

図2 骨髓由来の間質細胞には間葉系幹細胞が存在する

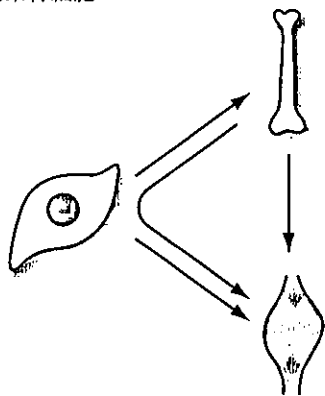
骨髓中は大部分が血液細胞であるが、そのなかの細胞をとりだして、骨髓の初期培養を行うと、壁に付着する間質細胞が培養される。間質細胞は、もともと、造血を支持する細胞として知られ、さまざまな造血にかかわる増殖因子を産生する。この間質細胞自身が、骨、骨格筋、心筋、軟骨、脂肪、神経に分化する能力を有する。つまり多分化能を有する幹細胞としての性質を有していると考えられる。間質細胞は間葉系由来であるから、間葉系幹細胞を含むことになる。一方、腹部皮下組織に由来する脂肪細胞がやはり多分化能を有し、再生医療に利用できる可能性が示された。骨髓中にも多数の脂肪細胞が存在しており、同様に細胞移植の供給源となる

生医療の供給源と考えた場合、肺、心臓、肝より採取するのはその侵襲性のため考えにくく、皮下結合織を採取するにも皮膚の切開を伴う。その点、骨髓間質細胞は、骨髓穿刺によって容易に採取でき、他の手技に比べても侵襲性が少ない。最近、腹部の脂肪織内に種々の間葉系細胞に分化できる幹細胞が存在することが示された²⁾。

腹部脂肪織は美容上、吸引し (liposuction)、廃棄

される組織ではあるが、再生医療の細胞供給源としては適当とは思にくい。というのも、骨髓間質には、間葉系幹細胞が含まれている³⁾⁻⁵⁾ (図2) のに対し、腹部脂肪織には間葉系幹細胞が含まれているのではなく、成熟脂肪細胞が培養過程で脱分化して、さまざまな分化形質を獲得するプロセスが必要となるからである (図3 A)。このような分化形質の再獲得が成人組織由来の幹細胞の特性と考えられ、幹細胞化と

A) 間葉系幹細胞



B) 組織特異的前駆細胞

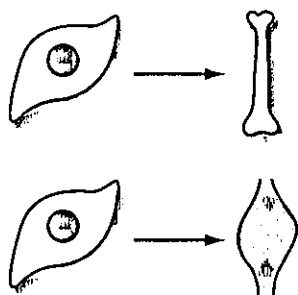


図3 間葉系幹細胞と再生医療

A) 骨髄間質細胞のなかには間葉系幹細胞が存在し、骨形成を行ったり、骨格筋へ分化する。骨髄中には未分化な幹細胞があると同時に、分化した骨芽細胞や脂肪細胞が含まれる。これらの分化した成熟細胞がいったん脱分化し、未分化幹細胞ないし前駆細胞になり細分化することもある。もう1つは、成熟骨芽細胞が脱分化する過程を経ずに直接、別の成熟細胞としての形質を有する可能性がある。B) 生物学を考えるうえで、間質細胞の多分化能を解析する過程はきわめて重要な意味をもつ。しかし、再生医療だけを念頭におくと、間質細胞の幹細胞性について考えることは別に、骨髄間質中に存在する前駆細胞を単離でき、増殖させることができれば十分である。その際には、それら前駆細胞を必要な数だけ得ることができることとその表面マーカーを詳細に同定することが大事になる

も呼べる。

③ 骨髄間質細胞の組織特異的な分化

移植部位特異的な分化に関し、驚くべき報告があった⁶⁾。間質細胞のうち幹細胞成分を濃縮した後に、ヒツジ胎仔の腹腔内に細胞移植を行った。移植後、2カ月後および5カ月後にヒツジ胎仔の組織を検討したところ、軟骨では軟骨に、骨格筋組織では骨格筋に、心

臓では心筋に、脂肪織では脂肪細胞に、胸腺・骨髄では間質細胞に分化し、分化に関し局所の組織特異性が認められた。僕らも同様の経験をしている。骨折部に移植した場合には骨形成がみられるにもかかわらず、心筋に間質細胞を移植した場合には骨形成がみられたことはない。この組織特異的な分化機構はどのようなものか？ まず、その場における細胞外物質ならびにサイトカインによると予想される。隣接する細胞の膜分子を介した誘導も無視できない。

④ 移植する細胞数の問題

間葉系幹細胞や神経幹細胞は、試験管内で増殖することが知られている。しかし、ヒトの細胞は不死ではなく、ある一定の分裂回数後に分裂しなくなる。老化 (senescence) として知られている現象である。この senescence の過程では、細胞は死滅するのではなく分裂しなくなり、増殖しないのであるが、これは細胞を生体内に戻して、障害を受けた組織を補填しようとする場合は問題となる。

2001年の3月に、皮下のヒト血管内皮細胞をテロメラーゼにより不死化させ、十分量の細胞を免疫不全マウスに注入することにより、ヒトの血管を形成することに成功したという報告がなされた⁷⁾。この報告は重要な意味をもつ。1つは、テロメラーゼによりヒトの細胞が不死化したり細胞寿命が延長することが知られているが、皮下の血管内皮細胞が不死化して移植可能であったことは特筆すべきことである。また、テロメラーゼで不死化した細胞が腫瘍をつくらず、生体内で血管網を形成したばかりか、宿主の血管と吻合して血液まで流れた。血管内に血栓を生じることによって生じる心筋梗塞をはじめとした虚血性病変への組織への血液再灌流の一助として、細胞治療が有効であることはいくつかの実験結果から示されている^{8)~10)} (図4 A)。血管内皮細胞と同様に骨髄間質由来の間葉系幹細胞はテロメラーゼ活性を有していない。間質細胞がテロメラーゼにより腫瘍化することなく、不死化してくれるかどうかは不明である。一方、細胞治療の供給源の1つとして胚性幹細胞 (ES細胞) から、インスリン産生細胞ならびにドーパミン産生細胞が作製されている^{11)~13)}。ES細胞は不死であることから、細胞数は十分量を手にいれることが可能であるが、腫瘍を形成する可能性も否定できない。

⑤ 虚血心筋に対する骨髄細胞を用いた細胞治療

前述したように、心筋の再構築に骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた細胞治療がヒト細胞を用いて、モデル動物で行われた。急性心筋梗塞（図4 B）後では、左心室壁の梗塞領域の拡大ならびに心筋細胞が死滅した後に線維性成分による置換といった過程が生じる。この心室壁の再構築を防ぐ目的に骨髄間質細胞を用いた。これらの間質細胞はCD34, CD45などの血液細胞のマーカー分子を発現しておらず、試験管内で骨、軟骨、脂肪、腱、心筋細胞、骨格筋細胞へ分化する。特に、心筋内に移植した場合は、生体内で間質細胞は心筋細胞へ分化し、心筋線維を再生させる1つのアプローチになる。

もう1つの考え方として、梗塞後の線維性瘢痕に間質由来の血管芽細胞を用いて血管新生を誘導するというものがあり、有効な治療となる（図4 C）。この過程には、コラゲナーゼや他のタンパク分解酵素の活性化という過程が必要である。梗塞後に生じる心筋線維の肥大に対して、毛細血管新生による血流は一般に不十分である。この肥大心筋線維に対する血流不足が、さらなる心筋細胞の死滅とそれに続く線維性置換の増大を促進する。ヒトならびにモデル動物の実験では、血管新生が心機能を改善することが知られ、骨髄由来の間質細胞を用いた血管新生の誘導が、心筋細胞の線維性置換と急性心筋梗塞後の心不全を防いだ⁹⁾。

⑥ 医療を進めるにあたっての評価システムの確立

細胞治療が有効であるかどうかは、今後、動物実験を用いてさまざまな疾病モデルで検討が進められていくことは間違いない。しかしながら、同時に患者さんに対して、骨髄細胞を心筋などに移植する試みはずでにいくつかの施設で開始されているようだ。本稿に書いたように現在、マウス、ラット、ヒツジなどの実験動物でその成果が検討されているさなかに、国内で細胞移植の医療も行われているというのが現実である。もちろん、十分な動物実験による有効性の検証が必要なのだが、実際に医療として進んでいるのであれば、それらの評価システムを早急に確立しておかなくてはならない。細胞治療を行ったことによって、移植した細胞が生着したのかどうか、生着した細胞が目的の細

胞に分化したかどうか、分化した細胞が宿主細胞と同調（シンクロ）して機能しているか、最後に組織の機能が補填されたのかどうかは最終的に評価されなくてはならない。正しい評価のためには、細胞を注入しない対照群も必要であるが、難しい面もある。

具体的にどのような方法で、再生医療の評価システムを確立する必要があるだろうか。ヒト由来の細胞を異種の動物に移植した場合に評価を行うためのマーカーは以下のものが挙げられる。

- ①動物に移植する場合は、ヒトタンパクにのみ反応する抗体を使用する。免疫が完成する前のヒツジ胎仔にヒト由来の細胞を移植した実験では β -2ミクログロブリンに対する抗体を用いてヒト由来とヒツジ由来の細胞を明確に分ける。
- ②ある種の分化マーカーでは、その認識抗体がヒトに特異的に認識するのでそれを用いる。
- ③*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、制限酵素である *Alu* によって、そのシグナルが消失するような分子を選択することでヒト由来の細胞を同定する。

一方、ヒトの場合の検証においても同様のアプローチが考えられる。最低限、治療プロトコルのなかに動物実験でも行っているような移植した細胞と宿主の細胞を明確に区別できるマーカーを治療以前に導入しないし、決めておかななくてはならない⁸⁾。特に組織特異的に分化した場合は、ドナーか宿主の細胞かを判断するのは難しい。区別できるマーカー（Y染色体など）がある場合はいいが、ない場合は動物実験の場合と異なり、移植した細胞と宿主の細胞を最初から区別することはできないのでマーカー分子を導入する必要がある。マーカー分子は、導入することでヒトに副作用がない機能的に無害な分子がよい。そして、この治療の初期においては、形態学的に明確に治療の経過を把握するために上記の内容を検証することが不可欠である。

そのためには、細胞治療の前後に目的の臓器より組織を生検する。もちろん、形態を検討することが可能な微小検体で十分である。組織学的に検討し、細胞移植後の生検組織と比較検討する。不幸にも、患者さんがお亡くなりになった場合は剖検（病理解剖）することでその妥当性を検討する。細胞治療・細胞移植は、従来行われてきた骨髄移植とある意味では似てはいるが、新しい概念のもとに行われる医療である。その有

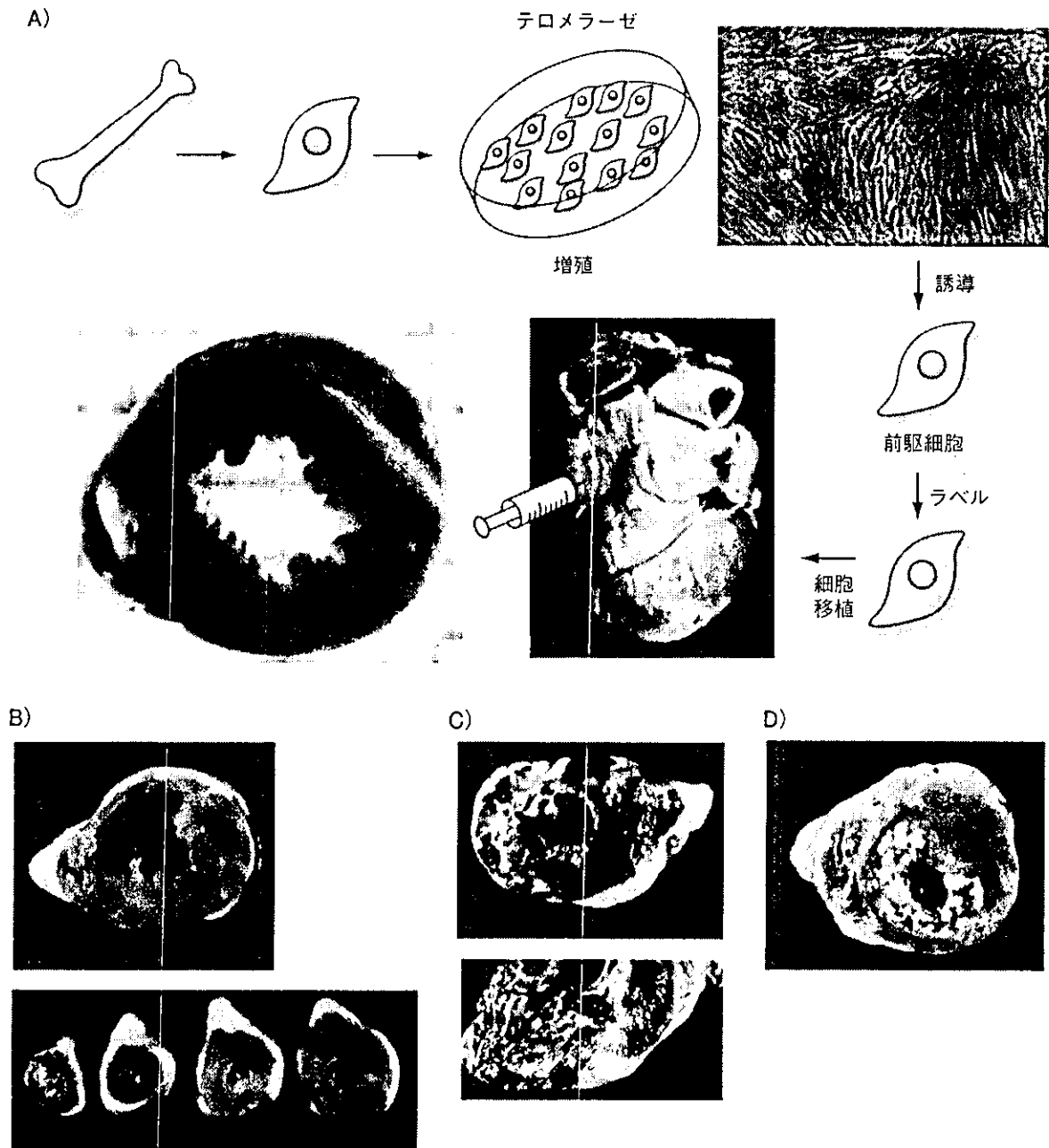


図4 骨髄間質細胞を用いた虚血性心疾患に対する細胞移植の模式図

A) 骨髄より細胞を採取し、*ex vivo*で培養する。ヒト由来の間質細胞には寿命があるので、必要な細胞数を得るためにその寿命を伸ばす。寿命を延長させるための1つの方法として、テロメラーゼを導入することが考えられる。位相差顕微鏡下の写真は、ヒト由来の骨髄間質細胞である。マウスの間質と比較し、大型である。細胞移植を行う前に、ドナー由来の細胞と宿主由来の細胞を区別するためにラベルをする。模式図では、 β -ガラクトシダーゼを導入し、酵素組織化学的反応により青くなるようにしている。左心室壁・前壁に直接注入する。注入後、切片を作製し、ドナー由来の細胞を青く染色する。前壁および中隔前半分にドナー由来の細胞が、宿主の心筋内に混じって存在する様子を示している。このラベルした細胞を心筋内に注入する実験は、五條理志博士による⁸⁾。B) ヒト急性心筋梗塞の心横断面。赤く出血しているところは、心筋が壊死に陥った部位である。下の写真には、心尖部から約1 cm 間隔で横断した心臓である。下のスケールは、メモリ1つが0.5cmとなっている。ヒト心臓は300gもあり、心筋梗塞の部位はかなり広範に及ぶ様子をここで示したい。このような広範な領域をカバーするには、相当量の細胞数が必要となることわかる。C) 陳旧性心筋梗塞の肉眼所見。上が横断面であり、下が縦に割をいれた写真である。古い心筋梗塞の部分は、新鮮心筋梗塞とは異なり、心筋は消失し線維性成分で完全に置換され白く見える。コラーゲン線維が心筋を置換しているために心筋としての機能は全くない。D) 心筋内に腫瘍成分が増殖する様子。この写真は、心筋に腫瘍が転移し、増殖しているものである。細胞移植をしてその部位に細胞が腫瘍化した場合は同様のことが生じると予想される。問題点として考えなくてはならないことではあるが、このような移植した細胞の腫瘍性増殖や結節性増殖が認められたことは一度もない

効性を明らかにするうえでも、病理組織学的検証を提案する。病理組織学的な検討は、基本的に侵襲性が高いのでその適応は慎重を要するが、再生医療におけるスタート時点の信頼性を獲得するうえでも十分な検証をするべきである。

検討項目として、まず重要となることは細胞レベルにおける分化マーカーの発現と、機能的な回復がどの程度得られたかを明らかにすることである。心筋細胞の場合は、形態学的に移植した細胞に横紋構造の有無ならびに分化マーカーであるミオシン、アクチン、Csx/Nkx2.5, MEF2, GATA-4の発現が必須である。さらに周囲の宿主に由来する心筋線維との間にギャップ結合を形成しているかどうかを検討する。移植した細胞が腫瘍性増殖をする可能性も完全に否定されたわけではなく、病理組織学的検討は不可避である(図4D)。

7 骨髄間質細胞を再生医療の供給源とした場合の問題点

予期せぬ副作用のなかで最も考えられるのは、目的としない細胞への分化である。心臓の中に心筋細胞・血管内皮細胞を目的として移植した後、骨組織が形成されてしまっはよくない。脳組織に神経細胞の移植を試みて、骨組織ができてはいけない。本誌、第1章-3)-1にもあるように骨芽細胞を利用した骨再生は歴史的にも古く、技術的にも進んでいる。本稿では、骨髄間質由来の間葉系幹細胞に注目したが、骨再生を目的としない場合に分化誘導して骨形成が生じたら悲劇である。どのようにして骨形成能を有する細胞(骨芽細胞)を除去できるか、基本的なストラテジーは骨芽細胞の単離と同じである。骨髄間質細胞のうち、骨芽細胞特異的なマーカーを用いてフローサイトメトリーによって除去する。逆に、移植した部位によっては、骨組織ができることが大きな問題にならない場合もある。大胆な言い回しをさせてもらえば、心筋、骨格筋、神経組織を除けば、骨形成による影響はさほど大きくないともいえる。病理解剖をしていて、肺などに陳旧性結核症に伴って骨形成を認めるが病的意義は全くない。いいかえれば、正常の組織内に骨ができて困るのは脳組織、心筋組織、骨格筋くらいであり、それ以外の組織・臓器では臨床的に問題になることは少ないか、全くないともまでいってもいい過ぎでな

いような気がしている。

再生医療だけを念頭において細胞移植や細胞転換を考えた場合、胚性幹細胞や間葉系幹細胞などの幹細胞が本当に必要かどうかは疑問である。目的の臓器・組織を構築する機能的な細胞を得るだけであれば、その前駆細胞があればいい。あらゆる種類の前駆細胞があれば目的の組織を構築するのは可能であり、別の細胞ができて困ることもない(図3B)。ただし、それぞれの前駆細胞の場合は、細胞の数が十分量得られない場合が多いと予想する。

おわりに一細胞治療における拒絶を防ぐには?

細胞治療の対象となっている疾病は、虚血性心疾患、パーキンソン病、糖尿病など患者は多い。間質細胞自体を1つの製剤として考え細胞を準備した場合、移植はすべて非自己由来細胞(allogeneic combination)となる。この場合では、シクロスポリン、アザチオプリン、メチルプレドニゾロンをはじめとした免疫抑制剤の使用を臓器移植の場合と同様に考えることが可能である。しかし、最も現実的な方法は、手間はかかるが患者さん自身の骨髄間質細胞を用い、細胞転換し、移植することである。自家移植であれば拒絶の心配は全くない。間質細胞は骨髄穿刺によって得られ、この点においてこの細胞は他の供給源と比較し、一日の長がある。もう1つの方法は、間質細胞内に免疫寛容を誘導する分子を導入後移植することである¹⁴⁾。臓器移植では、遺伝子導入はきわめて難しいが、細胞移植の場合は生体外で1回培養するので比較的容易である。幸い、間質細胞の遺伝子導入効率はきわめて高い。もしかしたら、拒絶の心配は全くないかもしれない。ヒトの骨髄由来の間葉系幹細胞をヒツジに移植した場合には、免疫が確立した後にも拒絶が生じなかった。われわれはこの点に関し、間葉系幹細胞には免疫学的な特殊性があるのではないかと指摘している。

秦 順一教授の研究室に筆者は所属する。岡野栄之教授、福田恵一博士、五條理志博士、桜田一洋博士との議論は、いつも刺激的である。今林英明先生、森 泰昌先生、越智健介先生、神山 淳氏と共に研究できることは幸運である。

文献

- 1) 梅澤明弘: 実験医学, 19: 350-356, 2001
- 2) Zuk, P. A. et al.: Tissue Eng., 7: 211-228, 2001

- 3) Umezawa, A. et al. : Mol. Cell. Biol., 11 : 920-927, 1991
- 4) Umezawa, A. et al. : J. Cell Physiol., 151 : 197-205, 1992
- 5) Makino, S. et al. : J. Clin. Invest., 103 : 697-705, 1999
- 6) Liechty, K. et al. : Nature Med., 6 : 1282-1286, 2000
- 7) Yang, J. et al. : Nature Biotechnol., 19 : 219-224, 2001
- 8) Gojo, S. et al. : J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 113 : 10-18, 1997
- 9) Kocher, A. et al. : Nature Med., 7 : 430-436, 2001
- 10) Orlic, D. et al. : Nature 410 : 701-705, 2001
- 11) Lumelsky, N. et al. : Science, 292 : 1389-1394, 2001
- 12) Lee, S. H. et al. : Nature Biotechnol., 18 : 675-679, 2000
- 13) Kawasaki, H. et al. : Neuron, 28 : 31-40, 2000
- 14) Munn, D. H. et al. : Science, 281 : 1191-1193, 1998

<著者プロフィール>

梅澤明弘：1985年慶應義塾大学医学部卒業，'89年慶應義塾大学医学部病理学教室助手，'91年米国カルフォルニア大学サンディエゴ校内科学教室，'92年米国バーナム研究所，2000年慶應義塾大学医学部助教授（病理学）。

骨髓間質細胞の分化の研究から始まり，メチル化・クロマチン構造の改変の研究，そしてヒト胎児性癌細胞の分化に進み，研究テーマは一貫して“細胞の全能性と部分全能性”の問題に関することである。間葉系細胞の予想以上の可塑性に驚いている。間葉系細胞のデフォルトと選択的分化の状態を行ったり来たりさせる（細胞転換）ことにより，細胞治療の“事実上の標準仕様”として，臓器の再構築の世界に貢献させたい。

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

間葉系幹細胞の応用展望

— 細胞移植に対する病理組織学的な評価システムの提言 —

梅澤明弘

慶應義塾大学医学部病理学 助教授

骨髄間質細胞を用いた細胞治療を考える。患者自身（自家）とドナー（他家）から採取する骨髄間質^(MSC)中に存在する間葉系幹細胞を中心に、独自の幹細胞技術を基盤とした骨、軟部組織、骨髄間質の再生および機能的回復をめざすための製品を開発することが目的となる。その開発するにあたり、従来の薬物の概念を細胞に広げた点が画期的である。研究標的は、整形外科領域、歯科領域のみならず、虚血性心疾患を含む循環器疾患、関節修復まで拡大しつつある。



細胞移植、骨髄間質、間葉系幹細胞、多分化能、拒絶、副作用。

はじめに

再生とは、生物が体の一部をなんらかの理由によって損壊されたときに、失った部分を修復する現象をいう。ヒトの皮膚の切り傷のように体のごく小さな部分が修復される場合は、創傷治癒とよび、体の大きな部分の修復を意味する再生と区別することが多い。ヒトの毛髪の抜け替わりのように、体の部分の損壊がその個体の生理的事情に基づく場合の再生を生理的再生とよぶ。生理的な抜け替わりでなく、完全に損失した場合にこれに対

し毛髪を未分化な細胞・液性因子等を用いて補修した場合は再生とよぶ。このような全身の様々な組織の再生を目指した場合に、自己細胞として比較的容易に採取できる骨髄間質由来の間葉系幹細胞は、その有用性および応用展望といった観点から極めて重要な細胞ソースである。

I. 再生医療の細胞ソースとして みた骨髄間質の生体外培養

今日注目されている再生医療の特徴は、移植する前に生体外で細胞培養ならびに分化誘導などの修飾をしてから、生体に戻す点である（図①）。骨髄間質由

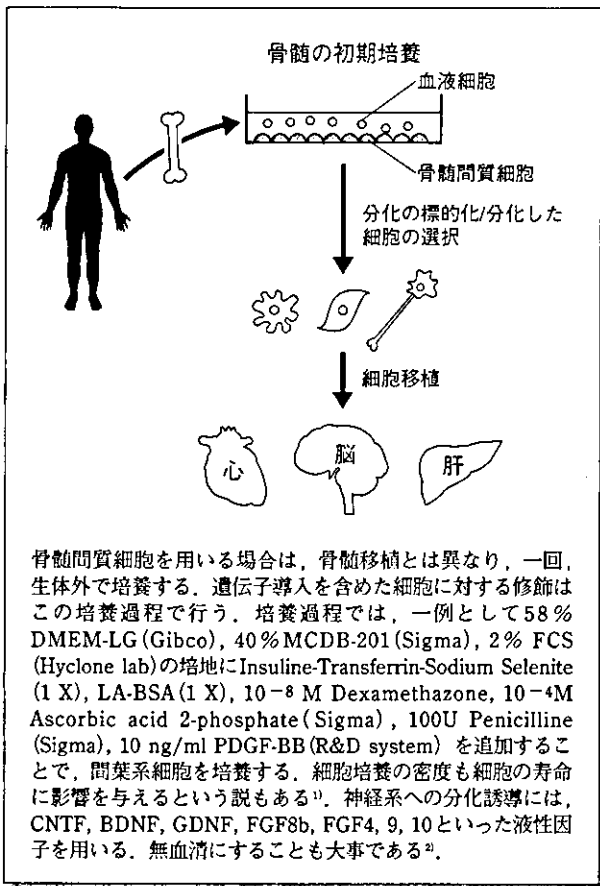
Akihiro Umezawa

Keio University School of Medicine, Department of Pathology, Associate Professor

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

: Mesenchymal stem cells are resatle as a source of cell therapy

図① 細胞移植の模式図



来の間葉系幹細胞の培養方法は、骨髓の初期培養に由来する¹⁾。マウスでは大腿骨・頭蓋骨から採取し、ヒトの場合は胸骨・腸骨から採る。骨髓培養は組織培養の一種で、組織培養とは生物の組織や器官から単離した細胞を適当な培養液中で生育させることをいう。培養液は、組織培養と同様に、生理的溶液に血清を添加したものや完全合成培地が使用可能であるが、細胞の種類によっては、十分な生育に成長因子やホルモンを必要とする。この成長因子にどのようなものを使用するかが極めて重要な意味を持つ。培養細胞は条件がよければ培養基質の上で増殖して単層の薄膜となり、正常細胞の場合は基質を覆い尽くすと分裂が停止する。適当な時期に細胞を集め、細胞の密度を低くして再培養を繰り返すことによって継

代培養が可能である。

培養細胞の機能や構造は、当然正常組織におけるものとは異なっている。しかし細胞培養は、生体中の液性因子や他組織の影響を排除できること、培養条件を制御しやすいこと、均一な細胞集団が得られることなどから、再生医学の分野で広く利用されている。特に、1個の細胞に由来する細胞集団(クローン)は、このような点で極めて有用である²⁾。最近では、培養された線維芽細胞

に直接いろいろな遺伝子を導入して、遺伝子導入による分化形質の変化を調べたりすることもなされる。しかし、細胞は長期の培養中にしばしば性質が変化するので注意を要する。性質の変化は、分化能の変化ばかりだけでなく、腫瘍化への第一歩となる遺伝子変異を培養中に獲得してしまう場合もあると考えておいたほうがよい。長期の培養後に性質が安定化したものを細胞株とよぶ。細胞はその起源によって培養の難易が異なる。一般に上皮細胞の長期培養は困難であり、細胞株が確立された例は多くない。これに対して、結合組織に由来する細胞、特に線維芽細胞は各種培養系においてよく増殖し、骨髓間質の場合も培養方法は確立している。骨髓間質細胞株の樹立も、げっ歯類では容易である一方、ヒトでは細胞

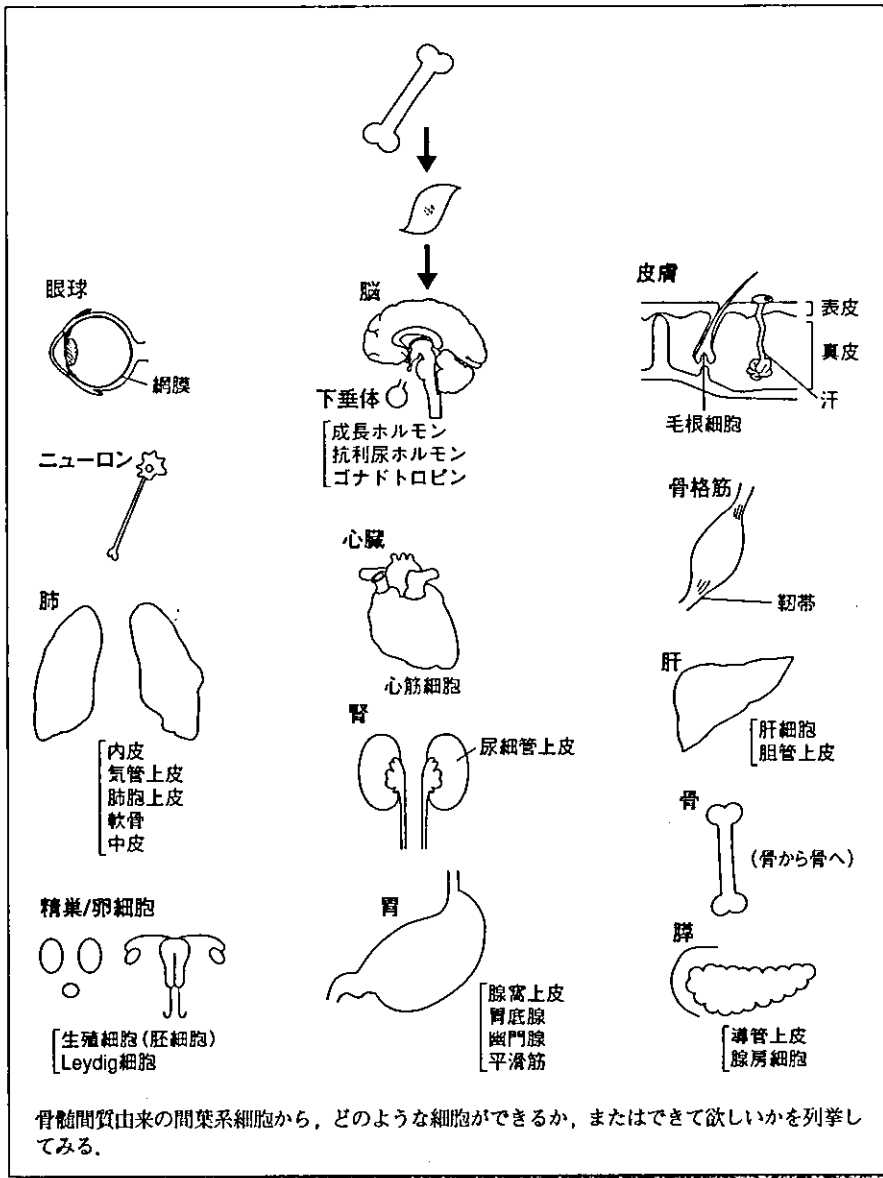
株を樹立することは難しい。

このように、骨髓間質中に含まれる間葉系幹細胞は生体外で増殖させることが可能であり、腫瘍化させずに不死化させることができ、分化能が保持できれば製剤化への可能性が広がる。可能性にむけて、解決しなくてはいけない点があるが、実現可能であろう。間葉系細胞の不死化ならびに多分化能にかかわる分子基盤を明らかにできれば、骨髓間質は再生医療の細胞ソースとして極めて扱いやすい。

II. 細胞移植という観点からみた骨髓移植(図③)

最も進んでいる細胞移植は骨髓移植であり、生体外で細胞を培養することはないが、骨髓移植について考えてみたい(参考となるウェブサイト: <http://wwwinfo.ncc.go.jp/NCC-CIS/pub/0sj/010702.html>)。腸骨骨髓から1000ccもの骨髓液を移植の際に利用する。骨髓移植に必要な充分量の血液幹細胞を得るには1000cc必要であり、凍結をすることはできても生体外で現在のところ血液幹細胞を増殖させることは難しい。実際には、移植する日に採取し、その日に2時間かけて中心静脈カテーテルを通じて、1000ccを注入する。骨髓液を採取する場合は、全身麻酔で行い、10ccずつ採取し、骨片はフィルターでこす。非血縁の方からの骨髓採取は他施設で行い、その日のうちに海外を含め、遠隔地であってもできる限り、早く運搬する。allogeneicな組み合わせ(他家移植)の場合、HLAが同一であっても生着不全が約5%生じる。生着不全を防ぐために宿主(ホスト)の

図2 骨髄間質細胞を出発点とした治療戦略



である。よく受ける質問であるが、「それぞれの組織由来の間葉系幹細胞に骨髄間質細胞同様、多分化能を有しているのか。」「間葉系幹細胞の分化能に違いがあるのか。」という問いに対する回答は得られていないが、再生医療を念頭においた場合、間葉系幹細胞の供給源として骨髄間質が最善であると考えている。一方、ヒト脂肪織および陰茎の包皮から実際には間葉系細胞が採取されている³⁾。脂肪細胞も包皮も必要でないと考えられるので、患者さんの承諾は受けやすいし、社会的な興味をそそっている。皮下脂肪織由来および真皮由来の間葉系幹細胞は、脂肪、平滑筋、神経などの多分化能を示す。

もうひとつ忘れてはならない間葉系細胞の供給源として、胎児がある。胎児肺由来の線維芽細胞は、細胞株として樹立されているわけではないが、培養液中での寿命が極めて長いので多くの施設に渡り、実験に供与されている。げっ歯類でよく知られている3T3細胞は、胎児由来である。ヒトの場合も倫理的な必要な手続きは極めて大事であるが、寿命が長い点で、胎児由来の間葉系細胞は骨髄間質より優れた点を有している。ただし、骨髄間質とは異なり、他家となるので再生医療の供給源として考えた場合、免疫学的な拒絶は避けられない。

IV. 細胞治療における拒絶を防ぐには？

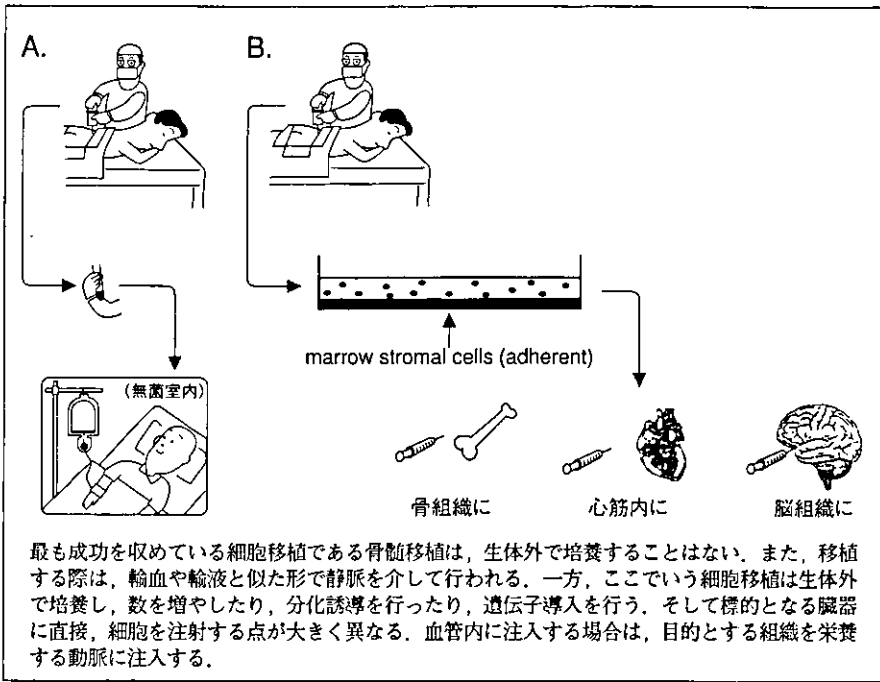
サイクロスポリンを初めとした免疫抑制剤の使用を、臓器移植の場合と同様に考えることが可能である。しかし、最も

免疫を完全にたたき、そのため、1週間かけて全身に対する放射線照射(2 Gy×6回)、免疫抑制剤投与(cyclophosphamide, AraC)を行う。骨髄移植の場合は、結果として免疫細胞も移入されることになるのでGVH (graft versus host) 病を生じる。これは骨髄間質の細胞移植では、免疫細胞の移植は行わないので問題とならないが、拒絶の問題は避けられない。

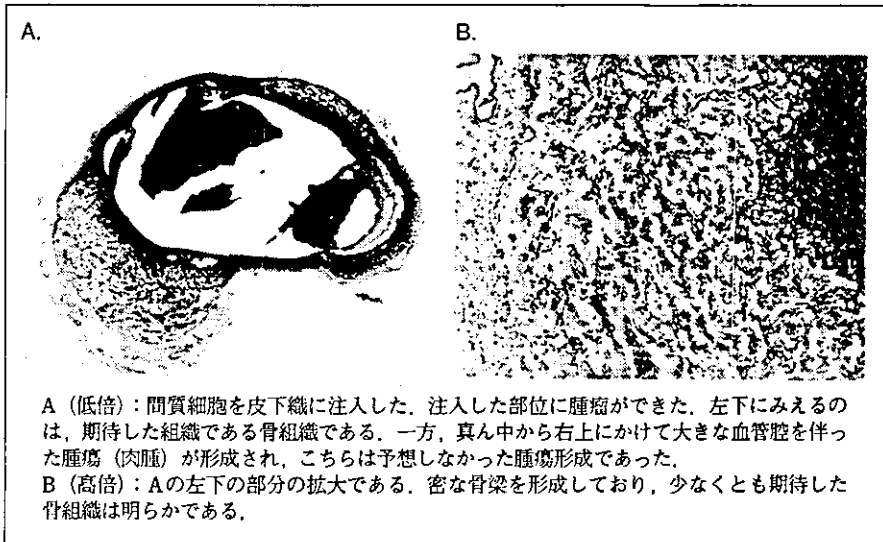
III. 骨髄間質のみが、間葉系幹細胞の供給する組織なのか

骨髄間質以外で間葉系幹細胞の供給源として考えられる組織はかなり存在する。間葉系細胞が存在しない組織は、あまり考えつかない。肺、心、全身皮膚、腎、肝、消化管、胆嚢、膀胱といった臓器では、上皮下組織に間葉系細胞が存在する。間葉系細胞が存在すれば、ある程度の割合で間葉系幹細胞が存在するはず

図③ 骨髄移植と骨髄間質の細胞移植の違いを表した模式図



図④ 細胞移植した場合に、分化形質と腫瘍形質が同居してしまった例



現実的な方法は手間がかかるが患者さん自身の骨髄間質細胞を用い、細胞転換し、移植することである。自家移植であれば拒絶の心配はまったくない。間質細胞は骨髄穿刺によって得られ、この点においてこの細胞は他の供給源と比較し、一日の長がある。もうひとつの方法は、間質細胞内に免疫寛容を誘導する分子を導入

後移植することである⁵⁾。幸い、間質細胞は遺伝子導入効率は極めて高い。もしかしたら、拒絶の心配はまったくないかもしれない。人の骨髄由来の間葉系幹細胞を羊に移植した場合には、免疫が確立した後も拒絶が生じなかった⁶⁾。著者達はこの点に関し、間葉系幹細胞には免疫学的な特殊性があるのではないかと指

摘している。

V. 再生医療・細胞移植における評価システムの確立は急務を要する

細胞治療の前に目的の臓器より組織を採取する。もちろん、生検であるからして微小検体で充分である。組織学的に検討し、細胞移植後の生検組織と比較検討する。不幸にも、患者さんがお亡くなりになった場合は剖検（病理解剖）することでその妥当性を検討する。細胞治療・細胞移植は、従来行われてきた骨髄移植とある意味では似てはいるが、新しい概念の元に行われる医療である。その有効性を明らかにする上でも、病理組織学的検証を提案する。評価対象は、1. 分化形質、2. 拒絶、3. 腫瘍化がある。

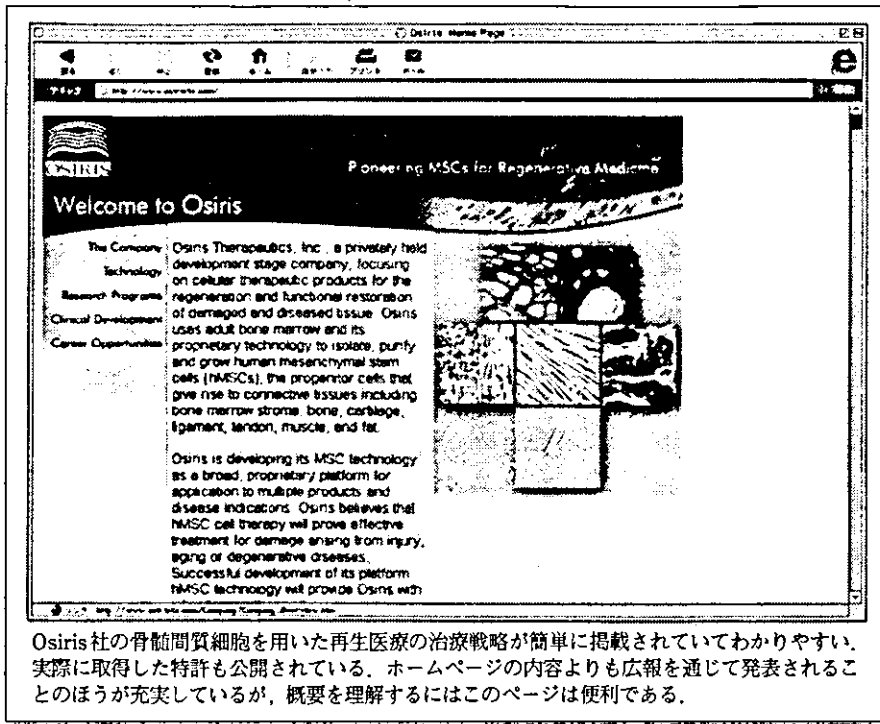
1. 分化形質の評価

心筋細胞の場合は、形態学的に移植した細胞に横紋構造の有無ならびに分化マーカーであるミオシン、アクチン、Csx/Nkx2.5, MEF2, GATA-4の発現は必須である⁷⁾。さらに周囲の宿主に由来する心筋線維との間にギャップ結合形成を意味する。ギャップ結合を形成することで宿主の心筋細胞と同期（シンクロナイゼーション）することができる。さらに、移植技術にも依存するが、移植した細胞が塊（かたまり）になっていないかどうか、肉芽を形成していないかどうかでも評価すべきポイントである。

2. 予期せぬ分化

予期せぬ副作用の中で、最も考えられるのは、目的としない細胞への分化である。イモリの前肢の再生芽は、その場では前肢になるが、後肢の場に移植されれ

図5 Osiris社のホームページ (http://www.osiristx.com/index.htm)



Osiris社の骨髄間質細胞を用いた再生医療の治療戦略が簡単に掲載されていてわかりやすい。実際に取得した特許も公開されている。ホームページの内容よりも広報を通じて発表されることのほうが充実しているが、概要を理解するにはこのページは便利である。

ば後肢になる。エビの目を深く切り取ると、目のかわりに触角が再生する(異型再生)が、これは目を深く傷つけたため目の再生の場が失われ、再生芽は触角再生の場の指示に従ったものと考えられ、目的の組織に分化形質を有している細胞が再生するよい例である。ヒト間葉系幹細胞でも同様の事実が得られており、ヒツジ胎子の腹腔内に移植した場合、全身の臓器で組織特異的分化を示した⁶⁾。一方、心臓の中に心筋細胞・血管内皮細胞を目的として、骨組織が形成されてしまっはよくない。脳組織に神経細胞の移植を試みて、骨組織ができてはいけない。骨髄間質由来の間葉系幹細胞を利用することより、骨再生を目的としない場合に分化誘導して骨形成が生じたら悲劇である。どのようにして骨形成能を有する細胞(骨芽細胞)を除去できるか? 基本的な戦略は骨芽細胞の単離と同じであり、骨髄間質細胞のうち、骨芽細胞特異的なマーカーを用いてフローサイト

メトリーによって除去するのが最も適切な方法であろう。

移植した部位によっては、骨組織ができることが大きな問題にならない場合もある。大胆ないい回しをさせてもらえば、心筋、骨格筋、神経組織以外の組織では、骨形成による影響はさほど大きくないともいえる。病理解剖をしていて、肺などに陳旧性結核症で骨形成を見ることは稀ではないが肺の機能傷害はない。肝臓においても骨形成したとしても好ましくないかもしれないが、肝機能に影響を与えないとは思わない。

3. 移植細胞のラベル

移植した細胞(ドナー)と宿主(レシピエント)の細胞を区別するためのマーカーを何にするかも課題のひとつである。ヒトに使用できるマーカーは様々な理由で制限を受ける。男性の細胞を女性に移植する場合は、Y染色体マーカーを利用できるがわかりにくい。βガラクトシダーゼは、組織の検討をする際に酵素組織

化学を行うために凍結切片を作製する必要があり不便である。Green Fluorescent Protein (GFP)は蛍光色素であるが、組織の自家蛍光と区別するほど蛍光が強くないことがある。また、活性酸素を生じ、細胞障害性を有している可能性がある。BrdUは、核内に取り込まれるために癌化の可能性がある。実際に、ドナー細胞を判断するために現実的に現場で用いることができる方法は、ペルオキシダーゼ反応を用いた免疫組織化学に限られる。

4. 移植細胞の腫瘍化の可能性

ヒト細胞を移植した場合の腫瘍化の可能性も忘れてはならない。不死化しているようなヒトES細胞や寿命を延長させた成人細胞(骨髄間質細胞を含む)を使用して、再生医療・細胞移植に使用した場合、移植後何年か経ったときに移植した細胞が組織の中で腫瘍化する可能性がある。現実的な言い方をさせて貰えば、腫瘍化する可能性があることを前提に様々な医療を行うことが重要となってくる。ヒトの場合はげっ歯類の細胞に比べると不死化する確率も低いし、試験管内で腫瘍化する可能性も低いとはいえず、ヒトの場合、細胞移植された個体は何十年もその後、生存する。何十年もの間に腫瘍化(形質転換)することは十分に予想される(図6)。腫瘍化しないとは、いえないのである。

VI. 骨髄間質をビジネスの対象としているOsiris社

間葉系の細胞は様々あれど骨髄間質に注目して、ビジネス化しているベンチャー企業にOsiris社(Osiris Therapeutics,

Inc., 2001 Aliceanna Street, MD 21231, USA)がある(図5)。この会社の基本方針は細胞移植である。その細胞の供給源として間質に注目しているのである。さらにいえば間質中に存在する間葉系幹細胞をその研究対象におき、ビジネスの標的化を行っている。医学でいえば、整形外科領域、歯科領域のみならず、虚血性心疾患を含む循環器疾患、関節修復までそのビジネスの標的を拡大しつつある。再生医療の範疇からは逸脱するかもしれないが、間質細胞は*in vitro*で遺伝子を導入できることから代謝性疾患の遺伝子治療の対象となる細胞としても注目している。

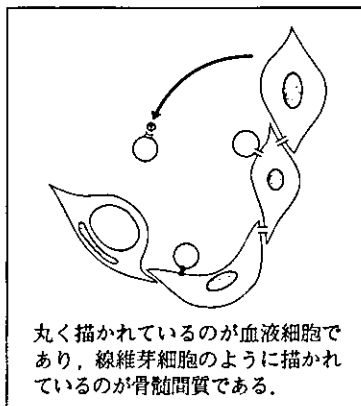
■おわりに

Osiris社のビジネス戦略は、独自の幹細胞技術を基盤とした骨、軟部組織、骨髄間質の再生および機能的回復をめざすための製品を開発することにある。その開発にあたり、従来の薬物の概念を細胞に拡張した点が画期的である。開発中の細胞製剤は患者自身(自家)とドナー(他

家)から採取するヒト間葉系幹細胞がある。細胞治療のターゲットになっている疾病を考えると製剤化は必要だと僕は思う。免疫を抑制する遺伝子を用いることで、医師が容易に使用できるシステム作りも大事である。

【用語解説】

1. 骨髄間質 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た。その後、この造血微小環境を構成する骨髄間質細胞は、主として細胞培養によって実態として把握された。培養において、造血幹細胞を維持することは知られていたが近年、胎児性幹細胞を神経に分化させる液性因子を産生することも明らかになった。



丸く描かれているのが血液細胞であり、線維芽細胞のように描かれているのが骨髄間質である。

参考文献

- 1) Colter, D. C., Sekiya, I., Prockop, D. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, Jul 3; 98(14), 7841-7845, 2001.
- 2) Kohyama, J., Abe, H., Shimazaki, T., Koizumi, A., Nakashima, K., Gojo, S., Taga, T., Okano, H., Hata, J. and Umezawa, A.: Differentiation (Stem cell issue), in press, 2001.
- 3) Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., Hedrick, M. H.: Tissue Eng. Apr; 7(2), 211-228, 2001.
- 4) Yang, J., Nagavarapu, U., Relloma, K., Sjaastad, M. D., Moss, W. C., Passaniti, A., Herron, GS.: Nat. Biotechnol, Mar; 19(3), 219-224, 2001.
- 5) Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T. et al.: Science 281, 1191-1193, 1998.
- 6) Liechty, K. W., MacKenzie, T. C., Shaaban, A. F., Radu, A., Moseley, A. M., Deans, R., Marshak, D. R., Flake A. W.: Nat. Med. Nov; 6(11), 1282-1286, 2000.
- 7) Gojo, S., Kitamura, S., Hatano, O., Takakusu, A., Hashimoto, K., Kanegae, Y., Saito, I.: J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 113, 10-8, 1997.

- Vibrio fischeri* luminescence system. J Bacteriol 163 : 1210, 1985
- 2) Van Delden C, Iglewski BH : Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerging Infect Dis 4 : 551, 1998
- 3) Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, et al : Quorum-sensing signals indicate that cystic

- fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 407 : 762, 2000
- 4) Tateda K, Comte R, Pechere JC, et al : Azithromycin Inhibits Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 45 : 1930, 2001

(東邦大学医学部微生物学教室・講師 舘田一博)

骨髄間葉系幹細胞 —生物学的役割からの新たな治療戦略

KEYWORDS

間葉系幹細胞, 再生, 細胞治療, 遺伝子治療

1. はじめに

骨髄間質(ストローマ)細胞は造血支持細胞として研究の対象となってきた。近年, このストローマが自己複製能と多種類の間葉系の機能細胞に分化する能力を有する幹細胞を有していることが示された¹⁾。さらには, 中胚葉由来ではあるが間葉系からはかけ離れていると考えられていた心筋細胞²⁾や骨格筋細胞³⁾が, この間葉系幹細胞から分化しうることが報告された。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の重要な一翼を担うと考えられている。一方, すでに臨床においては骨髄移植において生着不全を防ぐことを目的に, ストローマ細胞移植が始められている^{4,5)}。これらの臨床試験は, 移植細胞の生着促進のみならず, 移植片対宿主反応を抑制する可能性を示した。また, 間葉系幹細胞は, 増殖能が極めて高いことが特徴である。一方, 造血幹細胞の維持は困難で, 多くの遺伝子治療プロトコールが当初予想されていたほどの効果をもたらしていない。このような現状から, 間葉系幹細胞が遺伝子治療の有望なターゲットとなり始めている。

2. 骨髄ストローマ

骨髄には3つの主要な細胞群が存在する。造血細胞, 内皮細胞, ストローマ(間葉系由来の非造血細胞)である。ストローマと呼ばれる細胞は,

マクロファージ, 脂肪細胞, 骨形成細胞, 細網細胞の4つより成っているとされてきた。幹細胞生物学という分野が推し進められ, ストローマにも結合組織細胞(骨細胞, 軟骨細胞, 腱細胞, 脂肪細胞, 平滑筋細胞)にとっての幹細胞が存在することが提唱された。ヒトのストローマに対して, 骨, 軟骨, 脂肪という3つの系譜への分化を指標に colony forming assay が行われ, 3つの系譜への分化能が維持され, かつ自己複製能を保持している単一細胞由来の細胞が存在することが確かめられた⁶⁾。In vitro assay における幹細胞の頻度は, 骨髄有核細胞の 1×10^4 から 1×10^5 に1個の割合であると推定されている⁷⁾。げっ歯類のストローマの増殖能はすでに知られていたが, ヒト間葉系幹細胞の増殖能は多くの培養条件が検討され, げっ歯類に及ぶほどに改善された⁸⁾。40回の分裂を経ても, 増殖スピードは落ちるものの骨への分化能が維持できるとの報告がされている⁹⁾。

3. 細胞表面マーカー(表1)

造血系幹細胞とは異なり, 間葉系幹細胞の表面マーカーおよび分化過程でのその抗原の変遷に関しては詳しい検討がなされておらず, 造血系における系統樹は描かれていない。以前, $CD 34^+ CD 38^- HLA-DR^-$ の表面マーカーを有する胎児肝細胞は, 造血とストローマ系の細胞の両方に分化しうる多分化能(pluripotent)を有する細胞群であることが報告された¹⁰⁾。その後, この細胞群は $CD 50^-$ で亜群に分けることができ, $CD 50^-$ の細

表1 報告されているFACS解析に筆者らの解析を加えた間葉系幹細胞の表面マーカー

接着因子	positive	ICAM-1, 2, 3; L-selectin, NCAM, HCAM, VCAM, LFA-3, Hyaluronate receptor
	negative	E-selectin, P-selectin, Cadherin 5, PECAM-1
成長因子, サイトカインレセプター	positive	IL-1 R, 3 R, 4 R, 6 R, 7 R; Interferon γ R, TNF- α 1 R, 2 R, FGFR, PDGFR, Transferrin R
	negative	IL-2 R
インテグリン	positive	VLA- α 1, 2, 3, 5, 6; VLA- β , β 4-integrin
	negative	VLA- α 4, LFA-1, Mac 1
造血系マーカー	positive	CD 34, CD 40, CD 164
	negative	CD 1, CD 3, CD 4, CD 8, CD 14, CD 45, CD 80, CD 86

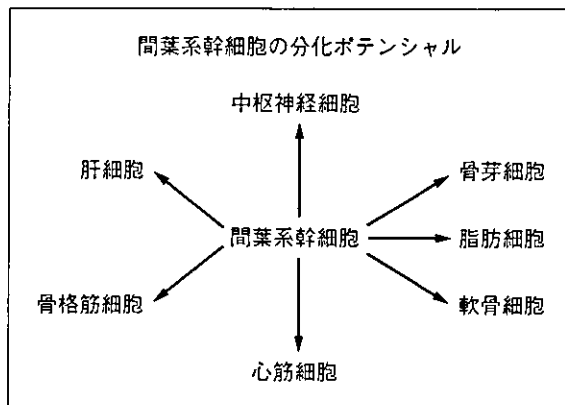


図1 間葉系幹細胞を中心にした分化可能と報告された細胞群

胞は間葉系幹細胞を生じ、CD 50⁺の細胞は造血細胞を生じうるという結果が示された¹¹⁾。造血幹細胞のマーカーとして広く認知されているCD 34に関しては、ある条件の下で誘導される分子であり、またHoechst 33342による染色が幹細胞の特性を極めてよく反映するとの報告のなかで、CD 34⁻の細胞群がより上流の真の幹細胞に近い細胞群であることが示されている¹²⁾。このCD 34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経過とともに失われていくといわれているが⁹⁾、CD 34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細胞培養による増殖因子の影響、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の検討は以下のようなものである^{6,13)}。接着分子ではICAM-1,2,3およびNCAM, HCAM, VCAM, L-selectinが発現しており、E-selectin, P-selectin, Cadherin, 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レセプターは、検討されたものはほとんどが陽性であった(IL-1 R, 3 R, 4 R, 6 R, 7 R; Interferon γ R, TNF- α 1 R, 2 R; FGFR, PDGFR, Transferrin R)が、IL-2 R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 , β が発現していなかった。免疫応答にかかわる分子では、CD 3 complex, CD 4, CD 8, B 7-1, 2 (CD 80, CD 86), MHC class IIは発現していなかった¹⁴⁾。現状は、このような記述的な情報が得られているに過ぎず、また重要な分子がまだ十分な検討を受けていない。今後、分化とともにこれらのマーカー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の解明が、間葉系幹細胞における臨床の治療戦略を組み立てるに当たって必須であると考える。

4. 臨床応用

1) 遺伝子治療

間葉系幹細胞は、現在の培養条件下で、非常に高い増殖能を有しながら自己複製能を保持しうる。このことは、間葉系幹細胞がレトロウイルスを用いた遺伝子治療の非常に好ましいターゲットとなりうることを示唆している。間葉系の病気自体に加えて¹⁵⁾、この幹細胞に分泌蛋白の遺伝子を導入し、治療効果を得ようという試みがいくつか報告されている。ヒトIL-3遺伝子を導入された幹細胞がマウスに移植され、8週間以上にわたり血中でヒトIL-3が確認されている¹⁶⁾。また、Factor IXは犬の実験で15週間にわたってその分泌が確認された¹⁷⁾。幹細胞に遺伝子が導入されたのが事実であれば、理論的にはそのホストが生

きている間は導入遺伝子産物があつてしかるべきであるが、いまわれわれが幹細胞と呼んでいる細胞群は分化細胞に運命づけられた細胞を多く含んでいる可能性が高いと考えられる。しかしながら、造血幹細胞の遺伝子治療プロトコールにおいて遭遇したような、低い増殖能に起因する導入効率が上昇させづらいことや十分な細胞数が得られないといった問題を回避することができ、今後の進展が期待される。

2) 細胞治療

幹細胞の投与方法として、経静脈投与と局所直接投与の2つが考えられる。経静脈的移植によって間葉系幹細胞はほとんどの臓器に生着し、5カ月にわたって生存していた¹⁾。臨床においても、すでに造血幹細胞の生着促進を目的に、骨髄移植と同時に骨髄ストローマ細胞の移植が行われている⁴⁾。方法は、乳癌に対して大量化学療法を受けた患者に対して、骨髄よりストローマを採取し、培養により増殖させた後に造血幹細胞と同時移植を施行するといったものであり、結果は白血球(8日目)および血小板(13.5日目)の回復が有意に早いものであった。一方、間葉系幹細胞の多分化能を考えると、病変部に直接幹細胞を注入するといった方法が考えられる。近年、間葉系幹細胞に純化しないままの骨髄細胞を用いて、*in vivo*において中枢神経細胞^{18,19)}、心筋細胞²⁰⁾、肝細胞²¹⁾に分化したという報告が相次いでいる(図1)。分化した細胞の同定はされていないが、間葉系幹細胞が最も近い位置にあると考えられている。この基礎的な検討をもとに臨床への還元を考えると、1つの大きな仮定が存在している。幹細胞は移植され生着した環境に影響を受け、その組織を再生するがごとくに分化プログラムを遂行するという場所特異性の仮定である²²⁾。しかしながら、この仮定は極めて危うく、われわれは幹細胞が環境とは関係のない任意の細胞に向かう現象を確認しており、今後十分な検討が必要であると考えている。解決されなければならない問題を抱えてはいるが、間葉系幹細胞が器官再生という目的のために持っているポテンシャルは高く、分化過程とともに変化する表面マーカーの解析が問題解決への糸口を与える可能性があり、臨床への道のりも遠くはないと考えている。

3) 免疫応答の修飾

間葉系幹細胞の phenotype の解析からも、免疫応答にかかわる重要な分子である MHC class II および B7-1, 2 が発現していないこと、さらには混合リンパ球反応において、Tリンパ球の反応性を抑制することが示されている。また、間葉系幹細胞への *ex vivo* 遺伝子導入実験より、その細胞の免疫原性が低いといわれている。これらの結果を踏まえ、ヒヒを用いて同種間での間葉系幹細胞移植の後、ドナー細胞を提供したヒヒより皮膚を採取し移植が行われた。結果、皮膚グラフトは有意に生着延長が確認された¹⁴⁾。このような実験的検討以外に、臨床では移植片対宿主病(GVHD)を予防することを目的に間葉系幹細胞移植が始められた。また、親子間もしくは兄弟間での造血幹細胞移植は現在まで芳しい結果をもたらしていないが、それをサポートするためにも間葉系幹細胞移植が計画されている。

5. おわりに

骨髄に由来する間葉系幹細胞に光が当てられ、幹細胞生物学の発展とあいまって、間葉系幹細胞は遺伝子治療、再生医療といった分野のターゲットとなっている。まだまだ解明されていない部分が多く、さらなる検討が必要であるものの、臨床への応用はかなり広範であると考えられる。

文 献

- 1) Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74, 1997
- 2) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103: 697-705, 1999
- 3) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530, 1998
- 4) Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al: Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 18: 307-316, 2000
- 5) Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, et al: *Ex vivo* expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal

- progenitor cells (mesenchymal progenitor cells) ; implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 16 : 557-564, 1995
- 6) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999
 - 7) Majors AK, Boehm CA, Nitto H, et al : Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res* 15 : 546-557, 1997
 - 8) Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al : Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176 : 57-66, 1998
 - 9) Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE : Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64 : 278-294, 1997
 - 10) Huang S, Terstappen LW : Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 368 : 664, 1994
 - 11) Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, et al : The "common stem cell" hypothesis reevaluated ; human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 85 : 2422-2435, 1995
 - 12) Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al : Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 183 : 1797-1806, 1996
 - 13) Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, et al : Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 3908-3913, 1998
 - 14) Klyushnenkova E, Shustova V, Mosca J : Human mesenchymal stem cells induce unresponsiveness in preactivated but not naive alloantigen specific T cells. *Exp Hematol* 27 : 122, 1999
 - 15) Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al : Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5 : 309-313, 1999
 - 16) Brouard N, Chapel A, Neidez-Nguyen TM, et al : Transplantation of stromal cells transduced with the human IL3 gene to stimulate hematopoiesis in human fetal bone grafts in non-obese, diabetic-severe combined immunodeficiency mice. *Leukemia* 12 : 1128-1135, 1998
 - 17) Hurwitz DR, Kirchgesser M, Merrill W, et al : Systemic delivery of human growth hormone or human factor IX in dogs by reintroduced genetically modified autologous bone marrow stromal cells. *Hum Gene Ther* 8 : 137-156, 1997
 - 18) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al : From marrow to brain ; expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290 : 1775-1779, 2000
 - 19) Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al : Turning blood into brain ; cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 290 : 1779-1782, 2000
 - 20) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001
 - 21) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 : 1168-1170, 1999
 - 22) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al : Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6 : 1282-1286, 2000
- (埼玉医科大学総合医療センター心臓外科 五條理志,
慶應義塾大学医学部病理学 梅澤明弘)

細胞移植と臓器再生

梅澤明弘*¹ 五條理志*² 秦 順一*^{1,3}

はじめに

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なかで細胞レベルで臓器の機能を補填することを目指す。細胞移植のなかで最も成功を収めているのは、骨髄移植である。造血系の幹細胞を移植することによって、抗癌剤によって失われた造血能を回復させる。ここでは、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を示す。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おり、その移植可能性を紹介したい。

I. 細胞移植とは

細胞治療または細胞移植とは、目的の細胞の前駆細胞を増殖・分化させることによって、細胞自体を生体内マイクロデバイスとして利用する新たな治療戦略である。この新たな戦略を現実のものとするために、いくつかのステップが必要である(図1)。細胞の *ex vivo* における培養技術とそれによる細胞数の確保は、第一に要求される技術である。言い換えれば細胞の増殖を維持することは、移植する細胞の数を維持する点で最も重要なことのひとつである。この点は、*ex vivo*

で細胞を増殖させることのない骨髄移植と異なっている。細胞治療には、分化した細胞を移植する場合と未分化な幹細胞を分化の方向づけを行った後に移植する場合が考えられる。幹細胞のなかには、さまざまなレベルの幹細胞が存在する。①全能性を有しており、全ての細胞に分化できる幹細胞が考えられる全能性幹細胞 totipotent stem cells, ②胎児性幹細胞のように三胚葉の系統に分化することが可能であるが、胚外栄養膜細胞への分化は限られてしまう幹細胞 pluripotent stem cells, ③ある限られた組織の細胞のみではあるが、多くの細胞に分化する能力を有している幹細胞である多能性幹細胞 multipotent stem cells が知られる。近年、間葉系の幹細胞が、分化に関して驚くほどに可塑性を有していることから注目されている^{1,2)}。部分全能性を有していると考えられてきた間葉系幹細胞が、全能性を有する幹細胞に相当する分化能を有していることが明らかにされつつあり、ここではこの間葉系幹細胞を例に挙げて細胞移植を概説したい^{9,10)}。

II. 間葉系幹細胞の供給源としての骨髄間質細胞

骨髄は血液細胞の増殖の場として知られている。骨髄では、血液細胞のほかに間質細胞の存在が知られている。造血の場では第二級市民として扱われてきた間質細胞は、骨髄中で網目構造をしており、血液細胞との間で種々の連絡があり、造血を支持する(図1A)。この間質細胞中には、非血液細胞の組織における幹細胞の条件を満たしている細胞が含まれている。中胚葉由来であり、培養することで線維芽細胞の形態をとることから、骨髄間質細胞に存在する幹細胞は間葉系由来と考えることができる。

近年、この骨髄由来の間質細胞が細胞治療ならびに臓器再生の供給源としての可能性が検討されている。創傷治療の過程における肉芽組織の間葉系の細胞は骨髄由来である可能性が示唆されていることや、子宮内膜増殖期の間葉系細胞が骨髄より由来するといったよ

*¹慶應義塾大学医学部病理学教室*²埼玉医科大学心臓外科学教室*³国立小児病院小児医療研究センター

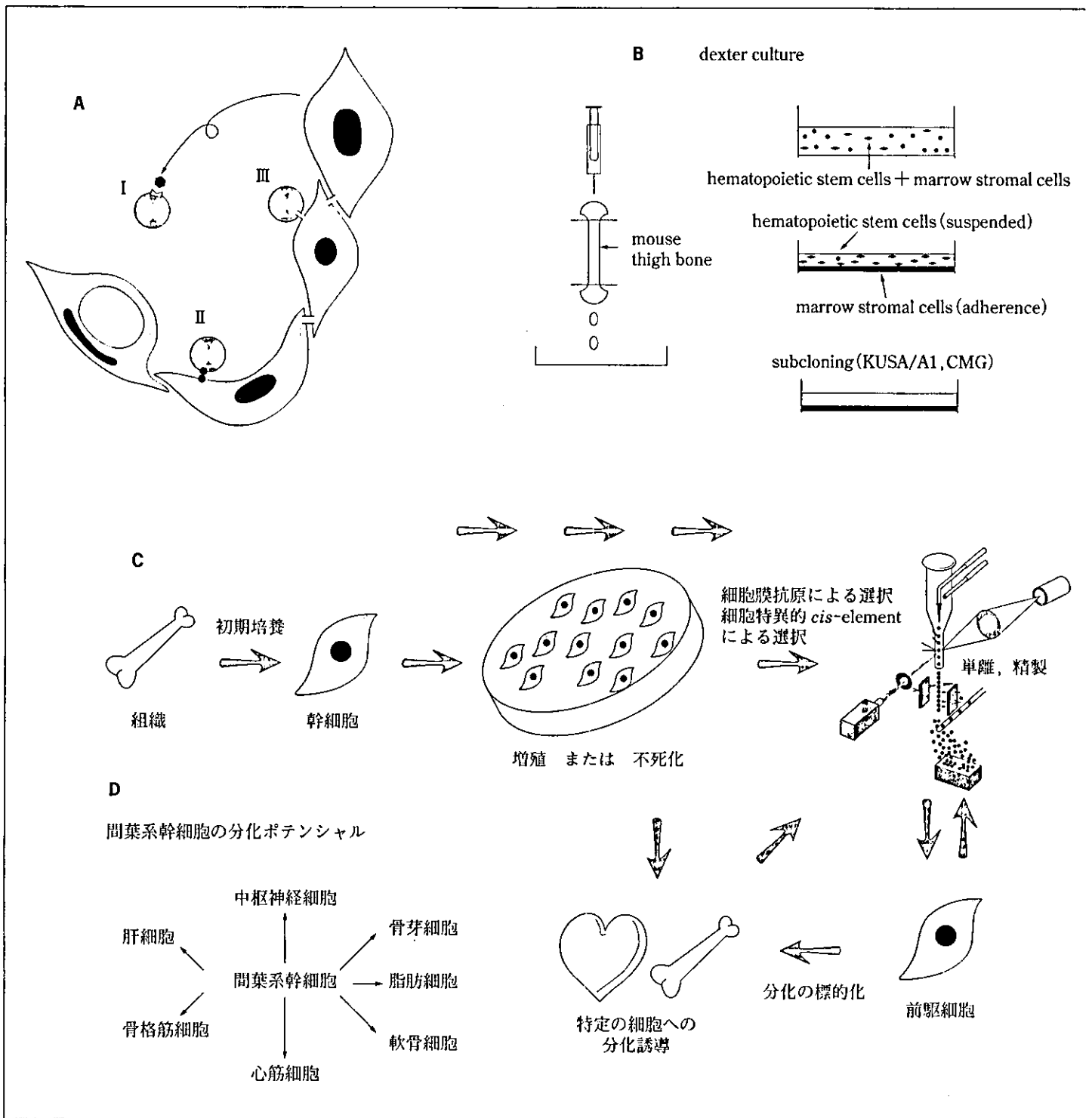


図1 骨髄間質を生体マイクロデバイスとして見立てた細胞移植の基本ストラテジー A: 骨髄間質の本来の造血に対する役割のモデル図。骨髄間質細胞と血液細胞との細胞相互作用を表した。液性因子を介する交流(I), 膜状の分子を介した連絡(II), ギャップ結合を介した交流(III)の3通りが考えられる。B: 骨髄初期培養の方法の模式図。C: 骨髄により間葉系幹細胞を得ることから目的の形質を有した細胞を選るまでの模式図。骨髄中から初期培養によって、間葉系幹細胞を単離する。その細胞を不死化させることにより、一定の細胞数を得る。十分な細胞数を得られるようであれば不死化させる必要はない。細胞を製剤とみなす場合には、不死化させておくとう便利である。これらの細胞をリセットし脱分化させるか、または meta-differentiation (trans-differentiation) させることで異なる細胞へ分化させる。D: 中胚葉に由来する間葉系幹細胞の *ex vivo* における細胞転換系の予想。

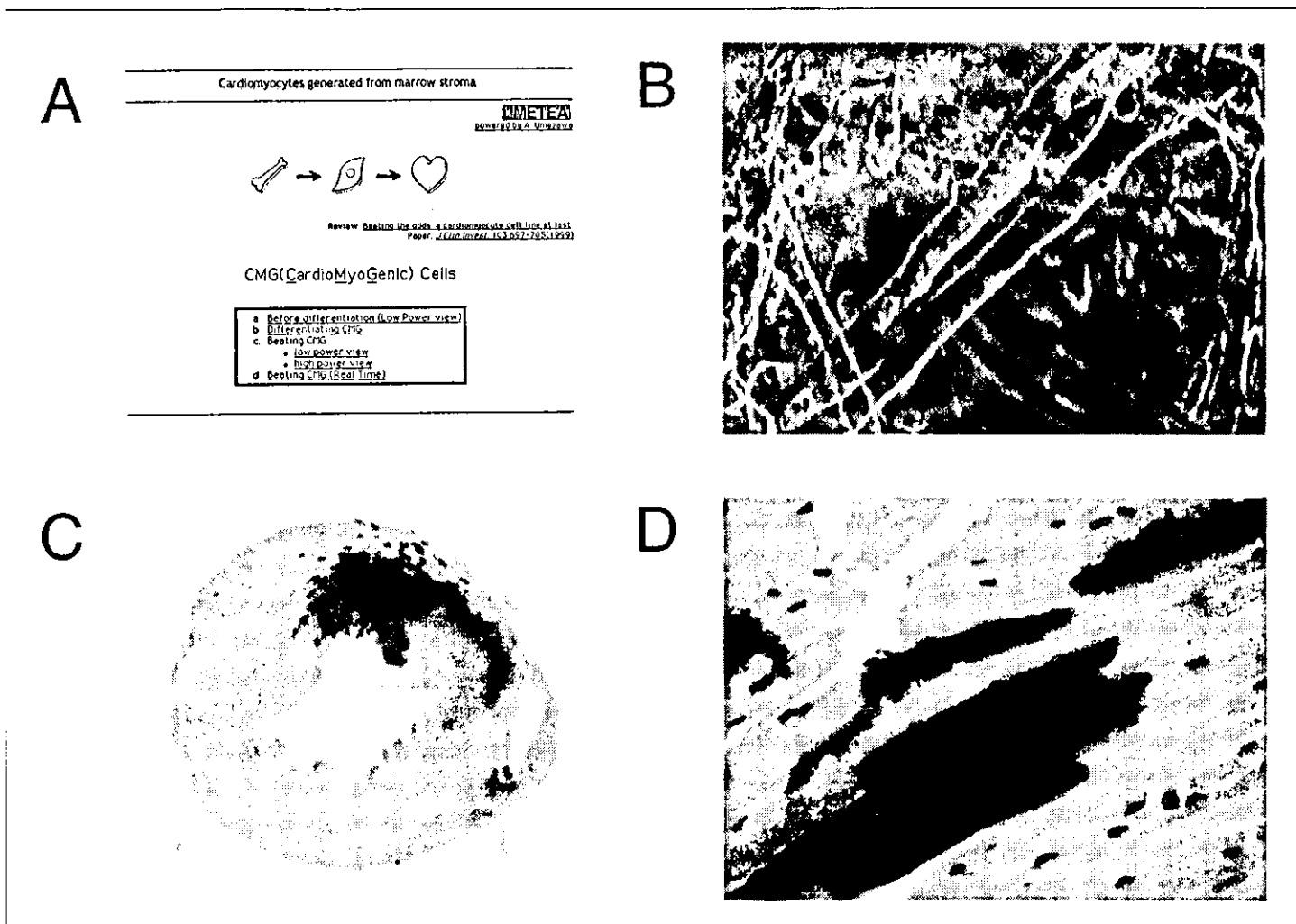


図2 「骨髄間質細胞の心筋細胞への分化」と「心筋細胞の心臓への移植」 A：骨髄間質細胞の心筋細胞への分化を示したアニメーション。間葉系幹細胞は心筋に分化する。間葉系幹細胞に対し、脱メチル化剤である5-azacytidineを処理した。28日後には心筋のtubeを形成し、収縮を開始する。形態学的にも心筋線維に特徴的な分岐ならびに構造をみる。ウェブサイト上に動画で供覧可能とした。アドレスは、<http://www.med.keio.ac.jp/~au/IHTML/>、または、<http://www.med.keio.ac.jp/patho/au/>である。B：骨髄間質細胞が心筋細胞へ分化したことを示す位相差顕微鏡像。C、D：胎児心筋細胞にβ-galactosidaseを導入し、同系マウスの心臓に細胞移植を行い、X-gal染色を行った。ドナー細胞は青く染色(白黒写真なので黒く染色)されている(Cは肉眼写真であり、Dは顕微鏡像、X-gal染色とHE染色の重染色)。

うなことが、報告されていることがその根拠となっている。骨髄間質細胞の分化形質として、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、1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¹⁾。このような多分化能は、胎児性幹細胞と同様に分裂を繰り返してもまた不死化しても保持され、特記すべきことである²⁾。

Dexterが開発した骨髄培養中に存在する間質細胞内には、間葉系幹細胞が含まれている(図1B)³⁾。骨髄培養を形成する4つの主な細胞は、造血細胞を別とすると骨芽細胞、脂肪細胞、マクロファージ、そして細網細胞である。アルカリホスファターゼ陽性の細胞

は、骨芽細胞に分化するように運命づけられている。骨髄中の脂肪細胞は、いくつかの因子によって影響を受ける。1つ目は、骨格筋系の発生ステージによって依存する。2つ目は、年齢とともに脂肪細胞の数は上昇する。さらに、造血のレベルによって脂肪細胞は依存する。すなわち造血の量に逆相関して脂肪細胞の数は増えてくる。同様に、骨芽細胞と脂肪細胞は、分化に関して逆の細胞として骨髄の環境において調整される。最近、多くの細胞分化系図すなわち骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞が、間葉系幹細胞に由来することが示された(図1D)。

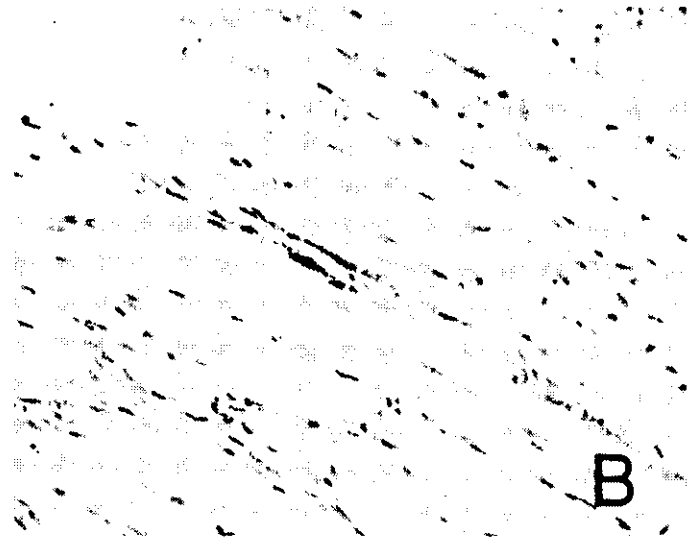


図3 骨髄間質細胞の血管内皮への分化 骨髄間質細胞に green fluorescent protein (GFP) を導入し、同系マウスの心臓に細胞移植を行い、GFP に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。連続切片で、移植された細胞は CD31 陽性であることが示された(A: HE 染色, B: 免疫組織化学染色)。

III. 心筋細胞の移植

成熟心筋細胞は増殖はせず、細胞の大きさの増大によって心臓への負荷増加に適応する。機能不全に陥った心臓は、心筋肥大という心筋細胞の増大により、その状況に適応しようとする。一方、その定説とは異なる考え方として、“心筋細胞を生じる幹細胞が心臓以外の組織に存在し、緩やかな速度で幹細胞もしくは前駆細胞を心臓に供給し、心臓に定着したそれらの細胞がある限られた回数だけ分裂し、成熟分化し、すでに存在している成熟心筋細胞と機能的合胞体を形成する”という仮説も提唱されている。

心筋細胞が *in vitro* で大量に確保できるという状況が得られれば、それらの細胞を用いた細胞移植という方法論で、重症心不全の治療に用いることが可能であろう。*in vivo* において、胎児心筋細胞を用いて心臓への移植の可能性が証明されて以来、遺伝子を導入した細胞(図2)⁴⁾、骨格筋細胞、平滑筋細胞、無処置の骨髄細胞がドナー細胞として用いられてきた。また、胎児性幹細胞を用いた実験も報告されている。以上のどの研究も心機能の収縮能の改善という重要なところにまで踏み込んではいないのが現状である。

心筋細胞は、骨髄間質細胞を分化誘導することによっても得られる⁵⁾。間質細胞を分化誘導させ、心筋内に直接注入したところ、心筋細胞と同時に血管内皮が形成される(図3)。移植された部位には、血管内皮のみがみられ、その外側には平滑筋はみられない。移植

された心筋細胞も血管の細胞も、宿主の心筋細胞や血管と協調して生存するか、また結合するかは現在のところわからない。

IV. 骨芽細胞の移植による骨形成

間質細胞のシステムは、特に骨、軟骨といった間葉系の結合組織に関してきわめて広く研究が進められてきた。ヒト間葉系幹細胞は、分化誘導することにより骨芽細胞の特徴を有した遺伝子の発現を認め、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、オステオポンチンも発現する。また脂肪細胞のマーカであるリポプロテインリパーゼの発現がみられる。これらのことは、骨髄間質細胞では分化のコミットが行われていない前駆細胞を含むことを意味している。ヒトの骨髄間質細胞は、血清中ならびに増殖因子の存在下において *in vitro* でコロニーを形成することが可能である。ここで言う増殖因子のなかには、血小板由来成長因子、bFGF、TGF- β 、EGF が含まれる。骨髄の初期培養の約 1/3 の細胞は、多分化能を有し、骨、軟骨、脂肪といった細胞系図に *in vitro* で分化することが可能である。

骨髄由来の骨芽細胞を生体内に移植することで、骨を形成することが可能である(図4A, B)。近年、血液中を循環する骨形成能を有する前駆細胞がヒトで明らかにされている。しかしながら、血液中に存在する前駆細胞は、骨髄から由来する前駆細胞に比べてさまざまな分化能力を有してことが明らかになっている。