

ボストンでの研究留学を終えて

小林 泰浩

総合歯科医学研究所

はじめに

2004年6月1日から2005年6月30日の期間ハーバード大学医学部マサチューセッツジェネラルホスピタル、内分泌学部門、クローネンバーグ教授の下で研究する機会を与えていただいた。わずか1年という短い期間であったが、日本では体験することのできない貴重な経験をすることができた。このレポートを通じて、これから研究留学を目指している若手の先生方のお役に少しでも立てればと思う。

ボストン

私が留学したハーバード大学は、マサチューセッツ州ボストンにある。ボストン（人口約60万人）はアメリカ東海岸に位置し、アメリカの独立戦争の舞台となった都市である。冬の気候は、塩尻よりやや寒い感じである。夏は、日本のように梅雨がないため過ごしやすいが、非常に短い。塩尻と同じように初夏には、一斉に花が咲くため、美しい街であった。

ボストンは、ニューヨークのような大都市ではないが、ハーバード大学、マサチューセッツ工科大学、ボストン大学など多数の大学が集中する学園都市である。学園都市であるためなのかどうか分からないが、ボストンは、アメリカの中でも治安のいい都市の1つであるように思う。このように非常に学際的に恵まれたすばらしい環境で約1年間留学生活を送ることができた。また、日本人が多いためか、日本の食料品を扱うスーパーが2軒ほどあり、簡単に日本の食品を購入することができた。アメリカ系のスーパーで、すしや豆腐が

普通に売られているのには非常に驚いたことを覚えている。

アメリカに到着して、まず始めたことは、住居探しである。単身赴任であったので、それほどブレッシャーはなかったが、つたない英語で家を探すことは困難を極めた。ボストンの空室率は5%ぐらいしかないそうである。そのうえ、ボストンは家賃が高い（アメリカでは家賃が高い都市のベスト3に入る）。1ベッドルームで1300ドル以上、1人用のスタジオで1000ドルから1200ドルが相場の家賃らしいのである。1週間のホテル住まいで何とか住居をきめて、落ち着くことにした。賃貸の契約をするために、銀行に口座を開設しなければならなかった。アメリカの銀行のシステムは日本と少し異なる。電気料金や家賃の支払いは、小切手を使って行う。日本では、銀行引き落としが普通と思っていたので、非常に不便であった。帰国直前によくインターネットを使って自分の口座から引き落とすシステムになった。家を決めたら次は電気の契約である。電気の申し込みは本人が電話をかけて申し込まなければならなかった。しかし、応対してくれた人の英語がさっぱりわからず、日系のオペレーターに通訳してもらい、ようやく契約ができた。

私がいるときにボストンに留学してきた長崎大学時代の友人に聞いた話によると、ボストンにある日系の不動産会社に依頼すると家探しから、電気、電話の開通などほとんどのセットアップを代行してくれるそうである。留学前には、その国の言語の学習はもちろん、いろいろな情報を集めて余裕をもって準備をすることをお勧めする。単身でいく場合、私のような場当たりのセットアッ



図1：ブルデンシャルタワーから見たチャールズ川とMGH（矢印）

ブも度胸を試すにはいいかもしれないが、お勧めはできない。

研究室

私が留学したマサチューセッツジェネラルホスピタル (MGH), 内分泌学部門は、世界に先駆けて副甲状腺ホルモンおよび副甲状腺ホルモン受容体のクローニングとこれらの分子の役割の解明を行ってきた研究室である。現在は、私の留学を受け入れてくださったクロネンバーグ教授が総指揮をとられている。この部門には、7つの研究グループがあり、脈々と副甲状腺ホルモンおよび副甲状腺ホルモン関連たんぱくに関する研究を続けている。

それぞれのグループには、Principal Investigator (P.I.) 1人と4, 5人のポストドクとテクニシャンがいる。P.I.は、自分自身でNIHなどのグラントを取得し、経済的に独立した研究者である。P.I.は、自分のグループのポストドクとテクニシャンを自分の取得した資金で雇用する。アメリカのどこの大学もそうであるように、ここもアメリカ人のポストドクは意外と少ない。おかげで、ドイツ人、中国人、日本人、フランス人、イタリア人、インド人など様々な国籍の人と友人になることができた。留学した後わかったことであるが、マサチューセッツジェネラルホスピタル、

内分泌学部門には、今までに多くの日本人内分泌学者が留学しているそうである。私の滞在中、私を含め4人の日本人が研究者として所属していた。

また、MGHには、DNA配列の解析やオリゴDNAを合成するコアファシリティーと呼ばれる部門や組織切片を作製する部門があり、非常に研究を行う上でのシステムが充実していた。一方で、日本では20年ぐらい前に使われなくなったような吸光度計や遠心機が今でも現役で働いている。アメリカ人はどうも古いものを大切にすることを好むようである。

研究生活

クロネンバーグ教授は、この内分泌学部門の総指揮をとるとともに、彼自身のグループの研究指導を週一回のリサーチミーティングを通して行っていた。内科医として臨床も行っており、非常に多忙なため、ラボで見かけることは少なかった。

1週間のスケジュールは、月曜と火曜日の午前中1時間ぐらいかけてグループミーティングを行う。ここでは、実験の進行状況を他のグループのメンバーも交えて論議する。月1回カルシウムラウンドという口演会がエーテルドーム (1847年に世界で初めてエーテル麻酔による公開手術が行わ

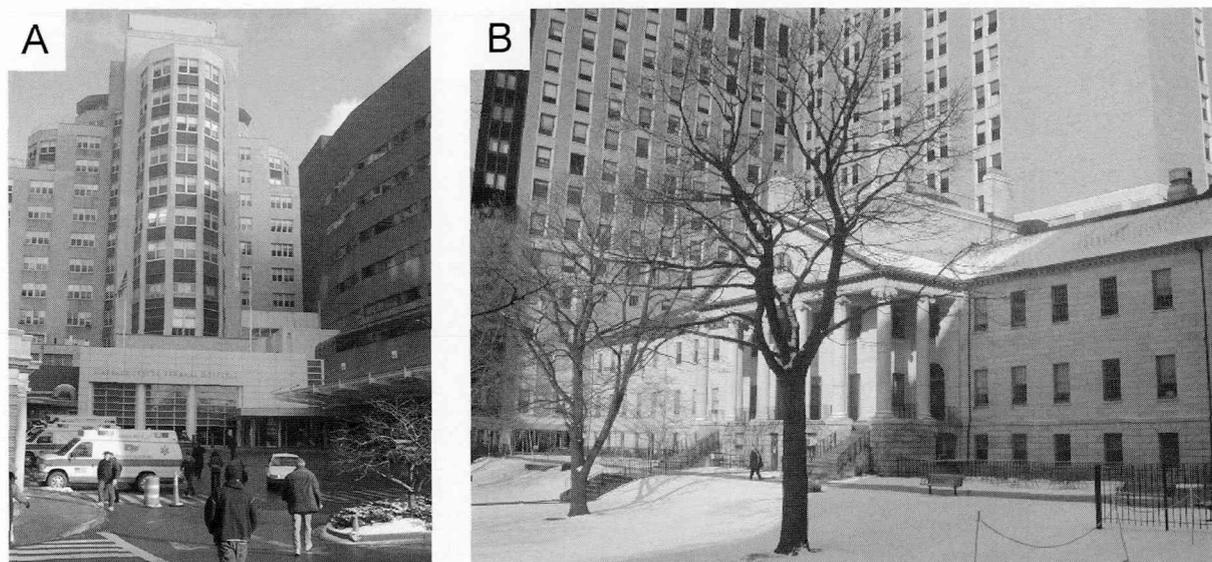


図2：MGHの正面玄関(A)とエーテルドーム(B)

れた)で開催され、ハーバード内外の研究者の研究内容を聞くことができた。論文紹介一週間に一回行われていた。紹介される論文は特に骨の領域にこだわらず広い領域のテーマの論文が紹介されていた。金曜日にはクッキートークと呼ばれるリサーチミーティングが昼に開かれ、論文投稿に近いまとまった研究内容をクッキーやランチを食べながら議論していた。

クローネンバーグ教授は、軟骨の発生過程における副甲状腺ホルモン関連たんぱく質の役割を主に研究している。私は、大学院卒業以来、骨を吸収する破骨細胞に興味を持って研究を続けてきた。このように研究対象が異なるにもかかわらず、私がクローネンバーグ研究室を留学先として選んだ理由は以下のとおりである。クローネンバーグ研究室は、軟骨の発生過程に関与する分子の役割を、生体内で証明することに非常にこだわりを持って行っている。すなわち、遺伝子操作したマウス(遺伝子欠損マウスやトランスジェニックマウス)を使って、自分の興味ある分子の生体における機能を解析するのである。クローネンバーグ研究室に留学すれば、生命現象に重要な分子を生体内で証明する方法をきつと習得できるはずだと確信を持てた点である。

私の最初のテーマは、軟骨細胞の分化を調節するホルモンとして知られる副甲状腺ホルモン関連たんぱく質の分泌調節機構の解明であった。副甲状腺ホルモン関連たんぱく質は、発生過程において、

軟骨の periarticular chondrocytes が分泌する。その受容体は、periarticular chondrocytes が分化した前肥大軟骨細胞が発現しており、副甲状腺ホルモン関連たんぱく質は、その受容体を有する前肥大軟骨細胞に作用し、肥大軟骨細胞への分化を抑制する。また、前肥大軟骨細胞は、インディアンヘッジホッグというタンパク質を分泌し、このインディアンヘッジホッグが、periarticular chondrocytes に作用し、副甲状腺ホルモン関連たんぱく質の分泌を促すことが知られている。この機構は、クローネンバーグ研究室で、遺伝子変異マウスを使い証明されてきた。

私のテーマは、インディアンヘッジホッグが、periarticular chondrocytes に直接作用して、副甲状腺ホルモン関連たんぱく質の分泌を促すのか? 別の因子の分泌を介して間接的に作用しているのか? を生体内で証明するものである。このシンプルな質問を生体内で解明する方法として、キメラマウスを作ることになった。キメラマウスとは、異なる遺伝子バックグラウンドを持った細胞が混ざり合った状態で発生したマウスである。このキメラマウスの作製は、現在行われている遺伝子欠損マウスを得るために必須な過程である。インディアンヘッジホッグのシグナル伝達に必須である *smoothed* のホモ欠損の periarticular chondrocytes が野生型の periarticular chondrocytes に囲まれており、野生型の細胞が副甲状腺ホルモン関連たんぱく質を分泌し、ホモ欠損の細胞が分泌

していなければ、インディアンヘッジホッグのシグナルは、periarticular chondrocytesに直接作用していることが証明できるという戦略である。

私はインディアンヘッジホッグのシグナル伝達に必須である *smoothened* のホモ欠損 ES 細胞と野生型の細胞からなるキメラマウスの作製に取りかかった。*smoothened* は、マウスの脊髄の発達などに重要な分子であり、*smoothened* のホモ欠損マウスは受精後9.5日つまり軟骨ができる以前に死んでしまう。ホモ欠損細胞の割合が高すぎると、そのマウスは、キメラにもかかわらず発生途中で死んでしまう。さらに、後にわかったことであるが、遺伝子が正常な ES 細胞を用いた場合においても、キメラマウスが発達する割合は、仮親の子宮に移植した胚の中で、せいぜい25%程度である。すなわち、戦略はシンプルであるが、非常に困難な実験であることが予想された。

ここで、キメラマウスを作製する方法を説明する。キメラ胚を作る方法は、2種類ある。1つは受精後3.5日胚 (blastocysts) の胚盤胞腔に特殊なニードルを使って ES 細胞を打ち込む blastocyst-injection 法ともう1つは受精後2.5日胚 (8細胞-桑実胚) と ES 細胞を共培養する会合法である。

まず、特殊な技術が必要でなく比較的簡単な会

合法で、キメラマウスを作製を試みた。しかし、この方法は、今までにこの研究室で行われたことがなく、初めての試みであった。会合に使う ES 細胞の数を10個から5個さらに3個と徐々に減らして、どの条件で効率よくキメラマウスができるか検討した。会合法の場合キメラ細胞の割合が高くなる傾向があるため、ES 細胞を10個または5個用いたものは、ほとんど発達しなかった。3個用いたものでは、正常に発達するマウスは増えるもののキメラでないマウスが増えた。結局、約250個のマウスキメラ胚を移植して2匹のキメラマウスを得ることができた。

これと同時に blastocyst-injection 法で、キメラマウスの作製を試みた。この方法は、顕微鏡下で、ホールディングピペットに固定した胚盤胞の細胞間隙にニードルを挿入し、ES 細胞を胚盤胞腔に打ち込む特殊な技術が必要である。数回の練習で、この技術を習得できたものの、それから5ヶ月間という長い間キメラマウスはできなかった。この技術だけは、人から習うことができない。成書で理解しても、手が動かないとニードルを挿入することができない。試行錯誤を繰り返して、会得するしかない。さらに、キメラマウスを作る技術は、非常に実験ステップが多いのに加えて、各々のステップの完成度が高くないと正常なマウスは発達しない。この点では、まさに神が

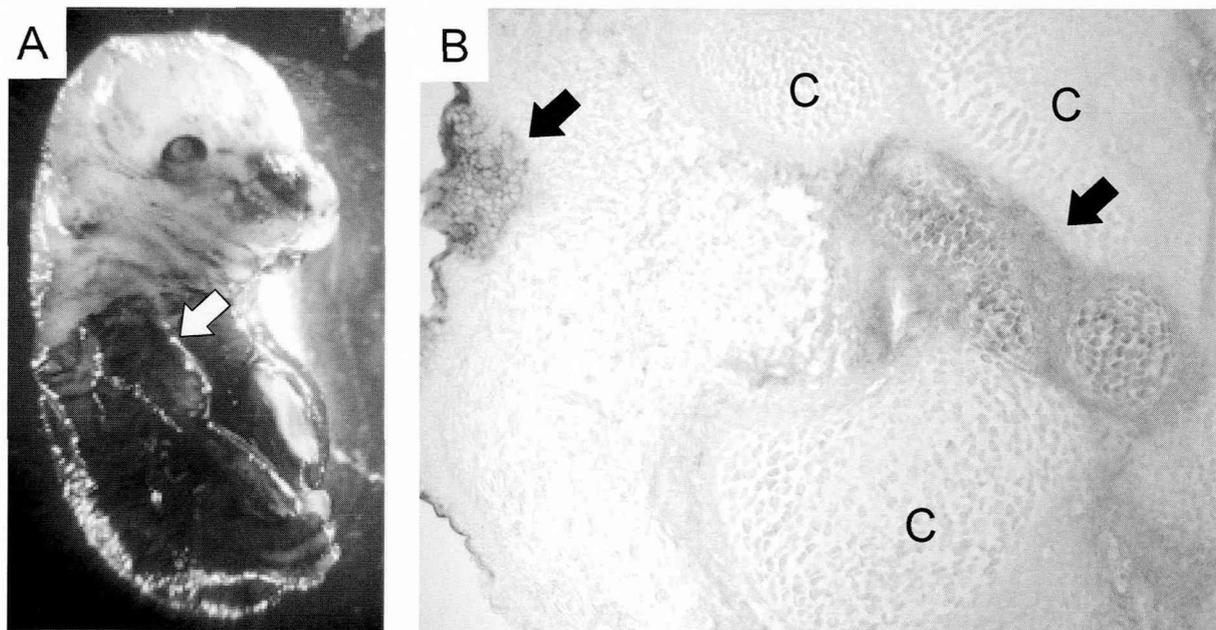


図3：作製した *smoothened*^{-/-}キメラマウス(A)と手背軟骨の組織像(B)

smoothened^{-/-}ES 細胞には、b-galactosidase 遺伝子が組み込んであり、その活性を染めることで、ES 由来の細胞が簡単にわかる。濃く染色されている細胞が *smoothened*^{-/-}細胞 (矢印)。C；軟骨細胞

創ったものへの人類の挑戦という感じである。

blastocyst-injection 法においても、15個から20個の数の ES 細胞を打ち込んだ胚は、ほとんど発達しなかった。5個の細胞を打ち込んだものは、ほとんどのものが発達するもののキメラマウスではなかった。しかし、キメラマウスではないが移植した胚の約8割がマウスに発達したことから、この段階での胚の移植技術は成功していることが考えられた。1週間に2回のペースで、blastocyst-injection と仮親への移植を続けた。しかし、キメラマウスができないまま時間だけが無駄に過ぎていった。この実験をあきらめかけた2005年5月に移植した胚の約3割がキメラマウスとして発達した。結局、ES細胞をインジェクションした約200個の胚を仮親の子宮に移植し、6匹のキメラを得ることができた。キメラ率の高いマウスは、下顎骨、四肢の形成不全が認められた。現在、このキメラマウスの四肢の切片を作製し、副甲状腺ホルモン関連たんぱく mRNA を検出して

いる。

終わりに

1年間という短い期間であったが、困難なテーマを実現化する努力によって、幾つかの貴重な友人関係を築くことができたと感じている。同時に、ES細胞をマウスにする貴重な技術を習得することができた。また、失敗を繰り返しても決してあきらめないクローネンバーグ教授の生命現象の謎を解明することに対する執着心と可能な限りシンプルな手法で謎を解明しようとする姿勢は、今回の留学で学ぶべき点であったと感じている。

稿を終えるにあたり、海外留学の機会を与えてくださいました高橋直之教授に深甚なる謝意を申しあげます。さらに様々なご援助、励ましをくださいました小澤英浩学長、宮沢裕夫教授、宇田川信之教授、王宝禮教授、本学大学関係者の皆様、総合歯科医学研究所の皆様に厚く御礼申し上げます。