

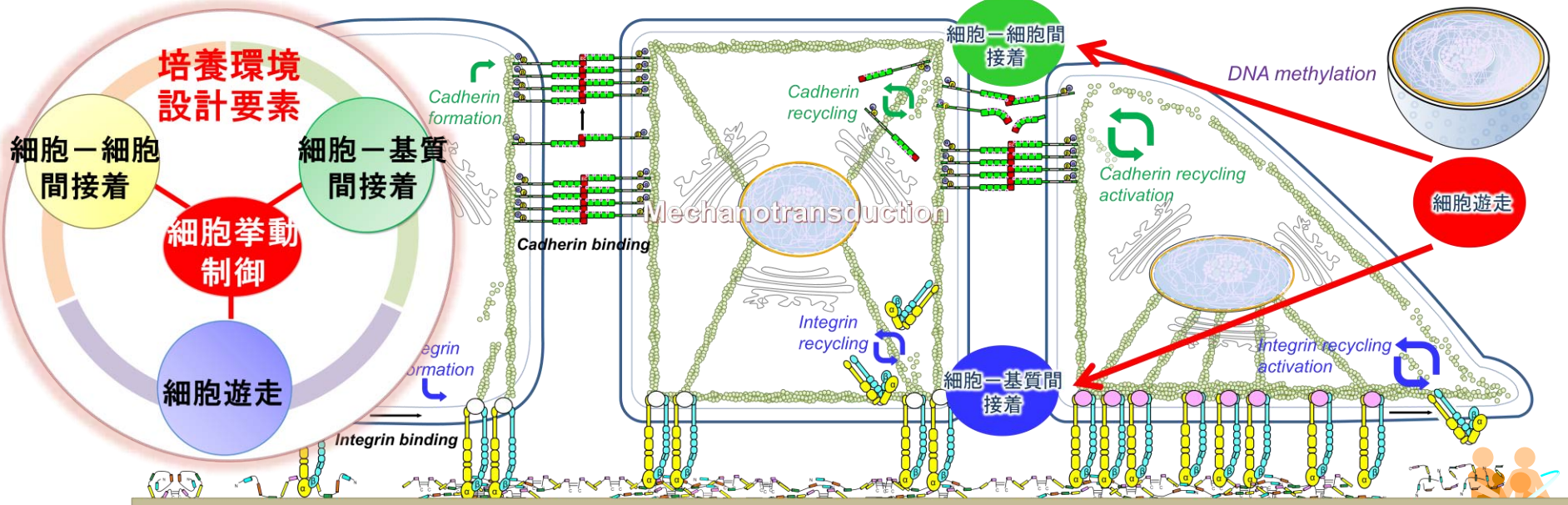
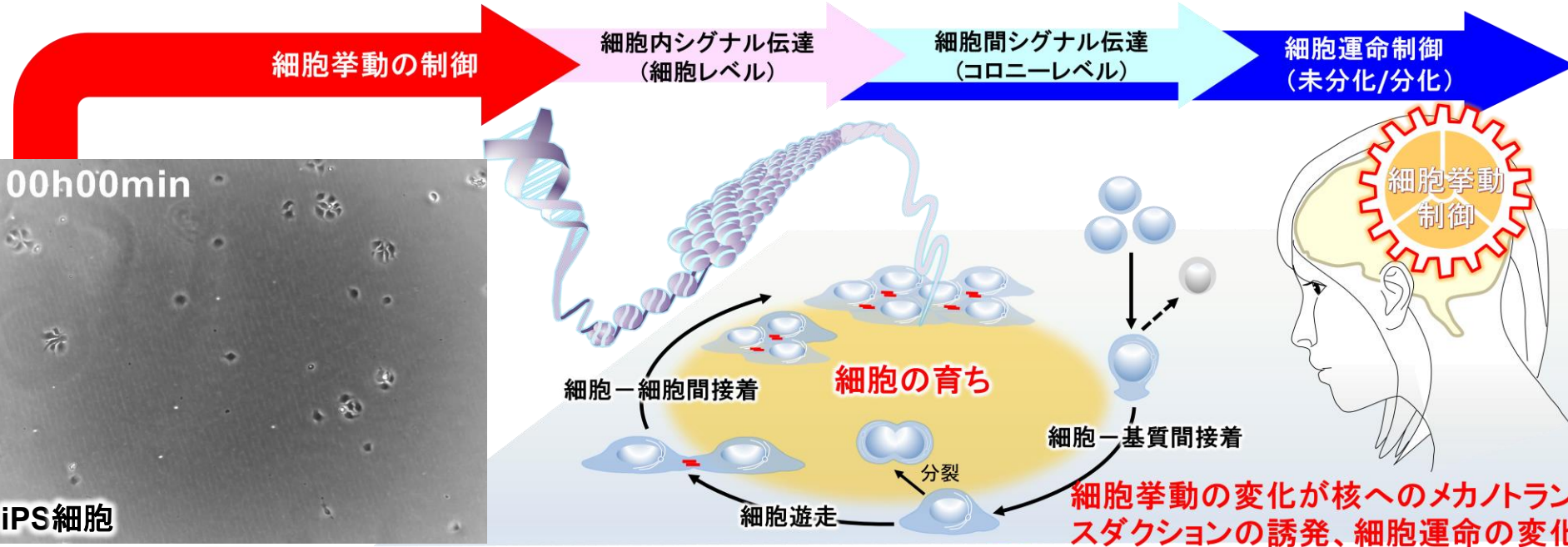
再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システム開発の成果発表

ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンを用いた ヒト iPS 細胞集塊分割技術とその高密度培養への応用

2018年12月21日(金)

大阪大学大学院工学研究科
金 美海

ヒトiPS未分化維持大量培養の効率化に関する研究



細胞収縮の観点から培養ツール・手法の開発が必要

ヒトiPS細胞の質的・量的改善を目指した培養技術の開発

既存の多能性幹細胞培養の境界領域の拡大を目指した細胞培養手法の開発

○現状の幹細胞培養

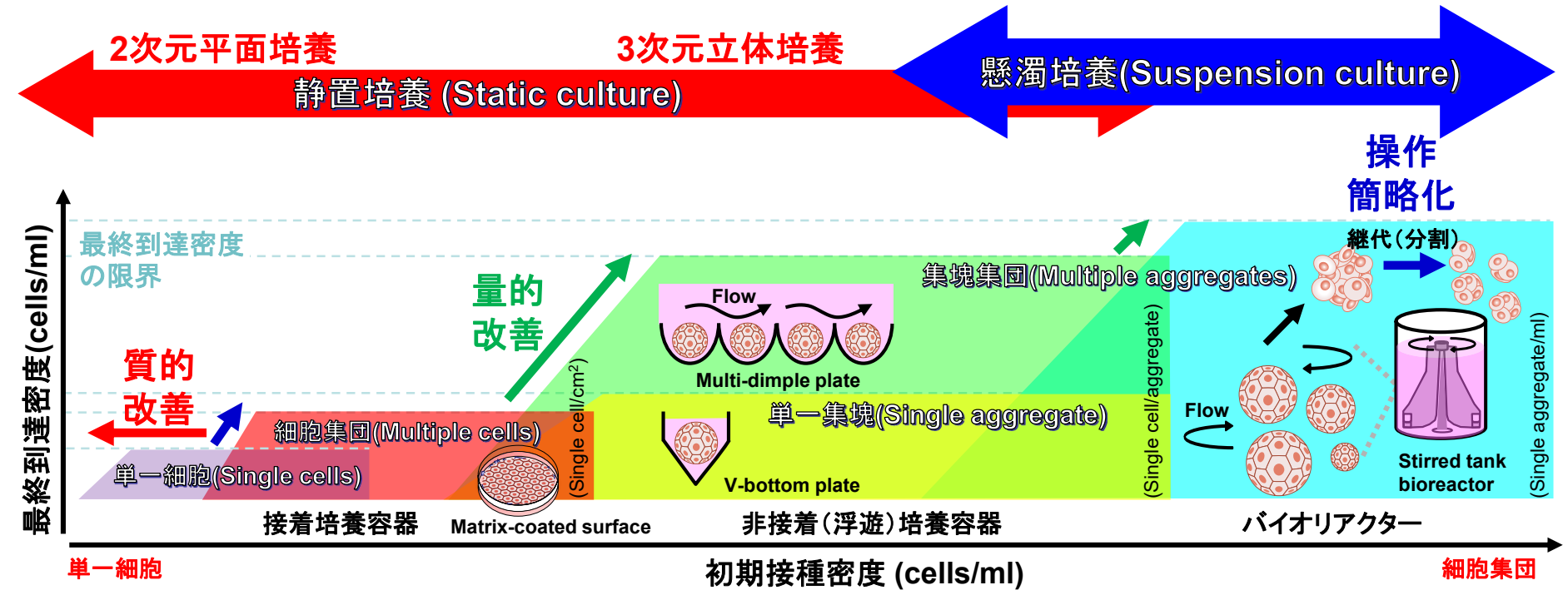
限界条件

酵素処理による単分散処理で接種後にアポトーシスを引き起こしやすい

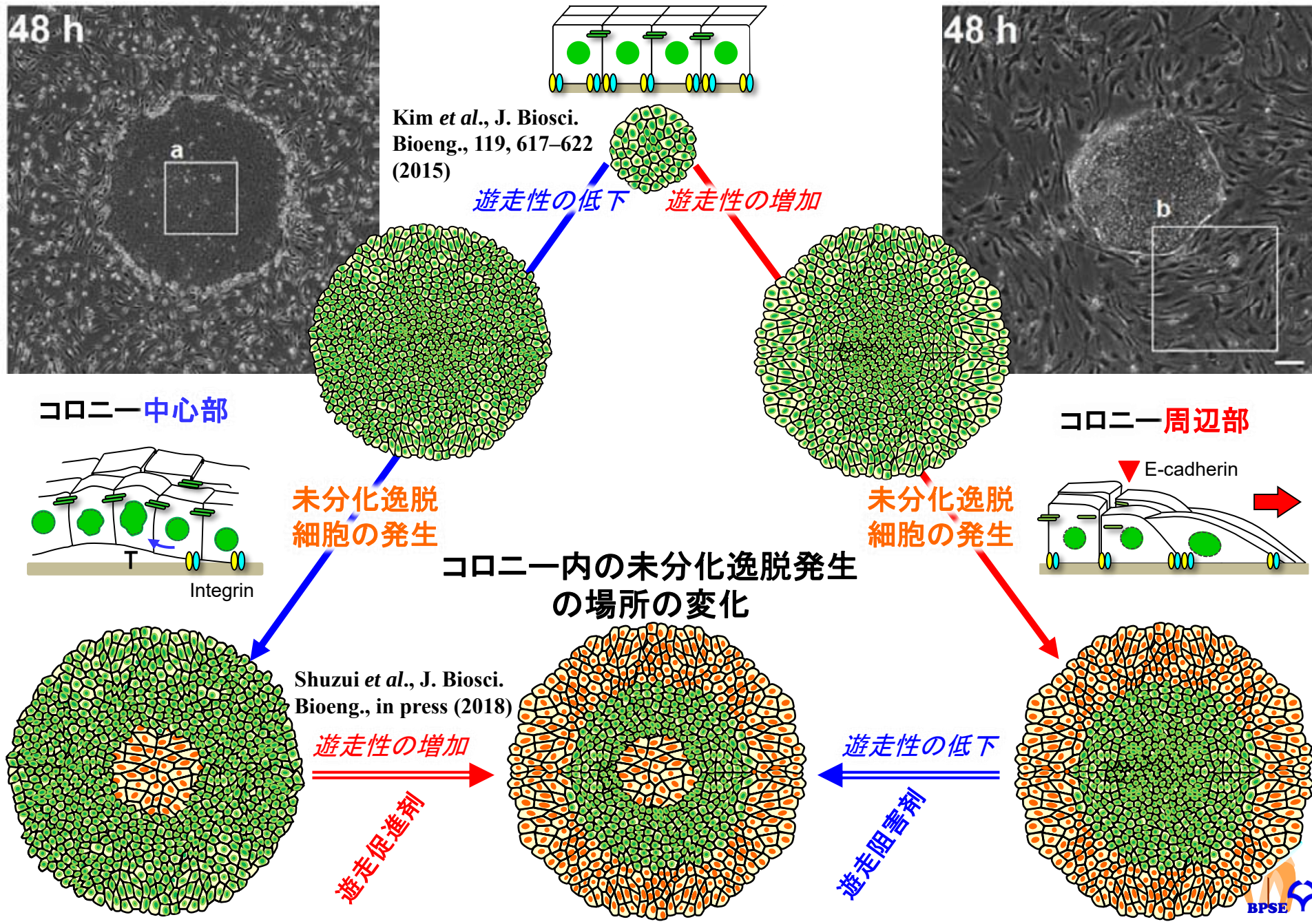
培養容器・培養槽内の培養操作が複雑で非効率的、培養生産コストが高い

細胞集塊内・培養槽内の時間的、空間的な位置の差により質的・量的の限界がおきやすい

攪拌によるストレスで接種後の集塊形成・分裂の際にアポトーシスを引き起こしやすい

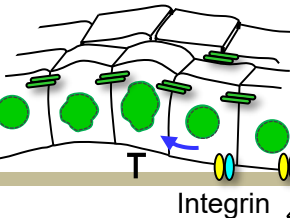


iPSコロニー内における挙動バランス変化と未分化逸脱の関係

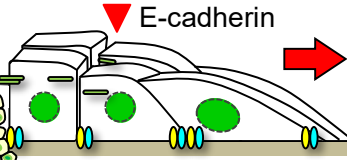


ヒトiPS細胞の質的・量的改善を目指した培養技術の開発

コロニー中心部



コロニー周辺部



未分化維持

整える
(発生防止)

遊走促進剤
細胞間接着阻害剤

遊走阻害剤

Shuzui et al., J. Biosci.
Bioeng., in press (2018)

未分化逸脱
細胞の発生

未分化逸脱
細胞の発生



未分化逸脱
細胞の除去

細胞間接着阻害剤

逸脱細胞
発生防止
増殖促進

Kim et al., Sci. Rep., 73,
93 (2017)
Kim et al., Biotechnol.
J., 14, 3 (2018)

逸脱細胞除去技術の開発

Hemagglutinin(HA)を用いた未分化逸脱細胞の除去によるヒトiPS細胞の未分化維持

ボツリヌス神経毒素複合体の構成成分の hemagglutinin (HA)は、細胞障害性を示さずに E-cadherinと結合することにより、上皮細胞間接着を破壊する活性を持つ。

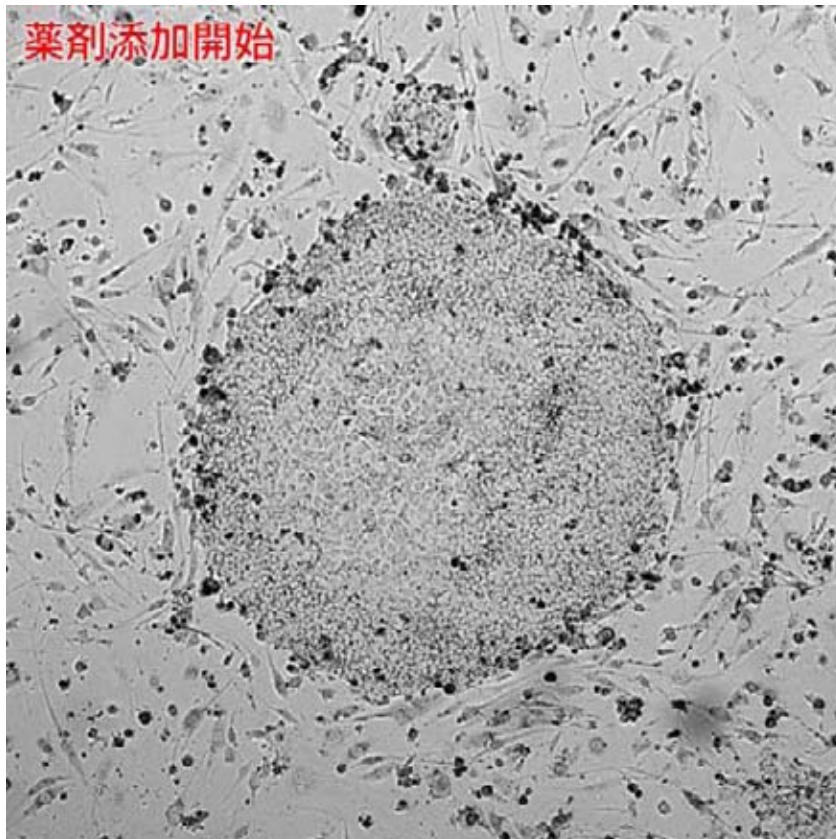


Hasegawa, K. *et al.*,
2007

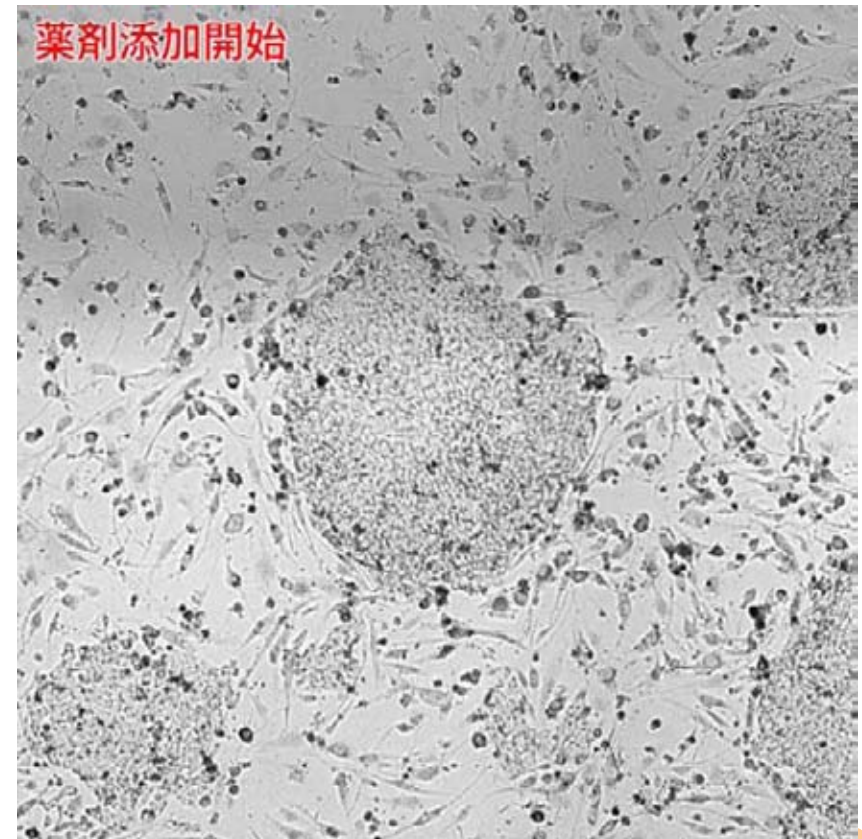
細胞: ヒトiPS細胞 (Tic株)
培地: Reprostem (Reprocell)

HA 50nM

未分化逸脱細胞を含むiPSコロニー



未分化維持iPSコロニー



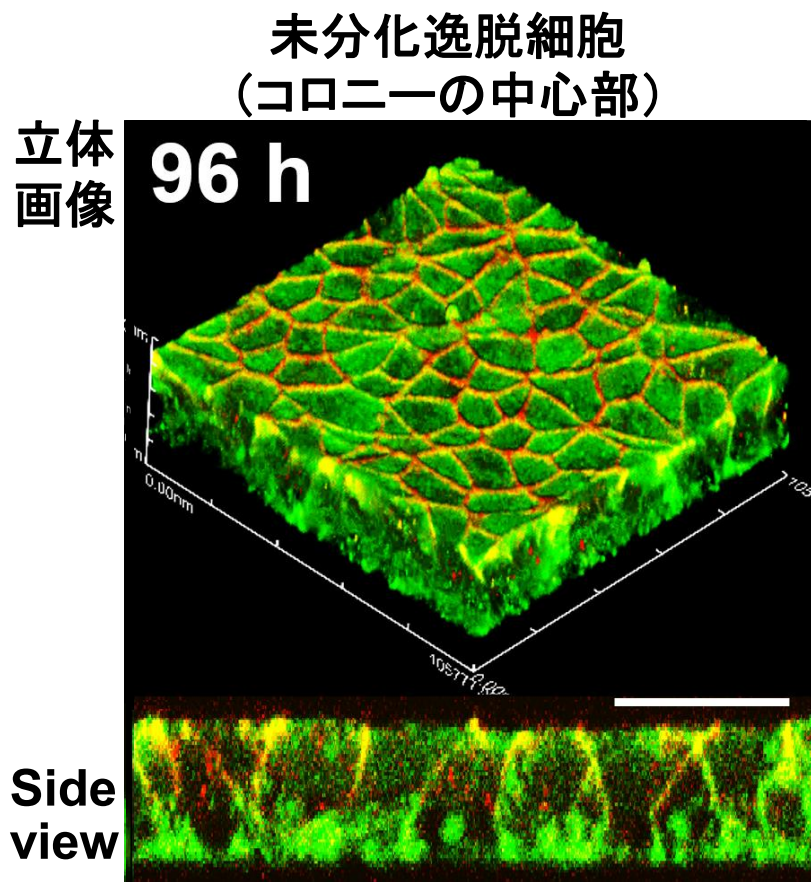
未分化逸脱細胞の除去による未分化維持

Kim *et al.*, Sci Rep. 7, 93 (2017)

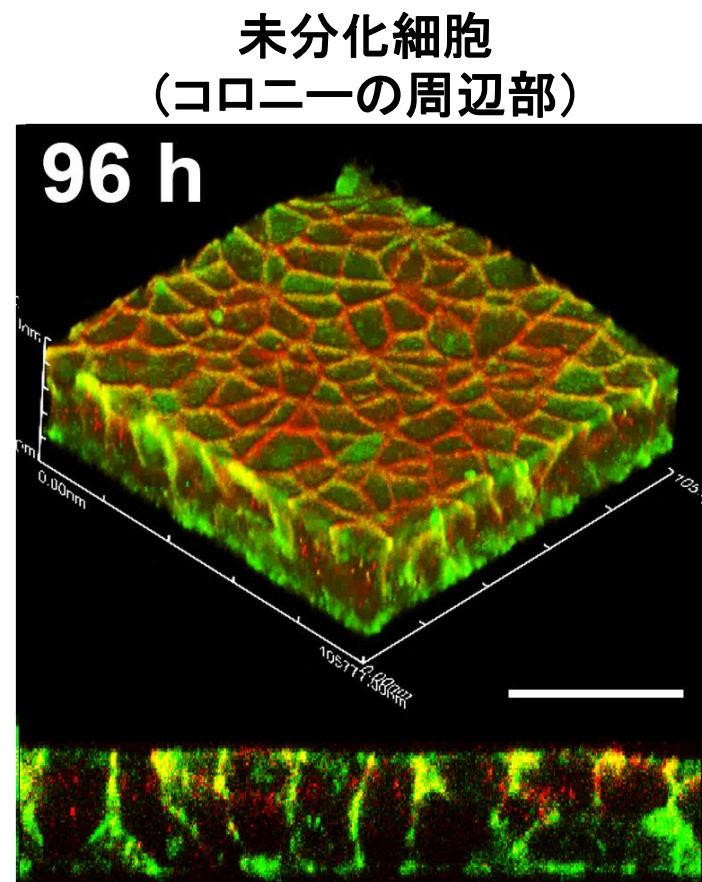
逸脱細胞除去技術の開発

Hemagglutinin(HA)添加後の未分化逸脱細胞と未分化細胞の変化

○細胞骨格(F-actin, 緑)と細胞－細胞間接着(E-cadherin, 赤)の蛍光染色



HA添加後の細胞間接着が崩壊され培養中に自然に除去される→未分化細胞の増殖により中心部が未分化細胞で埋まる



Scale bars: 100 μ m

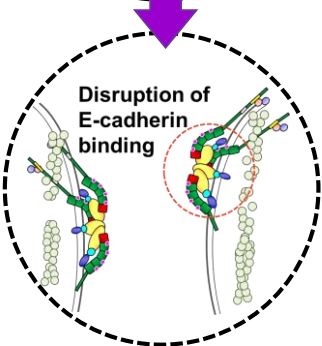
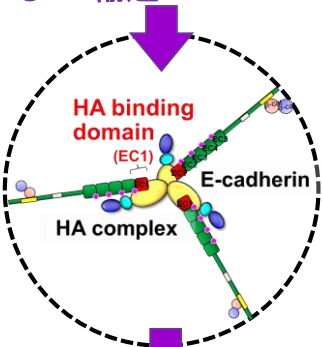
HA添加後の一時的に細胞間接着が崩壊されるが培養中に自然に回復される

逸脱細胞除去技術の開発

HA添加後の細胞内局在: 細胞骨格(F-actin, 灰色)とHA(flag, 緑)の蛍光染色

未分化逸脱細胞(コロニーの中心部)

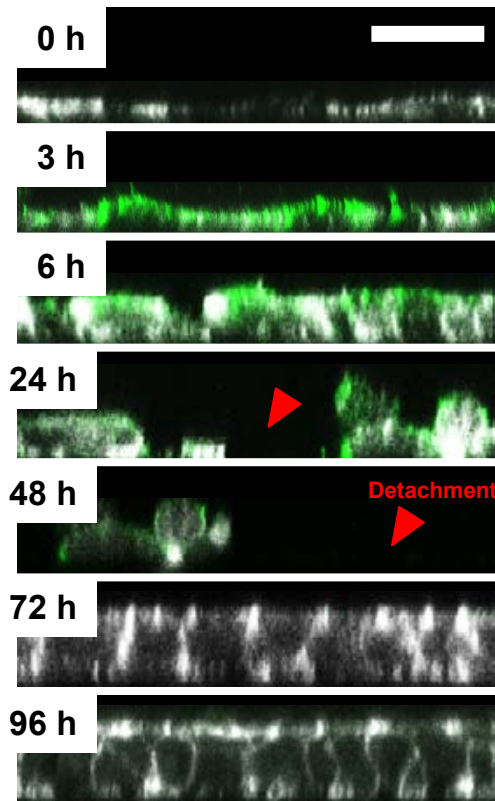
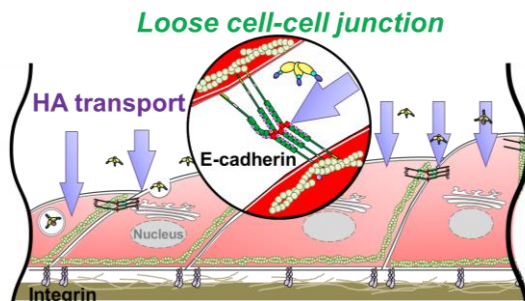
Transcellularと
paracellular経路による
HA輸送



HAによるE-cadherin
接着の阻害

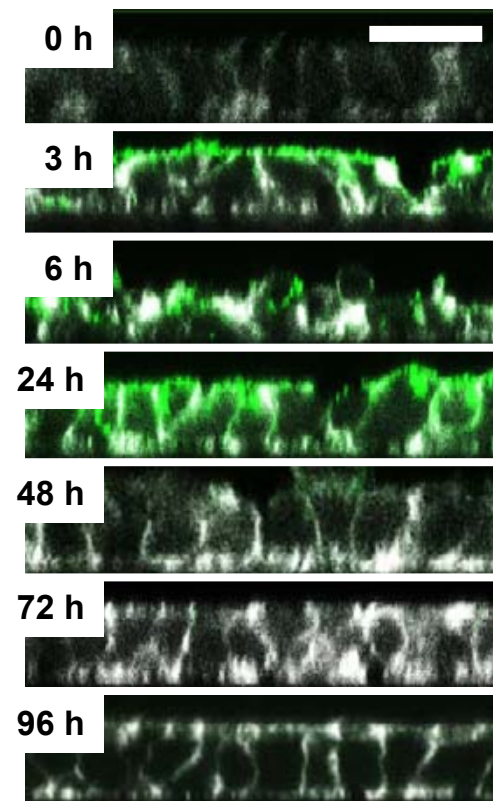
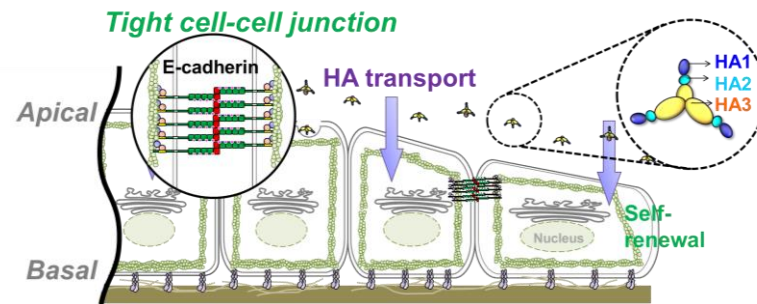


培養中にHAの分解



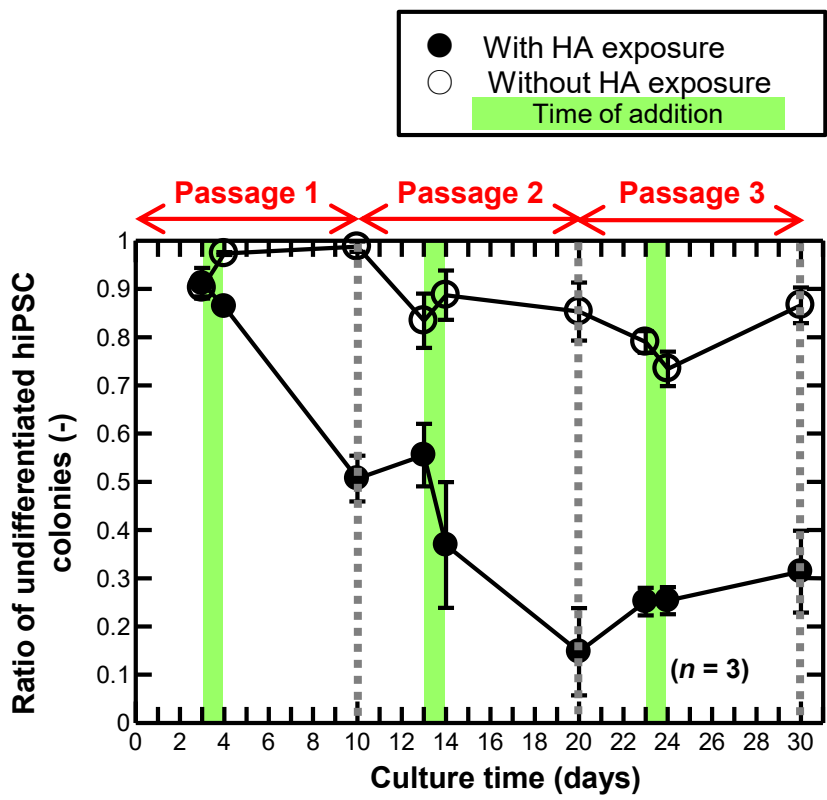
Side view

未分化細胞(コロニーの周辺部)



逸脱細胞除去技術の開発

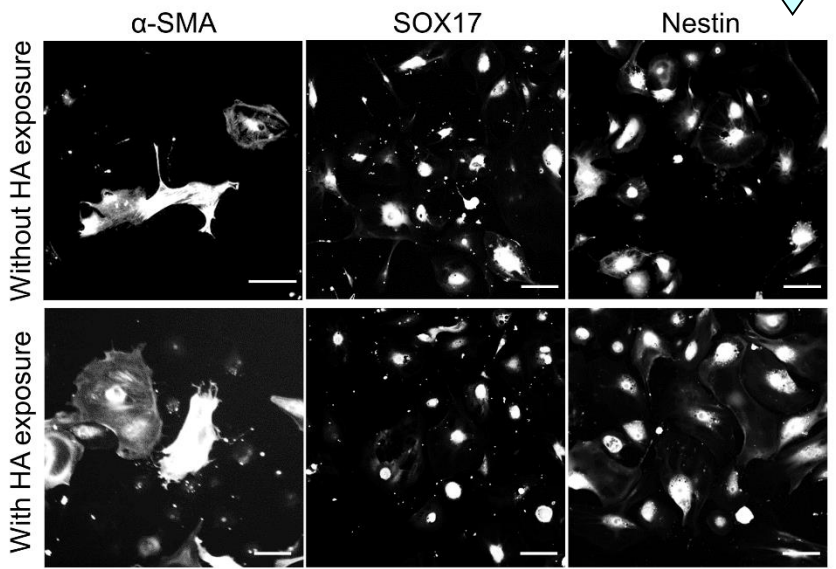
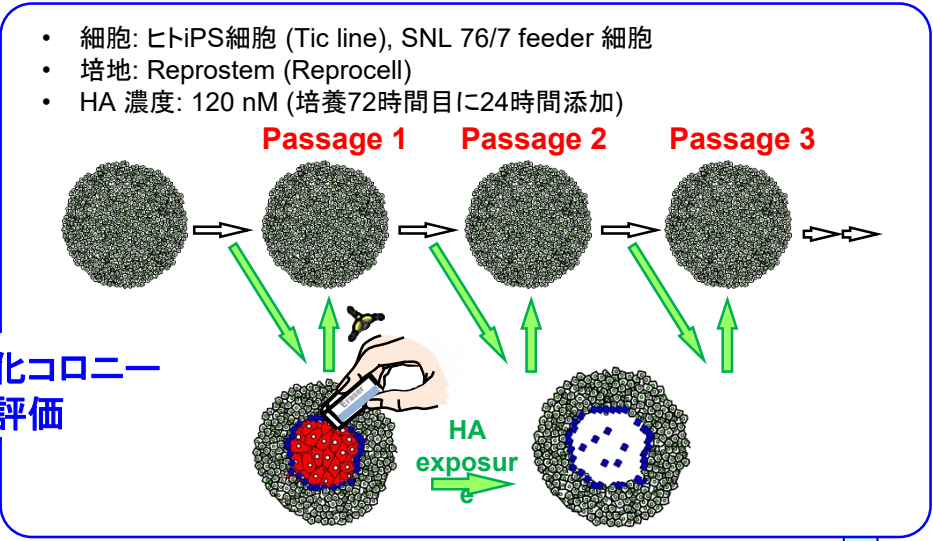
継代培養中の未分化維持能と培養後の分化能の検討



Number of total colonies(colonies)																
Non-addition	355	295	235	193	147	133	427	403	440							
HA addition	325	230	158	247	135	116	386	201	300							

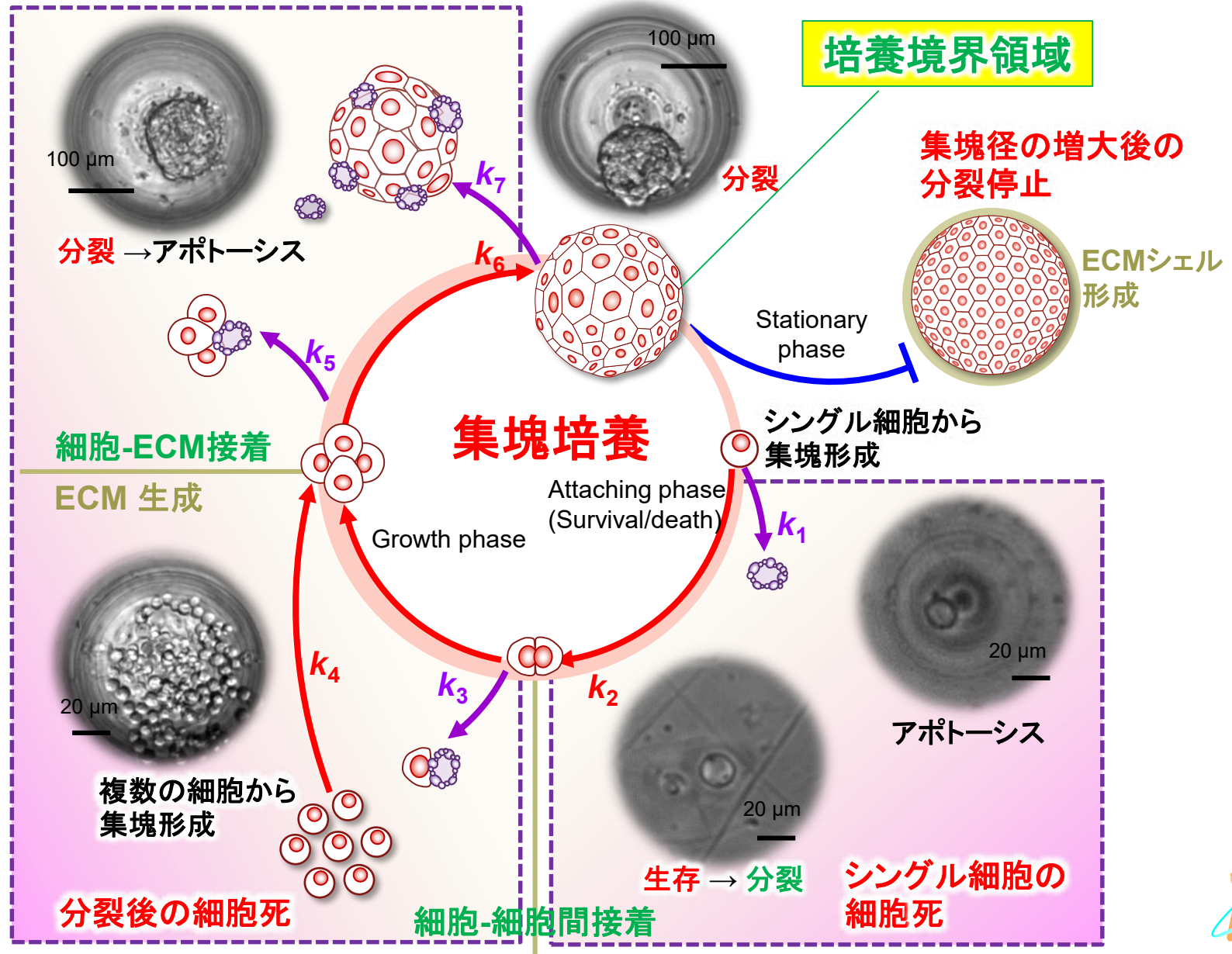
Ratio of undifferentiated hiPSC colonies (-)

$$= \frac{\text{Number of undifferentiated colony}}{\text{Number of total colony}}$$



iPS細胞の未分化維持培養における集塊形成機構の解明

○速度論的な観点によるiPS細胞集塊形成と維持過程

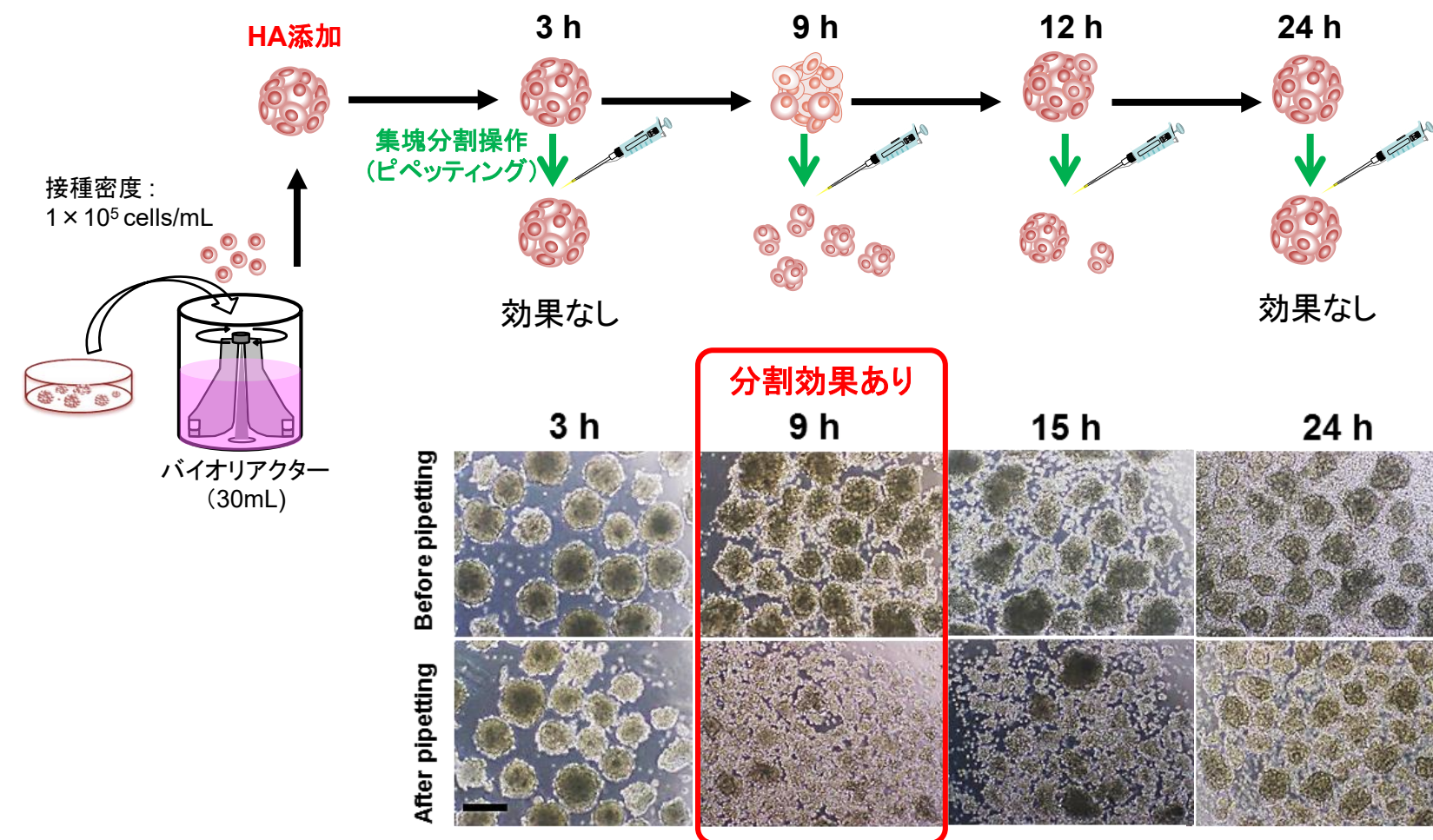


高密度化操作・細胞洗浄濃縮操作技術の開発

HA活性維持期間の把握, 無洗浄プロセスの可能性

Materials and Methods

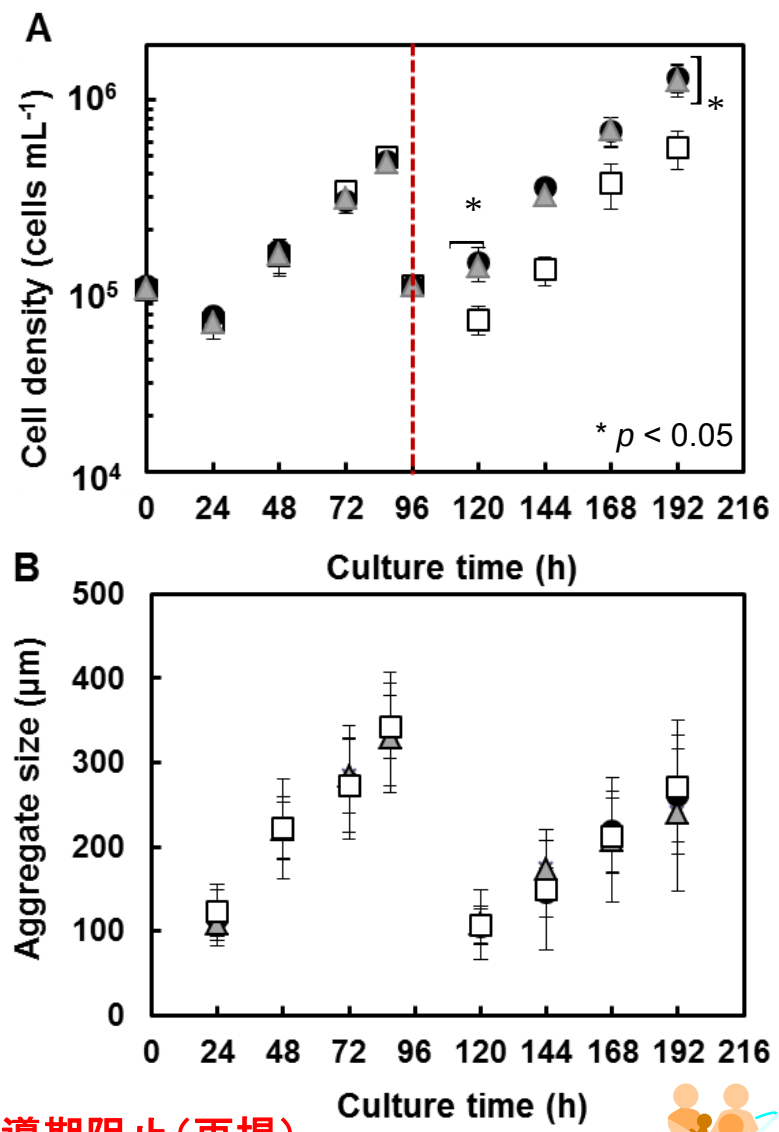
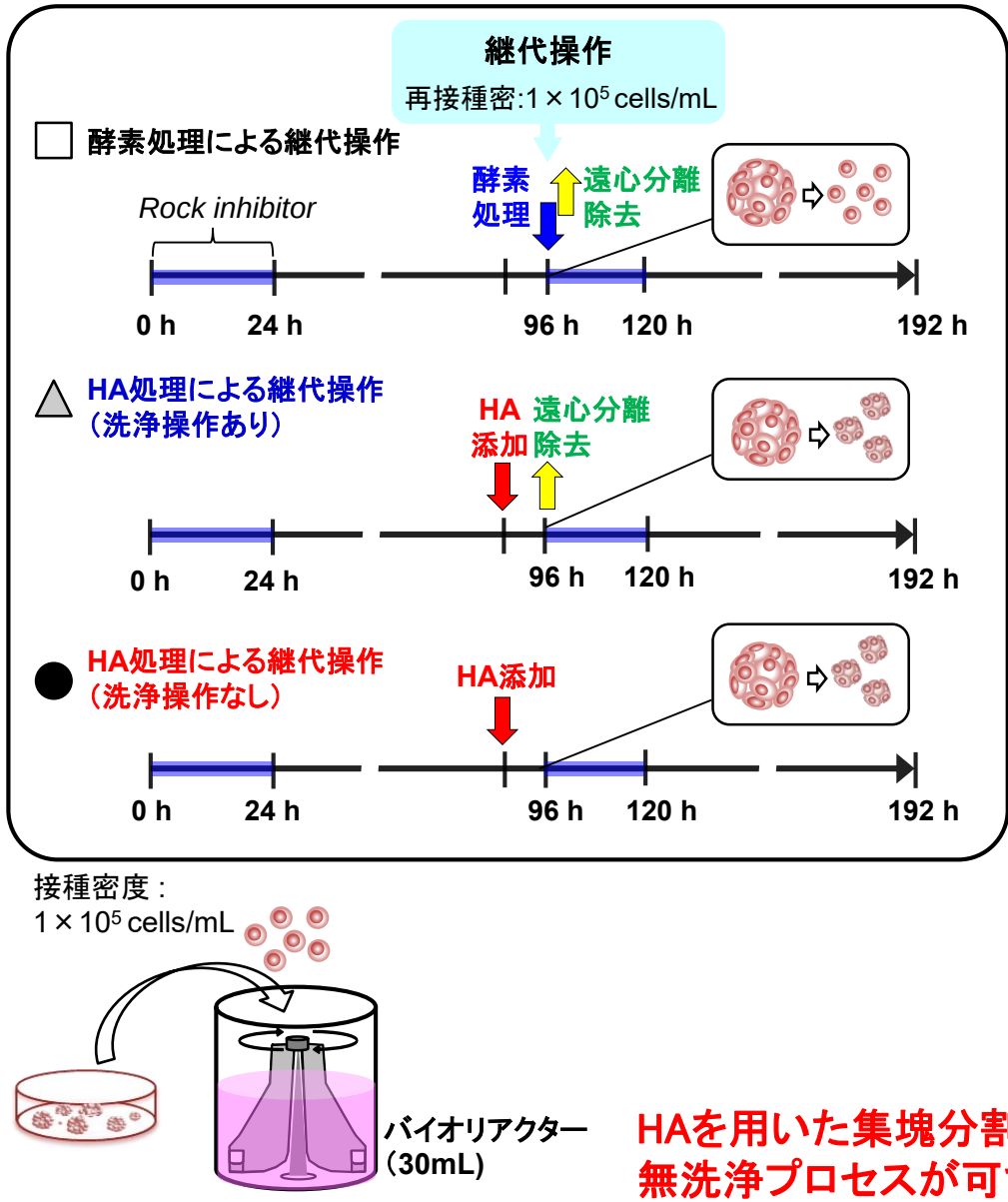
- Cells: human iPS cells (Tic)
- Medium: mTeSR™1 (STEMCELL TECHNOLOGIES)
- Culture vessel: 30 mL bioreactor (Able co. Ltd.)
- Seeding density: 1.0×10^5 cells/mL
- Reagent: HA type B (10 nM), at day 3



HAのエンドサイトーシス?

高密度化操作・細胞洗浄濃縮操作技術の開発

HA活性維持期間の把握, 無洗浄プロセスの可能性

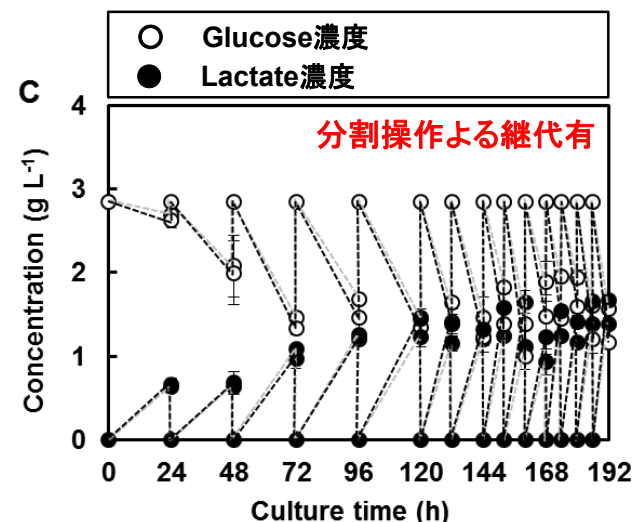
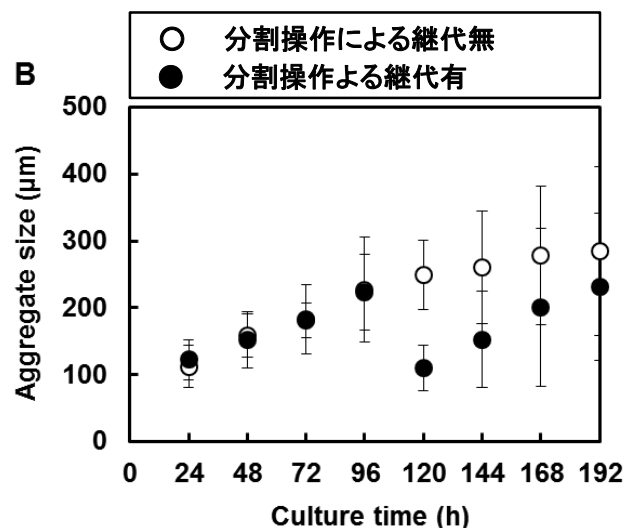
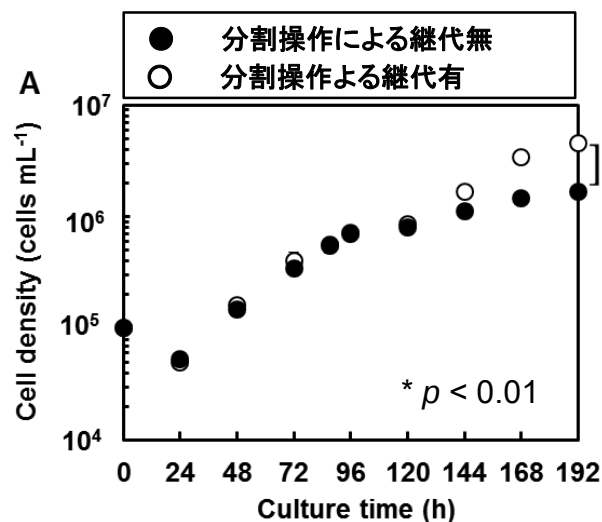
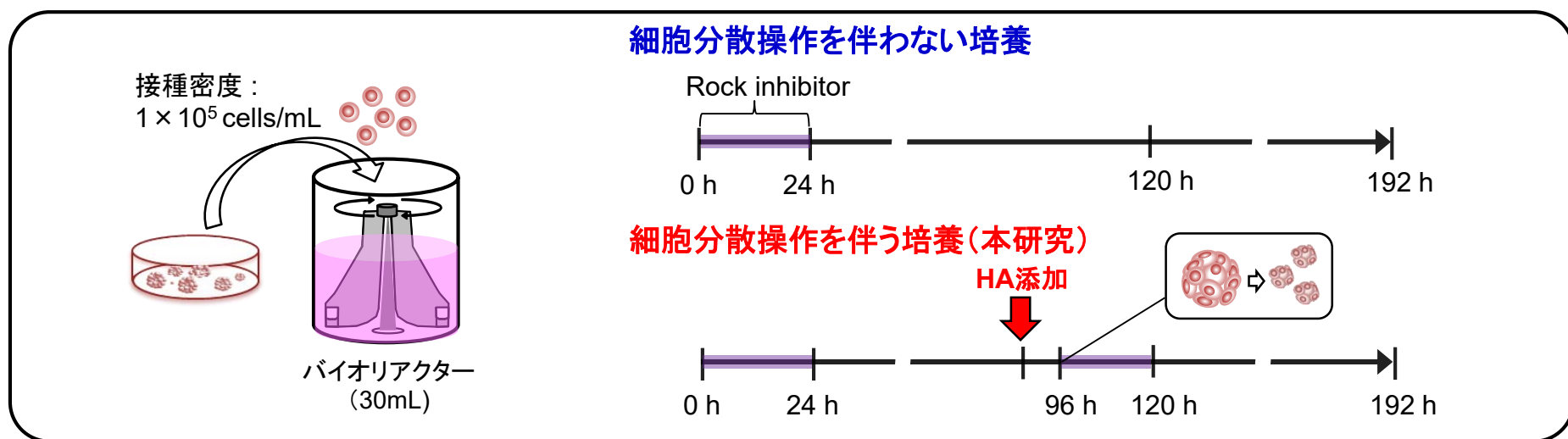


HAを用いた集塊分割, 誘導期阻止(再掲)
無洗浄プロセスが可能



高密度化操作・細胞洗浄濃縮操作技術の開発

無洗浄プロセスを伴った高濃度化操作



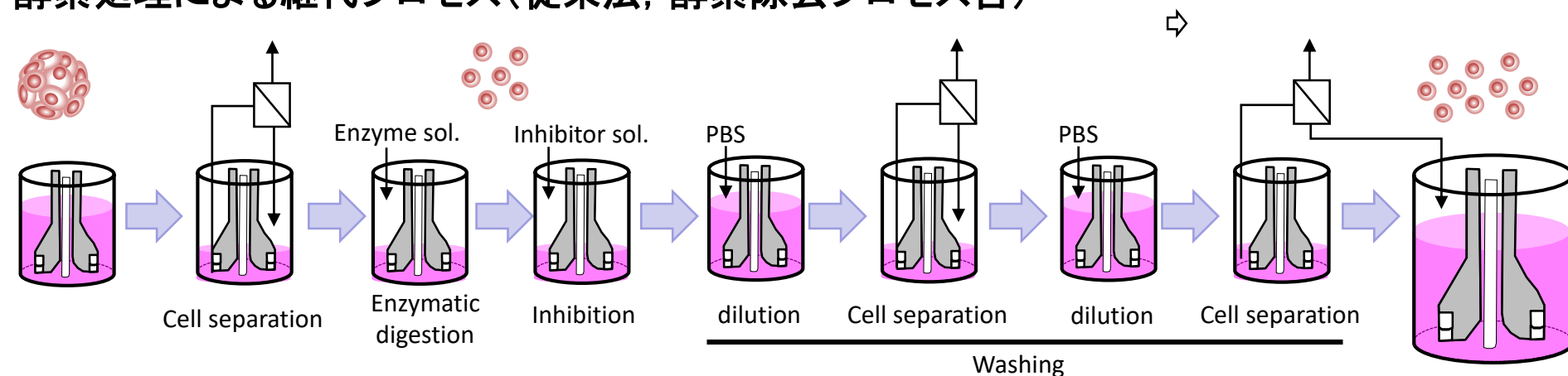
分割操作無: 集塊径増大によると推定される増殖停止

分割操作有: HA無洗浄でも分割操作後に集塊再形成・増殖

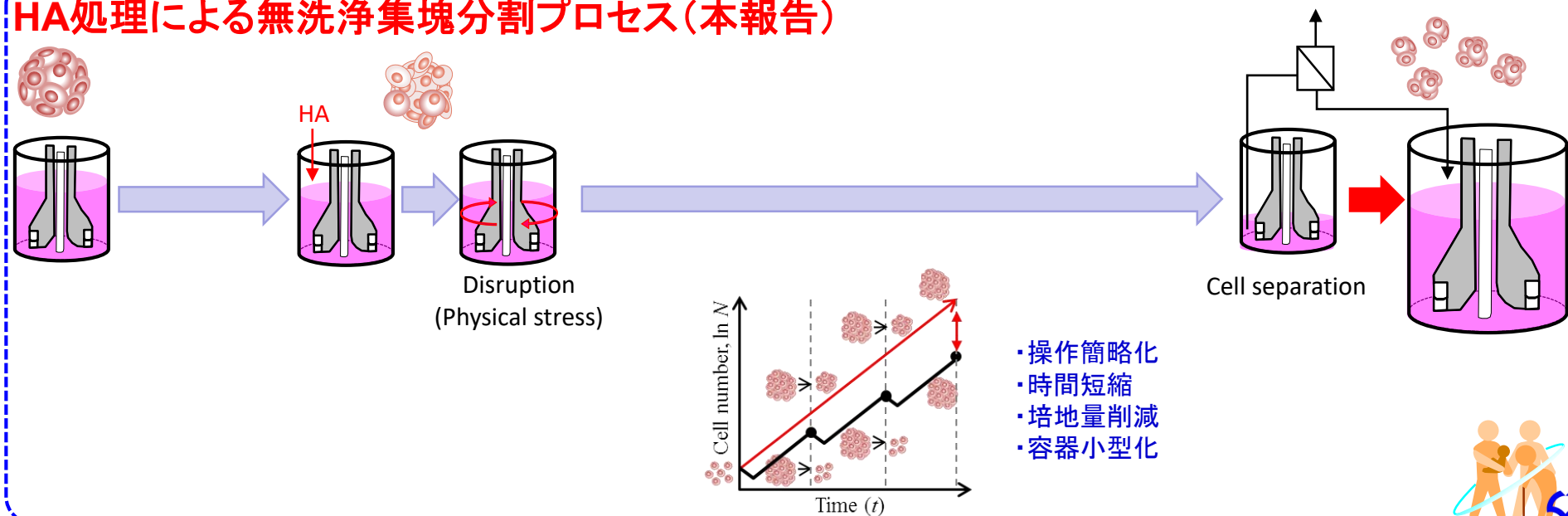
高密度化操作・細胞洗浄濃縮操作技術の開発

HA処理による無洗浄集塊分割プロセス

酵素処理による継代プロセス(従来法, 酵素除去プロセス含)



HA処理による無洗浄集塊分割プロセス(本報告)

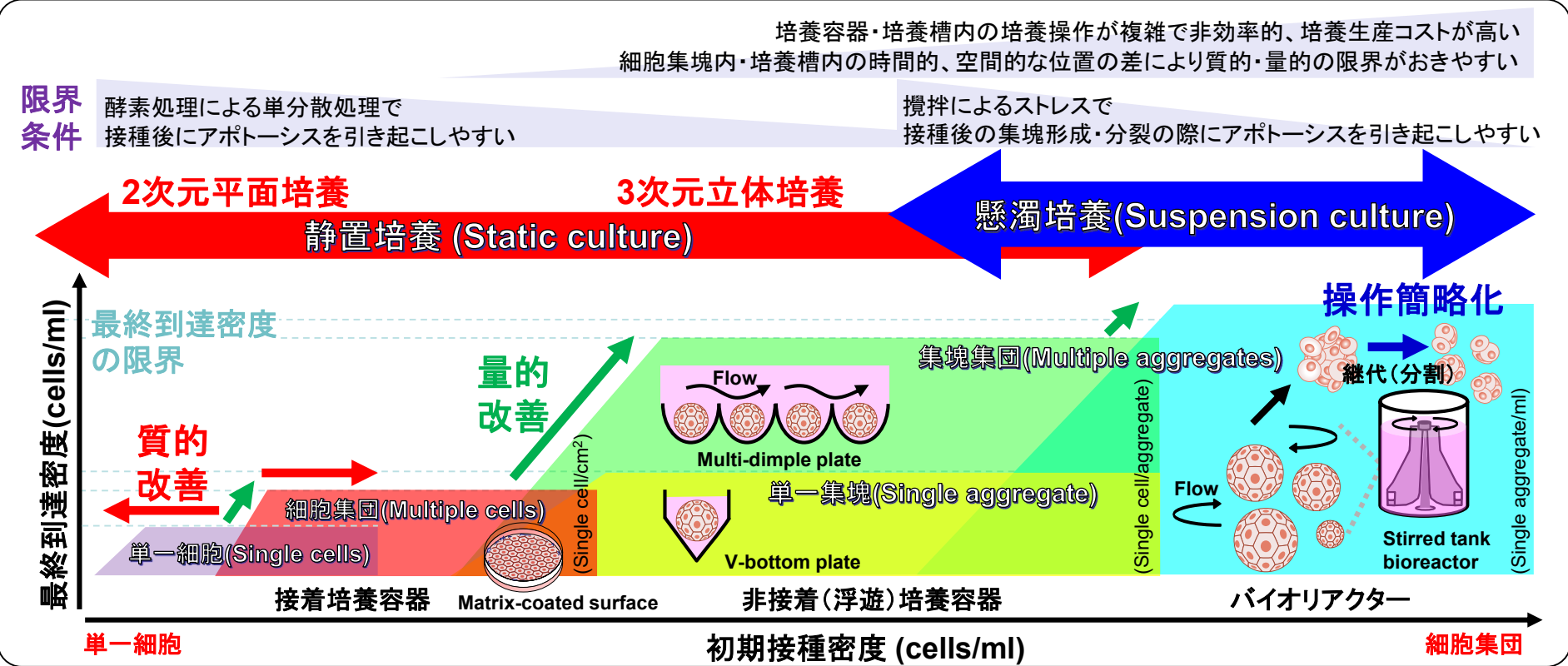


ポツリヌス菌由来ヘマグルチニン(HA)を用いた培養技術の開発

既存の多能性幹細胞培養の境界領域の拡大を目指した細胞培養手法の開発

HAの効果

- 逸脱細胞除去
選択性
- 逸脱細胞発生防止
濃度依存性
- 新規継代法
高密度培養
時間依存性
- 増殖促進
濃度依存性



謝辞

- 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物プロセスシステム工学領域 (紀ノ岡研究室の皆様)
- 藤永 由佳子先生 (金沢大学医薬保健研究域医学系細菌感染症制御学)
- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)

