2P-174 リバーストランスフェクションを用いた細胞遊走評価マイクロデバイス

○榎本 詢子^{1,2}, 長崎 玲子², 藤田 聡史², 福田 淳二^{1,2}
 (1)横国大院・工, (2)産総研・バイオメディカル)
 fukuda@ynu.ac.jp

日本人の死因の第一位は癌で、それは全体の約3割を占める。さらにその内の9割が癌転移により予後不良となっている。そのため、転移の抑制を目指した抗癌剤の開発が非常に重要である。しかし、転移に関わる抗癌剤ターゲットが未だに十分に同定されておらず、開発が進んでいないのが現状である。つまり、数万にも及ぶ遺伝子の中から転移に関わるターゲットを評価・同定する技術の開発が求められている。そこで本研究では、ガラス基板上にアレイ状に様々な遺伝子をスポットし、細胞に導入できる「リバーストランスフェクション」技術と微細加工技術を組み合わせて、癌を含む様々な細胞の単独遊走を遺伝子レベルで網羅的に評価する「マイクロアレイチップデバイス」を開発した。まず、アレイの高密度化には細胞の遊走領域を区切り、アレイ化された遺伝子の拡散を制御する必要があるため、Polydimethylsiloxane (PDMS) で各スポットを物理的に区切る細胞培養チャンパーを作製した。次に、チャンパー中で少なくとも24時間、細胞を良好な状態で培養できることを生死染色により確認した。さらに細胞の遊走性に関与する paxillin の遺伝子発現を抑制する siRNA (anti-paxillin siRNA) とプラスミドを細胞に共導入した系と2種類の対照実験を行い、細胞の遊走性を比較した。その結果、anti-Paxillin siRNA を用いた系において、細胞遊走が優位に抑えられた ($p < 0.01$)。以上の結果は、本デバイスが細胞遊走評価ツールとして有用であることを示しており、癌の浸潤・転移に関する研究を加速するツールとして期待できる。

Reverse transfection in microchamber arrays for cell migration

○Junko Enomoto^{1,2}, Reiko Nagasaki², Satoshi Fujita², Junji Fukuda^{1,2}
 (1)Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., (2)Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words cell migration, PDMS, Reverse transfection, siRNA

2P-176 シミュレーションを利用した培養石灰化組織のプロセス解析

○木原 隆典¹, 柏谷 康介², 鈴木 達郎², 弓場 俊輔³, 三宅 淳²
 (1)北九大院・国際環境工, (2)阪大院・基礎工, (3)産総研・健康工学)
 takanori.kihara@gmail.com

組織・器官は幹細胞から分化・増殖した細胞と、細胞によって分泌された細胞外マトリクスによって形成される。骨組織もこうした細胞分裂・分化・細胞外環境構築によって形成される結合組織であり、その初期形成過程は、組織中に間葉系幹細胞 (MSC) が集し、骨芽細胞へ分化、未石灰化組織である類骨の形成、そしてアパタイトの沈着 (石灰化) が生じる。こうした石灰化形成の各過程は明確であるが、これら各過程間の関係、各過程の最終的な石灰化組織への影響について十分には知られていない。

本研究では、石灰化組織の形成機構、特に形成過程における各事象が相互にどのように働きかけているのか、それが最終的な石灰化組織の形成にどのように影響を与えるかについて明らかにすることを目的に、シミュレーションを利用した解析を行った。

石灰化組織の形成機構を解析するためのモデルとして、MSC の生体外石灰化形成培養を利用した。MSC は骨分化誘導条件下で培養すると、骨芽細胞へと分化し、培養層が石灰化する。こうした骨芽細胞への分化や石灰化組織は生体内と類似のものであり、生体内の生体外モデルとして利用可能である。そこで、培養系における MSC の石灰化組織形成過程における各素過程間の作用や石灰化への影響を解析するため、各素過程をプロセスとして取り込んだシミュレーションを行った。特に細胞移動、増殖、分化、細胞外マトリクスの構築などによって石灰化がどのような影響を受けるかについて検討を行った。

In silico analysis of mineralized tissue formation of cultured MSC.

○Takanori Kihara¹, Kosuke Kashiitani², Tatsuro Suzuki², Shunsuke Yuba³, Jun Miyake²
 (1)Dept. Life Environ. Eng., Univ. Kitakyusyu, (2)Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., (3)Health Res. Inst., AIST)

Key words mesenchymal stem cell, tissue engineering, simulation, bone tissue

2P-175 創薬探索のための画像情報を用いた Phenotype-Based Screening 法の開発

○岡田 法大¹, 佐々木 寛人², 坪井 泰樹², 蟹江 慧¹, 清田 泰次郎³, 本多 裕之², 加藤 竜司¹
 (1)名大院・創薬科学・基盤創薬, (2)名大院・工・生物機能, (3)ニコン)
 okada.norihiro@f.mbox.nagoya-u.ac.jp

【目的】

創薬探索の分野では、スクリーニングのハイスループット化、低コスト化が求められている。創薬スクリーニングの過程ではヒト細胞を用いた cell-based screening が行われているが、スクリーニングのために目的の細胞を取得して下ることが困難であったり、スクリーニングのために大量の細胞が必要であるといった問題点を抱えている。そこで、現在幹細胞利用への期待が高まっており、幹細胞培養を安定に行うための薬剤が求められている。我々は、薬剤添加後の細胞形態の変化を生体情報学によって解析を行うことで、形態情報のみによる新たな薬剤評価手法の開発を行った。本研究では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSC) を対象とし、連続的な顕微鏡画像情報を用いた薬剤評価プロセスの自動化への可能性を評価した。

【方法と結果】

hBMSC に作用経路の異なる薬剤を添加し、薬剤添加後未分化培養時に4時間間隔で5日間撮影を行った位相差画像と、各薬剤添加後の細胞をさらに約3週間かけて脂肪組織へと分化誘導を行い、取得した実験評価データの解析を行うことにより、細胞形態と薬剤作用との関連性を見つけ、細胞形態による薬剤経路の分類を行った。

Development of phenotype-based screening method using cell image analysis for drug discovery

○Norihiro Okada¹, Hiroto Sasaki², Taiki Tsuboi², Kei Kanie¹, Yasujiro Kiyota³, Hiroyuki Honda², Ryuji Kato¹
 (1)Dept. Basic Med. Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., (2)Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., (3)Nikon Corporation)

Key words image analysis, mesenchymal stem cell

2P-177 遺伝子導入フィーダーを用いた多能性幹細胞の未分化維持培養システムの開発

○藤原 昇, 井藤 彰, 河邊 佳典, 上平 正道
 (九大院・工・化工)
 2TE13149K@s.kyushu-u.ac.jp

【目的】胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、栄養供給細胞であるフィーダー細胞上で培養することで、樹立および維持培養することができる。現在、フィーダー細胞として、主に初代胚性繊維芽細胞 (MEF) が用いられているが、取得のためにマウスを犠牲にすることや増殖に限りがあることから、代替となる高機能なフィーダー細胞の開発が求められている。これまでに当研究室では、マウスストロマー STO 細胞に、細胞接着タンパク質である E-カドヘリンを遺伝子導入した細胞株を作製し、未分化維持能力の向上を報告した。本研究では、LIF 遺伝子が導入された SNL フィーダー細胞に、E-カドヘリン遺伝子を組み込んだ細胞株を作製し、この細胞をフィーダーとしたマウス ES 細胞の未分化維持培養を試みた。

【実験方法及び結果】E-カドヘリンを構成的に発現する STO 細胞では、増殖速度が著しく低下したので、SNL 細胞への遺伝子導入では、Tet-off システムにより誘導発現ができるようにした。レンチウイルス生産用プラスミドにテトラサイクリン応答配列 (TRE) と E-カドヘリン遺伝子を挿入したプラスミド、および転写活性化タンパク質 (tTA) を挿入したプラスミドにより生産した2つのレンチウイルスベクターを用いて SNL 細胞に遺伝子導入した。RT-PCR、免疫染色およびウエスタンブロッティングを行った結果、Dox 添加の有無により E-カドヘリンの発現が制御可能な SNL/E 細胞を樹立することができた。樹立した SNL/E 細胞上でマウス ES 細胞を培養した結果、SNL/E 細胞は LIF を添加しなくても、マウス ES 細胞を未分化維持培養することができた。

Culture of pluripotent stem cells using genetically engineered feeder cells.

○Sho Fujiwara, Akira Ito, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
 (Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words E-cadherin, pluripotent stem cell, feeder cell, cell culture