

日時：2017年3月8日(水)

会場：仙台国際センター 会議棟2階 萩

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

応用に向けたiPS細胞の 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

多能性幹細胞の分化制御における 培地組成の重要性 ～メチオニン除去培地を利用した 分化制御～



東京工業大学 生命理工学院
生命理工学系
桑昭苑 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



StemFit®

応用に向けた iPS 細胞の培養法の開発

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

iPS細胞は血液細胞や線維芽細胞などの体細胞に初期化因子を導入することで容易に樹立することができるようになった。それらのiPS細胞は試験管の中でいろいろな体細胞に分化することができるため、そのような技術を活用した臨床応用が進みつつある(図1)。
iPS細胞から目的の細胞・組織を作り出し、患者に移植することで治療が可能になると考えられる。
本発表ではiPS細胞の応用に向けて、我々が取り組んできた培養法の開発のアップデートに関して報告する。

臨床応用可能なフィーダーフリー培養の開発

フィーダー細胞を使用した conventional な iPS 細胞の培養法について説明する。フィーダー細胞と iPS 細胞を共培養することで、iPS 細胞は元気に育つことができる。iPS 細胞を継代する際は、フィーダー細胞を取り除き、iPS 細胞のコロニーを細かく砕き、それらをまた新しいフィーダー細胞と共培養し、この操作を繰り返すことで細胞を増やしていくことができる。ただ、このフィーダー法を臨床応用するには、多くのハードルを越えなければならない。そこで我々は、解決しなければならない課題として、まずはフィーダー細胞を使用せず、コーティング材で代替する方法が良いと考えた。さらに培地の中に動物由来成分(FBSなど)を含まないものが必要であると考えた。これら2点に関して開発を進めてきたので紹介する。

まずはコーティング材の開発について説明する。開発当初、すでにヒトES/iPS細胞の接着培養に関して、ヒトES/iPS細胞は接着分子である $\alpha6\beta1$ インテグリンを発現し、細胞外基質であるラミニン511に結合することは、海外のグループより報告されていた¹⁾。そこで我々はこのラミニン511に着目し、フィーダーフリー培養に取り込もうと考えた。ラミニンは α, β, γ の3つのペプチド鎖が絡まり合っ一つの構造体を形成している。ラミニン全長だと分子量が800 kDaと非常に大きなタンパクであるため、精製度が低くなり臨床応用の課題となる。一方、大阪大学の関口先生は、ラミニン511のインテグリン結合ドメイン(ラミニン511-E8フラグメント)のみを組み換えタンパク質として発現し精製する技術を既に確立されていたため、我々は関口先生に共同研究を申し込み、このフラグメントを使用しiPS細胞の維持培養ができないかと検討を始めた。このE8フラグメントは150 kDaと比較的分子

量は小さく、精製後の収量も非常に高く、臨床応用するのに適していた。実際にこのE8フラグメントをiPS細胞の培養に使用すると非常に有効であることが確認された。そして現在、このフラグメントはiMatrix-511という製品として販売されている(医療応用可能な臨床グレードのiMatrix-511MGも販売されている)。

続いて培地の開発について説明する。当初、E8フラグメントと市販の培地で培養を試みたが、細胞の状態があまり良くなかったため、培地も一から開発する必要があると考え、味の素と共同研究を進めてきた。その結果完成したのが、StemFit®培地であり、我々は主にStemFit®AK03Nを使用している。AK03Nは、生物由来原料を含まない安全性の高い培地である。一から組成検討をし、299番目の候補培地が現在のStemFit®培地の組成のベースとなっている。iMatrix-511とStemFit®培地の組み合わせは、iPS細胞やES細胞などのヒト多能性幹細胞の培養に非常に適した培養系である²⁾。

フィーダーフリー培養法の有用性

このフィーダーフリー培養法の大きな特徴はシングルセル培養が可能なことである。iPS細胞をiMatrix-511でコートしたプレートにシングルセルで播種したものを、Time-lapse顕微鏡(BioStation CT、ニコン)でイメージング観察すると、シングルセルから分裂を繰り返し、一週間後には大きなコロニーが形成されることが観察できた。従来のオンフィーダー培養法(SNL法)とフィーダーフリー培養法(Ff法)の比較を行うと、Ff法の場合は支持細胞の代わりにiMatrix-511を、培地はStemFit®培地を使用し、播種に関しては、SNL法ではコロニーを小さめの塊に砕いて播種するのに対し、Ff法ではシングルセルにし、細胞数をカウントすることで一定数の細胞を播種することができる。継代率に関しては、SNL法では1:3~1:5程度であったが、Ff法では1:100まで培養効率を上げることに成功した。培地交換に関しては、SNL法はほぼ毎日実施するのに対し、Ff法では2日おきに実施し、Weekend-free培養が可能となった。Ff法の凍結法に関しては、市販品のSTEM-CELLBANKER®を使用し、緩慢法(-80℃)で凍結することで、質の高いストックを作製可能であることが確認できている。また、このiMatrix-511とStemFit®AK03Nは、PMDA(独立行政法人医薬品医療機器総合機構)から臨床応用可能なものとして同意を得られていることも重要なポイントである。実際に、このFf法はCiRAで実施しているiPS細胞のストックプロジェクトにおいて採用されている。また、本培養法は、臨床応用だけではなく基礎研究においても有用であると考えている。例えば、この培養法でゲノム編集を行う場合、シングルセルクローニングを容易に実施することが可能となっているため、より効率的に目的の細胞を取得することができると思われる。その他、SNL法で使用するマウスのフィーダー細胞の混入を避けたい実験系、

例えばRNA-seq等の場合にも、Ff法でサンプル調製することで綺麗なデータが得られることが期待できる(図2)。

フィーダーフリー培養法の改良

基本的な培養法のプロトコールは、CiRAや我々の研究室のホームページにおいても公開しているが、現在はより均質で良質なiPS細胞の培養法の開発を目指し、培養法の改良検討を実施している。我々が実施しているFf法では、iPS細胞を継代する際に、まずコロニーをTrypLE™ Selectで処理し、細胞間接着をメインに剥がす。この時点でiPS細胞はiMatrix-511と接着したままであるため、さらにスクレーパーで剥がし取り、ピペッティングすることでシングルセルにすることができる。このシングルセルになった細胞を、新しくiMatrix-511をコートしたプレートに播種することで、またコロニーを得ることができ、細胞の拡大培養が可能となっている。現在公開している培養法では、TrypLE™ Selectの処理時間は4分間実施することになっているが、検討を進めた結果、もう少し延長して処理した方が、細胞生存率が高く、最終的に得られる細胞数も多いことが明らかとなり、現在我々のラボでは10分間(クローンによる多少の差あり)処理することで、安定した培養が可能となっている。

2点目のポイントとしては、シングルセルで播種する際には、ROCK inhibitorであるY-27632(以下、Y)を培養液中に追加する必要があるが、その処理時間の検討を実施した。公開しているプロトコールでは、over nightでの処理というアバウトな記載がされているが、最適な処理時間を検討した結果、播種後24時間は必ずYの処理を行うということ、また播種後48時間以内にはYを除去し、新しいYの入っていないStemFit®培地に置換するのが最も良い条件ということが明らかとなっている。それ以上Yの処理時間を延長すると、細胞生存率が低下し、未分化マーカーの発現が低下することが確認されている。

3点目のポイントとしては、シングルセルで播種してからコロニーを形成し継代するまでの培養期間に関して、プロトコールでは8±1日という間隔で継代するよう記載があるが、最適な培養期間に関して検討を実施したので報告する。具体的には、ヒトiPS細胞である201B7とFf法で培養したiPS細胞2種を使用し、培養期間を5日間から9日間までふり、各日数における未分化マーカー TRA-1-60陽性細胞の割合を測定した。その結果、TRA-1-60陽性細胞の割合は播種後6,7日目をピークに、培養日数の延長とともに低下することが明らかとなった。この結果を受け、我々は基本的には7日間の培養期間で実施し、必要に

応じて6日間で継代する等調整し、問題なく安定した培養を行うことができている。

上記事項は、非常に細かい改良ではあるが、このような検討を積み重ねることでより安定したiPS細胞の培養が実現できていると考えている。

続いて、iMatrix-511のコーティングに関する検討を報告する。現在、iPS細胞の継代において、iMatrix-511は継代を始める前に、プレートに1時間以上コーティングする方法(pre-coating method、プレコート法)で実施しているが、最近、京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 胚性幹細胞分野の宮崎先生より、プレコートをせずに、iPS細胞を播種する際に培地中にiMatrix-511とYを添加し播種すると(mix method、mix法)、培養が上手くいくという内容の報告があった³⁾。我々もこのmix法の検討を実施したので報告する。上記論文では、このmix法を実施すると、使用するiMatrix-511を減量できるという内容であったため、我々も、iMatrix-511を通常量(×1)から、1/2, 1/4, 1/8, 1/16と減量し培養を試みた。通常のプレコート法の培養時とコロニー形態を比較すると、mix法のiMatrix-511を通常量(×1)では、コロニーの輪郭がはっきりし、コロコロとしたコンパクトなコロニーが形成されること、またmix法の1/2使用量の場合、プレコート法と同じようなコロニー形態を示すことが明らかとなった。以前の検討より、プレコート法においてiMatrix-511の使用量を多くした場合、コロニーがコンパクトに形成され、細胞もあまり増えないということが分かっていたため、今回のmix法の検討結果においては、iMatrix-511の通常量(×1)の使用は過剰であり、通常の半分の使用量に減らすことで、プレコート法と同様の培養ができるのではないかと考えている。さらに減量した1/4, 1/8, 1/16使用量に関しては、丸いコロニーが形成されず、明らかにラミニンの量が不足していることが分かった。

培養法の改良のアップデートとしては、以下3点が挙げられる。

- 1) TrypLE™ Selectの処理時間は4分間より延長し10分間程度処理する(クローンによっては剥がれ易いものもあり、観察しながら処理時間を調整する必要がある)。
- 2) シングルセルで播種する場合のYの処理時間に関しては、播種後24時間は必ず処理し、48時間までに除去する。
- 3) 継代期間は7日間がベストと考えられる。加えて、iMatrix-511のコーティングに関しては、現在はまだプレコート法で実施しているが、mix法においても安定した培養が可能と考えられるため、更なる条件検討を実施し問題が無いようであれば、新たなFf法として報告できればと考えている。

【参考文献】

- 1) Rodin S, et al. Nat Biotechnol. 2010; 28(6): 611-5
- 2) Nakagawa M, et al. Sci. Rep. 2014; Jan 8(4): 3594
- 3) Miyazaki T, et al. Sci Rep. 2017; Jan 30(7): 41165

図1 iPS細胞技術の応用

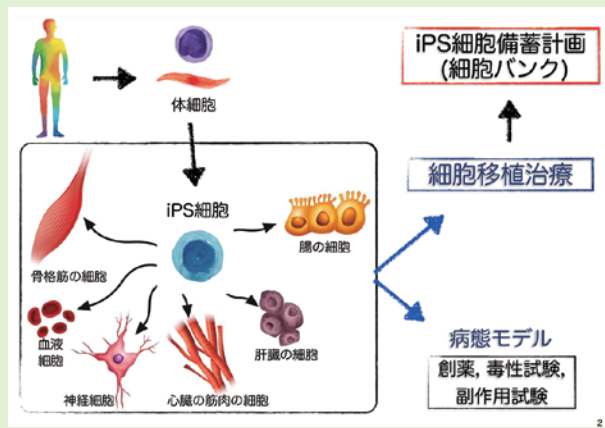


図2 新たに開発した臨床グレードのiPS細胞の培養方法

	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	シングルセル一カウントして一定数を播種	小さめの塊にして播種
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 緩慢法(-80℃)	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

多能性幹細胞の分化制御における培地組成の重要性

～メチオニン除去培地を利用した分化制御～

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系 桑昭苑 先生

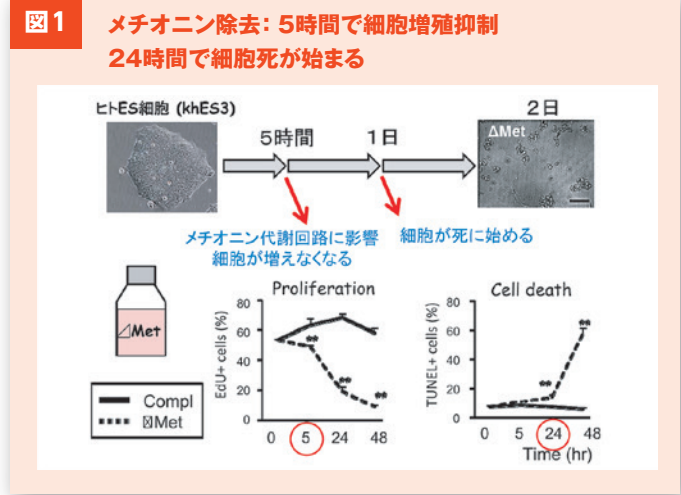
多能性幹細胞の分化における培地の重要性に関して発表する。当研究室ではiPS細胞から主に消化器官への分化誘導を行っており、細胞移植治療あるいは創薬への応用を目指している。これまで分化誘導における、足場や増殖因子などの培養環境に関する検討を重ねてきた。本日は、培養環境の中でも培地における分化制御という点に関して発表する。

皆さんもご経験があるかもしれないが、iPS細胞を分化誘導する際、細胞株によって分化が進みやすい株や、未分化細胞が残存しやすい株があり、分化効率が変わってくる。そういう問題点を解決したい、というところから研究が始まった。残存した未分化細胞を除去できないかということで、いろいろな検討をしたところ、以下の論文に出会った¹⁾。マウスES細胞におけるアミノ酸の依存性を検討した論文である。それぞれアミノ酸を一つずつ除いた培地で、細胞を培養した際、スレオニンを除いたときにマウスのES細胞は生存できないことを示している。その考察としては、スレオニンデヒドロゲナーゼ(TDH)という酵素をES細胞は高発現しており、スレオニン代謝への依存度が高いと考えられている。一方ヒトの細胞では、TDHはpseudogene(偽遺伝子)である点から、マウスとは異なる挙動を示すだろうと考え、ヒトにおける検討を実施した。

我々も20種類のアミノ酸を一つずつ除いた培地を調製し、それらの培地を、分化誘導の途中で使用し、アミノ酸の要求性を検討した。その結果、非常に興味深いことに、メチオニン(Met)を除去した際に、他のアミノ酸除去培地と異なる挙動を示すことが明らかとなった。Metは、含硫アミノ酸でメチル基を有し、S-アデノシルメチオニン(SAM)を介したメチル基のドナーとして非常に有名である。検討の結果、他のアミノ酸除去培地の群に比べ、Met除去培地において、OCT3/4陽性細胞が選択的に死滅すること、内胚葉マーカーであるSOX17の発現が変化しないこと、Met濃度依存的にこの現象が認められることが明らかとなった。さらに、分化細胞が完全にMetが必要としない訳ではなく4日間以上Met除去培地で培養するとSOX17陽性の内胚葉細胞も死滅してくることも明らかとなった。このように、ヒトES/iPS細胞において、未分化細胞が非常に高いMet要求性を示すこと、またその要求性は未分化細胞と内胚葉への分化細胞とは異なることを利用し、未分化細胞を除去できていると考えられる。その証拠として、マイクロアレイ解析の結果、Met代謝酵素群ならびにシステイン代謝酵素群の発現が、未分化細胞において高発現を示すことが明らかとなっており、Met代謝が激しく動いていることがわかる。さらに、未分化細胞が除去された状況で、

さらに肝臓への分化誘導を行うと、アルブミン陽性細胞ならびにアルブミン分泌量が増加することが認められる。一方、膵臓方向に分化誘導をかけると、PDX-1の発現が増加し、膵臓への分化効率の向上が認められた。

ここまでは、分化誘導途中でのMet要求性を検討した結果であるが、以降は、未分化細胞におけるMet要求性を未分化細胞に焦点を当て、検討したので報告する。具体的には、ES細胞・iPS細胞に対して、9種類の必須アミノ酸を一つずつ除去した培地を用いて検討を実施した。その結果、Met除去培地で培養した条件下において、どのES細胞もしくはiPS細胞においても、未分化細胞がきれいに死滅することが明らかとなった。これらの実験は除去培地を2日間処理した実験であり、さらに処理時間の検討を細かく行った結果、処理時間5時間と非常に速い段階において、既に未分化細胞の増殖は低下し、処理時間1日となるとアポトーシスを起こした細胞が有意に増加することが明らかとなった(図1)。さらに処理5時間の時点における代謝物の解析を実施した。先述の通り、SAMはメチル基ドナーとして、体内で起こる全てのメチル化に関与している重要な代謝物であるが、処理5時間の時点で、すでにSAMの濃度が低下していることが明らかとなった。しかしながら、細胞自身がそれを素早



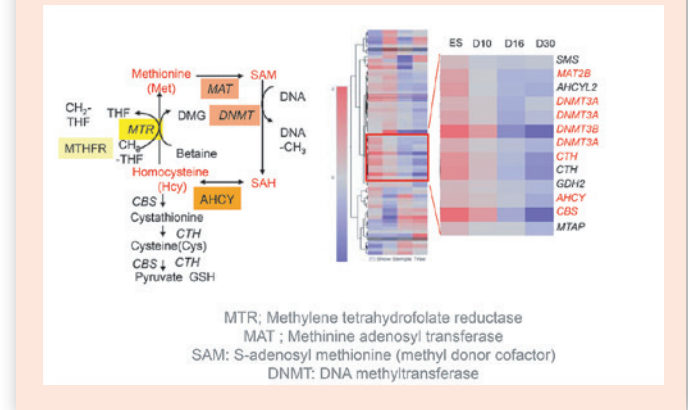
く感知し、合成酵素をup-regulationすることで、SAMの量が回復する。サルベージ回路(MTA回路)が発動されることで、MetやSAMの量が回復するというco-responseが起こり、2日間継続して処理することで細胞死が起こるのではないかと考えている。さらに、代謝物において細胞死をレスキューできるのか検証した結果、MetやSAMの添加により、細胞死がレスキューされること、またMTA(5'-methylthioadenosine、サルベージ回路中の代謝物)やホモシステインの添加によっても、部分的ではあるがレスキューされることが明らかとなった。

続いて、MetとSAMのどちらが重要なのかという検討を実施した。MAT2A/2Bのノックダウンを行うことで細胞死を再現できること、そしてシクロロイシンというMAT阻害剤の添加により、Met量を変えずにSAMだけを低下した場合においても、細胞死を再現できるということから、SAMが非常に重要であると考えている。

次に細胞内ではどのような現象が起こっているのかを検討した。Met除去5時間の処理における遺伝子発現プロファイルを解析した結果、Met除去した場合、他のアミノ酸除去群に比べ、発現がUP/DOWNする遺伝子が非常に多いことが明らかとなった(図2)。その中で、とくに細胞周期・細胞死・p53関連の遺伝子が多くup-regulateされているということ、しかしながらp53は転写レベルではそれほど大きな変化が無かったということから、p53について詳しく調べたところ、p53が安定化されていることが明らかとなった。p53はMet濃度依存的に発現量が安定化され、これらの結果は細胞死と関連性があるということから、p53のノックダウン実験を行ったところ、細胞死の部分的なレスキューが認められた。これらの結果より、p53のup-regulationは細胞死を惹起しているということが説明できると考えている。

他の変化としては、未分化マーカーであるNANOGも5時間の処理でdown-regulationされること、未分化維持/分化に関与するH3K4me3についても発現が激減していることが示された。これらの結果から、未分化細胞の多能性維持がcrisisを起こし、分化刺激に対して感受性が高まっているのではないかと考えられる。これを証明するために、短時間のMet除去の条件下(10時間処理)で、複数の方法による分化誘導を行ったところ、いずれの分化条件においても、分化促進の傾向が認められた。具体的なデータとしては、内胚葉(SOX17発現上昇)・中胚葉(T発現上昇)・外胚葉(PAX6・MAP2発現上昇)ということから、Met除去が代謝に影響し、未分化維持のcrisisを起こすとともに、分化の感受性を高めていることが示唆された。このように長時間のMet除去培地処理により未分化細胞を除去することができ、短時間の処理により分化促進が可能になることで、とくに長時間処理においては、将来的に造腫瘍性細胞に対する対処方法の一つとして応用できると考えている²⁾。さらに分化促進に関しては、我々が既に確立している5 stepの膵β細胞に対する

図2 未分化細胞: メチオニン-システイン代謝酵素群が高発現



分化誘導法³⁾にsphere培養にて分化誘導を行う方法⁴⁾を組み合わせ、Met除去培地の効果を検討した。その結果、初期の分化誘導においては、分化誘導効率に大きな影響を与えなかったが、後期においてはMet除去群において、INSULIN陽性細胞が増え、さらには糖応答性のInsulin分泌が亢進されることが示された。これらの結果より、Met除去培地の処理により、膵β細胞への分化誘導効率が向上することが示唆された。

また、分化誘導の各stepにおける、遺伝子発現解析の結果、対照(完全培地)群に比べMet除去培地群において、分化誘導後期において大きく発現変動する遺伝子が多く、そのメカニズムに関しては、おそらく先述のH3K4me3の発現減少が関与していると考えている。

以上の結果をまとめると、Met除去することによって、分化促進やエピゲノム、代謝物の変化を起こし、このような変化が多能性維持や分化制御に影響を与えていると考えている。

最後に、Met除去培地に関しては、既に多くの先生方からご関心頂けているが、もしご興味があれば当研究室にご連絡いただければ、当研究室より配布することが可能である。

【参考文献】

- 1) Wang J, et al. Science, 2009; 325(5939): 435-9
- 2) Shiraki N, et al. Cell Metab. 2014; 19(5): 780-94
- 3) Shahyalal HM, et al. J. Mol. Cell Biol. 2014; 6(5): 394-406
- 4) Schultz TC, et al. Plos One. 2012; 7(5): e37004