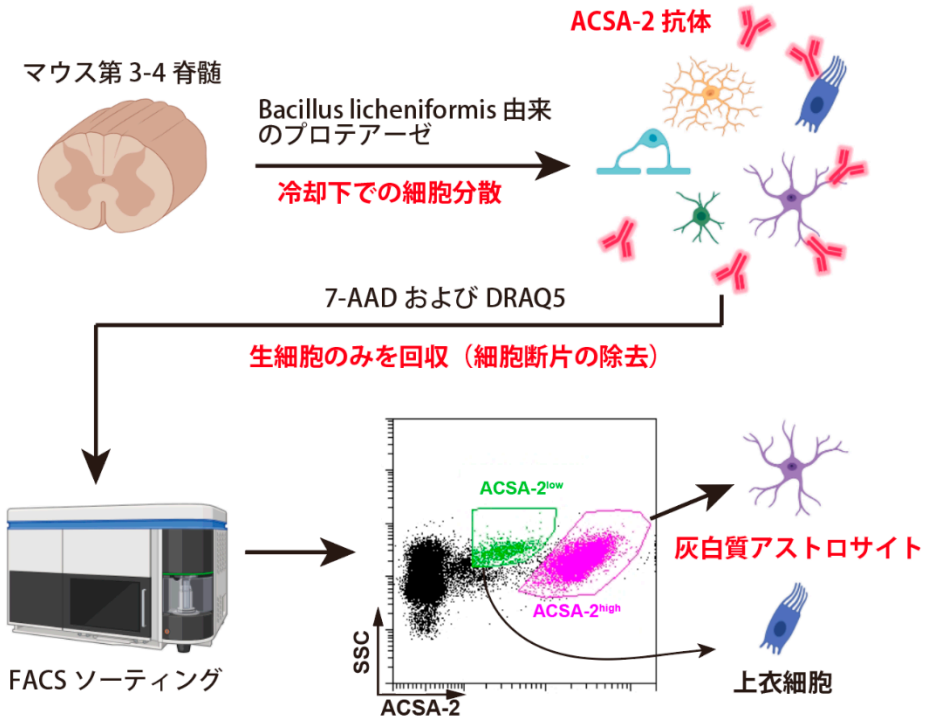
116　脊髄アストロサイトの機能解明に向けた技術基盤の創出	高露　雄太

【目的】脊髄神経細胞では初期応答遺伝子 cFOS などの発現増加が活動性の指標として使用され、免疫組織染色による陽性細胞の同定、あるいはそれを応用した Fos-TRAP 法などを利用することで、特定の時間軸で活動が亢進した神経細胞を同定することが可能である。一方で、脊髄アストロサイトは活動性の指標となる分子が同定されていないため、末梢への刺激時あるいは病態時におけるアストロサイトの時空間的な活動変化を捉えるのは現状難しい。そこで、脊髄アストロサイトの活動性マーカーを探索するにあたり、本研究ではアストロサイトに高発現することが知られている ATPase Na^+/K^+-transporting subunit beta 2（ATP1B2）を認識する astrocyte cell surface antigen-2（ACSA-2）抗体を使用し、fluorescent activated cell sorting（FACS）を用いて脊髄アストロサイトを高収率かつ高精度で単離可能な技術の確立を目的として検討を行った。

【方法】C57BL/6J 雄性マウスを使用し、実験を行った。免疫組織染色は、PBS をかん流後に 4%PFA で固定し、各種抗体を用いて第 4 腰髄の染色を行った。また、脊髄アストロサイトの単離は、マウス第 3/4 腰髄の酵素処理により細胞分散後、ミエリン除去を行い、ACSA-2 抗体と反応させた。FACS を用いて生細胞のみを回収し、mRNA を抽出後に逆転写反応を行い、各種プライマー・プローブを用いて遺伝子発現解析を行った。

【結果】冷却下でも酵素活性を示す *Bacillus licheniformis* 由来のプロテアーゼを細胞分散に使用することで、組織溶液を加温することなく、脊髄組織より ACSA-2 陽性細胞を単離可能であることを示した。さらに、酵素処理によって生じる可能性がある ACSA-2 陽性アストロサイトの突起断片を取り除く目的で、細胞核を染色する DRAQ5 を用いることで ACSA-2 強陽性および弱陽性細胞の各集団に分離可能であることが分かった。組織染色および qPCR 法を用いた解析により、各集団はそれぞれ脊髄の灰白質アストロサイトおよび中心管に存在する上衣細胞であることが明らかとなった。本研究で確立した手法は、既法よりも高収率かつ高精度なアストロサイト単離を可能としており、今後は本技術を基盤としてシングルセル RNA-seq 解析を行うことで、脊髄アストロサイトの活動性マーカーの同定が期待される。

高収率かつ高精度な脊髄アストロサイト単離法の確立



116. 脊髄アストロサイトの機能解明に向けた技術基盤の創出

高露　雄太

九州大学 大学院薬学研究院 薬理学分野

Key words：脊髄，アストロサイト，ACSA-2 抗体，FACS

緒　言

末梢からの感覚情報は脊髄後角内で適切な情報処理を受けた後、上位中枢へと伝達され、最終的に脳で認知する。近年の研究により脊髄後角内の神経回路は神経細胞のみならず、周囲に存在するグリア細胞によっても機能調節されることが明らかとなっており、従来考えられていたより遥かに複雑な制御メカニズムが存在している。グリア細胞の一種であるアストロサイトは、細胞外イオンや神経伝達物質を取り込むことで恒常性の維持に、またグルタミン酸や ATP 等のグリア伝達物質を放出することで神経細胞の機能調節に深く関与することが示唆されている［1］。さらに著者らの研究により、末梢の侵害刺激に対する脊髄アストロサイトのカルシウム濃度増加（Ca^{2+}応答）が痛覚過敏に重要であることを明らかとしており［2］、脊髄アストロサイトの活動性や機能を正確に理解することは感覚情報伝達のメカニズムを紐解く上で必須であると考える。

脊髄神経細胞では初期応答遺伝子 cFOS などの発現増加が活動性の指標として使用され、免疫組織染色による陽性細胞の同定、あるいはそれを応用した Fos-TRAP 法［3］などを利用することで、特定の時間軸で活動が亢進した神経細胞を同定することが可能である。一方で、脊髄アストロサイトは活動性の指標となる分子が同定されていないため，末梢への刺激時あるいは病態時におけるアストロサイトの時空間的な活動変化を捉えるのは困難である。そこで、脊髄アストロサイトの活動性マーカーを探索するにあたり、本研究ではアストロサイトに高発現することが知られている ATPase Na^+/K^+-transporting subunit beta 2（ATP1B2）を認識する astrocyte cell surface antigen-2（ACSA-2）抗体を使用し［4］、fluorescent activated cell sorting（FACS）を用いて脊髄アストロサイトを高収率かつ高精度で単離可能な技術の確立を目的として検討を行った。

方　法

1. 動物

C57BL/6J 雄性マウス（8～10 週齢で実験開始）を使用し、九州大学動物実験規定に沿って実験を実施した。

2. 免疫組織染色

PBS をかん流後に 4% PFA で固定し、抗 SOX9 抗体（1：2,000、R&D Systems）および抗 galectin-3 抗体（1：500、Cedarlane Labs）を用いて第 4 腰髄の免疫組織染色を行った。

3. FACS および qPCR 解析

マウス第 3/4 腰髄を単離し、*Bacillus licheniformis* 由来のプロテアーゼ（Sigma-Aldrich、P5380）を用いて細胞分散を行った。Myelin Removal Beads II（Milteny Biotec）を用いてミエリン除去後に、ACSA-2-PE 抗体（1 : 200、Miltenyi Biotec）と反応させた。7-aminoactinomycin D（7-AAD ; 1 : 40、eBioscience）および DRAQ5（1：666、Milteny Biotec）を用いて ACSA-2 陽性の生細胞を回収した。回収した細胞より mRNA を抽出後、逆転写反応を行い、各種プライマー・プローブを用いて遺伝子発現解析を行った。

結果および考察

1. FACS を用いた ACSA-2 陽性細胞の単離

脳や脊髄からのアストロサイトの単離にはシステインプロテアーゼとして知られているパパインが汎用される。酵素活性を得るために組織溶液を加温する必要があるが、加温操作自体が細胞の遺伝子発現に影響することが知られている［5］。そこで、本研究では低温下でも酵素活性を有する *Bacillus licheniformis* 由来のセリンプロテアーゼを用いることにした。4℃で 20 分酵素処理を行い、ミエリン除去を行ったところ、ACSA-2 陽性細胞の単離が確認された（図 1a、b）。ACSA-2 抗体は細胞膜表面に発現する ATP1B2 を認識するため、ACSA-2 陽性分画にはアストロサイトの突起断片が含まれる可能性が考えられる。そこで、細胞膜透過性のある核染色試薬として知られる DRAQ5 を用いた所、ACSA-2 強陽性と弱陽性集団に分かれることが明らかとなった（図 1c）。qPCR 解析により、ACSA-2 陽性細胞はアストロサイトマーカーである *Sox9* を豊富に発現する一方で、*Sox10*（オリゴデンドロサイト系譜）、*Mog*（成熟オリゴデンドロサイト）、*Itgam*（ミクログリア）、*Rbfox3*（神経細胞）、*Pecam1*（内皮細胞）などの細胞種マーカーの発現は低値を示した（図 1d）。

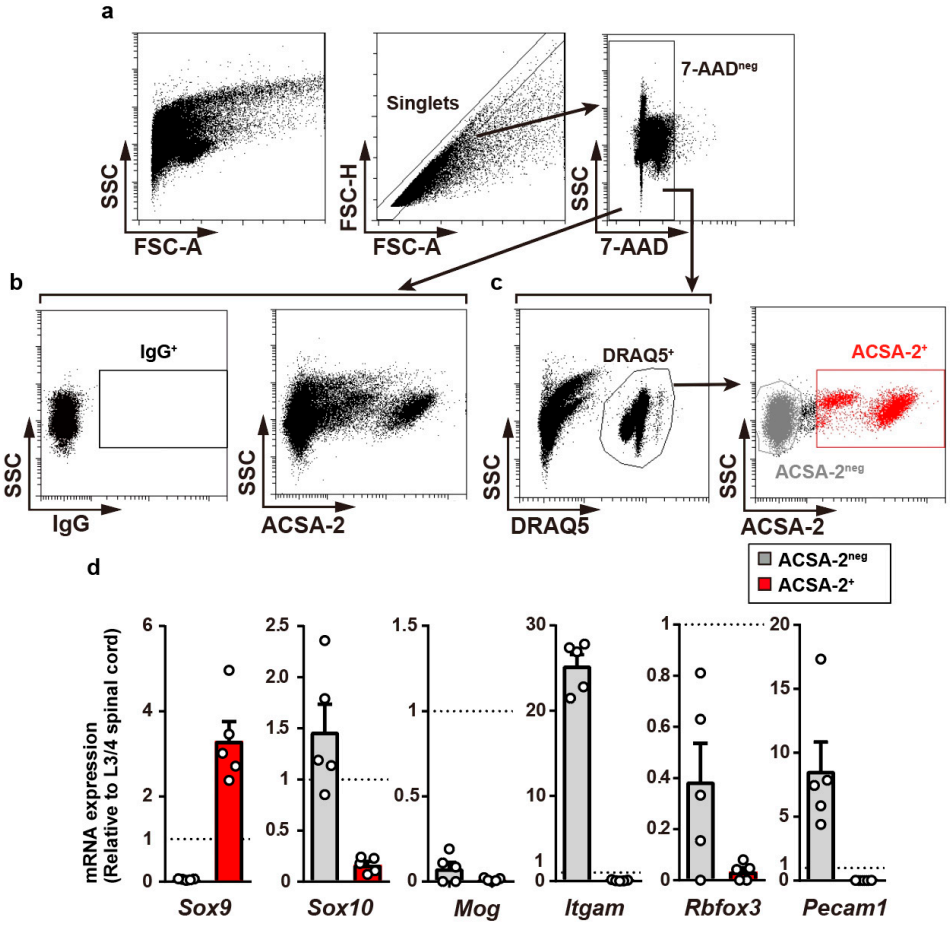


図 1. FACS を用いた腰髄からの ACSA-2 陽性細胞の単離

a～c）IgG-PE 抗体（a）、ACSA-2-PE 抗体（b）および ACSA-2-PE 抗体と DRAQ5 を用いた ACSA-2 陽性細胞の単離方法（c）。ACSA-2 陽性細胞は 7-AAD 陰性（生細胞）、DRAQ5 陽性（細胞体）かつ ACSA-2 陽性の細胞を選択。

d）ACSA-2 陽性および ACSA-2 陰性細胞における各細胞種マーカーの遺伝子発現を qPCR で解析。各遺伝子発現の値は *Gapdh* の mRNA で標準化し、第 3 および 4 腰髄組織の全細胞の値との比で示した（n = 5）。

2. ACSA-2 抗体を用いた灰白質アストロサイトよび上衣細胞の単離

次に、ACSA-2 強陽性および弱陽性細胞をそれぞれ単離し（図 2a）、qPCR 法を用いて細胞種の同定を試みた。その結果、ACSA-2 強陽性細胞では灰白質アストロサイトに特異的に発現することが知られる *Slc7a10*（alanine–serine–cysteine transporter-1 : ASC-1 をコードする）および *Sox9* の発現が豊富であり、灰白質アストロサイトであることが明らかとなった（図 2b）。一方で、ACSA-2 弱陽性細胞では白質アストロサイトマーカーとして知られる *Lgals3*（galectin-3 をコードする）および *Sox9* の発現が豊富であったが、ACSA-2 強陽性細胞とは異なり、アストロサイトマーカーとして知られる *Aqp4* の発現が低値を示した（図 2b）。そこで、galectin-3 の免疫組織染色を行ったところ、同分子は白質アストロサイトに加えて（図 2c）、上衣細胞での発現が確認された（図 2d）。さらに、ACSA-2 弱陽性細胞では上衣細胞マーカーの一つとして知られる *Dynlrb2* の発現が豊富であった（図 2e）。

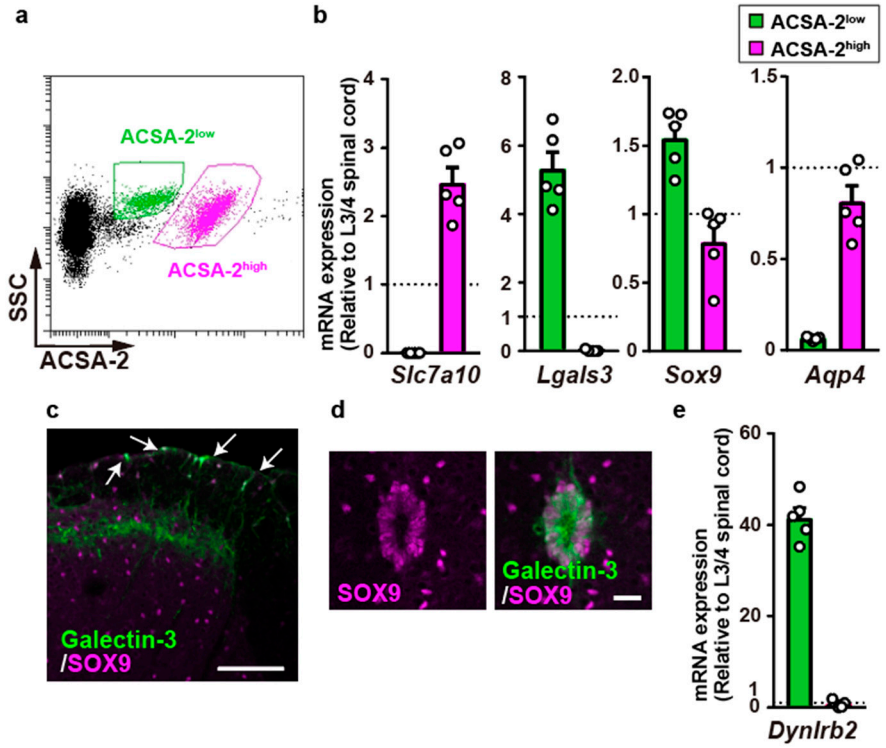


図 2. ACSA-2 強陽性および弱陽性細胞種の同定

a） ACSA-2 強陽性および弱陽性細胞の代表的な散布図。

b） ACSA-2 強陽性および弱陽性細胞における各遺伝子発現解析（n = 5）。

c、d） Galectin-3（緑）および SOX9（マゼンタ）抗体を用いた脊髄後角（c）および中心管付近（d）の染色画像。スケールバー：100 μm（c）および 20 μm（d）。 矢印は白質アストロサイトを示す。

e） *Dynlrb2* の mRNA 発現解析（n = 5）。

本研究により、ACSA-2 抗体を用いて脊髄より灰白質アストロサイトを高収率かつ高精度で回収する手法を確立した。また、ACSA-2 抗体を用いた FACS ソーティングではアストロサイトに加えて上衣細胞も同時に単離可能であることが明らかとなった。同手法は遺伝子改変マウスを使用する必要がないため、細胞種特異的ノックアウトマウスや遺伝子改変動物モデルなどへの適用が容易であると考える。また、マウスのみならずマーモセット［6］やヒト［7］においても ATP1B2 の発現がアストロサイトにおいて豊富であることが確認されており、他の種においても同様の解析が可能であると言える。今後は、同手法を用いてシングルセル RNA-seq 解析を行うことで、各種刺激に対する脊髄アストロサイトの活動性マーカーに資する分子の同定が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院薬学研究院薬理学分野の津田誠教授である。また、本研究にご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1） Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010 Jan 119(1):7-35. PMID: 20012068 DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8

2） Kohro Y, Matsuda T, Yoshihara K, Kohno K, Koga K, Katsuragi R, Oka T, Tashima R, Muneta S, Yamane T, Okada S, Momokino K, Furusho A, Hamase K, Oti T, Sakamoto H, Hayashida K, Kobayashi R, Horii T, Hatada I, Tozaki-Saitoh H, Mikoshiba K, Taylor V, Inoue K, Tsuda M. Spinal astrocytes in superficial laminae gate brainstem descending control of mechanosensory hypersensitivity. Nat Neurosci. 2020 Nov;23(11):1376-1387. PMID: 33020652 DOI: 10.1038/s41593-020-00713-4

3） Guenthner CJ, Miyamichi K, Yang HH, Heller HC, Luo L. Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations. Neuron. 2013 Jun 5;78(5):773-84. PMID: 23764283 DOI: 10.1016/j.neuron.2013.03.025

4） Batiuk MY, de Vin F, Duqué SI, Li C, Saito T, Saido T, Fiers M, Belgard TG, Holt MG. An immunoaffinity-based method for isolating ultrapure adult astrocytes based on ATP1B2 targeting by the ACSA-2 antibody. J Biol Chem. 2017 May 26;292(21):8874-8891. PMID: 28373281 DOI: 10.1074/jbc.M116.765313

5） Wu YE, Pan L, Zuo Y, Li X, Hong W. Detecting Activated Cell Populations Using Single-Cell RNA-Seq. Neuron. 2017 Oct 11;96(2):313-329. PMID: 29024657 DOI: 10.1016/j.neuron.2017.09.026

6） Lin JP, Kelly HM, Song Y, Kawaguchi R, Geschwind DH, Jacobson S, Reich DS. Transcriptomic architecture of nuclei in the marmoset CNS. Nat Commun. 2022 Sep 21;13(1):5531. PMID: 36130924 DOI: 10.1038/s41467-022-33140-z

7） Yadav A, Matson KJE, Li L, Hua I, Petrescu J, Kang K, Alkaslasi MR, Lee DI, Hasan S, Galuta A, Dedek A, Ameri S, Parnell J, Alshardan MM, Qumqumji FA, Alhamad SM, Wang AP, Poulen G, Lonjon N, Vachiery-Lahaye F, Gaur P, Nalls MA, Qi YA, Maric D, Ward ME, Hildebrand ME, Mery PF, Bourinet E, Bauchet L, Tsai EC, Phatnani H, Le Pichon CE, Menon V, Levine AJ. Neuron. 2023 Feb 1;111(3):328-344.e7. PMID: 36731429
DOI: 10.1016/j.neuron.2023.01.007