

ヒト多能性幹細胞培養用培地の開発の現状と課題

菅-岸本 三佳・古江-楠田 美保*

求められるヒトES/iPS用無血清培地

ヒト胚性幹 (ES) 細胞¹⁾やヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞²⁾は、細胞治療、ならびに薬効・毒性評価などスクリーニングツールとしての利用など創薬分野への応用にも広く期待されている。実用化するためには、細胞の品質を確保し、安定に大量供給できることが必要である。

培養に用いる培地や足場材料によって細胞の増殖や分子生物学的性質は変化する。特に、ヒトES/iPS細胞は、一般的な体細胞株に比べて培養環境の影響を受けやすく、継代するうちに異なる性質の細胞集団に替わることも多い。たとえば、不適切なタイミングで培地交換や継代を行えば、分化細胞が現れ、増殖能の高いクローンのみが生き残り、異なる細胞集団となっていく³⁾。細胞の品質を維持するには、培地の性質をよく把握して、培養を行う必要がある。

従来使用されてきたヒトES/iPS用培地の問題点

一般的に、ヒトES/iPS細胞の培養には、マウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞として、牛血清または代替血清である KnockOut™ Serum Replacement (KSR) と線維芽細胞増殖因子 FGF-2 (basic FGF)⁴⁾ を添加した培地が使用されている。フィーダー細胞を用いず、マトリジェル (マウス肉腫由来基底膜マトリックス) とフィーダー細胞のコンディションメEDIUMを使用する方法も広く利用されている⁵⁾。しかしながら、このような培養条件はさまざまな不確定物質を含んでいる⁶⁾。さらに、培養した細胞にヒト以外の動物由来成分シアル酸・N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) が細胞表面に確認され⁷⁾、臨床応用における安全性が懸念されはじめた。血清には細胞増殖因子、分化促進因子、接着因子やホルモンに加え、未知の因子が含まれるほか、プリオンやウイルスなどの病原体が含まれる可能性がある。また、血清にはロット差があるために、実験結果にもロット差がでてしまう。たとえば、ES細胞からembryoid body (胚様体) を作成する際に、使用する血清のロットによって分化誘導されてくる組織が異なることはしばしば見られる。KSRやマトリジェルは、血清と同様、ロット差のある動物由来成分を含みすべての組成は不明であ

る。従来、細胞治療には、既知の因子による無血清培地 (完全合成培地) か、自家血由来の血清を使用してきたが、ようやくヒト幹細胞においても培地の重要性が理解され始めたと言えよう。

無血清培養

品質の安定性を保ち病原体をできるだけ排除するためにも、未知の成分を含まない無血清培養が求められる。ここで述べる無血清培養とは、既知の成分よりなる合成培地を用いた培養条件、すなわち、chemically defined serum-free culture condition⁸⁾であり、単に血清を除いた基礎培地のみによる培養ではない。

無血清培養の歴史 1975年に、Sato^{9,10)}が、血清の役割とは、それに含まれるホルモン、増殖因子、接着因子などが細胞の増殖を促進することであり、これらの因子を基礎培地に加えることにより血清を代替できることを提言した。1979年には、BottensteinとSatoら¹¹⁾により、神経細胞の無血清培養用として、N-2サプリメント (インシュリン、トランスフェリン、プロゲステロン、亜セレン酸ナトリウム、プトレッシンから成る) が開発された。その後、N-2サプリメントは5因子 (インシュリン、トランスフェリン、エタノールアミン、2-メルカプトエタノール、亜セレン酸ナトリウム) あるいは6因子 (5因子+オレイン酸) に改良された。その結果、神経細胞だけでなくさまざまな細胞の無血清培養を行うことが可能となり、従来、血清添加の条件で培養されていた細胞が既知の因子により培養できるようになった^{12,13)}。一方、1993年に、Priceらのグループによって、神経細胞の無血清培養用に、インシュリンを含む20因子から構成されているB27[®]サプリメント¹⁴⁾が開発されたが、濃度は公開されていない。さらに、1998年にPriceらは、KSRを開発した。上述したように、現在、KSRはヒトES細胞用培地のサプリメントとして広く用いられているが、組成は非公開である。

組成の不明な培地を用いては、研究者は細胞の機能やシグナル伝達を正確に科学的に解析できない。これまでに多くの研究成果が発表されているが、組成非公開の製品やロット差の大きい動物由来成分を用いた培養条件、

*著者紹介 独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室 (研究リーダー)
E-mail: mkfurue@nibio.go.jp

特 集

実験条件であるために、実は正確に解析できていなかったり、再現性が低かったりすることが問題視されている。上述したように、一般的にヒトES/iPS細胞は、フィーダー細胞にMEFを用い、KSRやFGF-2などを用いて培養されている。このような未知の成分や多くの増殖因子を含む培養条件では、FGF-2の働きも詳細には解明されていなかった。筆者らが開発したhESF9培地¹⁵⁾は、構成成分が明確なため培地へ添加した増殖因子の機能や化合物の効果を正確に検証することができる。ヒトES/iPS細胞におけるFGF-2の作用経路を明らかにするため、hESF9培地を用いて選択的に酵素を阻害する化合物の効果をスクリーニングしたところ、FGF-2によって細胞内のプロテインキナーゼC (PKC) が活性化され、分化を促進することが明らかとなった。さらに、FGF-2により活性化されるextracellular signal-regulated kinase (ERK) ならびにPKCの阻害剤を併用したhESF9_{2ai}培地で培養を行うことにより、ヒトES/iPS細胞の分化を抑制し、未分化状態を安定に維持できることが明らかとなった¹⁶⁾。

このように、すべて既知の組成からなる培養条件（基礎培地、添加因子、足場材料）を用いることにより、細胞の増殖や分化に必要な因子の要求性など細胞の機能が正確に解析できるのである。安定供給の観点からも、できるだけ精製された既知の因子のみを使用するのが望ましい。

ヒトES/iPS用無血清培地の現状と課題

無血清培地の現状 ヒトES/iPS細胞用無血清(chemically defined serum-free)培地は、これまでに市販品を含めて20例近く報告されている。そのうち国内で使用できる主なものを表1に示した。しかし、これらの培地を用いても、現状ではすべてのES/iPS細胞株を誰でもが簡単に培養できるわけではない。その主な原因は、ヒトES/iPS細胞の未分化維持や分化における分子機構がまだ十分に解明されていないことによる。細胞の分子機構を科学的に解明するには、再現性が高い添加因子の影響を正確に解析できる既知組成の培地を用いて解析することが望ましい。しかし、すべての組成（成分および濃度）が公開されているものは、市販品および受注生産品ではSTEMPRO[®] hESC SFM¹⁷⁾とThomsonらのグループにより開発された培地(mTeSR[®]1¹⁸⁾, TeSR[®]2¹⁹⁾, およびE8培地²⁰⁾、そして筆者らが開発したhESF9培地とhESF-FX培地(hESF9をヒト以外の動物由来成分不含、ゼノフリーにしたもの)、上述の

hESF9_{2ai}培地のみである。

ノウハウの蓄積 ISCIプロジェクト(国際幹細胞イニシアティブ, The International Stem Cell Initiative)において、5施設が8条件の無血清培養条件^{15,17,18,21-25)}で複数のES細胞株を培養できるか検討した²⁶⁾。8条件ともそれぞれの開発者は培養可能であるにもかかわらず、すべての施設で培養可能であったのは2条件のみであった。その2条件でも、あらゆる株を培養できるわけではなかった。やはり、その培地・細胞株ごとのノウハウの蓄積が必要だと考えられる。現状で、広く使用されている細胞株に対して安定した培養維持が行えるのはmTeSR[®]1と思われるが、添加因子などの解析や分化誘導にはhESF9シリーズが適している。それぞれその目的にあった、できるだけロット差のない培地を適性に使用する必要がある。

添加因子 FGF-2などの添加因子一つをとってみても、その製造元、ロット、輸送方法、保存状態などによって生物活性が大きく変わるので、十分に注意しなければならない。実際、筆者らがFGF-2をhESF-FX培地に添加した際のヒトES/iPS細胞の増殖への影響を比較検討したところ、製造元、ロット、輸送方法、保存状態などによって活性が変わっていた(未発表データ)。FGF-2だけでなく、すべての添加因子について同様のことが起こりうる。また、培地に添加した後に活性が失われることもある。

足場材料 当然のことながら、どの培地とどの足場材料を組み合わせるか、どの濃度で使用するかによって、細胞のシグナルは変化し、培養面への接着、形態や増殖にも影響が出る。また、継代などで細胞を分散するときの方法も変わってくる。足場材料の特徴も理解して、適正に使用する必要がある。よく使用されているマトリジェルなどの基底膜マトリックスは、マウス腫瘍から分離した基底膜成分である。ヒトES/iPS細胞の培養に適合したものが市販されているものの、不確定因子を多く含んでおり、動物由来成分を含みロット差もあるので特に注意が必要である。また、ビトロネクチンやラミニンなどのヒト型リコンビナントのマトリックスを使用する際にも、添加因子と同様にその生物活性をロットごとにチェックするのが望ましい。

培養技術 実験者または研究施設が変わることによる、ヒトES/iPS細胞の品質変動も大きな問題の一つとなっている。高品質の細胞を維持するためには、高い培養技術を有する技術者が必要であるが、技術者を育てるには培養に熟練した指導者も必要である。

表1. 主な無血清培地 (chemically defined serum-free medium). 1~11は市販されている. 12~20は市販されていないが, 受注生産品を含む. 全組成が発表論文で公開されているものは, 研究室内で作製することができる. ゼノフリー: 非ヒト由来成分不含. アルブミンフリー: アルブミン不含.

	培地開発に関する文献・開発者	培地名・製品名 (発売元)	ゼノフリー	ゼノフリー, アルブミンフリー	全組成公開	開発者または製造販売元が推奨する細胞外マトリックスなど	備考
1	Wang et al. 2007	STEMPRO [®] hESC SFM (Gibco, Life Technologies)			○	基底膜マトリックス	
2	Ludwig et al. 2006a	mTeSR1 (STEMCELL Technologies)			○	基底膜マトリックス, ヒトリコンビナントラミニン521	米国WiCell Research Instituteの技術提携のもとカナダSTEMCELL Technologies社で開発された.
3	Ludwig et al. 2006b	TeSR2 (STEMCELL Technologies)	○		○	基底膜マトリックス	
4	Chen et al. 2011	TeSR-E8 (STEMCELL Technologies)	○	○	○	ヒトリコンビナントビトロネクチン	Dr. James Thomson (Wisconsin 大学) の研究室で開発したE8の成分をベースに, STEMCELL Technologies社が製品化
5		Essencial 8 (Gibco, Life Technologies)	○	○	○	ヒトリコンビナントビトロネクチン	Dr. James Thomson (Wisconsin 大学) の研究室で開発したE8の成分をベースにCDIにてバリデーションされた製品
6		HEScGRO [™] Serum-Free Medium for hES cells (Chemicon, Millipore)	○		非公開	ヒトフィーダー細胞 (ヒト線維芽細胞)	
7		PluriSTEM [™] Human ES/iPS Medium (EMD Millipore)	○		非公開	リコンビナントビトロネクチン	
8	Prof. Joseph Itskovitz-Eldor M.D., D.Sc (the Technion-Israel Institute of Technology)	NutriStem [®] hESC XF (Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd.)	○		非公開	リコンビナントビトロネクチン	
9		NutriStem [™] XF/FF Culture Medium (STEMGENT)	○		非公開	リコンビナントビトロネクチン	
10		AF NutriStem [®] hESC XF (Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd.)	○	○	非公開	リコンビナントビトロネクチン	
11	住友化学株式会社 (JST・S-イノバプロジェクト)	S-medium (DS ファーマバイオメディカル株式会社)	○		非公開	Corning [®] Synthemax [®] Surface-R 6 ウェルプレート	国内研究機関向けに市販されている.
12	Nakagawa et al. 2014	StemFit [®] AK03 (味の素株式会社)	○		非公開	リコンビナントラミニン-511 E8 フラグメント	Prof. Joseph Itskovitz-Eldor M.D., D.Sc (the Technion-Israel Institute of Technology) の技術をもとに味の素株式会社と京都大学iPS細胞研究所とで共同開発された. 国内一部研究機関へ提供されている.
13	Furue et al. 2008	hESF9			○	ウシ/ヒトフィブロネクチン	CSTIより受注生産品として販売
14		hESF-FX	○		○	ヒトフィブロネクチン	
15	Kinehara et al. 2013	hESF9 _{2ai}			○	ウシ/ヒトフィブロネクチン	
16	Li et al. 2005				○	基底膜マトリックス	
17	Liu et al. 2006				○	基底膜マトリックス	
18	Vallier et al. 2005	CDM			○	ウシ/ヒトフィブロネクチン	
19	Lu et al. 2006				○	基底膜マトリックス	
20	Yao et al. 2006				○	基底膜マトリックス	

特 集

ま と め

上記のように、基礎培地、添加因子、足場材料はどれもロットごとのチェックが必要である。精製されたリコンビナントの製品を使用する際にも、調製方法、保存方法など細部にまで注意を払い、さらに、安定した培養技術で、再現性の高い結果が得られるよう努めなければならない。ヒト幹細胞を実用化するための今後の課題は多く、解決にむけた基礎研究が必要である。

謝 辞

本稿に記載した研究内容は、厚生労働省科学研究費補助金による研究で実施した。

文 献

- 1) Thomson, J. A. *et al.*: *Science (New York)*, **282**, 1145 (1998).
- 2) Takahashi, K. *et al.*: *Cell*, **131**, 861 (2007).
- 3) Adewumi, O. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **25**, 803 (2007).
- 4) Amit, M. *et al.*: *Dev. Biol.*, **227**, 271 (2000).
- 5) Xu, C. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 971 (2001).
- 6) 古江-楠田美保: *Medical Science Digest*, **33**, 1251 (2007).
- 7) Martin, M. J. *et al.*: *Nat. Med.*, **11**, 228 (2005).
- 8) Barnes, D. W. *et al.*: *Methods for preparation of media, supplements, and substrata for serum-free animal culture*, Alan R. Liss, Inc, (1986).
- 9) Sato, G. H.: in *Biochemical Actions of Hormones* Vol. 3 (ed. Litwack, G.), Academic, 391 (1975).
- 10) Hayashi, I. and Sato, G. H.: *Nature*, **259**, 132 (1976).
- 11) Bottenstein, J. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **58**, 94 (1979).
- 12) Sato, J. D. *et al.*: *J. Exp. Med.*, **165**, 1761 (1987).
- 13) Sato, J. D. *et al.*: in *Basic Cell Culture* (ed. J. M. Davis.), Oxford University Press, p. 227 (2002).
- 14) Brewer, G. J. *et al.*: *J. Neurosci. Res.*, **35**, 567 (1993).
- 15) Furue, M. K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13409 (2008).
- 16) Kinehara, M. *et al.*: *PLoS One*, **8**, e54122 (2013).
- 17) Wang, L. *et al.*: *Blood*, **110**, 4111 (2007).
- 18) Ludwig, T. E. *et al.*: *Nat. Methods*, **3**, 637 (2006a).
- 19) Ludwig, T. E. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **24**, 185 (2006b).
- 20) Chen, G. *et al.*: *Nat. Methods*, **8**, 424 (2011).
- 21) Li, Y. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **91**, 688 (2005).
- 22) Liu, Y. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**, 131 (2006).
- 23) Vallier, L. *et al.*: *J. Cell Sci.*, **118**, 4495 (2005).
- 24) Lu, J., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5688 (2006).
- 25) Yao, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6907 (2006).
- 26) Akopian, V. *et al.*: *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **46**, 247 (2010).