

4Ba01 ROCK inhibitor (Y-27632) をヒト iPS 細胞の分散処理時に添加することの有効性

○堀口 あゆみ, 大貫 喜嗣, 青柳 満味, 黒澤 尋
(山梨大院・医工総合・生命)
kurohiro@yamanashi.ac.jp

【目的】

ヒト iPS 細胞 (hiPSCs) の継代培養や胚様体 (EB) 形成を、効率よく高い再現性をもって行うには、細胞をシングルセルへ分散して細胞数を計測する必要がある。しかし、シングルセル化した hiPSCs はプレビングを引きおこし、最終的にアポトーシスに至るため、ROCK inhibitor である Y-27632 を添加することによってアポトーシスを阻害している。その添加時期は分散処理後が一般的で、分散処理時に添加した例はこれまで報告されていない。本研究では、シングルセルの形状、継代培養及び EB 形成を評価することによって、hiPSCs を Y-27632 存在下で分散処理することの有効性を明らかにした。

【方法】

hiPSCs (201B7, RIKEN BRC.) を Accutase によりシングルセルに分散した。10 μ M の Y-27632 を分散処理時と分散処理後にそれぞれ添加し、シングルセルの形状の推移を観察した。培養した Feeder 細胞 (SNL 76/7) 上に 5×10^4 cells/well でシングルセルを播種し、6 日間の培養後、MTT assay により Viability を評価した。さらに、シングルセルを Lipidure coat plate A-U96 に 3×10^3 cells/well で播種し、細胞の凝集性及び形成された EB の形態に関して評価した。

【結果及び考察】

Y-27632 を分散処理時に添加した細胞は、分散処理後に添加したもの比べ、プレビングが抑制され、球形を維持していた。また、分散処理時添加によって、継代培養時の増殖性及び EB 形成時の細胞の凝集性が促進された。以上より、Y-27632 の分散処理時添加が hiPSCs の継代培養及び EB 形成において有効であることが示唆された。

The effectiveness of the presence of ROCK inhibitor (Y-27632) during dissociating human iPS cells into single cells

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

Key words hiPS cells, ROCK inhibitor, Embryoid body

4Ba03 ES 胚様体のマイクロパターンニング培養

○原 拓也, 中澤 浩二
(北九大院・国際環境工)
nakazawa@kitakyu-u.ac.jp

【目的】 ES 細胞は、未分化能と多分化能を持つ幹細胞であり、ES 細胞から機能性細胞への分化誘導過程では、胚様体と呼ばれる細胞集合体を形成させる手法が一般的に行われている。一方、我々はこれまでに材料表面の化学修飾技術を利用して、肝細胞が形成する細胞集合体をパターンニング培養できるマイクロチップ技術を確立してきた。本研究では、このチップ技術を利用して、マウス ES 胚様体のマイクロパターンニング培養を試みた。

【方法および結果】 ガラス基板上に細胞接着面となるゼラチン分子のスポットを規則的に形成し、それ以外の部分は細胞非接着分子であるポリエチレングリコールを化学修飾したマイクロチップを作製した。また、本研究では、ES 胚様体間距離の細胞特性への影響を評価するために、ゼラチンスポット間の距離が異なるチップを作製した。作製したチップにマウス ES 細胞を播種し、LIF および分化誘導因子が未添加の条件下で、ES 細胞が示す細胞特性を評価した。チップ上に播種された ES 細胞は、ゼラチンスポット上に接着・伸展し、その後、細胞増殖に伴って培養 3 日目頃から胚様体へと発達し、そのサイズは培養経過に伴って増大した。また、スポット間 (胚様体間) 距離は、そのサイズ変化に影響を与え、スポット間距離が離れるほど ES 胚様体サイズは増大した。一方、特異的なマーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR で評価した結果、形成された胚様体は中胚葉への分化が進行していた。また、スポット間距離が離れるほど分化速度が速いことが明らかになった。これらの違いは、隣接する胚様体間の相互作用に起因していると考えられ、酸素や栄養物質などの濃度分布に由来すると考えられる。

Micropatterned Embryoid Body culture of mouse ES cells

○Takuya Hara, Koji Nakazawa
(Dept. Life and Environment eng., The University of Kitakyusyu)

Key words ES cell, embryoid body, cell patterning culture

4Ba02 ヒト iPS 細胞培養における脱未分化現象の速度論的解析

○野澤 裕太, 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) を用いた再生医療や創薬などの産業的利用のためには、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、ヒト 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、異なるフィーダー上でのヒト iPS 細胞の脱未分化現象について速度論的に解析を行った。**【方法・結果】** ヒト iPS 細胞を 3 種のフィーダー細胞 (SNL, STO, MEF) を用いて培養を行った。細胞観察装置により各フィーダー細胞上での脱未分化コロニーの挙動を経時的に観察したところ、SNL, STO の条件では、コロニー中心部から未分化を逸脱した細胞 (脱未分化細胞) が発生し、未分化細胞を外側へ押し出しながら増殖し、脱未分化領域が広がる様子が観察された。一方、MEF の条件では、コロニーの周囲部から脱未分化細胞が発生し、コロニーの外側に向けて増殖しながら脱未分化領域が広がる様子が観察された。そこで、各フィーダー細胞上で培養したヒト iPS 細胞コロニー内の脱分化領域の比増殖速度を指標とする評価を行ったところ、SNL の条件では $2.7 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 、STO の条件では $3.3 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 、MEF の条件では $3.6 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ であり、MEF の条件における脱未分化領域の比増殖速度は SNL, STO よりも高い傾向があることが分かった。以上の結果より、MEF を用いたヒト iPS 細胞培養では SNL, STO の条件と比べ脱未分化細胞の増殖性が高いため、継代を繰り返すことで脱分化細胞の発生頻度が高くなることが示唆された。

Kinetic analysis of “de-undifferentiation” in colony of human induced pluripotent stem cells

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

Key words iPS cells, heterogeneity, de-undifferentiation

4Ba04 マウス iPS 細胞の神経細胞への分化の解析

○中村 麻衣¹, 上芝原 佑¹, 北澤 彩子², 川口 英夫¹, 清水 範夫^{1,2}
(¹東洋大院・生命科学,²東洋大・バイオナノ研究セ)
giants.7.cho@gmail.com

【目的】 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、自己複製能や多分化能を有しており、iPS 細胞から特定の細胞に効率的に分化誘導させる研究が広く行われている。我々の研究では以前に、マウス ES 細胞の培養液に脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) の培養上清液 (conditioned medium: CM) を添加すると、神経細胞に効率よく分化誘導できることを明らかにした。そこで、iPS 細胞についても DRG-CM を添加して神経細胞に効率よく分化誘導させるとともに、リアルタイム PCR を用いて各種神経細胞への分化過程を解析した。

【方法】 DRG-CM 添加におけるマウス iPS 細胞の神経細胞への分化割合を検討するため、iPS 細胞コロニーを培養 3 日目、6 日目、9 日目、12 日目に採取した。それらを β III-tubulin (神経細胞マーカー) の抗体で標識し、フルオロイメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定した。さらに、各種神経細胞への分化と培養日数との関係をリアルタイム PCR で分析した。

【結果】 DRG-CM を iPS 細胞コロニー培養液に添加し培養したところ、3 日間培養では DRG-CM を 2.5% 濃度で添加した場合に神経細胞への分化率が高くなったが、6-12 日間培養では DRG-CM 5-10% の濃度で添加した場合に分化率が高くなった。DRG-CM を 5% 添加した場合に神経細胞の種類に特異的な遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で検討した結果、 β III-tubulin の発現量は培養経過とともに上昇したが、ドーパミン作動性ニューロンなどの神経細胞においては培養 9 日目から各種神経細胞の特異的な遺伝子の発現量が急激に増加した。DRG-CM の添加により iPS 細胞を神経細胞に効率的に分化誘導できることが明らかとなった。

Differentiation of mouse iPS cells into neurons

○Mai Nakamura¹, Yu Kamishibahara¹, Ayako Kitazawa², Hideo Kawaguchi¹, Norio Shimizu^{1,2}
(¹Grad. Sch. Life Sci., Toyo Univ., ²Bio-nano., Toyo Univ.)

Key words differentiation, iPS cell, neuron