

- The Translocation of Protein Kinase C α in Neutrophilic Differentiation Cells. *Journal of Cellular Physiology*. 211, 189-196 (2007).
41. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Yukari Matsuishi, Masashi Toyoda, Yoko Katagiri, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akihiro Umezawa, and Teruhide Yamaguchi. Study on the quality control of cell therapy product. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1160, 263-269 (2007).
 42. Yamaguchi, T., Uchida, E. Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products. *CCDT Journal*. 7, 203-208 (2007).
 43. Mizuguchi, H., Funakoshi, N., Hosono, T., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs. *Hum. Gene Ther.* 18, 74-80 (2007).
 44. Koizumi N., Yamaguchi T., Kawabata K., Sakurai F., Sasaki T., Watanabe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production. *J. Immunol*. 178, 1767-1773 (2007).
 45. Ishii-Watabe A., Kobayashi T., Suzuki T., Yamaguchi T., Kawanishi T. Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture. *Biologicals*. 35, 247-257 (2007).
 46. Kanayasu-Toyoda T., Ishii-Watabe A., Suzuki T., Oshizawa T., and Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133 positive cells. *J Biol Chem*. 282, 33507-33514 (2007).
 47. Niimi S., Harashima M., Yamaguchi, T. Study of hepatocytes using RNA interference. *Journal of Organ Dysfunction*. 3, 164-182 (2007).
 48. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英. 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. *実験医学増刊号*. 25, 1127-1136 (2007).
 49. 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 山口照英. 細胞治療薬の品質・安全性評価における糖鎖解析の重要性と LC/MS の応用可能性. *News Letter 糖鎖フラッシュ号. Functional Glycomics*. 9, 35-41 (2007).
 50. 山口照英. Gene Therapy Discussion Group の動向について. *医薬品研究* 38, 50-59, (2007).
 51. 内田恵理子, 石井 (渡部) 明子, 山口照英. 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保. *臨床ウイルス学会誌*. 35, 278-290 (2007).
 52. 山口照英, 石井明子. 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験についてー TGN1412 事故が医薬品開発に与えたインパクト. *谷本学校毒性質問箱* 10, 1-34 (2007).
 53. 山口照英, 内田恵理子. 日米 EU 医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制に於ける国際動向. *Drug Delivery System*. 22(6), 651-659 (2007).
 54. 山口照英. ICH 遺伝子治療専門家会議ー2006 シカゴ会議報告ー. *医薬品研究* 38, 277-285 (2007).
 55. 山口照英. ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について. *Bio Clinica*. 27, 67-74 (2007).
 56. 山口照英, 土屋利江. 細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価. *YAKUGAKUZASSHI*. 127, 839-840 (2007).
 57. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英. 抗体の LC/MS. *抗体医薬品の最前線*. 105-115, 植田充美監修, シーエムシー, 東京(2007).
 58. 石井明子, 鈴木琢雄, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫. 植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保. *バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保* 702-718, 早川堯夫監修, 株式会社エル・アイ・シー, 東京 (2007).
 59. Minamisawa S., Uemura N., Sato Y., Yokoyama U., Yamaguchi T., Inoue K., Nakagome M., Bai Y., Hori H., Shimizu

- M., Mochizuki S., Ishikawa Y.
Post-transcriptional downregulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in the atrial myocardium. *FEBS Lett.* 580, 2247-2252 (2006).
60. Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H.. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. *Gene Ther.* 13, 1118-1126 (2006).
61. 山口照英. ICH 遺伝子治療専門家会議 シカゴミーティングと今後の展望. *ファルマシア*. 42(4), 357-360 (2006).
62. 山口照英. 医薬品各条の改正点ー生物薬品. *薬局*. 57, 89-95 (2006).
- 安全性シンポジウム、東京 (2008.12)
8. 早川堯夫: バイオロジクスにおける品質とはー改めて思いつくままに、バイオロジクスフォーラム第6回学術集会、東京 (2009.2)
9. 早川堯夫: iPS 細胞等も考慮した細胞製品の指針の整備状況について、第2回 iPS 細胞研究産業応用懇話会、京都 (2009.2)
10. 早川堯夫: 再生医療の規制基準動向、レギュラトリーサイエンスの視点、第4回再生医療の技術動向に関する調査委員会、東京 (2009.3)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし
2. 学会発表
1. Hayakawa T: Points to Consider on Effective Development of Cells/Tissue-Based Products, *BIOJAPAN 2008*, Regenerative Medicine, Stem Cell, Yokohama, JAPAN (2008.10)
2. Hayakawa T: Some Aspects of Evaluation and Control Regarding Subsequent-Entry Protein Products, *AusBiotec 2008*, Melbourne, Australia (2008.10)
3. Hayakawa T: Current Topics in Japan on Evaluation and Control of Biotechnology Products, *WCBP 2009: Symposium on the Interface of Regulatory and Analytical Sciences for Biotechnology Health Products*, San Francisco, USA (2009.1)
4. 早川堯夫: ヒト細胞組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針について、(財)先端医療振興財団シンポジウム(2008.10)
5. 早川堯夫: バイオ医薬品の現状と将来、近畿大学卒後研修会、(2008.11)
6. 早川堯夫: 再生医療実用化に向けて、BTJ プロフェッショナルセミナー、東京、(2008.11)
7. 早川堯夫: 再生医療実用化に向けたガイドライン、第8回医薬品等ウイルス

ヒト幹細胞の利用上の留意点

国立成育医療センター研究所

梅澤 明弘

はじめに

間葉系幹細胞の将来に関し、最も興味があることはその供給源であり、ヒト ES 細胞、iPS 細胞から中胚葉に由来する幹細胞ないしは間葉系幹細胞が樹立されている。これは中胚葉のみに限られたことではなく、内胚葉系、外胚葉系の細胞でも同様である。医療という面からは、間葉系幹細胞は細胞医療における利用できる細胞製剤として有望である。表皮細胞、角膜上皮細胞が現実の再生医療として利用されているのと同様に、間葉系幹細胞が形成外科、歯科口腔外科、循環器科、整形外科の領域で細胞製剤として考えられている。日本においても、骨髄に由来する間葉系細胞を移植することが、GvHD (移植片対宿主病) に対する治療選択肢として臨床試験が開始された。さらに、その増殖能が高いことと同時に遺伝子導入が容易であることより、遺伝子治療の対象となる細胞として考えられる。

1. 間葉系幹細胞の供給源としてのヒト ES 細胞及び iPS 細胞

ヒトのほとんどの組織から間葉系幹細胞は採取できる。各組織における実質細胞に対し、どのような組織においても間充織が存在するからである。その間充織をコラゲナーゼ、トリプシン処理することで培養を開始されてきた。骨髄、脂肪組織のみならず、月経血、臍帯血、臍帯、胎盤から間葉系幹細胞が採取できること、また採取された間葉系幹細胞が各組織ごとにその増殖能及び分化能が異なることを明らかにしてきた。骨髄は、脂肪を初めとした実質

組織に比較すると間葉系幹細胞が含まれる率が異なり、およそ 100 分の 1 程度である。それは、骨髄の細胞が大部分、造血細胞で占められ、間充織を占める細胞は極めて少ない。一方、骨髄に由来する間葉系幹細胞は増殖能、多分化能に優れ、数多くの論文が出版されている。その一方、いずれの組織に由来する間葉系幹細胞は増殖能に限界があり、生体外で増殖させた場合には必ず老化 (senescence) し、増殖を停止する。そのため、ヒト組織に移植する場合には、標準化された細胞数が足りなくなる。実際に、心筋組織に移植される場合には、 10^9 程度の数の細胞数が移植されているが重量でいうと 1 グラム程度であり、骨髄由来間葉系幹細胞では数が不足する。

そこで注目されているのが、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞由来の間葉系幹細胞ないしは間葉系前駆細胞である。これらが有利な点は、大きく 2 点ある。一つめは、ES 細胞及び iPS 細胞が不死であり、事実上、無限の数の細胞を得ることが可能である。二つめは、不死であることより、細胞製剤として標準化されたものが提供可能である点である。同時に、免疫原性が低いとされている間葉系幹細胞ではあるものの、さまざまな HLA ないし血液型抗原を有する細胞を用意することができ、それが Universal 細胞として ES 細胞及び iPS 細胞同様に検証された状態で提供できる。ただし、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞から間葉系に分化誘導した場合、元々不死であった形質が失われてしまうのではないかという危惧があったが、杞憂であった (文献 1)。

これは間葉系のみならず内胚葉系に分化した場合も同様である（文献2）。

間葉系細胞への誘導は、OP9細胞上にヒトES細胞を共培養することによって得られる（文献1）。OP9細胞は、元々M-CSF遺伝子に変異があるマウス骨髄間質細胞から得られた不死化細胞である。また、OP9細胞を有名にしたのは、マウスES細胞から血球を分化誘導する際にフィーダー細胞として利用できることを示されてからである。OP9細胞は前脂肪細胞として単離されてきたが、増殖できるような適切な血清を用いると軟骨芽細胞としての性質を有している。すなわち、分化誘導させることなしに、OP9細胞を免疫不全動物に移植すると軟骨を形成することが可能である（文献3）。OP9細胞自体も不死化している細胞であるので、フィーダー細胞として利用する場合は MytomycinC 処理ないしは放射線照射することにより分裂できないようにしておく。ヒトES細胞をOP9細胞上で培養を開始し、40日程度で間葉系幹細胞が単離できる。なお、共培養する段階でヒトES細胞の培地から間葉系幹細胞用に培地に転換しておくことが肝心である。間葉系幹細胞の基礎培地はDMEMを使用しているのが多いが、筆者は α -MEMを推薦する。得られたヒト間葉系幹細胞は、適切な分化誘導法により骨、軟骨、脂肪、骨格筋への分化誘導が可能である。品質検証された、無限増殖する、多分化能を有した間葉系幹細胞がヒトES細胞から得られる意義は極めて大きい。いまだ、報告はないがiPS細胞からも同様の細胞が得られるという報告はすぐになされるであろう。

2. 遺伝病に対する間葉系幹細胞を用いた再生医療

将来的な医療であり、安全性・有効性の検討が今後も十分に必要であることは間違いないことであるものの、間葉系幹細胞を細胞治療としての供給源に用いることが考えられる。対象疾患としては小児の先天性疾患である小児の先天性代謝異常症、尿素サイクル異常症、メチルマロン酸血症、

筋ジストロフィー、小児心不全を想定している。先天性代謝異常症の患者は日本に3千人、筋ジストロフィーの新規患者は毎年3千人である。代謝異常症では欠損酵素を分泌する幹細胞や分化細胞、尿素サイクル異常症・メチルマロン酸血症では肝細胞、筋ジストロフィーでは骨格筋の筋芽細胞、心不全では心筋細胞に分化させて患者に移植する。筋ジストロフィーには有効な治療法がなく、また、症例によっては慢性で長期間に渡り苦しむ。骨髄間質細胞は骨格筋への分化を生体内において示す。多核の幼弱な筋組織が形成される。遺伝性の筋疾患に対し、筋サテライト細胞と同じように間葉系幹細胞が骨格筋に分化し、筋力を増加させるのに有効である可能性がある。同時に移植した細胞が、宿主の骨格筋と癒合するようなことがあれば移植した細胞が有する正常の筋蛋白質を発現し、宿主骨格筋を正常に働かせることができるかもしれない。気になるのは免疫拒絶反応であるが、骨髄移植と異なり免疫担当細胞を移入しないので、約2~300種類の組織適合抗原のレパートリーを用意しておけば日本人の8割はカバーできる。

おわりに

間葉系幹細胞の作用については古くから論文として発表されており、間葉系幹細胞と造血細胞との直接の相互作用であり、増殖・分化を制御することが知られてきた（文献4）。基盤的な研究から20年が経過し、臨床研究に応用された歴史に生きることができたことを幸運に思う。

文献

1. Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L.: Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med.* 2(6):e161, 2005
2. Séguin CA, Draper JS, Nagy A, Rossant J.: Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 3(2):182-195, 2008.
3. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem.* 100(5):1240-1254, 2007
4. Ohkawa H, Harigaya K.: Effect of direct cell-to-cell interaction between the KM-102 clonal human marrow stromal cell line and the HL-60 myeloid leukemic cell line on the differentiation and proliferation of the HL-60 line. *Cancer Res.* 47(11):2879-2882, 1987.

間葉系幹細胞を用いた細胞治療／遺伝子治療の開発

Development of cell therapy/gene therapy

using mesenchymal stem cells

自治医科大学

内科学講座血液学部門

分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部

小澤 敬也

はじめに

骨髄の中には造血幹細胞と間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) という二つの体性幹細胞が存在し、造血システムを維持する上で両者が重要な役割を果たしている。多彩な細胞への分化能を有する MSC は、生体に投与すると組織傷害部位に集積する性質があることから再生医療への応用が検討されると共に、その免疫抑制能と炎症部位への集積性に着目した移植片対宿主病 (GVHD: graft-versus-host disease) の治療に関する臨床研究が進んでいる。また、MSC は腫瘍集積性を有することも明らかになり、癌遺伝子治療のプラットフォームとして用いる戦略も提案されている。さらに、再生医療／細胞治療の有効性を高めていくには遺伝子操作を絡めるアプローチが将来的な方向性であり、そ

の安全性を確保するためのテクノロジー開発も進んでいる。

本稿では、MSC を用いた再生医療／細胞治療に関する研究の最新の動向を概括する。

間葉系幹細胞 (MSC) について

非造血系の未分化細胞である MSC は、造血支持組織としての骨髄ストローマ細胞の構成成分に分化してだけでなく、さらに脂肪細胞・骨細胞・軟骨細胞・筋細胞・腱などの中胚葉系の様々な組織に分化する能力を持った細胞として、再生医療への応用といった観点から注目されている¹⁾。例えば、心筋梗塞後の心筋組織修復を目的に MSC を障害部位局所に移植する臨床研究が試みられており、関節症治療への応用を目指した研究も進んでいる。また、造血幹細胞移植領域では、MSC の造血支持能に基づいたものとして、移植後の生着促進と

造血系再構築促進効果は、特に臍帯血移植の場合にその効果が期待される。さらに、MSCが有する免疫抑制作用に着目し、重症GVHDの治療についても、臨床研究が活発化してきている。

MSCは幹細胞が持つ共通の性質として、自己複製能を有し、分化誘導条件下で様々な系列の細胞に分化する能力を持っているが、造血幹細胞の場合と異なり、それほど厳密な検討がなされているわけではない。MSCという用語自体も研究者によって使い方が異なっており、かなり混乱した状況にある。そこで、ISCT(International Society for Cellular Therapy)では、MSCの定義について次のような提案をしている²⁾。即ち、MSCをmesenchymal stem cellとmultipotent mesenchymal stromal cellの2つに大別し、幹細胞の定義を満たすようなものを前者としている。後者は、プラスチックに接着性の細胞で、形態学的に線維芽細胞様のものであるという大雑把な括りしかできない場合に用いるものとしている。

MSCの表面マーカーに関しては、CD45・CD34・CD14などの造血系マーカーが陰性で、CD102(ICAM-2)・CD105・CD106(VCAM-1)・CD29(integrin β 1)・CD58(LFA-3)・CD73・CD90(Thy-1)・CD166・その他の種々のインテグリン分子が陽性である。さらに、ヒトMSCはHLA class I抗原を発現し、IFN- γ で刺激するとHLA class II抗原も発現する。しかし、costimulatory分子のB7-1、B7-2、CD40、CD40リガンドを発現せず、アロ反応性T

リンパ球を刺激しない。また、MSCを様々な系統に分化誘導しても免疫原性はほとんど出現しないことが報告されている。したがって、免疫学的に急速に排除されることがないため、MSCを細胞治療に用いる際に、HLAを一致させる必要は必ずしもないとされている。但し、これらの現象は短期的な観察によるものであり、MSCがHLAのバリアを超えて体内で長期的に維持されるかどうかについては、否定的な報告も出されている³⁾。再生医療に応用するには、HLAを合わせるのが一般的である。

MSCの投与ルートとしては静脈注射が一般的であるが、かなりの部分は肺にトラップされてしまい、骨髄や全身の様々な組織に到達するのは一部である。また、組織障害や炎症のある部位には集積しやすいと考えられており、このような現象は再生医療における組織修復の機序との関係で興味深い。

安全性の点では、体外培養で増幅したMSCのゲノムに障害が発生していないかどうか問題となる。例えば、脂肪組織⁴⁾や骨髄⁵⁾から分離したヒトMSCの長期培養(数ヶ月)でトランスフォーメーションが生じ、染色体異常が出現することが報告されている。したがって、臨床用MSCは長期に亘る継代を避け、使用前に染色体異常の有無をチェックすることが重要である。

MSCの免疫抑制作用とGVHD制御への応用
混合リンパ球培養(MLC:mixed-lymphocyte culture)やレクチン刺

激による T リンパ球の増殖反応が、MSC 添加により *in vitro* で用量依存性に抑制されることが知られている。この場合、MSC の HLA を合わせる必要がないことも示されている。MSC による免疫制御の分子機構には、T リンパ球、NK 細胞、樹状細胞 (DC: dendritic cell) などが関与し、炎症性サイトカイン産生の抑制、抑制性サイトカイン産生の増加が観察されている (図 2)⁶⁾。その他、MSC の免疫制御には、MSC が産生する PGE₂⁷⁾ や NO⁸⁾ を介した機序なども想定されている。尚、MSC は分化してもその免疫抑制作用が認められると報告されている⁹⁾。

MSC 由来細胞の免疫抑制作用に着目した造血幹細胞移植への応用では、急性 GVHD に対する効果が期待されており、臨床治験が実施されている。MSC を投与する時期としては、造血幹細胞移植時に GVHD 予防を目的として投与する場合と、既存の治療法では制御できない重症 GVHD に対して治療目的に投与する場合がある。前者では MSC の有効性は確認されていないが、後者の治療を目的とする方法については、ヨーロッパの移植チームによる多施設非ランダム化第二相臨床試験が実施された¹⁰⁾。55 名のステロイド不応性重症急性 GVHD 患者が MSC 治療 (中央値 1.4×10^6 /kg の MSC を静脈注射) を受け、30 名 (55%) が完全なレスポンス、さらに 9 名が軽快した。合わせると 71% という高率で有効性が認められたわけで、対象症例の従来治療経過を考えると驚くべき成績であると言え

る。また、MSC の HLA が患者のものと同じであるかどうかは、治療成績に影響を与えなかったと報告されている。特に副作用も認められていない。その他、米国では Osiris 社による第三相臨床試験が実施されている。

なお、MSC の免疫抑制作用は、一方で GVL (graft-vs-leukemia) 効果まで抑えてしまうことが懸念されている。動物実験では、MSC の免疫抑制作用が癌細胞による腫瘍形成に有利に働く可能性があることを観察している報告もある¹⁹⁾。但し、長期的な悪影響よりは、当面の重症 GVHD の治療が優先されるべきであり、また MSC の影響が長期間に亘り持続することは考えにくいと、それほど心配する必要はないと思われる。

尚、MSC のソースとしては、従来は移植ドナーあるいは血縁者由来のものが用いられたケースが多いが、今後は、HLA を合わさずに用いる方法の臨床治験が進むものと思われる。この場合、1 人の正常骨髄から樹立された MSC が 100~200 人規模の患者の治療に用いられることになるものと予想される。

MSC の癌治療への応用

MSC は上述のように組織障害や炎症のある部位に集積していく性質を有するが、その他に癌病巣へ集積する性質があることも知られている。そこで、MSC を癌に対する遺伝子治療のプラットフォームとして利用しようという発想が生まれてきた。例

例えば、インターフェロン- β (IFN- β) を発現するように遺伝子改変した MSC を腫瘍ヌードマウスに静脈注射すると、その生存期間が延長するとの観察がなされている^{12,13)}。MSC が癌病巣に集積し、そこで局所的に IFN- β を発現し、抗腫瘍効果を発揮したものと推定されている。様々な抗腫瘍性サイトカインを全身投与した場合は、治療域では副作用の出現頻度が高く、ベネフィットが上回るとは言い難い。また、血中半減期が短いために、頻回投与を必要とするという問題点もある。一方、MSC を利用して腫瘍ターゲティングを行った場合は、抗腫瘍性サイトカインが腫瘍局所で発現されるために効果的であり、かつ全身性の副作用を極力減らすことができるものと考えられる。このような治療ストラテジーの臨床的有効性は今後の課題であるが、癌転移巣の治療法としては魅力的なアプローチである。

幹細胞のゲノム操作-染色体部位特異的遺伝子組み込み法の開発

幹細胞を用いた再生医療/細胞治療の有効性を高めていくには、遺伝子操作技術の応用が当然の流れである。導入遺伝子の長期的発現を期待する場合には、染色体 DNA に組み込ませる必要があり、従来、レトロウイルスベクターがよく用いられてきた。しかしながら、このベクターの場合は、標的細胞のゲノムにランダムに治療用遺伝子が組み込まれる傾向があり、挿入変異が問題となる。安全性確保の観点から、

相同組換え技術の応用が理想的であると考えられるが、その実用化にはまだ時間がかかるものと予想される。そこで、染色体の安全な部位に遺伝子を組み込ませる技術の開発が進んでいる。具体的には、非病原性ウイルスであるアデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) の性質の利用が考えられる。AAV の非構造調節性蛋白質である Rep は、AAV ゲノム両端の ITR (inverted terminal repeat) と呼ばれる T 字型ヘアピン構造にある Rep 結合部位 (RBS) に結合するが、ヒト第 19 番染色体長腕 AAVS1 領域 (19q13.4) にも RBS 相同配列が存在するため、同部位への野生型 AAV ゲノムの部位特異的組み込みが生ずると考えられている。このユニークな現象を応用し、Rep をトランスに働かせることにより、ITR 配列を連結した任意の遺伝子を AAVS1 領域に特異的に組み込ませることが可能となる。即ち、AAV の ITR と Rep という二つのコンポーネントを利用することにより、治療用遺伝子を安全な第 19 番染色体長腕 AAVS1 領域に組み込ませるというストラテジーである^{14,15)}。

おわりに

最近、我が国でも MSC の細胞医薬品としての臨床開発研究がスタートしている。MSC は造血幹細胞移植領域での細胞治療への応用以外に、心筋組織・関節組織・腱・神経組織などの修復を目的とした再生医療への利用も活発に研究されており、また、遺伝子治療との融合を含め、様々な治療戦

略を可能とする新しい医療の発展に繋がるものである。今後の大きな発展が期待される領域である。

文献

- 1) Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147, 1999.
- 2) Horwitz, E., Le Blanc, K., Dominici, M., et al.: Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395, 2005.
- 3) Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., et al.: Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 106: 4057-4065, 2005.
- 4) Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martin, M.C., et al.: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 65: 3035-3039, 2005.
- 5) Wang, Y., Huso, D.L., Harrington, J., et al.: Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 7: 509-519, 2005.
- 6) Nauta, A.J. and Fibbe, W.E.: Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110: 3499-3506, 2007.
- 7) Aggarwal, S., and Pittenger, M.F.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815-1822, 2005.
- 8) Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., et al.: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* (in press)
- 9) Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., et al.: HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 31: 890-896, 2003.
- 10) Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al.: Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371: 1579-1586, 2008.
- 11) Djouad, F., Plence, P., Bony, C., et al.: Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837-3844, 2003.
- 12) Studeny, M., Marini, F.C., Dembinski, J.L., et al.: Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 96: 1595-1603, 2004.
- 13) Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., et al.: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 65: 3307-3318, 2005.
- 14) Surosky, R.T., Urabe, M., Godwin, S.G., et al.: Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J. Virol.* 71: 7951-7959, 1997.
- 15) Kogure, K., Urabe, M., Mizukami, H., et al.: Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int. J. Hematol.* 73: 469-475, 2001.

人工多能性幹細胞(iPS細胞)の臨床応用における課題と展望

京都大学物質・細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター

センター長 山中伸弥

要旨

iPS細胞は、ごく少数の遺伝子を体細胞に導入することにより樹立される多能性幹細胞である。これを用いて患者と同じ遺伝情報を持つ神経細胞や心筋細胞などを作り出すことが可能であり、病態解明、毒性試験などへの応用が期待されている。一方、細胞移植治療への応用については、iPS細胞の誘導機構の解明、およびES細胞との十分な特性比較は未だ途上であり、また、移植治療における安全性確保など、検討すべき課題がある。本稿ではiPS細胞研究の臨床応用における課題と展望について紹介する。

はじめに

多能性幹細胞は自分自身と同じ細胞を作り出す自己複製能と、様々な種類の細胞に分化する多能性を合わせ持つ細胞である。その代表はES細胞であり、1981年にマウスで、1998年にはヒトで樹立が報告された。パーキンソン病や1型糖尿病などの変性疾患に対する根治療法として、このES細胞を用いた細胞移植療法が有効ではないかと期待されている。現在、ES細胞由来では初の臨床試験として、米国ではGeron社によるES細胞由来オリゴデンドロサイトを用いた脊髄損傷の臨床試験が計画されている。しかしながらES細胞の樹立には倫理的問題が依然としてあり、また、他家移植を行うにあたり、免疫抑制剤を利用しなくてはならないなどの問題もある。

iPS細胞の樹立

分化した体細胞が再び多能性を獲得することを細胞核の初期化と呼ぶ。もし患者自身の体細胞を初期化することで多能性幹細胞を作り出せれば、ES細胞の利用に付随する幾つかの問題を回避出来ると考えられる。1997年にヒツジの体細胞に核を取り除いた未受精卵を融合させると初期化が起こり、体細胞由来の個体が産まれることが報告された¹。また、体細胞の初期化はES細胞との細胞融合でも引き起こされることもわかってきた²。これらの研究から、未受精卵やES細胞には初期化因子と呼ぶべきものが存在することが示唆されていた。そこで私たちはマウス線維芽細胞にES細胞で発現する複数の遺伝子を強制的に発現させて、初期化が引き起こされるかを検討した。すると、わずか4種の転写因子(*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*および*c-Myc*)によってES細胞様の多能性幹細胞を作り出せることが分かった³。この細胞をinduced pluripotent stem (iPS)細胞と名づけ2006年に報告した。2007年には同じ4種の遺伝子によってヒト線維芽細胞からもiPS細胞を作製した⁴。同時期に私たちとは異なる組み合わせの遺伝子(*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*および*Lin28*)を用いてヒトiPS細胞の樹立も報告されている⁵。その後、世界各地で続々と研究成果が上がってきており、2008年にはラット⁶およびアカゲザル⁷からの樹立も報告された。

iPS 細胞誘導機構

iPS 細胞の誘導には複数の転写因子が用いられている。ES 細胞においてこれらの転写因子は数百を超える遺伝子座に結合し、それぞれの遺伝子の発現を制御している⁸。また、面白いことに Oct3/4, Sox2 および Nanog は自分自身を含めたお互いの遺伝子座に結合して相互に転写調節を行う。さらに多数の共通する標的遺伝子を持つ。Klf4 を含めたこれらの転写因子は ES 細胞において多能性維持のための転写調節ネットワークを形成している。iPS 細胞の誘導時にはこれらの転写因子を強制的に発現させることで、数百を超える下流遺伝子の発現が変化し、結果として初期化が起こるのではないかと考えられる。その際、恒常的な外来性転写因子の発現は必要ではなく、マウス線維芽細胞では最低 10 日間、ヒト線維芽細胞では 20 日間程度の発現が続けば iPS 細胞が樹立できることが報告されている。また、2008 年には私たちや他の研究グループが、一過性発現ベクターによるマウス iPS 細胞の樹立にも成功している^{9,10}。外来性遺伝子により初期化が引き起こされた後は、内在性遺伝子により多能性が維持されていると考えられる。遺伝子の発現調節には転写因子のほかにヒストンのメチル化やアセチル化、DNA のメチル化などのエピジェネティック修飾も関与する。線維芽細胞において多能性細胞のマーカーである Oct3/4 や Nanog などのプロモーター領域の DNA は高度にメチル化され不活性であるが、iPS 細胞ではメチル化の頻度が低下して活性化している。DNA 脱メチル化剤(5-アザシチジン)、ヒストン脱アセチル化阻害剤(バルプロ酸)やヒストンメチル化阻害剤(BIX-01294)などが iPS 細胞の誘導効率を上げるという報告もなされている¹¹。これらのことから iPS 細胞の誘導はエピジェネティックな変化を伴う過程であると考えられる。

Lin28 は RNA 結合活性を持つタンパク質であり、let7 ファミリー-microRNA の成熟を阻害することが知られている。Lin28 は ES 細胞で高発現しているが、分化の進行とともに減少し、それに反比例し

て成熟 let7 ファミリー-microRNA が認められるようになる¹²。成熟 let7 は肺腫瘍細胞の増殖を抑制し、分化を促進することが示されている。これらの結果から iPS 細胞の誘導過程において Lin28 は間接的に分化を抑制しているのではないかと推測されるが、詳細な機構については今後の解析が待たれる。

iPS 細胞の誘導には ES 細胞を培養するための培地を用いている。ヒトおよびマウス ES 細胞ではそれぞれサイトカインである bFGF および LIF の培地への添加が安定な未分化状態維持に有効である。Wnt3a の添加がマウス iPS 細胞の誘導効率を上げるという報告¹³もあり、これらの液性因子による初期化制御機構についても今後研究が進んでいくだろう。

iPS 細胞の応用

iPS 細胞の技術を利用すると、患者と同じ遺伝情報を持つ多能性幹細胞を得ることができる。さらにその細胞を分化させることにより、これまでサンプルの採取が困難であった心筋細胞や神経細胞などを利用できるようになる。こうした細胞を用いれば、疾患の発症機序の解明や、効果のある薬剤のスクリーニングなどに応用できると考えられる。すでにダウン症、パーキンソン病やハンチントン病などの患者から iPS 細胞が樹立されており¹⁴、さらに脊髄性筋萎縮症の患者から樹立した iPS 細胞を神経細胞へと分化させた病態モデルも報告されている¹⁵。こうした取り組みにより、病態進行の予測法、新たな治療法や、新薬が開発されれば、多くの人々がその恩恵にあずかると考えられる。

臨床応用の際の安全性について

もう一方の iPS 細胞の応用例としては細胞移植療法があげられる。原理的には治療を受ける一人ひとりから iPS 細胞を複製し、免疫拒絶反応の無いオーダーメイドの治療を行うことが可能である。ただし、樹立と分化誘導、さらに治療細胞としての効果や安全性の検討にかかる時間および経済的な観点から、実際には様々な HLA のレパートリーを揃えた iPS 細胞とその

分化細胞のバンクのような形が現実的ではないかと考えられる。しかし、こういった治療への応用にはまだ多くの課題が山積している。

多能性幹細胞を細胞移植治療に用いる場合の問題点に、腫瘍の形成が挙げられる。例えばES細胞からは神経細胞、 β 細胞や心筋細胞などへの分化誘導法が研究され、一部では疾患モデルマウスへの移植も行われている。しかし、完全な分化誘導はいまだ困難であり、少量の未分化細胞の残存が避けられない。こうした未分化細胞の混入によって移植後に腫瘍が形成されることがわかってきている。そのため、分化誘導後に如何にして未分化細胞を取り除くかが、今後重要な研究課題となるだろう。

iPS細胞に関しては、上述の問題に加え、iPS細胞特有の問題が存在する。一つ目は誘導方法に関するものである。現在は初期化因子の発現に主にレトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いている。これらのベクターは初期化因子を含む自身の遺伝子情報を目的細胞のゲノムへ組み込む。そのため、細胞分裂を経ても安定して初期化遺伝子を発現させることができる。細胞への導入効率も良く、ダメージも少ないことからiPS細胞の誘導には非常に有利であるが、一方でiPS細胞のゲノムに初期化遺伝子が挿入されたままになる点は治療を考えた場合には問題となる。特に癌原遺伝子として知られる*c-Myc*の使用は当初より危険性が指摘されていた。樹立され、安定になったiPS細胞では組み込んだ初期化遺伝子の発現はほとんど検出できない。これはES細胞に認められるような、レトロウイルスのプロモーターを不活性化する機構がiPS細胞にも存在するためだと考えられる。しかし、マウスiPS細胞から作製したキメラマウスやその子孫を観察すると、出生後3ヶ月以内に20%ものマウスに腫瘍が形成された¹⁶。これらの腫瘍ではレトロウイルスで導入した*c-Myc*の再活性化が認められたことから、これが腫瘍形成の一因であると考えられる。この問題に関しては、のちに*c-Myc*を用いない3因子(*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*)のみでも、誘導期間を長くすることでヒトお

よびマウスiPS細胞が誘導できることが報告された¹⁷。すなわち*c-Myc*はiPS細胞の樹立に必須ではないが、樹立効率を大きく上げる因子であると考えられる。*c-Myc*を含まない3因子で作成したiPS細胞由来のキメラマウスでは6ヶ月の観察期間内に腫瘍の発生を認めなかった。しかしながら、*Oct3/4*などの他の初期化遺伝子もそれぞれ発癌との関連が示唆されている。そのため最終的にはいずれの遺伝子もゲノムへ挿入しないようなiPS細胞の樹立方法が確立されることが望ましい。そこで私たちはウイルスベクターを用いない誘導方法の開発に取り組み、試行錯誤の結果プラスミドベクターによるマウスiPS細胞の樹立に成功した⁹。このiPS細胞は従来のiPS細胞と同様に多能性を持ち、調べた限りではゲノムへのプラスミドの組み込みは確認されていない。また別の手法として、遺伝子を発現させる代わりに、化合物を用いてiPS細胞を誘導する試みも行われている。マウス線維芽細胞ではBIX-01294に加え、L型カルシウムチャンネル作動薬であるBayK8644を培地に添加することで*Oct3/4*と*Klf4*の2つだけでiPS細胞が誘導できることが示されている。一方で、誘導元となる細胞を変えることで、必要となる因子の数を減らすことも可能である。内在性*Sox2*の発現の高い神経前駆細胞を用いれば、*Oct3/4*と*Klf4*の2つを加えるだけでiPS細胞が誘導できることが示されている¹⁸。そのほかにも、複数の初期化遺伝子をひとつのベクターにまとめることでゲノムへの組み込みを減らす工夫や、アデノウイルスを使用した方法など様々な取り組みが進められている。

iPS細胞に特有の問題としてもう一点考えられるのは、初期化に伴うものである。マウス体細胞の初期化は除核した未受精卵との融合でも報告されており、クローンマウスも誕生している。しかし、このクローンマウスでは早期の死亡、内分泌異常やDNAのメチル化パターンの異常が見つかっており、これらは不十分な初期化が原因ではないかと考えられている。同じことがiPS細胞にも当てはまるかどうかは検討

が必要だが、例えばマウスの肝臓に由来する iPS 細胞では、キメラマウスが出生直後に高頻度に死亡することが分かっている¹⁹。この結果は、iPS 細胞の初期化が不完全であることを示唆しているのかもしれない。iPS 細胞の誘導過程では、多能性維持に関わる遺伝子群の発現やエピジェネティック状態は ES 細胞様に変化すると考えられるが、それ以外の例えば分化時に必要となるような遺伝子群がどう変化しているのかなど、今後慎重に検討を重ねていくことが必要だと思われる。

まとめ

iPS 細胞は、たった数種類の遺伝子を発現させるだけで多能性幹細胞を作り出せると言う事実から多くの研究者を驚かせた。一方で、上述した問題点から早期の直接的な医療応用は難しいが、疾患の発症機序の解明や治療薬の開発等への利用はすでに始まりつつある。また、iPS 細胞の概念を応用して、マウスの膵臓外分泌細胞に β 細胞で発現する 3 つの転写因子 (*Ngn3*, *Pdx1* および *Mafa*) を発現させることで、 β 細胞へと変化させるという興味深い研究結果も報告されている²⁰。今後、多角的な検討によって、細胞移植治療開発における iPS 細胞の可能性が検証されていくであろう。

参考文献

1. Campbell KH, et al: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380(6569):64-66, 1996.
2. Tada M, et al: Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11(19):1553-1558, 2001.
3. Takahashi K, et al: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676, 2006.
4. Takahashi K, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872, 2007.
5. Yu J, et al: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858):1917-1920, 2007.
6. Liao J, et al: Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Adult Rat Cells. *Cell Stem Cell* 2008.
7. Liu H, et al: Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3(6):587-590, 2008.
8. Boyer LA, et al: Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122(6):947-956, 2005.
9. Okita K, et al: Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322(5903):949-953, 2008.
10. Stadtfeld M, et al: Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322(5903):945-949, 2008.
11. Shi Y, et al: A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2(6):525-528, 2008.
12. Viswanathan SR, et al: Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320(5872):97-100, 2008.
13. Marson A, et al: Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 3(2):132-135, 2008.
14. Park I, et al: Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5):877-886, 2008.
15. Ebert AD, et al: Induced

- pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2008.
16. Okita K, et al: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448(7151):313-317, 2007.
 17. Nakagawa M, et al: Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26(1):101-106, 2008.
 18. Shi Y, et al: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 3(5):568-574, 2008.
 19. Aoi T, et al: Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321(5889):699-702, 2008.
 20. Zhou Q, et al: In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455(7213):627-632, 2008.

再生医療実用に向けた医療組織工学の現状と展望

大和雅之

再生医療実現における組織工学の必要性
骨髄移植としてスタートした造血系肝細胞移植は、現在までにほぼ確立した医療技術となっており、骨髄バンクに続いて臍帯血バンクが立ち上がる等、試験的臨床研究のレベルをはるかに超えて、支援組織の整備の段階に入っている。しかし造血系以外では、肝細胞を含むと考えられる細胞懸濁液の注射で有効性が示されている臨床報告はきわめて限られている。遺伝子疾患に起因する肝不全患者への経門脈的あるいは脾臓への他家健常肝実質細胞移植や、パーキンソン病患者への中絶胎児由来他家神経細胞移植は有効性が確認されているが、これらでさえ全世界で 100 例弱程度にすぎない。この他、バージャー病などの下肢血行障害への自己骨髄細胞移植が有効であるとの報告が注目を集めている。しかし、筋組織への細胞懸濁液の移植は数十カ所から百カ所程度の注射によって達成され、その際に注射針が不可避免的に組織を傷つける他、移植された細胞の生着率が 10% 以下ときわめて低いこと、また島状の組織のみが再生し、大きな組織とならないなどの問題点も指摘されている。上記の細胞懸濁液移植は、すべて培養することなく採取した細胞を直接移植に供する系としては、膝関節軟骨の傷害に対する培養自己軟骨細胞懸濁液移植が知られている。欠損部位は自己骨膜で被覆する。その臨床応用は 1994 年にブリットバークらにより報告され、1995 年より Genzyme 社より患者軟骨細胞の培養代行サービス（1 件約 200 万円）が Carticel® として商品化されており、一万件以上の症例がある。フランスのフィリップ・メナシュが率いた、虚血性心筋症に対する培養自己骨格筋筋

芽細胞移植の第 II 相試験である MAGIC スタディはベルギー、フランス、ドイツ、イタリア、英国での多施設ランダム化試験であり、97 名の患者が参加した。バイパス手術時に梗塞部位およびその周囲に計 30 カ所の注射による細胞懸濁液移植を行った。第 I 相試験で頻発した不整脈を防ぐために全例に除細動器を装着している。試験の結果、プライマリーエンドポイントである心機能の改善を得ることができず、やはり、ヒトを含む大型動物の組織再生には、細胞懸濁液の注射だけでは不十分であり、何らかの形で組織を再構築する技術、すなわち組織工学の探求が必須であると考えられる。

組織工学黎明期

培養細胞を用いて臨床応用に成功したのは、ハワード・グリーンらによるものが最初である。グリーンは、特殊な培養条件下で移植に耐えうる重層化扁平上皮組織を作製できることを 1975 年に報告し、1980 年より臨床応用を開始した。培養皿からの回収には、ディスパーゼと呼ばれる微生物由来のタンパク質分解酵素を用いる。本技術を用いて Genzyme 社は、1988 年より Epicel® 商品名で患者表皮細胞の培養代行サービスを商品化している。同様の培養代行サービスはヨーロッパや韓国でも商業化されている他、本邦でも 2007 年に日本初の再生医療ベンチャーであるジャパン・ティッシュ・エンジニアリング社が厚生労働省の承認を得た。この技術を用いた症例は、これまでに 1 万件程度である。表皮と同様に、重層扁平上皮である角膜上皮も同様の培養条件で作製できるものの、培養表皮に比べ重層化度が低く、ディスパーゼ処理後に脆弱となるため、フィブリン

ゲルや羊膜を基質として培養し、そのまま角膜実質に移植する。あるいはわれわれが開発した温度応答性培養皿上で培養し、ディスプレイ処理ではなく室温程度の低温処理で回収し移植に供する。

1979年、ユージン・ベルらは、真皮（皮膚の下層部分、皮革製品の材料）など軟骨以外の多くの結合組織の主成分であるI型コラーゲンを生理的条件下で37℃に加熱するとゲル化することに着目し、ゲル化の際に細胞を導入すると内部で三次元的に細胞が分散した細胞を含むコラーゲンゲルを作製でき、これを三次元培養系とすることができることを報告した。ベルらはこの技術を発展させ、線維芽細胞を内部を含む収縮コラーゲンゲルの上に表皮細胞を播種し、これを培養全層型皮膚として1981年に論文報告した。この技術はベル自身が作ったOrganogenesis社がApligraf®という名前で商品化した。適応は糖尿病の際に足裏にできる難治性潰瘍である。Apligraf®は、細胞が生存した状態で出荷され、患者患部への移植後も細胞はしばらくの間生存しているものと考えられる。この間にApligraf®が創面を塞いで創傷治癒を促進する他、Apligraf®中に含まれる移植された細胞が、種々の細胞成長因子やサイトカイン、細胞外マトリックス成分を合成分泌することで、他の薬剤では見ることのできない良好な創傷治癒が生じる。

生分解性足場を用いた組織工学とその臨床応用

1980年代後半、ジョセフとチャールズのヴァカンティ兄弟は、皮膚のように薄い組織ではなく、肝臓のように分厚い臓器を作ることを目指して、三次元的な細胞の足場を作り、これに細胞を播種した後に移植に供するという新しい手法を提案した。足場の素材としてポリ乳酸やポリグリコール酸などの生分解性合成高分子が採用された。ポリスチレンやポリエチレンなどの合成高分子はいずれも生体適合性を大きく欠いており、われわれの体の中に埋入しても身体の一部として同化することはない。コラーゲンを中心とする線維性の組織で

周囲を取り囲まれ、内なる外部として隔離されてしまう。しかし、生分解性合成高分子は、生体内への埋入後に、ある一定の半減期をもって分解され、吸収もしくは排泄されるという性質をもち、すでに内臓の手術等に用いられる縫合糸の素材として臨床応用されていた。すなわち、対象とする組織の形態にあわせて成型した生分解性高分子製の細胞培養用足場に細胞を播種し、培養後に患部へ移植する。足場は分解するが、その間に足場に播種した細胞や宿主由来の細胞が合成・分泌したコラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスないし増殖した細胞と置換されるため、足場通りの形を再現した組織が再生することが原理的には期待される。逆に、生分解性高分子の分解・消失速度と細胞による細胞外マトリックスの産生速度、細胞の増殖速度がうまく対応していないと形が崩れることになる。

1993年、ジョセフ・ヴァカンティは共同研究者であるロバート・ランガーと共著でScience誌に「ティッシュ・エンジニアリング」と題する総説を発表し、組織工学研究が世界的に大ブレイクすることとなる。ただし、少なくとも現状では、生分解性合成高分子製足場を用いた臨床例はきわめて少ない。マウスの背中にとったヒトの「耳」は、1990年頃にはさまざまなメディアに登場していたが、それからおよそ20年が経過した現在においても、中国以外では一例の臨床応用もされていない。中国では約40症例があるが、全例で耳の形状が維持できていないとのことである。他には、ヴァカンティの共同研究者であったアントニー・アタラらによる膀胱再建術の臨床応用8例がLancet誌に報告されているが、その結果は必ずしも芳しいものではない。生分解性合成高分子製の足場を活用した組織工学製品として、Advanced Tissue Science社が開発したDermagraft®がある。割礼包皮由来他家皮膚線維芽細胞を生分解性合成高分子製のメッシュ上に播種し、培養した培養人工真皮であり、適応は難治性の潰瘍である。

臨床応用された他の組織工学技術

生分解性足場を用いない他の組織工学技術を用いた臨床応用例として、最近 New England Journal of Medicine 誌に報告された Cytograft Tissue Engineering 社によるものがある。同社は、シートベースド組織工学と呼ぶ技術(後述の温度応答性培養表面を活用する細胞シート工学とは異なる)を活用し、培養人工血管を開発してきた。

具体的にはアスコルビン酸などの添加により、コラーゲンなどの細胞外マトリックス産生を促進した培養条件下に、切手代の皮膚組織片から単離した患者自己線維芽細胞を供し、豊富な細胞外マトリックスと多数の細胞を含み、縫合等の操作に耐えるシートを作製する。これを心棒に巻き付けて血管様に加工した後に、患者自己血管内皮細胞を内腔に播種する。このようにして作製した LifelineTM は血液透析に用いる AV シャントとして臨床応用されており、10名の初期臨床結果(最長13ヶ月)が報告されている。培地成分以外の人工物を一切用いることなく、動脈圧に耐えうる培養人工血管が作製できたことは大きな成果である。

この他、最近では人工物で足場を作る研究と並行して、屍体あるいは動物由来の組織を界面活性剤等で脱細胞化し、不溶性の細胞外マトリックスだけからなる脱細胞化組織を足場として活用する研究が多数報告されている。この技術の臨床応用として、パオロ・マキャリニらが最近 Lancet 誌に報告した結核性気管支炎による気管支軟化の再生医療的治療がある。屍体由来の気管を脱細胞化し、ここに患者自己由来の上皮細胞と軟骨細胞を播種して培養した後に移植に供している。術後4ヶ月の一例報告ではあるが興味深い。

展望

今後、骨格筋や腎臓、肝臓等の大型組織・臓器の再生医療を目指すのであれば、どのようにして分厚い組織を再構築するかに関した研究にもっと注力すべきである。そのためにはホスト血管系接続しているか、あるいはマイクロサージェリーで接続可能な末端をもつ毛細血管網を組織中に再

生させることが必須である。同様に筋肉等の組織では神経系の再生も必須である。血管幹細胞でも細胞成長因子でもバイオリクターでも何でもかまわない。分厚い組織を作るための研究が強く求められている。

われわれは、室温程度に温度を下げると、培養細胞をシート状に脱着・回収できる温度応答性培養表面を活用する細胞シート工学を、10年以上にわたって提唱してきた。これまでに角膜上皮幹細胞疲弊症、食道ガンの切除後の人工潰瘍、拡張型心筋症の再生医療的治療において本技術の臨床応用に成功している。動物実験では、頻回移植(心筋細胞シート3枚/日×10日=30枚)によりラット皮下に1ミリの心筋組織を再生させることに成功している。頻回移植せざるを得ない理由は、ホスト血管系接続している毛細血管網が存在しない状態では、酸素や栄養素の補給は拡散に頼らざるを得ず、シート3枚以上の同時移植では内部にネクロシスが生じてしまうからである。心筋細胞シートの内部には毛細血管網がすでにあり、生体内への移植後数時間以内にホスト血管系に接続するため、頻回投与が可能となる。

動物実験では、ノックアウト等により特定の臓器を発生できない胎仔に、間葉系幹細胞等の幹細胞を異種移植し、胎仔の発生の間にホストの体内で移植した幹細胞から臓器を作る臓器工学的手法も検討されているが、臨床応用までのハードルは小さくない。しかし、このような研究から、臨床応用可能な臓器を作製するための数々の指針が得られるものと期待している。

おわりに

ジェフ・ハッベルは、遺伝子組み換えや高分子合成などさまざまな手法を用いて、ポリ乳酸などとは異なり細胞が認識する生物活性をもった足場用素材を種々開発しており、分子生物学に依存した新しい材料の創成ではトップを走っている。一般に、材料の研究者はあまり生物学に興味をもち、逆に臨床家は高分子合成(いわゆる亀の甲)に興味がない。最近、医工連携、産

学連携の重要性が唱えられているが、従来どおりのやり方、すなわち「工」の製作物を「医」で試験をし、また「工」にもどして改良するというのは、なかなか上手くいかない。

組織工学を提唱した二人であるヴァカンティとランガーは、外科医と応用化学者であり若い頃から20年以上のつきあいがあり、ランガーは生物学をよくわかっている。このようなタイプの研究者・臨床家を育てる必要があると思われる。

ヒト幹細胞臨床研究指針詳解

分担研究者 澤 芳樹

大阪大学大学院医学系研究科外科学講座心臓血管外科

研究協力者 松山晃文

大阪大学医学部附属病院未来医療センター

研究要旨

再生医療製品(細胞組織利用医薬品医療機器)の社会還元に向けて、それを取り巻く現行の制度を議論する必要がある。当該製品を社会還元するには現在2つのトラックがある。1つは薬事法による承認での保険収載であり、もう1つは医師の技術としての評価である。平成18年9月より、医師法の範囲内で行われるヒト幹細胞臨床研究を対象範囲として「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が施行されたところである。再生医療実現にむけ本指針を詳解したい。

A. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトがほぼ終了、世界はポストゲノム・バイオテクノロジーの実用化時代に突入している。そのなかでも再生医学へ向けられるまなざしは熱く、難治性疾患への光明として話題に上らない日はない。すでに、骨髄、末梢血、臍帯血中の造血幹細胞を用いた細胞治療が盛んに行われており、また骨髄細胞を直接心臓組織内に移植することにより、心筋梗塞などで壊死に陥った組織の機能を補う再生医療臨床研究も行われている。「イノベーション25」においても、肝硬変肝癌、重症心不全、糖尿病といった難治性疾患に対す

る再生医療が重点課題とされており、体性幹細胞を体外で増幅させ様々な再生医療に応用する研究も今後一層盛んに行われるものと認識している。加えて、わが国発の技術であるiPS細胞株樹立技術の確立もまた、国民の目耳を再生医療への期待へといざなっているところである。このように、近年の生命科学領域の進歩とその知見を基盤とした細胞工学・組織工学技術が発展する一方で、再生医療を臨床実現するには、科学的にみても医学的に見ても未だ不明な点も残されていることも事実であり、体外増幅による細胞の癌化、未知ウイルスなど感染症伝播の可能性など安全性を危惧する声があることも否めない。このような背景の下策定・施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年厚生労働省告示第425号)に関して、その内容を詳解することを目的とした。

B. 研究方法及び研究結果

1. はじめに—指針策定の経緯—

近年、体性幹細胞には胚葉を超えて様々な細胞への分化能をもったものが存在し、それらが可塑性を示すことが報告されている。すでにわが国においては、骨髄、末梢血、臍帯血中の造血幹細胞を用いた治療が盛んに行われており、また骨髄細胞を直接心臓組織内に移植することにより、心筋梗塞などで壊死に陥った組織の機能を補う