

汎用性ヒト型双腕ロボットと既存薬ライブラリーを用いた iPS 創薬研究

研究分担者 佐谷 秀行 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 教授

研究要旨

iPS 細胞 (iPSC) は、in vitro で様々な系譜の細胞に分化させることによって、その細胞特有の病態を解析することができる極めて優れたツールである。私たちは遺伝性疾患由来の iPSC から病的形質を発現する細胞を誘導し、それを用いて薬剤スクリーニングを行うことを目的として研究を行う。具体的には、高いスループットと再現性を持つ汎用性ヒト型双腕ロボットを用いた細胞アッセイ系を構築し、病的形質を有する iPSC 由来細胞を用いて既存薬ライブラリーをスクリーニングすることにより、早期に臨床に応用できる薬剤の同定を行う。

A. 研究目的

遺伝性疾患、とくに神経系に症状をきたす疾患では、患者の神経系細胞を用いてその形質の問題点を解析することは不可能である。しかし、iPSC の登場により、in vitro で神経系の細胞を誘導できるようになり、その細胞を用いた創薬研究が理論上可能となりつつある。

細胞を用いた薬剤スクリーニング (Cell-based drug screening) は、スループットが低いことと、再現性の低さに問題がある。今後様々な疾患の iPSC を用いて薬剤スクリーニングを行うためには、ハイスループットで再現性の高いシステムを構築する必要がある。

我が国はロボット開発では世界をリードし、近年開発されたヒト型双腕ロボットは、その作業の再現性の高さから、医学生物学実験にも使用されつつある。しかし、まだ単純なタンパク質調整や核酸抽出などの作業に用いられるだけで、薬剤スクリーニングのような複雑な作業に用いられた例はない。本研究は、ヒト型双腕ロボットを用いることにより、再現性もスループットも高い薬剤スクリーニング技術を確認し、次年度から iPSC を用いた薬剤探索を行うことを目的として実施した。

B. 研究方法

ヒト正常 iPSC、疾患 iPSC から誘導した各種細胞

の特性をリードアウトとしたアッセイ系を構築した後、汎用性ヒト型双腕ロボットを用いて、早期に臨床応用が可能な化合物を見出すことが、本プロジェクトのミッションである。本年度は、我が国で開発された汎用性ヒト型双腕ロボット(呼称「まほろ」)を用いて、ハイスループット薬剤スクリーニングを行うためのシステム作りを行った。

スループットと再現性が高い Cell-based drug screening を実現するためには、無菌条件下で長期間細胞が培養可能であること、細胞を扱う適切なヒトの操作手順をロボット動作に置き換えること(プログラミング、ティーチング)が重要である。そこで本年度は、作業工程が基本的、かつ汎用性が高く、薬剤スクリーニングにすぐに移行可能である 96 穴プレートを用いた細胞増殖能評価系を以下の過程を踏んで構築し、そのアルゴリズムを用いて既存の薬剤による細胞増殖能評価を実施した。

評価系構築手順

- A) 細胞増殖能定量化のための実験プロトコルの確立
- B) ロボットの作業プロトコルの確立、シミュレーション、プログラミング
- C) 必要設備の設置、器具等の配置、必要器具の作製およびロボットへの作業プロトコルのティーチング
- D) 試運転、必要器具の改良、ロボット動作のチ

ユーニング

E) ハイスループットアッセイの施行

具体的には、未分化な細胞が非接着培養条件下において球体を形成して増殖する能力(スフィア形成能)を評価するアッセイ系をモデルとしてシステムの構築を行った。実験の概略を図 1 に示す。細胞は骨肉腫癌幹細胞 (Oncogene 29:5687-5699, 2010) を使用し、化合物存在下で非接着丸底 96 穴細胞培養 dish と接着平底細胞培養 dish における細胞増殖の差異を見ることによりヒット化合物の抽出を行う。目的の化合物は、接着した条件では細胞増殖を阻害しないが、スフィア形成条件におい

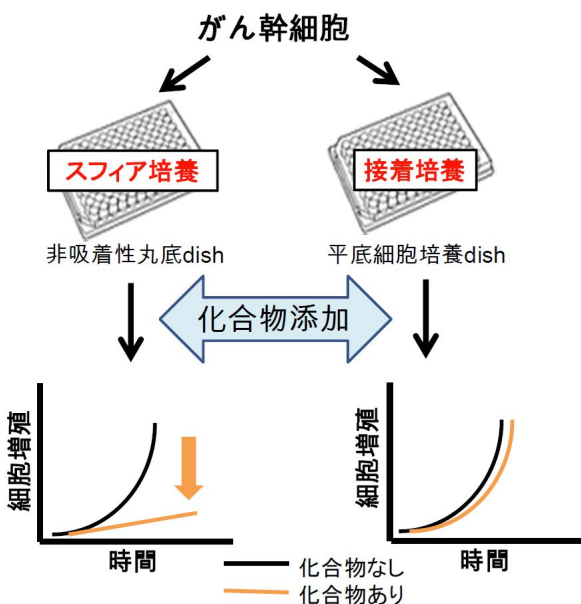


図 1 スフィア形成能抑制剤のスクリーニング

がん幹細胞を非接着性丸底皿、接着性平底皿に散布し、化合物ライブラリーを添加する。接着条件では増殖阻害を示さないが、スフィア形成培養のみで阻害効果を示す化合物の取得を目指す。

て増殖阻害を示す(図 1)。

以下に具体的に確立し施行したロボット作業手順を記載する。

1) 細胞の調整、器具の設置

細胞培養期間に応じた細胞数を調整する。例えば、2 日間の培養期間であれば 50 μ l 中に細胞が 1000 個入るように調整する。準備した細胞、化合

物溶解用ジメチルスルフォキシド(DMSO)液はロボット前面のチューブ(50ml のコニカルチューブ)立てへ、スクリーニングに用いる化合物、希釈用細胞培養液(96 穴に細胞培養液を 200 μ l ずつ分注する)は据え置き冷蔵庫へ、細胞播種用 96 穴培養皿(丸底、平底)は据え置き CO₂ インキュベーターへ設置する。ここまでの、施行する実験規模に応じた細胞数の準備、器具の設置はヒトの手で行うが、これ以降のスクリーニングの手順はロボットヘイチングを行い、自動運転を可能とした。

2) 汎用性ヒト型双腕ロボットによる作業工程仕様

ロボットはフィルターを通った空気で満たされたクリーンルームに配置され、CO₂ インキュベーター、冷蔵庫、プレートミキサー、ピペットマン用チップ(充填器に内蔵)、廃液用吸引器が併設されている。96 穴プレート、50 ml コニカルチューブ、細胞散布用リザーバー等はヘイチングによりロボットが正確に扱えるように位置を定めた。コニカルチューブの開栓、冷蔵庫、CO₂ インキュベーターの開閉・収納、8 連ピペットを用いた作業を始め、細胞培養に使用する器具に合わせてロボットが支持できるようにハンド部分、固定器具を新たに開発、新製した。特に、スクリーニング工程において鍵となる 8 連ピペッ

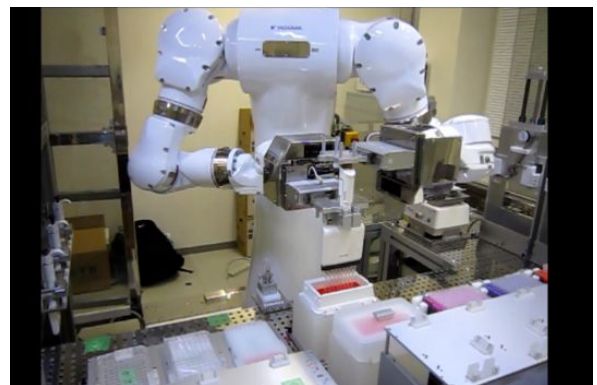


図 2 汎用性ヒト型双腕ロボット(まぼろ)による細胞調整作業

トを用いたピペッティング作業に工夫を要した。チップラックを新たに新製し、チップが 8 連すべてに装着するため角度や押し込む力を調整し、最終的に安定して全ての先端に装着することが可能となった。さらに、粘性の違いによる気泡の混入に対しては、ピペッティング操作の改良(速度、角度等)を

行い克服した(図2)。

細胞散布

コニカルチューブから細胞を滅菌リザーバーに移し、丸底、平底のプレートに50 μ lずつ8連ピペットを用いて散布を行う。この際、検証過程において、時間の経過とともに細胞が沈殿し、先に散布したウェルと後のウェルとの間に有意な細胞数の差が生じた。このため、細胞浮遊液を6列散布するごとに攪拌操作を追加したところ、全てのウェルで均等に、再現性良く細胞を散布することが可能となった。実験に必要となる全ての細胞を散布しCO₂インキュベーターへ収納し、以下の化合物の調整を行う。細胞96穴プレートは最大で丸底、平底4枚ずつに散布することが可能である。また、1ラン当たり最大で384種の化合物を検証することが可能であった。

化合物調整

96穴丸底プレートにあらかじめ準備された化合物ライブラリーを冷蔵庫から取り出し、DMSOを8連ピペットマンにて追添加することにより目的の濃度に希釈する。プレートミキサーにて振動数を調整しながら攪拌し、均一な溶解液を作る。溶解液より適量を8連ピペットマンにて採取し、化合物と共に冷蔵庫に収納していた200 μ lの細胞培養液(96穴プレートに用意)へ添加する。8連ピペットマンを用いてピペッティング操作により溶液を均一に混合する。添加後、DMSOに溶解した化合物のプレートは冷蔵庫へ保管する。次に、上述の通り散布した細胞(96穴丸底、平底)をCO₂インキュベーターから取り出し、調整した化合物含有の細胞培養液50 μ lを各ウェルに添加する。添加後、細胞培養96穴プレートはCO₂インキュベーターへ収納し培養を行う。最大で4バッチの施行が可能であり、2バッチ目以降は、化合物を取り出し希釈するところから繰り返して施行する。

3) 細胞増殖の定量化

目的の期間、細胞をインキュベートした後、Cell Titer Glo 細胞増殖アッセイキット(Promega社)を使用し、発光強度により細胞増殖を定量化する。

4) 倫理面の配慮

現時点ではヒト臨床検体の使用はないが、ヒト正常iPSC、疾患iPSCに対して化合物ライブラリーを用いたハイスループットの分化、増殖アッセイについては大学倫理委員会の承認を得た上で実施する。使用するiPSCは、インフォームドコンセントを十分に行った上で供与された細胞を用いて誘導する。

C. 研究結果

上記、研究方法の記載通り、プロトコール構築、

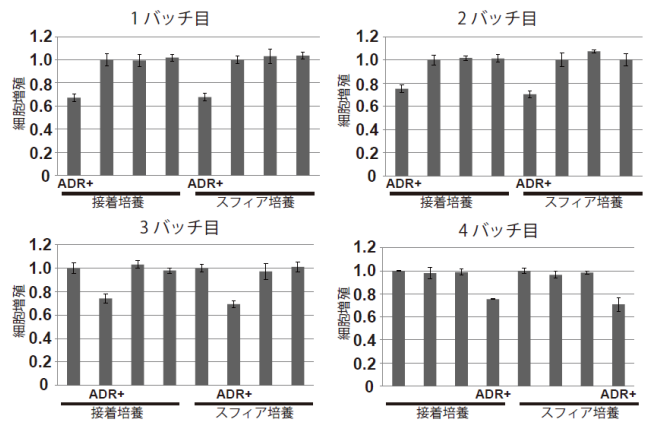


図3 4バッチを施行した際の骨肉腫幹細胞増殖の比較。ロボットにより細胞を散布、アドリアマイシン(ADR)240 ng/mlを添加(1列8ウェル)後、2日間培養した。12列のうち添加列より3または4ウェル、非添加列列より4ウェルを抽出し細胞増殖の定量化を行い平均を取った。

ロボットへのティーチング及びチューニングを通して、細胞を用いたハイスループットスクリーニング系を確立した。実際に抗癌剤(アドリアマイシン)を用いたアッセイ結果を示す(図3)。4バッチ(丸底、平底各4枚ずつ)施行したが、バッチ内、バッチ間の両者において細胞は均一に散布できており(アドリアマイシン未添加群では有意差なし)、アドリアマイシンの抗腫瘍活性も観察された(未添加群との比較:Student's t-testで $p < 0.005$)。さらに、重要な点はこれまで各ウェルの観察において細菌、カビなどの感染事故は起こっておらず、清潔操作に関して問題なく行っている状況である。

D. 考察

汎用性ヒト型双腕ロボットは、ヒトの動きを精緻に模倣してあらゆる動きが可能である。プログラミング

とティーチングにより比較的容易に用途変更ができる可塑性の高さから、自動車産業を始め様々な用途に活用されている。これまで、細胞を散布するハイスループットの機器は既に存在するが、汎用性ヒト型双腕ロボットによる細胞を用いたハイスループットアッセイ系の構築は世界発である。

本研究では実際にがん幹細胞を用いてスフィア形成能を阻害する化合物を抽出するアッセイ系を確立した。スフィア形成能はがん幹細胞のみならず一部の正常幹細胞において自己複製能を測る重要な指標となり (Int. J. Cancer 132: 1249-1259, 2013)、幹細胞の評価系で汎用されている。即ち、本研究から今後抽出されるヒット化合物からスフィア形成能に関する詳細な分子機構を解明してゆく研究の流れは、再生医療において幹細胞の効率的な増殖の点において貢献するものと考えられる。図 3 に結果を示したスフィア形成条件、細胞接着条件においてアドリアマイシンは増殖抑制効果に差を示さなかった。このことは、アドリアマイシンがスフィア培養下での特異的阻害作用を示す化合物ではないことを意味する。

本研究を通じて、このロボットが清潔操作、正確性、再現性が高度に求められる細胞培養アッセイに大変適していることが証明された。現在準備中のヒト正常 iPSC、疾患 iPSC を用いた分化、増殖アッセイへの移行も微調整によって容易に行えるものとする。本プロジェクトの遂行により、創薬分野のみならず工学の発展にも寄与できると考える。

E. 結論

汎用性ヒト型双腕ロボットを用いてハイスループットの細胞スクリーニング系を開発した。細胞操作を正確、再現性良くかつ清潔に施行することができ、今後、既存薬を用いたスクリーニングに対応することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takenouchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H and Kosaki K: Multiple cafe' au lait spots in familial patients with

MAP2K2 mutation. Am J Med Genet 164: 392-396, 2014

2. 学会発表

- 1) 佐谷秀行: がん幹細胞を標的とした治療薬開発の現状と課題。第3回がん新薬開発合同シンポジウム。11/29/2013、ステーションコンファレンス東京、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。