

3Bp18 脱細胞神経組織を足場とした3次元培養技術の開発

○天野 翔太, 鈴木 郁郎, 後藤 正男
(東京工科大院・バイオニクス)
amano.book@gmail.com

【目的】人工物を用いる治療技術から近年では細胞移植による再生医療技術に大きな期待が寄せられている。細胞移植治療は、細胞シートを用いて表皮、角膜上皮、心臓などの組織で行われており、成功を収めている。iPS細胞の発見もあり、今後、細胞から様々な組織を創る技術が重要となってくる。細胞から人工的に3次元組織を構築する手法の一つとして、細胞成分を除いた脱細胞組織の利用が着目されている。3次元組織構造と細胞外基質が保たれているからである。これまで、肝臓、心臓、などの組織の脱細胞化条件および、残存する細胞外マトリックス(ECM)の評価などが行われてきた。しかしながら、神経組織の脱細胞化条件やECMの評価、および脱細胞組織を足場とした3次元培養は行われていない。本研究では、神経組織の脱細胞化条件の検討および脱細胞神経組織を足場とした3次元培養技術の開発を目的とした。

【方法】ラット脳を用いて、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、TritonX-100で脱細胞神経組織を作製した。脱細胞化の有効性を評価するために、脱細胞後のHE染色および残留DNA量の測定を行った。また、脱細胞組織内に残存するECM量を評価および脱細胞神経組織の上に細胞培養を行い、細胞接着性と生存率を評価した。

【結果】界面活性剤を用いた脱細胞化により脱細胞神経組織を作製することに成功した。SDSおよびTritonX-100を用いた脱細胞組織のHE染色および残像DNAを測定した結果、未処理の組織に比べて優位に核が除去されていることが確認された。また、脱細胞組織上に神経細胞が培養されていることも確認されたため、脱細胞組織を足場とした3次元培養の可能性が示唆された。

Development of decellularized neural tissue and 3D culture techniques

○Shota Amano, Ikuro Suzuki, Masao Gotoh
(Dept. Bio., Tokyo Univ. Technol.)

Key words decellularized, 3D culture

3Bp20 K562細胞の巨核球系分化における培養面への一過性接着の重要性

○尾島 由紘¹, 小林 昇平², Nurhayati Retno¹, 原口 徳子², 田谷 正仁¹
(¹阪大院・基礎工,²情報通信研・未来ICT研究セ)
ojima@cheng.es.osaka-u.ac.jp

【目的】白血病細胞株K562は、多能性幹細胞の性質を有しており、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)により巨核球系細胞へと分化するため、造血系幹細胞のモデル細胞として研究されてきた。本研究は、浮遊性細胞であるK562の培養面への接着が巨核球系分化に及ぼす影響について解析を行った。

【方法および結果】PMA添加によりK562細胞の巨核球系分化を誘導し、分化の評価指標である高倍数性(8倍体以上と定義)細胞の割合をフローサイトメトリにより解析した。その結果、PMA添加3日後は約70%の細胞が接着しているが、9日間の培養期間中に接着している状態から浮遊した細胞が存在し、接着している細胞と比較して高い倍数性を持つことが確認された。さらに、PMA処理によって接着性となったK562細胞の核を蛍光染色し、タイムラプス観察した結果、細胞は核分裂後の細胞質分裂に失敗し、娘細胞の融合により倍数性が増加すること、その倍数性が増加した細胞が浮遊性になることが観察された。細胞の接着性を上げるために、種々の濃度のポリリジンで培養容器表面を処理したところ、20 ug/mlでPMA添加1日後の接着率が58%から73%へ促進され、9日後の高倍数性細胞の割合が25%から40%に増加した。以上の結果は、倍数性の増加に伴う細胞の浮遊をある程度抑制することが、高倍数化を促進する可能性を示している。

Importance of transient cell adhesion to the dish in the megakaryocytic differentiation of K562 cells

○Yoshihiro Ojima¹, Shouhei Kobayashi², Retno Nurhayati¹, Tokuko Haraguchi², Masahito Taya¹
(¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., ²Adv. ICT Res. Inst., NICT)

Key words K562 cells, megakaryocytic differentiation, adhesion

3Bp19 一細胞経時的解析を用いたプロモータ活性の比較

○染井 悠作, 袴田 和巳, 三宅 淳
(阪大院・基礎工)
hakamada@bpe.es.osaka-u.ac.jp

【目的】細胞内のシステムの解明には、遺伝子発現制御、細胞周期、シグナル伝達、代謝経路などのダイナミックな理解が重要である。しかし、従来の分子生物学的手法では細胞内のダイナミクスを捉えることが困難である可能性が指摘された。そのため、細胞内の遺伝子やタンパク質などの経時的な変化を調べる必要がある。我々は遺伝子発現のダイナミクスを解析するために遺伝子発現制御に注目して、一細胞時系列解析を提案している。

【方法】プロモータとしてCMV・SV40・EF1- α の下流にAcGFPを結合したベクターをNanofluorescenceを用いてそれぞれをHeLa細胞に遺伝子導入した後、10分間隔で24時間のタイムラプス撮影を行った。

【結果】細胞集団の一細胞に注目したところ、これまでの先行研究と同様、細胞分裂と遺伝子発現開始のタイミングとの間に強い相関が見られた。細胞分裂を基準にすることでより正確な細胞内時系列の評価を行うことが出来ると考えられる。さらに細胞分裂と遺伝子発現開始の間隔をプロモータ毎に調べたところ、CMVプロモータでは227.36分、SV40プロモータでは367.67分、EF1- α プロモータでは533.04分となった。細胞種、遺伝子導入試薬、遺伝子が同じという条件から、これらの時間差はプロモータの転写速度の違いであると考えられる。一細胞時系列解析と異なるプロモータをもつAcGFP遺伝子を用いることによって、細胞分裂から遺伝子が発現するまでの時間が異なることが分かった。このことから、プロモータの違いを評価することが可能であることが示唆された。一細胞時系列解析と同一プロモータあるいは同一遺伝子のベクターを用いることで遺伝子発現の経時的な変化を定量的に評価可能であると考えている。

Comparing activity of 3 promoters by using event driven timelapse analysis

○Yusaku Somei, Kazumi Hakamada, Jun Miyake
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words single cell, promoter activity, time course

3Bp21 The role of oxidative stress in the megakaryocytic differentiation of K562 cells

○Retno Nurhayati¹, Yoshihiro Ojima¹, Mark Duncan², William Miller², Masahito Taya¹
(¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., Japan, ²Dept. Chem. Biol. Eng., Northwestern Univ., USA)
taya@cheng.es.osaka-u.ac.jp

【Introduction】 Among human cell lines, K562 cells have been widely used as a model to study haematopoietic cell differentiation. Treatment with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) leads differentiation of K562 cells mimicking megakaryocytic lineage. Reactive oxygen species (ROS) generation has been assumed to be involved in the megakaryopoiesis. In this study, we attempted to understand the relation between oxidative stress and megakaryocytic differentiation of K562 cells.

【Methods】 Gene expression analysis was done using a PCR method. ROS content, CD41 expression and DNA ploidy were analyzed using flow cytometer.

【Result】 ROS level of K562 cells increased about 6 folds after being exposed with 10 ng/ml PMA. Under PMA induction, the expression of *cat* (encoding catalase) was strongly repressed, which subsequently affected the ability of K562 cells to eliminate ROS. Accordingly, two different types of antioxidants were introduced. The addition of water-soluble derivative of vitamin E effectively inhibited polyploidization and reduced the expression of CD41 (a specific marker for megakaryocytic differentiation). On the contrary, the introduction of vitamin C slightly enhanced polyploidization without affecting CD41 expression. The detailed mechanism is under our investigation.

The role of oxidative stress in the megakaryocytic differentiation of K562 cells

○Retno Nurhayati¹, Yoshihiro Ojima¹, Mark Duncan², William Miller², Masahito Taya¹
(¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., Japan, ²Dept. Chem. Biol. Eng., Northwestern Univ., USA)

Key words K562 cells, megakaryopoiesis, polyploidization, antioxidant