

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）

ヒト末梢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

ヒト由来ミクログリアのカルシウムイメージング測定

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、特殊な機器を要し、かつその機器に対する豊富な取り扱い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。

昨年度までの株化細胞を用いた実験系で、カルシウムイメージングの基礎実験系を構築した。本年度は、ヒトミクログリアを用いてカルシウムイメージングの実験系を構築した。ヒト細胞は株化細胞と異なり、デリケートであるため、各種条件の設定が必要であった。種々の条件検討の結果、ヒトのミクログリアにおいて最適な条件を確認し、ポジティブコントロールである ATP の反応を捉えることに成功した。

今後は、本条件を用いて、細胞内シグナルの解析などを行う予定である。

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。

昨年度までの株化細胞を用いた実験系で、カルシウムイメージングの基礎実験系を構築した。本年度は、ヒトミクログリアを用いてカルシウムイメージングの実験系を構築した。

B. 研究方法

(1)ミクログリアの作成

ヒト由来ミクログリアは、文献（Ohgidani M. et

al., Sci Rep, 4, 4957 (2014)) を参考に、単球から誘導した。単球を RPMI を基本培地として顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン 34 を加えた誘導培地で培養し、マイクログリアを誘導した。

(2)カルシウムイメージング

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。

マイクログリアをガラスボトムディッシュに播種し、Fura-2AM 試薬で染色を行った。その後、顕微鏡にセットし、バッファーの灌流を行った。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ミッターの 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。

なお、株化細胞での各種条件検討を原口が担当し、その条件を元にヒト由来マイクログリアでの実験は研究代表者の扇谷が実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理審査委員会の承認を受け、安全面・倫理面に十分に配慮して実施した。

C. 研究結果と考察

(1) ヒト由来マイクログリアの作成

ヒト由来マイクログリアは、研究代表者が開発した手法であり (研究方法 B-1) に記載の方法で作成した (図 1)。

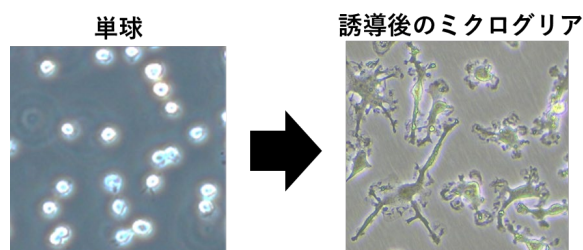


図 1) 作成したマイクログリア細胞

(2) カルシウムイメージング

実験(1)で作成したヒトマイクログリアを用いてカルシウムイメージングを行った。図 2 に示すように、十分に解析可能な Ratio Imaging 画像を得ることができた。

このことから、ヒトマイクログリア細胞を用いたカルシウムイメージングの条件を確立できたと判断した。

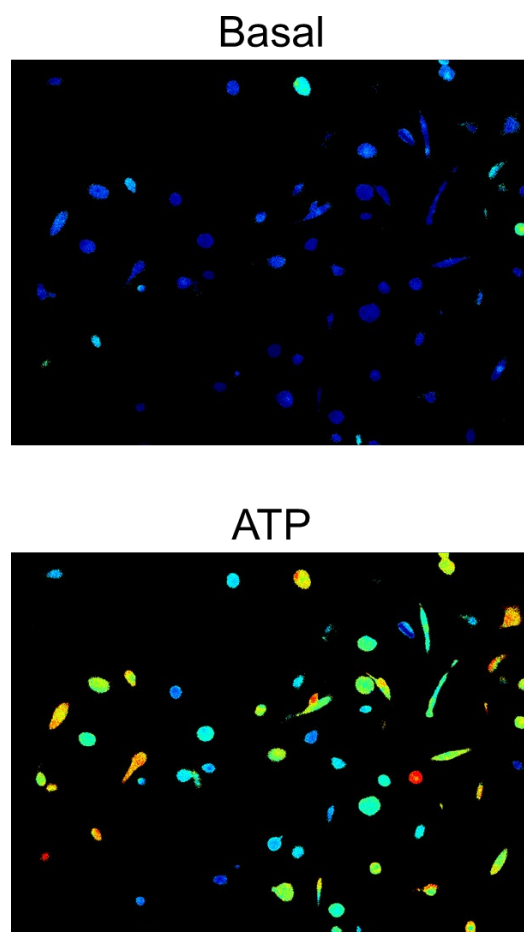


図 2) ヒトマイクログリア細胞の Ratio Imaging 像

また、ポジティブコントロールである ATP 刺激の反応も検討した。その結果、図 3 に示すように、急激な細胞内カルシウム濃度の増大が見られ、ヒトマイクログリア細胞においても、外部刺激に対する応答を捉えることが可能であると示唆された。

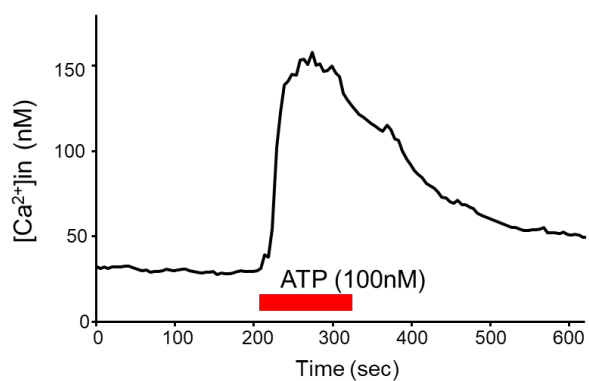


図 3) ATP 刺激による細胞応答

D. 結論

本年度は、ヒト由来マイクログリアを用いたカルシウムイメージングに成功した。また、外部刺激に対する細胞応答もヒト細胞レベルで確認することができた。今後は本実験系を用いて各種シグナル系の解析を行いたい。

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