

VIVANT-CELL[®]-Pot を使用した歯髄幹細胞の膜分取

今日の急速な再生医療の発展に伴い、体性(組織)幹細胞は移植治療や創薬研究等の様々な局面での応用が期待され、数多くの研究が進められている。幹細胞移植治療の実用化に向けた重要な課題の一つとして、患者由来組織からの幹細胞分離の効率化が挙げられる。近年、遊走因子および $8\mu\text{m}$ の開孔を持つ膜を使用し、細胞の遊走能を利用して歯髄、骨髄、脂肪組織から組織再生誘導能力の高い細胞集団を効率よく分離・濃縮する方法が報告された¹⁾²⁾。

VIVANT-CELL[®]-Pot は、この遊走因子膜分取法を応用して開発され、ヘテロな細胞集団の中から効率よく機能的な細胞を分離するために設計された細胞分離・培養用カルチャーインサートである。本アプリケーションノートでは、VIVANT-CELL[®]-Pot を使用した細胞分離の際に膜上にアプライした細胞数により、得られる分取細胞数が変化することを確認した検討実験について記述する。

1) Iohara, K., *et al.*, *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(7):521-33.

2) Hirose, Y., *et al.*, *J Stem Cell Res Transplant* 2014; 1(2):1006.

材料

- ・ヒト歯髄幹細胞 (Lonza Japan)
- ・ダルバッコ変法イーグル培地 (DMEM) (富士フィルム和光)
- ・ウシ胎児血清 (HyClone)
- ・ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (×100) (富士フィルム和光)
- ・PBS タブレット (タカラバイオ)
- ・組換え体 SDF1 α (PeproTech)
- ・TrypLE Select Enzyme (Gibco)
- ・エタノール (富士フィルム和光)
- ・ギムザ染色液 (武藤化学)
- ・Falcon[®] セルカルチャー 12 ウェル マルチウェルプレート 平底 (Corning)
- ・VIVANT-CELL[®]-Pot (ネッパジーン)

方法

凍結保存されたヒト歯髄幹細胞 (4×10^5 個) を解凍し、増殖培地 (DMEM, 10%FBS) に懸濁、10cm プレートに播種し CO₂ インキュベーターで 4 日間培養した。

培養した細胞を PBS で洗浄後、TrypLE Select を加え、37°C、5 分間の処理により分散した。分散処理を増殖培地により停止し、ピペティングの後に 1,500rpm、3 分間遠心して細胞を回収した。回収した細胞を FBS を含まない DMEM に 2.5×10^4 個/300 μL 、 5.0×10^4 個/300 μL 、 10.0×10^4 個/300 μL 、 20.0×10^4 個/300 μL の細胞密度になるようにそれぞれ懸濁した。12 ウェルプレートに遊走培地 (DMEM, 10%FBS, 100ng/ml SDF1 α) を 2mL ずつ加え、VIVANT-CELL[®]-Pot をセットした。VIVANT-CELL[®]-Pot の分離膜上に上記の細胞密度に調製した細胞懸濁液をそれぞれ 300 μL ずつ加え、CO₂ インキュベーターで 24 時間培養し、膜分取を行った。

24 時間の膜分取後、VIVANT-CELL[®]-Pot および遊走培地を除去し、エタノールを加えて細胞を固定した。エタノールを水道水で洗浄後、3%ギムザ染色液で 10 分間染色を行った。染色後、水洗し、倒立顕微鏡下で分取細胞をカウントした。

結果

VIVANT-CELL[®]-Pot を使用して、SDF1 α および血清を含む培地によるヒト歯髄幹細胞の遊走膜分取を行った。24 時間の膜分取により、分取細胞を得られることが示された (Fig.1)。また、分取細胞数を計数したところ、VIVANT-CELL[®]-Pot にアプライした細胞数に応じて、得られる分取細胞数が変化することが確認された (Fig.2)。アプライ細胞数 10.0 \times 10⁴ 個および 20.0 \times 10⁴ 個の間には、得られる細胞数に有意差は見られなかった。

考察

VIVANT-CELL[®]-Pot を使用したヒト歯髄幹細胞の遊走因子膜分取において、アプライした細胞数の増加に応じて分取細胞数が増加したが、アプライ数 10.0 \times 10⁴ 個および 20.0 \times 10⁴ 個の間における分取細胞数には有意差が見られなかったことから、得られる細胞数には分取限界があると推察される。また、膜上に 20.0 \times 10⁴ 個の細胞をアプライした際に得られる細胞数にばらつきが大きく見られることから、解析に資する際のアプライ細胞数は、分取限界に達するよりも少ない細胞数を採用することが望ましいと考えられるため、アプライする推奨の細胞数は 5.0 \times 10⁴ 個とした。

まとめ

VIVANT-CELL[®]-Pot によるヒト歯髄幹細胞の膜分取において、

- ・アプライ細胞が増加すると分取細胞が増加する。
- ・データの精度の観点から、アプライする推奨の細胞数は 5.0 \times 10⁴ 個とする。

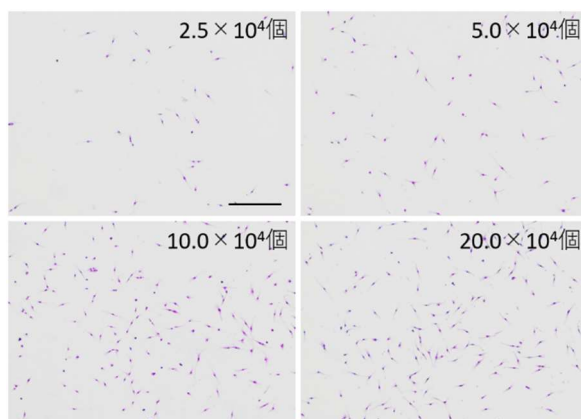


Fig.1 膜分取されたヒト歯髄幹細胞。図中に示した細胞数を膜上にアプライし、膜分取された細胞をギムザ染色し観察した。Scale bar, 500 μ m。

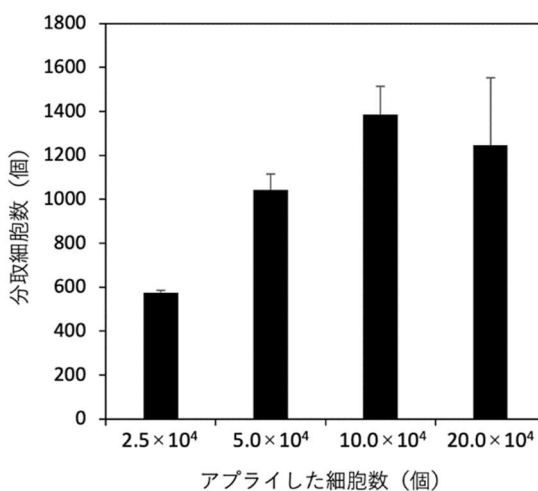


Fig.2 アプライした細胞数に対する各分取細胞数。

VIV-5-P12-48

幹細胞分取用分離膜 VIVANT-CELL[®]-Pot, 12 ウェル用, 48 ケ入

VIVANT-CELL[®]-Pot 幹細胞分取用分離膜

高機能・高品質な幹細胞を「簡便」「安価」「高効率」に



NEPAGENE
ネッパジーン株式会社

〒 272-0114 千葉県市川市塩焼 3-1-6
TEL: 047-306-7222, FAX: 047-306-7333 E-mail: info@nepagene.jp
URL: <http://www.nepagene.jp>