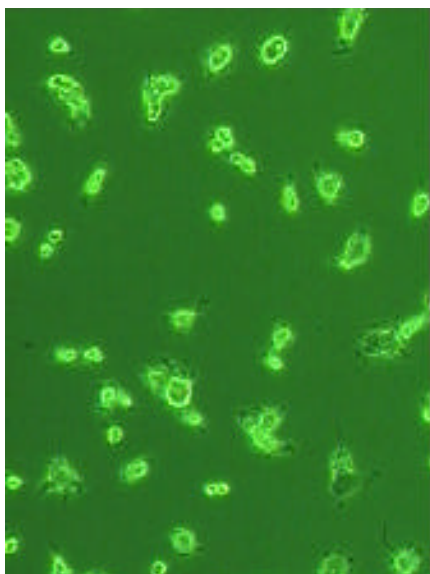


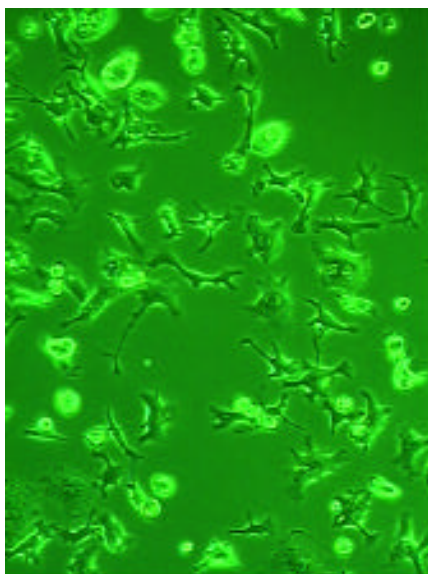
ミクログリア株細胞の基本的な性質について

株化ミクログリア細胞の性質について

ミクログリアの株化細胞はこれまでにいくつか報告されていますが、これらの細胞はマクrofージ様性質が強く、またがん遺伝子や遺伝子変異をもっているため細胞の増殖の調節が難しいなどの欠点があったようです。これに対し私の樹立した株化ミクログリアは primary から樹立した細胞で、**増殖因子依存的に増殖し、因子非存在下では増殖能を失い分岐したミクログリアの形態**（通常の脳内で見られる形態）をとるため、生体内でのミクログリアの性質を培養下で再現できるという特徴があります。



増殖中の形態



分岐状の形態



分岐状細胞を固定して
抗体染色したもの

また一次培養から分離できる複数のミクログリア亜集団に酷似した性質を示すものも見受けられることもあって、ミクログリアの亜集団の脳内での性質や役割を調べる上で有用であると考えられます。

ミクログリアにはサブタイプがあると少なくとも私は信じていて（現在までのところ primary から少なくとも type I と type II という 2 種類の性質の異なった分画を sorting する事に成功しています。）、マウスではそれに対応した複数の株化細胞が単離できています。それらを使って調べたところではたとえば Mac1 の発現（ラットでは OX42 にあたる）が細胞株の種類によって強いものと弱いものがあって、ミクログリアそのものがかなり性質が違う亜集団である可能性が考えられます（その他形態変化、増殖因子依存性、サイトカイン産生能、貪食能、表面抗原、発現タンパク質の違いなども調べています）。また一次培養から分離できる複数のミクログリア亜集団に酷似した性質を示すものも見受けられることもあって、ミクログリアの亜集団の脳内での性質や役割を調べる上で我々の樹立したミクログリア細胞株は有用であると考えられます。

欠点もあります。 primary から樹立した細胞であるため**継代に少し慣れが必要**です（細胞の状態が良い、悪いの判定や増殖速度、継代法など）。これまでの経験から継代には trypsin などの酵素を使うよりは rubber policeman の様な cell scraper を用いた方が継代後の plating efficiency や増殖効率が良いようです。また、trypsin などの酵素や EDTA などでは状態によっては完全に細胞が回収できないこともままあります。偏った性質の細胞だけを濃縮する危険性を除くためにも rubber policeman での継代をお奨めします。増殖は 7-10 日で約 10 倍程度に増殖します。しかし、split の際に damage をうけると lag time がでてしまうので正確には doubling が決められません。また、GM の濃度や血清の lot にも依存します。一応の細胞の良い状態での目安として 7-10 日で 1.0 倍に増殖するという線を推奨しています。血清の善し悪しにもかなり影響を受けます。培地や血清によってはマイクログリアの状態が悪くなります。具体的には増殖速度が変わる（速くなるまたは遅くなる）形態が変わる、バクオールが多くなる、多核の細胞がでてくる、接着が悪くなるなどです。とくに ramified form に誘導する場合、血清が悪いと ramified になる前に細胞が浮き上がってきてしまいます。株化細胞とはいっても少し特殊な細胞であるかも知れません。

株細胞の選択 -- どの細胞を使ったらよいか

マウスでは株細胞は 12 種類、ラットでは 1 種類分離しています。

これらのマイクログリア細胞株は primary から樹立した細胞で増殖因子存在下の培養で増殖して継代できますが、増殖因子を培地から除去することによって増殖を止め ramified になります。GM-CSF による増殖性は株によってかなり異なり、したがって培養しやすい細胞とし難い細胞があります。

こちらでは通常は比較的培養しやすい細胞をマウスで 4 種類、ラットで 1 種類継代しています。マウスの 4 種類の細胞はそれぞれ性質が微妙に異なり、type I に近いもの、type II に近いもの、それらの中間的なものなど色々です。これらの違いはかなり安定していてすくなくともこの 3 年ぐらいはあまり変わっていないようです。

マウスの細胞については色々な性質を、脳内での役割がちがったサブタイプという観点から primary から分離してきたものとかかなり詳細に検討しつつあり、いろいろと面白いことがわかってきています。そのあたりに御興味があればマウスの細胞を複数種類お使いになれば良いかと思えます。

単にマイクログリアが欲しいという事でしたら目的にあった細胞、または継代しやすい細胞をお奨めします。ただし、primary から分離したマイクログリアはかなり heterogeneity があり、それから得られた結果が単一の細胞で再現することは必ずしも保証できません。ごらんになりたい性質がどのクローンを利用したらよいかはあらかじめご相談いただいた方が良いかも知れません。しかし、こちらあまり広くは検索していませんのでわからないことが多いのも事実です。必ずしもお役に立てるとは限りません。

ラットで 1 種類単離している細胞株の GMI-R1 は LPS の応答性などからどちらかという Mac1 が弱い type II に近いと思われます。しかし、ラットではいろいろなプローブがあまり手持ちではありませんし、何といても 1 種類しか株細胞を分離していませんので比較していません。最近あまりラットの primary も作らないので調べていないことが多いです。

譲渡から培養までの手引き

ミクログリア細胞株は primary から樹立した細胞で増殖因子存在下の培養で増殖して継代できますが、増殖因子を培地から除去することによって増殖を止め ramified になります。また、これまでの経験から継代には trypsin などの酵素を使うよりは rubber policeman の様な cell scraper を用いた方が継代後の plating efficiency や増殖効率が良いようです。株化細胞とはいっても少し特殊な細胞であるかも知れません。

細胞をお送りする前に使用に関する承諾書と継代培養のプロトコールをお送りいたします。培地、試薬等をご準備下さい。準備が整いましたら御連絡いただき次第細胞をお送りいたします。ご都合の良い時期をお知らせ下さい。

[生細胞をお送りする場合] 細胞は継代に少し慣れが必要ですので(細胞の状態が良い、悪いや増殖速度、継代法など)、お送りする形態は増殖させていて状態がよいものをフラスコに播種してこちらで使用している培地を満たしてお送りします。培地はお送りする直前に fresh なものを充填しますので到着次第回収して遠心後冷蔵庫で保存していただけますと 2-3 回の継代にしようできますので、凍結 stock をお送りいただける程度にお使いいただけます。

ミクログリア細胞株は基本的には接着細胞です。お送りする状態は F12.5 のフラスコに $2-5 \times 10^5$ cells を播種した状態で fresh な培地を満たしたもの(輸送において空気が入っていると培地が動いて細胞に物理的なちからがかかってしまい死んでしまいます)です。お手元に届きましたらまずフラスコから培地をピペットなどで吸い取り、debris や浮遊している細胞を取り除くために 1500rpm x 5min 程度遠心して上清だけを分離して保存すれば当面の細胞の増殖にお使いいただけます。(ただし、フラスコに詰めた培地は GM-CSF は添加されていません。)このうちの一部の培地(5ml 程度)を使ってフラスコに添加して 1-3 日ぐらい細胞の状態が良くなるまで培養します(輸送によって細胞の viability が落ちていきますので)。この時に培地には GM-CSF を加えて下さい(5ml の培地ですと Genzyme 社製 mouse GM-CSF の場合 2-2.5ul の原液)。

[凍結細胞をお送りする場合] 場合によっては凍結細胞をお送りすることがあります。凍結状態は 1×10^6 cell/ml/tube で 10% DMSO 入りの培地で凍結しています。解凍時は通常の細胞の場合と同じように、37C bath でさっととかしたあと、10ml 程度の fresh medium で希釈し、すぐに遠心回収して培地を添加して dish にまきこんでください。2-3 時間 CO2 incubator で静置した後、GM-CSF を添加してください。

細胞の状態が良くなったら(輸送によるストレスがほとんど見られなかった場合は受け取った当日)培地をフラスコ中の細胞に吹き付けるようにして(このとき、泡が立たないように慎重にやります)細胞を浮遊させ(完全に浮遊させるのはなかなか難しいですので 1/3-半分程度の細胞が浮いたところが良いと思います)浮遊細胞を cell count してプラスチックディッシュにまいて継代します。この時も同様にお送りした培地の一部を使って継代して下さい。また GM-CSF を加えるタイミングは播種してから 2 時間ぐらいあと(細胞が十分基質に接着してから)にして下さい。この状態では 7-10 日で約 10 倍程度に増殖します。しかし、split の際に damage をうけると lag time がでてしまうので正確には doubling

が決められません。また、GM の濃度や血清の lot にも依存します。一応の細胞の良い状態での目安として 7-10 日で 10 倍に増殖するという線を推奨しています。(こちらで使っている GM で Ra2 では final x2500, 6-3 では final x2000 の希釈で培養すると大体それぐらいになります)。それ以上早いと形質変化したものがでやすいし、遅いときは細胞の状態か培養の condition に問題があるかだと思います。

ある程度増えたらラバーポリスマンで細胞を回収します。trypsin や EDTA でも回収できますが、完全にはがれないのと次の plating efficiency が悪くなります。しかしラバーポリスマンによる回収は慣れないと細胞が結構死んでしまうので stock を作ってからにした方がよいかも知れないです。

3×10^6 程度の数が回収できるようでしたら細胞の stock を作って下さい。stock はお送りした培地にファイナル 10% の DMSO を用時調製で作っていただいて十分氷で冷やしたあと細胞に添加して 1×10^6 / ml / stock tube で分注してとりあえず -80C の冷凍庫で over night おいて凍らせたあと液体窒素で保存します。(私は回収した細胞を 2×10^6 / ml で懸濁したものを 500ul を stock tube にとり、20% DMSO を用時調整して氷で 5 分以上冷やしたものを 500ul を加えてすばやく混ぜて(この時、ゆっくりと pipetting した方が今度起こしたときに plating efficiency がよい) キャップを強く締めて氷で 5-10 分冷やしてから -80C で overnight おいて液体窒素に保存しています。この手順を厳密に守れば市販の細胞保存液を使わなくてもかなり良い stock がつくれます。

数本の stock ができたら先生がお使いになる培地での細胞の状態を見るために培養を duplicate して一方にお送りした培地、もう一方に試す培地をくわえて比較して下さい。培地や血清によってはミクログリアの状態が悪くなります。具体的には増殖速度がかわる(速くなるまたは遅くなる)形態が変わる、バクオールが多くなる、多核の細胞がでてくる、接着が悪くなるなどです。

> GM-CSF を除いた後のメンテナンスで、特に注意が必要なこと等があるのでしょうか。

まきこむときに多少多めに細胞をまいた方がいいです。また、GM-free にするのは細胞が基質に接着してからがよくまた継代のストレスもありますので、まずまきこんで GM-CSF 処理して状態が良くなったから GM-free の培地に交換した方がいい culture がとれます。

継代の時の注意点としては、trypsin-EDTA などよりは rubber policeman のような cell scraper がよく(多少慣れが必要ですが)、前者ではダメージが大きいので後者に比べて conditioning に長めに時間をとる必要があります。また、GM を処理するタイミングはまきこんでから 2-3 時間して細胞が基質に接着してから加えた方がいいと思います。この時は濃い GM を genzyme 製のものです 10ml あたり 5ul 培地に添加します。

ramified microglia の誘導方法

ramified に誘導するときこれらのクローンの扱いにあまりなれていない方でもうまく良く方法として、とりあえずまきこんで 2-3 時間後に GM-CSF を添加して 1-2 日培養し、その後 GM-free 培地に交換

して6-7日おくことをお奨めします。この場合ですとほぼ間違いなく ramified form が取れます。まきこみ時点から GM を抜いてしまうと ramified になる前に状態が悪くなって浮いてきたり死んでしまったりすることがあります。split するときの機械的、化学的（酸化など）ダメージが加わるためだと考えられます。split になれて継代後の増殖に移るまでの lag time がなくなるくらい細胞の扱いに習熟されれば後者の方法でも ramified は取れるようになります。

最近いくつかのラボに細胞を分譲しての結果ですが、ramified に誘導するときにはたくさんの細胞が浮いてしまってうまくいかないことがあるようです。その場合は血清を変えてください。どの血清がいいかはやってみなければわかりませんが、私のところではいくつかのロットでうまくいっているので、手短にある血清の中には必ずうまくいくものがあると思います。どうしてもできない場合は相談してください。

形態と活性化状態について

GM 存在下での ameboidal な形態はいわゆる活性化状態の ameboidal とは多少異なります。また、ramified の形態をとっていても activated である状態もあります。（たとえば Alzheimer brain での HLA-DR 陽性分岐状ミクログリアなど）したがって培養下で形態誘導された状態にさらに刺激を加えてみると有益なデータが得る可能性があると思われます。