

## 神経前駆細胞からの初期ニューロン分化過程における細胞遷移を同定する Seahorse XFテクノロジーを用いた代謝のフェノタイピング

### Authors

Kanwaldeep Singh  
and Eva Szabo  
Stem Cell and Cancer Research  
Institute, McMaster University,  
Hamilton, Ontario, CA

Yoonseok Kam  
Agilent Technologies, Inc

### Abstract

*In vitro* 幹細胞分化系は、細胞分化を制御する必須因子の検証と完全に機能的な細胞の創出を可能にします。人工多能性幹細胞 (iPSCs) のような多能性細胞からの機能的な細胞の創出は、細胞の代謝におけるダイナミックな変化を伴います。これらの代謝の変化は、分化と成熟への細胞コミットメントの最初のステップから連続的に起こります。したがって、これらのプロセスを通じた細胞の代謝の時間依存的な生細胞解析が必要です。Agilent Seahorse XF テクノロジーは、細胞代謝の表現型の変化を観察するために、連続的および定量的な解析プラットフォームを提供することができます。このApplication Noteは、コミットした神経前駆体/幹細胞 (NPCs) から未熟NPCsまでの、侵害受容器感覚ニューロンの初期分化過程の代謝解析について詳細に述べています。XF解析のための細胞準備プロトコル、Ara-C処理による高増殖性細胞のネガティブセレクション、ゲノムDNAによるデータ・ノーマライゼーションについて含んでいます。得られたデータは、よりダイナミックな変化を示したミトコンドリア呼吸とは対照的に、コミットメント・ステージの後に続くNPCsにおける解糖の持続的な下方制御を明らかにしました。このアプリケーション・モデルは、最終分化ニューロンまでの成熟を通じた長期の分化過程の解析に拡張できます。また、他の幹細胞の時間依存的な代謝の変化に関する研究、とりわけ代謝の振動のような細胞のダイナミクスの評価へ適合させることができます。

## Introduction

体細胞をiPSCsに変換するリプログラミング技術の開発は、患者特有の細胞種と*in vitro*の細胞ベースの疾病モデルの創出をもたらしました。しかしながら、PSCsから興味のある細胞種の純粋な集団を創出するための直接的な分化方法が不足しているという大きな課題があります<sup>1</sup>。このように、創出される分化細胞は高度に不均一です。この不均一性は、疾患の進行への特定の細胞タイプの正確な寄与を評価することや、分化型の細胞種の分子および代謝の軌道を質的に解析することを難しくしています。以前の研究は、代謝と幹細胞発生間の機能的なつながりを同定しました<sup>2-3</sup>。例えば、いくつかの最近の研究は、NPCsがそれらの成熟した中枢神経系 (CNS) 細胞とは異なる代謝プロファイルを備えていることを示しました。この違いは、代謝経路が幹細胞運命決定における調節の役割を備えていることを示唆します<sup>4-5</sup>。

多くの研究が、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症を含む神経変性疾患のモデル化のために中心的である中枢神経系ニューロンとこれらのニューロンのサブタイプを誘導するために、iPSCsを使用してきました<sup>6-10</sup>。しかしながら、最近のいくつかの研究だけが、PSCsを末梢神経系 (PNS) のニューロンに分化させるための方法を報告しています<sup>11-12</sup>。従って、PNSの特定の感覚ニューロンの純粋な集団の誘導と、神経変性疾患のモデル化のためのそれらのアプリケーションについて解説しているプロトコルは十分にはありません。正常な末梢神経の発達過程の代謝要求性と異常な神経形成を引き起こしうる代謝障害を理解することは、NPC分化過程と末梢神経成熟過程の新たな代謝のチェックポイントを提供するでしょう。この理解は、ニューロパチーのためのターゲット治療ストラテジーの開発にもつながるでしょう。

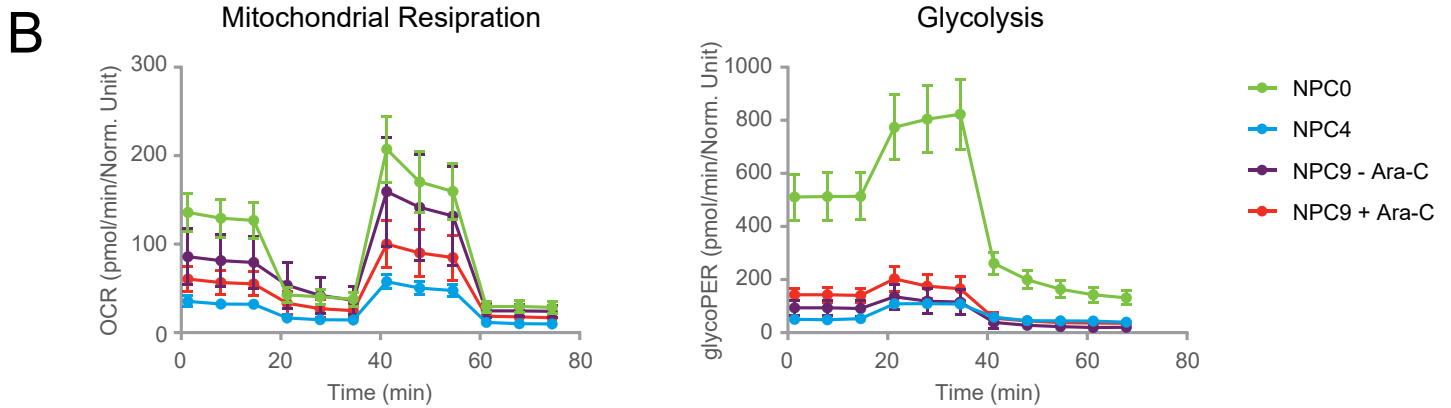
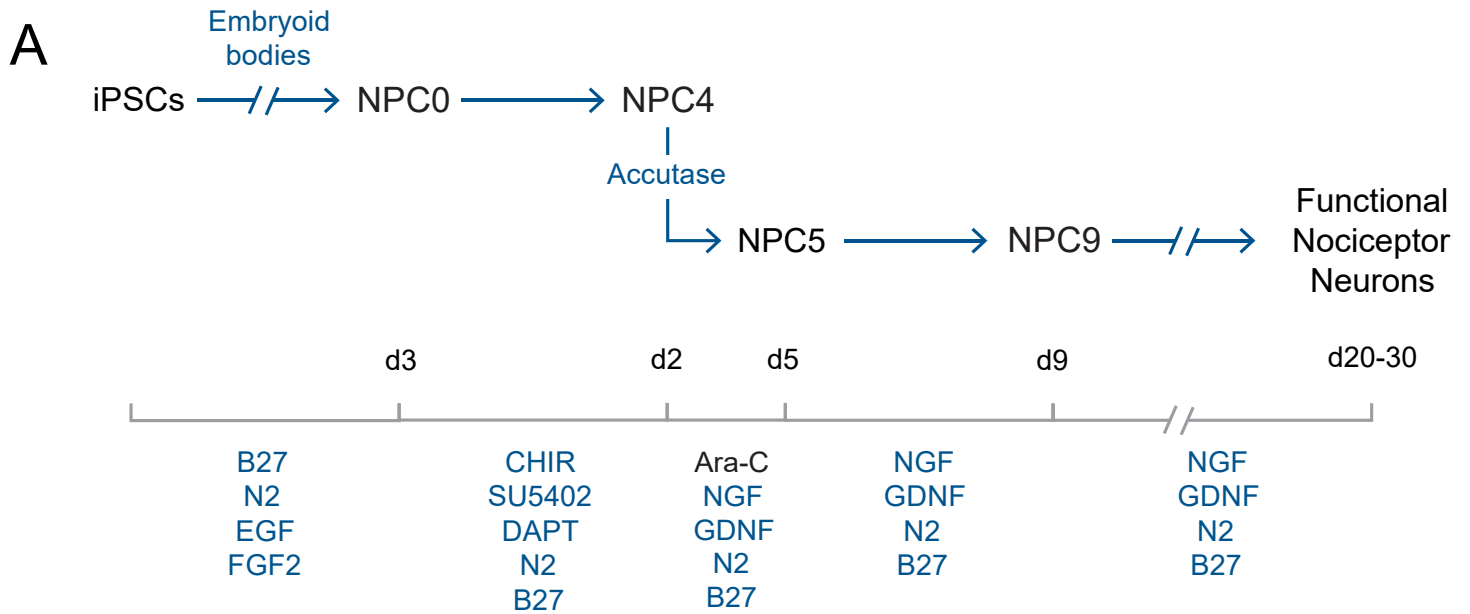
生きたNPCsと分化型ニューロンの細胞代謝の変化は、 Seahorse XF テクノロジーを用いて調べることができます。これらの細胞のミトコンドリア機能は、XF Cell Mito Stress Testを用いて計測することができます。細胞の解糖活性は、細胞外酸化速度(ECAR)を計測し、そこからプロトン流出速度 (PER) を算出する XF Glycolytic Rate Assayを用いて評価することができます。特に、HEPESの緩衝能を加えたアッセイ条件を適用することにより、解糖のみに依存するPERを glycolytic PER (glycoPER) として評価することができます。

## Results

### 初期の分化NPCsにおけるミトコンドリア呼吸と解糖の計測

最初に、ヒトiPSCsをNPC表現型へと分化させ、必要に応じて保存し、拡張させました。次にNPCsは最初の4日間、CHIR・SU5402・DAPTのような阻害剤と低分子による処理を通して、末梢神経分化を誘導する条件に曝露しました。分化した細胞を分離し、Ara-Cを含む / 含まない、成長因子NGFとGDNFを含む条件で再び播種しました (Fig1A : 詳細はMethodをご参照ください)。Ara-C処理は、分化した神経培養細胞を圧倒する傾向のある増殖性の細胞を除去するために実施し、より均一な神経培養を促進させました。分化培養の均一性は、分子および機能的な指標の正確で典型的な計測のために必要です。

Fig.1で示されるように、day 0からday 9へのNPCsの代謝が、ノーマライゼーションの後に比較されました。NPCsの分化が進行するにつれて、細胞は解糖速度に関してよりエネルギー性が下がり、glycoPERがミトコンドリア呼吸速度 (OCR) と比較して著しく減少しました。この減少は、幹/前駆細胞が分化し始めるにしたがって、解糖系が下方制御される代謝スイッチを受けることを示唆します。



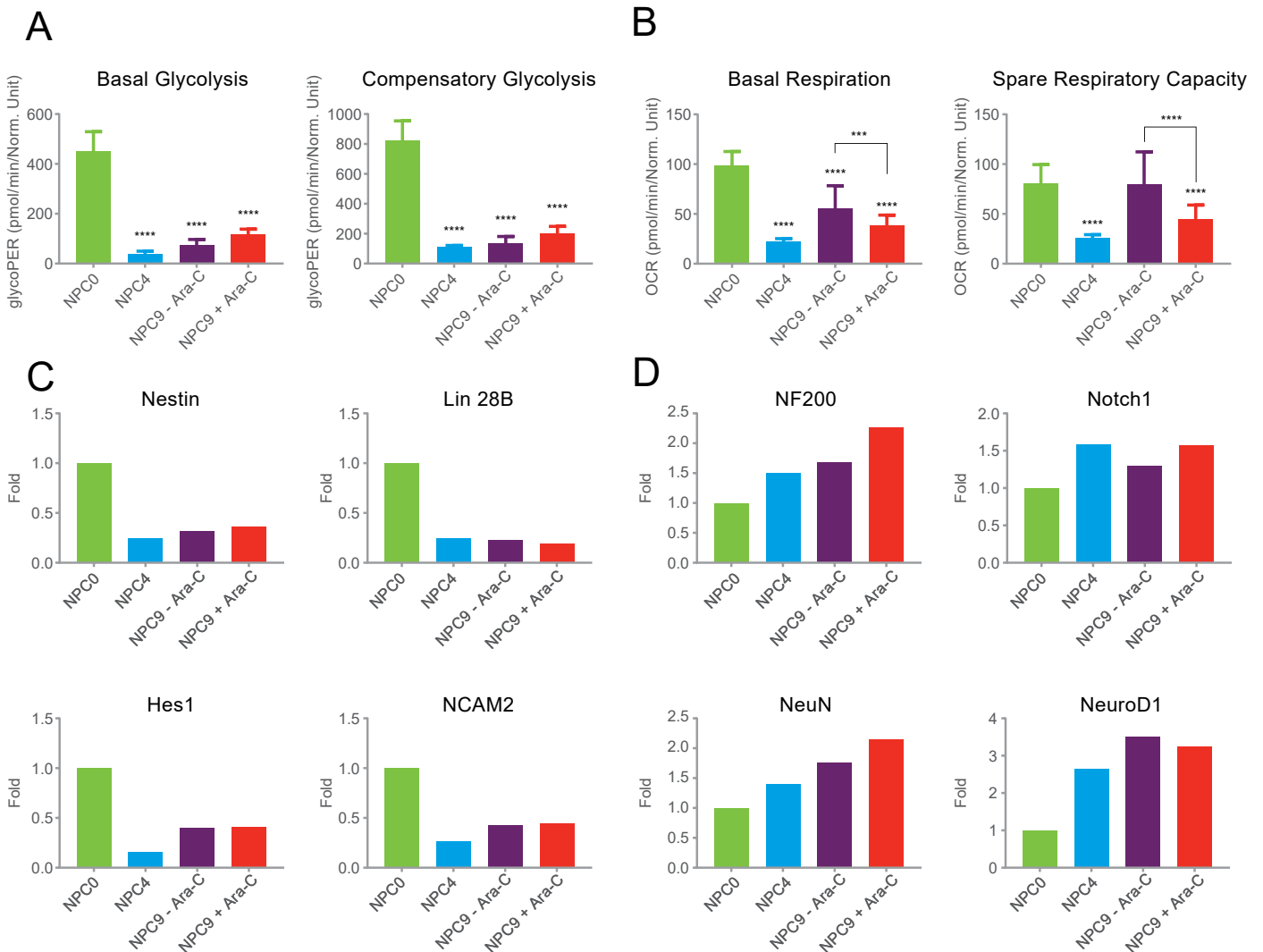
**Figure 1 : 初期のNPC分化過程の感覚ニューロン分化タイムラインと細胞の代謝プロファイル。** (A) iPSCsから機能的な感覚ニューロンまでの分化プロトコルを示す模式図。iPSCsからNPCsへの分化は、Materials & Methodsセクションで述べているように、胚様体法を用いて行われた。分化を経験したNPCsは、day 4で分離し、Ara-Cを含む / 含まない Matrigelコーティングした細胞培養ディッシュに再び播種した。(B) 初期のNPC分化過程の代謝の変化。ミトコンドリア呼吸と解糖を、初期のNPC分化過程の特定のタイムポイントにおいてそれぞれXF Cell Mito Stress TestとXF Glycolytic Rate Assay Kitで計測した。エラー・バーは平均±標準偏差 (n=26) としてレポートされた。

## NPCsからの初期の分化ステージの間の代謝の遷移

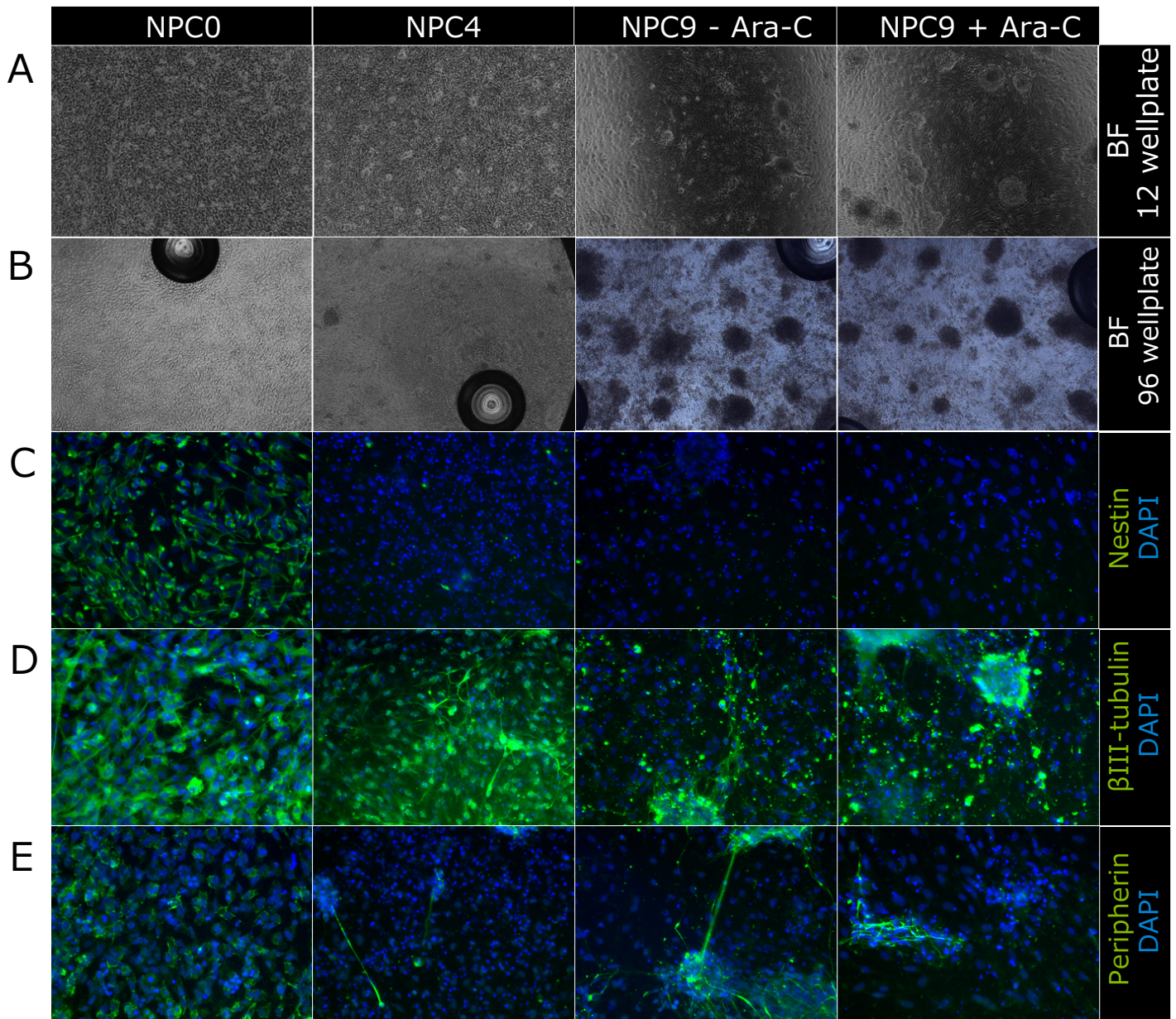
分化がday 0からday 9へと進むにつれて、定常状態の基礎解糖 (Basal Glycolysis) および補償的な解糖 (Compensatory Glycolysis) の有意な減少が観察されました。この減少は、細胞の解糖系に対する依存が分化の最初の4日間で下方制御されることを示唆します (Fig.2A)。加えて、NPC分化の最初の4日間、基礎呼吸 (Basal Respiration) と予備呼吸能 (Spare Respiratory Capacity) は同じく減少しました。しかしながら、分化のday 9までに、酸素消費レベルと予備呼吸能は未分化のNPCsで観察されたレベルと同様のレベルまで回復しました (Fig.2B)。この回復は、初期分化過程での代謝の振動を示している可能性があります。増殖性の細胞を除去するAra-Cの存

在下で、ミトコンドリア呼吸の回復がより遅かったことに注目することは重要です。この遅い回復は、細胞にAra-C処理が効果をもたらした結果であるようでした。

NPCsが予想される分化の道筋をたどったことを証明するために、NPCマーカー (Nestin、Lin28B、Hes1、NCAM2)、成熟した一般的なニューロンのマーカー (Notch1、NeuN、NeuroD1) と末梢ニューロンのマーカー (NF200) の遺伝子発現を調べました (Fig.2C、D)。分化のday 9タイムラインを超えて進んだとき、NPCマーカーの発現は著しく減少し (Fig.2C)、ニューロンのマーカー発現は次第に増加しました (Fig.2D)。



**Figure 2 : 細胞の代謝指標は、初期のNPC分化過程におけるニューロン遺伝子発現と一致する。** (A) 解糖は、XF Glycolytic Rate Assay Kitを用いて特定のタイムポイントで計測された。基礎解糖 (Basal Glycolysis) および補償的な解糖 (Compensatory Glycolysis) は、Report Generator (Agilent) を使用して算出され、データは総細胞DNA含有量に対してノーマライズされた。(B) ミトコンドリア呼吸指標である、基礎呼吸 (Basal Respiration) と予備呼吸能 (Spare Respiratory Capacity) は、XF Cell Mito Stress Test KitとそのReport Generator (Agilent)を用いて算出された。(C) NPCマーカーであるNestin、Lin28B、Hes1、NCAM2の遺伝子発現は、qRT-PCRによってNPC分化過程の異なるタイムポイントで測定され、day 0 NPCsを参照したフォールド変化が算出された。(D) ニューロンのマーカーであるNF200、Notch1、NeuN、NeuroD1の遺伝子発現データ。 (\*\*\*\*p<0.00001)



**Figure 3 : 初期のNPC分化過程における表現型の変化。**初期のNPC分化過程の特定のタイムポイントにおける、12ウェルプレート (A) および XF96 Seahorseプレート (B) 上の典型的な細胞の 4 X 位相差画像。細胞は、NPCマーカであるNestin (C) とニューロンのマーカであるβ III-tubulin (D) および Peripherin (E)で染色された。核の染色にDAPIが用いられた。(n=3)

NPCsからday 9の成熟ニューロンへの分化は、タンパク質レベルでのニューロンのマーカの存在を示すために、免疫蛍光解析によって評価されました (Fig.3)。分化が進行するにつれて、NPCsは形態を変えます。初めにday 4までに細胞集塊を形成し、day 9までに軸索走行が起こります (Fig.3A, B)。NPCsが分化するにつれて、それらはNPCマーカであるNestinの発現を失い (Fig.3C)、ニューロンのマーカであるβIII-tubulinの局在を示し

(Fig.3D)、末梢ニューロンのマーカである Peripherinの発現を得ていきます (Fig.3E)。

全体として、ミトコンドリアから独立した解糖系に対するミトコンドリア呼吸の比較は、day 0からday 9へと分化が進行するにつれて、細胞の代謝依存性が解糖系からミトコンドリア呼吸へと明らかにシフトすることを証明します (Fig.4)。

## ディスカッション

代謝解析とニューロン・マーカーの発現は、初期の末梢神経分化のタイムラインにおける異なる経過日数(0、4、5、9日)にて調査されました。ウェルあたりの細胞数が最適化されることが重要であり、データ・ポイントのための頑健性のあるノーマライゼーション法(すなわちタンパク質またはDNA含有量)が確立されています。多数の細胞種が末梢のニューロンと共に出現しているため、分化培養の不均一性に対して厳密な考慮がなされるべきです。神経分化の初期の培養物の不均一性は、形態学的違いと、代謝の計測のウェル間のばらつきによって証明されます。従って、代謝の解析に関して費やされるリソースを最小化するために、細胞健康状態の指標としてNPCsと分化している培養物の細胞形態を観察することは重要です。細胞が不健康である場合、代謝プロファイルは計測点ごとに大きな揺らぎを伴った最小のOCRとglycoPERを示すことにより、このことを反映するでしょう。

代謝のプロファイリングにおいて考慮されるべきもう一つの点は、OCRとglycoPER計測が分化タイムラインの間に振動するという可能性です。OCRはday 0からday 9の間に振動を示し、これは分化タイムラインを通して遺伝子発現プロファイルを調査した多数の分化プロトコルで観察された振動と類似していました。したがって、代謝の指標が分化の最初および最終のステージだけで解析される場合、細胞が末梢のニューロンに成熟する際に見落とされるであろう多数の代謝スイッチが存在する可能性があります。分化させているニューロンの純度を改善する頑健なプロトコルを確立することは、分化過程での信頼性が高く再現性のある代謝の遷移の計測のために重要です。ニューロンの均質な集団は、あらゆる代謝の変化をマスキングする他の細胞種の出現をも回避するでしょう。

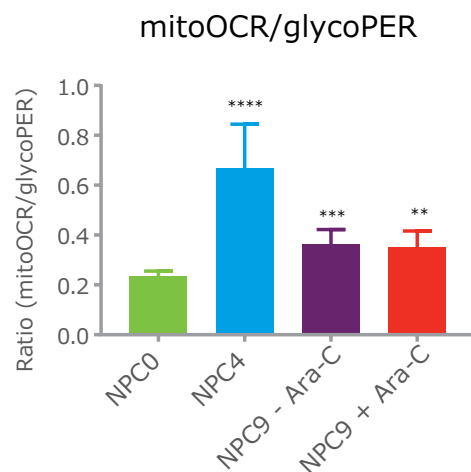
## 結論

分化過程におけるニューロンのXF Cell Mito Stress TestとXF Glycolytic Rate Assayを用いた代謝プロファイリングは、この技術が神経分化タイムラインの間の細胞遷移を反映する代謝の遷移を同定するために用いることができることを証明しました。したがって、これらのアッセイは、末梢ニューロンの分化の道筋を予測するためのステップとなる頑健性のある計測を提供します。

## Materials and methods

### NPCs培養と末梢の感覚ニューロンへの分化

ヒトiPSC由来のNPCsは、Matrigel (Corning, 354234) コートした細胞培養ディッシュ上で1X N2 (Thermo, 17502048)、1X B27 (Thermo, 17504044)、10ng/mL bFGF (PeproTech, 100-18B)、50ng/mL EGF (PeproTech, AF-100-15) を添加したDMEM/F12培地 (Corning, 10-090-CV) で培養した。分化のために、細胞をAccutase (Corning, 25-058-CI) で分離し、カウントし、1:15のMatrigelで二回コートした細胞培養ディッシュ上に、 $5.6 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>の密度で播種した。その翌日、神経分化を、1X N2 (Thermo, 17502048)、1X B27 Plus (Thermo, A3582801)、10 $\mu$ M DAP (Abcam, Ab120633)、10 $\mu$ M SU5402 (Cayman Chemicals, 13182)、3 $\mu$ M CHIR 99021 (Stem Cell Technologies, 72054) を含むNeurobasal培地 (Thermo, A3582901) で、コンフルエントなNPCs単層の上で誘導させた。分化は、新鮮な分化培地を使用した毎日の完全培地交換を行いながら、5日間継続した。誘導から5日後、細胞はAccutaseで分離し、1:15のMatrigelで二回コートした細胞培養ディッシュ上に、10 $\mu$ M Ara-C (Sigma, C1768) を含む または 含まない、1X N2、1X B27 Plus (Thermo, A3582801)、25ng/mL NGF (PeproTech, 450-01)、10ng/mL GDNF (PeproTech, 450-10) を添加したNeurobasal培地で、24時間再び培養した。培地は翌日と、その後2日ごとに交換した。



**Figure 4 : 初期のNPC分化過程での解糖からミトコンドリア呼吸へのシフト。**ミトコンドリアOCR (mitoOCR) と解糖のPER(glycoPER) の比は、特定のタイムポイントにおけるXF Glycolytic Rate Assay データから GRA Assay Report Generator を用いて算出された。エラー・バーは平均 $\pm$ 標準偏差としてレポートされた。(n=26; \*\*\*\*p<0.00001; \*\*\* p<0.0001; \*\*p<0.001)

### RNA単離・cDNA合成・定量的リアルタイムPCR

NPCsは、記述されたように6ウェルプレートに播種し、分化させた。RNAの単離は、Norgen RNA Isolation Plus Kit (Norgen Biotek, 48400) でメーカーのプロトコルに従い、分化過程に沿って特定のタイムポイントで実施した。各逆転写反応のために、Bioline SensiFast cDNA合成キット (Bioline, BIO-65054) と共に1µgのRNAを、キットのプロトコルに従って用いた。分化タイムラインに沿ったNPCマーカーの下方制御とニューロン・マーカーの上方制御を追跡するための遺伝子特異的プライマーを使用した各qRT-PCR反応のテンプレートとしてcDNA 1µLを用いた。

### 細胞代謝のプロファイリング

先に解説されたように、NPCsはXF96マイクロプレートに播種し、分化させた。Day 0にXF Cell Mito Stress TestとXF Glycolytic Rate Assayを、NPCsは day 1にMatrigelコートしたXF96プレート上に $6 \times 10^4$  cells/wellの密度で播種した。以前の細胞数最適化実験では、 $6 \times 10^4$  cells/well の条件がXF Cell Mito Stress TestとXF Glycolytic Rate Assay のための最適な細胞密度であることが見出された。Day 4の計測のため、先に述べたように、NPCsはday 1に $6 \times 10^4$  cells/wellで播種し、4日間分化させた。Day 9の計測のために、先に述べたように、NPCsはMatrigelコートした6ウェルプレート上で $4.8 \times 10^6$  cells/wellで播種し、5日間分化させた。Day 5に、先に述べたように細胞はAccutaseで分離し、Ara-Cを含む/含まない状態で、MatrigelコートしたXF96プレート上に再び播種し、Day9まで維持した。特定のタイムポイントにおいて、細胞は完全なXFアッセイ培地で二回洗浄し、XF Cell Mito

Stress TestとXF Glycolytic Rate Assayを各キットで提供される説明書に従って実施した。XF Cell Mito Stress Test用のXFアッセイ培地は、2.5mM L-Glutamine、1mM ピルビン酸ナトリウム、17.5mM グルコースを添加したフェノールレッドを含まないXF DMEMベース培地(Agilent, 103335-100) であった。XF Glycolytic Rate Assay用には、同じ培地に更に 5mM HEPES pH 7.4 (Agilent, 103337-100) を添加した。すべての培地のpHは、37°Cで7.4に調整した。最適化されたFCCP濃度 (0.5µM) をXF Cell Mito Stress Testのために用いた。OCRとglycoPERの値は、XFアッセイの後、細胞DNA含有量に対してノーマライズされた。細胞DNA含有量は、メーカーのプロトコルに従い、CyQuant Cell Proliferation assay kit (Thermo, C7026) を使用して測定した。

### 免疫蛍光染色

NPCsは、記述されたように12ウェルプレートに播種し、分化させた。細胞は、BD Cytofix / CytoPerm kit (BD Bioscience, 554714) を用いて特定のタイムポイントで固定した。固定に際し、細胞は室温で1時間 10% 正常ロバ血清でブロックし、その後4°Cにおいて Nestin (Abcam, Ab22035)、NF200 (Abcam, Ab78078)、Peripherin (Abcam, Ab123576) に対する一次抗体を用いたオーバーナイトのインキュベーションを行った。翌日、細胞を3回洗浄し、室温で1時間、Alexa Fluor-488 結合二次抗体 (Thermo, A11008、A11001) で染色した。細胞を3回洗浄し、DAPI (Thermo、D3571) で染色し、撮像した。

## References

1. Robinton, D.A. and Daley, G.Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481, 295–305 (2012).
2. Ochocki, J.D. and Simon, M.C. Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells. *The Journal of cell biology* 203, 23–33 (2013).
3. Shyh-Chang, N., et al. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 140, 2535–2547 (2013).
4. Kim, D.Y., et al. Metabolic circuits in neural stem cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 4221–4241 (2014).
5. Knobloch, M., et al. Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature* 493, 226–230 (2013).
6. Engel, M., et al. Common pitfalls of stem cell differentiation: a guide to improving protocols for neurodegenerative disease models and research. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73, 3693–3709 (2016).
7. Kriks, S., et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547–551 (2011).
8. Park, S., et al. Generation of dopaminergic neurons in vitro from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. *Neuro science letters* 359, 99–103 (2004).
9. Maroof, A.M., et al. Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells. *Cell stem cell* 12, 559–572 (2013).
10. Dimos, J.T., et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218–1221 (2008).
11. Lee, J.H., et al. Single Transcription Factor Conversion of Human Blood Fate to NPCs with CNS and PNS Developmental Capacity. *Cell reports* 11, 1367–1376 (2015).
12. Chambers, S.M., et al. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nature biotechnology* 30, 715–720 (2012).

※本文書に記載の製品は、すべて研究・実験用です。  
人・動物の診断あるいは治療等の臨床用途に使用することはできません。

●お問合せ先 (Seahorse XFシリーズ 販売店) :



**プライムテック株式会社**

東京都文京区小石川 1-3-25 小石川大園ビル2F  
Phone: [東京] 03-3816-0851 [大阪] 06-6310-8077  
<http://www.primetech.co.jp/> [sales@primetech.co.jp](mailto:sales@primetech.co.jp)

●製造元 :

