



Size- and time-dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate

ヒト iPS 細胞球状集塊の集塊径と培養時間経過に依存した増殖特性

(JBB, Vol. 124, No. 4, 469–475, 2017)

Suman C. Nath^a · 堀江 正信^b · 長森 英二^c · 紀ノ岡正博^{*}

再生医療・細胞治療の出発原料の一つである iPS 細胞の大量培養技術は、ワーキングセルバンクの構築の際などに重要である。iPS 細胞の大量生産では、他の細胞製造と同様に培養槽を用いた懸濁培養が、省スペース・省労力の観点から有効と考えられている。iPS 細胞の懸濁培養では、単細胞状態にて培養槽へ播種後、細胞は集塊形成し、槽内での初期集塊数ならびに初期集塊径が決まり、その後、各々の集塊内で細胞分裂することで、槽内での集塊数が一定のまま、集塊径が大きくなる。その際、初期集塊径が小さすぎると、細胞死が多くなり、結果、ラグタイム延長がみられることが知られている。一方、培養中の集塊径の増大は、集塊内への酸素や栄養源供給律速により、細胞分裂阻害を引き起こすことが知られている。よって、各培養時期での細胞集塊径に対する増殖の関係を理解することが、大量培養における操作設計において、重要と考えられる。そこで、本論文では、大量集塊懸濁培養を見据え、静置集塊培養にて、培養フェーズごとで集塊径と増殖速度の関係を定量的に明らかにし、集塊径が集塊培養における重要パラメーターであることを示し、集塊培養における適切な細胞集塊径範囲を示すことを目的とした。

実験では、単層での継代培養で準備された iPS 細胞 (Tic 株, JCRB1331) を用い、低接着性 V 底型 96 ウェルプレートにて集塊培養を行った。各ウェル (培地量 100 μL) に単分散された細胞を、初期細胞数 N_0 を変化させ播種し、一つの集塊を形成できる培養系とした。培養時間 $t = 24, 72, 120$ h において集塊を回収、集塊あたりに含まれる平均細胞数を求め、 $t = 0$ から 24 h までの細胞生存率 $\alpha = N_{24}/N_0$ 、および、 $t = 24-72$ h、 $t = 72-120$ h までのみかけの比増殖速度 μ^{app} (h^{-1}) を算出した。

α は N_0 が増加するほど増大したものの、最大値は 0.8 程度に留まった。ヒト多能性幹細胞は E-カドヘリンを

介した周辺細胞との結合がない単分散状態ではアポトーシスが加速されることが示されており¹⁾、 N_0 が増加するほど容器内で周辺細胞と接触・結合できる頻度が増すことで α が増大したと考えられた。この結果から、ヒト iPS 細胞集塊の浮遊培養において、単分散状態によるアポトーシスを防止することは、細胞収率を高めるうえで非常に重要であることが示唆された。培養期間を通した増幅率 ($= N_{120}/N_{24}$) は、 N_{24} に対して上に凸な曲線となり、 $t = 24$ から 72 h の μ^{app} と相関した。小さな N_{24} においては、馴化培地による増殖速度の改善が観察され、培養初期のパラクライン因子の不足が原因と考えられた。大きな N_{24} においては集塊径が大きすぎることに由来する栄養成分の拡散供給律速が考えられ、実際に集塊深部で増殖性マーカー ki-67 の発現低下が観察された。 $t = 72-120$ h においても、 μ^{app} は N_{72} に対して上に凸な曲線となったが、全範囲において $t = 24-72$ h における値よりも大幅に低下することが明らかになった。これらより、集塊径の増大による栄養供給律速の影響 (大きすぎると増えない: 細胞集塊依存性) だけでなく、集塊形成後の経過時間も集塊内細胞の増殖速度に影響 (時間が経ちすぎると増えない: 培養時間依存性) があることを示した。さらに、時間経過とともに集塊表層部に I 型コラーゲンが蓄積していることが観察され、細胞外マトリクスから成る“殻構造”の存在による物質透過性の低下が示唆された。

以上、本論文で得られた知識は、集塊懸濁培養において集塊を定期的に、単分散は避けつつ、小さく分割する技術の必要性を示し、後報にて²⁾、高い最終到達細胞濃度 ($4.5 \pm 0.2 \times 10^6$ cell/mL) を達成した。

1) Ohgushi, M. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **7**, 225 (2010).

2) Nath, S. C. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 910 (2018).

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

^a現, University of Calgary, ^b現, 京都大学, ^c現, 大阪工業大学
生物工学 第97巻 第2号 (2019)