

図3 HGFによる肝炎治療メカニズムの模式図

III HGFを治療因子として用いる利点や今後の展望

上記の劇症肝炎マウスモデルでは、肝障害の発症から肝不全死までの全経過が2～3時間とあまりにも急激であるという実験の制約上、HGFの前投与も行った。しかし、実際のヒトの劇症肝炎患者では、急性肝炎や急性肝障害の発症から、不可逆的な肝不全に進行、死亡するまでに数日～数週間かかるものである。よって、急性肝炎の発症後の初期にHGFを投与することは十分可能で、その段階で残存肝細胞は保護され、それ以上の肝障害の進行、劇症肝炎の発症が阻止されることが十分期待される。また、HGFは元来、肝再生の本体の因子としてクローニングされたように、同時に傷害後の残存肝細胞に働き、肝再生を強力に促進する³⁾。また、HGFはアルブミンや血液凝固・線溶系関連蛋白質の合成促進作用ももち、これもさらなる治療効果として期待される。このように、HGFは急性・劇症肝炎の病気の本体である肝細胞死を強力に阻止（病気の進展を阻止）し、また同時に肝傷害後の肝再生を強力に誘導（病気の治癒を促進）するという、まさに急性・劇症肝炎に対する理想的な根治医薬になるものと考えられる（図3）。よって、急性肝炎、薬剤性肝障害、劇症肝炎にしろ、肝障害を見つけた段階で、とにかくHGFを投与することで、これらの急性の肝疾患は治療できる（病気を止めて治癒する）ものと考えられる。

さて、その投与方法であるが、生体内に静脈経路で全身投与されたHGFは、主に肝臓で補足され、血中からは速やかに（数分で）消失してしまう。よって、このような急性・劇症肝炎の患者には、速攻性のあるリコンビナントHGFを、静脈経路（全身投与）で反復投与や持続点滴することが有用であると思われる。しかも、HGFは動物に有効量HGFを長期間投与しても副作用がみられないだけでなく、むしろ腎臓、肺、中枢神経、心臓に対しても組織保護・治癒作用をもつことが示されている。さらに筆者らは、安全性の面で潜在的に心配される問題で、またトランス

ジェニックマウスの検討では相反する結果が出ていた，肝癌に対するHGFの効果について検証し，HGF医薬は肝癌を抑制（増殖抑制とアポトーシス誘導）するという治療作用を示している⁴⁾。この点から，予後が悪い亜急性肝炎への応用や，劇症肝炎の合併症である多臓器障害の抑制などの目的には，より長期の安定した治療濃度が得られる遺伝子治療がより有用な治療手技となる可能性もあり，筆者らもその研究を進めている^{3) 4)}。

近年，さまざまな臓器，疾患に対し，再生医学の研究が盛んである。生後は自律再生能を消失してしまう多くの臓器の疾患の治療においては，増殖因子療法はある程度の治療効果がみられても，すでに障害され失われた組織は再生できない以上，なかなか根治にまでは至らない場合も多い。このため筆者らも，そのような臓器の代表である中枢神経や心臓に対しては，増殖因子療法に併せて，ヒトES（胚性幹）細胞などによる再建医学（細胞移植療法）の開発も進めている⁵⁾。しかし，究極の再生療法というのは，本来生体に備わっている自然の再生能力を賦活化することで病的状態を正常化することであり，その点で生後も再生能を保持する肝臓に対しては，HGFを中心とした増殖因子による「生体内再生療法」にこそ魅力を感じ，これこそが理想の再生療法と考えている。

本稿で述べたように，急性・劇症肝炎に対する医薬としてのHGFの有用性は，研究レベルでは十分に実証されているように思われる。本医薬は，少なくとも急性肝炎，その他の急性肝障害の患者には応用され得るものであるため，わが国だけでも毎年数十万人の新規患者が対象になるものと推察される。「急性肝障害にはHGFという特効薬があるから怖くない」，「劇症肝炎は過去の病気（HGFがあるから急性肝炎から進展することはない）」という時代が，一刻も早く来る日を筆者らも強く願っている。

本稿で紹介したFas誘導劇症肝炎¹⁾，エンドトキシン誘導劇症肝炎²⁾の研究は，大阪大学大学院医学系研究科・中村敏一教授，松本邦夫先生との共同研究として行ったものです。

●文 献

- 1) Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, et al : Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 244 : 683-690, 1998
- 2) Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, et al : Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 30 : 151-159, 1999
- 3) Kosai KI, Finegold MJ, Thi-Huynh BT, et al : Retrovirus-mediated *in vivo* gene transfer in the replicating liver using recombinant hepatocyte growth factor without liver injury or partial hepatectomy. *Hum Gene Ther* 9 : 1293-1301, 1998
- 4) Yuge K, Takahashi T, Nagano S, et al : Adenoviral gene transduction of hepatocyte growth factor elicits inhibitory effects for hepatoma. *Int J Oncol* 27 : 77-85, 2005
- 5) 高橋知之，藤原久義，國貞隆弘，他：ES細胞の心筋分化と再生医学への技術開発. *最新医学*60 : 1688-1694, 2005

第54回 全日本鍼灸学会学術大会 (福岡)

教育講演

遺伝子治療と再生医学

小賤 健一郎

久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学部門

要 旨

遺伝子を治療道具として使う遺伝子治療は、臨床試験が世界中で進んでいます。実際の医療手技は、遺伝子導入ベクターを注射するだけというように一般医療と近く、癌など、一部は一般医薬品に近いといわれています。一方、近年話題の再生医学には二種類あり、まず元来の生体の再生能を利用し、再生誘導物質を投与して生体内で障害した臓器を再生・治療するという理想的な治療法があります。さらに近年開発が期待されているのは、多分化能と無限増殖能を持つES (胚性幹) 細胞などから、体外で目的の細胞を創って細胞移植するという、臓器移植に代わる治療法です。また骨髄細胞移植を用いた再生医学は、科学的メカニズムには疑問もありますが、臨床応用もなされています。このような先端医療開発や臨床応用も、西洋、東洋の医学と連携し、全人的な医療を目指している点で、実は鍼灸学と同じ目標を共有しています。

キーワード：遺伝子治療、癌、再生医学、HGF (肝細胞増殖因子)、肝炎、ES (胚性幹) 細胞、クローン技術、骨髄細胞

I. はじめに

過分なお紹介をいただきありがとうございます。本日はこのような機会を与えて頂きましたこと、大会長の田山先生ならびに関係者の皆様に心より御礼申し上げます。遺伝子治療と再生医学ということでお話をさせていただきますが、先生方とは離れているようでかなり共通の目的を共有していることを一番わかっていたきたいと思います。

では、さっそく始めさせていただきます。遺伝子治療はだいたい1990年代くらいから一つの学問として確立した比較的新しい学問ですが、実際臨床にも応用されています。どういう特徴があるかといいますと、一つはバイオテクノロジーが基

盤となっているということです。もう一つは、最近よく新聞などにも書かれていますが、トランスレーショナルリサーチというもので、これは基礎研究成果をできるだけ具体的に患者さんについて実際に臨床研究をさせていただくことが必要だということです。従って、比較的臨床に近い分野だと思います。また、生命倫理の問題も重要です。さらに実際にこういう研究を臨床の場に持つていくには、知的財産として確保して、ベンチャー企業を作るなり、大きな企業と連携したりする必要があると思っています。以上を踏まえて、前半は遺伝子治療、後半は再生医学について、話を致します。

〒830-0011 福岡県久留米市旭町 67 番地

Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Cognitive and Molecular Research Institute for Brain Diseases, Kurume University, 67 Asahi-machi, Kurume 830-0011, Japan

E-mail: kosai@med.kurume-u.ac.jp

II. 遺伝子治療について

1. 遺伝子と遺伝子治療

まず、遺伝子はどんなものかということについて、簡単におさらいさせていただきます。人の身体にあるすべての臓器は細胞からなっています。細胞は、遺伝情報を持つ核と細胞質に分けられます。核の中をみていくと、もちろんご存知の通り染色体があります。人間の場合44本の常染色体と、XYか、XXのいずれかの性染色体があります。染色体は1本の長い紐のようなもので、これを糸にしますと、ここから何十kmも伸びるような長いものです。そこにDNAの場合では、A(アデニン)、G(グアニン)、C(シトシン)、T(チミン)という、たった4つの塩基の組み合わせによって遺伝子は構成されています。また、「DNA=遺伝子」ではなくて、実際はDNAのわずか数%という部分が遺伝子である、つまり核の中にある長い糸の中の数%が遺伝子であるということです。では、遺伝子とは何かといいますが、我々の生命現象の源はタンパク質で、身体を作るのもそうですし、いろいろな作用もタンパク質の働きで成り立っているわけですが、そのタンパク質を作る設計図が書かれている部分を遺伝子といいます。ゲノムプロジェクトという人間の身体の遺伝子の配列を全部読んでいくプロジェクトが終わってわかったことは、人間の遺伝子は当初10万と思われていたのがたかだか3万ぐらいしかなく、ネズミとあまり変わらないということです。遺伝子以外の、関係ない残りの90%くらいの配列の中に何か我々の高度な暗号が隠されているだろうといわれていますが、本日の話は遺伝子に限って、つまりタンパク質を作る暗号が載っている遺伝子についてのお話をいたします。

では、遺伝子治療とは何か。これには2つの解釈があります(図1)。一般の方は「遺伝子を変えてしまうような治療」ではないかと、恐ろしい印象を受けられるようですが、現実に我々がやっていますのは、「遺伝子を道具として使った治療」です。一部の病気では将来的に遺伝子自身を治すこともできるかもしれませんが、今の遺伝子治療はまだ遺伝子を道具として使う、つまり薬に近い感覚です。遺伝子を治療するのであれば遺伝子に

図1 遺伝子治療とは何か?

病気	病因	導入遺伝子
先天疾患	先天的な遺伝子異常による蛋白の欠損	欠損遺伝子
癌	様々な遺伝子異常による細胞の無秩序な増殖	癌を殺したり、免疫を誘導する遺伝子
後天性疾患	遺伝子の直接関与は少ない	治療目的の遺伝子(目的の蛋白を生体内で産生)

図1 遺伝子治療とは何か?

原因があるような先天性の疾患しか治せませんが、道具として使えば、癌、心臓の病気やインフルエンザ感染症などにも遺伝子治療が使えるということです。つまり遺伝子を、普通の薬と同じように使うということです。

代表的な先天性の病気では、遺伝子が1つおかしくなっていることによって必要なタンパク質が1つできないわけですから、それに正常な遺伝子を1つ入れてやればいいわけです。ところが癌の場合は、いろいろな遺伝子が身体の中でメチャクチャになっています。それを1つ1つ修復するには「遺伝子の治療」では不可能なのですが、遺伝子を薬として用いれば、癌を殺したり、あるいは身体の免疫を高めて癌を殺したりすることができます。感染症の場合では、例えば、ウイルスの遺伝子の一部を身体に入れることで、身体の中でウイルスのタンパク質を使って抗体を作らせるとか、いろいろなアイデアで遺伝子を道具として使う治療法を開発できる可能性があります。

2. 遺伝子治療の歴史(図2)

簡単に遺伝子治療の歴史を振り返りますと、1950年代にDNAが二重鎖であるという発見がありました。そのあと科学研究が積み重ねられて、実際に臨床で応用されるようになってきたということですが、80年代に功を焦った米国の研究者が、科学的進歩が追いつかないうちに、それも自分の国ではできないので、イタリアやイスラエルという国で患者さんにいきなり応用したという歴史があります。もちろん科学的基盤がないので、これは

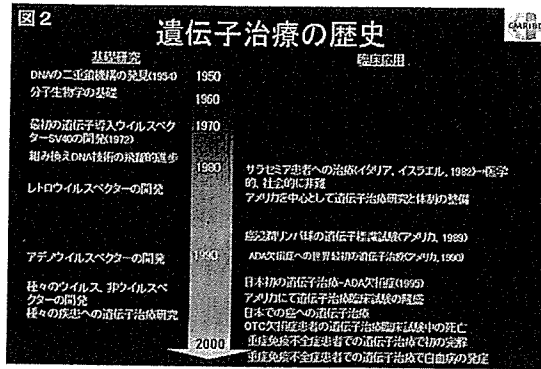


図2 遺伝子治療の歴史

効果も成さず、医学的にも社会的にも非難されました。ただ米国がすごいのは、ここで反省してきちんとやらなければならないということで、研究ももちろんですが、体制を整えなおしたということです。1990年代にそれが花開いて、1990年に最初の遺伝子治療が行われています。その後は日本でも遺伝子治療が行われています。このように1990年代は遺伝子治療の研究が割と盛んになって、実際患者さんにも応用され、今まで数千人から1万人近い患者さんに臨床試験が行われています。遺伝子治療の一般医薬化、つまり遺伝子製剤として売り出されて、一般の医療に入ってくるのも、そんなに遠い話ではないだろうと言われています。

遺伝子治療で、これは実は特殊な例なのですが、1例死亡が出て、「遺伝子治療は危ない」という社会的風潮になったことがありました。しかしその翌年には、全然治療法がないといわれていた、一つの遺伝子がおかしくなることによって身体の免疫が全然ない患者さんで、遺伝子治療の最初の成功、寛解の朗報がありました。つまりこの患者さん方は、生まれて一生無菌室で過ごさねばならないか、または無菌室にいたとしても免疫がないため1~2か月で感染症によって死んでしまうということを余儀無くされるわけですが、その患者さん方に1回遺伝子治療ただけで、緩解したという非常に喜ばしいニュースでした。ところが、それからまた1、2年しますと、そういう患者さんに、遺伝子治療後の白血病が発症するという予想もしないことが起こりました。先ほど、トランス

レーショナルリサーチといいましたが、これは十分な基礎研究はもちろん重要ですが、それでも人間の英知が及ばないところがありますので、実際患者さんで臨床試験をやらせていただいて、そこでまた新たな発見を得て、それを基礎研究に応用していくというものです。

3. 遺伝子治療の方法

どういうふうにして身体の中に遺伝子を入れるかというといえますと、二つの方法がありますが、一つは元々身体から、例えば肝臓なら肝臓の一部をとってきて、培養皿の上でその細胞をバラバラにして、治療する遺伝子を入れて、身体に戻すという方法があります。しかし考えて見ますと、肝臓を切り取ってくるわけですから、手術侵襲があるうえ、非常にお金もかかります。それこそ臓器移植をするようなものですから、多くの患者さんを治療する一般医療となるのは難しいということです。今はもう一つのIn vivo法という直接薬のように癌に向かって注射したり、あるいは血液に静脈注射したりすることによって、臓器に遺伝子を入れるという方法が用いられています。一般の医学と近い感覚です。

実際にどうやって遺伝子を入れるかという、多くの場合我々はウイルスを使います。ウイルスは、遺伝子とタンパク質のみを持っていて、細胞を持たないので生命ではないわけですが、しかし、我々の身体を利用しています。どういうことかと申しますと、ウイルスは鉤のようなカギを持っていて、我々の細胞をこじ開けて、自分の遺伝子を我々の細胞の核の中に入れることができるという機能を持っています。我々の身体は、核の中にある遺伝子があれば、これがウイルスの遺伝子か自分の遺伝子かわからないので、ウイルスのためにタンパク質を作らせてあげて、ウイルスを身体の中でどんどん作り出してしまうことになります。それならば、今度は我々がこのウイルスの性質を、遺伝子治療に利用させてもらおうというわけです。具体的には、これにはバイオテクノロジーの技術がいるわけですが、ウイルスの遺伝子を取り除いて自分の治療したい遺伝子に載せかえると、ウイルスは我々の細胞の中に治療する遺伝子を入れて

くれます。この場合ウイルスの設計図（遺伝子）は書かれていないので、ウイルスのタンパク質は作りません。このように身体の細胞中に遺伝子を運ぶものをベクター呼んでいますが、多くはウイルスを遺伝子学的に組み替えをすることによって、おこなっています。このようにウイルスをうまく利用して治療に用いますが、実際の臨床の現場ではウイルスの液が入ったものを注射するだけで、一般の医療に近いというわけです。

4. 癌に対する遺伝子治療

実際の臨床応用は、その8割方は癌に対して行われてきたので、まず癌の遺伝子治療について簡単に例を挙げて説明させていただきます。今までの西洋医学における手術や一般的な療法はもちろん今後も必要な医療なのですが、症例によっては限界もあります。遺伝子治療のいいところは何かというと、割合自由に、機能がわかっている遺伝子（設計図）を身体に入れてやるので、自分が欲しい効果が得られることです。つまり、どちらかというデジタル的な考えだと思います。例えば、癌細胞だけが死ぬような遺伝子を見つければ、それを癌細胞に入れてやればいい。あるいは、免疫を誘導して、癌を異物とみなして殺していくというようなアプローチもできます。今回はこのうち、免疫を誘導する例のお話させていただきます（図3）。私は先生方に近い考え方であると先に申しましたが、それは究極的にはどんな治療にしても、生体内の力を賦活化させてやるというのが、一番理想的な治療法だと思っているからです。例えば、インターロイキン2という物質があります。これはT細胞、B細胞といった、免疫の元となる細胞を増殖させるのに必須の因子です。そういうタンパク質を入れれば、どんどん免疫を賦活化して、癌を殺せるのではないかというアイデアは昔からあったわけです。しかし、タンパク質としてこういう物質を入れれば、動物ではいい結果を出せませんが、実際ヒトでやるとなかなか良い効果を示さなかったというのが今までの結果でした。何故かというとタンパク質はその物質の半減期のため、身体の中で数分間でなくなるので注射では効果が出ず、その場合に持続点滴で入れようとしても、実

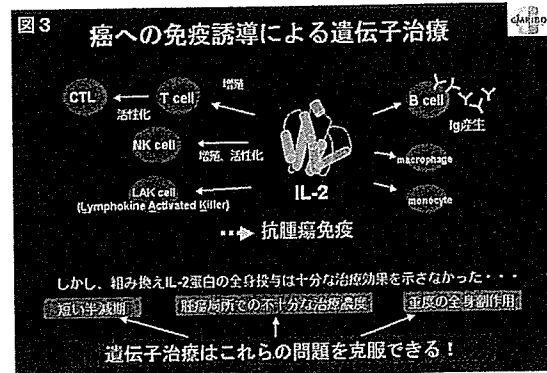


図3 癌への免疫誘導による遺伝子治療

際に癌には十分な治療濃度がいかにないのに、その一方で全身のいろんな臓器に副作用が出ます。つまり遺伝子治療では、この問題を克服できるのではないかということです。

具体的にどうするかということですが、骨肉腫の例を出させていただきます。骨肉腫というのは子供に多い癌で、整形外科の先生に聞きますと、治療法はかなり進歩し、腫瘍を一部だけ取ることもできるし、足を保存できる場合も多いのですが、やはり多くの例では足を切断し、また切断後も肺転移することがあります。もちろん既存の治療法も有用なのですが、遺伝子治療がいいのはどういふところかということ、遺伝子を癌細胞に直接注射して、癌細胞に免疫の元となるインターロイキン2という設計図（遺伝子）を入れると、癌細胞自身がこういう免疫を誘導するような物質を作り、全身にはそういう物質は流れないので副作用はでません。一方、癌細胞の中ではそういう高濃度の物質が出るので、免疫細胞が癌の近くで活性化されて、その免疫を誘導することによってこの癌を全部殺してしまうことができます。つまり身体の免疫を賦活化する遺伝子を薬としてうまく使うということになります。これが良いところは、身体の免疫が癌を異物だと認識してくれますと、今度は遠隔部の癌も治してしまうことができるということです。

これは動物実験の結果ですが、癌がいっぱい皮膚の下にあり、青いのが癌で生き生きしているのですが、治療した後はスカスカになり、この写真ではピンクに見えているところです。癌が全部死

んでしまっているのです。実際は局所しか治療していないのですが、肺にいっぱい転移があるような癌でも、動物実験では、癌が治ってしまい、綺麗になるという結果が出ています。もちろんすべての例が治るわけではなく、あくまでも動物実験の結果ではありますが、しかしこの結果からは、より臨床に近い、一回注射をするだけで、身体の免疫を賦活化して治療するという戦略ができるということを示唆しています。他にもいろいろな戦略があるのですが、この免疫の遺伝子治療は臨床試験が数多く行われていますので、一般医療としても、これから現実化してくると思います。それでも、癌の根治はすべてができるわけではありません。その最大の原因は、先ほど言ったように、注射してもウイルスが増殖しないようにしているので、液体が入ったところには確かに遺伝子が入って免疫を賦活化しますが、結局、遺伝子は全部の癌には入れることはできません。従って、いろいろな遺伝子を細工して他の癌にも治療効果を及ぼすような、あるいは根本的に全部の癌に遺伝子を入れ、癌を殺すような方法を開発する必要があるということです。このことから、「ウイルスを改変することによって癌だけを認識し、正常には何も影響を及ぼさない人工ウイルスが作れないか」という取り組みを、今我々ならびに世界の研究所がやっています (図4)。我々は特に、風邪の一

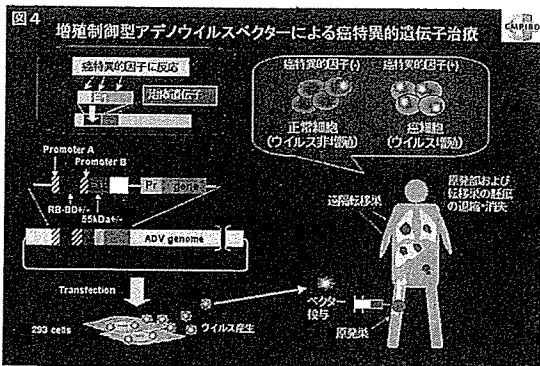


図4 増殖制御型アデノウイルスベクターによる癌特異的遺伝子治療

学的に作り変えて、癌だけ殺していくような人工アデノウイルスを作ろうとしています。つまり、癌だけで出ているような物質に反応してウイルスが増えていくような仕組みを作り、本当に癌だけ

が増えていくウイルスを作り上げようとしているところです。将来的に、正常では全く増殖しないが、癌ではどんどん増殖して癌細胞のみを殺していく、このような人工ウイルスが完成しますと、一回それをどこかに注射するだけで身体中に広がり、癌だけを見つけて殺してしまうことができます。我々はこういう治療法の開発を目指していますし、一部アメリカではそのような研究の臨床試験も始まっています。

III. 再生医学

1. 再生医学とは (図5)

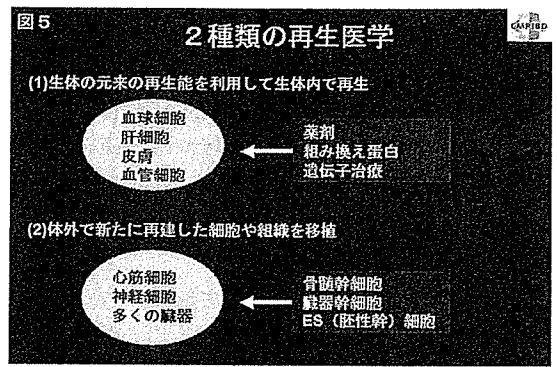


図5 2種類の再生医学

再生医学に関しましてはここ2~3年話題になり、新聞でもよく出てくるものかと思えます。簡単にどういものかといえますと、発生学というのは昔からある学問ですが、それは受精した段階から、次には胎児ができ、身体の臓器が作られていくわけですが、それがどういうメカニズムでできるのかを研究する学問です。つまり体内で臓器ができてくる場合と、生後に臓器が再生するのは同じ様なメカニズムがあるだろうから、そのメカニズムを利用して身体、臓器を再生させようという治療法の研究です。例えば、肝臓がやられた場合は肝臓が再生するような薬を何か投与する、あるいは遺伝子薬を投与する、というような医療です。これは生体内に元々ある再生能力を利用して行う治療ということで、こういうものができるとう究極の再生医療 (第一の再生医学) となりますが、ただ残念ながら全ての臓器や疾患でうまくいくとは限りません。何故なら、すべての臓器が再生す

る能力を持っているとは限らないからです。そこで、今話題になっているのがES（胚性幹）細胞です。ES細胞は、身体の子宮の中で、受精後5日目くらいの受精卵の中に含まれているのですが、すべての細胞の元となる細胞と考えて良いかと思えます。だから、これから心臓になるものもあれば肝臓になるものもある、つまりすべての細胞になりえる源となる細胞がここに含まれています。よってそれを取り出して、培養皿の上で自分が望むような細胞を作って、それを「臓器」移植の代わりに「細胞」移植することによって、病気を治療するという医療です。さらに将来的にはもちろん、「組織」や「臓器」を作ればよりいいのですが、そこまではなかなか簡単にできるものではないので、まずはES細胞から「細胞」を作って、心臓の一部が病気で欠けている場合は心臓の細胞を入れてやる、というのが第二の再生医学であります。

2. 第一の再生医学

まず、理想的な第一の再生医学について話します（図6）。肝炎という病気があります。肝炎が

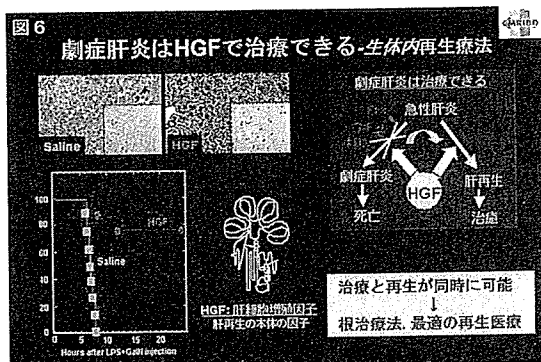


図6 劇症肝炎はHGFで治療できる-生体内再生療法

起こるメカニズムはだいたい解かっていて、生体は肝炎ウイルスが感染した肝細胞を異物として認識し、除外してくれるのですが、それが行き過ぎると肝臓全部を免疫が殺していくということになってしまい、これが現在治療法のない劇症肝炎の原因です。これには治療法はないのですが、私共が研究しているHGF（肝細胞増殖因子）は、肝臓を作るための、一番の大元となる再生誘導物質です。HGFは大阪大学の中村先生が見つけられた

のですが、こういう物質を注射しますと、これはネズミの例ですが、肝臓を作っている10%以上の肝細胞を人工的に増殖させることができます。またネズミの実験ですが、劇症肝炎で肝臓がなくなってしまうような物質を入れますと、7時間くらいでマウスは死んでいくのですが、このHGFを注射しますと、肝再生を誘導するだけでなく、さらにこの病気自体を止める働きがあります。つまり、肝炎がひどくなるとそれが劇症肝炎になって肝細胞の70%が死んでしまいます。それに対して今は治療法がないのですが、こういう再生するような物質を見つけてこれを入れますと、注射をするだけで病気が止まって、どんどん肝臓が再生していくことが可能になります。

こういう治療法ができるかと最適だと思のですが、すべての臓器に応用できるわけではありません。何故かということ、遺伝子治療の技術を使っているいろいろな物質を注射して心臓病を治せないかということ、岐阜大の循環器内科との共同研究でやってまいりましたので、その結果を交えてお話致します。心筋梗塞の動物モデルに、先ほどのHGFなどの物質（遺伝子）を入れますと、肝臓の場合はうまく再生誘導ができたわけですが、元来生後は再生する能力がない心臓では、確かに病気は少し良くなりましたが、完全に心臓が蘇ってくるというわけではありませんでした。こういう治療法は、確かに有効ではあるのですが、肝臓での完治を期待できるほどの成果は、心臓では再現できません。考えて見ますと、輸血とか生体肝移植とかは、血液や肝臓の一部を他人にあげても、自分の臓器は元に戻るからできるのであり、これとは対照的に心臓の場合は、一度障害されたら元に戻らないわけですので、心臓の生体移植などできないわけです。脳もそうです。従って脳梗塞や心筋梗塞で一度組織がやられると治らないため、頭の病気、心臓の病気は癌と並んで、いまだ3大死因であるのです。心臓病には、根本的には今の西洋医学では「心臓」移植しかなかったのですが、「細胞」移植でもいいだろうというのが、最近の研究でわかってきています。つまり、あるマウスの心臓からとってきた心筋細胞を別のマウスに入れるという実験で確認されているのですが、バラ

バラにした心筋細胞を、心臓の死んでいるところに注射をすると、移植した心筋細胞がその心臓にくっついて治るといことが確認されています。従って、多大な手術侵襲があり、また生命倫理、高額な費用、ドナー不足の問題などで、なかなか(特にわが国では)うまくいかない臓器移植に代り、「細胞」移植でいいのであれば、かなりこれらの問題が解決できるというわけです。後の問題は、「それでは心筋細胞をどこから持ってくるか」ということですが、人から人へ持ってくるわけにはいかないので、これを解決するのがもう一つの再生医学というわけで、ここでES細胞が出てきます。つまり第1の再生医学というのは、薬とか、いろいろな方法で、これは先生方のご研究と通じるかもしれませんが、生体内に元々ある再生能を賦活化して、病気を治療するというものです。しかしそれではうまくいかない場合、臓器移植に代わって細胞から望む細胞を作って、それを移植するという方法が第二の再生医学なのです。

3. ES細胞と第二の再生医学(図7)

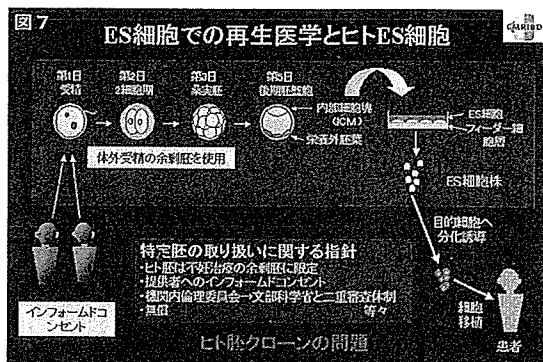


図7 ES細胞での再生医学とヒトES細胞

ES細胞について簡単にお話をします。ES細胞はマウスにもヒトにもあるのですが、体外受精した後に、1日置くと2つに細胞分裂して、桑実胚になります。マウスでは3日、ヒトでは5日ぐらいですが、こういうふうには2つの構造物が表われ、この塊を顕微鏡下に切り取って取り出し、特殊な条件下で培養皿で培養を繰り返すと、ES細胞を得ることができます。つまり、ここの部分にすべての臓器の源になる細胞であるES細胞があるの

です。このES細胞をまた別のマウスの子宮に戻しますと、つまり例えば、Aの遺伝子を持つES細胞を作ってBというマウスの子宮に入れると、Aという遺伝子を持つマウスが生まれてくることから、このES細胞の全能性が証明できます。またこの全能性のため、ヒトのES細胞の場合は子宮に戻すとクローン人間ができる可能性があるということで、生命倫理の問題がでてくるわけです。またES細胞の全能性を証明するもう一例として、マウスの皮膚にES細胞を植えつけますと、そこからいろいろな臓器ができてきます。しかし、子宮の中でおこるような正常のコントロールが効いていませんので、その皮膚に歯ができてたり、骨ができてたり、心臓ができてたりするわけです。このように臓器移植に代り、体外でES細胞を使って望む心臓細胞とか神経細胞とかを作って、それを移植するというのが、今よく騒がれている再生医療です。

我々もこのような研究をやっています、実際テクニック的にはいろいろな方法があるのですが、心臓を作る場合は、胚様体という塊を作ると、後日に心臓が一部できてきます。あるいは、別の細胞の上で共培養すると心臓ができるとか、いろいろなテクニックを使います。私どもは、ヒトES細胞を使用する研究の認可を受けてやっていますが、培養皿の上で確かに心臓が拍動するような塊をヒトES細胞から作ることができました。次に、これを細胞移植として治療に用いるには、目的の心臓細胞のみを単離してくる必要があります。そのため、ES細胞自体に遺伝子工学的な細工をして、心臓になった場合は光を出すようにします。その上で、ある機械を通した時に蛍光を当てると、心臓になったES細胞だけ緑に光るため、この機械で細胞を取り分けれます。ES細胞から心臓を作って、今言った方法で光らせて取ってきたES細胞がこれなのですが、このように一個になっても、やはり拍動する能力を持っており、明らかに心臓の能力を持っている細胞といえます。つまり現段階では、こういう細胞を作ることができる、というところまでできています。

では次に、心臓になる前の細胞を取れないかということで、我々はそういう方法の開発も試みて

いますので、簡単に紹介します。もちろん先ほどから言っていますように、医療という観点から、心臓移植の代わりに心筋細胞を作って移植に用いたりするのも重要ですが、それだけでなく、研究の方でもこの技術は有用で、つまり目的の細胞一個一個を取ってきて、その中の全ての3万個の遺伝子がどんなふう動いているかということを見ることが出来ます。つまり、どういう遺伝子が、その目的の細胞で多く出てくるのかをみることで、ここからまた新しい遺伝子を見つけたり、あるいはどういう遺伝子が働いて細胞ができていくのかということが分ってきます。このように心臓を作って、移植治療に用い、また一方では研究にも用いるということを、再生医学研究では行っています。今よく新聞などで騒がれている再生医学というのは、実際にはこういう研究が中心となっています。

4. ES細胞の治療への応用

ES細胞を用いた治療については、今はまだその段階ではなく、やっと目的の細胞を体外で作って、これを単離して取れるという段階にすぎないため、今後具体的になっていくと思われます。ES細胞の取り扱いについては、法律で決まっています。「特定胚の取り扱いに関する指針」というのが文部科学省から出ています。ヒトの胚というのは、ここでは受精卵のことです。さて、不妊治療をする場合には体外で受精させた受精卵は、凍結して保存しておきます。それをお母さんに戻すのですが、例えば10個できた場合に、3個戻してうまくお子さんができると、いらなくなった7個の凍結受精卵は、今までは廃棄されていたわけです。それを廃棄せずに、もちろんちゃんとインフォームドコンセントをして合意を得た場合、ES細胞を作るのにその凍結受精卵を使うことができます。もちろん誰もがやりたいといっているのではなく、まず機関内の倫理委員会で厳しい審査を受けて合格して、その後、文部科学省の専門委員会ですらに厳しく審査されるという二重の審査を受けなければならず、きちんとした目的に沿って、しかも実験を遂行する能力もあり、生命倫理もしっかり理解している場合のみ、研究が許可されます。もちろん、無償でやらないといけ

ないということになっています。我々も、2年前に日本では8番目に認可していただき、ヒトES細胞の研究をやってまいりました。日本では、「ES細胞を作る目的のためだけに体外受精をしてはいけない」ということになっていますので、先ほど言いましたように、インフォームドコンセントをして、元来は捨て去られる運命にあった凍結された受精卵を利用させていただいています。

さて、ヒト受精卵もマウスの場合と基本的には同じで、培養皿の上で受精卵を培養しますと、マウスは3日くらいだったのですが、ヒトの場合は生命の時間というものが長いので、5日で胚盤胞ができてきて、それを切り取りますと、同じ様にヒトES細胞が出来ます。ところで、マウスES細胞は、早くに発見され技術が確立され、この10~20年に様々な研究に応用されてきたわけですが、その一方、ヒトではまさかそれほど簡単には、ES細胞はできるとは誰も思っていませんでした。ところが、1998年に、アメリカで実際、ヒトのES細胞ができたということが報告され、一躍、「再生医学は現実のものとなり得る」ということになり、この数年、脚光を浴びるようになったというわけです。このように「夢物語だったヒトのES細胞が実際できた」、「割とそれが簡単にできる」ということが明らかになり、それはつまり、一方では、「これは大変だ」ということになり、法律なども実はここ数年でできたもので、急速に体制が整ってきたのです。研究、技術的な面からは、マウスでの実験を踏まえて、ヒトでも心臓細胞をES細胞から作れることが示せていますので、将来的には細胞移植治療なども、可能性がでてきたということです。ただ、その前にはもちろん倫理的問題について、種々の議論を行い、ちゃんとした審査を得てから臨床応用が可能となるのはいうまでもありません。

5. クローン技術とその応用

もう一つ説明しようと思ったのが、クローンの技術です。ヒトのクローン人間とかよく言いますが、クローン人間とクローン技術は少し違います。「あるヒトの細胞の核を別のヒトの細胞に入れ替える」というのが、クローン技術です。先ほど言

いましたように、ES細胞はあるヒトから取られるものですから、他人のES細胞から細胞を作って別の患者さんに移植することになります。この場合は他人の細胞ですので、当然、拒絶が出ますので、現在の臓器移植と同様に免疫抑制剤とか使わなければならないという問題が生じます。これを解決する手段がES細胞にはあり、それがクローン技術です。つまり、クローン技術をES細胞を作る元となる卵子に用いると、患者自身の遺伝子を持ったES細胞が作られることとなり、つまり患者自身の遺伝子を持った目的の細胞が作り出せることになります。例えば、今は受精卵を使わなくても、お母さんの卵子を刺激することによって強制的に分割させて、ES細胞を作ることもできますので、Aというお母さんの卵子を頂いて、それから核を除いて、Bという患者さんの皮膚などの細胞から核を取ってきて、卵子の核だけを入れ替えます。そうすると核の中に生命の遺伝情報があるので、この卵子からできたES細胞は、自分(Bさん)のES細胞になるわけです。この卵を別の人の子宮の中に入れると、クローン人間ができてしまうため生命倫理の問題はここでも重要ですが、ただ、クローン技術というのはクローン人間作りとは異なることはご理解頂きたいと思います。つまり、再生医学では、培養皿の上でクローン技術を用いるということです。間違ったやり方をしてしまうと、クローン人間などということも可能となるため、当初日本ではクローン技術の胚への応用もやってはいけないということでしたが、最近では本邦でもクローン技術を使う方向に意見が集約されているようです。

さらに、生まれつき遺伝子に病気があるような患者さんの場合についても、培養皿の上のほうが遺伝子治療はよりやりやすく、遺伝子の修復も割と簡単にできる可能性があります。これも夢物語であろうと思われたのですが、1~2年前マウスの実験では、既にできてしまいました。

以上、ES細胞による、再生医学を説明いたしました。さて、このようにこの分野の研究は、どんどん進歩していますが、臨床応用はいきなりやっていいわけではなくて、いろいろな生命倫理の問題もあります。ただし、それほど夢の治療ではな

くなっていますし、また、生命科学の研究材料としてもES細胞は有用ということです。

6. 骨髄を用いた治療とRETT症候群に対する治療の試み

次に話題の骨髄について簡単に説明させていただきます。数年前から、例えば骨から肝臓ができるとか、骨から神経ができるという報告が相次ぎました。例えば、血管が詰まった病気に血管を移植するのではなくて、自分の骨髄を取ってきて細胞を移植すると、これが血管に変わって治るのではないかということで、久留米大の循環器内科の先生方が開発されています。実際に太い血管ができるわけではなさそうですが、臨床での結果はいいということで、話題になっていました。ただし、科学的には本当なのか、つまり、血液になるはずの骨髄が、神経になるとか血管になると、つまりそれは分化が変わってしまうということなので、そのあたりで議論がありましたが、「どうも2つの細胞が融合しているのを見ているだけではないか」ということも最近言われています。従って、二つの全然違う細胞が、単に一つにくっついているのを見ているだけではないかということで、科学的にはまだ真偽のほどは不確かですが、この骨髄療法は、自分の組織を使うことができるため、臨床応用の大きな可能性を残しています。このように人間の体の中はいろいろな予想もしなかったことがどんどん起こってきて、大きなポテンシャルを秘めているということが分ると思います。もう少し研究が進むと、骨髄細胞を用いて、本当にいい再生医療ができるのかもしれない。

最後に紹介するのは、私どもが今やっている脳の研究で、Rett症候群という疾患に対する研究です。先天病の一つなのですが、遺伝子治療の技術を使って定位脳手術で遺伝子を入れることで病気を治療するという研究をやっています。遺伝子を変えて作ったモデルマウスでは、患者さんと同様に動きが悪いのですが、遺伝子治療、つまり頭に針を刺して遺伝子を入れると、完全ではないですが動きが戻るということで、脳の研究にも応用しています。自傷行為とって、自分で自分を傷つける症状や、イライラするような症状も治まると

いうことも効果としてみられ、こういう脳の研究も心臓の研究とあわせてやっています。脳も心臓と並んで、なかなか再生しないので、ES細胞や遺伝子治療の技術は有用だと思います。

IV. おわりに (図8)

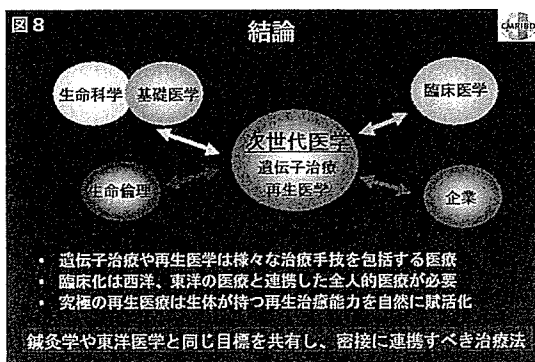


図8 結論

我々が研究しているのは、何と名づけていいかわかりませんが、遺伝子治療学とか再生医学とかいう新しい学問なのですが、決して突飛なものではないし、単なる生命科学の研究に終止するものではないので、臨床医学、あるいは先生方のような東洋医学とも、密接に関連しています。また、究極の目標は、先生方と一緒にです。患者さんを良く見るということと、また、生体はいろいろな能力を持っていますので、それを賦活化するような医療をすることですので、同じ目標をもっていると思っています。我々の特長は、遺伝子を単に使った治療、あるいは再生を目指した治療ということだけであり、今までの医療と、その目標は全く一緒だと思います。また臨床化の際には、

それこそ西洋、東洋の今までの医学と連携して、全人的な医療が必要だと思います。それは患者さん自身に対してもそうですが、医療というものを作り上げていく上でも、そうした視点をなくすと、単なる生物学で終わってしまうと思っています。私たちが考えている以上に、人間の身体はいろいろなポテンシャル秘めているということを、研究を通じて学んできました。究極の再生医療というのは、先ほど肝臓で示したように、できることなら複雑なES細胞とか使わずに、最終的には何か賦活化する方法があって、自分の再生能力、あるいは遺伝子治療の癌でもそうですが、元来の免疫を誘導することによって癌を殺すとか、身体のポテンシャルを最大限引き出せるようなことができれば究極の医療だと思います。それを目指してやっています。今日お話ししたことは先生方と違うような学問かと思われるかもしれませんが、決してそうではなくて、先生方の東洋医学、鍼灸医学と同じ目標を共有しているということをご理解いただければと思いますし、別に独立した学問ではなくて、今までの学問と一緒に、臨床とも基礎とも密接に連携すべき治療法だと思っています。私自身も最初ご紹介いただいたように、岐阜大学に行ったときには東洋医学講座におられた私の先生（その先生は元々癌研究の西洋医学的な研究、分子生物学をやられていたのですが、それだけでは駄目だということで東洋医学を目指されていた先生ですが）に非常に共鳴致しまして、また、私自信の身内も鍼灸をやっていますので、今後とも先生方にご指導いただけて、一緒に何か研究ならびに臨床をやらせていただければと願っています。ご清聴ありがとうございました。

THE 54th ANNUAL MEETING (FUKUOKA)

Educational Lecture

Gene Therapy and Regenerative Medicine

KOSAI Ken-ichiro

Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine,
Cognitive and Molecular Research Institute for Brain Diseases, Kurume University

Abstract

Clinical trials of gene therapy have been extensively performed in the world. Actual methods in many types of clinical gene therapy are simply injections of gene transfer vectors and are thus similar to conventional treatments; some of clinical gene medicine may be realized in general practices in near future. On the other hand, regenerative medicine is classified to two types. One is an induction of tissue regeneration within a body using a certain stimulator. The organs to which this strategy can be applied are limited although this type is an ideal treatment. The other is a reconstructive cell transplantation therapy using pluripotent embryonic stem (ES) cells, which may potentially replace current organ transplantation. Clinical trials of regenerative medicine using bone marrow cells have been performed although their scientific mechanism remains controversial. Importantly, the development and the clinical application of these innovative therapies should proceed with the same aims toward the same goals as acupuncture and moxibustion; i.e., they should also have a close relationship with the Western and the Oriental medicine and the same values of the medical treatment for the whole man.

Zen Nippon Shinkyu Gakkai Zasshi (Journal of the Japan Society of Acupuncture and Moxibustion: JJSAM), 2006; 56(1): 16-26.

Key words: Gene therapy, Cancer, Regenerative medicine, HGF (Hepatocyte growth factor), Hepatitis, ES (Embryonic stem) cell, Clone technology, Bone marrow cell

最新医学・第60巻・第8号 (2005年8月号 別刷)

特集 幹細胞生物学の新たな展開

ES 細胞の心筋分化と再生医学への技術開発

高橋知之 藤原久義

國貞隆弘 小財健一郎

最新医学社

ES 細胞の分化

ES 細胞の心筋分化と再生医学への技術開発

高橋知之^{*1*2*3} 藤原久義^{*4}國貞隆弘^{*5} 小財健一郎^{**1*3*6}

要 旨

無限増殖・多分化能を持つ ES 細胞は、発生学研究、さらに臓器移植に代わる移植用ドナー細胞として有用である。特に再生医学の実現には、分化誘導の特異性と効率の向上、目的細胞を同定・単離する標準化技術の確立が必要となる。本稿では筆者らの成果を中心に、効率的な心筋分化誘導法と、遺伝子治療技術を導入した ES 細胞由来の目的細胞を確実に同定・単離できる画期的新技术を、ヒト ES 細胞の結果と併せて概説する。

再生医療について

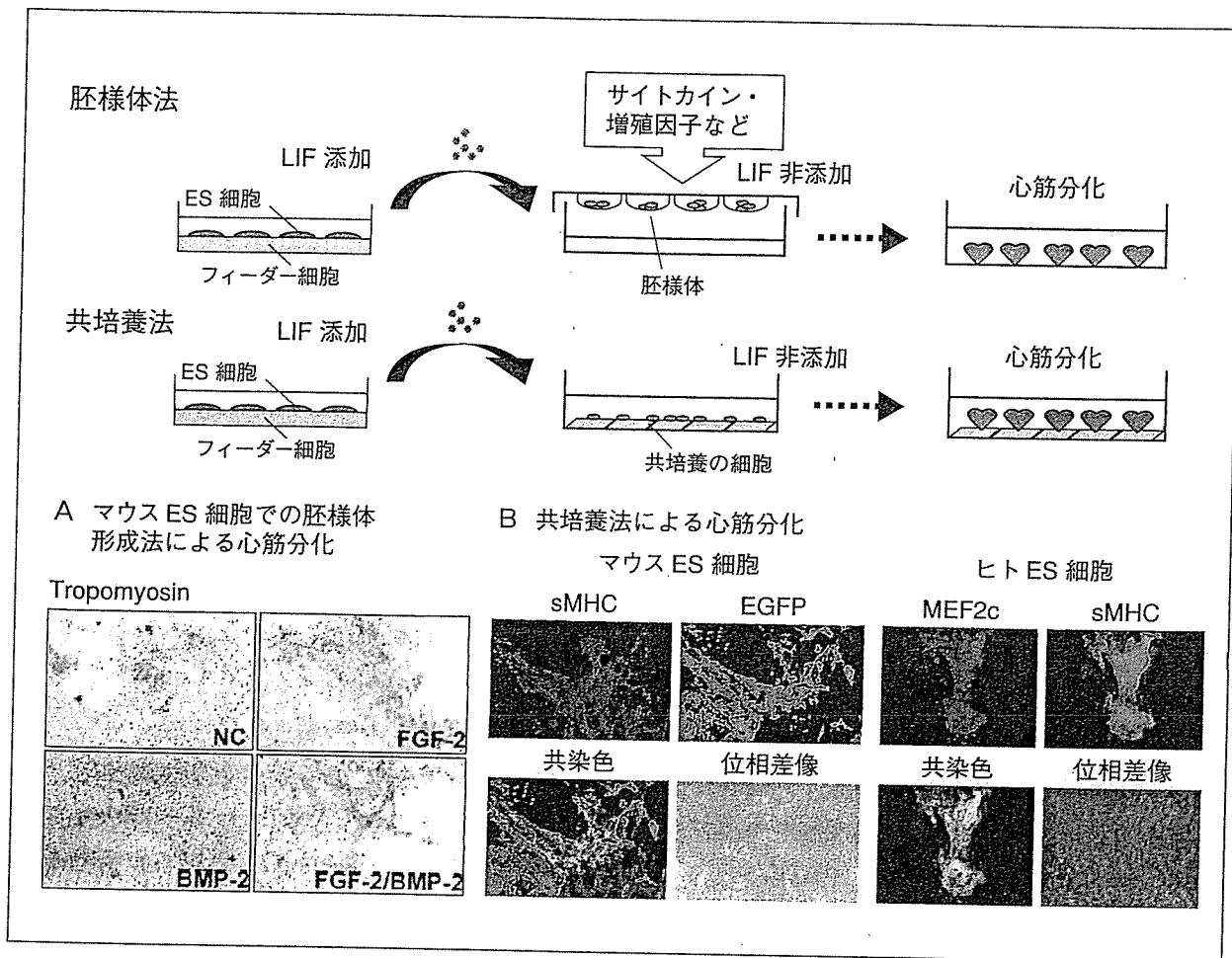
21 世紀の先端医療として再生医療（医学）の開発が期待されている。しかし再生医療と言ってもさまざまであるが、大きくは再生誘導タンパク質・遺伝子の投与による「生体内再生療法」¹⁻³⁾、「骨髄（幹）細胞」を利用した「再生療法」、「組織幹細胞」や「胚性幹細胞（ES 細胞）」を用いた「再建療法」の 3 つに分類できる⁴⁾⁵⁾。生後も再生能を保持する肝臓、皮膚、血管、造血器などの疾患には「生体内再生療法」は理想的であるが、ただ

生後は再生能を喪失する脳神経や心臓では治療効果に限界もある⁶⁾⁷⁾。また「骨髄（幹）細胞」を利用した再生医療は臨床化しやすい利点がある一方、治療効率や科学的メカニズムなどで解決すべき点も多い。そこで特に心筋梗塞に代表される自律再生能を持たない心臓などの難治性疾患には、ドナー不足の問題を抱える臓器移植に代わり、胚性幹細胞（ES 細胞）による「再建療法」の開発が期待されている（組織幹細胞の臨床応用化には、採取可能な臓器に限られるという絶対的制限、大量培養技術の確立など解決すべき問題がある）。しかしその臨床実用化のためには、① 目的細胞のみを特異的に効率良く分化誘導する方法、② その目的細胞のみを同定・単離する技術、③ 細胞移植治療法の確立が必要となるが、いまだ ①、② の基盤技術が十分に確立されておらず、よって現段階ではその基礎研究開発こそが急務である。本稿では心筋細胞をモデルとして、ES 細胞の分化誘導

*1 久留米大学高次脳疾患研究所
遺伝子治療再生医学部門 助教授 **1 同 教授
*2 久留米大学医学部 創薬再生医療学講座
*3 岐阜大学医学部 遺伝子治療再生医科学講座
*4 岐阜大学大学院医学研究科 再生医科学
循環病態学 教授
*5 同 組織・器官形成 教授
*6 久留米大学医学部 小児科学講座

キーワード：ヒト胚性幹細胞、遺伝子治療ベクター、心筋分化、再生医学

図1 ES細胞の分化誘導法



胚様体形成後 17 日目 (A), 共培養後 10 日目 (B) の免疫染色像。
略語：巻末の「今月の略語」参照

法, 分化した目的細胞の同定・単離技術, そしてヒト ES 細胞を用いた研究における筆者らの成果を中心に, ES 細胞による再生医学について概説する。

ES 細胞の分化

マウス ES 細胞は, 胚盤胞に戻されるとホスト組織とともに正常の組織発生に寄与し, 胎盤などの外部組織を除くすべての細胞に分化することができる。この ES 細胞の「多分化能」を利用し, 心筋細胞, 血管内皮細胞, 血液細胞, 神経細胞, グリア細胞, インスリン分泌細胞, 色素細胞などへの *in vitro* の分化誘導が報告されている⁹⁾。一方, ヒト ES 細胞は生命倫理的な問題から胚盤胞へ戻

すといった実験が不可能であるが, 免疫不全マウスへの皮下移植実験より, 内, 中, 外胚葉のいずれにも由来する組織が奇形腫内に形成されることから, マウス ES 細胞と同様に多分化能を保持するものと理解されている⁹⁾。

1. 胚様体法

分化誘導法としては, 未分化維持に必要な LIF を除いて ES 細胞を浮遊培養する胚様体 (embryoid body) 形成法が最も広く用いられている (図 1)。球状の胚様体内では胎仔発生を模倣し, 3 葉形成, そして上述のような種々の成熟細胞が効率的に分化誘導されるものと考えられている⁹⁾。特に心筋細胞の分化誘導に関するこれまでの報告はいずれもこ

の胚様体形成法に限られ、それに種々のサイトカインや増殖因子、ビタミン類などの化学物質の添加によってさらなる分化誘導の効率の上昇を試みたものである。筆者らは胚様体形成法に、心臓の発生に必須の増殖因子である BMP-2 と FGF-2 を至適濃度で添加することで、ES 細胞から心筋細胞への分化誘導効率の上昇に成功した⁹⁾。興味深いのは、これまでの発生学的研究報告から予想していたより比較的低濃度で、そして胚様体形成初期の3日間のみ FGF-2 と BMP-2 を添加したときに、最大の心筋分化誘導効果が得られたことである。FGF-2 や BMP-2 は心臓発生に先立つ中胚葉誘導の本体であり、この ES 細胞分化初期の3日間は個体発生期の3葉形成期に相当する。この結果は、分化に必須の因子とはいえ、単純に長時間・多量を作用させれば目的細胞の分化誘導が促進されるわけではなく、よって今後臨床応用化をにらんだヒト ES 細胞での効率的な分化系の確立においても、添加する分化促進因子の生理的な至適濃度や添加時期を慎重に検討する必要があることを示している。

2. 共培養法

もう1つの分化誘導法は他の細胞と ES 細胞を共培養する方法であり、マウス ES 細胞に関しては、あるストローマ細胞上で共培養することで血液細胞や神経細胞など特定の細胞種が分化誘導できることが報告されている(図1)⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。特にヒト ES 細胞においては、単一細胞化すると増殖能の喪失が見られ、また胚様体形成も容易ではないなどの技術的な問題があり、マウス ES 細胞での胚様体形成法が必ずしもヒト ES 細胞にはそのまま応用できないことを筆者らも経験している。そこで筆者らは、さまざまな培養細胞をスクリーニングした結果、胚様体の形成なしに共培養によりマウス ES 細胞から心筋細胞へ分化誘

導できる方法を初めて開発した(図1, 投稿準備中)。すなわち、スクリーニングによって得られた細胞とマウス ES 細胞を共培養するだけで、培養の経過に伴って Nkx2.5 や GATA-4, MEF2c といった転写因子や sarcomeric myosin heavy chain (sMHC), Troponin I のようなサルコメアを形成する心筋分化マーカーの発現が認められ、ES 細胞から自動収縮する心筋細胞が分化誘導できることを明らかにした。さらに筆者らの用いているヒト ES 細胞株では、胚様体形成法では自動収縮する心筋細胞がほとんど認められなかったのに対して、共培養法では心筋分化マーカーを発現し、自動収縮する心筋細胞を誘導できることを確認している。

3. その他の分化誘導法

そのほかにもコラーゲンなどの細胞外マトリックスを利用することによって、2次元培養下に単一の ES 細胞から系統的に血管構成細胞を分化誘導できることが報告されている⁹⁾¹²⁾。同様に心臓においても、先天性心疾患の治療などを想定した場合、今後は ES 細胞から「細胞」だけでなく「組織」構築の創出も必要となるであろう。

ES 細胞由来の目的細胞の同定と単離

1. 従来の単離技術とその限界

上述のように ES 細胞による目的細胞の分化誘導法の開発が試みられ、中には効率良く分化誘導できている細胞種もあるものの、しかし完全に目的細胞のみを特異的に分化誘導することは現時点では不可能である。よって ES 細胞による再建療法(細胞移植療法)を実用化するには、その分化誘導された目的細胞のみを同定して単離する技術の確立が必須となる。また一方、ES 細胞から分化過程の各段階での細胞を特異的に単離できれば、*in vitro* の系で細胞・遺伝子レベルで組織の分

化メカニズムが効率良く探索できることとなり、発生学における有用な新たな研究手技となると考えられる。細胞膜表面抗原マーカーを蛍光抗体で可視化し、セルソーターで単離するという手技が確立している血球・血管系細胞などの特定の細胞種においては、実際にES細胞から単離された目的細胞を用いてさまざまな分化メカニズムが解明されてきた¹²⁾。しかし、心筋細胞や神経細胞をはじめとするほとんどの細胞ではマーカーとなる細胞表面抗原は知られておらず、そのためこのような一般的な細胞種の単離に用いられる唯一の方法は、組織特異的遺伝子のプロモーター制御下にレポーター遺伝子が発現するような遺伝子構築を安定導入されたES細胞株を作製するということである。つまり、そのES細胞株を分化誘導させると、目的細胞種に分化したES細胞のみが特異的に可視化されるはずであるから、後はその可視化細胞をセルソーターで単離するという戦略である⁹⁾。

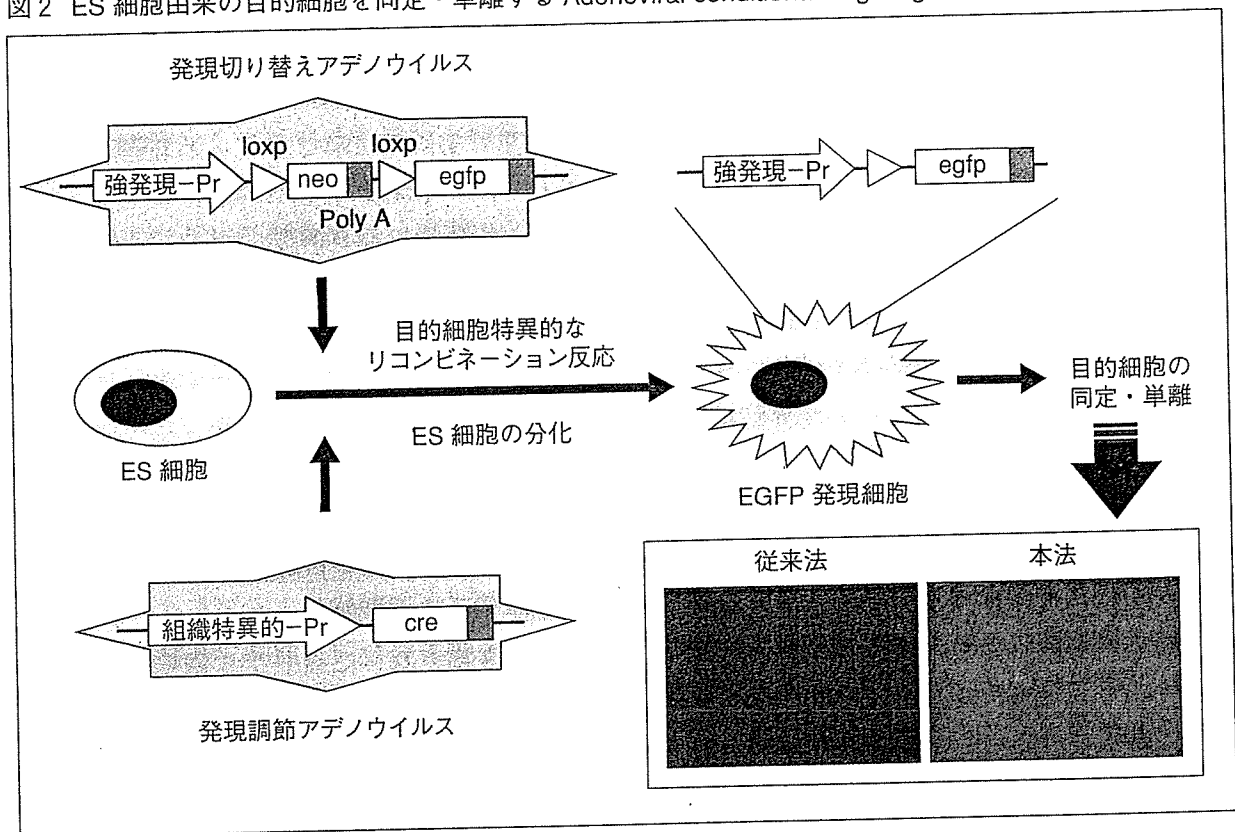
例えばマウスES細胞由来の心筋細胞の同定においては、 α MHC¹³⁾、 α Actin¹⁴⁾、ventricular myosin light chain 2 (MLC2v)¹⁵⁾といったサルコメアを構成する各遺伝子のプロモーターでレポーター遺伝子を発現させた方法が報告されている。しかし、これらは成熟心筋細胞で発現する遺伝子のプロモーターであるため、収縮・拍動する成熟心筋細胞は単離できても、心筋分化初期の細胞や心筋前駆細胞の単離は不可能であった。最近、心臓発生初期に発現するNkx2.5遺伝子座にGFP遺伝子をノックインしたES細胞を用いた心筋細胞単離法が報告されたが、実際に単離されている心筋細胞はやはりサルコメアタンパク質を発現する分化の進んだ心筋細胞である¹⁶⁾。筆者らはその原因を検討したが、これはNkx2.5遺伝子の転写因子のプロモーター活性が元来弱く、さらに分化初期段階ではより活性が低いため、可視化できるほどのレポ-

ターの蛍光タンパク質が産生されないことが理由であった。つまり、これまでの手技はその遺伝子構築と細胞株の作製に多大な労力と時間が費やされるだけでなく、目的遺伝子のプロモーター活性に完全に依存してしまうため、ES細胞から目的細胞（特に未分化の細胞）の同定・単離が結局は不可能という場合が少なくないと想像される。つまりこの問題こそが、ES細胞を用いた再生医学の実現において解決すべき最重要課題であると考えられた。

2. ES細胞由来の目的細胞を確実に同定・単離できる新技術

そこで筆者らは、これまでの遺伝子治療の基礎研究でのバックグラウンドも生かし、アデノウイルスベクターとリコンビネーションシステムによるES細胞由来の目的細胞を単離・同定する新しい技術「Adenoviral conditional targeting法」を開発した（図2、投稿中）。まずアデノウイルスベクターを用いたことで、極めて効率良く、いつでも（分化誘導中に）、簡単に（ウイルス液を培地に加えるだけ）遺伝子導入ができ、さらに染色体構造の影響を受けないepisomalな導入遺伝子（核中で染色体に組み込まれず安定して存在）からの発現は、ES細胞系でも極めて安定しているという利点が生まれた。さらにCreは微量の発現でもLoxP配列のリコンビネーション反応を起こせるため、目的細胞では必ず発現切り替えが起こり、以降はプロモーター活性の強力な汎用プロモーターでレポーター遺伝子は確実に発現され可視化される。つまり、目的遺伝子のプロモーターの活性に依存することなく唯一その特異性にのみ依存して、ES細胞から確実に簡単に目的細胞を単離できるものである。本法は調節アデノウイルスに簡単に任意のプロモーターを入れるだけなので、さまざまな組織に応用が可

図2 ES細胞由来の目的細胞を同定・単離する Adenoviral conditional targeting 法



右下枠内は Nkx2.5 プロモーターを用いた従来法と本法の蛍光顕微鏡下での写真。
略語：巻末の「今月の略語」参照

能である。またさらに、発現切り替えコンストラクトを ES 細胞に安定導入しておけば、マーキングされた目的細胞は *in vitro* の培養皿上で分化転帰が追跡できるという新手法も確立することができた。

さて実際に、本法に Nkx2.5, α MHC の各プロモーターを導入したところ、蛍光顕微鏡によりマウス ES 細胞の目的細胞が生存下では明瞭に可視化され、さらにセルソーターで確実にのおおの目的細胞を単離できた。まず、 α MHC 調節アデノウイルスで単離した細胞はサルコメア構成タンパク質を発現し、1 個の孤立細胞にしても自動収縮能を保持するような、成熟心筋細胞の性質を示した。一方、Nkx2.5 調節アデノウイルスによって単離された細胞は、サルコメア構造を持たず収縮能も示さない一方で、網羅的な遺伝子発現の検討では心筋分化の初期マーカーを示すと

いう、いまだ単離されていない心筋系統の初期細胞という興味深いものであった。

再生医療への応用

生後は自律再生能を失う心臓が障害された場合、現在は心臓移植以外に根本的な治療法がないが、心臓移植はドナー不足の問題、手術侵襲の問題など多くの問題を抱えている。一方、この 10 年間の動物実験の結果により、心臓においては「臓器」や「組織」でなくても、「細胞」移植で治療効果を示すだろうという有望な示唆がなされてきた。つまり、心筋梗塞の動物モデルに別の新生仔から採取し初代培養した心筋「細胞」をその梗塞巣に注入するだけで、ドナー細胞は宿主心筋に生着し機能した。これは最近の臨床研究で、心筋梗塞巣への骨格筋芽細胞の移植ですら著明な心機能の改善が見られたことから実証さ

れたと言えるが¹⁷⁾、しかし骨格筋芽細胞自体はドナー心筋細胞がない代替え手段にすぎず、実際、致死性不整脈の問題なども指摘されている。よってヒト ES 細胞から心筋細胞が分化誘導でき確実に単離できれば、もちろん生命倫理の問題は慎重に考えていく必要はあるが、ただ科学技術的な面からは心筋梗塞などへの心筋細胞移植療法がより現実のものとしてその視野にいることになる。すでにマウス ES 細胞の実験では、ES 細胞由来の心筋細胞（しかも筆者らのように高純度で単離された心筋細胞成分でなくても）は、筋ジストロフィー症のモデルマウスに移植された後に生着し心筋の形態や機能を有したこと¹⁸⁾、さらに心筋梗塞モデルラットへの移植で心機能低下が顕著に改善することなどが報告されている¹⁹⁾。しかし、高純度で単離された ES 細胞由来の心筋系統細胞を用いての前臨床的な本格的な治療実験や、またヒト ES 細胞での治療実験はいまだ報告がないが、これまではそれを可能とするこのような基盤技術が確立していなかったためである。今後、本稿で紹介した技術をヒト ES 細胞に応用し、実際に疾患モデルで前臨床的な治療実験を行っていくことが、ヒト ES 細胞による再生医療の確立のために重要と考えられる。

おわりに

再生医学研究の現状は、純粋な発生/幹細胞生物学的研究、あるいは臨床的研究が盛んであるのに比べ、ES 細胞でのバイオテクノロジー開発の専門的研究はいまだ少ない。筆者らはベクター開発などの遺伝子治療研究^{19) 20)}の蓄積を新技術開発に応用したが、さらにブレークスルーとなる新技術の創出には異領域の研究との融合も必要かもしれない。

文 献

1) Kosai K, et al: Abrogation of Fas-induced fulmi-

nant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 244 (3): 683-690, 1998.

- 2) Kosai K, et al: Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 30 (1): 151-159, 1999.
- 3) 小財健一郎, 他: HGF (肝細胞増殖因子) による劇症肝炎の治療. *小児科* 41 (3): 381-390, 2000.
- 4) Minatoguchi S, et al: Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 109 (21): 2572-2580, 2004.
- 5) 小財健一郎: 遺伝子治療と再生医学. *久留米医学会誌* 67 (5・6 別冊): 175-180, 2004.
- 6) Takahashi T, et al: Therapeutic potential of HGF as a regenerative factor. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 45 (13 Suppl): 2100-2108, 2000.
- 7) Li Y, et al: Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. *Circulation* 107 (19): 2499-2506, 2003.
- 8) Wassarman P.M., et al: Differentiation of embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 365: 1-510, 2003.
- 9) Kawai T, et al: Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 68 (7): 691-702, 2004.
- 10) Nakano T, et al: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265 (5175): 1098-1101, 1994.
- 11) Kawasaki H, et al: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28 (1): 31-40, 2000.
- 12) Nishikawa S.I., et al: Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1⁺ VE-cadherin⁺ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125 (9): 1747-1757, 1998.
- 13) Klug M.G., et al: Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem