

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16609

研究課題名（和文）ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の微小重力環境培養を応用した神経再生効果の解明と応用

研究課題名（英文）Elucidation and application of neuroregenerative effects of human skull-derived mesenchymal stem cells cultured in microgravity environment.

研究代表者

光原 崇文（Mitsuhara, Takafumi）

広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：80571801

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：神経系の再生医療のために、研究代表者らは神経堤細胞由来である頭蓋骨間葉系幹細胞に着目し、脳梗塞等の神経疾患に対する効果を報告している。

本研究においては、頭蓋骨間葉系幹細胞の脊髄損傷モデルラットへの治療効果を検証し、神経栄養因子を介した抗炎症・抗細胞死作用により有意な神経機能回復を誘導することをみいだした。また、効率の良い細胞治療のため微小重力環境を応用した間葉系幹細胞の培養をおこない、細胞骨格の適応的再編成により細胞の特性も変化し、樹状突起の増加やシナプス伝達の増加が惹起される可能性をみいだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は重症神経疾患に対する細胞治療の間葉系幹細胞ソースとして、神経再生に有利な頭蓋骨間葉系幹細胞に着目し、基礎研究を行っている。間葉系幹細胞は安全で有用な再生医療の細胞ソースとして注目されているが、一方で骨髄内の有核細胞に占める間葉系幹細胞数は加齢とともに減少することなど、問題点も存在する。本研究によって、模擬微小重力環境下での培養と移植効果を検証し、より機能回復の効率の良い細胞治療としての可能性を見出した。動物モデルをつかって脳梗塞・脊髄損傷などの重症神経疾患への細胞治療応用を実証し、作用機序の解明をふくめた再生医療の発展に資する研究となった。

研究成果の概要（英文）：For regenerative medicine of the nervous system, the principal investigators have focused on cranial mesenchymal stem cells derived from neural crest cells and reported their effects on neurological diseases such as cerebral infarction.

In this study, we examined the therapeutic effects of cranial mesenchymal stem cells on a rat model of spinal cord injury and found that they induced significant recovery of neurological function through anti-inflammatory and anti-cell death effects mediated by neurotrophic factors. In addition, we cultured mesenchymal stem cells in a microgravity environment for efficient cell therapy, and found that adaptive reorganization of the cytoskeleton may induce changes in cell characteristics, such as increased dendritic spines and increased synaptic transmission.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経再生 間葉系幹細胞 頭蓋骨 脳梗塞 模擬微小重力

## 様式 C-19, F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

重症神経疾患である重症脳梗塞や重症脊髄損傷等では集学的治療を行うが、神経損傷が重度であるが故に、現状ではその機能回復には限界があるといわざるを得ない。脳梗塞は、日本全国で約30万人/年弱が新規に発症する国民病であり、2025年には520万人の要介護者の増加が推定されている。患者の多くは、死亡や重篤な後遺障害が残るため社会的負担は甚大で、年間医療費は約2兆円/年、社会的損失は約8兆円/年と試算されており、新しい治療方法の開発が望まれている。脳梗塞治療においては、アルテプラゼ (tPA) や経皮的血管形成術など超急性期薬剤治療や血管内治療技術が日進月歩発達している。とはいえ、超高齢化社会を迎える日本においてますます重症神経疾患の危険性が高まるなか、社会全体へ機能回復の効率の良い治療法の波及のためにも、中等～重度脳梗塞にはアンメットメディカルニーズが存在し、再生医療による新たな治療法開発とその実用化は喫緊の課題といえる。本邦でも、再生医療のリスクに応じた適切な安全性の確保や細胞加工について体制整備が行われ、脳梗塞および脊髄損傷に対して間葉系幹細胞を神経再生のためのソースとして臨床研究・治験が行われており、その治療には一定の効果が確認されている。一方で最近の国外からの報告では、長期的効果に課題があることが複数指摘されるなど残された多くの課題を克服しつつ(医療経済的要因からも)より効率のよい細胞ソースを開発する事が期待されている。

これまで研究代表者らは新しい間葉系幹細胞ソースとして、頭蓋骨間葉系幹細胞を独自に樹立し研究してきた。ラットやヒト頭蓋骨間葉系幹細胞の特性解析および移植効果確認のため、脳梗塞モデルラットへの移植研究を行い、その優れた特性と治療効果を報告した。また、間葉系幹細胞を効率よく樹立し、その特性を維持するために、微小重力環境を応用することを構想し、未分化マーカーや細胞遊走因子受容体の発現、神経栄養因子の発現の変化について報告した。神経再生医療における機能回復のための効率の良い細胞ソースを、動物モデルを用いて探索することで、神経疾患におけるアンメットメディカルニーズを克服するための Proof of Concept の獲得し、間葉系幹細胞による細胞療法全体への波及効果を期待したい。

### 2. 研究の目的

本研究では脳梗塞モデルで検証した頭蓋骨由来間葉系幹細胞の細胞特性を応用し、脊髄損傷モデル(胸髄損傷モデル、重症頸髄損傷モデル)を用いて投与後の機能回復や、組織学的・分子生物学的回復の検討を行い、その作用機序解明に迫る。

また模擬微小重力環境培養を応用して間葉系幹細胞分化制御や移植時の組織再生を効率的にすることを旨とし、脳梗塞モデルを用いてその移植効果を検証する。

頭蓋骨 MSC と長幹骨 MSC の網羅的 RNA 解析比較し、特性解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞の脊髄損傷への移植効果

脊髄損傷(胸髄損傷)モデルラットを作成し、損傷1日後に、細胞移植を行った。治療群はラット頭蓋骨由来 MSC 投与と比較対象としてラット骨髄由来 MSC と PBS 投与のみの3群を作成した。移植後、運動機能評価と電気生理学的評価を行った。損傷28日後に、脊髄組織を回収し、損傷部の組織学的評価を行った。さらに、ラット頭蓋骨由来 MSC の作用機序の解明を行うために、細胞移植後1日後に脊髄組織を回収し、脊髄組織の遺伝子解析を行った。また、移植細胞の馴化培地を作成し、酸化および炎症性ストレスに暴露したマウス神経芽細胞腫/ラットグリオーマ細胞(NG108-15)にそれぞれの馴化培地を加え、生存率や、遺伝子解析を行った。

ヒト頭蓋骨 MSC は微小重力環境に暴露することでどのような特性を獲得するか

ヒト頭蓋骨サンプルは、我々の過去の報告に従い、開頭手術で前頭側頭骨の蝶形骨隆起を切除する過程で本来廃棄される予定であった骨片の一部から得ることとした。微小重力環境下での培養は、専用の培養フラスコで24時間の通常培養後、細胞を通常重力1G群と微小重力MG群の2群に分けた。MG群は、微小重力環境を作る装置「GRAVITE®」で培養を続け、80%コンフルエントに達した後、接着細胞を回収した。この装置は、サンプル細胞を2軸の周りに回転させ、装置中心での累積重力ベクトルを最小にすることができ、国際宇宙ステーションと同様の $10^{-3}G$ 環境を作り出すことができる。脳梗塞モデルラットを作成し、1G環境下で培養されたヒト頭蓋骨由来 MSC と、MG環境下で培養されたヒト頭蓋骨由来 MSC を脳梗塞1日後に尾静脈より投与を行った。移植効果判定には modified neurological severity score (mNSS)による運動機能評価を行った。MSCs 投与後 Day 35における脳梗塞巣(ischemic border zone)での Synaptophysin (シナプスのマーカー)、Tuj 1 (神経細胞のマーカー)について免疫染色して陽性率を調べた。MSCs 投与後 Day 35における脳梗塞巣の組織をサンプリングし、RNAを抽出後、cDNAを逆転写により合成した。TaqMan プライマーを用いて、real-time PCR 法による解析を実施した。

ラットにおける頭蓋骨 MSC と長幹骨 MSC の網羅的 RNA 解析比較

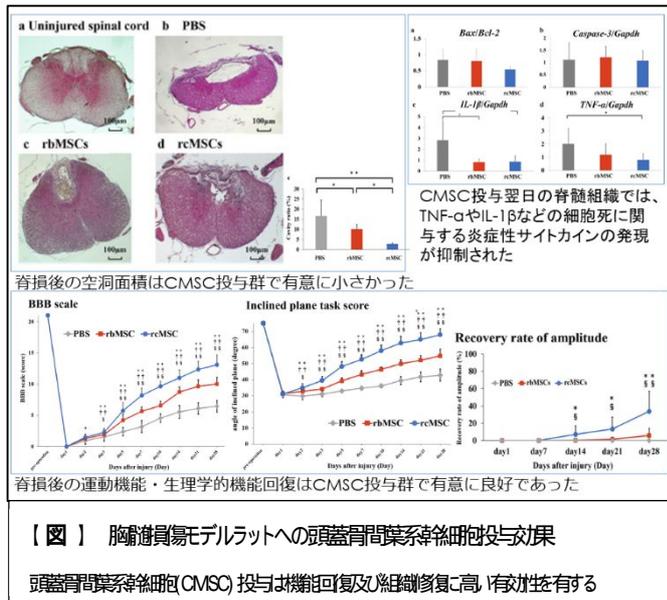
ラット頭蓋骨と長管骨よりそれぞれ頭蓋骨 MSC と長幹骨 MSC を樹立し(n=3)、RNA シーク

エンスを行った。遺伝子発現に差を認めたものに対して、遺伝子オントロジーエンリッチメント解析および階層クラスター解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞の脊髄損傷への移植効果

ラット長幹骨 MSC 投与群と比較し、ラット頭蓋骨間葉系幹細胞(CMSC)投与群は神経栄養因子の高い発現を認めた。また脊髄損傷モデルラットでは、ラット CMSC 投与群で運動機能評価、電気生理学的評価ともに有意な神経機能回復を認め、脊髄損傷後空洞化が小さかった。CMSC 投与翌日の脊髄組織において、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  といった細胞死に關与する炎症性サイトカインの発現が抑制されていた。以上のような結果から、脊髄損傷にも CMSC が機能回復効果に優れることを報告 (*Sci Rep*, 11(1):21907, 2021)した。さらに、重症神経モデルである頸髄損傷モデルへの rCMSC 投与では、損傷局所において TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  に加えて NOS2 (nitric oxide synthase 2)の発現が高くなることをみいだした (*Neurosci Lett*, 799: 137103, 2023)。

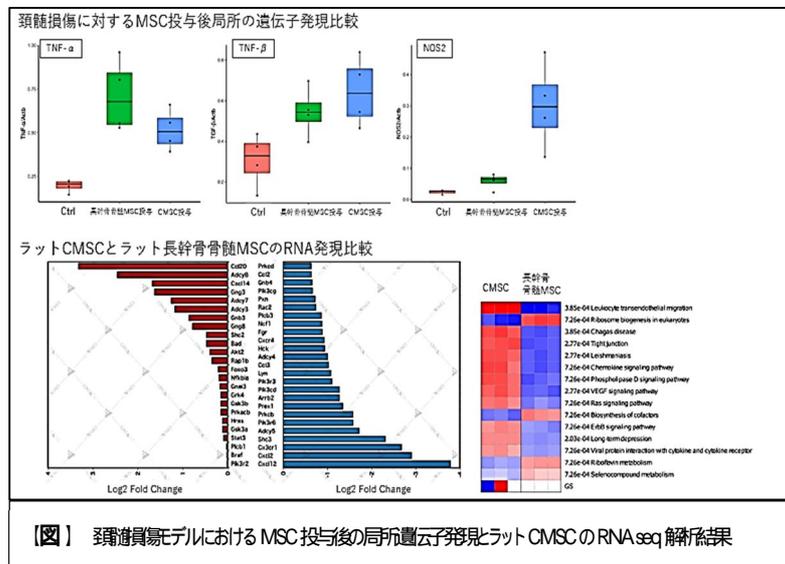


##### ヒト頭蓋骨 MSC は微小重力環境に暴露することでどのような特性を獲得するか

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。運動機能評価では 1G 環境下で培養された cMSCs 投与群と比較し、MG 環境下で培養された cMSCs 投与群は移植後の mNSS の有意な改善を認めた。免疫組織学的検討では各群とも、脳梗塞巣 (ischemic border zone) に、SYP, Tuj1 が確認された。PBS 群に比べ、1G 群および MG 群で比較的高い SYP, Tuj1 を認め、また、MG 群は SYP, Tuj1 いずれも全体的な染色強度が強かった。梗塞脳組織における遺伝子発現では MG 群で、Ngf, Fgf2, Syp の発現が有意に高く、Sort1 の発現が有意に低かった。

##### ラットにおける頭蓋骨 MSC と長幹骨 MSC の網羅的 RNA 解析比較

頭蓋骨 MSC においては Zic や Wnt などの神経の発達や形成に關連する遺伝子の発現が高い結果であった。また Ntrk や NGFR, IGFBP6 など、PI3K-Akt 経路や IGF シグナル経路に關与する遺伝子の発現が高い結果であった。一方、長幹骨 MSC では TLR 9 や CXCL12 などの炎症や血管新生に關連する遺伝子や、CX3CL1 や Nod2 など ERK 経路に關連する遺伝子の発現が高かった (*Neurosci Lett*, 799: 137103, 2023)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hosogai Masahiro, Takeda Masaaki, Maeda Yuyo, Okazaki Takahito, Mitsuhashi Takafumi, Ishii Daizo, Shimizu Kiyoharu, Kuwabara Masashi, Yamasaki Fumiyuki, Yuge Louis, Horie Nobutaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of longitudinal transcranial stimulation motor evoked potentials monitoring of the forelimbs and hindlimbs in an ischemic stroke rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24835-w	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 Maeda Yuyo, Takeda Masaaki, Mitsuhashi Takafumi, Okazaki Takahito, Shimizu Kiyoharu, Kuwabara Masashi, Hosogai Masahiro, Yuge Louis, Horie Nobutaka	4. 巻 17
2. 論文標題 Longitudinal electrophysiological changes after mesenchymal stem cell transplantation in a spinal cord injury rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0272526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0272526	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 Maeda Yuyo, Mitsuhashi Takafumi, Takeda Masaaki, Kawate Ayano, Kawano Reo, Shimizu Kiyoharu, Kuwabara Masashi, Hosogai Masahiro, Yuge Louis, Horie Nobutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel rat model for longitudinal electrophysiological evaluation after cold-induced brain injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2022.12.JNS222039	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 Maeda Yuyo, Otsuka Takashi, Takeda Masaaki, Okazaki Takahito, Shimizu Kiyoharu, Kuwabara Masashi, Hosogai Masahiro, Yuge Louis, Mitsuhashi Takafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Transplantation of rat cranial bone-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery in rats with spinal cord injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01490-1	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 Maeda Yuyo, Otsuka Takashi, Mitsuhara Takafumi, Okazaki Takahito, Yuge Louis, Takeda Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel bone-thinning technique for transcranial stimulation motor-evoked potentials in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91780-5	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 Otsuka Takashi, Maeda Yuyo, Kurose Tomoyuki, Nakagawa Kei, Mitsuhara Takafumi, Kawahara Yumi, Yuge Louis	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 and Development	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 Shimizu Kiyoharu, Mitsuhara Takafumi, Maeda Yuyo, Kuwabara Masashi, Hosogai Masahiro, Takeda Masaaki, Yuge Louis, Horie Nobutaka	4. 巻 799
2. 論文標題 Impact of intravenously administered cranial bone-derived mesenchymal stem cells on functional recovery in experimental spinal cord injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 137103 ~ 137103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2023.137103	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 光原崇文、前田 雄洋、原 健司、桑原政志、堀江 信貴
2. 発表標題 頭蓋骨間葉系幹細胞を用いた神経疾患に対するトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 光原崇文、前田 雄洋、原 健司、桑原政志、堀江 信貴
2. 発表標題 頭蓋骨間葉系幹細胞をもちいた神経再生治療の開発と挑戦
3. 学会等名 第66回日本脳循環代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 光原崇文、前田雄洋、原健司、桑原政志、堀江信貴
2. 発表標題 頭蓋骨間葉系幹細胞をもちいた神経再生治療の開発と挑戦
3. 学会等名 第66回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 光原崇文、前田雄洋、原健司、桑原政志、堀江信貴
2. 発表標題 頭蓋骨間葉系幹細胞を用いた神経疾患に対するトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 前田雄洋、光原崇文、原健司、桑原政志、清水陽元、武田正明、堀江信貴
2. 発表標題 経時的神経モニタリング技術を用いた 脊髄損傷における頭蓋骨由来間葉系幹細胞の最適な移植時期の検討
3. 学会等名 第23回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田雄洋, 光原崇文, 原健司, 桑原政志, 武田正明, 堀江信貴
2. 発表標題 電気生理学的評価を用いた脊髄損傷に対する間葉系幹細胞の複数回移植効果の検討
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 光原崇文, 前田雄洋, 桑原政志, 細貝昌弘, 清水陽元, 堀江信貴
2. 発表標題 頭蓋骨間葉系幹細胞を用いた神経疾患への挑戦
3. 学会等名 第48回日本脳卒中学会学術集会 (STROKE2023) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 光原崇文, 前田雄洋, 桑原政志, 細貝昌弘, 清水陽元, 堀江信貴
2. 発表標題 脳梗塞に対する幹細胞療法のトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第52回日本脳卒中の外科学会学術集会 (STROKE2023) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水陽元, 前田雄洋, 桑原政志, 細貝昌弘, 光原崇文, 武田正明, 弓削類, 堀江信貴
2. 発表標題 RNAシーケンスを用いたラット頭蓋骨髄由来と長管骨髄由来間葉系幹細胞のRNAプロファイル比較
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 前田雄洋、武田正明、光原崇文、岡崎貴仁、清水陽元、桑原正志、細貝昌弘、大塚貴志、河原裕美、辻 紘一郎、弓削類、堀江信貴
2. 発表標題 脊髄損傷モデルラットにおけるBBB scoreとTc-MEP導出の相関に関する検討
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 前田雄洋、光原崇文、大塚貴志、武田正明、岡崎貴仁、清水陽元、桑原正志、細貝昌弘、弓削類、堀江信貴
2. 発表標題 頭蓋骨由来間葉系幹細胞の脊髄損傷モデルラットへの移植効果
3. 学会等名 第22回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田 雄洋, 武田 正明, 大塚 貴志, 桑原 政志, 細貝 昌弘, 清水 陽元, 光原 崇文, 岡崎 貴仁, 弓削 類
2. 発表標題 ラットにおける、経時的で安定したMEP測定の新たな手技の確立
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuyo Maeda, Takafumi Mitsuhara, Takashi Otsuka, Masaaki Takeda, Takahito Okazaki, Kiyoharu Shimizu, Masashi Kuwabara, Yumi Kawahara, Koichiro Tsuji, Louis Yuge
2. 発表標題 RAT CRANIAL BONE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION PROMOTES FUNCTIONAL RECOVERY IN SPINAL CORD INJURY MODEL RATS
3. 学会等名 ISSCR 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原政志、光原崇文、大塚貴志、岡崎貴仁、武田正明、清水陽元、細貝昌弘、前田雄洋、河原裕美、堀江信貴、弓削類
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 前田雄洋、武田正明、光原崇文、岡崎貴仁、桑原正志、細貝昌弘、大塚貴志、河原裕美、弓削類、堀江信貴
2. 発表標題 脊髄損傷モデルラットにおけるMEP測定閾値の同定
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学大学院医系科学研究科脳神経外科学 神経再生研究グループ <a href="https://shinkeisaisei.hiroshima-u.ac.jp/">https://shinkeisaisei.hiroshima-u.ac.jp/</a>
--

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
---------	---------