

平成 21 年 5 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006 年度～2008 年度

課題番号：18300144

研究課題名（和文） 幹細胞の分化誘導における分化度の非侵襲的計測法の構築

研究課題名（英文） Development of noninvasive estimation of differentiation from stem cells

研究代表者

高木 睦 (TAKAGI MUTSUMI)

北海道大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20263212

研究成果の概要： 骨髄間葉系幹細胞をディッシュ底面に接着し分化誘導因子を添加して軟骨細胞への分化培養を行い、位相差顕微鏡にて観察するとともに、分化度の指標としてアグリカン mRNA の発現率(%)を定量した。その結果、分化誘導培養中のアグリカン mRNA 発現率が、全細胞数に占める大きい多角形細胞(多角形度(=面積/(長径)²)が 0.3 以上かつ接着面積が 4000 μm^2 以上である細胞)の数の割合に比例することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	9,900,000	2,970,000	12,870,000

研究分野：動物細胞培養工学

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：再生医療、細胞分化、診断、間葉系幹細胞、細胞形態、非侵襲的

1. 研究開始当初の背景

急速に実用化が進められている培養皮膚、培養軟骨など成熟組織細胞を増殖させて用いる再生医療で得られる科学的知見や経験を土台にし、幹細胞を用いたより広範囲な再生医療へと発展することが期待されていた。ここでは細胞の増殖のみならず分化を制御せねばならず、そのためには効率的な分化誘導培養法の開発は言うまでもないが、細胞の分

化状態を非侵襲的に診断する技術の確立が不可欠であった。

2. 研究の目的

本研究では、非侵襲的に得られる細胞の顕微鏡観察画像をもとにして細胞の分化状態を診断する新規診断方法の基礎を確立することを目的にした。より具体的には、ヒト骨髄間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化誘導培

養系において、顕微鏡観察で得られる細胞の形態的特長から、軟骨細胞特有な遺伝子の発現率を、細胞1個単位で診断できることを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSC) を10%ウシ胎児血清含有 DMEM 培地を用いてディッシュに播種し (0.75×10^3 および 1.5×10^3 cells/cm²)、37°C、5% CO₂ の雰囲気下で細胞を接着させた後、分化誘導因子としてデキサメタゾン、TGF- β_3 および IGF-1 を含む DMEM 培地に交換し、さらに1~21日間培養した。これらの細胞の倒立顕微鏡像を経時的にデジタル保存すると共に、細胞をトリプシン処理により回収し軟骨細胞の特徴の一つであるアグリカンの mRNA 発現率を定量的 RT-PCR 法によりヒト初代軟骨細胞をポジティブコントロールとして定量した。細胞画像をプリントアウトし、細胞の長径を測定した。また、細胞の形に沿って切り取り秤量し細胞の面積を算出した。面積の値を長径の値で割った値を便宜的に短径と考え、短径/長径比を算出した。

(2) 10%ウシ胎児血清のほかには分化誘導因子としてデキサメタゾン、TGF- β_3 および IGF-1 を含む DMEM 培地を用いて、ヒト骨髄由来 MSC を用いて、軟骨細胞への最も一般的な分化誘導培養法であるペレット培養を行った。ペレット培養後の細胞を播種密度 (1.5×10^3 cells/cm²) で細胞培養ディッシュ (Corning, 21 cm²) に播種し 37°C、5% CO₂ の雰囲気下で1日培養して接着させた後、任意の細胞について細胞形態を解析した。すなわち、細胞画像をプリントアウトし、細胞の長径を測定した。また、細胞の形に沿って切り取り秤量し細胞の面積を算出した。面積の値を長径の値で割った値を便宜的に短径と考え、短径/長径比を多角形度と定義し算出した。細胞形態解析と共に、その細胞近傍へフェムト秒レーザー (100 Hz, 1/60 sec/ショット) を照射して細胞1個を剥離しプラー (PC-10,

NARISHIGE) で回収した。回収した1細胞から mRNA を抽出し、1細胞定量的 RT-PCR によりアグリカン発現を定量した。

(3) ヒト MSC から軟骨細胞への分化培養において、MSC 特有の複数の表面抗原の有無を定量的に解析することにより、軟骨への分化と細胞形態との関連性のより直接的な証明に資することを目的とした。

TGF- β_3 と IGF-1 を含む培地を用いて24穴プレート (1.8 cm²) 底面上でヒト骨髄由来 MSC を分化培養し、細胞形態を解析するとともに免疫蛍光染色により CD90、CD166 の有無を調べた。この時、対照として繊維芽細胞と軟骨細胞を同時に染色し、蛍光輝度値の閾値を決定した。

4. 研究成果

(1) 細胞のアグリカン mRNA の発現率は培養中経時的に増加した。一方、培養初期は長細い形態をした細胞が大部分だったが、円形に近い形態をした細胞の割合が経時的に増加した。一方、分化誘導因子を含まない培地で培養した細胞にも丸い形態をしたものが少数存在したが、それらは比較的面積の小さいものがほとんどであった。

以上の観察結果を参考にし、丸い細胞は短径長径比が比較的大きいと考え、面積値と短径/長径比の組み合わせの中から、アグリカン発現率と相関関係をもつパラメータを検索した。その結果、[面積 > 4000 μm^2] かつ [短径/長径 > 0.3] の条件を満たす細胞数が全細胞数に占める割合に対して、アグリカンの発現率をプロットした場合に比較的高い相関関係 ($r^2=0.98$) という高い相関関係が得られた。以上のことから、細胞形態の顕微鏡観察画像の解析により間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化度を非破壊的・非侵襲的に診断できる可能性が明らかとなった。

(2) 接着面積が 4,000 μm^2 以上かつ多角形度が 0.3 以上の細胞 (大きい多角形細胞) は全

て、ヒト正常軟骨中の軟骨細胞における発現に比較して 10%以上の高いアグリカン発現率を示した。このことから、MSC の軟骨細胞への分化培養において、培養中の細胞形態から軟骨細胞への分化を診断できる可能性が 1 細胞単位で示された。

(3) 分化培養後の MSC において、大きい多角形細胞に含まれる CD90 陰性または CD166 陰性の細胞の割合は約 80%と高く、逆に、CD90 陰性または CD166 陰性の細胞に含まれる大きい多角形細胞の割合も 60%以上と高かった。この結果は主観的に CD90 の有無を判断した従来の結果とほぼ同じであったが、客観的に判断したことから、この細胞診断方法の信頼性は高まったと考えられた。

2 重免疫蛍光染色結果の客観的判断と細胞形態解析に基づき、大きい多角形細胞が高い割合で CD90、CD166 に陰性であり、軟骨系統細胞に分化している細胞である可能性がより高くなった。

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 1 件)

① M. Takagi, T. Kitabayashi, S. Koizumi, H. Hirose, S. Kondo, M. Fujiwara, K. Ueno, H. Misawa, Y. Hosokawa, H. Masuhara, and S. Wakitani

Correlation between cell morphology and aggrecan gene expression level during differentiation from mesenchymal stem cells to chondrocytes.

Biotechnology Letters, 30, 1189-1195 (2008).

[学会発表] (計 16 件)

① 高木 睦 「移植用接着動物細胞の非侵襲的品質評価法」 農芸化学学会年会、2009年3月27日 (福岡、福岡国際会議場)

② 藤原政司、高木 睦 「移植用接着動物細胞の非侵襲的品質評価法」 第 21 回代用臓器・

再生医学研究会総会、2009年1月31日 (札幌、札幌医科大学基礎医学研究棟)

③ 高木 睦、北林 孝之、小泉 覚、廣瀬遥香、藤原 政司、上野 貢生、三澤 弘明、細川 陽一郎、増原 宏、脇谷 滋之 「NONINVASIVE ESTIMATION OF AGGREGAN GENE EXPRESSION LEVEL BASED ON CELL MORPHOLOGY ANALYSIS DURING DIFFERENTIATION FROM HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS TO CHONDROCYTES」 JAACT 2008、2008年11月24日 (福岡、福岡国際会議場)

④ 高木 睦 「NONINVASIVE ESTIMATION OF AGGREGAN GENE EXPRESSION LEVEL BASED ON CELL MORPHOLOGY ANALYSIS DURING DIFFERENTIATION FROM HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS TO CHONDROCYTES」 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition、2008年10月12日 (中国・大連、Dalian World Expo Center)

⑤ 高木 睦 「レーザーを利用した細胞の診断と操作：特に再生医療へのアウトプット」 動物細胞工学シンポジウム、2008年8月4日 (東京、東京工業大学百年記念館)

⑥ 高木 睦、北林 孝之、小泉 覚、廣瀬遥香、藤原 政司、上野 貢生、三澤 弘明、細川 陽一郎、増原 宏、脇谷 滋之 「間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化度の細胞形態による非侵襲的モニタリング法開発」 再生医療学会、2008年3月13日 (名古屋、名古屋国際会議場)

⑦ 高木 睦、北林 孝之、小泉 覚、近藤真一、藤原 政司、上野 貢生、三澤 弘明、細川 陽一郎、増原 宏、脇谷 滋之 「Noninvasive Estimation of the Aggrecan Gene Expression Rate during Differentiation from Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes Based on Morphological Analysis」 国際再生医療学会 (TERMIS-AP 2007)、2007年12月3日 (東京、グランドプリンスホテル赤坂)

⑧ 高木 睦 「移植用細胞の非侵襲的診断法の開発」 日本生物工学会北日本支部札幌シンポジウム、2007年11月21日 (札幌、

北海道大学)

⑨高木 睦、北林 孝之、小泉 覚、藤原 政司、上野 貢生、三澤 弘明、細川 陽一郎、増原 宏、脇谷 滋之「間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化の細胞形態による非侵襲的診断法開発」日本生物工学会年会、2007年9月25日(東広島、広島大学)

⑩高木 睦、北林 孝之、小泉 覚、藤原 政司、上野 貢生、三澤 弘明、細川 陽一郎、増原 宏、脇谷 滋之「間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化の細胞形態による非侵襲的診断法開発」化学工学会秋季大会、2007年9月13日(札幌、北海道大学)

⑪高木 睦、北林 孝之、藤原 政司、上野 貢生、三澤 弘明、細川 陽一郎、増原 宏、脇谷 滋之「フェムト秒レーザーを利用した単一接着細胞の遺伝子発現解析」日本生物工学会、2006年9月11日(豊中、大阪大学豊中キャンパス)

⑫高木 睦「接着動物細胞の形態解析による非侵襲的分化診断の試み」日本生物工学会年会シンポジウム、2006年9月11日(豊中、大阪大学豊中キャンパス)

⑬高木 睦、近藤真一、小泉 覚、梅津洋介、藤原政司、脇谷滋之「顕微鏡画像による間葉系幹細胞からの軟骨細胞への分化度診断の試み」日本再生医療学会年会、2006年3月8日(岡山、岡山コンベンションセンター)

⑭高木 睦「Cell Processing Engineering for Regeneration of Cartilage: Noninvasive Diagnosis of Differentiation」The 7th Northeastern Asia Symposium on Biotechnology、2005年11月15日(韓国・慶州、Concorde Hotel)

⑮高木 睦、近藤真一、梅津洋介、藤原政司、脇谷滋之「間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化培養における細胞形態解析による分化度の診断」日本生物工学会年会、2005年11月15日(筑波、つくば国際会議場)

⑯高木 睦、近藤真一、服部裕美、梅津洋介、藤原政司、脇谷滋之「間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化培養における細胞形態によるアグリカン発現率の診断」再生医療学会、2

005年3月1日(大阪、大阪国際会議場)

[図書] (計1件)

①高木 睦、コロナ社、セルプロセッシング工学 - 抗体医薬から再生医療まで -、2007年、154ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 睦 (TAKAGI MUTSUMI)
北海道大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20263212

(2) 研究分担者

藤原 政司 (FUJIWARA MASASHI)
北海道大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：30229075

(3) 連携研究者

脇谷 滋之 (WAKITANI SHIGEYUKI)
大阪市立大学・医学部・准教授
研究者番号：70243243
(研究分担者：2006-2007)