

日時：2016年3月18日(金)
会場：大阪国際会議場5F 大ホール

再生医療の新たな培養法の展開

再生医療の早期実現のためには
培養技術の進歩が必要不可欠である。
本セミナーでは、iPS細胞の培養技術の
最新事例を紹介する。

演題①

ヒトiPS細胞を臨床応用可能にするための培養法の開発



京都大学 iPS細胞研究所
未来生命科学開拓部門
中川誠人 先生

演題②

幹細胞の挙動制御に基づく 未分化維持・分化誘導手法の開発



大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻
生物プロセスシステム工学領域
金美海 先生

座長



大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻
紀ノ岡正博 先生

ヒト iPS 細胞を 臨床応用可能にするための培養法の開発

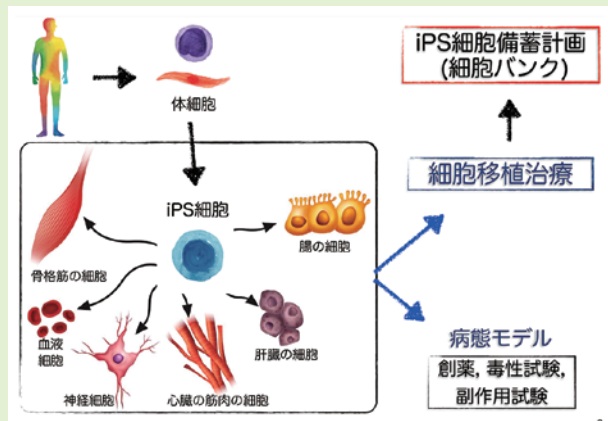
京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門 中川誠人 先生

ヒト多能性幹細胞の一つである iPS 細胞は我々の体を構成する様々な体細胞へと分化する能力を持ったまま、ほぼ無限に増殖する。この特徴から再生医療への応用が期待されているが、細胞を医療応用に使用する場合には、安全な培養環境を構築し、細胞品質を確保することが重要である。我々の開発したヒト iPS 細胞を臨床応用可能にするための培養法、ならびにその培養系がヒト多能性幹細胞に与える影響について紹介したい。

iPS 細胞技術の応用

iPS 細胞は体細胞を出発点として初期化することで多能性をもち、試験管内で分化誘導が可能である。iPS 細胞の応用としては、病態モデルの作製、創薬の薬効評価ならびに毒性試験、これまでできなかったスクリーニング系の構築、細胞移植のソース等が挙げられる(図1)。iPS 細胞を臨床応用するために、iPS 細胞研究所(CiRA)を中心として iPS 細胞のストックプロジェクトが進行中である。ストックプロジェクトでは、HLA ホモ型の健康人の方を探し、その方の血液から移植後の免疫拒絶を回避できるような iPS 細胞を作製している。臨床グレードの iPS 細胞を作製するには今の技術では1年程度要するが、凍結保存すればすぐに使用できるというメリットがある。日本は島国であるため、HLA 型の保存に偏りがあり、日本の中から一番頻度が高い HLA ホモドナーの方を探し、その血液から iPS 細胞作製し移植可能となる割合は、計算上日本人の20%をカバーできることになる。

図1 iPS細胞技術の応用



フィーダーフリー培養系の開発

コンベンショナルな iPS 細胞の培養法である、オンフィーダー培養法は細胞の生育が安定的で研究用途には適しているが、臨床応用するには幾つか課題がある。オンフィーダー培養系では、培地にウシやブタなどの動物由来の成分が含まれるため安全性の確保に課題があり、またフィーダー細胞がマウス由来の細胞を使用する点で臨床応用のハードルが高い。更には、iPS 細胞とは別にフィーダー細胞のハンドリングが加わるため非常に労力がかかる。これらの課題を解決するために、我々の研究チームは培養基材と培地の開発に的を絞って探索を進めてきた。

基材に関しては、iPS 細胞を培養する際、ディッシュ上に人工的なタンパク質をコートし、その上で培養できないか、という発想で進めてきた。さまざまな施設の研究成果¹⁾により、iPS 細胞の培養に必要な細胞外基質としてラミニン511という分子が非常に有効であること、またそれらに iPS 細胞が接着する際に $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンが非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。これらのことから、ラミニン511をコーティング基材として使用することを決定した。ラミニン511の全長は、 $\alpha \beta \gamma$ の構造体が鎖状に繋がったタンパク質で、インテグリン結合ドメインを有する。ただ、ラミニン511は、非常に分子量が大きく精製度が低い。そのため、大阪大学の関口先生の研究室では、ラミニンのインテグリン結合ドメインのみをリコンビナントタンパク質(ラミニン511-E8²⁾)として精製する技術をすでに開発されており、非常に精製度も高く収量も良いので、共同研究を依頼した。そして、実際に iPS 細胞のコーティング基材として使用したところ、非常に効率良く培養することができた。よって、ラミニン511-E8をコーティング剤として使用することが有効であると結論付けた。ラミニン511-E8に関

しては、(株)ニッピから iMatrix-511 という製品名で発売されている。

培地の課題としては、従来の iPS 細胞の培養に用いていた培地には様々な動物由来成分が含まれていた点である。このような動物由来成分を全く含まず、これらの成分を化合物が人工的なタンパク質で代替し培地を開発できないかと、味の素(株)と共同開発を行った。その成果として完成したのが、StemFit® 培地である³⁾。StemFit® AK03N に関しては、生物由来原料を全く含まない培地である。培地開発には数年を要し、組成決定までには299種類もの組成を検討し、299番目の組成が AK03N のベースとなっている。この培地に関しては、ヒト多能性幹細胞の培養用に最適化されているので、iPS 細胞のみならず ES 細胞の培養にも使用可能である。この StemFit® 培地をラミニン511-E8と組み合わせて使用することで、シングルセルで培養が可能となっている。このメリットとしては、シングルセルにすることで細胞をカウントして、目的の細胞数を播種でき、従来の細胞塊で発生していた継代時の個人間での手技の差が改善された。また、これまで1:3 ~ 1:5程度 of 継代率が、フィーダーフリー(以下、Ff)培養法では、1:100まで伸ばすことが可能となった。さらに、培地交換に関しては、オンフィーダー培養法(SNL法)に関しては、ほぼ毎日交換を行っていたが、Ff培養法では、1日ないしは2日おきに培地交換をすれば十分であるということがわかってきた。これまでのSNL法に比べ、非常に簡単に iPS 細胞を増やすことが可能となった(図2, 3)。

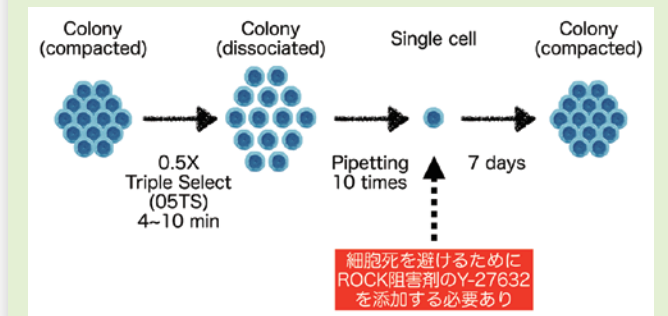
iMatrix-511 と StemFit® AK03N を使用した培養系に関しては、PMDA の事前相談において、臨床使用しても問題

図2 新たに開発した臨床グレードのiPS細胞の培養方法

	フィーダーフリー法(Ff)	フィーダー法(SNL)
支持細胞/基質	iMatrix-511(ラミニン)	マウスSNL細胞(マイトマイシン処理)
培地	StemFit® AK03N (Animal Component Free)	動物由来成分含む、血清含む
播種	シングルセル → カウントして一定数を播種	小さな塊にして播種
継代率	1:100	1:3
培地交換	1~2日おき	ほぼ毎日
凍結保存	STEM-CELLBANKER 緩凍法(-80°C)	DAP213 ガラス化法(LN ₂) (10秒で凍結推奨)

Nakagawa et al. 2014. Scientific Reports
平成27年度 産官学連携功労者表彰・文部科学大臣賞、
平成28年度 文部科学大臣表彰・科学技術賞

図3 Feeder-free culture system for hPSCs



無いという確認が取れているため、臨床応用可能な iPS 細胞の培養法が構築されたと考える。この培養法は、CiRA の iPS 細胞のストックプロジェクトにも活用されている。昨年度、臨床用の iPS 細胞が出荷されたが、その細胞もこの培養法で培養されたものである。現在では、臨床応用のみならず基礎研究においても幅広く使用されている。たとえば、シングルセル培養が可能なので、ゲノム編集後のクローニングにも応用可能である。また、iPS 細胞をサンプルとして回収する際にフィーダー細胞の混入を気にされる先生はこの培養法を用いている。

今後の展望

今回、iMatrix-511 と StemFit® 培地を用いた Ff 培養法を構築できたが、まだスタート地点に立ったにすぎないと考えている。よって今後は詳細な検討を進めながら、よりロバストな培養法の開発を進めていきたいと考えている。さらには、Ff 培養法が細胞に与える影響を解析し、それをフィードバックし次世代の培養システムの構築に繋げていきたい。それには培地や基材のみならず、機器や人も含まれるため、様々な業種の人と協力しながら開発を進め、臨床応用に貢献していきたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Rodin S, et al. Nat. Biotechnol. 2010 ; 28(6) : 611-5
- 2) Miyazaki T, et al. Nat. Commun. 2012 ; 3 : 1236
- 3) Nakagawa M, et al. Sci. Rep. 2014 ; 8(4) : 3594

幹細胞の挙動制御に基づく 未分化維持・分化誘導手法の開発

大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 **金美海** 先生

iPS細胞を未分化維持から分化誘導、組織化する培養プロセスの過程において、iPS細胞の産業応用のためには、未分化維持したまま細胞増殖させる過程が非常に重要と考える。我々は細胞培養のスケールを、マイクロレベル(単細胞)から、メソレベル(擬似胚葉体)、マクロレベル(組織)、メガレベル(臓器・個体)と分けて考え、培養手法を汎用化できるような培養プロセスを研究している。

ヒト多能性幹細胞培養手法の開発における現状と課題

培養容器内の細胞を取り巻く環境について考えると、細胞の挙動(遊走)に影響を与える細胞間接着および細胞-基質間接着の相互作用で、細胞挙動のバランスや内在性のシグナルが変化し、細胞の運命が変化していると考えている。これらの関係性を制御することで、細胞の運命づけをコントロールし、培養プロセスの設計に応用できないかと考えている。また培養プロセスの設計には、培養操作ならびに装置の設計といった量的拡大を目指した観点と、細胞挙動制御の質的改善の観点、双方からのアプローチが必要であると考えている。

細胞を継代する際の課題として、継代を重ねるたびに増殖が良い細胞と悪い細胞が混在することが挙げられる。細胞の成育は培地や基質、細胞株の影響も受けるが、同じ材料を使ったとしても、育て方(操作者のスキルやセンス)によってバラつきが発生する。そこで我々は、以下3点を軸に、細胞を中心としたモノづくりを進めている。

- ① 培養の材料によらず、どのような条件でも問題なく培養できる細胞培養の境界領域の拡大を行う。
- ② 細胞の育て方のルール作りをし、細胞培養の条件や操作の許容範囲を確定する。
- ③ 熟練者であろうが素人であろうが、大量培養装置であろうが、あらゆる培養に対応できるようにしていく必要がある(スキルとセンスのいい操作者のヒトづくり)。

未分化維持増殖の段階でバラつきの大きい細胞集団を分化誘導した場合、分化の方向性が拡散し、さらに大きなバラつきが発生すると考えている。故に、未分化維持増殖の段階で細胞挙動を制御することで、それらの細胞を分化誘導した際

の方向性を揃えることができると考えている。

現状の2次元培養と3次元培養では細胞到達密度に限界がある。また、細胞播種密度が極めて低い場合は細胞死が起こりやすく、一方で播種密度が高い3次元培養等の条件では、立体的な細胞集塊形成により細胞の不均一性の問題が発生する。それらの課題を解決し、どのような培養条件でも均一な細胞集団を得る細胞培養条件を設計する必要がある。そのために、①細胞培養の境界領域の拡大を目指した培養手法の開発、②培養方法を評価する方法論の構築、③細胞を培養プロセスの各ステージでみる(見る、診る、観る)ためのツールの開発が重要と考えている。

細胞挙動の操作による細胞運命の制御

細胞の挙動は、細胞遊走と細胞間接着、細胞-基質間接着の3つのバランスで成り立っていると考えている。これら3点の三角形の内側の範囲では、細胞は未分化維持し、その範囲から外す(外れる)ことで分化誘導が進むと考えている。細胞遊走を促進させたり、細胞間接着を阻害したりすることで、積極的に分化誘導を起こすことが可能と考え、現在それらの手法の開発を行っている。

細胞挙動を操作するための細胞外環境(場)の設計ツールとして、細胞遊走・細胞間接着・細胞-基質間接着を促進もしくは阻害する、ハサミや消しゴム、のりのような機能をする道具が必要と考えている。

ワディントン地形の概念¹⁾に基づいて、細胞分化過程を考えると、未分化維持細胞が山の頂点の谷に、中腹の谷に三胚葉、山の底辺に各細胞組織といったように示される。それぞれの谷を越える変化があることによって、各分化ステージ進む。この概念を、我々が開発している手法の探索に応用して考えると、未分化維持細胞が位置する、山の頂点の谷底にナ

イプ型もしくはプライム型で維持させるためのスコープや、山頂から下降へと分化誘導するスコープ、谷の淵から逸脱した細胞を消すための消しゴムのような道具が必要と考えている。山の下の方に行くと、分岐点が多く複雑になり制御困難となるため、山の頂上の未分化維持の状態できっかりと制御することが重要と考えている(図)。

細胞挙動を操作する設計ツール

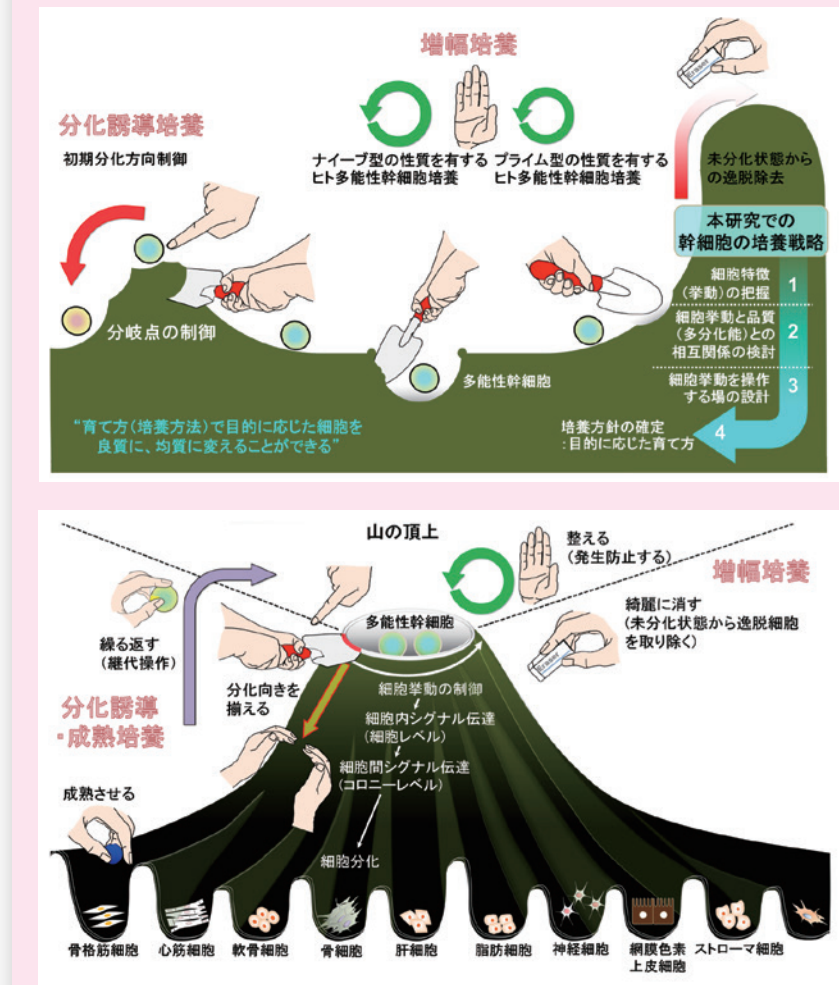
未分化維持制御の具体的な検討として、我々の研究室ではデンドリマーという素材を用いて研究を行ってきた。デンドリマーは、グルコーストランスポーターもしくはインテグリンとの結合を介して細胞接着する。デンドリマーは枝鎖の構造を変化させたり、枝鎖の先端にリガンドを付けたりすることができ、それらの密度を変えることで、接着する細胞密度や細胞挙動をコントロールできる。実際にデンドリマーの構

造(世代数)を変えることで、細胞挙動(遊走)を変化させ、分化の方向性を制御することが可能であった。この現象は、ヒトiPS細胞のみならず、ヒト間葉系細胞やマウスES細胞、ウサギの軟骨細胞においても、同様に制御できることが明らかとなっている^{2)~3)}。

先述の消しゴムのような機能をもつ素材として、我々はHemagglutinin(HA)に注目して研究している。HAをiPS細胞培養系に添加することで、未分化逸脱細胞が剥がれ、選択的に除去できることが明らかとなった。HAは細胞間接着を切断する機能があるが、未分化維持と未分化逸脱細胞の細胞間接着の強度の違いを利用して未分化逸脱細胞のみを選択的に除去していると考えている(特許出願中)。

当研究室では、幹細胞の挙動制御に基づく未分化維持ならびに分化誘導の各手法を研究しており、今回それらの一部を紹介したが、最終的にはそれらを繋ぎ、より広い範囲で展開していきたいと考えている。

図 生命の発生現象を表す「ワディントン地形」の制御に基づいた培養手法の開発



【参考文献】

- 1) Sekine R, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011 ; 1:108(44) : 17969-73
- 2) Kim MH, et al. Biomaterials. 2014 ; 35(22) : 5670-8
- 3) Kim MH, et al. Biochem. Eng. J. 2014 ; 84, 53-58
- 4) Mashayekhan S. et al. Polymers 2011 ; 3, 2078-87
- 5) Kim MH, et al. Biotechnol. Adv. 2010 ; 28(1), 7-16
- 6) Kim MH, et al. Biomaterials 2010 ; 31(30), 7666-77
- 7) Mashayekhan S. et al. Biomaterials 2008 ; 29(31), 4236-43
- 8) Kino-oka M et al. Biomaterials 2007 ; 28(9), 1680-8