

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09348

研究課題名(和文) 模擬微小重力環境で培養したヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の脳梗塞ラットへの移植効果

研究課題名(英文) Effects of transplantation of human cranial bone-derived mesenchymal stem cells cultured in a simulated microgravity on rat cerebral infarction model

研究代表者

岡崎 貴仁 (Okazaki, Takahito)

広島大学・医系科学研究科(医)・専門研究員

研究者番号：60437613

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)：頭蓋骨由来の間葉系幹細胞(cMSCs)は、腸骨由来MSCs(bMSCs)よりも高い移植効果を有している。また、模擬微小重力(MG)下で培養したcMSCsは、通常重力(1G)環境下で培養されたcMSCsに比べ移植による機能予後を改善する。今回我々は、MG環境下で培養したcMSCsを脳梗塞モデルラットに投与し、その移植効果について検討した。その結果、MG環境で培養したcMSCは、アポトーシスを抑制し、血管新生、シナプス形成、細胞損傷に対する修復に対し、より強力な効果を発揮することがわかり、MG環境で培養したcMSCは、虚血性脳卒中後の運動機能回復に有用な幹細胞源となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中によって脳に障害が生じると、重篤な機能障害をきたし、最悪の場合、死に至ることもある。近年、薬物療法や血管内治療などの外科的治療の進歩により、機能予後の改善が期待されている。一方、損傷を受けた脳組織は再生せず、十分な機能改善が見込まれないことも知られている。新たな治療方法として、中枢神経損傷に対する間葉系幹細胞の機能改善効果が注目されています。我々の研究結果では、通常重力環境から樹立されたものに比べ、微小重力環境から樹立したヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞は、脳梗塞モデルラットに対し機能改善が高いことを示した。今後は、ヒトを対象にした実臨床への応用に向け研究をすすめていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that human cranial bone-derived MSCs (cMSCs) have higher neuronal differentiation potential than conventional human bone marrow-derived MSCs (bMSCs) and improved motor function when transplanted into ischemic stroke model. On the other hand, we also reported that cMSCs cultured under simulated microgravity (MG) environment showed higher expression of neurotrophic factors than cMSCs cultured under normal gravity (1G) environment. In the present study, we investigated the transplantation effect of cMSCs cultured in the MG environment on a rat model of cerebral infarction.

As a result, cMSCs cultured in the MG environment inhibit neural apoptosis and have more potent effects on angiogenesis, synapse formation, and repair against cell damage, and cMSCs cultured in the MG environment may be a useful source of stem cells for the recovery of motor function after ischemic stroke.

研究分野：脳血管障害

キーワード：間葉系幹細胞 頭蓋骨 脳梗塞 模擬微小重力環境 移植

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療の分野が急速に発展しており、再生不能と考えられていた中枢神経系損傷についても、再生への道筋がみえつつある。再生医療への応用研究が期待される細胞として、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、胚性幹細胞(ES細胞)、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSCs)などが代表的である。iPS細胞は、分化の制御や腫瘍化、分化増殖の際に癌関連因子を使用することなどの問題が十分に解決されていない。ES細胞は受精卵を材料として用いる必要があるため倫理的な課題や、拒絶反応が問題となる。

一方、MSCsは腫瘍化や拒絶反応も問題とならず、材料の採取も比較的容易である。さらに、間葉系に属する細胞(骨細胞、軟骨細胞、心筋細胞、腱細胞、脂肪細胞など)のみならず、神経系細胞、肝細胞、膵島細胞への分化能も認められており、その多分化性により神経領域の再生医療への応用が期待される。これまで、脳梗塞モデルラットに対するヒト腸骨由来のMSCs(hiMSCs)の移植効果は報告されているが、その他の部位に由来するヒトMSCsの移植効果についての報告例は少ない。体幹や四肢の骨は中胚葉由来で、前頭部や顔面、頭蓋底の骨は神経堤細胞由来であり、採取する部位によってMSCsの増殖能や分化能が異なる可能性がある。

申請者は、ラット頭蓋骨由来MSCs(rcMSCs)はラット大腿骨由来のMSCs(rbMSCs)に比べ、神経堤マーカーであるsnailやslug、神経栄養因子であるnerve growth factor (NGF)やbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)の発現が高く、脳梗塞モデルラットの運動機能を有意に改善させることを報告した(Abiko M et al. Stem Cells Dev 27: 1053-1061, 2018)。

また、神経堤細胞由来であるヒト頭蓋骨からヒトMSCs(hcMSCs)の樹立に成功し、hiMSCsと比較して神経堤マーカーであるsnailやslugの発現が高く、神経系細胞へ分化しやすいことを報告した(Shinagawa K et al. Neuroscience Letters 606: 161-166, 2015)。さらに、in vivoを含めた検討では、BDNFやvascular endothelial growth factor (VEGF)など神経栄養因子の豊富な発現により、脳梗塞ラットモデルへの急性期経静脈的投与が有意に良好な機能改善をもたらすことを報告した(Oshita J et al. Neurologia medico-chirurgica, 2022)。頭蓋骨由来のMSCsは、脳梗塞に対して、より有効性の高い移植材料と考えられ、機能予後の改善につながることを期待される。

一方で神経再生医療を行う際に、培養環境や多分化能の維持も重要な要素のひとつとなる。申請者は、模擬微小重力(MG)環境下ではMSCsの細胞分化抑制や、ミトコンドリアの活動性低下による成長抑制を報告した(Yuge L et al. Stem cells Dev 20: 893-900, 2011)。また、MG環境下で培養したrbMSCsは、通常重力(1G)環境下で培養したrbMSCsと比べ、未分化細胞マーカーであるoctamer-4 (Oct-4)、細胞遊走因子受容体であるCXC receptor 4 (CXCR4)、神経栄養因子であるNGF、BDNFの発現が高く、脊髄損傷モデルラットへの移植で運動機能の有意な改善と脊髄切片で損傷部の空洞化が軽度であったことも報告した(Mitsuhara T et al. Stem Cell Res Ther 4: 35, 2013)。ヒトMSCsについても、申請者はhcMSCsをMG環境下で培養することで、Hepatocyte growth factor (HGF)やTransforming growth factor- (TGF-)などの神経栄養因子の発現が高まり、脳損傷モデルマウスへの投与で運動機能の改善を高めることを報告した(Otsuka T et al. Stem Cells Dev 27: 1287-1297, 2018)。MG環境下で培養したhcMSCsは、中枢神経損傷に対して高い移植効果が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虚血性脳卒中に対するhcMSCs移植治療を、より効果的に行う方法を明らかにすることである。その目的のため、虚血性脳卒中に対するhcMSCsの移植効果を評価するとともに、MG環境下で培養したhcMSCsの移植効果についても比較検討する。具体的には脳梗塞モデルラットに対して、MG環境と1G環境で培養したヒト頭蓋骨由来MSCsをそれぞれ移植し、投与効果について検討した。

3. 研究の方法

(1) hcMSCsの樹立と培養

開頭術時に側頭骨、蝶形骨から頭蓋骨片を3~5g採取し、増殖培地へ播種、接着細胞をhcMSCsとした。フローサイトメトリーや多分化能を分析し、MSCの特徴を満たしていることを確認した。

増殖培地: Dullbecco's modified Eagle's medium-Low Glucose, 10% fetal bovine serum, penicillin (100units/ml) / streptomycin (100 µg/ml)

培養環境: 5% CO₂, 95% air, 37

(2) MG環境の作成

重力制御装置(Gravite[®]; スペース・バイオ・ラボラトリーズ社)を用いて微小重力環境を作り出す。Graviteは直行二軸のまわりに試料を360°回転(X軸、Y軸、Z軸それぞれが同時にゆ

っくりと回転する)させ、重力ベクトルを時間軸で積分することにより、 $10^{-3}G$ の微小重力環境を作り出すことができる。

(3) hcMSCs の 1G, MG 環境での培養

増殖培地にて、それぞれ 1G と MG 環境で培養し、hcMSCs を継代 2-4 で移植に使用した。

(4) 脳梗塞モデルラットの作成

脳梗塞モデルラットは、250-300g のラット(雌)を用いて、イソフルラン吸入麻酔を行い外頸動脈より 4-0 ナイロン糸を内頸動脈に挿入し 2 時間後に糸を抜去するという中大脳動脈閉塞モデルを使用した。脳梗塞作成後 day1 に、MRI にて梗塞部を確認した。

(5) 実験の具体的な流れ

実験スケジュールは、0 日目に脳梗塞を作成した後、1 日目に hcMSCs を静脈内に投与した。移植したラットは、3 つのグループ(コントロール群: PBS のみを移植した群、 1G 群: 1G 環境で培養した hcMSCs を移植した群、 MG 群: MG 環境下で培養した hcMSCs を移植した群)に分けて評価した。Day 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35 のそれぞれの日にちに modified neurological severity score (mNSS) を用いた運動機能評価を行った。Day35 で脳組織を回収し、梗塞巣における免疫染色と、遺伝子・タンパク解析を行った。

(6) 免疫組織学的検討

それぞれの群において、hcMSCs 投与後 Day 35 における脳梗塞巣(虚血境界領域)の切片を作成し、Synaptophysin(シナプスのマーカー)、Tuj 1(神経細胞のマーカー)について免疫染色を行い比較検討した。

(7) Real-time PCR

Day 35 の脳梗塞部組織で、8 種類(BDNF, Ntrk2, Gap43, Ngf, SYP, Fgf2, VEGF, Sort1) の TaqMan プライマーを用いて、real-time PCR 解析を実施した。

(8) Western blotting

Day 35 の脳梗塞部組織で、Bax, Bcl-xL, Synaptophysin の発現をウェスタンブロット法を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) それぞれの環境下で培養した MSCs における表面マーカーの発現比較

フローサイトメトリー解析を用いて、それぞれの環境下で培養した MSCs の表面マーカーを比較したところ、1G, MG 環境下で培養した hcMSCs すべての陽性マーカーで陽性、かつ陰性マーカーで陰性を示した。そして、1G 環境で培養した hcMSCs と、MG 環境で培養した hcMSCs は類似した特徴を有していたことがわかった。

(2) 脳梗塞モデルラットの運動機能評価 (Fig.1)

MG 環境で培養した cMSCs 投与群は、1G 環境で培養した cMSCs 投与群と比較して、有意に運動機能が回復した。

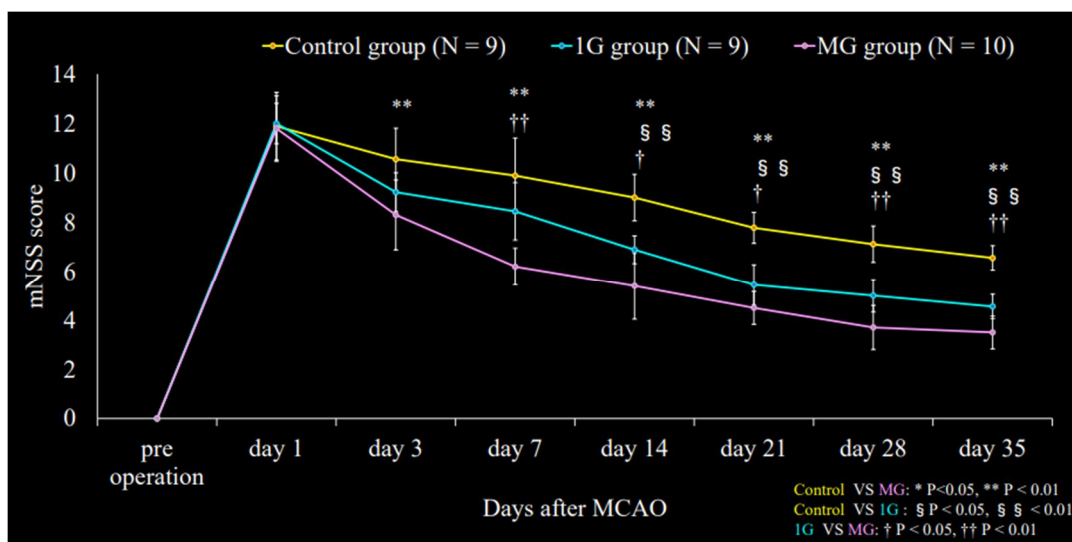


Fig.1 Evaluation of motor function in rat cerebral infarction model

(3) 免疫組織学的検討 (Fig.2)

PBS群、1G群、MG群それぞれの群において、脳梗塞巣（虚血境界領域）に、SYP、Tuj 1 が確認された。またPBS群に比べ、1G群およびMG群で比較的高いSYP、Tuj 1を認め、また、MG群はSYP、Tuj 1いずれも全体的な染色強度が強かった。

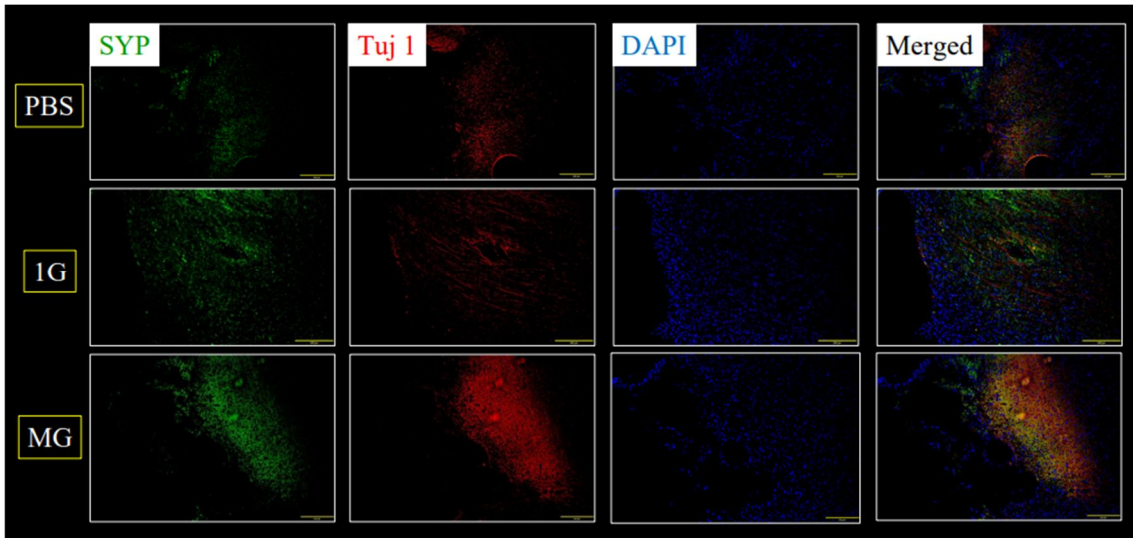


Fig.2 Immunohistochemical analysis

(4) Real-time PCR (Fig.3)

Ngf、Fgf2、SYPの発現量は、MG群で有意に高かった。また、Sort1の発現量はMG群で有意に低かった。

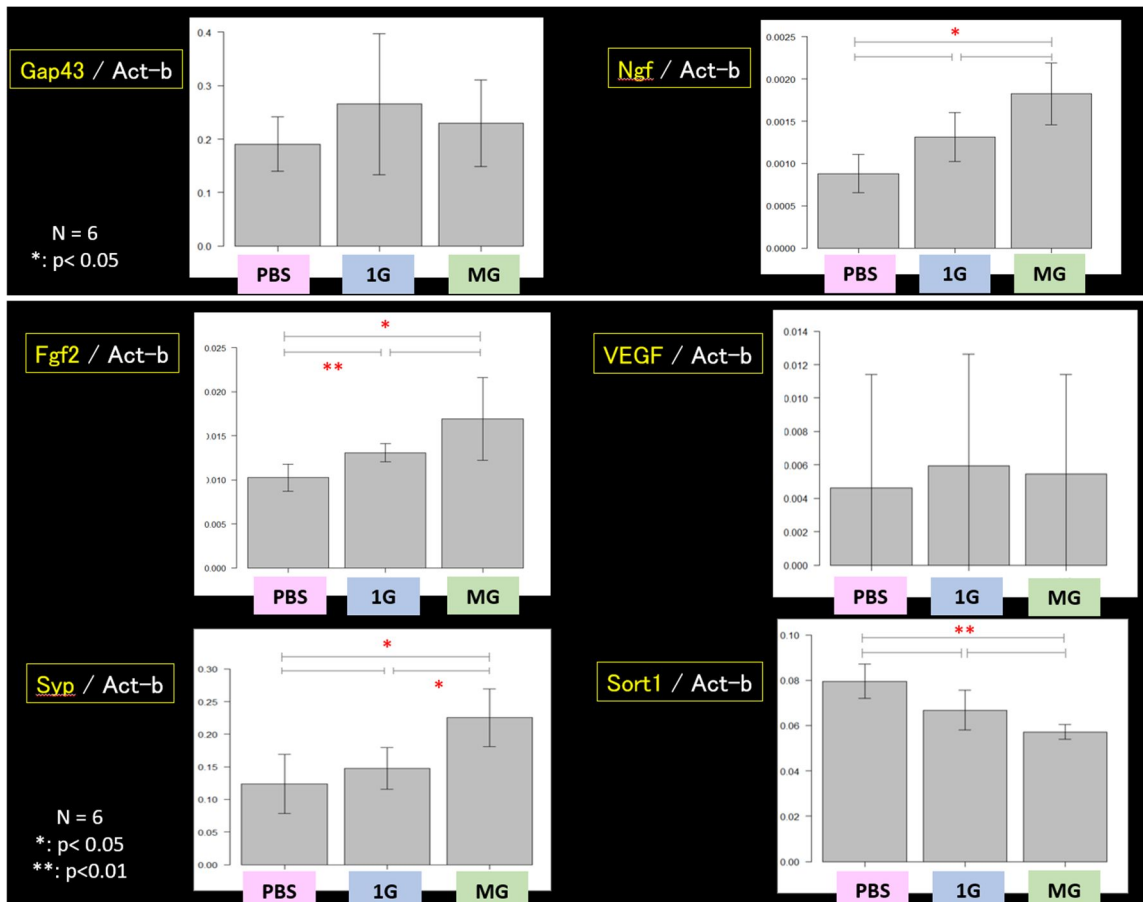


Fig.3 Real-time PCR analysis of brain infarcted sites

(5) Western blotting (Fig.4)

SYP の発現量は MG 群で有意に高いことがわかった。

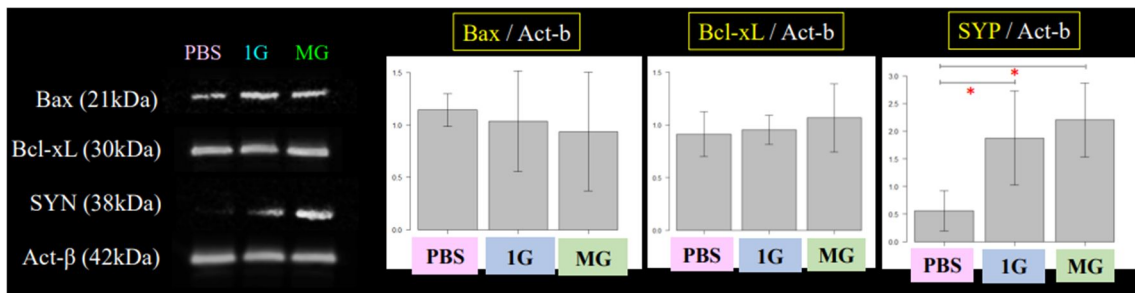


Fig.4 Western blotting analysis of brain infarcted sites

本研究により、MG 環境で培養した hcMSC は、1G 環境で培養した hcMSC よりも血管新生、シナプス形成、細胞損傷に対する修復などの多面的な作用を、より強く発揮し、運動機能の改善に大きく寄与することが示唆された。MG 環境で培養した hcMSC は、虚血性脳卒中後の運動機能回復のための幹細胞源として有用であることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑原政志、岡崎貴仁、弓削 類、栗栖 薫、堀江信貴
2. 発表標題 模擬微小重力環境で培養したヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞による脳梗塞モデルラットへの移植効果の検討
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原政志、岡崎貴仁、弓削 類、栗栖 薫、堀江信貴
2. 発表標題 模擬微小重力環境で培養したヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞による脳梗塞モデルラットへの移植効果の検討
3. 学会等名 第65回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原政志、岡崎貴仁、弓削 類、栗栖 薫、堀江信貴
2. 発表標題 模擬微小重力環境で培養したヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞による脳梗塞モデルラットへの移植効果の検討
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masashi Kuwabara, Takafumi Mitsuhara, Masataka Teranishi, Takashi Otsuka, Takeshi Imura, Takahito Okazaki, Masaaki Takeda, Daizo Ishii, Hiroshi Kondo, Kiyoharu Shimizu, Masahiro Hosogai, Takeshi hara, Yuyo Maeda, Louis Yuge, Nobutaka Horie
2. 発表標題 Effects of transplantation of human cranial bone-derived mesenchymal stem cells cultured in a simulated microgravity on rat cerebral infarction model
3. 学会等名 BRAIN & BRAIN PET 2023
4. 発表年 2023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	弓削 類 (Yuge Louis) (20263676)	広島大学・医系科学研究科(保)・教授 (15401)	
研究 分担者	栗栖 薫 (kurisu 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
---------	---------