

ウン症候群の小児では、染色体に異常がみられない小児と比較して、白血病の発生率が高いことがわかっています。また、ファンコニー⁽²⁾貧血やブルーム症候群⁽³⁾の患者さんの染色体は生まれつき障害を受けやすいことが知られていますが、そのような病気をまとめて、染色体脆弱症候群とよびます、これらの患者さんでも高率に白血病が発生します。

白血病がいろいろなタイプの白血病に分類されることは、成人も小児も同じですが(五四頁参照)、その分類された各白血病の割合は、成人と小児では大きく異なっています。成人の白血病の半数以上は急性骨髄性白血病(AML)で、そのほかに、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、骨髓異形成症候群(MDS)が各ターオー二〇割を占め、慢性リンパ性白血病(CLL)も二〜三割に認められます。これに対して、小児白血病では、ALLが七〇〜七五割を占め、AMLは二〇〜二五割、CMLとMDSにいたっては数割にすぎず、CLLは、小児ではほとんどみられません。

それぞれの白血病の小児における特徴については後で詳しく述べますが、小児白血病全体としてみれば、小児の白血病は成人のそれと比べて薬が効きやすいといえます。とくに近年、いろいろな種類の薬を組み合わせる治療を行う多剤併用療法の

(2) ファンコニー症候群

小児期から思春期に再生不良性貧血を発症する遺伝性疾患で、患者さんは、低身長、拇指奇形などの先天奇形や色素沈着などの身体的な特徴を有しています。本症の患者さんの染色体は、DNA架橋剤とよばれる特殊な薬剤により染色体断裂を起こしやすく、これを確認することにより診断されます。八つのタイプに分けられ、そのうちセタイプが、本症の原因となる遺伝子がわかっており、それらの遺伝子のいずれの異常によっても、DNAが障害されやすくなります。そのため、白血病などの悪性腫瘍の発生頻度が高いと考えられています。

(3) ブルーム症候群

BLMという遺伝子の障害による稀な遺伝性疾患で、患者さんには、低出生体重児、低身長などの身体発育不良、日光過敏性血管拡張

進歩は著しく、薬だけで完全に治ってしまう小児白血病の患者さんもずいぶん増えてきました。したがって、最初の治療として、造血幹細胞移植が行われる白血病は、小児の場合は特殊な白血病に限られています。

また、そうした治療法の進歩によって、同じ小児白血病といっても、治りやすいものから治りにくいものまで、さまざまであり、それぞれの患者さんの治りやすさ（白血病に限りませんが、病気の治りやすさを予後と呼び、治りやすいことを「予後がいい」とか、「予後良好である」「治りにくい」ことを「予後が悪い」「予後不良である」といいます）をある程度予測できるようになってきました。そうした予測される治りやすさの指標を予後因子とよびますが、この予後因子を用いることによって、治りやすいと推測される患者さんには、不必要に強い治療はしないで治してしまつことによって、患者さんの生活の質（QOL）を向上させていくことが考えられています。また逆に、治りにくいと予測される患者さんには強力な治療をして、少しでも治る確率を高めることが試みられています。

造血幹細胞移植はそういった強力な治療の一つといえます。造血幹細胞移植にもいろいろな種類があり、そのなかに臍帯血移植も含まれていることは、すでにほかの先生方が述べられておられるとおりで、臍帯血移植が白血病に対する非常に有効

性紅斑、色素沈着、色素脱失などの皮膚症状、細長い顔といった特徴があります。BLM遺伝子の異常によってもDNAは障害を受けやすくなり、そのため本症の患者さんも、白血病を含む様々な悪性腫瘍を発生しやすいことが知られています。

な治療法であることは、小児でも、成人でもかわりありません。ただ、臍帯血移植は、当然のことですが、採取できる造血幹細胞の数に限界があるので、とくに体格の小さな小児の白血病を治すためにはとても強力な手段となります。それでは、それぞれの小児白血病について、もう少し詳しくお話ししましょう（前章の東條先生のお話も参考にしてください）。

小児急性リンパ性白血病（ALL）

さきほども述べましたように、小児で最も多い白血病がこのALLで、二〜六歳に発症のピークがあります。小児ALLでは、FAB分類（五七頁参照）のL1が多（七〇〜八〇割）、L2が少なく（二〇〜三〇割）、成人とその比率が逆転しています（成人では、小児とは逆に、L2が多く（六〇〜八〇割）、L1が少なくなっています（二〇〜三〇割））。

ただし、小児ALLの場合、顕微鏡で観察される白血病細胞の形に基づくFAB分類よりも、白血病細胞表面上の、リンパ球の種類や成熟段階を反映していると考えられる蛋白質（マーカーといえます）を用いた免疫学的分類の方が、一般的によ

く用いられます。この分類に従えば、おおまかには、B前駆細胞型ALL⁽⁴⁾のタイプの白血病細胞の大部分はCD10というマーカーをもっており、小児ALLの七〇〜八〇割を占めています。成熟B細胞型ALL⁽⁴⁾（数割）、T細胞型ALL⁽⁴⁾（約一五割）に分けられ、そのほかに、特殊なタイプとしてNK細胞から生じたALLなどもあります。

小児ALLでは、成人のALLと比べて薬が効きやすいことは先に述べたとおりで、七〇割以上の患者さんで治るようになってきました。しかし、個々の患者さんを見れば、その予後は必ずしも一様ではありません。これまで、小児ALLの予後因子としては、最初に白血病と診断されたときの年齢と、血液中の白血球数が重要とされてきました。また、かなり最近まで、前述の免疫学的分類も小児ALLの予後因子となると考えられ、そのため免疫学的分類が重要視されてきました。つまり、B前駆細胞型ALLは予後がよく、成熟B細胞型ALL、T細胞型ALLは予後不良とされてきたのですが、近年の治療法の進歩により、そういった小児ALLのタイプによる予後の差はほとんどなくなり、むしろ、最初にプレドニゾンという薬を使ったときに、その薬がよく効くかどうかということの方が、よい予後因子となると考えられるようになってきています。

(4) B前駆細胞型ALL、成熟B細胞型ALL、T細胞型ALL

白血球の一種であるリンパ球は免疫に係る細胞で、大きくはBリンパ球（単にB細胞ともいいます）とTリンパ球（T細胞）に分類されます。B細胞は抗体を産生することにより、T細胞は直接細胞を攻撃することにより、抗原をもつウイルスやがん細胞を障害します。両者のいずれからも白血病細胞は発生し、各々B細胞型ALL、T細胞型ALLとよばれます。B細胞型ALLは小児ALLの七〇〜八〇割も占めるため、白血病細胞を発生したB細胞の成熟段階により、さらにB前駆細胞型ALL、成熟B細胞型ALLに分類されます。B前駆細胞型ALLは未熟なB細胞から、成熟B細胞型ALLは言葉どおり成熟したB細胞から発生すると考えられています。

そのほかに、白血病細胞の染色体や遺伝子の異常の有無が、患者さんの予後と関係することがわかっています。たとえば、白血病細胞にフィラデルフィア染色体と呼ばれる異常染色体がみつかるフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病(Ph ALL)は、非常に予後が悪いことが知られています。また、生後一年以内の乳児期に発症する乳児白血病も非常に予後が悪い白血病の一つですが、そのような乳児白血病患者さんの大部分の白血病細胞で、11番目の染色体に存在するMLLという遺伝子の異常がみつかっています。

そういった予後不良と予測される白血病を除けば、小児ALLでは、まず多剤併用療法で治療されることが普通です。一方、予後が悪いと予測される患者さんや、多剤併用療法があまり効かない患者さん、あるいは一旦は効いても再発してしまった患者さんに対しては、臍帯血移植を含む造血幹細胞移植が考慮されます。

◆ 小児骨髄性白血病(AML) ◆

小児のAMLにおいても、成人と同様にFAB分類がよく用いられます。そのFAB分類によるAMLの各々のタイプの間の比率に、小児と成人であまり大きな差

はありませんが、小児では、成人と較べてM3（急性前骨髄性白血病）が少なく、M7（急性巨核芽球性白血病）が多い傾向にあります。とくに、ダウン症候群に合併するAMLの大部分がM7であることはよく知られています。

一九七〇年以前は、小児AMLのほとんどの患者さんは死亡され、その後も、造血幹細胞移植が小児AMLの唯一の治療法とされた時期が長い間続きました。しかし最近では、多剤併用療法の進歩によって、小児AMLの予後も飛躍的に改善してきました。

とくに一九九一年以降、わが国では小児AMLの患者さんに対して、全国で統一された治療が行われるようになり、その生存率は六〇％を超えるようになってきました。これは多剤併用療法を基本とした治療ですが、もちろん小児AMLでも、予後不良と予測される患者さん、多剤併用療法があまり効かない患者さん、あるいは一旦は効いても再発してしまった患者さんに対しては、造血幹細胞移植が行われます。また、急性前骨髄性白血病や、ダウン症候群に合併したAMLの患者さんに対しては、通常のAMLの患者さんとは異なる特別な治療が実施されます。

小児慢性骨髄性白血病(CML)

小児CMLは、従来成人型と若年型に分けられてきました。成人型CMLというのは、文字どおり成人の方にみられるのと同じタイプのCMLで、白血病細胞にフィラデルフィア染色体がみつかるCMLのことを指します。一方、若年型CMLというのは、白血病細胞にフィラデルフィア染色体はみつからず、成人型CMLとはまったく異なる白血病と考えられるようになりました。そのため現在では、若年型CMLは若年型骨髄単球性白血病(JMML)とよばれることが多く、次にお話しするMDSに分類されています。そういうわけで、今は、小児においても、CMLといえは一般には、成人と同じフィラデルフィア染色体陽性のCMLを意味しました。したがって、CMLに関する基本的なことは、東條先生のお話を参考になさってください。

「小児白血病の特徴」でも述べましたように、CMLは小児ではまれな病気で、患者さんのその多くは学童以上の比較的年長の子どもたちです。治療方針や予後に関しては、成人と小児で大きな差はありません。また、治療においても、最近開発

されたイマチニブ（商品名・グリベック）という薬がよく効くことも成人と変わりはありませんが、このイマチニブだけでCMMLを完全に治療できるかどうかは、まだよくわかっておらず、少なくとも現時点では、小児CMMLの第一慢性期（六〇頁参照）に造血幹細胞移植を実施することが望ましいことを強調しておきたいと思えます。

骨髄異形成症候群(MDS)

MDSの概念は一般の方にはちょっとわかりにくいかもしれませんが、赤血球、白血球、血小板の三種類の血液細胞がうまく造られないという点では、再生不良性貧血とよく似ていると思われる方も多いと思いますが、むしろ白血病に近い病気と考えられており、従来のFAB分類でいう不応性貧血(RA)、鉄芽球性貧血(RAR S)を除けば、MDSは将来AMLになる可能性の高いという意味で、以前は前白血病状態ともよばれました。

白血病と同様に、MDSの原因についても十分にはわかっていません（というよりも、一部のMDSは前白血病状態なのですから、MDSの原因がわかれば、白血

病の原因もわかるというべきなのかもしれません。前述のFAB分類では、MDSは、顕微鏡で観察される血液の異常から、五つのタイプに分けられていますが、このことからMDSの原因は一樣でないと推測されます。

ただ、小児と成人のMDSでは異なる点が多く、これまでも、小児MDSの患者さんのなかには、FAB分類ではうまく分類できない患者さんがおられることが指摘されてきました。たとえば、RARsの患者さんは小児ではほとんどいません。また、小児CMLでお話しましたJMMLは、従来少し無理をして慢性骨髓単球形白血病(CML)に分類されてきましたが、そのためにいろいろな矛盾が生じていました。実際、成人、小児、いずれにおいても、FAB分類本来の定義に基づくCMLは、それぞれのMDSの五割ぐらいにすぎませんが、小児の場合、JMMLだけでMDSの約二〇割を占めています。そのため、最近では、JMMLを独立したMDSのタイプとしてあつかっているWHO分類、さらには小児MDS独自の分類も提案されています。

小児のMDSのもう一つの特徴は、がんや再生不良性貧血の治療後に発生する治療関連性MDSや、ダウン症候群、ファンコニー症候群、コストマン症候群、神経線維腫症^⑥、ヌーナン症候群などの先天性異常に合併するMDSの割合が非常に多い

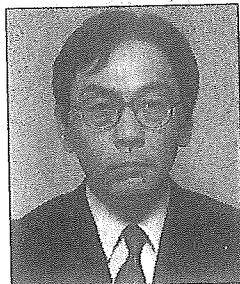
(5) コストマン症候群

白血球の一種である好中球(細菌などを細胞内に取り込み、分解して死に体)により、殺菌作用を発揮しますが、生後早期から減少するため、細菌感染を繰り返す先天性の免疫不全症で、好中球の機能に関連するさまざまな遺伝子の異常が報告されています。MDSやAMLを発生しやすいことが知られています。

(6) 神経線維腫症

皮膚の色素斑(その色からカフエーシ斑といいます)と多発する神経の腫瘍(その多くが神経線維腫という腫瘍です)を特徴とする遺伝性疾患で、二つのタイプがあり、それぞれに責任遺伝子がみつかっています。JMMLを合併することがある神経線維腫症は二型とみられ、ニューロfibrominというタンパク質をつくるための遺伝子の異常です。

ことで、前者は小児MDSの約二五割、後者は約一五割と推定されています。成人、小児、いずれにおいても、MDSの予後は悪く、RA、RARS以外のMDSは造血幹細胞移植の適応になると考えられています。



辻 浩一郎(つじ こういちろう)

一九五三年、愛知県生まれ。信州大学医学部医学科卒業後、同大学小児科学教室に入局。一九九四年から、東京大学医科学研究所附属病院小児細胞移植科科長、助教授。専門は、小児血液学、とくに造血幹細胞移植。著書に、「小児白血病ハンドブック」(共著、中外医学社、二〇〇三年)、「必携造血幹細胞移植」(共著、医学書院、二〇〇四年)など。

(7) ヌーナン症候群
外反肘、低身長などの身体的特徴と心臓の奇形を多発する遺伝性疾患で、JMMLを合併することがあることが知られています。本疾患の約半分の患者で、PTPN11という遺伝子の異常が認められますが、興味深いことに、この病気を合併しないJMMLの患者さんの約三分の一で、白血病細胞にPTPN11の異常が報告されています。

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、良きにつけ悪しきにつけ、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³⁾。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⁶⁾。

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心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⁸⁾(図1)。ES細胞とEG細胞の性状の差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¹⁰⁾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下で培養し、胚様体内部の細胞分化を誘導する方法^{16,17)}、

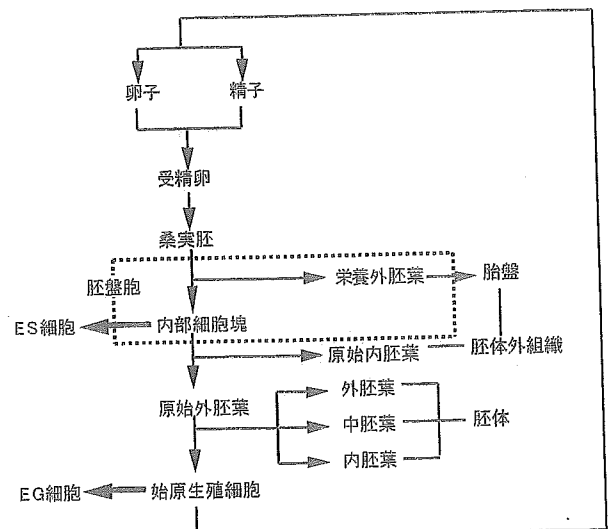


図1 ES細胞とEG細胞の由来

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、トロンボポエチン、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の成功¹⁸⁾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

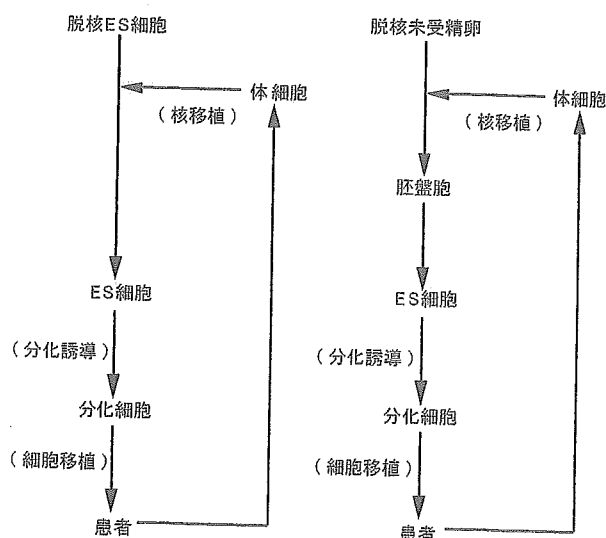


図 2 ヒト ES 細胞と体細胞核移植

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クローン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。

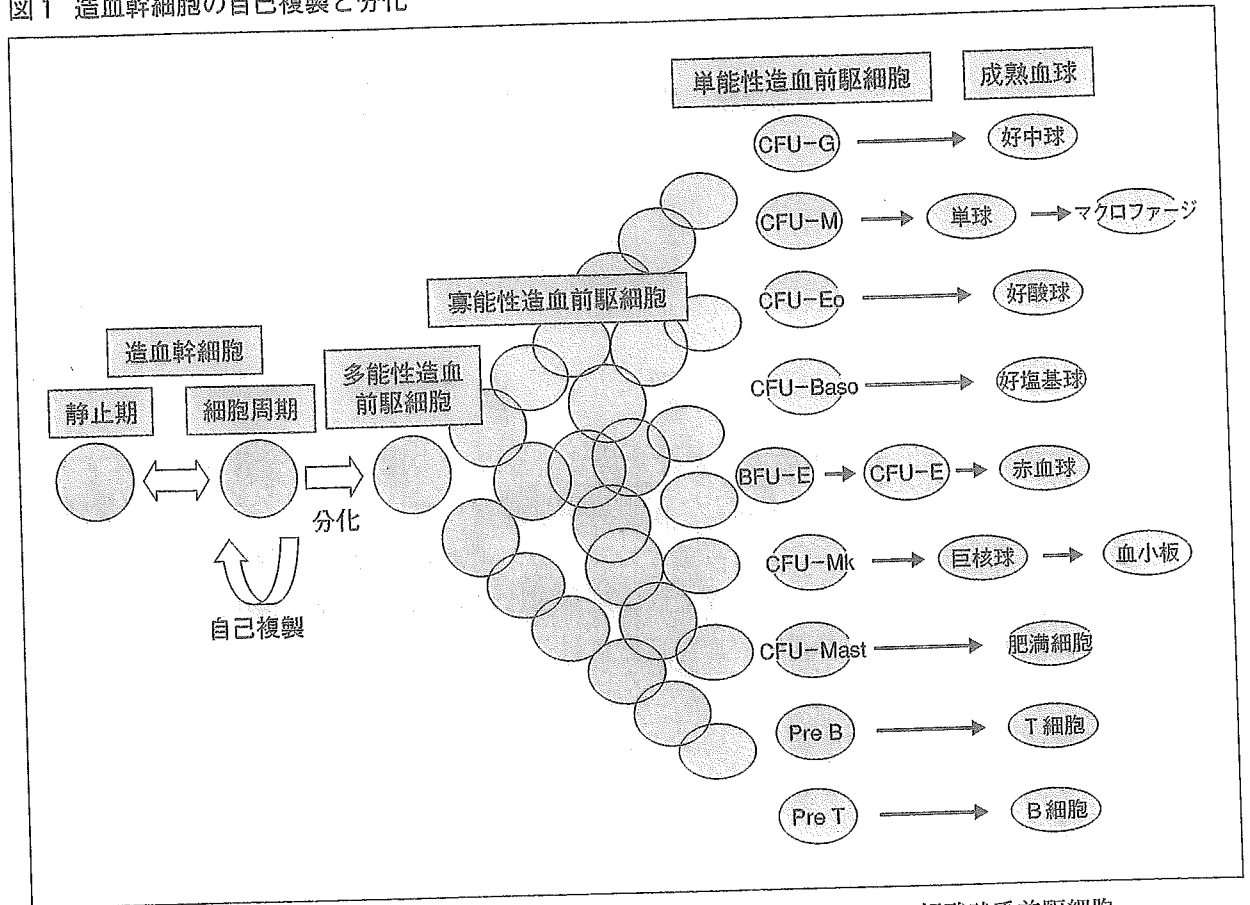
造血幹細胞の分化・増殖（図1）

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涯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。

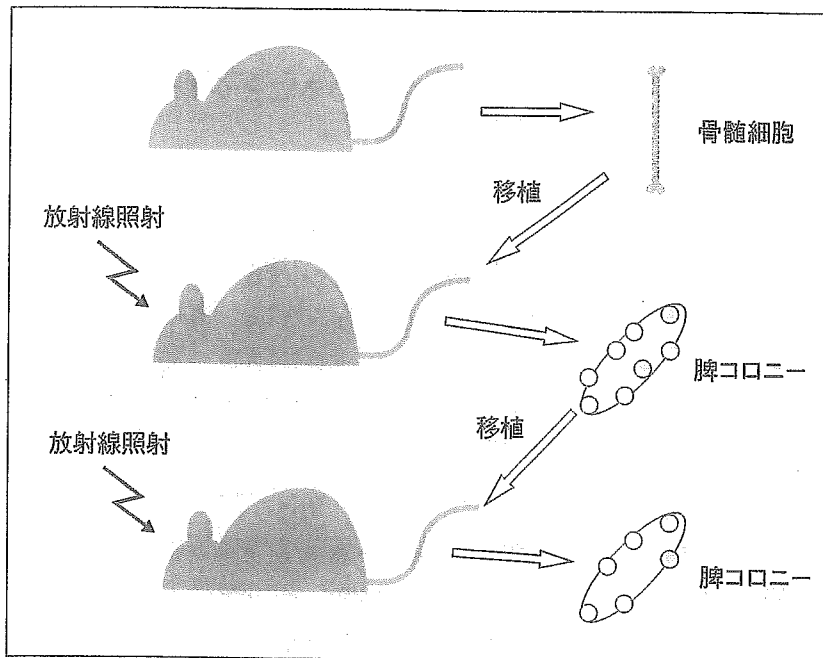
造血幹細胞は、他の幹細胞と同様に、幹細胞の基本的性質である自己複製能（細胞分裂により自己と同じ能力を有する細胞を複製する能力）と、多分化能（異なる形態と機能を持ったさまざまな血液細胞に分化する能力）という2つの能力を併せ持つことにより、長

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髓細胞

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⁵⁾ (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は、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、おのこ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、骨髄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、生体組織にはおのこ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