

マウス初代腹腔マクロファージへの 遺伝子導入の検討

東京大学 医学部附属病院
糖尿病代謝内科

熊谷 真義 先生

Introduction

マクロファージは単核球から分化する細胞の一つで、細菌やウイルスなど外来性の異物や死細胞を捕食する他、抗原提示によるTリンパ球の活性化、細胞性免疫の効果細胞としての働きなどを介して免疫システムに関与する。マクロファージにはその他にも多様な機能があり、例えば血管壁の変性コレステロールの処理にも関わり、アテローム性動脈硬化の進行においても重要である他、さらに最近では脂肪・腫瘍組織に存在するマクロファージの役割にも注目が集まっており、これらの分野の研究でその重要性が認識されている。しかしながら、分化マクロファージは増殖性が乏しく、RAW264.7やThP-1などの株化細胞は必ずしも生理的なマクロファージの役割を反映していないなどの問題があり、さらに遺伝子導入効率の悪さがそれに拍車をかけ、重

要でありながら研究標的としにくい細胞でもある。

骨髄から血中に出た単球が血管外の組織へ出たものがマクロファージと定義されるが、マクロファージは存在する組織により多彩な形態を示し、皮膚に存在する組織球、肝臓に存在するクッパー細胞、肺泡に存在する塵埃（じんあい）細胞などもマクロファージの一種である。腹腔内に存在するものを腹腔マクロファージと呼ぶが、thioglycollateなどの刺激により大量に腹腔内に誘導されることから、マクロファージを用いた実験に好んで使用される細胞である。（Fig.1）

初代マクロファージに効率的に遺伝子導入することにより、マクロファージ特異的に発現する遺伝子の発現調節や機能解析などが可能となり、動脈硬化性疾患や代謝・腫瘍学における新たな研究手法の道が開けるものと期待される。

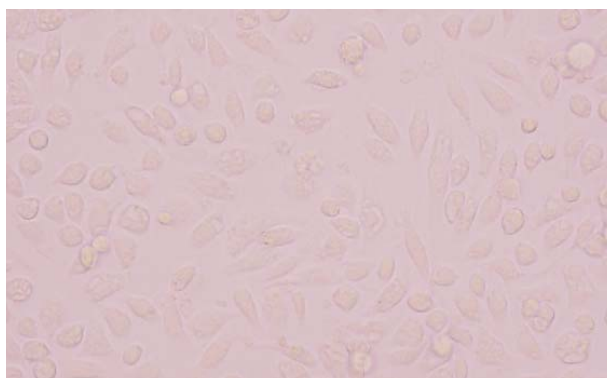


Fig.1 抽出後、プレートに播いて24時間後の
マウス腹腔マクロファージ

Summary

マウス腹腔マクロファージはカチオン性脂質などの遺伝子導入試薬ではほとんど遺伝子導入ができず、遺伝子導入実験が非常に困難な細胞の一つである。今回我々は、Neon™ Transfection Systemでマウス腹腔マクロファージへの遺伝子導入の検討を行った。

方法

マクロファージの抽出

C57/BL6J マウス 腹腔 内に 5% thioglycollate medium (Sigma) 2mlを注入し、3.5日後に断頭の上、シリンジ及び注射針を用いて計 15ml の PBS (7ml+8ml) にて 2 回腹腔内を洗浄し腹腔マクロファージを回収した。回収した腹腔洗浄液は 1000rpm、4℃、5分間遠心後、PBS にて 2 回洗浄し、細胞数を算定した。同手法により得られた細胞の大半はマクロファージであるが、若干の他の血球系細胞が混じるため、通常はプレートに数時間培養後に PBS にて洗浄を行い、接着細胞をマクロファージとするが、今回はエレクトロポレーションのため、プレーティング前の細胞をそのまま使い、観察時に接着細胞を評価した。(ポイント1)

エレクトロポレーション

Neon™ Transfection System のプロトコールに則ってエレクトロポレーションを行った。

導入遺伝子には、GFP 発現プラスミドを用いた。(ポイント2)

ペレット化したマウス腹腔マクロファージを total 9 μ l / 回となるように buffer R ないし buffer T に懸濁し、プラスミド 1 μ l (1 ~ 5 μ g) を加えた。細胞懸濁液 10 μ l を pipette で吸い上げ、Neon™ Transfection System にて遺伝子導入を行い、エレクトロポレーション直後に予め 24 ウェルプレートまたは 48 ウェルプレートに用意しておいた抗生物質なしの low glucose D-MEM [Dulbecco' s Modified Eagle Medium, WAKO] 培地に撒き、37℃・5% CO₂ インキュベーターにて培養を行った。(ポイント3,4)

導入効率の評価方法

エレクトロポレーションの 24 時間後に、蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8100, KEYENCE) にて細胞形態及び GFP 発光を観察し、導入効率の確認を行った (table 1)。

結果

Buffer (R or T buffer)、細胞数 (1 $\times$ 10⁵ の 5 乗 ~ 1 $\times$ 10⁶ の 6 乗)、プラスミド量 (1 ~ 5 μ g) 及びパルス電圧 (1600 ~ 2500 V)、パルス幅 (5 ~ 20 ms)、パルス回数 (1 ~ 3 回) を様々な組み合わせ、各条件下での遺伝子導入効率の評価を行った。

R buffer を用いて optimization program を行った場合は、ほとんど plasmid の導入はみられなかった。

T buffer を用いて、細胞数および plasmid 量を増加させたところ、最大で 10% の導入がみられ、その際の細胞の生存率も 60% を維持できた (細胞数: 2 $\times$ 10⁵ の 5 乗、プラスミド 2 μ g、電圧 2200V、パルス幅 10ms、パルス回数 2 回)。

導入翌日の導入率・生存率は良好であり、(グラフ 1 参照) GFP の発現も確認されたが、plating 24 時間後には通常見られる仮足の出現の見られない細胞が多かった。その後数日細胞を継続培養してみたところ、以後も仮足の出現が余り見られず、ディッシュへの接着も弱く、メディアウム交換時の洗浄で剥がれてしまう細胞が多く見られ、長期培養は困難であった。

グラフ 1

Table 1 の条件でエレクトロポレーションを行い、導入効率および生存率を測定した。

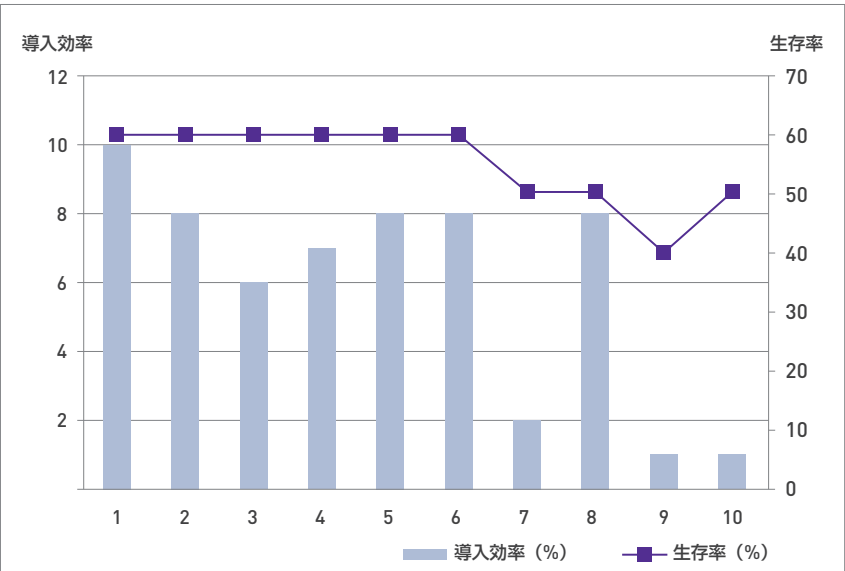


Table 1
細胞数、plasmid 量、エレクトロポレーションの各条件

	No. of cells	plasmid (ug)	voltage	pulse length (ms)	pulse repeat (times)	survival rate	transduction efficiency(%)
#1	2*10 ⁵	2	2200	10	2	60	10
2	2*10 ⁵	3	2200	10	2	60	8
3	2*10 ⁵	5	2200	10	2	60	6
4	5*10 ⁵	2	2200	10	2	60	7
5	5*10 ⁵	3	2200	10	2	60	8
6	5*10 ⁵	5	2200	10	2	60	8
7	1*10 ⁶	3	2200	10	2	50	8
8	1*10 ⁶	3	2200	10	2	50	8
9	1*10 ⁶	5	2200	10	2	40	1
10	1*10 ⁵	1	2200	10	2	50	1

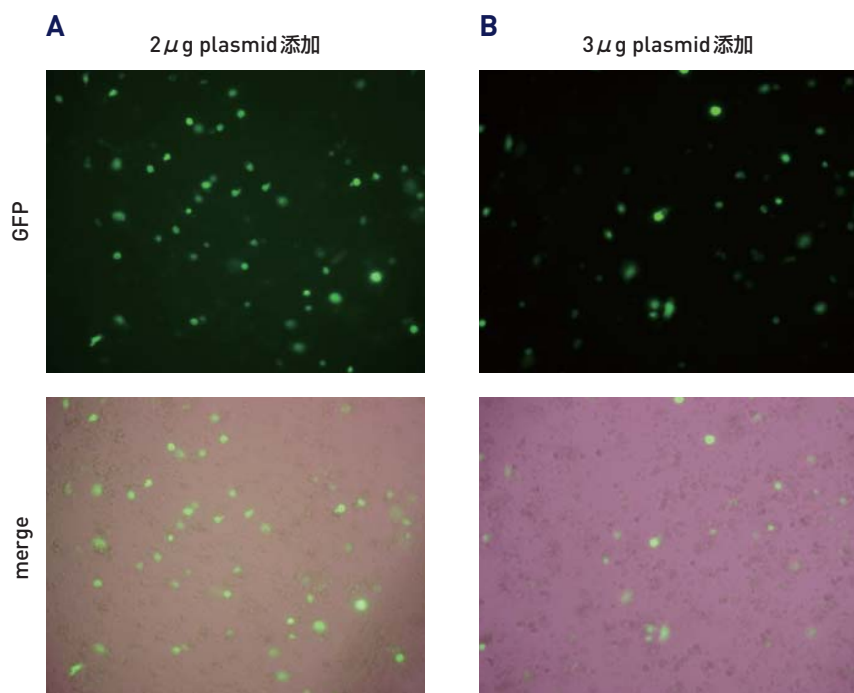


Fig.2 マウス腹腔マクロファージへの plasmid DNA の導入

2×10⁵細胞に2200V,10msパルス時間、2回パルスの条件でGFP発現 plasmid の導入を試みた。Aは2μgの plasmid を使用し、Bは3μgの plasmid を使用した。エレクトロポレーション後、24時間後に顕微鏡下で観察した。

Aの導入効果：10%、生存率60%

Bの導入効率：8%、生存率60%

考察および感想

Neon™ Transfection System を用いてマウス腹腔マクロファージへの遺伝子導入の検討を行った。細胞数やプラスミド量、及びパルス条件を調整することにより、最大で10%の導入効率、60%の生存率という結果を得ることができた。遺伝子導入が困難な細胞の特質を考えると特筆すべき導入効果といえ、導入効率及び生存率から考えると導入遺伝子の機能解析を行うことも可能と考えられる。今後の課題としては、導入効率が既知の手法に比べ上昇しているものの未だ低いため、さらに導入率を上げることはもちろんであるが、一方で100%近い導入率が得られない場合

には一定の導入率・生存率が再現性よく得られることが遺伝子導入・機能解析にあたっては重要となってくる。また、特にマクロファージを扱うに当たっては、ディッシュへの接着後の回収が困難であることから、細胞採取後のどの時点でエレクトロポレーションを行うかも重要な因子となってくる。エレクトロポレーションに伴う細胞障害性に関しては、エレクトロポレーション翌日にGFP発現が見られたことから短期的には機能していると考えられる細胞も、細胞の形態・長期飼育後の変化からは仮足形成が見られないなど細胞の微小構造障害を始め潜在的なダメージを受けていることは十分に考えられる。エレクトロポレー

ションによる細胞障害のメカニズムについては十分に明らかになっていないが、細胞膜の透過化、孔形成、遺伝子導入の中で、前者ほど電圧依存、後者ほど時間依存的な面が強いものと考えられ、いかに高電圧に伴う細胞ダメージを抑えつつ、効率よく遺伝子を導入し、障害後の修復を促進するかが課題となる。今回は細胞数やプラスミド量、パルス条件などを変更し条件検討を行ったが、加えて異なるパルスの組み合わせ、バッファー条件などに検討を加えることで、さらなる導入効率の改善が期待できるものと思われる。

操作上のポイント

ポイント1：PBSによる洗浄、遠心の回数を最小限にし、細胞への物理的ダメージを軽減させることで生存率を改善できる場合があります。

ポイント2：プラスミドの精製グレードは生存率に大きな影響を及ぼします。プラスミドはカラム精製したトランスフェクショングレードをご使用下さい。またエタノール沈殿を行った場合は、70%エタノールでしっかり洗浄し、塩類を確実に除去して下さい。

ポイント3：細胞をR buffer またはT buffer へ懸濁した後は速やかにエレクトロポレーションを実施下さい。時間を追うごとに生存率低下の原因となります。

ポイント4：細胞によっては低密度に播いた方が生存率が上がる場合があります。生存率を特に重要視される実験の場合はご検討下さい。



Neon™ Transfection System 製品情報

製品名	カタログ番号	サイズ
Neon システム		
Neon™ Transfection System ^{※1}	MPK5000	1 ユニット
Neon™ Transfection System Starter Pack ^{※2}	MPK5000S	1 セット
^{※1} Neon™ Transfection System[MPK5000] は、Neon™ システム本体、Neon™ Pipette (MPP100)、Neon™ Pipette Station (MPS100) で構成されています。 ^{※2} Starter Pack[MPK5000S] には、Neon™ Transfection System[MPK5000] に、Transfection Kit[MPK10096、MPK1096 各 1 キット] が添付されています。		
Neon 消耗品		
Neon™ Transfection System Kit (100μL)	MPK10096	1 キット (Neon チップ：96 本)
	MPK10025	1 キット (Neon チップ：25 本)
Neon™ Transfection System Kit (10μL)	MPK1096	1 キット (Neon チップ：96 本)
	MPK1025	1 キット (Neon チップ：25 本)
Neon™ Transfection Tubes	MPT100	1 パック (100 本)
Neon™ Pipette	MPP100	1 ユニット
Neon™ Pipette Station	MPS100	1 ユニット



公式 Facebook ページもチェック！ facebook.com/LifeTechnologiesJapan

ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8 TEL.03-6832-9300 FAX. 03-6832-9580
 大阪：〒564-0052 大阪府吹田市広芝町 10-28 TEL.06-6339-8165 FAX. 06-6339-8138

- コールセンター ————— ☎ 0120-650591 (携帯からでもご利用いただけます)
- テクニカルサポート ————— ☎ 0120-477-392 FAX : 0120-477-120
- オーダーサポート ————— TEL : 03-6832-6980 FAX : 03-6832-9584
- カスタムプライマーについて — TEL : 03-6832-6980 FAX : 03-6832-9585
- サービスラボ ————— TEL : 03-5753-3006 FAX : 03-5753-3007
- 営業部 ————— TEL : 03-6832-9300 FAX : 03-6832-9580

研究用におのみ使用できます。診断目的及びその手続上での使用は出来ません。

記載の社名および製品名は弊社または各社の商標または登録商標です。

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

© 2012, Life Technologies Japan Ltd. All rights reserved. Printed in Japan. 2010-76-MB-r2

販売条件: www.lifetechnologies.com/TC

www.lifetechnologies.com

販売店

life
technologies™