

(信州大・繊維) ○白川美徳、玉田靖 (国循病セ) 山岡哲二
(物材機構) 小林尚俊

緒言

シルクはフィブロインとセリシンという 2 種類のタンパク質からなる天然繊維であり、フィブロインはその優れた生体安全性やスポンジやナノファイバーなど様々な材料に安全なプロセスで加工できることから再生医療での足場材料としての利用が期待されている。

一方、iPS 細胞は様々な細胞に分化する能力を持った多能性幹細胞であり、再生医療での細胞源として重要であり、その培養方法の検討が進められている。我々は新規フィーダーフリー培養法としてシルクフィブロイン基材を用いその特性を調査する中でシルクフィブロイン上では iPS 細胞由来の接着コロニーと浮遊コロニーという 2 種類のコロニーが共存するという現象を見出した。本現象を利用することで、継代操作を行うことなく大量の iPS 細胞を培養できると期待されるため、長期培養を実施し 2 ヶ月に渡り iPS 細胞コロニーの出現を確認したものの、コロニー数の顕著な減少が観察された。そこで、本研究ではフィブロイン基材にもう一つのシルクタンパク質であるセリシンを加えた基材を作製し、長期培養によるコロニー数の変化について調査した。

実験

フィブロイン基材は、家蚕繭から常法により調製したフィブロイン水溶液を培養シャーレにコーティングした後 80%メタノールによる不溶化処理を行い作製した。フィブロイン/セリシン基材は、農研機構寺本英敏博士より提供頂いたセリシンホープを用い常法によりセリシン水溶液を調製し、フィブロイン水溶液と所定比率で混合しフィブロイン基材と同様に作製した。基材にマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17 株、理研 BRC) を播種し、LIF 含有培地により 37℃、5%CO₂ 下で培養を継続した。培養とともに発生する浮遊コロニーを 3 日ごとに培地と共に回収し、残った接着コロニーは新しく LIF 含有培地を加える事で培養を継続した。コロニーの未分化状態は未分化マーカーとなる Nanog-GFP の蛍光を観察する事で評価し、コロニー面積は培養期間ごとにコロニーの写真を撮影し ImageJ により算出した。セリシンの混合による基材の物性変化をゼータ電位と接触角測定により評価した。

結果と考察

接着コロニー数はフィブロイン基材で多くセリシンを混合するにつれ減少する一方、浮遊コロニーはフィブロイン基材とセリシン基材に比べ、フィブロインとセリシンの混合基材で多く発生した。またどの基材においても 1 か月にわたり Nanog-GFP の蛍光を確認することができ、シルク基材上でコロニーは未分化を維持していることが分かった。コロニー面積はどの基材においても培養期間が増加するにつれ大きくなる傾向が見られ、基材間で比較するとフィブロイン上のコロニー面積が最も小さく、セリシンを含有するにつれコロニー面積が大きくなった。

基材物性評価から、フィブロイン基材は最も高いゼータ電位を示し、セリシン混合とともにゼータ電位が低下することが観察された。一方、接触角測定においてはセリシン混合によっても顕著な変化は観察されなかった。セリシン混合による接着コロニーの減少と浮遊コロニーの増加は、セリシン混合により生じる基材の表面電位の変化による可能性が示唆される。