新規細胞治療の開発

松 本 太 郎

日本大学医学部先端医学系細胞再生・移植医学分野

はじめに

生活習慣の欧米化に伴い、心筋梗塞や末梢血管病 (peripheral artery disease, PAD) といった動脈硬化性疾患が増加し、日本人の死亡原因の第 2 位を占めている。とくに重症虚血性心不全や、末梢循環不全患者の予後や QOL は極めて低い。また固形腫瘍や、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチなど多くの疾患が、病的な血管新生を伴い、その病態形成に重要な役割を果たすことが明らかにされている。したがって血管新生の分子メカニズムを明確にして、血管新生を人為的に制御することができれば、多くの難治性疾患の治療に応用できると考えられる。私は、このような理由から、血管新生の分子メカニズムに興味をもち、研究を行ってきた。血管新生は、組織低酸素刺激によって血管内皮細胞から分泌される血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) や、その他の種々の血管新生因子が、バランス良く作用することによって誘導される現象である。血管新生を誘導する方法として、血管新生因子の遺伝子治療など数々の方法が試みられているが、機能的な血管を誘導するには血管新生因子をバランスよく発現する細胞を移植する方法が、私は最も良いと考えている。脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell, DFAT) は、我々の研究グループが開発した成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞で、高い血管新生誘導能を有することから、虚血性疾患治療に適した細胞ソースであると思われる。本稿では、私が行ってきた血管新生の分子機構に関する研究から、新規細胞治療の開発に至る研究成果、そして今後の展望について概説する。

I. 血管新生研究を始めた理由

私が血管新生の研究を始めたきっかけとして、一人の患者さんの存在がある。それは、1994 年、練馬光が丘病院に外向中の時のことであった。その患者さんは、糖尿病に伴う PAD を煩っており、足趾の難治性潰瘍に対して有効な治療法がなく足趾切断術が予定されていた。「足を切られたくない。なんとかありませんか。」という切実な訴えを聞き、何かできることはないかと考えた末、家族性高コレステロール血症に対して行う LDL ア

フェレーシス療法を、計 10 回実施した。当時、この治療が、高コレステロール血症を伴う PAD に有効であることが明らかにされていたが、コレステロール値が正常の患者に対しては、その効果は不明であった。駄目元で行った治療であったが、幸いにも効果を示し、この患者さんは足趾切断を免れることができた。患者さんが喜んだことは言うまでもない。LDL 吸着カラムに含まれるデキストラン硫酸がカリクレイン・キニン系を活性化し、ブラジキニンなどの血管拡張性物質の産生を亢進させることが、その作用機序だということも、その後明らかになった。この経験の中で、既存の確立された方法の中で治療を行うだけではなく、新しい治療に挑戦することの重要性を学んだ。それと同時に血管生物学を基礎からじっくり研究してみたいという気持ちがわき上がってきたことを記憶している。血管新生は、1971 年に Folkman によって確立された概念である¹⁾。彼は癌の発達は周囲から侵入する血管に依存していることを見出し、癌から分泌される因子が、既存の血管から血管内皮細胞を刺激し、新たな血管を作り出しているといった現象を明らかにした。1989 年に Ferrara ら²⁾ により、下垂体濾胞細胞培養上清中の血管内皮細胞特異的な増殖因子として、VEGF がクローニングされた。この発見がブレイクスルーとなり、血管新生は非常にホットな研究領域となった。その後種々の血管新生因子や血管新生阻害因子が同定され、これらの因子が、バランス良く作用することにより血管新生が誘導されることが明らかにされた (Fig. 1)。また同じ頃より、癌のみならず糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、粥状動脈硬化症など多くの疾患が、病的な血管新生を伴い、その病態形成に重要な役割を果たすことが明らかにされた³⁾。私は、血管新生を人為的に制御することができれば、多くの難治性疾患の治療に応用できると考え、血管新生研究を開始した。

II. 血管新生分子機構に関する研究

私は、1997 年から 1999 年までの二年間、千葉大学医学部に留学させていただく機会を得た。森聖二郎先生、齋藤康先生の指導の下、血管の成熟化にかかわる血小板由来増殖因子 (Platelet-derived growth factor, PDGF) シグナル伝達経路に関する研究を行った。主な研究成果とし

Fig. 1 血管新生の進行過程と関与する血管新生因子

て p38 MAP キナーゼを介する細胞遊走シグナル経路の発見がある⁴⁾。本研究は、それまでストレス刺激によってのみ活性化すると考えられてきた p38 MAP キナーゼが、増殖因子レセプター刺激によっても活性化され、細胞骨格を制御する機能分子であることを示した。その後、1999 年より 3 年間のスウェーデン・ウプサラ大学への留学を契機に Lena Claesson-Welsh 教授の指導の下、血管新生の分子メカニズムについて研究を行った。主な研究成果としては、Phosphopeptide mapping という手法を用いて、VEGF の受容体である VEGF レセプター 2 の活性化(チロシンリン酸化)部位を同定した仕事がある⁵⁾。この研究は VEGF の細胞内シグナル伝達の開始点を決めるものであり、がん治療の分子ターゲットとしても注目を集めている。またウシ毛細血管内皮細胞をコラーゲンゲル内で三次元的に培養することにより、微小血管に類似した管腔様構造を誘導する培養系を確立し、管腔形成を制御するシグナル分子の探索および機能解析を行った。そして FGF-2 は p38 MAP キナーゼの活性化を介して血管内皮細胞が過剰に増殖分化するのを制御し、正常な血管構造の構築に寄与していることを明らかにした⁶⁾。さらに血管内皮細胞の管腔形成に伴い発現亢進するタンパク質群をプロテオミクスの手法で網羅的に解析し、chloride intracellular channel 4 (CLIC4), α B-crystallin, ninein など管腔形成に必須な蛋白群の同定に成功した^{7,8)}。このようにスウェーデン留学時代は、血管新生に関する基礎研究を欧米の多くの研究者と共同で行ってきた。現在もウプサラ大学と共同研究を続けており、血管内皮管腔形成を制御する微小管結合蛋白 ninein の機能解析⁹⁾や、VEGF レセプター 2 チロシン 951 点変異を有する遺伝子改変マウスの形質解析などを行っている。

III. 新規細胞治療の開発

2002 年帰国後は日大に戻り、麦島秀雄先生が主任をされていた先端医学講座細胞再生・移植医学部門で再生医

学に関する研究を始めた。この研究領域は、もともと ES 細胞を用いた血管発生機構の研究を行っていたこともあり、私にとってなじみやすいものであった。2004 年に生物資源科学部の加野浩一郎先生が発見された成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞 (DFAT) を再生医療に応用できないかという大変興味深いご提案を受け、DFAT の研究を開始した。DFAT は高い増殖能と間葉系組織への多分化能を有するユニークな人工細胞であり、ドナー年齢を問わず少量の脂肪組織から調整可能なため、今まで再生医療の対象にならなかった高齢者などに対する適用が期待されている。現在までに骨、軟骨、膀胱平滑筋、心筋、血管などへの分化能、組織再生能を確認している¹⁰⁻¹²⁾。また DFAT は HGF や VEGF といった血管新生因子を豊富に分泌することが明らかになった。また虚血組織においてあたかもペリサイトのように形質を変え、血管内皮細胞の管腔形成を誘導する作用があることが明らかになった。このような特性から、DFAT は PAD 治療に適した細胞ソースであると思われ、難治性 PAD に対し、患者の皮下脂肪から DFAT を調製し、虚血筋組織に筋注射と云うといった臨床応用を考えている (Fig. 2)。2008 年からは科学技術振興機構 (JST) の助成を受け、ニプロ株式会社とともに DFAT を用いた再生医療実現化を目指した共同研究を進めている。すでに閉鎖系培養システムを用いた DFAT 調製法を確立するに至っており、現在、移植安全性の確認や、作業手順書の作成を行っている。

IV. 今後の展望

今後、2 年以内を目標に、難治性 PAD を対象とした DFAT 細胞治療の臨床研究を開始したいと考えている。その後、骨粗鬆症に伴随する難治性骨折や、前立腺癌手術後の腹圧性尿失禁、脳性麻痺などを対象とした細胞治療、そして臍帯血移植の際の生着促進を目的とした細胞治療などへ適応を拡大していく予定である。また京都大学の藤島移植グループとの共同研究で、DFAT と藤島細

難治性PAD患者

Fig. 2 難治性 PAD 患者に対する DFAT 移植

Fig. 3 日本大学における幹細胞研究コンソーシアム

胞を同時に移植する臨床研究計画も始まっている。学内外の確固たる研究組織の構築や大型研究費の獲得も実現しなければならないテーマであるが、これに関しては、日本大学内において幹細胞研究会を立ち上げてその基盤作りを始めている (日本大学幹細胞研究会 <http://www.dent.nihon-u.ac.jp/stemcell/>)。日本大学は、医学、歯学、獣医学、工学など再生医療の開発に必要なすべての部科校がそろっているまれな総合大学である。このメリットを生かして、基礎的な幹細胞学から、動物を使った前臨床試験、移植に必要なスキャフォールドの開発、そして

ヒトへの臨床応用といったプロセスを円滑に行えるネットワークを構築したいと考えている (Fig. 3)。

おわりに

このように細胞の特性を利用した治療法は、既存の治療法の概念を全く変えるポテンシャルを持っている。たとえば、グルコース応答性のある膵β細胞を自己体細胞から誘導し、移植する技術が確立すれば、インスリン療法などは衰退してしまうだろう。実際に2010年11月より、ヒトES細胞から誘導した網膜色素上皮細胞を、黄

斑变性症の患者に移植するといった臨床治験がアメリカで承認された。この治療により失明状態であった患者の視力が回復する可能性があるという。これは本格的な再生医療の幕開けであり、まさに患者にとっては光明といえるだろう。しかし、一方で重要なことは、このような細胞治療を、いかに患者の負担を少なく、安全かつ簡便に行えるかということにある。この点において腫瘍原性がなく、少量の脂肪組織より調製ができる DFAT は理想的な細胞であるといえる。クリニックレベルの施設で細胞調製が行えるようなキットなどを開発し、一般医療として万人に適応可能な細胞治療の確立を目指したい。

文 献

- 1) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; **285**: 1182–1186.
- 2) Ferrara N and Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**: 851–858.
- 3) Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; **1**: 27–31.
- 4) Matsumoto T, Yokote K, Tamura K, et al. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem* 1999; **274**: 13954–13960.
- 5) Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, et al. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *Embo J* 2005; **24**: 2342–2353.
- 6) Matsumoto T, Turesson I, Book M, et al. p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol* 2002; **156**: 149–160.
- 7) Bohman S, Matsumoto T, Suh K, et al. Proteomic analysis of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation reveals a role for chloride intracellular channel 4 (CLIC4) in tubular morphogenesis. *J Biol Chem* 2005; **280**: 42397–42404.
- 8) Dimberg A, Rylova S, Dieterich LC, et al. alphaB-crystallin promotes tumor angiogenesis by increasing vascular survival during tube morphogenesis. *Blood* 2008; **111**: 2015–2023.
- 9) Matsumoto T, Schiller P, Dieterich LC, et al. Ninein is expressed in the cytoplasm of angiogenic tip-cells and regulates tubular morphogenesis of endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 2123–2130.
- 10) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210–222.
- 11) Sakuma T, Matsumoto T, Kano K, et al. Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *J Urol* 2009; **182**: 355–365.
- 12) Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S, et al. Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2009; **47**: 565–575.

氏名：松本 太郎（まつもと たろう）

所属：日本大学医学部先端医学系細胞再生・移植医学分野

主な研究領域：血管新生の分子機構，脱分化脂肪細胞・胎児由来幹細胞を用いた細胞治療

抱負：私は、研究室の仲間とともに、脱分化脂肪細胞や、胎児由来幹細胞などの研究を通じて、子供から高齢者に至るまで万人に適応可能な再生医療の確立を目指して研究を行っています。このような臨床応用を目指したトランスレーショナル・リサーチは、患者やその家族に大きな夢と希望を与えるものであると考えています。今後もこのような研究活動や臍帯血バンクの側方支援を通じて、少しでも難治性疾患に悩む方々が穏やかな生活を送れる手助けができればと考えています。また同じような志をもつ研究者に広く門戸をひらき、「知ることの喜び」を実感してもらえるような魅力的な研究室を構築したいと考えております。