

---

## テクニカルノート

---

# マウス脳からのニューロン及びアストロサイトの初代培養法

香川慶輝, Majid Ebrahimi, 大和田祐二

山口大学大学院医学系研究科器官解剖学分野(解剖学第一) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

**Key words** : ニューロン, アストロサイト, 初代培養法

### 和文抄録

神経系細胞の培養実験では, 取扱いが容易で安定した結果が得られるという観点から, しばしば不死化細胞が用いられている。しかしながら, 不死化した細胞では, 細胞の有する性質が生体内と大きく異なっていることが問題となる。一方, 初代培養した神経系細胞は脳内における細胞機能の多くを温存しており, 生体脳の機能を培養環境下で再現する実験系の構築に有用である。本稿では, 神経系を構成する主要な細胞である神経細胞及びアストロサイトの初代培養法について概説する。

### はじめに

脳は神経細胞(ニューロン)とグリア細胞(アストロサイト, オリゴデンドロサイト, マイクログリア)と血管で構成されている。この内, ニューロン, アストロサイト及びオリゴデンドロサイトは同じ神経幹細胞を起源に持つが機能は異なっている<sup>1)</sup>。ニューロンは刺激の入力により放出される神経伝達物質を介して隣接するニューロンへ情報を伝達する<sup>2)</sup>。アストロサイトはニューロンの構造維持, 細胞外液の恒常性維持, 血液脳関門の形成など, 中枢を支持する役割を果たしている<sup>3)</sup>。また, オリゴデンドロサイトはミエリン形成により跳躍伝導を誘導し活動電位の伝達速度を高めるとともに, 神経栄養因子を介した神経機能の維持を行う<sup>4)</sup>。それぞれの細

胞が有する機能を解析するには, 生体脳から直接樹立した初代培養細胞により, 培養下で生体脳を再現することが必要である。これまでに初代培養方法は数多く報告されているが, 動物の種類や使用する週齢の違いにより, 安定して培養を行うことが難しいことが多い。本稿では, 当研究室が遺伝子変異マウスの解析等で, 安定した結果を得ているマウスのニューロンとアストロサイトの初代培養法を概説する。

### 1. ニューロンの初代培養法

ニューロンの初代培養は基本的にNumakawaらの方法に従っている<sup>5)</sup>。培養前日に培養皿のコーティングとグルコース溶液の調整を行っておく。培養皿のコーティングのため, ホウ酸バッファーで0.05%に希釈したポリエチレンイミン溶液を培養皿の底が浸るように注ぎ1晩静置する。使用前に滅菌蒸留水で3回洗浄する。グルコース溶液は20ml D-PBS(-)にD-グルコース100mg(最終濃度0.5%), BSA 4 mg(最終濃度0.02%), L-cystein 4 mg(最終濃度0.02%)を加え作成する。

妊娠14.5日目のマウスより胎児を取出し, 無血清培養液(Leibovit's L-15 medium)の入った培養皿に全脳を取り出す。さらに嗅球, 海馬, 髄膜を丁寧に取り除き大脳皮質部分だけを残す。無血清培養液と取り出した大脳皮質を滅菌プラスチック遠心管に移し, 2分間遠心後(1200rpm, 260g), 上清を吸い取る。前日調製しておいたグルコース溶液に0.25%パパイン, 0.01%DNase Iを加え, これを遠心

管に移し、37°C、15分インキュベーションする。2分間遠心後(1200rpm, 260g)、上清を吸引し、5%ウマ血清、5%ウシ胎児血清、100  $\mu$ g/ml ペニシリン-ストレプトマイシンを含んだDMEM F12 (1:1) ([+]L-Glutamine, [+]Sodium bicarbonate) 溶液を10ml加え、細胞塊が見えなくなるまでゆっくりピペティングを繰り返す。分散できなかった細胞塊は穴径が70  $\mu$ mのメッシュに通して取り除く。コーティングしておいた培養皿に細胞を播き、培養を開始する(温度:37°C, CO<sub>2</sub>:5%条件下)。培養後3日目に培養液の半量を除去し、新しい培養液を加える。この状態では培養皿にアストロサイトを中心としたグリア細胞が混在している。ニューロンの割合を高めるためDNA合成阻害剤であるシトシンアラビノフラノシド(AraC)を加え、アストロサイトの増加を抑える。培養後7日目には長い樹状突起や軸索を伸ばしたニューロンが確認できる(図1)。

## 2. アストロサイトの初代培養

アストロサイトの初代培養はWuらの方法を少し変更して行っている<sup>6)</sup>。ニューロンの初代培養に比べ容易である。

まず新生児マウスから全脳を無血清培養液の入った培養皿に取出し、嗅球、海馬、硬膜を丁寧に取り外し、大脳皮質を得る。無血清培地と大脳皮質を滅菌プラスチック遠心管に移し最終濃度が0.25%にな

るようトリプシンを加え37°C10分間インキュベートする。インキュベート後、細胞塊が見えなくなるまでゆっくりピペティングを繰り返す。分散できなかった細胞塊は穴径が100  $\mu$ mのメッシュに通して取り除く。5分間遠心後(1200rpm, 260g)、上清を吸引して、10%ウシ胎児血清、100  $\mu$ g/ml ペニシリン-ストレプトマイシンを含んだDMEM溶液を加えピペティングで細胞を分散し、培養フラスコに播き培養を開始する(温度:37°C, CO<sub>2</sub>:5%条件下)。3日ごとに培養液を新しいものに取り換え、細胞がconfluentになり次第、恒温振とう機を用い37°C、200rpmの条件で24時間振とうする。この操作により接着力の弱いマイクログリアやオリゴデンドロサイトは培養フラスコから剥がれ、純度の高いアストロサイトが得られる(図2)。

## 3. 実験例

我々の研究室では脂肪酸結合蛋白質(Fatty acid-binding protein, FABP)の機能解析を行っている。脳では脳型FABPと呼ばれるFABP7がアストロサイトに非常に強く発現している<sup>7)</sup>。また、FABP7遺伝子欠失型(FABP7-KO)マウスで大脳皮質損傷モデルを作成すると、損傷部アストロサイトの増殖が野生型に比べ遅延していることが明らかになった<sup>8)</sup>。FABP7によるアストロサイト増殖制御機構をより詳細に解析する目的で、野生型及びFABP7-KOマウスに由来するアストロサイトの初代培養を

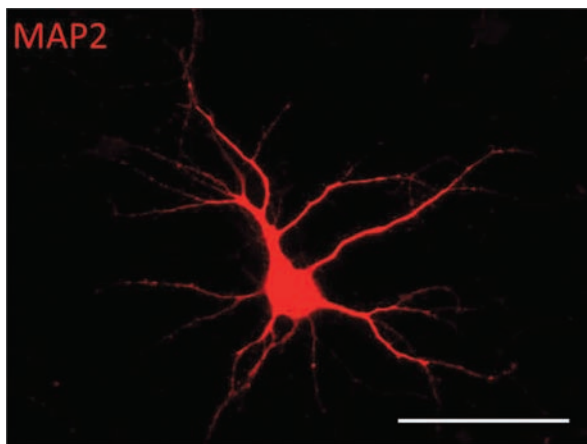


図1 抗MAP2抗体を用いた初代培養ニューロンの免疫染色像  
樹状突起マーカーであるMAP2陽性(赤色)の神経細胞を示す。Bar: 50  $\mu$ m

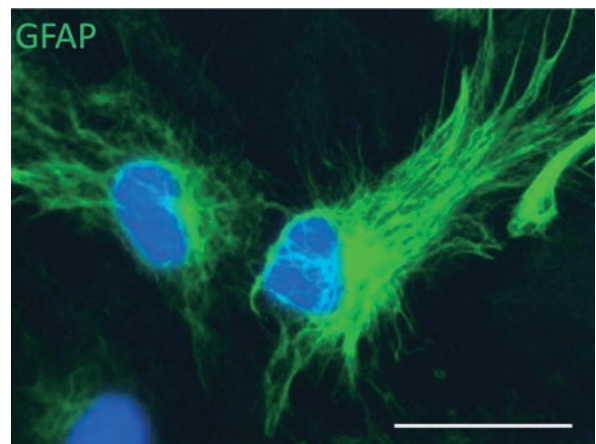


図2 抗GFAP抗体を用いた初代培養アストロサイトの免疫染色像  
細胞質にアストロサイトマーカーである緑色のGFAP陽性線維が観察される。青色:DAPIによる核染色; Bar: 50  $\mu$ m

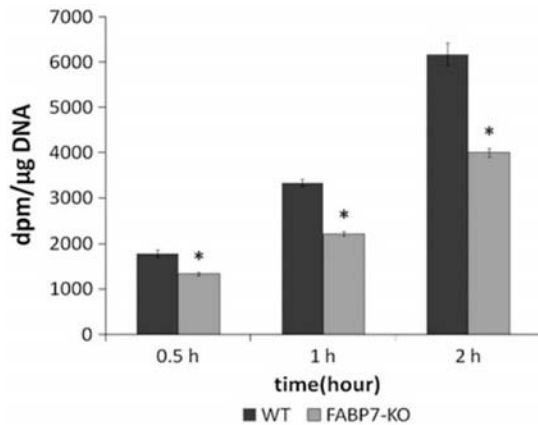


図3 初代培養アストロサイトをを用いた脂肪酸取り込み実験

各時間帯でFABP7-KOアストロサイトは野生型アストロサイトに比べ $\alpha$ -リノレン酸の取り込みが低下していることを示す。\*:  $P < 0.05$

行い, in vitroでアストロサイトの増殖能を調べた。その結果, FABP7-KOマウスのアストロサイトでは増殖能が低下しており, さらにn-3系脂肪酸である $\alpha$ -リノレン酸の取り込みが野生型のアストロサイトと比較して有意に低下していることが分かった(図3)。

#### おわりに

神経細胞やグリア細胞の初代培養細胞を用いて, 個々の細胞の性質や機能を生体に近い状態で再現することができる。本稿では, 実験例としてアストロサイト初代培養を用いた脂肪酸取り込み実験を紹介したが, 他にウエスタンブロットや培養上清を用いたELISAなどの生化学的な実験を行うに十分な培養を行うことも容易である。さらに, 神経細胞の初代培養は, アストロサイトに比べて生化学的解析を行うに十分な細胞数を得ることは難しいものの, シナプス形成や分子の細胞内局在など形態的解析を行うことが可能である。現在当講座では, 遺伝子変異マウスの行動異常を説明するために, 神経細胞とグリア細胞の機能関連に着目し, これらの初代培養細胞の同時培養を行い, 生体脳をより単純化したモデルとして使用している。現在広く使用されている遺伝子変異マウスなどの研究では, 不死化細胞を用いることなく, そのまま変異マウスから初代培養系を確立し, 詳細な表現型解析を行う必要性が, 今後さらに高まることが考えられる。

#### 引用文献

- 1) Rowitch D H, Kriegstein A R. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 2010 ; 468 : 214-222.
- 2) Obata, K. Synaptic inhibition and gamma-aminobutyric acid in the mammalian central nervous system. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2013 ; 89 : 139-156.
- 3) Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 2007 ; 28 : 138-145.
- 4) Lin S C, Bergles D E. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat Neurosci* 2004 ; 7 : 24-32.
- 5) Numakawa T, Yokomaku D, Kiyosue K, Adachi N, Matsumoto T, Numakawa Y, Taguchi T, Hatanaka H, Yamada M. Basic fibroblast growth factor evokes a rapid glutamate release through activation of the MAPK pathway in cultured cortical neurons. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 28861-28869.
- 6) Wu J, Wrathall J R, Schachner M. Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Cdelta activation induces close homolog of adhesion molecule L1 (CHL1) expression in cultured astrocytes. *Glia* 2010 ; 58 : 315-328.
- 7) Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H. Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. *J Chem Neuroanat* 1996 ; 12 : 113-122.
- 8) Sharifi K, Morihiro Y, Maekawa M, Yasumoto Y, Hoshi H, Adachi Y, Sawada T, Tokuda N, Kondo H, Yoshikawa T, Suzuki M, Owada Y. FABP7 expression in normal and stab-injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. *Histochem Cell Biol* 2011 ; 136 : 501-513.