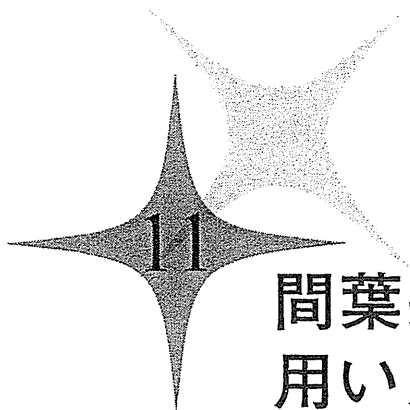
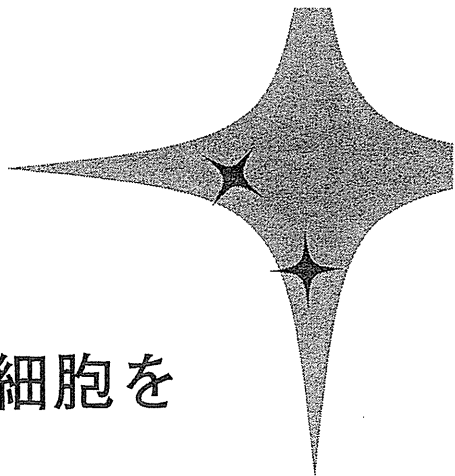


Tomita K, (杉山)	Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: Mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice.	Hepatology	59(1)	154-169	2014
Sato A, (杉山)	Suppressive Effect of the Histone Deacetylase Inhibitor, Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA), on Hepatitis C Virus Replication via Epigenetic Changes in Host Cells.	J Cell Biochem	114(9)	1987-96	2013
Nishitsuji H, (杉山)	HCV infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross-talk between hepatocytes and stellate cells.	J Virol	87(14)	8169-8178	2013
Chu PS, (杉山)	C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in mice.	Hepatology	58(1)	337-350	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷



間葉系幹細胞・Muse 細胞を用いた再生医療



11.1

間葉系幹細胞とは

間葉系幹細胞は骨髄、脂肪、真皮、臍帯、歯髄などの間葉系組織から採取される幹細胞としておおむね定義されており、発生学的には中胚葉系に属する。この細胞は腫瘍化の危険が低く安全性が高いこと、上述のアクセスしやすい組織から得られることなどのいくつかの特性をもっているために、現在ヒトへの応用が進められている。

間葉系幹細胞の研究は古くは骨髄で始まる。単一のクローンにより構築される colony-forming unit-fibroblastic cells が骨髄組織から培養可能であり、これらが自発的に骨形成することを Friedenstein が 1970 年に最初に報告したことに端を発する¹⁾。その後、培養下で骨髄間葉系幹細胞にサイトカインや還元剤を組み合わせた特定の誘導をかけると、骨・軟骨・脂肪に分化転換することが Pittenger らによって 1999 年に報告され、一気にこの領域の研究が進められた²⁾。また別の誘導方法を用いると中胚葉系の細胞だけでなく、胚葉を超えて神経系の細胞や肝細胞、気道系の細胞などの外・内胚葉性の細胞にも分化することが報告された³⁻⁶⁾。数年遅れて骨髄に引き続き、脂肪や臍帯由来の間葉系幹細胞でも同様の分化転換が示され、間葉系幹細胞は flexibility の高い分化能を有する幹細胞と認識されている。

間葉系幹細胞のもつおもな作用としては、①細胞の産生するサイトカインによる損傷組織の保護、②免疫抑制効果、③間葉系幹細胞の分化による組織修復・再生、などが考えられている。

①に関する作用はとくに骨髄の間葉系幹細胞で報告されており、これらの細胞は骨髄内で造血幹細胞を支持する機能を有しているため、多様なサイトカインを産生する。これらのサイトカインは、生体内に移植されると傷害を受けた組織において組織保護効果を発揮すると考えられている⁷⁾。一般に分化誘導を行わない

そのままの間葉系幹細胞が組織再生に有効とされるのはこの作用がメインであるが、基本的には移植後一定期間経過すると細胞は残存せず、したがってこの効果は長期間持続するものではない。

②の免疫抑制効果であるが、免疫細胞の活性を抑える因子を産生するためにもたらされるもので、免疫反応が関与するような疾患をターゲットとする場合、たとえば移植片対宿主病などに有効だと考えられ、現在、臨床試験がなされている⁸⁾。

③の細胞の分化による組織修復・再生であるが、間葉系幹細胞は同じ中胚葉系の骨・軟骨・脂肪に限らず、胚葉を超えて神経細胞、グリア細胞、肝細胞など幅広い分化を示すことが報告されている。このような分化は生体内での自発的な分化と培養系での分化誘導の両方が報告されている。たとえば、傷害を受けた組織に間葉系幹細胞を分化誘導せずにそのまま移植すると、きわめて率は低いものの生体内において自発的に組織を構成する細胞に分化し、組織修復に寄与することが報告されている^{9,10)}。また培養下で特定のサイトカインを用いて分化誘導を行うと一定の割合の細胞が目的とする細胞に分化することが報告され、再生医療への応用が示唆されている²⁻⁶⁾。ただし分化を担っている本体となる細胞はどのようなものなのか、なぜ胚葉を超えた幅広い分化が可能であるのか、ということに関し、これまで議論が続いていた。

間葉系幹細胞とは、通常、骨髓、真皮、脂肪組織などの間葉系組織からの接着性の細胞として分離培養されたものを指すことが多く、その場合さまざまな細胞が含まれており、事実単一の細胞種ではなく複数の細胞種から構成されている²⁾。したがって分化転換を担う細胞の同定は困難であった。これまで骨髓を中心に間葉系幹細胞は多能性があるということがいくつかのグループから提唱されている。たとえば Verfaillie らの成体マウス骨髓での MAPC、Schiller らの MIAMI 細胞、Ratajczak らの VSEL 細胞などがあげられるが、いずれも **Oct-4** や **Rex-1** などの多能性因子を発現し、3胚葉にまたがるさまざまな細胞への分化がみられると細胞として報告されている¹¹⁻¹³⁾。しかしいずれの研究も複数の細胞種から構成されている間葉系幹細胞をそのまま用いた研究であり、1細胞レベルにおける3胚葉性の細胞への分化や自己複製を示していないため、厳密な意味において幹細胞性を証明したとはいえない。また彼らのいう細胞を同定するための特定のマーカーが示されていないことや、細胞の特性の解析が不十分なため他施設での追試が困難であるなどの問題があった。一方、最近、皮膚や骨髓などのヒト間葉系組織に間葉系マーカーと多能性幹細胞マーカーのダブル陽性細胞として同定さ

れる，自己複製能と3胚葉性への分化を一細胞レベルで発揮する多能性幹細胞（Muse細胞）の存在が報告されている（後述）^{14,15)}。

これらのことから，間葉系幹細胞の神経疾患への応用については，**trophic** 効果を期待し分化誘導を行わず移植・投与する，あるいは神経細胞やグリア細胞に分化誘導して移植する，という2つのアプローチに大別可能である。本章では分化誘導を行わないそのままの間葉系幹細胞がどのようなモデル疾患でどのような効果があるとされているのか，また分化誘導を行う場合においては，どのような細胞へ誘導可能か，それぞれどのような疾患をターゲットに研究が行われどのような結果が得られているのかを概説する。

11.2

脳梗塞への応用

ラットおよびマウスにおける脳梗塞モデル動物は，中大脳動脈（MCA）を一過性あるいは永続的に閉塞させる（MCAo）モデルがおもに用いられている。中大脳動脈領域の脳梗塞は，ヒトにおいては半身の運動麻痺・感覚障害，意識障害，失語・失行・失認・半盲などを生じ，重篤例では死亡に至ることも少なくない。動物モデルにおいても症状には個体差があり，実験には重篤すぎず軽症すぎない個体を用いる。細胞移植については，こうしたMCAoモデル動物の脳に，脳定位固定装置を用いて線条体内へ直接注入する手法^{16,17)} や，経頸動脈的^{18,19)} あるいは経静脈的^{20,21)} に細胞を注入するという手法が用いられる。細胞移植の効果については，組織学評価（梗塞巣の減少や移植細胞の細胞系譜・サブタイプ同定）および行動・機能評価（前庭運動機能評価としての beam balance test や，感覚運動機能評価としての limb placing test，記憶・認知機能評価としての Morris water maze test）などが用いられる。

a. 分化誘導を行わないそのままの間葉系幹細胞

骨髄間葉系幹細胞の脳梗塞モデルへの移植研究は，これまでに多くの報告が存在する¹⁶⁻²¹⁾。いずれの報告でも機能面での効果があるとしているが，そのメカニズムとしては，神経系細胞への分化^{17,18,20)} や内在性前駆細胞の神経細胞新生誘導¹⁷⁾，血管新生誘導¹⁹⁾，シナプス形成促進作用¹⁹⁾，神経保護作用²¹⁾などが考えられている。臍帯由来間葉系幹細胞についてもほぼ同様の効果があるとされている^{22,23)}。一方で，脂肪由来間葉系幹細胞移植については，骨髄由来間葉系幹細胞よりも梗塞巣の改善および機能的回復においてより有効であり，その理由として

脂肪由来間葉系幹細胞のほうが VEGF や HGF などの栄養因子を多く産生するからであるとする報告も存在する²⁴⁾。ただし、こうした特定の細胞への誘導を行っていない間葉系幹細胞移植においては、移植部における神経系細胞への分化は限定的であり、その効果のほとんどは移植細胞の **trophic** 効果によるものと考えられている。すなわち、失われた、あるいは失われつつある細胞を間葉系幹細胞による分化転換で補うという意味の根本的治療ではないといえる。また、分化誘導を行っていない細胞の移植については、内在性神経系細胞との細胞融合の指摘もある^{25,26)}。

b. 遺伝子改変した間葉系幹細胞

骨髄間葉系幹細胞については、特定の栄養因子を導入した遺伝子改変型細胞の移植治療研究も多く試みられている。これまでに BDNF²⁷⁾ や FGF-2²⁸⁾, HGF²⁹⁾ などの栄養因子を強制発現させた骨髄間葉系幹細胞の研究がなされており、遺伝子改変を行わない間葉系幹細胞よりも組織修復効果が高いとされている。臍帯由来間葉系幹細胞についても HGF 強制発現細胞移植が試みられており、機能再建や再髄鞘化促進作用などが遺伝子改変しない細胞よりも優れていると報告されている³⁰⁾。いずれの報告でも遺伝子導入についてはアデノウイルスやヘルペス単純ウイルス、レンチウイルスといったウイルスベクターを用いた遺伝子強制発現系を用いており、臨床応用を念頭に置くのであれば、アレルギーや炎症反応、腫瘍形成の可能性などについて、十分な検討がなされなければならない。

c. 骨髄間葉系幹細胞から誘導した神経系細胞

これまでに、骨髄間葉系幹細胞から分化誘導した神経細胞^{31,32)} および神経前駆細胞^{33,34)} を用いた研究報告がなされている。分化神経細胞については、骨髄間葉系幹細胞に構成的活性型 Notch-1 である NICD (Notch-1 intracellular domain) 遺伝子をプラスミドを用いて導入し、NICD 発現細胞のみを G418 で選択後、さらに bFGF, CNTF, フォルスコリンといった液性因子により刺激することで神経細胞を誘導している。この誘導法によると、96% 以上の非常に高い効率で MAP-2 および Tuj-1 といった神経細胞マーカーを発現する細胞を得ることが可能であり、これらの細胞は活動電位や電位依存性の内向き電流を発揮する機能的な post-mitotic neuron であることが確認されている³⁾。こうした誘導神経細胞をラット MCAo モデルの脳実質非壊死部に移植すると、移植 28 日後において未処理の骨髄間葉系幹細胞と比較し、beam balance test や morris water maze test における機能回復が有意に向上していた。また、誘導神経細胞移植群では 30~45% 程度の移植細胞が残存していたのに対し、未処理骨髄間葉系幹細胞移植群

では10~20%程度にとどまっていた。それらのうち、神経細胞マーカーを発現していた細胞は、前者では90%程度であったのに対し、後者では0.6%程度であった³¹⁾。また、アレチネズミ左総頸動脈閉塞モデルへのヒト骨髄間葉系幹細胞由来誘導神経細胞の移植実験においては、未処理骨髄間葉系幹細胞移植群と比較し、体性感覚機能評価としての bilateral asymmetry test における機能回復が移植28日後において有意に向上していた。また、これらの細胞は移植組織内において神経細胞特異的マーカーであるニューロフィラメント (neurofilament) を発現していた。さらに、これらの移植細胞はアレチネズミ脳組織内においてヒト特異的DNAプローブによってのみ認識され、アレチネズミDNAプローブでは認識されないことが確認され、移植細胞における神経細胞マーカー発現が既存の神経細胞と移植細胞の細胞融合によるものではないことも明らかとされた³²⁾。これらのことから、骨髄間葉系幹細胞より誘導した分化神経細胞は、脳梗塞動物モデルにおいて組織学的・機能的回復に寄与することが明らかとなっている。

一方で、分化神経細胞ではなく、骨髄間葉系幹細胞から神経前駆細胞を誘導し、脳梗塞モデルへ移植したとする報告もある^{33,34)}。それらの報告によれば、骨髄間葉系幹細胞にNICDを導入しG418による選択を行った後、bFGFおよびEGF添加培地にて浮遊培養を行うことで、神経前駆細胞マーカーであるNestin, Sox2, NeuroDを発現する特徴的な細胞塊であるニューロスフェア (neurosphere) が得られ、これらの接着培養により、95%以上の高効率でMAP-2およびTuj-1といった神経細胞マーカーを発現する細胞が得られるとされる^{33,34)} (図11.1)。これらの細胞をラットMCAoモデルへ移植し移植後3カ月後に機能評価を行ったところ、limb placing test, Morris water maze testにおいて非誘導骨髄間葉系幹細胞移植群に比べ有意に機能回復がみられた。また、驚くべきことに移植細胞は脳実質内に広く分布しており、その数は移植細胞の4倍であるとされている。これらの細胞は分化神経細胞のマーカーであるNeuNを発現しており、また、カルビンディン、パルブアルブミン、TH, DARPP32などのさまざまな神経サブタイプマーカーを発現していた³³⁾。

脳梗塞では広範囲の神経細胞が一次的・二次的に損傷を受け死滅していくため、この骨髄間葉系幹細胞由来神経前駆細胞移植という手法は、さまざまな神経細胞サブタイプを供給するという点で、画期的と考えられる。また、移植細胞が4倍程度に増殖していたことは、移植後2週の時点で5%程度の移植細胞が分裂細胞マーカーであるKi67を発現していたのに対し、移植後3カ月後では観察されなかったことから、おそらく移植後早期に分裂・移動し、脳実質内に広範囲に広

がった可能性が示唆されている³³⁾。

こうした骨髄間葉系幹細胞由来神経前駆細胞を、人工材料と組み合わせてその効果を検証した報告も存在する³⁴⁾。人工材料としては、移植細胞の足場を供給するためのコラーゲンスポンジと、血管新生や内在性神経前駆細胞の活性化に寄与する bFGF 徐放マイクロスフェアを用いている。これらの人工材料と骨髄間葉系幹細胞由来神経前駆細胞を組み合わせてラット MCAo モデルへ移植した場合、移植後 35 日における梗塞巣の減少や、残存移植細胞数、血管新生、内在性神経前駆細胞の増加などに寄与していることが示されている (図 11.2)。また、limb placing test, beam balance test, morris water maze test による機能回復も確認

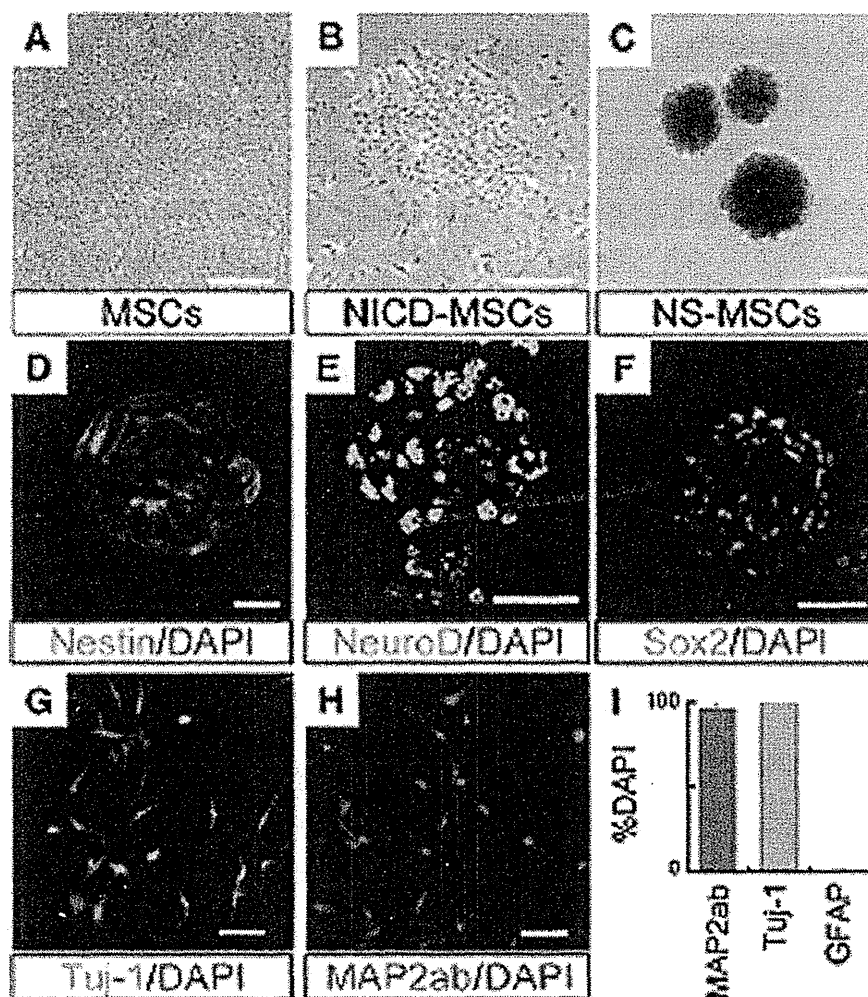


図 11.1 骨髄間葉系幹細胞からの神経前駆細胞誘導 (文献 33 より転載)

A: 通常のラット骨髄間葉系幹細胞 (MSCs), B: NICD を MSC に遺伝子導入する (NICD-MSCs) と細胞の形態が変化する, C: NICD-MSCs から誘導された sphere (NS-MSCs), D, E, F: NS-MSCs における神経前駆細胞関連マーカーの発現. D は Nestin, E は NeuroD, F は Sox2. G, H, I: NS-MSCs にさらに神経細胞への分化誘導をかけると β -チューブリンイソタイプ III (Tuj-1) 陽性細胞 (G) や MAP2ab (microtubule associated protein 2) 陽性細胞 (H) が認められ, それぞれの細胞の占める割合は非常に高い (I).

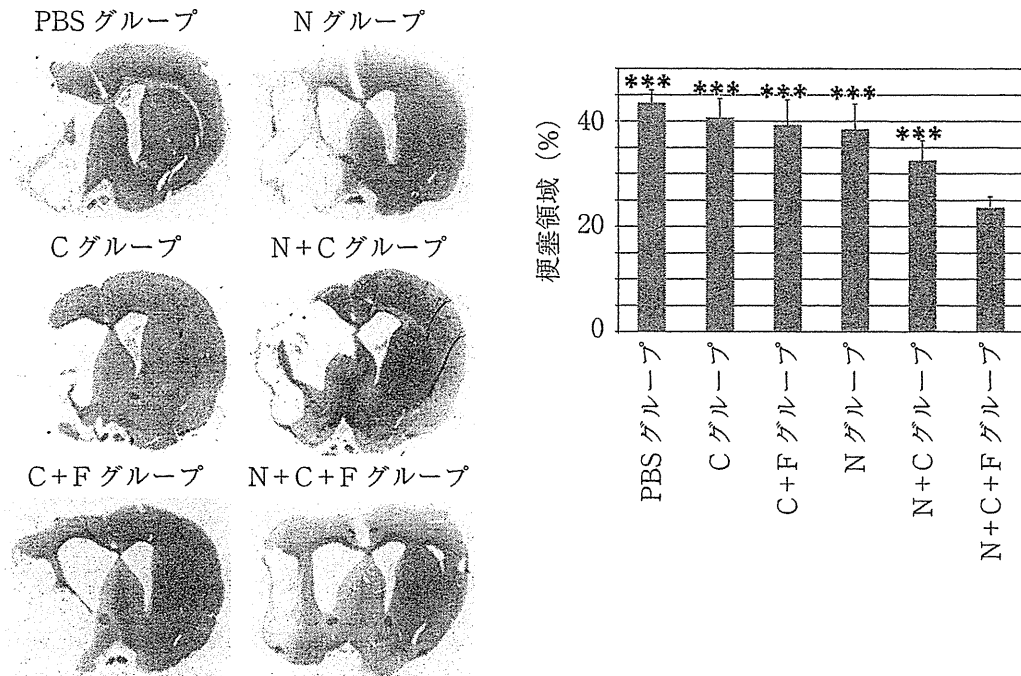


図 11.2 ラット脳梗塞モデルへの骨髄間葉系幹細胞由来神経前駆細胞と人工材料の組合せによる移植 (文献 34 より転載)

6つの移植群を作製し、35日後において脳梗塞領域の計測を行う。神経前駆細胞 (NS-MSCs) とコラーゲンスポンジと bFGF 徐放剤の3者が組み合わさったものにおいて、他の群と比較して梗塞領域が有意に小さいという結果を認めた。***: $p < 0.001$.

実験群

PBS グループ: PBS のみ。C グループ: コラーゲンスポンジのみ。C+F グループ: コラーゲンスポンジ+bFGF 徐放ゼラチン。N グループ: NS-MSCs のみ。N+C グループ: NS-MSCs+コラーゲンスポンジ。N+C+F グループ: NS-MSCs+コラーゲンスポンジ+bFGF 徐放ゼラチン。

されている³⁴⁾。これら骨髄間葉系幹細胞由来分化神経細胞移植、および神経前駆細胞移植においては、いずれの実験系においても腫瘍形成はみられていなかったことが報告されている³¹⁻³⁴⁾。すなわち、脳梗塞モデルにおいては分化型神経細胞移植よりも神経前駆細胞移植のほうが組織学的・機能的に望ましい結果が得られ、人工材料との組合せにより、その効果がさらに増強されることが明らかとなっている。いずれの系でも腫瘍性増殖がみられなかったことは、骨髄間葉系幹細胞および骨髄間葉系幹細胞由来神経系細胞移植という手法の安全性を示すものといえる。

d. 臨床試験実施例

現在までにいくつかの臨床試験が行われつつあるが、臨床試験実施例は2005年に報告された特定の細胞への誘導および遺伝子改変をしていない間葉系幹細胞の自家移植報告³⁵⁾が初めてであった。それによれば、機能評価の結果からは3

カ月程度の短期間であれば効果的であるといえるが、12カ月程度を経過すると有意差はみられないようである。また、観察期間中移植細胞に起因するアレルギー反応や局所および全身合併症、血管閉塞、腫瘍形成などの副作用はみられなかったとしている。また、近年さらにいくつかの報告がなされ、日本でも札幌医科大学の本望らのグループによる結果が示されている³⁶⁾。それによれば、自己血清を用いて培養された骨髄間葉系幹細胞を自家移植された脳梗塞患者12例すべてにおいて、術前および術後にMRIおよびMR血管造影で画像を取得し、その効果を1年をかけて比較しており、術後1週間の段階で病巣が少なくとも20%以上減少したとしている。また、神経学的症状についてはNIH stroke scaleを用いて検定を行っており、術後1週間の段階で症状の改善が促進されたとしている。いずれの症例においても腫瘍形成や異常な細胞増殖、神経学的症状の悪化、静脈塞栓症などの移植に伴う副作用はなかったことから、安全性および実現可能性が示されたとしている。この報告では細胞移植の効果は1週間以後はほとんどみられていなかったが、適応となった12例については脳梗塞発症から36~133日経過後の慢性期に移植を受けていた。骨髄間葉系幹細胞の主たる効果はtrophic効果による組織保護にあると考えられ、慢性期での移植ではその効果の発揮には自ずと限界があると考えられる。さらに早期に移植を受けた場合にどの程度の効果をもたらすのかについて、さらなる検討が期待される。

11.3 脊髄損傷への応用

ラットおよびマウスを用いた脊髄損傷動物モデルは、完全切断モデル、over hemisectionあるいはhemisectionといった部分切断モデル、そして挫滅モデルに分類できる。「切断部を超えた軸索再生が不可能であるから」というのが、従来より「中枢神経は再生しない」とされてきた大きな理由の1つであった。切断部を超えた軸索再生を可能とするにはどうすればよいかという点が、脊髄損傷の新たな治療法の開発という意味で重視されてきた。この点において、完全切断モデルでは切断部を超えた再生を示すことで軸索再生の足場として機能することをクリアに証明しうる反面、治療操作による有意な機能回復を示すことは困難である場合が多い。部分切断モデルでは機能回復における治療効果が得られやすいが、残存軸索との判別が困難であるため、切断部を超えた軸索再生をクリアに証明することができないという問題がある。よりヒトにおける臨床の実際に則し

ているのは挫滅モデルであるが、損傷程度の調節が難しいという難点がある。また、脊髄は脊柱管の中に存在するが、頭蓋骨内に存在する脳組織よりもスペースに限りがあり、多量の細胞を移植するうえでは、複数個所に移植を行うなどという工夫が必要とされる。ラット脊髄損傷モデルにおいては、Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) スケール³⁷⁾ という後肢の状態や後肢による体重保持に重点を置いた運動機能評価法が一般的に用いられている。

a. 分化誘導を行わないそのままの間葉系幹細胞

骨髄間葉系幹細胞の脊髄損傷への移植治療については、Chopp らが先駆けた報告をしている³⁸⁾。一部の細胞が神経細胞マーカーを発現し、また、損傷部近傍でオリゴデンドロサイトが増加しており、機能回復もみられたとしている。その後さまざまな研究室より多くの報告がなされており、機能回復のほか、移植骨髄間葉系幹細胞細胞の損傷部への移動^{39, 40)} や空洞形成体積の減少³⁹⁻⁴¹⁾、軸索再生促進作用⁴²⁾ などが報告されている。移植細胞の神経系細胞への分化については、観察されないか、観察されてもその程度は小さい。脂肪由来間葉系幹細胞を用いた移植治療研究については、挫滅損傷モデルへの移植治療において、12 週までの観察期間にて機能再建に寄与していたとの報告がある⁴³⁾。また、臍帯関連細胞については、臍帯由来間葉系幹細胞ではなく、臍帯血由来細胞が脊髄損傷移植治療研究に広く用いられてきた。臍帯血由来細胞の脊髄損傷移植治療における効果は、神経系細胞への分化、再髄鞘化の促進、抗アポトーシス作用、脊髄損傷により誘導される有害因子発現の抑制、血管新生、液性因子の分泌などにより説明されると考えられている⁴⁴⁾。ただし、いずれの実験系においても移植細胞は生体内で短期間しか残存せず、上記の効果も一時的であるといえる。また、神経系細胞への分化については一部シュワン細胞様の細胞への分化も観察されているが⁴⁵⁾、その割合は高いものではなく、軸索再生の足場を与える、あるいは移植細胞が積極的に髄鞘形成を行うという、脊髄損傷における軸索再生促進作用という意味において、量・質両面において十分な役割を果たしうるとは考えにくい。

b. 遺伝子改変した間葉系幹細胞

BDNF や NT-3 といった神経栄養因子は従来より脊髄損傷においてとくに下行性線維への軸索再生促進作用が知られており、遺伝子操作を加えてこれら 2 因子を強制発現させた線維芽細胞の移植などが試みられていた⁴⁶⁾。骨髄間葉系幹細胞や臍帯由来間葉系幹細胞においても、これら 2 因子を強制発現させた細胞移植の報告が存在する^{47, 48)}。いずれの報告でも損傷組織内における神経伝達物質陽性再生軸索の数の増加が見られるとしているが、損傷組織を超えた軸索再生につい

ては、顕著な改善はもたらさない。また、機能回復についても大きな差を与えるものではなく、その効果には限りがあるといえる。

c. 骨髄間葉系幹細胞から誘導した神経系細胞

骨髄間葉系幹細胞から神経細胞を誘導し、損傷脊髄へ移植したとする報告はいくつか存在する。そのいずれもが、脳梗塞移植の項で述べた方法とは異なる誘導法を用いている。Pedramらは、bFGF、レチノイン酸、ジブチリルcAMP、アスコルビン酸、フォルスコリン、イソプチルキサンチンなどを用いて神経細胞を誘導し、その誘導神経細胞と、骨髄間葉系幹細胞そのもの、および両者を混合した細胞群を、挫滅損傷モデルラットへ移植し、その機能回復への寄与を検討した⁴⁹⁾。この報告によれば、混合細胞移植群、誘導神経細胞移植群、骨髄間葉系幹細胞移植群、メデイウム投与のコントロール群の順で、それぞれ統計学的な有意差をもって運動機能回復がみられたという。また、移植細胞の移植組織内での生着を示しているが、生着したとされる移植細胞の神経細胞としての機能性についての検証はなされていないため、これら移植細胞の脊髄損傷における機能回復への関与に関する機序については不明のままであり、さらなる検証が必要である。

また、2001年に山澤らが報告した骨髄間葉系幹細胞からのシュワン細胞誘導法は、現在では骨髄間葉系幹細胞以外の脂肪由来および臍帯由来間葉系幹細胞においても応用され、現在では末梢神経損傷モデルおよび脊髄損傷モデルにおける移植治療研究に広く用いられている。その方法の詳細は11.6節に譲るとして、ここでは骨髄間葉系幹細胞由来シュワン細胞の脊髄損傷治療応用について述べる。この誘導法による骨髄間葉系幹細胞由来シュワン細胞の脊髄損傷モデルへの移植治療研究を2005年に初めて報告した鎌田らの論文では、脊髄の第7胸髄レベルを完全除去し、移植片として濾過膜で作製したチューブにマトリゲルを充填したものを移植した群、あるいは同チューブに骨髄間葉系幹細胞由来シュワン細胞を添加したマトリゲルを充填したものを移植した群を作製し、組織学的・機能的評価を行った。その結果、骨髄間葉系幹細胞由来シュワン細胞移植群においては、移植片およびその頭側の宿主脊髄内における上行性線維マーカー陽性の軸索の数の大幅な増加や、運動機能に顕著な回復がみられたとしている⁵⁰⁾。鎌田らは、その後挫滅損傷モデルにおいても同様の効果が得られることを示し、免疫電子顕微鏡法を用い、移植骨髄間葉系幹細胞由来シュワン細胞が末梢神経にみられるタイプのミエリンを形成している像を示している⁵¹⁾。ただし、空洞形成抑制効果は、誘導を行っていない骨髄間葉系幹細胞のほうが優位であったとしている。

d. 脂肪由来間葉系幹細胞から誘導した神経系細胞

脂肪由来間葉系幹細胞については、脊髄挫滅損傷モデルにおける神経細胞への分化誘導を行った細胞群移植と行っていない細胞群の移植について検討した報告が存在する⁴³⁾。2種類の神経細胞誘導法を検討しており、神経細胞分化については、2004年にHermannらが骨髄間葉系幹細胞からの神経細胞誘導法として報告したbFGFとEGFを用いた浮遊培養系⁵²⁾のほうが有効であったとしている。しかしながら、移植後の移植組織内における軸索数やBBBスケールによる機能評価では、未処理の脂肪由来間葉系幹細胞移植のほうが効果的であったと報告されている。

e. 臍帯由来間葉系幹細胞から誘導した神経系細胞

臍帯由来間葉系幹細胞からHermannらの方法⁵²⁾をもとにして神経前駆細胞を誘導し、胸髄レベルにおける完全切断モデルへ移植したとする報告があり⁵³⁾、運動機能回復に寄与したとしている。しかしながら、移植細胞が中枢神経系細胞として生着・機能しているかどうかについての検証が十分でなく、運動機能回復への機序についての詳細は不明である。

これらのことを総合すると、脊髄損傷においては、間葉系幹細胞そのものや、間葉系幹細胞より誘導した神経細胞やシュワン細胞を用いた移植治療が試みられており、これらの細胞は移植後にそれぞれ別々の機能を担うことが期待される。実際に、誘導神経細胞と間葉系幹細胞とを同時に移植すると機能回復効果がさらに促進されるとした報告も存在する⁴⁹⁾。上記2種の誘導細胞と未処理の間葉系幹細胞を適切な割合で混合して投与するといった方法が、より有効性の高い治療法としての可能性を秘めていると考えられる。

f. 臨床試験実施例

骨髄間葉系幹細胞を用いた脊髄損傷移植治療については、2005年のParkらの報告⁵⁴⁾では、脊髄損傷部に自家骨髄間葉系幹細胞を移植することに加え、GM-CSFを静脈注射し(5例)、7カ月の観察を行っている。GM-CSFのみの投与群(1例)と比較し、4例において一定の機能再建促進作用がみられたとしているが、その機序や移植細胞の運命については記されていない。このParkらの報告を筆頭にさまざまな投与方法による移植治療が試みられており、現在では慢性期にある脊髄損傷患者へその適応を広げつつある⁵⁵⁾。日本においては、関西医科大学における腰椎穿刺による細胞移植が試みられている⁵⁶⁾。ほかに、脂肪由来間葉系幹細胞の静脈内投与による移植治療が試みられており、1年以上前に脊髄損傷となった成人男子8例について、経静脈的に細胞移植を行っている⁵⁷⁾。この報告では3

カ月の観察期間中、機能回復への寄与はまったくみられなかった。これまでのいずれの報告においても、移植細胞に起因する腫瘍形成などの副作用は観察されず移植法の安全性は確認されたとしているが、その機能回復効果は報告によりまちまちである。より効果的な移植法の確立のためには、これまでの臨床治験の移植法とその効果についての議論を深めていく必要があると考えられる。

11.4 パーキンソン病への応用

パーキンソン病においてはさまざまな細胞が移植されてきており他章を参照いただきたい。ここでは間葉系幹細胞について概説する。

a. 分化誘導を行わないそのままの間葉系幹細胞

間葉系幹細胞の trophic 効果をメインとしてそのままの細胞を移植する実験が行われた。骨髄の間葉系幹細胞であるが、ラットの細胞をラットのパーキンソンモデル (6-hydroxydopamine (6-OHDA) の投与にて作製) の線条体に移植すると劇的な効果はないものの、部分的な機能回復がみられる⁵⁸⁻⁶²⁾。臍帯由来の間葉系幹細胞においても同様の傾向で、部分的な改善が認められたにとどまり劇的な効果はないとの報告がある^{63,64)}。ヒトでのパイロットスタディでは自己の骨髄間葉系幹細胞を患者に移植し 36 カ月追跡したところ、一定の効果はあり腫瘍形成はみられなかったという報告がある⁶⁵⁾。一般に誘導しないそのままの間葉系幹細胞は腫瘍形成がなく安全性は高いものの、生体内に長期に残存しないため trophic 効果は次第に薄れ、徐々になくなっていくために根本治療においては限界があるようである。

b. 遺伝子改変した間葉系幹細胞

L-DOPA やニューロトロフィンや GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) などの神経栄養因子を産生するように遺伝子操作した骨髄間葉系幹細胞の移植が動物レベルで行われており、症状の改善において一定の効果はあるようである⁶⁶⁻⁶⁹⁾。VEGF 遺伝子を導入した臍帯由来間葉系幹細胞においても同様の効果が報告されている⁷⁰⁾。

c. 骨髄間葉系幹細胞から誘導したドーパミン作動性神経細胞

培養系においてドーパミン作動性神経細胞様の細胞を誘導したという報告はあるが⁷¹⁻⁷³⁾、これらの報告はパーキンソンモデル動物での有効性検証がなされておらず、どの程度の機能的なドーパミン作動性神経細胞であるかは不明であ

る。また、bFGF, EGF, PDGF, Sonic hedgehog, FGF-8, GDNF, butylated hydroxyanisole, ジブチル cAMP などを用いて未分化神経細胞を誘導しモデル動物に移植したが、機能回復は認められず、未分化な神経細胞を投与しても効果は見込めないとする報告もある^{74, 75)}。

一方、ドーパミン作動性神経細胞としての機能を有する細胞を移植した場合は、組織学的、行動・生理学的解析において有意な効果が認められている。骨髄間葉系幹細胞に NICD を組み込んだプラスミドをリポフェクションで導入し G418 で選択の後、bFGF, CNTF, フォルスコリン, GDNF のサイトカインを投与すると 60% ほどの効率で TH (tyrosine hydroxylase) 陽性細胞が誘導される。この細胞はドーパミン神経の代表的なマーカー Nurr-1, Lmx1b, En1, Ptx3 も発現しており、さらに脱分極によってドーパミンを培養液中に放出することが高機能液体クロマトグラフィ (high-performance liquid chromatography) によって確認されている³⁾。このようにして誘導したラットおよびヒトのドーパミン神経をパーキンソンモデルラットの線条体に移植するとアポモルフィン誘発性の回転運動の軽減、adjusting step テストや paw-reaching テストなどの非薬理的行動解析において有意な改善がみられた。移植 3 カ月後において腫瘍形成は観察されず、移植細胞の 30% は残存し TH やドーパミントランスポーターを発現していた。また脳スライス培養でも移植脳においてドーパミン産生が確認されている³⁾。

d. 脂肪由来間葉系幹細胞から誘導した神経細胞

完全に分化した神経細胞ではないが、脂肪由来間葉系幹細胞から Tuj-1 陽性細胞を誘導しパーキンソンモデル動物に移植した報告があるが、効果は限定的のようである⁷⁶⁾。

e. 臍帯由来間葉系幹細胞から誘導した神経系細胞

神経系の細胞への分化能に関しては臍帯由来の間葉系幹細胞は骨髄由来のものと大きく違わないとの報告があり、実際に neuron-conditioned medium, Sonic hedgehog と FGF-8 を用いてドーパミン作動性神経様細胞を誘導している。これらの細胞をパーキンソンモデル動物に移植すると行動機能の改善がみられている⁷⁷⁻⁷⁹⁾。

f. 臨床試験実施例

骨髄間葉系幹細胞においてパイロットスタディが行われており、自己由来の分化誘導を行わないそのままの間葉系幹細胞をパーキンソン病の患者に移植し、36 カ月にわたり経過観察したという報告がなされている。それによると一部の機能回復がみられ、副作用や腫瘍形成は観察されなかった⁶⁵⁾。分化誘導を行わない間

葉系幹細胞の有効性に関しては、さらに長期にわたって検討する必要があると思われる。

11.5 その他の脳神経系の疾患

間葉系幹細胞を用いた多発性硬化症や筋萎縮性側索硬化症の移植治療については、すでにパイロットスタディが行われている。これらの疾患はその発症に免疫学的機序の関与が考えられており、間葉系幹細胞の免疫調節機能が発揮されることを期待し、移植治療が試みられている。骨髄間葉系幹細胞については多発性硬化症や筋萎縮性側索硬化症において⁸⁰⁾、臍帯由来間葉系幹細胞については多発性硬化症において⁸¹⁾、すでにその報告がなされている。Karussis らの報告においては、多発性硬化症（15 例）および筋萎縮性側索硬化症（19 例）への骨髄間葉系幹細胞の髄腔内投与移植あるいは静脈内投与移植が行われ、最長 2 年にわたる経過観察がなされた。観察期間中、腫瘍形成などの副作用はみられず、安全性が確認されたとしている。MRI による検索では、移植細胞の移動が示唆されており、また、リンパ球サブセット解析により、9 例においては骨髄間葉系幹細胞の免疫調節機能発揮されていたことも確認されたとしている⁸⁰⁾。また、臍帯由来間葉系幹細胞の多発性硬化症への移植治療では、病状の経過が安定したと報告されている⁸¹⁾。

11.6 末梢神経損傷への応用

末梢神経の変性と再生の機構の詳細は、第 9 章を参照いただきたい。ここでは、間葉系幹細胞を末梢神経損傷における神経再生にどのように寄与させることができるかについて焦点を当てる。

末梢神経はシュワン細胞という末梢性グリア細胞が神経軸索を被覆しているが、神経組織が損傷を受けて軸索が分断されると末梢側の神経軸索が変性し、それに伴いシュワン細胞が活性化され、神経軸索再生の足場を提供するだけでなくさまざまな液性因子やサイトカインを産生することにより神経再生を誘導する。最終的には神経機能発現に重要な髄鞘を再形成し、ここに跳躍伝導が可能となり、機能回復がもたらされる⁸²⁾。したがって末梢神経の機能回復を視野に入れるなら、

シュワン細胞,あるいはシュワン細胞としての機能を有する細胞を移植することが目的にかなっていると考えられる。

a. 分化誘導を行わないそのままの間葉系幹細胞

細胞を移植する場合, 損傷の激しい部位に細胞を注入・投与しても, 多くの場合は細胞が流出し生着せず有効に機能しえないため, 物質透過性チューブなどの組織工学的的手法により作製されたマテリアルに細胞を充填して移植する方法が一般的に採用されている。

骨髄や脂肪, 臍帯由来の分化誘導を行わないそのままの間葉系幹細胞を末梢神経に移植すると, 細胞をまったく充填しない素材のみの移植に比べて多少の再生効果がみられる。しかし, それは trophic 効果によるところが大きいと考えられる。というのも, 移植された細胞が髄鞘形成能を有するシュワン細胞に自発的に分化転換するという現象はほとんどみられないからである^{83,84)}。

一方, 間葉系幹細胞は特定のサイトカインや還元剤などを投与することによりシュワン細胞と同等の機能を有する細胞に分化転換させることが可能である。誘導シュワン細胞あるいは誘導を行わない間葉系幹細胞を移植した場合を比較すると, 形態学的にも機能的にも誘導したほうが効率的な再生効果をもたらすことが可能である^{83,84)}。

b. 骨髄間葉系幹細胞から誘導したシュワン細胞

骨髄間葉系幹細胞からのシュワン細胞誘導については, 2001年の出澤らの発表が最初である^{83,84)}。この方法では, 骨髄間葉系幹細胞を血清不含培地に還元剤である β -メルカプトエタノールを入れて24時間, その後血清を入れた培地に全トランスレチノイン酸(all-trans-retinoic acid)を添加したもので2~3日培養し, 最後にbFGF, PDGF, Heregulin, フォルスコリン(細胞内cAMP濃度上昇作用)の4因子を同時に加えた血清入り培地で分化誘導を行うと, P0, p75, O4, GFAP, MAG, ミエリン塩基性蛋白質, P0, PMP22などのシュワン細胞マーカーを発現し, 末梢神経内でミエリンを形成する能力を有する細胞に分化させることが可能である。シュワン細胞誘導効率は97%と非常に高率で, 末梢神経損傷モデル移植において組織学的に有意な軸索再生促進効果, 電気生理学的に有意な神経機能回復, 電子顕微鏡観察による髄鞘形成が認められた⁸⁵⁾。この分化誘導法によって得られたシュワン細胞はラット骨髄間葉系幹細胞とラット末梢神経損傷モデルで有効性が証明されただけでなく, ヒト骨髄間葉系幹細胞から分化誘導したシュワン細胞が免疫不全ラットの系でも同様に有効であることも確認されている⁸⁶⁾。さらにカニクイザルの骨髄間葉系幹細胞から誘導したシュワン細胞を同一

個体の正中神経に移植し、PET、電気生理などを用いた1年にわたる評価を行った結果、有効性と安全性の両方が確認された⁸⁷⁾。その後、さまざまな研究グループがこの分化誘導法とその再生促進効果を追試しており、この分化誘導法を基本として骨髄以外の間葉系幹細胞に応用している⁸⁸⁻⁹²⁾。

シュワン細胞の誘導機構について考察する。 β -メルカプトエタノールとレチノイン酸は必須の要素であり、これらを除外するとシュワン細胞が誘導されない。 β -メルカプトエタノールとは還元剤であるが、骨髄間葉系幹細胞に作用するとグルタチオンの合成を高めることにより神経系の細胞への分化を促進すると考えられる。レチノイン酸は発生における形態形成因子として作用することが知られており、MASH1, NeuroDなどの転写因子発現を誘導し神経栄養因子に対する反応性の獲得に寄与すると思われる。bFGF, PDGFはシュワン細胞の発生・分化に

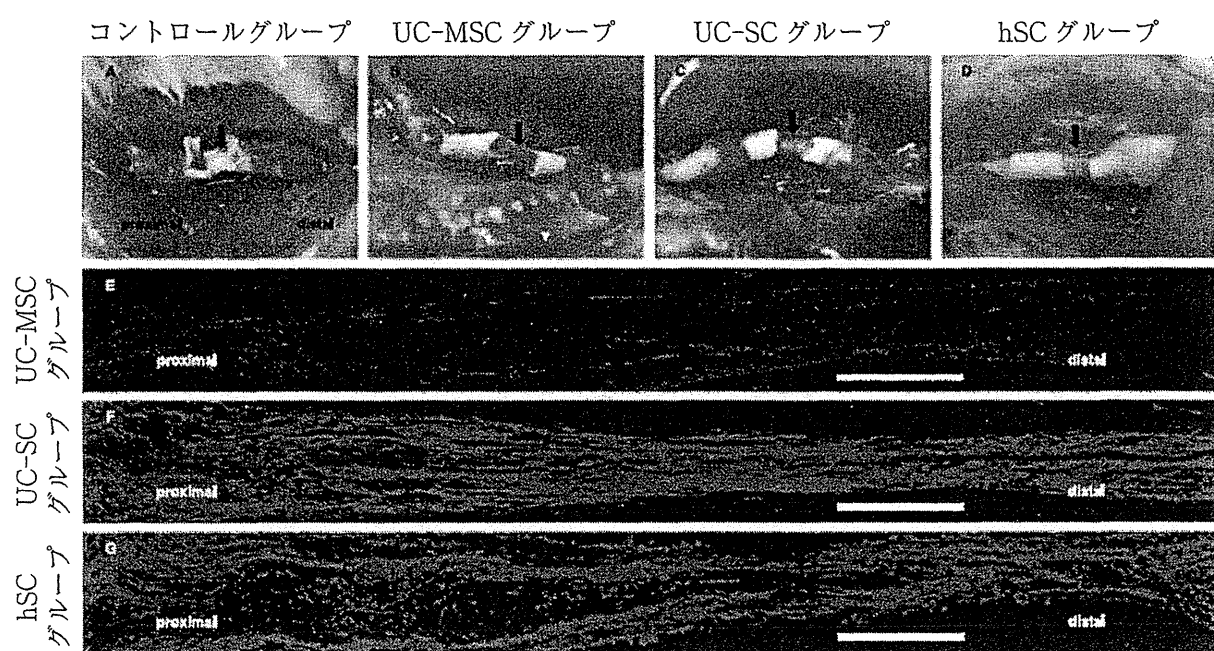


図 11.3 ヒト臍帯由来間葉系幹細胞から誘導したシュワン細胞によるラット末梢神経再生 (文献 84 より転載)

ヒト臍帯由来間葉系幹細胞からシュワン細胞を誘導し、免疫抑制剤投与下でラットの末梢神経切断モデルに移植する。(A~D) コントロールグループ：物質透過性チューブにマトリゲルのみ充填, UC-MSC グループ：ヒトの臍帯由来間葉系幹細胞を分化誘導を行わずに移植, UC-SC グループ：ヒト臍帯由来間葉系幹細胞から誘導したシュワン細胞を移植, hSC グループ：ヒト末梢神経由来のシュワン細胞を移植, いずれも移植後 21 日目。矢印は移植片内。コントロールグループではチューブ内に実質性の組織は認められない。UC-MSC では脆弱な組織は観察されるがしっかりとした神経性の組織ではない。一方, UC-SC グループと hSC グループでは白色調の実質性組織が観察される。(E~G) UC-MSC, UC-SC, hSC における移植片内の免疫組織像。抗ニューロフィラメント抗体を用いた染色の結果, UC-MSC では有効な軸索再生は認められないが, UC-SC と hSC では多数の再生線維が認められる。バー=1 mm。

かかわることが知られているが、**Neuregulin**（とくに heregulin あるいは GGF）は神経堤細胞がシュワン細胞に分化する際に作用する因子であり、間葉系幹細胞からの分化誘導においても大きく寄与している。フォルスコリンは細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、神経栄養因子受容体の細胞膜発現を促進することが報告されており、bFGF, PDGF, Neuregulin の作用増強をもたらし、シュワン細胞誘導を促進するものと考えられている⁸⁴⁾。

c. 臍帯由来間葉系幹細胞から誘導したシュワン細胞

骨髄間葉系幹細胞で用いたシュワン細胞誘導法を用いることにより、臍帯由来間葉系幹細胞からでも同様に機能的なシュワン細胞を分化誘導可能であることが報告されている（図 11.3）。電子顕微鏡を用いた観察や、機能検査である walking track analysis においても、末梢神経から採取したシュワン細胞と同等の形態学的・機能的再生効果を呈することが確認されている⁸⁴⁾。そのほか、同手法により分化誘導したシュワン細胞は NGF, BDNF などの神経栄養因子も産生し神経再生に寄与するとする報告もある^{88,89,92)}。

d. 脂肪由来間葉系幹細胞から誘導したシュワン細胞

脂肪由来間葉系幹細胞からのシュワン細胞誘導については、Terenghi らのグループが最初に報告した⁹¹⁾。2001 年の出澤らの方法を応用し誘導された細胞が神経細胞との共培養において軸索再生作用を示すことを確認している。Haycock らはこれらの結果を再現し、さらに腎臓周囲の脂肪組織のほうが皮下の脂肪と比しシュワン細胞に有意に誘導しやすいことを報告している⁹⁰⁾。

11.7

ヒト間葉系組織に存在する多能性幹細胞：Muse 細胞

ヒト成人の骨髄や真皮などの間葉系組織に 1 細胞から 3 胚葉性細胞への分化能と自己複製能を有する多能性幹細胞が存在し、**Muse 細胞**（multilineage-differentiating stress enduring cells）と名づけて報告されている¹⁴⁾。この細胞はストレス耐性の細胞として見出されており、多能性幹細胞マーカーである SSEA-3（未分化ヒト ES 細胞のマーカー）と間葉系マーカー CD105 のダブル陽性細胞として、成人ヒト真皮、骨髄などの間葉系組織や間葉系の培養細胞から採取可能である。SSEA-3 のほかに Nanog, Oct3/4, Sox2 などほかの多能性マーカーも発現しており、自己複製能を有する。さらに 1 細胞から 3 胚葉性の細胞に分化する能力を有するが、骨、軟骨、脂肪、平滑筋、骨格筋などの中胚葉性細胞、

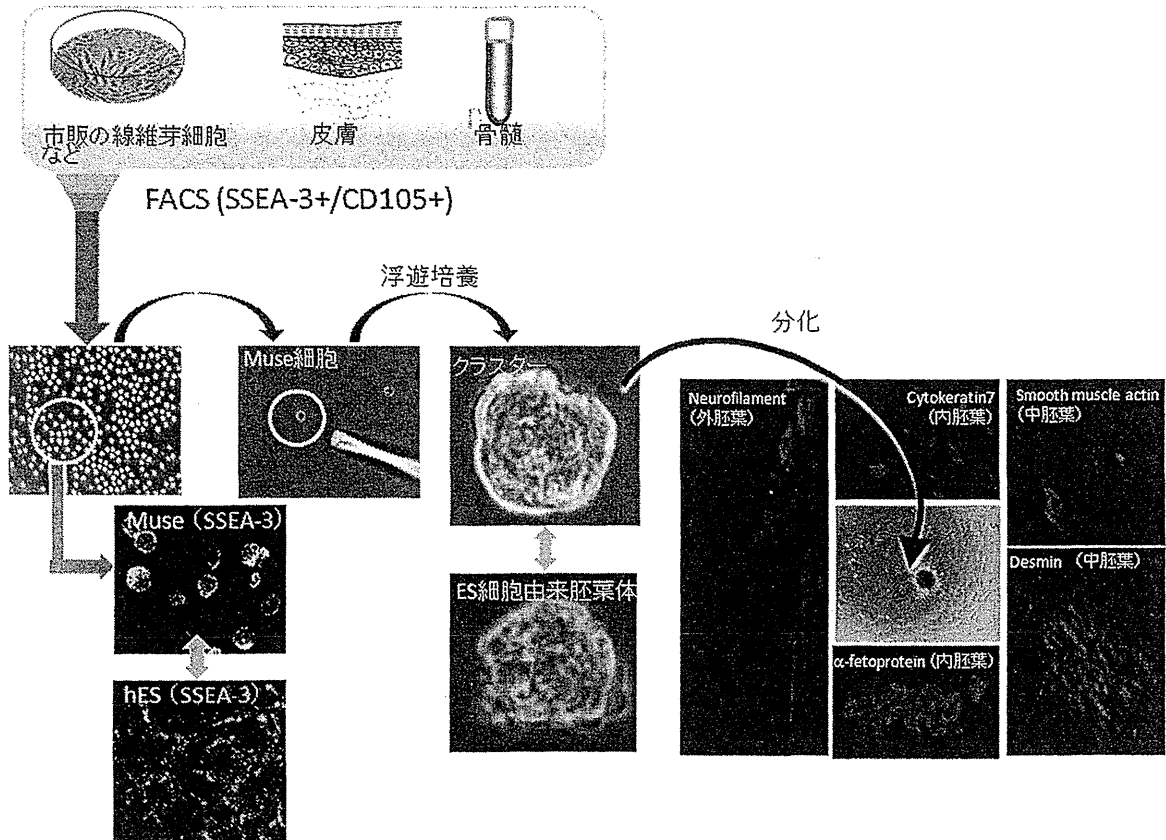


図 11.4 Muse 細胞の概要 (文献 14 を改変)

Muse 細胞は市販の間葉系培養細胞（たとえば線維芽細胞）や皮膚，骨髄などの間葉系組織から直接 SSEA-3/CD105 ダブル陽性の細胞として採取できる。この細胞を一細胞レベルで浮遊培養するとヒト ES 細胞由来の胚葉体と非常に類似した細胞塊を形成する。この細胞塊をゼラチン培養すると神経マーカー陽性の細胞を含め，3 胚葉性の細胞に自発的に分化する。

肝細胞，胆道系細胞などの内胚葉性細胞，さらに神経細胞，表皮細胞などの外胚葉性細胞に分化することが報告されている¹⁴⁾ (図 11.4)。

Muse 細胞は自発的に 3 胚葉性の細胞に分化するが，サイトカインなどを用いた特定の誘導をかけると細胞の分化を制御することが可能であり，非常に高い (90% 以上) 効率で遺伝子導入などをせずに目的とする細胞に分化誘導可能である。たとえば神経幹細胞用培地において培養後，神経分化を促進する因子で刺激すると神経系の細胞に分化する。HGF, FGF-4 などの因子を用いるとヒトアルブミン，ヒト α -胎児性蛋白質 (fetoprotein) 陽性の肝細胞に分化する。骨，脂肪なども同様にきわめて高い効率で分化する。このように多能性を有し 3 胚葉性の細胞に分化できる Muse 細胞はサイトカインなどの因子により効率的な分化誘導が可能である⁸⁷⁾。

Muse 細胞は正常なヒト組織に存在することと符合し，腫瘍性増殖能を示さな