

幹細胞培養のモニタリングのための インタクトセル・マススペクトロメトリー

Andreas Schnappr¹、脇 華菜
¹Shimadzu Europa GmbH

ユーザーベネフィット

- ◆ 顕微鏡観察に先んじて、細胞内の隠れた好ましくない変化を明らかにできます。
- ◆ 細胞培養をモニタリングする先入観なく実行可能で効率的なアプローチが可能です。
- ◆ 卓上型MALDI-TOF MSと統計ソフトウェアを用いた有望で迅速な方法になります。

■はじめに

マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)は、様々なタイプの試料から定性および定量的な情報を獲得するためのシンプルで素早い分析方法です。インタクトセルMALDI-TOF MSは、特定の低分子種もしくは生体分子の溶解と分画、または分離なしで、直接標的プレートにスポットされた真核細胞から生成されたスペクトル情報を提供します。本稿では、幹細胞培養のルーチンの品質管理とモニタリングにおけるMALDI-TOF MSの新しいアプリケーションを示します。

■幹細胞の品質管理の重要性

ヒト胚性幹細胞 (hESC) は細胞療法、バイオ産業または薬剤開発のための将来有望なツールです。しかしながら、長期間培養されたhESCは不必要かつ潜在的に有害な変異が表現型に生じ、安全な利用を妨げる可能性があります。これらの変異には細胞の形態に影響を与えないものもあり、遺伝子型を検査するまで気付かれません。

hESCの臨床的に関連する細胞種への分化は、未熟な段階から最終的な表現型の段階的なプロセスです。しかしながら、複雑な分化プロセスにおける実質的な不均一性は、機能的な表現型の欠如や癌的な増殖の傾向など、望ましくない特性を有する細胞を産生する可能性があります。インタクトセルMALDI-TOF MSは、正常および異常なhESC間において、容易で客観的な識別を可能にします。

■サンプルの準備

培養されたhESCは採取され (図1 A)、MS適合の等張緩衝液で洗浄し、トリフルオロ酢酸で酸性化したシナピン酸マトリックス溶液と混合して標的プレート上にスポットしました。標的スポットの走査型電子顕微鏡写真 (SEM) は、細胞がスポッティング後も統合性を維持していることを示します (図1 B)。MS分析はMALDI-8020 (図1 C) を用いて行い、その後eMSTAT Solution™ (図1 D) で統計分析を行いました。

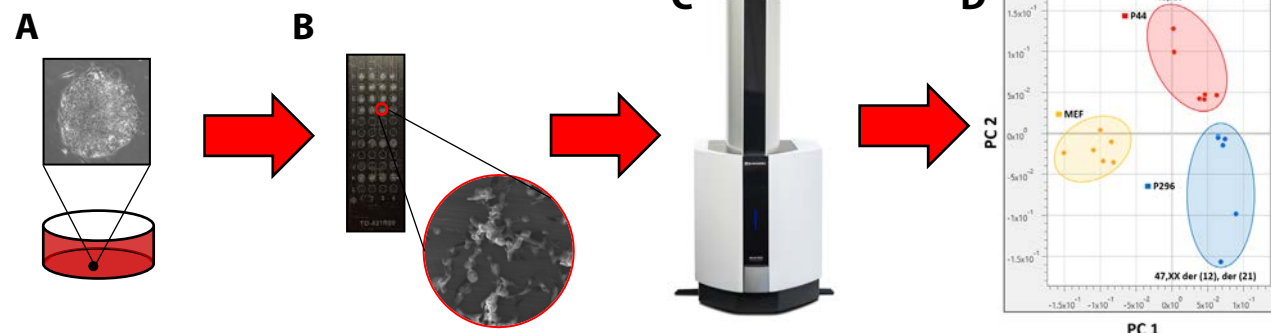


図1 本稿で用いたワークフロー

A: hESCの培養 B: 洗浄後にマトリックスと混合して分析用プレートにスポットした状態 C: MALDI-8020で分析 D: 統計解析

■MSスペクトルの統計解析による 形態的に同一のhESCにおける変化の明確化

幹細胞を長期にわたって培養した場合でも、形態上の変化は多くの場合で認められません (図2)。しかし、形態上は問題がなくても、染色体異常またはアポトーシス耐性のような危険な特性を獲得している可能性があります。このような危険な特性を持つクローンを選別するために、標準的な分子生物学による方法や顕微鏡観察による細胞の選別が行われます。しかし、これらの方法もしばしば失敗し、危険な特性を持つ望ましくないhESCクローンが経時的に選別され得ます。

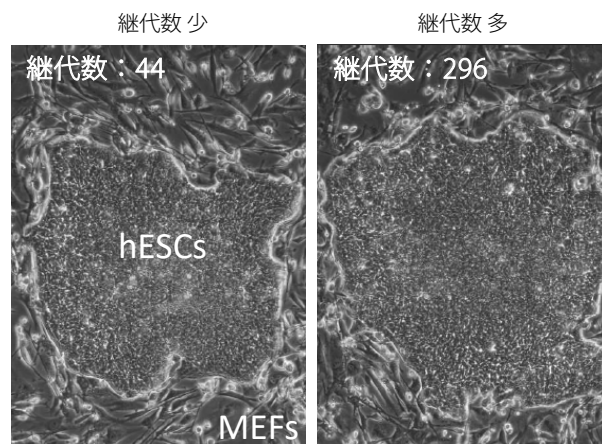


図2 継代数の違いによるhESCの形態の比較
積層したマウス胚由来線維芽細胞 (MEFs) 上で培養

興味深いことに、MSスペクトルは短期または長期培養されたhESCの分子プロファイルの変化を明らかにするのに十分な情報を提供します。幹細胞の継代時期の初期と後期の間のMSスペクトルの違いは、eMSTAT Solutionに搭載されているクラスター分類解析により可視化できます（図1D）。このように、マスペクトルによるフィンガープリントは、潜在的に危険な表現型を持つ幹細胞の同定を公平に先入観なく行うことができるツールとして活用できます。

■ 初期の肺前駆細胞への分化

主に同じアプローチを用いて、初期肺前駆細胞（ELEPs）に対するhESCの分化、適切な分化段階の確認、および未熟または癌表現型を有する細胞の排除についてモニターしました。分化中のhESCからのスペクトルフィンガープリントは、ほとんどのペプチドームまたは小さなプロテオームを示す2 から10 kDaの間の質量範囲で記録されました（図3）。ソフトウェアであるeMSTAT Solutionを用いた統計解析により、MSスペクトルの変化のみに基づいて親のhESC集団から、分化の日数に対応するステージD1 ~D10 を経て、ELEPsへの分化段階に対応するクラスターが明らかにできました（図4）。ELEPsは分化ルートにおける最終的な機能的な細胞実態を表しています。A549 肺癌細胞株は表現型はELLPsと離れていますが、肺関連細胞型として対照目的で使用しました。

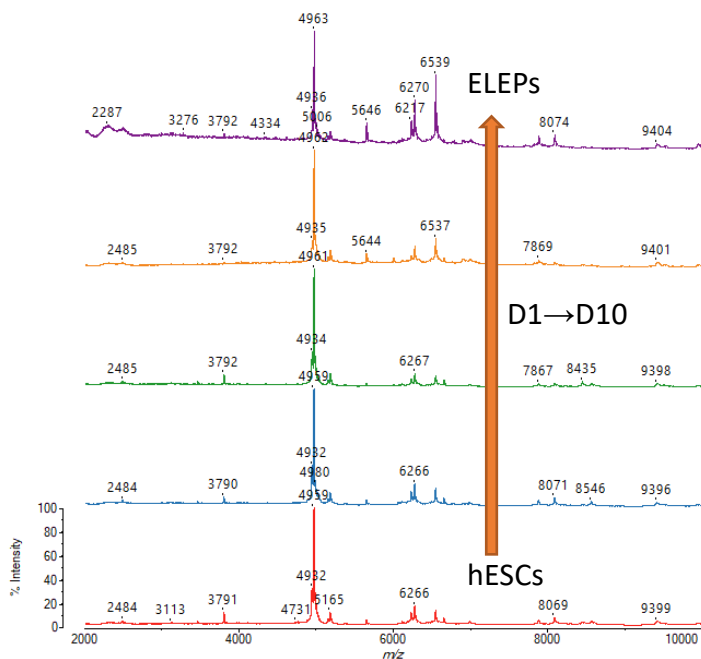


図3 様々な低質量分子物質のパターンを示すマスペクトル hESCはELEPsへ分化させるために刺激され、決まった時間毎に回収・MALDI分析向けに処理して分析を行いました。

■ まとめ

本アプリケーションは、臨床グレードまたはバイオ産業の幹細胞培養におけるインタクトセル・マスペクトロメトリーおよび品質管理のための、統計解析ソフトウェア eMSTAT Solutionと組み合わせた卓上型MALDI-8020 の可能性を示しています。この手法は薬剤開発や臨床研究において、長期培養による隠れた変異のモニタリングのための先入観なく実行可能で効率的なアプローチを提供します。ワークフローに組み込まれた統計解析との連携は、これらの変化が細胞形態または機能において顕著になる前に、分子プロファイルの段階的な変化を可視化することに役立ちます。

参考文献

Vaňhara et al., Stem Cells Transl. Med, 2018, 7 (1): 109-114.

謝辞

このアプリケーションニュースは、チェコ共和国のブルノにあるMasaryk大学医学部組織学・発生学教室で行われた共同研究の成果を利用して作成しました。

hESC分析はPetr Vanhara氏のチームによって行われ、ELEPsはAleš Hampel氏のチームのVendulaPelková氏、HanaKotasová氏、Volodymyr Porokh氏によって作製されました。

質量分析と重要な統計の専門家からの視点で助言を頂いたJosef Havel氏に感謝いたします。

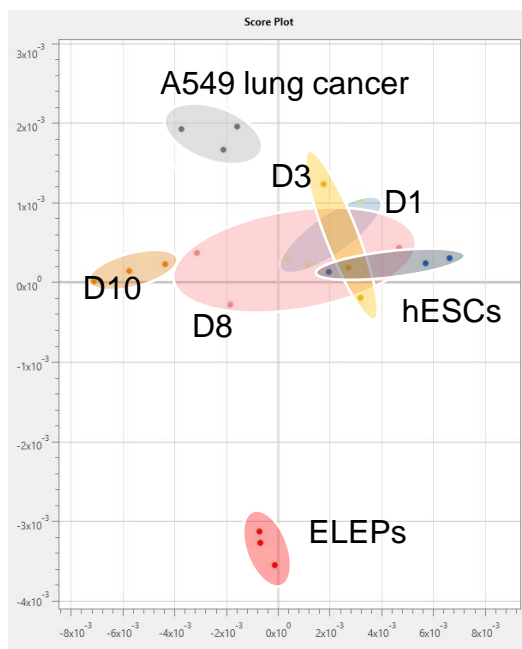


図4 eMSTAT SolutionによるhESCからELLPへの分化過程のクラスター解析 各点は個々の生体サンプル5回測定した際の平均スペクトルです。楕円の範囲は95%の信頼度を示します。

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。

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

05-SCA-295-005-JP 初版発行：2022年2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中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・認証等を受けた機器ではありません。本文中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。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Clubにご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022