

## ヒトiPS由来神経細胞の小スケール解析及びダメージフリーソーティング

### Introduction

山中伸弥教授(京都大学)が皮膚の細胞からiPS細胞(人工多能性幹細胞)を樹立する方法を確立し、2012年ノーベル生理学・医学賞に輝いた事は記憶に新しい。脳医学においてiPS細胞は、ドーパミン神経細胞が減ることで発症するパーキンソン病患者への移植や、アルツハイマー病やALS(=筋いしゆく性側索硬化症)など、これまで治療が困難だった病気に効く新薬の開発に期待が高まっている。

しかし、iPS細胞を神経細胞へ分化誘導時にはニューロンやグリアなど様々な神経細胞が混在してしまい目的の神経細胞のみを分離し、評価することが困難である。現在分離精製方法に関して様々な方法が世界的に試みられており、中でもflowcytometryによる細胞分離は期待されている。しかしながら現行のflowcytometryには、①サンプル間のクロスコンタミネーションの危険、②細胞に与えるダメージなどが懸念される。そこで我々は使い捨てchipを用いたOn-Chip Sortによる分化誘導のプロセスの解析を実施した。その結果iPS細胞の神経への分化誘導過程において、表現型がドラステックに変化する事が明らかになった。またiPS細胞のSortingを実施し、ダメージフリーでiPS細胞分離とiPS細胞培養に成功した。

### Material&Methods

#### 凍結細胞の解凍と培養

プロトコルに従って凍結細胞(コリン作動性神経細胞: ReproCELL Neuro Ach RCESDA104)を解凍する。カウント後 $1.8 \times 10^5$  cells(6well分)をday0の解析用及びソーティング用とした。残りの細胞を96well Plateへ播種しCO<sub>2</sub> 37°C培養し、培養1日後に $2.1 \times 10^5$  cells(7well分)をday1の解析用とし、培養8日後に $1.2 \times 10^5$  cells(4well分)をday8の解析用とした。

#### <On-Chip Sortによる解析>

##### 0 day

$1.5 \times 10^5$  cells(A)と $3 \times 10^4$  cells(B)の2Tubeに分け、それぞれをCD24 (BD mouse anti-human CD24-FITC)及びCD44 (BD mouse anti-human CD44-Alexa700)で染色した。

(B)を、培地150µlで懸濁後、wellへ播種した(染色後controlとして)。

(A)を遠心後上清を除去して、On-chip sample buffer(On-chip #2001007)で懸濁しOn-chip sortで標準シース液(On-chip #2001006)を使用して解析を行った。

##### 1 day

$2.1 \times 10^5$  cells(7well分)をAccutase(Innovetive cell technologies)で剥がし、Cell strainerに通してからCD24及びD44で染色し、遠心後上清を除去して、On-chip sample bufferで懸濁しOn-chip sortで標準シース液(On-chip #2001006)を使用して解析を行った。

##### 8day

$1.2 \times 10^5$  cells(4well分)をAccutase(Innovetive cell technologies)で剥がし、Cell strainerに通してからCD24及びD44で染色し、遠心後上清を除去して、On-chip sample bufferで懸濁しOn-chip sortで標準シース液を使用して解析を行った。

#### <On-Chip Sorterによるソーティング>

##### 0 day

解析後、Sortingを行った。

Sorting後、回収液を遠心し(1500rpm 5min R.T)し、培地150µlで懸濁し、コーティング済み96well plateへReplateし、培養した。

## <細胞の固定と免疫染色>

14 day

Sorting後の細胞と、染色後control (B)及び染色、Sortingをしていないcontrolの3種類の細胞について免疫染色を行った。



### 固定・膜透過処理・抗体反応

4%PFAで固定後0.2%Triton液で膜透過処理する。1%BSAでブロッキングを行った後、一次抗体:Anti-β-tubulin III 1:500 (SIGMA T8660)で4°C/O/N。翌日PBS washし、二次抗体:Alexa 546 anti-mouse 1:500(Invitrogen A11030)及びDAPI 1:1000を加え60min R.T (遮光)静置。PBS wash後PBSを入れた状態で観察した。

## Results

### On-Chip Sortを用いたiPS由来神経細胞の解析

我々は、Repro Neuro(RCESDA104)  $1.5 \times 10^5$  cellsを用いてCD44とCD24の細胞集団の分布の解析を実施した(Figure 1)。解凍後すぐに染色した結果、CD44+集団が多く発現していることがわかった(Figure A-1,A-2)。Plate outした後1日経過した細胞をaccutaseで処理し、CD24 CD44で染色後の分布を確認した。(Figure B-1,B-2) その結果Day 0と比較するとCD24+集団は0.66%増え、CD44+では40.87%減少した。続いて、誘導後8日経過した細胞群をday1同様accutaseで処理し染色後解析を実施した(Figure C-1,C-2)。その結果Day 0と比較するとCD24+は5.84%増え、CD44+では29.7%減少したがday1と比較するとCD44+は11.17%増加した。その結果をFigure 2に示した。

day0 解析結果  
(CD24/CD44 2color 染色)

day1 解析結果  
(CD24/CD44 2color 染色)

day8 解析結果  
(CD24/CD44 2color 染色)

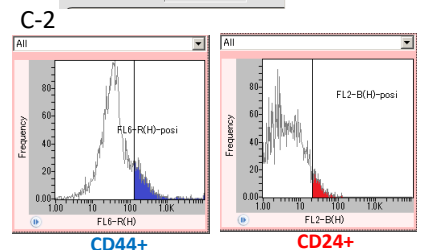
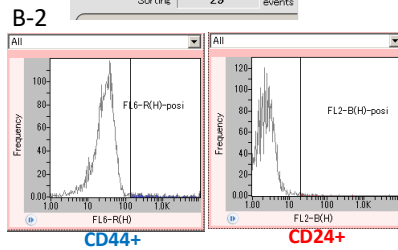
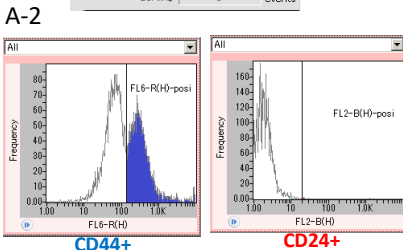
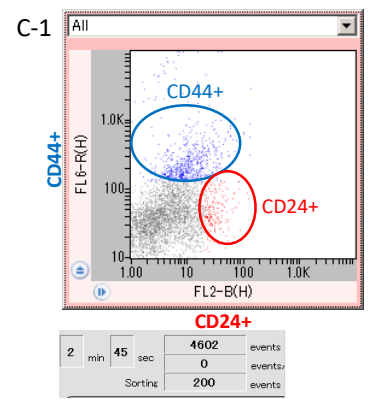
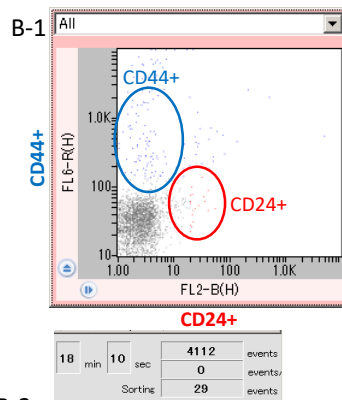
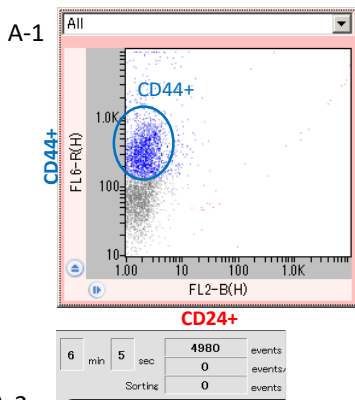


Figure1. On-Chip Sortのソフトウェアを用いたヒトiPS由来神経細胞誘導過程のプロセス解析結果。上段は(A-1,B-1,C-1)CD24,CD44のpopulationのドットプロット。下段は(A-2,B-2,C-2)CD24とCD44それぞれのヒストグラム

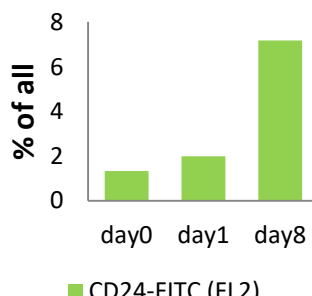
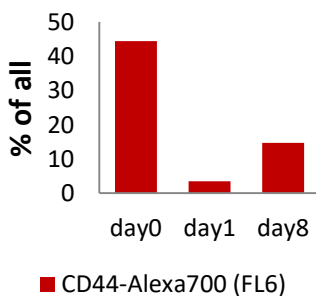


Figure2. ヒトiPS細胞を神経細胞へ分化誘導期間中の細胞集団の遷移モニタリング結果。CD44陽性細胞(左グラフ)、CD24陽性細胞(右グラフ)が、分化誘導開始(day0)からday1, day8と誘導日数に伴って、細胞の割合が変化して行く事が解った。

## On-Chip Sortを用いたiPS由来神経細胞のSorting

先の解析結果よりday0においてCD44+の分画が全体の44.4%であることが解った為、CD44+の分画のSortingを実施した(Fig 3-1)。CD44+の分画(2285 cells)をプレートへ播種し、培養を行った。(Fig 3-2-A)また、抗体の影響の比較のため、抗体染色後に細胞を播種した( $3 \times 10^4$  cells)。(Fig 3-2-B)。Fig 3Cは抗体染色及びSortingをしていないControlとして播種した( $3 \times 10^4$  cells)。  
Fig4は14日目のFig3-2-A/3-2-B/3-2-CをニューロンのマーカーであるAnti- $\beta$  tubulin IIIとDAPIで免疫染色を行った結果である。Fig 3-2及びFig4の結果より、day1、day7、day14と生育に差異が見られないことから、On-Chip SortでのSortingにおいて、ヒトiPS由来神経細胞をダメージフリーでSortingできることが確認された。

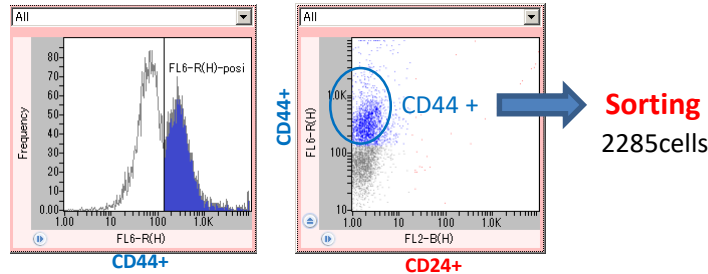


Figure 3-1. Sorting gate。CD44+集団をソーティング(右はCD24,CD44のドットプロット。左はCD44のヒストグラム)

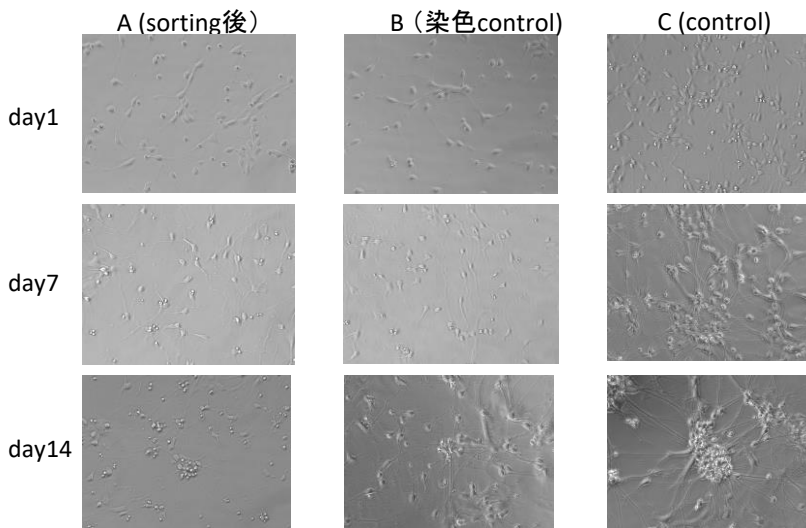


Figure 3-2. iPS由来神経細胞明視野画像。sorting後(A)、染色後(B)、解凍後(C)播種、培養後1日目、7日目、14日目のiPS由来神経細胞の明視野画像

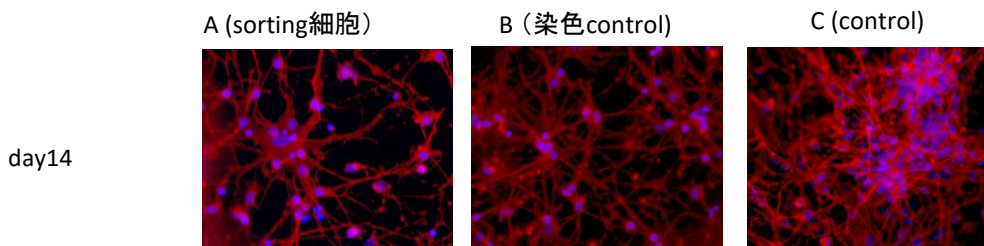


Figure 4. iPS由来神経細胞免疫染色画像(Red:Anti- $\beta$  tubulin III / Blue:DAPI)。sorting後(A)、染色後(B)、解凍後(C)播種、培養後14日目のiPS由来神経細胞の免疫染色画像

## Conclusion

On-Chip Sortを用いたiPS由来神経細胞の解析では、神経幹細胞表面マーカー候補であるCD24+ 及びCD44+ の分布がはっきりと分かれていること、また時系列ごとに分布が異なることが確認された。それは、iPS細胞がコリン作動性神経細胞へ分化する過程でのそれぞれの発現において、CD44+は早い段階で発現し、その後一旦発現が少なくなり、また発現量が増え、またCD24+は時系列で徐々に増えていくことがわかった。

またOn-Chip SortでのSortingにおいては、染色後播種した細胞及びcontrolと比較してもSorting後の細胞の生育に差がないことから、ダメージフリーでのSortingができた。

従来中枢神経系は再生能力が低く、いったん損傷すると再生は困難であるとされており、再生医療の分野では胚性幹細胞(ES細胞)を中心として多くの研究が進展してきた。しかし、ES細胞は、細胞供給源としてドナーから提供される受精卵を使用するため、倫理的な問題があるとともに、移植に利用した場合は同種異系統間移植となり拒絶反応が大きな課題となっていた。しかし山中氏等によるiPS細胞の樹立の成功による倫理的な問題・拒絶反応等の抜本的解決により、様々な神経疾患の治療において世界中で高い期待が寄せられ、中でもflowcytometryによる細胞分離は期待されてきた。

今回、ダメージなくpopulationを分取できることによって、On-Chip sortが、創薬開発に利用可能であることが示唆された。更に、On-Chip Sortは使い捨てチップを用いることにより、クロスコンタミネーションがなく、また小型であることから完全閉鎖型になりうるflowcytometryであるため、医療分野において移植などの細胞治療に利用できる唯一のflowcytometryである。



<http://www.on-chip.co.jp/en/>

**On-Chip Biotechnologies Co., Ltd.**

#204 Venture Port

2-24-16 Nakacho, Koganei city

Tokyo 184-0012 Japan

Phone +81-42-385-0461

Fax +81-42-385-0462

email [info@on-chip.co.jp](mailto:info@on-chip.co.jp)

**The world's first, flow cytometer using microfluidics chip**

Excellent operability and maintainability, a flow cytometer with brand-new technology