

微小重力環境における細胞の分化と老化の抑制

広島大学大学院 弓削 類、田原 栄俊、河原 裕美

テキサス大学 Anil D. Kulkarni

Inhibition of Cell Differentiation and Aging Using The Simulating Microgravity

Louis Yuge, Hidetoshi Tahara and Yumi Kawahara

Hiroshima University, 1-2-3 Minami-ku Kasumi Hiroshima 734-8551

E-mail: ryuge@hiroshima-u.ac.jp

Anil D. Kulkarni

The University of Texas Medical School, Houston, Texas 77030

Abstract: Little is known about cellular response such as proliferation, differentiation and gene expression to microgravity and this in part reflects lack of understanding of gravity-sensing and aging mechanisms. We investigated cell differentiation and aging of human mesenchymal stem cells and human normal osteoblasts cultured using the 3D-clinostat. Our results suggested that microgravity inhibited cell differentiation and aging. We propose that 3D-clinostat (Japanese original method) provides a novel method that contributes to cell therapy and developmental biology.

Key Word: Simulating Microgravity, Cell Differentiation, Aging

1. 緒言

再生医療（細胞治療）に欠かせない幹細胞を未分化維持し、なおかつ増殖させる技術は未だ確立していない。これまでの手法では、遺伝子導入や多種多様なサイトカインの添加によって、未分化状態を維持する手法が検討され、iPS細胞の確立はその大きな成果といえる。しかし、これら人為的・化学的操作の結果、移植細胞によるサイドエフェクト（移植細胞のがん化や添加薬剤による生体の環境ホルモン化など）が懸念される。また、成体幹細胞を大量培養する方法も未だ重要な問題である。このような諸問題は、細胞治療の臨床応用・再生医療の早期実現のために解決すべき課題である。

再生医療において、移植細胞の老化も重要な問題である。染色体末端にある telomere は、分裂を繰り返す、老化した細胞で短縮が認められることから、細胞老化と密接に関連していることが知られている。我々は、telomere 末端に幹細胞の自己複製に関わる領域があることを発見し、テロメラーゼには機構未知の幹細胞増殖促進活性があることを報告している¹⁾。

近年、寿命を伸ばす遺伝子（長寿遺伝子）が発見され、健康で長生きするための「アンチエイジング」に関する研究も始まった。長寿遺伝子の一つである Sirt1 は、p53, FoxO, Ku70 といったタンパク質の活性を調節し、細胞修復を高め、細胞のアポトーシスを

を制御していると考えられており、その発現が増加すると、細胞は、ストレスを受けてもアポトーシスを起こさずに生き延びることができる。

宇宙飛行士にみられる筋萎縮や骨萎縮のような宇宙適応症候群は、地上の 1G 環境から宇宙の 10⁻³G 環境に適応するために起こる生理的変化である。我々は、このような宇宙医学の研究から、微小重力環境では細胞の分化が抑制されることに着目し、研究を行ってきた²⁻⁴⁾。

しかし、再生医療へ応用可能な技術の創出を目指した細胞の重力応答機構の解明や、細胞の老化・寿命に関わる研究は行われていない。

そこで本研究では、ヒト間葉系幹細胞および正常ヒト骨芽細胞を模擬微小重力環境で培養し、細胞の分化と老化について検討したので報告する。

2. 材料と方法

三次元重力分散型模擬微小重力発生装置（3D-clinostat, 特許名：未分化多能性幹細胞増殖・分化制御方法及び装置, 共同発明者：三菱重工業株式会社 神戸造船所, 特許第 501260163 号, 2001 年, 海外特許 (WO2004/061092 A1 PCT; 米国, EU 等), 2004 年) (Fig. 1) を使用した。

ヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells: hMSCs, BioWhittaker 社, 米国), および正常ヒト骨



Fig. 1. Photograph of the 3D-clinostat. By controlled simultaneous rotation of two axes, the 3D-clinostat cancels the cumulative gravity vector at the center around the device, producing an environment with an average of 10^{-3} G over time.

芽細胞 (normal human osteoblasts: NHOst, BioWhittaker 社) を, 通常の 1G 環境下 (Group C) と模擬微小重力環境下 (Group CL) で培養した. 培養開始時および培養 7 日後と 14 日後に細胞を回収し, 分子細胞生物学の解析により細胞の分化や老化について解析した.

3. 結果と考察

1) hMSCs

培養開始時と培養 7 日後の細胞数を比較すると, Group CL は約 13 倍に増加した (Fig.2-A). Group C では約 4 倍だったことから, 模擬微小重力環境下では 1G 環境と比べても細胞数が約 3 倍増加した. この培養細胞が hMSCs であることを確認するため, FACS (fluorescent activated cell sorting) を用いて, 細胞表面マーカー ($CD14^-/CD34^-/CD45^-/CD29^+/CD44^+/CD90^+$) を検討した (Fig.2-B). これを数値化すると, Group CL では, 未分化状態のまま hMSCs の細胞数が増加し, 実験開始時の約 12 倍, Group C の約 6 倍になった (Fig.2-C). 軟骨の分化マーカーである Type II collagen と Aggrecan の mRNA 発現は, Group C は経時的に発現が増加したが, Group CL では発現していなかった (Fig.3-A) ことから, 微小重力環境下で培養した細胞は, 細胞表面マーカーだけでなく, mRNA レベルでも未分化状態を維持していることが示された.

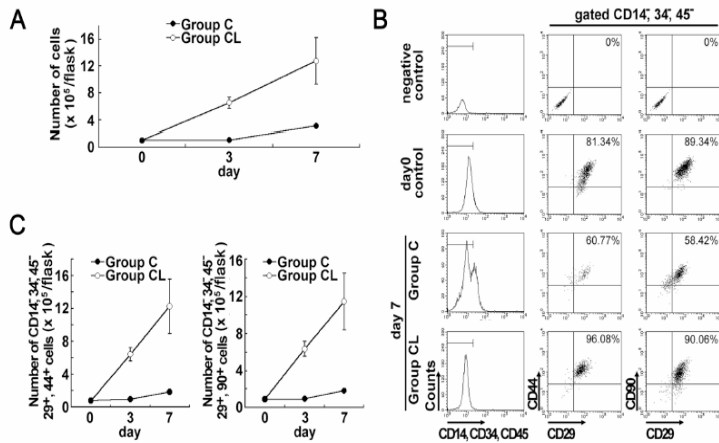


Fig.2. Flow cytometry analysis of cultured hMSCs.

(A) Growth of hMSCs under simulated microgravity (Group CL) or 1G conditions (Group C).

(B) Analysis of hMSCs for $CD14^-/CD34^-/CD45^-/CD29^+/CD44^+/CD90^+$ cells. hMSCs were gated $CD14^-/CD34^-/CD45^-$ and analyzed for $CD44^+/CD29^+$ or $CD90^+/CD29^+$.

(C) Analysis of cells $CD44^+/CD29^+$ or $CD90^+/CD29^+$ in Group CL and in Group C.

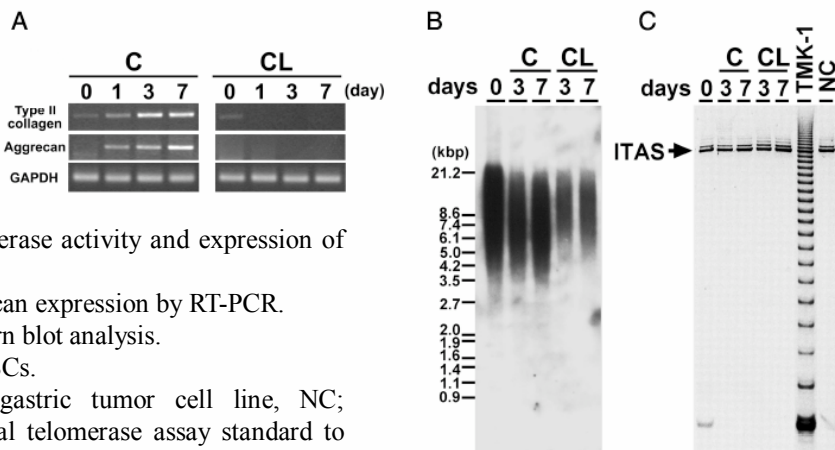


Fig. 3. Telomere length, telomerase activity and expression of differentiation markers.

(A) Collagen type II and aggrecan expression by RT-PCR.

(B) Telomere length by Southern blot analysis.

(C) Telomerase activity of hMSCs.

TMK-1; telomerase-positive gastric tumor cell line, NC; negative control. ITAS; internal telomerase assay standard to show that the PCR reaction proceeded normally.

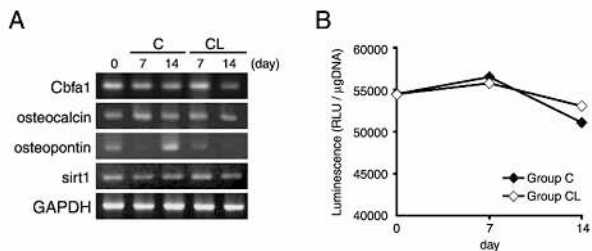


Fig.4. Expression of differentiation marker and longevity gene and analysis of telomere length (A) Cbfa1, osteocalcin, osteopontin and sirt1 expression by RT-PCR. (B) Telomere length of NHOst.

Group CL の Telomere length には、経時的な変化はなかったが、Group C は経時的に短くなった (Fig. 3-B). Telomerase activity は、両群ともに経時的な変化はなかった (Fig.3-C). このことから、1G 環境の培養では細胞分裂とともに細胞の寿命も短くなるが、微小重力環境で培養すると細胞の寿命を維持したまま増殖する可能性が示唆された。

2) NHOst

骨分化マーカーである Cbfa1, osteocalcin, osteopontin の mRNA 発現は、Group CL では、Group C と比較して発現が弱く (Fig.4-A)、微小重力環境により、骨の分化が抑制されていることが示唆された。

長寿遺伝子の一つである sirt1 の mRNA 発現は、Group CL で Group C より強い傾向がみられた (Fig.4-A). Telomere length も Group CL の方が Group C より長い傾向がみられ (Fig.4-B)、微小重力環境で培養すると細胞の老化が抑制される可能性が示唆された。

4. まとめ

我々は、微小重力環境によって得られる「タイムマシン」の様な幹細胞の分化抑制効果に着目し、サイトカイン等の薬物を使用しない、安全性の高い再生医療技術の確立を目指している。微小重力環境を使った本細胞培養技術で培養した hMSCs の軟骨欠損マウスへの移植実験⁴⁾ およびマウス骨髄細胞の脳挫傷モデルマウス移植実験⁵⁾ では、1G 環境で培養した細胞と比較して、生着率が良いという結果も得ている。

最近、脳梗塞患者に対し、患者自身の骨髄細胞を使って損傷した脳の神経細胞を再生させようという日本初の臨床治験が始まり、再生医療が現実味を帯びてきた。再生医療は、細胞治療ともいわれ、その臨床応用では幹細胞を「薬」として使用することから、その安全性、有効性、機能性 (細胞の生着率) に関する研究開発がこれから最も重要となる。

本研究の結果から、模擬微小重力環境では、1G 環境と比較して、

- ① hMSCs と NHOst の細胞分化が抑制され、Telomere length の長さが保たれた。
- ② NHOst の sirt1 mRNA 発現が増加した。

これらは、模擬微小重力環境において、重力応答性に細胞の分化だけでなく、老化も抑制される可能性を示唆するものである。

本研究を進めることにより、幹細胞の重力応答機構の解明を進め、再生医療へ応用可能な技術の開発とアンチエイジング研究につなげたい。

(本研究の一部は、23rd American Society for Gravitational and Space Biology で発表し、The student awards for outstanding poster presentations を受賞した。)

5. 参考文献

- 1) Tahara H., Kusunoki M., Yamanaka Y., *et al.*: Nature Methods, 2:829-831, 2005.
- 2) Yuge L., Hide I., Kumagai T., *et al.*: In Vitro Cell Dev Biol-Animal, 39: 89-97, 2003.
- 3) Hirasaka K., Nikawa T., Yuge L., *et al.*: BBA-Molecular Cell Research, 173: 130-140, 2005.
- 4) Yuge L., Kajiume T., Tahara H., *et al.*: Stem Cells Dev, 15: 921-929, 2006.
- 5) Sasaki A., Takeda M., Magaki T., *et al.*: American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB 23rd Annual Meeting NASA), Ames Research Center, Moffett Field, CA., USA, October 26, 2007.