

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19300191

研究課題名（和文） 微小重力環境を利用した未分化間葉系幹細胞のダイナミズム

研究課題名（英文） Mesenchymal stem cells dynamism in microgravity environment.

研究代表者

弓削 類 (YUGE RUI)

広島大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：20263676

研究成果の概要（和文）：微小重力環境では、間葉系幹細胞が未分化のまま増殖されやすい。微小重力環境は、細胞骨格を構成するアクチンフィラメントの重合度低下と細胞表面に存在する focal contact の減少を引き起こしていた。細胞外からの物理的刺激を核内へ伝える入力強度が減少し、遺伝子発現が変化した結果、微小重力環境では分化が抑制される可能性がある。その際、テロメアが短縮しにくいことも一因と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Microgravity environment expand mesenchymal stem cells populations that were maintained undifferentiated state. We showed microgravity environment caused polymeric decreased actin filament related to cytoskeleton proteins and decrease of number of focal contacts. Undifferentiating cells in microgravity environment as a result that decreased of signal by physical stimulation from the cell surface into a nucleus, and gene expression changed. Telomere length remained during culturing was considered in microgravity environment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：理学療法学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：微小重力環境、間葉系幹細胞、細胞骨格、テロメア、再生医療

1. 研究開始当初の背景

宇宙環境の無重力状態では、細胞の分化が抑制されることに着目し、地球上で人工無重力環境を作り出す装置 (3D-クリノスタット, 図 1) を使い、細胞培養できる独自の技術を開発した。我々は、平成 14 年度に受けた科研費の成果として、未分化な多能性幹細胞の

大量培養が可能となることを報告した。

細胞表面には、重力のような物理的刺激を感知できる機構が存在することが知られている (focal contact, 図 2)。細胞は、自身がおかれる環境の変化を focal contact で感知し、細胞骨格を介して核内へと伝達できるのである。微小重力環境において、幹細胞の未分

化性が保たれる現象は、このような細胞制御システムの影響によると考えられる。McBeathらは、ヒト間葉系幹細胞の分化を決定するには、細胞の形態と細胞に生じている張力、そして低分子量Gタンパク質 Rho が関与していると報告した (Dev Cell. 6: 483-495, 2004)。他の報告からも、細胞の分化決定には Rho が重要な働きを担っていることが示されている。Rho は、細胞骨格を構成するアクチンフィラメントの重合に係わる分子である。アクチンフィラメントの重合度は、forcal contact からの重力感知シグナルの伝達具合を左右すると推察される。

2. 研究の目的

幹細胞の自己複製能および多分化能のメカニズムを解明することを目的とし、細胞骨格の変化について検討する。また、テロメラーゼには、機構未知の幹細胞増殖促進活性がある可能性もあるため併せて検証したい。未分化および分化誘導細胞を薬剤非依存的に分化の促進/抑制ができる技術の開発は、将来の展開が期待される再生医療に必要な再生医療に必要となる生体外での細胞調製に有用な装置と手法であり、製品化を含めその技術の確立が期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells: hMSCs, BioWhittaker 社, 米国) を、プロトコールに従って増殖させた後、実験に使用した。

通常の 1G 環境下 (group C) と模擬微小重力環境下 (group CL) で培養した。模擬微小重力環境の作製には、三次元重力分散型模擬微小重力発生装置 (3D-クリノスタット, 図 1, 特許名: 多能性幹細胞増殖の培養方法、多能性幹細胞の培養システム、及び多能性幹細胞培養装置, 共同発明者: 三菱重工株式会社 神戸造船所, 特開 2003-9852) を使用した。この装置は、直行二軸のまわりに試料を 360°回転させ、重力ベクトルを時間軸で積分することにより $10^{-3} G$ の環境をつくることできる。

培養期間は 7 日間とし、細胞数の他、以下に示す (2) ~ (4) の項目について解析した。

(2) 細胞骨格の評価

図 2 に focal contact の概略図を示す。

細胞外と接着している細胞基底面の接着斑に加担するタンパク質の一つであるビンキュリン (vinculin) と、細胞骨格を構成するタンパク質であるアクチンフィラメント (actin filament) を免疫染色した。

幹細胞の未分化維持と細胞骨格の影響を



図 1 三次元重力分散型模擬微小重力発生装置 (3D-クリノスタット)

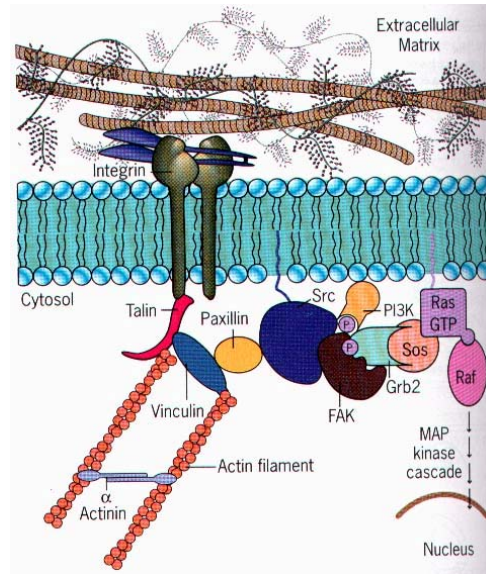


図 2 focal contact の概略図

細胞には、自身がおかれる環境の変化を focal contact で感知し、細胞骨格を介して核内へと伝達する機構が備わっている。

検討するため、細胞分化を促進する刺激として、1G 環境で培養中に培養細胞伸展システム (STREX 社) を使って伸長刺激を与えた実験群 (group ST) を設け (Vandenberg HH, In Vitro Cell Dev Biol. 24, 609-619, 1988), group 1G, group CL の 3 群で比較した。

(3) テロメア解析

TeloTTAGGG length assay (Roche Applied Science; Mannheim, Germany) によりテロメア長を、TRAP Assay (Tahara H., et al., Cancer Res 55:2734-2736, 1995) によりテロメラーゼ活性を測定した。

(4) 遺伝子発現解析

培養 7 日後のサンプルから RNA を抽出し、Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix 社) を使って、遺伝子発現を網羅的に解析した。なお、得られたデータは、log 対数による発現量を

用いて, group C と group CL の比較を行い, 2 倍以上変化があった遺伝子について検討した.

我々は, hMSCs のほかに, マウス ES 細胞, マウスやラットの骨髄から採取した骨髄間質細胞 (MSCs を含むとされる) も微小重力環境で培養する研究を行っており, 全ての細胞において, 微小重力環境では分化が抑制され, 未分化状態が維持される結果が得られている. そこで, マウス ES 細胞も同様の遺伝子発現解析を行い (Mouse Gene 1.0 ST Array, Affymetrix 社), hMSCs の結果と比較することで, 微小重力環境における幹細胞の未分化維持に係わる遺伝子の候補について検討した.

4. 研究成果

(1) 微小重力環境における hMSCs の増殖

培養開始時と培養 7 日後の細胞数を比較すると, group CL では約 13 倍に増加した (図 3A). group C では約 4 倍だったことから, 微小重力環境下では 1G 環境と比べても細胞数

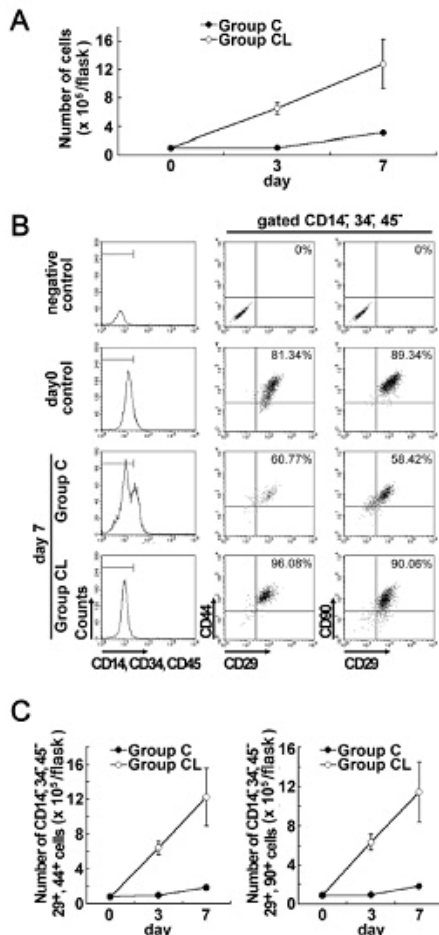


図 3 経時的な hMSCs 数変化
A: 培養細胞数. B: FACS 解析データ.
C: FACS 解析から算出した hMSCs 数. group C より group CL で, hMSCs が増加した.

が約 3 倍増加した. この培養細胞が hMSCs であることを確認するため, FACS (fluorescent activated cell sorting) を用いて, 細胞表面マーカー (CD14⁻/CD34⁻/CD45⁻/CD29⁺/CD44⁺/CD90⁺) を検討した (図 3B). その結果, 培養開始時の細胞は 80~90% の割合で hMSCs が存在しており, 培養 1 週間後には, group C ではその存在割合が約 60% 程度まで低下した. しかし, group CL では hMSCs の存在割合が 90~96% となり, 培養開始時より多くなった. これを数値化すると, group CL では未分化状態のまま hMSCs の細胞数が増加し, 実験開始時の約 12 倍, group C の約 6 倍になった (図 3C).

(2) 物理的刺激に対する細胞骨格の変化と hMSCs の未分化維持

hMSCs を微小重力環境で培養すると,

- ① ビンキュリン (細胞基底面の接着斑に加担するタンパク質) の発現が低下した
- ② ストレスファイバー (細胞骨格を構成するアクチンフィラメントが, 重合して束ねられたもの) の発現が低下した

また, 1G 環境で hMSCs に伸長刺激を加える (group ST) と, group 1G と比較して, ビンキュリンやストレスファイバーの発現が増加した.

幹細胞の自己複製と分化には, 細胞骨格の変化が密接に関係していると考えられる.

(3) 微小重力環境におけるテロメア変化

Group CL は, 培養開始時と比較して, テロメア長に変化はなかった (図 5A). しかし, group C では, テロメア長が経時的に短くなった. テロメラーゼの活性には, 両群共に差がなかった (図 5B).

テロメアは細胞寿命に関連し, 細胞分裂をするたびに短縮することが知られている. group CL では group C と比較して, 細胞数が増加したにも関わらず, テロメア長が短縮しなかったことは, 微小重力環境で細胞の老化抑制を示唆するものである. 再生医療において, ドナー細胞の寿命がレシピエントの寿命より短いことは, 将来の細胞治療で大きな問題が生じる可能性がある. 微小重力環境での幹細胞培養は, この問題を回避できる可能性があると考えられる.

(4) 微小重力環境が遺伝子発現に与える影響

group CL において, group C より発現が減少する遺伝子は 200, 発現が増加する遺伝子は 289 あることが分かった.

hMSCs と マウス ES 細胞 (mouse embryonic stem cells: mESCs) の解析データを比較したところ, 共通して微小重力環境で発

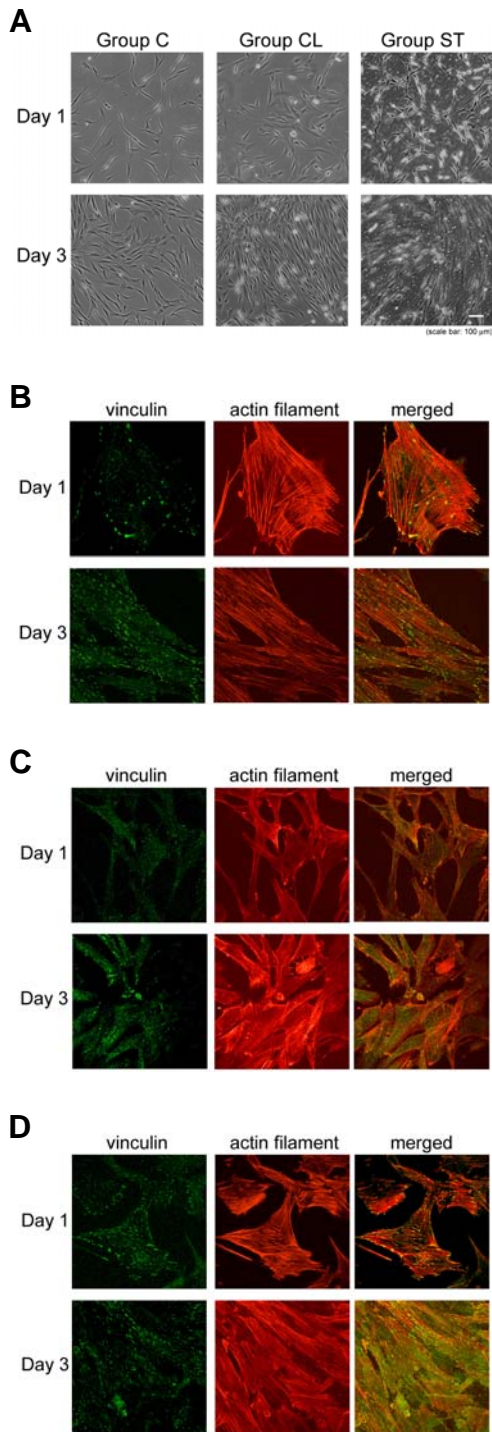


図 4 物理的刺激に対する細胞骨格の変化
A: 位相差顕微鏡像. B-D: 免疫染色像 (B: group C, C: group CL, D: group ST). ビンキュリンは緑色, アクチンフィラメントは赤色. 重ね合わせ画像で黄色に見える点が, focal contact である.

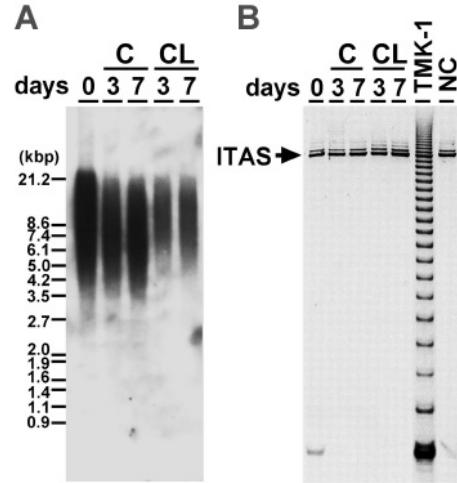


図 5 微小重力のテロメアへの影響
A: テロメア長. B: テロメラーゼ活性. group CL では, テロメアの長さが培養開始時とほぼ同じであった. テロメラーゼ活性は, 一定であった.

現が増加する遺伝子は 37, 減少する遺伝子は 19 であることが分かった (表 1-2). 特に, 共通して発現が減少する遺伝子の約半数は, アクチンフィラメントや細胞接着分子等の細胞骨格構成に関連する遺伝子であった (表 1 で * 印の遺伝子). このことから, 微小重力環境で幹細胞が未分化維持できる要因の一つとして, 細胞骨格の変化が大きく関与していると考えられる.

表 1 微小重力環境で発現が減少する遺伝子

Decreased expression folds in group CL (v.s. group 1G)		Gene symbol
hMSCs	mESCs	
10.2	2.5	MFAP4*
10.0	3.7	CNN1
7.3	2.6	ACTA2*
6.8	3.6	TXNIP
5.3	3.5	TAGLN*
5.1	3.4	ACTG2*
4.9	5.1	ACTC1*
3.9	4.6	AEBP1
3.8	7.4	CLDN1
3.0	7.8	FAM129A
3.0	4.6	DTSF
2.8	2.9	SVEP1
2.8	11.6	KRT7*
2.7	2.3	HSPG2
2.7	2.1	TGM2
2.5	7.2	ASS1
2.4	2.6	FLNC*
2.4	7.3	ANXA3
2.4	3.2	GLIPR2

2.4	7.2	COL4A1*
2.4	2.1	MCAM*
2.3	13.1	SERPINE1
2.3	3.7	CCDC80
2.3	2.9	VGLL3
2.2	4.1	COL1A1*
2.2	5.7	KRT18*
2.1	4.6	ANKRD1
2.1	5.4	COL12A1*
2.1	5.7	THBS2*
2.1	2.2	FADS3
2.1	2.3	CNN2*
2.0	3.2	UNC5B
2.0	4.2	THY1
2.0	2.8	FLNB*
2.0	24.5	SERPINB9
2.0	14.4	BGN
2.0	4.7	FBLN5

表2 微小重力環境で発現が増加する遺伝子

Increased expression folds in group CL (v.s. group 1G)		Gene symbol
hMSCs	mESCs	
12.6	2.5	NR4A2
5.5	2.3	KCNJ2
4.4	2.0	HMGCS1
4.3	2.0	ACAT2
3.9	2.1	PGS2
3.5	3.8	PRKAR2B
3.5	2.3	HSPA4L
3.1	2.5	PSD3
3.0	3.0	FRMD5
2.8	3.2	RNF144A
2.8	2.3	ACSS2
2.7	3.4	PTN
2.6	2.4	EPHB1
2.4	2.8	ELOVL4
2.2	2.1	LRP8
2.2	2.7	GULP1
2.1	2.6	EFCAB7
2.1	4.4	FZD3
2.1	2.1	HMGA2

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kawahara Y., Manabe T., Matsumoto M., Kajiume T., Matsumoto M., Yuge L.: LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. PLoS ONE 4: e6343, 2009. 査読有
- ② 弓削 類: 重力が生体に与える影響. 理学療法, 26: 585-589, 2009. 査読無
- ③ Makihiro S., Kawahara Y., Yuge L., Mine Y., Nikawa H.: Impact of the microgravity

environment in a three-dimensional clinostat on osteoblast- and osteoclast-like cells. Cell Biol Int, 32: 1176-1181, 2008. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① 河原裕美, 松本昌也, 猪村剛史, 松本昌泰, 弓削 類: 微小重力環境と幹細胞の未分化維持 —マウスES細胞での検討—. 第9回日本再生医療学会総会, 広島, 2010年3月18日.
- ② 猪村剛史, 松本昌也, 河原裕美, 弓削 類: 模擬微小重力環境下での細胞塊形成と神経分化能. 第9回日本再生医療学会総会, 広島, 2010年3月18日.
- ③ Kawahara Y., Manabe T., Matsumoto M., Imura T., Kajiume T., Takeda M., Matsumoto M., Yuge L.: Simulated microgravity: a novel approach to embryonic stem cell culture. American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB 25th Annual Meeting NASA), Raleigh, NC, USA, November 7, 2009.
- ④ Takeda M., Magaki T., Sasaki A., Manabe T., Matsumoto M., Kawahara Y., Yuge L., Kurisu K.: Transplantation of bone marrow stromal cells cultured under simulated microgravity into a spinal cord injury rat. American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB 25th Annual Meeting NASA), Raleigh, NC, USA, November 6, 2009.
- ⑤ Yuge L.: Microgravity facilitates stem cell proliferation and neural differentiation after transplantation. 6th Annual World Congress for Brain Mapping and Image Guided Therapy-International Brain Mapping and Intraoperative Surgical planning Sossiety (IBMISPS), Harvard Medical School, Boston, USA, August 28, 2009. (as an invited speaker)
- ⑥ Kawahara Y., Manabe T., Matsumoto M., Ogawa K., Kajiume T., Takeda M., Magaki T., Yamashita H., Takahashi T., Aoki S., Sueda Y., Matsumoto M., Yuge L.: Simulated microgravity enables LIF-free culture in mouse embryonic stem cells. 7th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Barcelona, Spain, July 9, 2009.
- ⑦ 真鍋朋誉, 武田正明, 松本昌也, 小川和幸, 河原裕美, 弓削 類: ラットにおける脊髄損傷後の微小重力培養骨髄由来細

- 胞移植. 第44回日本理学療法学会学術大会, 東京, 2009年5月30日.
- ⑧ 武田正明, 籬 拓郎, 真鍋朋誉, 弓削 類, 栗栖 薫: 脊髄損傷に対する微小重力培養骨髄由来細胞移植. 第8回日本再生医療学会総会, 東京, 2009年3月6日.
- ⑨ 弓削 類, 田原栄俊, 河原裕美, Anil D. Kulkarni, Lewis Romer: 神経再生における微小重力環境で培養した骨髄間質細胞の有用性, 第25回宇宙利用シンポジウム, 相模原, 2009年1月15日.
- ⑩ Yuge L.: Stem cell culture in microgravity. BIT's 1st Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2008, Foshan, China, December 2, 2008. (as an invited speaker)
- ⑪ Yuge L., Sasaki A., Takeda M., Magaki T., Wu S.L., Kawahara Y., Yoshimoto R., Manabe T., Ogawa K., Matsumoto M., Kajiume T.: Microgravity inhibits neural differentiation while sustaining the capability of differentiation. 6th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Philadelphia, PA, USA, June 11, 2008.
- ⑫ 佐々木輝, 呉 樹亮, 吉元玲子, 真鍋朋誉, 井川英明, 小川和幸, 松本昌也, 武田正明, 河原裕美, 弓削 類: 微小重力環境を利用した骨髄由来細胞の神経分化制御と治療効果. 第43回日本理学療法学会学術大会, 福岡, 2008年5月15日.
- ⑬ 佐々木輝, 呉 樹亮, 吉元玲子, 真鍋朋誉, 井川英明, 小川和幸, 松本昌也, 武田正明, 河原裕美, 弓削 類: 微小重力環境を利用した骨髄由来細胞の神経分化制御と治療効果. 第7回日本再生医療学会総会, 名古屋, 2008年3月13日.
- ⑭ Yuge L.: Stem cell culture in microgravity. 12th ADNAT convention, Symposium on Biology of Embryonic and Adult Stem Cells, Hyderabad, India, February 24, 2008. (as an invited speaker)
- ⑮ 弓削 類, 田原栄俊, 河原裕美, Anil D. Kulkarni: 微小重力環境における細胞の分化と老化の抑制, 第24回宇宙利用シンポジウム, 東京, 2008年1月17日.
- ⑯ Sasaki A., Takeda M., Magaki T., Wu S.L., Kawahara Y., Yoshimoto R., Manabe T., Boulenouar A., Kajiume T., Yuge L.: Microgravity inhibits neural differentiation while sustaining the capability of differentiation. American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB 23rd Annual Meeting NASA), Ames Research Center, Moffett Field, CA., USA, October 26, 2007.
- ⑰ Umeda C., Nitta J., Kawahara Y.,

Yoshimoto R., Kajiume T., Sasaki A., Wu S.L., Manabe T., Kanno M., Naminohira K., Nakagawa K., Fushimi T., Fujimura M., Yuge L.: Differentiation of human mesenchymal stem cells and effect of three-dimensional scaffold culture. 15th International Congress of World Confederation for Physical Therapy (WCPT), Vancouver, Canada, June 5, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弓削 類 (YUGE RUI)

広島大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 20263676

(2) 研究分担者

田原 栄俊 (TAHARA HIDETOSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・

教授

研究者番号: 00271065

梶梅 輝之 (KAJIUME TERUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・

助教

研究者番号: 40278924

(3) 連携研究者

該当なし