

Title	Mix glial culture 中での他細胞との接触に基づくミクログリア性質の分類
Author(s)	小島, 千佳
Citation	平成27年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書
Issue Date	2016-03
Text Version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/11094/54691
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

平成 27 年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏 名	こじま ちか 小島 千佳	学部 学科	医学部 保健学科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者名		学部 学科		学年	年
					年
アドバイザー教員 氏名	稲垣 忍	所属	大阪大学医学系研究科保健学専攻神経生物学研究室		
研究課題名	Mix glial culture 中での他細胞との接触に基づくミクログリア性質の分類				
研究成果の概要	Mix glial culture 中のミクログリアの多様性を明らかにするため、ICR マウスから得たグリア系混合培養細胞を用いて、免疫細胞染色によりミクログリアの形態と増殖性を解析した。mix glial culture 中の細胞形態、アストロサイトとの接触様式によってミクログリアを分類し、ミクログリアの増殖性とその形の多様性について調べた。その結果、アストロサイト上の増殖中のミクログリアにはアメーバ状のものが多いことが分かった。				
<p>◎緒論</p> <p>脳は神経細胞の集合体であり、多くのグリア細胞がそれぞれの機能を駆使して脳内環境を維持している。ミクログリアは免疫をつかさどる細胞と言われているが、その動態は解明されていないことが多い。初代培養ミクログリアをグリア系混合培養から単離する際、単離されるミクログリアの多くがアストロサイト上に存在し、アメーバ形態をしたものであるとする文献が存在する¹。しかし、その実際は十分に明らかでない。私はミクログリアの増殖は他のグリア細胞との接触によって惹起されるのではないかと考えた。また、ミクログリアは組織レベルでも細胞レベルでも多様な形態を展開することから、培養細胞を用いてその形と増殖にどのような関係があるかを調べた。</p> <p>◎方法</p> <p>培養細胞</p> <p>グリア系混合培養細胞はICRマウスから得た。生後2日目のICRマウスの大脳皮質を採取し、パスツールピペットを用いて組織を細胞に分離した。分離した細胞は10%ウシ血清、10%ウマ血清、0.1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有DMEM中で14日間、37℃・5%CO₂条件下で培養した。その後、4%PFAによって固定を行った。</p> <p>蛍光染色</p> <p>培養した細胞に対し、蛍光抗体染色をすることによってミクログリアを可視化した。1N HCl処理を行った後、0.1TrisHClで中和し、ブロッキング後に一次抗体として増殖細胞の検出のために抗BrdUラット抗体(1:1000)、ミクログリアの検出のために抗Iba1ウサギ抗体(1:1000)、アストロサイトの検出のために抗GFAPラビット抗体(1:500)を用いた。これらを可視化するため</p>					

に二次抗体としてCy3抗ラビット抗体(1:2000)、488抗マウス抗体(1:2000)、647抗ラット抗体(1:2000)を用いた。核染色にはDAPI(1:5000)を用いた。ミクログリアの増殖性を評価するために、BrdUの培地への添加は固定の24時間前に行った。

画像の取得

マウス3個体の培養細胞を1個体につき任意に15~20箇所を撮影し、画像を取得した。主に10倍での観察を行った。

統計処理

グラフには平均値と標準偏差を示した(n=3)。各群間の統計学的有意差はKruskal Wallis testとt検定を行い、Holm's法によって補正した。その結果 $p < 0.05$ となったものを有意差ありと判定した。

◎結果

●Iba1陽性細胞の分類

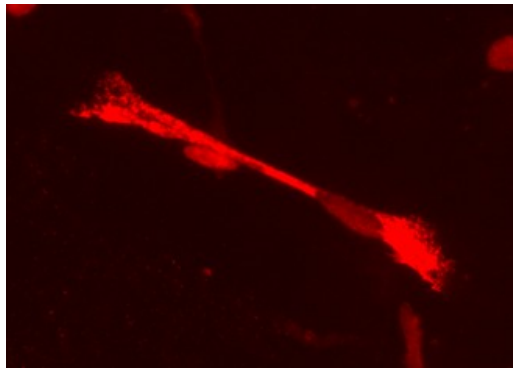
Iba1陽性細胞をGFAP陽性細胞との接触様式と形態によって以下のように分類した。

・接触様式による分類

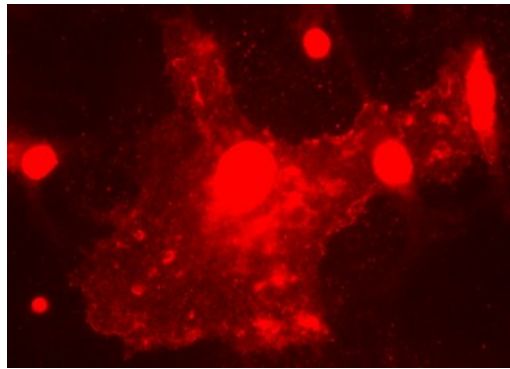
- a. GFAP陽性細胞と接触するIba1陽性細胞
- b. GFAP陽性細胞上にいるIba1陽性細胞
- c. GFAP陽性細胞と接触しないIba1陽性細胞

・形態による分類

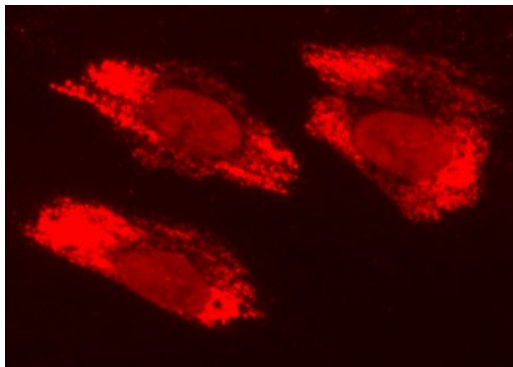
① 直線状に伸びたIba1陽性細胞



② アメーバ状のIba1陽性細胞



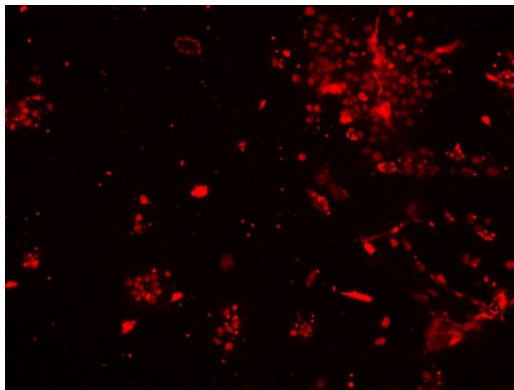
③ 細胞質が粗く染まるIba1陽性細胞



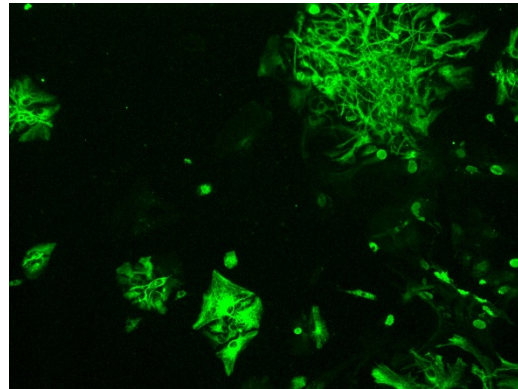
●GFAP陽性細胞との接触とIba1陽性細胞の形に基づく分類

培養したMix glial cultureを免疫染色によって可視化したものを以下に示す。

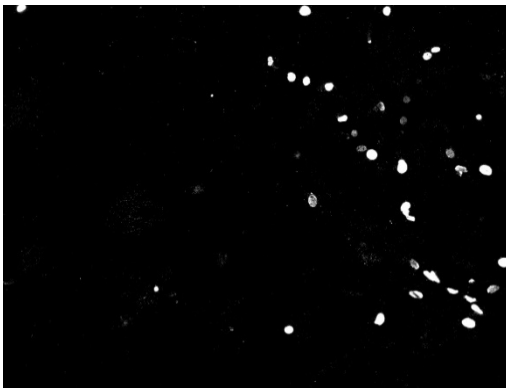
Iba1



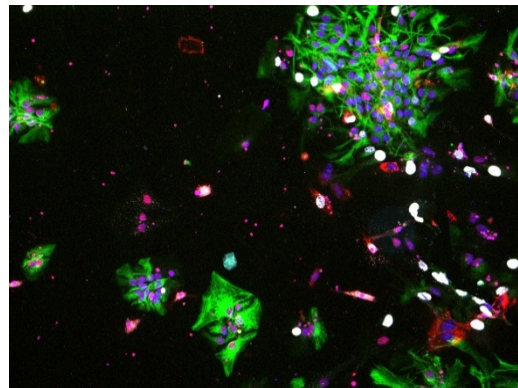
GFAP



BrdU



Merge



アストロサイトとの接触様式によってミクログリア数が変化するかを調べるため、全Iba1陽性細胞に占める各接触様式のIba1陽性細胞の割合をもとめた。その結果を以下に示す。GFAP陽性細胞との位置関係に基づくIba1陽性細胞の分類を行うと、GFAP陽性細胞と接触するIba1陽性細胞の割合の平均値が43.32% (±2.63)、GFAP陽性細胞上のIba1陽性細胞の割合が19.71% (±3.36)、GFAP陽性細胞と接触しないIba1陽性細胞の割合が36.97% (±2.95)であった。各群間に有意差はなかった。

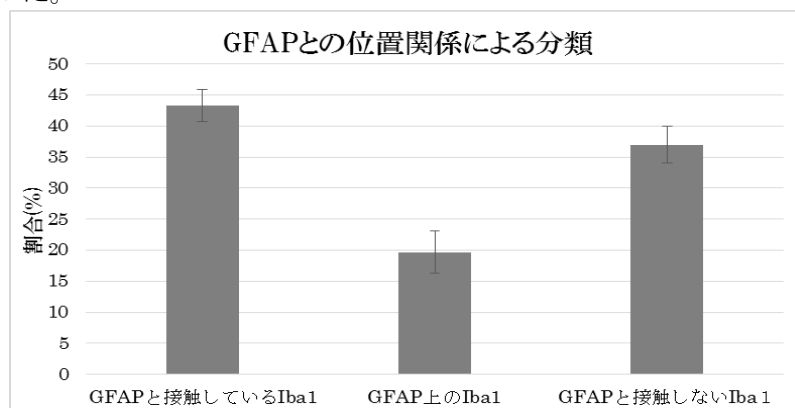


図1. 全Iba1に占める各接触様式のIba1の割合

●GFAP陽性細胞との接触様式とIba1陽性細胞の形態による分類

次に、アストロサイトとの接触様式によってミクログリアの形に変化があるかを調べた。Iba1

陽性細胞の総数に占める各接触様式のIba1陽性細胞の割合を各形態に分類したものを以下に示す。GFAP陽性細胞上にいるアメーバ状のIba1陽性細胞の割合が46.44%(±2.95)であったが、各群間に有意差はなかった。

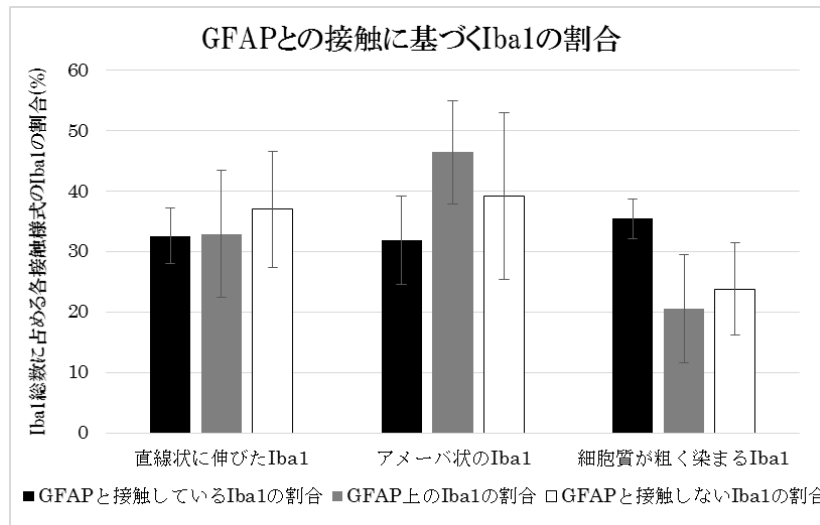


図2. Iba1陽性細胞の総数に占める各接触様式のIba1陽性細胞の割合を各形態に分類

●GFAPとの接触様式とIba1の増殖性・形態による分類

アストロサイトとの接触様式がミクログリアの増殖性・形態に変化をもたらすかを調べた。増殖性はBrdUの取り込み頻度によって行い、BrdU陽性細胞を増殖性細胞であると判定した。各接触様式のIba1陽性細胞に占めるBrdU陽性であるIba1陽性細胞の割合を以下に示す。BrdU陽性であるIba1陽性細胞の割合を形によって分類したが、各群間に有意差はなかった。

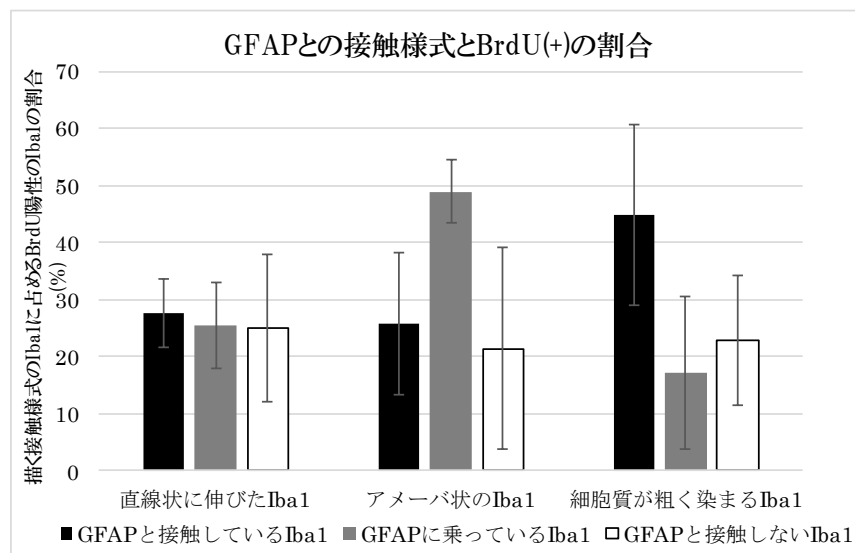


図3. 各接触様式のIba1に占めるBrdU陽性のIba1の割合

●GFAP陽性細胞上で増殖するIba1陽性細胞の形態による分類

アストロサイト上に存在する増殖性を持ったミクログリアにおいては、多くがアメーバ状の形態を呈するのではないかと予想し実態を調べた。GFAP陽性細胞上に存在するBrdU陽性のIba1

陽性細胞に占めるそれぞれの形態の割合を以下に示す。GFAP陽性細胞上に存在する増殖中のIba1陽性細胞にはアメーバ状のものが最も多く、この形態のIba1陽性細胞は直線状に伸びたIba1陽性細胞との間に有意な差があった。また、アメーバ形状のIba1陽性細胞と細胞質が粗く染まるIba1陽性細胞との間にも有意な差が見られた。

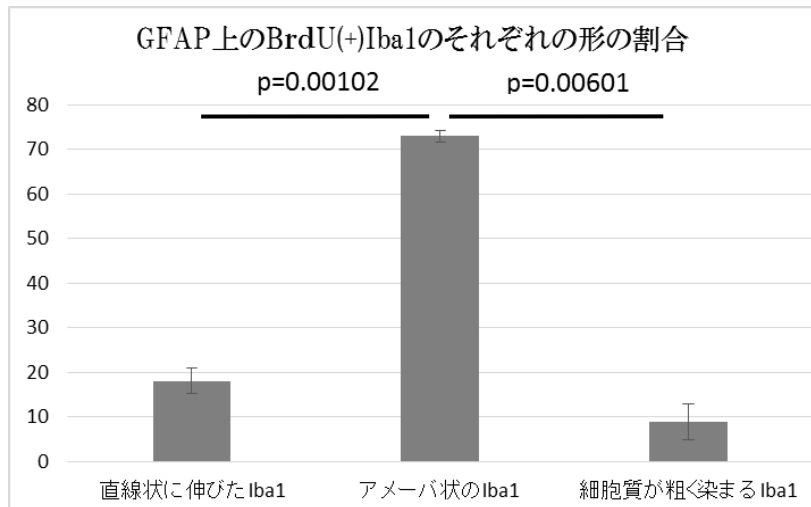


図 4. GFAP上に存在するBrdU陽性のIba1に占めるそれぞれの形態の割合

◎考察

本研究によってアストロサイト上に存在する増殖性のミクログリアのうち、多くがアメーバ状のミクログリアであることが明らかとなった。この結果からミクログリアがアストロサイト上に存在し、アメーバ状の形態となることで増殖性を獲得する可能性があるのではないかと考えられる。その際にはアストロサイトとミクログリア間で相互作用が生じていると考えられる。今後はこの相互作用がどのようなものであるかを明らかにすると共に、本研究で行った実験のn数を増やし、より正確な解析を行うことや、これ以外にもより多くの傾向を掴むことを目指したい。

参考文献¹: Saura J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. J Neuroinflammation. 2007 Oct 15;4:26. Review. PubMed PMID: 17937799; PubMed Central PMCID: PMC2140055.