

Original

幹細胞移植における脾臓 side population 細胞の
移植細胞としての有用性

木村 拓¹⁾, 高原武志²⁾, 鈴木悠地³⁾,
岩谷 岳¹⁾, 新田浩幸¹⁾, 佐々木章¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 外科学講座

²⁾ 藤田医科大学病院, 総合消化器外科

³⁾ 岩手医科大学医学部, 内科学講座消化器内科肝臓分野

(Received on December 2, 2020 & Accepted on December 7, 2020)

要旨

肝移植の代替療法として幹細胞移植が注目されている。その有力な候補細胞の一つに side population (SP) 細胞がある。SP 細胞は DNA 結合色素 Hoechst 33342 排泄能を持つ細胞で、様々な臓器に存在する。先行研究では、全臓器の中で脾臓が SP 細胞の最大の貯蔵庫であることを見出した。効果的な治療のためには移植のタイミングが重要であり、一時的な細胞の保存が必要となる。本研究では、脾臓 SP 細胞に注目し、凍結による長期保存が可能かどうかを調査することで移植

細胞としての有用性を検証した。まず、ラット脾細胞を凍結し期間ごとの SP 細胞の存在率を測定した。続いて、SP 細胞と非 SP (main population, MP) 細胞を単独で凍結し期間ごとの生存率を比較した。SP 細胞は全保存期間で存在し、凍結後 1 ヶ月で存在率が上昇していた。また、SP 細胞は MP 細胞と比較し一貫して凍結保存後の生存率が高かった。SP 細胞は細胞移植候補として考えた際、凍結ストレスに強いという有利な特性を持つことが示された。

Key words : side population cells, stem cell, transplantation, cryopreservation, splenocytes, hepatocytes

I. 緒 言

肝疾患は、世界で最も多い死因の一つである。末期肝不全に対する肝移植は非常に効果的な治療戦略であるが、ドナーの不足、待機中の死亡率、高コストであることなどは依然として大きな問題である。また、悪性疾患に対する大量肝切除後肝不全は肝移植の適応とはなりづらい。このような状況への代替療法として、幹細胞移植が有力な候補の一つと考えられており、研究が進められている¹⁾。近年になり、幹細胞に

関する研究は飛躍的な進歩を遂げているが、現在確立されている幹細胞純化の手法は主に表面抗原マーカーを複数組み合わせるものであり、簡便性に欠け、動物種によってもそのマーカーが異なることから普遍性に欠ける。1996 年、Goodell らは元来細胞周期の解析を行うために用いられてきた DNA 蛍光色素の Hoechst 33342 でマウス骨髄細胞を染色し、fluorescent-activated cell sorter (以下 FACS) を用いて 2 波長解析をすることで通常細胞周期解析で見られる G0/G1 期よりもさらに蛍光強度の低い細胞集団を発見し、その分画に造血幹細胞を多く含むことを報告した。その細胞集団は、

Corresponding author: Taku Kimura
kutaramuki17@gmail.com

展開した際の突出した分画のかたちから side population 細胞 (以下 SP 細胞) と名付けられ、高い増殖能・分化能を持つことが示された²⁾。その後、骨髄から分離した SP 細胞を筋ジストロフィーのモデルマウスに移植したところ、ジストロフィン陽性の筋細胞が骨格筋で確認された³⁾。皮膚⁴⁾、骨格筋⁵⁾、乳腺⁶⁾、心筋⁷⁾、脳⁸⁾、肝臓⁹⁾、腎臓¹⁰⁾、肺¹¹⁾などの様々な臓器、また、ヒト、サル、ブタ、イヌ、ゼブラフィッシュなどの異なった動物種でも同様に SP 細胞分画の存在が報告されており¹²⁾、臓器や動物種によらない普遍的な組織幹細胞分離法として、注目を集めている。また、コラーゲンゲルサンドイッチ法で肝細胞と共培養した SP 細胞が、肝細胞に特異的な蛋白であるサイトケラチン 18 を発現したことが報告されている¹³⁾。

我々の先行実験では、脾臓の SP 細胞の存在率が骨髄よりも高く、脾臓が全臓器の中で SP 細胞の最大の貯蔵庫であることを見出した。脾臓は肝硬変患者で腫大し、脾機能亢進のために摘出することがある臓器でもあり、摘出した脾臓から移植細胞を得ることができれば有用性が高く、SP 細胞の入手源として期待される。

効果的な治療のためには細胞移植のタイミングが重要であり、一時的な保存が必要となることもある。また、より良好な治療効果を得るために複数回にわたり移植を施行する可能性も考えられる。移植細胞が長期保存に耐えうる能力を有していることは重要な条件であり、SP 細胞にもその能力が求められる。本研究では、脾臓由来の SP 細胞が、一般的な細胞保存法である凍結による長期保存が可能かどうか調査することで、移植細胞としての有用性を検証した。

II. 研究材料および方法

岩手医科大学動物実験委員会の審査で承認 (登録者番号: M-29-088) を得て、実験動物の適正な取り扱いのもと動物実験を行った。動物は Wistar 系ラット雄性 (18 ~ 20 週齢) を用

いた。

1. 脾細胞の凍結保存と SP 細胞解析

脾細胞をある一定の期間 (1 ヶ月, 2 ヶ月, 3 ヶ月) 凍結保存後に解凍し、長期凍結保存後でも SP 細胞は存在しうるか検証を行った。また、同時に生細胞中に占める SP 細胞の存在率を測定し、比較した。

1) 脾細胞の採取

ラットより脾臓を摘出後、被膜を小剪刀で切開し、リン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS) 内で鑷子を用いて脾臓をしごくように圧搾し、70 μ m のセルストレーナー (Falcon Cell Strainers, Corning 社, ニューヨーク, アメリカ) で粗大な結合組織を除去することで、赤血球成分を含む脾細胞浮遊液を作成した。その後、塩化アンモニウム溶液 (RBC Lysis Buffer, pluriSelect 社, ライプツィヒ, ドイツ) で赤血球を溶血させ除去し、脾細胞を採取した。

上記手技で採取された細胞集団の評価は、採取した細胞中の T 細胞率を測定し、一般的なラット脾細胞の population と比較することにより行った。汎 T 細胞マーカーである CD3 抗原を発現した細胞を、あらかじめ FITC 標識されたラット抗 CD3 抗体 (FITC anti-rat CD3 Antibody, BioLegend 社, サンディエゴ, アメリカ) と反応させ免疫染色し、FACS (FACS Aria, Becton Dickinson 社, フランクリンレイクス, アメリカ) を用いて測定を行った。negative control としては isotype control 抗体 (FITC Mouse IgM, κ Isotype Ctrl Antibody, BioLegend 社) を使用した。

2) 脾細胞の凍結保存

採取した脾細胞は $2 \sim 3.0 \times 10^6$ 細胞/ml となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) 含有の凍結培地 (CELLBANKER 1, 日本全薬工業株式会社, 福島) で懸濁後、 -80°C で凍結保存した。

3) Hoechst 染色

脾細胞を $10^6 \sim 10^7$ 細胞/ml になるように培

地に再懸濁し、Hoechst 33342 (bisBenzimide H 33342, Sigma-Aldrich 社, セントルイス, アメリカ) を終濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。染色培地はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich 社) に非働化処理済のウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, Thermo Fisher Scientific 社, ウォルサム, アメリカ) (以下 FBS) を終濃度 2%, HEPES buffer (HEPES-Buffer 1 M, pH 7.5, American Research Products 社, ウォルサム, アメリカ) を終濃度 10 mM となるように添加したものを使用した。コントロール群には、ベラパミルを終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ となるように追加で添加した。攪拌しながら 37°C で 90 分間インキュベートした。インキュベート後細胞を洗浄し, propidium iodide (Propidium iodide, Sigma-Aldrich 社) (以下 PI) を終濃度 2 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した冷 PBS で再懸濁した。染色後の細胞は氷上で保管した。

4) SP 細胞解析

Hoechst 染色した脾細胞について、FACS を用いて PI 陰性の生細胞を選別後、縦軸に Hoechst blue (424/44) と横軸に Hoechst red (585/42) の 2 波長に展開した。双方で蛍光強度が低い、すなわち Hoechst 染色性の低い細胞集団が SP 細胞であり、Hoechst 排泄能が高いことを意味する。

2. SP 細胞と MP 細胞の分離と凍結保存

SP 細胞と SP 細胞以外の細胞 (main population 細胞, 以下 MP 細胞) とを分離後にそれぞれ単独で凍結保存し、凍結後 1・5・10・20・30 日で解凍した。凍結保存期間によってそれぞれの細胞の生存率の推移の比較を行った。

採取後の脾細胞を上記と同様に Hoechst 33342, PI で染色し、FACS を用いて SP 細胞と MP 細胞をそれぞれ約 2 万個ずつ分離した。分離した細胞は凍結培地内に直接採取し、採取

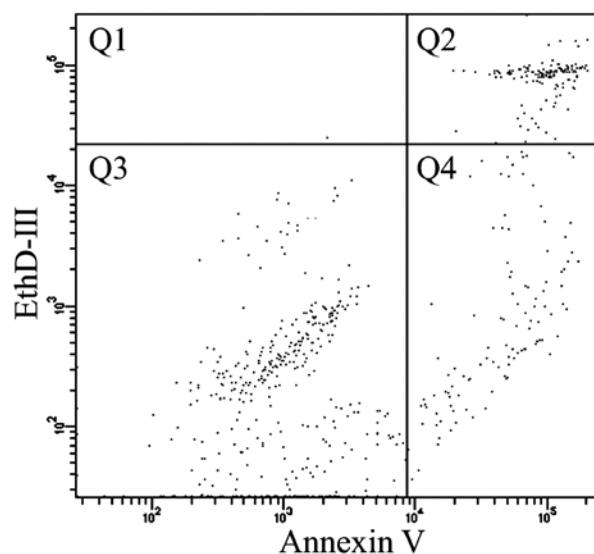


図 1. 生細胞率, アポトーシス細胞率, ネクローシス細胞率の測定

- Q2: ネクローシス細胞
- Q3: 生細胞
- Q4: アポトーシス細胞

後は直ちに -80°C で凍結した。

1) 生細胞率測定

SP 細胞と MP 細胞をそれぞれ Annexin V と Ethidium homodimer III (以後 EthD-III) で 2 重染色し解析を行った。

染色には Apoptotic/Necrotic Cell Detection Kit (PromoCell 社, ハイデルベルク, ドイツ) を使用した。Annexin V は細胞膜構造の変化が生じたアポトーシス細胞・ネクローシス細胞に特異的に結合するタンパク質で、本キットではあらかじめ FITC 標識されている。EthD-III はネクローシス細胞のみを染色する蛍光色素である。レーザーで励起される波長がそれぞれ異なるため FACS で生細胞, アポトーシス細胞, ネクローシス細胞の解析が可能である (図 1)。SP 細胞と MP 細胞をそれぞれプロトコールに準じて染色後、FACS を用いて生細胞数, アポトーシス細胞数を計測し、生存率を測定した。ピペティングや遠心操作などの機械的障害に起因すると考えられるネクローシス細胞は、計測から除外した。

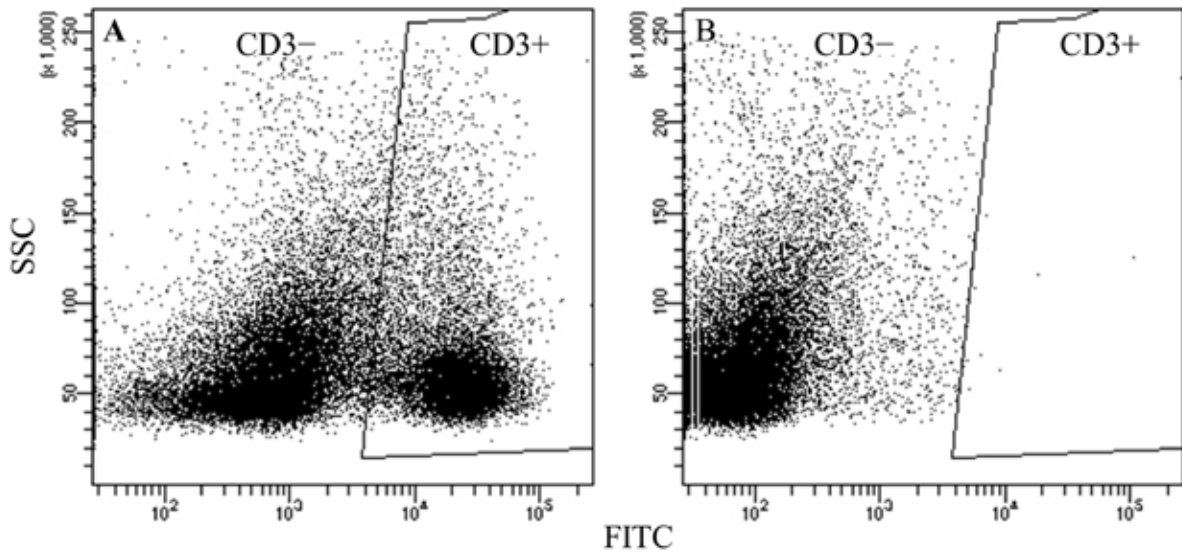


図2. ラット脾細胞の population 測定
 A: 抗 CD3 抗体による免疫染色後
 B: negative control

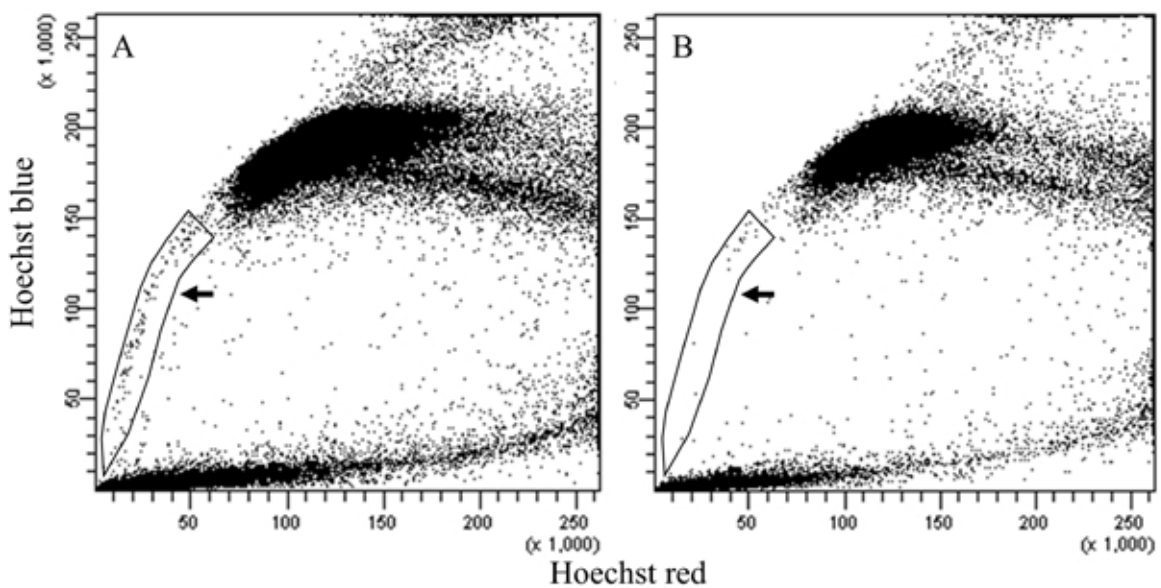


図3. SP細胞解析
 A: SP細胞分画
 B: ベラパミル添加による SP細胞分画の消失

3. 統計解析

数値は平均値 ± 標準偏差で表した。SP細胞とMP細胞の比較には、対応のない2標本t検定を用いた。統計解析は統計解析ソフトEZR (version 1.53, 自治医科大学, 栃木)で行った。p値が0.05未満を有意差ありとした。

III. 結 果

1. 脾細胞の凍結保存と SP細胞解析

脾臓から採取された総細胞数はラット1匹あたり $6.44 \pm 0.21 \times 10^8$ 個で、そのうちCD3陽性細胞率は33.0%であった。一般的にラット脾細胞中のT細胞率は31.5 ~ 33.5%程度¹⁴⁾で

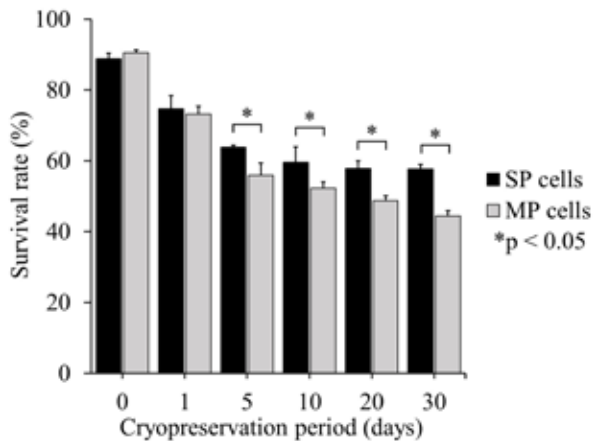


図4. SP細胞とMP細胞の各凍結保存期間における生存率の推移

day 0:分離直後, day 1:凍結後1日, day 5:凍結後5日, day 10:凍結後10日, day 20:凍結後20日, day 30:凍結後30日

あり, 採取された脾細胞は平均的な population であった (図2).

当実験における SP 細胞解析の1例を示す. ベラパミル添加群では SP 細胞分画の消失が確認され, 典型的な SP 細胞の観察が可能であった (図3).

脾細胞採取直後の SP 細胞の存在率は 1.78% であった. 全凍結保存期間において SP 細胞の存在が確認され, その存在率は凍結後 1・2・3 ヶ月でそれぞれ 1.83%, 1.21%, 1.18% であった.

2. SP 細胞と MP 細胞の分離と凍結保存

凍結期間が長期になるほど SP 細胞と MP 細胞の生存率は低下した. 分離直後, 凍結後1日の SP 細胞と MP 細胞の生存率は, 有意差が認められなかった (分離直後 / $p = 0.1204$, 凍結後1日 / $p = 0.3226$). 凍結後 5・10・20・30 日の生存率は, SP 細胞が $63.86 \pm 0.55\%$, $59.57 \pm 4.43\%$, $57.86 \pm 2.15\%$, $57.70 \pm 1.26\%$, MP 細胞が $55.93 \pm 3.45\%$, $52.25 \pm 1.81\%$, $48.74 \pm 1.38\%$, $44.45 \pm 1.49\%$ であり, 一貫して SP 細胞において生存率が有意に高かった (凍結後 5 日 / $p = 0.0163$, 10 日 / $p = 0.0483$, 20 日 / $p = 0.0036$, 30 日 / $p = 0.0003$) (図4).

IV. 考 察

肝臓の再生機構には, 肝臓内の肝芽細胞・オーバル細胞・組織幹細胞 (造血幹細胞など) が関与している可能性が高いとされる. これらは肝切除後に血清値が上昇する IL-6 などにより誘導され, HGF などの成長・増殖因子によって制御されている¹⁵⁾.

肝再生の過程において, どのような由来の細胞が障害肝に生着・増殖するのか未だ活発な議論の対象である. 人に対する生体肝移植では, 術後の肝生検でレシピエント由来の細胞がドナー肝内に同定されたとの報告がある¹⁶⁾. 肝再生へ関与する多様な候補細胞がどのように関与しているのかは明らかではないが, 間葉系幹細胞が肝障害を改善することが明らかとなっている¹⁷⁾.

今回, 脾細胞を長期凍結保存した場合でも SP 細胞の存在を認め, ある一定の保存期間内では十分に SP 細胞を獲得可能であることが確認された. また, 凍結後1ヵ月に解凍した脾細胞の解析を施行したところ, 生細胞中に占める SP 細胞の存在率が上昇しており, SP 細胞が凍結保存に強い可能性が示唆された. 上記結果を検証するために SP 細胞と MP 細胞をそれぞれ分離して単独で凍結保存し, 保存期間ごとに解凍した生存率を比較した. それぞれの細胞を分離し凍結保存した場合でも SP 細胞は MP 細胞より生存率が有意に高い傾向にあり, SP 細胞を今後の移植細胞の候補として考えた場合, 凍結保存に強いという有利な特徴があることが示された.

本現象が生じた理由の一つとして, SP 細胞と MP 細胞の遺伝子発現の差異が考えられる. SP 細胞の遺伝子発現をプロファイリングした文献では, Bcl-2 や Bcl-xL などのアポトーシス抑制遺伝子の発現が上方制御されていたことが報告されており, SP 細胞がアポトーシス抵抗性を持つ可能性を示唆している¹⁸⁾.

SP 細胞と MP 細胞の採取直後では, 有意差

はないがわずかに MP 細胞の生存率が高い傾向にあった。この原因としてはそれぞれの細胞の分離から凍結までにかかる所要時間の違いが影響したと考えている。SP 細胞は臓器や組織などによってもその存在率は異なるが、全体としての存在率は一般的な幹細胞同様に低く FACS での分離行程に時間がかかるため、わずかに SP 細胞と MP 細胞のダメージ差が生じた可能性がある。

本実験の limitation として、染色に使用した Hoechst 33342 の細胞毒性による生存率への影響が否定し得ないことがあげられる。Hoechst 33342 は細胞を生きのまま染色することが可能な色素ではあるが、DNA 合成の阻害や突然変異の誘発などの細胞毒性があり、生存率を低下させることが報告されている¹⁹⁾。SP 細胞はその Hoechst 33342 を排泄する ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 (ABCG2) を発現していることが特徴であり、MP 細胞と比較し Hoechst 33342 による細胞毒性を回避できた可能性が否定できない。

今回我々は SP 細胞の入手源として脾臓に着目した。脾臓を選択したことのメリットとして、冒頭で SP 細胞入手に関する合理性を挙げた。過去の文献では、ラット大量肝切除モデルに脾臓摘出を加えることで至適門脈圧へのコントロールが可能であり、肝再生が促進された²⁰⁾という報告があり、肝再生に関しては、上記に加えてさらに脾臓摘出自体の利点が得られる可能性が示唆された。

今後、摘出した脾臓より分離した SP 細胞を大量肝切除モデルに移植し、その生着率や肝再生への寄与などを検討していきたい。肝切除後に脾摘を行い、その脾臓より SP 細胞を分離して自家移植し、さらに肝再生を惹起する至適門脈圧に調整することが可能となれば、中長期的には再生医療における選択的細胞増殖法の開発への足がかりや切除不能肝腫瘍の究極的治療の開発につながると期待している。

利益相反：著者には開示すべき利益相反はない。

References

- 1) **Wang J, Sun M, Liu W, et al.**: Stem cell-based therapies for liver diseases: an overview and update. *Tissue Eng Regen Med* **16**, 107-118, 2019.
- 2) **Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al.**: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**, 1797-1806, 1996.
- 3) **Gussoni E, Someoka Y, Strickland CD, et al.**: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-394, 1999.
- 4) **Yano S, Ito Y, Fujimoto M, et al.**: Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells* **23**, 834-841, 2005.
- 5) **Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, et al.**: Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells* **22**, 1305-1320, 2004.
- 6) **Behbod F, Xian W, Shaw CA, et al.**: Transcriptional profiling of mammary gland side population cells. *Stem Cells* **24**, 1065-1074, 2006.
- 7) **Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, et al.**: The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* **530**, 239-243, 2002.
- 8) **Kim M and Morshead CM**: Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis. *J Neurosci* **23**, 10703-10709, 2003.
- 9) **Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC, et al.**: Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP) phenotype. *J Clin Invest* **108**, 1071-1077, 2001.
- 10) **Iwatani H, Ito T, Imai E, et al.**: Hematopoietic and nonhematopoietic potentials of Hoechst(low)/side population cells isolated from adult rat kidney. *Kidney Int* **65**, 1604-1614, 2004.
- 11) **Summer R, Kotton DN, Sun X, et al.**: Side population cells and bcrp1 expression in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, 97-104, 2003.
- 12) **Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al.**: Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem

- cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* **3**, 1337-1345, 1997.
- 13) 東 俊文：脾臓 SP 細胞の肝細胞への分化誘導. *G. I. Research* **12**, pp. 519-525, 先端医学社, 東京, 2004.
 - 14) Bio-Rad Laboratories, Inc.: Cell frequencies in common samples. <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-cell-frequency.html>
 - 15) **Duncan AW, Dorrell C and Grompe M**: Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* **137**, 466-481, 2009.
 - 16) **Katagiri H, Kushida Y, Nojima M, et al.**: A distinct subpopulation of bone marrow mesenchymal stem cells, muse cells, directly commit to the replacement of liver components. *Am J Transplant* **16**, 468-483, 2016.
 - 17) **Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al.**: A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 14228-14233, 2004.
 - 18) **Yajima T, Ochiai H, Uchiyama T, et al.**: Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell carcinoma cell line Ho-1-N-1. *Int J Oncol* **35**, 273-280, 2009.
 - 19) **Durand RE and Olive PL**: Cytotoxicity, mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342. *J Histochem Cytochem* **30**, 111-116, 1982.
 - 20) 安藤太郎, 高原武志, 長谷川康, 他：ラット肝切除モデルにおける脾摘の門脈圧と肝再生に与える影響. *岩手医誌* **68**, 189-196, 2016.

Utilization of spleen side population cells as transplant cells in stem cell transplantation

Taku KIMURA¹⁾, Takeshi TAKAHARA²⁾, Yuji SUZUKI³⁾,
Takeshi IWAYA¹⁾, Hiroyuki NITTA¹⁾ and Akira SASAKI¹⁾

¹⁾Department of Surgery, School of Medicine,
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

²⁾Department of Surgery, Fujita Health University Hospital,
Toyoake, Japan

³⁾Division of Hepatology, Department of Internal Medicine,
School of Medicine, Iwate Medical University, Yahaba, Japan

(Received on December 2, 2020 & Accepted on December 7, 2020)

Abstract

Stem cell transplantation has attracted attention as an alternative to liver transplantation. Side population (SP) cells are among the most promising candidate transplant cells. SP cells are capable of excreting the DNA-binding dye Hoechst 33342, and are found in various organs. In a previous study, we found that among all organs, the spleen was the largest reservoir of SP cells. Because the timing of transplantation is important for effective treatment, temporary storage of cells is often necessary. In this study, we focused on spleen SP cells, and assessed their usefulness as

transplant cells by evaluating whether they can be stored by freezing for extended periods. First, rat spleen cells were frozen, and the presence rate of SP cells was measured at each time point. SP cells and non-SP (main population, MP) cells were frozen and the survival rates of the SP and MP cells were compared at each time point. It was concluded that SP cells were resistant to freezing stress, which is an advantageous property for cells used in stem cell transplantation.
