

THE CHEMICAL TIMES

2020 No.2 (通巻256号)
ISSN 0285-2446

特 集

再生医療関連技術

02

再生医療における、
商業利用に対応したヒト細胞の安定供給

国立成育医療研究センター研究所 副所長 梅澤 明弘

06

化学合成可能な増殖因子代替化合物の開発

東京大学大学院工学系研究科 助教 植木 亮介 他

12

再生医療製品向け新規ウシ血小板溶解物
「NeoSERA[®]」開発と医療応用

兵庫医科大学 先端医学研究所 医薬開発研究部門 准教授 山原 研一 他

17

ヒト間葉系幹細胞用無血清培地:STK[®]シリーズ
(STK[®]1, STK[®]2, STK[®]3)の開発

株式会社ツーセル 研究本部 邵 金昌 他

23

ヒトiPS細胞用培地「ciKIC[™] iPS medium」の開発

関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所 研究員 渡邊 剛広 他



KANTO CHEMICAL CO., INC.

再生医療における、 商業利用に対応したヒト細胞の安定供給

Business model for stable supply and commercial use of human cells in regenerative medicine

梅澤 明弘 Akihiro Umezawa (Deputy Director of the Research Institute)

国立成育医療研究センター研究所 副所長
National Center for Child Health and Development

キーワード ... 輸送、品質管理、細胞供給、生物由来原料基準

01 はじめに

再生医療における原料細胞の入手に関し、産業化に向けた事業環境の整備は喫緊の課題である。企業にとって再生医療分野へ参入するにあたり、ドナーからの寄託が原則となっている国内における細胞原料の安定的な供給が大きな障壁の一つである。再生医療等製品の製造に利用可能なヒト同種体性幹細胞の安定的な供給を実現するため、国内医療機関からのヒト細胞原料が供給される工程に係る課題を克服するための体制モデルの構築が重要となる(図1)。医療機関がヒト同種体性幹細胞の原料を提供する場合には、ドナーへのインフォームドコンセントや採取した細胞原料の情報管理などの医療行為以外の作業が発生し、担当する医師にとって負担である。また企業が商用目的に使用する細胞原料を提供する際には生物由来原料基準(平成15年5月20日制定 厚生労働省告示第210号、最終改正平成26年9月26日

制定 厚生労働省告示第375号)を遵守して実施することが求められ、ドナーへの説明書・同意書に記載すべき内容や組織採取に掛かる実費、社会的にも許容される基準を明確にする必要がある。また現状は新規治療法につなげるため再生医療等製品の開発に熱意のある医師や研究者が中心となってヒト同種体性幹細胞の原料提供されるにとどまり、持続的な再生医療産業の発展のためには原料供給を組織的な体制として行うことが求められる。

02 関連法令について

再生医療等製品を製造する企業向けにヒト同種体性幹細胞原料を供給するには、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」(平成26年厚生労働省令第93号、GCTP省令)を遵守することになる。そのため商用利用可能な細胞原料

原料流通産業化に向けたモデル

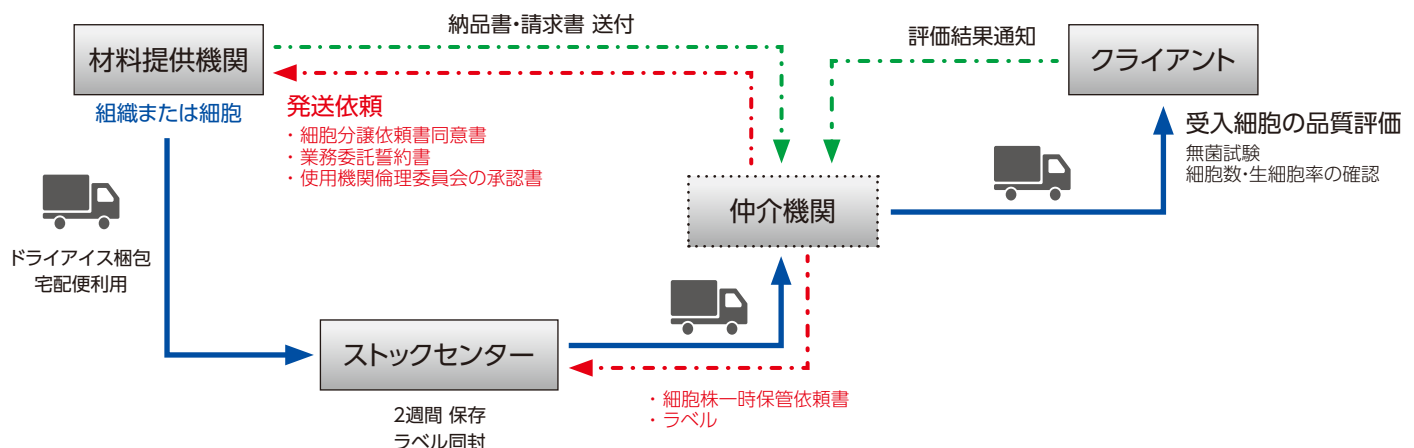


図1 材料提供期間(国内医療機関)とクライアント(製造販売企業)と仲介機関の関係

とは、企業が医薬品医療機器等法（薬機法）に基づいて行う治験や薬事承認を得るための製品の原料（原材料または原材料の元になる細胞）を指す。ヒト体性幹細胞とは、平成24年9月7日付け薬食発0907第3号厚生労働省医薬食品局長通知「ヒト同種体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」で定義する細胞である。体制モデルとしては、「国内医療機関」と「仲介機関」の存在により安定供給を実現できる。「国内医療機関」はヒト細胞原料の供給に関わる業務を医療機関が主体的に運営する組織体制となり、「仲介機関」は医療機関を支援し、企業への原料供給を仲介する供給体制を構築する。複数の医療機関のサポートを実施できる体制を構築し、細胞製造企業へ原料供給を仲介する。「国内医療機関」と「仲介機関」の連携のもとに、経済産業省、厚生労働省およびPMDAの行政・規制当局とも意見交換を行いつつ、仲介機関が行うべき役割・業務や責任範囲について明確にすることが肝要である。

03

法的、倫理的、社会的事項について

「平成29年度AMED間葉系幹細胞の安定供給事業の実現に向けた検討委員会報告書」を参考にした。この報告書に基づき、①仲介機関の役割の明確化、②情報管理の在り方、③医療機関の支援モデルの構築、④使用機関の支援モデルの構築、⑤ドナーに対する適切な情報提供、⑥仲介機関の役割を担うための自立的運用ビジネスモデルの構築をわれわれは行うことにした。医療機関は個人情報保護法を遵守し、組織・細胞提供先に識別番号等で匿名化された必要最小限の個人情報、及び細胞の品質と安全性に関わる情報を提供する。提供する情報には個人情報保護法第二条第三号に規定されている「要配慮個人情報」に該当するものが含まれる可能性がある。これらの情報を提供することを説明・同意文書に記載する。個人の特定につながるような患者情報については、個人情報管理のコストや情報漏洩のリスクの面から、可能な限り組織を提供する医療機関から持ち出さずに管理すべきである。一方、事業者の設定する組織・細胞の受け入れ基準によってはこれらの情報が必要となることも考えられる。医療機関及び組織・細胞提供先においては、医療機関から提供された組織・細胞に付随する暗号化された情報を適切に保管しトレーサビリティを確保するとともに、一連の業務について標準作業手順

- ・契約文書の作成
- ・責任範囲の明確化
- ・検体の所有権



図2 ドナーからの無償譲渡による細胞の入手

書を作成が求められる。細胞が有するゲノムは個人識別符号に相当することより、それへの対応も必要となる。また、ドナーからの自発的な提供（贈与）が原則である細胞の入手はヒト由来でない医薬品原料等の供給体制とは全く異なり、商用利用を意識し、倫理的、社会的事項を認識し、それらに関してどのように対応するかが重要である（図2）。

04

仲介機関の適切性

再生医療を個々に行う医療（自家移植）から広い対象（他家移植）へ産業化を目指し促進するための課題を明確にする必要がある。医薬品医療機器等法の下、再生医療を産業化レベルで活性化し、企業等の新規参入を促進するためには、第一に再生医療等製品の原材料となる組織・細胞の確保、管理と安定的な提供が保証される必要がある。原料供給源に関しては、周産期組織や手術検体などで医療上必要のなくなった医療廃棄物の利活用が期待されている。一方で、間葉系幹細胞による再生医療は、対象疾患が多岐にわたる上、間葉系幹細胞を採取する組織が様々であり得られる細胞も複数種からなる集団である。そのため、細胞ソースの体系的な品質評価を行い、付加価値的な原材料供給を行うことで再生医療製品開発に参入しやすくし、産業化を促進することが肝要である。ヒト同種体性幹細胞を用いた再生医療等製品の研究開発・治療への応用を促進するためには、製造工程の入り口の段階にあたる原料・材料（原料等）の安定的な供給が重要であり、そのためには原材料の提供元となる医療機関において原材料の提供が如何に行われるかが重要である。国立成育医療研究センターでは、成育バイオリソースプロジェクトとして、小児、産褥婦からの検体提供モデルを構築済みである。それらの細胞・組織について、商業利用に関する同意を取得し、品質管理、輸送管理、細胞規格を設定する。医療機関からのヒト体性幹細胞の原料を安定的に供給するためには、大学病院や国立高度専門医療研究センターといった公的な組織が非競争的な立場を維持しやすく、医療機関と事業者を仲介する機関を担うことがふさわしいと筆者は考えている。

05

仲介機関の医療機関に対する役割

仲介機関は原材料提供の医療機関から使用機関である再生医療等製品製造者まで原材料の流過程における様々な場面での役割を行うことが考えられる（図3）。この中には医療機関における提供者への同意取得や検体の取扱いの医療機関に対する支援、使用機関における倫理計画承認の確認や検体搬送・受け入れ時の支援等使用機関に対する支援が想定され、かつ仲介機関の自律的運営を考慮した場合、受益者負担による運営費の自立的確保が想定される。医療機関からの組織・細胞の提供においては、医療行為以外の様々な作業が発生することから、仲介機関はこれら医療機関の作業をサポートすることが想定される。その

中で、ドナーへの説明や同意取得、医療機関内における調整等については、仲介機関がSite Management Organizationとしての機能を有し、Clinical Research Coordinatorの経験のある人材を活用することで、医療機関の負担を大幅に減らせると同時に、質の高い運用が可能となる。

再生医療等製品の原料として用いるための組織・細胞の品質として、生原基に適合していることが必須であり、生原基第3の1(1)では施設、(2)では採取の方法、(3)ではドナースクリーニングについての要件が明記されている。その中でも、生原基第3の1(3)ウに記載のあるウインドウピリオドを勘案した感染症検査の必要性から、提供者からの同意取得にはこの点を考慮して実施する。ただし、状況によっては再検査が不要と判断される場合があると想定されるため、レギュラトリーサイエンスの観点から、慎重に判断する。ドナーへの説明や同意取得については医療機関内の人材育成や説明内容に関する基準づくりの支援を行っていく。併せて、仲介機関にて商用利用を目的とした組織・細胞の提供に関する適切な倫理審査体制を構築することで、医療機関における倫理審査の負担を軽減する。医療機関において実施する倫理審査にて検討が必要な項目を文書化する等の支援を行う。また、ドナーに対して適切な説明を行うためのスタッフの教育が必要となる。文書による同意説明文書の各項目については、治験や臨床研究におけるClinical Research Coordinatorに準じた知識レベルに加え、商用利用を目的とした提供にあたっては権利に関する適切な説明を行う。また、ホームページを開設し、広く本計画の意義を伝え、再生医療等製品の製造における原材料の患者(医療機関受診者)からの提供の重要性を啓蒙する。

- A. 細胞仲介事業の運営管理
- B. 仲介コーディネート・発注
- C. 各機関への費用の支払い
- D. 契約手続き
- E. 商用利用のインフォームドコンセント取得支援
- F. 倫理委員会対応支援
- G. 細胞授受の情報管理
- H. 新規組織提供機関の開拓
- I. 社会的啓蒙（広報活動）
- J. ドナースクリーニング支援
- K. 臨床情報の匿名化にかかる支援
- L. ドナー再検査にかかる支援

図3 仲介機関の医療機関に対する役割

06 インフォームドコンセントについて

手術によって摘出された組織については発生頻度が不定期であるため、安定的な組織入手を望む事業者にとってリスクとなる。健常ドナーからの組織・細胞提供の可能性については、移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律の下、骨髄・末梢血幹細胞提供の枠組みが確立していること等も踏まえ

ながら、幅広い観点からの検討を行う(図4)。製造販売承認された再生医療等製品の製造を目的とする組織・細胞の採取は生原基第3の1(4)をすべて満たしている必要がある。ドナーへの組織・細胞提供についての説明・同意取得については、生原基第3の1(4)イに掲げる事項について説明及び同意を取得する。代諾者への説明・同意取得については、生原基第3の1(4)ウに掲げる事項について文書にて説明及び同意を取得することとなっており、代諾者の同意を得た場合には生原基第3の1(4)エにおいてドナーと代諾者の関係について記録を作成する。また、生原基第3の1(4)イ(ケ)及びウ(ケ)に定めるとおり特許権、著作権、その他の財産権、経済的利益の帰属について明示する必要があり、再生医療等製品の原料として商用利用されることを明示しつつも、そこから利潤が発生してもドナーのものとならないことをしっかり伝え、十分に理解を得られるよう配慮する。再生医療等製品の原料に関しては生原基第3の1(4)フにあるように、ドナーの組織・細胞提供は無対価であることが原則となっている。したがって、再生医療等製品の原料となる組織・細胞については、組織や細胞そのものに対する対価を生じさせないよう提供を受け、かつ、その入手方法を査察等の際に詳細に開示できるようにしておく。組織・細胞の提供時のみでなく、その後もドナーの個人情報を管理・追跡する必要がある場合は、そのことを説明・同意文書に記載する。ドナーの健康状態について、組織・細胞提供後のフォローアップの必要性やその期間についてもさだめていく。

事業者側にはドナーの情報が追跡できない組織・細胞を用いて製品化することで、ドナー由来の疾病の発症に対応できない等のリスクが生じる可能性がある。一方で、ドナー情報を長期に追跡することは大きなコストがかかり、ドナーの情報が複数の医療機関にまたがることも考えられる。また、細胞は環境要因による影響を受けて状態が変化することから、ドナーの健康状態と採取した組織・細胞の状態は必ずしも一致しない。提供組織・細胞自体に由来するリスクと継代等の作業の中で環境変化により発生するリスクがあるという点に留意が必要である。提供した組

- (ア) ヒト細胞組織原料等の使途
- (イ) ヒト細胞組織原料等の提供により予期される危険及び不利益
- (ウ) ドナーとなることは任意であること
- (エ) 同意の撤回に関する事項
- (オ) 提供をしないこと又は同意を撤回することにより不利益な取扱いを受けないこと
- (カ) ヒト細胞組織原料等の提供に係る費用に関する事項
- (キ) ヒト細胞組織原料等の提供による健康被害に対する補償に関する事項
- (ク) ドナーの個人情報保護に関する事項
- (ケ) 特許権、著作権その他財産権又は経済的利益の帰属に関する事項
- (コ) その他ヒト細胞組織原料等を用いる医薬品内容に応じ必要な事項

図4 ドナー本人に対し説明・同意する事項

組織・細胞に何らかの影響を与える問題や事象が発生した場合、例えば数年後にドナーが疾病を発症し、それが採取した当時の組織・細胞に影響を及ぼしている可能性が否定できない場合等において、当該情報の開示範囲、対応等の適切な体制の構築も考慮する必要がある。特に、新生児由来の組織の場合は既往歴が存在しないため、フォローアップが求められる可能性が高い。これらのフォローアップ体制の構築についてはどの範囲までが義務であるのか、努力義務の場合はどの範囲まで最低限トレーサビリティを確保すべきかということについて検討する。再生医療等製品の品質を担保するための情報は長期的に維持管理する必要がある。仲介機関がアクセス可能な情報（臨床情報といった個人情報）について整理し、長期間の情報追跡を可能とする。

07 仲介機関の製造販売会社に対する役割

細胞品質に関し、生原基第3の1(5)にて、品質及び安全性の確保に必要な情報について8項目が定められている。これらの情報を取得し、管理する体制を構築していく。また、再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令（以下、GCTP省令）第十一条第二十四号にて、再生医療等製品の原料となる組織・細胞について受入れ時の記録により、当該製品の製品標準書に照らして適切なものであることを確認するとともに、その結果に関する記録を作成し、これを保管することと定められている。当該規定に合致した、供給・管理体制を構築していく（図5）。

- A. 細胞の単離
- B. 細胞の品質検査
- C. 細胞・組織の保管
- D. 附帯情報の提供
- E. 細胞・組織の搬送

図5 再生医療等製品の製造販売企業に対する役割

08 製造販売企業の役割

製造販売企業として、提供機関-仲介機関、仲介機関-使用機関、仲介機関-ストック機関、仲介機関-輸送機関との契約書、依頼書が必要となる。免責事項及び機密保持契約の適用範囲については機関別に定めるべきである。例えば、ストックセンターについては、発送先（使用機関名）と物品に対しての機密保持、仲介機関については凍結細胞についての付随情報、使用機関名、など全体に渡る機密保持が必要となる。また、仲介機関、提供機関、使用機関における情報管理の内容、手順の確認が必要となる。

提供機関での経費、輸送費については、仲介機関でのコスト算出、使用機関へのチャージの検討が必要となる。費用積算根拠となる価格表の作成が必要となる。費用積算根拠は、ケースごとに異なる可能性がある。医療機関と仲介機関としての自立的な運用のためにも、適切な費用算定と運用プロセスの明確化は重要である（図6）。

- A. 組織提供を依頼
(組織の種類・加工の要否・検査内容のリクエスト)
- B. 細胞仲介機関への費用の支払い

図6 製造販売企業の役割

09 おわりに

ヒト同種体性幹細胞の原料の供給に係る主な課題である医療機関からの原料提供に関わる工程を中心に、課題を克服するための仕組み作りをわれわれは支援したい。これによりヒト同種体性幹細胞を用いた再生医療等製品の研究開発を促進する。医療機関からのヒト同種体性幹細胞原料の供給を促進するため、国内医療機関からのヒト細胞原料供給に関わる担当医師の負担軽減と商用利用可能な細胞原料の安定的な供給モデル体制を構築することを目指している。これにより再生医療等製品を製造する企業は細胞原料の入手の機会増加が見込まれ、再生医療産業の発展につながることが期待される。

化学合成可能な増殖因子代替化合物の開発

Development of synthetic surrogates of growth factors

植木 亮介 Ryosuke Ueki, PhD (Assistant professor)

東京大学大学院工学系研究科 助教
Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

山東 信介 Shinsuke Sando, PhD (Professor)

東京大学大学院工学系研究科 教授
Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

キーワード ... 増殖因子、アゴニスト、DNAアプタマー

01 はじめに ~増殖因子の再生医療応用と問題点~

細胞の増殖・分化や器官形成を制御するタンパク質として知られる増殖因子は、その独特の生理作用から再生医療分野において重要な役割を果たしている。例えば、褥瘡や皮膚潰瘍などの創傷治療において増殖因子の組換えタンパク質（例：トラフェルミン）が外用薬として利用されている。また、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞を体外で培養、あるいは特定の体細胞へ分化誘導する際に、培地中に増殖因子を添加して生体内のシグナルを模倣するアプローチが取られている。今後も再生医療における増殖因子の重要性は高まると考えられるが、マテリアルとしての観点から見ると増殖因子は多くの問題点を抱えている。一つに、組換えタンパク質である増殖因子の製造には生物宿主を用いた発現系が必要であり、一般的に製造コストは非常に高価となる。また、糖鎖修飾やジスルフィド結合の形成パターンにばらつきが生じ得るため、化合物としての均一性を担保するのが難しい。更に、活性の発現に重要なタンパク質の折りたたみ構造は熱的に不安定なことが多く、失活あるいはロット間で活性差が生じる原因となる。上記のように、組換えタンパク質は化学合成品と比べて製造コストや品質管理等の観点でいくつかの問題を抱えている。本稿では、これらの問題を解決するアプローチについて著者らの研究例を交えつつ紹介したい。

02 肝細胞増殖因子 (HGF)

肝臓の再生因子として知られる肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor; HGF) は、細胞膜上に発現する受容体Metの二

量体形成を誘起することでMetを活性化させ、肝細胞をはじめとする様々な細胞の増殖・アポトーシス阻害に繋がるシグナル伝達を誘起する（図1）¹⁾。このようなリガンド結合に伴う受容体の二量化は、多くの増殖因子に共通の活性化機構である。二量化した受容体は細胞内ドメインのリン酸化を受け、細胞内へのシグナル伝達を開始する。組換えHGFは、その生理作用から肝炎・肝硬変などの難治性肝疾患²⁾や、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 治療への応用が検討されている³⁾。最近では、HGF遺伝子をコードするプラスミド「コラテジェン（ベベルミノゲンペルプラスミド）」が国内初の遺伝子治療薬として条件・期限付き承認を得るなど、再生医療分野への応用が期待されている。一方で、複雑な構造を持つポリペプチドであるHGFは組換えタンパク質生産における高価な製造コスト、収率の低さ、熱安定性の低さが実用上の問題点となる⁴⁾。この問題を解決するべく様々なアプローチが試みられているが、本節ではHGFの断片ポリペプチドを利用したアプローチについて紹介する。

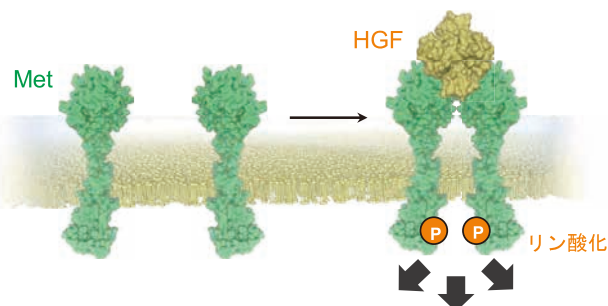


図1 肝細胞増殖因子 (HGF) による受容体 (Met) 二量化を介した細胞活性化

HGFはα鎖とβ鎖からなり、α鎖はN、K1、K2、K3、K4 ドメインから構成されている（図2a）。このうちNとK1ドメインからなる

NK1断片は弱いながらもMet活性化能を示すアゴニストとして機能することが知られている⁵⁾。一方で、NからK2ドメインからなるNK2断片はMet活性化能力を示さない。NK1は結晶構造においてNDドメインとK1ドメイン間のリンカー配列(図2b, 赤)を相互作用界面としたホモ二量体を構成している。一方でNK2単量体の結晶構造ではこのリンカー配列が構造内部に埋没することで二量体形成が妨げられていた(図2c, 赤)⁶⁾。つまり、このNDドメインとK1ドメイン間のリンカー配列の自己集合性が受容体二量化を介した活性化に必要であることを強く示唆している。ただし、NK1は受容体の活性化能は示すものの、HGFと同様に発現収量の低さや熱的な不安定性の問題を抱えている上、HGFと比較して受容体活性化能力が低いため、代替物質としての利用価値は低い。

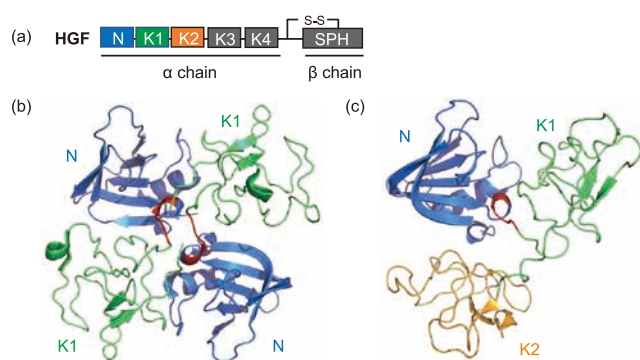


図2 HGFの構造とアゴニスト活性の相関
(a) HGF構造の概略図 (b) NK1および (c) NK2の結晶構造
(PDB ID: 2QJ2, 3HN4 を元に作図。
青:NDドメイン、緑:K1ドメイン、
橙:K2ドメイン、赤:N-K1ドメイン間配列)

この問題を解決すべく、Cochranらはイーストディスプレイ法によって高収率で発現可能、かつ高熱安定性のNK1変異体を取得することに成功している⁴⁾。具体的には酵母の細胞表層に発現するAga2pタンパク質にerror-prone PCRでランダム変異を導入したNK1を融合発現させた。こうして酵母の表層に提示されたNK1の変異体ライブラリは、FACSによって単離・配列解析することができる。変異体の中から高い発現量、Metへの高い結合能を示した変異体を解析したところ、熱安定性の指標である融解温度が20℃近く向上し、組換え発現での収率が40倍向上したNK1変異体の取得に成功している。更に、この高機能化されたNK1変異体の適切な位置にシステイン残基を導入することで、ジスルフィド結合によってホモ二量体を形成するNK1変異体の開発を報告している。この戦略により、HGFに匹敵する受容体活性化能力を示しながらも、高い熱安定性と高収率で発現可能なNK1変異体の開発に成功している。

一方、発現系に依存しない化学合成によるアプローチも低コスト化や品質の均質化という観点から非常に重要である。例えば、Vicogneらの研究グループでは化学合成とバイオコンジュゲーションによる機能的HGF断片の構築に成功している⁷⁾。彼らはビオチン修飾されたHGFのNDドメイン、K1ドメインを個別に化学合成し、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用によって多量化する戦略を採用している。NDドメイン、K1ドメインは固相合成された

複数のポリペプチド断片をChemical ligationによって連結することで合成されている。これらの生理活性を評価した結果、K1ドメイン/ストレプトアビジン複合体のみがMet活性化能力を示し、K1ドメインが受容体への相互作用に重要であることを示唆している。なお、この複合体は組換えNK1とほぼ同等の生理活性を示すことが確認されている。ただし、ホモダイマー形成能を失ったK1ドメインを集積化する目的でストレプトアビジンを利用しているため、未だ組換えタンパク質発現系に依存していることは注意が必要である。

03 DNAアプタマーからなるHGFの合成代替物

我々は、特定の高次構造に折りたたまれ、標的分子に選択的に結合する一本鎖DNA「DNAアプタマー」⁸⁾を用いた増殖因子の代替化合物の開発を進めている。DNAアプタマーは試験管内進化法と呼ばれる手法で取得することが可能である。本手法では1)ランダム配列のDNAライブラリを化学合成、2)標的分子に結合したDNA配列を単離、3)PCRによって増幅というサイクルを繰り返すことで、標的結合DNA配列を特定する(図3)。一般的にDNAアプタマーは20-100塩基程度の長さであり、ホスホロアミダイト法と呼ばれる固相合成法によって安価に化学合成可能である。また、DNA高次構造の熱変性は可逆的であり、タンパク質のように熱的な失活を起こす恐れが低い。

我々は、HGFと競合的にMetに結合する50塩基のDNAアプタマー⁹⁻¹⁰⁾を5'末端から直列に二分子連結し、アプタマー二量体(ss-0, 図3a)を合成、これがMetの活性化を誘導するアゴニストとして機能することを見出した¹¹⁾。DNAの相補鎖形成を利用してMet結合アプタマーを二量化した検証実験においても、アプタマーの二量化に依存した受容体活性化が見られたことから、受容体二量化を誘導するアプタマーの設計戦略の有効性が示された(lane 4, 図3b)。このアゴニスト活性を持つアプタマー二量体は受容体の活性化のみならず、HGF様の生理活性を示すことも確認されている。ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)の増殖試験において、アプタマー添加群はHGF添加群と同様にHUVECの増殖を促進した(図3c)。対照実験として、受容体への結合能を示さないアプタマーの逆配列(ss-0 Rev)を添加した場合には、有意な増殖の促進は見られなかったことから、アプタマー特異的な受容体への結合および二量化を支持している。

前述のように組換えHGFは肝炎・肝硬変治療薬としての応用が検討されているが、DNAアプタマーの医薬品応用においては生体内での安定性が問題となる。一般的に、DNAは血中の分解酵素(ヌクレアーゼ)により速やかに分解されてしまうため、全身投与の際には化学修飾による安定化を施すことが望ましい。しかし、50%ウシ胎児血清(FBS)中での評価において、コントロール核酸が1時間ほどでほぼ完全に分解したのに対し、我々の開発したアプタマー二量体は24時間後も一部が完全長のまま残存するほどの強い酵素分解耐性を示した¹²⁾。検討の結果、このアプタマー二量体の独特の折りたたみ構造によって、酵素分解への耐

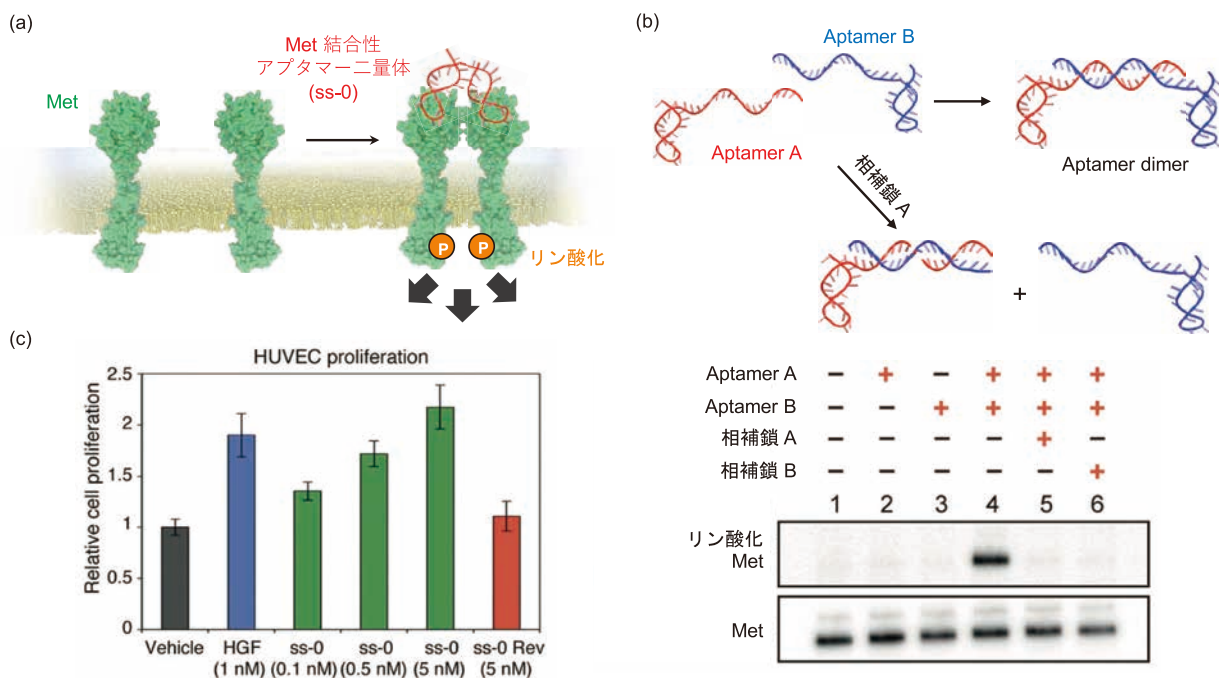


図3 HGF代替化合物として機能するDNAアプタマーの設計と生理作用
(a)アプタマー二量体による受容体活性化
(b)相補鎖形成を介したアプタマー二量体形成と受容体活性化能の相関
(c)ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の増殖試験結果(Adapted with permission from Reference 11.)

性が向上していることが判明した。このアプタマーをマウスに尾静脈投与したところ、肝臓組織におけるMetの活性化が確認され、投与されたアプタマーの一部が機能を保ったままの形で肝臓へ移行していることが示唆された。肝炎マウスモデルを用いた実験においても、アプタマー投与で肝細胞のアポトーシス抑制を示唆する結果が得られている¹²⁾。このように、本アプタマーは細胞レベル、および個体レベルでの生理活性が確認されており、化学合成可能なHGF代替物質としての応用が期待される。

04 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)

次に、著者らの研究グループでは塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factors; 以下bFGF) の代替化合物の開発に着手した (図4a)。bFGFのシグナル伝達はヒトES細胞・iPS細胞などの多能性幹細胞の未分化状態維持に重要な役割を果たすため、培地の添加物として用いられている。例えば、2011年Thomsonらは、血清などの夾雑物質を含まず、既知成分のみから構成されたiPS細胞培養用培地を報告しているが、この培地に含まれる組換えタンパク質はbFGF、TGF- β 、トランスフェリン、インスリンのみである¹³⁾。先に紹介したHGFとは異なり、bFGFは大腸菌で簡便に発現可能であるが、そのままの状態では生理条件下での安定性が低く、Thomsonらの報告によると細胞培養条件で24時間後にはほぼ活性を失う¹⁴⁾。そのため、bFGFの安定化剤や、安定な代替化合物の開発は重要な課題である。

bFGFは高度に硫酸化された天然多糖であるヘパリンと相互作用することで安定化することが知られており、保管や使用の際にヘパリンと共存させることで活性持続時間を延長することが

できる¹⁴⁾。ただし、ヘパリン自体が生物由来の製造原料を用いているため、不純物の混入リスクや脱硫酸反応による品質の不均一性の問題を抱えている。Maynardらは、ヘパリン模倣材料としてポリエチレングリコール (PEG) を側鎖に持つメタクリル酸メチルユニットとスチレンスルホン酸の共重合ポリマー p(SS-co-PEGMA) を設計した (図4b)¹⁵⁾。このポリマーをbFGF上のシステイン残基とジスルフィド結合を介して結合して得られた複合体は、様々な保管環境において安定性が向上していることが示された。例えば、55℃で30時間の熱処理、1%トリフルオロ酢酸溶液中で2時間の酸処理、トリプシン存在下で16時間の酵素消化条件において、組換えbFGFがほぼ完全に失活したのに対し、bFGF/ポリマー複合体は生理活性を維持していた。重要なことに、このbFGF/ポリマー複合体は一般的な組換えbFGFと同等の生理活性を示したことから、ポリマー修飾はFGF受容体との相互作用やシグナル伝達を阻害しないことが示唆されている。これまで組換えタンパク質へのPEG修飾によって体内動態を改善するアプローチは一般的であったが、この報告ではヘパリン模倣ポリマーによって組換えタンパク質の安定性向上が可能であることを初めて示している。

bFGFの抱える問題点を根本的に解決する方法として、化学合成可能で安定な代替化合物の開発はより魅力的である。HGFと同様、bFGFも部分断片を利用するアプローチがいくつか報告されている。具体的には、bFGFの受容体との相互作用部位である、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 11$ - $\beta 12$ 領域に由来するペプチドであるCanofinなどが報告されている (図4a, c)¹⁶⁾。これらの断片は10アミノ酸程度のペプチドであるため化学合成可能であるが、残念ながらbFGFに匹敵する強い活性を示す断片配列は未だ報告されていない。

05

bFGF代替アプタマーの開発

我々は、bFGF代替アプタマー開発のため、ヒトES細胞に発現し、bFGFと高親和性を示す受容体FGFR1を標的としたDNAアプタマーの取得を行なった¹⁷⁾。40塩基のランダム配列を含むDNAライブラリを合成し、これをFGFR1の細胞外ドメインと抗

体のFc領域を融合させたタンパク質と混合した。この融合タンパク質はProtein G修飾磁気ビーズに結合するため、磁石を用いて簡単にFGFR1結合配列を単離できる。6回の選別・増幅過程を繰り返した後にシーケンス解析を行い、いくつかの候補配列を特定した。配列の結合活性評価と最小化を行なった結果、FGFR1に約10 nMの解離定数で結合する38塩基のDNA配列SL38.2を特定した(図5a)。

このアプタマーを受容体を活性化するアゴニストへ変換する

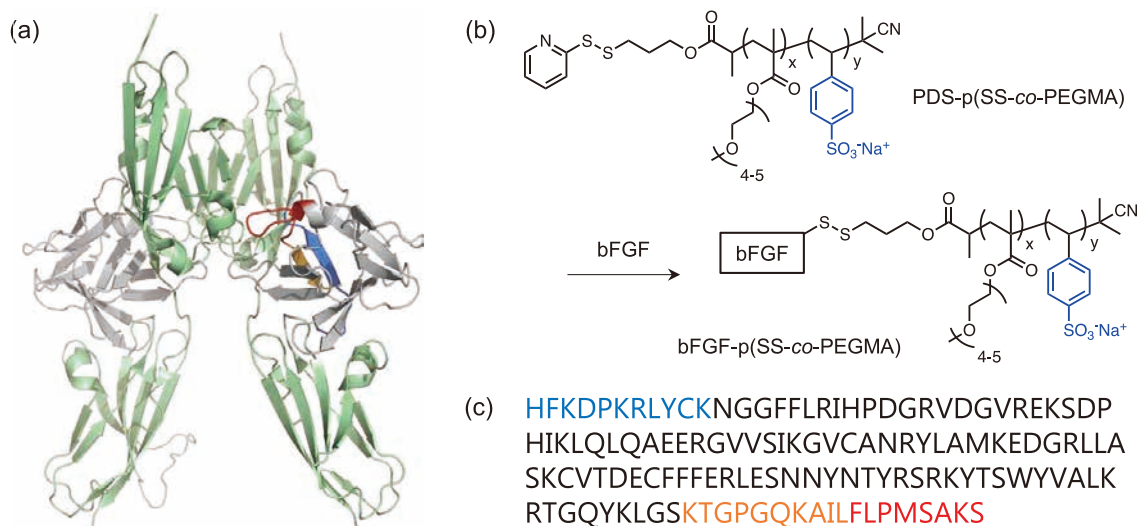


図4 bFGFの安定化、および機能的断片の化学合成を志向したアプローチ

(a) bFGF/FGFR1の2:2複合体の結晶構造 (PDB ID: 1FQ9) を元に作図。緑:FGFR1、灰:bFGF、青:Canofin 1、橙:Canofin 2、赤:Canofin 3
(b) ヘパリン模倣ポリマーp(ss-co-PEGMA)の構造とbFGFへのコンジュゲーション
(c) bFGF配列中のCanofin部分。文字色は図4aと対応。

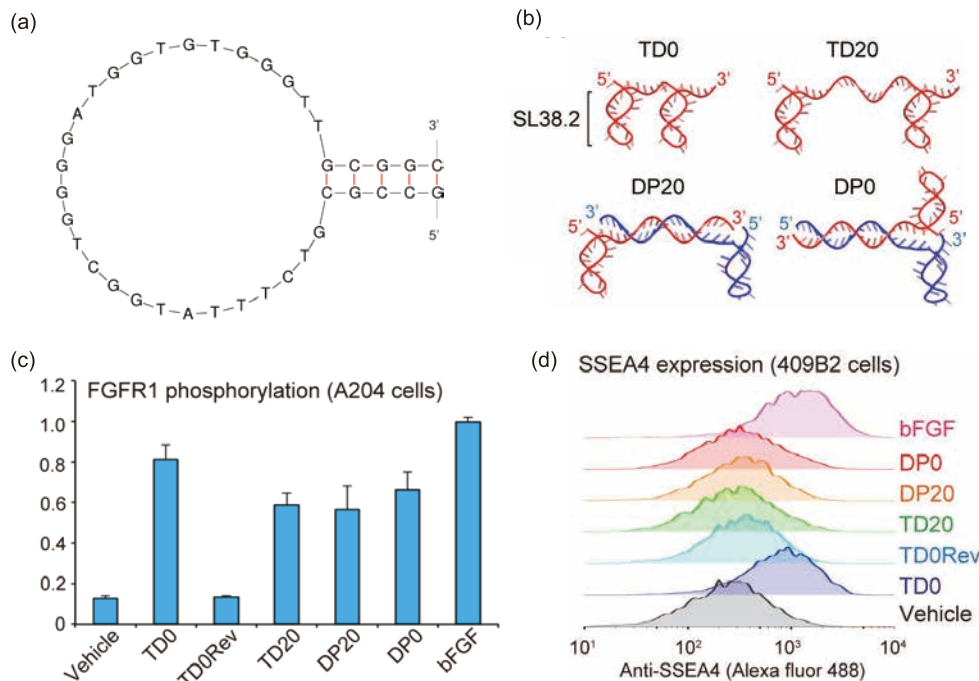


図5 bFGF代替化合物として機能するDNAアプタマーの設計と生理活性

(a) FGFR1結合性アプタマーSL38.2の配列と予測二次構造

(b) 設計したアプタマー二量体の概念図。TDXはX塩基の一本鎖リンカーを介してアプタマーを直列に二分子連結。

DPXはアプタマーをX塩基隔てて20塩基の相補鎖形成で二量化。

(c) FGFR1発現細胞を用いた受容体リン酸化量の評価

(d) ヒトiPS細胞を1週間培養した後の未分化マーカー(SSEA4)の発現量比較 (Adapted with permission from Reference 17.)

目的で、数種類のアプタマー二量体を設計した。5'末端から直列に二分子連結した設計や、DNA相補鎖形成を利用して二量体を形成させる設計を考案した(図5b)。これらの設計はそれぞれ、二つのアプタマー間の距離・配向性が変化しており、受容体の活性化に最適な二量化状態をスクリーニングすることができると考えた。設計したアプタマー二量体をFGFR1発現細胞に作用させ、受容体活性化レベルを評価したところ、いずれの設計でも受容体リン酸化の上昇が確認された(図5c)。特に、アプタマーを直列に二分子連結したアプタマー二量体(TD0)が最も高い活性を示した。次に、iPS細胞の未分化維持培養へ応用できるか検証するため、これらアプタマー二量体をbFGF不含培地へ添加してiPS細胞培養を行なった。培養開始から1週間後にiPS細胞の未分化マーカーの一つであるSSEA4の発現量を評価した結果、興味深いことにTD0のみがSSEA4の発現を維持しており、それ以外のアプタマーはbFGF非添加群とほぼ同等のレベルまでSSEA4発現量が低下していた(図5d)。FGFR発現株を用いた受容体活性化の評価では、いずれのアプタマーもアゴニストとして機能していたが、TD0のみが未分化マーカーの発現を維持したのは予

想外の結果であった。恐らく、アプタマーの二量化様式によって、細胞内シグナル伝達の様式に変化が起きていると考えられる。

TD0添加培地で1週間培養したiPS細胞について、更に評価を行なったところ、細胞が形成するコロニーの形態はbFGF存在下で培養した際の形態と類似しており、蛍光標識抗体を使った染色結果においても、コロニー全体からSSEA-4の発現が確認された(図6)。一方、対照サンプルであるTD0の逆配列(TD0Rev)を添加した培地で培養した場合は、bFGF非添加の際と類似した形態を示しており、SSEA4の発現も大幅に低下していた。定量PCRで未分化マーカーの一種であるOCT4の発現量を評価した結果でも同様の傾向が見られた。ただし、今回開発したアプタマーTD0添加培地で培養を継続した際には、未分化マーカーの緩やかな発現低下が確認されており、bFGF存在下で培養された細胞の状態と必ずしも一致しない可能性が示唆されている。この原因は未解明ではあるが、アプタマーの再進化による活性向上や、シグナル阻害剤との併用などのアプローチによって、bFGF添加培地で培養されたiPS細胞の表現型により近づくことが可能かもしれない。

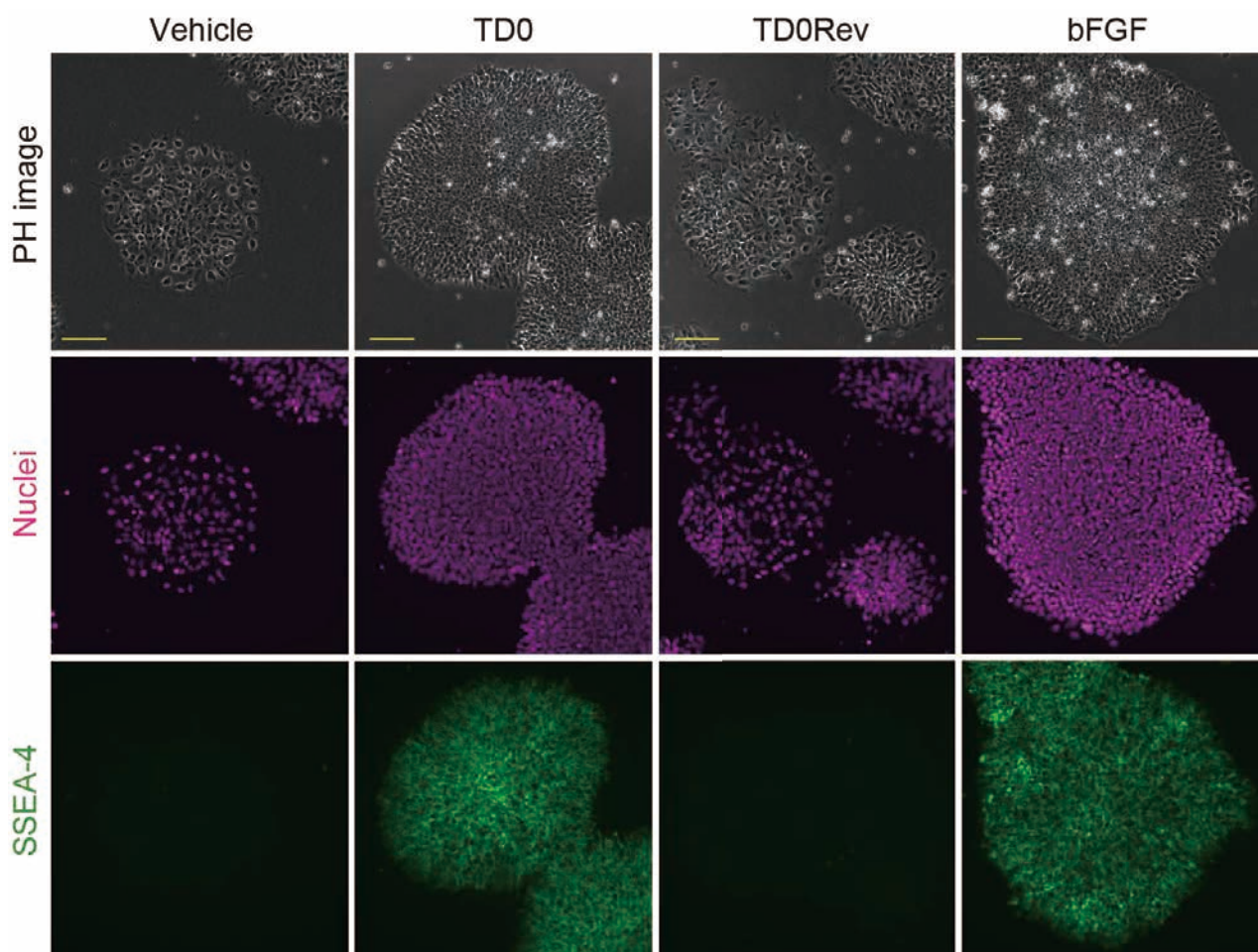


図6 ヒトiPS細胞を1週間培養した後の未分化マーカー(SSEA4)の発現。
上から位相差像、核染色(マゼンタ)、未分化マーカー SSEA4(緑)を表す。(Adapted with permission from Reference 17.)

本稿では、増殖因子の組換えタンパク質が抱える問題点と、その解決に向けたアプローチについて紹介した。我々の研究グループでは化学合成可能なDNAに着目して増殖因子代替化合物の開発を進めているが、進化工学的手法を利用することで、ペプチドなど他の分子から構成される受容体アゴニストの開発も可能である。例えば、今回紹介したHGFについては東京大学の菅らのグループが独自のスクリーニング系を用いて、Metに結合する特殊環状ペプチドを取得し、アゴニスト化に成功している¹⁸⁾。これら核酸・ペプチドからなるアゴニストは、その物性や生理活性に応じて、種々の目的への応用が可能であると期待される。DNAに基づいたアゴニスト設計の利点としては、ワトソン-クリック塩基対形成の選択性によって、二次構造を比較的容易に予測可能であることが挙げられる。これにより、目的の構造や特性を示すアゴニストを合理的に設計することができる。実際に我々のグループでは、アプタマー二量体の配列設計によって、受容体の活性化能を制御可能であることを見出した¹⁹⁾。この手法により、天然の増殖因子とは異なる受容体の活性化レベルを人為的に誘導し、細胞機能の精密な制御が可能であることを報告している。増殖因子が示す再生機能は多面的であり、様々な細胞種の増殖や分化を誘導するため、がん化などの副作用を引き起こすリスクが懸念されている。このようなアゴニスト活性の精密制御は、将来的に安全な再生医療の実現に貢献する分子技術となると期待される。

参考文献

- 1) K. Matsumoto, H. Funakoshi, H. Takahashi, K. Sakai, *Biomedicines* **2**(4), 275-300 (2014).
- 2) A. Ido, A. Moriuchi, M. Numata, T. Murayama, S. Teramukai, H. Marusawa, N. Yamaji, H. Setoyama, I. D. Kim, T. Chiba, S. Higuchi, M. Yokode, M. Fukushima, A. Shimizu, H. Tsubouchi, *J. Transl. Med.* **9**, 55 (2011).
- 3) 東北大学医学部神経内科, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を対象とした肝細胞増殖因子 (HGF) の第II相試験, <http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/hgf-als.html> (参照 2020-02-10).
- 4) D. S. Jones II, P. C. Tsai, J. R. Cochran, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**(32), 13035-13040 (2011).
- 5) W. D. Tolbert, J. Daugherty, C. Gao, Q. Xie, C. Miranti, E. Gherardi, G. Vande Woude, H. E. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(37), 14592-14597 (2007).
- 6) W. D. Tolbert, J. Daugherty-Holtrop, E. Gherardi, G. Vande Woude, H. E. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**(30), 13264-13269 (2010).
- 7) C. Simonneau, B. Leclercq, A. Mougél, E. Adriaenssens, C. Paquet, L. Raibaut, N. Ollivier, H. Drobecq, J. Marcoux, S. Cianférani, D. Tulasne, H. de Jonge, O. Melnyk, J. Vicogne, *Chem. Sci.* **6**(3), 2110 (2015).
- 8) J. Zhou, J. Rossi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 181-202 (2017).
- 9) A. Boltz, B. Piater, L. Toleikis, R. Guenther, H. Kolmer, B. Hock, *J. Biol. Chem.* **286**(24), 21896-21905 (2011).
- 10) R. Ueki, S. Sando, *Chem. Commun.* **50**(86), 13131-13134 (2014).
- 11) R. Ueki, A. Ueki, N. Kanda, S. Sando, *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**(2), 579-582 (2016).
- 12) R. Ueki, S. Uchida, N. Kanda, N. Yamada, A. Ueki, M. Akiyama, K. Toh, H. Cabral, S. Sando, *Sci. Adv. Accepted*.
- 13) G. Chen, D. R. 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, *Nat. Methods* **8**(5), 424-429 (2011).
- 14) G. Chen, D. R. Gulbranson, P. Yu, Z. Hou, J. A. Thomson, *Stem Cells*, **30**(4), 623-630 (2012).
- 15) T. H. Nguyen, S. H. Kim, C. G. Decker, D. Y. Wong, J. A. Loo, H. D. Maynard, *Nat. Chem.* **5**, 221-227 (2013).
- 16) S. Li, E. Bock, V. Berezin, *Int. J. Mol. Sci.* **11**(6), 2291-2305 (2010).
- 17) R. Ueki, S. Atsuta, A. Ueki, J. Hoshiyama, J. Li, Y. Hayashi, S. Sando, *Chem. Commun.* **55**(18), 2672-2675 (2019).
- 18) K. Ito, K. Sakai, Y. Suzuki, N. Ozawa, T. Hatta, T. Natsume, K. Matsumoto, H. Suga, *Nat. Commun.* **6**, 6373 (2015).
- 19) R. Ueki, M. Akiyama, S. Sando, *Preprint in ChemRxiv* <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.9703013.v1> (参照 2020-02-10).

再生医療製品向け新規ウシ血小板溶解物 「NeoSERA®」開発と医療応用

Development and clinical application of a new adult bovine-derived platelet lysate "NeoSERA" for regenerative medical products

山原 研一 Kenichi Yamahara (Associate Professor)

兵庫医科大学 先端医学研究所 医薬開発研究部門 准教授
Laboratory of Medical Innovation, Institute for Advanced Medical Sciences, Hyogo College of Medicine

浜田 彰子 Akiko Hamada (Researcher)

兵庫医科大学 先端医学研究所 医薬開発研究部門 研究員
Laboratory of Medical Innovation, Institute for Advanced Medical Sciences, Hyogo College of Medicine

藤盛 好啓 Yoshihiro Fujimori (Professor)

兵庫医科大学 先端医学研究所 医薬開発研究部門 教授
Laboratory of Medical Innovation, Institute for Advanced Medical Sciences, Hyogo College of Medicine

梅沢 晃 Ko Umezawa (Division Manager)

株式会社ジャパン・バイオメディカル 事業部長
Japan Biomedical Co., Ltd.

須藤 稔太 Toshita Sudo (CEO)

株式会社ジャパン・バイオメディカル 代表取締役
Japan Biomedical Co., Ltd.

キーワード ... 品質、GMP、日本薬局方、原材料管理

01 はじめに

我々は、新しい再生医療向け原材料として、胎児ウシ血清 (Fetal Bovine Serum:以下、FBS)に代わる、安全性・安定性・品質を高め、独自開発した国産ウシ血小板溶解物「NeoSERA®」を開発している。同時に、NeoSERA®を原材料とするヒト羊膜由来間葉系幹細胞 (以下、羊膜MSC)の製剤化と急性GVHD (移植片対宿主病)およびクローン病に対する医師主導治験を開始した (UMIN試験ID UMIN000029945、UMIN000029841)^{1,2)}。本稿では、NeoSERA®開発の経緯とその特徴、再生医療を中心とした医療応用の可能性を概説する。

02 NeoSERA®の開発経緯

FBSは、細胞培養技術を用いて製造されるワクチンなどの医薬品及び再生医療等製品向けに、細胞培養用添加剤のスタンダードとして汎用されている。しかし、1980年代後半英国から始まった牛海綿状脳症 (Bovine spongiform encephalopathy:

以下、BSE)の発生は、FBSの生産に影響を及ぼした。2001年の我が国でのBSE発生報告を契機に、医薬品等の安全性を確保するため、2003年から生物由来原料に対し、細菌やウイルス等の安全性確保のための基準 (「生物由来原料基準」 (平成15年5月20日厚生労働省告示第210号))が定められることとなった。同基準では、医薬品等向けの反すう動物に由来する原材料に関し、地理的BSEリスク評価に基づき、原産国が規定された。この結果、BSEが発症した我が国は利用可能な原産国ではなくなり、我が国でも一部実施されていた細胞培養用途のウシ血清の製造は途絶えることとなった³⁾。

その後、発生経路となる飼料の規制強化等によりBSEの発生は1992年をピークに大幅に減少し、2016年には年間2頭の発生まで減少しており (国際獣疫事務局 World Organisation for Animal Health:以下、OIE HPより⁴⁾)、BSEリスクは世界的に大幅に低下している。2013年5月OIEは日本や米国等を新たにBSEの「無視できるリスク国」に指定し、2014年の生物由来原料基準の改定 (平成26年9月26日厚生労働省告示第375号)では、反すう動物由来原料等の利用可能な原産国を、OIEの指定するBSEが「無視できるリスク国」としたことで、現状国産のウシ血清が医薬品や再生医療等製品の原材料として使用できる状況にある。

現在我が国で上市されている再生医療等製品のうち、ジェイス、ジャック、テムセル、ハートシートといった多くの製品で、その原材料としてFBSを使用している⁵⁾。この理由は、FBSが細胞培養用添加剤のスタンダードであることに加え、細胞培養コストが無血清培地よりも低額であることも理由と考えられる。しかしながら、FBSは不特定多数の胎児ウシの血液抽出物であり、場合によっては感染胎児由来のウシ血液の混入もあり得ることから、①BSE原因であるプリオン混入のリスク、②ロット差、③結果、細胞増殖性が劣る、といった、①安全性、②安定性、③品質における問題点が以前から指摘されている。また、胎児ウシからという、倫理的に大きな問題のある手法により採取されていることもクローズアップされている⁶⁾。

これらの背景を踏まえ、我々は国産の成牛の血液を加工することにより、FBSの欠点をすべて打ち消す、①安全、②安定、③高品質な、医薬品・再生医療等製品向け血清の開発を目指した。ヒントとなったのは、増殖因子を豊富に含む、ヒト血液由来の血小板溶解物である。ヒト血小板溶解物は、ヒト細胞、特にMSCの培養用添加剤としての使用が多数報告されている他⁷⁾、多くの製品が市販されている⁸⁾。そこで我々は、成牛から血小板を抽出し、血清化处理を施した国産ウシ血小板溶解物「NeoSERA®」を開発し(特許第6212723号)、その製造販売を手がける株式会社ジャパン・バイオメディカルを立ち上げた(<https://www.japan-biomedical.jp>)。

NeoSERA®の安全性は、ジャパン・バイオメディカルの専用牛舎にて、獣医による定期的な健康確認を受け、管理された成牛から採取された血液を原料として製造することで、完全なトレーサビリティを実現している。また、アメリカ合衆国農務省(United States Department of Agriculture:USDA)規則9CFR§113.420および欧州医薬品庁(European Medicines Agency:EMA)規則EMA/CVMP/743/00に従い、ウイルス不活化を含む滅菌を目的に30kGy以上のγ線照射を実施しており、生物由来原料基準の規程を満たす安全な細胞培養用血清である(平成29年4月17日 医薬品医療機器総合機構(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency :以下、PMDA)再生医療等製品材料適格性確認書取得 薬機審長発第0417002号)。

また、安定性は、単一プロトコルにて、少数の成牛からの繰り返し採血から得られた血小板溶解物をプールした上で分注製造することにより、ロット間差を最小限にしている。品質に関しても、採血から分注まで閉鎖系(分注のみ安全キャビネットでの操作)にて製造することで無菌性を担保し、常にエンドトキシンは検出感度以下であり、コンタミネーションによる品質低下は皆無としている。

03

NeoSERA®を用いた細胞培養

NeoSERA®の使用に関し、注意すべき点はFBSと大きな差はなく、MEM等の基礎培地への添加剤(～10%)として細胞培養に

用いることを推奨している。特にMSCについては、ヒト血小板溶解物同様、その増殖性は旺盛であり、5%程度の添加でFBSと同等の増殖を認めることが多い。

一方、NeoSERA®使用の主な注意点として、以下が挙げられるが、詳細は<https://www.japan-biomedical.jp/how-to-use-neosera>を参照してほしい。

- ①NeoSERA®は解凍により沈殿物が析出することがあるが、製品の品質には問題なく、気になるようであれば、遠心や0.22μmフィルター操作で除去を行う。
- ②FBSからNeoSERA®への変更は、3継代程度の馴化操作が必要である。具体的には、FBSとNeoSERA®の混合比率を3継代の間に75%:25%→50%:50%→25%:75%と段階的に変化させる方法を推奨している。馴化の際、細胞の増殖が速くなった場合であっても継代時の播種密度は大きく変更することなく、細胞をよく観察し、適切な継代のタイミングを決めることをおすすめしたい。

04

NeoSERA®の性能

NeoSERA®の主成分である血小板溶解物は、Platelet-derived growth factor (PDGF)、Transforming growth factor β (TGF-β)、Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、Epidermal growth factor (EGF)等の増殖因子が豊富に含まれており⁹⁾、細胞培養用添加剤として相応しい。そこで、再生医療分野で広く検討されているヒトMSCおよびワクチン製造に汎用されている細胞株について、NeoSERA®の性能に関しFBSと比較検討した。

《ヒトMSCにおけるNeoSERA®による増殖性》

ヒト骨髄MSCおよびヒト羊膜MSCにおいて、NeoSERA®およびFBSをそれぞれ10%添加したαMEMにて培養し、増殖曲線を作成した。培養7日目の培養写真・増殖曲線を図1に示す。

ヒト骨髄MSCおよびヒト羊膜MSCの培養写真(図1(A)(B))において、FBSおよびNeoSERA®で培養した細胞の形態に明確な差は認めなかった。増殖曲線(図1(C)(D))の結果から、ヒト骨髄・羊膜MSCの培養において、NeoSERA®はFBSよりも高い増殖性を有することが示されたことから、細胞製剤化におけるメリットである、短時間で多くの細胞を得ることが期待される。

《ワクチン製造用細胞株におけるNeoSERA®による増殖性》

細胞バンクより入手したアフリカモドリガル腎臓由来細胞株Vero細胞およびヒト胎児肺由来細胞株MRC-5細胞において、NeoSERA®(3ロット)およびFBSを細胞株のデータシートに基づき推奨される基礎培地に添加し培養を行い、増殖曲線を作成した。培養4あるいは5日目の培養写真・増殖曲線を図2に示す。

VeroおよびMRC-5の培養写真(図2(A)(B))において、FBS

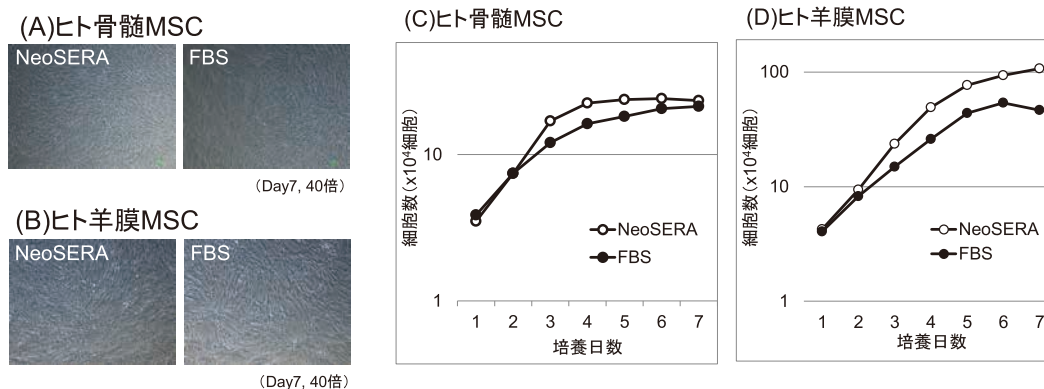


図1 NeoSERA®およびFBS添加によるヒト骨髄・羊膜MSCにおける増殖性
(A) ヒト骨髄MSC培養写真 (NeoSERA®, FBS: それぞれ40倍)
(B) ヒト羊膜MSC培養写真 (NeoSERA®, FBS: それぞれ40倍)
(C) ヒト骨髄MSC増殖曲線 (片対数)
(D) ヒト羊膜MSC増殖曲線 (片対数)

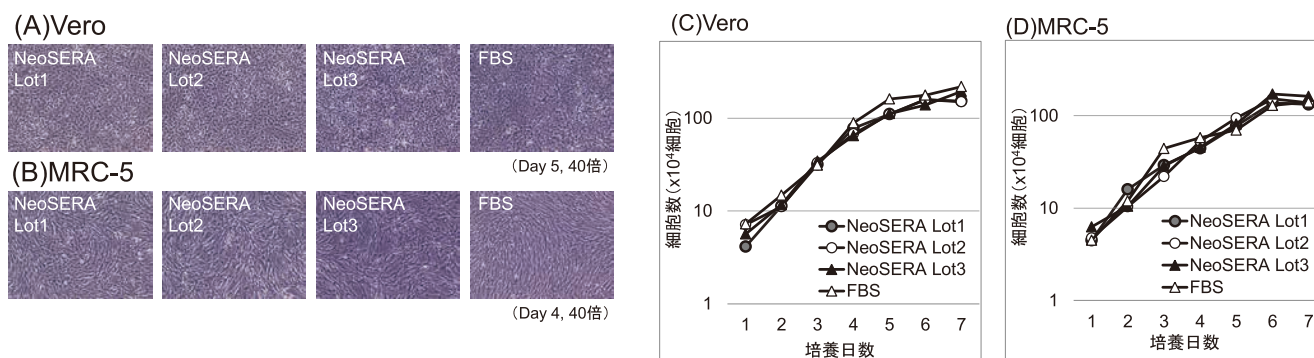


図2 NeoSERA®およびFBS添加によるVero・MRC-5における増殖性
(A) Vero培養写真 (NeoSERA® 3ロット、FBS: それぞれ40倍)
(B) MRC-5培養写真 (NeoSERA® 3ロット、FBS: それぞれ40倍)
(C) Vero増殖曲線 (片対数)
(D) MRC-5増殖曲線 (片対数)

およびNeoSERA®で培養した細胞の形態に明確な差は認めなかった。増殖曲線(図2(C)(D))の結果から、3ロットのNeoSERA®とFBSとの間に増殖性の差を認めなかった。

05 NeoSERA®を原材料とした羊膜MSC製剤開発

我々はこれまでの基礎的研究において、羊膜MSCが強力な免疫・炎症抑制効果を有することを示してきた^{10,11)}。例えば、急性移植片対宿主病 (Graft versus host disease: 以下、GVHD) モデルを用いた評価において、ヒト羊膜MSCの静脈内投与は急性GVHDの病態を改善することを示し、その理由の1つに羊膜MSCが有する高いプロスタグランジンE2産生能が考えられた¹²⁾。また、その発症に免疫学的機序が関与する炎症性腸疾患については、デキストラン硫酸ナトリウム投与によるモデル動物

において、羊膜MSCの静脈内投与が治療効果を示すことを見いだしている¹³⁾。

我々は、これら急性GVHDおよびクローン病モデルにおける非臨床試験の結果を踏まえ、羊膜MSCの製剤化と急性GVHD・クローン病に対する臨床試験実施をめざし、細胞調製施設での羊膜MSCの大量培養技術開発に着手した。1つ目の課題として、羊膜MSCの単離法の確立が必要であった。羊膜は羊水側からみて、基底膜に裏打ちされる一層の上皮細胞と、その下にある細胞外基質層があり、細胞外基質には羊膜1gあたり100万個以上のMSCが含まれる。そこで、羊膜から羊膜MSCのみを効率的に採取する方法として、基底膜を壊さない程度に細胞外基質のみを分解できる酵素の配合を決定し、知財化した(図3、特許第6512759号)。この酵素配合で羊膜を処理することにより、上皮細胞+基底膜は残る一方、MSCは酵素液に浮遊した状態となり、メッシュにて簡単に上皮細胞とMSCを分離することが可能とな

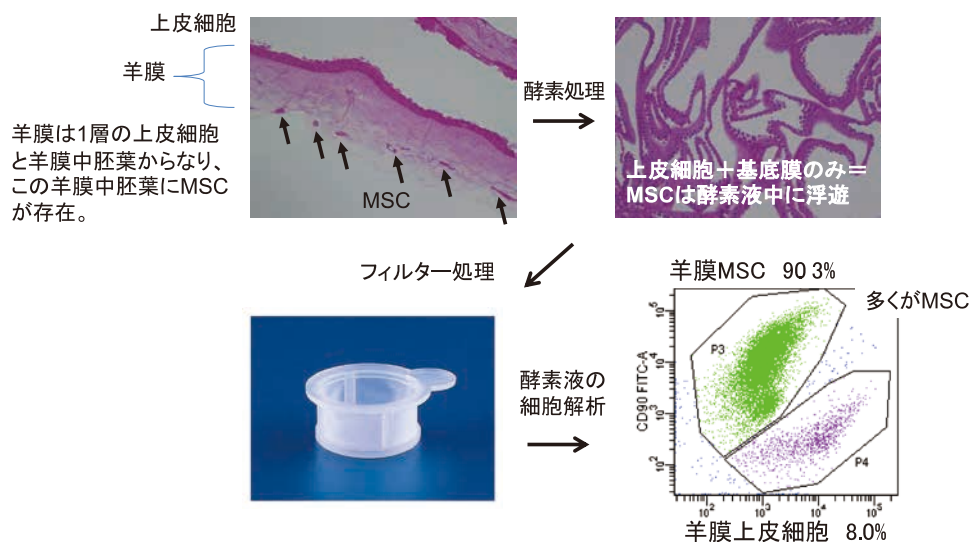


図3 羊膜MSCの分離



図4 NeoSERA®を原材料とした羊膜間葉系幹細胞の製剤化

り、FACSによるソーティングといった特別な操作なしに、遠心機のみで簡単に羊膜MSCのみ純化することに成功した。

2つ目の課題として、羊膜MSCの大量培養法の確立があった。まず、PMDA薬事戦略相談(現RS戦略相談)にて羊膜MSCの治験製品化に向け、概要書内容、特に原材料に関する相談から始まった。当時は旧薬事法の時代であり、再生医療等製品に対する明確なルールが十分には整備されておらず、更に著者にとって初めての経験ばかりで、手探りの状態であった。特に最も苦労したのは生物由来原料基準である。以前の同基準に関し、前述のごとく、羊膜MSCの原材料であるウシ血清はBSEを考慮し原則オセアニア産に限られること、更に無菌性、特にウイルスに関する規程が明確でなく、どのような資料をそろえれば良いかわからず、苦労した。結果的に、このときの努力・知識のお陰で、NeoSERA®を開発することに成功し、これを原材料とする羊膜MSC製剤の開発につながった。とりわけ、製法確立において、ロット差が無く、

細胞増殖性に優れたNeoSERA®を用いることで、FBSと比較し、①ロットチェックが不要、②製造工程が短期化、③大量培養が可能となり、大量製造が容易な製法の確立につながった(図4)。

06 羊膜MSC製剤の急性GVHD・クローン病に対する第I/II相医師主導治験と大学発ベンチャーの創業

このような流れの中で、試験名「同種造血幹細胞移植後に発症したステロイド抵抗性急性移植片対宿主病(急性GVHD)を対象としたAM01(羊膜由来間葉系幹細胞)の第I/II相試験」に関する治験実施計画を確定し、兵庫医科大学病院臨床研究審査委員会の承認(承認番号217851号)を経て、2017年11月厚生労働大臣に治験届を提出した(UMIN試験ID:UMIN000029945)。また、同時に計画していたクローン病に対する治験「既存治療で効果不十分の中等症の活動期クローン病患者を対象としたAM01

(羊膜由来間葉系幹細胞)の第I/II相試験」も同年9月に治験届を提出するに至った(UMIN試験ID:UMIN000029841)。

治験の概要であるが、既存の治療に抵抗性の、造血幹細胞移植後の急性GVHD・クローン病患者に対しAM01の静脈内投与を行い、その安全性評価を主たる評価とし、有効性を副次評価することを目的とする。投与方法は、AM01を下記の投与量に従って、急性GVHDは0日目、7日目、14日目、21日目に、クローン病は0日目、7日目のみ点滴で静脈内投与する。

低用量群 1.0×10⁶ 個 /kg :0、7、(14、21)日目

高用量群 4.0×10⁶ 個 /kg :0、7、(14、21)日目

用量は低用量群から開始し、少なくとも3例の低用量群での安全性に関し、独立した組織である効果安全性評価委員会にて確認された後に高用量群へ移行し、高用量群での安全性を確認することとしている。

羊膜MSC AM01を用いた急性GVHD・クローン病に対する医師主導治験であるが、他家MSCということもあり、治験継続には多額の資金が必要である。そこで、治験の円滑な実施、更には羊膜MSC AM01製剤の製造・研究開発サポートを目的としたベンチャー会社として2018年2月に株式会社シーテックスを立ちあげ、同年4月には兵庫医科大学初・発ベンチャーとしての認定を受けた(<https://www.c-tex.jp>)。今後、増資による資金を活用し、治験製品AM01の円滑な製造を目指すと共に、急性GVHD・クローン病以外の疾患への応用¹⁴⁾、再生医療等製品として早期の製造販売承認取得を進めていきたい。

07 NeoSERA®の今後

細胞培養技術を用いて製造される医薬品・再生医療等製品において、NeoSERA®を原材料とすることで、我々の羊膜MSC製剤のように、製品の安全性の強化、培養期間の短縮による低コスト化を実現できるものと考えており、我が国だけでなく世界展開を視野に、積極的な販売展開を行っていきたくと考えている。現在、NeoSERA®のGMP製造化、更には豪州産の製造に取り組んでおり、近い将来、製品化される予定である。NeoSERA®をFBSの代替品として幅広い研究者・技術者に使用して頂き、我々にフィードバックを頂くことで、よりよい製品になるものと考えており、ご協力頂ければ幸いです。

引用文献

- 1) S. Otagiri S, S. Ohnishi S, A. Miura A, et al. Hayashi, I. Kumagai, Y. M. Ito, T. Katsurada, S. Nakamura, R. Okamoto, K. Yamahara, K. Y. Cho, T. Isoe, N. Sato, N. Sakamoto., Evaluation of amnion-derived mesenchymal stem cells for treatment-resistant moderate Crohn's disease: study protocol for a phase I/II, dual-centre, open-label, uncontrolled, dose-response trial. *BMJ Open Gastroenterol* 52018;5; e000206 (2018).
- 2) K. Yamahara K, A. Hamada A, T. Soma T, R. Okamoto, M. Okada, S. Yoshihara, K. Yoshihara, K. Ikegame, H. Tamaki, K. Kaida, T. Inoue, Y. Ohsugi, H. Nishikawa, H. Hayashi, Y. M. Ito, H. Iijima, S. Ohnishi, D. Hashimoto, T. Isoe, T. Teshima, H. Ogawa, N. Sato, Y. Fujimori, et al. Safety and efficacy of amnion-derived mesenchymal stem cells (AM01) in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: a study protocol for a phase I/II Japanese trial. *BMJ Open* 2019;9; e026403 (2019).
- 3) 組合だより .. 中標津農業協同組合・中標津町農業共済組合 . Volume 9, 1993;6 (1993).
- 4) World Organisation for Animal Health, BSE situation in the world and annual incidence rate, <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-situation-in-the-world-and-annual-incidence-rate/> (参照 2020-1-31).
- 5) PMDA 医薬品医療機器総合機構, 承認情報 再生医療等製品 審査報告書・申請資料概要, <https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/review-information/ctp/0002.html> (参照 2020-1-31).
- 6) C. E. A. Jochems CE, J. B. F. van der Valk JB, F. R. Stafleu FR, V. Baumans, et al. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. Lab Anim.* 2002;30; :219-27 (2002).
- 7) E. Rubio-Azpeitia E, I. Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4; :52-62 (2014).
- 8) T. Burnouf T, D. Strunk D, M. B. C. Koh MB, et al., K. Schallmoser, Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 2016;76; :371-387 (2016).
- 9) C. Doucet C, I. Ernou I, Y. Zhang Y, et al., J.-R. Llense, L. Begot, X. Holy, J.-J. Lataillade, Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 2005;205(2); :228-236 (2005).
- 10) S. Ishikane S, K. Yamahara K, M. Sada M, et al. K. Harada, M. Kodama, H. Ishibashi-Ueda, K. Hayakawa, K. Mishima, K. Iwasaki, M. Fujiwara, K. Kangawa, T. Ikeda, Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;49(5); :753-761 (2010).
- 11) M. Ohshima M, K. Yamahara K, S. Ishikane S, et al., K. Harada, H. Tsuda, K. Otani, A. Taguchi, M. Miyazato, S. Katsuragi, J. Yoshimatsu, M. Kodama, K. Kangawa, T. Ikeda, Systemic transplantation of allogeneic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012;53(3); :4420-428 (2012).
- 12) K. Yamahara K, K. Harada K., M. Ohshima M, et al. S. Ishikane, S. Ohnishi, H. Tsuda, K. Otani, A. Taguchi, T. Soma, H. Ogawa, S. Katsuragi, J. Yoshimatsu, M. Harada-Shiba, K. Kangawa, T. Ikeda, Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2014;9; :e88319 (2014).
- 13) R. Onishi R, S. Ohnishi S, R. Higashi R, et al., M. Watari, K. Yamahara, N. Okubo, K. Nakagawa, T. Katsurada, G. Suda, M. Natsuizaka, H. Takeda, N. Sakamoto, Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats. *Cell Transplant.* 2015;24; :2601-2614 (2015).
- 14) Y. Imai Y, K. Yamahara K, A. Hamada A, et al., Y. Fujimori, K. Yamanishi, Human amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorate imiquimod-induced psoriasiform dermatitis in mice. *J. Dermatol.* 2019;46(3); :276-278 (2019).

ヒト間葉系幹細胞用無血清培地:STK[®]シリーズ (STK[®]1, STK[®]2, STK[®]3)の開発

Development of chemically defined serum-free media: STK[®] series (STK[®]1, STK[®]2, STK[®]3) for human mesenchymal stem cell

邵 金昌 Jinchang Shao (General Manager)

株式会社ツーセル 研究本部 本部長
Head Office of Research & Development, TWOCELLS COMPANY, LIMITED.

長谷川 森一 Shinichi Hasegawa (Vice Manager)

株式会社ツーセル 研究本部 副本部長
Head Office of Research & Development, TWOCELLS COMPANY, LIMITED.

加藤 幸夫 Yukio Kato (Vice President)

株式会社ツーセル 取締役副社長
TWOCELLS COMPANY, LIMITED.

辻 紘一郎 Tsuji Koichiro (President and Chief Executive Officer)

株式会社ツーセル 代表取締役社長
TWOCELLS COMPANY, LIMITED.

キーワード ■■ Chemically Defined Serum-free Media, Mesenchymal Stem Cell (MSC), Regenerative Medicine

01

はじめに

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: 以下MSC) は、骨、軟骨、靱帯、筋肉、脂肪など中胚葉由来組織へ分化するのみならず、外胚葉および内胚葉由来組織 (神経、肝臓など) へも分化する。しかもMSCは、成体ドナーの各組織 (骨髄、脂肪、滑膜、臍帯、歯髄など) から容易に分離できる¹⁻³⁾。MSCは胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: 以下ES細胞) より癌化リスクが小さく、iPS細胞 (induced Pluripotent stem cell) の様な遺伝子レベルの操作を必要としないため、臨床応用上の安全性が高く、倫理学的問題も少ない細胞である。そのため、近年国内外において、MSCを用いた細胞移植治療の研究が進められており、骨・関節疾患、循環系疾患、脳卒中、自己免疫疾患、移植片対宿主病 (Graft versus host disease: 以下GVHD) など、すでに多くの臨床例がある⁴⁻⁶⁾。一方、従来のMSC培養系には、通常培地に患者自己血清またはウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: 以下FBS) が添加されているが、血清には下記の3つの問題点がある。

①血清添加培地で培養したMSCの品質は一定しない;血清はおよそ1万種以上の成分を含むため複雑で、その中には未知物質が含まれる。また、血清成分はロットによって性能が変化したり、蛋白質分解酵素によって変性したりする。

②血清添加培地で培養したMSCの安全性は担保できない;FBS添加培地は各種病原体、例えばBSE (Bovine spongiform encephalopathy) プリオンやウイルスなどによる感染、異種蛋白によるアレルギー、動物型シアル酸産生などのリスクがある。また、患者の自己血清は同種になるため、FBSより免疫拒絶反応などのリスクが少なく安全だが、小児や重症患者からの大量採血は困難であるという問題もある。

③血清の成分はMSCに対して最適でない;血清はMSCに特異的な増殖因子を必ずしも十分に含有するとは限らない。また、血清中にはMSCの増殖を阻害する酵素や未分化性を損なう因子がある。

再生医療の移植用MSCの培養に無血清培地を用いると、血清ロットチェックが不要;培養期間の短縮;ウイルス、細菌、マイコプラズマなどの血清由来成分からの感染リスクの減少;効率的に品質の高い細胞を増幅できるなど、多くの利点が期待できる。

したがって、安全性及び品質の高いMSCを再生医療に提供できるようにするため、無血清培地 (完全合成培地) の開発は必要である⁷⁾。

本稿では、ヒトMSC用無血清培地:STK[®]シリーズ (STK[®]1, STK[®]2, STK[®]3) の開発経緯及びMSCの無血清培養技術について概説する。

02 初期の無血清培地

動物細胞の無血清培養は容易ではない。1980年頃、Gordon Satoらは、成長因子を添加した無血清培地を開発した⁸⁾。彼らの無血清培地は、株化(不死化)細胞の増殖を支持したが、動物やヒト組織から分離したプライマリ細胞の増殖を十分に支持しなかった。その後、Denis Gospodarowiczらは、細胞外基質(Extracellular matrix: 以下ECM)コート培養皿や血漿リポ蛋白質画分を用いて、各種のプライマリ細胞を長期間無血清培養した⁹⁻¹¹⁾。ただしECMや血漿リポ蛋白質画分には、未知物質が含まれている。そして、2000年頃から、再生医学の研究が盛んになるとともに、MSCを含む幹細胞用の無血清培地の開発が始まった。

03 ヒト間葉系幹細胞用無血清培地:STK[®]シリーズ(STK[®]1, STK[®]2, STK[®]3)の開発3.1 ヒトMSC継代培養用(大量培養用)無血清培地:STK[®]2

STK[®]2は国内初のMSC用無血清培地として2008年に開発された。

我々の目標は、単に無血清で安全であれば良いのではなく、従来法よりも高品質のMSCを効率的に増幅できるような、臨床で有効性を示せる培地を開発することにある。STK[®]2の開発実験には、ヒト腸骨骨髓由来MSCを使用した。我々は、10%FBS含有培地に添加したFibroblast growth factor-2 (FGF-2)が骨髓由来MSCの増殖を促進し、軟骨、脂肪、骨への分化能を高レベルに維持することを報告した(超増幅培養法)¹²⁾。現在では、FGF-2添加法/超増幅培養法は、全世界で定着している。そこで、STK[®]2でもFGF-2を基軸成分とした。通常FGF-2は非常に不安定であるが、無血清培地中では低濃度でも安定であった。おそらく血清中のFGF分解酵素やFGF結合蛋白がないためである。Hepatocyte growth factor (HGF)はMSC増殖を抑制すると報告されていた¹³⁾。またTransforming growth factor (TGF- β)は、一般には細胞増殖抑制因子であり分化促進因子でもある。しかし、これらの因子は、無血清条件下でMSCの未分化状態を維持しつつ増殖を促進した。さらにVascular endothelial growth factor (VEGF)、Connective tissue growth factor (CTGF)などもMSCの増殖を促進した。STK[®]2にはこれらの成長因子を組み合わせで添加した。またアルブミンは、ES細胞などの細胞の生存と増殖に必須でないが¹⁴⁾、MSCの生存と増殖には必須であった。各種の脂肪化合物は、低濃度で細胞増殖を促進し高濃度で抑制したので、それらの組み合わせと濃度を最適化してからSTK[®]2に加えた。

細胞を培養容器に単層で接着させた単層培養系でSTK[®]2を用いた場合は10%FBS含有培地以上にヒト骨髓MSCの増殖を促進した(図1)。さらにSTK[®]2はリン酸カルシウム担体(ハイドロキシアパタイト)存在下でもMSCの増殖を促進し、ハイドロキシアパタイトを足場とする培養骨の作成においても細胞増殖の面

で有効性があった¹⁵⁾。また初期のSTK[®]2には、ウシ血清由来アルブミンを含有していたが、現在は製造から管理された安全性の高い遺伝子組換えヒト血清アルブミンに置き換えている(図1)。次に、STK[®]2中の各成分の役割を明らかにするために、同培地から成分を一つだけ除去した培地をそれぞれ作製した。STK[®]2から各因子を一つ除去することで、細胞の生存率あるいは増殖率が低下した。そして、STK[®]2中にはMSCの生存に必須である化合物(インスリンなど)、増殖を促進するのに必要な化合物(FGF-2など)、未分化性を保つのに欠かせない化合物(TGF- β など)の必要性を明らかにした。

MSCは、様々な組織(骨髓、脂肪、滑膜、歯髄、臍帯組織など)から分離されている。これらのMSCの多分化能は類似しているが、滑膜MSCの軟骨分化能や、歯髄MSCの神経分化能は他のMSCと比較して高い。STK[®]2は、いずれのMSCに対しても、10%FBS含有培地より高レベルに増殖を促進した¹⁶⁻¹⁸⁾。

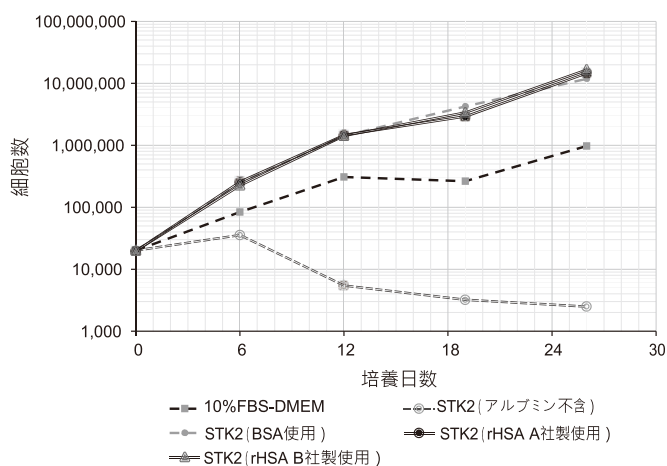


図1 ヒトMSCの長期培養に及ぼす遺伝子組換えヒト血清アルブミンの影響

3.2 ヒト初代MSC用(組織より初代細胞樹立培養用)無血清培地: STK[®]1

全培養プロセスを無血清化するには、初代培養系でも無血清培養が必要である。しかし、初代ヒト骨髓MSCの培養系では、STK[®]2培地を用いた培養は細胞の増殖をほとんど促進しなかった。特に、細胞の培養皿への接着能が低下した。骨髓から分離直後のMSCは接着力が弱いため、無血清培地中では増殖しないが、継代培養系で人工的環境に馴化すれば、STK[®]2中でも増殖できるようになるのかもしれない。一方、血清には接着因子が存在するため、初代、継代に関わらず、MSCの接着と増殖を支持するものと推察される。いずれにせよ、初代MSCの無血清培養系では、培養環境への馴化と細胞接着の促進が必要である。これらのことを考慮しSTK[®]2中に初代細胞の接着を阻害する成分などを除去することで、2010年にMSCの初代培養用無血清培地STK[®]1を開発した。

STK[®]2はヒト各組織MSCの大量培養をいずれも支持するが、

それに対して、各組織由来初代MSCのSTK®1への適応能は多様であった。滑膜由来初代MSCはSTK®1中でも最も高レベルの増殖を示した。次いで、歯髄由来初代MSCと脂肪由来初代MSCが、10%FBS含有培地よりもSTK®1中で活発に増殖した¹⁶⁾。しかし、これらの組織と比較して、骨髄由来初代MSCは特に接着能が低いため、ドナーによっては骨髄液から分離したMSCは、STK®1存在下で樹立培養できないことがある。

3.3 ヒトMSC骨分化誘導用無血清培地: STK®3

骨欠損の治療に自家骨移植がよく用いられているが、骨採取には長期間の疼痛をもたらす。しかも採取できる骨量は少ない。したがって大量に作製可能であるMSC由来培養骨への期待は社会的に大きい。ところが、従来のMSC用骨分化誘導培地¹⁹⁾(β -グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメタゾンなど含有:以下OS-medium)には10%FBSが含まれているので、前述の全培養プロセス無血清化のためにはMSC骨分化誘導用の無血清培地が求められていた。

各種化合物を検討した結果、いくつかの成長因子はMSCの増殖を促進する一方で、骨分化を抑制することが明らかになった。

そこで、STK®2から骨分化抑制因子を除去して、 β -グリセロリン酸、アスコルビン酸を追加したことにより世界初のMSC骨分化誘導用無血清培地:STK®3を開発した。STK®3の組成には骨形成蛋白質(Bone morphogenetic protein: BMP)などの骨誘導、促進因子を配合していないにもかかわらず、従来の血清含有OS-mediumよりも強力にかつ短期間に骨分化を誘導した。これは、血清中には骨分化を抑制する因子が存在することを示唆している。しかも、STK®2で前培養したMSCは、血清含有培地で前培養した細胞よりもSTK®3添加後により早く相乗的に骨分化した(図2)。従来法では、骨分化に3週間から4週を要するが、STK®3を用いれば1週間に短縮できるので、培養の省力化に役立つ。

3.4 STK®シリーズ培地の共通成分と追加成分

無血清培地の成分は7つのカテゴリー(栄養素、アルブミン、成長因子、脂質、低分子化合物、抗酸化剤、その他)に分類可能であり、すべての成分は化学的に既知である。STK®シリーズの全成分数は65~86個化合物である。STK®シリーズで最も成分数が多いのは、栄養素(無機質を含む)であり54~60個の化合物からなる。血清中には1万種以上の化合物が存在すると考えられるの

4日目		10%FBS培地で培養した細胞			STK2で培養した細胞		
培地の種類／細胞株(継代数)		株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)	株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)
10%FBS含有骨分化誘導培地							
STK3							

7日目		10%FBS培地で培養した細胞			STK2で培養した細胞		
培地の種類／細胞株(継代数)		株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)	株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)
10%FBS含有骨分化誘導培地							
STK3							

14日目		10%FBS培地で培養した細胞			STK2で培養した細胞		
培地の種類／細胞株(継代数)		株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)	株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)
10%FBS含有骨分化誘導培地							
STK3							

21日目		10%FBS培地で培養した細胞			STK2で培養した細胞		
培地の種類／細胞株(継代数)		株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)	株1 (P8)	株2 (P7)	株3 (P10)
10%FBS含有骨分化誘導培地							
STK3							

図2 ヒトMSCの骨分化に及ぼす無血清培地の影響:
骨分化誘導培地で培養したMSCの骨分化染色結果 (Alizarin red染色)

で、百個以下の化合物で細胞の長期間の生存と増殖を維持できる理由はまだ解明されていない。無血清培地中では、血清中に含まれる細胞内で必要な化合物が合成されるかもしれないし、微量分子は最初の持ち込みだけで十分かもしれない。

STK[®]1～3には共通成分(60個化合物)以外に、追加化合物(5～26種類)が配合されている。共通成分は生存を維持し、STK[®]1への追加成分は馴化と接着、STK[®]2への追加成分は増殖、STK[®]3への追加成分は骨分化を支持する。

3.5 臨床用STK[®]シリーズ(STK[®]1, STK[®]2)の開発

近年、再生医療の臨床研究の進展や実用化に伴い、「生物由来原料基準」(厚生労働省告示第210号、平成15年5月20日)に適合する原料のみを使用している、臨床用グレードの培地が求められていた。

我々は前述の研究用のSTK[®]シリーズの開発を通じて培ってきた培地の原料・組成等の開発技術を強みに、PMDAに再生医療等製品の材料適格性の相談をした上で、「生物由来原料基準」に適合する原料のみを使用した臨床用STK[®]シリーズ(STK[®]1, STK[®]2)を開発した。研究用STK[®]シリーズと比較して、臨床用STK[®]シリーズは、培地の高い性能を保ちながら培養した細胞の

安全性が担保できる。

現段階では臨床用STK[®]シリーズは、すでに自社開発したMSC由来細胞治療製品の研究開発に活用している。

04 MSCの無血清培養で使用する酵素液

脂肪、骨膜、歯髄、滑膜組織からMSCを分離、分散するのにコラゲナーゼなどが用いられるが、同酵素の生産過程では血清を使用していない製品を使用すべきである(Collagenase-A, animal origin free, Worthington Biochemical Co.など)。

継代のための細胞剥離剤としては、従来法ではブタやウシ由来トリプシンが使われているが、ウイルスやプリオンによる感染リスクがあり、動物由来成分フリーでなくなるという問題がある。また無血清培地には血清由来の蛋白分解酵素インヒビターが不在のため、動物由来成分が含まれているトリプシンを使用した場合、剥離後に精製トリプシンインヒビターの添加が必要である(無血清培養ではこれを怠ると細胞が死滅する)。一方、近年、cGMP(Current Good Manufacturing Practices)対応

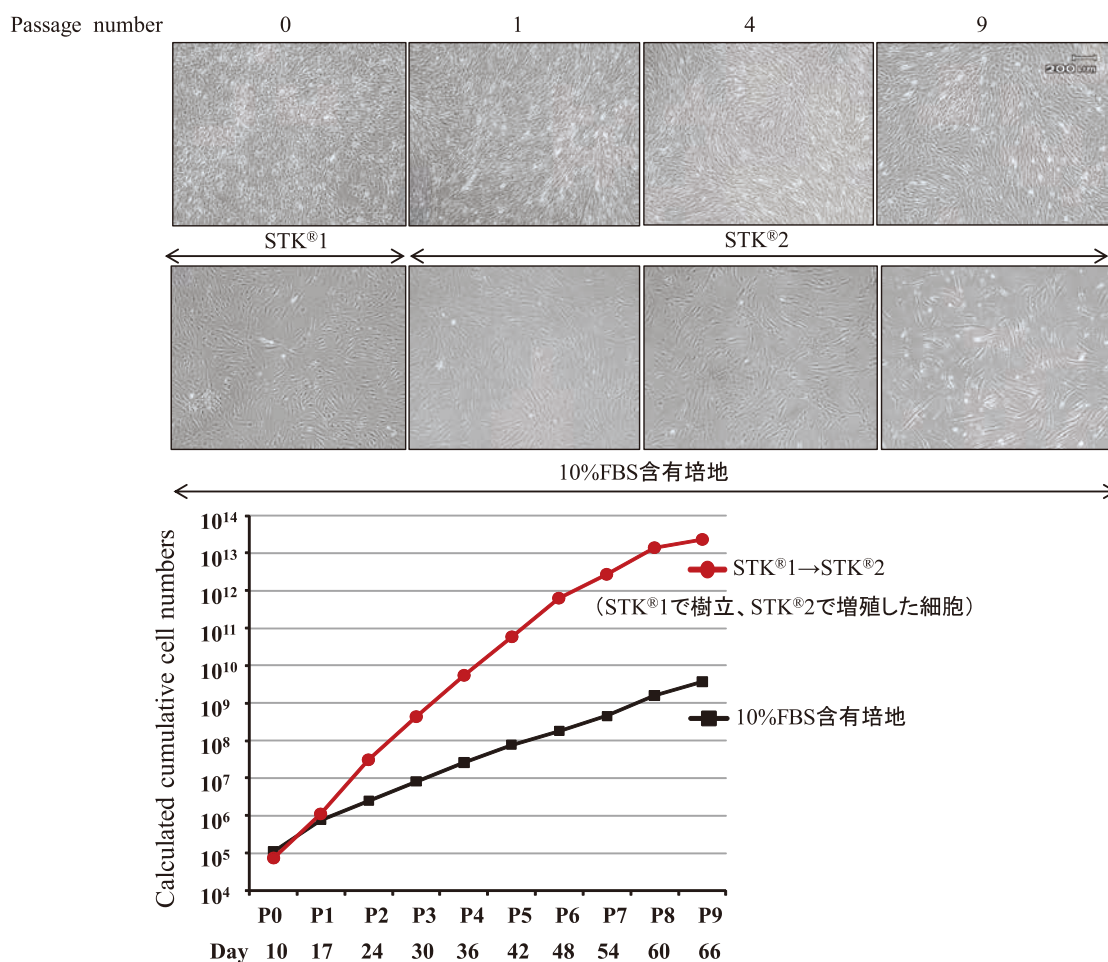


図3 STK[®]1, STK[®]2を用いたヒト滑膜MSCの長期連続的な継代培養・大量増殖:10%FBS含有培地との比較

の設備で、動物由来成分を使用せず製造された遺伝子組換え体トリプシン様酵素(TrypLE™ Select CTS™, Thermo Fisher Scientific; TrypZan™ Solution, Sigmaなど)が発売され、これらは、ヒトMSCの無血清培養に適用できる。動物由来成分が含まれているトリプシンより純度が高く細胞に優しい。多くの場合、洗浄すれば精製トリプシンインヒビターの添加は不要であるが、いずれの酵素を用いても細胞剥離後の十分の洗浄は必要である。また、無血清培地を用いた細胞継代では、機械的刺激(過度の攪拌や遠心など)による細胞にダメージを与えてしまうため、酵素濃度および酵素反応時間を最小にしなければならない。

05 STK®1、STK®2を用いた 関節疾患治療用他家滑膜MSCの増幅

滑膜由来のMSCは、他組織由来MSCと比較して、高い軟骨分化能を有するので、関節疾患治療での細胞ソースとして優れている。しかし、FBSや患者自己血清を用いる従来の培養法では、移植に必要とする数千万ないし億単位の細胞数を確保するのは難しい。そこで、我々はSTK®1とSTK®2を用い、ヒト滑膜組織から

MSCを分離して連続的に継代培養した。

Collagenase-A(animal origin free)の処理により組織から単離した初代滑膜MSCをSTK®1で培養すると、血清含有培地より多くの細胞が接着・増殖した。またSTK®1とSTK®2を用いた完全な無血清の培養条件下で連続的に継代培養(9継代以上)ができた。そして、10%FBS含有培地と比較して、細胞を1万倍まで増幅させる時間が約半分に短縮した(図3)。無血清培地で得られたMSCは、血清含有培地と比較して、細胞集団として均質であり、同様の細胞表面マーカーを発現した(図4)。また、すべての株で5継代後も染色体異常がなかった。さらに無血清培養したMSCは、血清含有培地よりも顕著に高レベルの軟骨、骨、脂肪分化能を示した(図5)。

従来の血清培養法を用いて増殖したMSCの数は最大でも数十人分程度しか得られないので自家移植は可能であるが、商業利用が可能な他家移植の安定供給は困難であった。しかし、STK®シリーズを利用することにより、ドナー一人分のヒト滑膜組織(湿重量0.5~1g)から、千人から一万人の関節疾患を治療するための高性能MSC(10^{13} 個)を増幅することができるようになった。

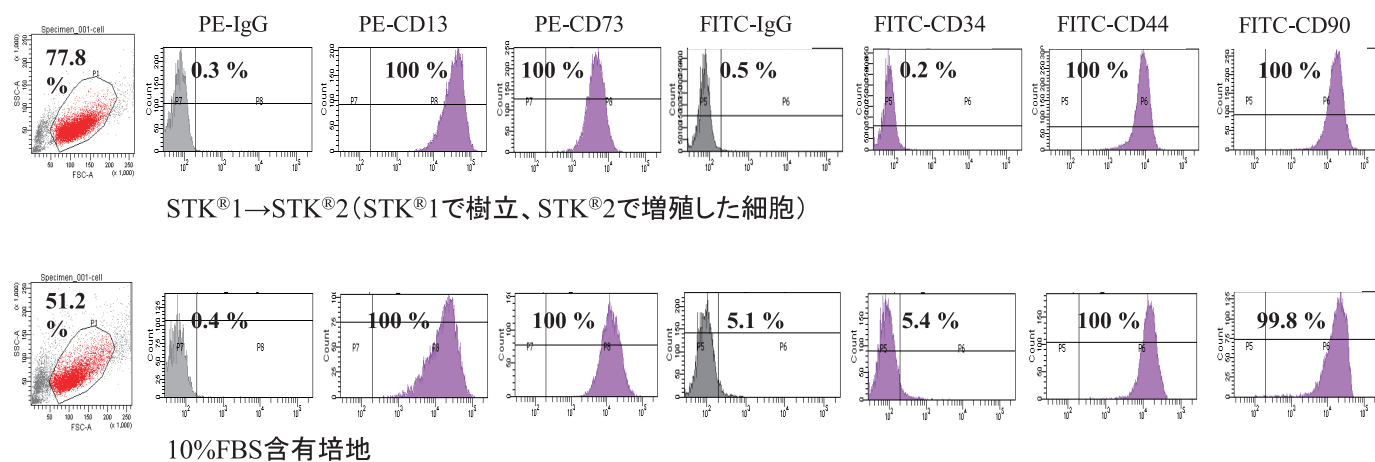


図4 STK®1, STK®2で増殖したヒト滑膜MSCの表面抗原マーカーの解析:10%FBS含有培地との比較

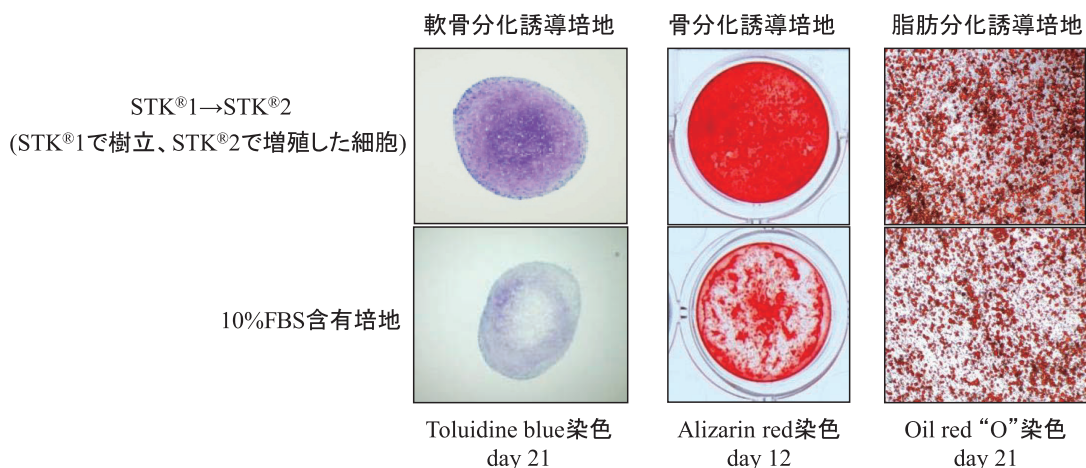


図5 STK®1, STK®2で培養したヒト滑膜MSCの軟骨・骨・脂肪への分化能:10%FBS含有培地との比較

06

MSC用無血清培地が直面している課題

MSC用無血清培地には細胞の増殖性および未分化性を保つため、数種類の遺伝子組換え成長因子を配合している。そのため、血清含有培地より高価になっている。最近のヒトES細胞用の無血清培地では、これまで必須とされてきたbFGFやTGF β を低分子化合物に置換することができた²⁰⁾。STK[®]シリーズについても、将来は遺伝子組換え成長因子などのコストが高い成分を低分子化合物に置換する必要がある。

無血清培地の開発には、培養皿への考慮も必要である。生体内で、幹細胞はニッチに存在するが、ニッチでは、液性因子以外にECMや他細胞との接触によりstemness(幹細胞らしさ)が維持される。培地は液性因子、培養皿はECM、フィーダー細胞は他細胞の影響を模倣する。ECMは、細胞の接着、遊走、増殖、分化を制御する²¹⁻²²⁾、未知物質を含むことが問題である。したがって、生体内のニッチを再現するには、無血清培地とECMの機能をもつ培養皿との組み合わせが不可欠である。

血清含有培地を使用すれば、血清蛋白が培養皿に付着して、ECMと類似した機能を発揮するのに対して、無血清培地では血清からのECM効果が期待できない。したがって、無血清培養用の培養皿が必要であり、各社が開発を進めている。従来のプラズマ処置したプラスチック培養皿の表面化学組成は一定でなく、しかも保管中にその化学性状が変化することが問題である。近年、ECMの一部機能が代替できる遺伝子組換えヒトフィブロネクチン、ビトロネクチンなどが発売されたが、コストが高く患者への経済負担を増加させるため再生医療には今のところ適合しない。今後、無血清培地と高機能の培養皿の併用が必要となるが、効果とコストのバランスを考慮しなければならない。

また、他家移植法では、移植するMSCの品質が十分管理されていないといけない。所謂MSCには共通分化レパートリーや共通の細胞表面抗原が知られているものの、ES細胞のように均質な細胞としてMSCを規定化できていない。我々は、現在各種MSCマーカーの開発にも着手しており、今後MSCの仕様を規定するのに役立つかもしれない²³⁻²⁵⁾。

参考文献

- 1) R. Secunda, R. Vennila, A.M. Mohanashankar, M. Rajasundari, S. Jeswanth, R. Surendran. *Cytotechnology* **67**(5), 793-807 (2015).
- 2) C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, F. P. Luyten. *Arthritis and Rheumatism* **44**(8), 1928-1942 (2001).
- 3) A. H. Huang, Y. K. Chen, L. M. Lin, T. Y. Shieh, A. W. S. Chan. *J. Oral Pathol. Med.* **37**(9), 571-574 (2008).
- 4) A. Andrzejewska, B. Lukomska, M. Janowski. *Stem Cells* **37**(7), 855-864 (2019).
- 5) C. Brown, C. McKee, S. Bakshi, K. Walker, E. Hakman, S. Halassy, D. Svinarich, R. Dodds, C. K. Govind, G. R. Chaudhry, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **13**(9), 1738-1755 (2019).
- 6) J. Galipeau, L. Sensébé, *Cell Stem Cell* **22**(6), 824-833 (2018).
- 7) F. Mannello, G.A. Tonti, *Stem Cells* **25**(7), 1603-1609 (2007).
- 8) D. Barnes, G. Sato, *Anal. Biochem.* **102**(2), 255-270 (1980).
- 9) D.K. Fujii, J. Cheng, D. Gospodarowicz, *J. Cell. Physiol.* **114**(3), 267-278 (1983).
- 10) Y. Kato, D. Gospodarowicz, *J. Cell. Physiol.* **120**(3), 354-363 (1984).
- 11) Y. Kato, D. Gospodarowicz, *J. Biol. Chem.* **260**(4), 2364-2373 (1985).
- 12) S. Tsutsumi, A. Shimazu, K. Miyazaki, H. Pan, C. Koike, E. Yoshida, K. Takagishi, Y. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**(2), 413-419 (2001).
- 13) G. Forte, M. Minieri, P. Cossa, D. Antenucci, M. Sala, V. Gnocchi, R. Fiaccavento, F. Carotenuto, P. Di Vito, P. M. Baldini, M. Prat, P. Di Nardo, *Stem Cells* **24**(1), 23-33 (2006).
- 14) G. Chen, DR. Gulbranson, Z. Hou, JM. Bolin, V. Ruotti, MD. Probasco, K. Smuga-Otto, SE. Howden, NR. Diol, NE. Propson, R. Wagner, GO. Lee, J. Antosiewicz-Bourget, JM. Teng, JA. Thomson, *Nat Methods* **8** (5), 424-429 (2011).
- 15) 石川 格, 澤田留美, 加藤幸夫, 辻紘一郎, 邵 金昌, 山田貴史, 加藤玲子, 土屋利江, *薬学雑誌* **129**(3), 381-384 (2009).
- 16) 加藤幸夫, 藤井紗貴子, 五藤紀子, 北山和子, 金輪真佐美, 河本 健, 藤本勝巳, 邵 金昌, 桂 由紀, 潘 海鷗, 長谷川森一, 辻紘一郎, *広島歯科医学雑誌* **39**(1), 1-8 (2011).
- 17) M. S. Lee, C. Youn, J. H. Kim, B. J. Park, J. Ahn, S. Hong, Y. D. Kim, Y. K. Shin, S. G. Park. *Int J Mol Sci.* **18**(8), 1779-1796 (2017).
- 18) S. Fujii, K. Fujimoto, N. Goto, Y. Abiko, A. Imaoka, JC. Shao, K. Kitayama, M. Kanawa, A. Sosiawan, K. Suardita, F. Nishimura, Y. Kato. *Biomed Rep.* **8**, 350-358 (2018).
- 19) M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak, *Science* **284**(5411), 143-147 (1999).
- 20) S. Yasuda, T. Ikeda, H. Shahsavarani, N. Yoshida, B. Nayer, M. Hino, N. Vartak-Sharma, H. Suemori, K. Hasegawa, *Nat. Biomed. Eng.* **2**(3), 173-182 (2018).
- 21) Y. Kato, D. Gospodarowicz, *J. Cell Biol.* **100**(2), 486-495 (1985).
- 22) T. Matsubara, S. Tsutsumi, H. Pan, H. Hiraoka, R. Oda, M. Nishimura, H. Kawaguchi, K. Nakamura, Y. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**(3), 503-508 (2004).
- 23) H. Kubo, M. Shimizu, Y. Taya, T. Kawamoto, M. Michida, E. Kaneko, A. Igarashi, M. Nishimura, K. Segoshi, Y. Shimazu, K. Tsuji, T. Aoba, Y. Kato, *Genes Cells* **14**(3), 407-424 (2009).
- 24) M. Ishii, C. Koike, A. Igarashi, K. Yamanaka, H. Pan, Y. Higashi, H. Kawaguchi, M. Sugiyama, N. Kamata, T. Iwata, T. Matsubara, K. Nakamura, H. Kurihara, K. Tsuji, Y. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**(1), 297-303 (2005).
- 25) A. Igarashi, K. Segoshi, Y. Sakai, H. Pan, M. Kanawa, Y. Higashi, M. Sugiyama, K. Nakamura, H. Kurihara, S. Yamaguchi, K. Tsuji, T. Kawamoto, Y. Kato, *Tissue Eng.* **13**(10), 2405-2417 (2007).

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治療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)。

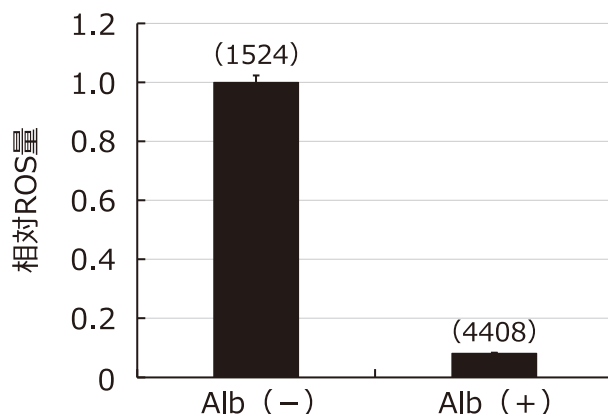


図1 血清アルブミンの有無と細胞内ROS量の関係
データは、Alb(-)のROS量を1とした際の相対値(平均値±標準誤差)。
棒グラフ上に位置する括弧内の数字はn数を示す。

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。

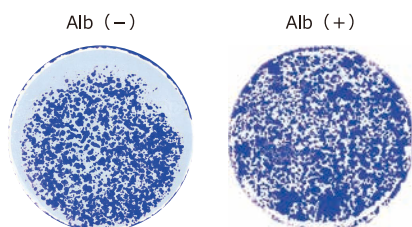


図2 血清アルブミンの有無が細胞接着に与える影響
写真は、倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した培養容器全体のタイリング画像。

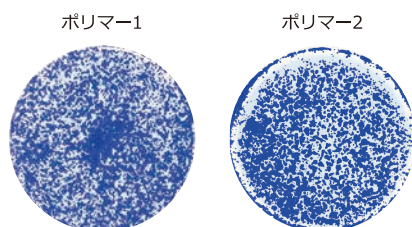


図3 各ポリマーが細胞接着に与える影響
写真は、倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した培養容器全体のタイリング画像。

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。

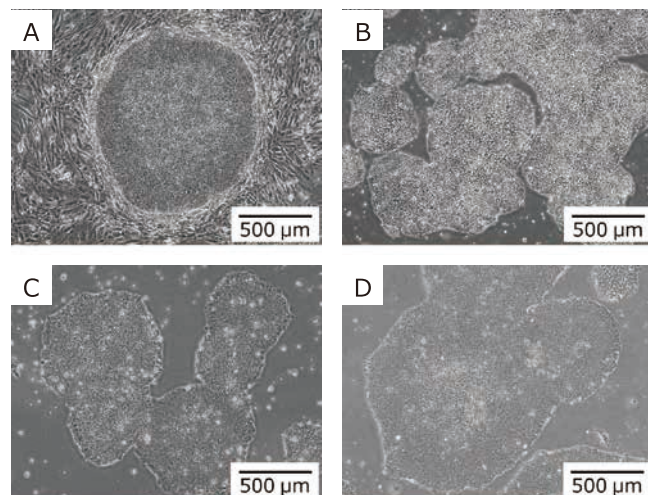


図4 各培地におけるiPS細胞の培養所見

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。

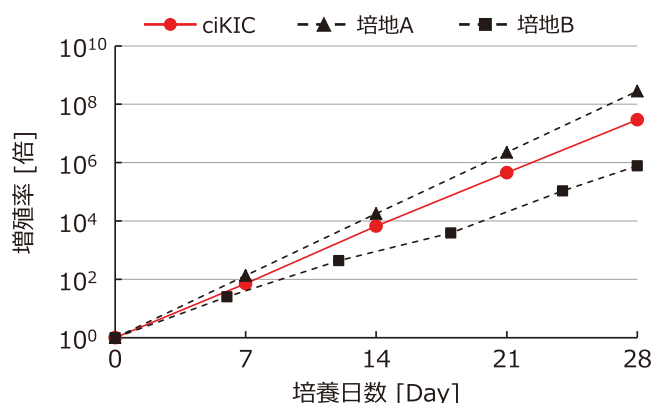


図5 各培地におけるiPS細胞の増殖率の推移

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。

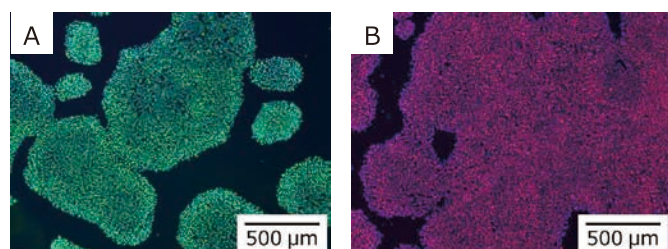


図6 ciKIC™ iPS mediumで培養したiPS細胞の免疫蛍光染色像
写真は、倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した蛍光画像。
A: Oct-3/4(緑)+核(青)、B: Nanog(赤)+核(青)。

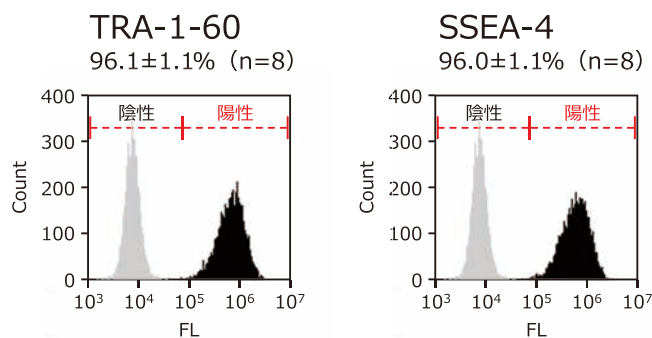


図7 ciKIC™ iPS mediumで培養したiPS細胞の未分化マーカー陽性率データは、代表的なヒストグラムと平均値±標準誤差。
グレーのヒストグラムは、unstained controlを示す。

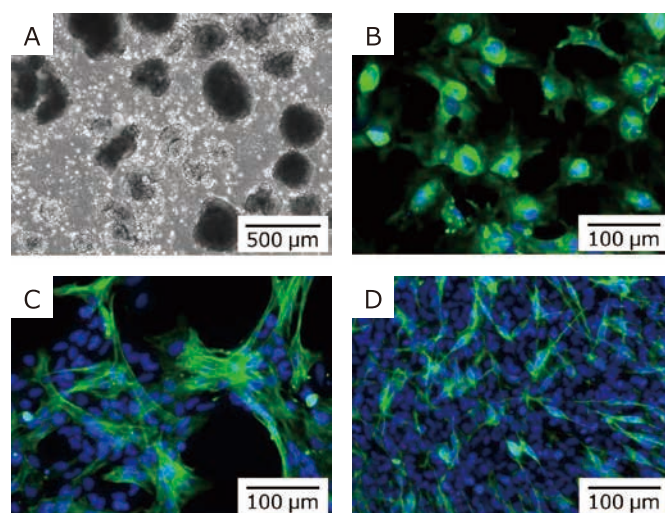


図8 ciKIC™ iPS mediumで培養したiPS細胞の三胚葉分化
A: 倒立型顕微鏡IX-73(オリンパス)を用いて撮影したEB(浮遊培養8日目)の位相差像。
B-D: 倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した蛍光画像であり、青は核、緑は各マーカー(B:AFP、C: α -SMA、D: β III-tubulin)を示す。

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).

キーワード解説

細胞培養

細胞を生体外で増殖させる方法であり、細胞の種類にあった培地、培養容器および足場材量が必要となる。作業者は、老廃物の除去と栄養供給を目的とした培地交換と、細胞が増えるスペースを確保するための植え継ぎ(継代)を行う。これらの作業は無菌的に行う必要があるため、クリーンベンチなどの環境設備も必須である。

幹細胞

幹細胞とは、分裂して自身と同じ細胞を作る能力(自己複製能)と、他の細胞に変化(分化)する能力(分化能)を併せ持つ細胞であり、例としてES細胞やiPS細胞が挙げられる。受精卵などが有する胎盤組織を含めた全ての細胞に分化する能力を全能性(Totipotency)と呼び、胎盤を除く全ての体組織に分化する能力を多能性(Pluripotency)と呼ぶ。

ヒトiPS細胞用 未分化維持培地 ciKIC™ iPS medium

iPS 細胞の培養に最適なフィーダーフリー用培地

Point
1

低タンパク質
アルブミン不含

Point
2

優れた操作性
土日(3連休)の培地交換が不要
シングルセルでの継代作業が可能

Point
3

**高い増殖支持能と
良好な未分化維持能**



- ★ 本製品は、京都大学 高等研究院 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) から技術移転を受けた培地に、関東化学(株)独自の技術を取り入れた製品です。
- ★ 本製品は試験研究用です。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。

※無断転載および複製を禁じます。

 **関東化学株式会社**

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
室町東三井ビルディング

電話(03)6214-1090 FAX(03)3241-1047

HP <http://www.kanto.co.jp/times/>

E-mail: chemiti-info@gms.kanto.co.jp 編集責任者: 猪瀬真人

2020年4月発行