

マルチガスインキュベーター内の酸素濃度コントロールが重要な理由

*in vivo*細胞培養と*in vivo*酸素濃度の恒常性を保つための方法についてご紹介します

Carl Radesovich, Business Intelligence and Product Manager, PHC Corporation of North America



WHITE PAPER

哺乳類細胞培養および

医薬品と疾患コントロールの展望

哺乳類細胞培養は、細胞と生体組織を直接研究するには大変有用な方法です。近年盛んになっている再生医療では細胞培養が治療に直結し、また *in vitro* 環境下での疾患研究にも広く活用されています。

細胞培養の技術は進化を続けており、精緻な *in vitro* 条件を再現する重要性は高まっています。特に幹細胞・バイオ医薬品・胚細胞を扱う研究において、この傾向は強いです。

細胞の種類によっては、*in vivo* 環境からの乖離は、データエラーや再現性の低い実験結果を招き、実験の遅れや創薬の遅延などにつながります。



Table 1 – 大気中濃度以下における相対酸素濃度

酸素	説明
21.0%	通常大気圧下における大気中酸素濃度
19.9%	5% CO ₂ 条件で使用するマルチガスインキュベーター内の酸素濃度
13.5%	肺胞内吸気酸素分圧。酸素分圧は空気や水蒸気の流入・流出によって規定される。
9.5%	動脈血内酸素濃度
6.5%	静脈末端や循環血中のおおよその酸素分圧

生理学的酸素濃度：

in vivo における酸素濃度レベル

大気レベルの酸素濃度を表すのに、Normoxia (酸素正常状態) という言葉がよく使われます。一般的には20~21% (分圧: 160 mmHg) となりますが、生体組織においてはそれほど高い濃度にはなりません。¹

- 肺の中の酸素濃度は約14.5%、末梢組織では3.4~6.8%まで低下します。ですから、生理学的酸素濃度である2~10%状態は大気圧に比べれば「低酸素状態」となるのです。
- 脳・肝臓・脾臓など体の多くの臓器は2~10%間の酸素濃度下にあります。胸腺や腎臓周辺では1%以下になっています。²
- がん組織のような病理組織は細胞内の酸素は濃度勾配を持っており、低いところでは1%以下になっています。
- 低酸素状態は、病理学的かつ生理学的に正常状態を維持するために重要な様々なメカニズムを制御しています。例えば、細胞分裂や増殖、創傷治癒や胎児の発達などがそうです。加えて、酸素濃度は初期胚の発達や幹細胞ニッチなどを決定づける作用があります。³



細胞培養において重要な恒常性

細胞培養において *in vivo* 環境をうまく維持することが細胞の恒常性を守る大切な条件になります。細胞内の複雑なネットワークによって、温度・pH・栄養因子・イオン種などの繊細なバランスが維持されています。⁴

以前の細胞培養では、研究者たちは *in vitro* で哺乳類細胞をうまく培養するために、恒常性の維持に役立つ特定の培養因子を培養液に添加していました。現在では、培養される哺乳類細胞は、5~7%のCO₂濃度・厳密に調整された栄養因子・pH緩衝液そして成長因子によってコントロールされています。

これらの因子の利用によって細胞培養の技術は飛躍的に向上し、細胞は正常に増殖するようになっています。ただし、いくつかの細胞では酸素濃度の影響を多分に受ける場合がある例が報告されています。

Table 2 – ヒト腫瘍の種類による酸素濃度の特徴⁵

腫瘍種	正常細胞の酸素濃度	腫瘍細胞の酸素濃度
脳腫瘍	3.4%	1.7%
頭頸部がん	5.3% ~ 6.7%	1.6% ~ 1.9%
肺がん	5.6%	1.9% ~ 2.2%
乳がん	6.8%	1.3%
子宮がん	5.5%	1.2%
肝臓がん	3.9%	1.8%
膵臓がん		0.3%
前立腺がん	3.4% ~ 3.9%	0.3% ~ 1.2%
外陰がん		1.3% ~ 1.7%
メラノーマ	5.3%	1.5%
腎がん	4.9%	1.3%
直腸がん	6.8%	2.5% ~ 4.2%
肉腫	6.7%	1.8%

大気中の気体濃度は酸素21%、窒素78%、微小ガス1%となっています。肺に吸引されるとヘモグロビンを介して酸素分子が赤血球に取り込まれ、血流に乗って全身の臓器に運ばれます。

典型的なCO₂インキュベーターはCO₂濃度を5%に維持しますが、酸素濃度は19.95%にしか下がりません。多少は低くなりますが低酸素濃度というには程遠く、再現性や持続性の高い条件にコントロールされるわけではありません。

細胞レベルでは *in vitro* 酸素濃度は様々な細胞活動に重要な役割を果たしています。⁶ 組織において、酸素濃度は、細胞分裂や細胞増殖そして創傷治癒などの特定の生体機能に大きく影響するのです。

慣例的に哺乳類細胞は *in vitro* では大気圧濃度に近い20%程度の酸素濃度で培養されています。しかしながら、生体組織由来の多くの哺乳類細胞が内包する酸素濃度は大気圧濃度よりかなり低い2~11%濃度域となっています。⁷

疾患モデルと生理学的メカニズムの研究においては *in vitro* 細胞培養が最も頻繁に利用されており、最近の研究報告によると、大気圧近辺の酸素濃度で哺乳類細胞を培養することに関する様々な弊害が実証されてきています。

研究によれば、高い酸素濃度を使えば使うほど、染色体の破壊が進み、「ストレス応答遺伝子」の発現が増加し、酸化損傷の亢進と全体的な細胞の脆弱化を招くと報告されています。細胞由来製品のために培養を行うとしても、適合性のない酸素濃度下にさらすことは、先の工程での生産物に多大な影響を与えることとなります。

細胞培養プロセスにおける低酸素誘導因子の酸素コントロール

大気中酸素濃度以下の環境は細胞シグナル伝達に特徴的な影響を与えます。低酸素濃度によって誘導される細胞機能因子は低酸素誘導因子(HIF)と呼ばれています。

HIFはDNA結合タンパクの一種であり、生理学的酸素濃度において活性化されます。HIFは細胞全体の恒常性の保持と血管形成や解糖系、赤血球形成などの主要な経路に重要な複数の遺伝子の転写をコントロールしています。

HIFにコントロールされる遺伝子は、生理学的に胎児形成時期や局所貧血時に発生するような細胞ストレスを減らすために重要な機能を持っています。⁸

HIFは正常の細胞分裂や細胞増殖を促進し、細胞のグルコースの取り込みや代謝を司る遺伝子の発現をコントロールする機能も持っています。血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)と呼ばれる一つの遺伝子は、血管新生(血管形成)の細胞プロセスに重要な役割を持ち、HIFがそれを促進します。

血管形成によって低酸素組織に酸素を送るようにしますが、血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)は、低酸素状態の微小環境が特徴的である胎児形成にも重要な役割を担っています。⁹

さらに、HIFは、がんのように特定の部位に低酸素状態の組織を作り出すような病態生理学的症状に重要な役割も担っています。腫瘍が成長する時の急速な細胞分裂は、低酸素状態を作ることによってHIFの活性化を誘発します。これにより、細胞の生存プロセスが開始され、恒常性の維持とがんの成長へとつながっていきます。¹⁰

生理学的酸素濃度が、細胞培養プロセスをコントロールするのに重要であるもう一つの理由として、大気圧レベルの酸素濃度が予想外の副次的な問題の引き金になることが挙げられます。例えば、高酸素濃度に起因する活性酸素種 (ROS) の発生などを引き起こすことがあるのです。

ROSによってDNAが損傷し、タンパク質合成とタンパク機能が改変され細胞膜が不安定になるのです。¹¹ 大気圧下酸素濃度で培養される細胞はストレス応答遺伝子の発現が起こり、この状態は *in vivo* の生理学的な酸素環境とは異なるものなのです。

結果として下流工程でこのような細胞培養を行えば、予測できない多くのトラブルが発生します。生理学的酸素濃度と同様の条件下で細胞培養を行うことで代謝や恒常性が *in vivo* 環境とはるかに近くなり、HIF環境のような重要な因子が活性化され、細胞の順応と生存性が促進されるのです。

HIF環境では細胞の生育は速くなり、生存期間は伸び、より健康的で、より生理学的に生体に近い遺伝子発現ができるようになります。¹²

大気圧下と同様の酸素濃度条件では、HIF状態は弱いか検知できないほどとなり、過剰の酸素による酸化損傷やストレスタンパク質の過剰発現などの異常が引き起こされることとなります。

体外受精

大気圧より低い酸素濃度による細胞培養の需要が増加しており、生理学的濃度 (~5%) と低酸素濃度域 (~0.1% ~2.5%) がこれから注目されることでしょう。

体外受精 (IVF) の領域では既に生理学的酸素濃度の有用性が認識されており、その条件下での培養が行われています。

生理学的酸素濃度は胚形成に重要な役割を担う因子となっています。胚発生と受精卵の着床には厳密な環境条件が必要であり、IVFの研究者たちは *in vitro* 胚培養の環境条件の最適化を求めています。

多くの研究結果が示すのは、高い酸素濃度下での胚培養はその発生の際に様々な問題が生じるということです。一方で低い酸素濃度 (~5%) で行えば良好な結果が得られることもわかっています。

さらなる研究では、生理学的酸素濃度 (~5%) のほうが20%酸素濃度 (大気圧下酸素濃度) 条件よりも着床や妊娠が遙かにうまく進むこともわかっています。¹³

発生学におけるHIF

HIFは胚発生を達成するために重要な要素の一つです。胚形成と器官形成において、多くの場合低酸素濃度の微小環境が必要な条件となってきます。

ある研究では、低酸素環境が十分でない胚形成においては大気圧下で培養した場合と同様の形質が観察され、例えば血管形成不全や神経ひだの閉鎖などが見受けられました。¹⁴ HIFが血管形成や細胞増殖に重要な役割を果たしているということが明らかに示されています。

別の研究では、適正な胎盤形成とそれに続く血管新生にもHIFが関与していることが示唆されています。また、胎盤発生の過程でHIF由来タンパクの発現が観察されるとの報告もなされています。

これらのことから、胚形成が低酸素環境の *in vitro* で正常に行われることが *in vitro* での心血管や肺形成において重要な要素となっていると考えられます。

IVF研究者等は *in vivo* における胚形成環境を正確に再現することに留意しています。活性酸素種 (ROS) の発生は予想外に起こりますが、生理学的酸素レベルで胚形成を行わせれば、その影響を最低限に抑えることが可能となります。

胚発生と受精卵の着床や受精において、DNA、タンパク、その他生物学的分子種に対するROSの有害な影響が問題になることを研究者たちは認識しています。¹⁵

このように、胚の培養を生理学的酸素濃度で行うことは、*in vivo* 細胞の恒常性を正確に再現するだけでなく、遺伝子プロファイルの全体性を保持する上でも有益なのです。これらの有益性は研究結果に大きく影響し、さらには着床や受精がうまく行われるためにも大切なこととなります。

多分野における酸素濃度の影響

IVF下における胚の培養の成功は、他の研究目的においても、酸素濃度レベルを変更することによって、細胞の健全性や成長が改善されることを示唆します。

細胞分化と増殖が正常に進む環境原理は、幹細胞や腫瘍の研究といった分野においても容易に適用できると思われれます。

酸素濃度はいくつかの代謝工程や細胞経路において重要な因子となります。よって、真に包括的で信頼性の高い結果を得るために、哺乳類細胞を培養する場合には生理学的酸素条件に合わせた酸素濃度で培養することを検討する必要があります。

低酸素濃度が肝要となる研究分野では、主として幹細胞研究と腫瘍研究の2分野が考えられます。

Table 3 – 酸素濃度に関する用語と基準値 ¹⁶

酸素の存在場	酸素分圧	酸素濃度	科学用語	学術用語
大気中	160 mm/Hg	21%	大気圧下	酸素正常状態
<i>in vivo</i> 酸素分圧				
肺内部	150 mm/Hg	2% ~ 10%	病態生理学的濃度	低酸素状態
血流内	50 ~ 100 mm/Hg			
生体組織中	20 ~ 50 mm/Hg			
低酸素状態	<15 mm/Hg	<2%	生理学的酸素濃度	

幹細胞

幹細胞研究分野においては、生理学的酸素濃度の理解が極めて重要になってきています。研究によれば、大気圧環境下での長期間の幹細胞培養では、染色体異常や遺伝子異常、エピゲノム異常が見受けられます。¹⁷

これらの遺伝子変異は腫瘍形成につながり、また下流研究の結果に大きく影響します。様々な種類の幹細胞や前駆細胞は微小環境の酸素濃度が1~5%の領域に存在しているので、高酸素濃度の環境に曝露されると多くの有害な影響を受けます。

この仮説を裏付けるために、生理学的酸素濃度下で培養した幹細胞については、遺伝子情報の安定性と、成熟幹細胞と胚性幹 (ES) 細胞の幹細胞性の保持を確かめる方法がとられています。¹⁸

生理学的酸素濃度は幹細胞の生育速度や分化能にも影響を与えます。ある研究では、ラットの骨髄間葉幹細胞を5%酸素濃度で培養した結果、大気圧下20%酸素濃度の場合と比較して、増殖速度の上昇とコロニー形成能の促進が観察されています。¹⁹

さらに、ES細胞は大気圧条件に晒されたES細胞と比較すると、低酸素濃度下ではその分化能は著しく低下する一方で、その生育は大幅に促進されます。低酸素濃度は胚性幹細胞が完全な多能性を発揮するために必要な条件になるのです。

それとは対照的に、ラット末梢神経と中枢神経システムの幹細胞を生理学的酸素濃度で培養すれば、神経ひだへの分化は促進されます。つまり酸素濃度が幹細胞の将来をどのように調節するかについては、生体組織によって複雑なメカニズムがそれぞれあるのでしょうか。このデータが示すことは、幹細胞研究においては酸素濃度がどのような役割を果たすかについて、まだまだ研究の余地が残されているということです。

酸素濃度によってどのように細胞の分化能が調節され、遺伝子情報の完全性が保持されるのかは、まだ完全には解明されていません。研究者たちはHIFによる酸素濃度の影響を探っています。その研究結果からみれば、HIFは幹細胞と前駆細胞の分化能に影響しているといえるでしょう。ある研究では、マウスの胎盤における栄養芽幹細胞の分化促進は、HIF欠損によって変化することがわかっています。²⁰

HIFを欠いた表現型は、大気圧酸素濃度と同条件となり、幹細胞は他の細胞タイプに分化します。例えば、海綿栄養芽細胞に分化する代わりに栄養芽巨大細胞に分化していきます。この研究が示すのは、この組織では3%となる生理学的酸素濃度がHIFを活性化させ、次いで胎盤細胞を特定の形質へ分化させるということです。

がんと生理学的酸素濃度

酸素濃度は、病態生理学的研究に重要な役割を担っています。ウイルスやがん、そしてその他の様々な疾患は、しばしば生体組織内に低酸素微小環境を作りますが、そこにおいてHIFは複雑な相互作用の引き金となっているのです。

HIV感染における神経毒性発症のメカニズムを理解するための研究において、生理学的酸素濃度下で培養した細胞はHIV由来の神経毒性によって死にますが、大気圧下で培養した細胞は死にません。²¹ これは、HIVによって死ぬ細胞が、それに対応する酸素濃度と強い関連性を持っているということを示しています。

ほかの研究では、低酸素症の進行によるHIFは、Wntシグナル経路にあるB-カテニンに競合的に結合することによってB-カテニンを抑制的に調節し、細胞周期の停止と転写活動の阻害を行うことがわかっています。²²

B-カテニンとWntシグナル経路は胚の発生に重要な役割を持っている一方で、正しく調節されない場合には、がんの発生と進行に関与します。これらの研究から、酸素濃度とHIFレベルには、病態生理学的な様々な役割があると考えられます。

がんや他の疾患のメカニズムを理解するための多くの研究がなされる中、これらに関連する細胞が酸素濃度にどのように影響されるかを探ることは大変重要になっています。

メカニズムの解明が進めば、IVFから学んだ知識は毒性学や腫瘍生物学などの他の分野に応用することができます。酸素濃度の因子がどのように生物学的メカニズムに関与するのかを理解することは、さらなる研究の進展に大変重要なことです。

結論

特に体外受精研究、幹細胞研究、腫瘍生物学研究のような課題に酸素濃度の因子を組み入れる最近のトレンドの中で、研究者たちは既存のCO₂インキュベーターに酸素濃度コントロールをオプションで取り付けるようになってきています。

研究予算が限られていることを考えれば、従来のCO₂インキュベーターではなく、CO₂も酸素もコントロールもできるマルチガスインキュベーターを導入することが重要です。

マルチガスインキュベーターの設計技術は進歩しています。2波長赤外線式CO₂センサーとジルコニア式O₂センサーを装備し、ドアの開閉に応じて即座に器内濃度レベルをリカバリできるガス制御アルゴリズムを兼ね備えた製品が開発されています。²³

- ¹⁾ Mohyeldin, Ahmed, Tomás Garzón-Muvdi, and Alfredo Quiñones-Hinojosa. "Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche." *Cell Stem Cell* 7, no. 2 (2010): 150-61. doi:10.1016/j.stem.2010.07.007.
- ²⁾ Simon, M. Celeste, and Brian Keith. "The Role of Oxygen Availability in Embryonic Development and Stem Cell Function." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nat Rev Mol Cell Biol 9, no. 4 (2008): 285-96. doi:10.1038/nrm2354.
- ³⁾ Ibid.
- ⁴⁾ Mohyeldin, et al.
- ⁵⁾ Table 2. Graphic adapted from McKeown, S R, MA, PhD. "Defining Normoxia, Physoxia and Hypoxia in Tumours—implications for Treatment Response." *Br J Radiol*, 20130676th ser., 87, no. 1035 (March 2014). doi:10.1259/bjr.20130676.
- ⁶⁾ Simon, et al.
- ⁷⁾ Herzenberg, Leonore A., and Leonard A. Herzenberg. "Our NIH Years: A Confluence of Beginnings." *The Journal of Biological Chemistry* 288, no. 1 (January 4, 2013): 687-702. doi:10.1074/jbc.X112.426742.
- ⁸⁾ Brahimi-Horn, M. C., and J. Pouyssegur. "HIF at a Glance." *Journal of Cell Science* 122, no. 8 (2009): 1055-057. doi:10.1242/jcs.035022.
- ⁹⁾ Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo ROC, Houghton FD. "Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions." *Reproduction* (2010) 139: 85-97
- ¹⁰⁾ Brahimi-Horn, et al.
- ¹¹⁾ Ventura-Juncá, Patricio, Isabel Irrarrázaval, Augusto J. Rolle, Juan I. Gutiérrez, Ricardo D. Moreno, and Manuel J. Santos. "In Vitro Fertilization (IVF) in Mammals: Epigenetic and Developmental Alterations. Scientific and Bioethical Implications for IVF in Humans." *Biol Res Biological Research* 48, no. 1 (2015). doi:10.1186/s40659-015-0059-y.
- ¹²⁾ Atkuri, K. R., L. A. Herzenberg, A.-K. Niemi, T. Cowan, and L. A. Herzenberg. "Importance of Culturing Primary Lymphocytes at Physiological Oxygen Levels." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, no. 11 (January 05, 2007): 4547-552. doi:10.1073/pnas.06117 32104.
- ¹³⁾ Peng ZF, Shi SL, Jin HX, Yao GD, Wang EY, Yang HY, Song WY, and Sun YP. "Impact of Oxygen Concentrations on Fertilization, Cleavage, Implantation, and Pregnancy Rates of *in vitro* Generated Human Embryos." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6179-85, 8, no. 4 (2015). US National Library of Medicine National Institutes of Health.
- ¹⁴⁾ Simon et al.
- ¹⁵⁾ Ventura-Junca et. al.
- ¹⁶⁾ Table 3. Graphic adapted from McKeown, S R, MA, PhD. "Defining Normoxia, Physoxia and Hypoxia in Tumours—implications for Treatment Response." *Br J Radiol*, 20130676th ser., 87, no. 1035 (March 2014). doi:10.1259/bjr.20130676.
- ¹⁷⁾ Ames, B. N., M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen. "Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, no. 17 (1993): 7915-922. doi:10.1073/pnas.90.17.7915.
- ¹⁸⁾ Wang, Fangnian, Shoba Thirumangalathu, and Mary R. Loeken. "Establishment of New Mouse Embryonic Stem Cell Lines Is Improved by Physiological Glucose and Oxygen." *Cloning and Stem Cells* 8, no. 2 (2006): 108-16. doi:10.1089/clo.2006.8.108.
- ¹⁹⁾ Simon et al.
- ²⁰⁾ Ibid.
- ²¹⁾ Tiede, L. M., E. A. Cook, B. Morsey, and H. S. Fox. "Oxygen Matters: Tissue Culture Oxygen Levels Affect Mitochondrial Function and Structure as Well as Responses to HIV Viroproteins." *Cell Death Dis* Cell Death and Disease 2, no. 12 (2011). doi:10.1038/cddis.2011.128.
- ²³⁾ Simon et al.
- ²⁴⁾ Restelli, L., C. Guarneri, A. Paffoni, A. Mangiarini, G. Ragni, and E. Somigliana. "Can We Use Incubators with Atmospheric Oxygen Tension in the First Phase of *in Vitro* Fertilization? A Retrospective Analysis." *Fertility and Sterility* 100, no. 3 (2013). doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.282.

White Paper Note Citation:
Radosevich, Carl. Benefits of Oxygen Control in the Cell Culture Incubator. Wood Dale, IL: PHC Corporation of North America, 2016.

お問い合わせは:

PHCbi

PHC株式会社 バイオメディカ事業部
<https://www.phcd.com/jp/biomedical/>

©2020 PHC 株式会社 無断転載禁止
製品の定格およびデザインは改善の為予告なく変更する場合があります。実際の製品には、ご使用の注意を表示しているものがあります。