

## 間葉系幹細胞の分化

大串 始\*

### はじめに

骨の中にある骨髄や骨の周囲を取り囲んでいる骨膜には間葉系幹細胞と呼ばれる幹細胞が存在する。この幹細胞は種々の細胞へと分化し、特に骨を形成する骨芽細胞や関節軟骨の構成細胞である軟骨細胞へ分化するのはよく知られている<sup>1,2)</sup>。しかし、これらの報告に加えて、この数年思いもつかない細胞へ分化する事が知られてきた。これらには、心筋細胞、血管内皮細胞、神経細胞、肝細胞等が含まれる(図1)。もし、このような細胞への分化を制御出来れば、種々の組織再生治療へとつながり、まさに夢の医療となる可能性を秘めている。本稿では、この間葉系細胞についての我々の研究成果ならびに最近の動向について概説する。

### 幹細胞とは

幹細胞 (stem cell) とは簡単に定義すると、自己

複製能を有し、さらに種々の細胞へ分化する能力を持った細胞である。当然発生初期にこの幹細胞があり、embryonic stem cell (ES 細胞) と呼ばれている。1998年にヒト ES 細胞を取り出し、培養増殖できたことが報告されて将来の再生医学への応用が期待されている<sup>3)</sup>。現在国際的に NIH に登録されているような ES 細胞の保持機関が 14 機関ある。日本におけるヒト ES 細胞の樹立に関しては京都大学の再生医科学研究所が樹立の確認を文部科学省から確認を受けている。通常使用される ES 細胞は他人の細胞由来であり、この細胞を用いての移植治療は、免疫抑制剤等を使用しない限り移植された細胞は拒絶される。しかし、韓国ソウル大学の Moon 教授率いるチームは、同意を得た女性から卵子と体細胞(卵丘細胞)を採取。核を除いた卵子に同じ女性の卵丘細胞の核を移植して作ったクローン胚を育て、ES 細胞を採取することに成功した<sup>4)</sup>。すなわち、自身の ES 細胞が確立できる可能性をしめした。しかし、ES 細胞は胎児に

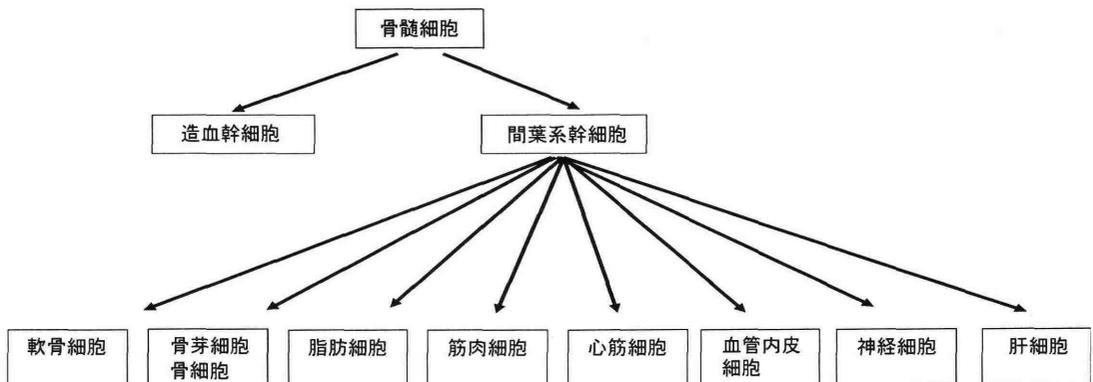


図1 骨髄由来間葉系幹細胞の種々細胞への分化

\*産業技術総合研究所関西センター(尼崎事業所)セルエン  
ジニアリング研究部門 組織・再生工学研究グループ

なりうる細胞であり、倫理的に考えると臨床応用するにはあまりにも大きな問題がある。

この ES 細胞に比し、成人 (adult) にも幹細胞の存在が知られている。よく知られているのは成人の造血幹細胞である。赤血球の平均寿命は 110 日で成熟した赤血球はもはや分裂できない、それどころか核を失っている。したがって、当然一連の前駆細胞が存在し、それらが絶えず分化して赤血球を作りだしてはならない。この前駆細胞は幹細胞より作り出される。すなわちこの成人幹細胞は自己複製能を有し必要に応じて前駆細胞へ分化する。

このような成人由来幹細胞が生体外において増殖可能で、さらに任意の刺激により種々の組織特異的細胞へ分化出来るなら、患者自身より取り出すことが可能でこの幹細胞を用いる利点は計り知れないものがある。この成人由来の幹細胞であるが、組織再生を念頭においての臨床応用を考える場合、どの幹細胞を選択すれば良いのであろうか。もちろん、採取する細胞が再生される組織へ分化する事が一番の条件である。その次に考えるのは、やはり容易かつ採取することによる患者への障害が少ないことが大事であろう。種々の細胞ソースが考えられる。例えば、脂肪、胎盤、臍帯血から多分化能を有する細胞がえられるとの報告がある。しかし、患者自身の細胞を用いることと、細胞採取による患者自身の障害を最小限に押さえることを考慮した場合、骨髄細胞は非常に魅力的である。骨髄は注射針 (骨髄針) により容易に採取可能で、この採取された骨髄には、上記に述べた造血幹細胞が存在するが間葉系幹細胞も存在する。間葉系細胞は造血幹細胞と異なり接着性の細胞であり、CD34, 45 等の造血幹細胞マーカーを発現しない<sup>5)</sup>。以下、この間葉系幹細胞の種々組織細胞への分化につき述べる (図1)。

### 骨芽細胞、骨細胞への分化

デキサメサゾン (Dexamethasone : Dex) が *in vitro* でラット骨髄に含まれる間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させることが報告され<sup>6)</sup>、また我々もこの現象を確認している<sup>7)</sup>。そこで、ヒト骨髄細胞を培養し間葉系幹細胞を増殖した。そして、トリプシンにより培養皿より細胞をはがし  $\beta$ -グリセロリン酸、

ビタミン C, Dex の存在あるいは非存在下で約 2 週間二次培養した。Dex 非存在下では細胞は fibroblastic な形態でシャーレ上を覆い尽くすように増殖する。しかし、Dex を加えることにより細胞の増殖はやや減弱するも比較的大きな細胞が多数出現し、それらの細胞周辺にはミネラルの沈着と思われる結節様の構造物が顕微鏡下に多数みられる。これらは alizarin red S に染まり、さらにカルセインの取り込みがみられることよりカルシウムが沈着していることが明らかである。以上の組織的所見は培養間葉系幹細胞が Dex の存在下に骨芽細胞へ細胞分化し、さらに *in vitro* で骨形成を引き起こしたことを示唆した。Jaiswal からも同様の報告をしている<sup>8)</sup>。しかし、種々の細胞培養においてもこのようなミネラルの沈着が起こることが知られ、この培養条件下の現象が真の骨形成でなく単なるカルシウムリン酸塩の沈着である可能性もある。

上記に述べた Dex 存在下での現象が単なるミネラルの沈着でなく、*in vitro* におけ骨塩沈着を伴った骨形成であることの証明には骨形成細胞である骨芽細胞の同定が必要となる。骨芽細胞は比較的大きな球形から立方体の形態を有する細胞であり、その細胞膜には豊富な Alkaline phosphatase (ALP) 活性を有する。さらに骨芽細胞は osteocalcin (オステオカルシン) あるいは bone Gla protein (BGP) と呼ばれる  $\gamma$ カルボキシルグルタミン酸を含んだ非コラーゲン蛋白を産生する。すなわち、高い ALP 活性とともにオステオカルシンが検出されれば、培養条件下に骨芽細胞が出現したことの証明にもなる。図2にみられるように Dex 存在下でのヒト間葉系幹細胞の培養により mineralization (石灰化) が起こる。この細胞層より蛋白を抽出してオステオカルシンの発現量を測定した。コントロール (dex を含まない培地でのヒト間葉系幹細胞の培養 : Dex-) に比し明らかに高い発現をしめした<sup>9)</sup>。また、ALP 活性も Dex 存在下ではあきらかに高い発現を示した (Dex+ALP activity)。以上のように、この石灰化が単なる石灰化でなくヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞へ分化過程をへて骨形成を示したことが確認できた。また、最近我々はこの *in vitro* での骨形成が生体内での骨形成と同様の 3 次元構造をもつことも報告している<sup>10)</sup>。さらに重要な点であるが、かなりの高齢のヒト骨髄でも間葉系幹細胞

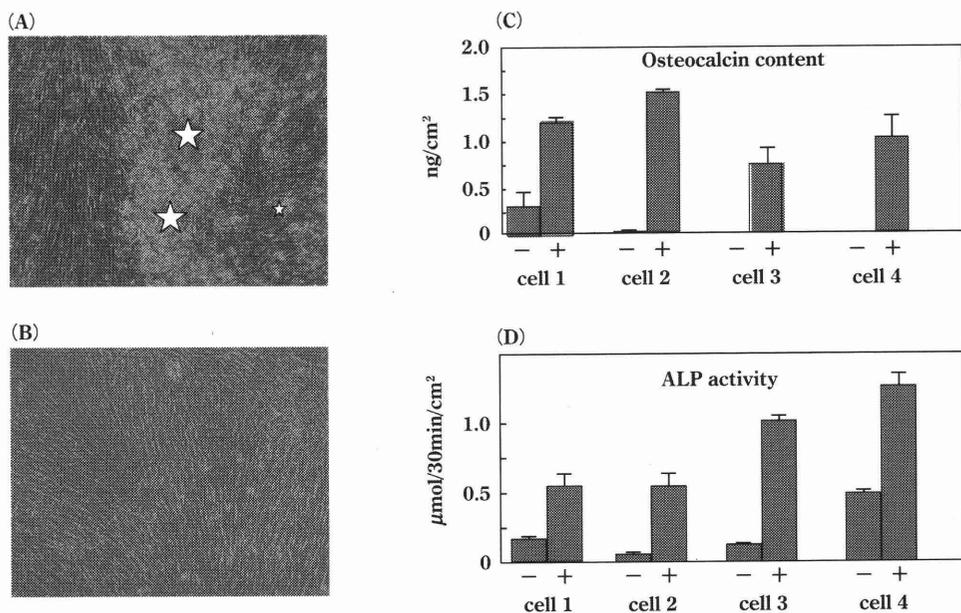


図2 ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養による骨形成

培養約 14 日で dexamethasone 存在 (+) では多数のカルシウムの沈着 (図A 石灰化: ☆印) が見られるが, dexamethasone 非存在下 (-) では間葉系細胞と思われる細胞の増殖が見られるも, 石灰化は見られない (図B). 培養細胞より総蛋白を抽出し, オステオカルシン蛋白を定量した (図C, ng/cm<sup>2</sup>). さらに, ALP 活性も測定した (図D,  $\mu\text{mol p-nitrophenol released per 30minutes/dish}$ ). このように, Dex+では明らかにこれら骨芽細胞のマーカーは高値を示した. 参考文献(9)より改変.

胞が増殖可能で, 例えば 80 歳の骨髄細胞でもこの *in vitro* の骨形成を示すことを確認している.

### 軟骨細胞

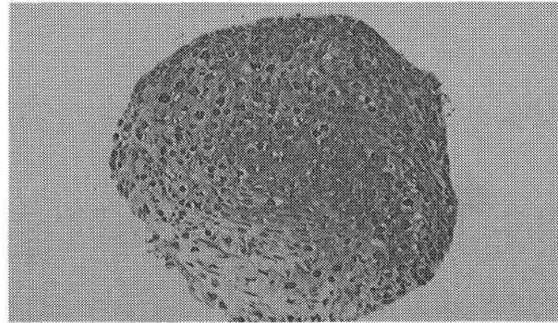
新鮮骨髄の生体内移植により骨芽細胞あるいは軟骨細胞が出現するのが知られている. これは骨髄に含まれる間葉系幹細胞の骨芽細胞・軟骨細胞への分化である<sup>11)</sup>. また, 培養により増殖された間葉系幹細胞も生体内での移植により同様の細胞分化が行われる<sup>12)</sup>. 上記に書かれているようにこの間葉系幹細胞は生体内ばかりでなく, 生体外でも培養操作により骨芽細胞に分化する. 同様に, 間葉系幹細胞を培養操作により軟骨細胞および軟骨基質を形成することが試みられている. 以前より, 間葉系幹細胞は高密度での細胞培養が軟骨細胞への分化に適しているとされている. また, TGF $\beta$ は未分化細胞の軟骨細胞への分化を刺激する事も報告されている. そこで, Caplan 等は骨髄より間葉系幹細胞を増殖して, 遠心することにより高密度の cell aggregate を作製した後 TGF $\beta$ の存在の下に培養を行った. この培養により cell ag-

gregate は軟骨基質を染める toluidine blue に濃染し, さらに免疫染色や遺伝子発現実験 (Northern blot) により軟骨基質に多く含まれる Type II ならびに Type X collagen が存在がこの cell aggregate に確認された<sup>13)</sup>. さらに, 我々は最近ヒト間葉系細胞を用いて, この軟骨形成が間葉系細胞の培養により起こること, さらにこの軟骨形成が TGF- $\beta$  と BMP-6 あるいは TGF- $\beta$  と IGF-1 の交互投与により促進されることを見出している<sup>14)</sup>.

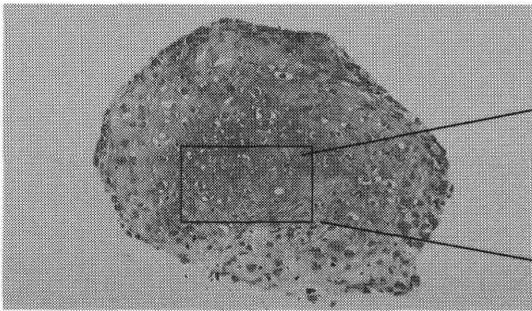
以上の結果は間葉系幹細胞の培養によりこの幹細胞が軟骨基質を含んだ軟骨細胞へ分化する事を示し (図3), この間葉系細胞を用いた軟骨再生治療が有用であることを示唆している<sup>12)</sup>.

### 筋肉細胞, 脂肪細胞

間葉系幹細胞の性質を有するマウス由来の cell line である C3H/10T1/2 は cytidine のアナログである 5-azacytidine を培地に添加する事により筋芽細胞, 脂肪細胞そして軟骨細胞へ分化する事が知られている. この 5-azacytidine は未分化細胞の筋肉細胞への分化を誘導する MyoD 遺伝子を活性化す



Anti collagen type 2



Toluidine blue

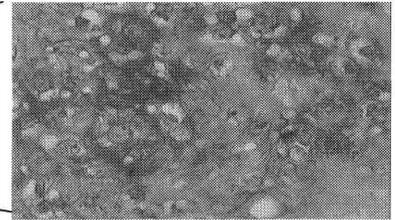


図3 ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養による軟骨形成

TGF-beta 存在下にヒト間葉系細胞を高密度(遠心によるペレット形成)に培養を行う。軟骨基質が豊富であることが、type 1 collagen ならびにトルイジンブルー染色が強陽性であることにより判る。

る事も知られている。ラット胎児の筋肉を培養する事により多核の myotube 類似の細胞が得られるが、脇谷等はラットの間葉系幹細胞の培養にこの 5-azacytidine を加えて同様の多核の細胞をして得られる事を報告している。この多核の細胞は時に収縮し、その収縮はアセチルコリンを添加することによりさらに強くなった。また、筋細胞に存在するミオシンも免疫染色により確認されている。さらに、この培養系でスダンブラックに染色される脂肪細胞の存在も確認している。このように、骨髄に含まれる間葉系幹細胞が筋細胞や脂肪細胞へ分化するポテンシャルを持つことを示した<sup>15)</sup>。

#### 心筋細胞への分化

上記の結果は間葉系幹細胞を用い筋ジストロフィーなど骨格筋の疾患への治療に応用出来ることを示す。また、骨格筋は増殖能があり MyoD のような分化誘導因子が確認されている。この骨格筋に比し、心筋の細胞は胎児期に増殖して、心臓の形態を持った後に、その増殖能はほとんどなくなるとされている。すなわち、生後間もなく最終

分化し、以後は細胞分裂を起こさない。さらに、この心筋細胞へ分化させる重要な分化調節因子がまだ見つかっていない。このように、間葉系幹細胞を用いても心筋への分化が非常に困難であることを示唆している。しかし、慶応大学の福田等<sup>16)</sup>はマウスの骨髄間葉系幹細胞の長期培養することにより、細胞株を作製した。この細胞に 5-azacytidine を負荷して、自己拍動を行う細胞集団を得た。これらの細胞の収縮蛋白質(アクチン、ミオシン等)のアイソフォームは胎児型心室筋にほぼ一致し、また細胞の活動電位は洞結節型と心室筋細胞型であり、時間経過とともに心室細胞型が増加した。さらに、遺伝子の発現パターンは胎児の未分化中胚葉細胞より心筋への分化過程に見られるのと同様のパターンであったと報告している。これらの結果は間葉系幹細胞が *in vitro* で心筋細胞へ分化したことを示唆する。また Toma 等はヒト間葉系細胞のヌードマウスへの移植により、間葉系細胞の心筋細胞への分化を報告している<sup>17)</sup>。さらに、国立循環器病センターの永谷等はマーキングした間葉系細胞の投与により心筋さらに血管内

皮へ分化できうることを確認するのみならず、心筋の機能亢進を証明している<sup>18)</sup>。

### 血管内皮細胞への分化

胎生期の血管の発生は、中胚葉細胞からの血液血管芽細胞 (hemangioblast) または血管芽細胞 (angioblast) と呼ばれる未分化細胞が血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) への分化を経る事により始まると考えられている。この胎生期の血管新生過程を血管発生 (vasculogenesis) を呼ぶ。このように EPC は胎生期に存在する細胞である。しかし、浅原等によりこの EPC が骨髄由来の細胞として末梢血中に存在することが報告された<sup>19)</sup>。また、この EPC の発見により、生体内での血管新生は、従来の血管内皮細胞の増殖・遊走による血管新生以外に、胎生期に起こる血管発生 (post-natal vasculogenesis) が起こりうる事が示唆された<sup>20)</sup>。この EPC は骨髄造血幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC) と共通の幹細胞から発生するとされ、HSC とともに CD34 等の細胞表面抗原を有する。

しかし、我々は CD34 等の血液幹細胞抗原が陰性である間葉系細胞を多孔体のセラミックとともに移植することにより、多孔体のセラミック気孔内に新生血管を誘導し、さらにその新生血管内皮細胞がドナーである間葉系細胞由来であることを見出した<sup>21)</sup>。このように、血管発生 (post-natal vasculogenesis) が CD34 陰性の間葉系細胞により起こりうる。実際、種々のモデルを用いて間葉系細胞移植により新生血管再生が起こりうる事が報告されている。また、上記にも引用したが、永谷等は間葉系細胞の投与により心筋内での新生血管の増殖を証明している<sup>18)</sup>。

### 神経細胞への分化

Azizi 等はヒト骨髄間葉系幹細胞を直接ラットの脳内へ注入して数日から 72 日間で観察したところ、このヒト細胞は間葉系幹細胞が持っているコラーゲンタイプ I の消失やフィブネクチンの発現の低下とともに、アストロサイトの性質を持つようになったと報告している<sup>22)</sup>。また、Sanchez-Ramos 等はマウスの骨髄細胞から表面マーカーの選択により血液幹細胞をのぞき間葉系幹細胞の培養を行った。すなわち、Scal 陽性細胞を除去し、ファイ

ブネクチン陽性細胞の多い細胞集団を得た。そしてこれらの間葉系幹細胞を retinoic acid と BDNF の存在下に培養すると、ファイブネクチン陽性細胞の率の減少が起こり、nestin, neuron-specific nuclear protein (NeuN) さらに glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性の細胞の出現を観察している<sup>23)</sup>。また、興味深いことに、この間葉系幹細胞を mesencephalic もしくは striatal cell と共培養すると、間葉系幹細胞の NeuN 陽性細胞は間葉系幹細胞のみの培養より 2 倍以上であったと報告している。この事は神経細胞を多く含む組織内での間葉系幹細胞の神経細胞への細胞分化が生じやすい事を示唆している。また、この報告ではマウスのみならずヒト骨髄間葉系幹細胞についてもほぼ同様の結果を得ている。さらに、Kohyama や Deng 等も同様に *in vitro* での培養により間葉系細胞の神経細胞への分化を報告している<sup>24,25)</sup>。以上の報告より、間葉系細胞あるいは間葉系細胞由来分化神経細胞を用いて、種々の神経疾患への応用展開が今後期待出来ると思われる。

### 肝細胞への分化

肝臓が障害を受けたときには oval cell と呼ばれている細胞が増殖し、肝細胞に分化すると言われている。すなわち、oval cell は肝臓における幹細胞として役割を果たす可能性がある。1999 年に Petersen 等は雌ラットに雄ラットの骨髄を移植し、その後化学物質により肝障害を起こした。肝障害を起こした 9 日には肝細胞に雄細胞を示す Y 染色体のマーカーは PCR によって検出されなかったが、oval cell が肝細胞へ分化しはじめる 13 日には肝細胞に Y 染色体のマーカーが検出された。また、*in situ* hybridization でも 9 日にこのマーカーが oval cell に検出され、13 日には肝細胞にも検出された。雄細胞は移植された骨髄にのみ含まれるので、雌肝細胞に Y 染色体が検出されたことは骨髄由来の細胞が肝細胞へ分化したことをしめす。彼らは 0.14% の肝細胞が Y chromosome に陽性であったと報告し、雄骨髄由来の細胞は  $9.9 \times 10^5$  であったと推測している。また、このような Y 染色体のマーカーの検出実験のみならず、ある種の酵素 (dipeptidyl peptidase) の欠損ラットにこの酵素を有している骨髄を用いて同様の実験を行い、0.16% の

肝細胞が骨髄由来であったと計算している。はたして、この再生肝細胞が骨髄間葉系幹細胞由来であるかは不明であるが、少なくとも骨髄由来の細胞が肝細胞へ分化しうる可能性を示した初めての報告である<sup>26)</sup>。最近では骨髄からの間葉系細胞を用いて *in vitro* 条件下に肝細胞へ分化し得る事が種々報告されている。例えば、我々も確認しているが、Wang 等は HGF の投与によりラットの間葉系細胞がアルブミンと alpha-fetoprotein の発現する細胞の出現を報告している<sup>27)</sup>。さらに、寺谷工等は培養間葉系細胞にアルブミンプロモーターの下流に GFP 遺伝子を導入して、GFP 陽性細胞が 70% 検出できたことを今年の再生医療学会で発表している。すなわち、*in vitro* で間葉系細胞の肝細胞への分化を惹き起こす事が可能である。

## 考 察

ES 細胞はあらゆる組織へ分化すると言われ、この潜在的な能力を考えると再生医療に用いるには魅力的な細胞と考えられる。しかし、倫理的な問題や腫瘍発生の危険性、またその分化能力はたやすく種々の細胞へ分化する為いかにしてその細胞分化を制御するかの問題点がある。これに比し、成人由来の骨髄間葉系幹細胞の種々細胞への分化能力は、種々臓器不全に対する再生医療の可能性を秘めている。実際、我々はこの患者由来の間葉系細胞を用いて骨軟骨再生治療を 2001 年より行っている<sup>28,29)</sup>。

骨髄に含まれる有核細胞にはこのような間葉系幹細胞がどのくらいの割合で存在するのであろうか。一説によると  $1/1 \times 10^9$  と計算されていて、その数は非常に少ない<sup>2,30)</sup>。また、その幹細胞の細胞マーカーも同定されていない。しかし、臨床応用を考える場合、時にはその分化した細胞が多く含まれれば、細胞集団は pure でなくても機能不全に陥っている臓器を再生する事は可能であると思われる。この点において、最近多分化能を有する幹細胞を純化させる試みもなされている。Verfaillie 等は骨髄細胞から MAPC と呼ばれる多分化能を有する細胞のクローニングに成功している<sup>31)</sup>。この MAPC と間葉系幹細胞との関係等に関しては不明な点があるが、そのすぐれた増殖能や分化能から、今後はこのような、純化された細胞を用いての移植治療が行われる可能性がある。

最近、骨髄由来幹細胞の多分化能について細胞融合の可能性が指摘されている。すなわち、幹細胞の多分化能は幹細胞自身が分化するのではなく、分化されている既存の細胞との融合により起こりうる事が報告されている。紙面の関係上この詳細は述べることは出来ないが、細胞融合の起こりうる可能性はありうるも、すべての分化現象をこの融合のみでは説明することは困難である。特に、*in vitro* での細胞分化をこの融合では説明できない。また、移植された幹細胞が組織障害を受けている部位で homing し得た場合、たとえ、部分的に細胞融合が起こったとしても、この移植により組織障害を克服できうるなら、臨床的には非常に意義があると思われる。すなわち、移植による機能改善を確認することが非常に大事である。

以上述べたように、成人の骨髄には種々の細胞へ分化し得る間葉系幹細胞が含まれるが、この骨髄は比較的容易に採取できる。入院等を要せず、局所麻酔を用いることで疼痛もコントロール出来、外来レベルでも十分に採取可能である。また、患者由来のこの間葉系幹細胞を用いることにより、すなわちドナー細胞は患者自身の細胞であるため、免疫反応や未知の感染症を防ぎ得る。最近、我々は国立循環器病センターとの共同研究により、この患者自身の間葉系細胞を用いた心・血管再生医療を開始した。近い将来これらの疾患のみならず、他の疾患への応用展開ができうる可能性があり、種々疾患に対する臓器移植を回避できうる時代の到達が期待される。

骨髄間葉系細胞を用いた骨・軟骨再生研究は奈良県立医大整形外科、公衆衛生、口腔外科の先生方の御協力をいただき深謝いたします。また、産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門、組織・再生工学研究グループの皆様の御協力を得ました。血管再生、心筋再生の研究においては、国立循環器病センター再生医療部室長の永谷憲歳先生ならびに北村惣一郎総長の御指導ならびに助言をいただき深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Owen M: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: Peck WA, editor. Bone and Mineral. vol. 3. Amsterdam: Elsevier; 1985. p.1-25.
- 2) Ohgushi H, Caplan AI: Stem cell technology and bioce-

- amics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 1999; 48: 913-27.
- 3) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
  - 4) Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, et al: Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303: 1669-74.
  - 5) Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, et al: Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 2004; 28: 33-9.
  - 6) Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1998; 254: 317-30.
  - 7) Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, et al: In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 1996; 32: 333-40.
  - 8) Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, et al: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64: 295-312.
  - 9) Kitamura S, Ohgushi H, Hirose M, et al: Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics. *Artif Organs* 2004; 28: 72-82.
  - 10) Kihara T, Oshima A, Hirose M, et al: Three-dimensional visualization analysis of in vitro cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 943-8.
  - 11) Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI: Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res* 1989; 7: 568-78.
  - 12) Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 579-92.
  - 13) Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, et al: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238: 265-72.
  - 14) Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, et al: Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 914-9.
  - 15) Wakitani S, Saito T, Caplan AI: Myogenic cell derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; 18: 1417-26.
  - 16) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
  - 17) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al: Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-8.
  - 18) Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al: Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol-Heart C*. in press.
  - 19) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
  - 20) Isner JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; 103: 1231-6.
  - 21) Akahane M, Ohgushi H, Kuriyama S, et al: Hydroxyapatite ceramics as a carrier of gene-transduced bone marrow cells. *J Orthop Sci* 2002; 7: 677-82.
  - 22) Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, et al: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3908-13.
  - 23) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164: 247-56.
  - 24) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, et al: Brain from bone: efficient “meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 2001; 68: 235-44.
  - 25) Deng W, Obrocka M, Fischer I, et al: In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 148-52.
  - 26) Petersen BE, Bown WC, Patrene KD, et al: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-9.
  - 27) Wang PP, Wang JH, Yan ZP, et al: Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 712-6.
  - 28) Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T: Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton. *Novartis Found Symp* 2003; 249:118-27.
  - 29) Ohgushi H, Kitamura S, Kotobuki N, et al: Clinical application of marrow mesenchymal stem cells for hard tissue repair. *Yonsei Med J* 2004; 45: 61-7.
  - 30) Vogel G: Can old cells learn new tricks? *Science* 2000; 287: 1418-9.
  - 31) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-9.