

## 文献

献してきたが、サイエンスにおける骨髄間質の存在自体もニッチ的である。隙間産業というか、隙間研究というか、隙間があいていてその部分で存在感を示す。なんと20世紀末期的な生き方なのであろうか。この骨髄間質が二級市民<sup>11)</sup>から脱却する日があるとすれば、そのときのロゴはセクシーでもキャッチーでもないが、“stroma”ではなく“kanshitsu”とローマ字で表記したい。しかし、苦勞に苦勞を重ね、間質が研究対象として二級市民の位置から抜け出せたときは、研究対象としての価値はほとんどなくなっていると思われ、それはそれで残念な気がする。

謝辞：岡野栄之教授，福田恵一博士，小川 聡教授，今林英明先生，戸山芳昭教授，桜田一洋博士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 悟さん，阿部 仁さんは魅力的な骨髄間質細胞をたくさん樹立し，数々の“発見”の多くは彼らに帰属すべきものです。自主学習に参加してくれた学生の田島信哉君，伊澤良兼君の多くの示唆は必要不可欠のものでありました。なお，神山 淳君も自主学習に参加してくれた学生です。

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 (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/HTML>) でご覧下さい。

- 1) Dexter, T. M. et al. : Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, **91** : 335-344, 1977.
- 2) Umezawa, A. et al. : Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J. Cell Physiol.*, **151** : 197-205, 1992.
- 3) Pittenger, M. F. et al. : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284** : 143-147, 1999.
- 4) Gojo, S. et al. : Transplantation of genetically marked cardiac muscle cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **113**(1) : 10-18, 1997.
- 5) Makino, S. et al. : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **103** : 697-705, 1999.
- 6) 岡野栄之：中枢神経系の幹細胞生物学。実験医学，**19**(15) : 80-90, 2001.
- 7) Kohyama, J. et al. : Brain from Bone : Efficient “meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with noggin or a demethylating agent. *Differentiation (Stem cell issue)*, **68** : 235-244, 2001.
- 8) Prockop, D. J. : Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, **276** : 71-74, 1997.
- 9) 梅澤明弘，秦 順一：骨髄間質を用いた臓器再生と細胞移植。医学のあゆみ，**192**(8) : 833-837, 2000.
- 10) Liechty, K. W. et al. : Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after *in utero* transplantation in sheep. *Nature Med.*, **6**(11) : 1282-1286, 2000.
- 11) Gerson, S. L. : Mesenchymal stem cells : no longer second class marrow citizens. *Nature Med.*, **5**(3) : 262-264, 1999.

\* \* \*

# 骨髄間質細胞による骨形成

梅澤明弘

慶應義塾大学医学部 病理学 (助教授)

## はじめに

細胞を用いた医療の中で最も進んでいる領域は、骨髄造血細胞であることは間違いがない。造血の場合は、消費されたスピードと同じ程度に再生し、補充が繰り返される。細胞の再生能は、細胞の増殖能つまり細胞分裂能と関連する。この細胞の再生能を利用して医療に結びつけることが、きわめて注目を浴びている。ここでは、骨芽細胞を用いた骨形成について概説したい。

## 再生医療システムにおける

### 骨芽細胞を用いた骨形成

種々の原因による細胞・組織障害に対して生体は、障害された組織を取り除き、健全な細胞が置き換わる反応を生じる。その過程は修復として知られる。この修復過程に認められる生体反応のひとつに再生がある。個体の発生途上や成熟した個体で細胞が傷害を受けたり死に至ると、細胞の増殖刺激がスタートする。本来の組織は分裂することのない細胞が、組織障害に伴って、細胞分裂が生じるようになること自体が再生なんだと考えると分かりやすい。

通常のヒト細胞の増殖・分化には、いくつか

のタイプがある。血液細胞は、幹細胞が増殖することに異なった前駆細胞に分化し、それらが増殖しながら、それぞれ異なった種類の成熟した血球に分化していく。皮膚、粘膜といった上皮細胞は、基底膜に接する細胞のみが増殖細胞であり、分裂後の娘細胞のうち、上層にいく細胞が分化にあずかる。これらの組織の細胞は個体の生涯にわたって、分裂を続ける。これらの細胞は傷害を受けると、幹細胞(stem cells)から分化した細胞によって再生される。

一方、骨細胞などの間葉系細胞や肝細胞では、分化が終了した細胞が増殖能力を有する。正常の状態ではG0期に止まっているが、刺激によって分裂を開始する細胞、すなわちG1期に移行しうる細胞である。間葉系細胞である骨芽細胞はこの種の細胞に相当する。

## 骨再生システムの供給源としての

### 骨髄間質細胞

骨の再生は、骨折において典型的に認められる。まず、欠損部は線維芽細胞と血管によって肉芽組織が形成される。同部の間葉系細胞が骨芽細胞に分化して、類骨組織を形成する。類骨組織は、Ca塩が沈着し、その過程で骨芽細胞は

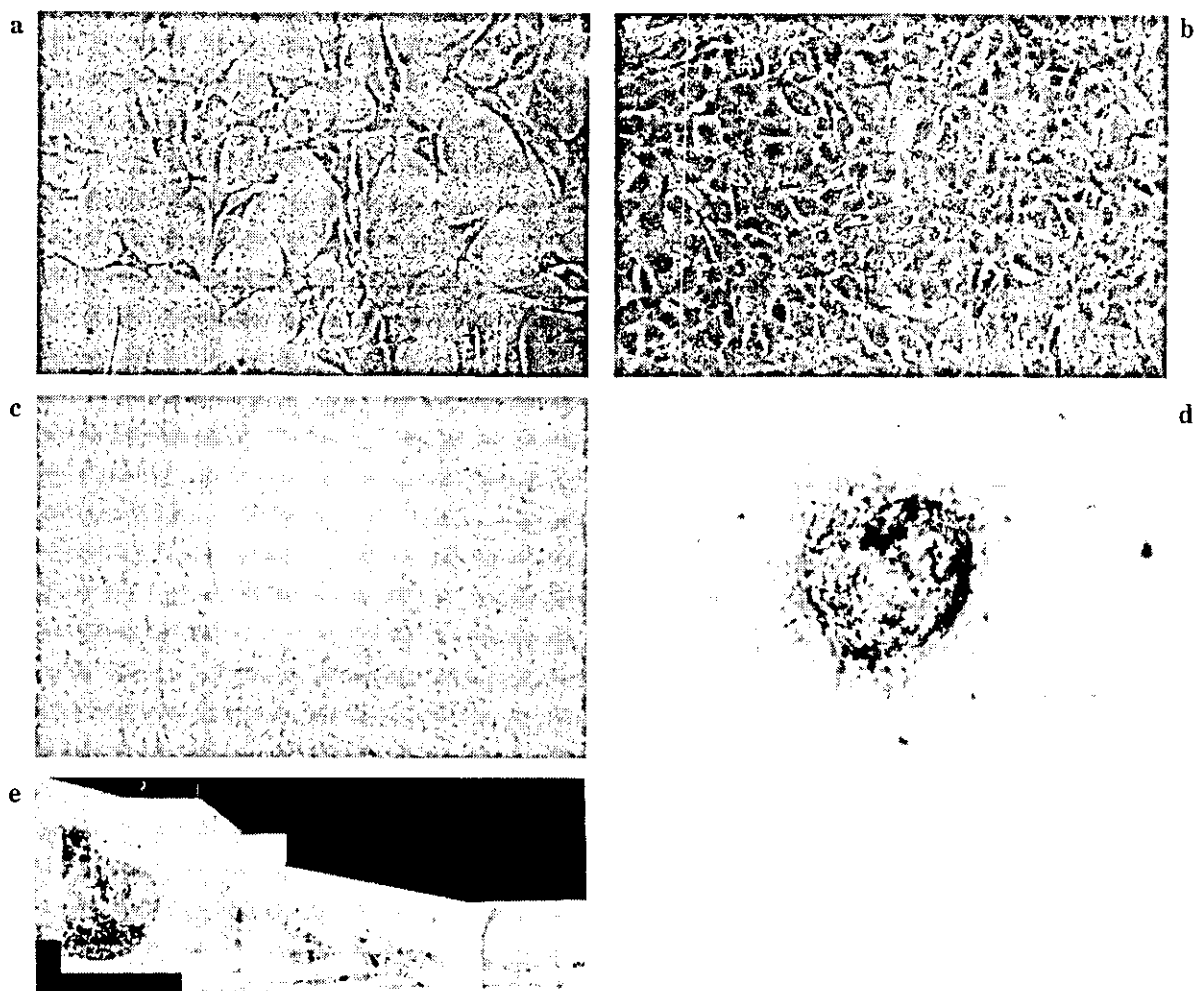


図 1. 骨芽細胞の試験管内における分化

a, b は位相差顕微鏡下における単離された骨芽細胞の形態, semi-confluent (a)ならびに confluent (b)の状態を示す. 形態学的に, 骨形成能を有さない線維芽細胞との区別は難しい, 酵素組織学的にアルカリ・フォスファターゼが強陽性である. 骨芽細胞は, 試験管内で骨結節(c; 位相差顕微鏡写真)を形成する. この骨結節は, Ca 塩が沈着しており, コッサ染色陽性となる(d). 骨結節を垂直断面で, 電子顕微鏡により観察すると, electron dense なマトリックスよりなる(e).

骨細胞に分化する. このような組織を仮骨(cal-  
lus)という. この時期では, 骨組織としての正常  
構造とはいえず, 破骨細胞が出現し, 過剰な骨  
を吸収し, 骨梁を整え, 骨髓腔が形成される.  
さらに Harvers 管が形成され, 血管が侵入し,  
骨組織として完成する.

骨髓由来の間質細胞を集めることによってこ  
の骨再生の過程を促進し, 細胞治療ならびに臓  
器再生のソースとして検討されている<sup>1,2)</sup>. 骨髓

間質細胞は, 骨の中に存在するので, そこに  
元々ある組織または分化形質を示す. 分化形質  
として, 骨芽細胞, 軟骨芽細胞, 脂肪細胞が知  
られる. 単一細胞のマーキングにより, ひとつ  
の細胞が分裂し異なる分化形質を示すことよ  
り, 多分化能を有する細胞である. このような  
多分化能は, 分裂を繰り返してもまた不死化し  
ても保持されることは, 胎児性幹(embryonic  
stem cell ; ES)細胞と同様であり, 特記すべき

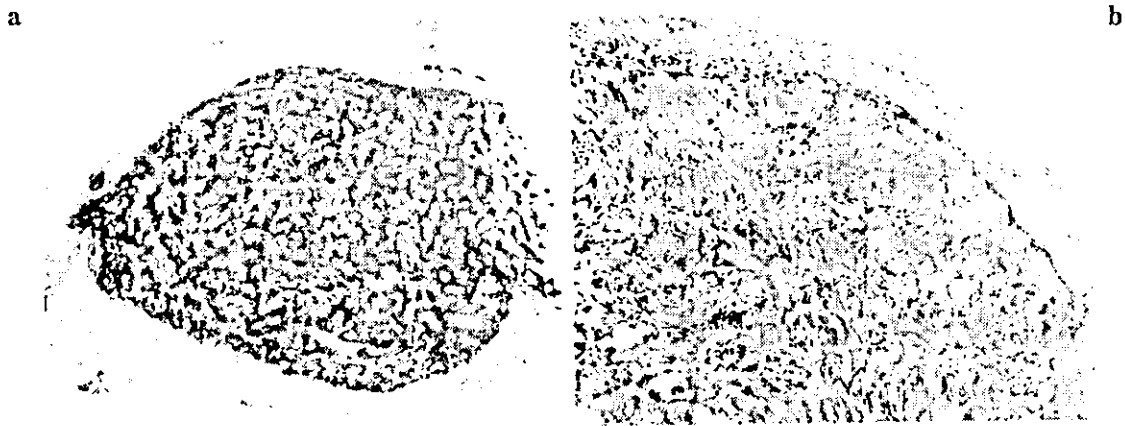


図 2. 骨芽細胞による生体内での骨形成 (a; 低倍, b; 高倍)

骨芽細胞を生体内に注入すると、明らかな骨形成をもたらす。写真に示した骨は、細胞を注入後4週に形成されたものであるが、骨は10日くらいで形成される。高倍において、明瞭な骨髓腔がつくられているのが分かる。また、腫瘍性の細胞の増殖がないことが分かる。骨梁は、生体における骨(脊椎骨, 胸骨, 腸骨)の骨髓と比べると明らかに密である。荷重に対して支えることが可能な骨であることが予想される。

ことである。

#### 骨芽細胞による骨形成

元々の骨髓間質細胞の性質として、脂肪細胞への分化、軟骨への分化、骨芽細胞への分化は本来備わった分化能と考えられる。そのうち、骨芽細胞への分化能については最も多くの研究がなされている<sup>3)</sup>。骨髓間質から単離した骨芽細胞は生体内において、効率的に骨を形成する。骨形成は再現性が高く、すべての注入部位で骨を形成する。同細胞の骨細胞としての特徴は際だっており、報告されている骨芽細胞とは本質的に異なる細胞である。驚くべきことに、骨を生体内で形成し、ある大きさを持った骨梁からなる骨組織をつくるにもかかわらず、その周辺に肉腫などの腫瘍を形成しない。その事実、骨芽細胞がすべての細胞製剤を考える上での貴重なモデルとなることを意味する。

培養系において、間葉系由来である骨芽細胞は線維芽細胞と区別がほとんどつかない(図1 a, b)。骨芽細胞に特徴的なことは、細胞

内にあるのではなく、細胞外にある。すなわち、細胞外にCa塩が沈着する細胞外基質を産生する(図1 c~e)。in vitroでの骨結節の形成が、骨芽細胞特異的な遺伝子の統合した機能によるかどうかは現在までのところ分かっていない。筆者を含めて、無作為塩基配列決定やDNA chipを用いて、線維芽細胞との差異を遺伝子発現レベルからの検討が精力的に進められている。線維芽細胞にみられず、骨芽細胞に認められる遺伝子としては、Cbfa1とosteocalcinがある。Cbfa1は転写因子であり、osteocalcinは骨芽細胞の機能を阻害する分泌蛋白質である。

発生過程において、骨形成はまったく異なる二つの経路をとる。頭蓋骨、下顎を除き、骨格を形成する骨は前もって軟骨によって形づくらせる。その後、血管の侵入に伴い、軟骨細胞はアポトーシスに陥り、骨芽細胞に置き換わる。この過程は内軟骨性骨化といわれる。一方、頭蓋骨や下顎骨では、軟骨形成を経ることなく直接に骨芽細胞が骨を形成し、この過程は膜性骨化と呼ぶ(図2)。

## 骨芽細胞による骨形成に対する

## ホルモン・ビタミンの影響

骨の形成にはホルモン、ビタミンが関与する。アンドロゲンは骨の増殖と石灰化を促進するが、エストロゲンはその逆の作用を有する。また、副甲状腺ホルモンは骨芽細胞の増殖を亢進させる。ビタミンCは膠原線維の増生に関与し、ビタミンDは石灰化を促進する。Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )ファミリーに属する液性因子である bone morphogenetic protein (BMP) は、骨芽細胞の分化を促進する。BMPの阻害分子である chordin, noggin は逆に骨芽細胞の分化を抑制する。

このように、骨形成はしばしば液性因子による調節を受ける。骨の再構築に与える臨床的な影響を考えると性ホルモン、副甲状腺ホルモンは重要な意味をもつ。エストラジオールのような性ホルモンは破骨細胞分化、骨吸収に影響を与える。結果として、閉経により性ホルモンが減少すると、骨粗鬆症になりやすくなる。同様に、副甲状腺ホルモンも骨再構築に関与する。

## 骨芽細胞の破骨細胞に与える影響

骨芽細胞は、破骨細胞の分化に対し直接的に作用する。骨芽細胞は骨吸収を行う分子の標的となり、骨芽細胞より発現される receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) ならびに macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) により、マクロファージから破骨細胞への分化に対し影響を与える<sup>4)</sup>。副甲状腺ホルモンは、骨芽細胞を介して破骨細胞に最終的に作用する良い例である。副甲状腺ホルモンが過剰に産生される疾病では、破骨細胞が活性化されるが、破骨細胞自身は副甲状腺ホルモンに対する受容体を有しているわけではない。副甲状腺ホルモンはその受容体を介して骨芽細胞に作用し、骨芽細胞は破骨細胞形成を促進する RANKL を産生する。

ビタミンDも同様である。生物学的に活性のあるビタミンDは、直接に以前は破骨細胞に対し作用すると考えられてきたが、骨芽細胞に RANKL を産生させることにより破骨細胞の分化を促進するのであろう。RANKL は TNF (腫瘍壊死因子) ファミリーのひとつである。臨床的に骨の炎症部位において、破骨細胞の増殖があることは良く知られていることと矛盾しない。骨芽細胞を皮下に移植すると膜性骨化を生じる(図2)が、ある場合には骨芽細胞によって生じた腫瘍内にきわめて多くの破骨細胞が誘導されることが明らかになっている(図3)。これらの事実は、破骨細胞が骨芽細胞との細胞間相互作用によって調節され、骨形成・吸収があるバランスで保たれていることを示唆している。

## 難治性骨折・骨欠損に対する

## 骨再生への挑戦

細胞を用いないサイトカインによる骨形成を利用した研究ならびに臨床への応用も進んでいる。1965年に UCLA の Urist 博士は、すりつぶした粉状の骨に骨形成能があることを明らかにし、それが後の BMP の単離につながった。Curis (米国の企業) は、骨移植と同様に組換え体 BMP が骨折の治癒を促進することを明らかにした<sup>5)</sup>。Curis の BMP 関連分子 osteogenic protein-1 も現在、欧米における臨床における承認を受けようとしている。

Osiris 社も骨修復を促すために、欠損している部に間葉系幹細胞を直接、移植している<sup>6)</sup>。これらの研究は、ラット、ウサギ、イヌで行われ、今日ではヒトに対して間葉系幹細胞を用いた研究が集中して進められている。その際に細胞だけを注入するだけでなく、同時に足場 (scaffold) をおき、その中に骨芽細胞を植え、骨を形成させている。足場には、コラーゲン・ゲルから始まり、穴のあいた Ca を含んだセラミック、ハイドロキシ・アパタイトを含む。

問題点がないわけではない。一番の臨床にお

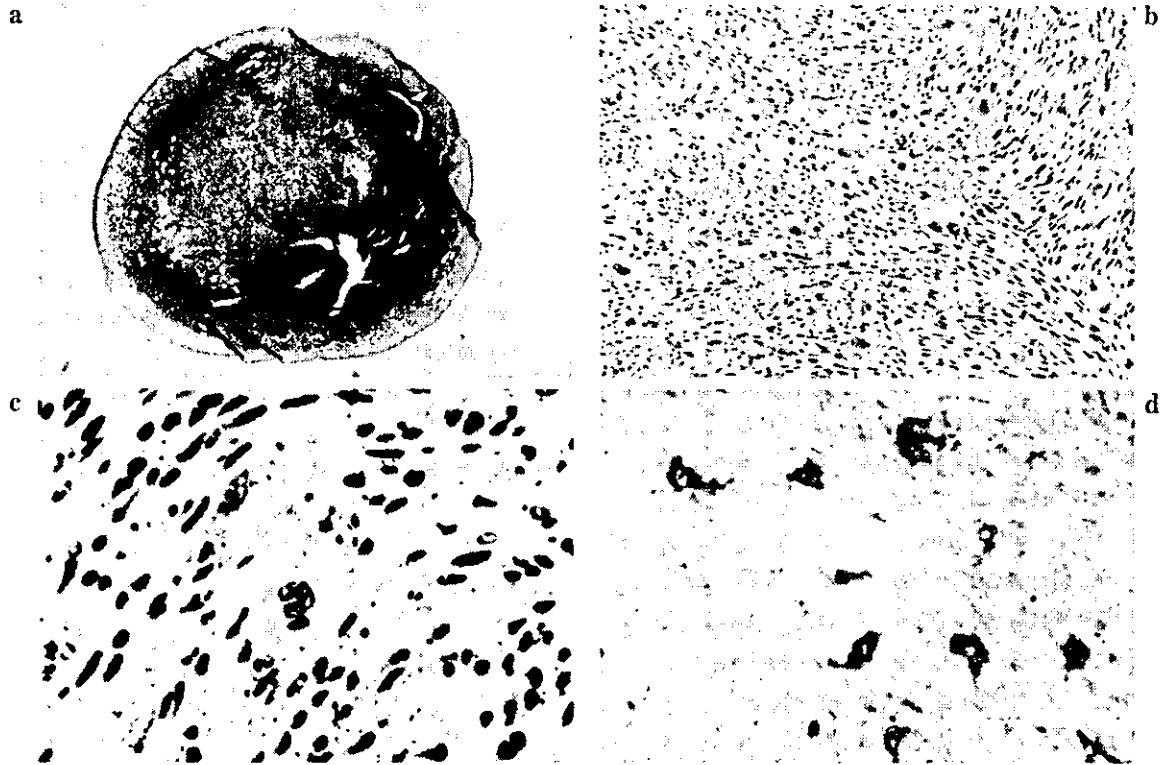


図 3. 骨芽細胞による生体内における破骨細胞の誘導

骨芽細胞には、破骨細胞を支持する能力を有する。このことは、試験管内においても明らかになっている。写真は、図1, 2で使用した骨芽細胞とは異なり生体内において骨形成能を有していないが、試験管内で骨芽細胞としての性格を有している細胞を利用した。注入した部位において、細胞は腫瘍を形成し(a; 低倍)、その中に多核の細胞が多数浸潤してきた(b; 中倍, c; 高倍)。これらの多核の細胞はTRAP(tartrate 抵抗性の酸フォスファターゼ活性)を有することより、破骨細胞であることが分かる(d)。骨芽細胞により、破骨細胞が遊走されている。

ける問題は、骨芽細胞による骨形成の時間的な遅れである。現在のプロトコールでは、治療を受けたいと思っている患者から骨芽細胞を単離してきて、それを1回培養することで増殖させ、患者に移植することで戻すという手順をとるが、これらは治療の開始を意味する細胞移植まで数週間を要する。緊急時では、まったく通用しないばかりか、プロトコールが培養のプロセスを含むためにそれにかかる費用もばかにできない。これらを解決するために、自家移植ではなく他家移植も検討されている。使用する間葉系細胞が免疫細胞に認識されず、拒絶が生じないようにしておけば、あらかじめ細胞を凍結し

て保持しておき、整形外科医が欲しい時に欲しいだけの細胞を使用できるという作戦である。

#### おわりに

臨床的な骨移植の最初の記載は、1682年のMeekrenに始まるとされる。その後、自家骨移植は19世紀前半より盛んに行われるようになった。また同種骨移植は1942年のInclanにより始められている。しかし自家骨移植では骨の大欠損への対応の問題、また同種骨移植では移植骨に対する抗原性や病原性、骨の生着率の問題などが残されている。このように骨移植はまだ解決されない、古くて新しい問題を抱えて

いる。

ES細胞を生体内に注入すると、三胚葉由来組織の混じった奇形腫が生じる。この中に骨や軟骨が混じっていることは古くから知られていたため、ES細胞から骨・軟骨芽細胞を単離することが試みられている。しかし臨床応用の前には効率のよい核移植技術を確立しなければならない。そして無限の分化能を持つ細胞をいかに特定の細胞のみへと分化させるかという、最大の問題も解決せねばならない。骨欠損に対する細胞治療は、今、スタートしたばかりである。

謝辞：筆者は、秦 順一教授の研究室に所属する。また、骨髄間質を用いた細胞移植と臓器再生に関して、岡野栄之博士、桜田一洋博士、福田恵一博士、牧野伸司博士、今林英明先生、越智健介先生、神山淳君との議論は、いつも刺激的でありました。発想

の元となった細胞は、丸山達也博士、草刈 悟さん、阿部 仁さんにより樹立され、クローニングされたものです。

#### 文 献

- 1) Pittenger MF *et al* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143, 1999.
- 2) Umezawa A *et al* : Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J Cell Physiol* 151 : 197, 1992.
- 3) Ducy P *et al* : The osteoblast : A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289 : 1501, 2000.
- 4) Teitelbaum SL : Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289 : 1504, 2000.
- 5) Petit-Zeman S : Regenerative medicine. *Nat Biotech* 19 : 201, 2001.
- 6) Service RF : Tissue engineers build new bone. *Science* 289 : 1498, 2000.

## 2. 臓器再生と幹細胞生物学

### 臓器再生—骨髄細胞の場合

梅澤明弘

細胞をヒトに移植することで、本来の臓器の機能を補充することができる。このように、臓器の機能を回復するために細胞を導入することを「細胞移植」と呼ぶ。細胞移植は従来の臓器移植と異なり、他人の臓器そのものを移植しようという考えではなく、自分の細胞を含めた範囲の中で細胞レベルで臓器の機能を補填することを目指す。細胞移植の中で最も成功を収めているのは、骨髄移植である。近年、造血系以外の細胞が、細胞移植を行ううえで有用であることが明らかになってきた。骨髄移植と異なる点は、細胞を分化させ、その分化を誘導された細胞を目的の組織に直接、注入することである。さまざまな細胞がこの細胞移植の対象になっている。骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞、そして心筋細胞が有用であることが知られる。また、分化・成熟した細胞ばかりでなく、成人の組織中に存在する幹細胞ないし未分化幹細胞が移植の供給源として注目されている。

#### はじめに

骨髄細胞は、細胞移植による臓器再生を考えると、一番、参考になる。骨髄細胞の移植は、造血臓器である骨髄にがん治療を含めた何らかの原因で造血が認められなくなったときに、造血機能を回復させるために行う。日本国内においても、移植例は3000例を越えて、骨髄移植は成果をあげている。ドナー登録も13.5万人である。対象となる病気は、急性白血病、慢性骨髄性白血病、再生不良性貧血、骨髄異形性症候群（白血病の前駆段階）である。元となる細胞は骨髄細胞であり、抗がん剤治療の後に骨髄移植を行う。自分の細胞を利用する場合は、拒絶はまったくない。同種骨髄移植では、骨髄のドナー登録者や血縁者から、全身麻酔によって骨髄細胞を得る。さらに、最近では、骨髄移植にかわり、末梢血や臍帯血に存在する幹細胞を用いた末梢血幹

細胞移植や臍帯血幹細胞移植も行われている。ちなみに臍帯とは、胎盤と胎児をつなぐ血管が含まれている管（臍の緒）である。このように骨髄移植は、疾病の治療法の一つとして、明らかに社会的・医学的に認められている。

再生とは、何らかの原因で失われた細胞がもとの細胞・組織の増殖によって補われる状態であり、失われた細胞がもとの細胞に置換されることがポイントである。再生という生命現象自体はかなり古くから認識されていた。これは紀元前8世紀ごろのギリシャの詩人であったヘシオドス（Hesiodos）の神話にプロメテウス（Prometheus）の肝臓再生の話が出てくることから推察される。再生を細胞レベルから、もう一度、考えてみる。種々の原因による細胞・組織障害に対して生体は、障害された組織を取り除き、健全な細胞が置き換わる反応を生じる。その過程は修復として知られる。この修復過程に認



められる生体反応の一つに再生がある。個体の発生途上や成熟した個体で細胞が障害を受けたり死に至ると、細胞の増殖刺激がスタートする。本来の組織では分裂することのない細胞が、組織障害に伴って、細胞分裂が生じるようになること自体が再生なのだと考えるとわかりやすい。

### 1. 臓器再生システムにおける骨髄細胞の重要な位置

近年、組織工学を応用して、失われた組織・機能を取り戻そうという新しい試みが始められている。ここでは骨髄細胞を用いて細胞治療・移植を説明していくが、骨髄移植とは、少なくとも概念的には考え方がまったく異なる。簡単に言えば、障害された細胞と同じ細胞を用いて補填する場合と、まったく異なる別の組織を用いて補填する場合のいずれもある。例をあげれば、骨髄移植のように血液細胞を補填するのに血液細胞を移植する場合と、血液幹細胞を用いて別の細胞からなる神経や肝臓を補填する場合がある。

神経や肝臓を、血液幹細胞によって補填するためには、血液幹細胞を本来とは異なる神経細胞や肝細胞にしなくてはならない。細胞が異なる細胞に分化することを細胞転換と呼ぶのが一般的である。このような細胞転換を伴う再生は、病的な状態としてとらえられているものも、ヒトでよく認められる。例をあげれば、気管の扁平上皮化生と胃の腸上皮化生がある。いずれも、外的因子の影響のある場である。気管の扁平上皮化生は、タバコを吸うヒトに多い。気管支上皮は、通常は多列線毛上皮であるが、表皮や食道粘膜にみられる重層扁平上皮が生じる。また、胃の腸上皮化生は、食べ物の影響を受けやすい。このように、分化した細胞を形態・機能とも他の系統の分化した細胞に変化させる現象は、ヒトの生体内でもみられることなのである。

先ほどの骨髄移植は、造血を再構築する目的で行

われているわけで、臨床的には造血にのみその寄与が明らかになっているが、造血細胞が回復する過程で、骨髄細胞は同時に消化管上皮・気管上皮・肝といった内胚葉由来の細胞や、皮膚などの外胚葉由来の細胞へ転換することが最近報告され始めた。一つ一つの細胞レベルで、このような細胞が別の細胞に転換する現象を見ることが可能となったわけではないので、感じとしては、生体内に注射すると骨髄の細胞がいろいろな細胞になることをみただけである。注射した細胞を区別するために蛍光色素や酵素を用いることもあるし、オス（男性）の細胞をメス（女性）に導入することでY染色体特異的な塩基配列で区別することもある。未分化な胎児性がん細胞（EC細胞）は、どんな細胞にでも変身することができる（図1）。後で詳しく書くが、骨髄細胞には造血細胞と間質細胞があって、いずれもが中胚葉由来であるが、そのうち、骨髄間質細胞がどんな細胞に分化できるかを示した（図2）。大切なことは、

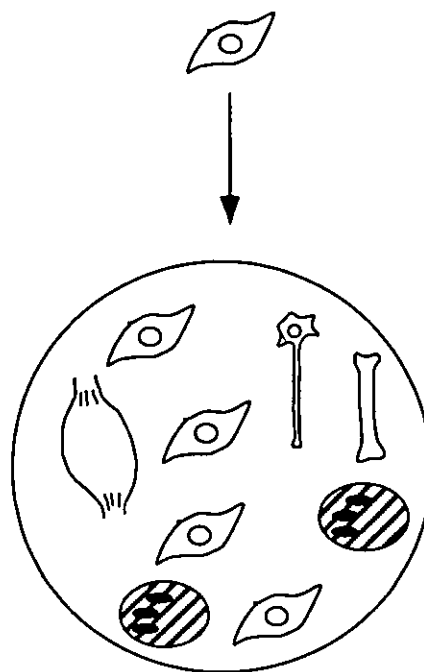


図1 細胞が多分化能を示す模式図。ここでは、未分化な細胞が、筋肉細胞や骨細胞になったり、外胚葉由来の神経細胞になったり、胎盤の細胞になったりする様子を示すが、いくつかの細胞は未分化細胞のまま生体内で存在する。

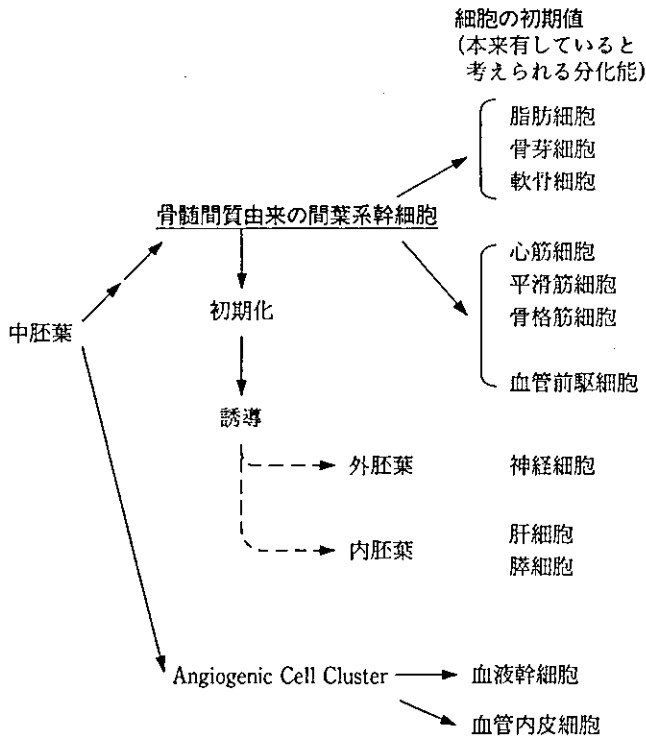
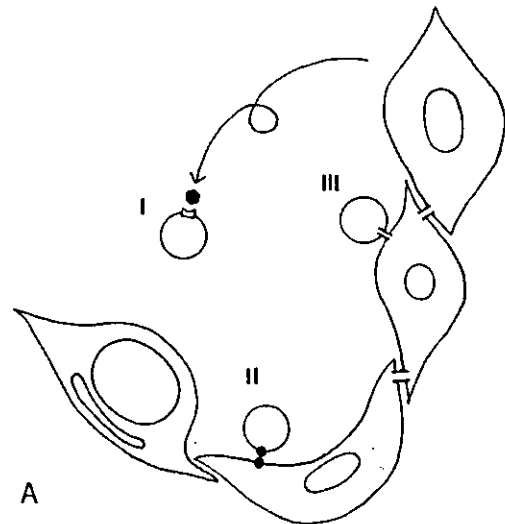


図2 骨髄間質細胞の分化過程の模式図と血球系・血管内皮細胞との位置関係。骨髄間質細胞は中胚葉由来の細胞であり、中胚葉由来の細胞への分化を示す。同時に分化能に関して予想以上の柔軟性を有し、外胚葉および内胚葉への分化も認められる。しかしながら、血液細胞や trophoblasts (胎盤) への分化はまったく認められていない。

骨髄間質細胞は分化能に関して予想以上の柔軟性を示し、外胚葉・内胚葉由来の細胞への分化もみられたが、胎盤への分化はまったくみられず、部分的な全能性を有している点である。

## 2. 骨髄を形作る細胞

ここで改めて、骨髄の形について説明したい。骨髄は、骨の中にある腔内に存在する細胞から形成される。軟らかい組織で、主に血液細胞で占められている。食材として利用されていることもあり、実際の骨髄をみたことがある方も多いかもしれない。血液細胞は99%を占めている。血液細胞を除くと、骨髄中の細胞の1%くらい存在する間葉系細胞が細網構造をとっている。これは細網組織と呼ばれ、その細胞要素である細網細胞は、胎生期の間葉細胞に



KUM-1  
-3  
-4  
-5  
-6  
-7  
-9



B

図3 骨髄間質細胞と血液細胞との3通りの交流と間質細胞における膠原線維の発現。A: 骨髄間質の本来の造血に対する役割のモデル図。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)の3通りが考えられる。B: 骨髄間質細胞(KUM-1~9)における膠原線維(Collagen type I)の発現を示すノザン解析。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、移植した部位に線維化巣をつくることはない。28S, 18S はリボソームRNAの位置を表し、mRNAの長さの参考となる。

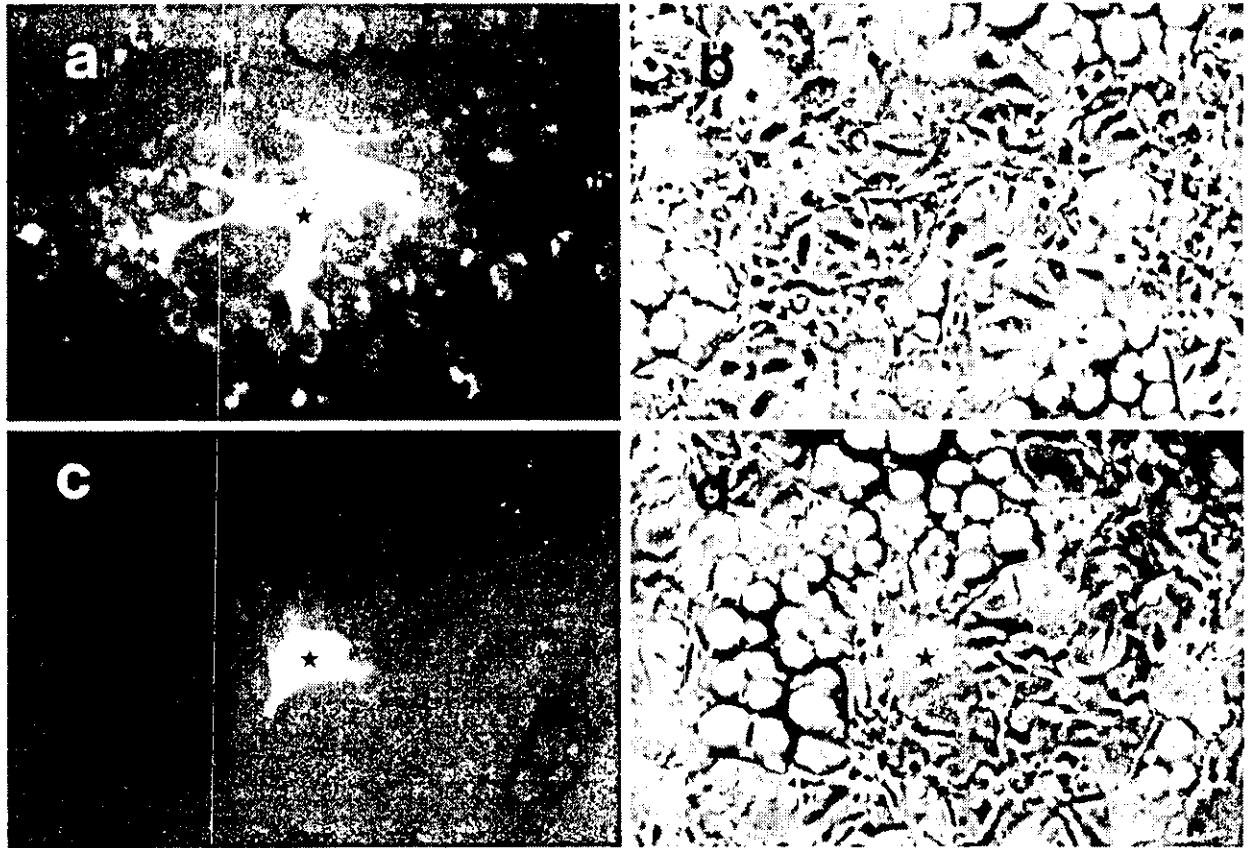


図4 骨髄の初期培養において、骨髄間質細胞は隣接する細胞との間に存在するギャップ結合を介して連絡する。骨髄の初期培養において、間質細胞のギャップ結合の存在を検討するために、一つの細胞(星印で示す)に蛍光色素を注入した。隣接する細胞との間に存在するギャップ結合を介して、蛍光色素は移動している(a, b)。間質細胞が脂肪細胞へ分化するとそのギャップ結合は消失し、色素の移動はなくなる(c, d)。a, c: 蛍光顕微鏡写真。b, d: 位相差顕微鏡写真。

似た突起の多い星形の形態を示し、一種の線維芽細胞である(図3A)。

この細胞は支持細胞であり、骨髄の場合は、骨髄間質細胞という。ここでは、骨髄中の血液細胞以外の支持細胞は、骨髄間質細胞として統一して呼ぶ。間質細胞はすべて間葉組織に由来する。間葉とは、上皮性の配列を示す内・外胚葉の間に落ちこんだ細胞から生じる組織で、突起をもった細胞が、網状につながりあった構造を示している。さらに、骨髄間質細胞をいくつか単離してきて、<sup>こ</sup>膠原線維の遺伝子の発現をみると、どの細胞も<sup>こ</sup>膠原線維を高発現している(図3B)。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。網目構造をとる細胞と細胞をつなぐ構造としてはギャップ結合があ

る(図3A, 図4)。

骨髄中の毛細血管は、小粒子を<sup>ど</sup>貪食することができることから細胞内皮系に分類されている。この毛細血管の外に、骨髄間質細胞が網目構造に存在して、血液細胞がぎっしりつまっているため、他の結合組織とは異なった形態をとる。血液細胞の中にある赤血球や赤芽球により、骨髄は赤く見えるが、血液細胞がなくなると間質細胞のうちの前脂肪細胞が脂肪を合成し始めて、脂肪細胞だらけになり黄色に見える。

### 3. 骨髄細胞の培養ならびに試験管内での分化形質

骨髄の初期培養系は、デクスター(Dexter, T. M.)らが初めて開発した。造血細胞の初期培養に



図5 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。

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%しかない壁に付着する細胞がまず現れる(図5A)。間質細胞には、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、軟骨を作るといった能力を、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、おそらく区別

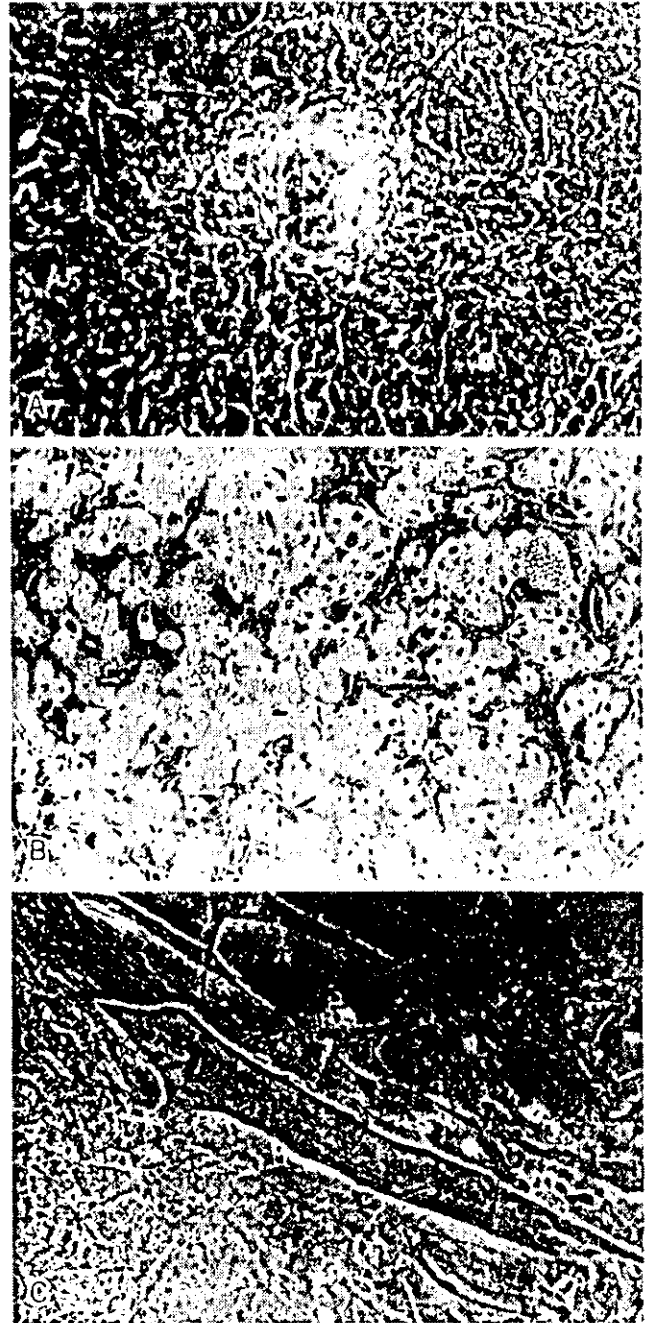


図6 骨髄間質由来の間質細胞が示す多分化能。一つのクローニングされた間質細胞は、骨結節(A)、脂肪細胞(B)、骨格筋細胞(C)といった分化形質を示す。このことは、骨髄間質中には間葉系幹細胞が存在していることを意味する。

できると考えられるが、現実的には表面マーカーとか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5

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5 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、このような培養をデクスター培養または長期骨髓培養と呼ぶ。造血幹細胞は、間質細胞の下に潜り込むようなかたちでひそんでいて、このよう

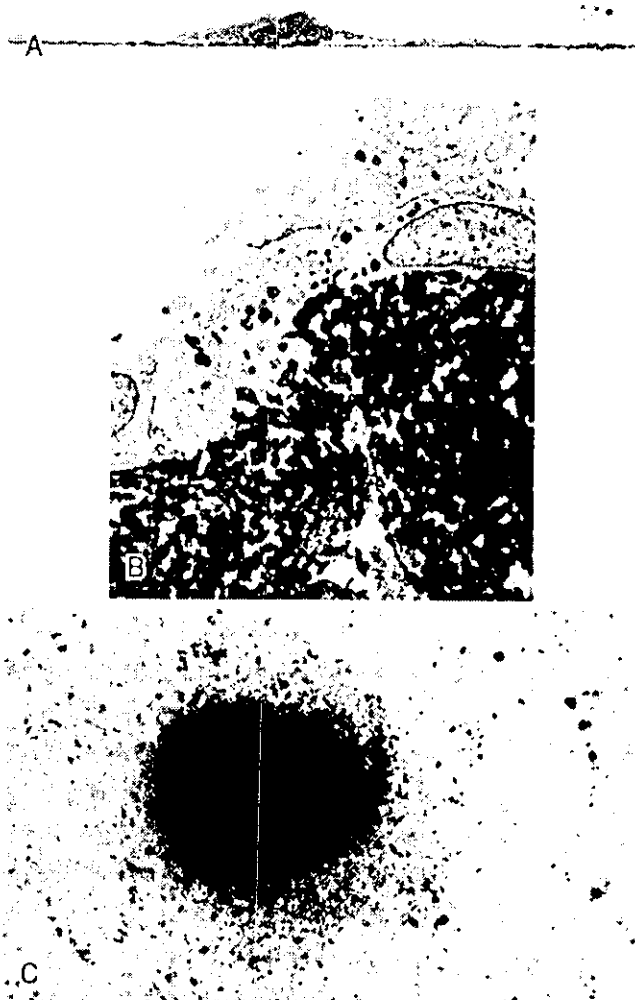


図7 骨髓間質由来の骨芽細胞が、試験管内で示した分化形質に関する詳細な検討。骨結節 (図6 A) を垂直にして標本作製した (A: 光学顕微鏡写真, B: 電子顕微鏡写真)。結節では、細胞がマトリックスを産生しており、細胞内にも電子濃度が高い顆粒をみる。骨結節では、カルシウムが沈着し、コッサ染色陽性(C)となる。

な空間をニッチェといい、間質細胞の主な作用は幹細胞の環境づくりにある。

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。培養皿の中でも、さまざまな分化形質を示す。骨結節 (図6 A), 脂肪細胞

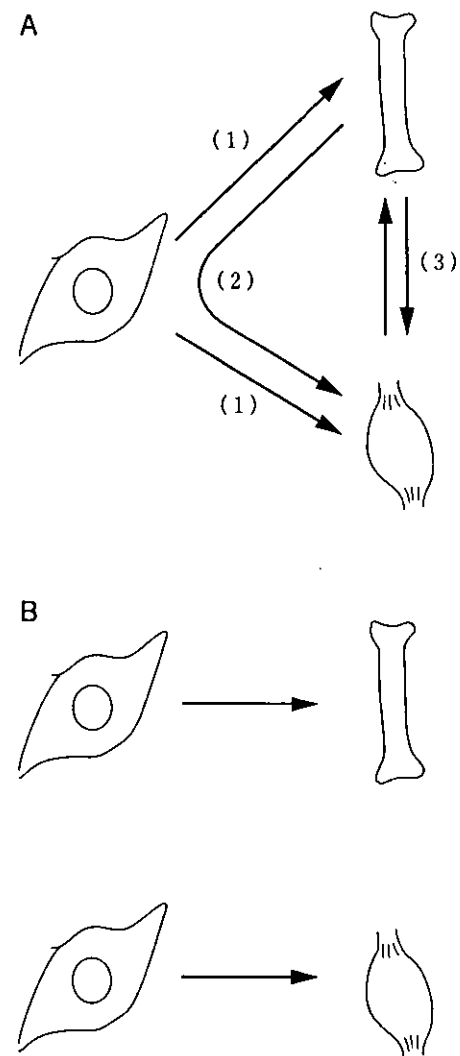


図8 細胞が2種類の分化形質を示す模式図。A: 細胞が2種類の分化形質を示す3通りの考え方。(1)幹細胞が存在し、2種類の分化形質を示す。(2)一つの明らかな形質を示す成熟細胞が、リセットし一回脱分化され、再び別の細胞へ再分化する。ここでは、骨芽細胞が一回脱分化し、その後、筋芽細胞に再分化する模式図を示す。(3)骨芽細胞が脱分化することなしに、筋芽細胞に細胞転換 (meta-differentiation または trans-differentiation) する。B: 2種類の分化形質を示す前駆細胞がある細胞集団に存在する場合がある。実験上で、あたかも A で示された過程を経たように見える場合もあるので気をつける必要がある。

(図6B), 骨格筋細胞(図6C)を示す。本号の川口・福田の項に詳しく記載されているが, 心筋細胞の再生の供給源としても間質細胞がきわめて有用である。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認める。電子顕微鏡を用いて骨結節をさらに詳細に検討すると, 培養している細胞の下に線維の塊をみる(図7A, B)。また, ところどころに濃いカルシウムの沈着を認める。コッサ染色というカルシウムを検出する染色で見ると, 結節に一致してカルシウムが沈着している(図7C)。強調したいことは, 培養皿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。

間質細胞は, ある確率または液性因子による誘導によって, 骨や筋肉に分化する(図8A)。その分化の仕方には, 3通りが考えられている。理解しやすいように骨芽細胞と筋芽細胞を例にあげる。(1)間質細胞中に存在している間葉系幹細胞が骨芽細胞や筋芽細胞に分化する。(2)骨芽細胞が一回脱分化して, 未分化間葉系細胞となり, それが筋芽細胞になる。(3)骨芽細胞が脱分化という過程を経ないで, そのまま筋芽細胞に分化する(転換する)。この場合は, もともとの骨芽細胞としての性格が, 筋芽細胞に変身したときに残っている可能性もある。筋肉なのに骨みたいところが残っているかもしれないし, 残っていないかもしれない。まったく別の考えであるが, 現実的には間質細胞を培養した場合, 図8Bに示すように, 骨芽細胞および筋芽細胞の前駆細胞がそれぞれ分化している可能性もある。この場合は, 幹細胞の存在はなくても, 一見多分化能がある細胞が存在しているかのように見える。

#### 4. 骨髄間質細胞の「初期値」と「選択値」

間質細胞は, 不死化した細胞(細胞株)がたくさん存在して, それぞれ種々の分化能を有する。ここ

の細胞株は, 脂肪細胞, 骨芽細胞株のように一つの分化能をもったものであり, この分化能に関しては, 分裂しても変わらない。より正確に言えば, 分裂しても, 分化能に変化はないと考えられており, 脂肪細胞は脂肪細胞のままであり, 骨芽細胞は骨芽細胞のままであると思われていたのだが, 最近はこの細胞の分化能に関する考え方がゆらいできている。しかし, 基本的には, 細胞株でみる限り, 血液細胞は血液細胞だし, 線維芽細胞は線維芽細胞である。この細胞の個性は, 培養し続けても未来永劫変化しない。この細胞の個性は, 遺伝子発現によって規定されていることは自明であり, その遺伝子発現は, 設計図であるゲノムDNAのメチル化(ゲノムDNAのうちCG配列がメチル化することにより, 一般に遺伝子の転写は抑えられる)やクロマチン(染色質)構造といった修飾状態によって規定される。たとえば, 骨格筋細胞, 脂肪細胞, 臍上皮細胞では, それぞれの独自のゲノムの修飾状態をもっていて(図9), この修飾状態は分裂過程で変わらないために, 骨格筋は脂肪細胞になることもなく, 臍上皮細胞になることもない。

この修飾状態を変えてやるためには, メチル化をそれぞれの細胞から除く。そうすると新たな遺伝子の発現を誘導する。または, クロマチン構造をゆるくすることでも遺伝子の発現を誘導することができる。新たな遺伝子を誘導することで, その遺伝子が細胞分化を上流で決めるような分子をコードしていれば, 細胞は予期せぬ方向へ分化する。メチル化を減らすために用いる試薬は5-アザシチジンであり, クロマチンを変化させる試薬はヒストン脱アセチル化酵素である。

#### 5. 生体内における骨髄間質細胞の分化能

間質細胞が分化するという現象は, 試験管の中だけにとどまらない。生体内に骨髄間質細胞を注入すれば, その分化形質を生体内で示す。一つの例であ

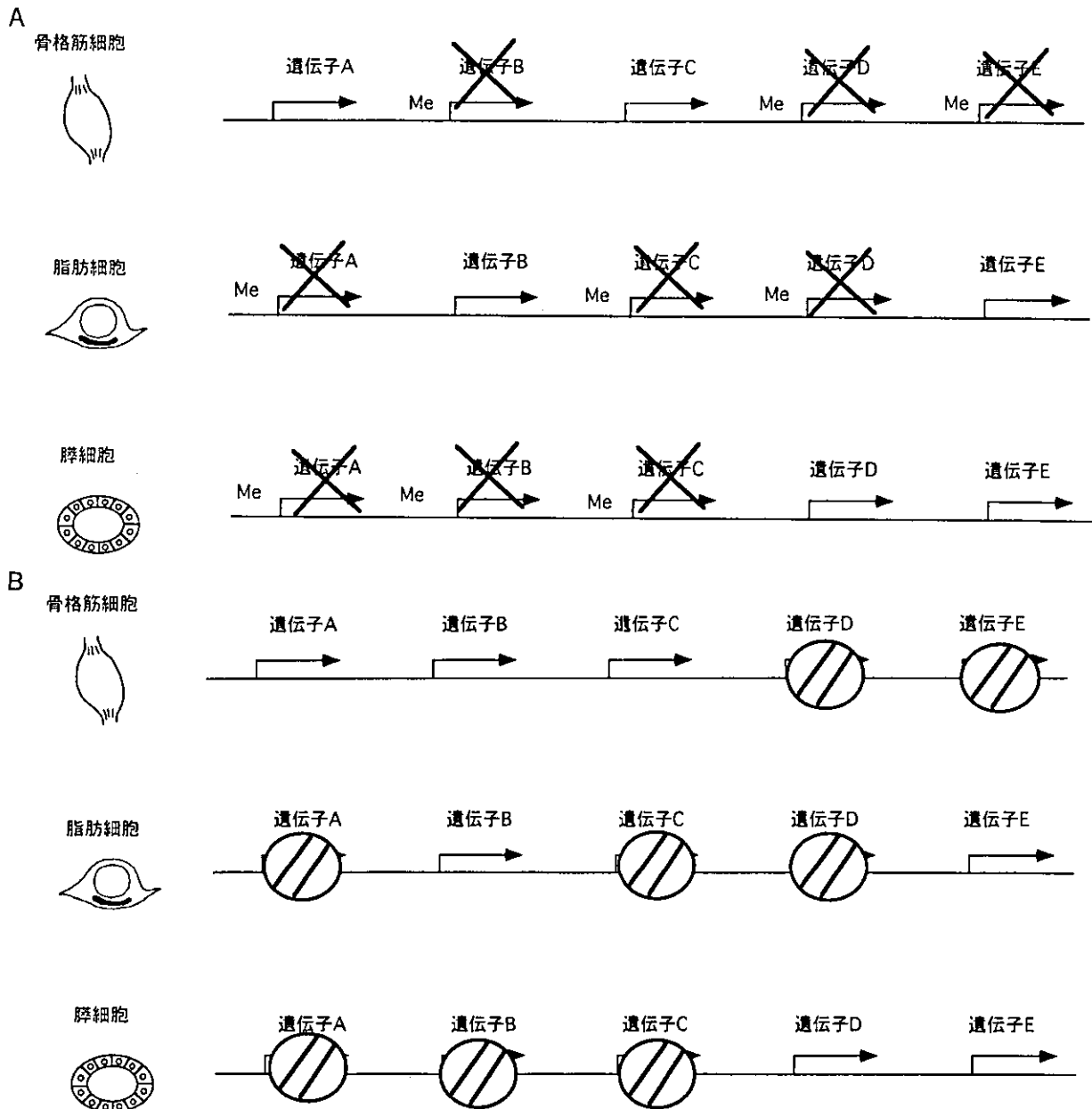
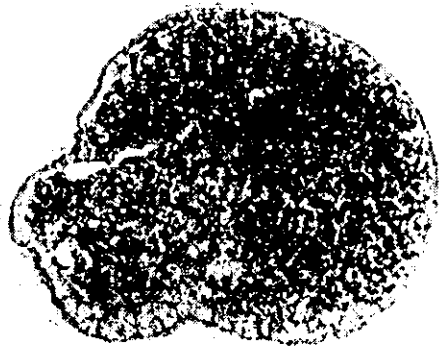


図9 成熟した細胞が固有のDNAメチル化(A)ならびにクロマチン構造(B)を有し、独自の遺伝子の発現パターンを示す模式図。ここでは、わかりやすくするために、例として骨格筋細胞、脂肪細胞、肝細胞をあげる。成体の骨格筋細胞は、再生するときは必ず骨格筋細胞となる。脂肪細胞を培養した場合、肝細胞のような上皮系の形態をとることは基本的にない。その細胞固有の情報は、ゲノム上のクロマチン状態、DNAメチル化または転写遺伝子群のネットワークによって維持され、細胞の形態・機能に反映される。この情報をリセットするには、誘導剤、コーティング、培養方法だけでは不十分であると考えられる。メチル化・クロマチン構築を変化させる物質として、低分子の化合物が有用になる。

るが、骨髄間質由来の骨芽細胞を注入すれば、骨を形成する(図10A)。骨を形成することができるようになると、骨組織の中に造血がみられる(図10B)。このような造血が宿主由来であることは、その骨芽細胞をdiffusion chamber(細胞の栄養分は

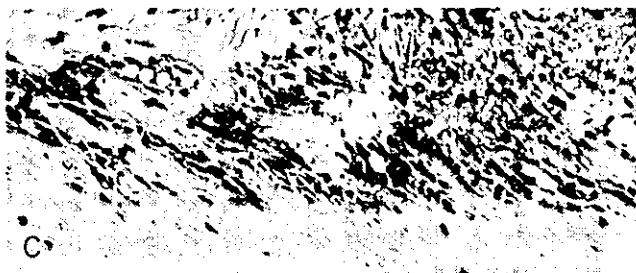
入ることができるが、細胞自体は入ることができない小部屋)に入れて生体内に移植すると、その小部屋の中では骨のみができ、血液細胞がまったくみられないことからわかる(図10C)。間質細胞をマウスの尾静脈内に注射した。すると細胞は肺のとこ



A



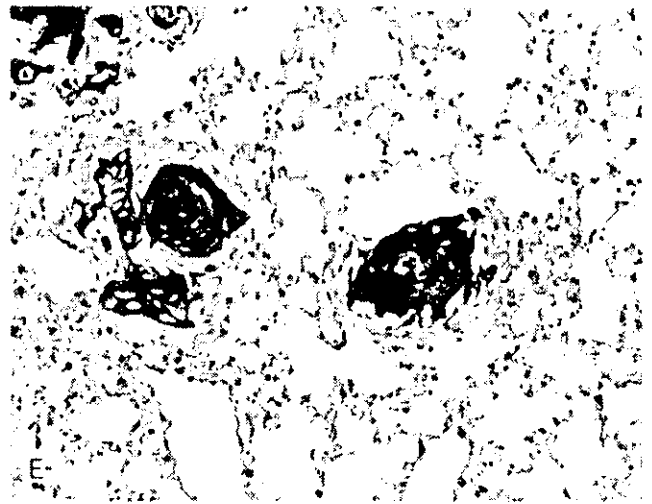
B



C



D



E

図10 骨髓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。このことは、骨芽細胞を diffusion chamber という小部屋に入れると骨形成はみられるが造血細胞はまったくみられないことからわかる(C)。骨芽細胞を静脈内に注入すると肺内に骨形成をみる(D:低倍, E:高倍)。このことは、骨芽細胞の注入場所によらず、分化形質は変わらないことを意味する。

ろで詰まり、詰まったところで骨形成を生じる(図10D, E)。

間質細胞を生体内に移植すると、その分化形質を生体内でも示すという事実は重要な意味をもつ。骨を作りたいと思えば、骨に分化できる間質細胞を注射する。軟骨を作りたいと思えば、軟骨に分化できる間質細胞を注射する。あまり嬉しくないかもしれないが、脂肪細胞を注射することだって可能である。

#### 6. 骨髓間質を細胞治療に用いる場合の注意点

注意しなくてはいけないこともある。注射した細胞ががん化(形質転換)していて、分化形質を示さず、腫瘍になってしまう場合は、たいへんに困る(図11)。細胞を移植してもらい、目的の組織の機能を補ってもらいたいと考えても、腫瘍が形成され



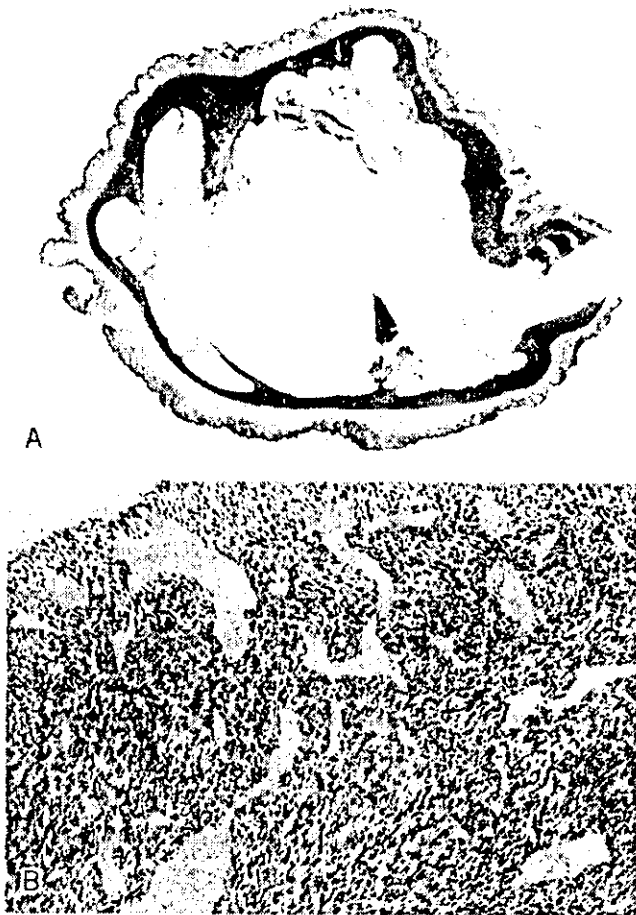


図11 皮下に移植した細胞が形成した肉腫。細胞を培養中に、そして移植した後に、細胞ががん化することがないかどうかは重要な点である。細胞移植は *ex vivo* において培養しており、その間に形質転換してしまう可能性は完全には否定できない。ここでは、*ex vivo* において間葉系の細胞にがん遺伝子を導入し、がん化させた後に移植したために、肉腫を形成した。ヒトの細胞を用いた場合には、通常に培養しただけでは腫瘍化ないし形質転換する可能性はない。A：低倍，B：高倍。

てしまつては、不利益になる。このことは、培養中で自然に不死化やがん化しやすいマウスの細胞ではとくに問題になる。ヒトでは、培養中にかんウイルスやがん遺伝子を導入しないで自然にかん化することは少ないので、あまり心配する必要はないのかもしれないが、その可能性を完全に否定することはできない。このような細胞治療の場合は、冒頭に紹介した骨髄移植とは異なり、一回、採取した細胞を *ex vivo* (生体外) で培養し、そしてその培養した細胞を目的の組織に戻すので、培養中の出来事には

注意が必要である。

さらに、ヒトで細胞治療を考える場合には、培養液中に使用する血清は患者さん自身のものが望ましい。ウシ血清を使用すれば、狂牛病を引き起こす牛のプリオンタンパク質も心配である。他人の血清を用いれば、その中に含まれているかもしれない肝炎ウイルスやプリオンの心配も残る。そのような点からも、自己血清が一番良いと考えられている。現在は、ヒトの細胞を培養するにあたって牛胎児血清を使用しており、これには十分な増殖因子が含まれている。一方、自己血清では、増殖因子の量が足りないかもしれない。その分は、組換えタンパク質を追加しなくてはいけない。そのときにも、どんな細胞を得たいときにはどんな増殖因子が良いかを詳細に実験的に決めておく必要がある。

#### おわりに

「どのような細胞が細胞移植に利用できるか」という重要かつ根元的な問題がある。骨髄間質細胞は、骨髄中に存在し骨髄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現実的な細胞の一つとして、骨髄間質細胞がある。骨髄間質細胞を骨髄の造血を支持する細胞として用いるだけでなく、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(細胞転換)、骨細胞ならびに心筋細胞にすることで、「細胞移植」に用いることができる可能性を示した。骨髄間質細胞を用いることを細胞治療の「事実上の標準仕様」とすることが、医療適応を念頭においた場合最も現実的であると考えている。

筆者は、秦 順一研究室に所属する。また、骨髄間質を用いた細胞移植と臓器再生に関する基礎研究をすすめてくれた牧野伸司博士、桜田一洋博士、岡野栄之博士、福田恵一博士、今林英明先生、越智健介先生、神山 淳君との議論は、いつも刺激的であった。発想の元となった骨髄間質細胞は、丸山達也博士、草刈

悟さん, 阿部 仁さんにより樹立され, クローニングされたものである。これらの細胞の樹立自体は努力の成果であり独創的ではないが, 細胞が示した形質の発見ならびにその意義は多くの示唆を与えてくれた。ありがとう。

## 文 献

- 1) Chiurazzi, P., Pomponi, M. G., Pietrobono, R., Bakker, C. E., Neri, G. and Oostra, B. A. : Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, 8(12), 2317-2323 (1999).
- 2) Christopher, R. R. *et al.* : Turning brain into blood : A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science*, 283, 534-537 (1999).
- 3) Gojo, S., Kitamura, S., Hatano, O., Takakusu, A., Hashimoto, K., Kanegae, Y. and Saito, I. : Transplantation of genetically marked cardiac muscle cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 113(1), 10-18 (1997).
- 4) 五條理志・梅澤明弘 : 間葉系幹細胞を用いた細胞移植による心臓再生。組織培養工学, 27(1), 22-27 (2001).
- 5) Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A. *et al.* : Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med.*, 5(3), 309-313 (1999).
- 6) 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. and Ogawa, S. : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 103, 697-705 (1999).
- 7) Mielnicki, L. M., Ying, A. M., Head, K. L., Asch, H. L. and Asch, B. B. : Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.*, 249(1), 161-176 (1999).
- 8) Petersen, B. E. *et al.* : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284, 1168-1170 (1999).
- 9) Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C. *et al.* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147 (1999).
- 10) Prockop, D. J. : Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-74 (1997).
- 11) 桜田一洋・桜田(大島)幹子 : 成体神経幹細胞分化の分子メカニズム。細胞工学, 19(3), 398-405 (2000).
- 12) Umezawa, A. *et al.* : Colony-stimulating factor 1 expression is down-regulated during the adipocyte differentiation of H-1/A marrow stromal cells and induced by cachectin/Tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 920-927 (1991).
- 13) 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).

(うめざわ あきひろ, 慶應義塾大学 医学部 病理学教室)

## 3) 間葉系幹細胞

# 2. 骨髄間質細胞由来の間葉系幹細胞を用いた臓器再生・細胞移植およびその評価システムの確立

梅澤明弘

幹細胞には、さまざまなレベルの幹細胞が存在する。全能性を有しており、すべての細胞に分化できる全能性幹細胞がある。一方、部分全能性を示す間葉系幹細胞が、ヒト骨髄から単離されている。間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、腱、骨格筋、骨髄間質といった間葉系組織を司る前駆細胞を生み出す。同時に、神経系へ分化することも明らかにされ、間葉系幹細胞は予想以上の可塑性を有していることが次々と明らかになってきている。間葉系幹細胞は、グローバルな“臓器”再構築または細胞治療の生体マイクロデバイスとして事実上の標準となる可能性がでてきた。

### はじめに

種々の原因による細胞・組織障害に対して生体は、障害された組織を取り除き、健全な細胞に置き換わる反応を生じる。その過程は修復として知られる。この修復過程に認められる生体反応の1つに再生がある。個体の発生途上や成熟した個体で細胞が障害を受けたり死に至ると、細胞の増殖刺激がスタートする。本来の組織では分裂することのない幹細胞が、組織障害に伴って、細胞分裂が生じるようになること自体が再生なんだと考えるとわかりやすい。

### ■生理的および病的状態における再生

通常のヒト細胞の増殖・分化には、いくつかのタイプがある。骨細胞などの間葉系細胞や肝細胞では、分化が終了した細胞が増殖能力を有する。正常の状態ではG0期に止まっているが、刺激によって分裂を開始す

【キーワード】

間葉系幹細胞、骨髄間質、細胞移植、再生、可塑性

る細胞、すなわちG1期に移行しうる細胞である。間葉系細胞である骨芽細胞はこの種の細胞に相当する。骨の再生は、骨折において典型的に認められる(図1A)。また、肝炎により肝細胞が死滅した場合、肝硬変に陥り、そこには肝細胞が増殖した再生結節がみられる(図1B)。皮膚、粘膜といった上皮細胞は、基底膜に接する細胞のみが増殖細胞であり、分裂後の娘細胞のうち、上層にいく細胞が分化にあずかる。これらの組織の細胞は、個体の生涯にわたって分裂能をもっている。

血液細胞は、幹細胞が増殖するごとに異なった前駆細胞に分化し、それらが増殖しながら、それぞれ異なった種類の成熟した血球に分化していく。骨髄幹細胞といった場合は、一般に血液幹細胞を指す。一方、骨髄由来の間葉系幹細胞といった場合は、間質細胞由来幹細胞である。骨髄細胞という場合は、正確に言えばこの2種類の細胞を含有していることになるが、間質細胞は骨髄細胞中の約1%にすぎず、骨髄細胞といえば血液細胞のことを指していると考えればよい。本稿では、造血幹細胞の微小環境を形成している間葉系細胞の再生医療に対する貢献につ

Mesenchymal stem cells are versatile as a source of cell therapy

Akihiro Umezawa : Department of Pathology, Keio University School of Medicine (慶應義塾大学医学部病理学教室)

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

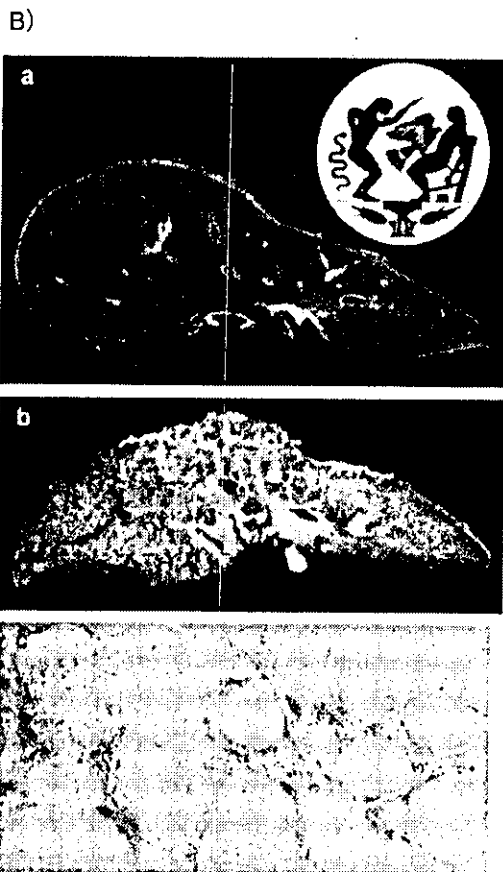
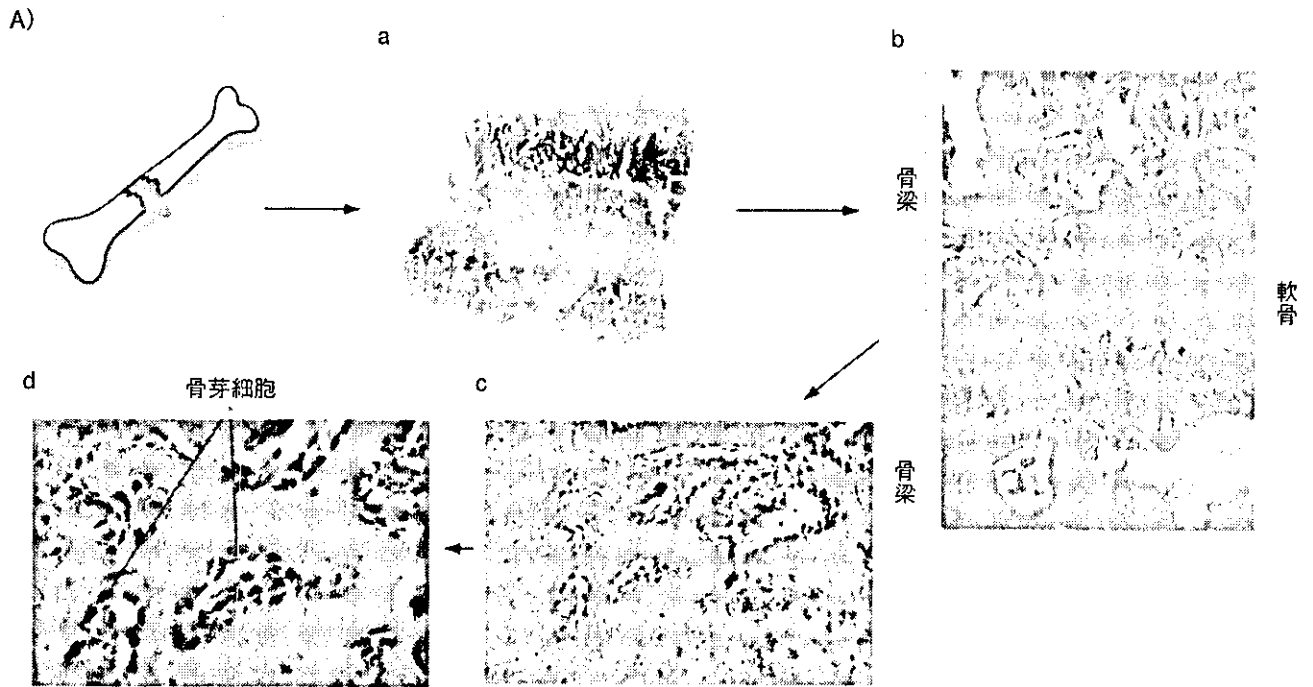


図1 病的状態に認められる再生

A) 骨折部位における治癒過程にみられる骨再生。写真は、骨折治癒過程の組織像であり、矢印の順に倍率が上昇している。b) 密な骨梁間に軟骨形成がみられる。c) 軟骨内に血管が侵入していき、骨形成がみられる。d) できあがった骨梁のところには、骨芽細胞が並んでいる。この骨芽細胞が骨を再生させている。B) 肝硬変にみられる再生結節。一番上に正常のヒト・肝臓断面の肉眼所見を示す(a)。肝臓は、ギリシャ神話のころから再生することが知られていた(a, 円内)。ギリシャ神話の一部の話である。プロメテウス(右)は巨神ヤペトスの息子で、弟エピメテウスと一緒にクロノスを倒すためにゼウス方で戦った。彼は人間をつくり、地を耕し作物をつくること、道具を使うこと、羊や牛を飼い慣らすこと、言葉で話すことなどたくさんを人間に教えた。最後に火を使うことを教えるため、ヘリオスの太陽の馬車から火を盗んだ。罰としてゼウス(左)によって岩に縛られ、ゼウスの放った大鷲に襲われ、肝臓を食べられたが、翌日には肝臓は再生し、くる日もくる日も肝臓をついばまれた。すなわち、このギリシャ神話の時代から、肝臓が再生することは知られていたわけである。(b) 肝炎後に生じた肝硬変の肉眼所見を示している。肝硬変では、丸い小結節はすべて肝細胞の再生した結節である。(c) 肝硬変の組織像。丸い部分の1つ1つが再生結節である。正常の肝細胞は死滅し、線維性成分で置換され、その後増殖能が高い肝細胞が結節状に再生する

いて注目したい<sup>1)</sup>(図2)。

## 2 間葉系幹細胞の供給源

ヒト胎児由来の間葉系幹細胞やペニスの包皮などの

皮膚から採取した間葉系幹細胞と、骨髄由来の間葉系幹細胞が異なる性質を有しているかどうかは、わかっていない。間葉系細胞は、皮下組織、肺、肝などあらゆる臓器に存在する。しかしながら、間葉系細胞を再