

論文内容要旨

Simulated Microgravity Culture Enhances the
Neuroprotective Effects of Human Cranial Bone-Derived
Mesenchymal Stem Cells in Traumatic Brain Injury

(模擬微小重力培養は外傷性脳損傷におけるヒト頭蓋骨
由来間葉系幹細胞の神経保護効果を高める)

Stem Cells and Development, 27(18): 1287-1297, 2018.

主指導教員：弓削 類 教授

(医系科学研究科 生体環境適応科学)

副指導教員：浦川 将 教授

(医系科学研究科 運動器機能医科学)

副指導教員：濱田 泰伸 教授

(医系科学研究科 生体機能解析制御科学)

大塚 貴志

(医歯薬保健学研究科 保健学専攻)

【緒言】

再生医療に用いる細胞の有力な候補として、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : 以下, MSCs)が注目されている。諸家の研究において、採取する組織の由来によって、樹立された MSCs が持つ特性が異なることが示唆されている。我々は従来とは異なる新しい MSCs として、ヒト頭蓋骨由来 MSCs (human cranial bone-derived mesenchymal stem cells : 以下, hcMSCs) に着目した。先行研究において、hcMSCs は神経堤由来であり、中胚葉由来である腸骨由来 MSCs と比較して、高い神経分化能を有することが報告されている。また、同じ神経堤由来である歯髄由来 MSCs は、他の組織に由来する MSCs と比較して神経栄養因子等の液性因子の放出が豊富であり、高い神経保護能力を有することが報告されていることから、hcMSCs は神経保護能力に優れた細胞であることが考えられる。

また、MSCs の移植に際して、移植効果をより高めることを目的とした培養環境の検討が行われている。培養環境の変化が細胞に与える影響について、多くの先行研究で報告されているが、そのなかでも模擬微小重力 (microgravity : 以下, MG) 環境が注目されている。MG 環境での培養によって、細胞周期、増殖及び分化などの細胞事象および細胞特性の変化がもたらされることが知られている。脊髄損傷モデルに対し、MG 環境で培養した MSCs は、通常重力 (以下, 1G) 環境で培養した MSCs よりも高い移植効果を示すことが報告されており、MG 環境での培養は MSC の持つ能力をより高めうると考えられる。そこで、本研究では、hcMSCs を MG 環境で培養し、中枢神経損傷モデルへの移植効果を神経保護に着目し、検討することを目的とした。

【方法】

脳神経外科的手術の際に得られるヒト頭蓋骨片より hcMSCs を樹立し、1G 環境および MG 環境で培養した。その後、hcMSCs の遺伝子発現に重力環境の違いが与える影響について real-time PCR 法を用いて解析した。移植実験では、脳損傷モデルマウスを作成し、損傷翌日に細胞移植を行った。実験群は、細胞を移植せず、生理食塩水のみを投与する群 (Group PBS)、1G 環境で培養した hcMSCs を移植する群 (Group 1G)、MG 環境で培養した hcMSCs を移植する群 (Group MG)の 3 群とした。細胞移植後の運動機能評価として、Rotarod test および Beam walking test を実施した。移植後の脳損傷領域における炎症、酸化ストレスに起因する二次的損傷の変化を解析するため、移植翌日に脳を摘出した。脳損傷領域から mRNA およびタンパク質を抽出し、real-time PCR 法とウエスタンブロッティング法を用いて、炎症関連因子およびアポトーシス関連因子の遺伝子およびタンパク質発現解析を行った。

また、神経細胞に対してリポ多糖によって炎症ストレスを、または過酸化水素によって酸化ストレスを誘導し、中枢神経損傷後の二次的損傷を模した in vitro モデルを作成した。実験群は、ストレスに曝露された神経細胞に対して通常培地を与える群 (Group Ctrl)、1G 環境で培養した hcMSCs の培養上清を与える群 (Group 1G-CM)、および MG 環境で培養した hcMSCs の培養上清を与える群 (group MG-CM)の 3 群とした。炎症および酸化ストレスに対する神経保護効果

を生存率評価、遺伝子発現解析によって評価した。

【結果】

MG環境で培養したhcMSCsは、1G環境で培養したものと比較して神経栄養因子の一種である肝細胞増殖因子 (*hepatocyte growth factor: HGF*)および抗炎症作用を有するトランスフォーミング増殖因子- β (*transforming growth factor- β : TGF- β*)の遺伝子発現が高かった。in vivoでの脳損傷モデルに対する移植実験では、Group PBS, Group 1Gと比較して、Group MGで有意に運動機能の改善が認められた。脳損傷領域周辺部の遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析では、Group PBSと比較してGroup MGで炎症関連因子およびアポトーシス関連因子の発現が抑制されていた。in vitroでは、Group CtrlおよびGroup 1G-CMと比較して、Group MG-CMで細胞生存率が高かった。また、遺伝子発現解析ではGroup MG-CMで炎症ストレスに対して炎症関連因子の発現が、酸化ストレスに対してはアポトーシス関連因子の発現が抑制された。

【考察】

本研究では、MG環境で培養したhcMSCsを脳損傷モデルマウスに移植することで、運動機能の改善がみられた。また、移植に用いた細胞の解析では、MG環境で培養したhcMSCsは、1G環境で培養したhcMSCsに比べ、*HGF*, *TGF- β* の発現量が高かった。*HGF*はアポトーシスの抑制、*TGF- β* は抗炎症作用を有することが報告されており、MG環境で培養したhcMSCsは*HGF*および*TGF- β* の発現と分泌を介して脳損傷の拡大を抑制した可能性が考えられる。脳損傷領域の解析では、Group MGにおいて炎症反応およびアポトーシスが抑制されていた。in vitroモデルにおいても、Group MG-CMで炎症反応やアポトーシスを有意に抑制することが示された。以上のことから、MG環境で培養したhcMSCsは、*HGF*および*TGF- β* を介して炎症反応およびアポトーシスを抑制し、神経細胞を保護することでその後の運動機能の改善に寄与した可能性が示唆された。

【結語】

模擬微小重力環境は、間葉系幹細胞の神経栄養因子や抗炎症因子の発現を増強させ、中枢神経損傷後の二次的損傷に対する神経保護効果を高めることが示された。