

hPSC から心筋細胞への分化誘導過程における転写因子発現のフローサイトメトリー解析

イントロダクション

ヒト多能性幹細胞 (hPSC) がダイレクトに目的の細胞に分化できる能力は、個別化医療や再生医療に計り知れない可能性を提供します [1,2]。多能性に重要な転写制御因子の同定、ならびにPSC を異なる細胞運命に導く成分が明らかなケミカル定義的な組成の培地および細胞培養条件は、研究者が高精度な分化制御によってさまざまな分化細胞に誘導することを可能にします [3]。多能性から最終分化への移行の特徴の 1 つは、細胞の運命決定因子として働くさまざまな転写因子の核での発現です。hPSC から誘導される心筋細胞の場合、多能性マーカーの発現がダウンレギュレーションし最終的に消失した後、細胞の運命を決定する他の因子が連続的に発現します [4]。この細胞は、初期に中胚葉系に誘導された後、心血管前駆細胞に運命決定されます。最終的に自発的な電気生理的活性や収縮性などの初代心臓細胞が有する多くの生理的特性を示す心筋細胞に分化します [5]。心血管生物学や潜在的な薬剤候補の心毒性について研究している研究者にとって、これらの特性を持つ細胞の培養を確実にすることは探索とスクリーニングを大きく加速させることにつながります。



心筋細胞分化の基礎をなす転写因子の動的な発現パターンの定量は、多くの場合、不均一な細胞集団からなる細胞および組織ライセートにおける、定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) による mRNA 転写産物の検出に依存します。このアプローチは高感度で、少量のサンプルを用いて実施することができますが、個々の細胞レベルの解析はできません。それに代わるアプローチは、細胞レベルでの転写因子発現の検出および定量に特異的な抗体を用いたハイコンテンツイメージングによる解析、またはマルチパラメータフローサイトメトリーです。分化するPSCのイメージベースの解析における課題は、培養中に形成された細胞コロニーの複雑な三次元的性質が、オートフォーカスおよび画像取得を難しくさせることです (図 1)。

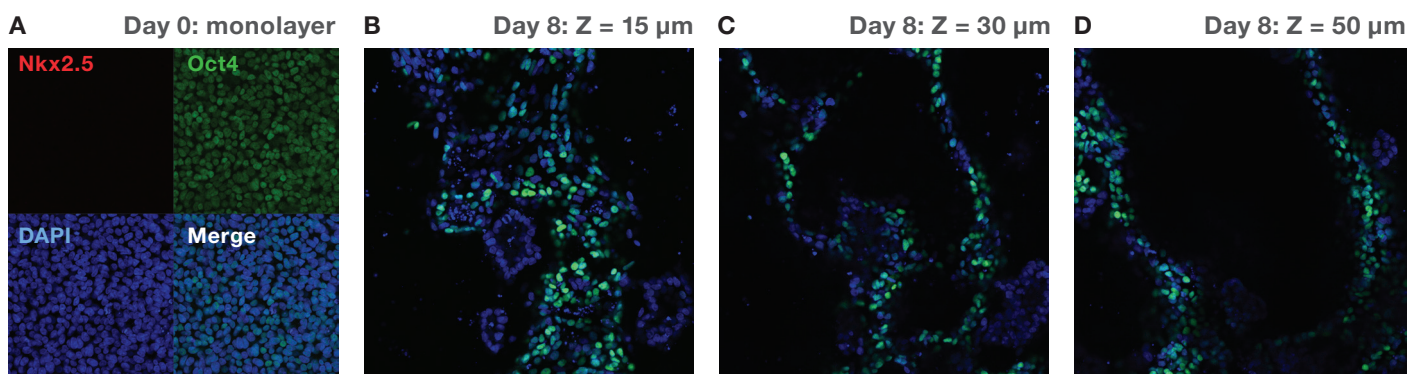


図 1. 分化前の hPSC の共焦点画像 (A) および心筋細胞の分化誘導 8 日目の画像 (B-D) (A) 細胞は、Oct4 (Invitrogen™ Alexa Fluor™ 488 dye, 緑色) および Nkx2.5 (Invitrogen™ Alexa Fluor™ 568 dye, 赤色) に対する抗体で標識し、核は DAPI (青色) で標識しました。ほぼすべての細胞において、核が Oct4 陽性の緑色を示していることから、多能性状態が維持されていることがわかります。Nkx2.5 の赤色は検出されていないことから、心臓中胚葉への分化誘導が開始されていないことが示唆されます。この段階で細胞はコンフルエントな単層から成り、単一平面のため簡単に画像化できます。(B-D) 細胞は、抗 Nkx2.5 抗体 (Alexa Fluor 488 dye, 緑色) および DAPI (青色) で標識しました。これらは、105 μm の z スタック共焦点画像の内、深さ15、30、および 50 μm で取得した光学スライスを示しています (それぞれ B、C、および D)。これは、分化誘導された hPSC (その多くは Nkx2.5+) が 105 μm の厚さにわたり分布していることを示しています。しかし、これらは三次元培養のため、広視野ハイコンテントアナリシスメージングシステムを使用して Nkx2.5+ 細胞を正確に解析することは容易ではありません。

ここでは心筋細胞に分化誘導される hPSC において、Oct4 (多能性を表す標準的なマーカー)、および Nkx2.5 (心筋細胞への分化の決定に関与するマーカー) を同時に定量できるフローサイトメトリーについて説明します。解析は、目詰まりや細胞のロスを抑え、細胞に優しい安全な解析を可能とする Invitrogen™ Attune™ NxT Flow Cytometer を用いました。このことは、幹細胞や心筋細胞のような脆弱で大きい細胞タイプの解析に理想的です。Attune NxT Flow Cytometer は、アコースティックアシストによるハイドロダイナミックフォーカシング技術を用いて開発されており、目詰まりを最小限に抑え、さまざまな細胞タイプを効率的に処理できるように設計された流路系です。これにより、より多量のデータとより詳細な情報を取得し、さらにスループットを向上させることができます。さらにデータ品質を維持したまま、大きな細胞、低濃度の細胞や貴重なサンプルをはじめとした幅広いサンプルタイプのデータ取得を今まで以上に迅速かつ正確に行えます。

方法

材料

- Gibco™ Vitronectin protein (製品番号 A14700)
- Gibco™ Essential 8™ Medium (製品番号 A1517001)
- Gibco™ PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit (製品番号 A2921201)
- Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme (製品番号 12605010)
- Invitrogen™ Donkey Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor™ 647 conjugate (製品番号 A31573)
- Gibco™ Phosphate-Buffered Saline (PBS) (製品番号 10010023)
- Invitrogen™ Countess™ II Automated Cell Counter (製品番号 AMQAX1000)
- Invitrogen™ EVOS™ XL Core Imaging System (製品番号 AMEX1000)
- Attune NxT Flow Cytometer, 4-laser configuration (製品番号 A24858)
- Thermo Scientific™ Nunc™ 6-well tissue culture plates (製品番号 140675)
- Thermo Scientific™ 12 x 75 mm round bottom tubes (製品番号 S40122)

細胞培養および抗体標識

PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit は、hPSC から分化開始後 10 日以内に拍動する心筋細胞へ効率的に分化誘導させるための、ready-to-use のゼノフリーシステムです。分化した心筋細胞は、Gibco™ Cardiomyocyte Maintenance Medium 中で 30 日以上維持できます。

製品マニュアルに従い、未分化 H9 hPSC をビトロネクチンコートした 6 ウェルプレート上で、Essential 8 Medium を使用して培養・増殖させました [6,7]。Day 0 に Cardiomyocyte Differentiation Medium A へ培地交換し、Day 3 に Cardiomyocyte Differentiation Medium B へ培地交換しました。Day 5 に Cardiomyocyte Maintenance Medium へ培地交換し、細胞をさらに 5~7 日維持培養しました (図 2)。Day 12 に位相差光学系を備えた EVOS XL Core Imaging System で拍動が観察でき、心臓細胞への分化が確認されました。

分化プロセスの間、毎日細胞剥離用酵素である Gibco™ TrypLE Express Enzyme を用いてプレートから細胞を剥離後、分散し、単一細胞懸濁液を調製しました。細胞数および生存率の測定は、Countess II 自動セルカウンターを用いて行い、平均的な細胞径は 13 μm でした。各タイムポイントで収集したトータル 1 x 10⁶ 個の細胞を遠心管に移し、用事調製した 4% ホルムアルデヒド含有 PBS 中で 15 分間固定後、400 xg で 5 分遠心し、PBS で洗浄しました。固定化した細胞は、全タイムポイントで細胞が回収されるまで PBS 中で 4°C で保存しました。細胞は透過処理後、5% 正常ロバ血清を含む BD Pharmingen™ Stain Buffer および 0.1% Triton X-100 界面活性剤を用いて、室温で 20 分間ブロッキング処理をしました。Rabbit anti-Nkx2.5

抗体をブロッキングバッファで 200 倍希釈し、細胞を 4°C で一晩インキュベートしました。細胞を Stain Buffer で洗浄後、Donkey Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 647 conjugate を 4 μg/mL の濃度になるようブロッキングバッファで希釈後、暗所下、室温で 2 時間インキュベートしました。Stain Buffer で洗浄後、Rabbit IgG を 10 μg/mL の濃度になるようブロッキングバッファで希釈し、Rabbit IgG 結合部位が飽和するまで 20 分間インキュベートしました。Rabbit anti-Oct4 antibody with Alexa Fluor 488 conjugate をブロッキングバッファと Rabbit IgG を含む溶液で 50 倍希釈し室温で 2 時間インキュベートしました。細胞を Stain Buffer で洗浄後、Attune NxT Flow Cytometer で解析しました。

フローサイトメトリーによるデータ取得

データは、BL1 および RL1 検出器 (それぞれ抗 Oct4 抗体 (Alexa Fluor 488 コンジュゲート) および抗 Nkx2.5 抗体 (Alexa Fluor 647 コンジュゲート) に対応 (表1)、ならびに前方散乱光 (FSC) および側方散乱光 (SSC) を用いて取得しました。データは、フローレート: 200 μL/min、FSC threshold を設定しトータルイベント数: 10,000 イベントになるまで取り込みました。

表 1. 光学系の構成

抗体	蛍光色素	励起レーザー (nm)	検出フィルタ (nm)	Attune NxT 検出器
Oct4	Alexa Fluor 488	488	530/30	BL1
Nkx2.5	Alexa Fluor 647	638	670/14	RL1

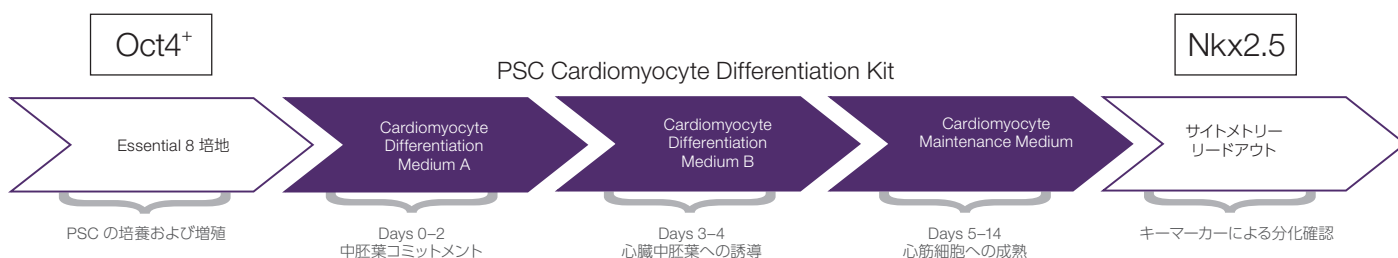


図 2. 心筋細胞分化へのワークフロー

結果

FSC-width と FSC-height の 2 パラメータのプロットでシングルセルにゲートを設定し分画しました (図 3)。この SINGLET ゲートを Oct4/Nkx2.5 で展開しました。Oct4⁺ イベント (緑色)、Nkx2.5⁺ イベント (赤色)、およびダブルネガティブイベント (青色) を識別するため、4 分割ゲートを用いて同定しました (図 4)。2 パラメータプロットを用いて各ターゲットに対する陽性の割合が算出されました (図 5)。分化前は、ほぼ 100% Oct4⁺ Nkx2.5⁻ 細胞であり、多能性を有することが示されました。Day 3 以降、Oct4⁺ 細胞の割合が減少し始め、多能性の喪失と最終分化した心筋細胞表現型への移行が Day 8 までに Nkx2.5 のロバストな発現として認められました。

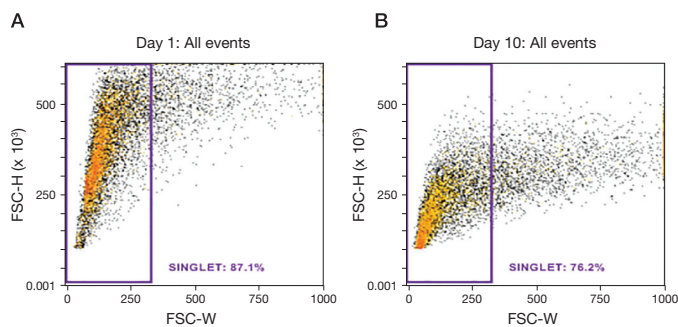


図 3. FSC-width vs. FSC-height 2 パラメータプロットをシングルセルの同定に使用 (A) Day 1 および (B) Day 10 のデータから、前方散乱光プロファイルに細胞分化に伴う変化がみられます。

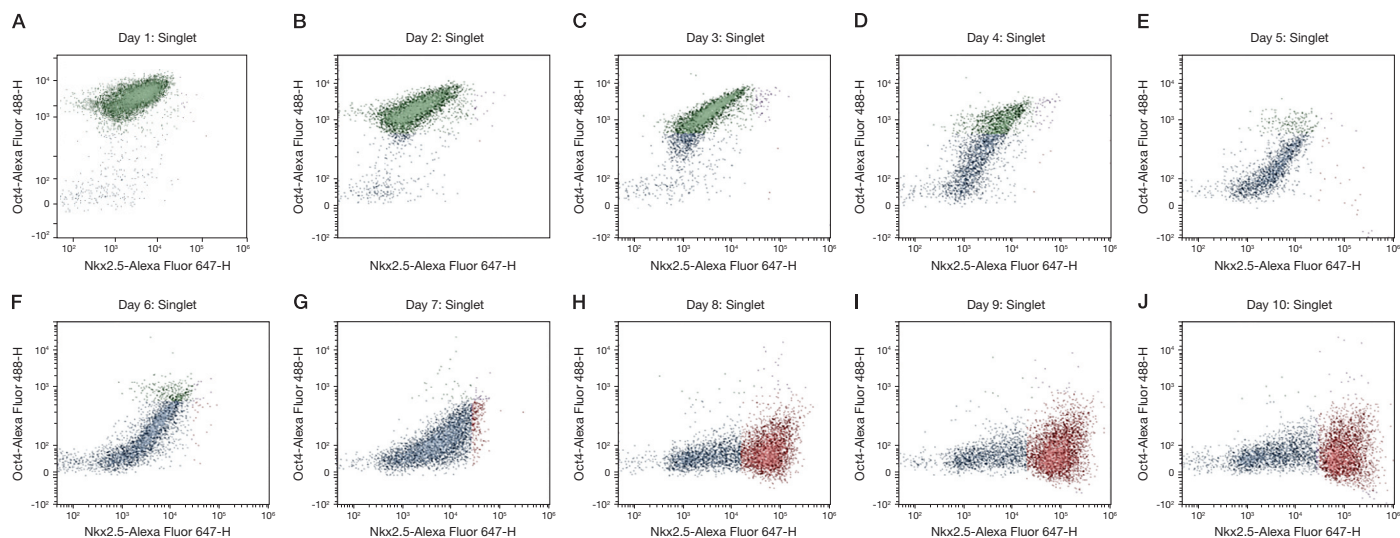


図 4. 心筋細胞への分化過程における H9 hPSC 細胞の Oct4 および Nkx2.5 発現プロファイルを示す 2 パラメータプロット すべてのプロットは シングルセルゲートティングしました。Day 1 (A) は、ほぼすべての細胞が Oct4⁺ / Nkx2.5⁻ で、多能性状態を示します。分化過程のタイムコースに伴い、日々分化していることがデータに示されており (B-J)、細胞は Oct4 の発現を失い、心筋分化マーカーの Nkx2.5 の発現を開始します。赤色の集団が Nkx2.5⁺ 細胞、緑色の集団が Oct4⁺ 細胞を示しています。

結論

H9 hPSCは、PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit に含まれる既知組成培地を用いて心筋細胞へと分化誘導でき、その過程をAttune NxT Flow Cytometer により多能性マーカー (Oct4) と心筋分化マーカー (Nkx2.5) を用いて定量解析できます。これらの転写因子に対する特異的抗体を用いた染色により得られた結果は、Oct4 および Nkx2.5 mRNA 転写因子の定量 RT-qPCR を用いた既知のデータと一致しており [4,8]、シングルセルレベルの解析ではさらなる利点もあります。hPSC は分化するにつれ高密度の三次元クラスターを形成するため、フローサイトメトリーによる定量にはイメージベースのハイコンテンツアナリシスによってこれらの培養を解析するよりもメリットがあります。

幹細胞および心筋細胞は、細胞のサイズ、脆弱性、および希少性のため、フローサイトメトリー解析には従来から困難なサンプルであることが示されています。アコースティックアシストによるハイドロダイナミックフォーカシングを備えた Attune NxT Flow Cytometer では、サンプルスループット速度が従来型サイトメーターよりも最大 10 倍まで高速化します。これは、サンプル処理がより迅速となるうえに非常に少ないサンプルからさえも十分量のイベントを取得できることを意味します。腫瘍や幹細胞のような困難なサンプルを使用する研究者は、特に Attune NxT Flow Cytometer の特性に関心を持っています。なぜなら、サンプルフローレートを上げるとともにデータ品質が低下する従来型フローサイトメーターとは異なり、本フローサイトメーターでは非常に高速なサンプルレートでもデータの品質を妥協する必要がないからです。今では、多くの細胞タイプやサンプルの解析に Attune NxT Flow Cytometer が使用されています。

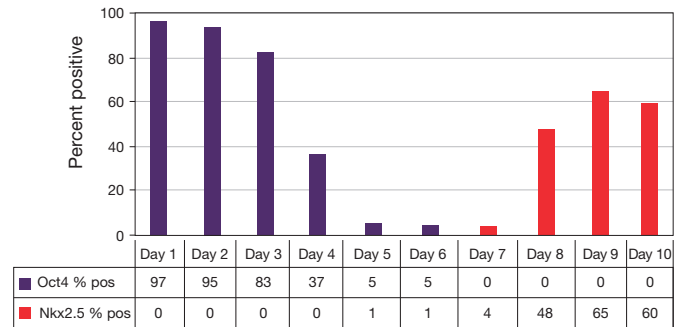


図 5. 10 日間の培養における Oct4 および Nkx2.5 の発現 分化前には、全細胞の 97% が Oct4+/Nkx2.5- の表現型を発現しており、多能性状態と一致します。分化誘導中は、Oct4 の発現が失われ多能性も喪失し、最終分化の心筋細胞表現型への移行が Nkx2.5 発現の増加として見られます。これらの結果は、Oct4/Nkx2.5 2 パラメータプロット上の 4 分割ゲートから得られ、SINGLET ゲートにおける陽性率が示されています。

参考文献

- Robinton DA, Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481:295-305.
- Addis RC, Epstein JA (2013) Induced regeneration – the progress and promise of direct reprogramming for heart repair. *Nat Med* 19:829-836.
- Chen G et al. (2011) Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 8:424-429.
- Zhang J et al. (2009) Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Cir Res* 104:e30-e41.
- Burridge PW et al. (2012) Production of *de novo* cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell* 10:16-28.
- User Guide: Essential 8 Medium, Thermo Fisher Scientific MAN0007569.
- Protocol: Culturing PSCs in Essential 8 Medium, Thermo Fisher Scientific MAN0007035.
- Yang L et al. (2008) Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic stem cell-derived population. *Nature* 453:524-528.

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/attune

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用はできません。
 記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。
 For Research Use only. Not for use in diagnostic procedures. © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
 All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
 Triton is a trademark of Union Carbide Corporation. BD Pharmingen is a trademark of Becton, Dickinson and Company.
 Essential 8 is a trademark of Cellular Dynamics International, Inc.
 価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
 実際の販売価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
 標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc

販売店

FPL058-A20050B

サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com
 オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584
 営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan) [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC