

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11240

研究課題名(和文) 脊髄虚血-再灌流障害に対する微小重力培養間葉系幹細胞の毛細血管への影響

研究課題名(英文) Effect of microgravity-cultured mesenchymal stem cells on capillaries for spinal cord ischemia-reperfusion injury

研究代表者

黒瀬 智之 (Kurose, Tomoyuki)

広島大学・医系科学研究科(保)・助教

研究者番号：20363054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：雄性SDラットを用い、虚血-再灌流による脊髄損傷モデルを作製した。再灌流直後に、PBSが通常重力下で培養した骨髄由来MSC(1G-MSC)が模擬微小重力環境下で培養したMSC(MG-MSC)を注入した。トマトレクチンが結合した開通毛細血管のMSC投与による改善は僅かであった。5週齢の雌性SDラットから採取した脊髄由来血管内皮細胞に対して、アポトーシスを誘導した。MSCをアポトーシス誘導後の内皮細胞培養環境に加えて共培養を行った。MSCを添加した共培養により、血管内皮細胞の生存率が増加し、アポトーシス率が減少した。MG-MSCの共培養が、1G-MSCの共培養よりもアポトーシス率を減少させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSCが血管内皮細胞のアポトーシスを抑制することを示唆し、損傷部付近における血管内皮の維持に貢献することが示唆された。MG-MSCが1G-MSCよりも高い治療効果を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A spinal cord injury model due to ischemia-reperfusion was created using male SD rats. Immediately after reperfusion, PBS or bone marrow-derived MSCs (1G-MSCs) cultured in normal gravity, or MSCs cultured in a simulated microgravity environment (MG-MSCs) were injected. The number of open capillaries bound to tomato lectin decreased, and the improvement with MSC administration was slight. Apoptosis was induced in spinal cord-derived vascular endothelial cells collected from 5-week-old female SD rats. MSCs were added to the endothelial cell culture environment after apoptosis induction and co-cultured. Co-culture with MSCs increased the survival rate of vascular endothelial cells and decreased the apoptosis rate. Co-culture of MG-MSCs reduced the apoptosis rate more than co-culture of 1G-MSCs.

研究分野：再生医療

キーワード：脊髄損傷 虚血-再灌流障害 間葉系幹細胞 毛細血管開通 血管内皮細胞 アポトーシス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胸部大動脈瘤などの外科手術の際、手術操作に伴う一時的な虚血と手術後の血流再開に伴う再灌流が脊髄に悪影響し、対麻痺がしばしば発生する。動脈瘤の部位によっては 20%という高い頻度で対麻痺が生じ、死亡する例もある。このような循環器手術後の対麻痺に対する治療効果を期待して、申請者らはラット虚血-再灌流脊髄損傷モデルを作製し、MSC を移植したところ、運動機能低下が抑制された。アストロサイトの活性化や BDNF の発現増加、アポトーシスの抑制などが起きていたが、治療効果のメカニズムについてさらに検討する必要がある。

様々な組織において、虚血-再灌流後の毛細血管網は破壊され、その結果として組織の虚血状態が持続化する。脊髄において虚血による低酸素や低栄養は、神経細胞の破壊をもたらすと考えられるが、脊髄の虚血-再灌流にどのように脊髄が破壊されるか分かっていない。また MSC 移植がどのように作用して治療効果をもたらすかも不明である。

### 2. 研究の目的

虚血-再灌流が引き起こす対麻痺に対する MSC の治療メカニズムの解明と治療成績改善方法の開発を目的とする。

由来の異なる MSC を用いた研究や臨床試験が行われているが、その回復は限定的で完治まで至っていない。様々な組織において、虚血-再灌流後に組織傷害を引き起こすことが報告されている。これらの報告では、炎症やアポトーシス、酸化ストレスなどの事象が注目されており、脳損傷や脊髄損傷時の毛細血管構造や毛細血管の血流に関する報告は見当たらない。虚血-再灌流後の脊髄内の毛細血管構造の変化や血流の変化が組織の損傷にどのように関与しているかを調べた。

MSC が血管内皮細胞に作用し、中枢神経組織における損傷時の血管構造に及ぼす影響を調べ、血管構造への治療効果が解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

雄性 SD ラットの左大腿動脈から挿入したバルーンカテーテルを膨らませて脊髄を虚血した。再灌流直後に、PBS か通常重力下で培養したラット骨髄由来 MSC (1G-MSC) か模擬微小重力環境下で培養した MSC (MG-MSC) を注入した。血管内皮と結合するトマトレクチンを注射し、脊髄を採取した。凍結横断切片を作製し、血管は抗 PECAM-1 抗体で、血流の有無はトマトレクチンに対する染色で、二重標識した。

5 週齢の SD ラットから脊髄を採取し、血管内皮細胞を分離して培養した。培養血管内皮細胞に対して、過酸化水素添加やアポトーシス誘導剤添加、低栄養環境での培養を行い、アポトーシスを誘導した。ラット骨髄由来 MSC を PKH 67 で染色後に、アポトーシス誘導後の内皮細胞培養環境に加えて共培養を行った。24 時間後、72 時間後に細胞を回収し、トマトレクチンで血管内皮細胞を染め、Annexin V を用いてアポトーシス細胞を染めてフローサイトメトリーで解析した。

### 4. 研究成果

虚血-再灌流後、運動機能が著しく低下したが、MSC を移植した群では徐々に改善した。正常な脊髄のほとんどの毛細血管が開いていたが、虚血中の多くの毛細血管は閉塞していた (図 1)。虚血-再灌流から 1 日後、開通している毛細血管が減少しており、3 日後の開通毛細血管はさらに減少した。トマトレクチン灌流染色を用いて、手術による虚血 再灌流操作で一時的な虚血とその後の再灌流が起きたことを確認できた。手術操作後もトマトレクチン陽性の毛細血管は減少を続けており、血流低下が持続したと考えられる。MSC 投与による改善はみられず、MSC による運動機能回復には血流以外の作用機序が重要と考える。

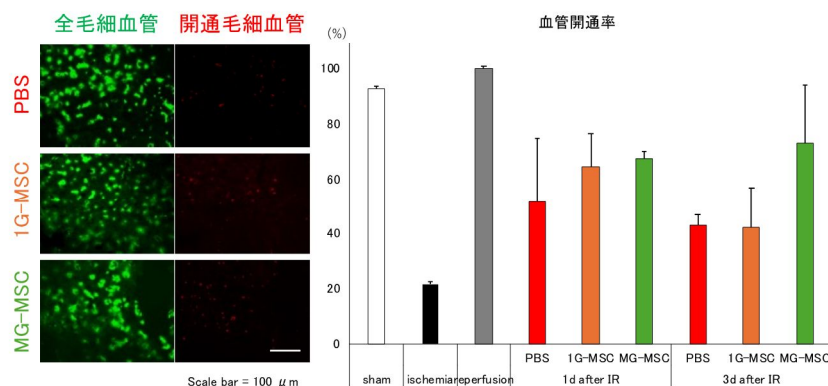


図1. トマトレクチンを用いた血管開通率の解析。正常な脊髄では、ほとんどの毛細血管が開いていたが、虚血中の多くの毛細血管は閉塞していた。再灌流直後はほぼ全ての毛細血管が開通していた。虚血-再灌流から1日後、開通している毛細血管が減少しており、3日後の開通毛細血管はさらに減少した。

アポトーシス誘導後の培養血管内皮細胞は、いずれの条件下でも生存率が低下し、アポトーシスを起こした細胞の比率が増加した(図2)。MSCを添加した共培養により、低栄養環境における血管内皮細胞の生存比率が増加し、アポトーシスの比率が減少した(図3)。

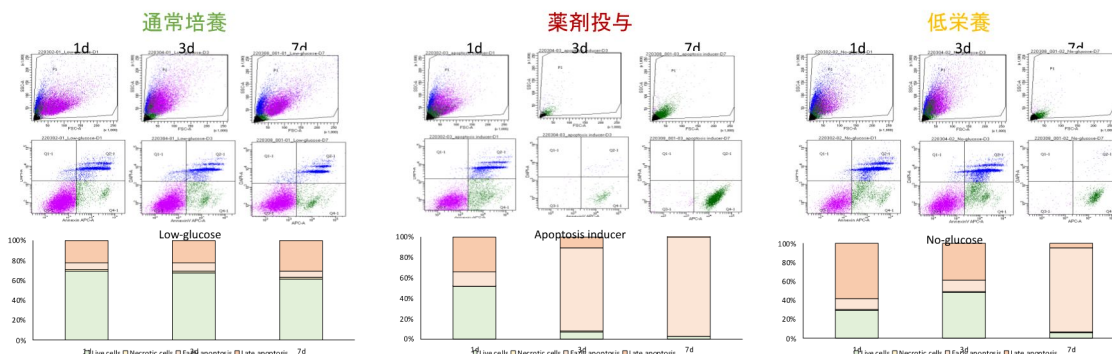


図2. アポトーシス誘導した血管内皮細胞のフローメトリー解析. 薬剤投与や低栄養によりアポトーシスを起こした細胞が著しく増加した.

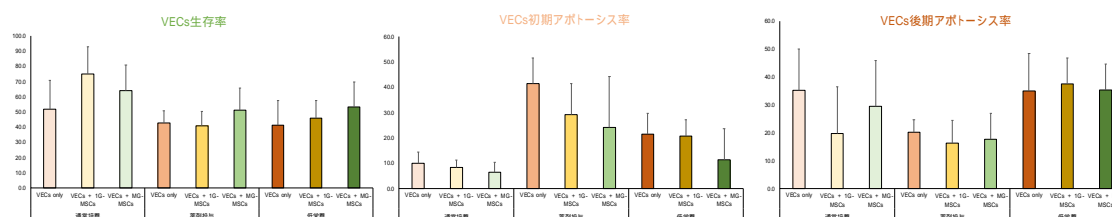


図3. アポトーシス誘導した脊髄由来血管内皮細胞に対するMSCのアポトーシス抑制効果. MSCとの共培養により、血管内皮細胞の生存比率が増加し、アポトーシスの比率が減少した.

アポトーシス誘導により血管内皮細胞の生存率が低下したが、MSCを添加することで生存率が増加し、アポトーシスの比率が減少した。これは、MSCが血管内皮細胞のアポトーシスを抑制することを示唆する。

損傷した中枢神経系組織において、移植したMSCが血流へ影響を及ぼしはしなかったが、損傷部付近における血管内皮の維持に貢献することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otsuka T, Maeda Y, Kurose T, Nakagawa K, Mitsuhara T, Kawahara Y, Yuge L	4. 巻 30
2. 論文標題 Comparisons of Neurotrophic Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived from Different Tissues on Chronic Spinal Cord Injury Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells Dev	6. 最初と最後の頁 865-875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/scd.2021.0070	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 Masataka Teranishi, Tomoyuki Kurose, Kei Nakagawa, Yumi Kawahara, Louis Yuge	4. 巻 22
2. 論文標題 Hypergravity enhances RBM4 expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and accelerates their differentiation into neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative therapy	6. 最初と最後の頁 109-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.12.010	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8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黒瀬 智之, 中川 慧, 河原 裕美, 高橋 信也, 弓削 類
2. 発表標題 模擬微小重力培養間葉系幹細胞による血管内皮細胞のアポトーシス抑制
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒瀬 智之, 高橋 信也, 大塚 貴志, 中川 慧, 河原 裕美, 弓削 類
2. 発表標題 損傷脊髄における模擬微小重力培養間葉系幹細胞の毛細血管への影響
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚貴志, 黒瀬 智之, 中川 慧, 寺西 正貴, 前田 雄洋, 光原 崇文, 河原 裕美, 堀江 信貴, 弓削 類
2. 発表標題 慢性期脊髄損傷モデルへの間葉系幹細胞の移植効果における由来組織ならびに重力環境の違いが与える影響
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒瀬智之
2. 発表標題 虚血-再灌流障害モデルラットの損傷脊髄における毛細血管への間葉系幹細胞の影響
3. 学会等名 第28回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒瀬智之
2. 発表標題 脳卒中中の運動機能障害に対する再生医療
3. 学会等名 第5回日本再生医療とリハビリテーション学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 徐 敏慧, 寺西 正貴, MD SALIMUL KARIM, 中川 慧, 黒瀬 智之, 弓削 類
2. 発表標題 脳損傷マウスの運動機能改善に対する間葉系幹細胞移植およびエクソソームの投与効果の比較
3. 学会等名 第5回日本再生医療とリハビリテーション学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩瀬 輝, 黒瀬智之, 山尾愛士, 中川 慧, 寺西正貴, 弓削 類
2. 発表標題 低栄養・低酸素環境が間葉系幹細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第5回日本再生医療とリハビリテーション学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Md. Salimul Karim, Takeshi Imura, Tomoyuki Kurose, Kei Nakagawa, Yumi Kawahara , and Louis Yuge
2. 発表標題 TRANSPLANTATION OF HUMAN CRANIAL BONE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND REHABILITATION ENHANCE MOTOR FUNCTIONAL RECOVERY IN MICE AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY
3. 学会等名 the annual meeting of International Society for Stem Cell Research (国際学会)
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

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