

## 胚性幹細胞を用いた再生医学

すずき のぼる  
鈴木 登

(受付:平成16年2月10日)

臓器移植法が施行されて数年が経過するが脳死患者からの移植医療の一般化にはさらに時間を要する状況にある。胚性幹 (embryonic stem cell: ES) 細胞はあらゆる細胞, 組織に分化する能力 (totipotential) と強い増殖能力を持つ。理論的には ES 細胞を必要な細胞, 組織に分化誘導することで, 治療に必要な十分量の機能細胞を提供することが可能となる。昨年本邦においてもヒト ES 細胞が樹立された。ヒト ES 細胞の臨床応用には倫理的な問題を含め解決すべき課題は多いものの, その応用は現在の移植医療において不足する臓器の提供を可能にする有力な手法のひとつである。

### ES 細胞とは

ES 細胞は胚発生の初期段階の胚から分離・樹立された多能性幹細胞である<sup>1)</sup>。ES 細胞は桑実胚が分化し胚盤胞を形成する時の内部細胞塊 (inner cell mass) から樹立される。内部細胞塊は将来胎児そのものに分化し体を形成する部位である。この細胞は *in vivo*, *in vitro* において 3 つの胚葉に分化することができる。実際この細胞を胚盤胞の中に注入するとホストの細胞と混ざり合ったキメラを形成する能力をもつ。さらに *in vitro* でサイトカインなどを添加したり, 目的の細胞に分化を促すような遺伝子を導入することで, 神経, 血液, 心筋, 軟骨などへの分化が可能である。ES 細胞のもう一つの特徴は染色体異常をおこすことなく無

制限に増殖し未分化な状態を維持したまま何代にもわたって継代する (self-renewing) ことができることである。これらの特徴を利用することで移植治療への応用のみならず, 細胞, 組織の発生, 分化, 幹細胞研究の重要な材料としても利用可能と考えられている。

### ES 細胞の分化誘導

ES 細胞から種々の細胞・組織を分化誘導する時, 一般的に行われるのが胚様体 (embryoid body; EB) の形成である。ES 細胞を浮遊培養すると細胞集塊 (EB) を形成する。EB は内胚葉, 中胚葉, 外胚葉のいずれの成分も含む球状の細胞の集合体である。この EB を浮遊状態のまま, あるいは培養皿に接着させて培養すると様々な細胞が分化してくる。培養を工夫することで目的の細胞や組織を選択的に分化誘導する。内胚葉性の組織を *in vitro* で誘導することは困難と思われていたが, 現在ではインスリン産生細胞等を作ることができるようになった。

### 神経再生

これまでは中枢神経は再生能力が低く, その再生は困難であると考えられていた。実際, 臨床的にも脳血管障害や頭部外傷で失われた神経機能が自然に回復することは見られない。1969 年に Raisman は脳の可塑性という概念を提唱し, Bjorklund は 1982 年に中枢神経系に胎児脳組織を移植すれば, 移植した組織はホストの脳の中で成長, 分化しホストの脳組織との間に神経結合を形成することを報告した。現在では中枢神経

聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学  
聖マリアンナ医科大学  
大学院先端医学研究施設再生医学研究部門

の再構築を応用し各種神経疾患への治療応用が検討されている。

未分化 ES 細胞からレチノイン酸を用いて神経系細胞を分化誘導できる。ES 細胞はまず Nestin 陽性の神経前駆細胞に分化する。In vitro でさらに培養を継続するとそれらの細胞は神経細胞の持つ tubulin, neurofilament middle chain を発現するようになる。一部の細胞は glial fibrillary acidic protein を持つアストロサイトや galactocerebroside を持つオリゴデンドロサイトへと分化する<sup>2)</sup>。

この分化誘導した神経細胞を胸髄を一部切除し作成した脊髄損傷マウスモデルに移植すると、神経細胞は脊髄内を移動し、NFM 陽性の成熟神経細胞へ分化した<sup>3)</sup>。一部ではシナプス形成に関わるシナプトフィジンを発現した。この成績は移植した神経細胞がシナプス形成、さらには neural network の再構築を行ったことを示唆する。これらのマウスの運動機能を評価すると、下肢の運動機能は PBS のみを注入したマウスでは殆どの改善しないにも関わらず、神経細胞を移植したマウスでは 7 日目より下肢運動機能の改善を認め、40 日目には下肢の 3 関節を使うまでに改善を認めた。同様に ES 細胞由来神経幹細胞移植は大脳運動野損傷マウスの運動能を著明に改善させた<sup>2,4)</sup>。

#### ES 細胞からの造血幹細胞分化誘導と骨髄再建

マウスでは既に ES 細胞から造血細胞を分化誘導して造血障害モデルに移植して骨髄再建が可能である<sup>5)</sup>。具体的には未分化 ES 細胞をメチルセルロースを含む培地で浮遊培養し EB を形成する。メチルセルロース含有培地は中胚葉系さらには血液系細胞の培養に適している。この中には血液系細胞と血管内皮の両方の共通前駆体といわれている血液血管芽細胞 (hemangioblast) が存在しており、これを骨髄移植に用いた。即ち、致死量放射線照射して造血障害を引き起こした SCID マウスに血管芽細胞を経静脈的に投与した。血管芽細胞は移植マウスの脾臓に生着して血管内皮細胞へと分化し血管を形成するとともに、骨髄に生着し白血球・血小板を含む造血を行い、末梢血中の白血球、血小板数は正常に復帰した。さらにコントロールである放射線照射 + PBS 移植マウスではその生存率は極めて低いが、放射線照射 + 血管芽細胞移植マ

ウスの生存率は正常マウスと同等であることから造血幹細胞としての能力をもっていることは明らかである。

#### ES 細胞から軟骨細胞の分化誘導

ES 細胞に bone morphogenetic protein (BMP)-2 あるいは BMP-4 存在下に培養することで軟骨細胞を分化誘導することが出来た<sup>1)</sup>。軟骨細胞に特異的と考えられるアルシアンブルーが陽性となり軟骨細胞特異的転写因子である Sox9 や scleraxis を発現し、型コラーゲンも陽性になり軟骨細胞と考えられた。C57BL/6 マウスの膝関節内に塩酸を注入し変形性膝関節症モデルを作成した。アルシアンブルー染色で軟骨を染色すると塩酸注入マウスでは滑膜細胞がほとんど脱落・消失していた。この変形性膝関節症モデルの膝関節内に軟骨細胞を移植すると、移入した軟骨細胞は大腿骨関節面や膝蓋部に生着することが示された。

#### ES 細胞から角膜上皮細胞の分化誘導

ES 細胞からは外胚葉由来の細胞・組織を誘導することは比較的容易である。我々も細胞外基質上でマウス ES 細胞を培養することにより、角膜上皮様細胞の誘導にも成功した。既にケラチンや眼特異的転写因子の発現にも成功し、マウスの角膜実質上に生着することを確認した。角膜は他の組織と異なり同種移植時に拒絶反応を示さない特異な組織であり、免疫抑制剤を用いずに移植できるという点や外部から容易に細胞の挙動を観察できる点など、ES 細胞の臨床応用を考えると非常に有望な組織である。

ES 細胞を用いた再生医学の研究は始まったばかりであり、その臨床応用には多くのハードルが待ち受けている。モデル動物での移植による臓器・機能再生は証明されつつあるが、ヒトにおいては実際の移植例は全くない。しかしこれらを地道に証明してゆくことで様々な領域で医学・医療の進展に貢献できることは間違えない。多くの若い先生方の再生医学研究への参加を期待している。

## 文 献

- 1) Suzuki N, Takeno M, Takeba Y, Miyagi T, Ye JM, Nagafuchi H, Sakane T. Induction of differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells in culture. I. Treatment with BMP-2 and BMP-4 induces chondrocyte differentiation. *The St. Marianna Medical Journal* 2001; 29: 25-31
- 2) Chiba S, Ikeda R, Kurokawa SM, Yoshikawa H, Takeno M, Nagafuchi H, Tadokoro M, Sekino H, Hashimoto T, Suzuki N. Anatomical and functional recovery by embryonic stem (ES) cell-derived neural tissue of a mouse model of brain damage. *J Neurol Sci* 2004. in press.
- 3) 濱田真里, 千葉俊明, 明石勝也, 青木治人, 鈴木登: マウス胚性幹 (ES) 細胞からの神経幹細胞の分化誘導と脊髄損傷モデルでの移植治療の有用性: *再生医療* 2003, 2 suppl: 119.
- 4) Chiba S, Iwasaki Y, Sekino H, Suzuki N: Motoneuron enriched neural cells derived from mouse ES cells reconstitute neural network to improve motor function of hemiplegic mice, a model of cerebral vascular diseases.: *Cell Transplant* 2003; 12: 457-468.
- 5) Miyagi T, Takeno M, Nagafuchi H, Takahashi M, and Suzuki N: Flk1 positive cells derived from mouse embryonic stem (ES) cells reconstitutes hematopoiesis in vivo in SCID mice. *Exp Hematol* :2002, 30: 1444-1453.
- 6) 本間龍介, 上野聰樹, 坪田一男, 鈴木登: マウス胚性幹 (ES) 細胞の上皮細胞への分化誘導とその角膜移植への応用: *再生医療* 2003, 2 suppl: 136.

