

Chondrogenesis Differentiation

目的 ヒト間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell)を軟骨細胞(chondrocyte)に分化誘導する。

Materials

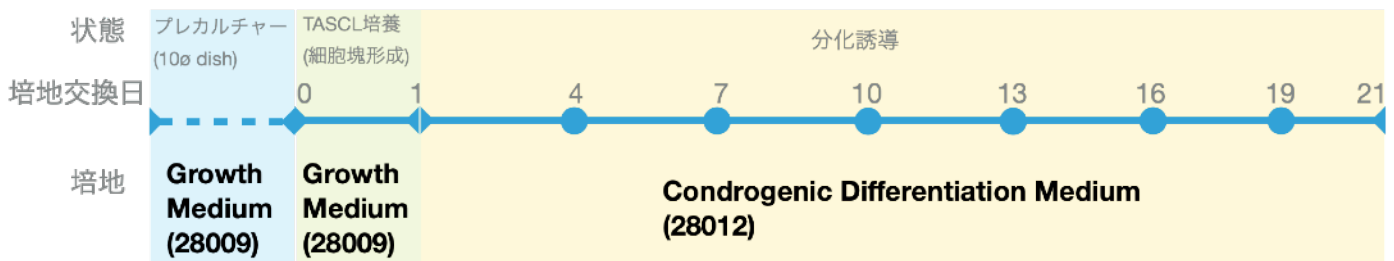
脂肪組織由来幹細胞 初代培養細胞
樹立方法：ヒト脂肪組織より分離
由来細胞：脂肪組織幹細胞

Freezing medium: Cryostem freezing medium (Cat.# 01-0013-05)
Passage Number: 1
Viability: 92%
Microbiology: Bacteria Mycoplasma Virus (HIV1&2;HCV;HBV;HTLV1&2;Parvovirus B19) are all Negative
Storage Conditions: liquid Nitrogen

#C-28009
間葉系幹細胞増殖培地2: **Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2(Ready-to-use)**

#C-28012
間葉系幹細胞軟骨細胞分化培地: **Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium (Ready-to-use)**

方法 タイムライン



培養

A. TASCL 播種前ASC培養

材料: 培養ディッシュ(10.0cmφ)
PBS(-)
Growth Medium(#C-28009)

* 1 TASCL micro-well に対し, 3.5 cm 径ディッシュであればconful 1~1.5枚、
6 cmディッシュであればhalf conful 1枚 で賄える。
confulの10 cmディッシュ1枚でTASCL 6個分(6-well 1枚分)が賄える。

1. 凍結細胞ストックを37°Cで一気に溶かす。
2. 溶かした細胞の懸濁液を15 mLチューブに移し、Growth Medium10 mLを少しずつ加えて全体を緩やかなピペティングで均一にする。
3. 300 x g, 5 分間, 25°Cで遠心し、上清を捨てる。
4. Growth Mediumで細胞を懸濁し、10.0cmディッシュにまく。
コートは不要。
5. トリパンプルーとヘモサイトメーターを用いて細胞数を測定する。
6. 適切な細胞数になるまで2日に1回培地を交換しながら培養する。

B. ASCのTASCLへの播種(0~1日目)

材料: TASCL600

滅菌済みMilliQ

PBS(-)

TrypLE - PBS(-) - EDTA

Growth Medium(#C-28009)

1. TASCLの気泡をMilliQで除去し、PBS(-)→培地の順で置換しておく。
2. 増殖した細胞に対し、PBS(-)で2回washする。
3. TrypLE - PBS(-) - EDTAを行き渡らせ、37°Cで5~10分インキュベートする。
* シングルセル化が必要だが、極端に長く処理すると細胞塊を作らなくなるので、スムーズに剥がれる様になったら後は軽いピペティングでシングル化する様にする
4. 細胞を15 mLチューブに回収し、PBS(-)で懸濁して300xg, 5minで集め、上清を捨てる。
5. TASCLの収まっているwellに2 mLの培地を満たした状態で、細胞を1 TASCL分あたり700 μ L程度で懸濁し、上から静かに中央、四隅、その間の順で滴下していき、全体を覆う。
6. 顕微鏡で細胞がTASCLのmicrowellに収まっているのを確認したら、37°C、5%CO₂のインキュベーターに入れる。
7. できれば1, 2, 3 hrの経過を観察し、細胞塊が形成されそうかどうか確認する。
24 hr以上において、細胞塊として安定させる。

C. TASCL使用下での分化誘導とメンテナンス (1日目~21日目)

材料: Differentiation Medium (#C-28012)

[1日目]

1. TASCLの収まっているウェル内の培地をDifferentiation Medium (#C-28012)に交換する。
2. 37°Cでインキュベートする。

[4, 7, 10, 13, 16, 19日目]

3. 培地交換し、37°Cで2日間インキュベートする。

[21日目]

4. 分化の状態を確認する。

Alcian Blue Staining

材料: Alcian Blue(Sigma A-3157)

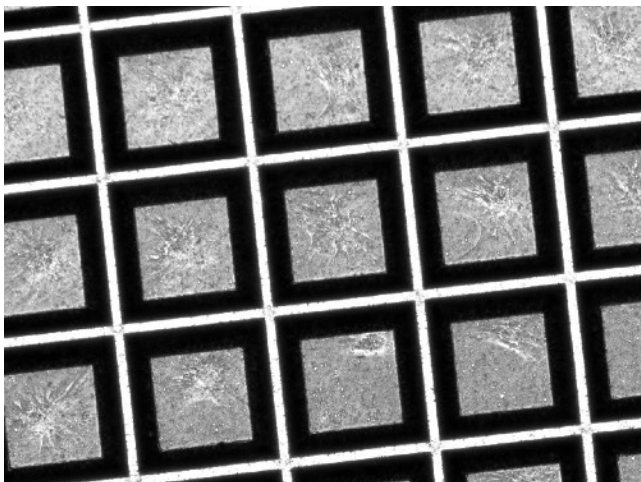
0.1N HCl

0.45 μm pored filter

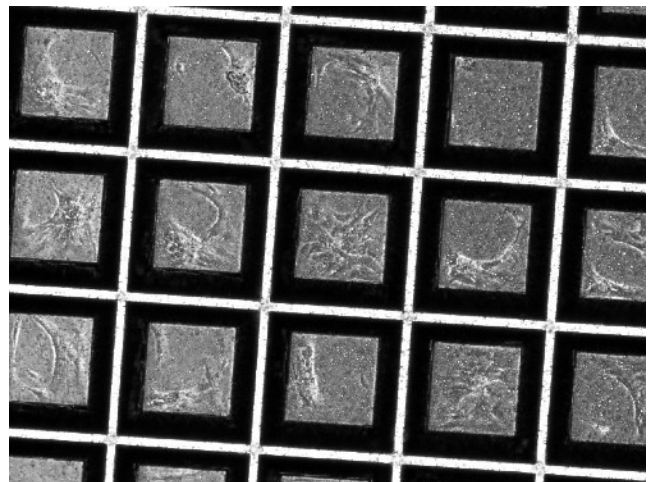
1. 0.2g の アルシアンブルーを20mLの0.1N HClで溶解する。
2. フィルター濾過する*シリンジを使う

- 方法:
1. 培養液を除去し、PBS(-)で洗浄する
 2. 4%Formaldehyde, 30min, RT で細胞を固定する
 3. Formaldehyde溶液を除去し、DWで細胞を洗浄する
 4. DWを除去し、アルシアンブルー溶液を加える
 5. アルミホイルで覆い(遮光)、RT, O/Nで染色する
 6. 染色液を除去し、0.1N HClで3回洗浄する
 7. HClを除去し、DWを加える
 8. アグリカンを含む細胞が青く染色されるので、撮像する

現在分化誘導後10日目



分化誘導開始2日目の様子



分化誘導開始時=進展していた細胞が、一つ一つの細胞の大きさが小さくなり、詰まった感じに変化してきている。現在までの間に上に浮いてくる様子はなく、iPS細胞に比べて強く接着している様子が観察される。