

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592127

研究課題名(和文) 微小重力環境で培養したヒト頭蓋骨由来MSCの神経分化能と機能評価

研究課題名(英文) A study of the neural differentiation and neural function of human cranial bone marrow stromal cells cultured under simulated microgravity

研究代表者

山口 智 (YAMAGUCHI, SATOSHI)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：60403573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト頭蓋骨骨髄細胞は神経堤発生と考えられ、これまでの腸骨由来骨髄細胞と比較してより神経再生に有利であると仮説を立て、それを検証した。骨髄間質細胞を培養する際にはその培養効率および未分化性の維持のために微小重力を応用して用いた。ラットにおいては通常の骨髄間質細胞も微小重力を応用することで、優れた神経再生のソースとなることを示した。ヒト頭蓋骨骨髄細胞はこれまで報告がなかったが、我々は初めて体外での培養に成功し、その優れた神経分化能を証明した。

研究成果の概要(英文)：Human cranial bones are thought to originate from the cranial neural crest that plays important role for construction of central nervous systems in the embryo. In this study, we have investigated human cranial bone marrow derived stem cell (hcBMSC) capacities for neural differentiation. We cultured BMSC under simulated microgravity conditions to facilitate functional recovery from neural injury. We show that hcBMSC has potency to differentiate into neural lineages better than the BMSC derived from iliac bone, and would be a novel alternative source of autologous adult stem cells for neural regenerative therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 脳神経外科学

キーワード：ヒト頭蓋骨骨髄間質細胞 微小重力環境 神経再生 間葉系幹細胞 骨髄間質細胞 脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

- (1) 重症神経疾患においては十分な機能回復が望めないのが現状である。骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cells: BMSC)に含まれる間葉系幹細胞は、腫瘍化の危険が低く安全性が高いこと、比較的入手しやすい組織から得られること、多様な栄養因子やサイトカインを産生し障害組織に対して組織保護効果や抗炎症作用、アポトーシス調整作用をもたらすことなどが報告され、神経再生医療における有力な細胞ソースと考えられている。
- (2) 近年発見された歯髄幹細胞は骨髄や臍帯血由来幹細胞と比較し、抗軸索伸長抑制因子効果やオリゴデンドロサイトに特異的に分化し髄鞘の再生に貢献するなど神経再生効果に特徴があったと報告されている (Sakai K, et al. J Clin Invest 2012;122:80-90)。このように骨髄採取部位により細胞特性が異なることも報告されている。
- (3) 元来間葉系幹細胞の多くが中胚葉由来と考えられるにも関わらず胚葉を超えて分化することが知られているが、他の胚葉由来の細胞には分化効率が劣ってしまうことが難点である。間葉系幹細胞を効率良く神経分化させるために、我々は発生学的見地から、神経堤細胞由来である頭蓋骨骨髄に着目した。

2. 研究の目的

- (1) 新しい骨髄間質細胞のソースとしてヒト頭蓋骨から骨髄間質細胞を採取し、主に神経分化についてのその分子生物学的特徴を検討する。実際の神経再生治療への臨床応用を見据え、モデルラットを用いた研究を行う。またヒト BMSC は模擬微小重力環境下で培養を行うことで細胞分化制御や移植時の組織再生を効率的に行える可能性があり、模擬微小重力環境を応用した研究も行う。

- (2) ヒト頭蓋骨骨髄を用いた研究の前段階として、まず骨髄由来 BMSC よりの神経分化誘導をより効率的に行い、実際の神経機能評価を行うため、ラット骨髄より採取した BMSC から神経細胞の分離増殖・分化において微小重力環境を応用する。また分離した BMSC を実際に脊髄損傷モデルに移植し神経機能再生の評価(運動感覚機能改善の評価)を行う。
- (3) 脳神経外科手術においてボランティアより得られるヒト頭蓋骨由来 BMSC (human cranial BMSC: hcBMSC)を樹立し、神経系細胞への分化誘導し、免疫不全脊髄損傷ラットへ移植して神経細胞機能の評価をする。

3. 研究の方法

5週齢 Fischer/F344 ラットの大腿骨と脛骨より骨髄細胞を採取し、接着細胞を培養細胞 (rBMSCs) として、1G 環境下にて7日間培養を行った群(1G 群)と、3D-clinostat を使用した模擬微小重力環境下にて7日間培養を行った群 (CL 群) に分けた。各群で形態学的観察を行うとともに、Oct-4 (未分化マーカー)、CXCR4 (細胞遊走因子受容体マーカー)、NGF および BDNF (神経栄養因子) の mRNA 発現を RT-PCR で観察した。また各群で免疫染色にて CXCR4 陽性率を算出した。

続いて成体雌ラットに Weight drop method により脊髄損傷を作成し、脊髄損傷作成直後に PKH26 にて標識した 1G/CL 両群の rBMSCs を移植した。移植実験群(n=29)は、脊髄損傷直後に PBS の静脈注射を行ったラットをコントロール群 (以下、Cont 群, n=11)、1G 環境下で7日間培養をした rBMSCs を脊髄損傷直後に移植したラット (1G 群, n=11)、模擬微小重力環境下で7日間培養した rBMSCs を脊髄損傷直後に移植したラット (CL 群, n=7) の3群に分けた。細胞移植は尾静脈より一匹あたり 3.0×10^5 個の rBMSCs を経静脈投与した。脊髄損傷か

ら 21 日間、後肢運動機能評価を BBB scale, inclined plane task を用いて行い、その後脊髄を摘出して凍結標本とし H&E 染色にて形態観察した。また摘出脊髄標本で NF-H (神経細胞分化マーカー) と GFAP (グリア細胞分化マーカー) の蛍光免疫染色、及びアポトーシス促進マーカーとして Bax, アポトーシス抑制マーカーとして Bcl-2 と Survivin の免疫染色を行いその陽性率を群間比較検討した。

ヒト頭蓋骨髄間質細胞 hcBMSC の効率的な樹立培養を血清培地下で行う研究を行った。血清培地下ではコントロール群として腸骨由来 BMSC と増殖能を比較検討した。また hcBMSC の分化能を検討するため、3 胚葉への分化誘導を行った。間葉系幹細胞マーカーを FACS にて確認した。神経分化誘導を行いその特性を RT-PCR 等で検索した。hcBMSC を培養し、免疫不全脊髄損傷ラットへ移植実験を行った。

4. 研究成果

CL 群では 1G 群に比べ小型で球形の細胞が多く、*Oct-4* と *CXCR4* の mRNA の発現が強くみられた。*NGF*, *BDNF* の発現は両群で差はみられなかった。CL 群では免疫染色において *CXCR4* 陽性率が有意に高かった (p value < 0.01)。

移植後のラットの運動機能変化は CL 群で他の 2 群と比較し有意な改善がみられた (p value < 0.01)。脊髄損傷 21 日後の H&E 染色では、3 群共に脊髄後索から中心部の損傷と組織の空洞化が観察された。空洞面積率は CL 群で有意に小さかった (p value < 0.05)。細胞移植をした 1G 群と CL 群では、脊髄損傷部周囲に PKH26 の赤色蛍光を発する移植細胞が観察された。CL 群では移植細胞がより多く集簇して観察された。移植細胞の一部では、NF-H および GFAP の発現が観察された。脊髄損傷領域及び周辺部において、CL 群では Bax 陽性率が他の 2 群より有意に低く

(p value < 0.01), Survivin 陽性率は Cont 群と比較して有意に高かった (p value < 0.01)。

上記結果は Stem Cell Research & Therapy 2013, 4:35 にて掲載された。

hcBMSC の研究においては、倫理委員会承認のもと、脳神経外科手術においてボランティアから頭蓋骨髄間質細胞を採取し、樹立することに成功した。hcBMSC の増殖能はコントロールと遜色無く、

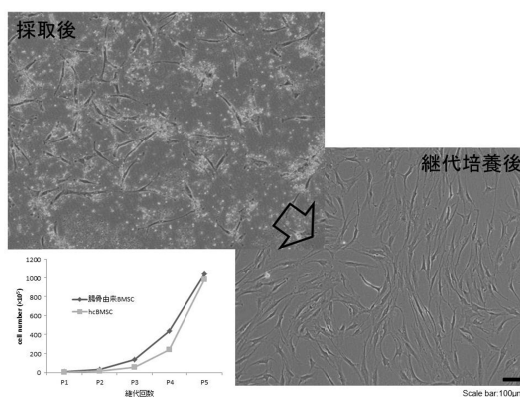


図1: hcBMSCの形態と増殖能を示す

またこれを神経分化誘導したところ、驚くことにコントロール群と比較して分化後に神経分化マーカーを強く発現していた。

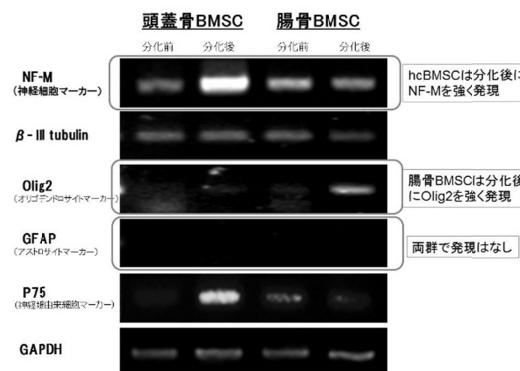


図2: 神経分化後の hcBMSC の分化マーカーを示す

hcBMSC の外胚葉 (骨、軟骨、脂肪) 分化能を免疫染色にて確認し、FACS にて間葉系幹細胞マーカーが高い陽性率であることを確認した。免疫不全脊髄損傷モデルラットへの移植

実験も行ったが、コントロール群と差は見られなかった。これらの結果から、hcBMSCは神経分化の幹細胞ソースとして高いポテンシャルを有す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 16 件)

1. Yamaguchi S (4人中2番目), Gowers' intrasyringeal hemorrhage associated with Chiari type I malformation in Noonan syndrome, *Surg Neurol Int*, 査読有, 5巻, 2014, p6, doi: 10.4103/2152-7806.125546
2. 山口智, 弓削類 (5人中3, 4番目), 微小重力環境で培養した骨髄間質細胞の脊髄損傷モデルへの移植効果, 脊髄外科 SPINAL SURGERY, 査読無, 27巻, 2013, pp274-276
3. Yamaguchi S (10人中1番目), Application of 4D-CTA using 320-row area detector computed tomography on spinal arteriovenous fistulae: initial experience, *Neurosurg Rev*, 査読有, 36巻, 2013, pp289-296, doi: 10.1007/s10143-012-0440-z
4. Yamaguchi S (7人中2番目), A case of a primary radiation-induced malignant peripheral nerve sheath tumor in the cauda equina in a patient with Neurofibromatosis type 2, *J Spin*, 査読有, 2巻, 2013, doi: 10.4172/2165-7939.1000129
5. Yuge L. (12人中12番目), Interactive effects of cell therapy and rehabilitation realize the full potential of neurogenesis in brain injury model, *Neurosci Lett*, 査読有, 555巻, 2013, pp73-78, doi: 10.1016/j.neulet.2013.09.009.
6. Yuge L(2人中2番目), Simulated microgravity based stem cell cultures enhance their utility for cell-based therapy, *Current Biotech*, 査読有, 2巻, 2013, pp257-261, DOI: 10.2174/22115501113029990020
7. Yuge L(8人中8番目), Electrical stimulation accelerates neuromuscular junction formation through ADAM19 / neuregulin / ErbB signaling in vitro. *Neurosci Lett*, 査読有, 545巻, 2013, pp29-34, doi: 10.1016/j.neulet.2013.04.006
8. Yamaguchi S, Yuge L, (8人中3, 7番目), Simulated microgravity facilitate cell migration and neuroprotection after bone marrow stromal cell transplantation in spinal cord injury, *Stem Cell Res Ther*, 査読有, 4巻, 2013, pp35, doi:10.1186/scrt184
9. Yuge L (8人中8番目), Electrical stimulation enhances neurogenin2 expression through β -catenin signaling pathway of mouse bone marrow stromal cells and intensifies the effect of cell transplantation on brain injury. *Neurosci Lett*, 査読有, 533巻, 2013, pp71-76, doi: 10.1016/j.neulet.2012.10.023
10. Yuge L (8人中7番目), Regulation of hematopoietic stem cells using protein transduction domain-fused Polycomb. *Exp Hematol*, 査読有, 40巻, 2012, pp751-760, doi: 10.1016/j.exphem.2012.05.005
11. Yamaguchi S (7人中6番目), An ischemic stroke patient with free floating thrombus in carotid artery, successfully treated by open carotid thrombectomy: a first case report in Nepal.

Hiroshima J Med Sci, 査読有, 61 巻、
pp101-103, 2013

12. 中川慧, 青景遵之, 弓削類, 運動イメージ (motor imagery) を活用した歩行トレーニング. 理学療法, 査読有, 29 巻, 2012, pp752-758
13. Yuge L. (12 人中 1 番目), Simulated microgravity maintains the undifferentiated state and enhances the neural repair potential of bone marrow stromal cells, Stem Cells Dev, 査読有, 20 巻, 2011, pp893-900
14. Yamaguchi S. (5 人中 2 番目), Utility of direct stimulation of roots in spinal surgery, Neurol Med Chir (Tokyo), 査読有, 51 巻, 2011, pp356-360,
15. Yamaguchi S (7 人中 1 番目), Lateral buttock congenital dermal sinus tract. Case report. Neurol Med Chir (Tokyo) 査読有, 51 巻, 2011, pp460-462, doi: 10.1089/scd.2010.0294
16. Yamaguchi S (4 人中 2 番目), Mirror-image spinal dural arteriovenous fistulas at the craniocervical junction: case report and review of the literature, Neurosurgery, 査読有, 69 巻, 2011, pp 1166-1171, doi: 10.1227 / NEU.0b013e318223bab5

[学会発表] (計 28 件)

1. 光原崇文, 山口智他, 微小重力環境で培養した骨髄間質細胞の脊髄損傷モデルへの移植効果, 第28 回日本脊髄外科学会、2013/6/6、名古屋国際会議場
2. S. Yamaguchi, Surgical treatment for the vascular malformations on the ventral spinal cord、7th Asia Pacific Cervical Spine Society Meeting in Sapporo、2013/8/22、Sapporo
3. 山口智他、脊髄硬膜・硬膜近傍に発生する動静脈瘻の局在、特徴についての

検討、第28回日本脊髄外科学会、
2013/6/7、名古屋国際会議場

4. Uwatoko H., Mitsuhara T., Yuge L 他., Human cranial bone derived stem cells have multipotency and the remarkable capacity of neural differentiation, 11th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 2013/6/14, Boston, MA, USA
5. 山口智他, Application of 4D-CTA using 320-row area detector CT on spinal AV fistulae、15th World Congress of Neurosurgery, 2013/9/12, Seoul, Korea
6. 上床裕之, 光原崇文, 山口智, 弓削類 他, ヒト骨髄間質細胞の神経分化誘導 - 頭蓋骨と腸骨での比較・検討 -、第48 回日本理学療法学会、2013/5/25, 名古屋
7. 大倉優之介, 光原崇文, 山口智, 弓削類 他, 臨床応用に向けたヒト頭蓋骨由来骨髄間質細胞の多分化能の検討, 第48 回日本理学療法学会、2013/5/25, 名古屋
8. 山口智他, 320列 area detector CTを用いた脊髄疾患4D imagingの試み、第27回日本脊髄外科学会、2012/6/22, 浦安市
9. 光原崇文, 山口智, 弓削類 他, ヒト頭蓋骨骨髄由来間質細胞は優れた神経分化能を有する, 第71回日本脳神経外科学会学術総会, 2012/10/17、大阪国際会議場
10. 光原崇文, 山口智, 弓削類 他, ヒト頭蓋骨間葉系幹細胞の神経分化, 第44回広島神経医科学研究会, 2012/07/23、広島大学医学部広仁会館
11. 光原崇文, 山口智, 弓削類 他, HUMAN CRANIAL BONE DERIVED STEM CELLS HAVE THE REMARKABLE

CAPACITY TO DIFFERENTIATE IN TO NEURAL LINEAGES, 10th International Society for Stem Cell Research, 2012/06/13、横浜

12. 籾拓郎, 弓削類, 山口智他, ヒト頭蓋骨髄由来間質細胞の神経分化誘導, 第11回日本再生医療学会総会, 2012/06/12、パシフィコ横浜
13. 上床裕之, 光原崇文, 山口智, 弓削類他, ヒト頭蓋骨由来骨髄間質細胞の神経分化誘導, 第47回日本理学療法学会大会, 2012/05/25、神戸ポートピアホテル
14. 上床裕之, 光原崇文, 山口智, 弓削類他, ヒト頭蓋骨由来骨髄間質細胞の神経分化誘導, 第24回日本脳循環代謝学会総会, 2012/11/08、リーガロイヤルホテル広島
15. 山口智他、320列CTによる4D-CTAを用いた脊髄動静脈奇形の血行動態評価、第71回日本脳神経外科学会学術総会、2012/10/17、大阪市
16. 山口智他、320列CTによる4D-CTAを用いた脊髄動静脈奇形の血行動態評価、第47回日本脊髄障害医学会, 2012/10/26 静岡市
17. 山口智他、Initial experience of 4D-CTA in the evaluation of spinal vascular malformations, 3rd Annual Meeting of Asia Spine, 2012/9/8、Kaoshiung, Taiwan
18. 山口智 他、Case presentation: spinal AVM, 2nd Annual Meeting of Asia Spine, 2011/9/2, Fukuoka
19. 山口智 他、Surgical treatment for the vascular malformations on the ventral spinal cord, 13th Asian-Australasian Society of Neurological Surgeons, 2011/12/3, Taipei, Taiwan
20. 山口智 他、脊髄硬膜動静脈瘻に対す

る非侵襲的画像診断の進歩: MRA, CT Aから320列装置による4DCTAまで、第70回日本脳神経外科学会学術総会、2011/10/13、横浜市

〔図書〕(計1件)

1. 山口智, 手根管症候群と頸椎疾患のレビュー. In 痛み・しびれの脊椎脊髄外科治療の効果とレビュー, eds 井須豊彦, メジカルビュー; pp150-151, 2012

〔その他〕

ホームページ

1. 広島大学脳神経外科
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/nouge/index.html>
 2. 広島大学大学院医歯薬保健学研究院成体環境適応科学研究室
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/yugelab/index.html>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
山口 智 (YAMAGUCHI SATOSHI)
広島大学・病院(医)・病院助教
研究者番号: 60403573
 - (2)研究分担者
弓削 類 (YUGE RUI)
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号: 20263676