

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 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  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,  
Projects for Technological Development
- 研究開発課題名： (日本語) 再生医療に用いる iPS 細胞大量培養プラットフォームの開発  
(英語) Development of iPS Cell Mass Culture Platform for Regenerative  
Medicine
- 研究開発担当者 (日本語) 旭硝子株式会社 技術本部 先端技術研究所 熊谷特別研究室  
特別研究員 熊谷博道
- 所属 役職 氏名： (英語) Hiromichi Kumagai, Fellow, Kumagai Fellow Laboratory,  
Innovative Technology Research Center, Technology General Division,  
Asahi Glass Co., Ltd.
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) なし  
開発課題名： (英語)
- 研究開発分担者 (日本語) なし  
所属 役職 氏名： (英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

本委託研究において、我々は iPS 細胞の大量培養技術及び安定供給にむけたプラットフォームを構築し、再生医療の実現と国際展開に貢献する事を目的に、iPS 細胞培養に必要なタンパク質類液性因子の製造技術開発（下記 1）および培養容器の開発（下記 2）を実施した。

その結果、iPS 細胞培養に重要な 4 種類の液性因子の製造態勢確立に目途を立てる事ができた。また、iPS 細胞の 3 次元培養法としてスフェロイド培養技術の有効性・重要性を確認し、実用化に目途を立てることができた。

### 1. 液性因子の製造技術開発

iPS 細胞の大量培養に必要なタンパク質性因子（液性因子）の製造技術開発について、汎用性が高く、重要度の高い 4 種類の液性因子（ヒト・トランスフェリン/hTF、ステムセルファクター/SCF、スーパーオキシドディスムターゼ/SOD、カタラーゼ/CAT）をターゲットに、製造技術の開発を実施した。それにあたり、「高い安全性」「高い堅牢性」「低コスト」を目標に、ウイルス等のコンタミネーションを回避する事ができる微生物宿主（酵母や大腸菌）を活用した遺伝子組換え生産系を構築し、医療用途に合致した製造技術の開発を行った。現在、それぞれの液性因子の遺伝子組換え宿主株を用いた生産系の構築が終わり、製造プロセス開発、試作品作製および実用化に向けた品質・生理活性評価などを順次進めている。鉄輸送能力を持つ巨大分子の液性因子 hTF（ヒト・トランスフェリン）については、大量製造プロセスの構築が終わり、10g 規模の生産を実施し、関係拠点および連携先にサンプル提供し、実用化を進めた。血液系細胞の分化誘導に欠かせない液性因子 SCF については、生産系を確立し、臨床用途での製造プロセス開発を開始した。少量試作を行い、得られた試作品を連携先に提供して品質評価を実施中である。さらに、iPS 細胞から分化誘導した神経系細胞培養に使用される B27 添加培地に含まれる液性因子である SOD と CAT についても、生産系を確立し、基本製造プロセスを完成させた。現在、品質評価用サンプルを試作し、連携先に提供する方向で準備を進めている。

### 2. 培養に必要な容器の開発

培養容器の開発にあたっては、iPS 細胞等を「高品質」「高効率」に増殖させる 3 次元培養技術の確立を目指し、未分化 iPS 細胞を多能性維持状態で効率的に増殖させるための微細加工培養容器の研究開発、その実用化検討を進めた。その結果、微細加工培養容器を用いることで、iPS 細胞から短時間で均一なスフェロイドを高効率・高密度に形成させ、未分化維持状態で効率的に増殖させるための 3 次元培養技術を確立した。さらに、微細加工培養容器を用いることで、適切な条件で iPS 細胞スフェロイドから効率的に心筋または神経細胞を分化誘導し、純化・成熟化まで実施可能な実験方法を開発した。心筋分化実験では、均一性の高い心筋スフェロイドの作製に成功し、心毒性試験等に活用できる可能性を見出している。得られた研究結果や技術情報を国内外の関係機関に提供すると同時に、国内外の学会や学術誌で発信し、本技術の早期の実用化・普及を図った。また、本技術の今後の臨床用途展開を進めるため、培養容器・基材の毒性試験を行い、生物学的安全性を評価した。得られた情報を関係機関に提供し、培養容器の臨床応用を促進した。シミュレーション解析による形状設計などアプローチを用いて、培養容器形状の最適化・規格化・大型化など検討を行い、実用化を進めている。

**(成果の概要：英文)**

The purpose of this research is to build a platform technology for large-scale, reproducible and low-cost culture of iPS cells. We have constructed the manufacturing technology of protein-based factors (R&D item-1) and developed 3D culture vessels (R&D item-2) in order to contribute to the early realization of regenerative medicine and its global expansion. As a result, we have successfully established the production systems of four protein-based factors, which are necessary for iPS cell culture. We have also confirmed the effectiveness and importance of spheroid culture technology as a 3D culture method for iPS cells and made a prospect for its practical application.

1. Development of manufacturing technology of protein-based factors.

We performed development of recombinant expression systems and manufacturing methods for 4 kinds of recombinant proteins (human transferrin: hTF, human superoxide dismutase: SOD, human catalase: CAT) and human stem cell factor: SCF) using microbial production systems in order to achieve low cost, robustness and high quality (animal- and virus-free) for medical application. The recombinant expression systems and basic manufacturing processes of these proteins have been constructed. Quality evaluation has been also carried out during the small scale production processes. Large-scale (>10g-order) production process of hTF (iron-transporting protein) was carried out for the preparation of Standard operation procedure. The product was provided to related organizations or partners in order to promote practical application. Production systems for the recombinant SCF (an important cytokine for hematopoiesis) has been established to develop its manufacturing process including quality control for medical application. Quality evaluation of SCF is ongoing by our partners. Production systems and basic manufacturing technology for the SOD and CAT (both, components of the B27 additives for neural cell culture), have been established for providing our partners for their evaluation.

2. Development of 3D culture vessels

We developed a simple and reproducible 3D culture method of human iPS cells by using a unique microfabric vessels, which have high density micro-wells created by laser processing. This 3D culture platform is a useful and robust technology for high-throughput generation of uniform-sized spheroids in a short time period with high density and maintaining their pluripotency, viability and growth. Furthermore, the technology provide high efficient differentiation into target cell types, such as cardiomyocytes and neural cells. Based on the spheroid formation using the culture vessels, we developed 3D culture and differentiation protocol useful for efficient induction, purification and maturation of cardiomyocyte or neural cells from iPS cell spheroids under optimized conditions. In myocardial differentiation experiments, we have succeeded in producing myocardial spheroids with high homogeneity, and found a possibility to be utilized for cardiotoxicity test etc. We have shared such research and technical information with the other organizations and disseminated them in academic meetings and journals, resulting in the promotion of our technology. In order to develop for clinical applications, the toxicity test of the culture vessels has been conducted. Obtained information was provided to relevant organizations to promote clinical application of the culture vessels. Optimization, standardization and upsizing of the vessels are under development based on the simulation-based approaches to realize early clinical application.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 3 件、国際誌 2 件)

1. Sato H, Idiris A, Miwa T, Kumagai H. Microfabric Vessels for Embryoid Body Formation and Rapid Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Scientific Reports*. 2016、6:31063.
2. Sato H, Idiris A, Miwa T, Kumagai H. Microfabric vessel-based system for efficient 3D culture and rapid differentiation of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell and Translational Investigation*. 2017、4: e1541.
3. 熊谷博道、イディリス アリムジャン. 多能性幹細胞胚様体形成用 3 次元培養容器「EZSPHERE®」. *BioClinica* (再生医療特集). 2016 年 10 月号.
4. 三輪 達明、イディリス アリムジャン、熊谷博道. 微細加工培養容器を活用した均一で高効率な細胞培養法. 【書籍】iPS細胞の安全・高品質な作製技術 (No.1867). 株式会社技術情報協会出版. 2016 年 10 月 31 日発刊 (ISBN : 978-4-86104-629-2)
5. 三輪 達明、イディリス アリムジャン. 多能性幹細胞スフェロイドの高密度形成および培養用微細加工容器<EZSPHERE®>. 月刊バイオインダストリー (【特集】再生医療用培養機器と材料). 2016 年 12 月号.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Optimization of Secretory Production of Recombinant Human Proteins by the Genome Modified *S. pombe*. ポスター、Shoko Yamazaki、Alimjan Idiris、Tetsuya Kotani、Hikomichi Kumagai. PEGS 2016 (Protein and Antibody Engineering Summit)、米国 (ボストン)、2016/4/27、国際.
2. 再生医療に用いる iPS 細胞大量培養プラットフォームの開発、口頭/ポスター、イディリス アリムジャン、AMED 情報交換会、東京、2016/5/31、国内.
3. Application of the unique microfabric vessels EZSPHERE for efficient generation, expansion and differentiation of human iPS cell aggregates. ポスター、Tatsuaki Miwa、Hiroki Sato、Alimjan Idiris、Hikomichi Kumagai. ISSCR 2016 (International Society for Stem Cell Research、2016 Annual Meeting)、米国 (サンフランシスコ)、2016/6/24、国際.
4. Development of Mass Culture Platform of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells for Regenerative Medicine. Alimjan Idiris、Tatsuaki Miwa、Chiaki Kojima、Shoko Yamazaki、Hikomichi Kumagai. World Stem Cell Summit 2016 (WSCS 2016)、米国 (フロリダ)、2016/12/7、国際.
5. 微細加工培養容器を用いた高効率な iPS 細胞スフェロイド形成および分化促進、口頭、三輪 達明、イディリス アリムジャン、熊谷 博道. 第 15 回日本再生医療学会総会、仙台、2017/3/7、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 再生医療及び遺伝子治療の実用化と規制動向 (H28 年度 AMED 研究開発課題: 産学官連携研究の促進に向けた創薬ニーズ等調査研究)、イディリス アリムジャン、熊谷 博道、公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 規制動向調査報告、2017/3/24、国内。
2. 「ヒト iPS 細胞の 3 次元培養プラットフォーム技術」、熊谷 博道、「日本化学会招待講演」、日本化学会 第 97 春季年会、横浜市、2017/3/16、国内。
3. 再生医療実現に向けた細胞培養・3 次元培養技術、熊谷博道、情報機構、2017/5、国内。

(4) 特許出願

特願 2017-079093 号