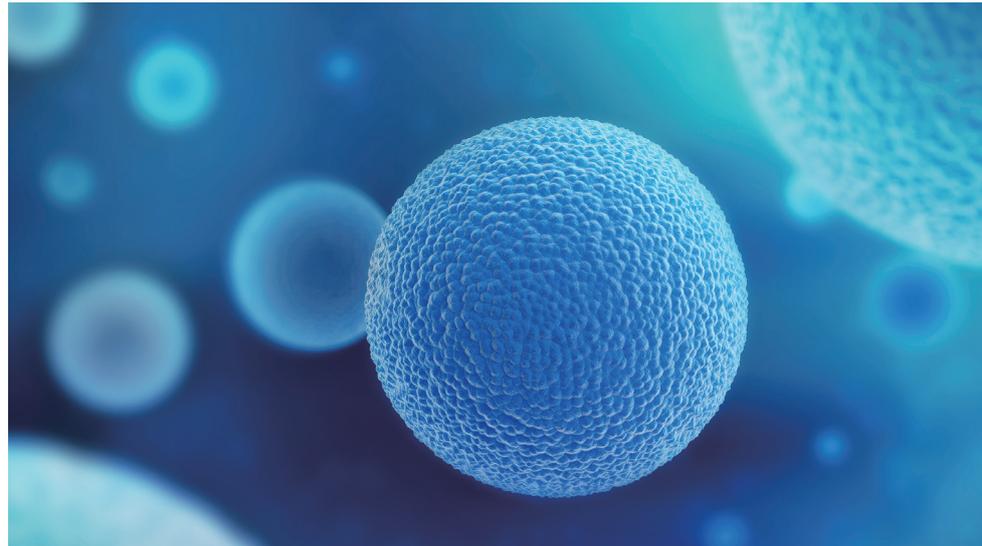


フローサイトメーター ユーザーレポート Vol.1



大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻
生物工学コース 生物プロセスシステム工学研究室

教授 紀ノ岡 正博
特任助教 福守 一浩

使用機種：CyFlow Cube 6 2台

主な用途：iPS細胞の未分化マーカーの解析
iPS細胞からの細胞の分化状態の解析

1. はじめに

フローサイトメーターは免疫学・血液学のみならず、幹細胞生物学研究および再生医療分野における細胞解析や細胞分取についても、なくてはならないツールとなってきている。

再生医療分野では臨床応用に向け、現在、移植する細胞の増殖・分化誘導工程の条件検討や未分化細胞の除去法についての研究が精力的に進められている。臨床においては、最終的に移植する細胞の「品質管理」として、フローサイトメーターを細胞表現型の確認、純度試験を始め、サイトカイン等の生理活性物質の分泌能の試験、細胞数や細胞生存率の測定に応用することが原理的に可能である。また、ある種の細胞の分離に関してはセルソーターを用いることが必須であり、無菌的な分離を中心とした安全性の確保が切実に望まれている。

このように再生医療の実現に高い有効性が期待されるフローサイトメーターを当研究室でも導入し、日々のさまざまな研究場面において活用している。今回は、そのうちiPS細胞に関連した代表的なアプリケーションについて、プロトコールおよびデータ例を紹介する。

2. 研究内容について

大阪大学大学院工学研究科生物プロセスシステム工学研究室では、生物化学工学的観点からヒト組織を利用した製造プロセスの構築に関する実践的研究を行っている。大別すると、研究内容は次のとおりである。

(1) 多分化能を有するヒト幹細胞の分化制御を
目指した培養面構築

(2) 臨床応用を目指したヒト培養組織の製造プロセス
に関する研究

(3) 培養組織製造プロセスの自動化

このうち、現在、フローサイトメーターは(2)のiPS細胞から分化させたヒト心筋細胞シートの製造プロセスの構築における心筋細胞の分化確認や、(3)のヒトiPS細胞大量培養プロセスでの細胞の未分化マーカーの確認に使用している。

当研究室では常に再生医療の臨床応用場面を意識した研究を展開しているため、培養リアクター内の細胞の品質評価を迅速に実施できるよう、製造プロセス検討用施設にシスメックスのアナライザーを1台導入し、また基礎研究での解析結果を共有できるよう、研究室にも同機種をもう1台設置している。

3. iPS細胞の未分化マーカーの確認

大阪大学に設置されている集中研究所では、細胞製造システムの研究開発のため、ヒトiPS細胞をいつでも使用できるように維持培養している。安定した製造工程の開発には、出発原料であるiPS細胞の活性維持と均質性の担保が必須であるため、複数の管理項目が設定されている。フローサイトメーターによる未分化マーカーの確認もそのひとつである。



【試薬・装置】

- Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD: 554714)
- Alexa Fluor® 488 Mouse anti-Oct3/4 (BD Pharmingen: 560253)
- Alexa Fluor® 488 Mouse IgG1 κ Isotype Control (BD Pharmingen: 557702)
- Human/Mouse SSEA-4 Fluorescein (R&D: FAB1435F)
- Mouse IgG3 Fluorescein (R&D: IC007F)
- FITC Mouse anti-Human TRA-1-60 (BD Pharmingen: 560380)
- FITC Mouse IgM K Isotype Control (BD Pharmingen: 555583)
- PE Anti-CD15, Human/Mouse (R&D: FAB2155P)
- Anti Normal IgM Control, Mouse (-) (R&D: IC015P)
- フローサイトメーター: CyFlow Cube 6 (Sysmex)

【方法】

ヒトiPS細胞 (1383D2株)をPBS(-)で洗浄し、未分化マーカー抗体 (Oct3/4, SSEA-4, TRA-1)および脱未分化マーカー抗体 (SSEA-1、試薬・装置の項ではCD15と記載)を添加し、暗所、室温に置いて30分間染色を行った。

ただし、Oct3/4のみはFixation/Permeabilization Solutionで前処理(4°Cで15分間)を行った。

Negative controlとして各マーカーのIsotype抗体で同様の前処理、および染色を行い、CyFlow Cube 6により測定した。

【結果】

未分化マーカーであるOct3/4, SSEA-4, TRA-1と、脱未分化マーカーであるSSEA-1の陽性率が設定された基準値以内 (例:未分化マーカー陽性率90%以上、脱未分化マーカー陽性率5%未満) であり、維持培養しているiPS細胞が未分化状態を維持していることが確認された。

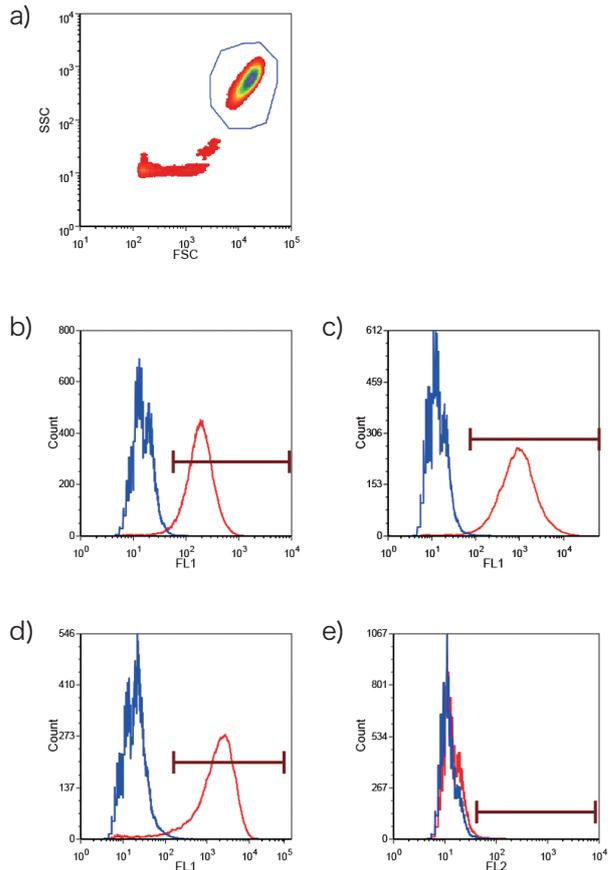
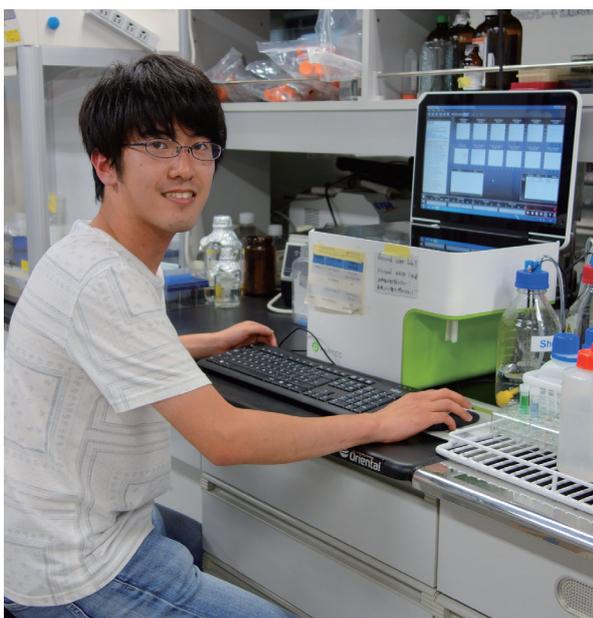


図1. 培養iPS細胞のFCM解析

- a) 培養iPS細胞を各抗体で染色し、FSC-SSCのプロットで展開。未分化iPS細胞集団にゲートを設定した。
- b) 未分化マーカー-Oct 3/4陽性(赤色)とアイソタイプコントロール(青色)との比較。陽性率は95.9%であった。
- c) 未分化マーカー-SSEA-4陽性(赤色)とアイソタイプコントロール(青色)との比較。陽性率は98.1%であった。
- d) 未分化マーカー-TRA-1陽性(赤色)とアイソタイプコントロール(青色)との比較。陽性率は94.4%であった。
- e) 脱未分化マーカー-SSEA-1陽性(赤色)とアイソタイプコントロール(青色)との比較。陽性率は1.5%であった。

4. iPS細胞からの心筋細胞の誘導 ～心筋細胞マーカーの解析～

工学部の実験室では、研究員と学生が共通の設備を利用して、主に幹細胞（iPS細胞やMSCなど）をターゲットとした基礎研究を展開している。幹細胞は培養環境（培地成分、基質、物理的刺激など）によりその特性が変化し、未分化性や多分化能に大きく影響することが知られている。たとえばiPS細胞を心筋細胞へ分化誘導プロトコルを開発する際も、細胞株や容器サイズの違いにより分化効率が異なる可能性が考えられる。このような評価実験には、フローサイトメーターによる心筋分化マーカーの測定が用いられる。



【試薬・装置】

- ・ Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD: 554714)
- ・ Anti-cardiac troponin T (cTnT; Thermo Scientific: MA5-12960)
- ・ Goat anti-Mouse IgG1 Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor® 647 (Thermo Scientific: A-21240)
- ・ Purified Mouse IgG1, κ Isotype Control (BD Pharmingen: 557273)
- ・ フローサイトメーター: CyFlow Cube 6 (Sysmex)

【方法】

分化誘導後のヒトiPS細胞（1383D2および253G1株。実験条件は非公開）をPBS(-)で洗浄し、Fixation/Permeabilization Solutionで前処理(4°Cで15分間)を行った。次に、心筋分化マーカー(心筋トロポニンT; cTnT)の抗体を添加し、暗所、室温に置いて30分間染色を行った。洗浄後、2次抗体を反応させ、CyFlow Cube 6により測定した。

【結果】

3種類の条件で分化誘導を行ったiPS細胞の心筋分化マーカー陽性率を比較した。陽性率の差により培養条件の選択と最適化を行うことができ、最終的には最適化したプロトコルを開発し、安定に分化誘導を可能にすることができた。

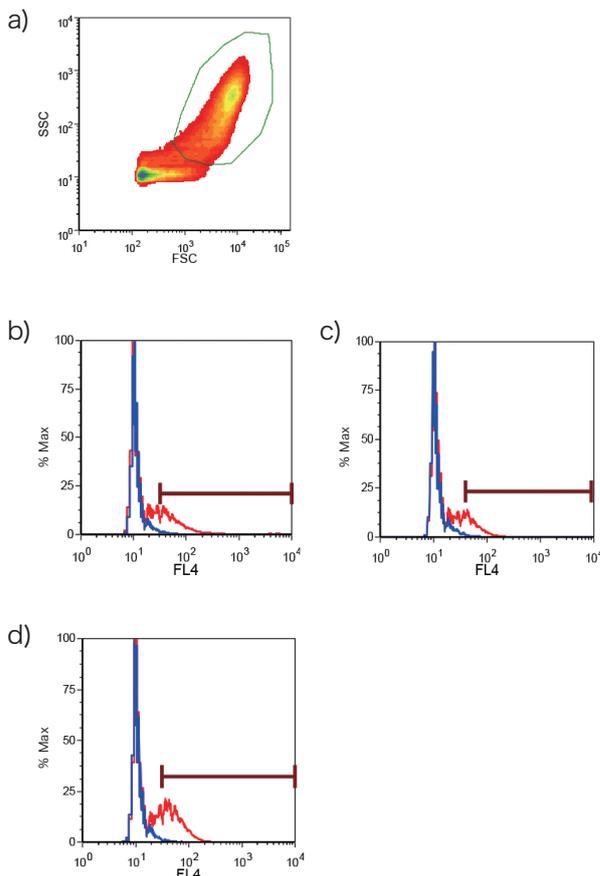
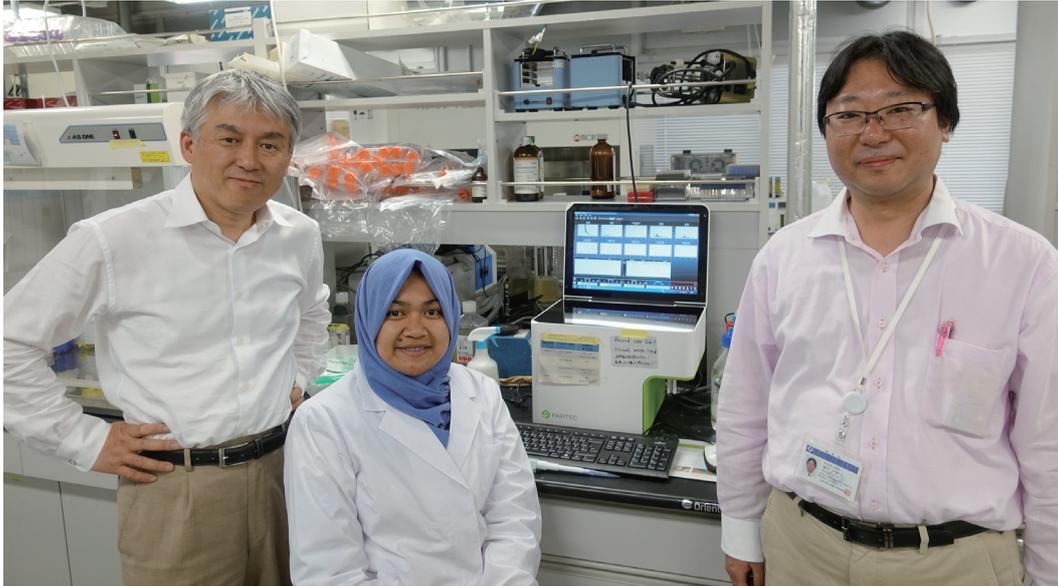


図2. iPS細胞からの分化心筋細胞のFCM解析

- 分化誘導したiPS細胞を心筋分化マーカーであるcTnT抗体で染色し、FSC-SSCのプロットで展開。分化した細胞集団にゲートを設定した。
- 培養条件1における分化マーカーcTnT陽性(赤色)とアイソタイプコントロール(青色)との比較。陽性率は25.9%であった。
- 培養条件2における分化マーカーcTnT陽性(赤色)とアイソタイプコントロール(青色)との比較。陽性率は16.3%であった
- 培養条件3における分化マーカーcTnT陽性(赤色)とアイソタイプコントロール(青色)との比較。陽性率は33.7%であった。

5. シスメックスの装置の導入背景および使用感について

CyFlow Cube 6は、フローサイトメーターとしてはA3サイズと小型で、解析ソフトウェアが本体に付属しているため、設置場所を選ばないことが利点のひとつと考えている。また、2レーザー4色対応の機種としては比較的安価なことから同じ機種を2台購入し、工学部の実験室とプロジェクトベースの開発拠点である集中研究所に1台ずつ設置することができた。研究室として公開する成果の信頼性を保証するためには、まず全ての実験担当者が同じプロトコルを用いて実施することが重要だと考えている。そのためには、評価する道具も同じであることが望ましい。Cube 6を2台設置することで、工学部の基礎研究と集中研究所の製造システム開発が、解析結果を共有しながら連携できるようになった。



紀ノ岡 教授

福守 特任助教

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。

お問い合わせ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I営業部

リレーションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-992-6272 Fax 078-991-2317

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557