

幹細胞の世界

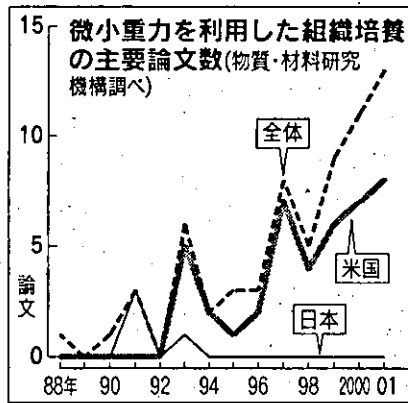
「骨髄の造血幹細胞から肝臓ができるかもしれない」。京都大学医学部の中畑龍俊教授は手応えを感じている。ネスミによる造血幹細胞の移植実験で、提供したネスミの細胞が網膜や心臓の筋肉、肝臓細胞、筋肉などに高い頻度で出現していたからだ。

「血液を作る造血幹細胞に内臓を作る能力があると、世界中の研究者が気づいた」（中畑教授）

これをきっかけに臓器にある幹細胞の能力を調べる研究も始まっている。筑波大学の中内啓光教授と谷口英樹講師らは昨年、ネスミを使い肝臓のもとになる肝幹細胞がよい臓や小腸の細胞にも成長することを確かめた。中内教授は「造血幹細胞を起点に、肝幹細胞や小腸幹細胞、小腸幹細胞へと分化する道筋があるようだ」と推測している。

この研究の端緒は、二〇〇〇年の米科学誌ネイチャー・メディスンに掲載された骨髄移植患者に関する論文だ。骨髄移植を受けた患者の肝臓を調べたところ、一部分が骨髄提供者の細胞からできていた。

臓器再生、立体構造が課題



協和発酵などがネスミの幹細胞から作製した心筋細胞(矢印部分)

米の先行に焦燥感も

細胞があるのか、共通の幹細胞があるのか混同している」と指摘する。現状を解説する。

幹細胞から内臓を再生するには大きな課題がある。立体的な形状に育てていくことだ。ネスミの骨髄から心臓の筋肉細胞作りに成功している慶応義塾大学の福田恵一講師

「臓や腎臓など血管が入り組んだ臓器には立体構造が必ず、皮膚など平面的な組織で作り、NASAに依存しているわけではないと体制作りに動

ルに乗せたかった。今

年三月、慶大医学部の梅沢明弘助教は米航空宇宙局(NASA)から届いた知らせに

「骨髄からとった幹細胞を微小重力状態で培養すると、どんな遺伝子が働いているのか調べられるのでは」とシヤトル利用の研究に応募したが、採用されなかった。

「この分野で特許の独占を許すと、実用時に不都合が生じかねない」と強調する。

「まず立体的な骨作り」

宇宙に目をつけたのは、宇宙空間で培養した細胞が平面ではなく、球状になることが分かってきたからだ。NASAを中心とする米国内では微小重力環境を利用した再生医療研究が活発になっている。

日本の研究者も宇宙・再生医療技術研究会(代表幹事、田中順三物質・材料研究機構生体材料研究センター長)を

作り、NASAに依存しているわけではないと体制作りに動

は、巨大市場をつかむことに

は、若実に進展している。イ

スラエル工科大学の研究陣は

昨年、ヒトの胚(はい)性幹

細胞(ES細胞)から糖尿病

治療に欠かせないホルモン、

インスリンを分泌する細胞を

成長させた。すい臓や肝臓の

再生で恩恵を受ける患者は、

国内で数百万人を超える。幹

細胞を操る基盤技術の開発

は、巨大市場をつかむことに

は、巨大市場をつかむことに

は、巨大市場をつかむことに

は、巨大市場をつかむことに

は、巨大市場をつかむことに

は、巨大市場をつかむことに

は、巨大市場をつかむことに

は、巨大市場をつかむことに

は、巨大市場をつかむことに

は、巨大市場をつかむことに

日本経済新聞

再生医療の最前線を第一線の研究者らが報告

日本内科学会パネル「再生医療の展望」

第100回日本内科学会では、パネルディスカッション「再生医療の展望」が行われ、日本を代表する第一線の研究者6人が再生医療の最前線を報告するとともに、今後の展望や問題点について、それぞれの考えを述べた。

なお、司会に予定されていた永井良三氏(東大)が急用で欠席したため、司会は池田康夫氏(慶大)のみで行われた(1面に関連記事)。

「アライン法は小脳心臓血管外科治療において有用な方法で、今後の外科治療の選択肢を広げる上での考えを示した。

さらに、大田裕氏(産科総合研究所)は、自己培養間葉細胞を用いた骨関節疾患の治療について述べた。従来の安全なシステムを構築した同研究所は、世界に先駆けて、種々骨疾患患者の骨髄から再生培養骨を構築し、その培養骨組織を用いた治療を行っているという。氏は、本治療法について解説し、「現在、合併症も見られず良好な結果を得ている」との報告を行った。

骨髄由来細胞による再生

最後に登壇した佐田政博氏(東大)は、骨髄を採取し、そこから成体幹細胞に閉じる最初の治療を「ハートビート」、再生医療に利用するまでの注意点を提示した。氏は、成体幹細胞はその細胞が存在する臓器の細胞のみならず、他の系統の細胞にも分化する可能性に注目。特に骨髄由来細胞による臨床応用の現状を報告し、今後の発展に期待を述べた一方で、血管病の病態に骨髄由来細胞が大きく関与していることについて触れ、注意する必要があることも強調した。



●司会の池田康夫氏

方、ソウラを交差しての高さは、再生医療を進める際に十分注意しなくてはならない。ソウラスの重要性を指摘する声も相次ぎ、司会の池田氏は、「再生医療は21世紀の医療であり、期待は大きい。もう臨床試験を行なっていくか、患者さん、国民の理解を得ながら進めなければならぬ医療だと想っています。ハートビートを」

血管新生療法 HGFによる再生医療

ハイスミス(上)と最初登壇した橋野明弘氏(中)は成体幹細胞から骨髄由来幹細胞と見なされるものについて解説した後、空原孝明氏(右)は血管新生療法の実状について報告。この分野では、若く日本人の研究者が国内臨床に活躍している現状や、細胞移植による治療の血管新生に関与する最初の治療動物モデルを開発した。氏は重症の閉塞性動脈硬化症の患者への治療について、移植細胞から血管新生性の因子「ソラス」を抽出、刺激を与えるという治療法を紹介。これまで特に下肢の治療に使われてきたが、元節の治療における有効性も示唆した。

一方、松本邦夫氏(阪大)はHGFによる再生医療の展望を目前、氏は、「再生医療の中には、よく知られている幹細胞を使った治療の他に、すでに分化した細胞が使用できるような方法が開始。再生医療のsimple duplicationによるものもある。HGFはソラスのひとつ。ソラスを含む細胞由来因子は重要な役割を担っている因子であり、閉塞をはじめ、腎臓、肝臓、心血管系など、さまざまな組織において再生、修復因子として機能する」と強調した。

さらに、長谷川正幸中心とする再生医療のチームが骨髄幹細胞由来の血管新生因子である、HGFの抽出が骨髄幹細胞からの治療、再生を促すという研究成果を示し、「5000の骨髄幹細胞」がもたらす効果を示した。

ティッシュエンジニアング 自己培養間葉型細胞による治療

また、橋野俊治氏(東大)は骨髄細胞を抽出した再生血管移植の報告について述べ、東大が2000年に1例を行って行った人工性骨形成剤の臨床試験に付随する治療結果を示した。これは骨髄中間葉細胞が良好であり、氏は「ソラス」

北里柴三郎「反骨の人生」

北里柴三郎(1874-1958)は、日本の医学界に大きな影響を与えた人物である。彼は、医学の発展と社会の進歩を求め、断固たる信念を持って行動した。その「反骨」の精神は、後進に大きな教訓を残している。本書は、彼の生涯を詳しく描き、その偉業と人間性を生々しく描き出している。読者は、彼の不屈の精神と、社会を動かす力に感銘を受けることだろう。

100周年を記念した企画

第100回を記念した本学会のバネルディスカッションでは、「再生医療の展望」がテーマとして選ばれた。これまでの本学会で企画されてきた企画の内容は、基本的に「再生医療」がテーマである。近年、再生医療が注目を集めている。本学会でも、再生医療の発展を促すべく、さまざまな取り組みを行っている。本学会は、再生医療の発展を促すべく、さまざまな取り組みを行っている。

第100回日本内科学会が、さる4月1-3日の3日間、名和町新会館(九大教授)のもと、福岡市の国際会議場、他で開催された。第100回目を迎えた今回は、「21世紀の内分秘代謝学の展望」と題した会期演説、偉大な医学者であった「橋本策」および「北里柴三郎」を振り返り上げた100周年記念講演(講演者はそれぞれ阪大 橋野俊治氏および愛知県心身障害者コロニー 植田達明氏)が行われた。また、「再生医療の展望」をテーマにしたバネルディスカッションや「ホルモンと長寿」「心房細動治療の進歩」の2題のシンポジウム、15題の教育講演、5題の宿題と報告、そして恒例となった「内科専門医によるCPC」が企画され、多数の内科医たちが参加した(1面に関連記事)。

100周年を記念し、ユニークな企画 第100回日本内科学会開催される



●バネルディスカッション

●名和町新会館



●名和町新会館

2003年5月12日
第 2534 号

週刊 医学界新聞



New Medical World Weekly

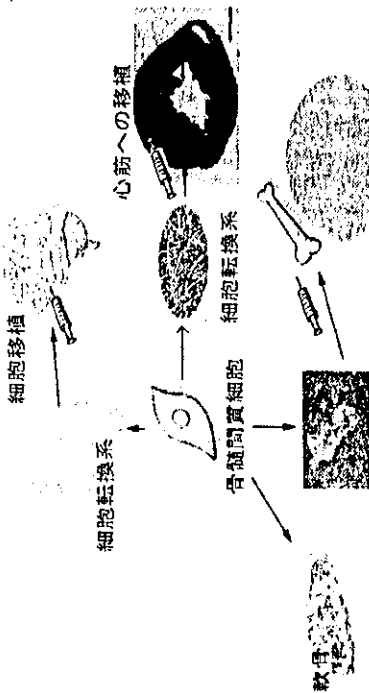
医学界新聞

〒100-0001 東京都千代田区千代田1-1-1
編集・発行 医学界新聞社
電話 03-5561-1111
FAX 03-5561-1112
E-mail: info@medworld.co.jp
http://www.medworld.co.jp

広がる再生医療

期待される実用化

23



間葉系幹細胞を使った細胞治療

国立成育医療センター研究部再生医療研究部の梅澤明誠部長のグループは、骨髄の中に存在する間葉系幹細胞を使った再生医療の研究に取り組んでいる。生体に移植して特定の組織の機能回復を目指す細胞治療の材料として活用するのが目的だ。

骨髄に含まれる細胞では、赤血球などの血球細胞を産生する造血幹細胞が、早くから再生医療の研究対象となっている。一方、間葉系幹細胞はこれまで「間質細胞の一つとして、血球細胞を支持する役割」などと考えられ、あまり注目がされなかった（梅澤部長）が、近年の研究で多分化能力が判明してから再生医療の材料として期待が高まっている。

間葉系幹細胞の大きさが利

点は、骨髄という比較的採取しやすい部位に存在している点に加え、特別な増殖因子を投与しなくても増やしやすいことだ。骨髄をシャーレ上で培養すると血球系細胞は培養液の上部に浮遊していくが、「間葉系幹細胞はシャーレに付着するため簡単に分離、回収できる」（同）のも特徴。

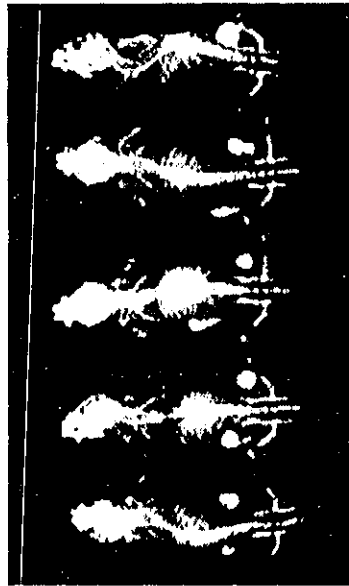
二〇〇 約2週間や骨に

分化誘導に関しても、胚性幹（ES）細胞はあらゆる細胞に分化する多分化能力を持つが、特定の細胞への分化を制御するのが難しいのに対して、骨や軟骨、骨格筋など分化する細胞の種類が限られているため制御が容易。同グループはこれまで、間葉系幹細胞の中から骨芽細胞を抽出し、マウスに移植すると約2週間ですべて完全に骨になることを確認している。

また神経細胞に高効率で分化させる手法も確立している。マウスの骨髄から採取した間葉系幹細胞から骨芽細胞だけを抽出、神経への成育を促

国立成育医療センター研究所・梅澤研究グループ

間葉系幹細胞から抽出した骨芽細胞をマウスに移植すると新たな骨が形成された（下部の黒い状の部分が）



分化させたこれらの細胞を骨に移植し、損傷を受けた部位の機能を回復させる。現在のところ有効な治療法がないパーキンソン病などの神経変性疾患や、心臓梗塞などの心臓病、筋ジストロフィーといった病気の治療に道を開くこととなる。日本人の骨髄から採取できた

骨芽細胞を投与すると4、5日後に神経細胞を形成したほか、神経伝達物質にも反応するなど神経細胞としての機能をもつことも分かった。

二〇〇 寿命の延長も

さらに間葉系幹細胞の寿命を延ばすことで心筋細胞をつくり出す実験も実施している。染色体の末端端にあり、細胞の寿命にかかわるテロメアという部分の長さを保つ遺伝子を遺伝子の骨髄から採取した間葉系幹細胞に組み込んだ。その結果、細胞分裂の回数が増え、約100回以上の細胞分裂以上となり、寿命が延長した。増殖させた細胞を移植させたマウスは移植した細胞が形成した骨格筋の機能を評価すると心筋の機能が回復した。

め、倫理上の懸念や拒絶反応の心配もない。同グループでは、間葉系幹細胞を未分化のまま移植する方法の実用化を目指している。患者の遺伝子などが原因で代謝にかかわる酵素の機能が低下し、手足の痛みや臓器障害などを引き起こすライソソーム病などに対する、数回にわたる移植を繰り返す現在の治療法に比べて治療期間の短縮や副作用の低減につながる。また動物実験も良好な結果を得ているが、ヒトでも同様の治療効果があるかだが今後の課題となる。ただ、梅澤部長は「間葉系幹細胞を使った再生医療はES細胞に比べて安全性が高く、臨床応用に近い」と、新たな治療技術の確立に期待を寄す。

2003.6.19 日刊工業新聞

ワードBOX

幹細胞

ほかの細胞の元になる細胞。自分自身が増える複製能力と、ほかの細胞になる能力を備えている。骨髄にあり赤血球や白血球をつくる造血幹細胞、肝臓にある肝幹細胞などさまざまな種類がある。けがや病気で傷んだ臓器などの細胞に分化させることができれば、移植して修復に使えることから研究が盛んになっている。



心臓の幹細胞発見 世界初、心筋に分化 千葉大グループ 再生医療への応用期待
2004.04.30掲載

再生しない臓器とされる心臓にも、ほかの細胞の元になる幹細胞があり、拍動する心筋細胞を生み出すことを小室一成千葉大教授（循環病態医科学）らのグループが三十日までに、マウスを使った実験で突き止めた。

心臓に幹細胞があるらしいとの研究はこれまでも発表されているが、実際に拍動する心筋細胞に分化させたのは世界初。心筋梗塞（こうそく）などで傷んだ心臓を修復する、再生医療への応用が期待される。

同教授らは心臓の細胞の中に幹細胞に特徴的な Sc a 1 というタンパク質を持つものがあることに着目。成長したマウスの心臓を酵素でばらばらにし、この細胞だけを取り出して培養。オキシトシンというホルモンをかけたところ、四週間後には培養皿で自律的に拍動する細胞が現れ始めた。

これらの細胞は、心筋に特有のタンパク質を作っていることから、心筋細胞に分化したことが確認できた。

生きた動物の心臓の中で幹細胞がどんな役割を果たしているか不明だが、心筋の再生にかかわっている可能性があるという。

培養した幹細胞は、条件によっては肝細胞や脂肪細胞などにもなり、さまざまな組織の細胞に分化する能力を備えていることも分かった。グループは今後、幹細胞を効率的に心筋細胞に分化させる方法を研究することになっている。

小室教授は「臨床応用はまだまだ先」としながら「幹細胞の再生能力を使えば傷んだ心臓の治療ができる」と話している。



●「心臓の復活」に道開く

▼国立成育医療センター研究所・梅沢明弘部長（再生医療）の話 心臓は一度駄目になると全く細胞が増えないと考えられていた。もし心臓に幹細胞が存在していると証明されたらすごいこと。「心臓の復活」に戦略的に取り組めるようになり、注射で心臓を治療できる可能性に道を開く。

トップページ

Copyright 2004 The Nishinippon Shimbun. All rights reserved.

掲載記事・写真の無断転載はできません。すべての著作権は西日本新聞社に帰属します。 西日本新聞社
ネットワーク上の著作権については新聞協会の考え
方を御参照ください。media@nishinippon.co.jp



■ ニュース > 朝刊

□ 前へもどる

■ スポーツ

■ パナ
天+ α

◎ 朝刊ニュース

2004/08/22

91歳の骨髄細胞若返らせ心筋に 国立成育医療センター成功

【ワシントン21日共同】九十一歳の女性から採取した骨髄の細胞を遺伝子操作で“若返り”させた上、試験管内で心筋細胞に成長させる実験に梅沢明弘・国立成育医療センター研究所部長らのグループが二十一日までに成功、欧州の遺伝子治療専門誌に発表した。

骨髄にはさまざまな細胞に分化できる幹細胞が含まれており、傷んだ組織を修復する再生医療に利用され始めている。しかし受精卵からつくる胚（はい）性幹細胞（ES細胞）よりも増殖能力が劣り、特に高齢者の細胞は早く分裂が止まってしまうという欠点があった。グループは「若返り操作によって、年齢に関係なく自分の骨髄細胞を再生医療に使えるようになる」としている。

グループは九十一歳の女性の骨髄から取り出した間葉系と呼ばれる幹細胞に、分裂能力を維持する働きがある「BM11」という遺伝子を入れ、細胞の寿命を延ばすことに成功。この幹細胞に低分子化合物などを加え、規則的に拍動する心筋に分化させた。

梅沢部長らは、幹細胞に直接遺伝子操作を加えず、培養液の成分を変えるだけで同様の若返り効果を得ることにもほぼ成功している。今後、心臓病患者に細胞を移植する臨床試験の実施を目指し、さらに安全性を確認したい、と同部長は話している。

検索 || ホーム → ニュース

骨髄細胞若返らせ心筋に 91歳女性から採取

共同通信

2004-08-24

2004年8月21日 — 91歳の女性から採取した骨髄の細胞を遺伝子操作で“若返り”させた上、試験管内で心筋細胞に成長させる実験に梅沢明弘・国立成育医療センター部長らのグループが21日までに成功、欧州の遺伝子治療専門誌に発表された。

骨髄にはさまざまな細胞に分化できる幹細胞が含まれており、傷んだ組織を修復する再生医療に利用され始めている。しかし受精卵からつくる胚（はい）性幹細胞（ES細胞）よりも増殖能力が劣り、特に高齢者の細胞は早く分裂が止まってしまうという欠点があった。グループは「若返り操作によって、年齢に関係なく自分の骨髄細胞を再生医療に使えるようになる」としている。

<http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20040821-00000123-kyodo-soci>

他の見出し

Copyright © 2000—2004 Japan-lifeissues.net Kochi, Japan

ワードBOX

幹細胞

ほかの細胞の元になる細胞。自分自身が増える複製能力と、ほかの細胞になる能力を備えている。骨髄にあり赤血球や白血球をつくる造血幹細胞、肝臓にある肝幹細胞などさまざまな種類がある。けがや病気で傷んだ臓器などの細胞に分化させることができれば、移植して修復に使えることから研究が盛んになっている。



心臓の幹細胞発見 世界初、心筋に分化 千葉大グループ 再生医療への応用期待
2004.04.30掲載

再生しない臓器とされる心臓にも、ほかの細胞の元になる幹細胞があり、拍動する心筋細胞を生み出すことを小室一成千葉大教授（循環病態医科学）らのグループが三十日まで、マウスを使った実験で突き止めた。

心臓に幹細胞があるらしいとの研究はこれまでも発表されているが、実際に拍動する心筋細胞に分化させたのは世界初。心筋梗塞（こうそく）などで傷んだ心臓を修復する、再生医療への応用が期待される。

同教授らは心臓の細胞の中に幹細胞に特徴的なScalというタンパク質を持つものがあることに着目。成長したマウスの心臓を酵素でばらばらにし、この細胞だけを取り出して培養。オキシトシンというホルモンをかけたところ、四週間後には培養皿で自律的に拍動する細胞が現れ始めた。

これらの細胞は、心筋に特有のタンパク質を作っていることから、心筋細胞に分化したことが確認できた。

生きた動物の心臓の中で幹細胞がどんな役割を果たしているか不明だが、心筋の再生にかかわっている可能性があるという。

培養した幹細胞は、条件によっては肝細胞や脂肪細胞などにもなり、さまざまな組織の細胞に分化する能力を備えていることも分かった。グループは今後、幹細胞を効率的に心筋細胞に分化させる方法を研究することになっている。

小室教授は「臨床応用はまだまだ先」としながら「幹細胞の再生能力を使えば傷んだ心臓の治療ができる」と話している。



●「心臓の復活」に道開く

▼国立成育医療センター研究所・梅沢明弘部長（再生医療）の話 心臓は一度駄目になると全く細胞が増えないと考えられていた。もし心臓に幹細胞が存在していると証明されたらすごいこと。「心臓の復活」に戦略的に取り組めるようになり、注射で心臓を治療できる可能性に道を開く。

トップページ

Copyright 2004 The Nishinippon Shimbun. All rights reserved.

掲載記事・写真の無断転載はできません。すべての著作権は西日本新聞社に帰属します。 西日本新聞社
ネットワーク上の著作権については新聞協会の考え
方を御参照ください。media@nishinippon.co.jp



■ ニュース > 朝刊

前へもどる

■ スポーツ

■ パナ
天+ α

朝刊ニュース

2004/08/22

91歳の骨髄細胞若返らせ心筋に 国立成育医療センター成功

【ワシントン21日共同】九十一歳の女性から採取した骨髄の細胞を遺伝子操作で“若返り”させた上、試験管内で心筋細胞に成長させる実験に梅沢明弘・国立成育医療センター研究所部長らのグループが二十一日までに成功、欧州の遺伝子治療専門誌に発表した。

骨髄にはさまざまな細胞に分化できる幹細胞が含まれており、傷んだ組織を修復する再生医療に利用され始めている。しかし受精卵からつくる胚（はい）性幹細胞（ES細胞）よりも増殖能力が劣り、特に高齢者の細胞は早く分裂が止まってしまうという欠点があった。グループは「若返り操作によって、年齢に関係なく自分の骨髄細胞を再生医療に使えるようになる」としている。

グループは九十一歳の女性の骨髄から取り出した間葉系と呼ばれる幹細胞に、分裂能力を維持する働きがある「BM11」という遺伝子を入れ、細胞の寿命を延ばすことに成功。この幹細胞に低分子化合物などを加え、規則的に拍動する心筋に分化させた。

梅沢部長らは、幹細胞に直接遺伝子操作を加えず、培養液の成分を変えるだけで同様の若返り効果を得ることにほぼ成功している。今後、心臓病患者に細胞を移植する臨床試験の実施を目指し、さらに安全性を確認したい、と同部長は話している。

検索 || ホーム → ニュース

骨髄細胞若返らせ心筋に 91歳女性から採取

共同通信

2004-08-24

2004年8月21日 — 91歳の女性から採取した骨髄の細胞を遺伝子操作で“若返り”させた上、試験管内で心筋細胞に成長させる実験に梅沢明弘・国立成育医療センター部長らのグループが21日までに成功、欧州の遺伝子治療専門誌に発表された。

骨髄にはさまざまな細胞に分化できる幹細胞が含まれており、傷んだ組織を修復する再生医療に利用され始めている。しかし受精卵からつくる胚（はい）性幹細胞（ES細胞）よりも増殖能力が劣り、特に高齢者の細胞は早く分裂が止まってしまうという欠点があった。グループは「若返り操作によって、年齢に関係なく自分の骨髄細胞を再生医療に使えるようになる」としている。

<http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20040821-00000123-kyodo-soci>

他の見出し

Copyright © 2000—2004 Japan-lifeissues.net Kochi, Japan

骨の形自在に再生

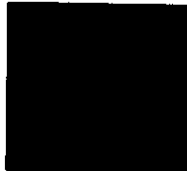
東京大学大学院・医学系研究科の疾患生命工学センターなどの研究チームは、事故や病気などで欠けた骨を再生する新技術を開発した。動物実験段階だが、骨のもとになる細胞から望みの形状の骨を自在に作り出せる。実際に円筒形の骨もできた。欠損した骨の部分にぴったり合わせる治療も将来可能になりそうだ。

今回の研究開発には東大のセンターのほか、国立成育医療センター研究所や物質・材料研究機構の研究者も参加した。

東大大学院など新技術

欠損部の治療は自分の別すい細胞を選別した。次の骨を切り出して移植する方法が一般的だけに、患者の体の負担軽減にもつながる。研究チームはまず、マウスの骨髄から骨に分化しやす分の二の高分子シートを丸めて円筒形にすると、骨も円筒形になって再生するなど、複雑な形状にできた。

ピンセットで再生した中空状の骨をつかむ。下はエックス線写真



実際の治療では、欠損部の形状

欠損部の治療に活用

に合わせてシートを加工し、骨を再生することになる。シートは生分解性のため、時間がたてば体内で分解されて骨だけが残る。欠損した骨の治療では人工の骨を埋め込む方法もあるが、体になじみにくい場合もある。生きた骨を使う再生医療に期待が集まっているが、形状が自在に制御できる技術が課題になっていた。研究チームは今後、ヒトの骨髄から取り出した細胞を使って、実際に骨を再生する実験に取り組みたいと話している。

ORIGINAL ARTICLE

Jun Kohyama · Hitoshi Abe · Takuya Shimazaki
 Amane Koizumi · Kinichi Nakashima · Satoshi Gojo
 Tetsuya Taga · Hideyuki Okano · Jun-ichi Hata
 Akihiro Umezawa

Brain from bone: Efficient “meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent

Accepted in revised form: 26 June 2001

Abstract Bone marrow stromal cells are able to differentiate into adipogenic, chondrogenic, myogenic, osteogenic, and cardiomyogenic lineages, all of which are limited to a mesoderm-derived origin. In this study, we showed that neurons, which are of an ectoderm-origin, could be generated from marrow-derived stromal cells by specific inducers, fibronectin/ornithine coating, and neurosphere formation. The neurons generated from marrow stroma formed neurites, expressed neuron-specific markers and genes, and started to respond to depolarizing stimuli as functional mature neurons. Among stromal cells, isolated mature osteoblasts which had strong *in vivo* osteogenic activity could be efficiently converted into functional neurons. This transdifferentiation or meta-differentiation was enhanced by Noggin, an inhibitor of bone morphogenetic proteins, in comparison with 5-azacytidine, a demethylating agent capable of altering the gene expression pattern. Marrow stroma is therefore a potential source of cells for neural cell transplantation.

Key words neuron · mesenchymal stem cell · Noggin · methylation · transdifferentiation · bone morphogenetic protein · dedifferentiation

Introduction

Bone marrow stromal (BMS) cells were originally reported to constitute a microenvironment of bone marrow and to be a prerequisite for the proliferation of hematopoietic stem cells (Dexter et al., 1977). Various hematopoietic lineages can be grown on BMS cells under appropriate conditions. BMS cells communicate with hematopoietic cells and BMS cells through cell-to-cell signals from cytokines (Metcalf, 1985; Umezawa et al., 1991), membrane-bound molecules, the extracellular matrix (Roberts et al., 1998), and gap junctions (Umezawa et al., 1990).

BMS cells *per se* are reported to have many characteristics of mesenchymal stem cells, which generate a progeny that can differentiate into multiple cell lineages (Fuchs and Segre, 2000). Pluripotent stem cells derived from marrow stroma may differentiate into various types of cell types, including bone (Rickard et al., 1994), muscle (Ferrari et al., 1998), fat (Harigaya et al., 1981; Umezawa et al., 1991), tendon, and cartilage (Ashton et al., 1980). Recently we have shown that marrow stroma is also a potential source of cardiomyocytes (Makino et al., 1999). Recent reports have shown that adult stem cells have a greater plasticity than previously thought (Bjornson et al., 1999; Petersen et al., 1999; Clarke et al., 2000), with BMS cells showing the potential to adopt totally different endpoints compared with their well-characterized mesenchymal derivatives (Pittenger et al., 1999), possibly including neural cells.

Cells from bone marrow exhibit neural phenotypes and marker expression when the cells migrate into the brain (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). How-

J. Kohyama¹ · H. Abe¹ · T. Shimazaki² · A. Koizumi² · H. Okano² · J. Hata¹ · A. Umezawa¹ (✉)
 Department of Pathology¹ and Physiology², Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
 e-mail: umezawa@1985.jukuin.keio.ac.jp
 Tel: + 81 3 5363 3764, Fax: + 81 3 3353 3290

T. Shimazaki · H. Okano
 Division of Neuroanatomy, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

K. Nakashima · T. Taga
 Department of Cell Fate Modulation, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University 2-2-1, Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan

S. Gojo
 Department of Cardiac Surgery, Saitama Medical Center, Kawagoe, Japan

ever, which population of bone marrow cells enter the brain and become neurons and what factor is involved in this process still need to be exactly deciphered. To this end, we used single cell-derived immortalized BMS cell lines in this study to determine which marrow cells differentiate into neural cells since separation of mesenchymal cells by commonly used methods such as Percoll gradient cannot eliminate the possibilities of contamination with hematopoietic cells. We therefore investigated cell lines which exhibited the morphological character of neural lineages through the action of a demethylating agent capable of altering gene expression (Holliday, 1996) as well as neural inducer Noggin on the basis that cardiomyocytes are generated from marrow stromal cells by 5-azacytidine (Makino et al., 1999).

Noggin is a diffusible factor involved in the neural induction during early embryogenesis (Smith and Harland, 1992) as well as adult neurogenesis (Lim et al., 2000) by antagonizing bone morphogenetic protein (BMP) signaling (Zimmerman et al., 1996). Furthermore, Noggin converts embryonic stem cells into primitive neural stem cells by the inhibition of BMP-related signaling (Tropepe et al., 2001). On the basis of these findings, we hypothesized that Noggin might antagonize BMP signaling which is necessary for osteogenesis of BMS cells and thus induce the differentiation of BMS cells into neural lineages. Neurons derived from BMS cells were examined for neuron-specific cell markers and gene expression, and were characterized electrophysiologically. Neurons could be generated from a specific fraction of BMS cells that we have been able to characterize.

Methods

Cell culture and transplantation

Dexter long-term bone marrow cultures derived from the bone marrow of female C3H/He mice were established as described (Whitlock and Witte, 1982, 1987; Umezawa et al., 1991, 1992). Cell lines from different dishes were subcloned by limiting dilution, and clones were designated NRG (neurogenic), KUM9 and KUSA/A1. The differentiation protocols to induce adipogenesis, osteogenesis, and myogenesis were followed as described (Pittenger et al., 1999, 2000).

To determine *in vivo* osteogenic activity, KUSA/A1 cells were transplanted subcutaneously. Six weeks after the transplantation, the tumor was excised for analysis.

Measurement of alkaline phosphatase (ALP) activity

BMS cells were analyzed by ALP assay as described (Leboy et al., 1991). The ALP activity was measured with an ALP B-test Waco kit (Waco) based on the method of Lowry-Bessey (Bessey et al., 1946). Fifty microliters of homogenate was incubated with the assay buffer at 37°C, and the reaction was spectrophotometrically measured at 405 nm.

5-azacytidine protocol for neuronal differentiation

Cells were cultured in IMDM supplemented with 10% FBS and streptomycin/penicillin at 33°C in humid air with 5% CO₂. For induction of cell differentiation, cells were treated with 10 μmol/l of 5-azacytidine (Sigma Chemical Co) for 96 h in IMDM medium supplemented 10% FBS containing 50 ng/ml of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) on a 60 mm dish that had been coated with poly-L-ornithine (Sigma) and fibronectin (Gibco BRL) (ornithine/fibronectin). After the induction protocol, medium was replaced with B27-supplemented DMEM/F12 (DMEM/F12/B27, Gibco BRL) containing 50 ng/ml of NGF, NT-3 and BDNF (NGF/NT3/BDNF).

xNoggin protocol for neuronal induction

KUSA/A1 cells were cultured in IMDM supplemented with 10% FBS and streptomycin/penicillin at 33°C in humid air with 5% CO₂. KUSA/A1 cells were transfected with xNoggin/MC BOS (a gift of Dr Yoshiko Takahashi) (Tonegawa and Takahashi, 1998) and neo (10:1) by liposomal transfection using Fugene. G418 was added into the medium 24 h after transfection. Seven to ten days after transfection, cell aggregates were detached from the dish and formed neurosphere-like cluster. Cluster-forming cells were dissociated by triturating using a Pasteur pipette, resuspended in DMEM/F12/B27 supplemented with 5% FBS containing 20 ng/ml bFGF, and then passaged on a 60 mm dish coated with ornithine/fibronectin. Medium was replaced with DMEM/F12/B27 containing 50 ng/ml NGF/NT-3/BDNF four days after the passage.

Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from NRG, KUM9 and KUSA/A1 cells (on Day 0, 2, 4, and 9) and adult mouse cerebrum by ISOGEN (Nippon gene). RT-PCR of neuron-specific genes, including NCAM, growth-associated protein-43 (GAP-43), Trk A, Trk B, Trk C and G3PDH was performed using 3 μg of total RNA. PCR was performed for 30–35 cycles, with each cycle consisting of 95°C for 30 s, 53–60°C for 1.5 min, and 72°C for 1 min, with an additional 7-min incubation at 72°C after completion of the last cycle. The primers used were follows: NCAM, CTCCTGCCTCCAACCATCATC and TCTCGTCATCTTCTCCTCGTTCTC; GAP43, GATGGCTCTGCTACTACC and TCGGCTTGTTAGGCTCC; Trk A, CTGGGCGGAGTGCCTGAA and GGCTGCCGGCTCAGGAA; Trk B, AATGAAACAAGCCACACAGGGC and TGGAGTGTTACTCCCATTGGAGAT; Trk C, AATTGAGGAGGAGCGGGGAC and GACATGCCCCAGAGGATAGCG; G3PDH, GACCACAGTCCATGCCATCACT and TCCACCACCCTGTGCTGTAG.

Immunocytochemistry

After cells were washed twice with PBS, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. After incubation with 10% normal goat serum, the cells were reacted with anti-MAP2 antibody (Sigma), anti-Tuj1 antibody (Sigma), anti-NeuN antibody (Chemicon international, Inc.), anti-Hu antibody (Marusich et al., 1994), anti-GFAP antibody (DAKO), and anti-Gal-C antibody (Sigma) in PBS containing 1% bovine serum albumin. As a methodological control, the primary antibody was omitted. After washing in PBS, slides were incubated with Peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody or anti-rabbit immunoglobulin antibody (EnVision, DAKO, co., K4001, CA). Cells were stained using a solution containing 3, 3'-diaminobenzidine (DAB), 10 mM sodium azide, and 0.01% H₂O₂ in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 6.7.

Patch clamp recording procedure

A coverslip to which cultured cells had adhered was placed in a recording chamber, and the chamber was mounted on the stage of an inverted microscope equipped with Nomarski optics (IX-70, Olympus, Japan) and a $\times 60$ objective lens. The chamber was continuously perfused with solutions gravity-fed at a rate of approximately 1 ml/min at room temperature (approximately 25°C). Membrane voltages and currents were recorded by a patch clamp method in the whole-cell configuration. The patch pipette was made of Pyrex tubing pulled on a micropipette puller (P-87, Sutter Instrument, Novato, CA). The recording pipette was connected to the input stage of a patch clamp amplifier (Axopatch 200B, Axon Instruments, Foster City, CA). An Ag-AgCl wire connected to the bath via a ceramic bridge served as an indifferent electrode. The pipette resistance was approximately 10 M Ω when filled with pipette solution. The input capacitance and the series resistance electrically compensated as much as possible. Recorded signals were low-pass filtered (Bessel filter, cut-off frequency 5 kHz) and sampled at 10 kHz with a DigiData 1200 interface and pCLAMP 8 software (Axon Instruments).

To analyze the patch clamp recording, cells were transfected with P/T α 1:EGFP plasmid by the lipofection method using FugeneTM 6 (Roche Diagnostic Corporation). Outwardly rectifying K⁺ currents were recorded by voltage-clamping the cell membrane to -97 mV, stepping to test voltages between -107 mV and +63 mV in 10 mV increments for 100 msec and returning to the initial holding potential.

Calcium imaging

Calcium imaging was performed by confocal microscopy of cultured cells loaded with fluo-3 acetoxymethyl ester (2 μ M; Molecular Probes, Eugene, Oregon). A BioRad MRC600 confocal scanning microscope, equipped with a krypton/argon laser (488 nm line), was used to obtain images of the fluo-3 signal. The emission fluorescence was measured through a 520 to 560 nm interference filter. The cells were challenged with a depolarizing stimulus of 135 mM potassium, 100 mM glutamate and 100 mM acetylcholine by bath applications. Image analysis was performed using Igor Pro software (WaveMetrics, Lake Oswego, OR) with custom-made procedures. Areas were normalized to the control response with the standard external solution and shown with colored scale. The standard external solution for patch clamp and Ca²⁺ imaging experiments contained (in mM) NaCl 135, KCl 2.5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10 and glucose 10 (pH 7.4), and the standard pipette solution for patch clamp experiments contained (in mM) NaCl 10, K gluconate 130, CaCl₂ 1, EGTA 1.1, HEPES 10 and ATP-Na₂ 2 (pH 7.2).

Fluorescence activated cell analysis

All samples were treated by water lysis. Cells, at a final concentration of 1×10^7 /ml, were incubated with 1 mg of a monoclonal antibody in Hank's balanced salt solution (containing 0.1% of albumin and 0.1% of sodium azide). In case that the first antibody is conjugated with biotin, cells were then washed twice and incubated with 1 mg of streptavidin-phycoerythrin (Gibco BRL) for 30 minutes on ice. Purified antibodies in the first step were stained with 1 mg of FITC-conjugated goat anti-mouse antibody. Controls included cells stained with individual isotype (mouse IgG1 or rat IgG2a). Incubations were performed in the presence of 10 mg of mouse immunoglobulin to prevent nonspecific antibody binding. Antibodies (anti-mouse Flk-1, CD31, CD34, c-kit, Sca-1, CD140a, CD144, CD14, CD29, CD41, CD44, CD49b, CD49d, CD54, CD90, CD102, CD106, Ly-6C, and Ly-6G, and isotype control antibodies) were purchased from Pharmingen Pharmaceutical, Inc. (San Diego, CA). After 2 washes with Hank's balanced salt solution, in order to remove dead cells, propidium iodide (PI) was

added to each test tube at a concentration of 1 mg/ml just before acquisition by FACScan flow cytometry (Beckton Dickinson) with the Argon laser at 488 nm. List mode data for 30,000 to 50,000 cells were collected in PI gate.

Results

To know the pluripotency and plasticity of BMS cells, we investigated neurogenesis in marrow-derived BMS cells. We isolated several clones from adult female C3H/He mice by frequent subculture. The clones could differentiate into osteogenic, adipogenic, and myogenic lineages in specific culture conditions (Fig. 1). The BMS cells showed a fibroblastic appearance without any treatment. We employed KUM9, NRG, and KUSA/A1 with several differentiation protocols (Pittenger et al., 1999) (Fig. 1). KUM9 cells exhibited several mesenchymal phenotypes including osteocytes, adipocytes, and myocytes, and NRG cells could differentiate into osteocytes and adipocytes. Interestingly, KUSA/A1 could only be otherwise induced to form osteoblasts and exhibit osteogenesis *in vivo* (Fig. 1a and b). KUSA/A1, NRG, and KUM9 exhibited extremely high alkali phosphatase activity, indicating that these cells have an osteogenic potential (Fig. 1c). We did not obtain cardiomyocytes from these clones.

We then characterized them with surface markers (Fig. 1d and e). Both KUM9 and NRG cells were positive for CD34 (hematopoietic stem cell markers), Sca-1 (Ly-6A/E), CD140 (platelet derived growth factor receptor- α), CD29 (Integrin 1), CD44 (Pgp-1/Ly-24), and Ly-6C; and negative for Flk-1 (KDR or VEGF-receptor2), CD31 (PECAM-1), c-kit (CD117), CD14 (a marker for macrophages and dendritic cells, and lipopolysaccharide receptor), CD144 (vascular endothelium cadherin or cadherin5), CD14, CD45 (leukocyte common antigen), CD49b (integrin α 2), CD49d (integrin α 4), CD54 (ICAM-1), CD90 (Thy-1), CD102 (ICAM-2), CD105 (endoglin or TGF- β receptor), and CD41 (integrin α IIb or platelet glycoprotein IIb). CD106 (VCAM-1) was detected in KUM9 cells, but not NRG cells. Surface marker analysis indicated that the cells exhibited markers for osteoblasts such as CD44 and Ly-6C; myeloid cells, Sca-1; and mesenchymal cells, CD140, indicating that these cells are of mesenchymal origin as well as morphological features. These cells did not express CD105, TGF- β receptor, while mesenchymal stem cells are reported to be positive for CD105 (Pittenger et al., 1999).

Neural differentiation was induced by 5-azaC, a demethylating agent (Fig. 2a). The BMS cells showed a fibroblastic appearance before treatment, and the morphology of the cells changed gradually, but dramatically on Day 4 (Fig. 2b). Approximately 20% of NRG and KUM9 cells formed neurite-like processes and showed a neuron-like morphology on Day 9. Immunocytochemistry revealed that the cells were positive for neuron-speci-

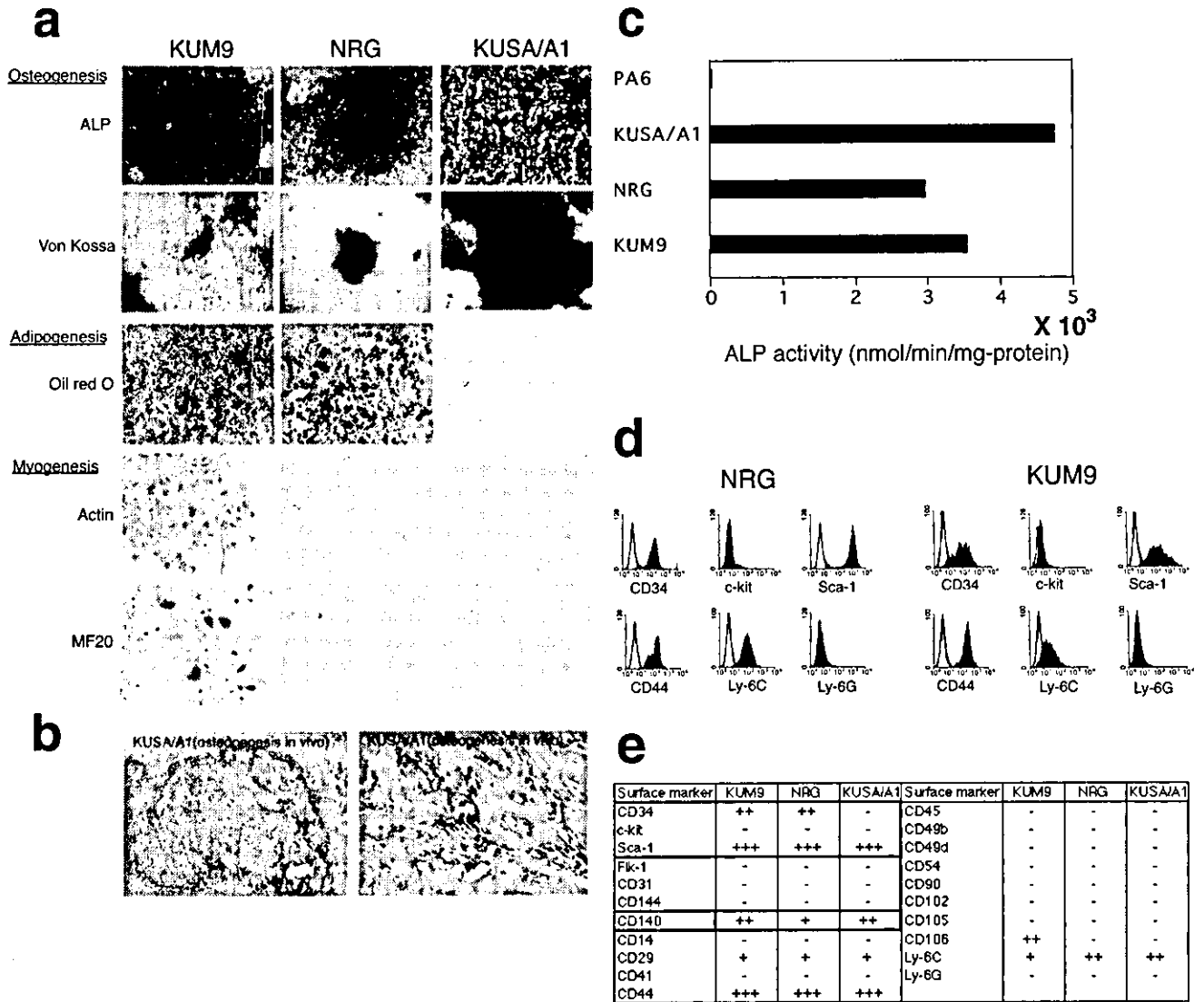


Fig. 1 Multiple differentiated phenotypes of isolated BMS cells which have a neurogenic potential. (a) The stromal KUM9, NRG and KUSA/A1 cells exposed to conditions that normally induce adipogenesis, osteogenesis, and myogenesis. Osteogenic, adipogenic, and myogenic differentiation were separately induced in the stromal clones. Adipogenic differentiation was observed in NRG and KUM9 cells with accumulation of lipid vacuoles within cells and staining of the vacuoles with Oil red O. Osteogenic differentiation was confirmed by alkaline phosphatase activity in all the cells tested. KUSA/A1 cells exhibited extremely high alkaline phosphatase activity, and aggregated and formed nodules. KUM9 cells could give rise to myocytes which was positively stained with anti-

MF20 and anti-actin antibodies. (b) *In vivo* osteogenic activity by KUSA/A1 cells. (right) High-power view of bone trabeculae generated by KUSA/A1. H.E. stain. (c) Quantitative analysis of alkali phosphatase activity was performed on each cell after MC3T3-PA6 preadipocytes (Kawasaki et al., 2000), KUSA/A1, NRG and KUM9 cells exposed to conditions that induce osteogenesis. (d) Representative results of flow cytometric analysis in NRG and KUM9 cells. NRG (left) and KUM9 (right) cells were stained with FITC-conjugated antibodies. Flow cytometric curve with these antibodies is shown in gray with the isotype control curve. (e) Further phenotypic analysis in KUM9, NRG and KUSA/A1.

fic markers including Tuj1, Hu, and NeuN, suggesting that they could be induced into neurons (Fig. 3a-e and g). To determine whether BMS cells may also be induced to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes, NRG, KUM9, and KUSA/A1 cells were immunohistochemically stained by glial markers (Fig. 3f, h, i, and l). These cells were positive for GFAP and Gal-C. Furthermore, the differentiated NRG, KUM9 and KUSA/A1

cells expressed neuron-specific genes such as Trk A, Trk B, Trk C, NCAM, and GAP-43 (Fig. 3o). Interestingly, the number of the positive cells differed among the cell lines (Fig. 3p), indicating that each cell line contained several committed progenitors that independently give rise to neurons, astrocytes and oligodendrocytes. These results suggest that these cells could be transformed into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes.

We next attempted to devise a system for regeneration of functional neurons without 5-azaC treatment. Based on the evidence that (i) Noggin is an inducer of neural cell lineage in *Xenopus* development (Lamb et al., 1993), (ii) Noggin creates a niche for adult neurogenesis in mammals (Lim et al., 2000), (iii) Noggin is a BMP2/4 antagonist and thus may inhibit osteogenic activities of the cells (Zimmerman et al., 1996), we examined whether Noggin could induce BMS cells to form neurons (Fig. 4). Four days after transfection, KUSA/A1 cells began to aggregate and detach from the dishes. The detached cells formed floating neurosphere-like clusters. When cluster-forming KUSA/A1 cells were transferred

onto ornithine/fibronectin-precoated dishes, almost all the cells exhibited a mature neuron-like morphology, including characteristic axons, axon terminals, and a refractile round cell body (Fig. 4a–e), and more than 50% of the cells became immunocytochemically positive for MAP2 (Fig. 4f). Interestingly, this Noggin-based protocol reduced the proportion of astrocytes to ~5% and increased that of neurons (Fig. 4g). Since BMP2 inhibits neurogenesis and concomitantly promotes astrogenesis of neural stem cells (Nakashima et al., 1999; Nakashima et al., 2001), antagonistic activity of Noggin to BMP2 may suppress astrocytic differentiation increasing the efficiency of neuron formation.

We then characterized the electrophysiological properties of neurons from BMS cells. To visualize neuronal cells alive among mixed cell population, NRG cells were transfected with P/T α 1:YFP (Sawamoto et al., 2001) and exposed to 5-azaC (Fig. 5a), since the marker fluorescence driven by the α 1-tubulin promoter is selectively expressed in precursors and young neurons (Roy et al., 2000; Sawamoto et al., 2001). Electrophysiological properties of these identified neuronal cells were analyzed by whole-cell patch clamp recording. 5-azaC treatment led to a decrease in resting membrane potential to -20 mV on Day 14, and -50 mV on Day 28 by whole-cell patch clamp recording. Such a resting membrane potential was also observed in neurons which served a positive control. Furthermore, we have measured ionic currents by the patch clamp method under voltage clamp condition (Fig 5b). With the increase of the voltage, rectifying current was clearly detected, indicating the presence of voltage-dependent K⁺ current. These results suggest that K⁺ channels started to be expressed concomitantly with the morphological change and the increased expression of the neuron-specific markers. The induction of potassium channel in differentiating BMS cells seems to be in accordance with the evidence that the expression of potassium channel parallels the maturation of cell excitability and neural differentiation throughout development (Ribera and Spitzer 1992; Ribera, 1999).

To determine the ability of neurons derived from BMS cells to respond to depolarizing stimuli, we loaded NRG cells with the calcium indicator dye fluo-3 and exposed them to high potassium (Fig. 5c). NRG cells treated with 5-azaC showed a rapid and reversible calcium increase in response to acetylcholine, a response characteristic of functional neurons (Pincus et al., 1998; Roy et al., 2000). Calcium increase was also determined in neurons obtained using the Noggin protocol in response to neurotransmitters and elevated potassium on Day 28. KUSA/A1-derived neurons clearly responded to potassium and glutamate (Fig. 5d–i). The calcium uptake was observed immediately after the stimulation of high potassium (Fig. 5g), which is probably resulted from opening of Ca²⁺ channel by depolarization with high potassium. These results suggest that functional mature neurons could be generated from BMS cells ex-

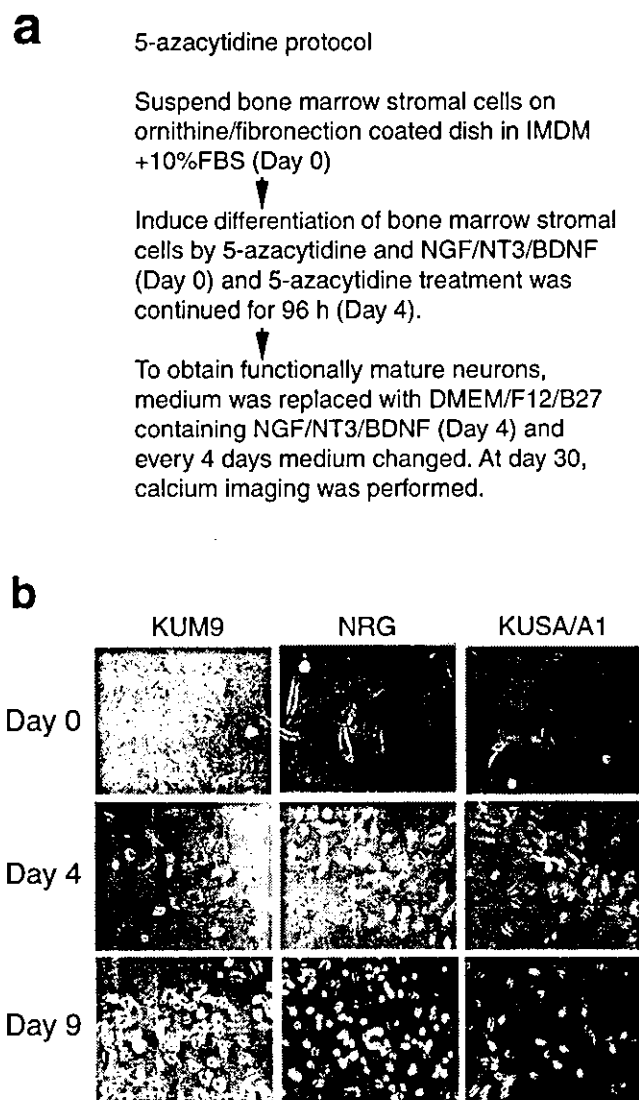


Fig. 2 A simple protocol for induction of "meta-differentiation" of BMS cells to neurons. (a) 5-azacytidine (5-azaC) protocol. Neurons could be generated from KUM2 subline (NRG), KUM9 and KUSA/A1 cells *in vitro*. (b) The cells showed fibroblast-like morphology before 5-azaC treatment and its morphology changed dramatically by Day 4. Approximately 20% of the NRG, KUM9 and KUSA/A1 cells formed neurite-like processes on Day 9.

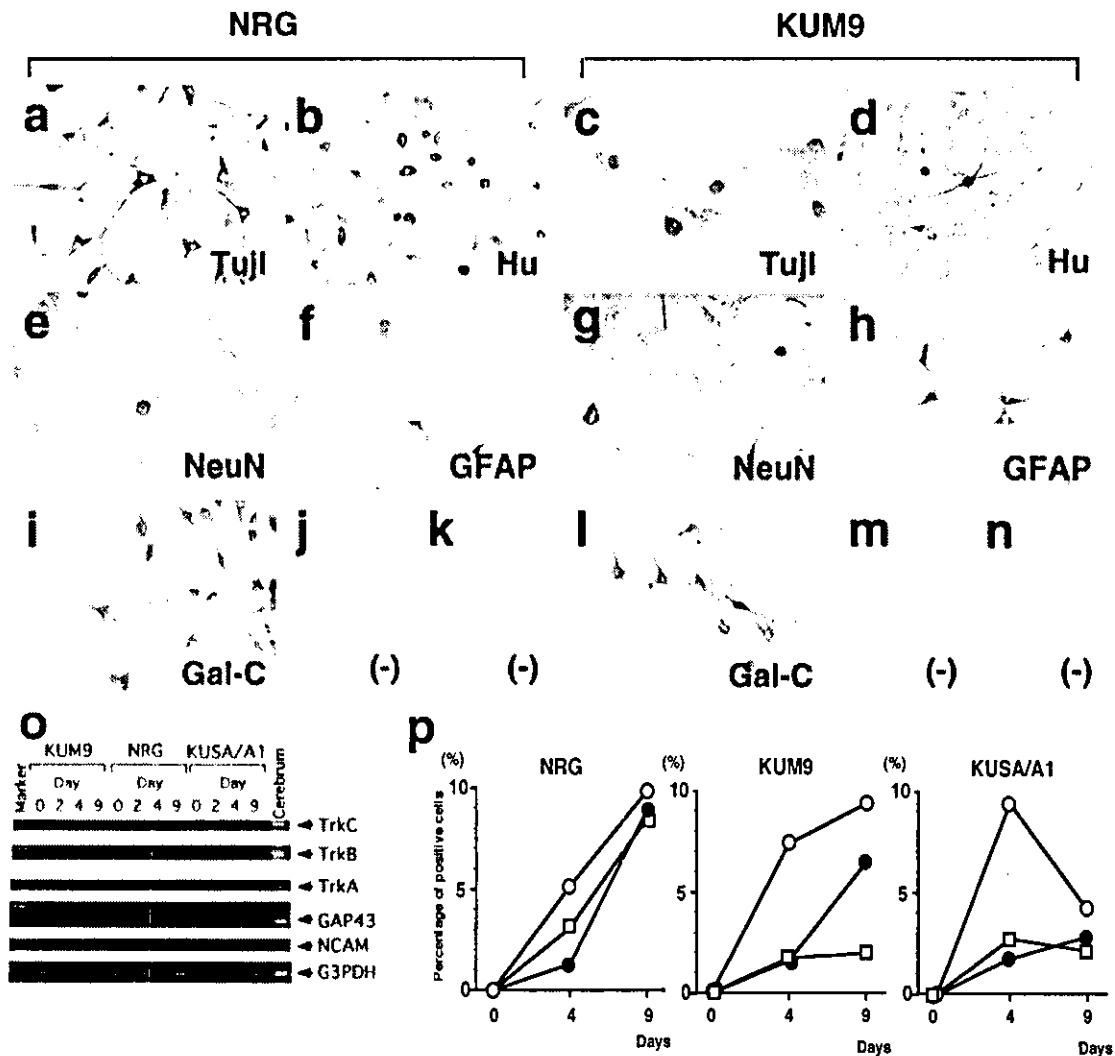


Fig. 3 Neurogenic differentiation of BMS cells with 5-azaC treatment (a–n) Immunohistochemical analysis of the stromal cell-derived neural cells. NRG and KUM9 cells were stained with anti-tubulin (TujI, a and c), anti-Hu (b, d), anti-NeuN (e, g), anti-GFAP (f, h), and anti-Gal-C (i, l) antibodies. As negative controls, these cells were stained with anti-mouse immunoglobulin antibody (j, m) or anti-rabbit immunoglobulin antibody (k, n). (o) RT-PCR was used to determine expression of the neuron-specific genes including *trkA*, *trkB*, *trkC*, *GAP-43*, and *N-CAM*. C3H/He mouse cerebrum was used as a positive control. The cells did not express any genes on Days 0 and 2. Expression of *trkA* was observed in NRG and KUSA/A1 cells on Day 9. *trkB* was expressed in KUM9, NRG

and KUSA/A1 on Day 9. *trkC* was expressed in KUM9 cells on Days 4 and 9, and in NRG and KUSA/A1 cells on Day 9. *GAP-43* was expressed in all the tested cell on Days 4 and 9. *NCAM* was expressed in KUM9 cells on Days 4 and 9, and in NRG and KUSA/A1 cells on Day 9. (p) Time-kinetics of expression of TujI, GFAP and Gal-C proteins was determined by immunohistochemistry. The BMS cells were treated with 5-azaC, fixed on Days 0, 4 and 9, and then stained with anti-TujI (open circle), anti-GFAP (open square) and anti-Gal-C (closed circle) antibodies, and the number of immunoreactive cells per field at $200 \pm$ configuration was counted and given as a percentage of total cells.

posed to Noggin. Immunocytochemistry confirmed that these cells were positive for TujI.

Discussion

We have devised an efficient and simple system for controlled regeneration of neurons from marrow stroma-derived bone cells. Particular fractions of oligo-potent KUM9 or bipotent NRG were found to start expressing

neuronal markers with exposure to a demethylating agent. Moreover, one hundred percent of KUSA/A1 express markers for osteoblasts at a high level, as determined by enzyme histochemistry and flow cytometric analysis. We thus conclude that isolated mature osteoblasts can be converted into functional neurons using the single cell-derived clonal KUSA/A1. Extensive characterization of this unique cell line enabled us to define this potential source of neurons. In contrast, MC3T3/PA6 stromal cells, which have an adipogenic potential

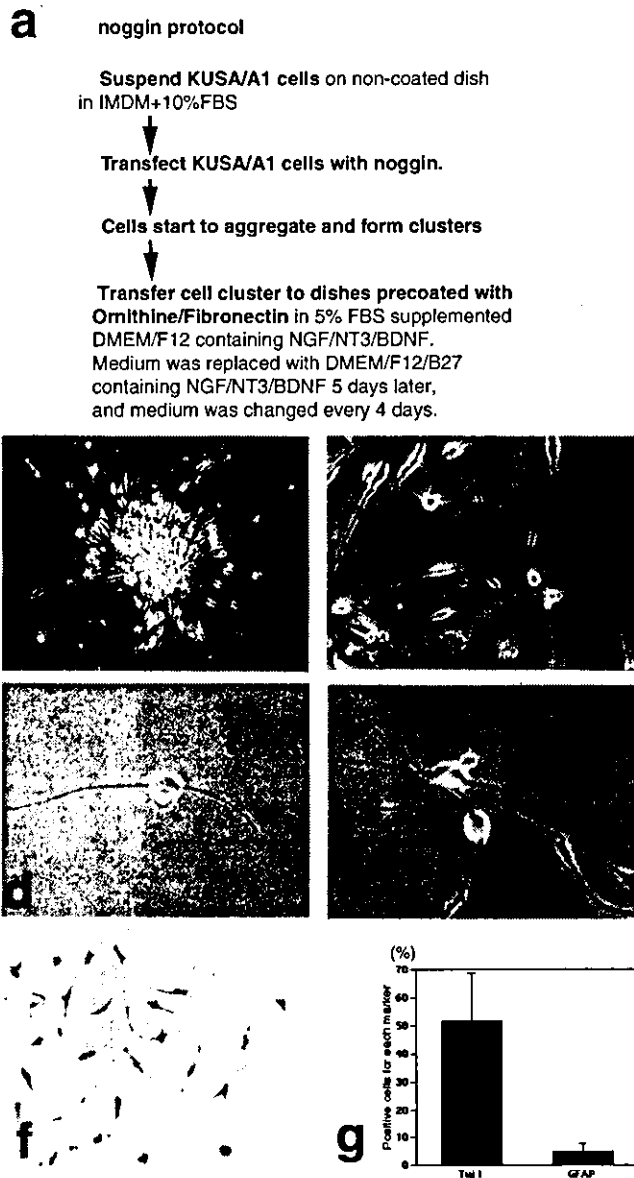


Fig. 4 Efficient Noggin protocol for neuronal induction. (a) Noggin protocol. (b–e) The cells had a round cell body, neurite-like spikes (>80%) and terminated forming an axon terminal-like appearance. (f) Immunohistochemical analysis of KUSA/A1 cells with the Noggin protocol. Immunocytochemical analysis with anti-MAP2 antibody was performed 2 weeks after the transfer of cell clusters to the ornithine/fibronectin coated dish. (g) Percentage of cells positive for MAP2 were counted. The proportion of the cells positive for GFAP, an astrocytic marker, with the Noggin protocol decreased in comparison to 5-azaC-based protocol.

and were recently reported to induce neurogenic differentiation of ES cells (Kawasaki et al., 2000), did not differentiate into neurons (data not shown). Our results reveal that mesoderm-derived BMS cells with osteogenic activity have a surprising plasticity to an ectodermal endpoint. We have also shown that neurons converted from osteoblasts respond to physiological transmitters

just like neurons generated from human adult neural stem cells (Roy et al., 2000).

BMS cells include multipotent progenitors which are able to differentiate into adipogenic, chondrogenic, myogenic, osteogenic, and cardiomyogenic lineages. However, differentiated phenotypes are limited to mesoderm-derived tissues. Demethylating agents have been used to induce cell differentiation into multiple lineages via modifying methylation/chromatin status which is precisely regulated during development (Umezawa et al., 1997). Here, the question is the mechanism underlying the conversion of a cell of mesodermal origin into that of ectodermal origin. 5-azaC is a cytidine analog with a nitrogen atom replacing the carbon at the 5 position of the pyrimidine ring. 5-azaC treatment results in hypomethylation of genes due to blocking methylation in replicating cells and/or inhibiting of methyltransferase, leading to gene expression (Holliday et al., 1996). The possible mechanisms of 5-azaC effect are (i) reversion of differentiated BMS cells to an immature pluripotent state in which they could differentiate into ectodermal, endodermal, and mesodermal lineages, (ii) induction of differentiation of pluripotent BMS cells present among the population, and (iii) transdifferentiation of mesodermal derivatives into ectodermal ones. 5-azaC is also reported to be a potent agent for maturation of neurons generated from neural stem cells (Schinstine and Iacovitti, 1997) indicating BMS cells may have a potential of neural stem cells and 5-azaC acts as a maturation inducing factor for neurogenesis.

We also adopted Noggin, a BMP2/4 antagonist (Zimmerman et al., 1996), as an inducible factor for generation of neurons, since Noggin participates in neurogenesis in *Xenopus* development (Lamb et al., 1993), and creates a niche for adult neurogenesis in mammals (Lim et al., 2000). Noggin-treated mature osteoblasts converted into neurons efficiently, suggesting that Noggin likewise has a pivotal role on transdifferentiation from BMS cells to neurons. Compared to 5-azaC treatment, Noggin suppressed generation of astrocytes from KUSA/A1 cells. Since BMPs induce astrocytic differentiation and inhibit neurogenesis (Nakashima et al., 2001), it is conceivable that the effect of Noggin as a BMP2/4 antagonist suppressed astrocytic differentiation and increased the proportion of neuronal formation (Lim et al., 2000). Moreover, the effect of Noggin as a BMP2/4 antagonist may play a critical role for neurogenesis from osteoblasts, since KUSA/A1 highly expressed BMPs (Ko, MSH, unpublished observation). Because BMPs induce the differentiation of mesenchymal cells into osteogenic cells (Wang et al., 1990; Hughes et al., 1995), antagonists of BMPs may inhibit osteocytic differentiation of KUSA/A1 and thus accelerate differentiation into a neural lineage. The Noggin protocol that cells were converted to a different germ layer with specific inducers, sphere formation, coating, and maturation is quite interesting since the protocol did not in-

clude treatment of methylation/chromatin modifiers such as 5-azaC, sodium butyrate, and trichostatin.

The lineage interconversion between distinct adult committed precursors that originate from the same germ layer is rather surprising. There is limited *in vitro* evidence that adult stem cells exhibited differentiated phenotypes that were observed in different germ cell layers. Following *in vivo* transplantation, cells from the bone marrow can give rise to liver oval cells which are

of endodermal origin (Petersen et al., 1999) as well as neuronal cells which are of ectodermal origin (Mezey et al., 2000). Expression of neurogenic phenotypes are observed in bone-originated sarcomas (Sugimoto et al., 1997). Lineage conversion between cells derived from different germ layers may occur in the levels of stem cells or multipotent precursors.

Stem cell biologists dream of the therapeutic use of stem cells for the recovery of damaged or degenerated

Fig. 5 Functional analysis of stromal cell-derived neurons. The function of stromal cell-derived neurons was evaluated by calcium imaging. (a) To identify functional mature neuron, P/T α 1: EYFP-transfected NRG cells were treated with 5-azaC and maintained for 3–4 weeks (left: phase-contrast photomicrograph; right: fluorescent micrograph). (b) The electrophysiological properties were analysed on NRG cells on Day 14 (upper column) and Day 28 (lower column) after 5-azaC treatment. Artifacts immediately after the voltage command are shown by asterisks. (c) Calcium imaging of the 5-azaC-treated NRG cells before (middle) and after acetylcholine (labeled as *Ach*) treatment (right). Phase contrast micrograph is shown on the left. The cells showed rapid and reversible calcium uptake (250%) in response to acetylcholine. (d–i) The KUSA/A1 stromal cells with the Noggin protocol (details in Fig. 4) were also loaded with fluo-3 and were exposed to stimuli. The cells showed rapid and irreversible increases (364%) in cytosolic calcium in response to potassium (d–g), and also responded to glutamate in a neuronal manner (h, i). (g) Corresponding fluo-3 traces reveal that high potassium stimulation elevates calcium uptake in the KUSA/A1 with the Noggin protocol (red). The undifferentiated cells did not exhibit any response to high potassium in the same coverslip (blue).

