

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17193

研究課題名（和文）ハイコンテンツセルソーターを用いた脂肪幹細胞分離技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of ASCs isolation technology using high content cell sorter

研究代表者

五十嵐 正樹（Igarashi, Masaki）

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：40769577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：初めに、ASCでの評価をおこなう前に、小耳症患者の余剰耳介組織を採取し、細胞単離し培養を行い、ヒト耳介組織由来の軟骨細胞を調整した。次に、脂肪組織由来間葉系幹細胞（ASC）でも分離可能かを検証するため、マウス脂肪組織よりASCを単離し、代表的なASCマーカーであるCD44、CD73、CD90、CD105陽性、CD14、CD31、CD45陰性の発現を確認した。ヒト耳介軟骨細胞は、細胞形態のみで軟骨特性の異なる集団を分離することが可能となり、そのアルゴリズムデータをもとにASCの分離や他の幹細胞との比較を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎顔面領域における骨欠損に対して、自己細胞や組織を用いた移植医療などの再生医療が臨床応用されつつある。しかし、外科的侵襲や感染などのリスク、培養による細胞脱分化による品質の低下、移植後の免疫応答などの問題がある。最近開発された無染色で光学的な分析により目的細胞を分離可能とする機械学習駆動型フローサイトメーターに着眼し、多分化能が高い間葉系間質細胞（ASC）を分離することや軟骨特性の高い培養軟骨細胞の分離など、分離操作が複雑な細胞を簡便に分離が可能となる。この技術が実現すれば、今後、従来装置では検出不可能とされてきた特異細胞などが検出、分取可能になり、さらなる再生医療研究の発展が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：Initially, excess auricular cartilage tissue from patients with microtia was harvested, cells were isolated and cultured and chondrocytes derived from human otoid tissue were reconstituted prior to evaluation by ASC. Next, to investigate whether adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ASCs) can also be isolated, ASCs were isolated from mouse adipose tissue, and the expression of representative ASC markers such as CD44, CD73, CD90, and CD105 positive and CD14, CD31, and CD45 negative were confirmed. Human auricular chondrocytes were able to isolate populations with different cartilage properties based on cell morphology alone, and the algorithm data were used to isolate ASCs and compared them with other stem cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：幹細胞 フローサイトメーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、口腔外科領域における先天異常、外傷、外科手術にともなう骨や組織欠損に対して、人工材料、自己由来成熟細胞・組織などが治療に用いられてきた[Caplan 2016 Nat Protoc]。しかし、前者には異物反応や術後の感染、後者には煩雑な操作性、侵襲性、採取量の限界といった問題が存在する。これらの問題を解決し得る新たな治療法として、間葉系幹細胞を用いた再生医療が脚光を浴びている[Ueda 2005 Cytotherapy]。間葉系幹細胞(MSC)は様々な組織に存在し、組織損傷等により遊走、増殖、さらには骨、軟骨、筋肉といった間葉系組織へ分化することが知られている[Caplan 2017 Stem Cells Transl Med]。中でも、骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)についての研究や臨床応用が最も進んでおり、骨欠損に対する応用が期待されている。一方、採取に際しての低侵襲性や、組織あたりの細胞数や細胞増殖能などの点における優位性から、近年、脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)が注目されている。しかし、現法において分離される脂肪由来細胞には内皮細胞や結合組織などが多く含まれていることから、幹細胞としての本質的な機能を発揮するには至っていない。したがって、幹細胞特性を効果的に作用させるには幹細胞のみを純化する必要がある。現在、幹細胞純化にはFACSを用いて分離する技術があるが、経験と熟練した技術が必要とされる。さらに、FACS操作での細胞刺激のため、分離時の生存性低下は避けられないため、MSCをin vitro培養したとしても、細胞増殖能や分化能などの幹細胞特性の顕著な低下は不可避であることから、実用化には至っていない(図1)。したがって、分離後の細胞特性に与える影響を緩和し、安定的に増殖培養するためには、細胞分離における操作の煩雑性と、分離時の細胞侵襲性を改善することは、幹細胞の臨床応用への実現するために重要と考える。

2. 研究の目的

近年、フローサイトメトリーを用いた研究が盛んにおこなわれており、なかでも幹細胞研究分野では多用されている。間葉系幹細胞のうち脂肪組織からも幹細胞が存在することが示唆されている[Xu 2007 Biochem Biophys Res Commun]。とくにCD31, CD34, CD45陰性、CD90, CD105陽性で分画される細胞集団で高確率に脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)が存在するとされている。このマーカーを用いることにより組織からASCを高効率に分離できることが示唆されている。また脂肪組織は生体から容易に多くの量を採取できることから[Yoshimura 2006 J Cell Physiol]、ASCは再生医療の細胞源として注目を集めている。しかし、ASCは他の間葉系幹細胞同様に、多くのマーカーを用いること、細胞侵襲がともなうことから、高活性を保った状態でのASC確保には課題がある。したがって、本研究の目的は、GMI法(Ghost Motion Imaging)を基に、形態情報のみに基づいた判別から分取までを可能とするシンクサイト社製フローサイトメーターを用いて細胞を直接解析・判別し、物理的に振り分けすることで、効率的な幹細胞分離培養技術を確立することである。

3. 研究の方法

サイトメーターの仕様設定

本研究で使用するハイコンテツフローサイトメーターは流路を通過する細胞の信号強度から細胞サイズを推測し、形態的特徴を再構築することで、非染色にて特定細胞を篩い分けることが可能となる。しかし、目的とする細胞の形態情報が分からなければ、特定することができないため、初めに、目的とする細胞の情報をあらかじめ、フローサイトメーターに記憶、学習させる必要がある。したがって、ASCでの評価をおこなう前に、すでに細胞情報が判明している市販の軟骨細胞や骨芽細胞(Lonza社、購入予定)など既知の間葉系細胞をコントロールとして、あらかじめフローサイトメーターに学習させる。次に、マウスから採取した軟骨や骨に含まれる軟骨細胞や骨芽細胞を当該機械でコントロールと同様の信号強度なるように調節をおこなったのち分離し、市販の細胞と差がないことを確認する。この結果から、機械の間葉系仕様を決定する。

従来法によるASC分離を基にしたサイトメーター性能評価

の結果をもとに、実際にASCでも分離可能か検証する。まず、マウス脂肪組織を摘出し、従来法に則して、抗体染色ののちセルソーターを用いてASCを分離する。間葉系幹細胞は分離直後より分化が始まるのと同時に形態的な変化も生じることから、ASCを分離したのち、ただちにハイコンテツサイトメーターにて細胞の形態情報を学習させておく。次に、新たなマウスから脂肪組織を摘出したのち、非染色、セルソーターを用いずにサイトメーターで細胞分離をおこなう。従来法と本法にて分離したASCの形態的特徴を蛍光顕微鏡または、電子顕微鏡にて確認し、本法が従来法と差がないことを確認する。

in vitroにおけるASC特性の検証

の結果から、本法にて分離したASCの細胞特性を従来法と比較検証する。In vitroにて、各法で分離した細胞のコロニー形成能評価としてCFU-F assayを、多能性評価として、骨、軟骨、脂肪分化誘導をおこない、従来法と同等あるいはそれ以上であることを確認する。

マウス頭蓋骨欠損モデルを用いたin vivoにおけるASC骨分化性能の検証

最後に、本法で分離取得した細胞の有用性評価として、in vivoでの分化性能評価をおこなう。

マウス左右側頭骨に 5 mm の骨欠損を作製し、本法と従来法で分離取得した ASC を 5 μ g/mL BMP-2 を含有したアテロコラーゲンスポンジに搭載し、欠損部へ移植する。移植後 4 週、8 週で摘出し、 μ -CT、DEXA (現有)にて形態計測学的に、移植片を組織学的に評価し、骨形成能の違いを検証する。最終的に、本法の有用性を立証する。

4 . 研究成果

本研究の目的は、高速高感度-画素素子で検出する 2 次元情報の撮影が可能なイメージング技術である GMI 法 (Ghost Motion Imaging) を基本技術に、形態情報のみに基づいた判別から分取までを可能とするフローサイトメーターを用いて、細胞に透過した信号を計測し、高速機械学習により直接解析・判別し、目的細胞を誘導泳動法によって流体デバイス内で物理的に振り分けすることで、効率的な幹細胞分離培養技術を確立することである (右図)。

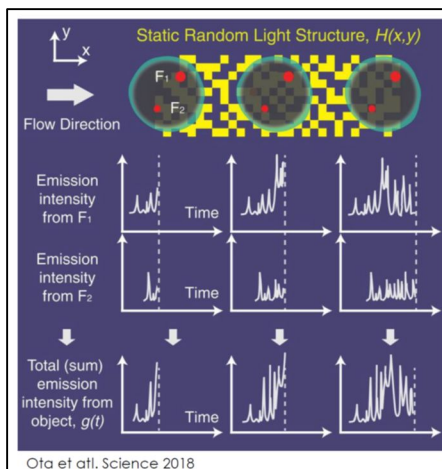
本研究で使用するハイコンテンツフローサイトメーターは流路を通過する細胞の信号強度から細胞サイズを推測し、形態的特徴を再構築することで、非染色にて特定細胞を篩い分けることが可能となる。しかし、目的とする細胞の形態情報が分からなければ、特定することができないため、初めに、目的とする細胞の情報をあらかじめ、フローサイトメーターに記憶、学習させる必要がある (右図)。

したがって、ASC での評価をおこなう前に、すでに細胞情報が判明している市販の軟骨細胞や骨芽細胞など既知の間葉系細胞をコントロールとして、あらかじめフローサイトメーターに学習させるために、小耳症患者の余剰耳介組織を採取し、細胞単離培養を行い、ヒト耳介軟骨細胞とマウスの耳介組織由来の軟骨細胞を調整した。

次に、脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ASC) でも分離可能かを検証するため、マウス脂肪組織より ASC を単離し、代表的な ASC マーカーである CD44, CD73, CD90, CD105 陽性、CD14, CD31, CD45 陰性の発現を確認した (下図)。ヒト耳介軟骨細胞は、ハイコンテンツフローサイトメーターにより細胞形態のみで軟骨特性の異なる集団を分離するアルゴリズムデータをもとに ASC の分離や他の幹細胞との比較を行っている。



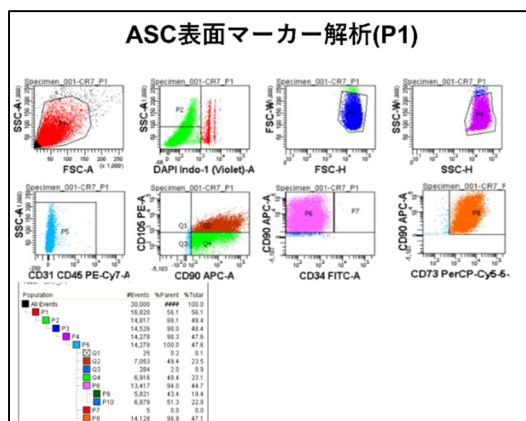
- 1) 高速で細胞の蛍光イメージを計測
- 2) 機械学習でリアルタイム解析
- 3) マイクロ流体中での選択的分取



光構造上を流れる細胞の動きに着目。
この光構造には「スポット」と呼ばれる穴があり、このスポット上での細胞の発光強度を時間信号へと画素検出器にて圧縮・変換し記録する。

記録された時間波形を直接機械学習 (SVM を使用) に適用させることによって、細胞形態に基づいた分離を可能とする。

その前段階として、予め目的とする細胞の情報を機械に記憶、学習させる必要がある。



	/全細胞 比率 (%)				生細胞	/生細胞 比率 (%)			
	CD31,CD45 陰性	CD90 陽性	CD105 陽性	CD90,CD105 陽性		CD31,CD45 陰性	CD90 陽性	CD105 陽性	CD90,CD105 陽性
#1	44.6	40.8	12.3	11.5	48.2	92.5	84.6	25.5	23.9
#2	65.9	65.5	9.9	9.9	69.2	95.2	94.7	14.3	14.3
#3	66.3	47.5	4.7	4.7	67.3	98.5	70.6	7.0	7.0
#4	53.2	47.3	26.6	26.3	55.1	96.6	85.8	48.3	47.7
#5	41.5	39.1	16.9	16.7	43.6	95.2	89.7	38.8	38.3
#6	56.5	54.3	5.4	5.4	57.2	98.8	94.9	9.4	9.4
#7	47.6	44.7	23.6	23.5	49.4	96.4	90.5	47.8	47.6
平均	53.7	48.5	14.2	14.0	55.7	96.2	87.3	27.3	26.9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小関 珠理亜, 安部 貴大, 阿部 雅修, 谷口 明紗子, 菅家 康介, 五十嵐 正樹, 柏木 美樹, 宮本 祥行, 西條 英人, 星 和人	4. 巻 67(2)
2. 論文標題 手術用ナビゲーションシステムを用いた上顎良性腫瘍の治療経験	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----