

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560195

研究課題名(和文) ヒトES細胞・ヒトiPS細胞の均質・大量培養に適した培養法の開発

研究課題名(英文) Development of Efficient Expansion for Human Pluripotent Stem Cells

研究代表者

川瀬 栄一郎(Kawase, Eihachiro)

京都大学・再生医科学研究所・講師

研究者番号：70402790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療や創薬スクリーニングの実現化、実用化が期待されている。この実現化のためには均質で高品質な多能性幹細胞を大量調整できる培養法の開発が不可欠である。本研究成果では、申請者が開発したプロトコルをさらに発展させ、ラミニン断片だけではなく、合成基質を用いてもほぼ同等の拡大培養ができる方法を確立した。長期培養した細胞でも細胞の未分化性、染色体の正常性、多分化能について問題がないことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells (hPSCs) including human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) is thought to provide renewable source for a wide range of applications in regenerative medicine, and as tools for human disease modeling and drug discovery. For these purposes, large numbers of cells with high quality are essential. Recently, we show that biological substrate, recombinant E8 fragments of laminin isoforms (LM-E8s) sustain long-term self-renewal of hPSCs in defined, xeno-free media with dissociated single-cell passing. However, biological materials are generally expensive to manufacture, have limited scalability and may have batch-to-batch variability. In this study, we developed our culture system to show similar performance using LM-E8s to efficient expansion of hPSCs under defined, xeno-free conditions using non-biological synthetic substrates.

研究分野：幹細胞

キーワード：幹細胞 ES細胞 iPS細胞 大量培養

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞などのヒト多能性幹細胞は、体を構成するほぼ全ての細胞腫に分化する能力及び多分化能を保持したまま、培養下で無制限に増殖できる株細胞である。このような特性から、将来ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療や創薬スクリーニングの実現化、実用化が期待されている。そのためには、均質で高品質な多能性幹細胞を調整できる大量培養法の開発が不可欠である。しかし、現在最も一般的に用いられている培養法では、細胞をコロニーとして継代維持し、継代毎に分化コロニーを除去するという、研究室スケールでは可能でも、大量培養には不適であり、この問題点を解決すべく技術開発が不可欠である。

2. 研究の目的

- (1) 本研究ではヒト多能性細胞の大量培養の実現化に不可欠な培養法の開発を目指している。
- (2) 我々は研究目的(1)に向け 2012 年 Nature Communications に新しい培養法を発表したが、この培養法をさらに改良し、大量培養に向けて最適化を進める。
- (3) 低コストで、ロット差を生じない培地の開発。具体的には成長因子、ヒトアルブミンなどの代替機能を有する化合物の同定を行う。

3. 研究の方法

- (1) 我々は既にラミニン断片 (LM-E8) を用いた単一細胞解離を用いたヒト多能性幹細胞の培養を確立したが (2012 年 Nature Communications に掲載)、大量培養に適した培養法にはさらなる改良が必要だった。そこで、細胞密度、継代法の検討、培養基質などについて、検討を行った。また、長期間培養した細胞株について、特性解析を行い、細胞の品質を検討した。
- (4) 大量培養により適した三次元培養への開発として、単一細胞に解離した状態から、効率よくスフェア形成し、拡大継大培養が可能かどうかの検討を行った。
- (5) ヒトアルブミンの代替として機能を有する化合物のリストアップし、その代替機能について検討を行う。

4. 研究成果

- (1) ヒト多能性幹細胞の高品質・均質培養として、細胞を単一分散解離して培養を行う手法に着目し、その成果は 2012 年に Nature Communications に掲載されたが、この汎用性のある培養法を普及するため詳細なプロトコルを日本語と英語で、論文・本などで発表を行った (Curr. Protoc. Stem Cell Biol. 英語; 「ES・iPS 細胞のフィーダーフリー培養法」(実験医学 別冊「ES・iPS 細胞実験スタンダード」)。実際、本プロトコルは多くの人によって再現されている。

(2) このプロトコルは研究室で行う小規模培養には適していたが実用化、産業化を目指す大量培養に適したプロトコルへの改良が必要であり、培養方法の検討を行った。その結果、LM-E8 だけではなく、人工基質である Synthemax (Corning) を用いても、この継代維持培養法が可能であることを見いだした。LM-E8 は intact なラミニンに比べ、分子量も小さく安価ではあるが、人工基質の方が均質で工業化しやすく、より安価となり、また長期保存も容易という有利性がある。

(3) Synthemax を培養基質として使い、複数のヒト多能性幹細胞を用い、市販されているいろいろな xeno-free グレードの培地 (TeSR2, NutriStem, PSGro など) で培養を行った。その結果、いずれの場合でも、長期培養したヒト多能性幹細胞では細胞の形態、未分化表面抗原マーカーの発現、未分化マーカー遺伝子の発現と分化マーカーの発現抑制についてリアルタイム PCR、抗体免疫染色などにより、未分化状態を維持していることが確認できた。さらに染色体の正常性について G-バンドを用いた核型解析と CGH マイクロアレイを用いて、染色体の正常性について確認を行った。これらをまとめ国際誌 2014 年に Methods of Molecular Biology に掲載された。さらにこの論文投稿後に、in vitro と in vivo で三胚葉への分化能があることを確認した。

(4) 接着培養ではスケール化に限界があることから、三次元培養に着目し、単一解離した細胞から三次元拡大維持培養が可能であるかの検討を行った。単一細胞からもスフェアを形成し、長期間未分化維持培養は可能であることを見いだすことに成功したが、その拡大率が接着培養に比べて低いこと、また安定性に問題があるということも明らかにした。また、我々は先行論文の再現を行ったが、細胞をコロニーあるいは単一細胞に解離し、三次元培養を用いた場合、拡大率が低く、安定性に問題があることが確認された。

(5) xeno-free グレードの培地ではロット差バッチ差が大きく、その大きな要因としてヒトアルブミンがあった。そこでアルブミンの代替物を見いだすことを目指し、培養以外の研究などでアルブミンの代替として使われているもの (例えばポリビニルアルコール) あるいは脂質などに着目して平成 25 年度にリストアップすることに成功した。

(6) ヒトアルブミンを含まない培地として開発された培地がいくつか販売されていたが、安定した培養は難しかった。しかしながら、TeSR-E8 (STEMCELL Technologies) は非常に安定的に良好な結果を示すことを見いだしたので、平成 26 年度においては当該部分のプロジェクトを中断することにした。しかしながら、TeSR-E8 は依然として培地の価格が高く、培地中に高価な成長因子 (bFGF 及び TGFb/Activin) を大量に含むことから、これらの代替機能を示す低分子化合物の同定が今度重要となる。我々は bFGF の代替化合

物の同定に成功しており(2013年 Biochem. Biophys. Res. Commun.に発表)、今後さらにこの成果を進展させ、この問題点の解決していくことが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Miyazaki, T. and Kawase, E. Efficient and scalable culture of single dissociated human pluripotent stem cells using recombinant E8 fragments of human laminin isoforms. **Curr. Protoc. Stem Cell Biol.** 32:1C. 18, 1-8 (2015). DOI:10.1002/9780470151808.sc01c18s32. 査読あり

Kuo, T.-F., Mao, D., Hirata, N., Khambu, B., Kimura, Y. Kawase, E., Shimogawa, H., Ojika, M., Nakatsuji, N., Ueda, K., and Uesugi, M. (2014). Selective elimination of human pluripotent stem cells by a marine natural product derivative. **Journal of the American Chemical Society** 136, 9798-801. DOI: 10.1021/ja501795c. 査読あり

Kawase, E. “Efficient Expansion of Dissociated Human Pluripotent Stem Cells using a Synthetic Substrate” *Methods Mol. Biol.* 2014 May 30. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/7651_2014_82 査読あり

Hirata, N., Nakagawa, M., Fujibayashi, Y., Yamauchi, K., Murata, A., Minami, I., Kondo, T., Kuo, T.-F., Endo, H., Tomioka, M., Inoue, H., Sato, S.-I., Ando, S., Kawazoe, Y., Aiba, K., Nagata, K., Kawase, E., Chang, Y.T., Suemori, H., Eto, K., Nakauchi, H., Yamanaka, S., Nakatsuji, N., Ueda, K., Uesugi, M. (2014). “A Chemical Probe Selective for Human Pluripotent Stem Cells.” **Cell Reports** 6, 1165-1174. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.02.006. 査読あり

Kumagai, H., Suemori, H., Uesugi, M., Nakatsuji, N. and Kawase, E. (2013). “Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal.” **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 434 (4), 710-716. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.061. 査読あり

Nakatsuji, N., Kawase, E., Miyazaki, T., Minami, I., Aiba, K. (2013) Multidisciplinary Research of Human Pluripotent Stem Cells for Application to Cell Therapy and Drug Discovery. **TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE** 10, 160-163.

DOI: 10.1007/s13770-013-0019-y. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

Takahashi, Tsuneo A., Tanaka, Keiji, Okuda, Shinji, Hirai, Masako, Takada, Kei, Kawase, Eihachiro, Suemori, Hirofumi, Nakatsuji, Norio, Kitagawa, Masanari. A NEW METHOD FOR THE DETECTION OF RESIDUAL MOUSE FEEDER CELLS CONTAMINATED IN THE PRODUCTS OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS. 12th International Society for Stem Cell Research (Vancouver, Canada, 2014.)

Takada, Kei, Hirai, Masako, Hamao, Mari, Kashigi, Fumi, Kawase, Eihachiro, Suemori Hirofumi, Nakatsuji, Norio. Takahashi, Tsuneo. HIGH FREQUENCY OF INTRACELLULAR ICE FORMATION DURING SLOW COOLING IN COLONIES OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS: COMPARISON TO DISSOCIATED SINGLE CELLS. 12th International Society for Stem Cell Research (Vancouver, Canada, 2014)

Hirai, Masako, Takada, Kei, Hamao, Mari, Kashigi, Fumi, Kawase, Eihachiro, Suemori Hirofumi, Nakatsuji, Norio. Takahashi, Tsuneo. VALIDATION OF CLINICAL GRADE HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS PRODUCED UNDER GMP. 12th International Society for Stem Cell Research (Vancouver, Canada, 2014.)

高橋恒夫、田中啓二、奥田真治、平井雅子、高田圭、川瀬栄八郎、末盛博文、中辻憲夫、北川 正成：ヒト ES/iPS 細胞調製における残存マウスフィーダー細胞の測定法の開発 第 13 回日本再生医療学会総会 (京都、2014)

平井雅子、高田圭、濱生麻里、櫻木芙美、川瀬栄八郎、末盛博文、中辻憲夫、高橋恒夫：ヒト ES 細胞既存株のクリーンアップによる臨床用ヒト ES 細胞株バンキングの構築 第 13 回日本再生医療学会総会 (京都、2014)

高田圭、平井雅子、川瀬栄八郎、末盛博文、中辻憲夫、高橋恒夫：ヒト ES 細胞における凍結保存の解析：コロニーの高頻度の細胞内氷晶形成 第 13 回日本再生医療学会総会 (京都、2014)

〔図書〕(計 2 件)

宮崎隆道、川瀬栄八郎 「ES・iPS 細胞の

フィーダーフリー培養法」実験医学 別冊
「ES・iPS細胞実験スタンダード」106-114
(2014)

Kawase, E. "Development of Culture Substrates and Culture Media for Efficient Expansion of Human Pluripotent Stem Cells." In Lecture Notes on Cell Biology and Materials Sciences" pp. 89-97 (Eds. Yuh-Jyh Jong and Norio Nakatsuji) (University System of Taiwan) ISBN 978-986-85735-2-9 (2014).

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川瀬 栄一郎 (Eihachiro Kawase)
京都大学・再生医科学研究所・講師
研究者番号：70402790

研究者番号：

(2) 研究分担者

なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

()

研究者番号：