

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 准教授

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。

本年度は、ヒト末梢血誘導ミクログリア細胞を用いた毒性評価系の構築として、細胞内酵素活性を用いて毒性評価を行う測定法である WST 法の実験条件の確立を行った。

播種密度および培地交換の条件などを検討した結果、最適条件 (20 万 Cells/mL、培地交換無し) を確立できた。

昨年度確立した遺伝子解析用の実験条件と合わせて、本年度の成果により、来年度実施する金属毒性の評価にスムーズに移行できる体制が整った。

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ミ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、末梢血の単球からミクログリア細胞を作製する技術を開発し、ヒトのミ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。

末梢血誘導型ミクログリア細胞は、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、末梢血誘導型ミクログリア細胞がヒトのミ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ミ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ミ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。

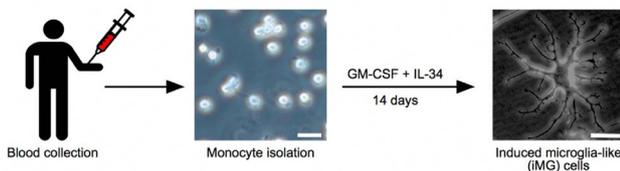


図 1) 末梢血誘導型ミクログリア (iMG) 細胞

B. 研究方法

本年度は、ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞を用いた毒性評価実験系の構築を行った。

ヒト末梢血誘導型ミ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。

毒性評価は、細胞内酵素の活性を測定し、生存率を算出する WST 法を用いて行う予定である。そこで、WST 法を用いた実験条件の最適化として、細胞の播種密度および培養中の培地交換の必要性を検討した。

細胞密度は、20 万、30 万、40 万 Cells/mL の条件で播種したものを比較した。培地交換は、2 週間の誘導培養中の 7 日目に全量交換、半量交換、交換無しの条件を比較した。

（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. 研究結果と考察

まず、細胞の播種密度を検討した結果、20 万 Cells/mL の播種密度が WST ホルマザン（WST が細胞内酵素によって代謝された物質）に由来する吸光度が最も高い結果となった（図 2）。

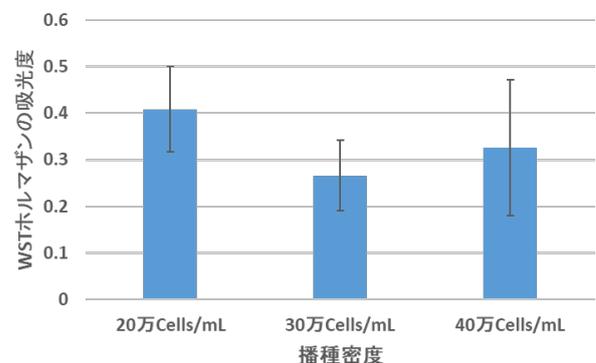


図 2) 最適な播種密度の条件検討

次に、誘導中の培地交換について、検討した。先ほどの実験で最適播種密度として見いだした 20 万 Cells/mL で細胞を播種し、誘導期間の 7 日目に培地を全量交換、半量交換、交換無しの条件で比較した。吸光度測定および顕微鏡観察の結果、培地を交換しなかったものと半量交換したものに大きな差は見られなかった。しかし、全量交換した細胞は、死細胞が確認でき、吸光度も低い値となった。培地交換は培養中の細胞をインキュベーターから出し、クリーン・ベンチ内で交換操作を行うため、コストおよびコンタミネーションのリスクが増加する。そのリスクと今回の結果を総合的に鑑みると、誘導中の培地交換は不要であると判断した。

なお、今回は 2 名の被験者からミクログリア細胞を作製して実験しており、多少の個人差も確認できた。この個人差はコンパニオン診断など、より個人差を重要視した際の評価に重要であり、興味深い。ただ、今回は神経毒性評価系の構築という一般的な条件を検討するため、平均化した値で評価した。

D. 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。昨年度確立した遺伝子解析用の実験条件と合わせて、本年度の成果により、来年度実施する金属毒性の評価にスムーズに移行できる体制が整った。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし