

【第110回生涯教育講座】

間葉系幹細胞の臨床応用とその効果

まつ ざき ゆ み みや もと けん いち
松 崎 有 未 宮 本 憲 一

キーワード：間葉系幹細胞，幹細胞移植，免疫調節，難治性疾患

要 旨

間葉細胞は様々な臓器において実質細胞の隙間を埋め、成熟細胞の生存や実質細胞中の幹細胞の未分化性を維持する役割を持つとされてきたが、近年では支持機能にとどまらず免疫炎症メディエーターとしての役割が示唆され着目されている。また間葉細胞の起源である間葉系幹細胞は骨髄を始め様々な組織に存在し、それらが持つ遊走能と免疫調節能が多くの難治性疾患の細胞治療に有効であると期待されている。本稿では、間葉系幹細胞についてのこれまでの研究の背景、組織再生を目指した基礎研究の実際、そして今後の再生医療への応用に向けて間葉系幹細胞研究が抱える問題点などについて概説する。

はじめに

近年の幹細胞生物学における急速な技術発展に伴い、これまで様々な難治性疾患に対して期待されていた組織再生による治療、すなわち再生医療が益々脚光を浴びるようになった。幹細胞とは、自己複製能と多分化能を有する細胞であり、大きく胚性幹細胞 (embryonic stem cells, ES 細胞) と体性幹細胞 (somatic stem cells) の2つに分けられる。ES 細胞は受精卵の胚盤胞より樹立される幹細胞で、個体を構成するすべての組織の細胞に分化する能力 (pluripotency) を持つ。一方、体性幹細胞は個体が成長した後にも様々な組織に

存在しており、限局的ではあるが体性幹細胞が属する組織を構成する種々の細胞に分化する能力 (multipotency) を持つ (図1)。

組織を構成する細胞には、その組織の主な機能を担う細胞 (実質細胞) とそれを支持する細胞 (間質細胞) とがあり、その特徴が最もよく知られているのが骨髄に存在する造血幹細胞 (HSCs) と間葉系幹細胞 (MSCs) である (図2)。骨髄での実質細胞である HSC は、赤血球や白血球など様々な機能を持つ細胞に分化する。一方、間質細胞である MSCs は、実質細胞の隙間を埋め、かつ HSCs を機能的に支持する役割を担っている。また、近年、MSCs は損傷を受けた組織の修復と損傷部位での免疫調節にも関与していることが報告されている。このことから、MSCs は今後の難治性疾患に対する細胞治療の有用なリソースとし

Yumi MATSUZAKI et al.

島根大学医学部生命科学講座腫瘍生物学

連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部生命科学講座腫瘍生物学

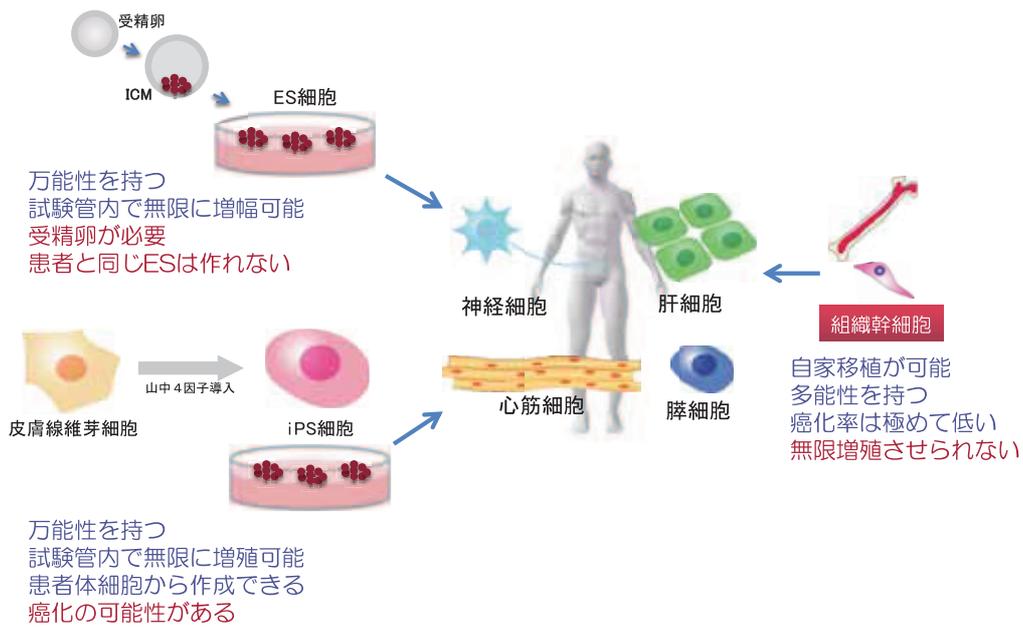


図1 再生医療応用が期待される3つの幹細胞

細胞を利用した再生医療の確立に向けて様々な細胞が研究されている。しかしながら、体細胞では増殖能力が低いことや、ES細胞では受精卵を用いることから倫理的問題、また本人の細胞ではないため免疫拒絶されてしまうという問題が生じている。近年開発されたIPS細胞は、それらの問題をクリアする画期的な細胞だが、ウイルス導入しているため安全性や、腫瘍化などの問題が残っている。一方、組織幹細胞の中でも、特に骨髄幹細胞は本人から採取でき、増殖能・多分化能があるため、比較的問題が少なく、すでに臨床応用も行われている。

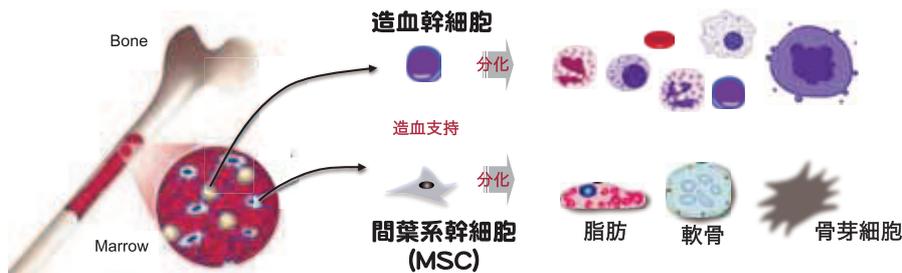


図2 骨髄中に存在する2つの幹細胞

血液を構成する細胞は骨髄の中にあり、血液細胞は造血幹細胞から一生を通じて産生(供給)されている。一方、造血幹細胞が体内でずっと造血し続けるために必要な因子を提供しているのが間葉系細胞であり、この働きを造血支持能と呼ぶ。間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)は造血支持機能とそれ自身が骨・軟骨・脂肪等に分化する能力を持つ、造血幹細胞とは別の働きを持つ幹細胞で、造血幹細胞と同様に骨髄に存在する。

て注目され、多くの研究グループによって盛んに研究されている。

1. 間葉系幹細胞とは

間葉系幹細胞は、1900年代後半に Friedenstein らによって、培養皿への接着性を持ち、骨への分化能を持つ細胞 (colony forming unit-fibroblast; CFU-F) として報告された¹⁾。その後、Pittenger らによって自己複製能および骨、脂肪、軟骨への分化能を有することが示された²⁾。MSCs を特徴づけるために多くの研究グループにより細胞表面タンパク、サイトカイン、細胞外マトリクス、成長因子レセプターの発現が報告され、現在では培養皿に接着し、CD73, CD90, CD105 陽性かつ CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a 陰性を示し、in vitro で骨、脂肪、軟骨への分化能を有することが MSCs の特徴を示す最小基準として提唱されている³⁾。また、MSCs は骨髄以外にも、滑膜⁴⁾、脂肪⁵⁾、臍帯^{6,7)}、胎盤⁸⁾、歯髓⁹⁾など様々な組織からも単離されており、それぞれの組織の損傷修復および恒常性の維持など組織の機能を維持するのに重要な役割を担っていると考えられている。

2. 間葉系幹細胞の臨床応用

幹細胞を用いた細胞治療においては、1) 移植した幹細胞が目的とする損傷部位に生着すること、2) 移植後の幹細胞が安全に機能すること、等が重要である。1) については多くの場合、損傷部位に直接投与 (局所移植) することで対処されるが、その分患者への負担も大きく、2) については、レシピエント側がドナーである幹細胞を攻撃 (拒絶反応)、あるいは骨髄移植などの血液を含む組織の移植の際に起こるドナー側からレシピエン

トに対する攻撃 (移植片対宿主病) というリスクを伴う。MSCs が持つ多分化能と免疫調節能は、それらの問題に対して有利に働くと期待されており、前者は損傷した細胞を移植した幹細胞から産生された機能的な細胞と置換することで機能回復を狙う目的があり、後者は MSCs から分泌される TGF1-β や HGF が T 細胞の分化を、LIF や INF-γ が T 細胞および NK 細胞の増殖を抑制することなどから¹⁰⁾、炎症・免疫抑制作用および、分泌因子による機能細胞の活性化を狙うものである (図3)。このようなことから、MSCs は様々な難治性疾患の細胞治療に有効であると考えられ、既に世界各国で臨床研究が行われている ([http:// www.clinicaltrials.gov/](http://www.clinicaltrials.gov/))。



図3 間葉系幹細胞 (MSC) を用いた細胞治療

間葉系幹細胞の機能は、大きく3つに分けられる。1) 機能細胞の生存を支持する支持機能、2) 分泌因子による免疫抑制作用、3) 細胞そのものが持つ分化能、である。

また投与方法には局所投与と経静脈投与の2つがある。特定の疾患に対し有効な治療効果を得るためには、細胞機能を理解した上でそれを活かすための適切な投与方法を選択することが重要である。

1) 筋ジストロフィー (Myodystrophy)

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、X連鎖劣性遺伝の進行性筋機能低下を特徴とする遺伝性疾患で、Xp21 に位置するジストロフィン遺伝子の異常が原因である。患者は男児3500人に一人の割合で出生し、ほとんどの患者が20歳までに死に至る重篤な先天性筋疾患である。Goncalves らは、骨髄由来の MSCs は筋細胞にも分化させることができ、さらに DMD 患者由来の筋芽細胞と共培養・分化誘導を行うことで MSCs と筋芽細胞が融合し筋管が形成されることを報告した¹¹⁾。同様の方法を用いて、Vieira らは融合によって形成された筋管でジストロフィン発現量の増加が見られることを報告した¹²⁾。さらに、Li らは、ラット MSCs をユートロフィン/ジストロフィンダブルノックアウトマウス (DMD モデルマウス) に移植すると、ライフスパンの延長、運動機能の改善および筋肉組織におけるユートロフィンとジストロフィン発現量の上昇が見られたことを報告した¹³⁾。生体内でのこのような効果の詳細なメカニズムは不明であるが、DMD モデルマウスである *dmx* マウスの筋肉には M1 マクロファージが存在しており、それが発現している IFN レセプターや iNOS が炎症作用や細胞障害をもたらしている¹⁴⁾。一方、MSCs は PGE2 を産生し、マクロファージの IL-10 分泌を促進する¹⁵⁾。これらのことから、DMD マウスの筋組織でも移植した MSCs が筋組織内のマクロファージに作用し IL-10 の分泌を促すことで抗炎症作用をもたらしているのではないかと考えられる。

2) アルツハイマー病 (Alzheimer Disease)

アルツハイマー病 (AD) は最もよく知られた記憶障害を伴う進行性神経変性疾患で、神経細胞内外における神経原線維変化とアミロイド斑を特

徴とする。Lee らは、アルツハイマー病の症状を引き起こしたマウスの脳に MSCs を移植することで記憶能力が回復し、大脳皮質や海馬に見られる神経細胞での β アミロイド沈着が減少することを報告した¹⁶⁾。さらに、MSCs の移植によってミクログリアが活性化し、脳内の炎症性サイトカインの減少が見られた。同様に、Yun らも β アミロイド1-42を注入したマウスに MSCs を移植すると、記憶能力の改善、 β アミロイド沈着の減少が見られることを報告した¹⁷⁾。さらに、移植したマウスは β アミロイドによる細胞死が抑えられ、海馬での iNOS や COX2 の減少が観察されている。このように MSCs 移植による症状改善効果はアルツハイマー病のような神経疾患にも有効であることが示唆されている。

3) 移植片対宿主病 (Graft versus Host Disease)

移植片対宿主病 (GVHD) は、輸血や骨髄移植を始めとする臓器移植に伴う大きなリスクの一つであり、ドナー側の T細胞活性化によりレシピエント側の組織が攻撃されることにより、最悪の場合患者は死に至る。これに対し、臨床治療ではステロイドや免疫抑制剤の投与が行われるが、一部の患者ではステロイド耐性を持つことも知られていることから、今後の GVHD 治療について新たな治療法の開発が求められている。また、GVHD には同種免疫反応を示す急性 GVHD と自己免疫疾患様の症状を示す慢性 GVHD に分けられ、近年の MSCs が持つ免疫調節能に関する勢力的な研究により臨床レベルでも多くの研究報告がなされている¹⁸⁾。Tobin らは、ヒト末梢血単核細胞を移植し急性 GVHD を引き起こさせた免疫不全マウスに MSCs を移植することで症状が緩解することを報告した¹⁹⁾。さらに、彼らは

MSCsの移植にはタイミングが重要なだけでなく、移植後の免疫調節にはINF- γ による活性化が必要であることを示した。一方、急性GVHDにおけるMSCsを用いた細胞治療は臨床レベルでも非常に盛んに行われており、そのほとんどはフェーズIもしくはIIであるが、一部ではフェーズIIIでの臨床試験も報告されている。Sanchez-Guijoらは、25人の急性GVHD患者に対し治療を行ったところ、性別、年齢、GVHDのグレードに関わらず17人の患者で緩解が見られたことを報告した²⁰⁾。しかしながら、緩解が見られた患者の約半数はGVHDの再発や感染症などを引き起こし、死に至っている。また、von Bahrらは、MSCs移植を受けた患者の剖検組織から、移植されたMSCsによる組織異形性や悪性腫瘍の形成は見られなかったが、移植したMSCsは最長で1年、ほとんどのケースで数日から1ヶ月程度しか生着せず、その免疫調節能は"hit and run"メカニズムによると報告している²¹⁾。一方、慢性

GVHDについては、発症メカニズムが十分に理解されておらず、急性GVHDのような臨床試験も殆ど行われていない。このように、GVHDにおけるMSCs移植は短期的ではあるが症状の改善をもたらすことがわかってきている。

おわりに

本稿ではMSCsを用いた細胞治療でき得る疾患としてDMD, AD, GVHDを代表例として紹介したが、他にも心不全, I型糖尿病, パーキンソン病, クロウン病などその他様々な難治性疾患の治療応用についても研究されている。しかしながら、ほとんどの疾患については、未だ生体内でのMSCsの作用機序など不明な点が多い。また、これらの報告で用いられたMSCsは培養皿への接着性を利用して得られたヘテロな細胞集団で、培養中の非生理的条件下による性質変化が無視されている。この問題に対し筆者らのグループでは、FCMを用いて直接ヒトおよびマウスの骨髄細胞

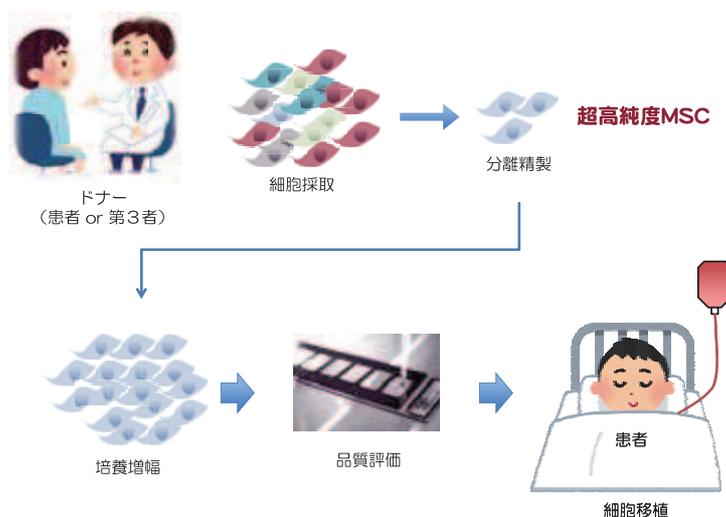


図4 超高純度間葉系幹細胞 (MSC) を用いた細胞治療をめざして

島根大学小児科および輸血部は、低フォスファターゼ症という先天性骨形成不全患者に対する有効な細胞治療を行うことができる全国で唯一の医療機関である。骨髄間葉系幹細胞投与による治療の有効性はすでに確認できているが、我々はさらにその治療効果を上げるべく、細胞の分離精製方法や培養増幅手法、あるいは細胞性能の指標となる評価方法を確立するなど、日夜努力を続けている。

から超高純度な MSCs を単離する方法を確立した^{22, 23)}。また網羅的な遺伝子発現解析から培養増幅を活性化させる因子細胞性能を担保するための品質評価に有用な指標などを明らかにした (図

4)。現在はここ数年のうちに島根大学発の新たな幹細胞療法として、超高純度 MSC を用いた難治疾患治療を確立すべく日夜邁進している。

参 考 文 献

- 1) Friedenstein AJ et al: *Exp Heatol*, 4: 267-274, 1976
- 2) Pittenger MF et al: *Science*, 284: 143-147, 1999
- 3) Dominici M et al: *Cytherapy*, 8: 315-317, 2006
- 4) De Bari C et al: *Arthritis Rheum*, 44: 1928-1942, 2001
- 5) Zuk PA et al: *Mol Biol Cell*, 13: 4279-4295, 2002
- 6) Wang HS et al: *Stem Cells*, 22: 1330-1337, 2004
- 7) Sarugaser R et al: *Stem Cells*, 23: 220-229, 2005
- 8) Yen BL et al: *Stem Cells*, 23: 3-9, 2005
- 9) Gronthos S et al: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 13625-13630, 2000
- 10) Farini A et al: *Stem Cells Int*, 2014: 306573, 2014
- 11) Goncalves MAFV et al: *Hum Mol Genet*, 15: 213-221, 2006
- 12) Vieira NM et al: *Biol Cell*, 100: 231-241, 2008
- 13) Li Z et al: *Cytherapy*, 13: 69-77, 2011
- 14) Villalta SA et al: *Hum Mol Genet*, 18: 482-496, 2009
- 15) Nemeth K et al: *Nat Med*, 15: 42-49, 2009
- 16) Lee JK et al: *Neurosci Lett*, 450: 136-141, 2009
- 17) Lee HJ et al: *Neurobiol Aging*, 33: 588-602, 2012
- 18) Kim N et al: *Ann Hematol*, 92: 1295-1308, 2013
- 19) Tobin LM et al: *Clin Exp Immunol*, 172: 333-348, 2013
- 20) Sanchez-Guijo F et al: *Biol Blood Marrow Transplant*, in press, 2014
- 21) von Bahr L et al: *Stem Cells*, 30: 1575-1578, 2012
- 22) Mabuchi et al: *Stem Cell eports*, 1: 152-165, 2013
- 23) Morikawa et al: *J Exp Med*, 206: 2483-2496, 2009

略 語

MSCs : mesenchymal stem cells (間葉系幹細胞)
 FCM : flow cytometry (フローサイトメトリー)
 HSCs : hematopoietic stem cells (造血幹細胞)
 MHC : major histocompatibility complex (主要組織適合抗原複合体)
 TGF1- β : Transforming growth factor 1- β (トランスフォーミング増殖因子 1 β)
 LIF : Leukemia inhibitory factor (白血病阻害因子)
 IFN γ : Interferon- γ (インターフェロン γ)
 HGF : Hepatocyt growth factor (肝細胞増殖因子)

NK 細胞 : Natural killer 細胞 (ナチュラルキラー細胞)
 iNOS : induced nitric oxide synthase (誘導型一酸化窒素合成酵素)
 IL : Interleukin (インターロイキン)
 PGE2 : Prostaglandin E2 (プロスタグランジン E2)
 COX2 : Cyclooxygenase 2 (シクロオキシゲナーゼ 2)
 DMD : Duchenne muscular dystrophy (デュシェンヌ型筋ジストロフィー)
 AD : Alzheimer disease (アルツハイマー病)
 GVHD : Graft versus host disease (移植片対宿主病)