

平成 21年 5月23日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592079
 研究課題名（和文）血管内移植された骨髄由来間葉系幹細胞およびその分化誘導細胞の
 生体内動態の解析
 研究課題名（英文）Distribution of intravascular transplanted bone marrow derived
 mesenchymal stem cells and their derivatives.
 研究代表者
 橋本 尚詞（HASHIMOTO HISASHI）
 東京慈恵会医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80189498

研究成果の概要：組織内に移植された場合には腫瘍を形成する能力を有する骨髄由来の間葉系幹細胞も、正常動物の血管内に移植された場合には内皮細胞に妨げられて血管外に侵出して組織内に生着することができず、死滅消失してしまうことが明らかとなった。このことは、骨髄由来間葉系幹細胞は血管内に漏出して遠隔地に腫瘍を形成する可能性は低いことを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：骨髄由来間葉系幹細胞、血管内移植、C3H 特異抗原

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来間葉系幹細胞を培養下で種々の細胞に分化させ、障害のある組織・器官に移植して機能回復を図る試みがなされつつある。しかしながら、分化誘導をかけたとしても全ての細胞が同じように分化しているわけではなく、形態的にも組織化学的にもある程度の多様性が存在している。確かに、移植された細胞が臓器内に留まり、臓器としての機能発現に参画しているという報告は多数あるが、その一方で、培養下で分化させ、増殖能が低下した細胞でも再び脱分化して増殖能を回復し、さらに環境によって別の系統の細胞に分化していく能力を保持している

との報告もある。すなわち、移植された細胞がすべて臓器内に留まって機能しているのか、そこから離れて異所性に機能発現することはないのか、分化状態を維持しうるのか、脱分化したり、異なる方向に分化することはないのか、など疑問点はつきない。

2. 研究の目的

本研究は以下の問題点を解明することを目的として行った。

- (1) 正常成熟個体の静脈内に移植された骨髄由来間葉系幹細胞の体内分布と機能発現
- (2) 発生環境下にさらされた骨髄由来間葉系幹細胞の体内分布と機能発現

3. 研究の方法

(1) BALB/cA^{-CSA}系マウス特異的抗CSA抗体の免疫染色法の検討

BALB/cA^{-CSA}系マウスとBALB/cA系マウスを材料として、パラフィン切片上、厚切り切片上、および培養細胞に対して、抗CSA抗体を用いて免疫染色を行うに当たっての固定法、前処理法の検討を行った。

(2) BALB/cA^{-CSA}系マウス骨髄由来間葉系幹細胞の分離

BALB/cA^{-CSA}系マウスの大腿骨より髄腔内の細胞を取り出して培養し、非付着性細胞を除いた後、トリプシン-EDTA処理による培養ディッシュへの付着性の違いを利用し、あるいはコロニアルクロニング法にて骨髄由来間葉系幹細胞を分離した。

(3) 骨髄由来間葉系幹細胞の性状確認

得られた骨髄由来間葉系幹細胞をBALB/cA系マウスの新生仔の頭蓋内、あるいは成獣雄の脾臓、精巣内に移植し、腫瘍形成及び分化能を調べた。

(4) 骨髄由来間葉系幹細胞の血管内移植と生体内分布の解析

得られた骨髄由来間葉系幹細胞をBALB/cA系マウスの大腿静脈内に移植し、その後の生体内分布について経時的に試料を採取してBALB/cA^{-CSA}系マウス由来細胞の分布を検索した。

(5) 抗CSA抗体反応部位検出に伴う非特異的反応の検討

抗CSA抗体はマウスのモノクローナル抗体(IgG1)であるため、第2抗体は内在性のIgG1とも結合してしまい、内在性IgG1を持った細胞が多い臓器では、陽性を示している細胞が抗CSA抗体に陽性な、真のBALB/cA^{-CSA}系マウス由来であるのか、内在性IgG1を持っていた擬陽性であるのかの判定が困難な場合がある。そこで、1)ビオチン標識ヤギ抗mouse IgG1抗体、2)抗CSA抗体、3)Alexa546標識抗mouse IgG1抗体、4)FITC標識Avidinの順に反応させ、陽性と擬陽性の鑑別を試みた。

(6) 羊水内移植された骨髄由来間葉系幹細胞の体内分布と機能発現

骨髄由来間葉系幹細胞を妊娠10日目の羊水内に移植した。

4. 研究成果

(1) BALB/cA^{-CSA}系マウス特異的抗CSA抗体の免疫染色法の検討

腎臓と肝臓のパラフィン切片を用いて検討した結果、固定法としてはピクリン酸とホルマリンと酢酸の混合液であるブアン固定液で固定した場合が最も染色性が高く、前処理法としては0.05Mのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)で15分間のオートクレーブ処理を行ったものが最良の結果が得られた。

同固定液で固定した組織は、緩衝液で洗浄後に厚切り切片として、デオキシコール酸で処理しても抗CSA抗体で染色可能であった。また、培養細胞の場合は、酢酸アルコール、あるいは-20°Cの100%メタノール固定で最良の結果が得られた。

(2) BALB/cA^{-CSA}系マウス骨髄由来間葉系幹細胞の分離

マウスの骨髄由来間葉系幹細胞は特性が明確ではなく、系統によって異なったマーカーが報告されている。そこで、本研究では、大腿骨骨髄より付着系細胞を分離し、1)採取後2回継代された細胞、2)継代を繰り返した結果、神経細胞様あるいは敷石状に増殖する性質を示すようになった細胞、これらはCD49e (Integrin $\alpha 5$)とCD29 (Integrin $\beta 1$)に陽性で、一部がCD44陽性であるが、CD34 (STRO-1)には陰性であった。3)骨髄由来の付着細胞を培養中に敷石状で重層化して盛り上がってきた細胞塊よりコロニアルクロニング法を用いて分離された細胞、これらはCD49e陽性、一部がCD29陽性、CD34陽性、CD44陽性であり、また一部は幼若神経細胞マーカーであるNestinに陽性を示した。

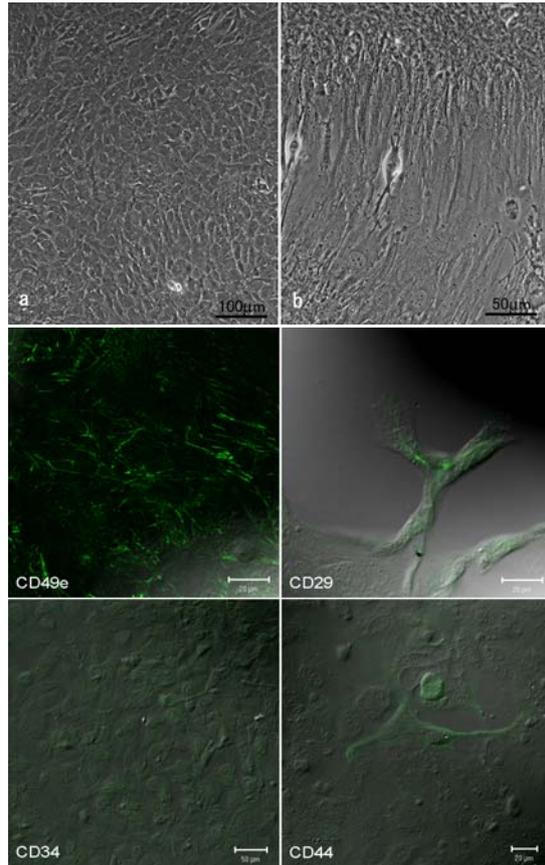


図1 継代によって得られた骨髄由来間葉系幹細胞(a:敷石状を呈する。b:神経細胞様を呈する。)とそのマーカーに対する反応性

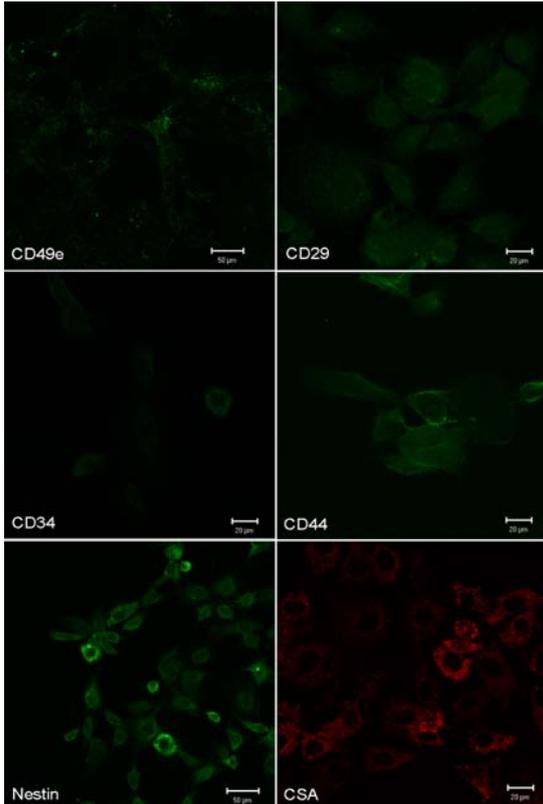
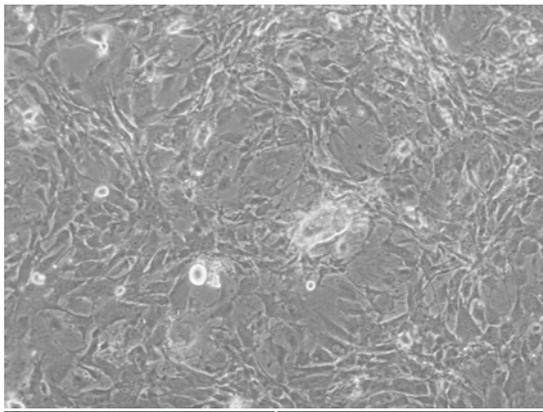


図2 コロニアルクローニング法で得られた骨髄由来間葉系幹細胞と各種マーカーに対する反応性

(3)骨髄由来間葉系幹細胞の性状確認

上記(2)で得られた2)あるいは3)をマウス新生仔の頭蓋内、成獣の精巣や脾臓に移植した。3)の細胞を頭蓋内に移植したところ、頭蓋の皮下に腫瘍を形成した。この腫瘍は一部頭蓋骨の形成を阻害して頭蓋腔内にまで成長していたが、髄膜で境界されていて脳内には侵入していなかった。この腫瘍は主に紡錘形を呈したCSA陽性細胞で構成されており、神経細胞様に分化したCSA陽性細胞も散見された。しかし、骨細胞や血管内皮細胞はCSA陰性であった。また、脳内にもCSA陽性細胞は認められなかった。

脾臓や精巣に移植された2)の細胞も同じく腫瘍を形成した。しかしながら、正常構造

を示している組織とは線維性皮膜等で隔絶されていた。どちらの腫瘍も内部には膜性化骨を起こして骨形成をしている部位があり、骨細胞、骨間の紡錘形をした結合組織細胞、血管内皮細胞などはCSA陽性であった。しかしながら、CSA陽性細胞が正常構造の組織構築に参加していることはなかった。また、脾臓に形成された腫瘍では、骨髄様の構造を形成し、その細網細胞はCSA陽性であったが、そこに見られた造血系細胞はCSA陰性であった。

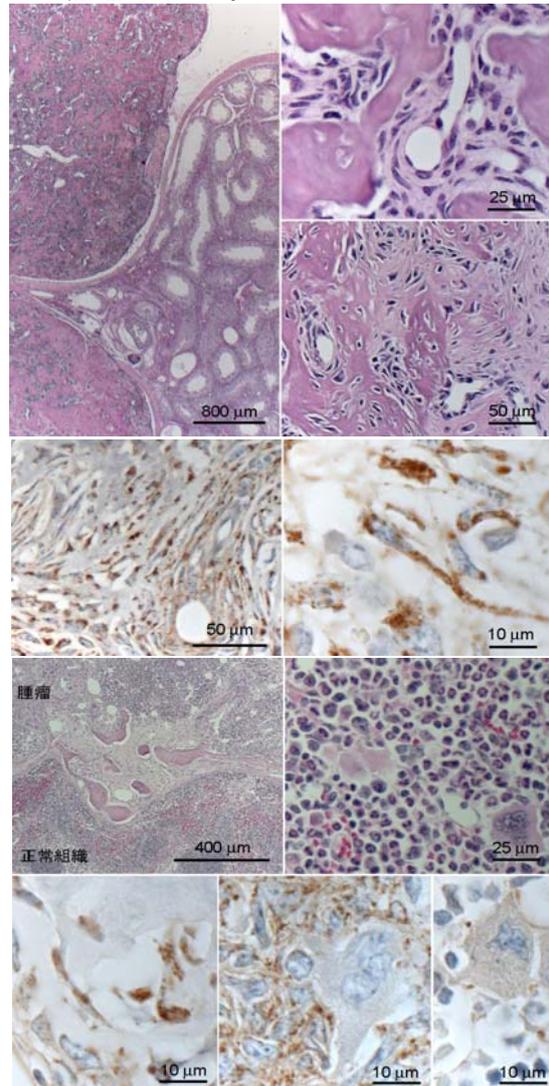


図3 精巣(上)と脾臓(下)に形成された腫瘍のHE染色像とCSAの免疫染色像

(4)骨髄由来間葉系幹細胞の血管内移植と生体内分布の解析

上記(3)の1)~3)の細胞を大腿静脈より血管内に移植し、その後の分布について経時的に観察した。その結果、まず1カ月後で観察したところ、全身の各臓器内でCSA陽性細胞は全く検出されなかったため、移植直後より調べていくことにした。移植直後では、肺の血管内に多数のCSA陽性細胞が散在

しているのを認められたが、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、脳等の肺以外の臓器内には全く検出されなかった。移植後1日目、2日目、3日目、と日が進むにつれて、肺の血管内のCSA陽性細胞は数が減少していき、4日目までは確認可能であった。しかしながら、いずれの日においても肺以外の臓器にCSA陽性細胞が認められることはなかった。

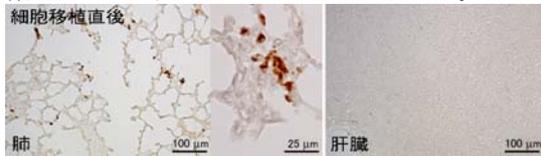


図4 骨髄間葉系幹細胞移植直後の肺と肝臓のCSA陽性細胞

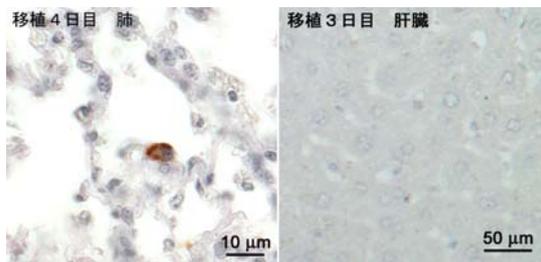


図5 移植4日目の肺に見られたCSA陽性細胞と移植3日目の肝臓

(5)抗CSA抗体陽性部位検出に伴う非特異的反応の検討

一般にマウスの組織をマウスモノクローナル抗体を用いて免疫染色する場合には、内在性のマウスIgGが反応し、特異的か非特異的か反応かの判断が困難な場合がある。今回の抗CSA抗体もマウスのIgG1であるため、その確認法について検討を行った。その結果、抗CSA抗体で反応させる前に、内在性IgG1をビオチン化抗マウスIgG1抗体で反応させておき、Alexa546標識の抗マウスIgG1抗体で反応させた後に、FITC標識アビジンで反応させると、特異的に染色されている部位からは、Alexa546の蛍光のみが検出されるのに対し、内在性IgG1が存在する部位からは、Alexa546の蛍光と共にFITCの蛍光も検出されるため、両者の蛍光の局在部位を比較するか、あるいは両者の画像を重ね合わせることにより、特異的反応と非特異的反応とを鑑別することが可能であった。

(6)骨髄由来間葉系幹細胞の羊水内移植

骨髄由来間葉系幹細胞を41個体の羊水中に移植したところ、正常に出生し、生育したのは1個体のみであり、この個体内にCSA陽性細胞は認められなかった。

(7)結果の総括

本研究では、臓器再生等を目的として移植された細胞内に含まれていた、あるいは

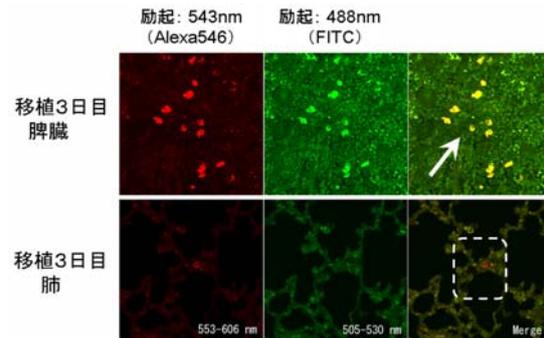


図6 抗CSAマウスモノクローナル抗体の陽性と疑陽性鑑別
白矢印で示す脾臓の黄色蛍光を発している細胞は、抗CSA抗体の局在を示しているAlexa546の蛍光を発しているが、内在性のIgG1を示すFITCの蛍光も発しており、疑陽性であると判断できる。白点線で囲んだ肺の赤色蛍光を発している細胞は、FITC陰性であり、抗CSA抗体に特異的に反応した陽性細胞と判断できる。

脱分化を起こして生じた、骨髄由来間葉系幹細胞が血管内に入り込んだ場合に生体内でどのようなことが起こるかを解明するために実験を行った。その結果、骨髄由来間葉系幹細胞は血管内に入り込んだとしても、当初は肺内の毛細血管に引っ掛かって生存しているが、肺を含め健全な臓器では毛細血管を突破して外部に侵出して生着することはなく、死滅してしまうものと考えられる。

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)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 尚詞 (HASHIMOTO HISASHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：80189498

(2)研究分担者

日下部 守昭 (KUSAKABE MORIAKI)
(財)動物繁殖研究所・実験動物研究センター・主席研究員
研究者番号：60153277

(3)連携研究者