

2Kp12

ヒト間葉系幹細胞の骨格形成変化に伴う分化現象

○圓山 尚¹, 金 美海¹, 紀ノ岡 正博², 田谷 正仁¹, 齋藤 弘弘³, 澤 芳樹³
(¹阪大院・基礎工・化工, ²阪大院・工・生命先端, ³阪大院・医)

【目的】Rhoファミリータンパク (RhoA, Rac1, Cdc42) は, actin形成に作用することで細胞の遊走や骨格を制御し, さらに様々な細胞機能発現のシグナルを仲介する. 本研究グループが考案したD-グルコース提示型デンドリマー面では, デンドリマー世代数による細胞形態の差異が見られた. そこで, 世代数の異なる面を用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) のRhoファミリータンパク生成, および分化誘導の可能性を検討した. 【実験・結果】D-グルコースを提示した世代数3および5のデンドリマー面 (G3, G5面) を用いてhMSCを培養した. 培養3日目の蛍光染色では, G3面で見られるstress fiberがG5面では形成されないことを確認した. またG5面の細胞ではRhoAの細胞中心部への局在化, Rac1の細胞先端部への局在化が見られた. さらにタンパク発現解析から, G3面に対してG5面の細胞ではRhoAの生成量が顕著に低下することが明らかになった. 培養7日目には, G3面上で細胞が紡錘形を示し, 筋系の分化マーカー desminに対し陽性を示した. 一方G5面では球状の細胞集塊が観察され, desmin陽性だけではなく軟骨細胞マーカー collagen type II陽性細胞の発現が確認された. 以上のことから, G5面ではRhoAの生成が抑制され, 集塊形成が促進され, 一部軟骨への分化誘導が引き起こされていることがわかった.

Differentiation of human mesenchymal stem cells by variation in cytoskeletal formation

○Nao MARUYAMA¹, Mee-hae KIM¹, Masahiro KINO-OKA², Masahito TAYA¹, Atsuhiko SAITO³, Yoshiki SAWA³
(¹Div. Chem. Eng., Osaka Univ., ²Dept. Biotech., Osaka Univ., ³Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)

Key words hMSC, actin, Rho-family GTPase, differentiation

2Kp14

位相シフトレーザー顕微鏡を用いた間葉系幹細胞の細胞周期および増殖速度の非侵襲的推定

○徳光 綾子¹, 脇谷 滋之², 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能, ²大阪市大院・医・整形外科)

【目的】再生医療など自家細胞システムで培養された細胞集団の不均一さを非侵襲的に品質評価する必要があるが, そのために細胞を破壊することはできない. そこで, 非侵襲的な細胞品質評価法の開発が必要と考えられる. 今回, 骨髄間葉系幹細胞 (MSC) の細胞周期および増殖速度の位相シフトレーザー顕微鏡 (PLM) を用いた非侵襲的推定を検討した. 【方法】DMEM-LG 培地を用いて, ヒト MSC を 37℃, 5% CO₂ 雰囲気下で二次元同調または非同調培養した. BrdU と DAPI で染色し各細胞の細胞周期を決定すると共に, PLM で各細胞の位相差を定量した. 【結果と考察】同調培養, 非同調培養ともに, G₂/M 期細胞の位相差は他の周期の細胞の位相差に比べて有意に高かった. また, 平均位相差と平均世代時間の間には明確な負の相関が認められた. 以上から, MSC の細胞周期および増殖速度を PLM を用いて非侵襲的に推定できる可能性が示された.

Noninvasive Estimation of Cell Cycle Phase of Human Mesenchymal Stem Cells by Phase-Shifting Laser Microscopy

○Ayako TOKUMITSU¹, Shigeyuki WAKITANI², Mutsumi TAKAGI¹
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Orth. Surg., Sch. Med., Osaka City Univ.)

Key words morphology, noninvasive, cell cycle, mesenchymal stem cells

2Kp13

軟骨細胞におけるアグリカン遺伝子発現度の培養上清分析による非侵襲的推定法検討

○尾上 香織¹, 楠橋 秀紀¹, 脇谷 滋之², 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能, ²大阪市大院・医・整形外科)

【目的】間葉系幹細胞 (MSC) から軟骨細胞への分化度, 並びに脱分化した軟骨細胞の再分化度を, 培養上清の分析により非侵襲的に評価する方法を検討した. 【方法】ヒト骨髄 MSC とヒト膝関節軟骨細胞を, 軟骨分化用培地 (Lonza 社) を用いて 3 週間ベレット培養を行い, 培地交換の際に得られる培養上清中のメラノーマ阻害活性 (MIA) タンパク質濃度 (ELISA法) を測定すると共に, 細胞数 (トリパンブルー法), アグリカン遺伝子発現率 (RT-PCR法) を測定した. 【結果と考察】MSC から軟骨細胞への分化培養及び, 脱分化した軟骨細胞の再分化培養では, それぞれアグリカン遺伝子発現率が10%以下及び50%以下の範囲で, アグリカン遺伝子発現率とMIA比生産速度との間に良好な正の相関関係が得られた. 従って, 培養上清中のMIA定量から, 非侵襲的に軟骨細胞への分化度を推定できる可能性が示された.

Noninvasive estimation of aggrecan gene expression level of chondrocytes by the analysis of culture supernatant

○Kaori ONOUE¹, Hideki KUSUBASHI¹, Shigeyuki WAKITANI², Mutsumi TAKAGI¹
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Orth. Surg., Sch. Med., Osaka City Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, differentiation, noninvasive, chondrocyte

2Kp15

ラマン分光法を利用した接着動物培養細胞種の非侵襲的識別法の検討

高木 睦¹, ○宮田 侑佳¹, 脇谷 滋之², 石坂 昌司³, 喜多村 昇³
(¹北大院・工・生物機能, ²大阪市大院・医・整形外科, ³北大院・理・化学)

【目的】再生医療に用いる細胞の均一性を非侵襲的に評価する必要がある. 今回は, 軟骨細胞と線維芽細胞のラマン分光による識別法を検討した. 【方法】軟骨細胞と線維芽細胞を二次元培養し, ラマン顕微鏡を用いてそれぞれの細胞質中央部分および細胞質外周付近のラマンスペクトル (415~3870 cm⁻¹) を測定した. 【結果】各細胞に固有のラマン散乱は認められなかったが, 細胞質外周付近のスペクトル同士を主成分分析すると, 細胞種の明確な違いが認められた. これより, 細胞種間の何らかの細胞成分の違いをラマンスペクトルにより検出できたと推測された. したがって, ラマンスペクトルを主成分分析することにより, 軟骨細胞と線維芽細胞を識別できる可能性が示された.

Non-invasive discrimination of adherent chondrocytes from fibroblasts using raman spectroscopy

Mutsumi TAKAGI¹, ○Yuka MIYATA¹, Shigeyuki WAKITANI², Shoji ISHIZAKA³, Noboru KITAMURA³
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Orth. Surg., Sch. Med., Osaka City Univ., ³Div. Chem., Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

Key words raman spectroscopy, chondrocyte, discrimination, principal component analysis