

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：再生医療用製品の大量生産に向けたヒト iPS 細胞用培養装置開発
2. 研究開発代表者：松浦 勝久(東京女子医科大学 先端生命医科学研究所)
3. 研究開発の成果

研究成果の概要：1)HLA ホモドナー由来 Ff-iPS 細胞の未分化大量培養技術開発

2)HLA ホモドナー由来 Ff-iPS 細胞の大量心筋分化誘導法開発

3) iPS 心筋組織中の残存未分化 iPS 細胞除去手法開発

4) 新規ディスプレイブルガラス pH 電極開発

研究成果の内容

1) スケーラブルな培養手法である 3 次元浮遊攪拌懸濁培養の再生医療への標準的な使用に向けては、HLA ホモドナー由来 Ff-iPS 細胞の安定的な培養実証が不可欠である。平成 26 年度に確立した Ff-iPS 細胞(253G1 株)での 3 次元浮遊攪拌懸濁培養による未分化培養手法に準じて、iMatrix511 上で維持培養された Ff-I01、Ff-I14 株の 3 次元浮遊攪拌懸濁培養を施行したところ、253G1 株同様に約 4 日間の培養により、 1×10^6 個/mL (100mL ベッセルあたり 1×10^8 個)を超える細胞の増幅が可能であり、また 2 次元での維持培養と同程度の未分化性維持が確認された。さらに核型解析を行ったところ、通常の 2 次元培養同様、核型異常は認められなかったことから、3 次元浮遊攪拌懸濁培養手法の有効性・安全性が示唆されたものと考えられる。

2) 上記未分化増幅手法と同様に、Ff-iPS 細胞を用いた 3 次元浮遊攪拌懸濁培養による効率的な分化誘導手法の開発は、我々が開発している大量培養技術を臨床応用する上で不可欠である。最近我々は、HLA ホモドナー由来 Ff-iPS 細胞において、効率的な心筋分化誘導手法を開発した。約 2 週間の分化培養後、細胞数は 100mL のリアクターあたり 1×10^8 個を超え、その 8 割が心筋細胞であった。分化誘導後の細胞を酵素処理後に温度応答性培養皿に播種することで細胞シートの回収も可能であることから、iPS を用いた心筋再生医療に 3 次元浮遊攪拌懸濁培養を用いることで、相当数の心筋細胞の回収が可能であり、また移植用心筋シートの作製も可能と考えられる。

3) 大量の移植細胞を要する再生医療においては、移植細胞中の未分化 iPS 細胞の残存の可能性は相対的に高くなる。したがって、大量培養に伴う再生医療の発展・普及には、分化誘導後の細胞集団から、より効率的に未分化 iPS 細胞を除去する手法の開発が不可欠である。最近我々は、ヒト iPS 細胞は 42°C の培養環境では容易に細胞死に至る一方、iPS 細胞より分化誘導された心筋細胞や線維芽細胞は 42°C に対し耐性を示し、分化誘導後の細胞を 42°C 環境に置くことで、分化抵抗性未分化細胞の混入指標である Lin28 の mRNA 発現が有意に減少する一方、心筋細胞や線維芽細胞の各種 mRNA および蛋白発現が保たれることを確認している。iPS 細胞は、心筋細胞に比して温度センサーでもある TRPV-1 の発現が有意に高く、siRNA を用いた検証の結果、42°C 環境での iPS 細胞死は TRPV-1 依存性であることが明らかとなった。さらに TRPV-1 の刺激薬の添加は、iPS 細胞の細胞死を誘導する一方、心筋細胞には影響しないことが明らかとなった。すなわち TRPV-1 の活性化が再生医療用製品中の分化抵抗性未分化細胞残存リスクを減少できることが示唆される。

4) 3 次元浮遊攪拌懸濁培養による高密度培養では、培養環境の安定化およびモニタリングが不可欠である。高密度培養環境下では、iPS 細胞の産出する乳酸等による pH の低下が懸念されることから、3 次元浮遊攪拌懸濁培養の臨床応用に際しては、臨床に対応できる pH 計測手段が、より安定的な再生医療の実現に必要であることから、新規のディスプレイブルガラス pH 電極の開発を行い、分化誘導期間内の計測地のズレが著しく少なく、また安全性の高い電極の開発に成功した。