

D116

壁付着性動物細胞のシングルセル培養のための基礎検討

(九大院工)○(学)堺 淳一*・(正)武井 孝行・(正)境 慎司・(正)井嶋 博之・(正)川上 幸衛

【緒言】

細胞チップは創薬における治験の代替法や細胞機能解析などのための新しい分析用バイオデバイスとして現在盛んに研究されている。本研究ではその新たな試みとして肝細胞を用いたシングルセル浮遊培養形態による細胞チップの創製を目的としている。球状の細胞形態は生体内の肝細胞形態と類似しており、スフェロイド等と比べ細胞同士の接着状態や細胞周囲の微小環境に差異がないことから、よりクリアな評価が可能な分析ツールの開発が期待できる。本検討では、細胞接着性ペプチド配列 (RGD) と細胞間接着阻害剤である Poly-ethyleneglycol (PEG) を組み合わせることにより、細胞の足場形成と凝集抑制を両立した培養技術の開発を目的とした。

【実験】

① RGD 濃度による細胞付着阻害の検討 所定濃度の GRGDS を添加した培地中に肝細胞を懸濁し、RGD 含有ペプチド(PnF)被覆 24 ウェルプレートに播種した。6 時間後の細胞付着率から肝細胞の処理に必要な培地中 GRGDS 濃度を得た。

②PEG-GRGDS の作製 N-Hydroxy succinimide を一端に有する PEG (PEG-NHS)と GRGDS を用いて PEG-GRGDS を作製した。反応率は 96%であり、得られた試料は限外ろ過による精製及び凍結乾燥の後に実験に用いた。なお、使用した PEG の分子量は 2000 から 40000 までの 5 種類であり、2000 のものであれば(2k)と記載している

③肝細胞培養 GRGDS, PEG-NHS や PEG-GRGDS を添加した培地中に肝細胞を懸濁し、低接着性 24 ウェルプレートを用いて培養した。また、細胞間の接着を阻害した分散培養を行うために一辺 30 μm の培養空間を有する PDMS チップ内でのシングルセル培養も行った。

【結果及び考察】

PnF 被覆表面に対する肝細胞の付着率は GRGDS 濃度依存的に低下し、150 nmol-GRGDS/ml においてほぼ全ての細胞付着が阻害された(Fig.1)。以降、GRGDS が肝細胞の RGD レセプターと十分に結合すると考えられる

150 nmol/ml の GRGDS 添加培地を用いることとした。

PEG-GRGDS 処理した肝細胞は細胞低接着性プレート上培養において良好な細胞分散状態を示した(Fig.2)。一方、PEG-GRGDS(40k)で修飾した肝細胞の ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)活性は細胞低接着性 PDMS チップ内シングルセル培養において有意に向上した。つまり、本手法を用いることにより細胞の足場形成が可能となり、肝細胞の機能発現を促進したことが考えられる。以上の結果より、PEG-GRGDS を用いることによる初代ラット肝細胞のシングルセル培養とそれら細胞による肝特異的機能発現が可能であることが示唆された。

【結言】

150 nmol/ml の PEG-GRGDS 添加培地を用いることで、肝細胞間の接着を阻害したシングルセル浮遊培養が可能であった。さらに、これら肝細胞は EROD 活性を発現していた。

【謝辞】本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「21656218」により実施された。

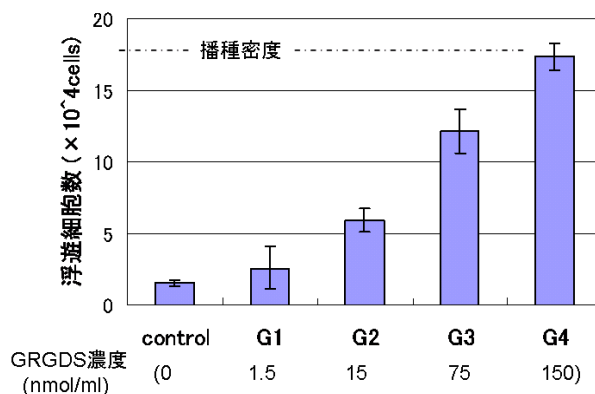
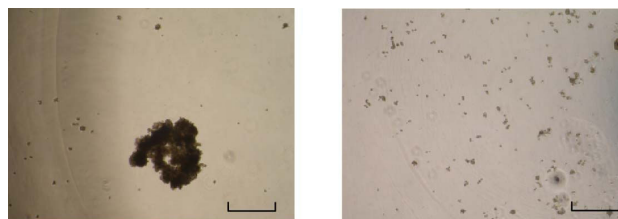


Fig.1 GRGDS 濃度による細胞接着阻害(n=3)

Fig.2 培養3日目の肝細胞形態 (左: コントロール、右: PEG-GRGDS(20K), bar=500 μm)

*E-mail: jsakai@chem-eng.kyushu-u.ac.jp