

Cell ball 技術による接着細胞のダメージレスソーティング

Damage-less sorting of adhesion cell by Cell ball technology

○佐々木陽良(東北工業大学 大学院工学研究科電子工学専攻)

小田原あおい(東北大学 大学院医工学研究科)

鈴木郁郎(東北工業大学 大学院工学研究科 電子工学専攻)

Akiyoshi SASAKI, Graduate School of Engineering, Tohoku Institute of Technology
Aoi ODAWARA, Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University
Ikurou SUZUKI, Graduate School of Engineering, Tohoku Institute of Technology

Abstract: Adherent cells, in which die by peeled off from the culture dish, is difficult to be applied to flow cytometric analysis and cell sorter technology. In this study, we have developed the Cell ball technology and Cell ball sorting technology that are possible to analyze and separate the adherent cells without peeled off from culture dish. Cell ball technology is that adherent cells were cultured on the biological particle surface. We succeeded in culturing a variety of neuronal cells and micro neural networks on the collagen particle surface, and confirmed survival more than a month. In addition, we have succeeded in the flow cytometric analysis and sorting of various type cell balls using a microfluidics cell sorter with damage-free. These results suggested that Cell ball technology is useful to high-thouput analysis and sorting in the adherent cells.

Key Words: Cell ball technology, Neuron cell, Cancer cell, Collagen, Cell ball sorting

1.背景

細胞を蛍光標識し、一細胞ずつ高速で解析するフローサイトメトリーや特定の細胞を分離・回収するセルソーターは、生命科学の基礎研究および創薬・再生医療研究において広く使われている。しかしながら、解析やソーティングできる細胞種には限界がある。一度シャーレから剥がすとダメージがある接着細胞などは、表現型が失われてしまいプローブによって認識されない、死んでしまう、ソーティング後の再培養ができないなどの問題がある。神経細胞は、表現型が現れるまでに培養日数を要し、細胞状態を維持したままフローサイトメトリー解析を行うことは困難である。したがって、このような接着細胞のハイスループット解析は、96wellプレートなどのマルチウエルを使用して、細胞集団の平均的な特性を検出する手法が主に用いられてきた。幹細胞の分化においても、細胞接着後ある程度の培養日数を経て、表現型が現れる場合が多く、シャーレから剥がすことでダメージのある細胞は、分化後の再培養が難しく、細胞の純化法が求められている。

2.目的

本研究では、接着細胞を剥がすことなく、細胞状態を維持したままフローサイトメトリー解析およびセルソーティングできる技術の開発を目的とした。具体的には、生体成分で構成された粒子表面に細胞を培養する Cell ball 技術と細胞をダメージレスに解析・分離できるマイクロ流路型セルソーターチップ技術を組み合わせ、Cell ball のままフローサイトメトリー解析およびソーティングできる技術の開発である。

3.方法

3-1 コラーゲン粒子の作製法

細胞を接着させる材料として、Collagen Type-1 を用いて流動パラフィンとのエマルジョン法により、コラーゲン粒子を作製した。

3-2 Neuron ball の作製法

粒子表面にラット胎児(E18)から採取した大脳皮質、海馬初代培養細胞を使用した。Neurobasal Medium(lifetech.)、B27 Supplement(lifetech.) 混合培地を使い、CO₂5%、37℃下で培養を行った。

3-3 免疫化学染色法

作製したコラーゲン粒子の識別を Collagen type-1 抗体、神経細胞の識別を β -Tubulin III 抗体、グリア細胞(アストロサイト)の識別を GFAP 抗体を用い、細胞数を Hoechst33258 を用いてカウントした。シナプス形成を確認するためにプレシナプスマーカーである Synaptophysin を用いた。共焦点顕微鏡 (SP-8, Leica)を用い3次元蛍光画像を取得し、Image Jにより画像編集した。

3-4 Ca²⁺イメージング

カルシウム蛍光指示薬である Oregon Green 488 BAPTA-1 を用い、ACSF 溶液下で Cell ball の自発活動計測を行った。冷却 CCD カメラ (Luca, Andor)で画像取得し、Image Jにより輝度解析を行った。

3-5 Cell ball ソーティング

Cell ball のフローサイトメトリー解析およびソーティングの評価をマイクロ流路型セルソーターチップおよび On-chip sort (On-chip biotech.)を用いた。ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞、ヒトグリオーマ細胞をコラーゲン粒子の周りに攪拌培養法により培養させ、生細胞マーカーである Calcein-AM、PKH67 とコラーゲン粒子のマーカーである Collagen type-1 抗体を用いて解析した。

4.結果

4-1 コラーゲン粒子の作製

エマルジョン法により作製したコラーゲン粒子をフィルターを用いて粒径の制御を試みた。Fig.1A-F はフィルター前後のコラーゲン粒子の位相差顕微鏡画像及び蛍光顕微鏡画像である。Fig.1G,H はフィルター前後のコラーゲン粒子を示しており、フィルター前の粒径平均は 90.8 μ m、標準偏

差 53.1、フィルター後の ball サイズ平均は 92.6 μm 、標準偏差 15.5 となり、フィルターによりおおまかなコラーゲン粒子の粒径の制御が可能であることが確認できた。

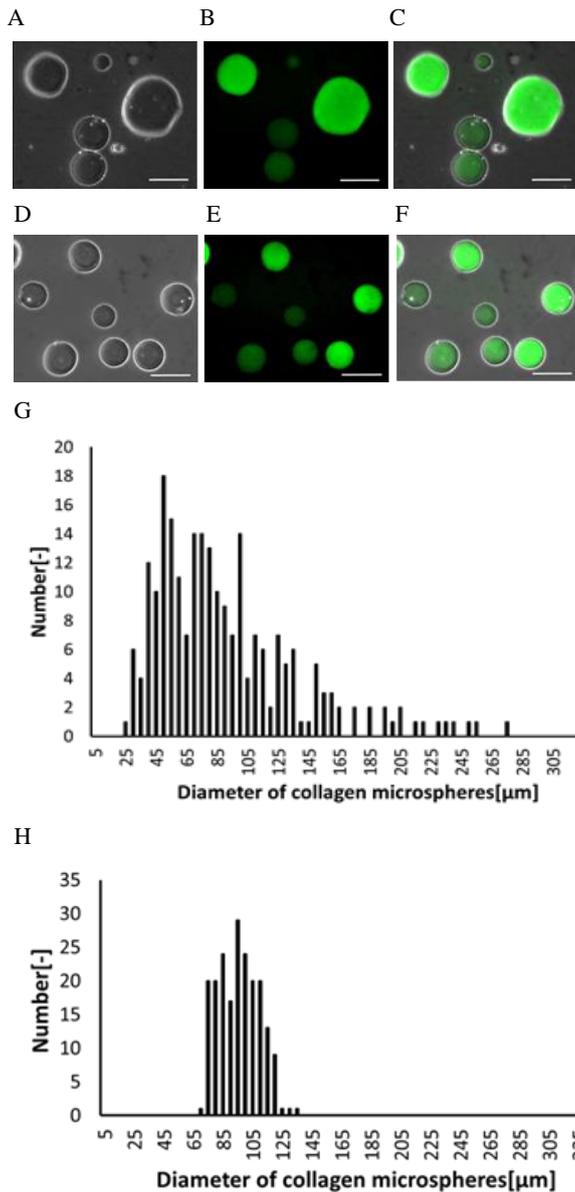


Fig.1 Generation of collagen microspheres

(A-C)フィルター前のコラーゲン粒子の顕微鏡画像、(A)位相差画像、(B) Collagen type-1 画像、(C)合成画像。(D-F)フィルター後のコラーゲン粒子の顕微鏡画像、(D)位相差画像、(E) Collagen type-1 画像、(F)合成画像。Scale bar=100 μm
(G)フィルター前のコラーゲン粒子分布図。(H) フィルター後のコラーゲン粒子分布図。

4-2 Neuron ball の作製

コラーゲン粒子表面での細胞培養では、1細胞レベルで神経細胞 ball、グリア細胞（アストロサイト）ball、神経細胞とグリア細胞の共培養 ball の作製および神経突起上にシナプス形成が確認された神経細胞 ball の作製に成功し、一ヶ月以上の生存を確認した。

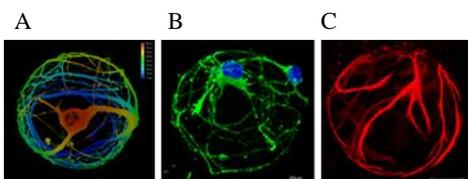


Fig.2 Fluorescence images of Neuron ball

(A)1神経細胞、(B)2神経細胞が粒子表面に接着した様子を示す共焦点顕微鏡3D画像、(C)粒子表面にグリア細胞が接着した様子を示す共焦点顕微鏡3D画像、(D-G)粒子表面に神経細胞とグリア細胞の共培養を示す共焦点顕微鏡3D画像。(D)合成画像、蛍光試薬(E) β -Tubulin III 画像、(F) GFAP 画像、(G) Hoechst33258 画像。
(H-K)粒子表面に伸展した神経突起上にシナプスの形成を示す共焦点顕微鏡画像3D画像。(H)合成画像、蛍光試薬(I) β -Tubulin III 画像、(J) Synaptophysin 画像、(K)Hoechst33258 画像。

4-3 Neuron ball の Ca^{2+} イメージング

三次元培養した Neuron ball 上の Ca^{2+} イメージングでは、粒子表面の神経細胞同士が Ca^{2+} オシレーションを示していた。Fig.3Bは3神経細胞の Ca^{2+} オシレーションの経時変化を示し、0.2sec以内で同期活動をしていた。同期活動はシナプス伝達によるものであり、ball 上に培養した神経ネットワークに機能的なシナプス形成が確認された。

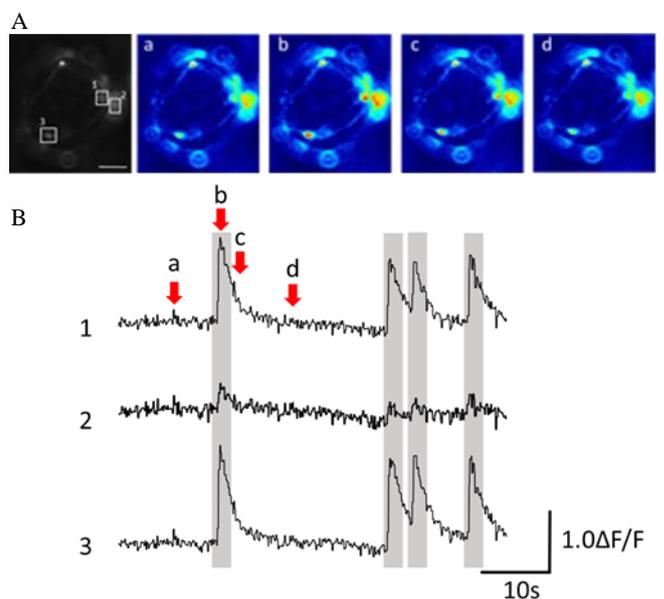


Fig.3 Ca^{2+} imaging of Neuron ball

(A)Neuron ball の蛍光顕微鏡画像、(a-d) Ca^{2+} オシレーション時の Neuron ball 蛍光顕微鏡画像(B)Neuron ball 上の神経細胞1～3の Ca^{2+} 輝度の経時変化。灰色の部分には Ca^{2+} オシレーションを示す。Scale bar=50 μm

4-4 Cell ball ソーティング

ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いたオンチップソーティングによる解析では、生きている Neuron ball 群、死んでいる若しくは細胞非接着の ball 群、コラーゲン粒子に付着していない細胞群の明確な分画が得られ、生細胞が接着

した Neuron ball 群のみのソーティングに成功した (Fig.4A-C)。ヒトグリオーマ細胞とラット神経細胞を用いた解析では、Neuron ball群、神経細胞群、Cancer ball群、がん細胞群の分画することが確認され、生細胞が接着した Neuron ball群のソーティングに成功した (Fig.4D-F)。ヒトグリオーマ細胞を用いた解析では、Cancer ball群、がん細胞群に分画することが確認された (Figure.4I)。Cancer ballソーティング後、100 μ m以下のballが基板に接着して細胞増殖が確認された (Fig.4J,K)。

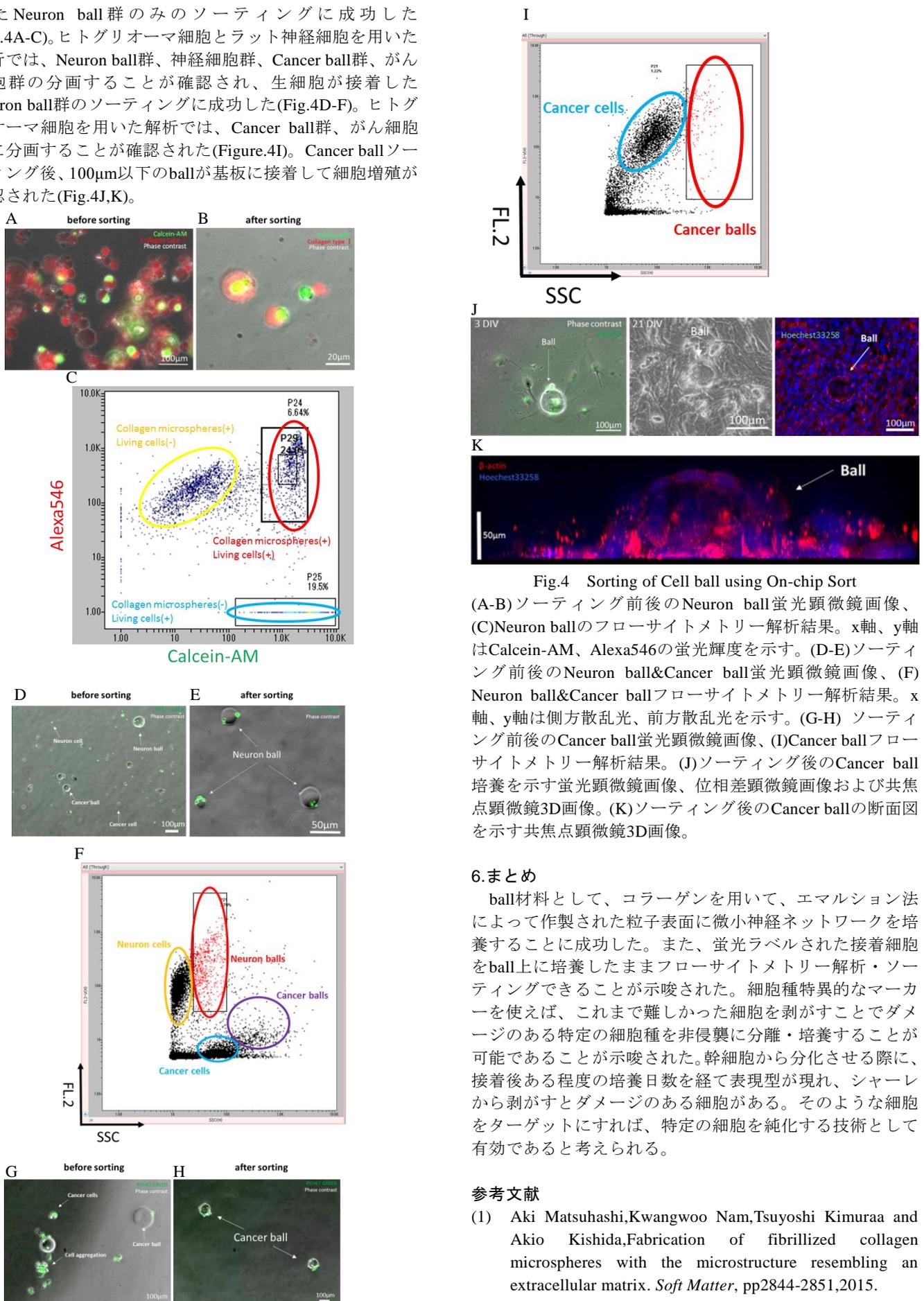


Fig.4 Sorting of Cell ball using On-chip Sort

(A-B)ソーティング前後のNeuron ball蛍光顕微鏡画像、(C)Neuron ballのフローサイトメトリー解析結果。x軸、y軸はCalcein-AM、Alexa546の蛍光輝度を示す。(D-E)ソーティング前後のNeuron ball&Cancer ball蛍光顕微鏡画像、(F) Neuron ball&Cancer ballフローサイトメトリー解析結果。x軸、y軸は側方散乱光、前方散乱光を示す。(G-H) ソーティング前後のCancer ball蛍光顕微鏡画像、(I)Cancer ballフローサイトメトリー解析結果。(J)ソーティング後のCancer ball培養を示す蛍光顕微鏡画像、位相差顕微鏡画像および共焦点顕微鏡3D画像。(K)ソーティング後のCancer ballの断面図を示す共焦点顕微鏡3D画像。

6.まとめ

ball材料として、コラーゲンを用いて、エマルション法によって作製された粒子表面に微小神経ネットワークを培養することに成功した。また、蛍光ラベルされた接着細胞をball上に培養したままフローサイトメトリー解析・ソーティングできることが示唆された。細胞種特異的なマーカーを使えば、これまで難しかった細胞を剥がすことでダメージのある特定の細胞種を非侵襲に分離・培養することが可能であることが示唆された。幹細胞から分化させる際に、接着後ある程度の培養日数を経て表現型が現れ、シャーレから剥がすとダメージのある細胞がある。そのような細胞をターゲットにすれば、特定の細胞を純化する技術として有効であると考えられる。

参考文献

- (1) Aki Matsuhashi, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimuraa and Akio Kishida, Fabrication of fibrillized collagen microspheres with the microstructure resembling an extracellular matrix. *Soft Matter*, pp2844-2851, 2015.