

## VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot を使用して得られた膜分取ヒト歯髄幹細胞における VEGF 産生能の評価

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<sup>1),2)</sup>。

VIVANT-CELL<sup>®</sup>-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、ヒト歯髄幹細胞から VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot を使用して特定の細胞集団を分取し、その培養上清に含まれる VEGF について定量を行った評価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 $\alpha$  (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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>-Pot (ネッパジーン)
- ・Human VEGF IQELISA<sup>™</sup> Kit (RayBiotech)

### 方法

凍結保存されたヒト歯髄幹細胞( $4\times 10^5$  個)を解凍し、増殖培地(DMEM, 10%FBS)に懸濁、10cm プレートに播種し CO<sub>2</sub> インキュベーターで 3 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  $5.0\times 10^4$  個/300 $\mu\text{L}$  の細胞密度になるように懸濁した。12 ウェルプレートに遊走培地(DMEM, 10%FBS, 100ng/ml SDF1 $\alpha$ )を 2mL ずつ加え、VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot をセットした。VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot の分離膜上に上記で調製した細胞懸濁液をそれぞれ 300 $\mu\text{L}$  ずつ加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 24 時間静置して膜分取を行った。また、コントロールとして上記の細胞懸濁液 15 $\mu\text{L}$ (2,500 個細胞)を遊走培地に直接播種し「未分取細胞群」(Fig.1)とした。

24 時間の膜分取後、VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot を 12 ウェルプレートから除去して遊走培地を増殖培地に

交換し、「分取細胞群」(Fig.1)とした。除去した VIVANT-CELL®-Pot 上に残った細胞を TrypLE Select 処理により分散し、増殖培地に播種して「膜上残細胞群」(Fig.1)とした。また「未分取細胞群」の培地を増殖培地に交換し、それぞれ培養を行った。

分取終了から 3 日間培養を行った後、「分取細胞群」「膜上細胞群」「未分取細胞群」それぞれについて継代を行った。

継代から 3 日間の培養後、培地を試料回収用の低血清培地(DMEM, 1%FBS)に交換し、更に 2 日間の培養後、培養上清を回収、試料中に含まれる VEGF 濃度を ELISA 法により定量した。

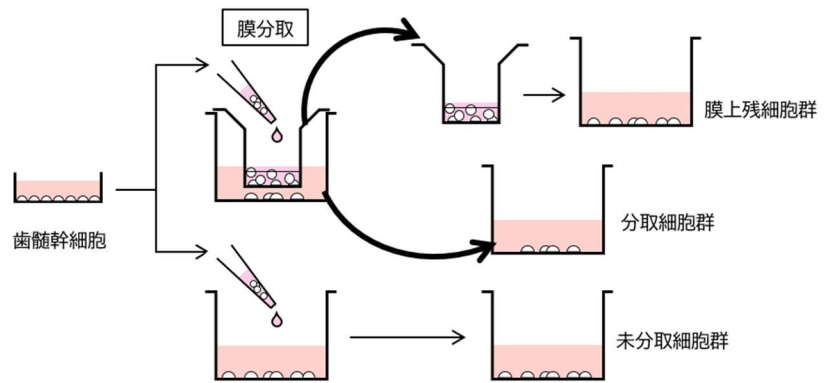


Fig.1 各細胞群の調製フロー概略

## 結果

VIVANT-CELL®-Pot を使用して、SDF1 $\alpha$ 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 時間の膜分取操作により得られた「分取細胞群」および「膜上残細胞群」、分取操作を行わなかった「未分取細胞群」について、それぞれ培養上清中に含まれる VEGF 濃度を ELISA 法により定量した(Fig.2)。この結果、VIVANT-CELL®-Pot により分取された細胞群から産生される VEGF 量は、膜上に残っていた細胞群に比べ有意に多いことが明らかとなった。

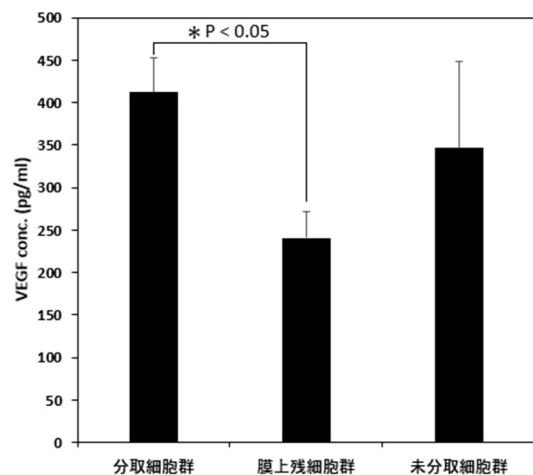


Fig.2 図中に示した細胞群の培養上清における VEGF 濃度

## まとめ

VIVANT-CELL®-Pot を使用した遊走膜分取法により、初代ヒト歯髄幹細胞集団に含まれる VEGF 産生能の高い細胞群を、効率よく分離・濃縮することが可能であることが示唆された。

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

