

未分化細胞維持のための細胞培養基質の検討および磁気ビーズによる細胞分離

日大生産工 (院) ○山下 翔平

日大生産工 野呂 知加子

1. 諸言

最近、iPS 細胞を用いた再生医療が世界の話題となっている。再生医療とはヒトの臓器の機能低下や損傷を、幹細胞によって修復することを意味する。再生医療に幹細胞を用いる場合、幹細胞は数が少ないので、通常は生体外での細胞培養により、幹細胞を増幅してから移植などに利用することが多い。

細胞培養時には培養皿を用いるが、細胞が接着する基質の性質も、生体内とは異なるプラスチック等の人工物である。近年、細胞外基質が接着している細胞に対して、増殖・分化などのシグナルを与える役割を担っていることが明らかになっている。従って、再生医療に応用する細胞を培養する際には、細胞と基質の相互作用に着目し、元の幹細胞の形質を維持できるような条件を選ぶ必要がある。

一方、通常の培養環境で細胞は、重力の影響を受けて培養皿の上では、2次元的なストレスのかかる形態をとることになる。このような状態において幹細胞は分化が亢進しやすくなり、未分化性を維持した培養条件においても幹細胞が、自然に分化してしまう可能性がある。そこで、未分化幹細胞の比率を測定し、かつ未分化幹細胞だけを分離する技術が必要とされている。その一つに、多くのサンプルを一度に処理することが出来、磁石で補修・回収可能な磁気

ビーズを用いた磁気細胞分離法がある。特に多摩川精機株式会社が東工大との共同研究により確立したナノ磁性微粒子「FG ビーズ」が注目されている。この磁気ビーズは従来品に比べ、非特異的吸着がほとんどない、多彩なりガンドを固定出来る、有機溶媒に対して強い耐性を示すといった特徴を持つ。従って、標的タンパク質のみを効率的に分離することが出来、新薬作りなどに威力を発揮すると期待されている。

本研究は、幹細胞の一つである、マウス ES 細胞 D3 株を用いて、細胞培養の際に用いる基質の表面特性の細胞形態や細胞分化に対する影響について、分子レベルで検討することを目的とする。

また、磁気ビーズを用いて未分化幹細胞だけを効率的に分離する方法についても合わせて検討した。

2. 材料と方法**2.1 培養方法**

マウス胚性幹 (ES) 細胞 D3 株(feeder free) を、Corning® BioCoat™ Collagen Type I および Collagen Type IV, Fibronectin, Laminin, Gelatin(Control)上に播種した。Laminin については、種類を変えて培養皿に塗布した。培養液は、DMEM+10%ノックアウト血清代替 KSR+5%牛胎児血清 FCS+1%PS+0.1%ES 細胞増殖因子 LIF+0.1%メルカプトエタノール 2-ME を使用した。同様に市販

Study of cell culture substrate for the undifferentiated cell maintenance
and the cell separation with magnetic beads

Shohei YAMASITA and Chikako YOSIDA-NORO

の Lamini(-111)に加え、異なる種類のラミニンを塗布した皿上で細胞の培養を行った。

播種後 6 時間から 72 時間まで、細胞形態を顕微鏡観察した。

2.2 RT-PCR

72 時間後に回収した細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。未分化マーカ及び、中胚葉分化マーカ-の遺伝子発現を調べた。また、ラミニン受容体であるインテグリンの発現についても確認した。

2.3 免疫染色

マウス ES 細胞の表面に発現する未分化マ-ーカー糖鎖抗原である stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

3. 結果と考察

播種後 6 時間後から 72 時間後までの細胞形態について、基質による違いを観察した。播種後 1 日目には、少しずつ差が見え始め、3 日目には顕著な差が見られた。Collagen IV では、細胞が仮足を出して成長していた。Laminin 処理した培養皿では、細胞が培養皿へ接着するよりも、細胞同士が接着して凝集塊を形成した (Fig.1)。

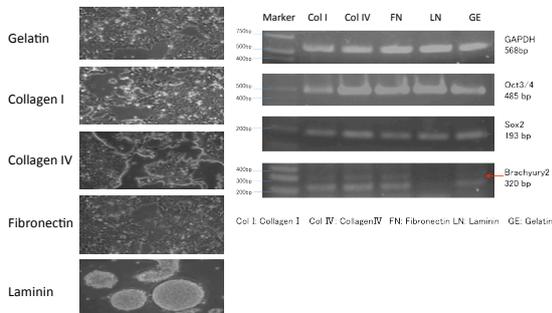


Fig. 1 培養3日目の細胞像及び遺伝子発現

また、RT-PCR の実験では、ES 細胞の未分化マ-ーカーである Oct3/4 の発現は Collagen IV, Fibronectin, Laminin 処理皿では保持され、Collagen I および Gelatin (Control) 処理皿ではむしろ低下していた(Fig.1)。同

じく未分化性の指標となる Sox2 の発現は、どの基質でも同程度であった。また、Laminin 処理皿では中胚葉マ-ーカーである Brachyury の発現が低下していた。

次にインテグリンの発現結果では、インテグリンの α 鎖において、細胞外基質の違いにより発現に差が見られた(Fig. 2)。

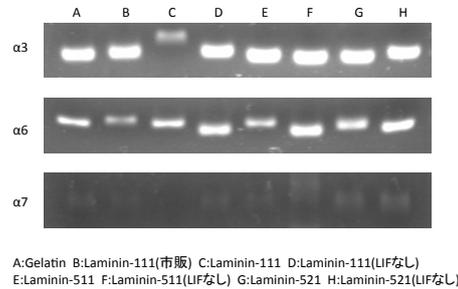


Fig. 2 インテグリン α 鎖の遺伝子発現

最後に、免疫染色の実験では、LIF を抜いても未分化細胞が多かったのは、市販の Laminin (-111) 処理培養皿上で (Fig. 3)、Laminin-511, 521 を塗布した皿上では、未分化細胞は少なかった (データ非表示)。

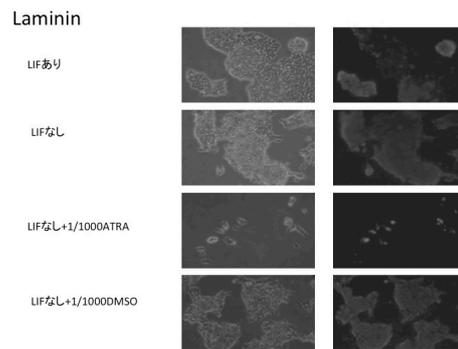


Fig. 3 Laminin 処理皿での SSEA-1 抗原発現

今後は、抗体を結合させた磁気ビーズ (FG-Beads 多摩川精機) を用いた幹細胞分離により、未分化幹細胞数の定量比較を行った。

【参考文献】

- 1) Domogatskaya AM *et al.*, (2008) *STEM CELLS*, **26**, 2800–2809.
- 2) Hayashi Y *et al.*, (2007) *STEM CELLS*, **25**, 3005–3015.
- 3) H.Handa *et al.*,(2009)*J.Magn.Soc.Jpn*,**33**, 154-158