

■ 総 説

培養間葉系幹細胞は他の細胞に分化して病気を治すのか —心筋梗塞, アルツハイマー病, 変形性膝関節症

佐藤 茂, 劉效蘭

■ Review

Could be cultured mesenchymal stem cells differentiated into other cells? - Ischemic heart disease, Alzheimer's disease and knee osteoarthritis

Shigeru Sato and Xiaolan Liu

Abstract

Bone and cartilage formation in the embryo and wound fracture healing process in the adult involve the progeny of a small number of cells called mesenchymal stem cells (MSCs). These cells divide could be osteocytes, chondrocytes cell and other cells. Rapidly advances in the cultured after isolation of MSCs, routinely called MSCs from various human tissues and organs have provided impetus to the field of cell therapy and regenerative medicine. However, MSCs in vivo and cultured MSCs is not the same. By electron microscopic observations, many types of cells are seen in cultured MSCs. Comparisons between MSCs, conditioned media and extracellular vesicles including exosomes were evaluated as regenerative medicine against ischemic hearts, Alzheimer's disease and knee osteoarthritis. MSCs conditioned medium and MSCs derived extracellular vesicles has a good therapeutic effect as regenerative medicine against various disease, having the same effects as cultured MSCs. In addition, it is unthinkable that cultured MSCs are differentiate into other cells in vivo.

Key words 培養間葉系幹細胞, 細胞分化, 心筋梗塞, アルツハイマー病, 変形性膝関節症

(WAARM Journal, 2023; 5: 33-47)

はじめに

培養間葉系幹細胞 (MSC) は他の細胞に分化して、障害を受けた組織を再生させて病気を治すとしていく多くの論文や総説が見られる。近年、培養 MSC から分泌されるサイトカイン、増殖因子あるいはエクソソームを含む細胞外小胞の働きにより病気を治癒することが知られてきた。そこで、培養 MSC が他の細胞に分化して心筋梗塞やアルツハイマー病、変形性膝関節症を治すのかを考察した。

間葉系幹細胞の発見

半世紀前 (1966 年) のことですが、Friedenstein AJ. ら^{1,2)} はマウスの骨髄を取り出してチャンバー

で培養すると、骨細胞が増殖して骨が作られる事が報告された。さらに、Friedenstein AJ. ら^{3,4)} は培養皿の底に付着した増殖能の盛んな線維芽細胞様の細胞がコロニーを形成することを見つけ colony forming unit fibroblast, CFU-F と名づけた。これが後に間葉系幹細胞と呼ばれる細胞である。

1991 年 Caplan AJ.⁵⁾ が始めて「間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell, mesenchymal stromal cell, MSC」という言葉を用いた。Caplan AJ. は胎児発生あるいは骨折の治癒過程において間葉系の未熟な細胞が関係していることを見つけた。この未熟な細胞を MSC と名付け、骨、軟骨など多くの間葉系細胞に分化するとの概念を作った。また、MSC から間葉系細胞への分化にはそれぞれの間葉系細胞の前駆

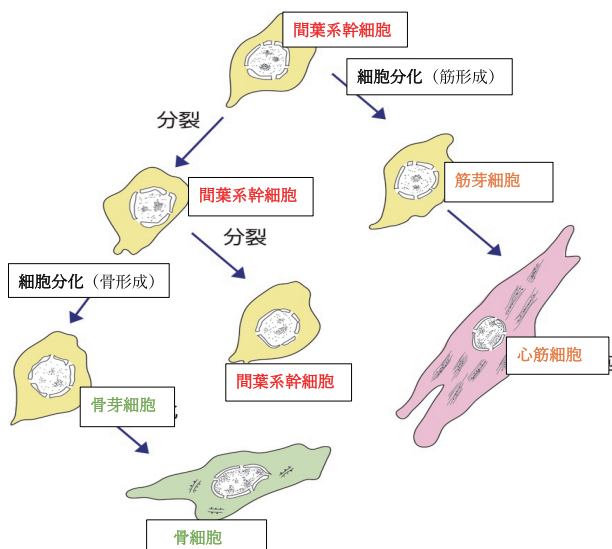


図 1. 間葉系幹細胞の分裂と細胞分化 mesenchymal process (Caplan AJ. の論文⁵⁾を参考)

MSC は細胞分裂により増殖する。一部の MSC は骨芽細胞 osteoblast になり骨細胞に、同様に軟骨芽細胞 chondroblast → 軟骨細胞, 真皮前駆細胞 dermis progenitor cell → 線維芽細胞, 前脂肪細胞 preadipocyte → 脂肪細胞, 血管内皮前駆細胞 endothelial progenitor cell → 血管内皮細胞, 筋芽細胞 myoblast → 骨格筋細胞・心筋細胞, へと分化する⁵⁾。

細胞のステージが存在することも述べている。MSC は増殖し続け、その一部が骨芽細胞から骨細胞へ、あるいは筋芽細胞から心筋細胞へと分化する。即ち、MSC が間葉系細胞に分化するにはそれぞれの間葉系細胞の前駆細胞に分化せねばならない事を示した (図 1)。

Caplan AJ. の提示した間葉系幹細胞の概念はあくまでも生体系、即ち、胎児発生や骨折治癒過程から導き出されたものである。そして、多くの研究者は骨髄や脂肪組織などから取り出し培養した幼若な間葉系の幹細胞を「mesenchymal stem cells」として扱った。MSC と名付けられた細胞はいつの間にか一人歩きをして間葉系だけではなく、内胚葉や外胚葉起源の細胞までも分化すると信じられるようになった。

生体での間葉系幹細胞の出現

胎児発生は別として、成人の生体内での MSC はほとんど観察されてはいない。間葉系ではないが、同じ中胚葉性の造血幹細胞は好中球や好酸球、単球、リンパ球、赤血球、巨核球に分化することは確かである。しかし、骨髄内での造血幹細胞と思われるものは観察されてはいない。

MSC についても同様に生体での骨髄や脂肪組織、心臓、皮膚下真皮層、臍帯など多くの組織で観察されてはいない。正常な組織では骨格筋のサテライト

細胞が MSC として観察されているに過ぎない。

1) 創傷治癒過程と間葉系幹細胞の出現

血管が破れると血管周皮細胞 pericyte の一部が MSC となる。この MSC は活性型 activated MSC となり再生間葉系幹細胞 regenerated MSC として平滑筋細胞や血管内皮細胞、軟骨などに分化するとの報告がある⁶⁾。即ち、血管周皮細胞の一部が MSC に分化するとした。

2) 動脈壁障害と間葉系幹細胞の出現

過酸化水素を投与して実験的に動脈の粥状硬化をおこさせると、中膜細胞の一部が活性型中膜細胞 activated cell となり肥厚している内膜へと遊走する。この活性型の細胞は筋原線維が消失して粗面小胞体やミトコンドリアが良く発達した細胞として観察される。この活性型中膜細胞が MSC と考えられる。その後、活性型細胞は剥離した内皮細胞の部位に張り付いて血管内皮細胞となる⁷⁾。即ち、平滑筋細胞が活性型中膜細胞 (MSC) となり内皮細胞へと分化するのである (図 2)。上記論文は 1994 年発表されたものであり、間葉系幹細胞の概念は一般的ではなく、多くの動脈硬化に関する論文において間葉系幹細胞は中膜細胞が活性化した細胞として扱われている。

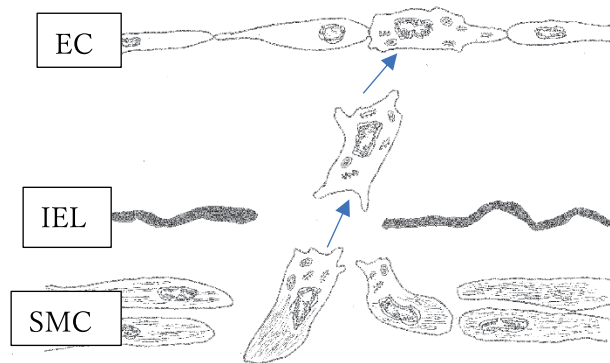


図 2. 軽度な粥状動脈硬化症における間葉系幹細胞の出現 (潘杰, 佐藤茂⁷⁾の論文を参考)

動脈内皮細胞 (EC) の剥離や内弾性板 (IEL) の破壊、中膜細胞 (SMC) の乱れを伴う粥状硬化症のラット動物実験において、中膜細胞が活性型の細胞 (間葉系幹細胞) となり、その一部が血管内皮細胞へと分化する。

このような創傷治癒過程では血管周皮細胞や平滑筋細胞の一部が MSC に分化することが生体内で観察されている。しかし、正常組織において平滑筋細胞や血管内皮細胞に分化する MSC は組織学的方法や電子顕微鏡でも観察されていない。

間葉系幹細胞の由来組織と分化能の相違

1) 培養間葉系幹細胞の性質

骨髄より取り出された造血幹細胞は白血球のマーカーである CD14 や CD34, CD45, HLA-DR を持つ細胞である。しかし、造血幹細胞と一緒に取り出された MSC はこのような白血球のマーカーを持たない⁸⁾。そして、造血幹細胞は浮遊細胞であるが、MSC は培養チャンバーの底に張り付いて増加する性質を持ち、細胞表面マーカーは接着分子 CD73, CD90, CD105 などが発現している細胞である⁹⁾。また、間質の結合組織と結合する細胞表面のインテグリンを持っている¹⁰⁾。

培養した MSC は平滑筋細胞を示す α -actin, 骨格筋細胞を示すミオシン, 神経細胞のマーカーであるネスチンが観察されている¹¹⁾。これらの研究により、骨髄から取り出された培養 MSC は骨細胞や軟骨細胞に分化するだけでなく、神経細胞やグリア細胞にも分化する細胞と信じられた¹²⁾。培養 MSC は均一な性質を持つものではなく、平滑筋細胞, 骨格筋細胞, あるいは神経細胞の性質を持つ細胞群であることが示された。また, transforming growth factor- β 受容体を持つ培養 MSC は増殖能と細胞分化能を改めて証明したものであるとしている¹³⁾。

2) 間葉系幹細胞はどんな細胞に分化すると言われているのか

ヒト骨髄などの由来の MSC がどのような細胞に分化するにかについてはいくつかの総説がある¹⁴⁻¹⁹⁾。MSC は中胚葉起源であるので、中胚葉の細胞 (骨細胞^{8, 20)}, 軟骨細胞⁸⁾, 心筋細胞²¹⁾, 脂肪細胞^{8, 22)}, 血管内皮細胞^{22, 23)}, 線維芽細胞, 中胚葉起源グリア細胞²³⁾ に分化するとしている。また, 中胚葉起源である尿細管上皮細胞²⁴⁾ にも分化するとの報告がある。

しかし, 中胚葉系の細胞だけではなく外胚葉起源の神経細胞あるいは神経様細胞^{25, 26)}, 膵臓のインシュリン分泌細胞²⁷⁾ に分化するとの報告がある。

また, 内胚葉起源の肺胞上皮細胞²⁸⁾ や肝細胞^{29, 30)} にも分化するとの報告もある。

表 1 に示したように多様な細胞に MSC は本当に分化できるのであろうか。分化したとする細胞の生物学的特徴の精度あるいは方法論に問題があるのかも知れない。また, 培養 MSC 治療により効果があった症例では, 多くの研究者は培養 MSC の細胞分化による効果と判断している論文がある。これは Caplan AJ.⁵⁾ による「MSC は他の細胞に分化するものである」との概念にとらわれている。特に, 間葉系幹細胞治療の黎明期ではその傾向が強い。病気が治ると, 培養 MSC の細胞分化によるものと単純に考えられた歴史があったのである。その後, MSC の培養上清液治療でも良い結果が報告されるようになり, 上清液に含まれるサイトカインや増殖因子, あるいは MSC 由来のエクソソームに注目が集まるようになる。最近では病気の快復に伴い再生してきた細胞は培養 MSC の細胞分化ではなく, 増殖因子やエクソソームによる組織幹細胞の活性化によるものであることが認識されるようになってきた。

3) 由来組織と細胞分化能の相違

培養 MSC の初期の研究や臨床応用は骨髄由来である。1995 年に血液悪性腫瘍患者に造血幹細胞と MSC を混合して骨髄移植したのが最初である。造血幹細胞単独より MSC を同時投与した方が予後良好であることが報告された³¹⁾。最初に臨床応用された MSC は骨髄由来である。それ故, MSC の基礎的研究および臨床応用の多くは骨髄由来のものが多く。例えば, MSC による心筋梗塞への治療や免疫調節に関する研究のほとんどが骨髄由来 MSC が用いられている。その後, 結合組織を持つ多くの組織あるいは血液からも MSC が取り出され培養されることとなる。

Fan X-L, Zhang Y, Li X. ら³²⁾ は培養 MSC の表面マーカーを検索し, 由来組織により異なることを示した (表 2)。この報告によると骨髄から分化できる細胞は脂肪細胞や骨細胞, 軟骨細胞, 平滑筋細胞

表 1. 培養間葉系幹細胞が細胞分化したとされる細胞

(中胚葉)
骨細胞、軟骨細胞、心筋細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、尿細管上皮細胞
(外胚葉)
上皮細胞、神経細胞、グリア細胞、インシュリン分泌細胞
(内胚葉)
肺胞上皮細胞、肝細胞

表 2. 培養間葉系幹細胞は由来組織により, 分化できる細胞が異なる (Fan X-L, Zhang Y, Li X, et al.³²) を参考)

	脂肪細胞	骨細胞	軟骨細胞	筋細胞	神経様細胞	血管内細胞	線維芽細胞
脂肪組織	○	○	○	-	-	-	-
骨髄	○	○	○	○	-	-	-
歯髄	○	○	○	○	○	-	-
滑膜	○	○	○	○	-	-	-
皮膚	○	○	○	-	○	○	-
臍帯	○	○	○	○	○	○	-
羊水	○	○	○	○	-	-	-
末血	○	○	-	-	-	-	○

○: 細胞表面マーカーを持っている

-: 細胞表面マーカーを持たない

だけである。前述した細胞内のたんぱく質から検索すると、骨髄からの MSC は神経細胞へと分化する可能性が示唆されるが、表面マーカーからは神経細胞への分化能はないことになる。

培養された MSC にそれぞれの細胞の特徴的な表面マーカーが見られることは確かである。その事と培養した MSC が生体内で他の細胞になることは同じではない。

4) 電子顕微鏡観察から見た培養間葉系幹細胞の形態的特徴

電子顕微鏡観察した培養 MSC は脂肪組織から取り出されたものである。培養皿に張り付いている MSC は N/C 比が高い細胞が集合して観察される。

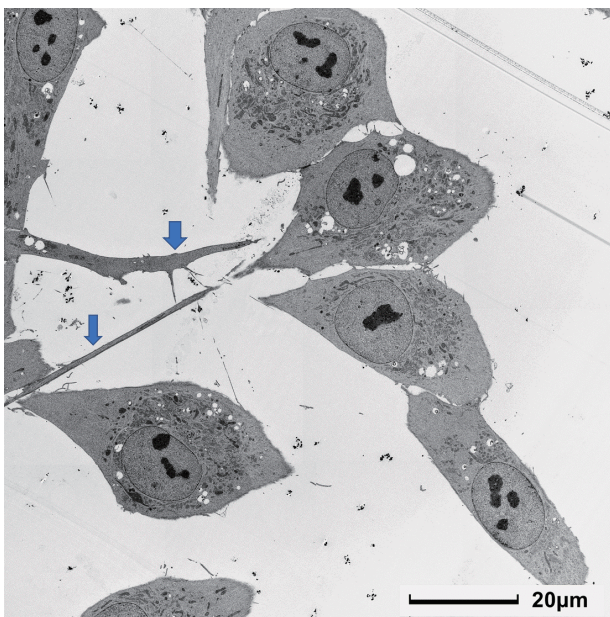


図 3. 脂肪組織から取り出した培養 MSC の電子顕微鏡写真。細胞の大きさは約長径 40μm のものが多く見られ、神経軸索を思わせる細長い細胞質突起 (矢印) を出している細胞も見られる。

核は核小体が目立つが、ヘテロクロマチンがほとんど見られない細胞である。このような核は培養された細胞に良く見られるものであり、盛んに有糸分裂をしている細胞であることを示している。細胞間結合は gap junction による緩い結合である (図 3)。

培養 MSC は Caplan AJ. 氏⁵⁾ が述べた未熟で均一な細胞ではなく、いくつかの異なった細胞で構成されている。ほとんどの培養 MSC の核は一つであるが、多核のものが観察されることがある。核が二つ見られる大きな細胞 (長径 60μm) の細胞内には空胞や細長いミトコンドリア、ライソソーム、アクチン線維が見られ (図 4)、基本的に単核の細胞内小器官と同じである。生体内で多核を持つ細胞は少なく、間葉系の細胞では脂肪細胞である。

高倍率で観察すると、盛んに透出分泌をしている培養 MSC が見られる。細胞の内部で形成された球形や楕円形の小胞 (直径 100nm) が細胞周辺に移動し、小型の球形な小胞 (直径 50nm) となる。細胞周縁部でこの小胞の膜状物が消失して、不定形の液状物として貯留されている。この液状物が細胞外へ

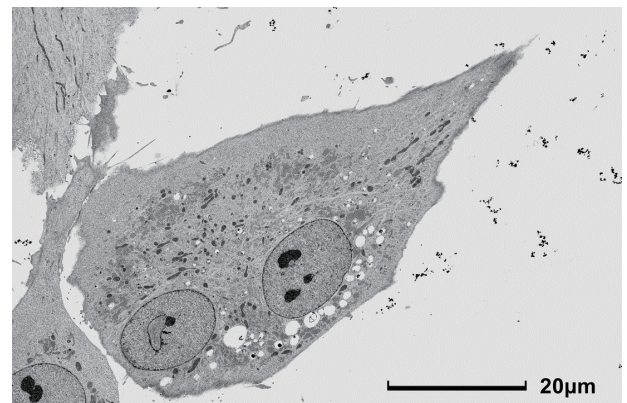


図 4. 脂肪組織由来の培養 MSC であり多核を示す細胞。二核の大型の細胞であり、細胞内に大小不同の空胞やミトコンドリアが見られる。

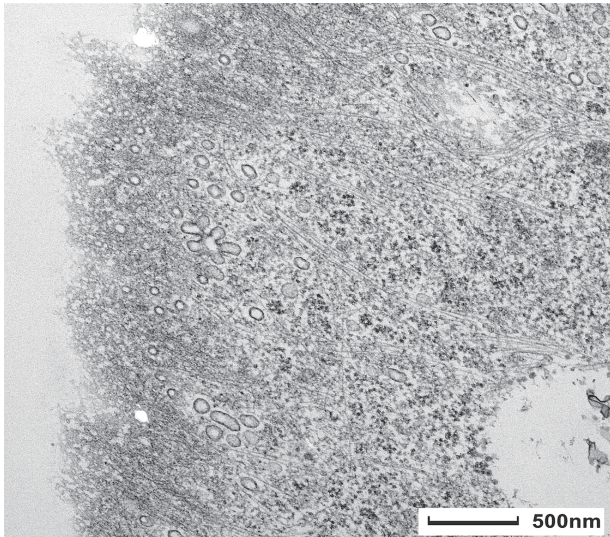


図5. 透出分泌 diacrine secretion 型の培養 MSC
細胞内には大型と小型の小胞や細胞内部から周辺部に向かって配列している豊富なアクチン様線維が見られる。また、細胞周縁部に不定形な液状物を貯留しているのが観察される。

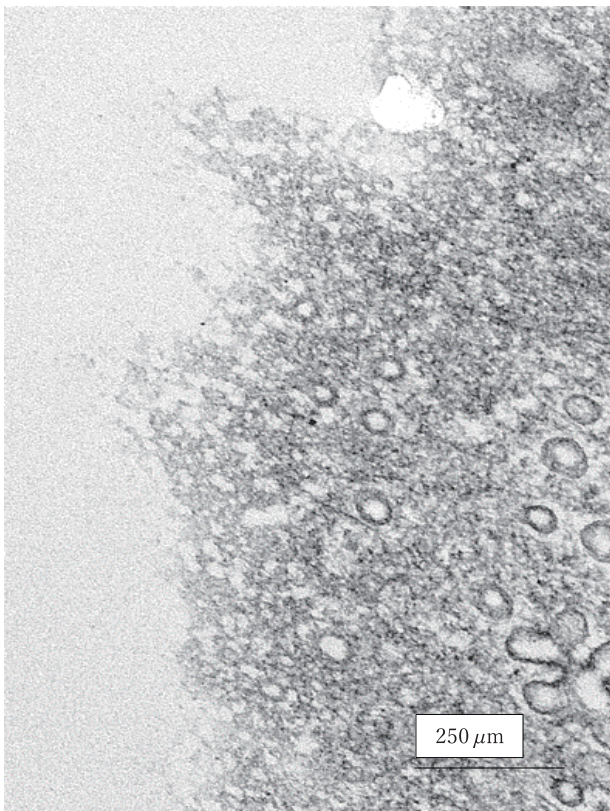


図6. 透出分泌の拡大写真
不定形の液状物が脆弱化している細胞膜から分泌されているのが観察される。

と傍分泌される。透出分泌している細胞質は明確な単位膜がみられず脆弱化している (図5, 6)。しかしながら、このような透出分泌が見られない培養 MSC の細胞膜は明瞭に単位膜構造が見られる (図7)。

培養 MSC は増殖因子とサイトカインの透出分泌以外にエクソソームを含む細胞外小胞の傍分泌

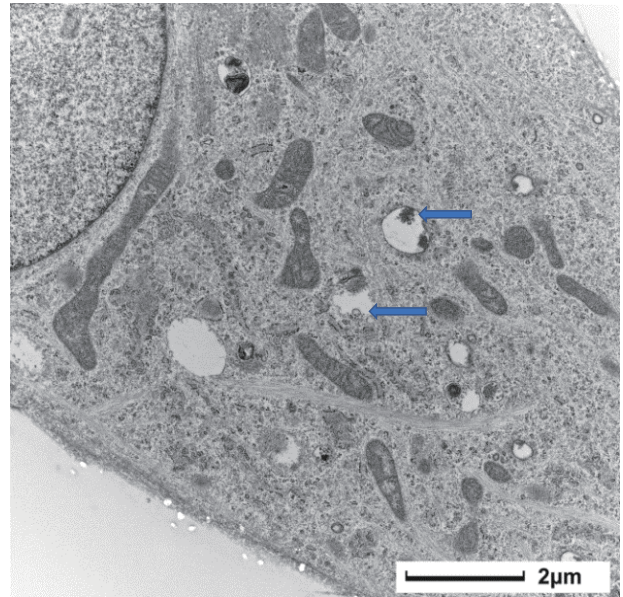


図7. エクソソーム分泌型の培養 MSC
細胞内には多数のアクチン様線維や空胞、ミトコンドリアが見られる。また、エクソソームの前駆体である暗多胞体 (矢印) が見られる。

paracrine も知られている。細胞外小胞は多胞体 multivesicular body で形成され、細胞外に放出される直径 100~200nm の小胞である。微小胞内部には mRNA や miRNA などを含み、細胞間コミュニケーションの働きがある。例えば、傷を受けた組織に血管新生を促す情報を伝達するのがエクソームである^{19,33)}。

これらの電子顕微鏡観察から、培養 MSC は均一な超微形態を示していないことが分かる。多核の細胞や神経軸索のような細長い細胞質突起を持つ細胞、あるいは異なった細胞内小器官を持ったものが観察された。このような異なった超微形態を示す培養 MSC は脂肪幹細胞や骨芽細胞、血管内皮幹細胞を含めた細胞群と考えた方が良いのではないだろうか。

間葉系幹細胞の臨床応用

MSC の臨床への応用は、1995 年に血液悪性腫瘍患者に造血幹細胞と混合して用いられたのが最初である³¹⁾。造血幹細胞単独よりも MSC を同時投与した方が予後良好であることが報告された。同時に MSC の安全性が確認されたとも言える。2004 年頃より培養 MSC を用いた細胞療法が心筋梗塞を始めとして多くの疾患に応用されるようになった。

これまでに培養 MSC の細胞療法で効果の認められた症例は、心筋梗塞、GVHD (移植片対宿主病)、糖尿病、肝炎、創傷、脊髄損傷、変形性関節症、潰

瘍性大腸炎, クローン病などである。数は少ないが筋萎縮性側索硬化症 (ALS), 全身性エリテマトーデス (SLE), リウマチ, パーキンソン病, 脳梗塞, 神経損傷, 褥瘡, 癍痕など多くの疾患例が報告されている¹⁵⁻¹⁹⁾。

付け加えるならば, Ikebe と Suzuki¹⁶⁾ は 2,000 人以上の異なった疾患患者の培養 MSC 治療を検索したところ, 治療効果が一定ではなく, 同一症例にも拘わらず効果が認められるものと認められないケースがあるとしている。この原因としてドナーの相違あるいは MSC の分離・増殖の方法が基準化されていない事が原因であると指摘している。

培養 MSC の各種疾患への効果は臨床応用や動物モデルが多数報告されている。中でも多くの論文が報告されている心筋梗塞やアルツハイマー病あるいは変形性膝関節症について, 培養 MSC の他の細胞への分化と治療効果の関係について述べる。

1) 心筋梗塞

骨髄由来の培養 MSC を心筋梗塞患者の左心室内膜部位に投与して左室駆出率 (LVEF) の回復や心筋梗塞部位が縮小される事が報告されている³⁴⁻⁴¹⁾。また, 培養 MSC を局所部位ではなく, 静脈投与でも心機能が改善したと報告されている⁴²⁾。さらに骨髄以外の組織由来 MSC も心筋梗塞患者の心室内膜に投与すると心機能が回復することが報告されている⁴³⁾。心筋梗塞患者に投与した培養 MSC の効果としては血行改善や梗塞部位の縮小が報告され, MSC が血管内皮細胞や心筋細胞に分化したと考え

られた⁴⁴⁻⁴⁶⁾。

しかし, ラットの心筋梗塞実験モデルから, MSC の培養上清液により虚血部位が縮小したとの報告がある⁴⁷⁾。このことは培養 MSC が心筋細胞や血管内皮細胞に分化することなしに, 増殖因子やエクソソームによって心筋細胞や内皮細胞が再生したことを示している。

ア) 培養 MSC は心筋細胞に分化するのか

心臓の心壁に栄養・酸素を供給している冠状動脈が狭窄や閉塞することで, 心壁が虚血状態になり, 心筋細胞が壊死して心筋梗塞が起こる。心筋梗塞は虚血性の病変なので, 閉塞した動脈のバイパス手術や血管に詰まった血栓を融解することにより改善する。

しかしながら, 心筋梗塞を起こした多くの患者では心筋梗塞を起こした部位の心筋細胞は壊死して, その部位がコラーゲン線維などにより線維化する。この線維化部位が破裂して重篤な状態になることがある。そこで, 線維化部位に心筋細胞や血管内皮細胞が再生する治療が望まれる。

再生医療としての幹細胞療法が知られており, iPS 細胞と培養 MSC 治療法を比較したのが図 8 である。

ヒトやマウスのヒフ下の線維芽細胞を取り出して培養して, ウイルスを用いて遺伝子を注入して人工的な幹細胞 iPS 細胞を作る。この iPS 細胞を心筋細胞に分化させる⁴⁸⁾。この心筋細胞を障害部位に移植するのが iPS 細胞治療である。培養により, iPS

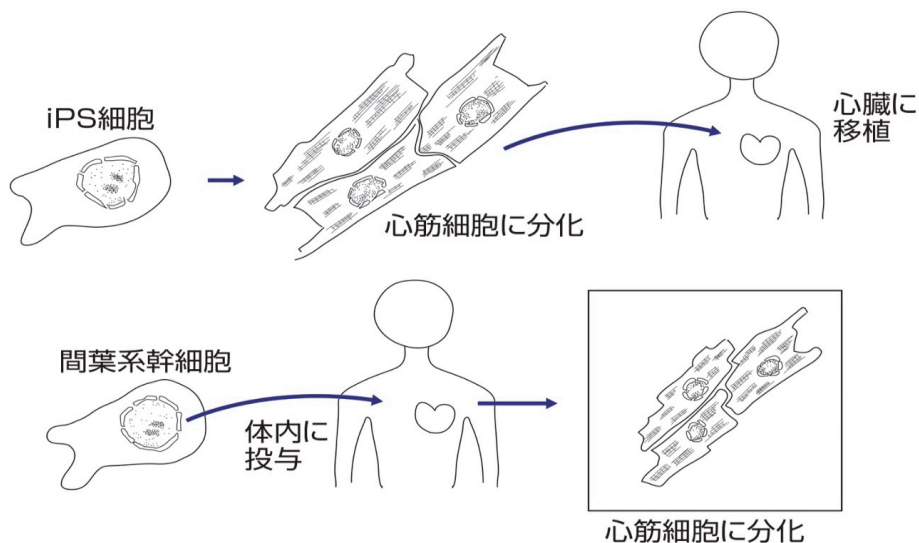


図 8. 一般的に考えられている iPS 細胞と MSC 治療の違い
培養状態で iPS 細胞を心筋細胞に分化させてから, 心筋梗塞部位に移植して心筋壁を再生させる方法が iPS 治療である。それに対して間葉系幹細胞治療は培養 MSC が体に入ってから心筋細胞に分化して心筋壁を再生させる。

細胞を分化させた心筋細胞の cell-sheet を線維化した虚血部位に移植して心筋梗塞治癒させる⁴⁹⁾。

正常マウス体内に培養 MSC を静脈から入れると、4日後には脾臓や肝、肺に多数の培養 MSC が見られるが心室にはほとんど見られない。しかし、実験的に心筋梗塞を起こすと梗塞部位には多数の培養 MSC が集簇している⁵⁰⁾。この理由は、培養 MSC が炎症部位に集簇する性質があるからである。その後、培養 MSC は心筋細胞に分化して虚血部位を再生させたと考えられた。

MSC は培養環境を変えることにより心筋細胞に分化することがいくつか報告がある。DNA methyltransferase 5-azacytidine を培地にいれると MSC が筋原線維特有なタンパク合成が起こることから心筋細胞に分化するとしている^{51,52)}。また、BMP-2, FGF-4, steroid, 抗酸化剤^{53,54)}、HGF⁵⁵⁾ あるいは低酸素状態などによっても心筋細胞の細胞マーカーが出現、あるいは細胞収縮する心筋様細胞へ分化するとの報告がある⁵⁶⁾。これらの MSC から心筋細胞への分化は培養系での話であり、生体内で本当に培養 MSC から心筋細胞へと分化したことを証明したものではない。

生体内で培養 MSC が心筋細胞に細胞分化したとされる2論文がある。一つは蛍光抗体法を用いた実験的虚血心であり、虚血部位周縁部の心筋細胞再生部に MSC と心筋細胞の両方の性質を持つキメラ細胞が出現したことから、MSC が心筋細胞へ分化したとする論文である⁵⁷⁾。他は Y 染色体を持つ培養 MSC をメスの虚血心に投与すると、虚血部位周縁部に注入された Y 染色体を持つ心筋細胞が見られた。このことから、培養 MSC が心筋細胞に分化したとする論文である⁵⁸⁾。マウスの実験で虚血周縁部に再生してきた心筋細胞は 40~60 個を超える細胞が電子顕微鏡で観察されている⁵⁰⁾。しかしながら、上記2論文は培養 MSC から分化したとする心筋細胞数は極端に少なく、多くの再生している心筋細胞の中にポツンと一個しか観察されていない。培養 MSC から心筋細胞の分化が起こるのが事実としても、再生した多数の心筋細胞中の一個の細胞ならば、心筋梗塞が改善する必須条件とは思えない。また、蛍光抗体法は人工産物が起こりやすいことは経験的に知られていることである。

イ) MSC の培養上清液による心筋梗塞の治療効果

MSC には膀胱分泌作用 paracrine があり、その培養上清液には多くのサイトカインや増殖因子 growth

factor を含むことが知られている⁵⁹⁻⁶²⁾。そして、これらのサイトカインや増殖因子は血管形成誘導、虚血部位の炎症や線維化抑制、抗アポトーシス作用などにより種々の組織障害保護に関係している⁶²⁾。増殖因子としては HGF, VEGF, VEGF, PGDF, bFGF, FGF2, KGF などが知られている。培養上清液に含まれるこれら増殖因子の働きで血管内皮幹細胞^{57,63,64)} や心筋幹細胞^{57,64-66)} を活性化させる。

付け加えるに心臓の心筋細胞は新生児では細胞増殖するが、その後心筋細胞の増殖が見られないことから、成人心臓には心臓幹細胞は存在しないと永らく考えられてきた。しかし、2002年に成人においても心筋幹細胞の存在が確認された^{67,68)}。

ウ) MSC 由来のエクソソームを含む細胞外小胞

細胞外小胞 extracellular vesicle は大きさや小胞に含まれているものにより三タイプに分けられる。エクソソーム、微小胞、アポトーシス様の小胞である。中でも細胞外小胞の一つであるエクソソームの研究が多い。エクソソームを含む細胞外小胞内には mRNA, miRNA をふくむ核酸物質が存在している⁶⁹⁾。

細胞外小胞は抗酸化ストレス、抗炎症作用、抗アポトーシス、免疫反応、ホメオスタシス、抗炎症反応、血管新生、腫瘍抑制などに関する細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしている⁷⁰⁻⁷³⁾。

心筋梗塞に対する MSC⁷⁴⁾ や心筋幹細胞由来⁷⁵⁾ のエクソソームは線維化抑制、心筋細胞の再生・増生を促すとしている。そのうえ、MAC 由来のエクソソームは血管内皮幹細胞や心筋幹細胞を活性化させて⁷⁶⁾ 梗塞部位を縮小させることが報告されている^{77,78)}。このことは MAC 由来のエクソソームは心筋梗塞に対して培養 MAC と同様な効果があり、培養 MSC が心筋細胞に分化しなくとも治療効果が高いことが示された。

Poomani MS, Mariappan I, Perumal R, 氏らはその総説⁷⁹⁾の中で心筋梗塞の MSC の治療効果の一つとして培養 MSC が心筋細胞へ分化することを述べている。しかしながら、培養 MSC が分泌する増殖因子やエクソソームは心筋幹細胞や毛細血管内皮幹細胞を刺激して増殖させる(図9)。このことは培養 MSC からの心筋細胞への分化は必要がないといえる。

2) アルツハイマー病

アルツハイマー病は大脳皮質や海馬領域に神経細胞壊死・消失が見られる。大脳皮質と海馬領域は記憶と密接に関係しており、両領域の神経細胞損傷・

NR: nicotinamide riboside
 NAM: nicotinamide (Vitamin B3)
 NMN: nicotinamide mononucleotide
 NAMPT: nicotinamide phosphoribosyltransferase
 NAD+: nicotinamide adenine dinucleotide

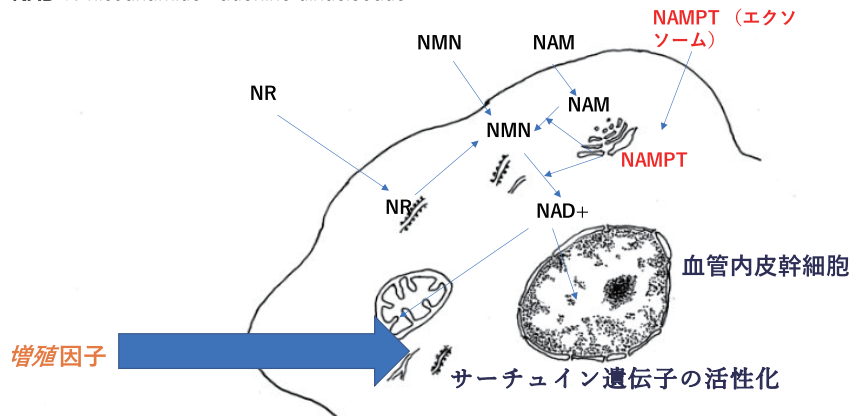


図9. 血管内皮幹細胞はサーチュイン遺伝子が活性化することにより増殖する

1. 腸から吸収された NR や NAM, NMN は細胞内に入り, NAD+ となり核内のサーチュイン遺伝子を活性化させて内皮細胞を増生させる.
2. エクソソームは NAMPT を含んでいる. この NAMPT は NAD+ の増加を促しサーチュイン遺伝子を活性化させる.
3. 増殖因子 VEGF は NAD+ を介さないで直接サーチュイン遺伝子を活性化させる.

壊死は記憶力と認知能力の低下へと導き, その症状からアルツハイマー型認知症とも呼ばれる⁸⁰⁾. 認知症の60~70%がアルツハイマー型認知症で, 通常は高齢者に発症して, 記憶力の低下によりひどい物忘れとなり, 日常生活にも問題が起これ健康寿命は終わりを告げる事となる^{81,82)}.

アルツハイマー病の特徴は細胞外のアミロイドβの蓄積と神経細胞内に出現するリン酸化したタウ蛋白である神経原線維の変性の出現である. そして, アミロイドβとタウ蛋白の蓄積がシナプスの消失や神経細胞壊死あるいはミクログリアやアストロサイトの変性を招くのである⁸³⁾. 臨床症状が出ていない時からアミロイドβやタウ蛋白出現が見られ, アルツハイマー病の進行と関係している⁸³⁾.

アルツハイマー型認知症治療の薬物療法はアミロイドβやタウ蛋白の蓄積を抑制するものが多い. それ故, 早期のアルツハイマー型認知症では効果が見られるが, 発症中期や後期では治療薬の効果は見られないようである⁸¹⁾.

ア) アルツハイマー病の培養 MSC の治療効果

MSC のアルツハイマー型認知症治療効果は多面

的である. 培養 MSC は血管内皮細胞増殖因子や脳やグリア細胞の神経栄養因子 GDNF, BDNF を分泌する. また, エクソソームを含む細胞外小胞を分泌して種々の神経保護や再生を促し, 抗アポトーシス作用にて神経細胞死を減少させる. その上, 培養 MSC はミクログリアをリプログラミングさせて抗炎症作用や抗酸化作用を促す⁸⁴⁾.

イ) アルツハイマー病に対して培養 MSC とエクソソームの治療効果は同じ

アルツハイマー病モデルマウスはアミロイドβの蓄積やタウ蛋白の細胞内蓄積, ミクログリアの活性化による炎症が起こる. このモデルマウスに MSC 由来のエクソソームを投与すると培養 MSC と同様な治療効果が得られる (表3).

培養 MSC 由来のエクソソームは抗アポトーシス作用を発現させて神経細胞壊死を防ぎ, 神経性の炎症を減少させる⁸⁵⁻⁸⁷⁾. アルツハイマー病マウスへ MSC 由来のエクソソームを投与すると, 大脳皮質と海馬をターゲットとしてアストロサイトの活性化やアミロイドβの減少, 神経幹細胞を活性化させる^{84,88)}.

表3. 培養 MSC と MSC 由来エクソソームによるアルツハイマー病モデルマウスの治療効果の比較

	神経幹細胞の活性化	アミロイドβの減少	タウ蛋白の減少	抗炎症
培養 MSC	○	○	○	○
エクソソーム	○	○	○	○

ウ) 培養 MSC は神経細胞に分化しない

神経細胞ではなく神経様細胞 neuro-like cell と記載されている論文が多いが、培養 MSC が神経細胞に分化する可能性について考察してみる。培養 MSC に神経細胞のマーカーであるネスチンが発現しているので神経細胞に分化すると考えられた^{11,32,26)}。また、脊髄損傷動物実験でラベルした培養 MSC が神経細胞に分化したとする研究がある⁸⁹⁾。一方、培養 MSC からの神経細胞への分化とするデータは人工産物である可能性がたかく、培養 MSC からの神経細胞への分化の可能性はないとの報告もある^{11,90)}。電子顕微鏡観察から神経細胞突起のような構造あるいは神経細胞のマーカーを培養 MSC は持っている事は認められるが、このような細胞は神経様細胞であり神経細胞ではない。事実、培養 MSC から神経細胞への分化を in vivo で直接的に証明した論文はない⁹⁰⁾。

エ) ミクログリアのリプログラミング

ミクログリアには形態的に不活性型と活性型があり、他には血管周囲性に見られるものもある (図 10)。活性型ミクログリアは活性酸素の発生や炎

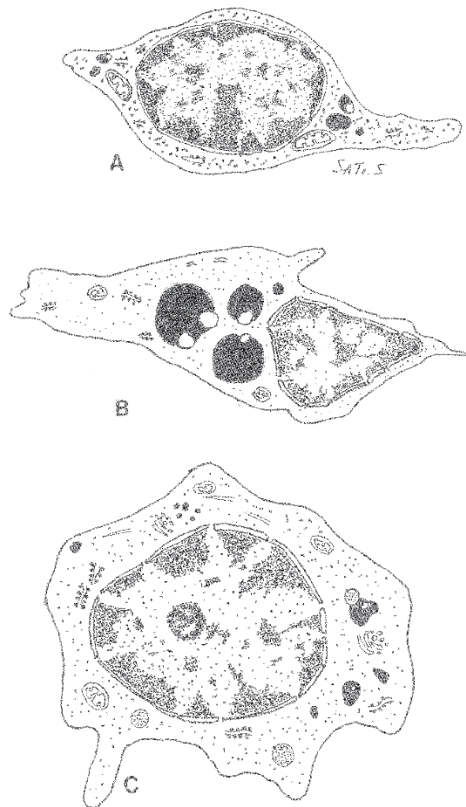


図 10. ラット大脳皮質のミクログリアの模式図 (佐藤茂, 安達, 佐佐木による⁹¹⁾)
 A. 不活性型のミクログリア
 B. 血管周囲性のミクログリア
 C. 活性型のミクログリア

症性サイトカインを放出して神経細胞の変性を促す⁹²⁾。活性型ミクログリアは不活性型と比較して、発達した細胞質突起を持ち粗面小胞体やゴルジ装置が発達しておりタンパク合成の盛んな細胞である。また、活性型ミクログリアの出現はミクログリア病とも知られている“鬱病” depression as a microglial disease”の原因となる⁹³⁾。

アルツハイマー病動物モデルに MSC 由来のエクソソームを投与すると、ミクログリアのリプログラミングが起き炎症性サイトカインが減少し、抗炎症性サイトカインの増加が起きる^{94,96)}。また、初代培養したミクログリアにアミロイドβを付加させると速やかにアミロイドβをミクログリアが捕食する⁹⁷⁾。この働きにより大脳皮質物質に蓄積されたアミロイドβを減少させるのである。

オ) オリゴデンドロサイトの活性化

神経細胞には有髄神経と無髄神経細胞が知られている。有髄神経を取り巻くミエリンは神経細胞を保護する役目がありオリゴデンドロサイトより作られる⁹¹⁾。アルツハイマー病の初期においてこのミエリンが壊れているとの報告がある。それ故、オリゴデンドロサイトあるいはオリゴデンドロサイトになる幹細胞を活性化させ、神経細胞障害を修復させる

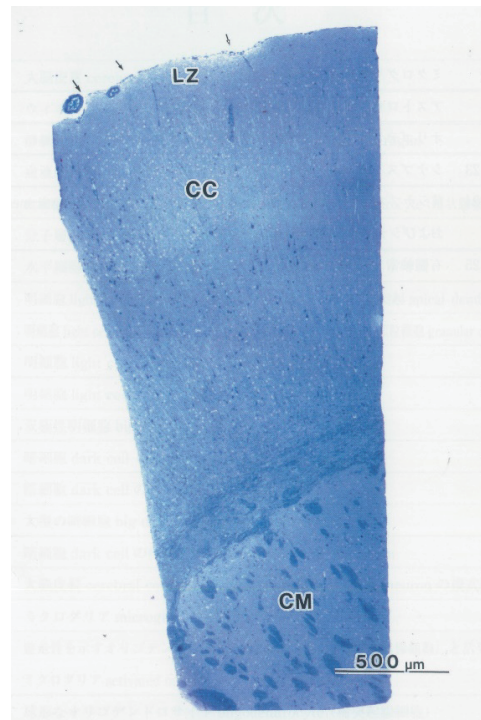


図 11. 大脳皮質と髄質の光学顕微鏡写真
 LZ: 分子層, CC: 大脳皮質, CM: 大脳髄質, 矢印: 髄膜
 大脳髄質のトリイジン青濃染部位がミエリン鞘である。大脳皮質は髄質よりミエリン鞘がとて少ない。それ故に皮質の神経細胞は障害を受けやすい。

ことによりアルツハイマー病治療に役に立つとしている⁹⁸⁾。

アルツハイマー病モデルのマウスにエクソソームを投与するとオリゴデンドロサイトを活性化させるとの報告がある^{85,95)}。アルツハイマー病では大脳皮質と海馬領域の神経細胞障害である。大脳皮質は大脳髓質とは異なりミエリン鞘を持つ有髄神経は少ない⁹¹⁾(図11)。また、海馬領域の神経細胞にはミエリン鞘がほとんど観察されない。それ故、海馬の神経細胞は大脳皮質の神経細胞が障害を受けにくい程度の軽い虚血状態でも神経細胞壊死が起こる。

カ) 培養 MSC から分泌される各種増殖因子やサイトカインによるアルツハイマー病治療

アルツハイマー病モデルマウスに培養 MSC を投与すると、神経幹細胞 neural stem cell を活性化させて神経細胞やグリア細胞の再生を促進させる⁹⁹⁾。付け加えるならば、海馬領域では神経幹細胞の存在は知られているが、大脳皮質での神経幹細胞の存在は不明である。

培養 MSC は神経細胞再生以外にシナプスの補修、抗炎症作用 (TNF- α , IL-1 β の減少), 神経保護作用を持つ神経栄養因子を分泌する¹⁰⁰⁾。また、ミクログリアの捕食能の活性化や血管再生, アミロイド β とタウ蛋白の減少, 酸化ストレスやアポトーシスの減少, A β プラークの減少が報告されている^{99,100)}。

培養 MSC が分泌する増殖因子 (成長因子) はグリア細胞由来栄養因子 GDNF, 血管内皮細胞増殖因子 VEGF, 脳由来神経栄養因子 BDNF, インシュリン様成長因子 1 IGF-1, 神経成長因子 NGF, 線維芽細胞増殖因子が知られている^{90,101)}。そして、培養 MSC からの神経保護因子分泌によりシナプスの成長や神経幹細胞分化により神経細胞が再生されている¹⁰²⁾。

3) 変形性膝関節症

ア) 加齢に伴い発症する

変形性膝関節症は閉経後の女性高齢者に多く見られ、膝関節軟骨がすり減り痛みを伴う事が多い。この関節軟骨のすり減りは関節への過度な負担, 酸化ストレスおよび炎症が原因である。変形性膝関節症の発症には炎症媒介因子 inflammatory mediator が慢性的に発現することが重要な原因であると考えられる^{103,104)}。

変形性膝関節症には消炎鎮痛剤などを用いた薬物治療, 膝関節の筋肉を増強さす運動療法などがあるが

膝関節痛の抜本的な治療方法ではない。変形性膝関節症の症状がひどくなると歩行困難となる。このような患者は人工膝関節の手術により歩行可能となるが、健常者のような歩行に戻る事は少ない。

イ) 培養 MSC とその上清液は同様な効果がある

培養 MSC を変形性膝関節症患者の関節部へ投与することにより、損傷している軟骨組織や滑膜細胞によって分泌される炎症因子を低下させる¹⁰⁵⁾。また、培養 MSC は炎症性サイトカインの IL-1 β を抑制, 酸化ストレスの減少, 軟骨細胞の増殖, 関節の消炎効果 (図12) が報告されている^{106,107)}。MSC の培養上清液を関節部投与しても培養 MSC 投与と同様な効果, IL-1 β , 酸化ストレスの減少, 軟骨細胞の増殖および関節痛の消炎効果が報告されている¹⁰⁸⁾ (図12)。付け加えるに、ラットの肩にモノヨード酢酸を投与して作った関節炎動物モデルを用いた実験から、培養 MSC を関節内に注入すると中枢性感作を抑制し、抗炎症作用および軟骨組織の防御因子 TSG-6 が発現したとの報告がある¹⁰⁹⁾。変形性膝関節症だけではなく、リュウマチの動物モデルを用いた実験から、培養 MSC 由来のエクソソームにより炎症性サイトカインの減少などの効果が見られる¹¹⁰⁾ との報告もある。MSC は軟骨細胞に分化すると報告している研究者は多い^{8,12,13,32)}。これらの報告は軟骨細胞が再生していることから導きだされたものであり、培養 MSC が軟骨細胞に分化したとする直接的な証明はなされていない。

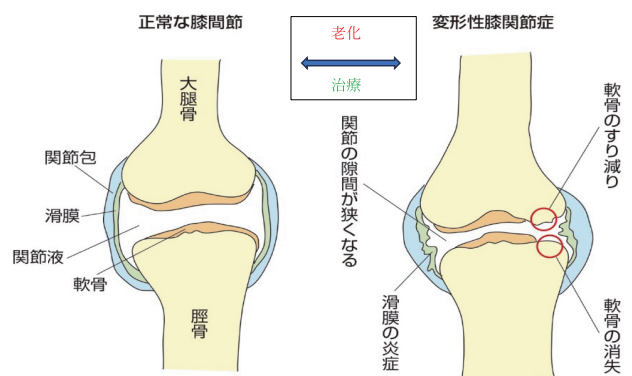


図12. 変形性膝関節症は培養 MSC やその上清液投与によりほぼ正常な膝関節に戻る

老化により変形性膝関節症になると、滑膜炎による変性、軟骨のすり減りや消失などが起こり歩行困難となる。発症初期より痛みが伴う病気である。培養 MSC やその培養上清液の局所投与によりほぼ正常な膝関節にもどる。また、治療直後より膝の痛みは軽減する。

ウ) 慢性疼痛緩和

変形性膝関節症などの筋骨格系の痛みは炎症性サ

イトカインであるインターロイキン (IL-1, IL-2, IL-6)^{111, 112)}が増加することによる。また、神経障害性の痛みはTNF- α が関係している^{113, 114)}。培養上清液は炎症性サイトカインやTNF- α を抑制する¹¹⁴⁾。

変形性膝関節症患者の疼痛部位に培養上清液を投与すると数分で痛みが和らぐことが報告されている。変形性膝関節症や関節炎、腰痛などの患者12人に上清液による治療を行った報告がある¹¹⁵⁾。MSCの培養上清液を疼痛部に2~5ml投与すると、投与後数分で多くの患者の痛みは軽くなる。軽い痛みの患者は痛みが全く感じないようになる。7段階 (とても痛い) 以上の患者の痛みの緩和は魔法をかけられたように感じるようである。患者の中には1か月すると痛みが戻る方もいるが、治療前のような強い痛みではない¹¹⁵⁾。また、痛みが再び起きたら再度上清液治療を受けると、疼痛緩和効果はさらに高まることの話である (三島雅辰氏私信)。

まとめ

培養幹細胞治療効果を中心に筋梗塞やアルツハイマー病、変形性膝関節症について比較して以下のような結果を得た。

- 1) 培養MSC, 培養上清液および培養MSC由来のエクソソーム投与はほぼ同様な治療効果が見られた。
- 2) 生体内で培養MSCは分化して他の細胞になる事はない。

参考文献

- 1) Friedenstein AJ, Piatetzky-Sharp II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966; 3: 581-390.
- 2) Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230-247.
- 3) Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3: 393-403.
- 4) Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Cloning in vitro and retransplantation in vivo*. *Transplantation*. 1974; 17: 331-340.
- 5) Caplan AJ. Mesenchymal stem cells. *J Orthopaedoc Research*. 1991; 9: 641-50.
- 6) Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 313-319.

- 7) 潘杰, 佐藤茂. 過酸化水素による実験的大動脈壁傷害—超微形態学的研究—. *臨床電顕誌*. 1994; 27: 197-212.
- 8) 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*. 2006; 8: 315-317.
- 9) Kulus M, Sibiak R, Stefanska K, et al. Mesenchymal stem/stromal cells derived from human and animal perinatal tissues—origins, characteristics, signaling pathways, and clinical trials. *Cell*. 2021; 10: 3278.
- 10) Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cell*. 2002; 20: 249-258.
- 11) Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation*. 2004; 72: 319-326.
- 12) George S, Hamblin MR, Abrahamse H. Differentiation of mesenchymal stem cells to neuroglia: in the context of cell signalling. *Stem Cell Rev. Rep*. 2019; 15: 814-826.
- 13) Hung SC, Chang CF, Ma HL, et al. Gene expression profiles of early adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Gene*. 2004; 340: 141-150.
- 14) Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Rev Immunol*. 2008; 8: 726-736.
- 15) Golpanian S, Wolf A, Hatzistergos KE, et al. Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue. *Physiol Rev*. 2016; 96: 1127-1168.
- 16) Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int*. 2014: 951512.
- 17) 中山亨之, 加藤栄史. (総説) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を利用した細胞療法—現状と展開—. *日本輸血細胞治療学会誌*. 2013; 59: 450-456.
- 18) 佐藤茂, 劉効蘭. 間葉系幹細胞による治療と抗老化. *国際抗老化再生医療学会雑誌*. 2013; 1: 1-20.
- 19) Hade MD, Suire CN, Suo Z. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: applications in regenerative medicine. *Cells*. 2021; 10: 1959.
- 20) Montespan F, Deschaseaux F, Sensebe L, et al. Osteodifferentiated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue express HLA-G and display immunomodulatory properties in HLA-mismatched settings: implications in bone repair therapy. *J Immunol Res*. 2014: 230346.
- 21) Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2010; 14: 878-889.
- 22) Meng X, Chen M, Su W, et al. The differentiation of mesenchymal stem cells to vascular cells regulated by the HMGB1/RAGE axis: Its application in cell therapy for transplant arteriosclerosis. *Stem Cell Res Ther*.

- 2018; 9: 85.
- 23) Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Aca Sci USA*. 1999; 96: 10711-10716.
 - 24) Baer PC, Doring C, Hansmann M-L, et al. New insights into epithelial differentiation of human adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013; 7: 271-278.
 - 25) Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 194: 664-673.
 - 26) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000; 164: 247-256.
 - 27) Kim SC, Han DJ, Lee JY. Adipose tissue derived stem cells for regeneration and differentiation into insulin-producing cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010; 5: 190-194.
 - 28) Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*. 2001; 128: 5181-5188.
 - 29) Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. 2005; 106: 756-763.
 - 30) Al Battah F, De Kock J, Vanhaecke T, et al. Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. *Scientific World J*. 2011; 11: 1568-1581.
 - 31) Lazaus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, et al. EX vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): Implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 16: 557-564.
 - 32) Fan X-L, Zhang Y, Li X, et al. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2020; 77: 2771-2794.
 - 33) Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020; 367(6478): eaau6977.
 - 34) Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: 2277-2286.
 - 35) Hare JM, Fishman JE, Genstenblith G, et al. Comparison of allogenic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEILON randomized trial. *JAMA*. 2012; 308: 2369-2379.
 - 36) Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003; 107: 2294-2302.
 - 37) Perin EC, Silva GV, Henry TD, et al. A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF). *Am heart J*. 2011; 161: 1078-87.
 - 38) Tse HF, Thambar S, Kwong YL, et al. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery disease (PROTECT-LAD trial). *Eur Heart J*. 2007; 28: 2998-3005.
 - 39) van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SL, et al. Intra-myocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized control trial. *JAMA*. 2009; 301: 1997-2004.
 - 40) Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischemic heart disease; promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J*. 2011; 32: 1197-1206.
 - 41) Gneocchi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cells therapy for heart disease. *Vascul Pharm*. 2012; 57: 48-55.
 - 42) Hare JM, Fishman JE, Genstenblith G, et al. Comparison of allogenic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEILON randomized trial. *JAMA*. 2012; 308: 2369-2379.
 - 43) Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sanchez PL, et al. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE trial. *Am Heart J*. 2014; 168: 88-95.
 - 44) Planat-Benard V, Menard C, Andre M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004; 94: 223-229.
 - 45) Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, et al. Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease. *World J Cardiol*. 2015; 7: 454-465.
 - 46) Miranville A, Heeschen C, Sengenes C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004; 110: 349-355.
 - 47) He J, Cai Y, Luo LM, et al. Hypoxic adipose mesenchymal stem cells derived conditioned medium protects myocardial infarct in rat. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19: 4397- 4406.
 - 48) Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008; 118: 498-506.
 - 49) Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Enhanced Therapeutic Effects of Human iPS Cell Derived-Cardiomyocyte by Combined Cell-Sheets with Omental Flap Technique in Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model. *Sci Rep*. 2017; 7: 8824.
 - 50) Misao Y, Takemura G, Arai M, et al., Bone marrow-

- derived myocyte-like cells and regulation of repair-related cytokines after bone marrow cell transplantation. *Cardiovasc Res.* 2006; 69: 476-90.
- 51) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999; 103: 697-705.
- 52) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* 1999; 100: II247-256.
- 53) Shim WS, Jiang S, Wong P, et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 324: 481-488.
- 54) Yoon J, Min BG, Kim YH, et al. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol.* 2005; 60: 277-284.
- 55) Forte G, Minieri M, Cossa P, et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: Proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells.* 2006; 24: 23-33.
- 56) Szaraz P, Gratch YS, Iqbal F, et al. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into functional cardiomyocyte-like Cells. *J Vis Exp.* 2017; 126: 55757.
- 57) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002; 105: 93-98.
- 58) Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 14022-14027.
- 59) Meirelles LdaS, Fontes AM, Covas DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20: 319-427.
- 60) Garcia-Gomez I, Elvira G, Zapata AG, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10: 1453-68.
- 61) Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of trans-differentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells.* 2007; 25: 2896-2902.
- 62) Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, et al. Conditional medium from human mesenchymal stroma cells: towards the clinical translation. *Int J Mol Sci.* 2019; 20: 1656.
- 63) Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, et al. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principle, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 532-542.
- 64) Behfar A, Terzic A. Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem cells yields cardiac progeny. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006; 3: S78-S82.
- 65) Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res.* 2010; 107: 913-922.
- 66) Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al. Cardiomyocyte regeneration: a consensus statement. *Circulation.* 2017; 136: 680-686.
- 67) Mehanna RA, Essawy MM, Barkat MA, et al. Cardiac stem cells: Current knowledge and future prospects. *World J Stem Cells.* 2022; 14:1-40.
- 68) 平井健太, 大槻審一, 佐野俊二ら. 心臓幹細胞を用いた心臓再生治療. *心臓.* 2016; 48: 1334-1339.
- 69) Koniusz S, Andrzejewska A, Muraca M, et al. Extracellular vesicles in physiology, pathology, and therapy of the immune and central nervous system, with focus on extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells as therapeutic tools. *Front Cell Neurosci.* 2016; 10: 109.
- 70) Rani S, Ryan AE, Griffin MD, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Mol Ther.* 2015; 23: 812-823.
- 71) Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9: 63.
- 72) Bagno L, Hatzistergos KE, Balkan W, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for cardiovascular disease: progress and challenges. *Mol Ther.* 2018; 26: 1610-1623.
- 73) Nguyen BY, Azam T, Wang X. Cellular signaling cross-talk between different cardiac cell populations: an insight into the role of exosomes in the heart diseases and therapy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021; 320: H1213-H1234.
- 74) Vrijnsen KR, Maring JA, Chamuleau SAJ, et al. Exosomes from Cardiomyocyte Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells Stimulate Angiogenesis Via EMMPRIN. *Adv Healthc Mater.* 2016; 5:2555-65.
- 75) Zhang Z, Yang J, Yan W, et al. Pretreatment of cardiac stem cells with exosomes derived from mesenchymal stem cells enhances myocardial repair. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5; e002856.
- 76) Dabrowska S, Andrzejewska A, Janowski M, et al., Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. *Front Immunol.* 2020; 11: 591065.
- 77) Li J, Rohailla S, Gelber N, et al. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2014; 109: 423.
- 78) Wen Z, Mai Z, Zhu X, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate cardiomyocyte apoptosis in hypoxic conditions through microRNA144 by targeting the PTEN/AKT pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11: 36.

- 79) Poomani MS, Mariappan I, Perumal R, et al. Mesenchymal stem cell (MSCs) therapy for ischemic heart disease: a promising frontier. *Global Heart*. 2022; 17: 19.
- 80) Bloom GS. Amyloid-beta and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*. 2014; 71: 505-508.
- 81) 下濱俊. アルツハイマー型認知症治療の現状と展望. *国際抗老化再生医療学会雑誌*. 2020; 3: 1-11.
- 82) Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatment in Alzheimer's disease. *Clin Med*. 2016; 16: 247-253.
- 83) Busche MA, Wegmann S, Dujardin S, et al. Tau impairs neural circuits, dominating amyloid-beta effects, in Alzheimer models in vivo. *Nat. Neurosci*. 2019; 22: 57-64.83
- 84) Nooshabadi VT, Mardpour S, Yousefi-Ahmadipour A, et al. The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: A new therapeutic option in regenerative medicine. *J. Cell Biochem*. 2018; 119: 8048-8073.
- 85) de Godoy MA, Saraiva LM, de Carvalho LRP, et al. Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid-beta oligomers. *J. Biol. Chem*. 2018; 293: 1957-1975.
- 86) Kang J, Li Z, Zhi Z, et al. MiR-21 derived from the exosomes of MSCs regulates the death and differentiation of neurons in patients with spinal cord injury. *Gene Ther*. 2019; 26: 491-503.
- 87) Hernández AE, García E. Mesenchymal stem cell therapy for Alzheimer's disease. *Stem Cells Int*. 2021; 2021: 7834421.
- 88) Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote neurogenesis and cognitive function recovery in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neural. Regen. Res*. 2019; 14: 1626-1634.
- 89) Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*. 2000; 11: 3001-3005.
- 90) Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res*. 2004; 77: 174-91.
- 91) 佐藤茂, 安達彰子, 佐佐木喜広ら. 電子顕微鏡アトラス ラットの正常構造 5 髄膜 6 大脳皮質. (有) 光原社. 2020 年.
- 92) Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*. 2018; 217: 458-472.
- 93) Amit I. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell*. 2017; 169: 1276-1290.
- 94) Cui GH, Wu J, Mou FF, et al. Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice. *FASEB J*. 2018; 32: 654-668.
- 95) Cui GH, Guo HD, Li H, et al. RVGmodified exosomes derived from mesenchymal stem cells rescue memory deficits by regulating inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease. *Immun Ageing*. 2019; 16:10.
- 96) de Godoy MA, Saraiva LM, de Carvalho LRP, et al. Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. *J Biol Chem*. 2018; 293: 1957-1975.
- 97) kitamura Y, Shibagaki K, Takata K, et al. Involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family verpulin-homologous protein (WAVE) and Rac1 in the phagocytosis of amyloid-beta (1-42) in rat microglia. *J Pharmacol Sci*. 2003; 92: 115-123.
- 98) Cai Z, Xiao M. Oligodendrocytes and Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*. 2016; 126: 97-104.
- 99) Yun H, Kim H, Park K, et al. Placenta-derived mesenchymal stem cells improve memory dysfunction in an A β 1-42-infused mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*. 2013; 4: e958-e958.
- 100) Alipour M, Nabavi S, Arab L, et al. Stem cell therapy in Alzheimer's disease: possible benefits and limiting drawbacks. *Mole Bio Repo*. 2019; 46: 1425-1446.
- 101) Staff NP, Jones D, Singer W. Mesenchymal stromal cell therapies for neurodegenerative diseases. *Mayo Clin Proc*. 2019; 94: 892-905.
- 102) Cooney D., Wimmers E., Ibrahim Z., et al. Mesenchymal stem cells enhance nerve regeneration in a rat sciatic nerve repair and hindlimb transplant model. *Sci Rep*. 2016; 6: 31306.
- 103) Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, et al. Interleukin 1 suppresser expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increased type I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest*. 1988; 82: 2026-2037.
- 104) Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE, et al. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum*. 2001; 44: 585-594.
- 105) Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert anti-inflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis Rheum*. 2013; 65: 1271-1281.
- 106) Tanaka Y, Sonomoto K, Kondo M, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment and repair of inflammatory arthritis. *Jap J Clin Immunol*. 2015; 38: 86-92.
- 107) Munoz-Criado I, Meseguer-Ripolles J, Mellado-Lopez M, et al. Human suprapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells induced chondrogenesis and cartilage repair in model of severe osteoarthritis. *Stem Cells Int*. 2017; 2017: 4758930.
- 108) Platas J, Guillen MI, Perez Del Caz MD, et al. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem

- cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging* (Albany NY). 2016; 8: 1703-1717.
- 109) Ichiseki T, Shimasaki M, Ueda Y, et al. Intraarticular-injected mesenchymal stem cells stimulate anti-inflammatory molecules and inhibit pain related protein and chondrolytic enzymes in a monoiodoacetate-induced rat arthritis model. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 203.
- 110) Tsujimaru K, Takanashi M, Sudo K, et al. Extracellular microvesicles that originated adipose tissue derived mesenchymal stem cells have the potential ability to improve rheumatoid arthritis on mice. *Regenerat Therp*. 2020; 15: 305-311.
- 111) Doss F, Menard J, Hauschild M, et al. Elevated IL-6 level in synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasm cells. *Scand J Rheumatol*. 2007; 36: 136-139.
- 112) de Oliveria CM, Sakata RK, Issy AM, et al. Cytokines and pain. *Res Bras Anesthesiol*. 2011; 61: 255-265.
- 113) Leung L, Cahill CM. TNF-alpha and neuropathic pain -a review. *J Neuroinflammation*. 2019; 7: 27.
- 114) Ghanman S, Bouffi C, Djouad F, et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*. 2010; 1: 2.
- 115) 三島雅辰. 筋骨格系疼痛に対する間葉系幹細胞培養上清液の治療効果. 国際抗老化再生医療学会雑誌. 2018; 1: 31-35.