

ない。成人のヒトには多くの分化した細胞が存在し、個体維持のためにそれぞれが機能する。大部分の細胞は完全に分化しているため、その系列の細胞に分化することはあっても、別の分化形質を示すことはない。しかし、これらの細胞でも部分的に全能性を有している。例外的な現象は一部報告されているが、部分全能性を有している細胞は元々の胚葉を越えて分化することはない（と考えられていた）。間葉系幹細胞が神経や血液細胞になることができない仕組みはどのようなものか、間葉系幹細胞が有する部分全能性の「部分」である機構はどこに存在するのか。これは、多分化能または部分全能性を有している細胞と、1種類の細胞にしか分化できない細胞との違いとまったく同じである。最初の時点、すなわち受精の時点ではあらゆる細胞になることができる。しかし、発生が進むと細胞は多分化能を失っていき、ある限られた細胞にしか分化できなくなる。結論からいえば、多分化能を有する細胞からある系統にしか分化できない細胞への移行は、細胞の潜在性の消失または遺伝子発現の制限にほかならない。

繰り返しになるが、分化が制限されるメカニズムを探ることは、遺伝子の発現が制御されるメカニズムを検討

することと同じである。遺伝子の発現は転写因子によって調節され、転写因子の発現自体も別の転写因子によって調節されている。ある分化状態では定常状態を保っているが、複雑な遺伝子発現のネットワークが存在し、そのネットワークの維持には自由な遺伝子発現が必要不可欠である。

分化能の制限に繋がる遺伝子発現の制限の機構として、DNAのメチル化とクロマチン構造が知られている（図4）。DNAのメチル化が多くなれば遺伝子発現は制限され、クロマチン構造が高次になれば遺伝子発現は制約を受ける。遺伝子の発現が制限されてしまえば、分化能も制限されてしまい、限られた細胞にしかなることができない。クロマチン構造を変化させる物質としては、ヒストンのアセチル基の量を低減させる低分子化合物がある。4-フェニル酪酸、sodium butyrate、トリコスタチンAはいずれもヒストンジアセチラーゼインヒターとして知られ、細胞内で不活化されている遺伝子の発現誘導を可能にする。また、間葉系幹細胞に対しDNAの脱メチル化剤である5-アザシチジンを単独処理することによって、心筋細胞をはじめとする興味深い分化形質の新たな出現が認められ、低分子化合物による幹細胞の

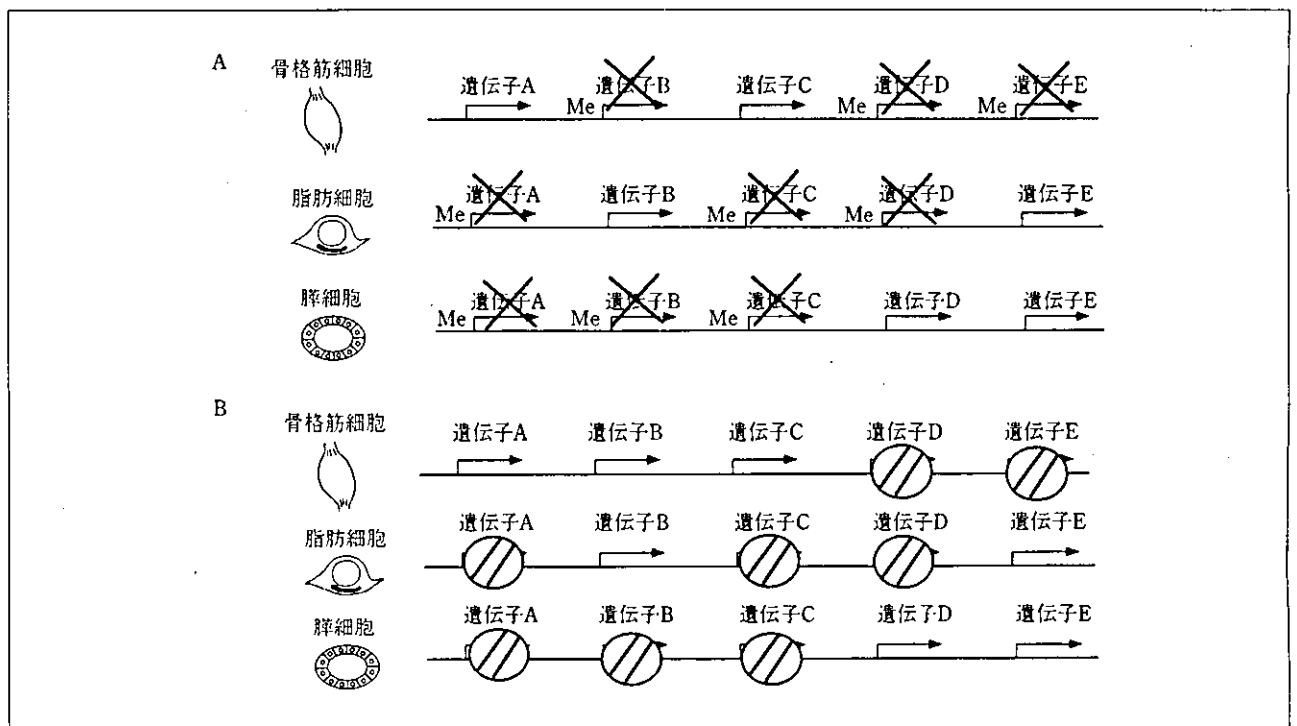


図4 ■細胞が固有のDNAメチル化(A)ならびにクロマチン構造(B)を有し、独自の遺伝子の発現パターンを示す

わかりやすくするために、骨格筋、脂肪細胞、脾細胞の例を挙げる。成体の骨格筋細胞は再生するときは必ず骨格筋細胞となる。脂肪細胞を培養した場合、基本的に脾細胞のような上皮系の形態をとることはない。その細胞固有の情報は、ゲノム上のクロマチン状態、DNAメチル化(図中Me)または転写遺伝子群のネットワークによって維持され、細胞の形態・機能に反映される。この情報をリセットするには、誘導剤、コーティング、培養方法だけでは不十分であると考えられる。メチル化・クロマチン構造を変化させる物質として、低分子の化合物が有用になる。

分化誘導はきわめて有効である。

*

移植は、ドナーとの関係により自家、同種、異種に分けられ、移植する単位としては遺伝子、細胞、組織、臓器の別がある。一般に移植医療というと臓器移植を意味し、細胞移植は含まれない。再生医療は細胞の供給源についての検討などいろいろな立場が含まれるが、基本的には外傷・病気・加齢によって傷害を受けた組織や臓器の再生を促進し、機能を回復させるのみならず、体外で幹細胞から組織や臓器を分化・再生させ、これを移植用に供給しようとするものである。その中には自家移植も含まれ、拒絶反応のない自家移植はある意味で最も有効であるが、医療の現場では手間も時間もかかり、障壁も多く、かなりの基礎研究が必要となる。細胞治療の対象臓器として、中脳黒質、皮膚、軟骨、骨が挙げられるが、いずれに対しても間葉系幹細胞が貢献できる可能性がある。間葉系幹細胞の個性は、ゲノムのメチル化状態、クロマチンの状態、転写因子のネットワークという3つの要因によって決まる。この3つを自在に操り、間質細胞を様々な組織・器官に変身させることが、近未来的な課題となる。

謝辞：岡野栄之教授、小川 聡教授、福田憲一博士、戸山芳昭教授、今林英明先生、桜田一洋博士との骨髄間質細胞の分化に関する共同研究で多くの示唆を受け、多くの世界的な潮流について最新情報の供与を受けました。草刈 悟氏、阿部 仁氏には、魅力的

な骨髄間質細胞をたくさん樹立していただき、彼らに帰属すべき発見が多数あります。神山 淳氏、田島信哉氏、伊澤良兼氏は自主学習に参加してくれた学生ですが、彼らの多くの示唆は必要不可欠でした。時間のある方は、骨髄間質の心筋への分化アニメーションをウェブサイトで見ただけだと嬉しいです (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/omezawa/HTML>, E-mail: omezawa@1985.jukuin.keio.ac.jp)。

文献

- 1) T.M. Dexter, T.D. Allen, L.G. Lajtha, R. Schofield & B. I. Lord: *J. Cell. Physiol.*, 82, 461 (1977).
- 2) M. Reyes, T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie & C. M. Verfaillie: *Blood*, 98, 2615 (2001).
- 3) S.A. Azizi, D. Stokes, B.J. Augelli, C. DiGirolamo & D.J. Prockop: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3908 (1998).
- 4) R.J. Deans & A.B. Moseley: *Exp. Hematol.*, 28, 875 (2000).
- 5) M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck *et al.*: *Science*, 284, 143 (1999).
- 6) 岡野栄之: 実験医学, 19, 80 (2001).
- 7) A. Kawaguchi, T. Miyata, K. Sawamoto, N. Takashita, A. Murayama, W. Akamatsu, M. Ogawa, M. Okabe, Y. Tano, S.A. Goldman & H. Okano: *Mol. Cell. Neurosci.*, 17, 259 (2001).
- 8) A. Umezawa, T. Maruyama, K. Segawa *et al.*: *J. Cell. Physiol.*, 151, 197 (1992).
- 9) A. Umezawa, K. Tachibana, K. Harigaya *et al.*: *Mol. Cell. Biol.*, 11, 920 (1991).
- 10) S. Makino, K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, H. Abe, J-i. Hata, A. Umezawa & S. Ogawa: *J. Clin. Invest.*, 103, 697 (1999).
- 11) J. Kohyama, H. Abe, T. Shimazaki, A. Koizumi, K. Nakashima, S. Gojo, T. Taga, H. Okano, J. Hata & A. Umezawa: *Differentiation*, 68, 235 (2001).

プロフィール

加瀬 広 (Hiroshi Kase) 昭和17年8月14日生<略歴>1966年東京大学農学部農芸化学科卒業/同年協和発酵工業(株)入社、現在にいたる。この間、1990~91年英国リバプール大学MRCケムブリッジに派遣留学。1996年農博(東京大学)<研究テーマと抱負>アデノシンと病気、医薬研究開発

片瀬 隆雄 (Takao Katase) 昭和17年10月30日生<略歴>1974年東京都立大学大学院理学研究科博士課程化学専攻修了後、神奈川県立衛生短期大学助手、同講師、同助教授を経て、現在、日本大学生物資源科学部教授。この間、1985~1986年米国ペンシルベニア州立大学客員教授<研究テーマと抱負>古環境復元地球化学、病因物質の有機物地球化学、プラスチックの分析化学<趣味>園芸、

旅行

金子 元 (Gen Kaneko) 昭和52年11月18日生<略歴>2001年東京大学農学部水圏生命科学専修卒業/同年同大学大学院農学生命科学研究科修士課程入学、現在にいたる<研究テーマと抱負>シオミスツボムシの寿命と個体数変動に関する分子生物学的研究<趣味>グライダー、サッカー

菊池 尚志 (Shoshi Kikuchi) Vol. 31, No. 11, p. 734 参照

小林 優 (Masaru Kobayashi) 昭和18年3月7日生<略歴>昭和40年北海道大学医学部薬学科卒業/43年同大学大学院中途退学後、教務職員/44年同大学薬学部助手/平成11年同助教授(薬用

植物園担当)、現在にいたる<研究テーマと抱負>NMRによる立体化学の推理<趣味>イタリアオペラ、読書、ワカサギ釣り

小松 節子 (Setsuko Komatsu) 昭和32年3月3日生<略歴>昭和55年明治薬科大学薬学部卒業後、同大学助手、慶應義塾大学医学部助手を経て、平成5年農林水産省農業生物資源研究所勤務。現在、同研究所チーム長。薬博<研究テーマと抱負>プロテオーム解析技術を応用して、イネの植物ホルモンを介する細胞内情報伝達機構を解明すること

坂田 完三 (Kanzo Sakata) Vol. 37, No. 1, p. 53 参照



再生医療

慶應義塾大学医学部 病理学教室 梅 澤 明 弘

再生医療は、主に発生学・材料工学・細胞生物学の発展に伴って生じた細胞を薬と見なして行う新たな試みである。新たな試みとしたが、実際には骨髄移植、末梢血幹細胞移植は造血組織の再生を自己血液細胞ないしは他家の血液細胞を利用して成功している。骨髄移植は、再生医療の中では最も成功していると筆者は理解している。最近の再生医療として紹介されている部分は、骨髄移植にかかわるような技術に加え、造血細胞以外の細胞を含め、増殖因子・分化誘導因子、マトリックス、生分解性ポリマーならびに幹細胞に関する情報を上手に統合することで新たに組織を再生するところである。「臓器、組織、細胞を造る」という課題を掲げた再生医療の主要な登場人物像をひとつひとつ紹介したい。

もともと再生とは、生体の失われた細胞・組織が残りの細胞の増殖によって補われることをいう。再生という生命現象がかなり古くから認識されていたという事実は、紀元前8世紀頃のギリシャの詩人である Hesiodos の神話からも理解できる。プロメテウスは人間を作り、地を耕し作物を作ること、道具を使うこと、羊や牛を飼い慣らすこと、言葉で話すこと等沢山のことを人間に教えた。最期に火を使うことを教えるため、ヘリオスの太陽の馬車から火を盗んだ。罰としてゼウスによって岩に縛られ、ゼウスの放った大鷲に襲われ、肝臓を食べられたが、翌日も肝臓は再生し、来る日も来る日も肝臓をついばまれた。すなわち、このギリシャ神話の時代から、肝臓が再生す

ることは知られていた訳である。

このように肝臓は再生しやすい。肝細胞が障害されても新たに再生して結節をつくり、肝硬変の時の再生結節となる。皮膚が欠損しても、表皮も真皮もきちっと創傷治癒が行われることは経験的にも理解しやすい。造血細胞の寿命が短いことから考えても分かるように、次から次へと造血細胞はつくりだされ、再生していると言える。消化管の上皮も潰瘍として欠損しても、その部分はやがて再生して治癒する。一方、脳神経組織、心筋組織、骨格筋組織、靭帯、腎は、ほとんど再生しない。心筋組織が梗塞に陥れば、新たに心筋細胞が再生してくることはなく、肝臓ともいえる線維性組織によって置換される。脳組織が梗塞に陥れば、組織が欠損し、脳軟化となり、神経組織が再生されることはないと考えられてきた。

再生しやすい組織、再生しない組織についてのいずれにおいても、細胞を導入することによって組織の機能を目指す。導入する細胞は、さまざまなレベルの幹細胞が考えられるが、大きく胎児性幹細胞と成体幹細胞に分類される。胎児性幹細胞は胚盤胞の内部細胞塊より樹立する細胞株であるが、驚くべきことに全身の組織や細胞に分化する能力を維持しており、全能性を有している。一方、成体幹細胞は、各臓器、組織に存在する幹細胞であり、血液幹細胞に代表されるように顆粒球系、赤芽球系、巨核球系の造血にかかわるすべての系列に分化可能である。すなわち、成体幹細胞

は限られた範囲の中で多分化能を示し、部分全能性を有している。

マスコミ紙上を賑わしているのは、この幹細胞の可塑性である。細胞の可塑性とは、細胞が別の細胞に変身することである。「幹細胞の可塑性」は10年以上前から知られており、胎児性幹細胞や様々なレベルの成体幹細胞は、発生を模倣する過程を試験管内で再現できる極めて重要な位置を占め、発生にかかわる分子機構の解明に多大なる貢献をし、サイエンスを押し進めるうえで、確固たる地位を得てきた。再生医療はこの細胞の可塑性を利用する。現実には生体内で細胞が別の細胞に変身することはほとんどなく、化生として知られるごくわずかな現象のみである。胃粘膜が腸上皮に変身する腸上皮化生、気管支上皮が表皮や食道粘膜に変身する扁平上皮化生がある。このような変身が移植した細胞で確認されたり、試験管内で再現できたりしている。特に骨髄移植により導入された血液幹細胞が全身の組織の細胞に分化するという報告は、驚きであった。

再生医療の中心となる細胞移植についての手順を次に紹介する。患者さんないしドナーの方の組織から細胞を一部採取する。骨髄穿刺を思い浮かべていただければ分かりやすい。血液幹細胞は試験管の中で培養することは難しいが、神経幹細胞、間葉系幹細胞は容易に増殖させることができる。増殖させた細胞の中から成体幹細胞に相当する細胞を細胞膜抗原、細胞特異的転写調節領域を利用して単離する。その細胞を分化誘導ないし転換プロトコールによって目的の細胞とし、心筋組織や神経組織等の各組織に移植する。移植に関しては、静注することも考えられるが組織内への局注である。

分化プロトコールは細かい話になってしまう。発生学の知識を利用して、増殖因子を利用したり、マトリックスを培養器の底にひいたり、丸く塊をつくったり、細胞培養の密度を変化させるこ

とによって、できあがる細胞を全く異なるものとする。ES細胞からドーパミン産生細胞やインスリン産生細胞を作製する際には、ES細胞の下にフィーダー細胞として特別な骨髄間質細胞をおく。完全な分化プロトコールができあがっているわけではなく、ある割合で分化したり、同時に別の細胞に分化したりする。たとえば、骨髄間質細胞を心筋細胞にする際には、周辺に脂肪細胞が同時に出現しているし (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/HTML>)、その割合は決して高くはないのが現状である。そこで分化誘導因子を利用したり、細胞内に転写因子を導入したり、マトリックスを利用したり、工夫を凝らしている。

対象とする疾病は、虚血性心疾患、リゾチーム病を含めた代謝疾患、筋疾患、パーキンソン病、脊髄損傷、糖尿病、熱傷である。骨髄移植や皮膚移植では、細胞や生分解性材料を用いて成功していることは前述したが、パーキンソン病では中絶胎児の神経組織を利用して有効であったという報告がなされている。さらに心筋内に骨髄細胞を注入することは日本、欧州で行われている。小児科領域になるかと思うが代謝疾患でも、細胞移植による cross correction により治療効果が期待できる可能性がある。骨髄間質細胞も造血亢進作用を期待され、治験が進んでいる。

再生医療に対し、積極的な企業に、胎児性幹細胞のゲロン社、間葉系幹細胞のオシリス社がある。多くの特許が取得され、実現に向けて、Cell processing center も設立されつつある。ゲロン社、オシリス社は米国の企業であるが、日本の製薬会社ならびに商社もこの新しい医療に対し、興味を示し、出資をしている。この2年の間に、具体的なめど、すなわちこの医療が価値が認められるのかどうか、採算がとれるのかどうかについての回答がでると予想されている。

問題点はいくつか指摘されている。最も根本的な問題が細胞移植することによって症状の改善が

見込まれるかどうかである。目的の細胞に生体内で分化したか、目的の細胞とは異なる分化形質を示していないかどうか。病気の症状を軽減するのに十分な細胞数を注入できたかどうか。十分な細胞数を試験管内で、すなわち生体外で培養できたかどうか。試験管内で細胞は十分増えたが腫瘍化していないか。そして移植後、細胞が腫瘍とならないか。培養している過程で細胞の分化能が低下しないかどうか。培養過程でウシ血清を使用しなくてはならず、狂牛病の心配はどうか。細胞培養の過程でばらつき、すなわち毎回同じように細胞を処置できたか。きりがいいように感じるかもしれ

ないが、だいたいこんなところである。

このような問題点があるとしても、それを上回る利益が期待できるのであれば再生医療を試みるかどうかの検討をするべきである。不利益にしても、個々の疾病で意味が異なるであろうし、問題点が解決してしまっている場合もある。利益と不利益を意識したうえで一定の手続きを踏み、それらが過程が公開されながらこの再生医療が進行することにより、この新しい治療法が社会から祝福される形で世に送り出してあげたい。

☆ ☆ ☆ ☆ ☆ ☆

幹細胞とエピジェネティクス

梅澤明弘

幹細胞には、胚性幹細胞と体性幹細胞がある。体性幹細胞は各組織・臓器ごとにいろいろ存在し、さまざまなレベルの幹細胞が存在する。全能性を有しており、すべての細胞に分化できる全能性幹細胞があり、その一方で、部分全能性を示す間葉系幹細胞がヒト骨髄から単離されている。この何種類かある幹細胞は、そのゲノムのエピジェネティクスにより支配されている。幹細胞の分化ならびに可塑性についてもエピジェネティクスにより決定される。このエピジェネティクスの状態を検討することで幹細胞のレベルならびにその分化能を予想可能と考える。

Key words

stem cell, methylation, epigenetics

幹細胞は分化能があり発生過程のどの段階でも安定状態にある

幹細胞は、成体における臓器に至るその発生過程でさまざまなレベルで存在する。全能性を有する受精卵から始まり、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(図1)。1つの細胞に分化できない場合は、前駆細胞という呼び方に

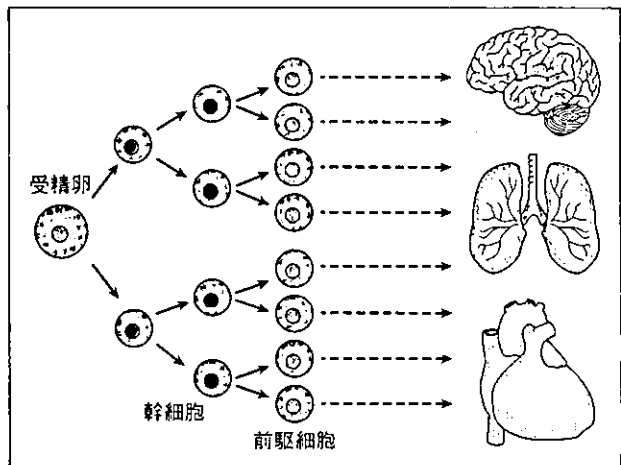


図1 すべての組織・細胞のもととなる受精卵から始めて、機能的に分化した細胞に至るまで、さまざまなレベルの幹細胞が存在する

Epigenetics in stem cells

Akihiro Umezawa

慶應義塾大学医学部病理学教室

うめざわ・あきひろ 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を経て、99年慶應義塾大学医学部助教授(病理学)。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分化に取り組み、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。間葉系細胞の default と preference の状態を行ったり来たりさせること(細胞転換)により、細胞治療の“事実上の標準仕様”として、臓器の再構築の世界に貢献させたい。

なってしまう。このように、生命は1個の受精卵から始まり、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作り出す。この現象が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。細胞の置かれている環境の因子が変化しない限り、細胞がその分化状態を変化させることはない。このことは、すでに終末分化を逃げてしまった細胞(骨格筋細胞、神

経細胞) についてではなく、発生途上にある段階の細胞についてもいえる。免疫系のB細胞は抗原刺激があるまで分化の途上にとどまっていることや、造血幹細胞から分化してくるときにある特殊な因子がないと次のステップに進まないことが、この考えを支持している。さらに、その安定状態は、細胞外環境因子に支えられているのではなく、細胞のうち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(図2)。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い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、もとの性質をある程度保つことがその根拠の一つである。

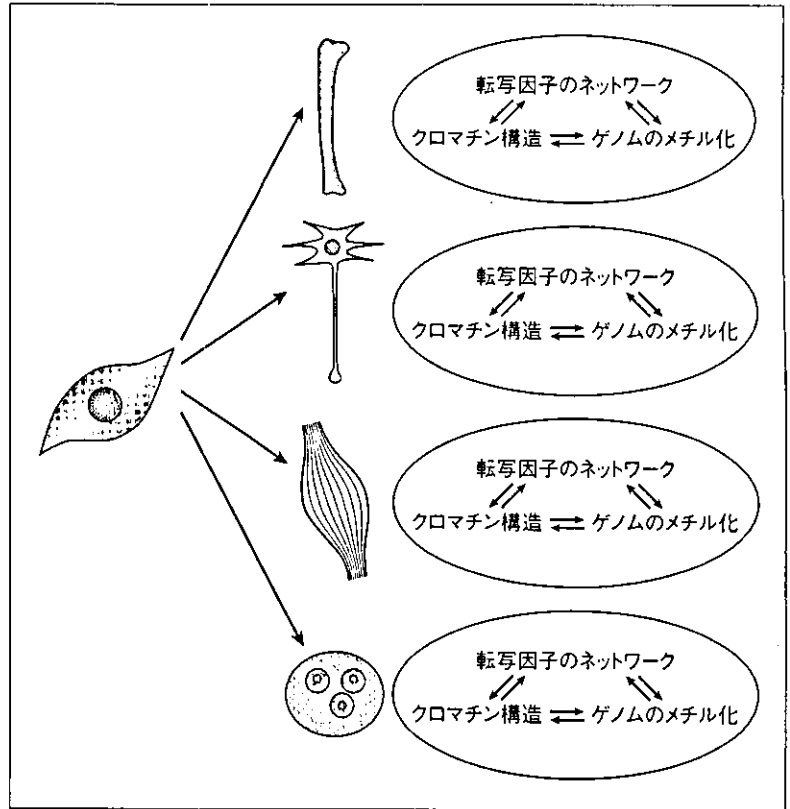


図2 幹細胞から成熟した細胞に至る分化過程には、それぞれの細胞の“転写因子”、“クロマチン”、“ゲノムのメチル化”による定常状態が存在する

幹細胞の定常状態をみれば 分化の度合がわかる

これら、分化状態の安定性と変化しやすいという、いささかパラドキシカルな事象が分化現象の基本であり、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(図2)。逆に定常状態が、転写因子のネットワーク、メチル化、クロマチン構造を固定してしまうことも考えられ、その状態を観察すれば分化の定常状態がどのレベルにあるかを指摘できることになる。究極のことをいえば、特定の分化した細胞でその機能や形態、そして組織の構築が決定されるのは、それらに必要な遺伝子が発現し(転写因子)、他の不必要な遺伝子の発現が抑制される(メチル化、クロマチン構造)ことによって行われている。一定の分化した細胞の個性は、発現している遺伝子のセットによって決まる。

幹細胞の分化は確率的である

幹細胞集団の動態は、確率的に決まっている場合

(stochastic model) と決定されている場合(deterministic model)がある¹⁾。deterministic modelではすべての幹細胞が不均等分裂(図3B)することにより、幹細胞と機能細胞がある一定の頻度で出現する。この場合の機能細胞は、急速に分裂したり、分化したりするので、TA細胞(transient amplifying cell)と呼ばれることでも知られる。stochastic modelとは、均等に分裂する場合(図3A)と不均等分裂する場合(図3B)がある一定の頻度で存在することをいうが、一定の頻度とは0%でもなく100%でもないその間の確率をさす。0%と100%の場合はdeterministic modelとなる。

ある特定の遺伝子に注目し、重要なまたは本質的な転写調節領域におけるCpG配列のメチル化パターンの不規則なまたはランダムな変化を利用してこの幹細胞の動態を明らかにすることができる(図4)。実は、幹細胞以外のあらゆる細胞を同定することがメチル化パターンを解析することで可能であるが、

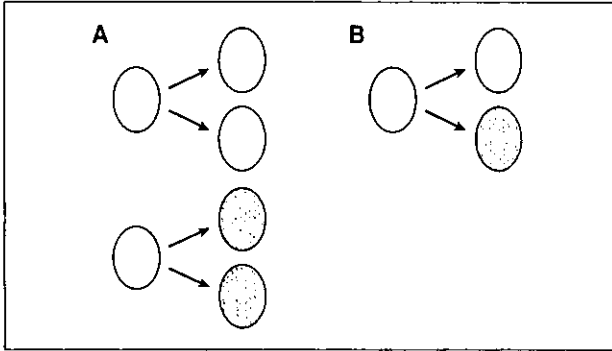


図3 幹細胞の不均等分裂と均等分裂

A: 幹細胞 (○) が均等に分裂することにより、2つの分化した細胞 (⊙) になるか、2つの幹細胞になるかを示す。
 B: 幹細胞が分裂し、1つの幹細胞と1つの分化細胞になることを示した不均等分裂の模式図

幹細胞の分裂能力ならびに多分化能といった観点から興味深い結果が得られると考えられる。

遺伝子のメチル化パターンから細胞の定常状態は推測可能である

“本質”的な転写調節領域のメチル化をみることは重要である。なぜなら、本質的である CpG 配列のみが幹細胞を区別でき、そうでないところはあらゆる細胞で同じパターンをとるので区別することができないからである (表1)。たとえば、ケラチン18 遺伝子の場合、本質的な CpG 配列は第1イントロン内のポリオーマ様エンハンサー内に存在し、エンハンサー内の CpG のみが発現と逆相関する²⁾ (図5)。それ以外の CpG は細胞や組織でメチル化に差がなく、よい指標とならない。実際に検討したことはないが、左右で異なる発現パターンをとる遺伝子のメチル化を検討すれば、ある DNA が身体の左の臓器から由来するものであるか右の臓器から由来するものであるかが、DNA メチル化パターンから指摘することが可能と考えている。最近、神経系においても、その分化マーカーの本質的な転写調節領域の研究で異なるメチル化が存在することが指摘され、注目を浴びた³⁾。

メチル化の有無は、1つのゲノム分子に注目すれば“あるなし”しかなく、中間が存在しないので0か1で表すことが可能である (図6)。デジタルな情

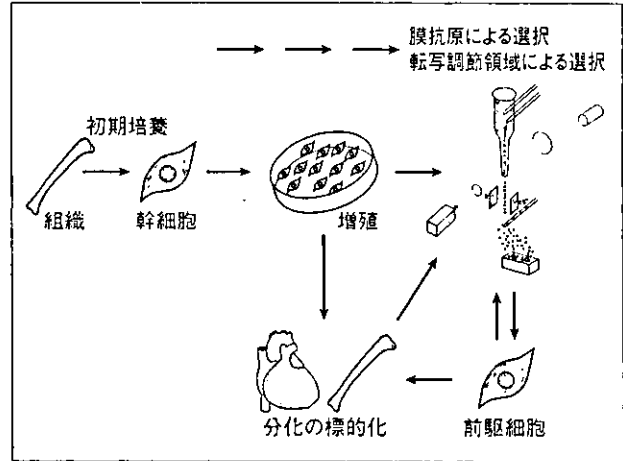


図4 体性幹細胞を区別する現実的な方法

それぞれの組織から、細胞を初期培養することで増殖させる。目的の幹細胞に特異的な表面抗原または幹細胞の定常状態を担う転写因子のシスエレメントを利用して、幹細胞を単離してくる。その後、分化誘導することによって、幹細胞から機能細胞へと転換させる。メチル化状態は転写因子、表面抗原の発現に影響を与えるので、間接的にメチル化状態によって幹細胞を区別できる点で意義がある。

報であり、個々の分子ごとにおけるメチル化パターンも bisulfite 法で明らかにすることが可能である⁴⁾。図5に示したメチル化の解析方法の一つである Maxam-Gilbert 法は、ある数のゲノムのメチル化を決めることができるため定量性はあるが、それぞれのゲノムの0か1かの情報に関しては反映されない。メチル化感受性を有する制限酵素を用いたサザンブロット解析でも定量的でしかない。bisulfite 法で、0, 1で決められていった転写調節領域のメチル化パターンを一つ一つ比較することで、幹細胞からTA細胞、そして分化した細胞のどの分化状態にある細胞かをメチル化パターンから推測することができる。

幹細胞 DNA は環境の影響を受けてメチル化し異常を引き起こす

Beckwith-Wiedemann 症候群の患者では、H19 遺伝子の転写調節領域においてメチル化の異常が認められている (図7)。エピジェネティックな異常は、ジェネティックな変化による結果として生じたものと予想されるが、疾病の症状はエピジェネティックな異常によって直接的に生じると思われる。Beckwith-

表1 幹細胞のレベルを決定するタグの候補となる CpG 配列が存在する転写因子の認識配列

転写因子	認識配列をもつ遺伝子	認識配列	文献
AP-1	AP1-TGF-beta1.1	TGAGACGAG	<i>J Biol Chem</i> 264 , 19373 (1989)
AP-1	AP1-TRE-1/C	ATGCGTCAG	<i>EMBO J</i> 8 , 3825 (1989)
AP-1	AP1-cfos	GACATCTGCGTCAGCAGGTTTCC	<i>Mol Cell Biol</i> 9 , 1327 (1989)
AP-1	AP1-col_syn	AGCTGATGAGTCAGCCG	<i>Cell</i> 49 , 741 (1987)
ATF	ATF_CS	RTGACGTMR	<i>Genes Dev</i> 3 , 2083 (1989)
ATF/CREB	CREB-fos	CTTCCGCCAGTGACGTAGGAAGTCC	<i>Mol Cell Biol</i> 10 , 2402 (1990)
ATF/CREB	CREB-hsp70	TCCGTGACGACTTA	<i>Mol Cell Biol</i> 9 , 2574 (1989)
Adf-1	Adf-1-Adh	CNGCCGNCGCCGNCT	<i>Trends Genet</i> 5 , 377 (1989)
Adf-1	p1_(1)	GCTGCCGTCCGC	<i>Mol Cell Biol</i> 10 , 539 (1990)
AhR	AhR-XRE1	CCTCCAGGCTCTTCTCACGCAACTCCGGGGCAC	<i>Science</i> 252 , 954 (1991)
BPV-E2	(E2)-E IIaE1	GACGTAGTTTTCCGCGC	<i>Mol Cell Biol</i> 7 , 3806 (1987)
C/EBP	C/EBP-alpha-1-AT-A	TTCGTGAGGTGGGCACATAACCTACTCT	<i>Science</i> 239 , 786 (1988)
CAP	CAP-CRE	GCCGTCATACTGTGACGTCTTTCAGAGCA	<i>Nature</i> 340 , 656 (1989)
CREB	CRE-fos	GTGACGTTTA	<i>Genes Dev</i> 3 , 198 (1989)
CREB	CRE-som	TGACGTCA	<i>Mol Cell Biol</i> 8 , 4225 (1988)
CREB	CRE-somatostatin	TGACGTC	<i>Nature</i> 328 , 175 (1987)
CTF	NFI-tk II	ACCCCGCCCA	<i>Cell</i> 42 , 559 (1985)
CTF/CP1	CTF/CP1-CTF-0	GCCAATGACAAGACG	<i>Nucleic Acids Res</i> 17 , 10179 (1989)
CYP1	CYP1-UAS0	CTAATAGCGATAATAGCGAGGG	<i>Mol Cell Biol</i> 8 , 2275 (1988)
E1A-F	BS13	CGGATGT	<i>Nucleic Acids Res</i> 17 , 10015 (1989)
E1A-F	BS15	CGGAAGT	<i>Nucleic Acids Res</i> 17 , 10015 (1989)
E1A-F	BS9	CGGATGT	<i>Nucleic Acids Res</i> 17 , 10015 (1989)
E2F	E2F-Ad12-E1a	GCGCGAAAA	<i>Genes Dev</i> 3 , 527 (1989)
E2F	E2F-myc	GCGGGAAAA	<i>Genes Dev</i> 3 , 527 (1989)
E2F	E2F_CS	TTTTSSCGS	<i>Nucleic Acids Res</i> 20 , 3 (1992)
E2F/DRTF-1	E2F/DRTF-1_class_I	TTTTCCCGCCAAAA	<i>Oncogene</i> 7 , 1075 (1992)
ENKTF1	ENKCRE-1_(1)	TGGCGTA	<i>Mol Cell Biol</i> 8 , 4225 (1988)
ER	ER-c-vit	GCGTGACCCGGAGCTGAAAGAACAC	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 81 , 429 (1984)
ER	ERE.cvit II	GGTCAGCGTGACC	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 85 , 7526 (1988)
Ets-1	Ets-1-T-alpha-2_(2)	CCTCTTCTTCCAGAGGATGTGGCTTCTGCGA	<i>J Virol</i> 66 , 5890 (1992)
Eve	site_e5_(1)	TCAGCACCGCACGATTAGCACCG	<i>Genes Dev</i> 5 , 594 (1991)
GCN4	HIS168	AAGCGTCAT	<i>Science</i> 234 , 451 (1986)
GR	GR-RUG-II	CGGACACGGAGTCCT	<i>EMBO J</i> 3 , 2771 (1984)
GR	GR-rTO-I	TGCACAGCGAGTTCT	<i>J Steroid Biochem</i> 27 , 9 (1987)
HNF-4	HNF-1-alpha-C_site	GGCTGAAGTCCAAAGTTCAGTCCCTTCGG	<i>Nature</i> 355 , 457 (1992)
HNF-4	HNF-4-apoC III	GCGCTGGGCAAAGGTACCTGC	<i>Genes Dev</i> 4 , 2353 (1990)
Myc/Max	c-Myc_binding_site	CACGTG	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 88 , 4323 (1991)
MyoD	MyoD-MCK-left_site	CACGTG	<i>Science</i> 255 , 979 (1992)
NF-1	NF-1-junction	TGGCGGGCCTCCA	<i>EMBO J</i> 9 , 947 (1990)
NF-κB	NFκB-MHCclass II	CGGGACTTCCC	<i>Mol Cell Biol</i> 9 , 844 (1989)
Oct-2	Oct-2-B	GCGGTAATGAGAT	<i>Mol Cell Biol</i> 11 , 3925 (1991)
P3A	P3A_CS	YNYGCGCW	<i>Genes Dev</i> 4 , 1999 (1990)
PEA-2	PEA-2_RS	CTGACCGCAG	<i>Genetika</i> 26 , 804 (1990)
PEA2	PE-a	GACCGCA	<i>EMBO J</i> 6 , 1331 (1987)
PU.1	PU-MHC_II_I-Ab	CGTCCCAAGTGAGGAACCAATCAGCATTG	<i>Cell</i> 61 , 113 (1990)
PUT3	PUT2_UAS2	GAAGCCGA	<i>Mol Cell Biol</i> 8 , 4634 (1988)
Pax-1	Pax-1_RS	CACCGTTCGGCTCTAGATATCTC	<i>Cell</i> 66 , 873 (1991)
Pax-2	site_e5_(2)	TCAGCACCGCACGATTAGCACCG	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 89 , 1179 (1992)
Pit-1	Pit-1-PRL-1	TCATCTATTTCCGTCAT	<i>Cell</i> 64 , 475 (1991)
RAR-gamma-1	beta-RARE	GATCTGTAGGTTACCGAAAGTCACTCA	<i>Mol Cell Biol</i> 11 , 4097 (1991)
SRF	CArg-hs3	CCATATACGG	<i>Mol Cell Biol</i> 8 , 4120 (1988)
Sp1	DSE_(1)	GAGGCGGGGC	<i>Nucleic Acids Res</i> 15 , 6437 (1987)
YY1	YY1-P5	GGTCTCCATTTTGAAGCG	<i>Nature</i> 354 , 241 (1991)
c-Ets-1	c-Ets-1-LTR	GCGCGCTTCCGCTCTCCGAG	<i>Oncogene</i> 8 , 1865 (1993)
c-Fos	X2_(1)	TGCGTCAT	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 89 , 11518 (1992)
c-Fos	c-Fos-CRE	CGTCATACTGTGACGTC	<i>J Biol Chem</i> 266 , 3882 (1991)
c-Jun	TRE_(2)	AGCTTGATGAGTCAGCCGGATC	<i>Cell</i> 62 , 1205 (1990)
c-Myb	c-Myb-F1-H	AAAACGGGAATGTTTTAAGAC	<i>Oncogene</i> 6 , 1397 (1991)

清水友益 (Thomas) 博士による解析結果.

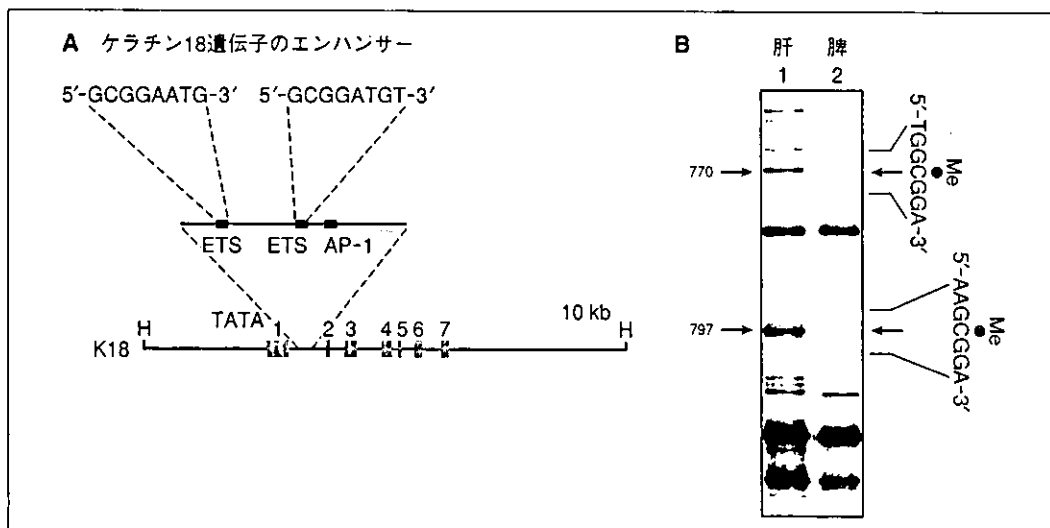


図5 組織特異的な遺伝子のメチル化

上皮の分化マーカーであるケラチン18遺伝子は、第1イントロンに存在する転写因子の認識配列のメチル化でその発現が区別される。そのため、上皮細胞と非上皮細胞の区別は、ケラチン18遺伝子の発現の有無だけでなく、ゲノムのメチル化によって判断できる。

A: ケラチン18遺伝子エンハンサーの転写因子ETSの認識配列中に存在するCpG配列の位置。

B: 同遺伝子の転写調節領域のメチル化状態を検討したMaxam-Gilbert法を示す。ケラチン18遺伝子が発現する肝臓ではメチル化がなく(バンドあり)、発現しない脾臓ではメチル化が存在する(バンドなし)。

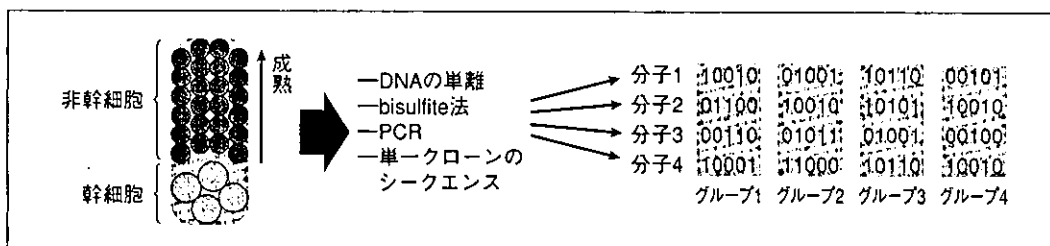


図6 メチル化の有無を0か1で表すことにより幹細胞の成熟度を判断できる

細胞からDNAを単離し、bisulfite法を用い、一つ一つのゲノムにおけるメチル化状態を検討する。いくつかの遺伝子の転写調節領域に関して、メチル化を検討すれば、幹細胞を区別できる。

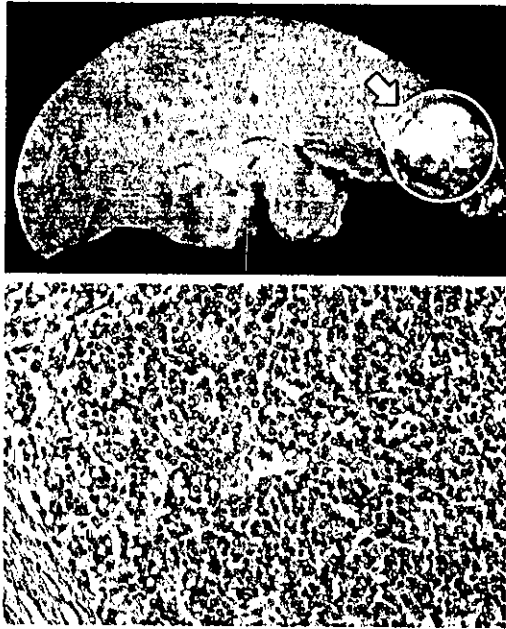
Wiedemann症候群という疾病では、臓器の発生異常とも関連するような過誤腫的な変化を認める。たとえば、肝に過誤腫、肝芽腫、脾に外分泌腺と内分泌腺が混在するような異常(nesidioblastosis)を伴うことがある⁵⁾。組織における細胞の分化が制御できていない状態である。

化生という現象も存在する。気管の扁平上皮化生と胃の腸上皮化生があるが、いずれも、外的因子の影響のある場である。気管の扁平上皮化生はタバコを吸うヒトに多く、また、胃の腸上皮化生は食べ物の影響を受けやすい。気管支上皮は多列線毛上皮で

あるが、気管支上皮の幹細胞から重層扁平上皮が生じる。このように、組織に存在する幹細胞を形態・機能とも他の系統の分化した細胞に変化させる現象がヒトの生体内でもみられ、この化生という現象は、繰り返しになるが、外的な因子に接触できるような気管、胃に多くみられ、DNA修飾による変化を生じやすそうな組織に認められる。

メチル化/クロマチン改変を行うことで確率的な分化誘導ができる

細胞を分化させるために脱メチル化作用を有する



ゲノムのメチル化の異常による
Beckwith-Wiedemann 症候群

H19 遺伝子転写調節領域の
メチル化の異常

↓
細胞転換

トンビはタカを生むか？

図7 Beckwith-Wiedemann 症候群
の患者の肝臓

過誤腫的 (hamartomatous) な細胞が出現していることを示した肉眼所見 (上, 矢印) と組織図 (下) を示す。ゲノムのメチル化の異常により組織に異なる細胞集団が産み出されてしまう

低分子化合物を使用する。この場合の分化は確率的であり、現在のところ予想できる範囲にないところが魅力でもある。5-アザシチジンは、ゲノムの DNA に取り込まれて DNA のメチル化を阻害するか、またはメチルトランスフェラーゼの活性を阻害する。この細胞に特有の DNA メチル化状態を脱メチル化剤で変化させること自体は、細胞が分裂するとその細胞でいられなくなることを意味し、細胞の分化状態のリセットがかかることになる⁶⁾。それゆえ脱メチル化剤で処理することは、①細胞の分化状態をもとに戻す (リセットをかける)、②細胞の分化に必要な (マスター) 転写因子の発現を誘導する、といった2つの作用がある。

DNA メチル化およびクロマチンを改変すると、細胞の初期化 (リセット) が起こるか、または自己 (アイデンティティ) を喪失する。骨髄間質細胞は心臓、脂肪、骨、臍になる^{7, 8)}。しかし、通常、血液幹細胞は骨、臍にならないし、骨髄間質細胞は表皮、血液細胞にはならない。骨髄内に心臓ができたことはない。細胞には細胞の固有の状態がある。脳が筋肉からできていると冗談でいうことがあるが、実際にはそのようなことはない。成人ヒトには多くの分化した細胞が存在し、個体の維持のためにそれ

ぞれが機能する。大部分の細胞は分化しきっているため、その細胞の系列に分化することはあっても別の分化形質を示すことはない。これらの細胞は部分的に全能性を有している。一部の例外的な現象は報告されているが、部分全能性を有している細胞はもともとの胚葉を越えて分化することはない (と考えられていた)⁹⁾。

骨髄間質細胞が基本的に神経や血液細胞になることができないしくみはどのようなものなのか、骨髄間質細胞が有する部分全能性の“部分”である機構はいずれに存在するのか、このことは、多分化能 (multipotent) または部分全能性を有している細胞と1種類の細胞にしか分化できない (unipotent) 細胞との違いとまったく同じである。最初の時点、すなわち受精卵の時点ではあらゆる細胞になることができる。一方、発生が進むと細胞は多分化能を失っていき、ある限られた細胞にしか分化できなくなる。多分化能を有する細胞からある系統にしか分化できない細胞への移行は、細胞の潜在性の消失または遺伝子発現の制限にほかならない。

幹細胞は不死であるとの考えがある。もし、本当に不死であれば、その不死である状態は幹細胞のメ

メチル化状態が決められている、逆にメチル化状態をみれば不死であるかどうかはわかるはずである。胚盤胞の内部細胞塊は胎児性幹細胞を作り出すことができること、胎児性幹細胞はどうやら不死であること、発生が進むとその不死であることが消失し死に至る細胞になってしまうこと、それらはメチル化が決められていて胚盤胞からその次の瞬間のメチル化の変化が重要らしいという可能性が考えられるが、これらのことを検証できる実験系はない。メチル化状態を決

めなくてはいけない場所が多すぎて今の技術では時間も時間もかかりすぎるのが問題となっている。

謝辞

本稿のもとのアイデアは洪実君からのものです (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/mita.html>)。清水友益君との議論は実りあるものでした。時間のある方は、脱メチル化剤によって生じた骨髄間質の心筋への分化に関するアニメーションをウェブサイトでご覧下さい (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/HTML>)。

文献

- 1) Ro S & Rannala B. Methylation patterns and mathematical models reveal dynamics of stem cell turnover in the human colon. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10519 (2001)
- 2) Umezawa A, Yamamoto H, Rhodes K et al. Methylation of an ETS site in the intron enhancer of the keratin 18 gene participates in tissue-specific repression. *Mol Cell Biol* **17**, 4885 (1997)
- 3) Takizawa T, Nakashima K, Namihira M et al. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* **1**, 749 (2001)
- 4) Yatabe Y, Tavare S & Shibata D. Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10839 (2001)
- 5) Fukuzawa R, Umezawa A, Morikawa Y et al. Nesidioblastosis and mixed hamartoma of the liver in Beckwith-Wiedemann syndrome : Case study including analysis of H19 methylation and insulin-like growth factor 2 genotyping and imprinting. *Pediatr Dev Pathol* **4**, 381 (2001)
- 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 (1992)
- 7) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* **103**, 697 (1999)
- 8) Umezawa A, Tachibana K, Harigaya K et al. Colony-stimulating factor 1 expression is down-regulated during the adipocyte differentiation of H-1/A marrow stromal cells and induced by cachectin/Tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* **11**, 920 (1991)
- 9) 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* **68**, 235 (2001)

間葉系幹細胞をもちいた再生医療研究

梅澤明弘*

胎児性幹細胞が全能性を有するのと同様に、骨髄間質は“部分”全能性をもつ。骨髄間質には、成体組織に存在する幹細胞としての性格を有する細胞と成熟細胞としての性格を有する細胞が存在する。細胞治療の標的となる組織を構築する細胞を得るためには、発生学を基盤としたプロトコールにより細胞を初期化することと、それにつづく細胞転換が必要となる。細胞転換にかかわる核の状態、すなわちメチル化とクロマチンを改変するメカニズムの解明のために間葉系幹細胞の樹立を成功させたことは、骨髄間質の細胞転換システムの研究の礎となった。

はじめに

再生医療・細胞移植の基礎となる“幹細胞の可塑性”は、少なくとも10年以上まえから試験管内で現象としてとらえられており、知られていた。そこで使用された胎児性幹細胞やさまざまなレベルの組織幹細胞は、発生を模倣する過程を試験管内で再現できるため発生にかかわる分子機構の解明に多大なる貢献をし、サイエンスを押し進めるうえで確固たる地位を得てきた。幹細胞からできる機能を有する分化した細胞をヒトの組織に戻すという発想はもともと生物学者のものであったが、どこか現実離れした考えとして、実現するのはまだ先の夢物語とし

てとらえていたところがあったように思う。一方、心臓、脳、骨格筋、骨、軟骨、内分泌の組織に細胞を移植して、その臓器の機能を助けられないかという欲求の強かった医療に携わる研究者が、幹細胞研究をはじめとした発生学から得られた知見をもちいて“生体内ではたらくことのできる細胞”を作製し、ヒトに戻すことを具体的にかつ精力的にはじめた。そのような中で、ヒトの細胞を使ってマウスの臓器の機能を補填する成功例はここ1年で数多く発表されている。動物実験からヒトへの臨床に向かうのはそう遠くない将来であろうし、すでに一部はじまっている。患者さんをはじめとした社会的要求の高まりは理解しているが、再生医療・細胞移植を確固たるものとするうえでも、そこにかかわる分子基盤を明確にしておくてはならない。さらに、社会的認知を受け、必要な手続きに関するステップを一つひとつ踏むことで、祝福される形で“幹細胞”を世に送りだしたいと思っている。

Key Word

骨髄間質
間葉系幹細胞
ニューロン
骨
メチル化

* UMEZAWA Akihiro/慶應義塾大学医学部病理学

1. 細胞は固有の性格を有する ～細胞の分化形質のこと～

ヒトの細胞とはいえ、個体のなかではすべてをまとめてただ単に細胞として存在していることはなく、血球の細胞であったり、肝臓の細胞であったり、軟骨の細胞であったり、脳の細胞であったりと千差万別のなかのいずれかの性格をそなえたものとしてのみ存在する。脳の細胞と血液の細胞とのあいだには機能的にも形態的にもたいへんな相違点がある。このように細胞に違いが生じ、特別な性格の出現する現象を“分化する”，そして性格の出現したものを“分化した”とよぶ。

多細胞生物の個体という細胞社会は、このように“分化した”細胞から成立している。細胞の分化にかかわる条件を明らかにすることは、発生機構解明につながるだけでなく、再生医療における基盤的技術を開発することにほかならない。一方、一度分化した細胞がいつのまにか別の性格のものに変化するようなことは起きないのだろうか。本稿では、分化した状態を細胞の初期値 (default state) とよぶ。細胞の初期値を具体的に説明することはむずかしいと考えているが、簡単にいえば、「血液細胞は分裂しても血液細胞，肝細胞は分裂しても肝細胞」といったように分裂しようともその初期設定された分化ステージは一定であるという考えである。そしてその初期値は、ゲノムのメチル化またはクロマチンといった二次ないし高次構造ならびに遺伝子相互のネットワーク上にその情報が掲載されている。本稿ではこれらの考えが最近の実験データで崩れていることをいくつかの例で示す。

2. トンビはタカを生むか？

「トンビはタカを生む」という諺は平凡な親から傑出した子供が産まれるたとえであるが、ここでいうトンビは骨髄間質細胞である⁹⁾。単なる骨髄間質が、身体的主要な臓器である心肺肝腎脳の構成細胞を生み出すことができるのであろうか。比較的多くの研究者が、実は昔から錬金術師を彷彿させるほどにどうにか実験的に肝臓を骨にしたり、筋肉を腎臓にするようなことが自由自在にできないかとさまざまな実験をつづけてきた。この研究者

が求めてきたことが、サイトカイン，マトリックス，転写因子をもちいることで少しずつできるようになってきた。スタートする細胞でいくつかの現象は異なるが、そのプロトコール自体が「トンビがタカを生む」ための秘密の鍵となる。

最初の契機は、福島でおこなわれた学会帰りの車で言われた「すべての造血を誘導できる骨髄間質細胞を単離するように」という指示であった。やり方は、骨髄間質の初期培養¹⁾，クローニングをつづけ、細胞をマウスの皮下に移植し、血液が誘導されたかどうかをみるという単調な実験のくり返しだった。単調だがむずかしい手順がないことは実験を進めるうえで幸運であった。いま思い起こせば、造血を亢進する骨髄間質は、米国のオシリス社が同定をめざした白血病およびリンパ腫の患者さんに対しておこなう細胞治療に使用する細胞そのものであった。

さまざまな分化能を有する骨髄間質を単離するのに重要な点は何か、またはそのためのプロトコールはどのようなものなのかという問いは、よく受ける質問の一つである。現在もそのポイントを明確にする努力をつづけているのであるが、17年まえにおこなったこと、ひたすらに細胞培養，クローニングをくり返し、生体内に細胞を注射し、そのなかに標的とするような活性を有している細胞はないかという作業のなかでみつめてきたものである²⁾。地道な作業のために手間がかかり、細胞治療・再生医療にもちいるには時間的なことを含めてむずかしい方法だが、表面抗原に対する抗体もフローサイトメトリ技術，転写調節領域の解析も不十分であったころなので、そのように進めていくしかなかった。「血液幹細胞を体内で誘導できる骨髄間質細胞株の単離および同定」にとって必要なことは丹念にマウスより採取した間質細胞の培養をおこなっていくことで、時間と労力と運が必要と思われた。幸運なことは、この研究に興味をもってくれた研究員らがあり、この単純な作業に参加してくれたことである³⁾。

そのような中で、ある日、「細胞を移植した部位が赤くなっている」という報告を受け、細胞を移植した部位にメスを入れたところ、内部が血液を思わせる赤くどろっとしたもので埋まっていた。正直な第一感は、移植し

た細胞が増殖し中心部が壊死に陥ってそこに出血し、赤くみえるのだらうと思った。標本を作製したところ予想に反し、造血ができ、赤芽球系、顆粒球系、巨核球系の3系統の細胞が増殖していた。骨髄ができており、結論から先にいうと、移植した骨髄間質細胞は間葉系幹細胞であったが、そこから分化した骨芽細胞が骨を作成し、その骨のなかに造血が誘導されたというわけである。もちろん理論的には予想できたが、実際に造血を誘導できる細胞の単離ができるとは半信半疑であったので、皮下の腫瘤を半分に分けたときに真っ赤な血液がみられたときは少々興奮した。この細胞自体が血液細胞になってしまうのではないかとも思ったが、実験によりこの考えは否定された。血液細胞がこの細胞を移植した部位にたどりついていたのである。実験の結果は、移植した細胞をディフュージョン・チャンバーという小部屋に入れることにより、そして移植した細胞を β -ガラクトシダーゼでラベルすることにより確実なものとなった。

この時点では移植した細胞は間葉系幹細胞に相当する細胞であり、そのなかから一つの形質を有する細胞をサブクローニングする必要があった(図①)。2年という歳月はかかったが、最終的に骨芽細胞を単離しとりだすことと、間接的ではあるが造血を誘導できる間質細胞をみつけることができた。草刈 悟氏が単離したことよりKUSA細胞と名づけ、サブクローニングしていくうちに名前が長くなり、最終的には成熟骨芽細胞KUSA/A1として知られている。この骨芽細胞は現在、①骨形成を促進する薬物のスクリーニングのアクセシ系、②骨の材料となったり骨の代わりとなるバイオマトリックスの検討、③新しい骨形成因子が存在する可能性、④基礎生物学的に骨芽細胞の分化機構の解明に利用できると考えている(図②)。

骨髄間質細胞は間葉系細胞であり、そのなかでも分化形質で最も明らかな脂肪細胞は比較的多く単離される⁹⁾。骨髄には脂肪細胞は多く存在し、造血がなくなるとそこは脂肪細胞で占められる。存在する割合からも、脂肪細胞が多くなるのは理解していたため、できるだけ脂肪細胞の形質を有していない細胞を欲していた。そこで、5-アザシチジン処理すると脂肪細胞の脂肪滴が大きくなり、試験管内で明らかな形質を示すことから、培養して

いる細胞に対し、5-アザシチジン処理をして脂肪細胞がでてくる、あるいは脂肪滴がみえてきたら、その細胞は廃棄するようについていた。その後、「間質細胞が動きだしている」との連絡を受け、早速培養室に見にいくと、リズムカルな動きをした細胞が位相差顕微鏡下で画面一杯にみえ、拍動および自動能を有していたことから、それが心筋細胞であり、骨格筋や平滑筋であると予想できたが、位相差顕微鏡下での形態と超微形態だけで強い示唆は得られなかった。最終的に、Makinoら¹⁰⁾により「心筋が骨髄間質からできる」と完全に証明された。牧野伸司氏にその細胞を撮影したビデオをみてもらったところ興味をもってくれたのがはじまりで、はじめて骨髄間質が踊り出すという報告を受けてから10年以上の月日が経ったことになる。牧野氏と福田恵一氏の不断の努力とともに、この期間に心筋細胞特異的転写因子の発見といった心血管系にかかわる国内外の発見があったお陰であることは間違いない。

間質細胞から脂肪細胞への分化は骨髄の初期培養から知られており、脂肪細胞が造血幹細胞を支持していることは間違いない。1981年にわれわれ⁹⁾は脂肪細胞に分化する細胞を単離した。その上清中に造血細胞を支持するサイトカインの産生があること、そしてその液性因子の産生が脂肪細胞への分化過程で減少することがつきつきに明らかにされた。さらに2000年には、前脂肪細胞が胚性幹(embryonic stem: ES)細胞をニューロンに分化させる液性因子を産生していることが明らかとなり、注目を浴びている。

骨髄間質細胞のニューロンへの分化は著者にとって驚くべきことであった。骨髄間質は中胚葉由来であり、外胚葉由来であるニューロンへ分化するとはまったく考えていなかったからである。間質細胞が心筋へ分化することは間違いないが、その頻度が低いことから効率よい分化プロトコルを求めて5-アザシチジン処理をおこない、その後、サイトカイン、マトリックス、転写因子の組みあわせで研究をはじめた¹¹⁾。神山 淳氏より培養しはじめた骨髄間質は踊りださないが突起を伸ばしはじめるといふ報告を受け、そのようなこともあるだろうと答え、動きだすまで待つようにと伝えたのを覚えている。何度も培養をくり返した結果、神経細胞ではないかとい

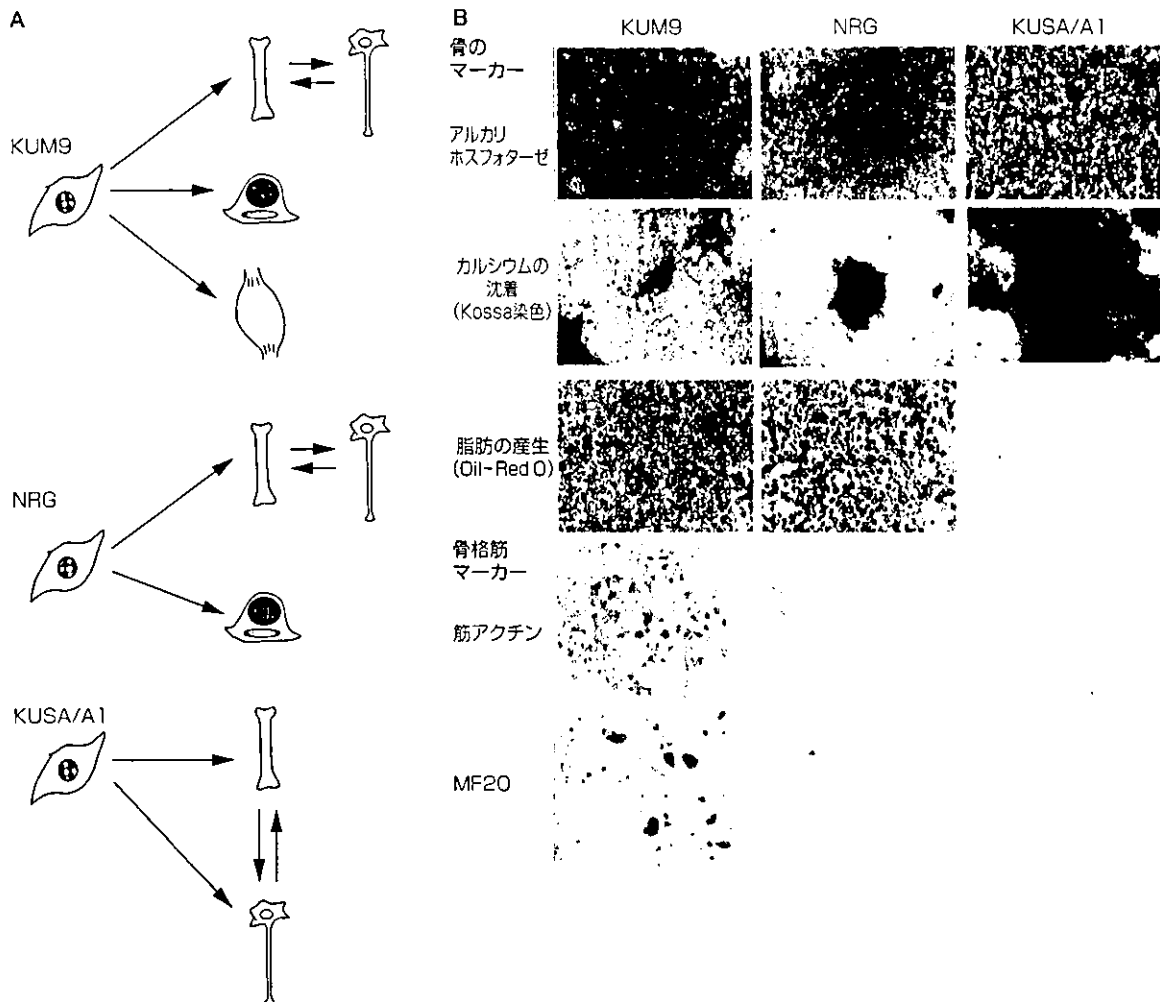


図1 さまざまなレベルの分化能を有する間葉系幹細胞

A: 試験管内で示すさまざまな分化形質より, KUM9 細胞は骨, 脂肪, 骨格筋に分化する最も高い分化能を有する. NRG は, 骨, 脂肪に分化する. KUSA/A1 細胞は骨にのみ分化する. いずれの細胞も骨芽細胞を介して, ニューロンへの分化形質を示す. このように間葉系幹細胞においてもその分化能には, 明らかな違いを認める.

B: 脱メチル化活性を有する低分子化合物により, 骨髄間質細胞はさまざまな分化マーカーを発現するようになる. 3種類の細胞(左から, KUM9, NRG, KUSA/A1)を使用している. マーカーは五つ示してあり, 上からアルカリホスファターゼ(赤色で骨の指標), Kossa 染色(カルシウムの沈着で黒くなり, 骨の指標), Oil-Red O 染色(赤色で脂肪の指標), アクチンの免疫組織化学染色(筋肉細胞の指標), MF20の免疫組織化学染色(筋肉細胞の指標)である. 一番左の細胞(KUM9)はすべてのマーカーを示し, 中央の細胞(NRG)は骨と脂肪になり, 一番右の細胞(KUSA/A1)は骨にしかない.

うので, それでは神経の領域で活躍している研究者にみていただき, もし違うということならば, 心筋細胞への細胞転換の効率を上げる研究に専念してもらうように約束した. 予想に反し, 3人の神経発生学者は皆, ニューロンとしての形態また一部アストロサイトをうかがわせる像をみると判断した(図3). そこで神経のマーカーによる免疫組織化学染色, RT-PCR で検討したところ,

5-アザシチジン処理後にマーカーの出現をみた. 著者自身が信じるようになったのは, 軸索のように突起を伸ばした細胞においてのみ, β -チューブリン, Hu などのマーカーが陽性となったためである(図4). 優秀な神経学者の力を借りて成熟ニューロンにし, 神経伝達物質に反応するところまでになり, ニューロンへの細胞転換のプロトコールも洗練されてきた. 神経発生学のお陰であり,



図② 骨芽細胞 KUSA/A1 は生体内で骨形成を速やかにおこなう

骨芽細胞を同系マウスの皮下組織に細胞移植し、4週間後に形成された組織の解析をおこなった。皮下に密な骨梁を形成する骨組織が認められる。高倍率で、骨組織と同時に骨髓腔もみられる。経時変化を追うと、移植後5週で骨髓腔内に3系統の造血細胞が出現する。KUSA/A1細胞は、monopotentialな間葉系細胞といえる。



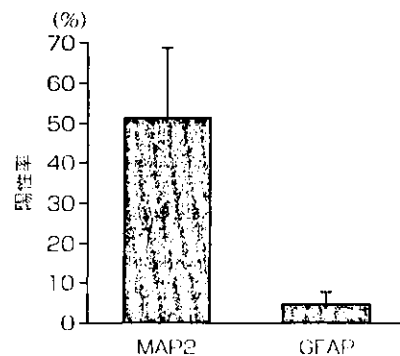
図③ 間葉系細胞からニューロンへ

骨芽細胞からノギンの導入を含めたサイトカイン、マトリックスの組みあわせでニューロンへの分化がみられる。KUSA/A1細胞より作製したニューロンは、丸く光る細胞質、長い突起、および突起の先にみられる扇状の末端といった特徴的な形態を示す(左と中央)。これらの細胞には神経伝達物質であるグルタミン酸に反応してカルシウムが流入する。突起を伸ばした細胞に神経特異的分子MAP2が免疫組織学的に陽性になる。

それらを明らかにしてきた過程について多くのことを学ばせていただいた。

3. 細胞株の利点・欠点を知ることは大事である

いままでの骨髓間質にかかわる研究のすべては、単一細胞由来のクローンでおこなわれてきた。現在はヒトの細胞に集中しているが、従来は腎臓類由来の細胞を使用してきたため自然に不死化しており、腫瘍化はしていない。初期培養を使用していないのは、血液・免疫にかかわる研究分野を模倣して研究しつづけたからであると思っている。すなわち、不死化した細胞をもちいれば、再



図④ 間葉系細胞から作製した神経細胞の割合

間葉系細胞から作製した神経細胞はニューロン特異的分子MAP2を発現する。一方、GFAP陽性の細胞はほとんどみられない。



NRG

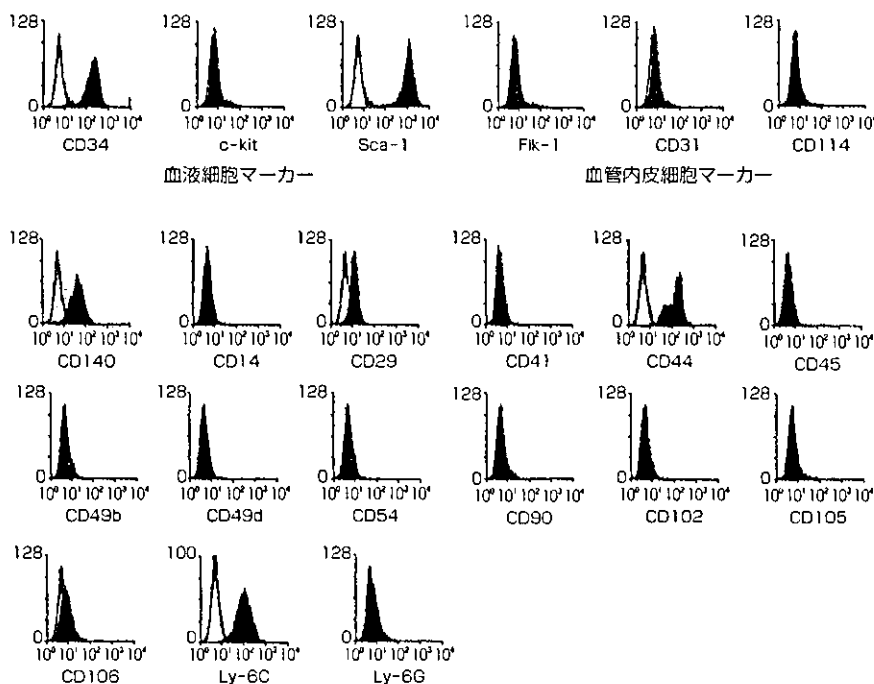


図5 多分化能を示す間葉系細胞の表面マーカー
 間葉系細胞 NRG は、CD34 陽性、c-kit 陰性、Sca-1 陽性である。

現性の有無は容易に判断できる。それは自分自身でおこなってもよいし、前記のようにほかの研究室が追試したり最終決定をおこなってもよいだろう。再現性の有無は、このように信じがたいことを信じるために最も重要である。さらに初期培養では毎回新しく培養をはじめなくてはならないのに対し、細胞株では時間的にも労力的にも容易に研究をはじめることができる。さらにクローニングすることで、ほかの細胞の混入やヘテロな細胞集団での実験ではなく単一の細胞由来であることを示すことで切れのよい実験ができる(図5)。欠点は、培養をくり返す過程での遺伝子レベルの変異にともなう分化形質の変化が生じる可能性を否定できないことである。この点に関しては、利点(benefit)と欠点(drawback)を天秤にかけ、その欠点を意識しつつ利点を最大限に利用することは間違いでなく、最終的に初期培養または培養もない系で(間質細胞の場合は数が少なすぎてむずかしいが)、決定すればよいことであると思っている。

おわりに

動き出す細胞が骨髄間質からできることをはじめて現象としてとらえたのは、10年以上まえのことである。

その現象を最も注目したのは慶應義塾大学循環器内科の福田氏である。心筋は胎児由来の心筋細胞とES細胞からしかできておらず、体細胞からできることはないという考え方を転換する必要があると指摘された。加えて、そのできあがった心筋細胞を心臓に注入することで、心筋症や虚血性心疾患の心機能を補填することが可能であるとの示唆がなされた⁹⁾。2001年には数多くの骨髄細胞ないし骨髄間質細胞の心臓への移植および心機能に対する貢献に関する論文が発表されているので^{10) 11)}、その指摘に異論はまったくないのだが、そのときは注入した細胞が線維化を増強させないか、あるいは分化しない細胞が出現するのではないか、肉芽組織をつくるのではないか、宿主の心筋細胞とのあいだにシンクロが生まれず不整脈が生じるのではないかなど、多くの疑問をもっていた。それも杞憂と思われ、メカニズムは不明瞭だが心筋に移植すると心筋への分化が促進するような傾向にあるようである。よい例えかどうかはわからないが、「木の棒」も「杖」と命名して高尾山の登山口で売れば飛ぶように売れたというケースもある。また、黎明期のマイコンを「ワープロ・表計算・データベースのマシン」として定義づけてヒットさせたIBM-PCの例もある。細胞転換

にしても幹細胞の可塑性にしてもかなり基礎的な内容の研究であり、完全にその機構を解明するまでの道のりは遠いが、そこに明快な目的と有用性がみえれば、多くの人が興味をもつだろう。それがいまの再生医療にかかわる研究の特徴と思っている。

●謝 辞

本稿で述べた研究は秦 順一研究室でおこなわれている。岡野栄之教授、福田恵一博士、小川 聡教授、今林英明先生、戸山芳昭教授、桜田一洋博士、神山 淳氏との骨髓間質細胞の分化に関する共同研究で多くの示唆を受け、世界的な潮流について最新情報の供与を受けた。草刈 悟氏、阿部 仁氏は魅力的な骨髓間質細胞をたくさん樹立し、数々の「発見」は彼らに帰属するべきものが多い。田島信哉君、伊澤良兼君は自主学习に参加してくれた学生だが、彼らの多くの示唆は必要不可欠のものであった。時間のある方は、骨髓間質の心筋への分化アニメーションをウェブサイトでご覧下さい (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/HTML>)。

文 献

- 1) Dexter TM *et al* : Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 91 : 335-344, 1997
- 2) Umezawa A *et al* : Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J Cell Physiol* 151 : 197-205, 1992
- 3) Umezawa A *et al* : Colony-stimulating factor 1

expression is down-regulated during the adipocyte differentiation of H-1/A marrow stromal cells and induced by cachectin/Tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 11 : 920-927, 1991

- 4) Makino S *et al* : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1991
- 5) Harigaya K *et al* : Murine bone marrow cell line producing colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci* 78 : 6963-6966, 1981
- 6) 梅澤明弘 : 骨髓間質細胞. 分子細胞治療 2 : 17-24, 2001
- 7) 岡野栄之 : 中枢神経系の幹細胞生物学. 実験医学 19 : 80-90, 2001
- 8) 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 (Stem cell issue)* 68 : 235-244, 2001
- 9) Gojo S *et al* : Transplantation of genetically marked cardiac muscle cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 113 : 10-18, 1997
- 10) Orlic D *et al* : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001
- 11) Kocher AA *et al* : Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7 : 430-436, 2001

うめざわ・あきひろ 1960年、浦安生まれ。専門は病理学。研究テーマは骨髓間質細胞を新しい生体マイクロデバイスに見立て、その分化能の可塑性を利用した細胞治療によるグローバルな臓器の再構築。

間葉系幹細胞

慶応義塾大学医学部病理学教員助教

梅澤明弘



ヒトの身体は60兆の細胞の集合体である。もとはたったひとつの受精卵で、分化・増殖を繰り返すことによって、成り立っているといわれる。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にはあるにせよ、元通りに修復することも不可能ではない。その供給源のひと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。

骨髄には、「造血」と「間質(支持組織)」の大きく分けて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もある^{1, 2, 12, 13)}。骨髄由来の細胞は安全に取り扱う技術が確立しており、骨髄穿刺により容易に採取できる。細胞移植の研究は、現在、非常に盛んに行われている分野であり、神経幹細胞をはじめ、その進歩は著しい^{10, 11)}。そのなかで、間質細胞を使うことが研究室のひとつの存在価値となっている。

細胞治療の先駆けとなった 骨髄移植から学ぶ

最も進んでいる細胞移植は骨髄移植であり、生体外で細胞を培養することはないが、骨髄移植について考えてみたい(参考となるウェブサイト：<http://www.info.ncc.go.jp/NCC-CIS/pub/0sj/010702.html>)。施設により違いはあるだろうが、基本的なことをおさらいする。腸骨骨髄から1000 ccもの骨髄液を移植の際に利用する。骨髄移植に必要な充分量の血液幹細胞を得るには1000 cc必要であり、凍結をすることはできても生体外で現在のところ血液幹細胞を増殖させることは難しい。実際には、移植する日に採取し、その日に2時間かけて中心静脈カテーテルを通じて、1000ccを注入する。骨髄液を採取する場合は、全身麻酔で行い、10ccずつ採取し、骨片はフィ

ルターでこす。非血縁の方からの骨髄採取は他施設で行い、その日のうちに海外を含め、遠隔地であってもできるかぎり、早く運搬する。allogeneicな組み合わせ(他家移植)の場合、HLAが同一であっても生着不全が約5%生じる。生着不全を防ぐために宿主(ホスト)の免疫を完全にたたき、そのため、前処置として1週間かけて全身に対する放射線照射(2Gy×6回)、免疫抑制剤投与(cyclophosphamide, AraC×2回)を行う。血液型が一致している場合は骨髄細胞のすべてを輸注する一方、血液型が不一致の場合は赤血球を除く(pheresis)。骨髄移植の場合は、結果として免疫細胞も移入されることになるのでGVH(graft versus host)病を生じる。これは骨髄間質の細胞移植では、免疫細胞の移植は行わないので問題とならないが、拒絶の問題はさげられない。

間葉系細胞の分化の指標を知る

分化を記述するには、現在の基礎生物学の教科書のかんりの部分を含む。そのすべてを研究する際に検討することは大事なことではあるけれども、時間や労力を考えると自分自身にとっての実験を進めるうえでの必要最小限のアッセイが確立していると時間の節約ができ、さまざまな細胞やプロトコルや移植実験を進めることが可能となり、大変便利だ。そこでひとつひとつの間葉系細胞の分化形質および必要最小限おさえておきたい組織形成能を列挙してみた。

軟骨から始める。軟骨を形成する能力があるかどうかは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、骨に比べて少し透明感がある軟骨を作らなくてはいけない。標本では、