

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毒性評価

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。

ヒト由来ミクログリアは、研究代表者（扇谷）と研究分担者（加藤）が共同で開発した技術であり、昨年度までの成果としてハイスループット可能な評価系を確立した。

本年度は、確立した実験系を用いて毒性評価を行った。ミクログリア単独での毒性評価の結果、金属種によって毒性が大きく変化することが明らかとなった。興味深い知見として、ミクログリアはニューロンよりも各種金属（コバルトを除く）に対する毒性感受性が高い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（食食能）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。

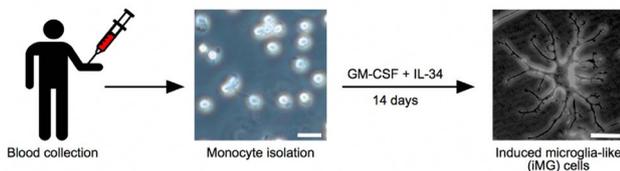


図 1) 末梢血誘導型ミクログリア (iMG) 細胞

B. 研究方法

(1) 使用細胞

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、ミクログリアを誘導した。

(2) 使用金属

実験に使用した金属は、カドミウム、コバルト、マンガンおよび銅の塩化物である。前年度までの基礎検討において、上記 4 種類の金属がニューロン単独と共培養系で IC50 値に比較的大きな差が認められたため使用した。

(3) 毒性評価

毒性評価は、酵素活性測定法である WST 法を用いて測定を行った。細胞を 96 穴プレートに播種し、24 時間後に各金属種を添加した。添加 24 時間後に WST-8 試薬を添加し、吸光度を測定した。得られた吸光度から生存率を算出した。50%細胞増殖抑制濃度 (IC50 値) は、濃度依存性の生存率曲線から Graphpad Prism ソフトウェアを用いて算出した。

(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) ヒト由来ミクログリアの作成

ヒト由来ミクログリアは、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 2)。

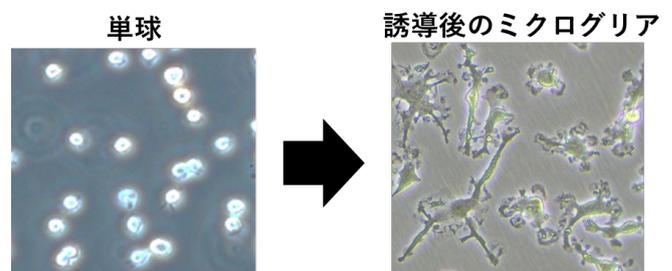


図 2) 作成したミクログリア細胞

(2) ヒト由来ミクログリアでの毒性評価

ミクログリア単独での毒性評価の結果、金属種によって毒性が大きく変化することが明らかとなった(図3)。研究代表者の扇谷が行ったニューロンでの毒性結果(研究代表者報告書図5)と比較したところ、ミクログリアはニューロンよりも各種金属(コバルトを除く)に対する毒性感受性が圧倒的に高いことが明らかとなった。通常の培養実験において、グリア細胞とニューロンではニューロンの方が圧倒的にデリケートな対応が必要であることが多い。しかし、本結果ではミクログリアの方が金属毒性に sensitive であることが明らかとなった。特にカドミウムに関してはかなり差異が大きい。本結果を単純に適用することはできないが、イタイイタイ病の病態にミクログリアが影響を及ぼしている(もしくは、受けている)可能性が考えられる。

D. 結論

本年度は、昨年度までに確立した実験系を用いて毒性評価を行った。ミクログリア単独での毒性評価の結果、金属種によって毒性が大きく変化することが明らかとなった。興味深い知見として、ニューロンよりも各種金属(コバルトを除く)に対する毒性感受性が高いことが明らかとなった。

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

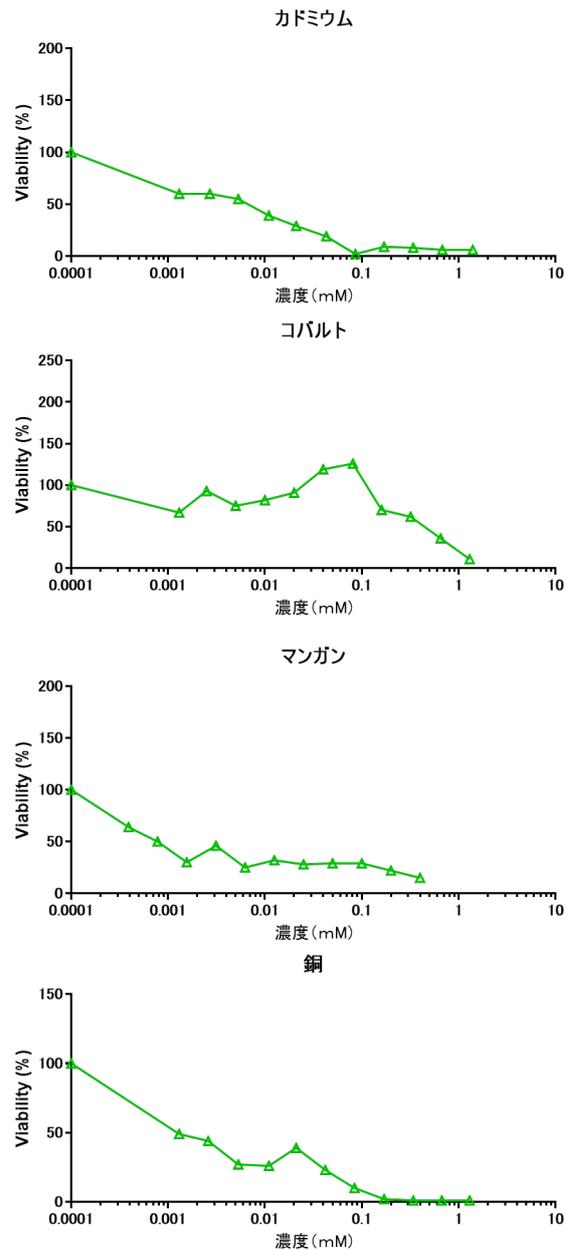


図3) ミクログリアでの毒性評価