

間葉系幹細胞を利用した再生医療における新たな戦略

石崎 明, 客本齊子, 横田聖司, 加茂政晴, 帖佐直幸

岩手医科大学学生化学講座細胞情報科学分野

要旨: 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は, 骨芽細胞, 脂肪細胞や軟骨芽細胞などの間葉系細胞に分化しうる体性幹細胞である。MSC はヒトの骨髄組織をはじめ, 脂肪組織や臍帯中の Wharton のゼリーなどに存在することが確かめられており, 骨, 軟骨, 血管あるいは心筋などを形成する能力があることから, 再生医療への応用が期待されている。

MSC を用いた再生医療を実現するためには, 幹細胞性 (stemness) の高い MSC を *ex vivo* の環境でいかに大量に培養できるかがポイントとなる。しかし, 一般的に, MSC は *ex vivo* での細胞増殖に伴いその stemness は消失し, 組織再生能力は低下する。一方, 骨組織再生を目的とした MSC の移植の際には, 外科的処置に伴う炎症反応が生じる。炎症反応により骨形成は抑制され, 骨吸収が促進されるため, MSC 移植による骨組織再生医療を実施する場合には, 抗炎症療法を併用することが望ましい。

ここでは, われわれが発見した stemness を維持したまま *ex vivo* で MSC を増殖させる分子メカニズムならびに MSC が抗炎症性マクロファージを増殖させる分子メカニズムについて解説するとともに, これらの分子基盤を応用した新たな骨組織再生医療樹立の可能性についてお示ししたい。

Key words: 間葉系幹細胞, 再生医療, 幹細胞性, 骨芽細胞, 脂肪細胞, 軟骨芽細胞, 炎症, M2 マクロファージ

I. はじめに

幹細胞とは二つの能力すなわち“自己複製能力”と“多分化能力”を併せもつ細胞のことをいう。これまでに, 幹細胞としては胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) が知られており, いずれの細胞も再生医療 (regenerative medicine) への応用が期待されている。しかし, ES 細胞においては, 倫理的な理由から再生医療への応用はむずかしく, また iPS 細胞においてはそのがん化の可能性から再生医療への応用は制限されている。一方, われわれの体内の各組織中には, ES 細胞や iPS 細胞ほどの多分化能力はもたないが, 炎症などによる組織破壊の後に組織再生に働く体性幹細胞 (somatic stem cell) が存在する。この体性幹細胞は, 倫理的問題や発がん性を回避しうる点で, 再生医療への応用に適していると考えら

れている。ここでは, 体性幹細胞の中でも, 整形外科領域や歯科領域などでの骨組織や軟骨組織あるいは靭帯組織などの間葉系組織の再生医療への応用が期待されている間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) に焦点を当て, その幹細胞としての性質についての最新の知見についてとりまとめて述べるとともに, MSC の再生医療への利用にあたり問題点となる事項をあげ, その問題点を克服するためにわれわれがすすめている研究の概要についての解説を加えたい。

II. MSC とは?

MSC は骨髄や脂肪組織などに存在し, プラスチック製の培養プレートの表面に接着して増殖しコロニーを形成する性質を有しており, また CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90/Thy1 ならびに CD105/endoglin/SH2 などの細胞表面マーカーを発現するが, CD34, CD45 や HLA-DR などの造血性細胞表面マーカーは発現しない^{1,2)}。加えて, 近年 CD146 あるいは CD271/low-affinity nerve growth factor receptor

連絡先: 石崎 明 aishisa@iwate-med.ac.jp

(LNGFR) についても MSC の細胞表面マーカーとして認識されている³⁾。さらには、MSC は骨芽細胞 (osteoblast)、脂肪細胞 (adipocyte) ならびに軟骨芽細胞 (chondroblast) に分化する能力を有していることが知られている⁴⁾。なお、骨髄中に含まれる MSC の割合は全細胞中の 0.001~0.01% と非常に少なく⁵⁾、また脂肪組織中に含まれる MSC の割合は全細胞中の 3% 程度と、骨髄中よりもかなり多くの MSC が含まれていると報告されている⁶⁾。MSC の分離については、骨髄組織や脂肪組織由来の細胞集団より、細胞表面の MSC マーカーに対する特異的な抗体を用いて MSC を蛍光ラベルしたうえで、セルソーターを用いて選別する方法が一般的である。このほかにも、MSC マーカーに対する特異的な抗体が付着した磁気ビーズと細胞集団とを混和した後、抗体を介して MSC に結合した磁気ビーズを磁力で回収することにより、MSC を選別する方法も用いられている。いずれの方法による MSC の選別方法を用いても、その選別後には組織再生を十分に担える数の MSC が得られるように、*ex vivo*での細胞培養法によりいったん MSC を増殖させてから移植に利用することが望ましい。しかし、一般的に MSC はその増殖に伴い、stemness を失っていくことが明らかとされている。すなわち、MSC が分裂して増えるに伴い自己複製能力や多分化能力が低下してしまうのである⁷⁾。このため、ヒト体内から取り出した MSC を利用した再生医療を推進するためには、その stemness を失わせることなく *ex vivo*にて増殖させる技術が必要であり、現在いろいろな研究がすすめられている。その中でも、最近われわれが新たに発見した MSC の stemness の維持に働く細胞内シグナル伝達経路について解説したい。

Ⅲ. SCRG1/BST1 系を介した新たなシグナル伝達機構により誘導される MSC の stemness 維持効果について

MSC の stemness、すなわち“自己複製能力”と“多分化能力”は、この細胞を用いた再生医療には不可欠である。これまでに、転写因子である Oct4 と Nanog は DNA メチル基転移酵素 [DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 : Dnmt1] の発現を誘導し、この Dnmt1 が細胞増殖抑制効果のあることが知られている p16 や p21 の発現を転写レベルで抑制することにより、MSC の自己複製能力と未分化状態を維持することが報告されている⁸⁾。興味深いことに Wen らは、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) と MSC の共培養 (細胞間接触のないト

ランスウェルを用いた共培養) では、EPC と MSC との可溶性成分による相互作用により、MSC の stemness の維持に働く転写因子 Oct4, Sox2, Nanog ならびに Klf4 の発現が上昇して自己複製能力と多分化能力が維持されることを報告している⁹⁾。また、Sukaran らは、線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor-2 : FGF-2) が MSC の Oct4 や Nanog の発現を誘導することにより、自己複製能力と多分化能力が維持されると報告している¹⁰⁾。しかしながら、MSC の stemness の維持に働く Oct4 と Nanog などの転写因子発現量の制御システムについては不明な点が多い。

一方、ヤギやヒツジがスクレイピー (scrapie) に感染すると伝達性海綿状脳症 (transmissible spongiform encephalopathy : TSE) を呈することが知られている¹¹⁾が、*scrapie responsive gene 1 (SCRG1)* はスクレイピーに感染して TSE を呈したマウスの脳で、その発現が上昇する遺伝子として報告された¹²⁾。SCRG1 は 98 個のアミノ酸からなるペプチドであるが、N 末端にシグナル配列を有することが知られており、分泌タンパク質として働くことが予測されていたが、MSC における SCRG1 の役割は不明であった。われわれは、ヒト MSC 細胞 UE7T-13 が骨芽細胞分化する際に、その分化程度に応じて減少する遺伝子を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析したところ、たいへん興味深いことに SCRG1 の発現が骨芽細胞分化に伴って顕著に低下することを見出した¹³⁾。一般的に、細胞分化が進行すると自己複製能力が低下することや、多分化能力が消失することが知られている。そこでわれわれは、MSC における SCRG1 の機能を明らかとするためにヒト SCRG1 リコンビナントタンパク質を作製してこの細胞に投与し、MSC の stemness や組織再生能力にどのように影響するかについて調査した。

MSC の細胞移動能力の低下は、この細胞の老化の度合 (stemness の低下の程度) と密接に関係していることが知られている¹⁴⁾。また MSC の細胞移動能力は、MSC の組織再生能力を反映するものとしても認知されている¹⁵⁾。そこで、われわれはヒト SCRG1 リコンビナントタンパク質が MSC の移動能力にどのような影響を与えるかについて調査した。まず、SCRG1 が一般的に細胞の移動能力の発現にかかわる細胞内シグナル伝達分子として知られる extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK) ならびに phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT の活性化¹⁶⁾にどのような影響を及ぼすか調査したところ、SCRG1 によりこれらの分子の活

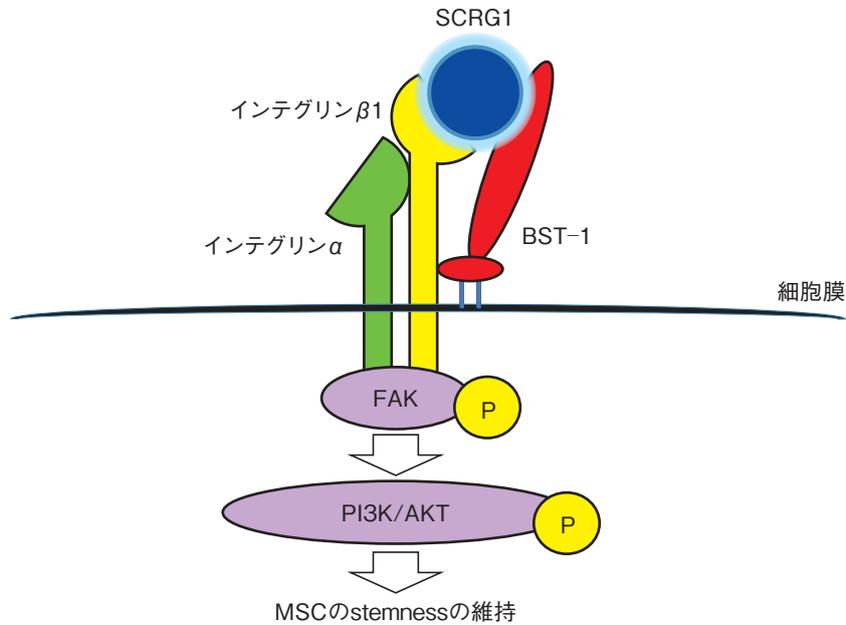


図 1. SCRG1 と BST-1 による新たな MSC の stemness 維持機構
 SCRG1 は MSC より分泌された後に、オートクリン (autocrine) あるいはパラクリン (paracrine) 的に働いて細胞膜上の受容体としての BST-1 と結合する¹³⁾。また、SCRG1 の免疫沈降に伴い、BST-1 に加えてインテグリン β1 が共沈することから、SCRG1/BST-1 による細胞内シグナル伝達にはインテグリン α とインテグリン β1 がかわるものと考えている。SCRG1 は MSC の BST-1 に結合することにより、この細胞の増殖に伴い低下する stemness (細胞複製能力、骨芽細胞分化能力ならびに細胞移動能力) を FAK や PI3K/AKT 依存的に維持するように働く¹³⁾。

性化 (リン酸化) が誘導されることが明らかとなった¹³⁾。さらに、SCRG1 は MSC の細胞移動能力を AKT/focal adhesion kinase (FAK) 依存的に促進することが判明した。これらの結果は、SCRG1 が MSC においてオートクリン (autocrine) あるいはパラクリン (paracrine) 的に働いて、MSC の細胞移動能力を促進することにより、その組織再生能力を高めるように働くことを示唆するものである。

次に、これまでに SCRG1 による刺激を細胞内に伝える細胞膜上の受容体の存在について明らかとした例がなかったことから、われわれはこの受容体を同定すべく研究をすすめた。興味深いことに、MSC を骨芽細胞誘導培地により刺激し、骨芽細胞に分化誘導した細胞に SCRG1 を与えても、先に述べた ERK, JNK ならびに PI3K/AKT の活性化が認められなかったことから、MSC における SCRG1 の受容体は、SCRG1 と同様に骨芽細胞分化が進行することに伴い、その発現が減少するものと推測した。そこで、ヒト MSC 細胞 UE7T-13 が骨芽細胞分化する際に、その分化程度に応じて発現が大きく減少する遺伝子群のうち、細胞膜タンパク質をコードする遺伝子を調査したところ 2 種類存在することが判明した。すなわち、bone marrow stromal cell antigen 1 (BST-1) と hyaluronan

synthase 2 (HAS2) という分子である¹³⁾。BST-1 はグリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol : GPI) アンカーを介して細胞膜に係留される糖タンパク質であり¹⁷⁾、好中球の細胞膜に存在して、その血管内皮への結合や血管内皮上での細胞移動ならびに血管からの漏出にかかわることが報告されている¹⁸⁾。一方、HAS2 は HAS ファミリー (HAS1~3) に属しているが、いずれの HAS も細胞膜貫通ドメインを有するタンパク質として知られており¹⁹⁾、またヒアルロン酸を合成する酵素として報告されている²⁰⁾。

次に、これらの 2 種類の細胞膜タンパク質のいずれが MSC における SCRG1 受容体として機能するのかを明らかにするための調査を実施した。まず、UE7T-13 細胞における BST-1 と HAS2 の発現を siRNA でノックダウンしたところ、BST-1 をノックダウンした場合のみ SCRG1 により誘導される ERK や AKT のリン酸化 (活性化) が抑制されることが判明した。この結果より、SCRG1 の受容体は HAS2 ではなく BST-1 であることが示唆されたため、UE7T-13 細胞で FLAG タグを付与した SCRG1 を強発現させた後に抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により SCRG1 と共沈するタンパク質を調査したところ、BST-1 が

SCRG1 と結合することが確認された。さらに、この細胞で BST-1 をノックダウンした場合には、FAK のリン酸化 (活性化) が抑制されるとともに、SCRG1 により促進される細胞移動能力が低下することが判明したことから、BST-1 は SCRG1 の受容体として働き、SCRG1/BST-1 系により活性化される細胞内シグナルは、FAK を介して MSC の細胞移動能力を正に調節することが示唆された (図 1)。さらに興味深いことに、通常は継代数の増加 (細胞分裂の回数の増加) に伴い低下する骨髄由来初代培養 MSC の細胞移動能力が、SCRG1 の投与により維持されることが判明した。

近年、コロニー形成単位 (colony-forming unit : CFU) が高値を示す MSC、すなわちコロニー形成能力が高い MSC は、細部表面マーカー CD271/LNGFR や CD90/Thy-1 の発現が認められ、また同時に CD106/vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) の発現量が高いことが報告された。さらに、この CD271/LNGFR (陽性)、Thy-1 (陽性) および CD106/VCAM-1 (強陽性) の MSC は、自己複製能力と多分化能力の高い MSC、すなわち高い stemness を有する MSC であることが知られている²¹⁾。そこでわれわれは、SCRG1 が骨髄由来初代培養 MSC の CD271/LNGFR、CD90/Thy-1 ならびに CD106/VCAM-1 の発現にどのように影響するかについて調査した。フローサイトメトリーを用いた実験結果より、SCRG1 はこの細胞における CD90/Thy-1 ならびに CD106/VCAM-1 の発現には影響しなかったが、CD271/LNGFR の発現を増強することが判明した。さらに、通常は継代数の増加に伴い低下する骨髄由来初代培養 MSC の増殖能力や骨芽細胞分化能力が SCRG1 の投与により維持されることが判明した¹³⁾。興味深いことに、SCRG1 は通常は継代数の増加に伴い低下する骨髄由来初代培養 MSC の脂肪細胞分化能力については影響を及ぼさないことから、SCRG1 が増殖期の骨髄由来初代培養 MSC に対して示す分化能力維持効果は、この細胞の骨芽細胞分化に特化されたものなのかもしれない。

これらの結果から、今回新たに発見された SCRG1/BST-1 を起点とした細胞内シグナルは増殖期にある MSC において、その増殖能力、細胞移動能力ならびに骨芽細胞分化能力の維持に働く可能性が示唆された。われわれは、SCRG1 を利用すれば、骨芽細胞分化能力が維持されたままの MSC を *ex vivo* にて大量に増殖させられる可能性があるかと期待している。そして、もしこのような MSC の *ex vivo* での大量調製が可能になれば、MSC を用いた骨組織再生療法が広範囲の

骨欠損に対しても適用しうるのではないかと考えている。

IV. 細胞間接着因子が MSC の stemness に与える影響について

Wang らは、ヒト初代培養 MSC を三次元培養すると、細胞同士の接着によりスフェロイド塊を形成するが、このスフェロイド塊を形成した MSC に骨芽細胞分化や脂肪細胞分化を誘導すると、通常の二次元培養で分化誘導したときに比べて、骨芽細胞や脂肪細胞の分化マーカーの発現が上昇したことを報告している²²⁾。この報告により、MSC 同士の細胞間相互作用とくに細胞間接着が、この細胞の stemness に影響する可能性が予測された。そこでわれわれは、UE7T-13 細胞がどのような接着機構を有しており、その接着機構が、この細胞の stemness にどのように影響するのかについて調査した。まず、細胞間接触が困難な低密度二次元培養と細胞間接触が容易な高密度二次元培養との間で、細胞間接着因子の発現の変動についてプライマーアレイを用いて網羅的に解析した。低密度二次元培養と比較して、高密度二次元培養でその発現がもっとも高まる細胞間接着因子は CD106/VCAM-1 であることが明らかとなった²³⁾。CD106/VCAM-1 は血管内皮細胞の表面に存在し、白血球表面の VLA-4/integrin $\alpha 4\beta 1$ や、lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule (LPAM)/integrin $\alpha 4\beta 7$ と結合することにより、白血球の血管外への溢出にかかわることが知られている²⁴⁾。われわれは、フローサイトメトリーを用いて UE7T-13 細胞表面に integrin $\alpha 4$ が発現していることを確認している。このことから、高密度二次元培養下で生育する MSC 同士の接着には CD106/VCAM-1 と integrin $\alpha 4$ とがかかわるものと推測している。

一方、CD106/VCAM-1 の発現は炎症性サイトカイン (interleukin-1beta : IL-1 β や tumor necrosis factor-alpha : TNF- α) により正に調節されることが明らかにされている²⁵⁾。また、この炎症性サイトカインによる CD106/VCAM-1 発現促進効果は転写因子として知られる nuclear factor- κ B (NF- κ B) を介することが明らかとされている。次にわれわれは、UE7T-13 細胞において、高密度二次元培養により誘導される CD106/VCAM-1 発現促進効果が NF- κ B を介したシグナル伝達系によるものであることを NF- κ B 経路の阻害剤を用いて確認した。しかし、先に述べた CD106/VCAM-1 と integrin $\alpha 4$ による UE7T-13 細胞間接着機構、あるいはそのほかの細胞間接着機構が NF- κ B の活性やその後の CD106/VCAM-1 の発現

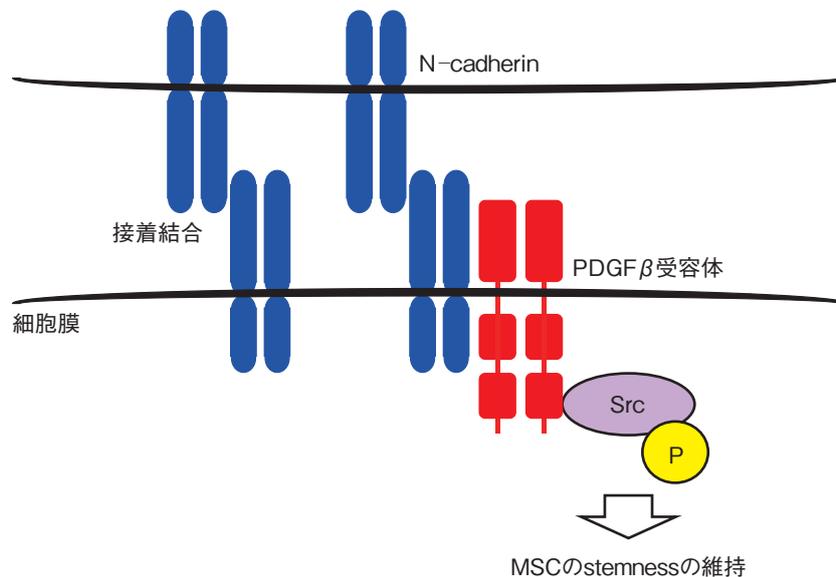


図2. N-cadherinによる細胞間接着による新たなMSCのstemness維持機構
Liuらは、血管内皮細胞表面に存在する接着分子として知られるVE-cadherinを介した細胞間結合により、近隣のVEGFRがリガンド非依存的に活性化され、その後のShcの活性化とそれに引き続き起こるNF- κ Bの活性化依存的にCD106/VCAM-1の発現を誘導することを報告した²⁶⁾。一方われわれは、MSCで発現するN-cadherinが血管内皮細胞におけるVE-cadherinと同様に働いて、PDGFR β をリガンド非依存的に活性化することによりCD106/VCAM-1の発現を誘導することを明らかにした²⁹⁾。LNGFR（陽性）、Thy-1（陽性）、CD106/VCAM-1（強陽性）のMSCは、自己複製能力と多分化能力の高いMSC、すなわち高いstemnessを有するMSCであることが知られている²¹⁾ことから、われわれはMSC同士のN-cadherinを介した細胞間接着がこの細胞のstemness維持のために働くものと考えている。

にどのように影響するかは明らかとされていなかった。

最近になり、血管内皮細胞表面にある接着分子として知られるvascular endothelial cadherin (VE-cadherin)を介した血管内皮細胞間の結合が、この細胞におけるCD106/VCAM-1の発現を誘導するという報告がなされた²⁶⁾。たいへん興味深いことに、このVE-cadherinを介した細胞間結合により、近隣の血管内皮細胞増殖因子受容体(vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR)がリガンド非依存的に活性化され、その後のShcの活性化と、それに引き続き起こるNF- κ Bの活性化依存的に血管内皮細胞におけるCD106/VCAM-1の発現を誘導した。そこでわれわれは、高密度培養されたUE7T-13細胞においても同様なCD106/VCAM-1発現誘導機構が存在するのではないかと予測して研究をすすめた。cadherinは細胞膜貫通型のタンパク質であり、Ca²⁺依存的にcadherin同士で結合することが知られている²⁷⁾。とくに間葉系細胞では、neural cadherin (N-cadherin)の発現が認められていることから、高密度培養環境下でのMSC同士のN-cadherinによる結合が、近隣の受容体のリガンド非依存的な活性化を誘導し、この活性化された受容体が誘導する細胞内シグナ

ルが最終的にCD106/VCAM-1の発現を誘導するのではないかと仮説が立てられた。VEGFRはその構造上の類似性からチロシンキナーゼ型受容体(receptor tyrosine kinase: RTK)ファミリーに属することが知られている²⁸⁾。そこでわれわれは、UE7T-13細胞間におけるN-cadherin同士の結合により活性化される近隣の分子は、このチロシンキナーゼ型受容体ファミリーに属するであろうと予測し、種々のチロシンキナーゼ型受容体に対する阻害剤を高密度環境下で培養されたUE7T-13細胞に投与し、CD106/VCAM-1の発現がどのように変化するか調査した。興味深いことに、投与したRTK阻害剤のうち血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor: PDGF)受容体(PDGFR)阻害剤のみが、高密度環境下のUE7T-13細胞で認められるCD106/VCAM-1の発現誘導を抑制した²⁹⁾。PDGFRは構造の類似する α 型(PDGFR α)と β 型(PDGFR β)の2種類が存在することが知られており、PDGFへの結合の際には、PDGFR α /PDGFR α 、PDGFR α /PDGFR β 、あるいはPDGFR β /PDGFR β の3種類の受容体ダイマーを形成することが報告されている³⁰⁾。一方、PDGFはA鎖、B鎖、C鎖ならびにD鎖によるダイマーからなり、

PDGFRのリガンドとしてはPDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CCならびにPDGF-DDの5種類が報告されている³⁰⁾.

次に, PDGFR α あるいはPDGFR β のいずれが高密度環境下のUE7T-13細胞で活性化される分子であるのかを明らかとするために, それぞれの遺伝子発現をsiRNAによりノックダウンした際の, UE7T-13細胞におけるCD106/VCAM-1の発現に対する影響を調査した. その結果, PDGFR β をノックダウンした場合にのみ, 高密度環境下のUE7T-13細胞で認められるCD106/VCAM-1の発現誘導が抑制された. 加えて, この細胞に細胞内ドメインの欠如したN-cadherin (細胞内シグナル伝達機能のないN-cadherin)を大量発現すると, 正常なN-cadherinに対するドミナントネガティブ的に働いて, 高密度環境下のUE7T-13細胞で認められるCD106/VCAM-1の発現誘導が抑制された. また, PDGFR β に結合することが知られているPDGF-BBをこの細胞に投与すると, 細胞増殖能力は促進されるが, CD106/VCAM-1の発現には関与しないことも明らかとなった.

これらの結果から, 高密度環境下のMSCではN-cadherinを介した細胞間結合により近隣のPDGFR β がリガンド非依存的に活性化され, 活性型PDGFR β により誘導される細胞内シグナルによってCD106/VCAM-1の発現が誘導されることが示唆された (図2)²⁹⁾. これまでの結果から, われわれは, MSCを*ex vivo*にて大量培養する際には, 低密度の播種による継代培養を避けることがこの細胞のstemness維持のために重要であると考えている.

V. MSCを利用した細胞治療による新たな消炎療法開発の可能性について

MSCは多分化能力を有する体性幹細胞として, 再生医療における細胞治療への応用が期待されていることは前述のとおりであるが, 骨髄中でのMSCは造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) のニッチ (niche) として働き, HSCの増殖能力や各血球細胞への多分化能力を維持したまま生育させる役割を担っていることも知られている³¹⁾. 加えて, MSCはNK細胞 (natural killer cell) やT細胞 (T lymphocyte)の増殖を抑制し, 抗原提示細胞としての樹状細胞 (dendritic cell: DC)の成熟度を低下させ, B細胞 (B lymphocyte)の機能を抑制するなどして免疫抑制的に働くことが注目されている³²⁾.

急性移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD)は, 移植された組織由来のT細胞 (ドナー由来)が免疫的に働いてレシピエント側の組織に強い

炎症を引き起こし破壊する病態を示す³³⁾. また興味深いことに, 慢性GVHDでは, このドナー由来T細胞が引き起こす炎症に加え, 通常は排除されるべき自己反応性B細胞の生存の亢進が認められることが報告されており, 自己抗体による炎症性組織破壊が伴うことが知られている. これらのGVHDによる炎症を治癒させるためには, ステロイド剤, 免疫細胞に働いて免疫抑制効果をもたらすチロシンキナーゼ阻害剤やプロテアソーム阻害剤あるいは免疫細胞の炎症巣へのホーミングを抑制する抗インテグリンモノクローナル抗体薬などが, 患者のGVHD重症度 (Grade I~IV)に合わせて投与されている³³⁾. 近年, これらのステロイドや免疫抑制剤による抗GVHD療法にかわって, MSCの免疫抑制的な働きを利用した細胞治療による抗GVHD療法が第I相あるいは第II相の臨床試験として全世界的に実施されており³⁴⁾, MSCによる細胞治療がGVHDの治療法として効果をあげた例がこれまでに複数報告されている^{35~37)}. 興味深いことに, 上記のような抗GVHD薬剤療法では著効が認められなかった症例に効果があることが示されており, MSCによる抗GVHD療法の有用性が明らかとされている.

一方, MSC以外で免疫反応を抑制する働きを有する細胞として, 制御性T細胞 (regulatory T cell: Treg)が知られている³⁸⁾. 一般的に, Treg細胞は, CD4陽性のT細胞の中の特種な画分であり, interleukin 2 (IL-2)受容体 (CD25)と転写因子であるforkhead box P3 (FoxP3)を発現している細胞として知られている. 抗原刺激を受けていないナイーブT細胞は末梢組織において抗原提示細胞からの刺激を受けると種々のT細胞に分化するが, とくにTreg細胞への分化にはIL-2やTGF- β による刺激が重要であることが知られている³⁹⁾. また, Treg細胞は, T細胞, B細胞, NK細胞ならびに抗原提示細胞の増殖や機能を抑制することにより, 局所の免疫反応を抑制することが知られている. また, Treg細胞によるこれらの免疫抑制効果の多くは, この細胞からの免疫抑制性サイトカインIL-10やTGF- β の分泌によるものであることがわかっている⁴⁰⁾. Treg細胞がこのような性質を有するため, Treg細胞を造血幹細胞移植時に発症するGVHDの治療に利用しようとする臨床試験が開始されている³⁸⁾.

このほか, 抗炎症性マクロファージ (M2-macrophage: M2-M Φ)による免疫抑制効果が最近注目されている. 一般的に, マクロファージはI型ヘルパーT細胞 (type I helper T cell: TH1)より分泌されるinterferon (IFN)- γ やlipopolysaccharide (LPS)の

刺激により炎症性 MΦ (M1-macrophage : M1-MΦ) に分極化し, 2 型ヘルパー T 細胞 (type II helper T cell : TH2) より分泌される IL-4 や IL-13 の刺激により M2-MΦ に分極化することが知られている⁴¹⁾. M1-MΦ は, 一酸化窒素 (nitric oxide : NO), 活性酸素 (reactive oxygen species : ROS), TNF- α ならびに IL-1 β などを分泌することにより炎症反応を惹起し促進させるが, それに反して M2-MΦ は Treg 細胞同様に免疫抑制性サイトカイン IL-10 や TGF- β を分泌して炎症反応を抑制することが知られている. また, 骨粗鬆症の治療あるいは腫瘍骨転移の抑制の目的で用いられるビスホスホネート (bisphosphonate : BP) は, 抜歯などの口腔内創傷治療過程において, 炎症の遷延化や顎骨壊死 (BP-related osteonecrosis of the jaw : BRONJ) を引き起こすことが知られているが, マウス BRONJ モデルにて M2-MΦ を腹腔内投与したところ, 炎症や顎骨壊死の症状の緩解が認められた⁴²⁾. このように M2-MΦ は炎症性難治性疾患を治癒させる細胞治療に応用できると期待されている. また, M1-MΦ は TNF- α と IL-1 β の作用により破骨細胞 (osteoclast : OC) による骨吸収を促進するが, M2-MΦ は IL-10 と TGF- β の作用によりこの骨吸収を抑制することが知られており, M1-MΦ あるいは M2-MΦ への分極化のバランスにより局所の骨代謝が制御されると理解されている⁴³⁾.

これらの報告を総合すると, MSC を利用した細胞治療による骨再生医療を考えた場合には, MSC の移植治療の際の外科的処置により起こる局所の炎症を抑制する目的ならびに炎症巣にホーミングする M1-MΦ による骨吸収促進作用を抑制する目的で, M2-MΦ の MSC との同時移植が効率的な骨再生につながるものと考えている. しかし, M2-MΦ を *ex vivo* にて大量培養する方法は報告されておらず, M2-MΦ の大量培養技術の開発が待ち望まれている.

最近, われわれは MSC を利用した新たな M2-MΦ 培養技術を樹立するとともに, MSC により M2-MΦ 前駆細胞としての M0-MΦ をどのように増殖させ, いかなる分子メカニズムで M2-MΦ に分化誘導するのかの一部を明らかにしたのでここに紹介する⁴⁴⁾.

当初われわれは, 強蛍光発現トランスジェニック (TG) マウス⁴⁵⁾ の骨髄から MSC を採取し, 各炎症性疾患モデルマウスに移植することにより, 各炎症巣に MSC がどのような機序でホーミングするのかを調査する目的で研究をすすめていた. まずわれわれは, MSC の培養環境を整えるべく, 培養液や培養時の酸素濃度などを最適化する実験を試みた. Spencer らの報告では, マウス骨髄中の酸素濃度は 0.6~4.2% であ

ることが明らかとされている⁴⁶⁾. また, Lennon らの報告によると, 通常の CO₂ インキュベーターを利用した一般的な細胞培養条件では 20% O₂, 5% CO₂ の条件下での培養となるが, 5% O₂, 5% CO₂ の条件下で培養した場合のほうが, MSC の増殖能力や骨芽細胞分化能力が上昇する⁴⁷⁾. これらの報告を根拠として, われわれは 5% O₂, 5% CO₂ の低酸素条件下で強蛍光発現 TG マウス骨髄由来 MSC の培養を試みることにした. たいへん興味深いことに, 本培養法では上記の間葉系細胞様形態を呈する細胞群のほかにも, 球状で小型の血球様細胞群が間葉系細胞周囲に認められた. 一般的に, 間葉系細胞が prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (TSG-6), IL-6, indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) や TGF- β 1 などの液性因子を介して M1-MΦ から M2-MΦ への分極化を誘導することが知られていた⁴⁸⁾ ので, 本培養法で今回観察された球状で増殖する小型の細胞が M2-MΦ ではないかと予測した. 興味深いことに, 本培養法で増殖する 2 種類の細胞は, 通常の細胞培養で用いる 20% O₂, 5% CO₂ の条件下では増殖しないため, 低酸素培養法でのみ認められる増殖促進メカニズムの存在が示唆されている.

次に, 本培養法により増殖する間葉系細胞と血球様細胞がそれぞれ MSC と M2-MΦ であるかどうかを調査するため, 2 回継代した後のマウス骨髄由来細胞から磁気ビーズで標識された抗血球細胞表面マーカー抗体 (lineage cell depletion kit) と磁気細胞分離装置を利用して血球系細胞を分離した. たいへん興味深いことに, 分離された血球系細胞 (lineage positive cell : Lin (+) 細胞) をフローサイトメーターにより解析したところ, その 85% の細胞が M2-MΦ マーカーとして知られる CD206/mannose receptor (MR) を発現していることが判明した. また, 血球系細胞が分離された残りの骨髄由来細胞は, マウス MSC マーカーである stem cell antigen-1 (Sca-1) ならびに CD90/Thy-1 を発現し, 骨芽細胞や脂肪細胞への多分化能力を有する MSC であることが明らかとなった⁴⁴⁾.

次に, 本培養法ではどのような分子メカニズムで MSC が M2-MΦ の増殖を促進するのかについて調査した. まず, MSC や Lin (+) 細胞がどのような遺伝子発現をしているかを DNA アレイ法により網羅的に調査し, MSC 側が発現する液性因子と血球系細胞側が発現する受容体との組合せを比較検討したところ, MSC が macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)/colony-stimulating factor 1 (CSF-1) を発現し, 血球系細胞側が M-CSF/CSF-1 受容体を発現していることが明らかとなった. M-CSF/CSF-1 は,

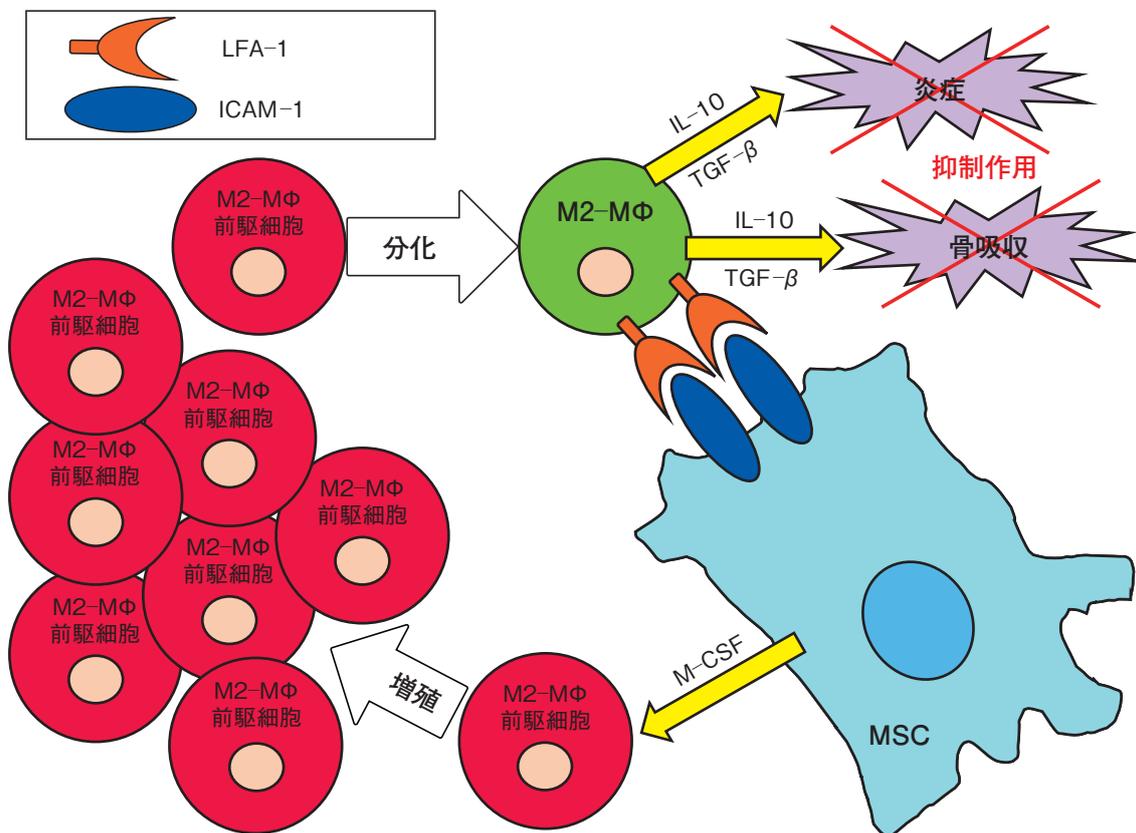


図3. MSCによる新たなM2-MΦ誘導機構

低酸素環境下 (5% O₂, 5% CO₂) でマウス骨髄由来細胞を培養すると, MSCとM2-MΦの2種類の細胞が増殖することが明らかとなった⁴⁴⁾. この培養環境下では, MSC由来のM-CSF/CSF-1により骨髄由来細胞中のM2-MΦ前駆細胞の増殖が促進されるとともに, MSCが発現するICAM-1と, M2-MΦ前駆細胞が発現するLFA-1との間の接着性刺激により, M2-MΦ前駆細胞がCD206/MR陽性でIL-10分泌能を有するM2-MΦに分化することが明らかとなった⁴⁴⁾. なお, このMSCによるM2-MΦ誘導機構の全容はまだ明らかではなく, 上記以外の液性因子や接着因子の存在についても調査中である.

単球/MΦの前駆細胞の増殖を促進することが知られている⁴⁹⁾. われわれは, MSCの培養上清の投与により増殖するLin (+)細胞にM-CSF/CSF-1受容体阻害剤を与えたところ, MSCの培養上清により促進されたLin (+)細胞の増殖が阻害された. これらの結果から, 低酸素骨髄由来細胞培養ではMSCの分泌するM-CSF/CSF-1によりLin (+)細胞の増殖が促進されることが明らかとなった. また, 低酸素培養前の骨髄組織から分離したLin (+)細胞にM-CSF/CSF-1を作用させて増殖した細胞 (この段階ではまだCD206/MRを発現していない) をMSC細胞と共培養すると, CD206/MR陽性のM2-MΦが多数出現することから, MSCから分泌されたM-CSF/CSF-1はLin (+)細胞中のM2-MΦ前駆細胞 (M0-MΦ)を増殖させることが強く示唆された⁴⁴⁾. 加えて興味深いことに, 低酸素培養下で2回継代した後のマウス骨髄由来細胞をMSCとLin (+)細胞に分離し, Lin (+)細胞単独培養, 非接触性MSC/Lin (+)細胞共培養 (液性因子のみでの細胞間相互作用が可能) あるいは接触性MSC/Lin (+)細胞共培養 (液性因子の

みならず細胞接着因子などによる細胞間相互作用が可能) を実施すると, Lin (+)細胞単独培養, 非接触性MSC/Lin (+)細胞共培養におけるLin (+)細胞でのCD206/MRの発現と比較して, 接触性MSC/Lin (+)細胞共培養では約5倍のCD206/MRの発現が認められた. さらに, Lin (+)細胞からの抗炎症性サイトカインIL-10の発現が, Lin (+)細胞単独培養, 非接触性MSC/Lin (+)細胞共培養, 接触性MSC/Lin (+)細胞共培養の順で増加することから, MSCによるM2-MΦの分化誘導のためには, 液性因子以外の接着因子などによる細胞間の直接的な相互作用が必要であることが予想された⁴⁴⁾. 一般的に, 白血球は血管外溢出の際に血管内皮細胞膜上に発現するintercellular adhesion molecule (ICAM)-1に白血球細胞膜上のleukocyte function-associated antigen (LFA)-1を介して結合することが知られている⁵⁰⁾が, われわれはMSCがICAM-1を発現していることや, Lin (+)細胞がLFA-1を発現していることを確認した. 興味深いことに, MSCへのLin (+)細胞の結合がICAM-1に対する抗体で部分的に

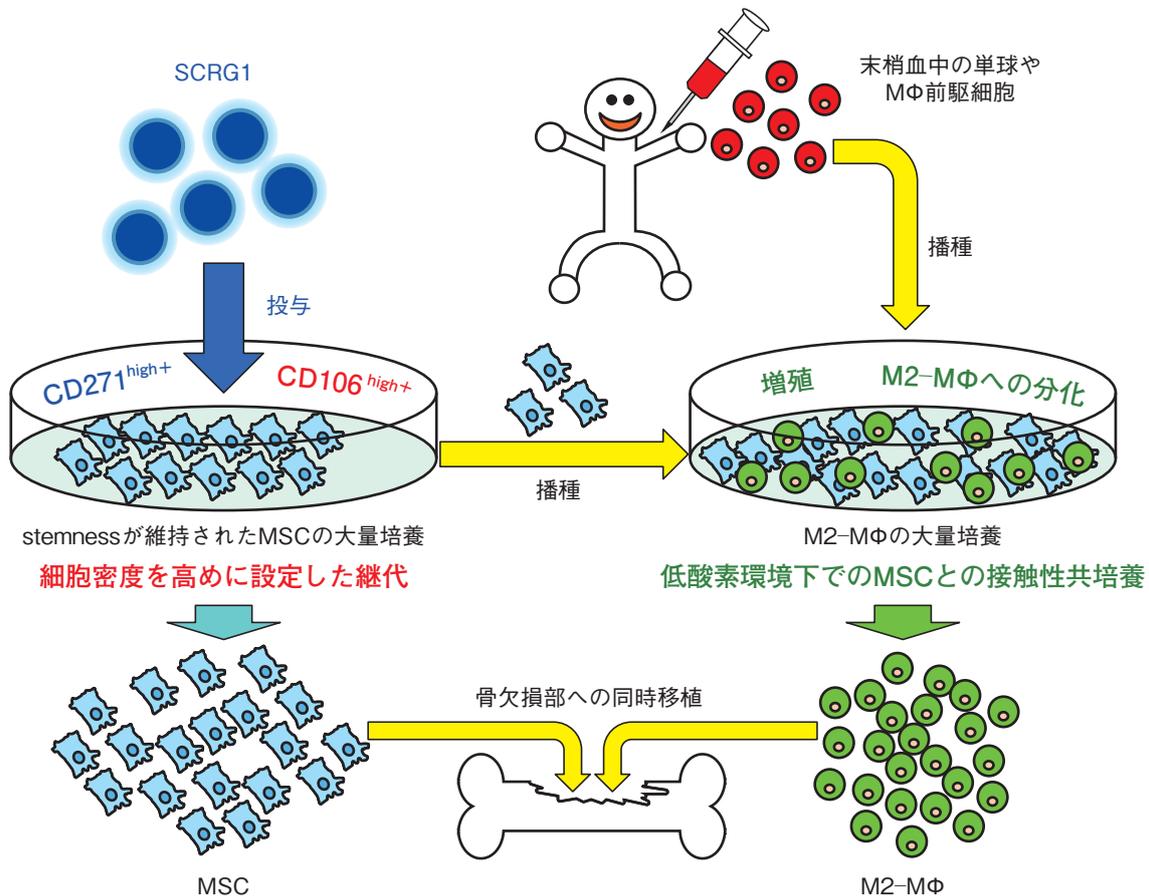


図 4. MSC を利用した骨組織再生医療の新たな戦略

ヒト由来 MSC を細胞治療としての再生医療に応用するには、*ex vivo* での MSC の大量培養が必要となる。図の左に示すごとく、SCRG1 を投与すると同時に継代培養の際に播種時の細胞密度をできるだけ高くする ($0.2 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/cm²) こと^{13, 23)} により CD271/LNGFR ならびに CD106/VCAM-1 の発現が高く維持された MSC (stemness が高く維持された MSC) の大量培養を実現させたい。一方、図の右に示すごとく、将来的にはヒト末梢血中の単球や MΦ 前駆細胞を採取後、これらの細胞と MSC との低酸素環境下 (5% O₂, 5% CO₂) での接着性共培養を行い、単球や MΦ 前駆細胞の増殖を促進するとともに M2-MΦ への分化を誘導する⁴⁴⁾ ことにより M2-MΦ を大量培養したいと考えている。なお、MSC による M2-MΦ 誘導機構の全容が明らかとなれば、MSC に頼らずとも、ヒト末梢血中の単球や MΦ 前駆細胞から大量の M2-MΦ を誘導できるものと期待している。また、骨組織再生医療では、局所の炎症反応を沈静化することにより骨吸収を抑制して骨形成を促進する M2-MΦ を MSC と同時に移植することが有効と考えられる。現在、われわれが発見した新たな培養法により大量培養された stemness の高い MSC と M2-MΦ とを併用した新たな骨組織再生医療の樹立を可能とすべく、日々の研究を続けているところである。

阻害されることや、接触性 MSC/Lin (+) 細胞共培養で誘導された Lin (+) 細胞における CD206/MR の発現が、ICAM-1/LFA-1 阻害剤により部分的に抑制されることから、われわれは MSC と Lin (+) 細胞との ICAM-1/LFA-1 を介した結合が Lin (+) 細胞の M2-MΦ への分化に働くと考えている⁴⁴⁾ (図 3)。しかし、ICAM-1/LFA-1 阻害剤により接触性 MSC/Lin (+) 細胞共培養で誘導された Lin (+) 細胞における CD206/MR の発現が部分的にしか抑制されないことから、ICAM-1/LFA-1 以外の細胞接着機構が Lin (+) 細胞の M2-MΦ への分化に働くと考えて、この接着機構を明らかにすべく調査中である。また、M2-MΦ 前駆細胞の増殖にかかわる M-CSF/CSF-1 以外の液性因子あるいは接着因子の存在についても調

査をすすめている。今後、Lin (+) 細胞を M2-MΦ へと分化させる MSC と、Lin (+) 細胞との細胞間相互作用の全容を明らかにしたい。

VI. MSC を利用した骨組織再生医療の新たな戦略

これまでにわれわれが発見した SCRG1 を用いた MSC の stemness の維持機構、MSC 同士の N-cadherin を介した細胞間接着による stemness 維持機構、ならびに骨髄由来細胞の低酸素培養下での M2-MΦ 誘導機構を総合的に医療応用につなげるための将来的な構想について説明したい。

MSC を再生医療に応用するには、まずは *ex vivo* でのヒト由来 MSC の大量培養が必要となるが、その際

のMSC増殖に伴うこの細胞のstemness（自己複製能力と多分化能力）の低下を防ぐ目的で、図4左のごとく、SCRG1を投与しつつ、継代の際の細胞密度をできるだけ高くすることで実現したいと考えている。加えて、とくに骨組織の再生を考える場合には、炎症反応を惹起することにより、骨形成を抑制して骨吸収を促進させるM1-MΦの働きを抑え、炎症反応を阻害することにより骨形成を促進して骨吸収を抑制するM2-MΦの働きを活性化する必要がある。この目的のためには、*ex vivo*でM2-MΦを大量培養し、それを骨組織再生の場に移植することが効果的であると考えられる。将来的にはヒト末梢血中の単球やMΦ前駆細胞を採血により採取後、これらの細胞とMSCとの接触性共培養を行い、単球やMΦ前駆細胞の増殖を促進するとともに、M2-MΦへの分化を誘導することによりM2-MΦを大量培養できるものと期待している（図4右）。そして、このように大量培養されたstemnessの高いMSCとM2-MΦを骨欠損部に同時移植することにより、形成効率のよい新たな骨組織再生医療が可能になるものと期待して、日々の研究を続けている（図4中央）。

文 献

- 1) Tobita M : Adipose-derived stem cells in dentistry. *J Oral Biosci* **55** : 122-126, 2013.
- 2) Arutyunyan I, Elchanikov A, Makarov A et al : Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. *Stem Cell Int* doi : 10. 1155/2016/6901286, 2016.
- 3) Rebekah MS, Raghunath M, Nurcombe V et al : Concise review ; multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med* **6** : 2172-2185, 2017.
- 4) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al : Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells ; The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8** : 315-317, 2006.
- 5) Ohsugi H, Caplan AI : Stem cell technology and bioceramics ; from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* **48** : 913-927, 1999.
- 6) Fraser JK, Zhu M, Wulur I et al : Adipose-derived cells. *Methods Mol Biol* **449** : 59-67, 2008.
- 7) Muraglia A, Cancedda R, Quarto R : Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiated in vitro according to hierarchical model. *J Cell Sci* **113** : 1161-1166, 2000.
- 8) Tsai CC, Su PF, Huang YF et al : Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell* **47** : 169-182, 2012.

- 9) Wen L, Wang Y, When N et al : Role of endothelial progenitor cells in maintaining stemness and enhancing differentiation of mesenchymal stem cells by indirect cell-cell interaction. *Stem Cells Dev* **25** : 123-138, 2016.
- 10) Sukarawan W, Nowwarote N, Kerdpon P et al : Effect of basic fibroblast growth factor on pluripotent marker expression and colony forming unit capacity of stem cells isolated from human exfoliated deciduous teeth. *Odontology* **102** : 160-166, 2014.
- 11) Prusiner SB : Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216** : 136-144, 1982.
- 12) Dron M, Bailly Y, Beringue V et al : Scrg1 is induced in TSE and brain injuries, and associated with autophagy. *Eur J Neurosci* **22** : 133-146, 2005.
- 13) Aomatsu E, Takahashi N, Sawada S et al : Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Sci Rep* **4** : 3652, 2014.
- 14) Turinetti V, Vitale E, Giachino C : Senescence in human mesenchymal stem cells ; functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int J Mol Sci*. doi : 10. 3390/ijms17071164, 2016.
- 15) Fujita K, Kuge K, Ozawa N et al : Clinical B-1 promotes migration of mesenchymal stem cells and accelerates wound healing in mice. *PLoS One*. doi : 10. 1371/journal. pone. 0144166, 2015.
- 16) Li I, Jianxin J : Regulatory factors of mesenchymal stem cell migration into injured tissues and their signal transduction mechanisms. *Front Med* **5** : 33-39, 2011.
- 17) Malavasi F, Deaglio S, Funaro A et al : Evolution of the ADP ribosyl cyclase /CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* **88** : 841-886, 2008.
- 18) Furano A, Ortolan E, Bovino P et al : Ecto-enzyme and innate immunity ; the role of human CD157 in leukocyte trafficking. *Front Biosci* **14** : 929-943, 2009.
- 19) Weigel PH, Hascall VC, Tammi M : Hyaluronan synthesis. *J Biol Chem* **272** : 13997-14000, 1997.
- 20) Itano N, Sawai T, Yoshida M : Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzyme properties. *J Biol Chem* **274** : 25085-25092, 1999.
- 21) Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S et al : LNGFR (+) THY-1 (+) VCAM-1 (hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports* **1** : 152-165, 2013.
- 22) Wang W, Itaka K, Ohba S et al : 3D spheroid culture system in micropatterned substrates for

- improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **30** : 2705–2715, 2009.
- 23) Nishihira S, Okubo N, Takahashi N et al : High-cell density-induced VCAM1 expression inhibits the migratory ability of mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* **35** : 475–481, 2011.
 - 24) Salmi M, Jalkanen S : Human leukocyte subpopulations from inflamed gut bind to joint vasculature using distinct sets of adhesion molecules. *J Immunol* **166** : 4650–4657, 2001.
 - 25) Collins T, Read MA, Neish AS et al : Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules : NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* **9** : 899–909, 1995.
 - 26) Liu Y, Sweet DT, Irani-Tehrani M et al : Shc coordinates signals from intercellular junctions and integrins to regulate flow-induced inflammation. *J Cell Biol* **182** : 185–196, 2008.
 - 27) Oda H, Takeichi M : Evolution ; structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J Cell Biol* **193** : 1137–1146, 2011.
 - 28) Lemmon MA, Schlessinger J : Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141** : 1117–1134, 2010.
 - 29) Aomatsu E, Chosa N, Nishihira S et al : Cell-cell adhesion through N-cadherin enhances VCAM-1 expression via PDGFR β in a ligand-independent manner in mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med* **33** : 565–572, 2014.
 - 30) Ishii Y, Hamashita T, Yamamoto S et al : Pathogenic significance and possibility as a therapeutic target of platelet derived growth factor. *Pathol Int* **67** : 235–246, 2017.
 - 31) Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H et al : Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* **107** : 1878–1887, 2006.
 - 32) Uccelli A, Moretta L, Pistoia V : Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8** : 726–736, 2008.
 - 33) Hill L, Alousi A, Kebriaei P et al : New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease. *Ther Adv Hematol* **9** : 21–46, 2018.
 - 34) Kim N, Im KI, Lim Y et al : Mesenchymal stem cells for the treatment and prevention of graft-versus-host disease ; experiments and practice. *Ann Hematol* **92** : 1295–1308, 2013.
 - 35) Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B et al : Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363** : 1439–1441, 2004.
 - 36) von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A et al : Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Explant* **43** : 245–251, 2009.
 - 37) Wu KH, Chan CK, Tsai C et al : Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation* **91** : 1412–1416, 2011.
 - 38) Mancusi A, Piccinelli S, Veradi A et al : The effect of TNF- α on regulatory T cell function in graft-versus-host disease. *Front Immunol* **9** : 356, 2018.
 - 39) Povoleri GA, Scottà C, Nova-Lamperti EA et al : Thymic versus induced regulatory T cells-who regulates the regulators. *Front Immunol* **4** : 169, 2013.
 - 40) Alikhan MA, Huynh M, Kitching AR et al : Regulatory T cells in renal disease. *Clin Transl Immunol* **7** : e1004, 2018.
 - 41) Martinez FO, Helming L, Gordon S : Alternative activation of macrophages ; an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* **27** : 451–482, 2009.
 - 42) Zhang Q, Atsuta I, Liu S et al : IL-17-mediated M1/M2 macrophage alteration contributes to pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Clin Cancer Res* **19** : 3176–3188, 2013.
 - 43) Gu Q, Yang H, Shi Q : Macrophages and bone inflammation. *J Orthop Transplant* **10** : 86–93, 2017.
 - 44) Takizawa N, Okubo N, Kamo M et al : Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture. *Exp Cell Res* **358** : 411–420, 2017.
 - 45) Ohtsuka M, Ogiwara S, Miura H et al : Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucl Acid Res* **38** : e198, 2010.
 - 46) Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E et al : Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* **508** : 269–273, 2014.
 - 47) Lennon DP, Edimison JM, Caplan AI : Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension ; effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol* **187** : 345–355, 2001.
 - 48) Zheng G, Ge M, Qiu G et al : Mesenchymal stromal cells affect disease outcomes via macrophage polarization. *Stem Cells Int* **2015** : 989473, 2015.
 - 49) Hume DA, MacDonard KP : Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* **119** : 1810–1820, 2012.
 - 50) Lawson C, Wolf S : ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* **61** : 22–32, 2009.

Novel strategy for regenerative medicine with mesenchymal stem cells

Akira Ishisaki, Seiko Kyakumoto, Seiji Yokota, Masaharu Kamo, Naoyuki Chosa

Division of Cellular Biosignal Sciences, Department of Biochemistry, Iwate Medical University

Summary

Mesenchymal stem cells (MSCs), which are able to differentiate into osteoblasts, adipocytes, and chondroblasts, are known as somatic stem cells. Previous studies have demonstrated that MSCs reside in the bone marrow, adipose tissue, and Wharton's jelly in umbilical cord, and retain the ability to regenerate bone, cartilage, blood vessel, and myocardium.

An important goal for regenerative stem cell therapy using MSCs is the successfully ex vivo passage of cells without the suppression of their stemness. It has been generally reported that propagation of MSCs with ex vivo culture systems must be accompanied with a loss of stemness in the cells. On the other hand, surgical implantation of MSCs induces an inflammatory response in the surgical wound. Because inflammation promotes bone resorption by osteoclasts and suppresses bone formation by osteoblasts, anti-inflammatory therapy could be combined with bone regenerative stem cell therapy using MSCs.

Here, we summarized our findings on the molecular mechanism underlying ex vivo propagation of MSCs without the suppression of their stemness, as well as the molecular mechanism underlying ex vivo propagation of anti-inflammatory macrophages (M2 macrophages) co-cultured with MSCs. Our findings may aid in establishing successful bone regenerative medicine with MSCs.

Key words : mesenchymal stem cell, regenerative medicine, stemness, osteoblast, adipocyte, chondroblast, inflammation, M2 macrophage