

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500388

研究課題名（和文） マウスを用いての骨髄細胞による臓器再生能の研究

研究課題名（英文） Behavior of Bone Marrow-derived Cells Following *in vivo* Transplantation

研究代表者

田口 修 (TAGUCHI OSAMU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00142167

研究成果の概要（和文）：

致死量の放射線を照射したマウスに green fluorescent protein (GFP)陽性の骨髄細胞を注射しておく（BMT マウス）とそのマウスの臓器は再生する。上皮細胞の形態と機能は間質によりコントロールされている。BMT マウスにおいて間質部位にリンパ球でないドナー由来間質細胞の出現が短時間になされるが、これはドナー間質細胞が上皮の再生を促し、臓器の形態と機能の維持に重要な役割を負っていることを示している。また骨髄細胞は骨髄に復帰したり、色んな臓器に侵入するための特殊な「キイ」を持ちあわせている。

研究成果の概要（英文）：

Following injection of green fluorescent protein positive (GFP⁺) bone marrow (BM) cells into lethally irradiated wild-type mice, the organs of the recipient mice (BM transplantation [BMT] mice) were regenerated. The maintenance of epithelial structure and function is controlled stromal cells. In BMT mice, GFP⁺ stromal cells were regenerated fairly rapidly indicating that BM-derived stromal cells play a pivotal role in epithelial renewal and are crucial for maintaining organ structure and function. BM-derived cells in the periphery possess a special “key” to return to the BM and then to migrate to various organs to become resident cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：実験動物技術、骨髄細胞、臓器再生、間質上皮相互作用、マウス

1. 研究開始当初の背景

移植した骨髄細胞がリンパ球以外の臓器の再生にも関与し、消化管では上皮細胞の再生もなされるという報告がなされていた。

2. 研究の目的

骨髄細胞内には生体を構成する臓器になり得る細胞が存在し、それらは臓器構成細胞と置き換わることができることが報告され

ている。この現象を追試していると、骨髄細胞は上皮細胞にはならないこと、骨髄細胞由来の間質細胞がリンパ球よりもはやく末梢臓器に出て、臓器の再生に関与していることや骨髄細胞は再び骨髄に復帰してくることが明らかとなった。本研究の目的はこれらのことをさらに追求し、証明することにある。

3. 研究の方法

(1) 致死量の放射線(10.5 Gy)を照射したマウスに GFP⁺の骨髄細胞(2×10^6)を注射(BMT マウス)し、臓器の再生を試みた時、ドナー細胞はどのような部位にどれだけ早く到達するかを検討する。

(2) 致死量の放射線を大腸や脾臓のみに照射したマウスに骨髄細胞(1×10^7)を注射したとき、骨髄細胞がそれらの臓器の再生に関与するかを検討する。

(3) 移植した骨髄細胞により再生した臓器で、ドナー細胞がどれだけ長く留まるかを検討する。そのためにはBMT マウスに再度致死量の放射線を照射し、こんどは野生型マウスの骨髄細胞(1×10^7)を注射する。

(4) GFP マウスと野生型マウスを併体結合し、相互の血液細胞等がどれだけ入れ替わるかを検討する。

(5) 放射線を照射しない無処置野生型マウスに骨髄細胞(1×10^7)と脾細胞(1×10^7)を注射したときに、どれだけドナー細胞がレシピエント内に留まるかを検討する。

4. 研究成果

(1) BMT マウスにおける個々の臓器でのドナー細胞の存在部位

骨髄細胞を移植してから6ヶ月後にBMT マウスを安楽死させ、多くの臓器におけるドナー細胞の存在部位を個々の臓器を蛍光顕微鏡で観察することにより検討した。リンパ球等の血液細胞とその他の細胞を区別するために、PE 標識 CD45 で観察組織を免疫染色することも試みた。またパラフィン切片を抗 GFP 抗体で免疫組織化学的に染色することも試みた。その結果図1に示すように、上皮と間質からなる組織においてはその間質部位に多数のドナー細胞の存在が確認出来た。ところが上皮細胞にはドナー由来の細胞は検出出来なかった。このことはこれまで報告されていた上皮細胞の再生がドナー骨髄細胞によりなされるという見解と異なる。その違いはこれまでの報告を検証すると上皮内へのリンパ球の浸潤を、上皮細胞と見誤っている可能性が極めて高いと思われる。

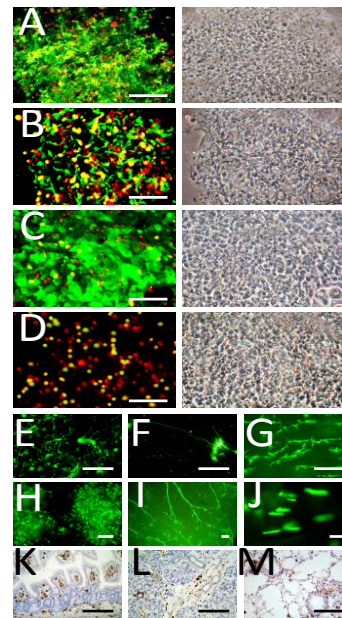


図1. BMT マウスにおけるドナーGFP 陽性細胞の存在部位。A. GFP マウスの肺。B. BMT マウスの肺。黄色はリンパ球を示す。C. GFP マウスの腸上皮部位。D. BMT マウスの腸上皮部位。Cで見られる大型の GFP 陽性の上皮細胞は見られない。E. BMT マウスの大脳におけるグリア細胞。F. 同神経細胞。G. BMT マウスの横隔膜。H. 同肝臓。I. MBTscid マウスの大脳の血管。J. 同心臓の筋板。K. 腸。L. 唾液腺。M. 肺。K~Mにおいて間質部位に GFP 陽性細胞が存在する。スケールバー：100 μ m。

次にBMT マウスにおいてドナー細胞がどれくらいの時間で臓器に到着するかを、腸と肺を用いて検討した。その結果 図2に示すように両組織において骨髄細胞移植24時間後

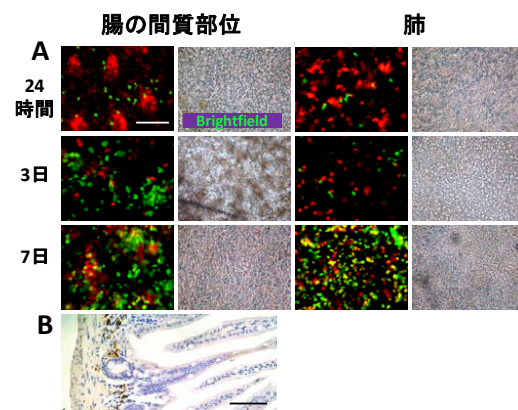


図2. AでBMT マウスにおける骨髄細胞注射後24時間、3日及び7日目において腸の間質

部位と肺でのドナー細胞の浸潤状況を示す。組織は PE 標識 CD45 抗体で染色し、リンパ球の存在が赤色と黄色で示されている。BMT マウスの腸と肺において処置後 24 時間でリンパ球でないドナー細胞の浸潤をすでに認めるが、黄色は認めずドナー由来のリンパ球の出現はない。ドナー由来のリンパ球の出現は 7 日目ですと顕著となる。B の免疫組織化学で処置後 3 日目における腸のドナー由来の細胞の存在部位を示しているが、ドナー細胞は上皮直下の間質部位に浸潤している。スケールバー：50 μ m。

にはそれらの臓器の間質部位にドナー細胞の浸潤が認められた。さらに図 2B に示すようにドナー細胞は上皮直下の間質部位に浸潤していた。これらの浸潤細胞は CD45 が陰性であることから、リンパ球ではない。ドナー由来のリンパ球の浸潤が見られるようになるのは処置後 3 日目からやっと少数出現するようになった。

(2)放射線を部分的に照射した BMT マウスにおけるドナー細胞の運命

放射線を大腸のみ、あるいは脾臓のみに部分的に照射すると、大腸では上皮細胞、脾臓ではリンパ球のほとんどが死滅するはずである。そこでこれらのマウスに骨髄細胞を注射し、ドナー細胞が障害を受けた臓器の再生に関与するかを検討した。対照としては大腸のみを鉛板でシールドしたマウスに放射線を照射し、BMT マウスを作製した。図 3A に示すように大腸のみに、あるいは図 3C に示すように脾臓のみに放射線を照射し、BMT マウス

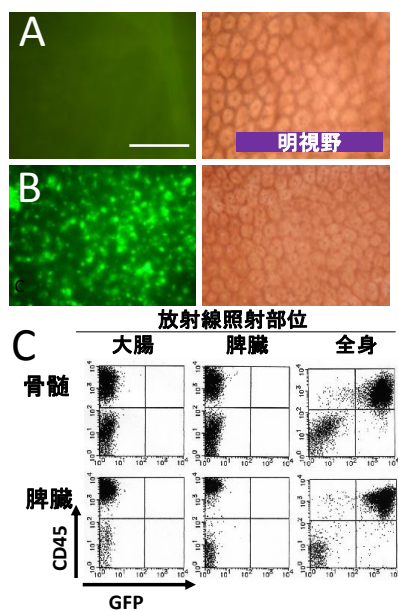


図 3. A、大腸のみに放射線を照射し、BMT マウス

ウスとした処置後 1 ヶ月の大腸。ドナー細胞の浸潤は認めない。B、大腸のみ鉛板でシールドし、放射線を照射したマウスで BMT マウスを作製し、処置後 1 ヶ月の大腸。放射線が当たっていない大腸にも多数のドナー細胞の浸潤を認める。C、大腸のみ (左)、脾臓のみ (中央)、全身 (右) に放射線を照射して BMT マウスを作製し、1 ヶ月後にそれぞれの骨髄細胞と脾細胞中の GFP 陽性のリンパ球を示す。大腸のみと脾臓のみに放射線を照射したマウスでは骨髄にも脾臓にもドナー細胞の定着はない。これは骨髄に放射線の照射がないと注射した骨髄細胞は骨髄に入ることができないこと、さらに骨髄から出てきた骨髄細胞でない個々の臓器に侵入できないことを示唆している。スケールバー：100 μ m。

スを作製した場合にはそれぞれの臓器の再生に注射した骨髄細胞はまったく関与できなかった。一方大腸のみをシールドして BMT マウスを作製した場合には図 3B に示すごとく大腸に多数のドナー細胞の浸潤が認められた。

(3)BMT マウスにおけるドナー細胞の存在時間

BMT マウスにおいて注射した骨髄細胞が臓器内でどれくらい長く留まるかを検討した。そのために処置 3 ヶ月後に BMT マウスに再度致死量の放射線を照射し、今度は野生型マウスの骨髄細胞を注射 (2ndBMT マウス) し、6 ヶ月後個々の臓器内に初回注射の GFP 陽性細胞がどれほど留まっているかを検討した。骨髄と脾臓における GFP 陽性細胞の比率を FACS

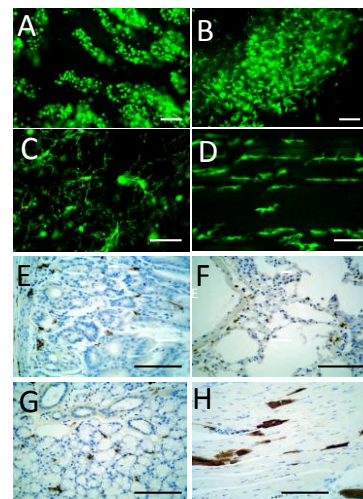


図 4. 2ndBMT マウスにおける GFP 陽性細胞。A:小腸の間質部位、B:肝臓の小葉間結合組織、C:大腸のグリア、D:横隔膜、E:小腸の間質、F:肺の間質、G:唾液腺の間質、H:心臓の筋板。スケールバー：100 μ m。

で検討してみた。その結果 GFP マウス、BMT マウス、2ndBMT マウスの骨髄と脾臓における GFP 陽性のリンパ球の比率 (%) はそれぞれ 84、72、0.14 と 98、85、0.16 であった。この結果は 2ndBMT マウスにおいて個々の臓器内で GFP 陽性の細胞が存在しても、それはまずリンパ球でないことを示している。図 4 に 2ndBMT マウスの小腸 (A、E)、肝臓 (B)、大脳 (C)、横隔膜 (D)、肺 (F)、唾液腺 (G)、心臓 (H) における GFP 陽性細胞の存在を示している。すべての臓器で多数の陽性細胞の存在が確認出来た。また腸、肺と唾液腺では間質部位に陽性細胞が確認出来た。6 ヶ月後の検索で多数の GFP 陽性細胞が検出できたので、これらの細胞はさらに長期に渡りこの部位に留まる事が予測できる。

(4) 併体結合によるマウス間の細胞移動

GFP マウスと野生型マウスを併体結合させることにより相互の細胞移動を検討した。まず併体結合 3 ヶ月後の脾臓と骨髄における相手方のリンパ球の比率を FACS で解析した。その結果脾臓においては 40~45% がパートナーのリンパ球に置き換わっていた。そして骨髄においては 20% 弱がパートナーの細胞であった。野生型マウスの個々の臓器におけるパートナー由来の GFP 陽性細胞の存在を検討した。そのためにまず併体結合を解除した後で、野生型マウスに致死量の放射線を照射し、野生型マウスの骨髄細胞を注射後、1 ヶ月してから個々の臓器における GFP 陽性細胞の存在を蛍光顕微鏡で検討した。その結果図 5 に示すごとく個々の臓器で GFP 陽性細胞が検出出来た。これはパートナーの骨髄由来の細胞が個々の臓器に入り込み、組織の再生に関与していることを示している。

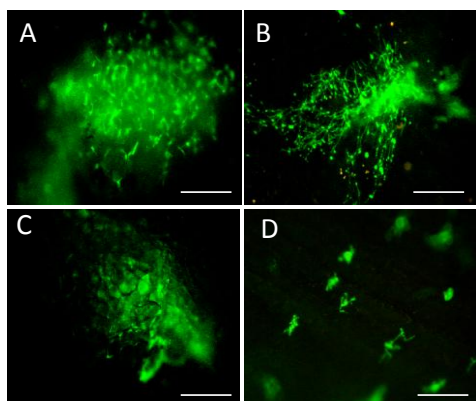


図 5. 併体結合を解除した野生型マウスに致死量の放射線を照射し、野生型マウスの骨髄細胞を注射して 1 ヶ月後の臓器。パートナー由来の GFP 陽性細胞が A: 肝臓の小葉間結合組織、B: 小脳のプルキンエ細胞、C: 脂肪組織、D: 大脳のグリア細胞に見られる。スケールバ

ー: 50 μ m。

骨髄にもパートナーの細胞が存在したが、この細胞が骨髄細胞としての機能があるかを調べてみた。そのために併体結合した野生型マウスの骨髄の中に存在する GFP 陽性細胞を FACS で回収し、致死量の放射線を照射したマウスに注射してみた。その結果注射を受けたマウスは GFP マウスの骨髄細胞の注射を受けたマウスと同様の経過をとったので、併体結合で移動していたパートナーの骨髄細胞は機能的であり、且つ骨髄細胞は骨髄を出て再び骨髄に帰ることをしていることが明らかとなった。

(5) 無処置野生型マウスへの GFP 陽性骨髄細胞と脾細胞の注射

併体結合によりパートナーの細胞で個々の臓器の再生がなされることが明らかとなった。また骨髄細胞が骨髄を出て、再び骨髄に帰ることも明らかとなった。このことは血液の中に骨髄に再帰したり、末梢の個々の臓器に侵入したりすることのできる細胞が存在していることを示唆している。そこで骨髄細胞と脾細胞を無処置の野生型マウスに注射してみることを試みた。その結果を表 1 に示す。

表 1. GFP 陽性骨髄細胞あるいは脾細胞を無処置野生型マウスへ注射

注射する細胞 匹数	GFP ⁺ 細胞 匹数	GFP ⁺ リンパ球 %
骨髄細胞 16	骨髄 1 脾臓 1	0.001 0.005
脾細胞 15	骨髄 12 脾臓 12	0.037 \pm 0.005* 0.16 \pm 0.22*

1x10⁷ 個の細胞を静注し、4 週後に FACS で GFP 陽性細胞を検索した。* p<0.01

無処置野生型マウスに GFP 陽性の骨髄細胞を注射しても 16 匹中 1 例のみに骨髄と脾臓にドナーリンパ球が観察できた。一方脾細胞を注射したときには 15 匹中 12 匹にドナーリンパ球が確認できた。この事は骨髄細胞は末梢に出るときに再び骨髄に帰ってくるため、さらに個々の臓器に侵入するための「カギ」を持っていることを示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Taguchi O, Tsujimura K, Kontani K, Harada Y, Nomura S, Ikeda H, Morita A, Sugiura H, Hayashi N, Yatabe Y, Seto M, Tatematsu M, Takahashi T, Fukushima A. Behavior of Bone Marrow-Derived Cells Following in Vivo Transplantation: Differentiation into Stromal Cells with Roles in Organ Maintenance. Am J Pathol. 182: 1255-1262, 2013.
- ② Harada Y, Ishida W, Fukuda K, Sumi T, Kawakita T, Taguchi O, Fukushima A. Identification of keratocyte-like cells differentiated from circulating bone marrow-derived cells in the mouse cornea. Med Mol Morphol. 2013 in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 修 (TAGUCHI OSAMU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号 : 00142167