

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12567

研究課題名(和文) 移植治療用細胞の遺伝的不安定性の指標となるマーカーの探索

研究課題名(英文) The search of the marker which becomes the index of the genetic-instability of the cell for the cell therapy

研究代表者

奥田 一博 (OKUDA, Kazuhiro)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00169228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞治療用細胞の品質管理について効率的かつ定量的な検査法を検討することが本研究の目的である。DNA傷害に関連したマーカー発現に着目し、フローサイトメーター(FCM)あるいは免疫蛍光染色により細胞表面マーカー、細胞接着因子、増殖因子受容体、細胞周期関連蛋白の動態を解析した。線照射により細胞増殖が抑制され細胞と核が肥大化したことに加え、 γ -H2AXが過剰発現した。しかしデジタルホログラフィック顕微鏡(DHM)により線を照射した生細胞を観察したところ、細胞サイズに関する指標のみ変化があり、DNA傷害に関連したマーカーは大幅に上昇はしなかった。これよりDHMは細胞品質管理に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim was to examine the efficient and quantitative method to assure the quality of cells to be used in cell therapy. Focused on the DNA damage markers, it was analyzed the movement of the cell-surface marker, the cell adhesion factor, the growth receptor and the protein related cell cycle using the flow cytometry (FCM) or the immunofluorescent staining. It was demonstrated that γ -ray-irradiation suppressed proliferation, enlarged cells and cell nuclei, and upregulated γ -H2AX. However, when observing the living cell which irradiated a γ -beam with the digital holographic microscope (DHM), there was a change only in the indexes related to cell size and the marker which is related to DNA damage repair were not substantially upregulated. Instead of DNA damage markers, we suggest that cell morphological parameters that are monitored by DHM could be a useful for the cell quality control.

研究分野：歯周病学

キーワード：再生治療 移植治療用細胞 酸化ストレス DNA傷害 間葉系幹細胞 骨膜細胞 細胞形態 細胞品質管理

1. 研究開始当初の背景

再生治療に用いる細胞は、移植前に様々な品質試験を受ける。そのほとんどは微生物の混入の可能性を排除するためのものであり、細胞自体の品質については染色体検査だけである(下図)。しかし、この染色体試験は、時間がかかるうえに、限られた数の細胞(約 10^{6-7} 個中10個程度)に対する手作業的定性試験であり、工業製品における抜き取り試験の効率(約 10^3 個中3-5個程度)の比ではない。従って、見落としが起きる危険性は高い。我々は、より効率的かつ定量的な検査法を模索して、DNA 傷害に関連したマーカーについて検討した。培養骨膜細胞に対して、さまざまな酸化ストレスを与えた場合、親和性の高い抗体が利用できるリン酸化 H2AX (γ -H2AX)と p53 の発現を鋭敏に検出できること、特に酸化ストレスが大きい場合は1週間以上にわたって検出できることを発見した(Kawase, Okuda *et al.*, *Cytotherapy*, 17:112-123;2015)。しかし、酸化ストレスが弱い場合は一過性の発現のため、見逃してしまうことも多い。一般的にDNA 傷害はp53により修復されると考えられているが、むしろ細胞周期に依存してG1/G0期にある細胞の場合、その修復は不完全であると理解すべきである。これが遺伝的不安定性の誘発に繋がっていると説明される(Limoli *et al.*, *Cancer Res*, 57:40-48;1997)。従って、double-strand breaks (DSBs)というDNA二重鎖切断だけでなく、一重鎖切断や酸化型塩基損傷や脱塩基部位生成などを傷害やそれらの修復履歴を示唆するようなマーカーを見つけることが肝要であり、それによって遺伝的に不安定な細胞を移植治療から排除し、より安全性の高い再生治療を担保することができる。

2. 研究の目的

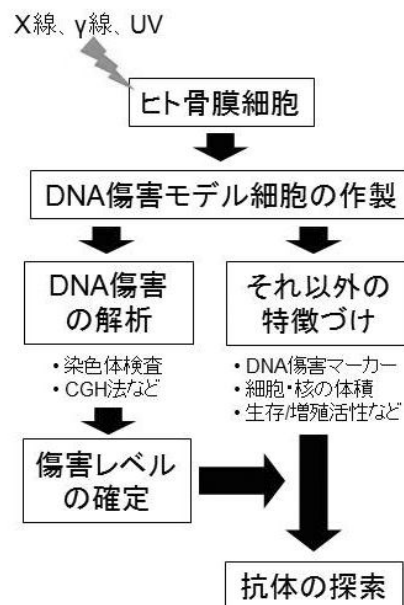
移植治療用の細胞は、防御機構の乏しい培養環境において、培養操作をはじめとする様々なストレスに曝されている。DNA や細胞内小器官や細胞膜が傷害を受け、培養者が気づかないまま移植に適さない細胞になっている可能性に常に注意を払う必要がある。本研究では、品質管理技術の向上を目標として、酸化ストレス刺激細胞モデルを用いて、遺伝的不安定性を示唆する指標となるマーカーを探索し技術基盤を確立することを目的とする。培養細胞に酸化ストレスを与えDNA 傷

害を形成し、通常の染色体検査およびCGH(Comparative Genomic Hybridization)法による染色体コピー異常の網羅的検出により得たデータを得る(基本情報とする)。並行して、入手可能な可能な限り収集したDNA 傷害に関連した蛋白の抗体を用いて行った分析結果と比較検討する。この作業の繰り返しの中から、比較的小規模なDNA 傷害や不完全修復に対しても鋭敏かつ長期間にわたって検出できるマーカーを絞り込む。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレス刺激細胞モデルの作製

同意のもとドナーから骨膜片を採取する。組織片培養により細胞をシート状のまま増幅する。直径が40-60mmになった時点で分散させ実験に供する。ヒト骨膜細胞に対して、X線、 γ 線、紫外線(UVA or UVC)、あるいは H_2O_2 で酸化ストレスを与える。染色体検査(Karyotype test)とCGH (Comparative Genomic Hybridization)法により、染色体異常(コピー数の欠失・過剰)を直接検出する。最も重要なモデル細胞は、検出可能な程度のDNA傷害を引き起こすレベルのストレスを与えることによって、ほとんどの細胞が生存して、一定期間後に再び増殖活性を示すものであり、その条件を見極める。なお、染色体検査は新潟大学病院の細胞処理センターの解析装置を利用する。



(2) DNA・染色体以外のキャラクタリゼーション

平行して、細胞の増殖/生存と γ -H2AXの核

内集積(foci形成)からDSBsを評価してスクリーニングする。

フローサイトメーター(FCM)あるいは免疫蛍光染色(IF)により、細胞表面マーカー(CD73など)、細胞接着因子(integrinなど)、増殖因子受容体(EGFRなど)、細胞周期関連蛋白(p21, cyclin Dなど)の動態を解析する。

FCMにより細胞および核の体積(Electronic volume)を計測評価する。

原子間力顕微鏡(AFM)により単一細胞レベルで細胞接着力を計測評価する。接着力は増殖活性の低下や細胞の老化と相関して強くなる傾向がある。

βガラクトシダーゼ染色やリン酸化retinoblastoma protein (Rb)の発現より生存細胞の老化度を評価する。

(3) マーカー分子の探索

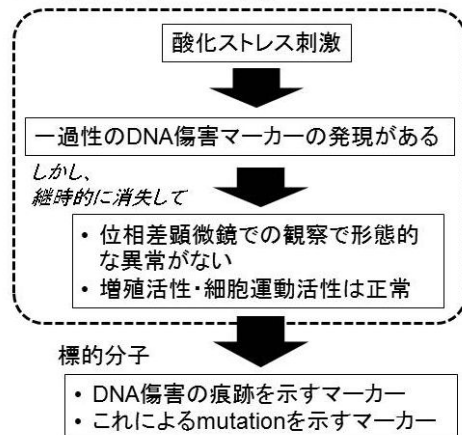
DNA 傷害マーカーと分類されている抗体を用いて、Western blot 法あるいは免疫蛍光染色 (IF)により、マーカー分子の発現を評価する。文献等で目星をつけながらも、膨大な数の市販品のなかから、特異性が高く、DNA 修復後もその痕跡を示すようなマーカーを見つける(下図参照)。経済的なサンプリング・キットなどを積極的に活用する。

前項の FCM などによるキャラクターゼーションで変化の認められた表面マーカーなどについても、さらに長期間にわたって追跡評価する。

メチル化 DNA を DNA アレイにより網羅的に解析し、DNA 傷害や細胞老化と関連のあるサイトを絞り込む。

DNA 傷害から回復し、再び増殖活性を示すようになった細胞について、集中的に検討する。

■ 理想的とするモデル細胞



4. 研究成果

(1) 酸化ストレス刺激細胞モデルの作製

ヒト骨髄細胞に対して、X線、γ線、紫外線(UVC)あるいは過酸化水素(H₂O₂)で酸化ストレスを与え、DNA 傷害細胞モデルを作成し、さらにその最適化を図った。染色体検査とCGH (Comparative Genomic Hybridization)法により、染色体異常を直接検出した。最適なモデル細胞は、検出可能な程度のDNA 傷害を引き起こすレベルのストレスを与えることによって、一時的に増殖を停止しても、ほとんどの細胞が生存して、一定期間後に再び増殖活性を示すものであり、4Gy以下の照射線量のX線(γ線)によって可能であることを見出した。UVCやH₂O₂によってもDNA 傷害は認められるものの、細胞膜傷害により細胞の生存率が有意に低下することから、参考データ取得のためのモデル細胞として採用した。

(2) DNA・染色体以外のキャラクターゼーション (Western blot 法による)

移植治療用細胞の品質管理技術は、細胞分化マーカーの発現を指標としたポジティブ選択が中心であり、「不良品」の排除という発想は染色体検査に反映されているだけである。しかし、この方法は効率が悪く、染色体異常が検出されないことを「不良品がない」とこと短絡していいのか疑問が残る。短時間で鋭敏かつ定量的に変異を検出する技術の開発が望まれている。そこで、DNA 二重鎖切断の検出と修復に関与する蛋白に注目し、それらの指標とした検出法の有用性について検討した。フローサイトメーターによりモデル細胞の細胞周期、細胞と核の大きさとCD44の発現を評価するとともに、Western blot 法により γ-H2AX, p53, p21 と PCNA の発現レベルを評価した。それぞれの酸化ストレスの用量依存性に細胞増殖は抑制され、一部の細胞には早期の老化を示唆する βガラクトシダーゼの発現が認められた。UVC や H₂O₂ では高用量によって、非アポトーシス細胞死が誘導されるが、最適な用量を選択することによって、あるいは酸化ストレスとしてX線(γ線)を選択することにより、細胞死は免れた。これらの最適化された細胞モデルについては、酸化ストレスを与えた直後から γ-H2AX と p53 の発現を亢進させた。これらの変化は8日間継続した。

以上の所見から、-H2AX と p53 を指標とすることで、比較的長期間 DNA 傷害の履歴をモニターできる可能性が示唆された。

(3) DNA・染色体以外のキャラクタリゼーション (Flow-cytometer 法による)

Western blot 法による指標タンパクの検出は半定量的で相対的な比較には向いているが、実際の出荷前品質検査を想定すると、ある程度絶対的評価ができる方が好ましい。そこで、flow-cytometer (FCM)により定量的評価を試みた。FCM 法は、ほかにも感度が高いこと、細胞体積の定量が可能なことやサンプルのプレパレーションから測定評価までの時間が短時間で済むというメリットがあり、多数のサンプルを扱う実践に向いた方法といえる。指標としては、上記の -H2AX と p53 に加えて、p21 と Rb protein についても検討した。細胞体積については、固定処理によって 30-50%縮小するものの、顕微鏡による評価と基本的に一致したものであった。すなわち、線照射モデル細胞において、細胞と核の大きさは膨化した。また、それと並行して、-H2AX と p21 の発現が亢進し、細胞増殖は抑制された。これらの変化は 12 日間持続するもので、Western blot 法による評価よりも長期間にわたって DNA 傷害履歴をモニターできる評価法として FCM 法が有用であることが示唆された。なお、同様の変化を IF 法によっても観察できた。IF 法は定性的な評価法であるが、細胞移植にとって損失にならない程度の少数の細胞で実施できるというメリットがあり、FCM 法とうまく組み合わせることで、それぞれのケースに応じた(特に、少数の細胞しか加工できなかった場合など)スクリーニング法になりうる可能性を明らかにできた。

(4) デジタルホログラフィック顕微鏡(DHM)による非接触的細胞品質評価の試み

上記の DNA 修復タンパクのリン酸化は、骨膜細胞では 1 週間近く発現が亢進した状態が保たれるが、間葉系幹細胞(MSC)では、発現が亢進した指標も数日でベースラインに戻ってしまうことが判明し、細胞によっては指標として有用性に劣ることが明らかになった。そこで、時間・コスト・感度・サンプルの犠牲程度などから、再度実用的で鋭敏な指標の探索に着手した。いくつかの候補の中から、近年実用化された光干渉技術を応用し

た顕微鏡(DHM)による細胞形態の非接触的・定量的解析法の有用性を検討した。40 種以上の評価指標のなかで線照射による形態変化の指標として有用な指標は細胞のサイズに関するもの(接着面積, 高さ, 体積)だけであった。骨髄と脂肪組織という由来の異なる 2 種類の MSC は、ともに骨膜細胞に比べて線に対する感受性が高く 1Gy に対して有意に膨化した。一方、骨膜細胞と異なり、DNA 修復タンパクの持続的発現亢進は認められなかった。骨膜細胞と同等の増殖活性にもかかわらず、MSC は放射線に関する感受性が高く、その細胞形態の変化は DHM によって定量化できた。よって、DHM は MSC の細胞品質管理におけるスクリーニングにおいて有用であることが示唆された。

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 2 件)

Kawase T, Okuda K, Magata M (他3名、1,2,3 番目). Non-invasive, quantitative assessment of the morphology of γ -irradiated human mesenchymal stem cells and periosteal cells using digital holographic microscopy.

International Journal of Radiation Biology. 92(12):796-805;2016. 査読有. DOI: 10.3390/dj5010007

Kawase T, Hayama K, Tsuchimochi M, Magata M, Okuda K (他3名、1,4,5 番目).

Evaluating the safety of somatic periosteal cells by flow-cytometric analysis monitoring the history of DNA damage. Biopreservation and Biobanking. 14(2):129-137;2015. 査読有. DOI: 10.1089/bio.2015.0072

[学会発表](計 1 件)

川瀬 知之, 奥田 一博, 永田 昌毅, (他 3名、1,2,3 番目). デジタルホログラフィック顕微鏡による非接触的細胞品質評価の試み. 第16回日本再生医療学会総会、2017.3.7. 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 一博 (OKUDA, Kazuhiro)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号： 00169228

(2) 研究分担者

川瀬 知之 (KAWASE, Tomoyuki)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号： 10463978

永田 昌毅 (NAGATA, Masaki)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号： 10242439

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()