

# 多能性幹細胞の3次元大量培養システム

松浦 勝久

## はじめに

多能性幹細胞（胚性幹細胞, 人工多能性幹 (iPS) 細胞）は、その無限増殖能および多分化能から、再生医療の重要な細胞ソースとして認識されている。またiPS細胞技術は、薬物毒性試験や疾患モデルの確立によって病態解明への応用が可能であることから、近年世界中で研究開発が進められている。一方で、多能性幹細胞を用いた再生医療および創薬研究への応用においては、大量かつ安定的な未分化細胞および分化細胞の供給が不可欠である。本稿では、我々が開発した3次元浮遊攪拌懸濁培養技術を中心に、臨床応用を見据えた多能性幹細胞大量培養技術について概説する。

## 3次元浮遊攪拌培養とその応用

ヒトiPS細胞の再生医療および創薬応用に際しては、 $10^9$ から $10^{10}$ 程度の細胞の安定的な細胞の供給が不可欠である。しかし、培地や増殖因子、細胞外マトリクスなど消耗品コストが、大量培養技術開発のボトルネックとなっている。世界的にも種々のコンセプトで大量培養技術開発が進められている中で、我々は培地体積当たりの細胞密度を高く設定できることから、3次元浮遊攪拌懸濁培養技術開発を進めてきた。これにより、目的とする細胞数を得るのに必要な培地や試薬量を削減でき、また一度に多くの細胞処理が可能であるため作業時間も軽減可能と考えられる。

3次元浮遊培養では、攪拌により培養液成分および培養液内酸素濃度を均一化することが必要であり、その効率は攪拌スピードに依存する。一方で過度の攪拌は、培養槽内の細胞に対しては物理的ストレスとなり、キャリアを用いず細胞凝集塊形成を介して細胞培養を行う際には、凝集塊形成を阻害することとなり、特に単一細胞では細胞死に陥りやすいヒトiPS細胞の培養には不向きである。一方で、低速攪拌では、細胞凝集塊どうしの非特異的な融合や培養槽下部への細胞凝集塊の沈降により、効率的な培養が難しい。このような課題に対し、我々はデルタ型の新たな形状の攪拌翼（図1A）を開発し、ヒトiPS細胞の大量培養を可能にした。このシステムを用いて細胞を攪拌すると、気相と接する培養槽上面では軸流が生じ、培養液内に効果的な給気が可能になる一方、細胞凝集塊が主に攪拌されている培養槽中下面では層流

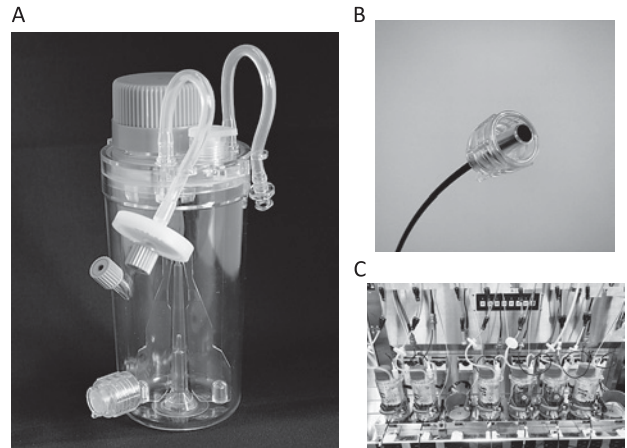


図1. ヒトiPS細胞用3次元浮遊攪拌懸濁培養装置. A: デルタ型攪拌翼を搭載した100 mL培養槽. B: 蛍光式溶存酸素センサー. C: 8連培養装置.

攪拌によって低ストレスかつ均一な攪拌が可能となった。3次元浮遊培養では、培養液内のpHおよび酸素濃度を経時的にモニタリングしつつ制御することが可能であるが、従来これらのセンサーを培養槽内に挿入し直接的に評価すると、センサー自体が均一な細胞攪拌を阻害することが問題であった。そこで我々は蛍光式溶存酸素センサーを独自開発した（図1B）。培養槽外部から非接触式に酸素濃度を感知し、培養槽上面より酸素、窒素などを適宜加えることにより、目的の酸素濃度に制御することが可能となった。

上記3次元浮遊攪拌培養装置（バイオリアクター）を用い、適切な攪拌翼の回転数、pHおよび溶存酸素濃度を設定することで、レトロウイルスベクターやエピソーマルベクターなど樹立方法の種類によらず、マウス胎仔線維芽細胞（MEF）やSNLフィーダー細胞上およびマトリゲル、ビトロネクチン、ラミニンE8フラグメント上で維持されたヒトiPS細胞を、単一細胞浮遊状態からmTeSR1, Essential 8, StemFit AK03を用いて培養することにより、細胞凝集塊形成を介して4日で約5倍、100 mlの培養槽あたり $1 \times 10^8$ 個までの未分化細胞増幅が可能となった。また一部の条件では、100 mlの培養槽と相似形で作成した1リットルの培養槽を用いてヒトiPS細胞の未分化培養に成功しており、 $1 \times 10^9$ 個程度までの細胞増幅も可能となっている。増幅されたiPS細胞は、*in vitro*, *in vivo*いずれにおいても3胚葉への分化

著者紹介 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 (准教授)

能を示すことから、多能性を保持していることが確認された。

3次元浮遊攪拌培養は、上記のように細胞凝集塊形成を介することから、分化誘導にも応用可能である点が、もう一つの利点である。最近我々は、ヒトiPS細胞のバイオリクターによる3次元浮遊培養において、高効率・高収量の心筋分化に成功している<sup>1,2)</sup>。バイオリクターを用いることにより、高密度に培養できるだけでなく、酸素濃度を厳密に制御できることから効率的な心筋分化が可能である。時期特異的な増殖因子および低分子化合物の添加により、心筋分化誘導16日目には、ほとんどの胚葉体で自律拍動が観察され、また約8割の細胞が心筋トロポニンT陽性であった。また細胞数は $1.5 \times 10^8$ 個に達し、100 mlのベッセル中に $1.2 \times 10^8$ 個の心筋細胞が一度の培養で回収できることが明らかとなった。このようにして作成された心筋細胞の電氣的興奮は、ナトリウムチャンネル、カリウムチャンネル、カルシウムチャンネルの各種阻害剤により濃度依存性に抑制される。現在ヒトiPS細胞由来の心筋細胞が世界的に創薬毒性評価に使用されようとしており、その細胞の供給においては欧米の企業が席卷している現状であり、日本発のヒトiPS細胞から同じく日本発の3次元浮遊培養技術により量産したヒト心筋細胞が世界的に使用されることが期待される。またヒトiPS細胞由来心筋細胞は、心臓再生医療の細胞ソースとしても有用である。上記方法で量産したヒト心筋細胞などを酵素処理にて胚葉体から単一細胞にした後、温度応答性培養皿へ播種すると、温度降下処理により細胞シートが形成され、細胞シート全面で自律拍動が観察される。このヒト心筋シートを3層に積層化し免疫不全ラット皮下に移植すると、移植6か月後も自律拍動が観察され、約300  $\mu\text{m}$ の厚みを持ったヒト心筋組織が構築された。3次元浮遊培養は、胚葉体形成を介して分化誘導が可能であり、すでに我々は、心筋細胞以外にも、血管内皮細胞、 $\beta$ 細胞の量産にも成功しており、共同研究を通してさらなる適応拡大が期待される。

### ヒトiPS細胞培養のコスト試算

上記のように、3次元浮遊攪拌培養技術により、ある程度の細胞の量産が可能となり、培養槽のスケールアップにより $10^9$ 個程度の細胞数は回収可能となっている。一方で、必要な細胞数を確保するのに要する培地・試薬などのコスト、さらには大量の細胞を処理するために必要な人員の確保は解決すべき課題であり、iPS細胞の安定的な培養技術習得に向けた教育訓練に要する時間も無視できない。MEF上で維持された $2 \times 10^7$ 個のヒトiPS細胞を100倍( $2 \times 10^9$ 個)まで培養皿上で増幅するに要する総コスト(培養液、試薬、培養消耗品、人件費、

機器費、使用機器の電気代を含む)を試算すると、およそ680万円必要であり(図2A)、また一人の技術者がこの作業を行うとすると、約14,000分(233時間)必要である(図2B)。この二次元培養のコストのおよそ7割が培養液やフィーダー細胞であった(図2C)。一方同様の細胞増幅を3次元浮遊培養装置(100 mlの培養槽で培養)で行う場合、総コストは、およそ220万円であり(図2A)、また一人の技術者の作業時間は、二次元培養のおよそ10分の1であった(約1,400分(23時間))(図2B)。また、3次元浮遊培養のコストでは、4割が培養槽関連の消耗品、約4割が培養溶液であった(図2C)。以上より、3次元浮遊培養技術は、大幅なコスト削減が図られるとともに作業量が削減できることから、ヒューマンエラーや投量差に伴う技術者間の培養効率の差を抑制する意味でも、再生医療の実現・普及に貢献できるものと考えられる。

### 3次元浮遊攪拌培養における高密度培養と培養環境維持の重要性

3次元浮遊攪拌培養は、高密度培養が可能な故に、上記のように低コストで細胞の量産が可能である。多能性幹細胞は増殖力が盛んであり、グルコース代謝によるATPの産生の結果、乳酸の産生も多いことから、過度の細胞密度は培地pHの低下を容易に來たしうる。生体でのpHの低下は、即生命の危機に直結することからもわかるように、細胞にとっても培地pHの低下は危惧すべきことであり、特に再生医療に用いられる細胞は、移植後に長期にわたって生着し適切に機能することが求められることから、その生産過程の培養環境の維持は、移植細胞の機能維持のみならず、細胞の安全性の観点からも、その重要性が認識されるべきである。最近我々は、3次元浮遊攪拌培養でのマウスES細胞の心筋分化過程における培養環境維持が、細胞の増殖、心筋分化および細胞の生着に重要であることを見いだしている<sup>3)</sup>。単一細胞浮遊状態のマウスES細胞を血清存在下で、pHおよび溶存酸素濃度(低酸素状態)を制御しつつ3次元浮遊攪拌培養を行うと、細胞凝集塊形成を介し約10日間で心筋細胞に分化した。図3に示すように、この分化過程で細胞数も増加し、培養開始6日目以降毎日1回の全量培地交換(間欠的培地交換)では、培養液中の乳酸濃度の上昇に伴いpHが低下し始め、日を追うごとにpHの低下は顕著となった。一方、1日当たり間欠的培地交換と同量の培養液を1日かけて連続的に交換すると、乳酸の蓄積は抑制され、極端なpHの低下が抑制された結果、培養10日目の細胞数はおよそ間欠的培地交換時の約2倍に達した。このような培養環境維持は、単に細胞数の増加にとどまらず、図4に示すように、連続培地交

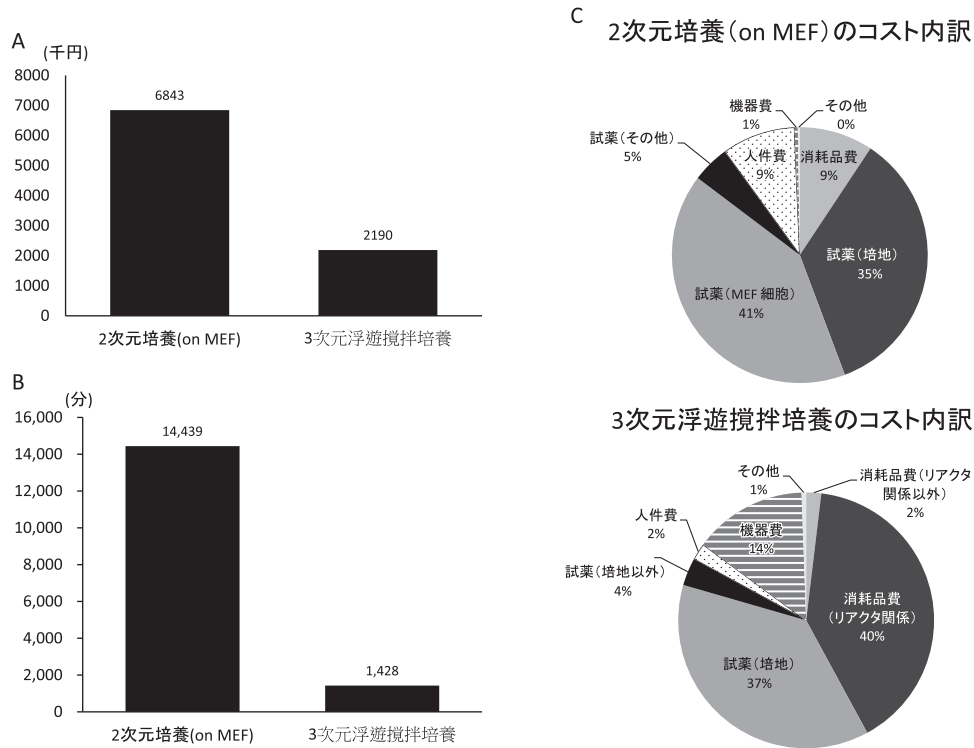


図2. ヒト iPS 細胞未分化培養コスト試算. A:  $2 \times 10^7$  個から  $2 \times 10^9$  個までの細胞増幅に要する総コスト (培養液, 試薬, 培養消耗品, 人件費, 機器費, 使用機器の電気代を含む). B:  $2 \times 10^7$  個から  $2 \times 10^9$  個までの細胞増幅に要する技術者の総作業時間. C: コスト内訳.

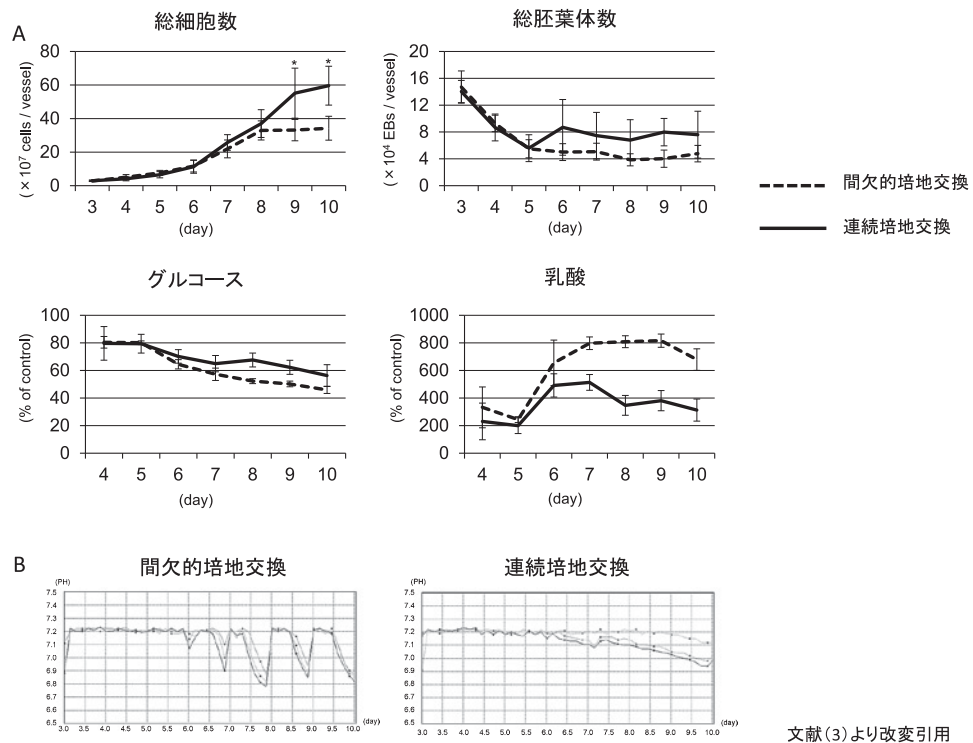
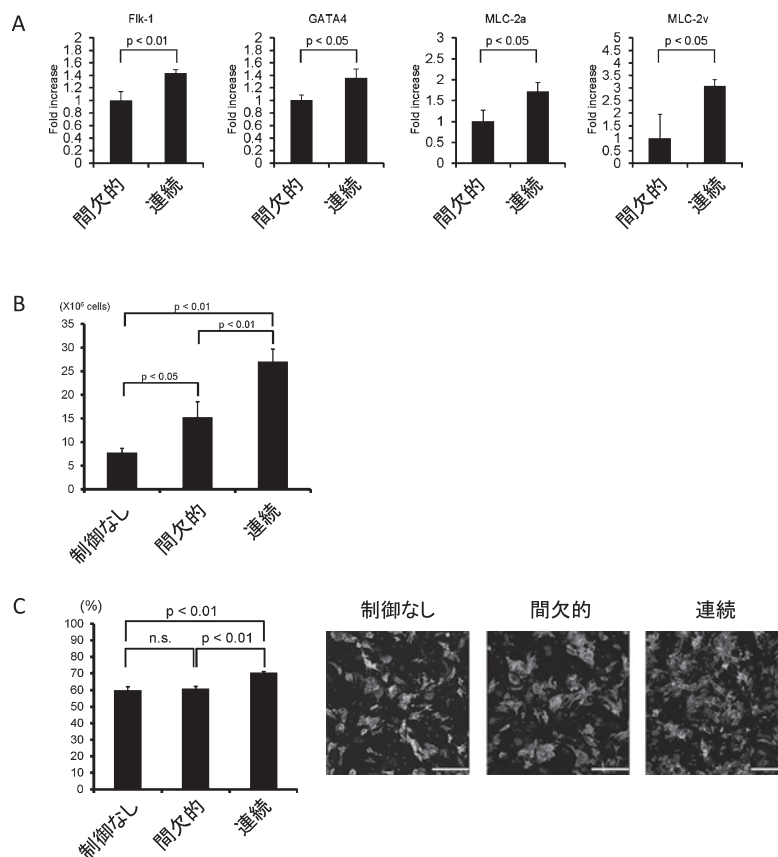


図3. マウス ES 細胞の3次元浮遊攪拌培養における培養環境評価. A: 心筋分化誘導過程の培養槽内総細胞数, 総胚葉体数, 培養上清中のグルコース濃度と乳酸濃度 (%コントロール). コントロール: 未使用培地. 間欠的培地交換: 1日1回全量 (100 ml) 培地交換. 連続培地交換: 1日分の培地 (100 ml) を24時間かけて連続的に交換.





文献(3)より改変引用

図4. 心筋細胞の収量と viability に対する培養環境の影響。A：心筋関連遺伝子発現（定量RT-PCR）。B：分化誘導後の心筋細胞収量。制御なし：CO<sub>2</sub>インキュベーター内でpH、溶存酸素を制御せずに培養。C：分化誘導後の心筋細胞を線維芽細胞と8：2の比率で共培養した後の、心筋細胞比率。右、心筋トロポニンT陽性細胞の免疫染色写真。

換では、各種心筋関連遺伝子発現が亢進し、また心筋細胞の収量も有意に増加した。一方、同じ培養槽を用い、一般のCO<sub>2</sub>インキュベーター内でpHや溶存酸素濃度を制御せず培養すると、心筋細胞の収量が少ないことが明らかとなった。さらに、細胞シート作成のために、得られた心筋細胞を線維芽細胞と8：2の比率で共培養した場合、連続培地交換にて分化誘導された心筋細胞を用いた際は、得られる心筋シート内の心筋細胞の比率が70%であったが、間欠培地交換および制御なしで分化誘導された心筋細胞を用いると、得られる心筋シート内の心筋細胞の比率は60%と低下した。以上より、pHおよび溶存酸素濃度の制御下に3次元浮遊攪拌培養を行うことで、細胞の収量および質の最大化が得られるものと考えられる。

### 終わりに

3次元浮遊攪拌懸濁培養技術は、細胞の数および質の両面で、ヒトiPS細胞を用いた再生医療および創薬応用への可能性をより一層高めるものと考えられる。一方で、

現行の再生医療では自家細胞が主であり、細胞培養はCell processing center内での培養皿による従来の培養手法と人海戦術に依存している。そして、3次元浮遊培養装置に限らず、種々の自動培養装置は、まだ実際の再生医療へ応用された例はなく、また再生医療に使用可能な装置としての要件も定まっていない。2013年11月の再生医療等安全性確保法成立により、再生医療用製品の外部委託生産が制度上可能となったことに加えて、京都大学iPS細胞研究所においてヒトiPS細胞のバンク化が進められている中、再生医療の普及には、より一層安全、安定かつ低コストの大量培養技術の重要性が高まっていくものと考えられ、それらの培養技術を再生医療で使用可能にするための基準作りが喫緊の課題と考えられる。

### 文 献

- 1) Matsuura, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 321 (2012).
- 2) Matsuura, K. *et al.*: *Anat. Rec. (Hoboken)*, **297**, 65 (2014).
- 3) Matsuura, K. *et al.*: *PLoS One*, **7**, e52176 (2012).