



Press Release

2014 年 4 月 22 日

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS)

日産化学工業株式会社

ニプロ株式会社

ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の新たな三次元培養法 —大量培養・大規模生産を可能に—

京都大学（総長：松本紘）の中辻憲夫物質－細胞統合システム拠点（iCeMS＝アイセムス）設立拠点長・再生医科学研究所教授の研究グループは、平成 22 年度から進めてきた NEDO プロジェクトにおける日産化学工業株式会社との共同研究によって、2 種類の機能性ポリマーを用いたヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）の大量培養技術における新たな三次元培養法の開発に成功しました。これにより、高品質のヒト多能性幹細胞の安定的な大量生産と供給を可能とし、ヒト ES/iPS 細胞を用いた再生医療や創薬活用の実用化と産業化に大きく貢献することが期待されます。

ヒト多能性幹細胞は、無限の増殖能と多分化能を有することから、再生医療や創薬研究への実用化が期待されています。そのためには、高品質の細胞を安定的に大量供給する必要がありますが、従来の接着培養法は、大量生産には不向きであり、近年注目されている浮遊培養法もまた細胞塊の大きさのコントロールや攪拌による細胞ダメージなどの問題点があります。

今回、最適な三次元培養による大量生産を可能にするために、新たなスフェア（※1）培養法を確立しました。今回開発した方法では、従来の細胞継代時の細胞解離に使用される酵素処理ではなく、メッシュフィルターを用いた機械的処理による細胞株の継代法を確立し、高分子ポリマーであるメチルセルロース（※2）を培養液中に添加することで、細胞スフェア間の自発的融合を大幅に減少し、細胞塊の大きさを均一にすることに成功しました。また、別の高分子ポリマーであるゼランガム（※3）を添加することで、攪拌することなく浮遊させることが可能な三次元スフェア培養法の開発に成功しました。この方法でニプロ株式会社が開発した 200mL 容量のガス透過性培養バッグを用いた培養では、10 の 8 乗個の細胞数を獲得でき、多能性幹細胞を効率的に増殖生産できるシステムの開発が可能であることを実証しました。この技術は、今後国内外で不可欠となる細胞大量生産にとって画期的な新技術です。

本成果は、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）プロジェクト「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術開発」（2010～2013 年度／サブプロジェクトリーダー：中辻憲夫）の一環として行われました。本論文は、**米国東部時間 4 月 24 日（木）正午（日本時間 4 月 25 日（金）午前 2 時）**に米科学誌 *STEM CELLS*・セル・リポーツ（Stem Cell Reports）電子版で公開される予定です。

1. 背景

ES 細胞や iPS 細胞など、ヒト多能性幹細胞株は、無制限の増殖を続ける能力と多種類の組織細胞への多分化能を合わせ持つことによって、遺伝形質など均一な特性をもつ多種類のヒト細胞を無尽蔵に供給可能であり、医学や創薬への広範な応用が期待されています。つまり、癌細胞など不死化した細胞株ではなく正常に近い機能をもつ各種の有用なヒト細胞を均一な品質で大規模に生産を続けることは、多能性幹細胞株の存在によって始めて可能になりました。その意味で、多能性幹細胞は自然が与えてくれた、極めて貴重な細胞リソースです。

現在、米国などではヒト ES 細胞株を用いた臨床試験が開始しています。また最近世界の製薬企業が一斉に幹細胞の創薬応用に乗出しつつあります。しかしながら、今後ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株が医学創薬に実用化されるためには、現在進行中である最初の臨床応用ケースの成功、および創薬開発への有用性確認をまずは行ったのち、これまで以上に実用化に向けた技術開発を進める必要があります。

特に重要なのは、細胞大量生産の技術開発です。細胞移植による実際の治療を行うためには、肝疾患や心疾患などでは 10 の 9 乗個以上の分化細胞の移植がひとりの患者に必要と考えられています。肝細胞や心筋細胞など分化後の機能細胞は増殖能が低下するので、大量生産を実現するためには、まず多能性幹細胞の大量培養技術の開発が不可欠になります。ちなみに、研究室で行われている通常の培養皿による培養では、直径 10 cm 培養皿に 10 の 7 乗個以下の多能性幹細胞を増殖させるのが限界です。つまり、10 の 9 乗個を得るためには、百枚の培養皿を使う必要があり、厳密な品質管理と微生物感染などの事故リスク対応は不可能です。また米国 FDA などが要請する、厳密な品質管理と安全性検査を成功させるためには、均一な品質であることを保証された同一ロット細胞を大量生産して、各種検査を使用前に行う必要があるため、多数の培養容器に分散して生産した細胞を集めても同一ロットとは言えないと考えられます。今回発表する論文は、正にこのような大量生産を目的とした新規技術の研究開発の成果として、今後の実用化に不可欠となる、新たな三次元培養システムを開発したものです。

2. 研究内容と成果

高品質のヒト ES/iPS 細胞を安定的に大量供給するには、従来の接着培養法では、細胞への最適環境を維持しながら細胞接着面積を大規模化するのは構造面とコスト面で困難であることから、大スケール培養と生産には不向きであり、現在浮遊培養法が注目されています。しかしながら、従来の浮遊培養系には、継代時の細胞生存率の低さや制御できない自発的細胞塊の融合、細胞塊の不均一なサイズという問題があります。また、大量生産を目指してスピナーフラスコ等を用いて攪拌する三次元浮遊培養法の報告もありますが、これらはヒト多能性幹細胞が特に敏感な力学的ストレスによる細胞ダメージがあるため本格的な大量培養の実用化には適さないことが、これまで多くの論文によって指摘されています。

これらの問題点を解決する為に、我々は、①細胞解離酵素を使わない機械的処理による継代法の確立、②高分子ポリマー・メチルセルロース（MC）の添加によって自発的なスフェア融合の大幅な減少に成功、さらに③別の高分子ポリマー・ジェランガム（Gellan Gum; GG）の添加によって攪拌が不要な三次元的浮遊培養法を開発しました。

まず、多能性幹細胞の浮遊培養法における生存率の低さは、継代時の酵素処理による単一細胞への解離が原因と考えられます。そこで我々は、酵素を使用しない代わりにナイロンメッシュフィルターに通すことでヒト多能性幹細胞スフェアを分割し、小さなサイズの均一なスフェアにする事に成功しました（図 1A）。継代後、スフェアのサイズは培養期間に比例して大きくなりますが、継代後 7 日目以降では、大きく成長し過ぎて内部細胞が変化し始めるため、5 日毎の継代を行いました（図 1B）。次に、不均一な細胞塊サイズや自発的な細胞死や細胞分化の原因となる細胞塊同士の融合を抑制する為に、多糖類の高分子ポリマーである MC を培地に添加しました。その結果、融合スフェアの大幅な減少に成功しました（図 1C）。また、FACS（※4）解析にて、MC 未添加での培養で未分化性マーカーを発現している細胞の割合が減少しているのに対して、MC 添加で培養した細胞は、90%以上が発現を維持していました。従って、融合スフェアの抑制は、スフェア培養における未分化性(多能性)維持に貢献していることが分かります。またスフェア培養における増殖速度は、フィーダ細胞やマトリゲルなど細胞接着分子を用いた接着培養法での増殖速度と同程度でした（図 1D）。

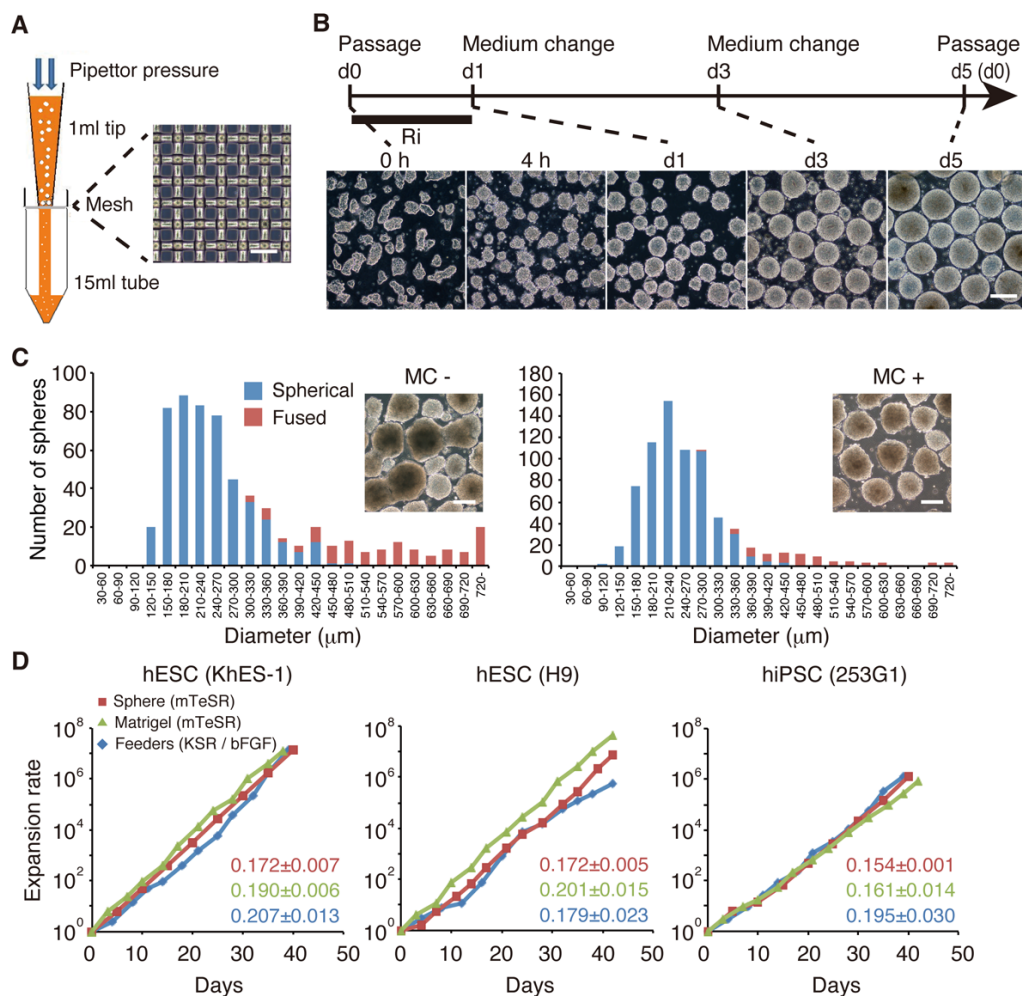


図 1. A. メッシュフィルターを用いたスフェアの継代方法の模式図。B. 継代サイクルとスフェアの形態。C. メチルセルロース (MC) の添加による融合スフェアの大幅な減少。D. スフェア培養と接着培養における細胞増殖の比較

さらに我々は、平面的なスフェア培養から更に大量培養を可能にする技術開発を目指し、従来使用されている攪拌培養による三次元培養の問題点を解決する技術開発を行いました。日産化学工業株式会社との共同研究において見つけた GG は、基本培地に添加することで、培地のハイドロゲル形成や大幅な粘度上昇なしで、スフェアを三次元的浮遊状態に保つことができます (図 2A)。そこで、MC と GG を最適な濃度で培地に加えてスフェア培養を行いました。まず培養用プレートでの培養では、細胞増殖に対して GG の影響は確認されませんでした (図 2B)。次に、三次元化するために、5ml プラスチックチューブを用いた培養では、細胞増殖が認められ継代維持が可能でしたが、ガス交換の不足が原因と考えられる細胞増殖の低下が認められた為、ニプロ株式会社のガス透過性膜を用いた小型培養バックと組み合わせました (図 2C)。その結果、MC のみを加えた培養皿等での培養と同様の細胞増殖と形態を示し、継代維持が可能でした (図 2B)。この三次元スフェア培養法で継代維持したスフェアの形態および増殖速度は、平面的なスフェア培養で維持したスフェアと同様でした (図 2D,E)。またこれらのスフェアはマルチカラー-FISH 法 (※5) において正常核型 (※6) を示し (図 3A)、FACS

解析や免疫染色法では、多能性マーカーを発現しています（図 3B,C）。またその分化能を調べるため、胚葉体形成後に遺伝子発現を検証したところ、三胚葉全ての分化マーカーの発現が認められ、分化能を維持していることが確認できました（図 3D）。このように、GG を用いることで、攪拌の不必要な三次元スフェア培養を可能とし、この培養法は多能性幹細胞の特徴的性質を保持した状態で、長期継代維持が可能でした。

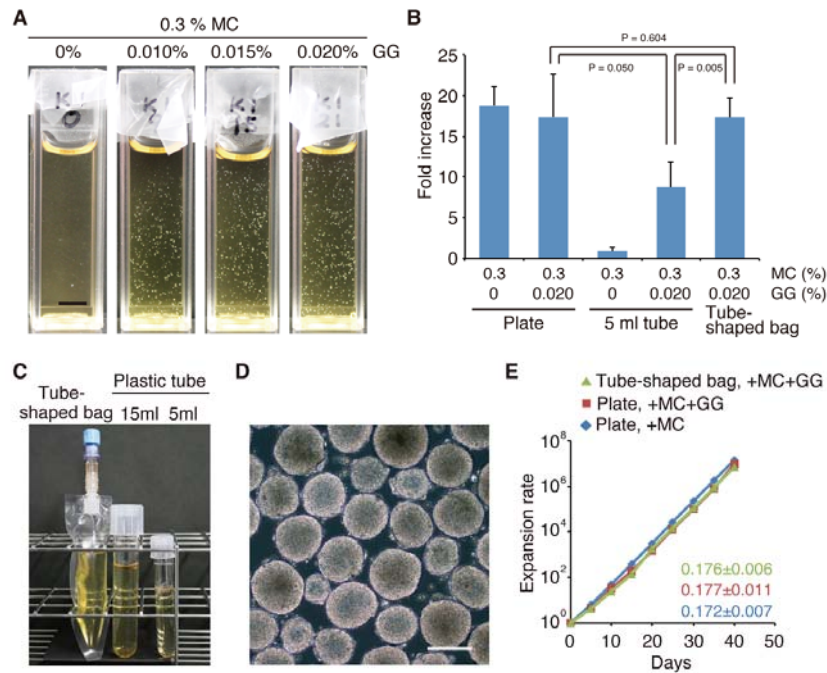


図 2. A. GG によるスフェアの沈降抑制。B. C. ガス透過性膜を用いたチューブ型バッグとポリスチレンチューブ。D. 三次元スフェア培養法で継代維持した 5 日目のスフェアの形態。E. 三次元スフェア培養法と二次元スフェア培養法における増殖の比較。

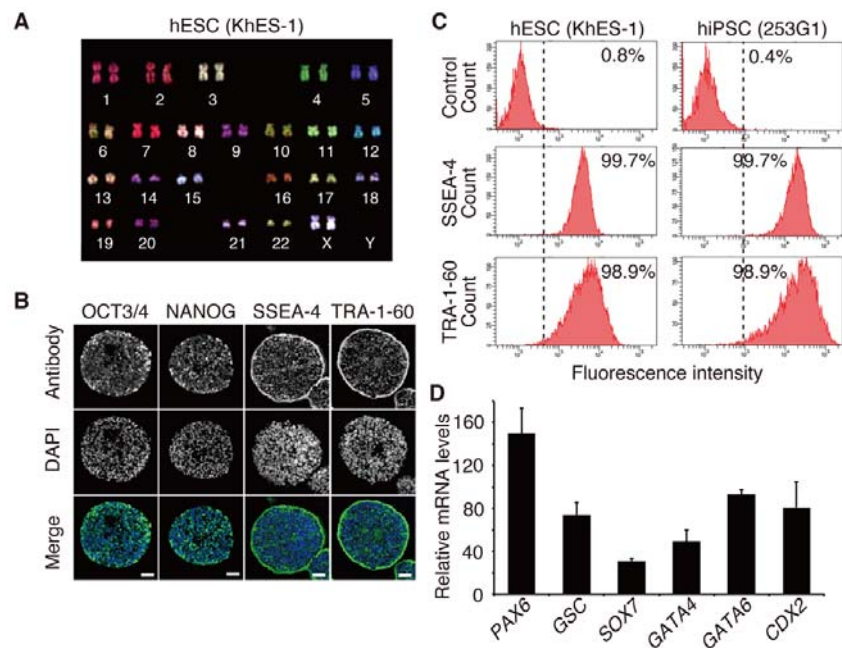


図 3.A. マルチカラー-FISH 法による核型解析。B. 免疫染色法による多能性マーカーの発現確認。C. FACS 解析による多能性マーカーの発現確認。D. 胚葉体形成後の遺伝子発現解析。

これらの技術が培養系のスケールアップに応用できることを確認するため、我々は 200ml のガス透過性培養バック（ニプロ社製）を用いて三次元スフェア培養を試みて、成功させました（図 4A）。例えば、京都大学で樹立されたヒト ES 細胞株（KhES-1）を使った場合、培養 5 日目で 1.4×10^8 の細胞数を得ることができ、スフェアの形態やサイズも小スケールと同様でした（図 4B, C）。このように、MC と GG を用いた三次元スフェア培養法は、攪拌によって生じる力学的ストレスによる細胞ダメージを与えることなく、多能性幹細胞を効率的に増殖生産できる新たな培養システムです。

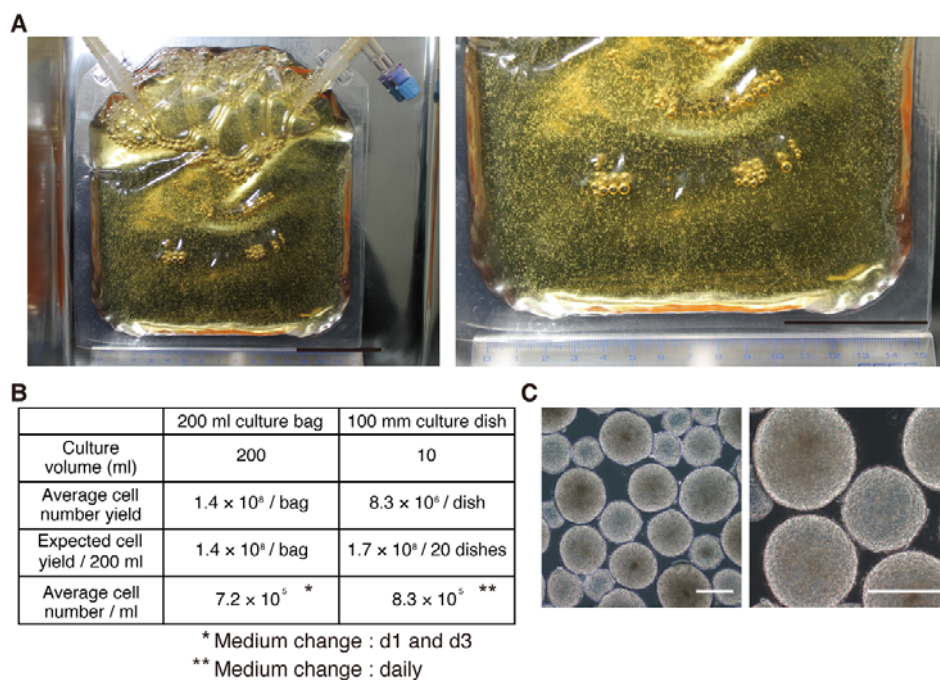


図 4.A. 200 ml 容量のガス透過性培養バッグを用いた三次元スフェア培養。 B. 三次元スフェア培養法と接着培養法の比較。 C. 200ml の三次元スフェア培養で維持した多能性幹細胞スフェアの形態。

3. 今後の期待

ヒト多能性幹細胞を再生医療や創薬に活用するためには、まず必要十分な数の未分化幹細胞を増殖生産したのち、各々の細胞治療などに必要な有用細胞に細胞分化誘導させて、最終産物である高品質で大量の分化細胞を生産する必要があります。しかしながら、現時点では多くの場合、まだ再生医療の現場で利用されているわけではなく、研究室レベルの培養と分化細胞の調製に留まっています。従って、今後の実用化に向けた大規模な培養生産システムを構築する必要があります。例えば、心筋細胞の再生医療分野に関して、国内で年間 18 万人、世界では年間 2000 万人以上の心疾患患者が死亡しており、その多くが、虚血性心臓疾患であると考えられています。また現在国内に治療中の心臓疾患患者が 80 万人以上存在すると言われており、移植治療が行われている疾患の中で最も患者数が多く、その医療費は 7700 億円に上り、それも年々増加傾向にあります。

また神経細胞の再生医療分野でも、パーキンソン病では細胞移植による治療効果は既に確認されているので、その早期の実用化（治療）が望まれています。その他の神経変性疾患においても、細胞移植による治療効果が見込まれています。これらのことから、今回の NEDO プロジェクトによる研究によって開発されたヒト多能性幹細胞の新たな三次元大量培養技術は、今後の再生医療等の実用化にとって不可欠となる、多能性幹細胞由来の心筋細胞を大量生産するシステムの開発、および神経系細胞の大量生産システムの開発を可能にする画期的なブレークスルーです。さらに今回の大量培養システムは、これまでの培養システムでは不可能であった多能性幹細胞から更に分化細胞の大量生産に適応

可能であると考えられることから、今後実用的な培養機器システムの開発に活用すれば、日本発の技術で世界的なシェアを獲得できる可能性があります。

現在、ヒト多能性幹細胞由来の分化細胞を用いた再生医療の実現化のために、様々なプロジェクト（再生医療実現拠点ネットワークプログラムなど）が進行しています。それらのプロジェクトは少数患者に対する臨床研究ですが、その結果が良好であった場合、標準的治療への応用を目指すことになります。その場合、細胞調製コストの面からも品質保証された分化細胞の大量培養機器システムの開発とその製品化は必須ですが、今回の研究成果は正にそのための基幹技術として活用することができます。

用語解説・注釈

- ※1 **スフェア**：球状の細胞塊
- ※2 **メチルセルロース**：水溶性のセルロース。工業的には増粘剤や乳化剤などの目的で使われるが、細胞培養にも培地の粘性を高める目的で使用されてきたが、今回の研究においては粘性増加が小さい濃度範囲で加えている。
- ※3 **ゼランガム**：真正細菌の *Sphingomonas elodea* によって生産される水溶性多糖類。食品添加物として広く使われている。
- ※4 **FACS**：FACS (fluorescence activated cell sorting) は、蛍光抗体で染色した細胞を液流に乗せて流し、レーザー光の焦点を通過させ、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面にある抗原量を定量的に測定することのできる機器。
- ※5 **マルチカラー-FISH 法**：核型解析の一つの方法。すべての染色体を別々の色に染色することで、転座や異数性の解析が容易にできる。
- ※6 **核型**：染色体の形、数、大きさに関すること指す。ヒトの場合、通常は合計 46 本の染色体を持っている。

論文タイトルと著者

“A 3D Sphere Culture System Containing Functional Polymers for Large-scale Human Pluripotent Stem Cell Production”

Tomomi G. Otsuji 1, Jiang Bin 1, Azumi Yoshimura 1, Misayo Tomura 2,
Daiki Tateyama 3, Itsunari Minami 1, Yoshihiro Yoshikawa 3, Kazuhiro Aiba 1, John E.
Heuser 1, Taito Nishino 2, Kouichi Hasegawa 1, 4, and Norio Nakatsuji 1, 5

1 Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Ushinomiya-cho, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

2 Nissan Chemical Industries, Ltd., 7-1 Kanda Nishiki-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-1154, Japan.

3 Nipro Corporation, 3023 Noji-cho, Kusatsu, Shiga 525-0055, Japan.

4 Institute for Stem Cell Biology and Regenerative medicine, National Centre for Biological Sciences, Bangalore 560065, India.

5 Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.

Stem Cell Reports 誌

Stem Cell Reports (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.03.012>

問い合わせ先

<研究内容について>

中辻 憲夫（ナカツジ ノリオ）責任著者（Corresponding Author）

京都大学 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS）教授・設立拠点長

Tel: 075-753-9860 | nnakatsu@icems.kyoto-u.ac.jp

尾辻 智美（オツジ トモミ）筆頭著者（First Author）

京都大学 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS）研究員

Tel: 075-753-9762 | totsuji@icems.kyoto-u.ac.jp

長谷川 光一（ハセガワ コウイチ）共著者（Co-Author）

京都大学 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS）講師

Tel: 075-753-9858 | khasegawa@icems.kyoto-u.ac.jp

西野 泰斗（ニシノ タイト）共著者（Co-Author）

日産化学工業（株） 生物科学研究所 グループリーダー

Tel: 0480-92-2513 | nishino@nissanchem.co.jp

<京都大学 iCeMS について>

相山 朋加（アイヤマ トモカ）

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS) 広報掛

Tel: 075-753-9755 | pr@icems.kyoto-u.ac.jp

<日産化学工業（株）について>

松岡 健（マツオカ ケン）

日産化学工業（株） 経営企画部 主席

Tel: 03-3296-8320 | info@nissanchem.co.jp

<ニプロ株式会社について>

広報担当

TEL : 06-6375-6700

<NEDO プロジェクトについて>

武井 良之（タケイ ヨシユキ）、矢野 貴久（ヤノ タカヒサ）

独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

バイオテクノロジー・医療技術部

Tel: 044-520-5230 | bio_window@ml.nedo.go.jp