

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590200  
 研究課題名（和文） 末梢組織内に分布する GFP 蛍光ラベルした骨髄由来細胞の微細形態と組織学的解析  
 研究課題名（英文） Histological and ultrastructural examination of the GFP labeled-bone marrow derived cells  
 研究代表者  
 中村 桂一郎 (NAKAMURA KEI-ICHIRO)  
 久留米大学・医学部・教授  
 研究者番号：20172398

研究成果の概要： レポーター分子としての GFP 発現により組織中の骨髄由来細胞を蛍光顕微鏡下に同定できる EGFP 骨髄移植キメラマウスについて様々な組織の形態観察を行った。その結果、角膜、皮膚および口腔粘膜の真皮において、骨髄由来細胞の組織特異的パターンでの分布、組織固有の線維芽細胞との近接さらに電顕観察による密着が確認された。それら細胞が組織幹細胞および niche として、組織の形態維持、創傷治癒における役割を果たす可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：骨髄，骨髄由来細胞，樹状細胞，脂肪組織，皮膚，キメラ動物，電子顕微鏡，再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

iPS 開発の成功で脚光を浴びている再生医学・医療分野では、より現実的な幹細胞のソースとして骨髄の組織幹細胞やそれに由来する流血中の内皮前駆細胞 (EPC) が有用であるとする多くの研究がなされ、臨床応用も積極的に試みられている。またここ数年の間

に、神経細胞が再生することや、心臓、消化管、神経組織などの末梢組織に組織幹細胞が存在することが常識となり、さらに脂肪組織幹細胞においては患者自身の脂肪組織から分離・精製し、それを移植することにより治療効果があることも数多く報告されている。しかしながら、それらの細胞が組織中において

てどのように分布し、どのような役割を果たすのか、医学生物学的特徴と意義は必ずしも明らかではなく、細胞学的知識も十分であるとは言えない。このような事情のもと、様々な疾病治療において期待される組織幹細胞を用いた再生医療の発展のためには、ヒトを頂点とする哺乳動物の組織・臓器中に分布する組織幹細胞について、より詳細な基礎医学生物学的・細胞学的情報を積み重ねることが重要である。

昨今、これまでの多くの研究により、様々な末梢組織中に *in vitro* において骨、軟骨、脂肪組織への分化能を有するという組織幹細胞の定義に当てはまる細胞が存在することは明らかである。しかしながら、結合組織を構成する細胞として、未分化間葉細胞 (undifferentiated mesenchymal cell) の存在はどの教科書にも記載されているものの、正常の *in vivo* 組織中における組織幹細胞の実態についての詳細は明らかでない。さらに、幹細胞を幹細胞として維持するために niche が重要であることが注目されているものの、その本態も未詳である。

## 2. 研究の目的

「研究開始当初の背景」で述べたような事情を踏まえ、本研究では、基礎医学としての組織学的見地に立ち、骨髄を代表とする間葉組織に存在する組織幹細胞およびそれらの生体内でのリクルートメントについて詳細な医学生物学的・形態的特徴を明らかにすることを目的とした。また、そのような研究に有用な、新たな形態観察手法および機器の開発をも試みた。

具体的には、角膜および皮膚と口腔粘膜の真皮を臓器・器官の代表として、まず第1に、それらの骨髄由来細胞の分布パターン、細胞の形や数を明らかにすること、次に、最近注目されている幹細胞 niche との関連において、骨髄由来細胞周囲の細胞・組織を観察し、それらとの関係を明らかにすることを目指した。

ここで、角膜は、主要細胞成分として間葉

組織・結合組織に最も多くみられる線維芽細胞のみが分布すると考えられる器官であること、皮膚は、表皮が 28 日のペースで細胞更新する組織であること、そして、口腔粘膜は、皮膚と同様の基本構築をもちながら、更新レートが約 1/2 であるという特徴に注目したものである。

一方、組織幹細胞は、組織中における分布頻度が低いことがよく知られている。このような細胞を対象とする研究には、広範囲にわたる、微細構造レベルの組織・細胞の観察が効率よく実行できることが必要である。そのために、光顕の観察効率と電顕の分解能をあわせもつ手法として、エッチング試料の走査型電顕観察法を導入した。また、近年の研究で注目されている GFP に代表される蛍光レポーター分子を活用する蛍光観察技術の改良を目指した新たな標識分子の開発・導入、さらにそれらの同時観察を可能とする新たな蛍光走査型電子顕微鏡の開発・改良を試みた。

## 3. 研究の方法

遺伝子解析の進んでいるマウスを哺乳動物モデルとして用い、末梢組織中に分布する骨髄由来細胞に注目して形態解析を行った。その際、骨髄に由来する細胞を容易かつ確実に同定するために、EGFP トランスジェニックマウスの骨髄を移植し、骨髄細胞が EGFP 陽性細胞に置換された GFP 骨髄キメラマウスを用いた。GFP 骨髄キメラマウスは組織中の骨髄由来細胞を瞬時に同定することができる画期的な動物モデルであり、本研究の大きな特徴の一つである。

上記モデル動物の様々な組織・臓器について、免疫組織細胞化学による観察としては、凍結切片法により作製した組織標本を、1 次抗体として、(1) マクロファージマーカーとして抗 Iba1 抗体を、また、(2) 線維芽細胞マーカーとして HSP47 (コラーゲン産生の分子シャペロン) に対する抗体を用い、2 次抗体としては市販の AlexaFluor488 および 568 により発色した。蛍光免疫染色した試料は、通常の蛍光顕微鏡および共焦点レーザー

顕微鏡 (Olympus FV1000) で詳細に観察し、記録した。一部の試料については、常法に従って電顕観察標本とし、透過型電顕 (TEM; Hitachi H7650) 下に観察・撮影した。

また、細胞間相互関係を詳細に観察するため、電顕レベルの解像度の得られる条件下に広汎にわたる観察を可能とする樹脂包埋した試料のイオンエッチング標本を作製し、走査型電顕 (SEM; Hitachi S800) 下に観察した。

以上の実験と並行して、蛍光観察と SEM 観察が同一試料について、移動することなく観察できるハイブリッド型顕微鏡 (FL-SEM) の開発・改良を試みた。この形態観察機器は、同じ切片を蛍光と電顕で観察することを可能とし、光顕レベルで蛍光標識された細胞を同一切片の SEM 観察により超微細形態レベルで同定し、解析することを可能とするものである。

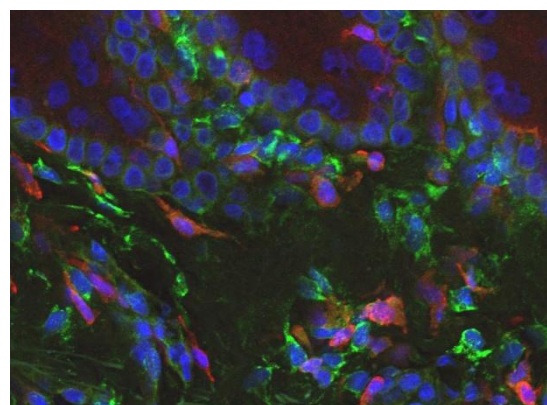
#### 4. 研究成果

EGFP トランスジェニックマウス骨髄の移植により作製した GFP 骨髄キメラマウスの角膜、皮膚、口腔粘膜を形態学的に解析することにより、それぞれの組織・臓器に特異的な様式で GFP 陽性の骨髄由来細胞が分布していることが明らかとなった。それぞれの組織・臓器においてみられる GFP 陽性細胞は、球形、楕円形、双極性、星状など、組織・臓器に特異的な形、大きさおよび分布比率を示しており、分布数も組織により異なっていた。また、それぞれの組織の GFP 陽性細胞の大半のものは、マクロファージマーカーである Iba1 を発現しており、免疫系細胞に分化した骨髄に由来する細胞であることが明らかとなった。

本研究の成果として 2009 年 3 月に米国解剖学会誌である *The Anatomical Record* に掲載された Takayama et al. の論文では、GFP 骨髄移植キメラマウスの角膜において、上皮内と実質内において骨髄由来 GFP 陽性細胞が観察されることを明らかにし、しかも分布領域の違いにより、それぞれ繊細な樹枝状突起をもつものと扁平な餅状の形態を示すこと

を報告した。この形態の違いは、そもそも異なる分化状態の細胞がそれぞれ異なる組織領域に分布したのか、または、もともとは同種の細胞が分布領域の微小環境により形態が規定されたのか、さらに検討する必要がある。また、大半の GFP 陽性細胞がマクロファージマーカーである Iba1 陽性であったものの、一部に Iba1 を発現しない GFP 陽性細胞が観察された。我々のこれまでの同様の実験モデル動物の観察において、心筋および骨格筋に明らかな GFP 陽性細胞の出現が確認されている。その機序は transdifferentiation か、または cell fusion によるものであるか不明であるが、骨髄に由来する細胞が末梢組織細胞に分化していることを示すものであり、そのような能力をもった骨髄由来細胞が末梢組織中に存在することを裏付けている。心筋・骨格筋組織以外にもそのような分化能力をもつ骨髄由来細胞が分配されている可能性は高い。今後、そのような骨髄由来細胞の細胞学的特徴、由来、運命を明らかにすることが重要である。

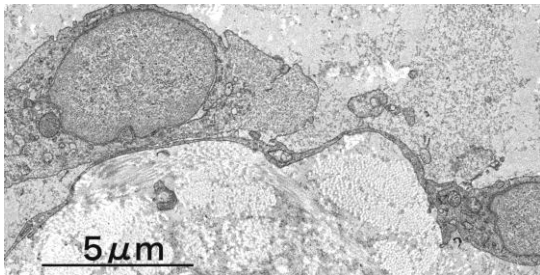
本研究において、さらに、コラーゲン線維産生能の指標である HSP47 (コラーゲン産生シャペロン) をマーカーとした免疫組織化学観察を試みたところ、様々な組織中において Iba1 陽性細胞が HSP47 陽性細胞と接触または近接する像が多く観察された (図 1 に歯肉の観察所見を示す。緑は HSP47、赤は Iba1、青は DAPI による核染色)。



[図 1]

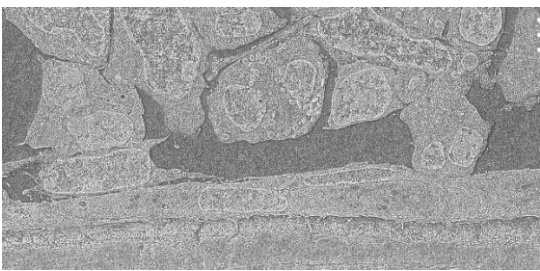
同様の試料の電子顕微鏡観察では、GFP 陽

性細胞と組織中の線維芽細胞様細胞が直接密に接触している様子が確認された。これまでのところ、ギャップ結合のような細胞間接着装置は見つかっていないが、隣接する細胞がそれらの細胞膜表面において広い領域にわたって緊密に接する像が頻繁に観察され、それら細胞同士の接着および密なシグナル伝達が予想された (図 2: 歯肉)。



[図 2]

次に、細胞間相互関係を詳細に観察するための骨髄の樹脂包埋、イオンエッチング試料の SEM 観察 (図 3) では、骨芽細胞と骨髄幹細胞の間に骨髄間質細胞 (reticular cell/stromal cell) の薄い突起が存在し、直接の接触は稀であった。この結果は、光顕レベルの観察では骨髄間質細胞の薄い突起は分解能の関係で明確ではなく、光顕観察にもとづく直接接触という理解による osteoblastic niche 仮説は必ずしも適切でない可能性を示している。このような解析は、電顕レベルの観察により初めて可能となるものであり、組織全体からすると頻度の低い現象であるため、あらかじめ光顕レベルで広範な観察をしておく必要がある。このような観察には、エッチング試料の FL-SEM 観察が効果的であった。



[図 3]

以上、今回の研究では、(1) 骨髄に由来する細胞が様々な末梢組織に組織特異的パターンをもって分布していることが明らかとなり、(2) それら細胞が組織固有の線維芽細胞様細胞と物理的に密な関係をもってしていることが明らかとなった。さらに詳細な解析が必要であるが、このような異種の細胞間相互作用は、末梢組織における組織幹細胞の niche としての役割を果たしていることも想像される。今後、これらの所見を一層詳細に検討し、細胞間相互作用について解析してゆく予定である。今回用いたキメラ動物では、骨髄移植に際して放射線照射をおこなっている。これまでに、通常の組織においては、正常動物の組織・細胞構築と差異や炎症等の所見は認められていないが、今後、解析において放射線照射の影響を考慮する必要もある。

以上の成果は、角膜、皮膚および口腔粘膜の真皮に特化して解析した結果を論文出版し、学会発表を行った。また、FL-SEM についても学会、論文として公表した。

以上、本研究により、様々な末梢組織に骨髄に由来する細胞が組織特異的形態をもって分布していることが明らかとなり、それらと組織在住の間葉あるいは結合組織性細胞との間に緊密な物理的接触があることが示すことができた。現在、CXCL12、PDGFR など、特有の chemokine あるいは成長因子受容体を発現する細胞が組織中に存在することが報告され、また、組織中の多種の細胞間相互関係についての報告も見られる。それらの分子を発現すると組織幹細胞との関連、niche など再生医学的観点から、これまでになかった人体の細胞構築の再考が進行している。また、人体のホメオスタシスを考える際、各組織で進行している細胞の形態および動態を知ることが生命現象を理解するためには必須のことであり、そのための新たな観察理論や機器の開発および一層の充実が望まれる。今後、今回の研究成果を基盤として、一層の発展のために必要な新しい研究機器の開発を目指すと共に、末梢組織に分布する骨髄由来細胞

の由来、可塑性、役割、動態等についてさらなる医学生物学的理解に貢献でき、ひいては再生医療の発展の一助となるよう研究を推進したい。

#### 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8件)

- ① Tetsuya Takayama, Teruyoshi Kondo, Masatoshi Kobayashi, Keisuke Ohta, Yoshihiro Ishibashi, Kei-ichiro Nakamura 11 番目/11 人: Characteristic Morphology and Distribution of Bone Marrow Derived Cells in the Cornea. The Anatomical Record. 292:756-763, 2009. 査読有り
- ② Toshiko Fujimura, Sho-ichi Yamagishi, Seiji Ueda, Kei-ichiro Nakamura 11 番目 / 12 人: Administration of pigment epithelium-derived factor (PEDF) reduces proteinuria by suppressing decreased nephrin and increased VEGF expression in the glomeruli of adriamycin-injected rats. Nephrol Dial Transplant. 24:1397-1406, 2009. 査読有り
- ③ Takaaki Kanemaru, Kazuho Hirata, Shin-Ichi Takasu, Kei-ichiro Nakamura 7 番目 / 7 人: A fluorescence scanning electron microscope. Ultramicroscopy. 109:344-349, 2009. 査読有り
- ④ 中村桂一郎: 特集 線維芽細胞をめぐる最新の知見. 細胞. 43:84, 2008. 査読無し
- ⑤ 金丸孝昭, 近藤照義, 高洲信一, 中村桂一郎 6 番目 / 6 人: 「ハイブリッド SEM」用試料作製法の確立過程. 医電技術誌. 22:38-39, 2008. 査読無し
- ⑥ 太田啓介, 東 龍平, 中村桂一郎: 加圧電圧 100kV の透過型電子顕微鏡を用いた電子線トモグラフィーによる微小構造の観察. 医電技術誌. 22:1:11-12, 2008. 査読無し
- ⑦ Teruyoshi Kondo, Kei-ichiro Nakamura, Norito Takamura, Jin Tokunaga: Up-regulation of  $\beta$  2-adrenergic receptor immunoreactivity in astrocytes in the spinal cord after dorsal rhizotomy.

九州保健福祉大学研究紀要. 9:153-161, 2008. 査読無し

- ⑧ 中村桂一郎: 末梢組織における骨髄由来細胞の形と分布様式. 細胞. 39:394-398, 2007. 査読無し

[学会発表] (計22件)

- ① 小林正利, 他: イオンエッチング法を利用した免疫組織化学切片の SEM 観察の試み. 第 50 日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会. 2008. 12. 6
- ② 横山 満, 他: Type I Collagen Fibril の電子染色像に関する考察. 第 50 日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会. 2008. 12. 6
- ③ 田上隆一郎, 他: ラット歯肉結合組織における線維芽細胞とマクロファージ. 第 50 日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会. 2008. 12. 6
- ④ 高野陽子, 他: GFP 発現組織の蛍光および透過型電顕のシームレス観察の試み. 第 50 日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会. 2008. 12. 6
- ⑤ 金丸孝昭, 他: 「FL-SEM」用切片試料作製法の検討. 第 50 日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会. 2008. 12. 6
- ⑥ 小林正利, 他: 骨髄における骨芽細胞とその他の細胞の相互関係の観察: 光顕から電顕へ. 日本解剖学会第 64 回九州支部学術集会. 2008. 10. 25
- ⑦ 太田啓介, 他: マウス真皮への骨髄由来細胞の関与とその細胞構成-骨髄キメラマウスを用いた研究. 第 49 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会. 2008. 10. 6
- ⑧ Tokumasa Hayashi *et al.*: The distribution and function of TRPM8 in bladder afferent neuron normal and bladder outlet obstruction rat. AUA Annual Meeting. 2008. 5. 18
- ⑨ Keisuke Ohta *et al.*: Electron Tomography Shows the Three Dimensional Actin Filament Architecture of Microvilli and Terminal Web of Rat Absorptive Epithelial Cells. 9th Asia-Pacific Microscopy Conference. 2008. 11. 4
- ⑩ 太田啓介, 他: STEM 電子線トモグラフィ

一法によるエポキシ樹脂包埋生物試料の微細構造観察. 日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会. 2008. 5. 23

- ⑪ 小林正利、他：骨格筋組織における骨髄由来細胞の分布. 第 113 回日本解剖学会総会全国学術集会. 2008. 3. 27
- ⑫ 太田啓介、他：末梢組織に分布する線維芽細胞と組織常在型マクロファージとの関連. 第 113 回日本解剖学会総会全国学術集会. 2008. 3. 28
- ⑬ 高山徹也、他：角膜に分布する骨髄由来細胞の組織学的観察. 第 113 回日本解剖学会総会全国学術集会. 2008. 3. 29
- ⑭ 中村桂一郎: Circulation Fibroblast? 第 49 回九州支部総会・学術講演会. 2007. 12. 1
- ⑮ Tokumasa Hayashi *et al.*: The distribution and function of TRPM8 in lower urinary tract normal and bladder outlet obstruction rat. 第 59 回日本泌尿器科学会西日本総会. 2007. 11. 10
- ⑯ 林 篤正、他:膀胱求心路に発現する TRPM8. 第 14 回日本排尿機能学会. 2007. 10. 6
- ⑰ 太田啓介、他：樹脂包埋生物試料の電子線トモグラフィ法における試料作成と撮影条件. 第 20 回九州電子顕微鏡技術研究会. 2007. 9. 8
- ⑱ 中村桂一郎、他：消化管壁にみられる骨髄由来細胞. 第 49 回日本平滑筋学会総会. 2007. 7. 5
- ⑲ Tsuyoshi SAGA *et al.*: An Anatomical Study of the Inferior Nasal Meatus Region of the Human Nasolacrimal Duct The 24th Annual Meeting of the American Association of Clinical Anatomists (第 24 回アメリカ臨床解剖学会). 2007. 6. 18
- ⑳ 金丸孝昭、他：「ハイブリッド SEM」用試料作製法の確立過程. 医学生物学電子顕微鏡技術学会. 2007. 5. 19
- ㉑ 太田啓介、他:加圧電圧 100kV の透過型電子顕微鏡を用いた電子線トモグラフィによる微小構造の観察. 医学生物学電子顕微鏡技術学会. 2007. 5. 19
- ㉒ 林 篤正、他：膀胱および L6, S1DRG での TRPM8 の発現. 第 95 回日本泌尿器科学会総会. 2007. 4. 16

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

「画像診断装置および診断方法」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 桂一郎 (NAKAMURA KEI-ICHIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20172398

### (2) 研究分担者

太田 啓介 (OHTA KEISUKE)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：00258401

小林 正利 (KOBAYASHI MASATOSHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30320154

高山 徹也 (TAKAYAMA TETSUYA)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70347029

金丸 孝昭 (KANEMARU TAKAAKI)

九州大学・大学病院・技能職員

研究者番号：60380515

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

田上 隆一郎

久留米大学・医学部・大学院生

岡 毅

久留米大学・医学部・大学院生

林 篤正

久留米大学・医学部・大学院生

東 龍平

久留米大学・医学部・技術職員

石橋 義広

久留米大学・医学部・嘱託職員