

マルチガスインキュベーター内で 酸素濃度コントロールが大切な理由



WHITE
PAPER

本稿では、*in vivo* で酸素濃度が果たす重要な役割をお伝えし、
酸素濃度を*in vitro* 培養細胞の恒常性維持に役立てる方法も探っていきます。

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

哺乳類の細胞培養と 医薬・疾患コントロールの未来

哺乳類の細胞培養は、細胞と生体組織を直接研究するために
とても有用な手段です。近年盛んになっている再生医療で
は、細胞培養が患者の治療に直結しています。また、細胞培
養は*in vitro*の疾患モデルとしても広く活用されています。

細胞培養の技術が進化するにつれて、*in vivo* 条件を*in vitro* 環
境下で正確に再現することがとても重要になってきていま
す。とくに、幹細胞・バイオ医薬品・胚細胞を扱う研究でこ
の傾向が強くなっています。

細胞を元々由来する*in vivo* 環境とは大きく異なる環境で培養
すると、誤ったデータが出てしまったり、実験での再現性が
無くなったり、実験や薬剤開発プロセスで望ましくない方向
に向かってしまうおそれもあります。



表1 - 大気中から血中までの酸素濃度

酸素	説明
21.0%	通常の大気圧下での、大気中の酸素濃度。
19.9%	5% CO ₂ 条件で動作しているマルチガス（細胞培養）インキュベーター内の酸素濃度。
13.5%	肺泡内吸気の酸素分圧 (pO ₂) における酸素濃度。 酸素濃度は空気や水蒸気の流入・流出によって規定される。
9.5%	動脈血の酸素濃度。
6.5%	静脈末端や循環血中の、おおよそその酸素分圧 (pO ₂) での酸素濃度。

生理的酸素濃度とは？ 生体内の酸素レベルを理解する

大気中の酸素濃度を表すとき、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）ですが、ほとんどの生体組織ではそこま
で高い濃度にはなりません。¹

- 肺の中の酸素濃度は約14.5%です。さらに、末梢組織の
酸素濃度は3.4～6.8%まで低下します。したがって、生
理的酸素濃度の2～10%という値は大気中の酸素濃度に
比べれば「低酸素状態」の値、ということになります。
- 脳・肝臓・脾臓など、体の多くの臓器の酸素濃度は2～
10%の間にあります。胸腺や腎臓などの一部の組織で
は酸素濃度が1%以下になっています。²
- 生体組織内には酸素の濃度勾配がありますが、がん組織の
ような病理組織では、低いところでは1%以下になってい
ます。
- 低酸素濃度は、正常な病理学的、生理学的なプロセスで一
種のシグナルとなり、細胞分裂や増殖・創傷治癒・胎児の
発達など、重要かつ多様なプロセスを制御しています。加
えて、酸素濃度は初期胚の発生や幹細胞ニッチなどでも、
重要な現象を決定づける作用があります。³



細胞培養では恒常性（ホメオスタシス）が大切

細胞培養で*in vivo*環境を模してうまく維持するために、細胞の恒常性（ホメオスタシス）を守ることが大切です。細胞プロセスの複雑なネットワークによって、細胞は、温度・pH・栄養因子・イオン種などの繊細なバランスを取っています。⁴

初期の細胞培養では、恒常性の維持に役立つ特定の環境要素に晒すことで、哺乳類細胞を*in vitro*でうまく培養できていました。現在、哺乳類細胞を培養する際は5～7%のCO₂濃度が維持され、栄養因子・pH緩衝液・成長因子も厳密に調整されるなど、培養環境のコントロールが行われています。

こうした要素を用いることで、細胞培養の技術は飛躍的に向上し、細胞を良い状態で培養できるようになっています。ただ、それぞれの種類の細胞ごとに適切な酸素濃度がありますが、こうした点は見過ごされがちです。

表2 - ヒト腫瘍の種類による酸素濃度の特徴⁵

腫瘍の種類	正常組織の酸素濃度	腫瘍組織の酸素濃度
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%

大気中の空気は、酸素21%、窒素78%、微量気体1%という比率になっています。肺に吸入された酸素分子はヘモグロビンを介して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。少しは低くなりますが低酸素濃度というには程遠く、再現性や持続性のある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*の酸素濃度はさまざまな細胞活動の調節に重要な役割を果たしています。⁶ ある生体組織では、細胞分裂・細胞増殖・創傷治療といった特定の生体機能に酸素濃度がとても重要な役割を果たします。

これまで哺乳類細胞の*in vitro*細胞培養では、大気中のレベルに近い20%程度の酸素濃度が適用されてきました。しかし、生体組織由来の多くの哺乳類細胞は、もともと大気中よりかなり低い2～11%の酸素濃度域から採取されています。⁷

疾患モデルと生理学的メカニズムの研究では、*in vitro*細胞培養がきわめて頻繁に行われますが、最近の研究によると、大気中の酸素濃度に近い濃度で哺乳類細胞を培養すると、細胞に様々な害があることがわかってきています。

研究によれば、酸素濃度が高いほど染色体が損傷する頻度も多くなり、「ストレス応答遺伝子」の発現が増加し、酸化による損傷が進んで細胞が全般的に脆弱になってしまうことが報告されています。培養細胞がホスティングに利用されるのか、細胞由来の生成物の発現に用いられるのかにかかわらず、細胞を適切ではない酸素濃度下にさらすことは下流の結果に多大な影響を及ぼします。

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

大気中の酸素濃度以下の環境では、低酸素濃度そのものが細胞シグナル伝達における機能を持っています。低酸素濃度で誘導される最も重要な細胞因子は、低酸素誘導因子（HIF）と呼ばれています。

HIFはDNA結合タンパク質のクラスを形成し、生理的酸素濃度下で活性化されます。HIFは細胞全体の恒常性を維持し、血管形成・解糖系・赤血球生成といった重要な経路を維持するための、さまざまな遺伝子の転写を制御しています。

HIFによって制御される遺伝子は、細胞の生存率を改善し、胎児発生や虚血の際に発生する生理的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

またHIFは、細胞のグルコース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ことにより、正常な細胞分裂や細胞増殖を促進する機能も持っています。血管内皮細胞増殖因子（VEGF-A）と呼ばれる遺伝子は、血管新生（血管の形成）の細胞プロセスに重要な役割を持ち、HIFの存在下では発現が促進されます。

血管が形成されると低酸素の組織に酸素が送られるようになります。また、胎児発生の際には低酸素状態の微小環境がしばしば見られますが、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）はここで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組織で低酸素状態を作り出すような、病態生理学的な状態や疾患の状態でも重要な役割を持っています。腫瘍が成長する時、細胞分裂が急速に起こると低酸素状態が作り出されてHIFが活性化されます。これにより、細胞が生存するためのプロセスが開始され、細胞の恒常性を維持してがんが成長する方向へと進展していきます。¹⁰

生理的酸素濃度は細胞培養プロセスをコントロールする際に重要であるため、大気中の酸素濃度にしておくと予想外の副次的な問題が起きることがあります。例えば高い酸素濃度下で活性酸素種（ROS）が発生する、といったことが挙げられます。

ROSによってDNAが損傷し、タンパク質合成のプロセスやタンパク質の機能が変化し、細胞膜が不安定になるなど細胞プロセスに影響が及ぶのです。¹¹ 大気中の酸素濃度で培養される細胞では、*in vivo*の生理的酸素濃度下とは異なるストレス応答遺伝子の発現が起っています。

そのため、このような細胞を下流の細胞培養実験で用いると予測できない結果が生じることがあります。一方、生理的酸素濃度下で細胞培養を行うことで、代謝や恒常性が*in vivo*環境とかなり近くなり、HIFのような重要な因子が活性化され、細胞の適応と生存性が向上するのです。

HIF存在下では細胞の生育は速くなり、生存期間は伸び、健全な細胞を維持でき、生理学的にも正常な遺伝子発現が行われるようになります。¹²

大気中の酸素濃度下では、HIFの発現はとても少ないか検知できないレベルになり、過剰な酸素によって酸化損傷やストレスタンパク質の過剰発現など有害な現象が引き起こされてしまいます。

体外受精

大気中より低い酸素濃度下での細胞培養の需要は増しており、生理的酸素濃度（～5%）と低酸素濃度域（～2.5%）がこれから注目されると思われます。

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

生理的酸素濃度下では、胚形成に重要な役割を担う因子の発現が刺激されます。胚発生と受精卵の着床には厳密な環境条件が必要です。IVFの研究においては、*in vitro*胚培養の環境条件の最適化が求められています。

多くの研究結果から、高酸素濃度下で胚培養を行うと発生の際に様々な問題が生じ、低酸素濃度下（～5%）で培養を行うと良好な結果が得られることがわかっています。

さらなる研究では、生理的酸素濃度（～5%）のほうが20%酸素（大気中の酸素濃度）条件よりも胚の質が高く、着床や妊娠がはる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は胚発生を成功させるために重要な因子の一つです。胚形成と器官形成の際には多くの低酸素濃度の微小環境が形成されますが、HIFはこうした状況に適応するために発現します。

ある研究では、大気中の酸素濃度下で培養した場合と同じような形質を持つHIF欠損胚では、血管形成不全や神経ひだの閉鎖などが観察されています。¹⁴ こうしたことは、HIFが血管形成や細胞増殖に重要な役割を果たしていることを示しています。

別の研究では、適正な胎盤構造の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、通常*in vivo*で胚を取り囲んでいる低酸素環境が、*in vitro*での心血管や肺形成でも重要な因子であることが示唆されます。

IVF研究などにおいては、*in vivo*の胚形成環境を正確に再現しなければなりません。活性酸素種（ROS）は、生理的酸素濃度で胚形成を行うと値が減少する変数の一つです。

ROSが、DNA・タンパク質・その他生体分子におよぼす有害な影響が、胚発生と受精卵の着床や受精の際に問題になることが認識されつつあります。¹⁵

このように、胚の生育を生理的酸素濃度下で行うことは、*in vivo*での細胞の恒常性を正確に再現するためだけでなく、遺伝子プロファイルの完全性を保つためにも有益です。こうした有益性は研究結果にも大きく影響し、着床や受精を成功させるためにも非常に重要なこととなります。

生理的酸素濃度が大きな役割を果たす他の分野

生理的酸素濃度下のIVFで胚の培養に成功したことから、他の研究分野でも、酸素濃度レベルを変えることによって細胞の健全性や成長が改善されることが示唆されます。

細胞分化と増殖を規定する環境原理は、幹細胞や腫瘍生物学など、他の研究分野にも応用できます。

酸素濃度は、いくつかの代謝経路や細胞経路で重要な要素となります。したがって、研究対象の核心に迫る信頼性の高い結果を得るためには、哺乳類細胞を培養する際に生理的な条件に合わせた酸素濃度下で培養を行うことを検討する必要があります。

低酸素濃度下での研究で大きな進展を見せている主な分野として、幹細胞研究と腫瘍研究の2つの分野が挙げられます。

表3 - 酸素濃度に関する用語と基準値¹⁶

酸素の存在する場など	酸素分圧 (pO ₂)	酸素濃度	科学用語	一般的な用語
大気中	160 mm/Hg	21%	大気中の酸素濃度	酸素正常状態 (Normoxia)
<i>in vivo</i> 酸素分圧 (pO ₂)				
肺内部	150 mm/Hg	2% ~ 10%	病態生理学的な酸素濃度	低酸素状態 (Hypoxia)
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%	生理的酸素濃度	

幹細胞

幹細胞の研究分野では、生理的酸素濃度の理解がとて重要になってきています。研究によれば、大気中の酸素濃度下で長期間にわたって幹細胞を培養すると、染色体異常やゲノム異常、エピゲノム異常が生じることがわかってきました。¹⁷

こうした遺伝子変異は腫瘍形成につながり、また下流の研究結果にも大きく影響する可能性があります。多くの種類の幹細胞や前駆細胞は、生理的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てしまいます。

この仮説を裏付けるために、生理的酸素濃度下で幹細胞を培養したところ、成体幹細胞と胚性幹細胞 (ES細胞) のゲノムの安定性が向上し、幹細胞性が維持されやすくなることが示されました。¹⁸

生理的酸素濃度は、幹細胞の増殖速度や分化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、大気中の酸素濃度20%と比較して増殖速度が上昇し、コロニー形成能も向上することが観察されています。¹⁹

さらに、大気中の酸素濃度下のES細胞と比較すると、低酸素濃度下のES細胞では分化能が著しく低下し、生育は大幅に促進されました。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好ましい条件なのです。

それとは対照的に、ラット末梢神経系と中枢神経系の幹細胞を生理的酸素濃度下で培養すると、ニューロンへの分化が促進されました。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、それぞれの生体組織ごとに複雑なメカニズムがあるようです。このデータからも、幹細胞研究における酸素濃度の役割について、まだまだ研究の余地が残されていることがわかります。

酸素濃度は幹細胞の分化を調節し、ゲノムの完全性の保持に関わりますが、その機構はまだ完全には解明されていません。そのような中で、HIFを介した酸素濃度の影響について研究が行われています。その結果、HIFは幹細胞と前駆細胞の分化に影響することが示されました。ある研究から、HIFが欠損したマウスでは、胎盤の発生の際に栄養膜幹細胞 (トロフォブラスト幹細胞) の分化が変化することがわかっています。²⁰

HIFを欠損すると、大気中の酸素濃度下と同じような表現型となり、幹細胞は本来とは異なる細胞タイプに分化します。例えば、海綿状栄養膜細胞に分化する代わりに栄養膜巨細胞に分化する、といったことが起こります。この研究から、大気中の酸素濃度より低い生理的酸素濃度 (この組織では3%) がHIFを活性化させ、その結果、胎盤細胞を特定の形質へ分化させるということが示唆されます。

がんと生理的酸素濃度

酸素濃度は病態生理学的研究で重要な役割を担っています。ウイルスやがん、その他のさまざまな疾患状態では、生体組織内に低酸素濃度の微小環境ができることが多いのですが、HIFはそうした環境で複雑な相互作用の引き金となっているのです。

HIVに感染した際の神経毒性発症メカニズムに関する研究では、生理的酸素濃度下で培養した細胞ではHIV由来の神経毒による細胞死を起しましたが、大気中の酸素濃度下で培養した細胞は細胞死を起しませんでした。²¹ このことから、HIVが細胞死を起こすメカニズムは酸素濃度と強い関連性を持っていることが示唆されます。

別の研究では、低酸素状態で活性化したHIFがWntシグナル伝達経路のB-カテニンに競合的に結合することによって、B-カテニンを下方制御し、細胞周期を停止して転写活性を阻害する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ますが、正しく調節されない場合にはがんの発生と進行にも関与します。これらの研究は、酸素濃度とHIFレベルがさまざまな病態生理学的プロセスで役割を果たすことを示唆しています。

がんや他の疾患のメカニズムを理解するためにますます多くの研究が行われる中で、酸素濃度がこうした細胞に及ぼす影響についてもさらに研究を進めていくことがとても重要です。

最適な結果を得るために、IVFから得た知識を毒物学や腫瘍生物学など他の分野に応用することも可能です。酸素濃度という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のためにとても重要なことです。

結論

特に体外受精・幹細胞・腫瘍生物学といった研究分野で、酸素濃度の要素を研究に組み入れることが最近の趨勢となっており、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。新機種では2波長赤外線式CO₂センサーとジルコニア式O₂センサーを装備して、ドアの開閉に応じて即座に器内濃度レベルをリカバリーできるガス制御アルゴリズムを兼ね備えた製品もリリースされています。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 Irrázaval, 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.
- ²²⁾ 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.

このWhite Paperは以下の原文を翻訳したものです。
Radosevich, Carl. "Benefits of Oxygen Control in the Cell Culture Incubator." 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に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。