

ミューズ細胞を用いた感染症の新しい治療法開発

鳥取大学医学部医学科感染制御学講座細菌学分野教授

藤井 潤

ミューズ細胞との出会い

Multilineage-differentiating stress enduring (Muse; ミューズ) 細胞は、トリプシンに抵抗性のある骨髄間葉系幹細胞として、2010年に東北大学の出澤真理教授が発見された非腫瘍性の多能性幹修復細胞である¹。当時、私は九州大学医学部細菌学でO157等の血清型を有する腸管出血性大腸菌 (*Shiga toxin-producing Escherichia coli*; STEC) 感染による脳症の研究していた。腸管出血性大腸菌を英語で直訳すると *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) となるがこの表記は国際的でない。大腸菌がベロ毒素を分泌ことが報告され、そのベロ毒素が赤痢菌である志賀菌 *Shigella dysenteriae* I が分泌する志賀毒素 (Shiga toxin; Stx) と同じであったことという発見があるからだ。志賀菌は日本人細菌学者なら誰もが知っている北里柴三郎の門下生志賀潔博士が約100年前に発見した赤痢菌である。そういう訳で志賀潔博士を称えて腸管出血性大腸菌をここではSTECと記載する。大腸菌がStxを分泌するとStxに数字が追記される。大腸菌が分泌する志賀毒素を大きく分けて1型 (Stx1) と2型 (Stx2) の2種類がある。よってSTECには①Stx1のみ分泌するもの、②Stx1とStx2の両方を分泌するもの、③Stx2のみ分泌するものがある。病原性の強いものから③>②>①となる。私はStx2によって引き起こされる脳症の機序と治療法を研究してきた。2010年に出澤教授らが発見したミューズ細胞が朝日新聞に大きく報道されたことを今でも鮮明に記憶している。その当時、私はStx2による脳症の治療法の開発に行き詰まりを感じておりそのニュースを目にした直観でミューズ細胞に懸けてみる決心をした。そして2010年3月15日に夢が叶い初めて出澤教授と仙台にてお目にかかることができた。出

澤教授は私の研究には独自性があるとお認めくださり2010年から出澤教授と共同研究を開始することができた。

ミューズ細胞の効果

私が特に注目したミューズ細胞の特徴は再生医療に用いられる細胞の中でそれ自体に強力な抗炎症作用があることである。iPS細胞にはそれ自体に抗炎症作用はない。脳梗塞や心筋梗塞等の疾患で脳や心臓の臓器が障害されるとSOSシグナルをそれら臓器が発信する。次に注目した点はミューズ細胞がこのSOSシグナルを感知して障害された臓器に①集積し、②炎症を食い止め、③「場の論理」によって欠落した細胞に迅速に分化することであった。出澤教授らはこの分子機構を明らかにしており、SOSシグナルはsphingosine-1-phosphate (S1P) であり、ミューズ細胞はS1Pの受容体であるS1P receptor 2 (S1PR2) でSOSシグナルをキャッチする²。こうしてミューズ細胞はダメージを受けた細胞に集積するとともにその場の環境を察知して自発的にダメージを受けた細胞に分化する。これを「場の論理」という。脳梗塞なら主に神経細胞、心筋梗塞なら心筋細胞に分化するので、スーパー細胞だと実感した。またミューズ細胞は他の再生医療に比べ臨床応用が簡単で既に多くの治験が始まっている。治療が簡単という由縁にはミューズ細胞は患者に点滴で投与できる点に加え、骨髄バンクや他の臓器移植に比べドナー登録が必要ないことである。移植で最もやっかいなことは臓器提供者 (ドナー) 主要組織適合複合体 major histocompatibility complex (MHC) と呼ばれるヒト白血球の抗原 (human leukocyte antigen; HLA) のタイプがある程度一致しないと移植された側の患者 (レシピエント) から移植された臓器

は拒絶されてしまう。この拒絶されることで移植された患者の病状が重篤になることを移植片対宿主病 (graft-versus-host disease ; GVHD) と呼び恐れられている。例えばiPS細胞を何かの臓器に分化させて利用するにも本人から取り出した細胞からiPS細胞を作らないといけない。他人から作った臓器では拒絶されてしまう。ところがミューズ細胞はHLA-Gを発現しており他人のミューズ細胞を点滴しても決して拒絶されない。HLA-Gとは妊娠時の胎盤で胎児が母体の免疫を逃れるために免疫寛容を行っているMHCの一種である。こうして、2018年、1月からは心筋梗塞、9月からは脳梗塞、12月からは表皮水疱症、2019年7月からは脊髄損傷、2020年1月からは脳性麻痺、2021年1月からは難病中の難病である筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) のミューズ細胞の治験が始まった。特にミューズ細胞を点滴された脳梗塞の患者の日常生活動作 (Activities of Daily Living; ADL) は有意に介助を必要としなくなるまで回復し、一部は職場復帰が可能となるレベルまで回復したことが本年2021年6月14日にプレスリリースされたことは記憶に新しい

(<http://www.nsg.med.tohoku.ac.jp/news/detail/id=966>)。

脳症を発症する STEC 感染マウスモデルでのミューズ細胞の効果

1994年、私は脳症を発症するSTEC感染マウスモデルを産業医科大学医学部微生物学教室で開発した³。ヒトはSTECに感染すると溶血性尿毒症症候群 (Hemolytic Uremic Syndrome; HUS) を発症することは既に1982年にカナダから報告されていた。しかし、当時STEC感染によってヒトは脳症を起こすことは、まだよくわかっていなかった。私は九州大学で研究していた頃、Schweiz Med Wochenschrというドイツのジャーナルを医学部九州大学附属図書館から発見した時に鳥肌が立つほど驚いた。そのジャーナルにはHUSを1955年に初めて報告したGasser Cの論文が掲載されていたからである。PubMedではもちろん見ることのできない原文である。ドイツ語だがよくよく読んで見ると小児5例中3例はKrämfeすなわち「けいれん」

を発症していた。HUSの3主徴 (腎不全、貧血、血小板減少) に加え発熱とけいれん等の脳症を発症すると、1924年に報告された血栓性血小板減少性紫斑病 (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura : TTP) になる。今ではTTPは止血因子であるvonWillebrand因子の切断因子であるメタロプロテアーゼ (ADAMTS13) が減少する先天疾患であることが判明している。私が産業医科大学に赴任した当時 (1990年代)、GasserはTTPを発見したのではないかということがまことしやかに語られていた。ところが、2011年STEC O111による集団食中毒が日本で起きると一変した。この事件は焼き肉チェーン店が出されたユッケという牛肉の生肉が原因でありHUSを発症した患者の約60%が脳症を伴っていた。私達はこの集団食中毒事件で脳症を発症して亡くなられた方の剖検例を病理学的に徹底して調べた。その結果、ヒトの脳のアストロサイトが活性化されてサイトカインストーム (cytokine storm) 状態になり脳が浮腫に陥り亡くなったと結論づけた。間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) は骨髄、脂肪、臍帯から分離され既にGVHDに有効であることは報告されていた⁴。サイトカインストームというキーワードは、まさしくGVHDを研究していたFerrara JLらが初めて使ったキーワードである⁵。そうして舞台は揃った。ヒト骨髄から分離されたMSCs (ミューズ細胞を含んでいないノンミューズ細胞)、多能性幹細胞のマーカーとして知られるstage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) 抗体によってヒト骨髄MSCsから分離されたミューズ細胞、ユッケから検出されヒトに脳症を起こしたSTEC O111、ヒトの細胞が尾静注 (iv) できる免疫不全マウス (NOD-SCIDマウス)、最後に私が1994年に発見したSTEC経口感染によって脳症を起こすマウスモデルである。こうして私達はNOD-SCIDマウスを用いたSTEC O111経口感染脳症発症マウスモデルをミューズ細胞のivで救命することができ、抗生物質も抗体も用いない未来型細菌感染症治療法を報告することができた⁶。驚いたのは、ミューズ細胞をivしたマウスは何の後遺症も残さなかった点であった。ミューズ細胞はまさしく脳からのSOSシグナルを受け、脳に集積し、場の論理

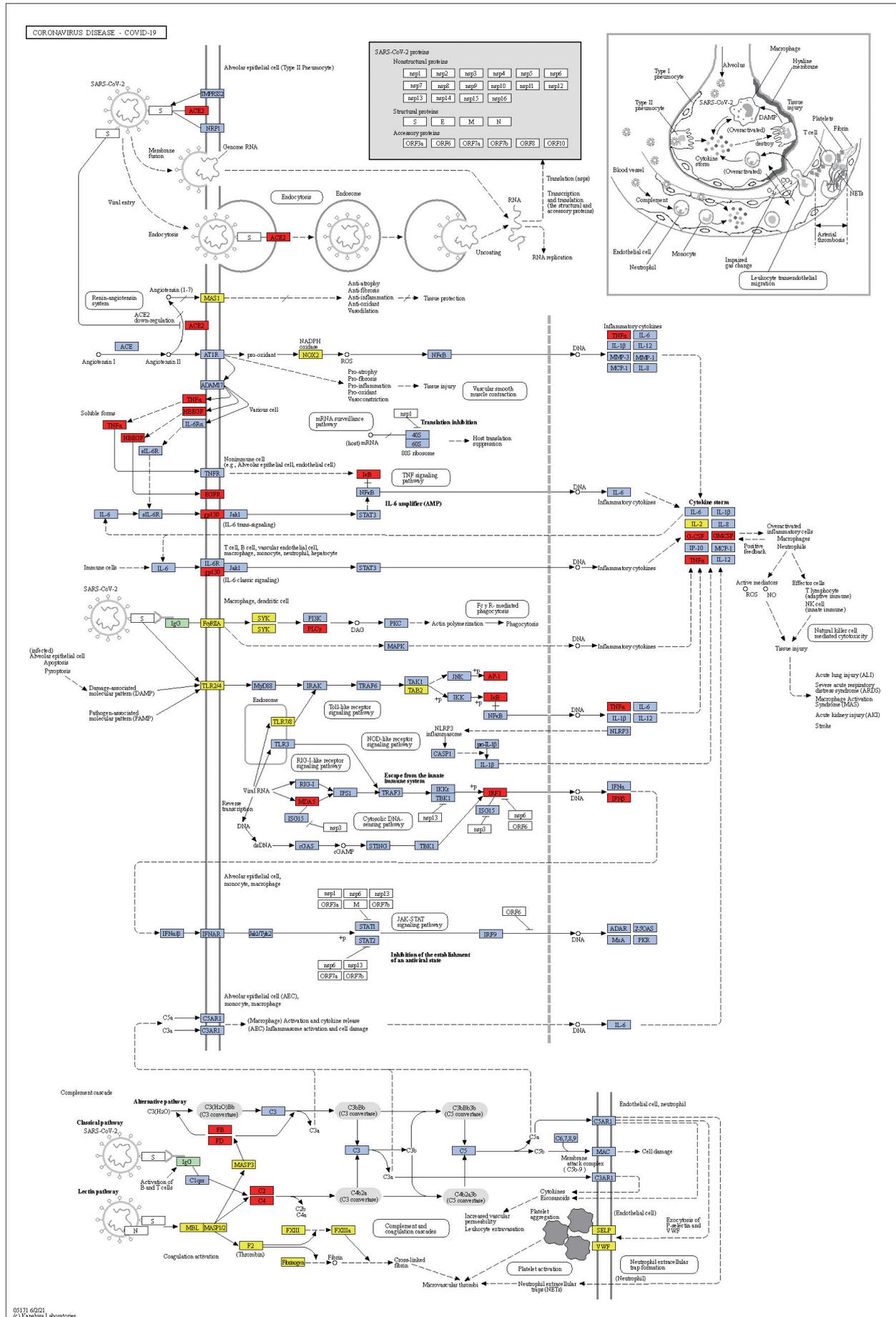
により失われた神経細胞に即座に分化することで後遺症を残さなかったと考えられた。これにて私の30年に及ぶ研究生活を終えるはずであった。

新型コロナウイルス研究の方向性

その後の私の人生を変えたのは、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のパンデミックであった。新型コロナウイルス感染症はcoronavirus disease 2019 (COVID-19) と呼ばれるようになった。COVID-19の肺炎患者は重症化して急性呼吸窮迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome; ARDS) となり人工呼吸器やエクモ (ExtraCorporeal Membrane Oxygenation; ECMO) に繋がれる。ARDSが更に進行して播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation; DIC) となり新型コロナで亡くなる人が急増した。現状、COVID-19で問題となっているのは、新型コロナが感染症法の2類相当になっているため、診断した医師は感染者を軽症も含め全て入院させなければいけないことである。次に入院した患者が重症化すると人工呼吸器やエクモに繋がれるため、この状態を維持するために多くの医師や看護師が必要になってしまうことである。大阪ではこの医師や看護師の不足が決定打となって医療崩壊が進み新型コロナ患者が溢れかえり適切な治療を受けずに自宅待機を余儀なくされ死亡していった患者も報告された。東京オリンピックでも東京の医療崩壊が危惧されていた。COVID-19重症患者の治療にはサイトカインストームを止めるために抗炎症剤としてステロイド剤であるデキサメサゾンが使われている。また、自己免疫疾患リウマチに使われる抗サイトカインモノクローナル抗体が使わ

れている。私達も志賀毒素による脳浮腫にはステロイドであるリンデロンのパルス治療が有効であることを動物実験で2009年に報告済みである⁷。それを受けて、2年後の2011年のユッケによる集団食中毒事件では、脳症の患者にメチルプレドニゾロンのパルス療法が有効であったとの報告がある。問題はその先を見すえた治療法の開発であった。MSCs自体には強力な抗炎症がありGVHDに有効であったことは前述した。私達にはMSCsよりもさらに強力な効果があるミューズ細胞がある。新型コロナが起こすサイトカインストームの機序も明らかになりつつある。レニン・アンギオテンシン系のアンギオテンシン (Ang) Iから強力なAngIIに変換するangiotensin-converting enzyme (ACE) と呼ばれている酵素がある。ACEホモログであるACE2はAngIIを変換し、結果的にAngIIを減少させる酵素である。このACE2を受容体にして新型コロナウイルスのスパイクタンパクが結合することで感染の第一歩が始まる。AngIIの受容体には2種類のサブタイプがあり、1型AngII受容体 (AT1) と2型AngII受容体 (AT2) が存在する。新型コロナウイルスはACE2を使って細胞内にエンターするため、細胞膜上のACE2そのものが減少する。そのことに呼応するのかわかっているがAngII可溶性タンパクが血中に増えAT1に結合することでサイトカインストームに傾くことが報告されている⁸。従って私はCOVID-19重症患者に如何にしてAngII可溶性タンパクがAT1に結合させない治療が肝要だと心得ている。

私の30年で終えるはずの研究は今も続いている。ミューズ細胞がCOVID-19患者の命を救い後遺症をなくすための研究は私の使命となった。



図の説明 マウスのアストロサイトの培養液にlipopolysaccharide (LPS) とStx2を加えることで、アストロサイト依存性サイトカインストームと思われる反応を起こさせた。この反応にミューズ細胞がどのように反応したかをマイクロアレイ解析で解析して⁶、得られた結果をKEGGの新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) パスウェイ解析で示した(赤は増加、黄色は変更なし、青は減少)。ミューズ細胞はAT1Rやsignal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) を介したIL-6 amplifier (IL-6増幅) の発現を減少させ、IL-6自体も減少していた。また別のレニン・アンギオテンシン系ではAT2は変化が認められなかった。なお、現在COVID-19サイトカインストームで増加を認めているTNF α やgranulocyte colony stimulating factor (G-CSF) はミューズ細胞で増加を示したが、これはあくまで擬似パスウェイ解析なのではっきりとしたことは言えないと考えている。

謝辞

この場におきまして新型コロナ感染で死亡した多くの人々に心から哀悼の意を捧げますと共に現在までに私達の新型コロナ感染の新たな治療の開発にご支援頂いている方々に心から感謝申し上げます。

文献

- 1 Wakao, S. *et al.* Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9875-9880, doi:10.1073/pnas.1100816108 (2011).
- 2 Yamada, Y. *et al.* S1P-S1PR2 Axis Mediates Homing of Muse Cells Into Damaged Heart for Long-Lasting Tissue Repair and Functional Recovery After Acute Myocardial Infarction. *Circ Res* 122, 1069-1083, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311648 (2018).
- 3 Fujii, J. *et al.* Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect Immun* 62, 3447-3453 (1994).
- 4 Le Blanc, K. *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439-1441, doi:10.1016/S0140-6736(04)16104-7 (2004).
- 5 Ferrara, J. L. *et al.* Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant Proc* 25, 1216-1217 (1993).
- 6 Ozuru, R. *et al.* Rescue from Stx2-Producing *E. coli*-Associated Encephalopathy by Intravenous Injection of Muse Cells in NOD-SCID Mice. *Mol Ther*, doi:10.1016/j.ymthe.2019.09.023 (2019).
- 7 Fujii, J. *et al.* Successful steroid pulse therapy for brain lesion caused by Shiga toxin 2 in rabbits. *Microb Pathog* 46, 179-184, doi:10.1016/j.micpath.2009.01.005 (2009).
- 8 Verdecchia, P. *et al.* The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur J Intern Med* 76, 14-20, doi:10.1016/j.ejim.2020.04.037 (2020).

A new treatment for infectious diseases using Muse cells

Department of Microbiology and Immunology,
Faculty of Medicine, Tottori University

Jun Fujii

Summary Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) causes acute encephalopathy that may lead to sudden death or severe neurologic sequelae. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cell is an endogenous reparative non-tumorigenic stem cell that naturally resides in the body and is thought to be useful in regenerative medicine. Muse cells have been applied to acute myocardial infarction, stroke, epidermolysis bullosa, spinal cord injury, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in clinical trials. Muse cells can be intravenously injected without HLA-matching or immunosuppressant treatment due to the immunotolerance capability. Muse cells accumulate to the damaged tissue, execute their strong anti-inflammatory effect against cytokine storm and replace damaged cells by differentiating into tissue-constituent cells. As mortality in COVID-19 patients has been linked to cytokine storm, we are currently developing the new therapeutic treatment using Muse cells to save the patients with severe COVID-19.

Key words: STEC, encephalopathy, Muse cells, S1P, cytokine storm, GVHD, SARS-CoV-2, COVID-19, SSEA-3