

2Jp25 肝細胞保存液としての保護剤の検討

○宮本 義孝, 林 衆治
(名大・医)

【背景・目的】細胞・組織を長期間安定に保存するために、最も有効な方法として、凍結保存が挙げられる。しかしながら、細胞の凍結過程における環境の変化に伴い、細胞は大きな障害を受ける。よって、いかに細胞への凍結障害を軽減し、凍結前の機能を維持できるかが重要な課題である。私は、以前の報告で、凍結保護剤として、オリゴ糖類に着目し、凍結保存が難しい肝実質細胞における凍結保護効果と融解後の生存率・接着率の改善について報告した (Miyamoto and Enosawa et al. Cell Transplantation 2006)。しかしながら、凍結前の肝機能を維持できたかと言えば不十分であり、改善の余地が数多く残されている。そこで、本研究では、肝実質細胞保存の鍵となる凍結保存液の組成、特に、凍結保護剤について検証した。その中でも、細胞内浸透性凍結保護剤であるジメチルスルホキシドと非浸透性凍結保護剤として糖類を中心に検討した成果を紹介する。【方法】SD ラットから肝実質細胞を分離した後、各凍結保存液で凍結した。保護剤として、ジメチルスルホキシド、ポリエチレングリコールや糖類を添加した。凍結は低温フリーザーを用い、保存は、液体窒素内に保管した。融解後、肝細胞の生存率をトリパンブルー色素排除能により測定した。また、プラスチック製培養皿上に、融解後の肝細胞を播種し、37℃、5%CO₂下で数日間培養した。24時間培養後、培養皿への肝実質細胞の接着率、及び生存率を評価した。【結果・考察】初代肝実質細胞の凍結保存条件には、浸透性凍結保護剤 (DMSO、ポリエチレングリコール) と非浸透性凍結保護剤の両方を添加した時が、最も有効であることがわかった。融解後の肝実質細胞は、培養皿への生着や形態も良好であった。

Cryopreservation of primary hepatocytes by supplementation of cryoprotectant

○Yoshitaka MIYAMOTO, Shuji HAYASHI
(Grad. Sch. Med., Nagoya Univ)

Key words hepatocyte, preservation, sugar

2Jp27 シアル酸結合レクチンによるマクロファージ IL-10 産生増強機構

庄司 徹, 屠 文杰, 安藤 宗稔, 河合 知明, ○西島 謙一,
飯島 信司
(名大院・工・生物機能)

[目的] 高等細胞の表面は糖鎖に覆われており、分化や活性化など細胞の状態を反映して大きく変化することが知られている。シアル酸は、糖鎖末端に存在し、その負電荷により細胞機能の調節に関わる重要な分子である。哺乳類に存在するシアル酸結合レクチン Siglec は主に免疫細胞に発現しており、LPS などの炎症誘導物質によるマクロファージの炎症活性を抑制することが我々の検討で明らかとなっている。Siglec の炎症抑制活性のうち抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生促進は顕著であり、今回そのメカニズムを解析した。
[方法及び結果] 現在 14 種類知られるヒト Siglec のうち様々な糖鎖と結合可能な Siglec-9 を発現させたマウスマクロファージ様細胞株 RAW264 を用いた。IL-10 の産生は、タンパク質だけでなく、mRNA レベルでも顕著に高められていた。転写調節メカニズムの解析のために IL-10 プロモーターを使ったルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。転写開始点上流 1.5, 1.0, 0.5 kbp を含むコンストラクトはいずれも同等の活性を示したことから、転写開始点近傍 500bp 以内に転写を活性化する領域が存在するものと考えられた。さらに、細かく解析した結果、既知の C/EBP 結合部位近傍とその上流の領域の関与が示唆された。現在さらに解析を進めている。

Mechanism of IL-10 enhancement by sialic acid-binding lectin

Toru SHOJI, Wenjie TU, Munetoshi ANDO, Tomoaki KAWAI,
○Ken-ichi NISHIJIMA, Shinji IJIMA
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words promoter, cytokine, inflammation

2Jp26 複数回の継代操作を行ったヒト軟骨細胞の回転培養による細胞凝集と機能発現

○園井 理恵¹, 山本 進二郎¹, 林 修平¹, 古崎 新太郎²,
塩谷 捨明¹
(¹ 崇城大・生物生命・応生科, ² 関東学院大・工)

【目的】

軟骨細胞は、体外で通常の継代培養を行うと脱分化し、II 型コラーゲンなどの軟骨組織に特徴的な細胞外マトリクスの生産が停止する。軟骨の機能を維持するには、生体内の環境を模倣したゲル培養などの三次元培養が有効であることが知られている。そこで、演者らは、細胞凝集に着目し、複数回継代培養した軟骨細胞に関して、その細胞凝集形成に対する回転操作の影響ならびに機能発現を検討した。

【方法・結果】

液体窒素に保存していた正常ヒト胎児由来の軟骨細胞を、単層状で 6 回継代培養し、細胞接着阻害因子をコートしたディッシュ (8.8 cm²) に 1.0 × 10⁵ cells / mL の細胞密度で 2 mL 播種した。0 ~ 120 rpm の回転数で培養し、細胞凝集を観察した。なお、細胞接着阻害因子無コートのディッシュで単層培養をしたものを対照実験とした。何れも大気圧下、37℃、5%CO₂ インキュベータ内で培養し、7 日毎に培地交換をした。細胞数と細胞機能発現の指標の一つとして、II 型コラーゲンをコードする遺伝子の発現を調べた。90 rpm 以上の回転数では、凝集体形成が見られず、1 週間でほとんどの細胞が死滅した。30, 60 rpm では、細胞凝集が見られ、II 型コラーゲンの発現が観察された。0 rpm (静置培養) でも細胞凝集体が形成され、良好な生細胞数や II 型コラーゲンの発現が観察された。以上の結果から、軟骨組織再生に細胞凝集が重要であることが示された。

Cell aggregation and subsequently of type II collagen expression of serially-subcultured human chondrocytes in rotational culture

○Rie SONOI¹, Shinjiro YAMAMOTO¹, Shuhei HAYASHI¹,
Shintaro HURUSAKI², Suteaki SHIOYA¹
(¹ Dept. Appl. Life Sci., Fac. Biotechnol. & Life Sci., Sojo Univ., ² Inst. Sci-Tech, Kanto-Gakuin Univ.)

Key words cell aggregation, type II collagen, subculture, rotational culture

2Jp28 T細胞における脂質ラフトの動的構造変化と活性化

○白 京玉, 杉田 恵美, 山口 健太郎, 濱田 勉, 高木 昌宏
(北陸先端大・院・マテリアル)

【目的】細胞膜は細胞と外界とを隔てているだけでなく増殖、分化、死滅など極めて重要な生命現象に分裂、出芽 (エンドサイトーシス) など動的な構造変化を介して関わっている。また、その膜構造の動的な構造変化に、膜ミクロドメイン (脂質ラフト) が重要な役割を担っている。しかし、細胞膜上におけるラフトの実態や、信号伝達における役割については、未解明の部分も多い。
本研究では、膜受容体による信号伝達系が良く研究されている免疫 T 細胞白血病株 Jurkat 細胞を用いて、ラフト構造の安定性や膜の動的構造変化と信号伝達に関して解析を行った。
【実験方法および結果】 Jurkat 細胞のラフト可視化は、原形質膜ガングリオシド GM1 の五糖類鎖に結合し、選択的に取り込まれるコレラ毒素サブユニット B (CT-B) の緑色蛍光 Alexa Fluor 488 のコンジュゲートを使用し、共集点レーザー顕微鏡にて観察した。また、Jurkat 細胞を抗原提示細胞の代わりに、蛋白質であるレクチン (ConA) 刺激により活性化させた。その結果、非刺激時に散在した、ラフト領域に相当する蛍光強度が強い領域と弱い領域が、刺激により集積する現象が認められた。現在、さらに 1 細胞レベルでのラフト領域可視化、ラフトの集積と細胞情報伝達 (免疫賦活) に関してさらに検討を加えている。

Dynamics of lipid raft and its importance in activation of T cell

○KeangOk Baek, Emi Sugita, Kentaro Yamaguchi, Tsutomu Hamada,
Masahiro Takagi
(Sch. Mat. Sci., JAIIST)

Key words Lipid rafts, ConA, CT-B, Confocal image