



第17回日本再生医療学会総会

味の素株式会社 共催学術セミナー20 (SES-20)

「再生医療の新たな培養法の展開」

会場

第2会場

パシフィコ横浜 5F
[503]

再生医療の早期実現のためには
培養技術の進歩が必要不可欠である。
本セミナーでは、iPS細胞の培養技術の
最新事例を紹介する。

日時 | 2018年3月23日(金)
12:00 - 12:50

本セミナーは整理券制となっております

座長

大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻
紀ノ岡 正博 先生



プログラム①

「簡便かつ高効率なES/iPS細胞の培養法」

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
末盛 博文 先生



プログラム②

「効率的なヒトiPS細胞の樹立・維持培養法」

京都大学 iPS細胞研究所
中川 誠人 先生



StemFit®

簡便かつ高効率な ES/iPS 細胞の培養法

京都大学ウイルス・再生医科学研究所 末盛博文 先生

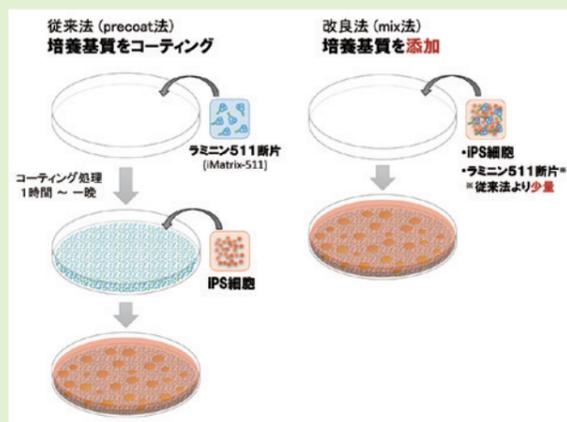
ES細胞の培養は、マウスの繊維芽細胞をシート状に培養したフィーダー細胞の上で増殖させるといった方法が一般的であり、歴史的には非常に手間のかかる培養法と考えられていた。その方法では臨床応用に適さないだろうということで、フィーダーを必要とせず、培養液に関しても成分が明確にわかるものを使用すべきという流れで現在は考えられている。そのような流れの中で、去年我々が発表した、簡便で効率の良い培養法を本日は紹介する¹⁾

その培養法は、ラミニンE8フラグメントを使用した培養法で、従来の方法に比べ簡単に培養することが可能となった。ES細胞の培養表面にはインテグリンが発現しており、接着する培養表面には適当な接着分子・基質分子を予めコーティングしておき、ES細胞・iPS細胞はそのコーティングに接着し、増殖するというのが従来の培養法である。ES細胞・iPS細胞の効果的な接着分子には、ラミニン511 E8フラグメントやfull lengthのラミニン521、ビトロネクチンなどが使われる。接着がうまくいかないと、細胞は死んでしまったり分化してしまったりするため、維持培養において接着表面をコントロールすることは重要だと考えられている。

本発表の中心となるラミニンE8フラグメントは、もともと大阪大学の関口清俊先生と我々が協力し、ラミニン511がヒトES細胞・iPS細胞の接着培養に有用だということを明らかにした。ところが、ラミニン511は非常に巨大な分子であり、製造・精製が困難ということで、関口先生がその機能ドメインであるラミニン511 E8フラグメントを作製した。これは、iMatrix 511やカイコに作らせたiMatrix 511-silkという製品で(株)マトリクスームから販売されている。

従来の方法は、iMatrix-511(以下iMatrix)を適切な濃度に希釈して培養皿に入れ、iMatrixの断片は培養皿表面に吸着するが、この工程は一時間から一晩かかると考えられている。その後、コーティング液を除いた後に、ES細胞/iPS細胞と培地を添加し、培養することができる。ここで問題なのは、コーティングする手間や時間がかかり作業効率を悪くすることである。もう一点は、準備した培養皿数に対して播種する細胞が十分に得られなかった場合には培養皿の何枚かは廃棄することになり、コーティング剤は高価であるのでコストが高くなる。逆に予想より多くの細胞が得られた場合にも用意していた培養皿の枚数が限られてしまうなど、培養スケールの柔軟な変更ができない。

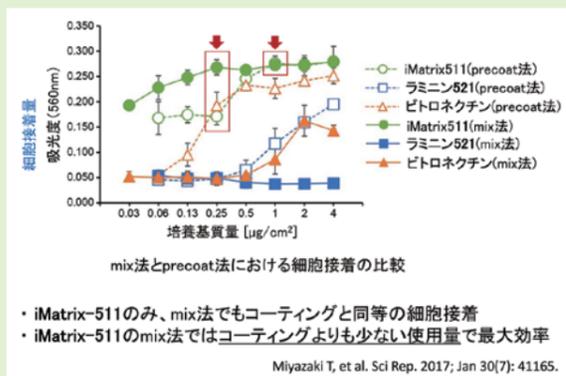
図1 方法の概略



その問題を解決するために我々は、iMatrixを培地や細胞と一緒に培養皿に播いたらどうなるだろうと考え、実際に培養してみたところ、細胞は培養皿に接着し、すくすくと増殖することが確認された(図1)。どのようなことが起こっているのかということで、iMatrixと他の接着基質(ラミニン521, ビトロネクチン)とを、従来法(precoat法)と改良法(mix法)とで比較したところ、いずれの接着基質も適切な濃度で使用した場合は、しっかりと接着するが、使用濃度を下げるとprecoat法の場合は接着効率が下がるが、mix法の場合は、より低い使用濃度でも最大の接着効率を維持する不思議な現象が起こった(図2)。ただし、他の接着基質(ラミニン521, ビトロネクチン)の場合は、そのような現象は見られず、mix法では高い接着効率が認められないということが明らかとなった。このような現象が見られるのは、現状iMatrixのみで、他の接着分子では確認されていない。さらに、細胞株(ヒトES細胞H9, ヒトiPS細胞253G1)や培地の種類(タンパク含量の少ないTeSR-E8, タンパク含量の多いStemFit® AK03N)に関しても検討したところ、細胞株を問わず、また培地の種類や培地中のタンパク含量を問わず、mix法を使えばprecoat法よりも、より低い接着基質の濃度でprecoat法と同程度の高い接着効率を示すことが明らかとなった(図3)。mix法では、precoat法のパフォーマンスを示すのに、接着基質の使用濃度は大体4分の1から5分の1程度ですむため、コスト削減が可能となる。細胞接着効率が最大となる適切な濃度のiMatrixを使用した場合、mix法もprecoat法も同程度の細胞増殖効率を示すことが確認された。

では、mix法の場合、どのように細胞が接着しているのか、precoat法と比較し時間を追って見たところ(播種5分後、15分後、120分後)、precoat法と同様にmix法でも、5分で細胞はほぼ動かない初期接着状態となり、15分もすると伸展をはじめ、120分後には完全に伸展していることが確認された。このように初期のkineticsもprecoat法とmix法はどちらも同様の傾向が見られた(図4)。

図2 Mix法でのhES細胞の接着効率



precoat法とmix法との違いを検証するため、iMatrix濃度を通常使用濃度よりもかなり希釈し(0.1 µg/cm², 0.05 µg/cm², 0.02 µg/cm²)、細胞の生育を比較した。ROCK inhibitorを培地に添加しているため、播種後1日目でも、0.02 µg/cm²とかなり低い濃度域でも接着しているように見えるが、培地交換し1時間経過するとiMatrix 0.02 µg/cm²のprecoat法では細胞が剥がれ始め、iMatrix 0.05 µg/cm²では、かなりの細胞が死んでいることが確認された。ただしその程度は、precoat法に比べてmix法の方がよりマイルドに見える。さらに1日経過すると、precoat法ではiMatrix 0.02 µg/cm², 0.05 µg/cm²では、細胞がかなり剥がれてしまう。mix法では、iMatrix 0.02 µg/cm²の場合、さすがに細胞は剥がれてしまうが、iMatrix 0.05 µg/cm²ではprecoat法よりも接着が良いように見える。iMatrix 0.1 µg/cm²の場合が最も差が明確で、mix法では全てのコロニーがしっかりと接着しているが、precoat法の場合はコロニーが十分に接着できていないことが確認された。

コーティングにどのくらいの時間が必要かということについて、iMatrix 0.1 µg/cm²の濃度で使用した場合、1時間、30分、15分、7分、3分とコーティング時間を変えてprecoat法とmix法を比較したところ、播種後1日目においてROCK inhibitorを添加した培地では3分間のコーティングでも、それなりに接着していることがわかる。ただ、播種後2日目においてROCK inhibitorが除去されると、コーティング時間3分、7分、15分の場合はほとんどの細胞が剥がれてしまい、コーティング時間は少なくとも30分間は必要であり、理想的には1時間以上置いた方が良いが、mix法に比べるとprecoat法の接着が低いようである。

どのようなメカニズムで、mix法において細胞が接着するのかということについて検討した。インテグリン分子とiMatrixがあるときに、細胞表面にあるインテグリン分子がiMatrixに接着し、その後細胞が伸展するというのが通常のパターンになる。ではmix法のときに考えられることは、細胞が浮遊状態にあるときにiMatrixがインテグリンに接着し、その後この状態で何もない培養皿表面に接着するのか、あるいは表面に一定量のiMatrixの接着が必要なのか、ということ検証してみた。iMatrixと細胞をインキュベートした後、細胞だけを集めて播種する群と、mix法で播種した群(mix法で播種した15分後に培地交換し、iMatrixを除いた群)に関して、播種後2日目までの細胞接着を比較した。前者の群は、iMatrixが培養液中に無く細胞表面に吸着しただけであるため、さすがに接着せず、すぐに剥がれてしまい、播種後2日後にはほとんど培養皿から細胞がいなくなった。mix法で播種した15分後に培地交換し、iMatrixを除いた群は、播種後ある程度接着しているが十分な接着

図3 Mix法でのiPS細胞の接着効率

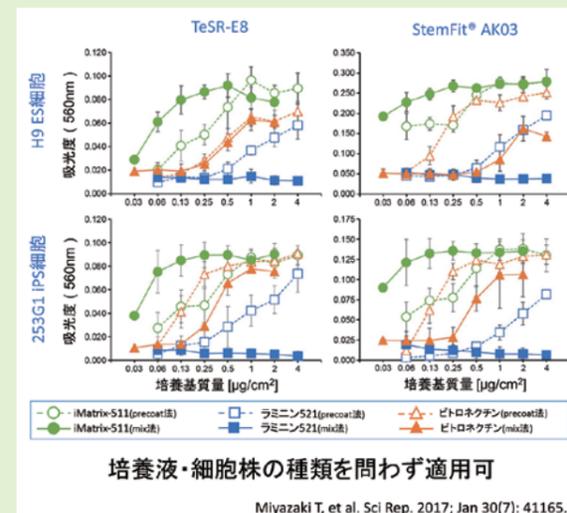
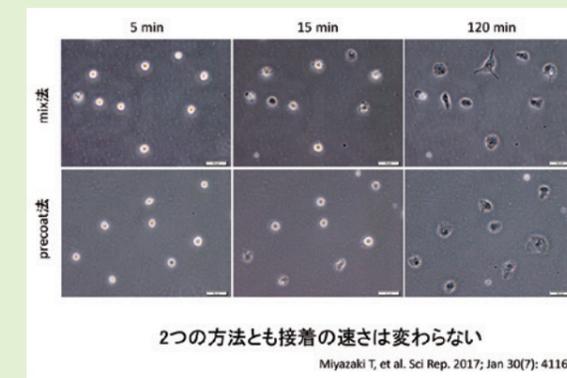


図3 Mix法でのiPS細胞の接着効率



効率を示さなかった。結論から言えば、mix法でなぜ細胞がきちんと接着して、なぜ伸展するのか、なぜ低い使用濃度でprecoat法と同等以上のパフォーマンスが得られるのかというのは、今のところ解明できていない。

このmix法を行う際によくあるトラブルを挙げると、播種密度が高い場合、培地中のiMatrixが細胞に全部吸着してしまうのか上手くないことがある(2.5×10⁴/cm²以上では播種しない方が良い)。ストック解凍時等、大量のデブリ(細胞片、死細胞)が存在する場合でも、同じ理由でprecoat法を薦める。ROCK inhibitorを除去すると細胞が剥がれてしまう場合は、おそらくiMatrixの添加量が少ないため、使用濃度を上げ最適化する必要がある。また最適な濃度は細胞株や使用する培地によっても変わってくる。

- mix法の想定される利用法としては、以下の通り。
- ・ iMatrixの使用量が少ないため費用削減が可能
- ・ precoatしないため時間短縮になる
- ・ 培養のスケールアップ・ダウンにも柔軟に対応可能
- ・ CPF内での作業工程の簡略化になる
- ・ 自動培養装置への展開がしやすくなる

mix法による培養法の改善・簡便化は、臨床用のES細胞株の樹立と分配への展開を目的としている。臨床用のES細胞株の樹立と分配の流れを説明すると、提供医療機関からいただいた凍結胚を、解凍後に内部細胞塊を取り出し、iMatrixとStemFit®の培地中で培養することで、未分化細胞が増殖維持培養が可能となる。ES細胞を樹立し、凍結保存した後に、臨床用ストックを作製するが、並行して非臨床の培養施設で評価用のストックを作製し分化能などの特性解析をする。適当な時期に細胞株樹立を大臣報告すると、細胞に正式な名前が付き、使用する場合は使用研究への細胞株の追加を申請し使用を開始できる。評価の結果、細胞が使用できることが確認でき、臨床研究に進もうとする場合は、臨床用のストックを分配していくといったスキームを考えている。興味のある方は、私の方まで連絡いただきたい。

1) Miyazaki T, et al. Sci Rep. 2017; Jan 30(7): 41165.

効率的なヒト iPS 細胞の樹立・維持培養法

京都大学 iPS 細胞研究所 中川誠人 先生

現在では、体細胞の初期化から凍結ストック作製に到るまで臨床応用可能な方法が確立されている。樹立に関しては、京都大学 iPS 細胞研究所で実施している HLA ホモドナー由来ヒト iPS 細胞ストックの製造にエピソーマルベクターが使用されているが、最近ではより高率な方法としてセンダイウイルス (SeV) や RNA を使った技術も関心を集めている。今回は、それらを使った樹立方法、ならびに維持培養法の改良を検討したので紹介したい(図1)。

効率的な iPS 細胞の樹立に向けて ～ RNA, SeV を用いた樹立方法の検討～

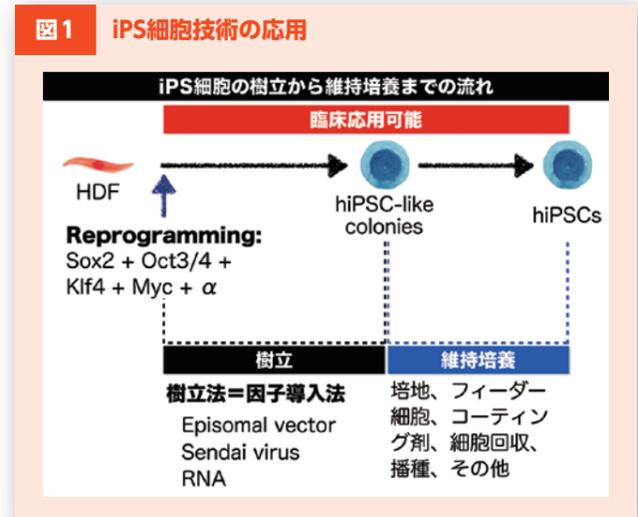
iPS 細胞の樹立で重要なことは初期化因子の導入方法だと考えられる。エピソーマルベクターを使った方法のメリットは、臨床用の iPS 細胞の製造方法として使用されている実績があること、さらに自分たちでベクターを容易に変換・作製できるため、(基礎)研究者にとって使いやすいベクターだということである。しかしながら、樹立効率が低く、樹立後の iPS 細胞におけるベクターの残存確認が必要なことがデメリットである。エピソーマルベクター以外の方法としては、センダイウイルスと RNA を使った方法がある。センダイウイルスは導入効率が高く、ゲノムに取り込まれないことがわかっている。しかし、パイオハザードレベル P2 で扱う必要があり、自分たちでベクターを自在に作製できない点がデメリットである。RNA による樹立を行う場合のメリットはゲノムに取り込まれないことであるが、導入効率・樹立効率や、自分たちで合成した RNA が使えるのかどうかなどに関しては未知であるため、我々自身の手で検討を行った。

RNA を用いた樹立方法に関して、取扱い易い細胞であるヒト線維芽細胞を元細胞として用いることとした。iMatrix-511(株)マトリクス、以下 iMatrix) をプレコートしたプレートに線維芽細胞を播種し (Day0)、その後4日間連続で RNA のトランスフェクションを行った (導入試薬は RNAiMAX を、キットは(株)プロセルから販売されている StemRNA-3rd Gen Reprogramming Kit を使用)。その際に、StemFit® AK03N から bFGF (C液) を抜いたもの (StemFit® AK03N bFGF(-))、つまり StemFit® AK03N の A 液と B 液のみを混合したものを用いた。トランスフェクション後も AK03N bFGF(-) で培地交換を行い、Day11 と 14 で評価した。キット添付のプロトコルでは低酸素状態で培養することを推奨しているため、通常の酸素濃度の群と並行して低酸素濃度における検討も実施した。また同様に、キット推奨の培地である NutriStem (Biological Industries) や、bFGF (=C液) も混合した AK03N も同様に評価した。

Day11 の段階で NutriStem または AK03N bFGF(-) を使った場合で iPS 細胞様のコロニー形成が確認された。しかしながら、bFGF の入った AK03N の場合は、線維芽細胞の増殖が強いせいか、コロニー形成は認められなかった。AK03N bFGF(-) で確認できた Day11 のコロニー

を TRA-1-60 で染色すると、しっかりときれいに染まった。さらに Day14 まで樹立を進め、フローサイトメーターで TRA-1-60 の陽性率を解析したところ、AK03N bFGF(-) で樹立を行った場合にはこの時点でおおよそ 90% の細胞が TRA-1-60 陽性であったなお、低酸素条件による優位性は認められなかった。本検討により、線維芽細胞に RNA を導入した結果、非常に高い樹立効率を得られることが確認できた。現在のところ血球細胞の RNA 初期化には成功していない。血球細胞への RNA の導入のところが難しく、改良を進めている。RNA をラボで合成し、先のキットと同様のプロトコルで初期化を行ったがうまくいかなかった。しかし、つい最近ほかのグループから市販のキットで RNA を合成し、線維芽細胞を高効率に初期化できることが報告された¹⁾。我々もこの論文の追試を進める予定である。

センダイウイルスを使った樹立に関しても、条件検討を進めている。センダイウイルスの感染条件としては、線維芽細胞 (1×10⁵ cells/point) と SeV (CytoTune®-iPS 2.0、(株)ID ファーマ) を混合し、1時間ほどインキュベーションした。その際、ボリュームをかなり小さくすることで高密度な感染条件にし、その後 iMatrix をコーティングしたプレートに細胞を播種した (Day0)。このときの培地は AK03N bFGF(-) を使用し、感染後の培地交換も、AK03N bFGF(-) を使用したが、Day7 からは bFGF を添加した通常の AK03N に切り替えたほうが、成績が良い



ことがわかっていたため、Day7以降はbFGFを含むAK03Nで樹立を続け、Day11においてTRA-1-60の陽性率をフローサイトメーターで測定した。その結果、Day11におけるTRA-1-60陽性率は80-90%であることが確認された。本検討により、センダイウイルスを使用した場合でも、非常に高い樹立効率を示すことが明らかとなった。センダイウイルスを樹立に使う利点としては、線維芽細胞だけでなく、血球細胞にも適用可能という点である。

効率的な iPS 細胞の維持培養に向けて ～フィーダーフリー培養法の改良～

我々は iPS 細胞を臨床応用可能なものにするために、基材は iMatrix、培地は StemFit® を使った新しいフィーダーフリーの培養法を開発してきた(図2)。フィーダー法に比べてフィーダーフリーの方法は、非常に簡便で、培養経験が少ない人でも習得しやすい培養法であると考えている。基材の iMatrix と培地の StemFit® は臨床使用可能な試薬として PMDA の確認が得られているということが大きなメリットである。この培養法は、京都大学 末盛博文先生らのグループが進められている臨床用ヒト ES 細胞の製造にも使用されており、ES 細胞を用いた臨床研究をする上でも、この培養方法が適用可能であると考えている。培養方法に関しては、2014年に論文発表したと同時に、プロトコルも公開した²⁾。フィーダーフリーの培養法においても、iPS 細胞はコロニーを形成するため、そのコロニーをばらばらにし、シングルセルとして播種し培養する、といった繰り返して継代を行う。2014年に公開したプロトコルでは、『細胞をばらばらにする際、TrypLE™ select を4分間処理し、その後セルスクレーパーで細胞をかき取って回収する。シングルセルにして播種する場合は Y-27632 (ROCK 阻害剤) を培地に添加することで細胞死を回避できる。その処理時間はオーバーナイトで行う。培養期間は 8±1 日とする。』としていた。当時は、細かな検証ができていなかった部分があったため、その後、私たちは細々とした検証を行ってきた。

TrypLE™ select の処理時間を検討したところ、TrypLE™ select の処理を長くした方が、Viability が上がり、それに伴い回収できる細胞数も増えることが分かった。現在、TrypLE™ select の処理は10分程度まで延ばしている。

培養期間を検討した結果、7日より培養期間を延ばすと viability が低下するため、7日間で培養サイクルを回す方が、1週間のスケジュールを立てやすく、その点でも良いだろうと考えている。

Y-27632 の処理時間に関しては、24時間より処理時間が短くなると細胞の viability が低下してくることが確認されているため、現在は 24時間～48時間と時間を決めて処理している (処理期間が長すぎても細胞の viability が低下する)。

凍結ストックを作製するタイミングとしては、継代後 6～7日目で作製すると、その後の再培養の成績が良いことがわかってきた。

細胞を回収する際は、TrypLE™ select の処理をした後に、培地を再

図2 臨床グレードの iPS 細胞の培養方法

| | フィーダーフリー法 (FF) | フィーダー法 (SNL) |
|---------|--|--|
| 支持細胞/基質 | iMatrix-511 (ラミニン) | マウス SNL 細胞 (マイトマイシン処理) |
| 培地 | StemFit® AK03N (Animal Component Free) | 動物由来成分含む、血清含む |
| 播種 | シングルセル ーカウントして一定数を播種 | 小さめの塊にして播種 |
| 継代率 | 1:100 | 1:3 |
| 培地交換 | 1～2日おき | ほぼ毎日 |
| 凍結保存 | STEM-CELLBANKER 緩慢法 (-80℃) | DAP213 ガラス化法 (LN ₂) (10秒で凍結推奨) |

Nakagawa et al. 2014. Scientific Reports
平成27年度 産官学連携功労者表彰・文部科学大臣賞、
平成28年度 文部科学大臣表彰・科学技術賞

添加し、セルスクレーパーで物理的にかき取って細胞を回収している。しかし、この物理的な刺激が細胞にとっては良くないだろうと感じていたが、なかなか解決する方法が見つからなかった。その一つの方法として、温度感受性マトリックス (DIC (株) との共同研究・開発、DIC_S05 コート) を評価した。TrypLE™ select の処理に続く培地再添加後からセルスクレーパーで回収するまでの時間が長くなるほど回収後の細胞の viability が低下することがわかった。同様の作業を DIC_S05 コートしたプレートで培養した iPS 細胞を用いて行った場合には、セルスクレーパーを使わずピペッティングだけで細胞の回収が可能であり、しかも回収後の細胞の viability 低下が抑制された。以上の結果から、温度感受性マトリックス (DIC_S05 コート品: Cepallet (セパレット)) を用いることで、より簡単な作業で、より良い状態の細胞を培養できる可能性が示唆された。

京都大学 末盛博文先生が開発された mix 法で培養すると iMatrix を事前にコーティングする必要がないため、より簡単に効率良く iPS 細胞を培養でき、かつラミニンの使用量は半分で実施できることから、コストの面でも有用な方法と考えている³⁾。

【参考文献】

- 1) Kogut I, et al. Nat. Commun. 2018, Feb 21(9):745
- 2) Nakagawa M, et al. Sci. Rep. 2014; Jan 8(4): 3594.
- 3) Miyazaki T, et al. Sci Rep. 2017; Jan 30(7): 41165.