

株式会社 日立製作所

事業実施期間：開始 平成31年4月1日～終了 令和2年3月31日

申請者役職・氏名 基礎研究センタ 研究員 齊藤 洸

研究・事業名

培養評価法開発に向けたエクソソームの解析

交付申請内容

研究・事業の目的及び意義

再生医療向けの、移植に適した安全な細胞の製造にはクリーンルーム内での専門技術者による手技培養が欠かせないが、設備の維持管理費や人件費が高額であり、再生医療の普及を妨げている。また、細胞品質が作業者のスキルに依存するため、品質の担保が重要である。さらに、人が作業することによる生物学的汚染のリスクもある。これらの課題を解決するため、日立製作所では、神戸医療産業都市におけるオープンイノベーションにより、再生医療用細胞製造のための閉鎖系自動培養技術の開発に取り組んできた。

申請者らはこれまで国立研究開発法人日本医療研究開発機構の2015～2018年度の委託事業「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業（再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発）」を受け、大日本住友製薬株式会社（令和元年当時、現住友ファーマ株式会社）ならびに京都大学と共同で、iPS細胞を用いたパーキンソン病治療法の実用化に向けたドパミン神経前駆細胞の大量製造技術を開発、またその安全性を評価する手法を確立してきた。本委託事業では、日立製作所が開発した閉鎖系自動培養装置iACE1（図1）を用いて、従来の手技培養から工業生産レベルのスケールアップを行った。

本研究では、閉鎖系自動培養装置を用いた細胞製造のさらなる安定化・品質向上を目的に、非侵襲で細胞状態を正確にモニタリングすることを目指す。培養モニタリングは培養自動化の次の課題であり、安全で高品質な細胞を製造する上で、再生医療分野における基盤技術となり得る。具体的には、近年がんのバイオマーカーとして着目を集める、細胞が放出する小胞であるエクソソームを指標とした新規の培養評価手法の確立を目指す。本技術は再生医療等製品の製造に必要な自動培養技術をさらに有用にするものであり、本技術の実装により広く包括的に利用可能になることが期待される。

研究・事業の方法及び手段

これまで日立製作所で開発してきた自動培養装置を初めとして、自動培養装置は、あらかじめ決定した培養条件において培養を行うシステムとなっている。細胞の品質評価は培養後に行われ、培養へのリアルタイムのフィードバックはできない。更なる培養の品質向上を目的として培養へのフィードバックを行うためには、非侵襲で培養状態をモニタリングする技術が不可欠であるが、現在十分に有効な手法は知られていない。そこで、培養上清中に含まれるエクソソームをバイオマーカーとした新規培養評価技術を開発することにした。エクソソームは放出元細胞の情報となる物質を多く含むことから、培養状態を正確に反映する優れた指標として活用できることが期待される。本研究では、エクソソーム由来の指標候補から実際の培養で機能するモニタリング指標を決定する。具体的には、エクソソームの培養上清中の粒子数密度や形態、RNAやタンパク質等のエクソソーム構成因子等の指標候補について、iPS細胞の増殖過程、ならびにドパミン神経前駆細胞への分化誘導過程において、細胞増殖や分化状態等の細胞状態を反映するかどうかを検証する。

手段としては、電気抵抗ナノパルス法による培養上清中エクソソームの粒子密度および粒径分布の解析、定量RT-PCRによるマーカー候補遺伝子の発現解析、ELISA法によるマーカー候補タンパク質の定量解析を実施する（図2）。

研究・事業の特徴（新規性、独自性等）

申請者らによるこれまでの研究開発により、自動培養装置を用いたパーキンソン病向けドパミン神経前駆細胞の製造プロトコルの最適化を実現し、従来の手技培養と比較してiPS細胞の増殖率向上の可能性があることが明らかになるなど、従来法を超える効率・品質で細胞製造が可能になりつつある。

更なる培養の品質向上のため、培養自動化の次のステップとして、培養状態をモニタリングすることで培養過程においてリアルタイムでフィードバック制御出来る、インテリジェント自動培養システムの開発を目指している。再生医療等製品の製造では、外部からの菌の混入や細胞のクロスコンタミネーションのリスクが低い、完全閉鎖系の自動培養装置を使用することが求められる。完全閉鎖系で培養状態をモニタリングするためには非侵襲で培養状態を計測する必要があるが、有効なモニタリング手法は確立されていないのが現状である。

そこで、申請者らは従来廃液として処理しており未活用であった培養上清に着目し、培養上清中に含まれる、細胞が分泌する小胞であるエクソソームをバイオマーカーとした新規培養評価技術の開発に着手することにした。エクソソームは放出元細胞の情報となる物質を多く含むことから、培養状態を正確に反映する優れた指標として活用できることが予想されるが、エクソソームを指標として培養を評価した例は現在のところ存在しない。近年、エクソソーム内に存在するmiRNAが、がんの転移に関与することが明らかとなり、miRNAが生体内における、がんのバイオマーカーとして着目を集めている。本研究ではエクソソーム内のmiRNAにとどまらず、培養上清中エクソソームの粒子数密度および粒径分布、エクソソーム構成mRNAおよびタンパク質等幅広く解析することが特徴である。これにより、真に有効な培養評価指標を見出し、閉鎖系自動培養技術に適用可能な、インラインでのモニタリングに適した指標を特定する。

研究・事業により期待される効果

日立製作所は、平成29年に再生医療の研究開発拠点を神戸医療産業都市に開設し、オープンイノベーションによる再生医療用細胞製造のための閉鎖系自動培養技術の開発に取り組んでおり、平成31年3月には製品化を実現した。申請者らはこれまで、iPS細胞製造の商用化で世界をリードする大日本住友製薬株式会社、ならびにiPS細胞を用いた再生医療実用化の研究で世界をリードする京都大学iPS細胞研究所の高橋淳教授との共同研究で、iPS細胞を用いたパーキンソン病治療法の実用化に向けたドパミン神経前駆細胞の大量製造技術を開発、またその安全性を評価する手法を確立してきた。培養モニタリングは、培養自動化の次の課題である。非侵襲での細胞モニタリング技術は、安全で高品質な細胞を製造する上で、再生医療分野における基盤技術となり得る。その中でもエクソソームはモニタリング指標の有力な候補であると期待される。日立製作所は引き続き、キーオピニオンリーダーである高橋淳教授および大日本住友製薬株式会社（令和元年当時、現住友ファーマ株式会社）と共同で、培養モニタリング技術に関する研究開発を神戸医療産業都市にて進めている。国内最大のバイオメディカルクラスター発で次世代の再生医療分野の基盤技術を開発することにより、広く包括的に利用される技術に成長できると期待される。



図1 閉鎖系自動培養装置 iACE1*

医療グレードの細胞製造を可能にする単回使用の完全閉鎖系モジュールを採用。同時に10億個の細胞を大量培養でき、全対象疾患で共通基盤工程であるiPS細胞の増幅および分化培養が可能な汎用装置。
（※iACEは株式会社日立製作所の登録商標）

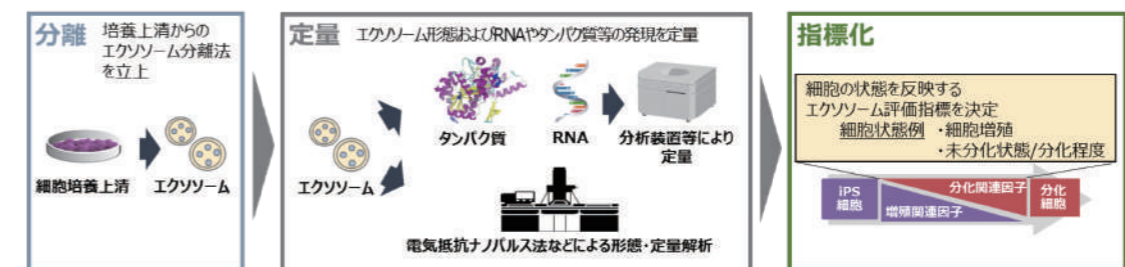


図2 本研究の概要

培養上清からのエクソソーム分離法の立ち上げ、各項目の定量、指標化までを本研究で実施。

実績報告内容

研究・事業の内容及び目標達成状況

従来の自動培養装置は、あらかじめ決定した培養条件において培養を行うシステムとなっている。細胞の品質評価は培養後に行われ、培養へのリアルタイムのフィードバックはできない。更なる培養の品質向上を目的として培養へのフィードバックを行うためには、非侵襲で培養状態をモニタリングする技術が不可欠であるが、現在十分に有効な手法は知られていない。そこで、今まで廃液として処理しており未活用であった培養上清に着目し、培養上清に含まれるエクソソームをバイオマーカーとした新規培養評価技術を開発することにした。エクソソームは放出元細胞の情報となる物質を多く含むことから、培養状態を正確に反映する優れた指標として活用できることが期待された。

本研究では、エクソソーム由来の指標候補から実際の培養で機能するモニタリング指標を決定した。具体的には、エクソソームの培養上清中の粒子数密度や形態、RNAやタンパク質等のエクソソーム構成因子等の指標候補について、iPS細胞の増殖過程、ならびにドパミン神経前駆細胞への分化誘導過程において、細胞増殖や分化状態等の細胞状態を反映するかどうかを検証した。以下では各種エクソソーム解析のためのエクソソーム分離法の立上げ結果、およびエクソソームの粒子数密度およびエクソソームを構成するRNAやタンパク質についての解析結果、ならびに特定できた指標候補のモニタリング指標としての有効性を検証した結果について以下に記述する。

①エクソソーム分離法の立上・検討

iPS細胞の培養上清中にはエクソソームが存在するが、電気抵抗ナノバルス法等によってエクソソームを定量するには培養上清そのままの状態では密度が低すぎて解析できず、100倍程度に濃縮する必要があった。そこで、エクソソームの分離・濃縮法の立上げと検討を行うことにした。すでに確立されている代表的なエクソソーム濃縮方法である超遠心分離法、フォスファチジルセリン(PS)アフィニティ法、ポリマー沈殿法の3手法を用いてiPS細胞の培養上清(播種後7日目)からエクソソームを精製し、透過型電子顕微鏡によりエクソソームの純度と視野あたりのエクソソーム数を検証した。培養上清10ml(1.0×10⁷cells相当)を使用し、各サンプルは酢酸ウランによるネガティブ染色により処理した。その結果、超遠心分離法では視野あたりの粒子数が100個程度と多数観察されたのに対し、PSアフィニティ法やポリマー沈殿法では視野あたりの粒子数が

3~4個程度しか観察されなかった(図1)。また、超遠心分離法やポリマー沈殿法では様々な形態・粒径のものが観察されたが、PSアフィニティ法では数が少ないものの、ほぼ均一の形態・粒径のものが観察された(図1)。本手法は、エクソソーム表面に存在するフォスファチジルセリンにカルシウム依存的に結合する物質を応用しているため、純度が高いエクソソームが濃縮されていると考えられる。PSアフィニティ法で観察されたエクソソームと思われる形態・粒径の顆粒が超遠心法でも多数観察されたため、超遠心法でエクソソームが多数回収できていると判断し、濃縮が必要な解析については超遠心法で濃縮したサンプルについて実施することにした。

②電気抵抗ナノバルス法による培養上清中エクソソームの粒子数密度の解析

iPS細胞の増殖過程で培養上清中のエクソソーム粒子数密度がどのように変化するかを解析するために、iPS細胞の培養過程で毎日培養液を回収し、培養上清中のエクソソーム粒子数密度を電気抵抗ナノバルス法により定量した。まず、9日間のiPS細胞増殖過程における増殖倍数の変化を図2aに示す。培養期間中iPS細胞は継時的に増加し、特に5日目で降指数関数的に増殖することから対数増殖期にあったと考えられる。次に、培養過程で毎日回収した培養上清10mlからエクソソームを超遠心法により100倍に濃縮し、電気抵抗ナノバルス法で粒子数密度を測定した結果を図2bに示す。播種後5日目までは上清中エクソソームの粒子数密度はほとんど変化しなかったが、5日目で降には指数関数的に増加した。細胞増殖をほぼ反映した結果となった。培養上清中エクソソーム粒子数密度が細胞増殖を反映したことから、エクソソーム粒子数密度と細胞数の相関を解析した。結果を図2cに示す。播種後1日目から9日目まで全期間でエクソソーム粒子数密度と細胞数の相関係数を算出した結果、0.94であり高い正の相関が認められた。さらに、細胞増殖が指数関数的に起こる播種後5日目から9日目までにおいて同様に相関係数を算出した結果、相関係数は0.94であり高い正の相関が認められた。これらの結果から、対数増殖期にあるiPS細胞は培養上清中エクソソームの粒子数密度を測定することによって増殖をモニタリング可能であることが分かった。

③定量RT-PCR等によるエクソソーム含有RNA(遺伝子)の解析

次に、細胞中においてマーカー遺伝子として知られている遺伝子がエクソソーム中でも細胞状態を反映するマーカーとして機能しているかどうかを検証するために、未分化マーカー遺伝

子であるNANOGとOCT4および腹側マーカーのCORIN、中脳マーカーのLMX1Aの発現量をマイクロアレイデータから抽出し、分化前後において細胞とエクソソームの間で比較した。その結果、未分化マーカーであるNANOGとOCT4は分化後に細胞中では発現量が大きく減少したのに対し、エクソソーム中ではその発現量はほとんど変化しなかった(図3)。腹側マーカーのCORINおよび中脳マーカーのLMX1Aの発現量は細胞では分化後は大きくその発現量が増加したが、エクソソーム中ではほとんど発現量に変化が見られなかった(図3)。このことから、細胞中とエクソソーム中では分化前後における各マーカー遺伝子発現量の変化が全く異なっており、エクソソーム中で変化する新規マーカー遺伝子を探索する必要があることが分かった。

④エクソソーム由来タンパク質の発現解析

エクソソームを構成するタンパク質としてCD63をはじめとするテトラスパンタンパク質が知られている。iPS細胞からドパミン神経前駆細胞への分化誘導過程で、これらテトラスパンタンパク質の発現量がどのように変化するかを検証するために、イムノプロットによる発現解析を行った。iPS細胞からドパミン神経前駆細胞への分化誘導過程(分化培養開始(day0)、分化途中(day8)、分化終了時点(day12))において培養上清を回収し、超遠心分離によるエクソソーム画分の単離を行い、CD63とその他テトラスパンタンパク質であるCD81およびCD9の発現をイムノプロットにより解析した。放出元細胞におけるこれらマーカータンパク質の発現を解析するために、細胞ライセートサンプルについても同様の解析を行った。細胞ライセートのみに発現するネガティブコントロールとして、βアクチンについても発現解析を行った。その結果を図4に示す。βアクチンは細胞ライセートサンプルのみに発現がみられ、エクソソーム画分には発現がみられなかった。この結果から、エクソソーム画分には細胞デブリ等コンタミネーションは無く、エクソソームが単離できていると考えられた。CD63はday8において一過的な強い発現がみられた。CD81についてもCD63同様にエクソソームサンプルにおいてday8における一過的な強い発現がみられた。CD9はエクソソームサンプルでday0における発現がみられたが、その後のday8およびday12では発現がみられなかった。以上の結果から、CD63、CD81、CD9等のテトラスパンタンパク質は分化のステージに応じて発現量が増加することから、モニタリング指標として有効である可能性が考えられた。

⑤得られたエクソソーム指標候補の有効性検証

イムノプロットによる解析により、CD63、CD81、CD9等のテトラスパンタンパク質が分化のステージに応じて発現量が増加することから、モニタリング指標として有効である可能性

が示された。そこで、iPS細胞からドパミン神経前駆細胞への分化誘導過程において、代表的なテトラスパンタンパク質の一つであるCD63の培養上清中における発現量を、ELISA法により詳細に解析することにした。細胞分化に必要な不可欠な分化誘導因子であるFGF8欠乏条件下による培養と通常条件の間で培養上清中CD63の発現量の比較定量を実施し、マーカー候補としての可能性を検証した。その結果を図5に示す。通常培養条件ではday7をピークとした一過的な発現誘導がみられたのに対し、FGF8欠乏条件下では培養上清中のCD63の発現量は全培養期間において通常培養条件と比較して低く推移し、day7における発現量は通常培養条件と比較して約40%程度低かった。また、FGF8欠乏条件下では、分化誘導初期であるday3で既に通常培養条件よりも培養上清中のCD63の発現量が50%以上低かった。以上の結果から、培養上清中のCD63の発現量はiPS細胞の分化状態を反映していると考えられ、分化効率の悪い培養を早期に発見できるモニタリング指標として有効であることが分かった。

以上の結果から、iPS細胞の増殖過程においては培養上清中エクソソームの粒子数密度を測定することによって増殖をモニタリング可能であること、iPS細胞からドパミン神経前駆細胞への分化誘導工程においてはエクソソームマーカータンパク質であるCD63の発現量が分化効率の悪い培養を早期に発見できるモニタリング指標として有効であることが分かった。

今後の展開

本研究により、培養上清中のエクソソームが細胞状態を反映する優れたモニタリング指標となり得ることが明らかとなった。特に、エクソソームの粒子数密度およびエクソソームマーカータンパク質であるCD63の発現量がモニタリング指標として有効であることが示された。エクソソームを用いた自動培養装置によるフィードバック制御の実現に向けて、エクソソーム粒子数密度のインラインでの測定技術および培養上清中タンパク質の簡便な検出技術の検討を開始する予定である。CD63以外のエクソソーム由来遺伝子およびタンパク質については引き続きマーカー探索を行い、高い精度でのモニタリングに適した指標の特定を引き続き行う予定である。

今後、本技術を再生医療分野において広く包括的に利用される基盤技術に育て上げることにより、周辺企業・機関等との相乗効果を生み出しながら神戸医療産業都市の発展に寄与できることが期待される。

本成果の一部は以下学術論文として発表し、日本生物工学会2022年度(第30回)論文賞を受賞した。

・Saito H, Kato M, Hirai K, Kiyama M, Ohyama K, Hanzawa H, Nakane A, Sekiya S, Yoshida K, Kishino A, Tsuchida A, Kimura T, Takahashi J and Takeda S. Analysis of extracellular vesicles as a potential monitoring index for differentiation of neural lineage cells derived from iPS cells. Journal of Bioscience and Bioengineering 132(4), 381-389 (2021).

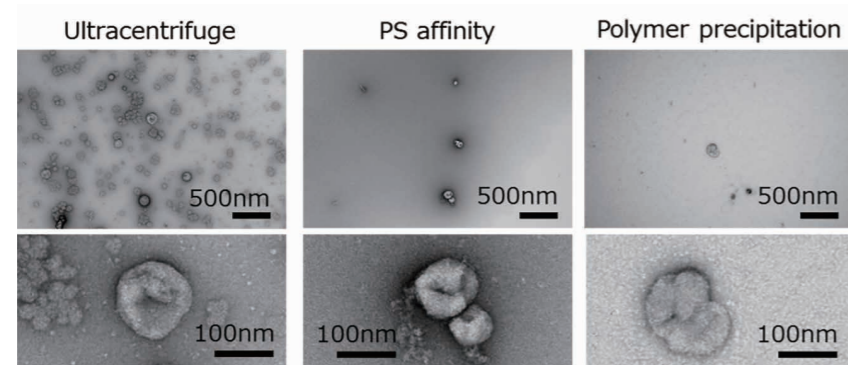


図1. 超遠心法 (ultracentrifuge)、PSアフィニティ法 (PS affinity)、ポリマー沈殿法 (polymer precipitation) を用いてiPS細胞培養上清からエクソソームを濃縮し、透過型電子顕微鏡で観察した。

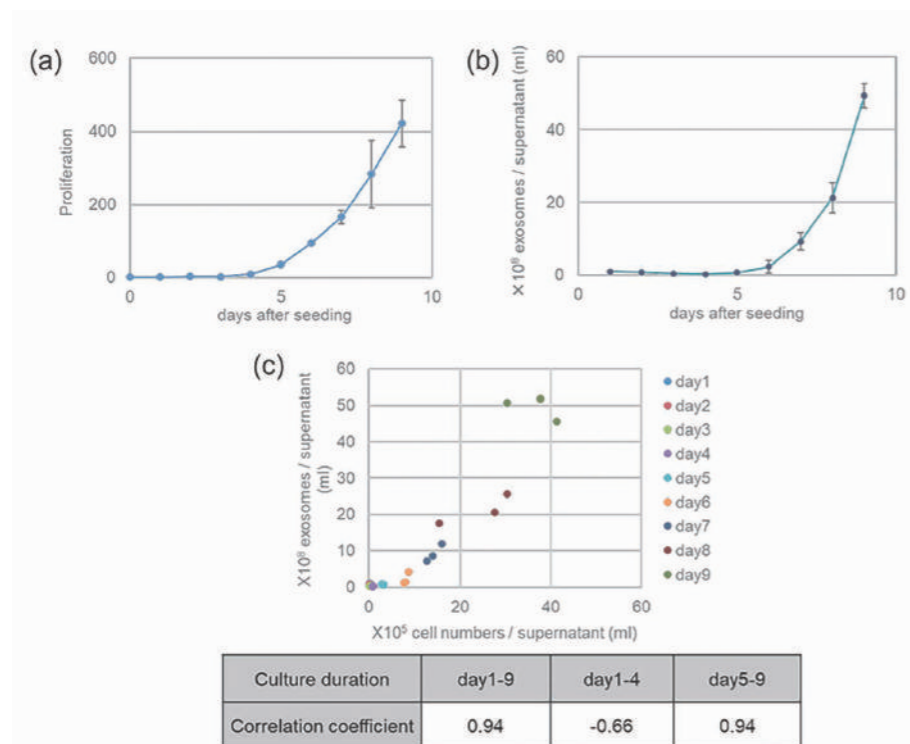


図2. (a) iPS細胞を9日間培養し、毎日細胞数をカウントして播種細胞数に対する増殖倍数を算出した。(b) iPS細胞の培養上清を毎日回収し、超遠心法による濃縮の後に電気抵抗ナノバルス法によりエクソソーム粒子数密度を定量した。(c) 細胞数とエクソソーム粒子数密度の相関を解析した。

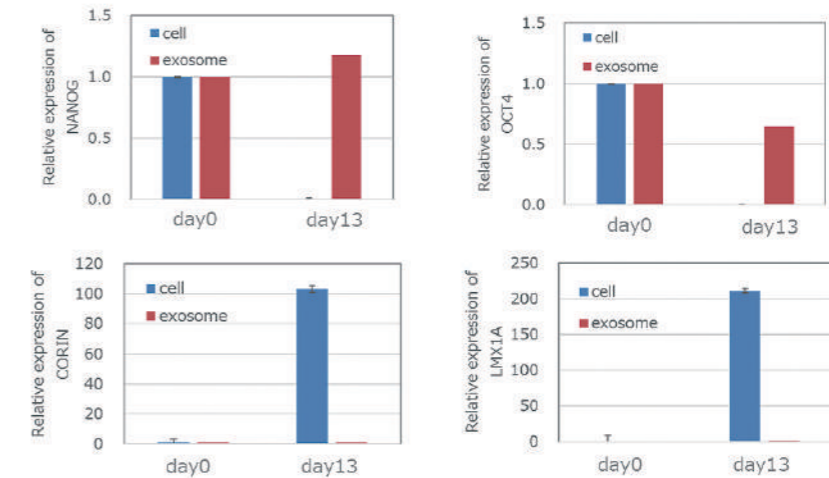


図3. iPS細胞からドパミン神経前駆細胞への分化誘導過程において、分化前(day0)および分化後(day13)の時点における未分化マーカー遺伝子NANOGおよびOCT4、分化マーカーCORINおよびLMX1Aの発現量をマイクロアレイ解析により定量した。

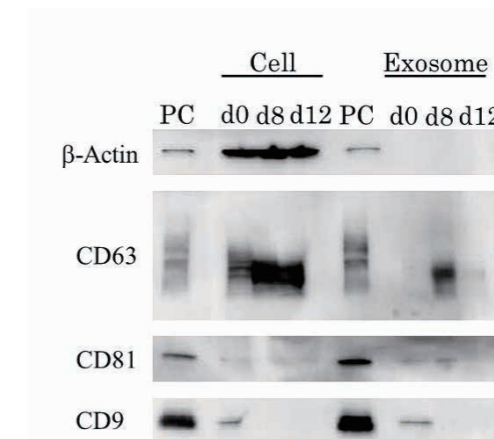


図4. iPS細胞からドパミン神経前駆細胞への分化誘導過程において、分化前(day0)および分化途中(day8)、分化後(day13)の時点におけるエクソソームマーカータンパク質CD63、CD81、CD9および細胞のみに発現するコントロールβ-Actinの培養上清中エクソソームでの発現をイムノブロットにより解析した。比較対象として、細胞ライセートにおける発現も同様に解析した。PC: 陽性コントロール(β-Actin、CD63、CD81:HCT116 exosome solution; CD9:293T Lysate sc-113009)。

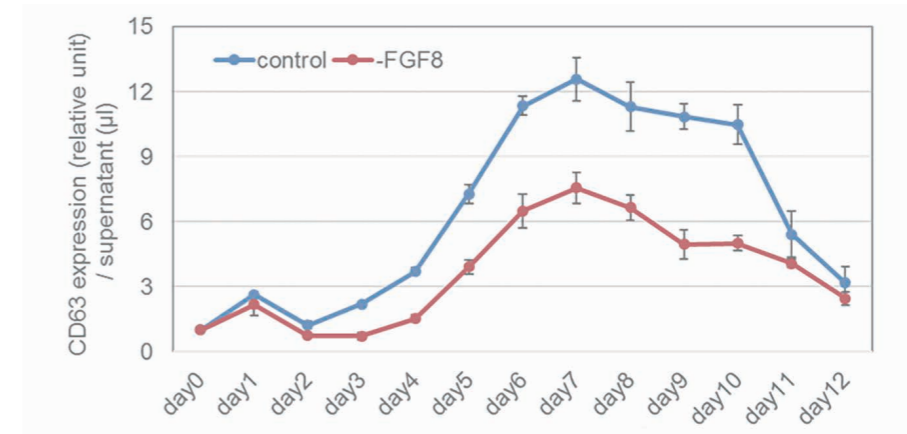


図5. iPS細胞からドパミン神経前駆細胞への分化誘導過程において、培養上清中エクソソームマーカータンパク質CD63の発現量をELISA法により経時的に定量した。分化誘導効率が低い培養例として、分化誘導因子FGF8欠乏条件(-FGF8)で分化培養を行い、通常培養条件(control)との比較を行った。