

微細加工培養容器を利用した ヒトiPS細胞からのサイズ均一かつ高効率な胚様体形成、培養技術

無断転載禁止

三輪 達明, 佐藤 拓輝, Alimjan Idris, 熊谷 博道
旭硝子株式会社 中央研究所

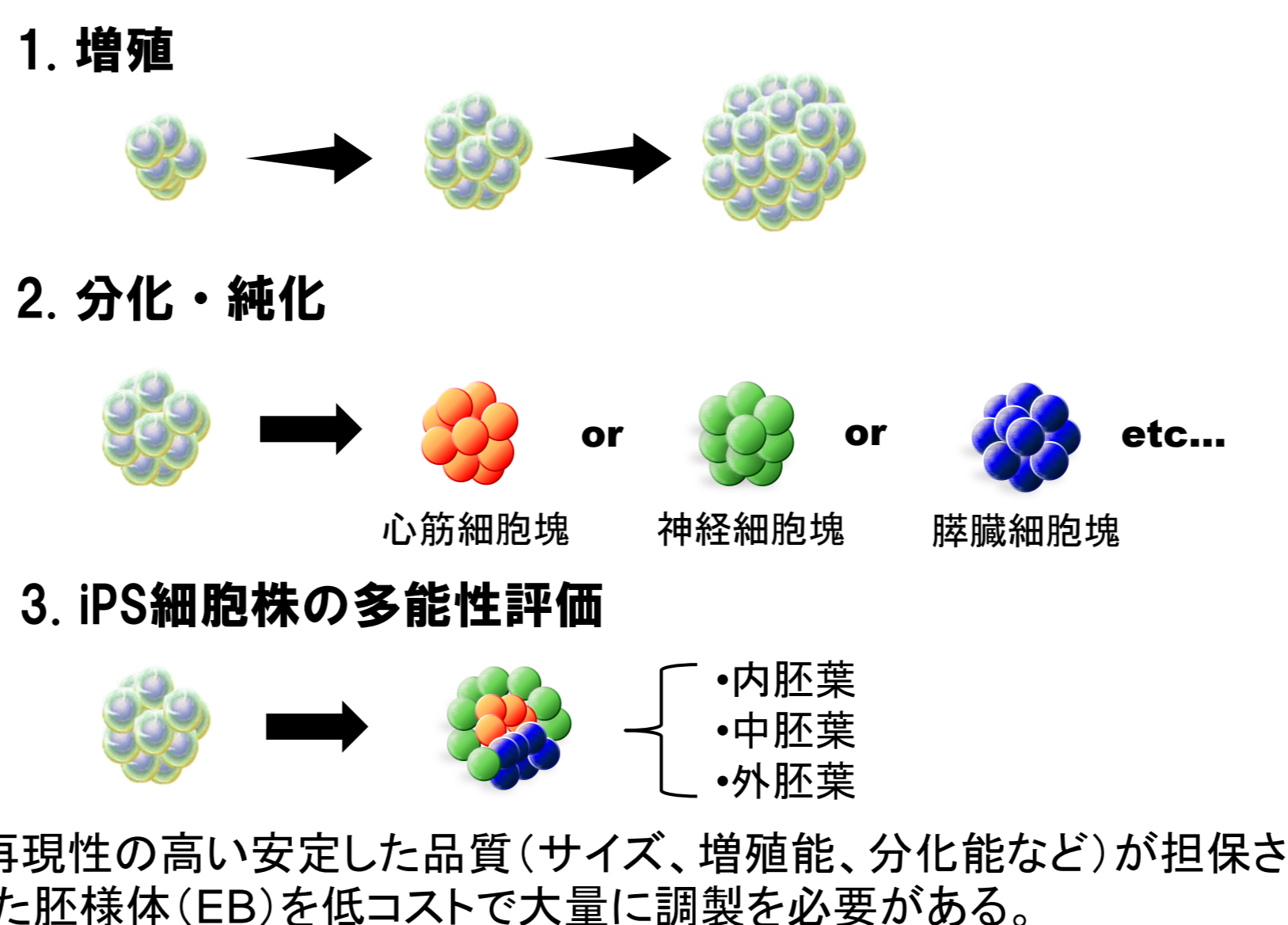
要約

【背景、目的】 幹細胞から各種組織細胞を効率良く分化誘導する手法の一つとして胚様体形成法がある。形成された胚様体のサイズは、その後の分化効率に影響することも知られている。そのため、ヒトiPS細胞を用いた再生医療の実現化においては、サイズ均一な胚様体を効率よく形成させ、安定的に培養する必要がある。本研究では、特殊な微細加工培養容器を用いて、ヒトiPS細胞からサイズ均一かつ高効率な胚様体を形成させる技術の開発を行った。

【方法、結果】 レーザー微細加工によって汎用のポリスチレン製ディッシュやマルチプレート容器の底面に約200-1000 μmの任意の径の小穴が隙間なく加工され、その表面にタンパク質低接着コートが施された特殊な培養容器(EZSPHERE)にシングルセル化したヒトiPS細胞を播種して、胚様体の形成効率やサイズ均一性を詳しく調べた。ここでは、V底またはU底96プレートやタンパク質低接着ディッシュを用いた従来の胚様体形成方法とは異なり、高密度で胚様体を形成させるため、細胞分散方法、小穴ごとの細胞数、培地交換方法、培地添加剤成分など培養条件の最適化検討を行った。その結果、サイズ均一な胚様体を高効率、高密度で形成させ、安定的に培養することに成功した。また、従来法に比べ、培養操作が簡易化されたため、再生医療のコストダウンも期待される。本研究は、JSTの「再生医療実現拠点ネットワークプログラム」の一環として行われた。

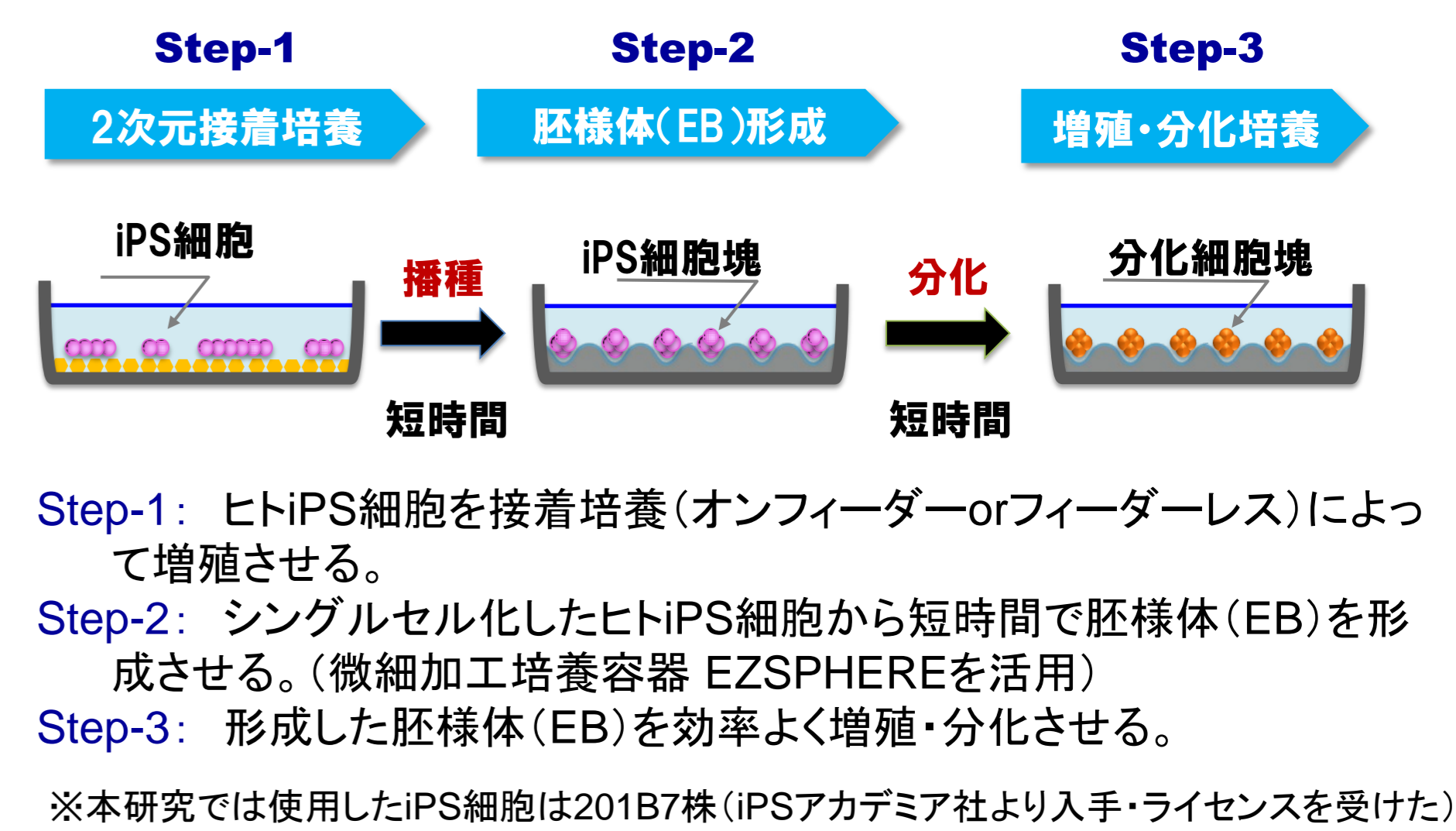
背景

再生医療におけるヒトiPS細胞の胚様体(EB)の利用



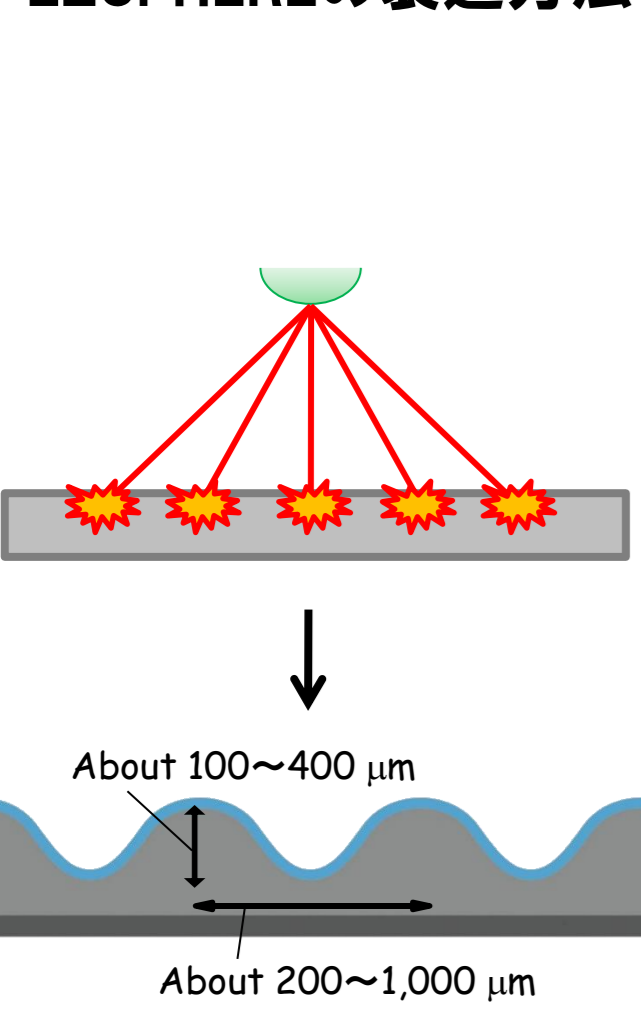
目的

ヒトiPS細胞からサイズ均一な胚様体(EB)を短時間で
簡便に大量に効率良く形成させる技術の開発

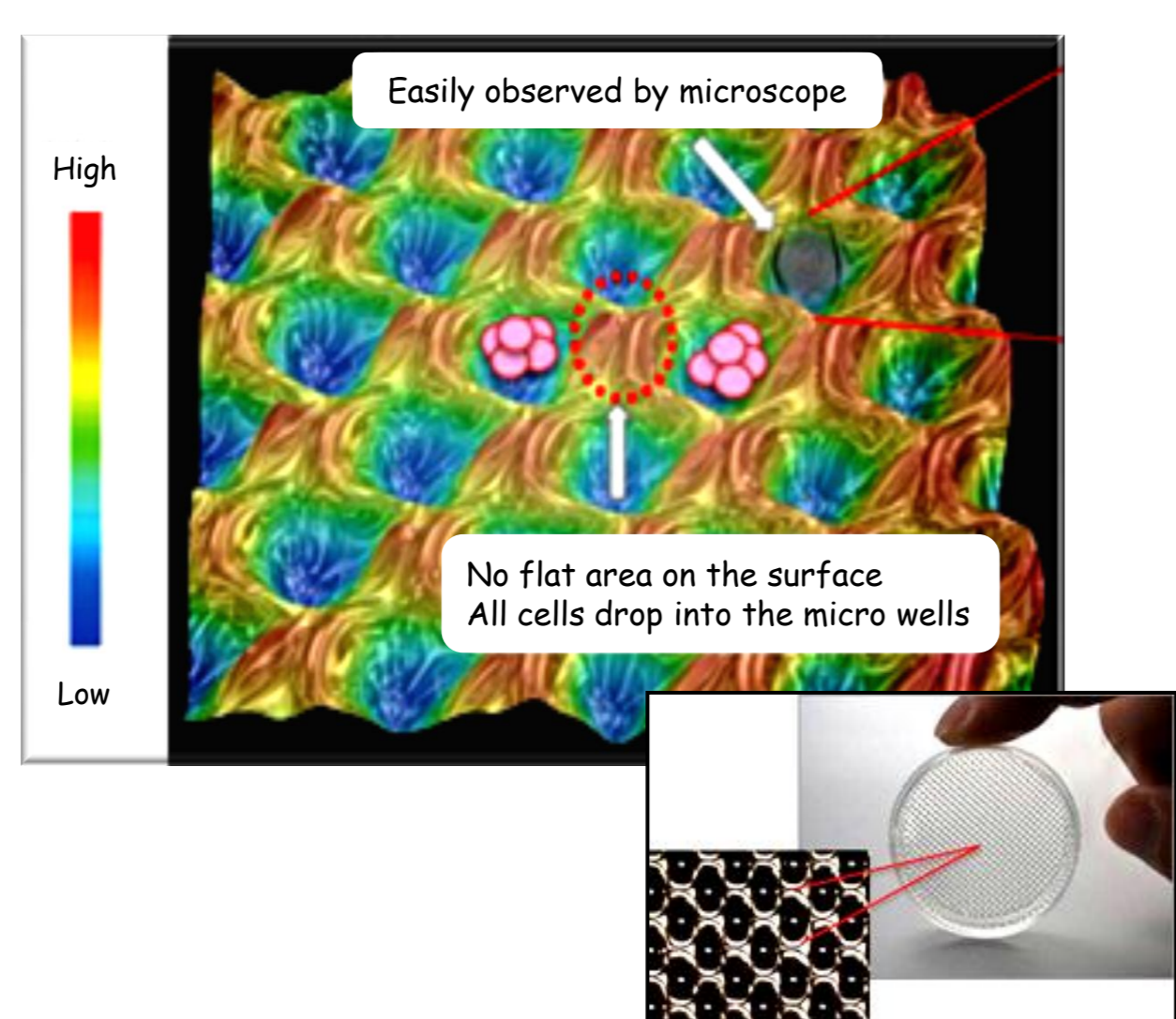


微細加工培養容器 EZSPHERE、それを用いた高効率な胚様体(EB)形成

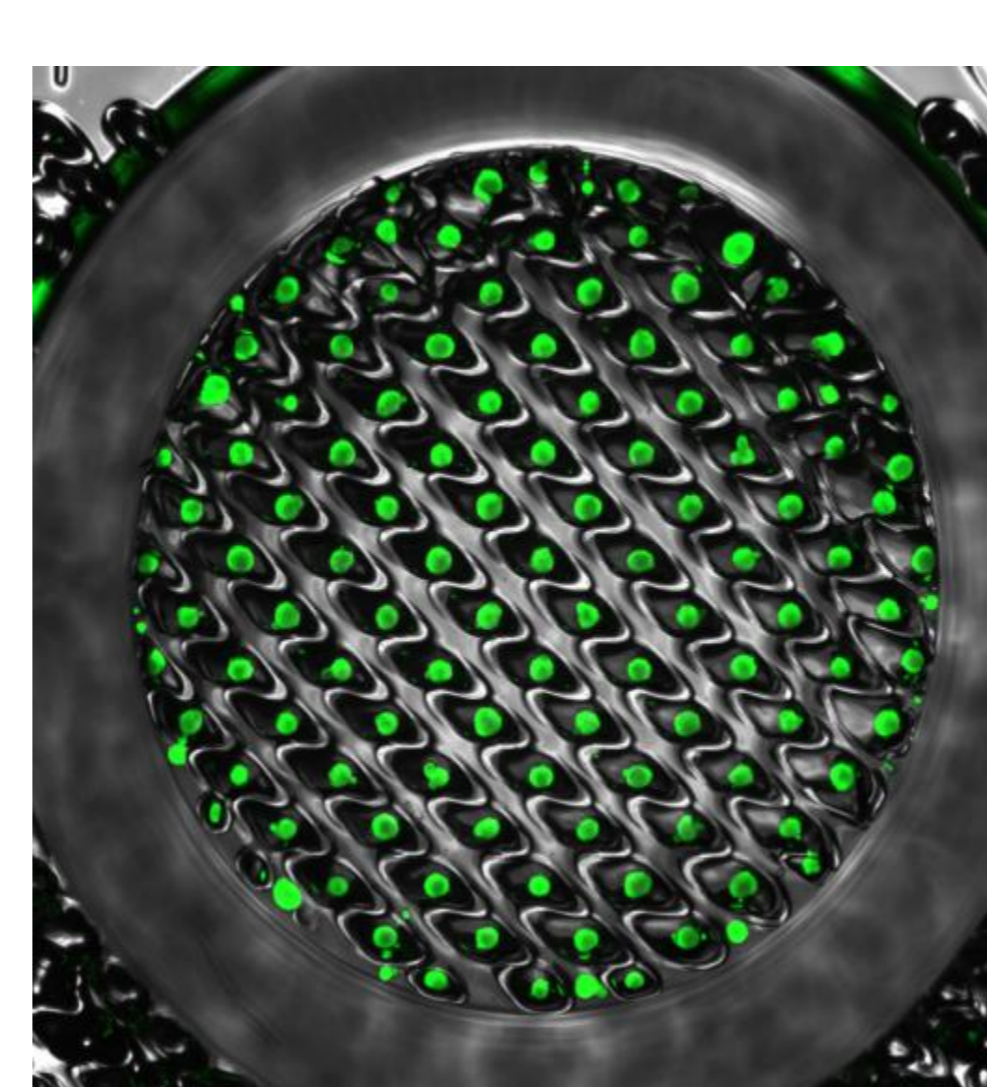
EZSPHEREの製造方法



EZSPHEREの微小ウェル



EZSPHEREの微小ウェルで形成させた胚様体



微小ウェル中で短時間で胚様体(EB)が形成可能

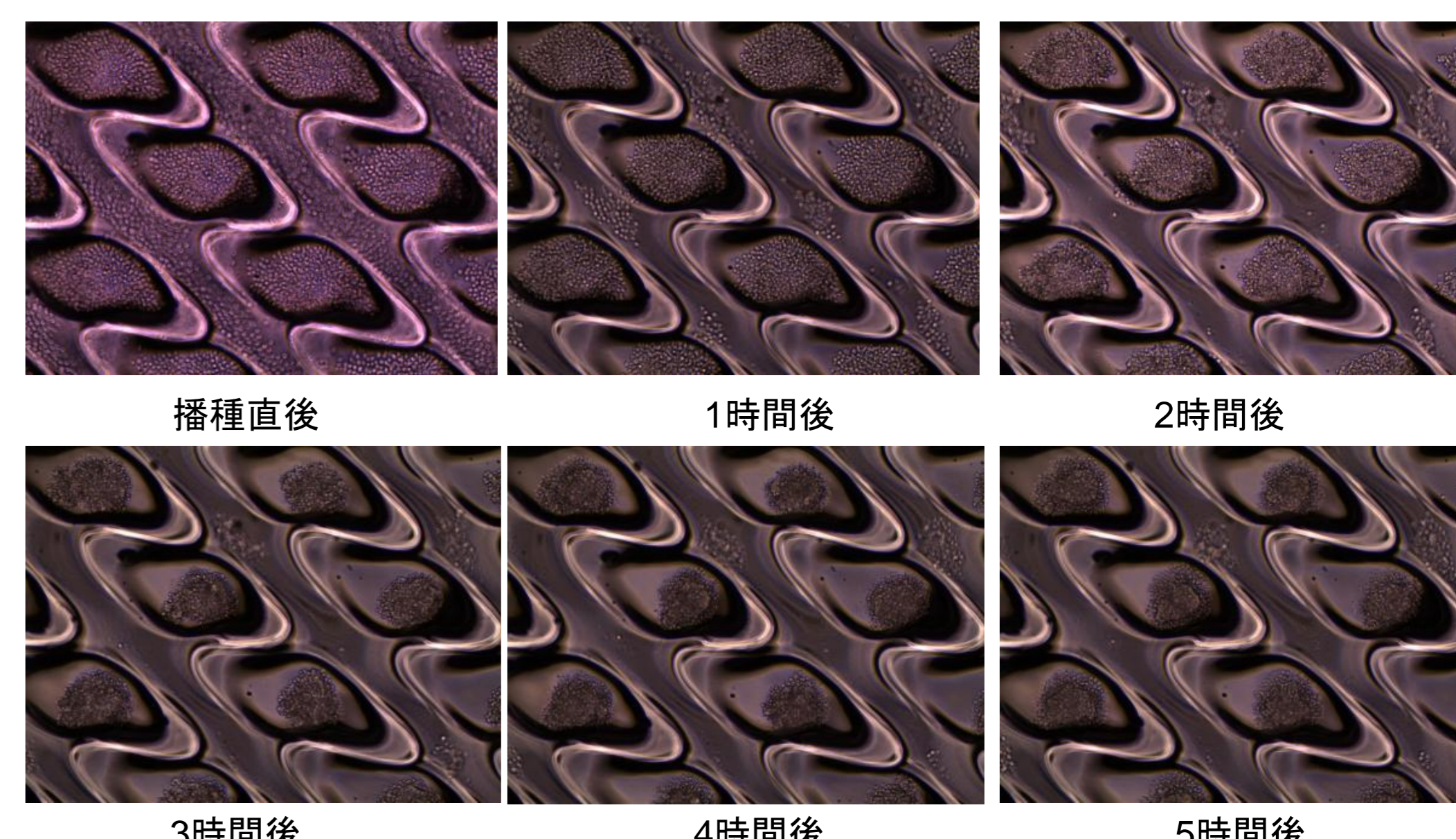


図1. EZSPHEREの製造方法および微小ウェルの形状
汎用のプラスチック製のシャーレやマルチウェルプレートの底面をレーザー加工することで、微小ウェルが均等な間隔で隙間なく形成され、さらに低接着コートされている。そのため、シングルセル化したiPS細胞は、各微小ウェルに均等に落ち込み、底面に接着することなく、近接する細胞同士が結合して短時間でサイズ均一な胚様体(EB)を形成し、浮遊培養できる。

図2. EZSPHEREの微小ウェル毎にシングルの胚様体(EB)が均一に形成され、高い生存率を示した
シングルセルに分散したヒトiPS細胞を1000 cells / 微小ウェル(約260 EBs/cm²に相当)となるように播種し、その翌日に細胞生存率を生死判定用二重蛍光染色で調べた(生細胞はCalcein AMで緑色に、死細胞はEthD-IIIで赤色に染色される)。蛍光顕微鏡で観察した結果、全ての微小ウェルでサイズ均一に形成されたEBが高い細胞生存率(緑色蛍光)を示した。

図3. シングルセル化したiPS細胞が均等に微小ウェルの中心に集まり、短時間で凝集してサイズ均一な胚様体(EB)が形成可能であることを顕微鏡で確認した
EZSPHEREに1000 cells / 微小ウェルとなるようにシングルセルに分散したヒトiPS細胞を播種し、Time-lapseで観察した。2時間程度で細胞は1つの塊となり、次第に球状の胚様体が形成された。短時間での細胞凝集が可能であるため、シングルセル分散のストレスによるiPS細胞への影響が緩和されると考えられる。

EZSPHEREによる培養法の最適化検討

EZSPHEREで胚様体を形成・維持培養する際には、iPS細胞をシングルセル化して、高密度で播種・培養するため、それがiPS細胞にストレスを与える可能性がある。そのため、既存の培養方法をEZSPHEREに適用するための最適化が必要であり、その検討を行った。その結果を図4、5にまとめた。

図4: EZSPHEREは通常の培養法よりもiPS細胞の播種密度が高いため、従来の培養方法通りPrimate ES minus bFGF (Reprocell) を使用して3日間培養すると、胚様体の生存率が低下してしまうという現象が発生した。そこで、培地に5% KSRを添加してみたところ、iPS細胞播種翌日(1日目)の胚様体の生存率が著しく向上することが判った。さらに、培養1日目に半分量の培地を新鮮な培地に交換することによって、培養3日目まで高い細胞生存率を維持することが可能になった。

図5: ヒトiPS細胞は、継代時の酵素処理や物理的なシヤア圧などのストレスに弱い。特に、シングルセル化する際には、細胞死を抑えるため通常10 μMのRho/Rock阻害剤(Y-27632)を添加する方法が知られている。その方法では一部細胞死が発生したため、Y-27632を細胞分散液にも加え、さらに添加濃度を50 μMにアップしたところ、細胞死を抑えることができ、微小ウェル毎にシングルの胚様体を形成させ、シングルセルのまま残っている細胞をほぼ無くすことに成功した。

課題	原因	解決法
胚様体形成時にシングルセルのまま残ってしまう細胞が発生する	ヒトiPS細胞のシングルセル分散によるストレスで細胞死	Y-27632を添加するタイミングと濃度を変更した
胚様体形成後、3日間培養すると、胚様体が崩壊し、シングルセルとなって細胞が死んでしまう	高密度培養であるため、培地中の栄養分が不足し、乳酸がたまり低pHになるなど、老廃物が蓄積する	培地に5% KSRを添加し、細胞播種翌日に半量の培地を新鮮な培地に交換した。

胚様体の形成効率の向上

培養条件の最適化によるEB(胚様体)生存率の向上

条件変更前: Primate ES - bFGF培地中で胚様体を形成させ、そのまま3日間培養
条件変更後: (1) Primate ES - bFGF培地に5% KSRを添加
(2) 播種翌日(day1)に半分量の培地を新鮮な培地に交換

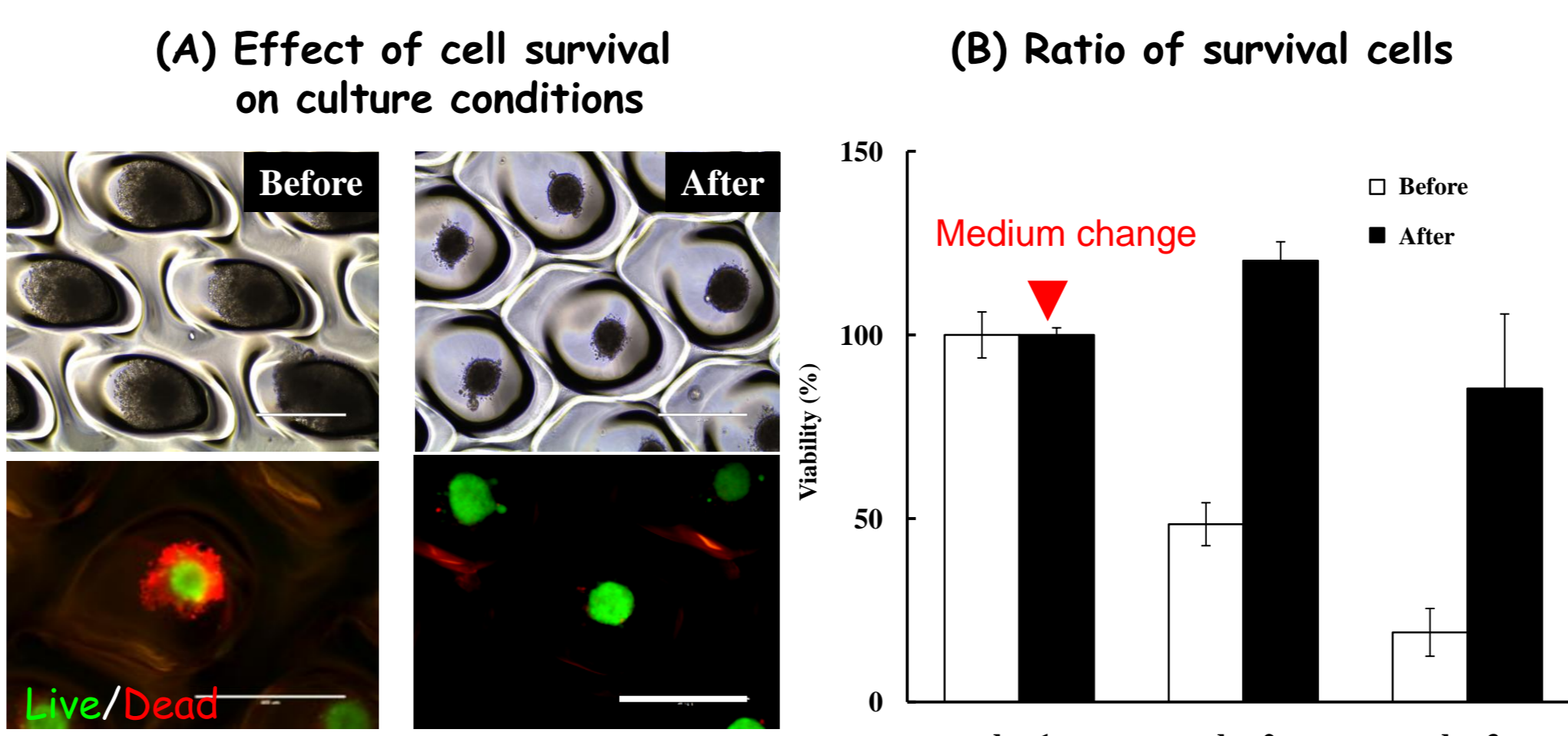


図4. 培地への5% KSR添加および培地交換タイミングの変更によるEB(胚様体)の生存率の向上
培養条件の改善前と後で胚様体(EB)の生細胞率を測定した。生細胞はCalcein AMで緑色に、死細胞はEthD-IIIで赤色に染色した(A)。Cell Counting Kit-8を用いて胚様体の細胞生存率を測定した(B)。条件変更前と比較し、条件変更後は死細胞がほとんど確認されず、培養を通じて、生細胞率が向上した。

培養条件のさらなる改良によるEB(胚様体)形成効率の向上

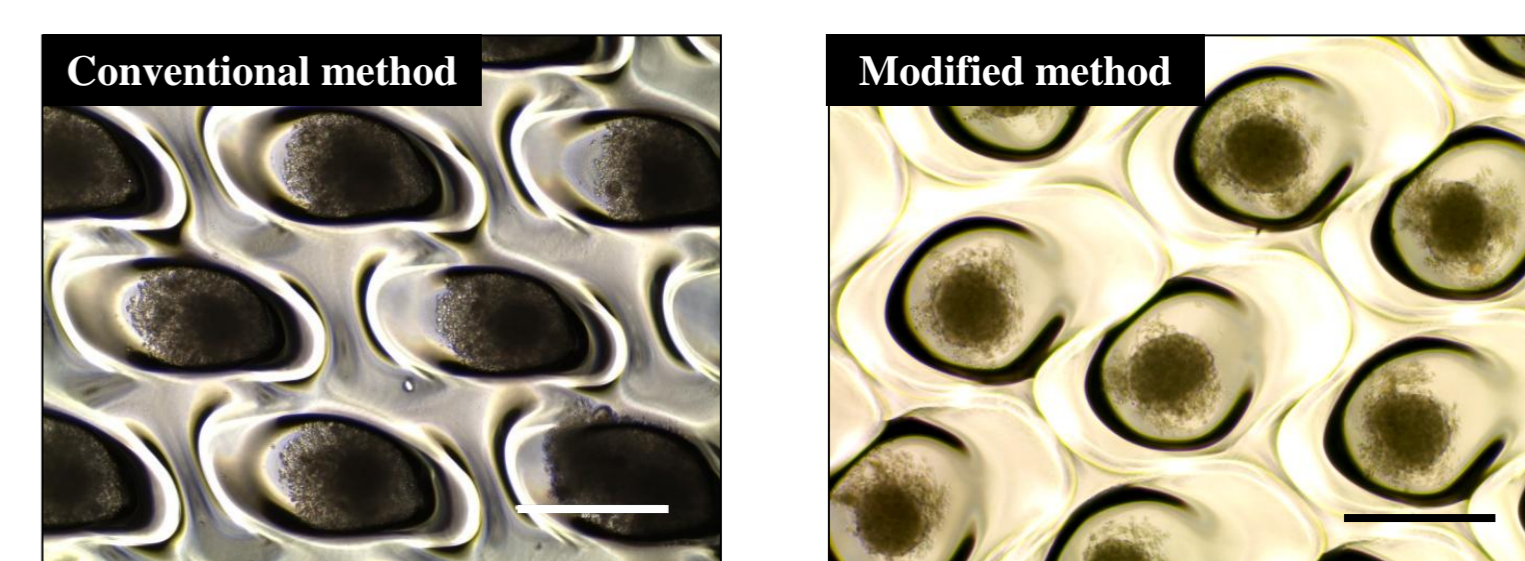
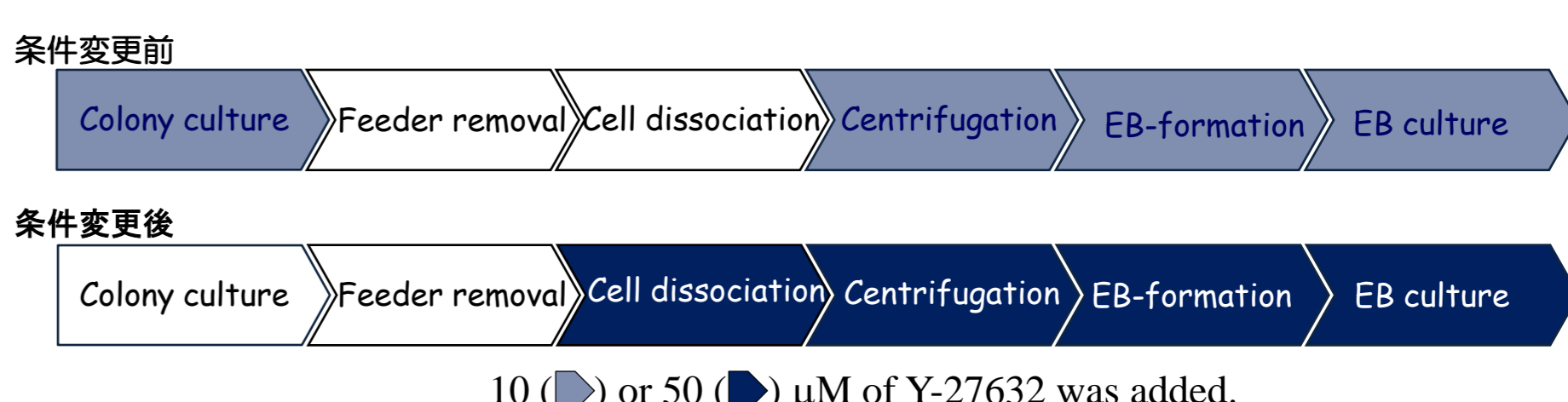
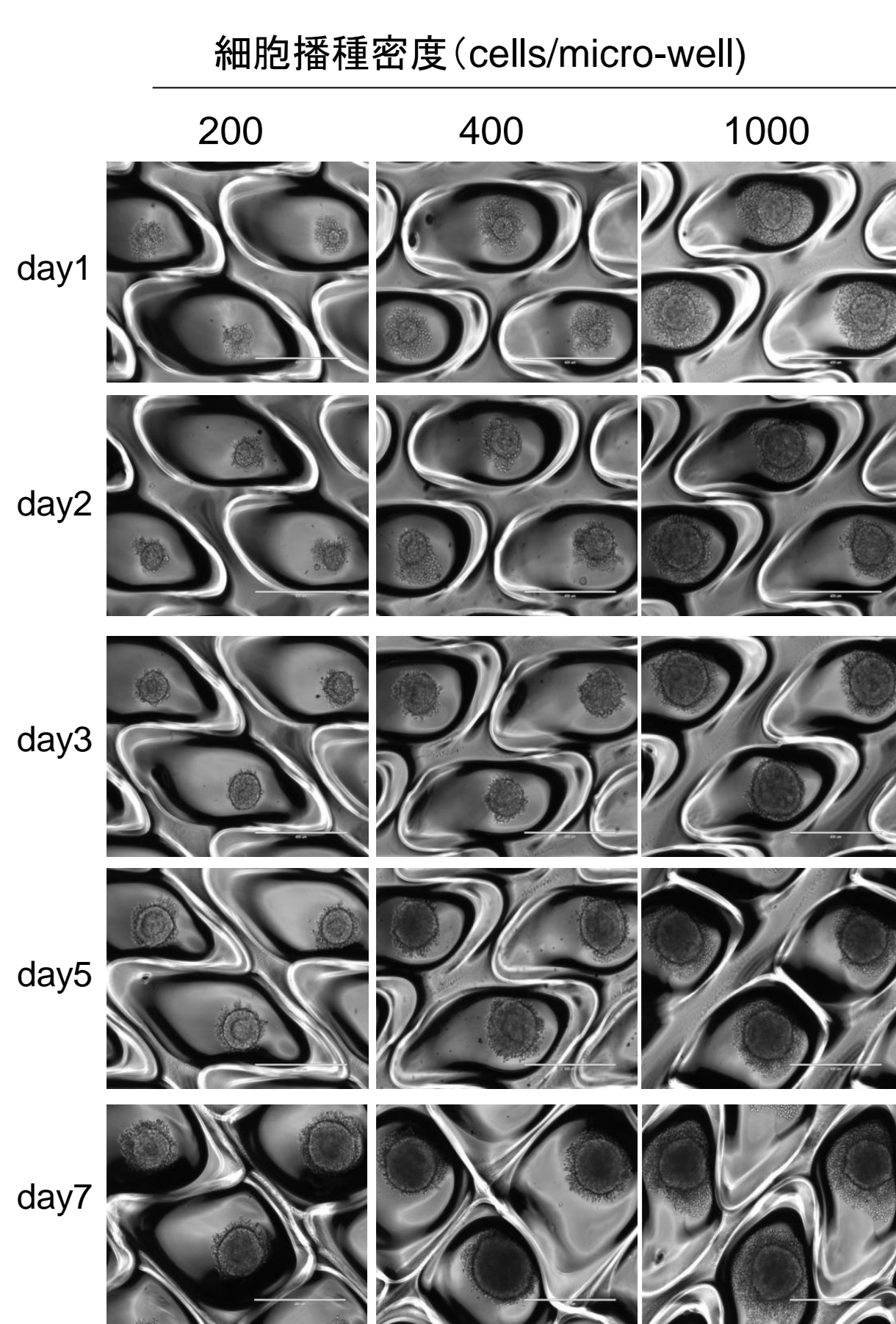


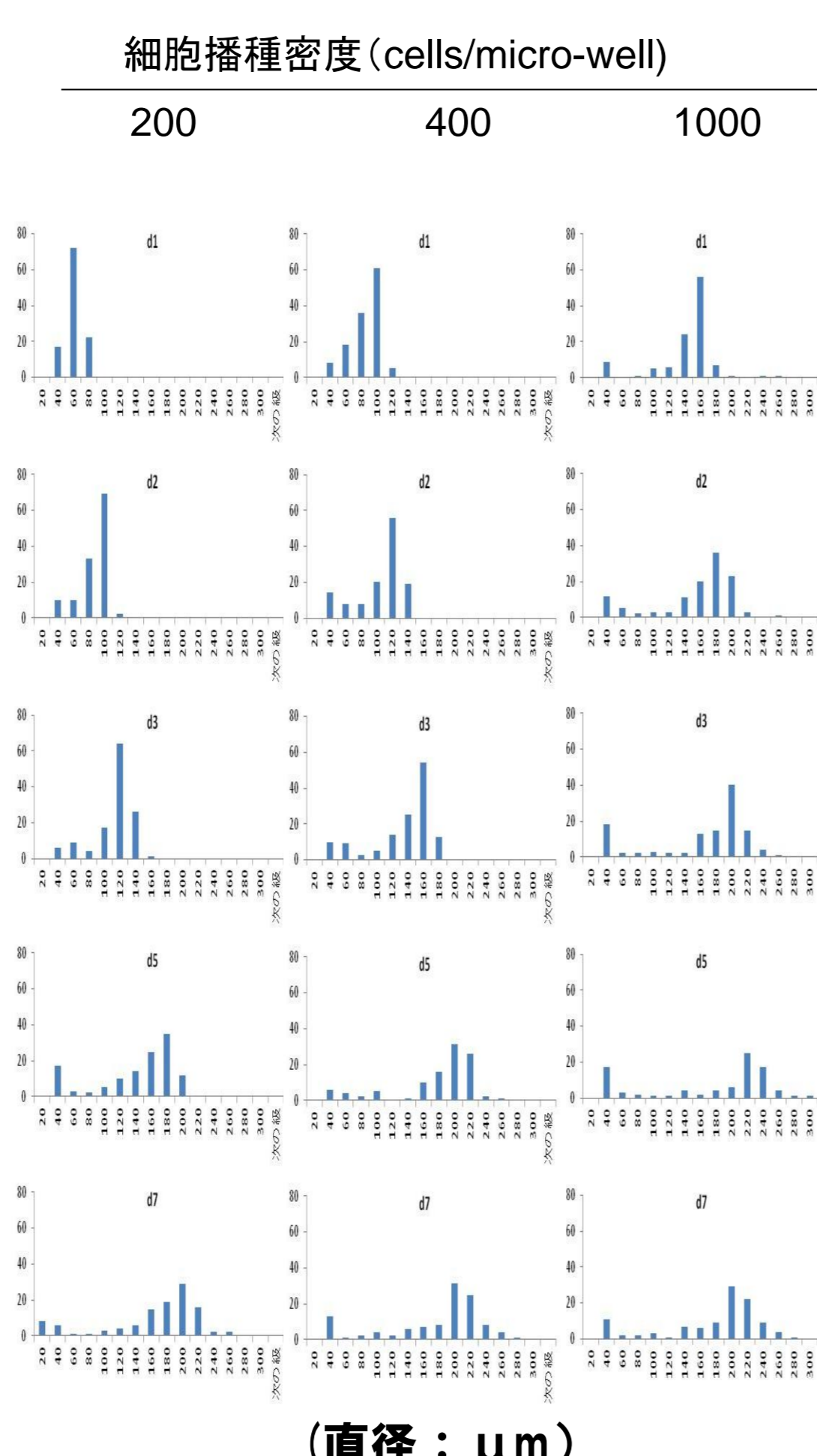
図5. ROCK 阻害剤Y-27632の添加濃度および添加タイミングの最適化による胚様体(EB)形成効率の向上
ヒトiPS細胞のシングルセル化のための細胞分散の際にROCK阻害剤Y-27632を加え、さらにその添加濃度を最適化した結果、細胞死が抑制され、分散化した細胞の残存の少ない効率的な胚様体(EB)形成が可能であることを確認した。

胚様体(EB)の増殖効率の確認

(A) 胚様体の増殖の様子



(B) 胚様体の直径分布



(C) 未分化状態のFACS解析

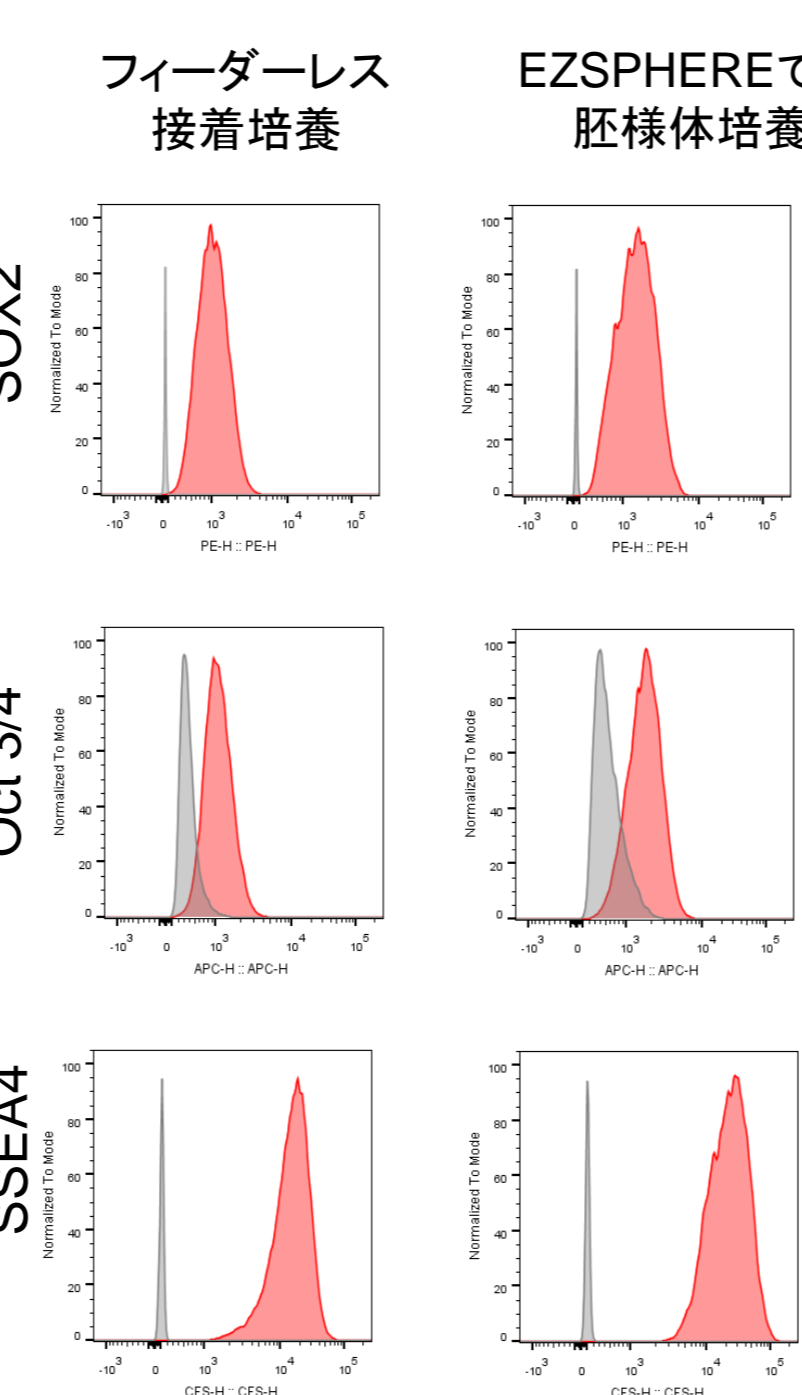
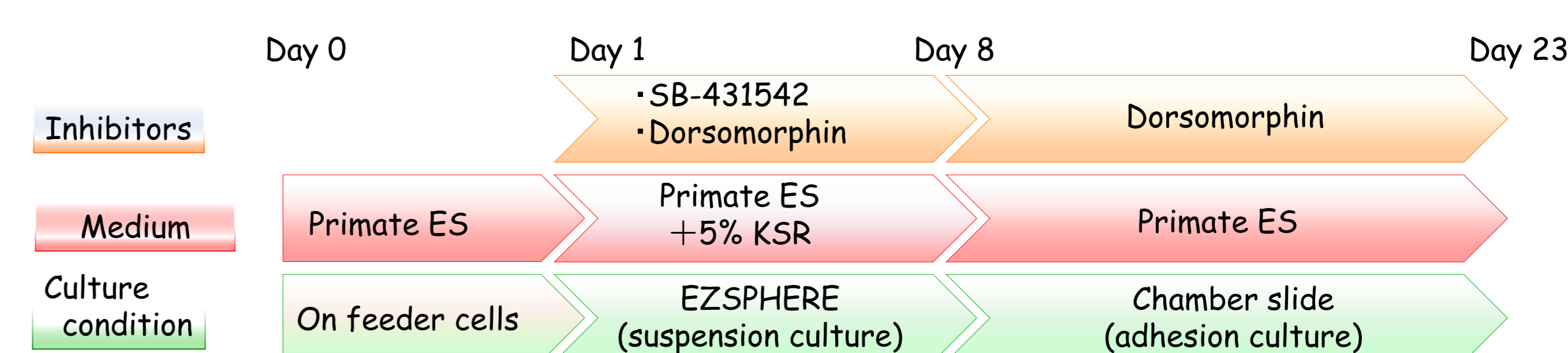


図6. EZSPHEREを用いたヒトiPS胚様体形成、その未分化維持状態での増殖検討の結果
シングルセルに分散したヒトiPS細胞の播種密度が200, 400, 1000 cells/微小ウェルになるようにしてEZSPHEREに播種して胚様体を形成させた。培養は、未分化維持・増殖用の培地mTeSR1中で、毎日培地の半分量を交換しながら経過を観察した(day1~7)。その結果、胚様体はサイズ均一性を保ったまま、直径200-230 μm程度まで効率良く増殖した(A)(B)。播種後4日目の胚様体の未分化マーカー(Sox2, Oct 3/4, SSEA4)発現率をFACSで解析し、ラミニン521上でフィーダーレス培養したヒトiPS細胞の場合と比較した(C)。胚様体培養とフィーダーレス培養したヒトiPS細胞の未分化率は同様に高い値を示した。

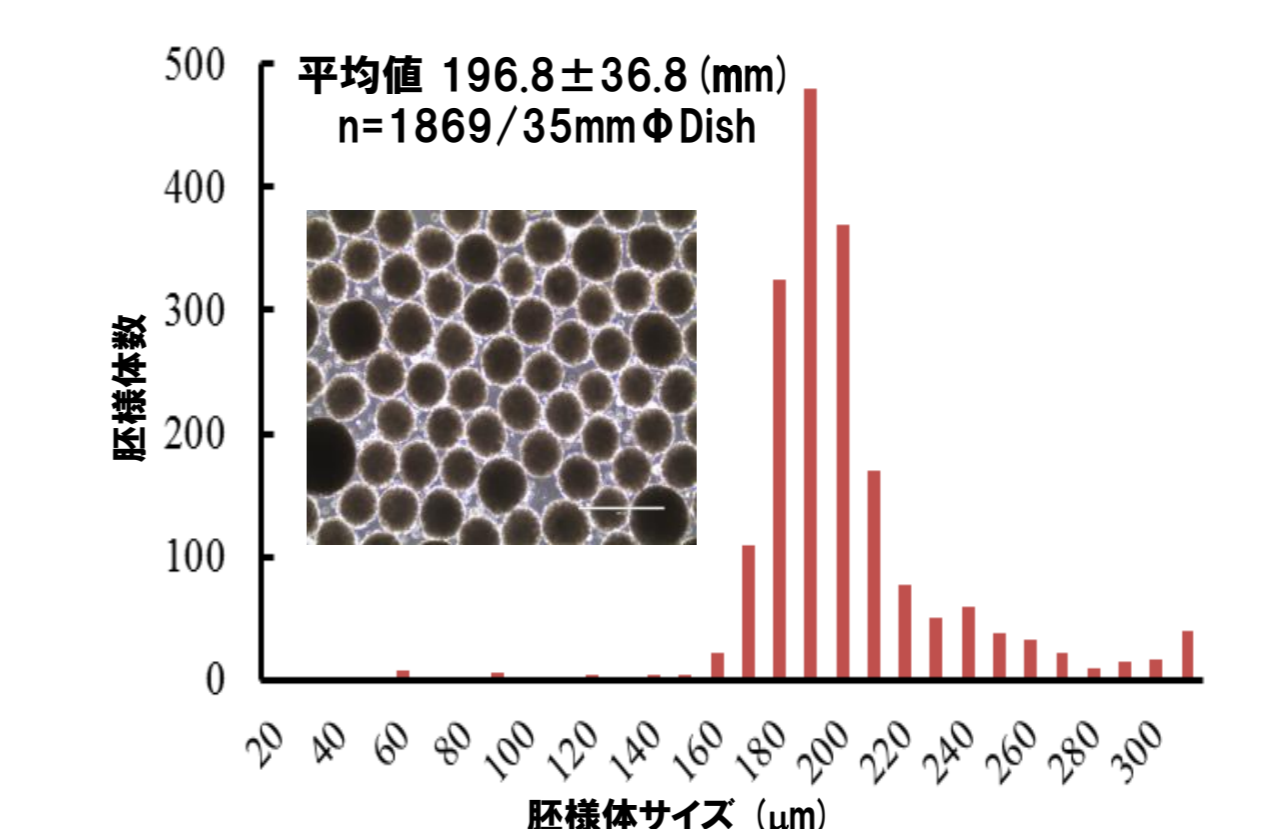
再生医療用途を念頭に入れた場合は、マウスフィーダー細胞を使用しないフィーダーレス培養したヒトiPS細胞を使用することが安全と望まれている。ただし、一般的にはフィーダーレス培養したヒトiPS細胞は胚様体の形成効率が高く、播種した細胞の一部はどうしてもシングルセル状態のまま残ってしまうという問題が確認されている。EZSPHEREでの胚様体培養法では、day-1ではシングルセルが存在するものの、day-2, 3以降は胚様体のサイズが成長してシングルセルがほとんど目立たなくなる。そのため、EZSPHEREはフィーダーレス培養したヒトiPS細胞の胚様体増殖にも適している可能性がある。

胚様体の分化効率の確認

(A) 神経分化工程



(B) EZSPHEREから回収した胚様体 (Day-8)



(C) 免疫染色によるβIII-tubulinの発現確認

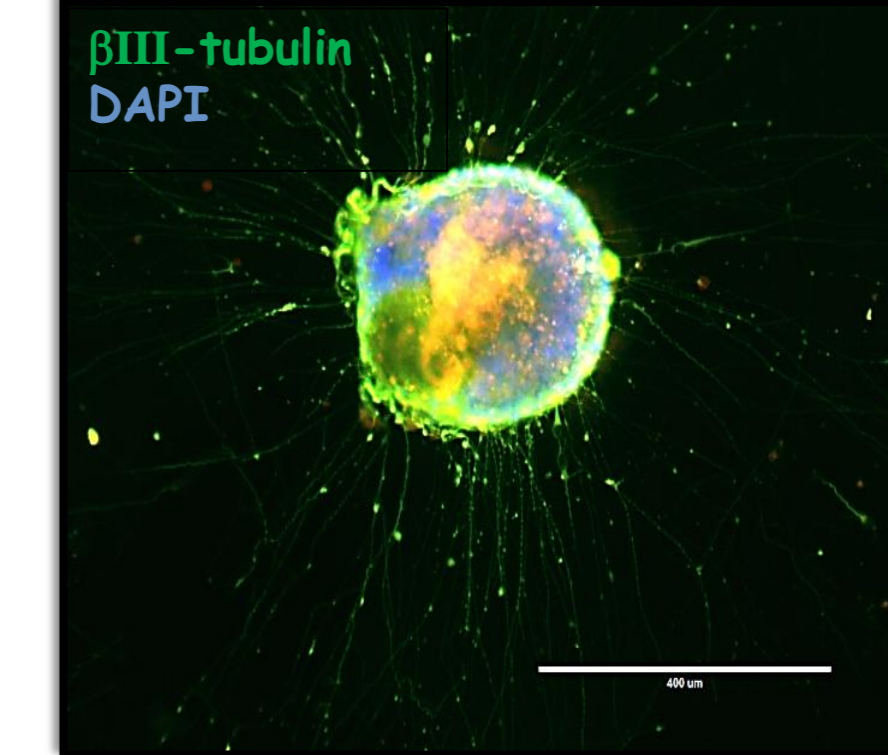


図7. EZSPHERE上でヒトiPS細胞から形成させた胚様体の神経分化能の確認
EZSPHEREを用いてiPS細胞から作製した胚様体の神経分化方法を示す(A)。培養8日後、35 mmφ DishタイプのEZSPHEREから胚様体を回収し、胚様体数及び大きさを調べた。平均直径196 μmのサイズ均一な胚様体を約1900個作製できた(B)。得られた胚様体をマトリゲルコートしたチャンバースライドに移して培養を続け、培養23日後に胚様体から突起が伸展しているのを確認した。ニューロンのマーカーβIII-tubulin抗体で染色されることから、神経突起であることが示された(C)。

まとめ

- EZSPHEREの課題を抽出し、その改善によって、胚様体の形成効率および細胞の生存率向上に成功した。さらに、培養条件の検討によってEZSPHERE上で胚様体を効率良く増殖させることができた。
- 今回の研究によって、EZSPHEREを用いたヒトiPS細胞からサイズ均一な胚様体(EB)を短時間に簡便に高効率に形成させる技術を確認し、今後の幅広い実用性の可能性を確認した。
- 神経分化試験によって、EZSPHEREで形成させた胚様体が高い分化能を維持していることを確認した。