

痛みに関連するDRGニューロン細胞のダメージフリーソーティング

Collaboration with Dr. Ikuro Suzuki, Tohoku Institute of Technology

Introduction

近年、痛みに関連する神経活動の研究や痛みを可視化するための開発がさまざまな分野で行われています。外界や臓器からの痛みの伝達を担うのは、後根神経節（DRG）に存在するDRGニューロンと呼ばれる感覚ニューロン（求心性ニューロン）の細胞体です。しかし、DRG内には他にも様々な種類の細胞が存在しており、多様な細胞集団で構成されています。DRG内に存在するDRGニューロンの種類によって、痛みに対する細胞の反応が異なることが知られています。そのため、不均一なサンプルから特定の種類のDRGニューロンを分離することで、その生化学や神経伝達の電気信号についての理解を深めることができ、医薬品の開発につながる可能性があります。On-chip® Sortは、従来のセルソーターでおこなわれていた全てのダメージに繋がるステップを排除しているため、DRGニューロンのような影響が出やすい細胞のソーティングが可能になります。本アプリケーションノートでは、On-chip® Sortによるサイズ別のDRG、および細胞表面にisolectin B4 (IB4)結合タンパク質が高発現しているDRGの分離機能を紹介します。

Methods

1. Sortによるサイズ別のDRG

10週齢の成体ラットから採取したDRGを、酵素処理により解離させ、Neural Basal Medium（10% FBS, 1% NGF添加）に懸濁してからソーティングしました。前処理したサンプルを大きさに応じてソーティングし（図1a）、5日間培養しました。培養した細胞は、パラホルムアルデヒドで固定し、神経細胞に含まれる微小管タンパク質を認識する抗β-チューブリンIIIと、神経伝達を担う神経細胞を認識する抗シナプトフィジンで染色しました。

2. IB4-positive DRGニューロンのソーティング

上記のようにして採取したDRGを、Alexa546標識抗IB4で30分間染色し、培地で洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察しました。染色したIB4の発現量が多いDRG細胞をOn-chip® Sortで分離し、4日間培養しました。

Results

1. Sortによるサイズ別のDRG

細胞の大きさの分布から4つのグループが観察され、そのうちの2つの細胞集団をOn-chip® Sortで別々にソーティングし（図1a）、5日間培養しました。両集団をパラホルムアルデヒドで固定し、抗β-チューブリンIIIと抗シナプトフィジンで染色しました（図1b）。抗β-チューブリンIIIと抗シナプトフィジンによる染色の顕微鏡観察でソーティング後5日間培養した2つの細胞集団がDRGニューロン細胞であることが確認されました。これらの結果から、On-chip® Sortは、生存率を維持したままDRGの神経細胞をサイズごとにソーティングできることが明らかになりました。

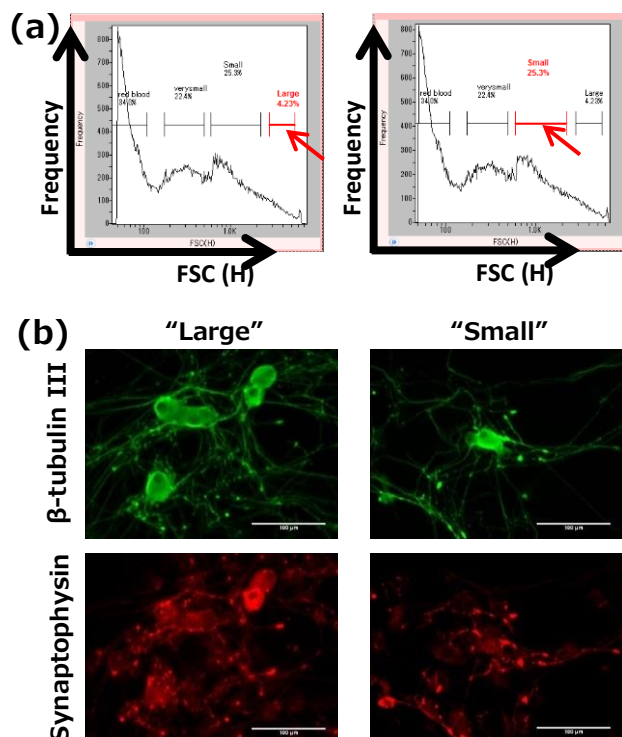


図1 (a)多様なDRGニューロン細胞をFSCヒストグラムでサイズ異存で解析。2つの集団を“Large”と“small”としてOn-chip® Sortでソーティング (b)5日間anti-β-tubulin III (緑)とanti-Synaptophysin (赤)で染色して、顕微鏡観察

Application Note

2. IB4-positive DRGニューロンのソーティング

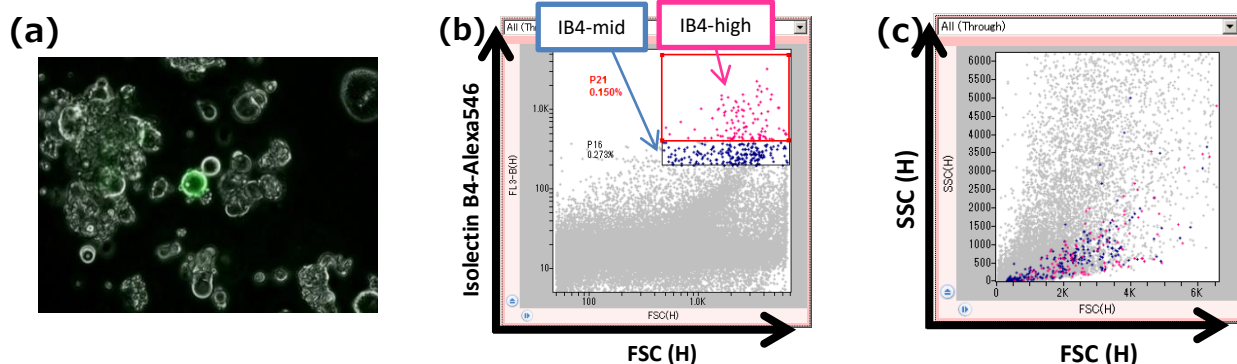


図2 (a)Alexa546-conjugated anti-IB4で染色したDRGニューロンの顕微鏡 (b) Anti-IB4-Alexa546 vs. FSCプロット図。“IB4-mid”と“IB4-high”をゲーティングしてIB4-highをソーティング (c) SSC vs. FSCのプロット図

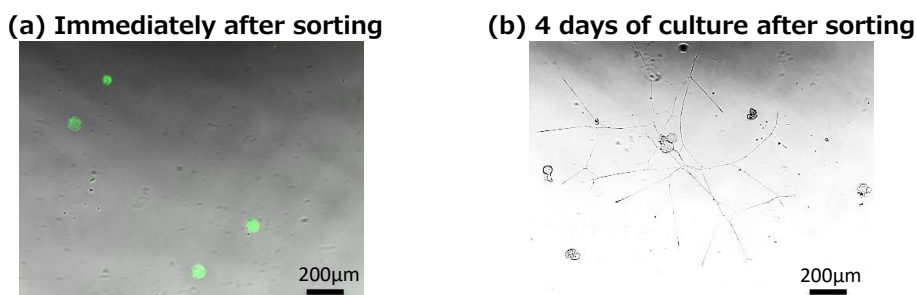


図3 DRGニューロンの顕微鏡写真(a)ソーティングした直後のIB4陽性細胞(b)ソーティング後4日間培養

DRGニューロンには、ペプチド性ニューロンと非ペプチド性ニューロンの2種類が存在することが知られています。細胞表面のIB4結合タンパク質は、非ペプチド性神経細胞に優先的に結合するという報告があり(1,2)、IB4の結合によって2種類の神経細胞を区別することができます。染色したDRGニューロンにIB4陽性細胞が存在することは、顕微鏡で確認しました(図2a)。On-chip® Sortでソーティングした結果、IB4の発現量が高い細胞集団と中程度の細胞集団(図2bではそれぞれ「IB4-high」と「IB4-mid」と表示)が見つかりました。また、IB4結合タンパク質の発現量と、細胞の大きさや細胞の複雑さとの相関関係を調べました(図2c)。しかし、その結果、2つのパラメータの間には関連性が見られませんでした。全体の0.15%を占める「IB4-high」グループをソーティングして、4日間培養しました。IB4を高発現している単離した細胞は、4日間の培養後に神経突起の伸長を示しました(図3)。この結果から、IB4陽性DRGニューロン細胞は、On-chip® Sortによるソーティング後も損傷を受けず、生存していることが示唆されました。

Summary

On-chip® Sortは、サイズによって異なる細胞集団から、疼痛などに関連するかもしれないDRGニューロンをソーティングすることができました。また、細胞表面にIB4結合タンパク質が高発現している細胞を単離することができました。いずれの場合も、シース液として培養液を使用し、ソーティング後に4~5日培養しても、単離した細胞は損傷を受けず、生存していることが確認されました。

References

- 1) C. L. Stucky, and G. R. Lewin. (1999). Isolectin B4-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *The Journal of Neuroscience*. 19(15): 6479-6505.
- 2) N. J. Fudge, and K. M. Mearow. (2013). Extracellular matrix-associated gene expression in adult sensory neuron populations cultured on a laminin substrate. *BMC Neuroscience*, 14:15.

株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

〒184-0012 東京都小金井市中町2-24-16 農工大・多摩小金井ベンチャーポート203号室

TEL: 042-385-0461 Email: info@on-chip.co.jp

URL: <https://on-chip.co.jp/>

