2Gp17 Regulation of chondrocyte migration and spatial distribution in collagen gel culture

○Mohd Nadzir Masrina¹, Masahiro Kino-oka², Masahito Taya¹
 (¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.,²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
 masurina@cheng.es.osaka-u.ac.jp

[Objective] The cultured cartilage should ideally have a spatially uniform cell distribution. Cultured cartilage with low cell seeding density is attractive due to the limited amount of chondrocytes obtained from patient. However, this caused heterogeneous cell distribution due to cell migration. In this study we attempted to improve the spatial cell distribution by regulating the cell migration by medium supplementation.

[Experimental and results] Collagen gel embedded with chondrocytes at seeding density = 2.0×10^5 cells/cm³ was cultured in DMEM (containing 10% FBS and ascorbic acid) with or without IGF-I. The spatial cell distribution of CellTracker green stained cells was observed at 5 and 7 d. The supplementation of IGF-I resulted in fewer aggregates of spindle shaped cells compared to the IGF-I-free culture. Furthermore collagen type I and MT1-MMP mRNA expressions in the IGF-I supplemented culture were 1.6 and more than 100 times lower, respectively, than that without IGF-I supplementation. It is well-known that MT1-MMP plays a pivotal role in cell migration and invasion, thus the results demonstrate the suppression of chondrocyte migration by IGF-I that improves the cell spatial distribution.

Regulation of chondrocyte migration and spatial distribution in collagen gel culture

○Mohd Nadzir Masrina¹, Masahiro Kino-oka², Masahito Taya¹
 (¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.,²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Cultured cartilage, Migration, Spatial distribution, IGF-I

2Gp19 間葉系幹細胞の骨組織形成過程シミュレーション解析

○木原 隆典, 柏谷 康介, 三宅 淳
 (阪大院・基礎工)
 takanori.kihara@gmail.com

骨組織形成の機構解明・制御は骨発生・骨修復のみならず、骨疾患・再生医療など幅広い分野で重要である。そもそも骨の研究は古くからなされており、その形成も微小な石灰化形成や、マクロな骨形成など静的なメカニズムについて明らかにされてきた。その一方で、微小な石灰化から骨組織がどのように形成されるのか、また静的なメカニズムによって実際に動的な現象が生じうるのか不明瞭な部分も多い。

本研究では石灰化、さらには骨組織形成過程について、すでに知られている静的な形成メカニズムでどこまで再現可能であるのか、逆にどういった部分が不足しているのかを明らかにするため、石灰化形成過程のモデリングとそのシミュレーションを行った。

石灰化形成過程は、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化・石灰化・骨組織形成過程を利用した。間葉系幹細胞が生体外で形成する骨組織は生体内に類似しており、生体内骨組織形成現象のin vitro再現系に適している。シミュレーションは、細胞の移動・増殖、骨芽細胞への分化、石灰化組織の形成の各過程について、細胞の動態をコンピューター上で再現できるようなシミュレーターを新規に作成した。こうした細胞の動態は、実際にin vitroで間葉系幹細胞の骨芽細胞誘導によって得られる結果にフィットするよう、その条件および数値パラメーターの設定を行った。本発表では実験で得られる骨組織過程を再現するのにどのような条件が必要であり、それぞれの条件がシミュレーション結果にどのように影響を与えるかについて報告する。

Computational modeling of in vitro mineralization of mesenchymal stem cells

○Takanroi Kihara, Kousuke Kashitani, Jun Miyake
 (Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, mineralization, simulation

2Gp18 ヒトiPS細胞のコロニー内における未分化細胞と分化細胞の挙動解析

○増田 英里, 金 美海, 紀ノ岡 正博
 (阪大院・工・生命先端)
 kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[目的] ヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を用いた確実で安全な治療法を確立するために、iPS細胞の未分化維持培養方法としての培養環境の改良や評価手法の確立が不可欠である。これまで、iPS細胞の継代培養において、研究者の経験や操作条件により細胞コロニーのサイズや未分化能などが異なる不均一性が確認された。本研究では、ヒトiPS細胞の培養中に発生する細胞分化現象に着目し、コロニー内の未分化および分化細胞の挙動解析を行った。

[方法・結果] ReproStem培地を用い、ヒトiPS細胞およびSNLフィーダー細胞の継代培養を行った。培養細胞観察装置を用いて継続的にコロニー内の個別細胞挙動を観察したところ、培養1日目に小さな細胞質と丸い核を有する小細胞が密集したコロニーを形成し、培養経過とともにコロニーが大きくなるのが観察された。しかし、培養3日目からコロニーの中心から細胞面積の大きい分化細胞が生じ、中心から外側に増殖しながら未分化細胞を押し出し、その領域が徐々に広がる様子が観察された。そこで培養3日目から17h、コロニー内の未分化と分化細胞領域の面積および増殖速度を指標とするコロニーの分化性評価を行った結果、17h後の未分化細胞領域の面積は1.5倍に、分化細胞領域の面積は4倍に増加し、分化細胞の比増殖速度は未分化細胞の比増殖速度の3.7倍となった。以上の結果より、分化細胞は未分化細胞と比較して増殖性が高いため、継代培養を繰り返すことでその分化細胞の発生頻度が高くなることが示唆され、iPS細胞の未分化維持継代培養を行うためには、播種時に分化細胞を全く含まないことが重要であると考えられた。

Behavior analysis of undifferentiated and differentiated cells in hiPS colony

○Eri MASUDA, Mee-Hae KIM, Masahiro KINO-OKA
 (Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words iPS cells, heterogeneity, differentiation, specific growth rate

2Gp20 コンフルエント状態における不死化網膜色素上皮細胞の分化特性の解析

○金 美海, 園井 理恵, 山田 健太, 稲森 雅和, 紀ノ岡 正博
 (阪大院・工・生命先端)
 kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[目的] 単層培養中のヒト網膜色素上皮 (RPE) 細胞は、紡錘形態では脱分化を引き起こすことが知られており、コンフルエントにて高密度の多角形細胞を維持させることが重要である。しかし、RPE細胞の分化能を維持させる方法としての培養環境の改良やコンフルエントにて細胞評価手法は存在しない。そこで本研究では、グルコース提示型デンドリマー面上におけるコンフルエント培養状態でのRPE細胞の分化特性を解析した。

[実験および結果] RPE細胞を用い、D-グルコース提示型デンドリマー培養面 (G1面) およびデンドリマーを提示しない通常の培養面 (PS面) にて、20% FBS含有Hams F10を用い培養を行った。さらに、基底膜成分であるラミニンをコートした培養面を用いてRPE細胞の細胞形態を評価した。その結果、培養14日後のG1面ではラミニン面と同様の単層の多角形細胞が敷石状に配列していることが確認された。しかし、PS面上でRPE細胞は多角形の形態は存在せず通常の分化が維持できないことが分かった。そこで細胞核密度とダイトジャンクションのマーカーであるZO-1の発現を指標とするRPE形態評価を行ったところ、ZO-1発現した細胞の割合が細胞密度の傾向同様に多角形の細胞で高いことが示され、コンフルエント培養状態での分化細胞を判別可能であることが示唆された。また、G1面ではZO-1発現した細胞の割合と細胞密度の傾向がラミニン面と同様に高いことから、G1面はRPE細胞の培養面として有効であることが示唆された。

Evaluation of differentiation state in confluent culture of human retinal pigment epithelial cells

○Mee-Hae Kim, Rie Sono, Kenta Yamada, Masakazu Inamori, Masahiro Kino-oka
 (Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Human retinal pigment epithelial cells, Dendrimer-immobilized surface with D-glucose display, Nucleus density, Differentiation