

2) Caco-2 細胞層を用いた物質透過実験法

東京大学大学院農学生命科学研究科 清水 誠, 望月 鉄之祐, 濱田 美影

はじめに

腸管における食品成分の透過は、管腔側と基底膜側を隔てている上皮細胞層により制御されている。この透過にはいくつかの経路がある。一つは腸管上皮細胞に発現しているトランスポーターによる透過である。アミノ酸、ペプチド、グルコースなどは上皮細胞の刷子縁膜上に発現した特異的なトランスポーターにより細胞内に取り込まれ、基底膜側のトランスポーターにより血液側に透過する。タンパク質等の高分子は細胞内小胞を介した輸送 (transcytosis) で透過する。また、水溶性低分子物質の多くは細胞間隙経路を受動拡散的に透過することができるが、この経路を介した透過は細胞間接着装置であるタイトジャンクションにより制御されている。一方、疎水性成分は受動拡散的に上皮細胞層を透過するが、ある種の ABC トランスポーターにより血液側あるいは管腔側に輸送される場合もある。

これらの腸管上皮透過性のいくつかを評価するにあたっては、透過性膜上に単層培養した Caco-2 などの腸管上皮株化細胞を用いた *in vitro* による方法が有用である (図 1)¹⁾。しかし、ここで見られる透過性は、上記のような異なる輸送系の総和としての透過であり、研究対象とする食品成分の透過性の解析には目的に応じた様々な実験が必要となる。高分子透過に関しては、horseradish peroxidase (HRP) や FITC-dextran などの高分子マーカーを用いた透過試験がなされている^{2, 3)}。トランスポーターを介した物質の透過は、ナトリウム、プロトンなどのイオン依存性、エネルギー依存性、基質濃度依存性、既知の基質や阻害剤を用いた競合作用などにより解析することが可能である⁴⁾。細胞間隙経路を介した透過は、細胞層の電気抵抗値 (TER) や低分子マーカー (Lucifer Yellow 等) 透過性との相関、タイトジャンクション調節性物質 (cytochalasin 等) 処理の影響などを調べることにより評価する⁵⁾。細胞内経路で輸送される成分に関しては、透過時間を長くした場合、一部が分解あるいは代謝されて透過する場合も多く、注意が必要である。本項では Caco-2 を用いた HRP, リポ酸, フラボノイドの透過測定について実例を挙げて紹介する。

(1) 実験用細胞の単層培養法

準備するもの

1. 細胞

- ・ヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2.

2. 試薬

- 培地：市販のダルベッコイーグル液体培地 (DMEM) に 10% 牛胎児血清，1% 非必須アミノ酸，ペニシリン・ストレプトマイシン (20U/ml・20 μ g/ml) を加えたもの。
- PBS(-)：市販の PBS(-) 粉末を水に溶かし，オートクレーブ滅菌。
- 0.1% トリプシン：トリプシン粉末を 0.1% になるように 0.02% EDTA 溶液 (PBS(-) に溶かし，オートクレーブ滅菌) に溶かし，pH8.0 に調整後，4 $^{\circ}$ C で一晩ゆっくり攪拌． pH7.2 に調整後，濾過滅菌して-20 $^{\circ}$ C にて保存。
- コラーゲンタイプ I 溶液：滅菌した 0.02N HCl 中に 6% になるように希釈混合。

3. 器具

- 12 穴 Transwell インサート：Corning 社製 (孔径 0.4 μ m，培養面積 1cm²)。
- コラーゲンコーティング：コラーゲン溶液を Transwell インサート内に加え，室温で 30 分以上放置．その後，膜表面を PBS(-) で 3 回洗浄。
- 経上皮電気抵抗 (TER) 測定装置：Milli-cell ERS (Millipore 社)。

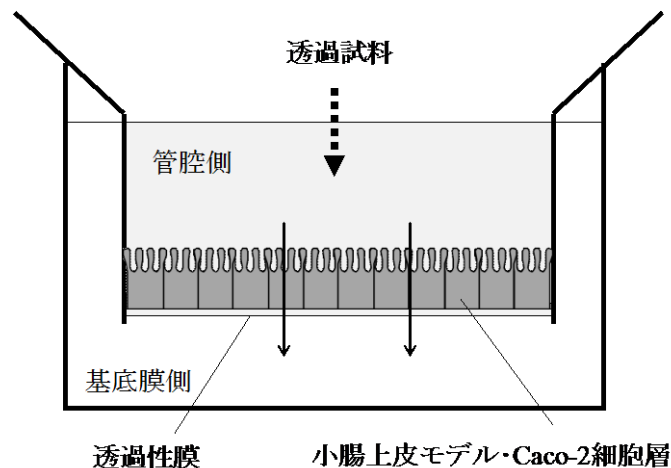


図 1 Caco-2 の単層培養系を用いた物質透過性試験系

プロトコール

1. 10cm ディッシュに培養しコンフレントになった細胞を PBS(-) で 1 回洗浄する。
2. トリプシン溶液 2ml を加え，37 $^{\circ}$ C で 5 分程度置いて細胞をはがす．培地 5ml を加えて十分にピペティングして回収，800rpm で 5 分間遠心して細胞を集める。
3. 上清を除去後，新鮮な培地を 10~20ml 加えピペティングして懸濁させる。
4. 生細胞数をカウントする．細胞数が 2 \times 10⁵/cm² となるように培地で希釈し，

Transwell-インサート内に分注する。

5. CO₂ インキュベーター中で培養し、培地交換を 1 日おきに行う。

プロトコールのポイント

- ・培養後の単層形成の状態を TER 測定によってモニターしておくことが必要である。TER 値は細胞の継代数や培養条件によって大きく変化するが、Caco-2 の場合、150 から 800 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) 程度のものが使われている。

(2) 実験例 1 – 高分子物質透過性 (HRP の透過性)

準備するもの

1. 細胞
 - ・ 12 穴用 Transwell インサートで 2 週間単層培養した Caco-2.
2. 実験用試薬・実験器具
 - ・ ハンクス氏液 (HBSS) : 市販の HBSS 粉末を水に溶解し、4mM NaHCO₃, 10mM HEPES を加え、pH7.4 に調整してからメスアップ。
 - ・ HRP 溶液 : HRP を HBSS に 10⁻⁵M となるように溶解。
 - ・ 基質バッファー : 0.05M Na₂HPO₄ と 0.025M クエン酸の混合液 5ml にオルトフェニレンジアミン 1 タブレット (0.05g), 1% H₂O₂ 90 μ l を加えたもの。
 - ・ 96 穴プレート
 - ・ 吸光プレートリーダー
 - ・ ドライバス

プロトコール

1. 細胞を培養している Transwell を温 HBSS で洗浄後、インサートの内側に 0.5 ml、外側に 1.5ml の HBSS を分注し、37°C で 30 分間置いて平衡化を行う。
2. 平衡化後、インサート内側の HBSS を除き、HRP 溶液 0.5ml を添加し 37°C で 2 時間インキュベートする。
3. インキュベート終了後インサート外側の HBSS 溶液を回収する。
4. 回収した溶液を 96 穴プレートに 1 ウェルあたり 10 μ l 入れる。
5. 基質バッファーを 1 ウェルあたり 100 μ l 入れ、室温で 30 分インキュベート後反応停止液 (1.25N H₂SO₄) を 1 ウェルあたり 100 μ l 入れ、反応を止める。
6. 測定波長 490nm での吸光値をプレートリーダーで定量する。

プロトコールのポイント

1. 回収率は (インサート外側に透過した HRP 量) / (インサート内側に添加した

HRP 量)により算出するが、計算の際、インサート外側の溶液量は内側の 3 倍であることを注意する。

2. HRP などの酵素タンパク質の量は酵素活性で測定できるが、他のタンパク質では ELISA 法や HPLC による定量など、試料に応じた手法を用いる必要がある。
3. HRP の透過性を指標に、腸管の高分子透過性を制御する食品成分の探索研究なども可能である。

(3) 実験例 2 - 低分子生理活性物質透過性 (α -リポ酸, フラボノイドの透過性) 準備するもの

1. 試薬・器具

- ・ α -リポ酸(LA) : dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解したものをストックする。
- ・ フラボノイド (ノビレチン) : 同様に DMSO に溶解して用いる。
- ・ 高速液体クロマトグラフィー(HPLC) システム
- ・ C₁₈ column : 例えば Cosmosil 5C₁₈-MS-II, 4.6×150mm (ナカライテスク)
- ・ HPLC 用移動相(70%メタノール-0.02%酢酸) : 脱気処理したもの。

プロトコール

1. 実験例 1 と同様に Caco-2 を単層培養した Transwell を HBSS で平衡化する。
2. 管腔側の液を半量(250 μ l) 除き、各種濃度の試料溶液を 250 μ l 添加し、37°C で一定時間透過させる。
3. 管腔側及び基底膜側のサンプルを回収し、HPLC を用いて定量する。LA の場合には 5~500 μ M に調製した LA 溶液を測定した際のピークエリアをもとに検量線を作成し、それによって定量を行う。ノビレチンも同様に定量する。

プロトコールのポイント

1. LA の透過性はエネルギー代謝阻害剤 (NaN₃ など) の存在下で低下し、インサート内の pH を低下させると顕著に増加する。これにより、プロトン依存性のトランスポーターによる輸送の存在が推定できる。このように pH やナトリウム濃度の変更は輸送メカニズムの推定に有効である (図 2)。
2. ノビレチンの場合には実験開始後の数時間で急速に透過が起こっているが、その間にノビレチンの総量も減少しているため、細胞内で代謝・分解が起こっているものと考えられる (図 3)。腸管上皮細胞通過時に抱合体などの代謝産物が生成してくるので定量の際には注意する必要がある。
3. フラボノイドの種類によって疎水性が異なるので、HPLC の移動相の組成は

その都度検討する。

4. 細胞を長時間インキュベートする場合は HBSS ではなく培地を用いる必要があるが、培地成分により試料の定量が困難になることに注意する。

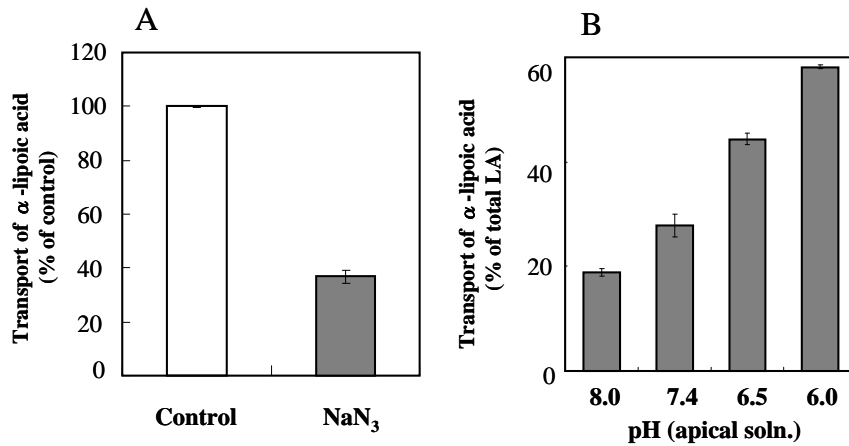


図2 Caco-2 細胞層における α -リポ酸の管腔側から基底膜側への透過。
 (A) アジ化ナトリウムの影響 (B) 管腔側 pH の影響

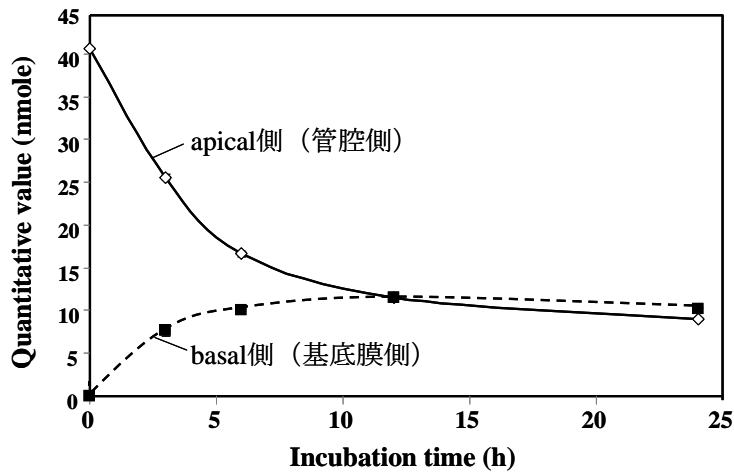


図3 Caco-2 細胞層におけるフラボノイド (ノビレチン) の管腔側から基底膜側への透過 (経時的変化)
 Apical 側に加えたノビレチンの 3/4 程度が 12 時間で basal 側に透過するが、同時に分解や代謝による変化も起こっているらしいことがわかる。

おわりに

Caco-2 などの細胞単層を用いた *in vitro* 透過性実験は、物質の吸収性の評価や透過の分子メカニズム研究のみならず、細胞内外の環境変化や生理活性物質の刺激による腸管上皮透過性の変化、それに関わるシグナル伝達経路などの解析にも有用である⁶⁾。

参考文献

- 1) 清水誠, 消化管由来培養細胞を用いた食品成分の腸管吸収性評価. 栄食誌, **56**, 251-255 (2003).
- 2) Heyman, M., Crain-Denoyelle, A.M., Nath, S.K. and Desjeux, J.F., Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *J. Cell. Physiol.*, **143**, 391-395 (1990).
- 3) Ohkubo, R., Tomita, M., Hotta, Y., Nagira, M. and Hayashi, M., Comparative study of flux of FITC-labeled Dextran 4000 on normal (iso)- and hyper-osmolarity in basal side in Caco-2 cell monolayers. *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, **18**, 404-408 (2003).
- 4) Takaishi, T., Yoshida, K., Satsu, H. and Shimizu, M. Transepithelial transport of α -lipoic acid across human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Agric Food Chem.*, **55**, 5253-5259 (2007).
- 5) Satake, M., Enjoh, M., Nakamura, Y., Takano, T., Kawamura, Y., Arai, S. and Shimizu, M., Transepithelial transport of a bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 378-384 (2002).
- 6) 奈良井朝子, II-3-1 上皮細胞層のバリアー機能測定法, 「腸管細胞機能実験法」, 上野川修一, 清水誠, 八村敏志, 戸塚護編, (学会出版センター, 東京), pp.80-85 (2005).