

足場材料としてパターンドットを生かした 臨床用iPS細胞製造の品質管理を制御する 仕組みの理解をめざして

¹公益財団法人 京都大学iPS細胞研究財団(CiRA_F) 細胞調製施設 (FiT)
²積水化学工業株式会社,³京都大学 高等研究院物質-細胞統合システム拠点
○中島 義基¹,塚原 正義¹,羽根田 聡²,井口 博貴²,清水 英子³,Minh NT Le³

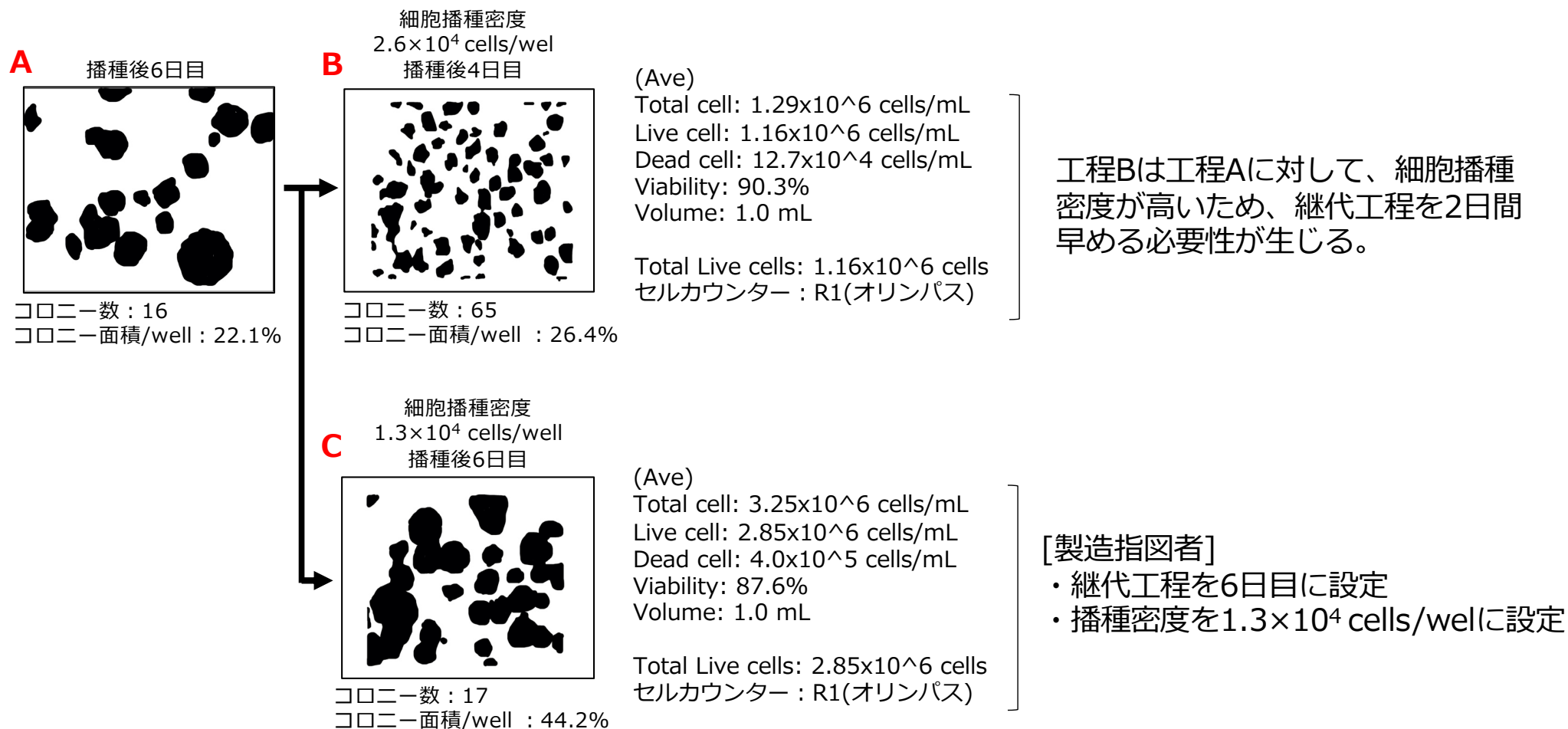
第20回日本再生医療学会総会

筆頭著者のCOI開示

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。

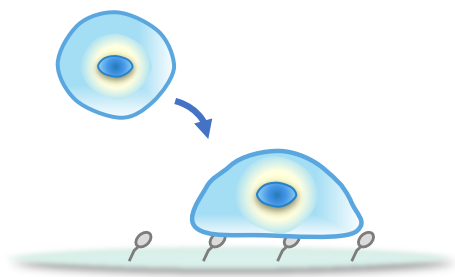
我々は、臨床向けiPS細胞の工業化製造に取り組んでいる。iPS細胞のコロニー形態は細胞の品質を示す指標として重要性が認識されており、通常、ラボでは直径約1mm大の類円形のコロニーが継代に用いられている。一方、臨床用iPS細胞は直径約0.5mm大で継代されることも多い。コロニーが播種されて継代されるまでの日数は特に臨床用iPS細胞製造スケジュールや品質に極めて大きな影響を与える。①細胞の播種密度(cells/mL)、②コロニーの直径(/mm)、③培地交換の頻度(回/day)または(mL/cm³/h)、④溶存酸素濃度(mg/L)、⑤継代間の日数(pass/days)。これら5要素はiPS細胞のタイプ(A)、細胞増殖速度(B)、培地組成(C)や足場材料の素材(D)、足場材料の形状(E)に影響を受ける。①-⑤の5要素は製造指図者が意図的に指示可能な培養条件の設定値である。一方で、(A)-(E)の5要因もまた臨床用iPS細胞製造スケジュールや品質に大きな影響を与える。本研究では、上記変数と因子の組み合わせをデータとして取り扱うために臨床用iPS細胞の製造を意識していくつかの培養条件を設定し、その上で、「②コロニーの直径」の規格化を図った。試験材料としてケミカルコーティングが施された4種類のドットサイズ(μm)を持つパターンプレート(積水化学工業株式会社)を用いた。細胞播種後、各プレートにおける分化細胞の出現率、アポトーシス細胞、ネクローシス細胞、生細胞の出現率を蛍光顕微鏡画像にて取得した。

臨床用iPS細胞製造の課題



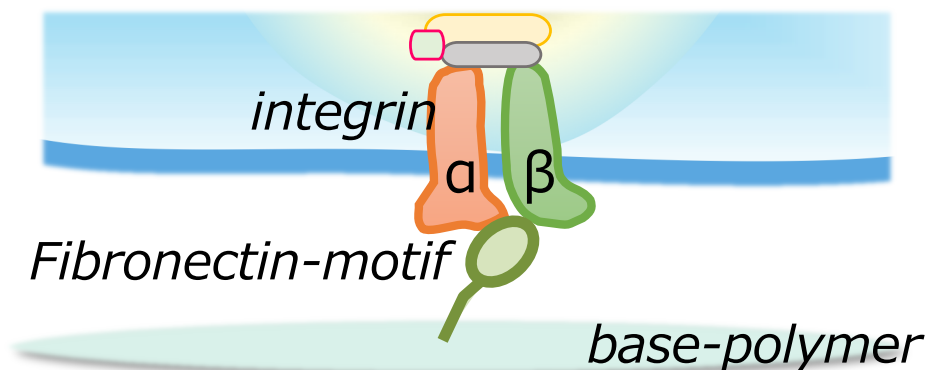
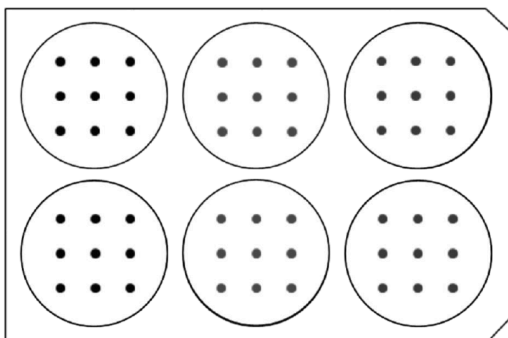
現行では、「セルカウントデータ→製造スケジュール管理→細胞品質管理」が重視されている。しかし、セルカウントデータは、細胞剥離前に取得できない。長期製造工程の管理や将来的な工程管理の自動化を目指すため、我々は「コロニーの直径の規格化」に着目した。

コロニーサイズの規格化のため、試験にパターンプレートを用いた。



フィブロネクチンモチーフ修飾PVB

KT-003, 004, 005, 006: パターニング品



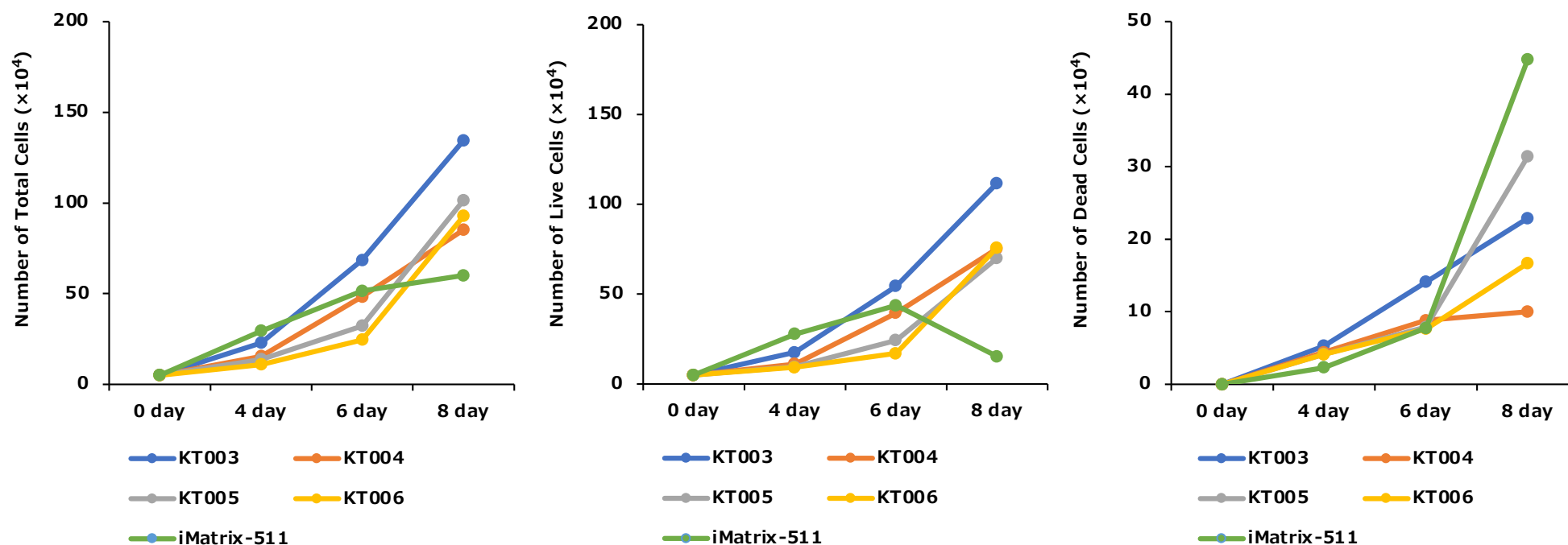
	プレート内容	ドットサイズ (μm)	ドット数 (個)	総接着面積 (cm^2)	枚数
KT-003	6wellPlate	500	638	1.2	5
KT-004	6wellPlate	1000	154	1.2	5
KT-005	6wellPlate	1500	69	1.2	5
KT-006	6wellPlate	2000	40	1.2	5

ケミカルコーティングが施されたドットサイズ(μm)を持つパターンプレート：(積水化学工業株式会社)

一般的な6 wellプレートの底面積は 9.5cm^2 。全てのパターンプレートは総接着面積が 1.2cm^2 に規定されており、wellの底面は面積の12.6%がインテグリン活性化による細胞接着面である。

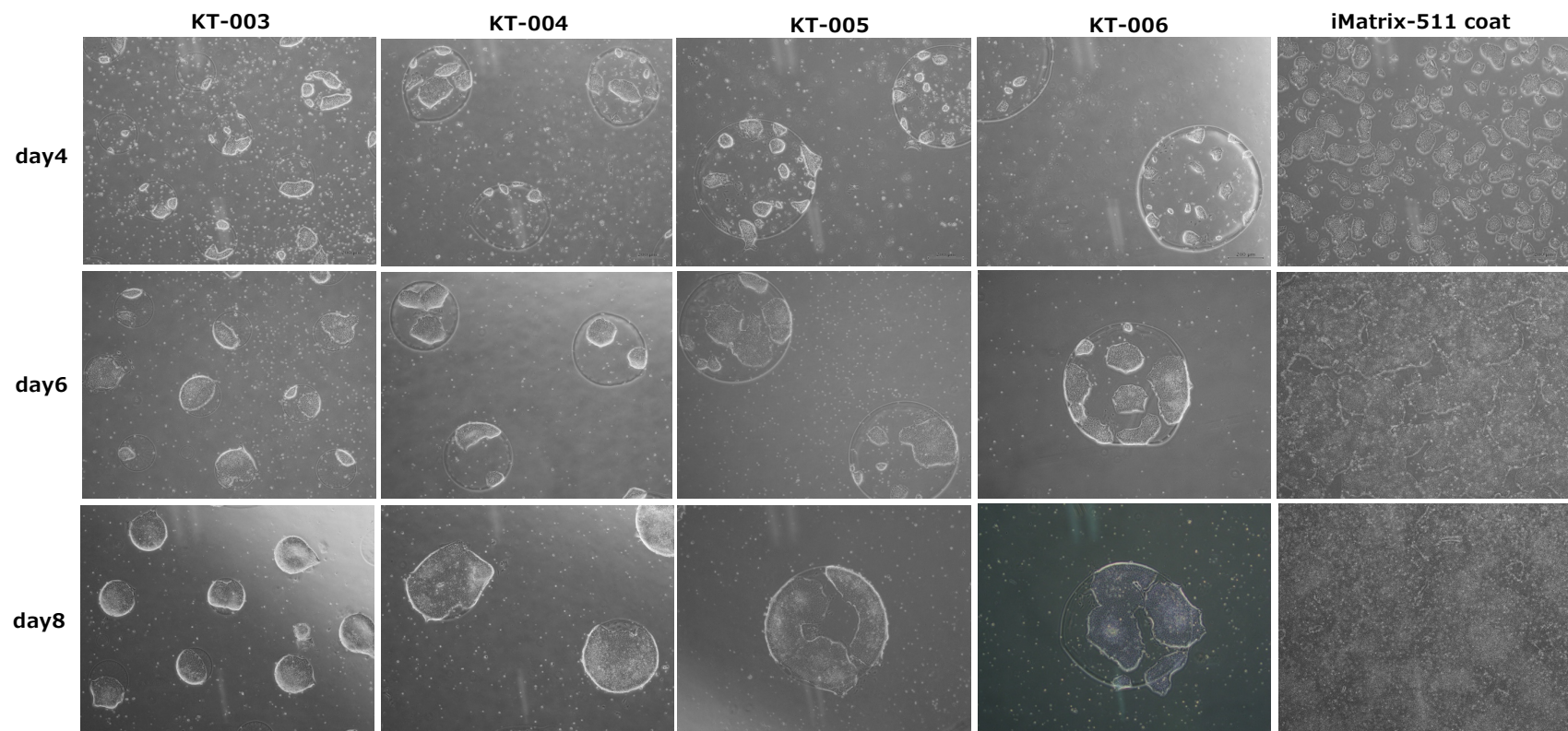
培養挙動評価・細胞増殖の挙動 (セルカウント)

臨床用iPS細胞の研究用細胞株である15M66細胞を用いて試験を行なった。15M66細胞(P6)をパターンプレートへ播種 (5×10^4 /well)後、day4,6,8における細胞数カウントデータを示す。全細胞数(左図)、生細胞数(中央図)、死細胞数(右図)。臨床用iPS細胞の一般的な培養方法に準じて、iMatrix-511(マトリクソーム)コーティングプレート($9.2 \mu\text{L}/\text{well}$ [6 well])に播種した細胞数をパターンプレートのドット総接着面積(1.2cm^2)に換算しコントロールとして折れ線グラフ中で緑色の線で示した。



全てのパターンプレートは細胞播種後、8日目をピークに 1×10^6 cells/wellまで細胞が増殖した。この結果、パターンプレートの総接着面(1.2cm^2)に対するコンフルエント状態でのiPS細胞接着細胞数は、 1×10^6 cellsであった。また、細胞播種数に対して培養8日目の接着細胞数は播種細胞数の2倍弱であった。day 6, 8における死細胞の出現数はiMatrix-511コーティングプレートと比較して少なかった。

培養挙動評価・細胞増殖の挙動(顕微鏡観察)

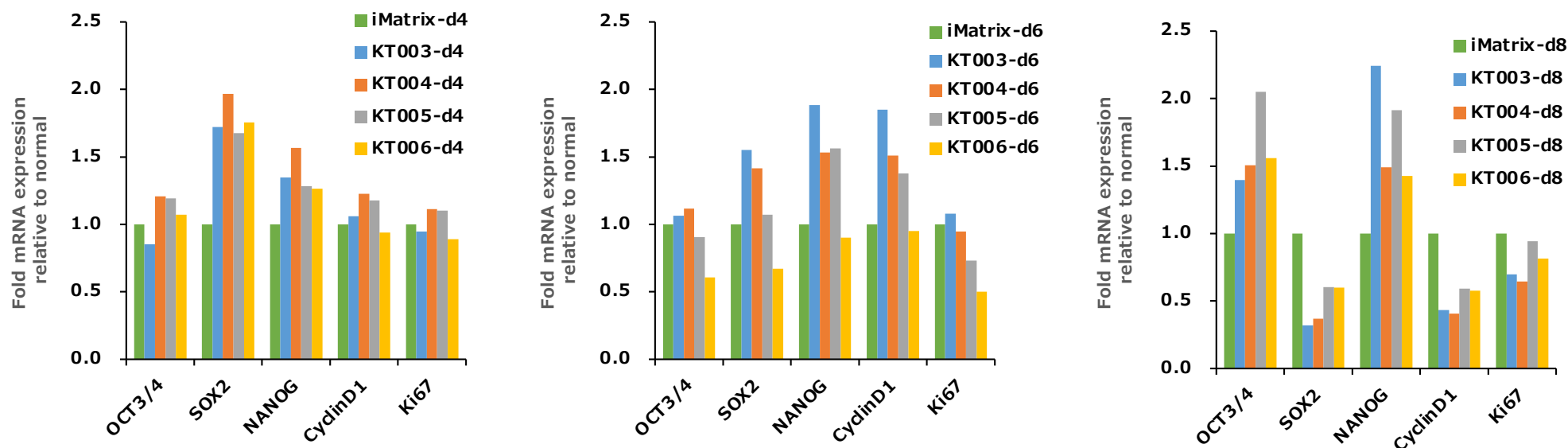


15M66細胞(P6)を各種のパターンプレートへ播種(5×10^4 /well)後、day4,6,8における光学顕微鏡写真($\times 40$ 倍)を示す(上図)。臨床用iPS細胞の一般的な培養方法に準じて、iMatrix-511(マトリクスーム)コーティングプレート($9.2 \mu\text{L}/\text{well}$ [6 well])に播種した細胞の写真を右列に示す。

全てのパターンプレートにおいて、複数のコロニーが癒合してドットサイズのコロニーが形成された。Day8には、ドット内はコンフルエント状態が確認された。

未分化マーカー・細胞増殖マーカーのmRNA発現量

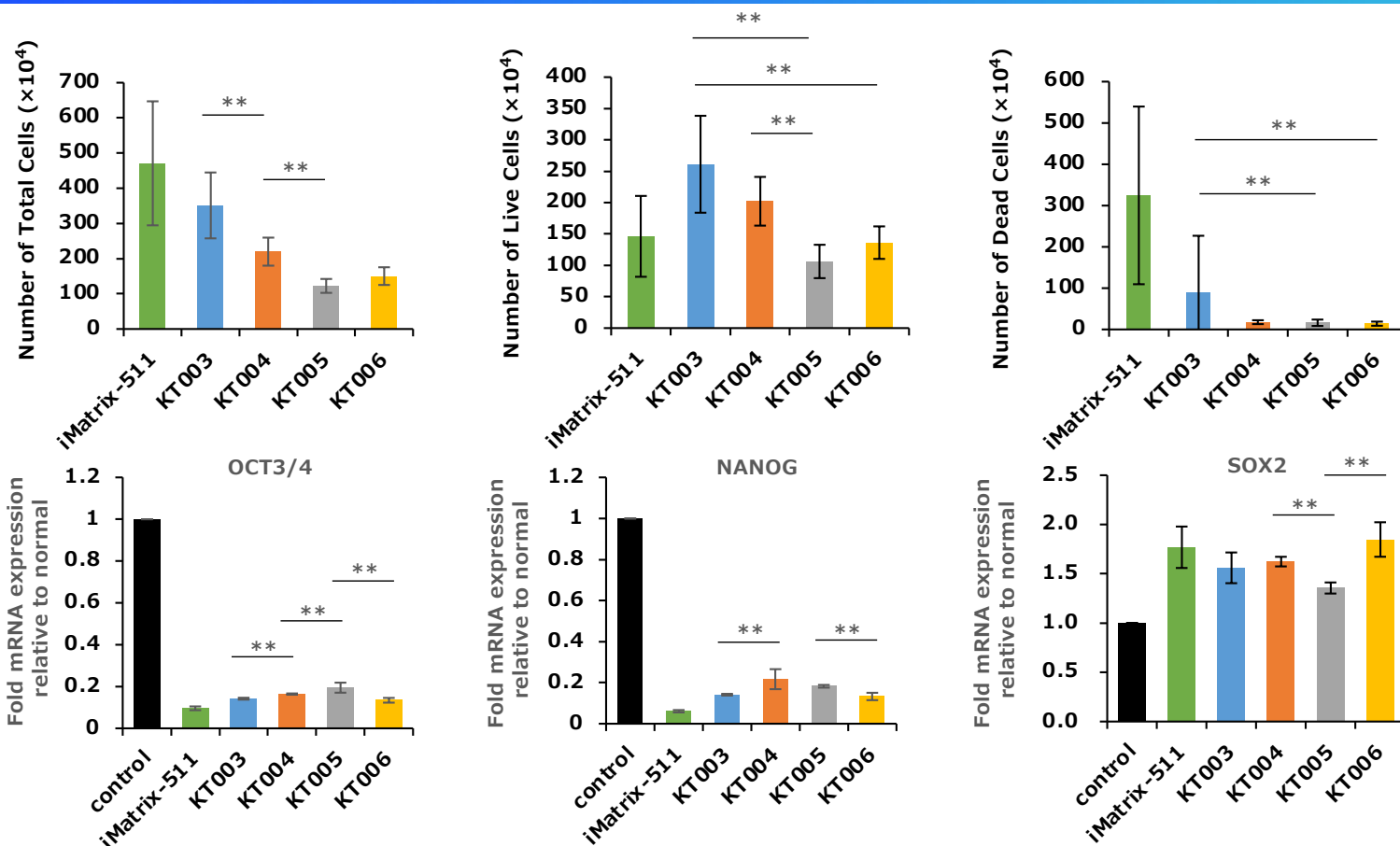
15M66細胞(P6)をパターンプレートへ播種(5×10^4 /well)後、day4,6,8におけるmRNA解析データを示す。臨床用iPS細胞の一般的な培養方法に準じて、iMatrix-511(マトリクスーム)コーティングプレート(9.2 μ L/well[6 well])に播種した細胞の、day4,6,8におけるmRNA発現量をコントロールとした。細胞播種後、day4(左図)、day6(中央図)、day8(右図)の解析結果を示す。



Day4では、全てのパターンプレートにおいて、コントロールと比較して未分化マーカーSOX2とNANOGのmRNA発現量が増加した。Day6では、KT003とKT004において、コントロールと比較して未分化マーカーSOX2とNANOGのmRNA発現量が増加した。KT003、KT004、KT005において、細胞増殖マーカーCyclinD1のmRNA発現量が増加した。この結果は、Day6において、コントロールでの培養細胞がコンフルエント状態になったことが影響と考えられた。Day8では、全てのパターンプレートにおいて、コントロールと比較して未分化マーカーOCT3/4とNANOGのmRNA発現量が増加した。その一方で、全てのパターンプレートにおいて、コントロールと比較して細胞増殖マーカーCyclinD1とKi67のmRNA発現量が低下した。この結果は、パターンプレートのドット内でコンフルエント状態となったiPS細胞は、細胞増殖が抑制され、未分化マーカーの発現量がコントロールと比較して増加していることを示す。

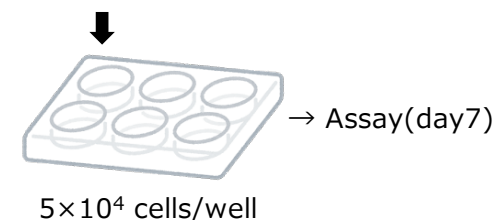
培養挙動評価

(培地交換を行わない7日間の培養) 細胞数と未分化マーカー発現量



15M66細胞(P7)をパターンプレートへ播種(5×10⁴/well)[Y-27632(10mM) 1.5μL +StemFitAK03 12mL/well(6 well)]後、培地交換をせず7日間培養を行い、day7における細胞数、およびmRNA解析データを示す[n=6]。臨床用iPS細胞の一般的な培養方法に準じて、iMatrix-511(マトリクス)コーティングプレート(9.2 μL/well[6 well])に播種した細胞を通常通りに7日間培地交換を行い、day7におけるmRNA発現量をコントロールとした。総細胞数(上段左図)、生細胞数(上段中央図)、死細胞数(上段右図)。Day7におけるmRNA解析結果(下段)。各グループ間の測定値をT検定し、有意差があった項目の一部をグラフ中に記載した。

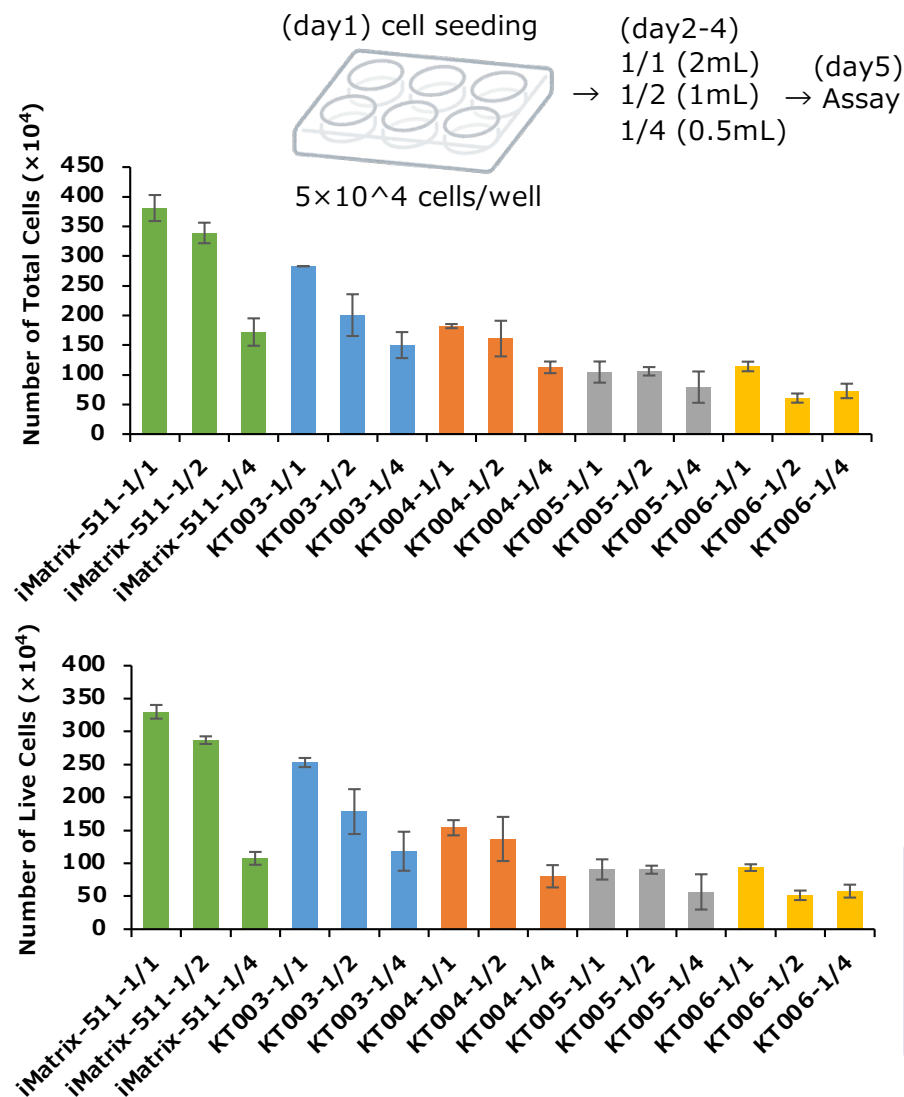
- Y27632(10mM)1.5μL
- StemFitAK03 12mL/well



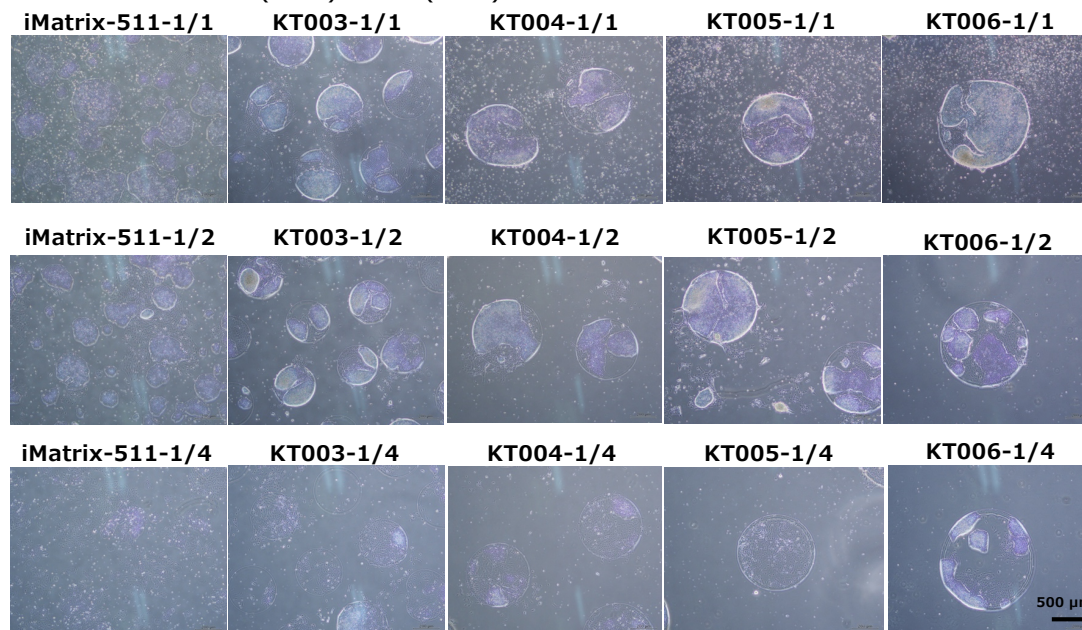
培地交換を7日間行わない条件下では、KT003とKT004はKT005と比較してday7における生細胞数は多かった。Day7における総細胞数は、パターンプレート間ではKT003とKT004は、KT005に比べて有意に多かった。ドットサイズの小さいKT003はドット数が638個有り、ドット数69個を持つKT005よりも約10倍多いことから細胞播種直後にドットに付着できた細胞の割合が高かったと考えられた。一方、KT005とKT006はKT003に比べて培養7日目の死細胞数が有意に少なかった。全てのパターンプレートにおいて、OCT3/4とNANOGのmRNA発現量はiMatrix-511を用いた培養グループよりも高かった。

培養挙動評価

(培地量を 1/1, 1/2, 1/4に減らした培養)



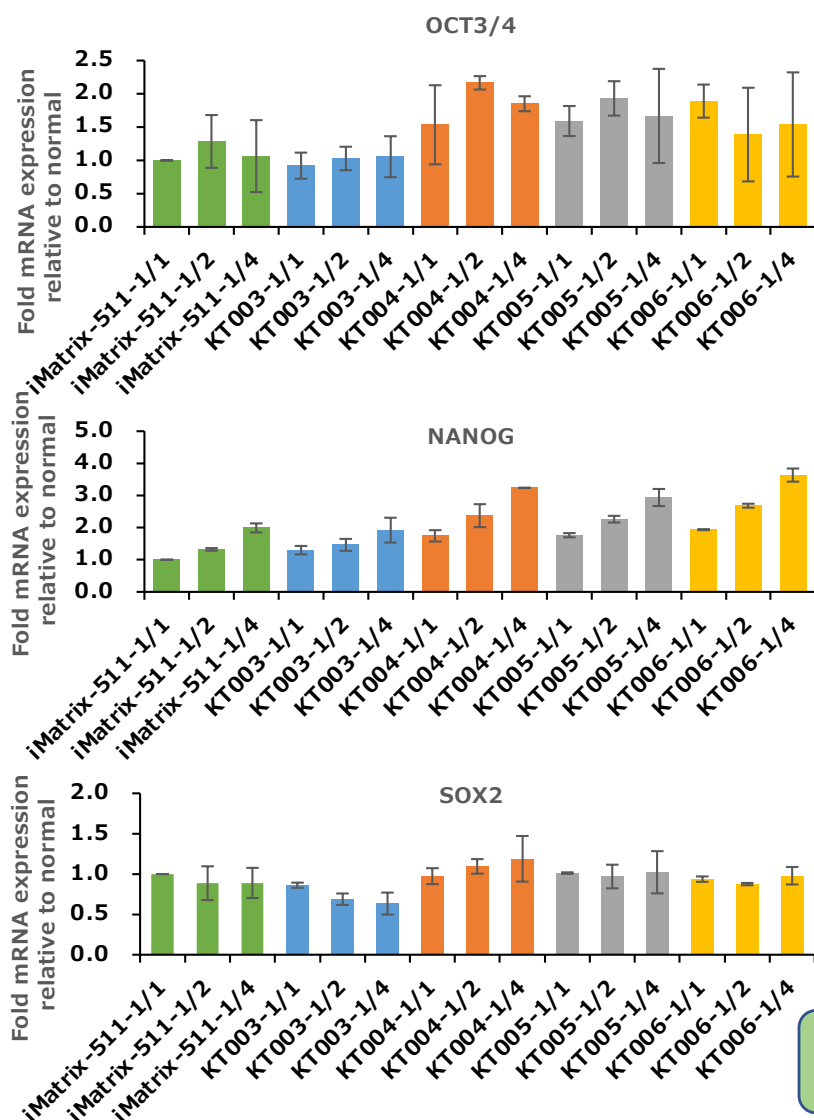
15M66 細胞 (P9) をパターンプレートへ播種 (5 × 10⁴/well)[Y-27632(10 μM)+StemFitAK03 1.5 mL/well(6 well)]後、翌日より6 wellプレートの各ウェルに対して 2.0、1.0、0.5 mLのStemFitAK03を毎日培地交換した。day5における細胞数を示す[n=2]。総細胞数(左図上段)、生細胞数(左図下段)。 day5の光学顕微鏡撮影画像(×40)を示す(下図)。



iMatrix-511を用いた培養グループ、および全てのパターンプレートにおいて、総細胞数と生細胞数は、培地量1/1に対して、1/2では低下し、1/4ではさらに低下する傾向が有った。iMatrix-511を用いた培養グループに比べて全てのパターンプレートで総細胞数と生細胞数が低下したが、パターンプレートの総接着面(1.2cm²)が小さいことが理由と考えられた。一方、パターンプレート間において、総細胞数と生細胞数が共にKT003が最も多く、KT006が最も少ない傾向が有った。KT004とKT005では1 mL/dayの培地で生細胞数が維持された。

培養挙動評価

(培地量 1/1, 1/2, 1/4) 未分化マーカー発現量・Kyoto Probe 1(KP-1)



(day1) cell seeding

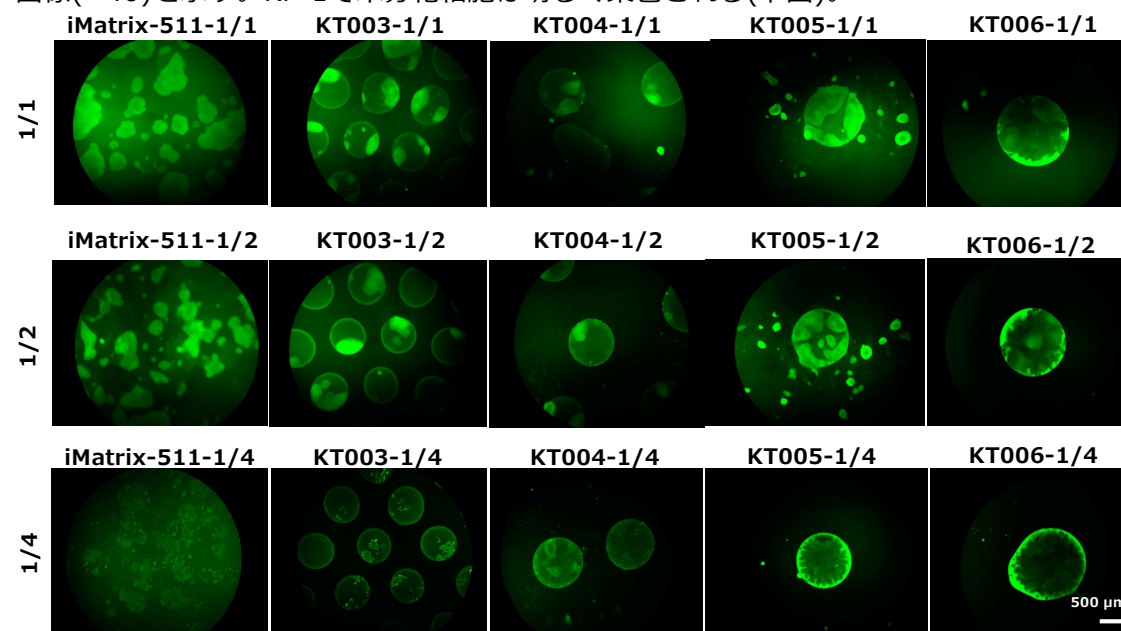


5×10^4 cells/well

(day2-4)

1/1 (2mL)
→ 1/2 (1mL) → Assay(day5)
1/4 (0.5mL)

15M66細胞(P9)をパターンプレートへ播種(5×10^4 /well)[Y-27632(10 μ M)+StemFitAK03 1.5 mL/well(6 well)]後、翌日より6 wellプレートの各ウェルに対して 2.0、1.0、0.5 mLのStemFitAK03を毎日培地交換した。day5におけるmRNA解析データを示す[n=2]。OCT3/4(左図上段)、NANOG(左図中段)、SOX2(左図下段)。Day5における蛍光顕微鏡撮影画像($\times 40$)を示す。KP-1で未分化細胞は明るく染色される(下図)。

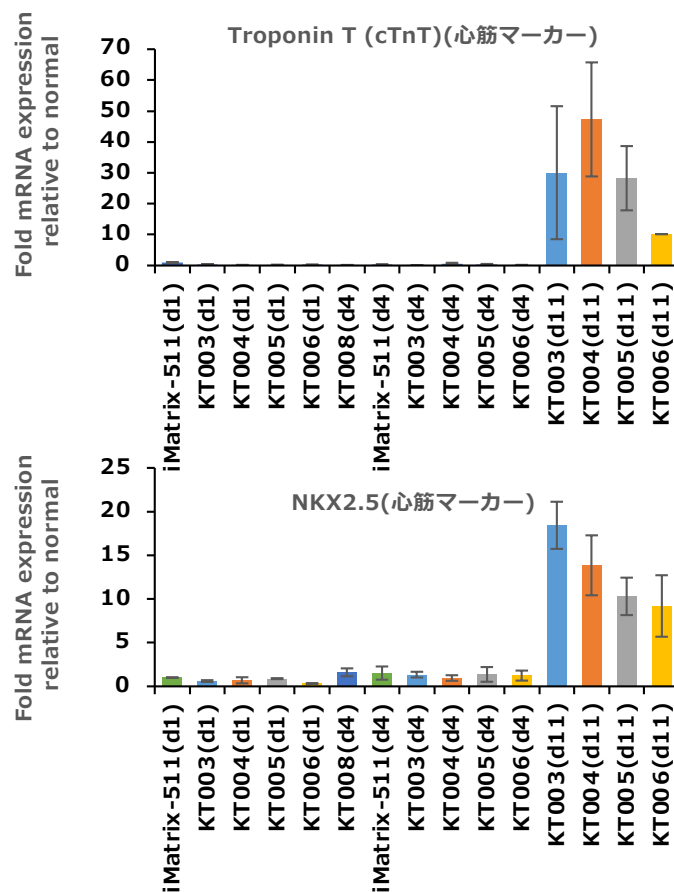
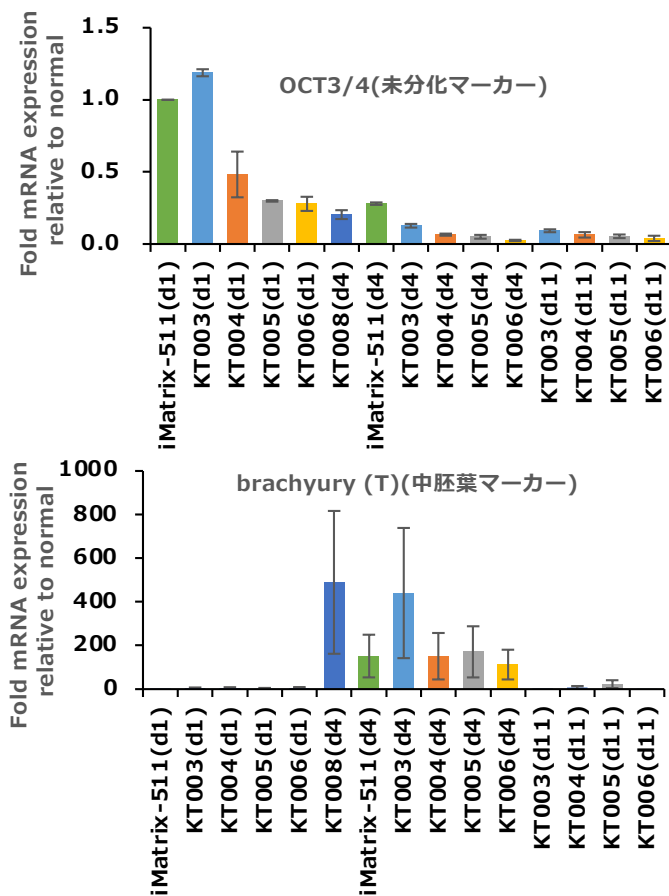


飢餓条件に生存する細胞の解析では、iMatrix-511を用いた培養グループに比べてKT004,KT005,KT006はOCT3/4とNANOG mRNAの発現量が高い傾向がある。

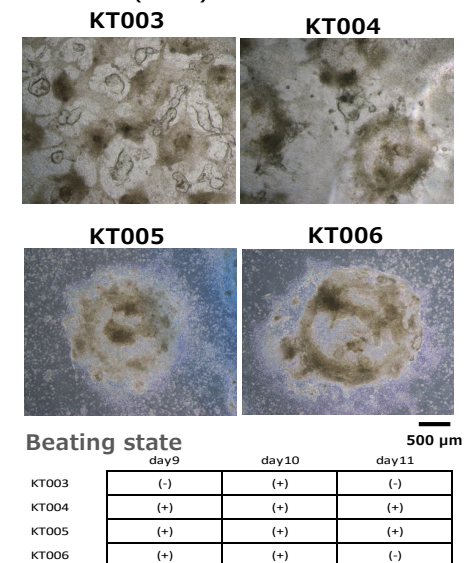
未分化品質評価(心筋分化誘導)

Cardiac Differentiation from hiPSCs protocol

day-1	day0	day1	day2	day3	day4	day5	day6	day7	day8	day9	day10	day11
StemFit AK03N	12 μ M CHIR99021 RPMI/B-27 without insulin [2mL/well(6well)]	(MC)RPMI/B-27 without insulin [4mL/well(6well)]		Add 2 μ M XAV939 into the 2 ml RPMI/B-27 without insulin		(MC)RPMI/B-27 without insulin [4mL/well(6well)]		(MC)RPMI/B-27 [4mL/well(6well)]		(MC)RPMI/ B-27 [4mL/well(6 well)]		



15M66 細胞 (P8) をパターンプレートへ播種 (5×10^4 /well) 7日後より、心筋細胞への分化誘導を行った。day1, 4, 11におけるmRNA解析データを示す[n=2](左図)。比較としてドットの表面処理をwell底面の全域へ行ったプレート(KT008)を用いた。iMatrix-511(培地添加 4.6 μ l)の足場条件で分化誘導(d1)したものをコントロールとし相対値算出の基準[1]とした。分化誘導のプロトコル(左上表)。Day11における光学顕微鏡撮影画像($\times 40$)を示す(下図)。心筋の拍動状態(下表)。



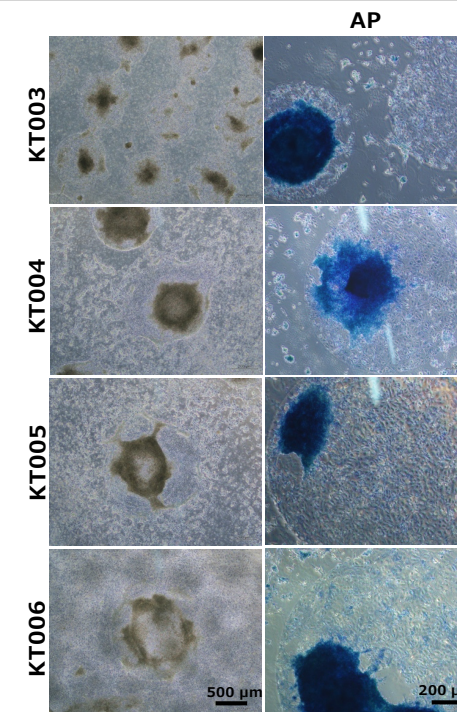
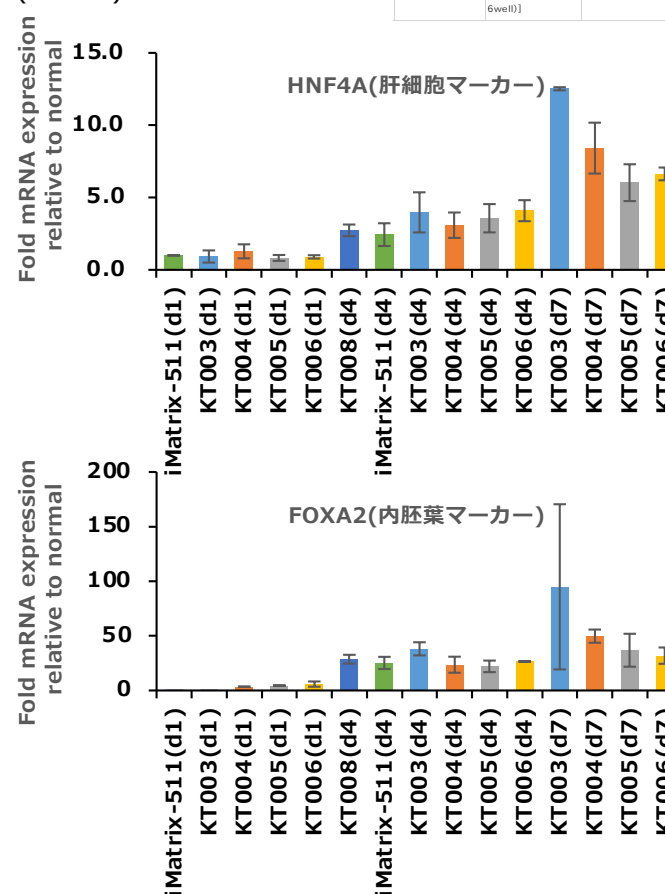
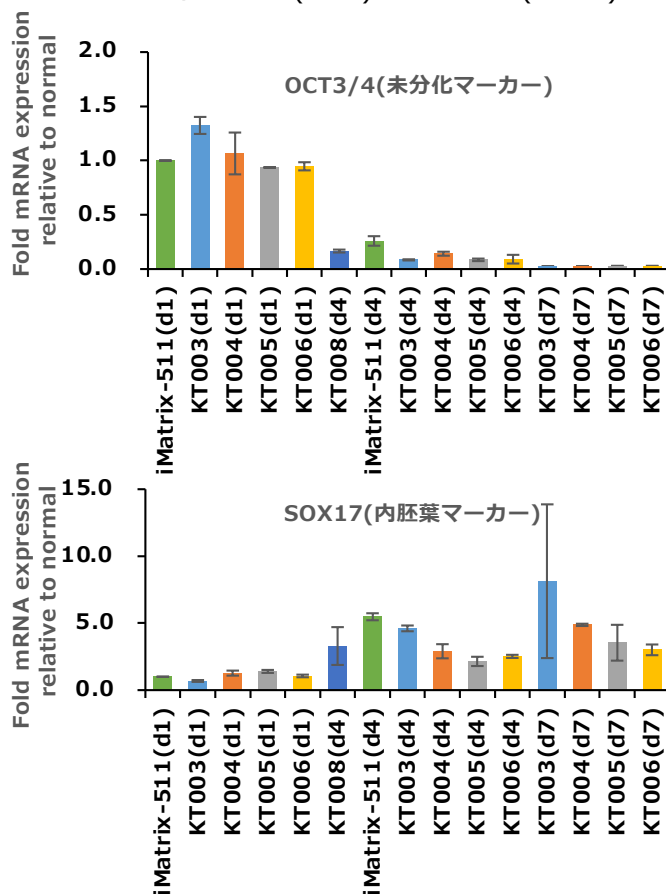
KT004はday11における心筋成熟マーカー(cTnT)発現量が最も多く分化成熟度が高い。KT003はday11で心筋前駆マーカー(NKX2.5)の発現量が最も高く分化誘導が遅延した。

未分化品質評価(肝細胞分化誘導)

15M66細胞(P8)をパターンプレートへ播種(5×10^4 /well)7日後より、肝細胞への初期分化誘導を行った。day1, 4, 7におけるmRNA解析データを示す[n=2](下図)。比較としてドットの表面処理をwell底面の全域へ行ったプレート(KT008)を用いた。iMatrix-511(培地添加 4.6 μ l)の足場条件で分化誘導(d1)したものをコントロールとし相対値算出の基準[1]とした。分化誘導のプロトコル(右表)。Day7における光学顕微鏡撮影画像($\times 40$)、AP染色像($\times 100$)を示す(右下図)。

Hepatocyte Differentiation from hiPSCs protocol

day-1	day0	day1	day2	day3	day4	day5	day6	day7
	Media: RPMI 1640 with GlutaMAX + B27 (-insulin) + NEAA (1%) + Pen/Strep (1%) with Activin A (100ng/ml), BMP4 (50ng/ml), CHIR99021 (3uM) [2mL/well(6well)]	(MC)RPMI 1640 GlutaMAX + B27 (-insulin) + NEAA (1%) + Pen/Strep (1%) with Activin A (100ng/ml), BMP4 (50ng/ml)	(MC)RPMI 1640 GlutaMAX + B27 (-insulin) + NEAA (1%) + Pen/Strep (1%) with Activin A (100ng/ml), BMP4 (50ng/ml)	(MC)RPMI 1640 GlutaMAX + B27 (-insulin) + NEAA (1%) + Pen/Strep (1%) with Activin A (100ng/ml), BMP4 (50ng/ml)	(MC)RPMI 1640 GlutaMAX + B27 (-insulin) + NEAA (1%) + Pen/Strep (1%) with Activin A (100ng/ml), BMP4 (50ng/ml)			
StemFit AK03N								



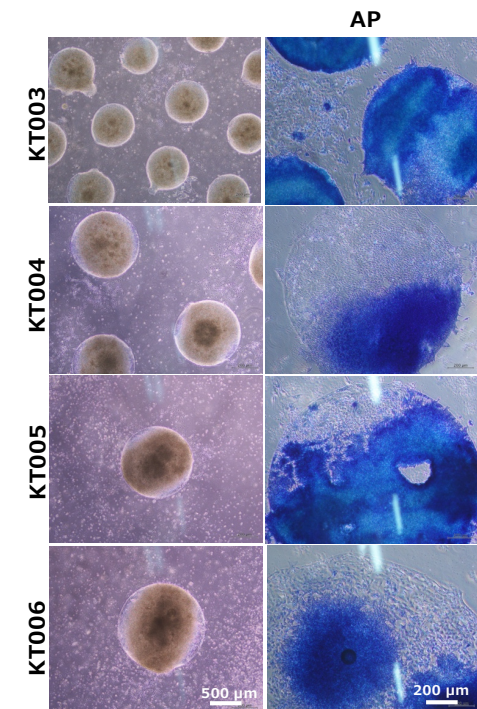
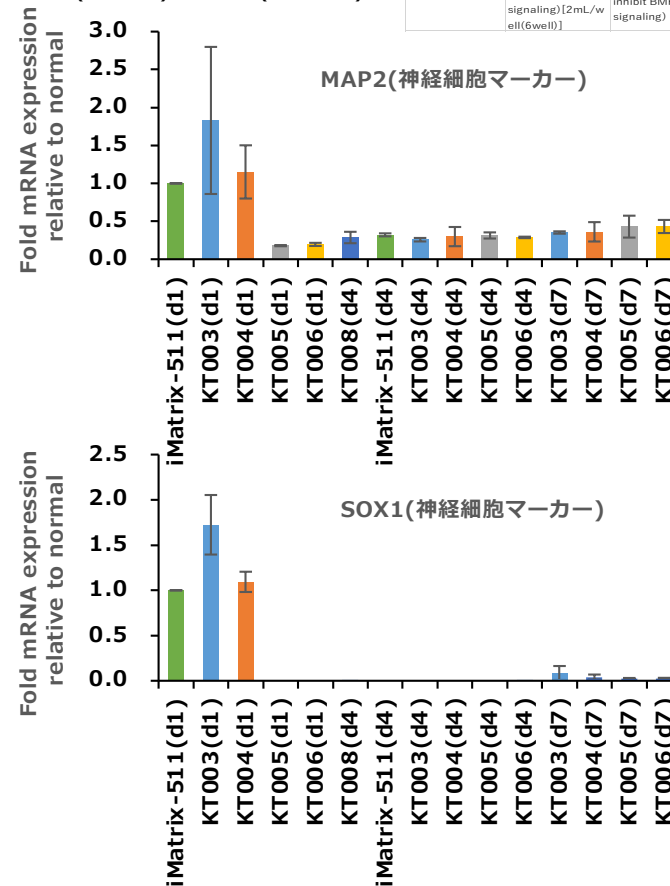
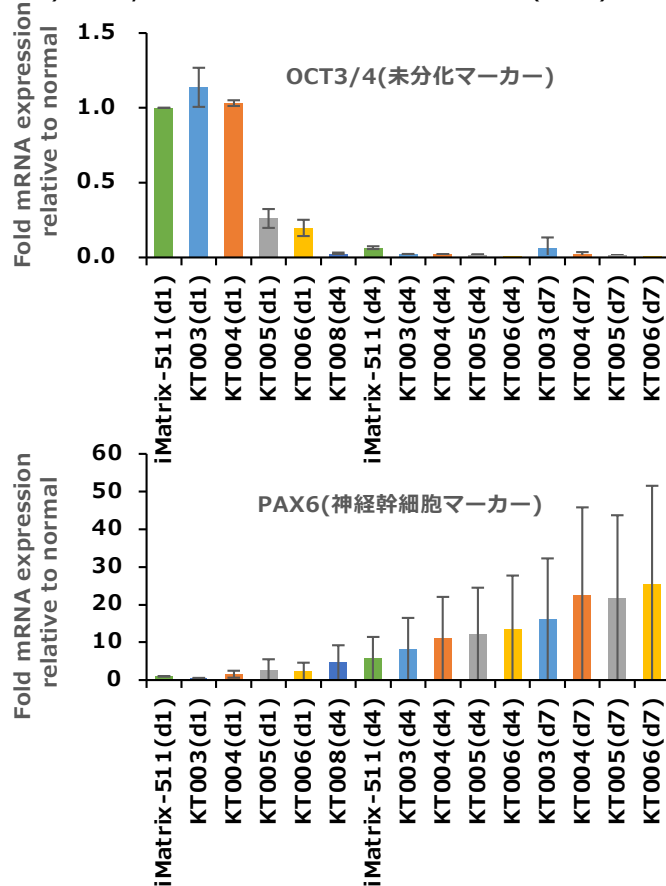
KT003とKT004は内胚葉マーカーSOX17とFOXA2、および肝細胞マーカーHNF4AのmRNA発現量は高い傾向が有る。

未分化品質評価(神経細胞分化誘導)

15M66細胞(P8)をパターンプレートへ播種(5×10^4 /well)7日後より、神経細胞への初期分化誘導を行った。day1, 4, 7におけるmRNA解析データを示す[n=2](下図)。比較としてドットの表面処理をwell底面の全域へ行ったプレート(KT008)を用いた。iMatrix-511(培地添加 4.6 μ l)の足場条件で分化誘導(d1)したものをコントロールとし相対値算出の基準[1]とした。分化誘導のプロトコル(右表)。Day7における光学顕微鏡撮影画像($\times 40$)、AP染色像($\times 100$)を示す(右下図)。

Neuronal Differentiation from hiPSCs protocol

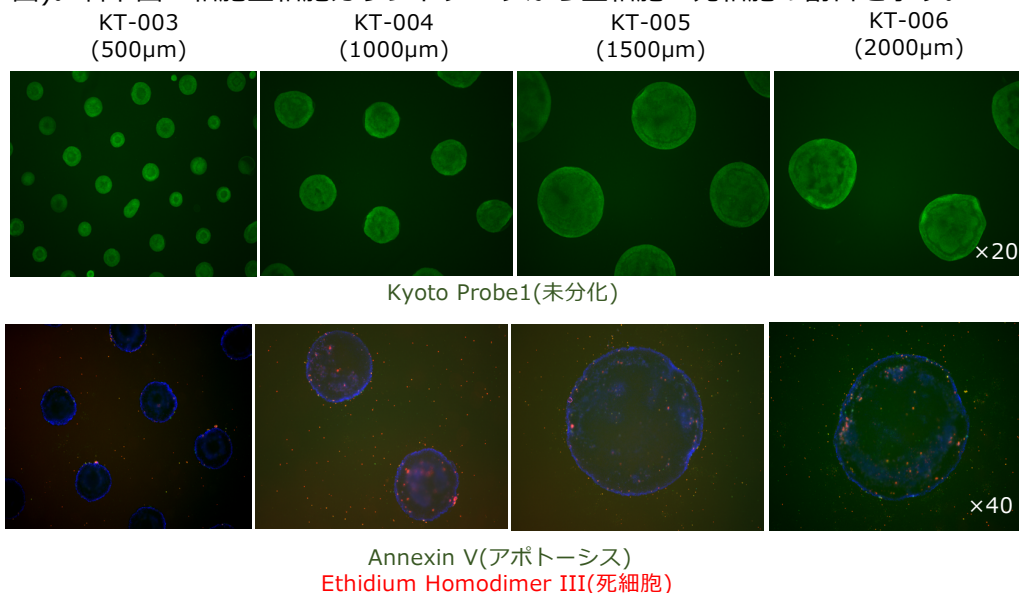
day-1	day0	day1	day2	day3	day4	day5	day6	day7
	Neural Differentiation Medium (NDM) supplemented with SB431542 (10 μ M; an ALK inhibitor inhibit TGF β signaling), and LDN193189 (100nM; a BMP receptor inhibitor inhibit BMP signaling)[2mL/well][6well]	Neural Differentiation Medium (NDM) supplemented with SB431542 (10 μ M; an ALK inhibitor inhibit TGF β signaling), and LDN193189 (100nM; a BMP receptor inhibitor inhibit BMP signaling)	(MC)Neural Differentiation Medium (NDM) supplemented with SB431542 (10 μ M; an ALK inhibitor inhibit TGF β signaling), and LDN193189 (100nM; a BMP receptor inhibitor inhibit BMP signaling)	(MC)Neural Differentiation Medium (NDM) supplemented with SB431542 (10 μ M; an ALK inhibitor inhibit TGF β signaling), and LDN193189 (100nM; a BMP receptor inhibitor inhibit BMP signaling)	(MC)Neural Differentiation Medium (NDM) supplemented with SB431542 (10 μ M; an ALK inhibitor inhibit TGF β signaling), and LDN193189 (100nM; a BMP receptor inhibitor inhibit BMP signaling)	(MC)Neural Differentiation Medium (NDM) supplemented with SB431542 (10 μ M; an ALK inhibitor inhibit TGF β signaling), and LDN193189 (100nM; a BMP receptor inhibitor inhibit BMP signaling)	(MC)Neural Differentiation Medium (NDM) supplemented with SB431542 (10 μ M; an ALK inhibitor inhibit TGF β signaling), and LDN193189 (100nM; a BMP receptor inhibitor inhibit BMP signaling)	



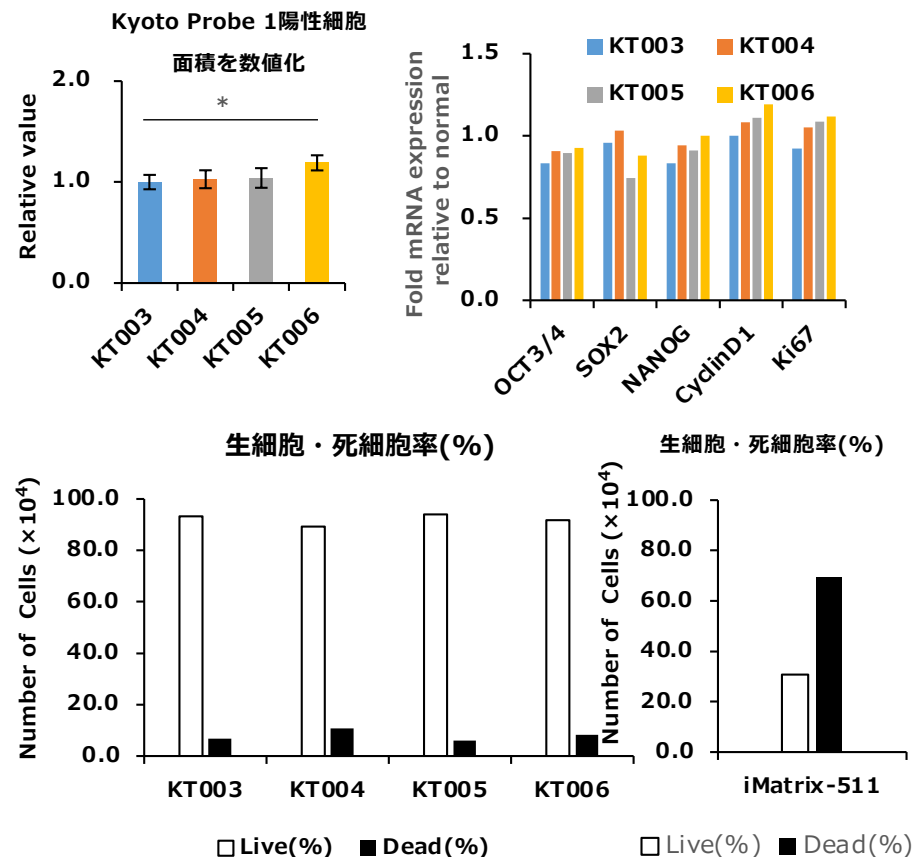
パターンプレート間での比較では、KT003に比べてKT006は神経幹細胞マーカーPAX6 mRNA発現量が高い傾向がある。

アポトーシス・死細胞、未分化状態

5×10⁴/wellの濃度で播種した15M66細胞(P3)をパターンプレートで培養後、7日目の蛍光染色画像を示す(Kyoto Probe 1：下図上段、Annexin V、Ethidium Homodimer III：下図下段)。右図：Kyoto Probe 1の陽性細胞面積を数値化した(右図)。5×10⁴/wellの濃度で播種した15M66細胞(P3)をKTプレートで培養後、7日目にmRNA発現解析を行った。コントロール：5×10⁴/wellの濃度で播種した15M66細胞(P3)をiMatrix-511コートプレートで培養後4日目の細胞を用いた(右図)。右下図：細胞生細胞カウントデータから生細胞・死細胞の割合を示す。



2000μmの巨大コロニーは未分化状態が高い。ドットパターン上には、アポトーシスや死細胞の発現は少ない。KT004,005,006の細胞増殖マーカー(CyclinD1,Ki67)発現量はコントロールに比べて高い。細胞増殖が高いグループではOCT3/4、NANOGの発現も高い傾向が認められた。



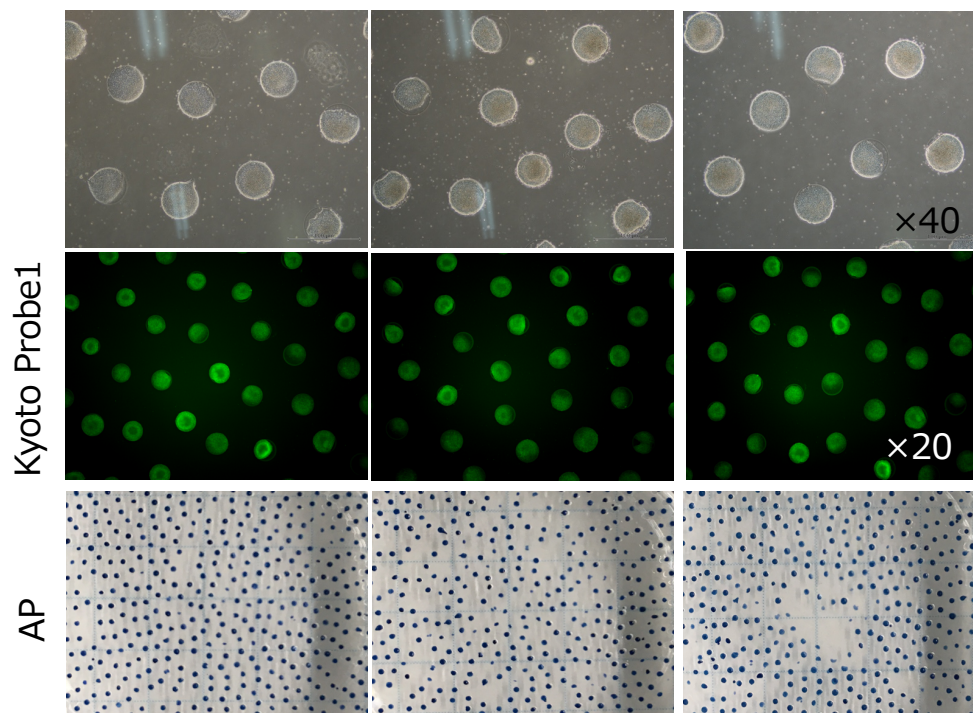
KT006に培養した細胞は、Kyoto probe 1の陽性細胞の蛍光染色強度がKT003と比べて有意に高い。高密度播種した細胞(5×10⁴/well)は、培養7日目において、iMatrix-511を用いた培養グループでは死細胞が出現する割合が増加する状況においてもパターンプレートを用いた培養条件では85%以上の細胞生存率を示した。

まとめ

プレート評価：StemFit AK3を用いての評価

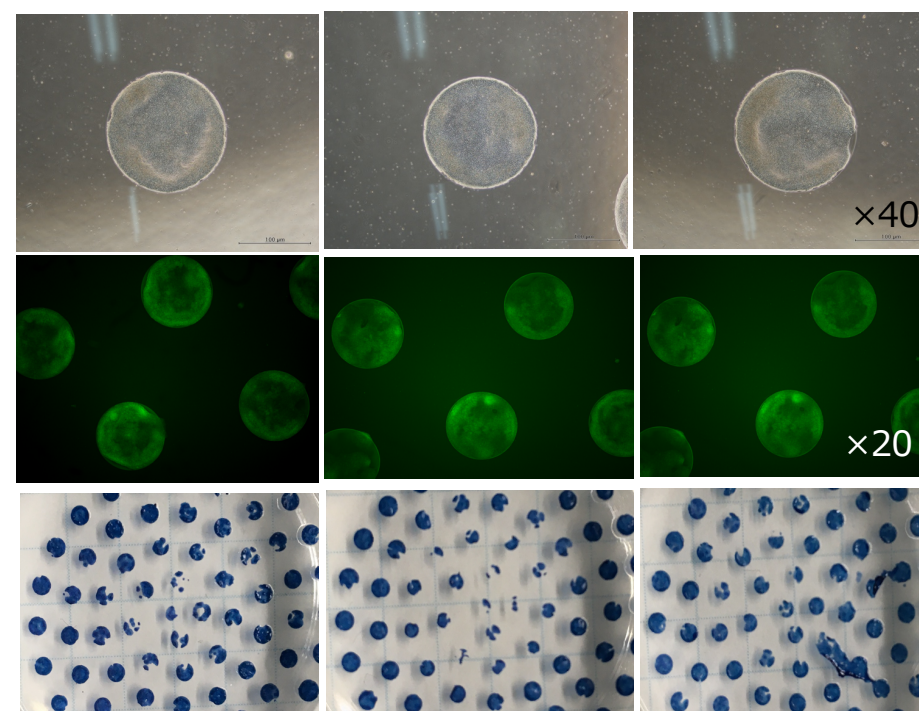
5×10⁴/wellの濃度で播種した15M66細胞(P3)をパターンプレートで培養後、7日目の蛍光染色画像を示す。上段：光学顕微鏡撮影画像(×40)、中段：蛍光顕微鏡を用いてKyoto Probe 1陽性細胞の蛍光染色画像、下段：AP染色後の肉眼撮影画像。

TK003



播種量(5×10⁴ cells/well) day7

TK005



播種量(5×10⁴ cells/well) day7

- (1) パターンプレートのドットパターンに均一なiPS細胞コロニーを認めた。
- (2) ドットパターン上のiPS細胞コロニーは未分化状態を維持した。
- (3) StemFit培地を用いてパターンプレートはiPS細胞のwell内での細胞数、細胞の未分化状態の維持を安定させた。