

## C315

## 任意形状でのシート状細胞組織体形成と分化傾向解析

(九大院工)○(学)佐藤康二・(他)楠見智明・(正)水本博・(正)梶原稔尚\*

## 【緒言】

胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES 細胞)は分化多能性と半無限の自己複製能を有することから、再生医療の適用細胞源として有力視されている。ES 細胞の分化は、細胞組織体を形成させることで誘導する方法が一般的であり、従来、細胞同士の自発的な接着による球状組織体(embryoid body: EB)を形成させる手法が用いられてきた。その分化機構は、細胞同士の接着や外因性の誘導物質、細胞分泌物の分布など、組織体内部の微小環境が影響していると考えられている。このことより、組織体の大きさを変えることで微小環境を制御し、①目的細胞への効率的な分化、②細胞の分化機構の解析への応用が期待される。ただし、EBの大きさの制御には播種細胞数や培養日数など種々の培養条件を変える必要があり、EB径のみを調節することは困難である。また、球状のEBは内部の細胞分布を行う上では最適な形状とは言い難い。

そこで我々は、組織体の形成空間を制御し、かつ形状をシート状にすることでこれらの課題を解決できる新規培養法の開発に取り組んだ。

## 【実験方法】

Fig. 1に開発した培養装置を示す。本装置は2枚の多孔平膜とその間隙を制御するスペーサーからなる空間を組織体形成空間としている。この結果、スペーサーの開口面積と厚みによって、形成される細胞組織体の形状制御が可能である。

今回の実験では、厚みが100 $\mu\text{m}$ 、300 $\mu\text{m}$ で組織体形成空間の体積を揃えた培養装置(以下Sheet 100、300とする)に $2.0 \times 10^5$  cellsのマウスES細胞を遠心播種し、細胞の増殖によりシート状の組織体を形成させた。評価は形態観察、細胞数変化、遺伝子発現解析、免疫蛍光染色により行った。

## 【実験結果および考察】

形態観察より、培養経過に伴い装置内で細胞が増殖しシート状の組織体が形成されることを確認した。形成した組織体内部の細胞形態をFig. 2に示す。Sheet 100では細胞質比率の少ない小さな細胞が高密度に存在していた。これに対し、Sheet 300では細胞質比率が比較的大きな細胞が観察された。また15日間の培養でSheet 100はSheet 300の約2.3倍の細胞数を示し、細胞形態観察との相関が示された。

未分化細胞に特異的に発現しているOct-4 mRNAの発現を解析したところ、Sheet 300はSheet 100と比較して早期に発現が低下した。これより、Sheet 300の方がより分化が進行していると考えられる。

また組織体内部の未分化細胞の免疫蛍光染色を行っ

たところ、培養15日目においてSheet 100では未分化細胞が組織体の厚み方向に対して中心部に分布していた(Fig. 3)のに対し、Sheet 300ではその存在が確認できなかった。以上のことより、ES細胞組織体において未分化細胞の維持には組織体の厚みが関与すると考えられる。

一方、分化マーカーとして評価した各種の遺伝子発現は両条件間で有意な差は見られなかった。未分化細胞の遺伝子発現に差が示されたことをふまえると、Sheet 100、Sheet 300の間に組織体内部での分化細胞の分布に差があると考えられる。このため、分化細胞に対して免疫蛍光染色を行うことを予定している。

## 【結言】

分化・未分化細胞の分布解析のための形状制御可能なシート状のES細胞組織体形成法を開発した。また、ES細胞組織体において未分化細胞の維持には、組織体の厚みが関与することが示された。

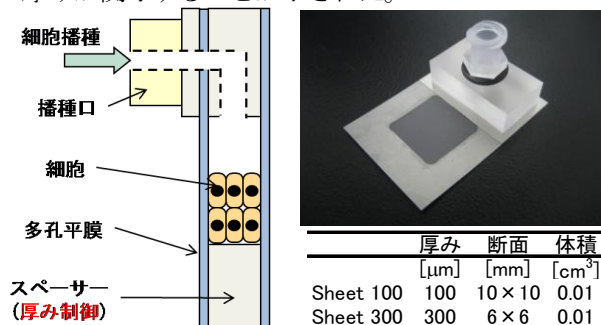


Fig. 1 シート形状のES細胞組織体形成装置

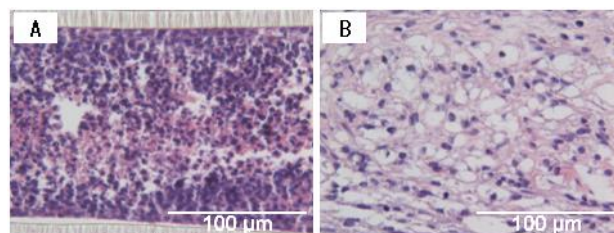


Fig. 2 形成された組織体内部の細胞形態(培養15日目、A:Sheet 100、B:Sheet 300)

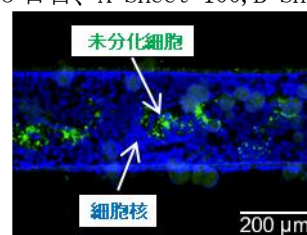


Fig. 3 Sheet 100における未分化細胞の免疫蛍光染色

\*TEL: 092-802-2746 FAX: 092-802-2796  
E-mail: kajiwara@chem-eng.kyushu-u.ac.jp