

原著

新生仔マウス初代培養心筋細胞の単離培養法

韓 沖¹⁾ 瀬谷和彦¹⁾ 小湊佳輝¹⁾ 野崎修平¹⁾
米倉 学²⁾ 村上 学¹⁾

抄録 新生仔マウス初代培養心筋細胞法は1960年代に確立された。しかし、多数の新生仔が必要であり、遺伝子改変動物に応用するためには問題も多い。今回我々は、野生型57BL/6J系マウス新生仔を用い、心筋保護剤であるブタンジオンモノオキシム存在下、2段階の酵素処理(トリプシン処理(約2時間)、コラゲナーゼ-ディスペラーゼ処理(約1時間))約5時間で単離し、初代培養できる手法を考案した。得られた初代培養心筋細胞は、培養開始後約12時間で拍動を開始し、1週間継続した。また、交感神経刺激薬を用いた生理学・薬理的検討でも心筋細胞機能が従来法で得た細胞と変わらないことを確認した。以上の結果は、本改良法が少数の個体しか得られない遺伝子改変マウス新生仔にも適用し得る事を示唆している。

弘前医学 67:147-152, 2017

キーワード: 新生仔マウス; 初代培養心筋細胞; 野生型; CREB; NFAT.

緒 言

哺乳類の初代培養心筋細胞は、1885年にRouxらがニワトリ胚の神経板組織を生理食塩水中で数週間生かすことに成功したのが最初である¹⁾。齧歯類では1960年にHararyとFarleyが新生仔ラット心筋細胞²⁾、1976年にPowelらが成熟ラット心筋細胞の単離培養に成功し³⁾、現在に至るまで心筋細胞の単離培養が行われている。

初代培養細胞は、生体から単離した細胞を最初に播種して培養したものである。細胞株とは異なり、生体から直接単離することから、その生体と同様な挙動を示すことが期待できる。したがって生理学研究を始め、医学研究において広く行われている。薬理学分野でも、新薬開発を目的とした候補物質の作用・副作用のスクリーニングに多く用いられている⁴⁾。

1970年代の遺伝子過剰発現マウスの作製以降、様々な遺伝子改変マウスが研究に使用されている^{5,6)}。したがって、マウス心筋細胞の単離条件を検討し、高い効率で一定期間細胞を維持し、研究に用いることは意義深いと考えられる⁷⁾。一般

的には心筋単離にはランゲンドルフ法が用いられている。この方法は大動脈に逆行性にカテーテルを挿入する方法である。心臓の栄養血管である冠動脈を経由して、生理的血行に近い条件で、細胞単離のためのコラゲナーゼを心臓全体に行き渡らせる方法である。したがって、細胞の回収率が高い⁸⁾。しかし、新生仔マウスの心臓は数ミリ程度の直径であり、高いテクニックが必要とされる⁹⁾。

また、新生仔マウスの心臓は、従来使用されているブタなどの哺乳類と比較して単離により得られる細胞数に限度がある。コラゲナーゼ等の酵素処理による影響を受けやすいことも知られている。線維芽細胞、血管内皮などが存在し、心筋細胞のみの単離が困難であることも問題である。我々は、新生仔マウス初代培養心筋細胞を比較的短時間で作製できる方法を開発した。生理学的、薬理的など広範囲にわたる心筋細胞の機能評価を、初代培養心筋細胞を用いて検討した。

¹⁾ 弘前大学大学院医学研究科 病態薬理学講座
²⁾ 弘前大学大学院医学研究科 循環器腎臓内科学講座

別刷請求先: 村上 学
平成28年6月20日受付
平成28年7月4日受理

方 法

動物

実験には C57BL/6J 系マウス(チャールズリバーラボラトリージャパン社)を使用した。マウスの取扱いは弘前大学動物実験委員会の承認取得後、弘前大学動物実験ガイドラインに従った。

試薬

洗浄液として PBS(Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含, 和光純薬)を用いた。抽出液は HBSS(Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含, 和光純薬)に 0.25% トリプシンを加えて調製した(トリプシンの終濃度は 0.08%)。酵素処理液は L15 培地(L-Glu 含有, Corning)に collagenase/dispase ミックス(Roche, 1.5mg/ml)を加えて調製した。いずれも 20 mM ブタンジオンモノオキシム(Sigma)を加え、濾過滅菌したものを用いた。ブタンジオンモノオキシムはミオシン ATP アーゼを阻害し、筋収縮を可逆的に抑制する効果があり、心筋を保護する効果がある。培養用培地は高グルコース含有 DMEM(500 mL)に 1% penicillin/streptomycin, 5% ウシ胎児血清を溶解したものを使用した。

初代培養心筋細胞の単離(簡便化法, 図 1)¹⁰⁾

1. 生後 1~3 日の新生仔マウス(1~7 匹)の表面を消毒用エタノールで除菌する(図1-A)。断頭開胸後、心臓を摘出する(図1-B, C)。
2. 付着物除去後、PBS に浸漬する(図1-D)。
3. 抽出液中で心臓を一辺約 0.5~1 mm になるよう細切し、4℃で 2 時間穏やかに攪拌する(図1-E, F)。
4. 酵素処理液を加え、30 分間、37℃ 保温状態で穏やかに攪拌する(図1-G)。
5. 上清を 70 μ セルストレーナーで濾過する。(濾過により、単離された細胞をその他の物と分離する、図1-H)。
6. 未消化の組織切片残渣を酵素処理液で 10 分間 37℃ 穏やかに攪拌する。このステップは匹数が少ない場合、最終的に得られる細胞数を確保するために重要と考えられる。
7. 追加の酵素処理後、再度セルストレーナーで濾過する。

8. 心筋細胞懸濁液を約 100 g で 5 分間遠心後、上澄みを除く。

9. ペレットを培養用培地で懸濁し、ノンコーティングディッシュに蒔いて 2 時間培養する。同ステップは接着性の良い線維芽細胞をディッシュに接着させ、接着性の低い心筋細胞と分離するステップである。

10. 非接着性の心筋細胞を緩やかなピペティングで回収し、細胞数計測後、 $1.2 \times 10^5/\text{cm}^2$ を基準に細胞をコーティングディッシュに播種する。細胞数が限られるため、1 心臓あたりの細胞を 24 ウェルディッシュ(1.9 cm^2)に播種した。実際には複数の心臓から細胞を単離し、実験手法に応じて 96 ウェルディッシュ(0.35 cm^2)、48 ウェルディッシュ(1.0 cm^2)に播種することになる。細胞数が極端に少ない場合はマトリゲル、ポリリジンなどでコートし、接着性を高めた小カバーガラス(直径 6 mm)を 48 ウェルディッシュ(1.0 cm^2)に入れ、ガラス上にドロップ状(1 滴)に播種し、15 分静置後、丁寧に培地を追加する。(コーティングしたカバーガラス上に心筋細胞が残る)。

播種後、位相差顕微鏡(IX71, オリンパス)を用いて鏡検した。

蛍光測定

細胞内カルシウム濃度測定¹¹⁾

新生仔マウス初代培養心筋細胞における細胞内カルシウム濃度を測定した。心筋細胞はカルシウム濃度指示薬である Fluo4-AM を細胞内に取り込ませ、蛍光強度を指標に細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光顕微鏡(ORCA-Flash 4.0 デジタル CMOS カメラセット)により継時的に測定した。Fluo4 蛍光測定は EGFP のフィルターセットを使用した。

細胞内情報伝達系の可視化^{12,13)}

CREB(cAMP response element binding protein), NFAT(Nuclear factor of activated T cells)の細胞内情報伝達に関わる因子の認識配列の下流に EGFP 遺伝子を挿入した。できた発現ベクター遺伝子を初代培養心筋細胞に transfection した。細胞内で cAMP が上昇した場合、EGFP 蛍光が増強する。同様に、細胞内 calcium-NFAT

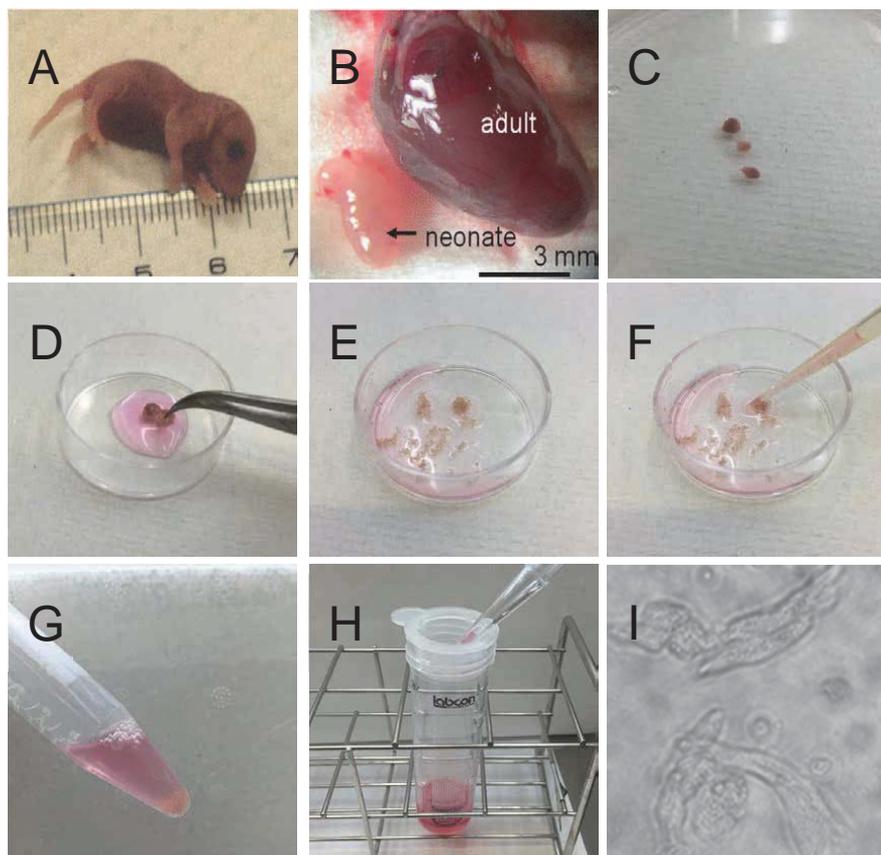


図1 新生仔マウス初代培養心筋細胞の単離方法

- A) 新生仔マウス, B) adult (成熟) および neonate (新生仔) マウスの心臓.
 C) 新生仔マウスを断頭後, 心臓を取り除いた. D) 単離した心臓.
 E-G) 外科剪刀を用いて心臓をミンスした後, 抽出液の入ったチューブに移し, 4℃で1時間攪拌.
 H) 単離した心筋組織の懸濁液をセルストレーナーで濾過.
 I) 新生仔マウスから単離した初代培養心筋細胞の写真.

系の指標として NFAT-EGFP 発現ベクターも transfection した. 交感神経系刺激薬であるイソプロテレノール (1 μM) による CREB-EGFP, あるいは NFAT-EGFP 発現細胞の反応を検討した. 遺伝子発現には X-treme (ロシュ社) を用いた.

結 果

簡便法を用いた初代培養心筋細胞の単離

我々が改良した簡便法では, 断頭開胸から培養開始に至る時間が, 約5時間と従来法(約2日間)と比較して大幅に改善された. 単離した細胞数は, 心臓3個から 1.5×10^5 個/mL, 7個から 3.5×10^5 個/mL が得られ, 従来の方と比べても相違ない結果を見出した¹¹⁾. 位相差顕微鏡による観察では, 非心筋細胞の割合が, 5%程度であっ

た.

初代培養心筋細胞の培養

コーティングディッシュへ播種後, 約12~16時間後に単一細胞による拍動を確認した. 24時間以降は, シンクロナイゼーションによる拍動の広域化が認められた. 拍動は, 培養開始後, 1週間まで維持された(図1-I).

イソプロテレノールに対する反応性の検討

交感神経作動薬, イソプロテレノール刺激後の初代培養心筋細胞における細胞内カルシウム濃度の変化を測定した. イソプロテレノール (1 μM) 刺激により, 一過性の細胞内カルシウム濃度増加が認められた(図2).

さらに, 遺伝子導入により CREB-EGFP

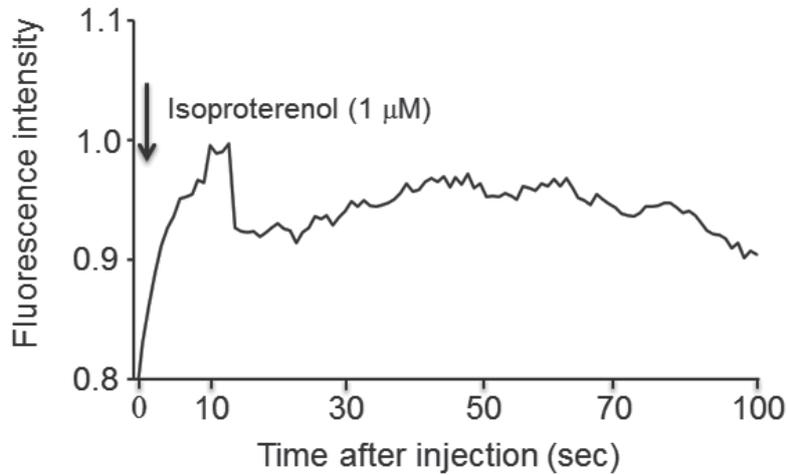


図2 イソプロテレノール刺激後の細胞内カルシウム濃度変化

新生仔マウス初代培養心筋細胞内にカルシウム濃度指示薬である Fluo4-AM を取り込ませた。交感神経作動薬、イソプロテレノール(1 μM)を添加し、蛍光強度を指標に細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光顕微鏡(ORCA-Flash 4.0 デジタル CMOS カメラセット)により継時的に測定した(ex: 480 nm, em: 510 nm)。

plasmid および NFAT-EGFP plasmid を細胞に発現させ、イソプロテレノールによる効果を検討した(図3)。図3Aに示したように、イソプロテレノール投与後、CREB-EGFP 発現細胞では basal と比較して蛍光強度の有意な増加が認められた。一方、NFAT-EGFP 発現細胞では変化は認められなかった(図3B)。CREB-EGFP では cAMP に依存した protein kinase A の活性化の度合いを EGFP 蛍光強度で計測することが可能である。一方、NFAT-EGFP では細胞内カルシウム濃度に依存する転写因子である活性化 T 細胞核内因子(NFAT)の活性を EGFP 蛍光強度で計測することが可能である。イソプロテレノールにより心筋細胞にある交感神経 β 受容体が活性化され、cAMP 濃度が増加し、CREB-EGFP 蛍光が増加したと考えられる¹⁴⁾。一方、イソプロテレノールによる細胞内カルシウム増加は二次的な増加(PKA リン酸化による電位依存性カルシウムチャネルの電流増加)しか期待できない。脱分極刺激等、細胞膜の電位が浅くなるような実験条件でない限り、効果は限定的となるはずである。事実、NFAT-EGFP の蛍光強度は有意な変化を認めなかった。

考 察

本研究では比較的短時間で新生仔マウス初代培養心筋細胞の単離を可能とした。単離後の心筋細胞は約12時間後から自発拍動を開始し、1週間持続するなど良好な形態を示した。また、イソプロテレノールによる薬物反応も確認でき、生理学、及び薬理的検討において、単離培養心筋細胞の機能は、従来の手法とほぼ同等と考えられる。

一方、本法では、得られる細胞数が少ないこと、単離後の非心筋細胞の割合が比較的多いなどの問題がある。また、5時間という細胞処理時間は、心筋のような酸素消費の大きい組織における長時間の低酸素状態を考えると、細胞へのダメージは避けられず、問題が多い。単離のみを目的とする場合、酵素処理の時間をさらに短縮することは十分に可能と考えられる。実際には1個体(1心臓)あたり96ウェルディッシュで5ウェル程度の細胞が得られた。一般に96ウェルディッシュ(0.35 cm²)には、1ウェルあたり約 1×10^4 個の細胞播種が基準である。概算ではあるが、1個体から約 5×10^4 個の心筋細胞を単離したことになる。この細胞数は生化学的分析に用いることを考えると、若干の困難が伴う。一般に DNA 抽出には 1×10^6 個の細胞が用いられるし、細胞のミ

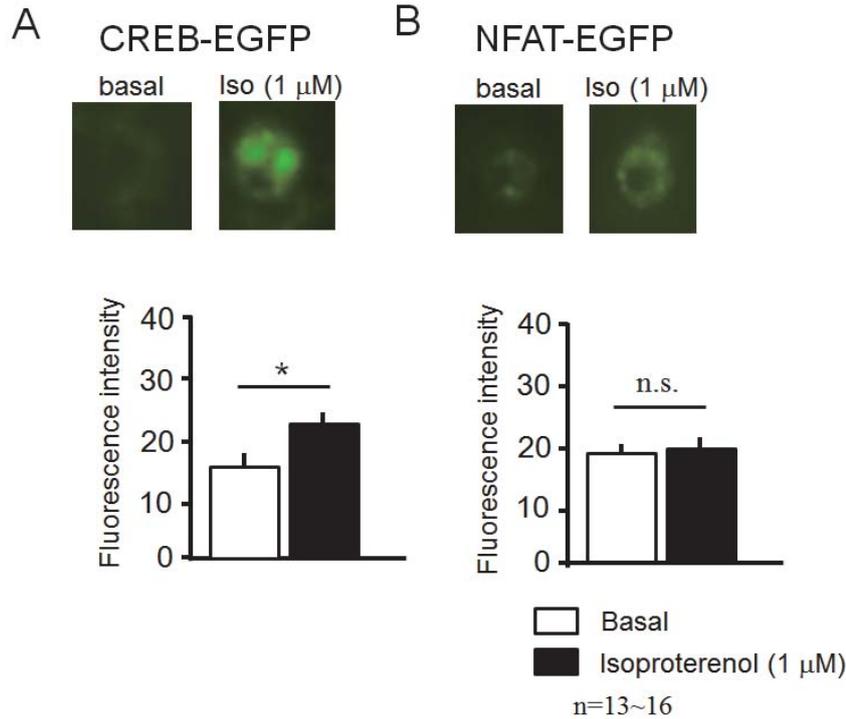


図3 各種タンパク質-EGFP 発現細胞におけるイソプロテレンール共存の影響

A) マウス新生仔初代培養心筋細胞への遺伝子導入により作製した CREB-EGFP 発現細胞にイソプロテレンール (1 μM) を添加し、蛍光強度の変化を調べた (ex: 480 nm, em: 510 nm). 上図: EGFP による蛍光発現の様子 (Basal: 無添加群, Iso: イソプロテレンール (1 μM) 添加群). 下図: 蛍光強度変化を表したグラフ (Basal: 無添加群 (白色棒), Iso: イソプロテレンール (1 μM) 添加群 (黒色棒)). $P < 0.05$ vs 無添加群 (n = 16).

B) マウス新生仔初代培養心筋細胞への遺伝子導入により作製した NFAT-EGFP 発現細胞にイソプロテレンール (1 μM) を添加し、蛍光強度の変化を調べた (ex: 480 nm, em: 510 nm). 上図: EGFP による蛍光発現の様子 (Basal: 無添加群, Iso: イソプロテレンール (1 μM) 添加群). 下図: 蛍光強度変化を表したグラフ (Basal: 無添加群) と Iso: イソプロテレンール (1 μM) 添加群.

クロゾーム分画精製などへの応用は現実的ではない。しかし、単一細胞を用いた RT-PCR やゲノム解析も PCR を用いる事で可能となっており、新生仔マウス 1 匹から細胞を単離培養する利点は大きい。遺伝子欠損マウスの一部は生後早期に致死的表现型を示すことが知られており、例え新生仔期でも、ホモ体での解析が可能となることは重要である。

近年、少ない細胞で解析する技術も確立されてきている。本研究で用いた CREB や NFAT など、転写因子の活性を EGFP 蛍光強度で測定する実験系や、蛍光指示薬による細胞内カルシウム測定法 (Fluo4) などである。どちらも蛍光顕微鏡を用いた実験系である。蛍光顕微鏡、および蛍光強度を測定する実験系は高額機器が必要であるが、応用範囲が広く、単一細胞、あるいは細胞内局所における蛍光強度の測定も可能であるため、

今後の解析技術の発展が待たれる。組織によっては、血管平滑筋などのように、細胞培養を経ずに直接臓器を観察することも可能である。

EGFP を測定する蛍光システムは、一波長蛍光しか利用できないシステムでも応用が広い。上記した EGFP を用いた遺伝子発現系だけでなく、Fluo4 や Fluo8 などによる細胞内カルシウム濃度測定にも使用可能である。蛍光顕微鏡を用いるシステムは試薬や発現遺伝子を変更することにより、単一細胞レベルで複数のカスケードを測定することが可能であるため、実験に使用する細胞数が限られる場合では特に有効である。時間分解能が問題となることが多いが、我々は簡便、簡潔であることを重視しているので、電気刺激の際に用いるようなミリ秒単位での測定はしていない。蛍光強度の測定は 1 スキャン 1 秒程度で行った。システムは電気生理 (パッチクランプ法) のシステ

ムも兼ねている。数十ミリ程度の時間分解能であれば、電気生理学的検討とカルシウム濃度との同時測定も可能なはずである。

ま と め

簡便化したマウス新生仔心筋細胞の初代培養系を確立した。比較的少数の個体から培養細胞を効率良く単離する事が特徴である。遺伝子改変マウスへの応用も可能であり、野生型と遺伝子改変マウス、双方のマウスから心筋細胞を同日中に単離することも可能である。電気生理や単一細胞における収縮実験への応用も期待される。今後、マウス解析における主要な技術として、より安定した簡便な方法の開発を目指している。

引 用 文 献

- 1) Roux W. Beitrage Zur Entwicklungsmechanik des Embryos. Z. Biol. 1885;21:411-526.
- 2) Harary I, Farley B. In vitro studies of single isolated beating heart cells. Science. 1960;131:1674-5.
- 3) Powell T, Twist VW. Respiratory activity of isolated cells from adult rat heart. J Physiol. 1975; 247(1):14p-16p.
- 4) Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. Cardiovasc Res. 1998;39:280-300.
- 5) Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974;71:1250-4.
- 6) Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77:7380-4.
- 7) Keyte A, Hutson MR. The neural crest in cardiac congenital anomalies. Differentiation. 2012;84:25-40.
- 8) Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Pflügers Archives. 1895;61:291-307.
- 9) Hoshino S, Omatsu-Kanbe M, Nakagawa M, Matsuura H. Postnatal developmental decline in *IK1* in mouse ventricular myocytes isolated by the Langendorff perfusion method: comparison with the chunk method. Pflugers Arch. 2012;463:649-668.
- 10) Ehler E, Moore-Morris T, Lange S. Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. J Vis Exp. 2013;79.
- 11) Nemoto T, Yanagita T, Maruta T, Sugita C, Satoh S, Kanai T, Wada A, et al. Endothelin-1-induced down-regulation of NaV1.7 expression in adrenal chromaffin cells: Attenuation of catecholamine secretion and tau dephosphorylation. FEBS Lett. 2013;587:898-905.
- 12) Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, Ono K, Munehisa Y, Koyama T, Nobori K, et al. Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007;361:934-40.
- 13) Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Takahashi Y, Iino K, Kuromitsu S, Mori Y, et al. Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. J Mol Cell Cardiol. 2007;42:498-507.
- 14) Han C, Tomita H, Ohba T, Nishizaki K, Ogata Y, Matsuzaki Y, Sawamura D, et al. Modified sympathetic nerve regulation in AKAP5-null mice. Biochem Biophys Res Commun. 2016;469:897-902.