

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2019

課題番号：15K10783

研究課題名（和文）嗅覚神経細胞への特異的分化を目的とした選択的細胞移植法の確立

研究課題名（英文）Establishment of selective cell transplantation for specific differentiation into olfactory sensory neurons

研究代表者

高原 潤子（Takahara, Junko）

岡山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：80448224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、単一細胞移植による嗅覚神経細胞への分化率向上を目指し、骨髄由来間葉系幹細胞の単離、培養の方法について検討した。フローサイトメーターを用いた細胞単離では、技術力を要因とする細胞の喪失が大きかった。そこで免疫磁気細胞分離法を用いて予め不要な細胞を除去し、目的とする細胞の存在頻度を高くすることを試みた。本研究で用いた免疫磁気細胞分離法は比較的簡便な方法であり導入しやすいという利点があった。しかしながら、組織からの細胞採取時のみにこの方法を行うだけでは間葉系幹細胞の分離・培養は難しいため、分離操作の回数を増やす等といった純度を上げる必要性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な細胞が存在する集団から存在頻度の非常に少ない細胞をソーティングするには、熟練した技術力が必要であり、習得に多くの時間を要する。また、実験者によるデータの差も大きくなる。そこで本研究で得られた成果は、存在頻度の非常に少ない細胞をソーティングする際に生じる技術力等の問題を解決する上で有用な情報になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated a method for isolating and culturing BMSCs (bone marrow-derived mesenchymal stem cells) for the purpose of improving the rate of differentiation into olfactory sensory neurons by transplanting one type of cells. In cell isolation using a flow cytometer, loss of cells was large due to immaturity of technical skills. Therefore, it was attempted to remove unnecessary cells in advance and increase the frequency of the target cells by using immunomagnetic cell separation. The immunomagnetic cell separation used in this study had the advantage of being relatively simple and easy to introduce. This method was performed after collecting the cells from the bones, but proliferation of mesenchymal stem cells could not be confirmed. Therefore, it was considered necessary to increase the number of times of this method to improve the purity.

研究分野：鼻科学

キーワード：細胞・組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、再生研究は著しく進展しており、様々な領域において再生治療の可能性を拓いている。再生治療での細胞移植法は、様々な細胞が混在した状態で移植されるため、細胞の性格など、含有する細胞の状態が一定ではなく、移植後の効果は偶然性に期待している部分が多い。そこで、均一した細胞を移植することが出来れば、目的の細胞を確実に増やせることが期待される。このように、効果をよりコントロールすることが出来れば、安全性や確実性が高まると考えられる。

申請者は、これまでに骨髄細胞が嗅覚組織を構成する細胞に分化することを発見し(Brain Res.2005,Acta Oto-Laryngologica.2013)、鼻科領域における新たな治療法の可能性を見いだした。また、嗅覚障害を起こすことで骨髄細胞の嗅覚組織への取り込みが上昇することも報告している(Rhinology.2010)。しかしながら、これまでの研究において骨髄細胞の嗅覚神経細胞への分化率は非常に低く、実用化を目指す上で問題になっている。そこで、嗅覚神経細胞へ分化する骨髄由来幹細胞を同定し、単一の細胞に純化した状態で移植する。このような選択的細胞移植によって、嗅覚神経細胞への分化率を飛躍的に向上させることが出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

骨髄細胞中には多分化能を有する幹細胞が存在しており、その中間葉系幹細胞は多くの研究によって分離方法や細胞マーカーが報告されている。

骨髄由来中間葉系幹細胞は、骨細胞、脂肪細胞等への分化が報告されており、神経細胞の再生にも強く関係していることが報告されている。本研究においても嗅覚神経細胞への分化率向上を目指していることから、中間葉系幹細胞の移植による効果が期待される。

そこで本研究では、骨髄由来の中間葉系幹細胞を分離、培養する方法の確立を検討し、単一に純化した状態の細胞移植による嗅覚神経細胞への分化率向上を目指す。

3. 研究の方法

蛍光標識タンパクを有するマウス(CAG-EGFP マウス)は高価であるため、野生型マウスを用いてテクニックが安定した後、CAG-EGFP マウスを用いて検討した。

(1)フローサイトメーターを用いた中間葉系幹細胞の分離

骨髄細胞の採取

安楽死させた野生型マウス(C57BL/6N, 10 週齢)より大腿骨・脛骨を採取し、乳棒、ハサミを用いて骨片を粉砕した。次にコラゲナーゼ処理(0.2%コラゲナーゼ, 37℃, 1 時間, 30/min)、赤血球溶解処理(冷滅菌水, 6 秒)を行い、細胞を分離、調整した。

セルソーティング

で調整した細胞を、各種抗体(CD45-PE, Ter119-PE, Sca1-FITC, PDGFR α -APC:eBioscience)を用いて染色した後、フローサイトメトリーで解析し、中間葉系幹細胞のソーティングを試みた。

(2)免疫磁気細胞分離法による中間葉系幹細胞/中間葉系前駆細胞の分離

骨髄細胞の採取

安楽死させた野生型マウス(C57BL/6N, 10 週齢)より大腿骨・脛骨を採取し、乳棒、メスを用いて骨片を粉砕した。次にコラゲナーゼ処理(0.2%コラゲナーゼ, 37℃, 1 時間, 120/min)を行い、細胞を分離、調整した。

EasySep による細胞分離

ベリタス社の EasySep Magnet 及び中間葉系幹細胞/中間葉系前駆細胞分離キットを用いて、で調整した細胞から中間葉系幹細胞等をネガティブ分離した。

培養

でネガティブ分離された細胞は、ペニシリン・ストレプトマイシンと 10%FBS が添加された MEM 培地にて培養(37℃, 5%CO₂ 条件下)した。

GFP マウス由来中間葉系幹細胞の分離

GFP マウス(CAG-EGFP, 10 週齢)を用いて、(2)- と同様の方法で中間葉系幹細胞等の分離、培養を行い、7~230 日後辺りまでの経時的観察を行った。

(3)免疫細胞染色

(2)- の培養細胞を、各経時的段階(必要量の細胞が回収出来るようになる 30 日目以降)において回収し、カバーガラスに播種した。一晚培養した後、細胞固定(4%PFA, 10 分, 室温)、ブロッキング(10%Donkey serum, 30 分, 室温)、一次抗体反応(抗 CD73 抗体(ab175396), 4℃, 一晚)、二次抗体反応(抗 Rabbit-Donkey 抗体, Alexa568, 室温, 30 分)を行い、封入(DAPI 入り封入剤)した。

4. 研究成果

(1)フローサイトメーターを用いた中間葉系幹細胞の分離

方法(1)の結果、中間葉系幹細胞の分離は出来なかった。原因として細胞収率の低さが考えられた。細胞収率に影響を与えた要因として、コラゲナーゼ処理の不十分、テクニックの問題が考えられた。

においては、既設の機器でのコラゲナーゼ処理時の攪拌速度が最大でも 30/min 程度で

あった。そのため、コラゲナーゼによるニッチからの間葉系幹細胞の分離が十分に行われず、細胞の収率に影響したと考えられた。

においては、骨組織からの細胞採取時に、乳棒操作、タッピング時の力加減が過度であったため、細胞へのダメージが大きくなり、細胞の収率に影響したと考えられた。

その他に、セルソーティングの経験不足も考えられた。

間葉系幹細胞の存在頻度は非常に少ないため、様々な細胞が存在する集団から生きのままソーティングするには熟練した技術力が必要であり、習得には多くの時間を要する。そこで、免疫磁気細胞分離法を用いて予め不要な細胞を除去し、目的とする細胞の存在頻度を高くしておいてからソーティングする。このようにすることで、技術力を要因とする細胞の喪失をカバーできるのではないかと考えられた。

(2)免疫磁気細胞分離法による間葉系幹細胞等の分離

方法(2)- の結果、細胞の収率が1.4倍に上昇した。このことから、コラゲナーゼ処理時の攪拌速度は細胞収率に影響を与えることがわかった。しかしながら、セルソーティングを行うにはまだ収量が不十分であり、テクニックの問題が考えられた。

方法(2)- , の結果、数回実験を重ねたところ、培養から14日後には小さな細胞集団がいくつか観察され始め、増殖している様子が確認出来るようになった。EasySepによる免疫磁気細胞分離法は比較的簡便な方法であり、導入しやすいと考えられた。

テクニックが安定したので、GFPマウスを用いての免疫磁気細胞分離法へと進めた。

方法(2)- の結果、GFPマウスにおいても培養から14日後には小さな細胞集団が観察され、経時的に集団は大きくなり増殖していた。また、30日後辺りから扁平様の大きな細胞が観察されるようになり、180日後辺りまで散見された。200日後辺りから増殖速度が顕著に大きくなった。

(3)細胞免疫染色

方法(3)の結果、いずれの経時的段階の細胞においてもCD73陽性細胞は観察されなかった。

方法(2)- , 方法(3)の結果より、培養から30日後辺りで細胞の老化、200日後辺りからは線維芽細胞の増殖が考えられた。また、CD73以外の間葉系幹細胞マーカーを用いた染色やフローサイトメトリーによる解析も必要であると考えられた。

以上の結果より、EasySepによる免疫磁気細胞分離法は比較的簡便な方法であり導入しやすいという利点があった。しかしながら、組織からの細胞採取時に使用するだけでは間葉系幹細胞の分離・培養は難しいため、分離操作の回数を増やす等といった純度を上げる必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	西崎 和則 (Nishizaki Kazunori) (90180603)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	