

## 論文

タンパク質透過性のコラーゲンゲル膜を用いた  
iPS細胞／フィーダー細胞の隔離培養システム大藪 淑美<sup>\*1)</sup> 柚木 俊二<sup>\*1)</sup>Development of separated culture system for iPS cells and feeder cells  
using a protein-permeable collagen gel membraneYoshimi Ohyabu<sup>\*1)</sup>, Shunji Yunoki<sup>\*1)</sup>

Induced pluripotent stem cells (iPS cells) are co-cultured with feeder cells to maintain their pluripotency, but isolation of iPS cells are problematic because of contamination by feeder cells. We have developed a cell-adhesive gel membrane with permeability for high molecular weight proteins in order to separately culture iPS cells and feeder cells. Membranes of collagen fibrillar gel (1-5 mm thick) were prepared at various collagen concentration, crosslinked with a commercial water-soluble carbodiimide. The gel membranes were mechanically supported by a plastic mesh. The decreases in membrane thickness and collagen concentration increased permeability of bovine serum albumin (molecular weight of 70 kDa), while the networks of collagen fibrils in the membrane were dense enough to prevent cell penetration into the membranes. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were cultured on biological dishes, and the membranes were set over the dishes. Mouse iPS cells maintained their pluripotency for at least 5 days while they were cultured on the membrane (collagen concentration 0.5%; 3mm thick). These results suggested that the separate culture system allowed the soluble factors from MEFs to permeate the membrane and affected iPS cells. The protein-permeable gel membrane has a potential for being used for cultivation of iPS cells for regenerative medicine.

キーワード：タンパク質透過性, 隔離培養システム, コラーゲン, iPS細胞

Keywords : Protein-permeable, Separated culture system, Collagen, iPS cells

## 1. はじめに

iPS (Induced pluripotent stem) 細胞は, 成人の細胞から作製され, すべての細胞に成長する分化多能性 (pluripotency) を保ちつつ, ほぼ無限に増殖させることができるため, 再生医療・創薬支援など様々な分野での利用が期待されている。iPS細胞はフィーダー細胞とよばれる栄養供給細胞との共培養<sup>(1)</sup>が必要とされ, その単離作業に高額な装置や手間を要することが問題となっていた。そこで, フィーダーレス培養<sup>(2)-(4)</sup>が開発された。しかし, 個体差が大きいiPS細胞全てに同様の効果をもたらす培養液は, フィーダー細胞が産生する特定の液性因子を添加しただけではできなかった。これらの問題は培養中のフィーダー細胞を分離して, 液性因子のみをiPS細胞に作用できれば, 手間もコストもかけずに解決される。

そこで我々は, 細胞が浸潤せずに液性因子を透過する膜を隔てて2種類の細胞を培養すれば, 本質的にフィーダー細胞との共培養と同じ培養環境をiPS細胞に付与できると

考えた。培養環境を分断してiPS細胞とフィーダー細胞を隔離して培養できる膜を, 細胞接着性を有するコラーゲン線維ゲルとし, 図1に示す隔離培養システムを開発した。この隔離培養システムを用いてiPS細胞とフィーダー細胞を隔離培養したのち, iPS細胞が分化多能性を保ちつつ, 増殖培養できることを実証した。

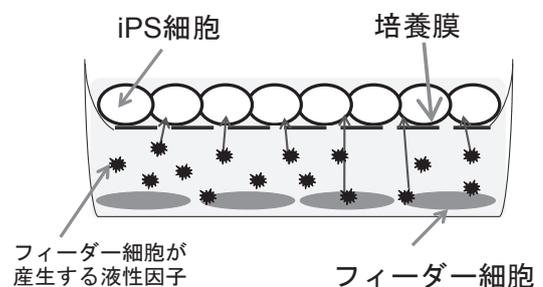


図1. 隔離培養システムの概念図

## 2. 実験方法

2.1 材料 プタ皮膚由来ペプシン可溶性コラーゲン (PSC) 水溶液 (日本ハム株式会社製, pH 3 希塩酸溶媒, 濃

事業名 平成23年度 (一財) 向科学技術振興財団研究助成  
\*1) バイオ応用技術グループ

度1.0%), 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド水溶液(和光純薬工業株式会社製, EDC), リン酸緩衝生理食塩水(PBS)調製用タブレット(Sigma-Aldrich Co.製), パラホルムアルデヒド-りん酸緩衝液(和光純薬工業株式会社製, PBS溶媒, 濃度4%), グルタルアルデヒド溶液(和光純薬工業株式会社製, 濃度25%), 組織脱水溶液(和光純薬工業株式会社製, エタノール濃度100%), t-ブチルアルコール(和光純薬工業株式会社製)ウシ血清アルブミン(和光純薬工業株式会社製, BSA, 分子量30~70 kDa)カップ状培養容器(Corning Inc.製, Falcon®セルカルチャーインサート), 6wellプレート(Corning Inc.製, 接着細胞用)を用いた。細胞はMEFs(オリエンタル酵母工業株式会社製, Murine Embryonic Fibroblasts)およびマウスiPS細胞(理化学研究所バイオリソースセンター提供, APS-00002)を用いた。培養試薬は, ウシ胎児血清(Corning Inc.製, FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium(Sigma-Aldrich Co.製, DMEM), および細胞分散液(Life Technology Co.製, 0.25%トリプシン/EDTA溶液)を用いた。ALP染色はAP Staining Kit(System Biosciences Inc.製, Red Color Kit)およびTris-HCl(Sigma-Aldrich Co.製, pH 9.0)を用いた。

**2.2 ゲル膜を有するカップ状培養容器の作製** 架橋したPSC線維ゲル膜を底面としたカップ状培養容器を, 以下の手順で作製した。PSC水溶液にPBSを混合して, メッシュ支持体を備えたカップ状培養容器に注ぎ, 37°Cで24時間静置し, コラーゲンを線維化させた。PSCの最終濃度は0.05, 0.1, 0.5%とした。カップ状培養容器に加えるPSC水溶液の量により, 最終的なゲル膜の膜厚を1~4 mmの範囲に調節した。架橋剤としてEDC(40 mM(ただし, Mはmol/dm<sup>3</sup>である))をゲル膜に加え, 24時間静置してコラーゲンを架橋した。ゲル容量の5倍量の超純水で洗浄して未反応の架橋剤を除去した。

### 2.3 ゲル膜の性能評価

(1) 強度試験 培養液の重さに対するゲル膜の機械的耐性を評価するために, カップ状培養容器の内側に培養に必要な2 mlの水を加えて破損の有無を観察した。

(2) 水透過性試験 培養に必要な5 mlの水を加えたプレートにカップ状培養容器を沈めて, 水圧によりゲル膜を通過した速度から水透過性を評価した。膜厚が1, 2, 3, 4 mmで, コラーゲン濃度を0.05, 0.1, 0.5%と変化させたゲル膜を備えたカップ状培養容器を, 水を加えた6wellプレートに設置した。ゲル膜を通過し, カップ状培養容器にたまった水の体積を45分後に計測して水透過性を比較した。

(3) タンパク質透過実験 カップ状培養容器に加えたBSA水溶液が自重によりゲル膜を通過する際のBSA濃度変化から, ゲル膜のタンパク質透過性を評価した。膜厚が一定で, コラーゲン濃度を0.05, 0.1, 0.5%と変化させたゲル膜を備えたカップ状培養容器を6wellプレートに設置して, 0.2% BSA水溶液をカップ状培養容器に加えた。6wellプレートへと通過した水溶液を回収・濃縮し, 電気泳動法により分子量と濃度を測定した。

(4) 細胞の接着性試験と透過試験 細胞がゲル膜に接着して培養できることを示し, 細胞およびゲル膜の空隙の大きさを以下の手順で観察した。MEFsを培養液に懸濁して, カップ状培養容器の内側に $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>になるように播種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>培養した。10% FBS含有DMEMをMEFs用培養液として用いた。培養後, ゲル膜をPBSで洗浄したのち, パラホルムアルデヒド, グルタルアルデヒドの順に固定し, 組織脱水溶液で脱水し, t-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥した。卓上走査型電子顕微鏡(SEM)(Miniscope® TM3000, 日立製作所株式会社製)を用いて, ゲル膜のコラーゲン線維と接着細胞の形態を観察した。

### 2.4 隔離培養の有効性試験

(1) iPS細胞の分化多能性評価 iPS細胞とMEFsを, それぞれカップ状培養容器の内側および外側で隔離培養し, iPS細胞の形態を観察した。iPS細胞の分化多能性は, アルカリフォスファターゼ(ALP)染色による染色性で評価した。  
〈iPS細胞の準備〉 iPS細胞を従来法で増殖させ準備した。以下に手順を示す。MEFsが接着した培養皿に, iPS細胞を $3.6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>になるように播種して培養した。15% FBS, 0.1 mM 非必須アミノ酸, 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, および1000 U LIFを添加したDMEMをiPS細胞用培養液として用いた。細胞分散液を添加し, すぐにMEFsを除去して静置したのち, iPS細胞を回収し, 培養液に分散した。

〈iPS細胞とMEFsの隔離培養〉 iPS細胞を隔離培養して, iPS細胞の形態を観察した。以下に手順を示す。カップ状培養容器を, MEFsを播種した6wellプレート内に設置した。カップ状培養容器の内側に $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>になるようにiPS細胞を播種して培養した。光学顕微鏡(オリンパス株式会社製, IX53)を用いて隔離培養および従来法の細胞の形態を比較した。

〈ALP染色〉 iPS細胞を固定し, Tris-HCl(100 mM)で洗浄し, 染色は添付のプロトコルに従った。光学顕微鏡を用いて隔離培養および従来法のALP染色性を比較した。

(2) iPS細胞の神経細胞への分化誘導 iPS細胞を神経細胞に分化誘導することにより, iPS細胞の分化多能性を評価した。詳細を以下に示す。

〈神経細胞への分化誘導培養〉 まず, iPS細胞を培養したカップ状培養容器を新しい6wellプレート内に配置して, 胚葉体形成用培養液(LIF不含iPS細胞用培養液)を加えて培養し, 胚葉体形成した。次に, 2 μM all-trans-retinoic acid(RA)を加えた胚葉体形成用培養液に交換して培養した。最後に, 神経細胞分化誘導用培養液(1% N2-supplement, 20 ng/ml basic FGFを添加したDMEM/F12)に交換して培養した。

従来法では, 2.4(1)〈iPS細胞の準備〉で示した方法でiPS細胞を単離・分散したのち, 胚葉体を形成させた。その後, 隔離培養と同一の培養を実施して分化誘導した。

〈神経細胞への分化誘導培養〉 2.3(4)と同様に細胞の形態をSEMで観察し, その形態からiPS細胞の神経細胞への分化を評価した。

### 3. 結果

**3.1 ゲル膜の性能評価** 濃度 (0.05, 0.1, 0.5%) と膜厚 (1~4 mm) を変化させたゲル膜を備えたカップ状培養容器を作製し, 膜の機械的強度および水透過性を評価した結果を表1に示す。コラーゲン濃度と膜厚が減少すると強度が弱くなり, メッシュ支持体があってもゲルが崩壊した。一方, コラーゲン濃度と膜厚が増加すると強度は高くなるが, カップ状培養容器の液面が低く, 水透過性が低下した。

BSA 溶液および各種ゲル膜を透過した BSA 溶液の電気泳動結果を図2に示す。原液と透過液はいずれも同様の位置にバンドが確認され, 分子量30~70 kDaのタンパク質がゲル膜を透過したことがわかった。しかし, コラーゲン濃度が高いゲル膜ではバンドの染色性が低下し, 透過液のタンパク質が減少していた。

タンパク質透過性があり, 強度があるゲル膜 (コラーゲン濃度0.5%で膜厚3 mm) 上で培養された細胞をSEMで観察した結果を図3に示す。不織布状コラーゲン線維ネットワークに細胞が接着・伸展している様子が観察された。細胞のサイズは50 μmを超えていたのに対し, ゲル膜のコラーゲン線維の空隙は1 μmに満たなかった。

**3.2 隔離培養されたiPS細胞の分化多能性** 強度およびタンパク質透過性をあわせ持つゲル膜 (コラーゲン濃度0.5%で膜厚3 mm) を備えたカップ状培養容器を用いてiPS細胞とMEFsの隔離培養を実施した。隔離培養および従来法で培養したiPS細胞の5日後の位相差顕微鏡観察像を図4 (A, B) に, ALP染色観察像を図4 (C, D) に示す。隔離培養されたiPS細胞のほぼ全てのコロニーは明瞭な輪郭を示し, ALP染色ではコロニーが全体的に赤く染色されたことにより, 分化多能性を有することが示された。一方, 従来法で培養されたiPS細胞は輪郭が不明瞭なコロニーが多く, 隔離培養に比べて, 染色される細胞は少なく, 辺縁のみが染色されるコロニーが多かった。染色結果を定量化するため, 培養容器ごとの全体的に染色されたコロニー数の割合を図5に示す。隔離培養では95.6%で, 従来法では19.7%であった。

隔離培養によって5日間の分化誘導培養を行った神経細胞のSEM観察像を, 従来法と比較して図6に示す。いずれも神経細胞に特有の樹状突起が確認されたが, 樹状突起を伸展する神経細胞の数は隔離培養の方が多かった。樹状突起の径や全長も明らかに隔離培養の方が大きかった。

### 4. 考察

本隔離培養システムを用いて, フィーダー細胞と接触させずにiPS細胞の増殖を行うことができた。隔離培養システムがフィーダー細胞との共培養に類似した培養環境をiPS細胞に与えたと考えられた。フィーダーレス培養システムの開発も進められているが, iPS細胞の分化多能性を保つためには共培養がまだまだ最も有効な手段である。医療に用いられるiPS細胞は, MEFsのような異種細胞の混入 (コン

タミネーション) により安全性を著しく損なう<sup>(5)</sup>。本隔離培養システムは, フィーダー細胞との共培養の有効性および単離作業不要なフィーダーレス培養の安全性を兼ね備えた新規の培養システムである。

表1. 異なるコラーゲン濃度と膜厚で作製された培養膜の強度と液体透過性

コラーゲン濃度 (%)	膜厚 (mm)	強度	液体透過性
0.5	4	○	△
0.5	3	○	○
0.5	2	○	○
0.5	1	×	—
0.1	5	○	△
0.1	4	○	○
0.1	3	○	○
0.1	2	○	○
0.1	1	×	—
0.05	3	○	○
0.05	2	△	—

(強度) ○: 破損しなかった, △: 一部破損した, ×: 破損して崩れた  
(透過度) ○: 外側と内側の液面が同じ, △: 外側の液面より内側の方が低かった



図2. コラーゲン濃度による分離膜透過前後のアルブミン水溶液の電気泳動結果

A: 分子量マーカー, B: 0.2%BSA水溶液, C: 0.05%分離膜透過後の水溶液, D: 0.1%分離膜透過後の水溶液, E: 0.5%分離膜透過後の水溶液

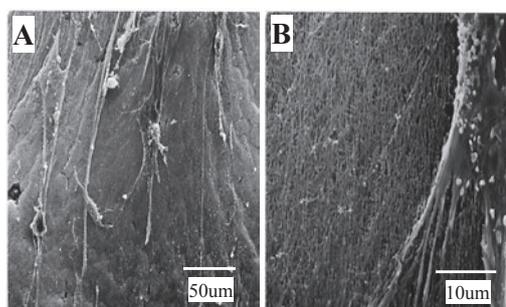


図3. 線維のMEFsのSEM観察像 低倍率 (A) と高倍率 (B)

本隔離培養システムの鍵となるのはタンパク質透過性のゲル膜である。iPS細胞の分化多能性維持に影響を与えているものは, フィーダー細胞が産生する液性因子のうち, タ

ンパク質と考えられている<sup>(6)</sup>。MEFs細胞と接触しなくてもiPS細胞の分化多能性が本隔離培養システムによって維持された結果は、BSA透過性を有したゲル膜を、MEFs細胞が産生したタンパク質も透過したためと推察された。BSAは生体内タンパク質の中でも比較的高分子量であり、BSA透過性は生体内タンパク質に対する透過性の指標として有用である。タンパク質透過性と強度を兼ね備えたゲル膜の作製にはラーゲン濃度と膜厚に適切な範囲がある。

また、ゲル膜をコラーゲン線維としたことは、細胞接着性を有するだけではない。iPS細胞がコラーゲン線維へ接着することで分化多能性を維持するという報告<sup>(7)</sup>がある。ゲル膜がコラーゲンであったことも分化多能性維持に貢献したと考えられる。

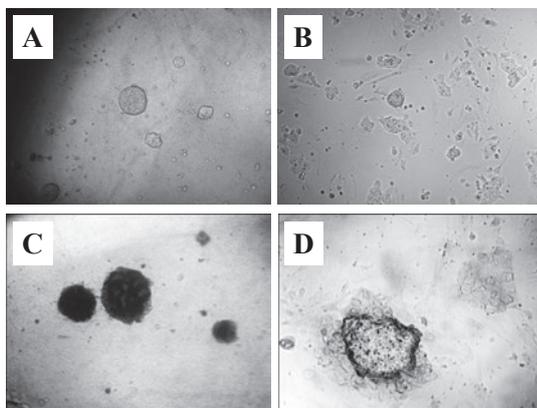


図4. 隔離培養(A, C)と従来培養(B, D)でのiPS細胞の観察像  
位相差顕微鏡による位相差顕微鏡観察像(A, B)  
光学顕微鏡によるALP染色後の観察像(C, D)

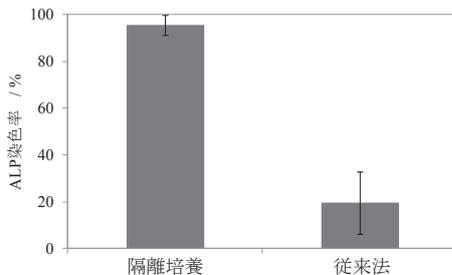


図5. 隔離培養および従来法のiPS細胞の分化多能性

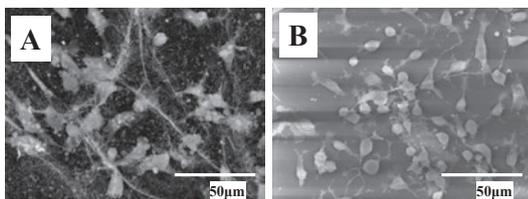


図6. 神経細胞に分化誘導したiPS細胞の走査電子顕微鏡観察像  
隔離培養(A)と従来培養(B)

コンタミネーションが生じないことだけが隔離培養の利点ではない。カップ状培養容器を持ち上げるだけでiPS細胞を別の培養系へと移せるため、iPS細胞の分散作業が実質的に不要になるという利点もある。従来法では、iPS細胞は分

化誘導するときに、酵素反応とピペッティングで細胞を単一に分散する必要がある。しかし、iPS細胞はこの細胞分散作業での化学的・物理的刺激に敏感である。したがって、iPS細胞へのダメージを最小限にし、効率よくiPS細胞を増殖・分化させる本培養システムはiPS細胞に最適な培養システムである。また、この隔離培養システムは、複数の細胞や組織で構築される3次元生体モデルにも利用できると期待される。

本隔離培養システムには二つの課題が残されている。一つ目は、ゲル膜がカップ状培養容器から剥離しやすいことである。コラーゲンゲルと樹脂を化学架橋することはできないため、容器の形状で、ゲル膜を剥離しにくくする設計をする必要がある。二つ目は、メッシュ支持体で容器全体の細胞の観察を妨げていることである。EDCによる架橋では、ゲル膜に柔軟性がなく、物理的刺激に弱いため、ゲル膜に柔軟性を付加する架橋剤を選択する必要がある。以上を改良すれば、さらに価値が高い培養システムとなる。

## 5. まとめ

我々は、高分子量のタンパク質の透過性を有する細胞接着性のゲル膜を用いて、iPS細胞およびフィーダー細胞を隔離して培養するシステムを開発した。iPS細胞が多能性を維持しながら増殖し、その後の細胞分散作業も不要になった。このゲル膜を備えた培養容器はiPS細胞を簡便に行うための研究用資材として短期的な商品化が期待されるとともに、細胞治療のためのiPS細胞培養系としても有用と考えられる。

## 謝 辞

本研究は、一般社団法人向科学技術振興財団研究助成(登録番号101004)の支援を受けて実施された。

(平成27年7月22日受付, 平成27年8月12日再受付)

## 文 献

- (1) Thomson JA et al.: "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts", *Science*, Vol.6, No.282 (5391), pp.1145-7 (1998)
- (2) Wang L et al.: "Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and ERBB2 receptor signaling", *Blood*, Vol.1, No.110(12), pp.4111-9 (2007)
- (3) Amit M et al.: "Feeder-free culture of human embryonic stem cells", *Methods Enzymol.*, Vol.420, pp.37-49 (2006)
- (4) Baharvand H et al.: "An efficient and easy-to-use cryopreservation protocol for human ES and iPS cells", *Nat Protoc.*, Vol.5, No.3, pp. 588-94 (2010)
- (5) Ning Suna et al.: "Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells", *PNAS*, Vol.106, No.37, pp.15720-5 (2009)
- (6) Takamichi M. et al.: "Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells", *Nat Commun.* DOI: 10.1038
- (7) Richards M et al.: "Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells", *Nat Biotechnol.*, Vol.20, No.9, pp.933-6 (2002)