気道上皮細胞の分化増殖と高分子糖タンパク分泌 — In vitro における粘液分泌の新しい評価法 —

磯浜洋一郎, 宮田 健

気道防御の最前線は気道粘膜上皮に存在する線毛細胞、杯細胞および粘膜下の粘膜下腺から分泌される粘液であり、粘液の物理化学的性状の変化が線毛運動による輸送効率—粘液線毛クリアランス—を大きく左右している。一方、肺泡Ⅱ型上皮細胞やクララ細胞などから分泌される肺表面活性物質 (pulmonary surfactant) も気道クリアランスに極めて重要な役割を果たしている(1~5)。気道の炎症時には上皮組織の傷害、線毛運動の抑制、粘液分泌の亢進などが認められ、気管支喘息においてもこの気道炎症に基づく気道過敏症が主症状の一つとなっている(6)。

気道粘液そのものの生理学的および病態生理学的意義、粘液の産生・貯蔵・分泌機構、さらには病態時にみられる異常分泌の機構などについては研究が遅れているが、特に、気道炎症時に増殖する杯細胞の粘液分泌機構についてはほとんど不明である。この主な理由は杯細胞が正常時にほとんど存在せず、これを単離、培養することが困難であった点にある。最近、我々は前駆細胞の基底細胞が粘液産生細胞に分化する培養条件を確立し、この細胞を用いた気道粘液様高分子糖タンパク分泌機構や電気生理学的特性についての研究を進めている(7, 8)。

本稿ではこの細胞の単離培養法と薬理学への応用について述べる。

原理

本来、気道粘液に関する検討を行うためには気道上皮から粘液分泌細胞を直接単離・培養することが in vivo に近い成績を得るためにも望ましい。しかし、杯細胞は病態時においてのみ増殖し正常時にはほとんど存在せず、

高純度の杯細胞を得ることは極めて困難である。気道上皮細胞のうち線毛細胞や杯細胞のような分化した機能をもつ細胞は一般に増殖能を持たず、これらの細胞の前駆細胞である基底細胞のみが増殖する。本法はこの性質を利用し、まず気道上皮の細胞を基質特異性の低いプロテアーゼ、サーモライシンを用いて可及的に全て分散し、継代培養することで高純度の基底細胞のカルチャーを形成させる。次いで、得られた高純度の基底細胞をコラーゲンゲル上で培養することによって杯細胞様の粘液分泌細胞へと分化させるという新規の発想に基づくものである。実験動物として用いたハムスターの気道の基底細胞は正常細胞として継代培養が可能で、本法の応用に適している。

1. ハムスター気道上皮細胞単離法

ハムスター気道上皮細胞のなかで基底細胞だけを直接単離・精製することは密度勾配精製法などの手法を用いることで可能ではあるが、得られる細胞数は少ない。継代培養を行うことにより高純度の基底細胞のカルチャーを得ることができるので、ここでは Goldman ら(9)の方法を基に気道上皮の細胞を可及的に全て単離する方法を示す。したがって、細胞間の接着に関わる物質の特定ができないために、細胞分散のための酵素には比較的基質特異性の低いサーモライシンを用いる。摘出した気管をリング状に切断後、室温 (20~25℃)、15分間のサーモライシン処理→遠心分離を繰り返すことで、酵素処理による細胞のダメージを少なくし、しかも得られる総細胞数を増やすことができる。この酵素処理→遠心分離のサイクルは我々の成績では5回が適当であり、4回以下では得られる総細胞数が少なく、また、6回以上では上皮下の線維芽細胞や結合組織の混在が目立つようになる。全ての操作はできるかぎり無菌的に行い (我々はクリーンベンチ内で全操作を行っている)、また気道上皮の損

傷を避けるため気管の摘出や、摘出した気管を扱う際にはできるだけ丁寧に行う。

●準備

実験動物

- ・ハムスター；シリアンゴールデン系，雄性，6週齢，クリーン。

酵素溶液および緩衝液

- ・リン酸緩衝生理的食塩液 (Ca^{2+} ， Mg^{2+} フリー) (PBS(-)，pH 7.3)；(ニッスイ社など，オートクレープで滅菌して用いる。
- ・サーモライシン溶液；サーモライシン (8080U/ml，Calbiochem 社) を 0.1 M Tris，0.002 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 8.0) に 0.01% となるように溶かした溶液を冷凍保存する。これを用時，PBS(-) で 16 倍希釈して用いる (最終 pH 7.5 - 7.6)。
- ・3 % BSA 含有 PBS(-)；3 % ウシ血清アルブミン (BSA)，1.8 mg/ml グルコース，1 μM ethylenediaminetetraacetic acid・disodium salt (EDTA) を PBS(-) で調製する。

培養液

- ・Ham's F-12 培地 (pH 7.3)；GIBCO 社，0.2 μm のフィルターで濾過滅菌して用いる。
- ・ウシ胎仔血清 (FBS)；必ずロットチェックを行い，細胞の接着，増殖の良好なものを選ぶ。
- ・抗生物質；最終濃度として 100 units/ml ペニシリン G，100 μg /ml ストレプトマイシン，5 μg /ml アムホテリシン B (全て Sigma 社) となるように調製し培養液に添加する。

その他の器具類

- ・10 ml ガラス製三角フラスコ；細胞が付着しないように dichlorodimethylsilane (Sigma 社) などでシリコン処理して用いる。
- ・実体顕微鏡；倍率 40 倍程度のものがよい。
- ・低速用小型マグネティックスターラー；1 cm のスターラーバーを用いる。
- ・炭酸ガス培養器；5 % CO_2 ，95 % 空気，37℃ に調整する。
- ・その他；遠心管，プラスチック培養皿およびピペット類は全てディスポーザルのもの (Falcon 社など) もしくは滅菌処理を施したものを用いる。

●操作手順

1) 気管の摘出

ハムスターをペントバルビタール (25 mg/kg, i.p.)

で麻酔後，全身を 70% エタノールを含ませた脱脂綿で拭いて消毒し，開腹，下大動脈より脱血，致死させる。気管を喉頭部から気管支分岐部まで切断，摘出し，滅菌 PBS(-) 中で洗浄しながら結合組織を除去する。

2) 酵素処理

細胞分散のための酵素が十分作用するように，メスの刃を用いて実体顕微鏡下，摘出した気管の輪状軟骨間を横切り幅約 1 mm のリング状とする。リング状の気管を 0.0006% のサーモライシン溶液 (ハムスター 1 匹分の気管当たり 1 ml) の入った滅菌フラスコに移し，20 - 25℃ 下，15 分間マグネティックスターラー上で穏やかに攪拌する。この際，回転数約 100 rpm として攪拌の効率を上げるためにスターラーバーがフラスコの内壁に軽くぶつかるようにする。

3) 遠心分離

上記酵素処理によって得られた細胞懸濁液を滅菌ピペットを使って 3 % BSA を含む PBS(-) 5 ml の入った 15 ml の遠心管に移す。細胞懸濁液は PBS(-) の上に静かに重層し，遠心 (450×g，5 分，4℃) によって細胞を集める。サーモライシン溶液の上清は遠心後回収し，再利用するのでこのときに決して下層と混ざらないように注意する。この際，あらかじめ 1 ml 程度の酵素溶液を重層しておくといよい。

4) 再酵素処理

細胞の収量を上げるために上記酵素処理に用いたリング状気管切片を再度，酵素処理する。上記遠心分離に用いた遠心管からサーモライシン溶液の上清を回収し，フラスコに戻し，再びリング状気管を 20 - 25℃，15 分間攪拌する。

5) 培養法

この攪拌→遠心の操作を計 5 回繰返し行い，最終的に遠心管の底部に沈んだ細胞を 1 % BSA を含む PBS(-) にて洗浄後，細胞数を血球計算盤上で数える。得られた気道上皮細胞は 10% FBS および抗生物質を含む Ham's F-12 培地に 1.0×10^5 個/ml となるように懸濁し，24 穴プラスチック培養皿に 1 ml/well ずつ分注し，炭酸ガス培養器中で静置培養する。

図 1 に単離法の概略を示した。本法によってハムスター 1 匹当たり $1.0 - 1.5 \times 10^5$ 個の上皮細胞が得られる。

6) 細胞生死判別法

単離した気道上皮細胞の生死判別にはトリパンブルー染色法を用いる。0.3% のトリパンブルー溶液 (GIBCO 社など) に細胞懸濁液を等容量混合し，血球計算盤上に

Fig. 1 Procedure for isolation of hamster tracheal epithelial cells.

で判別する。死細胞は青染される。本単離法によって得られる気道上皮細胞の生存率は90–95%である。

2. 継代培養およびコラーゲンゲル培養法

上記単離法によって単離し、初代培養した気道上皮細胞には線毛細胞や結合組織などの混在が認められる。しかし、これら混在する細胞は増殖能をもたず、基底細胞だけが増殖する。したがって、単離・初代培養した気道上皮細胞を継代培養することで高純度の基底細胞を数多く得ることができる。さらに、この培養基底細胞はコラーゲンゲル上に培養することによって杯細胞様の粘液分泌細胞へと分化させることができる。

継代培養は回数を重ねるほど細胞数は多く得られるが、4代目ないし5代目の培養では、明らかに形態の異なる巨大化した細胞の出現が認められるようになる。したがって、高純度の基底細胞を数多く得られる3代目細胞をコラーゲンゲルで培養し薬理学的評価に用いる。

●準備

- Ham's F-12培養；初代培養と同様に10% FBS および抗生物質を含む培養液を用いる。
- トリプシン溶液；0.25%トリプシン（GIBCO 社）、1 mM EDTA をPBS(–)に溶かし、0.2 μ m のフィルターで濾過滅菌して用いる。
- コラーゲンゲルコート培養皿；水中で、ブタ腱由来のI型コラーゲン溶液（新田ゼラチン社など）8容量に10倍濃度のHam's F-12培地1容量を加えよく混合し、再構成緩衝液（2.2% NaHCO_3 ，200 mM HEPES, 0.05N NaOH）を少しずつ加えpH 7.4に調製する。このコラーゲンゲル混合溶液を24穴培養皿に0.5 ml/well ずつ分注し、5% CO_2 ，37℃下30分加温してゲル化させて用いる。

●操作手順

1) 継代培養

前述の単離培養法によって4日間初代培養し、サブ・コンフルエント状態の気道上皮細胞の細胞表面をPBS(–) 1 ml/well にて2回洗浄後、上清を捨て、トリプシン

溶液50 μ l/well を加える。培養皿を静かに傾けてトリプシン溶液が培養皿の底部に十分に広がるようにし、温室で10-30秒間インキュベートする。このとき培養皿底部に付着していた細胞が浮き上がるのが肉眼でもわかるが、細胞が球形になっているのを顕微鏡下確認し、10% FBS を含む Ham's F-12培地 (1 ml/well) を加えトリプシンを不活性化する。その後、遠心操作 (400 $\times$ g, 5 分, 4 $^{\circ}$ C) によって細胞を集め、血球計算盤上で細胞数を数え、10% FBS および抗生物質を含む Ham's F-12培地に 1.0×10^5 個/ml となるように懸濁し、24穴培養皿に1 ml/well ずつ分注し初代培養と同様に炭酸ガス培養器内で再度培養する。

2) コラーゲンゲル上での培養

上記継代培養法と同様の方法で2代目気道上皮細胞をトリプシン溶液を用いて剥がし、細胞懸濁液 (1.0×10^6 個/ml) を調整し、コラーゲンゲルコート培養皿に1 ml/well ずつ分注して、炭酸ガス培養器内で培養する。

3) 細胞の保存

細胞は原則として単離・継代培養後直ちに分泌実験に

用いる。長期の保存は得られる細胞数が少なくなるばかりではなく、反応性の低下を引き起こす可能性がある。保存が必要な場合は、2代目まで継代培養した細胞をトリプシン溶液で剥がし、遠心にて集め、10% DMSO を含む FBS 懸濁し溶体窒素中で凍結、 -80° Cで保存する。この保存法で少なくとも約2 ヶ月は保存が可能であるが、保存した細胞は必ずトリパンブルー染色によって生存率を確認する必要がある。

3. 高分子糖タンパク分泌の評価法

3代目気道上皮細胞はコラーゲンゲル上で培養すると杯細胞様の粘液分泌細胞へと分化し (図2), プラスチック上で培養したときに比べ高分子分泌物の量が著明に増加する (図3)。この高分子分泌物は、ウシ睾丸由来のヒアルロニダーゼ抵抗性を示し、弱アルカリによって加水分解され、気道内腔に分泌される粘液の糖タンパク質 (high molecular glycoprotein ; HMGP) と同様の性質を有している。

ここでは、HMGP の放射性前駆物質として [14 C]-

Fig. 2 Photomicrographs of cultured hamster tracheal epithelial cells. Phase contrast micrograph of confluent culture of 1st subcultured tracheal epithelial cells (A, magnification: $\times 100$). Periodic acid-Schiff staining of 2nd subcultured tracheal epithelial cells on collagen gel (B, magnification: $\times 500$). Aliquots of cells were smeared on a slide glass and fixed with methanol.

glucosamine を用いて分泌物を標識し、分子ふるいクロマトにより高分子分画を分離、検出する方法について記す。本法は HMGP を正確にしかも高感度で検出できる点で優れている。

●準備

気道上皮細胞；上記方法によって3代目にコラーゲンゲル上で培養し、粘液分泌細胞へと分化させたものを用いる。

試薬類

- $[^{14}\text{C}]$ -glucosamine hydrochloride ; Amersham 社, 1.85-2.2 GBq/mmol のものを用いる。
- 乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性測定 ; LDH assay kit (日本商事) を用いる。
- Sepharose CL-4B カラム ; 直径 1 cm, 高さ 15 cm のガラス製カラムに高さ 10 cm 程度 Sepharose CL-4B (Pharmacia 社) を充填したものを用いる。移動相には 6 M 尿素を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いる。

●実験操作

1) 高分子糖タンパクの標識

3代目気道上皮細胞をコラーゲンゲルコートした24穴培養皿を用いて2日間培養しサブ・コンフルエント状態のときに、培養上清を除去し Ham's F-12 培地 (FBS, 抗生物質を含まない) 1 ml で2回細胞表面を洗浄する。次いで, $[^{14}\text{C}]$ -glucosamine 370 kBq/ml, 10% FBS および抗生物質を含む Ham's F-12 培地を 1 ml 加え 24 時間炭酸ガス培養器内で培養し、放射性物質を取り込ませ HMGP を標識する。

2) 粘液分泌の評価

24時間後の細胞から培養上清を除去し、37℃に加温しておいた Ham's F-12 培地 1 ml で細胞表面を洗浄後、新たに 200 μl の F-12 培地を加え 2 時間培養する。この 2 時間培養上清を pre-treatment period として回収する。

続いて、新たに 200 μl の F-12 培地を加え、薬物を 10 μl 添加し、さらに 30 分間培養する。この 30 分間の培養上清を treatment period として回収する。

回収した培養上清試料はそれぞれ、400 $\times$ g, 5 分, 4℃ の遠心によって浮遊細胞を除去し、各試料のうち 100 μl を Sepharose CL-4B カラムクロマトに供し分子量 100

Fig. 3 Sepharose CL-4B chromatography of $[^{14}\text{C}]$ -glucosamine-labeled glycoconjugates secreted from 2nd subcultured tracheal epithelial cells. Second subcultured tracheal epithelial cells were cultured on a plastic plate (A) or on collagen gel (B): 24-hr cultured media were concentrated and applied to the column chromatography.

万以上の高分子分画を分取，液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定する。

分泌に対する薬物の作用は，次式の様に薬物添加前後の分泌量の比で評価する。

$$\text{secretion ratio} = \frac{\text{dpm}_{\text{treatment period}}}{\text{dpm}_{\text{pre-treatment period}}}$$

3) 細胞傷害性の判定

分泌に及ぼす作用が細胞毒性によるものでないことを確認するために，培養上清中の LDH 活性を必ず測定しておく。LDH assay kit の基質呈色試薬 100 μl ，0.1N HCl 1 ml に対し，各培養上清試料 50 μl を用いる。コントロール群と比較し LDH 活性の有意な上昇がない場合は細胞傷害性はないものと判断する。

本評価法を用いたプロテインキナーゼ C (PKC) 賦活薬 phorbol myristate acetate (PMA) の濃度反応曲線を図 4 A に示した。PMA は 0.1 から 10 nM の範囲において濃度依存的に HMGP 分泌を促進し，また，同じく PKC 賦活薬である 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) も 200 μM の濃度で分泌を促進し，これら両薬物の作用は PKC 阻害薬 sphingosine 1 μM によってほぼ完全に抑制される (図 4 B)。

4. あとがき

杯細胞からの粘液分泌は亜硫酸ガスのような刺激性物質や気道炎症時に遊離される種々のプロテアーゼによって促進されることが報告されている(10, 11)。気道上皮細胞からの HMGP 分泌についても，初代培養細胞を用いた Kim らの研究により培養液の pH の上昇あるいは下降，低浸透圧および好中球由来のプロテアーゼなどによって促進されること(12, 13)。また，最近では ATP がプリン作動性の P_2 受容体を介して分泌を促進することが報告されている(14)。しかし，これらの分泌調節のメカニズムはほとんど不明のまま残されている。

本稿に紹介した粘液分泌細胞モデルによって，これまでの組織培養法(15)では解明できなかった気道炎症時の粘液分泌に関する細胞レベルでの新知見が得られるようになった。無血清培養法の確立など，今後さらに検討すべき課題も多いが，本細胞モデルは電気生理学的手法(7, 16)を用いたイオン動態の解明や，免疫化学的手法(17)あるいは分子生物学的手法(18)を用いた気道上皮細胞の分化・増殖機構の解明に応用可能であるばかりではなく，新規気道クリアランス改善薬の開発に際しても重要

Fig. 4 Effects of protein kinase C activators on high molecular weight glycoconjugates secretion from cultured tracheal epithelial cells. Concentration response curve for phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (A). Second subcultured tracheal epithelial cells were incubated with PMA for 30 min. Effects of sphingosine on PMA- or 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)-induced secretion (B). Second subcultured tracheal epithelial cells were incubated with PMA or OAG for 30 min. Sphingosine was added 10 min prior to the addition of PMA or OAG. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments. *: Significantly different ($P < 0.05$) vs. control (Duncan's multiple range test).

な基礎データを提供してくれるツールとして期待できる。

文 献

- 1) 宮田 健, 甲斐広文, 高木一範, 小田嘉明, 磯浜洋一郎, 高浜和夫: 気道分泌の生化学的薬理. 呼吸 **11**, 354~367 (1992)
- 2) Oda, Y., Isohama, Y., Kai, H., Takahama, K. and Miyata, T.: Increased production and/or secretion of pulmonary surfactant in sulfur dioxide exposure. *J. Pharmacobiodyn.* **12**, 726~730 (1989)
- 3) Oda, Y., Isohama, Y., Kai, H., Takahama, K. and Miyata, T.: Stimulation of pulmonary surfactant secretion by activating neutrophils in rat type II pneumocytes culture. *Life Sci.* **49**, 803~811 (1991)
- 4) Kai, H., Isohama, Y., Takaki, K., Oda, Y., Murahara, K., Takahama, K. and Miyata, T.: Both β_1 - and β_2 -adrenoceptors are involved in mediating phosphatidylcholine secretion in rat type II pneumocyte cultures. *Eur. J. Pharmacol.* **212**, 101~103 (1992)
- 5) Isohama, Y., Takahama, K., Kai, H. and Miyata, T.: Cross-talk between β -adrenergic and other signal transduction pathways in pulmonary surfactant secretion from cultured alveolar type II cells. *Japan. J. Pharmacol.* **61**, Supp. 82P (1993)
- 6) Basbaum, C.: Cellular mechanism of airway secretion. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 479~485 (1989)
- 7) 高浜和夫, 甲斐広文, 岡 正浩, 吉武和久, 濱村一郎, 磯浜洋一郎, 宮田 健: 培養気道上皮細胞の粘液糖蛋白分泌能と電気生理学的性質. 第20回薬物活性シンポジウム講演要旨集, 20~27 (1992)
- 8) Kai, H., Yoshitake, K., Hamamura, I., Isohama, Y., Takahama, K. and Miyata, T.: Mucins secretion from differentiated cultured hamster tracheal epithelial cells are mediated by protein kinase C activation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, A437 (1993)
- 9) Goldman, W. and Baseman, J.: Selective isolation and culture of a proliferating epithelial cell population from the hamster trachea. *In Vitro* **16**, 313~319 (1980)
- 10) Jones, R., Boldue, P. and Reid, L.: Goblet cell glycoprotein and tracheal gland hypertrophy in rat airway, the effect of tobacco smoke with or without the anti-inflammatory agent, phenylmethoxyloxadazole. *Br. J. Exp. Pathol.* **54**, 229~239 (1973)
- 11) Spicer, S.S., Charkin, L.W. and Wardell, J.R.Jr.: Effect of chronic sulfur dioxide inhalation on the carbohydrate histochemistry and histology of the canine respiratory tract. *Am. Rev. Respir. Dis.* **110**, 13~24 (1974)
- 12) Kim, K.C., Wasano, K., Niles, R.M., Schuster, J.E., Stone, P.J. and Brody, J.S.: Human neutrophil elastase release cell surface mucins from primary cultures of hamster tracheal epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 9303~9308 (1987)
- 13) Kim, K.C., Nassiri, J. and Brody, J.S.: Mechanisms of airway goblet cell mucin release, studies with cultured tracheal surface epithelial cells. *Am. J. Res. Cell. Mol. Biol.* **1**, 137~143 (1989)
- 14) Kim, K.C. and Lee, B.C.: P_2 purinoceptor regulation of mucin release by airway goblet cells in primary culture. *Br. J. Pharmacol.* **103**, 1057~1066 (1991)
- 15) Kai, H., Kimoto, A., Yoshitake, K., Matsumoto, S., Isohama, Y., Takahama, K. and Miyata, T.: Removal of extracellular Mg^{2+} suppresses sulfation of glycoconjugates secreted from rabbit trachea in culture. *Japan. J. Pharmacol.* **60**, 247~252 (1992)
- 16) 高浜和夫, 渡島 広, 甲斐広文, 宮田 健: 肺胞II型上皮細胞と電位依存性外向き電流. 呼吸 **10**, 85~100 (1991)
- 17) Hamamura, I., Yoshitake, K., Isohama, Y., Kai, H., Takahama, K., Miyata, T., Nakano, N., Moriyasu, M., Ichii, M. and Ichiki, T.: Preparation of monoclonal antibodies against airway mucins obtained from broncho alveolar lavage fluid of bronchitic hamsters. *Japan. J. Pharmacol.* **61**, Supp. 81P (1993)
- 18) Jany, B. and Basbaum, C.B.: Modification of mucin gene expression in airway disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, S38~S41 (1991)