

2.5 次元培養用パターンニングプレートの開発

今	泉		裕 ^{*1}
久	野	豪	士 ^{*1}
門	田	純	平 ^{*1}
牧	田	健	一 ^{*1}

Development of Patterning Plates for 2.5-dimensional Culture.

Yu IMAIZUMI
Goshi KUNO
Junpei KADOTA
Kenichi MAKITA

We focused on a "2.5-dimensional culture," which combines the advantages of an adhesive culture (2-dimensional) and a floating culture (3-dimensional), and developed a patterning plate for a 2.5-dimensional culture. We found a large number of cell masses were easily formed with good size uniformity on this patterning plate. We cultured iPS cells on this plate in an adherent state, with $279 \pm 23 \mu\text{m}$ diameter and approximately 24,000 pieces on a plate. With keeping an adherent state, we succeeded to differentiate the cell masses into nerve cells, cardiomyocytes according to the each protocols.

We expect this newly-developed plate will have great value in practical use for regenerative medicine and drug screening, due to the uniformity in the size of masses, the ease of handling, and the stability of efficiency in the differentiation induction.

1. はじめに

我々は、再生医療や創薬スクリーニング等へのiPS細胞応用を後押しするために、従来培養法における課題の解決を目指し、当社独自のパターンニングプレートを開発した。

2. 背景

iPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞は、様々な組織や臓器の細胞に分化する能力を持つことから、再生医療における移植細胞の原料や創薬スクリーニング

のモデル組織としての応用が期待されている。これまでに、再生医療では2018年にiPS細胞由来ドパミン産生神経細胞を移植する医師主導治験が開始された¹⁾。また、創薬スクリーニングでは2019年に筋萎縮性側索硬化症(ALS)を対象にiPS細胞由来神経細胞で有効性を示す化合物を見出し、人への治験が開始される²⁾等、iPS細胞の応用が急速に進展している。

今後、これらのiPS細胞を用いた再生医療、創薬スクリーニングを実用化するためには、iPS細胞由来分化細胞を高品質かつ大量に作製する技術が重要になると考える。また、現状では、再生医療で用いられるiPS細胞由来分化細胞は細胞培養加工施設(CPC)内で人の手作業によって作製しているが、作業者の手技による細胞品質のばらつきや、人件費等の費用の面が

*1 ファンクショナルポリマー研究所 環境バイオグループ



縦×横 [mm] 約 85×約 130
6well プレート

図1 開発品の外観

普及のハードルになると考える。これらの課題解決を目指した自動培養装置の開発も進歩しており、今後は自動培養装置への組み込みを考慮した iPS 細胞由来分化細胞の作製方法の開発も重要になる³⁾。

iPS 細胞を分化誘導する方法の1つとして、iPS 細胞を凝集させて胚様体 (embryoid body ; EB) という疑似的な胚を形成させた後、低分子化合物やタンパク質を添加した培地内で培養し、神経細胞や心筋細胞を作製する方法が報告されている^{4), 5)}。

従来の胚様体形成方法を図2に示す。培養容器として容器底面がU字の形状になったU字ボトムプレートを用いた場合、U字型のウェルの中で1つ1つ細胞が凝集するため、1つのウェルに1つの胚様体を形成する。比較的球形でサイズ均一性が高い胚様体が形成されるものの、1ウェルあたり1つの胚様体の形成であるため、胚様体の数に制限があり、大量形成には不向きである。また、胚様体の形成数を多くするため、細胞低接着シャーレやバイオリアクターで培養する方法もあるが、1度の細胞播種で、多くの胚様体を形成できるものの、細胞の自己凝集がランダムに生じるため胚様体の大きさや形状の均一性に乏しい。さらに、

これらの方法では胚様体が浮遊しているため、培地交換や培養容器を運搬する際に慎重な取り扱いが必要であり、操作が煩雑なことも課題である。

そこで我々は、培養プレートの底面に細胞接着領域と細胞非接着領域を設けることによって、簡便な操作で均一なサイズの胚様体を大量に形成可能な当社独自のパターンニングプレート (以後、開発品) を開発した。この開発品で形成する胚様体は接着した状態で立体的な構造になり、本開発品での培養法を平面培養の2次元培養と浮遊培養の3次元培養の特徴を併せ持つことから2.5次元培養と呼ぶ。本稿では、細胞接着領域と細胞非接着領域を有するパターンニングプレートの設計、iPS 細胞を対象とした2.5次元培養、および2.5次元培養による分化誘導評価について報告する。

なお本開発品は、再生医療や創薬スクリーニングの現場で iPS 細胞を産業応用する上での課題に対して、簡便な操作で iPS 細胞由来分化細胞を高品質かつ大量に作製できる技術を提供することで、iPS 細胞の産業応用への貢献を目指す。

3. 実験方法

[1] 開発品の設計

開発品の細胞接着領域を観察するため、iMatrix-511 (ニッピ製、892011) に対して、タンパク質標識キット (同仁化学研究所製、LK14) を使用して、蛍光色素でラベリングした iMatrix-511 を作製した。蛍光ラベリングした iMatrix-511 を PBS (-) (富士フィルム和光純薬製、166-23555) で希釈し、 $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるように開発品のウェル内に添加した。37°C で1時間静置した後、蛍光顕微鏡 (キーエンス製、BZ-X810) で撮像し、細胞接着領域への iMatrix-511 の吸着を観察した。

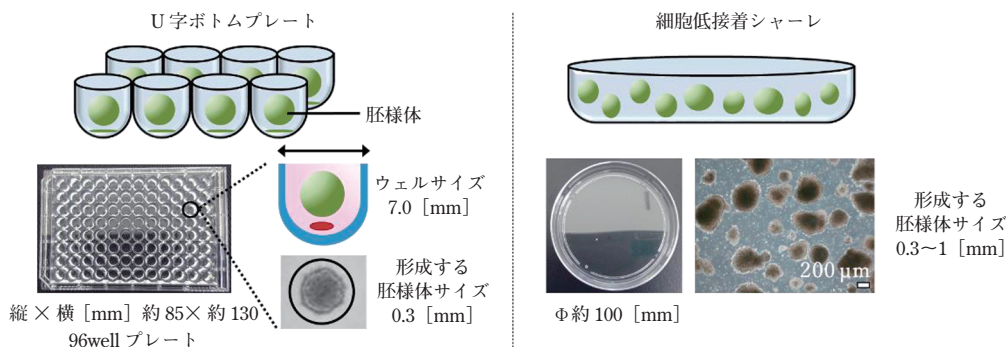


図2 従来の胚様体形成方法

[2] iPS細胞培養評価

(1) 立体構造の形成

開発品に iPS 細胞 (201B7 株) を 1.35×10^5 cells 播種し、 37°C 、 CO_2 濃度 5% の条件下で 7 日間培養した。培養液は StemFit®AK02N (味の素ヘルシーサプライ製、RCAK02N)、足場材は iMatrix-511 を $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で培養液に添加して使用した。顕微鏡観察には倒立顕微鏡 (OLYMPUS 製、IX73) を使用し、蛍光画像は蛍光顕微鏡 (キーエンス 製、BZ-X810) を使用して撮像した。

(2) 従来法との比較

従来法として、U 字ボトムプレート (住友ベークライト製、MS-9096U) に iPS 細胞を 1 ウェルあたり 200 cells 播種した。開発品は前述と同様の条件で細胞を播種し、開発品および U 字ボトムプレートでそれぞれ 5 日間培養した胚様体を免疫染色し、蛍光画像解析により形成する胚様体の数およびサイズを評価した。iPS 細胞の未分化マーカータンパク質である SSEA4 の免疫染色には、AlexaFluor®488 anti-human SSEA4 (Biolegend 製、330412) を使用した。蛍光画像は蛍光顕微鏡 (キーエンス 製、BZ-X810) を使用して撮像した。また、胚様体の数およびサイズは画像解析ソフト Image-Pro® (MEDIA CYBERNETICS 製、100-002) を使用して評価した。

[3] 未分化性維持評価

iPS 細胞の未分化性を維持する一般的な培養法である 2 次元培養をするため、ポリスチレン製の汎用シャーレ (Corning 製、430165) に iPS 細胞を 3600 cells 播種した。開発品は前述と同様の条件で細胞を播種し、開発品および汎用シャーレでそれぞれ 7 日間培養した。その後、それぞれ培養した細胞を TrypLE™ Select Enzyme ($\times 1$), no phenol red (ThermoFisher 製、12563011) を使用したトリプシン処理によってシングルセル状態にし、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (富士フィルム和光純薬製、161-20141) で細胞を固定した。iPS 細胞の未分化性は、SSEA4 タンパク質が発現する細胞割合をフローサイトメーター (日本ベクトンデッキンソン製、Accuri C6 plus) にて測定した。SSEA4 タンパク質の免疫染色には AlexaFluor®488 anti-human SSEA4 (Biolegend 製、330412) を使用した。

[4] 分化誘導

(1) 運動神経細胞分化誘導

iPS 細胞を開発品に 1.35×10^5 cells 播種し、培養

液に StemFit®AK02N、足場材に iMatrix511 を $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で添加して 1 日間未分化培養した後、分化誘導培養を開始した。分化誘導培地成分は文献 6 を参考にした。培養開始後 5 日目に形成した胚様体をトリプシン処理によってシングルセル状態にし、2.5 次元培養では開発品に 1.35×10^5 cells 播種した。一方で、従来法の 3 次元培養では細胞低接着シャーレ (住友ベークライト製、MS-90350) に 2×10^5 cells 播種し、それぞれ 19 日目まで培養した。その後、胚様体を再度シングルセル状にして、ポリ L-オルニチン溶液 (富士フィルム和光純薬製、163-27421) および Matrigel® (Corning 製、354277) をコートした汎用シャーレ (Corning 製、430165) に 1.9×10^6 cells 播種し、33 日目まで 2 次元培養した後、免疫染色および RT-qPCR を行った。免疫染色については、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (富士フィルム和光純薬製、161-20141) で細胞を固定し、運動神経細胞マーカーである HB9 および β III-tubulin、細胞核を DAPI で免疫染色した。HB9、 β III-tubulin の免疫染色には一次抗体に Polyclonal Anti-MNX1 Antibody (ATLAS ANTIBODIES 製、HPA071717)、Monoclonal Anti-beta-Tubulin III (Sigma-Aldrich 製、T8660) を使用し、二次抗体に、Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488 (ThermoFisher 製、A11034)、Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 555 (ThermoFisher 製、A21422) を使用した。また、DAPI の免疫染色には ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Cell Signaling TECHNOLOGY 製、8961S) を使用した。RT-qPCR については、運動神経細胞マーカーである ISL1 遺伝子を評価した。プライマーは Integrated DNA Technologies 製を、RT-qPCR 装置は QuantStudio3 (ThermoFisher 製) をそれぞれ使用した。

(2) 心筋細胞分化誘導

iPS 細胞を開発品に 1.35×10^5 cells 播種し、培養液は StemFit®AK02N、足場材は iMatrix511 を $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で培養液に添加して 2 日間未分化培養した。その後、培養液に STEMdiff Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit (STEMCELL Technologies 製、ST-05010) を用いてキット推奨の方法に従い、16 日目まで心筋細胞への分化誘導を行った。その後、分化誘導した心筋細胞の形態を観察するために胚様体をトリプシン処理によってシングルセル状態にして、ポリスチレン製の汎用プレート (Corning 製、3526) に播種した。

7日間の2次元培養終了後、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液（富士フィルム和光純薬製、161-20141）で細胞を固定し、心筋細胞マーカである心筋トロポニン T (cTnT) を免疫染色した。cTnTの免疫染色には Cardiac Troponin T Monoclonal Antibody (13-11) (ThermoFisher 製、MA5-12960) および Goat anti - Mouse IgG (H + L) Cross - Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™555 (ThermoFisher 製、A21422) を使用した。

4. 結果と考察

[1] 開発品の設計

iPS 細胞はランダムな増殖や自己凝集をするため、均一な胚様体を形成するには、胚様体の大きさや形状を制御することが重要であると考えた。また、前述の U 字ボトムプレートでの培養方法は 1 つのウェル毎に細胞を播種する操作や培地交換時に胚様体を吸引しないための慎重な操作が必要である。これらの煩雑な操作は、細胞塊が浮遊していることに原因があると考えた。以上のことから、開発品のコンセプトとして、①胚様体形状を制御する仕組みを取り入れること、②少ない培養操作で大量の胚様体を形成可能とすること、③胚様体を接着状態で形成することを設定し、従来の

胚様体形成方法の課題解決を目指した。

まず初めに、図 3 に示すように培養容器上の細胞が接着する領域を制限し、接着した細胞の増殖を通常の水平方向から垂直方向に向けることによって接着した状態で立体的な胚様体の形成ができないかと仮説を立てた。

上記コンセプトを満たす培養容器を実現するため、図 4 に示すセルカルチャー処理を施した細胞接着領域と細胞非接着ポリマーが被覆された細胞非接着領域を設けたパターンニングプレートを開発した。

細胞接着領域および細胞非接着領域が形成されていることを確認するため、蛍光ラベルで標識した iMatrix-511 を用い、タンパク質吸着試験を実施した。図 5 に示す蛍光画像から、細胞接着領域にのみ蛍光が観察され、細胞非接着領域には吸着が見られないことから、設計通りに細胞接着領域および細胞非接着領域の形成ができていないことを確認した。

[2] iPS 細胞培養評価

(1) 立体構造の形成

開発品を用いて、iPS 細胞が接着した状態で立体的な構造を形成するか調べた。図 6 に結果を示す。iPS 細胞の培養は、細胞接着領域にのみ細胞が接着し、培養 3 日後には細胞が増殖して細胞接着領域を埋め尽

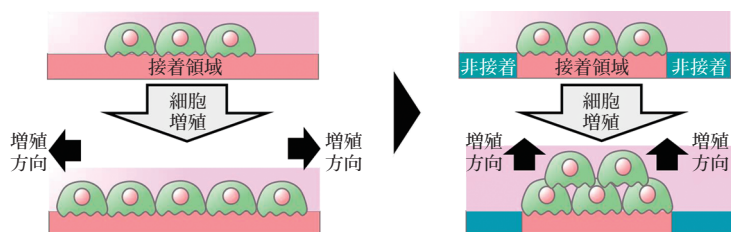


図 3 開発品のコンセプトイメージ

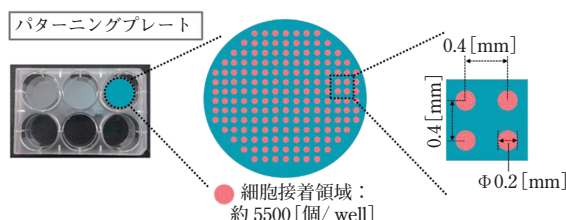


図 4 パターンニングプレートの設計イメージ

赤：iMatrix-511

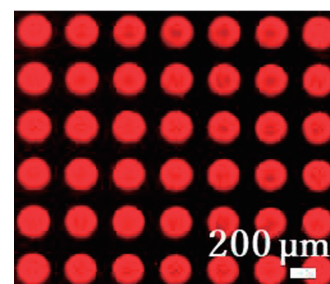


図 5 タンパク質吸着試験結果

くす状態が観察された。培養7日目の胚様体の厚みを評価したところ3つの胚様体平均で73 μmであり、通常のiPS細胞の2次元培養ではこのような厚みをもった胚様体は形成されないことから、設計通りに接着状態で立体構造が形成されることが判明した。

(2) 従来法との比較

開発品で形成した胚様体の形成数およびサイズ（胚様体の直径）をU字ボトムプレートと比較した。胚様体のサイズを画像解析ソフトで評価した結果を図7、表1に示す。開発品では1つのウェルあたり、胚様体を4,210個形成できており、胚様体サイズは279 ± 23 μmであった。一方、U字ボトムプレートでは

1プレートあたり96個の胚様体を形成し、サイズは279 ± 56 μmであったため、開発品の方が均一な胚様体を形成可能であることが判明した。

また、胚様体が接着していることから2次元培養と同様に接着面から剥がれることなく、容易に培地交換を行うことができた。

以上より、開発品では、簡便な操作でサイズ均一性が高い胚様体を大量に形成できることがわかった。

[3] 未分化性維持評価

iPS細胞は、一般的に未分化維持培地を使用して2次元培養することで、未分化性を維持しながら培養する。開発品で形成した胚様体が2次元培養と同様

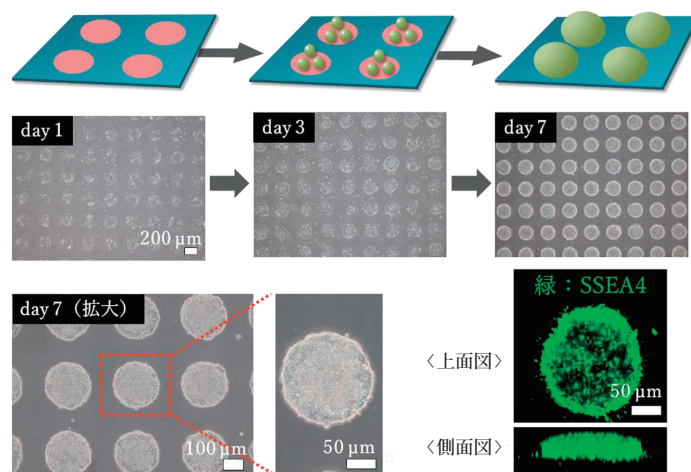


図6 開発品で形成した胚様体の様子

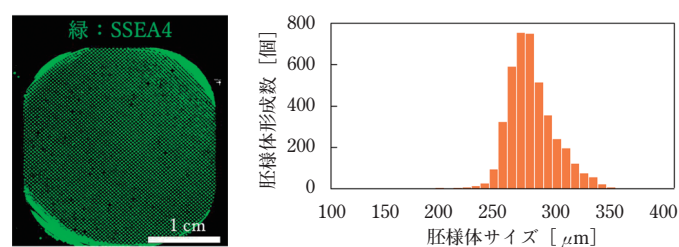


図7 開発品で形成した胚様体の様子およびサイズ評価結果

表1 従来の胚様体形成方法との培養結果比較

	2.5次元培養	3次元培養
	開発品 6wellプレート	U字ボトムプレート 96wellプレート
胚様体サイズ [μm]	279±23	279±56
形成する胚様体数 [個/プレート]	約24,000	96
培地交換	2次元培養と同様に簡便 全量交換	操作が煩雑 半量ずつ交換

表2 開発品の未分化性維持評価結果

SSEA4 を発現する細胞割合	
開発品	汎用シャーレ
2.5次元培養	2次元培養
99%	99%

に未分化性を維持できるか調べた。開発品および汎用シャーレでiPS細胞を7日間培養した後、SSEA4タンパク質が発現する細胞割合を比較した。表2に結果を示す。開発品において、SSEA4を発現する細胞割合は99%であり、一般的な2次元培養で培養した結果と同等であることが判明した。

以上より、開発品を用いたiPS細胞の2.5次元培養においても未分化性を維持したまま培養できることがわかった。

[4] 分化誘導

iPS細胞は外胚葉、中胚葉、内胚葉に分化する能力を持つ。再生医療や創薬スクリーニングでの応用が期待される外胚葉の運動神経細胞および中胚葉の心筋細胞への分化誘導が開発品を用いてできるかを調べた。

(1) 運動神経細胞分化誘導

従来法であるU字ボトムプレートで胚様体を形成させた3次元培養(3D)と比較して2.5次元培養(2.5D)による運動神経細胞への分化誘導を免疫染色およびRT-qPCRにて評価した。

分化誘導過程のスキームを図8、評価結果を図9に示す。免疫染色から運動神経細胞特異的なマーカーであるHB9および神経マーカーの β III-tubulin陽性を確認した。また、RT-qPCR結果から運動神経細胞マーカーのISL1遺伝子の発現が確認され、発現量が従来の3次元培養と同等以上であることも判明した。

(2) 心筋細胞分化誘導

分化誘導中の培養過程の様子、および胚様体を分散、再播種した細胞に対する免疫染色結果を図10に示す。培養10日目から胚様体が一定の間隔で拍動する様子を確認できた。また、シングルセルにして再播種した細胞からは心筋マーカーであるcTnTの陽性が確認できたことから、2.5次元培養における心筋細胞への分化誘導を確認した。

以上から2.5次元培養によって胚様体を形成させた

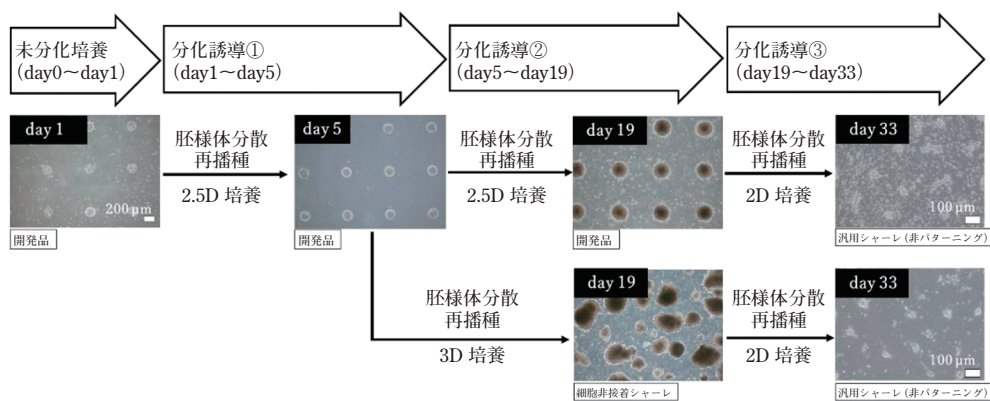


図8 運動神経細胞への分化誘導スキーム

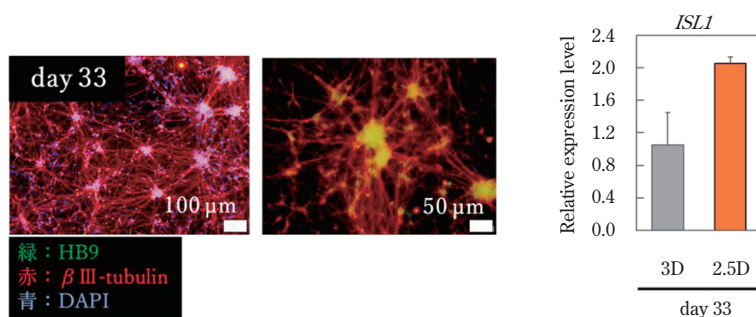


図9 運動神経細胞への分化誘導結果

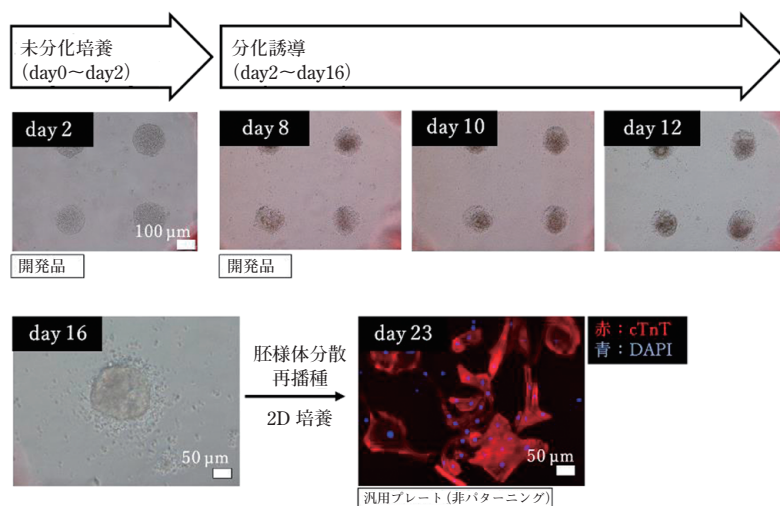


図10 心筋細胞への分化誘導結果

後、運動神経細胞および心筋細胞への分化誘導ができることを確認した。

5. おわりに

我々は、従来の培養方法における3つの課題（①サイズ均一性、②大量形成数、③操作性）の解決を目指し、細胞接着領域と細胞非接着領域を設けた当社独自のパターンニングプレートを開発した。細胞接着領域が厳密に制御された開発品では、iPS細胞の培養において水平方向への増殖が制限され垂直方向に増殖させることによって、プレートに接着したまま半球状の胚様体を均一なサイズで形成することができた。任意に細胞接着領域を設けることができるため、1つのプレートで大量の胚様体を形成することも可能である。また、プレートに胚様体が接着しているために培地交換において3次元培養の時のような慎重な操作が不要となり、操作性の面からも優れている。さらに、本開発品を使用しiPS細胞から形成した胚様体は高い未分化維持率を有すること、各種プロトコルに沿って運動神経細胞や心筋細胞等に分化誘導可能であることも見出した。

本開発品を使用することによって、サイズ均一性良く、大量に胚様体を形成でき、その胚様体を分化誘導した場合にロット間での分化誘導効率が安定化し、細胞品質の良好な細胞を確保できる。さらに、培地交換やプレート運搬時の操作を簡便かつ安定化することができるため、本開発品が今後、再生医療や創薬スクリーニングの実用化に向けて大いに貢献できると期待している。

引用文献

- 1) D. Doi et al., *Nat. Commun.*, 11, 3369 (2020)
- 2) K. Imamura et al., *Sci Transl Med.*, 9, 391 (2017)
- 3) (株)北隆館、*BIO Clinica*, 34(13)、45-51 (2019)
- 4) K. Watanabe., *Nat Neurosci.*, 8(3) 288-296 (2005)
- 5) (公社)日本薬理学会、*日本薬理学雑誌*, 141、32-36 (2013)
- 6) K. Fujimori., *Stem Cell Rep.*, 9(5) 1675-1691 (2017)

