

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656532

研究課題名(和文) 光増感色素を用いた細胞の選択的死滅と選別技術の研究

研究課題名(英文) Method for selection of cells using photosensitizers

研究代表者

原 正之 (HARA, Masayuki)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50344172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞/前駆細胞、間葉系幹細胞、を培養し、光増感色素(PS)の細胞内取り込み能を測定し、強光照射時に発生する活性酸素(ROS)により、分化細胞や未分化細胞がどのように障害を受けるかを調べる事ができ、一定の知見が得られた。但し、当初の目的にあるようにPSの取り込み能の違いを利用して分化細胞、未分化細胞を選別する技術を確立するという意味では、十分に技術が確立できたとは言えないので、今後ともさらに関連技術の検討が必要であると考えている。

研究成果の概要(英文)：We cultured neural stem/progenitor cells, mesenchymal stem cells. We measured the uptake of photosensitizer dyes into those cells. Those cells were injured by reactive oxygen species (ROS) evolved under illumination of strong actinic light. Various informations about injury of those cells were obtained, although the method to select immature and differentiated cells was still in development. Further effort is necessary to establish the method, including the establishment of related experimental conditions.

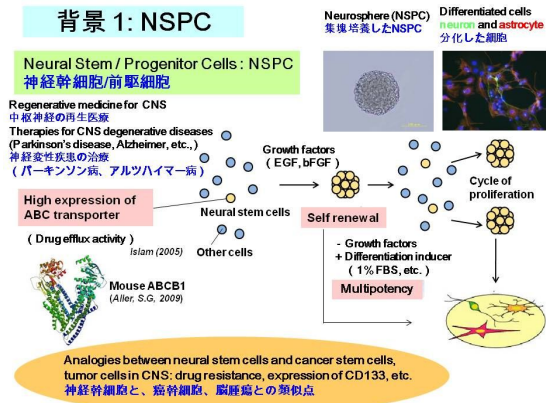
研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

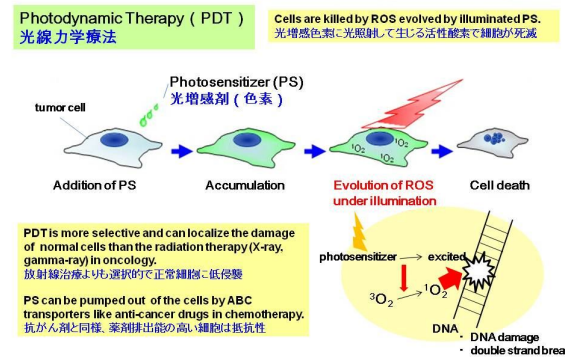
キーワード：神経幹細胞 間葉系幹細胞 細胞分離技術 光増感色素 PDT 細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1)神経幹 / 前駆細胞(NSPC)は、自己複製能と多分化能を兼ね備え、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化できる能力を持つ。NSPC を含む様々な体性幹細胞にはABC 輸送体等、薬剤排出ポンプとして機能する蛋白質が発現しており ATP 加水分解と同時に薬剤を細胞外に排出する事が知られている。また、体制幹細胞だけでなく、癌組織に存在すると言われる癌幹細胞にもこれらの蛋白質が発現して抗癌剤等に耐性を示す一因とも考えられている。



背景 2: 光線力学療法(PDT)の原理



(2) 光線力学療法 (PDT: photodynamic therapy) において、癌や腫瘍の治療に用いられる光増感色素 (PS: photosensitizer) は紫外から近赤外領域の光照射下で活性酸素 (ROS: reactive oxygen species) を局所的に発生し、癌や腫瘍を死滅させる働きがある。これらを上手く組み合わせて、NSPC や分化細胞の選択的な死滅による細胞選別を行なう事に興味を持っている。また我々はこれまで、神経系の細胞に対する X 線照射や、ROS など酸化ストレスの影響について研究してきた。

(3) 未分化な幹細胞は、一般に活性酸素や放射線への感受性が高く、同時に薬剤排出系ポンプの発現も高い場合が多い。各種の体性幹細胞や多能性幹細胞に発現する薬剤排出系ポンプ (ABC- transporter 等) や、細胞の活性酸素感受性 (放射線感受性を含む) に関する様々な研究が行われてきた。我々はこれまで、神経幹細胞の薬剤排出系の解析 (FEBS

Lett (2005),579,3473-3480; *Neurosci Res* (2005),52,75-82) や、活性酸素感受性 (*J Biosci Bioeng* (2005),100,331-334; *NeuroReport* (2007),18,895-900) の研究で成果をあげてきた。これらの研究を通じて、光増感反応を利用して細胞の選択的な死滅を行えば、全く新規な原理に基づく分化細胞と未分化細胞 (神経幹細胞等) の細胞選別技術を開発できるのでは? という着想を得て、今回の研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は、組織に分化した体細胞と未分化な幹細胞の、新規な選別方法の開発を目的とする。未分化で薬剤排出系を高発現した体性幹細胞や多能性幹細胞と、低発現の分化後の体細胞を、光増感度反応を利用して選別する全く新規な原理に基づく方法である。光増感色素の細胞への取り込み量の違いと、可視光照射時に生じる活性酸素による細胞障害感受性の違いを上手く組み合わせ、細胞の選択的な死滅を利用した、分化細胞と未分化細胞 (神経幹細胞等) の細胞選別技術を開発する事を目指した。この技術は、体性幹細胞の濃縮や、多能性幹細胞から分化誘導した体細胞中の未分化細胞の除去が行える為、将来は細胞プロセッシング技術として細胞移植治療に利用できる。

3. 研究の方法

(1) マウス神経幹 / 前駆細胞 (mNSPC)、ヒト神経幹 / 前駆細胞 (hNSPC) およびラット間葉系幹細胞 (MSC) を用いた未分化細胞の選択的生存と分化細胞の死滅・除去方法の開発を行った。

- ・細胞の選別が可能な条件を探索した。
- ・選別された未分化細胞の形態、増殖能、分化能を調べ、細胞障害の程度を確認した。
- ・上記の知見に基づいて幹細胞の選択・濃縮方法として利用できるかどうかを検討した。

(2) 光照射装置および光増感色素

- ・光照射装置には 10 - 50 万 Lx 程度の白色光源 (ハロゲンランプ) を使用。光ガイドを用いて、培養皿下面から可視光 (白色光) を照射した。
- ・光増感色素には rhodamine123 (RH) および hematoporphyrin (HP) を使用した。

(3) 光増感色素から生じる活性酸素の種類と発生量の測定、幹細胞における、薬剤排出系の発現、光増感色素の細胞外排出活性、を確認した。これに基づいて光増感色素の種類、濃度、光照射時間の違いによる光照射後の細胞生存率を測定した。各種の未分化および分化マーカーに対する抗体を用いて、各分化段階の細胞の存在比率の解析も実施した。

4. 研究成果

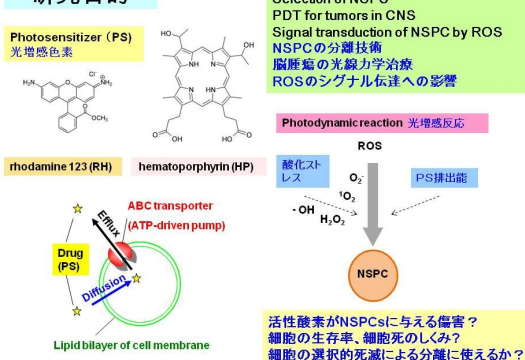
(1) まずはじめに、マウス胎児脳由来の神経幹 / 前駆細胞 (mNSPC: mouse neural stem / progenitor cell) とヒト神経幹 / 前駆細胞 (hNSPC: human neural stem / progenitor cell) について、Rhodamine 123 (RH) と hematoporphyrin (HP) の 2 種の光増感色素 (PS) の細胞内取り込みを測定した。

細胞の培養条件など

<マウス細胞>	<ヒト細胞>
ICRマウス (E 14) 大脳由来 NSPC	ヒト NSPC 株 NSC12 細胞
<培地> Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F12 (DMEM / F12)	<培地> Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F12 (DMEM / F12)
+	+
Basic fibroblast growth factor (bFGF) : 20 ng/ml Epidermal growth factor (EGF) : 20 ng/ml B27 supplement (50X) : 20 µl/ml Antibiotic-Antimycotic (100X) : 10 µl/ml	Basic fibroblast growth factor (bFGF) : 20 ng/ml Epidermal growth factor (EGF) : 20 ng/ml B27 supplement (50X) : 20 µl/ml Antibiotic-Antimycotic (100X) : 10 µl/ml Leukemia inhibitory factor (LIF) : 10 ng/ml Heparin : 10 ng/ml
<光増感色素> rhodamine 123 (RH), hematoporphyrin (HP) ABC B1 で排出 ABC G2 で排出	
<阻害剤> cyclosporin A (CsA), fumitremogin C (FTC) ABC B1 を阻害 ABC G2 を阻害	

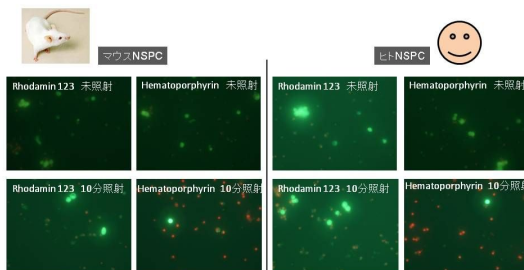
何れの細胞も、時間や濃度に依存した取り込み活性を示したが、同時に ABC 輸送体の阻害剤存在下で細胞内への取り込み量が増加したため、一度細胞内に入った色素 RH は ABCB1、HP は ABCG2 等の輸送体により細胞外に排出されるのではないかと推察された。取り込まれた色素の一部が能動輸送的に細胞外排出されている事が示唆された。

研究目的



(2) 上述の RH と HP の 2 種の光増感色素 (PS) の水溶液に halogen 光源の可視光 (白色光) を照射して励起すると活性酸素 (ROS) が生じることは、以前に確認している。ICR マウス胎仔脳由来 mNSPC とヒト胎児脳由来の hNSPC を neurosphere 法で培養し、光照射下で ROS を生じる光増感色素 (PS) による細胞の障害と死滅を検討した。RH と HP は、それぞれ時間依存的に細胞に取り込まれ、細胞の傷害状態を、Annexin V 染色 (apoptosis)、PI 染色 (細胞膜損傷) により評価したところ、強光照射下では apoptosis (アポトーシス) と necrosis (ネクローシス・壊死) の両方が起きることを確認した。

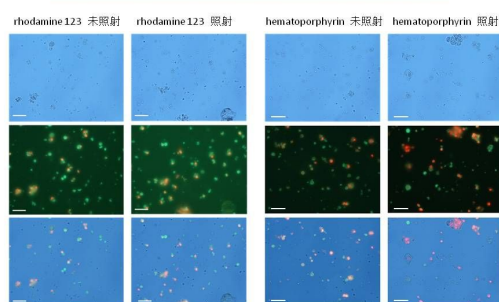
光増感反応後の細胞生死判定①



$$\text{生細胞 (\%)} = \frac{\text{FDA 陽性細胞}}{\text{全細胞数 (FDA 陽性 + PI 陽性)}} \times 100$$

$$\text{死細胞 (\%)} = \frac{\text{PI 陽性細胞}}{\text{全細胞数 (FDA 陽性 + PI 陽性)}} \times 100$$

光増感反応後のアポトーシス検出①



$$\text{アポトーシス性細胞 (\%)} = \frac{\text{Annexin V 陽性細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

$$\text{ネクローシス性細胞 (\%)} = \frac{\text{Annexin V \& PI 陽性細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

$$\text{生細胞 (\%)} = \frac{\text{Annexin V および PI 陰性細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

(3) mNSPC については、Sox2, CD133, nestin 等の未分化細胞マーカーを用いた免疫組織化学的検討により、未分化な mNSPC の方が分化後の細胞 (neuron, astrocyte) よりも ROS 感受性がやや高いことを明らかにした。また、ABCB1a が培養した mNSPC で高く発現している事を RT-PCR により確認した。これらの薬剤排出ポンプが阻害剤依存的に光増感色素 (RH, HP) の細胞外排出活性を示したものと推察した。

(4) 上記の NSPC に続いて、ラット骨髄由来の間葉系幹細胞 (rMSC: mesenchymal stem cell) を採取、培養して同様に RH, HP の細胞取り込み能を調べた。これらの細胞も ABC 輸送体の阻害剤に依存した取り込み活性を示した。また NSPC の場合と同様に、強光照射における細胞の死滅の程度を評価した。HP は効率的に MSC を死滅させたが、RH による細胞死滅の効果は NSPC の場合に比べていくらか弱く作用しているように思われた。

(5) mNSPC, hNSPC, rMSC 分化した細胞と未分化で幼若な幹細胞の選別を試みたが、この光依存的な細胞障害は、今回の試験条件では優位な阻害剤濃度依存性を示さなかったため、現段階では残念ながら、まだ選別技術の確立には成功していない。細胞の分化状態 (未分化、分化、の違い) による ROS 感受性の違いと、細胞外排出活性の高低という相反する傾向の違いにより、適切な条件を検索すれば、

当初に想定した細胞の選択的死滅による選別は可能であるのではないかと考えている。

大阪府立大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号： 30450894

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)

Hideki Mori, Ayumi Takahashi, Ayano Horimoto, Masayuki Hara, Migration of glial cells differentiated from neurosphere-forming neural stem/progenitor cells depends on the stiffness of the chemically cross-linked collagen gel substrate, *Neuroscience Letters*, (2013) 555, 1-6. (査読有り)

[学会発表](計 5件)

培養神経幹/前駆細胞に対する活性酸素の影響、森英樹、原正之、日本化学会第92春季年会 平成24年3月25日~28日(横浜・慶応義塾大学)

Neural stem/progenitor cells damaged by reactive oxygen species evolved by photosensitizing reaction, Hideki Mori, Masayuki Hara, International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June 13-16th, 2012, Pacifico Yokohama

培養神経幹/前駆細胞に対する活性酸素の影響、原正之、森英樹、第11回日本再生医療学会総会 平成24年6月12日~14日(パシフィコ横浜)

活性酸素による神経幹/前駆細胞の障害機構、森英樹、吉田陽亮、金村米博、原正之、第64回日本生物工学会大会(2012) 平成24年10月23-26日、神戸国際会議場

Neural stem/progenitor cells damaged by reactive oxygen species, Hideki Mori, Masayuki Hara, YABEC 2012、平成24年10月26日~28日(徳島大学)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~hara/>

<http://kyoindb.acs.osakafu-u.ac.jp/profile/out.JJMRpWkOtLAn2WkaMAKRfw==.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 正之 (HARA Masayuki)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：50344172

(2)研究分担者

森 英樹 (MORI Hideki)