

告している¹⁾。また FLC 細胞のアルブミン産生も、単層培養と比較して、RFB では高いことを報告した²⁾。この結果、この RFB システムはより培養肝細胞の機能を向上させる可能性が示唆された。また、岩堀らはこのシステムを用いた肝細胞の高密度培養において、CYP3A4 の発現と機能の亢進が生体に近いレベルまで上昇し、薬物代謝シミュレーションモデルとして有用であると報告した³⁾。

我々は培養液を循環するだけの簡易型 RFB を用いて尿細管細胞の培養にも取り組み、すでに高密度高機能培養が可能であることを確認している。さらに今回は、培養液中の酸素濃度や pH 調節が可能であり、培養液の循環や培養液の注入や廃液も自動化できる完全制御型の RFB システムを用い (Fig. 1)、高酸素、低酸素の条件に培養液中の糖濃度調節を加え、高血糖と虚血が病態の中心であると言われている糖尿病性腎症の解析モデルとして構築できうるか検討を行った。

対象と方法

細胞

ブタ近位尿細管上皮細胞である LLC-PK1 を使用した。培養液は 10% ウシ胎児血清を含む 199 アール培地を用いた。培養条件は 37°C CO₂ インキュベータにて二酸化炭素濃度 5%、湿度 95% とした。細胞の継代は、0.02% EDTA 含 25 USP units/mL トリプシン (Difco Co., Ltd.) を用いて剥し、 2×10^6 個に調整した。

RFB 培養

今回使用したシステムは、エイブル社製 5 ml 型

RFB カラム、マスフローコントローラー RAD925、そして培養担体として旭化成メディカル社製直径 230 nm、孔径 50 nm のセルロースマイクロキャリアを使用した。

まず $2 \sim 5 \times 10^7$ 個の細胞を RFB システムの培養液貯留槽 (Conditional vessel) に注入した。培地循環ポンプは 25 ml/min の速さで培地を循環させた。播種細胞はこの培地循環とともに流れ、RFB カラム内の培養担体に付着させて増殖させた。培養中の酸素制御は高酸素群は RFB 出口側酸素センサー上 100–200 mmHg 以上の酸素分圧を維持するよう酸素負荷を行った。低酸素群は非酸素負荷にて RFB 出口側酸素センサー上 25–50 mmHg の酸素分圧にて培養を行った。LLC-PK1 のアネロパックによる無酸素単層培養を比較対象とした。

増殖曲線

初期 1.8×10^7 個の細胞を RFB に播種した。定期的な培地交換の際、培養液中グルコース濃度を測定。培地内グルコース濃度との差からグルコース消費量を計算、単層培養におけるグルコース消費量と細胞数推移の結果から細胞数を算定して推定細胞数とし、増殖曲線を作成した。

HE 染色

RFB 培養後、細胞は 20% 中性ホルマリン緩衝液にて培養担体とともに固定した。SRL にてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

免疫染色

RFB 培養後、細胞を compound medium にて包埋

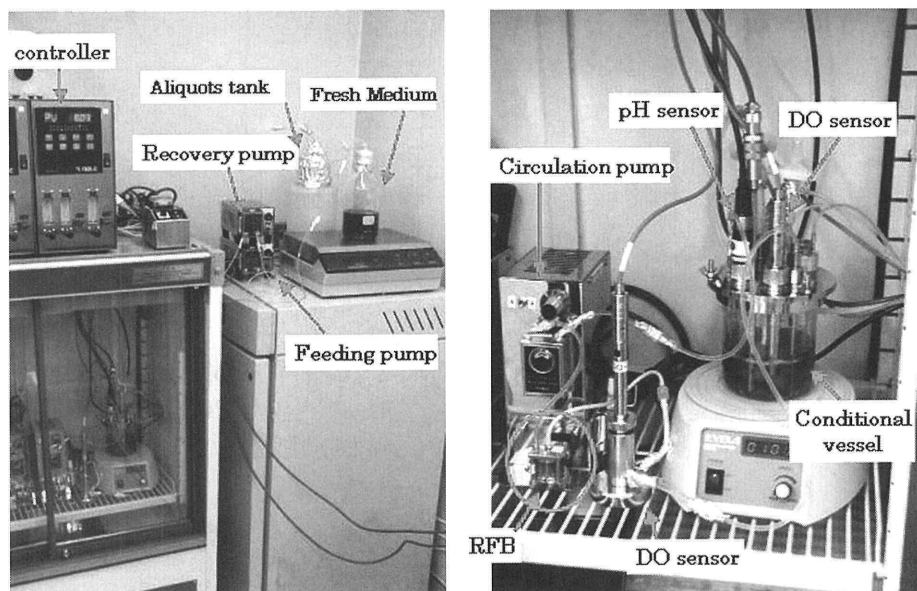


Fig. 1 System overview

し、液体窒素内で急速凍結した後クリオスタットにて切片作成した。切片上の検体に抗 Connective tissue growth factor (CTGF) 抗体、抗フィブロネクチン (FN) 抗体を各 100 倍希釈液を 40 μ l 添加して 37°C 30 分反応させた。リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 200 倍希釈液を 40 μ l 反応させた。再び PBS で洗浄の後蛍光顕微鏡にて鏡顕した。

TaqMan 定量 PCR

培養終了後培養担体ごと液体窒素にて急速凍結し、-80°C 冷凍庫に保存した。その後 RNeasy kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、Yeast tRNA 含有 RNase free 蒸留水にて 10 ng/ μ l に調節した。

一方、primer/probe については以下のものを使用した。CTGF forward primer: 5'-TGTGTGACGAGC CCAAGGA-3' CTGF reverse primer: 5'-GGACCAGGC AGTTGGCTCTA-3' CTGF TaqMan probe: 5'-[6FAM]CTTACCGACTGGAAGACACGTTTGGCC-3'

FN forward primer: 5'-TTGAGGAGCATGGTTTT AGGAGA-3' FN reverse primer: 5'-TGGCCTATG CCTTACGGG-3' FN TaqMan probe: 5'-[6FAM] CACCGCCCAAGGGCCA[TAMRA]-3'

50 μ l の反応液内に RNA サンプルは 10 ng 含め、forward と reverse primer 各 0.3 mmol/L と 0.9 mmol/l で調整した。反応はアプライド社の One step

RT-PCR Master Mix Reagent kit を用いて 1 ステップで行った。反応条件は stage 1: 48°C 30 分、stage 2: 95°C 10 分、stage 3: 95°C 15 秒と 60°C 1 分を 1 サイクルとして計 60 サイクル反応させて終了とした。

結 果

増殖曲線

Fig. 2 に増殖曲線の結果を示す。植え継ぎなしで順調に細胞数が増加することが確認され、RFB は LLC-PK1 にとって培養に有用なシステムであることが判明した。

HE 染色による培養後形態像

Fig. 3 は 14 日間植え継ぎなしで RFB 培養した後ホルマリン固定後 HE 染色した像である。示すように培

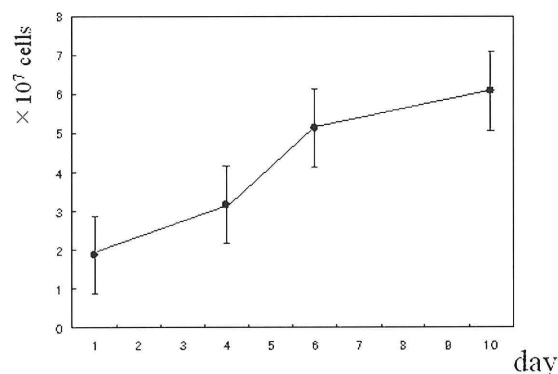


Fig. 2 Proliferative curve of LLC-PK1 cultured in RFB

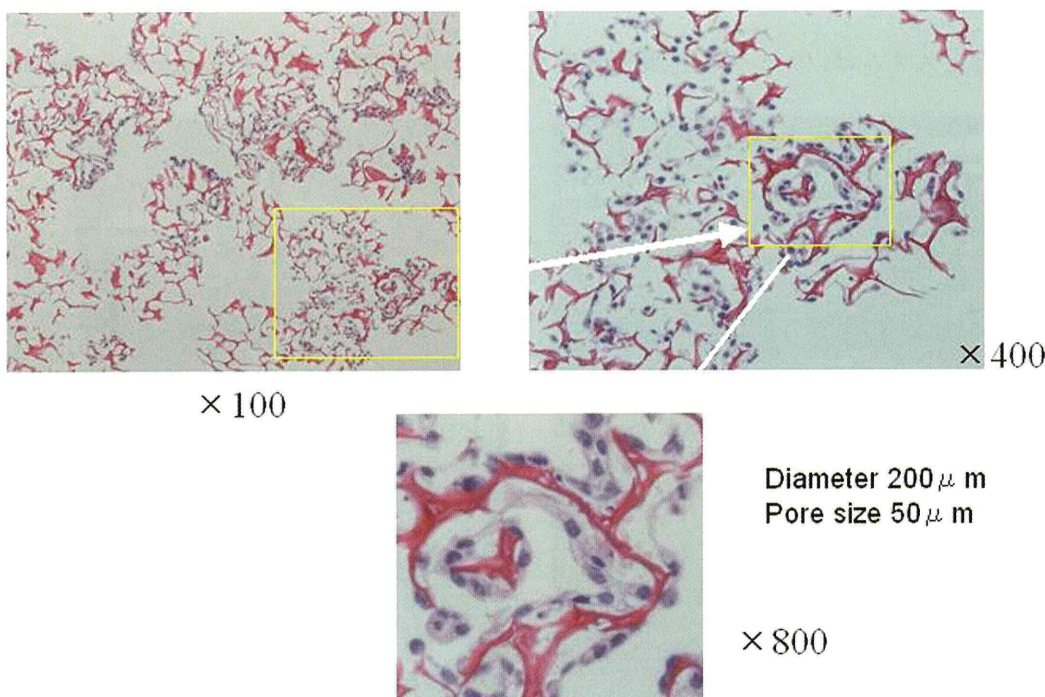


Fig. 3 H.E. stain of LLC-PK1 cultured in RFB using a microcarrier

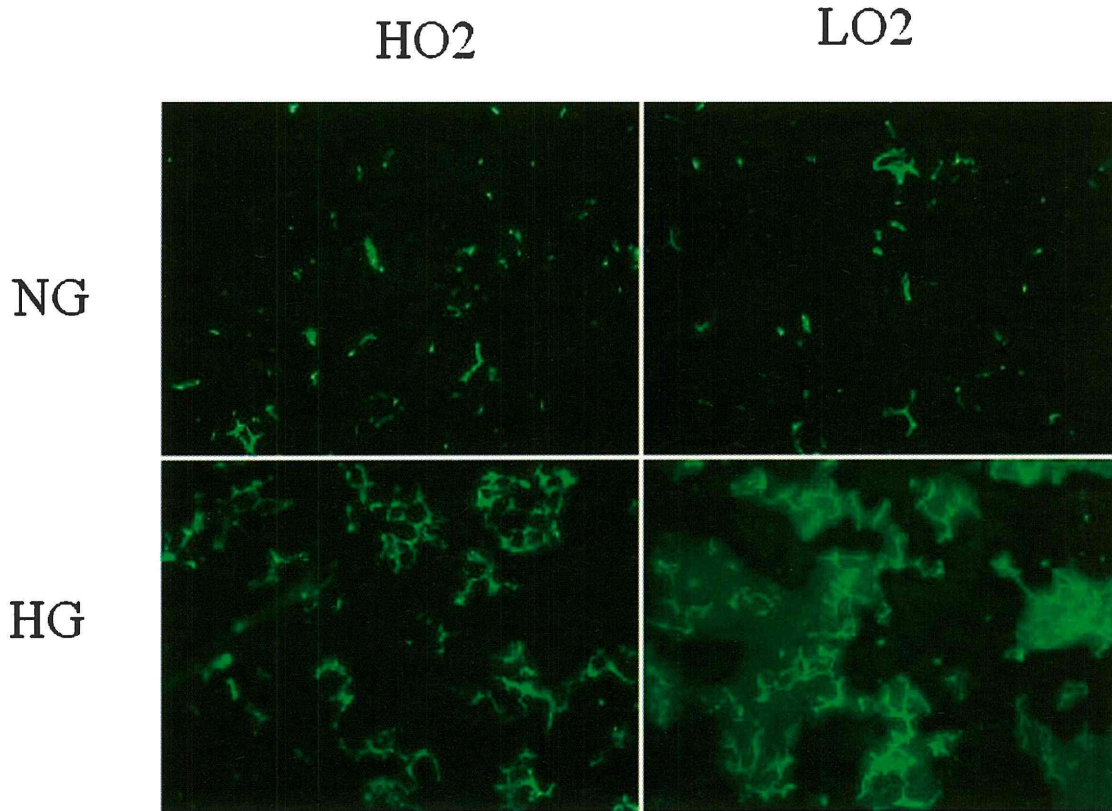


Fig. 4A

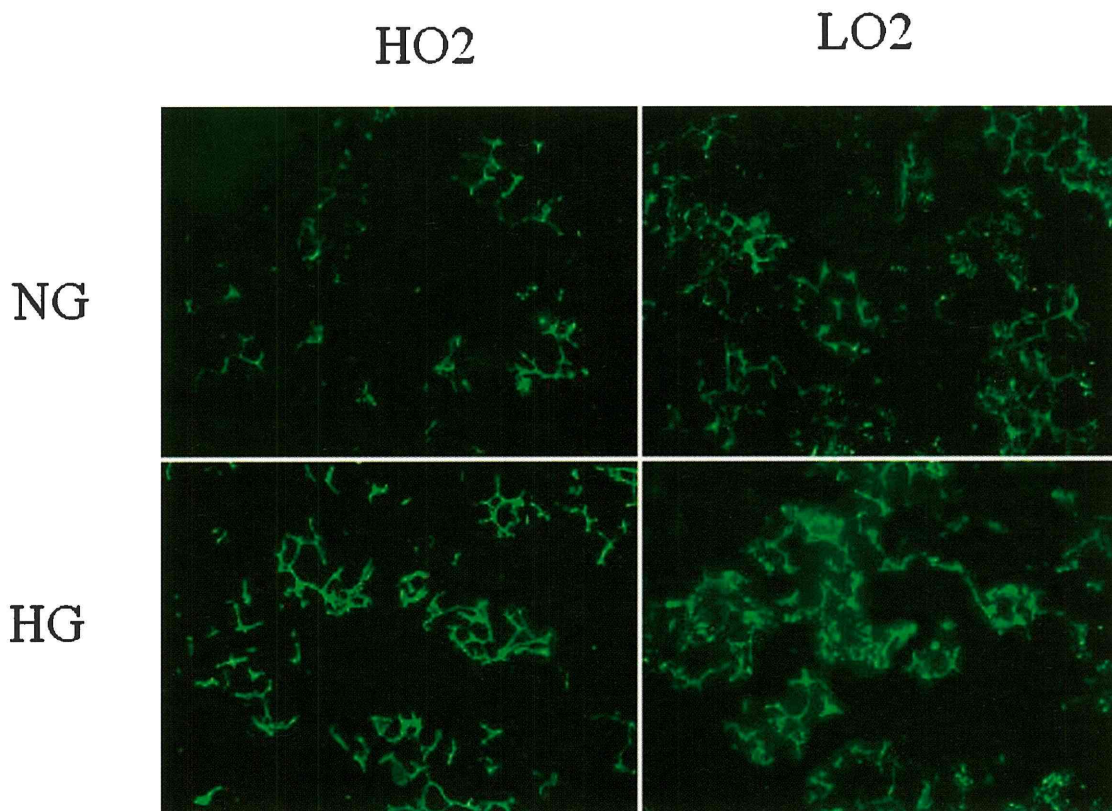


Fig. 4B

Fig. 4 A. Immunofluorescence detection of CTGF on LLC-PK1 cultured in RFB under various conditions.
B. Immunofluorescence detection of FN on LLC-PK1 cultured in RFB under various conditions.

養担体に付着して、LLC-PK1が多重に高密度に培養されていることが確認された。培地内グルコース消費量も維持されていた(結果未表示)ことより、細胞のviabilityは良好であることが確認された。

細胞外マトリックスの免疫染色像

各種条件で培養した後、細胞外マトリックスの発現状態を確認するため、CTGFとFNの免疫染色を行った(Fig. 4)。CTGFは、正常糖濃度(NG)かつ高酸素濃度(HO)下で培養した時に比べ、NGかつ低酸素濃度(LO)下で培養した際には発現レベルに差が見られなかったが、高糖濃度(HG)かつHO下で培養した場合若干発現が亢進した。HGかつLO下培養ではさらに発現が亢進した(Fig. 4A)。またFNの発現は、NGかつHO下培養に比べ、NGかつLO下培養やHGかつHO培養で若干発現が亢進し、HGかつLO下培養でさらに発現が亢進した(Fig. 4B)。アネロパックによる無酸素単層培養ではどの群もFN、CTGFとも発現が見られなかった(結果非表示)。

細胞外マトリックスのRNA発現定量

次に、細胞外マトリックスの蛋白発現が遺伝子レベルでどのように関与しているかを調べるためにTaqMan定量PCRにてRNA定量を行った(Fig. 5)。その結果、CTGFはNGかつHO下培養(NGHO)や

NGかつLO下培養(NGLO)で発現がほとんど見られず、HGかつHO下培養(HGHO)で若干発現が增强し、HGかつLO下培養(HGLO)では発現が著明に亢進していた。FNはNGHO、HGHO、NGLOの順で発現が亢進していったが、HGLOではむしろやや発現が低下した。アネロパックによる無酸素単層培養では発現が見られなかった(結果非表示)。

考 察

これまでの内外の報告では、糖尿病性腎症の種々の検討がなされてはきているが、全て尿細管細胞やメサンギウム細胞の単層培養を用いた検討である。しかし、本来生体では特に臓器を構成する細胞は立体的な3次元構造を構築している。しかもこの3次元構築が生体にとって各臓器の機能をも変える重要な点である。これまで肝臓細胞を中心にその検討がなされてきている。小田らは肝細胞の3次元培養によって細胞内骨格の構造変化がアルブミン産生能を増加させる転写因子の発現を亢進させ、培養時の細胞密度の上昇が肝細胞の分化を進行させることを報告している⁴⁾。

また、我々が今回導入した3次元培養システムであるRFBでは、RFBに充填した培養担体に細胞を付着させ培養する。もともと動物細胞は、血液細胞を除い

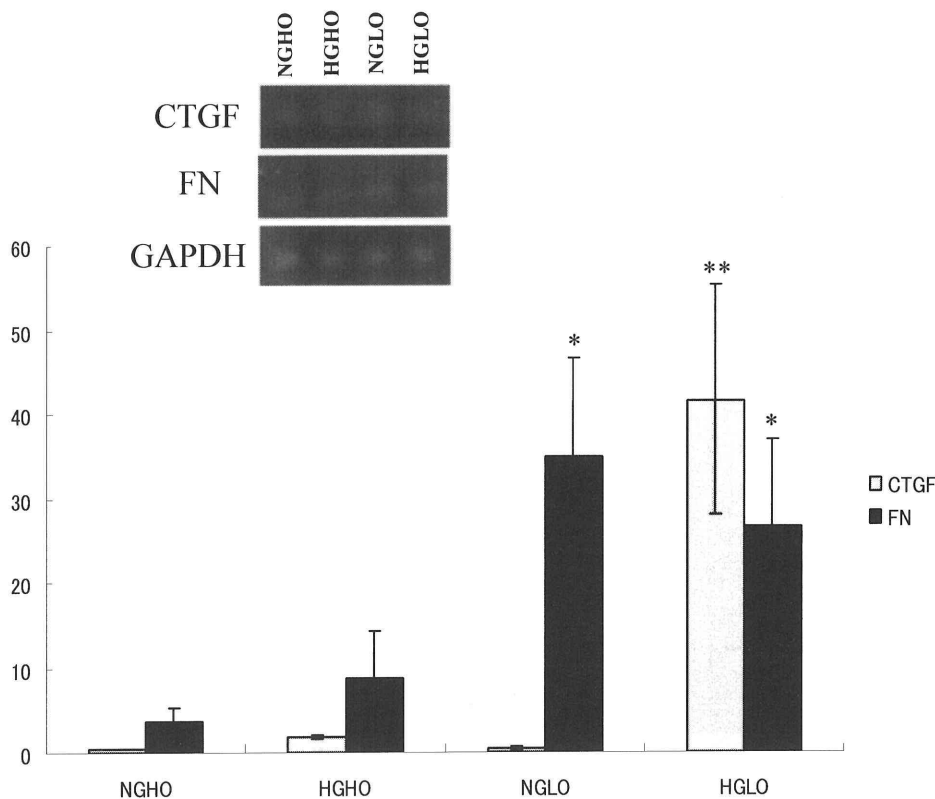


Fig. 5 Quantification of mRNA expression of CTGF and FN in LLC-PK1 by Taqman real time PCR under several conditions.

た組織由来の細胞の場合、生存及び増殖するためには何かに付着する必要があるという付着依存性がある。そのため開発された培養担体を RFB に応用することとした。この培養担体の違いによって細胞の培養状態が変化するので、種々の研究に対応するためハイドロキシアパタイトビーズ、シランビーズ、セルロースビーズ、マイクロキャリアビーズ等の培養担体を一通り取り揃えた。どの担体も多孔質で大きな表面積を生み出す構造を取っているため、高密度培養が可能となる。ハイドロキシアパタイトビーズは生体適合性が優れており、将来生体への応用や再生医療への応用を考えた場合有用である。シランビーズは細胞培養の点からは培養時と細胞回収時の簡便さから使用しやすい担体である。しかしこの両者は硬度が大きく、透過型電子顕微鏡で観察が不可である。その点セルロースビーズは可能であるが、培養条件や生体適合の点から前者に劣る。そこで我々はマイクロキャリアビーズに着目した。これは内部空隙率が90%以上で1gあたりの体積は45ml程度まで上がる。また細胞の付着性を良くするために、アミノ基を導入し正荷電を持たせている。この担体を用いて通常の培養状態でも 1.5×10^7 cells/mlまで培養することが可能であった。これは生体適合、細胞培養への適合、走査型透過型両者の電子顕微鏡で観察可能といった点で有用な担体であり、細胞の形態など基礎検討の際使用することにした。岩堀らは、このRFBシステムを用いた肝細胞の高密度3次元灌流培養により、CYP3A4の発現が単層培養に比べて最大100倍以上誘導され、転写レベルから調節されていることを報告した。そして、新規薬剤のヒトにおける薬物動態を臨床治験の前にシミュレーションできるモデルとして有用であることを示唆した⁶⁾。

一方、腎臓の硬化・繊維化に、細胞外マトリックスが関与していることは良く知られた事実である。特に近年、近位尿細管細胞の硬化に、CTGFが関与していること⁵⁾、FNも腎硬化に関与していることが判明している⁶⁾。糖尿病性腎症においてもこれら細胞外マトリックスが関与しており、単に血糖値が高いことのみが腎症進行に関与するわけではない。我々は、このRFBシステムの生体に近い環境を作り出す特徴に着目し、糖尿病性腎症病態解析モデルとして有用かどうか検討した。

そこで我々はブタ近位尿細管細胞を高密度3次元

培養し、糖濃度の違いと酸素濃度の違いによる細胞機能変化を確認した。その結果、高糖濃度低酸素状態でフィブロネクチンやCTGFの遺伝子と蛋白発現の上昇が確認され、糖尿病においては低酸素が並存することが病態進行に重要であることが示唆された。

今後は、この疾患発症に近いモデルが構築されたので、アンジオテンシン酵素阻害剤など各種対処の効果を検討していく予定である。

文 献

- 1) 日本透析医学会: わが国の慢性透析療法の現況。2003年12月31日現在。
- 2) Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, He DE, Shang TA, Whisennand HH, Kelly JH: Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* **16**: 60-65, 1992
- 3) Sussman NL, Kelly JH. Improvement liver function following treatment with an extracorporeal liver device. *ASAIO Trans* **17**: 27-30, 1993
- 4) Kawada M, Nagamori S, Aizaki H, Fukaya K, Niiya M, Matsuura T, Sujino H, Hasumura S, Yashida H, Mizutani S, Ikenaga H: Massive culture of human liver cancer cells in a newly developed radial flow bioreactor system: ultrafine structure of functionally enhanced hepatocarcinoma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **34**: 109-115, 1998
- 5) Nagamori S, Hasumura S, Matsuura T, Aizaki H, Kawada M. Developments in Bioartificial Liver Research: Concept, Function and Application. *J Gastroenterology* **35**: 493-503, 2000
- 6) Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T: CYP3A4 inducible model for *In Vitro* analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology* **37**: 665-673, 2003
- 7) 小田裕昭: 肝臓特異的遺伝子発現の調節機構とその制御。 *J Exp & Applied Cell Culture Research* **18**: 203-219, 1999
- 8) Kobayashi T, Inoue T, Okada H, Kikuta T, Kanno Y, Nishida T, Takigawa M, Sugaya T, Suzuki H: Connective tissue growth factor mediates the profibrotic effects of transforming growth factor-beta produced by tubular epithelial cells in response to high glucose. *Clin Exp Nephrol* **9**: 114-121, 2005
- 9) Skill NJ, Johnson TS, Coutts IG, Saint RE, Fisher M, Huang L, El Nahas AM, Collighan RJ, Griffin M: Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. *J Biol Chem* **279**: 47754-47762, 2004

In vitro analytic model of diabetes mellitus glomerulonephropathy using a bioartificial column

Yoshimaro JOHJIMA, Tohru IWAHORI, Yu KIHARA
Kentaro KUZUOKA, Shinichiro TAIRA, Osamu KONNNO
Isao AKASHI, Yuhki NAKAMURA, Kohichirou HAMA
Hitoshi IWAMOTO, Tatsuto ASHIZAWA, Naoto MATSUNO
Takeshi NAGAO

Fifth Department of Surgery, Tokyo Medical University

Abstract

We established an *in vitro* analytic model for diabetes mellitus glomerulonephropathy (DMGN) using a radial flow bioreactor (RFB). The RFB, which is a carrier-filled type bioreactor, was used for 3-dimensional perfusion culture of LLC-PK1, which is porcine proximal renal tubular cell line. We succeeded in culturing LLC-PK1 in the RFB for 14 days. Immunofluorescence assay demonstrated enhancement of staining for not only FN (fibronectin) but also CTGF (connective tissue growth factor), which is extracellular matrix (ECM), under conditions of high glucose levels and low oxygenation, but enhancement was not attained under conditions of high glucose level alone. These results suggested that the presence of both high glucose levels and low oxygenation are important environmental of conditions in the development of DMGN.

〈Key words〉 Radial Flow Bioreactor, CTGF, FN
