

【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

