

平成 21 年 4 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19760554  
 研究課題名 (和文) 微小中空カプセルを用いた ES 細胞からの均一胚様体大量調製法の確立

研究課題名 (英文) Development of the novel process for obtaining large amount of embryonic bodies from embryonic stem cells using small microcapsules with hollow core

研究代表者  
 境 慎司 (SAKAI SHINJI)  
 九州大学・大学院工学研究院・助教  
 研究者番号：20359938

## 研究成果の概要：

ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生医療の実現には、特定の臓器や組織の細胞に分化させる技術の他に、それらの細胞を大量に作り出す技術を開発することが必要である。本研究においては、そのための技術として、分化誘導を行う前段階の胚様体と呼ばれる球状の組織体を大量に調製するための培養容器の開発を行った。その結果、我々の身近に存在する海藻や植物からの抽出物を利用して直径約 0.1mm の胚様体を大量に調製する容器を開発することに成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2200000	0	2200000
2008年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	330000	3630000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能バイオプロセス

キーワード：マイクロカプセル, ES 細胞, 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

「再生医療」の実現は、多くの疾病の根本的な治療法になりえることから日本も含めて世界中で多くの検討が行われている。なかでも、全ての細胞系譜に分化できるとされる胚性幹細胞 (ES 細胞) の分化制御に関する研究が特に精力的に進められている。この ES 細胞からの分化誘導においては、胚葉体と呼ばれる ES 細胞の凝集塊を形成させるステップを経るのが最も一般的であり、細胞培養ディッシュの蓋に ES 細胞懸濁液滴を付着させ培養するハンギングドロップ法や、非細胞接着性の基材を用いた浮遊培養法がその

作製に広く用いられている。しかし、前者では得られる胚様体の状態が実験者の手技に大きく依存すること、後者では胚様体サイズの不均一性が問題となっている。これらの問題点は、分化制御に関する結果の再現性に大きな影響を及ぼす。さらに、大量の胚様体の調製が困難であることも共通する問題点である。以上のようなことから、サイズの均一性の高い胚様体を大量に調製可能な手法の確立は、再生医療の実現のために不可欠な事象であると考えられた。

このような課題に対して、研究代表者は、それまでに全く異なる用途での使用を目指

して検討を行っていた細胞包括カプセルを利用することを着想した。

## 2. 研究の目的

2年間の研究期間内に、細胞包括カプセルを利用して大量に胚様体を得るための基礎的な培養条件を確定すると共に、再生医療に関わる検討に使用可能であるために必要な分化能の保持を明らかにすることを目的とした。具体的には以下を目的とした。

### (1) カプセル構造の最適化

申請者がこれまでに確立していた直径100マイクロメートル程度の細胞包括ゲルビーズの作製に関する手法をもとに、これまでに代わる材料を開発し利用することで、より動物細胞の包括に適したカプセル調製方法を確立することを目的とした。

### (2) ES細胞のカプセル化

ES細胞からの胚様体形成においては、細胞接触面の細胞接着性などが胚様体形成までの期間および得られる胚様体の性質に影響を与えることが報告されている。したがって、カプセル最外層構成材料の物性が胚様体の形成過程およびその性質に与える影響を明らかにすることを目的とした。

### (3) 胚様体を回収可能なカプセルの開発

ES細胞から胚様体を作製した後は、カプセル内から組織体を回収する必要がある。そこで、細胞に穏和な条件下で組織体を回収することのできる新たなカプセルの開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) カプセル構造の最適化に関する検討

本研究開始前までに使用していた細胞包括材料はペルオキシダーゼの酵素反応で架橋するアルギン酸であった。しかしアルギン酸は、しばしばその製造過程で取り除くことの難しい細胞に傷害をあたえる成分の残留が問題となっている。そこで、アルギン酸に代わる材料として高純度のものを安価に入手可能であるカルボキシメチルセルロース

(CMC)を利用することが可能であるかどうかの検討を行った。カプセル作製に利用したCMC誘導体は、CMCに水溶性カルボジミドを用いてチラミンを結合させることによって作製した。この新たに開発した誘導体の水溶液に動物細胞を分散し、酵素ペルオキシダーゼを溶解させた後に、過酸化水素を溶解させ、層流状態で流動させた流動パラフィン流中に押し出した。この操作によって流動パラフィンから供給される過酸化水素を利用した直径約100マイクロメートル程度のゲルビーズの作製を行った。

ゲルビーズの作製後に、セルラーゼを用いて分解を試み、分解に要する時間とその後の生存活性を行った。

### (2) ES細胞のカプセル化に関する検討

マウスES細胞のカプセル化にはペルオキシダーゼの酵素反応でゲル化するアルギン酸誘導体を使用した。具体的には、培養皿から剥離したマウスES細胞をアルギン酸誘導体の水溶液に分散させた後、ペルオキシダーゼを溶解させ、上述と同じ方法で直径約100マイクロメートルのES細胞包括アルギン酸ゲルビーズを作製した。このゲルビーズを40度に保ったアガロース水溶液に分散させた後、過酸化水素を含まない層流で流動させた流動パラフィン流中に押し出し、得られたエマルジョンを冷却した。次いで、アルギン酸分解酵素であるアルギン酸リアーゼを含有する培地に浸すことによってアルギン酸ゲルビーズを分解し、球状の中空構造を得た。その後、培養を行い増殖性と、ES細胞の未分化性に関して評価を行った。

### (3) 胚様体を回収可能なカプセルの開発に関する検討

(2)の検討ではアガロースをカプセル膜として利用したが、アガロースゲルを細胞に穏和な環境で分解することは不可能であった。これを受けて、次いでいずれもペルオキシダーゼの酵素反応でゲル化可能なアルギン酸誘導体とCMC誘導体を利用して中空カプセルを作製した。具体的には、まずCMC誘導体のゲルビーズに細胞を包括した後に、アルギン酸ゲル皮膜を酵素反応によって形成させ、セルラーゼで内部のCMC誘導体ゲルを分解し、中空構造を作製した。適当な培養期間の後に、内部で細胞塊が形成されたカプセルを、アルギン酸リアーゼを含む培地に浸してカプセル壁の分解を行った。これにより回収された組織体を新しい細胞培養ディッシュに移し、各操作の際に最も影響を受けやすいと考えられる組織体最外層の細胞の接着挙動を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) カプセル構造の最適化に関する検討

CMC誘導体の利用可能性を探るために、まず直径100マイクロメートル程度のゲルビーズを作製可能であるかどうかを調べた。その結果、図1に示されるように、流動パラフィンの流速をコントロールすることによって粒子径の制御が可能であることが明らかとなり、目標とするサイズのゲル粒子も得ることができた。次いで、ネコ腎由来の繊維芽細胞の包括を行い、図2に示される細胞包括ゲルビーズを得ることができた。また、この細胞の生存活性推移を測定した結果、培養日数の経過と共に増加したことから(図3)、この材料は細胞死を招くことはないことが明らかとなった。さらに、このゲルビーズを

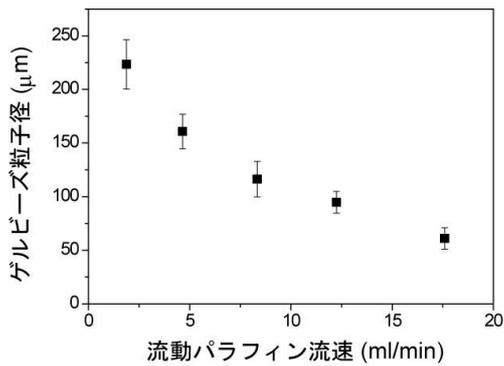


図 1.ゲルビーズ粒子径と流動パラフィン流速の相関.

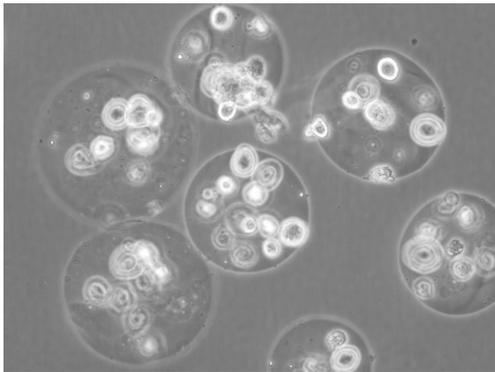


図 2. CMC 誘導体から作製した直径約 100 マイクロメートルの細胞包括ゲル.

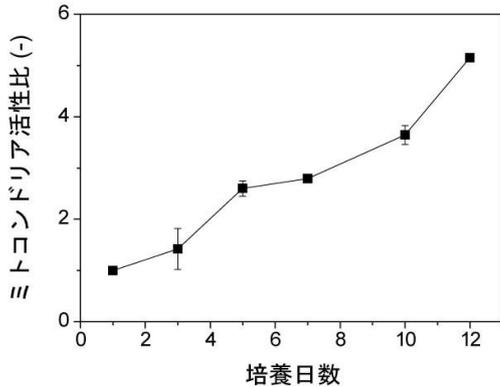


図 3. ゲルビーズ包括細胞のミトコンドリア活性推移.

セルロース分解酵素であるセルラーゼ含有培地に浸したところ、ゲルの分解が可能であり、それによって放出された細胞の生存率は 85%以上であったことから、この分解プロセスも細胞に悪影響を与えないことが示された。

30 年以上にわたり研究が続けられている動物細胞包カプセルの分野において、生体適合性の高いセルロースのみから構成されるカプセルはこれまで報告が無く、本研究で開発を行った胚様体調製用のカプセル材料以外のカプセル化用途においても有望な材料

を開発できたと言える。また、アルギン酸よりも安全性の高い材料の開発に成功した。

## (2) ES 細胞のカプセル化に関する検討

マウス ES 細胞をアルギン酸ゲルビーズに包括した後に、アガロースゲル皮膜を付与し、その後アルギン酸リアーゼを用いてアルギン酸ゲルの分解を行った。その結果、図 4 に示されるように、包括直後にはバラバラに分散していた ES 細胞が、カプセル作製 12 時間後には凝集して数個の細胞塊を形成した。さらに培養を続けると、組織体の大きさはカプセル中空を埋め尽くすまでに成長した。こうして得られた細胞塊に対してアルカリフォ

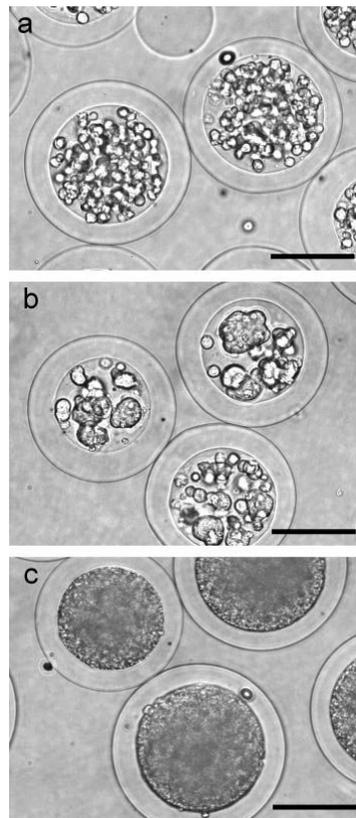


図 4. (a)ES 細胞包括直後、(b)12 時間後、(c)3 日後の顕微鏡写真.

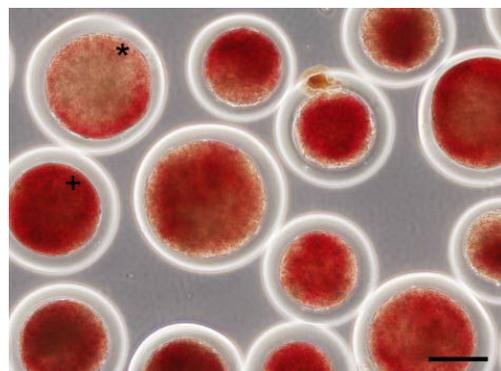


図 5. ES 細胞の ALP 染色写真. Bar:100 マイクロメートル.

スファターゼ染色を行った結果、強く赤く染まる部分が確認され、カプセル内で形成した細胞塊にも、既存の方法と同じように未分化な部分が存在することが明らかとなった。また、さらに培養期間を延長しても細胞が漏洩することなく、これまでの実験系では不可能であった細胞塊のサイズの増大を伴うことなく長期間胚様体を培養できる培養器となることが明らかとなった。この成果に関しては、非常にインパクトのある結果として、著名な学術誌である *Biotechnology and Bioengineering* 誌の表紙に掲載されると共に、掲載号の論文の中でインパクトを与えるであろう論文の一つとして紹介された。また、2009年2月17日には化学工業日報の一面においても紹介された。

### (3) 胚様体を回収可能なカプセルの開発に関する検討

上述のアガロースカプセルの欠点であるカプセル壁を細胞に穏和な条件下で分解できない欠点を解決するために、研究成果(1)、(2)で記載した CMC 誘導体とアルギン酸誘導体から中空カプセルを作製した。まず CMC 誘導体ゲルビーズに包括後、アルギン

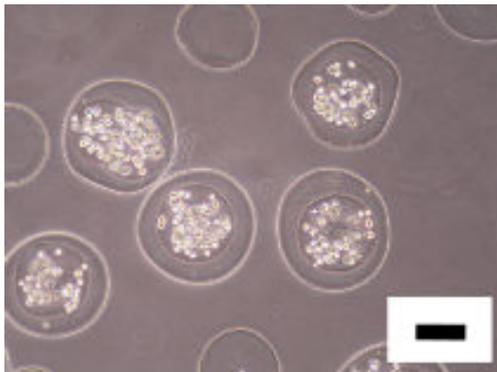


図6. CMC誘導体ゲルビーズを分解して作製したアルギン酸誘導体カプセル。

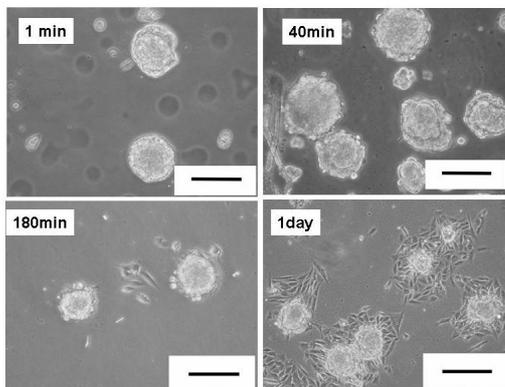


図7. アルギン酸皮膜を分解後の細胞塊形態変化. Bars: 100 マイクロメートル。

酸皮膜の形成を行い、その後にアルギン酸皮膜の分解を行ったところ(図6)、細胞の生存率は約85%と非常に高く、このカプセルが細胞の生存をほとんど損なうことなく作製可能であることが明らかとなった。次いで、2週間の培養を行ったところ、アガロースゲルを皮膜とした場合と同様に、カプセル内で細胞は球状の組織体を形成した。

カプセル壁の分解の影響を調べるためにアルギン酸分解酵素を含む培地に浸したところ、1分後にはアルギン酸カプセル皮膜は消失し、カプセル内部から球状の組織体を回収することができた。このように短時間で組織体を回収できることは予想外であったが、短時間で作業が終わることは実用化を考えた場合に非常に重要なポイントとなると考えられる。さらに、回収された組織体を別の培養ディッシュに移して培養したところ、40分後には接着し、180分後には細胞の伸展が確認され、1日後には明らかな増殖が確認された。このことは、カプセルの分解プロセスが組織体の表面近傍の細胞にも極めて穏和に進行したことを示している。

これまで世界中で検討が行われてきた細胞包括カプセルの歴史において、カプセル内部から細胞や組織を取り出して使用するための容器としてカプセルを開発・利用した報告はなく、この成果は世界で初めてのものであり、同分野に大きなインパクトを与えると考えられる。

今後は、このカプセルを利用してすい臓や心臓の細胞への分化を試みる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Shinji Sakai, Syo Ito, Yuko Ogushi, Ichiro Hashimoto, Koei Kawakami, Feasibility of carboxymethylcellulose with phenol moieties as a material for mammalian cell-enclosing subsieve-size capsules, *Cellulose*, 査読あり, vol.15, p.723-729 (2008)
- ② Shinji Sakai, Ichiro Hashimoto, Koei Kawakami, Agarose-gelatin conjugate membrane enhances proliferation of adherent cells enclosed in hollow-core microcapsules, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 査読有り, vol.19, p.937-944 (2008).
- ③ Shinji Sakai, Ichiro Hashimoto, Koei Kawakami, Production of cell-enclosing hollow-core agarose microcapsules via jetting in water-immiscible liquid paraffin and formation of embryoid body-like

spherical tissues from mouse ES cells enclosed within these microcapsules, *Biotechnology and Bioengineering*, 査読有り, vol.99, p.235-243 (2008).

- ④ Shinji Sakai, Ichiro Hashimoto, Yuko Ogushi, Koei Kawakami, Peroxidase-catalyzed cell-encapsulation in subsieve-size capsules of alginate with phenol moieties in water-immiscible fluid dissolving H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Biomacromolecules*, 査読有り, vol.8, p.2622-2626(2007).

〔学会発表〕(計3件)

- ① Shinji Sakai, Syo Ito, Koei Kawakami, Fabrication of cell-enclosing capsules with hollow-core via enzymatic functions, XVI International Conference on Bioencapsulation, 2008年9月5日, ダブリン(アイルランド)

〔その他〕

- ① 化学工業日報 2009年2月17日, 一面記事「ES細胞から胚様体-多糖質カプセル用い大量培養-」として研究成果が紹介された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

境 慎司 (SAKAI SHINJI)  
九州大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号：20359938