

1P-229 幹細胞制御因子スクリーニングに向けた細胞画像情報解析法の開発

○藤谷 将也¹, 河合 駿¹, 高橋 厚紀¹, 岡田 法大¹, 佐々木 寛人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, ²名大院・工, ³ニコン)
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

【目的】近年、再生医療や創薬応用に向けて幹細胞から目的細胞への効率的な分化誘導法が開発されている。特に、工業的な生産能力や安定性から低分子化合物による分化制御は、培養コストの削減、結果の安定性向上が期待でき、有用化合物の探索が活発化している。しかし分化制御因子の評価は長期の培養に加え投与の時期や回数の検証が必要である。そこで本研究では、これまで開発してきた位相差画像による細胞品質評価技術を応用し、短期間かつリアルタイムな制御因子評価法の構築を目的とした。

【方法・結果】細胞中の特定のシグナル分子を阻害する5種類の化合物を未分化培養中のヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBMSC)に暴露させ形態情報を抽出した。その後脂肪細胞へ分化誘導した実際の分化評価データを取得した。抽出した形態情報と分化評価データの相関性を解析した結果、細胞の形の情報とその化合物に反応したフェノタイプには相関性が高く、迅速かつリアルタイムに分化培養への影響をスクリーニングできる可能性が示唆された。

Image-based Analysis for Screening Additive Factors for Stem Cell Culture

○Masaya Fujitani¹, Shun Kawai¹, Atsuki Takahashi¹, Norihiro Okada¹,
Hiroto Sasaki², Kei Kanie¹, Yasujiro Kiyota³, Hiroyuki Honda², Ryuji Kato¹
(¹Grad. Sch. Pharma. Sci., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ³Nikon Corp.)

Key words cell morphology, mesenchymal stem cell, morphological change

1P-230 画像情報解析を用いたiPS細胞コロニーのリアルタイム評価法の開発

○吉田 啓¹, 長坂 理紗子¹, 岡田 光加¹, 松本 恵², 佐々木 寛人²,
蟹江 慧¹, 清田 泰次郎⁴, 本多 裕之², 古江-楠田 美保³, 加藤 竜司¹
(¹名大院・創薬科学, ²名大院・工, ³医薬基盤・健康・栄養研, ⁴ニコン)
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年 iPS 細胞研究成果は目覚ましく、創薬応用や臨床治療への道が開かれつつある。これらは、多様な評価のため安定した培養の制御・品質管理が必要である。しかし依然として、iPS 細胞の培養技術には感覚的・経験的な熟練の技術が必須であり、培養者によって操作後のコロニーの品質が異なることや、新人教育において数値的目標がわからないことなどの課題がある。これは今後、iPS 細胞培養をさらに安定化させ、多くの研究者が目的の成果を得るために必要不可欠な標準化の工程である。我々のグループは、位相差顕微鏡画像を用いて iPS 細胞の培養状態をリアルタイムに定量評価できる細胞画像情報解析法を開発してきた。本技術は、細胞活性の変化に回答するとされる細胞の形に着目し、経時的に顕微鏡画像を取得し、画像処理・データ解析することで、細胞形態の変化を定量的に評価する手法である。本手法を応用することで、通常は培養者では気づかない小さい細胞塊や手技の差を定量化でき、またそれにより細胞培養手技を数値的な目標値への換算が可能になると考えられる。本研究では、手培養において iPS 細胞の品質に悪影響を及ぼすと考えられる培養手技因子について、経時的なコロニー形態情報解析によって、従来感覚的であった評価が定量的に行える手法を開発したので報告する。

Development of real-time monitoring method for iPS cell quality maintenance

○Kei Yoshida¹, Risako Nagasaka¹, Mika Okada¹, Megumi Matsumoto²,
Hiroto Sasaki², Kei Kanie¹, Yasujiro Kiyota⁴, Hiroyuki Honda²,
Miho Furue-Kusuda³, Ryuji Kato¹
(¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., ²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ³Nat. Inst. Biomed. Innov. Health, Nutri., ⁴Nikon Corp.)

Key words Quality control of stem cells, Colony tracking analysis, iPSC

1P-231 ヒト iPS 細胞由来胚様体の構造解析と混入フィーダー細胞のふるまい

○大貫 喜嗣, 三浦 汐織, 山村 英樹, 黒澤 尋
(山梨大・生命環境)
kurohiro@yamanashi.ac.jp

【目的】胚様体(EB)は、ヒト iPS 細胞(hiPSCs)の *in vitro* 分化誘導システムとして広く用いられている。分化誘導の再現性を高めるためには、EB の質的な均一性を高める必要がある。EB の三次元構造は、細胞分化に影響を及ぼすと考えられるが、細胞間結合の度合、内部の中空化および混入したフィーダー細胞の振る舞いなどの詳細に関する知見は十分ではない。本研究では、これらの知見を得るために種々の条件で形成した hiPSCs の EB の表面および内部構造を解析した。

【方法】フィーダー細胞(SNL76/7)上で培養した hiPSCs(201B7, RIKEN BRC)を Accutase で分散し、初期播種細胞数が 300, 3000, 9000, 30000 cells/well となるように Lipidure-Coat Plate A-U96 に播種した。10 μM Y-27632 含有 EB medium 中で 3, 6, 9, 16 日間の浮遊培養を行い、EB を形成した。形成された EB の構造を電子顕微鏡、共焦点位相差顕微鏡、および切片を作成することにより EB の表面および内部構造を解析した。

【結果及び考察】電子顕微鏡により、EB 表面の細胞間接着が十分に行われるまで形成後 6 日間が必要であった。16 日目の EB の中心部には核の存在しない細胞が多数見られるようになったが、中空化には至らなかった。混入したフィーダー細胞は形成初期には均一に分布していたが、培養経過に伴い EB の外側に移動し、EB 表面に局在化することが明らかとなった。いずれの初期播種細胞数で形成した EB において同様の構造変化と現象が見られた。これらの知見は非侵襲的な品質管理手法を構築する上で重要である。

Structural analyses of embryoid bodies of human iPS cells and behavior of feeder cells as an impure ingredient

○Yoshitsugu Ohnuki, Shiori Miura, Hideki Yamamura, Hiroshi Kurosawa
(Fac. Life Environ. Sci., Yamanashi Univ.)

Key words human iPS cells, embryoid bodies

1P-232 Cadherin-expressing feeder cell systems for neural differentiation culture of iPS cells

○Paerhati Paerwen¹, Akira Ito², Sho Fujiwara², Kaori Iwamoto¹,
Hitomi Yamabe², Yoshinori Kawabe², Masamichi Kamihira^{1,2}
(¹Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., ²Fac. Eng., Kyushu Univ.)
kanihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

Induced pluripotent stem (iPS) cells have become important tools for medical and biological research. Based on the stromal cell derived activity (SDIA) method, neural differentiation of iPS cells can be induced, by co-culturing of iPS cells on PA6 cells. We hypothesized that a close contact between iPS cells and feeder cells will improve the performance of PA6 cells as feeders for neural differentiation. We thus constructed genetically modified PA6 cells expressing E- or N-cadherin (designated as PA6/E and PA6/N) as feeder cells in iPS cell culture to enhance the cell-cell interaction between iPS and PA6 cells. A Tet-on system was incorporated into retroviral vectors for inducible expression of E- and N-cadherin, to generate PA6/E and PA6/N. One day after seeding PA6/E or PA6/N cells, iPS cells were seeded on the feeders (Day0). Immunostaining with a neural specific marker TuJ was performed on Day2, Day4 and Day6. As the result, PA6/E cells induced the highest neural differentiation efficiency of iPS cells, while PA6/N cells enhanced the highest number of neurite-like structure of differentiated cells. In conclusion, PA6/E and PA6/N cells improved neural differentiation of iPS cells.

Cadherin-expressing feeder cell systems for neural differentiation culture of iPS cells

○Paerhati Paerwen¹, Akira Ito², Sho Fujiwara², Kaori Iwamoto¹, Hitomi Yamabe²,
Yoshinori Kawabe², Masamichi Kamihira^{1,2}
(¹Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., ²Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words iPS cells, neural differentiation, cadherin