

VERITAS SCIENCE LETTER

ES/iPS cells Research

Basic Research

Vol. 2
2011.11

ヒト iPS/ES 細胞の分化研究用 Defined、Animal Free 培地を用いた血球、心筋、内胚葉細胞への分化

序文

ヒト胚性幹細胞 (hESCs) とヒト誘導多能性幹細胞 (hiPSCs) を含む多能性幹細胞 (PSCs) は、自己複製と分化する能力の両方の性質を持つという特徴があります。PSCs はあらゆる体細胞系列の細胞に分化する能力を持っています。

ヒト多能性幹細胞の分化誘導には 3 種類の培養方法があります。

- (1) ストローマ細胞またはストローマ細胞の培養液から調製した培地との共培養
- (2) 胚様体 (EBs) の形成
- (3) 細胞外由来のマトリックスを用いた接着性細胞培養

共培養の方法は、標的となる系統由来であるなしにかかわらず支持及び誘導が可能なユニークなストローマ細胞を利用し、PSCs をその上で培養または、ストローマ細胞の培養液から調製した培地を利用してその後の PSC の培養に利用します。

例えば、血球分化は M2-10B4² または OP9³ ストローマ細胞との共培養あるいは HepG2 ストローマ細胞から調製した培地との培養によって誘導されます。この方法は効率的ではありますが、ストローマ細胞から分泌される未知の物質が含まれてしまうため、誘導のメカニズムはほとんどわかっていません。EBs ベースの分化では、接着培養から hPSCs を回収し、非接着培養容器に移動させる必要があります。そこで細胞は球状の EBs を形成し、続いてゼラチンなどに播種する事により様々な系統に分化します。

最後に、新しいプロトコルは EBs 形成を避け、代わりに細胞を細胞外由来タンパク質あるいはマトリックス上に接着させて培養する方法です。この方法は操作が簡単で自動化できる可能性も秘めています。現状では、(2) と (3) の方法は共に特定の物質を加えることで選択した系統への分化誘導を可能にします。これによりこれらは実験の手技として (1) の方法よりも受け入れられています。

特定の系統に分化を誘導する因子の多くは、一般的な胚形成の調整のプロセスの研究、あるいは多くの分子を用いたスクリーニングをすることで同定されてきました。

胚形成に関して、まず胚葉、次に特定の系統へと誘導するためには因子を特定の順序・時期・濃度で加えなくてはなりません。例えば、hPSCs を中胚葉胚層へと誘導するためには、bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) や Activin A を 1-4 日にかけて添加する必要があります。さらにそこから心筋細胞や血球細胞へ分化を誘導する場合は様々な因子のコンビネーションを添加する必要があります。同様に、内胚葉およびそれに続く臓器細胞への分化は、Activin A、FGF-10、シクロパミン、レチノイン酸を含むサイトカインの種類の組み合わせで誘導することができます。それぞれの系統へ誘導分化させるための効率の良い因子が次々に提示されています。

STEMdiff APEL Medium (STEMdiff APEL) は特に hPSC の分化をサポートするために開発された無血清および動物成分を含まない培地です。当初、VEGF、BMP-4、SCF、Activin A を添加しての hemato-endothelial cells の誘導の為に使用されていましたが、hPSCs の他の系統への分化のベース培地としても効率的であることが示されました。以下は文献から得られたサイトカインのコンビネーションで STEMdiff APEL を使用した hPSCs からの血球、心筋、内胚葉細胞への分化の例です。

hPSCs は特定の系統誘導因子を添加した STEMdiff APEL を使用することで、EBs または、接着性細胞ベースでの分化が可能です。

さらに以下の例において細胞は、分化の前に少なくとも 10 継代は mTeSR1 と MatrigelTM で維持されています。

STEMdiff APEL と適切な成長因子の組み合わせを使用することで、hPSCs から様々な体細胞系統への分化が可能でこれら以外のいろいろな方法でご利用頂くことをお勧めします。



商品コード	商品名	梱包単位
ST-05210	STEMdiff APEL Medium	100mL

STEMdiff APEL Medium の特長

- Defined、動物由来タンパク質フリー
- 成長因子フリー：分化に最適なサイトカインと条件の組み合わせを変えることでフレキシブルに使用可能
- Nature Protocols に掲載された文献をもとに開発した多能性幹細胞分化をサポートする基本培地
- 均一で再現性のあるヒト多能性幹細胞分化を促進
- mTeSR1 のフィーダーフリー培養で最適化
- 適切なサイトカインを加えることで3胚葉への分化をサポート

血球分化

このプロトコルは Ng et al.⁷ と Chadwick et al.¹⁴ のものに以下の変更を加え無血清での分化誘導を可能にしています。

- (1) 基礎培地として STEMdiff APEL を使用しました。
- (2) 細胞は、分化の前に少なくとも 10 継代は mTeSR1 と Matrigel™ で維持しました。
- (3) 分化手順全体は、EB ベースの手法の代わりに Matrigel™ コートした表面での接着細胞培養によって行いました。

まず、hPSCs は、mTeSR1 で Matrigel™ コートした 6 ウェルプレート上にディスペーズを用いて塊として継代しました。2 日間の継代後 (0 日)、mTeSR1 の培地を除去し、30 ng/mL VEGF, 30 ng/mL BMP-4, 40 ng/mL SCF, 50 ng/mL Activin A⁷ を添加した STEMdiff APEL をウェル当たり 3 mL ずつ加えました。4 日目に、この培地を除去し、300 ng/mL SCF, 300ng/mL Flt-3 ligand, 10 ng/mL IL-3, 10 ng/mL IL-6, 50 ng/mL G-CSF, 25 ng/mL BMP-4¹⁴ を添加した STEMdiff APEL を加えました。7 日目と 10 日目には、培地を 4 日目と同じ添加物を加えた STEMdiff APEL へ完全に交換しました。最後に、13 日目には細胞の血球分化の是非を、フローサイトメトリーによって CD34 と CD45 の発現を見ることによって解析しました。細胞は 13 日目にコロニー形成細胞 (CFC) アッセイを行い、ディッシュ当たり 10⁵ 個の細胞を MethoCult H4434 Classic にプレATINGし、10 日後にコロニーをカウントしました。

図 1 で示すように、STEMdiff APEL は文献で紹介されているサイトカインの組み合わせと接着性の細胞培養法と共に使用された場合、約 30% の細胞が造血系マーカー CD34 を発現しました。

また、約 7% の細胞が CD34 と CD45 の両方を発現し、造血前駆細胞 (図 1A および 1B) の存在を示しました。

さらに CFCs が 1000 個の細胞当たり約 1 つ (播種した 10⁵ 個の細胞あたり 100 個のコロニー、表 1) 存在することが確かめられました。興味深いことに、この方法によって CD34 と CD31¹⁵⁻¹⁷ を共発現している血管内皮細胞と推定される細胞も得られました (図 1C)。ここに示されている CD34⁺ 細胞、CD34⁺CD45⁺ 細胞及び、CFCs の頻度は Chadwick et al.¹³ のものや、最近の血球分化の論文¹⁴ と同様な結果が得られています。

この例は STEMdiff APEL が、確立された血球分化のプロトコルの代替物として有用な無血清、動物成分フリー培地であることを示しています。

表 1. コロニー数のカウント

実験	コロニー数 (/10 ⁵ 細胞)
1	432
2	95
3	178
4	115
5	143

13 日目に 1 x 10⁵ 個の細胞を MethoCult H4434 Classic にプレATINGし、10 日後にコロニーをカウントしました。異なる 2 つの hESC または hiPSC 株を使用し、5 つの実験の 1 x 10⁵ 個の細胞をプレATINGしたときのコロニー数を示しています。

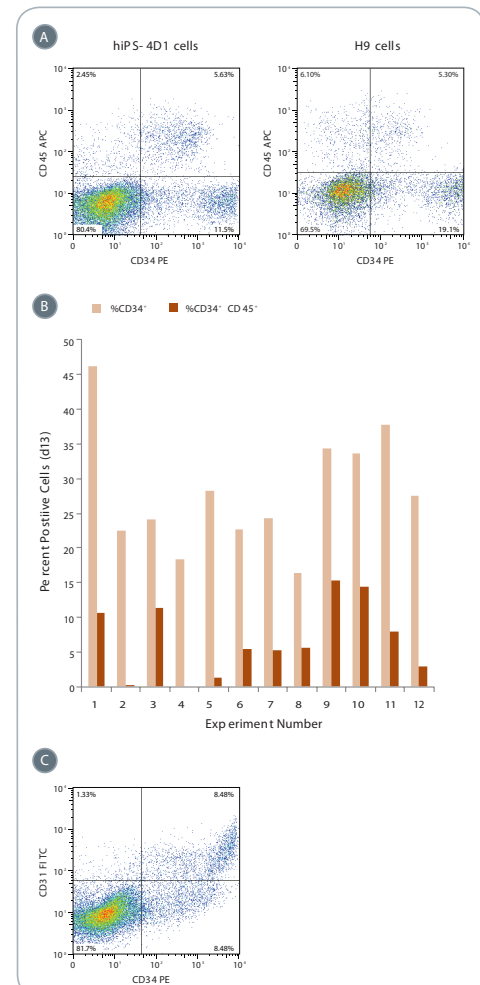


図 1. hPSCs の血球細胞への分化

- (A) hiPS-4D1 cells (左) 及び H9 cells (右) は、13 日間分化培養後、造血系マーカー CD34、CD45 の発現をフローサイトメトリーで解析しました。
- (B) 13 日目に 12 の実験で平均 28.0% (± 8.6 STDEV standard deviation) の細胞が CD34 を発現し、平均 7.3% (± 5.1%) の細胞が CD34⁺CD45⁺ ダブルポジティブでした。
- (C) 内皮細胞を示す CD31⁺CD34^{hi} 細胞もこのプロトコルで誘導しました。

心筋細胞分化

このプロトコルは Yang et al.,⁸ のものに以下の変更を加えたものです。

- (1) 基礎培地として、STEMdiff APEL を使用しました。
- (2) 細胞は、分化の前に少なくとも 10 継代は mTeSR1 と Matrigel™ で維持しました。
- (3) EB は AggreWell 400 プレート内に形成されました。
- (4) 全体の手順は AggreWell 400 プレート内で実施しました。

まず、0.5 ng/mL BMP-4 (図 2) を添加した STEMdiff APEL に 1000 個の細胞を含むような EB を AggreWell 400 plates で作成しました。1 日後、培地を 10 ng/mL BMP-4, 10 ng/mL Activin A, 5 ng/mL bFGF を添加した STEMdiff APEL に交換しました。4 日目には培地をさらに 10 ng/mL VEGF, 150 ng/mL Dkk1 を添加した STEMdiff APEL に変えました。8 日目には再び培地を 10 ng/mL VEGF, 150 ng/mL Dkk1, 10 ng/mL bFGF を添加した STEMdiff APEL に変更しました。12 日目には 8 日目と同様に新しい培地に交換しました。16 日目には EBs はシンクロした拍動が観察でき、細胞が心筋細胞マーカー心筋トロポニン T (cTnT) を発現している事をフローサイトメーターで解析しました。

図 3 で示されているように、95% の EBs で 16 日目には拍動が確認されました。この高頻度の拍動の一方で cTnT⁺ の細胞の割合は 0.1% から 5.8% の間で、それぞれの EB 中のごく少数の細胞のみが本当の心筋細胞であることが示唆されました。この頻度は Yang et al.,¹² での cTnT⁺ 細胞の頻度と比べて低いものの、STEMdiff APEL が mTeSR1 で成長した細胞を拍動心筋細胞へと高い頻度で分化するのを支持できることが示されました。この手順を使用して cTnT⁺ 細胞の頻度を上げるためにはさらなる最適化が必要とされます。

この例は確立された心筋細胞分化のプロトコルにおいて STEMdiff APEL が、無血清、動物成分フリーの代替物として有用である事を示しています。

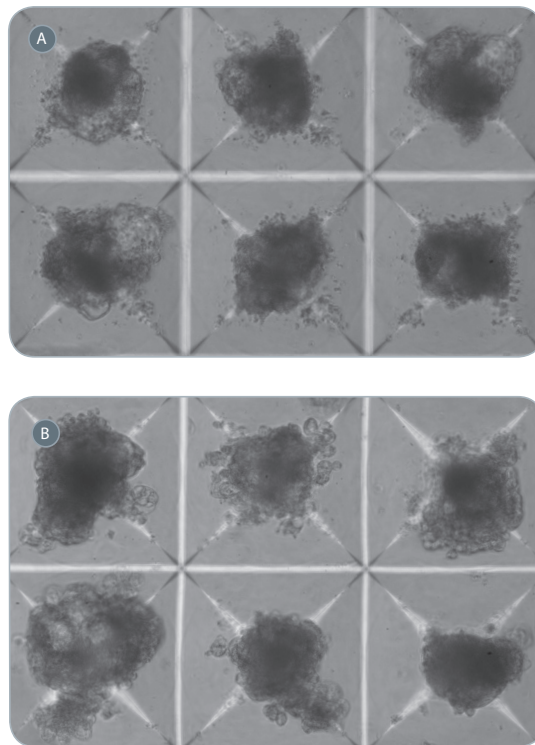


図 2. 心筋細胞分化プロトコルを使用した AggreWell 400 中の EBs hPSCs は、上記サイトカインを添加した STEMdiff APEL で心筋細胞へ分化させました。上記プロトコルで 5 日目 (A)、13 日目 (B) の AggreWell 400 中の EB を示します。EB の縁の透明な領域は、拍動を示す傾向がありました。X 100 倍。

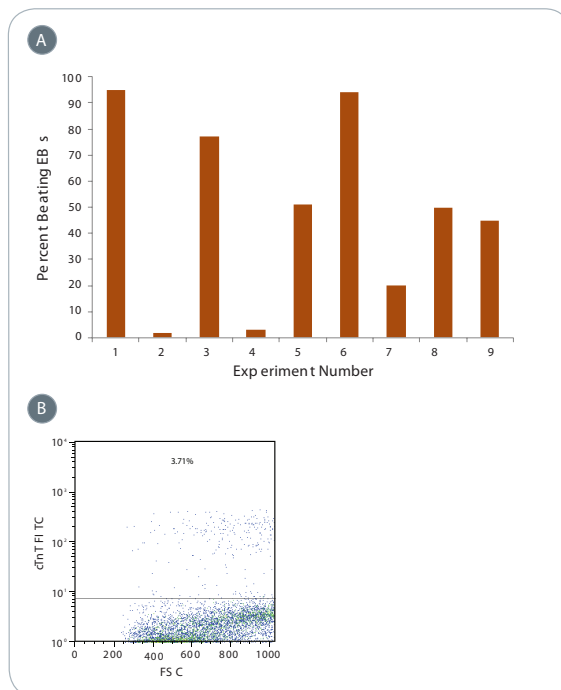


図 3. hPSCs の心筋細胞への分化

- (A) 拍動する EB は、16 日間培養後にカウントされ、全 EB 数の 5-95% で変化しました。
- (B) 16 日間培養後に Flow cytometry で cTnT の発現を測定しました。H9 hESCs から分化誘導後の cTnT⁺ 細胞の代表例を示しています。

内胚葉の誘導

このプロトコルは、Rezania et al.¹⁶ のものに以下の変更を加えたものです。

- (1) 基礎培地として STEMdiff APEL を使用しました。
- (2) 細胞は、分化の前に少なくとも 10 継代は mTeSR1 と Matrigel™ で維持されています。

まず、PSCs は ACCUTASE を使用してシングルセルにし、Matrigel™ コートした 6 ウェルプレートに 2mL の STEMdiff APEL (5 ng / mL の Y - 27632 ROCK Inhibitor を含む) で 1 ウェルあたり 3×10^6 個の細胞を播種しました。1 日目に、培地を除去し 100 ng/mL Activin A, 20 ng/mL Wnt3a, 8 ng/mL bFGF を添加した STEMdiff APEL に交換しました。培地は 2 日目、3 日目ともに STEMdiff APEL に交換しました。4 日目に、細胞は回収し、明確な内胚葉マーカーである CXCR4 と SOX-17 の発現をフローサイトメーターで解析しました。

図 4 で示されているように、内胚葉を誘導するサイトカインを添加した STEMdiff APEL で 4 日間培養した後、大部分の細胞は CXCR4 と SOX-17 を共発現していました。この手順を使用した場合、平均 $69.53 \pm 9.1\%$ の CXCR4⁺SOX-17⁺ ダブルポジティブの細胞が得られました (n=2、各回で 3 組分)。

細胞が CXCR4 を発現している頻度 (>90%) は Rezania et al.¹⁶ で示されたデータと一致しており、STEMdiff APEL が mTeSR1 で培養した hESCs からの内胚葉の誘導を起こせることを示しています。

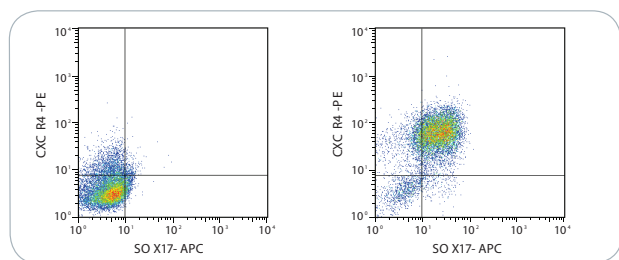


図 4. STEMdiff APEL と文献で紹介されたサイトカインを使用した hPSCs の最終的な内胚葉細胞への分化

H9 ヒト ES 細胞は、Rezania らの文献に基づいて分化させました。4 日目の細胞は最終的な内胚葉細胞マーカーの CXCR4 及び、SOX-17 が陽性でした。

左：サイトカインを添加していない STEMdiff APEL Medium
単独で培養した細胞

右：サイトカインを添加した STEMdiff APEL Medium で培養後の分化した細胞

まとめ

STEMdiff APEL は無血清、動物成分を含まない基本培地であり、特異的なサイトカインを添加した場合はヒト PSCs の分化を誘導します。

ここに示した例では hPSC の心筋細胞、血球または内胚葉系列への分化の可能性を示しました。他の系列への分化も、サイトカインまたは低分子阻害剤の組み合わせ、濃度、添加のタイミングを最適化することによっては可能かもしれません。

異なる細胞株は、与えられる刺激によってそれぞれ異なる応答をするため、上記プロトコルの最適化が必要な場合もあります。培養開始時の細胞集団の質は結果に大きく影響しますので、分化した細胞は 15% 未満である必要があります。

サイトカインは各分化系列上で、その活性に応じて使用量をご検討下さい。

References

1. Itskovitz-Eldor J et al. Mol Med 6:88-95,2000
2. Hill KL et al. Current Protocols in Stem Cell Biology,2007
3. Woods N-B et al. Stem Cells. 2011 May 4. doi:10.1002/stem.657
4. Lu M et al. Experimental Hematology 37:924-936. e924,2009
5. Gadue P, et al. Experimental Hematology 33:955-964,2005
6. Borowiak M et al. Cell Stem Cell 4:348-358,2009
7. Ng ES et al. Nat. Protocols 3:768-776,2008
8. Yang L et al. Nature 453:524-528,2008
9. Burridge PW et al. PLoS ONE 6:e18293,2011
10. Evseenko D et al. PNAS 107:13742-13747,2010
11. Filipczyk A et al. Cellular and Molecular Life Sciences 64:704-718,2007
12. Gaur M et al. Cytotherapy 12:807-817,2010
13. Chadwick K et al. Blood 102:906-915,2003
14. D'Amour KA et al. Nat Biotech 24:1392-1401,2006
15. Chica L et al. PLoS ONE 6: e14733,2011
16. Rezania A, et al. Diabetes 60:239-247,2011
17. Choi K-D et al. Stem Cells 27:559-567,2009

日本販売代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL.03-3593-3211(代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>