Nalgene Rapid-Flow PESフィルターユニットで滅菌ろ過した培地を使用した胚性幹細胞の培養

キーワード

Rapid-Flow、PESフィルター、マウス胚性幹細胞、iPS細胞、白血病抑制因子（LIF）、多能性

要約

細胞培養時にコンタミネーションを起こさないことは非常に大切で、その可能性を減らすために、通常は培地の滅菌ろ過を行います。しかし、培養が非常に難しい胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）では、ろ過により培地から重要な培地成分が除去されたり、培地中に有害物質が添加されたりすることを懸念して、培地の滅菌ろ過が省略されることがあります。それゆえ、多くの幹細胞研究者は成長因子など特定の培地成分のろ過を行っておらず、コンタミネーションのリスクが高くなっています。この実験では、Thermo Scientific™ Nalgene™ Rapid-Flow™ PESフィルターは培地中の重要な成分を除去したり、培地中に有害物質を添加したりしないこと、そして、Nalgene Rapid-Flow PESフィルターでろ過した培地で培養したES細胞は正常な増殖能と多能性を維持することを示します。

はじめに

幹細胞の多様性を維持したまま培養することは、幹細胞研究者に特有の課題の1つです。わずかな変化が幹細胞の自発的分化や細胞死を誘導するため、培養系は厳密に管理される必要があります。多能性幹細胞の自発的分化を阻止し、多能性を長期的に維持するためには、通常、発生中の胚の栄養外胚葉に発現する成長因子である白血病抑制因子（LIF）などが培地に添加されます。これらの培地サプリメントは高価なものが多いですが、細胞の多能性を維持するためには必要不可欠で、これらの成長因子を培地中で適切な濃度で維持することは非常に重要です。

コンタミネーションリスクを最小限に抑えるために、細胞培養用の培地はしばしば滅菌ろ過されます。この滅菌ろ過には、タンパク質低吸着かつ低溶出のポリエーテルサルフォン（PES）メンブレンフィルターが使用されます。しかし幹細胞用培地では、滅菌ろ過により培地中の重要な成長因子が除去されたり、培養に悪影響を与える可能性のある化合物が培地中に添加されたりするリスクを避けるため、研究者の多くはろ過した後の培地にLIFなどのもっとも重要な成分を添加します。これにより、重要な成分が培地中に確実に維持される一方で、その添加した成分が培地のコンタミネーションの一因となる可能性が生じます。

本稿では、Nalgene Rapid-Flow PESフィルターユニットを使用して幹細胞用増殖培地をろ過しても、LIFやその他の重要な成分が培地中から除去されず、細胞の増殖を阻害する化合物が培地中に添加されないことを示します。センシティブな培養系でのNalgene Rapid-Flow PESフィルターの有用性を明らかにするために、無血清培地 (LIFおよび2i含有) およびGibco™ Essential 8™培地を幹細胞培養に使用しました。その結果、Nalgene Rapid-Flow PESフィルターユニットを使用して幹細胞用増殖培地をろ過しても、幹細胞に悪影響を与えることはなく、幹細胞の正常な増殖と多能性を維持することができました。

実験方法

マウス LIF ELISA

すべての試薬はMouse LIF ELISA Quantikineアッセイキット (R&D Systems) の使用説明書に従って調製しました。LIFを含むES細胞完全培地1,500 mLを調製し、500 mLずつ3つに分注しました。分注したそれぞれの培地を同一ロットの500 mLサイズのNalgene Rapid-Flow PESフィルターユニット10個でろ過し、ろ過ごとにろ過された培地から評価用サンプルを採取しました。3つの異なるロットのNalgene Rapid-Flow PESフィルターを評価の対象とし、それぞれのろ過には新品のフィルターユニットを使用しました。評価用サンプルをPBSで1:4に希釈し、ELISAキットの使用説明書に従ってアッセイを行いました。プレートの読み込みはThermo Scientific™ Varioskan™ LUX マルチモードマイクロプレートリーダーを使用して450 nmで行いました。バックグラウンドの影響を除くため、450 nmの測定値から570 nmでの測定値を差し引き補正値としています。キャリブレーターの補正値を用いて検量線を作成し (R^2=0.99) 、線形回帰分析を用いてサンプル中のLIF濃度を求めました。

マウス胚アッセイ (MEA)

マウス胚アッセイ (MEA) は第三者品質管理試験機関で実施しました。3バッチの胚培養培地50 mLを3つの異なるロットのNalgene Rapid-Flow PESフィルターユニットでろ過しました。ろ過した培地を0.7 µLずつThermo Scientific™ Nunc™ IVFマルチディッシュの4つのウェルに添加し、21個の胚をそれぞれのフィルターユニット (3ロット) でろ過した培地で培養しました。対照群として、15個の胚をろ過していない培地で培養しました。胚を96時間観察し胚盤胞期への進行を判定しました。その後、胚を評価し、70%を超える胚が胚盤胞期に進行した場合に合格としました。

幹細胞培養

マウス胚性幹細胞 (mESC) は129/SVEV mESC (Millipore) の樹立された培養株から得ました。1バッチのLIFおよび2i含有培地[1,2]はGibco™培地成分を用いて調製し、半量をNalgene Rapid-Flow PESフィルターユニットを使用して1回ろ過し、残りはコントロール培地としました。Gibco™ Attachment Factor (AF) で5分以上コーティングしたThermo Scientific™ Nunc™ 6 Well マルチディッシュにろ過した培地とコントロール培地を入れ、mESCを播種しました。細胞は防指紋コートした6 Well ディッシュ上で5回継代しました。細胞は2〜3日間培養を行った後に継代し、継代の合間は培地を毎日交換しました。すべてのフィーディングと継代は、試験条件に適切な培地バッチを用いて行いました。5回目の継代で、細胞はフローサイトメトリー解析用のThermo Scientific™ Nunc™ 12 Well プレート、多能性マーカーの免疫染色用のThermo Scientific™ Nunc™ 48 Wellプレートにそれぞれ播種しました。5回目の継代後2日目に、フローサイトメトリー解析用にmESCを回収しました。3つのウェルから細胞を回収し、SSEA-1 (細胞表面の多能性マーカー) の免疫染色を行い、Invitrogen™ Attune™ NxT Flow Cytometerを用いて解析を行いました。5回目の継代後3日目に、明視野画像を撮影した後に細胞を回収し、増殖を調べるために細胞数をカウントしました。回収しなかった細胞は免疫細胞染色用に固定しました。

5回目の継代で回収した細胞を胚様体分化誘導プロトコル[3]に供しました。回収した細胞は分化培地を用いてハンギングドロップ法で培養しました (600細胞/滴) 。2日後、胚様体を未処理のディッシュに移して新鮮な分化培地で洗浄し、さらに3日間浮遊培養しました。その後、新鮮な分化培地が入ったNunc 48 Wellプレートに個々の胚様体を移し、さらに5日間培養しました (分化期間:合計10日間) 。10日目に胚様体を固定し、免疫染色の準備をしました。

Gibco™ Human Episomal iPSC Lineは樹立されたiPS細胞株から得られました。1バッチのEssential 8培地を調製し、半量をNalgene Rapid-Flow PESフィルターユニットを使用して1回ろ過し、残りはコントロール培地としました。Nunc 6 Well マルチディッシュは、Gibco™組み換え体ヒトビトロネクチンで1時間コーティングを行いました。細胞は、ろ過された培地とコントロール培地を入れたそれぞれのウェルに播種され、継代は3～4日ごとに5回、また、継代の合間には毎日培地を交換しました。5回目の継代で、細胞は免疫染色用のNunc 48 Well マルチディッシュと増殖確認用のNunc 6 Well マルチディッシュにそれぞれ播種しました。

免疫細胞染色

免疫細胞染色はNunc 48 Well プレートで行いました。mESCには、抗Oct-4抗体および抗SOX-2抗体 (Invitrogen™ Molecular Probes™) を一次抗体として使用しました。マウス胚様体には、抗マウスAFP抗体 (R&D Systems) 、抗SMA抗体および抗TUJ1抗体 (Molecular Probes) を一次抗体として使用しました。ヒトiPS細胞には、抗Oct-4抗体、抗SOX-2抗体、抗SSEA-4抗体および抗TRA-1-160抗体を一次抗体として使用しました (Molecular Probes) 。一次抗体を添加する前に、細胞の固定、透過処理およびブロッキングを行いました。ブロッキング溶液で適切な濃度に希釈した一次抗体を添加し、2～8°Cで一晩インキュベートしました。細胞をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) で3回洗浄後、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体を添加し、室温で1時間インキュベートしました。細胞をDPBSで3回洗浄後、Invitrogen™ NucBlue™ 核染色試薬で対比染色し、室温で5分間インキュベートしました。その後、細胞をDPBSでさらに2回洗浄しました。細胞は画像解析が完了するまで2～8°Cの暗所でDPBS中に保存しました。

結果と考察

Nalgene Rapid-Flow PESフィルターはmESC増殖培地中のLIF量を減少させない

mESC完全培地中のLIF量を連続ろ過後に測定しました。その結果、1回のろ過はLIF濃度に大きな影響を与えないことが示されました (図1) 。また、10回の連続ろ過後、増殖培地中から失われるLIFの量はわずか5%でした (図1) 。

Nalgene Rapid-Flow PESフィルターはろ過した培地中に有害物質を放出しない

高感度のマウス胚アッセイを実施し、ろ過によって有害物質が培地中に添加される可能性を評価しました。試験を実施した3ロットのフィルター中2ロットのフィルターでは、マウス胚の95%が96時間で胚盤胞期に成長しました。残り1ロットのフィルターでは、96時間で100%の胚が胚盤胞期に進行しました。これらの結果は、Nalgene Rapid-Flow PESフィルターは、細胞増殖に影響を与える有害物質を培地中に放出していないことを示唆します。

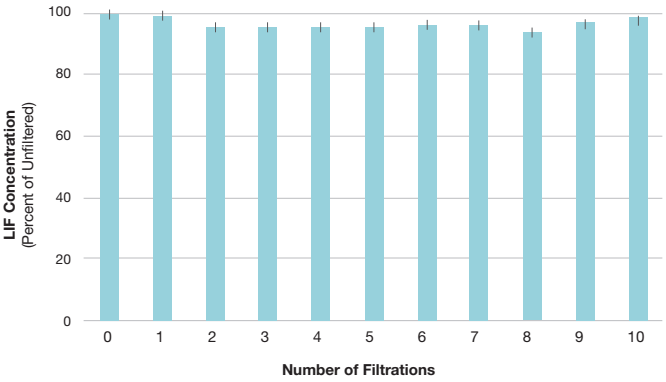

図1. Nalgene Rapid-Flow PESフィルターを用いた連続ろ過後のmESC完全増殖培地中のLIFの保持率

Nalgene Rapid-Flow PESフィルターでろ過した培地は幹細胞の増殖を促進し、多能性の維持を可能にする

ろ過した培地を使用して幹細胞 (mESCおよびiPSC) の継代培養を5回行いました。mESCは培養期間を通して良好に増殖し (図2) 、正常なmESCの形態を示しました (図3、左端 明視野) 。

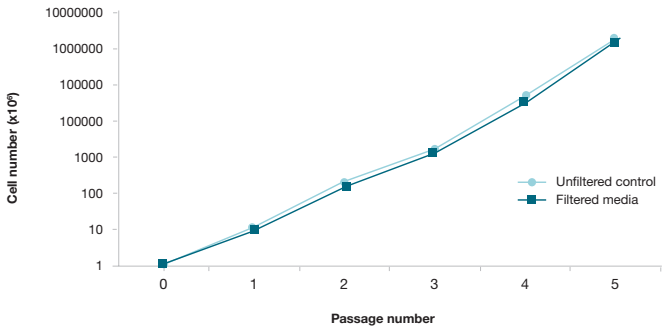

図2. 5回の継代培養期間におけるmESCの増殖

mESCの多能性をOct-4およびSOX-2のマーカーの免疫蛍光染色によって評価しました（図3）。明視野および免疫染色のいずれの条件でも、ろ過した培地で培養したmESCはコントロールと同程度の結果を示しました。SSEA-1発現細胞のフローサイトメトリー解析ではろ過した培地とろ過していないコントロール培地の間で有意差は認められませんでした（Student's t-test、$p>0.05$）（図4）。これらの結果は、LIF含有培地をろ過して培養に用いた場合でもmESCの多能性が培養期間を通して維持されることを示唆します。

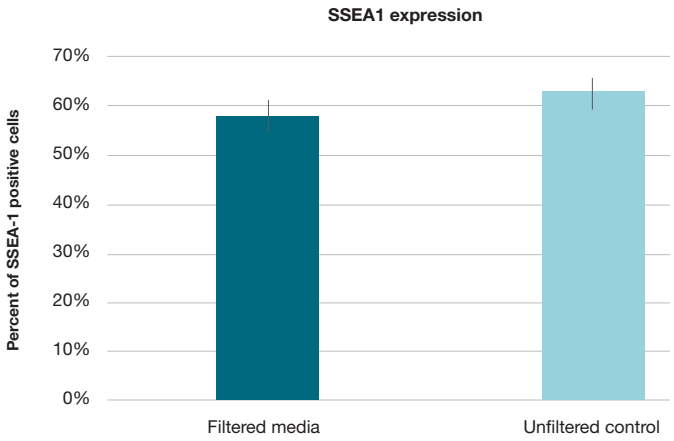

図4. ろ過した培地とろ過していないコントロール培地中における、多能性マーカーSSEA-1発現細胞の割合を比較したフローサイトメトリー解析結果

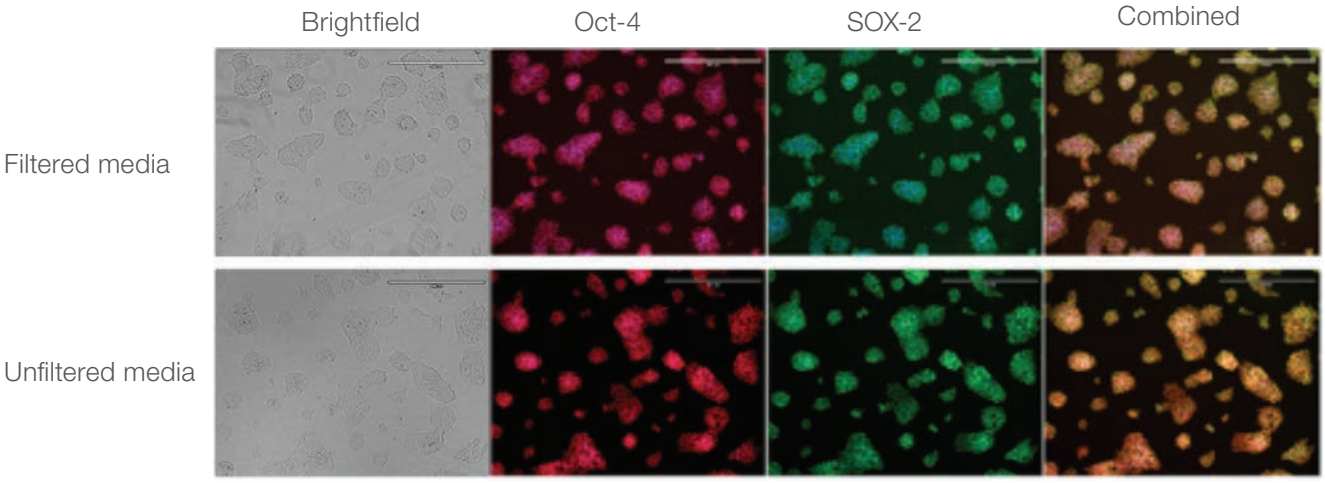

図3. ろ過した培地で5回の継代培養後の、mESC上の多能性マーカーの免疫蛍光染色
細胞はNucBlue核染色試薬で対比染色した。

iPSCも培養期間を通して良好な増殖が見られました。5回の継代培養期間中、ろ過していないコントロール培地中では細胞数が播種密度の7.4倍に増殖したのに対し、ろ過した培地中では14.7倍に増殖しました。iPSCの多能性はOct-4、SOX-2、SSEA-4およびTRA-1-60マーカーの免疫蛍光染色で評価しました（図5）。明視野および免疫染色のいずれの条件でも、ろ過した培地で培養したiPSCはコントロールと同等の結果を示しました。これらの結果は、ろ過した培地を培養に用いた場合でも、iPSCの多能性が培養期間を通して維持されることを示唆しています。

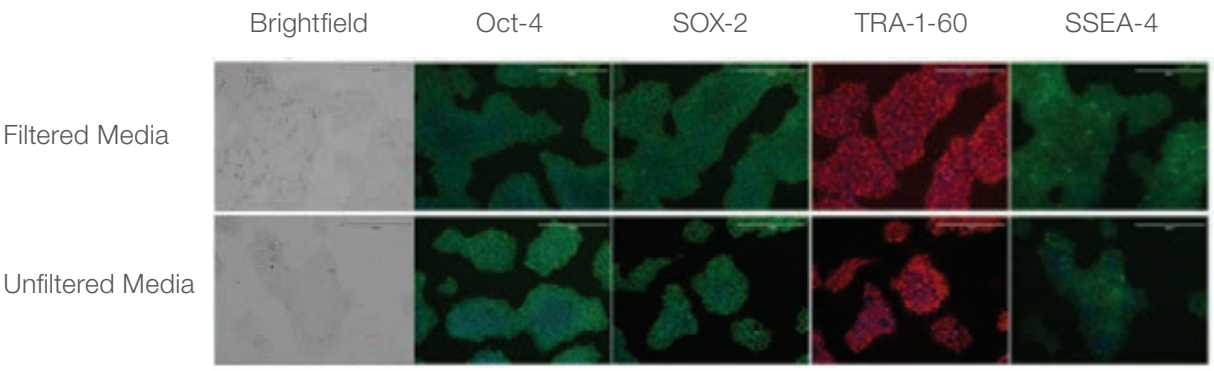

図5. ろ過した培地中で5回継代培養後の、ヒトiPSC上の多能性マーカーの免疫蛍光染色
細胞はNucBlue核染色試薬で対比染色した。

thermo scientific

ろ過した培地で5回の継代培養後にマウス胚様体が生成していることから、細胞が3つの胚葉すべてを生成する能力を維持していることが実証されました。AFP発現細胞（内胚葉系）、SMA発現細胞（中胚葉系）およびTUJ1（外胚葉系）の免疫蛍光染色陽性像が、固定後および染色後のマウスEBで確認されました（図6）。

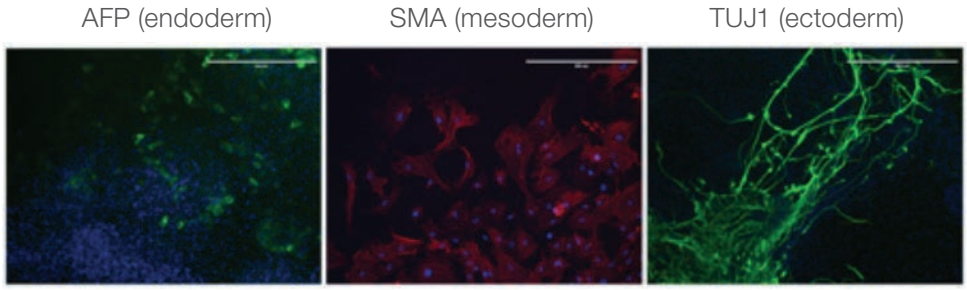

図6. マウスEBの免疫蛍光染色では、ろ過した培地中で5回継代培養したmESCから生成したEBに3つの胚葉系すべてが存在することが示された。

考察

本試験におけるLIF濃度の評価では、ろ過で生じ得るすべての影響を明確に把握するために培地のろ過を複数回行いました。連続ろ過によってLIFが除去された場合に、濃度の低下が検出できるようろ過ごとに新しいフィルターユニットを使用しました。通常のアプリケーションではこのような厳しい条件下でろ過を行うことはあまりありませんが、このような試験を行うことでろ過によって生じ得るわずかな影響を実験的に明らかにすることができます。

ろ過した培地で培養した幹細胞の維持培養を評価する実験では、非常に少ない成分からなるEssential 8培地をろ過したにもかかわらず、幹細胞は良好な増殖を続け、継代を通して多能性を維持していました。また、ろ過した培地で維持培養されたmESCに由来する胚様体から3つの胚葉すべての自発的分化が生じたことによっても多能性を維持していることが確認されました。これらの結果は、Nalgene Rapid-Flow PESフィルターが幹細胞培養における無菌性を維持するための安全なソリューションであることを示しています。

結論

- Nalgene Rapid-Flow PESフィルターユニットを使用した滅菌ろ過は、細胞培養に影響を与える成分を培地から除去したり、培地中に添加しません。
- Nalgene Rapid-Flow PESフィルターユニットを使用したESC完全増殖培地の滅菌ろ過は、幹細胞の増殖や多能性の維持に悪影響を与えません。
- Nalgene Rapid-Flow PESフィルターユニットを使用した滅菌ろ過は、幹細胞培養における無菌性維持のための安全なソリューションのひとつです。

参考文献

1. Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell selfrenewal. Nature 453, 519–523.
2. Yang, S.H., Kalkan, T., Morrisroe, C., Smith, A., and Sharrocks, A.D. (2012). A genome-wide RNAi screen reveals MAP kinase phosphatases as key ERK pathway regulators during embryonic stem cell differentiation. PLoS Genet. 8, e1003112.
3. Schroeder, I. S., Wiese, C., Truong, T. T., Rolletschek, A., & Wobus, A. M. (2009). Differentiation analysis of pluripotent mouse embryonic stem (ES) cells in vitro. Methods in Molecular Biology, 530, 219–250.

詳細はこちらをご覧ください **thermofisher.com/rapidflow**

研究用にのみ使用できます。診断用には使用いただけません。これらの製品は一般的なラボでの使用を目的としています。
製品の性能がお客様の用途やアプリケーションに適しているかどうかはお客様自身でご確認ください。
© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
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。
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。
標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc **LSP049-A2108OB**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

テクニカルサポート 0120-477-392 jptech@thermofisher.com
オーダーサポート TEL：03-6832-9260 FAX：03-6832-9261
営　業　部 TEL：03-6832-9270 FAX：03-6832-9271

facebook.com/ThermoFisherJapan @ThermoFisherJP
thermofisher.com

ThermoFisher SCIENTIFIC