



Title	培地流れがヒトiPS細胞集塊形状・増殖に及ぼす影響に関する研究
Author(s)	加藤, 雄真
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73546
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

培地流れがヒト iPS 細胞集塊形状・増殖に及ぼす影響
に関する研究

加藤雄真

2019 年 7 月

大阪大学大学院工学研究科

論文要旨

ヒト iPS 細胞は幅広い分化能を持ち、細胞治療やドラッグスクリーニングへの利用が期待される。ヒト iPS 細胞の応用の中でも、分化させた細胞を移植する代表的な治療法では、患者あたり $1\text{-}2 \times 10^9$ cells もの大量の細胞数が必要とされる。そのため、ヒト iPS 細胞を効率良く速やかに増幅することが求められる。本研究では、ヒト iPS 細胞の増幅プロセスを経る上で、液流を伴う操作が行われた時の影響を検討した。

一章では、ヒト iPS 細胞の樹立と実用化に向けた進捗をまとめた。遺伝子導入して得られたヒト iPS 細胞には、不均一性が見られる。また、他家移植治療を行うには、患者に応じた細胞株が必要となり、複数の細胞株のバンキングが進められている。そのため、細胞特性の異なる複数の細胞株が扱われることが想定される。ヒト iPS 細胞を培養できる手法は複数あるが、これらの手法の培養特性に応じて異なる影響が細胞に及ぼされる。高い収率が保たれる手法選択・パラメータ制御・装置設計の展望を図るには、異なる細胞特性と培養特性の関係の理解が必要とされる。特に、多くの場合に細胞集塊が形成される懸濁培養では、細胞株ごとに収率が異なる。しかし、細胞集塊の特徴の理解は十分ではなく、液流を受けた細胞集塊の増殖への影響の機構と、細胞株ごとに異なる集塊の特徴の理解が必要とされる。

二章では、二次元静置培養・三次元静置培養・三次元懸濁培養の異なる 3 つの手法を用いた時の 2 つのヒト iPS 細胞株の増殖を比較した。増殖を比較する際には、播種時からの培養時間に応じて初期・中期・後期に分けて増殖速度が評価し、時間依存的変化を比較した。この時、各培養手法によって、異なる増殖速度の変化が見られた。特に、三次元静置培養と三次元懸濁培養時には、細胞株ごとに顕著な違いが見られた。コラーゲン I の側面への局在が見られシェル構造の ECM が形成された細胞株の集塊では、三次元静置培養時に中期まで増殖速度が高く保たれたものの、後期に低下した。しかし、三次元懸濁培養では、初期から

後期まで増殖速度の低下は見られなかった。それに対して、シェル構造の ECM が形成されなかった細胞株の集塊では、三次元静置培養時には後期まで増殖速度が維持された。しかし、三次元懸濁培養では、初期には増殖したものの中後期にはほとんど増殖しなくなった。そのため、細胞集塊を覆うシェル構造の ECM は、集塊の拡大の妨げになり増殖速度を低下させることが示唆された。一方で、この ECM 構造は液流による細胞への物理的影響を防ぎ、増殖低下を妨げることが示唆された。

三章では、機械を用いた培地交換操作によって、決まった流束を伴うヒト iPS 細胞集塊の培養を行った。機械を用いた培地交換を行って培養することで、手操作の時より、ヒト iPS 細胞集塊の形状は均一であった。細胞集塊の形状は、機械による培地交換時の流束を変えて培養を行った際にも、違いが生じた。そのため、細胞集塊は液流を受けることで変形したと考えられる。細胞集塊の変形は、細胞株に応じて異なった。流束が高い液流を受けても安定した形状を保った細胞株の細胞集塊は、細胞集塊中心部より表面に局在したコラーゲン I の層が観察された。そのため、このような細胞集塊は、表面を覆うシェル構造の ECM によって、液流に対する安定性が向上したことが示唆された。さらに、細胞集塊の変形には、遅発的な特徴が見られた。そのため、細胞集塊は液流を受けた時、表面を覆う ECM が部分的に崩れ、その後に ECM が崩れた部分から細胞が遊走することで丸い形状が変化したことが示唆された。

本論文において、ヒト iPS 細胞集塊の液流に対する安定性は、表面に局在したシェル構造の ECM 形成により左右されることが示唆された。集塊表面に形成される ECM が薄かつた場合、液流を受けることで ECM が崩れ、細胞遊走を経て遅発的に変形する。さらに、この変形と液流による直接の影響で、細胞同士・ECM との接着が失われ、増殖速度が低下す

る。そのため、安定した高効率なヒト iPS 細胞増幅には、適切な ECM 形成の制御が必要とされる。また、機械を用いた安定した操作により、ECM 形成に対応した培養が可能となる。

目次

第一章 序論	1
1.1 ヒト iPS 細胞の樹立と多分化能	1
1.2 ヒト iPS 細胞の利用	3
1.3 ヒト iPS 細胞の増幅培養	6
1.4 ヒト iPS 細胞の接着を介した集塊形成	9
1.5 小括	11
第二章 ヒト iPS 細胞の静置・攪拌培養における増殖特性の比較	13
2.1 背景	13
2.2 実験	15
2.2.1 細胞株と培養条件	15
2.2.2 比較した培養手法	16
2.2.3 増殖性の定量的解析	17
2.2.4 凍結切片の作成と染色	17
2.2.5 再現性	18
2.3 結果	18
2.3.1 二次元静置培養	18
2.3.2 三次元静置培養	20
2.3.3 三次元懸濁培養	22
2.4 考察	24
2.5 小括	28

第三章 培地交換時のピペットイングで生じた液流によるヒト iPS 細胞集塊の変形への影響	
3.1 背景	29
3.2 実験	31
3.2.1 細胞株と培養条件	31
3.2.2 細胞集塊培養	31
3.2.3 細胞集塊形状の定量的解析	32
3.2.4 機械を用いた培地交換操作	33
3.2.5 Time-lapse 觀察	35
3.2.6 凍結切片の作成と染色	35
3.2.7 再現性	36
3.3 結果	36
3.3.1 手操作もしくは機械操作による培地交換を行った際の集塊形状	36
3.3.2 液流の集塊形状への影響	37
3.3.3 細胞集塊内部のコラーゲン I 形成	42
3.4 考察	43
3.5 小括	46
第四章 結言	47
変数一覧	49
略語一覧	50
参考文献	51
本報に関する論文	71

謝辞	72
----------	----

第一章 序論

1.1 ヒト iPS 細胞の樹立と多分化能

iPS 細胞 (Induced pluripotent stem cells, 人工多能性幹細胞) は, Takahashi *et al.* によって, マウス胎児纖維芽細胞に対してレトロウイルスを用いて Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 の遺伝子を導入することによって作成された (Takahashi *et al.*, 2006). その後, ヒト纖維芽細胞に対しても同様の手法によるリプログラミングが行われ, ヒト iPS 細胞が樹立された (Takahashi *et al.*, 2007). 遺伝子導入には, レトロウイルスに限らず, レンチウイルス (Nethercott *et al.*, 2011), アデノウイルス (Zhou *et al.*, 2009), センダイウイルス (Fusaki *et al.*, 2009), piggyBac トランスポゾン／トランスポザーゼシステム (Woltjen *et al.*, 2009), エピソーマルベクター (Yu *et al.*, 2009)など多様な手法を用いてヒト iPS 細胞を作成することができる。しかしヒト iPS 細胞では, マウスの iPS 細胞で見られる着床前エピblast と同様なナイーブな状態とは異なり, 着床後エピblast のプライムな状態が見られる (Takahashi *et al.*, 2015). プライムな状態の細胞はナイーブな状態のものとは異なり, 不均一で異なる分化能を持つため, iPS 細胞樹立の標準化が困難なことが課題として挙げられる (Takahashi *et al.*, 2016). Narshinh *et al.* の報告では, 個々のヒト iPS 細胞とヒト ES 細胞 (Embryonic stem cells, 胚性幹細胞) に対して分化・未分化に関わる 42 の遺伝子発現を分析し比較したところ, iPS 細胞の方が大きなばらつきが見られており (Narshinh *et al.*, 2011), 同じ細胞株の中でも不均一性が見られている。Oct3/4 や Sox2 などの多分化能因子が相互関連した転写因子のサーキットは, ESRR β の発現によって安定化されるが, EpiSC (Epiblast stem cell, エピblast 幹細胞) やヒト iPS 細胞ではこの発現が非常に弱い (Takashima *et al.*, 2015). そのような原因によって, ナイーブな状態のヒト iPS 細胞の獲得が困難になっていると考えられる。ナイーブな状態のヒト iPS 細

胞を樹立する試みも取り組まれており、幾つかのゲノム異常が見られたものの、Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 の発現の促進と特定の培養条件によって、実現している(Kilens *et al.*, 2018).

ヒト iPS 細胞は体を構成する様々な細胞へと分化することができ、これまでに様々なプロトコルが作成されている。心臓領域においては、Zhang *et al.* により従来 ES 細胞の心筋分化誘導に用いられてきた胚様体を形成させる手法により、ヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化が行われた (Zhang *et al.*, 2009)。この時の拍動した胚様体の割合は 10% 以下で分化誘導効率は非常に低かったが (Zhang *et al.*, 2009)，その後、Lian *et al.* によって、心筋分化誘導中の特定の期間に Wnt シグナルが制御されることで、増殖因子を含まない限定培地で 98% にものぼる高い純度の心筋細胞をヒト iPS 細胞から得られた (Lian *et al.*, 2012)。このように高い分化誘導率を得ることができる培養手法が確立されているものの、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞の、細胞の縦横比などの表現型は、成人のものではなく胎児様であり、十分に成熟させることができていないことが課題とされている (Batalov *et al.*, 2015)。遺伝子発現・微細構造・解糖系代謝・電気生理学的特徴などの特徴の成熟細胞との違いを改善するため、低分子試薬の添加・電気的機械的刺激・三次元構造の形成・培養の長期化などの手法を用いることで、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞をより成熟した状態に促す研究が取り組まれている (Machiraju *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2018)。神経領域においては、SMAD シグナルを阻害し神経細胞への分化誘導の高効率化 (Chambers *et al.*, 2009) 等を経て、ヒト iPS 細胞からドーパミン作動性ニューロン・皮質ニューロン・アストロサイトなどの、神経系を構成する多様な細胞を樹立するプロトコルが確立されている (Samoilova *et al.*, 2018)。更に、血液細胞では、ヒト iPS 細胞を、赤血球 (Lapillonne *et al.*, 2010)，樹状細胞やマクロファージ (Choi *et al.*, 2011; Senju *et al.*, 2009; Senju *et al.*, 2011)，T 細胞 (Lei *et al.*, 2009)，B 細胞 (Carpenter *et al.*, 2011) へ

の分化も行われている。他にも、視細胞 (Hirami *et al.*, 2009; Buchholz *et al.*, 2009) や腎細胞 (Taguchi *et al.*, 2014; Naganuma *et al.*, 2019) といった多様な細胞への分化が実現している。

1.2 ヒト iPS 細胞の利用

ヒト iPS 細胞は多様な細胞へ分化できる特徴を持つため、様々な細胞治療薬へ活用できるポテンシャルがある (Karagiannis *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2017)。

iPS 細胞を用いた疾患治療の例として、iPS 細胞から分化させて得られる T 細胞を利用する研究が進められている (Ando *et al.*, 2016; Kawamoto *et al.*, 2018; Sachamitr *et al.*, 2014; Farhood *et al.*, 2019)。T 細胞は、T 細胞受容体 (TCR) を介して癌細胞やウイルス感染細胞を認識し、殺傷することができる。そのため、ヒトの癌細胞で高発現している WT1 (Sugiyama *et al.*, 2001; Oka *et al.*, 2007) や MART-1 等を標的とするように、人為的に TCR 遺伝子を形質導入した T 細胞を、治療に用いることができる (Morgan *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2005)。TCR の代わりに、キメラ抗原受容体 (CAR, Chimeric antigen receptor) を発現させた CAR-T 細胞を用いる治療法も確立され、臨床試験において高い寛解率を示している (Brentjens *et al.*, 2011; Kalos *et al.*, 2012; Sadelain *et al.*, 2017)。このような技術によって、T 細胞は幅広い抗原を標的にし、治療に用いることができる。しかし、ウイルス抗原や癌抗原に長期間晒されないと、エフェクター機能や生存・増殖能が失われるため、効果的な T 細胞を患者から十分量回収することが困難な場合がある (Ando *et al.*, 2016; Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001; Kahan *et al.*, 2019)。そのため、多くの細胞数を *in vitro* で効率良く増やす必要がある。そこで、T 細胞から iPS 細胞を作成した後、細胞増幅を経て、再度 T 細胞へ分化させる研究が進められている (Nishimura *et al.*, 2013; Vizcardo *et al.*, 2013)。この T 細胞由来 iPS 細胞から

作成した T 細胞は、元の T 細胞と同等の細胞障害活性が保たれている (Maeda *et al.*, 2016). さらに、iPS 細胞へのリプログラミングを経て得られた T 細胞は、高い増殖能を持ち、テロメアーゼが延長されている (Nishimura *et al.*, 2013)ため、高い生産性が見込める。そのため、T 細胞を用いた免疫治療において、ヒト iPS 細胞を利用することのメリットは大きい。

他にも、iPS 細胞を移植に用いることで治療効果が示された例や、臨床試験が進められている例が多くある。特に、患者自身の細胞のみでは修復が困難な疾患に対する移植治療を目的として、iPS 細胞由来の網膜細胞・心筋細胞・神経細胞などを用いた研究が進められている。Mandai *et al.* は、iPS 細胞由来網膜細胞を加齢黄斑変性の患者に自家移植を行い、移植した細胞シートは一年後も生着が保たれた (Mandai *et al.*, 2017). Ye *et al.* は、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を心筋梗塞ブタモデルに移植することで、心機能を改善した (Ye *et al.*, 2014). 更に、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞シートの上を大網移植フラップで覆うことで、血管新生が促進され、細胞の生存が保たれた (Kawamura *et al.*, 2013). Kikuchi *et al.* は、パーキンソン病のサルに対して、iPS 細胞由来のドーパミン作動性神経細胞を移植し、6ヶ月間生着していることが確認された (Kikuchi *et al.*, 2011). 現在では、同様の移植治療の臨床試験が進められている (Takahashi *et al.*, 2019; Takahashi *et al.*, 2017). Kobayashi *et al.* は、脊髄損傷を負ったコモンマーモセットへ iPS 細胞由来神経前駆細胞を移植し、運動機能の修復が見られた (Kobayashi *et al.*, 2012).

これらの iPS 細胞由来の分化細胞の移植治療では、医薬品適正製造基準 (GMP, Good manufacturing practice) に則った環境や腫瘍化の評価が必要とされ、自家移植を行った際には患者あたり約 80 万ドルの費用が掛かる (Bravery *et al.*, 2015). 他家移植を行った際には、これらの評価を一括して行えるためコストを削減することができる上、ストックとして保存

することができ移植までの期間を短縮することができる (Shi *et al.*, 2017). しかし、他家移植を行う際には、免疫拒絶の課題を克服する必要がある。免疫細胞は主要組織適合遺伝子複合体 (MHC, Major histocompatibility complex) が提示する抗原を介して、傷害対象の細胞を認識する。MHC は個体ごとに異なっており、MHC 型が適合しない細胞は NK 細胞 (Natural killer cells, ナチュラルキラー細胞) による傷害対象となり免疫拒絶が起こる (Oberg *et al.*, 2004). MHC 遺伝子は 2 種類のハプロタイプを持っている。Morizane *et al.* の報告では、MHC ヘテロ接合体のカニクイザルの脳へ、片方の MHC 型が一致している MHC ホモ接合体のドーパミン作動性ニューロンを同種他家移植した際、免疫拒絶反応を起こさせずに生着させることができた (Morizane *et al.*, 2017). 同様に、Kawamura *et al.* によると、免疫抑制剤を必要としたものの、ほとんど免疫細胞の浸潤が無いまま、MHC ホモ接合の iPS 細胞由来心筋細胞をカニクイザルに他家移植することができた (Kawamura *et al.*, 2016). これらの事例のように、レシピエントの MHC 遺伝子の片方のハプロタイプが一致している MHC ハプロタイプホモの細胞を用いることで、他家移植が行える。ヒトの場合はヒト白血球抗原 (HLA, Human leukocyte antigen) が MHC に相当しているが、日本において、50 株の HLA ホモ iPS 細胞があれば、73% の患者に対して移植治療を行うことができる (75 株だと 80%, 140 株だと 90%) (Okita *et al.*, 2011). 幅広く他家移植を普及するために、これらの HLA ホモ iPS 細胞のバンキングが進められている (Rim *et al.*, 2018). さらに、HLA をノックアウトすることで NK 細胞活性を免れた iPS 細胞が作成可能となる。特に、HLA-C を保持したまま、HLA-A 及び HLA-B の遺伝子を完全に壊した iPS 細胞を用いることで、12 株で 90% にも及ぶ患者に治療を適用できると予測される (Xu *et al.*, 2019).

以上のように、ヒト iPS 細胞は疾患治療に対して幅広く活用されているが、一定の状態の細胞を得ることは困難とされている。さらに、他家移植治療への利用を想定した場合には、複数の iPS 細胞株が用いられることになる。そのため、複数の細胞株間で生じるヒト iPS 細胞の細胞挙動の違いと、それに応じた培養操作の影響に対する理解が必要とされる。

1.3 ヒト iPS 細胞の増幅培養

細胞治療において、効果的な治療を行うためには、一定の細胞数が必要とされる。例えば、典型的な心筋梗塞では 50 g の心筋が損失されており、最低でも $1-2 \times 10^9$ cells の細胞数が必要とされている (Jing *et al.*, 2008; Zweigerdt *et al.*, 2009)。糖尿病における移植治療では、 6×10^5 IE (1 IE は直径 150 μm の臍島 1 つ) の臍島が必要とされるため、移植過程での損失も含めて 1×10^9 cells 以上の β 細胞が必要とされる (Docherty *et al.*, 2007; Lock *et al.*, 2007)。化学療法や放射線治療後に必要となる臍帯血移植では、患者あたり 1.2×10^9 cells の有核細胞が必要とされる (Zweigerdt *et al.*, 2009)。

これらの細胞数を得るために細胞増幅のプロセスを経る必要があるが、主に細胞増幅は、ヒト iPS 細胞が未分化状態であり自己複製能を持っている間に行われる。一般的なプラスチック製の培養面上での培養では、 1350 cells/cm^2 の播種密度で培養開始した細胞を約 100 倍にすることができる (Nakagawa *et al.*, 2014)ため、一度の継代で $1.35 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度まで増殖させることができる。Φ 100 mm dish の場合、培養面積は 55 cm^2 のため、1 dishあたり 7.43×10^6 cells の細胞数を得ることができる。 10^9 cells の細胞数を得るためにには、135 枚ものΦ 100 mm dish を用いることになり、多くの労力・作業時間を要することになる。Tohyama *et al.* は、 632 cm^2 の培養面を 10 層積み重ねて一つにした培養容器を用い、 1×10^6

cells のヒト iPS 細胞を 1.7×10^9 cells にまで増幅させたことを報告している (Tohyama *et al.*, 2017). しかし、広い培養面上に細胞を接着させて増殖を促す培養手法は、均一な培養環境 (pCO₂ など) を形成するために複雑な装置設計が必要とされる。さらに、細胞播種や細胞回収操作を一括して行う事が困難なため、作業効率を高めにくい。そのため、一つの培養容器当たりの培養面積をこれまで以上に拡大することは困難であり、培養装置のスケールアップには適していない。複数の患者が必要とする細胞数を一括して用意するためには、容易にスケールアップできる培養装置を利用することが望ましい。スケールアップが可能であり多能性幹細胞を培養できる装置として、細胞培養バッグを用いた装置 (Wave bioreactor) (Kalmbach *et al.*, 2011; Correia *et al.*, 2014)・回転培養装置 (RWV, Rotating wall vessel) (DiStefano *et al.*, 2018; Consolo *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 1992)・攪拌培養装置 (Correia *et al.*, 2014; Shafa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Olmer *et al.*, 2012; Kempf *et al.*, 2014)・充填層型リアクター・中空糸 (Paccola *et al.*, 2019; Knöspel *et al.*, 2016)・気泡塔型培養装置・エアリフト型培養装置などが挙げられる (Kropp *et al.*, 2017)。これらの培養装置では、培養液中に一定の流れを生じさせており、容器内の培養環境が均一に保たれている。そのため、培養中に細胞が液流を受けることになるものの、スケールアップした装置設計を行いややすい。これらの培養装置を用いた懸濁培養では、一般的に $10^6 - 10^7$ cells/ml の細胞懸濁液を培養できる (Jing *et al.*, 2008) ため、大型の培養容器を用いることで複数の患者に対して利用できる細胞を一括して得られる。また、これらの培養容器・手法に応じて、細胞に対して及ぼされる影響が異なる。そのため、細胞収率を高く保ったまま培養を行うためには、各手法の培養特性を理解し、適した手法の選択やパラメータの制御を行うことが必要とされる。また、異なる手法に応じた培養

特性の違いを理解し、細胞への影響を調べることで、従来よりヒト iPS 細胞の特徴にあった装置設計の展望を図ることができると考えられる。

主流な培養手法として挙げられる攪拌培養装置・RWV (Kropp *et al.*, 2017) のように、細胞懸濁液を攪拌し培養液内での細胞の浮遊を維持した状態で行われる培養では、主に異なる 3 つの細胞形態が形成される。一つ目は、細胞同士が接着することで、細胞のみで形成された集塊の形態を作る (Shafa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Olmer *et al.*, 2012; Kempf *et al.*, 2014; Correia *et al.*, 2014)。集塊が形成された際、そのサイズによって細胞死や分化が引き起こされるために、集塊の分散や合一を適切に促す操作が必要とされる。二つ目は、マイクロキャリア上に細胞を接着させて、複数のマイクロキャリアと細胞が凝集塊を形成した形態を作る (Badenes *et al.*, 2017; Tavassoli *et al.*, 2018)。この手法では、細胞の種類（サイズ・形状）や培養工程（細胞数増幅・分化）に応じて、様々なキャリア（多孔質・非多孔質、材質）が用いられる。三つ目は、ハイドロゲル中に細胞が包み込まれた形態を形成する (Choe *et al.*, 2018; Wilson *et al.*, 2013; Tabata *et al.*, 2014)。幹細胞ニッチの環境を模倣して、特定の生体物質（アルギン酸やヒアルロン酸）がハイドロゲルとして選択され、足場環境を形成することができる。接着細胞であるヒト iPS 細胞は、立体的な培養装置内ではこれらの 3 つの形態を形成している。

このように、ヒト iPS 細胞の細胞増幅のために様々な培養手法が確立されている。それぞれの手法の違いを正確に把握するためには、それぞれの手法に対して、細胞状態に影響する培養特性の違いを理解することが求められる。特に、これらの手法の内スケールアップが可能なものであり主流な培養手法では、細胞は細胞のみでできた集塊やマイクロキャリアとの凝集塊が形成される。また、装置のスケールが大きくなるほど、より大きな液流を受け

ることになる。そのため、安定した細胞増殖を促し効率良く細胞を増幅するためには、培養手法ごとに異なる液流による細胞への影響を理解することが求められる。

1.4 ヒト iPS 細胞の接着を介した集塊形成

ヒト iPS 細胞を樹立するために、体細胞に Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc を導入した際、様々な形状の細胞が得られる (Takahashi *et al.*, 2007)。これらの細胞の中から、Sox2 や Cdx2 といった内在性の遺伝子発現と一緒に、細胞形態を評価することで、iPS 細胞を特定することができる (Wakao *et al.*, 2012)。また、Yu *et al.* の報告では、特定のヒト iPS 細胞集団の中でも、培養面との接着に影響されやすく形状が変化しやすい細胞と、そうではない細胞の、2種類の細胞があることが観察されている。この内、培養面との接着から影響を受けやすい細胞は、不安定だが高い未分化性を持っている (Yu *et al.*, 2018)。以上の例のように、ヒト iPS 細胞の状態は培養面上での形状に反映されている。個々の細胞の形状は、細胞内部のアクトミオシンによる張力と、Cell-ECM 結合・Cell-Cell 結合の広がりによって決まる (Mao *et al.*, 2015)。多能性幹細胞が ECM (Extracellular matrix, 細胞外マトリックス) とインテグリンの安定した相互作用を形成すると、細胞生存や増殖に対して機能をもつ FAK (Focal adhesion kinase) が活性化される (Vitillo *et al.*, 2017)。また、Cell-ECM 結合だけではなく、E-カドヘリンを介した Cell-Cell 結合も同様に細胞生存・自己複製を促している (Xu *et al.*, 2010)。そのため、これらの結合を適切に制御することによって、収率や増殖速度を高く保てると考えられる。これらの細胞接着に基づいた不均一な細胞形状は、iPS 細胞や ES 細胞のみではなく、幅広い細胞に対する機能の理解に用いられており、均一な細胞培養のための評価基準として着目されている (Marklein *et al.*, 2018)。

Cell-ECM 結合・Cell-Cell 結合は細胞状態の維持だけではなく、集塊形成にも必要とされる。Saias *et al.* によると、E-カドヘリン等の細胞間接着を阻害すると、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 の集塊形成が抑制された (Saias *et al.*, 2015)。Redmer *et al.* の報告でも、E-カドヘリンの発現が異なる iPS 細胞を比較すると、発現が高い iPS 細胞のみ集塊を形成できる結果が示されている (Redmer *et al.*, 2011)。また、Zeng *et al.* の報告では、コラーゲン合成の阻害やコラーゲンとインテグリンの相互作用のブロッキングによって、形成される細胞集塊が小さくなる (Zeng *et al.*, 2013)。これらの接着によって細胞集塊が形作られているが、それだけではなく、内部に蓄積された ECM も集塊を物理的に特徴づけ、細胞状態に影響を与えていている。Sachlos *et al.* によると、培養の進行に伴って、ES 細胞の集塊を覆うように、生化合物の集塊内部への拡散輸送を制限する ECM の殻が形成されることが報告されている (Sachlos *et al.*, 2008)。Nath *et al.* の報告では、このような ECM の殻状の構造が形成されることで、内部のヒト iPS 細胞集塊の増殖が阻害されることが示唆されている (Nath *et al.*, 2017)。

このような複数の要素によって、細胞集塊は特徴づけられている。これらの特徴を細胞集塊単位で理解するために、これまで様々な評価手法が用いられている。Guevorkian *et al.* はマウス肉腫細胞株 S180 の集塊表面をマイクロピペットで吸引し、吸引された長さの時間変化を測定し、粘弾性の特徴が細胞集塊にあることが観察された (Guevorkian *et al.*, 2010)。さらに同様の実験で、変形の間に細胞が能動的な収縮を繰り返すことで、パルス状の収縮を伴う変形が生じる特徴が見られた (Guevorkian *et al.*, 2011)。他にも、2枚の平行のプレートを用いて細胞集塊を圧迫し、かけられる力の時間変化を比較することで、細胞集塊の粘弾性を比較する手法も利用されている (Forgacs *et al.*, 1998)。Brodland *et al.* はこの手

法を用いて、かけられる力の変化・集塊形状から細胞質の粘性・細胞と培地の表面張力・細胞とプレートの表面張力・細胞-細胞間の張力を算出し、細胞-細胞間張力のみは細胞の種類に依らず一定の値を示した (Brodland *et al.*, 2009). Gonzalez-Rodriguez *et al.* は、マウス肉腫細胞株 S180 の細胞集塊の E-カドヘリン発現を変化させ、接着面との接着・他の集塊との接着が力を加えることによって剥離する時にかかる力を比較することで、E-カドヘリンの粘性損失への影響を観察した (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2013). Stirbat *et al.* は、胚性癌腫細胞株 F9 の細胞集塊にレオメーターを用いて物理的刺激を与えた実験を行っており、細胞集塊には、それまでに受けてきた刺激に応じて物理的特徴が変化することが分かった (Stirbat *et al.*, 2013).

以上のように様々な手法を用いて細胞集塊の特徴が調べられているが、液流に対する細胞集塊の特徴・挙動の変化については、これまで十分に理解されていない。特に、スケールアップした懸濁培養装置内では液流による影響を強く受けることになるため、この特徴を評価し細胞接着・集塊形成が保たれる培養が必要とされる。これらの細胞特性と培養特性の関係を調べるために、本研究では、液流による細胞集塊に対する影響を評価した。

1.5 小括

ヒト iPS 細胞は幅広い分化能を持ち、医療や研究への利用に対するポテンシャルが大きいが、細胞株や個々の細胞ごとに細胞状態が不均一である。液流を伴う培養環境において、効率良くヒト iPS 細胞を増やすためには、細胞の接着を維持したまま増殖を促す培養環境を整えることが求められる。しかし、各細胞株によって形成される集塊の特徴も異なる

り，液流を受けた時の増殖にも違いがある。そのため，細胞株ごとに異なる集塊の構造に対する液流の影響を調べ，細胞特性と培養特性の関係を理解する必要がある。

第二章 ヒト iPS 細胞の静置・攪拌培養における増殖特性の比較

2.1 背景

攪拌培養装置 (Correia *et al.*, 2014; Shafa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Olmer *et al.*, 2012; Kempf *et al.*, 2014) や中空糸膜 (Paccola Mesquita *et al.*, 2019; Knöspel *et al.*, 2016) のように、これまで種々の培養装置が用いたヒト iPS 細胞の培養が行われている。Wang *et al.* の報告では、ヒト iPS 細胞集塊がスピナーフラスコ内で懸濁培養され、測定された細胞濃度の変化から、攪拌速度と集塊分散間隔の最適化が行われている (Wang *et al.*, 2013)。また Meng *et al.* による報告では更に多くの条件検討が行われており、スピナーフラスコ内でヒト iPS 細胞集塊が懸濁培養され、播種時の集塊形成状態・播種細胞濃度・集塊サイズ・攪拌速度・pH・Y-27632 濃度などの培養環境に応じた細胞収率が比較され、細胞增幅培養の最適化が行われている (Meng *et al.*, 2017)。Kwok *et al.* によって報告されたヒト iPS 細胞の懸濁培養では、培地量・培地交換量が最適化されたプロトコルが用いられており、培地量あたりに得られる細胞数が増加している (Kwok *et al.*, 2018)。Gupta *et al.* の研究では、マイクロキャリア上でマウス iPS 細胞の懸濁培養が行われており、マイクロキャリアの維持と細胞増殖を保った培養には細かい攪拌速度の調整が必要になることが述べられている (Gupta *et al.*, 2016)。

Paccola *et al.* によって行われた中空糸膜上のヒト iPS 細胞の拡大培養では、異なる ECM によってコート処理した時の増殖の違いから、適した ECM が選択されている (Paccola Mesquita *et al.*, 2019)。以上のように、各培養手法において効率良くヒト iPS 細胞数を増幅するため、パラメータ設定に応じた細胞収率の比較が行われている。しかし、効率良く目的細胞を得ることができる細胞製造プロセスの設計には、各培養手法のパラメータだけではなく、異なる培養手法の比較も必要となる。

また、これらのヒト iPS 細胞の培養では細胞接着が形成され、コロニーや細胞集塊を作った状態での増殖が促される。そのため、培養日数の経過に伴ってコロニーや細胞集塊のサイズが拡大する。複数の研究で、コロニー・細胞集塊のサイズに依存した、細胞状態の違いが着目されている。Wu *et al.* (2014)の報告では、懸濁培養条件の場合の ES 細胞集塊内部へ浸透した酸素濃度の局在性が比較され、集塊側面部から遠い場所に位置する細胞は低酸素状態にあることが示されている。Bauwens *et al.* の報告では、マイクロパターン化したマトリゲル上に細胞を接着させることで決まったサイズのヒト ES 細胞のコロニーもしくは細胞集塊が形成されると、コロニーや細胞集塊の分化誘導時の遺伝子発現がサイズに応じて変化することが観察されている (Bauwens *et al.*, 2008)。Nath *et al.* によると、細胞集塊当たりに含まれる細胞数に応じて、増殖速度が異なることが報告されている (Nath *et al.*, 2017)。そのため、コロニーや細胞集塊が形成される培養手法では、培養時間の経過に応じて増殖速度の変化が見られ、各培養手法に応じて異なる増殖速度変化の傾向が見られると推測される。しかし、上述した研究では、細胞濃度の変化や最終的な細胞収率しか求められておらず、細胞状態の速度論的な比較はほとんど行われていない。

そのため、本章において、細胞を播種してからの培養時期に応じた増殖速度を算出した。得られた増殖速度の変化から、二次元静置培養・三次元静置培養・三次元懸濁培養の 3 つの培養手法を比較し、各培養手法を特徴化した。

2.2 実験

2.2.1 細胞株と培養条件

本研究で用いた Tic 株と 253G1 株のヒト iPS 細胞は、それぞれ JCRB 細胞バンク (JCRB Cell Bank, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) と理研バイオリソース研究センター (Riken BRC, Riken Bioresource Research Center) のものを用いた。細胞は、ラミニン 511-E8 フラグメント (iMatrix-511; Nippi, Kyoto, Japan) でコートされた ϕ 100 mm dish 内で、ヒト iPS 細胞用培地 (mTeSR1TM medium; StemCell Technologies, Canada) を用い、37°C, 5%CO₂ の環境下で未分化維持培養した。培養中、一日おきに培地交換を行いながら 4 日間の培養を続けた後、80%から 90% のコンフルエントに達するまで細胞が増殖した時に、継代操作を行った。継代操作では、まず培養を終えた細胞は、5 mM の濃度でエチレンジアミン四酢酸 (EDTA; Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を溶解した PBS (Phosphate buffered salts, リン酸緩衝生理食塩水) に、10 μM の ROCK (Rho-associated protein kinase, Rho キナーゼ) 阻害剤 (Y27632; Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を加えた溶液により、7 分間室温で処理した。その後、10 μM の ROCK 阻害剤を含む細胞剥離液 (TrypLE selectTM; Invitrogen, Waltham, MA, USA) を加えて 7 分間室温で処理することで、細胞が培養面から剥離した。回収された細胞は、細胞同士の接着を持たないようにピペッティング操作により単分散化し、再び iMatrix-511 でコートされた ϕ 100 mm dish に 1.00 × 10⁴ cells/cm² の細胞密度で播種し培養した。

2.2.2 比較した培養手法

本章における実験では、二次元静置培養・三次元静置培養・三次元懸濁培養の三種類の培養を行い、比較した。

二次元静置培養では、iMatrix-511によりコート処理された培養容器に、単分散状態の細胞が 1.00×10^4 cells/cm² の細胞濃度で播種した。播種時は、ROCK 阻害剤を含んだ mTeSR1 培地中で培養した。その後、24 h 毎に ROCK 阻害剤を含まない mTeSR1 培地で使用済み培地が交換し、新鮮な培地環境が保った。

三次元静置培養では、細胞が接着しないようにポリメタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (Sigma-Aldrich, MO, USA) でコート処理したマルチディンプルプレート (BWV-400P; Kuraray Co., Japan) に、単分散状態の細胞が播種した。プレート上にある複数のディンプル内には各 200 cells の細胞が入るように、 1.00×10^5 cells/ml の細胞濃度で細胞が播種した。細胞を播種した時は、ROCK 阻害剤を含む mTeSR1 培地中で細胞を培養し、その後、24 h 毎に ROCK 阻害剤を含まない mTeSR1 培地により培養用地中の培地を交換した。96 h の培養を経た時、回収した細胞集塊の凍結切片を作成した後、蛍光免疫染色に用いた。

三次元懸濁培養では、従来行われた培養と同様に、30 ml シングルユースバイオリアクター (BWV-S03A, Able Co., Tokyo) 内に単分散状態の細胞の懸濁液を加え、55 rpm で攪拌し続けながら培養した (Narita *et al.*, 2017; Arauchi *et al.*, 2017; Matsuura *et al.*, 2012)。培養開始時は、 1.00×10^5 cells/ml の細胞濃度になるよう細胞懸濁液を調整した。また播種直後からは、細胞を ROCK 阻害剤を含む mTeSR1 培地中で培養した。その後、培養容器内の培地を、24 h ごとに ROCK 阻害剤を含まない mTeSR1 培地により新鮮な培地と交換した。

2.2.3 増殖性の定量的解析

各培養において、培養時間、 $t = 24, 48, 72, 96$ h に細胞を回収し单分散状態にした後、TC20™ 自動セルカウンター (TC20, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) を用いて細胞濃度、 X_t (cells/ml)を測定した。二次元静置培養における細胞の单分散化は、継代時と同様の操作によって行った。三次元静置培養・三次元懸濁培養では、細胞集塊を回収した後、10 μM の ROCK 阻害剤を含む Accumax (Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA, USA) を用いて酵素処理することで、細胞同士が接着を持たない单分散状態にした。測定した細胞濃度、 X_t (cells/ml)を用いて、培養初期 ($t=24$ h) 培養中期 ($t=48$ h) 培養後期 ($t=72$ h) における 24 h の間 ($\Delta t = 24$ h) の見かけの比増殖速度を以下の式により算出した。

$$\mu^{\text{app}} = \frac{\ln(X_{t+\Delta t}/X_t)}{\Delta t}$$

2.2.4 凍結切片の作成と染色

Tic 株と 253G1 株の細胞集塊を 96 h の三次元静置培養を行った後回収し、凍結組織切片作成用包埋剤 (OCT, Tissue-Tek; Sakura FineTek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) に沈めた後、液体窒素で凍結した。凍結したサンプルはクライオスタッフ (Leica CM1850, Wetzlar, Germany) を用いて、厚さ 10 μm の切片にした。その後、切片を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako Pure Chemical Industries, Japan) で 10 min 処理し固定化した。PBS を用いてサンプルを洗浄した後、非イオン系界面活性剤である Triton X-100 (Wako Pure Chemical Industries, Japan) を 0.5% の濃度で PBS に希釈した溶液で 5 min 処理することで、生体膜を可溶化した。さらに、10% のブロックエースとポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween®20, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) をミリ Q 水で希釈した溶液を用いて再度サンプルを洗浄

した後、10%のブロックエース（DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan）を含む PBS で処理することでブロッキングした。その後、TBS を用いて洗浄した切片を、コラーゲン I に対する一次抗体（Abcam, Cambridge, MA, UK）を用いて 4°C で一晩処理した。ブロッキング剤と Tween20 をミリ Q 水で希釈した溶液、及び、TBS（Tris-buffered saline, トリス緩衝生理食塩水）を用いてサンプルを洗浄した後、Alexa Fluor488 標識二次抗体（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）で 60 min 処理した。TBS により切片を洗浄した後、PBS に希釈した DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）で 20 min 浸し核染色した。最後に PBS でサンプルを洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡（FV-1000; Olympus, Tokyo, Japan）を用いて観察した。

2.2.5 再現性

各培養条件に対して 3 回の実験を行い、再現性を確認した。各実験データは平均値±標準誤差 (SE) の値で示した。ステューデント *t* 検定により有意差を確認し、 $P < 0.01$, $P < 0.05$ のものに有意差が見られたものとしている。

2.3 結果

2.3.1 二次元静置培養

二次元静置培養における細胞形状と増殖を比較するため、2 つの細胞株（Tic 株・253G1 株）のヒト iPS 細胞がラミニン 511 フラグメントでコート処理された培養面上で 96 h 培養された。どちらの細胞株でも、細胞は $t = 24$ h に培養面上に広がっていた（図 1）。培養面上で、細胞はコロニーを形成した状態で、次第に単層のコンフルエンスに達していった。2 つ

の細胞株の細胞密度は培養時間と共に増加し, $t = 96$ h には, Tic 株では $(1.25 \pm 0.18) \times 10^4$ cells/cm², 253G1 株では $(1.01 \pm 0.06) \times 10^4$ cells/cm²に達した (図 2). 2 つの細胞株の細胞密度の変化に違いは見られなかったが, 培養初期・中期・後期における μ^{app} の値を比較すると,

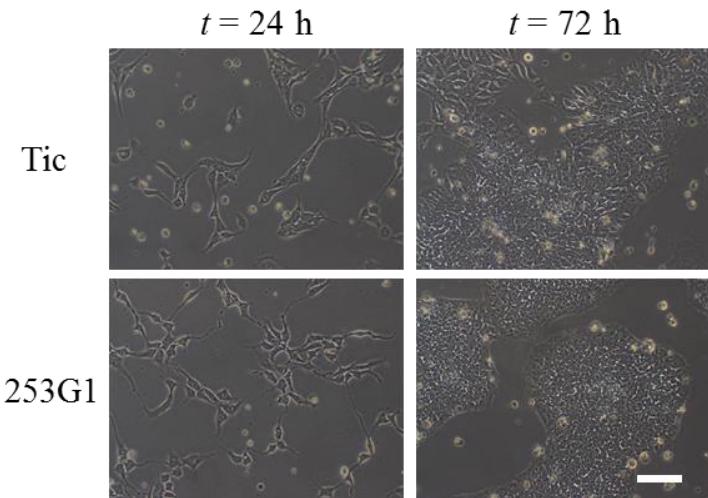


図 1 二次元静置培養時の $t = 24, 72$ h における 2 つのヒト iPS 細胞株 (Tic 株, 253G1 株)

のコロニー形成. スケールバー : 100 μm

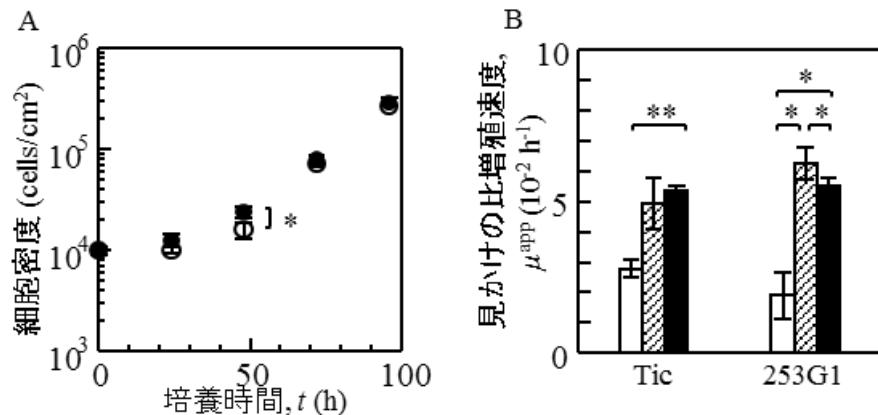


図 2 二次元静置培養時の 2 つのヒト iPS 細胞株 (Tic 株, 253G1 株) の増殖. 培養初期・中期・後期における (A) 細胞密度と (B) 見かけの比増殖速度, μ^{app} (h^{-1}). 有意差はステューデント t 検定により分析した; * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ ($n = 3$ per culture). エラーバーは標準偏差を示す. 黒丸と白丸はそれぞれ Tic 株と 253G1 株を示し, 白・斜線・黒棒はそれぞれ培養初期・中期・後期のデータを示す.

異なる増殖傾向が見られた。Tic 株では、 μ^{app} は培養時間の経過に伴い培養後期まで、次第に増加し、 $(5.36 \pm 0.13) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ まで達した。一方で、253G1 株では、培養中期まで増殖速度が増加し、 $(6.27 \pm 0.53) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ になったが、その後、培養後期に $(5.51 \pm 0.28) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ に下がった。

2.3.2 三次元静置培養

三次元静置培養における細胞集塊の形態と増殖を比較するため、ヒト iPS 細胞が単分散化し、マルチディンプルプレートに $1.00 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ の細胞濃度で播種した。 $t = 24 \text{ h}$ には単分散状態の細胞から集塊が形成され、その後の培養を経てサイズが拡大した（図 3）。2 つの細胞株の細胞集塊は均一に丸く、 $t = 96 \text{ h}$ には集塊形状への影響は見られなかった。 $t = 96 \text{ h}$ では細胞濃度に違いは見られなかったが、増殖速度の変化には細胞株間の違いが生じた（図 4）。Tic 株の $\mu^{app} (\text{h}^{-1})$ の値は培養初期・中期の間維持されたが、培養後期には $(1.81 \pm 0.16) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ に減少した。一方で、253G1 株の $\mu^{app} (\text{h}^{-1})$ は 96 h の培養の中で維持された。

また、コラーゲン I の染色でも細胞株間の違いが見られた。253G1 株の細胞集塊全体にわたってコラーゲン I が見られた。その一方で、Tic 株の細胞集塊では、集塊表層に局在的にコラーゲン I が蓄積していた（図 5）。

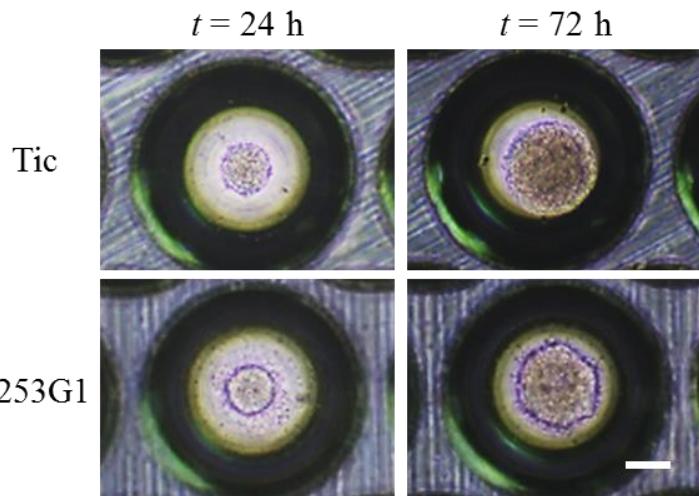


図3 三次元静置培養時の $t = 24, 72\text{ h}$ における 2 つのヒト iPS 細胞株 (Tic 株, 253G1 株) のコロニー形成 スケールバー : $100\text{ }\mu\text{m}$

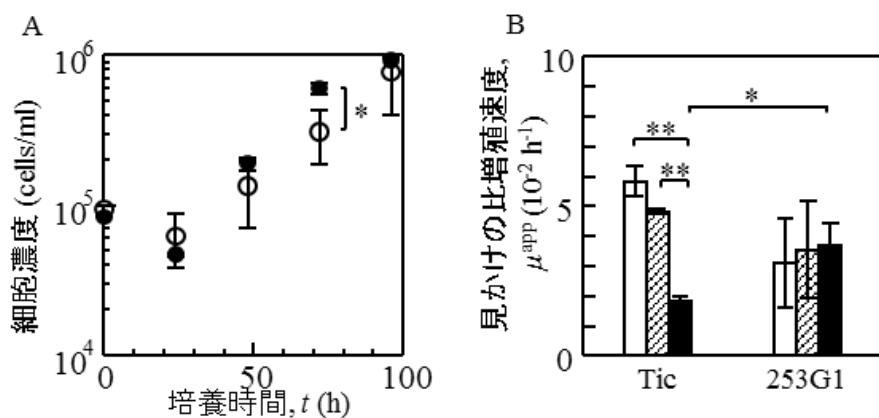


図4 三次元静置培養時の 2 つのヒト iPS 細胞株 (Tic 株, 253G1 株) の増殖. 培養初期・中期・後期における (A) 細胞密度と (B) 見かけの比増殖速度, $\mu_{\text{app}} (\text{h}^{-1})$. 有意差はステューデント t 検定により分析した; $*P < 0.01$, $**P < 0.05$ ($n = 3$ per culture). エラーバーは標準偏差を示す. 黒丸と白丸はそれぞれ Tic 株と 253G1 株を示し, 白・斜線・黒棒はそれぞれ培養初期・中期・後期のデータを示す.

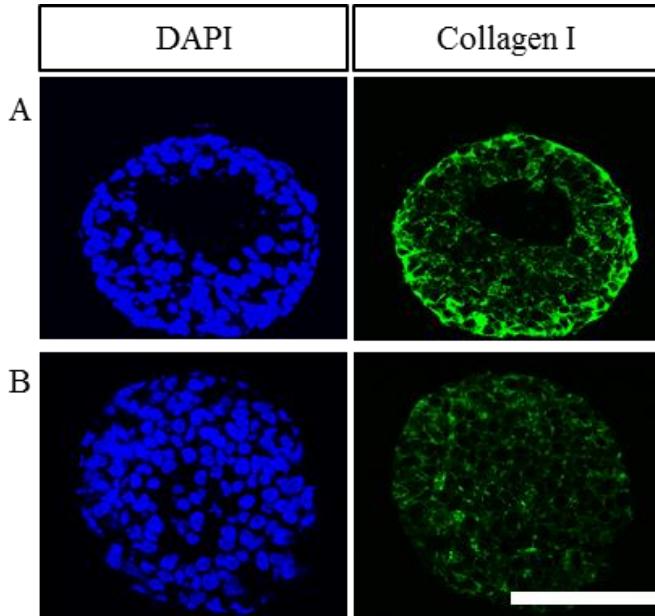


図 5 (A) Tic 株と (B) 253G1 株のヒト iPS 細胞集塊中のコラーゲン I (緑) の免疫染色。細胞は三次元静置培養で培養したものを染色している。細胞の核は DAPI (青) によって染色している。スケールバー : 100 μm

2.3.3 三次元懸濁培養

三次元懸濁培養におけるヒト iPS 細胞の細胞形態と増殖を比較するため、単分散化された細胞が 30 ml スケールのバイオリアクターに播種した。 $t=24 \text{ h}$ には細胞が集塊を形成し、培養を経て次第にサイズが拡大した(図 6)。 $t=96 \text{ h}$ において、253G1 株と比較して、Tic 株の細胞集塊は大きく丸かった。Tic 株の細胞集塊は培養中に形状が保たれたが、培養終了時には不均一なサイズであった。一方で、253G1 株の細胞集塊は形が崩れていた。 $t=24 \text{ h}$ において、細胞濃度に細胞株間の違いが見られず、Tic 株の細胞濃度は $(6.94 \pm 0.17) \times 10^4 \text{ cells/ml}$ 、253G1 株の細胞濃度は $(5.64 \pm 1.18) \times 10^4 \text{ cells/ml}$ であった(図 7)。また、 $t=96 \text{ h}$ においても細胞濃度に細胞株間の有意な差は見られなかった。増殖速度の変化を比較したところ、Tic 株の $\mu^{\text{app}} (\text{h}^{-1})$ は培養を通して維持された。しかし 253G1 株の場合、 $\mu^{\text{app}} (\text{h}^{-1})$ は培養初期には

Tic 株との有意な差は見られなかつたが、その後培養後期には $(0.85 \pm 0.71) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ まで減少した。

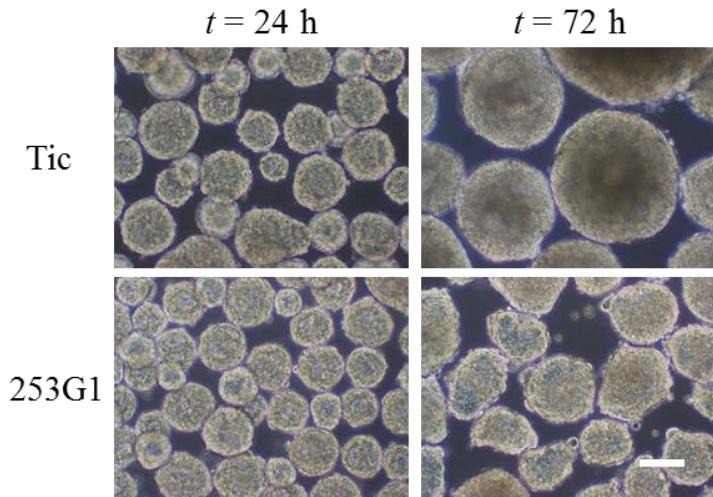


図 6 三次元懸濁培養時の $t = 24, 72 \text{ h}$ における 2 つのヒト iPS 細胞株 (Tic 株, 253G1 株) のコロニー形成。スケールバー : $100 \mu\text{m}$

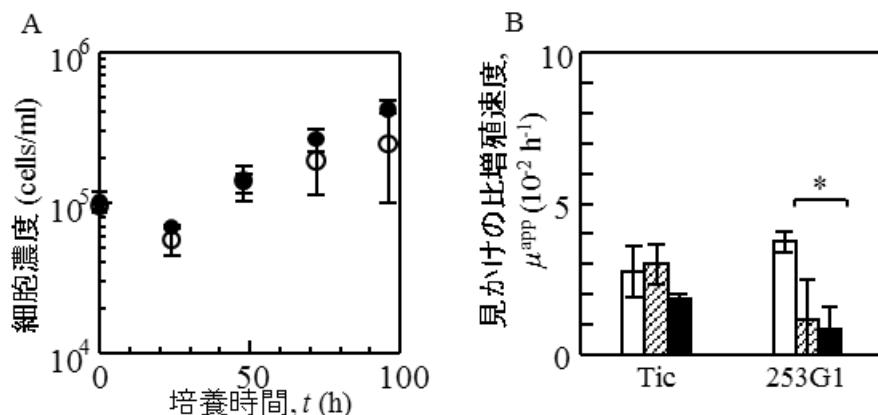


図 7 三次元懸濁培養時の 2 つのヒト iPS 細胞株 (Tic 株, 253G1 株) の増殖。培養初期・中期・後期における (A) 細胞密度と (B) 見かけの比増殖速度, μ_{app} (h^{-1})。有意差はステューデント t 検定により分析した; * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ ($n = 3$ per culture)。エラーバーは標準偏差を示す。黒丸と白丸はそれぞれ Tic 株と 253G1 株を示し、白・斜線・黒棒はそれぞれ培養初期・中期・後期のデータを示す。

2.4 考察

大スケールでの多能性幹細胞の培養では、安定した細胞増殖を促す培養が難しく、細胞製造の効率性を高く保った培養プロセスの設計の障壁となっている (Wang *et al.*, 2013; Otsuji *et al.*, 2014)。懸濁環境下では、攪拌操作で生じたシェアストレスが細胞へ加わることで増殖状態が変化することが、培養効率に影響する。これまで攪拌速度が異なる懸濁環境下での集塊形成に着目された研究は行われているが (Wang *et al.*, 2013)，静置環境下と懸濁環境下におけるヒト iPS 細胞の増殖能は比較されていない。本章では、このような培養環境が異なる細胞增幅培養手法を特徴化するため、3 つの培養手法に着目し、増殖挙動が比較された。細胞により形成された集塊は複雑な構造であり、網羅的に比較することは困難であるが、細胞一細胞間接着・細胞一基質間接着・細胞遊走といった細胞挙動によって強く制御されている (Kim *et al.*, 2018)。これらの集塊形成過程や細胞挙動に対して影響する主要な培養環境の制御因子が特定されることで、高効率に未分化状細胞の細胞增幅を行える、合理的な培養手法を設計することができる。

本章では、懸濁環境下でしっかりと集塊を形成し増殖を維持できる細胞株と、そのような集塊を形成できない細胞株の、異なる挙動を示す細胞株があることが示された。静置培養と懸濁培養における増殖傾向の違いを理解するため、2 つの細胞株を比較した。2 つの細胞株は集塊を形成した時、二次元培養では見られなかったような、異なる増殖の傾向が見られた。さらに、集塊内部に形成された ECM も細胞株ごとに異なっていた。これらの実験結果に基づいて、図 8 に静置条件下と懸濁条件下において形成された集塊と増殖の変化を図示した。これまで行われたヒト iPS 細胞の三次元懸濁培養でも、攪拌リアクターの攪拌速度に依存して、細胞集塊のサイズと増殖が異なっており (Wang *et al.*, 2013)，液流による増殖速

度への影響があること示されている。本章で見られた実験結果でも、細胞増殖を定量的に比較することで、三次元懸濁培養よりも三次元静置培養において、高い増殖速度が観察された（図 4,7）。2つの培養手法の増殖速度の違いは、コラーゲン I の染色実験により示された集塊内部で ECM が全般的に蓄積した 253G1 株（図 5）において、より顕著に見られた。Tic 株では、253G1 株とは異なり、細胞集塊側面付近にコラーゲン I が局在していた。細胞が集塊を形成した時、培養時間の経過に伴い ECM が集塊側面に蓄積し、生化学物質の拡散を妨げ

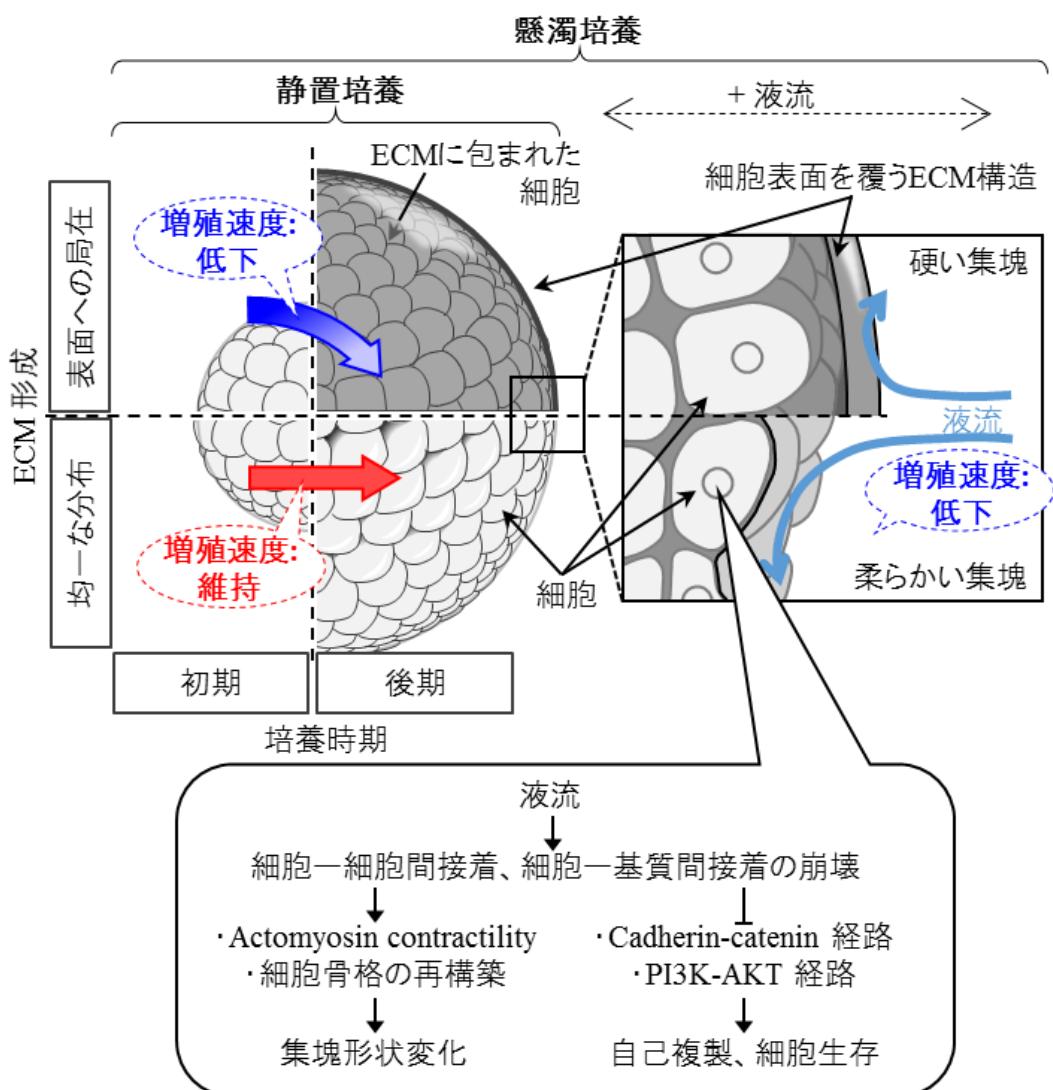


図 8 三次元静置培養・三次元懸濁培養時に、細胞により生成された ECM が細胞増殖の主要な制御因子として働くメカニズムの概念図。

るシェル構造の ECM が形成され (Sachlos *et al.*, 2008), この時にも ECM の局在性が見られている。そのため, Tic 株の細胞集塊表面は ECM で覆われており, シェル構造が形成されていたと考えられる。2 つの細胞株間で見られた ECM 形成と増殖の違いから, 静置条件下では, 表面を覆う ECM によって集塊の拡大が妨げられ, 増殖速度が低下したことが示唆される。また, シェル構造の ECM によって, 細胞は液流によって受ける物理的刺激から守られることが示唆される。

2 つの細胞株間には, 増殖速度のみではなく, 集塊形状の違いも見られた. Moreira *et al.* の報告では, 仔ハムスター腎臓細胞 (BHK 細胞) 集塊がスピナーフラスコ内で培養された時, 搅拌の液流によって細胞集塊の崩れと合一が生じるため, 液流の制御によって細胞集塊のサイズがコントロールできることが示唆されている (Moreira *et al.*, 1995). また, Papantoniou *et al.* によって, 毛細管中の液流によって, 酵素処理を経ることなく, ES 細胞の神経外胚葉分化で形成される細胞集塊を崩すことは報告されている (Papantoniou *et al.*, 2011). これらの研究結果から, 液流によって細胞集塊の崩壊の影響があることが明らかにされている。しっかりとしたシェル構造が形成されていない 253G1 株細胞集塊は, 液流によって ECM の構造が崩れやすく, 集塊全体の形状も崩れやすかったと考えられる。そのため, 253G1 株の細胞集塊は, 静置培養では丸かったが, 懸濁環境下では異なる形状であった. Spencer *et al.* によると, E カドヘリン中和抗体によって処理された ES 細胞のアクチン骨格の局在性が変化する様子から, E カドヘリン依存の細胞間相互作用によって, 細胞表層骨格の再構築が安定化することが報告されている (Spencer *et al.*, 2007). また, 同様に, 細胞が接着する ECM の特徴によっても細胞骨格の再構築が促される (Ambriz *et al.*, 2018; Halder *et al.*, 2012). そのため, 液流によって接着を失った細胞は, 細胞骨格上で

働くアクトミオシン活性も変化していると考えられる。細胞間接着・アクトミオシン活性は細胞集塊形成に影響しており (Saias *et al.*, 2015), これらの細胞挙動変化によって、細胞自身の動きによっても集塊が変形したことが示唆される。この変形の過程で失われた細胞の細胞－細胞間接着と ECM との接着は、細胞の増殖と関連していることが示唆されている。E カドヘリン依存の細胞－細胞間接着と、細胞が合成した ECM とのインテグリン依存の接着は、カドヘリン－カテニン経路とホスホイノシチド 3-キナーゼ (PI3K) -AKT シグナル経路を促進している (Vitillo *et al.*, 2016; Vitillo *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2012)ため、これらの接着が失われることで、増殖能低下やアポトーシスが生じる。本章で見られた液流による細胞の増殖速度低下の影響は、これらのシグナルの変化を介して生じたものであることが示唆される。そのため、増殖速度を維持した培養を行うためには、集塊内部で細胞により合成され蓄積した ECM の変化による、集塊変形のメカニズムの理解が重要となる。2 つの細胞株の集塊形状の違いから、これらの現象に対してより詳しく調べることが、静置条件下と懸濁条件下における、ヒト iPS 細胞集塊の増殖傾向の違いを理解するために必要とされることが示唆される。

本章でまとめた実験結果のように、静置条件及び懸濁条件のヒト iPS 細胞培養における増殖速度の時間依存的評価は、細胞が集塊を形成した時の増殖能の理解に対する有効なアプローチになる。細胞集塊の増殖能に対して、さらに理解を深めることで、効率良く低コストで細胞を培養できるスケールアップが可能な懸濁培養手法を実用化できる可能性がある。本章で示唆されたように、細胞集塊内部では細胞同士の相互作用と ECM との相互作用の繊細なバランスが、細胞増殖と関連づいており、これらの相互作用を適切に制御することで、高い効率性を維持した細胞製造のスケールアップが実現されると考えられる。

2.5 小括

2つのヒト iPS 細胞株を用いることで、静置環境下と懸濁環境下における三次元培養で時間依存的な増殖速度の変化に違いが見られた。2次元培養では細胞株間に増殖速度の変化に違いは見られなかったが、三次元懸濁培養では、2つの細胞株で集塊形状と増殖能に顕著な違いが生じた。本章の実験結果から、ヒト iPS 細胞の増殖を促す三次元懸濁培養は、三次元静置培養より、細胞製造プロセスに悪影響を及ぼし得る可能性があり、大スケールでの製造プロセスにおいて懸濁培養手法がなぜ細胞製造効率の低下と関連づいているのか説明された。

第三章 培地交換時のピペットイングで生じた液流によるヒト iPS 細胞集塊の変形への影響

3.1 背景

ヒト iPS 細胞を中心とした動物細胞が移植治療に用いられるためには、大量の細胞数が必要とされる(Jing *et al.*, 2008; Zweigerdt *et al.*, 2009; Docherty *et al.*, 2007; Lock *et al.*, 2007). 大量の細胞を培養することを目的とした時、培養装置のスケールアップだけではなく、培養工程を機械化する研究も行われている。Thomas *et al.* の報告では、完全に機械によって培養を行える装置である CompacT SelecT 培養装置が用いて、90 本の T175 フラスコ内での ES 細胞培養が一括して行われ、数継代の間に増殖能・未分化状態・分化能・核型を保ったまま大量の ES 細胞が培養されている (Thomas *et al.*, 2009)。同様に、Terstegge *et al.* によても、播種・培地交換・増殖因子添加を機械的に行える装置 Cell^{host} を用いることで、ES 細胞の未分化状態を保った培養が行われている (Terstegge *et al.*, 2007)。また Konagaya *et al.* によって、培養工程が完全に機械化され、フィーダー上のヒト iPS 細胞の 60 日間にわたる未分化状態を維持した培養と、ドーパミン作動性神経細胞・臍細胞・三胚葉への分化誘導が行われたことが報告されている (Konagaya *et al.*, 2015)。Paull *et al.* によると、リプログラミング前の細胞培養・リプログラミング・iPS 細胞の選別・iPS 細胞の培養・分化に至るまでの工程が完全に機械化されることによって、手操作で得られたヒト iPS 細胞より、均一な遺伝子発現の細胞が得られたことが報告されている (Paull *et al.*, 2015)。さらに、Matsumoto *et al.* によって、閉鎖系の培養システム内で機械化された操作によって iPS 細胞由来の RPE 細胞 (Retinal pigment epithelial, 網膜色素上皮細胞) シートが作成され、手操作で行った時と形態的・生物学的に同様の質を持つ細胞シートが得られたことが報告された (Matsumoto *et al.*, 2019)。他

にも機械化された培養工程により、ヒト心筋幹細胞の培養も行われている (Kami *et al.*, 2013).

これらの研究のように、コンタミネーションのリスク・技術者のスキルの差・操作の不安定性を抑えて大量の細胞を培養するために、細胞培養の機械化が進められている。

ヒト iPS 細胞の集塊形成は、一章でまとめた通り懸濁培養の代表的な手法の一つとして取り入れられている。しかし、ヒト iPS 細胞の集塊形成は懸濁環境下でのみ促される現象ではない。ヒト iPS 細胞の心筋細胞 (Zwi *et al.*, 2009; Pesl *et al.*, 2014) や神経細胞 (Yuan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2016) などへの分化では、分化誘導過程で細胞集塊が形成される手法もある。細胞集塊は、サイズによって内部の生物質の拡散が変化する (Sachlos *et al.*, 2008)ため、分化誘導効率を高く保つには均一なサイズの細胞集塊を形成する必要がある。マルチウェルプレート (Zhang *et al.*, 2013) やマイクロパターンプレート (Pesl *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2016) 内における静置条件下で、各ウェルやディンプルあたりに一定の細胞数が播種すると、均一なサイズの細胞集塊の形成が可能となる。これらの培養容器を用いることで細胞集塊のサイズを均一にすることができるものの、手操作では不安定な培養操作が行われ、細胞集塊の質の均一性が損なわれると考えられる。そのため、ヒト iPS 細胞集塊の培養時にも、機械を用いた培養操作が必要とされると考えられる。しかし、培養面上に接着した細胞に対する培養操作は機械化されているものの (Konagaya *et al.*, 2015; Matsumoto *et al.*, 2019; Kami *et al.*, 2013)，機械を用いた自動的なヒト iPS 細胞集塊の培養は発表されていない。

本研究では、マルチウェルプレート内で形成されたヒト iPS 細胞集塊を、機械操作によって培地交換を行う事で培養した。それによって得られた細胞集塊の投影写真の真円度を、手操作によって培養して得られた細胞集塊と比較し、細胞集塊の形状の均一性を評価した。

さらに、機械操作によって異なる流束の培地交換を行う事で、培養操作時に生じる液流の影響を調べた。

3.2 実験

3.2.1 細胞株と培養条件

本研究で用いた 1383D2 株と Tic 株のヒト iPS 細胞は、それぞれ京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA, Center for iPS Cell Research and Application) (Nakagawa *et al.*, 2014) と JCRB 細胞バンクのものを用いた。細胞は、ラミニン 511-E8 フラグメントでコートされた ϕ 100 mm dish 内で、ヒト iPS 細胞用培地 (StemFit AK02N medium; Ajinomoto, Tokyo, Japan) を用い、37°C, 5%CO₂ の環境下で未分化維持培養した。培養中、一日おきに培地交換を行いながら 4 日間の培養を続けた後、80%から 90% のコンフルエントに達するまで細胞が増殖した時に、継代操作を行った。継代操作は、二章と同様の流れで行った。

3.2.2 細胞集塊培養

ϕ 100 mm dish 内で培養したヒト iPS 細胞を、継代操作と同様の手順で、単分散化された状態で、回収した。回収した細胞の内生細胞数は、全自动セルカウンター (TC20; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いてトリパンブルー染色によってカウントした。細胞数測定によって 5.0×10^2 cells/well の播種細胞数になるよう、細胞を 96 ウェルプレート (ultra-low attachment V-bottom plate, Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) に播種し、96 h の培養を行った。培養開始後、初めの 48 h の間 10 μ M の ROCK 阻害剤を含む培地 100 μ l/well を用いて細胞を培養した。その後、培養容器内の培地を、24 h ごとに ROCK 阻害剤を含まない培地を用いて培地

交換した。培地交換は、ウェル内の培地量の半量を回収し、同じ量の新鮮培地を追加する操作を、機械操作もしくは手操作で3回繰り返すことで行った（図9A）。

3.2.3 細胞集塊形状の定量的解析

各培養に対して、48個の細胞集塊（ $n_{\text{agg}} = 48$ ）を形状分析に用いた。細胞集塊の形状分析のための投影画像は、10倍対物レンズが備えられたイメージング装置（IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）を用いて取得した。画像の撮影は、培地交換前後（ $t = 48, 72$ h）と培養終了時（ $t = 96$ h）に行った。取得した画像から、画像処理ソフトウェア（IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）を用いて集塊面積・真円度を測定し、集塊の拡大・変形を評価した。集塊の投影面積, a (μm^2)と周囲長, l (μm)は、もとの集塊の画像から、集塊の形状を示すグレースケール画像を手操作で抽出し、その画像から測定した。真円度, c (-)は、これらの値を用いることで $c = \frac{l^2}{4\pi a}$ の算出式に従って算出した（図9B）。さらに、培養時間, t (h)の培地交換から経過時間, Δt (h)の間の集塊の変形の大きさは、 $t = 48, 72$ hにおける培地交換前の集塊真円度, c_t (-)と $t = 48, 72$ hの培地交換の $\Delta t = 0, 24$ h後の集塊真円度, $c_{t,\Delta t}$ (-)を用いて、以下の式に従って測定した。

$$\eta_{t,\Delta t} = \frac{c_{t,\Delta t}}{c_t}$$

機械操作により培地交換を行った時の $t = 48$ h, $\Delta t = 0$ hにおける1383D2株の細胞集塊の変形 $\eta_{48,0}$ の値を用いて、丸い集塊の変形の大きさ, $\eta_{t,\Delta t}$ (-)の平均値, η_0 (-)と標準誤差, σ (-)が算出した。この値を用いて、変形の大きさが異なる細胞集塊を、変形していない細胞集塊 ($\eta_{t,\Delta t} < \eta_0 + 10\sigma$)・少し変形した細胞集塊 ($\eta_0 + 10\sigma \leq \eta_{t,\Delta t} < \eta_0 + 20\sigma$)・大きく変形した細胞集塊 ($\eta_0 + 20\sigma \leq \eta_{t,\Delta t}$)の3つに分類した。それぞれの細胞集塊の頻度, f_N (-), f_L (-),

f_H (-)を算出して、細胞株・培地交換操作・培地交換時間・培地交換後の経過時間ごとに比較した。

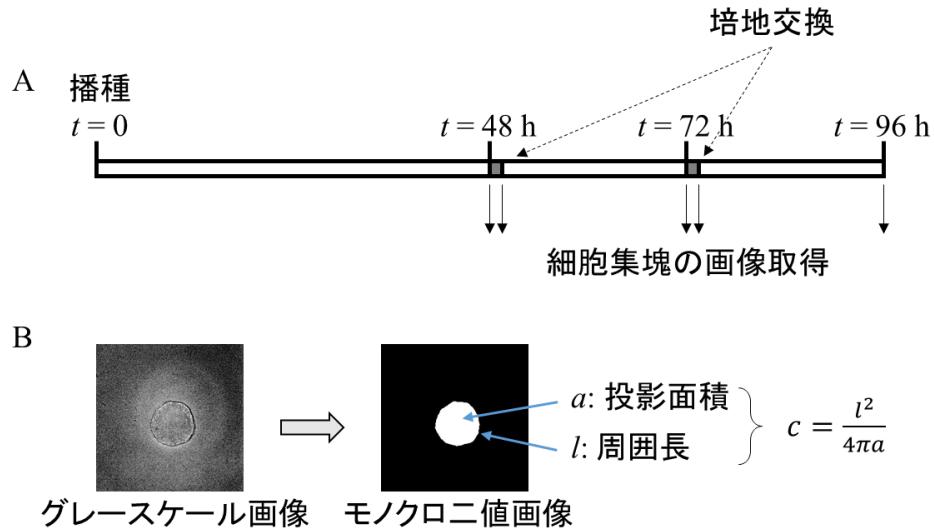


図9 96 ウェルプレート内における細胞集塊培養の実験の流れ. (A) 集塊培養プロセス. (B) 細胞集塊の画像処理.

3.2.4 機械を用いた培地交換操作

機械を用いた培地交換操作を、図 10A (Micronix, Kyoto, Japan) に示した装置を用いて行った。この装置は、クリーンベンチ内部に設置され、プレート設置部・蓋の取り外しユニット・ディスペンサー・使用済み培地と新鮮培地用の容器設置部で構成されている。ディスペンサーには、96 個のマイクロピペットが取り付けられており、培地の吐出吸引速度が調整できるようになっている。マイクロピペットの先端部は、ウェル中心から 1.5 mm、ウェル底から 3.0 mm の位置から培地吸引吐出が開始されるように、位置調整している（図 10B）。使用したマイクロピペット(CyBio® SELMA 96/250 μl; Analytik Jena, Jena, Germany)の内径は

0.4 mm になっている。また、培地交換時は低流束 (1.0×10^0 mm/s)・中流束 (5.0×10^1 mm/s)・高流束 (1.0×10^2 mm/s) で行われるよう調整している。

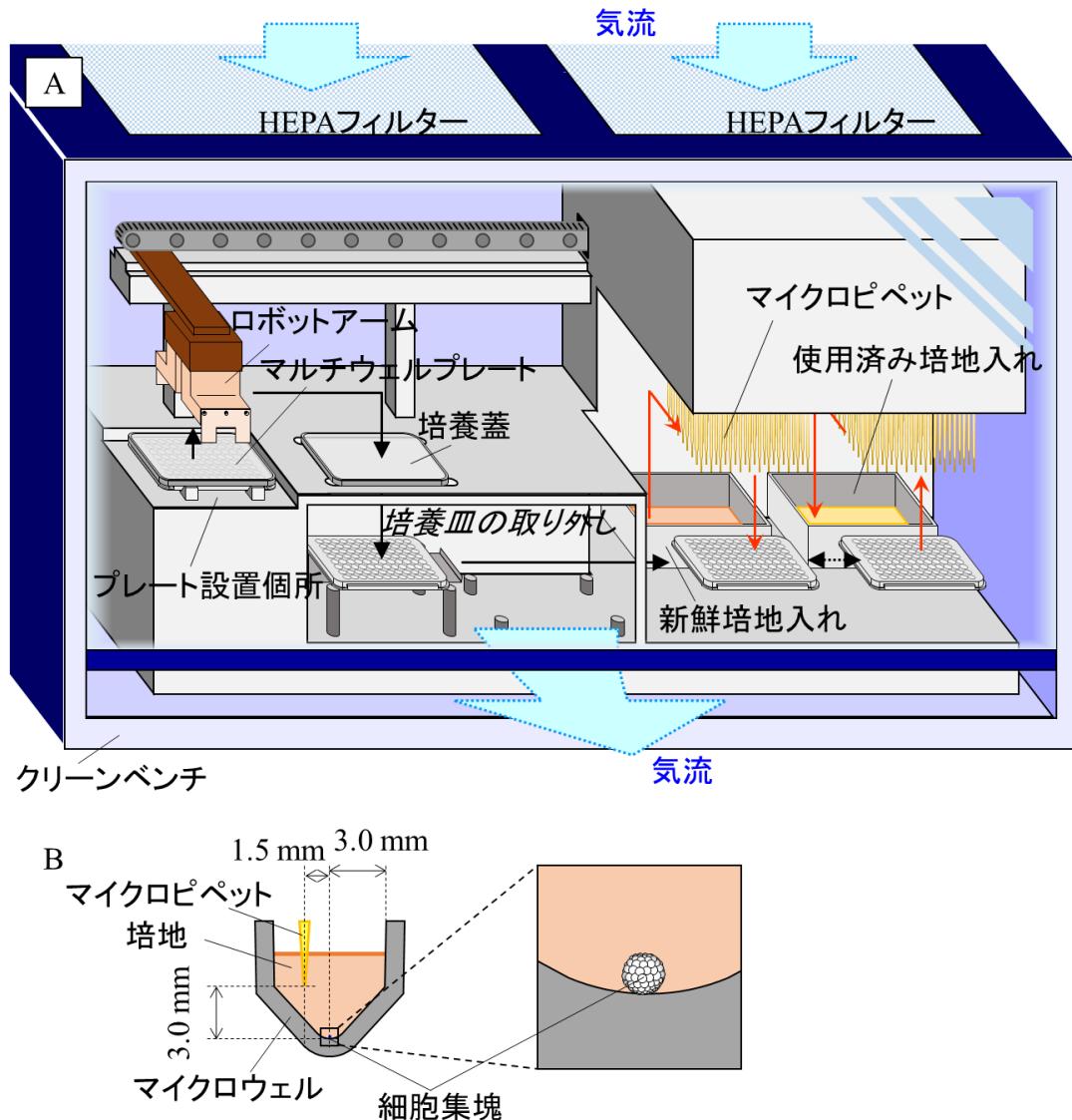


図 10 96 ウェルマルチウェルプレート内のヒト iPS 細胞集塊培養の機械による培地交換。 (A) 培地交換装置。 (B) 96 ウェルマルチウェルプレートの各ウェルでのマイクロピペットの挿入位置。

3.2.5 Time-lapse 観察

各培養条件の細胞集塊 ($n_{\text{agg}} \geq 48$) に対して、タイムラプス顕微鏡 (Biostudio imaging system, Nikon, Tokyo, Japan) を用いてタイムラプス観察を行った。画像は4倍対物レンズを用いて5分間隔で取得した。

3.2.6 凍結切片の作成と染色

三次元静置培養で得られた細胞集塊を回収し、二章で行った時と同様の手法によって凍結切片を作成した。その後、切片を4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で10 min処理し固定化した。PBSを用いてサンプルを洗浄した後、非イオン系界面活性剤であるTriton X-100を0.5%の濃度でPBSに希釈した溶液で5 min処理し、生体膜を可溶化した。さらに、10%のブロックエースとTween[®]20をミリQ水で希釈した溶液を用いて再度サンプルを洗浄した後、10%のブロックエースを含むPBSで処理することでブロッキングした。切片は、10%のブロックエースを含むPBS中にコラーゲンIに対する一次抗体（Abcam, Cambridge, MA, UK）で4°Cの環境下で一晩処理した。処理後のサンプルを、TBSで洗浄した後、10%のブロックエースを含むPBS中に希釈したAlexa Fluor 594標識二次抗体（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）により60分処理した。さらに、サンプルの洗浄を経た後、DAPIで20分間処理して核染色した。染色後のサンプルを、PBSを用いて洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、コラーゲンIの局在性を示す画像を取得した。

3.2.7 再現性

各培養条件に対して少なくとも2回の実験を行った。集塊真円度, $c (-)$ と投影面積, $a (\mu\text{m}^2)$ は、48個の細胞集塊から得られるデータを用いて、平均値±標準誤差 (SE) の値を示している。集塊真円度, $c (-)$ と投影面積, $a (\mu\text{m}^2)$ の変化を評価するためにステューデントt検定を行い $P < 0.01$ の場合に有意差が見られたものとしている。さらに、 $\eta_{t,\Delta t}$ の有意差も同様にして示した。

3.3 結果

3.3.1 手操作もしくは機械操作による培地交換を行った際の集塊形状

ヒトiPS細胞集塊を、培養 $t = 48, 72 \text{ h}$ に機械操作もしくは手操作による培地交換を行いながら、 96 h の間培養した。培養中の集塊の大きさと形状を、それぞれ、撮影された集塊画像から投影面積, $a (\mu\text{m}^2)$ と真円度, $c (-)$ を測定することで評価した。機械操作によって培地交換が行われる時、流束は $1.0 \times 10^0 \text{ mm/s}$ に設定している。手操作による培地交換操作を行った時の1383D2株の細胞集塊は、 $t = 48 \text{ h}$ に丸く（図11a）、 $a (\mu\text{m}^2)$ と $c (-)$ の値の分布は狭かった（図11A）。この時、 $a (\mu\text{m}^2)$ と $c (-)$ の平均値は、それぞれ $\bar{a} = (5.39 \pm 0.08) \times 10^4 \mu\text{m}^2$ と $\bar{c} = 1.05 \pm 0.00$ であった。その後、 $t = 96 \text{ h}$ には $\bar{a} = (1.95 \pm 0.03) \times 10^5 \mu\text{m}^2$ と $\bar{c} = 1.03 \pm 0.00$ となり、培養時間の経過に伴い $a (\mu\text{m}^2)$ の値が増加し分布も広がったが、 $c (-)$ の値には変化が見られず、分布も狭いままであった（図11A）。これらの値の変化から、1383D2株の細胞集塊は形状を保ったまま大きくなったことが示された（図11b）。機械操作による培地交換が行われた際にも、同様の傾向が見られ、細胞集塊は形状を保ったまま拡大した（ $t = 48 \text{ h}$

の時に $\bar{a} = (5.44 \pm 0.08) \times 10^4 \text{ } \mu\text{m}^2$, $\bar{c} = 1.06 \pm 0.01$, $t = 96 \text{ h}$ の時に $\bar{a} = (2.07 \pm 0.03) \times 10^5 \text{ } \mu\text{m}^2$, $\bar{c} = 1.04 \pm 0.00$ (図 11c-d).

一方で Tic 株の細胞集塊の場合, 手操作で培地交換して $t = 48 \text{ h}$ に得られた細胞集塊は, 1383D2 株の場合と同様に, 丸く (図 11e), 投影面積, $a (\mu\text{m}^2)$ と真円度, $c (-)$ の値は, $\bar{a} = (5.05 \pm 0.07) \times 10^4 \text{ } \mu\text{m}^2$ と $\bar{c} = 1.06 \pm 0.00$ であった (図 11C). しかし, その後 $t = 96 \text{ h}$ で $\bar{a} = (1.14 \pm 0.01) \times 10^5 \text{ } \mu\text{m}^2$, $\bar{c} = 1.28 \pm 0.02$ の値になり, $a (\mu\text{m}^2)$ の値は狭い分散のまま増加したが, $c (-)$ の値は広い分散を伴った増加が見られた. これらの値の変化から, 丸かった Tic 株の細胞集塊は, 集塊が拡大する間, 変形したことが示された. さらに $t = 96 \text{ h}$ に, 幾つかの Tic 株の細胞集塊は丸いままであったものの (図 11g), 中には表面に突出した部分を持つ細胞集塊が見られた (図 11f). それに対して, 培地交換を機械操作で行った場合には, 僅かに変形した細胞集塊は見られたものの (図 11h), $t = 96 \text{ h}$ に得られた集塊の真円度, $c (-)$ の分布は狭くなり (図 11D), 集塊の形状はより均一に丸かった (図 11i). これらの結果から, 機械操作によって高い安定性を持った培地交換操作が行われ, 集塊の形状が均一になったことが示された.

3.3.2 液流の集塊形状への影響

培地交換時の液流の影響を調べるために, 機械操作による培地交換を低流束 ($1.0 \times 10^0 \text{ mm/s}$)・中流束 ($5.0 \times 10^1 \text{ mm/s}$)・高流束 ($1.0 \times 10^2 \text{ mm/s}$) に設定して行い集塊の画像を比較した. 1383D2 株の細胞集塊は流束によらず丸かったが, Tic 株の細胞集塊は流束に応じて形状が異なった. 低流束の操作を行った時の Tic 株の細胞集塊は, 1383D2 株と比較すると, 丸くなかった. しかし, 中流束・高流束の場合と比較すると, 低流束の培養を行った細胞集

塊の方が丸かった。また、流束によらず Tic 株の細胞集塊は 1383D2 株より小さかった。さらに、低流束・中流束で操作を行って得られた集塊の、 $t=48, 72$ h の培地交換前後と培養終了時 ($t=96$ h) における投影面積, a (μm^2) と真円度, c (-) を測定して比較した。1383D2 株の集塊の培養では、低流束・中流束どちらの場合であっても (図 13A-B), $t=48, 72$ h における培地交換前後で丸い集塊は変形せず ($c \approx 1$), $t=96$ h における集塊の形状は均一であった。このことから、1383D2 株の細胞集塊に対して培地交換の影響は生じなかつたことが示された。Tic 株の場合では、低流束で培地交換を行った時, $t=48, 72$ h に行った培地交換前

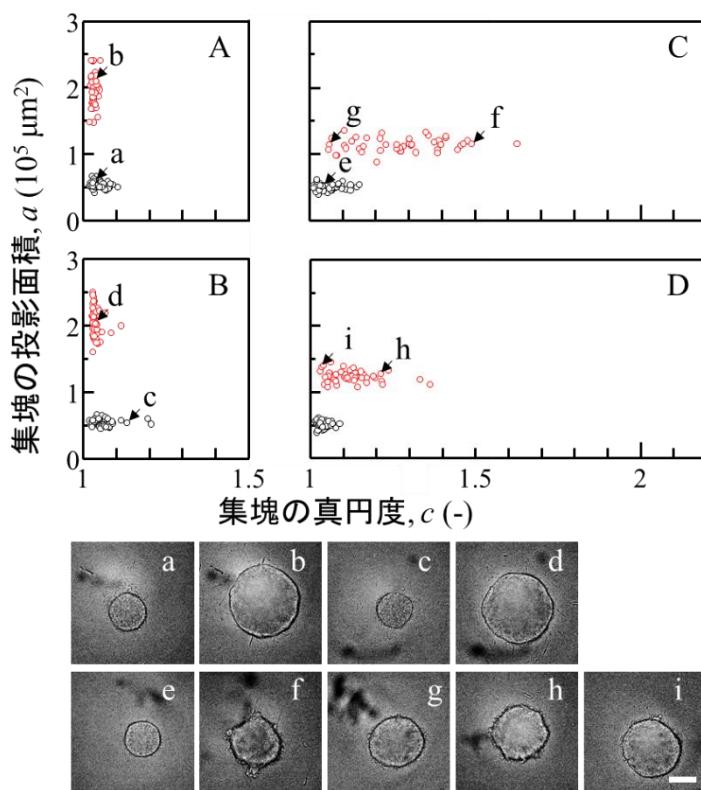


図 11 手操作 (A, C)・機械操作 (B, D) によって培地交換を行い培養した 1383D2 株 (A, B) と Tic 株 (C, D) の細胞集塊の形状と大きさ。 (A-D) 投影面積と真円度の分布。
 i) 各条件における集塊画像。 グラフ中の矢印は画像で示された特定の細胞集塊のデータを示す。 黒丸記号と赤丸記号は、それぞれ $t=48$ と $t=96$ h におけるデータを示す。スケールバー : 200 μm

後で集塊形状は変化しなかったが、 $t = 96$ h でより高く広く分布した c (-) の値を持つ変形した集塊が見られた（図 13C）。そのため、 $t = 72$ h の培地交換後のゆっくりとした変形が生じていることが示唆されている。さらに、中流束での培地交換では、 $t = 96$ h の時に高い c (-)

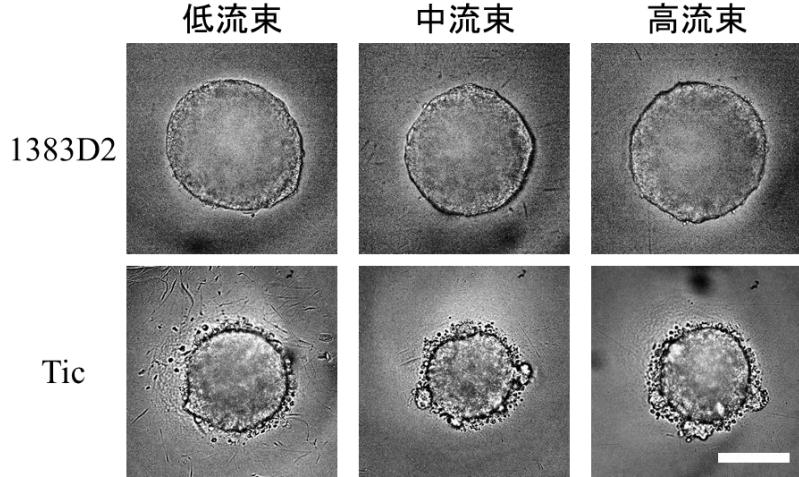


図 12 機械操作によって低流束・中流束・高流束の培地交換を行って培養した 1383D2 株と Tic 株の細胞集塊の明視野画像。スケールバー : 200 μm

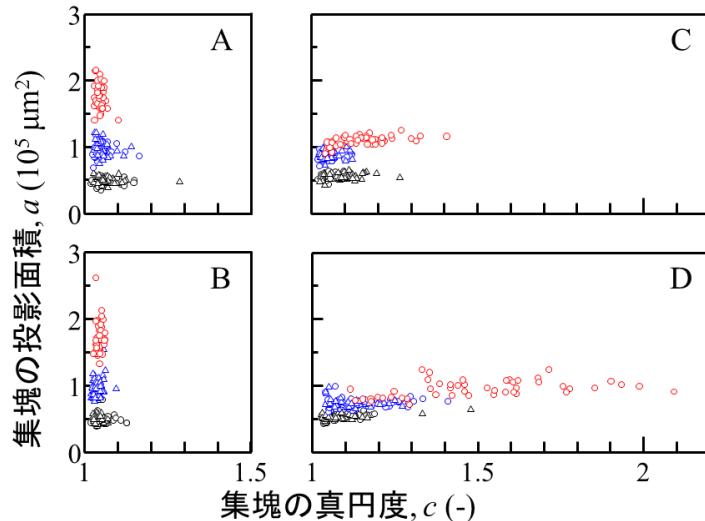


図 13 1383D2 株と Tic 株の集塊培養時に、機械操作の培地交換における液流の集塊形状への影響。低流束 (A, C) と中流束 (B, D) における 1383D2 株 (A, B) と Tic 株 (C, D) の集塊形状。丸記号及び三角記号は、それぞれ、 $t = 48$ (黒), 72 (青), 96 h (赤) における培地交換前のデータと培地交換後のデータを示す。

の値を持っており低流束時よりも顕著な変形が見られた（図 13D）。このように Tic 株の細胞集塊の変形には、培地交換直後では見られなかったものの、その後、時間を置いた時に見られる遅発性の特徴があることが示唆された。ここで見られた液流を受けた集塊の挙動を調べるため、代表的な細胞集塊のタイムラプス画像を作成した。1383D2 株の細胞集塊の場合は、中流束で培地交換を行った条件において、僅かに形状の変化が見られた。しかし、ほとんどの細胞集塊では流束に依らず、丸いままであった（図 14）。Tic 株の細胞集塊の場合は、 $t = 64$ h までは流束に依らず 1383D2 株と同様の挙動が見られたが、中流束時には次第に細胞集塊表面が変形し出し、 $t = 80$ h からは集塊表面に突出した箇所が生じ始めた。（図 15）

変形しなかった集塊 (f_N)・少し変形した集塊 (f_L)・大きく変形した集塊 (f_H) に分類し比率を比較することで、各細胞集塊の変形の推移を評価した。それによって、即時に変形した集塊と徐々に変形した集塊を区別した。1383D2 株の集塊では、低流束・中流束どちらの場合であっても、 $t = 48, 72$ h の培地交換後の $\Delta t = 0, 24$ h に、わずかな比率の細胞集塊が変形したものの (f_L)、ほとんどの細胞集塊が変形しなかった ($f_N \cong 1.0$)（図 16A, B）。そのため、1383D2 株の細胞集塊では、培地交換操作による直後の影響 ($\Delta t = 0$ h) も遅発的な影響 ($\Delta t = 24$ h) も生じなかった。低流束の操作によって Tic 株の細胞集塊を培養した時（図 16C）、 $t = 48$ h に行った直後に ($\Delta t = 0$ h) 少し変形した集塊が生じることで $f_N = 0.69$ となり、培地交換操作による即時的な影響が見られた。しかし、24 h の静置状態を経た後 ($\Delta t = 24$ h) 変形した細胞集塊は見られなくなり、ほとんどの細胞集塊が変形していない細胞集塊で占められていた ($f_N = 0.98$)。 $t = 72$ h での培地交換直後では ($\Delta t = 0$ h) ほとんどの細胞集塊が変形していなかったが ($f_N = 0.96$)、その後 24 h を経ると ($\Delta t = 24$ h)，集塊の形状が変化し、変形しなかった細胞集塊の比率が $f_N = 0.29$ まで減少した。この比率の変化から、 $t = 72$ h か

ら $t = 96$ hまでの間に培地交換操作による遅発的な影響が生じたことが示された。中流束の場合(図 16D), $t = 48$ hの培地交換による即時的に変形した細胞集塊の比率($\Delta t = 0$ h)は, $f_L = 0.02$ と $f_H = 0.04$ であったが, その後それぞれ $f_L = 0.25$ と $f_H = 0.27$ にまで増加した($\Delta t = 24$ h)。さらに, $t = 72$ hに行った2度目の培地交換操作では, 遅発的な変形が見られた細胞集塊の比率は $f_L = 0.10$ と $f_H = 0.81$ まで至った。これらの結果から, 中流束の液流には Tic 株

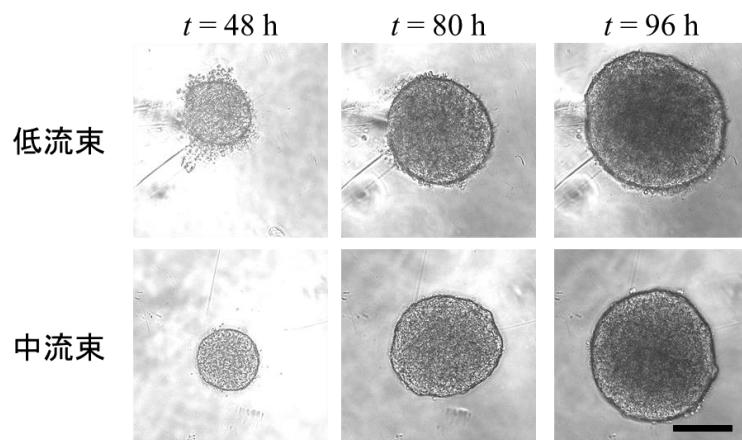


図 14 機械操作による低流束・中流束の培地交換を行って培養した 1383D2 株の細胞集塊のタイムラプス観察の画像。スケールバー : 200 μm

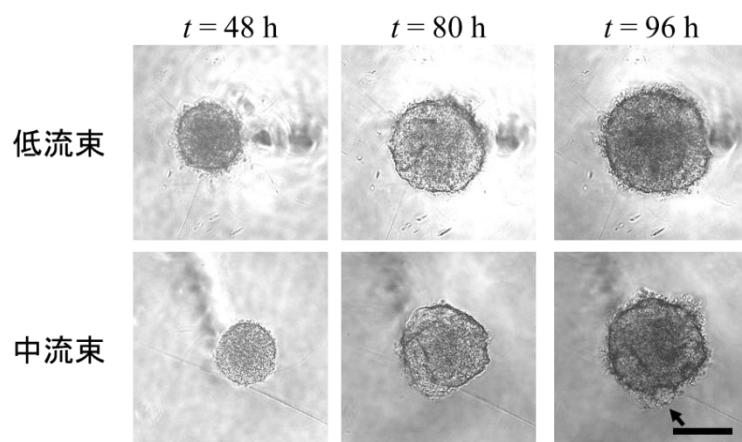


図 15 機械操作による低流束・中流束の培地交換を行って培養した Tic 株の細胞集塊のタイムラプス観察の画像。矢印は細胞集塊の表面が突出した部分を示す。スケールバー : 200 μm

の細胞集塊の変形に対して即時的な影響と遅発的な影響があり、低流束時より強い影響があることが示された。特に、大きく変形した細胞集塊は、培地交換直後には生じなかつもの、 $\Delta t = 24\text{ h}$ において遅発的に見られるものが多かった。そのため、細胞集塊の変形は主に遅発的に生じたことが明らかになった。

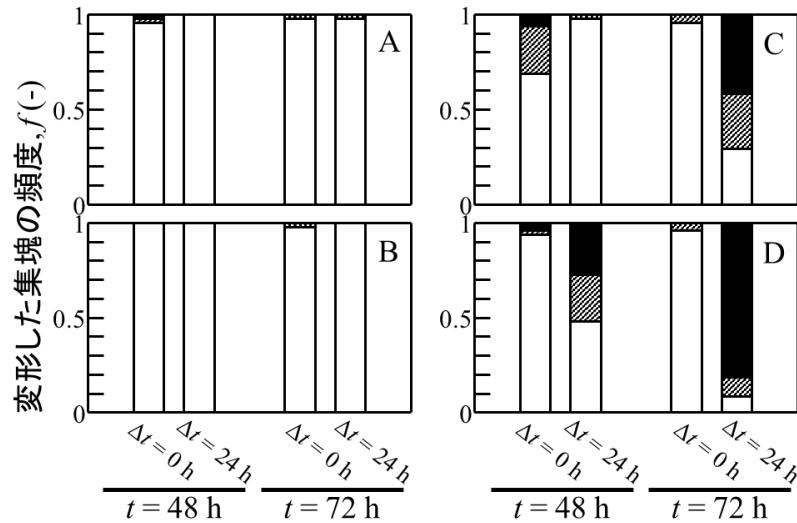


図 16 即時的、及び、遅発的な集塊形状の変化。低流束 (A, C) と中流束 (B, D) での 1383D2 株 (A, B) と Tic 株 (C, D) の変形した細胞集塊の頻度。棒グラフの白と斜線と黒の部分は、それぞれ変形していない集塊 (f_N)、少し変形した集塊 (f_L)、大きく変形した集塊 (f_H) の比率を示す。

3.3.3 細胞集塊内部のコラーゲン I 形成

$t = 96\text{ h}$ における細胞集塊の凍結切片に対し免疫抗体染色によって、コラーゲン I の分布を観察し、集塊内部の ECM の局在性を調べた。1383D2 株の細胞集塊中では、集塊表面付近に局在したバンド状のコラーゲン I が見られた (図 17A)。それに対して、Tic 株細胞集塊ではコラーゲン I の局在性が低くなっていた (図 17B)。

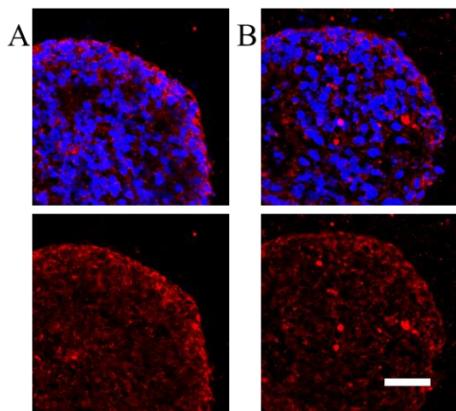


図 17 1383D2 株 (A) と Tic 株 (B) 細胞集塊のコラーゲン I (赤) と核 (青) の蛍光染色画像. スケールバー : 50 μm

3.4 考察

手操作で行うピペットを用いた培地交換操作は、各細胞集塊に対する操作の変動が生じやすく、機械操作よりも培地の添加と回収時の流束の正確性が低下した。この影響によって、異なる集塊形状が見られた。Neto *et al.* の報告では、デジタルシリンジを用いることによって、液回収の正確性が向上している (Neto *et al.*, 2018)。また、マイクロ流体チャネル中で、設定した液流より過剰に強い液流が生じた場合には、細胞剥離する様子が見られている (Zhou *et al.*, 2011)。大スケールの幹細胞培養では、これらのような摂動の細胞への影響を把握することが求められる (Kinney *et al.*, 2011)。培養操作を機械化すると、流束の摂動を最小限にし、均一な形状の集塊が形成される。本章の実験では、手操作での培地の吐出吸引操作の不安定性により、1383D2 株では見られなかった細胞集塊の形状の不均一性が、Tic 株の細胞集塊では見られた (図 11C-D)。この不均一性は培地交換操作を機械化することで改善された (図 13C-D)。これらの結果から、Tic 株の細胞集塊は、1383D2 株の細胞集塊より液流の影響を受けやすいことが示される。また、流束の摂動によって細胞集塊の形状の不均一性

が生じることも示される。Koike *et al.* の報告では、異なる細胞数や手法によって ES 細胞の集塊が形成された実験が行われ、これらの集塊形状の違いに応じて分化の傾向が異なる様子が観察された (Koike *et al.*, 2007)。そのため、培養操作で生じる液流を制御することによって分化の効率性の改善が可能となることが示唆された。

本章で得られた実験結果に基づいて図 18 にまとめたように、ECM 形成に応じて異なる一時的な液流による細胞集塊の変形への影響が生じたと考えられる。Sachlos *et al.* によると、ES 細胞で形成された細胞集塊では、数日間の培養を経て ECM が蓄積し集塊を覆うことで、生物質の拡散を妨げるシェル構造が形成される (Sachlos *et al.*, 2008)。本章の観察結果でも、1383D2 株の細胞集塊において、集塊側面部へのコラーゲン I の局在性が見られており (図 17A)，ECM のシェル構造が形成されたことが示唆された。Xie *et al.* によると、着床前胚を覆う ECM である zona pellucida が形成されることで、高浸透圧条件化アポトーシスを引き起こす致死率を向上させるシェアストレスの影響を和らげられることが報告されている (Xie *et al.*, 2006)。そのため、1383D2 株で見られた集塊を覆う ECM 構造によっても液流による影響が妨げられ、機械操作による培地交換の流束に依らず、集塊の均一な形状が保たれたと考えられる (図 13A-B)。それに対して、Tic 株の細胞集塊では、集塊側面部に見られたコラーゲン I の局在性が低かった (図 17B)。Tic 株の細胞集塊は高い流束の液流を受けることで崩れやすかった点から、集塊を守る ECM が無かった場合に集塊は液流に対してより脆い構造になっており、集塊形状の株間の違いは液流による影響によって生じたと考えられる (図 13C-D)。集塊内部の各細胞は細胞-細胞間接着でつなぎ合わされている (Saias *et al.*, 2015; Katsamba *et al.*, 2009)。ほとんどの細胞集塊の形状は、Tic 株の場合であっても培地交換によって即時的に変形しておらず ($\Delta t = 0$ h) (図 16D)，細胞間接着は剥離しなかった。細

胞集塊の変形は、ECM の崩壊によって細胞が集塊外側に遊走することによって生じたために、遅発的な現象になったと考えられる ($\Delta t = 24$ h) (図 15, 16D). このような遅発的な細胞集塊の形状変化は他の研究でも見られている。外肺葉外植片が平行版で圧迫された時、変形後即座に形状は戻らず、時間をかけて元の形になる (Schötz *et al.*, 2013). マイクロビペットで吸引された際にも、細胞集塊はゆっくりと変形していく (Guevorkian *et al.*, 2011). 大スケールでの培養に最適な培養操作を行うためには、これらの研究のような細胞集塊内部の ECM・細胞間接着・個々の細胞の変化の関係を明らかにすることが必要とされる。

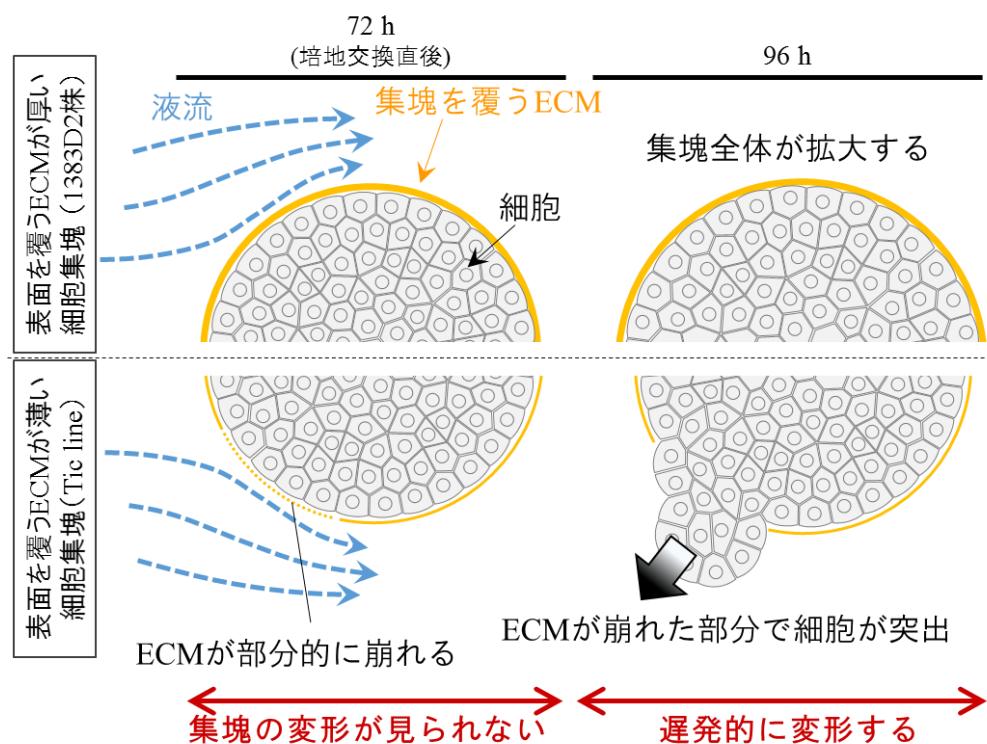


図 18 ヒト iPS 細胞集塊が培地交換による一時的な液流を受けた後に生じる遅発的な変形のメカニズムの概念図。

3.5 小括

本章における実験によって、手操作と比較して、機械操作で培地交換を行う事で細胞集塊の変形を抑えることができた。また、培地交換操作の影響で Tic 株細胞集塊の遅発的な変形が引き起こされ、このような変形は低流束で操作することで防がれることが示された。そのため、機械操作を導入した低流束の培養操作を行う事で均一な形状の細胞集塊を得られる。

第四章 結言

ヒト iPS 細胞は、細胞治療やドラッグスクリーニングなどに利用可能であり幅広く活用できるポテンシャルがある。ヒト iPS 細胞の一般的な普及のためには、特徴が異なるヒト iPS 細胞に対しても、効率良く安定した細胞増幅が行われることが求められる。ヒト iPS 細胞は細胞－細胞間接着・細胞－基質間接着が形成されることによって促されるシグナルを介して、細胞の生存・増殖が維持されるため、これらの接着の制御が必要とされる。

本研究から、異なる細胞株によって形成された細胞集塊ごとに、液流に対する安定性が異なった。液流に対する安定性は、細胞集塊表面を覆う ECM 形成によって左右されることが示唆された。細胞集塊が液流を受けると集塊表面の ECM が崩れる。集塊を覆う ECM が薄い場合、ECM が崩れた部分から細胞が集塊外に遊走する。それによって、細胞集塊全体の形状が遅発的に変形する。懸濁環境下では、これらの過程を経て、液流による物理的刺激・ECM の崩壊・遊走の影響を受けることで、細胞の接着は不安定になり、増殖が低下したものと考えられる（図 19）。以上のような集塊を構成する細胞状態の変化によって、時間依存的に増殖速度が変化することが示唆された。

細胞集塊が液流を受けた時、以上のメカニズムによって細胞の増殖効率が損なわれると考えられるため、ECM 形成・細胞接着・細胞遊走の 3 つの要素がバランスを保って制御されることが必要とされることが示唆された。

三章: ECMによる液流の防護と遊走による集塊変形

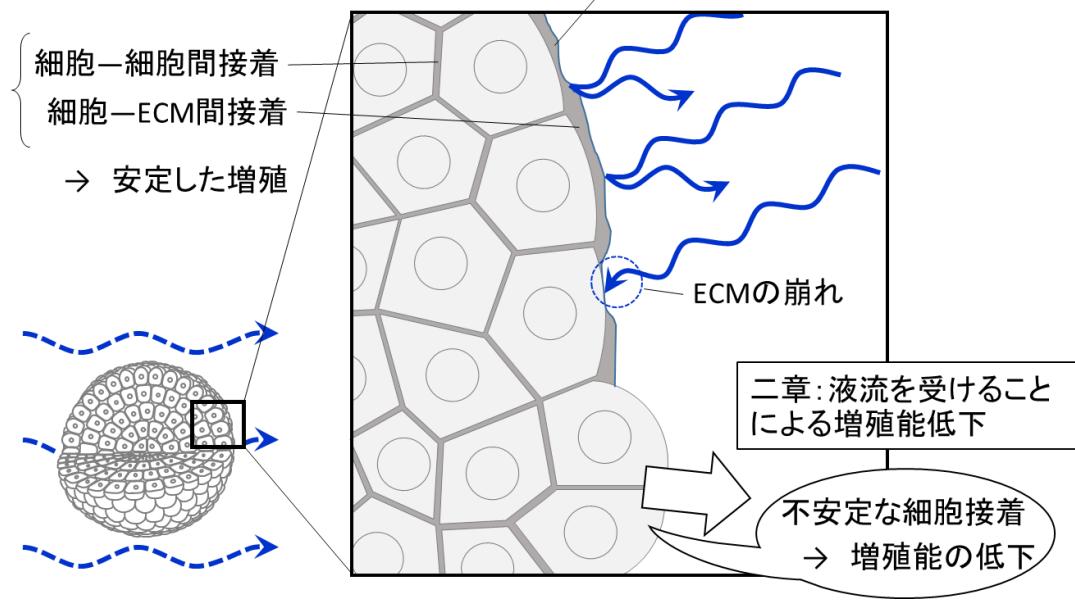


図 19 液流を受けたヒト iPS 細胞が、遅発的に変形し増殖を損なうメカニズムの概念図。

変数一覧

細胞集塊数	n_{agg}	[aggregates]
培養時間	t	[h]
細胞集塊の投影面積	a	[μm^2]
細胞集塊の周囲長	l	[μm]
細胞集塊の真円度	c	[$-$]
培地交換からの経過時間	Δt	[h]
培養時間, t (h)における細胞集塊の真円度	c_t	[$-$]
培養時間, t (h)から Δt (h)経過した時の細胞集塊の真円度	$c_{t,\Delta t}$	[$-$]
培養時間, t (h)から Δt (h)経過する間の細胞集塊の変形の大きさ	$\eta_{t,\Delta t}$	[$-$]
$\eta_{t,\Delta t}$ の平均	η_0	[$-$]
$\eta_{t,\Delta t}$ の標準誤差	σ	[$-$]
培地交換後に変形していない細胞集塊の頻度	f_N	[$-$]
培地交換後に少し変形した細胞集塊の頻度	f_L	[$-$]
培地交換後に大きく変形した細胞集塊の頻度	f_H	[$-$]
培地交換時間, t (h)における細胞濃度	X_t	[cells/ml]
見かけの比増殖速度	μ_{app}	[h^{-1}]

略語一覧

Induced pluripotent stem cell, 人工多能性幹細胞	iPS 細胞
Embryonic stem cell, 胚性幹細胞	ES 細胞
Epiblast stem cell, エピblast幹細胞	EpiSC
T cell receptor, T 細胞受容体	TCR
Chimeric antigen receptor, キメラ抗原受容体	CAR
Good manufacturing practice, 医薬品適正製造基準	GMP
Major histocompatibility complex, 主要組織適合遺伝子複合体	MHC
Natural killer cells, ナチュラルキラー細胞	NK 細胞
Human leukocyte antigen, ヒト白血球抗原	HLA
Rotating wall vessel, 回転培養装置	RWV
Extracellular matrix, 細胞外マトリックス	ECM
Focal adhesion kinase	FAK
Retinal pigment epithelial, 網膜色素上皮細胞	RPE
Ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸	EDTA
Phosphate buffered salts, リン酸緩衝生理食塩水	PBS
Rho-associated protein kinase, Rho キナーゼ	ROCK
Tris-buffered saline, トリス緩衝生理食塩水	TBS
4',6-diamidino-2-phenylindole	DAPI

参考文献

- Ambriz, X., de Lanerolle, P., Ambrosio, J. R.: The mechanobiology of the actin cytoskeleton in stem cells during differentiation and interaction with biomaterials. *Stem Cell Int.*, **2018**, 2891957 (2018)
- Ando, M., Nakauchi, H.: 'Off-the-shelf' immunotherapy with iPSC-derived rejuvenated cytotoxic T lymphocytes. *Exp. Hematol.*, **47**, 2-12 (2016)
- Arauchi, A., Matsuura, K., Shimizu, T., Okano, T.: Functional thyroid follicular cells differentiation from human-induced pluripotent stem cells in suspension culture. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **8**, 103 (2017)
- Badenes, S. M., Fernandes, T. G., Miranda, C. C., Pusch-Klein, A., Haupt, S., Rodrigues, C. A. V., Diogo, M. M., Brüstle, O., Cabral, J. M. S.: Long-term expansion of human induced pluripotent stem cells in a microcarrier-based dynamic system. *J. Chem. Technol. Bioto.*, **92**, 482-493 (2017)
- Batalov, I., Feinberg, A. W.: Differentiation of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells using monolayer culture. *Biomark. Insights*, **10**, 71-76 (2015)
- Bauwens, C. L., Peerani, R., Niebruegge, S., Woodhouse, K. A., Kumacheva, E., Husain, M., Zandstra, P. W.: Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. *Stem Cells*, **26**, 2300-2310 (2008)
- Bravery, C. A.: Do human leukocyte antigen-typed cellular therapeutics based on induced pluripotent stem cells make commercial sense?. *Stem Cells Dev.*, **24**, 1-10 (2015)
- Brentijens, R. J., Rivière, I., Park, J. H., Davila, M. L., Wang, X., Stefanski, J., Taylor, C., Yeh, R., Bartido, S., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., Bernal, Y., Pegram, H., Przybylowski, M., Hollyman, D., Usachenko, Y., Pirraglia, D., Hosey, J., Santos, E., Halton, E., Maslak, P.,

- Scheinberg, D., Jurcic, J., Heaney, M., Heller, G., Frattini, M., Sadelain, M.: Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, **118**, 4817-4828 (2011)
- Brodland, G. W., Yang, J., Sweny, J.: Cellular interfacial and surface tensions determined from aggregates compression tests using a finite element model. *HFSP J.*, **3**, 273-281 (2009)
- Buchholz, D. E., Hikita, S. T., Rowland, T. J., Friedrich, A. M., Hinman, C. R., Johnson, L. V., Clegg, D. O.: Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, **27**, 2427-2434 (2009)
- Carpenter, L., Malladi, R., Yang, C. T., French, A., Pilkington, K. J., Forsey, R. W., Sloane-Stanley, J., Silk, K. M., Davies, T. J., Fairchild, P. J., Enver, T., Watt, S. M.: Human induced pluripotent stem cells are capable of B-cell lymphopoiesis. *Blood*, **117**, 4008-4011 (2011)
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadeln, M., Studer, L.: Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.*, **27**, 275-280 (2009)
- Choe, G., Park, J., Park, H., Lee, J. Y.: Hydrogel biomaterials for stem cell microencapsulation. *Polymers*, **10**, 997 (2018)
- Choi, K. D., Vodyanik, M., Slukvin, I. I.: The hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.*, **6**, 296-313 (2011)
- Consolo, F., Bariani, C., Mantalaris, A., Montevecchi, F., Redaelli, A., Morbiducci, U.: Computational modeling for the optimization of a cardiogenic 3D bioprocess of encapsulated embryonic stem cells. *Biomech. Model Mechanobiol.*, **11**, 261-277 (2012)

Correia, C., Serra, M., Espinha, N., Sousa, M., Brito, C., Burkert, K., Zheng, Y., Hescheler, J., Carrondo, M. J., Sarić, T., Alves, P. M.: Combining hypoxia and bioreactor hydrodynamics boosts induced pluripotent stem cell differentiation towards cardiomyocytes. *Stem Cell Rev.*, **10**, 786-801 (2014)

DiStefano, T., Chen, H. Y., Panebianco, C., Kaya, K. D., Brooks, M. J., Gieser, L., Morgan, N. Y., Pohida, T., Swaroop, A.: Accelerated and improved differentiation of retinal organoids from pluripotent stem cells in rotating-wall vessel bioreactors. *Stem Cell Reports*, **10**, 300-313 (2018)

Docherty, K., Bernardo, A. S., Vallier, L.: Embryonic stem cell therapy for diabetes mellitus. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **18**, 827-838 (2007)

Farhood, B., Najafi, M., Mortezaee, K.: CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J. Cell Physiol.*, **234**, 8509-8521 (20019)

Forgacs, G., Foty, R. A., Shafrir, Y., Steinberg, M. S.: Viscoelastic properties of living embryonic tissues: a quantitative study. *Biophys. J.*, **74**, 2227-2234 (1998)

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., Honjo, T.: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, **192**, 1027-1034 (2000)

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., Hasegawa, M.: Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. B Phys. Biol. Sci.*, **85**, 348-362 (2009)

Gonzalez-Rodriguez, D., Bonnemay, L., Elgeti, J., Dufour, S., Cuvelier, D., Brochard-Wyart, F.: Detachment and fracture of cellular aggregates. *Soft Matter*, **9**, 2282-2290 (2013)

Guevorkian, K., Colbert, M. J., Durth, M., Dufour, S., Brochard-Wyart, F.: Aspiration of biological viscoelastic drops. *Phys. Rev. Lett.*, **104**, 218201 (2010)

Guevorkian, K., Gonzalez-Rodriguez, D., Carlier, C., Dufour, S., Brochard-Wyart, F.: Mechanosensitive shivering of model tissues under controlled aspiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13387-13392 (2011)

Gupta, P., Ismadi, M. Z., Verma, P. J., Fouras, A., Jadhav, S., Bellare, J., Hourigan, K.: Optimization of agitation speed in spinner flask for microcarrier structural integrity and expansion of induced pluripotent stem cells. *Cytotechnology*, **68**, 45-59 (2016)

Halder, G., Dupont, S., Piccolo, S.: Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2012**, 591-600 (2012)

Hirami, Y., Osakada, F., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Ikeda, H., Yoshimura, N., Takahashi, M.: Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci. Lett.*, **458**, 126-131 (2009)

Jing, D., Parikh, A., Carty Jr., J. M., Tzanakakis, E. S.: Stem cells for heart cell therapies. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **14**, 393-406 (2008)

Kahan, S. M., Zajac, A. J.: Immune exhaustion: past lessons and new insights from lymphocytic choriomeningitis virus. *Viruses*, **11**, 156 (2019)

Kalmbach, A., Bordás, R., Oncül, A. A., Thévenin, D., Genzel, Y., Reichl, U.: Experimental characterization of flow conditions in 2- and 20-l bioreactors with wave-induced motion.

Biotechnol. Prog., **27**, 402-409 (2011)

Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., Bagg, A., June, C. H.: T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.*, **3**, 95ra73 (2012)

Kami, D., Watakabe, K., Yamazaki-inoue, M., Minami, K., Kitani, T., Itakura, Y., Toyoda, M., Sakurai, T., Umezawa, A., Gojo, S.: Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine. *BMC Biotechnol.*, **13**, 102 (2013)

Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J. K., Todani, M., Nakagawa, M., Osawa, M., Yashiro, Y., Yamanaka, S., Osafune, K.: induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiol. Rev.*, **99**, 79-114 (2019)

Katsamba, P., Carroll, K., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Posy, S., Rajebhosale, M., Price, S., Jessell, T. M., Ben-Shaul, A., Shapiro, L., Honig, B. H.: Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 11594-11599 (2009)

Kawamoto, H., Masuda, K., Nagano, S., Maeda, T.: Cloning and expansion of antigen-specific T cells using iPS cell technology: development of "off-the shelf" T cells for the use in allogenic transfusion settings. *Int. J. Hematol.*, **107**, 271-277 (2018)

Kawamura, M., Miyagawa, S., Fukushima, S., Saito, A., Miki, K., Ito, E., Sougaw, N., Kawamura, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Toda, K., Sawa, Y.: Enhanced survival of transplanted

human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart. *Circulation*, 128, S87-94 (2013)

Kawamura, T., Miyagawa, S., Fukushima, S., Maeda, A., Kashiyama, N., Kawamura, A., Miki, K., Okita, K., Yoshida, Y., Shiina, T., Ogasawara, K., Miyagawa, S., Toda, K., Okuyama, H., Sawa, Y.: Cardiomyocytes derived from MHC-homozygous induced pluripotent stem cells exhibit reduced allogeneic immunogenicity in MHC-matched non-human primates. *Stem Cell Reports*, 6, 312-320 (2016)

Kempf, H., Olmer, R., Kropp, C., Rückert, M., Jara-Avaca, M., Robles-Diaz, D., Franke, A., Elliott, D. A., Wojciechowski, D., Fischer, M., Roa Lara, A., Kensah, G., Gruh, I., Haverich, A., Martin, U., Zweigerdt, R.: Controlling expansion and cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Stem Cell Reports*, 3, 1132-1146 (2014)

Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Saiki, H., Miyamoto, S., Takahashi, J.: Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.*, 1, 395-412 (2011)

Kilens, S., Meistermann, D., Moreno, D., Chariau, C., Gaignerie, A., Reignier, A., Lelièvre, Y., Casanova, M., Vallot, C., Nedellec, S., Flippe, L., Firmin, J., Song, J., Charpentier, E., Lammers, J., Donnart, A., Marec, N., Deb, W., Bihouëe, A., Le, Caïgne, C., Pecqueur, C., Redon, R., Barrière, P., Bourdon, J., Pasque, V., Soumillon, M., Mikkelsen, T. S., Rougeulle, C., Frèour, T., David, L., and the Milieu Intérieur Consortium: Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.*, 9, 360 (2018)

- Kim, M. H., Kino-Oka, M.: Bioprocessing strategies for pluripotent stem cells based on waddington's epigenetic landscape. *Trends Biotechnol.*, **36**, 89-104 (2018)
- Kinney, M. A., Sargent, C. Y., McDevitt, T. C.: The multiparametric effects of hydrodynamic environments on stem cell culture. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **17**, 249-262 (2011)
- Knöspel, F., Freyer, N., Stecklum, M., Gerlach, J. C., Zeilinger, K.: Periodic harvesting of embryonic stem cells from a hollow-fiber membrane based four-compartment bioreactor. *Biotechnol. Prog.*, **32**, 141-151 (2016)
- Kobayashi, Y., Okada, Y., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Yasuda, A., Nori, S., Hikishima, K., Konomi, T., Fujiyoshi, K., Tsuji, O., Toyama, Y., Yamanaka, S., Nakamura, M., Okano, H.: Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS One*, **7**, e52787 (2012)
- Koike, M., Sakaki, S., Amano, Y., Kurosawa, H.: Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies. *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 294-299 (2007)
- Konagaya, S., Ando, T., Yamauchi, T., Suemori, H., Iwata, H.: Long-term maintenance of human induced pluripotent stem cells by automated cell culture system. *Sci. Rep.*, **5**, 16647 (2015)
- Kropp, C., Massai, D., Zweigerdt, R.: Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells. *Process Biochem.*, **59**, 244-254 (2017)
- Kwok, C. K., Ueda, Y., Kadari, A., Günther, K., Ergün, S., Heron, A., Schnitzler, A. C., Rook, M., Edenhofer, F.: Scalable stirred suspension culture for the generation of billions of human induced

pluripotent stem cells using single-use bioreactors. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **12**, e1076-e1087 (2018)

Lapillonne, H., Kobari, L., Mazurier, C., Tropel, P., Giarratana, M. C., Zanella-Cleon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donzé, M., Puccio, H., Hebert, N., Francina, A., Andreu, G., Viville, S., Douay, L.: Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspective for the transfusion medicine. *Haematologica*, **2010**, 1651-1659 (2010)

Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chenova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Boussiotis, V. A., Carter, L. L., Carreno, B. M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A. H., Freeman, G. J.: PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.*, **2**, 261-268 (2001)

Lei, F., Haque, R., Weiler, L., Vrana, K. E., Song, J.: T lineage differentiation from induced pluripotent stem cells. *Cell Immunol.*, **260**, 1-5 (2009)

Li, L., Bennett, S. A., Wang, L.: Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh. Migr.*, **2012**, 59-70 (2012)

Lian, X., Hsiao, C., Wilson, G., Zhu, K., Hazeltine, L. B., Azarin, S. M., Raval, K. K., Zhang, J., Kamp, T. J., Palecek, S. P.: Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E1848-1857 (2012)

Lock, L. T., Tzanakakis, E. S.: Stem/progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes. *Tissue Eng.*, **13**, 1399-1412 (2007)

Machiraju, P., Greenway, S. C.: Current methods for the maturation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *World J. Stem Cells*, **11**, 33-43 (2019)

Maeda, T., Nagano, S., Ichise, H., Kataoka, K., Yamada, D., Ogawa, S., Koseki, H., Kitawaki, T., Kadokawa, N., Takaori-Kondo, A., Masuda, K., Kawamoto, H.: Regeneration of CD8αβ T cells from T-cell-derived iPSC imparts potent tumor antigen-specific cytotoxicity. *Cancer Res.*, **76**, 6839-6850 (2016)

Mandai, M., Kurimoto, Y., Takahashi, M.: Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N. Engl. J. Med.*, **377**, 792-793 (2017)

Mao, Y., Baum, B.: Tug of war - the influence of opposing physical forces on epithelial cell morphology. *Dev. Biol.*, **401**, 92-102 (2015)

Marklein, R. A., Lam, J., Guvendiren, M., Sung, K. E., Bauer, S. R.: Functionally-relevant morphological profiling: a tool to assess cellular heterogeneity. *Trends Biotechnol.*, **36**, 105-118 (2018)

Matsumoto, E., Koide, N., Hanzawa, H., Kiyama, M., Ohta, M., Kuwabara, J., Takeda, S., Takahashi, M.: Fabricating retinal pigment epithelial cell sheets derived from human induced pluripotent stem cells in an automated closed culture system for regenerative medicine. *PLoS One*, **14**, e0212369 (2019)

Matsuura, K., Wada, M., Konishi, K., Sato, M., Iwamoto, U., Sato, Y., Tachibana, A., Kikuchi, T., Iwamiya, T., Shimizu, T., Yamashita, J. K., Yamato, M., Hagiwara, N., Okano, T.: Fabrication of mouse embryonic stem cell-derived layered cardiac cell sheets using a bioreactor culture system. *PLoS One*, **7**, e52176 (2012)

- Meng, G., Liu, S., Poon, A., Rancourt, D. E.: Optimizing human induced pluripotent stem cell expansion in stirred-suspension culture. *Stem Cell Dev.*, **26**, 1804-1817 (2017)
- Moreira, J. L., Cruz, P. E., Santana, P. C., Aunins, J. G., Carrondo, M. J. T.: Formation and disruption of animal cell aggregates in stirred vessels: mechanisms and kinetic studies. *Chem. Eng. Sci.*, **50**, 2747-2764 (1995)
- Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., Zheng, Z., Nahvi, A., de, Vries, C. R., Rogers-Freezer, L. J., Mavroukakis, S. A., Rosenberg, S. A.: Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, **314**, 126-129 (2006)
- Morizane, A., Kikuchi, T., Hayashi, T., Mizuma, H., Takara, S., Doi, H., Mawatari, A., Glasser, M. F., Shiina, T., Ishigaki, H., Itoh, Y., Okita, K., Yamasaki, E., Doi, D., Onoe, H., Ogasawara, K., Yamanaka, S., Takahashi, J.: MHC matching improves engraftment of iPSC-derived neurons in non-human primates. *Nat. Commun.*, **8**, 385 (2017)
- Naganuma, H., Nishinakamura, R.: From organoids to transplantable artificial kidneys. *Transpl. Int.*, doi: 10.1111/tri.13404 (in press).
- Nakagawa, M., Taniguchi, Y., Senda, S., Takizawa, N., Ichisaka, T., Asano, K., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J., Nishizawa, M., Yoshida, Y., Toyoda, T., Osafune, K., Sekiguchi, K., Yamanaka, S.: A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.*, **4**, 3594 (2014)
- Narita, H., Shima, F., Yokoyama, J., Miyagawa, S., Tsukamoto, Y., Takamura, Y., Hiura, A., Fukumoto, K., Chiba, T., Watanabe, S., Sawa, Y., Akashi, M., Shimoda, H.: Engraftment and morphological

development of vascularized human iPS cell-derived 3D-cardiomyocyte tissue after xenotransplantation. *Sci. Rep.*, **7**, 13708 (2017)

Narsinh, K. H., Sun, N., Sanchez-Freire, V., Lee, A. S., Almeida, P., Hu, S., Jan, T., Wilson, K. D., Leong, D., Rosenberg, J., Yao, M., Robbins, R. C., Wu, J. C.: Single cell transcriptional profiling reveals heterogeneity of human induced pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.*, **121**, 1217-1221 (2011)

Nath, S. C., Horie, M., Nagamori, E., Kino-Oka, M.: Size- and time- dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate. *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 469-475 (2017)

Nethercott, H. E., Brick, D. J., Schwartz, P. H.: Derivation of induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction. *Methods Mol. Biol.*, **767**, 67-85 (2011)

Neto, R., Gooley, A., Breadmore, M. C., Hilder, E. F., Lapierre, F.: Precise, accurate and user-independent blood collection system for dried blood spot sample preparation. *Anal. Bioanal. Chem.*, **410**, 3315-3323 (2018)

Nishimura, T., Kaneko, S., Kawana-Tachikawa, A., Tajima, Y., Goto, H., Zhu, D., Nakayama-Hosoya, K., Iriguchi, S., Uemura, Y., Shimizu, T., Takayama, N., Yamada, D., Nishimura, K., Ohtaka, M., Watanabe, N., Takahashi, S., Iwamoto, A., Koseki, H., Nakanishi, M., Eto, K., Nakauchi, H.: Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*, **12**, 114-126 (2013)

Oberg, L., Johansson, S., Michaëlsson, J., Tomasello, E., Vivier, E., Kärre, K., Höglund, P.: Loss or mismatch of MHC class I is sufficient to trigger NK cell-mediated rejection of resting lymphocytes

in vivo - role of KARAP/DAP12-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.*, **34**, 1646-1653 (2004)

Oka, Y., Tsuboi, A., Elisseeva, O. A., Nakajima, H., Fujiki, F., Kawakami, M., Shirakata, T., Nishida, S., Hosen, N., Oji, Y., Kawase, I., Sugiyama, H.: WT1 peptide cancer vaccine for patients with hematopoietic malignancies and solid cancers. *Sci. World J.*, **7**, 649-665 (2007)

Okita K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H., Yamanaka, S.: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods*, **8**, 409-412 (2011)

Olmer, R., Lange, A., Selzer, S., Kasper, C., Haverich, A., Martin, U., Zweigerdt, R.: Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled stirred bioreactors. *Tissue Eng. Part C Methods*, **18**, 772-784 (2012)

Otsuji, T. G., Bin, J., Yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Minami, I., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J. E., Nishino, T., Hasegawa, K., Nakatsuji, N.: A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell Reports*, **2**, 734-745 (2014)

Paccolla Mesquita, F. C., Hochman-Mendez, C., Morrissey, J., Sampaio, L. C., Taylor, D. A.: Laminin as a potent substrate for large-scale expansion of human induced pluripotent stem cells in a closed cell expansion system. *Stem Cells Int.*, **2019**, Article ID 9704945. doi: 10.1155/2019/9704945. (2019)

- Papantoniou, I., Hoare, M., Veraitch, F. S.: The release of single cells from embryoid bodies in a capillary flow device. *Chem. Eng. Sci.*, **66**, 570-581 (2011)
- Paull, D., Sevilla, A., Zhou, H., Hahn, A. K., Kim, H., Napolitano, C., Tsankov, A., Shang, L., Krumholz, K., Jagadeesan, P., Woodard, C. M., Sun, B., Vilboux, T., Zimmer, M., Forero, E., Moroziewicz, D. N., Martinez, H., Malicdan, M. C., Weiss, K. A., Vensand, L. B., Dusenberry, C. R., Polus, H., Sy, K. T., Kahler, D. J., Gahl, W. A., Solomon, S. L., Chang, S., Meissner, A., Eggan, K., Noggle, S. A.: Automated, high-throughput derivation, characterization and differentiation of induced pluripotent stem cells. *Nat. Methods*, **12**, 885-892 (2015)
- Pesl, M., Acimovic, I., Pribyl, J., Hezova, R., Vilotic, A., Fauconnier, J., Vrbsky, J., Kruzliak, P., Skladal, P., Kara, T., Rotrekl, V., Lacampagne, A., Dvorak, P., Meli, A. C.: Forced aggregation and defined factors allow highly uniform-sized embryoid bodies and functional cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Heart Vessels*, **29**, 834-846 (2014)
- Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W., Besser, D.: E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep.*, **12**, 720-726 (2011)
- Rim, Y. A., Park, N., Nam, Y., Ham, D. S., Kim, J. W., Ha, H. Y., Jung, J. W., Jung, S. M., Baek, I. C., Kim, S. Y., Kim, T. G., Song, J., Lee, J., Park, S. H., Chung, N. G., Yoon, K. H., Ju, J. H.: Recent progress of national banking project on homozygous HLA-typed induced pluripotent stem cells in South Korea. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **12**, e1531-e1536 (2018)
- Sachamitr, P., Hackett, S., Fairchild, P. J.: Induced pluripotent stem cells: challenges and opportunities for cancer immunotherapy. *Front Immunol.*, **5**, 176 (2014)

Sachlos, E., Auguste, D. T.: Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive biochemicals: A strategy for stem cell differentiation. *Biomaterials*, **29**, 4471-4480 (2008)

Sadelain, M., Rivière, I., Riddell, S.: Therapeutic T cell engineering. *Nature*, **545**, 423-431 (2017)

Saias, L., Gomes, A., Cazales, M., Ducommun, B., Lobjoins, V.: Cell-cell adhesion and cytoskeleton tension oppose each other in regulating tumor cell aggregation. *Cancer Res.*, **75**, 2426-2433 (2015)

Samoilova, E. M., Kalsin, V. A., Kushnir, N. M., Chistyakov, D. A., Troitskiy, A. V., Baklaushev, V. P.: Adult neural stem cells: basic research and production strategies for neurorestorative therapy. *Stem Cells Int.*, **2018**, Article ID 4835491. doi: 10.1155/2018/4835491. (2018)

Sato, H., Idiris, A., Miwa, T., Kumagai, H.: Microfabric vessels for embryoid body formation and rapid differentiation of pluripotent stem cells. *Sci. Rep.*, **6**, 31063 (2016)

Schötz, E. M., Lanio, M., Talbot, J. A., Manning, M. L.: Glassy dynamics in three-dimensional embryonic tissues. *J. R. Soc. Interface*, **10**, 20130726 (2013)

Schwarz, R. P., Goodwin, T. J., Wolf, D. A.: Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity. *J. Tissue Cult. Methods*, **14**, 51-57 (1992)

Senju, S., Haruta, M., Matsumura, K., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takamatsu, K., Irie, A., Nishimura, Y.: Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Ther.*, **18**, 874-883 (2011)

Senju, S., Haruta, M., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Nishimura, Y.: Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, **27**, 1021-1031 (2009)

- Shafa, M., Sjønnesen, K., Yamashita, A., Liu, S., Michalak, M., Kallos, M. S., Rancourt, D. E.: Expansion and long-term maintenance of induced pluripotent stem cells in stirred suspension bioreactors. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **6**, 462-472 (2012)
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., Yamanaka, S.: Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **16**, 115-130 (2017)
- Spencer, H. L., Easthem, A. M., Merry, C. L. R., Southgate, T. D., Perez-Campo, F., Soncin, F., Ritson, S., Kemler, R., Stern, P. L., Ward, C. M.: E-cadherin inhibits cell surface localization of the promigratory 5T4 oncofetal antigen in mouse embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2838-2851 (2007)
- Stirbat, T. V., Tlili, S., Houver, T., Rieu, J. P., Barentin, C., Delanoë-Ayari, H.: Multicellular aggregates: a model system for tissue rheology. *Eur. Phys. J. E. Soft Matter*, **36**, 84 (2013)
- Sugiyama, H.: Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int. J. Hematol.*, **73**, 177-187 (2001)
- Tabata, Y., Horiguchi, I., Lutolf, M. P., Sakai, Y.: Development of bioactive hydrogel capsules for the 3D expansion of pluripotent stem cells in bioreactors. *Biomater. Sci.*, **2**, 176-183 (2014)
- Taguchi, A., Kaku, Y., Ohmori, T., Sharmin, S., Ogawa, M., Sasaki, H., Nishinakamura, R.: Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **14**, 53-67 (2014)
- Takahashi, K., Yamanaka, S.: A developmental framework for induced pluripotency. *Development*, **142**, 3274-3285 (2015)

Takahashi, J.: Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's diseases: an interview with JunTakahashi. *Regen. Med.*, **14**, 93-95 (2019)

Takahashi, J.: Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: the Kyoto trial. *Prog. Brain Res.*, **230**, 213-226 (2017)

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**, 861-872 (2007)

Takahashi, K., Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676 (2006)

Takahashi, K., Yamanaka, S.: A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 183-193 (2016)

Takashima, Y., Guo, G., Loss, R., Nichols, J., Ficz, G., Krueger, F., Oxley, D., Santos, F., Clarke, J., Mansfield, W., Reik, W., Bertone, P., Smith, A.: Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*, **162**, 452-453 (2015)

Tan, S. H., Ye, L.: Maturation of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: a critical step for drug development and cell therapy. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **11**, 375-392 (2018)

Tavassoli, H., Alhosseini, S. N., Tay, A., Chan, P. P. Y., Weng Oh, S. K., Warkiani, M. E.: Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: a biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. *Biomaterials*, **181**, 333-346 (2018)

Terstegge, S., Laufenberg, I., Pochert, J., Schenk, S., Itskovitz-Eldor, J., Endl, E., Brüstle, O.: Automated maintenance of embryonic stem cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **96**, 195-201 (2007)

Thomas, R. J., Anderson, D., Chandra, A., Smith, N. M., Young, L. E., Williams, D., Denning, C.: Automated, scalable culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, **102**, 1636-1644 (2009)

Tohyama, S., Fujita, J., Fujita, C., Yamaguchi, M., Kanaami, S., Ohno, R., Sakamoto, K., Kodama, M., Kurokawa, J., Kanazawa, H., Seki, T., Kishino, Y., Okada, M., Nakajima, K., Tanosaki, S., Someya, S., Hirano, A., Kawaguchi, S., Kobayashi, E., Fukuda, K.: Efficient large-scale 2D culture system for human induced pluripotent stem cells and differentiated cardiomyocytes. *Stem Cell Reports*, **9**, 1406-1414 (2017)

Vitillo, L., Baxter, M., Iskender, B., Whiting, P., Kimber, S. J.: Integrin-associated focal adhesion kinase protects human embryonic stem cells from apoptosis, detachment, and differentiation. *Stem Cell Reports*, **2016**, 167-176 (2016)

Vitillo, L., Kimber, S. J.: Integrin and FAK regulation of human pluripotent stem cells. *Curr. Stem Cell Rep.*, **3**, 358-365 (2017)

Vizcardo, R., Masuda, K., Yamada, D., Ikawa, T., Shimizu, K., Fujii, S., Koseki, H., Kawamoto, H.: Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8+ T cells. *Cell Stem Cell*, **12**, 31-36 (2013)

Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Ogura, F., Murakami, T., Niwa, A., Dezawa, M.: Morphologic and gene expression criteria for identifying human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, **7**, e48677 (2012)

- Wang, Y., Chou, B. K., Dowey, S., He, C., Gerecht, S., Cheng, L.: Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions. *Stem Cell Res.*, **11**, 1103-1116 (2013)
- Wilson, J. L., McDevitt, T. C.: Stem cell microencapsulation for phenotypic control, bioprocessing, and transplantation. *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 667-682 (2013)
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H. K., Nagy, A.: piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, **458**, 766-770 (2009)
- Wu, J., Rostami, M. R., Olaya, D. P. C., Tzanakakis, E. S.: Oxygen Transport and Stem Cell Aggregation in Stirred-Suspension bioreactor cultures. *PLoS One*, **9**, e102486 (2014)
- Xie, Y., Wang, F., Zhong, W., Puscheck, E., Shen, H., Rappolee, D. A.: Shear stress induced preimplantation embryo death that is delayed by the zona pellucida and associated with stress-activated protein kinase-mediated apoptosis. *Biol. Reprod.*, **75**, 45-55 (2006)
- Xu, H., Wang, B., Ono, M., Kagita, A., Fujii, K., Sasakawa, N., Ueda, T., Gee, P., Nishikawa, M., Nomura, M., Kitaoka, F., Takahashi, T., Okita, K., Yoshida, Y., Kaneko, S., Hotta, A.: Targeted disruption of HLA genes via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with enhanced immune compatibility. *Cell Stem Cell*, **24**, 566-578 (2019)
- Xu, Y., Zhu, X., Hahm, H. S., Wei, W., Hao, E., Hayek, A., Ding, S.: Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8129-8134 (2010)

- Xue, S. A., Gao, L., Hart, D., Gillmore, R., Qasim, W., Thrasher, A., Apperley, J., Engels, B., Uckert, W., Morris, E., Stauss, H.: Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene transduced human T cells. *Blood*, **106**, 3062-3067 (2005)
- Ye, L., Chang, Y. H., Xiong, Q., Zhang, P., Zhang, L., Somasundaram, P., Lepley, M., Swingen, C., Su, L., Wendel, J. S., Guo, J., Jang, A., Rosenbush, D., Greder, L., Dutton, J. R., Zhang, J., Kamp, T. J., Kaufman, D. S., Ge, Y., Zhang, J.: Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. *Cell Stem Cell*, **15**, 750-761 (2014)
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., Thomson, J. A.: Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, **324**, 797-801 (2009)
- Yu, L., Li, J., Hong, J., Takashima, Y., Fujimoto, N., Nakajima, M., Yamamoto, A., Dong, X., Dang, Y., Hou, Y., Yang, W., Minami, I., Okita, K., Tanaka, M., Luo, C., Tang, F., Chen, Y., Tang, C., Kotera, H., Liu, L.: Low cell-matrix adhesion reveals two subtypes of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, **11**, 142-156 (2018)
- Yuan, F., Fang, K. H., Cao, S. Y., Qu, Z. Y., Li, Q., Krencik, R., Xu, M., Bhattacharyya, A., Su, Y. W., Zhu, D. Y., Liu, Y.: Efficient generation of region-specific forebrain neurons from human pluripotent stem cells under highly defined condition. *Sci. Rep.*, **5**, 18550 (2015)
- Zeng, D., Ou, D. B., Wei, T., Ding, L., Liu, X. T., Hu, X. L., Li, X., Zheng, Q. S.: Collagen/ β 1 integrin interaction is required for embryoid body formation during cardiogenesis from murine induced pluripotent stem cells. *BMC Cell Biol.*, **14**, 5 (2013)

- Zhang, J., Wilson, G. F., Soerens, A. G., Koonce, C. H., Yu, J., Palecek, S. P., Thomson, J. A., Kamp, T. J.: Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ. Res.*, **104**, e30-41 (2009)
- Zhang, M., Schöler, H. R., Greber, B.: Rapid and efficient generation of neurons from human pluripotent stem cells in a multititre plate format. *J. Vis. Exp.*, **(73)**, 4335 (2013)
- Zhou, J., Ren, K., Dai, W., Zhao, Y., Ryan, D., Wu, H.: Pumping-induced perturbation of flow in microfluidic channels and its implications for on-chip cell culture. *Lab Chip*, **11**, 2288-2294 (2011)
- Zhou, W., Freed, C. R.: Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, **27**, 2667-2674 (2009)
- Zweigerdt, R.: Large scale production of stem cells and their derivatives. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **114**, 201-235 (2009)
- Zwi, L., Caspi, O., Arbel, G., Huber, I., Gepstein, A., Park, I. H., Gepstein, L.: Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*, **120**, 1513-1523 (2009)

本報に関する論文

1. Kato, Y., Kim, M. H., Kino-oka, M.: Comparison of growth kinetics between static and dynamic cultures of human induced pluripotent stem cells. *J Biosci. Bioeng.*, **125**, 736–740 (2018).
2. Kato, Y., Matsumoto, T., Kino-oka, M.: Effect of liquid flow by pipetting during medium change on deformation of hiPSC aggregates. *Regen. Ther.*, doi: 10.1016/j.reth.2019.03.004 (in press).

謝辞

本研究を行うにあたり，終始適切な御指導，御助言を賜りました紀ノ岡正博教授に，謹んで感謝の意を表します。研究を行う上で，様々な場面で多くのアドバイスを頂きました大阪工業大学長森英二准教授に，深く感謝いたします。研究室生活全般においても様々な御指導を頂きました金美海准教授に心から感謝いたします。機械化された培地交換操作による細胞集塊培養の研究の方向性や論文執筆について、様々な御助言をしていただいた味の素株式会社松本拓也様に心から感謝いたします。

研究生活において、いつも丁寧な技術的指導をしていただきました堀江正信助教，北島英樹特任助教には心よりお礼申し上げます。また、研究活動に対する様々な協力を快く引き受けて頂き、さらに、細かな部分にも相談に乗って頂いて真摯に対応して下さった園井理恵さん，小川祐樹さん，中村匡さんをはじめとする研究室の皆様に感謝致します。