

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

ヒト抹消血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた食品の神経毒性評価システムの開発

分担研究報告書

ミクログリアおよびニューロンを用いた共培養系でのカルシウムイメージング実験系の構築とその影響

研究分担者 原口 祥典 佐賀大学 研究員

**研究要旨**

カルシウムイメージングとは、細胞内カルシウムの流動を測定し、活動中の細胞内のカルシウムシグナリングを直接観察する手法である。カルシウムシグナリングは、神経伝達物質やホルモンなどの分泌、筋肉の収縮など生命や健康の維持に関与している。つまり、カルシウムイメージングを行うことで、細胞が健康な状態かを判断することが可能となる。一方、カルシウムイメージングは、特殊な機器と豊富な経験が必要な実験系である。特に、細胞ごとに実験条件の検討が必須であり、試薬の負荷時間やバッファー類の塩濃度などを最適化する必要がある。

昨年度は、実験系の基礎構築として単独培養でのカルシウムイメージングを行った。本年度は、ニューロンとミクログリアの共培養系を用いて実験系の構築を行い、共培養系による影響を確認した。

単独培養と共培養を比較すると、基底状態の細胞内カルシウム濃度に有意な差は認めなかったが、興味深いことにATP刺激によるカルシウム濃度の上昇幅に有意な差がみられた。

このことは、単独培養と共培養系では細胞レベルでの反応が異なっていることを示唆しており、共培養系が評価系に重要であることを示唆している。

**A. 研究目的**

カルシウムイメージングとは、細胞内カルシウムの流動を測定し、活動中の細胞内のカルシウムシグナリングを直接観察する手法である。カルシウムシグナリングは、神経伝達物質やホルモンなどの分泌、筋肉の収縮など生命や健康の維持に関与している。つまり、カルシウムイメージングを行うことで、細胞が健康な状態かを判断することが可能となる。

従来は、ニューロンのカルシウムイメージングが生理学的実験手法の代表例として広く研究されてきたが、近年、ミクログリアのカルシウムイメージングも重要な研究手法の1つとされている（工藤佳久、歯薬療法、2017）。

その一方で、カルシウムイメージングは、高感

度の検出器、蛍光顕微鏡、灌流装置、高性能ワークステーション、暗室、2波長切り替え式フィルターなどの特殊な機器が必要で、手技的にも経験が必要な実験系である。特に、細胞ごとに実験条件の検討が必須であり、試薬の負荷時間やバッファー類の塩濃度などを最適化する必要がある。

昨年度は、実験系の基礎構築として単独培養でのカルシウムイメージングを行った。本年度は、ニューロンとミクログリアの共培養系を用いて実験系の構築を行い、共培養系による影響を確認した。

## B. 研究方法

カルシウムイメージングは、Fura-2AM 試薬を用いて、2波長励起蛍光顕微鏡を用いて測定を行った。

生体（脳）ではニューロン単独ではなく、グリア細胞であるミクログリアが存在している。本研究はヒトでの神経毒性評価系の構築が最終目標であるため、ただ、単純にニューロンとミクログリアを1：1で混合するのではなく、より生体を模倣する実験系を用いた。文献検索の結果、ヒトのニューロンとミクログリアの細胞数の比率が5：1であることが報告(Sandra E.Dos Santos, et al., J. Neurosci.) されており、本実験の参考にした。本研究での共培養系とは、Neuro2A 細胞と BV2 細胞を細胞数比=5：1で混合し、培養したものとしている（図1）。

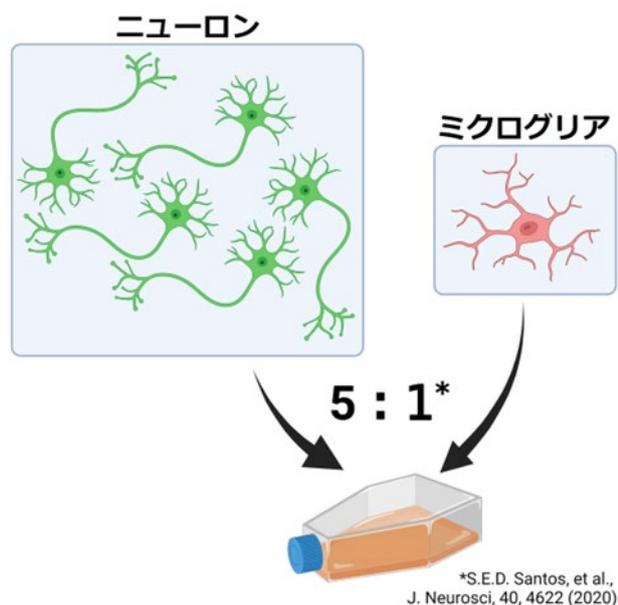


図1) 本研究で用いた共培養系

ミクログリアおよびニューロンをガラスボトムディッシュに播種し、翌日、Fura-2AM 試薬を5 $\mu$ Mで30分間の染色を行った。その後、顕微鏡にセットし、バッファの灌流を行った。カルシウムイメージングは、Ratio Imagingによる細胞内カルシウム濃度測定を行った。

また、外部刺激としてニューロトランスマITTERの1つであるATP（アデノシン三リン酸）を用いて細胞内カルシウム濃度の上昇幅（Amplitude）も測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、マウスの株化細胞を用いているため、倫理面において特筆すべき事項は存在しない。

## C. 研究結果と考察

まず、共培養条件下でのカルシウムイメージングの実験条件を検討した。昨年度確立したバッファ濃度や染色条件を用いたところ、図2に示すように、ミクログリアとニューロンの共培養系においてもカルシウムイメージングが実施可能であることを確認した。

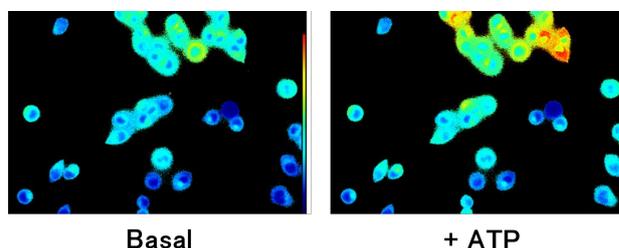


図2) 共培養下でのカルシウムイメージング

次に、単独培養と共培養系での基底状態（Basal）の細胞内カルシウム濃度を比較した。その結果、ミクログリア単独（82.7 $\pm$ 2.5 nM, n=212）とニューロンとの共培養系（85.9 $\pm$ 3.9 nM, n=144）で細胞内カルシウム濃度に有意な差は見られなかった（図3）。

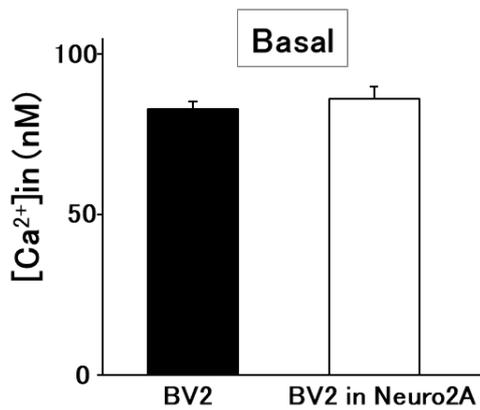


図 3) ミクログリア単独およびニューロンとの共培養系での基底状態の細胞内カルシウム濃度

しかしながら、興味深いことに、ATP による外部刺激を加えた際の細胞内カルシウム濃度の上昇幅 (Amplitude) に違いが見られた。ミクログリア単独では、上昇幅が  $84.6 \pm 11.1$  nM ( $n = 209$ ) であったのに対し、ニューロンとの共培養系では上昇幅が  $55.5 \pm 6.3$  nM ( $n = 141$ ) と有意 ( $p = 0.011$ ) に低い値であった (図 4)。

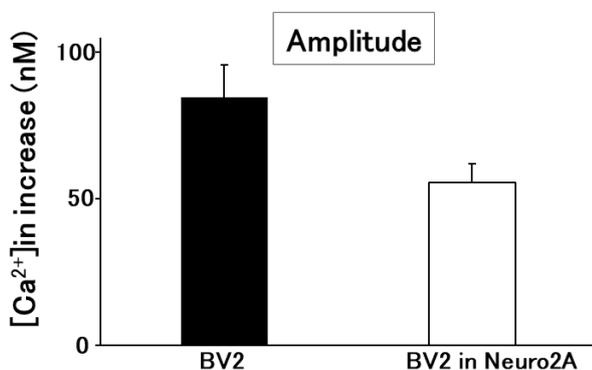


図 4) ミクログリア単独およびニューロンとの共培養系での ATP 刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇幅

現時点で、ATP 外部刺激時の共培養における細胞内カルシウム濃度の上昇幅が抑制されているメカニズムについては不明であるが、ニューロンとの相互作用によってこの現象が引き起こされてい

る可能性が高い。この事実は、単独培養と共培養系では細胞応答が異なる可能性を示唆しており、ニューロンおよびミクログリアの共培養系が毒性評価を含む *in vitro* 評価系として重要であることを意味している。

#### E. 結論

本年度は、ニューロンおよびミクログリアを用いた共培養系でのカルシウムイメージング実験系の構築に成功した。また、共培養下では、ニューロトランスマITTERに対して単独培養時と異なる細胞応答が見られた。この事実は、毒性評価を含む食品安全の *in vitro* 評価系として共培養系が重要であることを示唆している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし