生体機能細胞不死化技術と その生体機能再構成への利用

特集 細胞治療と DDS

帯刀益夫^{*1)}, 矢内信昭^{*2)}

Possible applications of conditionally immortalized tissue cell lines with differentiation functions

If all distinct cell types of the body could be clonally isolated and stocked, similar to cDNA or genomic DNA libraries, they would be very invaluable for studying the tissue and cellular functions. We developed new method to establish conditionally immortalized cell lines that retain the differentiated cell functions similar to the original tissues, using the temperature-sensitive simian virus 40 large tumor antigen gene transgenic mouse. We successfully established many functional cell lines including hepatocyte, renal tubule cell, vascular smooth muscle cell, gastric surface mucous cell and various bone marrow stromal cells. We developed *in vitro* hematopoietic microenvironment to support growth and differentiation of hematopoietic stem cells and their progenitors by coculture with bone marrow stromal cells. In addition, we showed that bone marrow stromal cell lines have properties of mesenchymal stem cells that differentiate towards osteoblast, skeletal muscle cell, endothelial cell, adipocyte, smooth muscle cell and cardiomyocyte.

Using newly developed transgenic rat, we established various endothelial cell lines from brain capillary, retinal capillary, bone marrow, and choroid plexus, which can be used for a novel *in vitro* system to investigate transport functions at the blood-tissue fluid barrier and to develop high throughput screening systems.

Our transgenic mouse and rat will be useful to develop new types of cell lines with differentiation potentials. The established cell lines will be useful to study tissue functions at cellular and molecular levels and may be applicable to high throughput drug screening, toxicity test, and to develop the alternatives to animal experiments.

生体の組織を構成している分化機能を持つ細胞は 200 種を超えられる。これら多様な細胞機能を解明し、生体組織の機能特性を再構築するためには、個々の分化機能を保持した細胞を不死化することが必要となる。筆者らは、温度感受性 SV40 T-抗原遺伝子導入トランスジェニックマウス、およびラットを作出し、多様な組織から分化機能を保持した不死化細胞株を樹立する方法を確立した。筆者らは、造血幹細胞を支持する骨髄の間質細胞株を多数不死化し、骨髄造血微小環境の *in vitro* 再構成を目指した研究を進め、これら間質細胞株が、細胞間相互作用により培養系で造血細胞の特異的支持機能を示すと同時に、骨芽細胞、内皮細胞、筋細胞、脂肪細胞、平滑筋細胞など多様に分化できる間葉系幹細胞としての性質も持っていることを明らかにした。

これら不死化した機能細胞株は、今後、再生医学的研究とともに、医薬品スクリーニングシステムや毒性評価システムの構築、新規生理活性物質の探索などへの創薬研究への利用も期待できる。

Masuo Obinata^{*1)}, Nobuaki Yanai^{*2)}

key words : SV40 T-antigen, transgenic mouse, immortalized cell line, tissue function, stem cell

多細胞生物の体を構成している細胞のほとんどは分化した細胞であり、これら分化した細胞は、個体発生の過程で一つの受精卵からの増殖と分化を経て

産み出され、いろいろな組織を構築して機能を発揮する。Sulston らは *C. elegans* を用いて、このような個体発生の過程が、一つの受精卵からはじまる細胞分裂の時間的・空間的な過程としての細胞系譜として明確に示した。*C. elegans* は 1 個体が約 1,000 個の細胞で構成されており、このような解析が可能であったが、ヒトをはじめとする哺乳動物において

^{*1)} Department of Cell Biology Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University 東北大学加齢医学研究所分子発生研究分野

^{*2)} Faculty of Nutrition Sciences, Miyagi-Gakuin Female University 宮城学院女子大学栄養科学科

図 1

も、こうした細胞系譜とその結果としての分化した細胞の特定化とその機能解析が必要であるが、ヒトの身体はおよそ 60 兆個に及ぶ細胞の集合であり、分化した細胞の種類も数百を超え、複雑すぎて *C. elegans* と同様の解析は不可能である。しかし、もし生体を構成する組織のすべての分化した細胞を細胞株クローンライブラリーとして確保し、その特性を明らかにし、これらを用いて生体組織の再構成を行うことができれば、*C. elegans* で行われたと同様の系統的な生体組織機能の研究が可能となる。

現在の組織培養法により生体の各組織の細胞を取り出し培養すると、一定期間増殖してから全体的な細胞死(クライシス)を起こしつつ、残った一部の細胞から不死化する細胞が一定頻度で現れるが、これらの細胞はいくつかの遺伝子変異を起こし、生体での本来の分化機能を失っている場合が多い。筆者らは、癌遺伝子の機能の研究から細胞の増殖と分化の転換を癌遺伝子が調節することを示したが、これを利用すれば、分化機能を保持した細胞株を樹立することが可能ではないかと考え、不死化のための遺伝子として SV40 T-抗原を選び、トランスジェニックマウスを作出した¹⁾。

これまで SV40 T-抗原などのウイルス由来の癌遺伝子を導入し、初代培養系で細胞を不死化しようとする試みが多数成功しているが、これら遺伝子導入は増殖性の細胞にのみ起こること、また個々の細胞で染色体導入位置の相違があるなどの欠点があり、トランスジェニックマウスを作出すればこのような欠点を解決でき、遺伝的にも同一の背景を持つ細胞株を樹立できると考えた(図 1)。特に、SV40 T-抗原遺伝子の温度感受性変異株を導入したトランスジェニックマウスを作出すれば、温度依存的に増殖と分化のスイッチが起きることも期待できる。温度感受性 T-抗原遺伝子はそれ自身のプロモーターを用いているので、多くの組織でユビキタな発現があり、効率よくいろいろな組織の細胞の初代培養から分化機能を持つ細胞の株化が可能であることがわかった。たとえば、アルブミンやチトクローム p 450 などの発現が認められる肝実質細胞株(TLR 1-4 株)¹⁾、パソプレッシン応答能を持つ腎尿細管の細胞株(TKC 細胞株)²⁾、胃粘膜上皮細胞株(GSM 細胞株)³⁾などが樹立された。

これら樹立された細胞株はほとんどが温度依存性の増殖を示すことがわかったが、細胞系により、当

初の予想に反して、T-抗原が活性状態にある 33°C でも、すでに分化機能を発揮しており、T-抗原が失活する 39°C の培養条件でも、分化形質の増強や誘導が認められない場合(肝細胞、腎尿細管細胞など)と、胃粘膜細胞、血管平滑筋細胞、骨髓ストローマ細胞などのように飽和密度に達して増殖抑制がかかったとき、あるいは 39°C に移したとき分化形質の上昇が認められる場合とがあった。この差は、T-抗原の制御機能の細胞による差なのかもしれない。また、T-抗原は癌抑制遺伝子産物 Rb, p 53 蛋白と結合するが、細胞系によってどちらと結合しているかが違っている可能性も考えられる。肝細胞、腎尿細管細胞株は 39°C では、細胞増殖の停止ののち、細胞死の誘導が起き、この細胞死はアポトーシスであることがわかった。このアポトーシスの誘導は、33°C では p 53 蛋白(正常タイプ)が T-抗原蛋白と複合体を形成しているが、39°C に移ると T-抗原が消失し、一過的に p 53 蛋白が蓄積することによるものと思われる^{4,11)}。

このようにして樹立された生体機能保持細胞株は、論文として公表したものを表 1 にまとめているので、興味のある方は論文をご覧ください。これら細胞株については、それぞれの分化形質についての解析などが進められており、本特集でもいくつかの例が示されているが、ここでは、こうした機能細胞株を用いて生体組織の *in vitro* での機能的再構成を試みている筆者らの研究について述べる。

不死化間質細胞株による骨髓造血微小環境の培養系での再構成

筆者らは、造血組織である骨髓に注目して、骨髓組織間質にある細胞(間質細胞とよぶ)を用いて造血幹細胞を培養系で維持できる骨髓機能の再構成を目指して研究した。

造血幹細胞は赤血球、白血球、血小板などすべての血液細胞を恒常的に産み出す多能性幹細胞であるが、この恒常的造血が起こる組織は、個体発生に伴って胚では卵黄嚢、胎児では肝臓、誕生してからは骨髓へと移動する。このことは、個体発生に伴い、造血幹細胞が造血に好適な環境(造血微小環境：

hematopoietic microenvironment)へ移動することによるものと考えられおり、最近の多能性幹細胞の再生医学研究のうえからも、これら造血組織の造血微小環境がいかに構成されており、また制御されているかが重要な研究課題となってきた。なかでも骨髓は、造血幹細胞や血液前駆細胞の増殖分化の制御の場として重要な組織であり、筆者らはこの骨髓の造血微小環境がこの組織を構成する間質細胞によってつくり出されており、これら間質細胞が造血細胞の増殖と分化の制御に多様な機能を持っていると推定した。

実際、Dexter らは骨髓から取り出したシャーレに付着性の間質細胞をフィーダーとして血液細胞を培養すると、長期の造血細胞の維持が *in vitro* 培養系で可能であることを報告しており(Dexter's long-term bone marrow culture とよばれる)、この混合培養系では、造血幹細胞が増殖(自己複製)しつつ分化し、成熟した血液細胞が長期的に産生されているものと考えられ、シャーレに付着性の間質細胞が幹細胞の増殖分化を支持していることを裏付けるものである。

間質細胞の支持機能には間質細胞と血液細胞直接の接着、細胞外基質(extracellular matrix)、さらにはサイトカインの産生などが重要と考えられているが、その具体的な分子メカニズムは明らかにされていない。その後、血液細胞の増殖分化の制御の研究は、サイトカインについて集中的に行われたが、少なくとも現在まで、これらサイトカインを組み合わせても満足のゆく形で *in vitro* で幹細胞を維持できる条件は見いだせていないことから、間質細胞の造血支持機能により注目が集まってきた。

そこで筆者らは、できるだけ多数の多様な骨髓間質細胞株を樹立し、これらにより培養系で造血微小環境を再構築しようと考え、SV40 T-抗原トランスジェニックマウスの骨髓から接着性の細胞を培養し、多数(60 クローン)の間質細胞株を樹立することに成功した⁸⁾。

樹立された間質細胞株は形態学的観察、生化学的解析などから、線維芽細胞、前脂肪細胞、内皮細胞の 3 種に大別されることがわかった。これらの細胞は、Dexter's culture において付着性の細胞として

表 1 トランスジェニックマウス, ラットから樹立された細胞株とその文献リスト

(Established cell lines from T-transgenic mice and rats) [細胞株 (クローン名) (参考文献) 分化マーカーの発現]

MOUSE CELL LINES	
<p>Kidney tubule cell lines</p> <p>distal tubule cell line (TKC-2) (2, 5, 40)</p> <p>characters of distal tubule cells, dome formation, vasopressin-induced cAMP synthesis</p> <p>early proximal tubule cell line (S 1) (6),</p> <p>unique morphology specific to proximal tubule</p> <p>vasopressin-induced intracellular calcium increase</p> <p>kidney tubule cell lines from microdissected nephron segments (7, 15)</p> <p>distal tubule, cortical and outer medullary collecting duct (OMCD), terminal proximal tubules (S 3 segment) intrarenal site-specific actions</p> <p>hepatocyte cell lines (TLR) (1)</p> <p>liver-specific morphological and biochemical properties</p> <p>inducibility of P 450 IA 1 by 3-methylcholanthrene</p> <p>gastric surface mucous cells GSM 06 and GSM 10 (3)</p> <p>PAS- and Con A-positive glycoproteins</p> <p>tracheal epithelial cell lines, TM 01 and TM 02-3 (18)</p> <p>high molecular weight glycoconjugates, ICAM-1</p> <p>colonic epithelial cell line (MCE 301) (26)</p> <p>microvilli-like structures, tight junctions and desmosomes, cytoskeletal (acidic cytokeratins and actin), basement membrane (laminin and collagen type IV)</p> <p>junctional complex proteins (ZO-1 and desmoplakin I + II), alkaline phosphatase (a brush border-associated enzyme)</p> <p>retinal pigment epithelium-derived cell line (RPET) (14)</p> <p>T 1-tyrosinase production, cytokeratin, microvilli</p> <p>vascular smooth muscle cell lines (SVS 30 and SVS 24 cells) (17, 21)</p> <p>α-actin, smooth muscle myosin heavy chain-1, and calponin. proliferation-dependent expression</p> <p>bone marrow stromal cell lines</p> <p>mesenchymal stem cell and progenitor cell lines</p> <p>bone marrow stromal cell line (TBR 31-2) (22)</p> <p>multipotency of mesenchymal cell differentiation, adipocyte (lipoprotein lipase)</p> <p>osteoblast (type I collagen and osteocalcin), chondrocyte (type II and X collagen)</p> <p>muscle cell (desmin)</p> <p>bone marrow stromal cell line (TBR-B) (25)</p> <p>differentiation potential to smooth muscle, <i>h1</i>-calponin, <i>h</i>-caldesmon, SM22α and α-actin</p> <p>bone marrow stromal cell line (TBR-series) (9)</p> <p>differentiation potentials to mesenchymal lineages of cells</p> <p>bone marrow stromal cell line for reconstruction of hematopoietic microenvironment</p> <p>(TBR 59) (12) support Lin-c-Kit+Sca 1+stem cells sorted from bone marrow</p> <p>(TBR 31-1) (12) support lymphopoiesis</p> <p>(TBR-series) (8, 16) support erythropoiesis, granulopoiesis and lymphopoiesis</p> <p>(TM-series) (10) support osteoclastogenesis</p> <p>hematopoietic cell line</p> <p>stromal cell-dependent hematopoietic stem-like cell line (THS-119) (19, 23)</p> <p>c-Kit, Sca-1 and CD 34 low, lineage (Gr-1, TER 119, Mac-1, CD 3, B 220)-negative, hematopoietic cell specific transcription factors</p> <p>chondrocyte-like cell line (TC 6) derived from articular cartilage (13)</p> <p>type II procollagen, link protein, and aggrecan</p> <p>chondrocyte cell lines (MCC-2, MCC-5, MCC-35) from the costal cartilage (28)</p> <p>type II, type XI, and type X-collagens, aggrecan, link protein</p>	<p>periodontal ligament fibroblasts (PDL-L 2) (44)</p> <p>alkaline phosphatase, type I collagen, periostin, runt-related transcription factor-2 (Runx 2) and EGF receptor,</p> <p>epididymal cell lines (PC 1 from proximal caput; and DC 1, DC 2, and DC 3 from distal caput) (42)</p> <p>expression of cytokeratin, epididymal specific proteins (androgen receptor, PEB-like protein, E-RABP, and EP 17)</p> <p>testicular Sertoli cell line (TTE 3) (37)</p> <p>Sertoli cell-specific genes (steel factor, inhibin-α, transferrin, follicle-stimulating hormone receptor and sulfated glycoprotein-2)</p> <p>vimentin and zonula occludens-1, mRNAs for 17β-HSD types 1 and 3, and inhibin-α</p> <p>Leydig cell line (TTE 1) (36)</p> <p>alkaline phosphatase and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) activities</p> <p>expression of cytokeratin and vimentin</p> <p>adrenocortical precursor cell lines (AcA 201, AcE 60 and AcA 101) (35)</p> <p>steroidogenic genes encoding steroidogenic factor-1, cholesterol side-chain cleavage P 450 scc, and steroidogenic acute regulatory protein,</p> <p>gingival epithelial cell lines (GE 1 and GE 6) (31)</p> <p>Characteristic keratin peptides, keratin 4 and 13, for mucosal epithelium</p> <p>Filaggrin, involucrin, IL-1β and TNF-α by the stimulation of lipopolysaccharide</p>
RAT CELL LINES	
	<p>bone marrow-derived endothelial cell lines (TR-BME) (32)</p> <p>(VEGF) receptor (VEGFR)-1, 2, Tie-1, 2 and von Willebrand factor (VWF)</p> <p>choroid plexus epithelial cell line (TR-CSFB) (30)</p> <p>transferrin, Na⁺, K⁺-ATPase uptake of L-Proline or L-glutamic acid</p> <p>brain capillary endothelial cell lines (27)</p> <p>von Willebrand factor, acetylated low-density lipoprotein uptake activity,</p> <p>tight-junction strand proteins (claudine-5, occludin), junctional adhesion molecule</p> <p>drug efflux transporter (P-glycoprotein, mdr 1a, mdr 1b, and mdr 2)</p> <p>drug influx transporter (GLUT-1, 3-O-methyl-D-glucose (3-OMG) uptake activity)</p> <p>large neutral amino acid transporter</p> <p>retinal capillary endothelial cell lines (TR-iBRB) (29)</p> <p>von Willebrand factor, acetylated-low density lipoprotein uptake activity</p> <p>VEGF receptor-2, GLUT 1, mdr 1a, mdr 1b and mdr 2</p> <p>syncytiotrophoblast cell lines, (TR-TBTs) (43)</p> <p>Polarized glucose transporters</p> <p>betaine/GABA transporter (GAT-2/BGT-1), concentrative nucleoside transporter 2 (CNT 2), equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT 1), and ENT 2</p> <p>gastric epithelial cell lines (RGE 1-01, RGE 1-02, RGE 1-03, RGE 1-21, RGE 1-22 and RGE 2-01) (39)</p> <p>cytoskeletal (cytokeratin and actin), basement membrane (laminin and collagen type IV)</p> <p>junctional complex (ZO-1 and desmoplakin I + II) proteins</p> <p>brain pericyte cell lines, TR-PCT 1 (38)</p> <p>responds to transforming growth factor-β1 and β-glycerophosphate</p> <p>type 2 astrocyte cell line (TR-AST) (33)</p> <p>GFAP and A 2 B 5 glutamine synthetase. acidic amino acid transporters, GLT-1</p> <p>bone marrow-derived endothelial cell lines (TR-BME) (32)</p> <p>VEGFR-2, VEGFR-1, Tie-1, 2, and VWF</p>

報告されているものとよく一致していた。

1. 骨髄間質細胞株の造血前駆細胞の特異的支持機能

筆者らは、樹立した骨髄間質細胞を用いて造血微小環境を *in vitro* で再構成し、幹細胞や前駆細胞の培養を行うことが造血幹細胞の増殖と分化の遺伝子制御を研究するために重要と考え、間質細胞株をフィーダーとして、造血細胞を共培養する新たな培養系を開発し、まず、血液前駆細胞に対するこれら間質細胞株の造血支持機能を系統的に調べた。骨髄または胎仔肝の前駆細胞をこれら間質細胞株をフィーダーとして培養すると、支持機能がある場合は巨大なコロニー(数百個~千個の細胞からなる)が形成される。この巨大コロニーの細胞を観察すると、赤血球系コロニー、顆粒球コロニーなどが認められ、間質細胞株の種類により、エリスロポイエチン依存に赤血球造血支持機能を持つものや、顆粒球造血支持機能を持つものなど、その造血支持機能に選択性があることがわかった。

赤血球造血の支持機能は、エリスロポイエチンの添加が必須であったが、顆粒球やマクロファージ系のコロニー形成を支持する細胞は、G-CSF、M-CSFなどのサイトカインの産生とは無関係に支持し、これらサイトカインを添加しても支持機能の亢進は認められない。

この赤芽球と間質細胞の共培養系を用いて予想される既知分子について阻害抗体を用いた実験を行い、間質細胞の赤血球造血支持には c-Kit や VLA-4 が必須であることがわかった。c-Kit のリガンドである stem cell factor (SCF) は、間質細胞で発現しており、膜結合型と分泌型のフォームが存在する。両者ともに血液細胞に発現する c-Kit 受容体を介して未分化血球細胞の増殖を制御している。VLA-4 は、細胞外基質である VCAM-1 と結合することで細胞の生存や接着シグナルを調節していると考えられている。

これらの結果から間質細胞の造血支持機能は、血球との細胞間の直接の相互作用を介した制御であることがわかり、今後、こうした細胞間相互作用を介して働く新しい機能分子の同定にこれら間質細胞株は有用な材料として利用できるであろう。

2. 骨髄間質細胞株による造血幹細胞の増殖分化誘導

骨髄では造血幹細胞の増殖分化を制御すると予想されるので、骨髄間質細胞株を用いて造血幹細胞の長期維持培養が可能かどうか調べた。セルソーターを用いて、造血幹細胞(血球分化マーカー(Lineage)陰性、c-Kit 陽性、Sca-1 陽性)を純化し、これをさまざまな骨髄間質細胞株と共培養したところ、造血幹細胞は間質細胞の下に潜り込んで増殖し、分化するにつれて間質細胞依存性が低下し、間質細胞の表層側に浮き上がってくる傾向がみられ、増殖した細胞はいわゆる敷石状のコロニー(cobblestone コロニー)を形成する。このコロニー形成能を指標に、各間質細胞の造血支持機能を比較すると、強い支持機能を示すものから、まったく支持しない細胞株まで存在することがわかり、骨髄間質細胞は、造血幹細胞の分化方向の決定や前駆細胞の増幅に対して多様な能力を示すことがわかった¹²⁾。この造血幹細胞の間質細胞による支持機能においても、阻害抗体を用いた実験により c-Kit や VLA 4 が重要であることが証明された。

こうして、樹立した間質細胞株と分画した造血幹細胞の共培養系として、*in vitro* で造血微小環境を再構築することが可能となってきた。

つぎに、造血幹細胞はセルソーターで純化できるものの、ソーティングされた細胞は、その後の解析に十分な細胞数を得られないことから、造血幹細胞が不死化されれば、間質細胞との相互作用を分子レベルで解明する有用な材料となるのではないかと考え、株化された間質細胞依存的に増殖する造血幹細胞株の樹立を試みた。ts-T-antigen トランスジェニックマウスの骨髄由来の Lineage-Sca-1+細胞を、造血支持能の高い間質細胞株 TBR 59 を支持細胞と培養し、長期にわたって継代すると、ソーティングした造血幹細胞と同様に間質細胞の下に潜り込んで cobblestone コロニーを形成して増殖し、また、細胞表面マーカーの Lineage-c-Kit+Sca-1+といった発現パターンやその転写因子などの発現からも、幼若な血球細胞の特性を持つ未分化血球細胞株 THS 119 を樹立することに成功した¹⁹⁾。THS 119 細胞の増殖は間質細胞依存的であり、間質細胞を除くと apoptosis を起こし死滅する。また、TBR 59 間

質細胞株以外の細胞株ではその増殖を維持できない間質細胞株があり、このような間質細胞株に TBR 59 間質細胞の conditioned medium を加えると増殖を回復することから、その維持には接着性の因子と液性因子の関与が考えられた。THS 119 細胞は、間質細胞がない状態では各種サイトカインのみで維持することはできなかったが、THS 119 と TBR 59 の共培養下に 2 カ月にわたり各種サイトカインを添加しつづけたところ、IL-3 あるいは IL-7 に依存し増殖する THS 119 の亜株が得られた。これら THS 119 細胞を用いて、間質細胞依存的な増殖とサイトカイン依存的な増殖の相違を調べた。その結果、サイトカイン依存的な THS 119 は恒常的に STAT 5 のリン酸化が認められるのに対し、間質細胞依存的な THS 119 細胞では STAT 5 のリン酸化が非常に弱いことがわかった。未分化な幹細胞は間質細胞の助けをかりて未分化性を維持されているが、いったん分化が誘導されると、間質細胞依存性を失い、サイトカイン依存性を獲得し、その後の分化成熟経路に進むと考えられるので、間質細胞依存性 THS 119 細胞株と、サイトカイン依存性の亜株との比較により、間質細胞依存性からサイトカイン依存性への転換の機構や、それぞれの増殖促進シグナルの違いなどを解析するよい材料となると思われる。

THS 119 細胞も間質細胞の下に潜り込んで cobblestone コロニーを形成して増殖することから、未分化血球細胞が間質細胞へ潜り込むという性質を保持していたので、この細胞系でこの潜り込みがどのような因子によるのか解析したところ、興味深いことに THS 119 細胞の潜り込みには血清中の脂質成分である sphingosine-1 phosphate (S1P) と lysophosphatidic acid (LPA) が関与していることが明らかとなった²⁴⁾。S1P や LPA は、造血細胞の膜受容体である edg-1、あるいは edg-2 を介し、また、阻害剤の実験から低分子 G 蛋白を介するシグナルにより未分化血球細胞の運動能を制御していることが証明された。実際、分画した造血幹細胞でも edg-1、edg-2 が発現していることを確認しており、脂質が未分化な造血細胞の重要な生理的因子として働く可能性があり興味深い結果である。

さらに、正常マウス骨髓細胞を Dexter 型の支持細胞の上で長期継代したのち、間質細胞依存的に維持される血液細胞のみを既存の間質細胞株 MSS 62 へ移し換え、MSS 62 細胞株依存に維持される共培養系 DFC を樹立した⁴¹⁾。この DFC 細胞の培養からいくつかの未分化造血細胞株を樹立したが、そのなかで DFC-28 細胞は、MSS 62 に依存的に未分化状態が維持される造血前駆細胞株であり、フィーダー細胞を MSS 62 から別の骨髓間質細胞株 TBR 31-1 との共培養へ移すと、c-Kit の発現低下、および Pax-5 の発現上昇を伴って初期 B リンパ球へ分化誘導されることがわかった。この分化誘導は、リンパ球系サイトカインである IL-7 や TBR 31-1 の培養上清の添加では起こらず、TBR 31-1 との直接的な接着を介したシグナルが必要であることが示唆された。また、驚くべきことに、いったん TBR 31-1 と共培養した DFC-28 細胞を再び MSS 62 と共培養すると、もとの未分化な形質に戻った。これは間質細胞との直接的なシグナルが、未分化血球細胞の可逆的な分化のスイッチに関与している可能性を示唆するものである。Pax-5 は B リンパ球の分化決定に重要な転写因子の一つであるが、Pax-5 を欠損する proB 細胞は、特定の条件下で他の血球系列(顆粒球、マクロファージ、T リンパ球、NK 細胞、破骨細胞等)へ分化できることが報告されているので、Pax-5 の発現が起こる前の細胞は分化の可塑性を有していると考えられ、DFC-28 でみられた間質細胞による Pax-5 の可逆的な発現は、B リンパ球への分化決定のみならず未分化血球の分化の可塑性を研究するうえで興味深い。この結果は、未分化な幹細胞が未分化状態と分化状態を可逆的に変換できること、そしてこの可逆性が間質細胞など外的因子により制御を受けていることを示唆するものであり、再生医学研究のうえから、いかに幹細胞の可塑性を制御し、ある方向への分化誘導を可能にするかという点で微小環境を構成する間質細胞の重要性が増してきたといえる。

3. 間葉系幹細胞としての骨髓間質細胞の性質

樹立された骨髓間質細胞株は、造血に対しては多様な支持能を示すが、同時にそれ自身は前脂肪細胞

図 2 分化機能保持細胞株の樹立とこれを用いた生体組織機能の再構築

図 3 分化機能保持細胞株の医薬品開発への利用

や血管内皮細胞、あるいは骨芽細胞、筋芽細胞といった間葉系幹細胞の性質を有していることがわかった。これら間質細胞株は、ある培養条件下では成熟した脂肪細胞、骨細胞、筋肉へと分化が可能であり、なかには一つの間質細胞が脂肪細胞、骨細胞、筋細胞へと分化できる多能性細胞もあることを示した。また、最近筆者らは、間質細胞から心筋細胞へと分

化誘導が起きることを示す結果も得ている。最近の再生医学研究では、骨髄の細胞を移植すると、肝臓、心臓、神経など多様な組織細胞への分化能を示すという報告がなされ、その実体に注目が集まっている。

また、骨髄の造血微小環境を構成する間質細胞が、このように間質細胞が間葉系幹細胞としての分化転換能を持っていることは、骨髄の造血微小環境を構築してゆくためにどのような制御を受けているかという点からも興味を持たれる。筆者らは、造血組織、特に骨髄で血液細胞が産生している Oncostatin M (OSM) に注目して、OSM の間質細胞に対する効果を検討したが、ある間質細胞株では、骨芽細胞や脂肪細胞へと分化誘導される際に、OSM が抑制する一方で、造血促進因子である SCF の産生を上昇させる働きがあることがわかった³⁴⁾。この結果は、血液細胞が産生する因子により間質細胞の増殖や分化が制御されることを示しており、骨髄では血液細胞と間質細胞の間で双方向シグナルによる制御により造血微小環境を維持しているという新しい組織制御系があることを示すものとして興味深い。

まとめ

不死化遺伝子導入トランスジェニックマウスは、いろいろな組織の機能細胞株の樹立にきわめて有効であり、ここで述べてきたように、これら樹立された複数の細胞株を組み合わせて培養することにより培養系で組織機能の再構成を進めてゆけば、組織形成の機構や複合的な組織機能の再構成の研究も可能になり、将来的には遺伝子治療、幹細胞移植、さらには組織再生など、疾患の新しい治療法のための基礎研究にも応用できるものと期待している(図 2)。

また、すでに樹立された腎尿細管細胞、胃粘膜細胞、平滑筋細胞などは、薬理学、毒性研究などに利用されはじめているし、医薬品開発のための生体機能を反映したスクリーニング系として、また、動物実験代替法への利用にも期待が持てる(図 3)。

文 献

- 1) Yanai Y, Suzuki M, Obinata M: Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-

- sensitive Simian Virus 40 large T-antigen gene. *Exp Cell Res* 197 : 50-56, 1991.
- 2) Yanai Y, Satoh T, Kyo S, Abe, K, Suzuki M, Obinata M : A tubule cell line established from transgenic mice harboring temperature-sensitive Simian Virus 40 large T-antigen gene. *Jpn J Cancer Res* 82 : 1344-1348, 1991.
- 3) Sugiyama N, Tabuchi Y, Horiuchi T, Obinata M, Furusawa M : Establishment of gastric surface mucous cell lines from transgenic mice harboring temperature-sensitive Simian Virus 40 large T-antigen gene. *Exp Cell Res* 209 : 382-387, 1993.
- 4) Yanai Y, Obinata M : Apoptosis is induced at nonpermissive temperature by a transient increase in p53 in cell lines immortalized with ts SV40 T-antigen gene. *Exp Cell Res* 211 : 296-300, 1994.
- 5) Takeuchi K, Yanai N, Takahashi N, Abe T, Tsutsumi E, Obinata M et al. : Different cellular actions of vasopressin-induced adenosine 3', 5'-monophosphate formation in an immortalized renal tubule cell line, TKC2. *Biochem Biophys Res Commun* 202 : 680-687, 1994.
- 6) Sekine T, Hosoyamada M, Haga-Mizuno A, Takeda M, Suzuki M, Obinata M et al. : Ammonia production in cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Contrib Nephrol* 110 : 98-102, 1994.
- 7) Takeda M, Hosoyamada M, Shirato I, Obinata M, Suzuki M et al. : Establishment of vasopressin-responsive early proximal tubular cell lines derived from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Biochem Mol Biol Int* 37 : 507-515, 1995.
- 8) Kameoka JI, Yanai N, Obinata M : Bone marrow stromal cells selectively stimulate the rapid expansion of lineage-restricted myeloid progenitors. *J Cell Physiol* 164 : 55-64, 1995.
- 9) Okuyama R, Yanai N, Obinata M : Differentiation capacity towards mesenchymal cell lineages of bone marrow stromal cells established from temperature-sensitive SV40 T-antigen transgenic mouse. *Exp Cell Res* 218 : 424-429, 1995.
- 10) Matsumoto NH, Tamura M, Denhardt DT, Obinata M, Noda M : Establishment and characterization of bone marrow stromal cell lines that support osteoclastogenesis. *Endocrinol* 136 : 4084-4091, 1995.
- 11) Taher A, Yanai N, Obinata M : Properties of incompletely immortalized cell lines generated from the line established from temperature-sensitive SV40 T-antigen transgenic mice. *Exp Cell Res* 219 : 332-338, 1995.
- 12) Okuyama R, Koguma M, Yanai N, Obinata M : Bone marrow stromal cells induce myeloid and lymphoid development of the sorted hematopoietic stem cells *in vitro*. *Blood* 86 : 2590-2597, 1995.
- 13) Mataga N, Tamura M, Yanai N, Shimomura T, Kimata K, Obinata M et al. : Establishment of a novel chondrocyte-like cell line derived from transgenic mice harboring temperature sensitive Simian Virus 40 large T-antigen gene. *J Bone and Mineral Res* 11 : 1646-1654, 1996.
- 14) Kato K, Ishiguro S, Yamamoto H, Yanai N, Obinata M et al. : A retinal pigment epithelium-derived cell line from transgenic mouse harboring temperature-sensitive Simian Virus 40 Large T-antigen gene. *Cell Struct & Funct* 21 : 459-468, 1996.
- 15) Hosoyamada M, Obinata M, Endou H : Cisplatin-induced toxicity in immortalized renal cell lines established from transgenic mice harboring temperature sensitive SV40 large T-antigen gene. *Arch Toxicol* 70 : 284-292, 1996.
- 16) Iguchi A, Okuyama R, Koguma M, Yanai N, Obinata M : Bone marrow stromal cells induce granulocytic development in the absence of G-CSF. *Cell Struct & Funct* 22 : 357-364, 1997.
- 17) Hasegawa K, Arakawa E, Oda S, Yanai N, Obinata M et al. : Novel smooth muscle cell lines from transgenic mice harboring temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene. temperature-dependent expression of smooth muscle myosin heavy chain-1 and calponin genes. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 2177-2186, 1997.
- 18) Sugiyama N, Tabuchi Y, Numata F, Horiuchi T, Ishibashi K et al. : Establishment and characterization of tracheal epithelial cell lines, TM 01 and TM 02-3, from transgenic mice bearing temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene. *Cell Structure & Function* 23 : 119-127, 1998.
- 19) Yanai N, Matsui N, Matsuda KI, Furusawa T, Ohkubo T et al. : A novel stromal cell-dependent hematopoietic cell line established from temperature-sensitive SV40 T-antigen transgenic mice. *Exp Hematol* 27 : 1087-1096, 1999.
- 20) Takahashi R, Hirabayashi M, Yanai N, Obinata M, Ueda M : Establishment of the tsA 58 transgenic rats as a source of conditionally immortalized cell lines. *Experimental Animals* 48 : 255-261, 1999.
- 21) Sugiyama T, Hasegawa K, Yanai N, Mikoshiba K, Obinata M et al. : Alteration of the increase in intracellular $[Ca^{2+}]$ in proliferating smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264 : 774-776, 1999.
- 22) Negishi Y, Kudo A, Obinata A, Kawashima K, Hirano H et al. : Multipotency of a bone marrow stromal cell line, TBR 31-2, established from ts SV40 T antigen gene transgenic mice. *Biophys Biochem Res Commun* 268 : 450-455, 2000.
- 23) Okubo T, Yanai N, Obinata M : Self-renewal and differentiation of a novel bipotent myeloid progenitor cells in the stroma-dependent culture. *Exp Hematol* 28 : 651-659, 2000.
- 24) Yanai N, Matsui N, Furusawa T, Okubo T, Obinata M : Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid trigger invasion of primitive hematopoietic cells into stromal cell layers. *Blood* 96 : 139-144, 2000.
- 25) Arakawa E, Hasegawa K, Yanai N, Obinata M, Matsuda Y : A mouse bone marrow stromal cell line, TBR-B, shows inducible expression of smooth muscle-specific genes. *FEBS Letters* 481 : 193-196, 2000.
- 26) Tabuchi Y, Ohta S, Arai Y, Kawahara M, Ishibashi K et al. : Establishment and characterization of a colonic epithelial cell line MCE 301 from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Cell Struct Funct* 25 : 297-307, 2000.
- 27) Hosoya K, Takashima T, Tetsuka K, Nagura T, Ohtsuki S et al. : mRNA expression and transport characterization of conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines : a new *in vitro* bbb model for drug targeting. *J Drug Target* 8 : 357-370, 2000.
- 28) Kitaoka E, Satomura K, Hayashi E, Yamanouchi K, Tobiume S et al. : Establishment and characterization of chondrocyte cell lines from the costal cartilage of SV40 large T antigen transgenic mice. *J Cell Biochem* 81 : 571-582, 2001.
- 29) Hosoya K, Tomi M, Ohtsuki S, Takanaga H, Ueda M et al. : Conditionally immortalized retinal capillary endothelial cell lines (TR-iBRB) expressing differentiated endothelial cell functions derived from a transgenic rat. *Exp Eye Res* 72 : 163-172, 2001.

- 30) Kitazawa T, Hosoya K, Watanabe M, Takashima T, Ohtsuki S et al. : Characterization of the amino acid transport of new immortalized choroid plexus epithelial cell lines : a novel *in vitro* system for investigating transport functions at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Pharm Res* 18 : 16-22, 2001.
- 31) Hatakeyama S, Ohara-Nemoto Y, Yanai N, Obinata M, Hayashi S et al. : Establishment of gingival epithelial cell lines from transgenic mice harboring temperature sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *J Oral Pathol Med* 30 : 296-304, 2001.
- 32) Hattori K, Muta M, Toi M, Iizasa H, Shinsei M et al. : Establishment of bone marrow-derived endothelial cell lines from ts-SV40 T-antigen gene transgenic rats. *Pharm Res* 18 : 9-15, 2001.
- 33) Tetsuka K, Hosoya KI, Ohtsuki S, Takanaga H, Yanai N, Ueda M et al. : Acidic amino acid transport characteristics of a newly developed conditionally immortalized rat type 2 astrocyte cell line (TR-AST). *Cell Struct Funct* 26 : 197-203, 2001.
- 34) Yanai N, Obinata M : Oncostatin M regulates mesenchymal cell differentiation and enhances hematopoietic supportive activity of bone marrow stromal cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 37 : 698-704, 2001.
- 35) Mukai K, Nagasawa H, Agake-Suzuki R, Mitani F, Yanai N et al. : Adrenocortical precursor cell lines immortalized with a temperature-sensitive oncogene. *Eur J Biochem* 269 : 69-81, 2002.
- 36) Ohta S, Tabuchi Y, Yanai N, Asano S, Fuse H, Obinata M : Establishment of A Leydig Cell Line, TTE1, from Transgenic Mice Harboring Temperature-Sensitive Simian Virus 40 Large T-Antigen Gene. *Arch Androl* 348 : 43-51, 2002.
- 37) Tabuchi Y, Ohta S, Kondo T, Yanai N, Obinata M et al. : Development of a conditionally immortalized testicular Sertoli cell line TTE3 expressing sertoli cell-specific genes from mice transgenic for temperature-sensitive simian virus 40 large t-antigen gene. *J Urol* 167 : 1538-1545, 2002.
- 38) Asashima T, Iizuka H, Terasaki T, Hosoya KI, Tetsuka K et al. : Newly developed rat brain pericyte cell lines, TR-PCT 1, responds to transforming growth factor-beta1 and beta-glycerophosphate. *Eur J Cell Biol* 81 : 145-152, 2002.
- 39) Tabuchi Y, Arai Y, Ohta S, Shioya H, Takahashi R et al. : Development and characterization of conditionally immortalized gastric epithelial cell lines from transgenic rats harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Cell Struct Funct* 27 : 71-79, 2002.
- 40) Takeuchi K, Sakurada K, Endou H, Obinata M, Quinlan MP : Differential effects of DNA tumor virus genes on the expression profiles, differentiation, and morphogenetic reprogramming potential of epithelial cells. *Virology* 300 : 8-19, 2002.
- 41) Okubo T, Yanai N, Ikawa S, Obinata M : Reversible switching of expression of c-kit and Pax-5 in immature hematopoietic progenitor cells by stromal cells. *Exp Hematol* 30 : 1193-1201, 2002.
- 42) Araki Y, Suzuki K, Matusik RJ, Obinata M, Orgebin-Crist MC : Immortalized epididymal cell lines from transgenic mice overexpressing temperature-sensitive Simian Virus 40 large T-antigen gene. *J Androl* 23 : 854-869, 2002.
- 43) Kitano T, Iizasa H, Terasaki T, Asashima T, Matsunaga N et al. : Polarized glucose transporters and mRNA expression properties in newly developed rat syncytiotrophoblast cell lines, TR-TBTs. *J Cell Physiol* 193 : 208-218, 2002.
- 44) Saito Y, Yoshizawa T, Takizawa F, Ikegame M, Ishibashi O et al. : A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx 2/Cbfa 1/Osf 2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Sci* 115 : 4191-4200, 2002.

文献として本方法で樹立された細胞株についての発表論文をまとめており、表1の()の数字がこの文献番号に対応している。これらの研究成果は大学から企業までの多数の研究者との共同作業によるものであり、共同研究者に感謝したい。特に、トランスジェニックマウス、ラットの維持管理供給に多大なご協力をいただいた共同研究者の第一製薬 石橋光太郎氏、YS ニューテクノロジー研究所 上田正次所長に感謝したい。