

RSMG-1、RSMG-2 細胞の培養法

古江美保
2005年12月1日

RSMG-1、RSMG-2 は JCRB 細胞バンクに寄託し、現在公開準備中。公開作業が完了すると JCRB 細胞バンクホームページ上で検索可能になり、HSRRB から購入できるようになる (<http://cellbank.nibio.go.jp/>)。2006年1-2月公開をメドにしている。

1. 培養を始める前に

RSMG 細胞の培養は、一般に行われている方法とかなり違う点があるので、十分に注意をして培養する必要がある。すべての実験器具類は、ディスポーザブルなものを使用し、洗剤を使って洗った器具類は使わないこと。ディッシュはコラーゲンコートしたものを使用するが市販のコラーゲンコート製品は使用せず、実験者が使用に先立って自分でコラーゲンコートして使用する。これはかなりクリティカルなポイントである。

2. 培養の準備

培地は MCDB153 (機能性ペプチド研究所) を使用する。
 Type IA コラーゲン (Cell matrix Type IA、新田ゼラチン)
 ウシインシュリン (シグマ I6634 あるいは、I1882。予算に余裕があれば、ready to use の I0516 でも良いが、その場合は濃度に注意。ここでは、I6634 か 1882 を使用。)
 ヒトトランスフェリン (シグマ T1147 100mg)
 2 -メルカプトエタノール (シグマ M7522)
 2 -エタノールアミン (シグマ E 0135)
 培養用・亜セレン酸ナトリウム (シグマ S9133) (下記参照)
 トリプシン・EDTA
 Soybean トリプシンインヒビター (Sigma T6522)
 FGF - 1 (UBI)

3. 基礎培地

MCDB153 培地 (液体培地・機能性ペプチド研究所)

培地組成について、組成表をみて、次の点を確認する(重要)。

a. 亜セレン酸ナトリウム

亜セレン酸ナトリウムが 0.00172mg/L (10nM)入っていることを確認する。もし、相当量入っていなければ下記のファクターとして不足分を添加する。方法は、ファクター作成を参照のこと。

b. ビルビン酸

0.11g/L ビルビン酸が入っていることを確認する。もし、入っていなければ、培地 500ml あたり 0.055g のビルビン酸を加える。
 方法：10ml の MCDB153 培地を抜き取ってこれに 0.055g のビルビン酸を溶解してフィルター滅菌した後、500ml のボトルに戻す。

c. L-イソロイシン

L-イソロイシン 0.05g を 10ml の MCDB153 培地に溶解してフィルター滅菌をした後、500ml のボトルに戻す。

以上の添加物を追加した特別注文培地は、機能性ペプチド研究所から入手することができる。RSMG 細胞培養用として注文する(バンクが機能性ペプチド研究所と交渉して準備する)。

4. ファクターのストック溶液の作成

(1) x100・インシュリン

ウシ・インシュリン 100mg を 100ml の 4mM HCl に溶解後、0.2 μm フィルターで滅菌。25ml ずつに分注する。1 本のみ 4 度に保存し、残りは-20 度で凍結保存する。

(2) x100・トランスフェリン

ヒト・トランスフェリンは PBS で溶解後、0.2 μm フィルターで滅菌。25ml ずつに分注し、1 本のみ 4 度に保存し、残りはマイナス 20 度にて保存する。ヒト血液からの抽出物のため、念のためバイオハザードとして注意して取り扱う。また、ロット番号などは、必ず、控えて置く。

(3) x100・2ファクターミックスの調整。

準備

- ・1Mメルカプトエタノールの作成（4度遮光保存）
2-メルカプトエタノール 1.4ml をミリ Q 水に溶解（1M）。
- ・1Mエタノールアミンの作成（4度遮光保存）
2-エタノールアミン 1.2ml をミリ Q 水に溶解（1M）。

作成

上記メルカプトエタノール、エタノールアミンを次の容量で 40ml PBS に溶解する。

1M メルカプトエタノール 40 μL

1M エタノールアミン 40 μL

この混合溶液を 0.2 μm フィルターで滅菌して、20ml ずつに分注して 4 度で遮光保存。（メルカプトエタノール、エタノールアミンの原液を分取する際には、手袋を使用し、ドラフト内で行う。）

（基礎培地に亜セレン酸が、相当量含まれていない場合は、このメルカプトエタノール、エタノールアミン溶液に不足分の亜セレン酸(Sigma)を加えて使用する）

5. 細胞の培養（直前準備と培養）

(1) ディッシュのコラーゲンコート

冷やした PBS 20ml にコラーゲンを 0.4ml 加えて、泡立たないように注意しながら十分ピペティングを行ってコラーゲンを溶解する。このコラーゲン溶液を 60mm ディッシュに 1ml 加えて、30 分以上室温に置いてコートする（この作業は前日に行うことも可能だが、その場合は乾燥しないようコラーゲン溶液を 2ml 程度に増量しておく。またディッシュは紫外線にさらされないようアルミ箔などで覆っておく。けして乾燥させてはならない点に注意。市販のコラーゲンコートディッシュは細胞の分化を促したり形態変化を誘導するので利用不可。

(2) MCDB153 +5F+F の作成

完全培地の調整は用事調整を原則とするが、困難な場合は混合後 1 週間程度使用可能であると考えて良い（4 度保存）。問題が起こるようならすぐ用事調整に切り替える。以下培地の作成法。

必要量の MCDB153 培地に、

インシュリンストック 10 μL/ml の割合で添加

トランスフェリンストック 5 μL/ml の割合で添加

2ファクターミックスストックを 10 μL/ml の割合で添加

F G F - 1 を 1ng/ml で添加

使用時まで 4 度で保存する。

(3) 細胞の解凍と培養開始

凍結保存から取り出した細胞は 37 度の温浴ですばやく溶解させるが、完全に溶解する前に、冷たい MCDB153 基礎培地を 10ml 添加して解凍する。

4 度、1200 回転、5 分遠心。

培地吸引

MCDB153 基礎培地 10ml 添加。軽くピペティング。

4 度、1200 回転、5 分遠心。

遠心している間に、60cm ディッシュのコラーゲン溶液を吸引し、PBS を添加。

培地吸引

冷たい MCDB153+5F+F、4ml を添加。

60cm ディッシュの PBS を吸引

細胞浮遊液を 60cm ディッシュに緩やかに入れる。

顕微鏡にて、細胞の表面が光っていることを確認。（生きているかどうかの確認）

37 度、5%CO₂ にて、培養開始。

(4) 培地交換

培地を暖める必要は基本的には無く、室温に戻す程度で良い。どうしても暖める必要がある場合は、必要量のみ分取して暖め、暖め直しは絶対にしてはならない。

細胞の増殖の状態を見ながら、基本的には 2 日ごとに培地を交換する。全交換はせず、0.5ml 程度の培地を残して新しい培地を添加する。

細胞があまり増殖してないと思われる場合は、2 日ごとに 1ml 程度の培地を除いて、1ml 程度の新鮮培地を添加する。

この培地条件はあまり栄養分が豊富では無いので、3 日以上培地交換をしないでいると栄養分が不足する。

(5) 継代

70% 程度のサブコンフルエントになったら、継代する。培養が順調なら 5 日から 7 日に 1 度の継代となる。この細胞は一度コンフルエントになると、分化する特徴があるので継代が難しくなる。また、全体としてはコンフルエントの 50% 程度の状態でも、一部のコロニーが大きくなってシート上にぎっしりと増えているようであれば継代する。その場合は、細胞数に応じて播種するディッシュの数を少なくする。

Soybean トリプシンインヒビターを 0.1% になるように MCDB153 培地にて溶解し（0.1% トリプシンインヒビター）これを 0.2 μm のフィルターで滅菌する。4 度保存。1% に溶解すれば、-20 度保存が可能。

【手順】

60 mm ディッシュをコラーゲンコートする。

氷を準備する。

必要量の MCDB153 基礎培地を氷中に置く。

MCDB153 + 5F + F を必要量作成し、氷中に置く。

0.1% トリプシンインヒビターを氷中に置く。

0.05% トリプシン/0.04% EDTA は、暖めないで、室温で使用する。

培地吸引

PBS 5 ml 添加

吸引

トリプシン EDTA を 1 ml 添加。

室温静置 5 分から 15 分。(RSMG-2 細胞は、RSMG-1 細胞に比べて剥がれにくい)

時々顕微鏡で細胞の状態を確認。

細胞が丸くなったら、ディッシュを軽くたたき、細胞を浮かせる。
 すばやくトリプシンインヒビターを 1 ml 添加
 すばやく冷たい MCD B 1 5 3 培地を 10 ml 添加、軽くピペティングする。
 4 度、1200 回転、5 分遠心
 培地吸引
 冷たい MCD B 1 5 3 培地を 10 ml 添加し、ピペティング
 細胞数計測用に、細胞浮遊液を 0.5 ml 分取。
 4 度、1200 回転、5 分遠心
 培地吸引
 冷たい MCD B 1 5 3 + 5 F + F16 ml に細胞を浮遊させる。
 コラーゲンコートした 60 mm ディッシュ 4 枚に細胞を播種(1:4 のスプリットレイシ
 ョで継代することになる)。
 培養。

(6) 培地交換のタイミング

金曜日に継代した場合は、培地を多めに添加し、月曜日の培地交換で、問題ありま
 せん。その場合は、深いディッシュを使用することを薦めます。が、木曜日に継代
 した場合は、土曜日か、日曜日に培地交換をする。

(7) 細胞分化

この培養条件では、未分化な状態を保つために、そのままでは、分化マーカーなど
 の発現は見られません。分化マーカーの発現や 3 次元での管腔形成させるためには、
 Ca 濃度を高くする必要があります。詳しくは、参考論文を参照してください。

(8) 論文引用

本細胞を使用する際は以下の論文を引用すること。

RSMG-1 cell line について

RefID:5541: Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, H., Sato, J. D., Asashima,
 M., Saito, S. Effects of hepatocyte growth factor (HGF) and activin A on
 the morphogenesis of rat submandibular gland-derived epithelial cells in
 serum-free collagen gel culture. *In Vitro Cellular & Developmental
 Biology* 35 : 131-135 (1999)

RSMG-2 cell line について

RefID:5541: Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, H., Sato, J. D., Asashima,
 M., Saito, S. Effects of hepatocyte growth factor (HGF) and activin A on
 the morphogenesis of rat submandibular gland-derived epithelial cells in
 serum-free collagen gel culture. *In Vitro Cellular & Developmental
 Biology* 35 : 131-135 (1999)

RefID:5544 Furue, M., Asashima, M., Hata, R. Establishment of RSMG-2
 cell line derived from male rat submandibular gland in serum-free
 defined culture. *Tissue Research Communication*. 19: 199-202 (2000)

- Furue, M., Zhang, Y., Okamoto, T., Hata, R., Asashima, M.,
Activin A induces expression of rat sel-11 mRNA, a negative regulator of
Notch signaling, in rat salivary gland-derived epithelial cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications 282, 745-749
(2001)(RefID:5573)
- Furue, M., Asashima, M., Hata, R.
Establishment of RSMG-2 cell line derived from male rat submandibular
gland in serum-free defined culture. Tissue Research Communication. 19:
199-202 (2000)(RefID:5544)
- Furue, M., Okamoto, T., Koshika, S., Asashima, M.
Isoleucine prevents rat salivary gland epithelial cells from apoptosis in
serum-free culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology 36: 287-
289, (2000)(RefID:5542)
- Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, H., Sato, J. D., Asashima, M., Saito, S.
Effects of hepatocyte growth factor (HGF) and activin A on the
morphogenesis of rat submandibular gland-derived epithelial cells in serum-
free collagen gel culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology 35 :
131-135 (1999) (RefID:5541)
- Furue, M., Okamoto, T., Asashima, M.
Effect of TGF- β on morphogenesis in rat salivary gland-derived RSMG-1
cells. Tissue Culture Research Communications 18: 339-343 (1999)
(RefID:5543)
- Furue, M., Saito, S.
Hepatocyte growth factor regulates the expression of activin A-subunit
mRNA in epithelial cells derived from rat submandibular gland.
In Vitro Cellular & Developmental Biology 34: 520-523, (1998)
(RefID:5540)