

VERITAS SCIENCE LETTER

Vol. 19
2019.08

PneumaCult-ALI Medium を用いた気管支 3D 培養モデルの作成

PneumaCult-ALI Medium を用いた気管支 3D 培養モデルの作成

呼吸器疾患と関連する組織学的変化を再現し得る *in vitro* モデルの開発

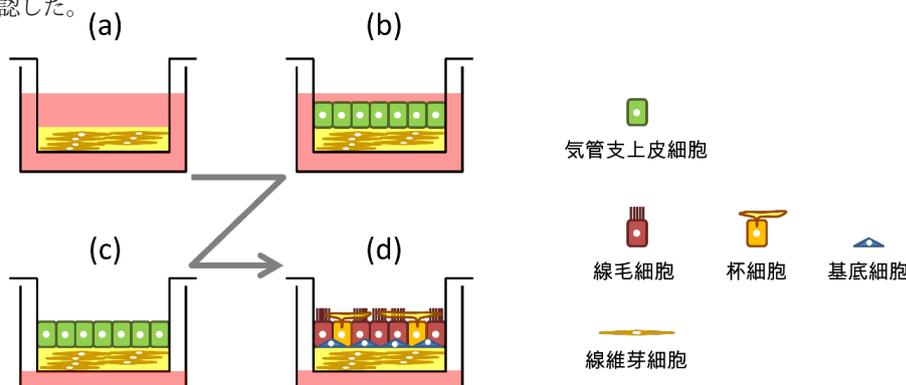
日本たばこ産業株式会社 R&D グループ 製品評価センター

石川晋吉

はじめに

近年、様々な器官や組織の一部を *in vitro* で再構成した 3D 培養モデルが開発されている。3D 培養モデルは主にヒト細胞を用いて作成されることから種差の問題を回避し得ること、また従来の培養モデルと比較してより生体に近いとされることから、基礎研究、毒性評価、再生医療、創薬開発といった幅広い分野で注目されている。呼吸器についても 3D 培養モデルの開発が進んでおり、気管支上皮細胞を Air-liquid interface (ALI) 培養することで、線毛細胞や杯細胞が分化した気管支上皮を *in vitro* で再現できることが知られている。気管支上皮は異物に対するバリアとしての機能を持つことから、このモデルを用いた *in vitro* での吸入毒性物質の評価手法の開発が期待されている。さらに、気管支上皮における組織学的変化は呼吸器疾患において重要であることから、気管支 3D 培養モデルを用いた疾患モデルの開発も期待されている。一方で、呼吸器疾患においては上皮細胞だけでなく間葉系細胞もその病態形成に関与することが知られており、パラクライン因子などを介した上皮-間葉間での相互作用が重要であることが言われている。従って、気管支上皮細胞と間葉系細胞とを共培養した *in vitro* モデルの開発が毒性評価や創薬開発に役立つと考えられる。

これらの背景のもと、気管支上皮細胞と肺線維芽細胞を共培養した 3D 培養モデルを作成した。この 3D 培養モデルが呼吸器疾患と関連する組織学的変化を *in vitro* で表現し得ることを確認するために、作成したモデルを線維症の誘導因子である TGF- β 1 で処理した。線維症に特徴的な組織学的変化が *in vitro* で誘導されたかどうか、組織切片を観察することで確認した。



方法及び材料

培養には肺線維芽細胞として IMR-90 (CCL-186; ATCC) を、ヒト気道上皮細胞として Normal Human Bronchial Epithelial Cells (NHBE) (CC-2540S; Lonza) を用いた。培養容器としては 12 ウェルプレート (353503; BD Biosciences) とセルカルチャーインサート (353103; BD Biosciences) を用いた。Cellmatrix Type I-A (Nitta Gelatin)、濃縮 MEM ハンクス培養液 (Nitta Gelatin)、再構成用緩衝液 (Nitta Gelatin) を 8:1:1 で混合し、インサートへ 100 μ L 添加した。37°C で 1 時間ゲル化した後に、Cellmatrix type I-A、Cellmatrix Type I-P (Nitta Gelatin)、濃縮 MEM ハンクス培養液、再構成用緩衝液、FBS に懸濁した IMR-90 (2.5×10^6 cell/mL) を 4:4:1:1:1 で混合し、インサートへ 250 μ L 重層した。37°C で 1 時間ゲル化した後に、MEM 10% FBS をインサートに 500 μ L、ウェルに 1 mL 添加して培養した (図 1a)。2 日後に培地交換を行うとともに、Airway Epithelial Cell Growth Medium (Promocell) に懸濁した NHBE (3.0×10^5 cell/mL) をインサートに 500 μ L 添加した (図 1b)。NHBE がセミコンフルエント以上になった状態から ALI 培養を開始した (図 1c)。ALI 培養には PneumaCult-ALI Medium (STEMCELL Technologies) を用い、インストラクションに従い、Hydrocortisone (STEMCELL Technologies)、Heparin (STEMCELL Technologies) を加えた。また、30 nM GM6001 (Invitrogen)、1% FBS についても添加した。この培養液をウェルに 600 μ L 添加して 3 週間培養することで、気道上皮様の分化が観察された (図 1d)。培養液の交換は 2-3 日おきに実施した。(次ページ)

図 1

気管支 3D 培養モデルの作成方法

(a) 線維芽細胞を包埋したコラーゲン層の作成。

(b) 気管支上皮細胞の重層。

(c) 気液界面培養の実施。

(d) 気液界面培養 3 週間後の分化状態。

また、培養液に Transforming growth factor (TGF)- β 1 を添加して ALI 培養することで線維症の誘導を行い、ALI 培養から 3 週間後に組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、免疫染色により組織状態を観察した。抗体は全て Abcam 製を用いた；acetylated α -tubulin (ab24610)、MUC5AC (ab3649)、anti-cytokeratin 5 (ab52635)、E-cadherin (ab40772)、vimentin (ab92547)、 α -smooth muscle actin (ab5694)、tenascin-C (ab108930)。

結果

3 週間の ALI 培養によって線毛細胞、杯細胞、基底細胞が分化した気管支上皮様の構造を *in vitro* で確認することができた (図 2)。次に、線維症の誘導因子である TGF- β 1 を培養液に加えて ALI 培養した際の組織状態を確認した。上皮細胞において、上皮マーカーである E-cadherin の発現が低下すること (図 3)、基底細胞において、間葉系マーカーである Vimentin の発現が上昇することが見られた (図 3、矢頭)。これらは上皮間葉転換に特徴的な変化である。また間葉系のレイヤーでは Vimentin 陽性の線維芽細胞の増加や α -smooth muscle actin を発現する筋線維芽細胞の増加が見られた (図 3)。さらに線維症との関連が言われている細胞外マトリックスの一つである Tenascin-C の発現について、*in vitro* と同様に基底膜部分で強い発現が見られること (図 3、矢印)、また、TGF- β 1 処理によりその発現が亢進している様子も観察することができた (図 3)。

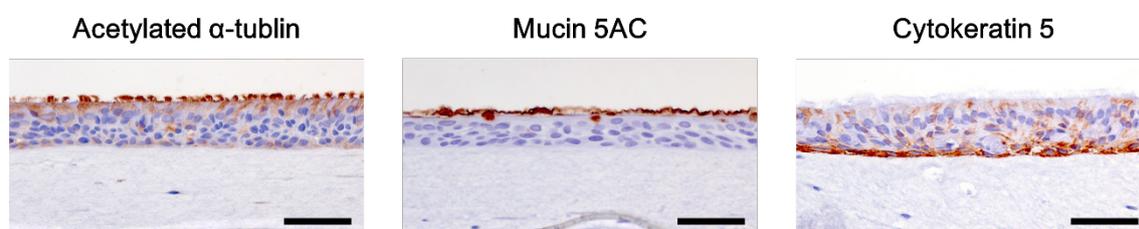


図 2
気管支 3D 培養モデルの分化状態 Acetylated α -tubulin 陽性の線毛細胞、Mucin 5AC 陽性の杯細胞、Cytokeratin 5 陽性の基底細胞が存在することが確認できる。スケールバー：50 μ m。

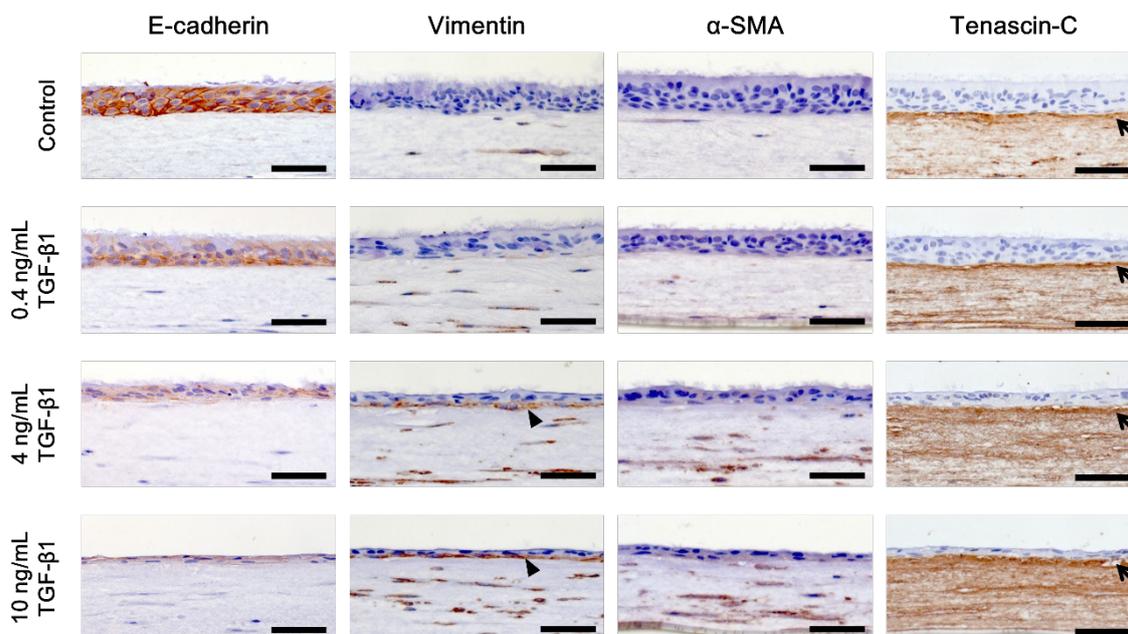


図 3
TGF- β 1 処理による組織像の変化 上皮マーカーとして E-cadherin、間葉系マーカーとして Vimentin、筋線維芽細胞のマーカーとして α -smooth muscle actin (SMA)、細胞外マトリックスとして Tenascin-C を選択して免疫染色を実施。矢頭は Vimentin 陽性の基底細胞を示す。矢印は基底膜部分での Tenascin-C の強い発現を示す。スケールバー：50 μ m。

結論

気管支上皮細胞と線維芽細胞の共培養において、PneumaCult-ALI Medium を用いることで、実際の気管支組織と同様の構造を *in vitro* で再現することができた。また TGF- β 1 を用いた実験から、このモデルが適切な刺激下で線維症様の組織学的変化（上皮間葉転換、筋線維芽細胞の集積、細胞外マトリックスの沈着）を呈する可能性が示された。このことは、当該モデルが毒性評価や創薬開発に活用できる可能性を示している。

参考文献

Ishikawa, Shinkichi, Kanae Ishimori, and Shigeaki Ito. "A 3D epithelial-mesenchymal co-culture model of human bronchial tissue recapitulates multiple features of airway tissue remodeling by TGF- β 1 treatment." *Respiratory research* 18.1 (2017): 195.

▶製品のご案内

STEMCELL Technologies 社 ヒト気道上皮細胞用 ALI 培養培地

製品コード	製品名	梱包単位
ST-05001	PneumaCult-ALI Medium	500 mL kit
ST-05021	PneumaCult-ALI Medium with 12 mm Transwell Inserts	500 mL + 48 inserts
ST-05022	PneumaCult-ALI Medium with 6.5 mm Transwell Inserts	500 mL + 48 inserts

* ST-05021 と ST-05022 は 12mm もしくは 6.5mm の Transwell Inserts が付属したキット製品になります。

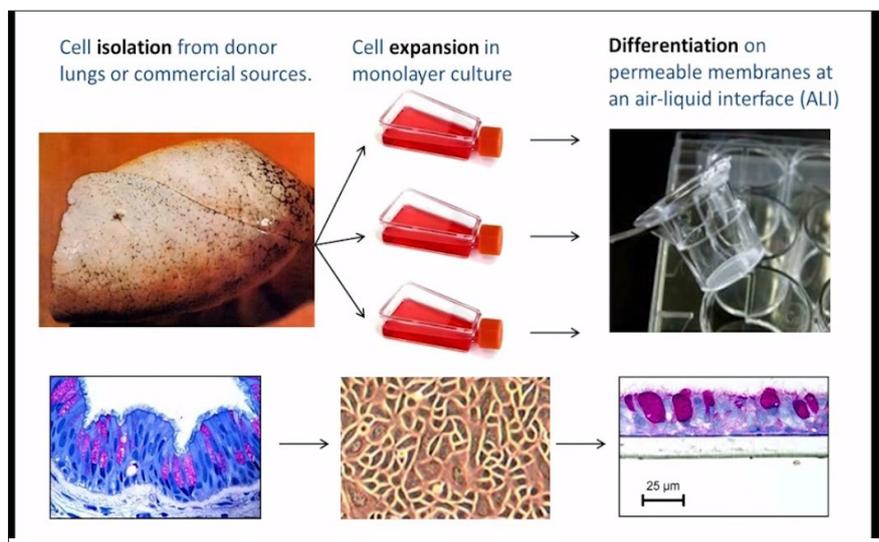
STEMCELL Technologies 社 ヒト気道上皮細胞用 ALI 培養補助試薬

製品コード	製品名	梱包単位
ST-07925	Hydrocortisone Stock Solution	3 mL
ST-07980	Heparin	2 mL

●ウェビナーのご紹介

タイトル: PneumaCult™ -ALI: An Improved Medium Formulation for the Differentiation of HBEC

概要: 生理的に適切な気管支上皮培養を実現することは困難です。PneumaCult™ -ALI 培地は、気液界面（ALI: Air-Liquid Interface）で培養したヒトの広範な粘液線毛分化をサポートします。本ウェビナーではブリティッシュコロンビア大学のジェームズ・ホッグ研究センターのサム・ワズワース博士が、ALI 分化の特徴と応用の概要を説明します。またそこでは、PneumaCult™ -ALI のパフォーマンスに関するデータを示し、それにより本培養で実現できる優れた生理的妥当性を提示しています。



https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/Movie_2_172.html

※本資料を閲覧又は視聴するには
ベリタス会員登録が必要です。

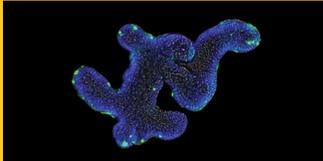


STEMCELL Technologies 社は、様々なオルガノイドの形成に有用で、
 効率と再現性の高い defined な無血清・all-in-one 培地を提供しております。
 オルガノイド培養ハンドブック申込 >>



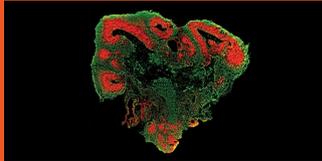
“ミニ臓器” オルガノイドの3次元培養をはじめませんか？

腸管オルガノイド(ES/iPS 細胞・ヒト・マウス)
 STEMdiff™ Intestinal Organoid
 IntestiCult™



- STEMdiff™ Intestinal Organoid :
 Dr. Jason Spence らの論文に基づく組成
- IntestiCult™
 Dr. Hans Clevers の論文に基づく組成

脳オルガノイド (ES/iPS 細胞)
 STEMdiff™ Cerebral Organoid



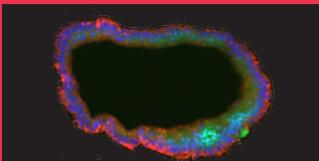
- 脳発生・脳疾患モデリング研究に
 Dr. Madeline Lancaster の論文に基づく組成

IntestiCult™ ユーザー様の声 A 研究所、I 様

従来は培地を自家調製していましたが、安定した培養ができませんでした。
 IntestiCult を使うと簡単・確実にオルガノイドを培養できました。圧倒的だと思います！



膵臓オルガノイド (マウス)
 PancreaCult™



- 膵臓細胞や疾患およびがん研究に
 Dr. Meritxell Huch の論文に基づく組成

肝臓オルガノイド (マウス)
 HepatiCult™



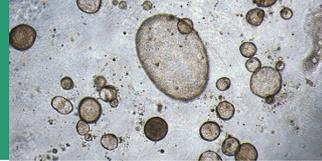
- *in vitro* での肝臓疾患モデリングに
 Dr. Meritxell Huch の論文に基づく組成

腎臓オルガノイド (ES/iPS 細胞)
 STEMdiff™ APEL2



- 腎臓細胞・腎臓オルガノイドの実績あり
 Dr. Andrew Elefanty の論文に基づく組成

肺オルガノイド (ヒト)
 PneumaCult™



- 呼吸器生物学、感染および疾患研究に
 STEMCELL Technologies 社による自社開発



STEMdiff™ APEL2 ユーザー様の声

高里 実 博士 国立研究開発法人 理化学研究所 生命機能科学研究センター
 レシピが論文で公開されており、ゼノフリーな培地であることが保証され、
 自作の培地と比較して分化細胞の生存性が向上しました。

株式会社

ベリタス

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14
 住友東新橋ビル3号館5階
 TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076
 E-mail: veritas@veritastk.co.jp
<https://www.veritastk.co.jp/>

ベリタスサイエンスレターは株式会社ベリタスが最新の情報のエッセンスを著者の了解を得てお届けしています。
 ご質問・ご意見は弊社技術グループ (TEL: 03-5776-0040、E-Mail: Tech_support@veritastk.co.jp) までお願い致します。