

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14064

研究課題名(和文) 浮遊懸濁培養中にヒトiPS細胞にかかる剪断ストレスの新規測定法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for measuring shear stress on human iPS cells in suspension culture

研究代表者

堀口 一樹(Horiguchi, Ikki)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：80791897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞の浮遊懸濁培養における剪断応力の間接的な影響を評価するために、高速度カメラおよび動画トラッキングを用いて、様々な振盪操作(往復および旋回)および振盪速度においてiPS細胞凝集体にかかる剪断応力を加速度として間接的に推定する手法を設計した。培養の結果と比較すると、増殖比において平均加速度に最適値が見られ、また平均加速度が増加するに従って死細胞数が増加する傾向が見られた。また追加検討として、多糖類ポリマーを用いた培地の塑性流体化を行うことで、平均加速度に対する死細胞数の増加を抑制することが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞は再生医療や創薬スクリーニングに用いる細胞ソースとして有望であり、その大量生産はこれらの応用技術の発展に寄与している。その大量生産においては浮遊懸濁培養が有望であるが、細胞凝集体の浮遊の維持や酸素供給の観点から攪拌が必須となる。本研究における剪断応力に対する細胞の応答性の評価は培養システム設計において有用な技術・知見である。また、培地を塑性流体化することによって、剪断応力に対する耐性を向上することができることもヒトiPS細胞の浮遊懸濁培養において重要な知見である。以上、本研究課題はヒトiPS細胞の大量培養に関する重要な知見を明らかにしており、工学的、社会的に有意義である。

研究成果の概要(英文)：In order to evaluate the indirect effect of shear stress on floating suspension cultures of iPS cells, a method was designed to indirectly estimate the shear stress on iPS cell aggregates as acceleration at various shaking operations (reciprocating and swirling) and shaking speeds using a high speed camera and video tracking. When compared with the results of the culture, an optimal value for the mean acceleration was observed in the growth ratio, and the number of dead cells tended to increase as the mean acceleration increased. Plastic fluidization of the medium with glycosylated polymers inhibited the increase in the number of dead cells with respect to the mean acceleration.

研究分野：生物化学工学

キーワード：iPS細胞 浮遊培養 剪断ストレス 加速度 塑性流体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) はその無限増殖能および多分化能から、再生医療や創薬スクリーニングに用いる正常細胞のソースとして期待されている。その産業応用には、iPS 細胞の大量生産が不可欠であり、その培養法の構築が求められている。

動物細胞の浮遊培養は、バイオ産業において広く用いられており、CHO 細胞や HEK293 細胞をはじめ、再生医療に用いる細胞の生産を目的として、ES 細胞や iPS 細胞でも研究が行われている。浮遊培養法は、研究室で広く行われる接着培養法と異なり細胞を接着させないため、細胞の最大増殖量が培養面積に依存しないため、容器を単純化しやすく、細胞を大量培養する場合に有利である。しかし、細胞凝集体の沈降や酸素濃度勾配などを解消するために攪拌を行う必要があり、それに伴う液流や攪拌翼から受ける剪断ストレスが細胞に負荷がかかる恐れがあるため、剪断ストレスを勘案しながら最適化を行う必要がある。

しかし、流体内を自由に移動する細胞にかかる剪断を計算することは容易ではない。一般的な方法として、センサーを用いた測定が可能であるが、浮遊培養中の細胞のように、自由に移動する測定点にかかる剪断応力の直接測定は不可能である。間接的な手法として、粒子法を用いた計算科学的手法が挙げられるが、計算条件によっては数日～数週間という計算時間を要する上に計算精度にも課題がある。このように、浮遊中の細胞にかかる剪断応力を測定する絶対的な方法は定まっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、計算及び測定が難しい細胞表面への剪断ストレスを、1) 簡便な装置設計で推測できる装置システムの設計および、2) 装置で得られた各種パラメーターに対する細胞応答を測定し、剪断ストレスをはじめとした浮遊培養中における「細胞をとりまく物理的環境が細胞に与える影響」を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、ヒト iPS 細胞の浮遊懸濁培養を対象とし、浮遊培養形式としてシェーカーを用いた旋回培養において加速度測定系を構築した。詳細を次に示す。

#### 3. 1. 浮遊懸濁培養中の iPS 細胞凝集体の動作撮影と解析

浮遊懸濁培養中の iPS 細胞凝集体の動作を撮影するための撮影システムの設計を行った。構成を図 1 に示す。プレートを板状 LED ライト上に配置し、照射しながら上部の高速度カメラにて異なる条件 (往復振盪および旋回振盪) および速度 (60rpm~120rpm) にて振盪攪拌した際の粒子の動作を撮影した。粒子には、4 日間浮遊懸濁培養したヒト iPS 細胞凝集体に CBB 染色を施したものを利用した。

撮影した動画中の粒子を、動画解析ソフトを用いてトラッキングして、粒子の加速度の時間変化および平均加速度を算出した。

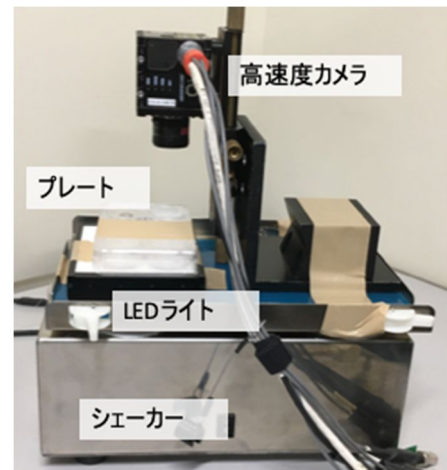


図 1 本研究で用いた撮影システム

#### 3. 2. 浮遊懸濁培養の培養結果との比較

3. 1 にて測定した振盪条件において、ヒト iPS 細胞を 4 日間浮遊懸濁培養し、増殖比 (細胞数カウント)・死細胞数 (LDH 放出量測定) を行い、細胞増殖と細胞死と浮遊懸濁培養中に凝集体が受ける加速度に対する相関の評価を行なった。

#### 3. 3. 塑性流体を用いた剪断応力への影響の軽減の検討 (追加検討)

ここまでで得られた知見を元に、追加の実験として、培養液の塑性流体化によって、浮遊懸濁培養における細胞の剪断ストレスへの影響の緩和を試みた。

多糖類系のポリマーを培養液に添加し、塑性流体化させた上で同様に浮遊懸濁培養を行い、培養後の増殖比 (細胞数カウント)・死細胞数 (LDH 放出量測定) を行い、剪断応力に対する細胞増殖・死の改善を行なった。

### 4. 研究成果

#### 4. 1. 浮遊懸濁培養中の iPS 細胞凝集体の動作撮影と解析

異なる条件で浮遊している細胞凝集体塊を撮影し、軌跡をトラッキングした往復振盪・旋回振盪のどちらにおいても、低速度領域 (60 rpm) では細胞凝集体塊はその場に留まり、中速度領域 (90 rpm) では周期的な動きを示し、高速度領域 (120 rpm) においては移動範囲が拡大されていく様子が見られた。特に、往復振盪の高速度領域では、不規則的な運動が見られ、液流れによって凝集体の挙動が大きく乱れている様子が認められた。旋回震盪では容器中心を軸にした円運動だけでなく、中心部へ向かっての小さな円運動が見られており、液流れが旋回運動に沿った円運

動だけではなく、遠心力による半径方向の流れの影響を受けていることが示唆された。これらの様子から、攪拌条件によって細胞の分散状態が変わることにより、細胞同士の接触時間や衝突頻度、衝突時の運動量変化が異なり、凝集体の形成に影響を及ぼしていることが予想される。

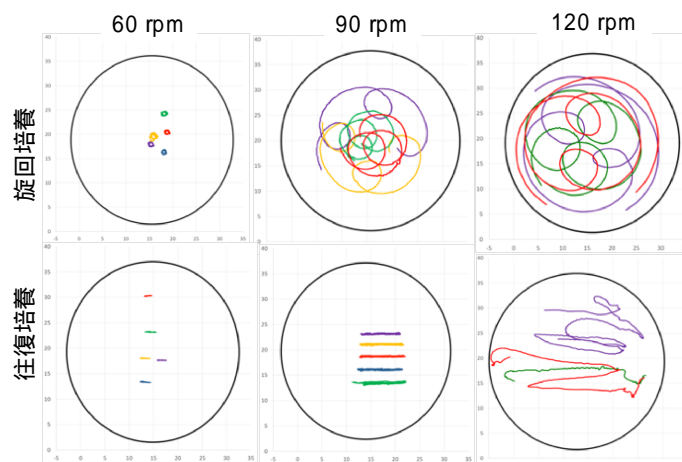


図 2 浮遊培養中の細胞凝集体の軌跡

振とう培養中の細胞にかかる剪断応力の違いを推定するために、攪拌中の細胞について加速度の絶対値の時間変化を解析した(図3)。回転振盪では、約  $500 \text{ mm/s}^2$  を中心として安定的に変動しているのに対し、往復攪拌では  $2000 \sim 3000 \text{ mm/s}^2$  の高加速度に周期的に達する傾向がみられた。これは、細胞の往復動と培地の往復流が正対する瞬間があり、その瞬間に細胞に負荷がかかるためであると考えられる。ニュートンの運動方程式から、加速度が大きな値を取っている時は、凝集体に大きな力がかかっていると考えられ、それが細胞の増殖・死に影響を与えていると考えられる。

#### 4. 2. 浮遊懸濁培養の培養結果との比較

トラッキングおよび加速度測定を行なった培養条件に対して、実際に浮遊懸濁培養を行い、増殖率および累計死細胞数の算出を行い、得られた値をプロットした。増殖率においては、秒間  $500 \sim 1000 \text{ mm/s}^2$  近傍に最適値が見られ、死細胞数においては、平均加速度に対して正の相関が見られた。さらに、この傾向は異なる振盪条件においても同様の傾向が得られており、振盪操作・速度に関わらず凝集体の平均加速度によって培養結果が予想できることが示唆された。

以上より、『剪断ストレスをはじめとした浮遊培養中における「細胞をとりまく物理的環境が細胞に与える影響」を明らかにする』という目的に対して、浮遊懸濁培養中の凝集体の加速度をモニターすることによって、細胞が培養中に受ける剪断ストレスを推定し、その影響を明らかにするという目的は達成されたと考えられる。

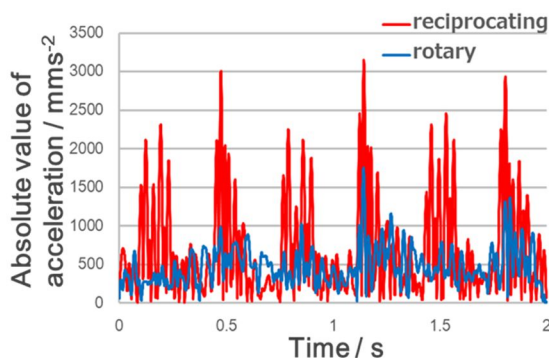


図 3 浮遊培養中の細胞の加速度の時間変化

#### 4. 3. 塑性流体を用いた剪断応力への影響の軽減の検討(追加検討)

本研究で得られた剪断ストレスに対する細胞の緩和を目的とし、多糖類系のポリマーを培養液に添加し、塑性流体化させた上で同様に浮遊懸濁培養を行い、培養後の増殖比・死細胞数評価を行い、剪断応力に対する細胞増殖・死の改善を行なった。結果として、塑性流体化させることによって、高剪断ストレス条件下における細胞増殖低下および死細胞増加の抑制が見られた。以上から、培地の粘度特性を変化させることで、剪断ストレスに対する影響を緩和することが可能であることが示唆された。

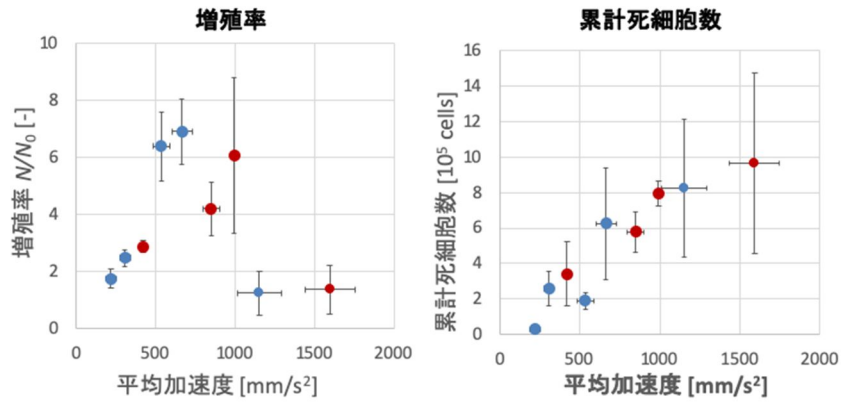


図 4 細胞の増殖率・累計死細胞数と平均加速度の関係

#### 4.4. 総括

本研究では、速度カメラおよびトラッキングを用いて、浮遊懸濁培養中の細胞にかかる剪断ストレスを推定するシステムの設計を行なった。実際の培養結果と比較し、振盪形式にかかわらず、平均加速度と細胞の生死には関係が見られ、これまで測定が困難であった浮遊状態の細胞にかかる剪断ストレスの推定指標として加速度が有効に機能していると考えられる。加えて、培養液の粘度特性を変化させることによる剪断ストレスに対する応答の緩和の検討を行い、その有効性が示唆された。今後は得られた成果の論文化を進めるとともに、細胞の大量生産において重要なパラメータの評価に関する検討を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikki Horiguchi, Ikumi Suzuki, Takashi Morimura, Yasuyuki Sakai	4. 巻 143
2. 論文標題 An orbital shaking culture of mammalian cells in 0-shaped vessels for the production of uniform aggregates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiment	6. 最初と最後の頁 e57922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57922	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀口一樹
2. 発表標題 FCeMシリーズを用いたiPS細胞の3次元浮遊懸濁培養
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長手武尊, 堀口一樹, 酒井康行
2. 発表標題 せん断応力に着目したヒトiPS細胞凝集体の浮遊培養の設計
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----