

BioLegendのMojoSort™システムを用いて磁気分離したマウスCX3CR1⁺骨髄細胞の分化

Miguel A. Tam, Hong Zhang, Dhanesh Gohel, Binggang Sun, Ken Lau, Jeffrey Koury, Dzung Nguyen, Xifeng Yang

ハイライト

- ・ MojoSort™を用いた磁気分離により、マウス骨髄から顆粒球の除去とCX3CR1⁺前駆細胞の濃縮が可能でした。
- ・ CX3CR1⁺ precursors 前駆細胞をGM-CSFによりマクロファージへ、GM-CSFとIL-4により樹状細胞へと試験管内で分化させることに成功しました。
- ・ LEGENDplex™を用いた解析により、マクロファージと樹状細胞がTLRアゴニストに反応して、特有のサイトカインおよびケモカインプロファイルを示すことが明らかになりました。
- ・ 養子移入実験においてレシピエントマウスの骨髄に定着する能力があったことから、濃縮したCX3CR1⁺前駆細胞は生体内での遊走能を保持していると考えられました。

要旨

骨髄由来マクロファージと樹状細胞のマーカーの中には、共通して発現しているものが数種類あります。また、それぞれの細胞が複数の病態において極めて重要な役割を果たすため、これらの細胞が有する他の特徴を理解することは重要です。そこで私たちは、磁気ビーズを含む様々なBioLegend製品を用いてCX3CR1⁺骨髄細胞を分離するプロトコルを実施し、マクロファージまたは樹状細胞の分化を促進する標準的な条件下で培養しました。培養後の細胞は、炎症性刺激に反応しサイトカインやケモカインを産生すること、また、共刺激分子の発現が上昇することを明らかにしました。さらに、養子移入実験ではCX3CR1⁺骨髄前駆細胞が生体内において遊走する能力があることを確認しました。今回の検討は、これらの重要な細胞と免疫系において果たす役割について、さらに理解する一助となります。

イントロダクション

ケモカインとその受容体は大きなタンパク質ファミリーを構成しています。その主な機能は濃度勾配を通して細胞遊走を促進することです。ケモカイン分子の特徴として、4つの保存されたシステイン残基を有しており、1番目と3番目、2番目と4番目のシステイン残基がそれぞれ対になり2つのジスルフィド結合を形成しています。N末端側の2つのシステイン残基の配置によって、ケモカインはCXC、CC、(X)C、CX3Cの4つのサブファミリーに分類されます。CXCは、最初の2つのシステイン残基の間に1アミノ酸残基が存在しています。CCの場合、2つのシステイン残基は隣接しています。(X)Cでは1番目と3番目のシステイン残基が欠けています。CX3Cに分類されるのはCX3CL1/fractalkineの1種類のみで、2つのシステイン残基の間に3アミノ酸残基を有しています。

CX3CR1はCX3CL1の受容体で、Gタンパク質共役型受容体（7回膜貫通型受容体）です。主にマクロファージやミクログリアなど自然免疫系の細胞に発現していますが、T細胞のサブセットなどにも発現しています。受容体を発現している細胞の性質を考慮すると、CX3CL1-CX3CR1相互作用はアルツハイマー病¹からアテローム性動脈硬化²、粘膜免疫³などの様々な病態において重要な役割を担っていると考えられます。

循環あるいは常在している細胞集団におけるCX3CR1の発現はGFP/CX3CR1レポーターマウスを用いて研究されてきましたが、CX3CR1⁺骨髄前駆細胞に関して詳細は明らかになっていませんでした。この報告では、マウスCX3CR1⁺骨髄細胞をポジティブセレクションにより分離後、GM-CSFまたはGM-CSFとIL-4の存在下で培養した場合にマクロファージまたは樹状細胞に分化する能力を評価しました。また、TLRで刺激した細胞の表面マーカーやサイトカインおよびケモカインプロファイル、マウス個体へ移植後の遊走能を解析しました。

材料と方法

骨髓細胞懸濁液

マウス骨髓からの細胞懸濁液調製については、いくつかの既報の方法があります⁴。ここでは、8-12週齢のC57BL/6マウスを安楽死させた後、大腿骨を採取し、無菌条件下で余分な組織を取り除きました。大腿骨は軽くすすぎ、完全培地に移しました。骨髓を露出させるため骨の末端を滅菌済みハサミで切り取り、29G x 1/2針とシリンジを用いて骨髓を流し出しました。細胞は滅菌済み15 mL チューブに回収し、洗浄後、Cellometer (Nexcelom)を用いて細胞数を計測しました。

細胞の磁気分離

CX3CR1⁺細胞は、BioLegendの磁気分離システムMojoSort™ (Cat. No. 480055)を用いて分離しました。抗Ly-6G抗体で標識した磁性ナノ粒子を用いて顆粒球細胞を除去し、ネガティブ画分をビオチン標識抗CX3CR1抗体と反応させ、洗浄後、ストレプトアビジン標識ナノ粒子と反応させました。

MojoSort™の詳細はこちら: biolegend.com/mojosort

細胞分化とToll-like receptorの刺激

細胞の磁気分離後、GM-CSF (10 ng/mL) またはGM-CSFとIL-4 (Cat. No. 576302, 10 ng/mL; Cat. No. 574302, 15 ng/mL)を加えた完全RPMI1640培地を用い、細胞濃度 $1-2 \times 10^6$ /mLの条件で7日間、24ウェルプレート中で培養しました。培地は2日ごとに補充しました。7日間培養後、細胞をLPS (50 µg/mL) またはCpG ODN 2395 (5 µM)で12時間から16時間刺激しました。刺激後、上清を回収し、サイトカインとケモカイン検出用の処理を行うまで-20°Cで保存しました。細胞はプレートから回収し、フローサイトメトリーで解析しました。

フローサイトメトリー解析

細胞はBioLegendのプロトコルに従って調製および染色しました。細胞懸濁液は前述のように骨髓あるいはリンパ器官から調製し、Red Blood Cell Lysis Buffer (BioLegend Cat. No. 420301, diluted 1 in 10)を用いて赤血球を溶血させました。細胞を洗浄後、細胞数を測定し、染色に適切な濃度で再懸濁しました。非特異的な結合を防ぐため、細胞をTruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32) antibody (Cat. No. 101319)でブロックしました。なお、現在は、より高いブロッキング効果が期待できるTruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) antibody (Cat. No. 156603, clone S17011E) の使用を推奨しております。Fcブロッキング後、細胞をanti-CD115 (Cat. No. 135505), CX3CR1 (Cat. No. 149007), CD80 (Cat. No. 104729), CD86 (Cat. No. 105013), I-A/I-E (MHC II) (Cat. No. 107627), Ly-6G (Cat. No. 127625), Ly-6C (Cat. No. 128023) および7-AAD (Cat. No. 420403)で染色しました。細胞のデータをLSR Fortessa™ (BD Biosciences)で取得後、FlowJoを用いてデータを解析しました。

サイトカインおよびケモカイン測定

サイトカインおよびケモカインプロファイルはBioLegendのLEGENDplex™を用いて解析しました。詳細なプロトコルは文献⁵で報告されています。LEGENDplex™は、サンドイッチイムノアッセイと同じ基本原理を使用するビーズベースのイムノアッセイです。捕捉用ビーズには特定のターゲットに対する捕捉抗体が標識されており、それぞれのビーズは大きさとビーズ自体の内部蛍光強度で区別することができます。予め決められた組み合わせの捕捉用ビーズを、ターゲットを含むサンプルと反応させます。その後、ビオチン標識検出抗体カクテルを加えると、捕捉用ビーズ - ターゲット - 検出抗体のサンドイッチ複合体が形成されます。最後に、PE標識ストレプトアビジンを加えます。これがビオチン標識検出抗体に結合し、ターゲットの量に比例した蛍光シグナル強度を呈します。特定のターゲットに対応するビーズ領域のPE蛍光シグナルをフローサイトメトリーを用いて定量します。その後、解析用ソフトウェアと標準曲線を用いて、特定のターゲットの濃度を求めることができます。

LEGENDplex™の詳細はこちら: biolegend.com/legendplex

生体への細胞移入実験

CX3CR1⁺細胞を前述のように分離し、BioLegendの推奨に従ってCFSEで標識しました。レシピエントマウスをイソフルランで麻酔し、10⁶個の細胞をPBS 100 µLに懸濁させ、眼窩後方から投与しました。対照マウスにはPBS 100 µLだけを投与しました。移植から72時間後にマウスを安楽死させ、脾臓、骨髓、リンパ器官を採取し、フローサイトメトリー解析用に処理しました。細胞はanti-CD115 (Cat. No. 135505), CX3CR1 (Cat. No. 149007), I-A/I-E (MHC II) (Cat. No. 107627), Ly-6C (Cat. No. 128023) および7-AAD (Cat. No. 420403)で染色しました。細胞のデータをLSR Fortessa™ (BD Biosciences)で取得後、FlowJoを用いてデータを解析しました。

特に記載のない限り、使用した試薬はすべてBioLegendの製品です。

詳細はこちら: biolegend.com/technical_protocols

結果

MojoSort™によるポジティブセレクションで骨髄CX3CR1⁺細胞を効率的に濃縮可能

骨髄は長骨などの中心腔内に存在しており、骨梁に埋め込まれた血管網に囲まれた、造血巣と脂肪細胞から構成されます。骨髄は主要な造血器官であると同時に一次リンパ組織でもあり、赤血球や顆粒球、単球、リンパ球や血小板の産生を担当しています。血液系やその他疾患において重要であるにもかかわらず、骨髄が複雑であるために、すべての前駆細胞やその生理学的機能を完全に明らかにすることが難しい状況です。

本研究では、CX3CR1の発現を特徴とする比較的不明の前駆細胞を解析し、この細胞をGM-CSF単独あるいはGM-CSFとIL-4両方で誘導した場合に、培養条件に応じてマクロファージまたは樹状細胞へ分化する能力を有するか明らかにすることを目的としました。しかしながら、初期段階の実験において、骨髄からCX3CR1⁺前駆細胞を分離することは難題であることが明らかになりました。それは、骨髄ではこの前駆細胞と関連がない細胞の割合が多く、これにより磁気分離で選択されるCX3CR1⁺細胞数を減少させる可能性があったためです。これらの不要な細胞の大部分はLy-6Gの発現が高いことから（図1）、顆粒球であることが同定されました。

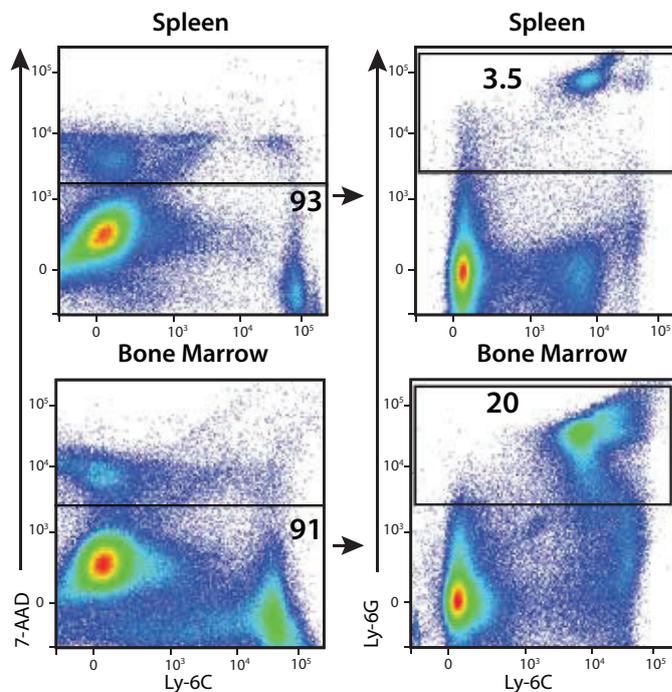


図1. マウス骨髄中のLy-6G⁺細胞の割合は比較的大きいため、CX3CR1⁺細胞を濃縮する前にLy-6G⁺細胞を除くことが有用かもしれません。

そこで私たちは、最初に抗Ly-6G抗体標識磁性ナノ粒子を用いて顆粒球を除去する分離方法を考案しました。これにより、CX3CR1⁺細胞のポジティブセレクションを行う際に、満足できる細胞数を維持する一方で、より高純度の細胞を得る可能性を最大化することができます。ポジティブセレクションはビオチン標識抗CX3CR1抗体とストレプトアビジン標識磁性ナノ粒子を用いて行いました。

CX3CR1⁺細胞の分離およびサイトカイン存在下での細胞培養を含む実験計画の概要を図2に示します。

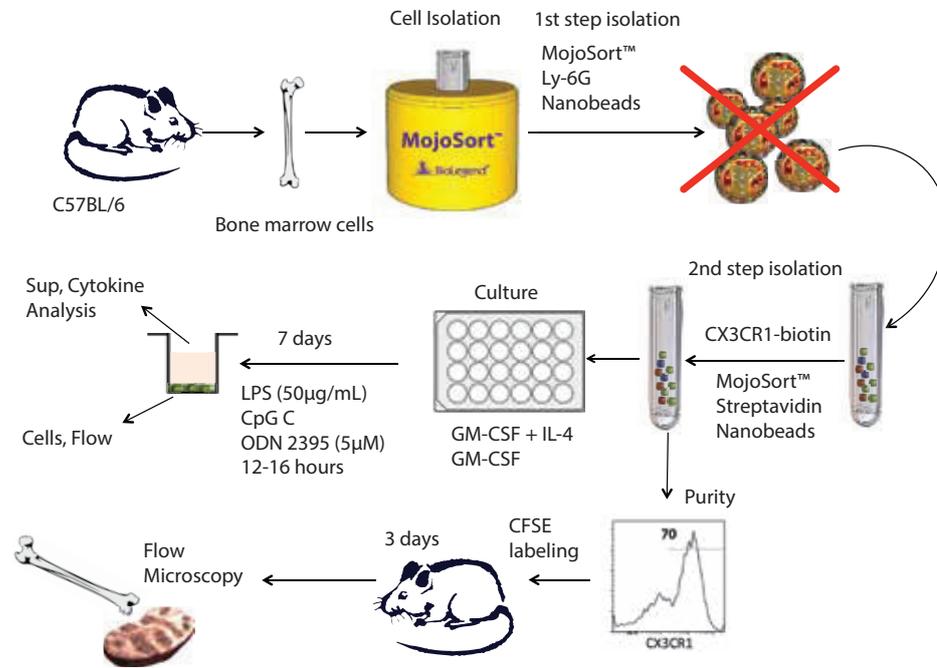


図2. 実験概要 (CX3CR1⁺細胞の分離、樹状細胞またはマクロファージへの分化、レシピエントマウスへの投与と細胞遊走能の確認)

この方法を用いることで、CX3CR1陽性画分を10倍以上濃縮することが可能でした。少ない細胞数の集団を扱うことには常に困難が伴います。それは、陽性細胞数が少なく、細胞の損失を抑えることが難しいためです。しかしながら、プロトコルや使用する試薬を最適化し、マウス骨髄細胞全体の7%にも満たない稀な細胞集団でさえも一貫して機能する、強力な方法を発見しました (図3)。

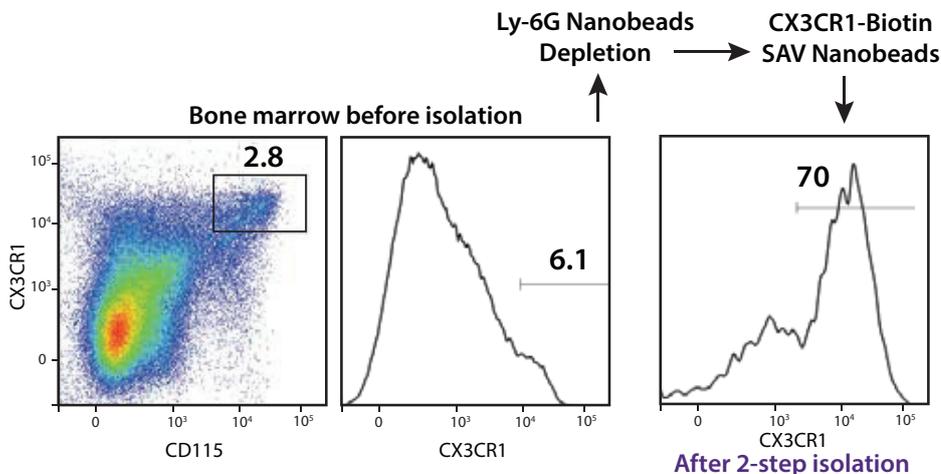


図3. MojoSort™を用いて濃縮すると、ポジティブセレクション後のCX3CR1⁺細胞の割合が10倍以上に増加します。

TLR刺激により分化した細胞の表面マーカーの特徴

CX3CR1⁺細胞を濃縮後、培地にGM-CSF単独あるいはGM-CSFとIL-4の両方を加え、細胞を分化させました。骨髄由来細胞分野は絶え間なく研究が行われていますが、これらのリコンビナントタンパク質を培地に添加すると、細胞はマクロファージ（GM-CSFの場合）あるいは樹状細胞（GM-CSFとIL-4の場合）へ分化し得ることは、広く理解されています。骨髄由来の最終分化細胞の特徴を十分に明らかにする必要があること、そして、マクロファージと樹状細胞について既に報告されている差異を考慮し、TLR刺激の存在下および非存在下における表面マーカーと、試験管内でのサイトカインおよびケモカインプロファイルを解析することにしました。

図4の左上はGM-CSF存在下で培養した細胞におけるCX3CR1とCD115の発現、右上はGM-CSFとIL-4の存在下で培養した細胞におけるCX3CR1とCD11cの発現を示しています。これら2種類の細胞培養の結果、それぞれ異なる表現型が観察されました。これは、CX3CR1⁺細胞が互いに異なる細胞へと分化することを示唆するものです。さらに、細胞をTLRアゴニスト、例えばLPS（TLR4アゴニスト）やCpG（TLR9アゴニスト）で刺激すると、MHC IIやCD80、CD86の発現が上昇しました。これは、抗原提示細胞において予想される反応でした。なぜなら抗原提示細胞はいくつかのTLRを発現し、TLRアゴニストで刺激するとさらに成熟するためです。抗原提示細胞の成熟に関する従来指標は、TLR刺激によるMHC IIと共刺激分子（CD80、CD86）の発現上昇です。

また、GM-CSF存在下で培養後、TLRアゴニストによる刺激の有無で発現パターンの違いが観察されました。例えば、TLRアゴニストで刺激しなかった細胞ではMHC IIとCD80の発現が低く、CD115の発現が上昇しました（灰色のヒストグラム）。一方、LPS（赤色のヒストグラム）またはCpG（青色のヒストグラム）で刺激した細胞では、どちらも同じ程度にMHC IIと共刺激分子の発現が上昇しました。興味深いことに、GM-CSFで分化誘導した細胞では、GM-CSFおよびIL-4で分化誘導した細胞と同程度にCD115の発現減少が観察されました。これは、異なる条件下で培養することによって異なる細胞へ分化したことを示唆しています。

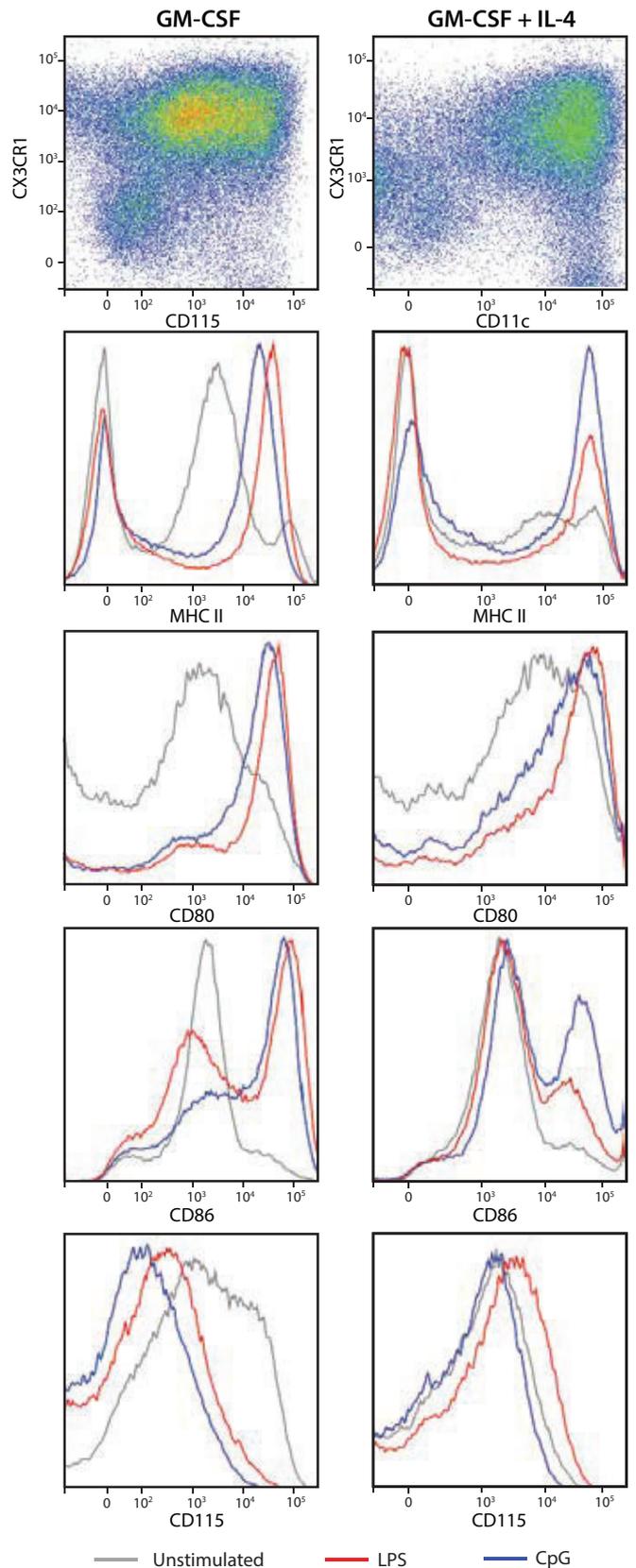


図4. CX3CR1⁺前駆細胞からGM-CSFあるいはGM-CSFとIL-4によって分化誘導した細胞は異なる細胞表面マーカーの表現型を示します（ドットプロット）。どちらの培養条件でも、TLRリガンドで刺激後、MHC II、CD80、CD86の発現上昇が確認されました。

TLR刺激後のサイトカインおよびケモカインプロファイル

次に、前述の培養方法に従って細胞を培養し、サイトカインプロファイルを調べました。弊社 LEGENDplex™を用いて、LPSまたはCpGで刺激後のマクロファージおよび樹状細胞由来の炎症性サイトカインとケモカインを解析しました。図5のように、マクロファージは樹状細胞とは異なるサイトカインの発現パターンを示しました。マクロファージでは IL-1α、IL-1β、IL-12p40、IL-12p70、IL-27、IFN-β、IP-10、KC、MIP-1α、およびMIP-1βの発現が増加しました。一方、樹状細胞では、IL-23、BLCとMIP-3αの増加が観察されました。さらに、CpGによる刺激と比較すると、LPSで刺激した場合はより強くサイトカインおよびケモカインの産生を引き起こしました。

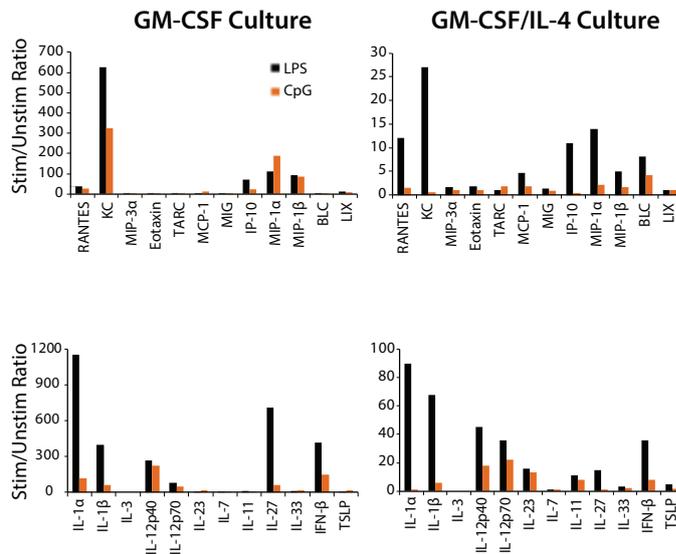


図5. マウス骨髄細胞をマクロファージまたは樹状細胞へ分化誘導し、LEGENDplex™を用いてサイトカインおよびケモカインプロファイルを解析しました。グラフの数値は、非刺激細胞に対する刺激細胞の値 (pg/mL) の比を示しています。

MojoSort™で分離した細胞は遊走能を保持しています

骨髄CX3CR1⁺前駆細胞の生体内における機能を評価するため、細胞をCFSEで標識し、レシピエントマウスへ投与しました。対照マウスにはPBSを投与しました。投与から3日後に、脾臓、腸、骨髄を採取し、染色しました。図6に示すように、CFSEで標識したドナーマウス由来のCX3CR1⁺細胞が骨髄へ移動したことから、細胞の遊走能はMojoSort™を用いた分離によって影響を受けないことが分かりました。

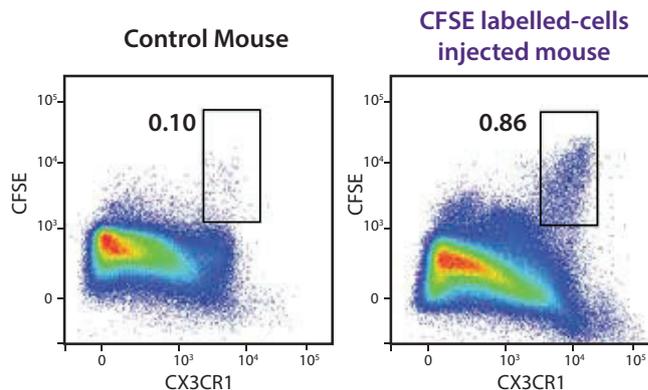


図6. ポジティブセレクションによって分離したCX3CR1⁺細胞をCFSEで標識し、C57BL/6マウスへ眼窩後方から投与しました。3日後、レシピエントマウスの骨髄を採取し、CD11b、F4/80、CX3CR1で染色しました。

考察

マクロファージおよび樹状細胞は正常な生理学的状態において重要であると同時に、多数の疾患の転帰にも重大な役割を担っています。Helftらは以前、骨髄由来マクロファージと樹状細胞の培養方法と細胞の不均一性について調べています⁸。これらの細胞には共通して発現しているマーカーがあることを考慮すると、さらに他の表現型、例えばパターン認識受容体やその他の重要な刺激による包括的なサイトカインおよびケモカイン発現プロファイルなどの特徴を調べることは、研究者にとって有益であるといえます。これは特に骨髄CX3CR1+前駆細胞に当てはまります。それは、末梢の対応する細胞と比較して、これらの前駆細胞に関してよく知られていないためです。本研究では、MojoSort™を用いてこの前駆細胞を分離した後、GM-CSFによってマクロファージへ、GM-CSFとIL-4によって樹状細胞へと分化させました。また、CD80、CD86、MHC IIといった細胞表面マーカーを解析し、LPSやCpGによる刺激後に共刺激分子の発現が増加することを明らかにしました。LEGENDplex™を用いてサイトカイン産生について調べたところ、それぞれの細胞集団は、使用したTLRアゴニストの種類によって異なるサイトカインプロファイルを示しました。さらに、マウス個体へ移植後も、CX3CR1+細胞が骨髄への遊走能を有していることを明らかにしました。骨髄からの大量のマクロファージおよび樹状細胞の誘導は、免疫学の複数の分野にわたる研究者にとって不可欠な要素となりつつあります。今回私たちが行った実験は、これらの細胞の表現型や機能、能力をより良く理解し、特徴を明らかにするのに役立つと考えられます。

参考文献

1. Guedes JR *et al.* Roles of Microglial and Monocyte Chemokines and Their Receptors in Regulating Alzheimer's Disease-Associated Amyloid- β and Tau Pathologies. *Front Neurol.* 2018. 9:549.
2. Martynowicz H *et al.* The role of chemokines in hypertension. *Adv Clin Exp Med.* 2014. 23(3):319-25.
3. Sans M *et al.* Enhanced recruitment of CX3CR1+ T cells by mucosal endothelial cell-derived fractalkine in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2007. 132(1):139-53.
4. Matheu MP *et al.* Generation of bone marrow derived murine dendritic cells for use in 2-photon imaging. *J Vis Exp.* 2008 Jul 9;(17). pii: 773.
5. Lehmann JS *et al.* Multiplex Cytokine Profiling of Stimulated Mouse Splenocytes Using a Cytometric Bead-based Immunoassay Platform. *J Vis Exp.* 2017 Nov 9;(129).
6. Ceredig R *et al.* Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol.* 2009. 9:293-300.
7. Travlos GS. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicol Pathol.* 2006. 34(5):548.
8. Helft J *et al.* GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity.* 2015. 42(6):1197-211.

San Diego, CA 92121
1.877.246.5343 (877-BIOLEGEND) | International: 1.858.768.5800

BioLegend products are manufactured in an ISO 13485:2016 certified facility following GMP compliant procedures, ensuring the highest quality and stability.

biolegend.com
17-0001-00

製品輸入販売元



Digital Biology®

トミーデジタルバイオロジー株式会社
〒112-0002 東京都文京区小石川1-1-17
日本生命春日駅前ビル 3階
email: info-ap@digital-biology.co.jp
phone: 03-6240-0843