

ヒトiPS細胞用培地 「ciKIC™ iPS medium」の開発

Development of culture medium for iPS cells “ciKIC™ iPS medium”

渡邊 剛広 Takehiro Watanabe (Researcher)

関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所 研究員
Life Science Laboratory, Technology and Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

澤口 智哉 Tomoya Sawaguchi (Chief Researcher)

関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所 主任研究員
Life Science Laboratory, Technology and Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

キーワード ■ 再生医療、iPS細胞、培地、未分化

01

はじめに

再生医療は、事故や重篤な疾患によって損傷した体や低下した身体機能を、体外で培養した細胞を用いて修復・補完することで、従来技術では治療が困難とされていたパーキンソン病や心臓病などの根治も可能にする夢の医療である。再生医療では、1回の治療に $10^8 \sim 10^{11}$ 個程度の細胞を必要とするが、体を構成する大部分の細胞は分化および成熟の過程で増殖能力を失っている。そのため、まずは自己もしくは他家の体内から増殖能を有している幹細胞を集め、これを患者に移植する治療が成されてきたが、この方法を適用できる範囲は骨髄移植などの一部に限られていた。一方で、1998年にヒト胚性幹細胞 (Embryonic stem cells; ES細胞) が樹立されたことで¹⁾再生医療の研究が加速することとなったが、ES細胞の作製には受精卵を用いるという倫理的な問題が伴っていた。そのような状況の中、2006年に山中らは、生体から採取した線維芽細胞に4種類の遺伝子 (Oct-3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) を導入することで人工的に幹細胞を作製することに成功した (人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent stem cells; iPS細胞))^{2,3)}。これにより、生命倫理の問題を回避しつつ再生医療に必要な膨大な数の細胞を確保するための道が拓かれた。

その後、2014年の再生医療等安全性確保法および医薬品医療機器等法の施行に伴いiPS細胞を用いた複数の臨床研究や試験が活性化したことで、再生医療に対する社会の期待は急速に高まったと言える。その期待に応えてiPS細胞を用いた再生医療を幅広く普及させるためには、iPS細胞に係る研究の深化と研究成果を患者に届けるためのバリューチェーンを構築することが必須である。なかでも、細胞の未分化性や増殖性および品質に大き

な影響を与える培地の重要性は極めて高い。

本稿では、iPS細胞の発明初期から現在に至るまでの培養方法と培地について概説するとともに、当社が開発したiPS細胞用培地「ciKIC™ iPS medium」について紹介する。

02

ヒトiPS細胞の培養方法と課題

ヒトiPS細胞が樹立された当初は、ヒトES細胞の知見をもとにオンフィーダー培養による未分化維持培養が行われていた。オンフィーダー培養は、マウス胚性線維芽細胞 (Murine embryonic fibroblasts; MEF) などをフィーダー細胞として用いる培養法である。フィーダー細胞は、iPS細胞が接着する足場としての役割を果たすとともに、iPS細胞の維持に必要な液性因子の供給の役割も担っている。しかしながら、オンフィーダー培養で増殖させたヒトiPS細胞にはフィーダー細胞 (異種細胞) が混入する恐れがあったり、ヒトの細胞には通常存在しないN-グリコシルノイラミン酸を含む糖鎖構造がヒト細胞表面に認められたりするなど⁴⁾、拒絶反応を引き起こすリスクが高まることから、医療応用における安全性が問題視されている。

このようなオンフィーダー培養が抱える安全性などの懸念を解決すべく、様々な研究機関や企業によってフィーダー細胞を使用しない培養法 (フィーダーフリー培養法) が開発されてきた。その結果、ビトロネクチンやラミニン511およびラミニン511のE8断片 (製品名iMatrix-511) などといった細胞外マトリックスを用いることで、フィーダー細胞の足場としての役割を代替することに成功している^{5,6)}。これにより、フィーダー細胞によってもたらされる安全上の懸念を払拭することが可能となった。一方で、これらの細胞外マトリックスには、フィーダー細胞のような液

性因子を供給する働きは無い。そのため、フィーダーフリー培養用培地には、フィーダー細胞が供給していた液性因子に代わる様々な成分を添加する必要がある。具体的には、塩基性線維芽細胞成長因子(basic Fibroblast growth factor;bFGF)やトランスフォーミング増殖因子- β (Transforming growth factor; TGF- β)といった増殖因子が比較的高濃度で含まれており^{7,8)}、さらに一部の培地には多量のヒト血清アルブミン(Human serum albumin;HSA)も添加されている。しかしながら、これらのタンパク質成分は、動物由来のものはロット間の品質に差が生じやすく、その結果として培地の性能に影響を及ぼす恐れがある。また、遺伝子組換えタンパク質として供給されているものは、動物由来に比べていずれも高価である。アニマルフリーやGMP (Good Manufacturing Practice)グレードといった再生医療用途向けの品質を求めることで培地にかかるコストがさらに高まることから、再生医療にかかる医療費を押し上げる理由の一つとなっている。

現状のフィーダーフリー培養用培地におけるロット間差やコスト面の課題を解決するためには、タンパク質成分をより安価で品質の安定した合成化合物に置き換えることが有効であると考えられる。その試みのひとつとして、2018年に長谷川らがグリコーゲン合成酵素キナーゼ3(Glycogen synthase kinase 3; GSK3)阻害作用を有する低分子化合物を用いてbFGFとTGF- β を代替する技術を報告している⁹⁾。また、我々は血清アルブミンの作用を合成化合物で代替する技術の開発を試み、一定の成果を収めることに成功した。次項では、血清アルブミンの作用とそれを代替する技術の一部を紹介する。

03 血清アルブミンの機能と代替物

血清アルブミンは、主に肝臓で合成される分子量約66,000のタンパク質であり、血清中に存在するタンパク質の約60%を占めている¹⁰⁾。アルブミンは、生体内において、血液の浸透圧の維持、抗酸化作用、脂肪酸や金属イオンなどの保持・輸送、栄養不足時のアミノ酸供給、といった様々な役割を果たしている¹¹⁾。我々は、これらの機能の中でも抗酸化作用と、我々が見出した細胞接着補助作用に着目し、代替物の探索を試みた。

3.1. 抗酸化作用に着目した代替物の探索

活性酸素種(Reactive oxygen species;ROS)は、主にミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を介したアデノシン5'-三リン酸産生経路において副産物として生成される。過剰に発生したROSは、細胞のDNAやタンパク質などを酸化することで構造変化を誘発し、それが原因となって細胞活動の低下やアポトーシスを引き起こす。生体内では、上記のようなROSによる傷害を防ぐために様々な抗酸化物質が働いているが、その一端を担っているのが血清アルブミンである。血清アルブミンには、N末端から34番目のシステイン残基がチオール基(SH基)を有する還元型アルブミンと、SH基が酸化される、または他の含硫アミノ

酸などとジスルフィド結合を形成した酸化型アルブミンの2種類が存在する。このうち還元型アルブミンは、生体が酸化ストレスに曝された際にSH基を利用してヒドロキシラジカル(OH $\cdot$)および次亜塩素酸イオン(OCl $^-$)を消去することや、過亜硝酸イオン(ONOO $^-$)の産生を抑制することが知られている¹²⁾。

このことから、我々は、血清アルブミンがiPS細胞内で生じたROSを消去することで、細胞の生存性・増殖性維持に関与しているのではないかと推測した。実際に、血清アルブミンを添加していない培地(Alb(-))と添加した培地(Alb(+))で培養したiPS細胞のROS量を比較すると、Alb(+))において細胞内のROS量が大幅に低下していることが確認できた(図1)。この知見をもとに、細胞内ROS量に着目した抗酸化物質のスクリーニングと添加培養試験を行った結果、SH基を有する一部の抗酸化物質がiPS細胞の増殖性を改善することが示唆された(data not shown)。

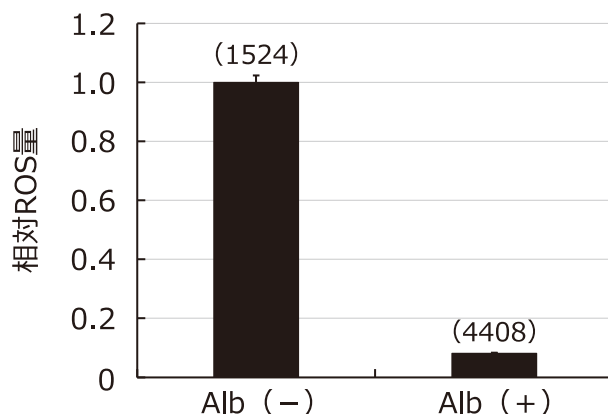


図1 血清アルブミンの有無と細胞内ROS量の関係
データは、Alb(-)のROS量を1とした際の相対値(平均値±標準誤差)。
棒グラフ上に位置する括弧内の数字はn数を示す。

3.2. 細胞接着補助作用に着目した代替物の探索

我々は、代替物の探索を続ける過程で、血清アルブミンが接着細胞の剥離を防ぐ効果を有することに気が付いた。実際に、Alb(-)またはAlb(+))を用いて7日間培養した細胞をクリスタルバイオレットで染色し、培養容器全体を顕微鏡で撮影した写真を図2に示す。Alb(-)では、培養容器中央にクリスタルバイオレットで染色された細胞が観察されるが、培養容器の周縁部には細胞がほとんど認められない。一方で、Alb(+))では、培養容器の周縁部にも細胞が観察され、細胞が剥離していないことがわかる。培養容器周縁部の細胞が剥がれる原因として、細胞培養時の培地交換が挙げられる。培地交換は、通常はピペット等を用いて穏やかに行うが、それでも培養容器内の周縁部には培地の流れが生じ、流れによる剪断力が細胞を培養容器から剥がす原因となり得る。

そこで我々は、血清アルブミンが細胞表面を覆うことで培地交換時の剪断力を軽減し、細胞の剥離を防いでいるという仮説を立て、同様の効果が期待される親水性高分子ポリマーの添加培養試験を行った。各種ポリマーを添加した培地を用いて7日間培

養した細胞をクリスタルバイオレットで染色して観察した結果、培養容器周縁部の細胞剥離を防ぐ2種類のポリマー（ポリマー1、ポリマー2）を見出すことに成功した（図3）。これら2種類のポリマーは、安価に合成することが可能だけでなく、医薬品にも添加される安全性の高い物質であるため、再生医療用途の培地原料として適していると言える。

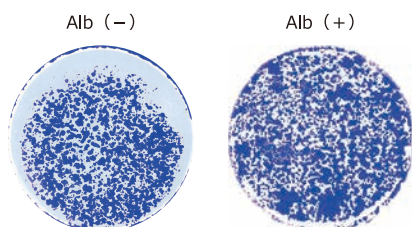


図2 血清アルブミンの有無が細胞接着に与える影響
写真は、倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した培養容器全体のタイリング画像。

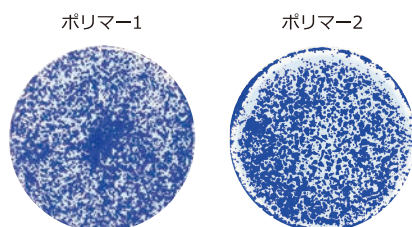


図3 各ポリマーが細胞接着に与える影響
写真は、倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した培養容器全体のタイリング画像。

04

ciKIC™ iPS mediumの性能

長谷川らが開発した低分子化合物を用いる未分化維持培地⁹⁾に、第3項に記載した血清アルブミン代替物の添加などの改良を加えた培地がciKIC™ iPS mediumである。本項では、ciKIC™ iPS mediumの性能について概説する。

4.1 細胞の形態と増殖性

実験には、SNLフィーダー細胞を用いてオンフィーダー条件下で維持培養したヒトiPS細胞253G1株¹³⁾を使用した。CTK解離液を用いてフィーダー細胞を除去した後、0.5×TrypLE select/EDTAを用いてiPS細胞をシングルセル化した。シングルセル化した細胞をY-27632 (Rho結合キナーゼ阻害剤)を含むciKIC™ iPS mediumに懸濁した後、iMatrix-511でコートした6ウェルプレートに50,000 cells/wellで播種した。以降の培地交換および継代は表1に示すスケジュールに従って実施した（継代時の細胞播種数は25,000 cells/well）。また、比較対照に用いた市販のフィーダーフリー培養用培地（培地A、培地B）を用いた実験は、各メーカーの推奨手順に従って行った。

継代直前に撮影したiPS細胞253G1株の位相差像を図4に示す。いずれの培地においても、丸く明瞭な核を有し、高い核/細

胞質比と細胞密度を有するiPS細胞に特徴的なコロニーが観察された。また、継代に合わせて血球計算盤を使って細胞数を測定し、その結果をもとに4週間にわたる増殖率の推移を記録した。その結果、ciKIC™ iPS mediumで培養した細胞は、4週間で約10⁷倍まで増殖した（図5）。これは、対照にした培地と比較して同程度の増殖性であった。

表1 各培地における培養スケジュール

	木	金	土	日	月	火	水
ciKIC™ iPS medium	P	○				○	○
培地A	P	○			○	○	○
培地B	P	○	○	○	○	○	P

P；継代、○；培地交換。

ciKIC™ iPS mediumおよび培地Aは7日間おきに継代を行い、培地Bは6日間おきに継代を行った。

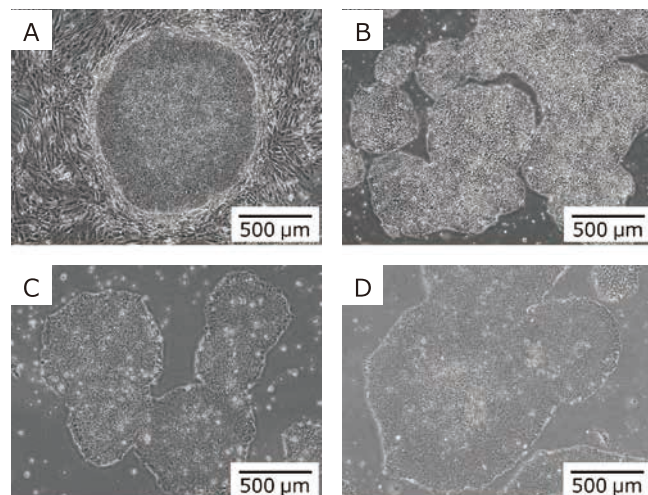


図4 各培地におけるiPS細胞の培養所見

写真は、倒立型顕微鏡IX-73(オリンパス)を用いて撮影した位相差像。

A；オンフィーダー培養、B；ciKIC™ iPS medium、C；培地A、D；培地B。

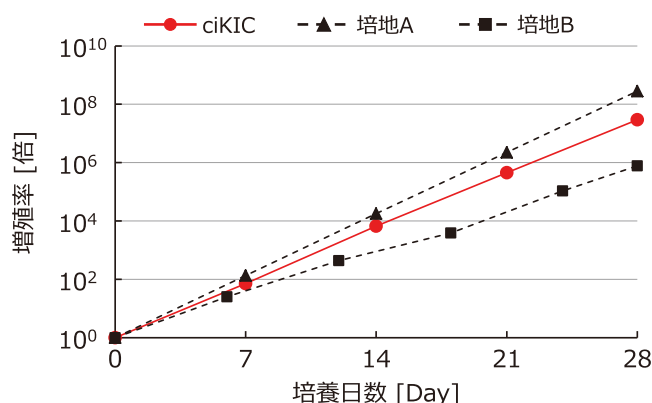


図5 各培地におけるiPS細胞の増殖率の推移

4.2. 細胞の未分化性(多能性)

iPS細胞は分化前(未分化)の状態であり、胎盤の細胞を除くあらゆる細胞へと分化する能力(多能性)を有している。ciKIC™ iPS mediumで培養した細胞がこのような性質を維持しているかどうか検証した。

はじめに、転写因子であるOct-3/4とNanogの免疫蛍光染色を行ったところ、ciKIC™ iPS mediumで培養したほとんどの細胞で蛍光が観察され、未分化マーカー陽性細胞であることが示唆された(図6)。次に、フローサイトメトリーを用いて細胞表面の2種類の糖鎖抗原(TRA-1-60、SSEA-4)の陽性率の測定を行った。その結果、ciKIC™ iPS mediumで培養した細胞では、両マーカー共に95%以上の陽性率を示した(図7)。

続いて、細胞の多能性を確認するために、胚様体(Embryoid body; EB)形成を介した三胚葉(内胚葉、中胚葉、外胚葉)への分化を試みた。ciKIC™ iPS mediumで継代後7日間培養したiPS細胞を0.5×TrypLE select/EDTAでシングルセル化した後、LIPIDURE-CM5206を用いて低接着処理を施した6ウェルプレートに100,000 cells/wellで播種し、同培地を用いて8日間浮遊培養を行うことでEBを作製した。その後、EBをゼラチンコートした6ウェルプレートに移行し、ciKIC™ iPS mediumから未分化維持成分を除いた培地を用いて12日間の接着培養を行った後、内胚葉、中胚葉、外胚葉に特異的なマーカー(α -fetoprotein; AFP、 α -smooth muscle actin; α -SMA、 β III-

tubulin)の免疫蛍光染色を行った。その結果、各マーカーを発現する細胞が認められたことから、三胚葉へ分化していることが示唆された(図8)。

以上の結果から、ciKIC™ iPS mediumで培養した細胞が未分化性(多能性)を有することが示された。

05 ciKIC™ iPS mediumの特徴と利点

ciKIC™ iPS mediumの最大の特徴は、未分化維持や細胞の生存性・増殖性向上に関わるタンパク質を合成化合物で代替した点である。当初の想定通り、安定した品質の培地をよりリーズナブルな価格で供給することが可能となった。加えて、本培地は最大で3日間は培地交換を行う必要がないため、休日作業の回避(人件費の抑制)や培地使用量の削減といった更なるコスト削減も期待される。さらに、継代時の細胞の播種方法として操作性に優れたシングルセル播種にも対応しているため、クランプ(小さな細胞塊)播種のような高度な技術を必要としない。これにより、手技間差や実験間差も生じにくくなったことから、増殖させたiPS細胞の品質の一定化にも寄与するものと期待される。もっとも、シングルセル播種自体にも問題点が指摘されているため¹⁴⁾状況に応じた継代法を選択する必要があるが、ユーザーに複数の選択肢を提示できたことは重要な点であると考えている。

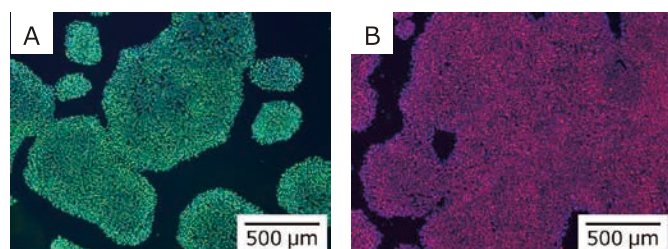


図6 ciKIC™ iPS mediumで培養したiPS細胞の免疫蛍光染色像写真は、倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した蛍光画像。A: Oct-3/4(緑)+核(青)、B: Nanog(赤)+核(青)。

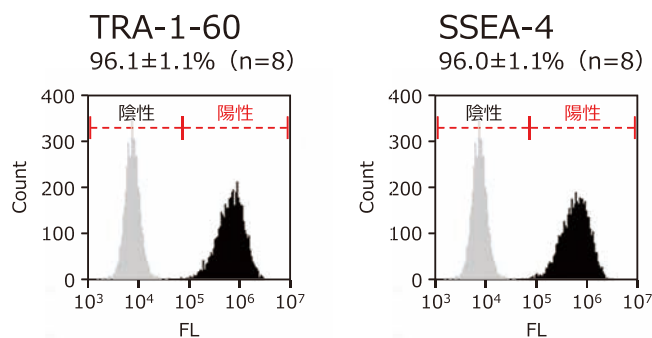


図7 ciKIC™ iPS mediumで培養したiPS細胞の未分化マーカー陽性率データは、代表的なヒストグラムと平均値±標準誤差。グレーのヒストグラムは、unstained controlを示す。

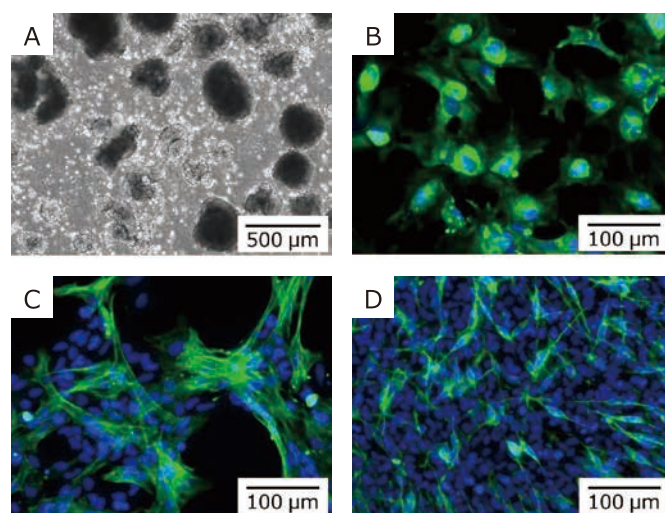


図8 ciKIC™ iPS mediumで培養したiPS細胞の三胚葉分化

A: 倒立型顕微鏡IX-73(オリンパス)を用いて撮影したEB(浮遊培養8日目)の位相差像。
B-D: 倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した蛍光画像であり、青は核、緑は各マーカー(B:AFP、C:α-SMA、D:βIII-tubulin)を示す。

06

おわりに

ヒトiPS細胞の様々な培養方法と課題について概説した。本稿で紹介したciKIC™ iPS mediumは、現在の再生医療が抱える問題の解決に貢献するものであると考えられる。現状の開発品には微量のタンパク質が含まれており、我々が目指すタンパク質を含まない完全合成培地の構築は未だ道半ばである。今後、残るタンパク質を代替する技術も確立することで、さらなる再生医療の発展とそれがもたらす人々の幸福に寄与していきたい。

参考文献

- 1) J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones, Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282** (5391), 1145-1147 (1998).
- 2) K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**(4), 663-676 (2006).
- 3) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**(5), 861-872 (2007).
- 4) M. J. Martin, A. Muotri, F. Gage, A. Varki, Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.* **11**(2), 228-232 (2005).
- 5) R. Bergström, S. Ström, F. Holm, A. Feki, O. Hovatta, Xeno-Free Culture of Human Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol. Biol.* **767**, 125-136 (2011).
- 6) T. Miyazaki, S. Futaki, H. Suemori, Y. Taniguchi, M. Yamada, M. Kawasaki, M. Hayashi, H. Kumagai, N. Nakatsuji, K. Sekiguchi, E. Kawase, Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat Commun* **3**, 1236 (2012).
- 7) T. E. Ludwig, M. E. Levenstein, J. M. Jones, W. T. Berggren, E. R. Mitchen, J. L. Frane, L. J. Crandall, C. A. Daigh, K. R. Conard, M. S. Piekarczyk, R. A. Llanas, J. A. Thomson, Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* **24**(2), 185-187 (2006).
- 8) G. Chen, D. G. Gulbranson, Z. Hou, J. M. Bolin, V. Ruotti, M. D. Probasco, K. Smuga-Otto, S. E. Howden, N. R. Diol, N. E. Propson, R. Wagner, G. O. Lee, J. Antosiewicz-Bourget, J. M. Teng, J. A. Thomson, Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* **8**(5), 424-429 (2011).
- 9) S. Yasuda, T. Ikeda, H. Shahsavarani, N. Yoshida, B. Nayer, M. Hino, N. Vartak-Sharma, H. Suemori, K. Hasegawa, Chemically defined and growth-factor-free culture system for the expansion and derivation of human pluripotent stem cells. *Nat. Biomed. Eng.* **2**(3), 173-182 (2018).
- 10) M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* **582**, 1783-1787 (2008).
- 11) 山田尚之, 中山 聡, 窪田和幸, 河上麻美, 鈴木榮一郎, 還元型・酸化型アルブミンの構造と機能解析 疾患マーカーとしての生理学的意義と臨床検体保存法の重要性. *臨床病理* **56**(5), 409-415 (2008).
- 12) 下 智比古, 高橋雅也, 武輪鈴子, 田中幸代, 蓮井正史, 金子一成, 小児ネフローゼ症候群における抗酸化物質としての血清アルブミンの役割. *日児腎誌* **23**(2), 80-83 (2010).
- 13) M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa, S. Yamanaka, Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**(1), 101-106 (2008).
- 14) Q. Bai, J. M. Ramirez, F. Becker, V. Pantescio, T. Lavabre-Bertrand, O. Hovatta, J. M. Lemaitre, F. Pellestor, J. De Vos, Temporal Analysis of Genome Alterations Induced by Single-Cell Passaging in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **24**(5), 653-662 (2015).