

CellPet 3D-iPSを用いたヒト間葉系幹細胞のスフェロイド培養

ヒト間葉系幹細胞を用いた細胞治療法の開発進展に伴い、ヒト間葉系幹細胞を安定的に供給するためにも大量培養技術の開発が進められている。現状では多層フラスコを用いた平面培養や、各種材料により形成されたマイクロキャリアを用いた懸濁培養法が提案されている。一方、iPS細胞のようにヒト間葉系幹細胞のスフェロイド培養も行われているが、間葉系幹細胞自身の性質もありiPS細胞スフェロイド培養ほど普及していないのが現状である。

そこで、CellPet 3D-iPSを用いてヒト間葉系幹細胞の3次元回転浮遊培養によるスフェロイド培養を行った。各種培地の検討を行う過程で、回転浮遊培養に伴いヒト間葉系幹細胞が過度に凝集する現象がみられた。そこでA社の細胞凝集抑制試薬を加えたところ、単分散後の播種から6日目までは大きな凝集塊を作らずに、粒径の揃ったスフェロイドが形成された。培養6日目に分散試薬によりスフェロイドを単分散化し、細胞を2等分して培養ベッセル2本に継代して12日目まで培養を行ったところ、細胞数は初期播種数のおよそ8倍に到達した。また、間葉系幹細胞の表面ポジティブマーカーであるCD44と、ネガティブマーカーであるCD34の発現割合をフローサイトメトリで評価したところ、回転浮遊培養前後で変化はなかった。このことから、CellPet 3D-iPSを用いたスフェロイド培養では間葉系幹細胞の性質を維持したまま培養可能であることが示された。

方法

細胞種：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞不死化細胞株 UE7T-13 (JCRB Cell Bank)

3次元回転浮遊培養培地：AK02N (Ajinomoto) + 10 μ M Y-27632 (Wako) + 細胞凝集抑制試薬 (A社)

ベッセル：ディスポーザブル培養ベッセル 50 ml (JTEC Corp.) 回転培養：40 rpm

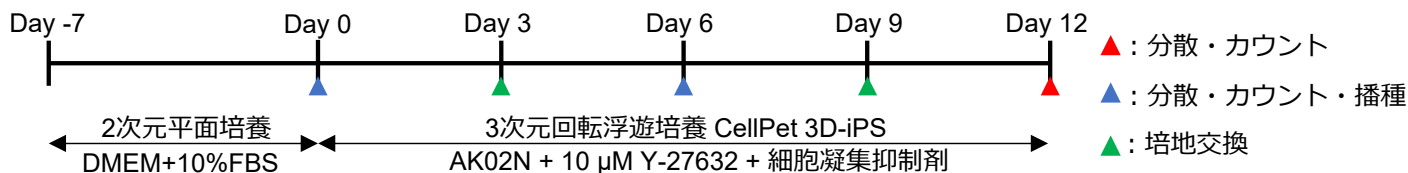
細胞カウント：Countess 3 (ThermoFischer)

イメージャー：Cell3iMager (SCREEN)

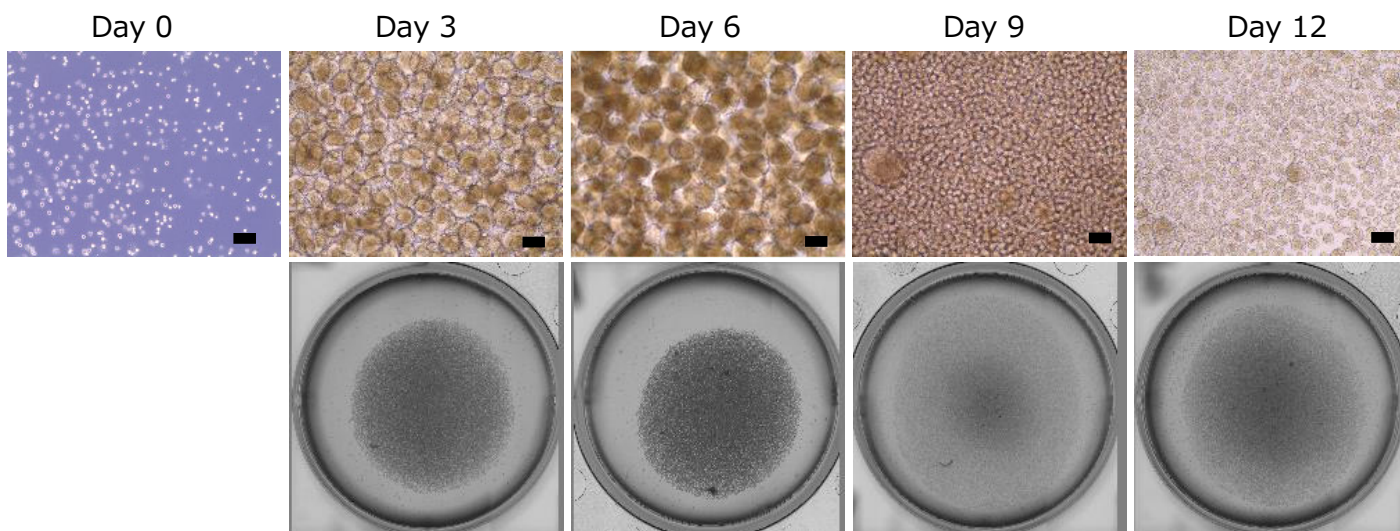
フローサイトメーター：Attune Flow Cytometer (ThermoFischer),

CD34抗体 (BD, Clone 581), CD44抗体 (BD, Clone L178)

培地交換スケジュール

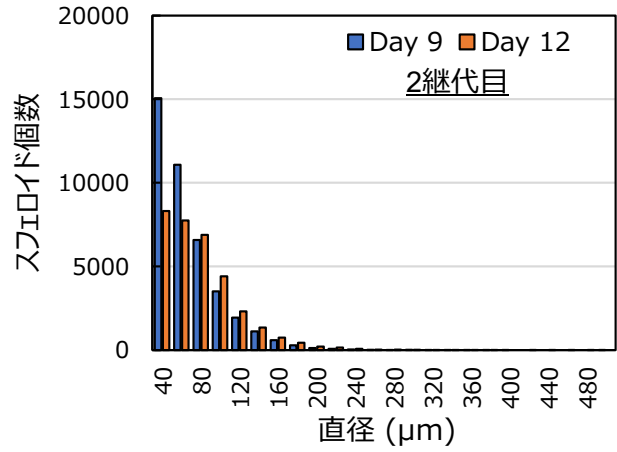
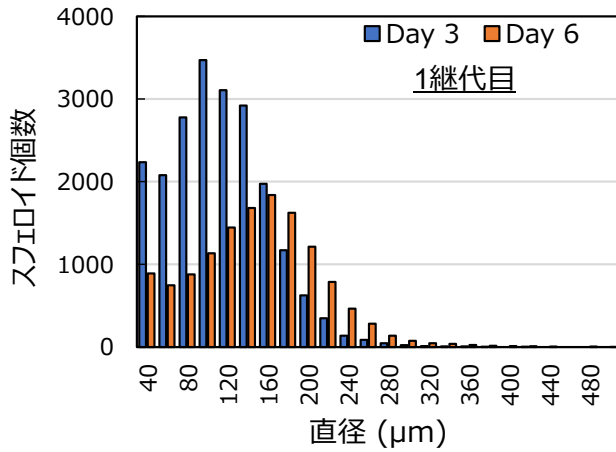


結果

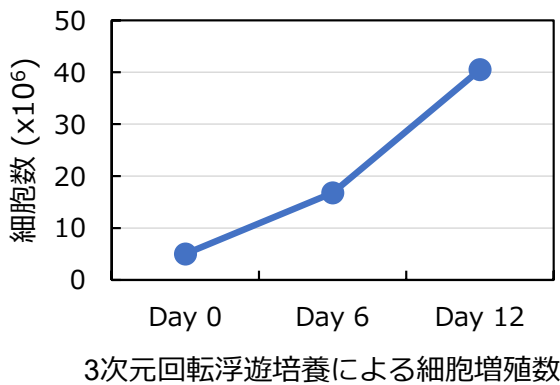


上段：ヒト間葉系幹細胞スフェロイド位相差顕微鏡像 (Bar = 200 μ m)

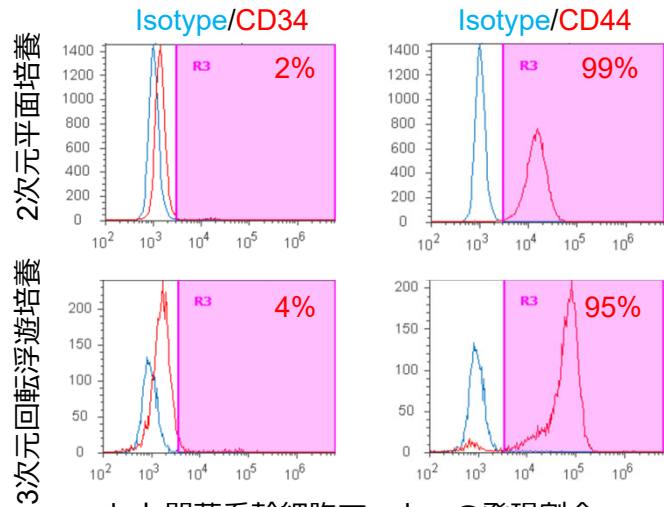
下段：イメージャー (Cell3iMager, SCREEN)によるスフェロイド全体像 (6well プレート)



ヒト間葉系幹細胞スフェロイドの粒径分布



3次元回転浮遊培養による細胞増殖数



ヒト間葉系幹細胞マーカーの発現割合

2次元平面培養ヒト間葉系幹細胞を単分散化してCellPet 3D-iPSの培養ベッセルに播種し、3次元回転浮遊培養を行った。位相差顕微鏡画像とイメージャー解析結果から、Day 3で直径最頻値が100 μm程度のほぼ均一なスフェロイドを形成していた。Day 6では直径最頻値が160 μm程度となり、培養日数を伸ばすことでスフェロイドが成長していることがわかった。Day 6で酵素分散によりスフェロイドを単分散化したあと、2等分して培養ベッセル2本に継代し3次元回転浮遊培養を行った。Day 9, Day 12の顕微鏡画像およびイメージャーの解析結果から、スフェロイドの直径は60 μm以下で最頻値を示したものの、Day 9からDay 12にかけて粒径が大きくなっていったことから、培養日数を伸ばすことでスフェロイドが成長していることがわかった。Day 6, Day 12での細胞数カウント結果から、Day 0の細胞播種数 5.0×10^6 個に対してそれぞれ 16.8×10^6 個 (3.4倍), 40.5×10^6 個 (8.1倍, 培養ベッセル2本の合計) となった。さらに3次元回転浮遊培養前後で表面マーカーの発現割合をフローサイトメトリで評価したところ、ポジティブマーカーであるCD44は95%を維持し、ネガティブマーカーのCD34は4%であったことから、ヒト間葉系幹細胞スフェロイドはその性質を維持したまま培養できていることが示唆された。

まとめ

CellPet 3D-iPSによる3次元回転浮遊培養システムにより、ヒト間葉系幹細胞スフェロイドの形成に成功した。ほぼ均一な粒径のスフェロイドを形成できており、Day 3, Day 6ではそれぞれ100 μm, 160 μmの最頻値を示した。Day 12までの培養により、Day 0での細胞播種数に対して8.1倍の細胞増殖率となった。今後、CellPet 3D-iPSにより形成したヒト間葉系幹細胞スフェロイドを用いて各種細胞への分化誘導実験を行うとともに、スフェロイド培養における初期播種細胞密度の影響についても評価していく。