

ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンを用いたヒト iPS 細胞の大量増幅のための培養操作法の開発

金 美海*・紀ノ岡正博

はじめに

iPS 細胞やES 細胞などの多能性幹細胞は、さまざまな体細胞へと分化する能力を有しているため、再生医療や創薬への応用が期待されている¹⁻³⁾。このような応用を実現化するためには、良質な iPS 細胞を安定して提供するための未分化維持培養方法としての培養環境の改良や評価手法の確立が不可欠である。これまでに筆者らは、細胞挙動特性制御とそれに基づく培養プロセスの開発に取り組んできた¹⁻⁷⁾。細胞・組織などの反応場を提供する空間を対象とし、「ヒト組織の成り立ちを理解し、育む技術を構築・利用する」ことに興味を持ち、生物プロセスの観点から、育む技術を構築・利用することを目指してきた。本稿では、これまで筆者らが開発してきたヒト iPS 培養手法の中で、細胞間接着 (E-カドヘリン) の阻害剤であるボツリヌス菌由来ヘマグルチニンを用いたヒト iPS 細胞を効率的に大量培養するための培養操作法の開発の概要を説明する。

ヒト iPS 細胞の未分化逸脱細胞の選択的除去技術の開発

ヒト iPS 細胞を大量培養する際には、一連の増幅培養（継代培養）の繰り返しにより、多くの未分化な細胞を調製する。この一連の培養において、未分化状態から逸脱した細胞が発生することが多い^{8,9)}。この逸脱した細胞（逸脱細胞）は、未分化細胞の分裂能力がほぼ同等または高く、結果、継代を重ねると、逸脱細胞数が未分化細胞数を上回り、逸脱細胞を含むコロニーの除去なしには未分化細胞の増幅が得られない。また、逸脱発生は未熟な培養操作者の培養に多く観察されるが、コロニーサイズの過大、コロニー同士の融合、液流れによるコロニーの部分剥離などにより誘引されることが知られており、培養現場では、低コンフルエントでの継代、播種時の均一性維持を行うことで、その発生頻度を下げる努力を行っている。近年では、培地・基質の開発により、逸脱発生が低減しているが、偶発的に発生した逸脱細胞を含むコロニーの除去は未だ必須である。逸脱細胞を含むコロニーの除去は、継代時に顕微鏡下で丁寧にピペッティング作業にて行われ、未分化細胞のみを含むコロニーの

みを回収することで、未分化状態を維持している。この煩雑な操作は、熟練した者だけによる培養（いわゆる職人のみができる培養）とならざるを得ず、幹細胞産業促進の障害といっても過言ではない。また、大量培養の自動化を考えるうえで、現状では、職人の手技を模倣した丁寧な培養とコロニー選抜を、観察装置とロボットハンドリングによるピペッティングを組み合わせた機械化にて成功させている⁹⁾。しかし、コストや操作時間などの関係で産業発展には未だ問題が多く、未分化細胞と逸脱細胞の生物的特徴の差異を利用した単純な逸脱細胞除去の操作手法が望まれている。

これまで筆者らは、ヒト iPS 細胞の未分化維持の継代培養は、SNL (SNL 76/7 mouse fibroblast STO cell line) フィーダーの培養において、未分化を逸脱した細胞がコロニー中心部において発生することを明らかにした^{3,8)}。コロニーが大きくなると必然的に逸脱現象が生じており、中心部分で圧迫された細胞が一部培養面から剥離することで、細胞-基質間接着が劣化し、アポトーシスが引き起こされる。その後、E-カドヘリンを介した細胞-細胞間接着の崩壊により逸脱細胞が発生し、活発な分裂による自己増幅により、逸脱細胞がコロニー内で優勢となることがわかった。一方、MEF (murine embryonic fibroblasts) フィーダー上では、iPS 細胞の遊走が活発となり、コロニー中心部分での逸脱現象が見られないものの、遊走が活発であるため、周辺部において、E-カドヘリンを介した細胞-細胞間接着が崩壊し、逸脱細胞が偶発的に発生している現象が見られた。さらに、遊走性を阻害する Rac1 阻害剤の添加では、コロニー周辺部の逸脱細胞の発生を抑制し、反対に中心部にて発生を誘発するという、SNL フィーダー上と同様の逸脱現象が見られた。

ボツリヌス菌由来のヘマグルチニン (HA, hemagglutinin) は、ボツリヌス神経毒素複合体の成分である¹⁰⁻¹²⁾。近年、この HA が、細胞接着分子である E-カドヘリンに特異的に結合し、それによって腸管上皮細胞の細胞間バリアを破壊するという分子機構を有することが報告されている。この HA が有する分子機構を用いて、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生す

* 著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（准教授） E-mail: mh-kim@bio.eng.osaka-u.ac.jp

る「未分化状態を脱した細胞」を除去可能な新たな培養手法を提案した。HAが細胞障害性を示さずにE-カドヘリンと結合することにより、上皮細胞間接着を破壊する活性を持つことから、SNLフィーダー上でのiPS細胞培養において、HAを添加したところ、未分化細胞のみからなるコロニーには影響しないが、逸脱細胞を含むコロニーでは、逸脱細胞のみがコロニーから押し出されて除去できることがわかった^{5,6)}。図1には、HAによる未分化逸脱細胞の選択的除去の機構を示す。未分化維持細胞のみからなる領域においては、タイトジャンクションの細胞間接着が強固に維持されているため、HAの添加後、E-カドヘリンの接着を阻害しても細胞間接着の崩壊に至らない。これらの細胞は培養中にE-カドヘリンの発現が回復し未分化を維持する。しかし、逸脱現象を引き起こしている領域では、タイトジャンクションが形成していない。E-カドヘリンの崩壊後、逸脱細胞はインテグリンを介した細胞-基質間接着が弱いため、アポトーシスを引き起こしながら、未分化細胞の増殖により、押

し出されて取り除かれたものと考えている。また、未分化細胞のE-カドヘリンを介した細胞-細胞間接着は、崩壊後にRapシグナルの働きにより再形成し回復しており、カドヘリンに吸着したHAは、カドヘリン同士の接着を阻害することで、細胞-細胞間ジャンクションの崩壊に導いているものと考えられる^{13,14)}。なお、カドヘリンに吸着したHAは、細胞によりエンドサイトーシス(細胞内への取り込み)、または、培地交換による洗浄により除去されることから、HAによるジャンクション崩壊は一時的なものとなり、逸脱細胞の除去の制御に適している(永続的にHAが効いてしまうと、HAを再度除去する工夫が必要となり、臨床用細胞培養への適用が難しくなると考えている)。一方、MEFフィーダー上での培養においては、コロニー外部に逸脱細胞が存在するため、細胞間接着は崩壊するものの除去には至らなかったことから、コロニー内部で発生した逸脱細胞のみが除去可能であることが示唆された。そこで、HAとRac1阻害剤との共添加により、コロニー内の逸脱細胞の発生部位を中心部としたところ、SNLフィーダー上での培養と同様に、逸脱細胞を除去することができることが確認された。さらに、未分化維持培養におけるHAの添加効果について添加方法およびHA添加濃度の条件を種々変化させ、逸脱細胞の除去を基礎的に検討することで、適用範囲を広げることができた。以上のように、本手法では、いずれの培養条件でも(「誰でも」「フィーダーの有無にかかわらず」「どの細胞株でも」「どの培地でも」「どの基質でも」)HA添加による逸脱細胞の除去が可能であり、未分化性および多能性を維持しながら、多能性幹細胞を増殖できることがわかった。

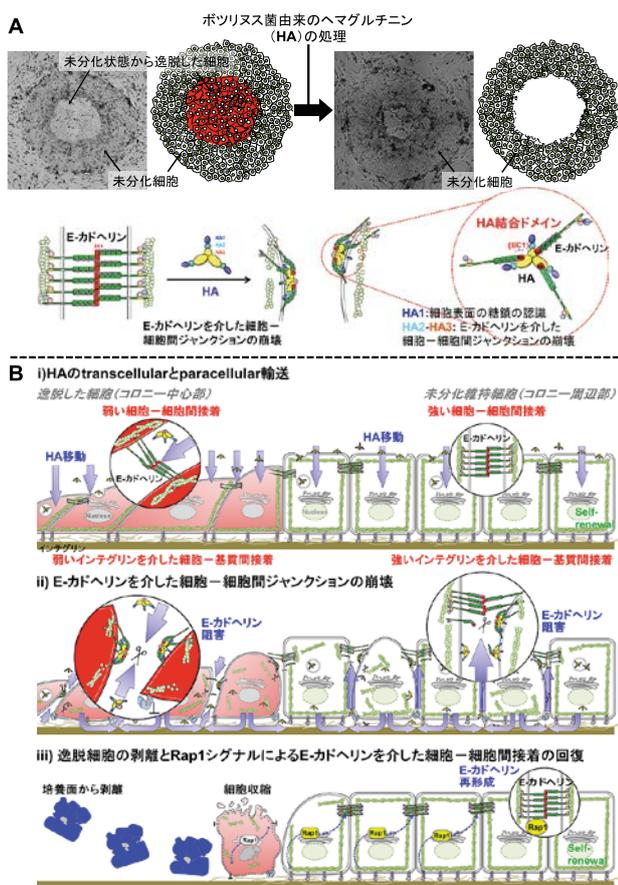


図1. ヒトiPS細胞未分化維持培養におけるHAによるコロニー内の逸脱細胞の除去。HAによるE-カドヘリンを介した細胞-細胞間タイトジャンクション崩壊機構(A)とHAによる未分化逸脱細胞の選択的除去の機構(B)。(文献3, 5, 6より改変)。

ヒトiPS細胞の高密度懸濁培養技術の開発

未分化維持培養においては、最終細胞数が10乗オーダー以上と超大量培養であり、通常の懸濁培養では、現状の懸濁培養技術では約10Lスケールでの培養となる。懸濁培養において、培養槽内での攪拌時に細胞集塊同士の融合などにより細胞集塊内で未分化細胞からの逸脱現象が発生し、不安定な培養となることが予想され、培養工学的観点からの新たな手法構築が必要である^{1,15,16)}。懸濁培養における未分化細胞の増幅を目的とした多くの場合、高い増殖速度を長時間維持することは困難である^{7,17)}。特に、継代時の細胞生存率の低さや、細胞集塊形成後、集塊径が大きくなると細胞分裂頻度が低くなり、ある一定の細胞密度で増殖が停止する問題がある。そのため、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）が乏しくなることで、細胞死や品質の低下、ひいては増殖率の低下などが起こると予想される¹⁸⁻²²。また、培養時間の経過とともに、細胞外マトリックス分泌により細胞集塊内の遊走性が低下すると、増殖の場として適さない環境が生まれる可能性も考えられた。その結果、1回の増幅培養において、安定して培養できる細胞塊の径の制限があることが予想され、細胞塊が大きくなり過ぎないようにする技術が必要になる。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操作が不可欠となる。また、酵素処理により単細胞にまで分散すると細胞死を起すため、これは避けなければならない^{23,24}。したがって、煩雑な操作が少なく誰でもできる未分化維持培養系として構築し、増幅培養の自動化を経て、10乗オーダー以上の超大量培養に適した手段の選定と培養システムの開発が必要である。

筆者らは、細胞集塊の自己崩壊、再形成を促す物質としてのポツリヌス菌由来HAが、細胞傷害性を示さずにE-カドヘリンと結合することにより、上皮細胞間接着を破壊する活性を持つことから、集塊培養中に添加することで集塊崩壊が自発的に生じると想定し、その実現性について検討した⁷。また、機械的に集塊を分割するアプローチとして篩を使った機械的分散法を検討した。培養した細胞集塊へ細胞間接着阻害剤であるHAを所定濃度添加し、添加後9hでピペッティング操作により大きな細胞集塊を小さな集塊へと分割できた。集塊分割後、培地交換とともに培養槽に再び播種した。コントロールとして、TrypLE Selectにより単分散処理を介した継代処理を行った。コントロールでは再播種1日後に細胞密度の有意な減少が見られたのに対し、集塊分割を行った条件では細胞密度が減少せず、速やかな細胞増殖が得られた。HAの添加によって小さく分割した細胞集塊を培養することによって、再び凝集塊が形成された。また、HAの添加時間（HA添加から培地交換までの時間）に対して、添加時間が9hの場合がもっとも分割の度合いが強く、12h以降では分割されにくくなるという傾向が確認された。したがって、HAにより細胞集塊を分割させた後、HAの除去操作を行わない場合であっても、iPS細胞を再度凝集させて細胞集塊を形成できることが示唆された。

図2にHAによる細胞集塊分割操作の機構と高密度懸濁培養法の設計について示す。HA処理後のピペッティングによって小さく分割された細胞集塊が、その後の培養により再凝集して細胞集塊を形成することが確認でき

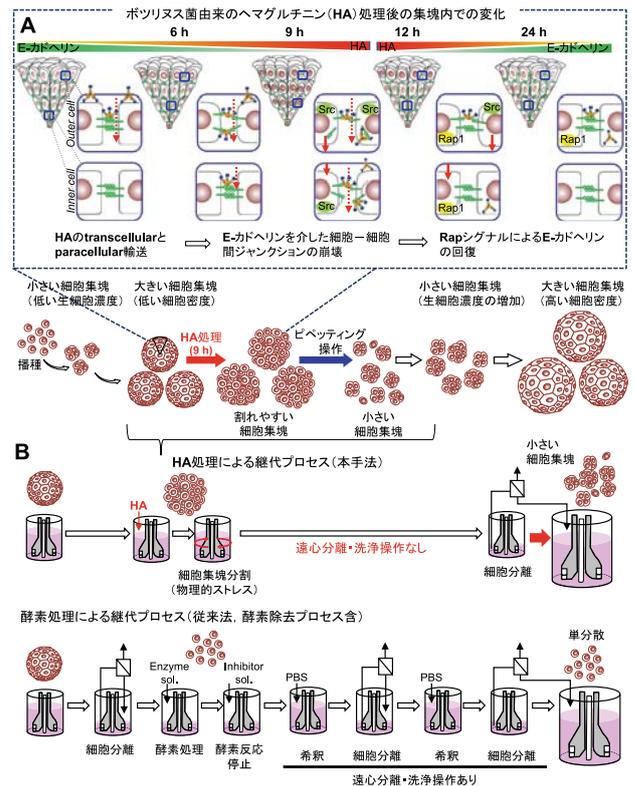


図2. ヒト iPS 細胞の集塊懸濁培養における HA による細胞集塊分割操作の機構 (A) と継代プロセス設計 (B)。(文献7より改変)

た。よって、細胞のエンドサイトーシスなどによって HA の消化または失活が起きていることが示唆された。また、培養日数とともに生細胞濃度が増加することが確認できた。コントロールの培養開始24h後から生細胞濃度が増加し迅速な増殖が確認されたが、培養開始120h付近では増殖速度が穏やかに減少した。一方、培養開始120h後にHA処理を行ったところ、1度低下していた増殖速度が再び回復し、144h以降においても細胞の増殖が確認された。また、培養開始192h後に2回目のHA処理を行ったところ、緩やかだった増殖速度の回復が確認され、192h培養後の最終的な生細胞濃度は、 $4.5 \pm 0.2 \times 10^6$ cells/mlであった(コントロールは $1.7 \pm 0.1 \times 10^6$ cells/ml)。以上より、HA処理による細胞分割操作法を利用した培養法は既存の継代培養法と比べて効率良く細胞増殖能が維持され、iPS細胞の高密度培養が可能であることがわかった。したがって、HAによる集塊分割手法は、懸濁培養におけるiPS細胞の大量増幅のためのバイオリアクターを使った閉鎖系培養への応用展開が期待される。

おわりに

培養工学的観点から、iPS細胞を用いた再生医療において、もっとも期待されることは、大量に分化細胞を得て移植できることである。そのためには、大量培養する技術はもちろんのこと、安定して、安全に調製できることが移植の際の安心につながる。その際、未分化維持培養においては、未分化状態から逸脱する細胞をいかに除去して均質な細胞群を準備するかが要となる。今回のHA添加によるiPS細胞の大量増幅のための培養操作法の構築は、安全性が確保されると、これまでになく均質性を生み出し、その後の種々の細胞への分化の安定性が期待できる。HA素材そのものは、ボツリヌス毒素複合体製剤（ボトックスなど）の中に含まれており、斜頸や斜視などの筋肉の異常収縮による疾患および皺伸ばしなどの美容整形に適応されていることから、安全性の高いものであると考えられる。また、カドヘリンに吸着したHAは、細胞によりエンドサイトーシス（細胞内への取り込み）または、培地交換の際の洗浄により除去され、HAによるジャンクション崩壊は一時的なものと予測していることから、逸脱細胞の除去の制御に適している。また、HA添加による細胞集塊の分割操作は、同一容器における細胞密度を大きくすることができ、容器削減、操作削減が実現でき、継代培養の自動化への展開が容易となる。これらのHA添加による未分化維持細胞の大量増幅培養の効率化は、「だれでも（熟練者であろうが素人であろうが、機械であろうが）」「だれでも（種々のiPS細胞株や種々企業が開発した培地）」、未分化維持培養を実現できることを意味する。幹細胞産業における細胞源確保の際に欠かせない大量培養操作に多大な貢献が見込まれる。

さらに、iPS細胞の培養のための道具開発の観点から鑑みると、細胞培養に関する道具の充実は、今後、細胞製造における工程の安定化だけではなく製品の有効性に対する向上を導く。これまで、質の良い未分化のiPS細胞を培養する目的で基質や培地の開発が多くの研究者に植え付けられ、今その成果が着実に各所で育っていることを感じる。子供がきれいに文字を書くことに例えれば、子供には良い筆記道具、つまり「(きれいな文字を書くための)紙と鉛筆」さらに「(間違ったときに使用する)消しゴム」が必要である。操作者がiPS細胞の未分化培養を安定的に実現するためには、紙と鉛筆に相当するも

のは、未分化逸脱細胞の発生抑制のための「良い基質と培地」、消しゴムに相当するものは、逸脱細胞の除去するもので「HA」と考えられる。消しゴムに相当する候補薬剤や用途開発で、類似先行研究は見当たらず、これまでにない画期的な発想のもと、得られた革新的手法である。一方、細胞集塊を割る道具としての展開は、多能性幹細胞の日常的な培養維持に加え、創薬・細胞治療などに応用するにあたり細胞を大量生産させる工程において、培養操作の簡便化および低コスト化に寄与することが期待される。

本稿で紹介した培養法の開発に関する研究は、日本医療研究開発機構（AMED）の、再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業「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」（PS：中畑龍俊，SPL：紀ノ岡正博）の支援を受けた。

文 献

- 1) Chen, K. G. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **14**, 13 (2014).
- 2) Kim, M.-H. and Kino-oka, M.: *Trends Biotechnol.*, **36**, 89 (2018).
- 3) Kim, M.-H. and Kino-oka, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 617 (2015).
- 4) Kim, M.-H. and Kino-oka, M.: *Biomaterials*, **35**, 5670 (2014).
- 5) Kim, M.-H. *et al.*: *Sci. Rep.*, **7**, 93 (2017).
- 6) Kim, M.-H. *et al.*: *Biotechnol. J.*, **13** (2018).
- 7) Nath, S. C. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, doi: 10.1002/bit.26526 (2017).
- 8) Kim, M.-H. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 1128 (2014).
- 9) Paull, D. *et al.*: *Nat. Methods*, **12**, 885 (2015).
- 10) Lee, K. *et al.*: *Science*, **344**, 1405 (2014).
- 11) Sugawara, Y. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **189**, 691 (2010).
- 12) Sugawara, Y. *et al.*: *PLoS One*, **9**, e111170 (2014).
- 13) Li, L. *et al.*: *Cell Adh. Migr.*, **6**, 59 (2012).
- 14) Li, L. *et al.*: *Stem Cells*, **28**, 247 (2010).
- 15) Fan, Y. *et al.*: *Stem Cell Rev.*, **11**, 96 (2015).
- 16) Zweigerdt, R. *et al.*: *Nat. Protoc.*, **6**, 689 (2011).
- 17) Nath, S. C. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 469 (2017).
- 18) Van Winkle, A. P. *et al.*: *Cells Tissues Organs*, **196**, 34 (2012).
- 19) Wu, J. *et al.*: *PLoS One*, **9**, e102486 (2014).
- 20) Sachlos, E. and Auguste, D. T.: *Biomaterials*, **29**, 4471 (2008).
- 21) Chang, B. S. *et al.*: *J. Reprod. Dev.*, **61**, 145 (2015).
- 22) Suh, H. N. and Han, H. J.: *J. Cell Physiol.*, **226**, 3422 (2011).
- 23) Watanabe, K., *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **25**, 681 (2007).
- 24) Ohgushi, M., *et al.*: *Cell Stem Cell*, **7**, 225 (2010).