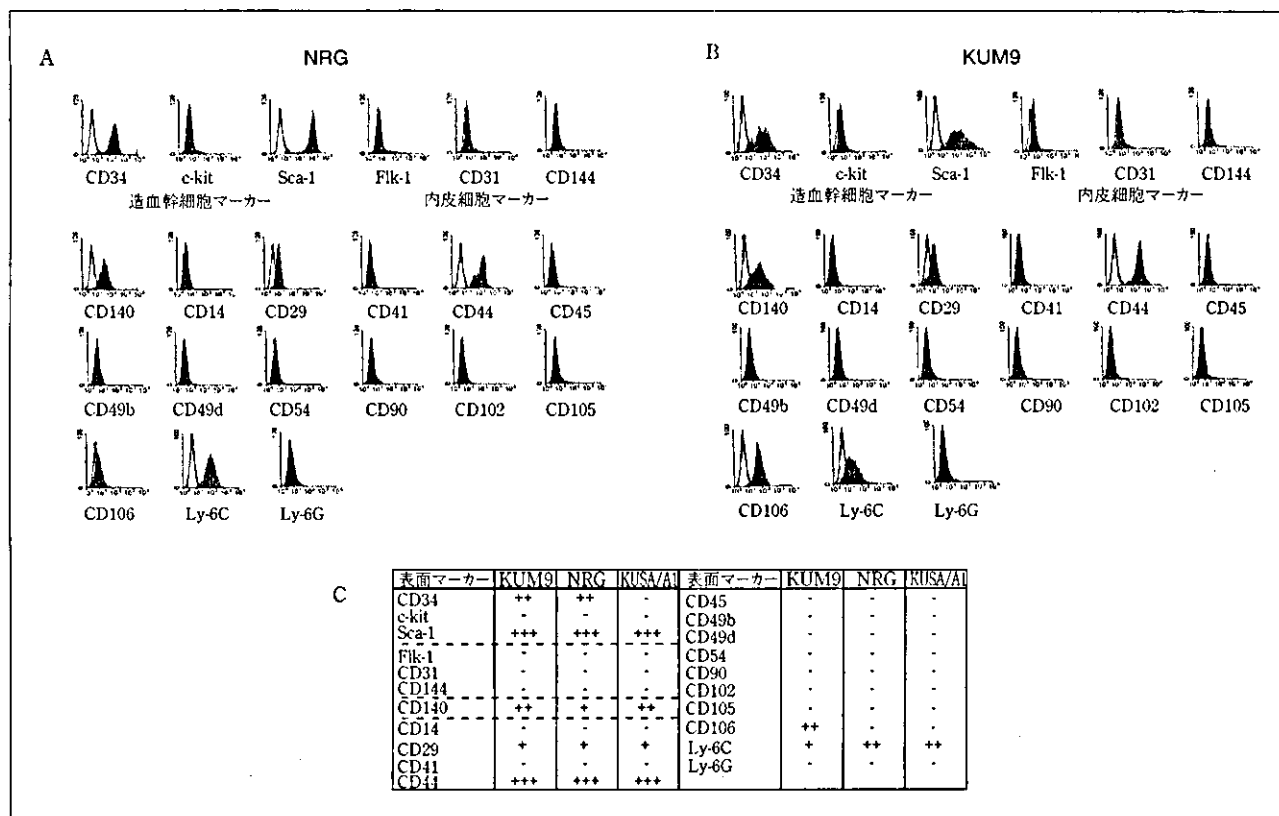


図 2 ■ 間葉系幹細胞、前駆細胞、骨芽細胞の表面マーカー

細胞系譜に従ったマーカー(A, B)とそのまとめ(C)。NRGはoligo-potentialな前駆細胞、KUM9はmulti-potentialな前駆細胞であり、KUSA/A1は骨芽細胞である。

特異な細胞株を単離した<sup>(6)</sup>。そのうちの1つ、培養条件下で骨・脂肪・骨格筋・心筋細胞に分化し得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。したがって、自己複製能を有する幹細胞もしくはそれに近い細胞だといえる。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、KUM2と同様に継代を続けても未分化な状態であることには変わりがなかった。骨・脂肪細胞にしか分化しなくなった2種類 (KUSA/O, NRG) の細胞を得たが、その表現型は異なっており、*in vivo* に置いたときには分化形質に違いが生じてくる可能性があると考えている(図2)。骨細胞および脂肪細胞にしか分化しなくなった未分化な細胞 (KUSA/A1 および KUM5A11E1) は、それぞれの細胞に運命づけられた前駆細胞と考えている。FACS を用いて表面抗原を検討した結果から、*c-kit*<sup>+</sup>, *CD34*<sup>+</sup>, *CD140*<sup>+</sup> が、多分化能を有する間葉系細胞と、分化を進めている細胞(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良いマーカーになると考えている。

*CD34*<sup>+</sup>, *CD38*<sup>-</sup>, *HLA*<sup>-</sup>, *DR*<sup>-</sup> の表面マーカーを有する胎児性幹細胞は、造血とストローマ系の細胞の両方に分化し得る多分化能を有することが報告された。その後、この細胞群は *CD50* で亜群に分けることができ、*CD50*<sup>-</sup> の細胞は間葉系幹細胞を生じ、*CD50*<sup>+</sup> の細胞は造血細胞を生じ得るという結果が示された。造血幹細胞のマーカーとして広く認知されている *CD34* は、ある条件の下で誘導される分子であり、*CD34*<sup>-</sup> の細胞群がより上流の真の幹細胞に近い細胞群であるとの報告もある。この *CD34* の間葉系幹細胞における発現は、培養初期には観察されるものの、時間の経過とともに失われていくといわれているが、*CD34* の発現は分化状態の一部を反映しているだけであり、特に間葉系幹細胞においては細胞培養による増殖因子や、血清の影響などを考えなければならない。

現在報告されている間葉系幹細胞の表面抗原について表2に示した。接着分子では *ICAM-1, 2, 3* および *NCAM, HCAM, VCAM, L-セレクトリン* が発現しており、*E-セレクトリン, P-セレクトリン, カドヘリン, PECAM-1* が発現していなかった。成長因子およびサイトカインの受容体のうち検討されたものは、ほとんどが陽性であった(インターロイキン(IL)-1R, 3R, 4R, 6R, 7R, インターフェロン $\gamma$ R, 腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ 1R, 2R, *FGFR, PDGFR, トランスフェリン受容体*) が、*IL-2R* は陰性であった。インテグリンファミリーでは、*VLA- $\alpha$ 1, 2, 3, 5, 6, - $\beta$ 1, 2, 3* が発現しており、*VLA- $\alpha$ 4, LFA-1 $\alpha, 1\beta$*  が発現していなかった。免疫応答に関わる分子では、*CD3* 複合体, *CD4, CD8, B7-1, 2 (CD80, CD86), MHC クラス II* は発現していなかった。

現状では、このような記述的な情報が得られているに過ぎず、重要な分子が何であるのかまだ十分な検討を受けていない。今後、分化とともに、こういったマーカー

表2 ■ ヒトとマウス間質細胞の表面マーカー

分子名	CD 番号	発現
<b>&lt;ヒト間質細胞&gt;</b>		
<b>I. 接着分子</b>		
ALCAM	CD166	陽性
ICAM-1	CD54	陽性
ICAM-2	CD102	陽性
ICAM-3	CD50	陽性
E-セレクトリン	CD62B	陰性
L-セレクトリン	CD62L	陽性
P-セレクトリン	CD62P	陰性
LFA-3	CD58	陽性
カドヘリン5	CD144	陰性
PECAM-1	CD31	陰性
NCAM	CD56	陽性
HCAM	CD44	陽性
VCAM	CD106	陽性
ヒアルロン酸受容体	CD44	陽性
<b>II. サイトカイン受容体</b>		
IL-1R( $\alpha, \beta$ )	CD121a,b	陽性
IL-2R	CD25	陰性
IL-3R	CD123	陽性
IL-4R	CD124	陽性
IL-6R	CD126	陽性
IL-7R	CD127	陽性
インターフェロン $\gamma$ R	CDw119	陽性
TNF- $\alpha$ 1R	CD120a	陽性
TNF- $\alpha$ 2R	CD120b	陽性
FGFR		陽性
PDGFR	CD140a	陽性
トランスフェリン受容体	CD71	陽性
<b>III. インテグリン</b>		
VLA- $\alpha$ 1	CD49a	陽性
VLA- $\alpha$ 2	CD49b	陽性
VLA- $\alpha$ 3	CD49c	陽性
VLA- $\alpha$ 4	CD49d	陰性
VLA- $\alpha$ 5	CD49e	陽性
VLA- $\alpha$ 6	CD49f	陽性
VLA- $\beta$ 鎖	CD29	陽性
$\beta$ インテグリン	CD104	陽性
LFA-1 $\alpha$ 鎖	CD11a	陰性
LFA-1 $\beta$ 鎖	CD18	陰性
ビトロネクチン R $\alpha$ 鎖	CD51	陰性
ビトロネクチン R $\beta$ 鎖	CD61	陽性
CR1 $\alpha$ 鎖	CD11c	陰性
Mac1	CD11b	陰性
<b>IV. その他</b>		
T6	CD1a	陰性
CD3 複合体	CD3	陰性
T4, T8	CD4, CD8	陰性
テトラスパン	CD9	陽性
LPS 受容体	CD14	陰性
ルイス X	CD15	陰性
-	CD34	陰性
白血球共通抗原	CD45	陰性
5'ターミナルヌクレオチダーゼ	CD73	陽性
B7-1	CD80	陰性
HB-15	CD83	陰性
B7-2	CD86	陰性
Thy-1	CD90	陽性
endoglin	CD105	陽性
MUC18	CD146	陽性
BST-1	CD157	陽性
<b>&lt;マウス間質細胞&gt;</b>		
分子名または CD 番号		発現
Stro-1 <sup>p</sup>		陽性
CD10		陽性
CD34		陽性
CD90(Thy-1)		陽性
CD105(endoglin)		陽性
CD106(VCAM-1)		陽性
Ly6A/E(Sca-1)		陽性
acetylated LDL receptor		陽性

の遺伝子発現がどのような振る舞いをするのか、どのような機能を担っているのかを解明していくことが、間葉系幹細胞を臨床の治療戦略に生かしていくために必須であると考えられる。

細胞を分離する他の方法として色素による分離が行われてきたが、最近、ヘキスト 33342 という色素の取り込み/排出によって、造血幹細胞が分離できることが報告された。さらに、この色素によって分離できるある細胞群(side population; SP細胞)は骨髄だけでなく、中枢神経系・骨格筋といった臓器にも存在し、それぞれ神経幹細胞および骨格筋の幹細胞である衛星細胞の性質をもっていた。マウス・ラット・ブタ・ヒトにおいてもSP細胞は同様に見いだされている。今後は、ヘキスト 33342 という色素の取り込み/排出がどのような機能を反映し、様々な臓器に存在する幹細胞とどのような関係にあるのかという検討が待たれる。

#### 間葉系細胞の分化の指標を知る

多分化能を示す骨髄中の間葉系幹細胞の割合は、年齢とともに減少してくるといわれている。新生児では1万分の1、10代では10万分の1、35歳では25万分の1、50歳では40万分の1、80歳では200万分の1の割合で、骨髄中に間葉系幹細胞としての性質を有している細胞が存在する。しかし一方、胎児は別にして、生後は年齢にあまり関係なく、100万分の1の割合で幹細胞性を有している細胞が存在している可能性が高いという考えもある(今林英明, 私信)。それによると驚くべきことに、得られた間葉系幹細胞は年齢に関係なく、従来考えられてきたよりも長期にわたって継代可能であり、90歳以上のヒトから得た細胞であっても、200日以上(分裂回数40回以上)は培養可能であるという。

分化について記述するには、現在の基礎生物学の教科書のかなりの部分を割かねばならない。研究する際にそのすべてを検討することは大事なことではあるが、時間や労力を考えると、自分自身にとって実験を進める上で必要最小限のアッセイを確立させておくほうが時間の節約ができ、様々な細胞を使つてのプロトコルや移植実験が可能となり、大変便利である。そこで一つ一つの間葉系細胞の分化形質、および必要最低限おさえておきたい組織形成能の中から、筆者が重要だと思ふものを以下に列挙する。

まず、軟骨から始めよう。軟骨を形成する能力がある細胞を皮下の結合組織内に移植して、コリコリとした塊となり、骨に比べると少し透明感がある軟骨を作らなく

てはならない。完成した標本では、トルイジン・ブルーで異染色性を示す軟骨基質の中に、軟骨細胞が埋もれていてほしい。試験管内では、軟骨が形成されたかどうかはまったくわからない。ある種の骨髄間質細胞は培養上清がドロツとなり、軟骨基質が試験管内でできたのではないかと思ったことがあったが、何の意味をもつか今のところ不明である。試験管内での軟骨細胞の形態は、線維芽細胞や骨芽細胞とは異なり四角く上皮様の印象を受けるが、それが意味のある形態かどうかは筆者自身も自信がない。

骨の場合は、試験管内での高いアルカリホスファターゼ活性、カルシウム沈着が一般に分化の指標となる。同時に最も大事なものは、細胞を移植することで体内で骨を形成させなくてはならないことである<sup>(8)</sup>。

脂肪については、脂肪滴が細胞内に溜まるのはきわめてわかりやすく<sup>(9)</sup>、分化の指標として何の染色をしなくても形態学的によい。分化初期に細胞内に小脂肪滴がたくさん溜まると黒く見えてわかりにくいだが、脂肪滴がだんだん大きくなってくと光ってきて、位相差顕微鏡下で容易に判断できる。脂肪滴を生体内の脂肪組織でみられる脂肪細胞のように、1つの細胞に大きな脂肪滴1つとしたければ、脱メチル化剤である5-アザシチジン処理をする。脂肪細胞の場合は試験管内でそれと判別できるので、骨や軟骨のように生体内に移植する必要はない。脂肪細胞を植えることで太らせたり、乳房を大きくするアッセイは必要ない。

心筋(心臓を構成する細胞)はどうか。心筋細胞への分化の指標としては次の2点が必要である。まず1点目は、試験管の中で細胞が自動的に動き、リズムカルに収縮することである<sup>(10)</sup>。収縮の「心拍数」は1分間に60回は必要であり、1分間に1回の収縮では心筋とはいえない。とりあえず「動く」ことが大事である。2点目は心筋の究極の目的または機能は、それぞれの細胞が同期して1つのポンプとしての役割を果たすことであり、そのために、分化した心筋細胞がギャップ結合で「交通」することが必要とされることである。

神経細胞はどうか<sup>(6,10)</sup>。形と機能の面から考えてみよう(図3)。神経としての特徴的な形態である細長い突起、三角形になっている突起の末端、丸くて位相差顕微鏡下でピカピカ光る細胞体が、試験管内において観察される必要がある<sup>(11)</sup>。免疫組織化学では、主にフィラメントに対する抗体を用いて観察する機会が多い。ニューロンとしてMAP2、 $\beta$ 3-チューブリン、Hu、NeuN、アストロサイトとしてGFAP、オリゴデンドロサイトとしてGal-Cがマーカーとなる。RT-PCRによって、TrkC、

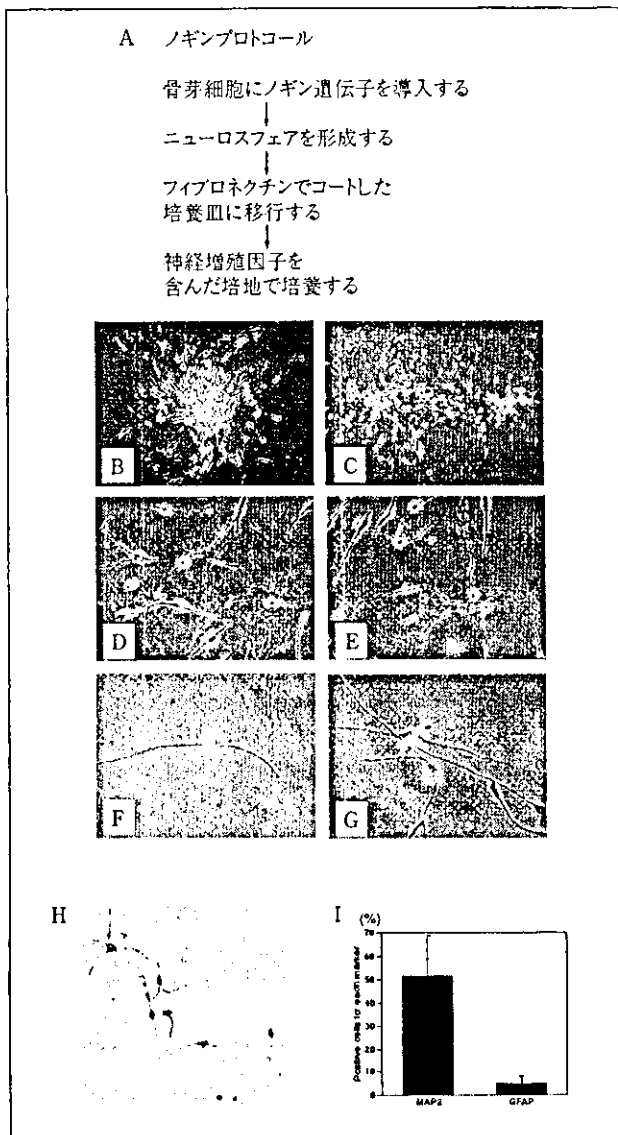


図3 ■ 中胚葉由来の間質細胞の神経細胞へ分化

間質細胞に対し神経分化への促進因子を処理する(A)と神経形質を示すようになる。細胞体は丸くピカピカ光り、長い突起が伸長してくる(B~G:位相差顕微鏡写真)神経に分化した細胞は、免疫組織化学によりMAP2(ニューロン特異的分子)陽性になる。MAP2陽性細胞の割合は半数以上であり、GFAP(アストロサイト特異的分子)陽性細胞はほとんど認められない(I)。HはMAP2に対する抗体を用いた免疫組織化学。

TrkB, TrkA, GAP43, NCAMの発現をみる。最終的には活動電位を得ることが必要不可欠であるが、神経系幹細胞ではなかなか活動電位を得るまで成熟させることは難しい。そこで、神経伝達物質であるアセチルコリン、グルタミン酸処理、高カリウム処理により、カルシウム・イメージング法で観察されるカルシウムの流入も重要なアッセイとなる。

### 細胞の「初期値」について

細胞転換にしても、分化の可塑性にしても、基礎的なことがかなり明らかになっているところから、この分野が始まっている。そして、間葉系幹細胞に関わる実験も発生生物学の知識を最大限利用しているため、サイエンスであると同時にエンジニアリングと考えられているのも頷ける。それぞれの細胞への分化に関わるプロトコールは、発生学から得られた成果の積み重ねのお陰である。培養に使用する培地や試薬にしる、目新しいものはないが、様々な手法が組み合わされている。

細胞転換に関しては近年多くの報告があり、生体内で造血から肝・神経・筋を含めたかなり広い範囲の組織への分化転換、筋肉細胞から造血細胞、毛根細胞から造血細胞への分化転換例などがある。さらに、試験管内において骨から神経への転換も報告された<sup>(1)</sup>。骨芽細胞は骨形成因子を阻害するノギン(noggin)と5-アザシチジンによって、神経細胞に転換する。ここで神経に転換される骨芽細胞は、生体内に移植すると骨形成を行なう。また、この骨芽細胞はクローンであり、骨芽細胞のマーカであるアルカリホスファターゼをすべての細胞で発現しているかどうかは酵素活性の組織染色で検討することが可能であり、神経細胞のコンタミネーションは考えられない。

この1つの細胞由来である細胞は、生体内で効率よく骨形成を行なうので、初期値(default state)は骨芽細胞であると考えるのが一般的である。しかし一方では、この細胞の初期値が骨ではなく、神経である可能性も否定できない。それは、ノギンを処理することで神経になってしまうのだから、本来は神経細胞であるにもかかわらず、細胞が骨形成因子を産生することで骨芽細胞としての性格をもつ仮の姿になっているという可能性である。この場合は神経細胞がこの細胞の初期値といえる。まとめると、①神経初期値説、②骨初期値説、③初期値など考えるのは意味がない説が考えられる。定常の分化状態であれば、①、②を考える意味があり(図3)、細胞には定常状態などないと考えるならば、この初期値についても考える必要がない。

### DNAメチル化およびクロマチンを改変する低分子化合物による細胞の初期化または自己の喪失

間葉系幹細胞は心臓、脂肪、骨、腱になるが、通常は表皮や血液細胞にはならない。細胞には細胞固有の状態があり、骨髄内に心臓ができることはなく、脳が筋肉でできていると冗談でいうことはあるが、実際にはありえ