

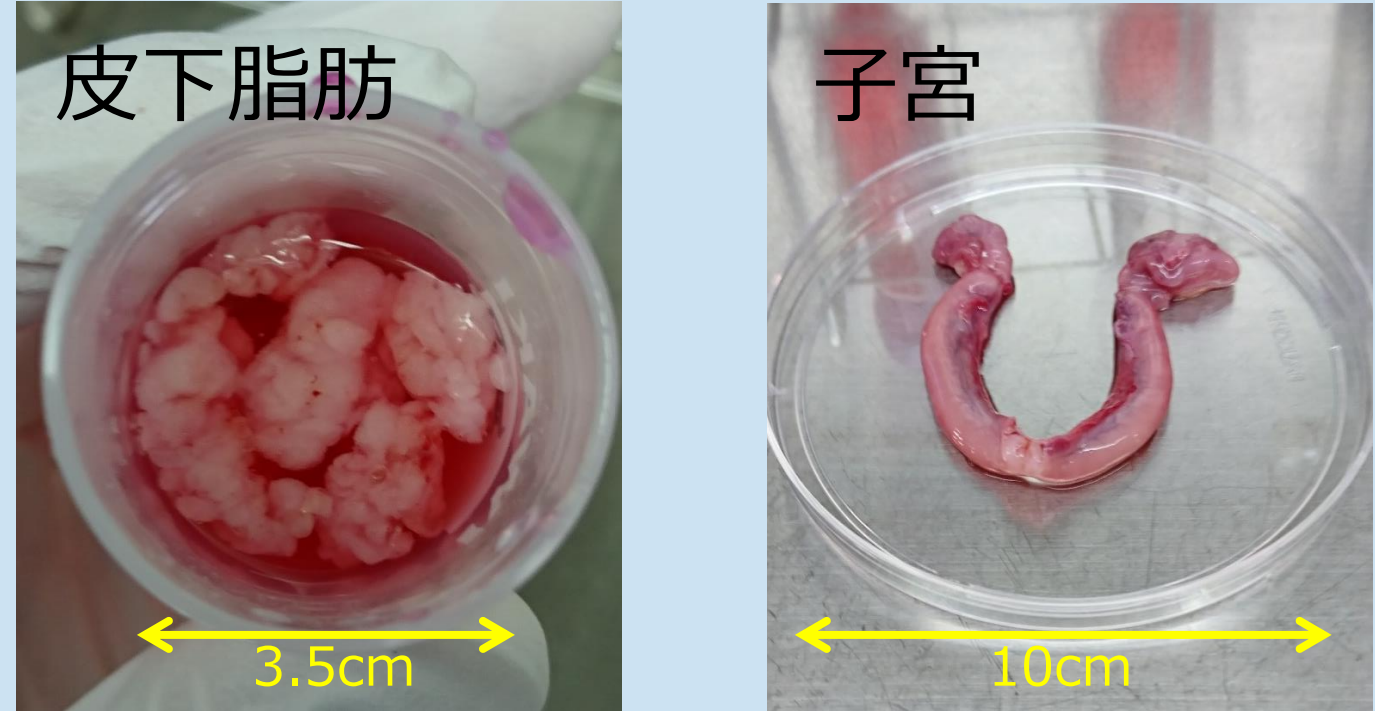
脂肪由来幹細胞培養用培地 KBM ADSC-2 を用いた ネコ幹細胞の培養と分化誘導の検討



飯島 友也, 高木 徹, 藤本 かおり, 對比地 久義
コージンバイオ株式会社 組織培養研究部



手術残余組織



背景

近年、医療技術の発展により、伴侶動物(イヌ、ネコ)に対しての細胞療法が着目されつつある。しかしながら、動物への細胞療法は極めて先進的な治療のため、基礎研究、臨床応用どちらにおいても知見が不足している状況である。動物細胞医療の発展、普及のためには、安定的に供給され、安全性が高く、効率的に動物幹細胞を培養可能な培地が必要となる。

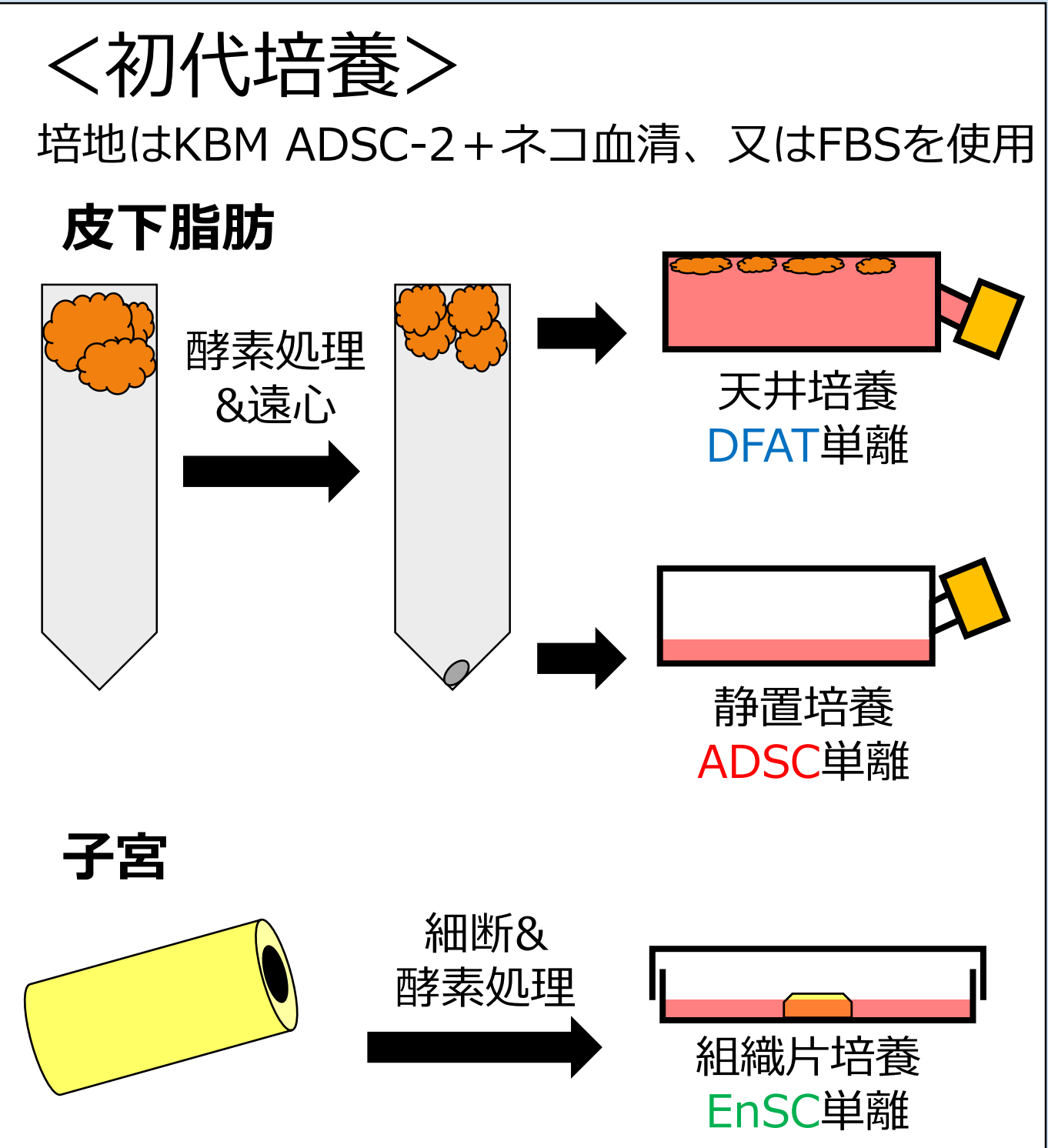
目的

ヒト脂肪由来幹細胞用培地として提供されているKBM ADSC-2が、ネコ多分化能細胞である、**脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)**、**脱分化脂肪細胞(DFAT)**、**子宮内膜幹細胞(EnSC)**においても有用な培養液か検討を行った。

材料

メス、6か月齢のネコ(雑種)に対して行われた避妊手術の残余組織(皮下脂肪、子宮、血液)

方法



<増殖性評価>
培養条件
容器: 12 Well Plate(Corning 3513)
培地: KBM ADSC-2 (コージンバイオ)
DMEM High Glucose (コージンバイオ)
FBS: 10% (GEMINI)
播種細胞数: 0.5万細胞/cm²(1.9万細胞/well)
温度: 37℃
CO₂: 5%
培養日数: 3日間

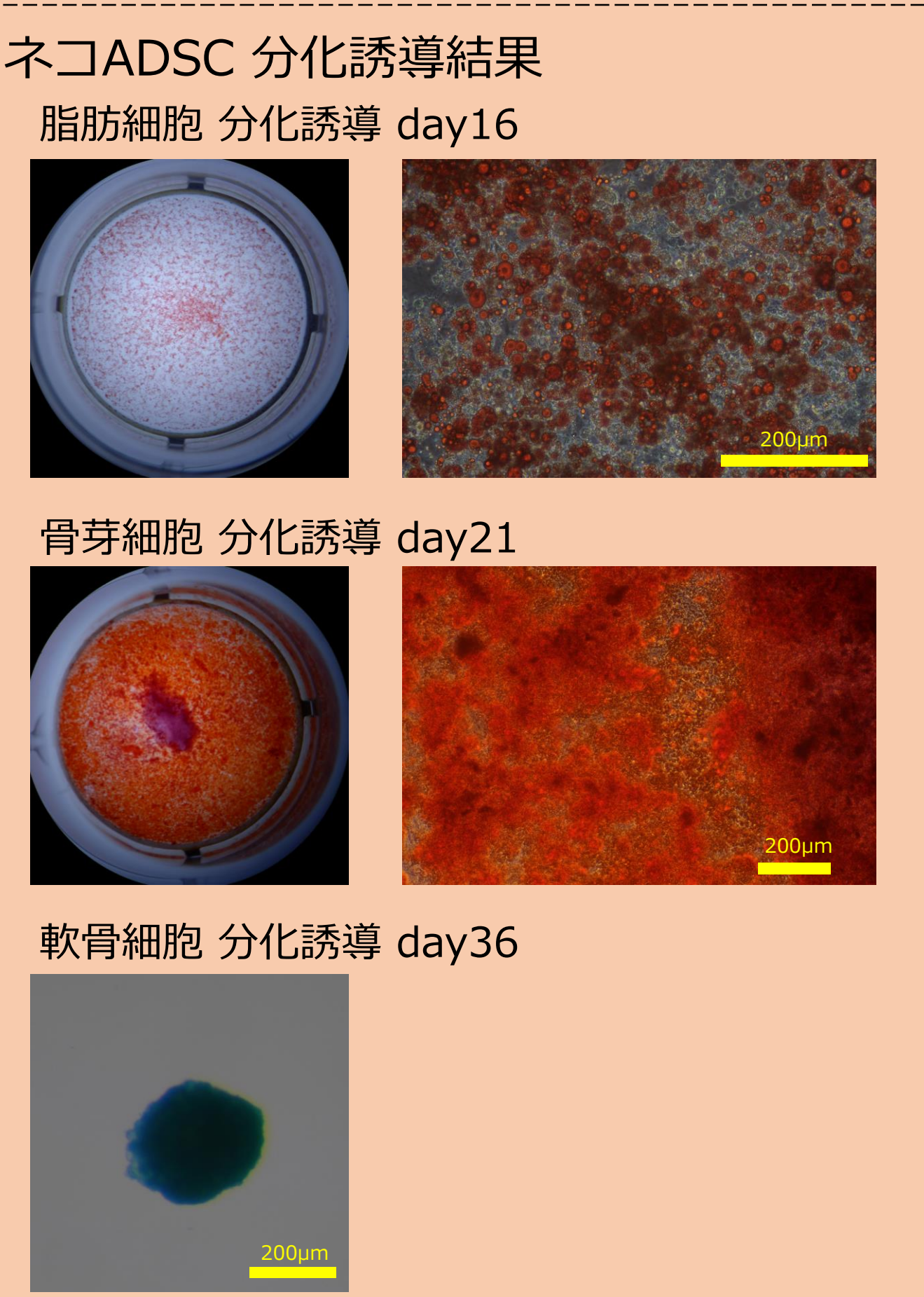
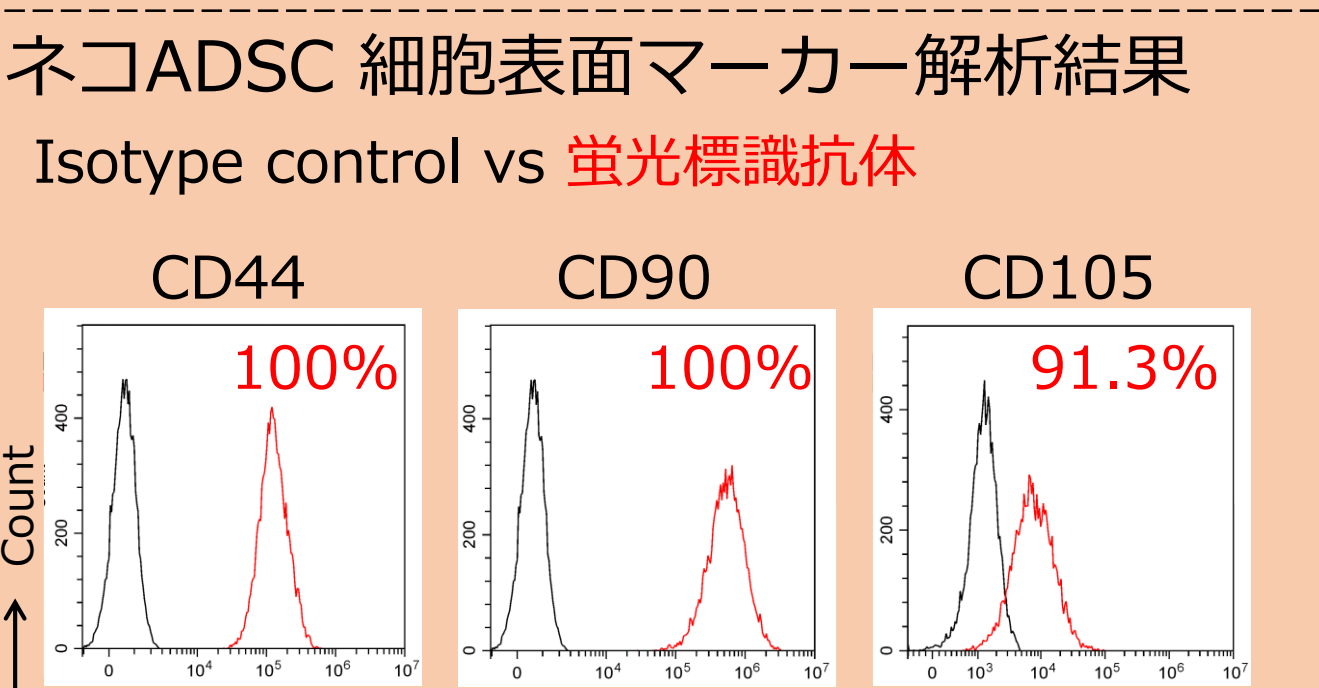
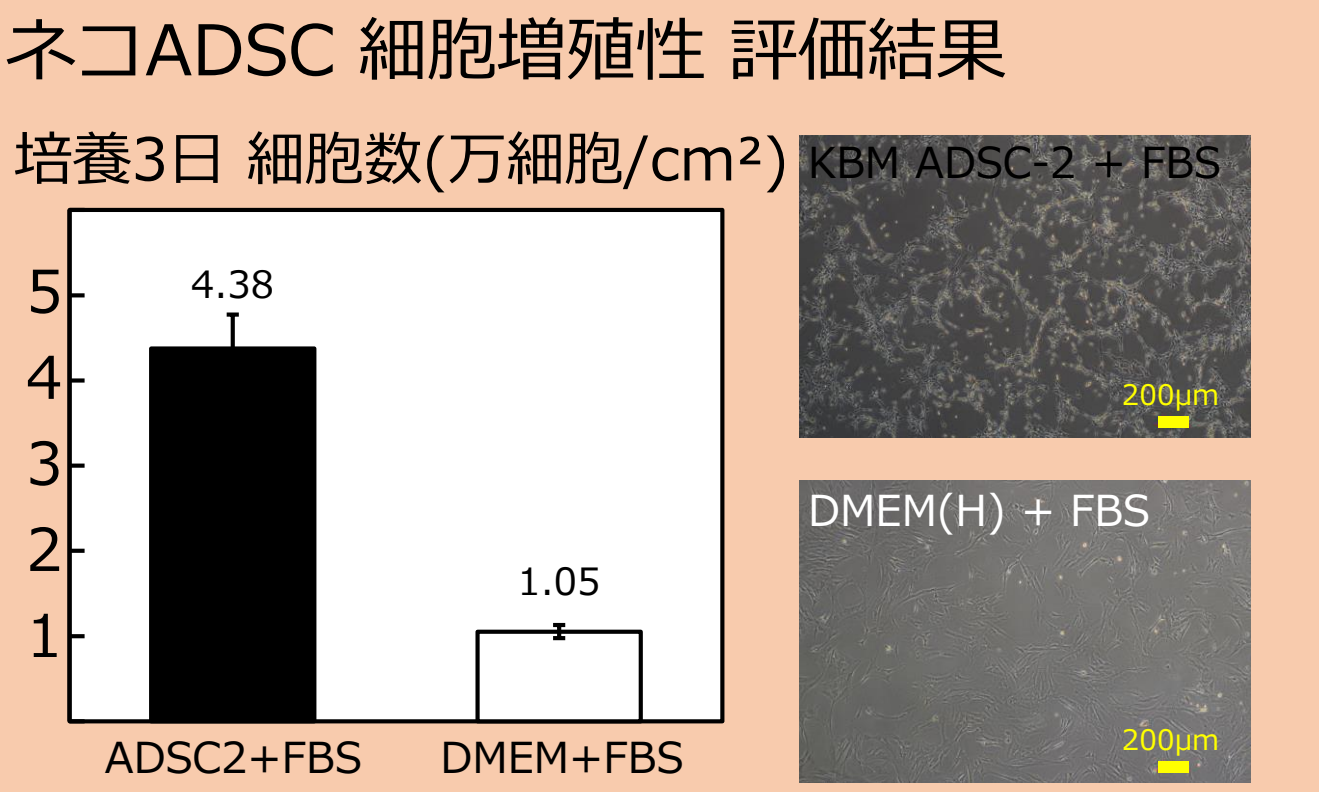
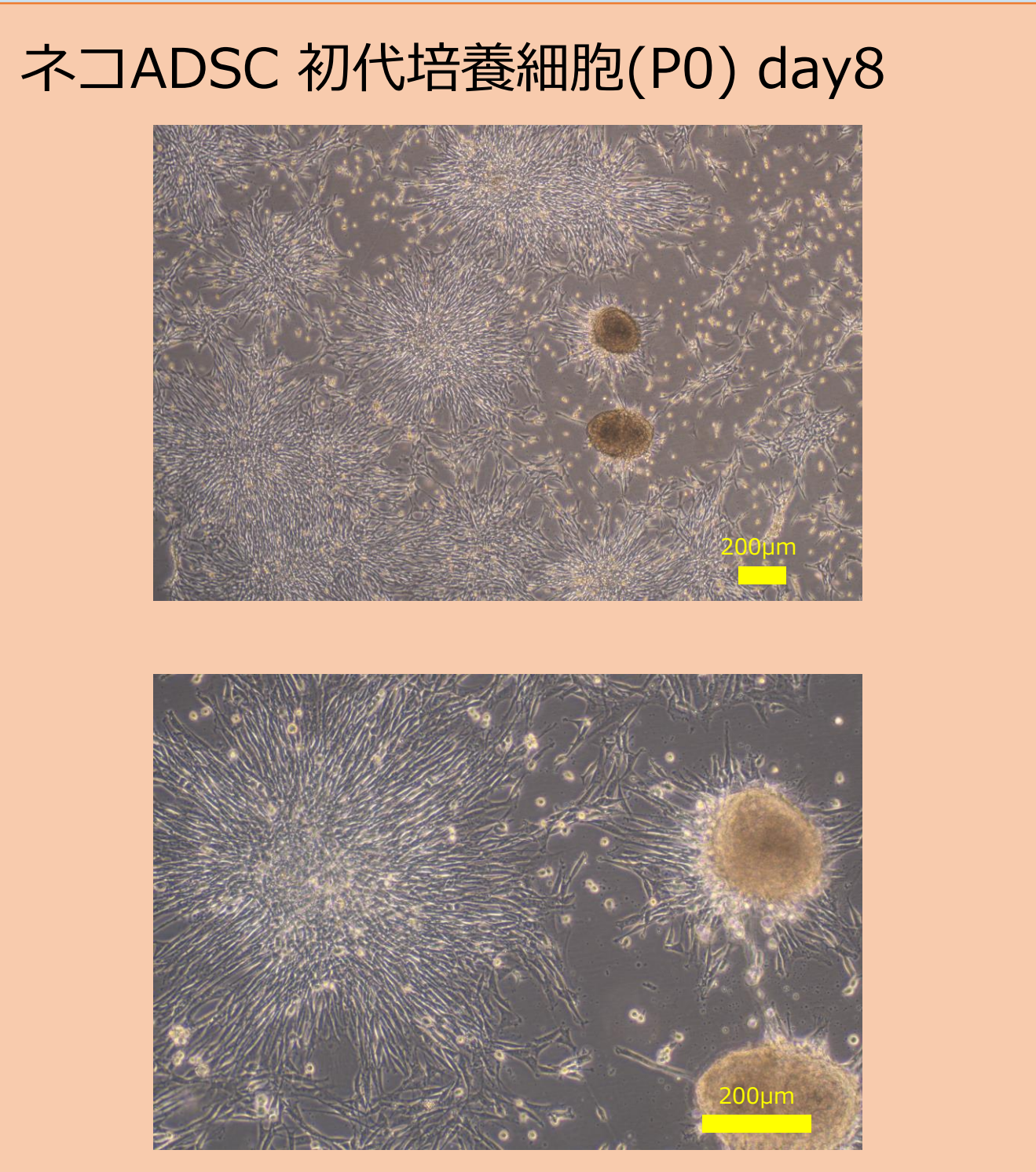
<表面マーカー評価>
・KBM ADSC-2+10% FBSで細胞(P3)を培養
・0.05%トリプシン - 0.53mmol/l EDTA (和光)を用いて細胞を回収
・PBSで細胞を洗浄後、抗体(BioLegend)で処理
・処理後の細胞をPBSで洗浄
・フローサイトメーター (CytoFLEX: BECKMAN COULTER)で解析

<分化誘導試験>
脂肪、骨芽細胞 分化誘導
・回収した細胞(P3)を
容器: 24 Well Plate (Corning 353047)
培地: KBM ADSC-2+10% FBS
播種細胞数: 4万細胞/cm²、1万細胞/cm²
で播種し、一晚培養
・翌日、分化誘導培地に置換
・以降、3-4日おきに培地交換、観察
・Oil Red O染色、Alizarin Red染色後、撮影

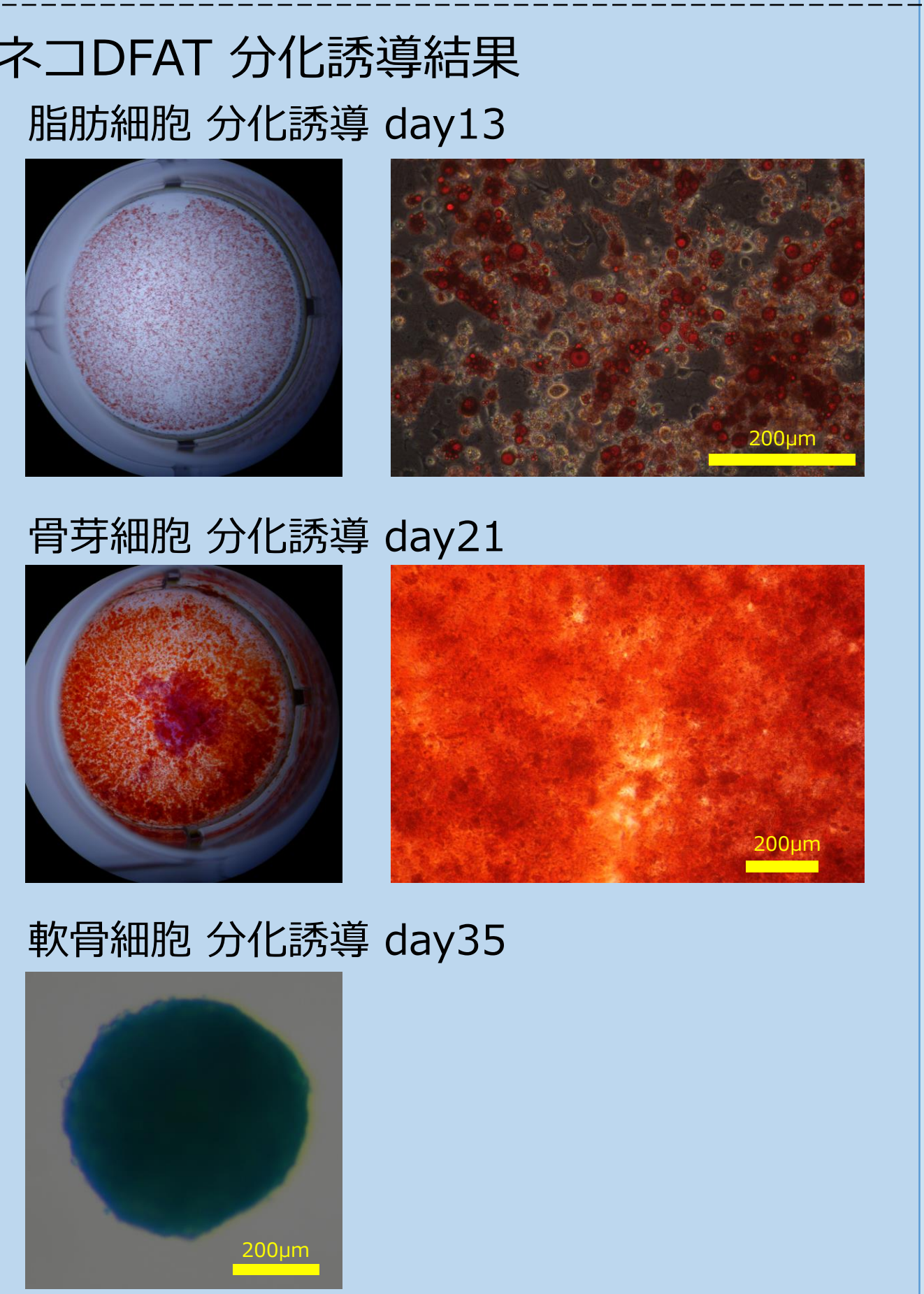
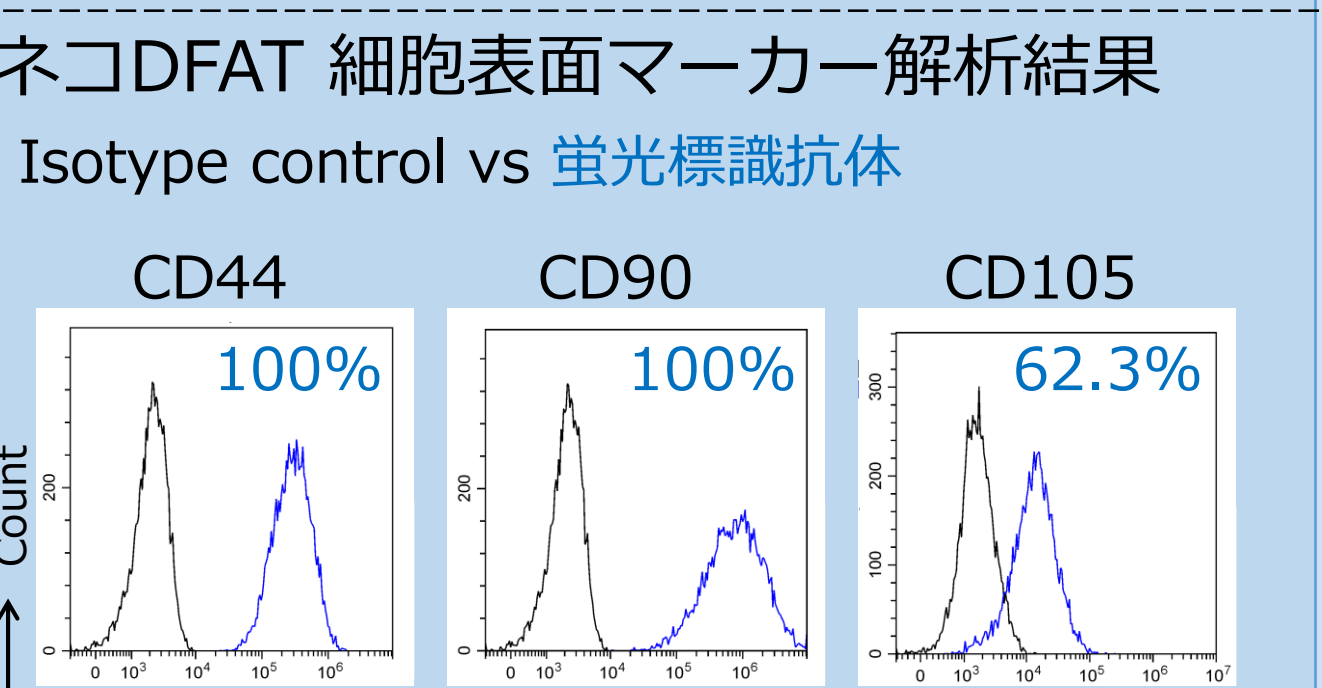
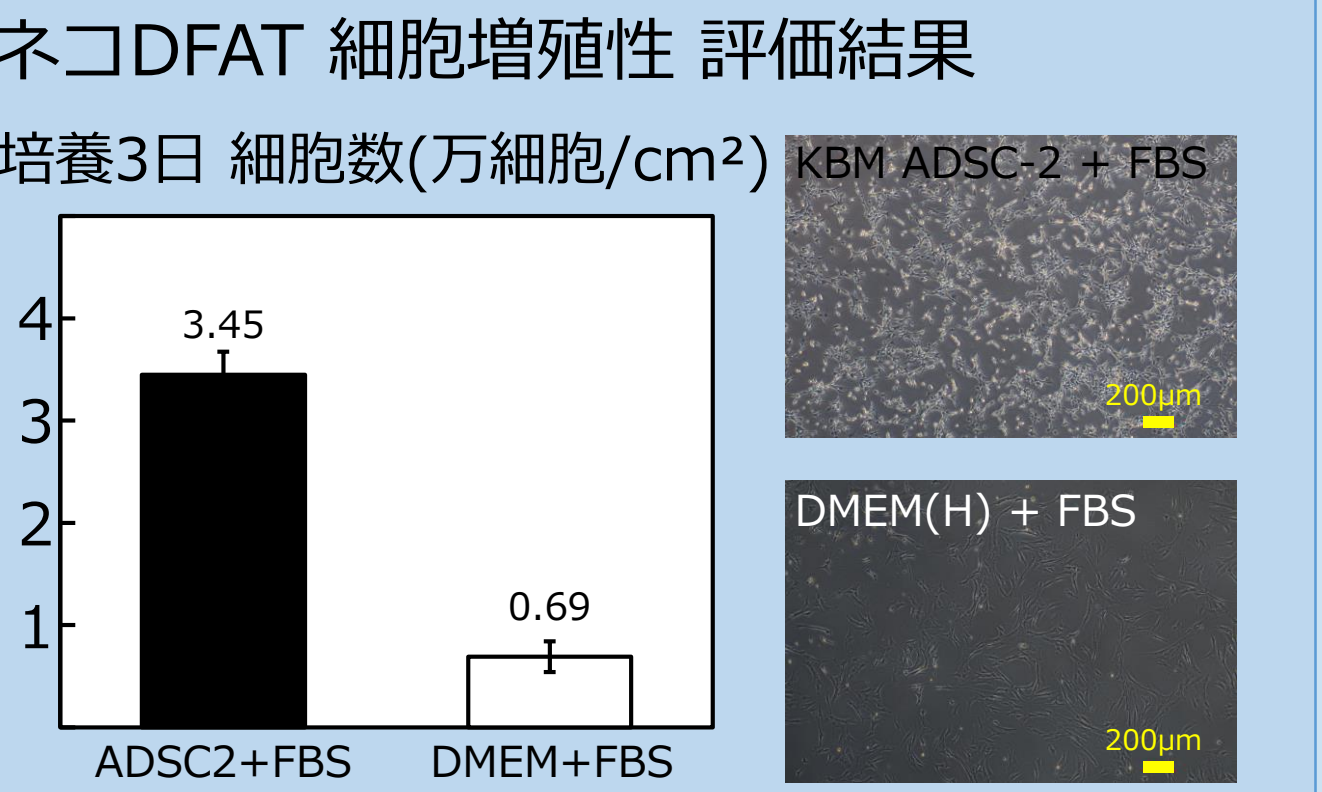
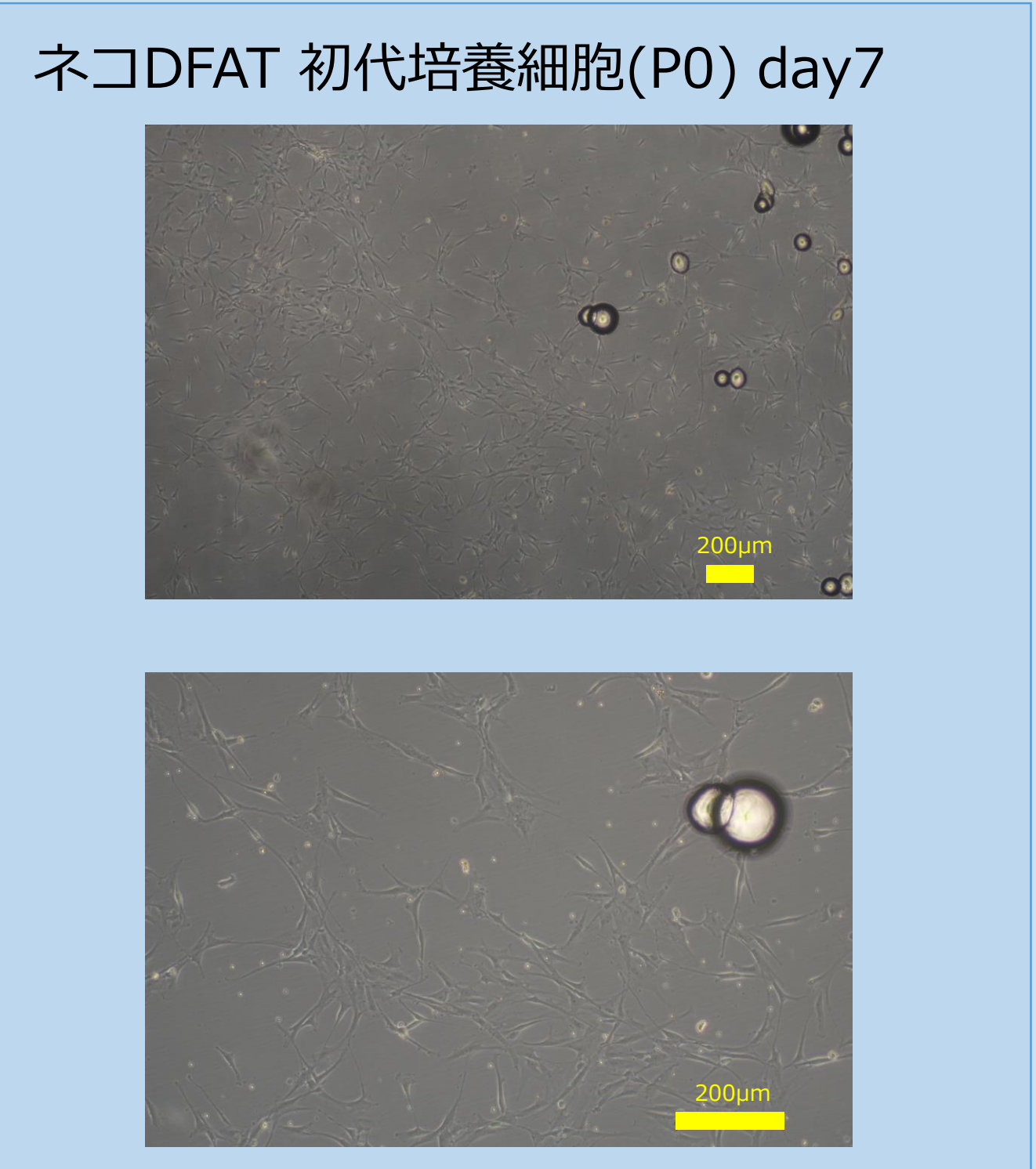
軟骨細胞 分化誘導
・回収した細胞(P3)を
KBM ADSC-2+10% FBSで懸濁
・ハンギングドロップ法で
1滴あたり20万細胞/25μlで播種し、一晚培養
・翌日、形成されたスフェアを
低接着処理96 Well Plate (Corning 3474)
に回収し、分化誘導培地に置換
・以降、定期的に攪拌、培地交換、観察
・Alcian Blue染色後、撮影

※ハンギングドロップ法 模式図
細胞懸濁液 → PBS →

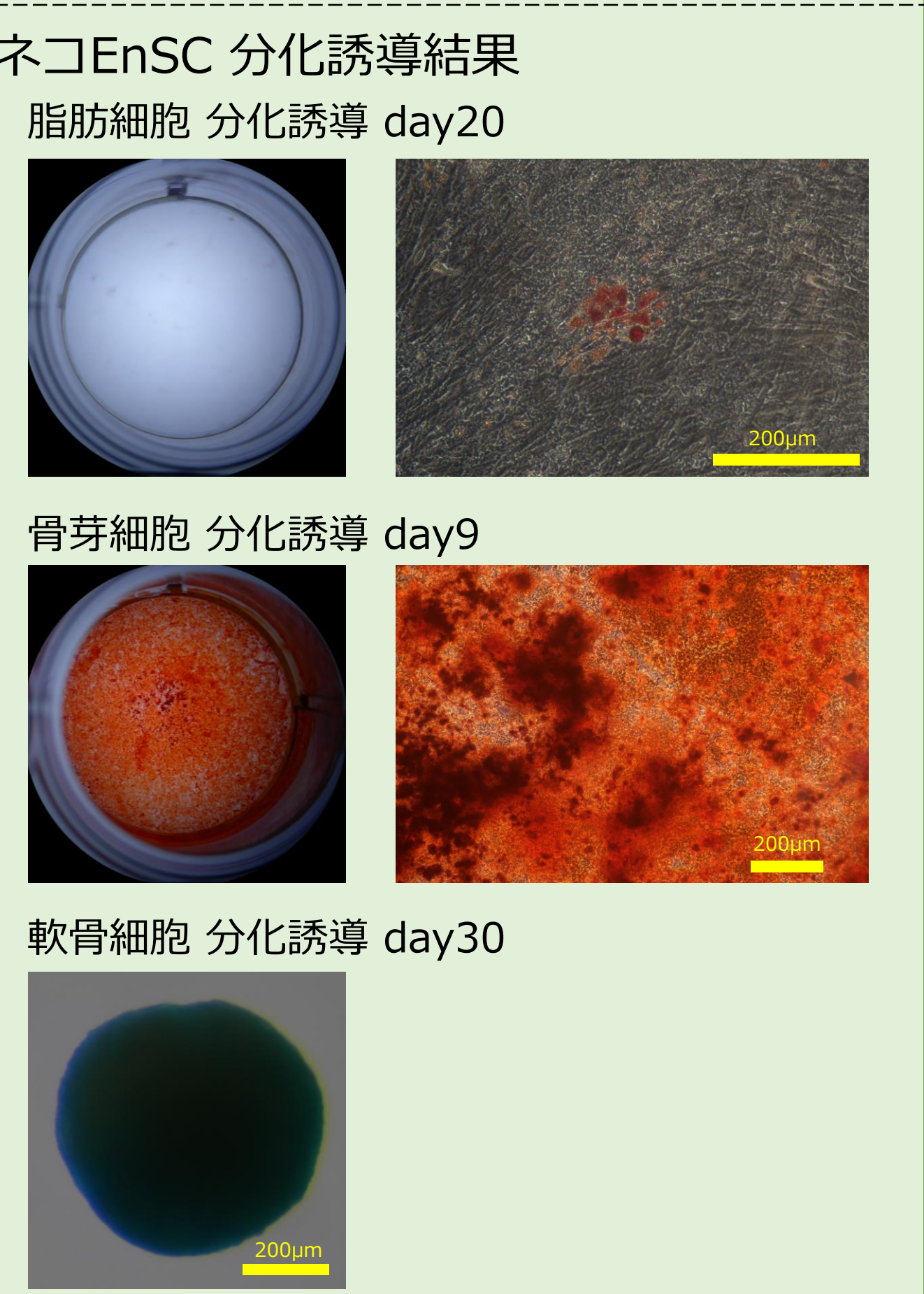
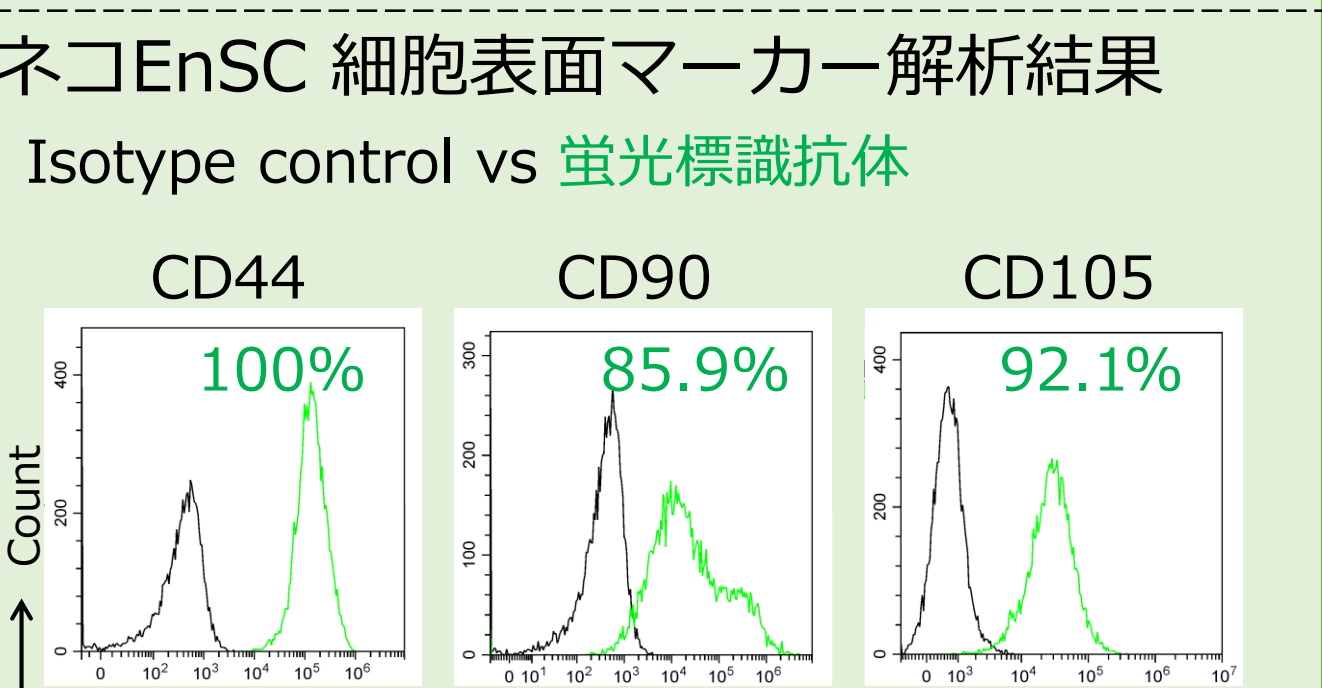
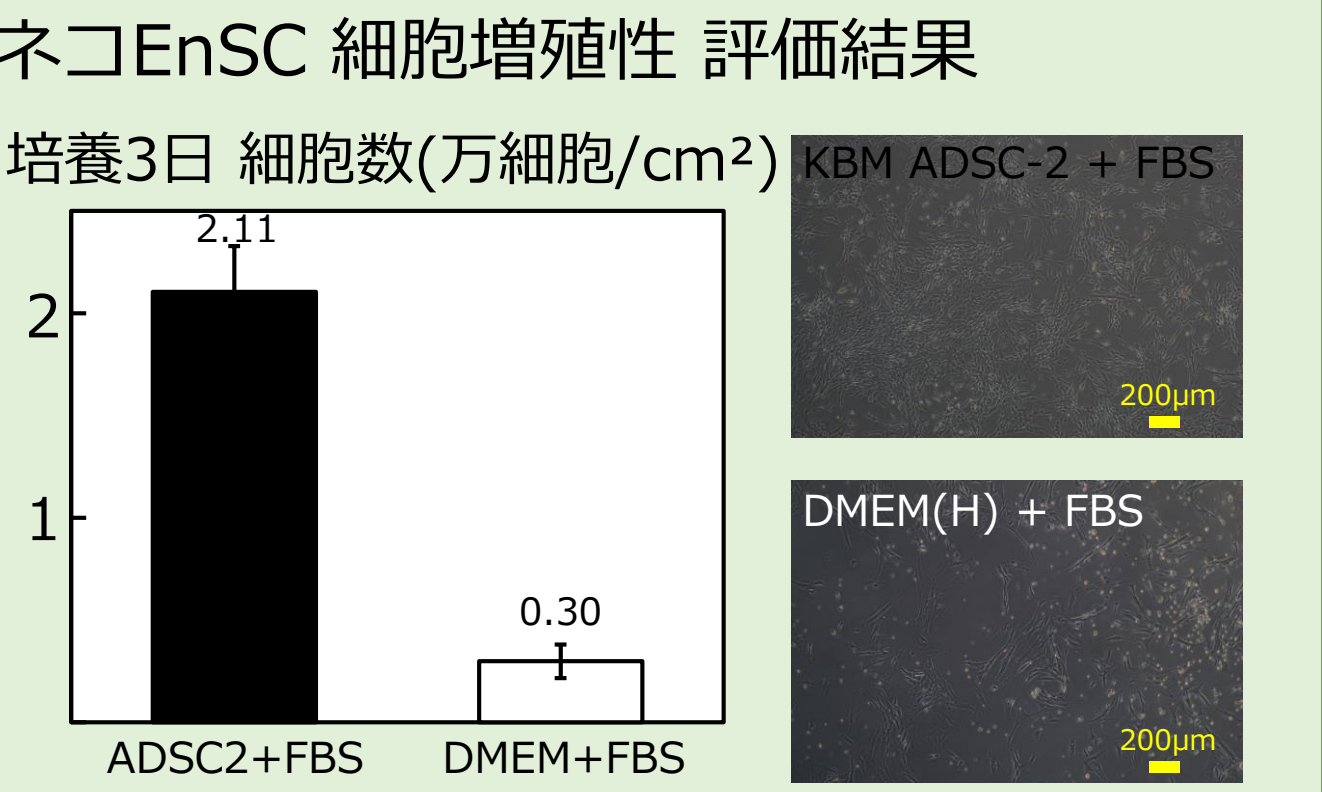
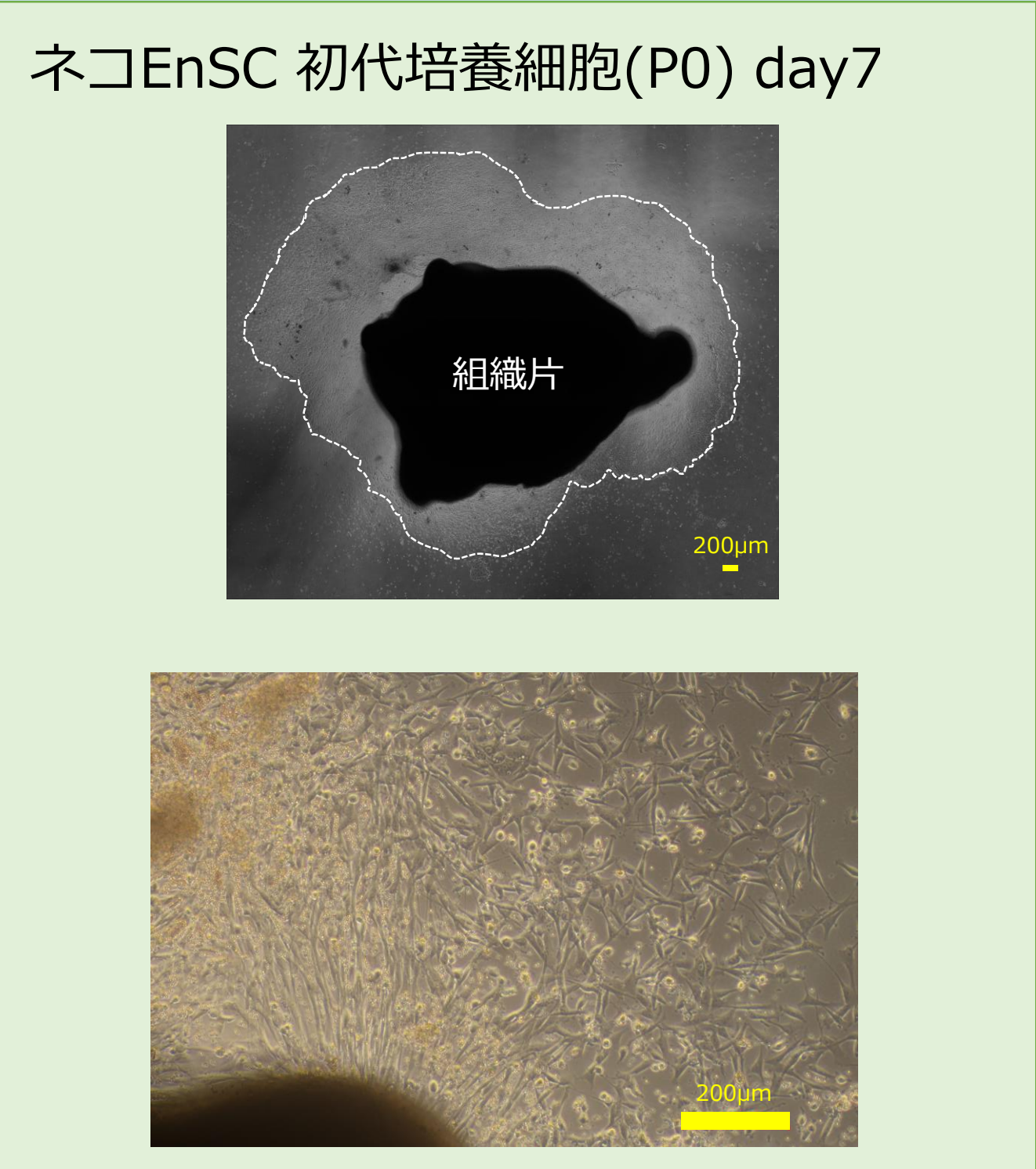
結果 ADSC



DFAT



EnSC



まとめ

KBM ADSC-2は、ネコADSC、DFAT、EnSCの初代培養が可能であることに加え、DMEM(H)よりも効率的に細胞増殖させ、未分化性(分化能)を維持したまま培養できた。

COI

本発表に関連して、筆頭著者らに開示すべきCOIはありません。

謝辞

新井宏禎 先生(新井動物病院)には手術、残余組織提供にご協力頂きました。感謝申し上げます。

参考文献

Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Iribe Y, Tanaka T, Matsubara Y, Sakuma T, Fukuda N, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H: "Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential." *J Cell Physiol*, 215(1):210-222, 2008

お問い合わせ

コージンバイオ株式会社
〒350-0214
埼玉県 坂戸市 千代田5-1-3
TEL 049-284-3781
FAX 049-284-4784
URL <https://kohjin-bio.jp>