

自家iPS細胞の閉鎖系自動培養のためのラミニン-511の保存安定性試験

中谷 有里¹, 清水 英子¹, 佐藤 優江¹, 塚原 正義¹

¹(公財) 京都大学iPS細胞研究財団 研究開発センター



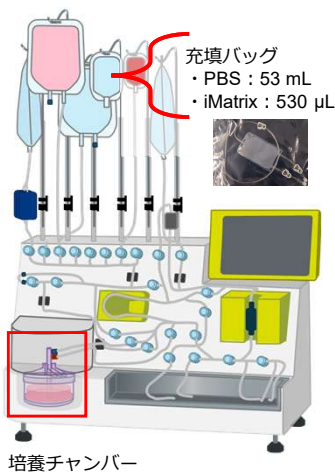
1.背景・目的

自家iPS細胞を用いた再生医療では、患者ごとに細胞を製造する必要があるため、製造コストと製造安定性の向上が重要な課題となっている。当製造施設では閉鎖系自動培養装置 (CliniMACS Prodigy®, Miltenyi Biotec) の導入により、血液採取から約1か月程度で自家iPS細胞の作製が可能であることを報告している。現在、さらなる低コスト化と製造の標準化を目的として、試薬や培地などを事前に充填したバッグと送液チューブを組み合わせた閉鎖系培養キットの開発を進めている。

本研究では、その重要な構成要素の一つである細胞培養足場材ラミニン-511 (iMatrix-511, マトリクソーム) のPBS希釈済み調製液に着目した。本試験における充填バッグや送液チューブへの吸着による試薬ロスや保存安定性が製造工程に影響する可能性がある。さらに、実機では「プライミング (流路洗浄)」がプログラムに組み込まれていることから、プライミングによる試薬ロス低減効果について検証した。

2.方法

閉鎖系培養装置 前準備



充填バッグ
 ・PBS : 53 mL
 ・iMatrix : 530 μ L

・A (充填バッグへのiMatrix吸着と保存安定性 試験)

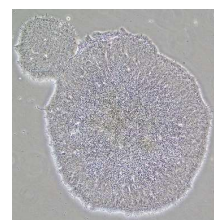
保存期間	保存条件	内容
0day	-	シリンジを用いて直接培養チャンパー内に送液
1week	4°C保冷庫内	
2weeks		
4weeks		
12weeks		

・B (送液チューブへのiMatrix吸着 試験)

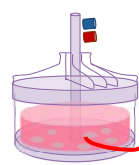
条件No.	送液条件	内容
I	プライミングなし 滞留なし	iMatrix液調製後、すぐにバッグから送液チューブを通して培養チャンパー内に送液
II	プライミングなし 滞留あり	iMatrix液を送液チューブ内に5分間滞留させてから培養チャンパー内に送液
III	プライミングあり 滞留あり	HSA含有生理食塩水を送液チューブ内に30分間滞留させ、その後iMatrix液を5分間滞留させてから培養チャンパー内に送液

iPSCs 播種

(CFiS-S03)



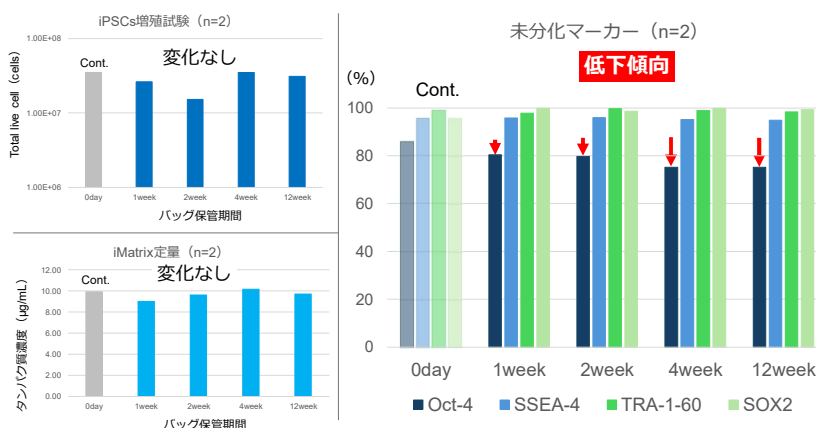
2×10⁵ cells /chamber



培養チャンパー

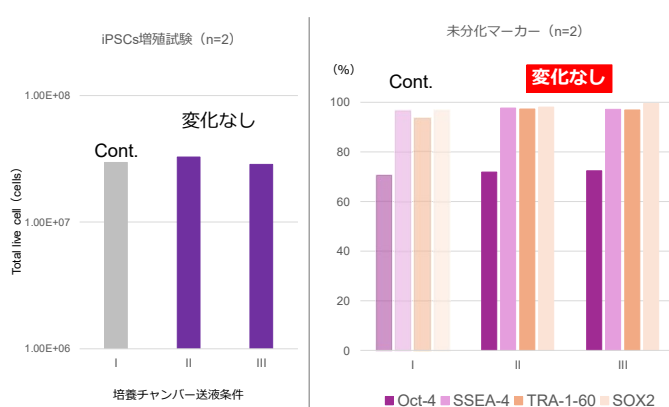
37°C
24 h

3-1.A試験結果 (充填バッグへの吸着と保存安定性)



A試験における細胞増殖試験、iMatrix定量の結果については、各保存期間内で大きな差は見られなかった。一方で、未分化マーカーの結果についても大きな差は見られないものの、保存期間が長いほど低下傾向にあった。

3-2.B試験結果 (送液チューブへの吸着)



B試験について、両試験ともに大きな差は見られなかった。未分化マーカーの結果については、調製後すぐのiMatrix液を送液した条件 I でもOct-4陽性率が低い傾向が認められた。

4.考察

本試験の範囲において、細胞増殖とiMatrixの定量の結果から、充填バッグならびに送液チューブへの顕著なiMatrixの吸着は認められなかった。一方で、FCMによるOct-4発現率は保存に伴い、低下傾向が認められた。希釈後iMatrixの保存条件や通液工程が、iMatrixの構造安定性/生物活性、ひいては未分化性維持に影響する懸念が示された。

また、保存安定性の対策としてHSA添加が考えられるが、細胞培養容器の材質によっては細胞接着活性に影響を及ぼす恐れがある。今後は、HSA添加の有無 (濃度条件を含む) に加えて、コーティング効率 (初期接着等) および未分化マーカーを指標に影響評価を行い、閉鎖系培養キットにおける安定的な細胞製造条件の確立を目指す。

謝辞

本研究は、AMED 課題番号 JP 25bm1323001の支援を受けました。

本研究は、多くの寄付者様のiPS細胞研究財団への多大なご支援により実施されました。ここに深く感謝申し上げます。

利益相反 (COI) 開示 : 本演題発表に関して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。