

# 幹細胞を用いた再生医療実現に向けた最新動向（後編）

## ヒト iPS 細胞の浮遊攪拌培養に適したバイオリアクターシリーズの開発

和田 昌憲

### はじめに

幹細胞の浮遊培養には、以前から動物細胞による物質生産に用いられている通気攪拌型バイオリアクターが用いられている。幹細胞が接着性の場合、担体（マイクロキャリア）に細胞を接着させ浮遊攪拌状態で担体上に増殖させる。本稿では、人工多能性幹細胞（iPS細胞）の浮遊攪拌培養における通気攪拌型バイオリアクターの利用について述べる。iPS細胞は、適切な組成の培養液に適切な細胞密度で播種し、適切な培養条件が整うと細胞凝集塊を形成し浮遊状態で増殖する。iPS細胞の未分化性の維持と分化誘導効率は、細胞凝集塊の大きさや均質性が大きく影響する。細胞凝集塊形成においては、培養槽内に適切なフローパターンを与える攪拌翼の選択が重要となる。以下に、当社で開発したヒトiPS細胞の浮遊攪拌培養に適したバイオリアクターシリーズについて紹介する。

### 培養槽設計の留意点

浮遊攪拌培養装置は、各種センサーで生育環境を計測し、計測器で電気信号に変換、生育環境を一定にするために制御を行う機能を備える。制御項目としては、攪拌、通気、温度、pH、溶存酸素濃度が一般的である。培養槽の設計において、特に攪拌方法の設計思想が目的産物の収量に大きく影響する。細胞培養における攪拌の目的は、酸素供給や培地成分や温度分布の均一化と細胞の分散であり、それによって酵素や抗体などのタンパク質、再生医療等製品の場合は細胞そのものを得ることである。かき混ぜることに主眼をおくと液流内部の剪断力が増し、細胞への破壊作用が大きくなる。液流内部の剪断速度（＝近接流体の相対速度）は、微小浮遊物の接近衝突（凝集作用）と剪断引き離し（＝細分化破壊作用）のいずれかに働く。細胞培養における重要な要素は細胞への酸素供給である。酸素要求性の高い好気性微生物の培養では、培養槽内に送り込んだ空気中の酸素を液中に溶け込ませるために強力な気泡の細分化破壊作用が必要となる。一方、動物細胞培養では細分化破壊作用を低く抑

え、剪断力から細胞を保護することを優先する。細胞の培養に最適な流動状態を与えるためには、①フローパターン、②槽内の要所所での流れの速度、③液流内部での速度勾配を考慮するべきである。酸素要求に対する供給を重視すると攪拌による剪断力とトレードオフの関係になることが多い。加えて、④酸素供給方法（装置）を考慮する。

浮遊状態でiPS細胞の凝集塊を形成させるための留意点は、iPS細胞が剪断力に対してきわめて感受性が高いこと、培養槽内に淀んだ部分があると凝集塊が集合・融合して肥大化し細胞死を招くことの2点である。すなわち設計において、槽内を均一によく混ぜ空間的な不均一さをなくし、細胞の凝集作用と細分化作用を適切なバランスで維持し、形成された細胞凝集塊の流動と浮遊を常に促すことが重要な点となる。iPS細胞は胚性多能性幹細胞（ES細胞）と同様に呼吸活性が高くないので、未分化維持培養においては増殖に多くの酸素を要求しない。

### 培養槽設計の実際

iPS細胞の凝集塊は、細胞自身と細胞間マトリクスから形成される。細胞凝集塊形成は、攪拌による物理的刺激によってその粒径が決まり、培地中の液性因子の刺激によって細胞外マトリックス（extracellular matrix；ECM）が分泌されて細胞同士の接着を強めることで成り立っている。細胞凝集塊の電子顕微鏡観察では、外皮構造と内部構造とがあり、外皮には表層細胞同士を接着するタイトジャンクション構造やECMが見られる<sup>1)</sup>。外部からの物理的刺激によって外皮構造が形成されることで物理的ダメージから免れ、培地成分による刺激はこの外皮構造を介して凝集塊内部へ伝えられると考えられる。ここで重要なのは、均一な細胞凝集塊を得ることである。拡散による酸素や栄養源の供給は、生体内の毛細血管網の微細構造から100 μm程度が限界と考えられている。すなわち、直径数100 μm以上の細胞凝集塊は、内部が虚血状態となり、細胞死を引き起こすということである。外部刺激への感受性や内部の栄養状態から、粒径がそろった直径200-300 μm程度の凝集塊が理想的と

著者紹介 エイブル株式会社開発部（専任課長）、技術士（生物工学部門） E-mail: wada@able-biott.co.jp



図1. iPS細胞の浮遊攪拌培養に適したシングルユースバイオリアクター。液量100 mL (左)と30 mL (右)。

されている。

ヒトiPS細胞の培養槽設計のための要件である低剪断力と均一混合を満たし、細胞凝集塊を定期的に浮遊させることができる攪拌翼の検討を行った。攪拌翼は、槽内を均一に攪拌し滞留ポイントを少なくするために培養槽内の側面や底面に沿った形状とした。また、細胞凝集塊の浮遊を促すために攪拌翼の面積を液上層に向かい小さくすることで上層と下層の液流に差を生じさせ、攪拌時の主なフローパターンを層流としながら上昇流も生じるようにした。層流の場合の槽中央部は液流速がほぼゼロになるので細胞凝集塊は中心付近に滞留してしまう。これを防ぐために攪拌翼を支持する中心軸を培養槽底面から屹立させ、基部に向かって上部から拡径にすることで中心底部の滞留ポイントをデッドスペースとする構造とした。攪拌翼はこの中心軸にも沿った形状とし、軸受けを気相部に設けることで摺動による細胞へのダメージをなくした(図1)。

### バイオリアクターシリーズの開発

筆者らは、細胞治療の分野での利用を想定し、単回使用のプラスチック製培養槽を開発し、2014年4月から販売を開始した。液量は30 mLと100 mLの2種類(図1)を用意し、液量100 mLの培養槽にはpHと溶存酸素のセンサーを搭載できるようにし、装置による培養環境の計測と制御を可能にした。培養液の均一な流れを妨げないように、pH電極は従来型直径12 mmの半分である6 mmの専用シングルユース電極を開発した(図2a)。溶存酸素電極は、酸素濃度に応じたポルフィリン錯体の蛍光消失特性を利用した光学式センサーを新規に開発し、排除体積を実質ゼロにした(図2b)。30 mL培養槽は、100 mL培養槽の設計思想をそのまま小型化したものであり、センサーは搭載せずに、インキュベーター内に設置して攪拌培養だけを行うことを想定した簡易タイプである。気密性の高いインキュベーター内の使用でも攪拌動力の発熱がきわめて少ない専用のマグネチックスターラーも同時に開発した(図2c)。

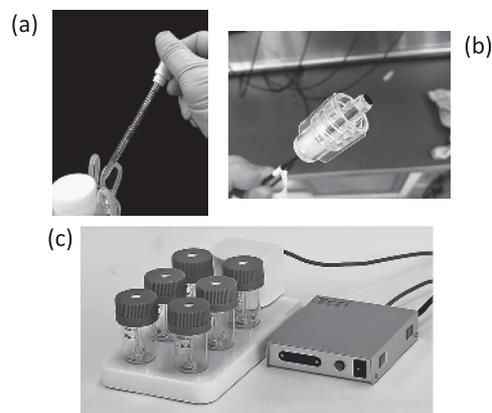


図2. 100 mLリアクター用シングルユースpH電極 (a), 同溶存酸素プローブ (b), 30 mLリアクター用6ch.マグネチックスターラー (c)。

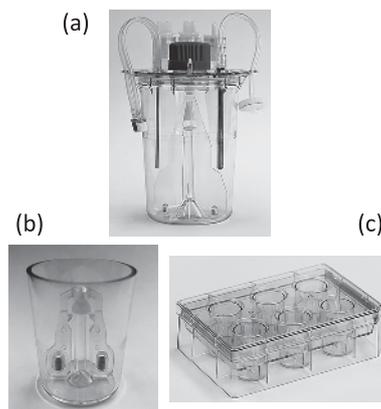


図3. シングルユースバイオリアクターシリーズ。液量500 mLリアクター (a)と5 mLリアクター (b), 同6連タイプ (c)。

将来的な本格的な細胞移植医療への応用を想定し、10億個相当のiPS細胞を一つの培養槽で得ることができる液量500 mLの培養槽を開発した(図3a)。一方、iPS細胞をさまざまな細胞へ分化誘導する培養条件を検討する作業は、サイトカインの種類や濃度、投与のタイミングなど多岐にわたる。このようなスクリーニング培養に適した小スケールの5 mL培養槽も同時に開発している(図3b)。5 mL培養槽は6ウェルタイタープレートと同サイズの6連タイプを用意している(図3c)。

iPS細胞を培養する方法を選択する指標として、スケラブルであることも重要である。目的とする細胞数へ到達するためには、どのような培養方法を選択すべきかということである。筆者らが開発した4種類のバイオリアクターは、iPS細胞の未分化維持培養で100万細胞から10億細胞までの1000倍スケールをカバーすることを想定している。4種類のバイオリアクターでiPS細胞が同様に生育し、求められる品質が維持されていることを検証した。1 mLあたり約10万細胞の単細胞のiPS細胞を

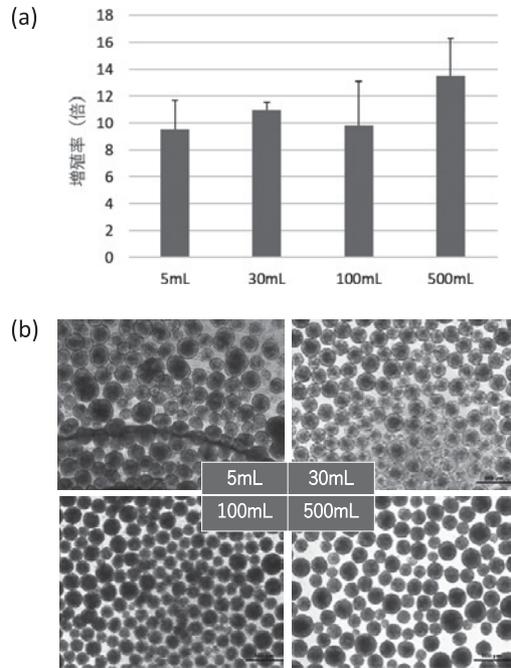


図4. バイオリアクター4種の培養4日目の結果比較. 播種細胞数に対する細胞増殖の倍率 (a) 細胞凝集塊の顕微鏡画像 (b).

播種し、4種のバイオリアクターの翼端速度をおよそ 5.5 m/min に合わせて比較培養を行った。培養開始から2日目まで Rho 結合キナーゼ (Rho-associated coiled-coil forming kinase : ROCK) 阻害剤を投入し、2日目と3日目に培地交換を行い、4日目で細胞凝集塊を回収し、凝集塊のサイズ計測と生細胞数の計測を行った。結果、4種のバイオリアクターはいずれも約10倍の生育を示し (図4a)、直径数100  $\mu\text{m}$  の均一な細胞凝集塊が得られた (図4b)。増殖したiPS細胞が未分化性を維持していることは、フローサイトメーターによって確認している。

#### スケールアップの課題

iPS細胞を培養する目的は、iPS細胞から分化誘導された各種の細胞を大量に得ることである。松浦らは筆者らの100 mLリアクターを用いて心筋誘導培養を行い、約1億個のトロポニン陽性細胞の誘導に成功している<sup>2)</sup>。分化誘導の工程は細胞種によってさまざまであるが、CHO細胞などによる物質生産と大きく異なるのは、iPS細胞の培養は未分化状態を維持しながらの増殖培養とその後の分化培養では、培養の連続性がないということである。すなわち、単一成分の培地を供給し続けるのではなく、培養の一定期間ごとに成分の異なる所定の培地へ完全に入れ替えなければならないということである。また、分化誘導期間は目的とする細胞種によって多岐にわたり、最長で数か月もの長期間無菌培養を維持しなければならないことも課題である。筆者らは、ある程度成長した細胞凝集塊は静止状態で速やかに沈降することを利

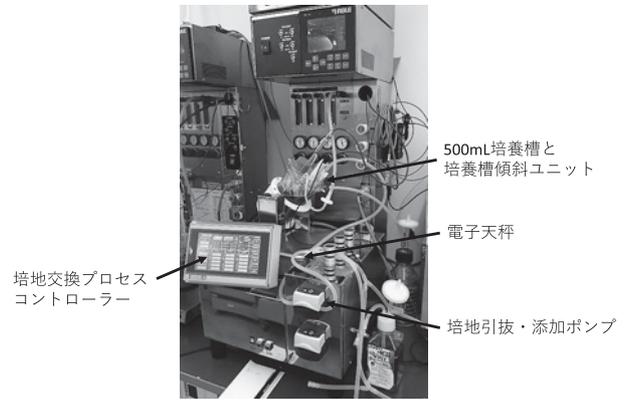


図5. 500 mLリアクターに対応した培地交換システム

用し、攪拌停止から培地引抜、培地添加までの工程を自動かつ安全確実に実行する装置を開発した (図5)。この装置は500 mLリアクターに対応し、①攪拌停止、②培養槽傾斜、③培地引抜、④培地添加の工程を自動で実行する。傾斜ユニット下部には電子天秤を備え、引抜量と添加量を管理できる。残液量を10%程度に抑えることができ、iPS細胞の未分化維持培養から心筋誘導培養まで対応できることを確認している。

#### 今後の展望

ヒトiPS細胞の浮遊攪拌培養は、小スケールから大スケールまで対応できるスケラブルな培養手段として注目されている。それは、ヒトiPS細胞の利用が研究段階から応用段階へ進んできたことの証である。再生医療等製品の製造においては、培養工程はもとより、その上流あるいは下流の工程についても開発途上にあるのが現状である。iPS細胞の浮遊攪拌培養においては、培養工程ではスケラブルかつ安全確実な培地交換方法を確立すること、下流工程では大量培養した細胞凝集塊を均一な単細胞にまで迅速かつ均質に調整し保存する手段に対応することが課題となる。

#### 謝 辞

本研究は、総合科学技術会議により制度設計され日本学術振興会を通して助成された最先端研究開発支援プログラム「再生医療産業化に向けたシステムインテグレーション—臓器ファクトリーの創生—」、科学技術振興機構 (現AMED) から支援された「再生医療実現拠点ネットワークプログラム」(技術開発個別課題)、NEDO (現AMED) から支援された「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発」(ヒト多能性幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発) の研究による成果である。

#### 文 献

- 1) Bratt-Leal, A. M. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **25**, 43 (2009).
- 2) Matsuura, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 321 (2012).