

Acknowledgements

The authors thank Drs M. Tsuchida, H. Ochiai, R. Kobayashi, F. Otsuki, M. Shimoda, K. Kawasaki, H. Nakadate, N. Sekiguchi, S. Nakagawa, D. Nakajima, A. Kikuchi, T. Ito, S. Iizuka, N. Aoyagi, T. Matsubayashi, N. Hyakuna, J. Ueyama, S. Ohga, T. Nakano, H. Naito, T. Hatashi and T. Mori for providing patients' information and samples. We also thank K. Oshina for technical assistance and E. Aoshima-Tanaka for preparing the manuscript.

References

- Aoki, E., Ohashi, H., Uchida, T., Murate, T., Saito, H. & Kinoshita, T. (2003) Expression levels of DNA methyltransferase genes do not correlate with p15INK4B gene methylation in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **17**, 1903–1904 [Letter].
- Arico, M., Biondi, A. & Pui, C.H. (1997) Juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, **90**, 479–488.
- Au, W.Y., Fung, A., Man, C., Ma, S.K., Wan, T.S., Liang, R. & Kwong, Y.L. (2003) Aberrant p15 gene promoter methylation in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: clinicopathological and karyotypic associations. *British Journal of Haematology*, **120**, 1062–1065.
- Cameron, E.E., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (1999) p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood*, **94**, 2445–2451.
- Christiansen, D.H., Andersen, M.K. & Pedersen-Bjergaard, J. (2003) Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **17**, 1813–1819.
- Daskalakis, M., Nguyen, T.T., Nguyen, C., Guldborg, P., Kohler, G., Wijermans, P., Jones, P.A. & Lubbert, M. (2002) Demethylation of a hypermethylation p15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood*, **100**, 2957–2964.
- Ebihara, Y., Wada, M., Ueda, T., Xu, M.J., Manabe, A., Tanaka, R., Ito, M., Mugishima, H., Asano, S., Nakahata, T. & Tsuji, K. (2002) Reconstitution of human haematopoiesis in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice by clonal cells expanded from single CD34⁺ CD38⁻ cells expressing Flk2/Flt3. *British Journal of Haematology*, **119**, 525–534.
- Emanuel, P.D. (1999) Myelodysplasia and myeloproliferative disorders in childhood: an update. *British Journal of Haematology*, **105**, 852–863.
- Emanuel, P.D., Bates, L.J., Castleberry, R.P., Gualtieri, R.J. & Zuckerman, S. (1991) Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. *Blood*, **77**, 925–929.
- Emanuel, P.D., Snyder, R.C., Wiley, T., Gopuram, B. & Castleberry, R.P. (2000) Inhibition of juvenile myelomonocytic leukemia cell growth in vitro by farnesyltransferase inhibitors. *Blood*, **95**, 639–645.
- Garcia-Manero, G., Daniel, J., Smith, T.L., Kornblau, S.M., Lee, M.S., Kantarjian, H.M. & Issa, J.P.J. (2002) DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*, **8**, 2217–2224.
- Garcia-Manero, G., Jeha, S., Daniel, J., Williamson, J., Albitar, M., Kantarjian, H.M. & Issa, J.P.J. (2003) Aberrant DNA methylation in pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, **97**, 695–702.
- Guo, S.X., Taki, T., Ohnishi, H., Piao, H.Y., Tabuchi, K., Bessho, F., Hanada, R., Yanagisawa, M. & Hayashi, Y. (2000) Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. *Leukemia Research*, **24**, 39–46.
- Gutierrez, M.I., Siraj, A.K., Bhargava, M., Ozbek, U., Banavali, S., Chaudhary, M.A., Solh, H.E.I. & Bhatia, K. (2003) Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia*, **17**, 1845–1850.
- Hasle, H., Niemeyer, C.M., Chessells, J.M., Baumann, I., Bennett, J.M., Kerndrup, G. & Head, D.R. (2003) A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*, **17**, 277–282.
- Herman, J.G. & Baylin, S.B. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, **349**, 2042–2054.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D. & Baylin, S.B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 9821–9826.
- Herman, J.G., Civin, C.I., Issa, J.P.J., Collector, M.I., Sharkis, S.J. & Baylin, S.B. (1997) Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major type of hematological malignancies. *Cancer Research*, **57**, 837–841.
- Isomura, M., Kamachi, Y., Kudo, K., Watanabe, N., Nakamura, Y., Yamamoto, T., Ken, R., Kojima, S. & Yamamoto, K. (2003) Somatic mutations in PTPN11 in the Japanese patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, **102**, 366a–367a [Abstract].
- Issa, J.P., Garcia-Manero, G., Giles, F.J., Mannari, R., Thomas, D., Faderl, S., Bayar, E., Lyons, J., Rosenfeld, C.S., Cortes, J. & Kantarjian, H.M. (2004) Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood*, **103**, 1635–1640.
- Jones, P.A. & Laird, P.W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics*, **21**, 163–167.
- Kosaki, K., Suzuki, T., Muroya, K., Hasegawa, T., Sato, S., Matsuo, N., Kosaki, R., Nagai, T., Hasegawa, Y. & Ogata, T. (2002) PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 3529–3533.
- Kubota, T., Das, S., Christian, S.L., Baylin, S.B., Herman, J.G. & Ledbetter, D.H. (1997) Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nature Genetics*, **16**, 16–17.
- Locatelli, F., Niemeyer, C., Angelucci, E., Bender-Gotze, C., Burdach, S., Ebell, W., Friedrich, W., Hasle, H., Hermann, J., Jacobsen, N., Klingebiel, T., Kremens, B., Mann, G., Pession, A., Peters, C., Schmid, H.J., Stary, J., Suttrop, M., Uderzo, C., van't Veer-Korthof, E.T., Vossen, J., Zecca, M. & Zimmermann, M. (1997) Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a report from the European Working Group on Myelodysplastic Syndrome in Childhood. *Journal of Clinical Oncology*, **15**, 566–573.
- Loh, M.L., Vattikuti, S., Schubert, S., Reynolds, M.G., Carlson, E., Lieuw, K.H., Cheng, J.W., Lee, C.M., Stokoe, D., Bonifas, J.M., Curtiss, N.P., Gotlib, J., Meshinchi, S., Le Beau, M.M., Emanuel,

- P.D. & Shannon, K.M. (2004) Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. *Blood*, **103**, 2325–2331
- Manabe, A. & Nakahata, T. (2003) Experiences on MDS and JMML from Japan. In: *Myelodysplastic and Myeloproliferative Disorders in Children* (ed. by L.F. Lopes & H. Hasle), pp. 317–324, Lemar Livraria, Sao Paulo, Brazil.
- Manabe, A., Okamura, J., Yumura-Yagi, K., Akiyama, Y., Sako, M., Uchiyama, H., Kojima, S., Koike, K., Saito, T. & Nakahata, T. (2002) MDS Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology (2002) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on the criteria of the International JMML Working Group. *Leukemia*, **16**, 645–649.
- Manabe, A., Zaike, Y., Sugahara, S., Tsuchida, M., Masunaga, A., Kikuchi, A., Kojima, S., Oda, M., Ikuta, K., Kato, K., Tsurusawa, M., Akiyama, Y., Hara, J., Ikushima, S. & Nakahata, T. (2003) Pediatric RAEB-M6a syndrome: a proposal of a unique entity. *Blood*, **102**, 329b [Abstract].
- Miyachi, J., Asada, M., Sasaki, M., Tsunematsu, Y., Kojima, S. & Mizutani, S. (1994) Mutations of the N-ras gene in juvenile chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **83**, 2248–2254.
- Niemeyer, C.M., Arico, M., Basso, G., Cantu-Rajoldi, A., Creutzig, U., Haas, O.A., Harbott, J., Hasle, H., Kerndrup, G., Locatelli, F., Mann, G., Stollmann-Gibbels, B., van't Veer Korthof, E.T., van Wering, E.R., Zimmermann, M. & Members of the European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS) (1997) Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. *Blood*, **89**, 3534–3543.
- Niemeyer, C.M., Fenu, S., Hasle, H., Mann, G., Stary, J. & van Wering, E. (1998) Differentiating juvenile myelomonocytic leukemia from infectious disease. *Blood*, **91**, 365–367 [Letter].
- Preisler, H.D., Li, B., Chen, H., Fisher, L., Nayini, J., Raza, A., Creech, S. & Venugopal, P. (2001) P15INK4B gene methylation and expression in normal, myelodysplastic, and acute myelogenous leukemia cells and in the marrow cells of cured lymphoma patients. *Leukemia*, **15**, 1589–1595.
- Quesnel, B., Guilerm, G., Verecque, R., Wattel, E., Preudhomme, C., Bauters, F., Vanrumbeke, M. & Fenaux, P. (1998) Methylation of the p15INK4b gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*, **91**, 2985–2990.
- Sakashita, K., Koike, K., Kinoshita, T., Shiohara, M., Kamijo, T., Taniguchi, S. & Kubota, T. (2001) Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of p15 during human myeloid development. *Journal of Clinical Investigation*, **108**, 1195–1204.
- Sasaki, H., Manabe, A., Kojima, S., Tsuchida, M., Hayashi, Y., Ikuta, K., Okamura, I., Koike, K., Ohara, A., Ishii, E., Komada, Y., Hibi, S. & Nakahata, T. (2001) MDS Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology (2001) Myelodysplastic syndrome in childhood: a retrospective study of 189 patients in Japan. *Leukemia*, **11**, 1713–1720.
- Shimizu, F., Nakayama, J., Ishizone, S., Zhang, M.X., Kawakubo, M., Ota, H., Sugiyama, A., Kawasaki, S., Fukuda, M. & Katsuyama, T. (2003) Usefulness of the real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay targeted to alpha1,4-N-acetylglucosaminyltransferase for the detection of gastric cancer. *Laboratory Investigation*, **83**, 187–197.
- Silverman, L.R., Demakos, E.P., Peterson, B.L., Kornblith, A.B., Holland, J.C., Odchimar-Reissig, R., Stone, R.M., Nelson, D., Powell, B.L., DeCastro, C.M., Ellerton, J., Larson, R.A., Schiffer, C.A. & Holland, J.F. (2002) Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of Clinical Oncology*, **20**, 2429–2440.
- Tartaglia, M., Niemeyer, C.M., Fragale, A., Song, X., Buechner, J., Jung, A., Hahlen, K., Hasle, H., Licht, J.D. & Gelb, B.D. (2003) Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nature Genetics*, **34**, 148–150.
- Teofili, L., Rutella, S., Chiusolo, P., La Barbera, E.O., Rumi, C., Ranelletti, F.O., Maggiano, N., Leone, G. & Larocca, L.M. (1998) Expression of p15INK4B in normal hematopoiesis. *Experimental Hematology*, **26**, 1133–1139.
- Teofili, L., Morosetti, R., Martini, M., Urbano, R., Putzulu, R., Rutella, S., Pierelli, L., Leone, G. & Larocca, L.M. (2000) Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B during normal and leukemic myeloid differentiation. *Experimental Hematology*, **28**, 519–526.
- Teofili, L., Martini, M., Di Mario, A., Rutella, S., Urbano, R., Luongo, M., Leone, G. & Larocca, L.M. (2001) Expression of p15ink4b gene during megakaryocytic differentiation of normal and myelodysplastic hematopoietic progenitors. *Blood*, **98**, 495–497.
- Teofili, L., Martini, M., Luongo, M., Diverio, D., Capelli, G., Breccia, M., Lo Coco, F., Leone, G. & Larocca, L.M. (2003) Hypermethylation of GpG islands in the promoter region of p15(INK4b) in acute promyelocytic leukemia represses p15(INK4b) expression and correlates with poor prognosis. *Leukemia*, **17**, 919–924.
- Tessema, M., Langer, F., Dingemann, J., Ganser, A., Kreipe, H. & Lehmann, U. (2003) Aberrant methylation and impaired expression of the p15 INK4b cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia*, **17**, 910–918.
- Toyota, M., Koyanagi, K.J., Toyota, M.O., Jair, K.W., Willman, C.L. & Issa, J.P.J. (2001) Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood*, **97**, 2823–2829.
- Tsuzaka, K., Fukuhara, I., Setoyama, Y., Yoshimoto, K., Suzuki, K., Abe, T. & Takeuchi, T. (2003) TCR zeta mRNA with an alternatively spliced 3'-untranslated region detected in systemic lupus erythematosus patients leads to the down-regulation of TCR zeta and TCR/CD3 complex. *Journal of Immunology*, **171**, 2496–2503.
- Uchida, T., Kinoshita, T., Nagai, H., Nakahara, Y., Saito, H. & Hotta, T. (1997) Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*, **90**, 1403–1409.
- Vardiman, J.W., Pierre, R., Imbert, M., Bain, B., Brunning, R.D. & Flandrin, G. (2001) Juvenile myelomonocytic leukaemia. In: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (ed. by E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein & J.W. Vardiman), pp. 55–57, IARC Press, Lyon, France.
- Wong, I.H.N., Ng, M.H.L., Huang, D.P. & Lee, J.C.K. (2000) Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood*, **95**, 1942–1949.

Definitive Hematopoiesis from Endothelial Cells in the Mouse Embryo; A Simple Guide

Daisuke Sugiyama¹ and Kohichiro Tsuji*

Circulation is composed of two interactive systems, the cardiovascular and the hematopoietic, which affect each other. Recently, endothelial progenitor cells/angioblasts have been identified in the circulation of the adult mouse and human. Furthermore, some hematopoietic cells (HCs) have been shown to contribute to angiogenesis, suggesting that HCs can transdifferentiate into endothelial cells (ECs). Although these concepts in adult are still controversial, understanding the mechanisms of the relationship between ECs and HCs would benefit the clinical application for cardiovascular and hematologic disorders. Both ECs and HCs are considered to be derived from a common germ layer, the mesoderm, and have more intimate relationship in embryo than in adult. Here, we describe the relationship between ECs and HCs with special attention to the hemogenic ECs in the mouse embryo. (Trends Cardiovasc Med 2006;16:45–49) © 2006, Elsevier Inc.

Daisuke Sugiyama is at the Department of Biochemistry, Dartmouth Medical School, HB7200 313Vail Building, Hanover, New Hampshire. Kohichiro Tsuji is at the Division of Cellular Therapy, Advanced Clinical Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan.

¹Tel.: (+1) 603-650-1235; fax: (+1) 603-650-1128.

*Address correspondence to: Kohichiro Tsuji, MD, PhD, Division of Cellular Therapy, Advanced Clinical Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. Tel.: (+81) 3-5449-5397; fax: (+81) 3-5449-5428; e-mail: tsujik@ims.u-tokyo.ac.jp.

© 2006, Elsevier Inc. All rights reserved. 1050-1738/06/\$-see front matter

• General Hematopoietic Cell Development

The relatively short gestation period of the mouse (18–21 days) contributes to its suitability as a research model in the field of mammalian development. In mice, hematopoiesis begins in the extraembryonic yolk sac (YS) at 7.5 days post-coitum (dpc), shifting to fetal liver (FL) at midgestation, then to spleen, and finally to bone marrow (BM) shortly before birth (Figure 1) (Dzierzak et al. 1998).

Earlier studies suggested that hematopoietic cell (HC) development initiated at one time in the YS. However, non-mammalian embryo grafting experiments suggested that there is another origin of hematopoiesis, which was

shown to be the intraembryonic para-aortic splanchnopleura (P-Sp)/aortogonad-mesonephros (AGM) region at 8.0 to 11.5 dpc. The P-Sp/AGM region is now considered by some to be the major source of adult hematopoiesis, and YS is considered a possible secondary source, although this concept is still controversial. Recently, the placenta has been identified as yet one more hematopoietic organ and a niche for the immature HC pool at 12.5 dpc. The hematopoietic activity of the placenta is transient and diminishes after the FL hematopoiesis becomes active. It is of interest whether the placenta produces HCs de novo and how the placenta affects the maintenance of HCs. Further studies will be necessary in the future. (Current work in this area has been reviewed by Mikkola et al. (2005)).

• Primitive and Definitive Hematopoiesis

One problem in the field of hematopoiesis research is that the terminology is historically complicated. There are two types of hematopoiesis, primitive (embryonic) and definitive (adult). Primitive hematopoiesis is transient, whereas definitive hematopoiesis continues until death. Avian embryos were first used to identify the origin of hematopoiesis, and several observations were applied to mouse embryos, although avian hematopoiesis and murine hematopoiesis are not identical. Primitive hematopoiesis is mainly restricted to erythropoiesis taking place in the YS. Some well-known characters of the cells have been used specifically for definitive hematopoiesis: (a) definitive erythroid cells, (b) high-proliferative potential colony-forming cells, (c) lymphoid cells, (d) hematopoietic stem cells (HSCs), and (e) others (granulocyte-macrophage colony-forming cells, spleen colony-forming cells, etc) (Figure 2). Although all characters are for identification of definitive hemato-

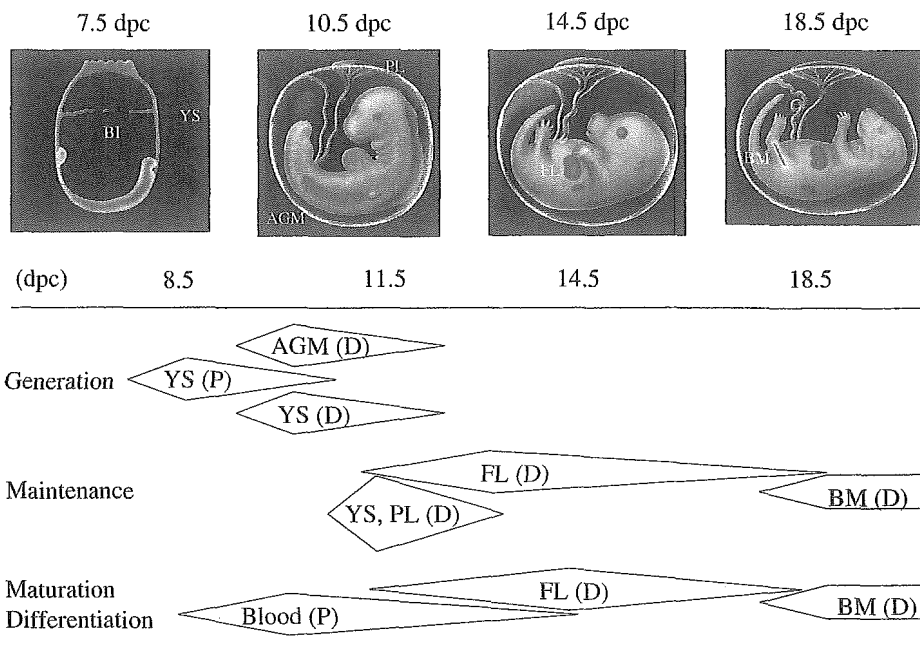


Figure 1. Schema of embryonic HC development. BI, blood island; PL, placenta; P, primitive hematopoiesis; D, definitive hematopoiesis.

poiesis, they are of unequal hierarchy. Thus, whereas HSCs have the potential to proceed to any mature blood cell during definitive hematopoiesis, other cells, such as definitive erythroid cells, are of more limited potential. In this context, definitive hematopoiesis is composed of two waves of emergence. The first wave is mainly definitive erythropoiesis, which takes place in the YS and diminishes gradually until birth, as if to cover the gap between primitive erythropoiesis in YS and definitive erythropoiesis by HSCs colonized in FL to support the growing embryo. Hematopoietic stem cells, generated in the P-Sp/AGM region and probably to lesser extent in the YS, are supposed to colonize the FL, initiate the second wave of definitive hematopoiesis, and sustain BM hematopoiesis in adult life. New terminology that distinguishes between these two waves of definitive hematopoiesis will be necessary to avoid confusion.

• **The Relationship Between ECs and HCs: Hemangioblasts and Hemogenic ECs**

Based on morphologic observation, the existence of “hemangioblasts” and “hemogenic ECs” has been hypothesized. Hemangioblasts are the cells capable of differentiating into both ECs and HCs in both primitive and definitive

hematopoiesis, whereas hemogenic ECs are structurally ECs and have only definitive hematopoietic potential. The first hematopoietic site in the YS is called a blood island, in which HCs (mainly primitive erythroid cells) develop inside and in close association with the outer layer of ECs. Current work in this area has been reviewed by Ferko-wicz and Yoder (2005). As the embryos develop, the EC layer forms blood vessels and HCs are released into the circulation. The spatial and temporal proximity of both EC and HC development suggested the possibility that both lineages were derived from a common precursor, the hemangioblast. Evidence supporting existence of such a cell comes from gene targeting experiments

that result in the absence of both lineages. In addition to the fact, several markers (e.g., Flk-1, CD31, CD34, Tie-2) are expressed in both lineages and embryonic stem cell technology has yielded insights for hemangioblast. On the other hand, a different model of EC and HC development states that HCs develop from ECs and, in terms of hematopoietic clusters of cells that are attached to the ventral luminal aspect of the dorsal aorta, are observed at 10.5 dpc (Garcia-Porrero et al. 1995, Marshall and Thrasher 2001). Therefore, it had long been proposed that hematopoiesis might originate from a specific subset of vascular ECs named hemogenic ECs. These clusters are observed from fish to human, regardless of the species. Especially in mammals, they are also observed in the omphalomesenteric artery and umbilical artery as well, both of which have HSC potentials (Garcia-Porrero et al. 1995, De Bruijn et al. 2000). The existence of hemogenic ECs has already been demonstrated in the YS as well as in the P-Sp/AGM region, and several lines of evidence support the notion that hemogenic ECs are able to generate only definitive HCs (Nishikawa et al. 1998, Sugiyama et al. 2003, Yokomizo et al. 2001). Although these two terms have been used interchangeably, they have distinct meanings. It is still unclear whether so-called hemangioblasts have potentials capable of differentiating into the other mesodermal lineages (i.e., skeletal muscle, bone, cartilage, and adipose tissue). Recently, a brachyury+Flk-1+ cell, which is supposed to be a hemangioblast, was detected in the posterior primitive streak in the mouse embryo at 7.5 dpc (Huber et al. 2004).

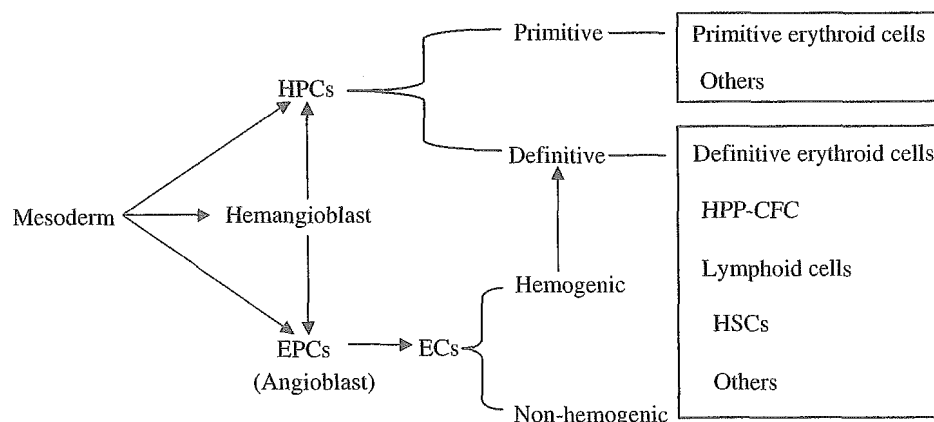


Figure 2. Simplified schema of hematopoietic differentiation pathway and type of hematopoiesis.

• Definitive Hematopoiesis in YS

The YS at 8.25 dpc has a potential of definitive erythropoiesis, in which the adult type hemoglobin gene is identified by RT-PCR (Palis et al. 1999). VE-cadherin+CD45⁻ cells, which are supposed to be ECs, were isolated from the YS and exhibited lymphoid potential in vitro and in vivo (Nishikawa et al. 1998, Fraser et al. 2002). The cells in the YS at 9.5 dpc have the potential of HSCs only when transplanted into neonate recipients conditioned by busulfan (Yoder et al. 1997). The cells in the YS at 8.0 dpc, before the establishment of circulation, have a potential of HSCs only when cocultured with the AGM-derived stromal cell line (Matsuoka et al. 2001). Taken together, this has proved that the YS has a potential of both waves of definitive hematopoiesis as mentioned in the previous section. According to the avian in vivo study, the YS contributes to definitive erythropoiesis, but not to lymphopoiesis and HSCs (Dieterlen-Lievre and Le Douarin 1993), suggesting that we might overestimate the hematopoietic potential by an in vitro assay. Difficult accessibility of mammalian embryos has made investigators establish some assay methods to identify the hematopoietic potential, which does not reflect the hematopoietic fate. Some in vitro assay method might enable the cells to acquire the unexpected potential that does not reflect the cell fate. To address this issue, we have designed experiments with the use of a whole-embryo culture system that enables us to manipulate the mouse embryo and follow the cell fate in vivo. Although the YS has a potential of definitive hematopoiesis, it remained unclear that hemogenic ECs in the YS contribute to definitive hematopoiesis in vivo in mice. DiI-conjugated acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL-DiI), which is incorporated into ECs and macrophages, was inoculated into embryos at 10.0 dpc by intracardiac injection, followed by whole-embryo culture (Figure 3) (Sugiyama et al. 2003). One hour after Ac-LDL-DiI inoculation, DiI staining was found along the entire endothelial tree. In sections, DiI staining was observed in the endothelial layer. The DiI⁺ cells expressed CD31 and CD34 but not CD45 by flow cytometry, which is an antigen characteristic for the endothelial lineage. Twelve hours after culture,

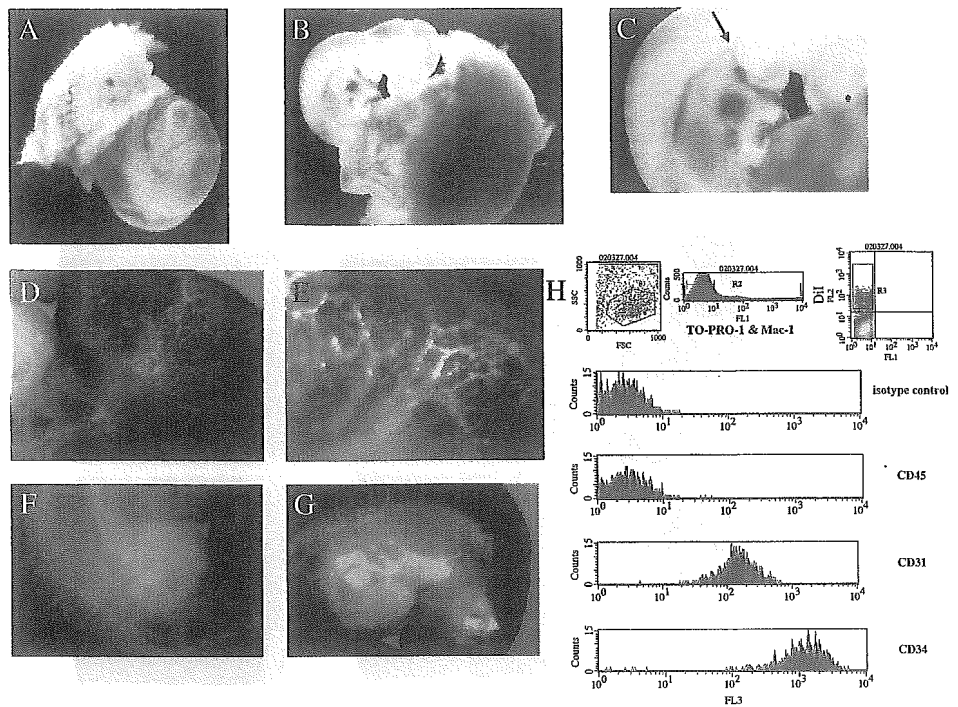


Figure 3. Ac-LDL-DiI inoculation by intracardiac injection. (A) Embryo at 10.0 dpc is dissected out without damage to the embryos. (B) YS is cut along blood vessels and embryo is bared. (C) Ac-LDL-DiI was inoculated by intracardiac injection. Arrow shows the glass needle. (D-G) DiI illumination (yellow) detected along blood vessels of whole body 1 hour after Ac-LDL-DiI inoculation (D, head part; E, magnified view of D; F, heart part; G, truncal part). (H) FACS profile of the cells incorporating Ac-LDL-DiI 1 hour after inoculation. After eliminating the dead cells and macrophages, DiI⁺ cells were examined. DiI⁺ cells have an endothelial character (CD45⁻CD31⁺CD34⁺).

definitive erythropoiesis considered to be from hemogenic ECs incorporating Ac-LDL-DiI was identified, although we could not tell which ECs contributed this hematopoiesis, as Ac-LDL-DiI was inoculated into the whole body of the embryo. Taken together with the report that the receptor of erythropoietin, a pivotal cytokine for definitive erythropoiesis, is expressed in the YS vasculature, suggesting that this definitive erythropoiesis is generated through ECs in the YS (Lee et al. 2001), the definitive erythropoiesis of hemogenic EC origin seems to be conserved between mouse and chicken. Recently, it has been shown that Tie-2 + Flk-1dimCD41⁻ cells, which are supposed to be ECs in the YS at 8.25 dpc, give rise to HCs expressing CD41, an HC marker, and acquire the potential of definitive hematopoiesis only when cocultured with OP9 stromal cell lines, suggesting the existence of hemogenic ECs (Li et al. 2005). Although some groups claim that the YS has no potential of lymphopoiesis and HSCs, negative results might be due to the problem in the assay systems. The potential of

definitive lymphopoiesis and HSCs may remain inactivated before 10.5 dpc and specific condition might be required for the YS to acquire the potentials of definitive lymphopoiesis and HSCs.

• Definitive Hematopoiesis in P-Sp/AGM Region

A series of studies has demonstrated that the P-Sp/AGM region has potentials of lymphopoiesis and HSCs (Cumano et al. 1996, 2001, Matsuoka et al. 2001, Medvinsky and Dzierzak 1996). VE-cadherin+CD45⁻ ECs isolated from the P-Sp/AGM region exhibit lymphoid potential like those from the YS (Nishikawa et al. 1998). Endothelial cells expressing *Runx-1*, an essential transcription factor for definitive hematopoiesis in the P-Sp/AGM region, have a potential of adult repopulating HSCs (North et al. 2002). The first expression of *Ly-6A*, one of the earliest genes expressed in HSCs, is restricted to the cells inserted into the endothelial layer in the P-Sp/AGM region (de Bruijn et al. 2002). Although we have shown that

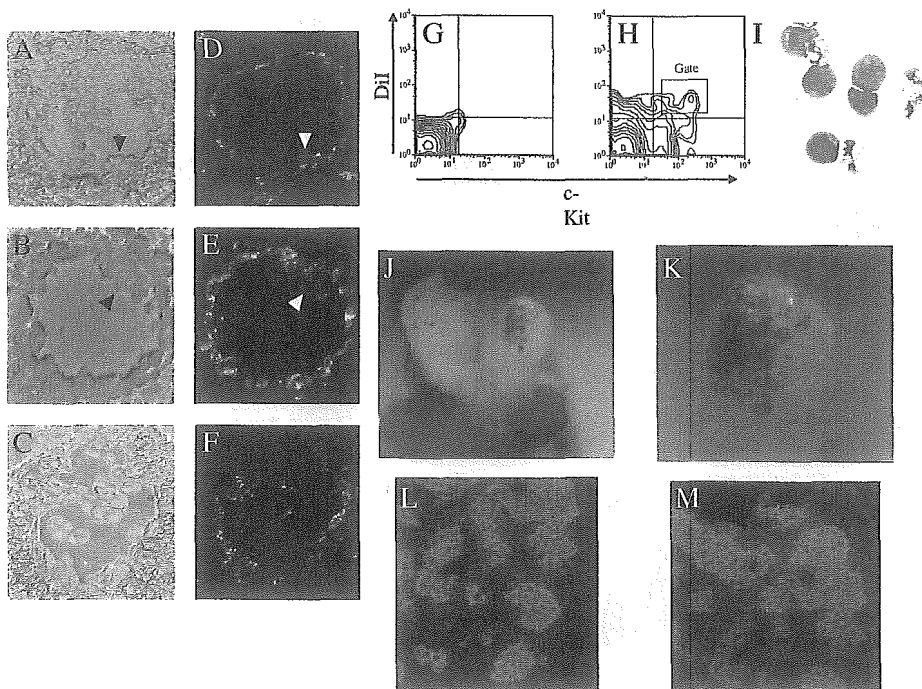


Figure 4. Characterization of DiI⁺ cells 12 hours after Ac-LDL-DiI inoculation. (A-E) Twelve hours after inoculation, DiI⁺ hematopoietic clusters were observed in the dorsal aortic floor (A, phase contrast; D, fluorescence) and in the umbilical artery (B, phase contrast; E, fluorescence). Arrowheads show the hematopoietic clusters. DiI⁺ circulating HCs were observed in the omphalomesenteric artery (C, phase contrast; F, fluorescence). (G,H) The blood sample of inoculated embryos was examined by flow cytometry. (G) Isotype control. (H) x-Axis, c-Kit; y-axis, DiI. Sorting gate for c-Kit⁺DiI⁺ cells is shown. (I) The morphology of c-Kit⁺DiI⁺ cells sorted with the use of the gate shown in (H). (J,K) The DiI⁺ cells sorted out from the blood of inoculated embryos were introduced back into the circulation of the second recipient embryos. (J) Fetal liver lobes of the recipient embryo. DiI⁺ cells that colonized FL were observed as yellow color (K). Magnified view of (J). (L,M) Observation by confocal microscopy. The colonized DiI⁺ cells were observed as white color.

Ac-LDL incorporating ECs contribute to definitive erythropoiesis, the HSC potential remained unclear. To address this issue, we further characterized the HCs generated from Ac-LDL incorporating ECs. Twelve hours after inoculation, DiI staining was observed in the hematopoietic clusters protruding into the aortic lumen and only a few circulating cells in addition to endothelial layer in the P-Sp/AGM region (Figure 4) (Sugiyama et al. 2005). Similar findings have already been observed in chicken embryos (Jaffredo et al. 1998). We sorted out the DiI⁺c-Kit⁺ cells from circulation by flow cytometry, which revealed two distinct populations by morphologic observation: immature HCs/HPCs with a blastic cell aspect and macrophages (Figure 4). In addition, the sorted DiI⁺ cells showed potentials of both neonate and adult HSCs by transplantation experiments and could colonize the FL when introduced back into recipient embryos (Figure 4) (Sugiyama et al.

2005). Because Ac-LDL-DiI is inoculated into whole body of embryos, it could not be identified which hemogenic ECs contributed to the HSCs. Taken together with the previous reports, hemogenic ECs incorporating Ac-LDL-DiI in the P-Sp/AGM region and probably in the YS contribute to neonate and adult HSCs.

• EC-Derived Definitive Hematopoiesis

Hemogenic ECs could be detected in both the YS and P-Sp/AGM region after 9.5 dpc (Nishikawa et al. 1998). Recently, hematopoietic clusters have been shown in the YS at 9.5 dpc as well as in the P-Sp/AGM region (Li et al. 2005, Yokomizo et al. 2001). The timing of hemogenic EC emergence is consistent with the emergence of hematopoietic clusters in both the YS and P-Sp/AGM region, suggesting that the hematopoietic clusters originate from hemogenic ECs (Garcia-Porrero et al. 1995,

Marshall and Thrasher 2001). Although we showed that both waves of definitive hematopoiesis are generated by Ac-LDL incorporating ECs, we could not deny the possibility that the other cells might somehow contribute to definitive hematopoiesis. Recently, subaortic patches (SAPs) consisting of mesenchymal cells underlying the dorsal aortic floor have been shown to have a potential of definitive hematopoiesis in the P-Sp/AGM region at 10.5 dpc (Bertrand et al. 2005). Cells found in both the SAPs and hematopoietic clusters express AA4.1, CD31, CD41, GATA-3, GATA-2, and *Runx-1*, but not CD45. Because mesenchymal cells within SAPs express many of the same markers as HSCs, and also have definitive hematopoietic potential, the authors suggested that hematopoietic clusters are formed by the cells from SAPs migrating through the ECs of the dorsal aorta rather than formed by hemogenic ECs themselves (Bertrand et al. 2005, North et al. 2002). However, electron microscopic observation shows that hematopoietic clusters attach strongly to the ECs by tight junction. It is unlikely that the hematopoietic clusters in the umbilical artery originate from a non-EC component structurally.

It is important to remain aware that, as our understanding of hematopoietic and vascular development improves, new facts will require us to reevaluate existing definitions so that we may adapt them appropriately. For example, CD45 is a panleukocyte marker supposed to be expressed in hematopoietic clusters. However, the intensity of CD45 expression in

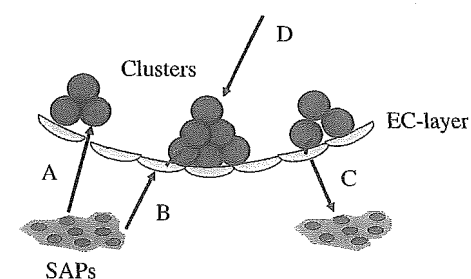


Figure 5. Model of HSC emergence in the P-Sp/AGM region. (A) Hematopoietic clusters are directly generated from SAPs. (B) Hematopoietic clusters are generated from SAPs via ECs as if SAPs were hemogenic endothelial progenitor cells/angioblasts. (C) Both hematopoietic clusters and SAPs are generated by hemogenic ECs. (D) Hematopoietic clusters have migrated from the other sources via circulation.

the clusters is very faint in the mouse embryo (Bertrand et al. 2005). Ac-LDL only is incorporated into macrophages and ECs. However, some embryonic cells might be able to incorporate Ac-LDL only in in vitro culture. A possible model is shown in Figure 5. Lineage-tracing experiments and further characterization of the cell nature will be necessary to understand the mechanisms how HSC generation is regulated in the mouse embryo.

• Concluding Remarks

We expect that these developmental approaches will enable us to understand the relationship between ECs and HCs for future clinical applications.

• Acknowledgments

The authors thank Dr D Church and Mr J Gaudet for critical reading of this manuscript, Dr T Yokomizo for helpful discussion and Sakura Motion Picture Co, Ltd, for helping the artwork. DS is a recipient of JSPS Postdoctoral Fellowships for Research Abroad.

References

- Bertrand JY, Giroux S, Golub R, et al.: 2005. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:134–139.
- Cumano A, Dieterlen-Lievre F, Godin I: 1996. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86: 907–916.
- Cumano A, Ferraz JC, Klaine M, et al.: 2001. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15:477–485.
- De Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, Dzierzak E: 2000. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J* 19:2465–2474.
- De Bruijn MF, Ma X, Robin C, et al.: 2002. Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity* 16:673–683.
- Dieterlen-Lievre F, Le Douarin NM: 1993. Developmental rules in the hematopoietic and immune systems of birds: how general are they? *Semin Dev Biol* 4:325–332.
- Dzierzak E., Medvinsky A, De Bruijn M: 1998. Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunol Today* 19: 228–236.
- Ferkowicz MJ, Yoder MC: 2005. Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Exp Hematol* 33: 1041–1047.
- Fraser ST, Ogawa M, Yu RT, et al.: 2002. Definitive hematopoietic commitment within the embryonic vascular endothelial-cadherin(+) population. *Exp Hematol* 30: 1070–1078.
- Garcia-Porrero JA, Godin IE, Dieterlen-Lievre F: 1995. Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* 192:425–435.
- Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, et al.: 2004. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432:625–630.
- Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lievre F: 1998. Intraaortic hematopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 125: 4575–4583.
- Lee R, Kertesz N, Joseph SB, et al.: 2001. Erythropoietin (Epo) and EpoR expression and 2 waves of erythropoiesis. *Blood* 98:1408–1415.
- Li W, Ferkowicz MJ, Johnson SA, et al.: 2005. Endothelial cells in the early murine yolk sac give rise to CD41-expressing hematopoietic cells. *Stem Cells Dev* 14:44–54.
- Marshall CJ, Thrasher AJ: 2001. The embryonic origins of human haematopoiesis. *Br J Haematol* 112:838–850.
- Matsuoka S, Tsuji K, Hisakawa H, et al.: 2001. Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aortagonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood* 98:6–12.
- Medvinsky A, Dzierzak E: 1996. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86:897–906.
- Mikkola HK, Gekas C, Orkin SH, Dieterlen-Lievre F: 2005. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp Hematol* 33:1048–1054.
- Nishikawa SI, Nishikawa S, Kawamoto H, et al.: 1998. In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 8:761–769.
- North TE, De Bruijn MF, Stacy T, et al.: 2002. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity* 16:661–672.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, et al.: 1999. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126: 5073–5084.
- Sugiyama D, Ogawa M, Hirose I, et al.: 2003. Erythropoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells at the pre-liver stage. *Blood* 101:4733–4738.
- Sugiyama D, Arai K, Tsuji K: 2001. Definitive hematopoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells in the mouse embryo. *Stem Cells Dev* 14:687–696.
- Yoder MC, Hiatt K, Dutt P, et al.: 1997. Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* 7:335–344.
- Yokomizo T, Ogawa M, Osato M, et al.: 2001. Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of hematopoietic cells from endothelial cells. *Genes Cells* 6: 13–23.

PII S1050-1738(06)00220-3

TCM

第46回学会・シンポジウム

小児血液研究の進歩

ヒト胚性幹細胞からの血液産生と再生医療

辻 浩 一 郎

東京大学医科学研究所附属病院小児細胞移植科

Production of Blood Cells from Human Embryonic Stem Cells and Regenerative Medicine

Kohichiro TSUJI

Department of Pediatric Hematology-Oncology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Abstract Embryonic stem (ES) cells are pluripotent cells derived from preimplantation embryos. Since ES cells have the ability to be maintained in culture indefinitely as undifferentiated cells, yet they are capable of forming more differentiated cell types, human ES cells recently established are expected as a novel source of human transplantable cells. We planned to produce hematopoietic stem cells (HSC) for transplantation and functional blood cells for transfusion from human ES cells. To reconstitute the hematopoietic circumstances of embryos *in vitro*, we established stromal cells from embryonic hematopoietic tissues. As expected, blood cells were generated from human ES cells in the coculture with the mouse embryo-derived stromal cells. We are now evaluating the function of the blood cells differentiated from human ES cells, and searching for the molecules contributing to the capability of the stromal cells to induce the differentiation of human ES cells to blood cells.

要 旨 胚性幹細胞 (ES 細胞) は、胎生期に由来する全能性幹細胞で、未分化な状態を保持したまま増殖できるとともに、種々の機能細胞に分化する能力を有している。そのため、近年樹立されたヒト ES 細胞は、移植片の新たな供給源として期待されている。そこで、移植用の造血幹細胞と、輸血用の成熟血液細胞を、ヒト ES 細胞から分化誘導することを計画した。われわれは、ヒト ES 細胞の分化誘導のためには、胎生期の造血環境を再構築することが重要と考え、マウス胎仔の造血組織からストローマ細胞を作製した。このストローマ細胞との共培養により、ヒト ES 細胞から種々の血液細胞が分化誘導された。現在、われわれは、分化誘導された血液細胞が、臨床応用可能な機能を有しているか否かを検討するとともに、作製されたストローマ細胞に発現されている、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導能を担う分子 (群) を探索している。

Key words: human embryonic stem (ES) cells, embryogenesis, blood cells, hematopoietic stem cells, regenerative medicine

I. はじめに

最初は夢物語のように思われた再生医療も、近年の著しい幹細胞生物学の発展により、現実の話として語られるようになってきた。とくに、組織幹細胞の可塑性の発

見¹⁾とヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) の樹立²⁾という2つの報告は、われわれにそのことを強く印象づけた。

ヒト ES 細胞については、樹立当初から、マスコミでは「万能細胞」と称され、良きにつけ悪きにつけ、再生医療の象徴であった。本稿では、われわれが現在行っている、ヒト ES 細胞からの血液細胞産生に関する研究をモデルとして、ヒト ES 細胞を用いた再生医療の現状を概説する。

2005年4月19日受理

別刷請求先：〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1
東京大学医科学研究所附属病院小児細胞移植科 辻浩一郎

Reprint requests to Kohichiro Tsuji, Department of Pediatric Hematology-Oncology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108-8639 Japan

II. ES細胞研究の歴史

1. マウス ES細胞の樹立

胎生初期に、受精卵は卵割を繰り返して、桑実胚を経て胚盤胞となる(図1)。ES細胞は、この胚盤胞内の、未分化な幹細胞集団である内部細胞塊に由来する細胞株として樹立される。

マウス ES細胞の樹立は1981年に初めて報告された³⁴⁾。マウス ES細胞は、胎仔線維芽細胞、STO細胞などのフィーダー細胞、あるいは、LIF (leukemia inhibitory factor) 存在下の培養により、未分化な状態のまま増殖継代される³⁾。こうしたES細胞の未分化性の維持機構については十分に解明されていないが、LIFの下流分子であるSTAT3や転写因子であるOct3/4が重要であることが報告されている⁶⁷⁾。

一方、マウス ES細胞をフィーダー細胞やLIF非存在下で浮遊培養すると、胚様体を形成する。この胚様体内では、血島など卵黄嚢類似の組織構造や筋細胞への分化が認められる。さらに、マウス ES細胞を同系マウスや免疫不全マウスの皮下や精巣内などに移植すると、外胚葉、中胚葉、内胚葉の3胚葉に属する細胞が混在するテラトーマが形成される。また、マウス ES細胞を注入された胚盤胞を成体雌マウスの子宮に移植することにより、ES細胞由来の遺伝子を受け継いだキメラマウスが作られる。このキメラマウスの交配により、ES細胞由来の細胞からなる完全な動物個体ができる。このことは、ES細胞が、始原生殖細胞を含めたすべての組織細胞に分化可能であり、最終的には個体全体を形成することができることを示している。その意味において、ES細胞は全能性を有する幹細胞といわれる。

遺伝子操作を受けたES細胞でもキメラマウスの作製は可能であるため、マウス ES細胞の全能性を利用して、遺伝子変異マウスを作ることができる。こうして作製された遺伝子変異マウスは、種々の遺伝子の機能解析のための重要な手段として用いられてきた。

1992年には、マウス始原生殖細胞をLIFとbFGF (basic fibroblast growth factor) 存在下で培養することにより、ES細胞と似た性質を有する胚性生殖細胞 (embryonic germ cell: EG細胞) が樹立された⁸³⁾(図1)。ES細胞とEG細胞の性状の違いについては十分に解析されているわけではないが、EG細胞もES細胞と同様に全能性を有している。

2. ヒト ES細胞の樹立

マウスばかりでなく、多くの動物で、ES細胞やEG細胞が樹立されてきたが、1998年に遂にヒト ES細胞と

EG細胞の樹立が報告された。Wisconsin大学のThomsonらはすでに霊長類(アカゲザルとマーモセット)の胚盤胞からES細胞を樹立していた^{16,17)}が、同様の方法によりヒト胚盤胞からもES細胞の樹立に成功した²⁾。一方、Johns Hopkins大学のGearhartらのグループは、中絶胎児から単離した始原生殖細胞からEG細胞の樹立に成功した¹²⁾。本邦においても、京都大学のグループが、カニクイザルES細胞、さらにはヒトES細胞の樹立に成功している。

当然のことながら、樹立されたヒトES細胞からキメラ個体が作製できるか否かについて確認することはできないが、ヒトES細胞を免疫不全マウスに移植すると、マウスES細胞と同様に、3胚葉由来の組織を含むテラトーマを形成することより、ヒトES細胞も全能性を有していると考えられている。しかし、ヒトES細胞は、マウスES細胞と比較して、栄養芽細胞に分化しやすい、マウスES細胞の維持に有用なLIFが有効でない、発現されている分化マーカーに差があるなど、マウスES細胞と異なる性質を有していることも指摘されている。

III. ES細胞の分化誘導

1. ES細胞から成熟細胞への分化誘導

ES細胞が全能性を有するといっても、現在のところ、その分化を完全に制御し、自在に特定の機能細胞へ誘導できるわけではない。マウスES細胞から*in vitro*で分化誘導可能な細胞としては、血液細胞^{13,15)}、血管内皮細胞¹⁶⁾、神経細胞¹⁷⁾等が報告されている。こうした誘導法の多くは胚様体を利用したもので、胚様体を種々の条件で培養し、胚様体内部の細胞分化を誘導する方法^{16,17)}、

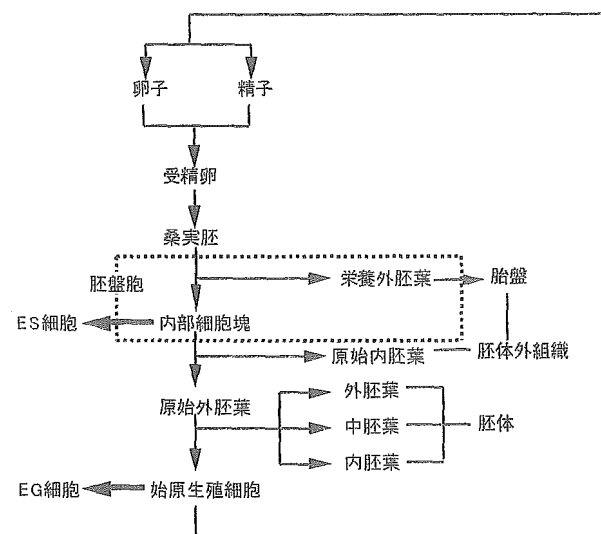


図1 ES細胞とEG細胞の由来

初期胚様体から形成される芽細胞コロニーから分化誘導する方法¹⁴⁾等がある。また胚様体を用いない方法としては、ES 細胞を種々のストローマ細胞上で培養する方法¹⁵⁾、ある程度分化させた ES 細胞の中から特定の分化能を有する細胞を、細胞表面マーカー等により選別して分化させる方法¹⁶⁾等がある。ヒト ES 細胞においても、神経細胞¹⁶⁾、心筋細胞¹⁷⁾、膵臓β細胞¹⁸⁾、内皮細胞¹⁹⁾への分化誘導が報告されている。

さらに最近では、種々の細胞分化に関わる転写因子の遺伝子を導入することにより ES 細胞を特定の機能細胞へ分化誘導しようという試みも行われている。たとえば、myoD により筋細胞へ、Hox11 により血液細胞へ、PDX-1 により膵臓β細胞への分化誘導等が試みられている。

2. ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞から造血幹細胞や成熟血液細胞への分化誘導が可能となれば、今日の造血幹細胞移植医療におけるドナー不足、あるいは、輸血医療における輸血用血液製剤の不足や、輸血用血液を介する感染の危険などの問題を解決することができる。これまでのところ、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導については、Kaufman らがストローマ細胞を用いた培養法²⁰⁾を、Wang らが胚様体を用いた培養法²¹⁾を報告しているのみであるが、そのいずれの方法でも、その血液細胞への分化誘導効率は必ずしも高くなく、また、分化誘導された血液細胞が、実際に臨床応用可能な機能を有しているか否かについても明らかにされていない。一方、ES 細胞から、移植可能な、長期造血再構築能を有する造血幹細胞への安定した分化誘導法に関しては、ヒトばかりでなく、マウスにおいても、いまだ確立された方法は報告されていない。

われわれは、ES 細胞の造血幹細胞/血液細胞への分化誘導が、従来の血液細胞の培養法では困難であった理由として、胎生期を起源とする ES 細胞の造血幹細胞/血液細胞への分化誘導には、胎生期の特定な時期に、特定な部位で特異的に機能する分子による刺激が必要であるためと推測した。したがって、ES 細胞から造血幹細胞/血液細胞への分化誘導のためには、胎生期の造血環境を再現することが重要であり、そのような胎生期造血機構を基盤とする、ヒト ES 細胞から造血幹細胞/血液細胞への分化誘導法の開発が可能ではないかと考えた。そこで、ヒト ES 細胞を用いた研究計画「ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から造血細胞への分化誘導法の開発」を、東京大学倫理審査委員会の承認を得た後、平成 14 年 7 月 8 日に文部科学省特定胚およびヒト ES 細胞研究専門委員会に申請した。同年 12 月 20 日には、当該研究は同委員会

により承認され、開始された。

ヒト ES 細胞を、胎生 15.5 日前後のマウス胎仔の胎仔肝より培養されたストローマ細胞と共培養すると、培養 6 日目頃より、ヒト ES 細胞は分化を開始した。培養 12 日目頃には、未分化な造血細胞の増殖を示す、いわゆる cobble stone area (CSA) (未分化な造血細胞がストローマ細胞下を這うようにして増殖する様子が、敷石を敷きつめたように観察されることから、この名称で呼ばれる)、が出現し、その数はしだいに増加した。CSA の数が最大となる培養 16 日目頃に、これらの培養細胞を採取し、エリスロポエチン、トロポポエチン、interleukin-3、SCF (stem cell factor)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 存在下で、コロニー培養すると、赤血球コロニー、顆粒球・マクロファージコロニー、種々の血液細胞から構成される混合コロニーなど、さまざまな血液細胞コロニーが形成された。これらのコロニーには、赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの血液細胞が含まれていた。とくに、赤血球については、成人型ヘモグロビンが合成されており、その酸素運搬能や血液型も確認することができた。

以上の結果は、われわれの開発したマウス胎仔肝由来ストローマ細胞を用いた培養法により、ヒト胚性幹細胞から、多能性造血前駆細胞を含む種々の造血前駆細胞が分化誘導され、さらにそれらの前駆細胞から多くの、臨床応用可能な血液細胞への分化誘導が可能となったことを示している。

IV. ES 細胞を用いた再生医療

1. ES 細胞を用いた再生医療の技術的問題

前述のように、ヒト ES 細胞から種々の機能細胞の分化誘導が可能となり、その臨床応用が現実のものとなりつつある。しかし、それが実際に実現されるためには、解決されねばならないいくつかの問題がある。技術的な問題点としては、異種細胞や異種血清に依存しないヒト ES 細胞の維持培養法の開発、ヒト ES 細胞から目的とする細胞への特異的分化誘導法の確立、ヒト ES 細胞由来の細胞を用いた移植における移植免疫の克服があげられる。

まず、ヒト ES 細胞自身の維持に、現時点では、マウス胎仔線維芽細胞やウシ胎仔血清が必要とされているという問題がある。異種間感染ということを考えれば、こうした異種の細胞や血清に依存しない、ヒト ES 細胞の維持培養法が開発されねばならない。

また、ヒト ES 細胞から種々の機能細胞が分化誘導さ

れたといっても、ヒト ES 細胞の一部が分化誘導されたというだけであって、特異的な誘導法が確立されているわけではない。この点では、われわれが開発した分化誘導法も同様の問題を抱えている。もちろん目的とする細胞だけを選別して用いることは可能であろうが、培養中に混入するかもしれないヒト ES 細胞の発癌性については十分に検討されねばならない。さらに臓器移植ということを考えれば、三次元構造をもった臓器を *in vitro* で構築する必要がある。

さらに、ES 細胞自身の有する遺伝子の正常性という問題がある。ES 細胞は正常 2 倍体核型という染色体の正常性を保持しつつ増殖可能ではあるが、そのことは遺伝子の正常性を保証するものではない。また仮に、ES 細胞が正常遺伝子を保持していたとしても、その分化制御を考える場合、正常発生とのエピジェネティクスの違いは考慮されねばならない。インプリンティングの影響を受ける遺伝子発現制御の異常により、分化誘導された細胞が何らかの機能異常を有する可能性についても、十分に検討されねばならない。

2. 移植免疫の克服

ヒト ES 細胞から目的とする機能細胞が *in vitro* で分化誘導できたとしても、実際の移植医療に利用するためには、移植に伴う免疫反応が克服されねばならない。ただし、輸血用血液細胞にかぎって言えば、血液型を合わせるだけでよく、あまり大きな問題はない。また、造血幹細胞移植においても、臍帯血移植に用いられる造血幹細胞が、必ずしも、すべての HLA (human leukocyte antigen) を一致させる必要がないことを考えれば、ヒト ES 細胞から分化誘導された造血幹細胞を用いた移植においても、患者の HLA と完全に一致させなくてもよい可能性はあるし、あるいは、そのほうが GVL (graft versus leukemia) 効果という点では有利かもしれない。しかし、現時点では、安全性という点を考慮すれば、HLA が完全に一致する ES 細胞を用意するのが妥当と考えられる。もちろん、外傷などにより損傷した組織の治療というような場合には、患者とまったく同じ遺伝子をもった ES 細胞を用意することが理想といえる。そうしたヒト ES 細胞由来の移植片を用いた移植における免疫学的問題を解決する方法としては、現在以下のようなことが考えられている。

1) ヒト ES 細胞バンク

現行の臍帯血バンクの成功を考えれば、さまざまな HLA を有するヒト ES 細胞を作製し、これをバンキングしておき、移植時にドナーと一致する HLA をもった ES 細胞から必要な移植片を作製するという方法が考えられ

る。しかし、仮に、用意する ES 細胞が臍帯血と同程度の HLA の一致度でよいとしても、実際には、多数のヒト ES 細胞の樹立と維持ということには、技術的にも、倫理的にも多くの困難がともなうと予想される。

2) ヒト ES 細胞の遺伝子改変

マウス ES 細胞で培われてきた遺伝子改変技術を駆使して、HLA の問題を解決しようという考えがある。方法としては、相同遺伝子組み換えを利用して、ドナーの HLA 遺伝子をヒト ES 細胞に導入する方法、さらには内在する HLA 遺伝子を破壊したヒト ES 細胞を作製し、これに必要とされる HLA 遺伝子を導入する方法等が考案されている。

3) 体細胞核移植の応用

あまりにも有名な羊のドリー¹⁸⁾の成功以来、体細胞核の未受精卵への移植によるクローン動物の作製技術は、畜産分野において著しい進歩を遂げた。この核移植技術を用いて、組織適合性の問題を解決しようという試みが提案されている。核移植のレシピエント細胞としては、ヒト ES 細胞自身とヒト未受精卵の 2 種類が考えられている (図 2)。前者においては、患者の体細胞核を移植された ES 細胞を分化誘導して、患者と同じゲノムをもった移植片を得ることになるが、現在のところ、この方法には技術的にまだ困難な点が多い。一方、後者においては、患者の体細胞核を移植されたヒト脱核未受精卵、いわゆるクローン胚から得られた胚盤胞により、患者本人のゲノムをもつ ES 細胞を樹立し、この ES 細胞から移植片を作製する。この方法は、少なくとも現時点では、前者よりも実現性は高いが、その過程で作製されるクローン胚から得られた胚盤胞を、成人女性の子宮に移植すれ

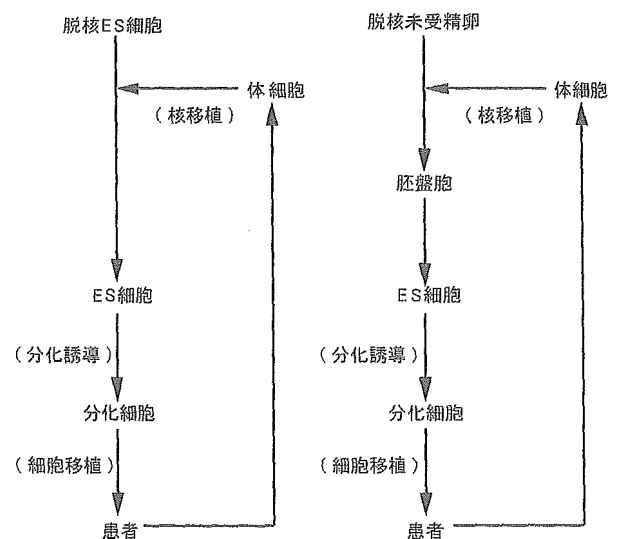


図 2 ヒト ES 細胞と体細胞核移植

ば、理論的には、クローン人間の作製が可能であり、このことが、後述する倫理的問題をはらんでいる。

3. ヒト ES 細胞をめぐる倫理的問題

ヒト ES 細胞を用いた再生医療にかかわる倫理的問題は、大きくは、ヒト ES 細胞の作製に必要とされるヒト胚にかかわる問題と、ヒト ES 細胞から作製されるヒトクローン胚にかかわる問題に分けられる。ただ、こうした倫理的問題の背景には、個人あるいは社会が抱えている宗教、思想、生命観の違いがあり、すべての人々が納得する回答はないともいえる。実際、これらの倫理的問題に対する取り組みには、世界各国でかなりの違いがある。

わが国においては、ヒト ES 細胞の作製と使用については、2001年に、文部科学省より「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」が示された。この指針では、ヒト胚を「生命の萌芽」と位置づけ、慎重に扱われねばならないとした上で、同省の審査委員会の承認を得た研究については、ヒト ES 細胞の作製と使用が認められた。われわれの研究についても、本指針を遵守して実施されている。

ヒトクローン胚研究については、2001年に成立した「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」(クローン技術規制法)により、クローン人間の誕生は法的に防止されている。しかし、クローン胚を用いた研究については、昨年(2000年)の7月に、総合科学技術会議の生命倫理専門委員会により、基本的にはヒトクローン胚研究を認める最終報告書がまとめられたが、この報告書に対しては批判も多く、現在のところは、クローン胚研究の科学的検証のための枠組みが整備されるまで、実質的にはモラトリアム状態にある。

倫理的問題について、確固たる結論を得ることは、本来的にありえないことなのかもしれない。結局のところ、こうした医学研究の正当性を最終的に保証するものは、研究者の倫理観でしかないであろう。とすれば、ヒト ES 細胞をめぐる倫理的問題の多くは、医学者、研究者の良心が問われているのであり、われわれは研究の高い公開性、透明性を確保し、社会が常に厳しく監視できるような研究体制を構築していく必要がある。

V. おわりに

われわれ小児科医は、人間が、「あかちゃん」という現実の人間として、この世にはじめて姿を現す場面にかかわり、彼らがおかあさんの子宮にいる頃から、彼らを見守り、その健やかな誕生を心から願っている。その意味では、生命の萌芽という問題を、もっとも実感し、真

剣に考えているもののひとりといえるだろう。そういった立場にあるものとして、われわれは、こうした問題について、社会に対して、自分たちの意見を表明していく責務を負っていることを自覚しなければならないと思う。

引用文献

- 1) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**: 1168-1170, 1999
- 2) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-1147, 1998
- 3) Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156, 1981
- 4) Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7634-7638, 1981
- 5) Smith AG, Nichols J, Robertson M, et al: Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development. *Dev Biol* **151**: 339-351, 1992
- 6) Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, et al: STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* **18**: 4261-4269, 1999
- 7) Niwa H, Miyazaki J, Smith AG: Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genet* **24**: 372-376, 2000
- 8) Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM: Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**: 841-847, 1992
- 9) Resnic JL, Bixler LS, Cheng L, et al: Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* **359**: 550-551, 1992
- 10) Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al: Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7844-7848, 1995
- 11) Thomson JA, Marshall VS: Perimate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* **38**: 133-165, 1998
- 12) Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, et al: Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13726-13731, 1998
- 13) Nakano T, Kodama H, Honjo T: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* **265**: 1098-1101, 1994
- 14) Kennedy M, Firpo M, Wall C, et al: A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* **386**: 488-493, 1997
- 15) Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, et al: Progressive lineage analysis by cell sorting and culture

- identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hematopoietic lineages. *Development* **125**: 1747-1757, 1998
- 16) Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al: Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnol* **18**: 399-404, 2000
- 17) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* **108**: 407-414, 2001
- 18) Assady S, Maor G, Amit M, et al: Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* **50**: 1691-1697, 2001
- 19) Levenberg S, Golub JS, Amit M, et al: Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4391-4396, 2002
- 20) Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, et al: Hematopoietic colony-stimulating cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Sci USA* **98**: 10716-10721, 2001
- 21) Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, et al: Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* **21**: 31-41, 2004

造血幹細胞

辻 浩一郎*

要 旨

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能という2つの能力を併せ持つことにより、我々の一生にわたる造血を維持し、造血幹細胞移植においてはレシピエントの骨髄に新たな造血を再構築することを可能としている。造血幹細胞は、現時点で最も研究の進んでいる体性幹細胞であり、造血幹細胞移植は最も完成度の高い再生医療と言える。さらに最近では、造血幹細胞が血液細胞以外の機能を持った細胞に分化する能力（可塑性）を有する可能性が示され、新たな医療への臨床応用が期待されている。しかし、造血幹細胞の生物学的性質についてはまだ不明な点も数多く残されており、それらを1つ1つ克服していくことにより、より安全で有効な造血幹細胞を用いた医療が実現されるものと思われる。

はじめに

再生医療が21世紀の医療の根幹をなす医療の1つであり、幹細胞がその主役となるであろうことは間違いのないことと思われる。現在のところ、その再生医療の材料となる幹細胞としては、本特集でも取り上げられているように、胎生期に起源を有する胚性幹細胞（ES細胞）と、我々成人の体内に存在し、日常の生体組織の維持・修復を担っている体性幹細胞が想定されている。実際の臨床応用を考えた場合、前者には技術的にも克服されねばならない課題も多く、また何よりも解決されるべき倫理的あるいは法的問題が残されて

おり、ヒトES細胞を用いた医療が社会に受け入れられるための環境整備にはまだ少し時間を要するであろう。その点、後者は倫理的問題も少なく、「可塑性」という極めて魅力的な現象が報告されたこともあり、近未来的には体性幹細胞を用いた医療が先行すると予想される。

造血幹細胞はそうした体性幹細胞の1つであり、造血幹細胞移植療法は少なくとも現時点では最も成功した再生医療と言える。本稿では、造血幹細胞移植の基礎となっている造血幹細胞の基本的性質を概説するとともに、造血幹細胞を用いた再生医療の新たな可能性にも言及したい。

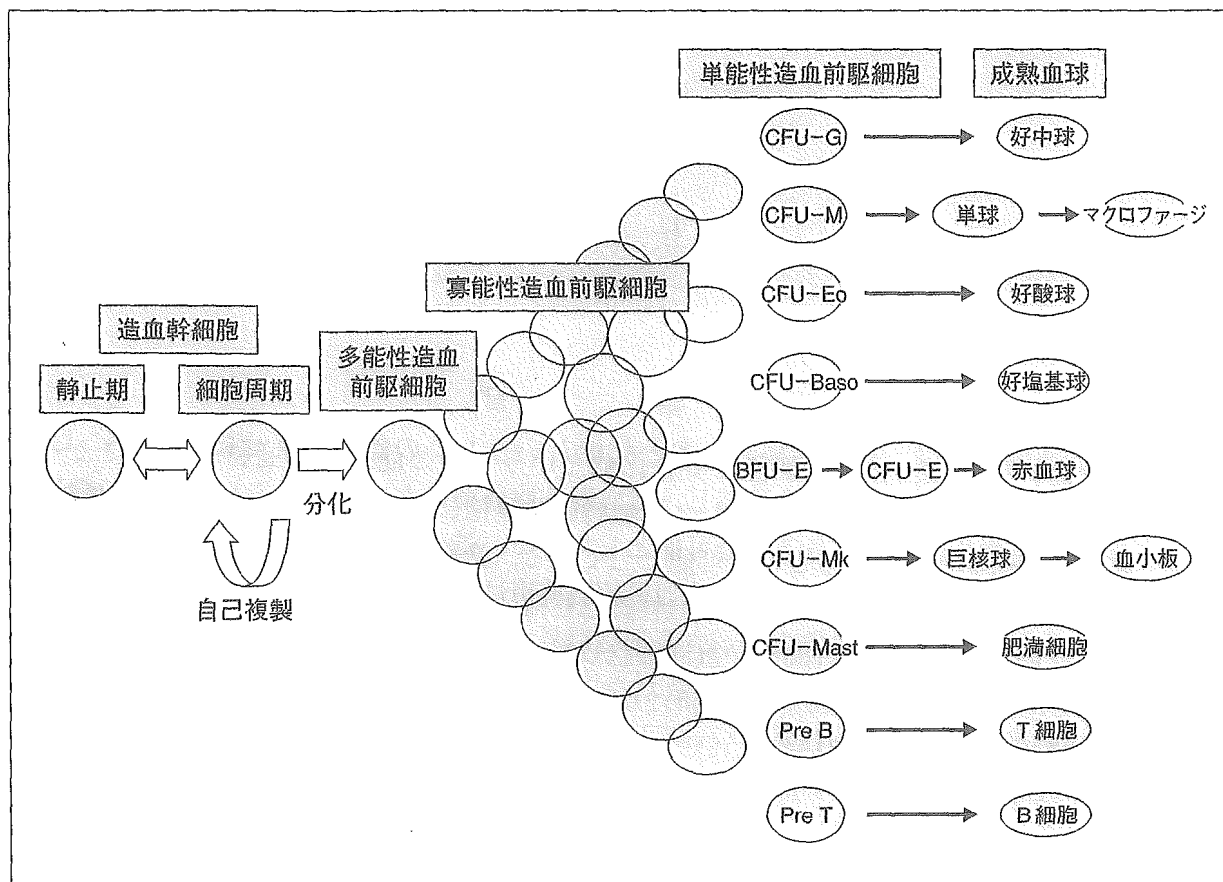
造血幹細胞の分化・増殖（図1）

血液中には形態と機能を異にする種々の血液細胞が存在するが、それらはいずれも固有

* 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター
細胞療法分野 助教授

キーワード：造血幹細胞，体性幹細胞，
造血幹細胞移植，再生医療，可塑性

図1 造血幹細胞の自己複製と分化



CFU-G：好中球系前駆細胞，CFU-M：マクロファージ系前駆細胞，CFU-Eo：好酸球系前駆細胞，
 CFU-Baso：好塩基球系前駆細胞，BFU-E：未熟赤血球系前駆細胞，CFU-E：成熟赤血球系前駆細胞，
 CFU-Mk：巨核球系前駆細胞，CFU-Mast：肥満細胞系前駆細胞，Pre B：B細胞系前駆細胞，
 Pre T：T細胞系前駆細胞

の寿命で崩壊している。この膨大な数の血液細胞を一生の間供給し続けるためには、その源となる未分化な細胞のプールが必要であり、これらの細胞を造血幹細胞と呼ぶ。この造血幹細胞をレシピエントに移植し、その体内、主には骨髄に新たな造血を再構築し、長期にわたり維持することが造血幹細胞移植の目的と言える。こうした造血幹細胞の能力は「長期造血再構築能」と呼ばれる。

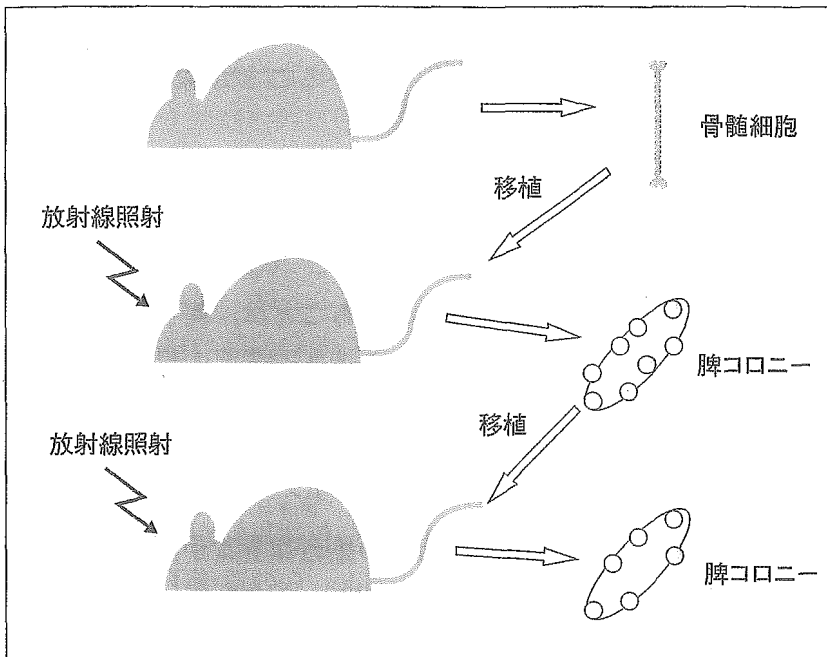
造血幹細胞は、他の幹細胞と同様に、幹細胞の基本的性質である自己複製能（細胞分裂により自己と同じ能力を有する細胞を複製する能力）と、多分化能（異なる形態と機能を持ったさまざまな血液細胞に分化する能力）という2つの能力を併せ持つことにより、長

期造血再構築を可能としている。

恒常状態では多くの造血幹細胞は静止期にあり、必要に応じて細胞周期に入り（活性化）、細胞分裂する。造血幹細胞は細胞分裂すると、その娘細胞は自己複製して再び造血幹細胞となるか、あるいは分化して多能性造血前駆細胞となる。多能性造血前駆細胞はすでに分化することが運命づけられた細胞で、多分化能は有しているが自己複製能は持たないことより、造血幹細胞とは区別される。

造血幹細胞由来の多能性造血前駆細胞は、細胞分裂を繰り返しながら次第に多分化能を失い、数種類の血球系への分化能のみを有する寡能性造血前駆細胞を経て、単一の血球系にしか分化できない単能性造血前駆細胞とな

図2 CFU-Sの自己複製



り、最終的にはリンパ球を含むすべての成熟血球を産生する。ただし、造血幹細胞移植後の免疫機構の再構築が造血機構のそれよりかなり遅れることから明らかなように、リンパ球の分化成熟過程は他の血液細胞とは異なっており、必ずしも十分に解明されているわけではない。特に多能性造血前駆細胞からリンパ球が産生される初期分化の過程は不明な点が多く、T細胞とB細胞に共通な前駆細胞の存在も報告されている¹⁾。ただいずれにしても、このリンパ球を含む血液細胞の産生過程は、サイトカインと呼ばれる種々の細胞から産生される液性因子と、血液細胞を取り囲む造血微小環境（ニッチ）により制御されている（新井の稿参照）。

造血幹細胞の活性化

1986年 Lemischka ら²⁾は、レトロウイルスの組み込み部位をマーカーとするマウス造血幹細胞の移植実験を行った。その結果、少なくとも移植後の造血回復期においては、造血幹細胞のプールが平均的に使われているのではなく、一部のクローンが消退を繰り返

していることを示した。さらに彼らは、移植を受けたマウスの骨髄を2次移植すると、最初のレシピエントマウスでは造血に関与しなかったクローンが、2次移植されたマウスの造血を支持しうることを示した。以上の結果は、静止期にある造血幹細胞は必要に応じて活性化され、造血に関与することを示している。造血幹細胞の活性化の機序については十分に解明されているわけではないが、少なくともその一部は複数のサイトカインの協同作用により制御されていると考えられている。

造血幹細胞の自己複製

造血幹細胞の自己複製という概念は、主に1961年に Till と McCulloch により報告されたマウス脾コロニーの実験から形成された³⁾。彼らは、致死量放射線照射したマウスに同系マウス骨髄を移植すると、10日後にはレシピエントマウスの脾臓に移植細胞数に比例して赤芽球、顆粒球、巨核球およびこれらの細胞の混在した脾コロニーが形成されることを見いだした（図2）。また、放射線により惹起された種々の染色体異常を有する骨髄細胞

を移植しても、1つのコロニーからは同一の染色体異常しか検出されないことより、個々の脾コロニーはそれぞれ1個の細胞に由来することが明らかとなり、この細胞は脾コロニー形成細胞 (CFU-S) と命名された。さらに、形成された脾コロニーを取り出し別の被照射マウスに移植すると、再び脾臓に3系統の血球細胞からなるコロニーが形成されることから (図2)、CFU-S は各血球系に分化する能力とともに自己複製する能力も有することが示され、CFU-S は造血幹細胞であると推測された。

それでは、造血幹細胞が細胞分裂する際、自己複製するか多能性造血前駆細胞に分化するかは、どのように制御されているのであろうか。Till ら⁴⁾ は、脾コロニー中に含まれる CFU-S の頻度を解析し、造血幹細胞が自己複製するか分化するかは個々の分裂では全くアランダムに起こるが、全体としては一定の確率 (彼らの計算によれば 0.6 と算出された) で規定される現象であるとする stochastic model を提唱した。

しかし最近になって、造血幹細胞も決して均一な細胞集団ではなく、階層性を有していると考えられるようになってきており、自己複製という概念も変わりつつある。つまり、長期造血再構築能という機能からみれば、確かに造血幹細胞は自己複製しているかのごとく観察されるとしても、厳密には造血幹細胞といえども細胞分裂すればそれなりの分化をするのであるが、長期造血再構築能を保持する未分化な細胞集団として十分な階層性を有しているために、一生にわたる造血を維持しようとの考えである。その意味では、造血幹細胞の自己複製機構とは、造血幹細胞の未分化性維持機構と言えるかもしれない。

最近では、こうした造血幹細胞の自己複製の分子基盤についても次第に明らかになりつつある。特に、ポリコムグループ遺伝子産

物は造血幹細胞の自己複製の制御に関与していると考えられ、中でも Bmi-1 はその中心的役割を担っていることが報告されている⁹⁾ (岩間の稿参照)。

造血幹細胞の多分化能

造血幹細胞がリンパ球を含むすべての血液細胞に分化しうることが、何らかのマーカーを有するマウス造血幹細胞の移植実験から証明される。例えば、放射線照射により誘導された染色体異常を有する造血幹細胞を移植されたマウスでは、リンパ球を含むすべての血球細胞で同一の染色体異常が認められるし⁶⁾、前述の Lemischka らの遺伝子工学的なマーカーを用いた移植実験でも同様の結果が示されている⁷⁾。さらに最近では、1個の造血幹細胞を移植することによりすべての血球系細胞が再構築されることも確認されている⁷⁾。

こうした造血幹細胞からさまざまな血液細胞への分化は、おのおのの血球系に特異的な転写因子によって制御されていると考えられている。特に、骨髓球系細胞への分化には C/EBP, PU.1, 赤血球・巨核球系細胞への分化には GATA 転写因子群が重要な役割を果たしていることが知られている。興味深いことに、C/EBP 遺伝子欠損マウスの造血幹細胞では、自己複製能を増強するとされる Bmi-1 の発現が亢進していることが報告されており⁸⁾、分化と自己複製という生物反応の相反的な関係が示唆される。

造血幹細胞の可塑性

従来、生体組織にはおのおのの組織に特異的な体性幹細胞が存在し、それらから特定の機能を持った成熟組織細胞が過不足なく供給されて生体は維持されていると考えられてきたが、1999年頃から、体性幹細胞の分化能は必ずしも限定的なものではなく、予想以上に広範な分化能 (可塑性) を有しているので

はないかという報告が相次いでなされた⁹⁾¹⁰⁾。これらの報告は体性幹細胞を用いた再生医療の新たな可能性を示すものであったが、最近になって体性幹細胞の可塑性に否定的な報告もなされ¹¹⁾¹²⁾、体性幹細胞の可塑性に関する見解は現在非常に混沌としている。

造血幹細胞についても、骨格筋や心筋などの筋肉細胞、神経細胞、肝細胞、膵細胞、腸管や気管・肺の上皮細胞、腎尿細管細胞、皮膚のケラチノサイトなどへの *in vivo*, *in vitro* での分化が報告されているが、検討されている造血幹細胞の純化の程度はさまざまであり、造血幹細胞が本当に可塑性を有しているか否かについて最終的な結論は出ていない。ただ現象的には、たとえ造血幹細胞ではないとしても、骨髄中の細胞が他の組織環境では、脱分化するにしろ、細胞融合するにしろ、さまざまな機能を獲得しうることは間違いなく、その意味では臨床的には有用な発見と言える。

造血幹細胞の発生と性質の変化

現在、造血幹細胞移植のための造血幹細胞としては、主に骨髄血中の造血幹細胞、G-CSF により末梢血に動員された造血幹細胞、臍帯血中の造血幹細胞が用いられている。もちろん、これらの造血幹細胞は基本的に自己複製能と多分化能を有しているからこそ造血幹細胞移植に用いられるわけであるが、実験的事実あるいは実際の造血幹細胞移植における臨床的観察からも明らかなように、これらの造血幹細胞の性状は必ずしも同一ではない。それらの性状の差異は、これらの造血幹細胞の発生学的違いを反映しているものと考えられる。

脊椎動物の胎生期造血には、その初期を担う1次造血と、それ以降の造血を担う2次造血があり、造血幹細胞は2次造血において初めて発生する。マウスにおいては、1次造血

は卵黄嚢、2次造血は胚体内の AGM 領域と呼ばれる部位、すなわちマウス胎仔の体軸に沿った部位で、背側大動脈、生殖堤と性腺、前腎・中腎を含む部位に発生する¹³⁾¹⁴⁾。この AGM 領域に発生した造血幹細胞は、その後造血の場を胎仔肝に移動し、劇的に増幅された後、さらに骨髄、脾臓に移動し、それ以後の一生にわたる造血を担うことになる。このように、胎生期の造血幹細胞はその発達段階に適したニッチを求めるとともに胎児体内を移動することからも明らかなように、造血幹細胞の性質も宿主の発達に伴って変化する。したがって、胎生期に起源を有する臍帯血中の造血幹細胞と成人骨髄中の造血幹細胞では、その能力に差異があるであろうことは想像に難くない。

また、末梢血中の造血幹細胞は骨髄造血幹細胞に由来するものの、少なくとも骨髄からの遊離が可能となるような何らかの修飾を受けた造血幹細胞であることを考えれば（服部の稿参照）、その性状が骨髄中の造血幹細胞と全く同じとは考えにくい。

実際、臍帯血中の造血幹細胞は、成人骨髄中の造血幹細胞や末梢血中の造血幹細胞と比較して高い長期造血再構築能を有していることが、数多く報告されている¹⁵⁾。今後、これらの造血幹細胞の性質の差異を明らかにしていくことにより、患者の病状に合わせた、より安全で、有効な造血幹細胞を選択することが可能となると考えられる。

おわりに

造血幹細胞は、体性幹細胞としては最も研究の先行した細胞であり、そうした研究成果を基盤として、造血幹細胞移植医療は発展してきた。造血幹細胞が本当に可塑性を有しているか否かは今後の検討を待たねばならないが、現象的には骨髄細胞を用いた再生医療の新たな可能性を示すものと言える。ただいず

れにしても、造血幹細胞についてはまだ未解決の問題が数多く残されており、それらを1つ1つ克服していくことにより、造血幹細胞移植がより完成度の高い医療として発展していくものと思われる。

文 献

- 1) Kondo M, et al: Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661-672, 1997.
- 2) Lemischka IR, et al: Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 45: 917-923, 1986.
- 3) Till J E, et al: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. *Radiat Res* 14: 213-218, 1961.
- 4) Till J E, et al: A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen-colony forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 51: 29-35, 1964.
- 5) Iwama A, et al: Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the Polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* 21: 843-851, 2004.
- 6) Abramson S, et al: The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* 145: 1567-1573, 1977.
- 7) Osawa M, et al: Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273: 242-245, 1996.
- 8) Zhang P, et al: Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capability and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP. *Immunity* 21: 853-863, 2004.
- 9) Bjornson CR, et al: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283: 534-537, 1999.
- 10) Jackson K A, et al: Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14482-14486, 1999.
- 11) Morshead C M, et al: Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alteration. *Nat Med* 8: 268-273, 2002.
- 12) Terada N, et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545, 2002.
- 13) Medvinsky A L, et al: An early pre-liver intra-embryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364: 64-68, 1993.
- 14) Muller A M, et al: Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1: 291-298, 1994.
- 15) Jean C Y, et al: Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative *in vivo* SCID-repopulating cell assay. *Blood* 89: 3919-3928, 1997.

Hematopoietic Stem Cells

Kohichiro Tsuji

Division of Cellular Therapy, Advanced Clinical Research Center,
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

ES細胞の造血幹細胞移植への応用

辻 浩 一 郎*

特集 造血幹細胞移植の将来

Application of embryonic stem cells to hematopoietic stem cell transplantation

21世紀の医療とも称される再生医療は、幹細胞を用いた医療ともいえる。なかでも、体性幹細胞である造血幹細胞を用いた造血幹細胞移植は、現時点では、最も成熟度の高い再生医療の一つであり、すでに種々の血液腫瘍性疾患に対する治療法として確立されている。しかし、その適応患者の拡大に伴い、ドナーの絶対的不足が大きな問題となっている。こうした問題を解決するために、全能性を有するヒト胚性幹細胞から分化誘導された造血幹細胞が、移植用造血幹細胞のための新たな供給源として注目されている。しかし、その実現のためには、克服されるべき問題も多く、そうした現実を絶えず社会に公開しながら、着実に研究を進めていく必要がある。

Kohichiro Tsuji*

key words : ES細胞 (embryonic stem cell : 胚性幹細胞), 体性幹細胞, 再生医療, 造血幹細胞, 造血幹細胞移植

再生医療という言葉が一般に認知されるようになったのは、ここ十数年のことであり、それより以前から造血幹細胞移植は実施され、現在では、種々の血液疾患・腫瘍性疾患に対する治療法の一つとしてほぼ確立されたといってもよいだろう。仮に、再生医療を“生物が本来保持している組織の再生能力を利用した医療”とするならば、そうした再生能力の基礎を担っている幹細胞は、再生医療の主役の一人であることは間違いはない。そうした意味で、造血幹細胞移植は、少なくとも現時点で、最も完成度の高い再生医療の一つといえる。

現在、再生医療のための幹細胞としては、体性幹細胞と胚性幹細胞(embryonic stem cell : ES細胞)の二つが考えられている。前者は、われわれ成人の生体に存在し、各組織の機能を維持するための細胞を過不足なく産生している幹細胞で、造血幹細胞は、歴史的に最もよく研究されてきた体性幹細胞だろう。もちろん、そのほかにも、神経幹細胞、肝臓幹細胞、間葉系幹細胞など、各組織にはそれぞれ特異的な体性幹細胞が存在し、成人

組織の機能維持に貢献している。

一方、ES細胞は、胎生期に由来し、すべての体性幹細胞の起源となる細胞である。マスコミでは、“万能細胞”とも称され、良くも悪くも、再生医療の象徴であった。本稿では、そうしたヒトES細胞を用いた再生医療の現状と問題点を含めて、造血幹細胞移植への応用の可能性について概説する。

ES細胞研究の歴史

1. マウス ES細胞の樹立

受精卵は卵割を繰り返して、胎生初期には、桑実胚を経て胚盤胞となる(図1)。ES細胞は、この胚盤胞内の、未分化な幹細胞集団である内部細胞塊に由来する細胞株として樹立される。

マウスES細胞の樹立は1981年にはじめて報告された^{1,2)}。マウスES細胞は、胎仔線維芽細胞、STO細胞などのフィーダー細胞、あるいは、LIF(leukemia inhibitory factor)存在下の培養により、未分化な状態のまま増殖継代される³⁾。こうしたES細胞の未分化性の維持機構については十分に解明されていないが、LIFの下流分子であるSTAT3や転写因子であるOct3/4が重要であるこ

*Division of Cellular Therapy, Advanced Clinical Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo 東京大学医科学研究所先端医療研究センター細胞療法分野