

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲル

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲル

BD™ PuraMatrix™ ペプチド
ハイドロゲルは、最適な3次元
細胞培養環境を提供する新規の
合成マトリックスです。

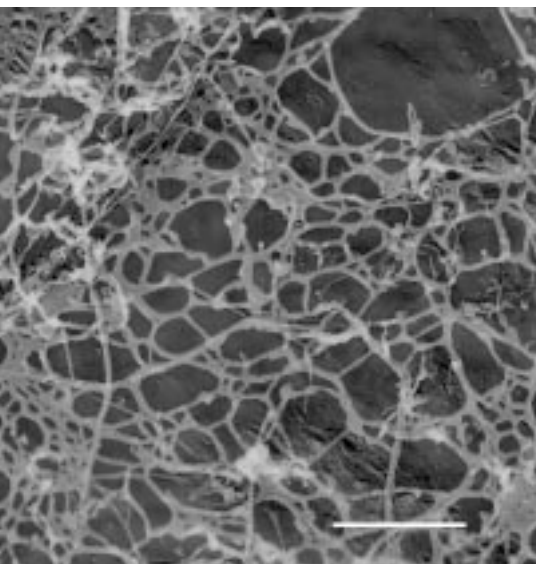


図1. BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲルの
電子顕微鏡写真(目盛は100 nm)

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲルは、様々な細胞培養に対し、三次元(3D)のマイクロ環境を提供する合成マトリックスです。細胞の増殖や分化を最適化するためには、本製品と生理活性分子(例: 成長因子、細胞外基質[ECM]タンパク質や他の分子)との適切な混合比を決定することが不可欠です。BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルは、標準アミノ酸(1% w/v)と99%の水から構成されています。生理学的条件下におくと、ペプチドが自己重合し、ナノメートル単位の線維構造を持った3Dハイドロゲルを形成します(図1)。このハイドロゲルは、ディッシュ、プレート、またはセルカルチャーインサート上で簡単に形成することができます。

以上のようにして作られたハイドロゲルは、肝前駆体細胞³、ラット褐色細胞腫(PC12)⁹、および海馬神経¹などの分化を促すことが知られています。また、様々な初代培養細胞(例: 神経細胞、線維芽細胞、角化細胞)および形質転換細胞(例: MG-63、SH-SY5Y、HEK293、NIH3T3)との接着を促すことも示されています¹³。さらに、幹細胞増殖、腫瘍細胞の転移や浸潤、血管新生、組織再生の*in vivo*研究などにも応用が期待できます。BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルは、生体適合性に優れ、吸収性で、動物由来の材料や病原体が全く含まれていません。特に動物を使った*in vivo*実験では、この可溶性材料を注入することで、生理学的条件下において3Dハイドロゲルが形成されます。

使用例

肝前駆体細胞の分化³

まず、ラットの肝前駆体細胞(Lig-8⁵)をBD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲル内に包埋し、所定の培地で一晚培養しました。得られたサンプルは、ブロモデオキシウリジン(BrdU)の取り込みや*in situ*免疫蛍光測定を行ないました。図2に示されるように、3Dハイドロゲルで培養したLig-8細胞は、スフェロイド状のコロニーを形成し、肝細胞マーカーのCCAAT/エンハンサー結合タンパク質 α (C/EBP α)とシトクロムP450 1A1/1A2(CYP1A1/1A2)を、細胞分裂活性とは無関係に発現します。つまり、増殖している細胞がある一方で、コロニー全体としては分化能力を示しています。

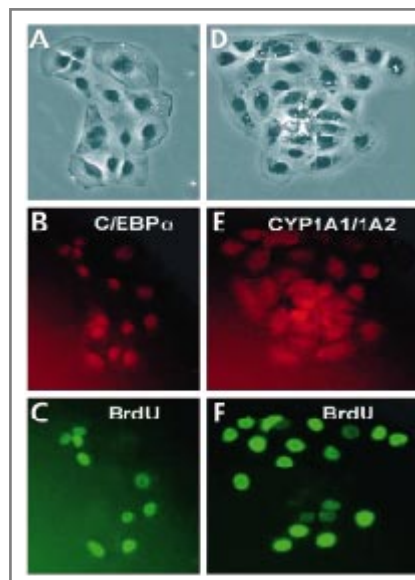


図2. BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲル内で培養されたLig-8細胞。分裂停止しているか否かに関係なく、スフェロイドを形成している細胞は、分化している。スフェロイドを単離して接着培養に移し、BrdUの存在下で24時間、培養した。

- (A) スフェロイドコロニー(位相差顕微鏡像)
- (B) AをC/EBP α に対して免疫染色(赤)
- (C) AをBrdUに対して免疫染色(緑)
- (D) スフェロイドコロニー(位相差顕微鏡像)
- (E) DをCYP1A1/1A2に対して免疫染色(赤)
- (F) DをBrdUに対して免疫染色(緑)

データは3D Matrix, Inc.提供。
Semino, C.E., et al., *Differentiation* 71:262(2003)

PC12細胞を用いた軸索伸長解析⁹

PC12細胞を、平面培養プロトコルに従ってBD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲル上で培養しました。細胞の分化形態を調べるために、神経成長因子(NGF)の存在下で培養し、共焦点レーザー顕微鏡を使って解析しました。この条件下で培養されたPC12細胞は分化し、軸索の顕著な伸長が観察されました(図3)。さらに同じハイドロゲルを使って培養したところ、ヒトSY5Y神経芽細胞腫や様々な初代培養神経細胞も、同程度の活性を示しました(表1)。

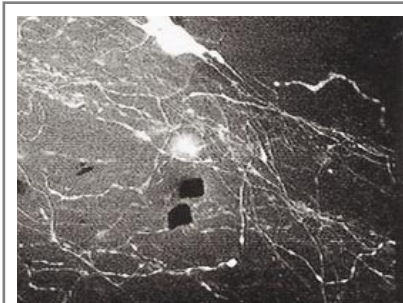


図3. BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲル上でのPC12細胞の軸索伸長と分化。この画像は、複数の共焦点顕微鏡像から合成した。NGF存在下で培養されたPC12細胞は、ハイドロゲルに接着し、軸索を伸長させた。黒い部分はハイドロゲルにあいた孔。この顕微鏡写真は、少なくとも4回の個別実験の一例である。

データは3D Matrix, Inc.提供。
Holmes, T.C., et al., PNAS USA 97: 6728(2000)

表1 BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲル上における神経細胞の軸索伸長

細胞種	軸索の長さ(μm)	細胞の由来 ¹
NGF処理ラットPC12	400-500	培養細胞株
NGF前処理PC12	400-500	培養細胞株
ヒトSY5Y神経芽細胞腫	400-500	培養細胞株
マウス小脳顆粒ニューロン	200-300	初代培養細胞 [‡]
マウス海馬ニューロン	100-200	初代培養細胞 [‡]
ラット海馬ニューロン	200-300	初代培養細胞 [§]

† 細胞はBD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲル上で培養。その後ハイドロゲルごと新しい培地の入ったディッシュに移す。軸索伸長の最大値測定は目盛線を使って目視で行なった。初代培養細胞の測定は、細胞接着後3~7日、培養細胞株に対する測定は、接着後10~14日後にそれぞれ行なわれた。

‡ 7日齢マウス

§ 1日齢ラット

海馬断片に由来する神経細胞の分化¹

海馬組織の断片(厚さ200 μm以下)を産後7.5日のラットから単離し、最長2週間、透過性インサートの上に置きました。インサートはコーティングしないものと(コントロール)BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルでコーティングしたもの(厚さ500 μm以下)の二種類を用意しました。ハイドロゲルで培養した場合、海馬組織片は成長し、神経細胞のハイドロゲル上への遊走が見られました(図4)。こうした神経細胞の遊走はコントロール実験では観察されず(図4g)ハイドロゲル培養では神経細胞およびグリア前駆細胞が組織片からハイドロゲル内に遊走していることがわかりました(図4fおよび図4h)。以上の結果から、BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルは、神経細胞の分化を促進し、組織を*in vivo*で成長させるために有用な材料であることが示唆されます。

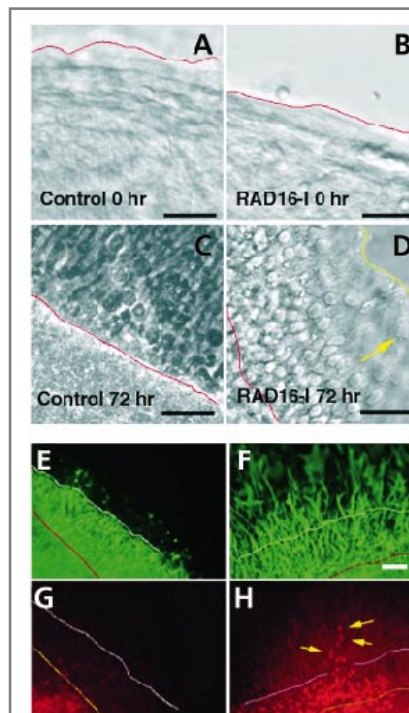


図4. BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲル上で培養された海馬組織片に見られる組織伸長。海馬断片はコントロールインサート、またはBD PuraMatrixペプチド ハイドロゲル(厚さ500 μm以下)上で培養された。低速度撮影を使って歯状回領域周辺の組織の成長を追った。(A)0時間におけるコントロールの組織片;(B)0時間におけるハイドロゲル(RAD16-1)上組織片;(C)72時間後のコントロールの組織片;(D)72時間後のハイドロゲル上組織片。赤い線は実験開始時における組織片の境界で、黄色い線は伸長した組織片の境界を示している。黄色い矢印は、組織が成長し、伸長している方向を示す。図下の黒線の長さは100 μm;(E)72時間後のコントロール、GFAP(グリア細胞マーカー、緑)を免疫蛍光染色した組織片;(F)72時間後のハイドロゲル培養、GFAP(緑)を免疫蛍光染色した組織片;(G)同じ断片層、NeuN(神経細胞マーカー、赤)を免疫蛍光染色;(H)同じ断片層、NeuN(赤)を免疫蛍光染色。EとFにおける赤い線、およびGとHにおける黄色い線は、実験開始時の組織片の境界を示している。EとGにおける白線は、コントロール実験における成長した組織片を示す。FとHにおける白線は、ハイドロゲル上で得られた過伸長を比較するためのもの。Hにおける黄色い矢印は、NeuNを発現している神経細胞(赤)が、ハイドロゲル培養の領域IIに移動しているところを示している。白い棒線の長さは100 μm。

データは3D Matrix, Inc.提供。
Semino, C.E., et al., Tissue Engineering 10:643(2004)

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲル

よくある質問と回答

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲル (354250) は、様々な細胞培養に対し、3Dのマイクロ環境を提供する合成マトリックスです。細胞の増殖や分化を最適化するためには、本製品と生理活性分子(例、成長因子、細胞外基質[ECM]タンパク質や他の分子)との適切な混合比を探ることが不可欠です。BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルは、標準アミノ酸 1% w/v と99%の水から成っています。生理学的条件下におくと、ペプチドが自己重合し、ナノメートル単位の線維構造を持った3Dハイドロゲルを形成します。このハイドロゲルは、ディッシュ、プレート、またはセルカルチャーインサートを使って簡単に形成することができます。

細胞培養

この製品にはどのような細胞の種類/用途が適していますか？

BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルは、肝前駆体細胞³(本文 図2)、ラット褐色細胞腫(PC12)⁴(本文 図3)および海馬神経¹(本文 図4)などの分化を促すことが知られています。また、様々な初代培養細胞(例：神経細胞、線維芽細胞、角化細胞)および形質転換細胞(例：MG-63、SH-SY5Y、HEK293、NIH3T3)との接着を促すことも示されています¹³。さらに、幹細胞増殖、腫瘍細胞の転移や浸潤、血管新生、組織再生の*in vivo*研究などにも応用が期待できます。

BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルは、タンパク質や成長因子などを添加しなくても、細胞増殖や分化を促進しますか？

細胞の増殖や分化の最適化を図るためには、BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルと生理活性分子(例、成長因子、細胞外基質[ECM]タンパク質や他の分子)との適切な混合比を決めることが必要です。

細胞はハイドロゲル上で培養した方がいいですか(平面培養) それともゲルの中で培養するのですか(3D包埋培養)？

どちらの方法も可能です。平面培養の最適条件は、細胞株の種類や実験の目的によって異なります。どちらも具体的な使用例や推奨方法については、ユーザーズガイドを参照ください。

平面培養法を用いて細胞をハイドロゲル表面に播種した場合、細胞はゲル内部に移動することができますか？

本ハイドロゲルは線維構造を持ち、柔軟性に優れているので(非共有結合)細胞はゲル内部に入ってゆく場合があります。移動する能力に関しては、細胞の種類によって異なります。

播種する際に適切な細胞密度はありますか？

標準的な細胞培養表面(TC)処理またはECMコーティングの器材を用いた平面培養と、同程度の細胞密度をお勧めします。また、3D包埋培養に対しては、 $0.5 - 1.0 \times 10^6$ cells/mLの密度が推奨されます。

BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルで細胞はどのくらいの期間、生存できますか？

培養の継続期間は、細胞の種類および培養条件によって異なります。例えば、3D包埋培養で6週間生存する場合や、平面培養で1~2週間生存する場合があります。

BD PuraMatrixペプチド ハイドロゲルから回収された細胞を継代培養することはできますか？

できます。ハイドロゲルから細胞を回収し、新たなBD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲル、または別の増殖基質(例：TC処理、ECMコーティング)に継代培養し、新たに成長/分化させることは可能です。細胞回収のプロトコルについては、ユーザーズガイドをご参照ください。

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲル

よくある質問と回答

材料の調製と操作

細胞と本材料を混ぜてゲル化させる際に、なぜ迅速な操作が必要なのですか？

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲル保存液 (1% w/v) のpHは3.0であり、細胞の生存率に影響を与えることがあります。したがって、細胞がこの液体にさらされる時間を最小限にとどめるためにも、培地を加えるまでの操作を手早く行なう必要があります。手順としては、最初の30分間で培地を3回交換し、サンプルの酸性度を生理学的pHに近い値にします。

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲルの構造的強度はどうなっていますか？

通常の使用濃度 (0.5% w/v) では、ハイドロゲルはやわからい線維状の網目構造を形成し、構造的にはそれほど強くありません。したがって、培地交換は特に慎重に行なう必要があります (ピペットや吸引管の先がハイドロゲルに直接あたらないように注意してください)。ただし、この0.5%のハイドロゲルは、多くの細胞の、接着や増殖を促進することがわかっています。ハイドロゲルの構造的強度を増加させるためには、希釈せずに (1% w/v) で使用ください。

細胞、生理活性分子、培地などと混合した時にできる気泡を取り除くにはどうしたらいいですか？

超音波浴槽の中で30分間処理するか、あるいは遠心分離によって気泡を取り除くことができます (例: 机上型遠心分離器を使い、5Kで2~5分間、遠心します)。1.5 mLのエッペンドルフチューブでの少量サンプルの場合は、マイクロ遠心器で10~15秒間、フル回転させます。

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲルは動物の*in vivo*実験に使用できますか？

はい、できます。本品は可溶性材料でできており、動物の体内に注入して生理学的環境に接すると、3Dハイドロゲルを形成します。また大小の注射針やカテーテルを使って扱えるので、操作も簡単です。ただし、20G以下の注射針を使用する際は、体内に気泡が入らないように充分注意してください。

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲルのペプチド配列はRGDと似ているので、細胞がRGD依存性インテグリン受容体と結合することはありますか？

いいえ、ありません。本ペプチド配列は細胞接着を促進しますが、RGD依存性のインテグリンのシグナル伝達には影響しません。また、これまでの研究によると、細胞接着がRGDペプチドによって阻害されることもありません¹³。

解析研究

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲルは、共焦点顕微鏡による解析に使用できますか？

はい、できます。本製品は透明なゲルを形成するので、共焦点顕微鏡による解析に対してもすぐれた解像度を提供します。

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲルで培養された細胞を使い、タンパク質や核酸の分子生物学的解析を行なうことはできますか？

はい、できます。本製品で培養された細胞は、ほとんどの分子生物学研究に用いることができます。まずゲルを破壊して細胞を取り出した後、遠心分離によって分離し、その後は標準的な手順に従って調整が可能です。

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲルは、免疫蛍光染色法にも利用できますか？

はい、できます。本製品で培養した細胞は、通常の方法を用いて、蛍光色素や免疫学的試薬で染色することができます。

BD™ PuraMatrix™ ペプチド ハイドロゲル

特長と利点

精製合成ペプチド (1% w/v)	細胞の付着を促進する高度に精製された基質
3Dハイドロゲル構造	平均ポアサイズ50-200 nmの線維構造を形成
操作が簡単	ゲル化に際し、細胞や生理活性分子(成長因子)と簡単に混合できます。in vivoの動物実験で注入可能
透明なハイドロゲル	標準的な染色法と顕微鏡観察により、サンプルを簡単に視覚化できます。
完成されたプロトコル	3D包埋培養・カルチャーインサートおよびマイクロプレート上での平面培養・継代培養および生化学解析のための細胞回収・in vivo注入

特徴

- 細胞接着を促すペプチド配列であるが、RGD依存のインテグリンシグナルを活性化しない
- 塩を含む水溶液中で、BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲルのペプチド成分が自己重合し、透明な3Dハイドロゲルを形成
- ナノメートル単位の線維構造
- 高い生体適合性。動物由来の材料や病原体を含有しない

製品仕様

- 精製人工ペプチドの1%水溶液 (w/v)
- pH3.0
- 品質管理:
 - バクテリア、カビ、マイクロプラズマ検査に合格
 - NIH3T3線維芽細胞の細胞毒性解析による細胞生存率80%以上
 - 質量分析法で均一性を確認
 - 自己重合アッセイを用いた線維構造形成

カタログ番号	容量	希望小売価格
BD PuraMatrix ペプチド ハイドロゲル		
354250	5 mL	35,000円

研究用。診断もしくは治療には使用できません。

PuraMatrixは3D Matrix, Inc.の登録商標です。

BD、BDロゴおよびその他すべての商標は、Becton, Dickinson and Companyのプロパティです。

参考文献

- Semino, C.E., et al., Entrapment of migrating hippocampal neural cells in 3D peptide nanofiber scaffold. *Tissue Engineering* 10:643 (2004).
- Zhang, S., Hydrogels: Wet or let die. *Nature Materials* 3:7 (2004).
- Semino, C.E., et al., Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation* 71:262 (2003).
- Semino, C.E., Can we build artificial stem cell compartments? *J Biomed Biotechnol* 2003:164 (2003).
- Lee, H-S., et al., Clonal expansion of adult rat hepatic stem cell lines by suppression of asymmetric cell kinetics (SACK). *Biotechnology and Bioengineering* 83:760 (2003).
- Kisiday, J., et al., Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9996 (2002).
- Zhang, S., Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnology Advances* 20:321 (2002).
- Zhang, S., et al., Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* 6:865 (2002).
- Holmes, TC, et al., Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6728 (2000).
- Altman, M., et al., Conformational behavior of ionic self-complementary peptides. *Protein Science* 9:1095 (2000).
- Zhang, S., et al., Biological surface engineering: A simple system for cell pattern formation. *Biomaterials* 20:1213 (1999).
- Zhang, S. and Altman, M., Peptide self-assembly in functional polymer science and engineering. *Reactive and Functional Polymers* 41:91 (1999).
- Zhang, S., et al., A Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment. *Biomaterials* 16:1385 (1995).
- Zhang, S., et al., A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3334 (1993).



輸入販売元

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

東京都港区赤坂8-5-26 赤坂DSビル 〒107-0052

ホームページアドレス: <http://www.bd.com/jp/>

製造元

BD Biosciences

製品に関するお問い合わせ/カタログ・価格表のご請求

お客様情報センター

(BDダイヤル)

☎ 0120-8555-90

Fax 024-593-5761

技術的なお問い合わせ

tech_cell@bd.com