

## ヒト iPS 細胞大量培養を効率化する操作論

長森 英二

## ヒト iPS 細胞培養操作の基本と現状

抗体医薬製造や再生医療用細胞製造など、動物細胞培養の産業応用への期待が拡大するにつれ、物質収支と速度論に基づいて工学的に培養装置やその操作を設計・オーガナイズできる人材の育成が重要になる。動物細胞の大量培養システムを構築する際にまず注意を払うべきは、①用いる細胞の特性や目的（量、質など）に合致した培養手法（平面培養、立体的な培養）の選択、②適切な（確立された）培地の選択、③オートクライン性の因子を十分に得られる初期細胞濃度の確保、④培地に十分量を溶解させることができない栄養源である酸素の供給法の選択、加えて、立体的な培養法を採用する場合には、⑤浮遊する細胞への過剰な物理的ストレスを避けつつ培養槽内の均一性を確保するための攪拌（液混合）方法、⑥培養の進行に合わせて経時的に変化する槽内の pH（主に乳酸発生に伴う低下）や溶存酸素濃度（DO）を適切に保つ制御を行う、などである<sup>1,2)</sup>。ヒト iPS 細胞の効率的な大量培養を実現するにあたっては、上述したような、従来用いられてきた動物細胞の大量培養装置の成り立ちや仕組みを十分に理解したうえで、ヒト iPS 細胞特異的に起こる現象・事項に十分に留意した容器、操作の選択・設計が重要である。通常の動物細胞培養に比べ、ヒト iPS 細胞培養の基本形において留意すべきとされてきた項目を以下にあげる。

- I. 単一細胞状態では増殖できない (E-カドヘリンを介した細胞-細胞間接着が細胞増殖に必須とされる<sup>3)</sup>)。よって二次元ではコロニー状に増殖し、三次元では細胞集塊状に増殖する形態をとることが必須である。
- II. 単一細胞状態で分散された状態ではきわめて速やかに細胞死が誘導される<sup>3)</sup>ため、継代時の単分散処理に対して他の動物細胞よりも脆弱である。
- III. 物理的なシェアストレス（剪断力）に弱いため、通常の動物細胞培養時よりもさらに緩やかな液ハンドリングや攪拌、通気条件が求められる。
- IV. 二次元培養では、近接するコロニー同士の合一や個々のコロニーの大型化が未分化性を低下（未分化からの逸脱）させること<sup>4)</sup>が知られている。

V. 乳酸の比生産速度が高く、また乳酸への感受性が他の動物細胞よりも鋭敏である<sup>5)</sup>ため、一般的な培地においては栄養源であるグルコースの枯渇よりも、老廃物である乳酸の蓄積が培養液の使用限界を規定している場合が多い。

VI. 培地には高コストなタンパク質（各種細胞増殖因子など）が含まれ、きわめて高価であるので、その培養は高コストになりがちである。

iPS 細胞の増殖培地や各種臓器細胞への分化誘導条件の研究では、その手法や培地のすべてが一から構築されているわけではなく、基本的には胚性幹 (ES) 細胞で培われてきた技術が iPS 細胞にも適用されてきた。iPS 細胞の平面培養は、長年、マイトマイシン C 処理したマウス胎児線維芽細胞をフィーダー細胞（不足する栄養素と足場の供給源）として、牛胎児血清や血清代替物に増殖因子を添加した培地を使用する方法が主流であったが、近年はフィーダー細胞レスかつ無血清培地を使ったものに移り変わって来ている<sup>6,7)</sup>。フィーダー細胞レスの培養においては、培養面上に速やかに細胞を接着、コロニー形成させ効率的な増殖を促す (I, II) ため、細胞外マトリクスあるいは人工的な基質をコーティングした培養面上に、一定濃度以上の播種密度（周囲の細胞との高い接触頻度）で培養することが必要である。各種無血清培地に適した基質としてマトリゲル<sup>TM</sup>やシンセマックス<sup>TM</sup>などの基質が各社から販売されている。継代時の剥離・単分散処理をマイルドに行うために、Accumax<sup>TM</sup>や TrypLE<sup>TM</sup> Select などの市販酵素処理剤が適宜選択・使用されている。酵素を含まない剥離剤も最近が発売されている。継代における単分散操作の細胞死 (II, III) を防ぐために ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ) 阻害剤が利用されており<sup>3)</sup>、効果を発揮している。周囲のコロニーとの合一を避けるために、培養面上にコンフルエント状態になるかなり以前に継代操作を行うことが定法 (IV) であったが、近年は培地やコーティングに用いる細胞外マトリクス類の改良 (iMatrix<sup>TM</sup>, ラミニン 511E8 断片<sup>7)</sup>) により、単一細胞にまで分散された状態による播種やコンフルエント状態に近い状態まで未分化を保った培養ができるようになってきているようである。これらの無血清培地や細胞

接着基質のコストの低下は著しく、近年は研究者の懐にも優しくなってきた。

細胞内にて産生された乳酸や $\text{NH}_4^+$ は低分子であるので細胞膜を通過、細胞外に放出され培地中に蓄積すると考えられる。老廃物である乳酸や $\text{NH}_4^+$ に対する細胞の感受性は細胞種によりさまざまであるが、閾値を超えた老廃物の蓄積は細胞毒性を引き起こす。たとえば乳酸については、ヒトiPS細胞やヒトES細胞、マウスES細胞では1 g/L、CHO細胞やヒト造血細胞、サル腎細胞では2 g/L、ヒト間葉系幹細胞やマウスハイブリドーマでは3 g/Lで細胞への毒性が報告されている<sup>5)</sup>。乳酸の蓄積により単純にpHが低下することで毒性が発揮されるわけではなく、中和条件においても蓄積した高乳酸濃度が細胞毒性を引き起こすことが多く報告されている。一方で、ヒトiPS細胞、ヒトES細胞、マウスES細胞の乳酸比生産速度はそれぞれ0.08, 0.07, 0.09 g/h  $10^9$  cellで、CHO細胞やマウスハイブリドーマ、ヒト造血細胞ではそれぞれ0.002, 0.04, 0.01 g/h  $10^9$  cellと報告されている<sup>5)</sup>。以上より、ヒト多能性幹細胞は、乳酸により毒性が発生する閾値が低いうえに、その比生産速度が高いことから特に頻回の培地交換を必要とし、高い培養コストになりやすいことがわかる(V)。

動物細胞培養に用いられる無血清培地には、各種のアミノ酸、無機塩類、ビタミン、炭水化物、脂質などの低分子が含まれる基礎培地に、各種の細胞増殖因子や細胞接着因子、ホルモン、培養細胞に対する保護効果を有する成分(アルブミン他)などの高分子タンパク質が多種類添加されているのが一般的である。特に、ヒトiPS培地の高コスト化の一因と考えられる高分子成分としては、線維芽細胞増殖子2, トランスフォーミング増殖因子1, インシュリン, 血清アルブミンなどが代表的である(VI)<sup>6)</sup>。

### ヒトiPS細胞の立体的培養に有効な操作設計

二次元培養は最終到達細胞濃度が低いいため、高コストな培地を大量に必要とし、また大量培養時には必要な培養面積も大きくなるため、培養の省スペース化・立体化が求められる(図1)。三次元培養は二次元培養に比べ高密度培養を実現するポテンシャルを有し、iPS細胞集塊を液体培地中に懸濁して三次元的に培養を行う集塊懸濁培養の最終到達細胞密度は $10^6$  cell/ml以上のオーダーに達するため<sup>8)</sup>、数リッタースケール(卓上サイズ)の培養槽で一度の治療で必要とされる $10^9$  cell超の細胞調製が可能と期待される。

三次元培養における効率的な培養操作設計を考えるた

$N_f = 10^9$  cellsを得るためには…  $N_f =$  最終細胞数(cells),  
 $X_f =$  最終細胞濃度 (cells/ml),  
 $V_f =$  液量 (ml),  $d =$  培地液高 (mm)

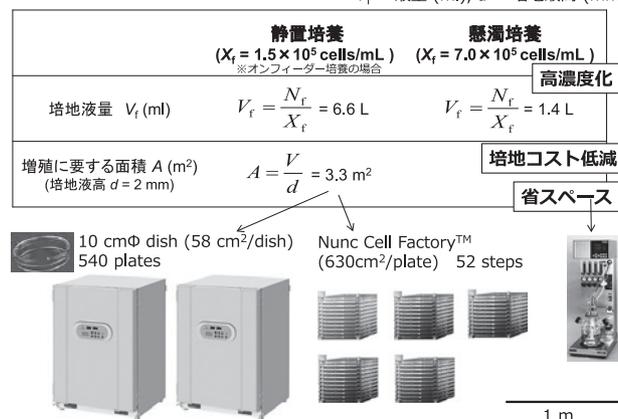


図1. 平面培養と立体的培養の比較

めに、図2に集塊懸濁培養容器内におけるiPS細胞の増殖挙動を模式的に示す。まず、集塊懸濁培養の開始に伴う細胞播種操作において、ヒトiPS細胞の酵素処理による単分散処理はアポトーシスを引き起こすため<sup>3)</sup>、細胞密度の減少がしばしば問題となる<sup>8)</sup>。細胞間接着力が脆弱と推測されるヒトiPS細胞株では、培養初期の集塊形成が起こらず、懸濁培養が行えないケースも観察されている。懸濁培養初期の集塊形成を促進するため、ROCK阻害剤が高い効果を発揮している(図2-①)。

集塊懸濁培養において、高い増殖速度を長時間維持するための境界条件を明らかにすることも必要である。集塊当たりの初期細胞数が大きすぎると、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)が乏しくなり、増殖速度が低下し、内部に細胞死が引き起こされる。また、培養時間経過とともに細胞外マトリクスが集塊内に過剰に蓄積することで物質透過性がさらに悪化する(図2-②)<sup>9)</sup>。よって、懸濁培養槽中において高い増殖速度を長期間にわたって維持するためには、定期的に集塊を崩し、前述の阻害を解除する操作が必要となる。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方法が必要である。ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンの添加にて細胞集塊が柔らかくほぐれ、大きな細胞集塊を小さな細胞集塊へと分割できることを見いだされている<sup>10)</sup>。分割された小集塊は速やかに増殖を再開し、この処理によって細胞密度が減少(細胞死)することもないため、iPS細胞懸濁培養における効果的な集塊分割法として期待される(図2-③)。

さらに集塊懸濁培養では、細胞濃度の高密度化に伴う素早い培地成分の枯渇および老廃物の蓄積による増殖速

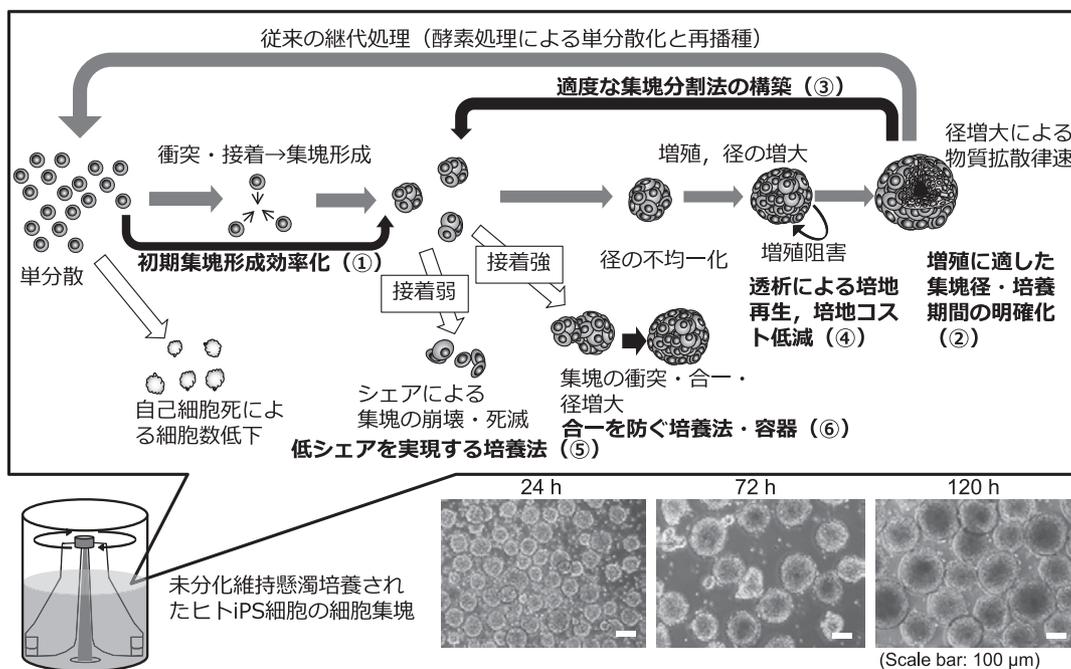


図2. 集塊懸濁培養におけるヒトiPS細胞の増殖挙動

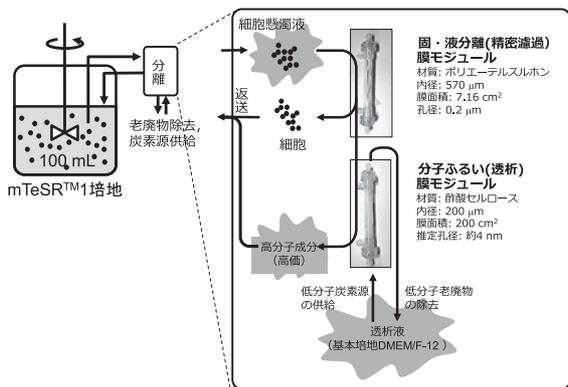


図3. ヒトiPS細胞集塊懸濁培養における透析操作

度の低下を考慮せねばならない。現状のプロセスでは、iPS細胞培地に含まれる高価な高分子成分が、未だに活性を保っているにも関わらず、培地交換によってすべて廃棄されている。図3に示すように、比較的安価な基礎培地を用いた透析処理によって、低分子成分である乳酸などの老廃物を除去するとともに、グルコースなどの低分子栄養源を供給し、さらに、ヒトiPS培地を高コスト化する高分子成分（線維芽細胞増殖子2, トランスフォーミング増殖因子1, インシュリン, 血清アルブミンなど）を使用済培地中に温存して再利用することが可能であることが示されている（図2-④）<sup>5)</sup>。ただし、線維芽細胞増殖子2については、培養中の熱変性や容器への吸着など

により培地中濃度の低下が観察され、ヘパリン添加による安定化<sup>11,12)</sup>による一定の効果的も認められたものの、集塊懸濁培養時の濃度低下は細胞による消費が主要因であることが明らかになったため、透析による温存のみではなく、消費速度に合わせた流加が必要であった。

ヒトiPS細胞集塊は懸濁培養時に発生する液流れなどによるシエアストレスに脆弱であることが知られており、いくつかの攪拌翼の形状や回転数などがこれまでに検討され報告されている<sup>13,14)</sup>。特に細胞間接着が脆弱な性質のヒトiPS細胞に対しては低シエアの培養技術が必要である（図2-⑤）が、単純に攪拌速度を落とすだけでは細胞集塊は培養槽底部に集まり、集塊同士の合一・径の増大・集塊内部での細胞死の発生を引き起こすこととなるため、低シエアでありながら槽内の集塊分布の均一性を高める工夫が必要である。培養槽が数L規模となった場合には培地の上面（気液接触面）から通気するのみでは酸素供給速度が不足すると試算されるため、物理的ストレスが少ないスパージング技術の開発も引き続き必要となる。

細胞間接着が強固な性質のヒトiPS細胞においては、槽内の集塊分布が均一である場合にも液流れによって偶発的に生じる集塊同士の衝突・接着によって集塊の合一が発生すること予想され、この合一を防ぐ培養法の開発も必要である（図2-⑥）。これに対して培地中で集塊を浮遊した状態で保持し集塊の衝突を避ける添加剤（脱

アシル化ゲランガム) や、集塊同士の合一を防ぐ添加剤 (カルボキシメチルセルロース) が報告されている<sup>15)</sup>が、液攪拌を伴わないこの培養系では高密度化に伴う酸素供給律速の問題は一層深刻となると予想され、課題となろう。集塊合一の問題を防ぐことに加え、シェアストレスに脆弱な細胞株にも対応可能な解決策として、マルチデンプル構造を有する培養容器を用いた大量培養法が提案されている<sup>16)</sup>。簡易な培地交換法も確立されてきており、今後の大量培養系への展開が期待される。

## 謝 辞

本原稿で紹介した筆者の研究成果は、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物学コース生物プロセスシステム工学領域 (紀ノ岡正博教授) において得られた。関係各位に謝意を表す。

## 文 献

- 1) 高木 睦：セルプロセッシング工学—抗体医薬から再生医療まで—, コロナ社 (2007).
- 2) 長森英二 (技術情報協会 編著)：iPS細胞の安全・高品質な作製技術, p. 183, 技術情報協会 (2016).
- 3) Watanabe, K. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **25**, 681 (2007).
- 4) Takahashi, K. *et al.*: *PLoS ONE*, **4**, e8067 (2009).
- 5) Nath, S. C. *et al.*: *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **40**, 123 (2017).
- 6) 古江美保ら：生物学, **92**, 487 (2014).
- 7) 谿口征雅・関口清俊：生物学, **96**, 328 (2018).
- 8) Olmer, R. *et al.*: *Stem Cell Res.*, **5**, 51 (2010).
- 9) Nath, S. C. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 469 (2017).
- 10) 金 美海・紀ノ岡正博：生物学, **96**, 333 (2018).
- 11) Chen, G. *et al.*: *Stem Cells*, **30**, 623 (2012).
- 12) Furue, M. K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13409 (2008).
- 13) Olmer, R. *et al.*: *Tissue Eng. Part. C Methods*, **18**, 772 (2012).
- 14) 和田昌憲：生物学, **96**, 381 (2018).
- 15) Otsuji, T. G. *et al.*: *Stem Cell Rep.*, **2**, 734 (2014).
- 16) 綾野 賢：生物学, **96**, 384 (2018).