

PRESS RELEASE

2024年11月20日

理化学研究所
公益財団法人京都大学 iPS細胞研究財団
株式会社カネカ

iPS細胞を浮遊培養で樹立・大量培養

—突発的分化を防ぐ化合物を見つけ、安定した生産手法を確立—

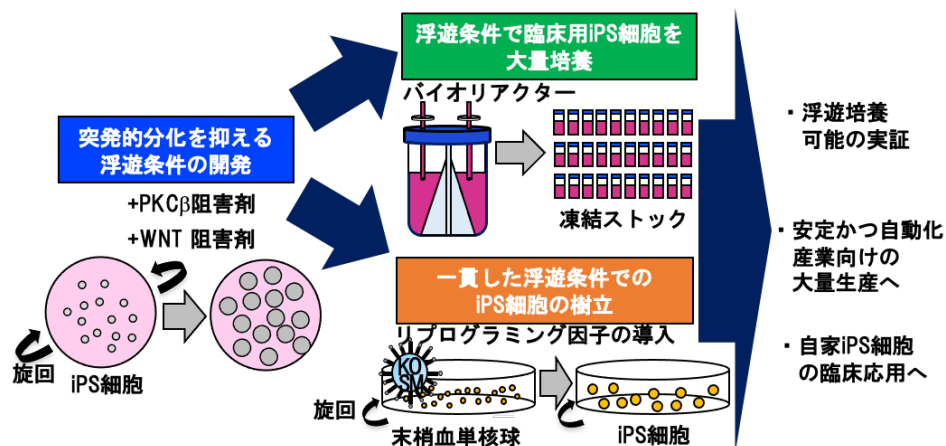
概要

理化学研究所（理研）バイオリソース研究センターiPS細胞高次特性解析開発チームの林洋平チームリーダー、高崎真美開発研究員、公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団研究開発センター、株式会社カネカ再生・細胞医療研究所らの共同研究グループは、iPS細胞^[1]の樹立から、大量培養までを浮遊培養で一貫して行うことに成功しました。

本研究成果は、iPS細胞を用いた再生医療において、産業向けの大量製造法の確立や患者由来iPS細胞の直接的な自家医療の開発に貢献すると期待できます。

従来の接着培養条件下で培養したヒトiPS細胞に比べ、浮遊培養条件下ではヒトiPS細胞が突発的に分化しやすいという課題がありました。しかし、共同研究グループは、2種類の化合物を加えることで、突発的分化が抑制されることを見いだしました。さらに、これらの化合物を添加した浮遊培養条件で、(1)ヒト末梢血単核球からのiPS細胞の樹立、(2)単一細胞を選別してクローン株を拡大、(3)自己複製特性を維持しながらの長期培養、(4)浮遊培養からの直接凍結保存とその直接解凍からの浮遊培養開始、(5)臨床グレードのヒトiPS細胞株の効率的な大量培養、といった、一連の培養プロセスを成功させました。この結果は、ヒトiPS細胞の状態を正確に制御しながら浮遊培養できたことで、安定的かつ自動化された臨床応用への道が開かれることを示しています。

本研究は、科学雑誌『eLife』オンライン版（11月12日付）に掲載されました。



本研究の概要

背景

ヒト iPS 細胞による細胞治療を可能にするためには、大量の細胞が必要です。そのため大規模な製造システムの開発が不可欠です。一般的に、ヒト iPS 細胞は培養皿などの底面に接着させて培養します。しかし、大量培養を実現しようとするれば、必要な培養皿の表面積が大きくなります。そのため、培養皿を積層化させたり、マイクロキャリア^[2]といった特殊な素材上に接着させたりする方法も使われています。しかし、培養処理が煩雑になったり、コストが高くなったりするなどの難点があります。そのため、ヒト iPS 細胞に対しては、特殊な材料を用いない浮遊培養法を開発することで、再生医療の産業化に向けて、費用対効果の大きい大量生産が可能となり、自動化や安全性確保の上でもメリットがあると考えられます。

これまでもヒト iPS 細胞の迅速かつ大規模な生産を可能にする浮遊培養技術の開発がいくつか試みられてきました。これらの研究において、ヒト iPS 細胞の長期培養や大量培養が達成されています。しかし、これまでの研究では、培養細胞の遺伝子発現に基づいた精密な制御や検証が行われているわけではありません。また、ヒト iPS 細胞の樹立、単一細胞を選別（ソーティング）してのクローン株の拡大培養、浮遊培養からの直接凍結保存と浮遊培養への直接解凍播種（はしゅ）、といったヒト iPS 細胞の培養において重要な一連のプロセスは浮遊培養条件では確立されていませんでした。

研究手法と成果

まず、既存の培養液を用いて、ヒト iPS 細胞を通常の接着培養条件と浮遊培養条件（非接着性の細胞培養プレート内で 90 回転/分の連続回転）でそれぞれ 10 日間培養し、遺伝子・タンパク質発現を比較解析しました。その結果、神経や皮膚のもととなる外胚葉、筋肉や腎臓のもととなる中胚葉、肺や胃腸のもととなる内胚葉のいずれのマーカー遺伝子・タンパク質においても、その発現が浮遊培養条件で上昇していました（図 1）。この結果は、浮遊培養条件では、ヒト iPS 細胞が突発的にさまざまな方向へ分化してしまうことを示しています。

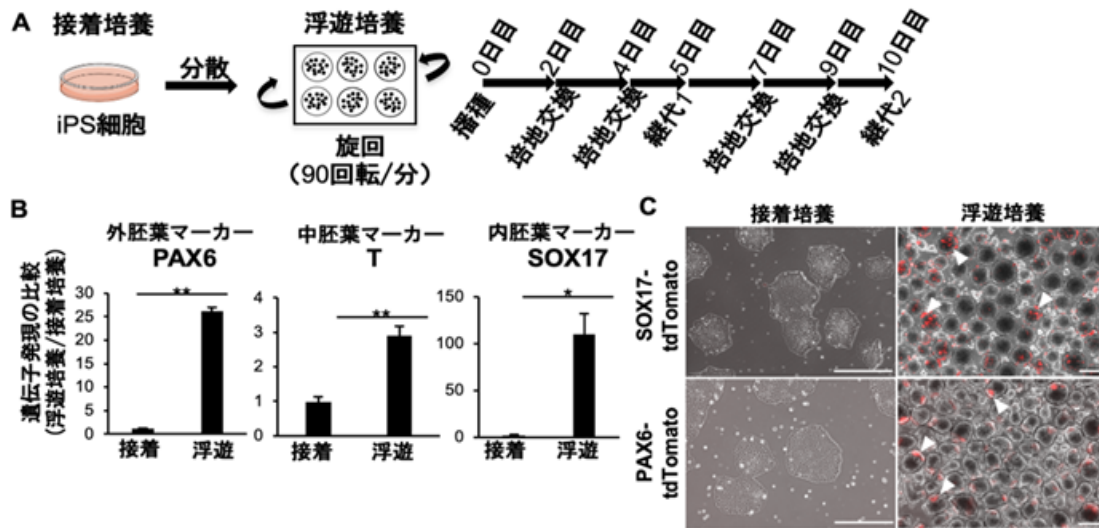


図 1 iPS 細胞の接着培養または浮遊培養条件における突発的分化の比較

(A) iPS 細胞の浮遊条件での培養方法。通常の接着培養条件で培養した iPS 細胞コロニーを単一細胞へ分散後、既存の培養液を用いて非接着性の培養プレート内で連続旋回 (90 回転/分) しながら 10 日間 (5 日目に 1 度継代) 培養し、遺伝子・タンパク質発現を解析した。

(B) 浮遊培養した iPS 細胞では、外胚葉、中胚葉、内胚葉それぞれで発現するマーカー遺伝子である PAX6、T、SOX17 の発現が、接着条件に比較して有意に上昇していた。

(C) 浮遊培養した iPS 細胞では、タンパク質 PAX6、SOX17 の発現が検出された。典型的なタンパク発現箇所を白色の矢印で示す。スケールバーは 400μm。

そこで、この突発的分化を抑えるための解決策を模索しました。既知の生物学的知見から、外胚葉、中胚葉、内胚葉それぞれの分化に関与する生物学的シグナル経路^[3]が分かっていたので、それらに対する阻害剤の中から突発的分化を抑える効果を持つものを探しました。その結果、外胚葉分化を抑制する PKC (β) シグナル^[4]阻害剤、中・内胚葉分化を抑制する WNT シグナル^[5]阻害剤を見だし、これらを培地に加えることで浮遊条件のヒト iPS 細胞を長期的に安定して未分化状態のまま培養できました (図 2)。

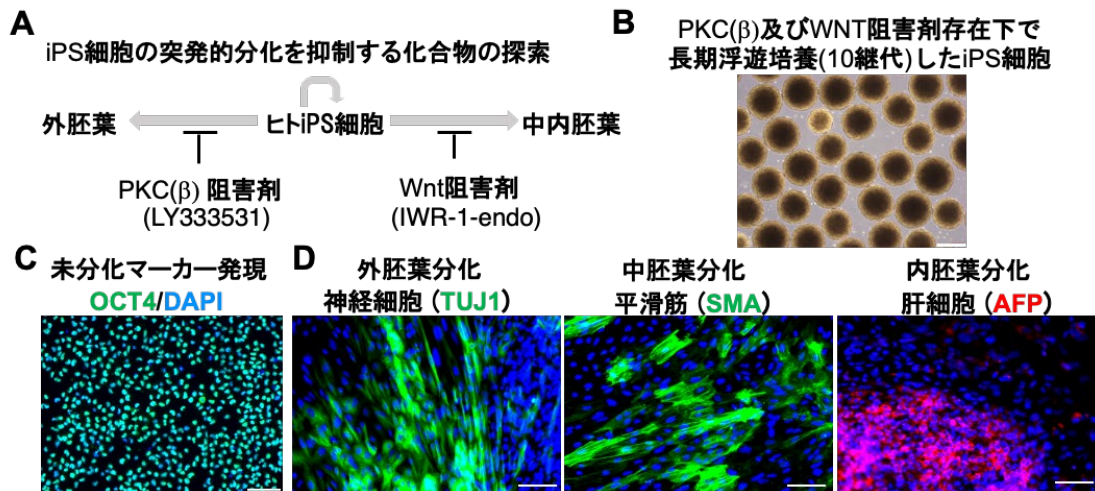


図2 シグナル阻害剤存在下で長期に浮遊培養した iPS 細胞の未分化性と多能性の評価

(A) 浮遊培養における iPS 細胞の突発的分化を抑制する化合物をスクリーニングし、PKC (β) シグナル阻害剤 (LY333531) により外胚葉への分化が、WNT シグナル阻害剤 (IWR-1-endo) により中・内胚葉への分化が、それぞれ抑制されることを明らかにした。

(B) PKC (β) および WNT シグナル阻害剤存在下で長期浮遊培養 (10 継代) した iPS 細胞の位相差顕微鏡像。表面が滑らかで均一な細胞塊を形成しており、突発的な細胞分化が少ない。スケールバーは 400μm。

(C) PKC (β) および WNT シグナル阻害剤存在下で長期浮遊培養した iPS 細胞においても、未分化マーカー OCT4 のタンパク質レベルでの発現が維持されていた。スケールバーは 100μm。

(D) 長期浮遊培養した iPS 細胞の多能性を、ランダムに分化させる胚葉体形成法にて評価した。外胚葉分化として神経マーカーの TUJ1、中胚葉分化として平滑筋マーカーの SMA、内胚葉分化として肝細胞マーカーの AFP を指標とし、それぞれ免疫染色法で解析した。その結果、3 胚葉への分化能を維持していることが示された。スケールバーは 100μm。

この条件を用いて、臨床用 iPS 細胞株に対して、バイオリアクター^[6]での大量培養を行いました。3~4 日間隔で 3 回、新しい培地に細胞を分注して継代を行い、1 回当たり約 100 万個の細胞が入った凍結チューブを 300 本程度作製する大量培養を達成しました。その後、各回の凍結チューブの一部を解凍播種し、大量培養された iPS 細胞の特性評価を実施しました。その結果、大量生産された iPS 細胞は、通常の接着培養条件と遜色なく自己複製、多能性、核型 (染色体構成) が維持され、ドーパミン作動性神経前駆細胞、心筋細胞、肝細胞といった再生医療や創薬にとって有用な細胞種への分化誘導効率も変わらないことが示されました (図 3)。以上の結果は、二つの阻害剤を用いた浮遊培養法が再生医療用 iPS 細胞の大量生産に適していることを示しています。

A 阻害剤添加条件下での大量浮遊培養臨床用iPS細胞株
ストック2 × 10⁵ 細胞

接着培養

6 × 10³ 細胞/cm²
25 cm²

接着培養

6日
1 × 10⁴ 細胞/cm²
300 cm²

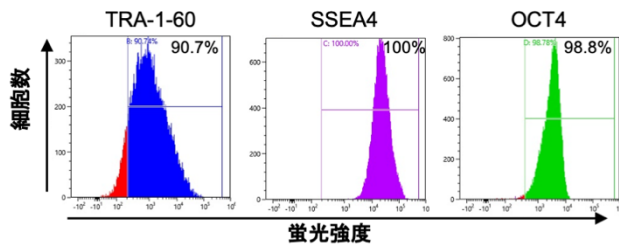
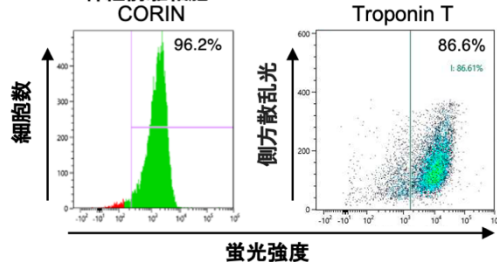
4日

バイオリアクター
(灌流条件)
イン → アウト
1 ~ 1.5 × 10⁵ 細胞/mL
320 mL

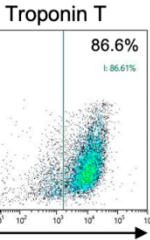
3 継代

3-4 日

細胞ストック

1 × 10⁶ 細胞/バイアル
~300バイアル/継代**B 未分化マーカー発現の維持****C 正常な核型維持****D ドーパミン作動性
神経前駆細胞**

心筋細胞



肝細胞

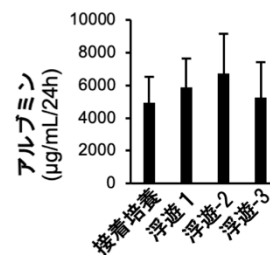


図3 臨床用 iPS 細胞の阻害剤存在下での大量浮遊培養とストック作製

(A) バイオリアクターを用いた阻害剤添加条件下での臨床用 iPS 細胞の大量浮遊培養とストック作製の模式図。

(B) 浮遊培養によって大量生産された iPS 細胞の未分化マーカー (TRA-1-60、SSEA4、OCT4) の発現を 1 細胞ごとに解析した。それぞれの未分化マーカーを発現している細胞は同程度の蛍光強度を示す。TRA-1-60、SSEA4、OCT4 の発現が高く維持されている。

(C) 浮遊培養によって大量生産された iPS 細胞の核型解析。正常な核型が保たれている。

(D) 浮遊培養によって大量生産された iPS 細胞の多能性の検証。ドーパミン作動性神経前駆細胞、心筋細胞、肝細胞といった、再生医療に有用な細胞種への高い分化誘導効率を示された。

さらに、共同研究グループは、WNT と PKC (β) それぞれのシグナル阻害剤を添加した浮遊培養条件で、FACSTMを用いて単一の細胞を選別し、そこから増殖したクローン株を取得できることを示しました。また、この浮遊培養条件から直接凍結ストック用の細胞を取り出し、さらに凍結ストックを直接浮遊培養条件に移して解凍播種することにも成功しています。このように、この浮遊培養条件では、細胞培養のプロセスとして重要なクローン株の取得、凍結ストックの採取、解凍播種を問題なく行うことができ、作業上の負担も少ないことが示されました。

ヒト iPS 細胞の臨床利用のためには、閉鎖系で確実かつ効率的にヒト iPS 細胞を樹立することが望まれています。これを達成するために、今回開発した浮遊

参考資料配布

培養条件下でヒト iPS 細胞を樹立することを試みました。ヒト末梢血単核球^[8]を材料として、センダイウイルスベクター^[9]の感染、あるいはエピソーマルベクター^[10]による遺伝子導入によってヒト iPS 細胞を作製しました (図 4A)。これらの遺伝子導入法は、細胞のゲノムに遺伝子が挿入されないため、臨床応用に向けた iPS 細胞の作製に使われています。遺伝子導入した細胞を、5~6 日ごとに継代を繰り返して浮遊培養を続けました。さらに、浮遊培養したヒト iPS 細胞を FACS によって単一細胞に選別し、これらの単一細胞由来のクローン懸濁 (けんたく) 培養条件下で増殖させ、クローン株を作製しました。このクローン株の細胞凝集体は均一な球状構造を示し、突発的な細胞分化はほとんど見られませんでした (図 4B)。また、クローン株は正常な核型を維持しており、自己複製マーカー陽性であり (図 4C)、さまざまな細胞へと分化できる多能性を示すことが分かりました (図 4D)。これらの結果は、PKC (β) と WNT のシグナル阻害剤を添加した浮遊培養条件で、正常なヒト iPS 細胞株の樹立に成功したことを示しています。

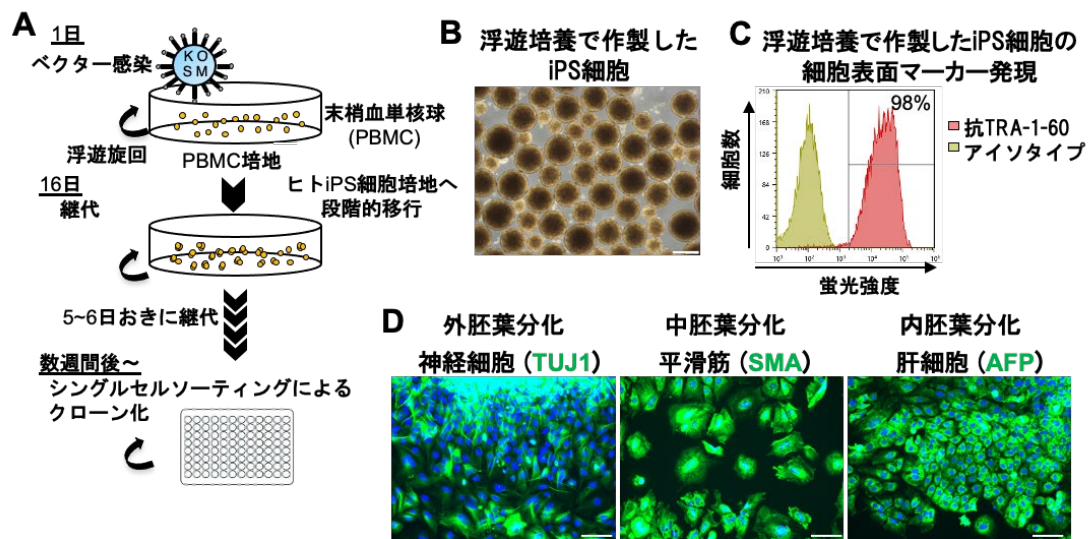


図 4 一貫した浮遊培養条件での iPS 細胞の樹立

(A) 一貫した浮遊培養条件での iPS 細胞樹立の概要図。

(B) 浮遊培養によって作製された iPS 細胞の位相差顕微鏡像。スケールバーは 400 μ m。

(C) 浮遊培養によって作製された iPS 細胞での未分化マーカー TRA-1-60 の発現を 1 細胞ごとに解析した。98%の細胞が陽性であることを示している。

(D) 浮遊培養によって作製された iPS 細胞の多能性をランダムに分化させる胚葉体法で確認した。外胚葉分化として神経細胞マーカーの TUJ1、中胚葉分化として平滑筋マーカーの SMA、内胚葉分化として肝細胞マーカーの AFP を指標とし、それぞれ免疫染色法で解析した。スケールバーは 100 μ m。

今後の期待

本研究では、浮遊培養条件下でヒト iPS 細胞を樹立し、大量生産するための一連の方法を開発しました。この方法は、マイクロキャリアや透析バッグなどの特別な材料を必要とせず、既存のさまざまな培地や多くのヒト iPS 細胞株で有

参考資料配布

効です。細胞の状態を精密に制御しながら、大量培養、自動化、安全性確保を行う点で有利だと考えられ、従来の方法では達成できなかった新規の産業応用が期待されます。

今回の研究では、突発的な細胞分化を抑える因子として、PKC (β) 阻害剤と WNT シグナル阻害剤という二つの化合物を同定しました。これらの阻害剤がどのような分子機構でヒト iPS 細胞の突発的分化を抑えるかを今後調べていくことで、より精密化された分化誘導法の開発にもつながると考えられます。

さらに、培養液に上記の化合物を添加することにより、浮遊培養条件下で初めて末梢血単核球からヒト iPS 細胞を作製することにも成功しました。浮遊培養は、無菌的な閉鎖系での自動培養などにつなげやすいため、自家ヒト iPS 細胞からの自家細胞治療の実現に貢献できると期待されます。

論文情報

<タイトル>

Complete suspension culture of human induced pluripotent stem cells supplemented with suppressors of spontaneous differentiation

<著者名>

Mami Matsuo-Takasaki, Sho Kambayashi, Yasuko Hemmi, Tamami Wakabayashi, Tomoya Shimizu, Yuri An, Hidenori Ito, Kazuhiro Takeuchi, Masato Ibuki, Terasu Kawashima, Rio Masayasu, Manami Suzuki, Yoshikazu Kawai, Masafumi Umekage, Tomoaki M Kato, Michiya Noguchi, Koji Nakade, Yukio Nakamura, Tomoyuki Nakaishi, Naoki Nishishita, Masayoshi Tsukahara, Yohei Hayashi.

<雑誌>

eLife

<DOI>

[10.7554/eLife.89724](https://doi.org/10.7554/eLife.89724)

補足説明

[1] iPS 細胞

ヒトを含む哺乳類の体細胞に、初期化する能力を持つ因子を導入し、培養すると、その細胞はさまざまな組織や臓器の細胞に分化する能力を持つ多能性幹細胞に変化する。この細胞を iPS 細胞（誘導性多能性幹細胞）と呼ぶ。iPS は induced pluripotent stem の略。

[2] マイクロキャリア

再生医療やバイオ医薬品の製造の細胞培養の工程において、細胞の足場材として用いる微小担体。培養液中でその表面に細胞を接着させることで 3 次元浮遊培養を可能にする素材。これにより、従来のシャーレを用いた 2 次元的な培養と比較して、培養スペースの狭小化と効率的な大量細胞培養が可能になる。

[3] 生物学的シグナル経路

細胞外の特定の分子による情報によって細胞の状態が変化する過程。具体的には、成

長因子やホルモンなどの細胞外メッセンジャー分子を細胞表面、または細胞内の受容体が受け取り、続くセカンドメッセンジャーやタンパクキナーゼによるタンパク質リン酸化の過程を経て、特定のシグナル経路が細胞内に伝達される。伝達された情報は、遺伝子の発現上昇や抑制といった細胞応答に変換され、細胞の増殖や分化が制御される。

[4] PKC (β) シグナル

PKC (プロテインキナーゼ C) は、多様な細胞内シグナル伝達経路に関与する広範な標的タンパク質をリン酸化する。PKC 酵素は多くのアイソザイムで構成されるが、これらのうち PKC (β) は、リン脂質ジアシルグリセロール (DG) と細胞内カルシウムイオンの濃度上昇によって活性化すると考えられ、標的のタンパク質のリン酸化を介して、細胞内にシグナルを伝達する。

[5] WNT シグナル

生物学的シグナル経路の一つ。糖タンパク質である WNT が、細胞表面受容体の FRIZZLED を介して、細胞内にシグナルを伝達する。古典的 WNT 経路、非古典的 WNT 経路である平面内細胞極性 (PCP) 経路、WNT/カルシウム経路に分類される。WNT シグナルは、初期発生における体軸パターン形成、細胞運命の決定、細胞増殖、細胞遊走などの制御に関与する。また、WNT シグナルは多能性幹細胞から中胚葉や内胚葉の前駆細胞への分化を誘導することが知られている。

[6] バイオリアクター

動植物の細胞や微生物、酵素などを用いて物質の合成や分解、生産を行う生化学反応装置。再生医療分野においては、容器内の温度、pH、攪拌速度、流量、通気などを管理しながら、ヒト由来細胞の大量培養に用いられ、無菌性の確保、自動化、低コスト化に貢献すると考えられている。

[7] FACS

不均一な細胞懸濁液を細胞が一行に流れる状態にし、それにレーザー光を照射して反射する光を測定することで、細胞一つ一つの情報を読み取り、さらにその情報を基に細胞を分取する (ソーティング) 方法。抗体が特定のタンパク質を認識して結合する原理を利用し、細胞表面マーカーに対する蛍光標識した特異性の高い抗体を用いて、標識された目的の細胞を選別できる。FACS は Fluorescence-activated cell sorting の略。

[8] ヒト末梢血単核球 (PBMC)

血液細胞のうち、リンパ球、単球、樹状細胞などを合わせた、単核白血球の総称である。技術的には、全血サンプルから遠心分離によって濃縮することができる。PBMC は Peripheral Blood Mononuclear Cells の略。

[9] センダイウイルスベクター

細胞内への遺伝子導入のために用いられる、センダイウイルスを改変して作られたベクター (運び屋) である。センダイウイルスベクターは、分裂、非分裂細胞にかかわらず遺伝子導入可能な RNA ウイルスベクターで、宿主のゲノム DNA には取り込まれず、細胞質内で数週間ほど発現が持続する。

[10] エピソーマルプラスミドベクター

遺伝子導入した細胞のゲノム DNA に取り込まれなくても、持続的に遺伝子発現を維持できるようにした非ウイルス性のプラスミドベクター。技術的には、EB ウイルス（エプスタイン・バール・ウイルス）由来の DNA 複製を維持するための EBNA1 タンパク質をコードする遺伝子と、そこから発現された EBNA1 タンパク質が結合でき、ベクターの DNA 複製起点となる Ori 配列を同一ベクター内に構築してある。

共同研究グループ

理化学研究所 バイオリソース研究センター

iPS 細胞高次特性解析開発チーム

チームリーダー	林 洋平	(ハヤシ・ヨウヘイ)
(筑波大学 医学医療系 教授 [連携大学院]、筑波大学グローバル教育院 ライフイノベーション学位プログラム 教授 [協働大学院])		
開発研究員	高崎真美	(タカサキ・マミ)
基礎科学特別研究員	伊藤秀矩	(イトウ・ヒデノリ)
テクニカルスタッフⅡ (研究当時)	若林玲実	(ワカバヤシ・タマミ)
研修生	清水智哉	(シミズ・トモヤ)
(東京理科大学 大学院薬学研究科学科 博士課程、 日本学術振興会特別研究員 DC1)		
テクニカルスタッフⅡ (研究当時)	安 瑜利	(アン・ユリ)
テクニカルスタッフⅡ (研究当時)	辺見康子	(ヘンミ・ヤスコ)
細胞材料開発室		
室長	中村幸夫	(ナカムラ・ユキオ)
上級技師	野口道也	(ノグチ・ミチヤ)
遺伝子材料開発室		
研究員 (研究当時)	中出浩司	(ナカデ・コウジ)

公益財団法人京都大学 iPS 細胞研究財団

業務執行理事/研究開発センター長	塚原正義	(ツカハラ・マサヨシ)
主幹研究員	梅景雅史	(ウメカゲ・マサフミ)
主任研究員	加藤智朗	(カトウ・トモアキ)

株式会社カネカ 再生・細胞医療研究所

執行役員・研究所長	上田恭義	(ウエダ・ヤスヨシ)
基幹研究員	中石智之	(ナカイシ・トモユキ)
主任	西下直希	(ニシシタ・ナオキ)
主任 (研究当時)	伊吹将人	(イブキ・マサト)
主任 (研究当時)	河井義和	(カワイ・ヨシカズ)
研究員	河嶋 照	(カワシマ・テラス)
研究員	政安梨緒	(マサヤス・リオ)
研究員	鈴木麻菜美	(スズキ・マナミ)
研究員 (研究当時)	竹内和博	(タケウチ・カズヒロ)
研究員 (研究当時)	神林 昌	(カンバヤシ・ショウ)

研究支援

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明・創薬研究課題「疾患特異的 iPS 細胞の樹立・特性解析・加工の高度化・効率化・情報公開（研究代表者：林洋平、課題番号：JP23bm1423010）」、同再生医療実現拠点ネットワークプログラム「再生医療用 iPS 細胞ストック開発拠点（研究代表者：山中伸弥、課題番号：JP15bm0104001）」による助成、株式会社カネカとの共同研究費、公益財団法人京都大学 iPS 細胞研究財団寄付金を受けて行われました。

本研究には理研バイオリソース研究センターから提供されたバイオリソース（ヒト iPS 細胞 HPS0063、HPS0077、HPS1006、HPS0381）が使用されました。

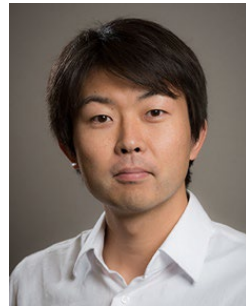
発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所 バイオリソース研究センター iPS 細胞高次特性解析開発チーム
 チームリーダー 林 洋平 (ハヤシ・ヨウヘイ)
 開発研究員 高崎真美 (タカサキ・マミ)
 Tel: 029-846-0042 (林) Fax: 029-846-0043 (林)
 Email: yohei.hayashi [at] riken.jp (林)



高崎真美



林 洋平

公益財団法人京都大学 iPS 細胞研究財団 研究開発センター

株式会社カネカ 再生・細胞医療研究所

<機関窓口>

理化学研究所 広報室 報道担当

Tel: 050-3495-0247 Email: ex-press [at] ml.riken.jp

公益財団法人京都大学 iPS 細胞研究財団 企画部門 広報グループ

Tel: 080-2359-8495 Email: contact [at] cira-foundation.or.jp

株式会社カネカ IR・広報（Investors & Public Relations）部

Tel: 03-5584-8074 Email: Info_Pro[at]kaneka.co.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。