

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

ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞を用いた実験系の構築

研究分担者 加藤 隆弘 九州大学 講師

研究要旨

本研究は、申請者が開発したヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞技術を用いて、神経毒性を中心とする食品安全性評価システムの開発を行うことを目的としている。

本年度の成果として、ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞を用いた実験基盤の構築に成功した。具体的には、24well プレートという微量な細胞数から RNA を抽出し、遺伝子解析を行うプロトコルの作成に成功した。また、末梢血誘導型ミクログリア細胞に PolyIC を添加したところ、ニューロンを障害することが知られている炎症性サイトカインである TNF- α の遺伝子発現が増大した。また、ミクログリア抑制剤を添加することで、その反応は抑制された。

これらのことから、ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞は、神経免疫の反応を捉えることができ、食品安全分野における神経毒性評価系に有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

我々の脳には、様々な種類の細胞が存在しており、その中心的な役割を担っているのはニューロン（神経細胞）であることはよく知られている。しかしながら近年、グリア細胞と呼ばれるニューロン以外の細胞に注目が集まっている。特に、脳内で唯一の免疫細胞であるミクログリアは、移動し傷害部位に集まる機能（遊走能）や異物を細胞内に取り込む機能（貪食能）やサイトカインを産生する機能を有しており、他の脳細胞とは異質の細胞である。特に、胎生期から発達期には、神経の分化誘導やシナプスの刈り込みにおいて不可欠な存在であり、次第に樹状に突起を伸展した Ramified 様の形態へと変化し、静止型として脳内の微細な環境変化を監視し続けている。最近では、定常的にシナプスの監視やシナプスの形成にも関

与していることが報告されている (Miyamoto, A., et al., Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex, Nat. Commun. 2016)。

さらに興味深いことに、ミクログリアは血液脳関門の透過性に影響していることも近年明らかにされた (Haruwaka K, et al., Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation, Nat. Commun., 2019)。このように、ミクログリアは様々な精神神経疾患の病態への関与が示唆されている極めて重要な脳細胞である (Salter, M. W., and B. Stevens, Microglia emerge as central players in brain disease, Nat Med, 2017)。

それでは、ヒトのミクログリアを用いて実験すれば良いのだが、生検によって中枢神経系からミ

クログリアを分離し、実験を行うには極めて高いハードルが存在している。その一方で我々は、ヒト由来細胞を用いたマイクログリアのトランスレーショナル研究の重要性を以前から認識しており、末梢血の単球からマイクログリア細胞を作製する技術を開発し、ヒトのマイクログリアをターゲットとするトランスレーショナル研究を推進してきた。

末梢血誘導型マイクログリア細胞は、通常採血で得られる末梢血から単球を分離し、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）とIL-34（インターロイキン 34）の2種類のサイトカインを添加して2週間培養するだけで作製することが可能である（図1）。当然ながら我々は、末梢血誘導型マイクログリア細胞がヒトのマイクログリア細胞としての性質を有しており、単球やマクロファージとは異なる細胞であることを確認している（Ohgidani M. et al., Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: Dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease, Sci Rep, 2014）。また、食食能やサイトカイン産生能といったマイクログリアとしての細胞機能も有しており、細胞・分子レベルでの解析が可能である。

本研究では、我々が開発した末梢血誘導型マイクログリア細胞技術を用いて、食品安全分野における神経毒性の評価系を構築することを目的としている。

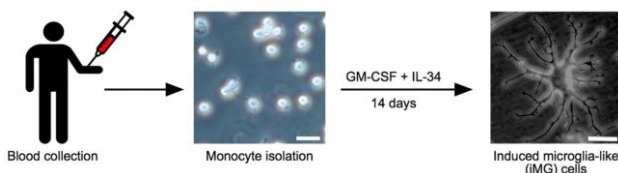


図1) 末梢血誘導型マイクログリア (iMG) 細胞

B. 研究方法

研究初年度である本年度は、ヒト末梢血誘導型

マイクログリア細胞を用いた実験系の基礎構築を行った。

ヒト末梢血誘導型マイクログリア細胞の作成は以下の手順で行った。採血した末梢血から単球を分離し、24well プレートに 4×10^5 cells/ml で播種した。翌日、10ng/ml の GM-CSF と 100ng/ml の IL-34 含有 RPMI 培地に交換し、2週間培養した。

作製したヒト末梢血誘導型マイクログリア細胞の遺伝子発現変化は、qRT-PCR 法を用いて検討した。24well プレートに RNA 抽出試薬 (total RNA isolation kit) を用いて RNA をスピнкаラム法で回収し、cDNA を合成した。合成した cDNA を用いてリアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行った。

今回は、マイクログリアを活性化することが知られている PolyIC を用いて、TNF- α の遺伝子発現変化を測定した。同時に、マイクログリア抑制剤として知られているミノサイクリンを用いて、抑制実験も行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学倫理審査委員会の承認を受け、採血に関しては、医師がインフォームド・コンセントを行い、安全面・倫理面に十分に配慮して実施した。

C. 研究結果

ヒト末梢血誘導型マイクログリア細胞を作製することに成功した（図1）。

また、24well プレートという微量な細胞数から RNA を抽出し、遺伝子解析を行うプロトコールの作成に成功した。

マイクログリアは、外部からの刺激に対して反応して活性化し、TNF- α などの炎症性サイトカインを産生することが知られている。そこで、マイクログリアを活性化することが知られている PolyIC

を用いて TNF- α の遺伝子発現変化を測定した。末梢血誘導型ミクログリア細胞に PolyIC を添加したところ、炎症性サイトカインである TNF- α の遺伝子発現が増大した。また、ミクログリア抑制剤を添加することで、その反応は抑制された(図 2)。

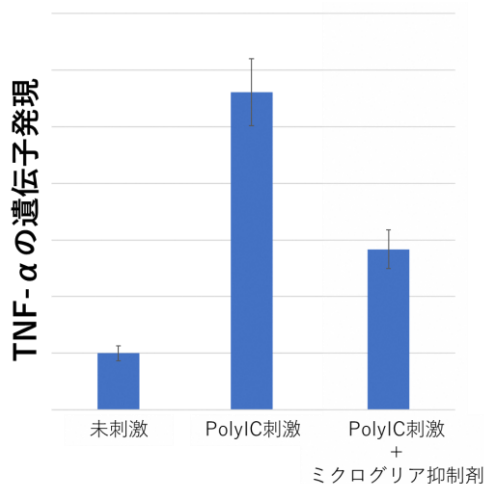


図 2) 末梢血誘導ミクログリア細胞に対する遺伝子発現応答実験

D. 考察

PoyIID による活性化でヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞は、代表的な炎症性サイトカインで、ニューロンを障害することが知られている TNF- α の遺伝子発現増大をみとめた。これは、ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞がヒトの神経免疫系のモデル細胞として有用であることを反映している。

加えて、24well プレートという微量なスケールでの実験を可能にすることが出来た。本結果は、数多くのサンプルをスクリーニングする際のハイスループット化に大きく貢献するものであると考えられる。

E. 結論

本年度は、ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞を用いた実験系の構築に成功した。次年度に予定している実験系は、本年度に構築した実験基盤を用いて初めて実施可能となるものであり、本年度の成果は、次年度に活用されるものである。

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