

図2 骨髓初期培養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得るまでの模式図

骨髓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

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。これには2つの方法があり、1つは表面マーカーによる単離である。現在、骨髓間質細胞中に存在する幹細胞を同定することは難しい。血球細胞とは異なり、分化のマーカーが十分とはいえないことがその理由である。そんな中、CD34は、重要な表面マーカーの1つである。CD34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。CD34を有していない骨髓間質細胞は造血を試験管内で支持することはできない。CD34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の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。

もう1つの方法は、幹細胞に特異的に発現する遺伝子の cis-element を利用することである。遺伝子そのものの転写調節領域を利用するか、または転写因子の結合配列をタンデムにつなげた配列により蛍光を発するタンパク質の遺伝子を発現させ、フローサイトメトリーで単離してくる。近年、骨、軟骨、脂肪、骨格筋、心筋に特異的な転写因子が同定されており、幹細胞だけでなく、各分化段階における細胞を精製するた

めにもこの方法は有効である。

この骨髓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難しい。骨髓より間葉系の幹細胞を管理、精製するには、表面抗原とそれに対する抗体を準備する必要がある。さらに抗体で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、今後の研究対象となる。

3 間質細胞の「default state (初期値)」と脱メチル化剤による初期化

培養系に骨髓の細胞をもってきて造血細胞を除くと、そこには脂肪細胞および骨芽細胞が単離されてくる(図3)。すなわち、何も処理をしなければ、骨髓間質細胞は脂肪細胞か骨芽細胞に分化するか、まれに軟骨に分化することになる。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。間葉系幹細胞から分化し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bipotentな前駆細胞は、さまざまなホルモンによってそれぞれの分化が逆相関の関係にある。例えば、ビタミンDは脂肪細胞の分化

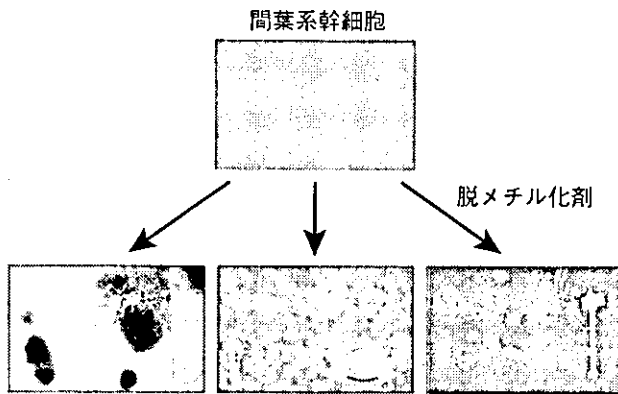


図3 間葉系幹細胞の分化系図

間葉系幹細胞は、試験管内においてさまざまな分化形質を示す。「骨細胞」への分化(左)は、カルシウムの沈着をコッサ染色で示している。「脂肪細胞」への分化(中央)では、細胞内に脂肪滴の存在がみられる。この脂肪滴は Oil-Red O 陽性であり、細胞内で合成されている。分化過程で脂肪合成酵素の発現が誘導されている。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(右)。このときには、脱メチル化剤を使う

を抑制し、骨芽細胞の分化を促進する。このことは、osteocalcin 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活性を上昇させ、osteocalcin の合成を上昇し、PTH の感受性を上昇させる。

骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨芽細胞は、もともとの骨髄間質の初期値として設定されていた状態であるので、誘導剤を用いることで分化させることができる。一方、心筋細胞、骨格筋細胞、神経細胞、血管内皮を間質細胞よりつくる場合は、この骨髄間質細胞の初期値をリセットする必要がある。細胞の固有の状態(初期値)は、その細胞のゲノム上のクロマチンまたはメチル化という修飾状態または高次情報として決められているので、その細胞の固有の状態を解除するために脱メチル化剤として5-azacytidineを使用する。正確に言えば、ある一定のきわめて低い頻度で間質細胞が心筋細胞、骨格筋細胞、神経細胞に分化することは知られているが、その頻度を極端に上昇させるには脱メチル化剤はきわめて有用である⁴⁾。

4 間葉系幹細胞の可塑性 (plasticity)

骨髄中から単離したにもかかわらず、間葉系幹細胞は驚くべき分化能を有している。上述したように、脱

Cardiomyocytes generated from marrow stroma

UMETEA
powered by A.Umezawa

Review : Beating the odds : a cardiomyocyte cell line at last
Paper : *J. Clin. Invest.* 103 : 697-705 (1999).

CMG (CardioMyoGenic) Cells

a. Before differentiation (Low Power view)

b. Differentiating CMG

c. Beating CMG

- low power view
- high power view

d. Beating CMG (Real Time)

図4 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がみられる。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/HTML/> または、<http://www.med.keio.ac.jp/patho/au/> である

メチル化剤である5-azacytidineおよびamphotericin Bによって、顕著な骨格筋細胞への分化を示す。ま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⁴⁾(図4)。間葉系幹細胞は心筋に特徴的な分岐を伴ったチューブ状を呈して拍動し、この拍動数は60~180/分である。この収縮は、いかなる刺激も必要とせず自動能によって生じている。心臓を形づくる転写因子の発現も認められ、間葉系細胞が心筋に分化していることは明らかである。

ヒト間葉系幹細胞も、心筋細胞に分化する。骨髄由来の細胞(CD34-, CD45-, CD14-)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、18日間培養すると、多核のデスミン陽性の細胞が出現する。さらに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100万個移植することでin vivoでの分化を検討した。6週間

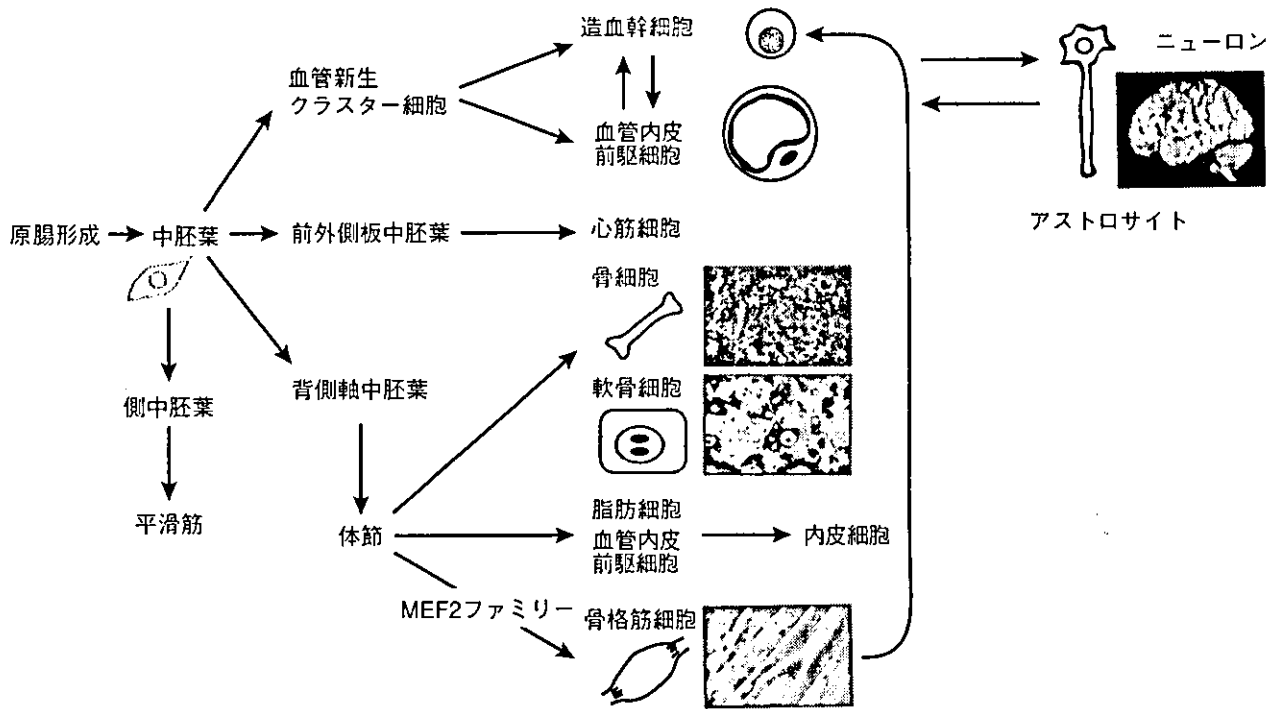
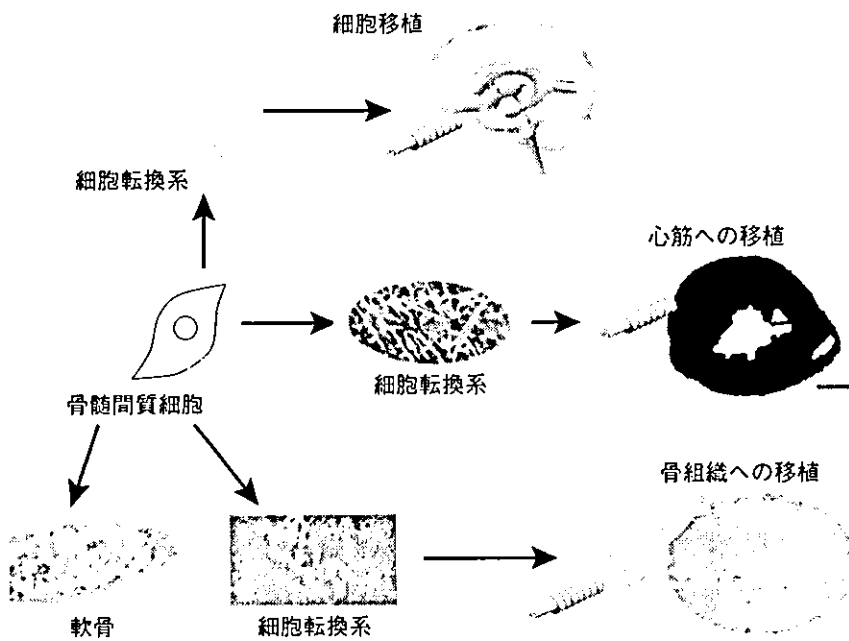


図5 中胚葉に由来する間葉系幹細胞の発生過程と *ex vivo* における細胞転換系



間葉系の幹細胞は、培養系においてすでに分化形質を示す。分化形質を示した後に生体内に移植する場合と、または分化誘導をかけるが分化する以前に（未分化な状態のまま）移植する方が有効である場合とに分かれる。骨組織への移植では、試験管内で分化させた場合は2日以内に生体内で骨を形成するが、未分化の状態では2週間以上かかる

図6 間葉系幹細胞の細胞転換系を用いた細胞移植

追跡した結果、標識したヒト間葉系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、 α -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必要がある。

間葉系幹細胞の予期せぬ分化能に関する報告が続いている。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(図5)。簡単な分化誘導によって、間葉系幹細胞は、神経特異的エノレース、NeuN, neurofilament-M, tauの神経形質を示した^{9)~7)}。またNGFの受容体である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付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言えず、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。

さらに骨髄細胞が肝臓の幹細胞(oval cells)に分化することが示された⁸⁾。この「骨髄の細胞から肝臓ができる」という報告では、肝細胞が間葉系細胞からできたのか血液細胞から生じたのかは明らかにされていない。肝細胞は内胚葉由来であるから、いずれにせよ中胚葉から内胚葉へと胚葉を越えて分化している。筆者には、間葉系幹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きわめて限られた細胞にしか分化せず、部分全能性しか示さない⁹⁾¹⁰⁾。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はきわめて有効である。

5 細胞製剤としての間葉系幹細胞

骨髄間質細胞を考える上で、臨床に向けての試みは重要な意味をもつ。Osiris社は、化学療法と造血幹細胞移植を受けている癌の患者を対象に、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(<http://www.osiristx.com/>)。その結果、間葉系幹細胞の製剤は、前臨床試験で拒絶反応と移植片対宿主病(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。この試験では、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、癌の治療そのものが造血細胞ならびに間葉系幹細胞のいずれをも破壊するため、必要となってくる。このプログラムは間葉系幹細胞を用いた治療をすることによって骨髄の微小環境を再生し、正常の骨髄機能を回復するために行われる。

「骨髄間質細胞による細胞再生治療」のヒトへの応

用について考えてみる¹¹⁾。間葉系幹細胞の研究は、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。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出し、細胞移植に用いることができる。しかし、逆に骨髄間質細胞を用いることによる問題点はないのか。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。問題点は目的の細胞に分化させることができてもそれらの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り、この点に関しては、テロメレースが重要な意味をもつ可能性がある¹²⁾。細胞移植には、まず目的とする細胞の前駆細胞を間質細胞よりつくるが、前駆細胞は増殖能力を有しているので大量に増やすことが容易である。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(図6)。心筋細胞は、局所に注入することで宿主の心筋内に生着し、生体中で協調的に機能する¹³⁾。

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、それらはたぶん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までには至っていない。例をあげれば、心臓の細胞が欲しいのにその中に骨の細胞が混ざっていたのでは、具合が悪い。腱の細胞が欲しいのに、その中に軟骨が混ざっては嬉しくない。心臓をつくる時には、ほとんどの細胞は心筋細胞からつくるのがベストだが、心臓形成に必要な細胞だけをつくるようにコントロールするのは難しいのである。

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さんに間葉系幹細胞の細胞移植が試みられている¹⁴⁾。細胞移植は、allogenic combinationで行われた。その結果、3名の患者さんのいずれの場合においても、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。癌の再発例の患者さんや抗癌剤の大量投与の患者さんに対しても間葉

系幹細胞が投与され、細胞治療への可能性が広がっている¹⁵⁾。全く同様に、軟骨発育不全の患者さんでも間葉系細胞が治療として役立ったということも言われており、難治性骨折、軟骨欠損、腱修復への治療の可能性への希望が膨らんでいる¹⁶⁾。局所に細胞を注射するにせよ、静脈注射するにしろ、自己由来の細胞を利用できる意味でも骨髄間質由来の間葉系幹細胞は、細胞治療における事実上の標準となると考える。

秦 順一教授の研究室に、筆者は所属する。五條理志博士、桜田一洋博士、岡野栄之博士、福田恵一博士、神山 淳君との議論は、いつも刺激的であった。

文献

- 1) Dexter, T. M., Allen, T. D., Lajtha, L. G., Schofield, R. & Lord, B. I. : J. Cell Phys., 82 : 461-470, 1977
- 2) Watanabe, Y. : Acta Haematologica Jpn., 48 : 1688-1700, 1985
- 3) Umezawa, A., Tachibana, K., Harigaya, K., Kusakari, S., Kato, S., Watanabe, Y. & Takano, T. : Mol. Cell Biol., 11 : 920-927, 1991
- 4) 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. & Ogawa, S. : J. Clin. Invest., 103 : 697-705, 1999
- 5) Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop D. J. & Black I. B. : J. Neurosci. Res., 61 : 364-370, 2000
- 6) Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Wiling, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R. & Sanberg, R. R. : Experimental Neurology, 164 : 247-256, 2000
- 7) Kopen, G. C., Prockop, D. J. & Phinney, D. G. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 : 10711-10716, 1999

- 8) Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. & Goff, J. P. : Science, 284 : 1168-1170, 1999
- 9) Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. & Marshak, D. R. : Science, 284 : 143-147, 1999
- 10) Umezawa, A., Maruyama, T., Segawa, K., Shaddock, R. K., Waheed, A. & Hata, J-I. : J. Cell Physiol., 151 : 197-205, 1992
- 11) Prockop, D. J. : Science, 276 : 71-74, 1997
- 12) Morales, C. P., Holt, S. E. & Ouellette, M., Kaur, K. J., Yan, Y., Wilson, K. S., White, M. A., Wright, W. E. & Shay, J. W. : Nature Genet., 21 : 115-118, 1999
- 13) Gojo, S., Kitamura, S., Hatano, O., Takakusu, A., Hashimoto, K., Kanegae, Y. & Saito, I. : The Journal of Thoracic and cardiovascular surgery, 113 : 10-18, 1997
- 14) Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J. C., Pyeritz, R. E. & Brenner, M. K. : Nature Med., 5 : 309-313, 1999
- 15) Gerson, S. L. : Nature Med., 5 : 262-264, 1999
- 16) Deans, R. J. & Moseley, A. B. : Experimental Hematology, 28 : 875-884, 2000

<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年米国カリ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，'99年慶應義塾大学医学部助教授（病理学）。骨髄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」の問題に関するものである。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 default と preference 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。

<http://www.med.keio.ac.jp/patho/au>

好評発売中 シリーズ創刊 第1号 わかる実験医学シリーズ 羊土社

免疫学がわかる

編集／小安重夫（慶應義塾大学医学部微生物学教室）


本書の内容

概論：ますますおもしろい免疫学
 基本編：T細胞分化のしくみ／B細胞分化のしくみ／抗体産生とクラススイッチ／MHCによるT細胞への抗原提示のしくみ／抗原提示と樹状細胞の役割／抗原レセプターとシグナル伝達の新展開
 トピックス編：樹状細胞とクロスプレゼンテーション／樹状細胞の生産するγδT細胞と免疫反応／感染初期防御機構に重要なインターロイキン15／Toll-likeレセプターによる細菌認識機構の最前線／自己免疫モデルマウスの新作製法

定価 **2,900円**＋税
 (本体 2,900円＋税)
 2000年11月発行/B5判/124頁
 ISBN4-89706-985-8

今まで免疫がわからなかった人も、これで全体像とトピックスがわかる！

細胞周期がわかる 編集／中山敏一 ● 詳しい内容は373ページをご覧ください ●



間葉性幹細胞を用いた細胞移植による心臓再生

Regenerative potential of mesenchymal stem cell for the heart

五條 理志*・梅澤 明弘**

Key words
stem cell, cardiomyocyte,
differentiation, regeneration

はじめに

従来、終末分化を遂げ高度に専門化した細胞群である中枢神経細胞や心筋細胞は、分裂による娘細胞を生じることなく、虚血や物理的損傷による細胞死から機能不全に陥った場合にも、細胞の補充はなされないと考えられてきた。哺乳動物の心臓の場合、胎生期には盛んに分裂をしていた細胞が、出生を起点にその増殖を一斉に停止し、その後の心臓の増大はその殆どが心筋細胞の肥大によるものであるとされてきた。一方、イモリは四肢再生の重要なモデルであるが、その心筋細胞も増殖能を維持し続け、更にパターンの再生といったレベルまでの能力を保持している。この再生能力が成熟細胞の脱分化ではなく、幹細胞の存在によるものである可能性が示唆されている。幹細胞の存在は、血液系で発見されて以来、他臓器においても幹細胞の存在（神経幹細胞、肝幹細胞、前立腺幹細胞、間葉系幹細胞）が確認されており、幹細胞生物学といった1つの学問分野を形成している。そのような潮流の中にあっても、心臓は中胚葉の間葉細胞に由来し、由来を同じくする骨格筋が衛星細胞という再生システムを有するのに対し、再生システムを有せず、増殖能を持たない終末分化した心筋細胞の機能合胞体としてRenewalされることなく孤立し、加齢や疾病による細胞損失に伴い機能低下していく臓器と認識されていた。幹細胞を中心とした多くの臓器の機能維持機構を考えると、心臓だけが孤立無援の状態維持

されている特異な状況を想定するよりも、心臓にとっての幹細胞もしくは前駆細胞が成人の体内でも保持され、心機能に恒常性を与えようとしている機構を想定するほうが現実的であると考えられる。少ないながらも、この考えを支持するような事実が発表され始めている。幹細胞の定義としては、自己複製能を持ち、分化した娘細胞を作り出すことであるが、心臓の中には現在のところこのような性質をもった細胞は発見されていない。しかしながら、最近になって心筋細胞の起源である中胚葉間葉系には心筋細胞に分化し、且つ骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞といった中胚葉起源の様々な細胞に分化する幹細胞が存在することが認められた。更に、内胚葉由来の肝細胞や外胚葉由来の中枢神経細胞といった、異なった胚葉由来の細胞群への分化能を有する細胞が、骨髄中に存在することを支持する研究が次々と発表されている。このことは、骨髄が血液系だけでなく、生体を構成する臓器の恒常性を維持するために、多能性幹細胞の貯蔵庫としての役割を持って存在しているかのごとき印象を与える。

本稿では、心臓の再生という命題を念頭に起きながら、幹細胞生物学の中の骨髄間質に含まれる間葉系幹細胞に焦点を当て、この細胞を用いた細胞移植という方法論による臨床応用の可能性と現在の課題を論じたいと考える。

1. 終末分化と増殖能

1) 哺乳動物の心臓における終末分化と増殖停止

成人の心臓に存在する心筋細胞は、生後直ぐに細胞増殖を停止した後、再び細胞周期に入ることではなく終末分化するというのが定説であった¹⁾。終末分化という静止状態は、何らかの刺激が与え

*Satoshi Gojo, **Akihiro Umezawa
*埼玉医科大学総合医療センター心臓外科：
Department of CV Surgery, Saitama Medical Center
**慶應義塾大学医学部病理学教室：Keio
University School of Medicine



図1 イモリの心臓を14日間Floatingにて組織培養した。持続的に拍動し続け、変性した心筋の部分は新たに複雑な管腔構造を作り始めており、血液の出入りが観察される。

られれば増殖相に入るG₀期ではなく、生理的機能を遂行するために専門化した状態を獲得し、いかなる刺激にも反応せず遂には細胞死にいたる状態と考えられている²⁾。しかし、心筋細胞は、DNA合成を虚血のような状況下では行うが細胞質分裂をしない³⁻⁵⁾。また、正常の発生過程でも同様に細胞分裂を伴わない核分裂が行われ、その結果Polyploidsが多数を占めるようになるといわれており⁶⁾、ヒトに於いてはOctaploid-binucleate myocytesが50%近くを占めていると報告されている⁷⁾。これらの事実は、成人の心筋細胞は終末分化した状態にあるのではないことを示唆している。

現在までの殆どの心筋細胞の増殖に関する研究は、細胞分裂が成人心筋細胞では生じ得ないことを報告しているが、未だその分子機構は不明のままである。種々のサイトカインもDNA複製をもたらしたが⁸⁾、増殖を起こすことは出来なかった。また、アデノウイルスE1AやE2F1の遺伝子導入はDNA生成を刺激したが⁹⁾、最終的にはアポトーシスによる細胞死を招来した。また、c-mycを心臓に発現させることでは、肥大を生じるのみであったが¹⁰⁾、v-mycの導入では心臓腫瘍が生じた¹¹⁾。他に、SV40 T antigenの導入による心筋細胞の不死化が報告されているが¹²⁾、Transformationをもたらした結果であり、これらの研究より正常心筋細胞の増殖能に関しては何ら類推することはできない。病理組織学的検討により、分裂像の確認が取れないことに根拠を置き、様々な方法によ

っても心筋細胞の増殖が認められないことを傍証にした、成熟心筋細胞に増殖能はないとする考えが現在の主流のようである。

2) イモリにおける心筋細胞の増殖機構の維持

イモリは、再生という現象を研究する上において四肢再生芽という貴重なモデルを提供してきた¹³⁾。哺乳動物では成熟心筋細胞の細胞分裂は観察されないため、培養条件下での成熟心筋細胞の性質と増殖能の関係は主にイモリで調べられてきたし、生体内での心臓のパターン再生はイモリが唯一の研究対象であった¹⁴⁾。初代培養された心筋細胞は、自動拍動を行い、密な筋繊維を有していた。また、培養開始より10日目に核分裂の指標は1.7に達し、その値は漸減するものの25日目頃までは、細胞分裂を容易に観察することができ、分裂のいずれの相においても拍動は維持されていた¹⁵⁾。組織培養では、初代培養の観察結果と同様の所見ながらも、明らかな脱分化が起こったと報告されているが¹⁶⁾、成熟心筋細胞の消失と心筋前駆細胞の増殖が起こっているとの考えを否定するものではないと考える(図1)。

臓器のパターン再生は、肝臓が最も良いモデルとして研究が行われているが、心臓においては、イモリを用いて心室筋を切除した部位にミンチ状の切除筋を移植するというモデルで検討がなされた。経時的に観察されたグラフトは、16日目に約80%位の細胞が変性により消失するも、45日目頃にはホストの心室筋と融合し、ホストの心室に似た形状でホスト心室筋と共に単一の心室腔を形

成した¹⁷⁾。詳しい検討により、この過程は再生芽と同様に、まず組織が疎になり、その後増殖相、続いて分化が起こっていることが示された¹⁸⁾。

研究が盛んな四肢再生芽においても、そのメカニズムが幹細胞にあるのか分化細胞の脱分化によるものなのかの結論は出ておらず、心臓においても依然解明すべき大きな課題である。

2. 成人における臓器維持機構

1) ヒト心臓の心筋細胞数

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應すると定説¹⁹⁾に対して、実際に心臓の細胞数を経年的に検討した数少ない報告によれば、誕生時の細胞数に比較して成人のそれは明らかに増加している²⁰⁾。これが、誕生後のごく限られた時間の中で達成されたのかどうかは不明である²¹⁾。興味深いことに、男性の細胞数は経年的に確実に減少しているにもかかわらず、女性の細胞数はほとんど減少しない²²⁾。様々な原因による心不全の原因とされているアポトーシス²³⁾や、冠状動脈硬化症による細胞壊死から女性の細胞のみが防御される機構があるとの根拠はないことから考えると、新しい心筋細胞を供給するシステムが存在し、女性の方が何らかの要因でその能力が大きいと考えることも可能である。

2) 不全心における心筋細胞の分裂能

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、その状況に適應しようとするが、近年、共焦点レーザー顕微鏡を用い細胞分裂像が検索された。 α -sarcomeric actinで心筋を同定し、Propidium iodideで核を染色し、急性及び慢性心不全の患者の心臓を検討した結果、百万個に対して平均11個の細胞分裂が存在することが認められた²⁴⁾。また、虚血性心筋症及び拡張型心筋症の心臓に対しても同様の検討がなされ、前者で百万個に対し平均値で152個の細胞が分裂しており、後者においては131個の細胞が増殖しているとの報告がなされた²⁵⁾。この研究では、正常心の核分裂指数が1.8であり、分裂が容易に認識できるイモリの培養心筋細胞の最も増殖能がある時の値にほぼ等しく、細胞分裂を伴わない核分裂をかなりの割合で含んでいるように思われる。しかし

ながら論文に示されている細胞分裂像は確かに存在しており、心筋細胞の増殖能を過大評価しているという批判の下にこの事実を無視すべきではないと考える。

心臓に関して上記の議論を昇華する1つの仮説として、我々は以下のようなシステムを想定している。「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、既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。」生理的メカニズムがこの仮説に近いものであれば、幹細胞を用いた臨床治療がかなり近いものとなると考えており、現在この作業仮説を証明すべく研究を進めている。

3. 多能性幹細胞の貯蔵庫としての骨髄間質

1) 中胚葉由来細胞群を供給する骨髄に存在する間葉系幹細胞

中胚葉に由来する組織は、血球系細胞、血管、心臓、骨、軟骨、脂肪組織、骨格筋、腱、組織間充織（線維芽細胞）などがある。血球系は、幹細胞という概念をもたらしたシステムであるが、骨髄という場合は浮遊系の血液以外に、付着系の様々な性質を有する細胞群（間葉系細胞）を抱えている。約130年前にCohnheimによって間葉系幹細胞の概念は提唱されていたが²⁶⁾、血液系で発展した幹細胞生物学とでも呼べる数多くのAssayや表面抗原の同定、増殖分化制御メカニズムの解明といった華々しい足跡から、間葉系幹細胞の研究は遅れをとってきた。現在まで間葉系細胞研究の分野では、クローン解析ではない方法ではあるが、骨芽細胞²⁷⁾、軟骨細胞²⁸⁾、脂肪組織²⁹⁾に、ある程度選択的にコミットメントをかけることに成功したとの報告がなされている。最近、牧野らにより間葉系細胞から心筋細胞が培養条件下に誘導出来たことが報告された³⁰⁾。骨髄に存在する間葉系幹細胞が発生過程において産み落とし、全く骨髄とは関係のなくなった心筋細胞を生じせしめる能力を保持しつづけていたことが示唆された。また、心筋細胞と同じ横紋筋である骨格筋も*in vitro*での分化誘導に成功しており³¹⁾、更に*in vivo*においても骨髄よりの骨格筋に分化する幹細胞も

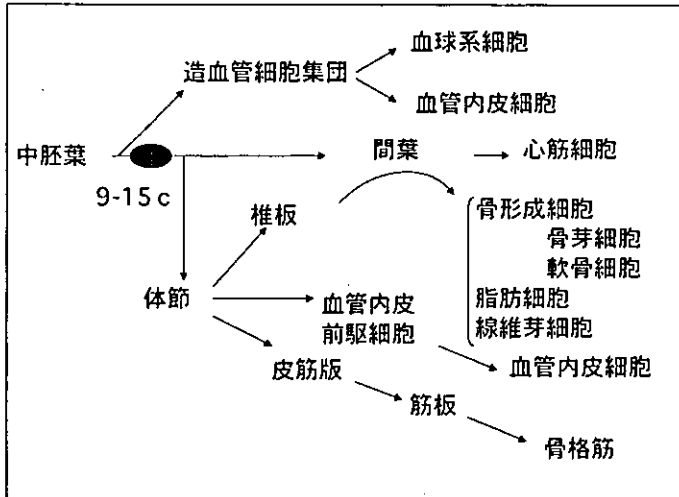


図2 間葉系幹細胞の *in vivo*での振る舞いを基礎に、現在実験に用いている細胞の推定される発生学的な位置を示す。

しくは前駆細胞が供給されていることが示された³²⁾。骨格筋は、衛星細胞という再生システムを持つ臓器でありながら、バックアップのように臓器維持機構を骨髄中に持っていることが示唆された。このように、骨髄に根を下ろすもう一つの幹細胞である間葉系幹細胞の大きなポテンシャルがクローズアップされ、それに関わる報告が著しく増加している。

我々は、間葉系幹細胞の解析を行ってきており³³⁾、現在 *in vivo*の間葉系細胞の振る舞いから得られている結果では、少なくとも発生学的には Hemangioblast 直後の位置にある細胞を得ている (図2, 投稿準備中)。

4. 間葉系幹細胞の胚葉を超えた分化の可能性 (図3)

上記の細胞群は中胚葉由来の細胞もしくは組織であるので、骨髄に定着している間葉系幹細胞がそれらを再生しても、著しく正常発生過程から逸脱するものではなかった。

しかしながら、内胚葉を起源とする肝細胞が骨髄由来の細胞によって非常に程度は低い供給される可能性が示唆された³⁴⁾。このことは、胚葉を越える分化ということになり、発生学に大きな波紋を呼んだ。幹細胞は考えられていた以上に可塑性をもっており、生体が緊急事態になった折には、発生過程すら飛び越えて生体の恒常性の維持に努める可能性があるという生物学者まで現れた。こ

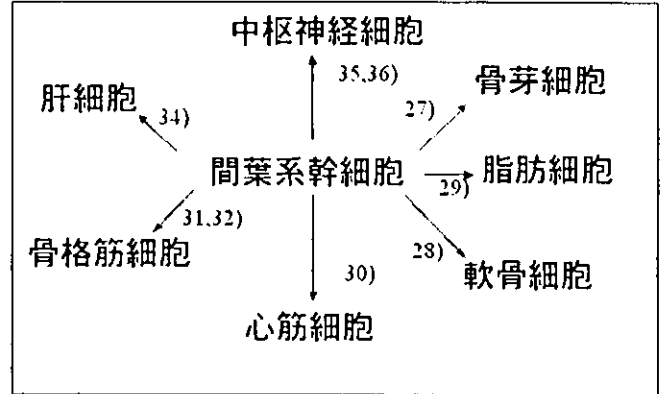


図3 現在まで報告されている骨髄間葉系細胞から分化するとされている細胞群。図中の番号は、本文中の参考文献である。

のような再生現象に躊躇する者が多い中、更に骨髄ストローマ細胞が中枢神経を生じるとの報告が2報掲載された^{35, 36)}。共に、培養条件の中での分化であるが、げっ歯類だけでなくヒトの骨髄ストローマ細胞も Neuron を生じると報告している。中胚葉は、外胚葉の原腸陥入により生じたものであり、外胚葉より発生学的には下位の存在であり、中胚葉由来の非血液系幹細胞が外胚葉由来の神経を形成したことが事実であるならば、発生のプロセスが逆行したことになる。このことは、肝細胞が骨髄より生じたとの報告にもまして、幹細胞を研究してきた者を含め多くの人に極めて強い驚きをもたらした。

5. 多能性幹細胞の純化と細胞移植

1) 臓器特異的プロモーターの利用

幹細胞の存在が確定すると、その次の大きな課題は、如何にこの幹細胞を同定するかが大きな問題である。1つの方法として、臓器特異的プロモーターの利用がある。

神経細胞は、心筋細胞と同様に終末分化と遂げ増殖を停止していると考えられてきた細胞であるが、近年、神経幹細胞の存在が確認された。ヒト神経幹細胞の分離の目的に、神経幹細胞もしくは前駆細胞に選択的に発現する Nestin と Talphal tubulin のプロモーターの制御下に Green Fluorescent Protein (GFP) をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドをヒト脳組織より分離した細胞に導入し、Fluorescence-Activated Cell Sorterにより GFP 発現細胞が回収された。これらの細胞は、細胞分

裂を行い、成熟神経細胞に分化したとの報告がある^{37,38)}。

心臓においても、これと同じアプローチが考えられる。心筋細胞に特異的に発現している分子としては、古くから心臓特異的な分子発現のために用いられている α -Myosin Heavy Chain Promoter³⁹⁾、⁴⁰⁾があるが、他にはCardiac α -Actin Promoter⁴¹⁾、Cardiac Myosin Light-Chain 2 promoter⁴²⁾、Cardiac Troponin T Promoter⁴³⁾といった心筋細胞特異的収縮関連蛋白に加えて、Na/Ca Exchanger Gene 1 Promoter⁴⁴⁾のようなイオンチャンネルに関わるもの等が報告されているが、神経幹細胞で利用したような心筋細胞前駆細胞に特異的に発現しているマーカーが捉えられていない状況では、既に心筋細胞に分化し終えたもしくは分化のかなり後半にあり増殖能が殆どない細胞しか分取できない。心筋幹細胞の研究のためにも、十分量の心筋細胞を*in vitro*で確保し細胞移植などの方法で臨床応用するためにも、神経幹細胞におけるNestinやMusashi 1のような分子の同定が待たれる。

2) 表面抗原の検索

血液系の幹細胞のマーカーとして良く用いられているCD34は、幹細胞からいくらか分化が進んだ細胞群に発現してくる分子であるとの報告がなされている。つまり、CD34 (-)のPopulationにこそ、よりPrimitiveな幹細胞が存在することが、複数の施設より発表されている^{45, 46)}。また、CD34

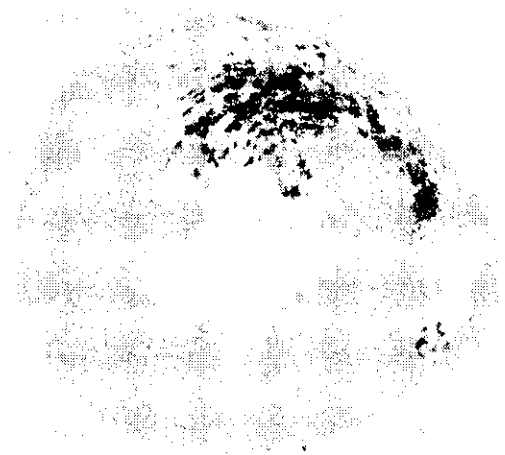


図4 胎児心筋細胞に β -Galactosidaseを導入し、同系マウスの心臓に細胞移植を行い、X-gal染色を行った。ドナー細胞は青く染色されている。

はある種のサイトカインにより誘導をされるものであるらしい⁴⁷⁾。CD34にこだわる必要はないとの見解も述べられており⁴⁸⁾、最も幹細胞研究が進んでいたと思われてきた血液系でも、表面抗原からのアプローチで現在も多く議論を抱えている状態である。間葉系幹細胞においてもあるグループが、この細胞にかなり選択的に発現している分子を同定したと発表しているが、CD105 (Endogrin) という既知のマーカーであり⁴⁹⁾、果たしてどこまで幹細胞をEnrichできるのか*in vivo*のデータが待たれるところである。



図5 胎児心筋細胞移植を行い、X-gal染色後に心筋細胞のギャップ接合を構成するコネキシン43を染色した。(+) : ドナー細胞, (-) : ホスト細胞, 矢印: コネキシン43

3) 治療としての心臓への細胞移植の可能性

心筋細胞が *in vitro* で大量に確保できるという状況が現れれば, それらの細胞を用いた細胞移植という方法論で, 末期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⁵⁰⁾, 遺伝子を導入した細胞 (図 4, 5)^{51, 52)}, 骨格筋細胞⁵³⁾, 平滑筋細胞⁵⁴⁾, 無処置の骨髄細胞⁵⁵⁾ などがドナー細胞として用いられてきた。また, Embryonic Stem Cell を用いた実験も報告されているが⁵⁶⁾, 倫理的な問題を含んでいる。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。また, 小動物のこの種類の実験では, どのような細胞を不全心に打ち込もうとも Elasticity の改善が起これ, 見かけ上は心機能の改善があるかのようなデータが出ることに注意を払わなければならない。

更に, 多くの実験は癌化ではない不老化が容易に起こるげっ歯類の細胞を用いた実験であり, ヒト細胞を用いると状況が一変する。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関わる可能性がある。ES細胞を用いない限り, 幹細胞の増殖停止と老化という問題は, 克服していかなければならない重要な問題である。

文 献

- 1) Karsner HT, *et al.*: Am.J.pathol.1, 351-371, 1925.
- 2) Baserga R, in the biology of Cell Reproduction., (Harvard University Press, Cambridge, Mass, USA, 1985), chap.1,2,and 4.
- 3) Nag AC, *et al.*: Tissue Cell 15, 597-613, 1983.
- 4) Rumyantsev PP, and Bodsov A, Biomed. Biochim. Acta 46, S610-S615, 1987.
- 5) Oberpriller JO, *et al.*: J. Mol. Cell Caradiol. 16, 1119-1126, 1984.
- 6) Soonpaa MH, *et al.*: Am. J. Physiol 271, H2183-H2189, 1996.
- 7) Brodsky VY, in the development and regenerative potential of cardiac muscle, Oberpriller JO., Oberpriller JC, Mauro A, Eds.(Harwood Academic Press, London, UK, 1991),chap.14.
- 8) Claycomb WC, and Moses RL, Dev. Biol. 127: 257-265, 1988.
- 9) Kirshenbaum LA, *et al.*: Dev.Biol.179,402-411, 1996.
- 10) Swain JL, *et al.*: Cell 50: 719-727, 1987.
- 11) S.Saule *et al.*,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 84: 7982-7986, 1987.
- 12) A. Sen, *et al.*: J. Biol. Chem. 263:19132-19136, 1988.
- 13) Norman WP, and Schmidt AJ: J. Morphol. 123: 271-311, 1967.
- 14) Oberpriller JO, and Oberpriller JC, in the development and regenerative potential of cardiac muscle, Oberpriller JO, Oberpriller JC, Mauro A, Eds. (Harwood Academic Publishers, London, UK, 1991), chap. 15.
- 15) Tate JM, and Oberpriller JO: Anat. Rec. 224: 29-42, 1989.
- 16) Nag AC, *et al.*:Tissue Cell 11, 231-248, 1979.
- 17) Bader D, and Oberpriller JO, J. Morphol. 155: 349-357, 1978.
- 18) Oberpriller JO, *et al.*: Cell Tissue Res. 253: 619-624, 1988.
- 19) Rakusan K: in Growth of the heart in health and disease, Zak R,Ed. (Raven Press Publishers, New York, NY, 1984).
- 20) Adler CP, and Costabel U: Virchows Arch.B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. 32:109-125, 1980.
- 21) Austin A, *et al.*: J. Anat. 187(Pt3): 641-647, 1995.
- 22) Olivetti G, *et al.*: J am. Coll. Cardiol. 26: 1068-1079, 1995.
- 23) Narula J, *et al.*: N. Engl. J. Med. 335: 1182-1189, 1996.
- 24) Quaini F, *et al.*: Circ. Res. 75: 1050-1063, 1994.
- 25) Kajstura J, *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95: 8801-8805, 1998.
- 26) Cohnheim J : Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med. 40: 1, 2000.
- 27) Haynesworth SE, *et al.* Bone 13: 81-88, 1992.
- 28) Johnstone B *et al.*: Exp.Cell Res. 238: 265-272, 1998.
- 29) Gimble JM, *et al.*: J Cell Biochem 50: 73-82, 1992.
- 30) Makino S, *et al.*: J. Clin. Invest 103: 697-705, 1999.
- 31) Wakitani S, *et al.*: Muscle Nerve 18: 1417-1426, 1995.
- 32) Ferrari G, *et al.*: Science 279: 1528-1530, 1998.
- 33) Umezawa A, *et al.*: J. Cell Physiol 151: 197-205, 1992.
- 34) Petersen BE, *et al.*: Science 284: 1168-1170, 1999.
- 35) Woodbury D, *et al.*: J. Neurosci. Res. 61: 364-370, 2000.
- 36) Sanchez-Ramos J, *et al.*: Exp. Neurol. 164: 247-256, 2000.
- 37) Roy NS, *et al.*: Nat. Med 6: 271-277, 2000.
- 38) Roy NS, *et al.*: J. Neurosci. Res. 59: 321-331, 2000.
- 39) Sah VP, *et al.*: J. Clin. Invest. 103: 1627-1634, 1999.
- 40) Kadambi VJ, *et al.*: J. Clin. Invest. 97: 533-539, 1996.
- 41) Fleischmann M, *et al.*: FEBS Lett. 440: 370-376, 1998.
- 42) Shen RA, *et al.*: Mol. Cell Biol. 11: 1676- 1685, 1991.
- 43) Wang Q, *et al.*: Circ. Res. 86: 478-484, 2000.
- 44) Nicholas SB, and Philipson KD: Am. J. Physiol. 277: H324-H330, 1999.
- 45) Goodell MA, *et al.*: Nat. Med 3: 1337-1345, 1997.
- 46) Osawa M, *et al.*: Science 273: 242-245, 1996.
- 47) Tajima F, *et al.*: Blood 96: 1989-1993, 2000.
- 48) Goodell MA.: Blood 94: 2545-2547, 1999.
- 49) Barry FP, *et al.*: Biochem. Biophys. Res. Commun. 265: 134-139, 1999.
- 50) Soonpaa MH, *et al.*: Science 264: 98-101, 1994.
- 51) Gojo S. *et al.*: J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 113: 10-18, 1997.
- 52) Tam S.K.,*et al.*: Cardiovas. Surg. 109: 918-923, 1995.
- 53) Taylor DA, *et al.*: Nat. Med. 4: 929-933, 1998.
- 54) Li RK, *et al.*: J. Mol. Cell Cardiol. 31: 513-522, 1999.
- 55) Tomita S, *et al.*,Circulation 100: II247-II256, 1999.
- 56) Klug MG,*et al.*: J. Clin. Invest. 98: 216-224, 1996.

4. 骨髄間質を用いた臓器再生と細胞治療

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、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によって臓器の機能を補填することを目指す。ここでは、骨髄中に存在する間質細胞が、細胞移植を行う上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、脂肪細胞そして心筋細胞としての表現形質を示し、多分化能を有する間葉系細胞の幹細胞が骨髄中に存在することが予想される。多分化能のうち、特に骨細胞、心筋細胞への分化について注目し、生体内への移植を試みた。

骨髄間質細胞 KUSA-A 1 は、骨細胞へ分化する。驚くべきことに、KUSA-A 1 細胞は生体内において骨を形成する。この骨形成は再現性が高く(骨形成率 100%)、他の細胞株ではみられない優れた特徴である。KUSA-A 1 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。この骨髄間質中に存在する骨細胞ならびに骨芽細胞としての「生物学的・医学的材料」としての可能性に注目している。一方、骨髄間質細胞 CMG は、心筋細胞へ分化する。CMG 細胞は心筋に特徴的な分岐を伴った tube 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ことを明確にした。分化過程で CMG 細胞の示す活動電位は、心筋に特徴的であった。これらの分化した細胞を心筋、骨格筋ならびに骨欠損部位に移植した、短期ならびに長期の移植後における細胞の意外な分化能についても示したい。

Mesenchymal stem cells derived from marrow stroma

AKIHIRO UMEZAWA Department of Pathology, Keio University School of Medicine



*うめざわ・あきひろ：慶應義塾大学医学部病理学助教授。平成元年慶應義塾大学大学院修了。平成7年同大学医学部専任講師。平成11年現職。主研究領域／病理学、小児腫瘍、発生学、DNA メチル化。

Key words

骨髄間質
間葉系幹細胞
脱メチル化
細胞移植

胎児性幹細胞ならびに胎児性癌細胞は多分化能を有している(図1)¹⁾。このような多能性を有している細胞が成人の組織に存在しているようであれば、ヒトの組織を再生させることが倫理的な問題もなく可能となる。私は骨髄由来の間質細胞が心筋細胞、骨細胞そして脂肪細胞に分化することが可能であることを報告してきた。骨髄間質細胞は、分化誘導を行うことで、拍動を行う心筋細胞になり、一方、骨形成を生じた。これらの分化誘導は、われわれのグループが世界に先駆け成功した。この興味深い現象をヒトの骨髄間質細胞で用いることで、再現性よく分化する系を確立したい。これらの細胞を用いることにより、虚血によって傷害された心筋組織の補充に用いることが可能であり、難治性の骨折部位に自らの骨髄間質細胞より得た骨細胞を補填することができる。このようなヒトの再生医学を、骨髄穿刺により容易に採取可能である骨髄間質細胞を標的として実現したい。

1. 間質細胞の「default state (初期値)」と脱メチル化剤による初期化

幹細胞のソースのひとつとして、骨髄間質がある^{2,3)}。骨髄間質は骨髄中に存在し、造血を支持する能力があることが知られている。液性因子を介した寄与、膜上の分子を介した関与、ならびにギャップ結合を介した連絡により、間質の細胞は血液細胞の分化・増殖を調節する(図2)。「間質細胞の造血に対する貢献」とは全く別に「間質細胞そのものの分化能」を利用することで、骨髄間質細胞を細胞治療ならびに臓器再生の供給源として役立つことを紹介する。

骨髄の中には、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨芽細胞が存在する。培養系に骨髄の細胞をもってきて、造血細胞を除くとそこには脂肪細胞および骨芽細胞が単離されてくる(図

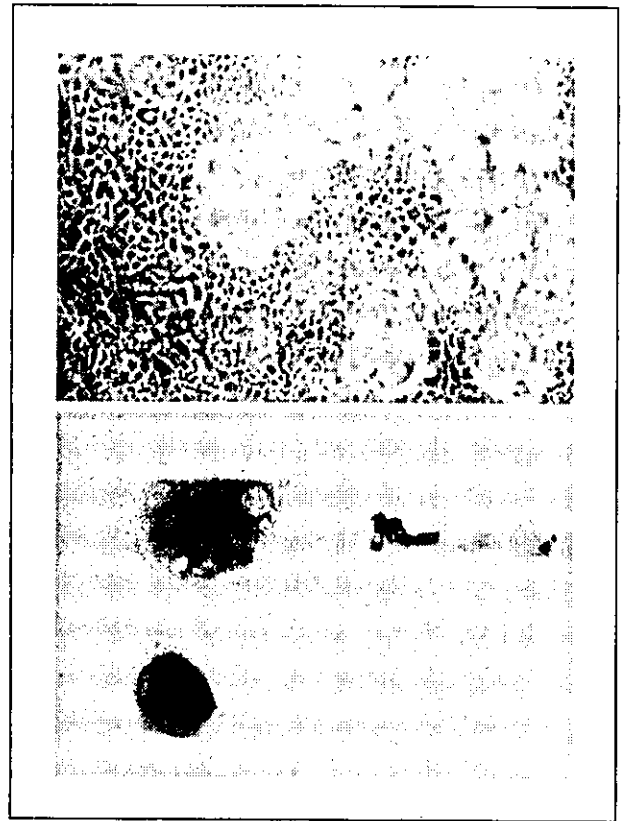


図1 全能性 (totipotency) を有するヒト胎児性癌細胞(上)とヒト絨毛ゴナドトロピンの産生(下)

ヒト精巣由来の胎児性癌細胞であるNCR-G3は、レチノイン酸処理により神経、骨格筋、上皮のマーカーを出現するようになる。位相差顕微鏡下において、胎児性癌細胞は壁付着細胞と浮遊細胞のふたつの形態をとる(上)。レチノイン酸処理後10日にて、ヒト絨毛ゴナドトロピンに対する抗体を用いて行った免疫組織化学の結果である(下)。syncytiotrophoblastic giant cellと同様の形態を有する多核巨細胞に陽性像が見られる。胎盤への分化を試験管内にて再現できる幹細胞として、ヒト胎児性癌細胞は特徴的である。

3)。すなわち、何も処理をしなければ、骨髄間質細胞は脂肪細胞か骨芽細胞に分化するか、まれに軟骨に分化することになる。形態学的・生化学的に特徴的な分化傾向がみられない場合は、骨髄に由来する線維芽細胞として扱う。

ここでは、骨髄間質細胞の、骨芽細胞や脂肪細胞といった本来の能力とともに別の予想

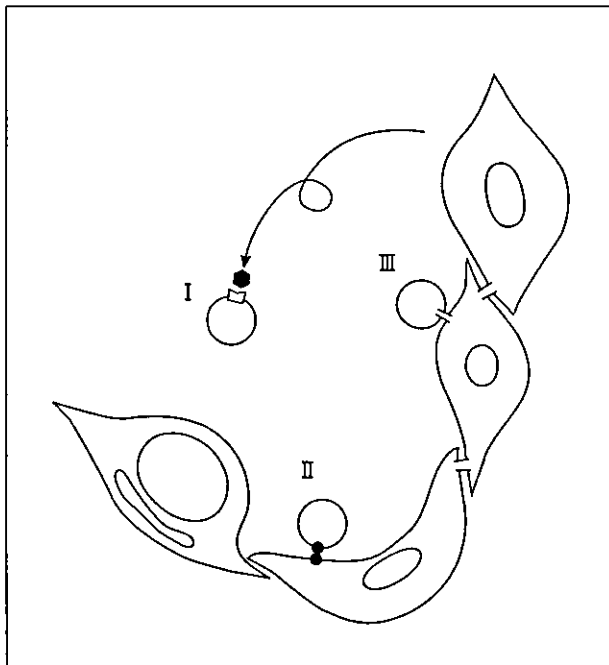


図2 骨髄間質の本来の造血に対する役割のモデル図

骨髄間質細胞と血液細胞との細胞相互作用を表した。CSF-1をはじめとする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。ギャップ結合は主にコネキシン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。

もしなかった分化能を利用して臓器の機能を補填しようとする。骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨芽細胞はもともとの、骨髄間質の初期値として設定されていた状態であるので、誘導剤を用いることで分化させることができる(図4)。一方、心筋細胞⁹⁾、骨格筋細胞、神経細胞、血管内皮を間質細胞より作る場合は、この骨髄間質細胞の初期値をリセットする必要がある。細胞の固有の状態(初期値)は、その細胞のゲノム上のクロマチンまたはメチル化という修飾状態または高次情報として決められているので、その細胞の固有の状態を解除するために脱メチル化剤として5-azacytidineを使用する。正確に言えば、ある一定

の極めて低い頻度で間質細胞が心筋細胞、骨格筋細胞、神経細胞に分化することは知られているが、その頻度を極端に上昇させるには脱メチル化剤は極めて有用である。神経系への分化を誘導するには、発生学の知識を利用するつもりでいる。神経幹細胞に対してニューロンへの分化を誘導する系を模倣し、間質細胞に対し無血清状態でbFGF、EGFを使用させ、誘導する際にはレチノイン酸、そして成熟にはBDNF、NT3、NGF、glia培養上清を処理する予定である。

2. マウス由来骨髄間質細胞とヒト由来骨髄間質細胞

マウスの間質細胞を目的の細胞に分化誘導させた後、臓器への移植を試みている。マウスの細胞は分裂が停止して増殖が止まるまではヒトに比較して限られている。しかしながら、容易に不死化させること(spontaneous immortalization)が可能のため、腫瘍化(transformation)しておらず不死化した細胞を得ることで移植の系を立ち上げ、十分量の細胞を得ることが可能である。この腫瘍化していないということは重要である。腫瘍化した場合、分化効率は落ちる。また、移植した場合、腫瘍となり、宿主にとって不都合となる。不死化しているだけであれば、移植先の臓器中で分化し、増殖を止める。

ヒトの場合は、マウスのように自然に不死化することはない、低頻度で不死化するのかもしれないが、ヒトの細胞が何らかの処理をすることなしに不死化することは実験室では観察されていない。SV40 large T抗原またはPolyoma middle T抗原を導入すると不死化する細胞が出現してくる。しかし、そのような方法で不死化された細胞は、同時に腫瘍化しており、分化形質を失っているばかりか、移植先で腫瘍を形成した。

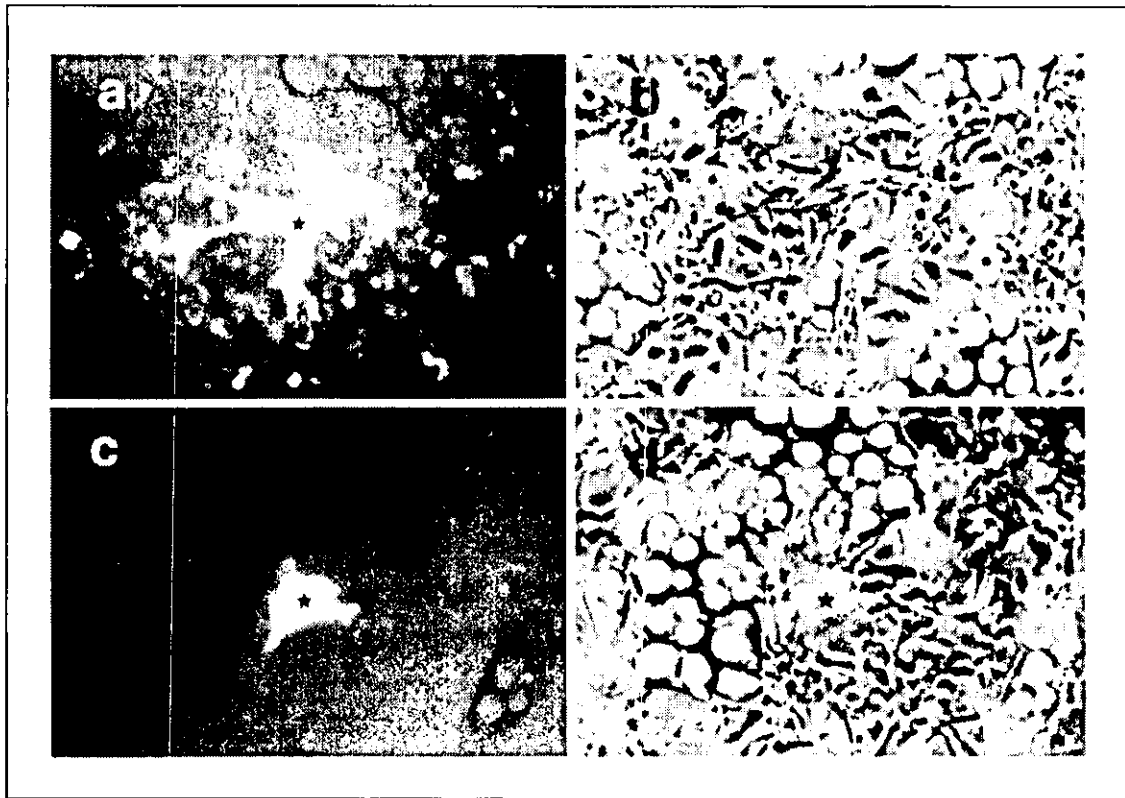


図3 骨髄の初期培養

骨髄の初期培養を行い、血液細胞を除去した。骨芽細胞ならびに脂肪細胞が見られる。骨芽細胞は、隣接する細胞とギャップ結合を介する連絡を有する。星印で示した細胞に Lucifer Yellow CH を注入し、その色素が隣接する細胞に移動し、ギャップ結合の存在を示している(a, b)。これらの細胞はコネキシン43を発現している。一方、脂肪細胞は、隣接する細胞との間にギャップ結合はなく、注入した細胞からの色素の移動はない(c, d)。

a, c: 蛍光像。b, d: 位相差顕微鏡像。

ヒトの骨髄間質細胞を用いて細胞移植・臓器再生を試みるには、マウス同様に相当数の細胞を用意しなければならない。10名以上の方からの骨髄間質細胞を用いて初期培養を作製したところ、数代で細胞は増殖を停止した。細胞は単離した方の年齢に依存して細胞寿命が決められているため、年齢の異なる方々から細胞を単離したが、分化誘導する実験系を行う場合にはあまり年齢に関係して細胞寿命が長いとは限らなかった。脱メチル化処理してから分化誘導するまでは何回か増殖させるので、ヒトの細胞移植を試みる上で細胞寿命を延ばすことは必要である。そのためにテロメラーゼを導入して細胞寿命の延長を試みた。残念ながら、細胞転換に必要なほどの寿

命の延長はみられなかった。線維芽細胞の寿命をテロメラーゼは延長するとされているので、骨髄間質細胞の寿命が延長することが予想される。私の場合、増殖が止まろうとしているときにテロメラーゼを導入したために、細胞寿命を延ばすことができなかった可能性があった。

ヒト間質細胞の分化誘導・未分化性の維持・細胞増殖には、液性因子は重要な役割をはたした。未分化の状態を保つことと増殖の維持に、bFGFは有効であった。細胞寿命を延長させるわけではないので、明らかに増殖を促進し、短時間で必要な細胞数をえることを可能とした。



図4 骨髄間質細胞の分化形質

骨髄間質細胞中には、骨芽細胞、脂肪細胞が含まれる。通常の培養状態において、骨芽細胞、脂肪細胞を単離してくることが可能である (default state)。酵素組織化学法によって、アルカリ・フォスファターゼが強陽性になり、骨芽細胞であることがわかる(上)。別の条件下では、骨芽細胞は脂肪細胞へ分化する(中)。これらの細胞中には、Oil Red O 陽性の脂肪滴を認める。さらにこれらの間質細胞に対して、5-azacytidine を処理することで、心筋細胞への分化を誘導することが可能となる(下)。

3. どのような細胞が細胞移植にとってベストであり、事実上の標準となりえるか？—骨髄間質細胞と他の幹細胞を比較して—

胎児性幹(ES)細胞は全能性を有しており、基本的に胎盤を除く全ての細胞を供与することが可能である。また、マウスならびにヒトでも ES 細胞は基本的に不死化していると考えられる。言い方を変えれば、不死化した細胞のみが報告され、多くの研究者に利用可能となっている。また、皮下移植した場合、ES 細胞の種類にもよるが、神経組織、気管、軟骨、消化管組織を含む奇形腫をつくり、悪性腫瘍としての性格は有していない。その問題を解決すれば、不死化していることにより細胞移植に十分に足り得る細胞数を簡単に得られる点は他の細胞にはない特徴がある。核移植技術とともに ES 細胞を利用すれば拒絶の問題も解決される。ただし、一般に言われているように簡単に ES 細胞をそれぞれの個人で樹立できるかどうか(または必要量の細胞を得られるかどうか)に関しては、私は疑問をもっている。また、特定の細胞に分化させ、移植先で目的の細胞のみを利用するのも難しい可能性を否定できない。

胎児組織から得る間葉系細胞は不死化していない。不死化はしていないが、胎児から単離してくるために増殖が停止する (senescence) までの細胞寿命は長く、十分な細胞数を得ることが可能となる。腫瘍化もしていないため、分化誘導も比較的安易であると考えられる。問題は、倫理的な側面と中胚葉系の細胞のみへの分化能 (limited differentiation capability) である。間葉系の細胞を増殖させるので、中胚葉以外の細胞は得にくいといった欠点がある。

成人組織の細胞は、分化しきった細胞であ

質 疑 応 答

り、その組織の形成能ならびに分化は最も優れている。軟骨より得られた軟骨芽細胞は軟骨を形成する。ただし、成人組織より得られた成熟細胞は、骨髄間質以上に細胞寿命が短く、ほとんど増殖しない。ゆえに目的の細胞数を得ることはむずかしいことになる。

「どん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存在する。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。私がここでくり返したいことは、臨床再生医学に用いることができる最も現実的な細胞のひとつとして骨髄間質細胞があることである。

謝 辞

この研究は、慶應義塾大学医学部・秦順一教授の研究室で行われました。阿部仁さんの発見と草刈悟さんの魅力的な骨髄間質細胞の樹立は、この研究のスタートです。岡野栄之教授、桜田一洋博士、福田恵一博士から、多くの世界的な潮流について up-date な情報の提供を受け、最新情報の供与を受けました。牧野伸司博士および神山淳君は、以前、私の自主学習のプログラムに参加してくれた学生でしたが、彼らの多くの実験結果は必要不可欠でした。

〔文献〕

- 1) Hata J-I, Fujimoto J, Ishii E, *et al.* : Differentiation of human germ cell tumor cells in vivo and in vitro. *Acta Histochem Cytochem* 1992; 25: 563-576.
- 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) Umezawa A, Tachibana K, Harigaya K, *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* 1991; 11: 920-927.
- 4) 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.

座長(秦) ありがとうございます。それではディスカッションをお願いします。

宮園浩平(癌研究会) たいへん面白いお話をありがとうございます。骨ができた細胞と、軟骨ができた細胞と、脂肪ができた細胞は、全部異なるのでしょうか。

梅澤 まったく違う細胞でして、不死化、腫瘍化はしていません。ですから、腫瘍ができたことは1度もありません。腫瘍ができたことも1度もありません。注入された細胞は必ず元の生体内の組織の中にバラバラに存在しています。細胞の注入は外科の先生にお願いしています。

宮園 骨になる細胞に軟骨ができたとか、分化の方向性が変わるという感じがありましたが、何か刺激をすることで、骨の細胞が脂肪細胞になるとか、あるいは逆の方向になるようなことはないのでしょうか。

梅澤 まず骨にしかならない細胞が得られています。それから骨と脂肪になる細胞は結構得られます。ただし軟骨と骨になる細胞は絶対に得られないと思っています。実際に私は成体から細胞を得る過程で、発生学のある時点のところのある細胞が不死化しているのではないか、ということ予想しています。

骨芽細胞を生体内に注入すると、2日で生体内で骨を作ります。しかし5-azacytidineを処理してトリックを使いますと、神経に転換できると考えています。

杉岡洋一(日本医学会幹事) 私は整形外科医ですので先生のお話に非常に興味を持ちました。骨髄の間葉系幹細胞そのものは、環境によって、例えば骨になったり、軟骨になったり、腱になったりということは前からいわれていますが、先生は、細胞そのものの分化の方向は決まっているとおっしゃったような

気がしたのですが、そうなのでしょうか。

梅澤 私どもは実は10種類以上の細胞を使っています。その中には私が間葉系幹細胞だと思っている細胞がありまして、その細胞は完全にコントロールしているわけではありません。例えば心臓に打った例では、心臓の中に骨ができたものは1例もありません。心臓の中に別の神経ができたということもありますが、脾臓に注入して肝臓を作ろうと思った時には、脾臓の中が骨だらけになったことはあります。その骨は肝臓に移動して、肝臓が骨だらけになったこともありますので、完全にコントロールしているわけではありません。

それから、もうすでに虚血筋肉に注入する研究をやっています。虚血に陥らせた筋肉の中に間葉系幹細胞を入れて骨格筋細胞を作ろうと思って実験しました。そして今週の水曜日に私が解剖して見ましたら、見事に硬いものができていました。もう骨か軟骨かどちらかができてしまって、筋肉などはできていなかったのだと思います。まだうまく行かないこともあるということです。ただうまく行かない理由もわかっていて、骨格筋再生を完全に成功させた時には、myosin light chain promoter の後ろに蛍光色素をつけて、筋肉になるだけの細胞を集めてきて注入しています。今回は5-azacytidine だけを処理して注入していますので、ちょっといい加減過ぎたかなと思っています。

杉岡 もう一つ、大腿骨を2/3欠損させて骨をつなげたとおっしゃいましたが、それだけ欠損させれば短縮しますね。何かその間にスペースを保つような、外固定といいますか、そういうものをなさったのでしょうか。

梅澤 マウスですのでまったくできなくて、ブラブラの状態です。今日はまったく短縮のないものをお見せしました。しかしマウスは動きますので、大部分はV字型にくつつ

いたりとか短縮しています。これは全部整形外科の先生にやっていただいています。例えばラットぐらいの大きさになれば外固定できるということですので、解決できる問題だと思っています。

杉岡 マウスでも針を使えば、髄内固定は簡単にできると思います。それから carrier を使ってBMPでも同じような骨ができるのですが、それとのスピードの違いはどうでしょうか。

梅澤 これは私どもの一番強調したい点であると思っています。BMPでcollagen gel等は非常によく行われていまして、臨床応用ができるということですが、治療ということを考えた場合、現実的にBMP-2だけではむずかしいということは知られています。一方細胞を使いますと、本当に速くて、10日以内どころか、生体内で2~3日で、少なくとも骨の塊は出てきますので、スピードという面からも細胞の方が有効であると信じています。

中尾 真(日本医学会幹事) demethylation は非常に安定な状態でお使いだろと思いますが、その程度を変えろというようなことで、いろいろな組織が出てくる可能性はないのでしょうか。

梅澤 5-azacytidine ですが、3 μ M, 10 μ M, 50 μ M といろいろな濃度でやっています。いくつかやっていますが、レチノイン酸などは、濃度に応じていろいろな臓器ができるということをお聞きしましたが、骨髄間質に関しては、濃度に応じて組織の方向性が変わるということは認められていません。それから5-azacytidine はあくまでもランダムな脱メチル化剤ですので、ただ細胞の固有の状態をリセットしているというようにご理解いただいて、目的の細胞を得るためには、サイトカインやマトリックスとか、いくつかの細工が必要と考えています。

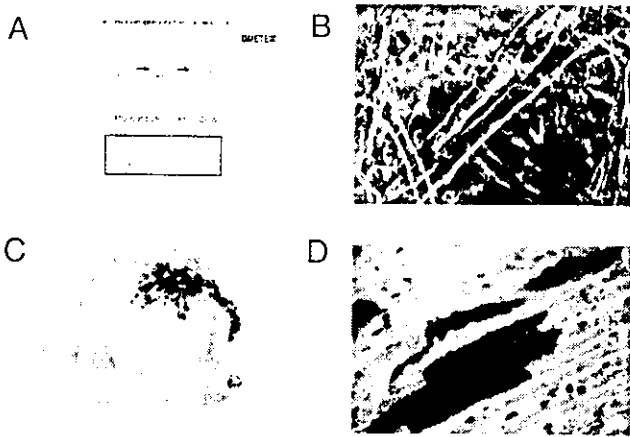
座長 ありがとうございます。

骨髄間質細胞から 神経細胞を作る

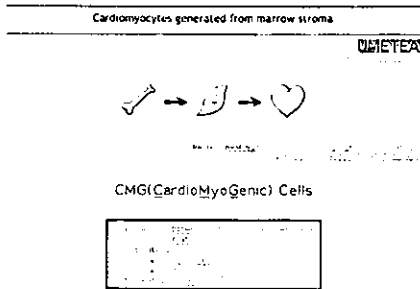
再生医療への貢献を目指して

ヒトの身体は六十兆の細胞の集合体。元はたった一つの受精卵で、分化・増殖を繰り返すこ

▼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=模式化したアニメーション (http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/参照)、B=心筋細胞に分化したことを示す位相差顕微鏡像、C、D=心筋細胞をマウスの心臓に細胞移植し、染料で染めだしたものの。Cは肉眼写真(埼玉医科大学五條理志博士撮影)、Dは顕微鏡像



▼骨髄間質細胞の心臓細胞への分化を示すアニメーション



最近、マウスの間質細胞を使って神経細胞を作り出すことに世界で初めて成功し、注目を浴びた。臨床への応用が可能になれば、神経細胞の変性脱落によるパーキンソン病や事故が原因の脊髄損傷治療など、再生医療への貢献が期待される。

とによって、成り立っているといわれる。この仕組みやプロセスを解明出来れば、病気やけがで失われた組織や器官を元通りに修復することも不可能ではない。慶応義塾大学医学部病理学教室の梅澤明弘助教授は、骨髄中の間質細胞を使って、さまざまな組織や器官の元になる細胞を作り出し、これを人体に細胞移植することを目指している。

間質細胞は、結合組織や血液、軟骨、骨等を作る間充織の一種で、間葉系幹細胞としての性格を持っている。骨髄由来のもの、白血病に対する骨髄移植手術の進展などで安全

に取り扱う技術が確立しており、骨髄穿刺により容易に採取出来る。梅沢助教授は「細胞移植の研究は、国際的にも非常に競争が激しい分野。いろんな細胞を素に研究が行われていますが、間質細胞を使うことに私たちのアイデンティティーがあり、一番の売りです」と話す。

心筋細胞のピクピクに小躍り

骨の中には「造血」と「間質」の二種類の細胞があり、間質細胞は網様のネットワーク構造で存在する。梅澤助教授は十二、三年前から、この細胞を基に生体への移植の実験に取り組んできた。骨髄から採取するため、骨に変えることはそう難しいことではないが、生体中では取っ掛かりとなる「足場」が無いと勝手な方向に増殖し、バラバラな形状を作る。目的の形状に誘導するための研究に精を出すのが、この分野でプライオリティを確保したのが、ベンチャービジネスのゲンザイム社。国際的に同社の特許が成立し、臨床への応用も始まっていた。

そうした中、梅澤助教授は間質細胞を顕微鏡で観察していて、ある日ピクピク動くものを認めた。心筋細胞が出来ていたのだ。病理解剖学が専門で、臓器や細胞の形態や機能を判断するのが仕事。自らを「形屋」と言う。「普通、細

胞はこんな動きはしません。やった、と小躍りしたものです。神経細胞づくりもこの研究の延長上にあります」。

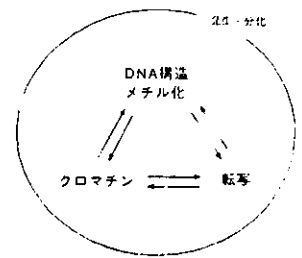
軸索、樹状突起もはつきり

同助教授が間質細胞の研究に本格的に取り組みきっかけの一つは、病理学教室を率いる秦順一教授の存在。秦教授

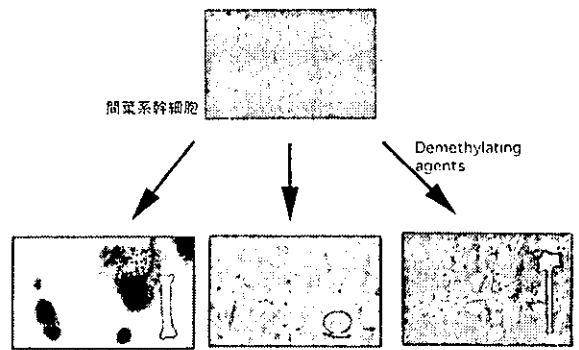
はヒト胎児性がん細胞の研究者。この細胞はどんな細胞にもなる、という全能性を持つ。胎児期に発現し、発生・分化に関係するが、胎児期を過ぎると消える。秦教授に協力し、細胞の全能性について研究する中で、骨髄間質細胞に着目、全能性の研究成果を応用して神経細胞づくりに成功する。現在、間質細胞はヒト胎児性がん細胞と共に同教室の研究テーマの二本柱になっている。

間質細胞には胎児性がん細胞やES細胞（胚性幹細胞）のように全能性は無いが、神経細胞のほか、心筋、骨格筋、軟骨などが出来ることが分かった。マウスの間質細胞を基に形成した神経細胞は、核と細胞質からなる細胞体、インパルスを伝達する軸索、他の神経細胞とシナプスを形成する樹状突起がはつきり認められ、培養から三週間後には神経伝達物質に反応したという。

成功のポイントは、最近の発生学の積み重ねにあり、「培養に使う血清にしろ、試薬にしろ、



▲細胞の発生・分化の仕組み（DNA、クロマチン、転写遺伝子群の関係を示す）



▲間質細胞の分化能（間質細胞が骨や心筋細胞に変わり得ることを表す）

目新しいものではありません。オリジナリティーがどこにあるか、と言われれば、さまざまな手法を組み合わせたことが特徴。これまで積み重ねてきた成果に間質細胞をくつつけただけです」と語る。

患者自身の細胞移植で免疫反応抑制

梅澤助教授は骨髄間質細胞をターゲットにする理由をこう説明する。「間質細胞が身体どこにでもあるからといって、肺臓や腕の筋肉から採取しようとする、大変な痛みを伴います。これに対して骨髄由来のものは、そうした心配は少なく、確実です。また、患者さん自身の細胞を使えば、異物として免疫細胞の攻撃を受け心配ありません」。



「細胞移植は臓器移植と同様、社会全体で考える必要のある問題」と梅澤助教授

今後の研究目標は、間質細胞の分化・増殖のメカニズムを遺伝子レベルで解明し、目的とする細胞を100%の確率で形成することにある。「身体の中に入れて、とんでもない細胞に変身する恐れがあるのでは臨床に使えません。医療に失敗は許されない」。

細胞の「個性」は、ゲノムのメチル化状態、クロマチン（染色体）の状態、転写因子のネットワークの三つの要因によって決まるといふ。この三つを自在に操り、間質細胞をさまざまな組織・器官に変えることが狙いだ。

国際的な激しい先陣争いの中で、梅澤助教授が重視しているのが特許の取得。「今こうして話している最中にも、我々を追い抜こうとしている研究者がいるのです。遅れをとれば、外国に高額の特許使用料を取られ、結局、患者さんの負担になります。また、研究や医療も制約を受け、日本全体の損失です」と強調する。

（ライター・佐々木 弘）