

再生誘導にむけた組織幹細胞の増殖分化制御とレーザー技術

開 祐司, 宿南 知佐

京都大学 再生医科学研究所生体分子設計学分野(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53)
CREST(〒332-0012 埼玉県川口市)

Research on the Control of Growth/Differentiation of Tissue Stem Cells; Possible Applications of Laser Technology for the Understanding of Inductive Tissue Regeneration

Yuji HIRAKI and Chisa SHUKUNAMI

Department of Cellular Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University,
53 Shogoin-Kawahara-cho, Sakyo, Kyoto 606-8507
CREST, Japan Science and Technology, Kawaguchi, Saitama 332-0012

(Received August 14, 2003)

In addition to infectious diseases, life-style related diseases become a more common reason for medication of elderly people than ever. Dysfunction of organs is an underlying cause of these diseases. Progressive aging of society urges us to find cures for this type of diseases. Taking advantage of versatile differentiation potentials in stem cells, researchers are attempting a functional restoration of damaged tissues and/or organs. Laser technology has provided such a powerful tool for the study of hematopoietic stem cells at a single-cell level as fluorescence activated cell sorter (FACS). However, many unanswered questions remain for understanding how growth and differentiation of stem cells are regulated and can be manipulated. Taking cartilage formation and repair by mesenchymal stem cells as a model, we explore possible applications of laser technology for the study of tissue stem cells at a single-cell level.

Key Words: Regenerative medicine, Stem cell, Differentiation, Cellular condensation

1. 再生医学と幹細胞

急速な高齢化社会の到来によって、医療が目指す標的に大きな変化が起こっている。ヒトに限らず動物の一生は、一固体として生を受けると成長・成熟を遂げて、次世代に子孫を残す。こうして、生き物としてのシステムは遺伝情報として後世に伝達されていく。そこで、動物の各個体は生殖細胞に内包される遺伝情報を運ぶ船にもたとえられ、次世代に遺伝子を受け渡して生殖期を過ぎると老化して、いずれは打ち捨てられる運命にある。従って、現在を謳歌している種は、長い進化的時間の間に、生殖期を十全な形で生きるべく様々な方策を備えている。この方策が破られると「疾病」が生じる。病原細菌などの感染に代表されるような外的な要因が主な原因で、そのような外的な要因を取り除けば、患者は治療可能であることが多い。このような疾病の治療には、19世紀中葉からの近代医学が大いに貢献して来た。

ところが、このような近代医学の進歩は、ヒトにこれまでに経験のない長い後生殖期をもたらすようになった。このような新しい状況で生命を脅かすものの多く

は、慢性臓器疾患に代表されるように、主な要因は内的でしかも病状は固定的なものである。根治は容易でなく、組織や臓器の機能障害(dysfunction)と考えるべき性格を持っている。糖尿病や動脈硬化を例にあげることができる。これまで障害(disabled)は介護(care)するべきもので、一般的に治療(cure)のための標的と考えられなかった。しかし、高齢が万人のものとなる社会においては、医療としてそのような障害をも対象とすることが求められる。身体を色々なパーツからできた生命機械にみたとすると、故障パーツを取り替えることによって対処することが考えられる。臓器移植は、この方向のアプローチである。しかし、移植臓器は機械部品のように生産・供給されるものではないから、高齢化と組織・臓器の機能低下ないし機能障害が万人の問題となる時代においては、そのニーズに答えられない。

我々の身体の最小単位は細胞であり、これが統合された多細胞生物個体として機能している。体細胞クローン動物「ドリー」の誕生が示したように、この「細胞」という最小の部品にも個体全体の設計図が仕込まれている。機械パーツでは、これを設計した“ヒト”が外から設計意図や

設計図に照らしてみても、適切に配置して初めて機能する。これに対して多細胞生物個体においては、全設計図が仕込まれた部品の相互関連によって、個体は機能している。このような生物の特性を利用して「組織や臓器の機能障害が克服できるのではないか」というのが、「再生医学」とこれを支える「再生生物学」と呼ばれる新しい研究分野である。再生医学へのアプローチは、さまざまに考えられているが、本稿では特に幹細胞に焦点をあてる。

2. 幹細胞システムとFACS

受精によって生じた1個の細胞から個体が形成される仕組みは、臓器・組織再生のための戦略を示すことになると考えられ、高齢化社会の「再生医学」は「発生生物学」を必要としている。受精卵には、個体全体を作り出す能力(全能性: totipotency)がある。原腸形成において三胚葉が分化するまで細胞は全能性を保っているが、発生が進むと細胞の潜在分化レパートリーは次第に限定されていく。そして、ついに細胞が終末分化(terminal differentiation)を

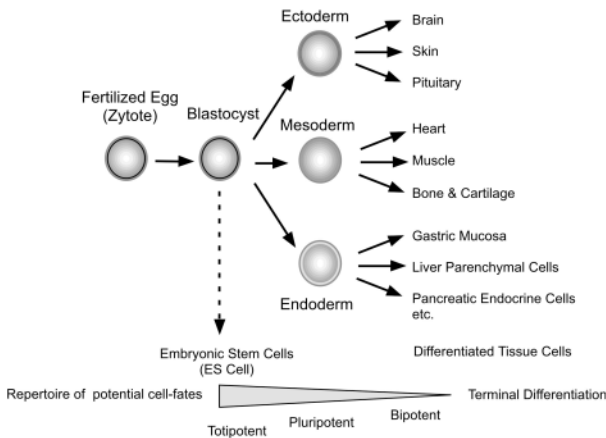


Fig. 1 Restriction of cell-fates during embryonic development. Embryonic stem cell lines are established from inner cell mass of blastocyst.

遂げて神経・筋肉などといった組織細胞となる(Fig. 1)。発生の初期には、細胞は全能性を保ったまま分裂増殖(自己複製)するので、胚盤胞の内部細胞塊から細胞を分離して、体外で全能性を保ったまま自己複製を続けさせることができる(Fig. 1)^{1,2)}。このようにして樹立された胚性幹細胞(ES細胞)株は、原則的に身体を構成するあらゆる種類の細胞に分化させることができるので、機能障害に陥った組織を取り除いた欠損部位に望みの分化細胞を移植して修復させることが考えられる。そこで、近年、ES細胞株の樹立と体外培養条件下でどんな細胞に分化誘導できるかについて盛んに研究されている。生体内では、全能性を保った細胞は、発生の進行と共に外胚葉(ectoderm)・中胚葉(mesoderm)・内胚葉(endoderm)に細胞系譜が分かれて器官形成が始まる頃には消失してしまう。

ところが、動物の身体を構成する多種多様な組織細胞の多くは恒常性維持のために常に更新される。例えば、皮膚や小腸の上皮、あるいは血球細胞は消耗した部分が新しく作り出された分化細胞で置き換えられていく。このように発生を終えた個体の維持のために新たな分化細胞を供給する元となる細胞が、組織幹細胞である。骨髄に存在する造血幹細胞(hematopoietic stem cell)による細胞供給システムが最もよく、研究されている(Fig. 2)。個体発生のおよむように(Fig. 1)、細胞は一定の仕方で細胞分化の潜在的レパートリーを減じながら最終的に多様に分化した血球細胞群を供給することができる(Fig. 2)。放射線照射によって骨髄造血機能を完全に失わせた動物に、純化した造血幹細胞を1個移植すれば、本当に一旦失われた血液細胞系が全て再構成されるのかなどの問題が盛んに検討されている³⁾。最近では、1個の造血幹細胞の移植により長期骨髄再構築と皮膚・肺胞上皮・消化管粘膜上皮や胆管上皮への分化が見られたとする論文も現れてきている⁴⁾。このように1個の細胞から胚葉を超えた様々な分化細胞が供給できる可能性が開けてくると、再生医療の可能性はますます広がろうとしている。

造血幹細胞系が他の幹細胞研究に先行して発展してい

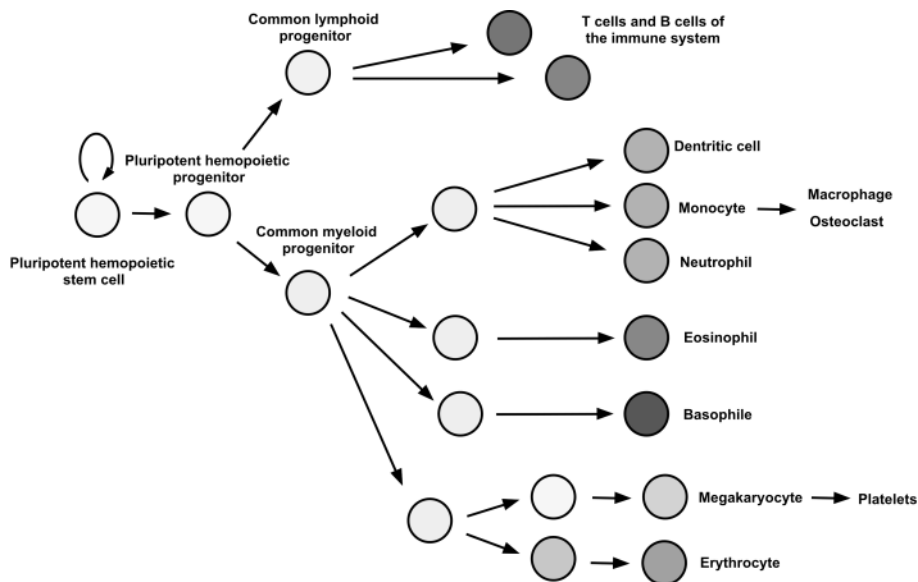


Fig. 2 The cell-lineage diagram of hematopoietic stem cells that give rise to a variety of mature blood cells.

る理由のひとつは、レーザー技術に負うところが大きい。血球細胞やその前駆細胞はいずれも球形で見た目には識別することは困難である。しかし、多くの細胞表面マーカーが同定され、これに対する特異的抗体も完備している。そこで、マーカーに対する蛍光抗体や蛍光色素などを利用して、分化細胞を特異的に標識することができる。FACS (fluorescence-activated cell sorter) を用いると、このように標識した細胞の懸濁液をノズルから噴射して、各細胞にレーザービームを当てて蛍光測定を行いながら細胞を分別することができる (Fig. 3)。このようなレーザー技術が、血球細胞のように浮遊細胞を1細胞レベルで分化形質を評価したり分別したりすることを可能にしたので、現在では、血液細胞の研究に不可欠の実験手段となっている。

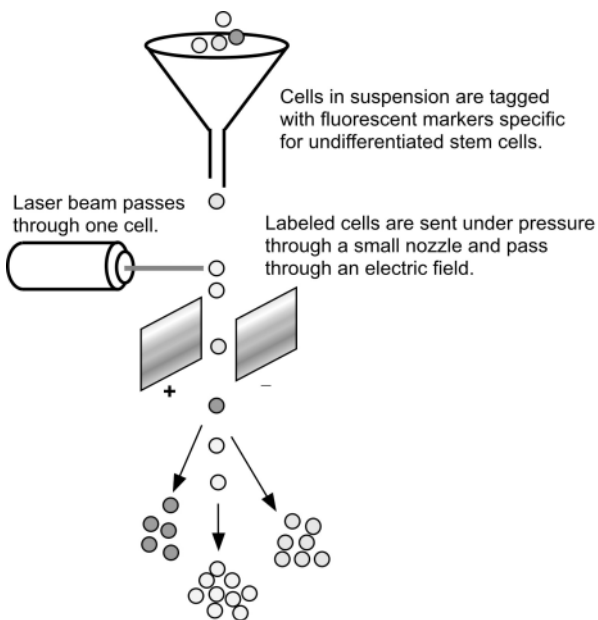


Fig. 3 Fluorescence activated cell sorter (FACS). FACS enabled us to separate each characteristic cell in suspension.

3. 間葉系幹細胞システムによる軟骨再生

骨髄には、造血幹細胞のほかに、骨芽細胞のほか軟骨細胞・脂肪細胞・筋芽細胞・線維芽細胞などへの分化能を持つ組織幹細胞(間葉系幹細胞)が存在する (Fig. 4)⁵⁾。幹細胞は、(1)長期(個体と同程度以上の期間)にわたって、元の分化レパートリーを維持したまま増殖できる(自己複製能を持つ)、(2)自身と異なる分化細胞やそれらの前駆細胞を供給する。この意味で、間葉系幹細胞システムの分化レパートリーは、Fig. 2で示した造血幹細胞と同様な形式で表すことができる (Fig. 4)。

間葉系幹細胞が供給することのできる種々の細胞のうちでも、軟骨細胞への分化あるいは、軟骨組織の再生修復が、近年、特に関心を集めている。というのも、血管に富む骨は比較的旺盛な再生修復能を持っているが、骨端表面を覆う関節軟骨は、無血管組織であり再生能力に極めて乏しい。関節軟骨の表面が損傷を受けると容易に変形性関節症へと移行し、運動能力の著しい低下をきたす。軟骨は無血管かつ無神経組織であるが、骨は神経網が発達しているため、関節軟骨が欠損して骨組織が擦れると激しい痛みを発する。平易に表現すると、「寝たきり」の原因となる。

軟骨組織から分化した軟骨細胞を分離培養して、ある程度増やすことができるので、得られた軟骨細胞を移植して欠損部を充填することが行われるようになって来た (Fig. 5A)⁶⁾。当面の効果は上がるものの、関節軟骨の下を支える軟骨下骨(subchondral bone)の修復とカップルしないまま欠損空間を埋めるので、修復軟骨組織と軟骨下骨の連結が形成されない点が危惧される。一方、骨髄から間葉系幹細胞が十分に動員されると、幹細胞から分化した細胞によって欠損部は一旦軟骨で充填されるが、軟骨下骨の修復とカップリングして余分な軟骨は骨に置換される。この軟骨形成と骨形成の連係は、元の組織構築が

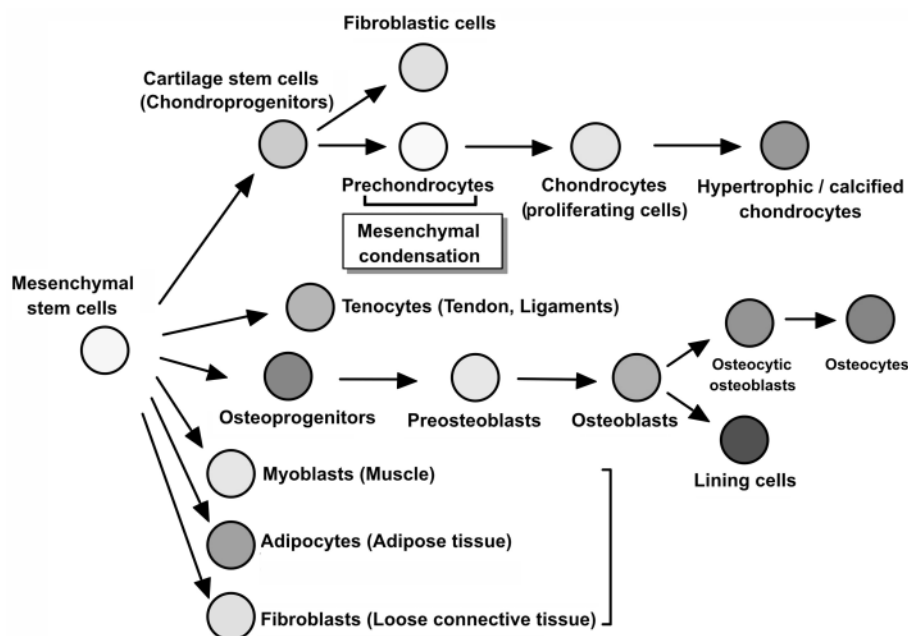


Fig. 4 Mesenchymal stem cells in bone marrow.

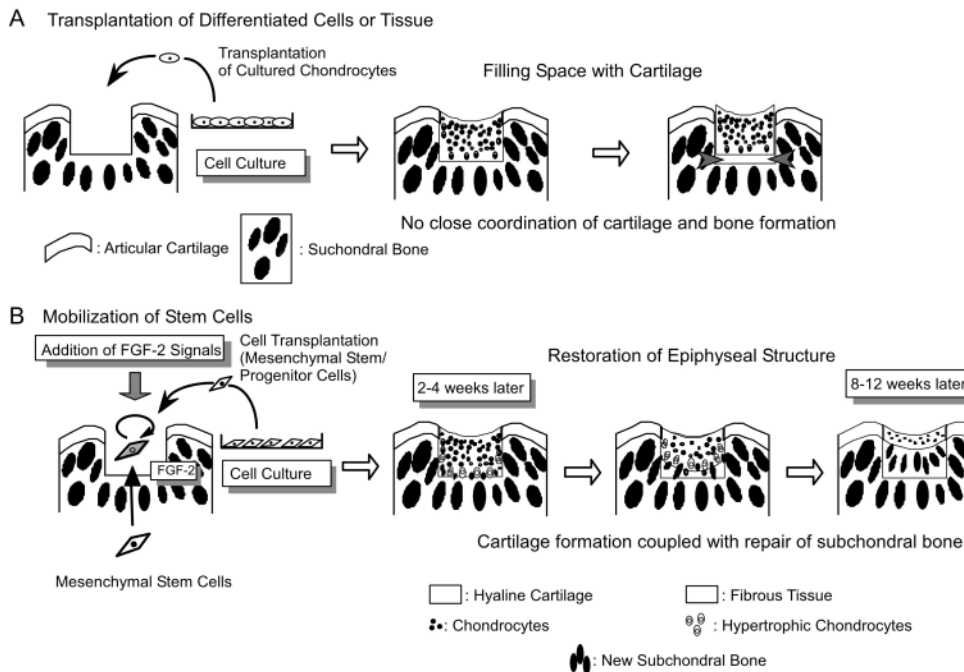


Fig. 5 Repair modes of full-thickness defects of articular cartilage.

再生されるまで続いて停止する (Fig. 5B).

組織欠損がないときには細胞数を維持するためにわずかに自己複製していた幹細胞が、(1)欠損の出現によって再生が誘導されるべき場所に急速に動員され、(2)周囲の細胞外環境からのシグナルを受けて特定の系譜に分化した細胞を供給して組織の再構築を促進するという一般原則が、ここで具体的に見て取れる (Fig. 6)。幹細胞が十分に動員されない場合には、体外で培養することで十分な数の幹細胞を得て、これを移植する。あるいは、幹細胞の動因や増殖を促進するシグナルを付加しても、同じように組織再生を誘導することができる。将来的には、このようなことが医療上の対処として考えられる。

4. 組織再生「場」の形成

我々の身体を作っている細胞は、基本的に次の4つのことができるだけである。増殖 (proliferation)、遊走 (migration)、特定の組織機能を示ようになる細胞分化 (cell differentiation)、さらに分化の一形態と考えてもよいプログラムされた細胞死 (programmed cell death) である (Fig. 7)。多細胞生物を構成する細胞は、物理的環境条件や、細胞同士の接着 (adhesion) あるいは細胞外基質 (extracellular matrix) への結合、さらにはホルモンやホルモ

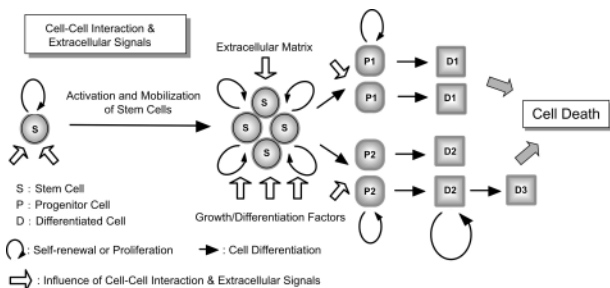


Fig. 6 Activation of somatic stem cells during tissue repair.

ン様の増殖分化因子 (growth and differentiation factor) を介して、この4つ細胞行動のうち“どれ”を“いつ”とるかを定める。組織・臓器形成、あるいは個体形成そのものも、この4つの細胞行動の組み合わせでできている。終末分化を遂げて、個体の中で細胞が果たす代謝機能が最終的に確定すると、この機能遂行に全代謝能力を集中するので、最早、自己を複製・増殖する余裕を持たなくなる。したがって、成長板軟骨における増殖軟骨のような例外を除いて、通常、細胞増殖と細胞分化は、両立しない (Fig. 7)。

分化した軟骨細胞の増殖は、自らが多量に産生した細胞外基質とこれに結合した増殖分化因子複合体によって、物理的にも化学的にも規制されている。したがって、細胞外基質を特定の酵素作用によって除去して得られる軟骨細胞の増殖能力を利用した、Fig. 5Aのような組織修復のやり方は、ある意味で例外的である。また、この場合でも、周囲組織との相互作用の連携が不十分であることは、既に述べた。Fig. 5Bのように、既存の周囲組織と連携をもった組織再生修復がおこるには、組織幹細胞

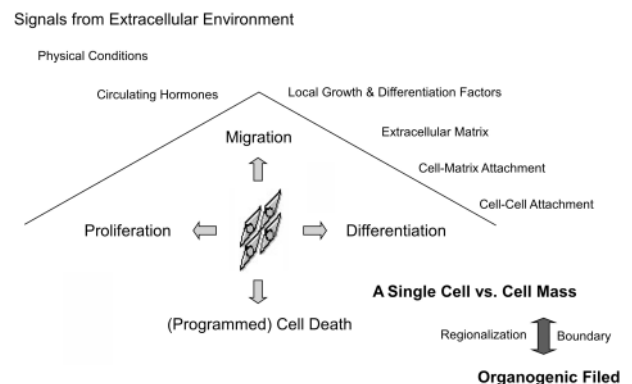


Fig. 7 Behaviors of a single cell in response to signals from extracellular environment.

(あるいは前駆細胞)が周囲の細胞外環境から受容する情報に常に応答しながら、許容された細胞分化系譜のいずれかを選ぶ特定の細胞集団が組織欠損空間の中に出現する必要がある。この意味で、新しい再生医療の創出のためには、組織形成や再生誘導のための「場」において幹細胞がどのようなメカニズムで自己組織化を行うのかについて、分子レベルで明らかにする必要がある。

発生段階を終えた生物個体内で、幹細胞システムがどのようにして分化細胞や組織の更新を維持しているのかについては、造血幹細胞システム研究(Fig. 2)が先導的なモデルとなっている。この場合には、液相に分散している状況が本来的に細胞が機能している環境であるから、幹細胞が生み出す血液細胞系の評価においても、個々の細胞における分化形質と、各分化形質を保持した細胞集団の大きさ(細胞数)が問題にされれば十分である。FACSは、このような系においては決定的に重要な解析技術となることが容易に理解される。ところが、3次元構築をもつ実質組織における組織形成・再生においては、個々の細胞の分化形質のみではなく、細胞の移動(特定のシグナルに反応して引き起こされる細胞遊走)や特定の細胞集団の空間配置などが重要な役割を演じる(Fig. 7)。

軟骨形成に限らず、筋肉や脂肪分化のような間葉系組織の形成では、いずれも特定の系譜に分化がコミットされた細胞群が凝集して、組織分化のための「場」が領域化されることが決定的に重要である⁷⁾。我々は、マウス胚性腫瘍(embryonal carcinoma)細胞から分離されたクローン化細胞株ATDC5を用いて、前節で紹介した関節軟骨の再生誘導機序(Fig. 5B)を細胞培養系で再現する細胞分化モデル系を構築した(Fig. 8)^{8,9)}。ATDC5細胞が*in vitro*培養系で示す2次元の軟骨形成は、幹細胞系による組織形成、特に組織形成「場」の領域化(細胞凝集領域の形成)の特性をよく反映している。すなわち、未分化細胞は旺盛に増殖(倍加時間:約16時間)して、細胞同士が互いに接触して1層の細胞シートを作ると増殖を止める(Fig. 8A)。やがて、未分化細胞が作る細胞シートの中にやや細長い細胞が密集した領域(細胞凝集領域)が出現してくる(Fig. 8B中、bの領域)。細胞凝集といっても、領域内の細胞密度は(*in vivo*においても)周囲に比べて30~50%ほど高いだけで必ずしも細胞の増殖が前提ではない。むしろ、細胞間相互作用の様式が周囲と異なると理解されている。この凝集領域内の細胞のみが軟骨分化を実行して、II型コラーゲンとアグリカンを主成分とする軟骨基質を旺盛に産生する(細胞形態は丸みを帯びる)。凝集領域の間隙を埋める細胞群(Fig. 8B中、aの領域)は目立った形態変化を示さないが、既に軟骨を取り巻く線維芽細胞のような振る舞いをする。少なくとも、これ以降は軟骨分化因子BMP (bone morphogenetic protein)を添加しても、軟骨細胞とはならない。対照

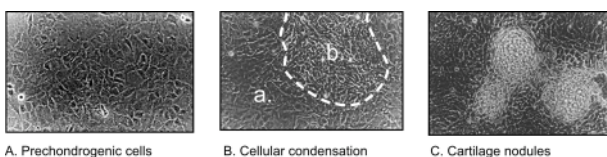


Fig. 8 Chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells.

的に、凝集領域内部で出現した軟骨細胞はゆっくりと増殖して(倍加時間:約48時間)3次元的に積み重なって軟骨結節を作る(Fig. 8C)。やがて、軟骨細胞は終末分化をむかえて増殖を停止し、肥大化すると共に細胞外基質は石灰化する。このようにATDC5細胞は、均質な細胞集団から出発して互いに性格の異なる細胞集団を自律的に作り出すことができる。Fig. 8Aの状態の細胞は全て均質な前駆軟骨細胞であることは、この状態で十分量のBMPを添加すると、どの細胞も一斉に軟骨細胞に分化して、均質な軟骨細胞シートを作ることによってわかる^{8,10)}。

5. 接着細胞の一細胞操作への期待

大部分の組織細胞がそうであるように、ATDC5細胞は細胞間接着あるいは細胞-基質(足場)間接着して増殖分化する。したがって、ATDC5細胞培養系が示す組織分化では、一定の空間を占有するひと纏まりの細胞集団が出現すること(Fig. 8B, aやbの領域)、さらに互いに細胞集団の間には境界ができること(Fig. 8B, 白い点線の部分)など、血液細胞のように浮遊細胞群を生み出す造血幹細胞システムには存在しない重要な側面がある。

ATDC5細胞培養系では、線維芽細胞様の細胞シートの中に原則的に円形の軟骨細胞集団が出現して“水玉模様”を作り出すという最も単純な組織構築を示すに過ぎない。それでも、均質な細胞集団における細胞分化の時間展開によって、細胞集団の自己組織化が誘導されるに至る素過程(elementary process)を解析する貴重な機会を与える。現在のところ、このATDC5細胞系の自律的組織分化の背景には、未分化細胞の自己複製を維持するFGF (fibroblast growth factor)シグナル、細胞分化を正に制御するBMPシグナル、分化を負に制御するPTHrP (parathyroid hormone-related protein)やNogginなどのシグナルがネットワークを作っていることが示唆されている(Fig. 9)¹⁰⁻¹²⁾。未分化細胞に細胞凝集の領域化が誘導される現象は、軟骨分化が促進されることと独立に制御されており、Delta-Notchシグナルが重要な役割をしていることが明らかとなってきた^{13,14)}。各細胞が核に内蔵しているゲノム情報が具体的に数え上げられる時代が到来している現在、ひとつひとつの細胞の形質を全発現遺伝子のパターンと発現レベルで記述することも可能になる。実際にATDC5細胞培養系

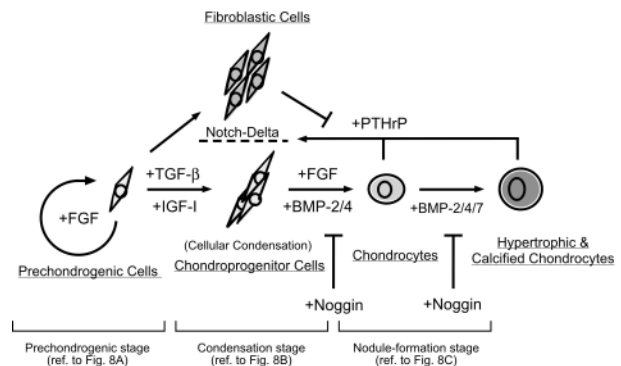


Fig. 9 Putative signaling network underlying the controlled growth and differentiation of ATDC5 cells.

でも、BMPによる分化誘導シグナルに対する初期応答をゲノムワイドに解析することも既に行われている¹⁵⁾。

FACSは、特定の形質を持った細胞を1細胞レベルで同定・分離できるので造血幹細胞システムの研究に不可欠の役割を果たして来た。間葉系幹細胞などの組織幹細胞の研究においても、FACSが重要な研究手段として用いられる。しかし、細胞間接着や細胞-基質間接着を介した相互作用に依存する細胞分化系においては、細胞集団とその空間的位置関係と境界の形成など、浮遊細胞系にはない素過程が組織再生や修復に決定的な役割を持っている。細胞浮遊液を調製するために、細胞を周囲との接着から解離させること自体が、細胞の特性を変化させる。これを解析する新たな手法が不可欠で、レーザー研究のひとつの標的となっていることが了解される。周囲の細胞や基質との接着を維持したままで細胞をマークしたり、遺伝子導入したりすることが要求される。あるいは、ある特定の細胞を特定の細胞環境から短時間で切り離して、新たな細胞環境においた時の細胞応答などについて、解析する必要が生じている。例えば、Fig. 8Bのb領域にある細胞を突然にa領域に置いたらどのような振る舞いをするのか、境界領域の細胞を取り除いたらできた空間はどのようにして新たな境界をつくるのだろうか、さらにFig. 8Cにみられる軟骨結節の中にあって既に軟骨基質を蓄積している分化細胞を細胞凝集環境の内や外に置いたときの細胞応答はどうなっているのか、知りたいことは数多くある。本特集号で、細川らがこのような指向を持ったレーザー研究の現状について解説している¹⁶⁾。一見、作為的で無意味に見えるこのような細胞操作は、組織幹細胞を臓器・組織欠損に実際に導入する近未来の再

生医療においては、実際にもっと複雑な形で生体内に起こる事態なのである。

参考文献

- 1) J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones: *Science* **282** (1998) 1145.
- 2) B. E. Reubinoff, M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trounson, and A. Bongso: *Nat. Biotechnol.* **18** (2000) 399.
- 3) M. Osawa, K. Hanada, H. Hamada, and H. Nakauchi: *Science* **273** (1996) 242.
- 4) D. S. Krause, N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel, and S. J. Sharkis: *Cell* **105** (2001) 369.
- 5) M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak: *Science* **284** (1999) 143.
- 6) M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, and L. Peterson: *N. Engl. J. Med.* **331** (1994) 889.
- 7) B. K. Hall and T. Miyake: *Bioessays* **22** (2000) 138.
- 8) C. Shukunami, C. Shigeno, T. Atsumi, K. Ishizeki, F. Suzuki, and Y. Hiraki: *J. Cell Biol.* **133** (1996) 457.
- 9) C. Shukunami, K. Ishizeki, T. Atsumi, Y. Ohta, F. Suzuki, and Y. Hiraki: *J. Bone Miner. Res.* **12** (1997) 1174.
- 10) C. Shukunami, Y. Ohta, M. Sakuda, and Y. Hiraki: *Exp. Cell Res.* **241** (1998) 1.
- 11) M. Fujii, K. Takeda, T. Imamura, H. Aoki, T. K. Sampath, S. Enomoto, M. Kawabata, M. Kato, H. Ichijo, and K. Miyazono: *Mol. Biol. Cell* **10** (1999) 3801.
- 12) A. Shimizu, K. Tada, C. Shukunami, Y. Hiraki, T. Kurokawa, N. Magane, and M. Kurokawa-Seo: *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 11031.
- 13) C. Shukunami, H. Akiyama, T. Nakamura, and Y. Hiraki: *FEBS Lett.* **469** (2000) 83.
- 14) N. Watanabe, Y. Tezuka, K. Matsuno, S. Miyatani, N. Morimura, M. Yasuda, R. Fujimaki, K. Kuroda, Y. Hiraki, N. Hozumi, and K.-i. Tezuka: *J. Bone Miner. Metab.* **21** (2003) 344.
- 15) W. Matthias, C. Shukunami, U. Heinzmann, K. Hamajima, Y. Hiraki, and K. Imai: *Genomics.* **83** (2004) 45.
- 16) Y. Hosokawa, J. Takabayashi, Y. Hiraki, C. Shukunami, and H. Masuhara: *The Review of Laser Engineering* **32** (2004) 94.