

平成17年度文部科学省SPP

骨髄移植を受けたマウスでの ドナー細胞の推移の観察



北陸高等学校

内藤	龍太	中林	和庸
辻	望	清水	彩華

★実験の目的と背景★

- GFPは緑色蛍光を発することから識別が容易で、移植後に増殖した細胞がドナー(臓器提供者)、レシピエント(提供を受けた者)のいずれに由来するかを識別する指標となる。

- このGFPの遺伝子を組み込んだマウス(Tgマウス)をドナーとして骨髄移植を行い、レシピエントのどこの部位にドナー由来の細胞ができたかを調べた。



- 骨髄幹細胞を用いた再生医療の可能性を探るため、レシピエントの筋肉に傷害(バイオプシー)を与え、その再生に骨髄幹細胞が関与しているかどうかを調べた。

★マウスの解剖★

■Tgマウス、骨髄移植マウス、コントロールマウスに麻酔をかけ、血を抜き取り安楽死させた。

■安楽死させたマウスを解剖用ハサミ、ピンセットで解剖し、すい臓、脾臓、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉、脂肪、大脳、などを取りだし、蛍光実体顕微鏡を用いてGFP蛍光の見える組織を調べた。



←Tgマウスの解剖



実体蛍光顕微鏡でのマウスの観察

結果

◆肉眼で観察できた蛍光部位(Tgマウス)

⇒ すい臓・心臓・筋肉・胸腺

◆肉眼で観察できた蛍光部位(移植マウス)

⇒ 胸腺

◆実体顕微鏡で観察できた蛍光部位(Tgマウス)

⇒ 脳・腎臓・胃・腸・精巣・脾臓・すい臓・心臓・筋肉・胸腺

◆実体顕微鏡で観察できた蛍光部位(移植マウス)

⇒ 腸(パイエル氏板)・腸管膜リンパ節・胸腺・皮下組織

左:Tgマウス 右:移植マウス



★Tgマウスの凍結切片観察★

- 摘出したTgマウスの臓器はパラホルムアルデヒドで固定したのち、ドライアイス・エタノール(-80°C)で凍結させた。
- クリオスタットという機械を用いて、切片を作成した。切片は厚さ10 μ m、内部温度-20°C。

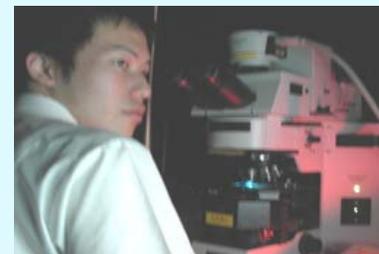


←切片作成中♪



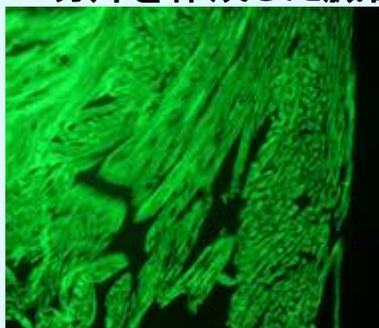
切片→

- スライドグラスにのせた切片を光学画像解析室にて蛍光顕微鏡を用いて観察した。

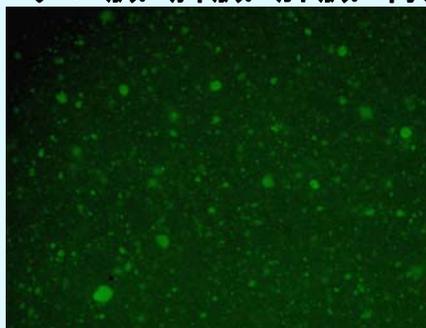


結果

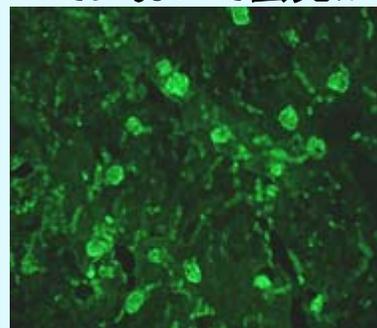
- 切片を作成した臓器(肺・すい臓・脾臓・肝臓・腎臓)すべてにおいて蛍光が観察できた。



←
心臓



←
脾臓



←腎臓

糸球体がよく蛍光を発しているのがわかる。

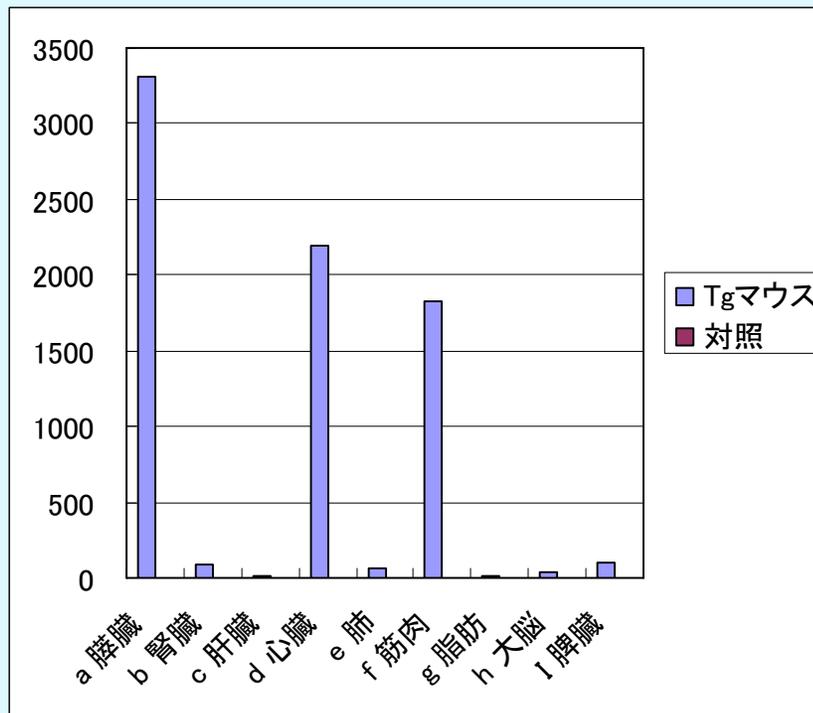
☆ Tgマウスにおける臓器別GFP発現量の違い ☆

【方法】解剖したマウスからいくつかの臓器を分けて取り出し、それぞれ10倍量のPBSを加えてホモジナイズした。冷却遠心後、上清の蛍光を蛍光強度計で測定した。



【結果】 Tgマウスでは、膵臓、筋肉、心臓で特に強い蛍光が認められる。他の臓器でも全般にすべての臓器で蛍光が観察されるといい良い(下表)。

	Tgマウス	対照
a 膵臓	3307.8	0.6
b 腎臓	84.3	1.3
c 肝臓	18.0	1.4
d 心臓	2193.0	0.9
e 肺	62.1	0.6
f 筋肉	1822.5	0.6
g 脂肪	10.3	0.1
h 大脳	35.9	0.5
I 脾臓	106.5	0.8

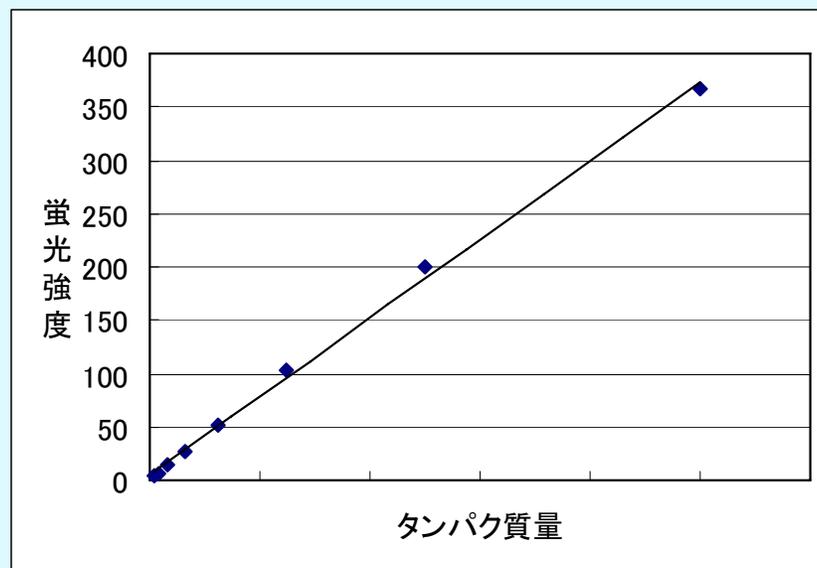


【方法】すい臓からの抽出液を基準として、10倍希釈系列を作製し蛍光強度を測定した。

【結果】10倍希釈系列の蛍光強度を測定したところ、タンパク質量に比例して蛍光強度が強くなっていることがわかった(右下図)。このことから、蛍光強度が直接GFPの発現量を反映しているといえる。



蛍光強度計による測定

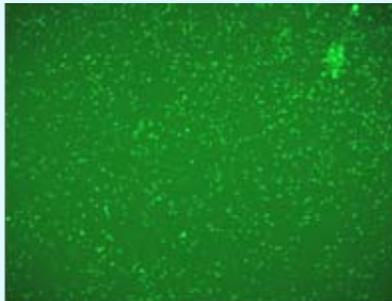


タンパク質量と蛍光強度

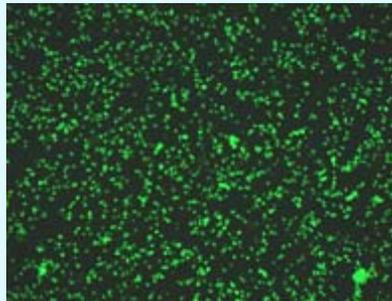
★Tgマウスと移植マウスの骨髄と末梢血におけるGFPの発現★

【方法】

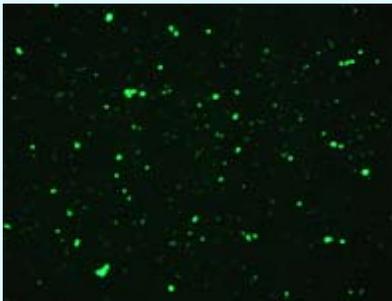
- 双方のマウスから大腿骨を取り出し、骨髄を採取し蛍光顕微鏡で観察した。
- 双方のマウスの心臓から血液を取り出しスライドガラスにのせ、蛍光顕微鏡で観察した。



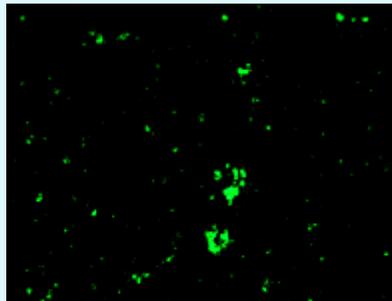
Tgマウスの骨髄



移植マウスの骨髄



Tgマウスの末梢血



移植マウスの末梢血

←どちらのマウスでも骨髄及び末梢血において同程度の蛍光が観察された。

【結果】

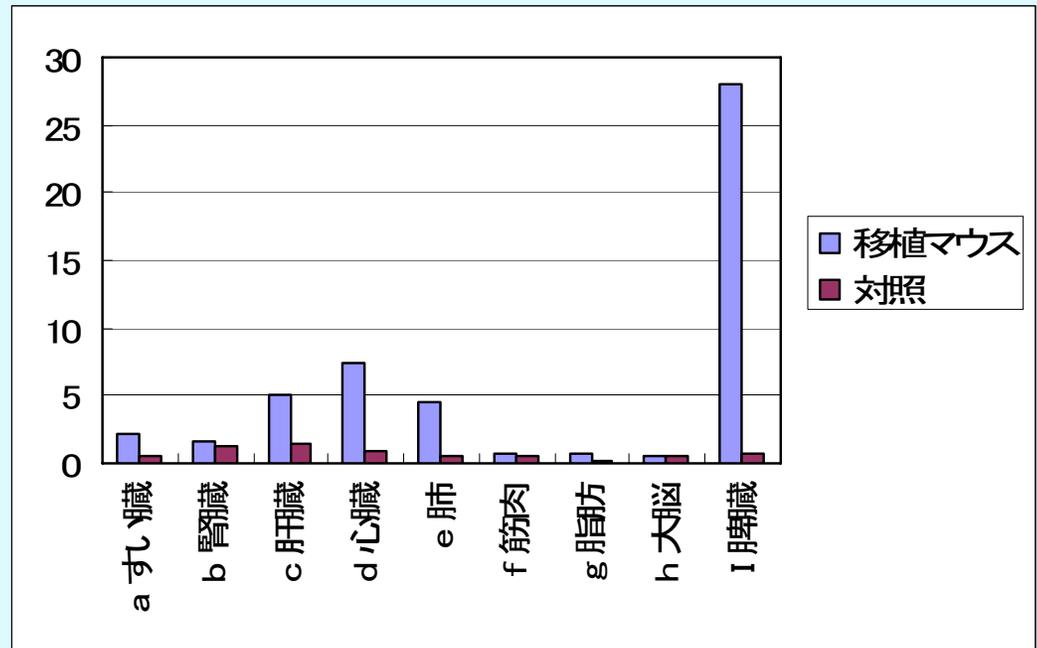
移植マウスでは骨髄がドナーであるTgマウスの骨髄に由来する細胞に置きかわっていることがわかった。骨髄にGFP発現細胞が存在しているのでGFPが発現する血球が作られ、全身に伝わっていくのがわかった。

☆ 移植マウスにおけるGFP発現組織の探索 ☆

【方法】解剖したマウスからいくつかの臓器を分けて取り出し、それぞれ10倍量のPBSを加えてホモジナイズした。冷却遠心後、上清の蛍光を蛍光強度計で測定した。

【結果】移植マウスでは脾臓で比較的強い蛍光が認められる。その他肝臓、心臓、肺に若干強い蛍光が見られるが、膵臓、腎臓、筋肉、脂肪、大脳では対照と変わらない結果となった(下表)。

	移植マウス	対照
a 膵臓	2.1	0.6
b 腎臓	1.6	1.3
c 肝臓	5.1	1.4
d 心臓	7.4	0.9
e 肺	4.55	0.6
f 筋肉	0.65	0.6
g 脂肪	0.7	0.1
h 大脳	0.6	0.5
I 脾臓	28.05	0.8



【まとめ】解剖による肉眼所見、血液レベルの観察、蛍光強度計による計測から、移植マウスにおいては骨髄がドナー由来の細胞に置き換わっているだけでなく、リンパ系(造血系)組織においてもドナー由来の細胞が観察できた。

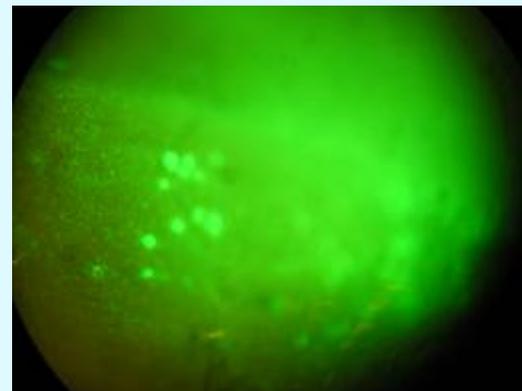
★バイオプシー部位の蛍光観察★

【方法】バイオプシー処理した移植マウスの皮をはいでバイオプシー部位の筋肉を蛍光顕微鏡で観察した。

※バイオプシー……筋肉にあらかじめ傷をつけ、治っていく過程で骨髄幹細胞の働きを調べた。

【結果】バイオプシー処理した部位に蛍光色の斑点が見えた(右図)。

【考察】蛍光が確認できたことより、バイオプシー部位に骨髄幹細胞に由来する細胞が存在することが分かった。この事より傷を治すのは傷口付近の筋肉幹細胞の増殖だけではなく、骨髄幹細胞も関係しているといえる。



☆ 全体の考察 ☆

- 今回のTgマウスにおいては、GFP遺伝子の前にアクチンのプロモーター配列が組み込まれている。Tgマウスのほぼ全ての組織でGFPの発現が見られたが、これらの組織がアクチンを含んでいるためだと考えられる。特に、筋肉、心臓は多くのアクチンを含んでいるので、強い蛍光が観察できた。
- Tgマウスのすい臓で強いGFPの発現が見られたことに関しては、次のような理由が考えられる。
 - ① すい臓でアクチンが盛んに合成されている。
 - ② すい臓は機能タンパク質であるホルモンや酵素を多く作るから、基本的にタンパク質合成能力が高い。
 - ③ アクチンのプロモーター配列とすい臓で合成される何らかのタンパク質のプロモーター配列が似ている。
- 血球が全身に伝わるので、移植マウスにおいてもすべての臓器でGFPが発現すると思ったが、実際には一部の臓器でしかGFPが発現しなかった。白血球が蛍光を発していることから脾臓やリンパ節で蛍光が見られたのは、この白血球が脾臓やリンパ節で作られ破壊されるからだと考えられる。
- バイオプシー部位に骨髄幹細胞に由来する細胞の存在が分かった。もし、筋肉以外でも何らかの傷害を受けた部位に骨髄幹細胞が集まって同様に再生を助けているとしたら、このことを利用して細胞の増殖だけでは手に負えない傷の再生の手助けになるかもしれない。

☆ 感想 & 謝辞 ☆

内藤: 普段、学校では体験できない解剖や、初めて見る機器を用いての実験は大変有意義なものとなりました。

中林: 研究というものがどんなものか分かりとても有意義な時間だった。
将来、新しいことを研究していくのもおもしろそうと思った。

清水: 普通じゃできない経験ができて、とても感激しました。ここでやったことを、これからどんどん生かしていきたいです。

辻: 医療の現場では、研究による新しい発見がとても大切だということがわかり、今まで遠い存在だった研究室がとても身近に感じられるようになりました。

【謝辞】

私たち高校生のために、このような素晴らしい機会を与えて下さった松川先生をはじめ福井大学総合実験研究支援センターの皆様には深く感謝いたします。また、直接ご指導いただいた小泉先生、前田先生は実験中始終優しくリードして下さい、とても心強く感じました。本当にありがとうございました。

