

2005年SPP クラゲの発光蛋白の秘密とその利用

平成17年8月25－26日

骨髄移植マウスでのドナー幹細胞のゆくえ

福井県立大野高等学校

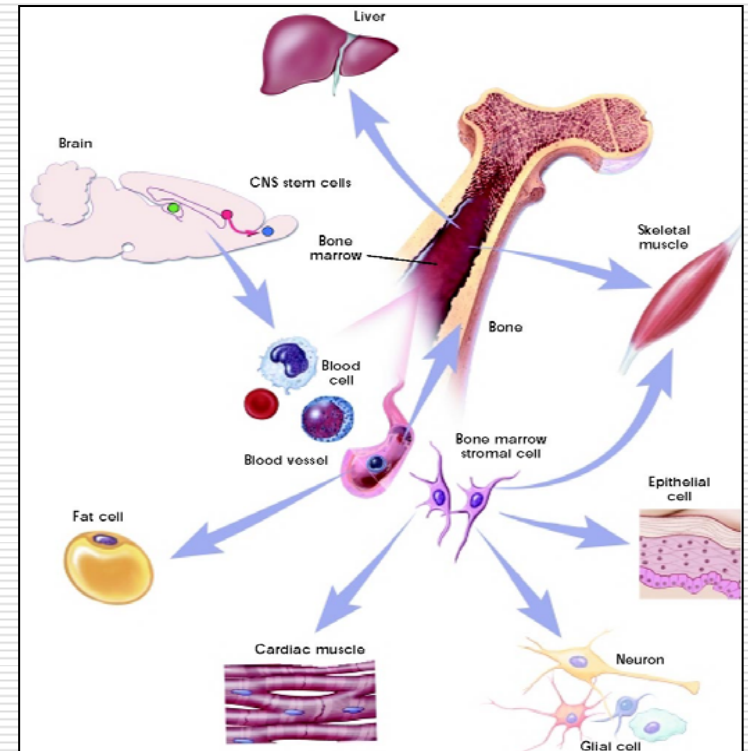
北林佑季也、水島圭剛
西行美咲、加藤直子

目的

私たちの体には自らと同じ細胞を複製し、製造する能力を持ち、それが存在していた組織内のあらゆる細胞に分化できる能力を有する成体幹細胞がある。

骨髄にある間葉幹細胞と呼ばれる幹細胞は、骨髄細胞だけでなく、筋肉細胞や骨細胞など他の種類の細胞へも分化できることが分かってきた(右図)。成体幹細胞から自在に身体各部位を作り出すことができれば、臓器移植医療の可能性は大幅に広がるが、これらの幹細胞がどのような条件のもとでどんな特定の機能を持つ細胞に分化できるかは研究途上である。

私たちは骨髄の幹細胞の分化能力を理解するため、クラゲの蛍光蛋白質(GFP)遺伝子を導入したトランスジェニックマウスをドナーとし、その骨髄細胞を移植したレシピエントマウスでGFP蛍光の分布や強さを調べた。



成体幹細胞の多分化能

<http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics4.asp>

方法

GFP量: マウスを蛍光実体顕微鏡で観察したのち、臓器の一部を9倍量の抽出液(0.3%SDS加PBS)を加えホモゲナイズし、15,000rpm 20分遠心し、上清の蛍光強度を測定した。すい臓のGFP抽出液を2倍段階希釈し、蛍光強度とGFP量の関係を求め、各臓器、組織の蛍光強度からこれらの臓器、組織中のGFP量の相対量を算出した。

組織のGFP蛍光観察: 摘出した組織、臓器の一部は4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片標本を作成したのち蛍光顕微鏡で観察した。

骨髄移植: レシピエントのC57BL/6マウスにX線(9.5Gy)を照射し、C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)トランスジェニックマウス(グリーンマウス)から採取した骨髄細胞 2×10^6 個を静脈内に注射した。実験時は移植後、60-65日であった。



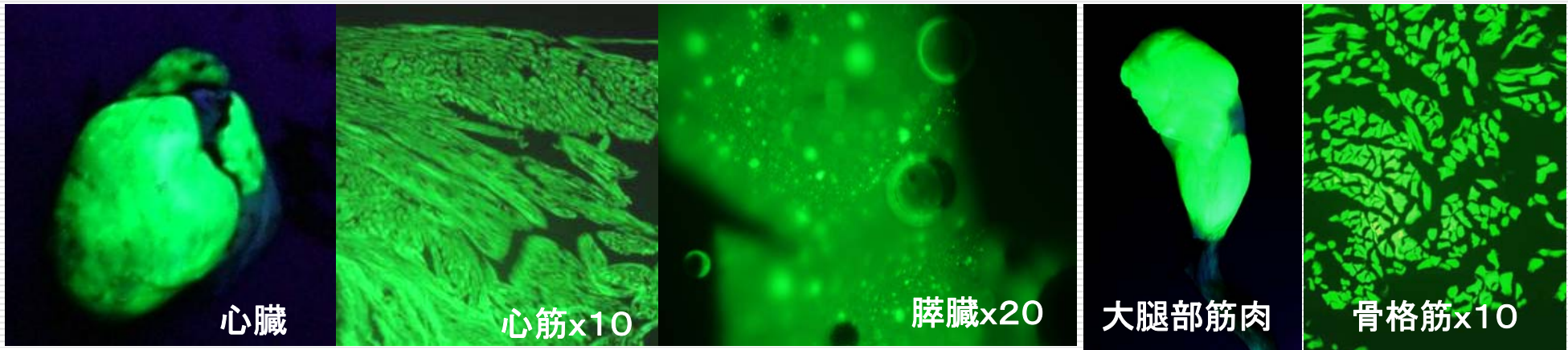
凍結切片標本の作製



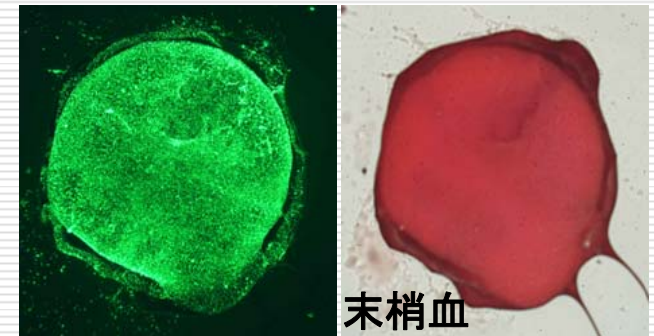
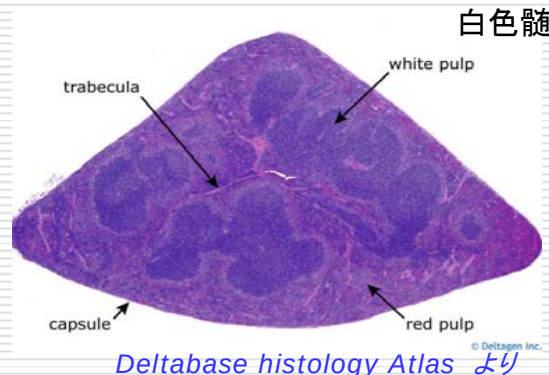
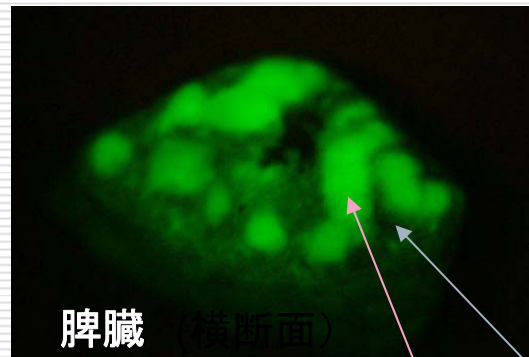
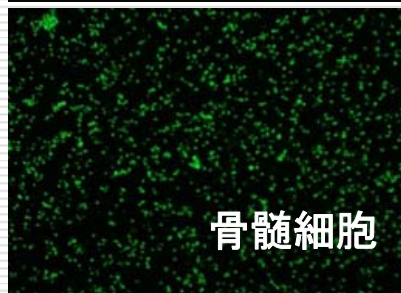
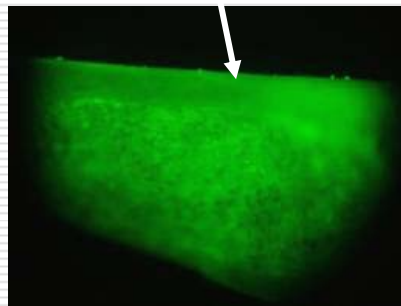
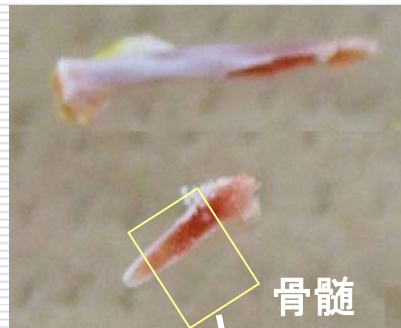
マウスでのGFP蛍光観察

結果と考察

最初に、骨髄細胞ドナーのグリーンマウスではGFPがどの臓器、組織で作られているかを調べた。グリーンマウスは β アクチンのプロモーターとEGFP遺伝子のcDNAから構成されたミニ遺伝子を受精卵の前核に注入する方法で作成されたものある。アクチンは細胞骨格を作る蛋白で、細胞蛋白の5%を占めることから、多くの細胞、組織、臓器でGFP蛋白が作られること、またアクチンは筋肉細胞には特に多い(細胞蛋白の15%)ので筋肉で強く発現することが期待される。実際、骨格筋、心筋で非常に強いGFP蛍光が見られ、脾臓、胸腺、肺、肝臓、皮膚などほとんどの臓器で、赤血球、毛以外の細胞でGFP蛋白が作られることが確認できた(6ページ表)。脾臓では臓器全体での強い蛍光に加えてさらに強い蛍光が水滴状に散在していることから、産生量が多いことに加え、分解されずに分泌腺で蓄えられているのかも知れない。



グリーンマウスでの蛍光観察



骨髄細胞のほとんどがGFP陽性で、末梢血液でも白血球で蛍光が見られた。また、胸腺、脾臓、リンパ節など骨髄の造血幹細胞から分化した細胞で蛍光が見られたが、脾臓では赤血球の多い赤色髄では蛍光がほとんどみられず、リンパ組織からなる白色髄に蛍光が見られた。

グリーンマウスと骨髄細胞移植レシピエントマウスでのGFP量

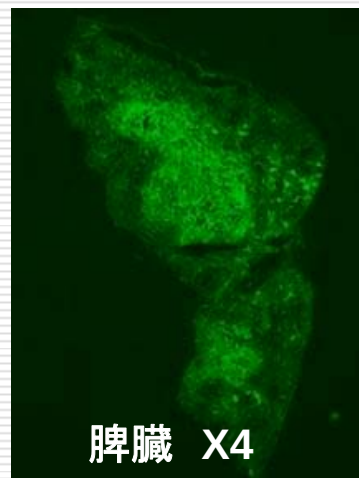
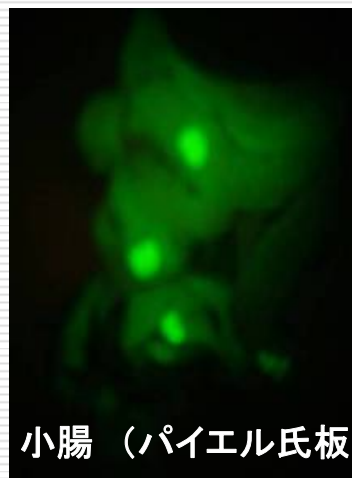
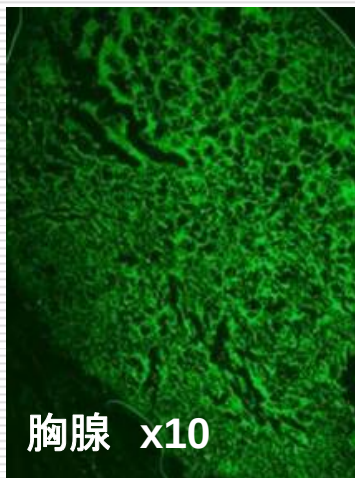
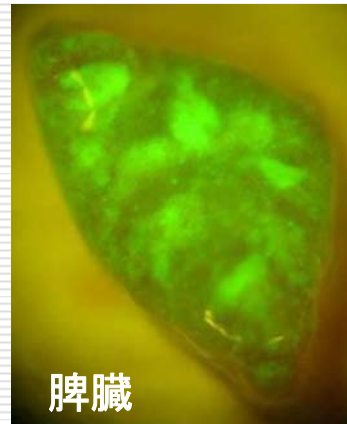
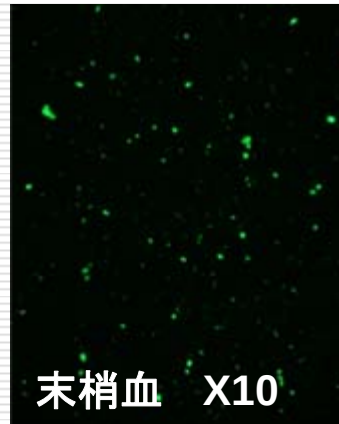
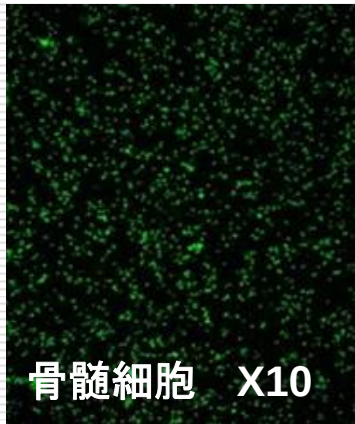
	Green-A	Green-B	Recipient-A	Recipient-B
すい臓	17,000	14580	16	0
肝臓	47	30	0	0
腎臓	307	139	0	0
脾臓	222	116	130	127
心臓	7,730	4,670	0	0
筋肉	8,360	3,190	0	0
胸腺	368	159	94	131
皮膚	770	206	0	0
脳	231	175	0	0
肺	252	141	0	0
脂肪	111	22	0	0
精巣	129	57	—	—
唾液腺	348	300	10	17
十二指腸	924	213	12	14
回腸	354	58	—	—
胃	395	213	22	4
リンパ節	—	—	—	100



GFP量の測定

(湿重量あたりの相対量)

骨髄移植レシピエントマウスの血液、リンパ系でのGFP蛍光



骨髄移植レシピエントマウスでは、骨髄、脾臓(白色髄)、胸腺、リンパ節、末梢血液でGFP蛍光が見られ、胸腺や脾臓での蛍光の強さ計測したところ、骨髄のドナーであるグリーンマウスとほとんど同じであった(6ページ表)。



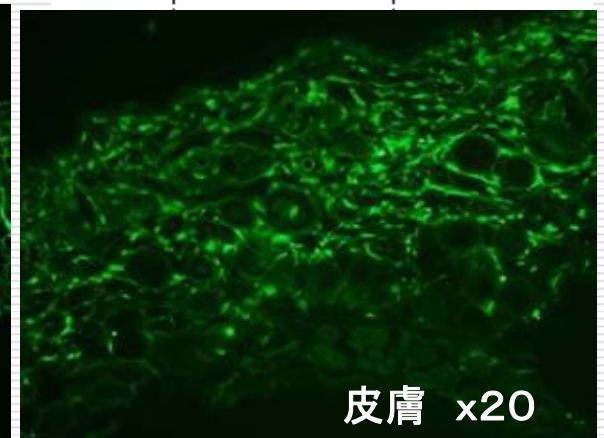
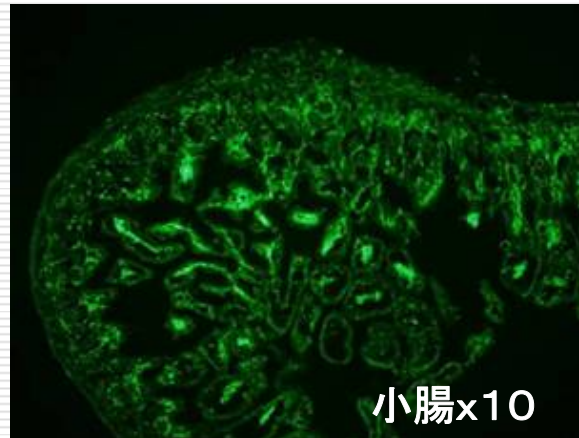
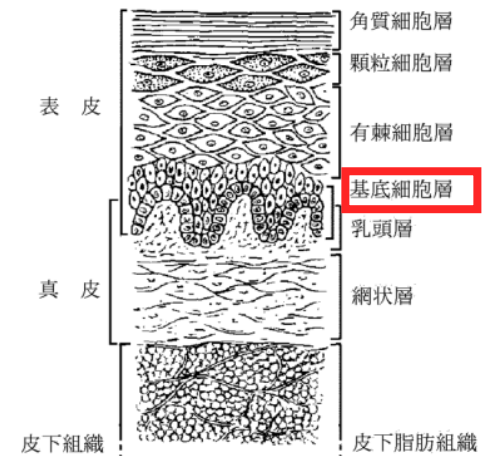
GFP量の測定

骨髓移植レシピエントマウスの皮膚、小腸でのGFP蛍光

皮膚や小腸では、蛍光測定では数値に出なかったが(6ページ表)、組織の蛍光顕微鏡観察では明瞭な蛍光が見られた。

皮膚では表皮にGFP蛍光が見られた。基底細胞層に放射線感受性の皮膚の幹細胞があり、これらの幹細胞は放射線照射を受けて死滅したが、移植した骨髓幹細胞がここに定着して増殖分化したと考えられる。

小腸でも、皮膚と同様に腸粘膜上皮は多層の細胞層から成り、分裂性で放射線感受性の細胞を含む未分化細胞層(基底層やクリプト構造)はドナーの幹細胞で置き換わり、GFP蛍光を持つ細胞はこの幹細胞から増殖、分化した細胞である考えられる。



組織の蛍光観察

まとめ

- グリーンマウスでは赤血球、毛以外の細胞、組織でGFPの蛍光がみられたが、特に、骨格筋、心筋、脾臓では重量あたりで肝臓の200－500倍ものGFPが存在した。遺伝子の発現がプロモーターによって調節されていることが理解できた。
 - グリーンマウスの骨髄細胞を移植したレシピエントマウスでは、造血系の臓器、細胞（脾臓、骨髄、リンパ節、胸腺、末梢白血球）でGFPの蛍光が見られ、ドナー由来の造血幹細胞が増殖、分化していることが分かった。
 - 造血組織以外でも、レシピエントマウスの多くの組織でGFP蛍光が観察された（蛍光強度では数値に表れないが組織もあったが）。皮膚、腸管では骨髄幹細胞から分化した細胞が表皮、腸粘膜上皮を構成していることが観察できた。
 - レシピエントマウスで筋肉のバイオペシーをした部位ではGFP蛍光が見られたことから（結果は省略しました）、筋肉の再生にもドナー由来の骨髄幹細胞が関わっていると思われる。
 - 以上のことから、骨髄にある成体幹細胞は血液、リンパ系の細胞に分化するだけでなく、いろいろな組織に分化できる可能性を秘めた細胞であることがよく理解できた。
-

感想

私たちは全員が1年生ということもあり、難しいのではないかと、本当に面白いのだろうか多少不安な気持ちで参加しました。今まで動物を解剖したことがなく、最初はハサミを入れることにさえ抵抗があり、「本当に解剖なんてできるのかな」ととても不安でした。しかし実際やってみると慣れてきて、最後には何の抵抗もなく解剖に取り組んでいる自分がいました。いろいろな臓器でGFPの光り具合をグリーンマウスとレシピエントマウスで比較する余裕もできました。学校では忙しいこともあり、授業であまり実験をやらなくなりましたが、SPP授業ではじっくり実験に取り組んだことから科学の面白さ、科学の最先端を支える研究者の気持ちも分かったように思います。当初の不安な思いとは裏腹にとっても貴重で有意義な体験でした。

今回の体験が、将来の夢の1つのきっかけになればいいなと思います。

最後に実験でお世話になった小泉先生、前田先生はじめ、バイオメディカル実験研究支援センターの皆様方に感謝いたします。
