

図4 骨芽細胞移植による骨形成 A,B:骨芽細胞を,同系マウスの皮下組織に細胞移植を行い,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,骨組織と同時に骨髄腔もみられる。経時変化を追うと,移植後5週で骨髄腔内に3系統の造血細胞が出現する。C,D:骨芽細胞を,allogenicマウスの皮下組織に細胞移植を行い,4週間後に形成された組織の解析を行った。皮下組織に骨は形成されているが,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多数の多核巨細胞が出現しているのがみられる。

この循環血液内に存在する前駆細胞は,年齢とともに減少し,骨関節炎などの病気によっても減少する。この骨への分化能は,ヒトの場合,間葉系幹細胞の培養中において40回まで分裂を維持している。

#### V. 細胞移植による軟骨形成

骨髄幹細胞の前駆細胞による軟骨の形成についても,近年,注目を浴びている<sup>7)</sup>。in vitroによる発生分化系は,骨髄由来の間葉系前駆細胞が軟骨への分化のを有していることを示していた。間葉系幹細胞由来の細胞を移植することによって軟骨も修復がなされている可能性が示されている。慢性関節リウマチにおけ

る治療法の一つとしても骨髄間質細胞の本来の分化能を利用しようとする考えがある。関節損傷部位における軟骨細胞移植もその一つである。広範囲軟骨欠損部位における軟骨再生治療において,骨髄間質細胞を用いた細胞治療の研究が試みられている。現在,臨床的に行われている軟骨細胞移植においては,自家組織の軟骨を関節鏡視下で採取し,その軟骨を培養増殖させ軟骨欠損部に移植する。この方法では慢性関節リウマチにおける広範囲の軟骨欠損の症例において,必要軟骨量を確保できないこと,また移植が広範囲になるほど移植した細胞が剥がれやすいという欠点がある。それに対し骨髄間質細胞を用いる場合,細胞の増殖能力

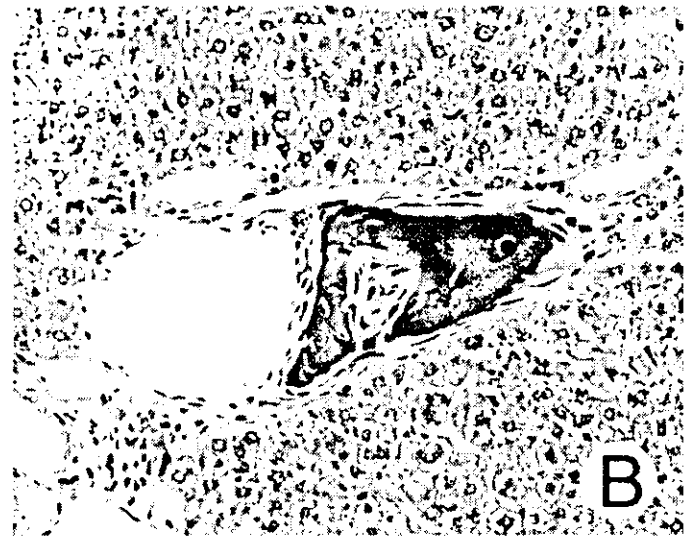


図5 間葉系幹細胞を脾臓への移植 A：間葉系幹細胞を脾臓に移植し、脾静脈を介して肝臓に肝細胞を再生させるように試みた。予想に反し、脾臓内に骨組織を形成した。左下に骨形成部位の高倍率の像を示す。B：何ヵ所かの肝グリソン鞘に骨形成がみられた。脾臓に移植された間葉系幹細胞が、骨芽細胞に分化し、脾静脈を介して肝臓に骨を形成したと思われる。

が高くかなりの細胞数が得られること、また間質細胞をそのまま移植する場合において、移植部位で軟骨への分化誘導が行われ周囲との親和性が強まるという利点がある。現在、マウスにおいて、骨髄細胞由来の骨細胞へ分化する骨芽細胞株や軟骨へ分化する細胞株を用いて骨軟骨の関節を作る研究が進んでいる。ヒトへの応用においては、骨髄間質細胞より、骨、軟骨への特異的に分化する細胞を取り出し、軟骨細胞への分化誘導を行い、またもしくは間質細胞の状態での移植を行うことが行われている。

## VI. 神経組織への細胞移植

中絶胎児の脳から、ドーパミンニューロンの前駆細胞を取得してパーキンソン病に移植する再生療法(細胞治療)が米国の病院で行われた。臨床結果として、60歳未満の症例では、高い有効性が示された。この結果は、ヒト成体脳にもある程度の再構築能が残されていることを示唆している。しかし、中絶胎児を用いた治療法は倫理的問題に加え、一人の患者を治療するのに10体近い胎児が必要であるため、現実的な医療へと応用するには大きな障害が存在する。この課題を解決するためには、大量のドーパミンニューロン前駆細胞を効率的に *in vitro* で調製する必要がある。ヒト胎児由来の神経幹細胞をある程度 *in vitro* で増幅することが可能になってきており、この神経幹細胞から目的のニューロンへの特異的な分化をコントロールできれば、中絶胎児細胞の代わりに細胞移植の材料として用いることができる<sup>6)</sup>。一方、骨髄間質細胞も中胚

葉系ばかりか、外胚葉由来の神経組織への分化も認められることが徐々に明らかになってきている。間葉系幹細胞を脳内に移植した場合、細胞は生体内にGFAP陽性の細胞が認められた。このアプローチでは、ヒトの細胞をラットの脳内に移植し、成功している。神経組織への細胞移植の供給源は、胎児性幹細胞となるのか、神経幹細胞になるのか、骨髄間質細胞が「事実上の標準」となるのかは、今後の研究の結果次第とともに、使いやすさなどの科学的な側面ばかりでなく、現実的な側面から決まると思われる。

## VII. 細胞治療の副作用

細胞治療における副作用について考えたい。細胞を移植した後に、細胞が癌化することはないのか。紹介した研究は、ヒトの結果も含まれるが主にげっ歯類の結果から得られた成果である。用いたげっ歯類の細胞は不死化しているが、それらの細胞を移植したとしても腫瘍にはならない。しかし、ここで紹介した細胞移植は *ex vivo* において培養しており(図1)、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。移植する細胞は、量の問題を考えると、不死化しており絶対に腫瘍化していないものが望ましい。

移植した組織に、目的とは別の分化した細胞が出現してしまうことは重要な問題である。実際には全く生じなかったが、心臓に移植した細胞によって骨ができた場合を考えれば、いかに好ましいことでないことがわかる。しかし、間葉系幹細胞を脾臓に移植した際には骨形成が認められ、同時に脾静脈を介して肝グリソ

ン鞘に骨形成がみられた(図5)。

移植した細胞が、膠原線維を初めとするマトリックスを出してしまい本来の臓器の機能を邪魔することがあるようであれば、これも困る。心筋への細胞の移植を例に挙げてみれば、心筋胼胝ないしは小線維化巣を生じてしまうことは予想された副作用の一つであるが、現実には今のところ全く認められない。

自己の細胞を移植する場合は問題にはならないが、使用する細胞が allogenic combination である場合は、免疫による排除も考えられる。これは、臓器移植でも同様である。異物となってしまうことにより、目的の細胞機能を果たせないばかりか、排除されてしまうことも考えられる(図4C, D)。

### おわりに

マウスの個体とヒトの個体で最も異なる点は、細胞の量である。ヒト間葉系細胞の増殖はきわめて悪く、また老化という問題も大きく関わる可能性がある。細胞移植によって作り出される組織の量の問題は、大変重要な課題である。成人の細胞を用いた場合、培養によって増殖する細胞の量は限られており、移植される組織はかなり小さいものである。成人の細胞で現在治療できる量は、感覚的な言い方をさせてもらえば一寸法師くらいの大きさの臓器ならば回復できるが、成人の臓器の機能を回復するには細胞の量が足りない。例外としては、ドーパミン産生細胞およびインスリン産生β細胞のような生理活性物質の産生を行い、その量が微量でも有効な場合である。細胞の増殖停止と細胞の老化という問題は、克服していかなければならない重要な問題である。

間葉系細胞の遺伝病であり、骨芽細胞のコラーゲンI型の産生を認めないことにより、骨の変形を伴う骨形成不全症に間葉系幹細胞の細胞移植が試みられている。細胞移植は、allogenic combination で行われた。3症例とも、間葉系幹細胞が骨に生着し、骨形成を促進し、成功例として報告されている<sup>9)</sup>。癌の再発例や抗癌剤の大量投与例に対しても間葉系幹細胞を移植され、細胞治療への可能性が広がっている。再生医学が臨床応用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全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。

### 謝辞

細胞移植の病理と臨床について書かせていただいたことを、井藤久雄先生ならびに伊藤雅文先生に深く感謝いたします。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進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、いつも刺激的でありました。使用した細胞は、牧野伸司博士、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, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C. et al. : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284 : 143-147
- 2) Umezawa, A., Maruyama, T., Segawa, K. et al. : Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis in vivo. *J Cell Physiol* 1992, 151 : 197-205
- 3) Dexter, T. M., Allen, T. D. and Lajtha, L. G. : Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1997, 91 : 335-344
- 4) Gojo, S., Kitamura, S., Hatano, O. et al. : Transplantation of genetically marked cardiac muscle cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997, 113(1) : 10-18
- 5) Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S. et al. : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999, 103 : 697-705
- 6) 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* 2000, 19(3) : 398-405
- 7) Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I. et al. : In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998, 238 : 265-272
- 8) 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* 1999, 5(3) : 309-313
- 9) Prockop, D. J. : Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997, 276 : 71-74
- 10) Gerson, S. L. : Mesenchymal stem cells : no longer second class marrow citizens. *Nat Med* 1999, 5(3) : 262-264

特集

再生医療システム — その研究と進歩 —

## 間葉系幹細胞による「臓器」再構築

—新しい生体マイクロデバイスとしての骨髄間質細胞の  
可塑性を用いた細胞移植—

慶應義塾大学医学部・病理学教室

梅澤 明弘

**要旨** 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取めているのは、骨髄移植である。ここでは、骨髄中に存在する間葉系幹細胞が、細胞移植を行う上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。間葉系幹細胞は多分化能を有し、骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞そして心筋細胞に分化することが知られる。骨髄間質に由来する間葉系幹細胞は移植が可能であることと分化能に可塑性があることから、生体内における臓器再構築に寄与すると考えられる。

[Biotherapy 15 (2) : 119-125, March, 2001]

### *In Vivo* Organogenesis by Direct Injection of Isolated Adult Mesenchymal Stem Cells

Akihiro Umezawa

Department of Pathology, Keio University School of Medicine

#### Summary

The existence of stem cells for nonhematopoietic cells in bone marrow was first suggested by Cohnheim about 130 years ago. Recently, it was reported that bone marrow-derived stromal cells differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes when placed in appropriate *in vitro* and *in vivo* environments. Since it was demonstrated that bone marrow-derived stromal cells were a homogeneous population that met the criteria for non-hematopoietic stem cells, these cells have been referred to as mesenchymal stem cells because they generate an array of cells defined as mesenchymal cells. We have previously shown that cardiomyocytes and skeletal myocytes can be generated from bone marrow-derived cells under specific culture conditions. Skeletal muscle might be recruited from bone marrow under certain conditions *in vivo*. Importantly, transplanted cells did not form any abnormal extracellular matrices, or induce any significant inflammatory reactions. Mesenchymal stem cells maintain the ability to differentiate into many kinds of cells *in vivo* in adults and will provide us new ways of cellular engineering.

**Key words:** Mesenchymal stem cells, Methylation, Regeneration, Marrow stroma, Differentiation

**Address request for reprints to:** Dr. Akihiro Umezawa, Department of Pathology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

## はじめに

再生医療システムを考える時はいつも頭に浮かぶことがある。何らかの原因で失われた細胞が元の細胞・組織の増殖によって補われる状態が再生であり、失われた細胞が元の細胞に置換されることがポイントである。自分自身がよく出会う再生は、病的な状態としてとらえられているものである。欠損された組織が、本来の細胞とは異なる細胞によって補われることをいう。ヒトの病的な状態でもあるので、「化生 (metaplasia)」という言葉で表わされる。有名な化生として、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。また、胃の腸上皮化生は、食べ物の影響を受けやすい。気管支上皮は、多列線毛上皮であるが、重層扁平上皮が生じる。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を利用して、間葉系細胞による「臓器」再構築についてここでは注目する。

## I. 再生医療システムにおけるヒト細胞の増殖・分化

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として再生がある。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わかりやすい。

通常ヒト細胞の増殖・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。一方、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。もう一つは、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。

再生医療システムを考える上で、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が利用できる。例をあげれば、血液細胞を補填するのに血液幹細胞を移植する場合と、できるかどうかはわからないが神経幹細胞を用いて血液細胞を補填する場合がある。いずれも可能であるという報告が相次いでなされているが、骨髄由来の間葉系細胞を用いてその可能性を探る。

## II. 再生医療システムの供給源としての骨髄間質細胞

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ソースとして検討されている<sup>9-11)</sup>。創傷治癒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うなことが、反論はあるにせよ、報告されていることがその根拠となっている。骨髄間質細胞は、骨のなかに存在するので、そこにもともと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<sup>1)</sup>。単一細胞のマーキングにより、一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、胎児性幹細胞と同様であり、特記すべきことである。

## III. 骨髄間質細胞の「初期値」としての分化能

もともとの骨髄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。骨髄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(骨形成率100%)。同細胞の骨細胞としての特徴は際立っている。驚くべきことに、骨を生体内で形成し、ある大きさをもった骨梁からなる骨組織を作るにもかかわらず、その周辺に肉腫などの腫瘍を形成することはまったくない。同時に、マウ

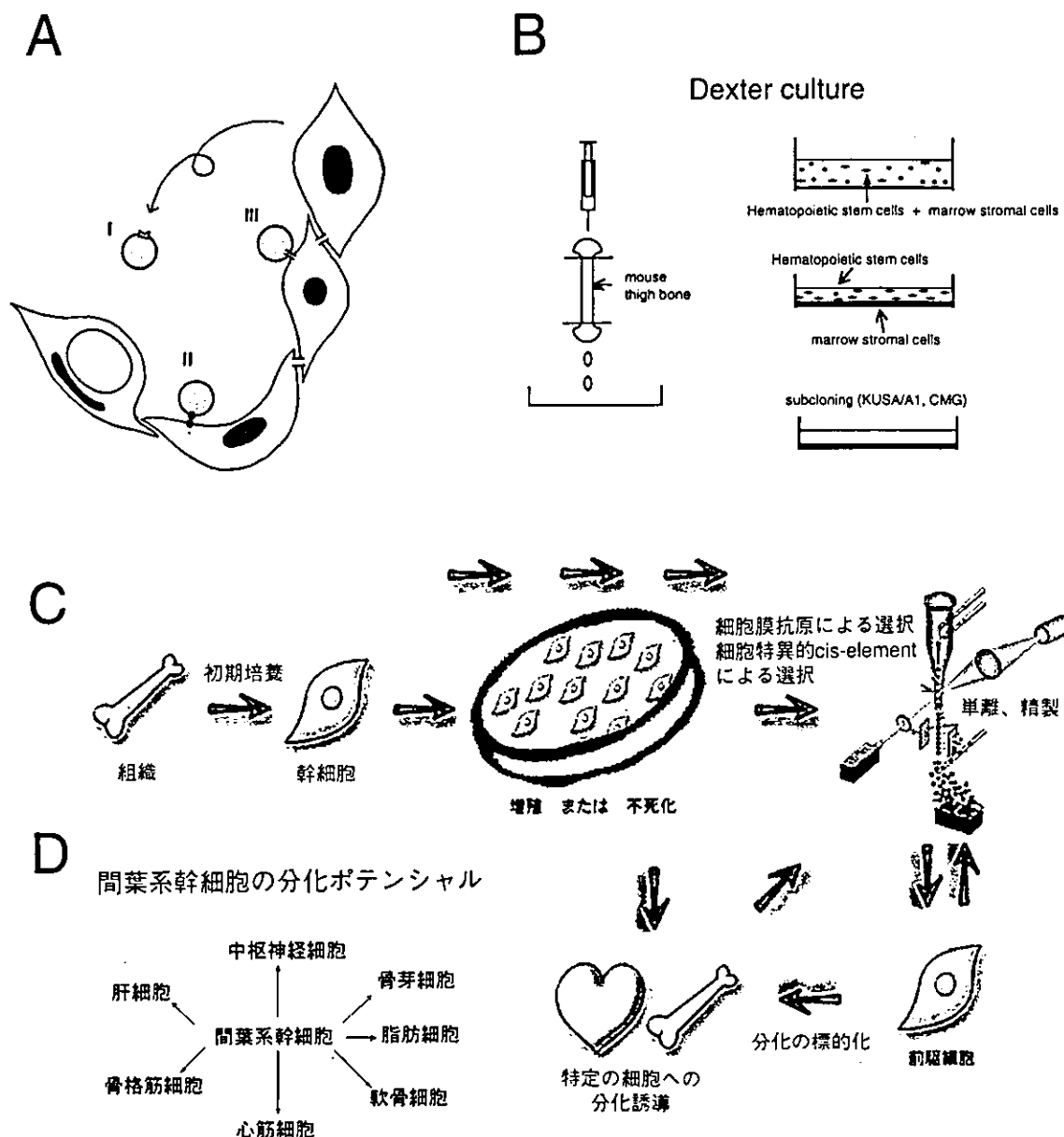


図1 骨髄間質を生体マイクロデバイスとして見立てた細胞移植の基本ストラテジー

- 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) の三通りが考えられる。
- 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ぶまでの模式図。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の分化させる。
- 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。

スの場合は分化形質を有したまま不死化させることが可能である。その事実は、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。

#### IV. 骨髄間質細胞の分化能の意外な柔軟性

骨髄中から単離したにもかかわらず、骨髄間質細胞は驚くべき分化能を有している。脱メチル化

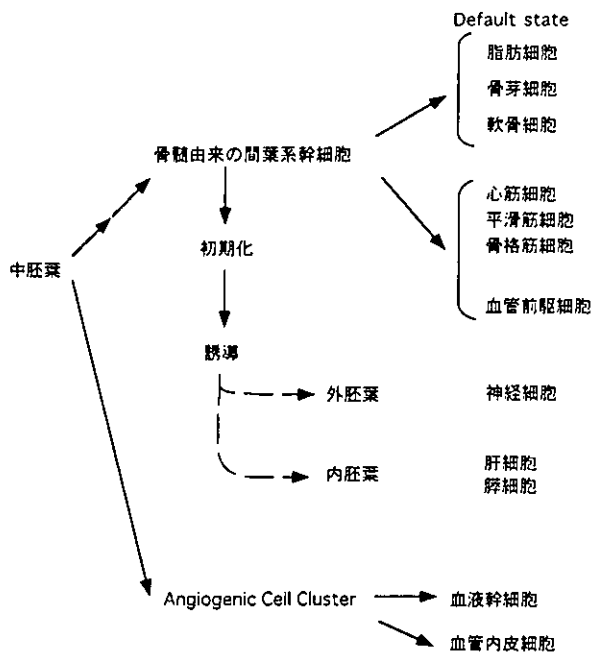


図2 骨髓間質細胞の分化過程の模式図と血球系・血管内皮細胞との位置関係  
 骨髓間質細胞は、分化能に関して予想以上の柔軟性を有し、外胚葉および内胚葉への分化も認められた。しかしながら、血液細胞や trophoblasts (胎盤) への分化はまったく認められてなかった。

剤である 5-azacytidine および amphotericin B によって、骨格筋細胞への分化を示した。骨格筋細胞に特徴的なチューブ状の構造をとり、横紋構造も明らかになった。一方、同じ横紋筋ではあるが、異なる特徴を有する心筋細胞への分化も示す<sup>5)</sup>。骨髓間質より作製した心筋細胞は、特徴的な分岐を伴ったチューブ状を呈し拍動し、この拍動数は 60~180/分である。この収縮がいかなる刺激も必要とせず自動能によって生じていること、さらに収縮がシンクロナイゼーションを伴っている。分化過程で示す活動電位は、「洞結節型」と「Purkinje 型」の二通りがみられる。生理的な心筋細胞の挙動を示す骨髓間質細胞の細胞移植を心筋組織にすることにより、心筋の機能を補填できることが予想された。ごく最近では、骨髓間質を中胚葉以外の細胞に分化させることに成功したという報告が相次いでなされた。間質細胞に限らず、中胚葉由来の血液細胞はニューロンへの分化能を有していることが生体内への移植で明らかとなっている。このように細胞の分化形質に柔軟性がみられるのであれば、胚葉を越えて分化する可能性

が、われわれが従来考えていたよりも高いのではないだろうか。

## V. 「分化の標的化」と「成熟細胞の選択」

間葉系の幹細胞を利用する上で、必要とする細胞を得る方法の確立は最も大事なことである。レチノイン酸、ビタミンC、ビタミンD、デキサメサゾンといった低分子の化合物を処理することで分化の方向付け(標的化)を決めることができる。発生学を基盤とした情報を根拠に、蛋白性の液性因子であるインスリン、BMP-2、FGF-2、トランスフェリンも有効であった。このような分化誘導剤を用いることで分化形質をコントロールすることが可能である。一方、培養ディッシュのコーティングも重要な要素となる。通常の培養ディッシュは、線維芽細胞を増殖させるような仕様となっていると思われ、同時に通常用いる血清も間葉系の細胞を増殖させるのに効果を発揮する。このことは間質細胞を増殖させるには最適であるが、分化を調節するには不適切である。ディッシュ上のコーティングを、目的の分化形質を誘導するのに適切なものに変更することはかなり有効であった。3番目は、確率的に分化した場合、目的の方向に分化した細胞を単離してくることで100%均一な細胞を得ることが可能である。すなわち、表面マーカーを分化系列ごとに決めることでソーティングして行うことができる。このことは、血液細胞、免疫細胞で成功していることをそのまま、適応すると考えればいい。分化した細胞に特異的に active な遺伝子の転写調節領域の下流に蛍光色素をつけ、ソートしてくることで、細胞を純化する方法は予想以上に有効であった。最後に、細胞密度の問題がある。細胞の培養する時に、培養する細胞密度を変更したり、その培養方法(付着性のない培養皿の使用)を変更することにより、明らかに分化の効率を上昇させた。

## VI. 低分子化合物によるリセットで、細胞の「初期値」をクリアできるか?

細胞は、発生過程でそれぞれ固有の分化能を有するようになる。成体の肝細胞は、再生する時は必ず肝細胞または胆管上皮となって結節を作る。リンパ腫の細胞を培養した場合、浮遊細胞以外の

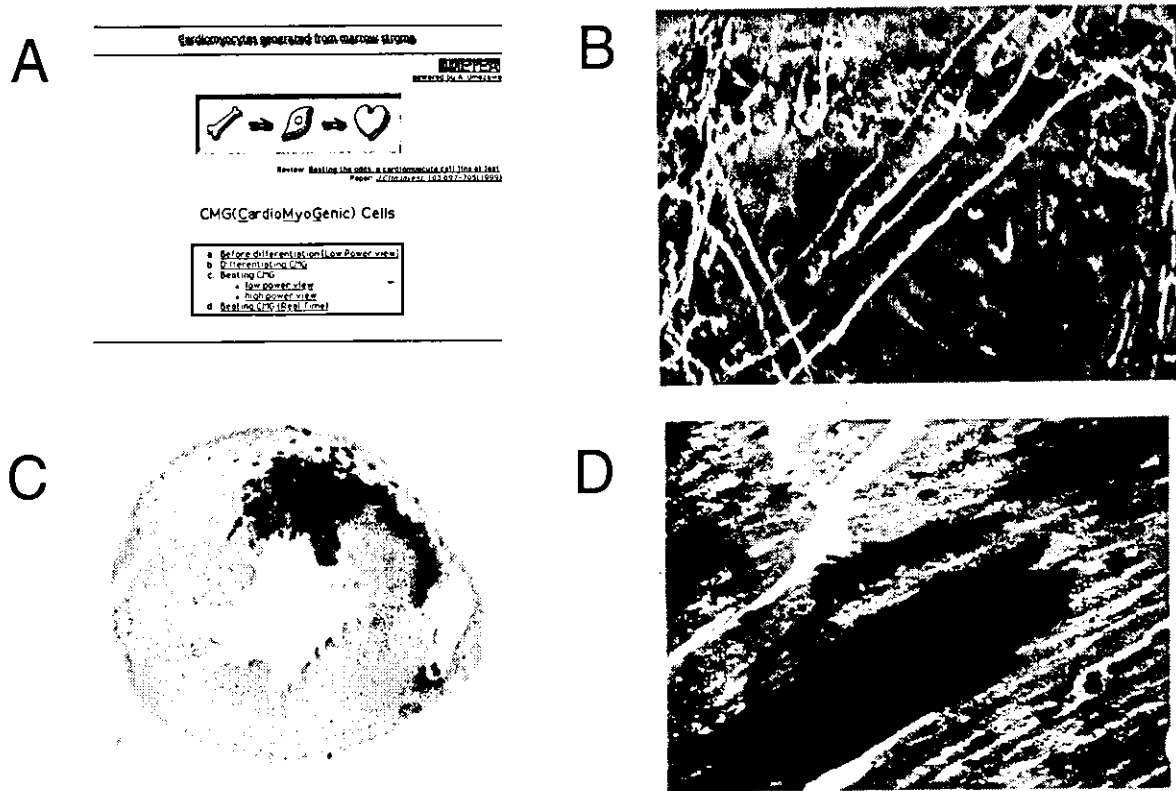


図3 骨髄間質細胞の心筋細胞への分化と心筋細胞の心臓への移植  
 A : 骨髄間質細胞の心筋細胞への分化を示したアニメーション。間葉系幹細胞は、心筋に分化する。間葉系幹細胞に対し、脱メチル化剤である5-azacytidine を処理した。28 日後には心筋のチューブを形成し、収縮を開始する。形態学的にも心筋線維に特徴的な分岐ならびに構造をみる。ウェブサイトに動画を閲覧可能とした。アドレスは、<http://www.med.keio.ac.jp/~au/HTML/>、または、<http://www.med.keio.ac.jp/patho/au/>である。  
 B : 骨髄間質細胞が心筋細胞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 b-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。

形態をとることは基本的にない。その細胞固有の情報、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。クロマチン構築を変化させる物質として、hyperacetylating drug がある。4-phenylbutyrate, sodium butyrate, trichostatin A は、いずれも histone deacetylase inhibitor として知られ、細胞内で不活化されている（発現が高次クロマチン構造で抑えられている）遺伝子の発現誘導が可能となる<sup>3,7)</sup>。骨髄間質細胞に5-azacytidine 単独処理により、心筋細胞をはじめとする興味深い分化形質の新たな出現をみる。しかし、hyperacetylating agents

単独による明らかな効果はみられていない。

### VII. 細胞治療の問題点は、どこまで解決できているのか？

細胞治療における問題点ならびに副作用について考えたい。

1. 細胞を移植した後に、細胞が癌化することはないのか

紹介した研究は、ヒトの結果も含まれるが主にげっ歯類の結果から得られた成果である。げっ歯類の不死化してはいるが、腫瘍化していない細胞を用いた場合、最終的に心筋に移植した場合をいえば、今までのところ、まったく腫瘍化していない。しかし、ここで紹介した細胞移植は *ex vivo* において培養しており、その間に形質転換してし



もう可能性は、完全には否定できない。移植する細胞は、量の問題を考えると、不死化しており絶対に腫瘍化していないものが望ましい。

2. 移植した組織に、目的とは別の分化した細胞が出現してしまうことは重要な問題である。実際にはまったく生じなかったが、心臓に移植した細胞によって骨ができた場合を考えれば、いかに好ましいことでないことがわかる。自験例では、間葉系幹細胞を脾臓に移植した際に骨形成が認められ、同時に脾静脈を介して肝グリソン鞘に骨形成がみられた。

3. 移植した細胞が、膠原線維を初めとするマトリックスをだしてしまい本来の臓器の機能を邪魔することがあるようであれば、これも困る。心筋への細胞の移植を例にあげてみれば、心筋胼胝ないしは小線維化巣を生じてしまうことは予想された副作用の一つであるが、現実には今のところまったく認められない。

4. 自己の細胞を移植する場合は問題にはならないが、使用する細胞が allogeneic combination である場合は、免疫による排除も考えられる。これは、臓器移植でも同様である。異物となってしまうことにより、目的の細胞機能を果たせないばかりか、排除されてしまうことも考えられる。

5. 構築の問題も重要になる。造血系、脳組織、心筋組織は、細胞を注入した場合、比較的構築を考えなくとも、移植した細胞の効果が期待できる<sup>4)</sup>。しかし、肝細胞を考えた場合、産生された胆汁の排出される経路を再生された細胞で構築するのは、難しい。さらに、腎臓、肺臓を考えた場合、細胞が目的の細胞に分化するだけでは不十分であり、細胞が機能するには複雑な構造を要求される。

6. 構築の問題とも関係するが、生体内に細胞を注入した場合、移植した細胞が宿主の細胞との機能的同期（シンクロナイゼーション）できるか<sup>12)</sup>。たとえば、移植された心筋細胞は、隣接する宿主の細胞と協調的に収縮するかどうか、別のリズムを刻まないかどうか。移植された血管内皮細胞は、宿主の内皮細胞とくっついて、作られた血管内に血液が流れるのかどうか。

7. 最後に足場 (scaffold) の問題も、考えておきたい。足場なしに骨芽細胞を移植すれば、目

的の形状をとることなく骨を形成する。骨としての構築は形成しても、マクロレベルでの形状は制御しにくい。簡単な例としては、星形の骨やトゲトゲした骨は、生体内では必要としない。

#### VIII. 組織の機能を代償するために十分な細胞の量と機能は得られるのか？

マウスの研究とヒトの研究で最も異なると考えていることは、量の問題である。ヒト間葉系細胞の増殖は極めて悪く、また老化という問題も大きくかわる可能性がある。細胞移植によって作りだされる組織の量の問題は、たいへん重要な課題である。成人の細胞を用いた場合、培養によって増殖する細胞の量は限られており、移植される組織はかなり小さいものである。成人の細胞で現在治療できる量は、感覚的ないい方をさせてもらえば一寸法師くらいの大さの臓器ならば回復できるが、成人の臓器の機能を回復するには細胞の量が足りない。例外としては、ドーパミン産生細胞<sup>6)</sup>およびインスリン産生 $\beta$ 細胞のような生理活性物質の産生を行い、その量が微量でも有効な場合であると予想される。細胞の増殖停止と細胞の老化という問題は、細胞分化とはまったく別の問題として、克服していかなければならない重要な課題である。

#### IX. 細胞治療を開始するための社会的コンセンサスを得るのは容易と予想する

心不全で苦しむ患者が、多くいる。現実的に心機能を回復する見込みがない場合、脳死患者からの臓器移植か人工心臓しか、本質的な治療としては考えられない。しかし、臓器移植は数が足りず、人工心臓は血栓形成の問題が避けられない。一方、細胞治療は効果の程度を予想するのは慎重になる必要があるのは間違いないが、上記の副作用を差し引いても患者側からの要求、社会的要求が極めて高くなると私は考えている。

おわりに

間葉系細胞の遺伝病であり、骨芽細胞のコラーゲン I 型の産生を認めないことにより骨の変形を伴う骨形成不全症の患者に間葉系幹細胞の細胞移植が試みられている<sup>8)</sup>。細胞移植は、allogeneic

combinationで行われた。3名の患者いずれも、間葉系幹細胞が骨に生着し、骨形成を促進し、成功例として報告されている。癌の再発例の患者や抗癌剤の大量投与の患者に対しても間葉系幹細胞を投与され、細胞治療への可能性が広がっている。「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、医療適応を念頭にした場合最も現実的であると、考えている。

謝辞 再生医療システムの特集号に、「新しい生体マイクロデバイスとしての骨髄間質細胞」について書く機会を与えていただきましたことを、赤池敏宏教授に心より深謝致します。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進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 淳氏との議論は、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 悟氏、阿部 仁氏により樹立され、クローニングされたものです。

## 文 献

- 1) Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C. *et al.*: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147, 1999.
- 2) Umezawa, A., Maruyama, T., Segawa, K. *et al.*: Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J. Cell Physiol.* 151: 197-205, 1992.
- 3) Mielnicki, L.M., Ying, A.M., Head, K.L. *et al.*: Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 249(1): 161-176, 1999.
- 4) Gojo, S., Kitamura, S., Hatano, O. *et al.*: Transplantation of genetically marked cardiac muscle cells. *J. Thora. Cardiovasc. Surg.* 113(1): 10-18, 1997.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Chiurazzi, P., Pomponi, M.G., Pietrobono, R. *et al.*: Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 8(12): 2317-2323, 1999.
- 8) 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.
- 9) Prockop, D.J.: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74, 1997.
- 10) Gerson, S.L.: Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens. *Nat. Med.* 5(3): 262-264, 1999.
- 11) Vogel, G.: Can old cells learn new tricks? *Science* 287: 1418-1419, 2000.
- 12) 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.

## 骨髄間質細胞

梅澤明弘\*

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。間質細胞は、骨髄中で網目構造をしており、血液細胞とのあいだで種々の連絡があり、その連絡を介して血液細胞は増殖・分化する。骨髄中の間質細胞は、造血への支持能力があることでその生理的役割がある。このような間質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」とよぶ。ここでは、骨髄中に存在する間質細胞が、細胞移植をおこなううえで有用であることを示す。独自に樹立した骨髄間質細胞は、興味深いことに骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞そして心筋細胞としての表現形質を示した。多分化能を有する間葉系幹細胞が骨髄中に存在することが予想され、その移植可能性を検討した。

### はじめに

造血は、線維芽細胞、前脂肪細胞、内皮細胞、ならびにマクロファージよりなる造血微小環境によって支持される。造血幹細胞は自己複製能を有し、骨髄間質細胞から産生される液性因子および細胞外マトリックスによって増殖分化が調節される(図①)。同時に、細胞の膜上分子およびギャップ結合を介した細胞間連絡によって調節され、造血幹細胞としての多分化能が維持されている。この骨髄培養は、長期にわたって顆粒球系ならびに巨核

#### Key Word

骨髄間質  
間葉系幹細胞  
メチル化  
ニューロン  
骨

球系の細胞産生を維持する。一方、骨髄間質細胞も、造血細胞同様に多分化能を有する。現在、骨髄間質細胞中に存在する幹細胞を同定することはむずかしい。血球細胞とは異なり、分化のマーカークが十分とはいえないことがその理由である。

### 1. 骨髄中で骨髄間質細胞は細網構造をとり、造血微小環境を形成する

組織学的には、骨髄間質は造血を維持するためにお互いが網様構造をとり、ネットワークを形成している(図②)。この構造において、造血細胞は間質細胞と直接ないしは間接的に連絡することができる。Dexter ら<sup>1)</sup>はマウスの骨髄の初期培養系を確立し、多能性幹細胞の維持が可能であることを示した(図③)。この系においては、さまざまな種類の骨髄間質細胞が造血微小環境に存在していることが示された。主たる細胞成分としては、線維芽

\* UMEZAWA Akihiro/慶應義塾大学医学部病理学

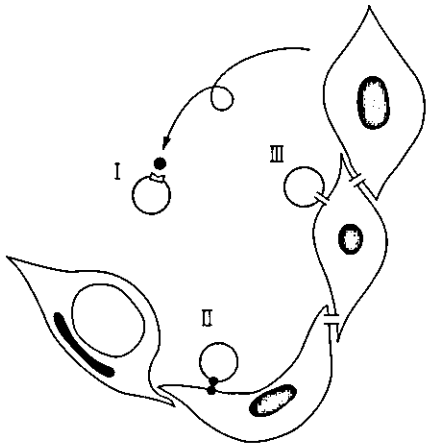


図1 骨髓間質の本来の造血に対する役割のモデル図

(Umezawa *et al*, 1991<sup>9)</sup>より改変引用)

骨髓間質細胞と血液細胞との細胞相互作用を表した。CSF-1をはじめとする液性因子を介する交流(I), 膜上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。ギャップ結合はおもにコネクシン43を発現しており, 脂肪細胞への分化過程ではその交流は消失する。また, 脂肪細胞へ分化すると液性因子も発現しなくなる。

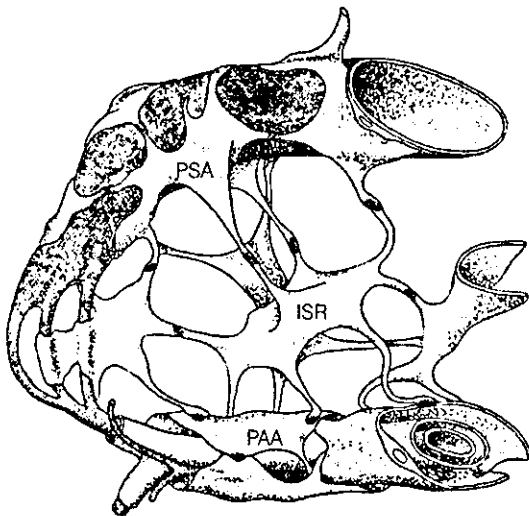


図2 骨髓における間質細胞によって形成される細網構造

(Watanabe *et al*, 1985<sup>9)</sup>より改変引用)

電子顕微鏡による詳細な解析<sup>9)</sup>から, 図中に示すような細胞に分類している。PSA: perisinusoidal adventitial cells, ISR: intersinusoidal reticular cells, PAA: periarterial adventitial cells. これらの分類はあとに述べる機能的分類とは強い相関を認めないが, このような細胞がネットワークを形成して細網構造をとり, 造血微小環境を形成する様子が形態ではよくわかる。

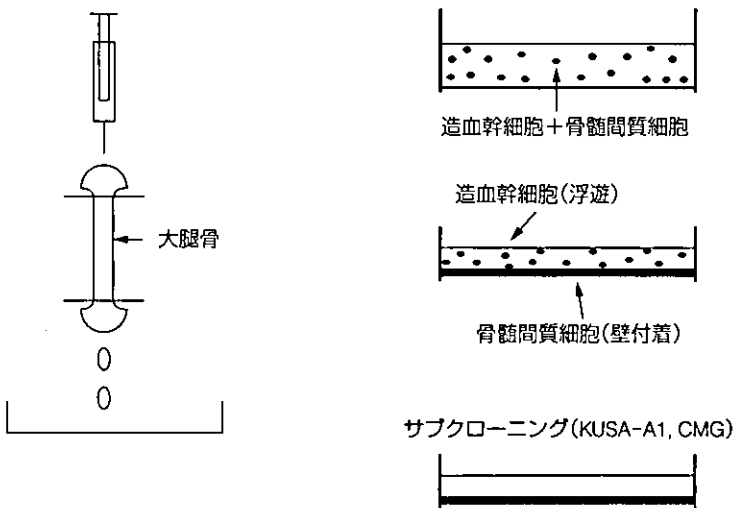
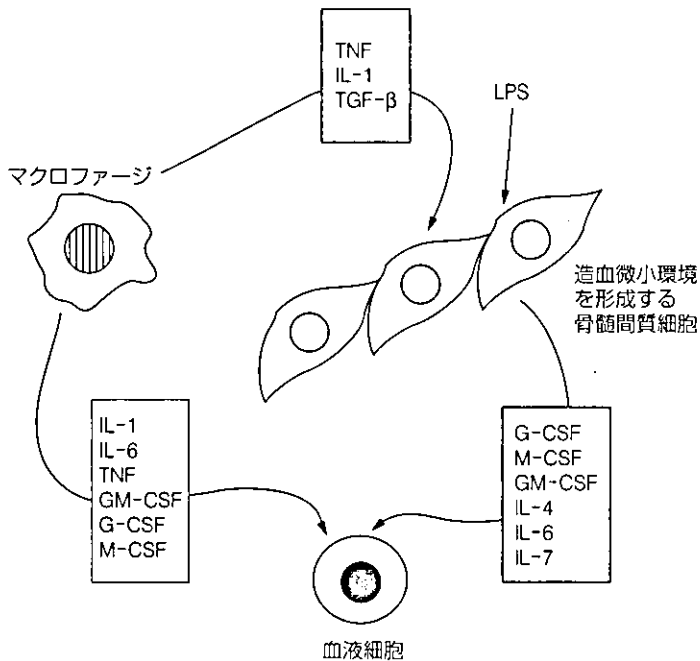


図3 骨髓初期培養の模式図

骨髓の初期培養のおもな目的は, 造血系の幹細胞が維持されることである。この造血幹細胞の維持には, 壁付着細胞(間質細胞)の関与が必須である。いままで付属品と考えられてきた骨髓間質細胞が, 予想以上の分化能を有していることが明らかになってきた。そのことは細胞治療の材料として利用可能であることを意味し, また遺伝子治療の標的となる細胞としても注目を浴びている。



図④ 造血微小環境における液性因子による細胞間連絡

細胞，前脂肪細胞，脂肪細胞，内皮細胞，骨芽細胞ならびにマクロファージがあげられる。

骨髄の初期培養のためには，図③に示すように大腿骨をむきだしにする。周囲の骨格筋，結合織を除去し，大腿骨のみとする。さらに，その両端を切りとり，骨髄をむきだしにする。片方から，培養液を注入し，骨髄細胞をとりだす。とりだされた細胞を培養系にもってくるわけであるが，間質細胞の特徴として壁に付着するために浮遊細胞である血液細胞とは容易に純化することが可能である。培養皿に付着する間質細胞にもぐりこむように，幼弱な血液細胞が入りこんで維持されることがある。壁に付着する細胞には，マクロファージとともにさまざまな間質細胞が存在し，造血系とのあいだでさまざまなサイトカインによる調節がなされる(図④)。初期培養では，不均一な分化能を有した何種類かの間葉系の細胞が含まれる。しかし，継代を重ねることによって，線維芽細胞の形態ないしは紡錘形の形態をとる間質細胞のみが培養されるようになる。培養初期では間質細胞は不均一な集団であるが，やがては均一な集団になってくる。その後は，目的の分化形質を有する間質細胞をクローニング・シリッジを用いてサブクローニングする。

## 2. 骨髄間質細胞を不死化させることで，研究材料そして道具としての価値が高まった

培養された骨髄間質細胞を不死化しようと考えたのは，ある意味でコロブスの卵的な発想であった。当時は不死化された細胞はすでに多く存在した。同時に骨髄の初期培養がなされたのであるから，壁付着細胞の単一細胞をクローニングする試みは意味づけがむずかしかった。しかしながら，継代を重ねることで自然に不死化させることでマウスの間質細胞を得ることに成功した。また，得られた間質細胞の上清は明らかに造血細胞を維持する能力を有していたことから，その後数多くのマウス由来の骨髄間質細胞株が樹立された<sup>2)</sup>。脂肪細胞・骨芽細胞に分化する細胞を得られたことは，間質細胞が骨髄由来であることを考えると当然のように思えた。あたりまえのことを実現できることはそれはそれですばらしいことで，その後は造血幹細胞を維持できる細胞株も得られ，骨髄培養は一気にその重要性，再現性ならびに実現性が増した。

その後，ヒトの間質細胞の不死化が試みられた。ヒト間質細胞の場合は自然に不死化することはなかった。そ

のため、SV 40 ラージ T 抗原を導入することによって、不死化することに成功した。不死化したヒト間質細胞株からは、造血を支持可能な液性因子の産生が同定され、その研究はきわめて興味深い対象となった。しかしながら、SV 40 ラージ T 抗原を導入すると不死化はするものの同時にトランスフォームしてしまい、分化形質を明瞭には示さなかった。現在、トランスフォームすることなく不死化する細胞を得るために、テロメラーゼの導入が検討されている<sup>9)</sup>。各種成体幹細胞がテロメラーゼで不死化できるかどうかは基礎的な観点からもこの分野での最も重要な研究課題の一つである。完全な証明はないが、不死化していない神経系幹細胞では神経分化のシグナルが入るまでは RB 遺伝子は不活化されていると考えられている。また幹細胞増殖因子(神経系幹細胞の場合は、FGF 2)は RB 遺伝子の不活化にはたらいっていると考えられている。ゆえに、骨髄の間葉系幹細胞もテロメラーゼと幹細胞増殖因子(血清あるいは FGF 2)を組みあわせることによって長期間培養を維持できる可能性は十分にあると考えられる。このことは、間質細胞の製剤化を考えるうえできわめて重要になってくる。

### 3. 骨髄間質細胞の表面マーカーの研究により、目的の分化能を有する前駆細胞を単離できるようになった

CD 34 は重要な表面マーカーの一つである。CD 34 は造血幹細胞ならびに間質細胞のいずれにも発現が認められる。CD 34 を有していない骨髄間質細胞は造血を試験管内で支持することはできない。CD 34 は未分化な造血細胞の表面マーカーばかりでなく、未分化な間葉系細胞のマーカーとしても知られる。また、STRO-1 によって規定される細胞も未分化である。V-CAM-1 はリンパ球系の前駆細胞の結合に関与する。Kit リガンドは造血幹細胞の増殖に必要なだけでなく、造血幹細胞の造血微小環境への生着に直接関与する。

間質細胞の性質が、液性因子ならびに膜上の分子に関して詳細に検討しつくされると、間質細胞そのものに対する研究自体は徐々に少なくなってきた。一方、再生医学に対する研究の進歩と同時に、幹細胞に関する研究の進歩はめざましいものがあった。その流れのなかで骨髄

中に間葉系幹細胞が存在することが明らかにされ、再び骨髄由来の間質細胞が注目を浴びることになった<sup>67)</sup>。骨髄間質細胞は、骨芽細胞、脂肪細胞、ならびに軟骨芽細胞に分化することが知られていたが、それ以外の分化形質に対しても検討が加わった(図 9)。このような多分化能を有する骨髄間質細胞は、年齢とともに減少してくる。この骨髄間質細胞に存在する幹細胞の同定は、その数が少ないこと、表面マーカーがいまだに明らかにされていないことから現在でもむずかしい。骨髄より間葉系幹細胞を管理、精製してくるには、表面抗原とそれに対する抗体を準備する必要がある。さらに抗体によって認識される抗原の有無によって規定された細胞系列をすべて明らかにすることは、これからの研究対象となる。

### 4. 細胞治療のソースとして、骨髄間質を考える

骨髄間質細胞を考えるうえで、Osiris 社の臨床に向けての試みは重要な意味をもつ(Osiris Therapeutics Inc., Press release, 19990608)。Osiris 社は、骨髄間葉系幹細胞を用いた臨床安全性試験を開始した。化学療法と造血幹細胞移植を受けているがん患者を対象に、ヒト間葉系幹細胞製剤の安全性をみる臨床試験を開始している。間葉系幹細胞の製剤はドナーから提供される輸血製剤で、前臨床試験で拒絶反応と移植片対宿主病(graft versus host disease : GVHD)を起こすことなく移植を補助することに成功したと発表している。第 I 相臨床試験では、組織が適合する親類ドナーからの造血幹細胞と併用した。組織が適合する患者の親類から採取した少量の骨髄の検体からヒト骨髄間葉系幹細胞を分離し、3,000 倍以上に増殖させて用いた。これらの幹細胞の移植は、がんの治療そのものが造血細胞ならびに間葉系幹細胞いずれをも破壊することにより必要となってくる。Osiris 社のこのプログラムは間葉系幹細胞を移植することによって骨髄の微小環境を再生することと正常の骨髄機能を回復するためにおこなわれる。

Osiris 社は骨髄由来の単核細胞中に占める間葉系幹細胞の割合と年齢との関係に関するデータを発表した。新生児は 1 万分の一くらいに間葉系幹細胞が存在するが、10 歳代の人では 10 万分の一に、35 歳では 25 万分の一、

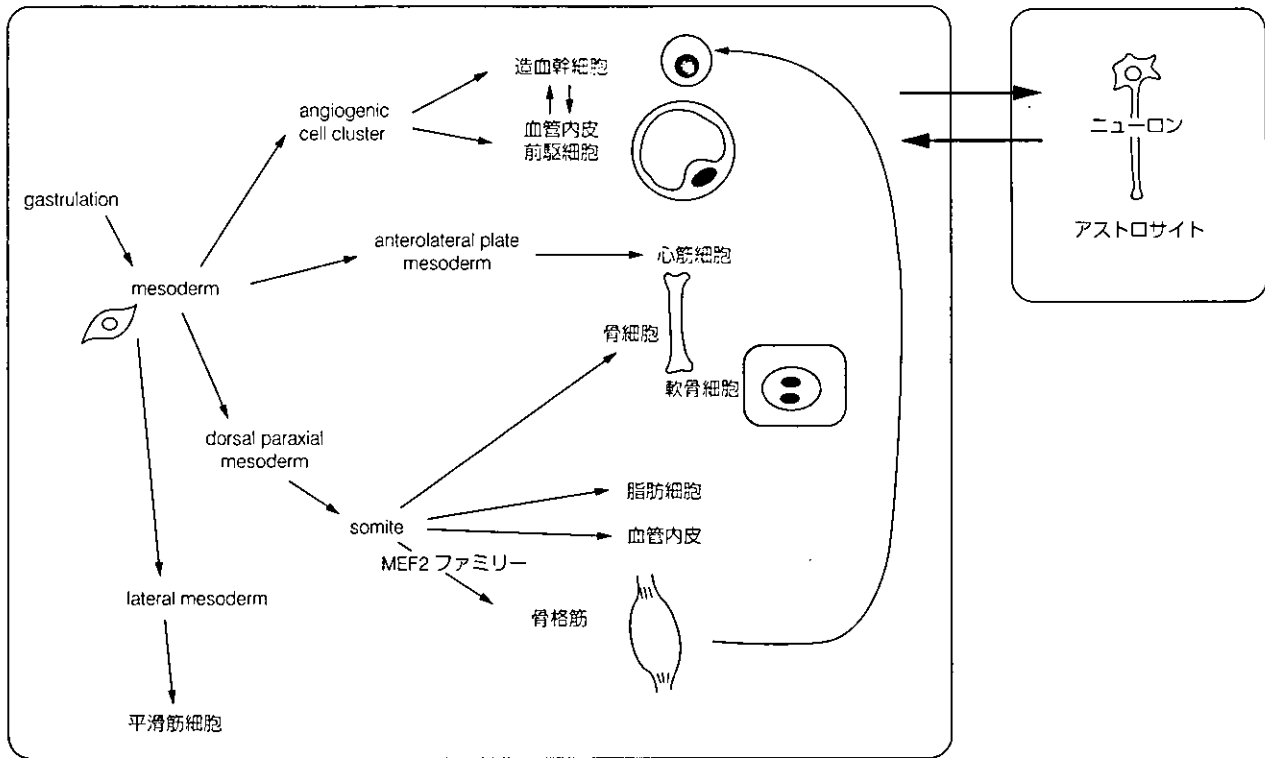


図6 骨髄間質細胞に含まれる間葉系幹細胞の分化系図

骨髄間質細胞は、図に示すようなさまざまな細胞に分化可能である。ここで注目しなくてはならないのは、中胚葉に由来する骨髄間質細胞が神経細胞への分化能を有していることである。また、逆に神経系の細胞が、血液細胞への分化を示すという報告もされた。

50歳では40万分の一、80歳では200万分の一に減少する。Osiris社によると、年齢とともに数は変動するが性質には変化がないと報告している。したがって、若い人からのほうが取得は容易であると考えられる。それでも10歳代の人で間葉系幹細胞の数は10万分の一であるから分画が重要であるのも確かである。

### 5. 骨髄間質には、本来、骨・軟骨・脂肪を形成する前駆細胞が存在する

本来の骨髄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もともとそなわった分化能と考えられる<sup>5)</sup>。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。今回紹介する骨髄間質細胞 KUSA-A 1 は、骨細胞へ分化する<sup>7)</sup>。KUSA-A 1 細胞は生体内において、効率的に骨を形成する。この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(骨形成率 100%)。同細胞の骨細胞としての

特徴はきわだっており、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、ある大きさをも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することはまったくない。同時に、この細胞は分化形質を有したまま不死化している。その事実、KUSA-A 1 細胞がすべての細胞製剤を考えるうえでの貴重なモデルとなることを意味する。

骨髄間質から単離された骨芽細胞の分化は、グルココルチコイド、ビタミン D によって誘導される。骨芽細胞と脂肪細胞に分化可能である bipotential な前駆細胞は、さまざまなホルモンによって分化が逆相関の関係にある。たとえば、ビタミン D は脂肪細胞の分化を抑制し、骨芽細胞の分化を促進する。このことは、オステオカルシンの転写物の増加によって示されている。BMP 2 は、骨芽細胞の分化を促進する。すなわち、アルカリホスファターゼの合成を上昇させ、オステオカルシン合成を上

昇し、副甲状腺ホルモンの感受性を上昇させる。

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) における治療法の一つとしても骨髄間質細胞の本来の分化能を利用しようとする考えがある。関節損傷部位における軟骨細胞移植もその一つである。広範囲軟骨欠損部位における軟骨再生治療において、骨髄間質細胞を用いた細胞治療の研究が試みられている。骨髄の間質細胞は血液細胞の造血支持細胞であるが、骨、軟骨、脂肪細胞へ分化する。現在、臨床的におこなわれている軟骨細胞移植においては、自家組織の軟骨を関節鏡視下で採取し、その軟骨を培養増殖させ軟骨欠損部に移植する。この方法では慢性関節リウマチにおける広範囲の軟骨欠損の症例において必要軟骨量を確保できないこと、また移植が広範囲になるほど移植した細胞がはがれやすいという欠点がある。それに対し骨髄間質細胞を用いる場合、細胞の増殖能力が高くかなりの細胞数が得られること、また間質細胞をそのまま移植する場合において、移植部位で軟骨への分化誘導がおこなわれ周囲との親和性が強まることなどが利点としてあげられる。現在、マウスにおいて、骨髄細胞由来の骨細胞へ分化する骨芽細胞株、軟骨へ分化する細胞株をもちいて骨軟骨の関節をつくる研究が進んでいる。ヒトへの応用においては、骨髄間質細胞より、骨、軟骨へ特異的に分化する細胞をとりだし、軟骨細胞への分化誘導をおこない、もしくは間質細胞の状態での移植がおこなわれている。現在この研究はスタートしたばかりであるが、近い将来、骨髄間質が骨軟骨の細胞治療のソースとして、再生医学の中心となることが十分考えられる。

## 6. 骨髄間質細胞は、分化能に関し意外な柔軟性を示す

骨髄中から単離したにもかかわらず、骨髄間質細胞は驚くべき分化能を有している。脱メチル化剤である5-アザシチジンおよびアムホテリシンBによって骨格筋細胞への分化を示した。骨格筋細胞に特徴的なチューブ状の構造をとり、横紋構造も明らかになった。一方、同じ横紋筋ではあるが、異なる特徴を有する心筋細胞への分化も示す。骨髄間質細胞 CMG は、心筋細胞へ分化する<sup>9)</sup>。CMG 細胞は心筋に特徴的な分岐をともなったチューブ

状を呈し拍動し、この拍動数は60~180/分である。この収縮がいかなる刺激も必要とせず自動能によって生じていること、さらに収縮がシンクロナイゼーションをともなっていることを明確にした。分化過程でCMG細胞の示す活動電位は、「洞結節型」と「プルキンエ型」の2通りがみられる。まず、洞結節型では第4相にて電位が浅くなり、活動電位は60 msec と長い。一方、プルキンエ型では2峰性を示し、持続時間は100 msec とやはり心筋に特徴的で長い。第4相で活動電位が浅くなるのは、自動能を有する細胞であることを示唆する。心臓を形づくる転写因子の発現も認められ、CMG細胞が心筋に分化していることは明らかである。生理的な心筋細胞の挙動を示す骨髄間質細胞の細胞移植を心筋組織にすることにより、心筋の機能を補填できることが予想された。

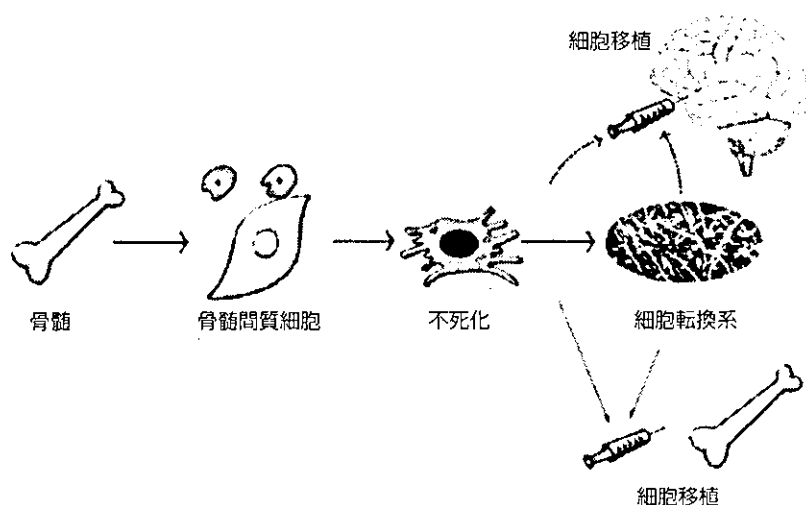
Pittenger ら (Osiris Therapeutics inc.)<sup>9)</sup> は、ヒト骨髄より多分化能を有する細胞 (間葉系幹細胞) を培養して、心筋細胞に分化するかどうかを検討した (表1)。骨髄由来の細胞 (CD 34<sup>-</sup>, CD 45<sup>-</sup>, CD 14<sup>-</sup>) を1プレートあたり5万細胞で培養し、種々の分化因子で3日間処理した。その後、18日間培養してマーカーであるデスミンおよび $\alpha$ アクチニンの発現を調べた。デスミン陽性の細胞は多核になっているが、横紋筋の構造はできていない。また、陽性の細胞だけをクローン化するという操作もおこなっていない。したがって現時点では、*in vitro* で完全な心筋細胞へ分化できる細胞があるかどうかについては結論することができない。しかし、ある程度マーカー発現する細胞が存在することから、*in vivo* での分化を検討した。ラットの左冠動脈を45分間閉塞させ、2週間おいた心筋梗塞モデルの梗塞部位に2週間培養して標識したヒト間葉系幹細胞を100万個移植した。6週間追跡した結果、標識したヒト間質細胞が生存しており、その一部がトロポミオシン、トロポニンT、 $\alpha$ アクチニンなどの心筋マーカーを発現していた。今後、機能的に回復がみられるかどうか、大型の動物でも可能かどうかについて検討を加えていくと報告している。

このような予期せぬ分化能に関する報告がつついていく。骨髄細胞 (間葉系か血液系かはわからない) が肝の幹細胞 (oval cells) に分化することが示された<sup>10)</sup>。また、神経系細胞が造血細胞になることがやはり生体内で明らか



表① ヒト間葉系幹細胞に対する種々の誘導剤による心筋細胞への分化

添加物	濃度域	至適濃度	マーカの発現
トリ胎児抽出物	1~10%	25%	yes
レチノイン酸	0.01~100 mM	0.1 mM	yes
ウアバイン	0.01~1mM	≦0.01 mM	yes
5-アザシチジン	3~10 mM	10 mM	yes
2-デオキシ-5 アザシチジン	300 nM		no
6-チオグアニン	1~3 mM	1~100 mM	yes
トリコスタチン A	3~300 mM		no
ソディウムブチレート	1 mM		no
HMBA	0.01~30 mM		no
ヘミン	1.5 nM~150 mM	0.1~10 mM	yes
DMSO	0.1~1.5%		no



図⑥ 骨髄間質細胞をもちいた細胞移植

骨髄中から、初期培養によって間質細胞を単離する。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、不死化させておくことと便利である。これらの細胞をリセットし脱分化させるか、または細胞転換(meta-differentiation, trans-differentiation)させることで異なる細胞へ分化させる。ここでは、骨髄間質細胞は終末分化した細胞と考えている。もともと、間葉系の幹細胞が骨髄中に存在している可能性もある。

となった<sup>11)</sup>。骨髄間質細胞については、最近、間葉系以外の細胞への分化も報告され、その真偽とは別に骨髄間質の研究は新たな展開を迎えた。簡単な分化誘導によって、骨髄間質は、神経特異的エノラーゼ、NeuN, neurofilament-M, tau の神経形質を示した<sup>12)</sup>。神経成長因子(nerve growth factor: NGF)のレセプターである trkA の発現もみられた。形態学的には、神経に類似した突起を有し、growth cone もみられているようである。このことは間質が中胚葉系へ運命づけられた分化を放棄し、外胚葉形質を示すという点で画期的である。しかしながら、その解析は十分とはいえず、神経組織への細胞治療の可能性を考えると、今後の正確な研究結果が待たれる。

### 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注目されている。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(図⑥)。骨髄間質細胞をもちいることを細胞治療の「事実上の標準仕様」とすることが、医療適応を念頭にした場合最も現実的であると考えている。

●謝辞

秦 順一研究室に、筆者は所属する。岡野栄之博士、桜田一洋博士、福田恵一博士、五條理志博士、今林英明先生との議論は、いつも刺激的であった。

文 献

- 1) Dexter TM *et al* : Stimulation of differentiation and proliferation of hematopoietic cells *in vitro*. *J Cell Phy* 82 : 461-470, 1977
- 2) Harigaya K *et al* : Murine bone marrow cell line producing colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci* 78 : 6963-6966, 1981
- 3) Watanabe Y : Fine structure of bone marrow stroma. *Acta Haematologica Jpn* 48 : 1688-1700, 1985
- 4) 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
- 5) Morales CP *et al* : Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 21 : 115-118, 1999
- 6) Pittenger MF *et al* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999
- 7) Umezawa A *et al* : Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J Cell Physiol* 151 : 197-205, 1992
- 8) Makino S *et al* : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1999
- 9) Pittenger MF *et al* : Weinstein Cardiovascular Development Conference, Tucson, Arizona, 1999, pp. 20-23
- 10) Petersen BE *et al* : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 : 1168-1170, 1999
- 11) Christopher RR *et al* : Turning Brain into blood : a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283 : 534-537, 1999
- 12) Woodbury D *et al* : Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61 : 364-370, 2000

うめざわ・あきひろ 1960年、千葉生まれ。  
専門は病理学。研究テーマは骨髄間質細胞を新しい生体  
マイクロデバイスにみたく、その分化能の可塑性を利用  
した細胞治療によるグローバルな臓器の再構築。

## 間葉系幹細胞研究の現状と展望

## 生体マイクロデバイスによる「臓器」再構築

梅澤明弘

幹細胞には、さまざまなレベルが存在する。例えば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と同時に、神経系への分化も明らかにされ、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出てきた。

## はじめに

幹細胞とひとくちに言ってもさまざまなレベルが存在しており、それぞれの幹細胞の分化能で分類することが可能である。まず、全能性を有しており、すべての細胞に分化できる幹細胞が考えられる (totipotency: 全能性幹細胞)。次に、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が存在する (pluripotency)。さらに、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がある (multipotency: 多能性幹細胞)。幹細胞というからには多くの種類の細胞へ分化する能力を保持してはならないが、2つの細胞に分化する場合でも bipotential stem cell や bipotential progenitor cells と呼ぶことがある。多能性肝細胞の

中で最も有名なのが、顆粒球系、赤芽球系、巨核球系の三系統の細胞に分化する造血系幹細胞である。一方近年、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。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並みの分化能を有していることが明らかにされつつある。さらにこの間葉系幹細胞は、正常組織のターンオーバーに必要な前駆細胞、ならびに欠損した組織の修復に利用される前駆細胞の供給源となる。

## 間葉系幹細胞システムを供給する骨髄間質

間葉系幹細胞のソースとして、骨髄中に存在している間質細胞が注目されている。間葉系細胞は、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血からも採取でき、より正確に言えば、あらゆる組織の初期培養を行えば、間葉系細胞が培養されてくる。これは間葉系細胞に対して最も適切な条件で、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他ならない。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は、間葉

## [キーワード]

間葉系幹細胞, 骨髄間質, 細胞移植, 再生, 可塑性

Mesenchymal stem cells are versatile as a source of cell therapy

Akihiro Umezawa: Keio University School of Medicine, Department of Pathology (慶応義塾大学医学部病理学)

E-mail: au@med.keio.ac.jp

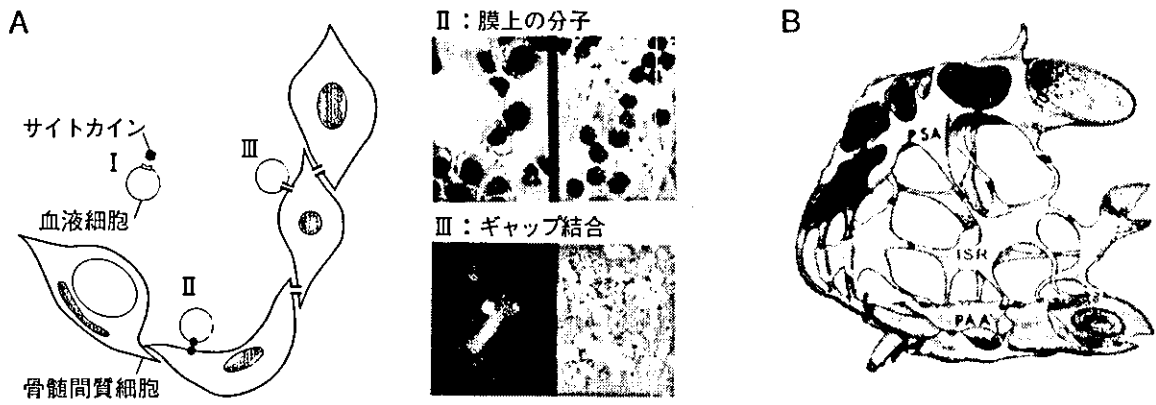


図1 骨髄間質の本来の造血に対する役割のモデル図

A) 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。膜上の分子を介した連絡 (II) では、血液細胞単独では増殖する (黒く示されている) のに対し (写真左)、間質細胞の上では全く増殖しない (写真右) ことが示されている。一方、ギャップ結合を介した連絡 (III) では、ある特定の細胞が間質細胞との間には存在していることを色素移入法 (写真左) と位相差顕微鏡像 (写真右) で示している。B) 骨髄における間質細胞によって形成される細網構造を表している。この図は、電子顕微鏡による詳細な解析から予想された。形態学的に以下の細胞に分類している (PSA : perisinusoidal adventitial cells, ISR : intersinusoidal reticular cells, PAA : periaarterial adventitial cells)。これらの分類は後に述べる機能的分類とは強い相関を認めないが、このような細胞がネットワークを形成して、細網構造をとり造血微小環境を形成する様子が形態的によくわかる

系細胞がよく増殖する。しかし、「どんな細胞が間葉系幹細胞のソースとして最も適切か」という問いに対しては、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<sup>1)</sup>ことから、最も現実的な間葉系幹細胞の供給源と考えられる。

造血は、線維芽細胞、前脂肪細胞、内皮細胞、ならびにマクロファージよりなる造血微小環境によって支持される。骨髄間質細胞から産生される液性因子および細胞外マトリックスによって血液細胞の増殖分化が調節される<sup>2)</sup> (図1)。同時に、細胞の膜上の分子およびギャップ結合を介した細胞間連絡によっても調節され、血液細胞が維持されている。組織学的には、骨髄間質細胞は造血を維持するために、お互いが網様構造を取りネットワークを形成している<sup>3)</sup>。この構造において、造血細胞は間質細胞と直接ないしは間接的に連絡することができる。Dexterは、マウスの骨髄の初期培養を確立し、多能性幹細胞の維持が可能であることを示した<sup>1)</sup>。骨髄の初期培養では、間質細胞の培養皿の壁に付着する特徴から浮遊細胞である血液細胞とは容易に分離することが可能である。

## 2 間葉系幹細胞の「分化の標的化」と「成熟細胞の選択」

間葉系幹細胞を骨髄間質から単離し、目的の分化形

質を有する細胞を得るまでにはいくつかの方法ならびにステップがある (図2)。中でも、間葉系幹細胞を特異的に培養して育てることが可能な培養条件がある。もともと培養当初は間葉系幹細胞は少量であり、骨髄由来の単核細胞中に占める間葉系幹細胞の割合は、新生児は1万分の1くらいであるが、10歳代の人では10万分の1に、35歳では25万分の1、50歳では40万分の1、80歳では200万分の1に減少する。年齢とともに数は変動するが性質には変化がない。したがって、若い人の方が取得は容易であると考えられる。

間葉系の幹細胞を利用する上で、必要とする細胞を単離する方法の確立は最も大事なことである。例えば、低分子の化合物を処理することで分化の方向付け (標的化) を決めることができる。またタンパク性の液性因子であるインスリン、BMP-2、FGF-2、トランスフェリンも有効である。このような分化誘導剤を用いることで分化形質を調節することが可能である。一方、培養皿上のコーティングを、目的の分化形質を誘導するのに適切なものに変更することはかなり有効であった。間葉系幹細胞 (CD45<sup>-</sup>/GlyA<sup>-</sup>) を維持する培養方法の1つの例として、フィブロネクチンでコートしたディッシュ上に IGF, PDGF, アスコルビン酸, dexamethazone, リノレン酸を含んだ2%FCSで培養することがあげられる。