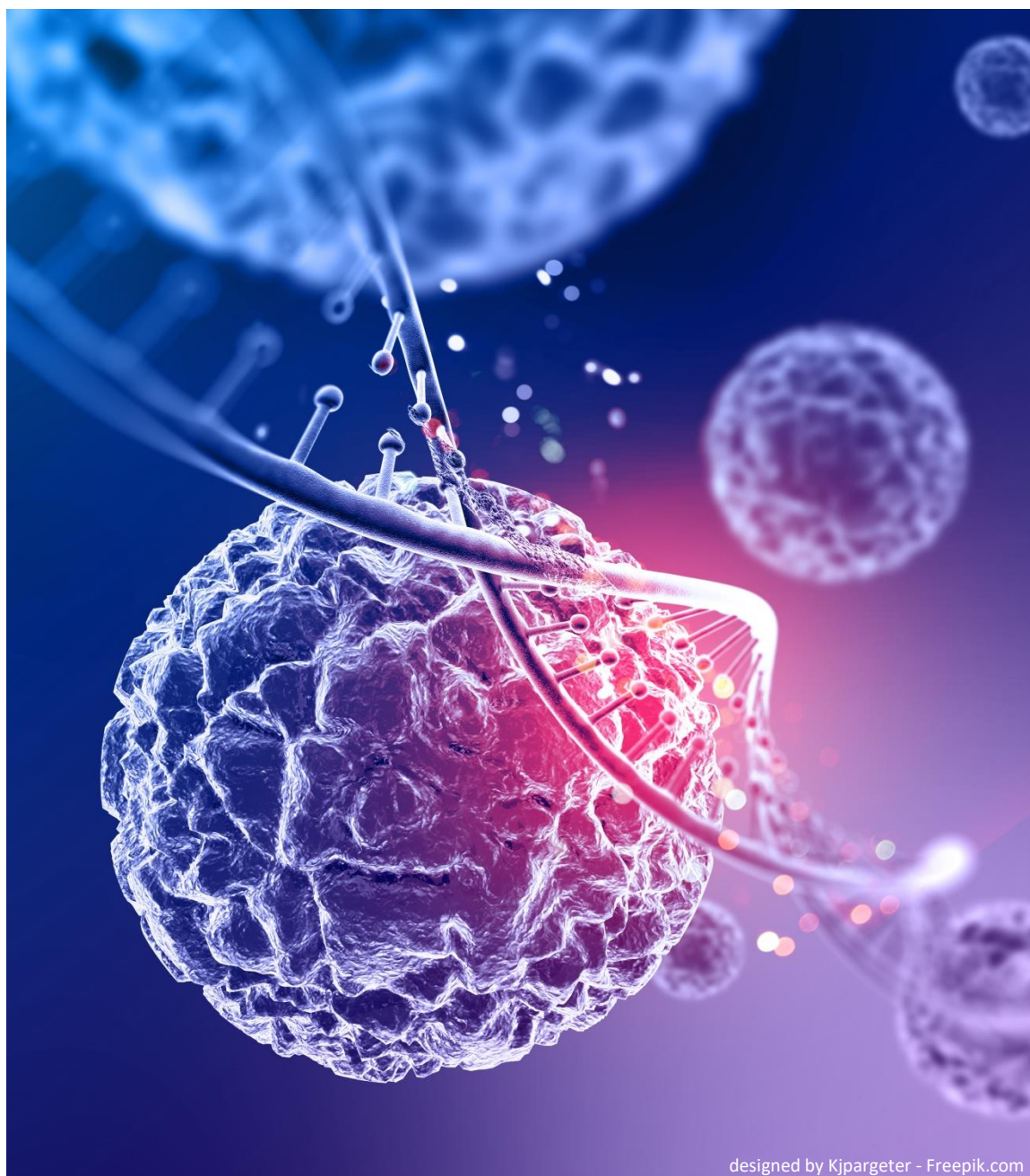


セルソーティングによる細胞ダメージ“SICS”
(Sorter Induced Cellular Stress)
を最小限に抑えるセルソーター

“On-chip[®] Sort”

～質の高い細胞をソーティングするための革新的技術～



designed by Kjpargeter - Freepik.com

株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

はじめに

近年のバイオメディカル分野における急速な技術発展は、短時間にシングルセル・レベルで多くのサンプルを観察する事（ハイスループット・スクリーニング）を実現している。加えて再生医療などにおける幹細胞創生技術は、誘導によって得られた細胞集団がヘテロであるため、その中から目的の細胞のみを選抜する操作も必要となっている。このように ハイスループット解析技術を応用し、**如何に質の高い細胞サンプル**を取得するかが重要となってきている。

ハイスループット細胞処理技術の一つとしてフローサイトメーター・セルソーターがある。しかしながら、細胞ソーティング後に細胞が増えずに死んでしまったとか、発現プロファイルが異なったという経験はないだろうか？

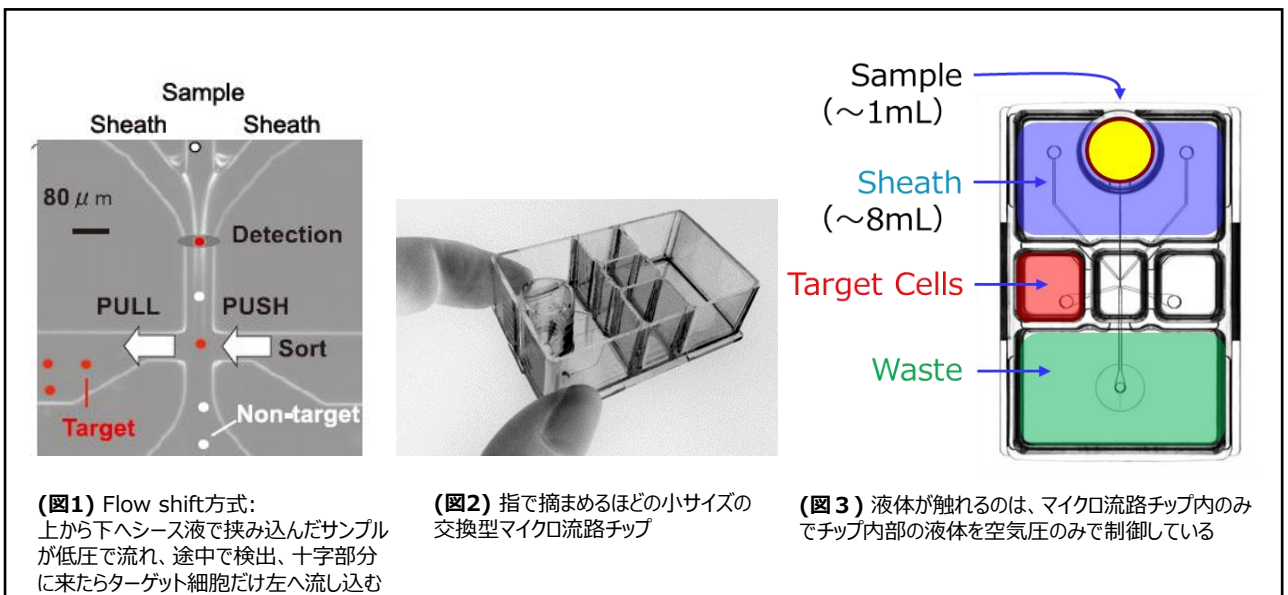
それは**SICS(Sorter Induced Cellular Stress)**と表現がされる、細胞へのダメージ、ストレスに起因している。従来のJet-in-Air方式のセルソーターは、1)シース圧が強い 2)液滴形成に超音波をかける 3)分取するために電荷をかける 4)超高速で液面もしくは壁面へ衝突させる 5)細胞にやさしいシース液ではなく浸透圧などの環境変化が激しい、などの懸念があり、これによりソーティング後の細胞に、1)生育速度が落ちる 2)形態が異なる 3)機能が落ちる 4)フェノタイプが変わる、などの影響が出る可能性がある。このようなSICSと呼ばれる現象は、間違いなく2次解析にも影響を与えると考えられる。

一方、当社が販売するマイクロ流路内完結型セルソーター **“On-chip® Sort”** はシステムの違いからこのSICSの影響を大幅に低減しており、「細胞に優しい」セルソーターとなっている。

On-chip Sortとは

マイクロ流路内の液体を空気圧制御のみでコントロールして、単純にターゲットを流し込むソーティング方法とした“Flow shift”方式（図1）という独自のセルソーティングシステムを搭載したのが“On-chip® Sort”である。そのシステムは指で摘まめるほどのサイズの小さい使い捨て交換型マイクロ流路チップ（図2）を採用したことで可能となり、流路系全体がこのチップ内に収まり（図3）、少量培地でもソーティングすることが出来る。また装置本体に液体が触れることがないためメンテナンスが容易いであり、使い捨て交換型チップであるためにクロス コンタミネーションの可能性もないという画期的なシステムである。

このようなシステムをイメージをするだけでも**細胞に与えるストレスが緩和される**ことが容易に想像できるのではないだろうか。



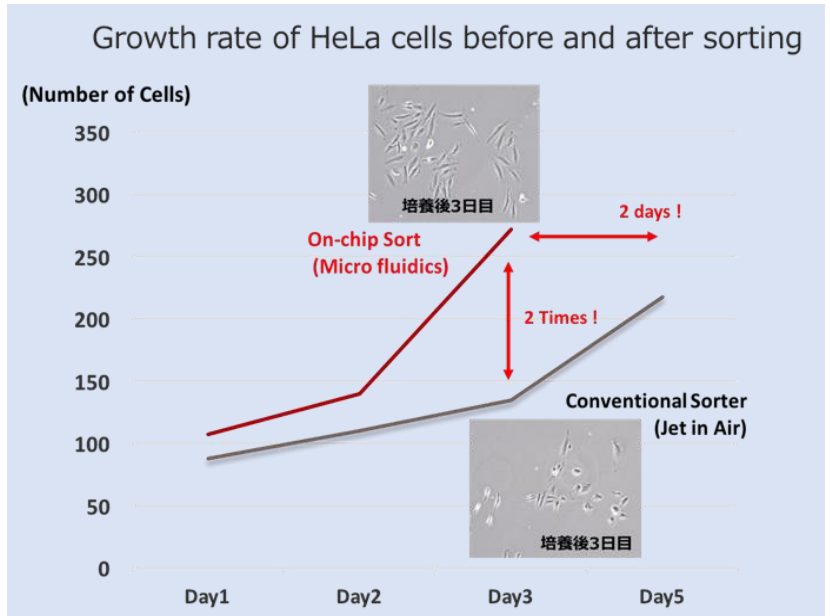
ダメージフリー・ソーティング

“On-chip® Sort” のSICSを抑える効果は、どの程度のものなのだろうか？そこで、育成速度と形態維持について代表的なJet-in-Air方式のセル・ソーター（以下ではConventional Sorterと呼ぶ）と当社On-chip® Sortを用いて比較した。

我々は、一般的に増殖能力が非常に高く、ソーティング後においても容易に増殖可能な細胞株としても知られているHeLa細胞(子宮頸がん由来)を対象としてソーティング後の育成状況を観察した(図4)。

各ソーターでそれぞれ100個ずつソートした細胞を96穴プレートに播種し、1日間隔で細胞数をカウントした。増殖の差が認められたのは、2日後以降。On-chip® Sortでソーティングした細胞は、一足早く増殖を始めた。3日目で2倍の細胞数に増え、Conventional Sorterが同じ細胞数に達するのはその2日後であった。

このようなソーティング後の培養で問題がないとされてきた細胞株においても育成速度に差が認められたことは、増殖能力の低い細胞や物理的ダメージに弱い細胞などへの影響が更に顕著になるだろうと憶測される。

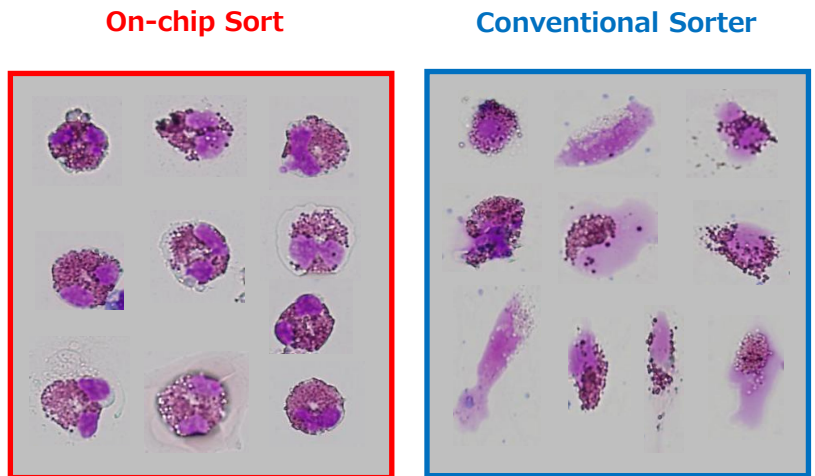


(図4) ソーティング後のHeLa細胞の増殖曲線。
横軸は播種後の日数、縦軸は細胞数。写真は3日目に撮影したもの。

セルソーターは、従来リンパ球など物理的ダメージに非常に強い細胞をソーティングするために開発され、発展してきた。そのため、リンパ球ソーティングにおける形態上変化というのはどちらのタイプのソーターもほとんど差がないと思われる。しかしながら、少し複雑な構造をしている細胞や少し大きな細胞をソーティングするときは事情が異なる。

本データは、細胞内顆粒が多い好酸球をソーティングし、サイトスピンで標本化したものである(図5)。一目で判別できる通り形態上大きな異なりが認められる。

我々もソーティングのみでここまで大きな形態差が出るとは考えていないが、ソーティング後の細胞膜の弱り具合の差がサイトスピンでスライドに吹き付ける際に大きな負担となり、このような顕著な差が生まれていると考察する。



(図5) 末梢血好酸球のソーティング後サイトスピンで標本化したときの形態。左がOn-chip® Sort後、右が従来のソーティング後。

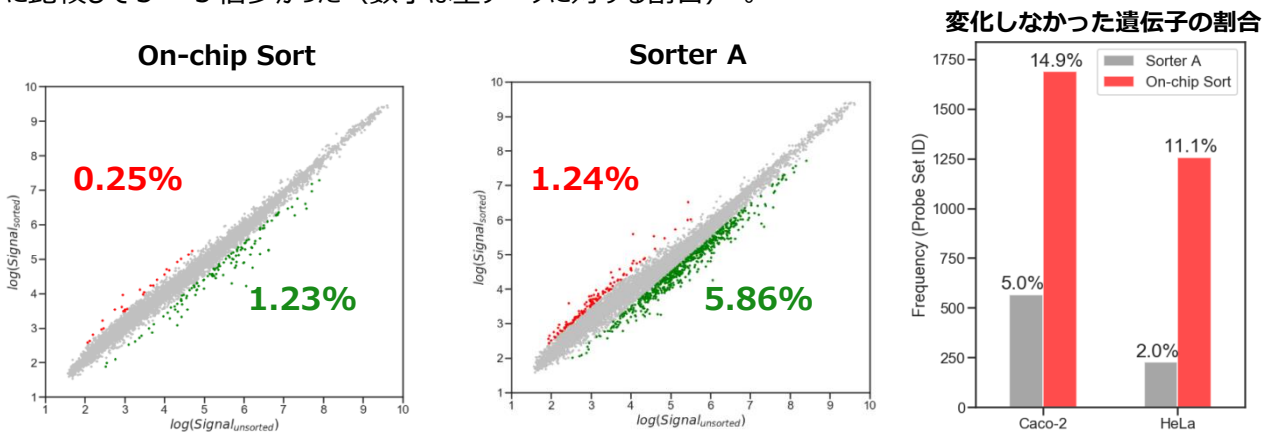
遺伝子発現パターンに与える影響

再生医療分野において疾病へとつながる細胞内の分子パスウェイについての手ごかりは多く集められてきているが、そのようなパスウェイがどのように疾患に影響するかといった知見は未知の部分がいまだ多く存在する。その解析のためには遺伝子発現解析が有効であるが、ES細胞などの幹細胞では継代だけでも遺伝子発現パターンが変動する可能性もあり (Matoba, et al. PLOS ONE, 1(1): e26)、より質の高いデータを得るためにこのような環境要因による影響を最小限に抑える工夫が必要である。

ここでは細胞ソーティングの遺伝子発現パターンへの影響を調べるため、Caco-2細胞とHeLa細胞の2種類の細胞を2種類のセル・ソーター (当社On-chip Sortと他社製Jet-in-Air方式のソーターA) で 5万個ずつソーティングし、それぞれ遺伝子発現量の変化を、ソートしていない細胞をコントロールとしてマイクロアレイ解析をおこなった。

図6左・中において、On-chip® SortはソーターAに比べて、細胞の遺伝子発現に与える影響が少ないことが示唆された。

図6右において、遺伝子発現レベルが全く変動しない遺伝子数は、On-chip® Sortが既存のセルソーターに比較して3～5倍多かった (数字は全データに対する割合)。

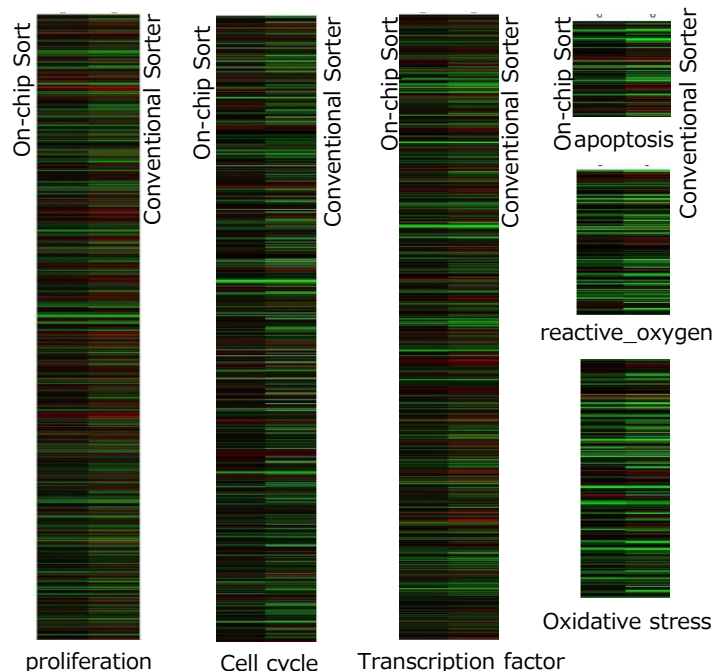


(図6左・中) 赤・緑の点はコントロール (ソート無し) のものと比較して大きく遺伝子発現量が増加したものを表す (数字は全データに対する割合)。(図6右) 各プロパティ(apoptosis, cell adhesion, cell cycle, etc)で分類されている生データをすべて統合したデータのうち、発現量の変化 (ソートした細胞のシグナル強度 / ソートしていない細胞のシグナル強度) をヒストグラムとして、HeLa、Caco-2でプロットした結果。

同上解析データを更に分類ごとに分けて主に差が認められたものを示した (図7)。細胞増殖、細胞周期、細胞死などの分類で差が認められることは、前記した育成速度が異なる現象を補正して説明するデータとなりえる。また転写因子にも影響がありそうなことからソーティング後の2次解析の解釈も慎重なものとなる可能性がある。

今回のプロトコルは、ソーティング後30~60分間に次処理をした結果であるため、手技的な工夫次第では今回示した結果と異なる結果が得られる可能性はあるが、今回の培養と遺伝子発現の両データから、ソーティング方法の違いが細胞に与えるストレスについては、少なからずの注意が必要であることが示唆される。

マイクロアレイ解析協力：
株式会社セルイノバター受託研究部 安田様、萩原様
九州大学 田代康介先生

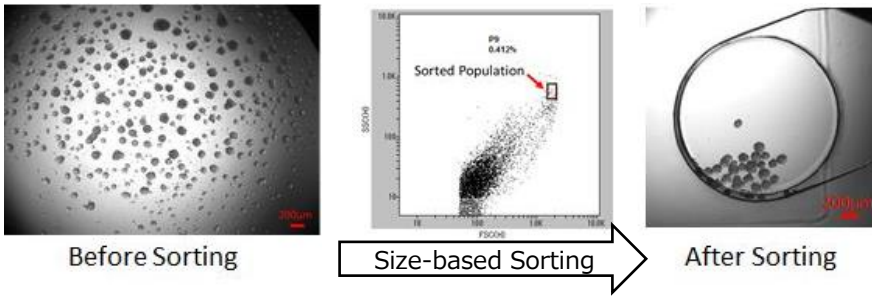


(図7) 主に差が認められる分類ごとの解析。左がソーティングなしと比較したOn-chip® Sort。右がソーティングなしと比較したConventional Sorter。黒が差がなし。緑が低下。赤が上昇。

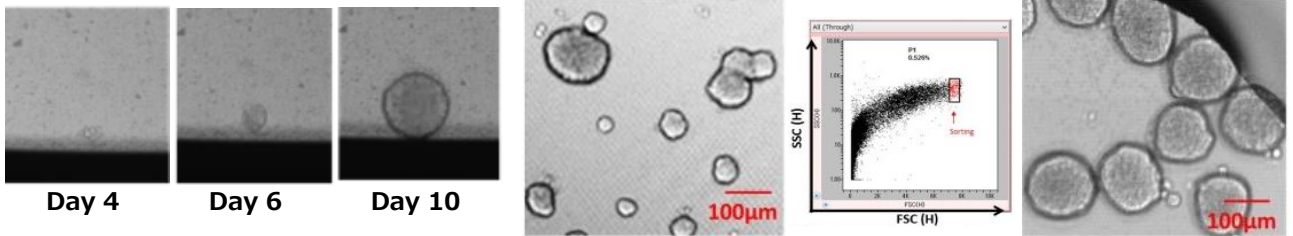
スフェロイド（細胞塊）のソーティング

3次元培養（3D Cell Culture）は、より生体に近い状況を再現できることから、幹細胞スフェロイドによる薬物代謝・毒性試験など、様々な分野で利用されている。しかし、作製するスフェロイドのサイズによって分化しやすい臓器が決まることから、より質の高いスフェロイドを得るためにはスフェロイドのサイズを制御する必要があった。

既存のセル・ソーターでは、スフェロイド等のサイズの大きい細胞塊は液滴形成時の圧開放ダメージや細胞回収時の受け皿への衝突により、スフェロイドの形状が変わる、または壊れたりする可能性が高い。しかし、当社のOn-chip® Sortでは流路幅80μmのチップであっても最大45μm径まで培養したスフェロイドを分取し（図8）、再度培養することでダメージ等の影響を与えずに100μm径サイズのスフェロイドを作製することが可能となっている（図9）。また我々の開発した150μm幅の流路チップを用いることで、100μm径サイズのスフェロイドのみを選択的にソートすることも可能である（図10）。



（図8） On-chip® Sortによるスフェロイドのソーティング

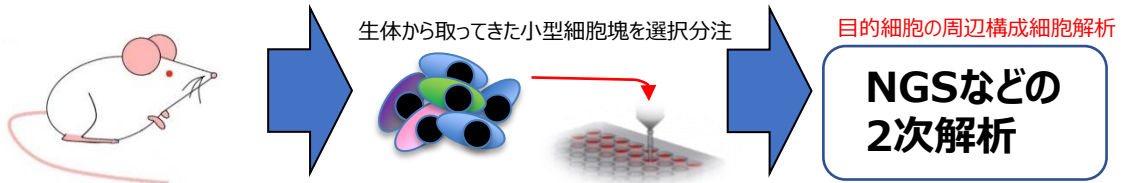


（図9） ソートしたスフェロイドの100μmサイズへの培養

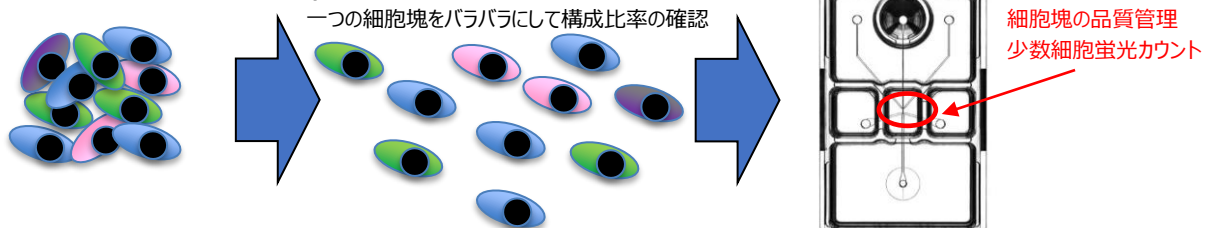
（図10） 100μmサイズ・スフェロイドのソーティング

クラスター（細胞塊）のソーティングと構成解析の可能性

パターン1（周辺結合細胞解析）



パターン2（構成細胞品質解析）



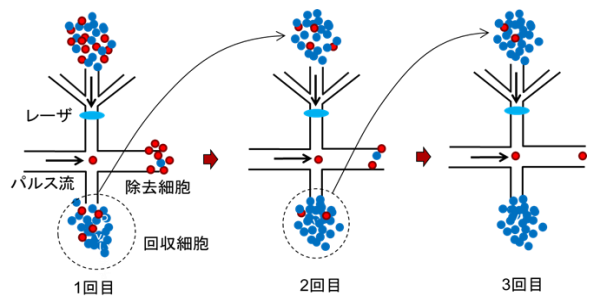
（図11） 細胞塊の活用イメージ例

わずかな残存未分化細胞を完全に取り除く “繰り返しネガティブ・ソーティング”

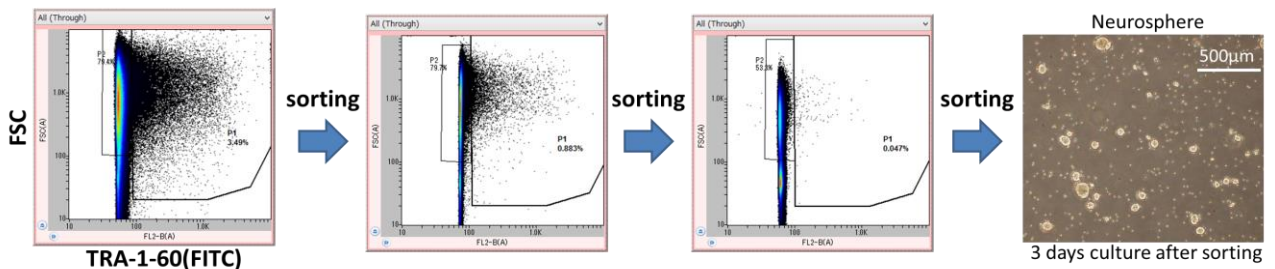
iPS細胞などの幹細胞から分化誘導した細胞を使用する際、未分化細胞の残存が腫瘍化する危険性があるため、未分化細胞を効率的に除去し均一な分化細胞のみの細胞集団を得るため、現在さまざまな手法が用いられている。しかし、未分化細胞の完全な除去は難しい。ここではそのような目的のために開発された“繰り返しネガティブ・ソーティング”という概念を説明する。

繰り返しネガティブ・ソーティングとは

通常のセル・ソーターは「必要なものを分取するのみ」であり、分取する以外の細胞は大きなタンクへ廃液として流される。繰り返しネガティブ・ソーティングではソートにより「不必要なもの（＝未分化細胞）を分取する」。そして廃液を回収することを目的とする（図 1 2）。廃液で回収された細胞集団はまだ未分化細胞を含んでいる可能性があるため、再びネガティブ・ソーティングを複数回行うことで最終的には未分化細胞を完全に除去することが出来る（図 1 3）。



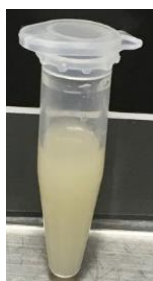
(図 1 2) 繰り返しネガティブソーティングの概念図



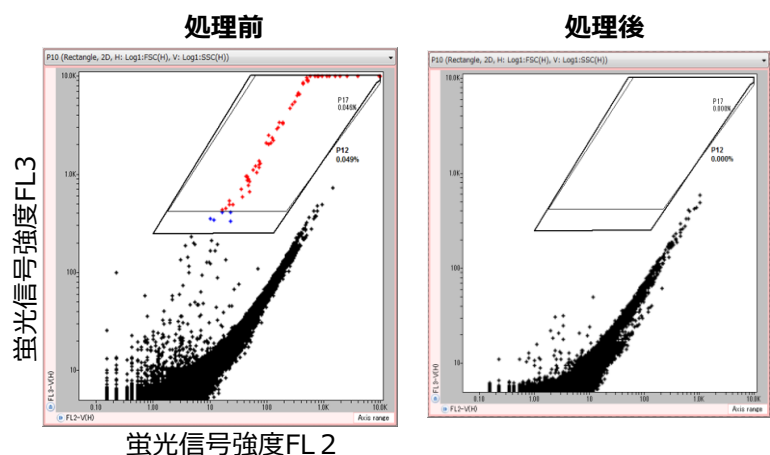
(図 1 3) 繰り返しネガティブソーティングによる未分化細胞の除去

分化誘導された神経幹細胞に残存する約4%の未分化細胞の除去を行った。未分化細胞をTRA-1-60抗体でFITC蛍光ラベルをおこない、その蛍光によって未分化細胞を検出し除去した。3回繰り返し処理により未分化細胞が50個以下に減少し、3回目のソーティング後“ゼロ”になると仮定した状態でその後の培養も可能である事が確認された。

量産規模となる 10^8 個細胞の高濃度状態（図 1 4）における細胞除去を検討した。Molt4を 10^8 個まで培養して 10^4 個の未分化細胞をスパイク（意図的に混入）したものをサンプルとした。未分化細胞をTRA-1-60抗体で染色した。図 1 5において除去すべき未分化細胞を“ゼロ”にしたことを示している。本処理時間は40分程度で可能であった。未分化細胞残存数が更に多い 10^5 個程度の場合は、繰り返し操作が6回となり処理時間は60分と予想されるが、それでも処理は実現可能であると考えられる。



(図 1 4) 処理サンプル濃度：
> 10^8 個/mL



(図 1 5) 繰り返しネガティブ・ソーティング処理前・処理後のサンプルの散佈図。
未分化iPS細胞による蛍光が消失し、未分化細胞が除去された。

StemSure® hPSCリムーバーと繰り返しネガティブソーティングの組み合わせによる現実的な未分化細胞完全除去

StemSure® hPSCリムーバーは、iPS細胞除去試薬として製品化されている。1x10⁸個のMolt4細胞中にiPS細胞数4x10⁶を添加し、本リムーバーを0.2 µg/mLの濃度で24時間作用させ、その後、浮遊状態のiPS死細胞を含む上澄みを取り除いて、張り付いているiPS細胞数を全量評価した。

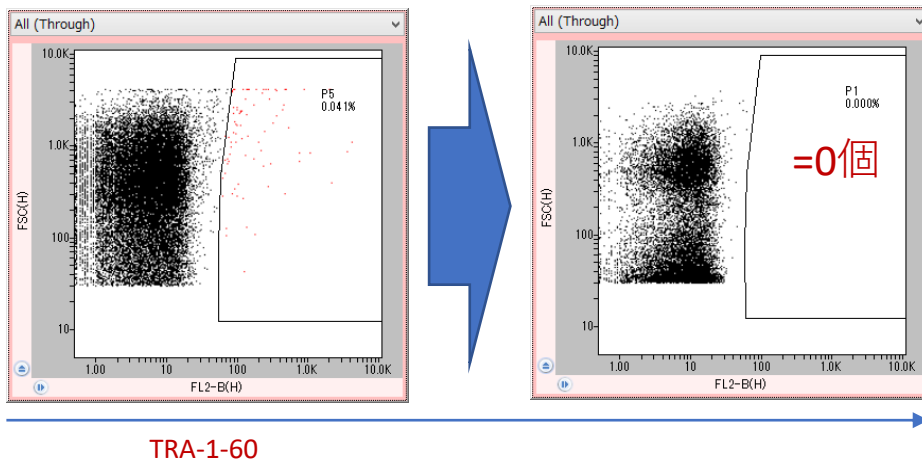
その結果、処理前のiPS細胞数4x10⁶個が、24時間処理後に2x10⁴個まで低減した。

On-chip Sortは1x10⁸個中の最大1x10⁵個の未分化細胞までしか完全除去することが出来ない。分化誘導させた細胞の未分化細胞残存率は~20%とバラツキが大きくOn-chip Sortにおいて処理することが出来ないケースもある。

しかし、本リムーバーを使用することにより残存数を更に減少させることが出来る。

10⁴個細胞の残存であればソーティング処理時間は40分程度でありTRA-1-60発現細胞を確認しなら“ゼロ”にすることができる(図16)。

(2018年 富士フィルム和光純薬工業チラスから抜粋)



(図16) 繰り返しネガティブ・ソーティング処理。TRA-1-60染色した細胞を除去して分化細胞のみを回収する。

上記の成果はAMED「医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発/ヒト多能性幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発」において当社と京都大学ウイルス再生研 中馬准教授と共同で実施しました。(除去試薬提供協力：富士フィルム和光純薬)

まとめ

On-chip® Sortは、既存のセル・ソーターでは実現できない様々な特徴(ダメージフリー・ソーティング、細胞塊のソーティング、ネガティブ・ソーティング)を概観してきた。再生医療分野を中心に質の高い細胞集団(均一サイズ、遺伝子発現への影響の最小化など)を得ることは重要なファクターである。

またOn-chip Biotechnologiesは、セルソーターの機能を拡張するための2機種も販売している。

オイルもシース液として流すことが出来るソーターの特徴を生かすためのW/Oエマルジョンを作製するOn-chip® Droplet generatorと、7~200µmサイズまでのサンプルを1個/1ウェルで分注していく On-chip® SPiSである。どちらの製品もOn-chip Sortと組み合わせることでシングルセル解析の可能性の枠が広がるツールであると考えられる。

皆様のご支援のもと、マイクロ流路チップ方式のOn-chip Sortで、全く新しいソーティングの世界を切り開いて行きたいと考えております。

世界初！交換型マイクロ流路チップ・セルソーター

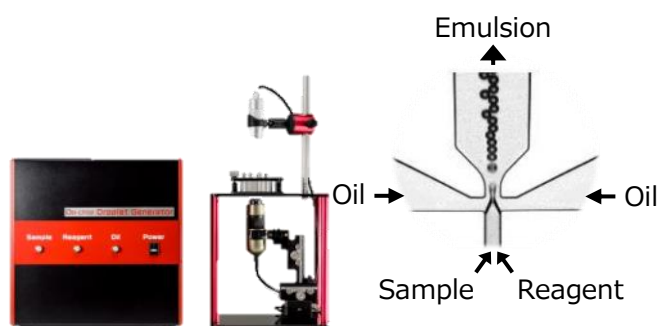
On-chip® Sort

- 1 ダメージなく細胞を分離
- 2 シース液に培養液、海水、オイル等を選択可能
- 3 無菌的、コンタミネーションフリーで分離可能
- 4 小型、簡単操作、バイオハザード対応

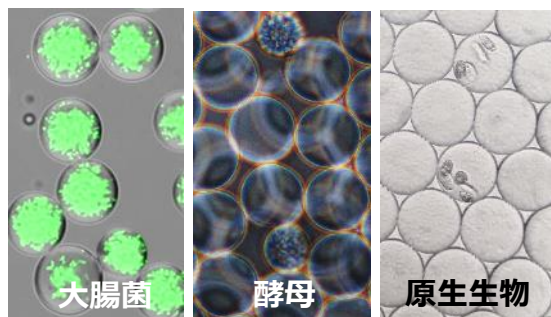


細胞/細菌や遺伝子のシングル封入されたエマルジョンを大量作製

On-chip® Droplet Generator



例) 作成、培養後



簡単・確実にシングルセルをウェルプレートに分注

On-chip® SPiS



細胞数確認

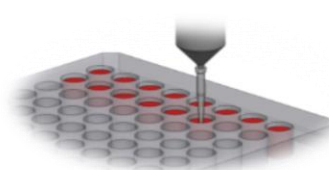


CCDカメラで細胞数を検出
1個となるまでリトライ

1個の場合



ウェルに分注



検出された細胞が1個の場合ウェルに分注
= 確実に一個ずつ分注

細胞吸着防止試薬

On-chip T Buffer



1. 細胞洗浄による損失を最小限に抑え、様々な用途の洗浄液としてお使いいただけます。
2. コーティング作用がありチップやチューブへの細胞の吸着を防ぎます。