

【第125回生涯教育講座】

間葉系幹細胞治療の可能性と問題点

まつ 松 ざき 崎 ゆう 有 み 未

キーワード：mesenchymal stem cell, motility, clinical application

要 旨

再生医療（幹細胞治療）は臓器移植に代わる新しい医学分野として発展することが期待されている。昨今、再生医療実現化に向けたES細胞、iPS細胞の研究に重点がおかれて多くの公的資金が投じられている。しかし、ES細胞やiPS細胞は一旦組織幹細胞に分化誘導させる必要があり、未分化細胞の混入等による腫瘍化の問題など安全性の面でクリアしなければならない問題が残されている。

一方、生体内には様々な細胞に分化し組織を構成する多能性を持った組織幹細胞が存在する。間葉系幹細胞は造血幹細胞と同様に古くから知られている体性幹細胞の一つである。血液以外の組織への分化能を持つ間葉系幹細胞は幹細胞治療の早期実現が望める現実的な細胞ソースとして内外から注目され、すでに各方面で臨床応用が始まっている。

しかしながら、間葉系幹細胞の体内動態や分化能については不明な点が多く残されており、治癒機序が不明瞭なままに治療成績のみを指標とした安易な臨床応用が先行しているのが現状である。このままでは、纖維性瘢痕化・異所性骨化・腫瘍形成を含む予測のつかない副作用を生み出す危険性がある。従来とは異なる観点からその安全性や有効性を判定する方法論を確立し、安全で効果的な治療を安定して行うには、治療のために必要な「細胞性能」を担保する基準の設定が必要と思われる。

は じ め に

イギリスの科学雑誌ネイチャーは今年1月、「日本の幹細胞製品の販売にブレーキを」と題し日本の早期承認制度を批判する記事を掲載した。

Yumi MATSUZAKI
島根大学医学部生命科学講座
連絡先：〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1
島根大学医学部生命科学講座

Nature誌が俎上に載せたのは、脊髄損傷治療薬「ステミラック注」の承認問題だ。「脊髄損傷に対する世界初の再生医療等製品」として、ニプロと札幌医大が共同開発したものである。

ステミラック注は、患者の骨髄液から採取した間葉系幹細胞を培養し、静脈注射をして脊髄損傷の改善を図るという。整形外科医の間では、その学術的な基盤の乏しさや副作用の危険性から、

「承認はありえないだろう」との見方が一般的だった。ところが昨年末、PMDA がこの薬を7年間の期限付きで承認し、世界中の医療現場を驚かせた。

この承認に対して1月31日付のNature誌は、幹細胞科学や脊髄損傷の専門家10人の意見をもとに具体的な論拠を挙げ、厳しい批判を展開した(Nature掲載の批判1ならびにNature掲載の批判2)。いったい何が問題なのか。本稿ではNatureの指摘について科学的な側面から検討する。

間葉系幹細胞とは

間葉系幹細胞は種々の組織から得られるが、古くよりその存在が知られ、臨床応用のための細胞ソースとして用いられている組織は骨髄である。骨髄に含まれる細胞は大きく二つに分かれ、血球系の細胞とそれを支持する間質細胞が存在する。骨髄は再生可能な組織であり、造血に関わる造血幹細胞(hematopoietic stem cell: HSC)および骨髄間質の产生に関わる間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)が存在し、脂肪・骨・軟骨など間質細胞への分化能を持つとされている¹⁾。

骨髄中に含まれるMSCの数は総有核細胞数の0.001-0.1%と非常に低く、骨髄1ml中には約100万個の様々な細胞が含まれているが、その中のMSCの数はわずか10-100個程度である²⁾。しかし、未分化性を維持したまま培養増殖させることができ難なHSCと異なり、MSCはシャーレ上で比較的容易に増殖させることができる。

新鮮骨髄をシャーレ上に播種するとその大多数は赤血球を含む血球系細胞であり、この段階でMSCを見いだすのは困難である。しかし、数日後にはシャーレの底に線維芽細胞様の形態の細胞

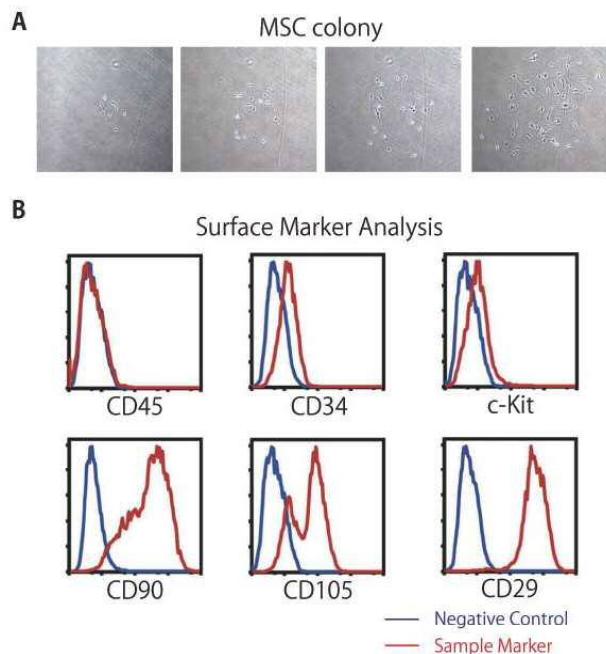


図1：間葉系幹細胞の接着培養分離

- (A) 線維芽細胞様の形態を示す、間葉系幹細胞のコロニーの様子。
 (B) フローサイトメーターによる細胞表面抗原解析。血球系マーカー(CD45, CD34, c-kit)は発現しておらず、CD90, CD105, CD29などの表面マーカーが発現している。

が出現し始め、約10日でシャーレを覆い尽くすように増殖する(図1A)。しかしながら、この初期培養で得られた細胞の大部分は分化・増殖能を持たない『何か』であり、本当の意味でのMSCを得るために、初代培養をトリプシン等によりシャーレからはがし、さらに多数のシャーレ上に播種(継代)して、不必要的細胞を除去する過程が必要である。このような操作で得られた細胞を一般的にMSCと呼び、FACS解析による細胞表面抗原解析を行うと、血球系細胞に存在するCD34やCD45陰性、MSCマーカーとされているThy-1, CD105, CD29等は強陽性である(図1B)。

一方、接着分子・細胞外マトリクス・成長因子レセプター等の発現解析では、必ずしも一致した

報告がなされていない³⁻⁷⁾。このことは付着細胞の培養条件（培養期間や基礎培地、血清の種類、濃度、成長因子、細胞密度など）、個々の手技によってはアウトプットにばらつきがでることを示唆している。

培養増殖させた MSC を *in vitro* で分化誘導すると脂肪・骨・軟骨に分化する^{1,2)}。また近年、外胚葉や内胚葉由来の組織細胞へも分化することが報告されている³⁻⁵⁾。臨床の現場ではすでにその多彩な組織への分化能を生かし、MSCs が様々な疾患に対する細胞移植治療の供給源として利用される段階に入っている。また、MSC は血管内皮細胞へも分化するのみならず VEGF（血管内皮細胞成長因子：vascular endothelial growth factor）を多量に分泌する⁶⁻⁸⁾。このため骨・関節疾患のみならず心疾患者に対しても患者自身の MSC を用いる再生医療が行われている。しかしながら、MSC をレシピエントに対し経静脈的に移入すると、移植されたほぼ全ての細胞が肺毛細血管に捕捉され血液循環に入らないことは、以前から良く知られている⁹⁾。このため、特定部位に生着させたい場合は近傍動脈経由で投与するか、あるいは試験管内で人工骨や人工軟骨に分化誘導した後に欠損部位に移植する等の方法をとる必要があり、骨・軟骨形成不全など重篤な全身症状を示す患者に対しては治療効果が望めないという問題点が指摘されている。一方、骨髄単核細胞移植の場合は、その中に含まれる微量の MSC が患部に遊走・生着し治療効果がある、といった報告があるため、培養後の MSC と骨髄中に存在している MSC とではそれぞれの性質に差があるのでないかと考えられる¹⁰⁻¹⁴⁾。

間葉系幹細胞のフローサイトメトリーによる直接分離

そういった観点から、骨髄から直接細胞表面マーカーを指標に MSC を分離してその性状を解析しようとする試みがなされてきたが¹⁵⁻¹⁷⁾、造血系幹細胞のように効率よく間葉系幹細胞を分離するための表現型を同定するには至らず、表現型・分化能についても様々に異なる結果が示され、細胞本来が持つ性状について一致した見解には達していないのが現状であった。

これらの問題点を明確にすることを目的とし、我々は骨髄 MSC に特異的に発現する抗原群を同定し、フローサイトメトリーを用いてマウスおよびヒト骨髄細胞から直接分離する技術を確立した（図 2 A）。

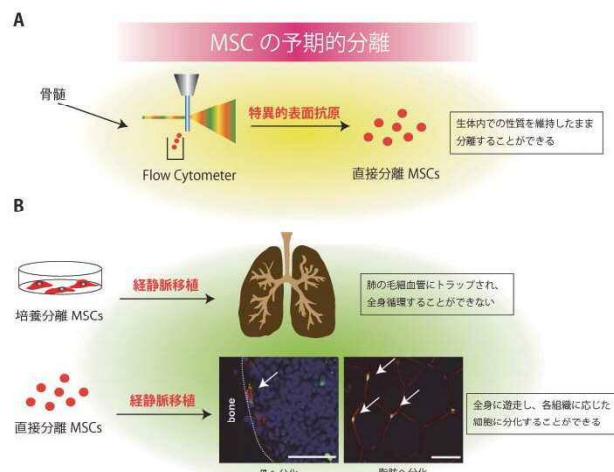


図 2：間葉系幹細胞の予期的分離

- (A) 骨髄間葉系幹細胞に特異的に発現する抗原群を使用した、フローサイトメーターによる間葉系幹細胞の直接分離。
- (B) 培養により得られた間葉系幹細胞は、経静脈的投与により肺にトラップされてしまうが、培養を経ずに分離した間葉系幹細胞は肺にトラップされること無く全身に遊走することができる。

マウス MSC は CD45/Ter 119陰性, CD140 a (PDGFR α) および Sca-1 共陽性細胞分画中に存在している¹⁸⁾。この細胞集団は、1) 血球系細胞を全く含まず、2) 分離後に培養すると線維芽細胞様の形態で増殖し、3) 骨・軟骨・脂肪分化能を持つ。これらの結果から培養 MSC の起源細胞であることが示唆される。また従来の分離法に比べ MSC が約50,000倍に濃縮されている。

この手法で得た MSC (以下、新鮮 MSC) と通常法で得た培養 MSC との最も大きな違いは、前述したように培養 MSC が経静脈移植後ただちに肺毛細血管にトラップされてしまい末梢循環しないのに対し、骨髓から直接分離した新鮮 MSC は造血幹細胞同様に骨髓を始めとする全身の臓器に遊走・生着し、骨・脂肪および造血支持細胞へ分化する点である(図2B)。

一方で、分離後に培養増殖させ、細胞総数を増やして移植すると、培養 MSC と同様にほとんどの移植細胞が肺にトラップされてしまい、骨髓への生着は認められなかったことから、骨髓内にいる MSC は遊走能を持つが、培養増殖中にその機能を失ってしまう、という仮説が直接証明できることになる。さらに特記すべき点は、この培養後の MSC を大量に (マウス一匹あたり 1×10^6 以上) 経静脈投与すると、かなりの確率で呼吸不全状態となりレシピエントが死亡してしまったことである。

骨髓および脂肪由来ヒト間葉系幹細胞

我々はヒト MSC の直接分離方法も確立しており、ヒト骨髓中の LNGFR (CD271) と Thy-1 (CD90) 共陽性細胞集団中に 6 個中 1 個という高頻度でヒト MSC が含まれていることを明らかにしている²¹⁾。

近年、骨髓以外の組織に存在する MSC が次々に見出された。特にこれまで廃棄されていた脂肪組織を酵素処理して得た細胞を培養するだけで、骨髓よりも簡単に MSC が得られることから、骨髓 MSC に代わる魅力的な細胞ソースとして注目されている。

我々が見出したヒト MSC マーカー (LNGFR (CD271) と Thy-1 (CD90)) を発現する細胞は脂肪組織中にも存在しており、骨髓 MSC よりも脂肪に分化しやすく骨分化能が若干低いという差違はあるものの、脂肪組織中に骨髓 MSC に極めて類似した MSC が存在することは疑問の余地がない。これら骨髓・脂肪それぞれから分離した直後の新鮮 MSC と培養後の MSC をそれぞれ免疫不全動物に経静脈投与を行ったところ、マウスの場合と同様に新鮮 MSC は骨髓に生着するが、培養 MSC は肺にトラップされるという結果となった。

したがって、現在行われている脂肪由来 MSC を用いた治療のほとんどが、組織中から取り出した有核細胞を培養増幅後に患者体内に経静脈投与するという手法がとられており、これが冒頭に示した死亡事故につながったことは容易に想像できる。

なぜ MSC が培養後に遊走能を失うのかについては、遊走に必要な分子が発現しなくなる、または凝固因子が過剰に発現する、等諸説ある^{19,20)}。将来的には、遺伝子導入等により遊走能を維持したまま培養増殖させる方法が開発される可能性はあるが、現時点では MSC を移植に用いる場合は、組織から分離した直後の手を加えていない細胞なのか、培養増幅後の細胞なのかで投与方法を変える必要がある。すなわち、経静脈投与する場合は前者のみを用いるべきであり、後者を投与するよ

うな治療法は危険きわまりない、ということを特記したい。

MSC の移植における注意点

以上まとめると、間葉系幹細胞の臨床応用には細胞の状態によって3種類の可能性がある。

1. 単離したばかりの新鮮な細胞集団
2. 培養して増やした未分化な細胞
3. ある特定の細胞に分化誘導したもの

患者の骨髄や脂肪から有核細胞をとりだしそのまま移植する場合、MSCの頻度が極めて低いことから細胞数の確保が困難となる。一方、治療効果 MSC を体外で増殖させて同一患者にその細胞を用いて治療する、という新しい治療技術はドナー不足で問題となっている組織・臓器移植におけるかわる治療法となる可能性を秘めているが、前述のように遊走性を失うことばかりではなく、細胞の増殖・分化能には個人差があり、全て培養細胞が同様の挙動を示すのではないため、品質を一定に保つことが困難であることも問題点の一つである。また、MSC は数継代を経るとその増殖能が低下するとともに分化能も低下する。そのため、分化・増殖能を持つ細胞を安定供給するにはまず多数の正常ボランティアから細胞を採取し、培養細胞を保存しておき、必要に応じてその保存細胞を用いて治療する、という方向になりがちである。この場合、他人の細胞を用いる同種移植となり移植免疫反応が生じる。また、既知ならびに未知の感染症を引き起こす可能性も高い等の問題もある。

おわりに

冒頭でとりあげた Nature 誌の論説でとりわけ強調されていた点は、この治療法に「サイエンスの基盤がない」ことである。つまり「静脈注射によって全身投与された間葉系幹細胞が脊髄の再生に繋がるという仮説自体が、今までのエビデンスに反して」いる、という主張である。静脈注射された培養間葉系幹細胞は肺の小血管にトラップされ、損傷した脊髄（を含む各臓器）までは届かないことは本稿でも述べた通りである。また万一、幹細胞が脊髄に届いたとしても、損傷部で新たな神経細胞に分化するという科学的エビデンスは否定的で、むしろ肺塞栓の副作用の懸念があることはここまで繰返し述べてきた。

先進技術を応用した高度医療である再生医療は、失われた臓器・組織の機能を回復させる新しい治療法として、特に皮膚・硬組織・角膜などの疾患に対してすでに臨床応用が進んでおり、現実的な医療としての段階に入っている。今後、再生医療が次のステージである心臓や肝臓、脾臓などの重要臓器の治療に本格的に拡大し、普遍的な医療として発展、普及していくためには、最新の科学的技術・知識に基づいた治療の有効性を高めつつ、その効果の予測・評価法を確立し、移植に用いる細胞の安全性を保証し、社会的なコンセンサスを得ることが重要である。本稿で述べた「遊走性」の面から論じた総説はほとんどないため、重要な警鐘となることを願って本稿を記した。

参考文献

1) Caplan AI et al: Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 9 (5): 641-650, 1991

2) Ohgushi H et al: Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. J Biomed

- Mater Res 48 (6): 913-927, 1999
- 3) Pittenger MF et al: Multilineage Potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284 (5411): 143-147, 1999
- 4) Colter DC et al: Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 28; 97 (7): 3213-3218, 2000.
- 5) Alsalameh S et al: Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 50 (5): 1522-1532, 2004.
- 6) da Silva Meirelles L et al: Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 119: 2204-2213, 2006
- 7) Aslan H et al: Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD 105+ cells. *Stem Cells* 24 (7): 1728-1737, 2006
- 8) Dezawa M et al: Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*. 113 (12): 1701-1710, 2004
- 9) Rombouts WJ et al: Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*. 17: 160-170, 2003
- 10) Theise ND et al: Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32 (1): 11-16, 2000
- 11) Ikeda E et al: Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation* 76 (5): 495-505, 2008
- 12) Nagaya N 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 Circ Physiol* 287 (6): 2670-2676, 2004.
- 13) Nagaya N et al: Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 23; 112 (8): 1128-1135, 2005
- 14) Kagiwada H et al: Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2 (4): 184-189, 2008
- 15) Gregory CA et al: Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 10; 306 (2): 330-335, 2005
- 16) Gang EJ et al: SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 15; 109 (4): 1743-1751, 2007
- 17) Anjos-Afonso F et al: Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood* 1; 109 (3): 1298-1306, 2007
- 18) Morikawa S et al: Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 26; 206 (11): 2483-2496, 2009
- 19) Sackstein R et al: Ex vivo glycan engineering of CD 44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat. Med* 14: 181-187, 2008
- 20) Tatsumi K et al: Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism. *Biochem Biophys Res Commun* 8; 431 (2): 203-209, 2013
- 21) Mabuchi Y, et al: LNGFR (+) VCAM-1 (hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports*. 1 (2): 152-65, 2013.