

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360340

研究課題名(和文) 攪拌培養槽を用いたヒトiPS細胞大量培養プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of human iPS cell culture system using stirred tank bioreactors

研究代表者

境 慎司(SAKAI, SHINJI)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：20359938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞を細胞源とする再生医療が広く普及するようになるためには、大量培養法の確立が不可欠である。本課題では、攪拌培養槽を用いた培養を行う際に不可欠と考えられる、剪断力から細胞を保護しながら培養が可能であるとともに、形成する細胞塊のサイズも制御可能な細胞包括マイクロカプセルの開発を実施した。新たに開発した方法は、既存の方法よりも簡便にかつ短時間で細胞包括マイクロカプセルを作製可能な方法であった。このカプセルはエアリフト型攪拌槽での培養に十分な強度を有しており、またヒトiPS細胞を未分化を維持した状態で増殖させることも可能であった。

研究成果の概要(英文)：For realizing the regenerative medicine using human iPS cells, establishment of the technology of culturing the cells in huge amount is essential. In this study, we aimed to develop the microcapsules suitable for culturing iPS cells in stirred tank bioreactors. The microcapsule membrane acts as physical barriers for protecting the cells from shear forces given from the flow of surrounding solution. In addition, it is expected that the size of the cluster of the cells grown in the microcapsules can be defined by the microcapsule size. The method which we developed in this study realizes the microcapsule production with easier and shorter operation time compared with previous ones. The strength of the microcapsules prepared by the developed method was sufficient enough for incubating them in an air-lift type stirred tank bioreactor. In addition, enclosed human iPS cells grew in the microcapsules with keeping their undifferentiated state.

研究分野：生物化学工学

キーワード：iPS細胞 再生医療 マイクロカプセル 大量培養

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療は組織や臓器が正常に機能しない患者の根治医療として期待されている。そのための細胞源としては、患者本人の細胞からも作製可能な iPS 細胞(人工多能性幹細胞)に大きな期待が寄せられている。iPS 細胞から分化誘導した細胞が患者に適用されるようになるためには、腫瘍化回避、効率的分化誘導、ヘテロな細胞集団からの細胞選別に関する技術を確認する必要があり、学術誌に有望な成果が報告されるなど、それらの確立に向けた知見が蓄積してきている。一方で、多くの患者がその恩恵を受けられるようになるためには、手作業による操作が中心の培養皿スケールよりも大きなスケールで、かつ環境因子の制御が可能な培養システムの開発が必要である。

ここで、「細胞を限られた空間で大量に培養する」という視点からは、平板上での培養よりも攪拌培養槽を用いて三次元的に培養する方が有利である。このため、微生物の大量培養においては 40 年以上も攪拌培養が主流であり続けている。このようなことから、これまでもヒト ES 細胞を攪拌培養槽で球状の組織体として培養した報告があった。しかし、細胞塊に含まれる ES 細胞の分化能はそのサイズにより大きく異なり、最適な塊のサイズは直径 200  $\mu\text{m}$  程度との報告(Valamehr et al, PNAS, vol.105, p.14459 (2008))や、攪拌により生じるせん断力(Yamamoto et al, Am J Physiol-Heart C, vol.288,p.H1915(2005))や組織体の肥大化による細胞塊中心部への酸素や栄養分の供給不良は意図しない方向への分化を誘引する(Powers et al, Biotechnol Bioeng, vol.101, p.241(2008)など)との報告を考慮すると、それらの制御が困難な単に培養液に細胞を分散して攪拌するだけのプロセスは適当ではなく、せん断力から保護しながら大量になおかつ中心部にまで十分に酸素や栄養分を供給可能な均一性の高い細胞塊サイズで培養できる新しい攪拌培養プロセスの構築が必要であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞をせん断力から保護しながら、直径 200  $\mu\text{m}$  程度の均一なサイズの球状組織体を得るために、ヒドロゲルのマイクロカプセルを利用し、その内部で培養することの有用性を実証することを目的とした。具体的には、まず、本研究開始当初に有していたマイクロカプセルを用いてその有望性を評価した後、よりヒト iPS 細胞の包括に適するマイクロカプセルを開発し、その有用性を評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 2 段階法で得られるマイクロカプセル中のヒト iPS 細胞培養

本研究の開始前までにマウスの ES 細胞を利用した検討においてその有用性を報告し

てきた方法を適用するために、ヒト iPS 細胞を包括する直径約 200  $\mu\text{m}$  のゼラチンゲルビーズを作製した後、これらを厚さ 50  $\mu\text{m}$  程度のアルギン酸ゲルで覆ったゲルビーズを作製した。その後、内部のゼラチンゲルビーズを溶解するという 2 段階の方法で、ヒト iPS 細胞を包括するアルギン酸ゲルマイクロカプセルを作製した。その後、包括されたヒト iPS 細胞の増殖を評価した。

(2) 1 段階法による簡便なマイクロカプセル作製法の開発と物性評価

細胞包括マイクロカプセルを用いたヒト iPS 細胞の培養が広く使用されるようになるためには、より簡単に作製できる方法であることが望ましい。そこで、従来の細胞包括マイクロカプセルの作製と比較して半分の工程数で作製可能な方法の開発を行った。これを実現するために、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を消費しながら進行する西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)の酵素反応による水溶液のゲル化と、このゲル化に必要な  $\text{H}_2\text{O}_2$  を分解することでゲルの形成を抑制するカタラーゼの酵素反応を組み合わせた方法の開発を行った。具体的には、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を溶解させた水溶液に、HRP とその酵素反応により架橋されるフェノール性水酸基を含む高分子、さらにカタラーゼを溶解させた溶液を、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を溶解させた流動パラフィン流中に押し出す方法(図 1)を開発した。さらに、この方法で得られるマイクロカプセルに関して、攪拌培養の可否や、各酵素濃度などの調製条件を変化させた場合に、内部の細胞の生存のために必要な物質透過特性を有しているかどうかなどの検討を実施した。

(3) 1 段階法による簡便なマイクロカプセルを用いたヒト iPS 細胞の培養

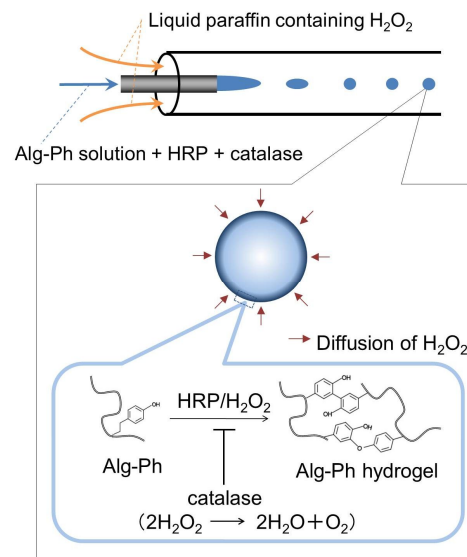


図 1.  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含む流動パラフィン中 1 段階でのカプセル作製法模式図。

新たに開発した方法により簡便に作製可能なマイクロカプセル内にヒト iPS 細胞を包

括し、細胞の増殖および未分化性の維持を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 2 段階法で得られるマイクロカプセル中でのヒト iPS 細胞培養

2 段階法を経て作製したアルギン酸誘導体ゲルカプセルに包括されたヒト iPS 細胞は、包括直後には約 90% の生存率を示し、他の細胞で報告してきたように、本作製方法がヒト iPS 細胞に対しても穏和であることが明らかとなった。さらに、包括翌日には、カプセル内で小さな集塊を形成し、その後、期待した通りにカプセルの内部で増殖した。これらの結果はヒト iPS 細胞を細胞源とする再生医療の普及のために非常に有望なものである一方で、実用化においては大量の細胞の包括が必要であることを考慮すると、より簡便かつ短時間に大量のカプセルを作製できる方法が必要であることが明らかとなった。

(2) 1 段階法による簡便なマイクロカプセル作製法の開発と物性評価

2.5 % (w/v) フェノール性水酸基導入アルギン酸誘導体 (Alg-Ph) および 100 units/mL HRP、 $9.1 \times 10^4$  units/mL カタラーゼを混合した高分子溶液を押し出し、1.4 mM  $H_2O_2$  含有流動パラフィン中に 10 分間静置することで得られた中空マイクロカプセルの直径は 260  $\mu\text{m}$  であった。このマイクロカプセルに対して中空部分の形成を短時間で確認するために、増殖速度の速い大腸菌を包括したカプセルを作製し、10 時間培養したところ、内部で増殖した (図 2 a)。さらに、そのカプセルを遠心したところ、内部で大腸菌が一部分に集積したことから (図 2 b) 一方、カタラーゼを含まない高分子溶液から得られたマイクロカプセルでは、大腸菌が集積することはなかった。集積した大腸菌からカプセル表面までの距離を測定することにより膜厚の計測を行ったところ、この調製条件では 36  $\mu\text{m}$  であった。これらの結果より、HRP をカタラーゼを同時に用いた作製を行うことにより、1 段階で液体のコアが存在するマイクロカプセルを作製できることが明らかとなった。すなわち、従来法の半分の工程数により、約半分の時間で同量の細胞を包括可能な中空マイクロカプセルの作製法の開発に成功した。本方法は、ヒト iPS 細胞を包括する

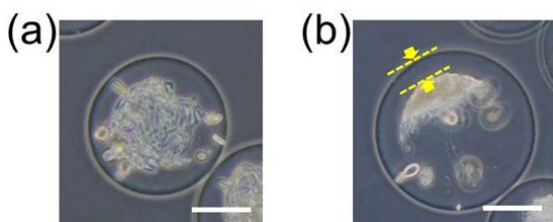


図 2 . (a)内部で大腸菌が増殖したマイクロカプセル, (b)遠心後に大腸菌が集積したマイクロカプセル. Bar: 100  $\mu\text{m}$ .

マイクロカプセルだけでなく、その他の動物細胞にも適用可能であることから、今後、他用途にも検討されていくものと期待される

次いで、中空マイクロカプセルの直径および膜厚制御の可能性に関し検討を行った。その結果、マイクロカプセルの直径は、流動パラフィンの流速により直径 100 ~ 400  $\mu\text{m}$  の範

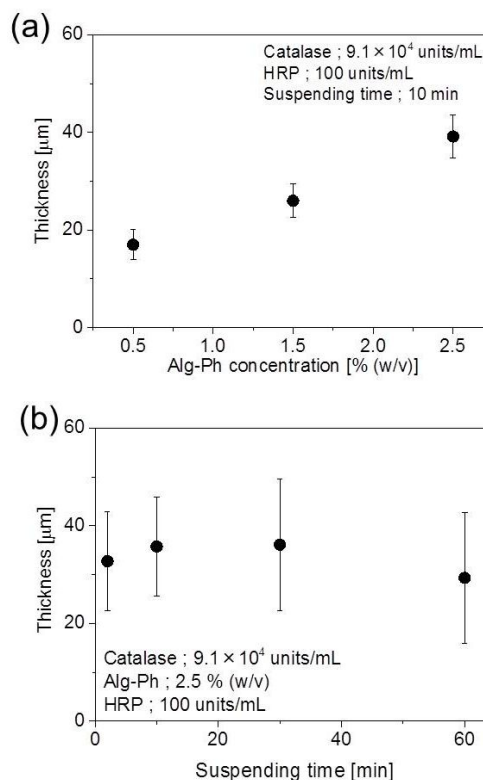


図 3 . (a)Alg-Ph および(b)流動パラフィン中の分散時間を変化させた場合の膜厚変化 .

囲で制御が可能であり、膜厚は、HRP、カタラーゼおよび Alg-Ph 濃度により 10 ~ 40  $\mu\text{m}$  の範囲で制御が可能である一方で、流動パラフィン中での静置時間には依存しないことを明らかにすることができた。

また、物質透過特性に関しては、Alg-Ph 濃度を増加させるほど、ゲル中の高分子密度の増加によると考えられる透過性の低下が確認された。しかし、本研究で細胞の包括に適用した 2.5% の Alg-Ph より作製されるカプセルは、これまで広く動物細胞の包括に用いられてきた未修飾のアルギン酸から得られるゲルと同等の透過性を有しており、細胞包括に適用しても問題がないことを明らかにすることができた。

その他にヒト iPS 細胞を培養するにあたって明らかにしておくべき物性として、膨潤性と強度を調べた。その結果、生理的浸透圧の緩衝液や培養培地中で、強度の低下を引き起こすカプセルの膨張が生じることはなかった。また、Alg-Ph の濃度を 1.5% 以上とすると、人工体液中で 12 時間の振とう実験中ほとんどは壊れない強度であることを明らかとした。

HRP の酵素反応によりゲルを形成させる方法の利点として、フェノール性水酸基を導入できさえすれば多くの材料をカプセル材料として使用可能であることが挙げられる。そこで、Alg-Ph に代わって、カルボキシメチルセルロース誘導体やヒアルロン酸誘導体に関して評価を行い、Alg-Ph と同じように細胞包括中空マイクロカプセルを作製可能であることを明らかにした。

さらに、この方法で作製したマイクロカプセルに包括された HeLa 細胞の生存率は 90% 以上であり、アルギン酸分解酵素であるアルギン酸リアーゼを用いて Alg-Ph ゲル皮膜を分解した後に、マイクロカプセルから回収した細胞を培養皿に播種したところ、通常の継代培養の細胞と同様の増殖挙動を示した。これらの結果より、本作製法は動物細胞に対して極めて穏和であることを確認できた。

物性評価から得られた知見を基に、中空マイクロカプセルをエアリフト型攪拌バイオリアクターへ適用すると、約 90% 以上のマイクロカプセルは 5 日間壊れることなく培養することが可能であり、その内部で細胞が増殖したことから、攪拌バイオリアクターを用いた大量培養への適用が可能であることを見出した。

### (3) 1 段階法による簡便なマイクロカプセルを用いたヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞を包括した後に、マイクロカプセル皮膜を分解して生存率を測定したところ 91% であり、カプセル化直前の生存率 94% と同等の値であった。この結果より、カプセル化工程におけるヒト iPS 細胞への影響が少ないことが明らかとなった。

次に、マイクロカプセル内のヒト iPS 細胞の増殖挙動に関して評価したところ、カプセル化直後に直径約 50  $\mu\text{m}$  であった中空マイクロカプセル内の細胞組織体は、培養日数の経過に伴って増殖し、培養 19 日目において直径が約 120  $\mu\text{m}$  となった (図 4)。この組織体



図 4 成長したヒト iPS 細胞組織体を含むマイクロカプセル。Bar: 100  $\mu\text{m}$ 。

のなかの細胞の生存を評価したところ、培養 10 日目および 19 日目において、死細胞はほとんど存在していなかった。

さらに、マイクロカプセル内で増殖したヒト iPS 細胞の未分化性に関して、未分化マーカーの 1 つである SSEA-4 の発現量を指標に、

フローサイトメーターを用いて解析を行ったところ、培養 10 日目および 19 日目において、SSEA-4 陽性の細胞はそれぞれ 94% および 91% であり、カプセル化前の細胞の陽性比率 (95%) と同等の値であった。これらの結果より、中空マイクロカプセル内で培養して形成した組織体は、内部の細胞まで未分化性を維持した状態であることを明らかにすることができた。

以上の検討により、本研究で開発を行った中空マイクロカプセルのヒト iPS 細胞の未分化培養デバイスとしての有用性を明らかとすることができた。これに加えて、上述したように攪拌培養に適用可能であった結果から、本マイクロカプセルのヒト iPS 細胞大量培養用デバイスとしての有用性を実証することができた。

本デバイスは、本研究で検討を実施した未分化を維持した状態での大量培養だけでなく、大量の細胞からの一括分化誘導への適用など将来的に、ヒト iPS 細胞を用いる再生医療分野において大きな可能性を有していると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Shinji Sakai, Yang Liu, Emma Jane Mah, Masahito Taya: Horseradish peroxidase/catalase-mediated cell-laden alginate-based hydrogel tube production in two-phase coaxial flow of aqueous solutions for filament-like tissues fabrication, 査読有, *Biofabrication* **5** (1), 015012, (2013). Doi: 10.1088/1758-5082/5/1/015012.
2. Yang Liu, Shinji Sakai, Masahito Taya: Impact of the composition of alginate and gelatin derivatives in bio-conjugated hydrogels on the fabrication of cell sheets and spherical tissues with living cell sheaths, 査読有, *Acta Biomaterialia* **9** (5), 6616-6623 (2013). Doi: 10.1016/j.actbio.2013.01.037.
3. Tomoaki Ashida, Shinji Sakai, Masahito Taya: Competing two enzymatic reactions realizing one-step preparation of cell-enclosing duplex microcapsules, 査読有, *Biotechnology Progress*, **29** (6), 1528-1534 (2013). Doi: 10.1002/btpr.1800.
4. Shinji Sakai, Tomoaki Ashida, Shotaro Ogino, Masahito Taya: Horseradish peroxidase-mediated encapsulation of mammalian cells in hydrogel particles by dropping, 査読有, *Journal of Microencapsulation*, **31** (1), 100-104 (2014). Doi: 10.3109/02652048.2013.808281.
5. Tomoaki Ashida, Shinji Sakai, Masahito Taya: Characteristics of duplex

microcapsules prepared from an alginate-derivative polymer via horseradish peroxidase- and catalase-catalyzed reactions, 査読有り, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 印刷中.

6. Tomoaki Ashida, Shinji Sakai, Masahito Taya: Propagation of human iPS cells in alginate-based microcapsules prepared using horseradish peroxidase- and catalase-catalyzed reactions, 査読有り, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 印刷中.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 境慎司, 稲垣仁美, 劉楊, 田谷正仁: 血管内皮細胞層による微小組織体ラッピング法の開発, 第 11 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜 (神奈川) 2012 年 6 月 13 日.
2. 津村美華, 境慎司, 田谷正仁: 酵素架橋フェノール性水酸基導入ゼラチン誘導体ゲルの力学的特性と細孔構造の温度依存性, 日本バイオマテリアル学会 第 7 回関西若手研究発表会, 甲南大学 (兵庫), 2012 年 8 月 2 日.
3. Shinji Sakai, Mika Tsumura, Masahito Taya: Blood glucose-triggered co-enzymatic in situ hydrogelation, The 18th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC), 徳島大学 (徳島), 2012 年 10 月 27 日.
4. Yang Liu, Shinji Sakai, Masahito Taya: Enzymatically conjugated alginate/gelatin hydrogels for tissue engineering application, The 18th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC), 徳島大学 (徳島), 2012 年 10 月 27 日.
5. 境慎司, 津村美華, 駒谷季実子, 田谷正仁: 血糖濃度のグルコースをトリガーとする in situ ヒドロゲル形成法の開発とその応用, 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012, 仙台国際センター (宮城), 2012 年 11 月 26 日.
6. 芦田知亮, 境慎司, 田谷正仁: ワンステップで作製可能な中空カプセルを用いたヒト iPS 細胞培養, 第 12 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜 (神奈川) 2013 年 3 月 22 日.
7. Tomoaki Ashida, Shinji Sakai, Masahito Taya: One-step preparation of cell-enclosing microcapsules with hollow core via competitive enzymatic reactions, *Materials*

in Medicine International Conference, Faenza (Italy) 2013 年 10 月 10 日.

8. Tomoaki Ashida, Shinji Sakai, Masahito Taya: Encapsulation of hiPSCs in duplex microcapsules prepared via enzymatic reactions, XXII International Conference on Bioencapsulation, Bratislava (Slovakia) 2014 年 9 月 18 日.

〔図書〕(計 4 件)

1. Shinji Sakai, Shinji Tanaka, Koei Kawakami, Shigeki Arii: Bioencapsulation of Living Cells for Diverse Medical Applications, pp154-177, Bentham eBOOKS, 2013, June.
2. 境 慎司: 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, 第 2 章 第 3 節, p185-190, (株)技術情報協会 NTS, 2014 年 4 月
3. 境慎司, 田谷正仁: ゲルテクノロジーハンドブック ~機能設計・評価・シミュレーションから製造プロセス・製品化まで, 第 4 章, 第 12 節, p.720-727, NTS, 2014 年 10 月
4. 芦田知亮, 境 慎司, 田谷正仁: 再生医療のための細胞包括マイクロカプセルの開発, 「マイクロ/ナノカプセルの調製, 徐放性制御と応用事例」, pp.247-249, 技術情報協会 2014 年 9 月.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

境 慎司 (SAKAI, Shinji)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授  
研究者番号：20359938

### (2)研究分担者

田谷 正仁 (TAYA, Masahito)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授  
研究者番号：60144127