

図1 間葉系幹細胞ならびに骨芽細胞のアルカリ・フォスファターゼ活性  
脂肪細胞 (PA6), 骨芽細胞 (KUSA/A1), 間葉系前駆細胞 (Committed stem cell), 間葉系幹細胞 (KUM9) のアルカリ・フォスファターゼ活性.

トリジン・ブルーで異染色性 (metachromasie) を示す軟骨基質のなかにペアになった軟骨細胞が埋もれてほしい。試験管内では、軟骨かどうかは全くわからない。ある種の骨髄間質は培養上清がどろっとなり、軟骨基質が試験管内で出たのではないかと思ったことがあるが、分化形質としての意義は不明である。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意味のある形態かどうかは自分自身でも自信がない。

骨の場合は、試験管内でアルカリ・フォスファターゼの高い活性(図1)、カルシウムの沈着が一般によく検討対象となる。同時に最も大事なものは、細胞を移植することで骨を形成させることである<sup>2)</sup>。

脂肪はどうか。脂肪滴が細胞内に溜まるのは、きわめてわかりやすい。分化の指標として形態学的に何の染色もしなくてもわかる。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きてわかりにくいけれども、脂肪滴がだんだんと大きくなってくと脂肪滴が光ってきて、位相差顕微鏡下で容易に判断できる<sup>3, 5)</sup>。脂肪滴を生体内の脂肪組織 (brown fat を除く) 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-azacytidine 処理をする。ゆえに脂肪細胞の場合は試験管内のなかでわかるので、骨や軟骨のように移植する必要はない。脂肪細胞を植えることで太らしたり、乳房を大きくするアッセイは必要ない。

心筋はどうか。心筋細胞は2通りのことが必要である。まず、試験管のなかで細胞に自動能をみとめ、リズムカルな収縮を必要とする<sup>4)</sup>。収縮の「心拍数」は、1分間に60回は必要である。1分間に1回の収縮では、心筋 (心臓を構成する細胞) とはいえない。「動く」ことが大事である、とりあえず、心筋の究極の「目的」または機能

は、それぞれの細胞がシンクロして1つのポンプとして働くことである。シンクロするためには、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である。これらの細胞がギャップ結合を介する連絡を有することは色素移動法により明らかにされている。また、コネキシン 43 の発現も認められる。

神経細胞はどうか。形と機能の面から考える。神経としての特徴的な形態である細長い突起、突起の末端が三角形になっていること、丸くて位相差顕微鏡下でピカピカ光る細胞体が、試験管内における特徴と考える。免疫組織化学では、主にフィラメントに対する抗体が多い。ニューロンとして MAP 2,  $\beta$ 3-tubulin, 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, TrkB, TrkA, GAP43, NCAM の発現をみる。最終的には活動電位を得ることは必要不可欠であるけれども、神

経系幹細胞においてもなかなか活動電位を得るまで成熟させることはむずかしい。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・イメージング法でカルシウムの流入も重要なアッセイとなる。

以上の分化の特徴については、実はこの再生の各項目を詳細にみればわかることである。ここでは特に簡単に調べられるものを列挙してみた。

Regeneration Medicine

細胞の初期値について

細胞転換にしたって、分化の可塑性にしたって、基礎的なことはかなりわかっていて、この分野が始まっている。そして、間葉系幹細胞にかかわる実験も、発生生物学の知識を思いっきり利用しているため、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かかわるプロトコールは、発生学の積

み重ねによるお陰である。培養に使用する培地、試薬にしる、目新しいものはないけれども、さまざまな手法を組み合わせている。

近年の細胞転換に関しては多くの報告があり、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、筋肉細胞から造血細胞、毛根細胞から造血細胞がある。さらに、試験管内において骨から神経への変身が報告された<sup>6)</sup>。その骨芽細胞をノギンと5-azacytidine は、神経に転換する(次頁図!!)。ノギンは骨形成因子を阻害する。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う。また、クローンであり、骨芽細胞のマーカであるアルカリ・フォスファターゼをすべての細胞が発現していることは酵素組織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。

このひとつの細胞由来である(single cell-derived)細胞は、生体内で効率よく骨形成を行うので、骨芽細胞と

考えられる。初期値は骨芽細胞であると考えるのが一般的である。一方、この細胞の初期値は骨ではなく、神経である可能性も否定できない。ノギンを処理することで神経になってしまうのであるから本来は神経細胞なの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。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 初期値なんて考えるのは意味がない説

定常の分化状態があれば、①、②が意味がある(図3)。細胞には定常状態なんてないならば、この初期値というのは、考える必要がない。

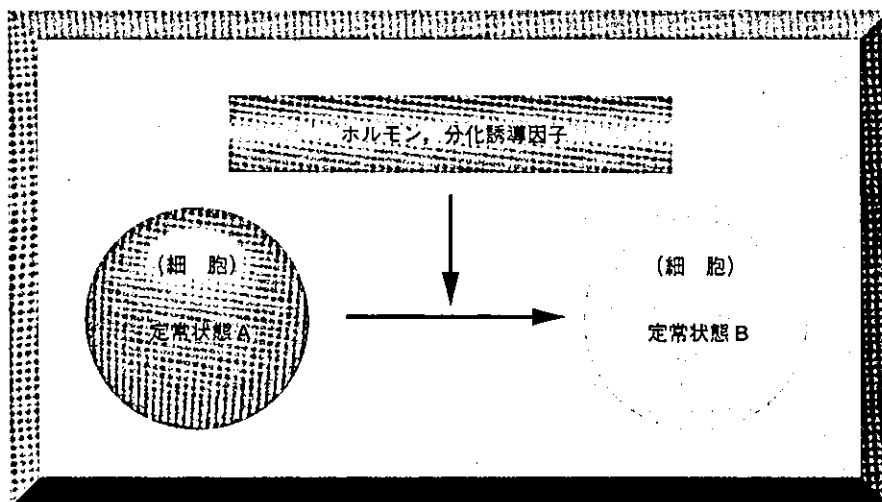
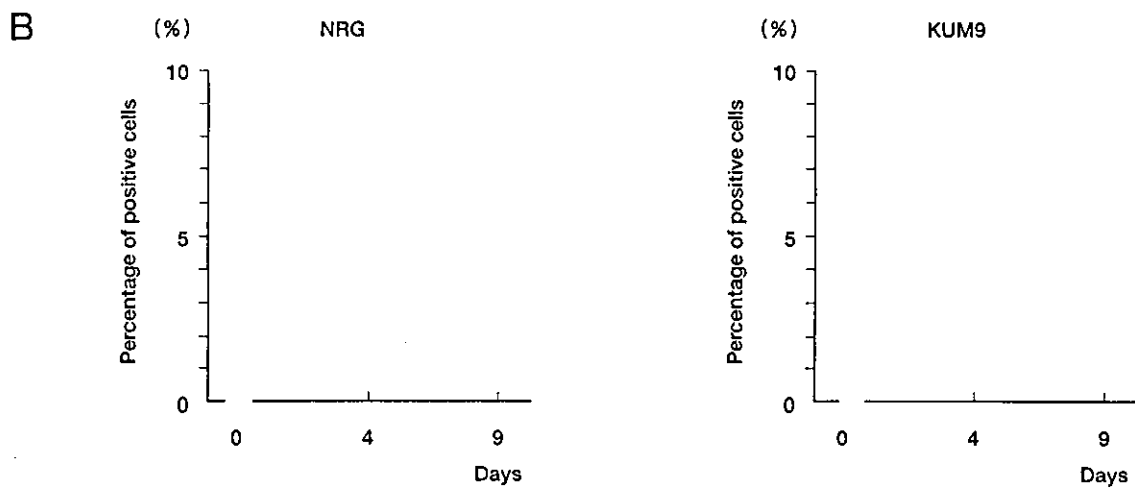
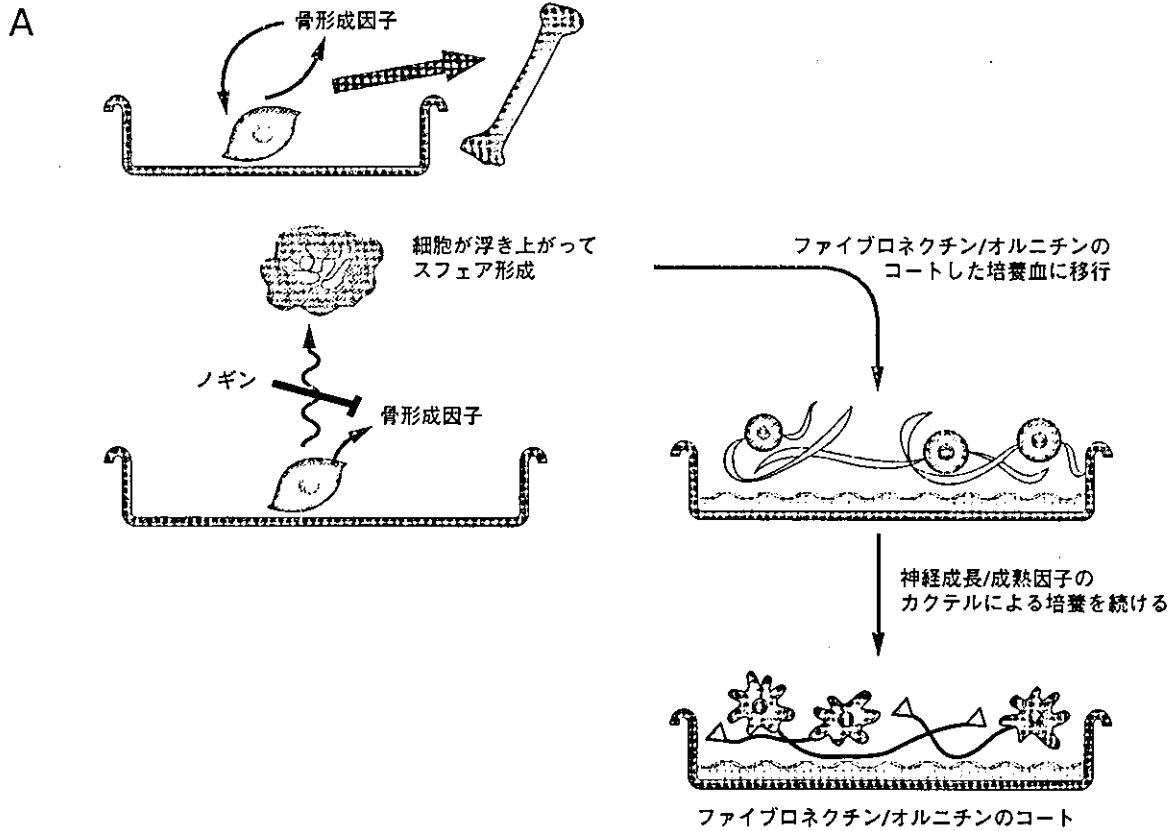


図3 分化における基本的過程



A: 骨形成因子・阻害剤であるノギン、マトリックス、成熟因子を用いることで、骨芽細胞はすべてニューロンへ分化する。  
 B: 間葉系幹細胞(NRG, KUM9)は、5-azacytidine 処理により5~10%の細胞に神経マーカーが陽性になる。



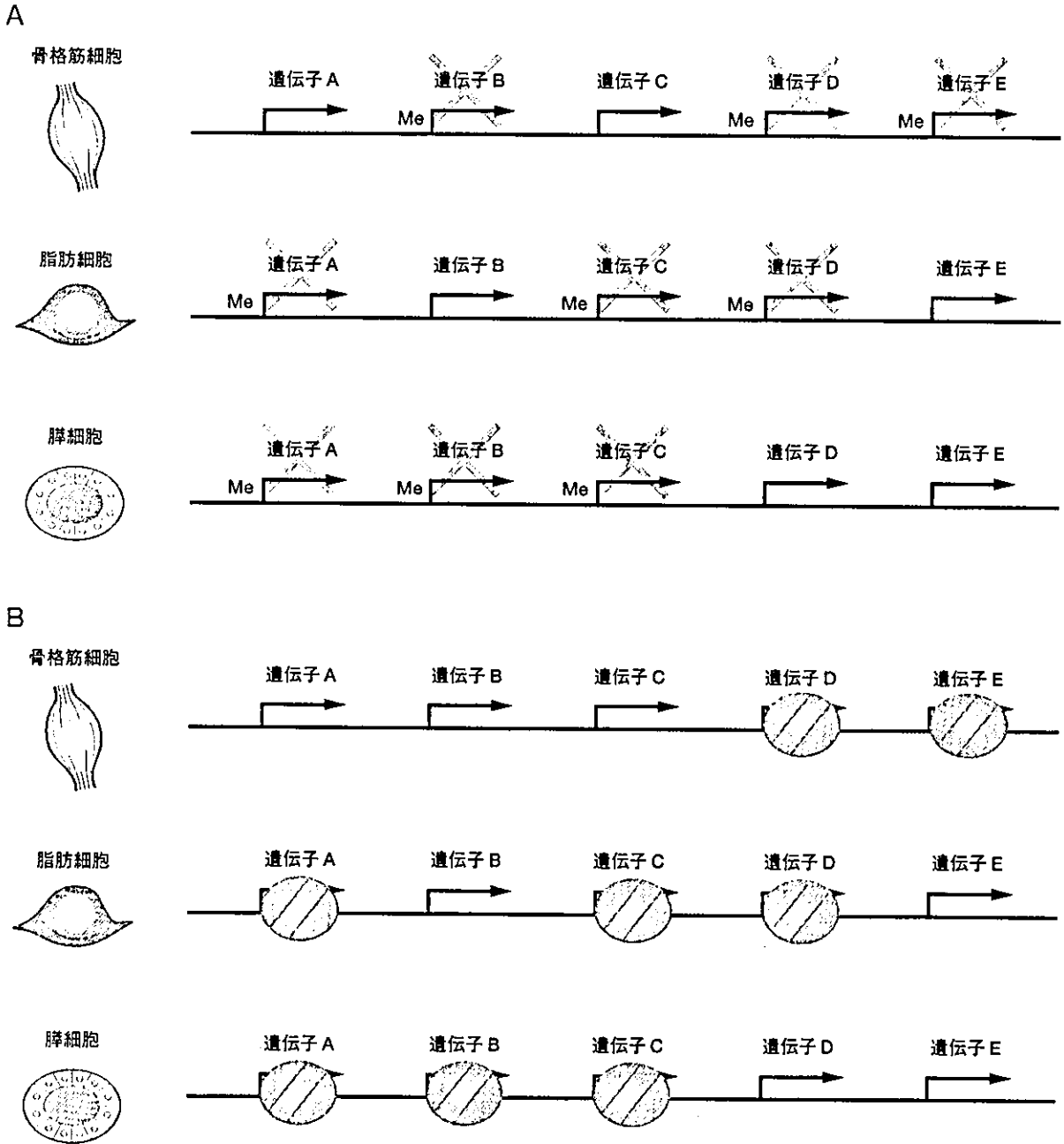


図5 細胞分化のメカニズム(左)から胚性幹細胞(ES)を導出し、分化の逆方向への誘導(右)を示す実験的モデル

ここでは、わかりやすくするために、例として骨格筋、脂肪細胞、膵細胞をあげる。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、膵細胞のような上皮系の形態をとることは基本的にない。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・クロマチン構築を変化させる物質として、低分子の化合物が有用になる。

合で骨髄中に間葉系幹細胞としての性質を有している。一方、研究室の今林英明は、あまり年齢に関係なく、胎児は別にして生後は年齢に関係なく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ことは間違いないようであると感じている。さらに驚くべきことに年齢に関係なく、従来考えられてきたよりも長期に継代可能である。90歳以上の方から得た細胞であっても、200日以上(分裂回数40回以上)培養可能である。

遺伝子の発現が制御されてしまうメカニズムが重要である。遺伝子の発現は転写因子によって調節されている。また、転写因子の発現自体も転写因子によって調節されており、ある分化状態では定常状態を保っては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。その分化能の制限につながる遺伝子発現の制限の機構で知られているものはDNAのメチル化とクロマチン構造がある(図5)。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<sup>17)</sup>。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、かぎられた細胞にしかなることができない。クロマチン構築を変化させる物質として、ヒストンのアセチル基の量を変化させる低分子化合物がある。4-phenylbutyrate, sodium butyrate, trichostatin A は、いずれも histone deacetylase inhibitor 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が可能となる。ま

た、間葉系幹細胞にDNAの脱メチル化剤である5-azacytidine 単独処理により、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をみとめ、低分子化合物はきわめて有効である。

### 間葉系幹細胞の移植に関する方法

さまざまな細胞を供給源として細胞移植の研究が進められている<sup>14-16)</sup>。骨髄移植の場合はConditioningにより骨髄を破壊する(myeloablative regimen)。これによって骨髄にスペースを作る。すべての細胞医療が、骨髄移植のようにスペースを本当に作る必要はあるのだろうか。マウスの全身の組織に移植する場合は、放射線照射を行い、そのスペースをつくることを試みている。もともと、傷害をもっている組織を使って研究を進めたほうが、その効率が通常の細胞移植に比較し、著明に増大する。あたかも、ドナーの細胞が組織・臓器の欠陥を補正するために転換しているようにも見える。

細胞治療の対象として、心筋梗塞とか疾病にしか細胞を移植しないので、問題にはならないだろう<sup>7-9)</sup>。しかしながら、心筋の疾病においては、生理的に比較的安定な状態にある組織に移植することもある。たとえば、線維化巣に細胞を移植する状態と似ている。線維化巣では安定した状態にあり、スペースがある状態ではない。線維化した心筋(心筋べんち)に細胞を移植して意味があるのだろうか。また、拡張性心筋症は心筋線維の脱落・消失とともに、心筋線維と心筋線維のあいだに豊

富に膠原線維が貯まる。心筋症自体は心臓に欠陥がある病気だが、ある意味で安定した状態にあり、スペースがある状態とは思えない。答えとなるかどうかはわからないが、杉山友康博士と今林英明氏が行ったランダム塩基配列決定法による発現レベルの検討をみると、ヒト間葉系幹細胞は線維化のもとである膠原線維を破壊する酵素を発現していることが明らかになった。

### おわりに

移植とは、ドナーとの関係により、自家、同種、異種に分けられ、移植する単位の大きさでは遺伝子、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ており、細胞移植は含まれていない。再生医療はいろいろな立場、細胞の供給源を含有するものであるが、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。そのなかには、自家移植も含まれ、拒絶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、多くの基礎研究が必要となる。この細胞治療の対象臓器として、中脳黒質、睪ラ氏島、皮膚、軟骨、骨芽があげられているが、いずれに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(染色質)の状態、転写因子のネットワークの3つの要因によって決まる。この3つを自在に操り、間質細胞をさま

ざまな組織・器官に変身させることが近未来的な課題となる。

## 謝辞

慶應義塾大学医学部の岡野栄之教授、小川聡教授、福田恵一博士、戸山芳昭教授、今林英明先生、協和発酵株式会社の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、阿部仁氏は、魅力的な骨髄間質細胞をたくさん樹立し、数々の「発見」は彼らに帰属すべきものが多い。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のものであります。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ご覧下さい(<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/omezawa/HTML>)。

## References

- 1) Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG : Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 91 : 335-344, 1977
- 2) 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
- 3) 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 : 920-927, 1991
- 4) 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
- 5) Harigaya K, Cronkite EP, Miller ME, Shadduck RK : Murine bone marrow cell line producing colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 6963-6966, 1981
- 6) 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 : 235-244, 2001
- 7) Gojo S, Kitamura S, Hatano O et al : Transplantation of genetically marked cardiac muscle cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 113 : 10-18, 1997
- 8) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001
- 9) 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 : 430-436, 2001
- 10) 岡野栄之 : 中枢神経系の幹細胞生物学. *実験医学* 19 : 80-90, 2001
- 11) Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K et al : Nestin-EGFP transgenic mice : visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci* 17 : 259-273, 2001
- 12) 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 : 7841-7845, 2001
- 13) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999
- 14) 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 : 1282-1286, 2000
- 15) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al : Multilineage cells from human adipose tissue : implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 : 211-228, 2001
- 16) Yang J, Nagavarapu U, Relloma K et al : Telomerized human microvasculature is functional *in vivo*. *Nat Biotechnol* 19 : 219-224, 2001
- 17) 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 : 4885-4894, 1997

慶應義塾大学医学部助教授 梅澤明弘

# 組織幹細胞と生殖細胞の再生医学

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年以上前から試験管内で現象としてとらえられており、知られていました。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きわ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ました。

幹細胞からできる機能を有する分化した細胞を人の組織に戻してあげるという発想は、もともと生物学者のものでありましたが、どこか現実離れした考えとして、実現するのは先の、ちょっとした夢物語としてとらえられていたところがあったような気がします。

しかし一方で、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てあげたいという欲求の強かった医療にたずさわる研究者が、幹細胞研究をはじめとした発生学から得られた知見を用いて「生体内で働くことのできる細胞」を作製し人に戻すことを具体的、かつ精力的に始めていきました。そんな中で、人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ます。動物実験から人への臨床に向かうのはそう遠くない将来でしょうし、一部始まっているのです。

そのような状況の中で、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

とができるだろうかという考えがあります(図1)。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」あるいは「卵巣がない」といった絶対的不妊因子を有している患者さんに対して福音となります。

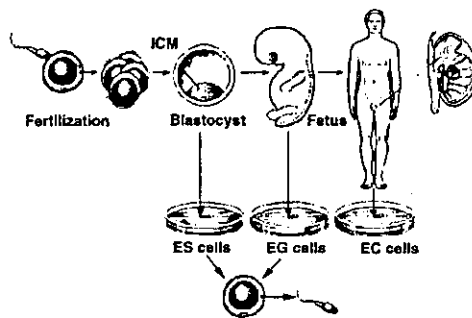


図1

精子や卵子をつくり出す供給源となる細胞には、どんなものがあるのでしょうか？精子では、精子のもととなる精祖細胞があります。そのもとである原始生殖細胞があります。そのもととなるエピプラストも取り出せるのであれば、精子になる可能性があります。さらに胚盤胞由来の内部細胞塊ないしはES(胎児性幹)細胞があります。ES細胞から精子をつくり出すことに成功していることから、体中の成体細胞の核を未受精卵に核移植して、胚盤胞まで発生させ、その内部細胞塊を取り出し、細胞供給源とすることが可能であれば、どんな細胞でも精子になる可能性があります。無茶な発想かもしれませんが、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します(図2)。



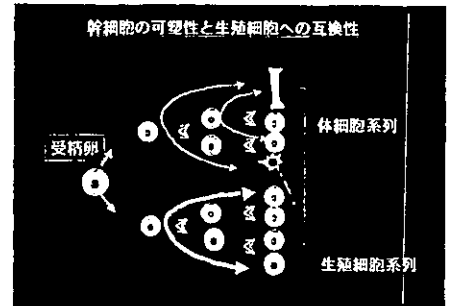


図2

精子をつくり出すことは可能であっても、そのゲノムのメチル化の状態が正常でなければ、正常の妊娠というわけにはいきません。この考えはある意味で、クローン動物と同様であります。体細胞のゲノムのメチル化が生殖細胞のゲノムのメチル化と異なるために、胎児の奇形を生じたり、巨大な胎盤が形成されたり、出生直後に生きることができないといったことが報告されています。

体細胞のゲノム・メチル化は精子のそれとは異なっており、メチル化が異なっていれば遺伝子の発現パターンが変化してしまうわけです。

それではどうしたら良いのでしょうか？体細胞や生殖細胞から、精子をつくり出す技術が確立していない現時点において、メチル化の状態の話をしても仕方がないかもしれません。精子の形まで、より正確に言えば減数分裂を生じさせるような形にまでもっていきけることが先決ではありますが、

先の先まで考えればゲノムのメチル化は無視できません。

まず、発育途中にある原始胚細胞核の機能及びゲノムの発生活持能をそれぞれ評価することが大事となります。生殖細胞の発生、成熟過程とepigeneticな修飾との連関を明確にしないてはいけません。この生殖細胞の機能評価のひとつとして、ゲノムの「成熟」度をひとつの評価基準とし、その配偶子形成機構における意義を追求したいと思っています。これらの研究は生理的な配偶子形成のみならず、クローン動物の異常発症機構の解明にまでつながります。

私は、マウス由来の原始胚細胞、胎児性幹細胞、胎児性癌細胞を取り扱ってきました。同時に、中胚葉由来幹細胞を得ることに世界に先んじて成功しています。中胚葉性幹細胞は、幹細胞としての多分化能を有しているだけでなく、ニッシュとしての機能を有している可能性が高い。ヒト初期胚のモデルであるヒト胎児性幹細胞の支持細胞としての役割を明確にしていきたいと思っています。

そして、これらの基盤的研究をさらに高いレベルに進展させ、生殖医療研究に再生医学にかかわる技術を用いて、貢献したいと考えています。

今後、再生医療の分野のひとつとして、「幹細胞の個性」に関する研究をさらに基礎的に発展させるとともに、(1)ヒト胎児性幹細胞、原始胚細胞の分化システムの解明、(2)配偶子形成機構とepigeneticsの

連関の決定、(3)クローン技術の発展とそれにもなった細胞移植系の確立に関するサイエンスを推進することは、必要不可欠です。

この研究過程を通じて生殖細胞の発生、成熟ならびに受精から始まるヒト初期発生過程とその異常発症機構の解明、生殖補助技術の開発に挑戦していくことで、新たに再生医療が貢献できる範囲が広がるはずであると信じています。

患者さんをはじめとした、社会的要求の高まりを理解してはおりますが、再生医療・細胞移植を確固たるものとするうえで、そこにかかわる分子基盤を明確にしなくてはなりません。さらに、社会的認知を受け必要な手続きに関係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」を世に送り出してあげたいと思っております。

## PROFILE

(うめざわ・あきひろ)

昭和60年慶應義塾大学医学部卒業、平成元年慶應義塾大学医学部病理学教室助手、平成3年米国カリフォルニア大学サンディエゴ校内科学教室、平成4年米国バーナム研究所、平成11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はじまり、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。「間葉系細胞の予想以上の可塑性に驚いている。生殖系列の細胞を利用して、精子形成をめざす。可能であれば、体細胞を用いて生殖医療の世界に貢献したい」という

E-mail : umezawa@1985.jukuin.keio.ac.jp

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

## 特集

## 再生医学の新世紀—造血再生医療を中心に

# 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell) による造血再生\*

梅澤明弘\*\*

Key Words : marrow stroma, mesenchymal stem cell, micro environment, niche

## はじめに

骨髄には、「造血」と「間質(支持組織)」にかかわる、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。この細胞を素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持つものもあり、骨髄間質由来の間葉系幹細胞に関する研究は、げっ歯類のみならず、ヒトにおいて同定されつつある。動物実験において、間葉系幹細胞を含む間質成分を移植することは、造血支持にとって必要不可欠な骨髄微小環境を整備することに繋がることが明らかにされた。骨髄由来の間葉系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、いろいろな細胞を素に研究が行われているが、間質細胞を使うことにより造血機能の回復が促進されることについて、ここでは注目していく。

## 間葉系細胞

造血のすべての成分をつくり出す血液幹細胞に加え、骨髄にはすべての間葉系細胞を生み出すもうひとつの幹細胞が存在する。これらの細胞は間葉系幹細胞と呼ばれ、骨、脂肪、軟骨、骨格筋、心筋<sup>1)</sup>、神経を生体内および試験管内で作る。ヒトの間葉系幹細胞に関する研究も進み、近年では分化形質および機能の喪失なしに生体外で増やすことが可能となった。この生体外で増殖させた間葉系幹細胞の利用はさまざまな治療に試みられており、その効果が検証されつつある。間葉系幹細胞移植にかかわる治療効果はほぼ確立しつつあり、造血機能促進のために行う細胞治療のひとつの供給源になりうる。

## 造血と骨髄間質

造血は完全に正常な骨髄間質を必要とし、発生過程で造血の場は移動するがそれぞれの場における間質の重要性は変化しない(図1-A)。30年前にDexter博士は、試験管内における研究で、造血は間質細胞との接触が必要であることを明らかにした<sup>2)</sup>。骨髄間質の細胞成分としてはマクロファージ、細網細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、骨芽細胞があり、これらの細胞がつくり出す液性因子、細胞間連絡、マトリックスによって血液幹細胞は維持、増殖、分化する(図1-B)。

\* Mesenchymal stem cells as the hematopoietic microenvironment.

\*\* Akihiro UMEZAWA, M.D.: 慶應義塾大学医学部病理学教室(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35); Department of Pathology, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, JAPAN (E-mail : umezawa@1985.jukuin.keio.ac.jp)

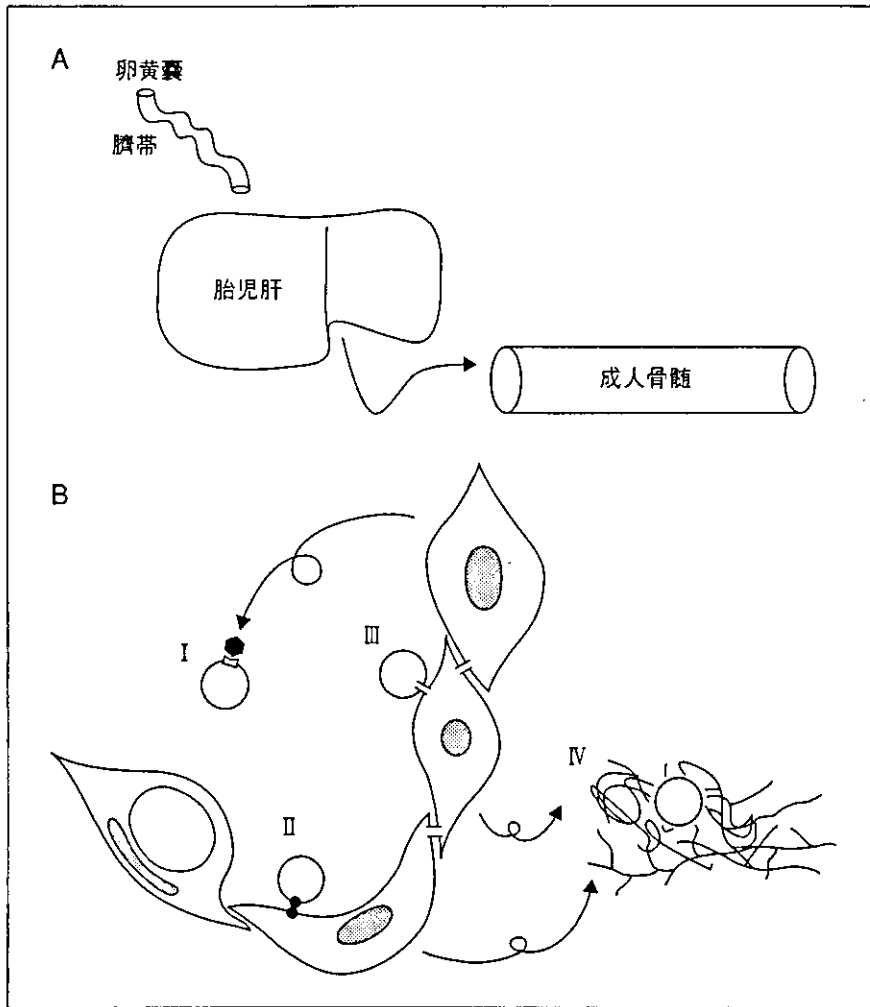


図1 造血場の発生過程の移行(A)と骨髄間質の本来の造血に対する役割のモデル図(B)

(B)骨髄間質細胞と血液細胞との細胞相互作用を表した。液性因子を介する交流(I)、膜状の分子を介した連絡(II)、ギャップ結合を介した交流(III)、マトリックスを介する調節(IV)の4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交流は消失する。また、脂肪細胞へ分化すると液性因子も発現しなくなる(文献<sup>9)</sup>。

造血細胞の初期培養には間葉系細胞が必要であり、骨髄の初期培養を始めると、骨髄細胞中の1%にしかない壁に付着する細胞がまず現れる(図2-A)。間質細胞は、さまざまな形のものがある。機能的なこと、たとえば、脂肪を産生するとか、骨を形成するとか、軟骨をつくるといった能力を培養されてきた細胞の形で区別できるかどうかは興味深いことであり、現実的には表面マーカーや細胞特異的な転写因子の有無で判断する。その培養された間質細胞の上に造血細胞を追加してやると、間質細胞に付着する形で造血細胞が存在する(図2-B)。培養を続けると造血細胞は増殖し、間質細胞の上にコロニー

を作るようになる(図2-C)。このコロニーの中には造血幹細胞も維持されることが知られており、間質細胞を用いることで長期に渡り造血幹細胞が保持され、血液細胞が産生され続ける。そのため、このような培養をDexter培養または長期骨髄培養と呼ぶ。造血幹細胞は、間質細胞の下に潜り込むようなかたちで潜んでいて、このような空間をニッチといい、間質細胞の主な作用は幹細胞の環境づくりにある。生体内に間質細胞を移植することにより、造血が誘導されることも知られる(図3)。

間質細胞の造血支持機構の中でも、液性因子による血液細胞の増殖・分化はもっとも解析が

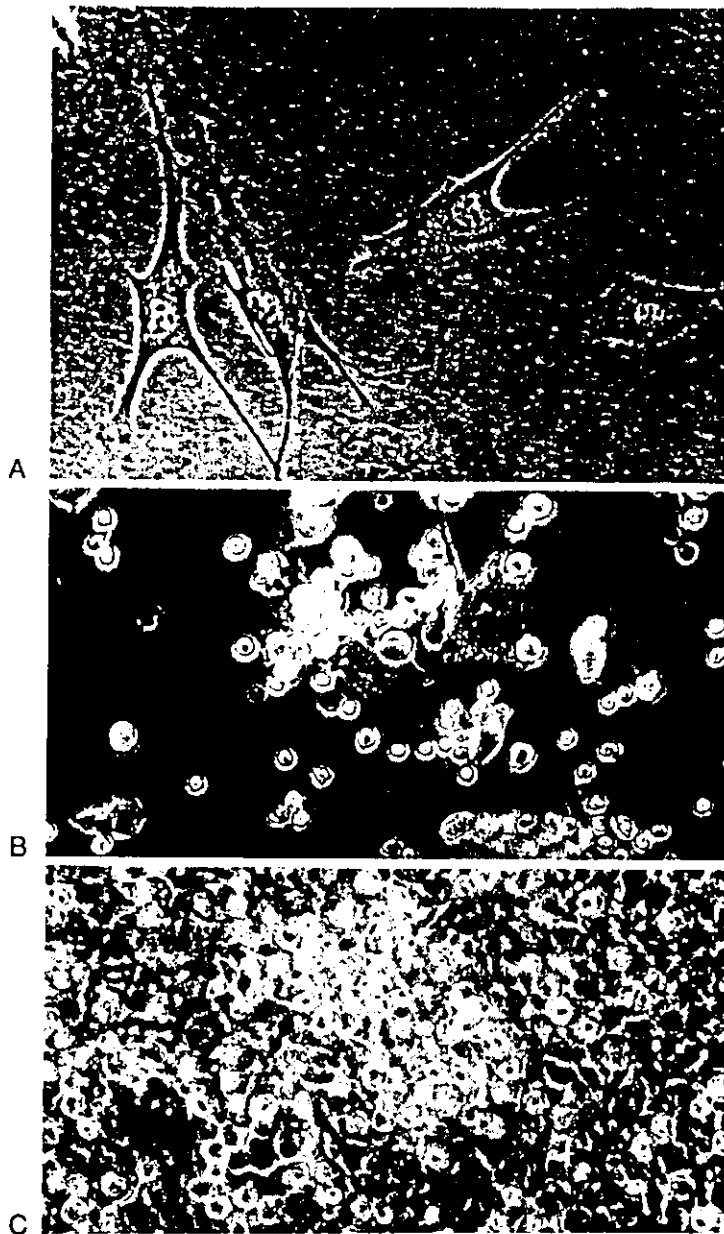


図2 骨髄間質細胞の試験管内における造血支持能  
骨髄間質細胞は、線維芽細胞の形態を示す(A)。他の胎児由来の間葉系細胞と形態的に同じである。骨髄の初期培養当初は、間質細胞の上に少数の丸い血液細胞が認められる(B)。培養を続けると、血液細胞が増殖し、コロニーをつくる(C)。血液細胞は、間質細胞という支持細胞なしでコロニーを作ることはない。

進んでいる(図4)。間質の液性因子による造血が重要であることをよく示す例として、骨髄間質が造血に寄与する分子に変異を有するSl<sup>d</sup>マウスでは、高度の造血障害および貧血が認められ、血液幹細胞移植によりその造血障害と貧血は改善せず、間質の異常であることが知られる<sup>7)</sup>。後にこのマウスでは、c-kit ligand(SCF)の膜型に変異があることが明らかにされ、その変異が造血

障害に至る原因となることが発見された。さらに、げっ歯類、ヒトにおいて放射線・化学療法のいずれでも間質は障害を受けることが認められた<sup>5)</sup>。放射線照射、化学療法を受ける骨髄移植患者は、間葉系幹細胞は健常人の60~90%であり、骨髄移植を受けた後12か月以上もその数は正常に戻らない。間質が正常のレベルまで再構築されるのは、5歳以下の患者に限られる。これらの事実は、血液幹細胞移植では間質はしばしば障害を受け、そのことが移植後の造血の回復を遅らせている可能性がある。

遺伝的に障害を受けた場合や放射線・化学療法によりダメージを受けた間質を戻すために正常人ドナーから間質細胞の移植を受けることは、血液幹細胞移植の成功する確率を上昇させると考えられる。Sl<sup>d</sup>マウスでは、正常間質細胞を移植されると造血は回復し、貧血も治癒する。また、間質成分を同時に移植することは、組織適合抗原が一致していない骨髄移植の生着率を上昇させる。これらのことは、間質細胞が血液細胞に直接作用して造血機能を亢進させるだけでなく、拒絶・生着率の問題に関しても良い方向に導くことで、その両方の作用で骨髄移植を増強させることを意味している。

### ヒト間葉系幹細胞の同定と増殖

骨髄間質細胞の表面マーカーの研究により、目的的分化形質を示す前駆細胞を単離できる(図5-A, B)。CD34は重要な表面マーカーのひとつである。CD34は、造血幹細胞ならびに間質細胞のいずれにも発現が認められる。CD34を有していない骨髄間質細胞は造血を試験管内で支持することはできない。CD34は、未分化な造血細胞の表面マーカーばかりでなく未分化な間葉系の細胞のマーカーとしても知られる。このような多分化能を有する骨髄間質細胞は、年齢とともに減少してくる。新生児は1万分の1くらいに間葉系幹細胞が存在するが、10歳代の人では10万分の1に、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に減少する。したがって、若い人の方が間葉系幹細胞の単離は容易であると考えられる。この骨髄間質細胞に存在する幹細胞は、その数が少ないこと、表面マーカーが完全に明らかにされていないことから、現在でも同定することは難しい。骨髄から間葉系の幹細胞を単離、精製してくるには、表面抗原とそれに対する抗体を準備する必要がある。さらに、抗体によって認識される抗原の有無によって規定された細胞系列をすべて明らかにすることは、これからの研究対象となる。さらにマトリックスに関しては、骨髄間質細胞をいくつか単離してきて膠原線維の遺伝子の発現をみると、どの細胞も膠原線維を高発現している(図5-C)。このことは間質細胞が間葉系由来であることを意味している。最後に、網目構造をとる間質細胞と血液細胞をつなぐ構造として、もう一つ、ギャップ結合がある(図6)。

### 骨髄間質中の間葉系幹細胞の多分化能

マウス骨髄由来の間質細胞の培養のためには、大腿骨をむき出しにし、周囲の骨格筋、結合織を除去し、大腿骨のみとする。その両端を切り取り、骨髄細胞を取り出す。取り出された細胞を培養系にもってくるわけであるが、間質細胞は壁に付着するという特徴があるために、浮遊細胞である血液細胞とは容易に分離することが可能である。ディッシュに付着する間質細胞に潜り込むように、幼弱な血液細胞が入り込んで維持されることがある。壁に付着する細胞には、マクロファージとともにさまざまな間質細胞が存在し、造血系との間でさまざまなサイトカインによる調節がなされる。初期培養では、不均一な分化能を有した何種類かの間葉系の細胞が含まれる。しかし、継代を重ねることによって、線維芽細胞の形態ないしは紡錘形の形態をとる間質細胞のみが培養されるようになる。初期培



図3 骨髄間質由来の骨芽細胞が移植後、生体内で形成した骨組織

骨芽細胞を皮下に移植すると骨を形成する(A:低倍, B:高倍)。高倍(B)にすると、移植された細胞によって生じた骨組織の間に血液細胞がみられる。写真ではわかりにくいですが、顆粒球系、赤芽球系、巨核球系のすべての血球成分がみられることより、血液幹細胞ないしは前駆細胞が骨組織に入り込んだと考えられる。

養では間質細胞は不均一な集団であるが、やがては均一な集団になってくる。その後は、目的の分化形質を有する間質細胞をクローニング・シリンジを用いてサブクローニングする。

環境づくりに活躍する間質細胞自身の特徴は、その間質細胞の中に多分化能を有した間葉系の幹細胞が存在することである(図7)。培養皿の中でも、さまざまな分化形質を示す。骨結節(図8-A)、脂肪細胞(図8-B)、骨格筋細胞(図8-C)、心筋細胞(図8-D)を示す<sup>12)</sup>。したがって、心筋細胞の再生の供給源として、間質細胞はきわめて有望

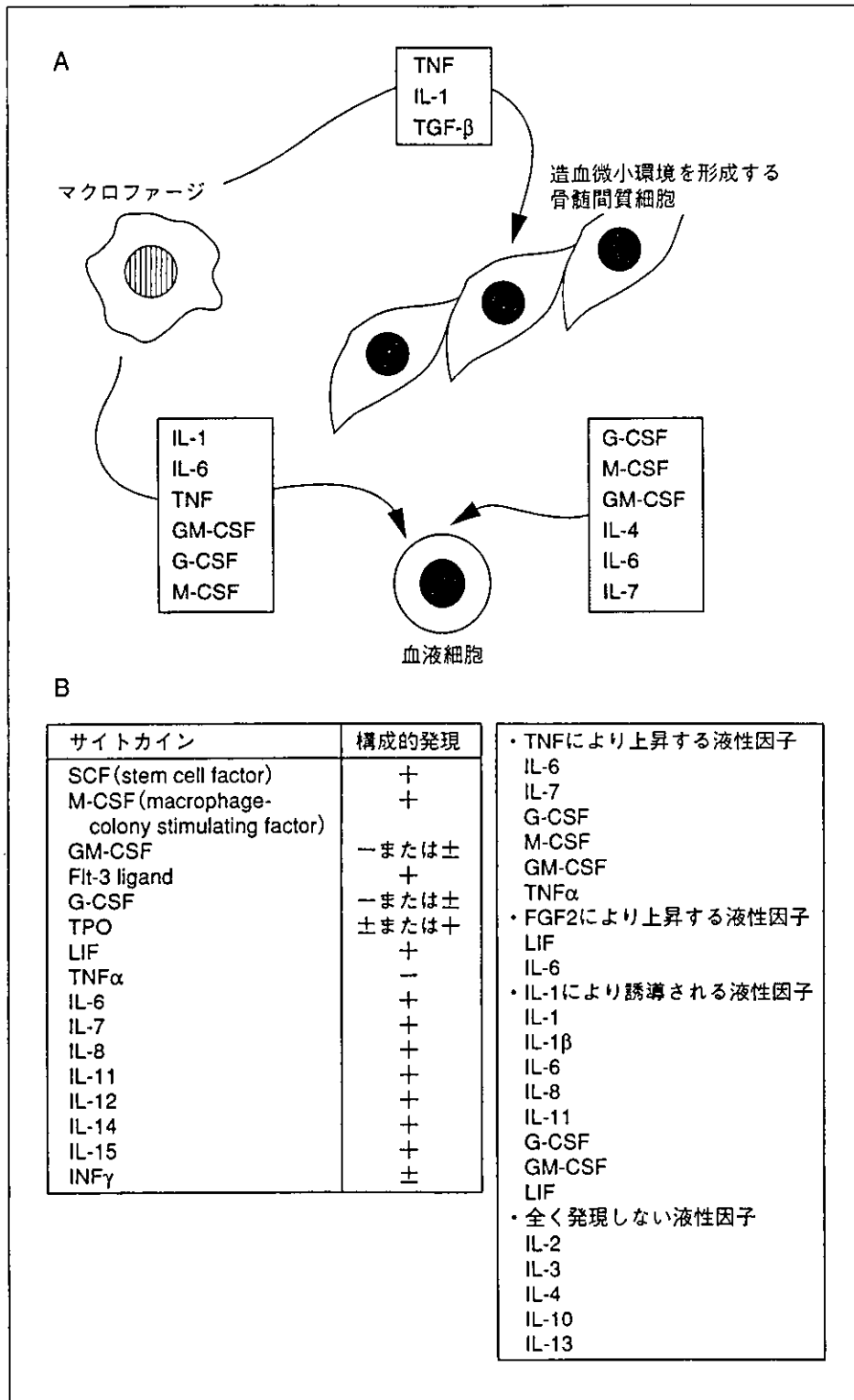


図4 造血微小環境における液性因子による細胞間連絡(A)とヒト間質細胞(初期培養)が発現する液性因子(B)

である<sup>13)</sup>。脂肪細胞中の脂肪は、培養液中から取り込むのではなく、細胞自体が酵素を用いて作っている。骨格筋においては、細胞内に横紋構造をみとめる。骨結節をさらに電子顕微鏡を用い

て詳細に検討すると、培養している細胞の下に線維の塊をみる。また、ところどころに濃いカルシウムの沈着を認める。さらに、幹細胞の中でも神経幹細胞の研究はきわめて進んでいる<sup>10)11)</sup>

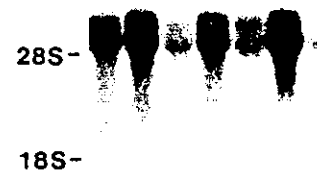
A. ヒト間質細胞			IV その他		
分子名	CD番号	発現	分子名	CD番号	発現
I 接着分子			T6	CD1a	陰性
ALCAM	CD166	陽性	CD3 complex	CD3	陰性
ICAM-1	CD54	陽性	T4, T8	CD4, CD8	陰性
ICAM-2	CD102	陽性	Tetraspan	CD9	陽性
ICAM-3	CD50	陽性	LPS receptor	CD14	陰性
E-selectin	CD62E	陰性	LewisX	CD15	陰性
L-selectin	CD62L	陽性	-	CD34	陰性
P-selectin	CD62P	陰性	Leukocyte common antigen	CD45	陰性
LFA-3	CD58	陽性	5' terminal nucleotidase	CD73	陽性
Cadherin 5	CD144	陰性	B7-1	CD80	陰性
PECAM-1	CD31	陰性	HB-15	CD83	陰性
NCAM	CD56	陽性	B7-2	CD86	陰性
HCAM	CD44	陽性	Thy-1	CD90	陽性
VCAM	CD106	陽性	Endoglin	CD105	陽性
Hyaluronate receptor	CD44	陽性	MUC18	CD146	陽性
II サイトカイン受容体			BST-1	CD157	陽性
IL-1R (α and β)	CD121a,b	陽性	B. マウス間質細胞		
IL-2R	CD25	陰性	分子名またはCD番号	発現	
IL-3R	CD123	陽性	Stro-1 <sup>b</sup>	陽性	
IL-4R	CD124	陽性	CD10	陽性	
IL-6R	CD126	陽性	CD34	陽性	
IL-7R	CD127	陽性	CD90 (Thy-1)	陽性	
Interferon γ R	CDw119	陽性	CD105 (Endoglin)	陽性	
TNF-α-1R	CD120a	陽性	CD106 (VCAM-1)	陽性	
TNF-α-2R	CD120b	陽性	Ly6A/E (Sca-1)	陽性	
FGFR		陽性	Acetylated LDL Receptor	陽性	
PDGFR	CD140a	陽性			
Transferrin receptor	CD71	陽性			
III インテグリン			C.		
VLA-α1	CD49a	陽性	KUM - 1 3 4 5 6 7 9		
VLA-α2	CD49b	陽性	28S-		
VLA-α3	CD49c	陽性			
VLA-α4	CD49d	陰性			
VLA-α5	CD49e	陽性			
VLA-α6	CD49f	陽性			
VLA-β chain	CD29	陽性			
β4 integrin	CD104	陽性			
LFA-1 α chain	CD11a	陰性			
LFA-1 β chain	CD18	陰性			
Vitronectin R α chain	CD51	陰性			
Vitronectin R β chain	CD61	陽性			
CR4 α chain	CD11c	陰性			
Mac 1	CD11b	陰性			

図5 間質細胞が発現する分子

(A)ヒト間質細胞が発現する接着分子，液性因子受容体，インテグリン等，(B)マウス間質細胞が発現する分子，(C)マウス間質細胞株は，いずれもコラーゲンI型を発現することを示すノザン解析．間質細胞は間葉系由来の細胞であり，他の間葉系細胞同様，膠原線維の高い発現をみる．試験管内ではこのように膠原線維の高い発現をみるが，局所的に間質細胞を移植した部位にも線維化巣をつくることはない．(文献<sup>23)</sup>より)

が，その分化プロトコルを用いることで，中胚葉由来の間質細胞も神経形質を示すことが明らかになった<sup>14)</sup>(図9)．強調したいことは，培養血の中で分化している様子がすべて明らかになっていることである．

### 間葉系幹細胞と免疫

サルにおける研究で，間葉系幹細胞は移植において，あまり拒絶を受けない<sup>5)</sup>．ヒトの間葉系幹細胞はクラスII抗原およびT細胞co-stimulatory

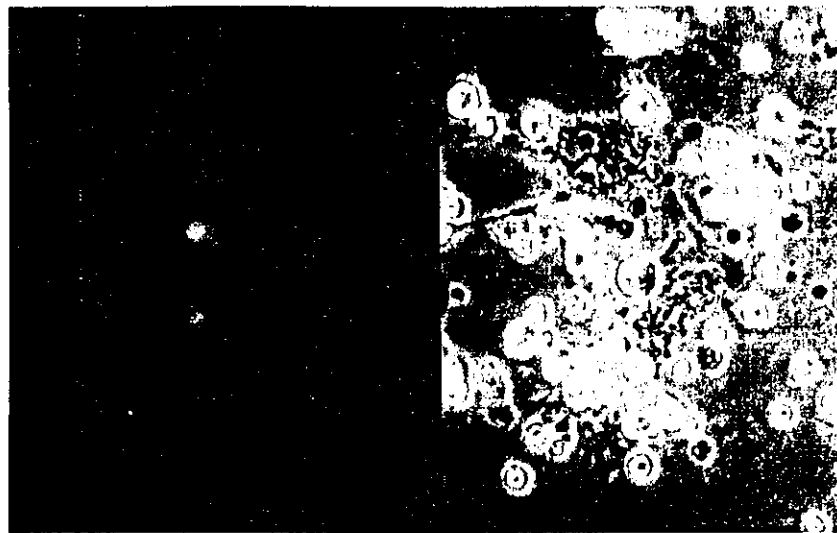


図6 間質細胞と血液細胞との間に認められるギャップ結合を介した連絡壁に付着した間質細胞に蛍光色素を注入した。蛍光色素は、ギャップ結合を介し、血液細胞に移行した。(左)蛍光顕微鏡写真、(右)位相差顕微鏡写真。

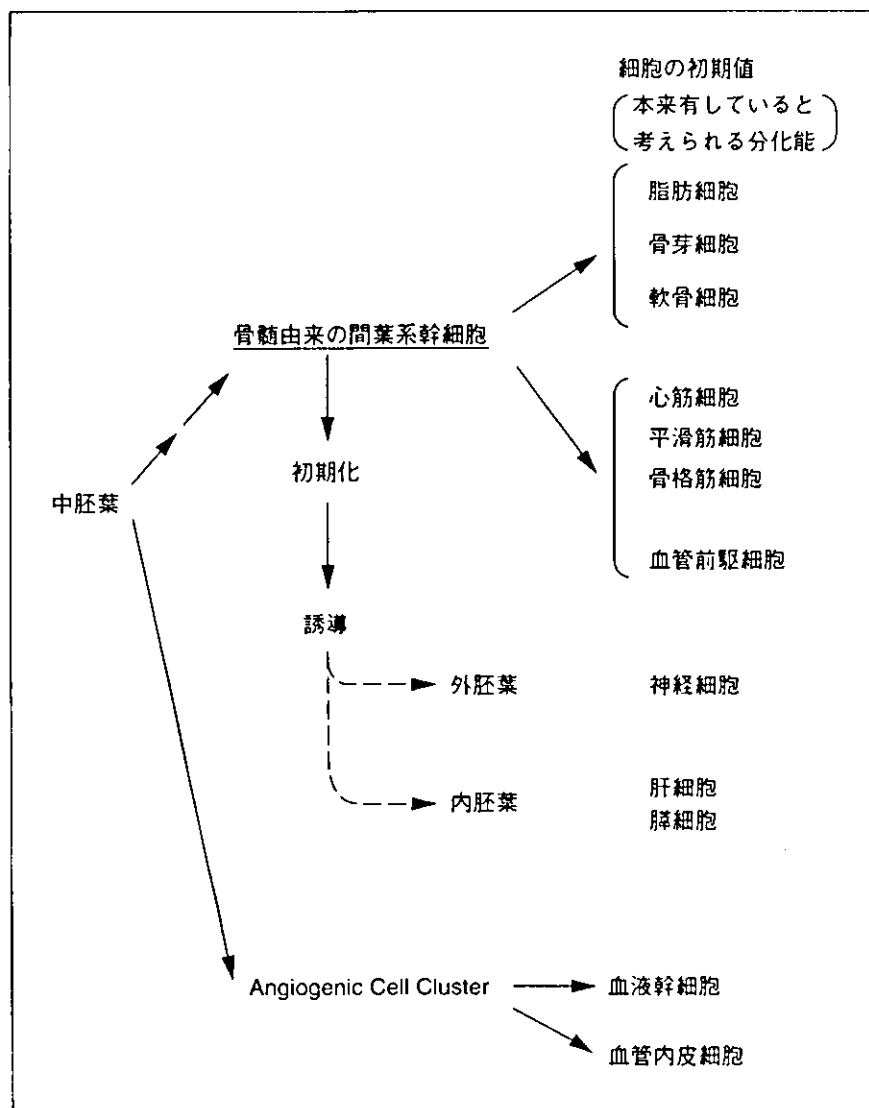


図7 骨髓間質細胞の分化過程の模式図と血球系・血管内皮細胞との位置関係

骨髓間質細胞は、中胚葉由来の細胞であり、中胚葉由来の細胞への分化を示す。同時に分化能に関して予想以上の柔軟性を有し、外胚葉および内胚葉への分化も認められる。しかしながら、血液細胞や trophoblasts (胎盤) への分化はまったく認められていない。



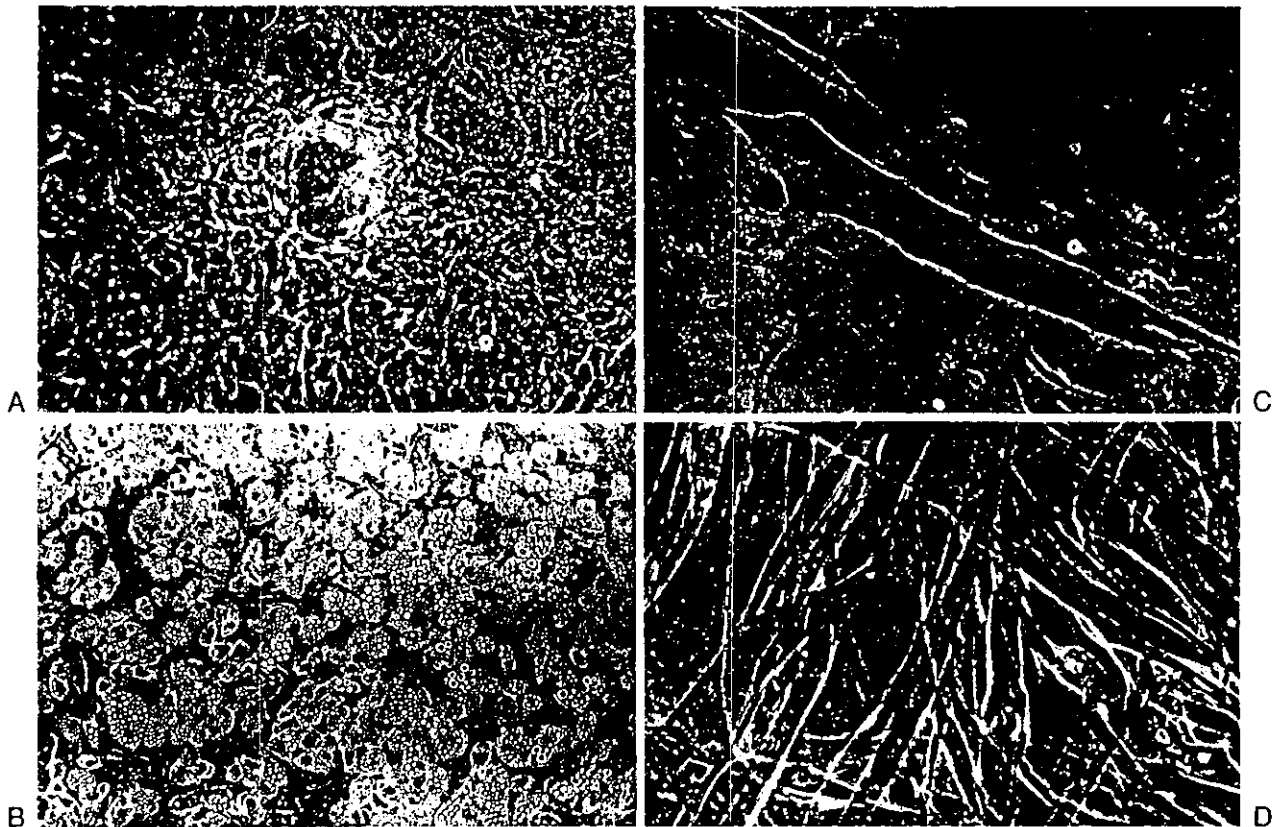


図8 骨髄間質由来の間質細胞が示す多分化能  
 一つのクローニングされた間質細胞は、骨結節(A)、脂肪細胞(B)、骨格筋細胞(C)、心筋細胞(D)といった分化形質を示す。このことは、骨髄間質中には間葉系幹細胞が存在していることを意味する。

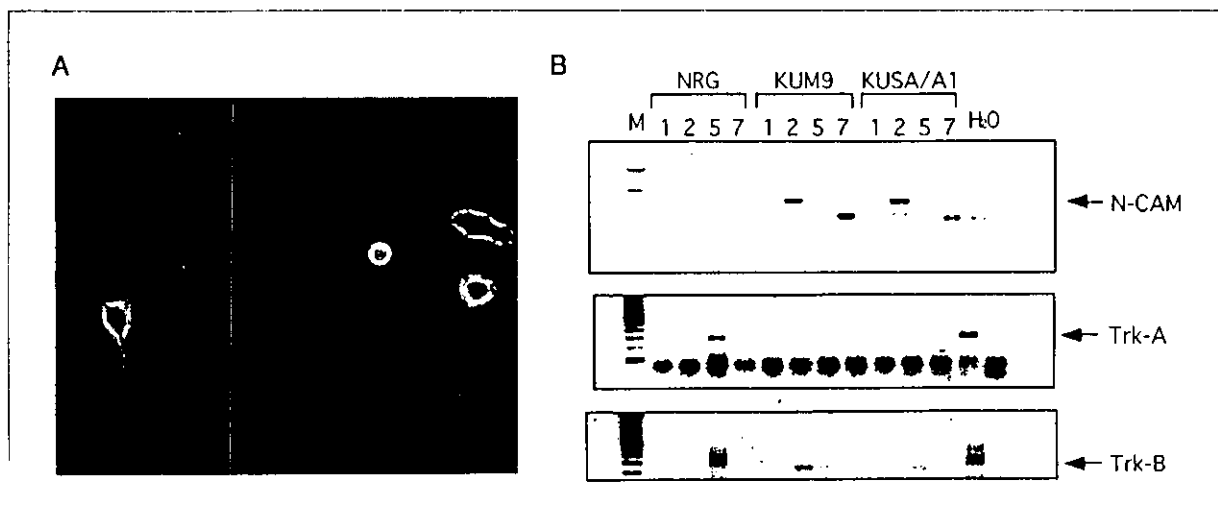


図9 中胚葉由来の間質細胞の神経細胞への分化  
 間質細胞に対し、低分子化合物の脱メチル化剤を処理すると神経形質を示すようになる。細胞体は丸く、ぴかぴか光り、長い突起を伸長する(A：位相差顕微鏡写真)。また、形態だけでなく、N-CAM, Trk-A, Trk-Bといった神経特異的遺伝子の発現を認める(B：RT-PCR)。間質細胞は、NRG, KUM9, KUSA/A1の3つで検討した。左から、マーカー、脱メチル化剤を処理した後の日数、H2Oは、RNAの代わりに水を使用した陰性コントロールである。処理後の日数は異なるが、いずれの遺伝子も脱メチル化剤で誘導される。

間葉系幹細胞の供給源	セッティング	施設
自己	ボランティア (患者)	CWRU/ICC
自己	乳癌	CWRU/ICCおよび
同種	自己末梢血前駆細胞	米国の多施設
同種	遺伝病、同種骨髄	CWRU/ICC
同種	移植後	欧米の多施設
同種	同種骨髄移植	
同種	または	
同種	HLAが同一の親族の	
同種	末梢血	St Jude CRH
同種	骨形成不全症	ミネソタ大学
(他施設より)	臍帯血治療	
同種	リンパ腫、	CWRU/ICC
(他施設より)	自己末梢血前駆細胞	
同種	同種移植	米国の多施設
(他施設より)	(HLA同一の非親族より)	

図 10 細胞培養により増殖させた間葉系幹細胞を利用した臨床トリアル

CWRU/ICC=Case Western Reserve University and Ireland Cancer Center, Cleveland, CRH=Childrens Research Hospital. (文献<sup>4)</sup>より)

分子(B7)を構成的に発現しない。さらにヒト間質細胞は基本的に免疫寛容であり、リンパ球混合試験に反応しない。また、リンパ球混合試験自体も、間葉系幹細胞を加えることにより抑制される。皮膚移植の生着率が同種の間葉系幹細胞を移植時に静注することにより上昇することが、サルで観察されている。現在の研究では不十分な状態であるが、間葉系幹細胞の免疫作用の調節および免疫抑制作用は臨床的にきわめて重要な意義があると予想されている。

このような免疫の調節作用と同時に、間葉系幹細胞はGVHD反応を減弱ないし抑制する可能性が出てきた。Phase Iの間葉系幹細胞のdose escalationに関する治験によって、悪性の造血疾患に対して血液幹細胞移植と同時に組織適合抗原が一致した間葉系幹細胞が移入され、少なくとも重篤な副作用はみられていない。

### 造血機能促進を目的として 骨髄間質を用いる

骨髄間質細胞を考えるうえで、臨床に向けての試みは重要な意味をもつ(図 10)。いくつかの企業は、骨髄間葉系幹細胞を用いた臨床安全性試験を開始した<sup>4)</sup>。化学療法と造血幹細胞移植を受けているがんの患者を対象に、ヒト間葉系幹細胞製剤の安全性をみる臨床試験を開始している。間葉系幹細胞の製剤はドナーから提供され

る輸血製剤で、前臨床試験で拒絶反応と移植片対宿主病(GVHD)を起こすことなく移植を補助することに成功したと発表している。組織が適合する患者の親類から採取した少量の骨髄の検体からヒト骨髄間葉系幹細胞を分離し、3,000倍以上に増殖させて用いた。これらの幹細胞の移植は、がんの治療そのものが造血細胞ならびに間葉系の幹細胞のいずれをも破壊することにより必要となってくる。間葉系幹細胞の治療をすることによって骨髄の微小環境を再生すること、正常の骨髄機能を回復するために行われる。

間葉系幹細胞は生体外できわめて強い増殖能を有するがゆえに、レトロウイルスによる遺伝子導入効率が高い。間葉系幹細胞に液性因子の遺伝子を導入し、静脈内に注射することで細胞が全身に行き渡る。骨髄に生着した細胞は、遺伝子からつくられる蛋白質により、その治療効果を発現する。イヌを用いた研究で、factor IX遺伝子を導入した自己間質細胞を副作用なしに全身に生着させることに成功した<sup>8)</sup>。ヒト間質細胞を用いた研究では、エリスロポイエチン遺伝子を導入した細胞により、免疫不全マウスの貧血が改善する。

### おわりに

間葉系幹細胞移植は、いまだ明らかに黎明期にある。移植における間葉系幹細胞の量ならび

表1 骨髄間質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)
同種(臍帯血, unrelated, haploidentical)
in utero
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
血友病
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

に注入のタイミングなどの問題はまったく未解決である。骨髄移植同様に移植された間葉系幹細胞は、骨髄を含む全身の臓器に運ばれるのか、どのくらいの割合が骨髄微小環境を形成できるのか。間葉系幹細胞といっても、研究者間でいわれている細胞は同一のものを指しているのか、または種々雑多な集団なのか。これらの問いに対する回答は、実験モデルないし自己ないし同種の臨床治療によってのみ得られる。しかし、最近発表されるデータでは、間葉系幹細胞移植は新しいタイプの細胞治療として、ヒト疾病(表1)に対してかなり約束された治療であることが示唆されている。

謝辞：岡野栄之教授，小川 聡教授，福田恵一博士，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 仁氏は，魅力的な骨髄間質細胞をたくさん樹立し，数々の「発見」は彼らに帰属すべきものが多い。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のものでありました。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ご覧下さい(<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/HTML>)。

## 文 献

- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells : Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology* 2000 ; 28 : 875-84.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli B Jr, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats – similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95(7) : 3908-13.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 ; 284 : 143-7.
- Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells : heading into the clinic. *Bone Marrow Transplantation* 2001 ; 27 : 235-9.
- Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Current Opinion of Hematology* 2000 ; 7 : 358-63.
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG, Schofield R, Lord BI. Stimulation of differentiation and proliferation of hematopoietic cells *in vitro*. *J Cell Phy* 1977 ; 82 : 461-70.
- Kapu R, Majumdar M, Xiao X, et al. Signaling through the interaction of membrane-restricted stem cell factor and c-kit receptor tyrosine kinase : genetic evidence for a differential role in erythropoiesis. *Blood* 1998 ; 91 : 879-89.
- Hurwitz DR, Kirchgesser M, Merrill W, et al. Systemic delivery of human growth hormone or human factor IX in dogs by reintroduced genetically modified autologous bone marrow stromal cells. *Hum Gene Ther* 1997 ; 8 : 137-56.
- 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* 1991 ; 11 : 920-7.
- 岡野栄之：中枢神経系の幹細胞生物学。実験医学 2001 ; 19(15) : 80-90.
- Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita N, Murayama A, Akamatsu W, Ogawa M, Okaba M, Tano Y, Goldman SA, Okano H. Nestin-EGFP transgenic mice : visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci* 2001 ; 17(2) : 259-73.
- 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.
- 13) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama, H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J-i, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 1999 ; 103 : 697-705.
- 14) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. Brain from Bone : Efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with noggin or a demethylating agent. Differentiation (Stem cell issue) 2001 ; 68 : 235-44.

\* \* \*