

インターセルを用いた NHEK (NB) との共培養による NHEM (NB) の増殖への影響

1. 目的

メラノサイトをケラチノサイトと共培養することによってメラノサイトの増殖性の変化を調べる。インターセル TP を使用することで両細胞は非接触状態で培養することが可能となり、両細胞における液性因子のみの影響を調べることができる。さらに共培養用培地への KGF 添加によってメラノサイトの増殖性がどのような影響を受けるかを調べる。

2. 材料と方法

細胞 : NHEM-HP(NB)-4' (新生児包皮由来) (Cat No. KM-4302, Strain No. 04550)
NHEK(NB)(新生児包皮由来) (Cat No. KK-4009, Strain No. 10023)

培地 : ①メラノサイト前培養用増殖培地: DermaLife M Comp kit (Cat No. LMC-LL0027)
②ケラチノサイト前培養用増殖培地: Humedia-KG2 (Cat No. KK-2150S)
③共培養用培地: 培地①と培地②の混合培地
④上記培地③に KGF (FGF-7) を各種濃度 (0, 1, 10ng/ml) 含む培地

共培養用培養器

: インターセル TP (透視タイプ、24 穴マルチプレート用、膜孔径 0.45µm)

培地①および②を使ってメラノサイトおよびケラチノサイトをそれぞれ前培養し、各細胞をトリプシン処理によって回収した。回収したメラノサイトは 24 穴マルチプレートに 20,000 個 (700µl) / ウェルで播種、ケラチノサイトはコラーゲン I-A をコートしたインターセル TP に 15,000 個 (200µl) / インターセルで播種した。播種翌日にメラノサイトが播種された 24 穴マルチプレートにケラチノサイトを播種したインターセル TP を配置し (Fig.1)、ウェルおよびインターセルの培地を培地④で培地交換した。その後培地交換は 1 または 2 日おきに行い、3 日目および 7 日目にメラノサイトの様子を写真撮影するとともに、細胞の増殖性を確認した。

細胞の増殖性の確認には、Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 同仁化学) を使用した。マルチプレート内の培地を除き、CCK-8 原液を培地④で 10 倍に希釈した溶液を 700µl / ウェルで添加、37°C で 2 時間インキュベート後、マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定し、各条件での増殖性を比較した。

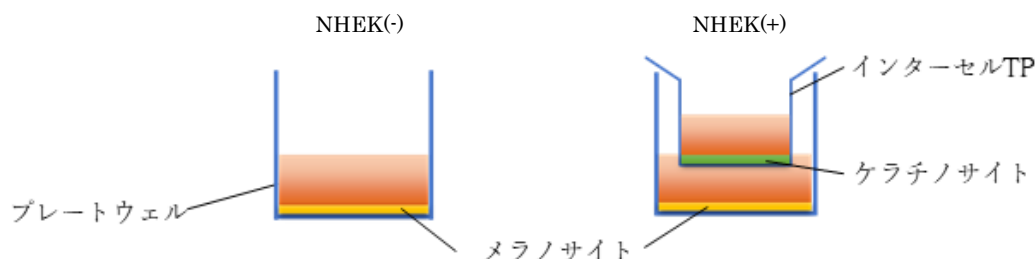


Fig. 1 共培養の模式図

プレートウェル内にメラノサイト (黄色) を播種し、インターセル TP 内にケラチノサイト (緑色) を播種して共培養した。KGF はインターセル内およびプレートウェル内の培地に添加した。

3. 結果

メラノサイトとケラチノサイトを共培養して3日目および7日目のいずれにおいても、メラノサイトはケラチノサイトと共培養することでその増殖が促進されることが確認された。

また3日目と7日目のメラノサイトの増殖性を測定したところ、7日目において KGF 濃度依存的にメラノサイトの増殖性は促進された。(Fig.2)。

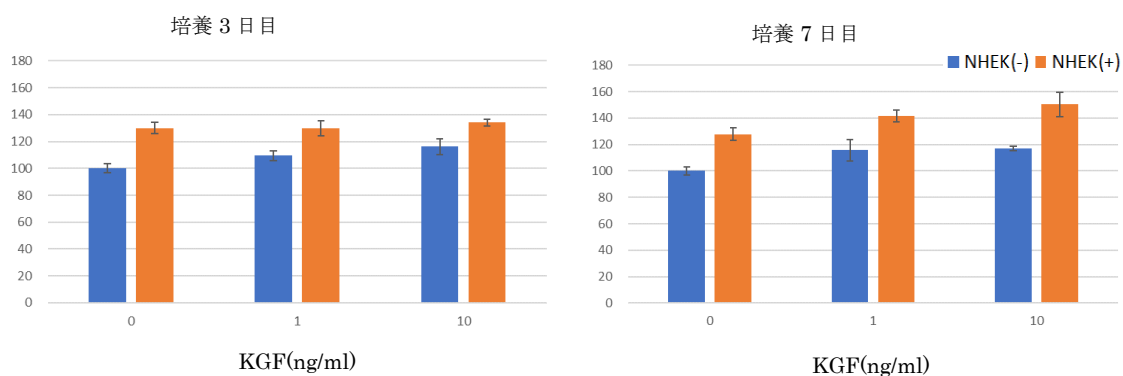
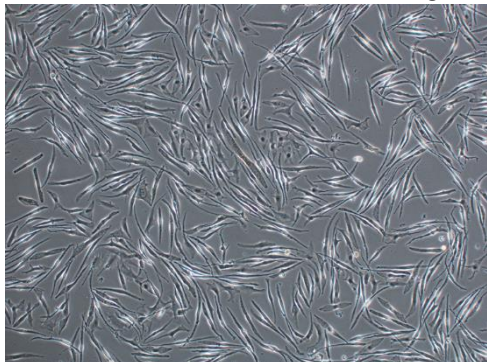


Fig. 2 メラノサイトの増殖性

培養3日目および7日目の生細胞数を CCK-8 アッセイで評価した。各培養日数のケラチノサイト単独、かつ KGF 無添加の場合を 100 とした。

① 培養7日目、NHEK なし、KGF (0ng/ml)



② 培養7日目、NHEK あり、KGF (10ng/ml)

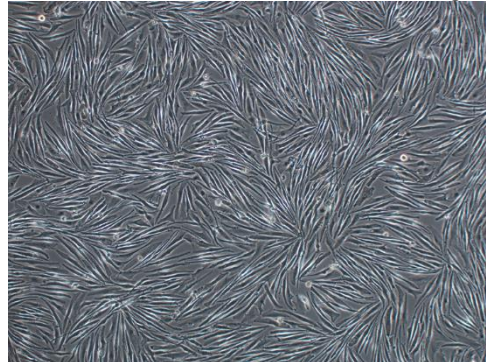


Fig. 3 メラノサイトの顕微鏡画像

培養7日目において NHEK との共培養および KGF (10ng/ml) 添加によって、メラノサイトは増殖が促進され密集した培養状態が確認された(写真②)。