

幹細胞を用いた先天性心筋異常のモデル化

ジョーンズ・ホプキンス大学 細胞分子医学科
Dr. Chulan Kwon ラボリサーチアソシエイト
Dr. Peter Andersen 様

使用機種

セルソーターSH800S

主な用途

幹細胞を用いた先天性心筋異常のモデル化



セルソーターSH800Sの発生生物学におけるアプリケーション

「心臓の初期発生についてはまだ解明されていない点が多くあります。」と語るのはDr. Peter Andersen。ジョーンズ・ホプキンス大学細胞分子医学科のDr. Chulan Kwonラボのリサーチアソシエイトである。彼はさらに続ける。「自然流産の約30%は心臓の異常が原因であり、新生児の約1%は心臓に先天性な欠陥を抱えて生まれます。しかし、このことについての解明はほとんど進んでいません。なぜなら、そのような欠陥は子宮内での初期発生の過程で露呈するからです。そして、当然のことながら、ヒトでの研究を行うことができません。」

「我々は細胞の成熟プロセスを大幅にスピードアップさせる‘タイムマシン’を開発しました。」

他に何か手段はないのか? 「そこで、マウスに着目しました。」とDr. Andersen。

彼はDr. Kwonと共にマウスの遺伝学や生態に精通している。数年前に、このような発生初期に生じるイベントをモデル化する試みを開始した。胚細胞や人工多能性幹細胞 (iPS) を心筋前駆細胞に分化させ、さらに心筋細胞 (cardiomyocytes, CMs) まで分化させることに着手した。

そこで壁に突き当たった。「これらの細胞は、培養皿の中では成熟細胞にならないのです。」とDr. Andersen。「In vitroの培養皿の中では、細胞は未成熟の細胞つまり胚細胞のままなのです。これらの細胞で疾病をモデル化しようとする、成熟した心筋細胞とは全く異なる振る舞いをします。例えば、成熟細胞に有効な薬剤が、これらの幼若細胞には効かない場合があるのです。」

“バイオインキュベーター”によるブレイクスルー
Dr. AndersenとDr. Kwonは、巧妙な手段を見出した※1。マウスの心筋前駆細胞をラットの新生仔の心臓に注入すると、この心筋前駆細胞は心筋細胞まで正常に成熟した。さらに重要なブレイクスルーとして、ヒトの心筋前駆細胞でも同じことが起こったのである。ラットの心臓は、マウスやヒトの成熟した心筋細胞を作るための“バイオインキュベーター”となったのである※2。さらに、細胞が成熟するまで研究者が長い時間待つ必要もなくなった。

「人間の赤ちゃんが大人になるまで15年、あるいは20年とかかる訳ですが、ラットではおよそ8~10週間で成体になります。そしてこのことは、ラットの心臓に注入したヒトの細胞においても同様なのです。我々は細胞の成熟プロセスを大幅にスピードアップさせる‘タイムマシン’を開発しました。」この技術の模式図を図1に示してある。

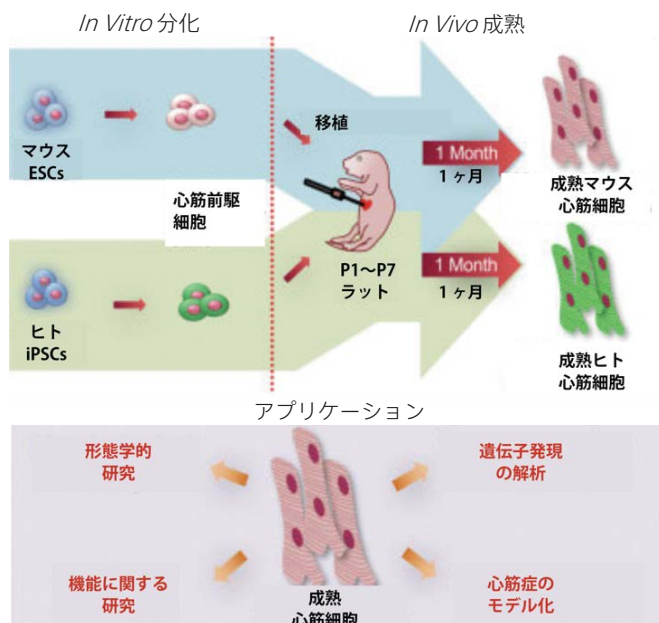


図1. ラットの心臓を用いたマウス、もしくはヒトの心筋細胞の“バイオインキュベーション”。両動物種に由来する細胞は、様々なアプリケーションに用いられる。
出典：Cho, Lee, Tampakakis *et al*, 2017.

この研究は、セルソーターSH800Sに大きく依存している。「私たちは、研究の多くの局面でセルソーターSH800Sを使います。」とDr. Andersen。

「これを使わない研究なんて考えられません。」
 心筋細胞の成熟に関する研究では、培養した細胞が真に成熟細胞であることを実証する必要があった。そこで彼らはセルソーターSH800Sを使い、iPS細胞株に導入したGFPとRFPの発現をもとに、*in vitro*のヒト及びマウスの心筋細胞をプレートにソーティングし、*in vivo*の成体心筋細胞と比較した。

「これらの細胞に対して、様々な機能アッセイやゲノムアッセイを行いました。」とDr. Andersenは述べている。「そして本物の成熟細胞と同等であることが示されました。」

図2に、成熟心筋細胞の3Dイメージングを示している。

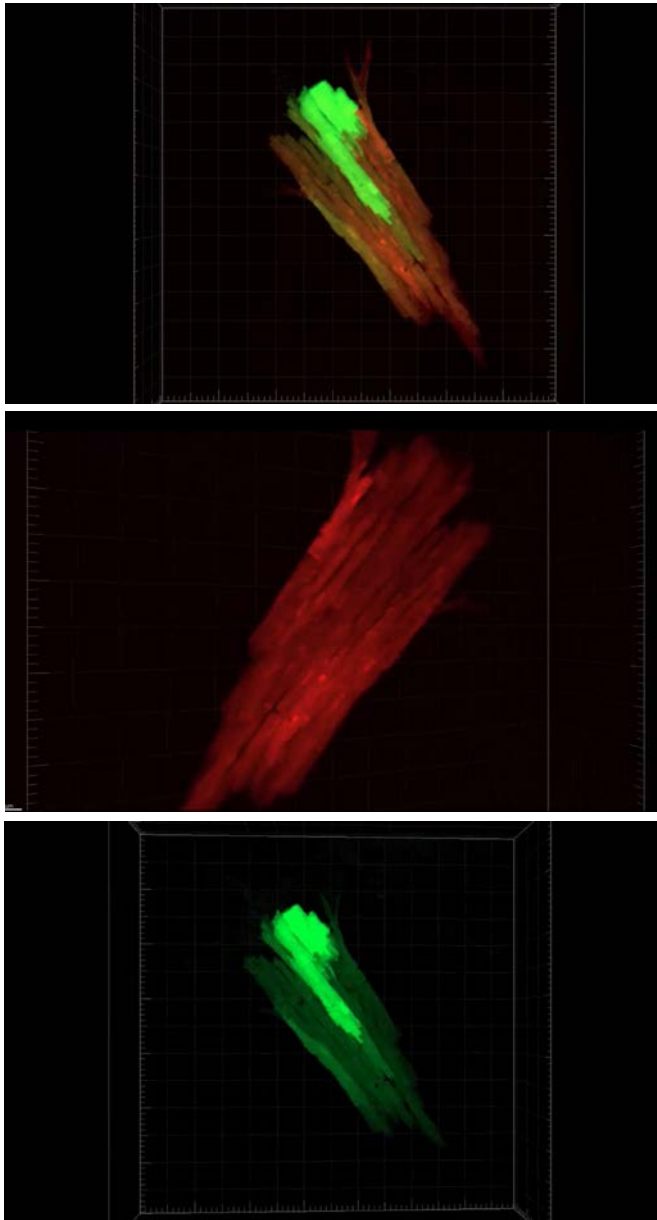


図2. ラットの心臓の中で2ヶ月間成熟させたマウス心筋細胞の3Dイメージ。

出典: Cho, Lee, Tampakakis *et al*, 2017.

現在、彼らの研究室では、シングルセルソーティングとRNAシーケンシングを組み合わせた複数のプロジェクトが進行中である。

「この2つを組み合わせることで、極めて強力でスループットの高いワークフローを実現できます。」とDr. Andersen。

「何千個もの細胞を384ウェルプレートにシングルセルソーティングし、その場で前処理を施し、そのままRNAシーケンスに回すことができます。」

別の研究で彼らは、心臓の異なる部位を生じさせる2つの細胞集団 — First Heart FieldとSecond Heart Field (FHFとSHF) — の発生を研究するための、心筋オルガノイド法を開発した。FHF細胞とSHF細胞をそれぞれGFPとRFPでラベリングすることで、これらの細胞のソーティングを行った。

「我々は、このようなオルガノイドが作成可能であることを示すとともに、これらの細胞の成熟プロセスを培養皿の上でミミック（模倣）することができたのです。これらの細胞は*in vivo*で成熟したマウス細胞とほとんど見分けがつかないものでした。とても素晴らしい結果でした。」

図3に、クラスター解析の結果を示している。

この図からは、成体心筋細胞（緑）と*in vivo*で成熟させた心筋細胞（青）はよく似ているが、*in vitro*で成熟させた心筋細胞（赤）とは全く異なっていることがわかる。

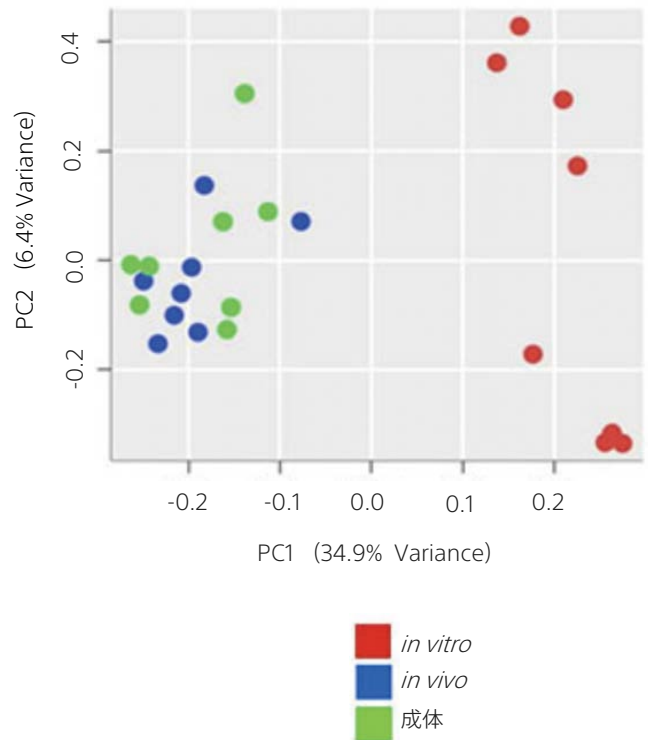


図3. *in vitro* (赤)、*in vivo* (青)、成体 (緑)、心筋細胞の遺伝子発現のクラスター解析。

出典: Cho, Lee, Tampakakis *et al*, 2017.

ソニー製セルソーターを使えば、
サンプルを装填し、ソーティングを
開始すれば後はソーターから離れて
別の作業をすることができます。

ジョンズ・ホプキンス大学 Dr. Peter Andersen



ゲームチェンジャー：ソニーの自動化技術

Dr. Andersenは2013年にセルソーターSH800Sの最初の顧客の一人となった。なぜ彼は新しいセルソーターのパイオニアユーザーとなったのだろうか？「私にとってゲームチェンジャーとなったのは、オートメーション（自動化）でした。」他のベンダーのセルソーターでは、専任のオペレーターが必要で、朝仕事を始める際に1時間以上かけてソーターの校正を行い、その後も常にモニターしておく必要があった。「なぜなら、ほんのわずかな状態の変化で、あらゆるものが変わってしまう可能性があるからです。」

ソニーは、装置自身が自動で校正作業を行い、安定化させ、常に状態をモニターする完全自動化マシンを提案しました。「私は半信半疑でしたよ。」とDr. Andersenは振り返る。「しかし、実際にテストしてみると本当にそうでした。私が本当に欲しかったのは、専任のテクニシャンをトレーニングし、給料を支払い、いつも装置をモニターするといったような必要がなく、常に適切に動作してくれる装置です。だからこそソニーは、これまでも大きな成功を収めてきたのだらうと私は思うのです。彼らは、顧客の声に耳を傾け、真に機能する製品を開発してきました。」

Dr. Andersenはソニーのソフトウェアのユーザーフレンドリーさについても強調する。「エンジニアが、生物学者向けのソフトウェアを開発している状況を想像してみてください。エンジニアは、エンジニアが理解したことをもとに、ソフトウェアをデザインします。しかし、エンジニアは、我々の様な生物学者とは同じ“言葉”を使っていません。ですから、そのようなエンジニアがデザインしたソフトウェアは通常、とても使いづらいのです。ソニーは、

ユーザーフレンドリーで、使いやすく、とても直感的なソフトウェアを作ってくれました。」

新たなユーザーのトレーニングも容易であった。「私たちの研究室はとても大きくて、ソーターが必要な人が沢山います。そのような人々の、あらゆる面倒を私がみることはできません。ソニー製セルソーターを使えば、30分から45分でトレーニングを終えることができます。その後は、トレーニングを受けた人が装置をスタートアップさせ、ソーティングを実行し、装置のシャットダウンを行うことができるようになります。これはとても素晴らしいことなのです。」

「ウォークアウェイ・ソートは私たちにとって非常に有用です。ソニー製セルソーターを使えば、サンプルを装填し、ソーティングを開始すれば後はソーターから離れて別の作業をすることができます。」

Dr. Andersenにとって第二のゲームチェンジャーとなったのは、ウォークアウェイ・ソーティング（ソーターに張り付いていなくてもソーティングが可能であること）であった。

「ウォークアウェイ・ソートは私たちにとって非常に有用です。他の装置であれば、専任スタッフが装置に張り付いてソーティングをモニターする必要があります。ソニー製セルソーターを使えば、サンプルを装填し、ソーティングを開始し、その後は文字通り、装置から離れることができます。ソーティングする細胞の数にもよりますが、20分から1時間後に装置に戻って、ソーティング済みの細胞を回収しそれを好きなように培養することができます。ソニー製セルソーターのおかげで、私の研究生活はずいぶん楽になり、日々の実験ワークフローがより効率的なものとなりました。」

ソーティングにおける特殊な課題を解決する

Dr. Andersenは、ソーティングにおける特殊な課題にチャレンジしている。「心筋細胞はとても大きいのです。最大で長さ200 μm 、幅20 μm に至る長方形であり、しかも非常に剛直なのです。」と彼は説明する。

「私たちは、ソニーが提供している最大サイズのディスプレイザブルソーティングチップである130- μm チップを使っています。チップを詰まらせないために、サンプルを希釈させる必要があります。しかし、私たちのプロトコルを使えば、このセルソーターは、成体の心筋細胞を生きのまま、機能している状態で実際にソーティングしてくれるのです。スループットが必要十分に高いというわけではありませんが、培養皿の中から手作業で取り出すことと比較するとはるかに高速です。」

Dr. Kwonの研究室では、同研究所の他の研究グループにもセルソーターSH800を使えるようにしているので、ディスプレイザブルソーティングチップは、多数のユーザーや多彩なタイプのサンプルに対応する上でも有用である。それぞれの実験は、新しいディスプレイザブルソーティングチップを使って実施される。

「myocyte以外の細胞の場合には100- μm チップを使うことが多いです。これで興味ある細胞の95%をカバーできます。」とDr. Andersen。

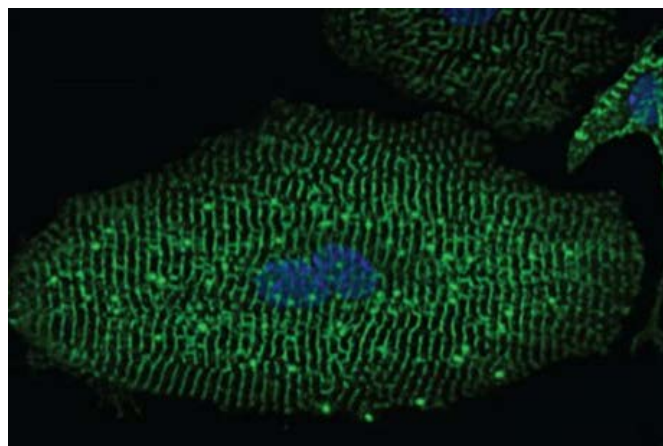
「ディスプレイザブルソーティングチップを使い分けることにより、多くの人のソーター利用が簡単になり、また、サンプル間のクロスコンタミネーションの問題を無くすことができます。」

セルソーターSH800をソーティング専用に使うことが、よりシンプルな運用方法であるとDr. Andersenは考えているが、博士は稀にソートした細胞の分析にセルソーターSH800を使うことがある。「私たちの研究室には、ソニー製セルソーターの他に2レーザーのフローサイトメーター（セルアナライザー）があるので、これらを使い分けしようとしています。しかし、ソニー製セルソーターは4レーザーシステムで、6色まで検出することができます。当研究室のセルアナライザーよりも2色多く検出することができるのです。」

セルソーターSH800S

簡単セットアップ・小型化を実現した“日本発”セルソーター

- ・ 96/384シングルセルソート（SPモデル/384はオプション）
- ・ 目的に応じてオフィスサイズを選択できるディスプレイザブルソーティングチップ
- ・ 直感に訴えるユーザーフレンドリーなソフトウェア



ですから、5色以上の検出が必要な場合には、ソニー製セルソーターをセルアナライザーとして使います。」

最後に、ご自身の研究室にセルソーターがあることのインパクトについて尋ねた。

Dr. Andersenの答えは、「It's huge（とても大きい）」であった。「研究室専用のセルソーターを使うことで、はるかに効率が良くなります。セルソーターのような機器をコアラボのような共同施設で共有する場合、機器の時間枠を確保するのが極めて困難です。私たちは患者の細胞を使って研究を実施しており、多くの場合、患者の来院の通知を前日までに受けられることはありません。患者が手術を受けその細胞が入手できれば、即座にソーターを使う必要があるのです。」

もちろん、噂はまたたく間に広がる。

「ちょうど今日も、ホプキンスの研究者からソニー製セルソーターを使いたいというリクエストのメールが、2通届きました。このソーターのおかげで、私は有名人になりましたよ。」と博士は笑う。

参考文献

1. Cho GS, Lee DI, Tampakakis E, et al. Neonatal transplantation confers maturation of PSC-derived cardiomyocytes conducive to modeling cardiomyopathy. *Cell Rep.* 2017; 18: 571-582. PubMed
2. Cho GS, Tampakakis E, Andersen P, Kwon C. Use of a neonatal rat system as a bioincubator to generate adult-like mature cardiomyocytes from human and mouse pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 2017; 12: 2097-2109. PubMed

発行元

ソニーイメージングプロダクツ&ソリューションズ(株)
ライフサイエンス営業部
〒243-0014 神奈川県厚木市旭町 4-14-1
Tel: 0120-667-010
Fax: 0120-388-060
E-mail: cytometry@sony.com
URL: <http://www.sony.co.jp/LS>

