

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10709

研究課題名(和文) 微小重力環境で培養した間葉系幹細胞による脊髄再生治療の開発と作用機序の解明

研究課題名(英文) Development of spinal cord regeneration therapy using mesenchymal stem cells cultured in a microgravity environment and elucidation of the mechanism of action

研究代表者

弓削 類 (Yuge, Louis)

広島大学・医系科学研究科(保)・教授

研究者番号：20263676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、模擬微小重力環境で培養した間葉系幹細胞の中枢神経疾患モデルに対する治療効果とそのメカニズムを解明することを目的とし、継続した研究を行ってきた。虚血性脊髄損傷モデルラットに対し、急性期で通常重力環境または模擬微小重力環境で培養された間葉系幹細胞を投与し、運動機能の評価を行った。その結果、無処置に比べ、模擬微小重力環境培養で有意な運動機能の改善を示し、脊髄におけるアポトーシスとそれに対する内因性の神経保護効果を高めることが示され、模擬尾錠重力環境は薬剤や遺伝子処理を必要としない簡易かつ効率的な幹細胞培養環境であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国において、脊髄損傷を対象に、自家間葉系幹細胞を用いた再生医療の臨床試験がすでに開始されているが、優れた改善を示さない症例も報告され、既存の細胞治療のみでは効果が不十分であることが指摘されている。解決法の一つとして、培養環境の変化による細胞応答を利用した治療効果の賦活化が挙げられる。本研究は、臨床応用に最も近い細胞である間葉系幹細胞を使用しつつも、その由来組織による違いや、さらには治療効果を高める培養環境として、模擬微小重力環境に着目した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have continued research with the aim of elucidating the therapeutic effect and mechanism of mesenchymal stem cells cultured in a simulated microgravity environment for central nervous system disease models.

Mesenchymal stem cells cultured in a normal gravity environment or a simulated microgravity environment in the acute phase were administered to ischemic spinal cord injury model rats, and motor function was evaluated. As a result, it was shown that simulated microgravity environment culture significantly improved motor function and enhanced endogenous neuroprotective effect compared to untreated.

Therefore, it was suggested that simulated microgravity environment was a simple and efficient stem cell culture environment that did not require drug or gene treatment.

研究分野：神経再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 微小重力 細胞移植 神経再生 抗炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、脊髄損傷後の機能障害に対して、多分化能を有する幹細胞を利用した再生医療に期待が寄せられている。脊髄損傷患者を対象に、一部臨床試験も行われているが、未だ有効な技術は確立されていない。再生医療の細胞ソースとして広く用いられる間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) は、これまでに生体の様々な組織からの樹立が報告されており、申請者らも様々な組織からの MSCs の樹立に成功している (Yuge L., *et al.*: Stem Cells Dev, 2011; Mitsuhashi T., *et al.*: Stem Cell Res Ther, 2013)。なかでも神経外胚葉起源である (四肢の長管骨は中胚葉起源) ヒト頭蓋骨由来 MSCs に着目し、その高い神経分化特性について報告した (Shinagawa K., *et al.*: Neurosci Lett, 2015)。

加えて、研究代表者らは、これまでに地球上で微小重力環境を創り出すために重力制御装置 (Gravite® 図 1) を使用し、重力と細胞応答の研究を行い、微小重力環境で培養した MSCs を中枢神経損傷モデルへ移植すると、1G 環境で培養した MSCs と比較して移植効果が良好であること (Yuge L., *et al.*: Stem Cells Dev, 2011) (Otsuka T., *et al.*: Stem Cells Dev, 2018) や、ラット脊髄損傷モデルに対し微小重力環境で培養した MSCs を移植した結果、脊髄組織におけるアポトーシスに関わる因子の発現が 1G 環境下で培養した MSCs 移植群よりも抑制され、機能改善が良好であること (Mitsuhashi T., *et al.*: Stem Cell Res Ther, 2013) を報告している。申請者らの研究成果をさらに発展させ、脊髄損傷の再生治療にとって、最適な細胞移植条件の選定、さらには微小重力環境での培養が MSCs に与える影響を詳細に解析することによって、既存の再生治療では成しえない新規治療法の開発に繋がるとの考えから今回の研究計画の着想に至った。

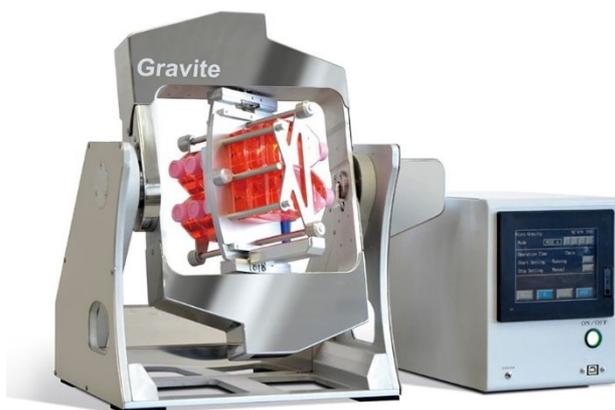


図 1. 重力制御装置 Gravite®

2. 研究の目的

未だ中枢神経疾患に対する有効な再生医療技術は確立されておらず cMSCs や微小重力環境の使用は優れた治療効果を示す可能性がある。本研究では、MSCs 採取部位による移植効果の差異を検討するとともに、微小重力培養を行った MSCs の移植効果を検討することで脊髄損傷に対する再生医療における微小重力培養の有用性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 由来組織の違いによるMSCs特性の差異の解明

骨髄，脂肪，頭蓋骨からそれぞれMSCsを樹立し，その特性について，神経，骨，脂肪各系統への分化能解析を行い，real-time PCR法を用いて神経栄養因子，血管新生因子，抗炎症因子の遺伝子発現解析を行った．また，中枢神経損傷後に二次的損傷として損傷組織で生じる炎症や酸化ストレスを模した環境に神経細胞を曝露し，細胞死を誘導した．その神経細胞に対し，各種MSCs分泌物を含む培養上清を調製して投与し，細胞生存率や遺伝子発現解析によって神経保護効果を検討した．

(2) 模擬微小重力培養がMSCsに与える影響の解明

MSCs を模擬微小重力環境で培養し，通常重力培養との比較を(1)と同様の解析手法を用いて検討し，模擬微小重力培養の有用性を *in vitro* にて検討を試みた．

(3) 脊髄損傷モデルに対する模擬微小重力培養MSCsの治療効果の検討

大動脈手術による虚血性脊髄損傷モデルを作製し，模擬微小重力環境または通常重力環境で培養された MSCs を損傷後早期に移植し，運動機能の推移を比較した．また，治療効果のメカニズムとして，損傷後早期にあたる急性期反応に対する影響に着目し，脊髄組織を用いて免疫組織化学染色や Western blotting 法によるタンパク質発現解析を行った．

4．研究成果

(1) 由来組織の違いによるMSCs特性の差異

骨髄，脂肪，頭蓋骨のそれぞれから MSCs の樹立に成功し，多系統分化能に差がないことを確認した．遺伝子発現解析の結果，神経栄養因子の発現は頭蓋骨由来 MSCs で，血管新生因子や抗炎症因子の発現については脂肪由来 MSCs で有意に高かった(図 2)．また，ストレス曝露された神経細胞に対する保護効果を MSCs の分泌物を含む培養上清を利用して検証した結果，各 MSCs で一定の神経保護効果がみられたが，特に頭蓋骨由来 MSCs で効果がより顕著であった(図 3)．

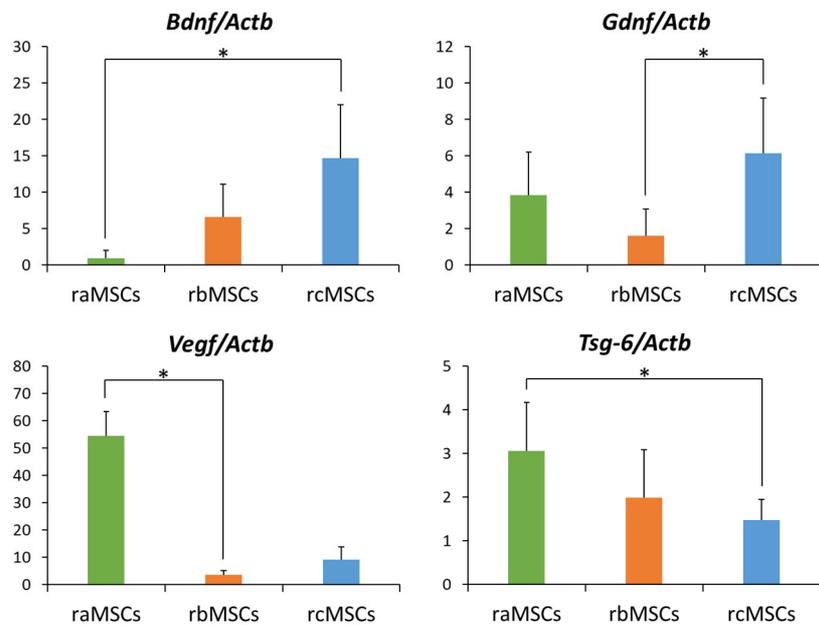


図 2 . 各組織由来 MSCs の遺伝子発現

raMSCs : 脂肪由来 MSCs , rbMSCs : 骨髄由来 MSCs , rcMSCs : 頭蓋骨由来 MSCs

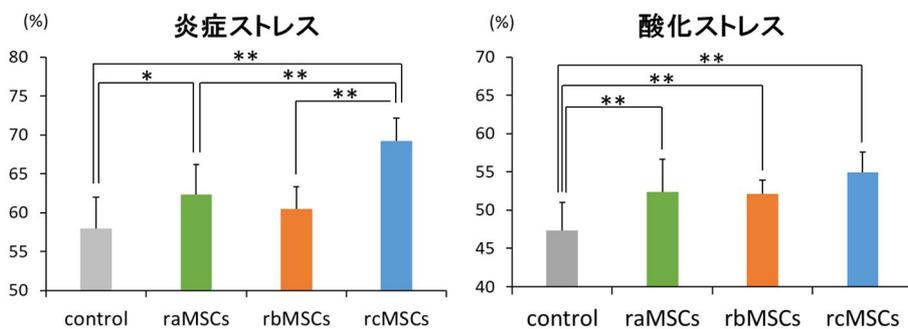


図 3 . 細胞死を誘導された神経細胞に対する各組織由来 MSCs の神経保護効果

(2) 模擬微小重力培養がMSCsに与える影響

模擬微小環境もしくは通常重力環境で骨髄 MSCs ,頭蓋骨由来 MSCs を培養し , 神経栄養因子 , 抗炎症因子を中心に治療効果に寄与しうる因子の遺伝子発現を解析した . その結果 , 骨髄由来間葉系幹細胞では Vegf のみが変化したが , 頭蓋骨由来間葉系幹細胞では Gdnf , Vegf に加え , Tsg-6 といった抗炎症因子の遺伝子発現が微小重力環境での培養によって変化した(図 4). このことから , 模擬微小重力環境は間葉系幹細胞の神経保護ならびに抗炎症作用を高めることと , その効果は由来する組織によって異なる可能性が示唆された .

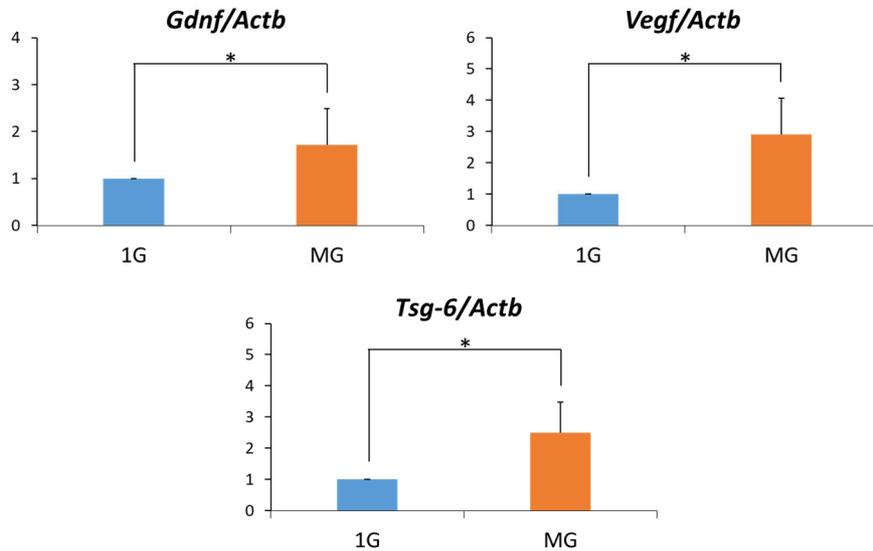


図4．MSCsの遺伝子発現における模擬微小重力培養および通常重力培養の差異

(3) 脊髄損傷モデルに対する模擬微小重力培養MSCsの治療効果

模擬微小環境もしくは通常重力環境で骨髄MSCsを虚血性脊髄損傷モデルに移植し、治療効果を運動機能に着目して追跡した。その結果、模擬微小重力環境で培養されたMSCsは通常重力環境で培養されたMSCsに比べ、運動機能が有意に改善した(図5)。治療効果のメカニズムとして、急性期での組織内の反応を解析した結果、神経細胞のアポトーシス、グリア細胞であるアストロサイトの活性化と神経栄養因子であるBDNFの産生増強が確認され、模擬微小重力環境で培養されたMSCsは内因性の神経保護効果の促進を介して神経細胞の細胞死による脱落を防いだことが示された。このことから、模擬微小重力環境はMSCsの治療効果を薬剤や遺伝子処理を介することなく高められる簡便かつ有用な培養環境であることが示唆された。

今後は、脊髄組織内で一定の変化が見られた血管系への影響に着目して解析を進めるとともに、より効率的なMSCsの能力賦活化が可能な模擬微小重力培養の条件検討を行っていく予定である。

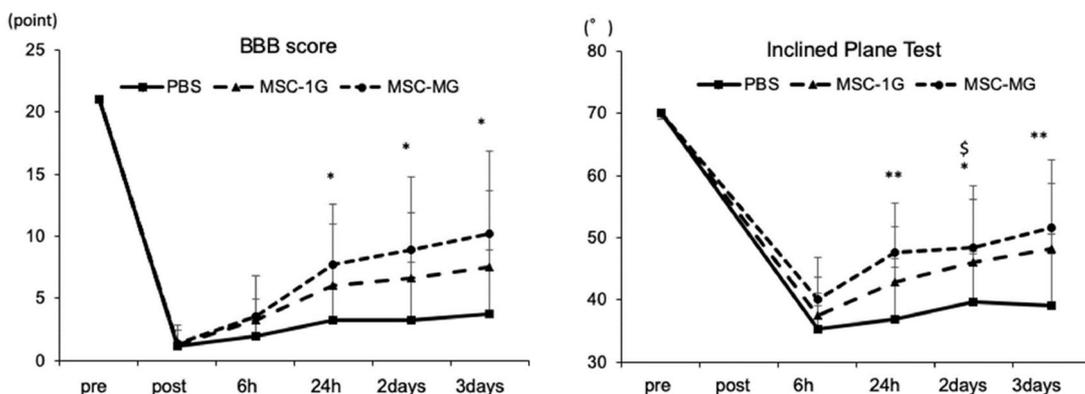


図5．模擬微小重力環境で培養したMSCsを移植した脊髄損傷モデルの運動機能の推移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi Shinya, Nakagawa Kei, Tomiyasu Mayumi, Nakashima Ayumu, Katayama Keijiro, Imura Takeshi, Herlambang Bagus, Okubo Tomoe, Arihiro Koji, Kawahara Yumi, Yuge Louis, Sueda Taijiro	4. 巻 105
2. 論文標題 Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy Improves Lower Limb Movement After Spinal Cord Ischemia in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Annals of Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 1523 ~ 1530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2017.12.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abiko Masaru, Mitsuahara Takafumi, Okazaki Takahito, Imura Takeshi, Nakagawa Kei, Otsuka Takashi, Oshita Jumpei, Takeda Masaaki, Kawahara Yumi, Yuge Louis, Kurisu Kaoru	4. 巻 27
2. 論文標題 Rat Cranial Bone-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery in Ischemic Stroke Model Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 1053 ~ 1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2018.0022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imura Takeshi, Nakagawa Kei, Kawahara Yumi, Yuge Louis	4. 巻 27
2. 論文標題 Stem Cell Culture in Microgravity and Its Application in Cell-Based Therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 1298 ~ 1302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2017.0298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsuka Takashi, Imura Takeshi, Nakagawa Kei, Shrestha Looniva, Takahashi Shinya, Kawahara Yumi, Sueda Taijiro, Kurisu Kaoru, Yuge Louis	4. 巻 27
2. 論文標題 Simulated Microgravity Culture Enhances the Neuroprotective Effects of Human Cranial Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells in Traumatic Brain Injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 1287 ~ 1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2017.0299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imura Takeshi, Otsuka Takashi, Kawahara Yumi, Yuge Louis	4. 巻 12
2. 論文標題 "Microgravity" as a unique and useful stem cell culture environment for cell-based therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 2~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurose Tomoyuki, Takahashi Shinya, Otsuka Takashi, Nakagawa Kei, Imura Takeshi, Sueda Taijiro, Yuge Louis	4. 巻 41
2. 論文標題 Simulated microgravity-cultured mesenchymal stem cells improve recovery following spinal cord ischemia in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101601 ~ 101601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2019.101601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koaykul Chaiyong, Kim Mee-Hae, Kawahara Yumi, Yuge Louis, Kino-oka Masahiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Alterations in Nuclear Lamina and the Cytoskeleton of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Cultured Under Simulated Microgravity Conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 1167 ~ 1176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2018.0229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 OSHITA Jumpei, OKAZAKI Takahito, MITSUHARA Takafumi, IMURA Takeshi, NAKAGAWA Kei, OTSUKA Takashi, KUROSE Tomoyuki, TAMURA Takayuki, ABIKO Masaru, TAKEDA Masaaki, KAWAHARA Yumi, YUGE Louis, KURISU Kaoru	4. 巻 60
2. 論文標題 Early Transplantation of Human Cranial Bone-derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Functional Recovery in Ischemic Stroke Model Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 83 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2019-0186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黒瀬智之, 高橋信也, 中川 慧, 猪村剛史, 大塚貴志, 河原裕美, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力環境を利用した虚血 再灌流による脊髄損傷に対する培養間葉系幹細胞の移植効果
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大塚貴志, 猪村剛史, 中川 慧, 黒瀬智之, 河原裕美, 栗栖 薫, 弓削 類
2. 発表標題 模擬微小重力環境下での連続的な継代が間葉系幹細胞の特性に与える影響
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本佳央梨, 猪村剛史, 小西宏武, 大塚貴志, 松本昌也, 光原崇文, 河原裕美, 辻紘一郎, 弓削 類, 栗栖 薫
2. 発表標題 頭蓋骨由来間葉系幹細胞を用いた特定細胞加工物の検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Otsuka, Takeshi Imura, Kei Nakagawa, Tomoyuki Kurose, Masataka Teranishi, Md. Salimul Karim, Yumi Kawahara, Kaoru Kurisu, Louis Yuge
2. 発表標題 Simulated microgravity culture potentiates neuroprotective effect of mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 35th Annual Meeting of the American Society for Gravitational and Space Research (ASGSR) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺西 正貴, 大塚 貴志, 猪村 剛史, 中川 慧, 大下 純平, 河原 裕美, 栗栖 薫, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力培養がラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞の神経保護メカニズムに及ぼす影響
3. 学会等名 第2回日本再生医療とリハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒瀬 智之, 高橋 信也, 中川 慧, 猪村 剛史, 大塚 貴志, 河原 裕美, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力環境で培養した間葉系幹細胞による脊髄損傷後の運動機能改善
3. 学会等名 第2回日本再生医療とリハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒瀬 智之, 高橋 信也, 中川 慧, 猪村 剛史, 大塚 貴志, 河原 裕美, 末田 泰二郎, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力環境培養間葉系幹細胞が損傷脊髄の運動機能におよぼす影響
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚 貴志, 猪村 剛史, 中川 慧, 阿美古 将, 大下 純平, 河原 裕美, 栗栖 薫, 弓削 類
2. 発表標題 ラット頭蓋骨, 骨髄, 脂肪組織由来間葉系幹細胞の特性比較と神経保護効果
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺西 正貴, 大塚 貴志, 猪村 剛史, 中川 慧, 阿美古 将, 大下 純平, 河原 裕美, 栗栖 薫, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力環境で培養したラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞の神経保護メカニズムの検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	末田 泰二郎 (Sueda Taijiro) (10162835)	広島大学・医系科学研究科(医)・名誉教授 (15401)	
研究 分担者	栗栖 薫 (Kurusu Kaoru) (70201473)	広島大学・医系科学研究科(医)・名誉教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------