

効率的にヒト iPS 細胞を大量増幅するための 培養操作法の開発



研究ノート

長 森 英 二*, 紀ノ岡 正 博**

Development of efficient suspension culture system for
scalable expansion of human iPS cells

Key Words : human iPS cell, suspension culture, cell aggregate, bioreactor

病気やけがによって臓器に大きなダメージを負った患者には、臓器移植を行う場合があるが、臓器移植を希望する患者数に対して、臓器提供者（ドナー）の数が圧倒的に不足している。この問題を解決するために、患者から採取した細胞を体外で培養し、その細胞から臓器や移植片をつくりだして移植する「再生医療（組織工学）」に注目が集まっている。この技術の開発によって、ドナー不足の問題は解消すると共に、患者の細胞から作った臓器を移植するため免疫拒絶反応の心配もない。近年、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が樹立され、この研究にノーベル賞が授与されて以降、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の早期実現がいつそう強く要望されるようになった。

図1に、現時点で想定されているヒト iPS 細胞を用いた再生医療の流れを示す。未分化状態で大量の増幅されたヒト iPS 細胞は、目的とする臓器の細胞へと分化誘導され、移植に適した形（組織）へと加

工された後、患者に移植される。この際、幹細胞を用いた大型臓器の再生や治療には体重 70kg の患者一人当たり $10^9 \sim 10^{10}$ もの膨大な細胞数が必要と試算されており¹⁾、ヒト iPS 細胞を未分化維持された状態で効率的に大量培養・保存し、これを目的とする細胞へと効率的に分化誘導する手法の開発が望まれている。

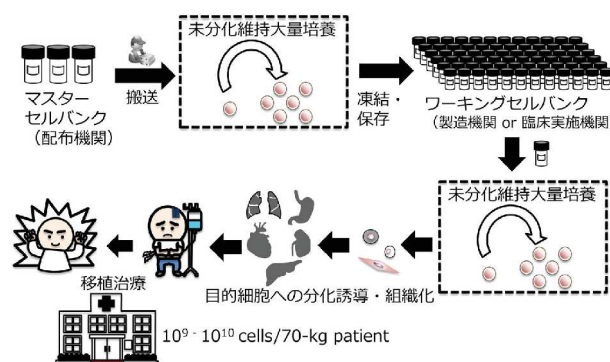


図1 ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の流れ



* Eiji NAGAMORI

1974年6月生

名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学専攻

現在、大阪大学大学院 工学研究科生命先端工学専攻生物学コース 講師
博士(工学) 生物化学工学、培養工学

TEL: 06-6879-7445

FAX: 06-6879-4246

E-mail: nagamori@bio.eng.osaka-u.ac.jp



** Masahiro KINO-OKA

1965年11月生

大阪大学大学院基礎工学研究科
現在、大阪大学大学院 工学研究科生命先端工学専攻生物学コース 教授
博士(工学) 生物化学工学、組織工学

TEL: 06-6879-7444

FAX: 06-6879-4246

E-mail: kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

現在のヒト iPS 細胞の未分化維持培養には、細胞外マトリクスなどの基質をコーティングした培養面上にヒト iPS 細胞を接着させ静置した状態にて培養を行う平面静置培養が主に用いられている。しかしながら、本法は最終到達細胞濃度が低いため高コストな培地（1リットル当たり数万円）を大量に必要とし、また培養面積も大きいため、省スペース化が求められる（図2）。

我々は、ヒト iPS 細胞の大量培養を実現するために、「ヒト iPS 細胞未分化維持大量培養の効率化に関する研究（図3）」に取り組んできた。低コストでの大量調製を実現するために、ヒト iPS 細胞集塊を懸濁培養し高密度化による製造設備の省スペースを目指した「立体的に培養する」技術、細胞濃度を高く保った状態でスケールアップを行うことで使用

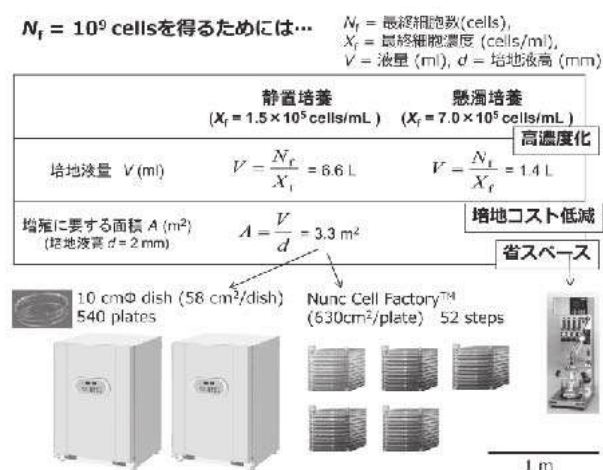


図2 静置培養と懸濁培養の比較

する新鮮培地の削減を目指した「細胞密度を保つ」技術、老廃物の除去と消費成分の補充により、サイトカインなどの付加価値の高い培地成分の最小使用を目指した「培地を再利用する」技術、簡略化された生産プロセスを実現するために培地中にて細胞集塊を適度に分割することで複雑な「継代操作を省く」技術、未分化から逸脱した（分化した）細胞の発生を抑制することで最終的な未分化細胞の収率向上を目指した「未分化を維持する」技術の5つを主要な必要技術として掲げ、それぞれを構成する要素技術の開発を進めてきた。

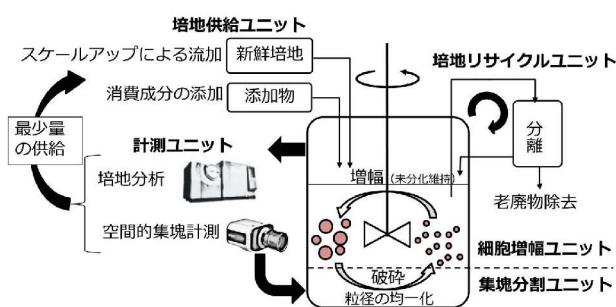


図3 ヒト iPS 細胞未分化維持大量培養の効率化

ヒト iPS 細胞の集塊を液体培地中に懸濁して三次元的に培養を行う集塊懸濁培養の最終到達細胞密度は 10^6 cell/mL のオーダーに達し¹⁾、数リットルスケール（卓上サイズ）の培養槽で上述の規模の大量細胞調製が可能であると期待される。しかしながら、この懸濁培養法をロバストな大量細胞調製技術として実用に供する（例えば、培養特性の異なるヒト

iPS 細胞株にも難なく適用することが可能な手法とする）ためには、より効率的な培養操作法の開発が重要と考えられる。図4に集塊培養容器内におけるヒト iPS 細胞の増殖挙動の模式図を示す。まず集塊懸濁培養の開始に伴う細胞播種操作において、ヒト iPS 細胞の酵素処理による単分散処理はアポトーシスを引き起こし²⁾、細胞密度の減少がしばしば問題となる¹⁾。細胞間接着力が脆弱と推測されるヒト iPS 細胞株では、培養初期の集塊形成が適切に成されず、懸濁培養が行えないケースも観察されている。懸濁培養初期の集塊形成を促進する方法の開発が必要となる (①)。

集塊懸濁培養において高い増殖速度を長時間維持するための境界条件を明らかにすることも必要である。集塊当たりの初期細胞数が大きすぎると、増殖速度が低下し、集塊径の増大により集塊内部への栄養や酸素の供給（拡散）が乏しくなり、内部に細胞死が引き起こされることが予想される。また培養時間経過とともに細胞-基質間接着や細胞間接着が強固となりすぎること増殖の場として適さない環境が生まれる可能性も予想される (②)。

よって、懸濁培養槽中において高い増殖速度を長期間に亘って維持するためには、定期的に集塊を崩し、前述の障害を解除する操作が必要であることが示唆される。既存の酵素処理による単分散を伴う継代操作では、細胞密度の減少が顕著となるため、単分散処理を経ず、集塊を適度な大きさに分割する方法が必要である。我々はある薬剤の添加にて細胞集塊が柔らかくほぐれ、大きな細胞集塊を小さな細胞集塊へと分割することができることを見出した。分割された小集塊は速やかに増殖を再開し、この処理によって細胞密度が減少することもなかったため、ヒト iPS 細胞懸濁培養における効果的な集塊分割法として期待している (③)。

さらに集塊懸濁培養では、細胞濃度の上昇と共に培地成分の枯渇および老廃物の蓄積による増殖速度の低下が考えられる³⁾。現状のプロセスでは、高価なヒト iPS 細胞培地に含まれる高コストな成分が未だに活性を保っているにも関わらず、培地交換によってこれらの成分を全て廃棄してしまっている。培地成分を透析処理することで培地を再生することが必要と考えられる。この透析処理によって、低分子成分である乳酸等の老廃物を除去するとともに、グ

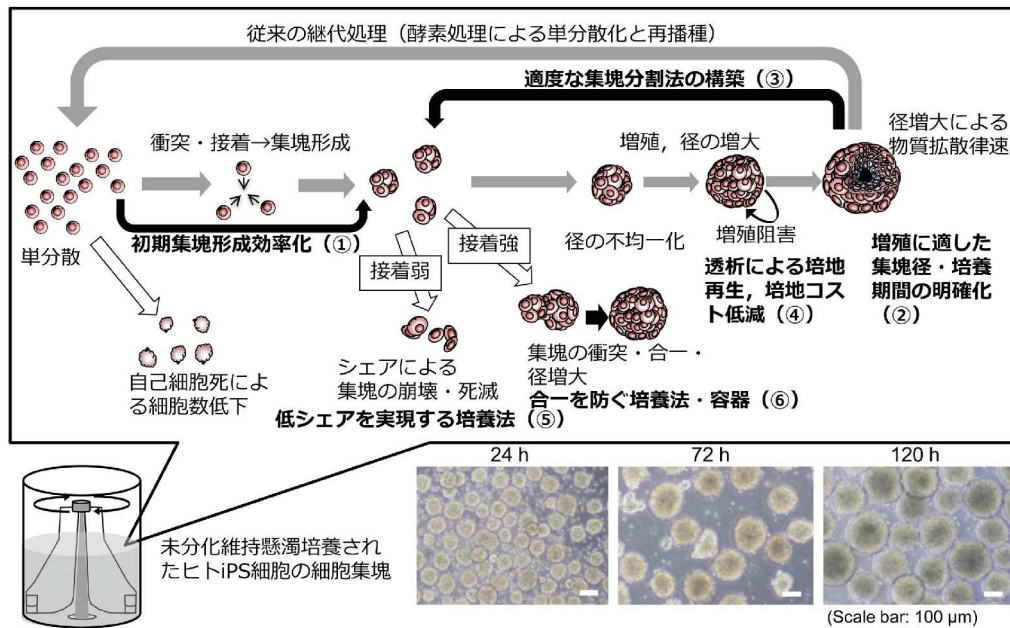


図4 集塊懸濁培養におけるヒト iPS 細胞の増殖挙動

ルコース等の低分子な栄養源を供給し、更に、ヒト iPS 細胞培地に含まれる高コストな高分子成分（線維芽細胞増殖因子 2, トランスフォーミング増殖因子 1, インシュリン, 血清アルブミンなど）を使用済培地中に温存して再利用することが可能と期待される (4)。

ヒト iPS 細胞集塊は懸濁培養時に発生する液流れ等によるシェアストレスに脆弱であることが知られ

ており、いくつかの攪拌翼の形状や回転数などがこれまでに検討され報告されている⁴⁾。特に細胞間接着が脆弱な性質のヒト iPS 細胞に対しては低シェアな培養技術が必要である (5) が、単純に攪拌速度を落とすだけでは細胞集塊は培養槽底部に集まり、集塊同士の合一・径の増大・集塊内部での細胞死の発生を引き起こすこととなるため、低シェアでありながら槽内の集塊分布の均一性を高める工夫が必要

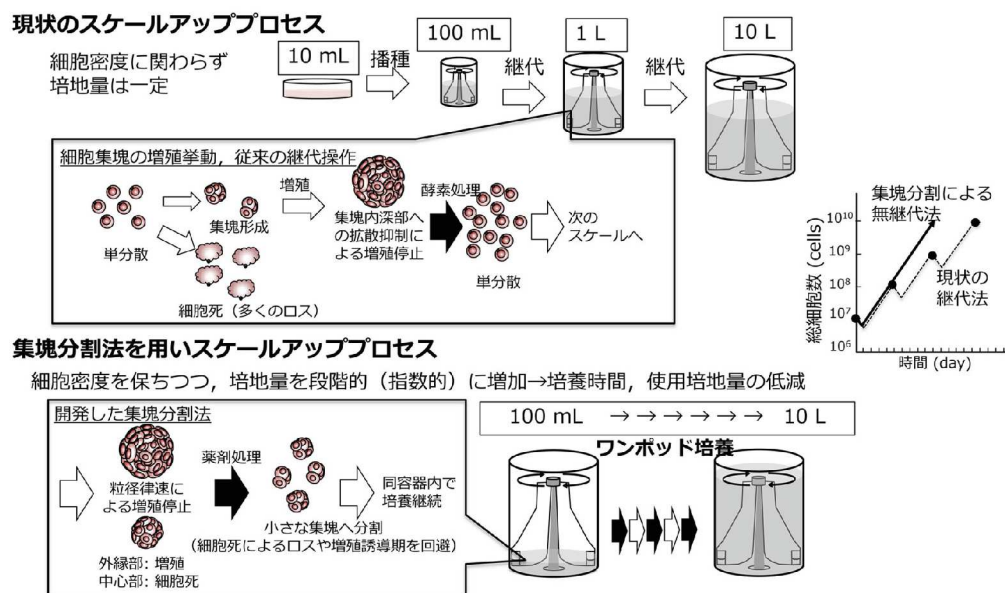


図5 要素技術の統合により可能となるスケールアッププロセス

である。また細胞間接着が強固な性質のiPS細胞においては、槽内の集塊分布が均一である場合にも液流れによって偶発的に生じる集塊同士の衝突・接着によって集塊の合一、径の増大による増殖低下が発生することが予想され、この合一を防ぐ培養法の開発も必要である(⑥)。

以上の要素技術の確立により、高密度な培養(省スペース化)が可能な立体的(懸濁)培養において、高い増殖速度を保ちつつ、細胞密度が一定となるよう培地を流加(指数流加培養)し、新鮮培地量を削減する無継代スケールアップ操作(図5)が可能となり、ヒトiPS細胞の培養コストが大幅に削減されることが期待される。

近年、ヒトiPS細胞を用いた再生医療の実現が強く要望される中、より多くの患者に対してこの治療法を役立てて行くためには、品質が保証されたヒトiPS細胞を、必要な時に、必要な量だけ、低コストで調製する技術が必要となってくる。このような要求を満たした製造技術という観点では、標準的な培養手法は未だ定まっておらず、株間差などにも影響されることが無いロバストな大量培養技術の構築は

引き続き重要な課題である。阪大工学部応用生物工学コースの諸先輩方が中心となって学問的に体系化し、世界をリードしてきた“生物化学工学”の考え方・センスが、再生医療分野の発展・実現に果たすべき役割は、今後も益々大きくなると考えている。

参考文献

1. Olmer et al., *Stem Cell Res.*, 5, 51-64 (2010)
2. Watanabe et al., *Nat. Biotechnol.*, 25, 681-686 (2007)
3. Chen et al., *Stem Cells Dev.*, 19, 1781-1792 (2010)
4. Olmer et al., *Tissue Eng. Part. C*, 18, 772-784 (2012)

謝辞

本研究は、JST研究成果展開事業「戦略的イノベーション創出推進プログラム(S-イノベ)」、およびNEDO委託事業「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発」による支援を受けている。

