The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

タートラップやポリAトラップなど，ベクター側の工夫が必要となる．また，相同組換えの生じた細胞を薬剤選択するためには，ある程度の長期にわたる培養と単一細胞からのコロニー形成が必要となる．しかし，培養体細胞の分裂能は有限で，コロニー形成率はES細胞と比較するときわめて低い．さらに，長期間にわたる培養により，核型の変化や何らかの変異が生じ，核移植に用いるには不適当な細胞になる場合がある．この問題を回避するため，可逆的不死化細胞の利用も考えられるが，一般には，比較的高い分裂能力を持つ胎児由来線維芽細胞が用いられている．これまでに報告されたトランスジェニッククローン家畜は，すべて胎児由来線維芽細胞が用いられている．今後の課題は，核移植に利用できる細胞種の範囲を広げ，相同組換えが生じやすく，個体への発生能が高い細胞種を明らかにすることであろう．

理論的には，培養細胞に施すことができる遺伝子操作のすべてを，体細胞クローン技術を介して家畜に応用することが可能となったと考えられる．今後，マウスで通常行われている，ランダムミュータジェネシスやコンディショナルノックアウト，導入遺伝子の発現誘導系など，より高度で複雑な遺伝子導入が家畜でも行われるかもしれない．その結果，より有用で付加価値の高いトランスジェニック家畜が作出されるようになるであろう．

最近，霊長類のクローン作出が，技術的に困難であることが報告された.[5] 未受精卵子には特有のタンパクが紡錘体に存在し，初期胚における染色体の正常な分配に重要な機能を持つ．クローン作出の際，未受精卵子中の核を取り除き体細胞核を導入するが，他の動物種では，卵子細胞質よりこのタンパクが補完されるのに対し，霊長類では補完されない．そのため，霊長類の場合，一見正常に見えるクローン胚においても，染色体の分配が異常となることが報告されたのである．この報告は，再生医療の分野においても重要な意味を持つ．現在，ヒト体細胞由来のクローン胚を作出し，そこから単離したES細胞を用いた治療法が考案されている．今回の報告は，ヒトクローン胚由来のES細胞に染色体異常が生じる可能性を示したもので，その利用には充分な考慮が必要となる．一方，ブタを用いた異種移植は，ブタ内因性レトロウイルスの感染等の危険性が示されている．これらの新しい技術は研究段階で，今後はさらに重要性が増すと思われる．しかし，その利用には多くの危険性も指摘されている．真に人類に貢献する技術となりうるよう，慎重な配慮と不断の努力が不可欠であろう．

文　献

1) Wilmut, I. *et al.*: *Nature*, **385**, 810 (1997).
2) McCreath, K. J. *et al.*: *Nature*, **405**, 1066 (2000).
3) Dai, Y. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 251 (2002).
4) Lai, L. *et al.*: *Science*, **295**, 1089 (2002).
5) Simery, C. *et al.*: *Science*, **300**, 297 (2003).

ES細胞を用いた再生医療

小川真一郎[1]・田川　陽一[2*]

1990年代に始まった生体部分肝移植はわが国でもすでに2000例を超えるに至った．今まで治療困難と考えられていた臓器不全の新たな治療手段として，臓器移植医療が認識されるようになった．しかしながら，臓器移植医療は，中枢神経系のような複雑な機能や構造を持つ組織の移植には不適当であり，また，移植が実施されている臓器においても恒常的なドナー（臓器）不足が問題となっている．このような状況の中，新たな選択肢として臓器再生を目指した再生医療が注目されている．近年，さまざまな組織において幹細胞（生体組織幹細胞）の存在が同定されるようになり，組織幹細胞を利用した医療への新しい可能性が注目されている．すでに臨床分野では，血液疾患に対して骨髄移植が標準治療とされ，幹細胞システムを利用した臓器再生の成功例として認識されている．部分切除された肝臓が術後に手術前と同等の大きさにまで回復し血管系も含めた組織が形成されることは以前より知られており，肝幹細胞の存在が示唆されている．このように，再生医療の世界は基礎的な開発研究から臨床応用まで幅広く，たとえば，細胞分化の生物学的研究，分化の環境を作る材料の開発，目的細胞のみに精製するための技術開発，再生された細胞・組織の機能試験，臨床応用のための移植動物実験など多くの研究者の協力が必要不可欠である．

再生医療に応用される細胞の候補

「幹細胞」とは，図1に示すように多分化能と自己複製

*著者紹介（代表）[2]信州大学ヒト環境科学研究支援センター生命科学分野動物実験部門（講師）〒399-8621 長野県松本市旭3-1-1
TEL. 0263-37-2699 FAX. 0263-37-2698 E-mail: tagawa@sch.md.shinshu-u.ac.jp
http://dept.md.shinshu-u.ac.jp/i-animal/home-dept/top.html
[1]信州大学医学部外科学講座

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

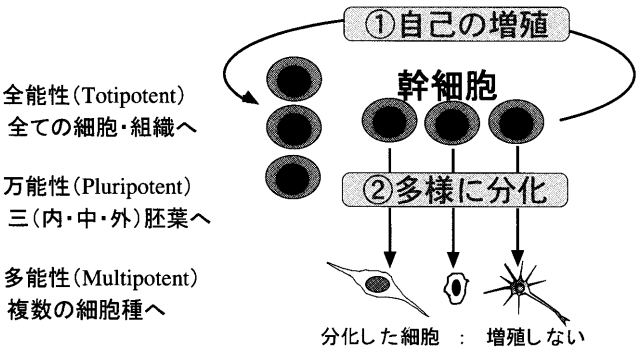

図1．幹細胞の定義．幹細胞は自己増殖し，多様に分化できる能力を持つ．ES細胞は，それ自身では不可能であるが，胚の助けがあれば個体を構成する能力があるので万能である．

能を有する未分化な細胞のことである．各組織幹細胞や骨髄幹細胞などと言った「体性幹細胞」は，自己移植として用いることができる点で期待されている．しかし，健常でない患者自身から必要十分量の幹細胞を入手することは非常に難しいと思われる．

一方，ES細胞は，分化に対して万能性であるだけでなく，高い増殖性をも持つ．ES細胞を未分化状態で大量に増殖させた後，目的となる細胞へ分化誘導させることにより，十分な量の目的細胞を得ることが期待できる．1981年にマウスES細胞が樹立[1]されてから長い間，他の動物種からES細胞は樹立できなかったが，サルのES細胞に続いて1998年に米国のグループによりヒトES細胞が樹立された．[2,3] このヒトES細胞と呼ばれる細胞がマウスES細胞ほど万能性であるかは明らかでないが，再生医療への応用にきわめて高い期待が持たれている．

ES細胞からの再生医療

ES細胞からの分化誘導の方法は，大きく分けて3つに大別される．一つは，ES細胞の万能性（未分化状態）を維持するために必要であった分化抑制因子LIFやフィーダー細胞を用いずに浮遊培養し，球状の胚様体を形成させる方法である．この胚様体は着床直後の卵筒胚の時期に近似した構造を持ち，やがて外，中，内胚葉系のそれぞれの前駆細胞へ分化させることができる．この胚様体に適当な各種液性因子を添加すると，さらに分化することが知られている．その例として，BMP4（中胚葉），[4] IL-3（骨髄系），レチノイン酸（神経系），TGF-β1（筋形成）[5] などが報告されている．二つ目は，胚様体を経由させずにES細胞と特定の細胞種とを共培養して分化誘導する方法である．骨髄の間質から樹立されたストローマ細胞とES細胞を共培養することにより，血液細胞[6] やドーパミンニューロン[7,8] へ分化誘導される．三つ目として，ES細胞を特殊な基質（マトリックス）上で培養して分化誘導させる方法である．ES細胞をコラーゲンIV処理ディッシュ上で培養すると，ES細胞は中胚葉を経由し血管内皮前駆細胞となる．[9] さらに，この中にVEGFを添加すると血管内皮細胞へ分化できた報告がある．このようなことから，液性因子や共培養の細胞だけでなく，特殊材料によるマトリックスの開発研究も盛んに行われている．

ヒトES細胞においても，胚葉体を経由して，自律拍動する心筋細胞，[10,11] 血管内皮細胞，[12] インスリン分泌細胞，[13] 神経細胞への分化成功例[14] や，ストローマ細胞との共培養により造血前駆細胞への分化成功例[15] が報告されている．このような方法によって目的細胞の存在頻度を高めることは可能であるが，すべての細胞を同一方向に分化誘導することは難しい．また，図2に示すように，未分化なES細胞をマウスに移植すると奇形腫（テラトーマ）ができることが知られている．よって，目的細胞種以外に分化してしまった細胞や未分化なままのES細胞は完全に取り除かれなくてはならない．将来的に再生医学への応用を考慮すると，目的とする細胞への分化誘導系の樹立と共に，確実にその細胞を純化選別することが重要である．細胞特異的に発現するプロモーターが存在する場合，そのプロモーターによって制御される薬剤耐性遺伝子や，緑色蛍光タンパク質（GFP）などの選別遺伝子をES細胞に導入し，薬剤耐性やGFP強度を指標に純化選別を行う方法がある．[16,17] またES細胞の遺伝子改変の容易さを利用し，各種細胞の分化，形態形成に関わる転写因子や，発生学的系譜の上流に位置する転写因子などの遺伝子発現をコントロールできるES細胞を作製し，分化誘導した例も報告されている．[18,19]

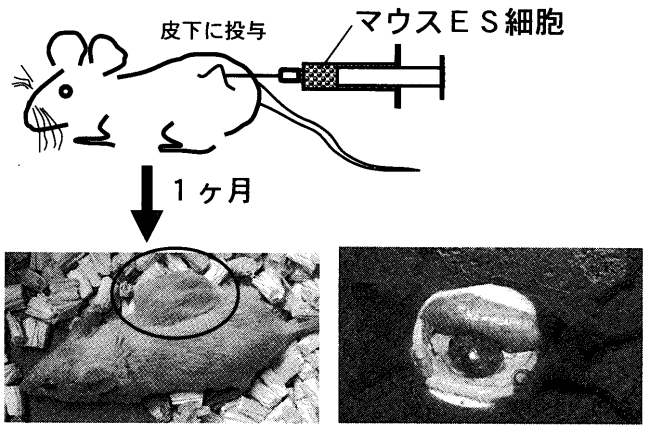

図2．ES細胞を同型またはSCID，ヌードマウスへ移植すると良性腫瘍（奇形腫）が形成される．

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ヒトES細胞を用いた再生医療の今後

ヒトES細胞を用いた再生医療が現実的に考えられるようになったが，検討すべき課題は山積みである．文部科学省により指針が作製されたが，ヒトES細胞はその樹立の過程から，常に倫理的な問題を抱えている．世の中の多くの方々がES細胞に関心を持ち，多くの議論が今後行われることが必要と思われる．

マウスES細胞はキメラマウスを作製してその万能性の確認ができるが，ヒトES細胞の場合はそのような解析はできない．そこで，別な方法でヒトES細胞の評価をすることが必要となる．つまり，ヒトES細胞の標準化（プロファイリング）をしない限り，ヒトES細胞を用いた研究成果の科学的信頼性が評価できない．

また，目的とする細胞の単離（純化選別）方法の確立や，レシピエントとドナー細胞とのHLAが異なるために引き起こされる免疫拒絶の解決など，科学的にも技術的にも課題は多い．免疫学的に患者個人に適応するES細胞を得るため，体細胞核移植によるキメラ胚からのES細胞の樹立や，既存ES細胞のHLA置換システムの確立，HLAのバリエーションを網羅した多数のES細胞株のバンク化などが考えられるが，未だに現実的な段階に至っていない．

肝臓医療の分野に目を向けると，図3に示すようにヒトES細胞からの肝細胞再生システムには多くの期待があり，我々は3段階の実用化を想定している．第一に，今まで動物の肝細胞に頼っていた新規薬剤の開発に伴う薬剤代謝実験をヒト肝細胞と同じ機能を持ったヒトES細胞由来肝細胞を用いて行うことが可能となる．第二に，バイオ人工肝の有効な細胞源にもなると思われ，急性肝不全の根治治療や肝移植までのブリッジユースとして期待できる．第三には，ヒトES細胞由来肝細胞を用いた細胞移植療法である．この細胞移植療法は，個体内での肝の再構築に時間を要することから劇症肝炎の治療には非常に難しいと考えているが，先天性代謝疾患や変性疾患による肝不全に特に期待できる．また，ES細胞から肝細胞へ分化誘導する試験管システムを詳細に解析することにより，肝発生や肝再生の分野に新たな知見を与えてくれる可能性もあると思われる．

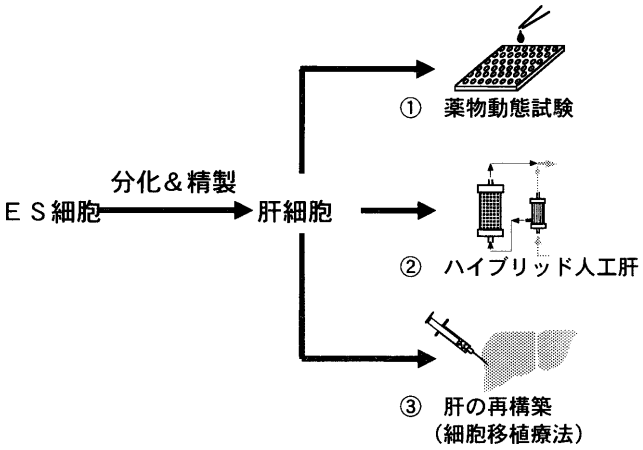

図3．ヒトES細胞由来肝細胞の実用化3段階

ES細胞の再生医療応用へ向けての研究は始まったばかりである．さまざまな問題を抱えながらも着実に発展しており，遠くない将来にヒトES細胞が，多くの難病・難治性疾患に苦しむ人々の治療に役立つことを期待している．さらに再生医療への期待だけにとどまらず，発生学をはじめとするバイオロジーへの新しい切り口として貢献できると思われる．

文　献

1) Evans, M. J. *et al.*: *Nature*, **292**, 154 (1981).
2) Thompson, J. A. *et al.*: *Science*, **282**, 1145 (1998).
3) Shamblotts, M. J. *et al*:: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13726 (1998).
4) Johansson, B. M. *et al.*: *Mol. Cell Biol.*, **15**, 141 (1995).
5) Schuldiner, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11307 (2000).
6) Nakano, T. *et al.*: *Science*, **265**, 1098 (1994).
7) Kawasaki, H. *et al.*: *Neuron*, **28**, 31 (2000).
8) Brustle, O. *et al.*: *Science*, **285**, 754 (1999).
9) Nishikawa, S. I. *et al*:: *Development* , **125**, 1745 (1998).
10) Kehat, I. *et al.*: *J. Clin. Invest.*, **98**, 216 (1996).
11) Xu, C. *et al.*: *Cir. Res.*, **91**, 501 (2002).
12) Levenberg, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4391 (2002).
13) Assady, S. *et al.*: *Diabetes*, **50**, 1691 (2001).
14) Reubinoff, B. E. *et al*:: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1134 (2001).
15) Kaufman, D. C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10716 (2001).
16) Yamashita, J. *et al.*: *Nature*, **408**, 92 (2000).
17) Muller, M. *et al.*: *FASEB J.*, **14**, 2540 (2000).
18) Kyba, M. *et al.*: *Cell*, **109**, 29 (2002).
19) Rideout, W. M. *et al.*: *Cell*, **109**, 17 (2002).

NII-Electronic Library Service