体内細胞動員による再生治療

大阪大学大学院医学系研究科

金田安史*

Tissue regeneration by recruitment of stem cells to injured tissues

Much attention has been paid to stem cell therapy. Current strategy is the use of pluripotent stem cells such as embryonal stem cells or induced pluripotent stem cells. Recently, it is found that stem cells derived from various tissues such as bone marrow and adipose tissue may have potential to regenerate injured tissues. However, as far as transplantation of stem cells or differentiated cells from stem cells is involved, physiological tissue regeneration may not be achieved. Furthermore, cell-transplantation therapy may not be widely spread in the world. Gene therapy for neovascularization using angiogenic genes has presented a new concept for tissue regeneration. A novel strategy for tissue regeneration is the recruitment of stem cells to injured tissues and the induction of physiological differentiation of stem cells for tissue repair. Several factors have been reported to achieve *in vivo* tissue regeneration. For example, HMGB1 (high mobility group protein 1), a multifunctional protein, can egress mesenchymal stem cells from bone marrow and SDF-1 (stromal cell derived factor-1) may be associated to recruit those stem cells to injured tissues. Herein, I introduce the current status of recruitment of stem cells for tissue repair.

現在行われている再生治療は、主として体外培養した幹細胞の移植である。これにより従来治療が困難と思われていた難治性疾患の治療の可能性が示されてきた。一方で、体外培養することによる遺伝子発現の変化も否定できない。たとえ有効性が示されたとしても用事調整の細胞では広く治療剤として普及することは難しい。もし体内の幹細胞を損傷部位に集積させて分化させることができれば、最も自然な形で組織再生が可能になるとともに、その誘導因子は再生治療剤として世界中に利用されるであろう。そのような幹細胞の損傷組織への動員や分化を促進する因子の研究も進んでおり、臨床応用に近づいているものもある。その取り組みの現状を紹介する。

Yasufumi Kaneda*

Keywords: stem cell, tissue repair, HMGB1, SDF-1, cell recruitment

血管新生遺伝子治療がもたらした新概念

近年、ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生治療の可能性が示されてきている。その再生治療はそれら多能性細胞そのものの移植や、あるいは体外で分化させてから体内移植を行う方法である。難病治療に光明を与える一方で、造腫瘍性や抗原性などの問題も依然として指摘されている。もし体内で分化能を有する細胞を損傷部位に誘導し組織再生を促進することができれば、最も自然な形で治療ができる

であろう。そのためには生体内の幹細胞に焦点を当てて、それが分化できる微小環境を研究するとともに、それらの幹細胞を損傷部位にまで呼び寄せて集積させる因子の同定が必要である。それが果たして可能かどうか？その実証は、1990 年末から 2000 年中ごろまでさかんに世界中で行われた血管新生遺伝子治療によって与えられたことができる。1997 年 Isner らは、閉塞性動脈硬化症やバージャー病で末梢血管の循環不全に陥っている患者に対し、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の plasmid DNA を骨格筋に注射すると下肢の血流や血圧が改善され、潰瘍も治

* Graduate School of Medicine, Osaka University

癒し下肢切断を免れることを報告した¹⁾。生活習慣病の遺伝子治療の成功例として注目を集めたこの遺伝子治療の機序は、骨格筋への遺伝子導入によって1~2週間にわたって VEGF 蛋白が産生、徐放され、血管内皮細胞の増殖と遊走が促進されて管腔形成がおこることによっている。しかし VEGF では血管平滑筋の遊走はおこさず、形成された血管は内皮細胞よりなる管腔で平滑筋を周囲に有しないために機能的ではなく透過性が高い。そこで angiopoietin 1 遺伝子の有効性を証明する報告もなされた²⁾。また肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) の遺伝子は血管内皮細胞も平滑筋細胞も増殖、遊走させるので機能的な血管新生を起こす遺伝子として臨床応用もなされている³⁾。遺伝子ではなく骨髓細胞を注入しても著明な血管新生がおこり循環不全を治療できることが報告された⁴⁾。これはおそらく骨髓細胞中に血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells; EPC) が含まれていたことによると推察される。EPC は造血幹細胞 (hematopoietic stem cell; HSC) から直接分化してくる CD34⁺, CD133⁺ のものと、いったん単核球になってから形成される CD14⁺, CD1a⁺, CD45⁺ ものものとがあり、ともに VEGFR-2⁺, CD31⁺ の表面マーカーを有している²⁾。これらが成熟した血管内皮細胞に分化すると考えられている。このような血管新生治療は、末梢血管を対象としたケースで成功例が相次いでいる。遺伝子治療や細胞治療の結果を基にしてそのメカニズムを推察すると、血管新生は angiogenesis と vasculogenesis の両方の可能性があると考えられる。前者は、既存の血管から血管内皮細胞が増殖し、matrix

methalloprotease が血管の基底膜を分解して、血管が発芽 (sprouting) するようにしておこるが、後者では、骨髓中や末梢血液中に存在する EPC が虚血部位に遊走し、増殖、分化して血管のない部位に新しい血管形成がおこる。おそらく図 1 のように前者の angiogenesis のときに、骨髓から末梢血液に出てきた EPC が虚血部位に遊走してきて管腔形成に関わっていると考えられる。これが遺伝子導入で可能であるということは、実は極めて斬新で有用なコンセプトを提供している。すなわち、1つの分子で体内の前駆細胞や幹細胞を傷害部位に動員して組織を再生する生体内再生療法の考え方である。蛋白製剤や低分子化合物でも同様な作用と成果を期待できる。実際に、fibroblast growth factor-2 (FGF-2) 蛋白を 30 μ g/kg で 1~2 回動脈内に注入する臨床試験がなされたが、著明な改善効果は認められなかった⁵⁾。蛋白製剤の応用のためには、drug

図1 虚血時における血管新生のメカニズム

- ① 虚血環境下では低酸素により matrix methalloprotease が活性化され、血管基底膜を分解し血管周囲に存在する平滑筋細胞 (VSMC) も脆弱になる。
- ② 末梢血液中には骨髓より血管内皮前駆細胞 (EPC) が供給されているが、低酸素状態になっている部位に高く発現する SDF-1 などの因子によって虚血部位に集積する。
- ③ EPC が血管の脆弱部から血管壁に入り込んで増殖を始める。
- ④ 管腔形成が促進される。
- ⑤ 増殖した EPC は血管内皮細胞 (EC) に分化し、VSMC も遊走して新生血管が形成される。

delivery system (DDS) を利用した薬剤の徐放化が必要であると考えられる。田畑らはゼラチンハイドロゲルに FGF-2 を封入し、マウスの背部に埋め込んで約 30 日かけて徐放させることにより、虚血下肢の血流改善に成功した⁶⁾。これをもとに 200 μ g の FGF-2 のゼラチンハイドロゲルを虚血下肢の筋肉内に注入し、安全性と症状改善を検証する臨床研究が行われている⁷⁾。また我々は DDS を併用した新たな血管新生ペプチドによる血管新生療法の可能性を示してきた。

血管新生ペプチドとその徐放による血管新生療法

1) 血管内皮増殖因子 AG-30 の構造と機能

我々は、循環器疾患の分子病態の解明とそれをもとにした治療分子の同定を目指し、血管内皮細胞を対象として、その生存、増殖を制御する分子の探索を行った。独自に開発した HVJ envelope vector (HVJ-E) を用いてヒト心筋より作成した市販の cDNA library をスクリーニングし、血管内皮増殖促進、抑制遺伝子を各々 3 種類分離した⁸⁾。その中で最も高い増殖促進能をもつ遺伝子に注目して調べてみると、扁平上皮癌の抗原である SART-2 遺伝子の 3' 末端の断片であった。活性部分は SART-2 の塩基配列 No. 2660 ~ 2750 の 90 ヌクレオチドよりなる短い遺伝子であり、SART-2 本来の翻訳の読み枠とは異なる読み枠で翻訳される 30 個のアミノ酸よりなる新規のペプチドであった。これが生理的に存在するかどうかは不明であるが、このペプチドは Angiogenic-30 (AG-30) と命名された。しかしそのアミノ酸配列を調べてみると、正電荷をもつアミノ酸群と疎水性のアミノ酸群とが対をなして α -helix 構造を形成し (図 2A)、既に報告のある抗菌ペプチドと極めて類似した構造をもつことが明らかになった。実際にこのペプチド AG-30 は既存の抗菌ペプチド LL-37 と比較して同等以上の抗菌活性を示すことが分かった。

AG-30 はヒト大動脈血管内皮細胞に対し、その増殖と遊走を促進することが示され、その活性はいずれも LL-37 よりも高いことが分かった。線維芽細胞のシート状に血管内皮細胞を巻き、血管新生因子

を加えることでシャーレ内で管腔形成をさせる *in vitro* tube formation assay を施行すると、AG-30 は LL-37 よりも強力な管腔形成能をもつことが明らかになった。AG-30 を血管内皮細胞に加えると 72 時間後に Angiopoietin-2, Interleukin-8, Insulin-like growth factor-1 が有意に再現性よく発現上昇する⁹⁾。これらはいずれも血管新生作用のある遺伝子群であり、AG-30 の血管内皮増殖作用や遊走作用を裏づけるものである。しかしその受容体やシグナル伝達機構についてはまだ不明である。

2) マウス個体での血管新生作用について

AG-30 の生体での機能を調べるため、AG-30 を封入したマトリゲルをマウス皮下に移植し、7 日後にマトリゲル周囲の組織を免疫染色で調べてみると、血管内皮細胞のマーカーである CD31 陽性で、血管平滑筋細胞のマーカーである α -smooth muscle actin 陽性の管腔が AG-30 を封入した場合のみ形成されていることが分かった⁹⁾。そこでマウス下肢の血管を結紮して虚血状態をつくり、この下肢の骨格筋内に AG-30 を直接投与した。しかし 2 日程度ですべて分解されることが分かったため、徐放化を行うことにした。様々な含水量 (85.5%, 94.1%, 98.0%) をもつカチオン化ゼラチンゲル (pI=5) を京都大学の田畑教授にご提供いただきマウス皮下に埋め込んで分解試験を行うと、85.5% のものは 14 日後でも 80% の内容物が残存していた。98.0% のものは 7 日後に全内容物が放出された。一方 94.1% のものの残存量は 7 日後に 70%, 14 日後には 20% になっており、徐放化剤として適していると判断した。このカチオン化ゼラチンゲルに AG-30 を含浸 (AG-30/gelatin gel) させ、筋肉に注入すると約 20 日かけて AG-30 が分解されることが分かった。そこでこれを虚血下肢に注入したところ、レーザードップラーで調べると血流の回復が見られ、図 2B, C に示すように 4 週間で正常の 80% 以上のレベルまで回復することが分かった⁹⁾。ゼラチンゲルを用いないとほとんど改善が見られなかった。またスルホアセチル化ゼラチンに AG-30 を含浸させて徐放させた場合と比較しても、血流改善効果は高かった。毛細血管密度を CD31 の免疫染色で評価すると AG-30/

gelatin gel により AG-30 の量に依存した血管密度の増加が認められた。

3) 改変型 AG-30 の構築による作用増強

AG-30 の作用の増強のため、より正電荷を強めるためにアミノ酸置換を行ったペプチドや、より疎水性を高めるためのアミノ酸置換を行ったペプチド、さらには安定性を増すために両末端に Cap 構造を付加したペプチドを作成した¹⁰⁾。これらのペプチドの血管内皮細胞遊走能、*in vitro* tube formation 活性及び抗菌活性を比較すると、5つのアミノ酸をすべて正電荷型にした AG-30-5C が最も強い作用を示した。マウスの尾に傷を作って虚血状態にし、そこに AG-30-5C を塗布するとカチオン化ゼラチンを用いなくても濃度依存性に血流の回復が認められた。

このペプチドの創傷治癒効果を調べるため、糖尿病マウスの皮膚に傷をつくり、そこに *Staphylococcus aureus* を感染させたモデルやブタの皮膚での創傷に対する治癒効果を調べると、いずれも効果があり、特に後者では臨床応用されているヒト組み換え型線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor-2) のスプレー製剤 (商品名：フィブラストスプレー) とほぼ同等の創傷治癒効果が確認できた¹⁰⁾。

以上のように、AG-30 は抗菌性と血管新生作用を有することから、難治性潰瘍の治療剤として有用性が高いと考えられ、大阪大学医学部附属病院では末梢循環不全による潰瘍を有する患者に対する臨床研究を開始する。これにより proof of concept が得られれば、さらに対象を広げて治験を行う計画である。

図2 (A) AG30 の構造

図のように α -helix 構造をとっており、正電荷をもつアミノ酸が並んだサイド(cationic)と疎水性の高いアミノ酸が並んだサイド(hydrophobic)が存在すると予想される。(B) 虚血下肢の血流回復実験。AG-30 単独(500 μ g)と AG-30/gelatin gel(pI=5 のカチオン化ゼラチンゲルとスルホアセチル化ゲルに含浸させた)の筋肉内投与による血流回復能の比較。2week 及び 4week で有意差あり。(C) マウス虚血下肢(円内)の血流をレーザドップラーで計測した。AG-30 を含浸させたカチオン化ゼラチンゲル投与前(左)と投与後 4 週(右)の比較。

Angiopoietin-1 による心筋梗塞の治療における 体内細胞動員

血管新生に必要な EPC は虚血部位に集積し、心筋梗塞後に心筋や血管の再生にも関与することが期待されてきた^{11,12)}。しかし糖尿病では EPC の分化能力が十分ではなく、糖尿病モデルマウスでは EPC のレベルも低い。そこで糖尿病モデルマウスにおいて EPC を供給させ、心筋や血管への分化能力を増強させる治療法が必要である。Angiopoietin-1 は Tie-2 に結合する分泌糖蛋白質で、PI3kinase/Akt 経路を活性化して内皮細胞のアポトーシスを抑制するとともに、血管透過性を抑制する作用も有している¹³⁾。一方、骨髄では HSC の生存にも関与していることが知られている¹⁴⁾。そこで Zeng らは Angiopoietin-1 遺伝子を強発現するアデノウイルスベクターを作成し、これを心筋梗塞をつくった糖尿病モデルマウスに全身投与し心臓と骨髄での Angiopoietin-1 遺伝子発現を誘導した¹⁵⁾。心臓では血管内皮や血管平滑筋細胞に Angiopoietin-1 蛋白質の局在が認められた。この遺伝子導入により骨髄から CD133⁺/c-kit⁺ の細胞群が血液中に移行し、梗塞部位に集積すること、心筋梗塞の改善がおこることが分かった。心臓の梗塞部位に集積した CD133⁺/c-kit⁺ 細胞群では Angiopoietin-1 遺伝子発現により SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) やそのレセプターである CXCR4 の発現が誘導されていた。このことは、SDF-1/CXCR4 のシグナル経路が骨髄細胞の損傷組織へのリクルートに関与していることを示唆しているが、何故 Angiopoietin-1 によって骨髄からの特定細胞群が血液中に漏出するのか、Angiopoietin-1 遺伝子の骨髄での発現が必要なのか、漏出した細胞群がどのようにして損傷組織へ集積していくのか、など詳細な機構はまだ解明されていない。

骨形成誘導因子の徐放による 骨髄間葉系細胞の動員と異所性骨形成

1) BMP-2 による骨髄細胞の動員

前述の研究成果は、細胞の損傷組織への動員を示

唆しているが、幹細胞の供給源は明らかではない。おそらく骨髄であると思われるので、それを明らかにするために GFP 細胞を骨髄移植したマウスを作成し、様々な誘導因子を用いて骨髄細胞の動員を調べることにした。

骨形成誘導因子 (bone morphogenetic protein 2; BMP2) を封入したゲルを筋膜下に埋め込んだマウスでは異所性の骨形成がおこる¹⁶⁾。そこで我々は GFP 細胞を骨髄移植したマウスの、筋膜下に BMP2 封入ゲルを埋め込み、GFP 陽性細胞の末梢血液中への動員を調べたところ、GFP 細胞は血液中を循環し、3 週間後に異所性の骨形成部位に集積した。BMP2 ゲルを埋め込んだマウスの血液中の単核球を分離して培養すると、骨分化能を有する骨形成前駆細胞 (osteogenic progenitor cell : OPC) であることが分かった。さらに GFP 細胞を骨髄移植して BMP2 ゲルを埋め込んだマウスの血液中より単核球を分離し、BMP2 ゲルを埋め込んだヌードマウスに移植したところ、異所性の骨形成部位に集積することが明らかになった¹⁷⁾。このことは異所性の骨形成部位には骨髄由来の OPC が動員されることを示している。次に GFP 骨髄移植マウスと野生型マウスの皮膚を縫合して末梢循環を共有させる共生マウスモデル (parabiotic pairing mice model) を作成して、異所性骨形成における OPC の集積機構を

図3 BMP-2 ゲルをマウスの筋膜下に埋め込んでから末梢血液中 (PB) と骨髄中 (BM) に出現する CD45- の単核球の割合

解析した。共生マウスモデルの野生型マウス筋膜下に BMP2 ゲルを埋め込んで異所性骨化を誘導した結果、GFP 陽性骨形成が確認され、末梢循環を介した骨髄由来の OPC の骨形成部位への供給が初めて示された。図 3 のように BMP2 ゲルを埋め込んで 3 日目には末梢循環血液中の単核球の約 80% は OPC であり、そのマーカーは造血系由来の CD45 ではなく間葉系由来の CD44 であることが判明した¹⁸⁾。

2) 骨髄間葉系細胞の集積による骨形成

BMP-2 により骨髄より動員される細胞分画の機能を検証するために CD45⁺ 分画を GFP マウスから採取し、これを CD45⁻ の細胞群 (GFP 陰性) と混合して骨髄移植したマウスでは、異所性骨化部位には GFP 陰性の細胞が集積し、その周囲に GFP 陽性細胞が集積することが分かり、異所性の骨形成には CD45 陰性のおそらく間葉系細胞が関与していることが推測された。この CD45 陰性の骨髄単核球を取り出し、BMP2 (+), (-) の培地で培養して遺伝子発現を調べると、骨形成に関与する *cbfa1*, *osteopontin* は分離直後には発現しないが、培養系に移すと BMP2 なしでも発現が誘導された (図 4)。さらに *alkaline phosphatase* や *osteocalcin* は BMP2 を添加した培地でのみ発現誘導が見られた¹⁸⁾。BMP2 ゲルを埋め込んだマウスの血液より CD45⁻ 単核球を取り出し、これを *hydroxylapatite* と混合してマウスに移植すると骨形成が見られ、この細胞画分が骨分化能を持つことが検証された。そこでこの細胞画分のさらなるマーカーを解析すると CD44⁺ である骨髄間葉系細胞であることが分かり、さらに CXCR4⁺ であることが判明した (図 5)¹⁸⁾。このことは CXCR4 のリガンドで

図 4 CD45 陰性の骨髄単核球をマウス体外に取り出し、BMP2 (+), (-) の培地で培養して遺伝子発現を RT-PCR で調べた。骨形成に関与する *Cbfa1*, *Osteopontin* は分離直後 (1) には発現しないが、培養系に移すと BMP2 なし (2) でも発現が誘導された。さらに *Alkaline phosphatase* や *Osteocalcin* は BMP2 を添加した培地 (3) でのみ発現誘導が見られた。Internal control として *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* の発現を調べた。

図 5 BMP2 ゲルを埋め込んだマウスの血液中の単核球の分画をフローサイトメーターで解析した。BMP-2 ゲルを埋め込んだマウス (BMP-2 implanted) と無処理の wild type マウスのサンプルを比較すると CD45⁻/CD44⁺, CD45⁻/CXCR4⁺ の細胞群が著明に増加している。

ある SDF-1 によって集積誘導が起こる可能性を示している。これを証明するために BMP-2 ゲルを埋め込んだ周囲の組織における遺伝子発現を調べると SDF-1 の発現が埋め込み 7 日後に有意に高くなること、さらに埋め込み 6, 7 日後には HIF-1 の発現が増強することが明らかになった¹⁸⁾。以上のことから BMP-2 ゲルを埋め込むと HIF-1 の発現増強により SDF-1 が発現し、これにより CXCR4 陽性の CD44⁺ の骨髄間葉系単核球が集積し、その中に含まれる OPC により異所性骨形成が誘導されることが推測された (図 6)。また骨折マウスにおいても末梢循環血液中に骨 OPC が大量に出現すること、骨折部位での SDF-1 の発現が高いこと、異所性骨化部位や骨折部の骨再生部位に集積して骨芽細胞を供給していることが明らかとなった。この研究の過程で注目すべきことは、末梢血に出現した OPC は体外に取り出して培養を開始した直後から間葉系分化マーカーの遺伝子発現を活性化する一方、末梢血中ではより未分化な状態で存在することであり、体外採取して培養・増殖するステップは OPC が本来持つ可塑性を制限している可能性があり、OPC の損

傷部位特異的集積・再生誘導メカニズム解明研究を基にした体内再生誘導医薬開発の重要性がこのことから理解される。この実験系において、おそらく SDF-1/CXCR4 は末梢血液中に湧出した OPC を BMP-2 ゲルのある部位に引き寄せるシグナルであろうと考えられるが、BMP-2 や SDF-1 の血液中の濃度は上昇しないことから、どのようなメカニズムで骨髄細胞が末梢血液中に動員されるかは明らかではない。その回答は次の実験結果によってもたらされることになった。

HMGB1 による骨髄間葉系幹細胞の動員と組織再生

1) 骨髄間葉系幹細胞動員因子としての HMGB1 の同定

先天性表皮水疱症は、表皮と真皮をつなぐ蛋白質の変異により表皮の脱落が起こる遺伝性疾患である。なかでも栄養障害型は type VII collagen の変異により全身性の表皮脱落を誘発する。皮膚の幹細胞は脱落する表皮側に含まれているので、表皮再生は起こらないはずであるが、表皮はすぐに再生される。では幹細胞はどこから来るのか？我々はそれが

図6 BMP-2ゲルを筋膜下に埋め込んだマウスでの骨形成前駆細胞(OPC)の骨髄からの供給機構

骨髄からではないかと推測し、GFP マウスの骨髄細胞と Type VII collagen ノックアウトマウスの皮膚片を用いた実験系を立ち上げて検証することにした。Type VII collagen の欠損マウスは食道粘膜上皮の剥離により接触ができないため生後しばらくして死亡する。そのマウスの皮膚片を正常マウスの皮膚切開部位に移植し縫合して脱落しないようにしたところ、正常マウスの皮膚を移植した際には見られないような細胞浸潤がおこることがわかった¹⁹⁾。そこでこの皮膚移植マウスに、放射線照射したのち、GFP マウスの骨髄細胞を移植すると、皮膚片移植部位に GFP 陽性細胞の集積が見られた。次に GFP マウスの皮膚を切開して Type VII collagen の欠損マウスの皮膚片を移植し、正常のマウス骨髄細胞を静脈注入すると、皮膚片移植部位には GFP 陰性の細胞が集積した¹⁹⁾。このことから骨髄細胞が皮膚移植部位に集積することが検証されたが、我々はさらに Type VII collagen の欠損マウスの皮膚移植の際には、傷害をもつ皮膚片から骨髄細胞を動員す

る因子が放出されるのではないかと仮説を立てた。そこで傷害した皮膚片を短時間緩衝液中に浸して得られた上清をマトリゲルに封入してマウスの皮下に埋め込み、1 週間後に浸潤してくる細胞集団を解析した。この細胞は主として造血系細胞のもつ CD45 ではなく間葉系細胞のもつ CD44 陽性の細胞であり、さらに間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) のマーカーである PDGFR α 陽性であった¹⁹⁾。つまり損傷皮膚からは、骨髄の MSC を損傷部位へ動員する分子が存在するのではないかと推測される。そこで MSC の遊走を指標に損傷皮膚抽出液から蛋白質精製を行い、HMGB1 (high mobility group protein 1) を同定、分離した¹⁹⁾。HMGB1 は DNA に結合する核蛋白質であるが、細胞質にも存在し、分泌もされる (図 7)。核内で PCAF, p300, CBP などのヒストンアセチルトランスフェラーゼによって Lys 残基がアセチル化を受けて細胞質に運ばれた HMGB1 は secretory lysosome に溜められてから細胞外に分泌される²⁰⁾。HMGB1 はシグナ

図 7 : HMGB1 の生理機能。感染時および組織損傷時の多彩な機能を示す。HAT:histone acetyltransferase, LPS: lipopolysaccharide.

ルペプチドを有さず、その細胞外放出には分泌型ライソゾームの寄与が示唆されている。図7に示すように HMGB1 は多彩な作用をもつ蛋白質であり、最近、炎症反応を惹起、促進させる因子として注目されている。分泌されてウイルスや細菌の構成成分と複合体をつくった HMGB1 や壊死細胞から放出されてヒストンやサイトカイン (IL-1 β) と結合した HMGB1 は、マクロファージや単球などの炎症細胞に作用して炎症系サイトカイン産生を誘導し、損傷部位に炎症反応を誘導する。その際には終末糖化産物受容体 (receptor of advanced glycation endproducts、RAGE) や Toll 様受容体 4 (Toll-like receptor 4、TLR4) を介して細胞内ヘシグナルを伝えることが知られている²¹⁾。これは自然免疫系の強化による細菌やウイルスの除去であり、組織修復をおこす過程の1つとも考えられる。一方、free の HMGB1 は炎症を抑制するようにはたたらき、それも組織修復の一環ではないかと思われる。たとえば

炎症細胞上の CD24 に結合すると TLR から刺激で活性化される NF- κ B を抑制する²¹⁾。今回の我々の発見は、さらにそのあとのステップとしての組織再生に HMGB1 が MSC の動員を介して関与していることを示したものである。HMGB1 を用いた組織修復は、現在のところ、徐放よりは静脈注入により一挙に骨髓から MSC を放出させる方が効果的であることがわかっている。図8に示すように、マウスの尾静脈より HMGB1 を静脈注射すると、12 時間後に PDGFR α 陽性の MSC が末梢血液中に増加することが分かった。そのときにマウスの骨髓を二光子顕微鏡で観察すると、MSC が血管に向かって集積する像が認められた。

2) HMGB1 の投与による損傷組織修復

HMGB1 の全身投与により損傷部位の修復効果を検証するために、皮膚損傷を作成したマウスに HMGB1 を尾静脈より注入すると組織修復が促進さ

図8 (A) HMGB1 (10 μ g) 或いは PBS (400 μ l) をマウスの尾静脈から注射。(B) 注射後12時間での末梢血液中の PDGFR α 陽性 CD44 陽性の MSC の割合。(C) HMGB1、PBS を尾静脈から注射後12時間での骨髓における PDGFR α 陽性細胞 (GFP でラベル) の挙動をとらえた二光子顕微鏡像。赤い線状構造は骨髓中の血管。

れ、特にコラーゲンの蓄積による肉芽形成ではなく、非癒痕性の修復がおこることが明らかになった。これは線維芽細胞ではなく MSC を遊走させてきた結果であることも裏づけられた。HMGB1 で動員された MSC が何故損傷部位に集積するのかについては、別の因子がはたらいているようであり、BMP-2 の場合と同じように SDF-1/CXCR4 のシグナルの関与が示唆されている。したがって徐放化技術の応用については、SDF-1 を対象にするのが局所への MSC の動員に効果的であると考えられる。しかし HMGB1 で動員された MSC が局所で分化して組織再生をおこすかどうかは、まだ直接的な証拠には乏しい。実際に表皮水疱症の患者血清中では HMGB1 の濃度が健常人の血中濃度よりも上がっているが、患者の表皮が時間的にも空間的にも効率よく再生されるような環境を動物モデルの系ではまだ再現できていない。おそらく MSC が分化できる微小環境が必要であり、その詳細な解明が生体内再生療法を可能にすると考えられる。

MSC にはいくつもの細胞集団があり、表面マーカーで分類して多分化能をもつ骨髄間葉系幹細胞の分画を同定することは、今後の再生治療への応用に非常に重要なテーマである。我々は MSC のマーカーである PDGFR α を指標に骨髄細胞を FACS で分類し、その多分化能を評価した。PDGFR α^+ /Lineage (Lin) $^-$ /c-kit $^-$ の分画と PDGFR α^+ /Lin $^-$ /c-kit $^-$ 及び PDGFR α^+ /Lin $^-$ /c-kit $^+$ の 3 分画に分けられることがわかった。骨分化培地や脂肪分化培地で培養すると PDGFR α^+ /Lin $^-$ /c-kit $^-$ のみが骨や脂肪に分化したが、PDGFR α^+ /Lin $^-$ /c-kit $^-$ は骨分化のみ、PDGFR α^+ /Lin $^-$ /c-kit $^+$ は培養を続けることができず分化もおこらなかった。PDGFR α^+ /Lin $^-$ /c-kit $^-$ の細胞群は、皮膚組織の抽出液中で培養すると 4 週間で keratin-5 陽性のケラチノサイトへの分化も示すことが分かった。したがって、骨髄中の MSC において、末梢に動員されて損傷組織の再生に関与すると考えられる細胞群は PDGFR α^+ /Lin $^-$ /c-kit $^-$ の指標を持つ細胞群であり、これらの細胞が分化する微小環境を構築することが効率のよい組織再生の誘導につながると考えられる。

HMGB1 の機能と再生治療への応用については、

Bianchi のグループも精力的に研究を進めており、彼らの報告では心筋梗塞をつくったマウスの梗塞周囲部位に 200ng の HMGB1 を局注すると、心筋の幹細胞と考えられる c-kit $^+$ 細胞が梗塞部位に集積し、心筋再生を促進していること、心筋梗塞の作成後 HMGB1 を梗塞部位に局注し、すぐに c-kit $^+$ の骨髄細胞を静脈注射すると、HMGB1 注射部位に c-kit $^+$ の骨髄細胞が集積すること、HMGB1 の局注により心筋梗塞マウスの心機能が 4 週間にわたってしだいに改善されることが明らかになっている²²⁾。この報告では、HMGB1 は骨髄からの細胞動員ではなく、血液中の c-kit $^+$ 細胞の損傷組織へのホーミングに関与していることになり、我々のデータとは一部異なる。しかし HMGB1 を局注していること、心筋の幹細胞としての観点から c-kit $^+$ 細胞に注目していることなど、実験系が異なっていることから、HMGB1 の多彩な作用を別の角度から見ているものかもしれない。実際、HMGB1 が SDF-1 と結合することにより CXCR4 への結合を著明に高めて、SDF-1/CXCR4 のシグナルを増強すること、損傷組織では低酸素状態から SDF-1 の発現が高まっていると予想されることから、HMGB1 の梗塞周囲部位への局所注入により直接的には SDF-1/CXCR4 の機能を増強し、c-kit $^+$ 細胞の集積を促進している可能性は大いにあると考えられる。もしそうであるとするなら、HMGB1 の徐放化剤を損傷組織に埋め込めば、骨髄からの細胞の集積の促進にやはり有効であると考えられ、さらに、SDF-1 と HMGB1 の両者を徐放することができれば、その作用を増強する再生治療剤になるであろう。

おわりに

体内細胞動員による疾病治療の発想は古くから存在しているし、ケモカインで代表されるような細胞動員因子も数多く見出されてきた。しかし ES 細胞や iPS 細胞を用いた細胞療法による再生治療の注目度が高いために、その重要性が見過ごされてきたといっても過言ではないかもしれない。しかし体外に取り出すだけで細胞の遺伝子発現は変化する。より生理的に近い状況で細胞を機能させて疾病治療を実

現するために、体内細胞動員療法は 今後さらに注目されると考えられるし、ドラッグデリバリー技術と組み合わせることによってその機能がさらに高められることが期待される。本章で取り上げた分子がさらに機能が解明されて最適な適応疾患が決まれば、細胞を用いなくても蛋白製剤として再生治療が

可能になるであろう。また、そのシグナル伝達機構も明らかになってきており、蛋白製剤と同じような機能をもつ低分子化合物の設計や探索も行われることが予想され、そうなれば一般の医薬品と同じように、服用すれば組織が再生できるようになる日が訪れるのではないかと考えられる。

文献

- 1) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 197;1114-23, 1998.
- 2) Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282:468-71, 1998.
- 3) Morishita, R., Aoki, M., Hashiya, N., Makino, H., Yamasaki, K., Azuma, J., Sawa, Y., Matsuda, H., Kaneda, Y., Ogiwara, T.: Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 44, 203-209, 2004.
- 4) Krenning, G., van Luyn, M.J.A., Harmsen, M.C. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: Implications for therapy. *Trends in Mol. Med.* 15. 180-9, 2009.
- 5) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH; TRAFFIC Investigators. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study) : a randomised trial. *Lancet* 359:2053-8, 2002.
- 6) Esaki, J., Marui, A., Tabata, Y., Komeda, M. Controlled release systems of angiogenic growth factors for cardiovascular diseases. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 4: 635-49, 2007.
- 7) Marui A, Tabata Y, Kojima S, Yamamoto M, Tambara K, Nishina T, Saji Y, Inui K, Hashida T, Yokoyama S, Onodera R, Ikeda T, Fukushima M, Komeda M. A novel approach to therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia by sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel: an initial report of the phase I-IIa study. *Circ J*. 71:1181-6, 2007.
- 8) Nishikawa T, Nakagami H, Matsuki A, Maeda A, Yo CY, Harada T, Morishita R, Tamai K, Kaneda Y. Development of high-throughput functional screening of therapeutic genes, using a hemagglutinating virus of Japan envelope vector. *Hum Gene Ther*. 17:470-5, 2006.
- 9) Nishikawa, T., Nakagami, H., Maeda, A., Morishita, R., Miyazaki, N., Ogawa, T., Tabata, Y., Kikuchi, Y., Hayashi, H., Tatsu, Y., Yumoto, N., Tamai, K., Tomono, K., and Kaneda, Y. Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Medicine*, 3, 535-46, 2009.
- 10) Nakagami, H., Nishikawa, T., Tamura, N., Maeda, A., Hibino, H., Mochizuki, M., Shimosato, T., Moriya, T., Morishita, R., Tamai, K., Tomono, K., Kaneda, Y. Modification of Novel Angiogenic Peptide, AG-30, Toward Clinical Application. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. In press.
- 11) Isner, J.M., Asahara, T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization.. *J. Clin. Invest.* 103: 1231-6, 1999.
- 12) Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 355:1222-32, 2006.
- 13) Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87:1171-80, 1996.
- 14) Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 118:149-61, 2004.
- 15) Zeng, H., Li, L., Chen, J-X. Overexpression of angiopoietin-1 increases CD133+/c-kit+ cells and reduces myocardial apoptosis in db/db mouse infarcted hearts. *PLoS ONE* 7, e35905.
- 16) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mittleman LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators for bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242:1528-34, 1996.
- 17) Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H., Kaneda, Y. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 354, 453-8, 2007.
- 18) Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H., Kaneda, Y. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by CXCR4/SDF1 pathway. *Stem Cells*, 26, 223-34, 2008.
- 19) Tamai, K., Yamazaki, T., Chino, T., Ishii, M., Otsuru, S., Kikuchi, Y., Iinuma, S., Saga, K., Nimura, K., Shimbo, T., Umegaki, N., Katayama, I., Miyazaki, J., Takeda, J., McGrath, J., Uitto, J., Kaneda, Y. PDGFR- α -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 108, 6609-14, 2011.
- 21) Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J*. 22:5551-60, 2003.
- 22) Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., Coyle, A.J. HMGB1 and RAGE :inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 28: 367-88, 2010.
- 22) Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, Leoni O, Palumbo R, Battistini L, Rastaldo R, Müller S, Pompilio G, Anversa P, Bianchi ME, Capogrossi MC. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 97:e73-83, 2005.