



CL-Quantアドオンモジュール

「hPSCコロニートラッキング」を用いた
ヒトiPS細胞コロニーのトラッキング

< BioStation CT 使用例 >

胚性幹細胞 (ES細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を含むヒト多能性幹細胞 (hPS細胞) は、自己複製能と多分化能の特徴を有することから再生医療や創薬研究におけるツールとして期待されています。一方、hPS細胞は培養維持中にゲノム不安定性を示し、トランスフォームしたクローンの発生により異常な増殖性を獲得することが報告されているほか、トランスフォームしたhPS細胞では分化能が低下することが知られています。また、培養条件の変更の際には数世代にわたり形質の安定性の評価が必要です。培養中のhPS細胞の増殖性を評価することは、細胞の品質・形質の評価の一つとして大変重要です。CL-Quantアドオンモジュール「hPSCコロニートラッキング」は画像解析ソフトウェアCL-Quantと組み合わせて使用することにより、hPS細胞コロニーをトラッキングし、その面積の変化から個別コロニーの増殖性を自動で算出できます。ヒトiPS細胞の品質や形質の評価を目的として、BioStation CTで取得した位相差画像からヒトiPS細胞をトラッキングし、個別のコロニー面積を経時的に測定しました。

観察装置

- BioStation CT (Nikon, MLA10000)

画像解析ソフトウェア

- CL-Quant ver. 5.02 (Nikon, MLS21000)

CL-Quant アドオンモジュール

- CL-Quantトラッキングモジュール(Nikon, MLS21020)
- hPSCコロニートラッキング PC-QE01 (Nikon, MLS30501)

細胞

- ヒトiPS細胞株 253G1 (民間企業等での利用の場合：京都大学iPS細胞研究所/iPSアカデミアジャパン, 学術機関の場合：HPS0002 理研バイオリソースセンター)

試薬及び材料

- StemFit®AK02N(Ajinomoto, AK02N)
- iMatrix-511 solution (0.5mg/ml) (MATRIXOME, 892011)
- Y-27632 (FUJIFILM Wako Pure Chemical, 257-00511)
- TrypLE™ Select(1x), no Phenol Red(Thermo Fisher Scientific, 12563011)
- PBS, pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, 10010023)
- Costar® 6-well Clear TC-Treated Multiple Well Plates (Corning, 3516)

方法

ヒトiPS(253G1)細胞をTrypLE™ Selectによりシングルセルに分散し、iMatrix-511でコートした6ウェルプレート各ウェルにAK02N (Y-27632含む) 培地を用いて、 6.5×10^4 細胞/ウェルの細胞密度で播種しました。播種した細胞はBioStation CT内の37°C、5% CO₂ 環境下で培養しました。細胞が接着したことを確認し、播種後2時間後から6時間毎に、4倍の対物レンズでウェル中心部の8×8視野(約15.5mm×15.5mm)を撮影しました。得られた画像データはCL-Quantとアドオンモジュール「hPSCコロニートラッキング」を用いて解析し、トラッキングした各コロニー面積「Ph-Cell region-Area (μm^2)」を自動計測しました。トラッキングする細胞領域は、パラメーター内の「Remove size」を「500」に設定し、調整しました。トラッキングしたiPS細胞コロニーのマスク表示と計測数値を画面上で確認したのち、Microsoft Excel®形式で出力し、数値を「Colony area (μm^2)」として個別コロニー面積の経時変化をグラフ化しました。

結果

播種後2時間後から6時間毎に140時間までBioStatoion CTで撮影を行い、CL-Quantとアドオンモジュール「hPSC コロニートラッキング」を用いて解析を行いました。トラッキングしたiPS細胞の個別コロニーの細胞領域を画像上でマスクし(図1)、その面積を測定しました(表1)。

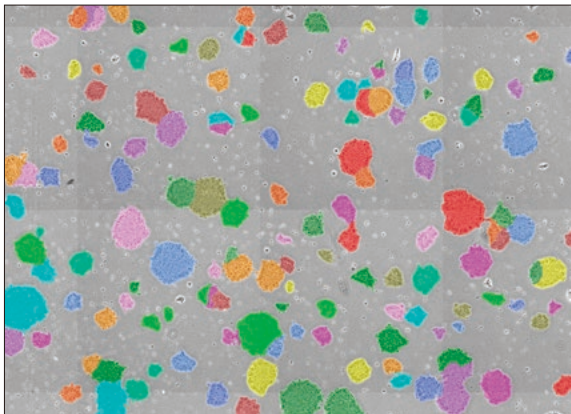


図1 コロニー領域を認識するマスクをオーバーラップした位相差画像

播種110時間後の位相差画像にトラッキングした細胞領域のマスクをオーバーラップした画像。マスクの色は、個別のトラッキングオブジェクトを示す。

表1.トラッキングしたヒトiPS細胞のコロニー面積の経時変化

Time (hours)	Colony area (μm^2)				
	Tracked object 2	Tracked object 5	Tracked object 18	Tracked object 107	Tracked object 122
2					
8					
14	9056	15520			
20	10096	18736	8672		
26	8352	15456	16480		
32	10272	16928	13056		
38	10928	18464	16464		
44	11808	17504	17792		
50	14592	22240	20304		
56	15360	27808	27808		
62	19328	32448	33472	10416	
68	22688	40608	38960	11264	9088
74	30288	52272	46656	11504	9328
80	37520	61728	58976	12832	13344
86	46480	77824	74976	16144	15200
92	62928	96528	96704	18560	18528
98	84768	125696	125664	23968	23312
104	112112	170392	162288	30464	30288
110	142944	212812	199456	39456	38944
116	183440	255580	248032	50016	53792
122	233200	301356	293808	65712	67168
128	287872	346512	337448	76608	80496
134	340784	372188	381860	99056	99104
140	392412	389436	411528	116620	123700

個別コロニー面積の経時変化をグラフに示し(図2A)、トラッキングした代表的なコロニーの細胞領域をマスク表示しました(図2B)。図2Aと2Bに示すように、各コロニーの面積は播種32時間後からばらつきが観察されましたが、面積は拡大しました。

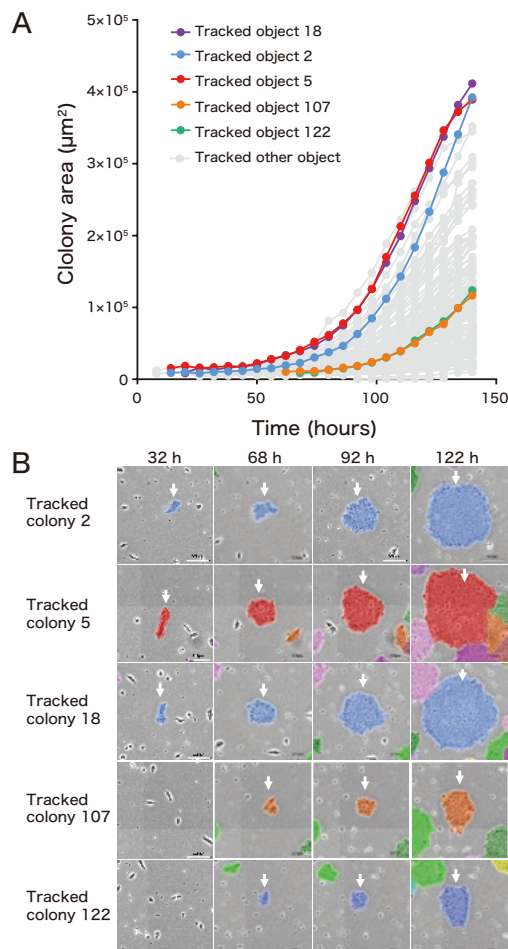


図2 トラッキングしたヒトiPS細胞のコロニー面積の経時変化

- A. 個別のコロニー面積の経時変化を示した。選択したいくつかのコロニーをカラーシンボルとして表示した。
- B. 播種後の各経過時間における、トラッキングした個別コロニーを異なる色のマスクで表示した。スケールバーは $200\mu\text{m}$ を示す。矢印は、面積を数値化したコロニーを示した。

まとめ

- iPS細胞コロニーの位相差画像をCL-Quantとアドオンモジュール「hPSC コロニートラッキング」でトラッキング解析することにより、それぞれのコロニー面積の経時変化の自動算出が可能です。
- マスク画像を参照することで、コロニー領域が正しく認識されているかどうかを簡単に確認できます。
- 培養を継続中に、コロニー面積の経時変化をモニターできるため、コロニーの成長を測定することでhPS細胞の品質を評価できます。

お問い合わせ先

株式会社 ニコンインステック

バイオサイエンス営業本部
140-0015 東京都品川区西大井1-6-3(株式会社ニコン 大井ウエストビル3F)
Tel: (03)773-8138
https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/



株式会社 ニコン
108-6290 東京都港区港南2-15-3 (品川インターシティ C棟)
<https://www.nikon.co.jp/>