

1Gp03 遺伝子導入間葉系幹細胞移植による軟骨欠損治療法の *in vitro* 評価

岩井 良輔¹, ○藤原 政司¹, 脇谷 滋之², 高木 睦¹
 (¹北大院・工・生物機能,²阪市大院・医・整形外科)
 takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】サイトカイン遺伝子導入間葉系幹細胞 (MSC) の移植による軟骨欠損治療を目指し、我々は既にMSC内で高発現できるベクターを開発した。そこで、遺伝子導入MSCの軟骨欠損治療における有効性を新たに開発した *in vitro* 評価系により評価した。

【方法】ブタ大腿骨頭部から採取した骨軟骨ディスク (直径: 6.5 mm) の軟骨組織表面に部分欠損 (半径: 0.8 mm, 深さ: 1.6 mm) を作製した。この軟骨ディスクまたは骨部分を分離した軟骨ディスクの欠損内、ブタ軟骨細胞、ヒト間葉系幹細胞 (MSC) または TGF-β3 遺伝子導入 MSC の懸濁液を 1 μl ずつ播種し3週間培養した後、切片をアルシアンブルー染色した。

【結果と考察】骨軟骨ディスク欠損内へのMSC播種ではMSCのアポトーシスが認められたが、軟骨ディスク欠損内へのMSC播種では軟骨様組織の生成が観察された。MSCを播種した軟骨ディスク欠損内には、軟骨組織の表層 (繊維芽状) と中間層 (球状) に見られる2種類の細胞形態が表層と深部でそれぞれ観察された。TGF-β3 遺伝子導入 MSC を播種した場合、非導入 MSC を播種し TGF-β3 (10 ng/ml) を添加した場合に比べて明らかに良好な軟骨様組織の生成が認められ、サイトカイン遺伝子導入MSC移植による軟骨欠損治療の有効性が示唆された。

***In vitro* evaluation of cartilage regeneration using genetically modified mesenchymal stem cells**

Ryosuke Iwai¹, ○Masashi Fujiwara¹, Shigeyuki Wakitani², Mutsumi Takagi¹
 (¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.,²Orth. Surg., Grad. Sch. Med., Osaka City Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, gene transfection, cartilage regeneration, cartilage defect model

1Gp05 ハンギングドロップ法における培養条件がマウス ES 細胞胚様体の分化状態に及ぼす影響

○大貫 喜嗣, 黒澤 尋
 (山梨大院・医工総合・生命)
 g08dh101@yamanashi.ac.jp

【目的】胚様体 (EB) は、ES細胞の *in vitro* 分化誘導システムとして広く用いられている。EBの形成にはハンギングドロップ法 (HD法) が広く用いられているが、ドロップ当たりの初期細胞数は 20 ~ 1000 cells/drop であり、ドロップの容積も 15 ~ 50 μL と定まっていない。我々は、EBの分化状態を一定の範囲に収めることが、その後の目的細胞の分化誘導を安定的に進める上で重要であると考え、HD法における初期条件がEBの分化状態にどのような影響を与えるかを検討した。

【方法】マウスES細胞 (129sv) の初期播種細胞数が 100, 500, 1000 cells、懸濁液量が 10, 20, 30, 50 μL となるように 100 mm シャーレのフタに懸濁液を作製し、HD法で3又は5日間の培養を行いFBS存在下でEBを形成した。形成されたEBの遺伝子発現をRT-PCRにより解析した。さらに、ゼラチンコート上に播種し、FBS又はKSRを含む培地で7又は9日間の接着培養を行い、心筋及び神経への分化を誘導した。

【結果及び考察】HD法ではEBのgrowth upをサポートできるのは5日間が限界で、懸濁液 10 及び 20 μL の5日目ではEBが十分に生育しなかった。3日間で形成したEBでは神経が発生したが、5日間ではほとんど発生しなかった。1000 cells/10 μL で形成した3日目のEBを接着すると接着率の低下がみられた。このことから、HD法でEB形成を行う際は、目的とする分化細胞に適した初期培養条件と培養期間を設定することが重要であると思われる。

Effect of initial culture conditions on the differentiation status of embryoid bodies from mouse ES cells by the hanging drop method.

○Yoshitsugu Ohnuki, Hiroshi Kurosawa
 (Dept. Biotech., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words ES cells, embryoid body, differentiation control, hanging drop method.

1Gp04 グルコース消費速度の制御による軟骨様細胞シートの厚さ増大

○佐竹 賢一¹, 辻 勇介¹, 脇谷 滋之², 高木 睦¹
 (¹北大院・工・生物機能,²阪市大院・医・整形外科)
 takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【背景と目的】三次元培養方法のモデル培養系としてのブタ初代膝関節軟骨細胞を用いたスキャフォールドフリー軟骨様細胞シート培養において、培地グルコース濃度や培地液量を操作してグルコース消費速度を制御することによって、ECM蓄積密度を上げ、シート厚さを増大することを検討した。

【方法】ブタ初代軟骨細胞 (6.2×10⁵ cells) をセルカルチャーインサート (面積 0.3 cm²) に培地と共に入れ、遠心分離 (200×g, 5分) の後、37℃、5%CO₂ 雰囲気下で4週間培養した。培養終了後、シートの直径と厚みを測定し、アグリカン蓄積量はDMMB法、培地上清のグルコース濃度はグルコース測定キットで各々定量した。

【結果と考察】基本条件 (培地グルコース濃度 (4.5 g/l)、培地液量 (300 μl)) から、培地液量を 600 μl に増加させた場合、グルコース消費速度が約 1.1 倍に増大し、シートの厚さは約 1.2 倍となった。一方、培地液量 600 μl の条件において培地グルコース濃度を 4.5 g/l から 9.0 g/l に増加させた場合、グルコース消費速度が約 2.4 倍に、シートの厚さが約 1.5 倍と各々増大し、アグリカン蓄積量も基本条件のシートの約 1.3 倍に増大した。

Control of depth of cartilage-like chondrocytes sheet by adjusting glucose consumption rate

○Kenichi Satake¹, Yusuke Tuji¹, Shigeyuki Wakitani², Mutsumi Takagi¹
 (¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.,²Orth. Surg., Grad. Sch. Med., Osaka-City Univ.)

Key words chondrocyte, scaffold-free, cell sheet

1Gp06 シングルセル化したヒトiPS細胞からの胚様体形成とその分化状態

○矢崎 こゆき, 安藤 友子, 黒澤 尋
 (山梨大院・医工総合・生命)
 g11mb026@yamanashi.ac.jp

【目的】ヒトiPS細胞の胚様体 (EB) 形成は、細胞をシングルセルにまで分散せずに、大きさが不均一なコロニーや細胞小集塊を浮遊培養することにより行われている。このためEBの大きさは不揃いとなり、分化状態も一定しないという問題が示唆されている。我々は、分化指向性に関与するとされるEBの大きさを一定の範囲に収めることが重要であると考え、細胞をシングルセルに分散して既知細胞数からEB形成を行う方法を検討した。その結果、Y-27632の添加が有効であることを見いだした。本実験ではシングルセル化したヒトiPS細胞からの胚様体形成とその分化状態について検討した。

【方法】シングルセルに分散したヒトiPS細胞 (201B7) 懸濁液を、細胞非接着性のU底96-well plateに3000 cells/wellとなるよう播種し、Y-27632 (終濃度 10 μM) 存在下でEBを形成した (96-well法)。比較対照として、ヒトiPS細胞のコロニーを細胞非接着性の6-well plateへ約 5.0×10⁵ cells/wellとなるよう播種し、Y-27632非存在下でEBを形成した (従来法)。形成されたEBの遺伝子発現をRT-PCRにより解析した。

【結果】Y-27632を添加することで、シングルセルにまで分散した既知数のヒトiPS細胞からEBを形成することができた。96-well法で形成したEBの大きさは従来法で形成したEBと比べてばらつきが小さかった (径: 約 350 ~ 500 μm)。一方、従来法で形成したEBの大きさはばらつきが大きく (径: 約 100 ~ 450 μm)、平均径は96-well法で形成したEBに比べて小さくなった。両EBにおける未分化マーカーと一部の分化マーカーにおいて、発現量に差がみられた。

Embryoid body formation from human iPS cells dispersed into single cells and differentiation status of the EBs.

○koyuki yasaki, tomoko ando, hiroshi kurosawa
 (Dept. Biotech., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words human iPS cells, Y-27632, embryoid body