
ヒト ES/iPS 細胞の大量培養に適した 細胞培養基材の開発に成功

ーナノ加工した「布」が細胞培養の新機軸へー

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) の陳勇 (チェン・ヨン) 特定拠点教授、亀井謙一郎 (かめい・けんいちろう) 特定准教授、劉莉 (リュウ・リ) 特定拠点助教らの研究グループとグンゼ株式会社は共同で、ヒト ES/iPS 細胞^{*1}の大量培養を可能にする、「布」を足場とした細胞培養基材の開発に、世界で初めて成功しました。これは、従来とは全く異なる培養方法で、今後、再生医療などにおいてヒト ES/iPS 細胞が実用化される際に、十分な細胞数を獲得するための重要な技術となることが期待されます。

ヒト ES/iPS 細胞は再生医療や創薬などで活躍する細胞として期待されています。その一方で従来のような培養皿やフラスコを用いた 2 次元 (平面) 細胞培養では、空間を上手く活用できず、実用化の際に十分な細胞数を得ることが非常に困難でした。また、大量細胞培養法として近年着目されている液体に細胞を浮遊させて行う培養法では、不規則な細胞凝集や攪拌による細胞ストレスがヒト ES/iPS 細胞の品質に大きく影響を及ぼしてしまいました。

そこで今回の研究では、フィルターなどの分野などで実用化されているナノ加工技術を基にした「ナノファイバー」に着目しました。このナノファイバーを細胞の人工的な足場として用いることによって、ヒト ES/iPS 細胞の未分化状態を維持したまま増殖を促すことができます。しかし、ナノファイバーは材料としてはもろく、大量培養に応用することができていませんでした。本成果では、物理的な強度があるマイクロファイバーをナノファイバーを組み合わせ、丈夫な新しい基材「Fiber-on-Fiber (ファイバー・オン・ファイバー)」の開発に成功しました。さらに、この基材をガス透過性のある細胞培養バッグに封入し、上手くバッグ内の空間を用いることによって、細胞にストレスをかけずにヒト ES/iPS 細胞を大量培養できる方法の開発にも成功しています。これらを用いて、世界的にも例を見ない非常に効率の良い細胞増殖効率を得ることに成功しました。

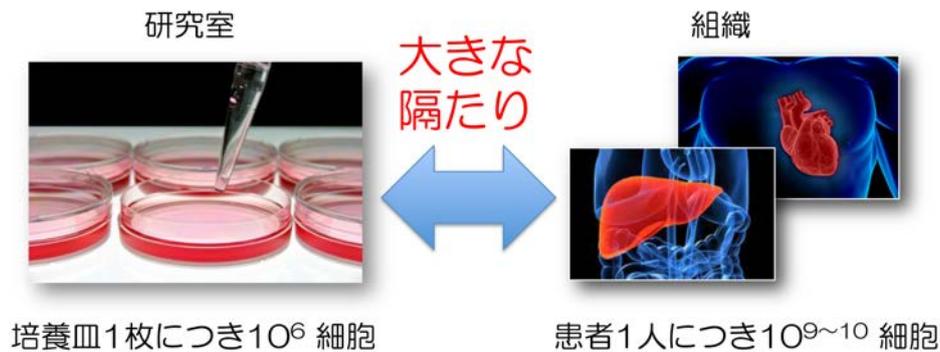
本成果により、ヒト ES/iPS 細胞を効率よく培養することができ、目的組織細胞への分化誘導に必要な量の細胞を準備、創薬や再生医療の発展に寄与することが期待されます。

本成果はオランダの科学誌「Biomaterials (バイオマテリアルズ)」に掲載されました。

1. 背景

ヒト ES/iPS 細胞は、再生医療、細胞移植治療、創薬などに応用・実用化が期待されており、実用化へ向けて研究・開発が進められています。これらの実用化へ向けては、品質・純度が共に高い細胞が大量に必要となってきます。

しかしながら、従来から用いられている細胞培養法ではヒト ES/iPS 細胞を大量に培養することは困難でした。長年行われている細胞培養法では、細胞培養フラスコや細胞培養皿などを使用しています。しかし、従来法は研究室レベルでは十分な細胞数 (10^6 個) ですが、患者 1 人を治療するためには細胞培養皿が 1000 枚以上必要 ($10^9 \sim 10^{10}$ 個) となり、大きな隔たりがあります (図 1)。そこで、従来法に代わる新しい培養法の開発が必要となっています。



患者1人につき培養皿1000枚以上が必要

図 1 従来から使用されている細胞培養皿と、患者さんを治療するために必要な細胞数との比較

現在、これらの問題点を解決するために様々な細胞大量培養法の開発が行われています (図 2)。例えば、細胞凝集塊や微粒子状での培養、カプセル内での細胞封入、それらを培地中に浮遊させて培養する方法などが挙げられます。しかしながら、どの方法も培地を攪拌するときに起きてしまうランダムな細胞凝集と細胞ストレスによって、細胞の低品質化や細胞死が起こり、得られる細胞数が減少することなどが問題となっており、より効率的に高品質の細胞を培養できる方法が必要とされています。

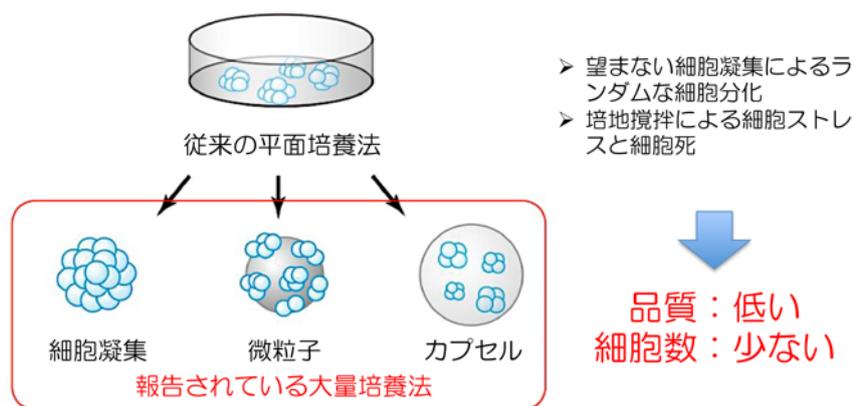


図 2 これまでに開発されてきたヒト ES/iPS 細胞大量培養法とその問題点

私たちはこれまでに「ナノファイバー」技術を細胞の「足場」として使って、新しい培養法を開発する研究を行ってきました。このナノファイバーとは、髪の毛の 1000 分の 1 程度の細さ (300 nm 程度) で、従来の細胞培養皿と比較してより細胞が接着・増殖しやすくなる基材です。私達の体の中では、細

胞の足場（細胞外マトリックス ※2）はナノファイバー状の構造を持っており、細胞の増殖や機能を制御しています（図3）。これを人工的に作製することが出来れば、私達も自在に細胞の増殖を制御できるようになると考えました。



図3 私達の体の中における細胞足場（細胞外マトリックス;ECM。図中では緑で示されている。）はナノファイバー状の構造で、細胞の増殖や機能を厳密に制御している。

そこで、私たちはゼリーや薬のカプセルで使用されるようなゼラチン ※3を使って作製したナノファイバーを使って、ヒトES/iPS細胞を培養する方法の開発に成功していました(Liu et al., *Biomaterials*, 2014)。その一方で、このゼラチンナノファイバーはあまりの細さからとても壊れやすく、大量培養には適していませんでした。

2. 研究内容と成果

本成果では、これらの問題点を解決するために、ゼラチンナノファイバーの下により丈夫なマイクロファイバーを置いた階層的な細胞培養基材を開発しました（図4）。私たちはこれを「ファイバー・オン・ファイバー」と名付けました。マイクロファイバーの素材としては、生体適合性が高く、生分解性もあり、既に臨床でも使用されているポリグリコール酸 ※4を使用しました。

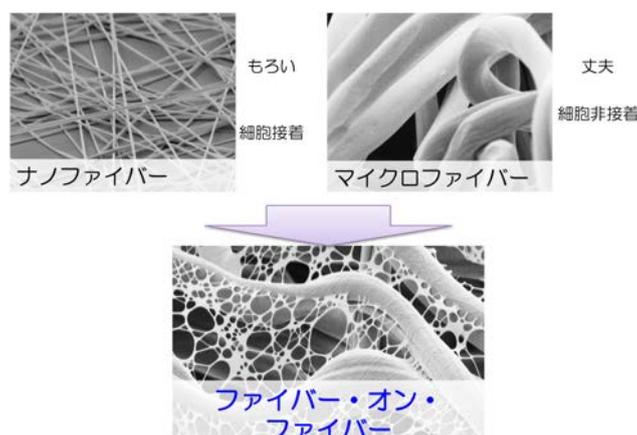
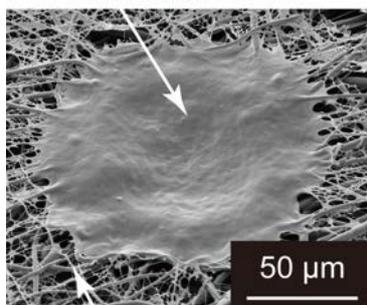


図 4 本研究成果である「ファイバー・オン・ファイバー」。ナノファイバーによるヒト ES/iPS 細胞の増殖・未分化維持能と、マイクロファイバーが持つ丈夫さを兼ね揃えた、新しい細胞培養基材。

まず、「ファイバー・オン・ファイバー」上でヒト ES/iPS 細胞が培養できることを確認しました (図 5)。こうして培養した幹細胞について、幹細胞未分化であることを示す目印である SSEA4 や TRA-1-60 などの発現を測定したところ、96%以上の細胞がこれらを発現していることを確認できました。

ヒト ES 細胞のコロニー

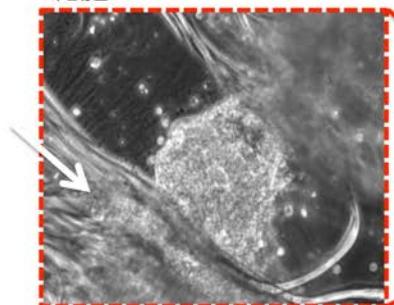


ナノファイバー

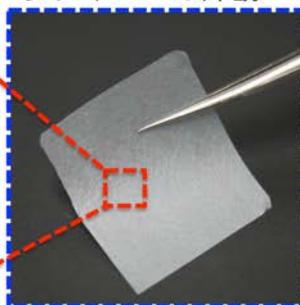
図 5 本研究成果である「ファイバー・オン・ファイバー」と、その上で培養したヒト ES 細胞の電子顕微鏡写真。ナノファイバー上でコロニーを形成しながら増殖したことが確認できる。

この「ファイバー・オン・ファイバー」は、その上で細胞を培養したままピンセットなどで持ったり折り曲げたりする「布」の様な培養基材で (図 6)、この性質を使ってヒト ES/iPS 細胞の大量培養法の開発に取り組みました。まず、従来からよく使用される培養液^{*5} 攪拌機能がついたスピナーフラスコではなく、ガス透過性を持ち静置培養に適した細胞培養バックを使用しました。静置培養することで細胞へのストレスを軽減することができます。また、折ったり重ねたりできるこの基材を細胞培養バックに 50 枚以上を封入することで、バッグ内の細胞培養液を効率よく使用することができます。従来は毎日培養液を交換する必要がありましたが、この方法ではバッグ中に十分な培養液があるため、1 週間の培養期間中 2 回だけで済み、しかも、培養液を交換する際には、付属のチューブを使って行うので雑菌などの混入も防ぐことができます。加えて、「ファイバー・オン・ファイバー」は細胞接着が非常に優れているため非常に少ない細胞数からでも培養を開始することができます。さらに本成果では、1 週間で細胞数が 40~50 倍以上に増えており、このように短期間で高効率に細胞増殖できる培養系は世界的にも類を見ません。

ファイバー・オン・
ファイバー上のヒト ES
細胞



ファイバー・オン・
ファイバーの外観



ファイバー・オン・ファ
イバーを封入した細胞培
養バック

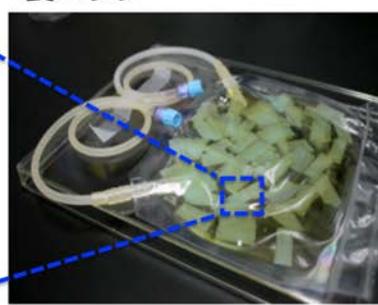


図 6 本研究成果である「ファイバー・オン・ファイバー」と細胞培養バックを用いた大量培養法。使用したファイバー・オン・ファイバーの大きさは 20 mm×25 mm。

3. 今後の展開

本成果では、まず「ファイバー・オン・ファイバー」という新しい細胞培養基材を開発し、それを用いてヒト ES/iPS 細胞の新しい大量培養法の開発に成功しました。これは、従来から提唱されていた大量培養法とは全く違う、ナノ加工された「布」を用いる方法です。今後、組織工学や再生医療の発展に貢献することが期待されます。また、ヒト ES/iPS 細胞だけでなく、様々な接着系の細胞を大量培養するために基材としても利用されることが期待されます。

また、本成果で開発した基材は、ヒト ES/iPS 細胞からの分化誘導にも使用できる可能性があります。生体適合性の高い材料も使用しているので、細胞移植用の基材としての可能性もあります。現在、本研究で開発した「ファイバー・オン・ファイバー」はその実用化へと向けての取り組みを進めています。

4. 用語解説

- ※1 **ヒト ES/iPS 細胞**：ヒト由来の胚性幹細胞 (embryonic stem cell) と人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell) の略。生体外における無限回の自己複製能と、あらゆる組織細胞へと分化が可能な、特徴的な性質も持っている。そのため、再生医療や創薬への実用化が期待されている。ヒト iPS 細胞は、本学山中教授、iPS 細胞研究所所長によって開発され、その誘導機構の発見から、2012年にジョン・ガードン ケンブリッジ大学名誉教授と共にノーベル賞が授与された。
- ※2 **細胞外マトリックス**：生体内において、細胞の外にあるタンパク質や構造体のことであり、細胞外微小環境を構成する因子の一つである。コラーゲンやラミニンなどが代表的な細胞外マトリックスタンパクである。
- ※3 **ゼラチン**：コラーゲンなどの変性物で、本研究では、組織を酸処理して得られたものを使用している。一般的に、食用ではゼリー等で使用されるが、薬用カプセルとしても使用されている。
- ※4 **ポリグリコール酸**：生体適合性が高く、生分解性もあるポリマー。縫合糸などとして臨床でも使用されている。
- ※5 **培養液**：細胞を培養するために準備した溶液で、細胞が生存するために必要なアミノ酸、糖、成長因子や無機イオンなどで構成されている。

5. 論文タイトル・著者

“Nano-on-micro fibrous extracellular matrices for scalable expansion of human ES/iPS cells”

Li Liu,[‡] Ken-ichiro Kamei,^{‡*} Momoko Yoshioka, Minako Nakajima, Junjun Li, Nanae Fujimoto, Shiho Terada, Yumie Tokunaga, Yoshie Koyama, Hideki Sato, Kouichi Hasegawa, Norio Nakatsuji and Yong Chen*

Biomaterials | DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.039

*は本研究全般に関する責任著者

#は本論文の筆頭著者

6. 支援について

本成果に至るまでに、日本学術振興会 科学研究費補助金（若手（A）代表 亀井謙一郎、23681028；若手（B）代表 劉莉、22710116；基盤（B）代表 陳勇、22350104）、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO 研究代表 中辻憲夫）、文部科学省 WPIプログラムの支援を受けています。

7. iCeMS について

京都大学 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS＝アイセムス）は、文部科学省「世界トップレベル研究拠点（WPI）プログラム」に平成 19 年度に採択された拠点です。iCeMS では、生物学、物理学、化学の分野を超えて新しい学問を作り、その学問を社会に還元することを目標に活動している日本で唯一の研究拠点了。その新しい学問からは、汚水や空気の浄化といった環境問題の解決、脳の若返りといった医療に役立つ可能性を秘めたとてつもないアイデアが次々と生まれています。

詳しくはウェブサイトをご覧ください。 <http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/>

8. 世界トップレベル研究拠点プログラム（WPI）について

WPI は、平成 19 年度から開始された文部科学省の事業です。WPI では、世界トップレベルの研究に取り組むことはもちろんのこと、従来の大学のシステムでは成しえない研究組織・研究環境・事務体制の国際化を目指しています。これらは短期間で実現できるものではないため、10 年という実施期間が設けられており、各拠点はこれまで様々な取り組みを行ってきました。その結果、拠点長のリーダーシップのもと、拠点内の公用語を英語としたり、研究者の外国人比率 30% を達成するなど先進的な取り組みを行っているほか、現在までに、採択拠点からノーベル賞受賞者を 2 名（山中伸弥先生、梶田隆章先生）輩出するなど、高い成果を挙げています。

詳しくはウェブサイトをご覧ください。 <https://www.jsps.go.jp/wpi/>