

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15102

研究課題名(和文)酸素ナノ気泡による効率的なヒト細胞大量培養法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the efficient mass culture method for human cells using oxygen ultra-fine bubble

研究代表者

福重 香 (Fukushige, Kaori)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：30805023

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)：再生医療の実現に向けた効率的なヒト細胞大量培養法の確立を目指し、酸素ナノ気泡(O2-UFB(ウルトラファインバブル))を含有させた細胞培養液の有効性を評価した。平均粒子径約150 nmのO2-UFB含有培養液を作製できた。ヒトiPS細胞の培養において、通常培養液と比較して約20%細胞数が増加した。品質および安全性の観点から未分化維持評価を行い、影響がないことが確認できた。また、ヒト正常細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)でも、約25%の細胞数増加がみられた。本研究によりO2-UFBが、ヒト細胞の培養に有効であることが示唆された。現在、灌流培養を主軸とした大量培養系への応用を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工多能性幹細胞(iPS細胞)技術の発展は目覚ましく、ヒト細胞による再生医療の普及は目前まできている。多くの患者に広く提供するには、莫大な量の細胞を高品質かつ低コストで培養する技術の確立が必須となる。様々な培養法の開発が進んでいるが、培養液中への必要十分量の酸素供給が大きな障壁となっている。本研究では、ヒト細胞の培養における酸素供給法として、酸素ナノ気泡の応用を試みた。酸素そのものの他に添加物を必要とせず、粒子径などの物理特性により安価かつ効率的な酸素供給キャリアとしての機能が期待できる。酸素ナノ気泡による汎用性が高い酸素供給法の確立により、効率的なヒト細胞大量培養の早期実現を可能にする。

研究成果の概要(英文)：This study verified that cell culture medium containing oxygen nano-bubbles (O2-UFB (Ultra-Fine Bubble)) is effective in establishing an efficient mass culture method for human cells intended to regenerative medicine. The culture medium containing uniformly dispersed O2-UFBs with an average particle size of approximately 150 nm was prepared. In the culture of human iPS cells, the number of cells increased by about 20% compared to the normal culture medium. Undifferentiated maintenance evaluation was conducted from the viewpoint of quality and safety, and it was confirmed that there was no adverse effect. In human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), which are normal human cells, the cell number was also increased about 25%. This study suggests that O2-UFB is effective for culturing human cells. We are currently attempting to apply this method to mass culture systems, mainly perfusion culture system.

研究分野：バイオシステム医工学

キーワード：ナノ気泡 ウルトラファインバブル ガスデリバリー 細胞大量培養 酸素 iPS細胞

## 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) 技術の発展は目覚ましく、ヒト細胞による再生医療の普及は目前まできている。最近では、パーキンソン病や脊髄損傷を対象とした再生医療の治験が始まり、その効果が明らかになってきた。この治療には、患者 1 人あたり  $10^6 \sim 10^7$  個オーダーの細胞が必要であり、さらに臓器を再生する場合には、 $10^9 \sim 10^{10}$  個オーダーの細胞が必要となる。これらの治療を多くの患者に広く提供するためには、莫大な量の細胞を培養する技術の確立が必須となるが、大量の細胞を安価に安定して培養する技術は未だ確立されていない。通常、iPS 細胞および正常細胞 (iPS 細胞を分化させて得られる目的細胞) を培養する場合、培養皿や培養フラスコを用いた平面接着培養法を用いる。仮に、この方法で患者 1 人あたりに必要となる  $10^{10}$  個の iPS 細胞を得るには、毎日 100 L の培養液と直径 10 cm の培養皿 10,000 枚が必要である。このような状況で大量に一定品質の細胞を得るためには、大変な労力とコストがかかる。そのため、浮遊培養法や多層培養法など、様々な大量培養法の開発が進められているが、どの方法においても、培養液中に必要な分量の酸素を供給できないことが大きな障壁となっている。現在、大量の酸素を供給するための方法として、『培養液中に酸素をバブリングして酸素濃度を増やす方法』や『培養液に空気 (酸素) が接する表面積を増やす方法』がある。しかし、作業工程が多く、かつ、コストが高いため実用化に至っていない。

本研究では、ヒト細胞の培養において最適量の酸素を供給する方法として、酸素ナノ気泡の応用を試みる。ナノ気泡は、1  $\mu\text{m}$  以下の気泡の総称であり、国際的には『ウルトラファインバブル; Ultrafine-Bubble (UFB)』と定義されている。酸素ナノ気泡は、ブラウン運動により、水中に長期間、安定に保持される特徴を有しており、最近、植物の栽培や魚の養殖において成長促進剤として実用化され、注目を集めている。しかし、その発展は、商業的な側面に注目が注がれ、学術的な検証は未だ少ない。特に、医療分野における研究開発は遅れており、培養細胞への影響の検証は始まったばかりである。現在、酸素ナノ気泡による iPS 細胞の増殖効果に関する報告は、世界にない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞およびヒト正常細胞の培養における酸素ナノ気泡の有効性を検討し、大量培養への応用を試みることである。本研究では、培養細胞に酸素を効率的に供給するため、直径約 100 nm の酸素ナノ気泡に着目した。培養液中に酸素を簡便かつ安価に保持できる利点に加え、このサイズに制御することで、酸素ナノ気泡は、細胞内に酸素を効率的に送達するナノ担体として機能すると考えられる。我々は独自にナノ気泡を作製する装置を開発し、ナノ気泡の医療応用に挑戦している。この装置は、完全閉鎖型のため、無菌のナノ気泡を作製できる。この技術により、粒子径約 100 nm の酸素ナノ気泡を無菌で、約  $2.0 \times 10^9$  個/ml の高濃度に含有する細胞培養液を調製できる。酸素ナノ気泡により効率的かつ安価で、汎用性が高い酸素供給法を確立し、細胞大量培養の早期実現を目指す。

### 3. 研究の方法

細胞培養における酸素ナノ気泡の有効性を評価するため、iPS 細胞およびヒト正常細胞の 1 つとして頻用されるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、各種 *in vitro* 評価を行った。酸素 ( $\text{O}_2$ ) から成る UFB ( $\text{O}_2$ -UFB) を細胞培養液に含有させ、通常培養条件 ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) にある培養細胞に曝露し、その影響を検討した。

iPS 細胞は、human iPS cell line 12 (ChiPSC12) (Cellartis) を用い、培養液として Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (Cellartis) を用いた。この培養液を用いることで、ヒト由来の多能性幹細胞をフィーダーフリーで培養可能であり、長期間未分化状態を維持できる。この培地の使用マニュアルに従い iPS 細胞の培養を行った。

HUVEC の培養は、EGM-2 基本培地 (Endothelial Cell Growth Medium 2: EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium2), PromoCell)+ 添加因子 (Endothelial Cell Growth Medium 2 SupplementPack, PromoCell) を用いた。

$\text{O}_2$ -UFB を含む細胞培養液の作製には、独自に開発した医療応用のためのナノ気泡作製装置 (Fig. 1) を使用した。酸素ガスと各種培養液を用い、ベンチュリー方式により  $\text{O}_2$ -UFB 含有培養液を作製した。通常培養液での培養群をコントロール (Cont.)、酸素ナノ気泡を含有しない酸素溶存培養液で培養した群 ( $\text{O}_2$ -dis.) を比較群とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 酸素ナノ気泡含有培養液の物性評価

ナノ気泡の粒径・数濃度を計測する代表的手法であるナノ粒子トラッキング法粒子解析装置 (NanoSight NS300, Malvern) を用いて、 $\text{O}_2$ -UFB を含有する培養液の物性を評価した。独自のナノ気泡作製装置を用いて  $\text{O}_2$ -UFB 含有 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を作製し、評価したところ、粒子径約 150 nm の  $\text{O}_2$ -UFB を約  $1.5 \times 10^9$  個/ml の高濃度に含有する細胞培養液を調製できることが確認できた (Fig. 2)。

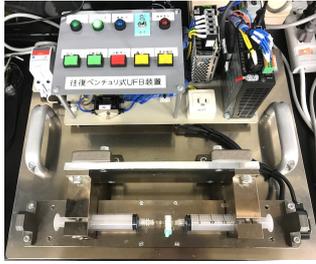
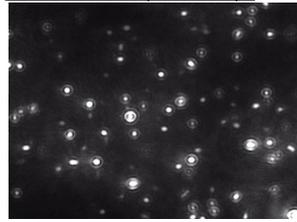


Fig. 1 ナノ気泡作製装置

可視化画像(散乱光)



粒子径・粒子濃度

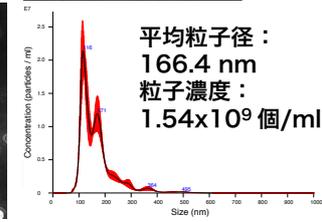


Fig. 2 酸素ナノ気泡含有培養液の物性

(2) 酸素ナノ気泡が iPS 細胞の増殖にもたらす効果

iPS 細胞を、O<sub>2</sub>-UFB 含有培養液を用いて培養(4 日間)し、O<sub>2</sub>-UFB が細胞増殖にもたらす効果を、MTT assay によるミトコンドリア活性評価および細胞数カウントにより評価した。O<sub>2</sub>-UFB 含有培養液群では、通常培養液群と比較して MTT 活性で約 5%、細胞数カウントで 20%の有意な増加がみられた(Fig. 3)。O<sub>2</sub>-UFB は、iPS 細胞の培養において細胞増殖を促進させる効果を持つことが示唆された。

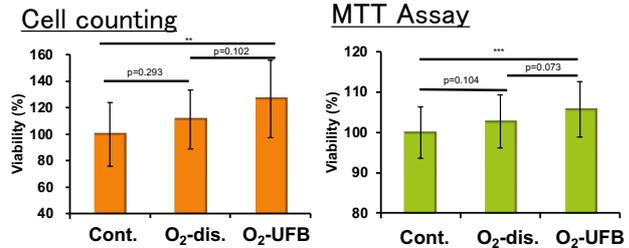


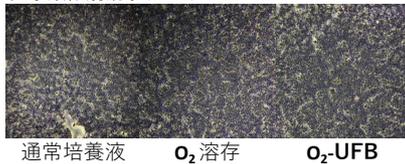
Fig. 3 酸素ナノ気泡の細胞増殖効果(iPS 細胞)

(3) 酸素ナノ気泡が iPS 細胞の未分化維持にもたらす影響

iPS 細胞を、O<sub>2</sub>-UFB 含有培養液を用いて培養し、iPS 細胞の未分化維持に与える影響を評価した。細胞の形態評価、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性評価および分化マーカー(TRA-1-60、SSEA4)による FACS 解析を行った。細胞の形態評価および ALP 活性評価においてコントロール、O<sub>2</sub>-dis. および O<sub>2</sub>-UFB の 3 群間に差異はなく(Fig. 4)、iPS 細胞の未分化維持に O<sub>2</sub>-UFB の悪影響がないことが示唆された。FACS 解析において、3 群ともほぼ 100%の細胞に SSEA-4 の発現がみられた(Fig. 4)。また、TRA-1-60 の発現評価においては、O<sub>2</sub>-UFB 曝露群でも、通常培養液と同等以上の細胞が TRA-1-60 を発現していた。これらの結果から、iPS 細胞の未分化維持に O<sub>2</sub>-UFB による影響はみられず、細胞の品質・安全性に問題を与えないことが示唆された。

ALP活性評価

光学顕微鏡観察(×40)



未分化マーカー解析(FACS)

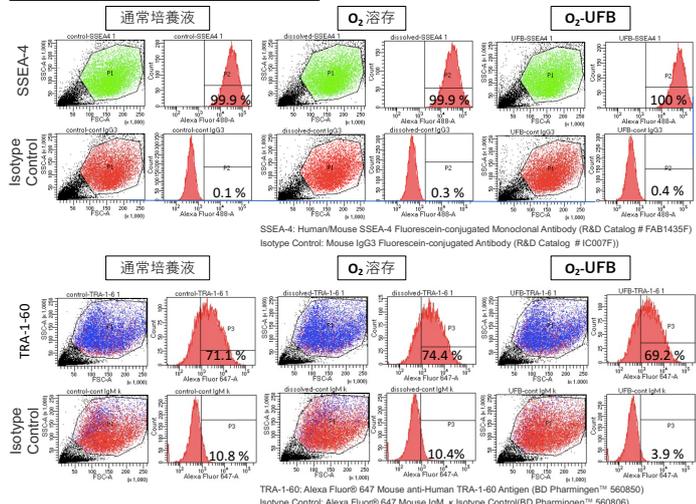


Fig. 4 酸素ナノ気泡の iPS 細胞の未分化維持にもたらす影響

(4) 酸素ナノ気泡が正常細胞(HUVEC)の増殖にもたらす効果

HUVEC を、O<sub>2</sub>-UFB 含有培養液を用いて培養し(4 日間)、O<sub>2</sub>-UFB が細胞増殖にもたらす効果を、MTT assay によるミトコンドリア活性評価および細胞数カウントにより評価した。O<sub>2</sub>-UFB 含有培養液群では、通常培養液群と比較して細胞数カウントで 25%の有意な増加がみられた(Fig. 5)。一方、ミトコンドリア活性評価では有意な差はみられなかった。O<sub>2</sub>-UFB は、ヒト正常細胞の培養においても細胞増殖を促進させることが期待で

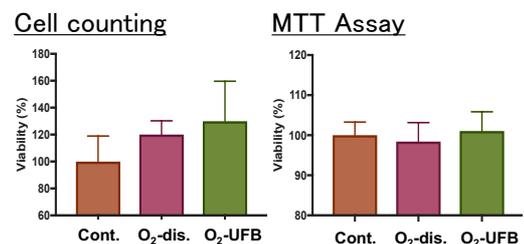


Fig. 5 酸素ナノ気泡の細胞増殖効果(HUVEC)

きるが、さらなる検証が必要である。

本研究により、 $O_2$ -UFB が、iPS 細胞の未分化維持培養の促進に有効であることが示唆された。今後、iPS 細胞の目的細胞への分化に対する UFB の有用性評価を行うことで、再生医療に向けた UFB の有効性をさらに検証していく。

現在、ヒト細胞の効率的な大量培養法の確立を目指し、灌流培養系の立ち上げを行っている。灌流培養は、細胞組織のより深部まで新鮮な培地を供給できるため、より長期間の培養・活性維持が可能な培養法として、再生医療における細胞生産への応用が期待されている。しかしながら、灌流培養により大量の細胞を生産するにあたり、十分な酸素供給のため、ある程度流速が必要であり、細胞損傷と高価な添加因子の使用量増加が問題となる。今後、酸素ナノ気泡がこの問題解決の一助となることを期待し、さらなる検討を進めていく。

現在、開発中のプロトタイプ灌流装置にて培養検討を行っている (Fig. 6)。これまで市販されている機器と異なり、 $1 \mu\text{l}/\text{min}$  単位での流量制御が精度よく再現できており、 $O_2$ -UFB 含有培養液による検討を行っている。



Fig. 6 開発中の灌流培養装置

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福重 香、畑山 直之、竹内 堂朗、内藤 宗和
2. 発表標題 ウルトラファインバブル製剤の実用化に向けた検討 -NOガス降圧剤-
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内藤 宗和、福重 香、畑山 直之、竹内 堂朗
2. 発表標題 ウルトラファインバブル製剤の実用化に向けた物性検討
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹内 堂朗、福重 香、畑山 直之、内藤 宗和
2. 発表標題 ウルトラファインバブルの医療応用に向けた基礎的検討 界面活性剤のウルトラファインバブルへの作用
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福重 香、内藤 宗和
2. 発表標題 生理活性ガスを用いたウルトラファインバブル製剤の開発に向けて
3. 学会等名 日本薬剤学会 第38年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 多能性細胞の未分化維持培養用組成物、多能性細胞の未分化維持培養用培地、多能性細胞の未分化状態での維持培養方法、および多能性細胞の製造方法	発明者 畑山直之、内藤宗和、平井宗一、福重香、坂上茂樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/025973	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 多能性細胞の未分化維持培養用組成物、多能性細胞の未分化維持培養用培地、多能性細胞の未分化状態での維持培養方法、および多能性細胞の製造方法	発明者 畑山直之、内藤宗和、平井宗一、福重香、坂上茂樹	権利者 愛知医科大学、住友精化株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2020-123653	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 血管拡張組成物、血管拡張組成物キット、血管の狭窄または閉塞性障害に起因する疾患用医薬組成物、および血管の狭窄または閉塞性障害に起因する疾患用医薬組成物キット	発明者 畑山直之、内藤宗和、平井宗一、福重香	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/003258	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	内藤 宗和  (Naito Munekazu)  (10384984)	教授	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------