

神経再生における微小重力環境で培養した骨髄間質系細胞の有用性

弓削 類¹, 田原 栄俊¹, 河原 裕美¹, Anil D. Kulkarni², Lewis Romer³

広島大学¹, テキサス大学², ジョンホプキンス大学³

Effectiveness of Bone Marrow Stromal Cell Cultured under Microgravity in Neurogenesis

Louis Yuge¹, Hidetoshi Tahara¹, Yumi Kawahara¹, Anil D. Kulkarni² and Lewis Romer³

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

²The University of Texas Medical School, Houston, Texas

³Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland

Correspondence to: ryuge@hiroshima-u.ac.jp

Abstract: Recently, regenerative medicine with bone marrow stromal cells (BMSCs) has gained significant attention for the treatment of central nervous system diseases. Here, we investigated the activity of BMSCs under simulated microgravity conditions, with special focus on their cellular responses to physical stimulation. In conclusion, we demonstrated that mouse BMSCs maintained multipotency in culture in 3D-clinostat, and their transplantation may contribute to recovery of functions in injured brain. Establishing cell therapy needs a mean of maintaining multipotency in donor cells for future use. This study suggests that simulated microgravity could be a candidate for that.

Key Word: Simulated Microgravity, Neurogenesis, Bone Marrow Stromal Cells

1. 緒言

近年、中枢神経系疾患の新しい治療法としての再生医療に期待が寄せられている。これまでに、ラット脳梗塞モデルに対し、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) の脳内移植治療が有効であったこと¹⁾, BMSCs には、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells) が存在し、中胚葉由来の細胞に分化するだけでなく、神経細胞やグリア細胞といった外胚葉由来の細胞へも分化誘導可能であることが報告され²⁻⁴⁾, BMSCs は、中枢神経系疾患における細胞治療の候補として注目されている。

我々は、物理的刺激に対する細胞応答に着目し、その成果を再生医療へ応用したいと考えている。これまで模擬微小重力環境下では、幹細胞の細胞分化の抑制されることが報告されている^{5,6)}。しかし、模擬微小重力環境から 1G 環境に細胞を戻し、正常に分化するかを検討した報告は少ない。また、模擬微小重力環境下で培養した細胞を動物疾患モデルに移植した研究は稀である。

本研究では、BMSCs が模擬微小重力環境下で未分化性を維持し、中枢神経系疾患に対する移植細胞として有効であるかを検討するため、1G 環境下あるい

は模擬微小重力環境下でマウス BMSCs を培養し、その特性を *in vitro*, *in vivo* の両面から解析した。

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; USA, EU 等), 2004 年) を使用した。

マウスの大腿骨と脛骨より骨髄細胞を採取し、培養皿に播種した。48 時間後、培養皿底面に接着した細胞を培養細胞 (BMSCs) とした。増殖させた BMSCs は、OptiCellTM に播種し、7 日間の増殖培養後、神経分化誘導を開始した (Day 0)。実験群は、① Group GM: 増殖用培地で培養し続け、分化誘導を行わなかった群、② Group 1G: 1G 環境下にて神経分化誘導した群、③ Group CL: 模擬微小重力環境下にて神経分化誘導した群の 3 群とした。分化誘導 7 日後 (Day 7) の細胞を回収し、分子細胞学的解析および脳挫傷モデルマウスに対する移植細胞とした。

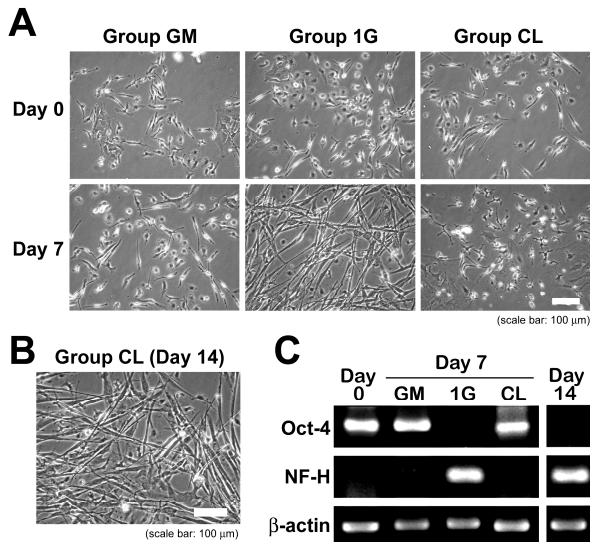


Fig. 1 Character of cells cultured in microgravity

In Group 1G, the neural-induced group cultured under 1G condition, many cells with long protrusions were observed (A), and the neural differentiation markers (neurofilament heavy; NF-H) were expressed only in Group 1G at day 7 (C). However, under microgravity, no cells with neuron-like characteristics were observed (A). When Group CL cells were cultured under 1G condition and kept in the induction medium for another 7 days, numerous cells grew long protrusions and conjugated with other cells (B), and NF-H were expressed (C).

脳挫傷モデルマウスは、液体窒素を用いて冷却した金属プローブを頭蓋骨削除後の頭蓋骨部位へ当てることにより作成した。細胞移植は、脳挫傷 7 日後に一匹あたり 3.0×10^5 個の細胞懸濁液をマウスの後眼窩静脈叢へ注射して行った。運動機能の評価には、rotarod test と beam-walking test を用いた。

3. 結果と考察

1) 微小重力環境で培養した細胞の特性 (*in vitro*)

1G 環境で神経へ分化誘導すると (Group 1G), BMSCs は、神経に分化した (Fig. 1A,C). Group CL では、神経細胞様の形態をした細胞が観察されず、未分化マーカー (Oct-4) が強く発現し、分化マーカー (NF-H) の発現はなかった。この細胞を 1G 環境に戻した 7 日後、Group 1G と同様に細胞突起の伸長が観察され、分化マーカーが強く発現した (Fig. 1B,C).

このことから、模擬微小重力環境下では BMSCs の神経細胞への分化能を維持したまま、未分化な状態で培養が可能であることが分かった。

2) 微小重力環境で培養した細胞の有用性 (*in vivo*)

細胞移植から 3 週間後、静注した細胞は脳の損傷領域で同定され、Group CL の細胞を移植したマウスの運動機能は、有意に回復した (Fig. 2A). 移植した細胞は、損傷部位で神経細胞に分化した (Fig. 2B).

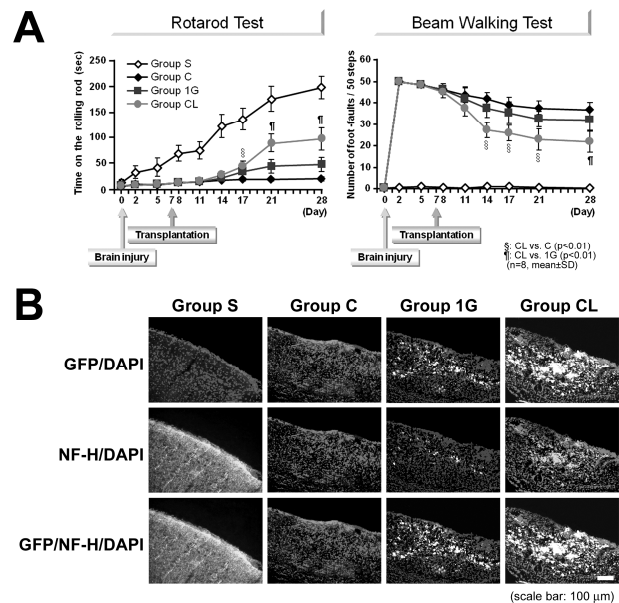


Fig. 2 Effectiveness of cells cultured in microgravity

Mice grafted with Group CL cells had the highest scores and showed greatest improvement compared to all other groups (A). Group S was sham operated mouse, Group C mice received PBS, no cellular grafting. Immunostained images of each group 28 days after inducing damage are shown (B). Cells expressing GFP are graft cells. Mice grafted with Group CL cells showed numerous NF-H expressing cells.

模擬微小重力環境下で培養した BMSCs は、多くの細胞が損傷領域まで遊走し、神経細胞に分化することで神経再生に関与し、運動機能改善に貢献したと考えられる。このことは、微小重力環境下で培養した細胞が、生体内においても幹細胞としての能力を発揮したことを示唆している。

4. まとめ

本研究により、微小重力環境では骨髄由来間質細胞の未分化性維持ができ、その培養細胞は、細胞治療へ応用され得ることが示唆された。

5. 参考文献

- 1) Chen J., *et al.*, Neuropharmacology, 39: 711-716, 2000.
- 2) Jiang Y., *et al.*, Nature, 418: 41-49, 2002.
- 3) Hermann A., *et al.*, J. Cell Sci., 117: 4411-4422, 2004.
- 4) Wislet-Gendebien S., *et al.*, Stem Cells, 23: 392-402, 2005.
- 5) Plett P. A., *et al.*, Exp. Hematol., 32: 773-781, 2004.
- 6) Yuge L., *et al.*, In Vitro Cell Dev. Biol. Anim., 39: 89-97, 2003.