

シンポジウム 3

再生医療の進歩

シンポジウム3 司会のことば

再生医療の進歩

iPS細胞の発見・開発により、それを応用した再生医療の発展に大きな期待がもたれている。また、iPS細胞を利用した再生医療の可能性に脚光が当たると、それ以外の再生医療も再評価されてきている。本シンポジウムでは最近進歩の著しい再生医療の現状について、5名から報告・発表され、個々の発表について活発な質疑が行われた。

木村貴文先生(京都大学iPS細胞研究所)からはES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞を用いた再生医療の世界および日本の全体的な動向、および再生医療にかかる法整備の状況が発表された。

iPS細胞を用いた再生治療の具体的な研究については、赤松和土先生(慶應義塾大学医学部生理学教室)から神経疾患研究を効率良く行うため、マウス線維芽細胞に山中4因子を導入してiPS細胞を誘導する途中で、iPS細胞をクローン化する手順をスキップして線維芽細胞を神経幹細胞へと18日間で直接誘導する効率的な方法を開発し(directly induced neural stem cell; diNSC)、このDiNSCがiPS細胞由来の神経幹細胞と異なり奇形腫を作り作りづらいことが示された。また人でも同様なDiNSCが誘導でき、脊髄損傷患者に本人の繊維芽細胞由来のDiNSCの自家移植により安全で有効な治療が行われる可能性について言及された。

河本宏先生(京都大学医科学研究所再生免疫学分野)からは、ガン特異的T細胞からiPS細胞を作製すると、このiPS細胞は再構成されたT細胞レセプター遺伝子を持っているので、これを大量培養してキラーT細胞を誘導すると、ガン特異的なレ

江藤浩之(京都大学iPS細胞研究所臨床応用部門)

田所憲治(日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)

セプターを発現し、ガン特異的に活性化するキラーT細胞を大量に誘導でき、この方法がガン特異的な免疫療法を行う有望な方法となりうることが報告された。

一方、iPS細胞を用いない再生医療としては2つの発表があった。七戸秀夫先生(北海道大学医学研究科脳神経外科)からは、骨髄間質細胞は神経細胞に分化することが知られており、これを用いた中枢神経の再生医療のため、ウシ胎児血清の代わりに他家血小板用溶解物を用いる骨髄間質細胞培養法を開発し、こうして培養された骨髄間質細胞が細胞表面抗原、栄養因子産生、神経細胞分化能がウシ胎児血清を用いたものと同等で、ラット脳虚血モデル移植後の細胞生着、神経機能回復が同等以上であることが発表され、現在臨床試験に向けて準備中であることが報告された。

また、上田実先生(名古屋大学大学院医学系研究科頭頸部感覚器外科講座顎顔面外科学)からは、従来再生医療は損傷した組織臓器に幹細胞を移植することで再生が行われると考えられてきたが、脳梗塞ラット、脊髄損傷ラット、劇症肝炎モデルラットなどでは幹細胞培養上清の投与が幹細胞の移植と治療成績が同等であり、培養上清としては乳児歯髓幹細胞の培養上清が最も大きな治療効果を示したことを報告し、治療の困難な急性期臓器不全にたいして、乳歯髓幹細胞由来培養上清の投与は安全かつ臨床応用可能な有効な治療法であり、幹細胞移植一辺倒の再生医療に新たな分野が生まれる可能性を示した。

シンポジウム3

iPS細胞技術を用いた神経疾患研究と治療

赤松和土 (慶應義塾大学医学部生理学)

神経幹細胞は神経損傷・神経変性に対する細胞移植治療の移植源として有効であることが報告されてきた。脊髄損傷モデル動物に対しては、ラット神経幹細胞(Ogawa *et al.* J.Neurosci Res. 2002), マウスES細胞由来神経幹細胞(Kumagai *et al.* Plos One 2008), マウスiPS細胞由来神経幹細胞(Tsuiji *et al.* PNAS 2010)が、治療効果を有することが報告されている。近年報告されたiPS細胞の樹立技術は、損傷患者に対する自己移植の可能性を切り開き、安全で倫理的に問題のない移植医療が確立されることが期待されている。しかしながら脊髄損傷においては損傷部位が癒着化する以前の時期(マウスでは受傷後7~14日程度)に細胞移植を行わないとその効果がほとんどないことが明らかになっている(Ogawa *et al.* J.Neurosci Res. 2002)。これに対してiPS細胞は樹立および神経分化誘導に必要な期間はマウス細胞で2カ月、ヒト細胞で3~4カ月以上を要するため、iPS細胞の大きなメリットの一つである自家移植を目指すためには、より早く細胞を誘導する技術の開発が必要である。さらに現在のiPS細胞の樹立技術では樹立されたクローンにおける腫瘍原性を詳細に評価した後でないと、樹立されたiPS細胞が安全であるかどうか

かは担保できない。しかしながら現状では成体細胞から得たマウスiPS細胞から神経幹細胞に分化誘導を行っても、極めて高い確率で未分化細胞が残存し、移植動物に奇形種を引き起こすことが報告されている(Miura *et al.* Nature Biotech 2009)。近年では線維芽細胞への転写因子導入を用いたダイレクトリプログラミングによって、神経細胞への直接誘導が可能であると報告されているが(Vierbuchen *et al.* Nature 2010)、これらの細胞はpost-mitoticで、*in vitro*で増殖させることができないという欠点がある。我々はこの問題を解決するために、体細胞から直接に安全かつ増殖可能な神経幹細胞を得る方法について検討を行った。山中4因子の導入によりリプログラミング過程にあるマウス線維芽細胞を、低密度でLIF/FGF以外のシグナルを含まない培養に移行することにより、iPS細胞をクローン化する手順をスキップして線維芽細胞を神経幹細胞へと18日間で直接誘導する方法を開発した(directly induced neural stem cell; diNSC) (図1)。diNSCの詳細な解析を行ったところ、胎児線維芽細胞由来のdiNSCはES/iPS細胞由来の神経幹細胞とほぼ同様の性質を持っていたが、成体線維芽細胞由来のdiNSCはマウス胎児

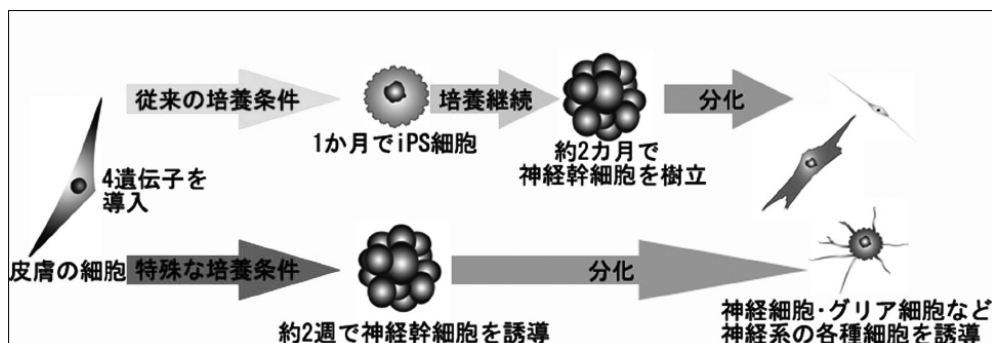


図1 皮膚の細胞から神経幹細胞の直接誘導

由来の神経幹細胞と同様に迅速にグリアを生み出す成熟神経幹細胞へと迅速に分化し、多能性幹細胞由来の神経幹細胞とは異なる性質を持つことが明らかになった。次に我々はdiNSCの安全性に関する検証を行った。マウスiPS細胞から神経幹細胞を誘導した場合、分化誘導した移植細胞に含まれるNanog陽性細胞が0.01%以下(1万個に1個以下)でないと、高率に移植個体に奇形種を形成することが報告されている(Miura *et al.* Nature Biotech 2009)。この含有率はiPS細胞のクローンによって大きく異なり、樹立後に慎重にクローンを選択し、その安全性を検討する必要がある。さらに、成体皮膚から誘導したiPS細胞では、このような性質を持つ安全なiPS細胞を得ることはほぼ不可能であった。diNSCにおいて、同様にNanogレポーターの発現を指標に腫瘍化能の評価と安全性の検討を行った。diNSCはクローンとして細胞を樹立しないため、元細胞の性質が同様であれば、同様の培養法で得られたdiNSCの分化傾向は集団としてはほぼ等しく常に再現された。我々は培養条件をさらに検討することにより、Nanog陽性細胞が常に10万個中0個、というdiNSCを誘導することに成功した。diNSCのようなグリアを産生する神経幹細胞は、これまでの研究でマウス脊髄損傷モデルへの治療効果を有していることが推測されるため、この方法を用いると結果的にiPS細胞を経由するよりも早く安全でグリア産生可能な神経幹細胞を調整できる可能性が見いださ

れた。次に我々はこのdiNSCがヒト細胞でも誘導できれば、移植までの時間が限られる疾患に対して有効で安全な移植源になるのではないかと考えた。マウスと同様の方法でヒトdiNSCの誘導を試みたところ、皮膚繊維芽細胞への遺伝子導入から約2週間でニューロンを産生するNeurosphereが誘導された。従来、iPS細胞の樹立に2カ月程度、分化誘導にも2カ月程度の期間を要していたことから考えると、飛躍的に所要時間を短縮することができた。現在我々は安全性の高いヒトdiNSCの効率的な誘導法を開発しているが、ヒトdiNSCが神経損傷への移植において、安全性が高く治療効果を有することが示されれば、さらに腫瘍化しないクローンの選択と評価の期間が不要になることを考慮すると、実際の脊髄損傷患者への臨床研究が極めて近いものになると考えられる。現在では脊髄損傷患者に対するiPS細胞由来細胞を用いた治療は、その有効期間の短さから、あらかじめ細胞バンクにストックされたHLA抗原適合のクローンを他家移植することによって行われると期待されており、免疫拒絶の問題、他家移植の安全性など、iPSの優位性を十分に享受できない点が大きな課題として残されていた。そのような欠点を補うためにヒトdiNSCが安全で有効な細胞移植源であることが示されれば、一気に脊髄損傷の治療そのものを変える標準的な治療となることを期待して研究を進めている。

シンポジウム3

Platelet lysateで培養した骨髄間質細胞移植による脳梗塞再生医療

七戸秀夫, 寶金清博(北海道大学医学研究科脳神経外科)

1. はじめに

わが国の疾患別死亡率は1970年以前には脳卒中が圧倒的に高い比率を占めて第1位であった。しかしながら、1970年代以降、脳卒中の死亡率は劇的に減少しており、現在では第4位となっている。しかし、脳卒中の有病率は依然として高く、厚生労働省「平成21年度国民医療費の概況」によると国民総医療費36兆67億円のうち脳卒中には1兆5,513億円が費やされ、前年度から1,207億円増加した。また要介護者の原因疾患のうち脳卒中が最多の24%を占め、さらに重症なものほどその占める割合が高い(要介護5:33.8%,平成22年度国民生活基礎調査の概況)。すなわち、脳血管疾患の救命率は改善しているものの、重篤な神経症状を後遺して日常生活に多大な支障をきたしている患者は増加しているのが現状である。とりわけ近年、脳卒中のなかで脳梗塞の発症率が増加している。そのため脳梗塞の後遺症により日常生活に多大な支障を来している患者に対し、神経機能を回復させるための治療法開発は従来から課題となっていた。しかし国内外で長きにわたり研究が行われてきたものの、有効な治療薬はほとんど発見されていない。後遺症としての神経症状の改善を見込める治療は、現状ではリハビリテーションだけであるが、その治療効果には限界がある。

脳梗塞など中枢神経疾患の有する問題点は、脳組織がひとたび障害を受けるとその再生が非常に困難であるということにつきる。いまから約1世紀前、スペインの神経解剖学者ラモニ・カハールは末梢神経には軸索再性能があるが中枢神経にはそのような再生は見られないと記述した。それから約100年間に渡って中枢神経系は再生が起る環境を失っているとの考え方が支配し続けた。しかし、20世紀末に至ってこれを覆す知見が次々と発表されつつある。最もインパクトを与えたものは、生涯に渡る神経幹細胞の存在の発見であり、成人脳においても自己増殖能と神経細胞への分化能を

有する細胞が存在していることが明らかとなった。現在では虚血のみならず、外傷、神経変性などさまざまな原因による中枢神経系疾患で、再生医療の可能性がひろく模索されている。

2. 自家骨髄間質細胞を用いた脳梗塞再生医療

最近、さまざまな幹細胞をもちいた再生医療が急速に進歩しており、これまで困難であった脳梗塞の後遺症を回復させるためのブレイクスルーとして期待されている。なかでも骨髄間質細胞(bone marrow stromal cells; BMSC)は、1998年に神経系細胞へも分化しうることが報告されてから、注目を集めるようになった移植ソースである¹⁾。BMSCとは本来、骨髄腔内の壁在細胞であり、生理的には造血幹細胞の生存、増殖に関わるnicheを形成すると考えられている。骨、軟骨、脂肪組織に分化可能なことから間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)の別名も持つ。BMSCのもつ神経保護作用には、大きく分けて3つの機序が考えられている。一つは、移植されたBMSCが神経系細胞に分化するというもの(Transdifferentiation)。もう一つはドナー細胞が、レシピエントの障害された神経細胞に細胞融合するというもの(Cell fusion)。さらには、BMSCが損傷組織の周辺部でサイトカインや栄養因子を分泌し、神経保護効果を発揮するというものである(Nursing effect)。これらは、BMSCの有するheterogeneityに由来する多面性効果であると考えられる²⁾。

またBMSCは患者自身の骨髄から採取・培養が可能であり、ES細胞やiPS細胞に比べ生命倫理的な問題や免疫反応、腫瘍形成などの問題がなく、臨床応用を考える上できわめて有利である。このため、自家BMSC移植による脳梗塞患者に対する中枢神経再生医療は、国内外で小規模な臨床試験として開始されつつある^{3), 4)}。脳梗塞に対する再生医療の本格的な臨床応用は、患者各人における幸福の実現にとどまらず、高齢化が進み脳卒中に

対する治療・介護の費用が今後も増加すると予想されるわが国の福祉や医療経済の上からも、きわめて重要な課題であると考えられる。

3. Platelet lysateを用いたBMSC培養と、中枢神経再生

しかし、BMSC移植治療を臨床応用する上で残された問題の一つに、細胞培養法の安全性がある。過去の報告では、脳梗塞に対するTherapeutic time windowの観点から急～亜急性期の間にBMSCを移植することが望ましいとされる⁵⁾。骨髓採取後に移植に必要な細胞数まで培養するため、現在の技術で3～4週間かかる。ほとんどの基礎研究では、培養に必須な添加物としてFCS(ウシ胎児血清)が用いられてきた。過去の臨床応用でもFCSが使用されてきたが、動物由来物質の使用は可能な限り避けるべきである。HonmouらはFCS代替品として自家血清をBMSC培養に使用したが⁴⁾、脳梗塞患者の多くは高齢で自家血清の活性に懸念があり、またしばしば低栄養状態に陥るため大量の血清を採集することに懸念がある。

この問題を回避するために、ヒト血小板溶解物(platelet lysate; PL)を用いたBMSC培養法が報告されている。血小板は内部に豊富な栄養因子を含むことが知られており、PLは凍結解凍により血小板を破碎し遠心分離で細胞膜を除去して精製される。2005年にDoucetらがPLの有用性を報告して以来、現在までに数多くの報告がみられ、臨床応用も行われている⁶⁾。そのため、われわれは他家ヒトPLをもちいたBMSCの安全かつ効率的な培養法を、非臨床試験にて検証した。方法は、有効期間切れ人血小板濃厚液(日赤)を用いてPLを作成し、ボランティア由来のヒトBMSCを培養した(5% PL群, 10% FCS群)。in vitro実験とともに、ラット脳梗塞モデルの同側線条体へ虚血7日後に定位的移植(5×10^5 個)し解析を行った。結果、5% PLを用いて培養したヒトBMSC(PL-BMSC)は10% FCSを用いたもの(FCS-BMSC)と比較して、細胞表面抗原において相違はみられなかった(陽性: CD44, CD90, CD105, CD166, 陰性: CD34, CD45)。培養速度に関してはほぼ同等であった。培養液上清中の栄養因子に関してELISA法で測定すると、PL-BMSCではBDNF, HGF, β -NGF, TGF- β 1の分泌がみられ、これらが移植された組織にて神経保護作用を示すと考えられた。

レチノイン酸やbFGFを用いた、in vitroでの化学的刺激による神経系細胞分化誘導においては、両者とも一部の細胞に神経系細胞のマーカー(Tuj1, GFAP)発現がみられ、神経系細胞への分化傾向を示した。また、PL-BMSCをラット脳梗塞モデルの脳内に直接移植すると、脳梗塞により障害された運動機能をvehicle群に比べ有意に回復させた。移植8週後に組織学的検討を行うと、ホスト脳に細胞生着が観察され、多くは病変部へ遊走を示していた。これらの細胞の一部は神経系細胞への分化傾向を示した。また超常磁性酸化鉄(superparamagnetic iron oxide; SPIO)製剤をもちいてPL-BMSCをラベリングし、ラット脳梗塞モデルに移植すると、移植8週後までMRIで細胞追跡が可能であった。

すなわちPLを用いて培養したヒトBMSCは、細胞表面抗原、栄養因子産生、神経系細胞への分化能のいずれにおいてもFCSで培養したものとほぼ同等であり、また培養速度や、ラット脳虚血モデル移植後の細胞生着、神経機能回復のいずれにおいても同等以上であることを示した。

4. 臨床試験に向けた取り組み

われわれは上記の研究成果に基づき、医師主導による『新たな培養・移植・イメージング技術を駆使した自己骨髓間質細胞移植による脳梗塞再生治療—治療メカニズムの解明を目的とした臨床試験』(RAINBOW研究)を、平成27年度の開始に向け準備中である。本研究は、以下の点で過去の臨床試験と異なる新規性のあるプロトコルである。

- ①他家PLをもちいた、自己BMSCの安全かつ効率的な培養法
- ②脳梗塞周辺部への効率的な移植を目指した、脳定位的手術による直接細胞移植法
- ③MRIによる移植細胞の挙動把握(cell tracking)を目的とした、SPIO製剤をもちいたBMSCラベリング法

具体的には、対象となる脳梗塞患者から亜急性期に骨髓を採取し細胞培養を行う。この際にボランティア由来のPLを添加物として用いる。3～4週間培養し必要な細胞数(5×10^7 個)以上に達したら細胞を回収し、患者脳内の病変周囲数カ所に定位的移植される。またMRIによるcell trackingを行うため、移植24時間前にSPIO(リゾビスト[®], 富士フイルムRIファーマ)でBMSCをラベリング

する。

本研究に関して、われわれの施設は『平成24年度革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業実施機関』に選定された。本事業では(独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)と連携し、革新的な技術に基づく再生医療製品について有効性、安全性を確立するための研究が求められている。上述した他家ヒトPLを用いたBMSC培養法のように、その成果により中枢神経再生療法に新しい

道を切り拓くだけでなく、再生医療全体(たとえばBMSCを用いた関節軟骨損傷、GVHD、虚血性心疾患などの治療)の進展にも大いに寄与するものと期待される。現在は日本赤十字社北海道ブロック血液センターとの共同研究として、PL作成目的にボランティアから血小板成分採血をおこなっている。しかし、今後のPLの安定供給を目的に、有効期間切れ人血小板濃厚液を使用した研究を現在申請中である。

文 献

- 1) Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. 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: 3908-3913
- 2) Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, Yano S, Hida K, Iwasaki Y. Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J Neurosci Res*. 2007; 86: 1024-1035
- 3) Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*. 2005; 57: 874-882
- 4) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, *et al*. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain*. 2011; 134: 1790-1807
- 5) Kawabori M, Kuroda S, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y, *et al*. Timing and cell dose determine therapeutic effects of bone marrow stromal cell transplantation in rat model of cerebral infarct. *Neuropathology*. 2013; 33: 140-148
- 6) Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, *et al*. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005; 205: 228-236

シンポジウム3

幹細胞培養液を用いた臓器の再生

上田 実(名古屋大学大学院医学系研究科頭頸部・感覚器外科学講座顎顔面外科学)

はじめに

再生医療の基本戦略は損傷した組織・臓器に、幹細胞を移植することで、それらを再生するものと考えられてきた。しかし実際に幹細胞移植を行うには、高額な培養施設、人材、細胞の扱いにくさに加えて、移植幹細胞の腫瘍化というリスクが完全に消去できないことが問題点として指摘されている。

本稿でわれわれは、特定の急性臓器不全にたいしては、幹細胞の移植なしの再生医療が可能であることを記述する。

そもそも幹細胞のような活性の高い細胞を生体内に注入するためには、安全面でのハードルが高くなるのは当たり前である。いったん生体内にはいった幹細胞は事実上追跡の方法はなく、全身的、局所的にどのような働きをしているかわからない。

またどのような機序で体外に排出されるのかも不明である。

再生医療が始まったころには、ごく大雑把に次のように、理解されていた(図1)。ヒトの身体に病気や外傷ができれば、健康な細胞を外から移植すれば元のような組織が再生して病気は治る、移植する細胞(幹細胞)は自分の細胞を培養したものだから免疫反応も起きないし、培養すればいくらでも増やすことができる。幹細胞は、分化能や増殖能にすぐれている。したがって移植した場所が、心臓なら心筋の細胞に、脳なら神経細胞に分化して、ダメになった細胞と置き換わってくれる(細胞置換)、というものである。

幹細胞の威力を示した有名な研究は、脊髄損傷のラットを幹細胞移植で治療した実験である¹⁾(Ide, 2010)。脊髄を損傷すると障害をうけた場所

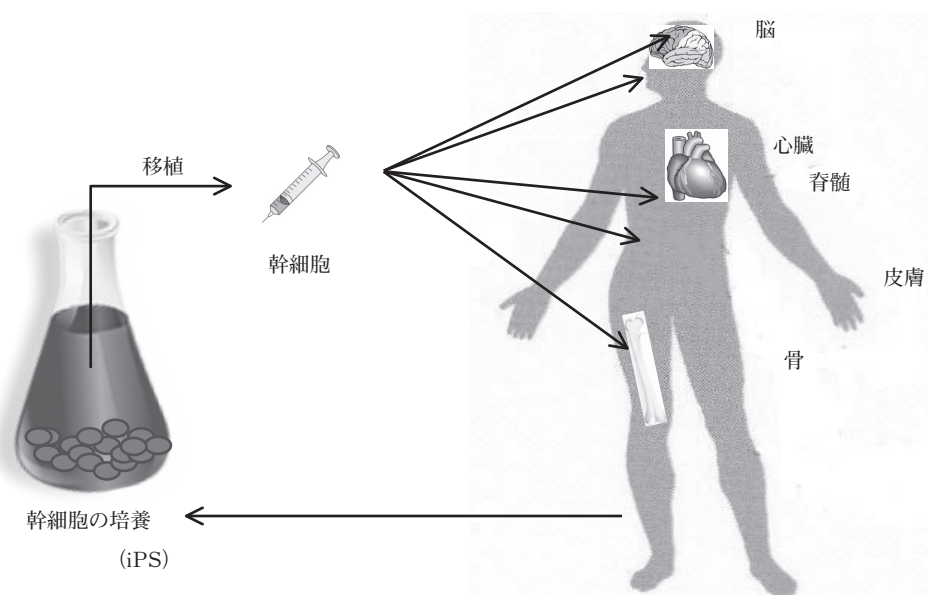


図1 古典的な再生医療の原理

より遠位の運動機能はまったく失われるので、歩行はできなくなる。しかし損傷した脊髄の部位に幹細胞を移植すると、8週ぐらいで、下肢をうごかしかろうじて歩行できるようになる。定説にしたがえば、移植した幹細胞が脊髄神経に分化して軸索を再生し下肢をうごかしたのだろう。ところが、移植した幹細胞にマーカーをつけて脊髄を観察してみると、驚いたことに移植細胞は2週間以内にすべて消えていたのである。同じような実験が心筋梗塞モデルでもみられた。人工的に心筋梗塞を起こした心臓に骨髄幹細胞を移植すると、梗塞部分が縮小する。しかし、移植した幹細胞は早期に消失してしまう²⁾ (J. M. Ehmsen)。こうした実験からわかることは、幹細胞は破損した組織の機能細胞に直接置き換わるのではなく、幹細胞から分泌される液性成分が微小環境を整えて、内在性幹細胞とともに組織を再生したと考えざるをえない。

幹細胞から分泌される液性成分とは

幹細胞の直接的な置換がなくとも組織が再生するとすれば、幹細胞の移植は必要なくなり、そのかわりに幹細胞の分泌する液性成分だけを投与すれば再生医療ができる。

培養中の幹細胞は生体と同じ環境で生きている。したがって幹細胞の生産するすべての物質は培養液中に蓄積される。われわれはこれらの培養液の成分を分析したところ、少なくとも200～300種類のサイトカイン50以上の細胞外マトリクスが存在することが明らかになった。ただし、個々のサイトカインや細胞外マトリクスのすべての機能はあきらかではない。しかし総体としての幹細胞培養液は、以下のような効果を持っていることが明らかになっている。1) 2) 細胞増殖促進, 3) 細胞遊走効果, 4) 血管新生, 5) 細胞保護効果, 6) アポトーシスの減少, 7) 抗炎症効果, 8) 免疫抑制効果, 9) 細胞外マトリクスの安定性維持, である。

また培養液中に含まれるサイトカインは、幹細胞の種類にそれぞれにきまったサイトカインライブラリーと細胞外マトリクスが存在することも分かった。

われわれはこうした幹細胞のなかでも、中枢神経再生をターゲットにするために乳歯髄幹細胞に注目した。この細胞は神経堤細胞由来で、非常に増殖能が高く、強い抗炎症効果、細胞保護効果、

さまざまな神経細胞に分化する能力を持っている³⁾。

われわれがおこなった乳歯髄幹細胞の培養液もちいた脳梗塞の治療実験について紹介する。

幹細胞培養液を用いた脳梗塞の治療実験

脳梗塞の再生医療は比較的古くからおこなわれており、有名なのは骨髄幹細胞を静注することで、一部の細胞が血液脳関門を通過して梗塞部にいたり、先に述べた骨髄幹細胞のパラクライン因子と内在性幹細胞で脳梗塞を治癒させるというものである⁴⁾。

われわれは、中大脳動脈に血栓を作ることで作成した永久脳梗塞モデルに歯髄幹細胞を梗塞部に直接注入することで運動機能が改善し、梗塞体積が縮小することをまず明らかにした⁵⁾。つぎに同じ脳梗塞モデルラットに乳歯髄幹細胞の培養上清 (SHED-CM) を経鼻的に投与した (1日10 μ L 15日間) 投与した。経鼻投与を選択した理由は、投与が簡便で、静脈投与にくらべてBBBを回避しやすい、全身への影響が少ない、臭球を介した脳内への薬物投与法が確立されていることである。図2は脳梗塞領域の計測結果を示す。梗塞16日目の資料において、左はコントロール (PBS投与群) 右はSHED-CM投与群で、有意に梗塞体積の縮小がみとめられる。

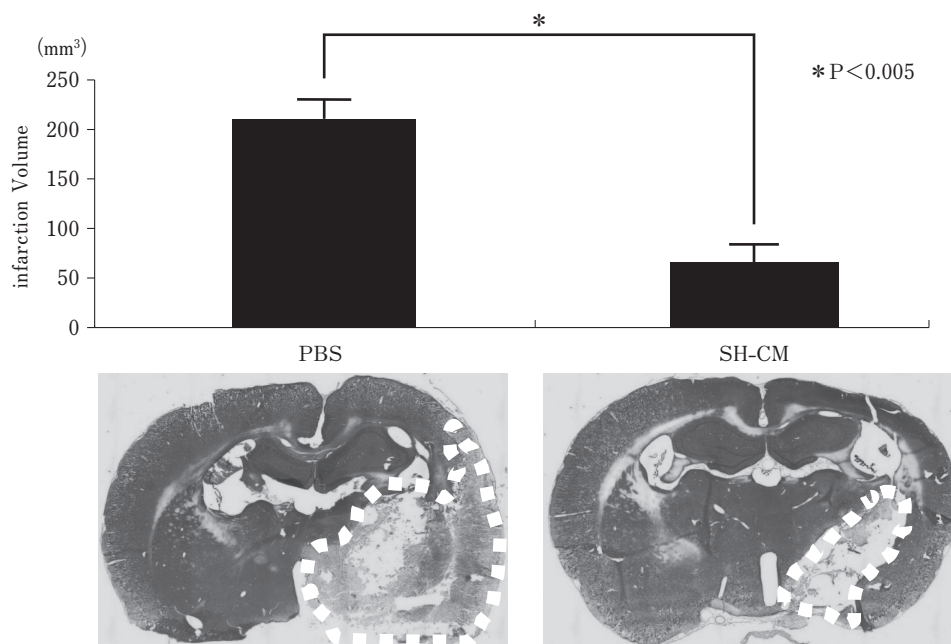
運動麻痺スコアの変化もコントロール群と比較してSHED-CM投与群で有意に運動麻痺の回復がみとめられた。

免疫染色をみても神経幹細胞、神経前駆細胞マーカーであるdoublecortin (DCX)、神経細胞マーカーであるneurofilament (NF)、NeuN、血管内皮細胞マーカーであるRECA-1の抗体を用いて脳梗塞部位における免疫組織化学染色の結果を示す。コントロール群と比較してSHED-CM群で陽性細胞の増加を認めた。

以上のように乳歯髄幹細胞の培養液は脳梗塞モデルラットは、幹細胞移植に匹敵する効果を示した⁶⁾。このことは幹細胞の移植が必須のものではなく、幹細胞の分泌するサイトカインは、幹細胞移植と同等の再生能力を示し、幹細胞を用いない再生医療が可能であることを強く示唆している。

幹細胞を用いない再生医療

幹細胞移植が細胞レベルでの移植医療であると



脳梗塞16日後に採取した資料において左はコントロール、右はSHED=CM投与群で優位に梗塞領域の縮小が見られる

図2 脳梗塞領域の計測

すれば、幹細胞培養液による再生医療は一種の薬物療法といえる。したがって治療スキームが根本的に異なってくる。移植には必ずドナーが必要だが薬物療法は工場生産された培養液が準備されて随時使用可能である(図3)。細胞移植の場合、全身投与の際の影響(肺栓塞など)、排出の問題もある。もっとも懸念されるのは幹細胞の腫瘍化の問題である。培養細胞を使用する限り、さけて通れないリスクである。しかし幹細胞培養液の投与だけなら腫瘍化の危険はほぼゼロといってよい。

ただ幹細胞移植が全く必要ないということではない。幹細胞培養液の効果は、急性期の進行性の疾患を、内在性の幹細胞の微小環境を整えることで組織の破壊を食い止め、再生に向かわせる。し

たがって慢性の変性性疾患などでは内在性幹細胞は絶滅したと考えられるので、外来性に幹細胞を補充する必要があるかもしれない。

おわりに

以上より治療の困難な急性期臓器不全にたいして、乳歯髄幹細胞由来培養上清の投与は安全かつ臨床応用可能な有効な治療法であり、幹細胞移植一辺倒の再生医療に新たな分野が生まれる可能性を示すものである

幹細胞を使わない再生医療が可能なら、その実用化にとって計りしれないメリットをもたらす。

今後は培養上清中の成分分析を進めるとともに、製剤化に向けた機能成分の特定に努めたい。

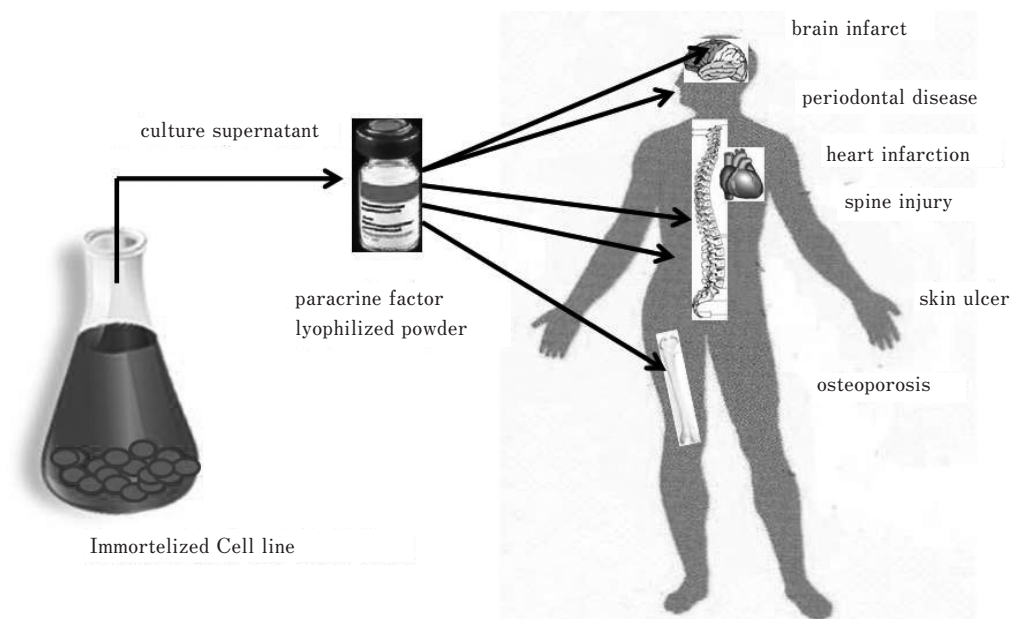


図3 幹細胞を用いない再生医療の概念図

引用文献

- 1) Ide, C *et al.*: Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat • Brain Res. 1332, 32-47 (2010)
- 2) Mueller-Ehmsen, J.: Survival and development of neonatal Rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium J. Mol. Cell. Cardiol/34: 107-116 (2002)
- 3) Miura, M. *et al.*: SHED: stem cell from human exfoliated deciduous teeth, Proc. Ntri. Acad. Sci. USA, 100: 5807-5812, 2003
- 4) Honmou, O *et al.*: Intravenous administration of aut-serum expanded mesenchymal stem cellin stroke. Brain 134, 1790-1807, 2011
- 5) Sugiyama M, *et al.*: Dental pulp-derived CD31/CD146 side population stem/Progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rat. Tissue Engineering part A. 17 (9-10): 1303-11, 2011
- 6) 服部 宇：歯髄幹細胞由来成長因子を用いた脳梗塞の再生医療, 医学の歩み, 239 : 841-845, 2011