

背景・目的

創薬研究や再生医療分野におけるiPS細胞とその分化細胞の活用が進む中で、iPS細胞の未分化性維持や分化誘導効率といった細胞品質評価の重要性は大きくなっている。しかしながら、現在主流の評価系は細胞に対する侵襲性が高く、測定に際し手間と時間を要する。

培養液分析装置BioProfile Flex2及びBP400(ノバ・バイオメディカル社)は回収した培養上清の複数の成分を短時間で分析可能であり、細胞に対し非侵襲で簡便な品質管理への応用が期待された。そこで今回、iPS細胞の維持培養や分化誘導時の品質管理へのBioProfile Flex2及びBP400の応用を検討した。

現行の細胞品質の評価系

リアルタイムPCR

免疫染色

フローサイトメトリー

- 測定やその準備に手間と時間を要する
- 細胞の破壊や細胞への試薬類の添加が必要
- 基本的に評価用サンプルを別途用意することが必要、同一細胞群の品質を経時で評価することは不可能

BioProfile Flex2及びBp400による培養上清分析 (以下はBioProfile Flex2の仕様)

- 培養液を最大で265µlサンプリングするだけの容易で非侵襲的な検査
- 短時間で複数の培地成分の計測が可能
 - 最短2分、最長4分30秒で測定完了
 - 最大16項目の同時分析が可能

Glutamine	Glutamate	Glucose
Lactate	NH ₄ ⁺	Na ⁺
Ca ⁺⁺	pH	pO ₂
Total Cell Density		Viable Cell Density
Viability	Average Cell Diameter	Osmometry

- 同一細胞群対象の経時モニタリングが可能

iPS細胞の維持培養における培養上清成分分析

1. 実験概要

iPS細胞培養の熟練技術者が健常者由来のiPS細胞株AとBのフィーダーフリーの維持培養を8継代行った。播種から1日目、3日目、6日目に回収した培養上清をBioProfile Flex2で成分分析し、計8継代分の測定値の平均を算出し変動をグラフ化した。

2. 実験条件

培養容器：6well plate
 コーティング剤：iMatrix-511
 播種培地：StemFit AK02N + 10 µM Y-27632
 維持培養培地：StemFit AK02N
 細胞播種数：1.0×10⁴ cells/well

3. 結果と考察

iPS細胞株A
 iPS細胞株B



・全項目で安定的に培地成分が測定でき、複数継代を重ねた際にも各成分の挙動変化の再現性が取れた。
 ・異なる株間でも各パラメーターの変動様式は極めて類似しており、他のiPS細胞株でも同様の成分分析が可能であることが示唆された。

iPS細胞由来分化細胞の分化誘導率と成分値変動との関連性の評価

1. 実験概要

健常者由来及び神経疾患患者由来のiPS細胞からドーパミン産生神経前駆細胞への分化誘導を複数回行い、それぞれの分化誘導効率をフローサイトメトリーで解析した。分化誘導中の任意のタイミング(計6回)で回収した培養上清をBioProfile BP400で成分分析し、分化誘導効率の異なる実験毎での各パラメーターの変動の比較を行った。

2. 実験条件

培養容器：6well plate
 コーティング剤：iMatrix-511
 播種培地：Day0 培地
 細胞播種数：4.0×10⁶ cells/well
 培地交換日：Day 1, 3, 5, 7, 9, 11

Day0：
 8GMK + 0.1 µM LDN193189
 0.5 µM A-83-01
 5 µM Y-27632

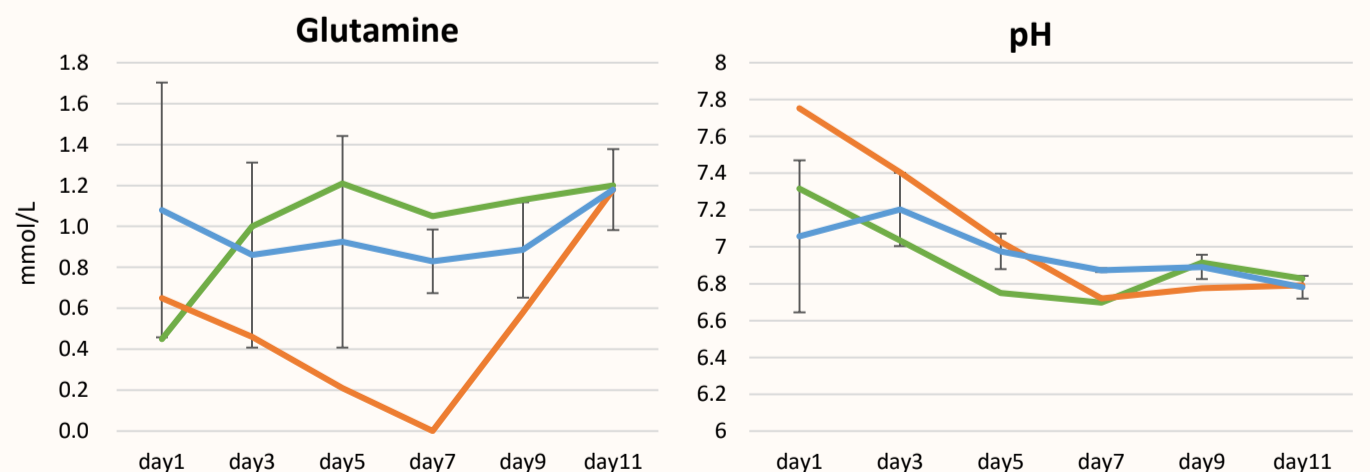
Day1~2：
 8GMK + 0.1 µM LDN 193189
 0.5 µM A-83-01
 2 µM Purmorphamin
 100 ng/mL FGF8

Day3~6：
 8GMK + 0.1 µM LDN 193189
 0.5 µM A-83-01
 2 µM Purmorphamin
 100 ng/mL FGF8
 3 µM CHIR 99021

Day7~12：
 8GMK + 0.1 µM LDN 193189
 3 µM CHIR 99021

3. 結果と考察

健常者株平均
(誘導効率60%)
 疾患株 試行1回目
(誘導効率3.9%)
 疾患株 試行2回目
(誘導効率71.7%)



・分化誘導効率の低かった試行1回目の疾患株からの分化誘導では、健常者株と比較しGlutamine濃度はday7をピークに著しく低い値を、pHはday1で著しく高い値を示しパラメーターの挙動に差がみられた。
 ・分化誘導効率の高かった試行2回目の疾患株からの分化誘導ではGlutamine及びpHは健常者株と同じ挙動を示した。
 ・培地成分を経時的に測定し過去のデータと比較することで、分化誘導の成功率を予測できる可能性が示唆された。

まとめ

・培地成分の分析データを蓄積しiPS細胞の未分化性や分化効率との相関を解析することで、細胞品質や異常の有無を評価できる可能性が示唆された。
 ・BioProfile Flex2及びBP400をルーチンの維持培養やCPCの培養系に適用することで、評価システムの簡素化及びコストダウンといった効果が期待される。