様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年　４月　５日現在

機関番号：１５４０１
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：２００８　～　２０１０
課題番号：２０３９０２４６
研究課題名（和文）　人工無重力下で大量培養した間葉系幹細胞による虚血性損傷脳治療法の最適化
研究課題名（英文）　Optimal therapeutic approach on ischemic brain insult using bone marrow stromal cells cultured under simulated microgravity
研究代表者
松本　昌泰（MATSUMOTO MASAYASU）
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：２０１９２３４６

研究成果の概要（和文）：
再生医療を行う上で重要な鍵となる幹細胞の培養については、様々な培養方法が試みられている。われわれは模擬微小重力環境下では、通常必要とされる特殊な蛋白や他の細胞なしにマウス胚性幹細胞を培養することができることを明らかにし、新規の簡便かつ効果的な幹細胞の培養方法を見出した。また微小重力発生装置で培養した骨髄間質細胞を片麻痺モデルマウスに移植する実験系において、同方法で培養することにより幹細胞の組織修復能力が向上することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：
The culture methods of stem cells are a key factor for tissue engineering and several methods have been proposed. We have showed that simulated microgravity allows novel LIF-free and animal derived material-free culture methods for mouse embryonic stem cells. Our study indicates that culturing cells under simulated microgravity enhances their survival rate by maintaining an undifferentiated state of cells, making this a potentially attractive method for culturing donor cells to be used in grafting.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００８年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
２００９年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
２０１０年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総　計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学
キーワード：①脳神経疾患　②移植・再生医療　③虚血性脳損傷　④動物モデル

１．研究開始当初の背景近年、内在性の神経幹細胞を用いた治療法の代替法として、神経

系への分化も報告されている間葉系幹細胞を用いる方法が検討されつつあり、申請者らは脳損傷モデルラットに、GFP でラベルした間葉系幹細胞を静脈内注射することによって、損傷部位に間葉系幹細胞が生着・増殖し神経機能を回復することを予備的な実験により確認していた。

２．研究の目的

本研究では地上で人工無重力環境を造り出す装置（三次元重力分散型模擬微小重力発生装置）を用いて微小重力環境下で培養した間葉系幹細胞の幹細胞としての特性を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

3-1．マウス骨髄間質細胞（bone marrow stromal cells: BMSCs)

マウスの大腿骨と脛骨より骨髄細胞を採取し，培養皿に播種した．48 時間後，培養皿底面に接着した細胞を培養細胞とした．増殖させた BMSCs は, OptiCell ™ (NUNC) に播種し，7 日間の増殖培養後，神経分化誘導を開始した (Day 0).

実験群は，① Group 1G-GM: 1G 環境で増殖培養し続け，分化誘導を行わなかった群，② Group CL-GM: 微小重力環境で増殖培養し続け，分化誘導を行わなかった群，③ Group 1G-ND: 1G 環境下にて神経分化誘導した群，④ Group CL-ND: 微小重力環境下にて神経分化誘導した群の 4 群とした．分化誘導 7 日後 (Day 7) の細胞を回収し, 分子細胞学的解析および片麻痺モデルマウスに対する移植細胞とした．細胞移植は，脳挫傷 7 日後に静脈経由にて行った．

Day 7 に微小重力環境で培養した細胞を 1G 環境に移行し，さらに 7 日間培養を継続し (Day 14), 分化における重力の影響を検討した.

3-2．マウス胚性幹細胞（embryonic stem cells: ES 細胞)

マウス ES 細胞を模擬微小重力環境で培養した．培養は，feeder-free, serum-free 培地として市販されている ESF-C 培地（細胞科学研究所）を用いた．本培地に添付のプロトコールに従えば，type I collagen にて培養容器をコーティングし，培地に白血球阻害因子 (leukemia inhibitory factor: LIF) を添加する必要がある．本実験では，微小重力環境で幹細胞が未分化維持しやすいことを検討するため, あえてコーティングや LIF の添加を行わず，マウス ES 細胞の培養常識から外れた条件で，通常の 1G 環境（Group 1G）あるいは微小重力環境（Group CL）で培養した．培養 7 日後の細胞を回収し，分子細胞学的解析および皮下移植を行った.

４．研究成果

4-1．マウス BMSCs

1G 環境で神経へ分化誘導すると（Group 1G-ND), BMSCs は, 神経に分化した. Group CL-ND では，神経細胞様の形態をした細胞が観察されず, 未分化マーカー（Oct-4）が強く発現し, 分化マーカー（NF-H）の発現はなかった．この Group CL-ND の細胞を 1G 環境に戻した 7 日後，Group 1G-ND と同様に細胞突起の伸長が観察され，分化マーカーが強く発現した．このことから，模擬微小重力環境下では BMSCs の神経細胞への分化能を維持したまま，未分化な状態で培養が可能であることが分かった.

細胞移植から 3 週間後，静注した細胞は脳の損傷領域で同定され，Group CL-ND の細胞を移植したマウスの運動機能は，有意に回復した．移植した細胞は，損傷部位で神経細胞に分化した.

模擬微小重力環境下で培養した BMSCs は，より多くの細胞が損傷領域まで遊走し，

神経細胞に分化することで神経再生に関与し，運動機能改善に貢献したと考えられる．このことは，微小重力環境下で培養した細胞が，生体内においても幹細胞としての能力を発揮したことを示唆している．

4-2．マウス ES 細胞

Group CL では，培養 3 日後（Day 3）に小さな細胞塊を数多く形成し，その浮遊した細胞塊は，培養日数の経過とともに大型化した．培養 7 日後（Day 7），Group CL の細胞は，alkaline phosphatase (ALP) 染色陽性を示し，未分化マーカーの発現を維持していた．また，マウス皮下に移植すると，テラトーマを形成した．Group 1G では，未分化性を維持することはできなかった．

本研究において，微小重力環境ではマウス ES 細胞を LIF なし（LIF-free）で細胞塊培養することができた．これは同時に，feeder-free, serum-free, coating-free, trypsin-free での培養を可能にする方法で，模擬微小重力環境がより簡便で安全で効果的な幹細胞培養方法であることが示唆された．

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２０件）

1. Ishihara-Kawase K, Ohtsuki T, Sugihara S, Tanaka H, Nakamura T, Kimura A, Matsumoto M. Cerebral sinus thrombosis and heparin-induced thrombocytopenia in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Intern Med.49: 941-943, 2010.（査読あり）
2. Yamazaki Y, Ochi K, Nakata Y, Dohi E, Eguchi K, Yamaguchi S, Matsushige T, Ueda T, Amatya VJ, Takeshima Y, Nakamura T, Ohtsuki T, Kohriyama T, Matsumoto M. Trigeminal neuropathy from perineural spread of an amyloidoma detected by blink reflex and thin-slice magnetic resonance imaging. Muscle Nerve. 41: 875-878, 2010.（査読あり）
3. Sueda Y, Naka H, Ohtsuki T, Kono T, Aoki S, Ohshita T, Nomura E, Wakabayashi S, Kohriyama T, Matsumoto M. Positional relationship between recurrent intracerebral hemorrhage/lacunar infarction and previously detected microbleeds. AJNR Am J Neuroradiol. 31: 1498-1503, 2010.（査読あり）
4. Kondo K, Maruishi M, Ueno H, Sawada K, Hashimoto Y, Ohshita T, Takahashi T, Ohtsuki T, Matsumoto M. The pathophysiology of prospective memory failure after diffuse axonal injury--lesion-symptom analysis using diffusion tensor imaging. BMC Neurosci 11:147, 2010.（査読あり）
5. Yuge L, Sasaki A, Kawahara Y, Wu SL, Matsumoto M, Manabe T, Kajiume T, Takeda M, Magaki T, Takahashi T, Kurisu K, Matsumoto M. Simulated Microgravity Maintains the Undifferentiated State and Enhances the Neural Repair Potential of Bone Marrow Stem Cells Dev,30:893-900, 2010.（査読あり）
6. Ueno H, Maruishi M, Miyatani M, Muranaka H, Kondo K, Ohshita T, Matsumoto M. Brain activations in

errorless and errorful learning in patients with diffuse axonal injury: a functional MRI study. Brain Inj. 23: 291-298, 2009.（査読あり）

7. Shrestha I, Takahashi T, Nomura E, Ohtsuki T, Ohshita T, Ueno H, Kohriyama T, Matsumoto M. Association between central systolic blood pressure, white matter lesions in cerebral MRI and carotid atherosclerosis. Hypertens Res 32: 869-874, 2009. （査読あり）
8. Shrestha I, Ohtsuki T, Takahashi T, Nomura E, Kohriyama T, Matsumoto M. Diagonal ear-lobe crease is correlated with atherosclerotic changes in carotid arteries. Circ J. 73: 1945-1949, 2009.（査読あり）
9. Kawahara Y, Manabe T, Matsumoto M, Kajiume T, Matsumoto M, Yuge L. LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. PLoS One 23: 1-4, 2009. （査読あり）
10. Doskaliyev A, Yamasaki F, Saito T, Nomura E, Sugiyama K, Ohtsuki T, Matsumoto M, Kurisu K. Advantages of high b value diffusion-weighted imaging in the diagnosis of acute stroke -a case report. Cerebrovasc Dis 27: 616-617, 2009. （査読あり）
11. Miyoshi M, Ito H, Arakawa R, Takahashi H, Takano H, Higuchi M, Okumura M, Otsuka T, Kodaka F, Sekine M, Sasaki T, Fujie S, Seki C, Maeda J, Nakao R, Zhang MR, Fukumura T, Matsumoto M, Suhara T. Quantitative analysis of peripheral benzodiazepine receptor in the human brain using PET with (11)C-AC-5216. J Nucl Med 50: 1095-1101, 2009. （査読あり）
12. Fukuuchi Y, Tohgi H, Okudera T, Ikeda Y, Miyanaga Y, Uchiyama S, Hirano M, Shinohara Y, Matsumoto M, Yamaguchi T. A Randomized, Double-Blind Study Comparing the Safety and Efficacy of Clopidogrel versus Ticlopidine in Japanese Patients with Noncardioembolic Cerebral Infarction. Cerebrovasc Dis. 25: 40-49, 2008. （査読あり）
13. Fukuba H, Takahashi T, Jin HG, Kohriyama T, Matsumoto M. Abundance of aspargynyl-hydroxylase FIH is regulated by Siah-1 under normoxic conditions. Neurosci Lett 433: 209-214, 2008. （査読あり）
14. Jin HG, Yamashita H, Nakamura T, Fukuba H, Takahashi T, Hiji M, Kohriyama T, Matsumoto M. Synphilin-1 transgenic mice exhibit mild motor impairments. Neurosci Lett. 445：12-17, 2008. （査読あり）
15. Hiji M, Takahashi T, Fukuba H, Yamashita H, Kohriyama T, Matsumoto M. White matter lesions in the brain with frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease: TDP-43-immunopositive inclusions co-localize with p62, but not ubiquitin. Acta Neuropathol. 116：183-191, 2008. （査読あり）
16. Ueno H, Naka H, Ohshita T, Kondo K, Nomura E, Ohtsuki T, Kohriyama T,

Wakabayashi S, Matsumoto M. Association between cerebral microbleeds on T2*-weighted MR images and recurrent hemorrhagic stroke in patients treated with warfarin following ischemic stroke. AJNR Am J Neuroradiol.29: 1483-1486, 2008. （査読あり）

17. Yamada M, Mimori Y, Kasagi F, Miyachi T, Ohshita T, Sudoh S, Ikeda J, Matsui K, Nakamura S, Matsumoto M, Fujiwara S, Sasaki H. Incidence of dementia, Alzheimer disease, and vascular dementia in a Japanese population: Radiation Effects ResearchFoundation adult health study. Neuroepidemiology 30: 152-160, 2008. （査読あり）
18. Shrestha I, Ohshita T, Naka H, Morino H, Matsumoto M. Cytotoxic edema in neuro-Behcet's disease ? Intern Med. 47: 2073-2076, 2008. （査読あり）

〔学会発表〕（計　7　件）

1. 松本昌泰　CKD と脳血管障害 ～その予防と対策～第 40 回日本腎臓学会西部学術大会、2010.10.8-9、広島国際会議場
2. 松本昌泰　「変貌する脳保護戦略」第 62 回日本自律神経学会総会、2009.11.5－6　和歌山
3. 松本昌泰　「頚動脈病変評価：その臨床的意義」第 50 回日本脈管学会総会、2009.10.29－31、東京
4. 松本昌泰　「変貌する脳卒中医療～チーム医療の意義～」リハビリテーション・ケア合同研究大会広島 2009、2009.10.23－24、広島
5. 松本昌泰　「メタボリックシンドロームと脳血管障害」第 24 回日本糖尿病合併症学会、2009.10.9－10、岡山
6. 松本昌泰　「脳卒中医療維新のフロントライン」第 27 回日本神経治療学会総会、2009.6.11－12、熊本
7. 松本昌泰　「脳卒中医学・医療維新と EBM」 第 18 回日本脳ドック学会総会、2009.6.4－5、東京

６．研究組織

(1)研究代表者

松本　昌泰（MATSUMOTO MASAYASU）
広島大学・大学院医歯薬総合研究科・教授
研究者番号：２０１９２３４６

(2)研究分担者

弓削　類　（YUGE RUI）
広島大学・保健学研究科・教授
研究者番号：２０２６３６７６

大槻　俊輔（OHTSUKI TOSHIHO）
広島大学・病院・講師
研究者番号：２０４１８７９２

高橋　哲也（TAKAHASHI TETSUYA）
広島大学・病院・講師
研究者番号：００４３５９４２

山下　拓史（YAMASHITA HIROSHI）
広島大学・病院・講師
研究者番号：２０３１１８１３
（H20→H20）

(3)連携研究者

田原　栄俊（TAHARA HIDETOSHI）
広島大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：００２７１０６５