

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18774

研究課題名(和文)大気圧プラズマを用いた生体内未分化細胞誘導と再生技術創生

研究課題名(英文)New technique for tissue regeneration with induction of immature cells by atmospheric pressure plasma

研究代表者

片岡 洋祐(Kataoka, Yosky)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40291033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、成獣哺乳類大脳皮質への大気圧プラズマの直接照射によって未分化細胞を誘導することで、中枢神経組織に組織再生をもたらすのかについて評価した。特に未分化細胞の起源を明らかにし、さらに、数ミリメートルを越える広い範囲を電子顕微鏡で組織観察できる広域電子顕微鏡技術等を用いて、ラット大脳皮質への大気圧プラズマ照射後、未分化細胞が誘導される様子を詳細に観察した。また、中大脳動脈領域を対象とした脳梗塞モデルラットにおいて、プラズマ照射によって大脳皮質梗塞領域に幼弱細胞マーカーを発現する細胞が多数誘導できることもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大気圧プラズマを利用した生体内(in vivo)組織再生技術は、現在おこなわれているES細胞やiPS細胞を移植する再生技術とは全く異なり、生体が自然に持つ再生能力を最大限に引き出すものであり、中枢神経系のように複雑な神経回路の再生など、これまで困難であった複雑な組織構築を再現する再生医療を実現できる可能性がある。また、iPS細胞のような遺伝子導入を必要としないため癌化のリスクも小さいと思われ、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated whether direct irradiation of atmospheric pressure plasma to the adult mammalian cerebral cortex can lead to tissue regeneration by inducing immature cells. In particular, we tried to identify the origin of those immature cells, and to observe the induction manner of immature cells after atmospheric pressure plasma irradiation to the cerebral cortex in rats, using large-scale electron microscopy which realizes comprehensive observation of the tissue microstructure in wider range exceeding a few millimeters. Furthermore, even in cerebral infarction model of rats, it was found that many cells expressing immature cell markers can be induced in the infarction area by plasma irradiation.

研究分野：生理学

キーワード：大気圧プラズマ 広域電子顕微鏡 大脳皮質 未分化細胞 梗塞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プラズマはイオン・ラジカル・電子・光を含む集団であり、生体分子や組織とも相互作用することが知られている。中でも大気圧プラズマは、近年、癌治療や止血操作等へ応用されようとしている。しかしながら、そうした生体との作用メカニズムについては未だ不明な点も多く、特に、中枢神経組織へのプラズマの作用についての研究は世界的にもほとんど進められていない。

申請者はこれまでに、麻酔下の成獣哺乳類（ラットやマウス）の大脳皮質に、大気圧プラズマを直接照射すると、本来、大脳皮質には存在しない幼弱な未分化細胞群が照射部位周辺に多数出現することを、光学顕微鏡を用いた組織化学的手法を通して観察してきた。こうした未分化細胞は組織内で新しい組織構築を形成するポテンシャルをもつことや、培養すると大量の細胞塊（スフェア）を容易に形成し、ニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトなど、すべての中枢神経系細胞に効率よく分化させえることから、すぐれた自己複製能と多分化能を有することを明らかにしている。

2. 研究の目的

これまでのES細胞やiPS細胞を移植する再生技術とは全く異なり、大気圧プラズマを生体組織へ直接照射することで、遺伝子導入を必要とすることなく未分化細胞を大量に誘導し、生体内（in vivo）組織再生を実現する新しい医療技術基盤を構築できる可能性がある。そこで、本研究課題では、そうした技術開発に向かう前提条件として、大気圧プラズマ照射によって成獣哺乳類の大脳皮質に誘導される未分化細胞の起源となる細胞について、電子顕微鏡技術を用いて検討した。また、脳梗塞モデル動物においてプラズマ照射し、組織再生効果に関する組織学的変化を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) 脳表からラット大脳皮質に大気圧プラズマを1分間照射し、その後、大脳皮質内に出現する未分化細胞の起源となる細胞を組織化学および生化学研究を通して同定した。予想される未分化細胞の起源について、大脳皮質由来の細胞としてはグリア前駆細胞（抗NG2抗体、抗PDGFR α 抗体陽性）、ペリサイト（抗NG2抗体、抗PDGFR β 抗体陽性）を想定して同定を進めた。また、大脳皮質外から侵入してくる可能性のある細胞として、骨髄由来幹細胞、間葉系幹細胞等を想定した。

(2) 大気圧プラズマ照射後の組織の状態や、誘導される細胞を詳細に観察するため、網羅的な電子顕微鏡観察を広い領域で実現できる広域電子顕微鏡技術を利用し、大気圧プラズマ照射領域から周辺領域までをシームレスに観察した。広域電子顕微鏡技術の概要については、図1に示す。

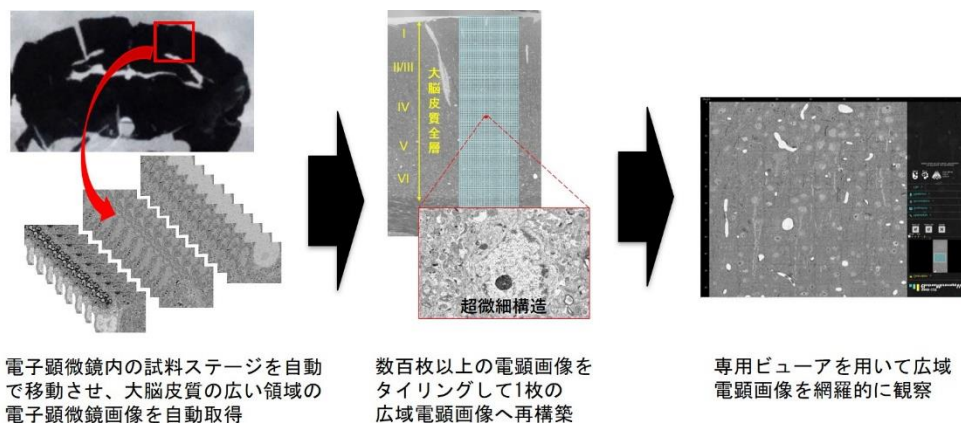


図1 広域電子顕微鏡技術概略

(3) ラット中大脳動脈を結紮して脳梗塞モデルを作製し、その後、大気圧プラズマを梗塞領域へ1分間照射し、梗塞巣を中心に組織の再生変化を組織化学的に観察した。

4. 研究成果

(1) ラット大脳皮質に大気圧プラズマを1分間照射し、その後、大脳皮質内に出現する未分化細胞の起源となる細胞を組織化学的に調べた。3-7日に多数の増殖細胞（Ki-67陽性）が出現した。増殖細胞の多くはNG2陽性細胞、CD11b陽性細胞、GFAP陽性細胞であった。また、細胞増殖像は示していなかったが、骨髄系マーカー陽性の細胞も観察された。

(2) 成獣ラットあるいはマウスの大脳皮質組織を対象に大気圧プラズマを照射した後、培養系でスフェアを作製し、スフェア形成細胞を組織学的に観察した。スフェアには骨髄由来細胞やNG2陽性細胞等が含まれており、こうした細胞が大気圧プラズマ照射によって誘導される再生能

をもった細胞の起源である可能性が見いだされた。

(3) 数ミリメートルを越える広い範囲を電子顕微鏡で組織観察できる広域電子顕微鏡を用いた観察研究では、大脳皮質への大気圧プラズマ照射 3 日後に骨髄系の細胞が血管周囲に侵入している可能性が捉えられた。また、プラズマを照射した大脳皮質では、電子染色で濃染される血管様構造が観察され、それらの構造の壁を多数の細胞が層状に重なって形成していることもわかった。プラズマによって誘導されるこうした細胞や血管様組織構造等が組織再生につながる可能性が見いだされた。このように、細胞や組織の超微細構造を広い範囲で観察できる広域電子顕微鏡は、組織再生研究に大いに利活用できることもわかった。

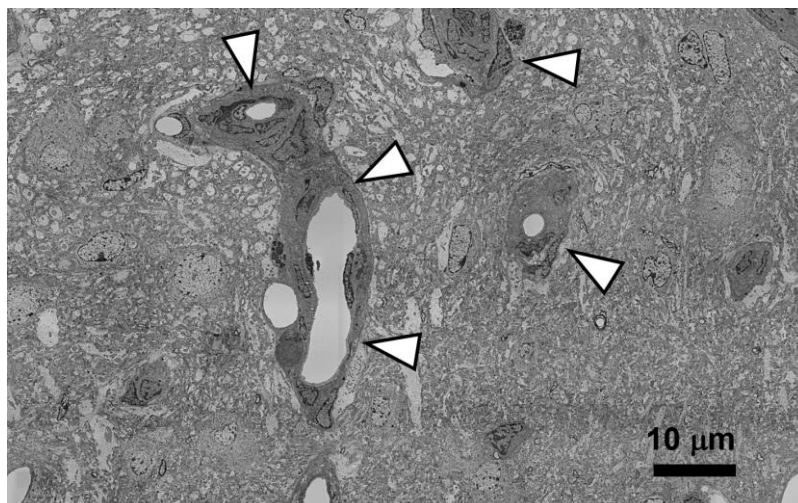


図2 プラズマ照射後に大脳皮質で観察された血管様構造（広域電子顕微鏡像中の矢頭）

(4) 中大脳動脈を対象とした脳梗塞モデルラットを作製し、大脳皮質表層から梗塞領域へ大気圧プラズマを照射したところ、梗塞巣中に中枢神経系の幼弱細胞マーカーである Nestin を発現する細胞が多数誘導されることが観察された。今後、梗塞巣の縮小など中枢神経組織再生を効果的に促すためには、プラズマ照射条件（照射時間や照射回数等）のさらなる最適化が必要であるものと思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 山野恵美、片岡洋祐	4. 巻 270
2. 論文標題 疲労および慢性疲労症候群のメタボロミクス研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 466-470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 片岡洋祐、大和正典	4. 巻 18
2. 論文標題 腎臓への近赤外低反応レベルレーザー照射による抗炎症効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本レーザー治療学会誌	6. 最初と最後の頁 69-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 田村泰久、片岡洋祐	4. 巻 34
2. 論文標題 脳内神経炎症から神経を保護するグリア細胞	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本認知症学会誌	6. 最初と最後の頁 8-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Takeda, K., Yamada, H., Ishikawa, K., Sakakita, H., Kim, J., Ueda, M., Ikeda, J., Akimoto, Y., Kataoka, Y., Yokoyama, N., Ikehara, Y., Hori, M.	4. 巻 52
2. 論文標題 Systematic diagnostics of the electrical, optical, and physicochemical characteristics of low-temperature atmospheric-pressure helium plasma sources.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physics D: Applied Physics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6463/aaff44	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 Koike, T., Tanaka, S., Hirahara, Y., Oe, S., Kurokawa, K., Maeda, M., Suga, M., Kataoka, Y., Yamada, H.	4. 巻 527
2. 論文標題 Morphological characteristics of p75 neurotrophin receptor-positive cells define a new type of glial cell in the rat dorsal root ganglia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Comp. Neurol.	6. 最初と最後の頁 2047-2060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24667	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, M., Seto, T., Kadono, C., Morimoto, H., Kida, S., Suga, M., Nakamura, M., Kataoka, Y., Hamazaki, T., Shintaku, H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Autophagy in the Central Nervous System and Effects of Chloroquine in Mucopolysaccharidosis Type II Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20235829	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 Kikuchi-Taura, A., Okinaka, Y., Takeuchi, Y., Ogawa, Y., Maeda, M., Kataoka, Y., Yasui, T., Kimura, T., Gul, S., Claussen, C., Boltze, J., Taguchi, A.	4. 巻 51
2. 論文標題 Bone marrow mononuclear cells activate angiogenesis via gap junction mediated cell-cell interaction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 1279-1289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.119.028072	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 該当する

1. 著者名 田村泰久、片岡洋祐	4. 巻 36
2. 論文標題 神経炎症制御にかかわるNG2グリア	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 389-393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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33件（うち招待講演 18件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Kataoka, Y., Eguchi, A., Takata, K., Maeda, M., Tamura, Y.
2. 発表標題 Multi-modal imaging study of age-dependent change in dynamics and function of progenitor cells expressing NG2.
3. 学会等名 RIKEN Aging Project Symposium 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Maeda, M., Suga, M., Eguchi, A., Kume, S., Ueda, C., Kataoka, Y.
2. 発表標題 Analysis of age-dependent change of tissue microstructure
3. 学会等名 RIKEN Aging Project Symposium 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 疲労倦怠感と脳内神経炎症
3. 学会等名 第52回京阪泌尿器腫瘍セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 脳内幹細胞・前駆細胞のイメージングおよび操作技術が解き明かす脳組織の新しい機能維持機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kataoka, Y., Tamura, Y., Yamato, M., Kume, S., Takata, K., Eguchi, A., Maeda, M.
2. 発表標題 Dynamics and roles of NG2-expressing progenitor cells.
3. 学会等名 A3 Foresight Program Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kume, S., Kataoka, Y.
2. 発表標題 Comprehensive analysis of ultra microstructural microscopy images using machine learning.
3. 学会等名 A3 Foresight Program Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 最先端生命科学の今と未病予防
3. 学会等名 第11回国際健康健美長寿フォーラム博覧会・第2回世界大健康運動会学術フォーラム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamano, E., Sugimoto, M., Kume, S., Watanabe, Y., Soga, T., Bateman, L., Vernon, SD., Kataoka, Y.
2. 発表標題 Metabolic features of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS).
3. 学会等名 The 15th Annual International Conference of the Metabolomics Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久米慧嗣、村川泰裕、陳桂花、田村勝、小林紀郎、榎屋啓志、須賀三雄、前田光代、片岡洋祐
2. 発表標題 広域電子顕微鏡技術による生体組織のビッグデータ解析
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 疲労科学研究プラットフォームとその応用展開
3. 学会等名 第15回 日本疲労学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 光治療の多様性と未来
3. 学会等名 第31回 日本レーザー治療学会・第22回日本レーザー・スポーツ医科学学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡洋祐、大和正典、前田光代
2. 発表標題 光とプラズマを用いた未来再生医療
3. 学会等名 第31回 日本レーザー治療学会・第22回日本レーザー・スポーツ医科学学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 グリア前駆細胞による免疫制御
3. 学会等名 先端医療研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kataoka, Y., Tamura, Y., Kume, S., Maeda, M., Eguchi, A., Suga M.
2. 発表標題 Multi-modal imaging of glial progenitor cells.
3. 学会等名 Neuro2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久米慧嗣、片岡洋祐
2. 発表標題 広域超微細構造イメージング法とAI技術を用いた網羅的生体組織形態解析
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永森友樹、物井則幸、後藤博、中村好孝、菅原経継、平尾香織、沢田あゆみ、内山章、青野恵、古賀良彦、水野敬、片岡洋祐
2. 発表標題 睡眠の質測定と睡眠改善方法の提案が健康増進と労働生産性の向上に及ぼす影響
3. 学会等名 第15回 日本疲労学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maeda, M., Suga, M., Nakamura, M., Suzuki, K., Hasebe, Y., Kikuchi, N., Yamagichi, Y., Eguchi, A., Kume, S., Matsuzaki, R., Ueda, C., Kataoka, Y.
2. 発表標題 Analysis of age-dependent change of tissue microstructure in mouse cerebral cortex using large-scale electron microscopy.
3. 学会等名 Neuro 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamato, M., Tamura, Y., Maeda, M., Eguchi, A., Kume, S., Kataoka Y.
2. 発表標題 Large-scale electron microscopic analysis of change of tissue microstructure in adult rat cerebral cortex after irradiation of atmospheric-pressure plasma.
3. 学会等名 Neuro 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡洋祐、久米慧嗣、前田光代、江口麻美、須賀三雄
2. 発表標題 広域電子顕微鏡技術と画像ビューアーの開発
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会学術集会・第13回日中合同組織細胞化学セミナー合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Danno, S., Nakano, M., Goto, T., Wrabel, A., Sakaue-Sawano, A., Ando, R., Miyawaki, A., Funabiki, K., Kataoka, Y.
2. 発表標題 In vivo imaging of cancer microenvironment using fiber-bundle based micro-endoscope.
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会学術集会・第13回日中合同組織細胞化学セミナー合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久米慧嗣、片岡洋祐
2. 発表標題 Comprehensive Morphology Analysis Using The Wide-range Electron Microscopy Imaging and Machine Learning
3. 学会等名 理化学研究所-広島大学 合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 Multi-modal imaging of stem/progenitor cells or cancer cells with PET, optical imaging, and micro-endoscopy
3. 学会等名 理化学研究所-広島大学 合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村深雪、魚津伸夫、由井慶、高田孔美、田村泰久、片岡洋祐
2. 発表標題 小麦末粉水抽出物が脳機能へ及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本臨床栄養学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 光治療の多様性と未来
3. 学会等名 第31回日本レーザー治療学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 光とプラズマを用いた未来再生医療
3. 学会等名 第31回日本レーザー治療学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kataoka, Y.
2. 発表標題 Multi-modal imaging technologies including large-scale electron microscopy
3. 学会等名 Annual Symposium of Tumor Heterogeneity and Network Research Center（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kataoka, Y., Kume, S., Yamato, M., Tamura, Y., Eguchi, A., Takata, K., Danno, S., Maeda, M., Hasebe, Y., Yamaguchi, Y., Kikuchi, N., Suga, M.
2. 発表標題 Large-scale electron microscopy and imaging big data analysis
3. 学会等名 A3 Foresight Program Meeting 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡洋祐、大和正典
2. 発表標題 低反応レベル光の生体への作用機序
3. 学会等名 第30回日本レーザー治療学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 炎症から神経を保護するグリア細胞と認知症の治療戦略
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 低反応レベル光の生体への作用
3. 学会等名 第30回記念日本レーザー歯学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡洋祐
2. 発表標題 広域電子顕微鏡による画像ビッグデータがもたらす世界
3. 学会等名 シンポジウム「画像ビッグデータが切り拓く健康・医学の新時代」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大和正典、田村泰久、中野正行、久米慧嗣、江口麻美、高田孔美、片岡洋祐
2. 発表標題 Production of neurospheres from adult rat cerebral cortex with atmospheric-pressure plasma irradiation
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田村泰久、高田孔美、中野正行、江口麻美、片岡洋祐
2. 発表標題 Selective ablation of NG2 progenitor cells induced neuroinflammation in adult rat brain
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 久米慧嗣、小林宣夫、片岡洋祐	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社技術情報協会	5. 総ページ数 598
3. 書名 ストレス・疲労のセンシングとその評価技術	

1. 著者名 Toyokuni, S., et al.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 458
3. 書名 Plasma Medical Science	

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞機能評価研究チーム http://www.riken.jp/research/labs/bdr/cell_func_img/
--

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
研究協力者	大和 正典 (YAMATO MASANORI)		
研究協力者	田村 泰久 (TAMURA YASUHISA)		