

令和元年6月17日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14630

研究課題名(和文)クエットフローを用いた回転浮遊培養における細胞増殖への影響

研究課題名(英文)Controlling shear stress in a suspension culture using Couette flow for efficient cell proliferation

研究代表者

坂口 勝久(Sakaguchi, Katsuhisa)

早稲田大学・理工学術院・准教授(任期付)

研究者番号：70468867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子工学を応用して微生物や動物細胞で製造するバイオ医薬品(タンパク質)や、幹細胞から組織や臓器を作り出して治療を行う再生医療が新しい時代を切り開く医療として注目を浴びている。しかしながら、バイオ医薬品や再生医療等の次世代医療には膨大なコストがかかってしまい社会的に大きな負担となることが懸念されている。そこで、本研究ではクエットフローを用いた回転浮遊培養を行うことで、簡易的に大量細胞を増殖させる培養法の開発を行った。その結果、開発したクエットフロー培養を行うことで、培養皿と同程度の細胞増殖に成功した。このより簡便な回転浮遊培養を用いながら大量の細胞を増殖させる培養方法を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したクエットフローを用いて回転浮遊培養を行う方法は、培養皿と同程度の細胞増殖効率の獲得に成功した。回転浮遊培養は、通常のポリスチレンの皿に細胞を接着させる培養方法に比べてコストが1/3、作業時間1/10になるため、細胞製造費において大幅な改善が見込める。以上のことから、本研究では大量の細胞を増殖させつつ簡便な新規回転浮遊培養を見出すことで、社会的に大きな負担となることが懸念されている次世代医療の膨大な費用を大幅に改善させる可能性を見い出した。

研究成果の概要(英文)：Biopharmaceuticals manufactured by applying genetic engineering, and regenerative medicine that creates tissues and organs from stem cells and treats them are drawing attention as the next generation medical treatment. However, the next generation medical treatment will be costed enormously and will be a socially severe problem. Therefore, in this research, we developed a novel culture method to easily grow a large number of cells by performing rotational suspension culture using Couette flow. Couette flow is a flow that occurs in the liquid in the gap between two concentric rotating cylinders, and is a very stable flow that generates uniform shear stress at all locations in the incubator. As a result, by performing the developed Couette flow culture, it succeeded in cell proliferation comparable to the normal culture dish. We have found a novel culture method for growing a large number of cells using this more convenient rotary suspension culture.

研究分野：組織工学、再生医療

キーワード：バイオ医薬 組織工学 再生医療 回転浮遊培養 クエットフロー バイオリクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、「糖尿病治療薬ヒトインスリン」や「抗ウイルス・抗がん作用治療薬インターフェロン」等のバイオ医薬品は著しい発展を遂げており、2013年世界で開発された医薬品の約22%:16兆円がバイオ医薬品にあたり、2020年には30兆円規模に発展すると予測されている。一方、再生医療の市場規模は2012年で2400億円、2020年には1.1兆円と予測されており、バイオ医薬と共に世界医療市場での急拡大が予測されている。このような急激な成長の中でバイオ医薬品として使用されるタンパク質、再生医療で使用される細胞培養に必要なタンパク質、そして作製される組織臓器に必要な細胞を大量に製造する手法の開発が急務となっている。ここで課題となるのが動物細胞を用いた回転浮遊培養である。動物細胞の細胞膜は非常に脆弱で衝突力に弱いいため、回転浮遊培養での増殖は静置培養に比べて著しく遅く、ほとんど増殖ができないため生産量には限界があり非常に高価なものとなっている。そこで、本申請研究は動物細胞に対して、クエットフローを用いた回転浮遊培養を提案する。クエットフローとは、2つの同心回転円筒の隙間にある液体に生じる流れであり、培養器内の全ての場所において均等なせん断応力が発生する極めて安定した流れである。これにより、従来の攪拌によって生じていた細かい渦や乱流による局所の高せん断応力や細胞同士の衝突を大幅に減少させ、大量の細胞増殖、そして大量のタンパク質の製造を向上させることを考案した。回転浮遊培養にクエットフローを作製するには従来プロペラやハンマー形状である攪拌棒を単純な筒状のものに変更するだけで実現できる。この模式図を図1に示す。従って、この手法は簡便な設計変更により大型化にも対応でき、現行のプラントにも応用できる手法と考える。

以上のことから、クエットフローを実現した回転浮遊培養による細胞増殖への影響を検討し、高い細胞増殖率の条件を探索する。さらには、バイオ医薬の大量製造への応用や再生医療のための大量細胞製造への応用の可能性を見出す。

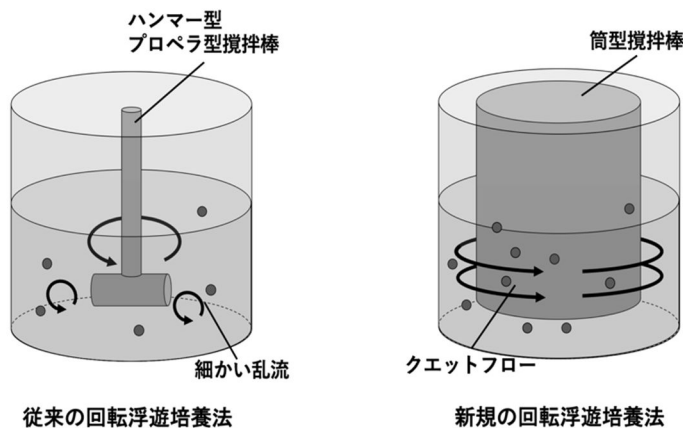


図1 回転浮遊培養

### 2. 研究の目的

遺伝子工学を応用して微生物や動物細胞で製造するバイオ医薬品(タンパク質)や、ES細胞・iPS細胞から組織や臓器を作り出して治療を行う再生医療が新しい時代を切り開く医療として注目を浴びている。しかしながら、これら次世代医療には膨大なコストがかかってしまい社会的に大きな負担となることが懸念されている。そこで、安価に膨大な量のタンパク質や動物細胞を製造する技術が開発できれば、より良い医療の拡大のみならず次世代バイオテクノロジーの研究が推進されると考えられる。本申請研究ではクエットフローを用いた回転浮遊培養を用いることで、細胞に対する衝撃力を押さえながらも、栄養分や酸素の供給、および老廃物の除去を促進する大量細胞増殖培養法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

エイブル社製 iPS 細胞培養用バイオリアクターを基にクエットフローが作成できる培養装置を開発する。攪拌棒を筒状に改変し、培養器と攪拌棒のクリアランスを1~5mmに設定して設計作製を行う。また、インキュベータ内での高温多湿に対して、安定的な回転30~150rpmが得られるかを検討する。この培養条件が実現できれば、生体内で赤血球が受けるせん断応力を基準に低いものから過剰なせん断応力まで細胞表面に与えることができる。

次に、新規の回転培養器の流れ解析を行う。具体的な解析手法としてはParticle Image Velocimetry (PIV)システムを使用する。マイクロオーダーの蛍光粒子を培養液中に浮遊させてレーザーを照射し、ハイスピードカメラで蛍光粒子の反射を撮影することにより流れの可視化を行う。この撮影した画像を解析することで液中に発生したせん断応力、渦や衝突の量を測定する。これにより、新規に作製した回転浮遊培養器がクエットフローを実現できているかの解析評価を行う。最後に細胞増殖の最適な回転浮遊培養条件を見出す。基本的な培養条件である温度、酸

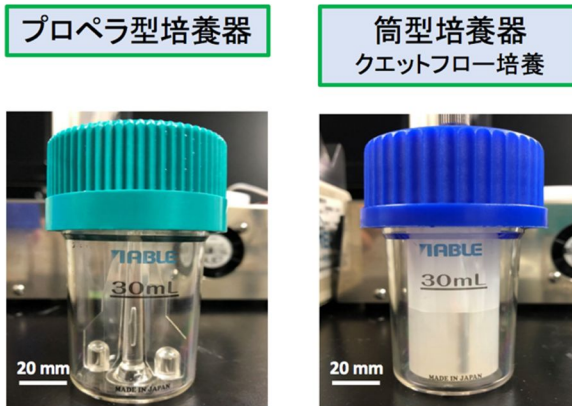


図2 プロペラ型回転浮遊培養器と筒型回転浮遊培養器

素、pHに加えて、本研究では回転スピード、および攪拌棒と培養器のクリアランスによる刺激の変化を加える。図2は羽型培養器と、本件研究申請で作成した筒型回転軸である。

#### 4. 研究成果

クエットフローとは、2つの同心回転円筒の間にある液体に生じる流れであり、培養器内の全ての場所において均等なせん断応力が発生する極めて安定した流れである。これにより、従来の攪拌によって生じていた細かい渦や乱流による局所の高せん断応力や細胞同士の衝突を大幅に減少させ、大量の細胞を増殖させることを考案した。

平成29年度は、エイブル社製 iPS 細胞培養用バイオリアクターを基に、クエットフローを作用させる筒型攪拌棒を開発した。この筒型攪拌棒に高磁場磁石を2~4極埋め込み、通常のスターラーでも回転できるように作成した。次に、新規バイオリアクターが実際にクエットフローを生じさせるかを観察するため、Particle Image Velocimetry システムを使用した。観察した結果、50~1500rpm においてクエット流れが確認でき、極めて安定的な流れが観測できた。そして、この流れを使って治療用タンパク質を作る際に用いられている細胞 HEK293 の 50rpm 回転培養実験を行なった。培養期間3日後の細胞増殖率は、クエットフローが約2.5倍、従来のプロペラ方式が約4倍、培養皿では約10倍を示した。従って、従来方式や培養皿に比べて細胞増殖率は低い結果となった。その結果を図3に示す。

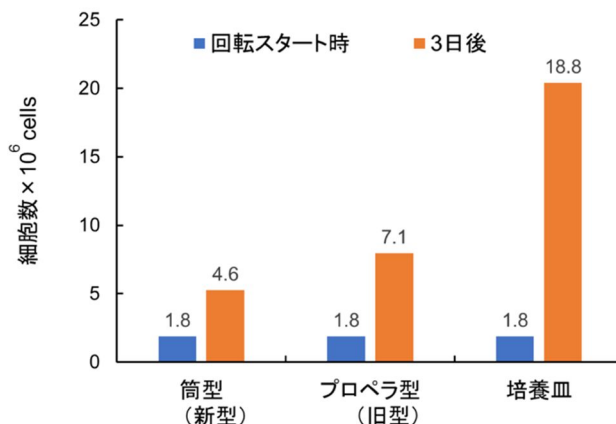


図3 各培養法による培養後細胞数

平成30年度はこの原因を解決するための追加実験を行った。従来の培養器はポリスチレン容器を使用しているため、培養器のボトムやサイドからのガス供給は難しく、空気との境界線は液体の上面でしかなく、十分な酸素を取り組むことができていないのではないかと考えた。つまりは、クエットフローによって上層の流れと下層の流れが交わることが少なく、容器下部への酸素供給はかなり困難と考える。そこで、培養容器をシリコン製にすることで容器のサイドおよびボトムから酸素を供給し、培養皿の環境と同じくらいのガス供給環境を構築した。シリコン容器の作成法として、ストラタシス社の3Dプリンタを用いて容器の鋳型を作成し、シリコンの溶液を流し込んで硬化させて作成した。手順を図4に示す。作成したシリコン製培養器で回転培養をした結果、プロペラ型・筒型の双方でポリスチレン容器より細胞の増殖が多いことが確認できた。さらに、本研究で開発した筒型クエットフロー培養では、培養3日目で播種数の10倍、ポリスチレン容器の5倍と、培養皿の増殖と同程度の結果が得られた。培養の様子を図5に示し、細胞増殖の結果を図6に示す。

以上のことから、クエットフローを使うことと、酸素供給量の多い培養器を使うことで、高い増殖力を持つ回転浮遊培養法を開発した。このことから、簡便に大量細胞の増殖させる新規の培養方法を見出した。

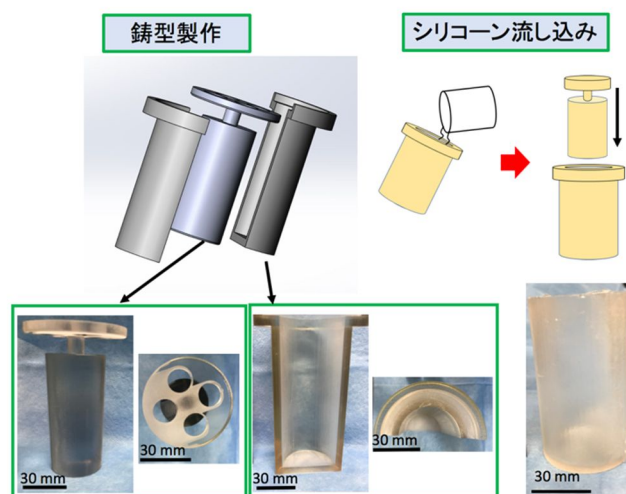


図4 シリコン容器の作成

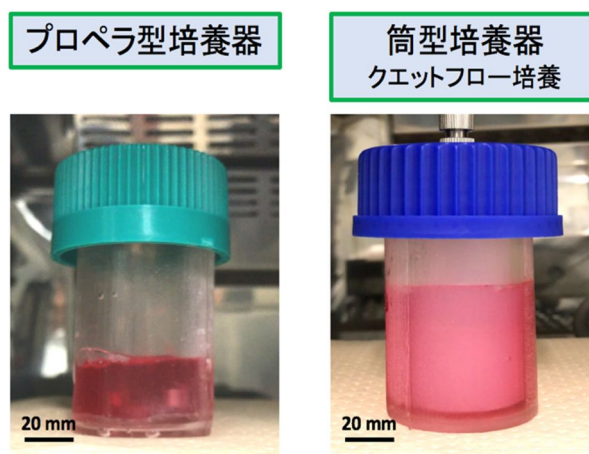


図5 シリコン容器に変更した回転浮遊培養

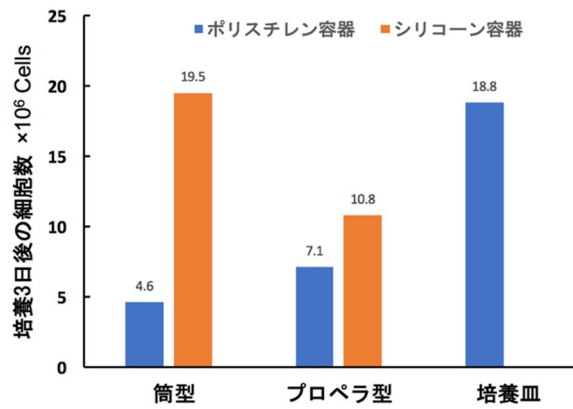


図6 シリコン容器を用いた回転浮遊培養

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

坂口勝久、清水達也、梅津光生、日本生体医工学会、2019

坂口勝久、戸部友輔、佐野和紀、関根秀一、松浦勝久、清水達也、小林英司、梅津光生、日本再生医療学会、2019

## 6. 研究組織

研究分担者はありません。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。