

平成19年度「微小重力環境を利用した再生医療」活動報告書

広島大学・大学院保健学研究科 弓削 類

1. 構成メンバー

氏名	所属
弓削 類	広島大学・大学院保健学研究科
田原 栄俊	広島大学・大学院医歯薬学総合研究科
Anil D. Kulkarni	Department of Surgery The University of Texas Medical School
Lewis Romer	Department of Anesthesiology, Cell Biology, and Pediatrics, Johns Hopkins University
河原 裕美	広島大学・大学院保健学研究科

2. 本年度WG会合開催実績

(1) 第1回：平成19年10月29日

3. 活動目的

我々は、微小重力環境によって得られる幹細胞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、宇宙

環境の再生医療技術への有効利用に向けた研究を行うことを目的としている。模擬微小重力環境を使用して、生体内での存在頻度が低い幹細胞を増殖・分化させる技術の確立を優先に研究開発を行う。

4. 活動内容

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。そこで本年度は、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。

【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、分子細胞生物学的解析により細胞の分化や老化について解析した。

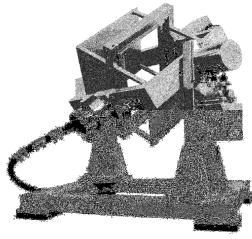


Fig. 1. Photograph of the 3D-clinostat. By controlled simultaneous rotation of two axes, the 3D-clinostat cancels the cumulative gravity vector at the center around the device, producing an environment with an average of 10^{-3} G over time.

【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

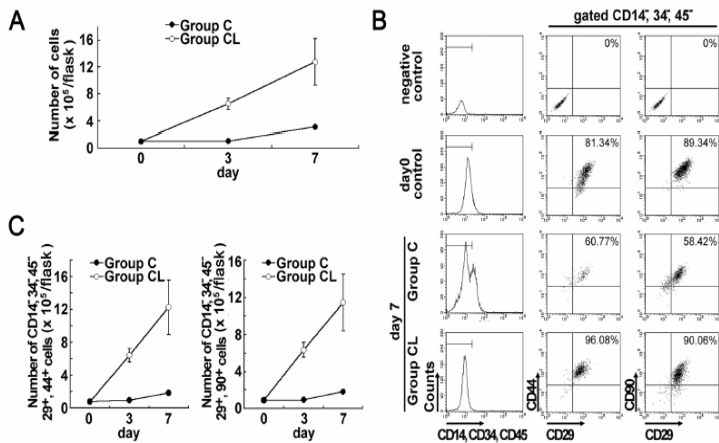


Fig.2. Flow cytometry analysis of cultured hMSCs.

(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.

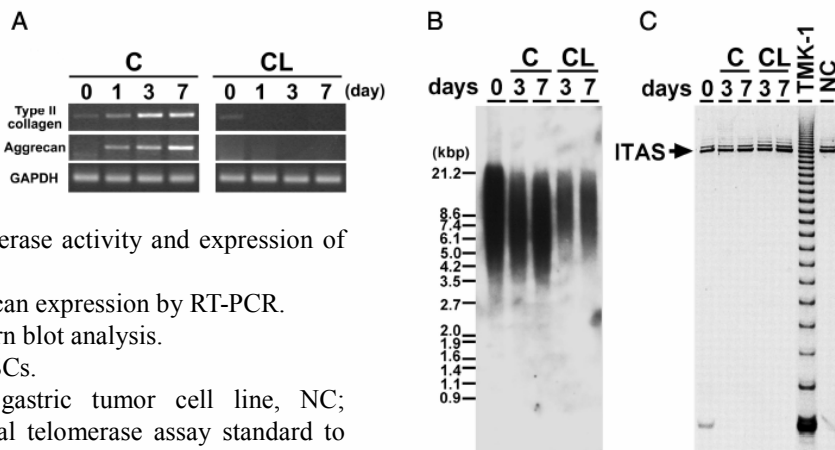


Fig. 3. Telomere length, telomerase activity and expression of differentiation markers.

(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.

維持していることが示された。

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。

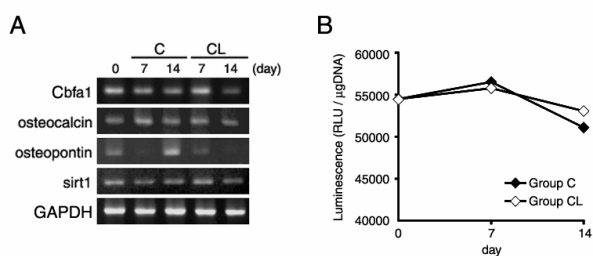


Fig.4. Expression of differentiation marker and longevity gene and analysis of telomere length (A) Cbfa1, osteocalcin, osteopontin and sirt1 expression by RT-PCR. (B) Telomere length of NHOst.

5. 成果

1) Yuge L.: Stem cell culture in microgravity. 12th ADNAT convention, Symposium on Biology of Embryonic and Adult Stem Cells, Centre for Cellular and Molecular Biology (CCMB), Hyderabad, India, February 24, 2008

2) Makihira S., Kawahara Y., Yuge L., Mine Y., Nikawa H.: Impact of the Microgravity Environment in a Three-dimensional Clinostat on Osteoblast- and Osteoclast-like.. CellsCell Biology International, 2008 accepted paper

3) Kawahara Y., Nikawa T., Hirasaka K., Miyashita T., Kataoka K., Yuge L.: Preventive effect of isometric contraction exercise on disuse muscle atrophy using tail suspension mice. Journal of Physical Therapy Science, 20: 39-44, 2008

4) Wu SL., Sasaki A., Yoshimoto R., Kawahara Y., Manabe T., Kataoka K., Asashima M., Yuge L.: NSCs improve learning and memory of Alzheimer's disease rats. Pathobiology, 2008 accepted paper