

2P-165 Nocodazole 処理によるヒト iPS 細胞の細胞周期同調

○山口 千尋, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋
(山梨大院・医工総)
kurohiro@yamanashi.ac.jp

【背景と目的】

ヒト iPS 細胞の増殖・分化プロセスを安定化する為には、原料としての iPS 細胞集団を均一化する必要がある。不均一性をもたらす一つの要因として、細胞周期があげられる。例えば、周期が不均一な細胞集団では、特定の時期でタンパク質の動きを生化学的に調べるのに不都合であり、再現性を得られない可能性がある。細胞周期が揃った iPS 細胞を原料とすることによってその後の増殖・分化プロセスが安定化し、細胞製品の品質管理がしやすくなると考えられる。本研究では微小管形成阻害剤の1つである Nocodazole を用いたヒト iPS 細胞の同調処理条件を検討した。

【方法】

フィーダー細胞 (SNL76/7) 上もしくはフィーダー細胞なしの条件でヒト iPS 細胞 (201B7, 理研 BRC) を培養した。セミコンフルエントに達したところで、0、200、400、800 ng/ml の Nocodazole 含有培地に交換し、24 時間培養した。その後、Accutase により細胞を剥離させ EtOH 固定 (4°C, Overnight) を行った。PI 染色を行い、Tali™ image-based cytometer で蛍光強度に対する細胞分布 (頻度) を測定し、細胞周期を確認した。

【結果と考察】

フィーダー細胞存在下ではヒト iPS 細胞の細胞周期は十分に同調されなかった。一方、フィーダー細胞なしの条件下では、Nocodazole 濃度依存的に高蛍光強度側への細胞分布のシフトがみられ、細胞周期の同調が起きていることが示唆された。以上より、フィーダー細胞として用いた SNL 細胞は、Nocodazole による細胞同調処理の妨げになると考えられる。

Nocodazole treatment for cell cycle synchronization of human iPS cells

○Chihiro Yamaguchi, Yoshitsugu Ohnuki, Hiroshi Kurosawa
(Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words iPS cells, cell cycle, nocodazole

2P-166 シングルセルに分散したヒト iPS 細胞のコロニー形成

○池田 智一, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋
(山梨大院・医工総)
kurohiro@yamanashi.ac.jp

【目的】 ヒト iPS 細胞のコロニー形成は細胞の接着性や生存性などの細胞活性と関係している。そのため、コロニー形成率はヒト iPS 細胞の品質評価項目の一つとなり得る。また、培養プロセスの安定化を図る上では、ヒト iPS 細胞をシングルセルに分散することが望ましい。本研究ではシングルセルに分散したヒト iPS 細胞を異なる細胞密度で播種・培養した時のコロニー形成率を求め、分散が細胞に与える影響を評価した。また、培地にいくつかの生育関連因子を添加することによって、コロニー形成率を高めることを試みた。

【方法】 ヒト iPS 細胞 (201B7, 理研 BRC) のコロニーをシングルセルに分散した後、フィーダー細胞上に 20、200、2000、20000 cells/well の細胞密度で播種し、7 日間の培養を行った。次に、20000 cells/well の条件においては、種々の生育関連因子を基礎培地に加えて、3 継代培養した。検討した生育関連因子の組み合わせは bFGF、CHIR99021、Y-27632、bFGF+CHIR99021、bFGF+Y-27632 の 5 通りである。

【結果】 播種時の細胞密度によらずコロニー形成率 (コロニー数/播種細胞数) はおおむね一定 (5~10%) となった。これにより、コロニー形成は播種時の細胞密度に関わらず、一定の確率で起こることが示唆された。CHIR99021 の添加によって、コロニー形成率が向上する傾向が見られた。Y-27632 の添加は 2 継代目以降のコロニー形成率を著しく低下させた。bFGF の添加はコロニー形成率には大きな影響を及ぼさなかったが、コロニーの未分化性を保つ効果がみられた。bFGF+CHIR99021 の条件がコロニー形成率と未分化性維持の双方に効果的であった。

Colony formation of single cell-dissociated human iPS cells

○Tomokazu Ikeda, Yoshitsugu Ohnuki, Hiroshi Kurosawa
(Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words iPS cell, colony formation, plating efficiency, single cell

2P-167 細胞間接着の阻害によるヒト iPS 細胞の無継代懸濁培養プロセスの確立

○都倉 知浩¹, 堀江 正信², 長森 英二¹, 紀ノ岡 正博¹
(¹阪大院・工・生命先端・生工, ²京大・環境安全)
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】 ヒト人工多能性幹細胞 (hiPS 細胞) は懸濁培養において球状細胞集塊を形成し、集塊同士の合一または細胞増殖による集塊径増大を経て、増殖阻害を引き起こす。既存の酵素処理による継代法では、集塊の単分散処理による自己細胞死に伴う細胞密度の減少が課題である。本研究では、hiPS 細胞の細胞間接着を特異的に阻害する薬剤を用い、集塊を適度な大きさに分割する培養法を検討した。

【方法・結果】 二次元培養面上で培養した hiPS 細胞 (Tic, 成育医療センター) を TrypLE Select (Life Technologies) により単分散処理し、mTeSR1 培地 (Stem cell technologies) を 30 ml 含む培養槽 (Able) に 1.0×10^5 cells/ml で播種し、懸濁培養を行った。培養 5 日目に細胞間接着阻害剤を所定濃度添加し、添加後 12 h でピペッティング操作により大きな細胞集塊を小さな集塊へと分割してきた。集塊分割後、培地交換と共に培養槽に再び播種した。コントロールとして TrypLE Select により単分散処理を介した継代処理を行った。コントロールでは再播種 1 日後細胞密度の有意な減少が見られたのに対し、集塊分割を行った条件では細胞密度が減少せず、速やかな細胞増殖が得られた。以上より本薬剤を用いた集塊分割法は、既存の継代培養法と比較して、効率良く細胞増殖を維持可能である。

Development of non-passage culture system for human induced pluripotent stem cell by inhibition of cell-cell connection

○Tomohiro Tokura¹, Masanobu Horie², Eiji Nagamori¹, Masahiro Kino-oka¹
(¹Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Div. Biochem. Eng., RIRC, Kyoto Univ.)

Key words human induced pluripotent stem cell, suspension culture, non-passage culture

2P-168 異なるヒト iPS 細胞株の集塊懸濁培養における増殖挙動

○加藤 雄真¹, 堀江 正信², 長森 英二¹, 紀ノ岡 正博¹
(¹阪大院・工・生命先端・生工, ²京大・環境安全)
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景】 ヒト iPS 細胞を利用した再生医療の実現には、細胞バンクに保存された由来の異なるヒト iPS 細胞株を安定して大量培養するための培養操作法の確立が重要である。三次元的に増幅を行うヒト iPS 細胞集塊懸濁培養は、平面培養に比べ最終到達細胞密度が高く、省スペースで低コストを実現可能な培養法と期待される。本報では集塊懸濁培養における異なる細胞株の増殖挙動について報告する。

【方法】 Tic 株 (成育医療センター) および 253G1 株 (理研バイオリソースセンター) を用いた。平面培養により前培養された細胞を剥離・回収後、単分散状態で細胞密度 1.0×10^5 cells/ml にて 30ml 培養槽 (Able) に播種した。培養開始後 24、72 h の細胞集塊を回収し、トリパンブルー染色法により生細胞濃度を得た。播種細胞数に対する 24 h 後の細胞生存率 α (-) と、その後 72 h までの比増殖速度 μ (h^{-1}) を算出した。

【結果】 細胞株 Tic では $\alpha = 0.61$, $\mu = 2.6 \times 10^{-2} h^{-1}$ であったのに対し、253G1 株では $\alpha = 0.21$, $\mu = -0.70 \times 10^{-2} h^{-1}$ であり播種時における単分散処理に起因する自己細胞死の頻度が高いと共に、増殖が得られないことが明らかになった。Tic 株の細胞集塊は増殖培養を通して球状を保ったのに対し、253G1 株の細胞集塊は脆く崩壊が観られ、これは細胞-細胞間接着力および細胞外マトリクス分泌量、細胞-基質間接着力の差に由来することが示唆された。以上は平面培養において観察された各株の形態的な特徴を反映した。

Growth behavior of different human iPS cell strains in aggregate suspension culture

○Yuma KATO¹, Masanobu HORIE², Eiji NAGAMORI¹, Masahiro KINO-OKA¹
(¹Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Div. Biochem. Eng., RIRC, Kyoto Univ.)

Key words human induced pluripotent stem cell, suspension culture, aggregate