

皮膚由来細胞から多能性幹細胞を分離回収する方法の開発

電子技術課 高田耕児 中央研究所 大永崇 小幡勤

富山大学 長田拓哉 塚田一博 京都大学 嶋田裕

1. 緒言

幹細胞は、様々な細胞へ分化する能力と自己複製する能力を合わせ持つ細胞であり、これを利用した再生医療が新しい医療として期待されている。成熟細胞を未分化状態に戻してできる幹細胞が大きく注目されている一方で、私たちの体の中に既に存在している幹細胞を利用する研究も盛んに行われている。中でも皮膚に存在する幹細胞は入手のしやすさから幹細胞供給源として期待される。本研究では皮膚の細胞（線維芽細胞）から幹細胞を分離するための新しい細胞分離方法の検討を行った。

2. 実験方法

幹細胞と結合する抗体付き磁気ビーズは次のように調整した。抗 SSEA3 抗体（または抗 SSEA4 抗体）0.1mg を 1mL の PBS に溶解させ、そこに 20mM NHS-PEG₄-Biotin (Thermo Scientific 社製) を 3μL 加えて室温で 30 分間反応させた。それを脱塩カラムに通して抗体に結合していないビオチンを除去し、ビオチン化抗体を得た。次にストレプトアビジン固定化磁気ビーズ分散液 (JSR Life Sciences 社製) 200μL にビオチン化抗体 44μL を加え室温で 30 分間振とうしてストレプトアビジンとビオチンとを結合させ、PBS で 2 回洗浄したものを抗体付き磁気ビーズとして以下の実験に用いた。細胞として皮膚の細胞の一種である正常皮膚線維芽細胞（以下、線維芽細胞）を用いた。培養した線維芽細胞をトリプシン処理により回収した後、 1×10^4 cells/mL となるように PBS で希釈し、抗 SSEA3 抗体または抗 SSEA4 抗体付きの磁気ビーズ 0.5mg と室温で 5 分間振とうしたものを試料とした。

チップは既報¹⁾と同様のものを作製した。構造を図 1 に示す。Inlet1 から試料を、Inlet2 から PBS をそれぞれシリンジポンプにより流速 200μL/min で送液した。試料中のフリーの磁気ビーズはサイズ分離部の上側を流れ Outlet1 から排出される（この液を「廃棄液」とする）。試

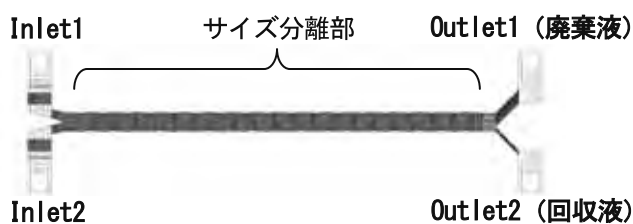


図 1 チップの構造

料中の細胞は図 1 のサイズ分離部で下方向へと移動し、Outlet2 から回収される（この液を「回収液」とする）。廃棄液と回収液について、それぞれ磁気ビーズの数、細胞の数を計測した。

3. 実験結果および考察

従来から抗体付き磁気ビーズを用いて細胞を分離する方法は広く用いられている。標的細胞と非標的細胞が混在する懸濁液中に標的細胞のみと結合する抗体付き磁気ビーズを加え、磁石で引き付けて回収する方法である。しかし図 2 に示すように、従来の方法はフリーの磁気ビーズが懸濁液中に大過剰に存在するために、磁石で引き付けた際、フリーの磁気ビーズが非標的細胞や夾雑物を巻き込んで集まり、分離精度が落ちるという問題がある。本研究では、このフリーの磁気ビーズをこれまで開発してきたサイズ分離用マイクロ流体チップ¹⁾によって除去する。

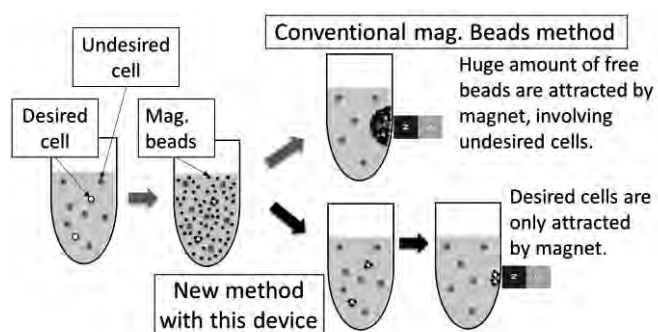


図 2 従来の磁気ビーズ法とチップを用いた新しい方法

標的細胞である線維芽細胞中の幹細胞には幹細胞マーカーである SSEA3 または SSEA4 という抗原が細胞表面に出ている可能性がある。その場合、標的細胞は抗 SSEA3 抗体または抗 SSEA4 抗体と結合する。これらの抗体を付けた磁気ビーズを線維芽細胞と混ぜたものを試料として、サイズ分離用マイクロ流体チップに流した。

抗 SSEA4 抗体を用いて実験した場合の、廃棄液と回収液の光学顕微鏡写真を図 3 に示す。廃棄液は多数のフリーの磁気ビーズ（直径約 3μm）が見られるのに対し、回収液にはフリーの磁気ビーズは見られない。また、廃棄液には細胞が見られないのに対し、回収液には細胞（直径 10~30μm）が見られる。このことから、サイズ分離用マイクロ流体チップにより磁気ビーズと細胞が分離でき

ることが分かった。細胞に磁気ビーズが結合して見えるものはごくわずかであった（SSEA3を用いた実験でも同様であった）。これは、今回準備した線維芽細胞の中で、SSEA3 または SSEA4 を表面に出した細胞が非常に少ないためと考えられる。また回収した細胞の解析は今回行っていない。今後大量の試料を用いた検討と回収した細胞の解析が必要と考えられる。

抗 SSEA3 抗体と抗 SSEA4 抗体を用いた実験の廃棄液と回収液の磁気ビーズ数、細胞数を計測したものを表 1 に示す。抗 SSEA3 抗体を用いた実験では廃棄液中の磁気ビーズは 21376×10^4 個、回収液の磁気ビーズは 1×10^4 個未満であり（廃棄液と回収液の計測方法を統一しており、これより少ない数は計測できない）、99.995%以上の磁気ビーズが廃棄液側に排出された。それに対し廃棄液中の細胞は 5 個、回収液中の細胞は 2621 個であり、99.8%の細胞が回収液側に排出された。

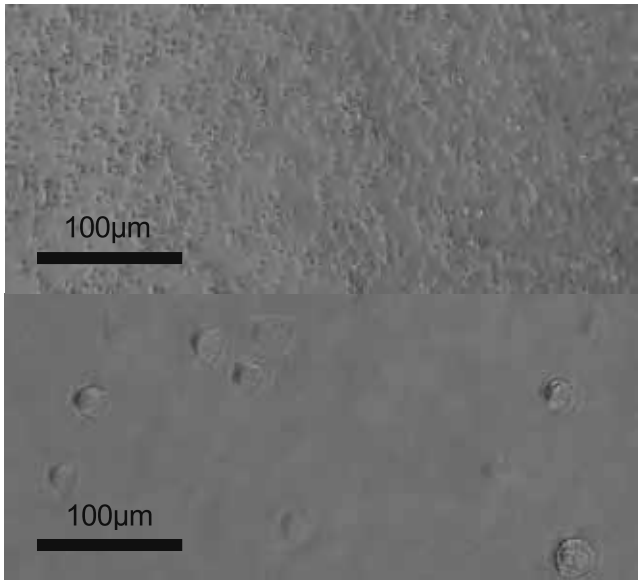


図 3 廃棄液（上）と回収液（下）の光学顕微鏡写真

表 1 廃棄液と回収液の磁気ビーズ数および細胞数
SSEA3

		廃棄液	回収液
磁気ビーズ	数	21376×10^4 個	$<1 \times 10^4$ 個
	割合	$>99.995\%$	$<0.005\%$
細胞	数	5 個	2621 個
	割合	0.2%	99.8%

		廃棄液	回収液
磁気ビーズ	数	18752×10^4 個	$<1 \times 10^4$ 個
	割合	$>99.995\%$	$<0.005\%$
細胞	数	9 個	2759 個
	割合	0.3%	99.7%

抗 SSEA4 抗体を用いた実験では廃棄液中の磁気ビーズは 18752×10^4 個、回収液の磁気ビーズは 1×10^4 個未満であり、99.995%以上の磁気ビーズが廃棄液側に排出された。それに対し廃棄液中の細胞は 5 個、回収液中の細胞は 2621 個であり、99.8%の細胞が回収液側に排出された。

これらのことからマイクロ流体チップでフリーの磁気ビーズと細胞とを高精度に分離できることが分かった。

4. 結言

磁気ビーズとサイズ分離用マイクロ流体チップを組み合わせた細胞分離法を開発した。細胞懸濁液に抗体付き磁気ビーズを加えた試料を用いて実験を行い、細胞とフリーの磁気ビーズを分離することができた。この結果から今後様々な実験にこの方法を応用可能となった。

参考文献

1)富山県工業技術センター研究報告 29, 92 (2015)

キーワード：マイクロ流体デバイス、細胞分離、幹細胞

Development of a Method for Isolation of Somatic Stem Cells

Koji TAKATA, Takashi OHNAGA, Tsutomu OBATA

Takuya NAGATA (University of Toyama), Kazuhiro TSUKADA (University of Toyama)

Yutaka SHIMADA (Kyoto University)

The method to isolate and analyze somatic stem cells in fibroblast has a potential to be used in study of regenerative medicine, etc. Magnetic beads technic is often used to separate target cells from other cells. But in conventional method, huge amount of free beads are attracted by magnet, involving undesired cells. In this study, microfluidic devices which could be used for size-based cell separation and recovery were used to separate the cells from free magnetic beads. We carried out separation tests using anti-SSEA3 or anti-SSEA4 antibody-attached magnetic beads and fibroblast, and showed that fibroblast were successfully separated from free magnetic beads. This method could be used for accurate cell separation.