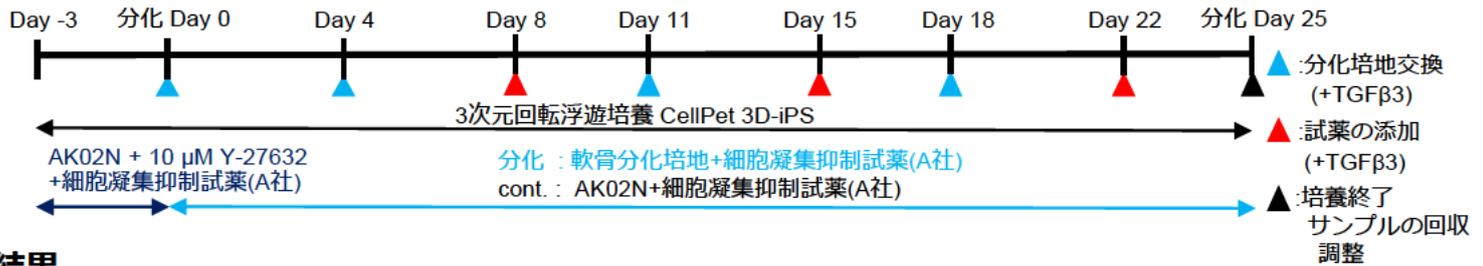


CellPet 3D-iPS ディスポーザブル培養ベッセルを用いた ヒト間葉系間質細胞スフェロイドの軟骨分化誘導

CellPet 3D-iPSを用いた「[ヒト間葉系間質細胞のスフェロイド培養\(PDF\)](#)」では、ヒト間葉系間質細胞の均一なスフェロイドの形成に成功し、その性質を維持したまま培養ができていたことが示唆された。今回、ヒト間葉系間質細胞のスフェロイドを用いて25日間の軟骨分化誘導をおこない、その解析をおこなった。

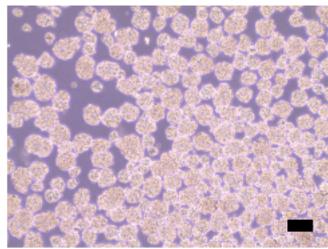
実験のスケジュール



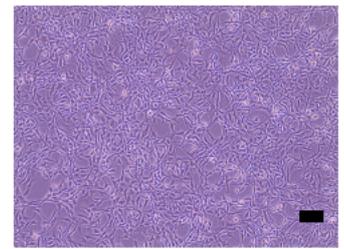
結果

(分化0日目)

3次元回転浮遊培養



平面培養



軟骨分化培養

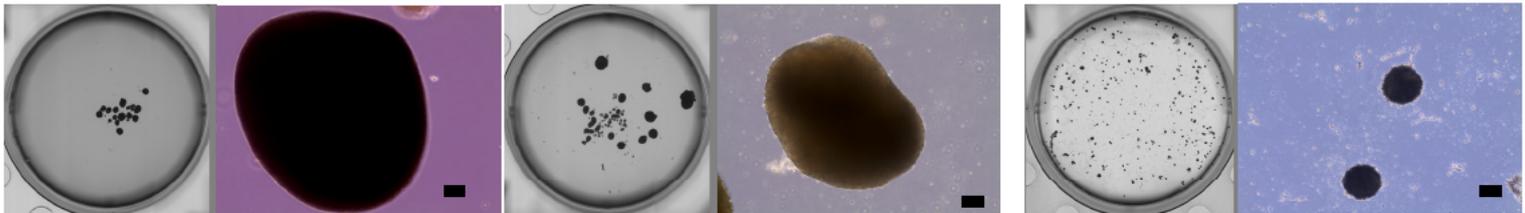
軟骨分化培養

(分化25日目)

(軟骨分化)

(cont. 培地のみ)

(軟骨分化)



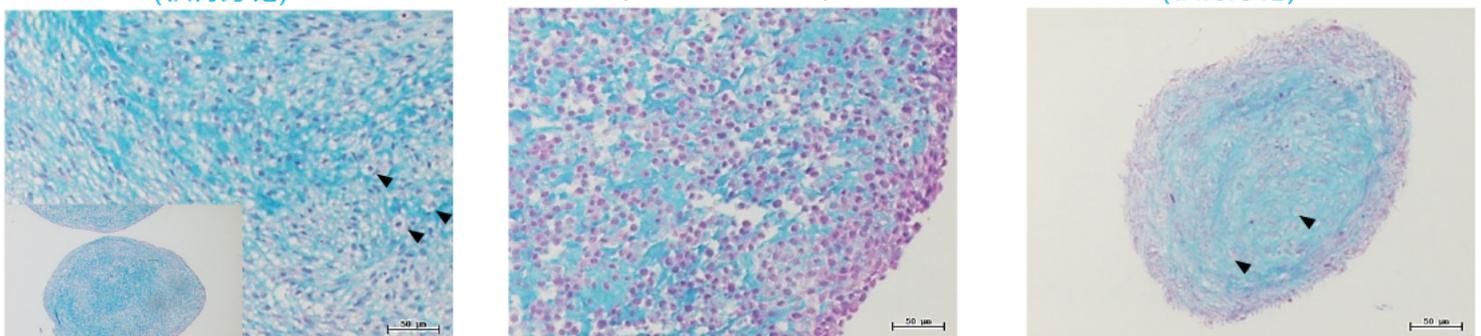
上下段：ヒト間葉系間質細胞スフェロイド位相差顕微鏡像 (Bar = 200 μ m)
中段：イメージャー(Cell3iMager, SCREEN)によるスフェロイド全体像(6well plate)

組織染色-1 アルシアンブルー染色

3次元回転浮遊培養

(cont. 培地のみ)

平面培養
(軟骨分化)

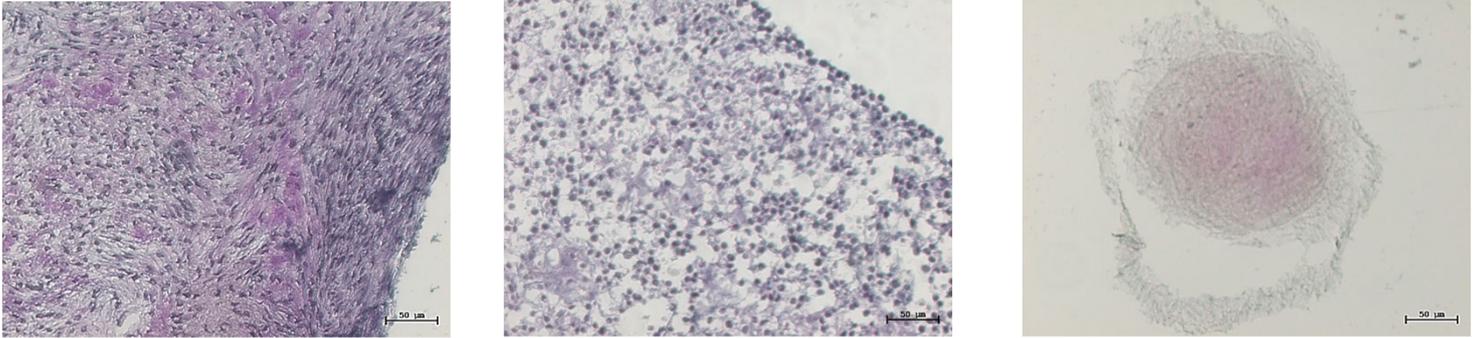


ヒアルロン酸などの酸性粘液物質 粘性多糖類:青色, 核:赤色

▼: 軟骨小腔(一部)

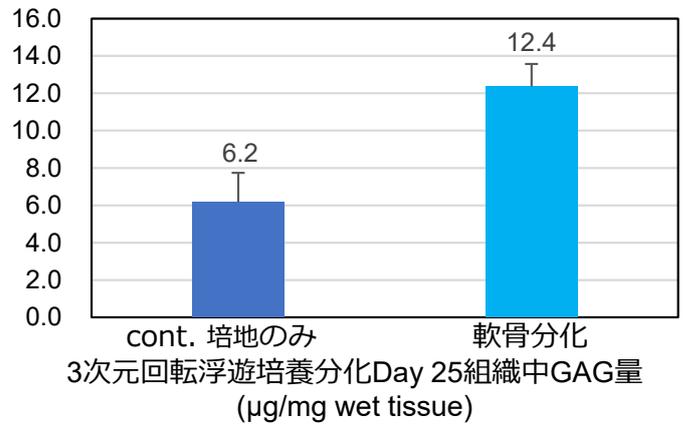
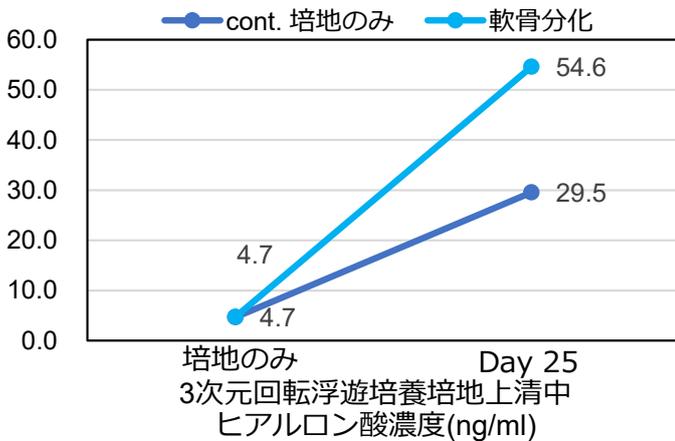
組織染色-2 エラスチカ・ワンギーソン染色

3次元回転浮遊培養 (軟骨分化) (cont. 培地のみ) 平面培養 (軟骨分化)



弾性線維(エラスチン):青藍から黒色, 膠原線維(コラーゲン):赤色, 核:黒褐色

軟骨分化誘導組織の分泌物



まとめ

- CellPet 3D-iPSを用いてヒト骨髄由来間葉系間質細胞のスフェロイドを作製し、そのまま軟骨組織への分化誘導に成功した。
- 分化誘導初期は直径80µm程度の均一なスフェロイドで分化を開始し、スフェロイドが徐々に凝集することにより培養終了時には組織の中まで細胞が密でスフェロイド同士の接着部も一体化していた。
- 組織染色結果から軟骨分化培地での3次元回転浮遊培養では軟骨小腔が確認されるとともに、軟骨分化に伴い産生されるヒアルロン酸、弾性線維、膠原線維は平面培養と比較して良く染色されているので、軟骨分化については3次元回転浮遊培養が良いと判断した。
- 軟骨分化培地で25日間3次元回転浮遊培養をおこなうことで、培地中ヒアルロン酸濃度および組織中GAG量はコントロール培地での培養と比較して上昇しており、軟骨分化が促進されていることが観察された。

実験方法

細胞種：ヒト骨髄由来間葉系細胞不死化細胞株 UE7T-13(JCRB Cell Bank)

3次元回転浮遊培養培地：AK02N (Ajinomoto) +10 µM Y27632 (wako) +細胞凝集抑制試薬 (A社)

平面培養培地：AK02N (Ajinomoto)

3次元回転浮遊培養軟骨分化培地：Human Mesenchymal Stem Cell(hMSC) Chondrogenic Differentiation Medium BulletKit (Lonza) +TGFβ3 (SIGMA) +細胞凝集抑制試薬 (A社)

平面培養軟骨分化培地：hMSC Chondrogenic Differentiation Medium BulletKit (Lonza) +TGFβ3 (SIGMA)

ベッセル：ディスプレイブル培養ベッセル50ml (JTEC Corp.) 回転培養 40rpm

イメージャー：Cell3iMager (SCREEN) 撮影：EVOS (Thermo Fisher), Axio Observer (Zeiss)

プレートリーダー：Infinite® 200 PRO (TECAN)

染色：アルシアンブルー染色：アルシアンブルー液 (Wako) +ケルンエヒトロート液 (武藤化学)

エラスチカ・ワンギーソン染色：ワンギーソン液 (Wako) +鉄ヘマトキシリン液 (Wako)
+レゾルシンフクシン液 (武藤化学)

測定キット：ヒアルロン酸濃度：DuoSet Hyaluronan (R&D), GAG量：GLYCOSAMINOGLYCAN (biocolor)

お問い合わせ先

(株)ジェイテックコーポレーション 営業部

〒567-0086

大阪府茨木市彩都やまぶき2-5-38

Tel : 072-655-2786 Fax : 072-643-2391

info@j-tec.co.jp