

MakCellを用いた初期中胚葉分化誘導

iPS細胞を目的とする細胞へ分化誘導するためには、種々の培地と試薬を組み合わせる適切なタイミングで培地交換を行う必要があり、作業者の負担を低減するためにも培地交換の自動化、機械化が望まれる。そこで、3種類の培地を利用可能であり、培地交換タイムスケジュールを設定可能な卓上型自動細胞培養装置 MakCellを用いてヒトiPS細胞の初期中胚葉分化誘導を行った。MakCellには分化誘導培地3種類を搭載し、培地交換プログラムを使用することで自動で分化誘導培地への交換を進めた。さらに、培地を切り替えるタイミングでは洗浄シーケンスを導入することにより、自動での分化誘導が可能かを検証した。コントロール群として、手作業による初期中胚葉分化誘導との比較を行った。初期中胚葉分化誘導試薬としてCHIR99021を2日間添加した。分化誘導開始 Day 0 から Day 6 まで毎日サンプル回収を行い、中胚葉分化マーカーであるBrachyuryおよびPDGFR α 、未分化マーカーであるPOU5f1およびNanogの遺伝子発現レベルをqRT-PCRにより評価した。

方法

細胞種：ヒトiPS 253G1 (播種密度 8×10^5 cells/well)

CELLFLOAT® CellPet 3D-iPS, CellPet FTを用いてiPSスフェロイド拡大維持培養後、
酵素分散し器材へ播種

未分化維持培地：AK02N (Ajinomoto)

器材：12 well plate (Falcon), iMatrix-511(Nippi)

分化誘導培地：RPMI1640 (Wako), Ascorbic acid (Sigma), BSA (Wako), GlutaMAX (Gibco)

分化誘導試薬：CHIR99021 (Wako)

添加試薬：ITS-X (Gibco)

洗浄用培地：分化誘導培地と同じ

RT-qPCR：StepOne Plus (ThermoFisher), TaqMan Gene Expression Assays (ThermoFisher)

MakCell構成

Day 0に3種類の培地をセット

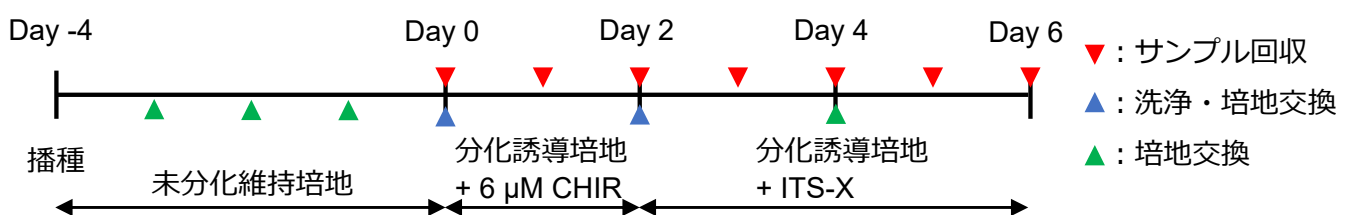
ボトル①：洗浄用培地（分化誘導培地と同じ）

ボトル②：分化誘導培地 + 6 μ M CHIR99021

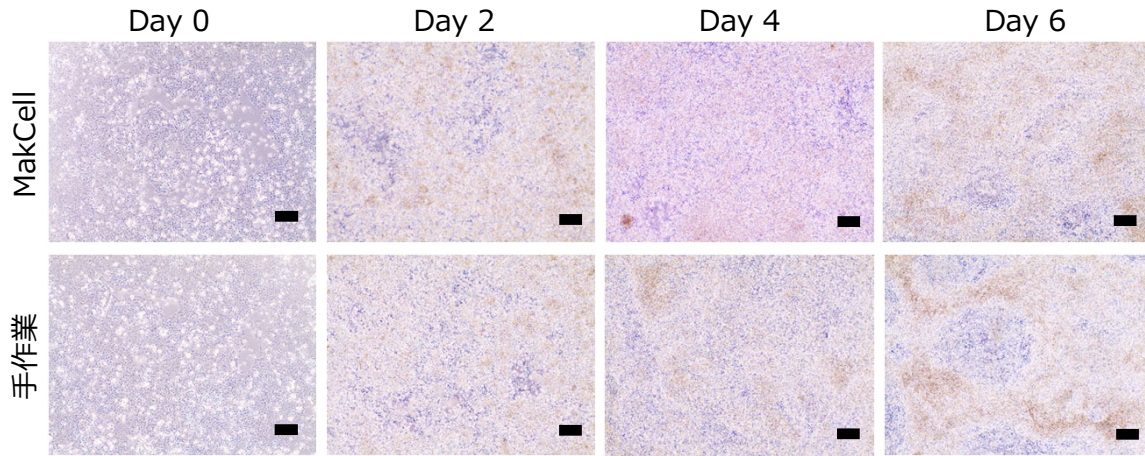
ボトル③：分化誘導培地 + ITS-X

供給用チューブセットには「500mL/1000mL ボトル供給用チューブセット(低吸着)」を利用。

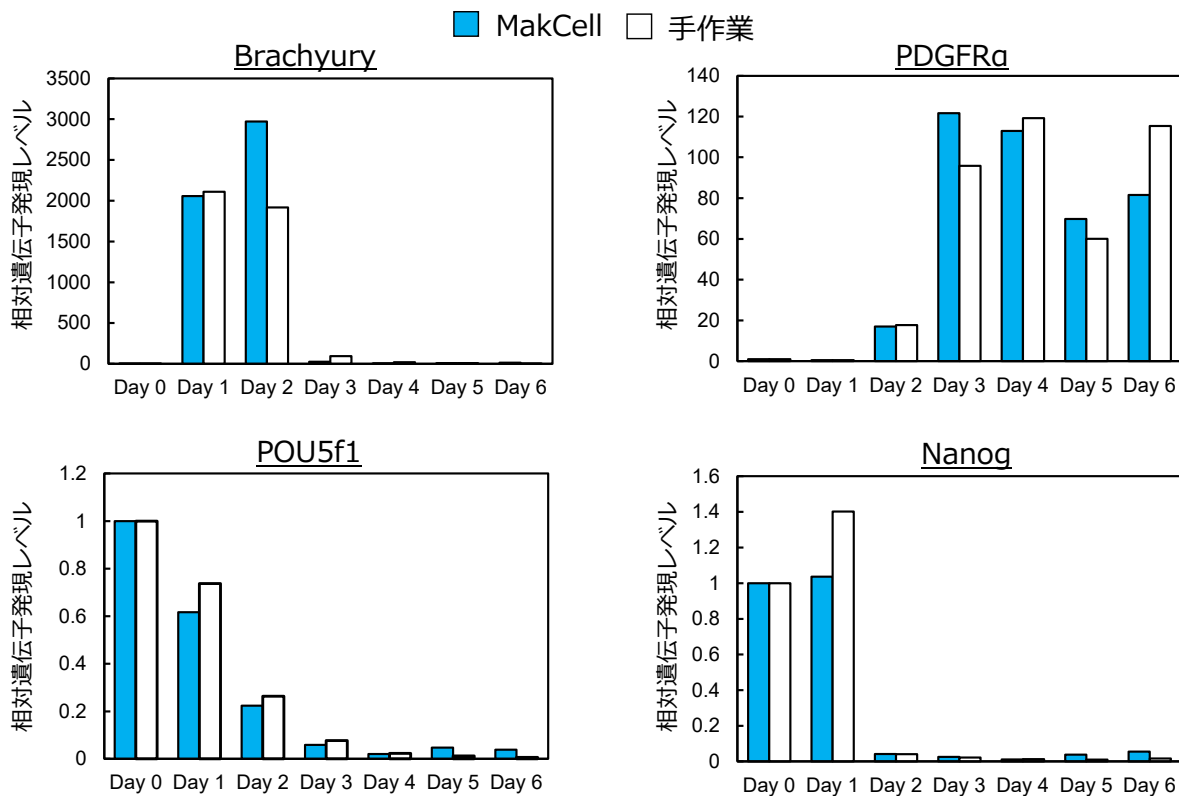
培地交換・サンプル回収スケジュール



結果



初期中胚葉分化誘導過程の細胞位相差顕微鏡像 (Bar = 200 μm)



初期中胚葉分化誘導過程の中胚葉，未分化マーカー遺伝子発現

MakCellおよび手作業による初期中胚葉分化誘導のための培地交換でも，細胞形態に大きな違いは見られず，また遺伝子発現は同様の傾向を示した．CHIR添加後，Day 1からDay 2にかけてBrachyuryの一過性の発現上昇がみられた．Day 2の培地交換にてCHIRを取り除いたあと，Day 3以降でBrachyuryの発現は減少した．一方，Day 2以降からPDGFRαの発現上昇がみられるようになり，少なくともDay 6までの発現上昇を確認した．また未分化マーカーPOU5f1およびNanogともにDay 2以降で発現減少していることから，未分化状態から初期中胚葉へ分化誘導されていることが示唆された．

まとめ

3種類の培地を切り替えてヒトiPS細胞の初期中胚葉分化誘導を行った．手作業と同様にMakCellでも初期中胚葉分化を示す遺伝子発現がみられたことから，MakCellによる3種類の培地を用いた自動培地交換で分化誘導可能であることが示唆された．