

cellZscope による ヒト皮膚バリア機能の測定

皮膚組織の上皮細胞層は、皮膚バリアとして外部からの病原菌への感染防御や物質の吸収や透過を制御しています。この皮膚バリア機能には、細胞間のタイトジャンクションが大きな役割を果たしていることが知られています。自動モニタリング装置「cellZscope」は、皮膚のバリア機能を経上皮電気抵抗値 (TER) として、リアルタイムに測定する事が可能です。本稿では、初代ヒト皮膚角化細胞を用いた TER の測定の方法とそのポイントについて、順天堂大学の Niyonsaba Francois 先生に測定の実例について教えていただきました。

目的

初代ヒト角化細胞における抗菌ペプチドであるヒト β -defensin-3 がタイトジャンクションに与える影響を cellZscope により測定する

材料

ヒト初代角化細胞 (クラボウ, Cat#KK-4009)
増殖培地; HuMedia-KG2 with supplements (クラボウ, Cat#KK-2150S)
高 Ca^{2+} 培地; 増殖培地 + 1.35mM Ca^{2+}
刺激培地; HuMedia-KG2 (without supplements) + 1.35mM Ca^{2+}

方法

Day 1

- 70-80% の状態の細胞をトリプシン処理により回収する
- 細胞の濃度を 3.6×10^5 cells/ml に増殖培地で調製する
- 予め 24-well マルチプレートの各 well に 1.3ml の増殖培地を分注する
- カルチャーインサート (メルクミリポア, Cat#PIHT 12R) をウェルにいれて、200 μ l の細胞懸濁液を分注する
- 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターで、一晚培養する

Day 2

- 新しい 24-well マルチウェルプレートの各 well に 1.3ml の増殖培地を分注する
- 培養したカルチャーインサートを新しい増殖培地が入った 24-well プレートに移す
- インサート内の古い培地をアスピレーターで除く
- 200 μ l の新しい増殖培地をインサート上部に加える
- 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターで更に 2 日間培養する

Day 4

- 高 Ca^{2+} 培地 1.3ml を新しい 24-well マルチプレートの各 well に分注する
- 培養したカルチャーインサートを 11. で準備したマルチプレートに移す
- インサート内の古い培地をスピレーターで除き、200 μ l の高 Ca^{2+} 培地を添加する
- 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターで一晩培養する

ここがポイント!

初代細胞ではロットにより接着率や倍加時間などが異なります。また、ロットにより、細胞層を形成しない場合もあるので注意が必要です。

ここがポイント!

初代細胞では使用する継代数が重要です。本実験では、3 継代目の細胞を使用しています。



cellZscope 細胞タイトジャンクション
リアルタイムモニタリングシステム
(現行モデル cellZscope+)

Day 5

1. 刺激培地を調製する
2. **cellZscope** のセルモジュールをクリーンベンチにいれ、下部電極の well に 1.0ml の刺激培地（ヒト β -defensin-3 20 μ g/ml 添加、または無添加）を分注する
3. 培養したカルチャーインサートを **cellZscope** に移す
4. 培地を取り除き、300 μ l の刺激培地で 1 回洗浄する
5. 300 μ l の刺激培地（ヒト β -defensin-3 添加または無添加）を各ウェルに添加する
6. セルモジュールの蓋をして、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ インキュベーターで 24-120h 培養する
7. TER の測定を 1 時間ごとに行う (0-120h)

ここがポイント!

培地交換はカルチャーインサートの上部および下部の両方を 2 日毎に行います。

ここがポイント!

ブランクとして、必ず細胞層なし、カルチャーインサートのみ well を測定するようにします。

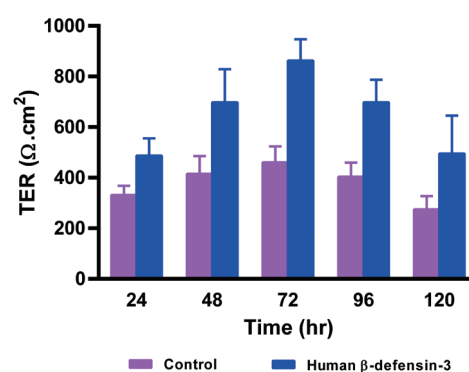
結果と考察

上記のプロトコルに従って培養し、ステップ 16 のカルチャーインサートの下部の培地にヒト β -defensin-3 を添加または無添加で培養を行い、TER の測定を行った結果を下記に示します。

Human β -defensin-3 を添加した細胞層では、コントロールと比較して、TER の値が上昇していることが確認されました（右図）。

この結果は、human β -defensin-3 が、タイトジャンクションを介して、皮膚のバリア機能を制御していることを示しています。また、**cellZscope** により継続的な測定により、処理後 72 時間後に TER の値が最大になることがわかりました。

このように **cellZscope** による TER の継続的な解析は、細胞層のバリア機能をタイトジャンクションに着目して解析する上で有用なツールと言えます。また、**cellZscope** で使用するカルチャーインサートは市販されている種々のフォーマットに対応しているため、**cellZscope** で決めた実験条件を他の実験系にもそのまま応用する事が可能です。



【謝辞】

本稿で記載したプロトコル、データ、および実験のポイント等のすべての情報について、順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センターの Niyonsaba Francois 准教授のご厚意によりご提供およびアドバイスをいただきました。この場をお借りしてお礼を申し上げます。

参考文献

1. Kiatsurayanon C et al. *Host defense (Antimicrobial) peptide, human beta-defensin-3, improves the function of the epithelial tight-junction barrier in human keratinocytes.* J Invest Dermatol, 2014 ; **134**(8): p. 2163-73.
2. Akiyama T et al. *The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function.* J Innate Immun, 2014; **6**(6): p. 739-53.
3. Hattori F et al. *The antimicrobial protein S100A7/psoriasin enhances the expression of keratinocyte differentiation markers and strengthens the skin's tight junction barrier.* Br J Dermatol, 2014; **171**(4): p. 742-53.

販売代理店

販売代理店