

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04173

研究課題名(和文) 移動速度論の観点によるヒトiPS細胞増殖、分化機構の解明と実用的生産技術への提言

研究課題名(英文) Elucidation of the proliferation and differentiation mechanism of the human induced pluripotent stem cells and its proposal to practical production from view point of transport phenomena

研究代表者

岡野 泰則 (Yasunori, Okano)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：90204007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹細胞(iPS細胞)を大量生産する方法として従来の静置培養に代わり、攪拌操作を用いた懸濁培養を用いる試みがなされている。しかし、一般に多能性幹細胞はせん断応力により分化し、底面中央部に細胞塊が集積することで不均一な大きさとなる問題点が報告されている。これらを回避する攪拌方法を実験のみで検討することは多くの試行錯誤を伴うため、数値シミュレーションを併用し現象を統一的に理解することが効率的である。そこで本研究では、懸濁培養時のiPS細胞塊挙動を予測する数値解析手法を開発し、細胞塊が受けるせん断応力と槽内の粒子分布を求め、最適な攪拌方法を検討した。

研究成果の概要(英文)：In suspension culture of iPS cells, the shear stress generated during the mixing is expected to promote differentiation of induced pluripotent stem (iPS) cells. This stress on the cell can be controlled by the impeller shape and rotational rate of the cell suspension. However, it is difficult to measure the effect of these operative parameters on the shear stress by experiments. Therefore, we have developed a numerical model to obtain the average and the maximum shear stress in two kinds of stirred tanks and an orbital shaking cylindrical container. Our results showed that the shear stress depended strongly on the type of mixing and lesser extent on the shape of the impeller. The average shear stress is larger in the shaking mode than that in the stirring mode. In contrast, the maximum shear stress is much smaller for the shaking than for stirring, suggesting stirring and shaking should be selectively used depending on the application.

研究分野：化学工学

キーワード：移動速度論 数値解析 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS (人工多機能性幹) 細胞を利用した再生医療は次世代医療として注目されている。しかし、移植医療を実施する場合には  $10^8$  を超える細胞数が要求されているにも関わらず、現在の細胞培養は厳密に制限された実験室内での熟練されたオペレーターによる複雑な作業に依存しているのが現状である。加えて臨床を対象とした細胞培養は、患者が発生した後にスペックと必要な量、スケジュールが確定される、いわゆる急を要するロット差の大きいテイラーメイド生産である点に特徴がある。従って、本技術を実用化レベルに押し上げるためには、培養細胞の安定生産を実現しうるプロセス開発や製品の品質評価といった工学的な技術の構築が必須である。

実際の細胞培養プロセスは培地内物質濃度が不均一であり、しかもその状況は時間とともに変化する。そのため同一の培地(シャーレ)内においても、場所によって異なった機能(ガン化など)が発現することは良く知られている。このような非定常かつ不均一な製造技術の実用化には数値解析が有効であることを申請者は一連の半導体結晶製造に関する研究を通じ多くの経験をしてきた。しかしながら現在の細胞培養は、シャーレ内を1つのブラックボックスとして取り扱う極めて定性的な研究手法が主流であるため、定量性はおろか実験の再現性についても疑問が付きまとうのが現状である。加えて、細胞あるいは細胞集団を1つの反応器として捉え、細胞周囲の環境は濃度分布の存在などにより不均一であるにも関わらず、培地内不均一に伴う細胞機能の不均一性を表現しうる速度論モデルは存在していない。そればかりか、細胞の増殖、分化、細胞死はサイトカインと呼ばれるタンパク質を介して発生するにも関わらず、サイトカインの放出速度、培地内濃度分布、拡散係数などに関する定量的な知見すらないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究はこれまで多分に熟練者の経験に基づき行われてきたヒト iPS 細胞培養技術をコンピューターシミュレーションに基づく移動現象論の観点から取り組むことにより、細胞あるいは細胞集団単位での機能発現、分化を時空間的に予想、制御しうる技術を構築し、標準細胞の最適かつ高速、大量培養法の実現に寄与することを目的とする。そのために、(1) 拡散係数、最大反応(増殖、分化)速度といった基礎物性の算出、(2) 細胞の増殖、機能発現(多分化性など)を支配する流動、拡散などの移動現象論的因子の特定、以上を用いて、(3) 細胞外環境の影響を厳密に考慮しうる細胞機能発現、分化予測シミュレーターの開発を行い、実用的生産技術への提言を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、(1) 実験結果に裏付けされた高精度な細胞培養数値シミュレーターの開発、(2) それを用いた細胞増殖、分化発生に及ぼす培養環境内不均一性の影響の解明、(3) 大量生産を目的とした浮遊培養の最適化、を行った。そのためにこれまで未知であった拡散係数などの物性値を細胞チップを用いた実験結果から逆算をし、分化挙動に及ぼす細胞配置の影響を解明し、その結果を浮遊培養容器内粒子数の決定等に活用した。研究期間を通じ、数値計算と実験結果との比較検討を常に行うことにより、シミュレーターをブラッシュアップした。

### 4. 研究成果

(1) 振とう培養装置における最適化条件の探索

本研究では iPS 細胞集塊を直径 1 mm の粒子と近似し解析を行った。支配方程式は、流体に連続式と以下に示す Navier-Stokes 式を、粒子に Newton の運動方程式を用いた。 $U$  は回転する容器の速度ベクトルであり、以下に示す一方向回転モデル(One-direction rotation; ODR) と、正逆交互回転モデル(Periodic accelerated rotation; PAR) の円の座標を微分し代入した。

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho_f \mathbf{v}_f) + \nabla \cdot (\rho_f \mathbf{v}_f \mathbf{v}_f) \quad (1)$$

$$= -\nabla p + \nabla \cdot (\mu_f \nabla \mathbf{v}_f) + \rho_f \mathbf{g} - m_s \frac{dU}{dt} + \mathbf{F}_\sigma$$

$$U = [-R_s \omega \sin \omega t, -R_s \omega \cos \omega t, 0] \quad (2)$$

Figure 1 に 50、60、70 rpm における一方向攪拌、60 rpm の正逆交互攪拌時に粒子の受けるせん断応力の平均値の時間変化を示す。攪拌開始直後は動き始めの影響により流れが安定していないが、開始から 5 秒以降には周期性がみられる。60 rpm の正逆交互攪拌のせん断応力は大きく振動しているが、60 rpm の一方向攪拌と平均的に同じ値である。また、振動は 50 rpm と 70 rpm の一方向攪拌の値の間に収まっており、二つの攪拌方法でせん断応力に大きな違いはないと考えられる。次に攪拌槽内粒子分布を求めるため、各セル内に粒子が占める割合( $\alpha_c$ )を定義する。Figure 2 に PAR における  $Dr$  に対する底面接地率  $R_B$  の時間平均を示す。 $Dr$  の増大に伴い  $R_B$  の平均値は極小値をとる分布を示した。この極小値部分が最適な操作条件であるため、物性値や攪拌槽内径に応じ最適な回転半径を決定できると考えられる。Table 1 に ODR と PAR の 30 秒時の  $R_B$  を、Fig. 3 に中心軸を通る底面から液面までの断面における鉛直方向速度の時間平均を示す。槽内中心部の上向き速度は、流体が剛体回転する ODR より PAR で強く生成されており、これにより PAR の  $R_B$  が減少したと考えられる。

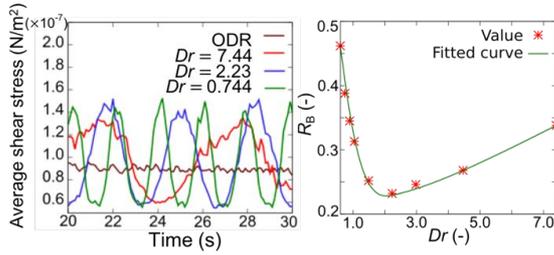


Figure 1. Time variation of average shear stress

Figure 2  $R_B$ - $Dr$  variation of the PAR model

Table 1

$R_B$  at 30 s

Model	$R_B$ (-)
ODR	0.663
PAR	0.274

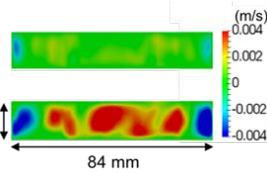


Figure 3 Mean vertical velocity in sectional view

### (2) 攪拌翼を用いた培養装置における最適化条件の探索

解析領域は直径 63 mm、高さ 36 mm の円筒攪拌槽であり、直径 17 mm、同一高さの攪拌軸に Fig. 4 に示した一段翼、二段翼の攪拌翼を取り付けた。攪拌速度は 60 rpm とし、攪拌  $Re$  数は約 400 である。容器は静置しているため、(2)式において  $l=0$  となる。

流体と粒子の速度差である slip velocity ( $V_{slip}$ )が増加すれば粒子に作用するせん断応力も増大するため、この値を用いてせん断応力を定性的に評価した。Figure 5 に一段翼、二段翼の攪拌及び振とう攪拌時の  $|V_{slip}|$  の平均値、最大値を示した。平均  $|V_{slip}|$  は二段翼より一段翼の方が大きい、 $|V_{slip}|$  の最大値は二段翼が多く時間で大きい。このことから平均的に大きな  $|V_{slip}|$  が作用する攪拌翼と、瞬間的に大きな  $|V_{slip}|$  が作用するものは異なることが分かった。また振とう攪拌は一段翼、二段翼の攪拌より平均、最大  $|V_{slip}|$  ともはるかに小さいことが分かった。両攪拌方法とも平均  $|V_{slip}|$  は攪拌開始直後に大きく振動し、時間の経過とともに安定している。粒子への大きなせん断応力の回避には、この攪拌開始時のせん断応力を抑制する必要があることが分かった。

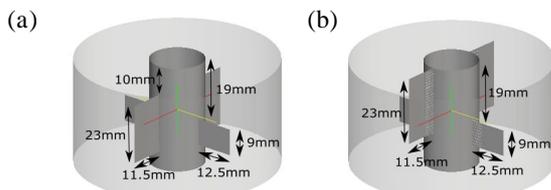


Figure 4 Numerical configurations of stirring model: (a) one level (b) two level

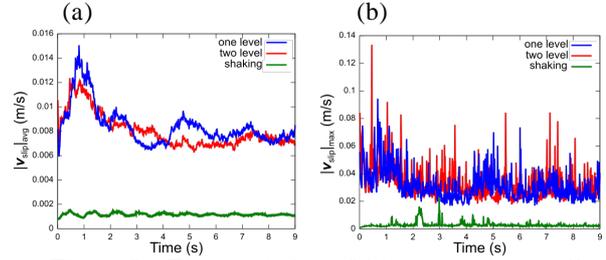


Figure 5 Time variation of (a) averaged over all particles and (b) maximum slip velocity.

### (3) 培養環境中の三次元物質移動を考慮した細胞培養シミュレーション

細胞挙動を (i) 二次元 Cellular automaton (CA) 法により、液性因子の濃度分布を (ii) 拡散方程式によりモデル化し、両者を連立して解いた。二次元および三次元の解析領域と初期細胞配置を Fig. 6 に示す。三次元の場合、領域底面にのみ細胞を配置し、二次元 CA 法を適用した。

#### (i) 二次元 CA 法 (細胞挙動モデル)

細胞挙動として増殖・遊走・分化・液性因子の分泌・消費を考慮した。液性因子は細胞集塊の中心部付近の未分化細胞から分泌され、全ての未分化細胞によって消費されると仮定した。また、細胞は液性因子濃度が閾値を超えた位置に存在する場合に分化すると仮定した。

#### (ii) 拡散方程式

細胞集塊内部では液性因子の以下の拡散方程式を解いた。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_e \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) + D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + \delta_1 S - \delta_2 k C$$

ここで  $C$  は濃度、 $S$  は分泌速度、 $k$  は消費反応速度定数であり、 $\delta_1, \delta_2$  はそれぞれ (i) の分泌、消費ルールに従い 0 か 1 に決定する。 $D_e, D$  はそれぞれ細胞集塊内部の有効拡散係数、培地中の拡散係数であり、 $D_e \leq D$  と仮定した。細胞集塊外では拡散方程式の  $D_e$  を  $D$  に置き換え、 $S = k = 0$  として解いた。一般的なタンパク質の分子量と培地の粘度に基づき、Stokes-Einstein 式より  $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  と推算し、 $S = 10^{-8} \text{ kg}/\text{m}^3\text{s}$ 、 $k = 0, 10^{-4}, 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、 $D_e = 10^{-10}, 10^{-12}, 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$  を組み合わせた 9 種類の条件について計算を行った。

未分化・分化細胞分布の時間変化の一例 (3D、 $k = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、 $D_e = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) を Fig. 7 に示す。細胞は円形の細胞集塊を形成し、細胞集塊中心部で分化が生じた。この結果は実験で観察される挙動と定性的に一致した。

分化細胞数の時間変化を Fig. 8 に示す。拡散方程式の各項のオーダーを評価すると、二次元では拡散項の影響が比較的大きく  $D_e$  に依存した分化挙動が得られた。一方で三次元では、 $k = 0, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  の場合は  $z$  方向への拡散が支配的になり、 $D_e$  に依らず類似した分化挙動が得られた。 $k = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  の場合は消費

項の影響が大きくなるため分化速度が低下し、実験と良好に一致した。以上より、本モデルにおいて拡散方程式を評価することで細胞挙動を予測できると考えられ、また、実験を再現できる  $k = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  が消費反応速度定数として妥当な値であると逆算された

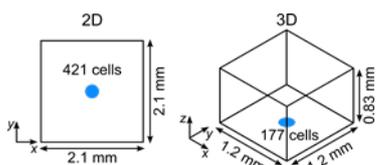


Figure 6 Numerical domain and initial colony position of 2D and 3D

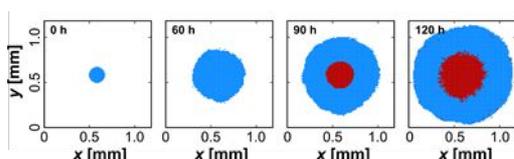


Figure 7 Time variation of the cell distribution: blue and red parts represent undifferentiated and differentiated cells, respectively

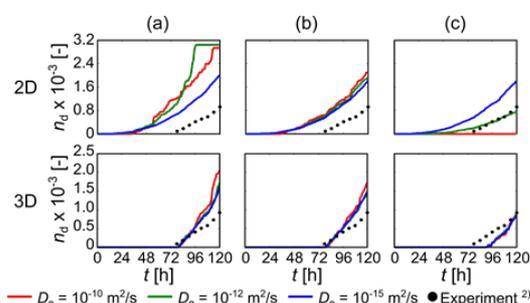


Figure 8 Time variation of the number of differentiated cells ( $n_d$ ):  
(a)  $k = 0 \text{ s}^{-1}$ , (b)  $k = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , (c)  $k = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$

## 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2件)

T. Yamamoto, M. Yano, Y. Okano and M. Kino-oka, "Numerical investigation for the movement of cell colonies in bioreactors: stirring and orbital shaking tanks" J. Chem. Eng, Japan, accepted.

M. Yano, T. Yamamoto, Y. Okano, T. Kanamori and M. Kino-oka, "Numerical study of fluid dynamics and particle behavior in an iPS cell culture tank," AJChE, 17, (2017), 29-36.

[学会発表](計11件)

M. Yano, T. Yamamoto, Y. Okano, and M. Kino-oka, "Numerical simulation of iPS cell behavior in a suspension culture using CFD-DEM", The 10th World Congress of Chemical Engineering (WCCE10) (2017).

矢野 雅貴, 山本 卓也, 岡野 泰則, 紀ノ岡 正博, iPS 細胞に関する懸濁培養最適化のための混合装置内粒子挙動解析モデル, 化学工学会第 49 回秋季大会 (2017).

金丸 尚紀, 矢野 雅貴, 関本 敦, 岡野 泰則, 紀ノ岡 正博, 数値解析を用いた iPS 細胞懸濁培養における最適化条件の探索, 化学工学会 第 83 年会 (2017).

田中 康奨, 矢野 雅貴, 関本 敦, 岡野 泰則, 紀ノ岡 正博, iPS 細胞懸濁培養における粒径分布の影響に関する数値解析, 第 20 回化学工学会学生発表会(東広島大会)(2018).

M. Yano, T. Yamamoto, Y. Okano, T. Kanamori and M. Kino-oka, "Numerical study of fluid dynamics and particle behaviour in an iPS cell culture tank", 23rd Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE2016) (2016).

M. Yano, T. Yamamoto, Y. Okano, T. Kanamori, M. Kino-oka, "Investigation of particle behavior in a stirred tank for optimization of suspension culture of iPS cell", The 27th International Symposium on Transport Phenomena (ISTP-27) (2016).

矢野雅貴、山本 卓也、岡野 泰則、都倉 知浩、金森 敏幸、紀ノ岡 正博、離散要素法を用いた iPS 細胞懸濁培養の数値シミュレーション, 化学工学会第 82 年会 (2017).

矢野雅貴、山本 卓也、岡野 泰則、都倉 知浩、金森 敏幸、紀ノ岡 正博、懸濁培養最適化のための数値流体解析・離散要素法連成シミュレーション, 化学工学会第 82 年会 (2017).

矢野 雅貴、山本 卓也、高木 洋平、岡野 泰則、杉浦 慎治、金森 敏幸、紀ノ岡 正博, iPS 細胞懸濁培養最適化のための粒子挙動の数値解析, 化学工学会 第 48 回秋季大会 (2016).

Y. Okano, H. Suzuki, T. Yamamoto, Y. Takagi, S. Sugiura, K. Sumaru, T. Kanamori, and M. Kino-oka, "Numerical Modelling on iPS Cell Culture Based on Transport Phenomena in a Culture Environment", The 22nd Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE 2015) (2015).

H. Suzuki, T. Yamamoto, Y. Takagi, Y. Okano, S. Sugiura, K. Sumaru, T. Kanamori and M. Kino-oka, "Numerical modeling of iPS cell culture based on mass transfer in a culture environment", APCChE 2015 Congress incorporating Chemeca 2015 (2015).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡野 泰則 (OKANO, Yasunori)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授  
研究者番号：90204007

### (2) 研究分担者

紀ノ岡 正博 (KINO-OKA, Masahiro)  
大阪大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：40234314

金森 敏幸 (KANAMORI, Toshiyuki)  
独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞  
工学研究センター・研究チーム長  
研究者番号：50356797