

身体のはじまりを知る—幹細胞のはなし—

小川亜希子

はじめに

みなさんは、カエルの卵を観察したことがあるだろうか。カエルの受精は産卵時に行われる。そこで受精した卵は、卵割を繰り返して胞胚 (blastula) と呼ばれる多細胞体になる。その後、胞胚内では大規模な細胞移動が起こり、細胞は、それぞれ外胚葉 (ectoderm)・中胚葉 (mesoderm)・内胚葉 (endoderm) へと分化する。そして各々の胚葉が各器官を形成していき、頭と胴体と尾が観察できるようになると、オタマジャクシらしい風貌になる。やがてオタマジャクシは、卵膜内で動くようになり、次第にグルグルと活発に回るようになって、ついには卵膜を破ってふ化する。カエルの卵は、実体顕微鏡下で観察可能なくらいに大きく透明なため、受精卵からふ化までの過程が実によく分かる。生命の誕生を身近に実感できる良い機会となるにちがいない。

さて、受精卵に遡ってみよう。多細胞生物の種類により、卵割の様式や胚形成の形態は異なるものの、一つの個体は、たった1個の受精卵から始まるのである。受精卵は、あらゆる細胞に分化する能力を持つ細胞である。では、胞胚となった細胞はどうだろう。胞胚時期の細胞もまた、あらゆる細胞に分化する能力を持っている。それでは、外胚葉・中胚葉・内胚葉となった細胞はどうであろうか。答えは、YesともNoともいえる。たとえば、外胚葉に分化した細胞は、脳や皮膚となるが骨や軟骨にはならない。中胚葉に分化した細胞は、循環器系や筋肉となるが脳にはならない。内胚葉に分化した細胞は、消化器や呼吸器となるが脳や筋肉にはならないのである。

このように、胚葉系に分化した細胞群は、ある特定された(分化した)、しかし複数にわたる種類の器官・臓器に分化していく。

一方、さまざまな細胞に分化でき、無限に増殖可能な細胞は「幹細胞 (stem cell)」と呼ばれる。幹細胞は、その未分化状態や由来によって大きく3つに分類されており、それぞれ胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES cell)、体性幹細胞 (somatic stem cell または 成体幹細胞: adult stem cell)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS cell) (図1) と名づけられている(表1)。一方、多細胞生物の各器官や臓器を構成する細胞は、体細胞 (somatic cell または body cell) と呼ばれている。さて、体細胞と幹細胞の染色体を比べると、それらの遺伝情報は両者間で同じである。しかし、発現している遺伝子(群)

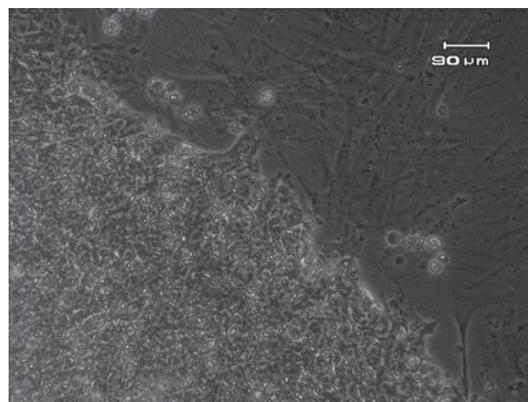


図1. 培養中のiPS細胞(写真提供: 福井大学 寺田聡先生の研究室)。左側の細胞塊がiPS細胞である。

表1. 幹細胞の種類について

名称	由来	特徴
胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES cell)	胞胚の内部細胞	<ul style="list-style-type: none"> 自己増殖能が高い 身体を構成するすべての種類の細胞に分化可能(多分化能をもつ)
体性幹細胞または成体幹細胞 (somatic stem cell or adult stem cell)	成体組織・器官	<ul style="list-style-type: none"> 自己増殖能が高い 特定の組織・器官を構成する細胞に分化可能
人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS cell)	成体組織・器官に特定の遺伝子を導入*	<ul style="list-style-type: none"> 自己増殖能が高い 多分化能をもつ

*遺伝子は *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4* の4種類。現在では、他の遺伝子の組合せも開発されている

著者紹介 鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科(講師) E-mail: ogawa@chem.suzuka-ct.ac.jp

は両者間で大きく異なっており、未分化状態の維持に働く遺伝子群が発現しているとき、その細胞は幹細胞となる。一方、特定の機能を持つように遺伝子（群）が発現すると、体細胞となる。通常では、一度分化（が決定）した細胞が幹細胞になることはない。

本稿では、幹細胞にまつわるエピソードや歴史、各々の幹細胞の特徴について紹介するとともにそれらの培養に関する研究も紹介したい。これらを通じて幹細胞に関する理解を深め、幹細胞の持つ魅力や可能性を感じてもらいたい。そして、医療や科学技術で果たす幹細胞の役割や貢献について考える機会となることを願う。

幹細胞の由来と研究の歴史¹⁻⁴⁾

幹細胞にはいくつかの種類があることを紹介したが、幹細胞に共通した特徴として1) 自己再生能をもち、2) 無限増殖能があり、3) 多分化能を有することがあげられる。しかし、幹細胞という言葉が使われ始めた頃は、その意味が少し異なっていた。

幹細胞 (stem cell) という言葉が最初に科学誌に登場するのは、19世紀後半である。ドイツの生物学者 Haeckel は Darwin の進化論支持者であった。Haeckel は、共通する祖先からの枝分かれによる生物の進化を表した多くの系統樹を描き、それらを stammbäume (ドイツ語で stem tree を意味する) と呼んだ (1868年)。そして彼は、系統樹に登場する共通祖先としての単細胞生物が、あらゆる多細胞生物に進化したと推定し、その単細胞生物を stammzelle (ドイツ語で stem cell を意味する) と表現している。また彼は、受精卵が一個体を形成するという理由から受精卵は stammzelle だと表現している (1877年)。それから15年後、Boveri と Häcker は、線虫胚を用いて、受精卵と生殖細胞との間に生殖細胞系を提案し、これらも stem cell と呼んでいる (現在の始原生殖細胞: primordial germ cell や生殖幹細胞: germ stem cell にあたる)。それから4年後の1896年、stammzelle は Wilson によって stem cell と翻訳され、広く知られるようになった。一方、植物では Sedgwick が植物の成長部位を表現するのに stem cell を使っている (1886年)。

Haeckel が stammzelle を使い始めたのと同じ頃、造血系細胞の起源が議論されていた。血液を構成する細胞は、大別すると赤血球、白血球、顆粒細胞に分けられる。お互いがあまりに異なった形状と性質を持っているため、これらの起源は別であると考えられるグループと共通する細胞が起源だと考えるグループが存在した。このうち後者の研究者の間で、造血系細胞の起源となる細胞は stem cell と呼ばれるようになった。この議論は、1960年代に

入って McCulloch と Till によって造血幹細胞の物的証拠が確認されるまで、半世紀以上続いたのである。そして、造血幹細胞の発見より少し前 (1957年)、Thomas (1990年ノーベル生理学・医学賞受賞) によって世界初の骨髄移植が行われている。これは、幹細胞を再生医療に応用した最初の報告である (なお、初めて骨髄移植に成功したのは1968年に Good らが免疫不全患者に行った症例である)。そして1981年、Evans と Martin は別々に、マウス胚から多能性幹細胞 (pluripotent stem cell) の分離に成功した。これらが最初の ES 細胞である。

ES 細胞⁵⁻⁶⁾

ES 細胞は、哺乳動物の胚の内部細胞に由来する培養細胞を示す。ES 細胞は、生殖細胞を含む身体を構成するあらゆる細胞に分化でき、胚の再構築も可能である。最初の ES 細胞はマウス胚から得られ、続いて霊長類 (1995年)、直後にヒトでも成功している。では、ES 細胞のしるし (マーカー) は何だろうか。分子生物学的なマーカーは、*Nanog*, *Oct4*, *Sox2* という転写因子である。これらが正確な発現レベルを保つと、ES 細胞は未分化状態を保つことができる。一方、これらの発現レベルが変化すると、その発現量に応じて分化の方向 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) が決まる。

ES 細胞培養が開始された頃、ES 細胞は「フィーダー細胞 (feeder cells)」でできたシート上で培養されていた。フィーダー細胞とは、マウス胎仔の繊維芽細胞を増殖しないように加工した細胞であり、ES 細胞が未分化状態を保ったまま増殖するのに必要な因子類や栄養源を供給する。このフィーダー細胞は、時に ES 細胞に紛れてしまう (コンタミネーションを生じる) 危険性がある。これは特に、医療に用いる際にはどうしても避けたいことである (免疫拒絶などさまざまな問題を引き起こすため)。したがって現在では、フィーダー細胞を使わない ES 細胞培養用培地や培養方法が開発されている。ES 細胞の培養においては、細胞の未分化状態維持に特定の成長因子 (growth factor) を添加する必要がある。マウス ES 細胞の場合は leukemia inhibitory factor (LIF) が必須であり、ヒト ES 細胞の場合は basic FGF (bFGF) が必須である。なぜマウスとヒトの間で成長因子が異なるのか、その理由についてはよく分かっておらず、理由の解明は今後の課題である。

さて、ES 細胞の培養系から成長因子を取り除くと、ES 細胞が胚葉体 (embryonic body: EB) をつくる。この EB 形成は分化の第一歩であり、ここから外胚葉、中胚葉および内胚葉へと分かれていく (図2)。外胚葉は、

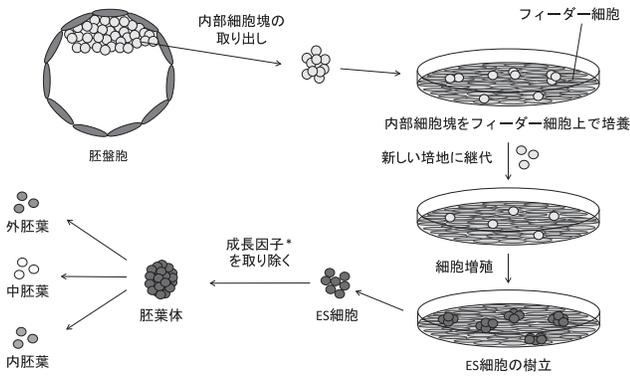


図2. ES細胞の調製. *: マウスの場合はLIF, ヒトの場合はbFGF

主に神経系や感覚器系（皮膚など）の細胞に分化する能力があり、中胚葉は主に骨格系や循環器系、生殖器系の細胞に分化する能力があり、内胚葉は主に消化器系や呼吸器系の細胞に分化する能力がある。つまり、ES細胞からは身体を構成するのに必要な細胞をすべて得ることが可能なのである。この魅力的な特徴から、ES細胞を再生医療に利用しようとする研究がすすめられてきたのである（再生医療については、文献7を参照）。

医療でES細胞を使えるようにするためには、確実に（100%の確率で）目的の細胞へと分化させねばならない。なぜなら、たとえ1個の未分化細胞が混じったとしても、その1個が増殖を続け、でたらめな分化をする結果、ガン組織になってしまう可能性が危惧されるからである。しかし現在のところ、100%の確率で目的の胚葉系細胞（のみ）に分化させる方法は確立されていない。たとえば、EBをbone morphogenetic protein (BMP) で処理してやると、中胚葉前駆細胞 (mesodermal progenitor cell) が現れるのだが、この中胚葉前駆細胞のみを集めるには、フローサイトメトリーによる分離回収が必要である（フローサイトメトリーについては文献8を参照）。どのようなメカニズムで決まった細胞に分化するのか、この大問題の解決は、幹細胞を再生医療に用いるためにきわめて重要である。

ES細胞を再生医療に使用するには、倫理的問題も克服せねばならない。ES細胞は胞胚から作られる。ヒトの場合、この胞胚は人工授精で得られた受精卵が元になっている。受精卵を操作することは、命の操作にあたるのではないかと、という議論である。そのため各国では、ヒトES細胞の作製や取扱いについて厳格な規制が行われている⁹⁾。アメリカでは、過去にES細胞研究に対して研究助成をしない（研究を止める）時期があった。しかし、2009年にオバマ大統領が再生医学に関連した

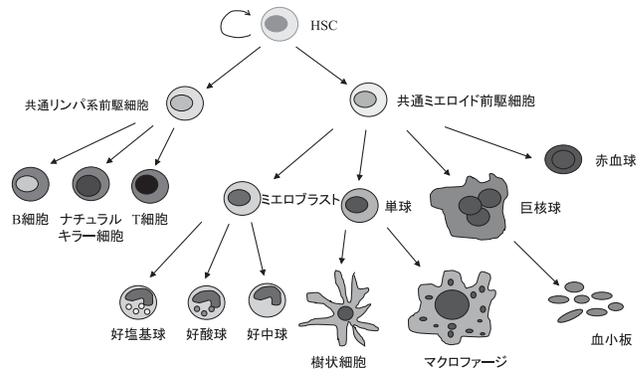


図3. 血液系細胞の系統図

ヒトES細胞研究を認める声明を発表し、これを受けてNational Institutes of Health (NIH) ではヒトES細胞研究のガイドラインを作成し、それらの研究が再開されたのである¹⁰⁾。

体性幹細胞^{5,11)}

骨髄移植という言葉を知ったことがあるだろう。骨髄移植は、白血病や再生不良性貧血などの病気で、正常な造血が行われなくなってしまった患者の造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HMC) を、健康な方の造血幹細胞と入れ替え（実際はドナーから採取された造血幹細胞を点滴静注する）、患者の造血機能を回復させる治療法である¹²⁾。造血幹細胞は末梢血や骨髄中にある。この造血幹細胞は骨髄 (bone marrow) にある細胞の1万個に1個の頻度 (0.01%) でしか見つからない程にまれである。造血幹細胞は、血液を構成するあらゆる細胞に分化できる能力があり（図3）、高い自己増殖能を持っている。造血幹細胞は、赤ちゃんから成人に至るすべての世代の骨髄に存在する体性幹細胞の一種である。そして、骨髄には間葉幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC または間質細胞: stromal cell) も存在する。MSCもまた体性幹細胞である。MSCは造血幹細胞よりも存在量が少なく、1万-10万個に1個の割合 (0.001-0.01%) である。MSCは血液系細胞に分化できるほか、軟骨や骨、腱や靭帯、筋肉や皮膚、脂肪組織そして神経にも分化する能力を持つ。

現在知られている体性幹細胞には、造血幹細胞、神経幹細胞、生殖幹細胞、腸幹細胞、表皮幹細胞、そしてMSCがある。こうした体性幹細胞は、特定の組織（器官）を構成する細胞に分化する能力を持っており、非常に高い増殖能も持っている。前述したように、体性幹細胞はあらゆる世代の組織に存在する。そのため、あるヒトから体性幹細胞を取り出して培養して増やし、再び同じヒト

ト体内に戻して失われた機能や器官を修復させたり(細胞治療)、特定の組織に再構築してから移植したりも可能である。こうした治療に利用される細胞は、ドナー(提供する人)とレシピエント(移植される人)が同じであるため(自家移植になるため)、免疫拒絶を心配する必要がない。ここで問題となるのが、治療に必要な体性幹細胞の確保である。末梢血由来造血幹細胞移植の場合を例にあげると、日本ではレシピエントでの生着に必要な末梢血由来の造血幹細胞は、 2×10^6 個/kgと定められている¹³⁾。ここで60 kgのレシピエントから必要な末梢血量を計算してみる。1細胞が直径20 μm の球体で造血幹細胞の存在率が0.01%であると仮定すると、5リットル程度の末梢血が必要なことが分かる。いかに多くのリソースを必要とするか実感してもらえただろうか(末梢血の場合は、造血幹細胞を遠心分離した後、残りの成分は再びドナーに戻される)。このように、体性幹細胞を(治療に必要な)十分量を確保することは簡単なことではない。

体性幹細胞の中でもMSCは、(ES細胞ほどではないが)多岐にわたる系統の細胞に分化する能力を持つため、血液に限らず骨や皮膚などの再生にも有効であると考えられる。再生医療にも使用できる十分な量と質を持つMSCを確保するためには、体外(細胞)培養が不可欠である。一般に動物細胞培養では、血清入り培地が使用される。血清(serum)にはさまざまな成長因子(growth factors)が含まれており、増殖促進効果が高く細胞機能維持にも有効だからである。一方で、血清の使用にはいくつ問題点もある。まず、血清由来の病原体混入の可能性である。これは、特に動物細胞を医薬品製造や治療に用いるときには、絶対に避けたい点である。そして、製造ロットごとの品質変動や世界的な供給不足、高額な点も問題だ。さらにMSC培養においては、細胞の性質(品質)が変化してしまう問題がある。BonabらはMSCを血清入り培地で培養し、次の現象が生じたことを報告している¹⁴⁾。①(11-15日間隔で)継代を重ねるごとに集団倍加数が減少した。②骨細胞への分化率は5継代目以降に減少しはじめ、10継代目では80%に減少した。③脂肪細胞への分化率は6継代目には90%、10継代目には40%に減少した。さらに④テロメア長も減少した。このように、MSCを多分化能(未分化能)と増殖能を維持した状態で長期培養するのは難しく、効果的な方法が確立されていないのが現状である。現在、血清代替となる成長因子を用いた無血清培地の開発が行われている¹⁵⁾。たとえば、血小板ライセート(platelet lysate)を含む無血清培地である。血小板ライセートには、組織再生で

重要な役割を果たすPDGFやbFGF、TGF- β といった成長因子が豊富に含まれている。この培地中では、MSCの増殖は血清よりも良いが、分化効率については変動するようである。無血清培地には、動物由来因子を含まないanimal components free、使用している化合物がすべてわかっているchemical-defined、成長因子などのタンパク質を含まないprotein-freeまでさまざまある。現在、MSC用の無血清培地は約20種類ほどが市販されている。しかしながら万能ではないため、MSCごとに性能評価を行う必要があり、今後もMSC培養により適した無血清培地の開発が続けられるだろう。

iPS細胞¹⁶⁾

筆者が大学生になった当時(1996年)、世間は羊のDollyの誕生に沸いていた。Dollyは世界で初めて誕生したクローン哺乳類の名前である。ニュースでは、近い将来クローン人間も誕生するのではないか、との憶測が飛び交う一方で、クローン作製で生じる倫理的問題もまたクローズアップされ、それこそDollyは科学者だけにとどまらず政治や宗教などさまざまな方面の人々に大きな衝撃を与えていた。Dollyは、6歳の雌羊の乳腺細胞から得られた核を別の羊の(核を取り除いた)卵細胞に移植した細胞から誕生した。Dollyの遺伝情報は核の提供者となった6歳の雌羊と同じであり、クローン羊なのである¹⁷⁾。

ヒトをはじめとする多細胞生物では、身体の臓器・組織ごとに決まった細胞が特定の機能を持っている。たとえば、脳では神経細胞やアストログリアが協働して働き情報伝達を行っている。眼では錐体細胞(主に色を認識)と桿体細胞(主に光を認識)が網膜を形成して視神経を通じて視覚を形成している。このように、特定の機能をもつように分化した細胞は「体細胞」と呼ばれている。一方、さまざまな細胞になる(分化する)能力をもつ細胞は「幹細胞」と呼ばれている。受精卵は幹細胞に含まれ、ヒトの場合では、受精卵が増殖・分化して赤ちゃんとなり胎盤となる。

さて、先述したDollyの誕生は、なぜ大々的なニュースとなったのだろうか。それは、Dollyの遺伝情報である染色体が、乳腺細胞という体細胞から得られたからである。乳腺細胞はミルクを作る役割に特化しており、幹細胞にはならない。しかし、そこから得られた核(染色体)は、(核を取り除いた未受精卵子内で)適切に処理してやることによって再び未分化能を有するES細胞となることが証明されたのである。Dolly以降、クローンマウスやクローン牛など他の哺乳類でもクローン動物が

誕生している。

それから10年後の2006年、山中ら（現京都大学）はマウスの繊維芽細胞に特定の4種類の遺伝子：*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*を導入して、幹細胞の特徴を持つ細胞の作製に成功した¹⁸⁾。彼らは、この細胞を人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS cell, iPS細胞）と名付けた。翌年には、ヒトの体細胞からもiPS細胞の作出に成功し、その後世界中で多くのiPS細胞が作られている。そして山中氏は、iPS細胞の創始者として功績を称えられ2012年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。なぜiPS細胞は、これほどまでに注目され、その応用性が期待されているのだろうか。その理由の一つは、iPS細胞の作製に必要な細胞が特殊なもの（たとえば受精卵）ではなく、「皮膚や粘膜組織の一部といった簡単に手に入る細胞である」という利便性の良さ、そして倫理的問題がないことだと考えられる。

それまで多能性細胞といえばES細胞のみであったが、iPSの誕生によって幹細胞を利用した再生医療の実現は、さらに近づいたのである。しかし、iPS細胞を再生医療に利用するためには、iPS細胞の安全性、保存法、長期培養法、大規模培養法など達成せねばならない課題が多い。中でも安全性は特に重要だ。iPS細胞の培養や保存時には、chemical definedな無血清培地や細胞保存液を使用して病原体混入リスクを回避する必要があるし、iPS細胞の作製時には、細胞のガン化リスクを低減させるためにガン遺伝子（*c-Myc*）を用いないリプログラミングを実現するのが望ましい。また、iPS細胞からの細胞分化方法についても、確実かつ効率的に行われなければならない。2010年4月、先述の山中氏を所長として京都大学にiPS細胞研究所（CiRA：サイラ）が設立され、iPS細胞を用いた再生医療の実現に向け精力的に研究が進められている。その成果には、たとえば*c-Myc*遺伝子を除いた3因子によるiPS細胞の樹立方法の確立（ホームページからはプロトコルも入手可能）や、パーキンソン病の治療に向けたiPS細胞からのドーパミン細胞の分化と移植法の開発¹⁹⁾などがあげられる。また、iPS細胞そのものの特徴（たとえばiPS作製時の遺伝子導入によるリプログラミング現象や細胞分化メカニズムなど）を知ることは、多細胞生物そのものの仕組みを知ることにもつなり、医学分野に限らない科学技術の発展にとっても大きな意義がある。

おわりに

驚異的な器官再生能力を持つ生物といえば、プラナリアではないだろうか。プラナリアは、横半分（頭部と尾部）に切っても縦半分に切っても、各々の部位から完全なプラナリアが再生する。これは、プラナリアの全身に全能性幹細胞が存在している（全細胞の約10%）から可能なのである²⁰⁾。そして、ヒトの体内にもプラナリアほどの全能性はないものの幹細胞が存在することが分かり、失った体の機能を取り戻す再生医療の実現がぐんと近づいたのである。また、幹細胞から体細胞へと分化する過程や体細胞から幹細胞にリプログラミングされる過程を解明していくことは、長い地球の歴史の中で多細胞生物が紡いできた生命の神秘を紐解いていくことにつながっている。いずれにおいても、培養・観察・分析が重要な役割を担っていることは間違いない。

文 献

- 1) Ramalho-Santos, M. and Willenbring, H.: *Cell Stem Cell*, **1**, 35 (2007).
- 2) Mokry, J. and Pisal, R.: *Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences*, Elsevier, 237 (2015).
- 3) NIH Depart. Health and Human Services: *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*, 1 (2001).
- 4) Children's Hospital Boston: <http://stemcell.childrenshospital.org/about-stem-cells/> (2016/03/03).
- 5) Prochazkova, M. *et al.*: *Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences*, Elsevier, 249 (2015).
- 6) Hwang, N. S. *et al.*: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 199 (2008).
- 7) 井家益和：生物工学, **92**, 110 (2012).
- 8) 金山直樹：生物工学, **90**, 785 (2012).
- 9) Stephens, N.: *Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences*, Elsevier, 855 (2015).
- 10) NIH: <http://stemcells.nih.gov/policy/pages/2009guidelines.aspx>
- 11) Bongso, A. and Richards, M.: *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, **18**, 827 (2004).
- 12) 日本骨髄バンク：<http://www.jmdp.or.jp/>(2016/03/03).
- 13) (財) 骨髄移植推進財団：非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアル暫定版, p. 19 (2010).
- 14) Bonab, M. M. *et al.*: *BMC Cell Biol.*, **7**, 14 (2006).
- 15) Gottipamula, S. *et al.*: *Cell Prolif.*, **46**, 608 (2013).
- 16) Yamanaka, S.: *Cell Stem Cell*, **10**, 678 (2012).
- 17) The Roslin Institute at the University of Edinburgh: <http://www.roslin.ed.ac.uk/public-interest/dolly-the-sheep/a-life-of-dolly/> (2016/03/03).
- 18) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: *Cell*, **126**, 663 (2006).
- 19) Doi, D. *et al.*: *Stem Cell Reports*, **2**, 337 (2014).
- 20) RIKEN CDB: http://www.cdb.riken.jp/jp/millennium/2_1.html (2016/03/03).