

Application News

No. B98

MALDI-TOF 質量分析法

培養細胞の簡易評価

– 卓上型 MALDI-TOF MS を用いた iPS 細胞の分化／未分化評価 –

培養細胞の生育状態や分化／未分化を判断することは、再生医療や基礎研究においての重要な評価項目となります。この細胞評価を質量分析により簡単に実施できれば、煩雑な作業や時間の節約につながります。

そこで、iPS 細胞およびその培養液を対象として、質量分析により細胞の状態を知ることが可能かどうかを知るため、MALDI-8020 を用いた AuraSolution™ による自動分析と、統計解析ソフトウェアである eMSTAT Solution™ による予備的な解析を試みましたのでご報告します。

S. Nakaya

■ 分析試料の調製

培養細胞サンプルおよび培地サンプルとして、表 1 に示した各培養段階の iPS 細胞と培地を用いました。培養中の培地は 1 日おきに半量を新しいものと入れ替えました。定量 PCR を用いて、分化／未分化マーカーである OCT3/4 と NANOG（未分化マーカー）、SOX1（外胚葉マーカー）および SOX17（内胚葉マーカー）の相対発現量を各培養段階の細胞と比較したところ、未分化スフェロイドから分化スフェロイドさらに接着分化細胞の順に、細胞の分化が進んでいることが示唆されました（データ不掲載）。

質量分析による細胞測定に際しては、それぞれの培養細胞を回収し、PBS バッファで 2 回洗浄した後、10%トリクロロ酢酸下で短時間超音波処理を行い、10,000 xg で 1 分間遠心して得られたペレットを少量のアセトニトリル溶液に懸濁しました。懸濁液（1 μL）とマトリックス溶液（0.1%トリフルオロ酢酸を含む 50%アセトニトリル水溶液に 5 mg/mL 濃度で溶解した α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、1 μL）を混合し、MALDI ターゲットプレートに搭載して乾燥させたものを測定しました。

培養液測定に際しては、培養上清（0.5 μL）とマトリックス溶液（同上、0.5 μL）を混合したものを全量 MALDI ターゲットプレートに搭載して乾燥させたものを測定しました。

■ 分析試料の MALDI-TOF MS 測定

MALDI ターゲットプレートに搭載した分析試料を、卓上型 MALDI-TOF MS "MALDI-8020" に挿入し、自動分析ソフトウェア SampleStation™/AuraSolution ソフトウェアを用いて、自動分析によりマススペクトルを取得しました。自動分析時の測定パラメータは表 2 の通りです。また、マススペクトルの一例を図 1 に示しました。

表 1 分析サンプルリスト

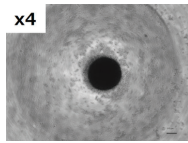
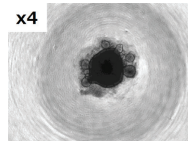
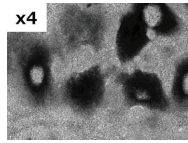
サンプル	培地	培養日数	形態	n 数
未分化スフェロイド	Essential 8	7 days		6
分化スフェロイド	Essential 8+FBS (牛胎児血清)	7 days		6
接着分化細胞	Essential 8+FBS+ゼラチンコート	7 days		6
未分化培地 (D2)	Essential 8	2 Days	-	6
未分化培地 (D7)	Essential 8	7 Days	-	6
分化培地 (D2)	Essential 8+FBS	2 Days	-	6
分化培地 (D7)	Essential 8+FBS	7 Days	-	6
分化培地ゼラチンコート (D2)	Essential 8+FBS+ゼラチンコート	2 Days	-	6
分化培地ゼラチンコート (D7)	Essential 8+FBS+ゼラチンコート	7 Days	-	6

表2 MALDI データ取得パラメータ

細胞測定	
Tuning	linear
Polarity	positive
Mass range	2,000-30,000 Da
Laser rep. rate	200 Hz
Accumulation rate (laser shots/profile)	20
Profiles	1156
Sampling method	Raster
培養上清測定	
Tuning	linear
Polarity	positive
Mass range	2,000-30,000 Da
Laser rep. rate	200 Hz
Accumulation rate (laser shots/profile)	20
Profiles	676
Sampling method	Raster

■ MS 分析データの eMSTAT Solution による解析

自動分析により得られた MS データを eMSTAT Solution ソフトウェアで解析した結果、図 2 に示したように各培養条件で 7 日間培養した未分化スフェロイド、分化スフェロイドおよび接着分化細胞をそれぞれグループ化することができました。また、培養液に関しては培養日数によるグループ化ができた他、スフェロイドを形成した培養 7 日目の分化培地 (D7) が、接着分化細胞の培地である分化培地ゼラチンコート (D2) と分化培地ゼラチンコート (D7) に近接したグループとなることが確認できました。

今回の結果は、シンプルな卓上型 MALDI-TOF MS である MALDI-8020 をベースに、多検体処理に適した自動分析ソフトウェアと統計解析ソフトウェアである eMSTAT Solution を組み合わせることにより、細胞の生育状態や分化/未分化の評価をより簡単に素早く実施できる可能性を示すものと考えられます。

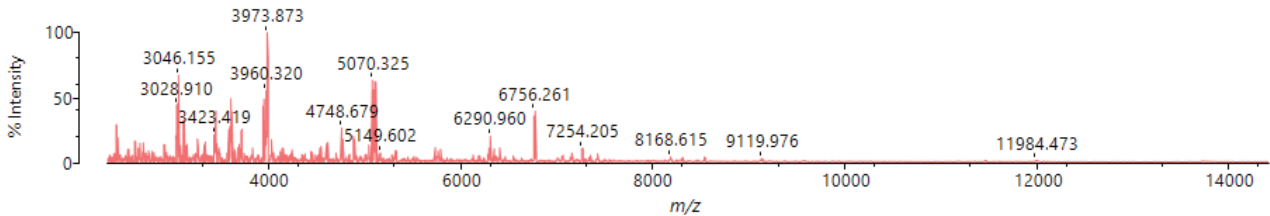


図1 iPS 細胞の直接測定で得られたマスペクトル一例

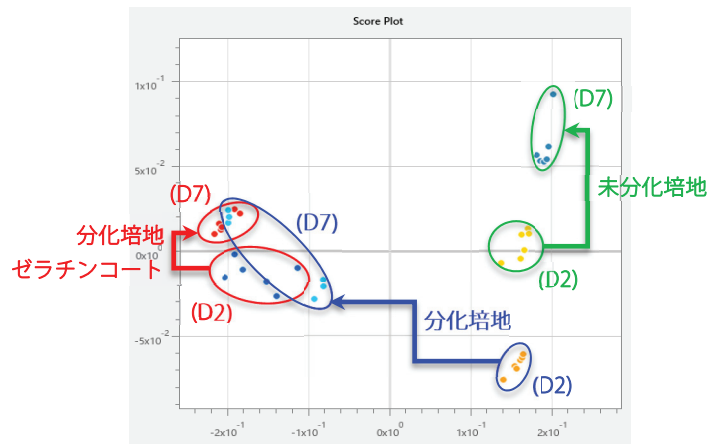
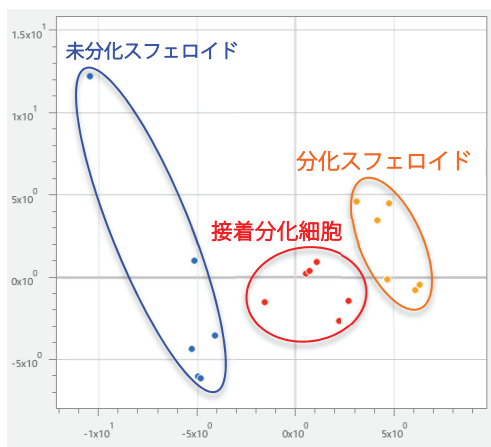


図2 eMSTAT Solution での解析結果
左：iPS 細胞、右：培養上清

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証を受けた機器ではありません。本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

eMSTAT Solution は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。AuraSolution および SampleStation は、Kratos Analytical Ltd の商標です。その他、本文書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中には TM、*マークを明記していない場合があります。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年5月
島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。