

幹細胞培養技術/培養装置の国内および世界的動向

堀口 一樹^{1*}・卜部 祐輔²・酒井 康行³

はじめに

ヒトの臓器は大量の細胞から構築されており、その再生にも大量の細胞が必要となる。たとえば、ヒトの肝臓の再生には、 10^{10} 個オーダーの細胞数が必要であると言われているし、比較的小さな膵臓でも 10^8 個オーダーの細胞数が要求される¹⁾。そのため、再生医療に用いる細胞ソースとして期待されているiPS細胞を始めとした幹細胞も同程度の細胞数が必要となる。しかし、ディッシュやフラスコを用いる実験室的手法の量的拡大には限界があり、一定以上の品質の細胞を大量かつ低コストで生産可能な培養装置・システムの開発が必要である。本稿では効率的かつ大量に幹細胞を培養する装置・技術の現状を簡単に紹介する。

培養装置

培養形式 細胞の培養法として、マトリゲルなどのマトリックスやフィーダー細胞で被覆した培養表面に接着させる接着培養と、培養液中に浮遊させる浮遊培養の二つに大別することができる(図1)。接着培養は観察が容易であり、特に形態観察によって細胞の状態を一次判断することの多い全能性幹細胞では非常に有効である。しかし、細胞の最大収量は培養面積に依存するため、より多くの細胞を得ようとするとき培養装置が複雑になる傾向があり、スケールアップには不利である。一方、浮遊

培養では、細胞の最大収量は培地体積に依存するため、スケールアップしても培養装置は接着培養に比べて単純にしやすいという利点がある。本節では、接着培養・浮遊培養のそれぞれについて国内外で発表されている代表的な培養装置について紹介する。

接着培養装置 接着培養では、細胞の収量が培養面積に依存するため、大量培養の達成には、培養面積の拡大が重要である。培養面積の拡大方法としていくつかの方法が考えられ、カナカから発表されている自動培養装置P4CSなどが例としてあげられる²⁾。また、培養面の積層化も培養面積の拡大に有効である。ニプロは培養容器としてバッグを導入し、上下両面に細胞を接着・培養させることで培養面積の拡大を達成している³⁾。また、川崎重工が開発したオートカルチャーは、培養操作をオートメーション化することで、同時に培養できるディッシュ数を増やすことで、細胞の収量を高めているが、操作が複雑なため、チップの不良品への対応などの懸念がある⁴⁾。

浮遊培養装置 全能性幹細胞を浮遊培養すると、凝集体を形成する。そのため、浮遊状態で安定な増殖を達成させるためには、過剰な細胞の凝集を抑制しつつ、培養液流による剪断応力によって細胞死が引き起こされないように培養液を攪拌する必要がある。主な攪拌方法として、攪拌子によって培養液を攪拌する方法と、培養容器自体を駆動することによって内部の培養液を間接的に流動させる方法の2種類が考えられる。前者の代表的な装置として、スピナーフラスコがあげられ、国内では、エイブルが東京女子医科大学などと共同でiPS細胞用に攪拌子などを改良したものを開発し、2014年度に販売される見通しである(詳細は、女子医科大学/松浦先生の稿を参照)。一方、国外でもドイツのDASGIPがHannover Medical Schoolなどと共同でスピナーフラスコによるヒト全能性幹細胞増殖を実現させており⁵⁾、開発競争は今後激化することが予想される。

一方、攪拌子を用いず、培養容器自体を駆動させることで内部の培養液を流動させる培養装置も開発されている。英国のGE healthcareのWAVE bioreactor systemは、

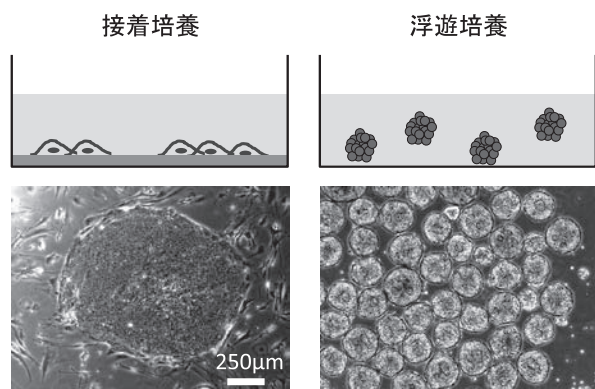


図1. 全能性幹細胞の二つの培養形式

* 著者紹介 ¹ 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻(博士後期課程) E-mail: ikki-h@iis.u-tokyo.ac.jp

² 東京大学大学院工学系研究科化学システム工学専攻(博士前期課程) E-mail: urabe@iis.u-tokyo.ac.jp

³ 東京大学生産技術研究所統合バイオメディカルシステム国際研究センター(教授) E-mail: sakaiyas@iis.u-tokyo.ac.jp

特 集

培養バッグを揺り動かすことで培養液を攪拌させ、生じる波によってエアレーションしている⁶⁾。培養バッグは1リットルから500リットルまで対応しており、ヒト全能性幹細胞の大量培養として必要な細胞数を得るために必要と考えられるスケールにも十分対応可能である。米国のSyntheconのRotary Cell Culture System (RCCS)は円筒状のリアクターを一軸回転させることで、重力の影響を軽減しながら培養液を攪拌することができる⁷⁾。国内でも、広島大学の学内ベンチャーであるスペース・バイオ・ラボラトリーズが、培養容器を2軸回転させ、疑似無重力下で細胞を培養する培養装置としてGraviteを開発している⁸⁾。これらの培養装置は、低い剪断応力で細胞を浮遊培養できる点で魅力的であるが、回転機構を備える必要があるため、装置の構造が複雑になり、培地交換などの操作が煩雑になることが問題となる。

マイクロキャリア培養 最後に、接着培養と浮遊培養の両方の側面を持つマイクロキャリア培養の現状について述べる。マイクロキャリア培養では、数マイクロ数百マイクロメートルスケールの粒子上に細胞を接着させて増殖させることで、高い培養面積を高密度で得られる(図2)。Chenらの検証によると、ヒトES細胞の培養に用いるマイクロキャリアにも、マトリゲルなど接着基質の被覆が必要であることが報告されている。また、長径100 μm 以下の小さなマイクロキャリアは増殖に向かず、カルボキシメチル基などの負電荷を持つ残基が表面に支配的であると、接着しないことが知られている⁹⁾。

マイクロキャリア培養は、浮遊懸濁培養に用いる装置を使うことが多いが、マイクロキャリアベースの培養容器の設計も行われている。HamiltonのBioLevigatorは、GEMと呼ばれるアルギン酸ゲルベースのマイクロキャリアと組み合わせて用いられる培養装置である¹⁰⁾。マイクロキャリアは磁性粒子を含んでおり、浮遊状態などを制御することができる。回収時は分解液を用いてマイクロキャリアごと分解することで細胞のみを効率的に回収できる。

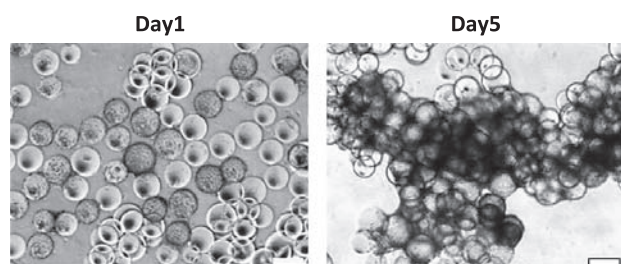


図2. Cytodex 3を用いたヒトiPS細胞の培養例 (Bar = 200 μm)

大量培養特有の課題 ここまで、接着培養と浮遊培養の二つに分けて国内外の培養装置の動向を紹介してきた。最後に、以上の培養装置の設計にあたって直面する、実験室的手法ではあまり考慮されてこなかった課題について指摘したい。第一に考慮すべき点として、酸素の供給があげられる。たとえば、スピナーフラスコでは、細胞密度にもよるが1リットル程度を超えると上面通気のみでは酸素供給が不十分となる。そのため、抗体生産などで用いられている従来の細胞培養プロセスでは、間欠的なスパーキングが行われる。全能性幹細胞は基本的に嫌気呼吸であり、酸素の消費は高くないが、スケールアップに当たって、酸素透過膜を使った分子状の酸素供給やマイクロバブルの利用など、酸素供給法の考慮が必要である。

次に課題となるのはコンタミネーションの防止である。紹介した培養装置のほとんどは閉鎖系のため、培養中の菌類やカビの混入は考えられないが、細胞を播種するステップや細胞を回収するステップなど、系を開放しなくてはならないステップ(チェンジオーバー)ではコンタミネーションの可能性が考えられる。特に大量培養を想定した培養装置では、投入する培地の量も多く、操作が煩雑になるため、コンタミネーションの可能性も高くなる。コンタミネーションの防止策として抗生剤などの投与があげられるが、実験室的な幹細胞培養では、幹細胞への影響を嫌って抗生剤を除くケースもあり、mTeSR1やEssential 8などの市販のReady-to-useな培養液には、抗生剤を含んでいない場合も多い。しかし、大量培養においてはコンタミネーションのリスクを最小化するため、抗生剤の投入などを検討すべきであると考えられている。

培養技術

ここまで、幹細胞の大量培養の容器として、国内外の多様な培養装置について紹介してきた。本節では、培養のゼノフリー化など、培養装置の改良ではカバーできない問題点を解決する培養技術について述べる。また、大スケール化はされていないが、幹細胞の大量培養において重要と考えられる小スケールでの培養装置設計も本節で述べる。

基質のゼノフリー化 全能性幹細胞の接着培養において、基質は重要な役割を持つ。実験室では、マウス胚性線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast; MEF)フィーダー上、あるいはマトリゲルなど細胞外基質上での培養が一般的である。しかし、これらはいずれも異種動物由来の成分を含んでおり、これらの条件で培養された幹細胞

胞を移植することは、感染症や免疫拒否反応などの観点から避ける必要がある。そのため、異種動物由来の成分を含まない培養基質の開発が必要である。

国内の例では、京都大学で開発されたラミニン断片 (LM-E8) があげられる。これは、ラミニン 511 全体より小さく、大量精製が可能である。さらに、通常ヒト全能性幹細胞は単細胞にすると ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase) 阻害なしではアポトーシスを起こしてしまうが、ラミニン断片を用いると、単一細胞であっても接着し、増殖する事が報告されている¹¹⁾。国外では、Life technologiesが販売しているビトロネクチン断片 (VTN-N) があげられる。こちら、ビトロネクチン全体より安価に製造することができる。これは、後述の Essential 8 と組み合わせることで、安価な接着培養を達成できる。

培養液の開発 基質と同様に、培養液の開発も重要であり、フィーダーフリーなヒト全能性幹細胞用培地は大量に開発されている (表 1)。mTeSR1 はもっとも初期に開発された培地であり、成分も公開されているため、ヒト全能性幹細胞用培地としてもっとも広く使われている。しかし、毒物・劇物にあたる 2-メルカプトエタノールやメタパナジン酸アンモニウムを含んでいるため、医療への応用には課題が残る。後発培地としてもっともシンプルなものは、Life technologies の Essential 8 である。これは、8 つの添加物で構成される DMEM/F12 ベースの培地であり、添加物が圧倒的に少ないため、他の培地に比べてより低コストでヒト全能性幹細胞の培養ができる。Life technologies は前述のビトロネクチン断片 VTN-N と組み合わせ、細胞の分散には EDTA を用いることを推奨している¹²⁾。

国内でも多数のヒト全能性幹細胞用培地が開発されている。リプロセルは、全能性幹細胞の培養・再生医療を専門にしたバイオベンチャーであり、ヒト全能性幹細胞用培地を数種類開発しており、近年ではゼノフリー培地も発売している¹³⁾。和光純薬は、自社工場を持ち、自主 GMP 管理で培地を大量生産している。ヒト全能性幹

細胞の培養液は後発であるが、大量生産の点で有利である¹⁴⁾。

凝集の抑制 基質を用いずに全能性幹細胞を浮遊培養する場合、凝集体を形成して増殖するため、過剰な凝集を抑制することが重要であると前節で述べた。本項では、過剰な凝集を攪拌以外の方法で抑制する技術について紹介する。

均一で、再現性よく凝集体を作製するという観点では、マイクロウェルによる培養が考えられる。実際、均一な凝集体を生成するために、多種多様なマイクロウェルが開発・販売されている。これらは、全能性幹細胞を一定数ずつ物理的に分配することで、特定の細胞数からなる凝集体を作製することができる。しかし、培地交換などの液流に伴って凝集体がマイクロウェル外に飛び出すことがあるため、直接的な培地交換は難しい。特に、凝集体が大きくなるとこの傾向が見られるため、長期間の幹細胞培養には向かない。そのため、マイクロウェルによる培養は、凝集体を浮遊懸濁培養に持ち込むなどの前処理として用いられている¹⁵⁾。

また、培地に添加物を加えることで、凝集を抑制する方法も考えられている。2014 年、日産化学が京都大学と共同研究し、2 種の多糖類を組み合わせ、培養液の比重・粘度を調節することで、細胞の過剰凝集を抑制する方法を開発した¹⁶⁾。この手法では、攪拌を一切用いないため、培養液の流動による細胞への影響はクリアできるが、スケールアップによる酸素供給に対する配慮が必要と考えられる。

アルギン酸ゲルなどのカプセルに封入する事で物理的に細胞同士を隔離する方法も考えられている。当研究室でも、この手法で、マウス iPS 細胞の凝集体をアルギン酸ゲルカプセル中で形成させ、培養を行っている (図 3)¹⁷⁾。その際、通常の浮遊懸濁培養などで形成される凝集体と異なり、細胞の脱未分化が抑制されている事が確認された。特に、通常凝集体表面に現れる原始内胚葉の細胞層の形成が阻害されている様子が明らかになった。全能性

表 1. 国内外の代表的なヒト全能性培養液

品名	販売社 (国)
mTeSR1	Stem Cell Tech. (カナダ)
Essential 8	Life technologies (米国)
Ripro FF/FF2/XF	リプロセル (日本)
StemSure	和光純薬 (日本)
CELRENA	細胞科学研究所 (日本)
S-Medium	DS ファーマ (日本)

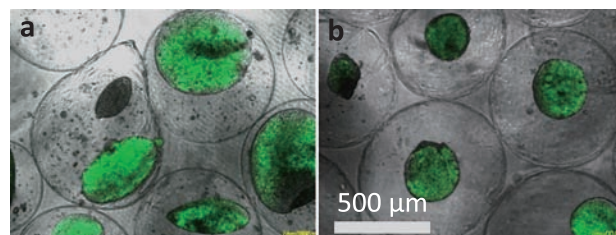


図 3. アルギン酸ゲルカプセル中で培養されたマウス iPS 細胞。(a) 中実カプセル、(b) 中空カプセル。緑蛍光は Nanog 陽性細胞。

特 集

幹細胞のアルギン酸ゲルによる固定化では、凝集体がカプセル外に流出してしまうなど、大量培養への応用には課題も多い。しかし、ゲル化がきわめて早いアルギン酸ゲルと混合ゲルを形成させることで、ゲル化速度が遅く、通常カプセル化が困難なゲルでもカプセル化材料として利用できる。当研究室でも、RGD (Arg-Gly-Asp tripeptide) などを化学修飾したPEGゲルをアルギン酸ゲルと混合し、マウス全能性幹細胞の固定化に使用している¹⁸⁾。

増殖因子の保持 実験室的手法では、増殖因子の投与によって幹細胞の増殖や分化誘導を実施している。しかし、培養液量が増加するに従って、投与しなくてはならない増殖因子量も増加する。そのため、大量の高価な増殖因子を消費する事になり、培養コストは高くなる。たとえば、内胚葉系の分化で用いられるActivin Aは、通常50–100 ng/ml程度の濃度で使用されるが、これを市価で換算すると培地1リットルあたり数十万円のオーダーとなり、日々の培地交換などを考慮すると、全能性幹細胞の大スケール分化誘導は超高額プロセスとなることが懸念される。そのため、投与する増殖因子量の削減はスケールアップにおいて重要な課題である。たとえば、抗体精製などに用いられる透析膜を用いた増殖因子の保持などが考えられる¹⁹⁾。また、細胞自身が分泌する因子を有効活用することで、細胞の増殖・分化を低コストで制御できる可能性がある。当研究室でも、マイクロデバイスを用いてマウスES細胞の自己分泌因子を培養空間中に高濃度で保持することで、分化を抑制できることを報告している²⁰⁾。これらの技術は特に、多数の増殖因子の投与が必要となる大量分化誘導プロセスにおいて重要となる。

おわりに

これまで、全能性幹細胞を中心に、大量培養装置および技術の開発動向について紹介してきた。ヒトiPS細胞が開発されてから7年経ち、細胞数をあまり要しない網膜色素上皮などの再生は我が国でも臨床試験に進んでいる。しかし、心筋や脾臓、肝臓といった大型臓器の再生には、より多くの細胞数が必要であり、現状でもその要求される細胞数を達成できるゴールドスタンダードは定まっていない。

また、未分化維持増殖に関しては、さまざまな研究が進められているが、分化誘導のスケールアップに関してはほとんど研究例がなく、浮遊懸濁培養で肝臓系への分化誘導を試みた例が報告されている程度である²¹⁾。分化誘導プロセスのスケールアップにおける最大の問題点

は、培地コストである。当研究室の試算では、 10^6 個の全能性幹細胞を 10^8 個まで増殖させるために必要な培養液コストが50万円前後かかる。これに対し、たとえば脾臓の分化誘導では、人体の100分の1程度のサイズであるマウス脾臓の場合ですら、その脾臓再生に有用な数の脾臓を得るために必要な分化誘導培地コストは290–580万円かかると予想される。以上から、通常研究室で行われている生物学的手法を単にスケールアップするだけでは、全能性幹細胞を用いた再生医療は超高額医療となると考えられる。

このような背景から、ヒト全能性幹細胞の大量培養・分化誘導プロセスの確立には、酸素の供給、栄養基質と老廃物の効率的交換および、局地的投与による増殖因子の投与量削減などを活用した低コスト化が重要な鍵となると考えられ、総括的な大量培養技術確立の研究だけではなく、各技術の発展が重要であると考えられる。

文 献

- 1) Bianconi, E. *et al.*: *Ann. Hum. Biol.*, **40**, 463 (2013).
- 2) カネカ閉鎖系自動細胞培養装置: <http://www.kaneka-cell.com>
- 3) ニプロ株式会社プレスリリース2012年11月22日: <http://www.nipro.co.jp/ja/news/2012/document/121122.pdf>
- 4) 川崎重工株式会社 細胞自動培養ロボットシステム オートカルチャー: <http://www.khi.co.jp/mechamd/>
- 5) Olmer, R. *et al.*: *Tissue Eng. Part C Methods*, **18**, 772 (2012).
- 6) GEヘルスケアジャパン株式会社 WAVE bioreactor: <http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/1278.html>
- 7) Gerecht-Nir, S. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 493 (2004).
- 8) Yuge, L. *et al.*: *Stem Cells Dev.*, **15**, 921 (2006).
- 9) Chen, AKL. *et al.*: *Stem Cell Res.*, **7**, 97 (2011).
- 10) Hamilton Company Hamilton BioLevigator: <http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/1278.html>
- 11) Miyazaki, T. *et al.*: *Nat. Commun.*, **3**, 1236 (2012).
- 12) Chen, G. *et al.*: *Nat. Methods*, **8**, 424 (2011).
- 13) 株式会社リプロセル: <https://www.reprocell.com/>
- 14) 和光純薬: <http://www.wako-chem.co.jp>
- 15) Ungrin, M. D. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 853 (2012).
- 16) Otsuji, G. T. *et al.*: *Stem Cell Reports*, **2**, 1 (2014).
- 17) Horiguchi, I. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, (in press, DOI: 10.1002/btpr.1891).
- 18) Tabata, Y. *et al.*: *Biomater. Science*, **2**, 176 (2014).
- 19) Baumann, F. *et al.*: *Biopharm International*, **18**, 22 (2005).
- 20) Chowdhury, M. M. *et al.*: *Biomicrofluidics*, **6**, 14117 (2012).
- 21) Vosough, M. *et al.*: *Stem Cells Dev.*, **22**, 2693 (2013).