

6) 複合培養系を用いた腸管上皮細胞機能評価系 (炎症性腸疾患)

東京大学大学院農学生命科学研究科 薩 秀夫, 石本 容子

はじめに

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease; IBD) は潰瘍性大腸炎及びクローン病に代表される消化器疾患であり, 近年その患者数が急激に増加している. また炎症性腸疾患はやはり増加の一途を辿る大腸癌のリスクファクターでもあり, 従って炎症性腸疾患の予防・改善は大腸癌の予防・改善につながることを期待される. 炎症性腸疾患は腸管免疫系を制御するサイトカインの産生異常に起因することが知られており, 特にクローン病では異常亢進したマクロファージが産生する TNF- α をはじめとする炎症性サイトカインによって腸管上皮細胞が損傷を受けていることが知られている. そこで炎症性腸疾患を予防・改善する食品因子を簡便に探索する評価系として複合培養系を用いることとした. 複合培養系とは異種の培養細胞を同一容器内で共培養する系であり, 液性因子を介した細胞間の制御が解析可能となる. 本稿では, 腸管上皮様細胞株と活性化マクロファージ様細胞株の複合培養系を用いて構築した炎症性腸疾患の *in vitro* 評価系について紹介する.

準備するもの

1. 実験機器・器具

- ・クリーンベンチ
- ・CO₂ インキュベーター (37°C, 5%CO₂)
- ・吸引アスピレーター (培地の除去に用いる.)
- ・パスツールピペット (乾熱滅菌したもの. 培地の除去に用いる.)
- ・マイクロピペット
- ・マイクロピペットチップ (滅菌されたもの)
- ・遠心機
- ・倒立顕微鏡
- ・15mL コニカルチューブ (滅菌済み)
- ・50mL コニカルチューブ (滅菌済み)
- ・1.5mL マイクロチューブ (オートクレーブ滅菌したもの)
- ・血球計数板
- ・細胞培養用ディッシュ (接着細胞用)
- ・細胞培養用フラスコ (浮遊細胞用)
- ・細胞培養用 12 well plate

- ・細胞培養用 12 well Transwell (Corning-Costar, 型番 3401)
- ・LDH Cytotoxic Test kit (Wako)
- ・Millicel-ERS (日本ミリポア)
- ・マイクロプレートリーダー (Model550; BIO-RAD)

2. 試薬

1) 試薬

- ・Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 低グルコース, グルタミン含有) (Sigma)
- ・0.4%トリパンブルー溶液 (Sigma)
- ・PBS(-)粉末 (phosphate-buffered saline) (日水製薬)
- ・牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Sigma)
- ・phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma)
- ・非必須アミノ酸 (non-essential amino acid, NEAA) (Invitrogen)
- ・コラーゲンタイプ I-C 溶液 (新田ゼラチン)
- ・トリプシン粉末 (Difco)
- ・ペニシリンーストレプトマイシン溶液 (10,000units/ml ペニシリン及び 10mg/ml ストレプトマイシン含 0.9%NaCl 溶液) (Invitrogen)
- ・ハンクス粉末 (Hanks' balanced salt solution, HBSS) (Sigma)

2) 試薬の調製

- ・PBS(-)の調製
PBS(-)粉末 9.7g を MilliQ 水 1L に溶かしオートクレーブする (121°C, 20 分).
- ・0.1%トリプシン溶液
トリプシン粉末 0.5g を 0.02% EDTA/PBS(-) 500ml に溶解し, 濾過滅菌した後
に分注し-20°Cにて凍結保存する.
- ・FBS の前処理
-20°Cで凍結保存された FBS を 37°Cで溶かした後, 56°Cで 30 分以上インキュ
ベートし補体成分を不活化する. 補体を不活化した FBS を分注し, 再び-20°C
で凍結保存しておく.
- ・0.02N HCl 溶液
HCl 原液を MilliQ 水で希釈して 0.02N となるように調製した後, 濾過滅菌
する.
- ・HBSS 溶液
ハンクス粉末 9.7g を適量の MilliQ 水に溶かしたものに, NaHCO₃ を 4mM,
HEPES を 10mM となるように加えて KOH で pH7.4 に調製した後, 1 L になる
よう調製する.

3. 細胞株及び細胞培養

1) 細胞株

ヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2 は American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.) より購入する。またヒト急性単球性白血病由来株化細胞 THP-1 はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入する。

2) 細胞培養用培地の調製及び基本的な培養

(1) Caco-2 細胞培養用培地の調製

DMEM 500ml, FBS 56ml, NEAA 5.6ml, ペニシリンーストレプトマイシン溶液 (ペニシリン濃度 10,000U/ml, ストレプトマイシン濃度 10mg/ml) 2ml を無菌操作で混合する。

(2) THP-1 細胞培養用培地の調製

DMEM 500ml, FBS 56ml, ペニシリンーストレプトマイシン溶液 (ペニシリン濃度 10,000U/ml, ストレプトマイシン濃度 10mg/ml) 2ml を無菌操作で混合する。

(3) Caco-2 細胞の培養

Caco-2 細胞の培養には接着細胞用プラスチックディッシュを用い、5%CO₂ 環境下の 37°C インキュベーター内で培養する。培地は 2~3 日に一度交換し、細胞がコンフルエントに達する前に継代をおこなうこととする。継代操作は次のようにおこなう。ディッシュより培地を除き、PBS(-) 10ml で細胞表面を洗浄した後、0.1%トリプシン溶液をディッシュ 1 枚につき 2ml ずつ加え、37°C インキュベーター内にてしばらく放置する。細胞がはがれたら、ディッシュに培地を 8ml 加えてトリプシンを失活させ 50ml 遠沈管に回収する。これを遠心機で遠心し (800rpm, 5 分, 室温) 細胞を沈殿させ上清を除去後、希釈倍率に応じて培地を加えよくピペッティングして新たなディッシュに播く。継代時において細胞を遠沈管に回収し遠心する前に、その細胞懸濁液の一部をトリパンブルー染色液で 4 倍希釈する。この 4 倍希釈液を血球計数板にのせ、その生細胞数をカウントすることにより、継代時の全細胞数を算出する。

(4) THP-1 細胞の培養

THP-1 細胞の培養には浮遊細胞用プラスチックフラスコを用い、5%CO₂ を含む 37°C インキュベーター内で培養する。3~4 日おきに適当な密度に希釈し新たなフラスコに入れ替え、細胞密度を $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml の範囲に保つようにする。

プロトコール

1. 複合培養に向けた Caco-2 細胞の準備

1) 12 well Transwell のコラーゲンコーティング

0.02N HCl 溶液で 15 倍に希釈したコラーゲンタイプ I-C 溶液を 12 well Transwell の各インサートに 300 μ l ずつ加え、30 分以上室温で放置する。コラーゲン溶液を除去したのち、PBS(-)で各 well を 2 回洗浄する。

2) 12 well Transwell での Caco-2 細胞の培養

複合培養実験用に、Caco-2 細胞を 12 well Transwell に 1×10^5 cells/well の濃度で播種する。この際 Transwell の内側 (apical 側) には、 2×10^5 cells/ml に調製した Caco-2 細胞懸濁液を 500 μ l 加え (インサート内は 1×10^5 cells となる)、外側 (basal 側) には Caco-2 用培地を 1.5ml 加える。CO₂ インキュベーター内で培養を開始し、培地交換は 2~3 日に一度おこなう。実験には 14 日間ほど培養して十分に分化した細胞を用いる。

2. 複合培養に向けた THP-1 細胞の準備

1) 12 well plate のコラーゲンコーティング

0.02N HCl 溶液で 15 倍に希釈したコラーゲンタイプ I-C 溶液を各 well に 600 μ l ずつ加え、30 分以上室温で放置する。コラーゲン溶液を除去したのち、PBS(-)で各 well を 2 回洗浄する。

2) 12 well plate での THP-1 細胞の培養

2×10^5 cells/ml の密度に調製した THP-1 細胞懸濁液に dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した PMA を 200nM となるよう添加し、各 well に 1.5ml ずつ分注した後 (well 内は 3×10^5 cells となる)、CO₂ インキュベーター内で培養する。この間 THP-1 細胞は PMA を加えて培養することにより、単球様の浮遊細胞からマクロファージ様の接着細胞へと分化・形態変化する。2 日後に 200nM PMA を含む培地で培地交換してさらに 2~3 日培養し十分にマクロファージ様に分化させる。実験に用いる前には THP-1 用培地で細胞表面を 2 回洗い、PMA を除いてから使用する。

3. 複合培養の開始

1) 上記で用意した Caco-2 細胞及び THP-1 細胞を用いて、実際に複合培養を以下の通り開始する。

2) 12 well plate 上で 4 日間 PMA 処理を施した THP-1 細胞を培地で 2 回洗って PMA を除去し、そこに 12 well Transwell の透過性膜上で 2 週間前後培養し分

化させた Caco-2 細胞を移し、apical 側には 500 μ l, basal 側には 1500 μ l の新しい培地 (apical 側 : Caco-2 用培地, basal 側 : THP-1 用培地を使用する) を加えて, これを複合培養開始とする (図 1 に簡単な流れを示す.)

- 3) 複合培養開始後, 以下に従って適宜 TER 測定及び LDH assay をおこない腸管上皮細胞機能を評価する.

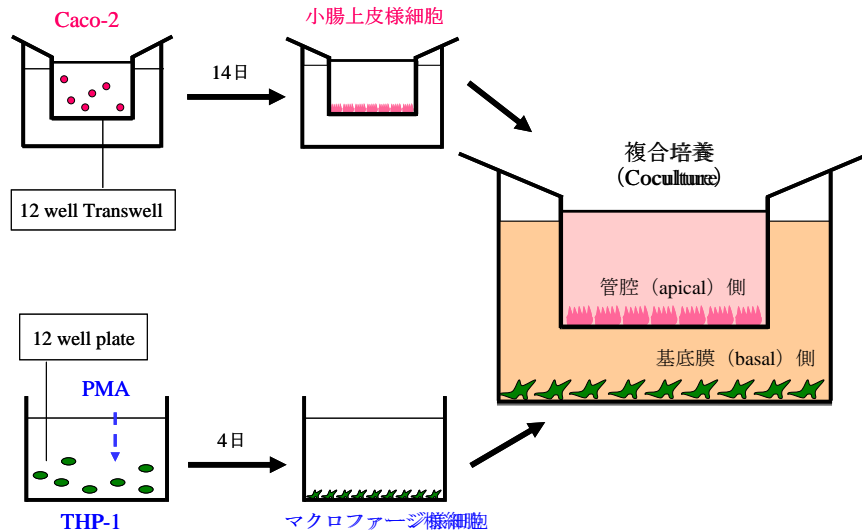


図 1 腸管上皮様 Caco-2 細胞とマクロファージ様 THP-1 細胞を用いた複合培養系の流れ

4. 経上皮電気抵抗値 (TER 値) の測定

- 1) 実験前に Millicell-ERS に電極をセットし, HBSS 溶液に電極を浸して 30 分以上平衡化する.
- 2) Caco-2 細胞を培養していた Transwell のインサートをピンセットで別の 12 well plate に移した後, HBSS 溶液で 2 回洗浄する.
- 3) さらに新しい HBSS 溶液を Transwell の内側に 500 μ l, 外側に 1500 μ l 添加し 37 $^{\circ}$ C でインキュベートする.
- 4) 60 分間インキュベートした後, Millicell-ERS (日本ミリポア) を用いて, Transwell の内側と外側にそれぞれ電極を正しく挿入して TER 値 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) を測定する.

5. LDH assay による細胞障害試験

THP-1 細胞と複合培養した Caco-2 細胞について, TER 値の測定後に LDH Cytotoxic Test Kit を用いて細胞障害試験をおこなう.

- 1) TER 値を測定後, そのまま Caco-2 細胞層を傷つけないように Transwell の内

側の HBSS 溶液（上清）を全量エッペンチューブに回収する。

- 2) さらに Transwell の内側に 0.1% TritonX-100 (MilliQ 水で希釈) を 1well につき 250 μ l 添加し 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした後、細胞をピペッティングにて溶解し別に回収する。ここで 1) で得た上清を放出 LDH 測定用サンプル、2) で得た細胞溶解液を残存 LDH 測定用サンプルとする。
- 3) それぞれのサンプルを適当な濃度に希釈し、1well につき 50 μ l をマイクロプレート（キットに添付）に入れる。
- 4) キット中の発色試薬を 50 μ l ずつ加えて LDH 酵素反応を開始し、5 分後に反応停止液 100 μ l ずつを加えて反応を停止させる。
- 5) マイクロプレートリーダー（Model550; BIO-RAD 社）で 560nm (\pm 10nm) の吸光度を測定し、LDH 酵素活性とする。

計算方法

細胞膜損傷による LDH 放出率は次の計算式により求める。

$$\text{LDH 放出率 (\%)} = \frac{\text{(放出 LDH サンプルの酵素活性)}}{\text{(放出 LDH サンプルの酵素活性) + (残存 LDH サンプルの酵素活性)}} \times 100$$

上述の通り THP-1 細胞と複合培養をおこなった Caco-2 細胞では、複合培養開始後 48 時間以降で顕著な TER 値の低下及び LDH 放出率の増加が観察され、腸管上皮細胞層が損傷を受けていることが確認された (図 2)。これより本複合培養系は、実際の炎症性腸疾患時の腸管粘膜層における病態（腸管上皮細胞層の損傷）を一部再現しているといえる。

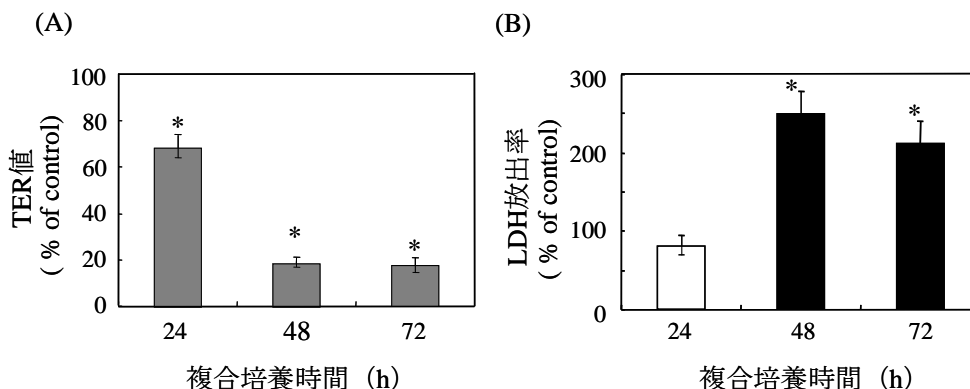


図 2 マクロファージ様 THP-1 細胞と複合培養した際の腸管上皮様 Caco-2 細胞における経上皮電気抵抗値 (TER) (A) と LDH 放出率 (B) の変化

いずれも複合培養開始時 (0 時間) の値をコントロールとし、100%として相対値で示した。The mean \pm S.D., n=3, *p<0.05

プロトコールのポイント

- Transwell の培地交換は以下のようにしておこなう。吸うときは外側 (basal 側) 内側 (apical 側) の順に培地をパスツールピペットで吸い取る。basal 側の培地を吸うとき、インサート側にパスツールの先端を接触させインサートの下側に残る培地も吸い取る。培地を入れるときは apical 側、basal 側の順に加える。
- THP-1 の分化に用いる PMA の使用期限は 6 ヶ月である。DMSO で溶解後は凍結溶解を避けるためにエッペンチューブに分注し、1 回ごとに使い切るようにする。筆者らは、DMSO で溶解後は 3, 4 ヶ月で新しいものに交換している。また最初にストック溶液 (2mM) を分注して凍結保存しておき、使用時に DMSO で 200 μ M に希釈し、最終的に 200nM となるよう培地に加えている。

おわりに

本稿では、腸管上皮モデル Caco-2 細胞とマクロファージ様 THP-1 細胞の複合培養系を用いた *in vitro* 炎症性腸疾患モデル系を紹介した。本複合培養系に関してはさらに、THP-1 による Caco-2 細胞障害は主として THP-1 が分泌する TNF- α に起因すること、IBD 治療薬である抗 TNF- α 中和抗体、5-アミノサリチル酸、エタネルセプトを添加することによっていずれも腸管上皮細胞障害が有意に抑制されることを確認している¹⁾。さらに本モデル系を用いて THP-1 による腸管上皮 Caco-2 細胞障害を抑制する食品因子を探索したところ、アミノ酸の一種であるタウリンが抑制作用を有することを見出した。実際にタウリンは DSS 誘導腸炎モデルマウスを用いた *in vivo* 腸炎モデル系での解析においても腸炎症状を予防する作用が確認され、複合培養を用いた本モデル系が炎症性腸疾患を予防・改善する食品因子を探索する *in vitro* 評価系として有効であることが確認された²⁾。

なお本複合培養系を応用して、下層の細胞株を変えることにより腸管上皮細胞とその他の異種細胞との相互作用を解析することも可能である。筆者らは同様な方法を用いて、腸管上皮細胞と神経系細胞との相互作用を解析した結果を報告している^{3) 4)}。詳細は参考文献あるいは実験書⁵⁾を参照されたい。

参考文献

- 1) Satsu, H., Ishimoto, Y., Nakano, T., Mochizuki, T., Iwanaga, T. and Shimizu, M., Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumour necrosis factor-alpha. *Exp. Cell Res.*, **312**, 3909-3919 (2006).
- 2) Zhao, Z., Satsu, H., Fujisawa M., Hori, M., Ishimoto, Y., Totsuka, M., Nambu, A., Kakuta, S., Ozaki, H. and Shimizu, M., Attenuation by dietary taurine of dextran

- sulfate sodium-induced colitis in mice and of THP-1-induced damage to intestinal Caco-2 cell monolayers. *Amino Acids*, **35**, 217-224 (2008).
- 3) Satsu, H., Yokoyama, T., Ogawa, N., Fujiwara-Hatano, Y. and Shimizu, M., The changes in the neuronal PC12 and the intestinal epithelial Caco-2 cells during the coculture-The functional analysis using *in vitro* coculture system-. *Cytotechnology*, **35**, 73-79 (2001).
- 4) Satsu, H., Yokoyama, T., Ogawa, N., Fujiwara-Hatano, Y. and Shimizu, M., The effect of neuronal PC12 cells on the functional properties of intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **67**, 1312-1318 (2003).
- 5) 薩秀夫, 複合培養系による上皮細胞機能測定, 「腸管細胞機能実験法」(生物化学実験法 50), 上野川修一・清水誠・八村敏志・戸塚護編著, (学会出版センター, 東京), pp.96-101 (2005).