

2016年9月5日から19日までボン大学短期滞在プログラムに参加した。今回のプログラムでは、ボン大学の Institute of Molecular Psychiatry、Zimmer 研究室に2週間所属し、脳組織を使用した実験手法の習得を行った。実験は、マウス海馬の切片培養及び NMDA 刺激による死細胞のカウント、ミクログリアの単離、ヒストンのメチル化に対するウエスタンブロッティングの3種類を主に行った。

初日である9月5日は10時に LIMES に集合したのち、Zimmer 研究室の野崎千尋さんに Life and Brain の Zimmer 研究室へと案内していただいた。Zimmer 研究室に到着してからは、スーパーバイザーの Eva Beins とともに2週間の実験スケジュールの組み立てを行った。そのスケジュールでは、スライスカルチャーについては6日に培養に使用する培地の調整を行い、7日に海馬スライスを作成、2-3日に1度培地交換をしながら1週間培養し、15日にスライスカルチャーに対して NMDA 刺激を行うというスケジュールであった。1週間の培養期間には、事前にグリア細胞の培養とウエスタンブロッティングに興味がある旨を伝えていたことから、それら2つの実験を行うこととなった。

スライスカルチャーを用いた実験では、初日に Zimmer 研究室で使用しているカルチャープロトコルをいただき、その読み込みと参考文献としてラットの海馬を使用したスライスカルチャーのプロトコルもいただいたため、どのような手順で操作を行うかを学習した。次の日に、wild type と CB1 KO のマウス(P2-7)を用いて実際に脳切片の作成を行った。1日かけて短期集中でスライスの作り方を学習することができ、とても有意義だった。カルチャーを開始した次の日には培地交換をする必要があるため、培地の交換を行い、その翌日にはスライス作成によりどの程度組織が障害を受けているかを観察するために、Propidium Iodide(PI)を培地に添加することで死細胞を染め、死細胞の量を調べた。切片は 350 μ m の幅で作成するように設定してあったが、切片を作成するときに使用するビブラトームの調子によって厚い切片ができてしまうことがあり、そのような切片では死細胞が多く存在していた。培養から7日目に NMDA 刺激を行った。刺激の前にはコントロールとして、PI 染色画像を取得した。NMDA 刺激では、培地に NMDA 1 μ M を加え、その状態で4時間インキュベーションを行った。インキュベーション後には洗浄を行い、24時間後に観察を行った。培養から2日目に取得した切片の PI 染色の結果と7日目にコントロールとして刺激前に取得したものを比較すると、7日目のものの方が死細胞の数が減少していた(Fig.1a)。通常は切片の作成から2週間培養したのちに実験に使用するそうだが、今回は研究室への滞在期間が2週間ということで培養期間を1週間としたため、PI で染色される細胞がいくつ

か観察された。しかし、wild type と CB1 KO の間で染色されている細胞数の差はなかった。次に、コントロール PI 染色画像と NMDA 刺激から 24 時間後の PI 染色画像を比較すると、NMDA 刺激後の方が PI で染色されている細胞数が多く確認された(Fig.1b)。染色画像を Image J を用いて、海馬面積に対する PI によって染色された面積の割合を算出したところ、wild type ではコントロールと NMDA 刺激の間で死細胞数が優位に増加したことが示された(Fig.2a)。しかし、CB1 KO では、NMDA 刺激後の方が死細胞数を多く観察したが統計的な差はなかった。CB1 KO 群で差が見られなかったことについて、コントロールの時点で死細胞が海馬全体の面積に対して 20%を超えるものはデータとして使用しないことにしたことで、データとして使用したスライスの枚数が 3 枚となってしまったことから、n 数が少なかったことで差が見られなかったと予測する。あといくつかデータを足すことができれば CB1 KO 群についても統計的に差があると言えたのではないかと思う。今回用いた CB1 KO マウスでは、中枢神経系に発現するカンナビノイドレセプターの CB1 受容体をノックアウトしている。CB1 受容体には、プレシナプスからの神経伝達物質の放出過多を抑制する働きがあることと、NMDA 刺激によって起こる興奮毒性は神経伝達物質であるグルタミン酸の異常放出によって引き起こされる興奮毒性を模したものであるという 2 点から、当初の仮説では CB1 KO 群では NMDA 刺激による細胞死は wild type のものと比較すると多くなるとしていた。しかしながら、実験結果を見ると wild type よりも CB1 KO で死細胞数が少なかった(Fig.2b)。仮説と反する結果が出たため、これについて考察を行った。先行研究を調べると、CB1 受容体の主な作用としては神経伝達物質の放出過多の抑制があるが、その一方で CB1 受容体に対するアンタゴニストを投与すると神経保護作用が確認されたという論文がいくつか見つかった。また、CB1 受容体をノックアウトすることで NMDA 受容体の構造が変化するという報告も出ていた。これらのことから、NMDA 受容体の構造変化により CB1 KO では NMDA による刺激が弱められたことや、CB1 受容体がないことで神経保護作用が働いたことで死細胞の数が少なくなったと考えられることができる。今回のプログラムでは滞在期間が 2 週間のみであったため、それ以上の実験を行い、これらの考察を検証することができなかったが、CB1 受容体の未解明な点についてとても興味を持ったので、これからも注目していきたいと思う。

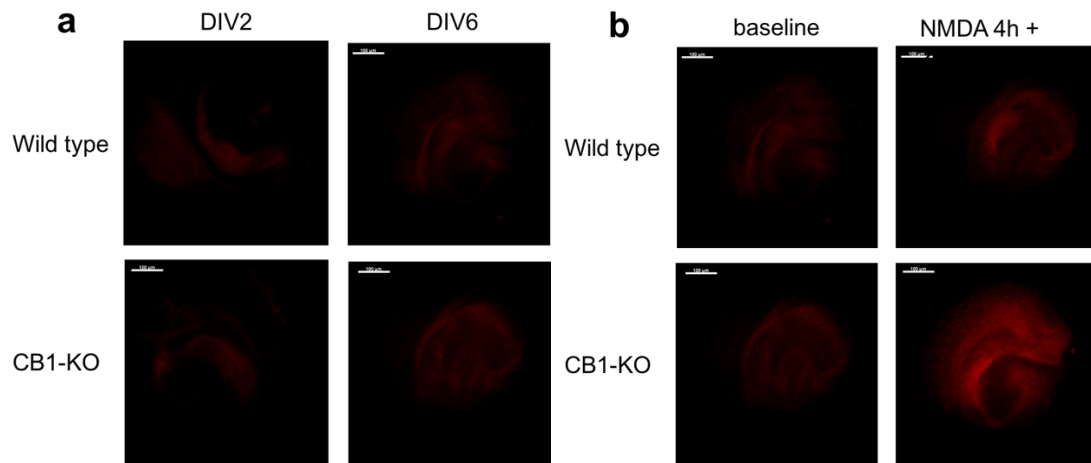


Fig1. PI staining of OHSC

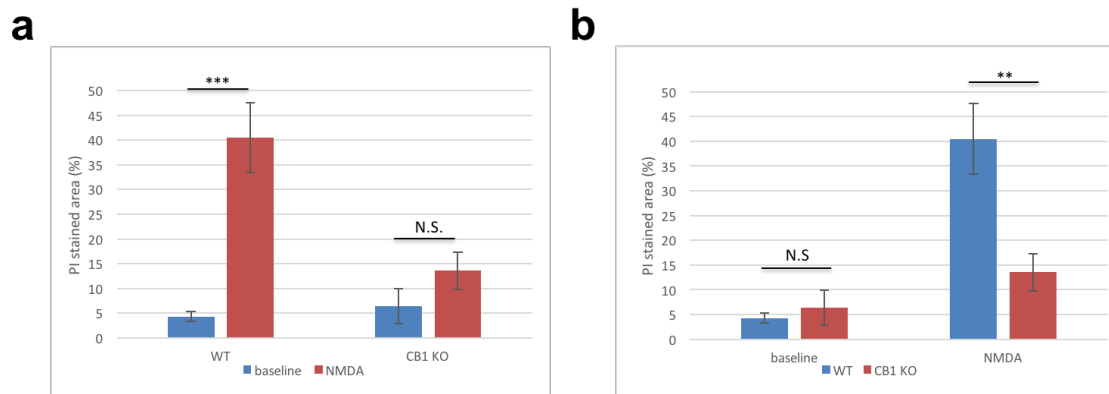


Fig2. Quantification of PI stained area

ミクログリアの単離について、Zimmer 研究室では脳内の炎症の指標としてミクログリアをターゲットとしていることからミクログリアの単離及び培養の系が立ち上がっていた。仔マウスの脳を用いると単離してから 1 週間ほど培養ができるとのことであったが、実験に使用することのできる仔マウスがいなかったため、アダルトのマウスの脳を用いてミクログリアの単離のみを行った。用いたマウスは、ミクログリア特異的に GFP を発現しているマウスであったため、単離後に蛍光を観察することで実際にミクログリアが得られているかどうかを確認した。結果として、いくつか細胞のようなものを得ることはできたが GFP の発現は確認できなかった。この理由として、この単離は Percoll を用いて層を作成しその中からミクログリアが存在すると考えられる層のみを取り出すというプロトコルであったため、目的の層を回収できていなかったことが考えられる。また、Zimmer 研究室では、アダルトマウスからミクログリアを単離したのちには FACS によって GFP 陽性細胞のみを得て実験に使用するということがあったが、今回は時間の関係上 FACS をすることはでき

ず、蛍光の確認のみであったことから、FACSをおこなうことができているならばマイクログリアを得ることができていたかもしれない。

ウエスタンブロッティングについて、普段の実験では使用していない実験手法ではあるが広く用いられる手法であるので一連の流れを確認するために行わせていただいた。今回は脳全体を対象としてヒストンのメチル化を対象として実験を行った。脳全体を対象としてウエスタンブロッティングを行うのは Zimmer 研究室では初めてであったようで、テクニシャンの方と共同で作業を行った。初めてのプロトコルを使用したことと、初めての抗体を使用したことの2つの理由から結果としてバンドを得ることができなかったが、全体の流れを復習することができた。

実験以外の内容として、ランチをセミナールームで研究室の方々と食べるのが習慣となっていたのでその時間にスーパーバイザー以外の研究室の方々と話をする機会があり、ボン付近の観光地やおすすめの食べ物、店、お土産などを教えていただいた。また、2週目には Zimmer 研究室が担当する medical course の学生向けの動物実験講義が開かれていたため、実験が午前中で終わってしまった2日間その講義に参加し、動物実験の基礎を学び、また medical course の学生さんとも少し交流をすることができた。

1週目には LIMES の学生さんたちが主導で BBQ やバスでの観光ツアーを開催していたり、その他にもボン大学の学生さんたちとの交流もありとても密度の濃い2週間だった。



スーパーバイザーの Eva と