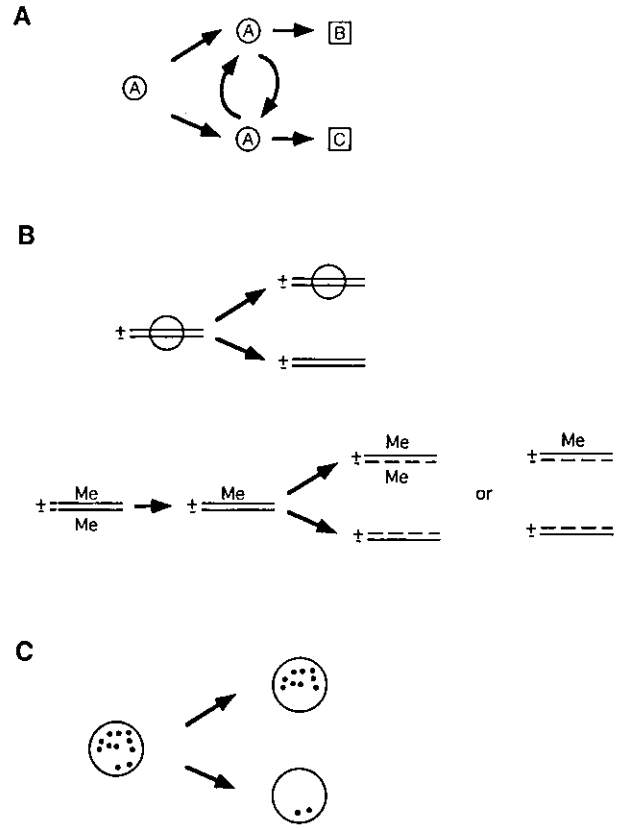


第1図 ヒト胎児性がん細胞が多分化能を示す模式図。

れることによって生じる不均等分裂です(第2図C)。細胞を構成する蛋白質の量が異っていれば、その時点で別の細胞とすることができます。完全に別の細胞になるにはいくつかの蛋白質でそのような不均等な分布をするか転写因子が少しの量でも異なった量の分布をすれば別の細胞になってしまいます。

ひとつの細胞が何種類かの細胞になるのに不均等分裂を考えない機構も存在します。誘導剤の濃度の違いによって、異なる細胞ができあがる機構です(第3図)。すでに知られているものとしては、レチノイン酸がありますし、TGF-βファミリーのひとつである activin も濃度によって生じる分化形質が異なってきます。レチノイン酸の受容体は細胞質に存在し activin の受容体は細胞膜にあり違っていますが、最終的に発現が誘導される転写因子によってできあがる細胞の種類が異なってくるわけです⁶⁾。

もうひとつの考え方は、可能性は高いのですが少々むずかしいものです。細胞の状態が決められて誘導剤の濃度が決められても、できあがる細胞は違ってくるという確率論的な考えです(第4図)⁷⁾。この考えでいくと発生はでたらめになり、ヒトという個体はできあがってこな

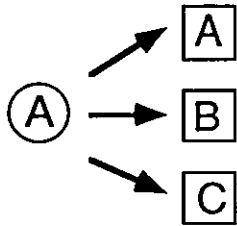


第2図 細胞の不均等分裂に関する考えられる3つの機構。

不均等分裂 (Asymmetric division) とは誘導剤に反応した幹細胞が分裂した際に生じる不均等であり、この不均等分裂によって細胞の多分化能を説明する。よって、第2—4図は異なり、個々の幹細胞の誘導剤に対する反応の違いではない。3つの機構が考えられる。A. 分裂した際のわずかな差が細胞間の相互作用によって最終的に異なる細胞となるモデル。引き金は確率的であるが、システムとして必然となる。B. ゲノムの修飾状態(クロマチン構造ならびにメチル化) が分裂後に異なる状態となり、それが最終的に細胞の不均等な分裂を生じさせるモデル。二重鎖 DNA 上に結合している丸印は、コア・ヒストンを意味する。「Me」は、DNA 上のメチル化による修飾状態を示す。C. 蛋白・mRNA の不均等な分布が分裂後に分子の不均等な分配となり、それが細胞の不均等分裂を引き起こすモデル。大きな丸はひとつの細胞を示し、その中の小さい黒丸は蛋白、mRNA を表している。

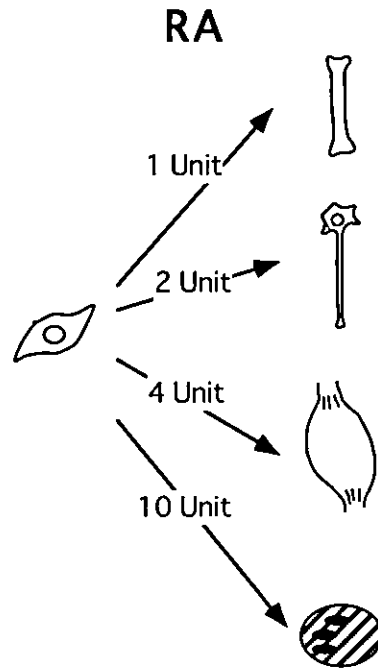
いような印象を受けますがそうではありません。できあがり決定されているにもかかわらず (deterministic)、その過程はかなりおおざっぱな確率に依存します (stochastic)。その細胞の確率的な分化も元をたせば遺伝子の発現に依存するので、その遺伝子の発現の量が確率的に決まっているというアイデアであります。くりかえして言えば、個々の細胞の遺伝子発現は確率的でも、ある一定の条件 (培養状態、誘導剤の濃度) が決まれば全体としてはその発現量は決まってしまう。

A



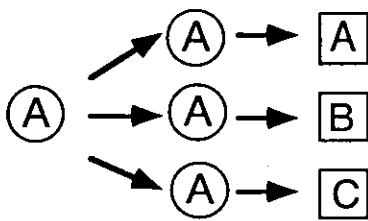
Multipotent stem cells

B

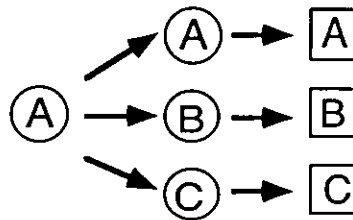


第3図 真の多分化能を有する幹細胞が誘導剤の濃度により分化を示す模式図。細胞株はさまざまな細胞に分化することが可能な幹細胞株であることを示す(A)。この図では誘導剤[レチノイン酸(RA)]の濃度の違いにより、分化する方向(表現形質)が異なることを意味する(B)。濃度が低い方から骨、神経、筋、合胞体栄養細胞に分化することを示しているが、これはデータに基づいたものではなく、単に理解しやすいように濃度を記入しただけである。この場合は、一つの lineage にだけ分化するサブクローンを得にくい。

A



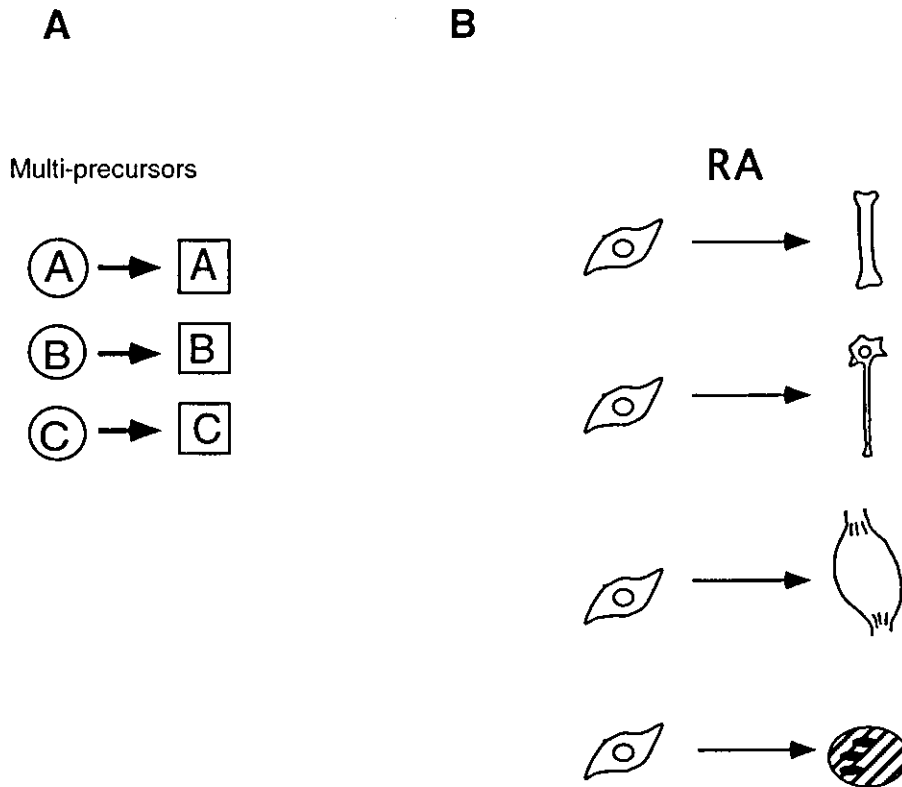
B



第4図 真の多分化能を有する幹細胞が確率的な分化を示す模式図。細胞株はさまざまな細胞に分化することが可能な幹細胞株であるが、分化誘導剤による細胞の反応は一定でなく、いろいろな細胞に分化する。細胞の環境・分化誘導剤の状況を決しても、細胞は確率的に(stochastic)分化するというモデルである。AとBでは大きな違いはないが、誘導剤により分化が確率的に決まっている場合(A)と前駆細胞が確率的にできる場合(B)の二通りの可能性がある。

最後に考えなくてはならない可能性は、幹細胞と考えられている細胞が、元々、いくつかの種類の前駆細胞を含有していることです(第5図)。これは、幹細胞の概念

から外れますが、しばしば培養過程での問題そして生体内で幹細胞が存在しているか否かを検討する際に必ず問題となりますが、実験的に証明することが困難なことが



第5図 細胞の中にさまざまな前駆体が存在し、それが多分化能を示す模式図。A, Bは、いずれも同じことを意味し、誘導剤の濃度は一定だが、細胞株の中には必ずいろいろな細胞の前駆体 (precursors) が含まれており、それぞれの前駆体に応じて分化することを示している。Aは模式図である。Bでは、骨、神経、筋、合胞体巨細胞の前駆体が誘導剤であるレチノイン酸 (RA) によりそれぞれの分化した細胞に分化することを具体的に表した。この場合は、一つの lineage にだけ分化するサブクローンを得ることができる。

多く見うけられます。誘導剤を処理することで、いくつもの前駆体からさまざまな細胞が出現し、あたかも幹細胞が存在しているかのようにみえます。

2. 全能性と部分全能性—多分化能が失われていく機構について—

血液幹細胞はいろいろな種類の細胞、すなわち赤芽球系、顆粒球系、巨核球系の細胞に分化します⁸⁾。また、骨髓間質細胞は心臓、脂肪、骨、腱になります。しかし、一般に血液幹細胞は骨、腱にならないし、骨髓間質細胞は表皮、血液細胞になりません。これらの細胞は部分的に全能性を有していると考えられます。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元々の胚葉を越えて分化することはありません。骨髓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仕組みはどのようなものなのでしょうか。骨髓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でしょうか。このことは、多分化能 (mul-

tipotent) または部分全能性を有している細胞と、一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す。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れます。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ります。結論から言えば、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りません。

遺伝子の発現が制御されてしまうメカニズムが問題です。遺伝子の発現は転写因子によって調節されています。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ています。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す。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ります。DNAのメチル化が多くなれば遺伝

子発現は制限されます。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わけです。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ことになります。

例外として、クローン羊では分化した細胞の核に全能性があることを示されました⁹⁾。ここで示唆したように「分化した細胞には全能性はない」という従来の考えとは異なるので注目され、発見者は賞賛されました。同様に、部分全能性を有する骨髄間質細胞が胎児性がん細胞のように全能性を有するようになるのでしょうか。分化した細胞に、脱分化または先祖帰りが生じなくてはなりません。クローン羊の場合は発生過程を必要としましたが、発生を介さないでさまざまな細胞を骨髄間質細胞から作成する(細胞転換)ことが思うままにできれば、骨髄間質細胞は「細胞治療」に使用することができる大変よいソースとなります。

註) 多分化能を示す骨髄間質細胞中の間葉系幹細胞の割合も年齢と共に減少してきます¹⁰⁾。

新生児	1/10,000
10代	1/100,000
35歳	1/250,000
50歳	1/400,000
80歳	1/2,000,000

藤野忠広先生、桜田一洋博士、福田恵一博士との実りある議論はいつも刺激的でした。草刈悟さんはこれらの元となる「草」細胞を樹立してくれました。現在は卒業した方々が主ですが、慶應医学部の学生諸君の発見はいつも私を支えてくれました。ありがとうございます。

文 献

- 1) Hata J-I, Fujimoto J, Ishii E, Umezawa A, Kokai Y, Matsubayashi Y, Abe H, Kusakari S, Kikuchi H, Yamada T, Maruyama T: Differentiation of human germ cell tumor cells in vivo and in vitro. *Acta Histochem Cytochem* 25: 563—576, 1992
- 2) Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting SG, Carlin C, Dracopoli NC, Fogh J: Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest* 50: 147—162, 1984
- 3) Mintz B, Illmensee K: Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3585—3589, 1975
- 4) 岡野栄之: 神経発生の制御機構の分子生物学的研究. *慶應医学*, 75: 1—33, 1998
- 5) 勝部憲一, 坂本啓: 神経管初期発生における Notch シグナルの役割. *細胞工学*, 18: 1314—1321, 1999
- 6) Simeone A, Acampora D, Arcioni L, Andrews PW, Boncinelli E, Mavilio F: Sequential activation of Hox 2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* 346: 763—766, 1990
- 7) Ko MS, Nakauchi H, Takahashi N: The dose dependence of glucocorticoid-inducible gene expression results from changes in the number of transcriptionally active templates. *Embo J* 9: 2835—2842, 1990
- 8) Umezawa A, Maruyama T, Segawa K, Shaddock RK, Waheed A, Hata J: Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis in vivo. *J Cell Physiol* 151: 197—205, 1992
- 9) Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KII: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1997 Mar 13; 386 (6621): 200]. *Nature* 385: 810—813, 1997
- 10) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143—147, 1999

りかかる必要があるといわれるゆえんであろう。American College of Surgeons の statement も同様のことをのべていると出月⁴⁾が引用している。Bruce U MacFadyen Jr.⁶⁾は将来は3 dimensional imaging と telepresence surgery が可能であると予想している。

とにもかくにも外科医にとって LC は習熟せねばならない手技となっているのである。

参考文献

- 1) 菅田文夫：胆道，7：22—24，1993
- 2) 大藤正雄：胆道，7：27—29，1993
- 3) 羽生富士雄：胆道，7：40—41，1993
- 4) 出月康夫：外科診療，7：21—23，1991
- 5) 内山勝弘ら：胆道，7：148—154，1993
- 6) Bruce V MacFadyen, Jr.：第57回日臨外会，1995
渡辺 衛（けいゆう病院）

KUSA (草) 細胞は骨芽細胞！ KUM 細胞は心筋細胞？

“からだのなかで造血を誘導できるようなひとつの細胞由来の骨髄間質細胞株はできないだろうか？”一番はじめの動機はこんなものでした。

当時（10年ほど前）は、現在臨床医学で利用されているような血液の増殖因子も単離されておらず、骨髄間質細胞が有する骨髄幹細胞誘導能ならびに間質細胞より産生される増殖因子による血液細胞の支持能はきわめて魅力的な研究対象であり、その分子の同定は重要な目標でした。そのなかで研究室内で培養していた骨髄間質細胞のひとつがマウスに移植すると白血球系、赤芽球系、巨核球系の三系統の血液細胞を誘導するのを見て、興味深く思いました。この系は再現性はありませんでした。

ヌードマウスに移植されているヒトないしマウスの腫瘍内に造血が誘導されているような場合はないわけですから、骨髄間質細胞が生体内で三系統の血液細胞の分化を引き起こしたのは驚きでした。間違いなく、骨髄間質細胞の膜上に特異的に発現される血液幹細胞を接着させる分子か、間質細胞が産生する遊走因子がこの造血に働きかけているものと考えました。この造血を誘導する作用は骨髄間質細胞にしかないと信じたわけです。

「血液幹細胞を体のなか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行っていくことで、時間と労力と運が必要と思われました。幸運なことは、5人の研究員が興味をもってこれの単純な作業に参加してくれたことです。不死化した間質細胞を同系統または免疫不全のマウスに注射し、造血ができたかどうか組織形態学的に決定するわけです。

運良く初めに計画してから3年くらいで、再現性よく生体内で造血誘導能を有する骨髄間質細胞を得ることができすでに報告しました（Umezawa A, Maruyama T, Segawa K, Shaddock RK, Waheed A, Hata JI: Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis in vivo. J Cell Physiol 151:197—205, 1992）。この極めて興味深い骨髄間質細胞株を得る過程は特記すべきことはなく、根気と運によっているのでもここでは触れません。

この細胞株はサブクロニングを繰り返し、単一の細胞株として考えられるにもかかわらず、多分化能を有していることにこの細胞の性格付けをしているうちに気づきました。すなわち、通常の培養では線維芽細胞の形態を保持しているにもかかわらず、分化誘導によって骨細胞、心筋細胞（筋細胞）、脂肪細胞へと分化するわけです。多分化能といいますが EC 細胞や ES 細胞のように三系統の細胞に分化するわけではなく、間葉系の細胞（中胚葉）のみへの分化を示します。

同系のマウスかまたは免疫不全のマウスに皮下移植しますと2週間ほどで骨髄ができ、4週間ほどで造血が誘導されてきます。移植部位に造血は誘導され、その中に血液幹細胞が存在していました。今度は再現性がありました。もちろん、理論的には予想できまし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、皮下の腫瘍を半分に分けた時に真っ赤な血液がみられたときは少々、興奮しました。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いましたが、実験によりこの考えは否定されました。血液細胞がこの細胞を移植した部位に辿り着いているわけです。

この細胞をマウスの尾静脈より注射しますと、2週間以内に肺に骨組織を形成します。細胞が骨組織を誘導するのか、またはこの細胞自体が骨芽細胞なのかが分からなかったので diffusion

chamber という小部屋に細胞を入れる実験を行ったところ、その小部屋の中に骨が形成されたので、その細胞が骨芽細胞であることが明らかとなりました。

その後、2年の間にその骨芽細胞のサブクローニングに成功し、その細胞を KUSA 細胞（草細胞）と名付けました。慣用的に研究室内で培養している者の名前をとったこともありますが、素人ががんばって樹立した細胞という自嘲した意味も含めてあります。KUSA 細胞は、1) 骨形成を促進する薬物のスクリーニングのアッセイ系、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、現在、利用できると考えています。

前述しましたように、元の細胞は心筋細胞（筋肉細胞）にも分化します。DNA のメチル化を阻害する物質を処理することで、自然に収縮するまでになります。その収縮はリズムカルで、心筋細胞の初期培養の収縮に似ています。形態学的にも、電子顕微鏡レベルで骨格筋というよりも心筋細胞に類似しています。また、心筋型のギャップ結合蛋白質を発現しています。この細胞は、所属する慶應義塾大学医学部の頭文字をとって KUM 細胞と名付けました。

これらの細胞株は、いままで初期培養を利用したり、分化しない細胞株を利用してきた骨ならびに心筋細胞の分化の機構の解明する研究に利用できます。いずれの細胞も通常の培養で再現性の高い分化形質を保持し、増殖も極めて速く、私どもが実際に培養したことのある細胞のなかでももっとも培養しやすい細胞です。

私たちの結果を医学に応用することはできないでしょうか。骨髄間質細胞は、血球系の細胞を除けば他の組織にくらべて骨髄より比較的容易に得ることができます。この間質細胞が骨芽細胞の、そして心筋細胞の供給源になることができる可能性をこの細胞株の樹立の事実は示しています。さまざまな困難はあるでしょうが、骨芽細胞は治療しにくい骨折部位に移植することで、そして心筋細胞は心筋が壊死に陥った部位に移植することで治療に役に立つ可能性があるわけです。本人の骨髄より得られるわけですから拒絶反応はなく、ヒトの細胞は不死化しにくいことを考えれば腫瘍化

の危険もありません。克服すべき点は多々ありますが、このようなことを最近考えています。

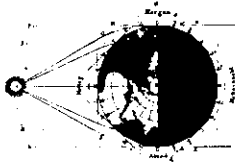
草刈 悟、丸山達也、秦 順一、梅澤明弘
(病理学教室)

シミュレーション技術と医学

コンピュータの発達で医学を大きく進歩させた例は CT・MRI などを始めとして枚挙にいとまがないが、耳科学・聴覚医学の分野も例外ではない。画像診断はもちろんであるが、シミュレーションとしての例をあげれば補聴器の実耳利得などは外耳の形状と中耳の特性がわかればシミュレーションにより予測可能であるし、蝸牛や聴覚中枢路についても計算機上にモデルを作成することにより解析がなされている。中耳手術についても、高橋先生（現山口大学教授）の方法により得られた聴力は、従来のモデルでは説明できないほど良好であったが、これも最近考え出されたモデルで数値シミュレーションを行うと説明可能であった。ヒトで研究を行う場合、倫理的問題があるのでとりうるデータは限られており、しかも対象は必要最小限とすることが望まれるので、シミュレーションの手法はきわめて有用と思われる。しかも最近のパソコンは高性能化しており、以前には大型機でなければできなかったような複雑な数値計算もパソコンで短時間にできるようになった。また計算を行うソフトも充実してきており、我々が今までプログラミングを行って求めたような計算のかなりの部分が市販のソフトで行えるようになってきた。慶應の先生方により 3 次元 CT による手術のシミュレーションの研究が行われていると聞くと、これなどもコンピュータの進歩なしではできなかったものと思われる。

もちろん生体现象は非常に複雑であるが、かなりのところまでモデル化して計算機上で扱うことができるようになってきたものと思う。現在の工学系の進歩はシミュレーション技術の発達に負うところも多いわけであるし、物理学などは理論の方が先行している。人間は機械ではないとはいえ、適切なシミュレーションの方法を確立することは医学を科学とする上で大事なことと思われる。

わが国でも少しずつ耳科領域においてモデルによる解析を行った発表がみられるようになってき



間葉系幹細胞による臓器再生

その表面マーカーに着目する

梅澤明弘

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

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

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

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

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

Mesenchymal Stem Cells

Akihiro UMEZAWA, 慶應義塾大学医学部

間葉系幹細胞の取得、増殖そして分化

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

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

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

用語解説

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

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

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

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

間葉系細胞を規定する分子

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

筆者らは、マウス骨髄の付着系細胞よりいくつかの

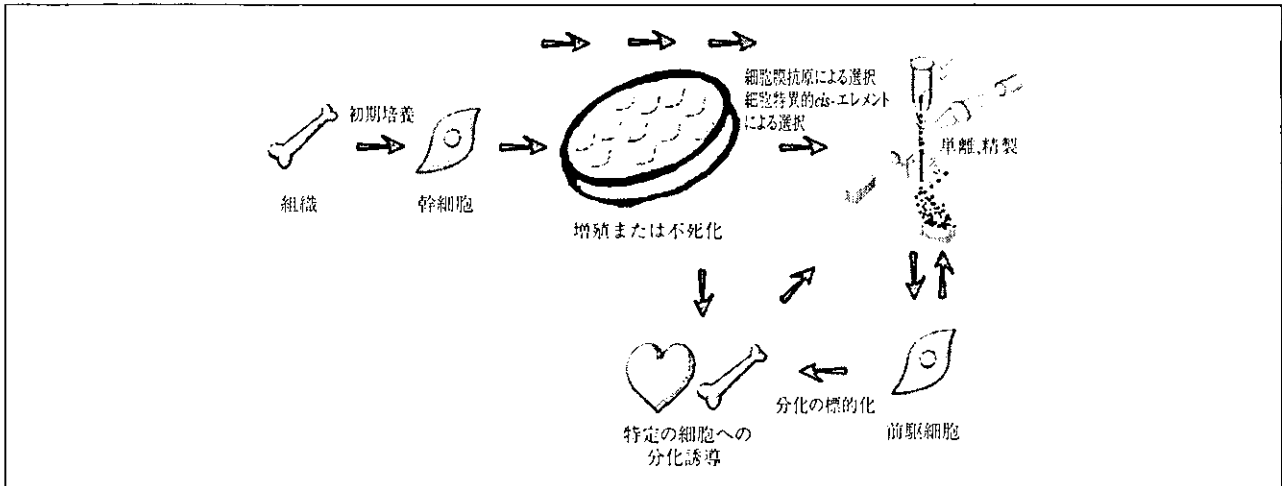


図 1 ■ 骨髓初期培養により間葉系幹細胞を得て、その後目的の形質を有した細胞を得るまで

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

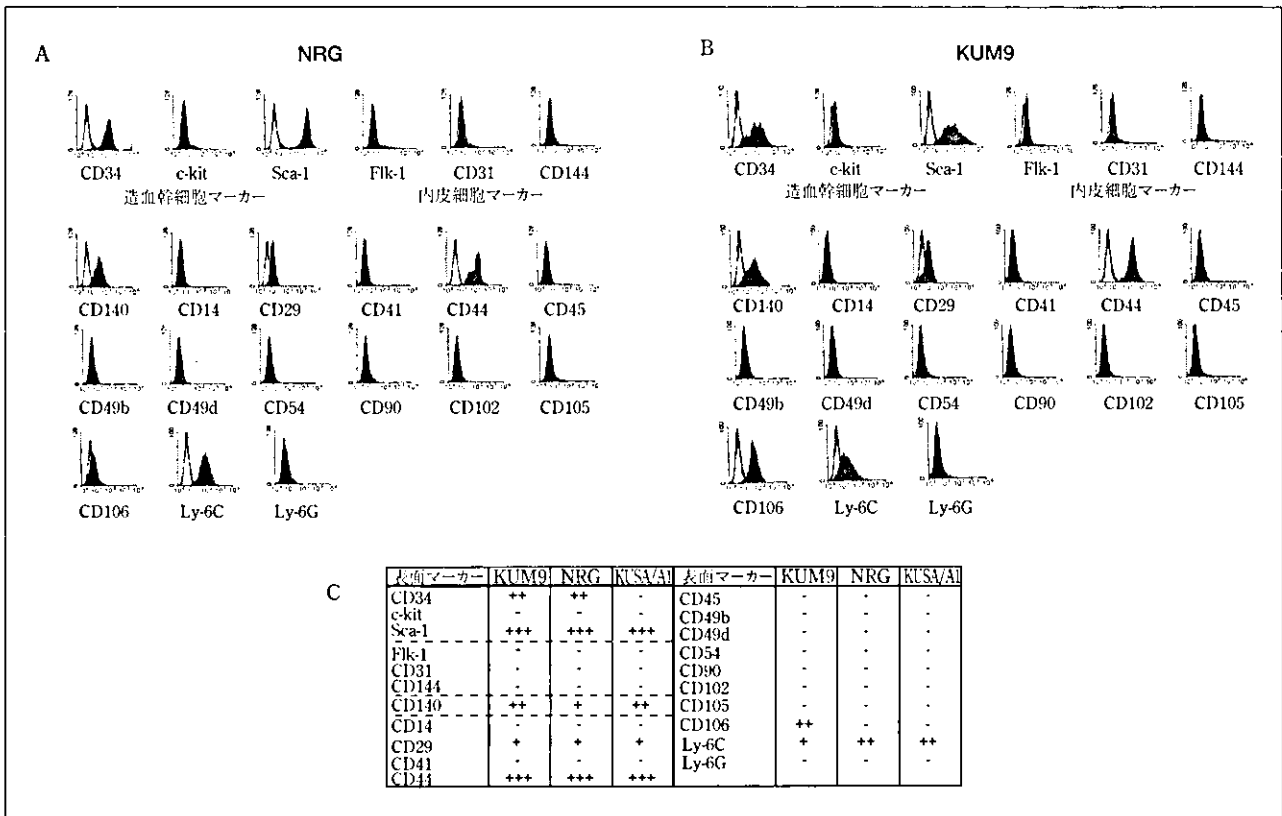


図 2 ■ 間葉系幹細胞、前駆細胞、骨芽細胞の表面マーカー

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

特異な細胞株を単離した⁽⁹⁾。そのうちの1つ、培養条件下で骨・脂肪・骨格筋・心筋細胞に分化し得る多分化能をもった細胞株(KUM2)は、完全な自己複製能とはいえないが、試験管内での分化を目安にすると、継代

を続けてもその分化能に変わりなく未分化な状態を維持している。したがって、自己複製能を有する幹細胞もしくはそれに近い細胞だといえる。また、心筋細胞への分化能を失った細胞株(KUM9)は、骨・脂肪・骨格筋細胞

への分化能は保持しており、KUM2と同様に継代を続けても未分化な状態であることには変わりがなかった。骨・脂肪細胞にしか分化しなくなった2種類(KUSA/O, NRG)の細胞を得たが、その表現型は異なっており、*in vivo*に置いたときには分化形質に違いが生じてくる可能性があると考えている(図2)。骨細胞および脂肪細胞にしか分化しなくなった未分化な細胞(KUSA/A1およびKUM5A11E1)は、それぞれの細胞に運命づけられた前駆細胞と考えている。FACSを用いて表面抗原を検討した結果から、c-kit⁺, CD34⁺, CD140⁺が、多分化能を有する間葉系細胞と、分化を進めている細胞(前駆細胞)および血球系幹細胞を含む血球系細胞とを区別する良いマーカーになると考えている。

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

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

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

表2 ■ヒトとマウス間質細胞の表面マーカー

分子名	CD 番号	発現
<ヒト間質細胞>		
I. 接着分子		
ALCAM	CD166	陽性
ICAM-1	CD54	陽性
ICAM-2	CD102	陽性
ICAM-3	CD50	陽性
E-セレクトリン	CD62B	陰性
L-セレクトリン	CD62L	陽性
P-セレクトリン	CD62P	陰性
LFA-3	CD58	陽性
カドヘリン5	CD144	陰性
PECAM-1	CD31	陰性
NCAM	CD56	陽性
HCAM	CD44	陽性
VCAM	CD106	陽性
ヒアルロン酸受容体	CD44	陽性
II. サイトカイン受容体		
IL-1R(α , β)	CD121a,b	陽性
IL-2R	CD25	陰性
IL-3R	CD123	陽性
IL-4R	CD124	陽性
IL-6R	CD126	陽性
IL-7R	CD127	陽性
インターフェロン γ R	CDw119	陽性
TNF- α 1R	CD120a	陽性
TNF- α 2R	CD120b	陽性
FGFR		陽性
PDGFR	CD140a	陽性
トランスフェリン受容体	CD71	陽性
III. インテグリン		
VLA- α 1	CD49a	陽性
VLA- α 2	CD49b	陽性
VLA- α 3	CD49c	陽性
VLA- α 4	CD49d	陰性
VLA- α 5	CD49e	陽性
VLA- α 6	CD49f	陽性
VLA- β 鎖	CD29	陽性
β インテグリン	CD104	陽性
LFA-1 α 鎖	CD11a	陰性
LFA-1 β 鎖	CD18	陰性
ビトロネクチンR α 鎖	CD51	陰性
ビトロネクチンR β 鎖	CD61	陽性
CR4 α 鎖	CD11c	陰性
Mac1	CD11b	陰性
IV. その他		
T6	CD1a	陰性
CD3複合体	CD3	陰性
T4, T8	CD4, CD8	陰性
テトラスパン	CD9	陽性
LPS受容体	CD14	陰性
ルイスX	CD15	陰性
—	CD34	陰性
白血球共通抗原	CD45	陰性
5'ターミナルヌクレオチダーゼ	CD73	陽性
B7-1	CD80	陰性
HB-15	CD83	陰性
B7-2	CD86	陰性
Thy-1	CD90	陽性
endoglin	CD105	陽性
MUC18	CD146	陽性
BST-1	CD157	陽性
<マウス間質細胞>		
分子名またはCD番号		発現
Stro-1 ^p		陽性
CD10		陽性
CD34		陽性
CD90(Thy-1)		陽性
CD105(endoglin)		陽性
CD106(VCAM-1)		陽性
Ly6A/E(Sca-1)		陽性
acetylated LDL receptor		陽性

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

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

間葉系細胞の分化の指標を知る

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

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

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

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

骨の場合は、試験管内での高いアルカリホスファターゼ活性、カルシウム沈着が一般に分化の指標となる。同時に最も大事なものは、細胞を移植することで体内で骨を形成させなくてはならないことである⁽⁹⁾。

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

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

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

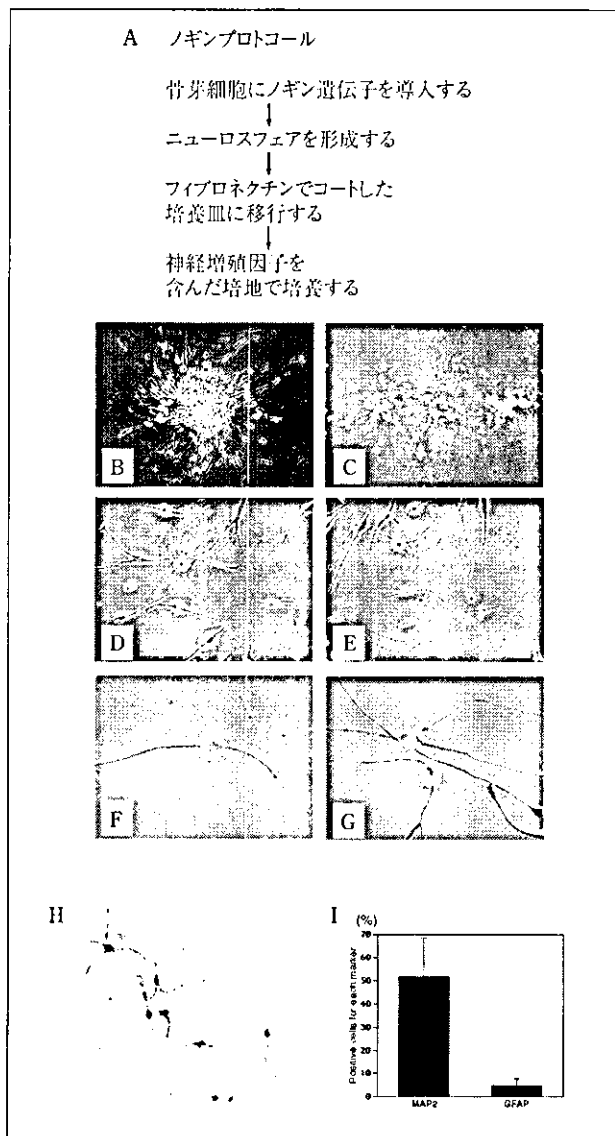


図 3 ■ 中胚葉由来の間質細胞の神経細胞へ分化

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

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

細胞の「初期値」について

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

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

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

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

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

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、すなわち受精卵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。

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ビターとして知られ、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

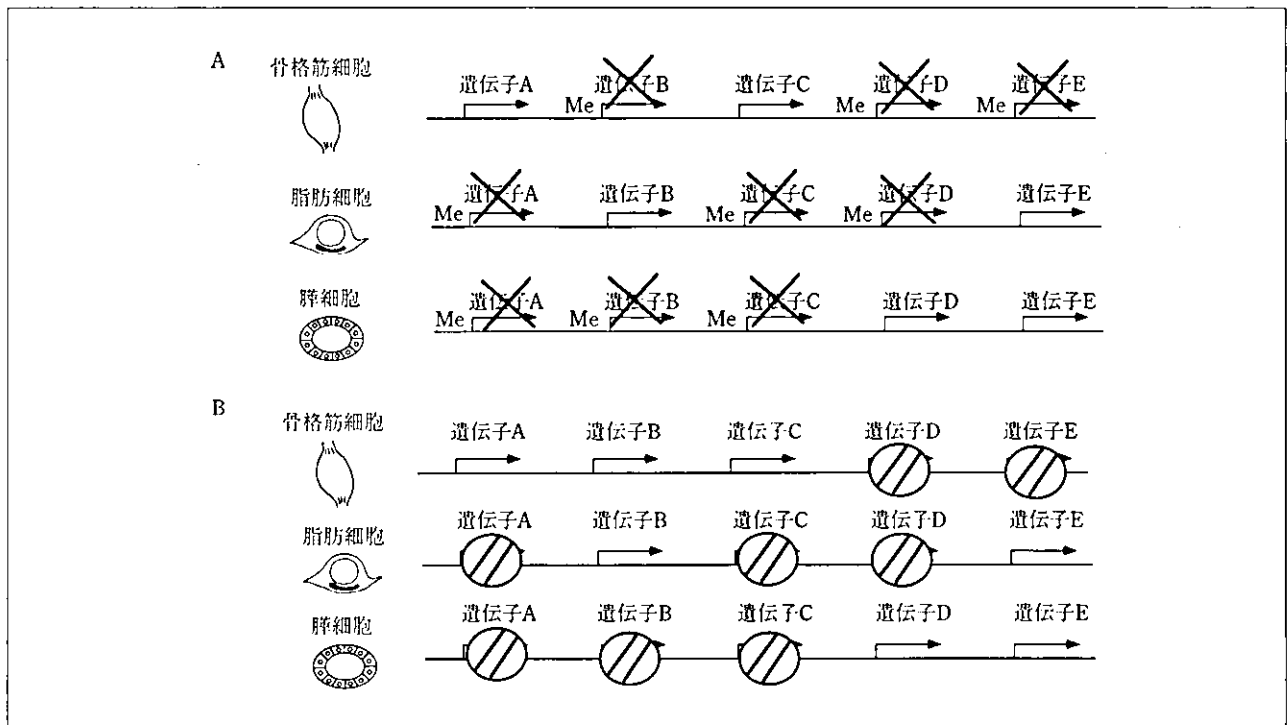


図4 ■細胞が固有のDNAメチル化(A)ならびにクロマチン構造(B)を有し、独自の遺伝子の発現パターンを示す

わかりやすくするために、骨格筋、脂肪細胞、肝細胞の例を挙げる。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、基本的に肝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、彼らに帰属する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/umezawa/HTML>, E-mail: umezawa@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>シオミズツボウ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

間葉系幹細胞

——新しい生体マイクロデバイス・骨髄間質細胞の可塑性を利用したグローバルな“臓器”再構築——

梅澤明弘 神山 淳 阿部 仁 秦 順一

◎2000年の暮れに、旧科学技術庁が“21世紀の展望とそのあり方”について各分野の専門家に調査し、“こういうことが起こりうる”という視点にたった意見が発表された。そのなかの医療の改革に関する分野で、“再生医療の普及”があった。“生体から分離した細胞をもとに、あらゆる機能性細胞を*in vitro*で大量に生産する技術が確立する。これによって再生医療が一般化し、治療後の人体は、もともとの身体部分、クローン臓器、人工組織で構成されるのが普通になるが、再生医療が脳にまで及ぶと本当の自分とは何なのかが問題となる”とある。書いた本人はどのようなつもりかわからないが、最後のくだりはすこしユーモアが感じられ、短い文章ながら的を射ている。もし、自分の骨髄間質細胞を用いて細胞転換してニューロンにし、脳内に移植することが可能となった場合においても、脳の高次機能や意識についてまで再生するとは思えない。一方、神経以外の機能的細胞を間葉系幹細胞からつくりだすことができれば、それが臓器固有の働きを補助することは十分可能である。

Key word 骨髄間質, 間葉系幹細胞, 細胞転換, 細胞移植, 再生

骨髄間質細胞をご存じですか

1970年代の後半、造血臓器である骨髄において造血機能が円滑に行われるためには、造血環境を支持する造血微小環境の存在が必須であることが明らかにされ、はじめて骨髄間質が間を埋める細胞としてだけでなく、機能的にも役に立っていることが示唆された¹⁾。その後、この造血微小環境は*in vitro*の研究を中心として発展し、いくつもの不死化した間質細胞が得られた。それらは当初より脂肪細胞への分化といった分化能は知られていたが、おもに血液幹細胞と免疫細胞の支持能を有しているなどの造血への貢献で分類がなされ、より未分化血球細胞を維持する能力を有している間質細胞がもてはやされ、科学への貢献も多大なるものがあつた。

こんななかで、分化の研究は成体より単離した細

胞の分化から胎児性幹(ES)細胞や胎児性癌(EC)細胞といった未分化多能性幹細胞にかかわる分化が注目を浴びた。これら未分化細胞は、*in vivo*であらゆる細胞へ分化することが知られた。*in vitro*でもこの多分化能がつぎつぎと再現され、再生医療の供給源となる。一方、1990年ごろに骨髄間質にも信じられない事実がみられた²⁾。造血微小環境の維持という高度の機能を有している骨髄間質細胞に、未分化細胞に特有な多分化能が存在するという事実がみられたことである³⁾。詳細には、成人から採取した骨髄間質細胞は間葉系由来であり、骨、軟骨、心筋、骨格筋、脂肪に分化し、心筋細胞に分化したさいには拍動をはじめようになる^{4,5)}。さらには胚葉を越えて神経幹細胞⁶⁾のようにニューロンにまで分化することが明らかになってきた⁷⁾。

こうした研究成果には、必然的に骨髄間質細胞の再生医療への応用という、きわめて実際的な医療行為につなげる動きがみられた^{8,9)}。とくにヒトへの応用という観点からすると、①骨髄細胞は日常行われる骨髄穿刺液より容易に分離・培養する

Marrow stromal cells as a novel microdevice of regenerative medicine

Akihiro UMEZAWA, Jun KOHYAMA, Hitoshi ABE and Jun-ichi HATA :

慶應義塾大学医学部病理学教室

ことができるため、その利用が簡単である。②自己細胞を用いることができるため、拒否反応を避けることができ、また倫理的な問題が生じる余地も限られる。また、③上述のように、間質細胞の多分化能を利用すれば、心筋、骨、軟骨組織に対して広範に利用できる可能性が広がる。最後に一言付け加えれば、間葉系細胞であるがゆえに *in vitro* で増殖が盛んであり、大量の細胞を得ることが可能であり、遺伝子操作もしやすい。

多分化能を有する間質細胞を機能性細胞に転換するには、発生学の知識を利用している。分化した細胞(核)の初期化における実際の誘導方法を明らかにすることは、細胞移植を考えるうえでの課題であり、発生学の知識からスタートする。このような現実には則した面が、細胞移植・再生の研究が錬金術的と指摘される所以であると考え、指摘は指摘として、細胞の全能性を明らかにするにはゲノムまたは核の“全能性”の分子機構を明らかにする必要があることは間違いない。一方、このような分子機構を明らかにすることと同時に、細胞を別の細胞へと分化させる細胞転換を考えるうえでは低分子化合物によるリセットで、細胞の“初期値”をクリアすることがもっとも効率がよいと感じていた。さらにいえば、“初期値”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思っていた。その考えはどうも誤りであったようだ。

☪ DNAメチル化およびクロマチンを改変する低分子化合物による細胞の初期化(リセット)または自己(アイデンティティ)の喪失

骨髄間質細胞は心臓、脂肪、骨、腱になる。しかし通常、血液幹細胞は骨、腱にならないし、骨髄間質細胞は表皮、血液細胞にならない。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はあるが、実際にはない。ヒト成人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)。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仕組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、といったことは、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能力を有する。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。

多分化能を示す骨髄間質細胞中の間葉系幹細胞の割合も、年齢とともに減少してくるといわれている。新生児では1/10,000、10代では1/100,000、35歳では1/250,000、50歳では1/400,000、80歳では1/2,000,000の割合で、骨髄間質細胞中に間葉系幹細胞としての性質を有している。一方、研究室の今林は、胎児は別として生後は年齢にあまり関係なく、1/1,000,000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、骨髄間質細胞は年齢に関係なく、従来考えられてきたよりも長期に継代可能である。90歳以上のヒトから得た細胞であっても、200日以上(分裂回数40回以上)培養が可能である。

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には、DNAのメチル化とクロマチン構造がある(「サイドメモ」参照)。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, trichostatinA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、骨髄間質細胞に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あらたな出現を認め、低分子化合物はきわめて有効であることが分かる。

骨髄間質の細胞転換システム

細胞治療は従来知られている治療とは異なり、あらたな可能性を秘めている。自分の細胞を用いて本来の元となる細胞の機能とは異なる細胞にしてから治療に用いる。すなわち、この骨髄間質細胞をさまざまな細胞に分化させ、再生医学として治療に応用する。骨髄間質細胞は成人由来の細胞であり、基本的に“骨髄間質細胞”として分化した細胞である。分化した細胞が別の種類の分化した細胞になる。

骨髄には骨や脂肪があるため、骨髄間質細胞が骨や脂肪になることは当然、予想される。正確に言えば、骨をつくる骨芽細胞になる。この骨芽細胞を用いれば生体内に移植することで骨をつくる。骨を作製することにより、難治性骨折や骨欠損部に移植することで医療に貢献することが可能となる。軟骨も同様に、膝の軟骨が欠損した場合に有効となる。脂肪細胞はもともと骨髄中には存在しているが、分化研究に用いられることはあつたとしても細胞移植の供給源には考えられていない。腹部脂肪を移植され、肥満が充進するといったイメージがあるのかもしれない。骨髄間質細胞が心臓になるということは、慶應義塾大学の内科と病理が共同で発表した⁵⁾。骨髄細胞の心臓への移植の発表が続ぎ、虚血性心疾患のモデルで心機能の補填に成功している。驚くべきことに、*in vitro*では心筋への分化は低いが、生体内では予想以上に部位特異的な分化を示すようである¹⁰⁾。部

位特異的な分化というのは、心臓に移植すれば心筋組織に、骨格筋に移植すれば骨格筋に、脳に移植すれば神経細胞にといった再生医学を念頭にした場合、きわめて都合のよい現象である。もし、胚葉を越えて分化するということであるなら、骨髄間質細胞が外胚葉由来である神経に分化することができるかもしれないし、皮膚の表皮ができるかもしれない。そうなれば、脊髄損傷や火傷の患者に骨髄間質の細胞治療の可能性が開かれる。そんななか、間質細胞からグリアができると報告され、ニューロンへの分化も発表された⁷⁾。

間質細胞を用いて、体を形成するすべての種類の細胞を生み出すという夢がある。しかし、現実的には間質細胞は部分全能性しか示さないことが多い。この部分全能性を示すためにも、5-azacytidineという低分子の天然有機化合物を使わなくてはいけないのが現状である。この5-azacytidine

サイド メモ

メチル化/クロマチン改変に伴う 確率的な分化誘導

細胞を分化させる目的で、脱メチル化作用を有する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。細胞のゲノムのDNAはその細胞に特有の修飾をもつ。DNAの一次情報に加え、付加される情報としてはDNAメチル化とクロマチンがある。DNAのメチル化とは、CpGのシトシンの部位にメチル化が生じ、メチル化シトシンとなることである。このメチル化シトシンは転写因子のDNAの結合に関する親和性を変化させる。一般に転写因子が結合できなくなることによって、遺伝子の発現がなくなる。このメチル化の状態とクロマチン状態が密接にリンクしていることが、分子レベルで明らかにされている。5-azacytidine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methyltransferase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。したがって、脱メチル化剤で処理することには、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。

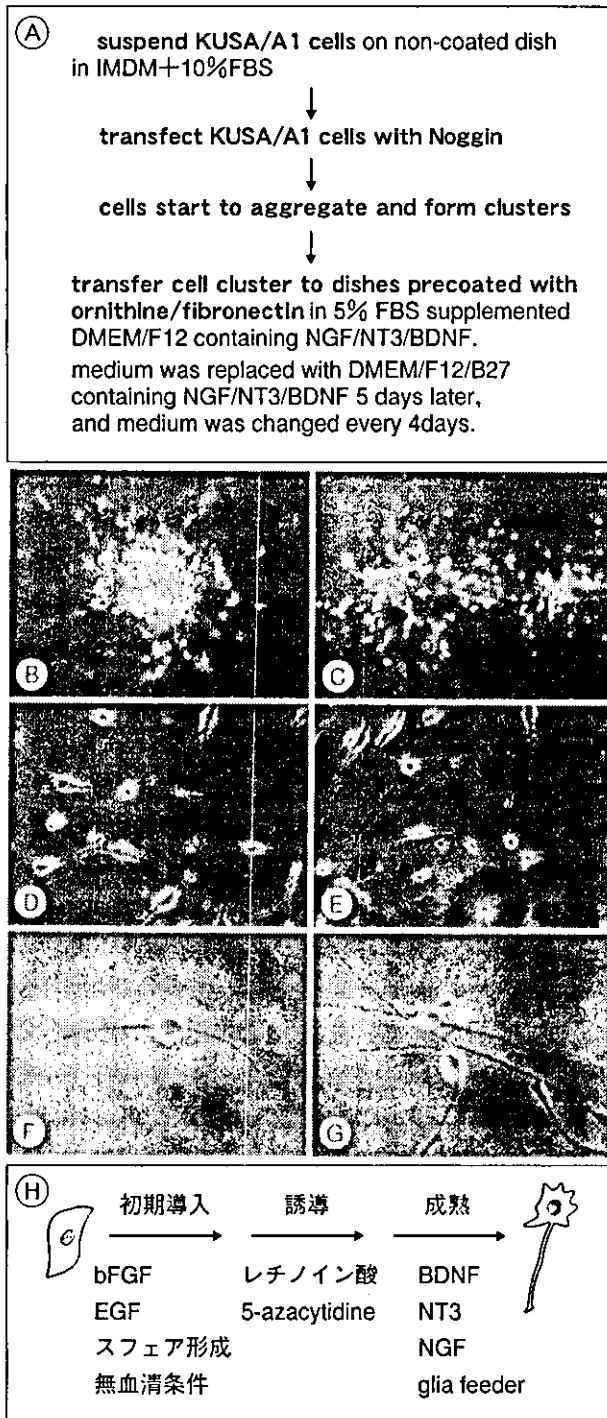


図1 液性因子(サイトカイン)を用いた骨髄間質からニューロンへの分化誘導

A: 骨形成因子阻害薬であるNogginを用いて骨髄間質由来の骨芽細胞をニューロンにするプロトコール。
 B~G: 骨髄間質から細胞転換したニューロンの形態(さまざまな倍率で示している)。
 H: サイトカインを用いて分化誘導する過程の模式図。

は分化誘導にとって必須であるが、分化誘導にさいしてはサイトカインも大事になってくる(図1)。サイトカインばかりでなく、細胞外物質により分

化をコントロールすることが可能である。逆に、分化誘導するサイトカインではなく、特定の系統に分化するのを防ぐ場合にも、サイトカインは有効である。

クローンヒツジでは終末分化した細胞の核に全能性があることが示された。同様に、部分全能性を有する骨髄間質細胞が胎児性癌細胞のように全能性を有するようになるのであろうか。分化した細胞に脱分化または先祖返りが生じなくてはならないのか、分化した形質のまま別の細胞へ転換するのか。クローンヒツジの場合は発生過程を必要としたが、発生を介さないでさまざまな細胞を骨髄間質細胞から作製する(細胞転換)ことを思うままにできれば、骨髄間質細胞は“細胞治療”に使用することができるたいへんよい供給源となる。

標的細胞の選択

多分化能を有している細胞を分化させた場合、目的としない細胞が混じる(図2)。そうした場合、目的の細胞を選択する技術が必要となる。神経細胞への分化はすでに知られている液性因子とマトリックスを用いて行う。初期誘導にはNogginを用い、神経系へのコミットメントがはじまると、間質細胞が接着できていた培養皿のコーティングでは接着できずに浮遊してくる。マトリックスのよい点は、標的細胞が付着する場合でも付着しない場合でも選択が可能であり、その選択が容易であり、特異的であることである(図1, 2)。Nogginは誘導として働き、分化して浮遊した細胞を集めてくる作業は選択である。NogginはBMP阻害として働き、ニューロンへの分化を引き起こすことで選択というよりも誘導である。それに対し、ある種の液性因子で細胞が生存でき、液性因子に反応しない細胞が増殖しなかったり死滅する場合は、これも選択と考えることができる。

もうひとつの選択としてもっとも有名な方法は、血液の世界で成功している表面抗原による選択である。機能的細胞に特異的に、またはその前駆細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体を作製し、フローサイトメトリーにより分離する。表面抗原だけでなく、細胞特異的遺伝子の転写調節領域下流に蛍光色素(green fluorescent protein)

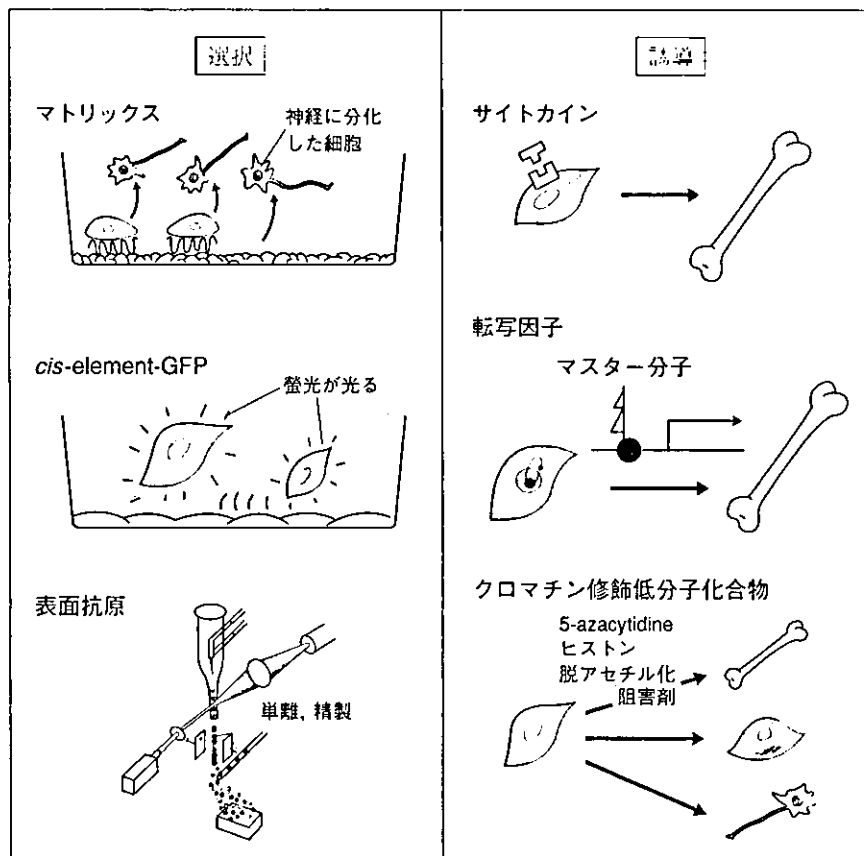


図 2 分化した細胞の選択(左側)と分化の標的化(右側)にかかわる模式図
 分化した細胞の選択にはマトリックス, 細胞特異的転写調節領域(cis), 表面抗原を用いる。一方, 細胞分化の標的化は, サイトカイン, 転写因子(trans), クロマチン修飾能を有する低分子化合物による。

をつなげ, 標的細胞に分化した場合に蛍光色素が発現するようにすれば, 同様にフローサイトメトリーで分離可能である。

骨髄間質細胞による細胞再生治療のヒトへの応用

ここで紹介した研究は, ヒトへの応用というきわめて現実的な側面をもっている。ヒトに応用できた場合のメリットはたくさんある。まず, 自らの細胞を用いて行うので拒絶がない(図3)。また, 別のヒトをつくるわけではないので, 倫理的問題が生じてこない。間質細胞を用いることによって本来とは異なる細胞をつくりだし, 細胞治療に用いる。

逆に, 骨髄間質細胞を用いることによる問題点はないのだろうか。基本的に生物学的ならびに倫理的なことは問題とならない。それよりも最大の問題点は, 現時点でヒトの骨髄間質細胞をさまざま

まな細胞に分化させることができるかどうかはわからないことである。次の問題点は, 分化させることができても, 十分な細胞数を確保できるかどうかである。十分な細胞数とは, 治療に使えるくらいまでの細胞数という意味である。細胞治療には, まず目的とする細胞の前駆細胞を間質細胞よりつくる。前駆細胞は増殖能力を有しているため, 大量に増やすことができる。その後, 増えた細胞を誘導剤を利用して分化させ, 生体に戻す。誘導剤を用いることで分化することは, いくつかの種類の細胞で示すことが可能となったが, 前駆細胞という状態で増殖させることが可能かどうかに関しては未解決の部分が多い。

最後は, それぞれの分化形質を完全にコントロールすることができるかどうかである。分化形質を誘導することは可能となったが, それらは多分に確率的要素を含んでおり, すべての細胞を目的の細胞にすることにまでは至っていない。例を

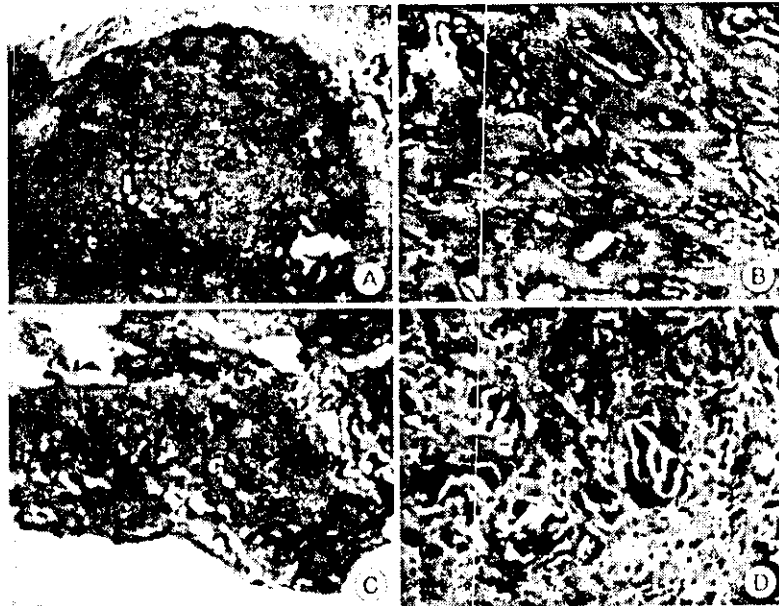


図3 骨芽細胞移植による骨形成と他家移植における拒絶反応

A, B: 同系マウスの皮下組織に骨芽細胞の移植を行い、4週間後に形成された組織の解析を行った。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。

C, D: allogeneic マウスの皮下組織に骨芽細胞の移植を行い、4週間後に形成された組織の解析を行った。骨は皮下組織に形成されているが、明らかな骨組織の塊は認められなかった。高倍率で骨組織が破壊されているのがみられ、破壊された骨組織の周囲には多数の多核巨細胞が出現しているのがみられる。

あげれば、心臓の細胞がほしいのに、そのなかに骨の細胞が混じっていたのでは不都合である。腱の細胞がほしいのに、そのなかに軟骨が混じっているのは嬉しくない。心臓をつくるときにはほとんどの細胞は心筋細胞からつくるのがベストだが、心臓だけの細胞をつくるようにコントロールするのは難しいのである。

ヒト成人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している。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。もちろん、未分化な幹細胞が血液細胞や消化管といった分裂の多い組織では存在し、種々の細胞になる。また、癌細胞はひとつの分化形質だけでなく、2つの分化形質を示したり、いくつかの分化形質を示すことがある。

“どのような細胞が細胞治療に利用できるか”という根元的な疑問がある。骨髓間質細胞は骨髓中に存在し、骨髓穿刺で容易に採取でき、培養技術も確立している。臨床再生医学に用いることが

できるもっとも現実的な細胞は、骨髓間質細胞である。“再生”という言葉はふさわしくないかもしれない。骨髓間質細胞を骨髓の造血を指示する細胞として用いるのではなく、分化誘導させることによってまったく別の細胞に生まれ変わらせるので、“細胞治療”といういい方が適切かもしれない。

🍵 おわりに

余談であるが、“間質”という語感が好きである。15年以上もつきあっているので親しみがあるのであろうけれども、隙間を埋めていてメジャーな感じがいないところがよい。細胞の名前としても無名なために、発生学や生物学の本に記載されてきたことはない。わずかに、骨髓の形態学者によって造血細胞の超微形態の検討が終了した後、研究対象として、おそらく間質もあるかといった程度で研究がはじまったのではないだろうか。血液学分野では造血にかかわるニッチを形成することでその存在が知られ、サイエンスに貢