

実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡を用いた
Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)
陽性細胞の同定法

諏訪 通博

新潟大学大学院医歯学総合研究科

腎泌尿器病態学分野

(主任：高橋公太教授)

Identification of Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)
Positive Cells Using Real - Time Intravital
Confocal Laser Scanning Microscopy

Michihiro SUWA

Division of Urology, Department of Regenerative and Transplant Medicine,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Kota TAKAHASHI)

要 旨

【背景】

近年、骨髄由来細胞が様々な臓器の細胞に分化することが報告され、障害臓器に対する骨髄由来細胞を用いた再生治療への応用が期待されている。一方、骨髄由来細胞の腎構成細胞への分化については、一致した見解は得られていない。このような見解の相違は実験モデルの違いや動物種の違いに起因する可能性もあるが、骨髄由来細胞に対する各種マーカーの同定法の相違、その手技の困難さなど、技術的な問題も大きく関係していると考えられる。

今回、われわれは腎障害時の修復過程における骨髄由来細胞の役割を研究する目的で、Enhanced green fluorescent protein (EGFP) Transgenic Rat (EGFP ラット) を用いて、骨髄由来細胞の細胞局在を明らかにする最適な同定法について検討した。

Reprint requests to: Michihiro SUWA
Division of Urology Department of Regenerative
and Transplant Medicine
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahomachi - dori,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科腎泌尿器病態学分野
諏訪 通博

【方法】

EGFP ラットの未固定凍結切片と 4%パラホルムアルデヒド固定凍結切片、さらに、生体顕微鏡を用いて、EGFP ラットの最適な観察方法を比較検討した。次に腎障害時の修復過程における骨髓由来細胞の役割を研究する目的で、EGFP ラットの骨髓を、致死量放射線照射を行った野生型ラットに静注し、キメララットを作成した。骨髓が完全に置換された骨髓移植 5 週目に 60 分の腎虚血（虚血群）または、擬似手術（コントロール群）を行った。腎機能が回復した 2 週後に、実時間型レーザー走査生体顕微鏡を用いて、腎皮質を生体内観察した。さらに 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い 10 μ m 凍結切片を作成し、骨髓由来細胞の細胞局在を明らかにする最適な同定法について比較検討した。

【結果】

EGFP ラットの凍結切片による観察は、EGFP の強い水溶性のために、4%パラホルムアルデヒドによる固定が必要であった。生体顕微鏡による生体内観察は、尿細管間質微小血管周囲の詳細な観察が可能で、組織切片による観察では困難であった血管内皮細胞の局在も確認できた。キメララット腎間質の EGFP 陽性骨髓由来細胞の細胞局在についての比較検討では、コントロール群で、尿細管周囲間質に散在する EGFP 陽性骨髓由来細胞を認めた。4%パラホルムアルデヒド固定凍結切片と生体顕微鏡の所見は、ほぼ同様であった。一方、虚血群において、EGFP 陽性骨髓由来尿細管間質浸潤細胞、EGFP 陽性骨髓由来血管内皮前駆細胞を認めた。凍結切片の観察では、EGFP 陽性骨髓由来血管内皮前駆細胞はわずかの頻度しか認められなかったが、生体顕微鏡を用いた生体内観察により、多数の EGFP 陽性骨髓由来血管内皮前駆細胞が確認された。

【考察】

実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡を用いることにより、骨髓由来の尿細管間質浸潤細胞、および血管内皮前駆細胞の同定が可能となった。従来のパラホルムアルデヒド固定凍結切片の観察では困難であった、EGFP 陽性骨髓由来血管内皮前駆細胞の局在が明らかとなり、血管再生機構を解析するうえでの本法の有用性が確認された。

キーワード：Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)、キメラ、生体顕微鏡、血管内皮細胞、虚血再灌流傷害

はじめに

近年、骨髓由来細胞が様々な臓器の細胞に分化することが報告されている^{1) - 16)}。一方、骨髓由来細胞の腎構成細胞への分化については、メサンギウム細胞への分化は確認されているものの¹⁾²⁾、糸球体上皮細胞、尿細管細胞、腎間質血管内皮細胞などへの分化については一致した見解はえられていない^{12) - 16)}。このような見解の相違は実験モデルの違いや動物種の違いに起因する可能性もあるが、骨髓由来細胞に対する各種マーカーの同定法の相違、その手技の困難さなど、技術的な問題も大きく関係していると考えられる。

骨髓由来細胞の各臓器構成細胞への分化に関す

る研究は、通常、骨髓移植モデルを用いて行われる。つまり、致死量放射線照射により骨髓を破壊した後、各種マーカー遺伝子導入動物から採取した骨髓細胞、あるいは、異なる major histocompatibility complex (MHC) や異なる性別の骨髓細胞を移植し、いわゆる骨髓キメラ動物を作成後、骨髓由来細胞の各臓器構成細胞への分化を検討するものである¹⁷⁾。Enhanced green fluorescent protein (EGFP) は、クラゲから得られた蛍光蛋白である GFP を遺伝子改変により蛍光強度を増強したマーカーであるが、その遺伝子を強制発現した遺伝子導入動物や細胞を用いた研究が注目されてきている。その他としては、 β -ガラクトシダーゼや MHC、性染色体等をマーカーとして用いる方

法があるが、抗体による染色や *in situ hybridization* などとの併用が必要で、技術的な面での問題が多い。一方、EGFPは強い水溶性のために組織観察が難しいという欠点があるものの¹⁸⁾、特別な染色を行う必要がなく、容易にその発現部位を同定することが可能であることから、非常に優れたマーカーとなりうる。

今回、われわれは、腎障害時の修復過程における骨髄由来細胞の役割を研究する目的で、EGFP transgenic rat を用いて、骨髄由来細胞の組織局在を明らかにする最適な同定法について検討した。

実験動物と方法

実験動物

EGFP transgenic Sprague-Dawley Rat (EGFP ラット) を日本 SLC (大阪大学, 岡部勝先生の認証受理済) より購入し、新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター動物資源開発支援研究部門にて EGFP ラット (EGFP (+/-)) の交配を行い、自家繁殖させたものを実験に使用した。EGFP ラットは EGFP マウスと同様の方法で作成され、EGFP の発現はサイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリ β -actin プロモーターにより、体毛と赤血球以外の細胞の細胞質に強制発現される¹⁸⁾。すべての動物実験は新潟大学における動物実験の指針と規則に基づき行われた。

EGFP ラット腎臓の切片標本の観察

EGFP ラットを pentobarbital sodium (50mg/Kg) 腹腔内投与により全身麻酔し、左心室から phosphate-buffered saline (PBS) を灌流後、直ちに腎臓を切離し、細切し、 -80°C ヘキサン中で急速凍結した。次に EGFP 陽性細胞を同定する際の組織固定の重要性を検討するために、左心室から少量の PBS で灌流後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。EGFP ラットの腎臓をラットより切離し、細切後、 -80°C ヘキサン中で急速凍結した。それぞれの切片を比較検討するために、 $10\mu\text{m}$ 凍結切片を作成し、共焦点レーザー走査顕微鏡 (MRC-1024; Bio-Rad, Tokyo, Japan) で観

察した。えられた画像は、IBM コンピューター (OS2) 附属デジタル画像ソフトで取り込んだものを使用した。

EGFP ラット腎間質の実時間生体内観察

EGFP ラット腎間質の実時間生体内観察のために、共焦点レーザー走査顕微鏡 (CSU-10, Yokokawa, Tokyo, Japan) と高速冷却 CCD カメラ (C2400-89, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を連結したシステムを用いた。このシステムが、fluorescein isothiocyanate (FITC) を指標とした腎微小循環動態の観察に極めて有用であることを既に報告しているが¹⁹⁾、今回、EGFP の有効波長が FITC と近接していることを利用し、EGFP の実時間生体内観察に応用した。このシステムを概説すると、共焦点レーザー走査顕微鏡は、水浸対物レンズ (Fluor 10x/0.30W, Fluor 40x/0.80W, Nikon) を使用し、共焦点スキャナーユニットはタンデム方式を採用している。このユニットは円盤 (Nipkow disk, ニポウ板) に配置したピンホールを通してレーザー光を検体に当て、反射光ないし発蛍光を、高速回転したピンホールを通して共焦点像をえる。その際、2万個に及ぶマイクロレンズを持つ円盤も同様に回転させ、集光率を高めて、1000 フレーム/秒以上の高速走査を行い、高速 CCD カメラが 30 フレーム/秒の共焦点像を捉えることが可能となる。えられた画像はビデオレコーダー (Model SVO-9600; Sony, Tokyo, Japan) に録画し画像解析に用いることができる。なお、この実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡の観察可能深度は約 $100\mu\text{m}$ である。

EGFP ラットは thiobutabarbital sodium salt (100mg/kg) 腹腔内投与による麻酔後、左腰部斜切開にて左腎を露出し、 37°C 生理食塩水を満たした容器に左腎を浸し、約 30 分間左腎を静置し血行動態を安定させ、実時間型生体顕微鏡による生体内観察を行った。

全身放射線照射と骨髄移植

雄 6~8 週齢の EGFP 陰性の野生型ラットをレシピエントとし、graft versus host disease (GVHD)

等の免疫学的反応を最小限とするために、兄弟の EGFP 陽性ラットをドナーとして骨髄移植を行った。骨髄細胞は EGFP 陽性ラットの大腿骨、脛骨、上腕骨の骨髄を PBS で流出し採取した。それらを径 75- μm 、50- μm のメッシュで濾過し、再度 PBS で洗浄、 $1-2 \times 10^8$ cells/ml に調整後、使用時まで氷冷した。EGFP 陰性ラットは X 線照射装置 (PS-3000 SB Cs-137, Pony Industry. co. LTD., Tokyo, Japan) を用いて致死量 10Gy を照射した。照射後 4 時間以内に EGFP 陽性ラットから採取した骨髄細胞を照射済みドナーの尾静脈より投与した。なお、この様に作成されたラットをキメララット (理論的に骨髄由来細胞のみ EGFP 陽性細胞となる) とした。キメララットは 2 週間、無菌的に飼育され、抗生剤、免疫抑制剤等は投与しなかった。また、キメララットの骨髄は骨髄移植後 5 週間後までには EGFP 陽性細胞に置換されていることを確認している (投稿準備中)。

実験プロトコール (腎虚血再灌流傷害)

骨髄移植 5 週後のキメララットを pentobarbital sodium (50mg/Kg) 腹腔内投与により全身麻酔した。虚血群 ($n = 3$) は、腹部正中切開後に左腎動静脈を露出し、血管クリップ (Fine Science Tools, Forster City, CA) で左腎動静脈を遮断、60 分後開放した。血流再開を肉眼的に確認後、切開創を縫合した。コントロール群 ($n = 3$) は腹部正中切開のみ行った。虚血またはコントロール手術の 2 週後にキメララットの左腎を実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡で生体内観察した。生体顕微鏡による観察後、左心室より少量の PBS を灌流した後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。

光学顕微鏡による観察

光学顕微鏡観察用に腎臓の一部は、10%中性ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、2~3 μm 切片を periodic acid-Schiff (PAS), hematoxylin and eosin (HE) 染色したものを観察した。

免疫組織化学的検索

キメララット腎を免疫組織化学的に検討するために、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定したキメララットの腎臓を細切、軽く PBS で洗浄し、4 $^{\circ}\text{C}$ の 6.8%スクロース-PBS に 24 時間浸透後、-80 $^{\circ}\text{C}$ へキサン中で急速凍結した。10 μm 凍結切片を作成し、PBS で 3 回洗浄後、1 次抗体を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間反応させた。1 次抗体は 50 倍希釈マウス抗ラット CD45 (Common Leukocyte Antigen) モノクローナル抗体 (Cosmobio, Tokyo, Japan), 50 倍希釈マウス抗ラット CD31 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1; PECAM-1) モノクローナル抗体 (Serotec Ltd., Oxford, England) を使用した。PBS で 3 回洗浄した後、2 次抗体である 20 倍希釈 tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) 標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark) を室温で 2 時間反応させた。なお、2 次抗体はラットイムノグロブリンとの非特異的反応を防ぐために、2%ラット血清で吸収後使用した。これらの切片は前述と同様、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

キメララット腎間質の実時間生体内観察

キメララット腎間質の EGFP 陽性細胞について、前述のシステムを用いて実時間生体内観察を行った。観察の際に、FITC 標識自己赤血球を投与することにより腎間質における微小血管を含めた血管系を同定でき、腎間質の解剖学的局在が理解しやすい。キメララットは thiobutabarbitol sodium salt (100mg/kg) 腹腔内投与で麻酔し、FITC 標識自己赤血球の投与と血圧測定のために左内頸動脈にポリエチレンカテーテル (PE50) を留置した後、EGFP ラットと同様の方法で、実時間生体顕微鏡で生体内観察した。FITC 標識自己赤血球は、予め観察するキメララットから採血した赤血球を FITC (1mg/ml; ICN Pharmaceuticals, Inc., Cleveland, OH) を含んだ 37 $^{\circ}\text{C}$ の PBS に 1 時間浸透させ標識した後、1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を含んだ PBS で 2 回洗浄し、未結合の蛍光色素を除去後、生理食塩水でヘマトクリット (Ht) 値を約

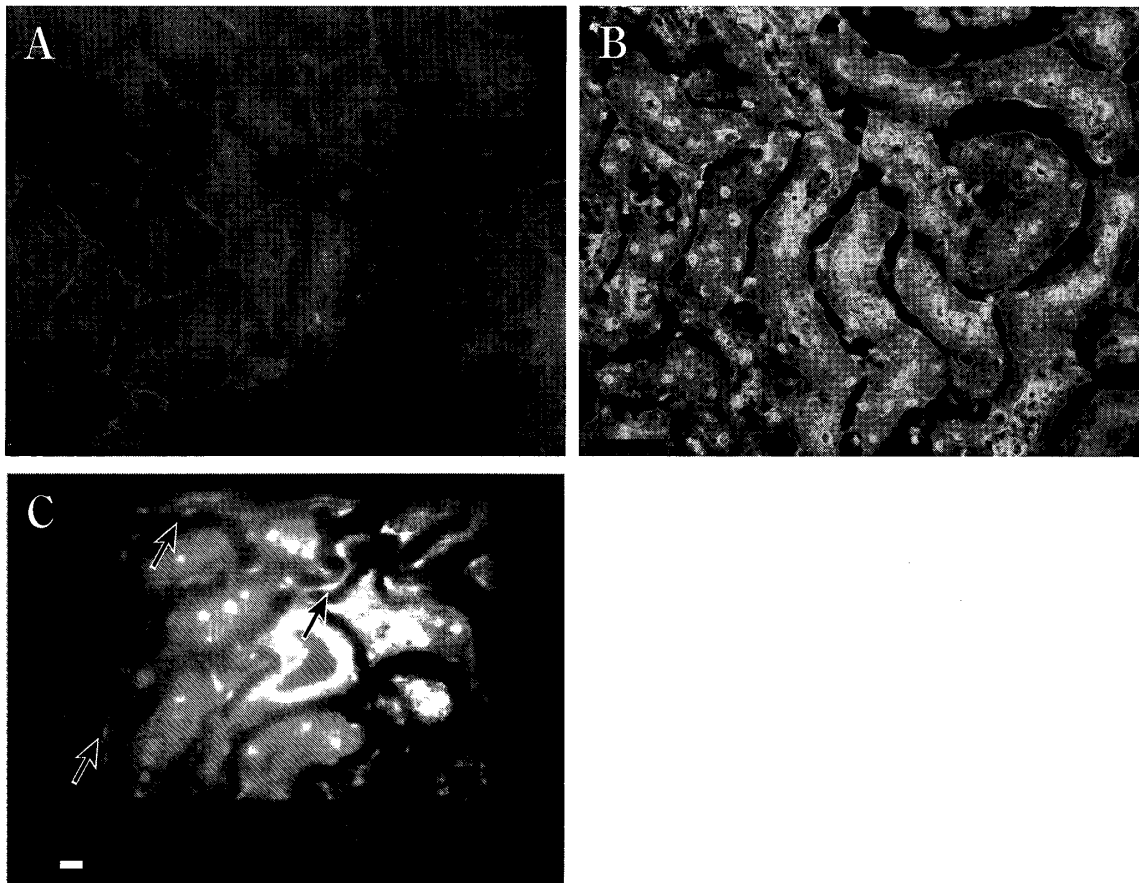


図1 EGFPラット腎の共焦点レーザー走査顕微鏡及び実時間型生体顕微鏡所見

共焦点レーザー走査顕微鏡による、未固定EGFPラット腎の $10\mu\text{m}$ 切片(A)では、細胞内からEGFPの流出を認めた。一方、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した切片(B)は、EGFPが細胞内に保持されていた。実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡によるEGFPの生体内観察所見(C)。すべての細胞にEGFPが発現し、その発現は核と細胞質に強く認められた。特に尿細管間質微小血管周囲の詳細な観察が可能で、血管内皮細胞の局在も確認できた(矢印)。共焦点レーザー走査顕微鏡所見、実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡所見ともに、拡大率は対物レンズ $\times 40$ 。実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡所見のバーは $10\mu\text{m}$ を示す。

50%に調整し、体重1Kgあたり1mlを、左内頸動脈留置カテーテルより注入した。概算上、標識自己赤血球の割合は全赤血球の約1%である。

結 果

EGFPラット腎臓の切片標本の観察

EGFPマウスの系で、凍結切片を観察する場合の組織固定の重要性について既に報告されている

が¹⁸⁾、EGFPラットの切片標本を観察する場合の、4%パラホルムアルデヒド等による組織固定の必要性について検討した。図1Aに示したように、PBS灌流のみのEGFPラット腎では、強い水溶性を持つEGFPは組織から流出しており、未固定標本によるEGFP陽性細胞の観察は不適當であった。一方、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定したEGFPラット腎では、EGFPが細胞内に保持されていた(図1B)。

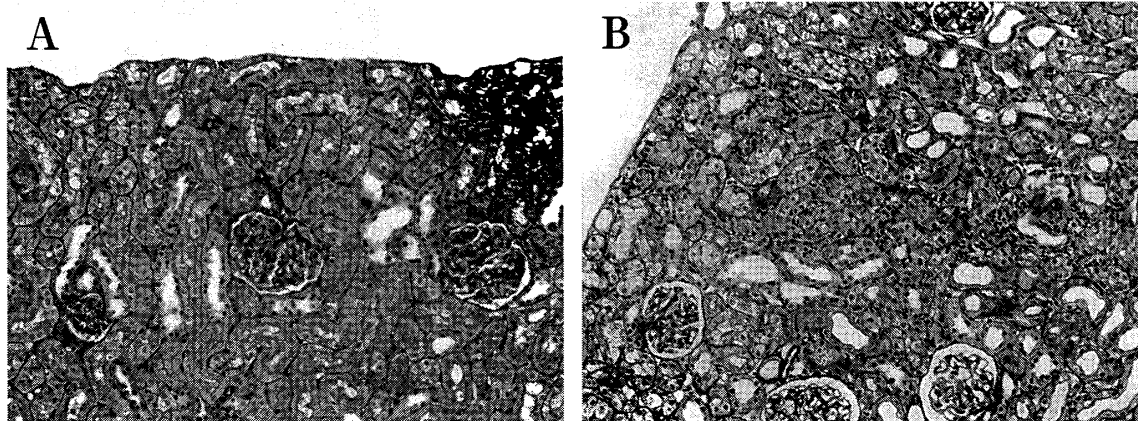


図2 コントロール群 (A), 虚血群 (B) の光学顕微鏡所見

虚血再灌流2週後のキメララット腎は、軽度の細胞浸潤を認め、尿細管の一部空包化は残存していたが、ほとんどの尿細管は正常構造を示し、急性尿細管壊死からは、回復していた。拡大率は×200, PAS染色。

EGFP ラット腎間質の実時間生体内観察

EGFPは前述のように強い水溶性タンパクである。EGFPラットの場合、EGFPは細胞質にほぼ均一に分布しているが、細胞機能が低下あるいは細胞死に陥り、細胞膜の破綻が生じると、容易に細胞外へ流出してしまう。EGFPラット腎を生体内観察すると、ほとんど全ての細胞にEGFPが発現し、その発現は核と細胞質に強く認められた(図1C)。また、尿細管、間質微小血管周囲の解剖学的部位も判別可能となり、組織切片による観察では困難であった血管内皮細胞の局在も確認できた。

キメララット腎虚血再灌流傷害後の光学顕微鏡所見

虚血再灌流2週後のキメララット腎は、軽度の細胞浸潤を認め、尿細管の一部空包化は残存していたが、ほとんどの尿細管は正常構造を示し、急性尿細管壊死からは、ほぼ回復していた。また、腎皮膜直下にも浸潤細胞や傷害された尿細管を認め、障害は腎皮膜直下まで及んでいたことを示していた(図2)。

キメララット腎に動員された

EGFP 陽性骨髄由来細胞

共焦点レーザー走査顕微鏡によるキメララットの10 μ m切片標本の観察では、コントロール群で、間質に散在する骨髄由来細胞であるEGFP陽性細胞を認めた(図3A)。これらの細胞の約半数は、伊藤らがvimentin陽性の間葉系の細胞ということ報告しているが²⁾、われわれも同様の結果を得た(データ未提示)。一方、虚血群では、より多くのEGFP陽性細胞の局在を認めた(図3B)。

次いで、虚血群における骨髄由来のEGFP陽性細胞の性状を検索するために免疫組織化学的に検討した。抗CD45抗体の染色により、EGFP陽性細胞の多くはCD45陽性の白血球系の細胞であった(図4)。さらに、抗PECAM-1抗体で血管内皮細胞を染色したところ、一部にEGFPと同一の局在を示す微小血管を認めた(図5)。対物レンズ40倍による凍結切片の観察で、EGFP陽性微小血管は各視野に1~2個認められた。

キメララット腎間質の実時間生体内観察

前述したように、EGFP陽性細胞の観察には、生体顕微鏡による観察が最も適していると考えられるため、キメララット腎間質の実時間生体内観

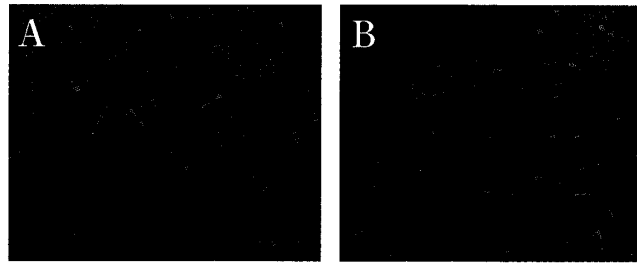


図3 キメララット腎の10 μ m切片標本の共焦点レーザー走査顕微鏡所見

コントロール群で、間質に散在するEGFP陽性骨髄由来細胞を認めた(A)。虚血群では、より多くのEGFP陽性細胞の局在を認めた(B)。拡大率は対物レンズ \times 40。

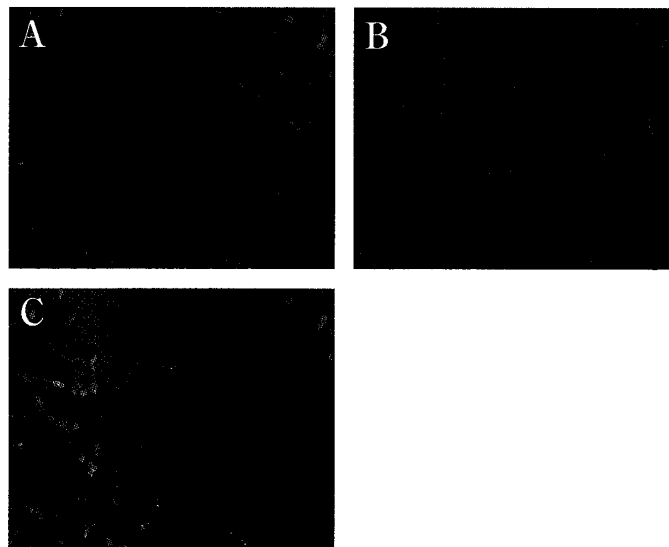


図4 虚血群における、抗CD45抗体による免疫組織化学的検討

EGFP陽性細胞(A:緑)。CD45(B:赤)。EGFP陽性細胞の多くはCD45陽性白血球系の細胞であった(C)。拡大率は対物レンズ \times 40。

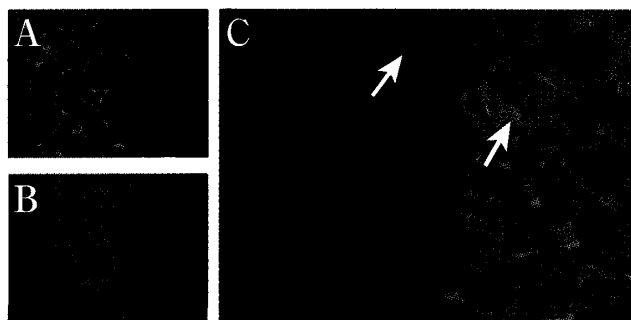


図5 虚血群における、血管内皮細胞同定のための抗PECAM-1抗体による免疫組織化学的検討

EGFP陽性細胞(A:緑)。PECAM-1(B:赤)。一部にEGFP陽性微小血管を認めた(C:矢印)。拡大率は対物レンズ \times 40。

察を行った。図 6A に示すように、コントロール群では、切片組織像とほぼ同様に間質に散在する EGFP 陽性骨髄由来細胞を認めた。一方、虚血群 (図 6B) では、尿細管周囲間質に EGFP 陽性浸潤細胞を認め、血管壁に一致して、EGFP 陽性血管内皮細胞を認めた。切片の観察では、わずかの頻度しか認められなかった EGFP 陽性骨髄由来血管内皮前駆細胞を多数認めることができた。さらに、多くの EGFP 陽性細胞により置換されている血管と、一部のみ置換されている血管を認めた。腎虚血再灌流傷害後の腎間質微小血管の修復に、骨髄由来血管内皮前駆細胞が動員されることを確認できた。

考 察

浅原らにより 1997 年に、末梢血中に骨髄由来血管内皮前駆細胞が存在することが報告²⁰⁾されて以来、骨髄由来細胞が、様々な臓器の構成細胞に分化することが報告されてきている。肝臓では肝細胞や血管内皮細胞^{3)–5)}、心臓では心筋細胞や血管内皮細胞⁶⁾⁷⁾、中枢神経においても神経細胞や血管内皮細胞^{8)–10)}、等への分化が明らかにされている。また、臓器が虚血等の傷害を受けた時に、循環骨髄由来血液幹細胞が増加すること¹²⁾、骨髄由来細胞が傷害を受けた部位に集簇することなどが報告されている¹¹⁾。さらに、骨髄由来細胞は、他の臓器幹細胞に比べ、細胞の採取と処理が比較的容易であることなどから、障害臓器に対する骨髄由来細胞の治療への応用が期待されている。

一方、骨髄由来細胞の腎構成細胞への分化については、糸球体メサンギウム細胞への分化は確認されているものの¹⁾²⁾、糸球体上皮細胞、尿細管細胞、腎間質血管内皮細胞への分化については、それぞれの細胞が確認できたとする報告¹³⁾、尿細管細胞のみ確認できたとする報告¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾、それら全て確認できなかったとする報告¹⁶⁾があり、一致した見解は得られていない。このような見解の相違は実験モデルの違いや動物種の違いに起因する可能性もあるが、本研究で取り扱った各種マ

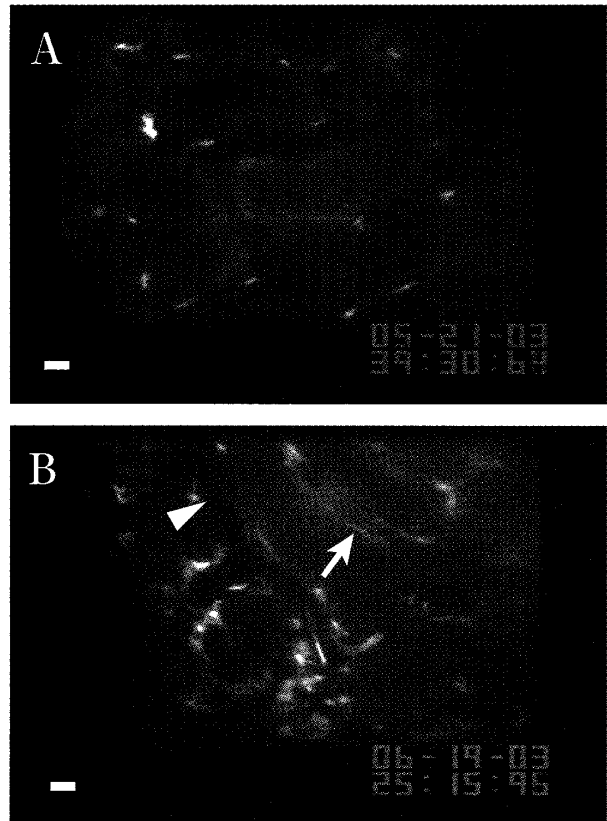


図 6 コントロール群 (A)、虚血群 (B) の実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡所見

コントロール群では、切片組織像とほぼ同様に間質に散在する EGFP 陽性骨髄由来細胞を認めた。一方、虚血群では、尿細管周囲間質に EGFP 陽性浸潤細胞を認め、血管壁に一致して、EGFP 陽性血管内皮細胞を認めた。切片組織像では、わずかの頻度しか認められなかった EGFP 陽性骨髄由来血管内皮前駆細胞を多数認めた。さらに、多くの EGFP 陽性細胞により置換されている血管 (矢印) と、一部のみ置換されている血管 (矢頭) を認めた。拡大率は対物レンズ×40。バーは 10 μ m を示す。

ーカーの同定法の相違、その手技の困難さなど、技術的な問題も大きく関係していると考えられる。

骨髄由来細胞の各臓器構成細胞への分化に関する研究は、通常、骨髄移植モデルを用いて行われる。すなわち、今回使用した EGFP キメララット

モデルのように、放射線照射により骨髄を破壊した後、LacZ, GFP等各種マーカー遺伝子導入動物から採取した骨髄細胞、または、異なる性別やMHCを持つ骨髄細胞を移植し、いわゆる骨髄キメラ動物を作成して骨髄由来細胞の各臓器構成細胞への分化を検討するものである。LacZ遺伝子導入動物の場合、そこから産生される β -ガラクトシダーゼ自身の染色や、それに対する抗体で染色する必要があるが、その染色法の技術的困難性についてはしばしば指摘されている。また、性染色体やMHCをマーカーとして使う場合、*in situ hybridization*を行う必要がある。さらに、分化した細胞の種類を同定するための各種抗体による2重染色を要する。一方、GFPは下村らにより1962年に発見された、クラゲからえられた蛍光タンパクで²¹⁾、Prascherらにより1992年にcDNAがクローニングされて以来²²⁾、急速に普及したマーカー蛋白である。特別な染色をする必要がなく、紫外線照射下で容易に同定可能である。また最近では、GFPを遺伝子改変して蛍光強度を増強したEGFPがマーカーとして用いられることが多い。今回、使用したEGFPラットは、大阪大学の岡部らによりEGFPマウスと同様の方法¹⁸⁾で作出されたが、体毛と赤血球以外のほぼ全ての細胞でEGFPを発現している。また、各細胞内のEGFP発現部位は核と細胞質とされている。一方、EGFPは、強い水溶性を持ち、細胞機能の低下や細胞死に伴って細胞膜の機能が低下すると、容易に細胞外に流出してしまうといった欠点を持っている¹⁸⁾。この強い水溶性のため、切片によるEGFPの観察には、少なくとも4%以上のパラホルムアルデヒド等による固定が必要である。また4%ホルムアルデヒドによるEGFP固定切片と抗GFP抗体による染色を比較し、固定された切片による観察は、EGFPの分布を正しく示していると報告もある²³⁾。強い水溶性を持つGFPは、一般に、GFP標識遺伝子を組み込んだ遺伝子の、培養細胞における細胞内発現や、線虫、ゼブラフィッシュ等でのGFP発現局在を生存した状態で観察するのが最適とされている^{24)–26)}。また、今回と同様の方法で作成されたEGFPマウスの精

原細胞を生体内観察することにより、精原細胞の分化、増殖についての詳細な観察が可能となったとする報告もある²⁷⁾。以上のことから、本研究ではEGFPキメララットを用いたEGFP陽性骨髄由来細胞の同定法として、実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡による生体内観察を試みた。

今回、われわれが用いた実時間顕微鏡装置は、共焦点レーザー走査顕微鏡(CSU-10, Yokokawa, Tokyo, Japan)と高速冷却CCDカメラ(C2400-89, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を連結したシステムである。このシステムが、FITCを指標とした腎微小循環動態の観察に極めて有用であることを既に報告しているが¹⁹⁾、今回、EGFPの有効波長がFITCと近接していることを利用しEGFPの生体内観察に応用した。EGFPの波長は励起極大波長488nmで、蛍光極大波長が509nmである。FITCの波長と近似しており、FITC観察用フィルターの使用により、FITC自己標識赤血球との同時生体内観察も可能である。今回、FITC自己標識赤血球を微小血管部位を同定するための指標としたが、この単位時間当たりの移動距離を算出することにより、それぞれの微小血管の血流速度を求めることが可能である。このことを利用し、EGFP陽性骨髄由来血管内皮前駆細胞で置換された微小血管とそれ以外の微小血管の血流速度を計測し、その相違を比較検討することにより、骨髄由来血管内皮前駆細胞で修復された血管の機能評価を直接的に検討することが可能となると考えている。

腎間質微小血管への骨髄由来血管内皮前駆細胞の動員については、従来、否定的な報告が多い。EGFPキメララットを用いたThy-1腎炎の修復過程において、糸球体微小血管、尿管周囲微小血管ともに骨髄由来血管内皮細胞を認めなかったとする報告²⁾や、EGFPキメラマウスの虚血再灌流傷害24時間後の尿管周囲微小血管に、骨髄由来血管内皮細胞を認めなかったとする報告がある²⁸⁾。それぞれ、10%ホルマリン固定4 μ m凍結切片あるいは4%パラホルムアルデヒド固定0.5 μ m凍結切片による観察である。今回、われわれは、EGFP陽性細胞の観察において、組織固定の

問題だけでなく、切片の厚さの重要性についても考慮した。すなわち、薄切標本の場合、切片作成過程で細胞を傷害することにより、傷害面からEGFPが流出してしまう可能性を考慮し、10 μ m切片を作成し観察した。この観察により、EGFP陽性骨髄由来血管内皮前駆細胞の存在を示すことができた。さらに、実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡による非侵襲的な生体内観察を行うことで、多くの尿管周囲微小血管に動員されたEGFP陽性の骨髄由来血管内皮前駆細胞を同定することができた。また、われわれは今回と同一のキメララットモデルを用いた、Thy-1腎炎の糸球体微小血管修復過程において、単離糸球体を共焦点レーザー走査顕微鏡を使用し、糸球体への侵襲が少ない状態で観察することにより、糸球体毛細血管再生に関わるEGFP陽性血管内皮前駆細胞を確認している（投稿準備中）。そして、ヒトの腎移植患者において、血管型急性拒絶反応を起こした患者の移植腎の尿管周囲微小血管に、多くのレシピエント由来血管内皮細胞を認めたとする報告²⁹⁾もあり、われわれの今回得た成績を支持するデータと言える。

キメララットの凍結切片と生体顕微鏡所見の比較検討により、従来の4%パラホルムアルデヒド固定凍結切片では、必ずしも全てのEGFPが保持されていないことが確認された。特に、血管内皮細胞におけるEGFPの細胞内保持は極めて不良と思われた。血管内皮細胞のように脆弱で、細胞質に乏しい細胞の場合、EGFPの高い水溶性のために切片標本作成の過程でEGFPが容易に流出してしまう可能性が強い。このような現象は、EGFP陽性細胞を定量化するフローサイトメトリーによる測定でも、約70%の細胞しかEGFP陽性と判定されないという結果¹⁾にも反映されていると考えられる。今回用いた実時間型共焦点レーザー走査生体顕微鏡による生体内観察法は、生体内における骨髄由来細胞をはじめとした組織幹細胞の分化機構を明らかにする研究のみならず、補充・分化した細胞が構成する臓器・器官の機能評価にも応用可能であり、再生医学研究の発展に寄与するものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御高閲を頂きました新潟大学大学院医歯学総合研究科腎泌尿器病態学分野 高橋公太教授、ならびに、研究全般にわたりご指導頂きました新潟大学大学院医歯学総合研究科腎研究施設機能制御学分野 追手 巍教授に深謝致します。また、ご協力頂きました新潟大学大学院医歯学総合研究科腎研究施設機能制御学分野の諸先生方に感謝申し上げます。本研究は科学研究費（B：No.15390266）の支援を得た。また、この研究の一部は、第36回米国腎臓学会で発表された。

文 献

- 1) Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong Y, Nagasawa R, Okabe M, Maruyama N, Hosoya T and Ohno T: The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 12: 1401-1409, 2001.
- 2) Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M and Hori M: Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol* 12: 2625-2635, 2001.
- 3) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS and Goff JP: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284: 1168-1170, 1999.
- 4) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL and Grompe M: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6: 1229-1234, 2000.
- 5) Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK and Goodell MA: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107: 1395-1402, 2001.
- 6) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A and Anversa P: Bone marrow cells regenerate

- infarcted myocardium. *Nature* 410: 701 - 705, 2001.
- 7) Gao Z, McAlister VC and Williams GM: Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet* 357: 932 - 933, 2001.
 - 8) Eglitis MA and Mezey E: Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4080 - 4085, 1997.
 - 9) Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA and McKercher SR: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779 - 1782, 2000.
 - 10) Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J and Carothers J: Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 33: 1362 - 1368, 2002.
 - 11) Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Keddes LH, Kloner RA and Leor J: Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108: 863 - 868, 2003.
 - 12) Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS and Cantley LG: Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 112: 42 - 49, 2003.
 - 13) Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C and Wright NA: Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 195: 229 - 235, 2001.
 - 14) Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ and Igarashi P: Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 14: 1188 - 1199, 2003.
 - 15) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S and Sharkis SJ: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105: 369 - 377, 2001.
 - 16) Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL and Weissman IL: Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297: 2256 - 2259, 2002.
 - 17) Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA and Alison MR: Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci* 103: 355 - 369, 2002.
 - 18) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T and Nishimune Y: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313 - 319, 1997.
 - 19) Oyanagi-Tanaka Y, Yao J, Wada Y, Morioka T, Suzuki Y, Gejyo F, Arakawa M and Oite T: Real-time observation of hemodynamic changes in glomerular aneurysms induced by anti-Thy-1 antibody. *Kidney Int* 59: 252 - 259, 2001.
 - 20) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G and Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964 - 967, 1997.
 - 21) Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223 - 239, 1962.
 - 22) Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG and Cormier MJ: Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229 - 233, 1992.
 - 23) Walter I, Fleischmann M, Klein D, Muller M, Salmons B, Gunzburg WH, Renner M and Gelbmann W: Rapid and sensitive detection of enhanced green fluorescent protein expression in paraffin sections by confocal laser scanning microscopy. *Histochem J* 32: 99 - 103, 2000.
 - 24) Tsien RY: The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509 - 544, 1998.
 - 25) Kerr R, Lev-Ram V, Baird G, Vincent P, Tsien RY and Schafer WR: Optical imaging of calcium

- transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron* 26: 583-594, 2000.
- 26) Higashijima S, Hotta Y and Okamoto H: Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer. *J Neurosci* 20: 206-218, 2000.
- 27) Ohta H, Yomogida K, Yamada S, Okabe M and Nishimune Y: Real-time observation of transplanted 'green germ cells': proliferation and differentiation of stem cells. *Dev Growth Differ* 42: 105-112, 2000.
- 28) Day YJ, Huang L, McDuffie MJ, Rosin DL, Ye H, Chen JF, Schwarzschild MA, Fink JS, Linden J and Okusa MD: Renal protection from ischemia mediated by A2A adenosine receptors on bone marrow-derived cells. *J Clin Invest* 112: 883-891, 2003.
- 29) Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, van Kemenade FJ, van Es LA, Bruijn JA and van Krieken JH: Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 357: 33-37, 2001.

(平成 16 年 1 月 22 日受付)
