

P-12-02

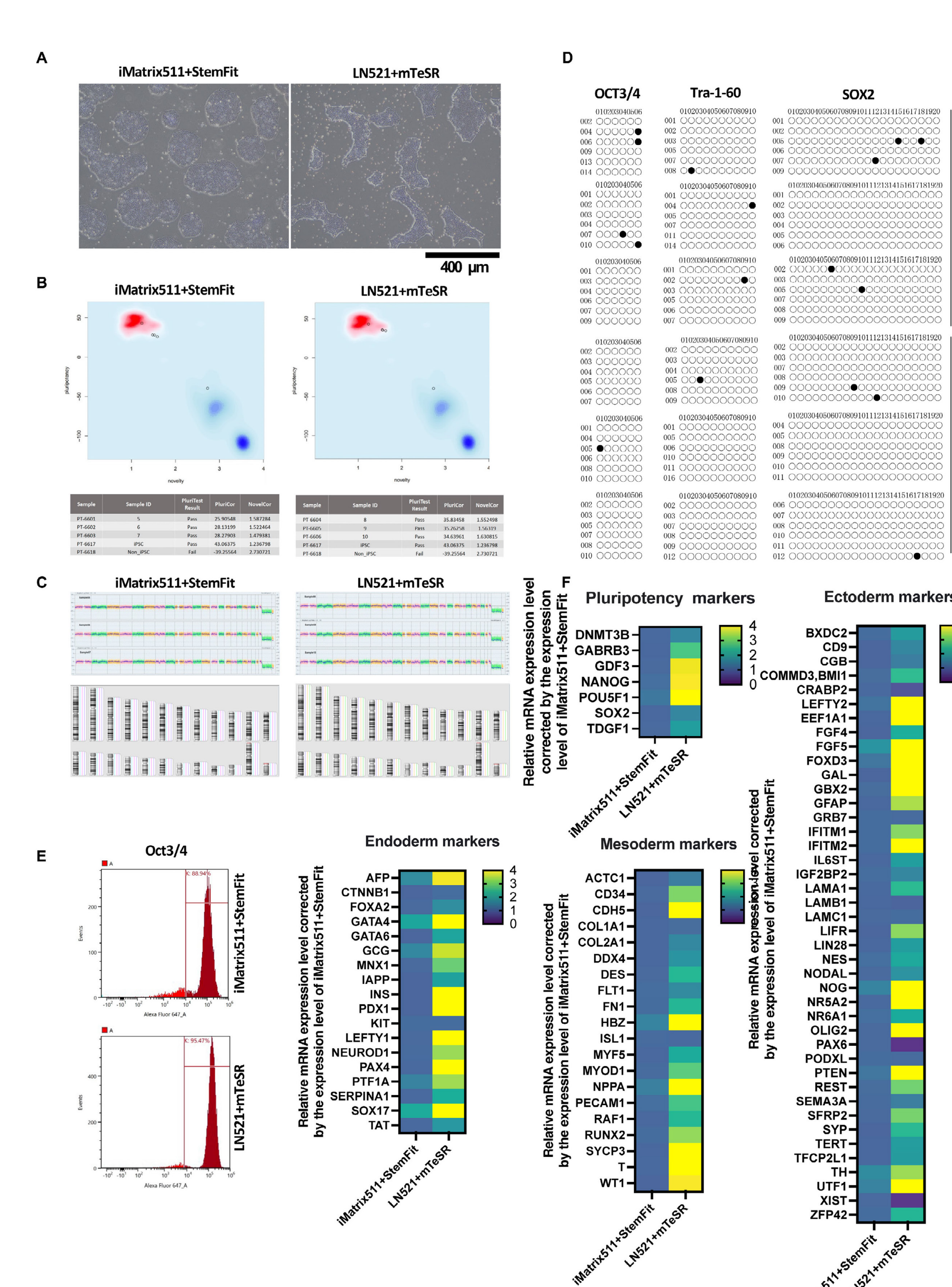
培養培地の解析によるiPS細胞から分化誘導した心筋細胞の分化特性評価

中島 義基、塚原 正義

1公益財団法人 京都大学iPS細胞研究財団

(概要) iPS細胞から心筋細胞を作製する際に、心臓関連検査である「ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (HANP)、ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント (NT-proBNP)、心筋トロポニンT (TNNT2)」の項目について調べた。

(結果) iPS細胞の前培養培地をEssential 8様の組成へ変えることで、心臓の組織誘導を高めることが可能となった。

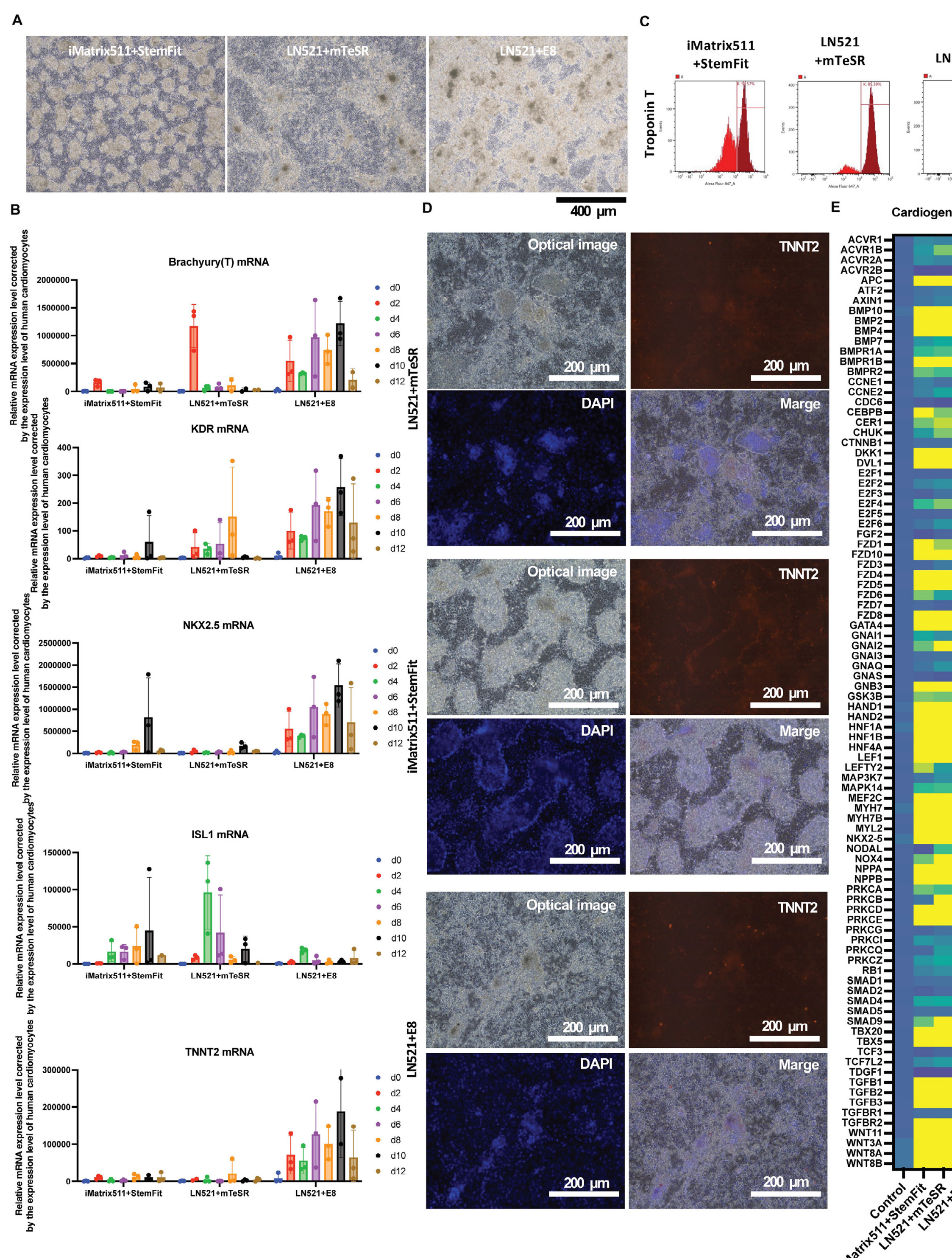


① [2種類の培養培地を使いiPS細胞の品質を比較した]

- ・ StemFit AK03(味の素)+iMatrix-511(マトリクソーム)
- ・ mTeSR™ Plus-cGMP(STEMCELL Technologies)+Biolaminin 521 LN(BioLamina)

iPS細胞のコロニー形が異なる(A)、共に未分化は維持(中胚葉(D,E,F)され、遺伝子変異は生じない(C)。mTeSRは内胚葉マーカー-SOX17や中胚葉マーカー-Tが低い(F)。

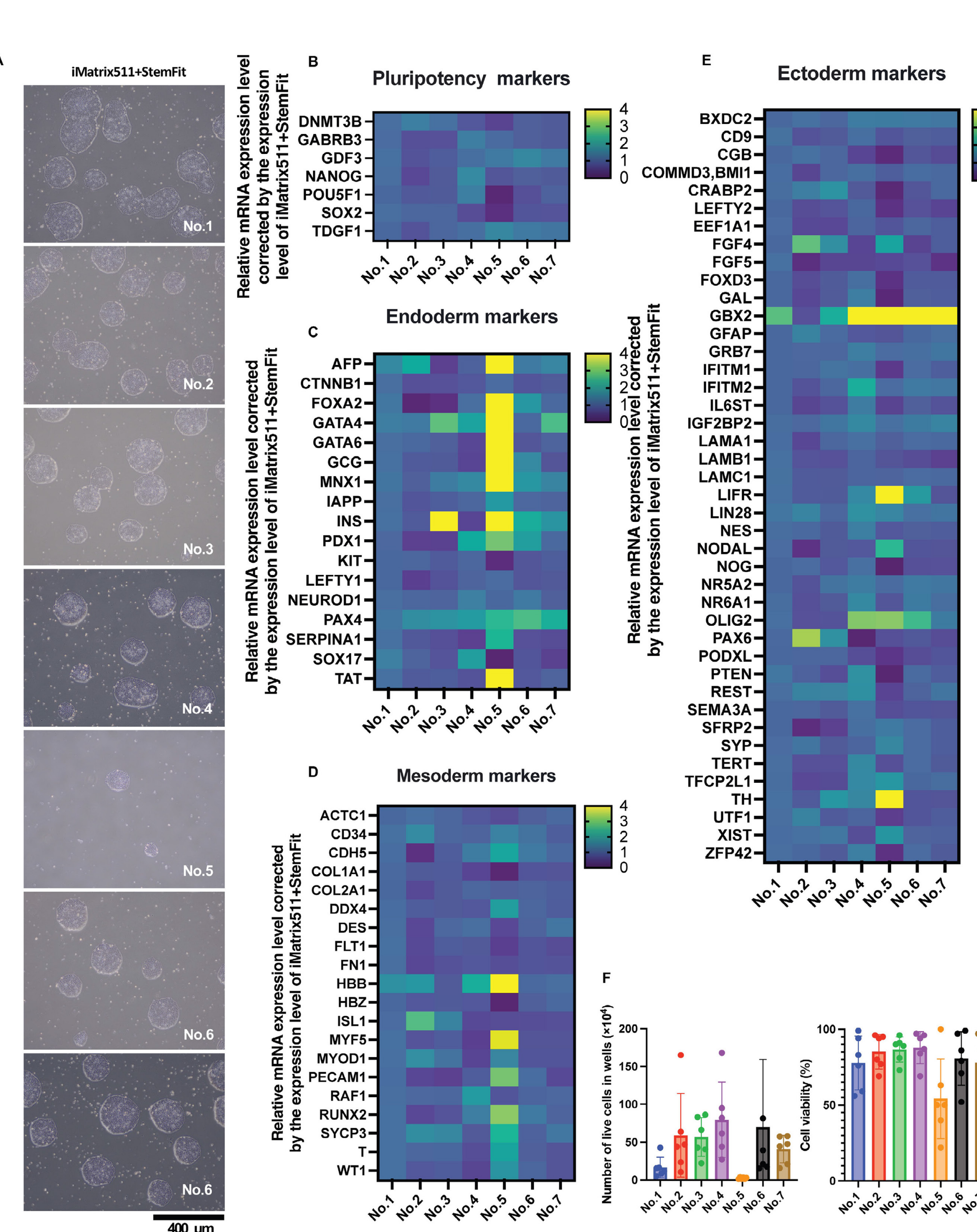
iPS細胞用培地の違いは分化マーカーのmRNA発現に影響を与える



④ [心筋分化過程について評価した]

STEMdiff Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit (STEMCELL Technologies)を用いて心筋分化誘導した。全ての培養条件において隆起した細胞認められTNNT2陽性であった(D)。LN521+mTeSRとiMatrix511+StemFitではday2で中胚葉マーカー-Brachyury(T) mRNAが一過性に発現したが、LN521+E8ではday10まで持続的な発現が認められた(B)。TNNT2陰性の細胞(目的外細胞)の出現はLN521+E8で少なかった(C)。ISL1 mRNAの発現はLN521+E8で少なかった(C)。

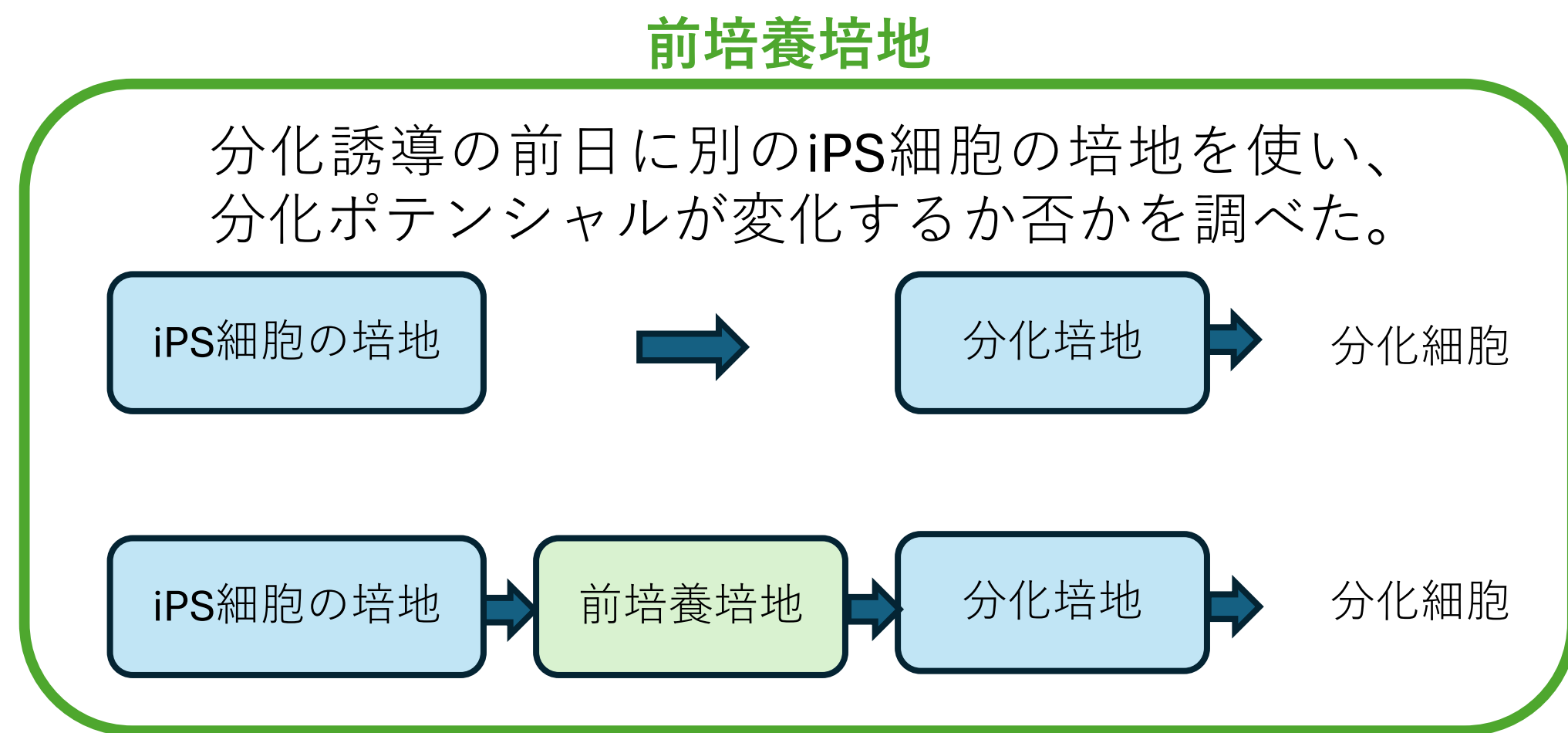
前培養でE8を用いるとその後の心筋分化でTNNT2陽性率が増加する



⑦ [臨床用前培養培地を使いiPS細胞の品質を比較した]

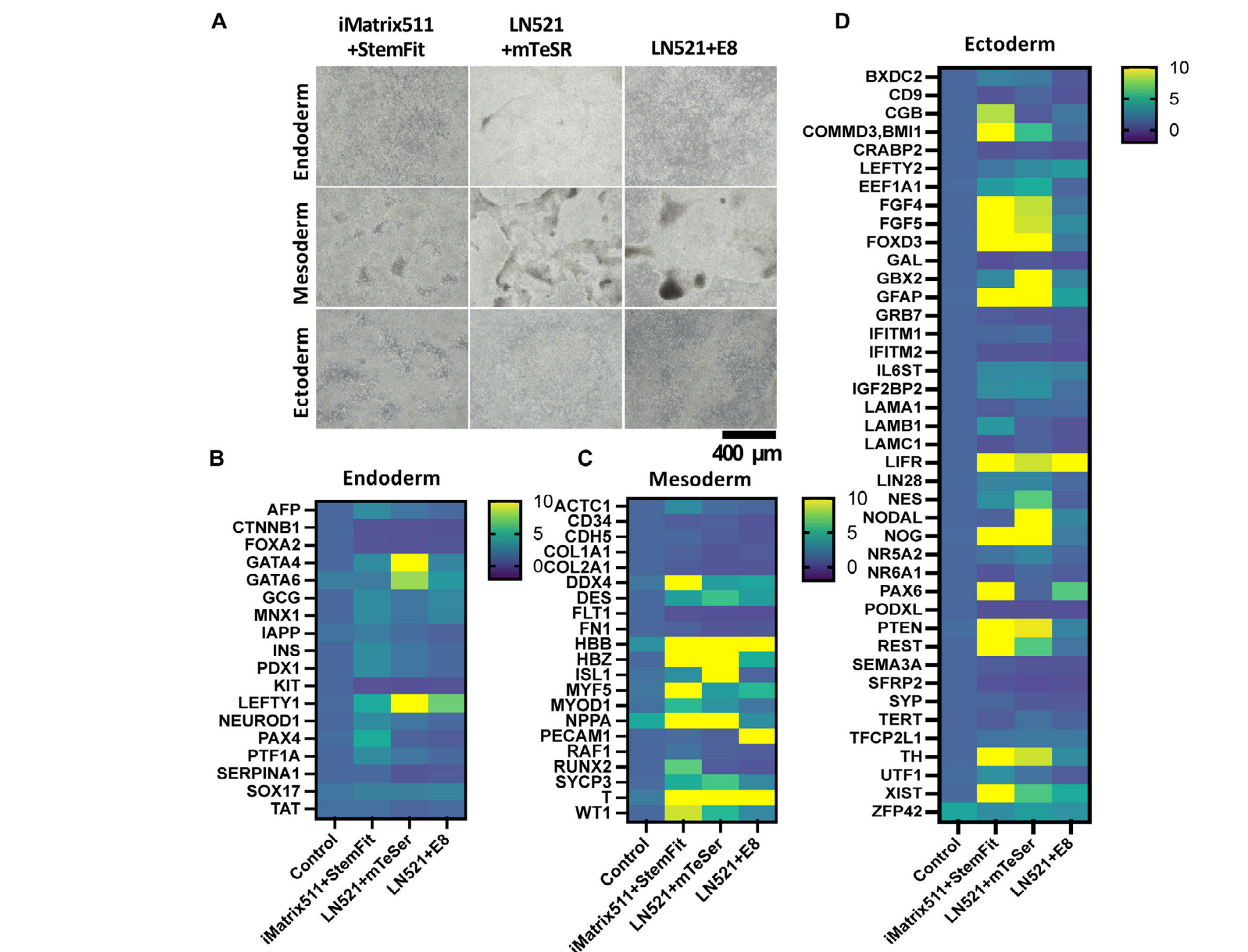
足場材料としてiMatrix-511を用いた。No.1-7の前培養培地で未分化マーカーmRNA発現は維持された(B)。No.5では内胚葉(C)、中胚葉(D)、外胚葉(E)に関するmRNA発現の増加が認められ、細胞増殖も遅かった(F)。ISL3のmRNA発現は、No.2では有意高く、No.3では高かった。

臨床用の前培養培地でも分化マーカーのmRNA発現に影響を与える



- ・ iMatrix511+StemFit(+1day StemFit)
- ・ LN521+mTeSR(+1day mTeSR)
- ・ LN521+mTeSR(+1day E8)

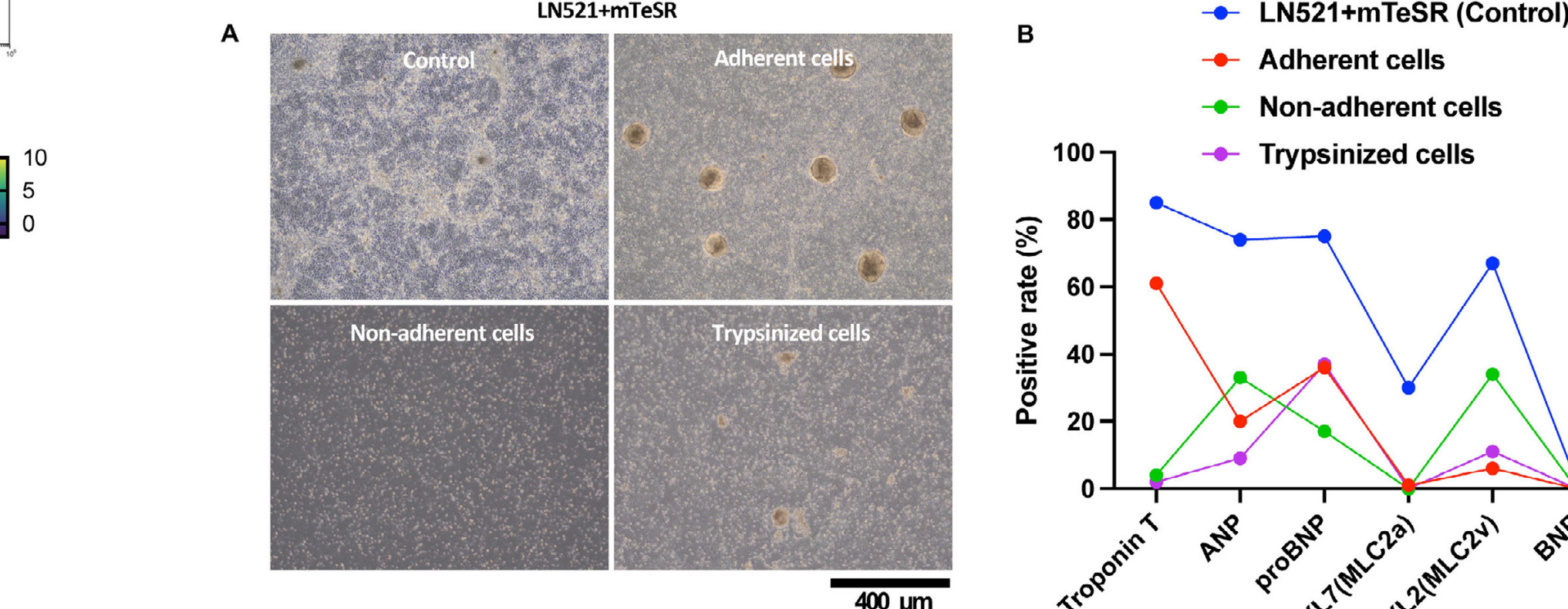
LN521+mTeSRに分化誘導開始の前日に前培養培地としてEssential 8(Thermo Fisher Scientific)を用いた。



② [前培養の影響を三胚葉分化で比較した]

STEMdiff Trilineage Differentiation Kit (STEMCELL Technologies)を用いて2日間で三胚葉へ分化誘導を行った。前培養でLN521+mTeSRを用いると心筋分化に関してISL1 mRNA発現が高い(C)。前培養でE8を用いるとISL1 mRNA発現は抑制された。

前培養培地はその後の三胚葉分化に影響する



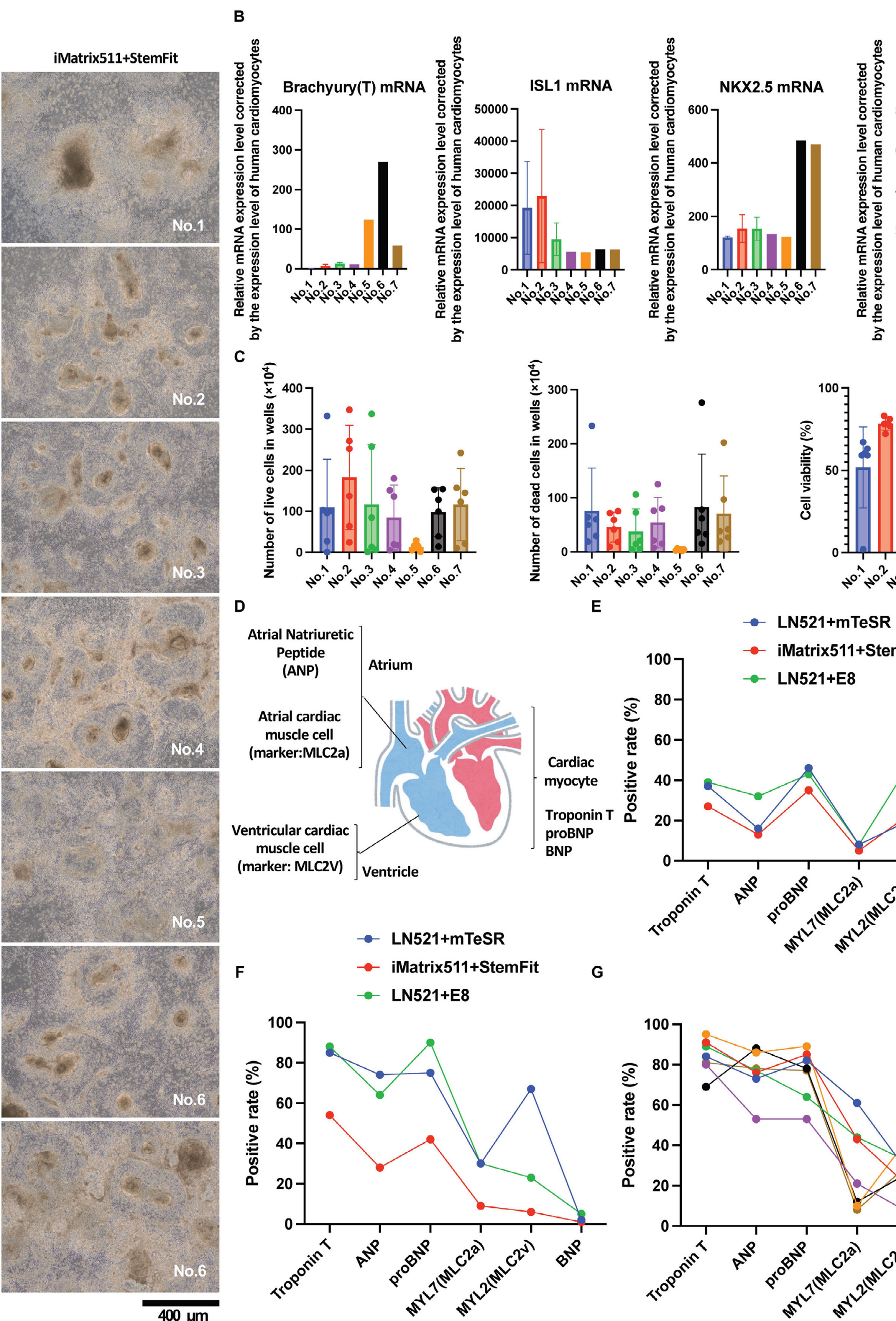
⑤ [心筋分化の組織化(オルガノイド)を調べた]

心組織の評価として用いたマーカー

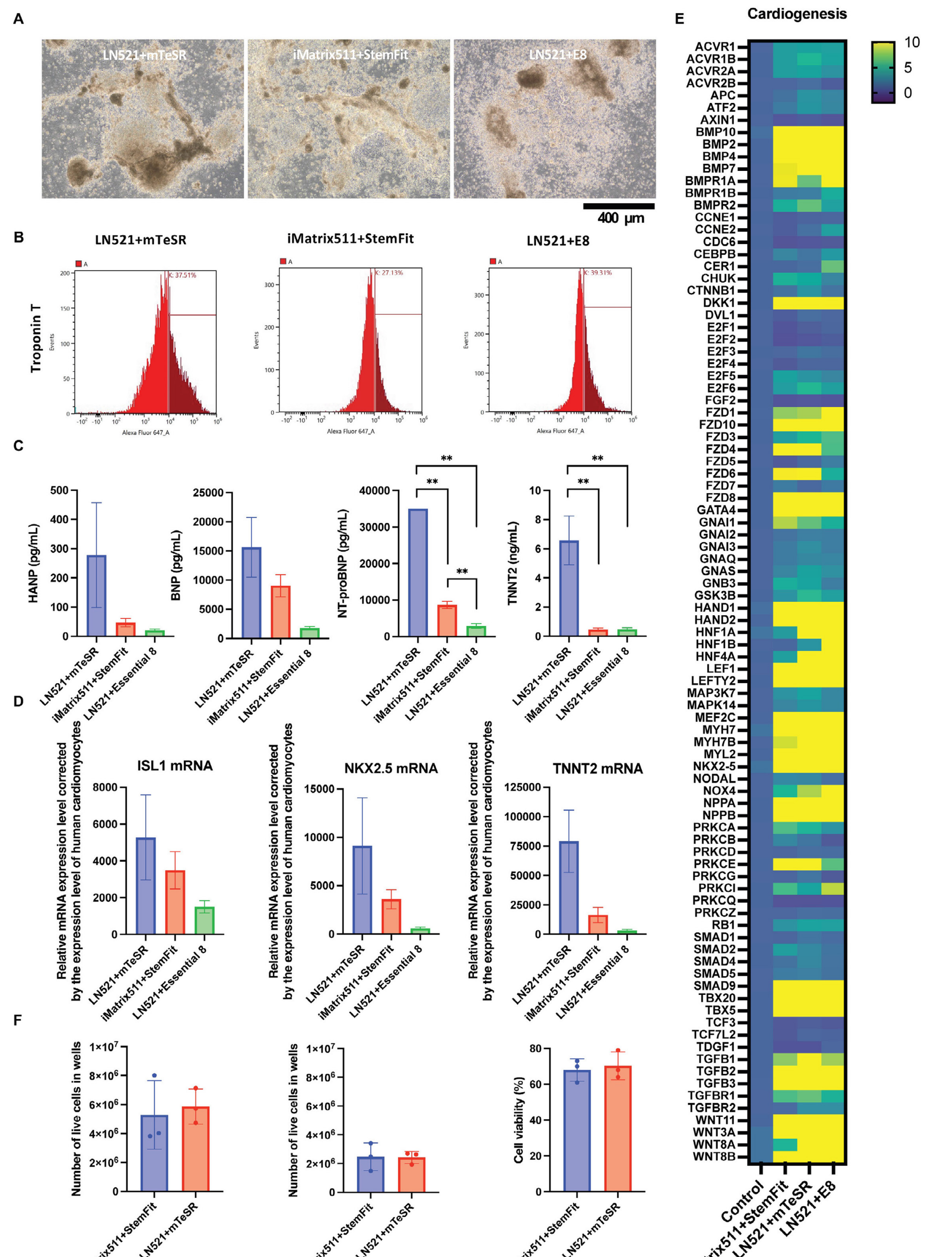
- TroponinT 心筋細胞のマーカー
- ANP 主に心房に発現するホルモン
- proBNP 心筋が発現するホルモンの前駆体
- BNP 心筋が発現するホルモン
- MLC2a 心房のマーカー
- MLC2v 心室のマーカー

足場材料としてBiolaminin 521 LNを用いた。LN521+mTeSR(Control)では、接着細胞層と隆起した細胞が観察された(A、左上図)。非接着性の細胞のみを回収 (Non-adherent cells)すると(A、左下図)、葉状で中心部に褐色の細胞塊を持つ構造となった接着細胞(Adherent cells)を認めた(A、右上図)。トリプシンで細胞層をシングルセルまで解離 (Trypsinized cells)すると解離した細胞は自己修復できずに葉状の構造は消失した(A、右下図)。注目すべきは、Non-adherent cellsを除去したAdherent cellsのみ(A、右上図)ではControlよりも全てのマーカーの陽性率は低くなった、特にMLC2a陽性細胞が認められなかった(B)。この結果は、非接着のNon-adherent cellsにANP陽性細胞が含まれることを示す。心房を形成する細胞は、Non-adherent に多く含まれている可能性が示唆された。

組織化を阻害すると心組織マーカー発現は低下する



心臓前駆細胞
ISL1+
NKX2.5+
心臓領域の全ての細胞に分化誘導が可能



③ [心臓の組織形成(オルガノイド)の可能性について評価した]

PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて心筋分化誘導した。前培養でLN521+mTeSRを用いると心臓前駆細胞のマーカー-ISL1とNKX2.5のmRNAは高くなった。培養上清をAmicon-Ultra15(10K)(Merck Millipore)を用いて10倍濃縮して心臓関連検査を行うとANPやBNPなど心臓が分泌するホルモン濃度も高くなった(C)。この結果は、心臓の組織形成(オルガノイド)が促進されたと考えられた。心筋マーカーのTNNT2は前培養でE8を用いた場合タンパク質発現は増加した(B)。培地によるiPS細胞の細胞増殖、細胞死への影響は認められなかった(F)。

前培養培地はその後の心筋の組織分化に影響を与える

⑥ [方法]

- ・ iPS細胞：CFIS-S01株(iPS細胞研究財団)
- ・ 臨床用iPS細胞用培地を用いた前培養培地の作製：

StemFit AK03N			
A	B	C	
https://www.ahs.jp/omoto.com/products/stemfit.html			
Pattern No.1	1/1	1/1	1/1 → StemFit AK03
Pattern No.2	1/1	1/1	1/10
Pattern No.3	1/1	1/4	1/4
Pattern No.4	1/10	1/10	1/1
Pattern No.5	1/4	1/1	1/1
Pattern No.6	1/5	1/5	1/1
Pattern No.7	1/2	1/2	1/1

臨床向けの細胞製造に使用可能な材料として、StemFit AK03(味の素)を選び、そのA液、B液、C液の配合を変えて前培養培地を作製した。

臨床用の前培養培地を作製した

⑧ [臨床用前培養培地で心筋分化について評価した]

心筋細胞の分化誘導に以下の分化誘導培地を用いた。心筋分化誘導培地(Day12にサンプリングを行った)
Day0 12μM CHIR99021, RPMI/B-27 without insulin
Day1 RPMI/B-27 without insulin
Day3 2μM XAV939, RPMI/B-27 without insulin
Day5 RPMI/B-27 without insulin
Day7 RPMI/B-27 with insulin

No.1-7の臨床用前培養培地で培養後に分化誘導した心筋細胞の12日目の写真(A)。12日目の細胞数と細胞生存率(C)。心組織の評価として用いたマーカーの組織発現部位の図(D)。フローサイトメトリーでTNNT2陽性細胞の割合が低いNo.6とNo.7(G)は、分化誘導12日目のmRNA発現で中胚葉マーカーのBrachyury(T)、心臓前駆細胞マーカーのNKX2.5、心筋マーカーのTNNT2が高い傾向が認められ(B)、幼若細胞と成熟細胞の混在が示唆された。フローサイトメトリーでTNNT2陽性細胞の割合が高いNo.2、No.3では分化誘導12日目のmRNA発現で心臓前駆細胞マーカーのISL1が高い傾向が認められた(B)。この結果は、ISL1が高いことがTNNT2陽性細胞の割合を高めることを示唆した。Gの結果を比較するために、結果E(③の結果)と、結果F(④の結果)を示す。

臨床用の前培養培地のEssential 8様の組成のNo.2とNo.3では共にTNNT2陽性率が増加する

培養培地の解析によるiPS細胞から分化誘導した心筋細胞の分化特性評価

謝辞

本研究は、AMEDの課題番号JP 24bm1323001の支援を受けました。
本研究は、多くの寄付者様の多大なご支援により実施されました。

筆頭演者は、過去1年間(1月〜12月)において、
本演題の発表に関して開示すべきCOIはありません。

iPS細胞研究財団
中島 義基