

making a difference



APPLICATION NOTE

ThinCert® 96ウェルHTSインサートを使用した、
ハイスループット*in vitro* 気道モデル構築

www.gbo.com/bioscience


greiner
BIO-ONE

1. 序論

気液界面 (air-liquid interface, ALI) での細胞培養は、*in vitro*で安定した気道の機能モデルを生成し、偽重層上皮を再現するための一般的な方法です。ALI細胞培養は、疾患モデリング [1,2]、薬物検査、細胞間シグナル伝達、大気汚染物質の肺に対する毒性研究 [3] など、下気道に関連するさまざまなプロセスを研究するために頻繁に採用されています。ALI細胞培養を確立するためには、正常なヒト気管支上皮細胞 (NHBE) を多孔質メンブレンインサート (ThinCert® 96ウェル HTSインサート) で培養します。初期段階では、細胞を培地中で増殖させてコンフルエントな細胞層を形成します。その後インサートプレートから培地を取り除き、細胞を気液界面に移します。ThinCert® HTSインサートはメンブレンの上下にそれぞれ培地を入れることができるため、細胞の基底側は培地と直接接した状態を維持しながら、頂端側は空気に晒されます。この状態において細胞は、タイトジャンクションの形成や繊毛と粘液の発達、細胞極性の確立を含め、生体内の組織に見られるものに類似した形態的・機能的分化をたどります。

ALI細胞培養はCOVID-19疾患モデル構築の過程でさらに注目を集めており、SARSCoV-2 関連の研究に頻繁に用いられています。ThinCert®セルカルチャーインサートをはじめとする透過膜インサートは、*in vitro*で気道上皮モデルを構築するための不可欠なツールであることが証明されています [4, 5, 6, 7]。弊社Greiner Bio-OneのThinCert®製品グループはこれまでに多くのご利用実績がありますが、今回新たにハイスループットアッセイに特化した自動化システムフレンドリーな製品であるThinCert® 96ウェルHTSインサートを追加したことで、更にラインナップが強化されました。単一ウェル用のインサートとは対照的に、96ウェルHTSインサートは1プレート分を1つのユニットとして扱うことができるため、手作業を大幅に削減できます。

2. 材料と方法

製品	製造元	製品番号
細胞		
Normal Human Bronchial Epithelial Cells	Lonza	CC-2540S
細胞培養キット		
PneumaCult-Ex Plus culture medium	Stemcell Technologies	05040
PneumaCult-ALI Medium for differentiation	Stemcell Technologies	05001
試薬		
Hydrocortisone, 2 x 10 ⁻⁴ M	Stemcell Technologies	07925
Heparin, 2 mg/ml / 0,2 %	Stemcell Technologies	07980
Accutase cell detachment solution	Stemcell Technologies	07920
Rat Tail Collagen Coating Solution, 50 µg/ml	Sigma Aldrich	122-20
Trypsin/EDTA solution (0.05 %/0.02 %)	PAN Biotech	P10-023100

製品	製造元	製品番号
蛍光免疫染色		
Mouse anti- β -Tubulin IV	Sigma-Aldrich	T7941-.2ML
Alexa 488 goat anti-mouse	Life Technologies	A11001
Rabbit anti-ZO1	Life Technologies	40-2200
Alexa 546 goat anti-rabbit	Life Technologies	A11010
アルシアンブルー染色		
Alcian blue 8GX	Sigma Aldrich	A3157-10G
DAPI染色		
DAPI	Sigma-Aldrich	D8417-10MG

3. アッセイ手順

3.1 細胞播種の準備（一般的な細胞培養）

1. 一般的な細胞培養のプロトコルに従って、NHBE細胞を培養する。（例：60%コンフルエント）
2. 培地を取り除き、PBSでリンスする。
3. アクターゼ溶液を添加し、細胞を剥離する。
4. 細胞懸濁液を遠心管に移し、遠心する。350 x g、5分
5. 細胞ペレットを予め温めた細胞培養液に再懸濁する。
6. 細胞懸濁液を希釈して細胞密度を調整する。
150,000 cells/cm² (420,000 cells/ml)

3.2 コラーゲンコーティング

1. インサートプレートの各ウェルに、ラット尾由来コラーゲンストック液28 μ l (10 μ g/cm²) をアプライする。
2. インキュベート 室温, 1時間
3. PBSでリンスする。

3.3 THINCERT® 96ウェルHTSインサートに細胞を播種（細胞培養液中での増殖フェーズ）

1. 3.1.6で準備した細胞懸濁液をインサートプレートの各ウェルに50 μ lずつ播種する。
約 21,000 cells/ウェル
2. レシーバープレートの各ウェルに、培地を200 μ lずつ加える。
3. ThinCert® 96ウェルHTSインサートをレシーバープレートにセットする。
4. プレートをインキュベータ内に置く。
37°C, 5% CO₂
5. コンフルエントな細胞層が形成されるまで、5日間培養する。
6. 48時間後以降に培地交換する。

3.4 培地交換

1. リザーバープレート（下側）の培地を除去する。
2. インサートプレート（上側）の培地を除去する。
3. リザーバープレートに培地を加える。
4. インサートプレートに培地を加える。

レザーバープレートの培地交換について:

インサートプレートには培地交換のためのアクセスポート（図1）があります。マルチチャンネルピペット等を用い、アクセスポートを通してレザーバープレートの培地交換が可能です。または、インサートプレートを持ち上げて培地交換を行うこともできます。

取り扱い上の注意:

レザーバープレート内の培地が過度に動かないように、プレートの取り扱いには注意してください。

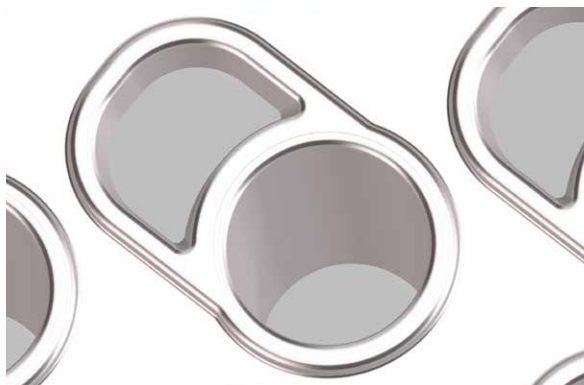


図1：アクセスポートはインサートプレート上の各ウェルのすぐ隣にあります。ここからシングルチャンネル/マルチチャンネルピペットまたはロボットによる液体分注に対応でき、経上皮電気抵抗（Transepithelial Electric Resistance, TEER）測定のための電極を通すこともできます。

3.5 気液界面での細胞培養（分化フェーズ）

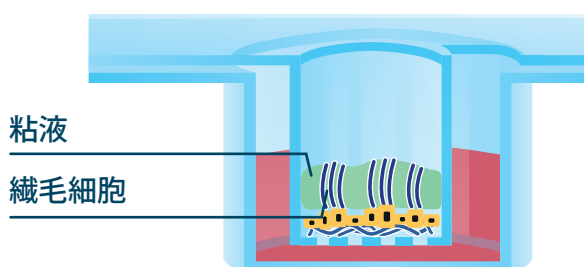
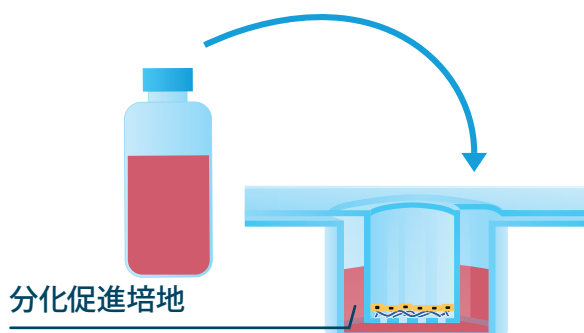
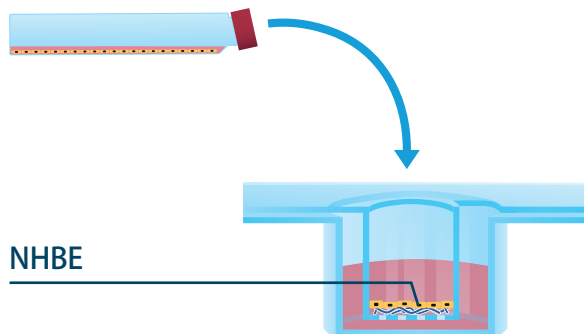
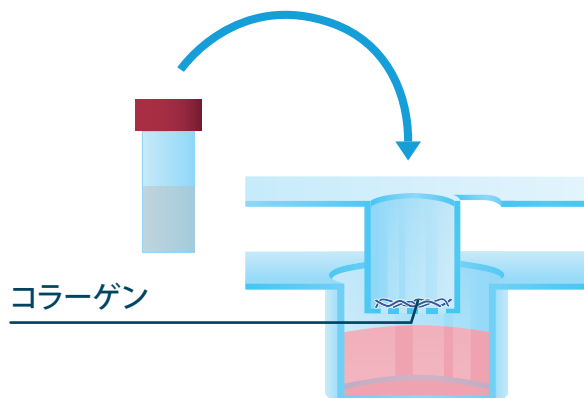
1. リザーバープレート（下側）の培地を除去する。
2. インサートプレート（上側）の培地を除去する。
3. リザーバープレートに分化促進培地を150μl加える。
4. インサートプレートに培地を入れずにおくことで、ALI細胞培養を実現する。
5. 2日毎にリザーバープレートの分化促進培地を交換する。
6. 1週間に一度、インサートプレートの細胞を100μlのPBSで洗い、粘液を除去する。
7. PBSを注意深く取り除く。

注意事項：細胞層を傷つけると上皮バリアの完全性が損なわれるため、注意する。

8. 20から25日間培養する。

注意事項：培地がリザーバープレートからインサートプレート側に染み出た場合は、注意深く除去する。

4. 気液界面での細胞培養



1

インサートプレートの準備
メンブレンをコラーゲンコートする。

2

細胞培養液中で培養（増殖フェーズ）
インサートプレートの各ウェルに細胞懸濁液を加える。

5日間継続培養
（48時間ごとに培地交換する。）

3

ALI細胞培養 — 気液界面での細胞培養（分化フェーズ）
リザーバープレートに分化促進培地を加え、インサートプレートの培地を取り除く。

20 ～ 25日間継続培養
（48時間ごとに培地交換する。）
1週間に一度PBSで洗浄する。

4

ALI細胞培養 — 気液界面での細胞培養（分化フェーズ）
20 ～ 25日間継続培養

4.1 分化マーカー

分化状態を評価するために、抗 β -チューブリンIV抗体を使用して、生体内の気道上皮に見られる細胞のほぼすべてを占める繊毛細胞を検出しました。粘液を産生する杯細胞の存在は、気道の粘液層に見られる硫酸化およびカルボキシル化多糖類を検出するアルシアンブルー染色によって証明されました。この2つの細胞は異物排除機構である繊毛運動において主要な役割を果たし、外来粒子や病原体に対する最初の防御機構として機能します。

タイトジャンクションが多孔質膜上に選択的バリアとして形成されたことを証明するために、タイトジャンクションタンパク質-1 (ZO-1) を対応するウサギ抗体で検出しました。

4.2 抗 β チューブリンIV抗体を用いた蛍光免疫染色

1. 冷たい10%ホルマリンで頂端側の細胞を固定する
(室温, 15分間)
2. 各ウェルを100 μ lのPBSで2回洗浄する
3. 50 μ lの0.1 % Triton X-100 PBSで細胞を透過処理する
(室温, 5分間)
4. 各ウェルを100 μ lのPBSで洗浄する
5. ブロッキングバッファー (PBS + 5% ヤギ血清) を使用し、インキュベートする (1時間)
6. 各ウェルを100 μ lのPBSで洗浄する
7. ブロッキングバッファーに一次抗体 (マウス抗 β チューブリン IV抗体) を添加し、各ウェルに加える
インキュベート (室温, 1時間 または 4°C, O/N)
8. 各ウェルを100 μ lのPBSで3回洗浄する
9. ブロッキングバッファーに二次抗体 (Alexa488ヤギ抗マウス抗体、および必要に応じて DAPI 10 μ g/ml) を添加し、各ウェルに加える
インキュベート (室温, 暗所, 1 時間)
10. 各ウェルを100 μ lのPBSで3回洗浄する
11. メスを用いてメンブレンを切り取る
12. メンブレンを顕微鏡スライドに置き、適切に据え付ける

4.3 抗ZO-1抗体を用いた蛍光免疫染色

1. 冷たい10%ホルマリンで頂端側の細胞を固定する
(室温, 15分間)
2. 各ウェルを100 μ lのPBSで2回洗浄する
3. 50 μ lの0.1 % Triton X-100 PBSで細胞を透過処理する
(室温, 5分間)
4. 各ウェルを100 μ lのPBSで洗浄する
5. ブロッキングバッファー (PBS + 5% ヤギ血清) を使用し、インキュベートする (1時間)
6. 各ウェルを100 μ lのPBSで洗浄する
7. ブロッキングバッファーに一次抗体 (ウサギ抗ZO-1抗体) を添加し、各ウェルに加える
インキュベート (室温, 1時間 または 4°C, O/N)
8. 各ウェルを100 μ lのPBSで3回洗浄する
9. ブロッキングバッファーに二次抗体 (Alexa546ヤギ抗ウサギ抗体) を添加し、各ウェルに加える
インキュベート (室温, 暗所, 1 時間)
10. 各ウェルを100 μ lのPBSで3回洗浄する
11. メスを用いてメンブレンを切り取る
12. メンブレンを顕微鏡スライドに置き、適切に据え付ける

4.4 アルシアンブルー染色

アルシアンブルー溶液の調製: 10 ml 塩酸 + 90 ml 脱イオン水 + 1 g アルシアンブルー (粉末)

1. 冷たい10%ホルマリンで細胞を固定する
(室温, 30分間)
2. 各ウェルを100 μ lのPBSで3回洗浄する
3. 50 μ lのアルシアンブルー溶液を加える
インキュベート (室温, 30 分間)
4. 各ウェルを 0.1 N塩酸で 3 回洗浄する
5. 蒸留水を加え、顕微鏡観察する
(ここでは膜を切り取らない)

5. 結果

このアプリケーションノートではThinCert® 96ウェルHTSインサートを用いて気道上皮の*in vitro*モデルを構築しました。この目的のため、正常なヒト気管支上皮細胞（NHBE）を気液界面で培養しました。（ALI細胞培養）

5.1 蛍光免疫染色

偽重層上皮の分化状態を分析するために、ALI培養細胞を固定し、抗 β チューブリンIV抗体および抗ZO-1抗体で染色して、繊毛細胞と特徴的なタイトジャンクションを検出しました。DAPI染色を使用して核を可視化し（図3）、全体的な細胞形態を評価しました。免疫細胞染色の結果、タイトジャンクションを発達させた上皮細胞が単層を形成し（図4）、頂端側領域と基底側領域の間の境界となっています。主要な繊毛タンパク質である β チューブリンIVは、分化した細胞組成の存在を証明する優れた分化マーカーです（図2）。

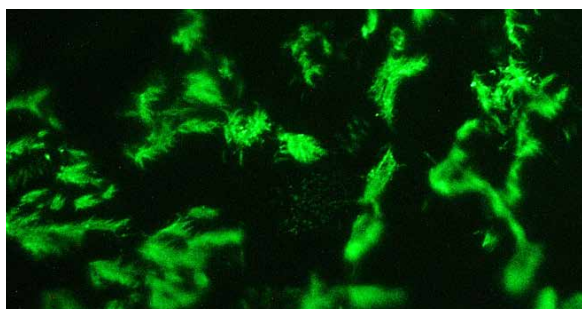


図2：抗 β チューブリンIV抗体染色（緑）

ThinCert® HTSインサート上で繊毛を発達させた細胞が観察された。（63 x）

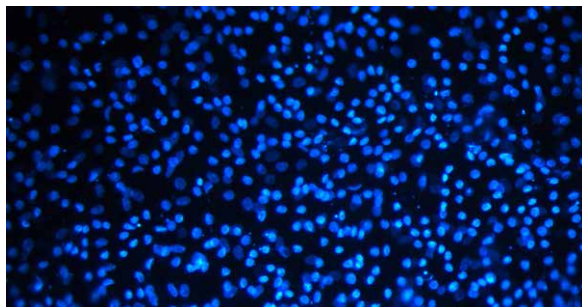


図3：DAPI染色（青）

ThinCert® HTSインサート上で細胞層が形成された。（20x）

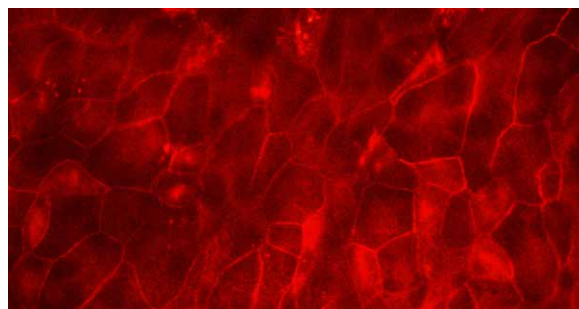


図4：抗ZO-1抗体染色（赤）

ThinCert® HTSインサート上でタイトジャンクションを発達させた細胞が観察された。（63 x）

5.2 組織化学的染色

ALI細胞培養開始から25日後、固定した細胞をアルシアンブルー染色し（図5）、偽重層上皮の粘液に含まれる典型的な多糖類と糖タンパク質を検出しました。アルシアンブルー染色の結果は、気液条件下での分化の指標として機能します。



図5：アルシアンブルー染色で粘液中の多糖類を検出した。（10 x）



図6：ALI細胞培養開始から25日後の固定前のNHBE細胞（10 x）

ThinCert® 96 ウェル HTS インサートは、*in vitro*において *in vivo*と同様の増殖条件を可能にし、個々の細胞から上皮の再構築を促進します。ALI培養細胞は、タイトジャンクション、細胞極性、バリア機能などの組織固有の特徴を発現するため、組織固有の現象を研究するために使用することができます。

ThinCert® 96ウェルHTSインサート（インサートプレートとレシーバープレートのセット品）

培養面積 14 mm²、ワーキングボリウム（インサートプレート） 15 ~ 160 μl、
ワーキングボリウム（レシーバープレート） 120 ~ 300 μl、低蒸発フタ付き

製品番号	ポア密度	ポア径	メンブレン	表面処理	滅菌	入数
655640	1 x 10 ⁸ /cm ²	0.4 μm	半透明	TC	滅菌済	5枚入り (個別包装)
655641	2 x 10 ⁷ /cm ²	0.4 μm	透明	TC	滅菌済	5枚入り (個別包装)

ThinCert® 96ウェルHTSインサート専用レシーバープレート

ワーキングボリウム（レシーバープレート） 120 ~ 300 μl、低蒸発フタ付き

製品番号	培養面積	表面処理	滅菌	入数
655169	-	無処理	滅菌済	32枚入り (8枚/包 x 4包)
655167	53 mm ²	TC	滅菌済	32枚入り (8枚/包 x 4包)

参考文献

1. Bluhmki, T., Bitzer, S., Gindele, J.A. et al. Development of a miniaturized 96-Transwell air-liquid interface human small airway epithelial model. *Sci Rep* 10, 13022 (2020)
2. Schögler, A., Blank, F., Brügger, M. et al. Characterization of pediatric cystic fibrosis airway epithelial cell cultures at the air-liquid interface obtained by non-invasive nasal cytology brush sampling. *Respir Res* 18, 215 (2017)
3. Upadhyay S, Palmberg L. Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicol Sci.* 2018 Jul 1;164 (1) :21-30
4. Lukassen, Soeren, et al. "SARS - CoV - 2 receptor ACE 2 and TMPRSS 2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells." *The EMBO journal* 39.10 (2020) : e105114.
5. Djidrovski, Ivo, et al. "SARS-CoV-2 infects an upper airway model derived from induced pluripotent stem cells." *Stem Cells* 39.10 (2021) : 1310-1321.
6. Le, Nguyen Phan Khoi, et al. "Comparative Anti-Inflammatory Effects of Salix Cortex Extracts and Acetylsalicylic Acid in SARS-CoV-2 Peptide and LPS-Activated Human In Vitro Systems." *International journal of molecular sciences* 22.13 (2021) : 6766.
7. Schulze, Jessica, et al. "Analysis of SARS-CoV-2 replication in explant cultures of the human upper respiratory tract reveals broad tissue tropism of wild-type and B. 1.1. 7 variant viruses." *The Journal of Infectious Diseases* (2021) .

株式会社グライナー・ジャパン

〒101-0047 東京都千代田区内神田1-14-10

TEL 03-5843-9159 FAX 03-6275-0546

URL https://www.gbo.com/ja_JP.html

グライナー・ジャパン取扱店