iPS細胞の凍結・解凍方法の検討

山下優美、 塚原正義 上田杏菜、

(京都大学iPS細胞研究財団)

CiRA Foundation

はじめに

題:iPS細胞の解凍後の生存性(接着し増殖する細胞の割合)が悪い。

的:凍結・解凍方法を改良し、生存性向上。

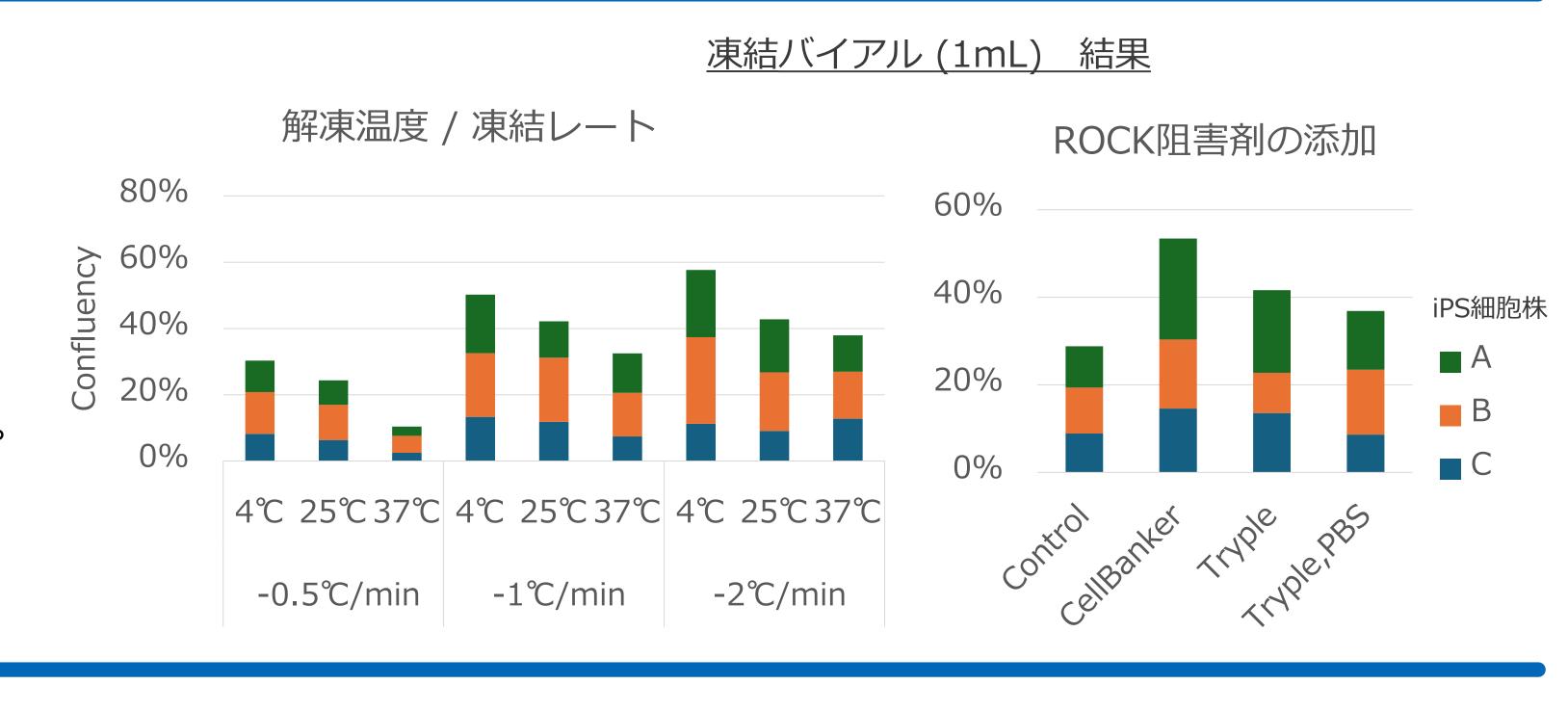
景:バイアル(1mL)を用いたこれまでの結果(右図)

緩慢解凍やROCK阻害剤の添加により生存性向上を確認。

◆ 本報告:自動培養装置用の閉鎖系50mLバックを用いて同様の検討を実施。

併せて細胞品質への影響を評価。

方法



【培養】

※今回は手動で実施

【凍結】



懸濁し、プログラムフリー ザーを用いて凍結。

【解凍】



ウォーターバスや恒温槽等を 用いて、凍結バイアルの中身 が完全に溶けきるまで静置。

【解析:細胞生存性】



解凍後のiPS細胞を6well plateに 6.5×10⁴cells/wellで播種。 4日目にIncucyte®でConfluency解析。

【評価:分化能】

心筋細胞、ドパミン 神経前駆細胞への 分化誘導実施。 (財団HPに記載)





結果【細胞生存性】

凍結レート 解凍温度 凍結・融解 80% 8.0% 35% 30% 60% 6.0% 25% Conflue 40% 4.0% 20% 20% 15% 2.0% 10% 0% 0.0% 5% 紫竈 淡 淌 0% 4°C 25℃ 37℃ -2°C/min -0.5℃/min ROCK阻害剤 ROCK阻害剤 iPS細胞株AのDay4 Confluency . 80% 20% 60% 15% 10% 20% 0% 5% ROCK阻害剤 ROCK阻害剤 0% 添加なし 添加あり

- 凍結バッグの場合であっても、バイアルと同等の結果が得られた。
- -2℃/minの急速凍結・4℃での緩慢解凍が細胞生存性が高い。
- 細胞融解装置(VIAThaw)を用いての解凍では4℃と同程度。
- トリプシン、PBS、CELLBANKERにROCK阻害剤の添加は有効。

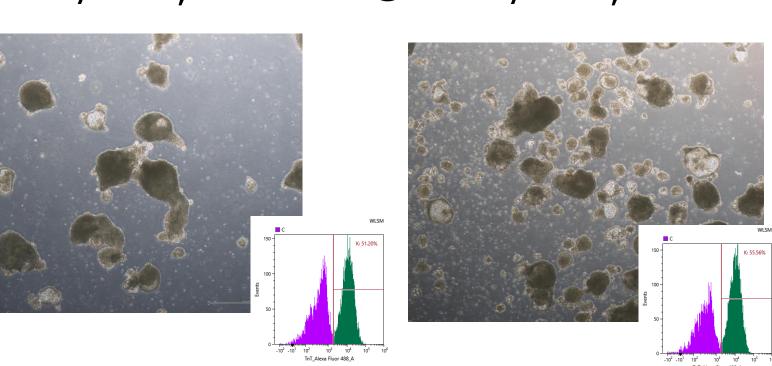
【分化能】

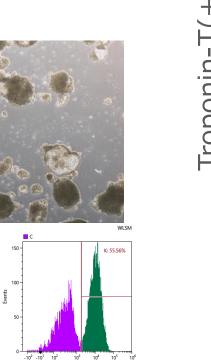
①-0.5℃/min,37℃(緩慢凍結・急速解凍) ② -2℃/min, 4℃(急速凍結・ 緩慢解凍)で凍結・解凍したiPS細胞について分化誘導を実施。

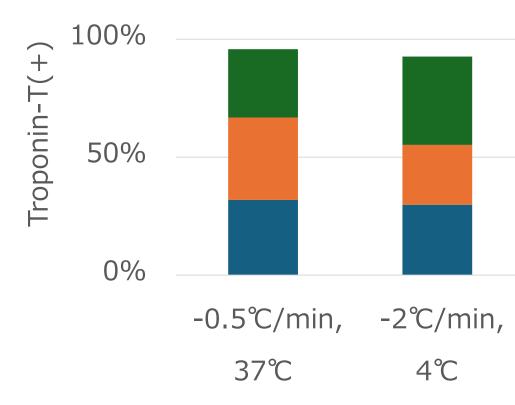
【心筋細胞】

-0.5℃/min,37℃

② -2℃/min, 4℃

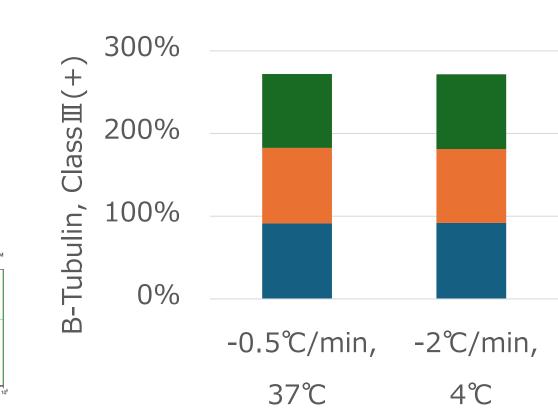






【ドパミン神経前駆細胞】

② -2℃/min, 4℃ ① -0.5℃/min,37℃



● 凍結・融解条件による分化誘導効率に差は見られなかった。

まとめ

- 凍結バッグにおいても急速凍結・緩慢解凍条件が細胞生存性が高い。
- 細胞剥離試薬へのROCK阻害剤の添加は有効。
- 凍結・融解条件が品質へ与える影響は少ない。
- バッグの方が解凍時の温度の影響が大きい。

課題と今後の展開

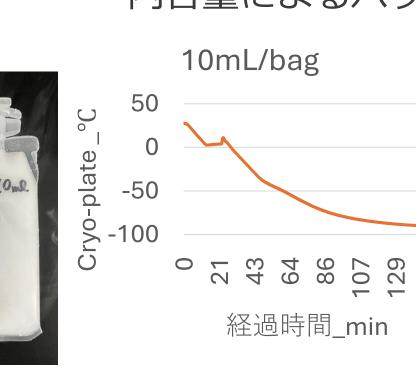
【凍結】

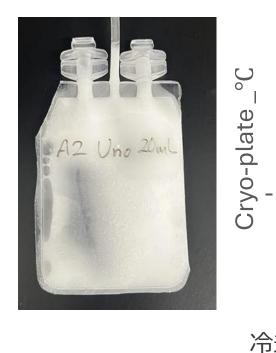
- ✓ 内容量(10mL,20mL)が多くなると急速凍結が困難。
- ✓ 一度に冷却可能なバッグに個数制限あり。
- ✓ バッグでのセルバンク専用の凍結装置が必要。

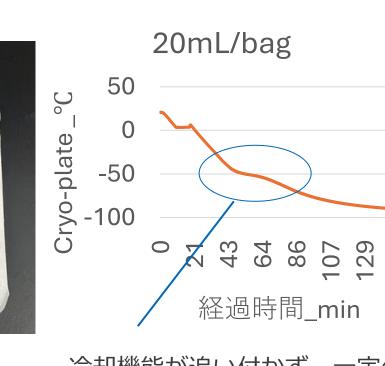
【解凍】

✓ 厚みが均等にならないため、解凍時にムラがでる。

内容量によるバッグの凍結状態の違い







冷却機能が追い付かず、一定の レートで冷却できていない

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。