

iPS 細胞の品質管理を迅速かつ簡便に行える顕微鏡システムの開発
～顕微鏡観察により細胞の多能性を生きたままで定量的に評価～

研究成果のポイント

1. 細胞内微小構造を無染色で詳細に画像化できる顕微鏡システムを開発しました。
2. 画像解析によりミトコンドリア活性を定量的に評価する方法を開発しました。
3. 多能性幹細胞(iPS 細胞や ES 細胞)の多能性を、生きたまま顕微鏡観察するだけで定量的に評価できるシステムを確立しました。
4. 多能性幹細胞の品質の迅速、簡便かつ定量的な評価が可能となることから、再生医療等への応用が期待できる技術です。

国立大学法人筑波大学 医学医療系 西村健准教授、久武幸司教授らの研究グループは、多能性^{注1)}幹細胞を生きたまま観察するだけで、その品質が定量的に評価できる顕微鏡システムの開発に成功しました。

再生医療では、人工多能性幹細胞(iPS細胞)や胚性幹細胞(ES細胞)を分化させて利用します。しかしこれらの細胞の多能性が低いと、分化誘導効率が悪いため、分化しきれない細胞が残存し、腫瘍等を形成するリスクが増大します。このリスクを軽減するためには、細胞の多能性を評価し、多能性幹細胞の品質を管理する必要があります。多能性の評価には、細胞を固定・破壊して遺伝子やその発現パターンを調べる方法や、長期間をかけて分化誘導を行う方法がありますが、これらの多能性幹細胞の品質管理方法には大きな労力とコストがかかります。

本研究グループは、オリンパス株式会社が技術開発したRM-DIC顕微鏡^{注2)}を改良し、細胞内の微小構造を無染色で画像化できる「PD imaging system」の開発に成功しました。このシステムで得られた画像の処理方法を最適化すると、細胞内のミトコンドリア量を定量的に評価できることを見出しました。ミトコンドリア活性は多能性と逆相関することから、「PD imaging system」で多能性幹細胞を画像化すると、細胞を固定・破壊せずに生きたままで細胞の多能性が定量的に評価できることを明らかにしました。実際に、多能性の異なるiPS細胞群を「PD imaging system」で画像化すると、高い多能性を持つ高品質なiPS細胞を選別することができました。

「PD imaging system」で得られた多能性幹細胞コロニーの画像から、その断面像を重ね合わせると、三次元画像を構築することができます。この三次元画像からコロニーの形態や内部構造の情報を抽出し、多能性幹細胞コロニーの多能性を評価することにも成功しました。

「PD imaging system」は、多能性幹細胞の品質を迅速、簡便かつ定量的に評価することを可能にするため、再生医療等への応用が期待できる技術であると思われます。

本研究の成果は、2019年2月11日(日本時間午後7時)付けでScientific Reports誌で公開される予定です。

研究の背景

人工多能性幹細胞(iPS細胞)や胚性幹細胞(ES細胞)などの多能性幹細胞の、再生医療への応用が期待されています。しかし、多能性を安定に維持することが困難であるために、多能性幹細胞は非常に不均一な細胞集団になる傾向にあります。しかも、目的とする細胞に分化誘導後も、多能性を十分に獲得していない細胞は一部に未分化な細胞として残存し、移植後に腫瘍等を形成するリスクを持ってしまいます。そのため、iPS細胞誘導時や多能性幹細胞の維持培養時に、細胞が高い多能性を獲得しているかどうかを評価し、多能性幹細胞の品質管理を厳密に行う必要があります。しかし現在主に用いられている多能性評価方法は、まず不均一な細胞集団からクローニングによって均一な集団を得た後に、それぞれの細胞集団に対して、細胞の固定や破壊を伴う遺伝子発現解析によって多能性関連遺伝子の発現を確認したり、一ヶ月以上をかけてテラトーマを形成させて分化能を確認するというものです。多能性幹細胞から分化誘導した細胞を用いた再生医療の実用化を進めるためには、このように労力とコストがかかる多能性評価方法に代わる、培養中の多能性幹細胞から高い多能性を持つ細胞を簡便に選別し、すぐに分化誘導に用いることを可能にするシステムの開発が必要です。

研究内容と成果

オリンパス株式会社が技術開発したRM-DIC顕微鏡^{注2)文献1)}では、微分干渉顕微鏡の特性として、得られた画像のシアー方向によって画像の鮮明さに違いがありました(図1)。そこで、RM-DIC顕微鏡にシアー方向を切り換える機構を追加することによって、直交するシアー方向を持つ2枚の画像を一つの視野で取得することを可能にしました。このようにして得られた2枚の画像を重ね合わせる際の画像処理方法を最適化することによって、シアー方向の影響の無い細胞像の取得が可能になりました^{文献2)}。この「PD imaging system」で得られた画像(以降PD image)では、細胞を固定・染色することなく、従来の位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡よりも詳細に、細胞内微小構造が可視化されていました(図1)。可視化された細胞内微小構造の中から細胞質内に存在するものを抽出した画像(以降ePD image)を作成し、抽出された部分の面積比として、細胞質内の微小構造物を定量化した値(以降PD index)を算出しました。

次に、ePD imageに抽出された細胞質内の微小構造物が、どの細胞小器官に対応するかを検討しました。その結果、抽出された部分とミトコンドリアが多く重なっており、ミトコンドリア量の増減に対応してPD indexの値も変化したことから、ePD imageでは主にミトコンドリアが画像化されており、PD indexはミトコンドリア量を反映した値であることが明らかになりました。

本研究グループは、以前の解析^{文献3)}において、多能性が高いiPS細胞ではミトコンドリア活性が低く、反対に、多能性が低いiPS細胞ではミトコンドリア活性が高いことを明らかにしていることから、次に、多能性の違いを「PD imaging system」を用いて解析可能であるかを検討しました。まず始めに、研究グループの3S reprogramming system^{注3)文献4)}を用いて多能性の低いiPS細胞と高いiPS細胞を誘導し、それぞれを「PD imaging system」で観察・解析しました。その結果、多能性の低いiPS細胞では、ePD imageで見られる細胞質内微小構造が多く見られ、PD indexも高い値を示しました(図2)。また、同様に「PD imaging system」でES細胞を観察・解析した結果、やはり多能性が低いES細胞では高いPD indexを、多能性が高いES細胞では低いPD indexを示しました。以上の結果から、多能性幹細胞を「PD imaging system」で画像解析し、算出されたPD indexを用いることによって、細胞の多能性を生きたまま定量的に評価できることを明らかにしました。さらに、多能性の異なるiPS細胞の集団からランダムにクローニングした細胞の多能性とPD indexの関係を解析することで、各iPS細胞クローンの多能性とPD indexの値が逆相関することを明らかにしました。このことから、染色等を行うことなく、PD indexを用いて高い多能性を持つiPS細胞の選別が可能であることが示唆されました。

マウスの多能性幹細胞は立体的なコロニーを形成することが知られています。PD imageとePD imageは、コロニーの断面図を画像化できることから、横断面をコロニーの上から下まで10~30枚程度のePD imageとして取得し、重

ね合わせることによって、コロニーの三次元像を画像化することを試みました。その結果、細胞を染色せずにコロニーの立体像を作成することに成功しました。このコロニーの三次元像からは、垂直方向の断面も作成することが可能です(図3)。三次元像を用いて多能性幹細胞コロニーの多能性と立体的形状の関係を解析した結果、多能性が高い細胞ほど、立体的なコロニーを形成する傾向があることを発見しました。この傾向をコロニーの縦横比として定量化し、Aspect ratioとして算出した結果、多能性が高い細胞ほど高いAspect ratioを示すことが明らかになりました(図3)。この結果から、PD indexに加えAspect ratioも、多能性を定量的に表す数値として利用できることが示唆されました。

今後の展開

本研究で開発した「PD imaging system」では、多能性幹細胞を生きたまま顕微鏡観察するのみで、PD indexやAspect ratioによって細胞の状態やコロニーの形態を定量化でき、これらの数値を用いることによって、迅速、簡便に、細胞の多能性を定量的に評価できることが示されました。このシステムは、多能性幹細胞の品質管理に関わる労力やコストを大幅に削減できる可能性を持っており、多能性幹細胞を用いた再生医療の実用化に大きく貢献するテクノロジーになると期待されます(図4)。

また今回の研究では、PD imageから抽出した細胞質内の微小構造のみを多能性の評価に用いましたが、抽出時の閾値を変えることにより、核小体などの別の細胞小器官を抽出することも可能であると思われます。これにより核小体量の変化を伴うガンなどの疾患に対しても、「PD imaging system」を用いた定量的評価が可能であると思われます。さらに、「PD imaging system」は無染色で細胞集合体の内部構造を立体的に画像化できることから、オルガノイドなどのより複雑な細胞集合体の解析にも応用することが期待されます。

参考図

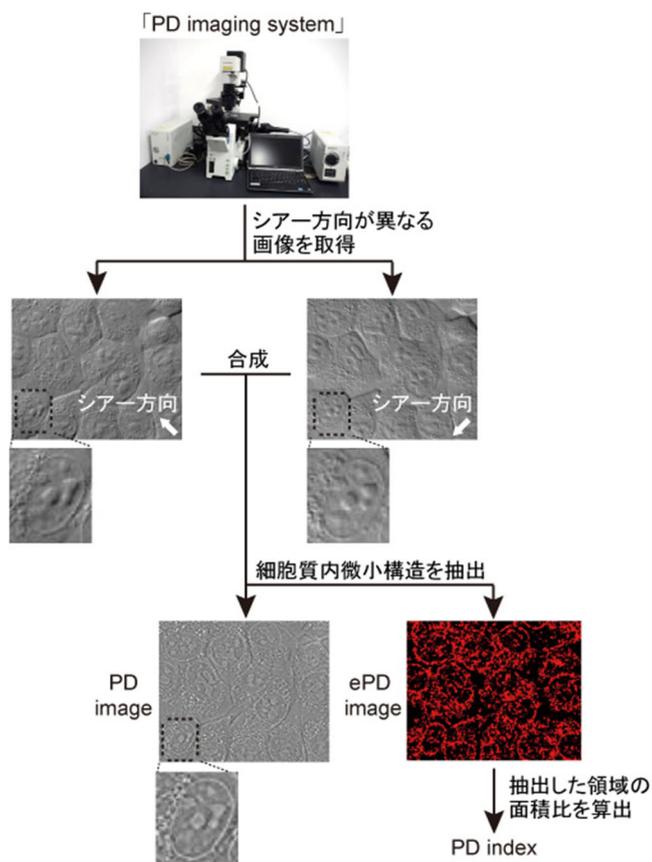


図1:「PD imaging system」による細胞内微小構造解析

「PD imaging system」によって取得した、シアー方向が直交する画像を合成することによって、細胞内微小構造の詳細な画像化が可能になる。

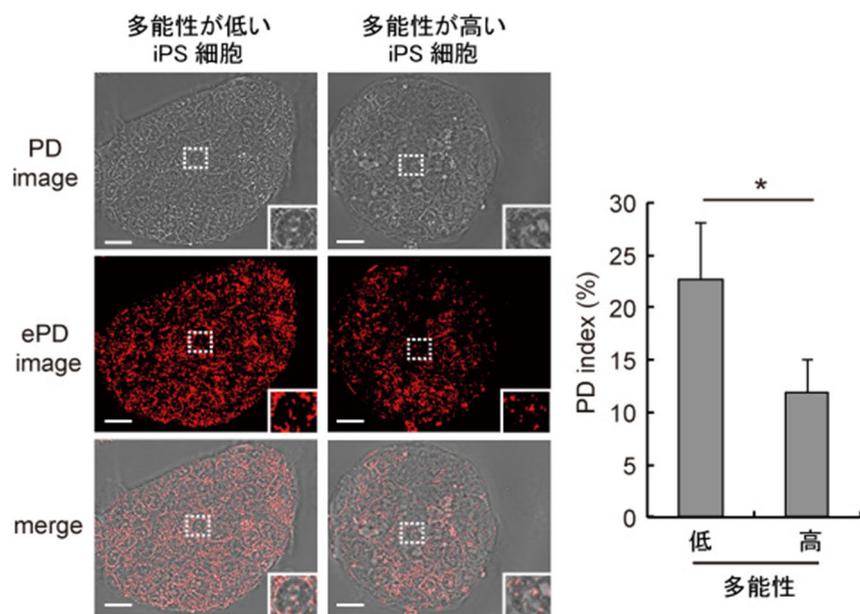


図2:異なる多能性を持つ iPS 細胞の解析

多能性が高い iPS 細胞では、ePD image で抽出される細胞質内微小構造が少なく、PD index も小さい値を示す。

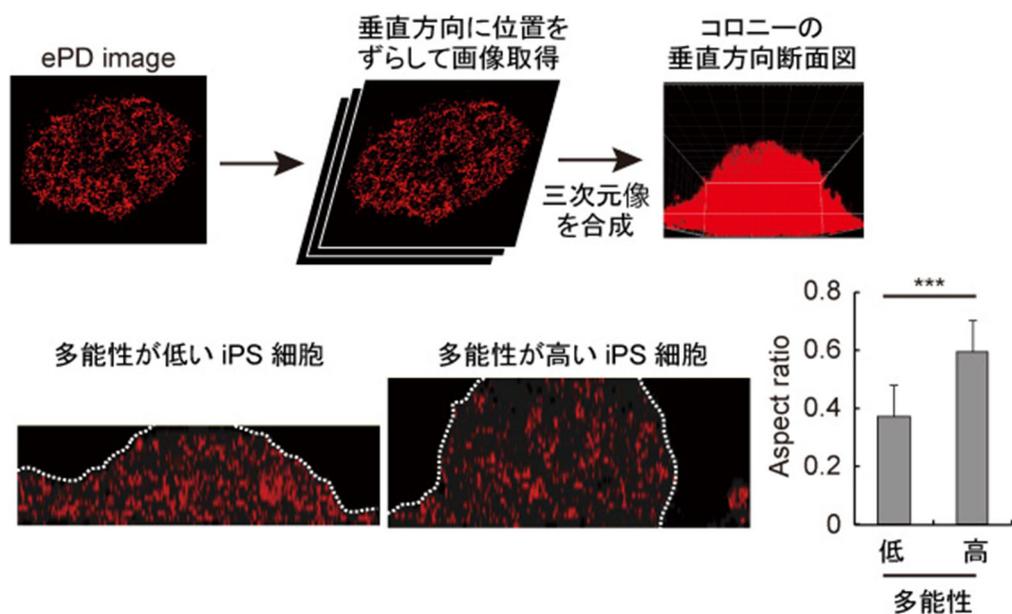


図3:iPS 細胞コロニーの三次元像取得と形状解析

多能性が異なる iPS 細胞に対して、ePD image を重ねて各々のコロニーの三次元像を取得し、その断面図を比較すると、多能性が高い細胞ほど、立体的なコロニーの形状をしていることがわかる。縦横比を示す Aspect ratio も多能性と相関した値を示す。

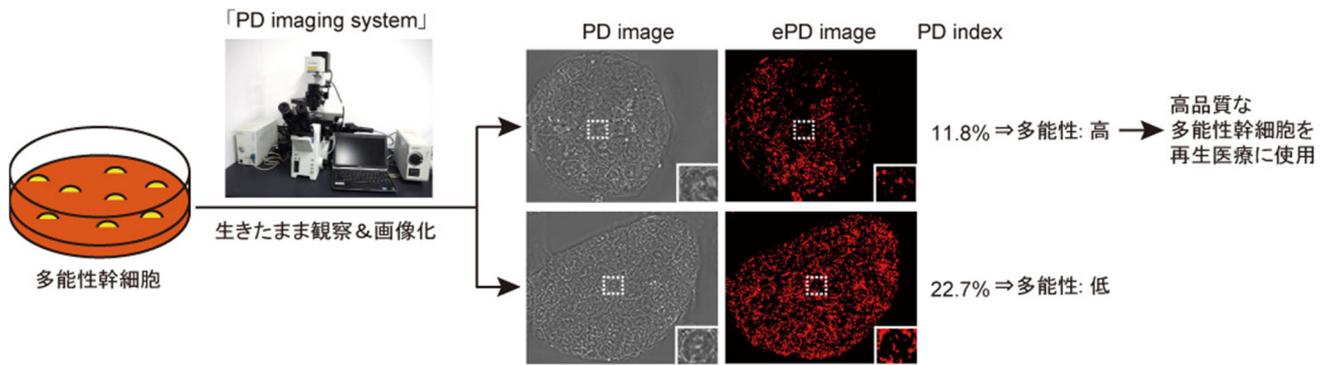


図4:「PD imaging system」を用いた多能性幹細胞品質管理のモデル

培養している多能性幹細胞を、生きたまま何も処理することなく「PD imaging system」で観察し、各コロニー毎に PD image を取得する。ミトコンドリアを含む細胞質内微小構造を PD image から抽出して ePD image を作成し、抽出されてきた領域の面積比として PD index を算出する。多能性が高い細胞は低い PD index を示すことから、PD index の値を指標に多能性幹細胞の品質を定量的に評価することができる。

用語解説

注1) 多能性

様々な組織に分化できる能力(多分化能)と、性質が変わることなく増殖する能力(自己複製能)の両方を併せ持つ能力を多能性といいます。胚性幹細胞(ES 細胞)は多能性を持つ代表的な細胞。iPS 細胞も体細胞に遺伝子を導入して、ES 細胞と同等の多能性を獲得させた細胞です。高い多能性を維持している iPS 細胞は高品質な iPS 細胞と考えられ、様々な組織を分化誘導し、再生医療に応用することができます。

注2) RM-DIC 顕微鏡

生細胞のように無色透明な物体を生きたまま観察できる顕微鏡に微分干渉顕微鏡(Differential interference contrast microscope)があります。この微分干渉顕微鏡は、ある一定の方向(シアー方向)に横ズラシした2つの物体像を元に画像を形成するため、シアー方向については微細な構造の観察が可能です。干渉計に用いられている計測技術を微分干渉顕微鏡に付加して、観察物体の微細な形状の三次元計測を可能にした装置がRM-DIC(Retardation-Modulated Differential Interference Contrast)顕微鏡です。

注3) 3S reprogramming system

本研究グループの SeVdp ベクターシステムを使って Klf4, Oct4, Sox2, c-Myc 遺伝子を導入して iPS 細胞を誘導する際、Klf4 タンパク質の発現量を調節することによって、誘導されてくる iPS 細胞の多能性を変えられる iPS 細胞誘導システム。Klf4 量が少ないと多能性が低い iPS 細胞が、多いと多能性が高い iPS 細胞が均質な細胞群として誘導されます。

参考文献

- 1)Ishiwata, H., Itoh, M. & Yatagai, T.: A new analysis for extending the measurement range of the retardation-modulated differential interference contrast (RM-DIC) microscope. *Opt. Commun.* Vol. 281, 1412-1423, 2008
- 2)Ishiwata, H.: Phase distribution measurement method and phase distribution measurement apparatus. *U.S. patent* No. 9,594,941, 2017

3) Nishimura K, Aizawa S, Nugroho FL, Shiomitsu E, Tran YTH, Bui PL, Borisova E, Sakuragi Y, Takada H, Kurisaki A, Hayashi Y, Fukuda A, Nakanishi M, Hisatake K: A role for KLF4 in promoting the metabolic shift via TCL1 during induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cell Rep.* Vol. 8(3), 787–801, 2017

4) Nishimura K, Kato T, Chen C, Oinam L, Shiomitsu E, Ayakawa D, Ohtaka M, Fukuda A, Nakanishi M, Hisatake K: Manipulation of KLF4 expression generates iPSCs paused at successive stages of reprogramming. *Stem Cell Rep.* Vol. 3(5), 915–929, 2014

掲載論文

【題名】 Live-cell imaging of subcellular structures for quantitative evaluation of pluripotent stem cells
(細胞内微細構造を生細胞で画像化するシステムを用いた多能性幹細胞の定量的評価方法)

【著者名】 Ken Nishimura(西村 健), Hiroshi Ishiwata(石渡 裕), Yuta Sakuragi(櫻木 佑太), Yohei Hayashi(林 洋平), Aya Fukuda(福田 綾), Koji Hisatake(久武 幸司)

【掲載誌】 Scientific Reports
doi:10.1038/s41598-018-37779-x

問い合わせ先

西村 健(にしむら けん)

筑波大学 医学医療系 准教授

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

久武 幸司(ひさたけ こうじ)

筑波大学 医学医療系 教授

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1