

マルチディンプルを用いた 新しいヒト iPS 細胞集塊大量培養技術

綾野 賢

筆者らは樹脂表面に数百マイクロメートルオーダーの微細な形状を付与する技術を活用し、三次元細胞培養プレート（商品名：Elplasia[®]）を開発してきた。本稿では「Elplasia[®]」を再生医療用途、特に未分化iPS細胞の拡大培養に応用する試みについて紹介する。

「Elplasia[®]」の紹介

開発の経緯 株式会社クラレでは1980年頃からプラスチックの微細成形技術に取り組んでおり、これまでにレーザーディスクやリアプロジェクションテレビ部材など種々の光学製品や電気製品に応用してきた。当社技術の特徴は、マイクロメートルレベルの構造が大面積かつ高精度に付与された金型（スタンパー）を製造できる点、および当スタンパーを用いてプラスチックに微細構造を高制御で転写できる点にある。筆者らはこの技術を新たにライフサイエンス領域に展開するために、約10年前からマイクロ空間細胞培養プレートの開発を行ってきた。「Elplasia[®]」は細胞培養容器の底面に多数の均一な規則的の微細構造を持ち、各マイクロ空間内で細胞を凝集させることにより、均一サイズの細胞集塊を高密度に多数作製する事が可能な製品である。

活用事例 開発初期から現在まで「Elplasia[®]」の主要な用途の一つとして注力してきたのが創薬スクリーニング用途である。近年、製薬企業などで実施されている創薬スクリーニングではmonolayer cultureが主流だが、スフェロイド培養などの3次元培養により予測性を高める方法が提唱されており¹⁾、薬物毒性試験や抗ガン剤スクリーニングにて3次元培養の検討が進んでいる。筆者らは6-ウェルから384-ウェルのプレートフォーマットをラインナップし、プレートの底面にマス型の微細構造SQ：Square Typeを規則的に配置した培養プレートを作製した。これまでに初代肝細胞や株化肝細胞を「Elplasia[®]」上でスフェロイド培養することにより、*in vitro*での薬剤代謝酵素の活性低下が抑えられるとのデータが得られており²⁻⁴⁾、現在、SQ Type 384ウェルプレートを用いたハイスループットでの抗ガン剤のスクリーニング検討も始まっている。

一方で、「Elplasia[®]」の新たな用途の一つとして、近

年開発に力を入れている分野が再生医療用途である。iPS細胞やそこから誘導される体細胞を培養する際、3次元構造体（細胞集塊またはオルガノイド）を作製する方法が注目されている。細胞集塊作製方法としては従来、ハンギングドロップ法、マトリゲルなどのハイドロゲルやスキャフォールドを用いる方法、浮遊攪拌培養、および細胞非接着表面のU底またはV底96/384ウェルプレートなど多くの方法が提案されてきた。これらに対して、筆者らはサイズの揃った細胞集塊を一度に単純な操作で大量に作製できることを特長とする「Elplasia[®]」RB：Round Bottom Typeを開発し、肝臓原基⁵⁾などさまざまな臓器再生に応用を広げつつある。

マルチディンプルの特長 再生医療等細胞移植による治療においては、対象臓器によっては 10^6 から 10^{10} 個の細胞が必要と言われており、大量の細胞を一定の品質で低コストに作る事が大きな課題となっている。大量の細胞を細胞集塊として作製する場合、集塊のサイズが一定でないと品質（集塊を構成する細胞や細胞集塊自体としての機能）を担保することが難しく、サイズを均一化する事が重要であると言われてている。

筆者らは図1に示すように、容器底面に直径約500 μm 、深さ約400 μm の丸底型（ディンプル）のマイクロ空間が高密度に配置された培養プレート「Elplasia[®]」RBを開発した。6-ウェル、24-ウェルおよび96-ウェル

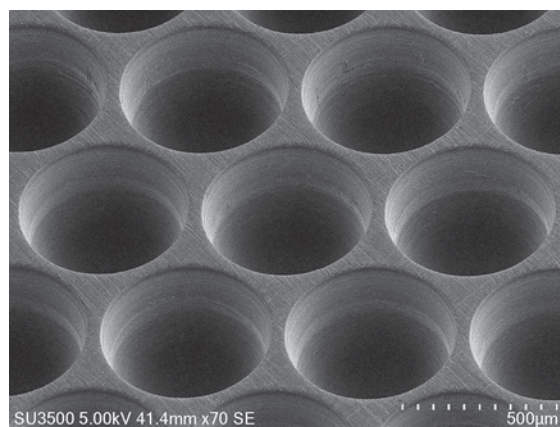


図1. 「Elplasia[®]」RBのSEM観察像。直径約500 μm 深さ約400 μm のディンプルが高密度に配列されている。

タイプがあり、たとえば6-ウェルプレートタイプでは、1ウェルあたり約3,000個のマイクロ空間が配置されている。プレート底面はポリマーコーティングによる細胞低接着処理が施してあり、細胞懸濁液をウェルに注入するだけで、細胞が各マイクロ空間に沈降した後、自発的に細胞集塊が形成される。マイクロ空間によって区画された空間内で細胞集塊が形成されるため、サイズの均一な細胞集塊を大量に得ることが可能となった。

未分化iPS細胞の集塊培養

実験の概要 マルチディンプルを用いた細胞集塊培養が未分化iPS細胞の維持・拡大培養に応用可能であるか確かめるために実験を行った。具体的には、「Elplasia[®]」RB 500 400 6-wellおよび市販のU底96-wellプレートで2回の継代作業を含む長期培養を行い、従来の平板培養を行った場合の細胞数と遺伝子発現状態を比較した。

方法 マルチディンプルの形状は前項に記載の通り、直径約500 μm、深さ約400 μmで、6-ウェルプレートタイプ（1ウェルあたり約3,000個のディンプル）を用いた。ディンプルの表面は通常、親水化処理を施した後、細胞非接着のポリマーコーティングを実施しているが、今回の実験では、コーティングをしていないもの、すなわち親水処理のみのものでも実験を行った。これまでの株化（がん）細胞や初代細胞の培養知見においては、親水処理のみの場合、細胞はディンプル表面に接着・伸展するため、細胞集塊を形成しない。その他に、従来集塊形成法に用いられてきたU底96-ウェルプレート（住

友ベークライト）、および、平板培養として6-ウェルプレート（IWAKI）を比較対象として用いた。

細胞株は京都大学iPS細胞研究所より提供された1231A3株を使用し、培地はStemFitAK02N（味の素）を使用した。なおiPS細胞を扱う実験についてはすべて株式会社iPSポータルに委託した。

細胞播種数および1ウェルあたりの培地量は表1のように設定した。まず平板培養の細胞播種数と培地量について、京都大学iPS細胞研究所より公開されているフィーダーフリーでの維持培養プロトコル⁶⁾に従って決定した。U底96-ウェルプレートについては、平板6-ウェルと底面積あたりの細胞数が同等となるように設定した。マルチディンプルについては、事前検討を行い、すべてのディンプルに細胞が均一に播種できる最低量として、約25 cells/dimple (75,000 cells/well)を設定した。

まず、平板培養で増やした未分化iPS細胞を前記4つのプレートに播種し、培養7日目にそれぞれのプレートから細胞を回収し、一部を表1に記載の細胞数で再播種

表1. 播種細胞量および培地量

プレート種類	播種数	培地量
	[cells/well]	[mL/well]
マルチディンプル 親水処理	75,000	3
マルチディンプル 非接着コート	75,000	3
U底 96-ウェル	450	0.2
平板（市販6-ウェルプレート）	13,000	1.5

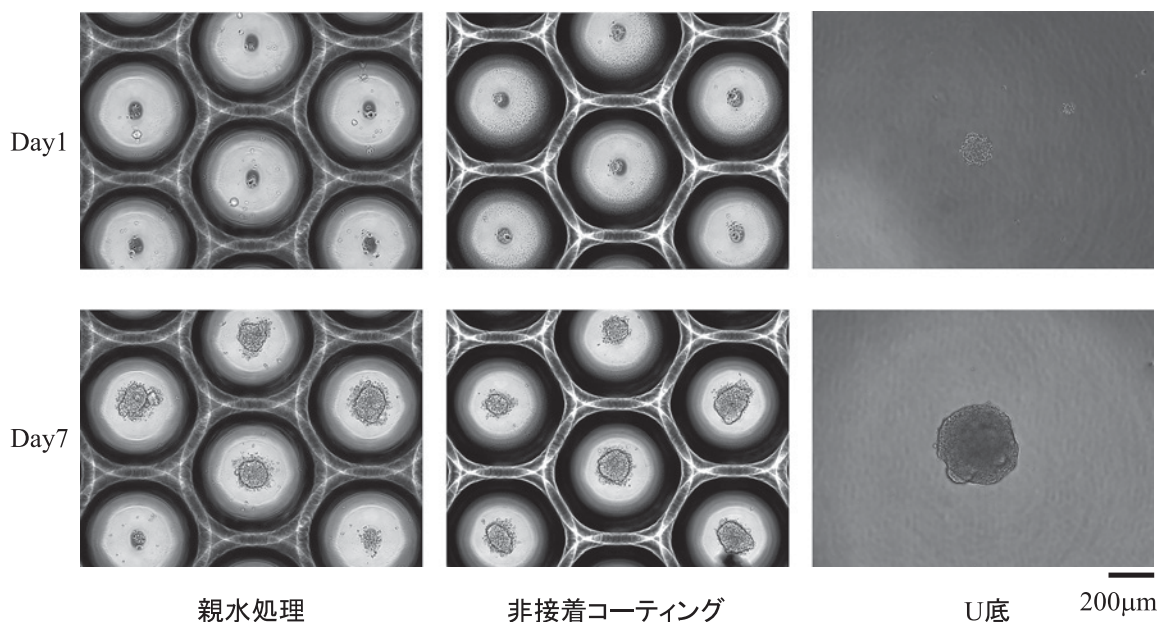


図2. 「Elplasia[®]」RBおよび他社U底プレートで培養した未分化iPS細胞（1231A3株）の形態

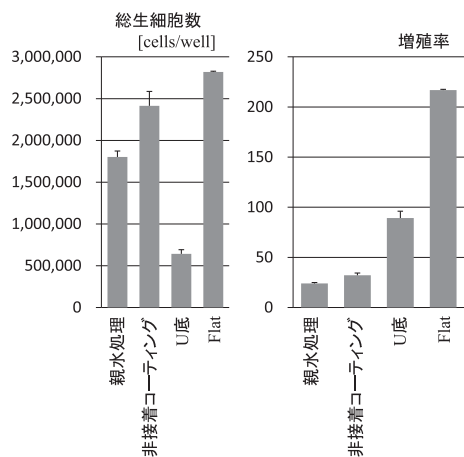


図3. 各培養方法で3継代後の総生細胞数と増殖率. U底プレートについては、16ウェル分の細胞を合わせて、6-ウェルプレートの1ウェル分と比較した。

(継代)し、残りの一部を細胞数計測と遺伝子発現解析に用いた。同様の継代作業をもう一度繰り返し、合計21日間の長期培養を行った。

結果 図2に培養1日目および培養7日目の細胞の形態を示す。非接着コーティングを施したディンプルにおいては、播種翌日に直径約40 μmの細胞集塊が形成され、培養7日目には直径約180 μmに増殖していた。また親水処理のみのディンプル表面でも、予想に反して細胞集塊が形成されており、そのサイズは非接着コーティングのものと同程度であった。非接着コーティングのない表面での集塊形成は未分化iPS細胞に特有の現象であり、他の細胞の接着メカニズムとの違いなど非常に興味深い。U底プレートでは、播種翌日で直径約100 μmの細胞集塊が形成され、7日目には直径400 μm以上になっていた。細胞集塊の表面に凹凸が観察されるものが見られた。

次に図3では、培養21日目(3継代目)に得られる総生細胞数と、これを播種数で割った増殖率を示す。平板培養で得られる細胞数は約2,800,000 cells/wellで増殖率は約217倍に対して、マルチディンプル培養では増殖率24倍(親水処理)、32倍(非接着コート)であった。またU底96-wellプレートでは、増殖率は約89倍であった。一般に集塊形成した細胞は、平板培養した細胞に比べて増殖率が低いことが知られているが、それに加えて今回、細胞あたりの培地量が平板培養と比較して少なかったことが増殖率の低下に影響したものと考えられる。

図4に培養21日目(3継代目)に回収した細胞の未分化マーカー発現率を比較した結果を示す。OCT3/4およ

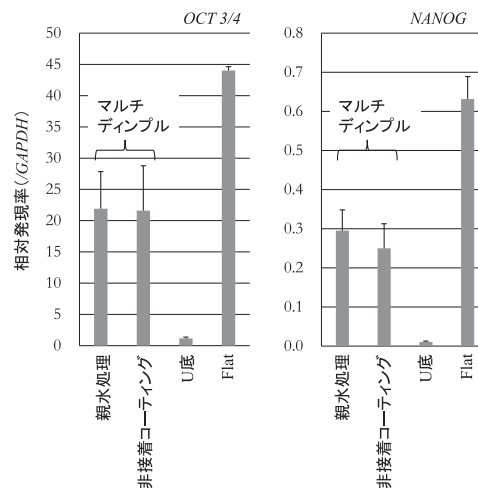


図4. 各培養方法で3継代後の未分化マーカー発現率

びNANOGいずれについても、平板培養に対して、マルチディンプルは約1/2の発現率ではあるが、未分化性を維持していた。一方でU底96-ウェルプレートについては、発現量が顕著に低下しており、未分化逸脱が疑われた。細胞集塊サイズが400 μm以上と大きかったために、集塊内外の環境に差異が生じ、長期培養の過程で未分化維持に影響したものと推測される。

考察 今回の検討により、マルチディンプルによる集塊培養がヒトiPS細胞の未分化維持・拡大培養に応用できることがわかった。播種数や培地量などの最適化によって、より平板培養に近いアウトプットも実現可能と期待される。またU底96-ウェルプレートとの比較により、集塊サイズの小ささが未分化維持に重要であることが示唆された。マルチディンプル構造を用いることで径が小さい細胞集塊を大量に増殖させることができる本手法の利点が明らかになった。今後は自動培養装置への適合を進めるなど、新しいiPS細胞集塊大量培養技術としての確立を目指したい。

文 献

- 1) Kunz-Schughart, L. A. *et al.*: *J. Biomol. Screen.*, **9**, 273 (2004).
- 2) Nishimura, M. *et al.*: *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**, 236 (2010).
- 3) Nakamura, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 78 (2011).
- 4) Kobayashi, K. *et al.*: *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **27**, 478 (2012).
- 5) Takebe, T. *et al.*: *Cell Rep.*, **21**, 2661 (2017).
- 6) 京都大学iPS細胞研究所: フィーダーフリーでのヒトiPS細胞の樹立および維持培養 <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/protocol.html> (2018/7/5)