

2023年7月

キーワード:

人工多能性幹細胞、iPS細胞、多能性、幹細胞、CellCelector Flex、Incucyte、iQue、細胞培養、iPS細胞特性解析、iPS細胞研究開発

人工多能性幹細胞の培養、維持および特性解析のためのソリューション

Daryl Cole, PhD – Scientist - Sartorius

Kirsty McBain – Scientist - Sartorius

Nicola Bevan – Manager - Sartorius

はじめに

創薬から疾患のオルガノイドモデリングまで、研究に不可欠なツールとして幹細胞の使用が増え続けています。最新のトレンドは、従来の実験動物を使用した研究モデルを用いない、より相似性の高いシステムにおけるヒト機能のシミュレーションです。その目標を達成するためには、柔軟で、かつヒト機能に対して特異性の高い実験・研究ツールが必要となります。人工多能性幹細胞 (iPS細胞) は、正常な組織細胞から、重要な転写因子の強制的な発現で作成できるため、貴重な細胞を研究開発用として無制限に供給できます。これらの細胞は特異性が非常に高いため、その維持と培養は他の細胞株よりも細心の注意が必要です。したがって、iPS細胞の培養および維持のためのソリューションは、難しさを伴わず、広く利用できることが重要です。幹細胞の特性解析は、使用方法論が難しく、データの信頼性も低くなる可能性があるため、培養および実験を通して幹細胞を正確にモニタリングできる、ゆるぎない技術の開発が重要となります。また、iPS細胞を維持する際の各条件が最適でない場合には、その多能性が失われる可能性があります。

再現性は研究において非常に重要で、作業の自動化はプロセスの構築とデータ生成について高いレベルで一貫性をもたらします。CellCelector Flex自動細胞イメージング・ピッキングシステムは、標的細胞の同定とピッキングを自動で行うプラットフォームで、高い精度の提供はもちろん、細胞損傷を非常に低く抑えることができるため、デリケートなiPS細胞を使用する研究の理想的な自動化ソリューションとなります。Incucyte®生細胞解析システムは、iPS細胞を扱うワークフローにおいて画像取得プロセスを自動化し、形態やコロニー形成の経時変化をインキュベーター内で解析し、モニタリングします。その結果、培養プレートの移動による貴重なiPS細胞のかく乱が抑えられ、さらに増殖と健康状態のリアルタイムでのトラッキングが行えます。

さらに、iQue® 超高速フローサイトメーターの使用で、iPS細胞のより詳細な特性解析が行えるため、幹細胞性の維持に不可欠な多能性マーカーの発現変化と、iPS細胞の全体的な状態を把握することができます。

iPS細胞の培養、モニタリングと特性解析など、従来の手法やプロセスの多くには、以下のような可能性があります。

1. 一貫性および信頼性が低い結果、播種された細胞群分布の不均一性、細胞死および分化のレベルが高くなります。
2. 細胞の増殖とコンフルエンス（細胞占有面積率）をモニタリングするため、培養プレート定期的にインキュベーターから取り出す必要があり、その作業が細胞のかく乱につながります。

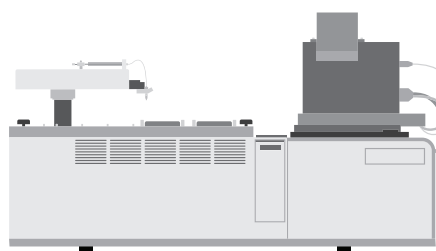
3. 解析に必要なサンプル量が多いため、ダウンストリームの研究開発アプリケーションに使用できるサンプルが少なくなります。
4. 複数の特性を測定するために、さまざまな解析手法を使用する必要があります。

本アプリケーションノートでは、研究開発におけるiPS細胞の培養、維持・管理と特性解析にむけて、ザルトリウスプラットフォームが提供する画期的なソリューションをご紹介します。

手法

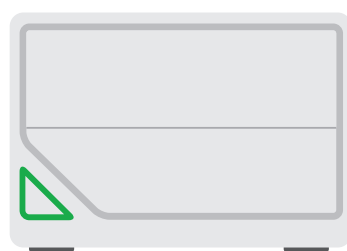
iPS細胞の増殖と特性解析のための、柔軟で包括的なザルトリウスのプラットフォームを複数用いたワークフローを以下にご紹介します。

CellCelector Flex自動細胞イメージング・ピッキングシステム



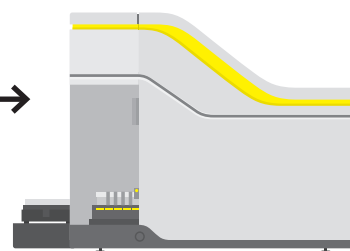
細胞のピッキングと単離

Incucyte® 生細胞解析システム



細胞の形態、コンフルエンスと増殖のモニタリング

iQue® 超高速フローサイトメーター



マーカー発現の特性解析

図1. iPS細胞培養における、ザルトリウスのプラットフォームを複数使用を示す模式図

CellCelector Flex、Incucyte®とiQue®の3台のザルトリウス製品を使用することで、iPS細胞のピッキングと播種、増殖とコンフルエンスのモニタリング、および多能性試験ができます。

細胞の培養と維持

iPS細胞のピッキングと播種

CellCelector FlexのAdherent Colony Picking Module (接着性細胞コロニーピッキングモジュール) を使用して、個々の細胞およびコロニーのピッキングを行い、組織培養プレートに播種してさらに増殖させダウンストリーム処理を行いました。CellCelector Flexを使用して画像はピッキングの前と後

に取得され、コロニー操作による細胞への影響をモニタリングしました。播種後、500 nM濃度のヨウ化プロピジウム (PI) をiPS細胞コロニーに添加し、3分間培養してPI染色を行い、PBSで2回洗浄した後、画像取得のために増殖培地 (mTESR Plus) に懸濁しました。

iPS細胞の融解と培養

Vitronectin XF™ (CellAdhere™ Dilution Bufferで1:25に希釈)でコーティングした6ウェルプレートに細胞(ヒト包皮線維芽細胞由来ATCC-DYS0100細胞)に融解し、Y-27632 (ROCK inhibitor、10 μM)を添加した1 mLの増殖培地(mTESR™ Plus)中に 1×10^6 細胞/ウェルの密度で播種、37°Cで培養しました。

コンフルエンス、コロニー形成および全体的な細胞の形態および健康状態評価のため、Incucyte®システムを使用してiPS細胞をモニタリングしました。コロニーのコンフルエンスは、内蔵のIncucyte® AIコンフルエンスソフトウェア・

アルゴリズムを使用して解析しました。継代は、細胞解離試薬を使用して3~4日毎に約60~70%のコンフルエンスで行い、 1×10^5 細胞/ウェルの密度で新しいプレートに再播種しました。週日は毎日培地交換を行い、金曜日に2倍容量の培地交換を行い、週末は培地交換を行いませんでした。非最適化iPS細胞の培養では、10% FBS、2 mMのL-グルタミン、100 μg/mLのペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI 1640培地を使用する以外、上記と同一の条件で細胞を増殖しました。

多能性の特性解析とモニタリング

多能性の特性解析：iQue® 超高速フローサイトメーター

iPS細胞は継代時に、細胞解離試薬を使用してシングルセルに解離しました。シングルセル懸濁液に生存率解析用のiQue® Membrane Integrity (B/Red)色素を添加し、細胞表面マーカー抗体である1種類の非多能性マーカー(SSEA-1)および2種類の多能性マーカー(SSEA-4およびTRA-1-60)で染色しました(PBS + 2% FBS中)。細胞は、 2×10^4 細胞/ウェルでV底の96ウェルプレートに播種し、前述の抗体カ

クテルで染色しました(室温の暗所で30分)。プレートを洗浄するために、PBS + 2% FBS (100 μl)を添加して遠心分離(300 × g、5分)を行い、上清を吸引しました。プレートを振とうし(3000 rpm、60秒)、PBS + 2% FBS (20 μL)に再懸濁させてiQue®で分析しました。iQue Forecyt®ソフトウェアにおいて各抗体について最適な補正がなされた後、データ解析を行いました。

多能性と細胞の健康状態のモニタリング：Incucyte® 生細胞解析システム

実験中、iPS細胞の形態とコンフルエンスの変化は、Incucyte® 生細胞解析システムを使用してモニタリングしました。培養iPS細胞株を4時間間隔、10×の倍率で反復画像スキャンスケジュールを使用して、高解像度(HD)位相差画像をモニタリングしました。核と細胞質の比は、

Incucyte® Nuclight Rapid Red Dye (1:1000)を使用してiPS細胞の核を染色し、マスクングを使用して細胞質領域(コンフルエンスマスク)と核領域(蛍光マスク)の測定から算出し、多能性/正常iPS細胞形態を定量しました。

細胞内部と表面マーカーの研究

iPS細胞とコントロールTHP-1細胞は、 2×10^4 細胞ウェルでV底の96ウェルプレートに播種、固定化し、テクニカルノート：Intracellular Staining Assay for iQue® Platformに記載されたプロトコルに従って、透過処理と染色を行いました。多能

性マーカーとしてSSEA-4、TRA-1-60、Oct 3/4とSox-2の解析を行い、SSEA-1発現を非多能性マーカーとして使用しました。iQue Forecyt®ソフトウェアにおいて各抗体について最適な補正がなされた後、解析を行いました。

結果

iPS細胞のような幹細胞に関して、一貫性と再現性があり、ゆるぎないデータを生み出すためには、培養と特性解析のためのワークフロー開発が必要不可欠となります。

ここで紹介したザルトリウスのプラットフォーム(図1)の使用で、幹細胞の健康状態と幹細胞性の主要なマーカーのモニタリングと特性解析を行いながら、健康状態が良好な多能性のiPS細胞が培養できるメリットを明確に示すことができます。

CellSelector Flex自動細胞イメージング・ピッキングシステムを使用したiPS細胞のピッキングは、迅速で細胞にやさしく、かつ高い信頼性をもたらします。

細胞の良好な健康状態を維持することは、どのような細胞系を扱う場合にも重要で、特にiPS細胞などの幹細胞においては極めて重要です。ここにご紹介するデータは、CellSelector Flexの細胞ピッキングおよび播種が細胞にやさしいことを明確に示します。細胞死を識別できる色素ヨウ化プロピジウム(PI)で染色した場合、iPS細胞のマニュアル操作では、CellSelector Flexを使用した場合と比較してPI陽性細胞の数が増加しており、健康な細胞が少ないことを示しています(図2A)。

また、CellSelector Flexのコロニーは細胞の破片や不純物が少なく、境界がよりはっきりとしています(図2B)。CellSelector Flexの柔軟性と能力は、組織培養プレートからiPS細胞シングルセルを、もしくは全iPS細胞コロニーからもピッキングできることで実証されます。この機能によって、さらなる培養規模の拡大に対応して、標準培養プレートから理想的なコロニーを選び出すことができます。

また、後続する培養工程のためにコロニーの一部が選択できます。この機能は、コロニーの一部が自発的に分化する場合に有用です。分化したセクションを除去することや、多能性を有するセクションを採取して継代または解析することが可能です(図2C-F)。

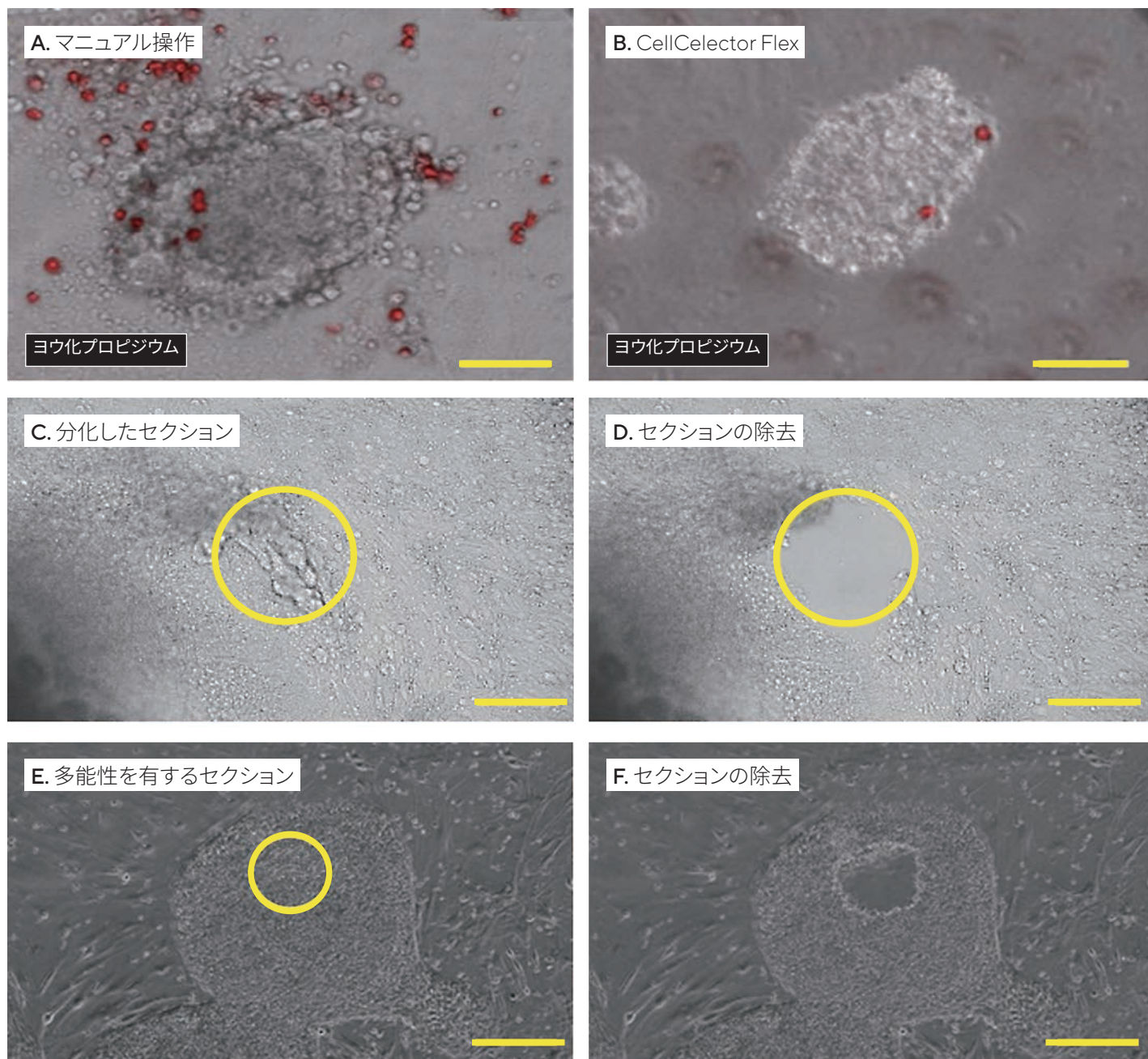


図 2. CellSelector Flex を使用した迅速、正確、おだやかで、かつ信頼性が高い iPS 細胞のピッキング

CellSelectorプラットフォームを使用して取得した、iPSCコロニーのピッキングを示す顕微鏡画像。(A) マニュアル操作、(B) CellSelectorを使用してピッキングおよび播種を行った細胞コロニーの、細胞死を示すヨウ化プロピジウム (PI) 染色結果 (C) CellSelectorによるピッキング前の、幹細胞コロニー内分化領域を示す顕微鏡画像 (D) 上記 (C) の画像に示す培養プレート領域から分化領域を除去した画像 (E) フィーダーレイヤー上で増殖させた大きなiPS細胞コロニーにおいて、多能性細胞の一部をピッキングする前の顕微鏡画像。コロニーの右下部には自発的な分化があります。(F) 後続の培養のために、(E) のコロニーから多能性細胞のターゲット領域を、CellSelector Flexによるピッキングで採取した後の画像。スケールバーは500 μm 。

培養中のiPS細胞における形態と多能性ポテンシャルのモニタリング

CellSelector Flexは、ザルトリウスのもう一つのプラットフォームであるIncucyte® 生細胞解析システムと併用して、同じプロジェクトで使用することができます。このシステムは、培養中の細胞をインキュベーター内でモニタリングするツールを提供し、培養プレートをインキュベーターから取り出さずに形態の変化を記録、解析することができます。下記の例では、多能性における形態学的指標の損失が観察および記録され、その後の解析で変化を定量することができます。

培養2日後のiPS細胞のIncucyte®画像は、最適化条件下と非最適化条件下での培養で顕著な形態の差を示します。最適化条件下で増殖したiPS細胞は、境界が明確な密集したコロニーを形成しており、位相画像が明るく(図3B)、非最適化条件下で培養したiPS細胞はより分散しており、密集したコロニーを形成せず、線維芽細胞様になり始めています(図

3E)。Incucyte® Nuclight Rapid Red Dyeを使用した核染色でも、非最適化条件下での培養では細胞の分散を示し(図3D)、最適化条件下での培養で見られるタイトな分布(図3A)を得られず、核がより分散しています。

これらの形態学的な差の定量は、10倍の倍率でIncucyte® Adherent Cell-by-Cellスキャンが行われ、核および細胞質面積の計測ではBasic AnalyzerとAIコンフルエンス解析を使用して、iPS細胞研究で一般的な標準値、核/細胞質比を次式から求めました(図3C、F)。

$$\frac{\text{核の総面積}}{\text{細胞質の総面積}} = \text{核/細胞質比}$$

図3Gのグラフは、非最適化条件下ではこの比が0.6から0.4に低下していることを示します。細胞がよりiPSC様で多能性であるほど、核/細胞質比は高くなります。

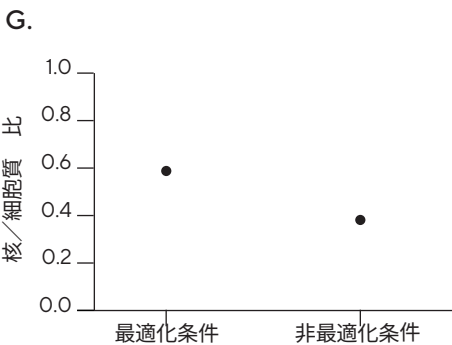
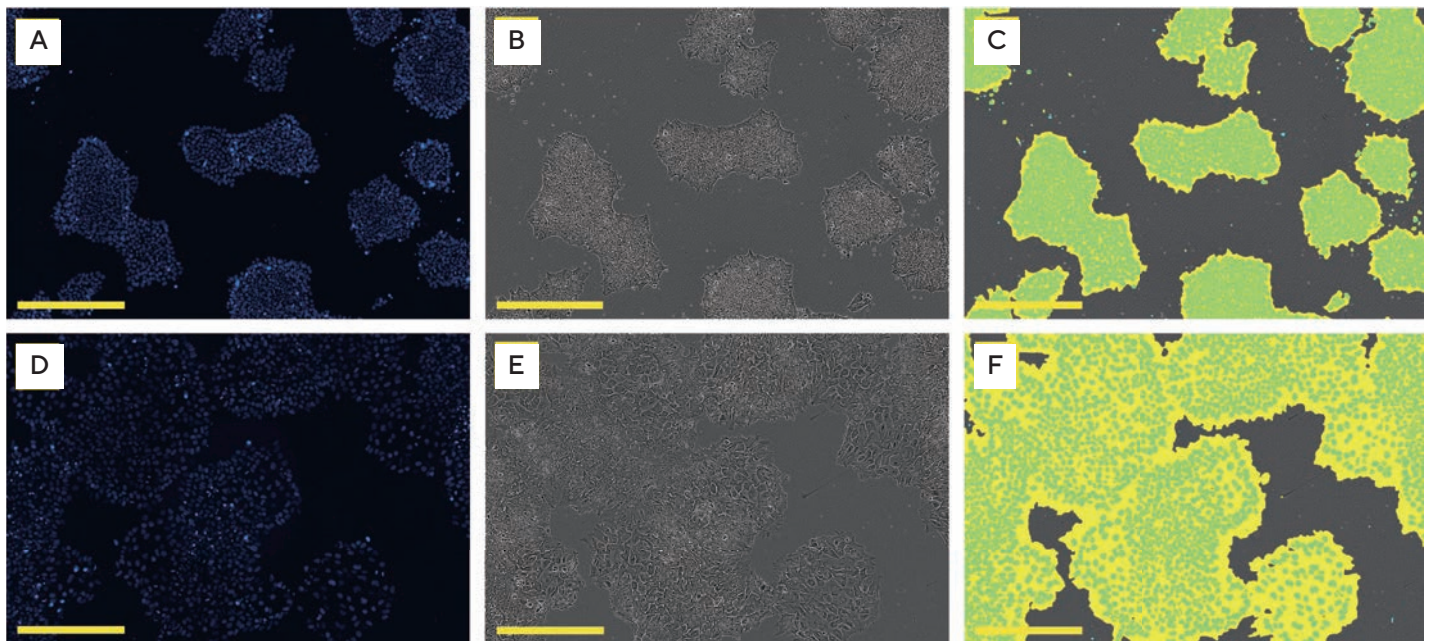


図3. iPS細胞培養中の形態と多能性のモニタリング

最適化(mTESR Plus)、および非最適化(RPMI)条件下で培養されたiPS細胞のIncucyte®画像(A、D) Nuclight Rapid Red Dyeで染色したiPS細胞の蛍光画像で、各条件間の核密度を比較(B、E) 両条件間の形態学的変化を示す、同じiPS細胞の位相差画像(C、F) Incucyteの解析によって定量された細胞の占有領域と核領域を示す。(G)の核/細胞質非の算定に使用。スケールバーは400 μm。

iQue® 超高速フローサイトメーターによる、iPS細胞マーカーの発現変化解析

iQue®プラットフォームを使用した特異的な多能性マーカー・表面マーカー発現解析では、わずか10 μLのサンプル量しか必要としないため、非最適化条件下で培養したiPS細胞の多能性損失について、サンプル量に余裕をもってさらなる研究が行えます。

非最適化条件下で培養したiPS細胞は、最適化された条件と比較して、多能性マーカー発現の急速な損失を示します(図4)。これはIncucyte®プラットフォームで収集されたデータ(図3)と相関する多能性の損失を示します。培養2日後(図4A)の非最適化条件下での培養の解析は、最適化条件下と比較して、多能性マーカーSSEA-4(97.3 ± 0.8%)とTRA-1-60(89.8 ± 0.9%)の発現および多能性保持ポピュレーション(34.6 ± 0.3%)の低下を示し、処理4日後では、さらに低下しています(SSEA-4 63.4 ± 2.9%、TRA-1-60 59.9 ± 2.9%、多能性保持ポピュレーション 19.3 ± 3.0%) (図4B)。一方、最適化条件下で培養したiPS細胞では、これら

マーカーの経時的な発現プロファイルに、顕著な差は観察されませんでした(それぞれの多能性マーカー95 ± 0.4%、SSEA-11.8 ± 0.5%未満)(図4A、B)。また、非最適化条件下での培養では、非多能性マーカーであるSSEA-1発現の増加(57.5 ± 0.7%)が、処理後2日目という早い時期から確認され、培養期間を通じて高い値が維持されています(図4A)。

図4C(iQue Forecyt®ソフトウェア生成のドットプロット)には、最適化条件(1.63% SSEA-1陽性)と非最適化条件(57.5% SSEA-1陽性)の間でのSSEA-1発現の明確なシフトがあります(上部の2つのドットプロット)。下部の2つのプロットでは、非最適化条件下における多能性マーカーの発現低下を示し、最適化条件下のiPS細胞はプロットの右上にコンパクトなドットプロット分布(SSEA-4+、TRA-1-60+)を示すのに対し、非最適化条件下では、プロットがTRA-1-60陰性領域にシフトしたより広がった分布を示しています。

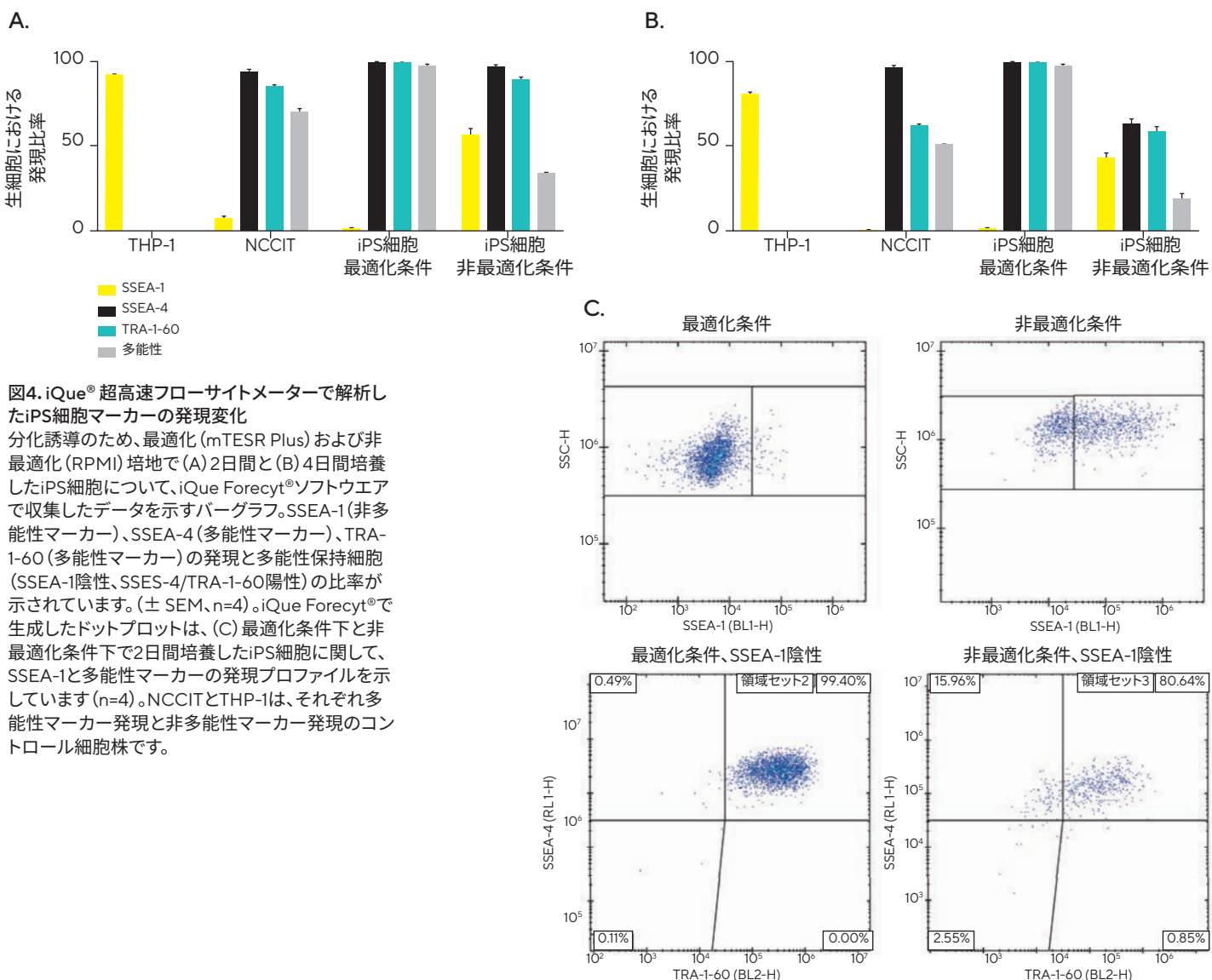


図4. iQue® 超高速フローサイトメーターで解析したiPS細胞マーカーの発現変化

分化誘導のため、最適化(mTESR Plus)および非最適化(RPMI)培地で(A)2日間と(B)4日間培養したiPS細胞について、iQue Forecyt®ソフトウェアで収集したデータを示すバーグラフ。SSEA-1(非多能性マーカー)、SSEA-4(多能性マーカー)、TRA-1-60(多能性マーカー)の発現と多能性保持細胞(SSEA-1陰性、SSEA-4/TRA-1-60陽性)の比率が示されています。(± SEM, n=4)。iQue Forecyt®で生成したドットプロットは、(C)最適化条件下と非最適化条件下で2日間培養したiPS細胞に関して、SSEA-1と多能性マーカーの発現プロファイルを示しています(n=4)。NCCITとTHP-1は、それぞれ多能性マーカー発現と非多能性マーカー発現のコントロール細胞株です。

表面および細胞内マーカー染色により、ハイスループットな細胞特性解析ソリューションを提供

iQue® 超高速フローサイトメーターを使用し、表面マーカーに加えて細胞内マーカーを観察することで、細胞多能性のさらなる特性解析が可能になります。

THP-1細胞を非多能性のコントロールとして使用して、iPSCの表面マーカーであるSSEA-1、SSEA-4およびTRA-1-60の染色および細胞内マーカーであるOct 3/4およびSox 2の染色(固定および透過処理後)を行いました(図5)。iQue Forecyt®ソフトウェアで直接取得されたドットプロットデータは、多能性マーカーSSEA-4、TRA-1-60、Oct 3/4とSox 2のiPSC細胞における発現(黒色)と、非多能性マーカーSSEA-1の

THP-1コントロール細胞株のみにおける発現(黄色)を明確に示しています(図5A)。図5Bのヒートマップでは、この発現パターンをプレートビュー構成で、黒色は高発現、黄色は低発現として示し、iQue Forecyt®ソフトウェアの柔軟なデータ表示能力を示す例となっています。図5Cに示す棒グラフ表示データは、2つの細胞型の発現プロファイルの対照性をさらに強調しています。このように、iPS細胞を含む細胞株において、多様なマーカーの発現特性解析を複合的で柔軟な解析ワークフローによって行えることは、iQue® 超高速フローサイトメーターを含むザルトリウスのプラットフォームの能力と有用性を実証します。

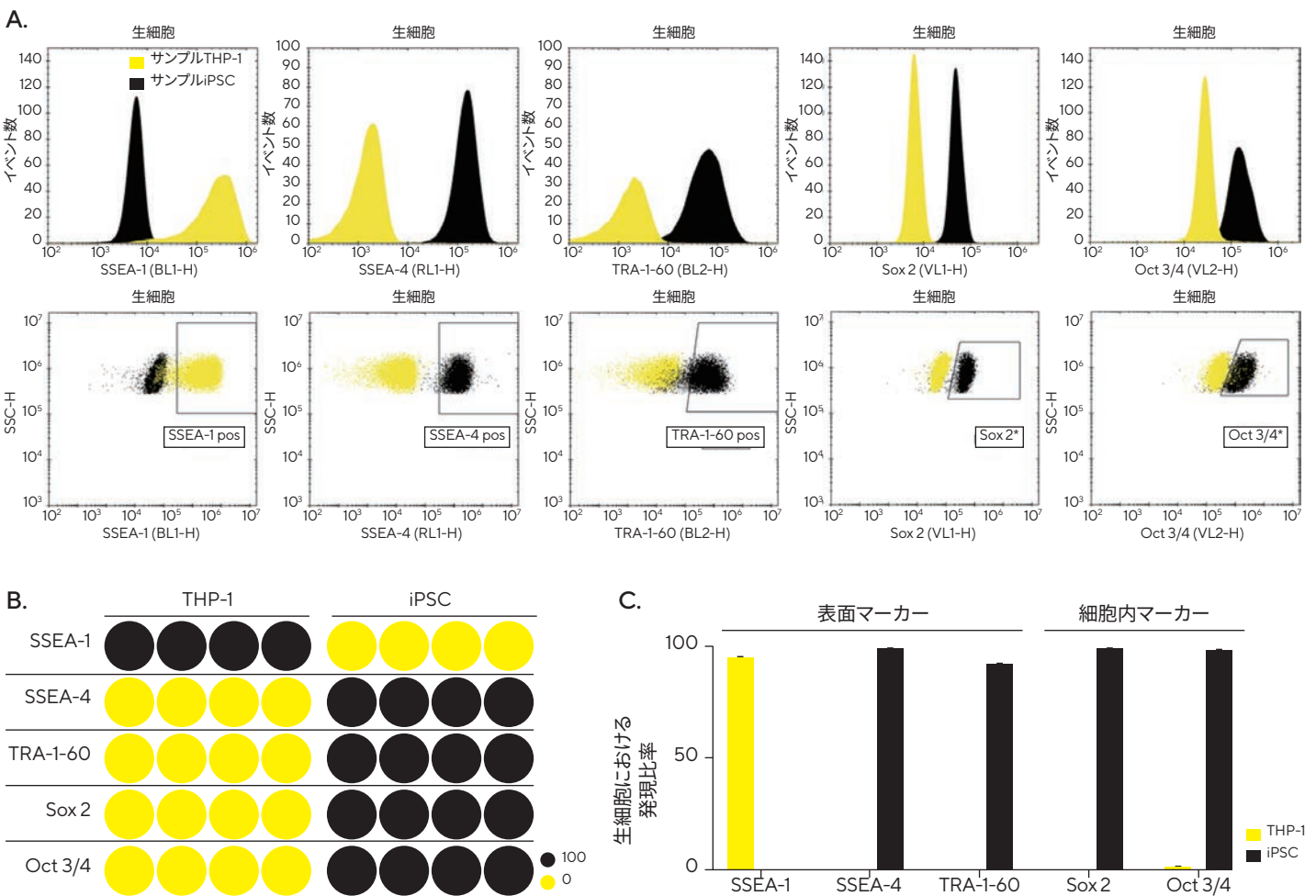


図5. 表面および細胞内マーカー染色は、ハイスループットな細胞特性解析ソリューションを提供します。

SSEA-1を非多能性細胞のマーカーとして、SSEA-4、TRA-1-60、Sox 2とOct 3/4をすべて多能性マーカーとして使用しました。(A) iQue®Forecytソフトウェアシステムで生成されたヒストグラムとドットプロットは、iPSC細胞とコントロール細胞における、種々の表面、および細胞内マーカーの発現を示しています(n=4)。iQue Forecyt®が生成したヒートマップ(B)は、同一マーカーに関するプレートマップと各ウェルの発現プロファイルを示しています。(C) 他社ソフトウェアで生成したマーカー発現データを棒グラフにて表示しています(± SEM, n=4)。

結論

iPS細胞は多くの研究分野において使用が増加している一方で、その多能性、生存率と増殖能を維持した最適な増殖のため、特定の条件を必要としています。これらの条件を満たすための費用は高額な場合が多く、iPS細胞の状態をモニタリングするためには、複数の技術と解決策を必要とし、複雑で時間もかかります。

iPS細胞培養のワークフローにおいて、CellCelector Flex 自動細胞イメージング・ピッキングシステム、Incucyte® 生細胞解析システムとiQue® 超高速フローサイトメーターという、複数のザルトリウスプラットフォームの使用で、iPS細胞のピッキングと播種、形態のモニタリング、および多能性特性解析など、一連の作業がスムーズに行えることを示しました。この統合されたワークフローが持つ、従来の各種方法と比べた場合の優位性は以下となります。

1. 高い一貫性と信頼性、CellCelector Flexは後続の試験や培養用として特定のiPS細胞コロニーを高い再現性でピッキングできるため、細胞の良好な健康状態が維持されます。

2. デリケートなiPS細胞株培養において、インキュベーターから培養プレートを取り出さずに形態と増殖特性を観察できます。
3. 細胞型の特性解析に必要なサンプル量を最小化することにより、ダウンストリームに必要なサンプルの消費を最小限に抑えることができます。
4. 表面マーカー発現と細胞内マーカー発現のような、複数指標の特性解析を同一プラットフォームで行うマルチプレックス実験により、研究に柔軟性を提供します。

今回ご紹介したデータ群は、薬剤開発から、疾患モデリングや臨床治療研究まで、様々な研究開発アプリケーションにおいてiPS細胞の培養、記録・観察と特性解析を行う上で、複数のザルトリウスのシステムを組み合わせることによってもたらされる、高能率なワークフローの持つ強みを示しています。

参考文献

1. Takahashi K, Yamanaka S. (2022) **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904174.

ザルトリウス・ジャパン株式会社

東京本社
〒140-0001
東京都品川区北品川1-8-11
Daiwa 品川Northビル4階
Phone: 03-6478-5200
Fax: 03-6478-5494
Email: hp.info@sartorius.com

名古屋営業所
〒450-6411
名古屋市中村区名駅3-28-12
大名古屋ビルヂング11F
Phone: 03-6478-5200

大阪営業所
〒532-0003
大阪市淀川区宮原4-3-39
Phone: 03-6478-5203
Fax: 03-6478-5496



詳細はこちら: www.sartorius.com

掲載されている内容は、予告なく変更される場合があります。

©2024 Sartorius Japan K.K.

無断複写・複製・転載を禁じます。

ザルトリウス製品の名称はすべて、ザルトリウスAGおよび/

またはその関係各社の登録商標および財産です。

04 | 2024