

MakCellを用いたヒトiPS細胞の心筋分化誘導

卓上型自動培養装置「MakCell」は培地交換を自動で実施する装置で、日々の細胞維持に必要な培地交換にかかる作業時間の削減や休日出勤の削減に貢献している。本ノートでは、再生医療研究で行われている幹細胞の分化誘導をMakCellで実施し、分化誘導実験に必要な手間と時間のかかるプロセス、つまり複数種類の培地使用や交換のタイミング、頻度等が関わる煩雑な作業をMakCellで自動化することで作業負担を軽減し、MakCellが効率的・効果的な研究推進に役立つことを示す。

MakCellの3つの培地供給・排出ラインを使用し、低分子阻害剤を含む培地を切り替えてヒトiPS細胞から心筋分化誘導を試みた。GSK inhibition/Wnt inhibition プロトコルの各阻害剤での培養日数を4パターン設定し、分化15日目における心筋細胞マーカーであるcTnT陽性率で分化誘導条件を比較検討した。

方法

細胞種：ヒトiPS 253G1 (播種密度 8×10^4 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), IWR-1 (Sigma), IWP-2 (Sigma)

添加試薬：Y-27632 (Wako), ITS-X (Gibco)

洗浄用培地：分化誘導培地と同じ

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

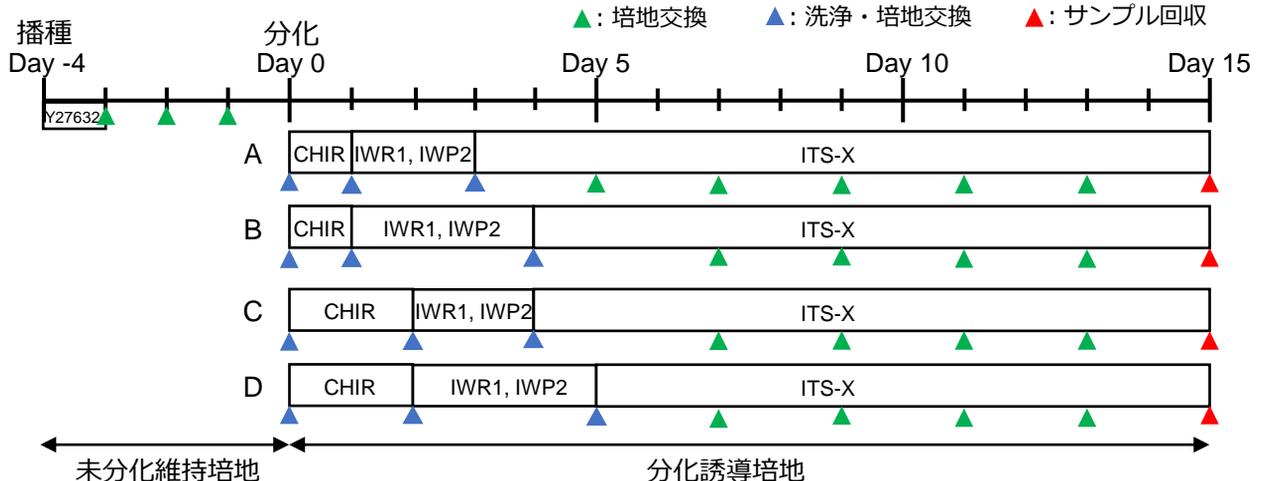
抗体：cTnT抗体 (CT3, SantaCruz), α -actinin抗体 (EA-53, Sigma),
蛍光標識2次抗体 (ThermoFischer)

MakCell構成

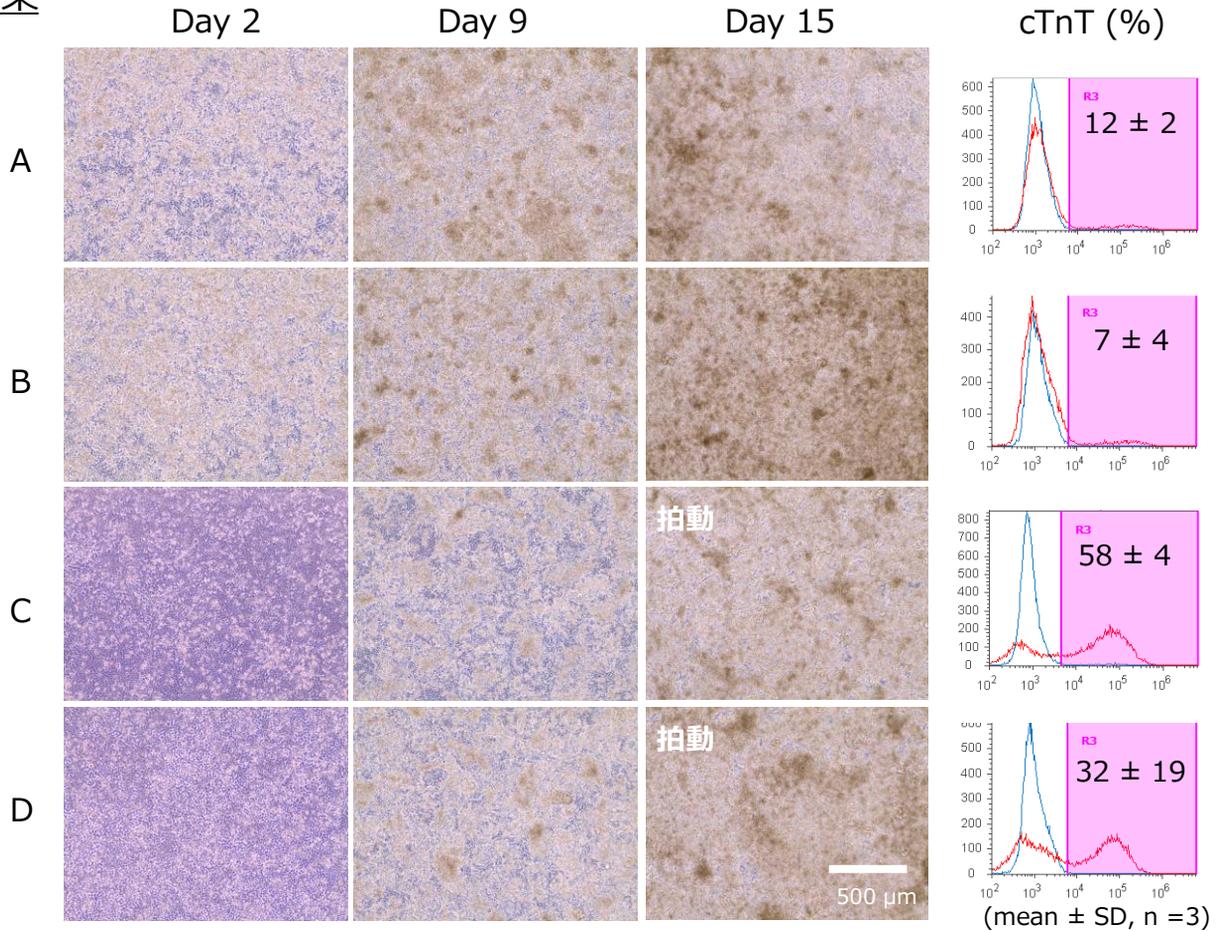
	ライン①	ライン②	ライン③
Day -4 - Day 0	未分化維持培地	分化誘導培地 + 6 μ M CHIR99021	分化誘導培地 (洗浄用)
Day 0 - Day 3	分化誘導培地 + ITS-X	分化誘導培地 + 6 μ M IWR-1, 8 μ M IWP-2	↓
Day 3 - Day 15	↓	-	↓

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

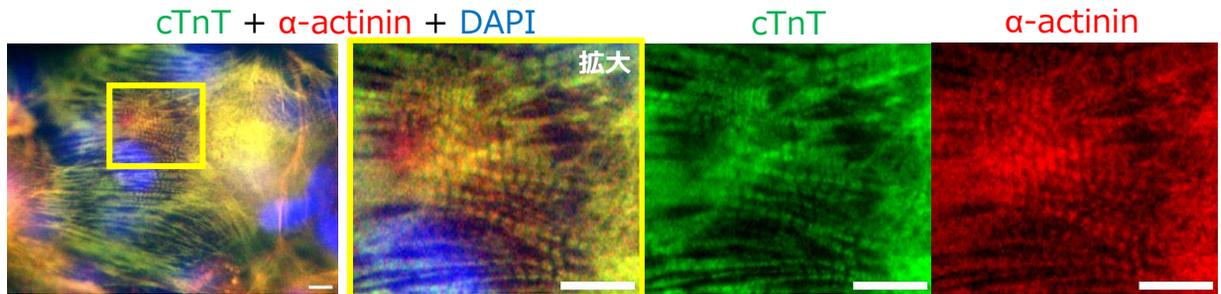
培地交換スケジュール



結果



分化誘導過程の顕微鏡画像とDay 15におけるcTnT陽性率



iPS由来心筋細胞の免疫蛍光染色 (Bar = 10 μm)

MakCellの3つの培地ラインを用いて、培地ボトルを取り替えながらiPS細胞の未分化維持培養から心筋分化誘導を行った。心筋分化誘導においてGSK inhibitionと、Wnt inhibitionのそれぞれの培養日数を変えて分化15日目のcTnT陽性率を評価した。条件A-Cにおいて各ウェル間 (3ウェル) のばらつきは低く抑えられており、条件Cではおよそ60%の陽性率が得られ、拍動していることを確認できた。Day 15で拍動していたウェルから細胞を剥離し、カバーガラス上に播種し直して免疫蛍光染色を行ったところ、cTnT、α-actininで構成されるサルコメア構造を確認することができた。

まとめ

- ・ MakCellを用いて心筋分化誘導における各阻害剤の培養時間の条件検討を行った。
- ・ 低分子阻害剤を含む培地の切り替えを行い、iPS細胞から心筋分化誘導が可能であることを示した。
- ・ MakCellは分化誘導における複数種類の培地交換の自動化にも対応できる装置であることを示した。
- ・ およそ3週間にわたる分化誘導実験において人の作業が必要になるのはDay -4とDay 0に行うチューブ・培地・ノズルの準備の2回だけであることから、MakCellは分化誘導実験のような頻繁に培地交換作業が必要となる実験において、作業時間の大幅な低減に寄与できる装置であることを示した。

参考：作業時間比較

	手作業	MakCell
作業内容	培地遠沈管分注 5分/回 培地加温 15分/回 洗浄・培地交換 15分/回 培地交換回数 13回	チューブ・培地・ノズル準備 30分 準備回数 2回 (Day -4, Day 0) プログラム設定 20分
作業時間 合計	455分 (7時間35分)	80分