

MakCellによるセルカルチャーインサートを用いた腸管上皮細胞シートモデルの培養

卓上型自動培養装置“MakCell”は培地交換を自動で実施する装置で、日々の細胞維持に必要な培地交換にかかる作業時間の削減や休日出勤の削減に貢献している。今回，“MakCell”でセルカルチャーインサートを使用した細胞シート培養の自動化に成功した。

“MakCell”で作製した腸管上皮細胞シートは人による培地交換（手培養）で作製した細胞シートと同じバリア機能を有することを確認した。

方法

細胞種：ヒト結腸がん由来細胞株（Caco-2細胞）

器材：SUMILON Companion Plate for Cell Culture Insert（住友ベークライト社製 #MS-80240C） 24well用 Cell Culture Insert（FALCON社製 #353095） Cellmatrix Type I-C（新田ゼラチン） HCl希釈しコート CellQART Insert（SABEU社製 #9320402）

培地：D-MEM（High glucose FUJIFILM Wako）

培地添加試薬：FBS（Sigma）、抗生剤（gibco）、NEAA（Sigma）

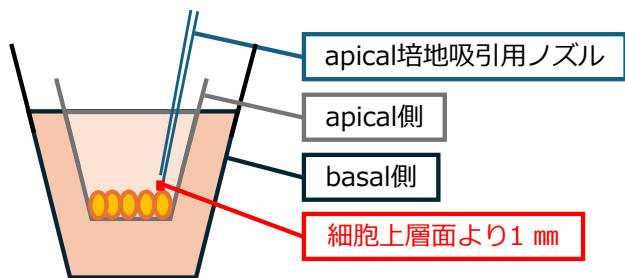
抗体：ZO1抗体（Abcam）、蛍光標識Phalloidin（コスモ・バイオ）、蛍光標識2次抗体（ThermoFischer）

試薬：FITC-Dextran 4kDa（Chondrex）、TNFα（R&D）

培養期間：21日間 2-3日に1度培地交換（手培養、MakCell培養ともに同じタイミング）

培地交換順 各wellに対して

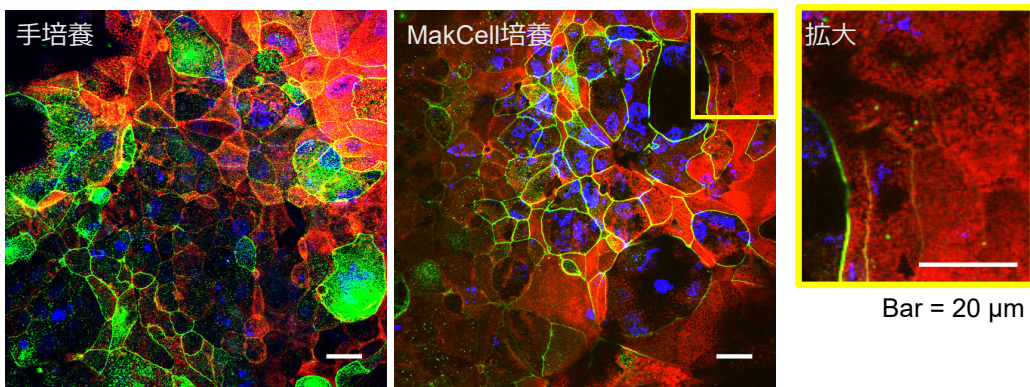
basal培地の吸引 (ノズル先端 底付き)	➡	basal培地の供給 (ゆっくり滴下)	➡	apical培地の吸引 (ノズル先端 細胞より 1 mm上)	➡	apical培地の供給 (ゆっくり滴下)
---------------------------	---	------------------------	---	--------------------------------------	---	-------------------------



結果

①細胞シート 免疫蛍光染色 ZO1+Phalloidin+DAPI

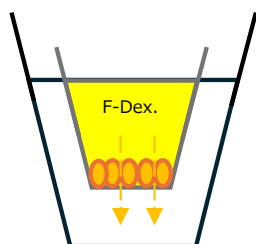
タイトジャンクションの形成とCaco-2細胞株の過密培養による腸管上皮様構造に見られる微絨毛を確認した。



結果 (続き)

②透過性試験

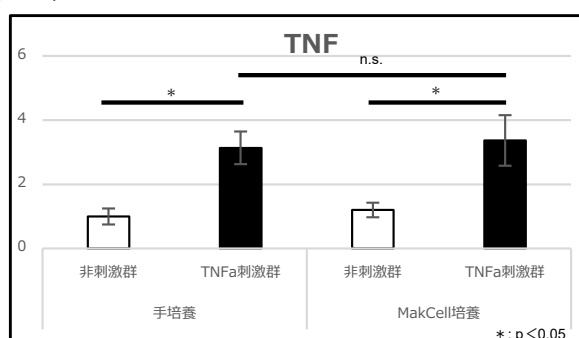
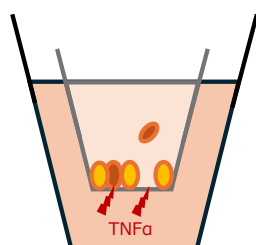
作製した細胞シートに添加したFITC-Dextran 4 kDa (F-Dex.) がbasal側へ透過していないことを確認した。



		F-Dex. 添加量(ug)	結果(ug)	透過率(%)
Cont. (培養なし)	F-Dex.(-)	0	未検出	-
	F-Dex.(+)	3.125	1.56	50
手培養	F-Dex.(-)	0	未検出	-
	F-Dex.(+)	3.125	未検出	-
MakCell培養	F-Dex.(-)	0	未検出	-
	F-Dex.(+)	3.125	未検出	-

③TNFα刺激による遺伝子発現解析

TNFα刺激により炎症性誘発遺伝子 (TNF)の発現の上昇を確認した。



MakCellを用いて、Caco-2細胞の培養をおこなった。培養21日目には過密培養により腸管上皮様に分化したことを示す微絨毛を確認した。また、タイトジャンクションを構成するZO1の発現と細胞シートの物質不透過の結果より、バリア機能を有する細胞シートの作製ができたと推測する。TNFα刺激によって腸管上皮構造透過性を亢進させ、炎症を誘発するメカニズムの1つである炎症誘発遺伝子 TNFの発現の上昇を確認した。

上記評価項目において、手培養とMakCell培養の解析結果はほぼ同等であることを確認した。

まとめ

- MakCellで小腸における腸管機能を再現した細胞モデルとして、創薬研究分野などで広く利用できる細胞シートを製造できた。
- MakCellを使用することで、作業者の操作ミスによる細胞シートへのダメージの懸念を排除することができ、細胞シートを安定的に製造することができる。
- 作業者は注意を要する頻回の培地交換作業から解放されるため、細胞シートモデルを利用した各種試験や解析に専念できることから、MakCellは研究推進に貢献する装置と言える。

(参考)

- 上記MakCellでの培地交換順は一例です。吸引→供給の順番は自由に組むことができます。
- セルカルチャーインサートを用いた培地交換だけではなく、通常の培養容器にも対応可能です。
- 低酸素培養にも対応しています。
- 培地は3種類まで搭載できます。

ご不明点はお気軽に下記までお問い合わせください。

