

iPS 細胞等幹細胞／フィーダー細胞の分離培養膜の開発

○大藪 淑美^{*1)}、柚木 俊二^{*1)}

1. 目的・背景

幹細胞研究で用いられる iPS 細胞は、多能性を維持しながら増殖させることが必要である。培養方法の一つに、必要な液性因子を産生するフィーダー細胞を下敷きにして、同一平面上に iPS 細胞と一緒に培養する方法があるが、iPS 細胞を実験等に使用する場合には、フィーダー細胞と分離する作業が必要になる。形質を維持した iPS 細胞の単離操作は複雑な作業のため、簡素化・効率化が求められる。iPS 細胞の取り扱いが難しく、分化能の低下や染色体の異常が頻発するため、従来法を大きく変更することなく、フィーダー細胞と iPS 細胞を分離培養することが iPS 細胞研究の効率化につながる。

分離培養に要求される膜は、フィーダー細胞が産生する液性因子（タンパク質）の透過性が必要である。我々は、コラーゲンナノ線維からなるハイドロゲルの生物学的・物理化学的性質に着目した。コラーゲンナノ線維からなるハイドロゲルを形成し、線維間の空隙は液性因子を透過させる通路となる。ナノ線維間に架橋を導入し、空隙を制御して分離膜を作製する。

本研究は、分離培養容器（図1）で両細胞を隔離して、フィーダー細胞が産生する液性因子を iPS 細胞に作用させるタンパク質透過性の分離膜材料を開発することを目的とした。

2. 研究内容

(1) 実験方法

pH3.0 希塩酸で希釈した 0.2% 豚皮由来のアテロコラーゲン溶液に 1.5×PBS を等量混合し、カップ状培養容器に流し込んだ。カップ状容器は、底面に近い壁面にゼラチンをコーティングした後、メッシュを貼り準備した。37℃でコラーゲンを線維化させ、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド水溶液でコラーゲン線維ゲルを架橋して分離膜を作製した（特願 2012-074775）。

PBS で洗浄した分離膜を、フィーダー細胞を播種した培養皿内に配置した。膜上に iPS 細胞を播種して 5 日間培養した。iPS 細胞の未分化性能を ALP 染色により評価した。

(2) 結果及び考察

培養した iPS 細胞の位相差顕微鏡観察像を図 2 に示す。iPS 細胞の分化能は未分化能の高さで評価するため、未分化維持率を評価した。iPS 細胞のコロニーは、輪郭が明瞭な球状の凝集体であった。これに対して従来法では、コロニーは輪郭が不明瞭でいびつな凝集体であった。また、未分化状態を染色する ALP 染色では、分離膜上の iPS 細胞の方がより染色性が良好であった。90% 以上染色されたコロニーを未分化維持されていると評価した。未分化維持率は、従来法では 19.7% であるが、分離膜上では 95.6% であった。コラーゲンが iPS 細胞の未分化維持に影響があるとの報告があることから、分離膜のコラーゲンが iPS 細胞に影響を与えたと考えられる。

3. 今後の展開

本成果は、iPS 細胞に限らず、分離膜を必要とする様々な細胞にも利用が考えられ、分離培養容器の商品化が期待される。しかしながら、現状の分離膜は脆弱であり、生産効率が低いため、分離膜の生産性を向上する改良が必要である。

謝辞

本研究の一部は、（一財）向科学技術振興財団研究助成により実施された。

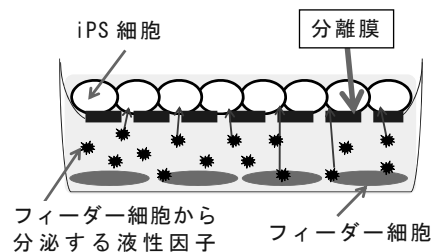


図 1. 分離培養の概念図

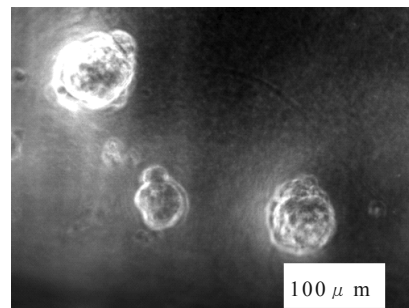


図 2. 分離培養の iPS 細胞の位相差観察像

*1) バイオ応用技術グループ