The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト細胞集塊を用いた回転浮遊培養の特性に関する研究
Author(s)	橋田, 礼博
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88008
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

ヒト細胞集塊を用いた回転浮遊培養の特性に関する研究

橋田 礼博

2022 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

第 1 章 緒論 1

1.1 緒言 1

1.2 ヒト細胞の培養技術 2

1.3 ヒト細胞集塊の浮遊培養 4

1.4 ヒト細胞集塊の浮遊培養手法 6

1.5 回転浮遊培養の原理と歴史 7

1.6 本研究の目的と構成 10

第 2 章 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の反応速度論的解釈 13

2.1 緒言 13

2.2 実験材料および方法 15

2.2.1 使用細胞および培養方法 15

2.2.2 浮遊静置培養および回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の培養 15

2.2.3 細胞集塊形態の観察 16

2.2.4 細胞数，細胞集塊サイズ，細胞集塊数の測定 16

2.2.5 反応速度定数の定義 17

2.2.6 凍結切片作製および免疫蛍光染色 19

2.2.7 統計解析 20

2.3 実験結果 21

2.3.1 細胞集塊サイズ分布の経時変化 21

2.3.2 細胞数，細胞集塊数，平均細胞集塊体積の経時変化の速度論的解析 25

2.3.3 ヒト iPS 細胞集塊における E-cadherin および細胞外マトリックスの局在性の観察 28

2.4 考察 30

2.4.1 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の挙動特性 30

2.4.2 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の挙動特性が細胞増殖に与える影響 33

2.4.3 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動を支配する生物学的因子 37

2.4.4 ヒト iPS 細胞集塊群の培養における回転浮遊培養の特性 38

2.5 小括 40

第 3 章 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞由来心筋組織の成熟化メカニズムの解明 41
3.1 緒言 41
3.2 実験材料および方法 43
3.2.1 使用細胞および培養方法 43
3.2.2 ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導および細胞集塊の単分散処理 43
3.2.3 フローサイトメトリーによるトロポニン陽性率の測定 44
3.2.4 回転浮遊培養における心筋組織の培養 46
3.2.5 心筋組織の形態観察および投影面積測定 47
3.2.6 ウェスタンブロッティングによる心筋構成タンパク質形成の定量評価 47
3.2.7 蛍光染色および心筋組織構造の 3 次元観察 48
3.3.8 心筋組織切片の免疫蛍光染色 48
3.2.9 統計解析 49
3.3 実験結果 50
3.3.1 回転浮遊培養における心筋組織形態変化の特性 50
3.3.2 心筋組織における心筋構成タンパク質形成の特性 52
3.3.3 心筋組織における核および F-actin の空間的分布，形態，構造の特性 54
3.3.4 心筋組織における心核ラミナの局在とその形成量 56
3.4 考察 58
3.4.1 心筋組織の形態変化特性と心筋構成タンパク質の形成の関係 58
3.4.2 回転浮遊培養における心筋成熟のトリガーとなる因子 59
3.5 小括 63
第 4 章 総括 64
本報に関する論文 67
略語リスト 68
参考文献 70
謝辞 85

第 1 章　緒論

1.1　緒言

生体外における動物細胞培養に関する研究の歴史は古く，20 世紀初めに R. G. Harrison 博士がカエルの脊索から採取した細胞を培養し始めたことに端を発する (Harrison, 1907)．その後 20 世紀においては培養技術の開発 (培養液，培養器材，培養環境の開発) が飛躍的に進歩し，多種多様な細胞，組織の培養が可能になった．細胞培養技術は，生命現象の解明のみならず，それを利用した病態解明 (Egawa, *et al.*, 2012)，治療法開発 (Adachi, *et al.*, 2018)，移植材料開発 (Nishiguchi, *et al.*, 2015; Li, *et al.*, 2017)，毒性評価 (Aikawa, *et al.*, 2014)，細胞・組織製品生産 (Sharma, *et al.*, 2011) といった広範な分野に用いられており，基礎学問の発展は勿論の事，医学，工学，薬学分野を中心として多くの研究開発を支え続けてきた経緯がある (Ravi, *et al.*, 2015)．近年ではバイオテクノロジーの急速な発展に伴い，ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) (James, *et al.*, 1998) やヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) (Takahashi, *et al.*, 2007)，そしてそれらに由来する分化細胞といった多種多様なヒト細胞が出現した．これらのヒト細胞は基礎生物学研究のみならず再生医療，創薬・疾患研究といった応用研究にも多く用いられており，今後も科学技術の発展に伴い，様々な分野におけるヒト細胞培養の利用拡大が予想される (Mason, *et al.*, 2011; Inoue, *et al.*, 2014)．一方で，ヒト細胞の培養は種々の内的，外的因子によって変動しやすいという性質を有しており，この変動については全容解明に至っていないのが現状である．したがって，上述した基礎・応用研究を更に発展させていくためには，当該課題を念頭に置き，細胞，培地，基質，培養手法，培養操作，培養工程をはじめとする種々の因子の特性理解やその制御方法の構築まで含めた「培養技術の開発」を行っていくことが，今後も強く求められ続けると考えられる (Kino-oka, *et al.*, 2019; Kim and Kino-oka, 2020).

その点，我々培養工学を修める者の役割の 1 つは，現在の培養技術をさらに発展させていくための，理論的に体系化された方法論や考え方を示すことにあると考えられる．本研究はそのような考えの下，「ヒト細胞集塊培養における回転浮遊培養の特性とその意義」という

主題に対して，工学的観点から新たな解釈を与えることを目的として行われたものである．

1.2　ヒト細胞の培養技術

ヒト細胞培養の主たる目的は，生体内から取り出した細胞の生命維持，増殖，分化を生体外において行う事にある．その目的達成にあたって，細胞の能力を最大限に引き出すためのツールとしてこれまで多種多様なバイオリアクターシステムの開発がなされてきた．一般にバイオリアクターは「綿密に監視された環境条件および厳密に制御された操作条件の下，生物学的および生化学的プロセスが発生するデバイス」と定義され (Martin, *et al.*, 2004)，微生物培養用のバイオリアクターシステムの開発が始まりと言われている (Lee, 1986)．その後培養対象は植物細胞や動物細胞，ヒト細胞など多岐にわたるようになり，現在では培養対象や目的に応じて多種多様なバイオリアクターシステムの開発がなされている (Glacken, *et al.*, 1983; Abdullah, *et al.*, 2005).

本研究で対象としているヒト細胞の場合は，培養対象は大きく足場依存性細胞と足場非依存性細胞に分類され，血球系細胞のような一部の足場非依存性細胞を除いて，多くの細胞が足場依存性細胞に分類される．足場依存性細胞は基本的に培養面に吸着した細胞外マトリックスと呼ばれる一連のタンパク質群に対してインテグリン受容体を介して接着する (Bershadsky *et al.*, 2003)．また，細胞が複数存在する場合は，細胞同士がカドヘリンやギャップ結合構成タンパク質，密着結合構成タンパク質をはじめとする各種タンパク質を介した細胞-細胞間接着を形成する (Takeuchi, 1988; Vannia, 2002; Roy and Verx, 2008)．細胞はこれらの接着を形成することで生存シグナルをはじめとする様々なシグナルがはたらき，細胞としての生命活動 (生命維持，増殖，分化) を行うことができるようになる (Kennis, *et al.*, 1997; Miyamoto, *et al.*, 1998)．また，これらの生命活動は，細胞が培地中に含まれる酸素，栄養分，イオン類をはじめとする各種調節因子，レセプターをターゲットとする因子 (サイトカイン類，ホルモン) を利用することによってなされるものでもある (Yao and Asayama, 2017)．したがってヒト細胞培養用のバイオリアクターシステムは，細胞が生命活動を行うための場を提供する重要なツールであり，これらの細胞の特徴を理解した上での設計が求められる．現

在汎用される細胞培養用ディッシュ・フラスコはこれらの細胞を培養するために開発された最も基本的なバイオリアクターシステムであり, 細胞の管理や取り扱いが容易であるといった観点から基礎研究に多く用いられてきた (Ince, *et al.*, 1985). 他にも，多層型培養用フラスコやローラーボトル型培養容器 (Fayaz, *et al.*, 1997; Berson and Friederichs, 2008)，ホローファイバー型培養容器, マイクロキャリア型式培養容器といったバイオリアクターシステムも存在し, これらは培養面積を拡大することによってより効率的に有用物質生産や細胞生産を行うことを目的として設計，利用されてきた.

また，足場依存性細胞は，上述した細胞-基質間接着や細胞-細胞間接着を組み合わせることにより，立体構造を有する細胞集塊を形成することも知られている．細胞集塊の形成方法としては，細胞同士が自然に凝集して細胞集塊が形成するパターン (Nath, *et al.*, 2017; Kato, *et al.*, 2018; Kim, *et al.*, 2019) や，足場を用意して細胞を播種し，細胞集塊を形成させるパターン (Li, *et al.*, 2017; Badekila, *et al.*, 2020)，さらに単層培養で形成させた細胞シートを多層にわたって重ね合わせることによって細胞集塊を形成させるパターン (Kobayashi and Okano, 2010; Ngo, *et al.*, 2013) といったものが存在する．これらの細胞集塊を培養するために，単層培養用のバイオリアクターシステムだけでなく，非接着性のディッシュやフラスコ，浮遊攪拌型培養槽 (Sucosky, *et al.*, 2003) や灌流型バイオリアクターシステム (Langer and Vacanti, 1993; Butler, *et al.*, 2000)，バッグ培養システム (Otsuji, *et al.*, 2014)，回転浮遊培養システム (Unsworth and Lelkers, 1998; Hammond, T.G. and Hammond, M., 2001) といったバイオリアクターシステムも開発されてきた．これらのバイオリアクターシステムは，単層培養用バイオリアクターシステムで課題となりうる省スペース化の難しさや, 細胞集塊への物質供給律速を解消するために設計されたものがほとんどである.

以上述べてきたように，ヒト細胞の培養技術は，平面をベースとした接着培養技術の開発に始まり，その後立体をベースとする接着または浮遊培養技術の開発も進んできた．このような流れから近年では立体をベースとした接着または浮遊培養用の様々なバイオリアクターシステムが盛んに開発されている．一方，これらの中には，バイオリアクターシステムの本来の定義に基づいた「綿密に監視された環境条件および厳密に制御された操作条件の下,

生物学的および生化学的プロセスが発生する」ような考えの下，設計されていないものも数多く含まれている．特に立体構造を有する細胞集塊の培養では，平面をベースとする接着培養と比較してそもそもの生物学的現象を把握することの難しさがあり，当該問題の要因の 1 つとなっていると考えられる．したがって，これらのバイオリアクターシステムを有効に活用していくためには, 培養の特性を工学的観点から深く理解しておくことが極めて重要であると考えられる．

1.3　ヒト細胞集塊の浮遊培養

前節で述べたような背景から, 本研究ではヒト細胞集塊の浮遊培養を研究対象とすることとした．ヒト細胞集塊の浮遊培養とは，支持体がある状態またはない状態のいずれかにおいて，立体構造を有する細胞集塊を形成させ，培地中で浮遊させながら立体的に細胞の生命維持，増幅，分化を行うことである (Baraniak, *et al.*, 2012; Knight and Przyborski, 2015)．ヒト細胞集塊の浮遊培養では, 通常の平面培養と比較して細胞の核の形態や骨格形成の仕方に大きな違いが見られ, それに続く遺伝子発現やタンパク質形成にも影響を及ぼすことが知られている (Thomas, *et al.*, 2002; Vergani, *et al.*, 2004)．また，平面培養では細胞集塊の浮遊培養と比較して隣接する細胞との相互作用にも限りがあることが指摘されており, これも細胞の増幅や分化の機構に影響を及ぼすと考えられている (Cukierman, *et al.*, 2002)．その点，平面培養と比較すると細胞集塊の浮遊培養の方が生体内の 3 次元的な形態, 構造を模倣しているといった利点 (Santini and Rainaldi, 1999; Massa, et al., 2017, Roh, et al., 2019) や，細胞の増幅，分化をより効率よく行うことができるといった利点 (Matsuura, et al., 2012) を有することから, 当該培養の有用性が認識されている．

ヒト細胞集塊の浮遊培養において細胞の表現型に影響を与える因子は様々であるが, 単一の細胞集塊培養では細胞集塊周りの境界条件や細胞集塊の浮遊状態といった要素が細胞の表現型に影響を与える因子として考えられている (Hammond, T.G. and Hammond, J.M., 2001; Martin, *et al.*, 2004; Selden and Fuller, 2018) (**Fig 1.1**)．細胞集塊周りの境界条件としては培地成分の濃度勾配や，細胞集塊にはたらく剪断ストレスといったものが挙げられ，前者は細胞集

塊への物質移動に関わり(Sutherland, *et al.*, 1986; Martin, *et al.*, 1999; Ishaug, *et al.*, 1997)，後者は細胞集塊表面の細胞に対する力学的負荷の付与による細胞障害または細胞特性の変化に関わっている (Kato, *et al.*, 2018; Kato, *et al.*, 2019)．細胞集塊の浮遊状態に関しては細胞集塊が沈降状態であるか浮遊状態であるかによって細胞集塊そのものにはたらく力, 特に重力の分散が起こり，直接的または間接的に細胞の表現型に影響を与える可能性がある (Koaykul, *et al.*, 2019)．複数細胞集塊群の場合は隣接する細胞集塊間同士の合一や衝突といった現象が起こり，結果として細胞の表現型に影響を及ぼす (Stephen, et al., 2004) (**Fig. 1.1**)．これらの要素は浮遊培養の手法によって異なるため, 当該培養手法においてどのような要素が細胞特性に影響を及ぼしうるのかを理解しておくことが重要となる.

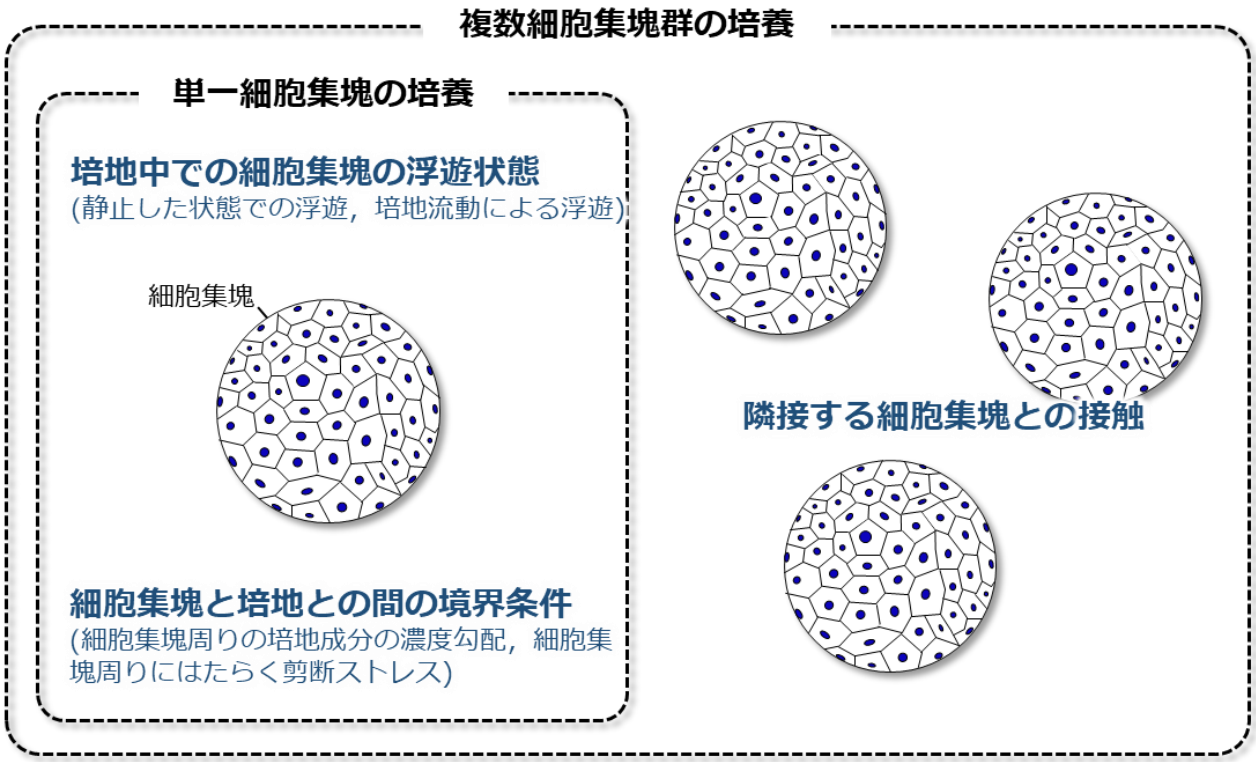
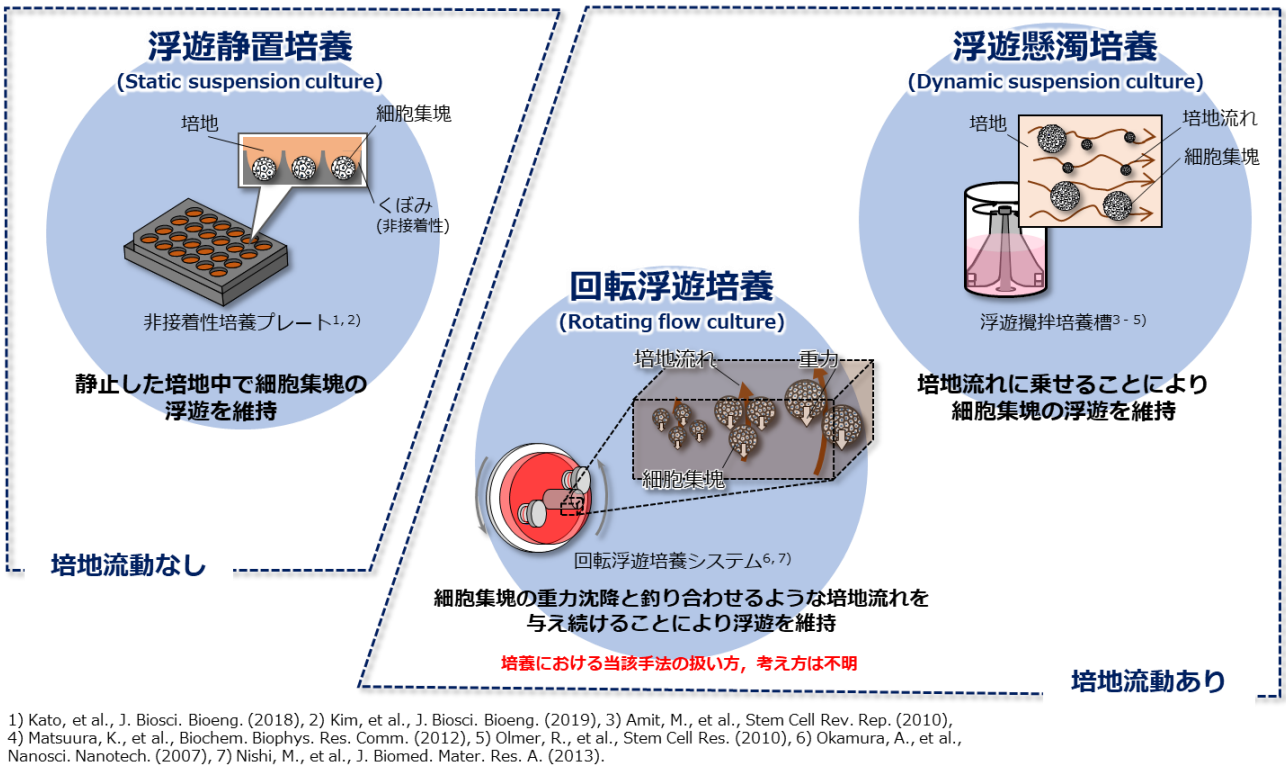


Fig. 1.1 The possible factors which affect the characteristics of cell aggregates in suspension culture

1.4　ヒト細胞集塊の浮遊培養手法

ヒト細胞集塊の浮遊培養の手法は，細胞集塊の浮遊状態を如何にして保つかという観点から，代表的なものとして浮遊静置培養，浮遊懸濁培養，そして回転浮遊培養の 3 つに分類される (**Fig. 1.2**).



1) Kato, et al., J. Biosci. Bioeng. (2018), 2) Kim, et al., J. Biosci. Bioeng. (2019), 3) Amit, M., et al., Stem Cell Rev. Rep. (2010), 4) Matsuura, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (2012), 5) Olmer, R., et al., Stem Cell Res. (2010), 6) Okamura, A., et al., Nanosci. Nanotech. (2007), 7) Nishi, M., et al., J. Biomed. Mater. Res. A. (2013).

Fig. 1.2 Representative culture methods of human cell aggregates in suspension.

浮遊静置培養は培地中で細胞集塊が静止した状態で浮遊を維持するものであり，具体的には非接着性の培養プレート (Kato, *et al.*, 2018; Kim, *et al.*, 2019) や，ゲランガムのような粘性を高める物質を添加した培地にて浮遊を維持するバッグ培養システム (Otsuji, *et al.*, 2014) といったものが挙げられる．この培養手法は培地流動を伴わないため細胞集塊に対する剪断ストレスや隣接する細胞集塊との相互作用の影響を抑えることができる．一方で，細胞集塊周りでは酸素・栄養分の消費と老廃物の蓄積により培地成分の濃度分布が不均一となり，細胞集塊に対する物質移動が効率よく行えないという欠点もある．その点浮遊懸濁培養や回転浮

遊培養は培地流動を伴うため細胞集塊周りの培地成分の不均一性は解消される. 浮遊懸濁培養は培地を混合することにより流れを発生させて細胞集塊の浮遊状態を維持する培養手法であり，浮遊攪拌培養槽に代表される様々な培養システムが開発されている (Amit, *et al.*, 2011; Matsuura, *et al.*, 2012; Olmer, *et al.*, 2013). 均一系として扱えるためスケールアップが容易であるという利点を有するが, 培地流動によって発生する乱流または遷移流から細胞に剪断ストレスがはたらくため，細胞障害が発生するという欠点もある. 回転浮遊培養も同じく液流動を駆動力として細胞集塊の浮遊を保つ培養手法であるが, 浮遊懸濁培養とは概念的に異なり, 細胞集塊の重力沈降と釣り合わせるような最低限の培地流動を与えることにより細胞集塊の浮遊状態を維持する. 回転浮遊培養は浮遊懸濁培養と比較して細胞集塊に対する剪断ストレスを抑えることができるため, 細胞集塊への負荷が少ない培養方法として認識されている. その点，回転浮遊培養は低剪断ストレスかつ効率的な物質移動が可能という他の培養手法にはない利点を有するが, 浮遊懸濁培養と比較すると不均一系となるためスケールアップの容易性は劣る.

以上のように, いずれも如何にして細胞集塊の浮遊状態を維持するかという考えの下考案されたものであるが，その中で回転浮遊培養の特性は他の 2 つの培養手法とは，細胞集塊に対する培地流れの与え方の観点から概念的に区別される. 一方，回転浮遊培養の持つ培養特性の本質的な意味やその工学的意義については，実は未だ不明な点が多く，当該培養で起こる生物学的現象現象のメカニズムや, 当該特性の利用方法も明らかではないのが現状である. このような背景から，本研究では回転浮遊培養の概念に着目し，培養におけるこの本質的な意味と工学的意義について明らかにすることとした.

1.5 回転浮遊培養の歴史と原理

回転浮遊培養は，歴史的には 1970 年代にアメリカ航空宇宙局 (National Aeronautics and Space Administration (NASA)) が，宇宙空間における基礎生物学研究やそれを元にした病態・疾患研究を地球上で行うため，地球上で細胞集塊の微小重力状態，すなわち宇宙空間と同じように細胞集塊に重力がはたらかない状態を作り出すことを目的として開発した培養シス

テムと言われている (NASA, 2002). 当時は宇宙航空産業の黎明期であり，基礎学問の発展は勿論の事，実際に宇宙空間で業務に従事する者の健康や安全を守るため，宇宙空間における生物学研究が行われ始めた時期というのも背景にあると考えられる．一方で，地上で培養を行う以上細胞集塊には重力がはたらくため，この微小重力状態という考え方が正しいかどうかについて長年議論が繰り広げられてきた．その結果，現在では後述する原理のように，「細胞集塊の重力沈降と釣り合わせるような培地流れを与え続ける培養手法」という考え方が広まるようになった (Hammond, T.G. and Hammond, M., 2001; Sladkova and Peppo, 2014; Varley, et al., 2017).

回転浮遊培養を用いた細胞，組織の培養に関する研究も多く行われており，その培養対象や培養目的も多岐にわたる．ES 細胞をはじめとする多能性幹細胞の培養では，従来の浮遊静置培養や浮遊懸濁培養と同程度かそれ以上の増幅効率や分化効率を示すといった例が報告されている (Rungarunlert, *et al.*, 2013; Teo, *et al.*, 2014). また，増幅培養や分化誘導培養だけでなく，これらの分化細胞を用いた組織培養においても，通常の浮遊静置培養や灌流培養と比較して重厚かつ機能性に優れた軟骨組織 (Obradovic, *et al.*, 2001; Pei, *et al.*, 2002; Ohyabu, *et al.*, 2006; Sakai, *et al.*, 2009)，骨組織 (Sikavitsas, *et al.*, 2001; Nishi, *et al.*, 2012)，肝組織 (Okamura, *et al.*, 2007; Ishikawa, *et al.*, 2011)，腫瘍細胞組織 (Licato, *et al.*, 2001; Rhee, *et al.*, 2001) の作製が可能であることが示されている．さらに，間葉系幹細胞を用いたエクソソーム生産に関する研究例も報告されており，回転浮遊培養ではエクソソームの生産量が通常の接着培養と比較して大きく向上することも示されている (Yan, *et al.*, 2021).

組織培養工学に関する研究では，培地流れに伴う酸素・栄養分の効率的な供給や低剪断ストレスといった因子が，組織内部への物質供給や成熟化因子の産生，細胞-細胞間の接着や細胞-基質間の接着の向上に寄与し，組織構造・機能の獲得に至ったとの解釈がなされた報告例 (Okamura, *et al.*, 2007; Ishikawa, *et al.*, 2011; Nishi, *et al.*, 2012) もあるが直接的な機序解明には至っていない．また他にも，組織培養工学分野だけでなく，物質生産に関する研究においても，回転浮遊培養における特有の立体細胞集塊，組織の浮遊状態が細胞内の遺伝子発現のパターンを変化させ，効率の良い組織成熟化や物質生産に至ったという解釈も存在する

(Yan, *et al.*, 2021) が，これに至るまでの直接的な因果関係もまた示されてはいない．

このように，いずれの報告も細胞増幅や分化の結果，出力として得られる表現型に着目したものがほとんどであり，回転浮遊培養を行うことによってどのようにしてその表現型に至ったのか，その仕組みについては不明な点が多い．その原因としては，回転浮遊培養の装置的な特性と，培養過程で起こる生物学的現象の関係について明らかになっていないことが挙げられる．

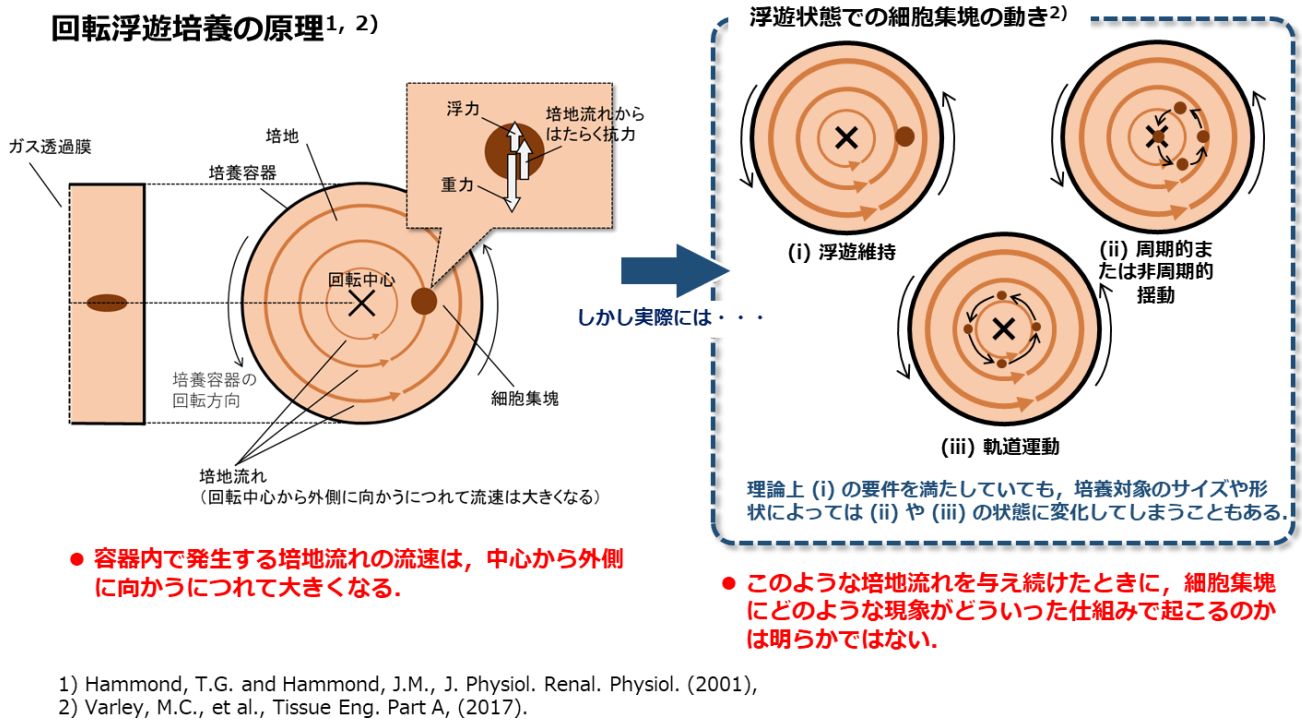


Fig. 1.3 The principle of rotating flow culture and the relationship between aggregate morphology and medium flow in aggregate settling state.

回転浮遊培養では，培地が満たされた円形のベッセルが水平方向の回転軸を中心として回転することにより，この回転軸の周りに同心円状の培地流れが発生する．この培地流れの流速は，中心からの距離が大きくなるにつれて速くなる．そしてこの培地流れのうち，鉛直上向き方向の液流れによって生じる力と，細胞集塊にはたらく重力，浮力が釣り合うことで，原理的には細胞集塊が培地中で浮遊し続ける状態が実現するとされている(Hammond, T.G.

and Hammond, M., 2001) (**Fig. 1.3**). 近年では回転浮遊培養における粒子挙動や流体流れに関する研究も多くなされるようになり, 以下のような 3 つのような浮遊特性を持つことも明らかになった ;「(i) 細胞集塊が見かけ上静止して浮遊を維持する状態」,「(ii) 周期的または非周期的揺動を伴いながら細胞集塊が浮遊する状態」, そして「(iii) 細胞集塊が培地流れに乗って軌道運動しながら浮遊する状態」である (Varley, et al., 2017) (**Fig. 1.3**). このように, 理論上 (i) の状態となるように細胞集塊に対して培地流れを与え続けていたとしても, (ii) や (iii) のような浮遊状態になる場合もある. これは, 培養対象としている細胞集塊の種類によってサイズや形状が異なり, それに対する培地流れのはたらき方が変わるため, 鉛直方向の力のつり合いが取れなくなってしまうからではないかと考えられている (Hammond, T.G. and Hammond, M., 2001; Varley, et al., 2017).

以上のような装置的特性を有する回転浮遊培養であるが, 結局のところ, 細胞集塊の重力沈降と釣り合わせるような培地流れを与え続けたときに, 細胞集塊にどのような生物学的現象がどのような仕組みで起こるのか, またそれが細胞の増幅や分化に如何なる影響を及ぼすのかという点は, 先述の通り今もなお不明である. このような背景を鑑み, 本研究では回転浮遊培養の装置的な特性と培養過程で起こる生物学的現象の関係に着目し, 典型的な例として複数細胞集塊群と単一細胞集塊の培養を対象に現象解明を行う事で, 今まで未解明であった回転浮遊培養の特性 (細胞集塊の重力沈降と釣り合わせるような培地流れを与え続けることの意味) とその工学的意義 (培養における当該特性の扱い方, 考え方) について明らかにする事とした.

1.6 本研究の目的と構成

本研究の目的は, ヒト細胞集塊を用い, 培養過程における現象解明を通じて回転浮遊培養の特性とその工学的意義を明らかにすることである. 目的達成にあたり, 本研究では複数細胞集塊群および単一細胞集塊の培養を対象として, 培養過程で起こる現象と機構について調査を行い, その結果を回転浮遊培養の装置的な特性と結びつけることで, 回転浮遊培養の特性とその工学的意義について明らかにする, という戦略をとった.

第 1 章では，種々のヒト細胞集塊の浮遊培養手法における回転浮遊培養の位置づけと概念，そして当該培養手法の特性について明らかにすることの重要性について述べた.

第 2 章では回転浮遊培養において複数細胞集塊群に起こる現象を明らかにするため, ヒト iPS 細胞の浮遊培養を研究対象とし，細胞集塊群の挙動特性とそれが細胞増殖に及ぼす影響について反応速度論的に解釈した. さらにこの解釈結果を特性の異なる 2 種類の細胞株間で比較し, 細胞集塊挙動の違いを支配する生物学的因子とその機構について考察した. 最後にこれらの結果を受けて, 複数細胞集塊群の培養における回転浮遊培養の特性について議論した.

続く第 3 章では，単一細胞集塊の培養における回転浮遊培養の影響を明らかにするため, ヒト iPS 細胞由来心筋組織を対象としてその成熟化メカニズム (分化プロセスの 1 つ) の解明を行った. まず心筋組織の形態変化の特性と成熟化マーカー形成の特性の関係について調査を行い，心筋組織の成熟化過程で心筋組織に起こる現象を明らかにした. さらにその結果を受けて当該現象の機構やそれが心筋成熟に及ぼす影響を明らかにするため, 心筋組織構造の特性について調査を行った. 以上の結果を元に回転浮遊培養における成熟化メカニズムがどのようなものであるのか, そしてそれが回転浮遊培養のどのような要素によって引き起こされるのかについて考察した.

第 4 章では総括として第 2 章および第 3 章で得られた結果をまとめ，これらの結果から回転浮遊培養の特性とその工学的意義について述べた.

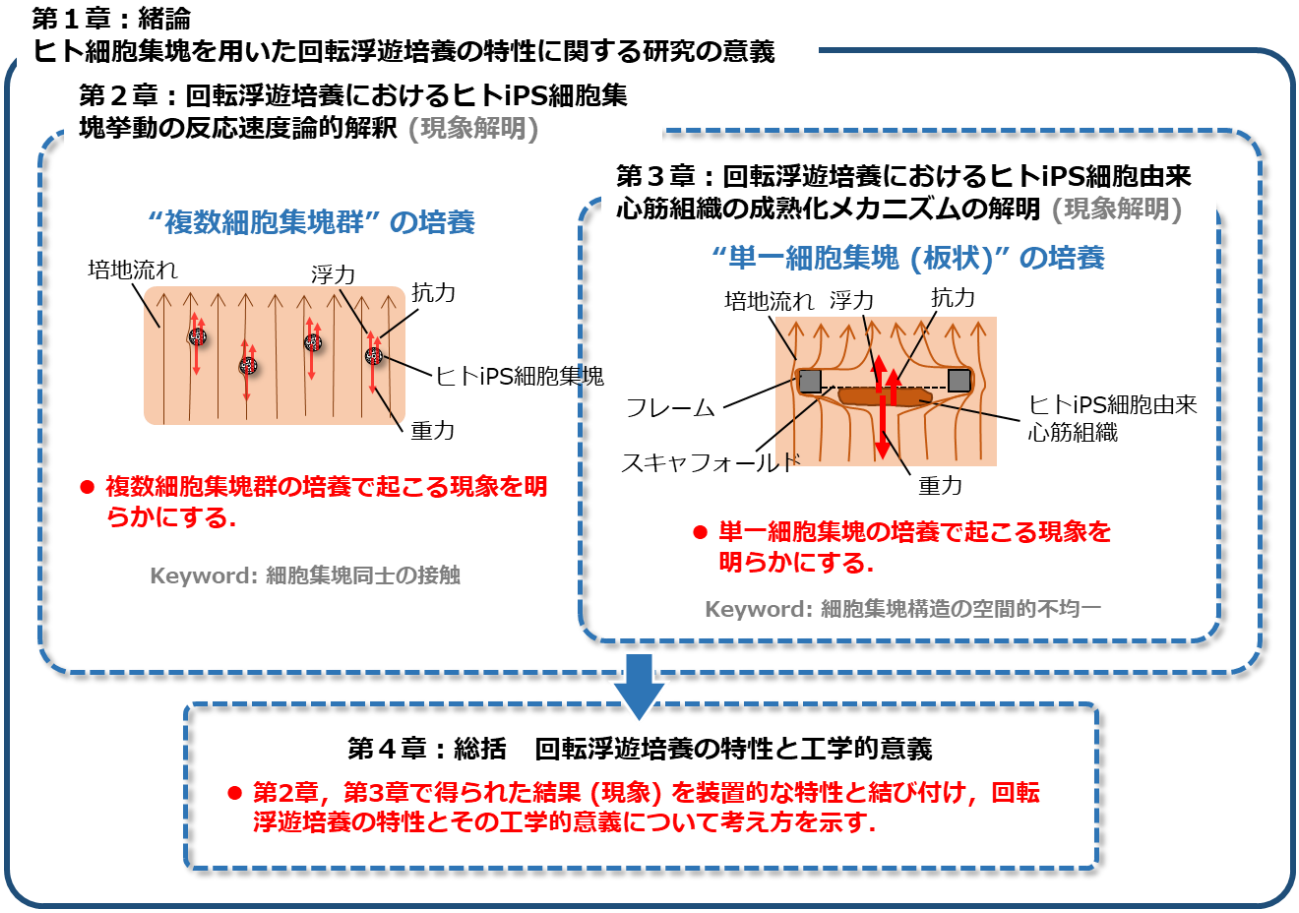


Fig. 1.4 Outline of this study.

第 2 章 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の反応速度論的解釈

2.1 緒言

近年，基礎生物学研究のみならず，再生医療，創薬・疾患研究といった応用研究におけるヒト iPS 細胞の利用拡大に伴い，質・量ともに十分な細胞を確保するための大量培養技術の確立が強く求められている (Henning, *et al.*, 2015)．ヒト iPS 細胞の大量培養には，省スペース化や高密度培養が可能な浮遊培養が適しているとされており，これまでにも多くのヒト iPS 細胞の浮遊培養に関する研究が行われてきた．代表的なものとしては，浮遊攪拌培養槽を用いた浮遊懸濁培養 (Olmer, *et al.*, 2010; Amit, *et al.*, 2011; Bemard, *et al.*, 2017; Nath, *et al.*, 2017) や，非接着性培養プレートを用いた浮遊静置培養 (Kato, *et al.*, 2018; Kim, *et al.*, 2019), 培養槽そのものを攪拌する振とう培養 (Horiguchi, *et al.*, 2016; Ibuki, *et al.*, 2019) といったものが挙げられ, いずれの培養手法においてもヒト iPS 細胞の増殖特性を考慮した研究開発が行われている．浮遊培養におけるヒト iPS 細胞の増殖に影響を与える因子は様々であるが, 最終的には培養過程における細胞の挙動が変化し, 結果として細胞数や細胞密度といった細胞増殖に関する表現型が現れる．したがって，種々の培養特性がヒト iPS 細胞の増殖という表現型に与える影響を理解するためには, 培養過程で起こる細胞挙動の特性を工学的観点から理解する事が極めて重要であると考えられる.

ヒト iPS 細胞の浮遊培養の基本的な特性として，細胞同士が E-cadherin を介した細胞-細胞間接着を形成することにより立体構造を有する細胞集塊が形成されることが知られている (Kim, *et al.*, 2019)．これらの細胞集塊は培養の経過とともに細胞分裂によって集塊内の細胞数が増加し，細胞集塊サイズが拡大していく(Kato, *et al.*, 2018; Kim, *et al.*, 2019)．また，集塊同士が互いに凝集してより巨大な細胞集塊を形成する集塊合一 (Stephen, *et al.*, 2004) や, 細胞集塊から単細胞が剥がれ落ちることによって発生する集塊崩壊 (Ioannis, *et al.*, 2011), また細胞集塊がより小さな細胞集塊へと割れる集塊分割 (Nath, *et al.*, 2017) といった一連の挙動が観察される. このように培養過程における細胞集塊挙動の理解に関する研究は多く行われている．一方で，これら一連の細胞集塊挙動が起こった結果として細胞増殖に対して如

何なる影響が及ぼされるのか，理論的な解釈はなされていない.

上記背景を鑑み, 本章では複数細胞集塊群の培養における回転浮遊培養の特性を明らかにするため，ヒト iPS 細胞集塊群の浮遊培養を研究対象として，培養過程における現象解明を行った．具体的には，回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の特性とそれが細胞増殖に及ぼす影響について反応速度論的に解釈するとともに, それを支配する生物学的因子について調査を行い, メカニズムについて文献を交えて考察した. 最後にこれらの結果を受けて, 複数細胞集塊群を用いた場合の回転浮遊培養の特性について議論した.

2.2　実験材料および方法

2.2.1　使用細胞および培養方法

ヒト iPS 細胞は，253G1 株および 201B7 株 (理化学研究所バイオリソースセンター提供) を使用した．細胞は，Laminin 511-E8 fragment, iMatrix-511 (Nippi Inc., Tokyo, Japan) を 0.25 μg cm^{-2} となるようにコーティングした 60 mm dish (Corning Inc., NY, USA) にて，StemFit®AK02N (Ajinomoto Inc., Tokyo, Japan，以下「培地」と表記) を用いて 37℃，5%CO_2 雰囲気下で維持培養を行った．細胞の継代では，培養上清を取り除いた後，培養面を phosphate–buffered–saline (PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) で 2 回洗浄し，10 μM Y-27632 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を含む 5 mM Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic Acid Disodium Salt Dihydrate (2NA) (Dojindo, Kumamoto, Japan)/ PBS を添加して 37℃で 10 min 静置した. 細胞を剥離した後, 細胞を遠沈管に回収し，再度 10 μM Y-27632 を含む培地を用いて培養面上に残った細胞を遠沈管に回収した．1000 rpm で 3 min 遠心分離を行った．上清を取り除いた後に，10 μM Y-27632 を含む培地で再懸濁し，単分散処理を行った．単分散された細胞について，全自動セルカウンター, Countess (Life Technologies, California, USA) を用いてトリパンブルー染色法による細胞数計測を行った．細胞数計測後，10 μM Y-27632 含有培地が入った新たな dish に，5.0×10^3 cells cm^{-2} となるように細胞を播種した．播種してから 24 h 後に 10 μM Y-27632 を含まない培地に切り替え，その後も 24 h 毎に 10 μM Y-27632 を含まない培地で培地交換を行った．培養 120 h の細胞を本実験に使用した.

2.2.2　浮遊静置培養および回転浮遊培養における iPS 細胞集塊の培養

概要を **Fig. 2.1** に示した．細胞の集塊培養では，細胞を継代培養と同じ方法で剥離・回収し，単分散処理した細胞を，10 μM Y-27632 を含む培地が入った 24 well Micro-Space Cell Culture Plate, Elplasia (Kuraray, Tokyo, Japan) に 1.0×10^5 cells mL^{-1} (2.0×10^2 cells $dimple^{-1}$) となるように播種した．細胞を播種してから 24 h 後を $t = 0$ と定義し，Static condition では 24

well Micro-Space Cell Culture Plate にて培養を $t = 72$ h まで続けた．培地交換は，10 μM Y-27632 を含む培地を用いて 24 h 毎に行った．Floating condition では，$t = 0$ において 24 well Micro-Space Cell Culture Plate で形成した細胞集塊 6.0×10^2 aggregates を回収し， 10 mL Rotating Wall Vessel (Synthecon Inc., Texas, USA) に播種した．$t = 72$ h まで 10 μM Y-27632 を含む培地で培地交換を行わずに培養を行った．

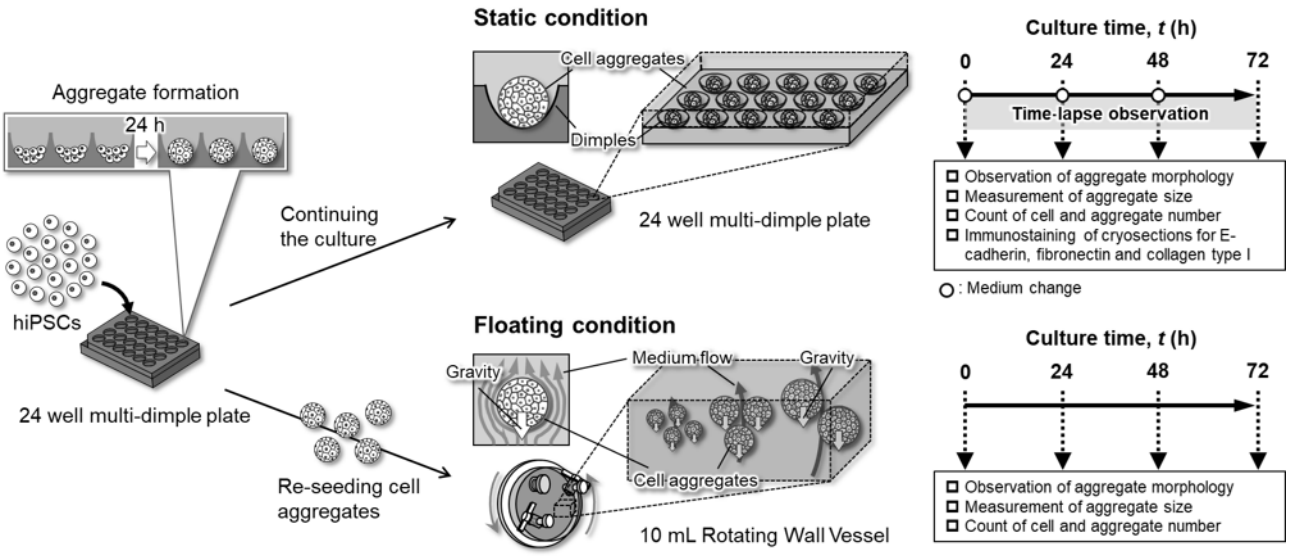


Fig. 2.1 Schematic diagram showing the outline of experimental design of current study.

2.2.3 細胞集塊形態の観察

$t = 0$, 24 h, 48 h, 72 h において，位相差顕微鏡 EVOS®XL Core (Life technologies, California, USA) の 10 倍対物レンズを用いて各培養条件における細胞集塊形態の観察を行い，位相差画像を取得した．また，Static condition において，位相差顕微鏡 Biostudio-T (Nikon Engineering, Co., Ltd., Kanagawa, Japan) の 1.6 倍対物レンズを使用して 10 min 間隔で位相差画像を取得した．取得した位相差画像を，画像処理ソフト Cell Image Viewer (Nikon Engineering) により編集し，30 fps のタイムラプス動画を作成した．

2.2.4 細胞数，細胞集塊サイズ，細胞集塊数の測定

培養過程における細胞数，細胞集塊サイズ，細胞集塊数の経時変化を明らかにするため，

以下の手順に従って総細胞数 n_c (cells)，細胞集塊投影面積 S (μm^2)，細胞集塊数 n_{ag} (aggregate) を決定した．

まず，n_c については以下の手順により決定した．t = 0, 24, 48, 72 h のそれぞれにおいて細胞集塊を回収し，PBS にて洗浄した．洗浄後，遠心分離 (1000 rpm, 3 min) を行い，上清を廃棄した．次に 10 μM Y-27632 を含む Accumax (Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA, USA) 500 μL 添加し，37℃にて 10 min 静置した (酵素処理)．その後 10 μM Y-27632 を含む培地 500 μL を添加して酵素反応を停止させた．細胞の単分散処理を行い，遠心分離 (1000 rpm，3 min) を行った後，上清を廃棄した．最後に 10 μM Y-27632 を含む培地適量にて細胞を再懸濁し，全自動セルカウンター, Countess にて細胞数計測を行った．計測結果を元に，n_c を決定した．

S および n_{ag} については以下の手順にて決定した．t = 0, 24 h, 48 h, 72 h において明視野顕微鏡 IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて細胞集塊の明視野画像取得を行った．静置培養では，24 well Micro-Space Cell Culture Plate の well 内全域の明視野画像取得を取得した．回転浮遊培養では，細胞集塊を Costar® 12 well clear TC-treated multiple well plate (Corning Inc.) に移し，well 内全域の明視野画像取得を行った．次に画像処理ソフト Image Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA) を用いて画像のタイリングを行い，well 内全域の全視野画像を作成した．タイリングした画像内の全てのオブジェクトの輪郭をトラッキングし，投影面積 S (μm^2) を測定した．本研究では $S > 0.03 \times 10^4$ μm^2 のオブジェクトを細胞集塊と定義した．また，各培養時間 t (h) において測定した細胞集塊数を n_{ag} (aggregates) と定義した．

2.2.5 反応速度定数の定義

細胞集塊挙動が細胞増殖に与える影響を明らかにするため，以下の式 (1) ~ (3) に定義した 3 種類の比速度（見かけの比増殖速度 μ^{app} (h^{-1})，見かけの比集塊数増幅速度 η^{app} (h^{-1})，見かけの比平均単一集塊あたり細胞数増幅速度 ν^{app} (h^{-1})）を算出した．

$$\mu^{\mathrm{app}} = \frac{1}{n_{\mathrm{c}}} \cdot \frac{\mathrm{d}n_{\mathrm{c}}}{\mathrm{d}t} \tag{1}$$

$$\eta^{\mathrm{app}} = \frac{1}{n_{\mathrm{ag}}} \cdot \frac{\mathrm{d}n_{\mathrm{ag}}}{\mathrm{d}t} \tag{2}$$

$$\nu^{\mathrm{app}} = \frac{1}{\overline{n_{\mathrm{ca}}}} \cdot \frac{\mathrm{d}\overline{n_{\mathrm{ca}}}}{\mathrm{d}t} \tag{3}$$

ここで $\overline{n_{\mathrm{ca}}}$ は平均単一細胞集塊当たり細胞数 (cells aggregate^{-1}) であり，以下の式 (4) により定義した．

$$\begin{aligned} \overline{n_{\mathrm{ca}}} &= \frac{1}{n_{\mathrm{ag}}} \sum_{i=1}^{n_{\mathrm{ag}}} n_{\mathrm{ca}_i} \\ \overline{n_{\mathrm{ca}}} &= \frac{1}{n_{\mathrm{ag}}} \sum_{i=1}^{n_{\mathrm{ag}}} \frac{V_{\mathrm{ag}_i}}{v_{\mathrm{c}}} \\ \overline{n_{\mathrm{ca}}} &= \frac{\overline{V_{\mathrm{ag}}}}{v_{\mathrm{c}}} \left(\overline{V_{\mathrm{ag}}} = \frac{1}{n_{\mathrm{ag}}} \sum_{i=1}^{n_{\mathrm{ag}}} V_{\mathrm{ag}_i} \right) \end{aligned} \tag{4}$$

ここで n_{ca_i}，V_{ag_i}，v_{c} はそれぞれ単一細胞集塊当たり細胞数 (cells aggregate^{-1})，細胞集塊体積 (μm^3)，シングルセルの体積 (μm^3 cell^{-1}) である．今回，本研究では，v_{c} は一定であるとみなすこととするため，式 (3) は以下のように表される．

$$\begin{aligned} \nu^{\mathrm{app}} &= \frac{1}{\overline{V_{\mathrm{ag}}}/v_{\mathrm{c}}} \cdot \frac{\mathrm{d}\left(\overline{V_{\mathrm{ag}}}/v_{\mathrm{c}}\right)}{\mathrm{d}t} \\ \nu^{\mathrm{app}} &= \frac{1}{\overline{V_{\mathrm{ag}}}} \cdot \frac{\mathrm{d}\overline{V_{\mathrm{ag}}}}{\mathrm{d}t} \end{aligned} \tag{5}$$

なお，今回，各細胞集塊の V_{ag_i} の値は，細胞集塊を球と仮定し，以下の式 (6) から見積もった．S_i は各細胞集塊の投影面積 (μm^2) である．

$$V_{\mathrm{ag}_i} = \frac{4}{3}\sqrt{\frac{S_i^{\,2}}{\pi}} \tag{6}$$

2.2.6　凍結切片作製および免疫蛍光染色

細胞集塊の凍結切片染色（免疫蛍光染色）については，先行研究 (Nath, *et al.*, 2017; Kato, *et al.*, 2018; Kim, *et al.*, 2019) と同様の手順で行った．まず細胞集塊を回収して PBS にて洗浄し，4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(FUJIFILM Wako) にて 30 min サンプルの固定化処理を行った．次に PBS にて洗浄した後，15%スクロース/PBS 溶液に一晩浸してサンプルの脱水処理を行った．脱水処理終了後，サンプルを O.T.C.コンパウンド (Tissue-Tek, Tokyo, Japan) にて包埋・凍結し，凍結標本を作製した．この凍結標本から 10 μm 厚の凍結標本切片を作製し，スライドガラスに張り付けた．そして細胞-細胞間接着分子である E-cadherin，および細胞外マトリックスである Fibronectin，Collagen type I を標的とした免疫蛍光染色，そして核を標的とした化学蛍光染色を以下に示す手順にて行った．

まず PBS にて O.T.C.コンパウンドを洗浄・除去し，標本切片を 4℃下にて一晩ブロックエース溶液で浸した (ブロッキング処理)．次にブロックエース溶液を除去し，TBS にて標本切片を一度洗浄した後, 4℃下にて 1 h, 1 次抗体溶液に浸して 1 次抗体反応を行った. なお, 1 次抗体としては Anti-E-cadherin antibody (sc21791, Santa Cruz Technology, Dallas, TX, USA), Anti-fibronectin antibody (sc6953, Santa Cruz Technology)，Anti-collagen type I antibody (ab34710, Abcam, Cambridge, UK) をそれぞれ用いた．1 次抗体反応終了後，標本切片を TBS にて洗浄し，室温にて 1 h，2 次抗体溶液に浸して 2 次抗体反応を行った．2 次抗体には上述した 3 つの抗体のそれぞれに対して，Alexa Fluor 488 goat-anti mouse antibody (Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 594 donkey-anti goat antibody (Thermo Fisher Scientific)および Alexa Fluor 488 goat-anti rabbit antibody (Thermo Fisher Scientific) を用いた．2 次抗体反応終了後，TBS にて標本切片を洗浄し，室温にて 20 min，4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) を用いて核染色処理を行った．核染色処理終了後，標本切片を D-PBS にて洗浄し，カバー

ガラスをかけた．この標本切片を共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) にて観察し，蛍光画像を取得した．

2.2.7 統計解析

各培養条件での培養は少なくとも 3 回行い，独立してデータを取得した．得られたデータは平均値をグラフにし，エラーバーとして標準偏差を表示した．Student’s t-test をデータ間の有意差を決定するために用い，有意水準 1%または 5%で検定を行った．

2.3 実験結果

2.3.1 細胞集塊サイズ分布の経時変化

細胞集塊のサイズ分布が時間とともにどのように変化したのかを明らかにするため, $t = 0$, 24, 48, 72 h において取得した明視野画像から細胞集塊の投影面積 S (μm^2) を測定し，そのヒストグラムの経時変化を解析した (**Fig. 2.2**). また，その際の代表的な細胞集塊の形態を **Fig. 2.3** に示した．ヒストグラムは，横軸を S (μm^2), 縦軸を頻度 (-) としている．ここで頻度 (-) は，横軸 S (μm^2) を一定の間隔で区切り，各区間に属する細胞集塊数 (aggregates) を総細胞集塊数 n_{ag} (aggregates) で除した値である．横軸 S (μm^2) の区切り方については次の通りとした．$S = 0.03 \times 10^4$ - 5.03×10^4 μm^2 の範囲では 0.50×10^4 μm^2 毎に横軸を区切った (**Fig. 2.2A – N**). また $S > 5.03 \times 10^4$ μm^2 の範囲では，これを満たす細胞集塊の頻度をまとめてヒストグラムの右端に示した (**Fig. 2.2A – N**). さらに，253G1 株の Floating condition においては，$S > 5.03 \times 10^4$ μm^2 を満たす細胞集塊のさらに詳細のサイズ分布を明らかにするため，20.00×10^4 μm^2 毎に横軸を区切ったヒストグラムを別に用意し，解析を行った (**Fig. 2.2E1 - G1**). これらのヒストグラムの経時変化の解析の結果，いずれの細胞株（253G1 株，201B7 株）の場合においても，Static condition および Floating condition の間でヒストグラムの経時変化の仕方に顕著な違いがみられることが分かった.

まず 253G1 株について，結果は以下の通りとなった．Static condition では，細胞集塊投影面積の最頻値の値が，$t = 0$ から $t = 72$ h にかけて $S = 0.78 \times 10^4$ μm^2 から $S = 2.78 \times 10^4$ μm^2 へと徐々に増大していく様子が確認された (**Fig. 2.2A - D, 2.3A - D**). 一方で Floating condition では，細胞集塊は Static condition と比較して幅広いサイズ範囲に分布していた．特に $t = 24$ h の時点で，Static condition では確認されなかった $S > 5.03 \times 10^4$ μm^2 の範囲に該当する細胞集塊も確認された (**Fig. 2.2E**). 当該範囲における細胞集塊の頻度分布の詳細について確認すると，$t = 24$ h から $t = 48$ h にかけて $S = 5.03 – 25.03 \times 10^4$ μm^2 に該当する細胞集塊の頻度が増加し，$t = 48$ h から $t = 72$ h にかけて $S = 5.03 – 25.03 \times 10^4$ μm^2 に該当する細胞集塊の頻度が減少して $S = 25.03 – 45.03 \times 10^4$ μm^2 に該当する細胞集塊の頻度が増加していた (**Fig. 2.2E1 -**

G1).

次に 201B7 株について，結果は以下の通りとなった．Static condition では 253G1 株と同様に細胞集塊サイズが時間の経過とともに増加していく様子が確認された (**Fig. 2.2H - K, 2.3H - K**)．一方で Floating condition では，$t = 0$ から $t = 48$ h にかけて $S = 0.53 \times 10^4$ - 1.03×10^4 μm^2 に該当する細胞集塊の頻度が減少し，$S = 0.03 \times 10^4 – 0.53 \times 10^4$ μm^2 に該当する細胞集塊の頻度が増加していた (**Fig. 2.2H, L, M**)．なお，$t = 48$ h から $t = 72$ h にかけては頻度分布の形状に顕著な差は認められなかった (**Fig. 2.2M, N**).

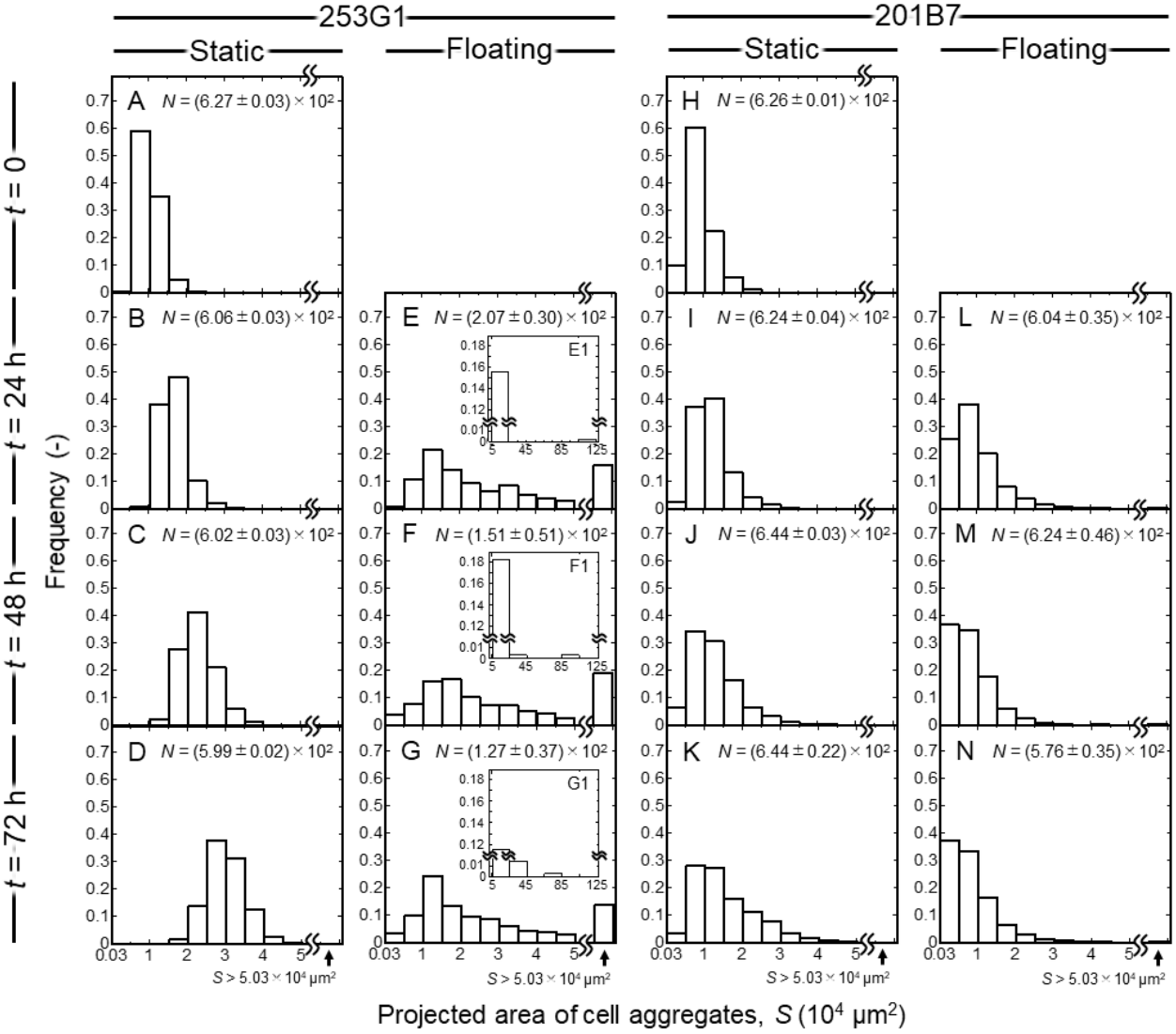


Fig. 2.2 Distribution of projected area of cell aggregates of 253G1 and 201B7 lines under static and floating conditions at t = 0, 24, 48, and 72 h. Each bar was expressed every 0.50 × 10^4 μm^2 (A - N) and 20.00 × 10^4 μm^2 (E1 - G1). Cell aggregates larger than 5.03 × 10^4 μm^2 were put in the right side of histograms (A - N). All distributions followed non-normal distribution based on Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). At least three independent experiments were conducted for each tested condition.

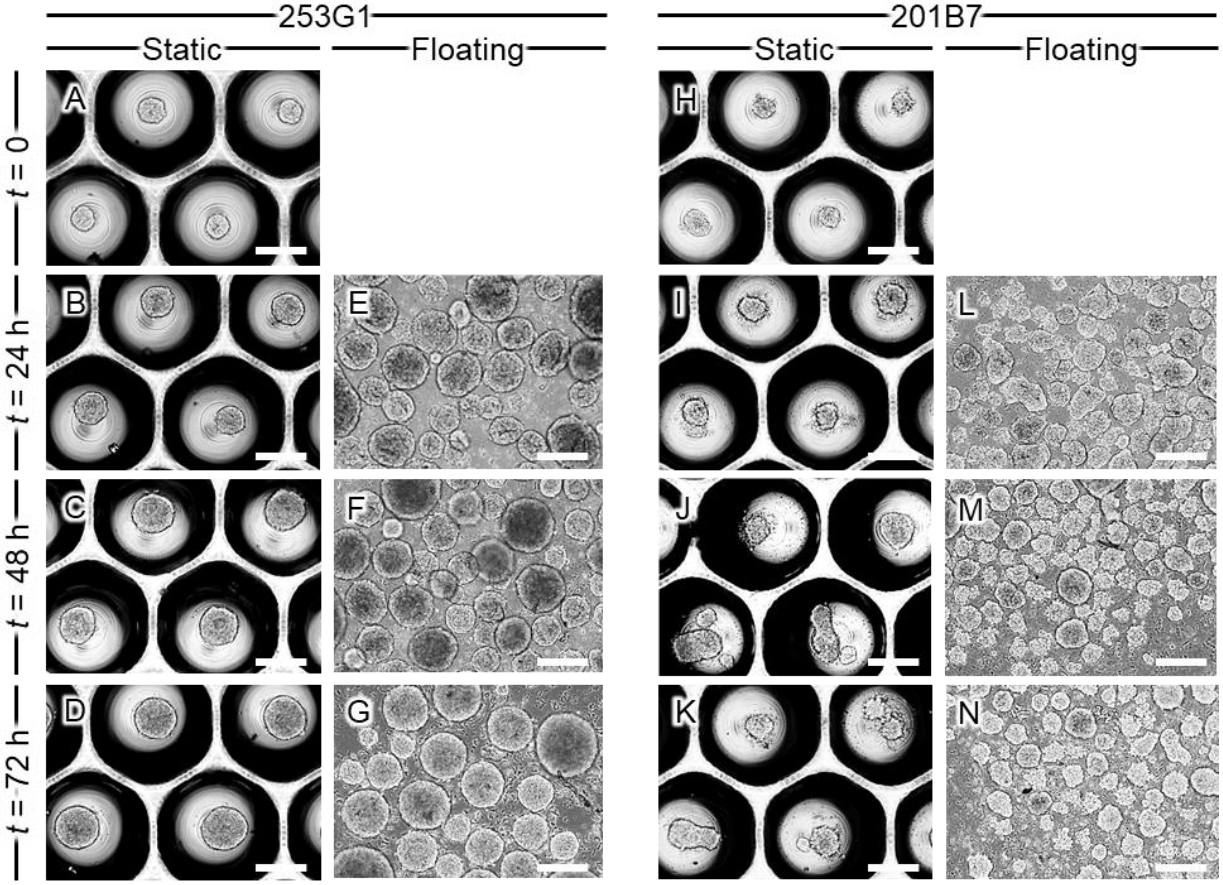


Fig. 2.3 Representative images of hiPSC aggregates of 253G1 and 201B7 lines under static and floating conditions at t = 0, 24, 48, and 72 h. Scale bars show 200 μm.

2.3.2　細胞数，細胞集塊数，平均細胞集塊体積の経時変化の速度論的解析

細胞集塊挙動が細胞増殖に与える影響を明らかにするため，n_c，n_{ag}，$\overline{V_{ag}}$ の経時変化，および式 (2.1), (2.2) および (2.5) に基づいて算出した μ^{app}, η^{app} および ν^{app} の経時変化の解析を行った．

まず 253G1 株について，結果は以下の通りとなった．Static condition では，$t = 0$ から $t = 72$ h にかけて，n_c および $\overline{V_{ag}}$ の値は単調に増加しており (**Fig. 2.4A, C**)，μ^{app} および ν^{app} は正の値を維持していた (**Fig. 2.5A, C**)．この時 n_{ag} はほぼ一定の値を維持しており (**Fig. 2.4B**)，η^{app} は 0 に近い値であった (**Fig. 2.5B**)．一方で Floating condition では，Static condition と比較して特に n_{ag} および $\overline{V_{ag}}$ の値の変化の仕方に顕著な違いが認められた．$t = 0 – 24$ h において，μ^{app} の値は Static condition と比較してほぼ同等であったにも関わらず，$\overline{V_{ag}}$ は大きく増加し，n_{ag} は大きく減少していることが確認された．その後時間の経過とともに μ^{app} の値は減少した．また n_{ag}，$\overline{V_{ag}}$ の値はそれぞれゆるやかに減少，増加していることが確認された (**Fig. 2.4B, C**).

次に 201B7 株について，結果は以下の通りとなった．253G1 株の場合と同様に，Static condition では $t = 0$ から $t = 72$ h にかけて n_{ag} はほぼ一定の値を保ちながら，n_c および $\overline{V_{ag}}$ の値が単調に増加していることが確認された (**Fig. 2.4D, F**)．Floating condition においても n_{ag} はほぼ一定の値を維持していた (**Fig. 2.4E**)．しかし n_c および $\overline{V_{ag}}$ の値は Static condition と異なり，特に $t = 24$ h 以降，増加することなく一定の値を維持しており (**Fig. 2.4D, F**)，これらの比速度 (μ^{app}, ν^{app}) もほぼ 0 に近い値であることが確認された (**Fig. 2.5D, F**).

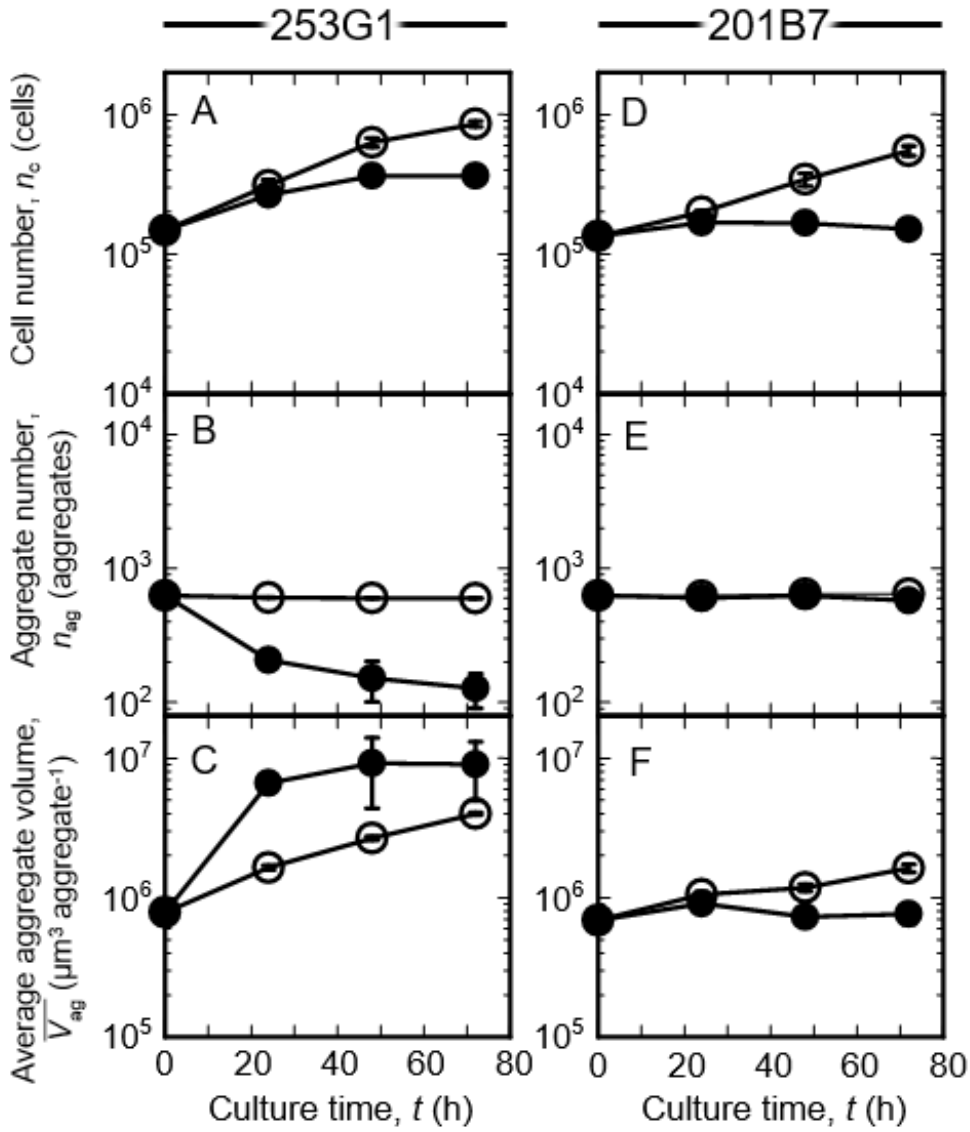


Fig. 2.4 Time profile of cell number, n_c (cells) (A, D), aggregate number n_{ag} (aggregates) (B, E) and average aggregate volume, $\overline{V_{ag}}$ (μm^3 aggregate^{-1}) (C, F) of 253G1 line (A - C) and 201B7 line (D - F) (n = 3). Error bars represent the standard deviation. Open circle: static condition, closed circle: floating condition.

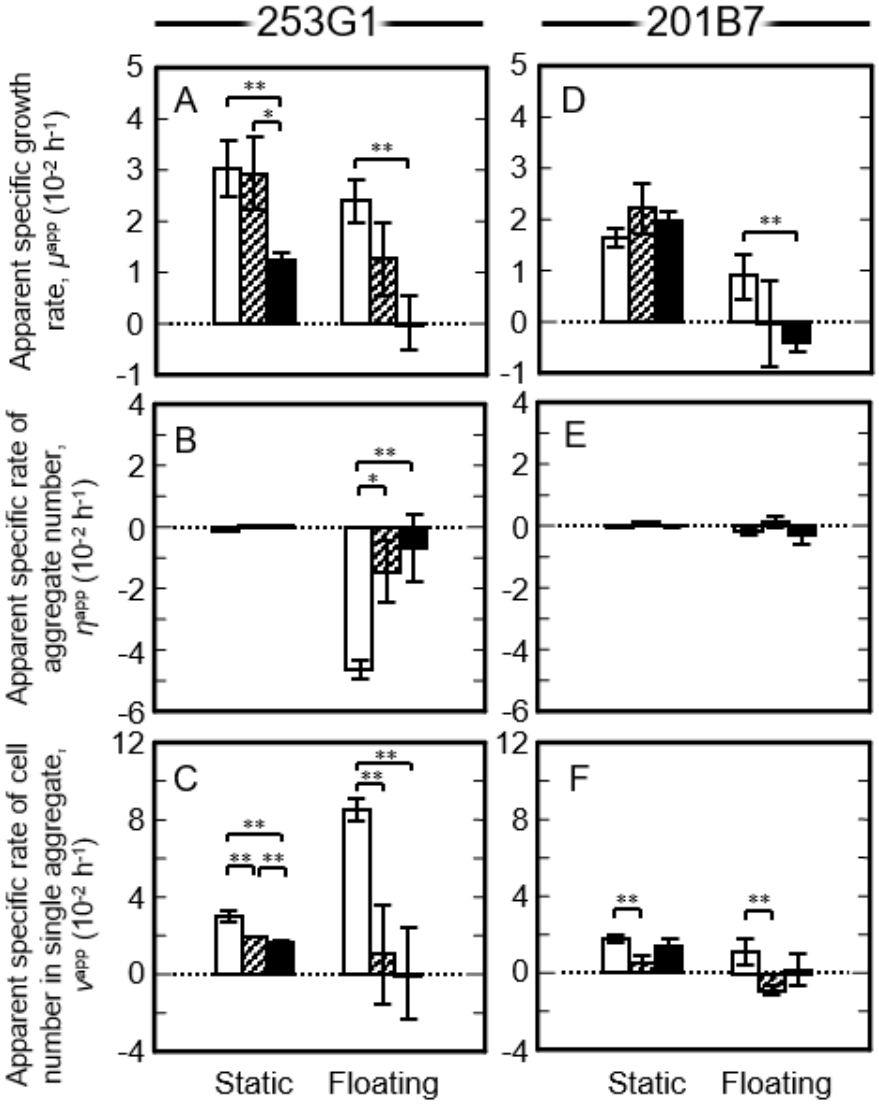


Fig. 2.5 Apparent specific growth rate, μ^{app} (h^{-1}) (A, D), apparent specific rate of aggregate number, η^{app} (h^{-1}) (B, E) and apparent specific rate of cell number in single aggregate, ν^{app} (h^{-1}) (C, F) every 24 h of 253G1 line (A - C) and 201B7 line (D - F) under static and floating culture condition. White bars, shade bars and black bars are values of kinetic parameters during t = 0 - 24 h, during t = 24 - 48 h, and during t = 48 - 72 h, respectively. Statistical significance was analyzed by performing two tailed Student's t-tests; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ (n = 3). Error bars represent the standard deviation.

2.3.3　ヒト iPS 細胞集塊における E-cadherin および細胞外マトリックスの局在性の観察

2.3.1 および 2.3.2 において，Floating condition におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の特性を明らかにしてきた．その結果，253G1 株および 201B7 株の間で細胞集塊の挙動のパターンが顕著に異なることを見出した．そこで我々は，このような細胞集塊の挙動パターンの違いを支配する因子を明らかにするため，細胞-細胞間接着分子である E-cadherin，そして細胞外マトリックスである Fibronectin および Collagen type I の細胞集塊内における局在性の観察を行った．その結果，特に細胞集塊外縁部におけるこれらのタンパク質の局在性が，細胞株間で顕著に異なることを見出した．Floating condition において，Static condition より巨大な細胞集塊を形成していた 253G1 株では，E-cadherin，Fibronectin，Collagen type I といったタンパク質は均一に分布していた．一方で 201B7 株では，細胞集塊外縁部において，これらのタンパク質は 253G1 株と比較すると不均一に分布していた．

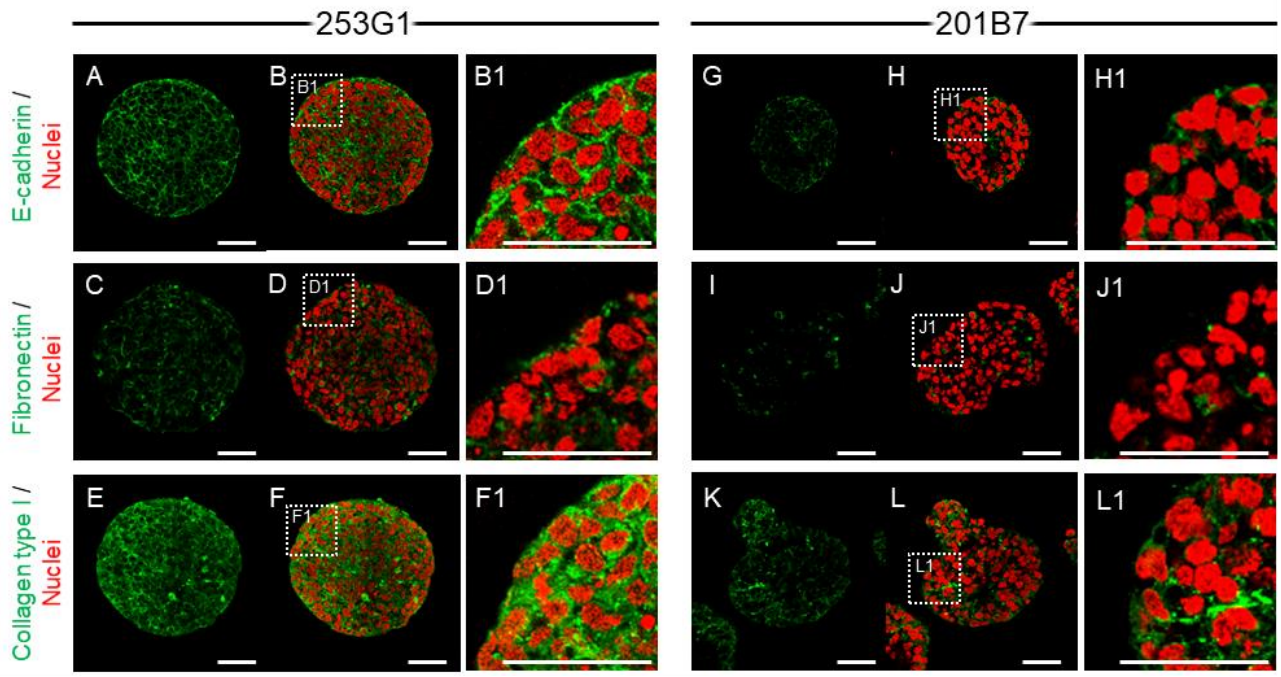


Fig. 2.6 Florescent images of hiPSC aggregates of 253G1 cell line (A – F, B1, D1, F1) and 201B7 line (G – L, H1. J1. L1) at t = 72 h under Static condition, showing for nuclei (red) and E-cadherin (green). (A, B, G, H, B1. H1), fibronectin (green) (C, D, I, J, D1, J1) and collagen type I (green) (E, F, K, L, F1, L1). Panels of B1, D1, F1, H1, J1 and L1 show magnified views of the boxed area. Scale bars show 50 μm.

2.4 考察

2.4.1 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の挙動特性

浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の挙動特性を明らかにすることは, 集塊挙動が細胞増殖に与える影響を評価する上で極めて重要である．本研究では，Static condition と Floating condition の間で細胞集塊サイズ分布の経時変化を比較することにより, 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の挙動特性を明らかにした.

Static condition では 253G1 株，201B7 株ともに，時間の経過とともに細胞集塊サイズ，細胞数が単調に増加しており，細胞分裂による増殖がなされていたと考えられる．過去の研究においてもヒト iPS 細胞集塊の浮遊静置培養における増殖について報告されており (Kato, *et al.*, 2018; Kim, *et al.*, 2019)，本研究における結果はこれらと一致するものであったことから妥当であると考えられる. 一方で細胞集塊形態の変化については顕著な違いが認められており，253G1 株は球状を維持しつつ集塊サイズを増大させたが (**Fig. 2.7A**)，201B7 株は歪な形状へと変化しつつ集塊サイズを増大させた (**Fig. 2.7C**)．詳細のメカニズムは不明であるが，中には 1 つの細胞集塊が分割して 2 つの細胞集塊へと分かれる様子も認められた．このような挙動特性を有する細胞集塊をそれぞれ Floating condition にて培養すると，それぞれについて Static condition とは異なる集塊挙動が観察された.

253G1 株の場合は $t = 24$ h の時点で Static condition と比較して大きなサイズの細胞集塊が確認され (**Fig. 2.2B, E**)，$t = 0 – 24$ h における μ^{app} についても Static condition との間で有意な差が認められなかった (**Fig. 2.5A**) ことも考慮すると，これらの細胞集塊は細胞分裂だけでなく，細胞集塊同士の合一によって生じたものと考えられた (**Fig. 2.7B**)．この点については細胞集塊数 n_{ag} が有意に減少し，さらに平均細胞集塊体積も有意に増加していたことからも裏付けられる (**Fig. 2.4B, C**)．過去の研究においてもヒト iPS 細胞をはじめとする多能性幹細胞集塊の合一について報告がなされており, 当該現象は, 細胞集塊表面において E-cadherin を介した細胞-細胞間接着が形成され，これを起点として細胞が他方の細胞集塊の表面を遊走して進行するものと考えられている (Stephen, *et al.*, 2004)．これらの結果，知見から，回

転浮遊培養ではヒト iPS 細胞集塊の合一が起こっていることが示唆された.

一方で 201B7 株では，253G1 株とは異なり $t = 24$ h 以降細胞集塊サイズが有意に増加，減少することはなく，一定のレベルを維持しつつ，一部 $t = 0$ と比較して小さなサイズの細胞集塊が認められた．細胞数 n_c や細胞集塊数 n_{ag} についても同様に一定のレベルを維持しており，細胞集塊形態の位相差画像から $t = 24$ h 以降シングルセルと考えられるものが多く認められた (**Fig. 2.3L-M**). これらのことから，201B7 株の細胞集塊では細胞分裂によって増加した細胞数と同程度の細胞数が集塊崩壊によってシングルセルとして細胞集塊表面から剥がれたことが考えられる．多能性幹細胞をはじめとする種々の細胞集塊に対する集塊崩壊 (シングルセルの発生) については過去の研究においても多くの解釈がなされており，細胞集塊内の細胞が細胞-細胞間接着および細胞-基質間接着を失ってシングルセルとして細胞集塊外に放出されるパターン (Kim, *et al.*, 2019) や，液流による剪断ストレスのような物理的要因によって細胞集塊表面の細胞が同じように接着を失い, 細胞集塊外へと放出されるパターン (Byers, *et al.*, 1995; Ioannis, *et al.*, 2010) が報告されている．これらの報告例は本結果に対する解釈を支持するものであり, 回転浮遊培養におけるもう 1 つのヒト iPS 細胞集塊の挙動として，集塊崩壊が起こっていることが示唆された (**Fig. 2.7D**).

以上から, 今回異なる細胞特性を有する 2 種類のヒト iPS 細胞集塊を回転浮遊培養にて培養した結果，集塊合一と集塊崩壊の 2 つの現象が発生していることが示唆された.

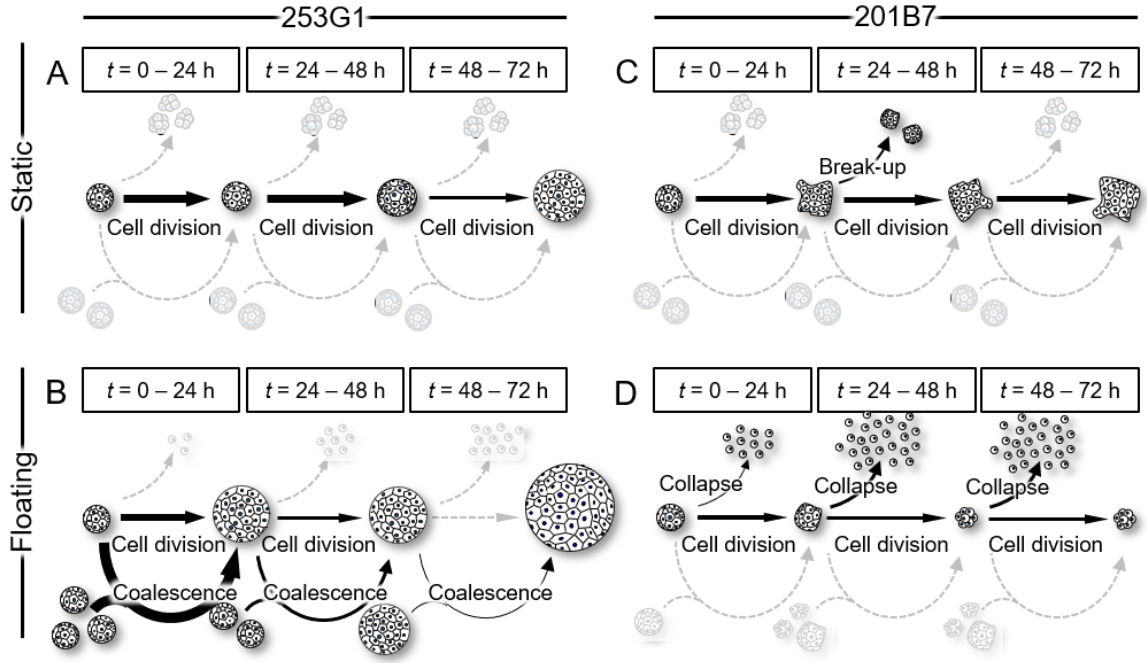


Fig. 2.7 Possible aggregate behaviors of two types of hiPSCs (253G1 and 201B7 lines) under static and floating culture conditions. Black solid arrows mean aggregate behaviors suggested in this study and gray dot arrows mean behaviors not suggested in this study. The boldness of each arrow means possible rate of aggregate behaviors during each culture period based on kinetic analysis. In the case of 253G1 line under static condition, aggregate size gradually increased with time by cell division (A). Under floating condition, larger sized aggregates about 200 - 600 μm were observed during the culture. The apparent specific growth rate gradually decreased due to excessive increase of aggregate size during t = 0 - 24 h compared to those under static condition, which were caused by coalescence between cell aggregates (B). On the other hand, in the case of 201B7 line, aggregate size also increased by cell division with constant levels of apparent specific growth rate but aggregate morphology dramatically changed during the culture compared to that of 253G1 line. Cell aggregate which separated into two aggregates were also observed during t = 24 - 48 h (C). Under floating condition, smaller sized aggregates less than 100 μm were generated and the apparent specific growth rate was lower value than that under static condition during the culture due to the collapse of aggregates to strip single cells. The rate of aggregate collapse during t = 24 - 72 h was higher than that during t = 0 - 24 h (D).

2.4.2　回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の挙動特性が細胞増殖に与える影響

2.4.1 における細胞集塊サイズ分布の解析結果から, 253G1 株は集塊合一を起こしやすく, 201B7 株は集塊崩壊または集塊分割を起こしやす事が考えられた．そこで本節では，これらの集塊挙動が細胞増殖に与える影響について，μ^{app}，η^{app}，ν^{app} といった速度論的パラメータの経時変化を元に解釈する．前節で明らかになったヒト iPS 細胞集塊の挙動特性を元に，各速度論的パラメータを以下のように定義した.

$$\mu^{app} = \mu_g - k_d \tag{7}$$

ここで μ_g (h^{-1}) は比増殖速度，k_d (h^{-1}) は比死滅速度である．ここで，Static condition においては集塊崩壊に伴う細胞死は無視できるものとして扱うこととしており ($k_d \simeq 0$)，Static condition における μ^{app} を μ_{st} (h^{-1}) としたとき, μ_g を μ_{st} としてみなしている. その上で Floating condition における μ_g を μ_{st} として考えると，Floating condition における k_d は以下のように表される.

$$k_d = \mu_{st} - \mu^{app} \tag{8}$$

また，集塊合一および集塊崩壊に伴う細胞集塊数の変化については，η^{app} を用いて以下のように定義した.

$$\eta^{app} = k_{bu} - k_{coa} \tag{9}$$

ここで k_{bu} (h^{-1}) は比分割速度，k_{coa} (h^{-1}) は比合一速度である．本研究では，Static condition におけるこれらの速度定数 k_{bu}，k_{coa} はほぼ 0 に近い値としてみなしている ($k_{bu} \simeq 0$，$k_{coa} \simeq 0$). ここで総細胞数 n_c (cells) は細胞集塊数 n_{ag} (aggregates) および平均単一集塊当たり細胞数

$\overline{n_{\mathrm{ca}}}$ (cells aggregate^{-1}) を用いて以下のように定義される．

$$n_{\mathrm{c}} = n_{\mathrm{ag}} \cdot \overline{n_{\mathrm{ca}}} \tag{10}$$

両辺を培養時間 t (h) で微分することにより以下の式が得られる．

$$\frac{\mathrm{d}n_{\mathrm{c}}}{\mathrm{d}t} = \overline{n_{\mathrm{ca}}} \cdot \frac{\mathrm{d}n_{\mathrm{ag}}}{\mathrm{d}t} + n_{\mathrm{ag}} \cdot \frac{\mathrm{d}\overline{n_{\mathrm{ca}}}}{\mathrm{d}t} \tag{11}$$

式 (1) ~ (3) を用いることにより，式 (13) は以下のように表される．

$$v^{\mathrm{app}} = \mu^{\mathrm{app}} - \eta^{\mathrm{app}} \tag{12}$$

$$v^{\mathrm{app}} = (\mu_{\mathrm{g}} - k_{\mathrm{d}}) - (k_{\mathrm{bu}} - k_{\mathrm{coa}}) \tag{13}$$

式 (13) は，平均集塊体積が細胞分裂，細胞死，集塊分割，集塊合一の速度に依存して変化することを意味している．

Fig. 2.8 からも明らかなように，Floating condition では，253G1 株および 201B7 株ともに k_{d} の値が t = 24 h – 48 h および t = 48 h – 72 h において有意に増加しており，2.4.1 節で確認された集塊合一や集塊崩壊といった細胞集塊挙動が k_{d} の値の変化に影響を与えていることが考えられた．

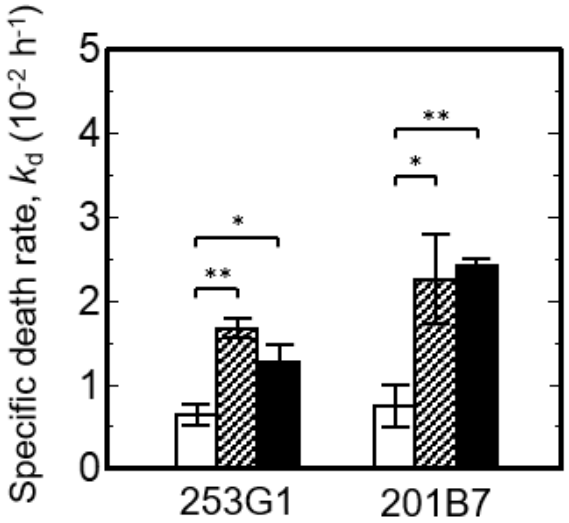


Fig. 2.8 Specific death rate, k_d (h^{-1}) of 253G1 and 201B7 lines every 24 h under floating condition. White bars, shade bars and black bars mean k_d during t = 0 - 24 h, during t = 24 - 48 h and during t = 48 - 72 h, respectively. Statistical significance was analyzed by performing two tailed Student's t-tests; *p < 0.05, **p < 0.01 (n = 3). Error bars represent the standard deviation.

253G1 株の場合は t = 0 – 24 h における η^{app} が最も低い負の値を示しており (**Fig. 2.5B**)，式 (9) を元に考えると集塊合一が最も高頻度で発生していたと考えられる．その後 η^{app} は徐々に 0 に近い値に近づくと同時に，μ^{app} も有意に減少していた (**Fig. 2.5A, B**)．過去の研究ではヒト iPS 細胞の集塊サイズとその増殖速度の関係について解釈がなされており，集塊サイズの増大に伴って時間依存的に細胞の比増殖速度が低下することが示されている (Nath, *et al.*, 2017)．これは集塊サイズの増大に伴って細胞集塊中心部への酸素，栄養分の供給が十分に行き届かず，細胞集塊中心部の細胞が細胞増殖に十分な酸素，栄養分を得られなくなり，増殖速度が低下することにより引き起こされるものと考えられている (Kinney *et al.*, 2011; Winkle *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014)．**Fig. 2.2** の分布から細胞集塊を球と仮定した時の直径を算出すると，すべての細胞集塊数 n_{ag} (aggregate) に対して直径 200 μm 以上に該当する細胞集塊の数の割合は t = 24 h, 48 h, 72 h のそれぞれで 34.3 ± 14.6%，35.7 ± 10.6%，29.2 ± 7.2%となっており，Static culture condition の場合（t = 24 h, 48 h, 72 h のそれぞれで 0%, 5.21 ± 1.27%,

38.1 ± 3.2%）と比較して，特に t = 24 h，t = 48 h では有意に高い値を維持し続けていた (Students' t-test, $p < 0.05$)．これらのことから，253G1 株の t = 24 h 以降の見かけの比増殖速度が低下した要因は，集塊合一による過剰な細胞集塊サイズの増大に伴う酸素，栄養分の供給律速によるもの推察される．

一方，201B7 株は t = 24 h 以降 η^{app} はほぼ 0 に近い値で一定となっており，式 (9) から集塊合一の発生頻度と集塊分割の発生頻度は平衡状態にあることが考えられる．したがって式 (13) の ν^{app} を以下のように見積もった．

$$\nu^{\mathrm{app}} \simeq \mu_{\mathrm{g}} - k_{\mathrm{d}} \tag{14}$$

Fig. 2.5 において ν^{app} の値は t = 0 -24 h では正の値で他の時間 (t = 24 – 48 h, t = 48 – 72 h) と比較して有意に高い値を示していたことから，細胞分裂の発生頻度の方が高かったことが考えられる．一方 t = 24 h 以降，ν^{app} は負またはほぼ 0 に近い値を示しており，細胞死の頻度が有意に高いか細胞分裂の頻度と平衡状態であったことが考えられた．前節 2.4.1 で述べたように，201B7 株は細胞集塊表面から細胞が剥がれ落ちる集塊崩壊が発生していることが考えられた．過去の研究では，iPS 細胞をはじめとする多能性幹細胞は，細胞-細胞間接着または細胞-基質間接着を失い単細胞状態になると Rho/ROCK/myosin シグナルの活性化に伴うミオシンの過剰形成により，アクチン-ミオシン収縮運動に起因するブレビングが発生し，数時間程度でアポトーシスが誘導されることが知られている (Ohgushi, *et al.*, 2010)．また iPS 細胞が細胞-細胞間接着または細胞-基質間接着を形成するまでの間に当該現象の発生を防ぐために ROCK 阻害剤を用いることがあるが，特に本研究で使用した ROCK 阻害剤の 1 つである Y-27632 は，ROCK の触媒部位に対して ATP 拮抗的に結合することで，その酵素活性を選択的に阻害することにより当該シグナルの活性を抑制する (Watanabe, *et al.*, 2007)．しかし結局のところ細胞が接着を形成できなかった場合には生存シグナルおよび増殖シグナル (Suemori, *et al.*, 2006; Stover, *et al.*, 2011) が活性化されないため，死滅に至る．これは

iPS 細胞の浮遊懸濁培養において，シングルセル状態で播種後，Rho キナーゼ阻害剤が培地に添加されていても 24 h 後にはその 30 – 40%の細胞が接着を形成することができず死滅に至ることからも裏付けられる (Nath, *et al.*, 2017)．今回の細胞集塊挙動の速度論的解析の結果と前節の細胞集塊挙動の解釈を踏まえると，特に $t = 24$ h 以降に集塊崩壊に伴うシングルセルの発生頻度が顕著に高くなり，シングルセル状態となった iPS 細胞がアポトーシスまたは接着を持てなかったことによる死滅に至り，これが $t = 24$ h 以降の比死滅速度の有意な増加に至った要因と推察される．

以上のヒト iPS 細胞集塊挙動の速度論的解釈から，集塊合一に伴う過剰な細胞集塊サイズの拡大，および集塊崩壊に伴う細胞集塊表面からのシングルセルの発生が，それぞれ細胞増殖を阻害する主要因であることが示唆された．

2.4.3　回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動を支配する生物学的因子

本研究では，これまでに確認された集塊合一や集塊崩壊といった挙動を支配する生物学的因子について考察するため，細胞-細胞間接着および細胞-基質間接着の形成に関わる E-cadherin および細胞外マトリックスの Collagen type I，Fibronectin (Kim, *et al.*, 2019) といったタンパク質の局在性を調査した．その結果，**Fig. 2.6** からも明らかなように 253G1 株ではこれらのタンパク質が細胞集塊外縁部に均一に分布していたのに対し，201B7 株では不均一に分布していた．このことから 253G1 株は細胞集塊外縁部においてこれらのタンパク質を形成しやすく，逆に 201B7 株は形成しにくい特性を有しているのではないかと考えられる．

2.4.1 節で述べたように，多能性幹細胞集塊の集塊合一は，細胞集塊同士が集塊表面で E-cadherin を介した細胞-細胞間接着を形成し，それに続いて細胞が細胞集塊表面を遊走することによって進行するとされている (Stephen, *et al.*, 2004)．また集塊崩壊は，集塊内の細胞が接着の不安定性に起因して細胞-細胞間または細胞-基質間接着を失うこと (Kim, *et al.*, 2019)，または液流から生じる剪断ストレスに対して，細胞集塊表面上の細胞-細胞間接着，細胞-基質間接着が耐えうることができず，細胞が脱接着すること (Byers, *et al.*, 1995; Ioannis, *et al.*, 2010) により生じると考えられており，特にヒト iPS 細胞をはじめとする多能性幹細胞は，

E-cadherin や ECM といったタンパク質を介した細胞-細胞間接着や細胞-基質間接着が形成されることにより細胞内に生存シグナルが伝達され，生命維持を行っている (Suemori, *et al.*, 2006; Stover, *et al.*, 2011)．ヒト iPS 細胞集塊の浮遊培養においてもこれらのメカニズムにおいて，細胞-細胞間接着や細胞-基質間接着の形成が細胞集塊形成の安定性に寄与していることが示されている (Kato, *et al.*, 2018; Kim, *et al.*, 2019; Kato, *et al.*, 2019)．これらの結果および知見を考慮すると，細胞株の特性に依存した E-cadherin および ECM の細胞集塊外縁部における形成の仕方が集塊構造の安定性や細胞集塊接触時の反応性を変化させ, 結果的に集塊合一および集塊崩壊の発生頻度に影響を及ぼしたものと考えられる.

2.4.4　ヒト iPS 細胞集塊群の培養における回転浮遊培養の特性

以上から回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の特性とそれが細胞増殖に及ぼす影響について明らかになり，特に集塊合一および集塊崩壊の発生パターンの違いは，集塊構造の安定性に加え, 細胞集塊接触時における反応性といった細胞特性の違いにより生じることが考えられた．この内，細胞集塊の合一が起こるためには細胞集塊同士が接触している必要があり，実はこの「細胞集塊同士の接触の発生」が，当該培養の特性を示す重要な因子の 1 つではないかと考えられる.

第 1 章でも述べたように回転浮遊培養における細胞集塊の浮遊状態は大きく 3 パターン ((i) 見かけ上静止した浮遊状態，(ii) 周期的または非周期的揺動を伴う浮遊状態，(iii) 軌道運動を伴う浮遊状態) に分類される (Varley, et al., 2017)．(i) の場合は鉛直方向の力のつり合いにより浮遊しているため, 水平方向の力ははたらかず細胞集塊同士の接触が発生するとは考えにくい．また (iii) の場合も細胞集塊は培地流れとともに層流に乗って円軌道運動を行うため，この場合も各細胞集塊の描く軌道が交わる可能性は低く，細胞集塊同士の接触が起こるとは考えにくい．なお今回，回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の浮遊状態を観察したところ，(ii) の周期的または非周期的揺動と考えられる浮遊状態を確認している (デジタルデータ参照，紙面上ではデータ非表示)．これらを考慮すると，回転浮遊培養にて細胞集塊の合一が起こった原因は，(ii) の細胞集塊の周期的または非周期的揺動により細胞集塊

同士の接触が生じたためではないかと推察される. 特に複数細胞集塊群の場合は個々の細胞集塊のサイズや形状は不均一であり, 細胞集塊によって当該揺動の軌道は変化すると考えられる．また，このように細胞集塊が描く軌道が異なる場合は，複数の軌道が交わる可能性も十分に考えられるため，その軌道の交点で細胞集塊同士が接触し，今回確認された合一に至ったのではないかと考えられる．これらの事から，複数細胞集塊群の培養における回転浮遊培養の特性として, 当該培養では周期的または非周期的揺動に伴う細胞集塊同士の接触が発生しており, これが集塊合一の発生およびその後の増殖阻害に影響を及ぼす重要な因子であることが考えられた.

2.5 小括

本章では, 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の挙動特性およびそれが細胞増殖に与える影響を反応速度論的に解釈した. 細胞集塊サイズ分布の経時変化の解釈や細胞集塊形態の観察結果から, 回転浮遊培養ではヒト iPS 細胞集塊の集塊合一および集塊崩壊が発生しており，これらの発生の仕方にも時間依存的な特徴があることが示唆された．また，比速度およびそれを元にした反応速度定数 (細胞集塊挙動の発生頻度) の解釈から，培養初期での集塊合一に伴う過剰な集塊サイズ増大, および培養後期での集塊崩壊によるシングルセルの発生が，細胞増殖を阻害する重要な因子であることが示唆された．さらに，集塊合一の発生や集塊形成の安定性に寄与している E-cadherin や ECM といったタンパク質の細胞集塊内における局在が，細胞株間で顕著に異なることが明らかになった．今回確認された細胞株間での挙動の違いは, 集塊構造の安定性や細胞集塊接触時における反応性の違いによって生じるものであり，特に後者は「細胞集塊同士の接触」という培養特性に起因して発生すると考えられる. このことから当該特性が複数細胞集塊群の培養における回転浮遊培養の重要な特性の 1 つとして考えられた.

第 3 章 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞由来心筋組織の成熟化メカニズムの解明

3.1 緒言

現在，重症心不全の病態解明や治療法・治療薬開発といった広範な分野においてヒト iPS 細胞由来心筋組織の需要が高まっており, その作製技術および培養技術の開発が強く求められている (Martins, *et al.*, 2014; Miyagawa and Sawa, 2018). これまで積層法 (Kawamura, *et al.*, 2013) やスキャフォールド法 (Gelmi, *et al.*, 2016; Li, *et al.*, 2017) といった心筋組織の作製方法が開発されており，生体外での心筋組織作製が可能となってきた．これらの心筋組織はいったん作製された後，組織としての機能，構造を向上させることを目的として成熟化培養を行うのが一般的である. 心筋組織をより成熟化させる方法についてもこれまで多くの研究がなされており， 3 次元的な組織全体に十分な酸素，栄養分を供給する方法 (ハイドロゲルを含有させる方法 (Matsuo, *et al.*, 2015), 血管網を形成させる方法 (Sakaguchi, *et al.*, 2013)) や, 組織に対して様々な力学的負荷を与えることで, 心筋組織を成熟化させる方法が開発されてきた.

近年では，Li らが 2017 年に，ポリ乳酸-グリコール酸共重合体を主成分とするスキャフォールドを用いることにより iPS 細胞由来心筋組織の作製が可能であることを示している (Li, *et al.*, 2017). さらにその後の研究で Nakazato らは，回転浮遊培養系においてこの心筋組織の成熟化培養を行うと, 静置培養系で培養した場合と比較して極めて重厚な心筋組織となること，当該心筋組織は全体として同調して拍動し，なおかつ成熟心筋に認められる β-Myosin heavy chain (β-MHC)，Connexin-43 といった心筋構成タンパク質の生成量が有意に高くなることを示している (Nakazato, *et al.*, 2020). さらに Nakazato らは，回転浮遊培養系で培養した心筋組織では，静置培養系で培養した心筋組織と比較して，生理的心肥大 (心筋組織が成熟化して自身の機能を獲得し，肥大化していく現象) (Bianca, *et al.*, 2010; Shimizu and Minamino, 2016) や細胞の生存に関わる FAK シグナル，PI3K/Akt シグナル，mTOR シグナルといった一連のシグナル (Simpton, *et al.*, 1993; Condorelli, *et al.*, 2002; Shioi, *et al.*, 2003) の活性が有意に高いことを示している (Nakazato, *et al.*, 2020). これらのことから, Nakazato らは,

回転浮遊培養系では,「心筋組織の生理的心肥大」が促進され，より成熟化した重厚な心筋組織ができたのではないかと考察している (Nakazato, *et al.*, 2020).

一方で心筋組織の無限沈降状態を実現する回転浮遊培養システムにおいて, なぜ成熟化の進んだ重厚な心筋組織ができるのか，そのメカニズムに関しては不明な点が多い．一般に心筋組織の成熟化は前述したように心筋組織としての機能および構造を獲得することであり，その機能としてはサルコメア構造の形成に伴う収縮力の発生やその同調性の向上が挙げられる (Karbasi, *et al.*, 2020)．収縮力の発生には細胞内に形成されるサルコメア構造が必要となり，これを発揮するにあたってはエネルギー源である ATP やカルシウムイオンといった一連の代謝物が利用される. 心筋細胞におけるサルコメア構造の形成やそれに伴う心筋細胞形態，構造の変化，および代謝や細胞周期の変化 (Werner, *et al.*, 1989; Lopaschuk, *et al.*, 1991; Stanley, *et al.*, 2005; Puente, *et al.*, 2014; de Carvalho, *et al.*, 2017) は，心筋細胞がこれらの機能を発揮するために起こるものとされており, これら一連の表現型が心筋成熟のマーカーや評価指標として用いられることが多い．また，このような機構を利用した心筋成熟の促進に関する多くの心筋組織工学研究が行われてきた. 力学的負荷を与えることによりサルコメア構造の形成を促す例 (Russell, *et al.*, 2010; Salameh, *et al.*, 2010) や，心筋細胞の配向性を整えることによりサルコメア構造に起因する収縮運動を起こしやすくする例 (Li, *et al.*, 2017) が報告されている．例を挙げると枚挙にいとまがないが，いずれの報告例においても心筋組織やその中の細胞の形態や構造, 機能を如何にして生体内のものに近づけるかという狙いで行われたものがほとんどである．回転浮遊培養における心筋成熟についても，これらの要素いずれかを含んだ一連の成熟化メカニズムが存在すると考えられる.

以上のような背景を鑑みて, 本章では単一細胞集塊の培養における回転浮遊培養の特性について明らかにするため, 集塊構造の不均一性が発生すると予想されるヒト iPS 細胞由来心筋組織を研究対象とし，その成熟化メカニズム (分化プロセスの 1 つ) の解明を行う事とした. 具体的には心筋成熟に伴って変化すると予想される組織形態, 構造変化の特性に着目し, これらの関係性について明らかにすることで, 回転浮遊培養における心筋成熟のメカニズムおよびそのトリガーとなる因子について考察した.

3.2　実験材料および方法

3.2.1　使用細胞および培養方法

本研究ではヒト iPS 細胞 (253G1 株，理化学研究所バイオリソースセンター提供) およびマイトマイシン C 処理済みのマウス胚繊維芽細胞 (MEF) (ReproCELL Inc., Tokyo, Japan) を用いた．これらの細胞は Repro Coat (ReproCELL Inc.) でコーティングした培養皿 (Corning, Costar, Cambridge, USA) および basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (ReproCELL Inc.) を終濃度 5 ng/mL となるように添加した Primate ES Cell Medium (ReproCELL Inc.) を用いて 37℃, 5%CO_2 雰囲気下で培養されたものである．

細胞の継代および培養は以下に示す方法で行った．Repro Coat でコーティングした培養皿に MEF を 1.4×10^5 cells/cm^2 となるように播種し，37℃，5%CO_2 雰囲気下にて 1 日培養した．培養には終濃度で 10% Fetal Bovine Seram (FBS; Thermo Fisher Scientific) および 1% Penicillin-Streptomycin, Liquid (Thermo Fisher Scientific) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (4.5g/l グルコース)(L-グルタミン，ピルビン酸含有)(液体) (DMEM; Nacalai Tesuque Inc., Kyoto, Japan) を用いた．翌日，セミコンフルエント状態のヒト iPS 細胞を CTK 溶液 (ReproCELL Inc.) 処理にて剥離・回収し，1000 rpm で 3 min 遠心分離を行った．上清を廃棄した後，終濃度で 5 ng/mL bFGF を含む Primate ES Cell Medium にて小細胞塊状となるように細胞を再懸濁し，DMEM/10 % FBS/1% Penicillin-Streptomycin, Liquid を 5 ng/mL bFGF/Primate ES Cell Medium に入れ替えた培養皿に適量播種した. 播種完了後, 37℃, 5%CO_2 雰囲気下にて培養を開始し，培養 5 日目の細胞を継代に，培養 6 日目の細胞を心筋分化誘導に使用した．なお，この間培地交換は 5 ng/mL bFGF/Primate ES Cell Medium を用いて毎日行った．

3.2.2　ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導および細胞集塊の単分散処理

ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導は先行研究と同様の方法にて行った (Sougawa, *et al.*, 2021). 以下に方法を示す (**Fig. 3.1**). 培養には，StemProTM-34 SFM (1X) (Thermo Fisher Scientific) を

使用した．この液体培地は，解凍した Nutrient Supplement (40 X) を加え，さらに L-glutamine (200 mM) (Thermo Fisher Scientific)，1-Thioglycerol (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA)，L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Trisodium Salt (FUJIFILM Wako) をそれぞれ終濃度で 2 mM，400 μM，50 μg/mL となるように添加し，混合して調製を行った．これを以下「基礎培地」と表記する．培養 6 日目のヒト iPS 細胞および MEF を終濃度で 10 μM Y-27632 (FUJIFILM Wako) を含む Accumax (Innovative Cell Technologies) にて剥離し，回収した細胞を遠心分離 (1000 rpm, 3 min) にかけた．上清を廃棄した後，終濃度で 10 μM Y-27632 を含む基礎培地にて再懸濁および単分散処理を行った．その後細胞数計測を行い，計測結果を元に必要量の細胞を遠沈管に分取して遠心分離 (1000 rpm, 3 min) にかけた．上清を廃棄した後に終濃度で 5 μM Y27632 および 5 ng/mL Bone Morphologic Protein-4 (BMP-4) (R&D Systems, Inc., MN, USA) を含む基礎培地を用いて 1.5×10^5 cells/mL となるように細胞を再懸濁し，30 mL bioreactor (Able Co. Ltd., Tokyo, Japan) に播種した．播種完了後を Day 0 とし，Day 15 まで心筋分化誘導を行った．30 mL bioreactor の攪拌翼の回転速度は 40 rpm とした．Day 1 では bFGF，BMP-4，Activin A (R&D Systems, Inc.) をそれぞれ終濃度 5 ng/mL，10 ng/mL，14 ng/mL となるように添加した. Day 4 では終濃度で 6 μM IWR-1 (Sigma-Aldrich) および 8 μM IWP-2 (Sigma-Aldrich) を含む基礎培地に，Day 6 では 終濃度で 5 ng/mL VEGF (FUJIFILM Wako) および 10 ng/mL bFGF を含む基礎培地に切り替え，Day 6 以降は後者の培地で 2 日毎に培地交換を行った．

Day 15 において細胞集塊を回収し，Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) (Sigma-Aldrich) で 5 倍希釈した Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Thermo Fisher Scientific) を用いて酵素反応処理 (37℃，10 min) を行った．酵素反応処理終了後，ピペッティングによる細胞集塊の単分散処理を行い，遠心分離 (100 rpm, 5 min) にかけた．上清を廃棄した後，DMEM/10 % FBS/1% Penicillin-Streptomycin, Liquid にて細胞を再懸濁し，細胞数計測を行った．

3.2.3 フローサイトメトリーによるトロポニン陽性率の測定

心筋分化誘導で得られた細胞含まれる心筋細胞の割合を確認するため，フローサイトメトリーによるトロポニン陽性率の測定を行った．心筋分化誘導終了後，単分散処理を行った細

胞 3.0 × 10^5 cells (以下サンプルと表記) を 1.5 mL チューブに分取し, Cytofix/Cytoperm (Becton, Dickinson and Company Inc. (BD), MJ, USA) にてサンプルの固定化・膜透過処理 (4℃, 30 min) を行った．固定化・膜透過処理終了後， PBS にて 15 倍希釈した Bovine Albumin Fraction V Solution (7.5%) (Thermo Fisher Scientific) (以下 0.5%BSA/PBS 溶液と表記) にて 4℃下で一晩サンプルのブロッキング処理を行った．ブロッキング処理終了後，精製水にて 10 倍希釈した Perm/Wash buffer (BD) (以下 10X Perm/Wash buffer と表記) に Troponin T-C 抗体(CT3) Alexa Fluor 488 (Santa Cruz Biotechnology) および Normal mouse IgG2a Alexa Fluor 488 (Santa Cruz Biotechnology) をそれぞれ 300 倍希釈して抗体反応液を調製し，これを用いて 4℃下，遮光状態で 60 min 抗原抗体反応処理を行った．抗原抗体反応処理終了後，10X Perm/Wash buffer および 0.5%BSA/PBS 溶液にてサンプルの洗浄処理を行い，フローサイトメーターCyFlow Cube 6 (Sysmex, Co. Ltd., Hyogo, Japan) を用いてトロポニン陽性率の測定を行った．

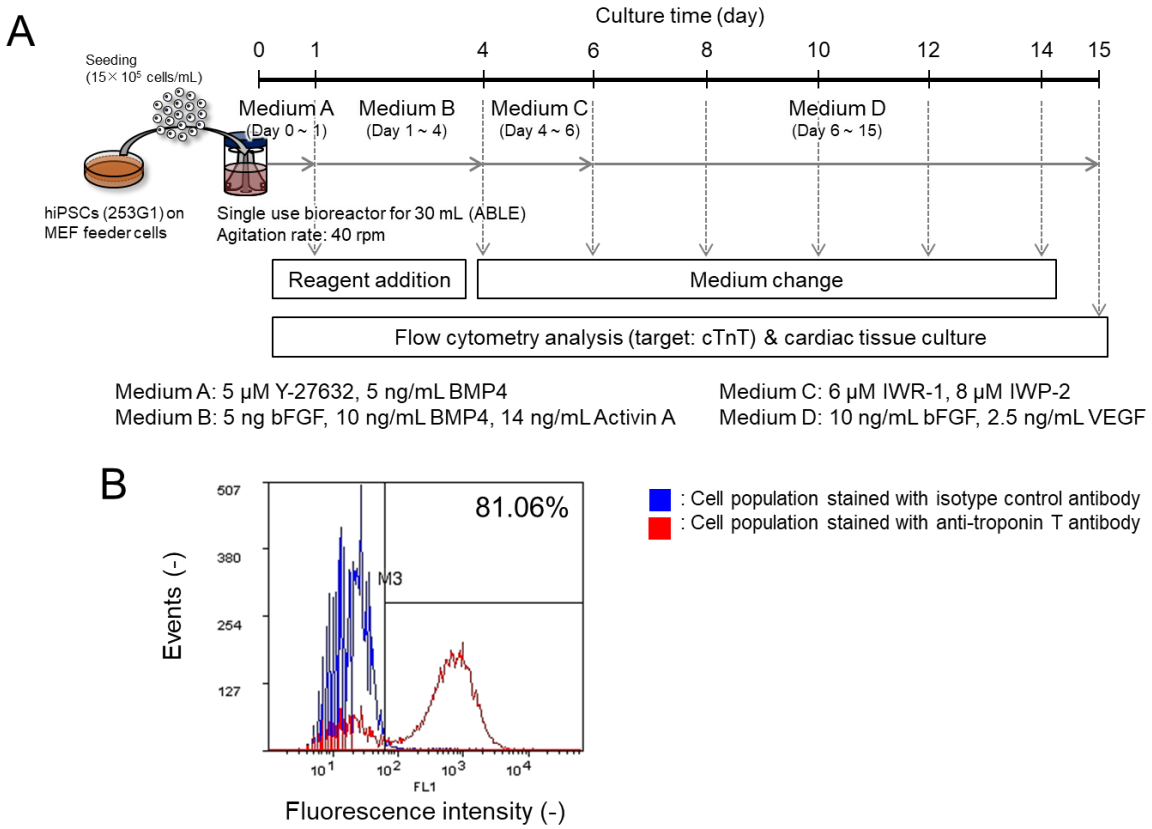


Fig. 3.1 The procedure of cardiac differentiation culture of hiPSCs (A) and the ratio of cardiac troponin T positive cells based on flow cytometry analysis (B).

3.2.4　回転浮遊培養における心筋組織の培養

ヒト iPS 細胞由来心筋組織の培養は先行研究と同様の方法にて行った (Nakazato, *et al.*, 2020)．以下に方法を示す (**Fig. 3.2**)．心筋分化誘導終了後，単分散処理を施した細胞を DMEM/10 % FBS/1% Penicillin-Streptomycin, Liquid にて細胞密度 3.0×10^7 cells/mL となるように懸濁して細胞懸濁液を調製し，6 mm×6 mm Aligned nanofibers 1 枚当たり 2.0×10^6 cells となるように細胞を播種した．細胞播種完了後，37℃，5%CO_2 雰囲気下で 3 h 静置して細胞を 6 mm × 6 mm Aligned nanofibers (Li, *et al.*, 2017) に接着させた後，DMEM/10 % FBS/1% Penicillin-Streptomycin, Liquid を 6 well plate の 1 well 当たり培地量 5 mL となるように添加し，37℃，5%CO_2 雰囲気下で前培養を開始した．前培養開始から 3 日目の心筋組織を静置培養 (以下 Static condition と表記) および回転浮遊培養 (以下 Floating condition と表記) にて培養した．培養開始時を Day 0 と定義し，Day 5 まで培養を行った．培養にはディスク型ベッセル＜100 mL＞ (JTEC Co. Ltd., Osaka, Japan) および Cell Pet Cube (JTEC Co. Ltd.) を用い，ベッセルの回転数を Static condition では 0 に，Floating condition では 10 rpm にそれぞれ設定して 37℃，5%CO_2 雰囲気下で培養を行った．

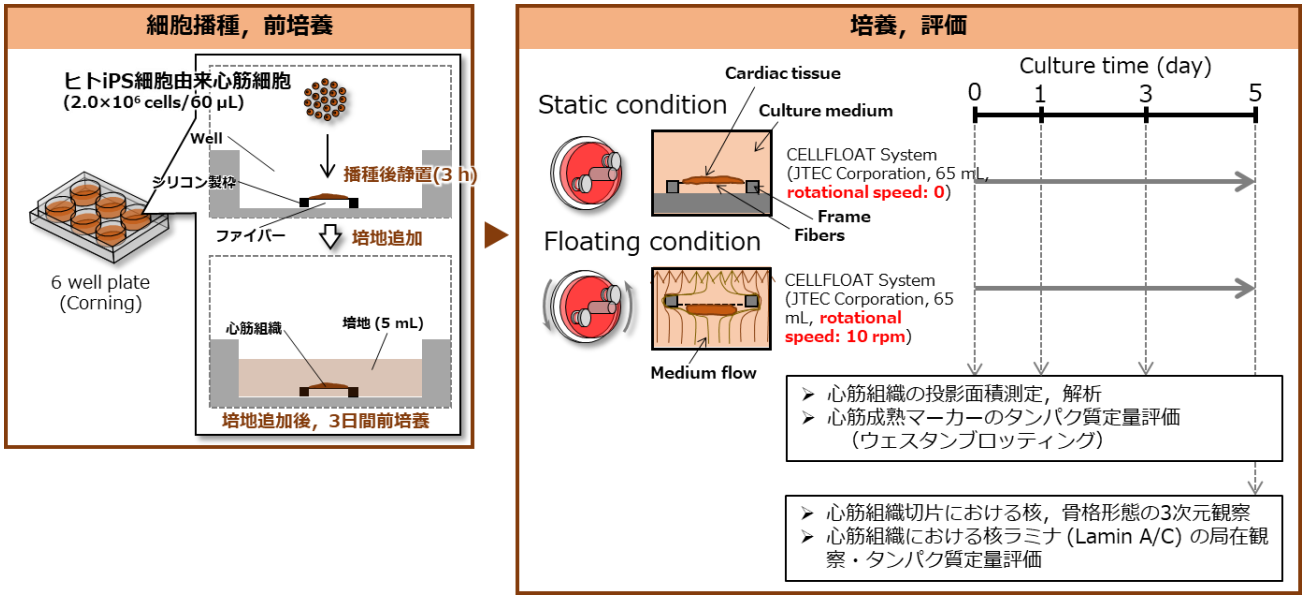


Fig. 3.2 The procedure for the culture of cardiac tissue in static and floating conditions.

3.2.5　心筋組織の形態観察および投影面積測定

培養過程における心筋組織形態変化の特性を理解するため，Day 0，Day 1，Day 3，Day 5 のそれぞれにおいて心筋組織の形態観察および画像取得を行い, 取得した画像から心筋組織の投影面積 S (μm^2)を測定した．心筋組織の形態観察および画像取得は，倒立型明視野顕微鏡 IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) の 2 倍対物レンズを用いて行い，投影面積測定は画像処理ソフト Image Pro Plus 7.0 を用いて第 2 章と同様の方法で行った.

3.2.6　ウェスタンブロッティングによる心筋構成タンパク質形成の定量評価

心筋組織の成熟度の評価を行うため，先行研究 (Nakazato, *et al.*, 2020) の評価方法に基づき，ウェスタンブロッティングによる心筋構成タンパク質 (Troponin T，Sarcomeric Alpha Actinin (SAA)，β-Myosin Heavy Chain (β-MHC)) の定量評価を行った．以下に方法を示す. Day 0，Day 1，Day 3，Day 5 において心筋組織を回収して PBS で洗浄した後，Halt™ Protease & Phosphatase inhibitor Single-Use Cocktail (100X) (Thermo Fisher Scientific) を 1/100 量加えた CelLytic M:Mammalian Cell Lysis/Extraction reagent (Sigma-Aldrich) を添加し，氷上で 10 min 静置した. その後同じく氷上でソニケーション処理を行った後, 遠心分離 (4℃, 12,000 rpm, 15 min) にかけ，上清をタンパク質抽出液として採取した.

採取したタンパク質抽出液に含まれるタンパク質の濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し，測定結果を元にポリアクリルアミドゲル電気泳動に用いるタンパク質抽出液の液量を決定した. 既往研究と同様の方法にてポリアクリルアミドゲル電気泳動および PVDF メンブレンへのタンパク質転写処理を行い，終濃度で 5%となるように ECL Blocking Agent (GE Healthcare) を含ませた TBS でブロッキング処理を行った．ブロッキング処理終了後，終濃度で 5%および 1%となるように ECL Blocking Agent (GE Healthcare) および Tween-20 (Nacalai Tesque) を含ませた TBS (以下，抗体反応液) に 1 次抗体 (Anti-Cardiac Troponin T (Abcam), Anti-Sarcomeric Alpha Actinin (Abcam), Anti-Myosin Heavy Chain-7 (Proteintech), Anti-connexin-43 (Sigma), Anti-Lamin A/C antibody (Santa Cruz Biotechnology), anti-Lamin B1 antibody (Abcam), Anti-GAPDH (Cell Signaling technology)) を希

釈し，4℃下で一晩 1 次抗体反応を行った．1 次抗体反応終了後，PVDF メンブレンを終濃度で 1%となるように Tween-20 (Nakalai Tesque) を含ませた TBS (以下, TBS-T) にて洗浄した．洗浄処理終了後，抗体反応液に 2 次抗体 (Dylight 800 goat anti-rabbit (Biorad), Starbright 700 goat anti-mouse (Biorad)) を希釈し，室温下で 1 h，遮光状態で 2 次抗体反応を行った．2 次抗体反応終了後，PVDF メンブレンを TBS-T にて洗浄し，バンド検出器 ChemiDoc MP imaging system (Biorad) を用いてバンド検出および蛍光画像の取得を行った．取得した蛍光画像を元に，画像処理ソフト Image Lab Software (Biorad) を用いて検出したそれぞれのバンドの輝度を測定した．

3.2.7 蛍光染色および心筋組織切片の 3 次元構造観察

心筋組織における核および骨格タンパク質 (F-actin) の時間的分布の特性を理解するため，化学蛍光染色による心筋組織の 3 次元構造観察を行った．以下に方法を示す． Day 5 にて心筋組織を回収し，PBS で一度洗浄した後，4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (FUJIFILM Wako) にて 30 min 固定化処理を行った．固定化処理終了後，組織を PBS で洗浄し，15%スクロース/PBS 溶液に一晩浸して脱水処理を行った．脱水処理終了後，心筋組織を O.T.C.コンパウンドにて包埋・凍結し，凍結標本を作製した．この凍結標本から 60 μm 厚の凍結標本切片を作製し，スライドガラスに張り付けた．この標本切片を PBS にて洗浄して O.C.T.コンパウンドを除去した後，0.5%Triton X-100/PBS 溶液に 10 min 浸し，膜透過処理を行った．膜透過処理終了後，Alexa 488 conjugated phalloidin (Thermo Fisher Scientific) および 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ用いて F-actin および核の染色を行った．染色処理終了後，標本切片を PBS にて洗浄し，共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (Olynpus) を用いて標本切片の 3 次元構造観察を行った．

3.2.8 心筋組織切片の免疫蛍光染色

心筋組織における核アミナ (Lamin A/C) の局在性を明らかにするため，免疫蛍光染色による心筋組織構造観察を行った．3.2.7 に示した方法と同様の方法にて心筋組織を凍結包埋

し，心筋組織の凍結標本を作製した．作製した凍結標本から 10 μm 厚の凍結標本切片を作製し，スライドガラスに張り付けた．この標本切片を PBS で洗浄して O.C.T.コンパウンドを除去した後，0.5%Triton X-100/PBS 溶液に 10 min 浸し，膜透過処理を行った．膜透過処理終了後，標本切片をブロックエース溶液に浸して 4℃下で一晩ブロッキング処理を行った．ブロッキング処理終了後，Anti-Lamin A/C antibody (Santa Cruz Biotechnology) を用いて調製した 1 次抗体溶液で標本切片を 4℃下で一晩浸し，1 次抗体反応を行った．1 次抗体反応終了後，標本切片を Alexa Fluor 488 goat-anti mouse antibody (Thermo Fisher Scientific)を用いて調製した 2 次抗体溶液に室温で 1 h 浸し，2 次抗体反応を行った．2 次抗体反応終了後，4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) を用いて核の染色を行った．染色処理終了後，標本切片を PBS にて洗浄し，共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (Olynpus) を用いて標本切片の構造観察を行った．

3.2.9 統計解析

各培養条件での培養は少なくとも 3 回行い，独立してデータを取得した．得られたデータは平均値をグラフにし，エラーバーとして標準偏差を表示した．Student’s t-test をデータ間の有意差を決定するために用い，有意水準 1%または 5%で検定を行った．

3.3　実験結果

3.3.1　回転浮遊培養における心筋組織形態変化の特性

回転浮遊培養における心筋組織形態変化の特性を明らかにするため，各培養時間 (Day 0, Day 1, Day 3 および Day 5) における心筋組織の投影面積 S (μm^2) を測定し，Day 0 のときの投影面積 S_0 (μm^2) に対する投影面積変化率 S/S_0 (-) を算出した．各培養時間に対してこの値をプロットした図を **Fig. 3.3A** に示した．比較対象として用意した静置培養においては S/S_0 の値の顕著な変化は認められなかったのに対し，回転浮遊培養では S/S_0 が Day 0 から Day 3 にかけて有意に減少していた (**Fig. 3.3A**)．Day 3 から Day 5 にかけては顕著な変化は認められなかったが，Day 5 における S/S_0 の値は静置培養のものと比較して有意に低い値であった (**Fig. 3.3A**).

また，この時の心筋組織の形態変化の仕方についても，明視野顕微鏡での観察結果から静置培養と回転浮遊培養の間で顕著な違いが認められた．両条件とも，ナノファイバー線維に対して縦方向には顕著な変化が認められなかったが，ナノファイバー線維垂直方向に対しては，静置培養と比較すると回転浮遊培養の方が組織形態の変化が大きく，ナノファイバー線維が Day 0 と比較して変形している様子が確認された (**Fig. 3.3F1, F3, G1, G3**).

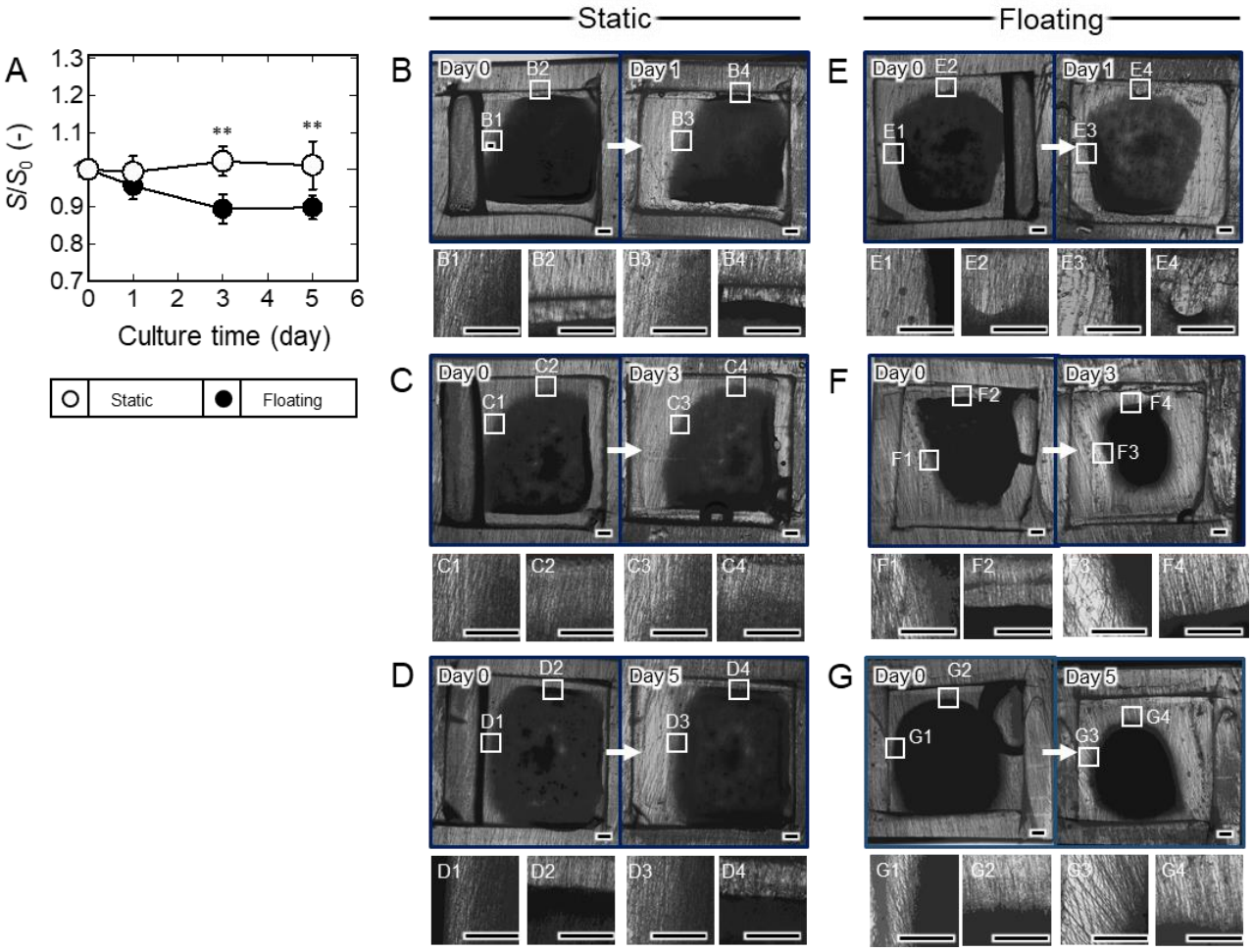


Fig. 3.3 Morphological change of cardiac tissue in static and floating conditions. (A) Time profile of the projected area ratio (S/S0). Statistical significance was analyzed by performing two tailed Student's t-tests; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ ($n = 6$). Error bars represent the standard deviation. (B - M) Bright field images of cardiac tissue on Day 0, Day 1, Day 3, and Day 5. Scale bars show 500 μm.

3.3.2　心筋組織における心筋構成タンパク質形成の特性

心筋組織における心筋骨格タンパク質 (Troponin T, Sarcomeric Alpha Actinin (SAA), β-Myosin Heavy Chain-7 (β-MHC)) および細胞-細胞間ギャップ結合構成タンパク質 (Connexin-43) の形成について，回転浮遊培養での時間依存的な変化の特性を明らかにするため，ウェスタンブロッティングによるこれらのタンパク質の定量評価を行い, 比較対象として用意した静置培養のものと比較した．定量評価を行う際には，まず各培養時間における各バンド (**Fig. 3.4A**) の蛍光強度を測定し，ローディングコントロール (GAPDH)に対する標的タンパク質の相対蛍光強度を算出した．その相対蛍光強度について，Day 0 における値を 1 としたときの Day 1，Day 3，Day 5 の相対値をプロットしたのが **Fig. 3.4B-E** に示すグラフである．

比較対象として用意した静置培養ではいずれのタンパク質もその形成量について時間依存的な変化は認められなかった (**Fig. 3.5B-E**)．回転浮遊培養においても Troponin T および SAA の形成に関しては顕著な変化は認められなかった (**Fig. 3.4B, C**) が，β-MHC および Connexin-43 については Day 3 以降に有意に増加する傾向が認められた (**Fig. 3.4D, E**).

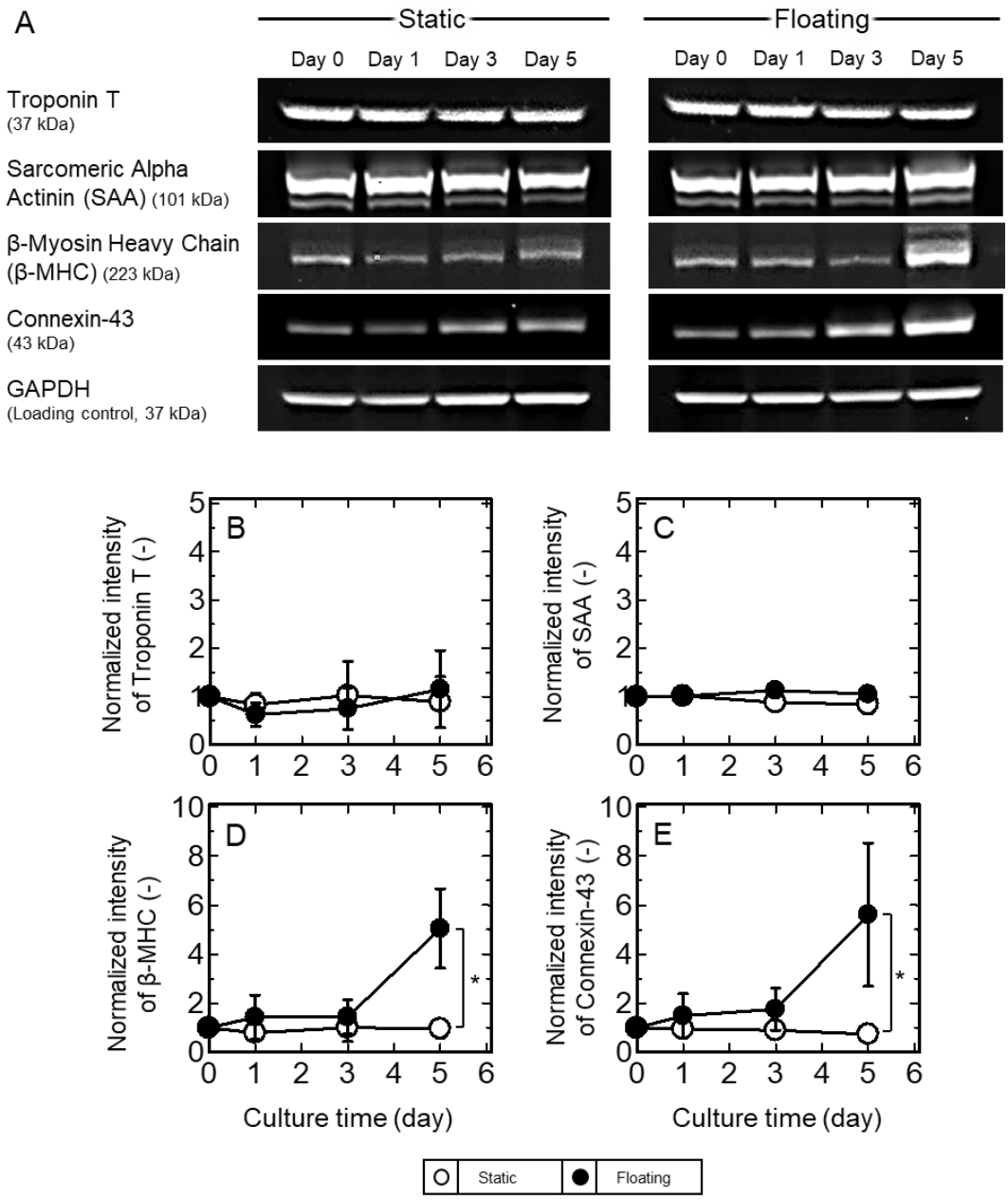


Fig. 3.4 Maturation properties of cardiac tissue in static and floating conditions. (A) The western blot images of Troponin T, Sarcomeric Alpha Actinin (SAA), β-Myosin Heavy Chain (β-MHC), Connexin-43, and GAPDH (loading control), and (B-E) their quantitative analysis. The intensity of each target proteins was normalized to that of GAPDH. Open circle: static condition, closed circle: floating condition. Statistical significance was analyzed by performing two tailed Student's t-tests; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ ($n = 3$).

3.3.3　心筋組織における核および F-actin の空間的分布，形態，構造の特性

次に，回転浮遊培養にて培養した心筋組織の 3 次元的な構造特性を理解するため，心筋組織切片における核および骨格 (F-actin) の 3 次元構造観察を行い，その結果を比較対象として用意した静置培養のものと比較した．**Fig. 3.5** に示した図はナノファイバー線維方向に対して垂直に切った組織の断面であり，組織中心部 (Central region) と組織周囲部 (Peripheral region) をそれぞれ示している (**Fig. 3.5A-D**)．また，ナノファイバー線維が局在していたと考えられる側を Fiber sheet side, その反対側で組織表面側を Surface side とし, その間を Middle side としたときに，それぞれにおける XY 平面，XZ 平面，YZ 平面の観察結果を **Fig. 3.5A1-D3** にそれぞれ示している．

まず組織片の構造特性として，組織中心部においては Floating condition の方が Static condition と比較して分厚い構造を有していた (**Fig. 3.5A, C**)．また周囲部においては Static condition の組織片は比較的扁平したような構造であったのに対し，Floating condition では比較的丸みを帯びたような構造を有していた (**Fig. 3.5B, D**). また, 核の分布は Static condition, Floating condition ともに均一であったが F-actin の構造については条件間で顕著な違いが認められ，Floating condition では Static condition で認められなかったような F-actin の筋状の構造が組織中心部，組織周囲部のそれぞれの組織表面側で認められた (**Fig. 3.5C, D**)．このときの組織切片各部位 (**Fig. 3.5A1-D3**) における核の形態を 3 次元的に観察すると，Fiber sheet side や Middle side においては Static condition，Floating condition ともに丸い形状の核が多く認められた (**Fig. 3.5A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2**) のに対し, Surface side では Static condition と Floating condition の間で核の形態に顕著な違いが認められた．Static condition では他の部位と同様に丸い形状の核が多く分布していた (**Fig. 3.5A3, B3**) が，Floating condition では組織表面部分の核が組織表面に沿って扁平したような形態を示していた (**Fig. 3.5C3, D3**).

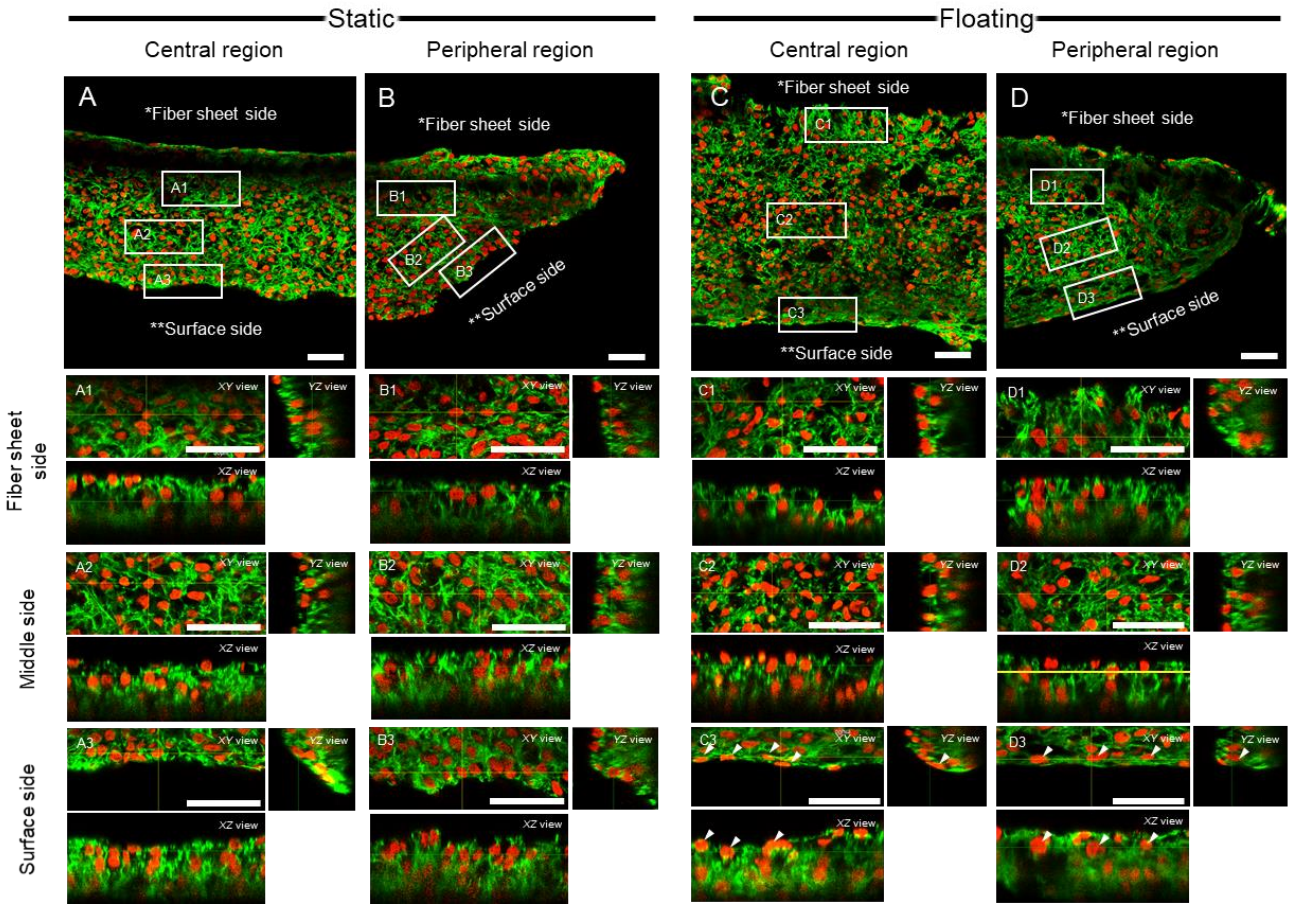


Fig. 3.5 Localization of nuclei and actin cytoskeleton in hiPSC-derived cardiac tissue cultured in static and floating conditions on Day 5. Confocal fluorescence images of F-actin (green) and nuclei (red) show top-down views of 3D-reconstruction (XYZ planes) and 2D optical cross-sectioning (XZ and YZ planes). The yellow lines in the top-down views indicate the location of the cross-sectional side view. Scale bars = 50 μm.

3.3.4　心筋組織における核ラミナの局在とその形成量

心筋組織における核アミナの局在とその形成量について明らかにするため, 免疫蛍光染色による Lamin A/C の局在観察およびウェスタンブロッティングによる Lamin A/C の形成量に関する定量評価を行った．ウェスタンブロッティングによるタンパク質定量評価では，全細胞において形成される Lamin B1 に対してどの程度 Lamin A/C が形成されているかを明らかにするため，先行研究 (Koaykul, *et al.*, 2019; Kim, *et al.*, 2021) と同様の評価方法に基づいて Lamin B1 に対する Lamin A/C の相対蛍光強度を算出し，その値を Day 0 および Day 5 の Static condition のものと比較した.

Fig. 3.6A の染色画像からも明らかなように，Static codition と比較して Floating condition の方が Lamin A/C 陽性細胞がより多く認められた．加えて，その局在性についても違いがはっきりと認められ，Static condition では組織内部に Lamin A/C 陽性細胞が不均一に局在していたのに対し，Floating condition では組織全体に均一に Lamin A/C 陽性細胞が局在していた．さらにウェスタンブロッティングによるタンパク質定量評価の結果においても Floating condition では Lamin A/C の形成量が Day 0 から Day 5 にかけて維持されており Static condition のものと比較して顕著に多いことが明らかとなった (**Fig. 3.6B**).

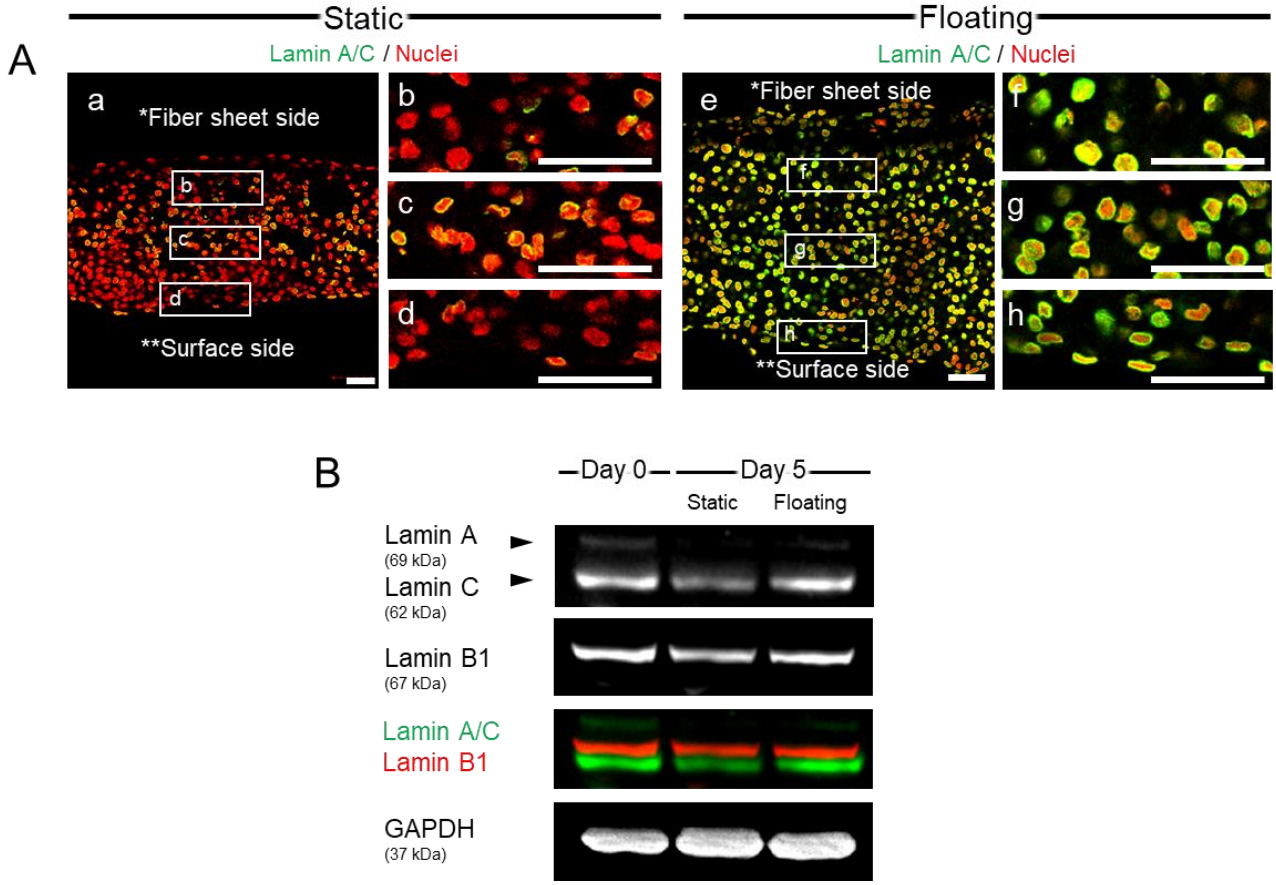


Fig. 3.6 Distribution and formation of nuclei lamina in cardiac tissue of static and floating conditions. (A) Immunostaining images of Lamin A/C (green) and nuclei (red) in the central region of cardiac tissue. (b-d, f-h) Magnified views of the boxed area in (a) and (d), respectively. Scale bars show 50 μm. (B) The western blot images of Lamin A/C, Lamin B1, and GAPDH.

3.4　考察

本研究では, 回転浮遊培養における心筋成熟のメカニズムを明らかにすることを目的として，成熟化に伴って発生しうる組織の形態および構造変化の特性を調査し，その結果から成熟化のトリガーとなる因子を見出す，という戦略をとった．その結果，心筋組織の形態変化や心筋構成タンパク質の形成パターンには時間依存的な特性があることが示され，これら 2 つの現象の間に, 回転浮遊培養における心筋成熟のトリガーとなる因子が存在する可能性が考えられた．本節では，これらの関係性について組織構造特性と回転浮遊培養の培養特性の観点から考察し，心筋成熟のトリガーとなりうる因子について言及した.

3.4.1　心筋組織の形態変化特性と心筋構成タンパク質の形成の関係

培養過程における心筋組織形態の変化について調査を行ったところ，**Fig. 3.2** の結果からも明らかなように，心筋組織の投影面積比 S/S_0 (-) が静置培養と比較して回転浮遊培養の方が有意に減少し，特に Day 0 から Day 3 にかけての S/S_0 の値の減少が顕著であった．S/S_0 が有意に減少した要因はいくつか考えられ，1 つは組織外縁部の細胞が徐々に剥がれて組織から消失してしまった可能性, もう 1 つは細胞が剥がれることなく組織そのものが中心部に向かって収縮し, 分厚い構造へと変化した可能性である. 明視野画像における組織形態の観察, 特に組織外縁部における拡大像の観察結果では，静置培養，回転浮遊培養ともに組織外縁部においては目立った組織の損傷は認められず，前者の細胞が剥がれ，消失したことによる S/S_0 の値の減少の可能性は低いと考えられる．一方，回転浮遊培養では静置培養と比較して組織外縁部付近におけるナノファイバー線維の顕著な変化が認められ, 特にナノファイバー線維の配列方向に対して垂直な方向に対するファイバー線維の形状変化が顕著であった (**Fig. 3.3 F1, F3, G1, G3**)．このことからこの方向に組織が収縮して分厚い構造へと変化したのではないかと考えられる. 先行研究では回転浮遊培養で培養した心筋組織は分厚い構造へと変化したことが示されており (Nakazato, *et al.*, 2020)，本研究においても組織構造観察の結果から回転浮遊培養では静置培養と比較して顕著に分厚い構造が確認されている (**Fig. 3.5A, C**)．これらの知見および結果は，培養過程において組織が収縮して分厚い構造へと変

化したことを支持するものであり, 回転浮遊培養では培養経過に伴って心筋組織が縮む現象が起こっていることが示唆された.

一方で, 培養過程における心筋構成タンパク質 (Troponin T, Sarcomeric Alpha Actinin (SAA), β-Myosin Heavy Chain (β-MHC), Connexin-43) の形成量の経時変化について調査を行ったところ, これらのタンパク質形成のパターンは上述した S/S_0 の変化の仕方と大きく異なることが分かった. Troponin T および SAA の形成量については培養中いずれも一定のレベルを維持していたのに対し, β-MHC および Connexin-43 の形成量は組織が縮んだ後の Day 3 以降に有意に増加していた (**Fig. 3.4**). 一般に Troponin T および SAA は, それぞれアクチン-ミオシン収縮運動の調節, サルコメア構造に維持に関与している代表的な心筋構成タンパク質であり, 未成熟心筋の段階から形成されることが知られている (Karbassi, *et al.*, 2020). 一方で β-MHC および Connexin-43 はそれぞれ, サルコメア構造の成熟および電気生理学的機能の成熟に伴って形成されるタンパク質であり, 心筋成熟のマーカーとして広く汎用されている (Reiser, *et al.*, 2001; McDevit, *et al.*, 2002; Salameh, *et al.*, 2010; Zhang, *et al.*, 2017; Cui, *et al.*, 2019). これらの報告を考慮すると, Floating condition の心筋組織は Day 3 までの間, 未成熟心筋としての表現型を維持しながら縮み, 何らかの因子がトリガーとなって Day 3 以降に心筋成熟が進行し始めたことが考えられる. すなわち, **Fig. 3.3** および **Fig. 3.4** の結果は, 心筋成熟が進み始める前の組織が縮む現象に, 成熟化のトリガーとなる因子が存在することを示唆しており, 詳細のメカニズム解明のためにはこの点についてのより詳細の調査が必要であることが考えられた.

3.4.2 回転浮遊培養における心筋成熟のトリガーとなる因子

前節から心筋成熟のトリガーとなる因子は心筋組織が縮む現象にある可能性が示唆され, 心筋組織構造の詳細な理解が当該因子の特定につながると考えられた. そこで本研究では心筋組織構造の 3 次元観察を行い, 核および F-actin の空間的な形態, 分布の特性を明らかにした (**Fig. 3.5, 3.5**). **Fig. 3.7** にはその結果と, 前節で述べた心筋組織形態変化および心筋構成タンパク質形成の変化の調査結果 (**Fig. 3.3, 3.4**) に基づいて, 回転浮遊培養における心筋

成熟のメカニズムに関する仮説の概念図を示した.

Fig. 3.5 の核，F-actin の 3 次元構造観察の結果かから，回転浮遊培養では無限沈降に伴って液流が当たる組織表層部において, 組織表面に沿って扁平した形状の核が多く存在していた (**Fig. 3.5C3, D3**). 筋細胞に対して液流由来の剪断ストレスを付与した時の細胞骨格形成への影響についてはいくつか報告例があり, 基本的に剪断ストレスが付与された方向に沿ってアクチンフィラメントが配向する傾向があるとされている (Ann, *et al.*, 2002; Steven, *et al.*, 2013). また，心筋細胞集塊に対して扁平するような力学的負荷を付与した際には，細胞集塊から生じるサルコメア構造由来の収縮力が大きくなることも報告されている (Nakano, *et al.*, 2021). 回転浮遊培養では無限沈降により組織表面に対して絶えず鉛直方向の流体からの抗力がかかっており，特に沈降方向と逆の鉛直上向き，すなわち組織表面から内部に向かう方向に圧迫するような力がはたらき続けるものと推察される. また組織表面では表面に沿った方向に流体から発生する剪断ストレスがはたらき続ける. これらの報告例や本研究における結果を考慮すると,「(i) 心筋組織表面鉛直上向きに液流が当たることにより細胞が組織内部方向に圧迫されること」, そして「(ii) 組織表面に沿った方向に剪断ストレスがはたらくこと」で組織表層部の細胞が扁平した形状へと変化し，サルコメア構造が形成されているのではないかと考えられる．加えて，サルコメア構造が形成された部位ではアクチン-ミオシン収縮運動が起こりやすく，水平方向に沿った収縮力が発生することも知られている (Alam, *et al.*, 2016; Chanet, *et al.*, 2017; Alisafaei *et al.*, 2019). 本研究の結果では同じく組織表層部において F-actin の筋状の構造が確認されており (**Fig. 3,5C3, D3**)，組織表面の方向に沿った収縮力が発生していることが考えられる. 特に組織周囲部ではこの収縮力がはたらくことによって組織中心方向に向かって縮むような運動を起こすことが考えられ, 組織表面において細胞形態の変化を伴う骨格形成が, いわゆる組織が縮む現象のトリガーとなったのではないかと考えられる.

一方, 回転浮遊培養では組織内の細胞において核ラミナである Lamin A/C の形成が静置培養と比較して顕著であり, 組織全体に均一に Lamin A/C 陽性細胞が分布していた (**Fig. 3.6**). Lamin A/C は分化細胞において核の内側に形成されるタンパク質であり，核の形態の保持や

クロマチン形態の制御を通じた遺伝子発現制御に寄与する重要なタンパク質である (Lenz-Bohme, *et al.*, 1997; Sullivan, *et al.*, 1999; Liu, *et al.*, 2000; Dechat, *et al.*, 2008). Lamin A/C は細胞が外部から圧迫されるような力学的負荷を受けたときに, その負荷が細胞骨格を介して核に伝達され，核内に顕著に形成されることが知られている (Wang, *et al.*, 2009). 特に心筋では Lamin A/C の形成がそれに続く Sad1p and Unc-84 homology 1-2 (SUN1-2)，Nesprin，Desmin といった一連のタンパク質群の形成を促し, サルコメア構造の形成やその配向性の向上が促進されると考えられている (Carmosino, *et al.*, 2014). またこの一連のタンパク質群の形成を促すのが Serum response factor (SRF) と呼ばれる調節タンパク質であり，Lamin A/C の核内で形成されることにより SRF の形成, 活性化が促進されることが報告されている (Balza and Misla, 2006; Vartiaien, *et al.*, 2007). すなわち，心筋細胞に対する力学的負荷の付与は Lamin A/C の蓄積を通じたサルコメア構造の形成に極めて重要な役割を担っていると考えられる.

本研究では，核と F-actin の 3 次元構造観察の結果から，組織表層部の細胞でアクチン-ミオシン収縮運動が発生することにより組織外部から内部方向に向かって内部の細胞を圧迫するような力がはたらくことが考えられ, これが組織が縮む現象の主要因の 1 つとして考えられる. 加えてこの圧迫する力がはたらくことにより組織内部の心筋細胞の Lamin A/C 形成が促され，後に続くサルコメア構造の形成や Connexin-43 の形成にも正の影響を与えたことが考えられる. 実際に回転浮遊培養では Lamin A/C の形成が維持されており (**Fig. 3.6B**)，無限沈降に伴って発生する液流が組織表層部にはたらくことにより細胞が扁平した形状へと変化する. そして扁平した形状の心筋細胞に発生する細胞骨格由来の組織表面方向に沿った収縮力が組織の縮みを伴って組織内部の細胞を圧迫し, Lamin A/C の形成を促す. この Lamin A/C の形成により心筋成熟に関連する一連のタンパク質群のはたらきが活性化され, 心筋成熟が遅発的に進行したものと考えられる (**Fig. 3.7**).

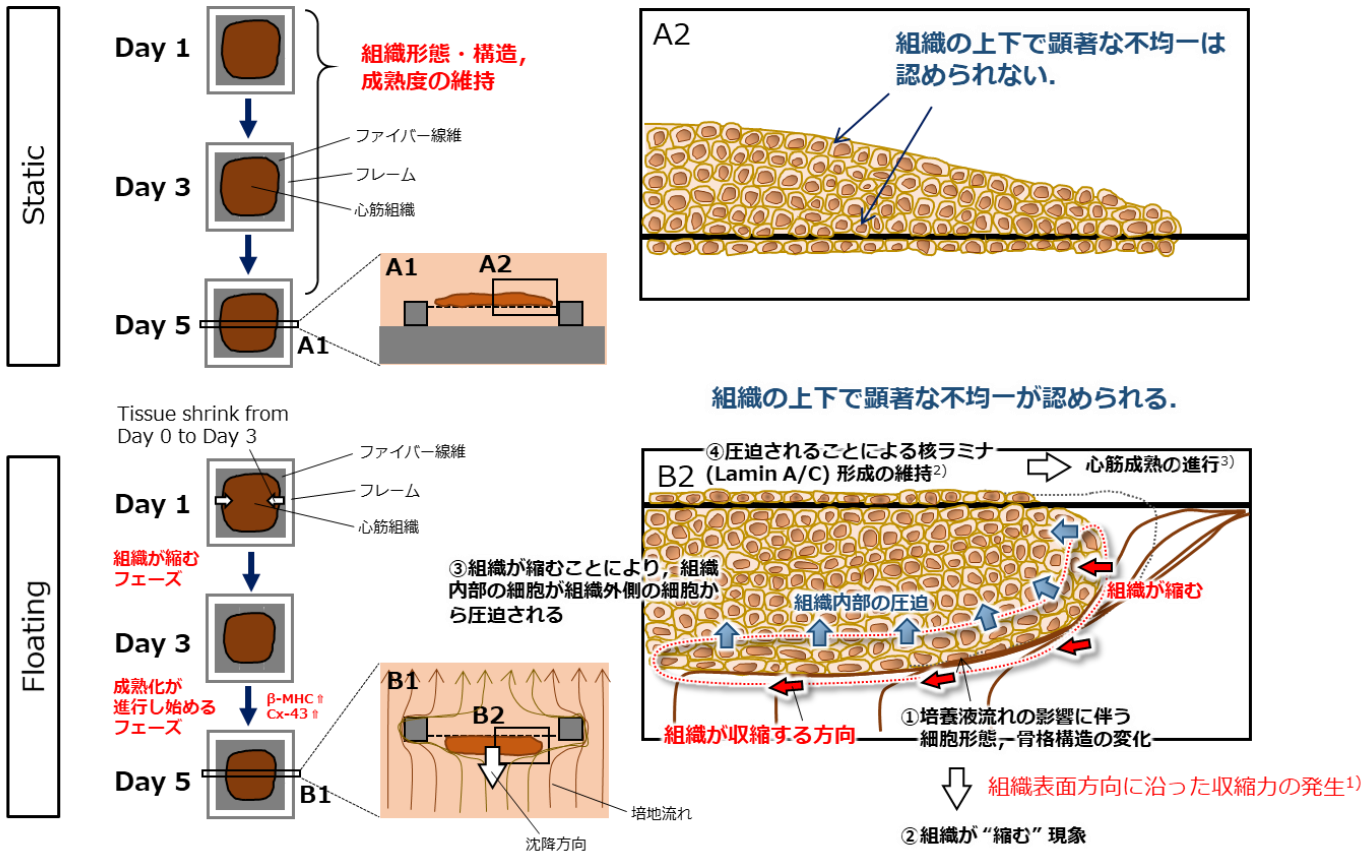


Fig. 3.7 Schematic illustration showing the possible mechanism of cardiac tissue maturation in rotating flow culture. The cardiomyocyte shape in the surface of the tissue cultured in floating condition showed the flat due to medium flow with infinite sedimentation. The flat shape cardiomyocytes perform contractile force along with the surface of the tissue, resulted in the shrink of tissue. Moreover, the formation of nucleus lamina in the tissue of floating condition might be maintained due to the compression from outside cells to inside cells. The nucleus lamina contributes to the maturation of cardiomyocytes by the activation of regulatory proteins associated with sarcomere structure maturation. These spatial heterogeneity in the tissue due to infinite sedimentation, which was not observed in static condition, was the most important factor for cardiac maturation in rotating flow culture.

3.5　小括

本研究の結果から，回転浮遊培養ではヒト iPS 細胞由来心筋組織が縮む現象が起こっており，その変化の仕方についても時間依存的な特徴があることが示された．また，成熟心筋にみられる β-MHC や Connexin-43 といったタンパク質の形成は組織が縮んだ後に有意に増加しており，組織が縮んだ後に心筋成熟が進行し始めたことが示唆された．回転浮遊培養で培養した心筋組織では組織表面に扁平した細胞が多く認められ，F-actin の筋状の構造も確認されたことから，組織表面の細胞から組織内部の細胞に対して圧迫するような力がはたらいていることが考えられた．さらに回転浮遊培養では静置培養と比較すると核ラミナ (Lamin A/C) の形成が維持されており，回転浮遊培養における心筋成熟に寄与する重要な因子の 1 つであることが示唆された．以上から回転浮遊培養における心筋成熟のメカニズムとして「培地流れの影響により組織表面の細胞形態が変化し，組織が収縮する事」，そして「この収縮時に組織内部の細胞にはたらく圧迫が，核ラミナ (Lamin A/C) の形成維持を促し，心筋成熟に至ったこと」が考えられた．

第 4 章　総括

本研究ではヒト細胞集塊を用い, 培養過程における現象解明を通じて回転浮遊培養の特性とその工学的意義について明らかにした．その結果をまとめると以下のようになる．

- 第 2 章では複数細胞集塊群の培養の例としてヒト iPS 細胞を用い，培養過程における細胞集塊挙動の特性とそれが細胞増殖に与える影響を反応速度論的に解釈した．その結果, 回転浮遊培養では集塊合一および集塊崩壊の 2 つの現象が発生しており，培養初期の集塊合一に伴う過剰な集塊サイズ増大，そして培養後期の集塊崩壊に伴うシングルセルの発生が細胞増殖を阻害する重要な因子であることが示唆された．さらに集塊合一と集塊崩壊の発生頻度が異なる 2 つの細胞株間では，これら 2 つの現象の発生に寄与する E-cadherin および細胞外マトリックス (ECM) の細胞集塊外縁部における局在性が顕著に異なることを見出した．今回確認された細胞株間での挙動の違いは，集塊構造の安定性や細胞集塊接触時における反応性の違いによって生じるものであり，特に後者は「細胞集塊同士の接触」という培養特性に起因して発生すると考えられる．このことから当該特性が複数細胞集塊群の培養における回転浮遊培養の重要な特性の 1 つとして考えられた．
- 続く第 3 章では，単一細胞集塊の培養特性を明らかにするため，ヒト iPS 細胞由来心筋組織を用い，成熟化メカニズムの解明を行った．その結果，回転浮遊培養では心筋組織の成熟化が進行する前の段階で組織が縮み分厚い構造へと変化することが示唆された．またこの心筋組織の 3 次元構造観察の結果から，無限沈降に伴って流体の流れがはたらく組織表面部分に扁平した形状の核が多く認められ，F-actin の筋状の構造も確認された．さらに細胞が力学的負荷を受けることにより核内に形成され，加えて心筋成熟にも寄与している核ラミナ (Lamin A/C) の形成が回転浮遊培養で培養した心筋組織において維持されていた．これらの事から，無限沈降に伴う流体由来のストレスにより，組織表面の細胞が扁平する，そしてこれにより発生した収縮力や組織内部の細胞を圧迫する力が組織内の核ラミナの形成を促し，遅発的に心筋成熟の発生に至ったことが考えられた．

以上の結果は「細胞集塊同士の接触」や「細胞集塊構造の空間的不均一の発生」といった回転浮遊培養の特性を示す重要な知見あり，これらが当該培養における細胞の増幅や分化に大きく影響を及ぼす因子であることが考えられた (**Fig. 4.1**).

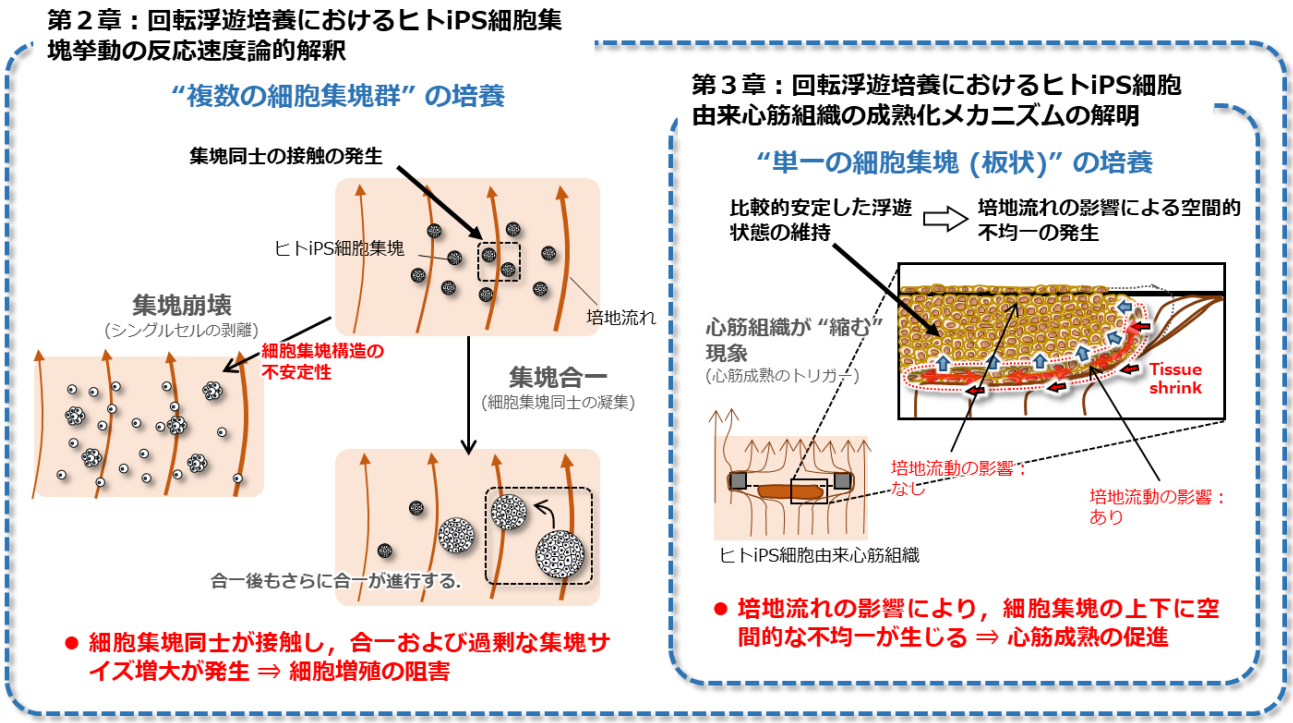


Fig. 4.1 Schematic illustration showing the characteristics of rotating flow culture with human cell aggregates.

第 1 章でも述べたように，回転浮遊培養に対する考え方は時代とともに変化しており，当初は細胞集塊の微小重力状態を創り出すための培養手法というコンセプトの下開発された．しかし地上で培養する以上は物体には必ず重力がはたらくため，微小重力状態という考え方が正しいかどうかについては長年議論が繰り広げられてきた．その後，物体にはたらく重力の存在を認めた上で，現在では細胞集塊の重力沈降と釣り合わせるような培地流れを与え続ける培養手法，という認識が広まるようになった．ところが回転浮遊培養における粒子挙動や流体解析に関する多くの研究 (Ju, *et al.*, 2006; Chao, *et al.*, 2015;Varley, *et al.*, 2017) が進む

と，細胞集塊は無限沈降状態だけでなく，周期的または非周期的揺動状態や，軌道運動状態のいずれかにて浮遊することが示された．

このように，回転浮遊培養研究の最も大きな課題の 1 つは，回転浮遊培養そのものの定義が非常に難しい点にあり，現在もなお，当該培養の装置的特性を考慮しても厳密な定義がなされていないのが現状といえる．その中で本研究は，回転浮遊培養の装置的特性と生物学的現象を結びつけるという観点に着目し，複数細胞集塊群および単一細胞集塊の培養を対象に現象解明を行う事で，「ヒト細胞集塊培養における回転浮遊培養の本質的な特性とは」という問いに対して，工学的観点から新たな解釈を与えることを行った．その結果，上述したような 2 つの特性が見出され，しかもそれが細胞の増幅と分化に影響を及ぼす重要な因子であることが示唆された．これらは今まで未解明であった回転浮遊培養の特性とその工学的意義を示す極めて重要な知見であり，今後回転浮遊培養における生物学的現象を解明していく場合のみならず，細胞の増幅や分化を如何にして向上させていくか，考え方を創出していく場合においても，その手がかりとなりうる点で重要な概念であると考えられる．したがって，本研究における成果は，今後の培養工学の発展に寄与するものであると考えられる．

本報に関する論文

Hashida, A., Uemura, T., and Kino-oka, M.: Kinetics on aggregate behaviors of human induced pluripotent stem cells in static suspension and rotating flow cultures, J. Biosci. Bioeng., **129**, 494-501 (2020).

※本博士論文 第 2 章 に関与

略語リスト

略号

BMP4	bone morphogenetic protein 4
ECM	Extracellular matrix
IWP2	Inhibitor of Wnt Production-2
IWR1	Inhibitor of Wnt Response-1
RWV	Rotating wall vessel
SAA	Sarcomeric Alpha Actinin
SUN	Sad1p and Unc-84 homology
VEGF	vascular endothelial growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
cTnT	Cardiac troponin T
β-MHC	β-Myosin Heavy Chain

指標

k_{bu}	比分割速度 (h^{-1})
k_{coa}	比合一速度 (h^{-1})
k_d	比死滅速度 (h^{-1})
μ^{app}	見かけの比増殖速度 (h^{-1})
μ_g	比増殖速度 (h^{-1})
μ_{st}	Static condition における比増殖速度 (h^{-1})
η^{app}	見かけの比細胞集塊数増幅速度 (h^{-1})
ν^{app}	見かけの比平均集塊体積増幅速度 (h^{-1})

変数

V_{ag_i}	細胞集塊体積 (μm^3)
$\overline{V_{\mathrm{ag}}}$	平均集塊体積 (μm^3)
n_{ca_i}	単一細胞集塊あたり細胞数 (cells aggregate^{-1})
$\overline{n_{\mathrm{ca}}}$	単一細胞集塊あたり平均細胞数 (cells aggregate^{-1})
S	細胞集塊投影面積 (μm^2)
S_i	各細胞集塊の投影面積 (μm^2)
n_{ag}	細胞集塊数 (aggregates)
n_{c}	細胞数 (cells)
t	培養時間 (h)
v_{c}	単一細胞体積 (μm^3 cell^{-1})

参考文献

Adachi, K., Kano, Y., Nagai, T., Okuyama, N., Sakoda, Y., and Tamada, K.: IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor, Nature Biology, 36, 146-153 (2018).

Aikawa, N., Kunisato, A., Nagao, K., Takaba, K., and Ohgami, K.: Detection of thalidomide embryotoxicity by in vitro embryotoxicity. J. Pharmacol. Sci., **124**, 201 – 207 (2014).

Alam, S. G., Zhang, Q., Prasad, N., Li, Y., Chamala, S., Kuchibhotla, R., Kc, B., Aggarwal, V., Shrestha, S., Jones, A. L., Levy, S. E., Roux, K. J., Nickerson, J. A., and Lele, T. P.: The mammalian LINC complex regulates genome transcriptional responses to substrate rigidity. Scientific Reports, **6**, 38063 (2016).

Alisafaei, F., Jokhun, D. S., Shivashankar, G. V., and Shenoy, V. B.: Regulation of nuclear architecture, mechanics, and nucleocytoplasmic shuttling of epigenetic factors by cell geometric constraints. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **116**, 13200– 13209 (2019).

Amit, M., Chebath, J., Margulets, V., Laevsky, I., Miropolsky, Y., Shariki, K., Peri, M., Blais, I., Slutsky, G., Revel, M., Itskovitz-Eldor, J.: Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. Stem Cell Rev. Rep., 6, 248–259 (2010).

Ann, A. L., Dionne, A. G., Sheila, D., C., Anthony, R., and William, J. K.: Fluid shear stress-induced alignment of cultured vascular smooth muscle cell, J. Biomechanical Engineering., **124**, 37-43 (2002).

Balza, R.O. and Misra, R.P.: Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes, J. Biol. Chem., **281**, 6498– 6510 (2006).

Baraniak, P.R. and McDevitt, T.C.: Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential, Cell and Tissue Research, **347**, 701–711 (2012).

Bers, D. M.: Cardiac excitation-contraction coupling, Nature, **415**, 198-205 (2002).

Bershadsky, A. D., Balaban, N. Q., and Geiger, B.: Adhesion-dependent cell mechanosensitivity, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 19, 677–695 (2003).

Berson, R.E. and Friederichs, G.: A Self-feeding roller bottle for continuous cell culture, Biotechnol. Prog., **24**, 154-157 (2008).

Bianca, C.B., Kate, L.W., Lynette, P., and Julie, R.M.: Molecular distinction between physiological and pathological hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies, Pharmacology & Therapeutics, 128, 191-227 (2010).

Braga, V.M.M.: Cell–cell adhesion and signaling, Current Opinion in Cell Biology, 5, 546-556 (2002).

Butler, D.L., Goldstein, S.A., and Guilak, F.: Functional tissue engineering: the role of biomechanics, J. Biomech. Eng., **122**, 570-575 (2000).

Byers, S. W., Sommers, C. L., Hoxter, B., Mercurio, A. M., and Tozeren, A.: Role of E-cadherin in the response of tumor cell aggregates to lymphatic, venous and arterial flow: measurement of cell-cell adhesion strength, J. Cell Sci., **108**, 2053-2064 (1995).

Carmosino, M., Torretta, S., Procino, G., Gerbino, A., Forleo, C., Favale, S., and Svelto, M.: Role of nuclear Lamin A/C in cardiomyocyte functions, Biology of the Cell, **106**, 346-358 (2014).

Chanet, S., Miller, C. J., Vaishnav, E. D., Ermentrout, B., Davidson, L. A., and Martin, A. C.: Actomyosin meshwork mechanosensing enables tissue shape to orient cell force. Nature Communications, 8, 15014 (2017).

Chao, T.C. and Das, D.B.: Numerical simulation of coupled cell motion and nutrient transport in NASA's rotating bioreactor, Chemical Engineering Journal, **259**, 961-971 (2015).

Condorelli, G., Drusco, A., Stassi, G., Bellacosa, A., Roncarati, R., Iaccarino, G., Russo, M.A., Gu, Y., Dalton, N., Chung, C., Latronico. M.V., Napoli, C., Sadoshima, J., Croce, C.M., and Ross, J.: Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 99, 12333-12338 (2002).

Cui, Y., Zheng, Y., Liu, X., Yan, L., Fan, X., Yong, J., Hu, Y., Dong, J., Li, Q., Wu, X., Gao, S., Li, J., Wen, L., Qiao, J., and Tang, F.: Single-cell transcriptome analysis maps the developmental

track of the human heart, Cell Rep., **26**,1934–1950 (2019).

Cukierman, E., Pankov, R., Yamada, K.M.: Cell interactions with three-dimensional matrices. Curr Opin Cell Biol **14**, 633– 639 (2002).

De Carvalho, A. E. T. S., Bassaneze, V., Forni, M. F., Keusseyan, A. A., Kowaltowski, A. J., and Krieger, J. E.: Early Postnatal Cardiomyocyte Proliferation Requires High Oxidative Energy Metabolism, Sci Rep, **7**, 15434 (2017).

Dechat, T., Gajewski, A., Korbei, B., Gerlich, D., Daigle, N., Haraguchi, T., Furukawa, K., Ellenberg, J. and Foisner, R.: LAP2alpha and BAF transiently localize to telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly, J. Cell Sci., **117**, 6117– 6128 (2004).

Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., and other 33 autors: Drug screening for ALS using patient specific induced pluripotent stem cells, Stem Cells, **4**, 1-8 (2012).

Fayaz, A., Zavarei, A., Howaizi, N., and Eslami, N.: Production of Rabies Vaccine Using BHK-21 with Roller Bottle Cell Culture Technique, Iranian Biomedical Journal, **1**, 35-38 (1997).

Fink, C., Ergün, S., Kralisch, D., Remmers, U., Weil, J., and Eschenhagen, T.: Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement, FASEB J., **14**, 669-679 (2000).

Gelmi, A., Pobuda, A.C., Muinck, E., Los, M., Rafat, M., Jager, E.W.H.: Direct mechanical stimulation of stem cells: a beating electromechanically active scaffold for cardiac tissue engineering, Adv. Healthcare Mater., **5**, 1471–1480 (2016).

Glacken, M.W., Fleischaker, R.J., and Sinskey, A.J.: Mammalian cell culture: engineering principles and scale-up, Trends in Biotechnol., 1, 102-108 (1983).

Guokai, C., Zhonggang, H., Daniel, R. G., and James, A. T.: Actin-myosin contractility is responsible for the reduced viability of dissociated human embryonic stem cells, Stem Cells, **7**, 240-248 (2010).

Hammond, T.G. and Hammond, J.M.: Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel, J. Physiol. Renal. Physiol., **281**, 12-25 (2001).

Harrison, R.G.: Observations on the living develping nerve fiber, Rroc. Soc. Exp. Biol. Med., **4**, 140 (2907).

Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, RM., and Fischer, R.: Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, Nature Biotechnology, 22, 1415–1422 (2004).

Ince, C., Dissel, J.T., and Diesselhoff, M.M.C.: A teflon culture dish for high-magnification microscopy and measurements in single cells, Pfliigers Arch., **403**, 240-244 (1985).

Inoue, H., Nagata, N., Kurokawa, H., Yamanaka, S.: iPS cells: a game changer for future medicine, EMBO J., **33**, 409–417 (2014)

Ioannis, P., Mike, H., and Farlan, S. V.: The release of single cells from embryoid body in a capillary flow device, Chem. Eng. Sci., **66**, 570-581 (2011).

Ishaug, S.L., Crane, G.M., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J., and Mikos, A.G.: Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds, J. Biomed. Mater. Res., **36**, 17-28 (1997).

I**shikawa, M., Sekine, K., Okamura, A., Zheng, Y. W., Ueno, Y., Koike, N., Tanaka, J., and Taniguchi, H.:** Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor, J Biosci Bioeng, **111**, 711-718 (2011).

Ivana, B., Veronica, B., Paul, J. G., Mark, J., Dylan, S., Adam, G., Daniel, C., and Peter, W. A.: Time-lapse analysis of human embryonic stem cells reveals multiple bottlenecks restricting colony formation and their relief upon culture adaptation. Stem Cells, **3**, 142-155 (2014).

Ju, Z.H., Liu, T.Q., Ma, X.H., and Cui, Z.F.: Numerical simulation of microcarrier motion in a rotating wall vessel bioreactor, Biomed. Environ. Sci., **19**, 163-168 (2006).

Karbassi, E., Fenix, A., Marchiano, S., Muraoka, N., Nakamura, K., Yang, X., and Murry, C. E.: Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine, Nat Rev Cardiol, **17**, 341-359 (2020).

Kato, Y., Kim, M. H., and 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).

Kim, M. H., Takeuchi, K., and Kino-oka, M.: Role of cell-secreted extracellular matrix formation in aggregate formation and stability of human induced pluripotent stem cells in suspension culture, J. Biosci. Bioeng., **127**, 372-380 (2019).

Kim, M.H. and Kino-oka, M.: Bioengineering considerations for a nurturing way to enhance scalable expansion of human pluripotent stem cells., Biotech. J., **15**, 1900314 (2020).

Kim, M.H., Thanuthanakhun, N., Fujimoto, S., and Kino-oka, M.: Effect of initial seeding density on cell behavior-driven epigenetic memory and preferential lineage differentiation of human iPSCs, Stem Cell Res., 56, 102534 (2021).

Kinney, M., Sargent, C., and McDevitt, T.: The multiparametric effects of hydrodynamic environments on stem cell culture, Tissue Eng. Part B, **17**, 249-262 (2011).

Kino-oka, M., Mizutani, M., and Medcalf, N.: Cell manufacturbility, Cell Gene Therapy Insights, **5**, 1347-1359 (2019).

Koaykul, C., Kim, M.H., Kawahara, Y., Yuge, L., and Kino-oka M.: Maintenance of neurogenic differentiation potential in passaged bone marrow-derived human mesenchymal stem cells under simulated microgravity conditions, Stem Cells and Developments, **28**, 1552-1561, (2020).

Kobayashi, J. and Okano, T.: Fabrication of a thermoresponsive cell culture dish: a key technology for cell sheet tissue engineering. Sci. Technol. Adv. Mater. **11**, 014111 (12pp) (2010).

Kropp, C., Kempf, H., Halloin, C., Robles-Diaz, D., Franke, A., Scheper, T., Kinast, K., Knorpp, T., Joos, T. O., Haverich, A., and other 3 authors: Impact of feeding strategies on the scalable expansion of human pluripotent stem cells in single-use stirred tank bioreactors, Stem Cells Transl. Med., **5**, 1289-1301 (2016).

Langer,R. and Vacanti, J.P.: Tissue engineering, Science, **260**, 920-926 (1993).

Lee, Y.K.: Enclosed bioreactors for the mass cultivation of photosynthetic microorganisms: the future trend, Trends in Biotechnol., 7, 186-189 (1986).

Lenz-Bohme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H. and Schmitt, B.:

Insertional mutation of the Drosophila nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes and accumulation of annulate lamellae, J. Cell Biol., **137**, 1001– 1016 (1997).

Leor, J., Etzion, S.A., Dar, A., Shapiro, L., Barbash, I.M., Battler, A., Granot, Y., and Cohen, S.: Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium, Circulation, **102**, 56-61 (2000).

Li, J., Minami, I., Shiozaki, M., Yu, L., Yajima, S., Miyagawa, S., Shiba, Y., Morone, N., Fukushima, S., Yoshioka, M., Li, S., Qiao, J., Li, X., Wang, L., Kotera, H., Nakatsuji, N., Sawa, Y., Chen, Y., and Liu, L.: Human pluripotent stem cell-derived cardiac tissue-like constructs for repairing the infarcted myocardium, Stem Cell Reports, **9**, 1546-1559 (2017).

Li, R.K., Jia, Z.Q., Weisel, R.D., Mickle, D.A.G., Choi, A., and Yau, T.M.: Survival and function of bioengineered cardiac grafts, Circulation, **100**, 1163-1169 (1999).

Licato, L.L., Prieto, V.G., Grimm, E.A.: A novel preclinical model of human malignant melanoma utilizing bioreactor rotating-wall vessels, In vitro Cell Dev. Biol. Anim., **37**, 121-126 (2001).

Liu, J., Rolef Ben-Shahar, T., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A. and Gruenbaum, Y.: Essential roles for Caenorhabditis elegans lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression and spatial organization of nuclear pore complexes, Mol. Biol. Cell, **11**, 3937– 3947 (2000).

Lopaschuk, G. D., Spafford, M. A., and Marsh, D. R.: Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth, Am J Physiol, **261**, H1698-1705 (1991).

Lundy, S. D., Zhu, W. Z., Regnier, M., and Laflamme, M. A.: Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells, Stem Cells Dev, **22**, 1991-2002 (2013).

Martin, I., Obradovic, B., Freed, L.E., and Vunjak-Novakovic, G.: Method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineered cartilage, Ann. Biomed. Eng., **27**, 656-662 (1999).

Martin, I., Wendit, D., and Heberer. M.: The role of bioreactors in tissue engineering, TRENDS in Biotechnol., **22**, 80-86 (2004).

Martins, A.M., Novakovic, G.V., and Reis, R.L.: The current status of iPS cells in cardiac research and their potential for tissue engineering and regenerative medicine, Stem Cell Rev. and Rep., **10**, 177–190 (2014).

Mason, C., Brindley, D. A., Culme-Seymour, E. J., Davie, N. L.: Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential, Regen. Med., **6**, 265–272 (2011)

Massa, S., Sakr, M.A., Seo, J., Bandaru, P., Arneri, A., Bersini, S., Zare-Eelanjegh, E., Jalilian, E., Cha, B.H., Antona, S., Enrico, A., Gao, Y., Hassan, S., Acevedo, J.P., Dokmeci, M.R., Zhang, Y.S., Khademhosseini, A., and Shin, S.R.: Bioprinted 3D vascularized tissue model for drug toxicity analysis, Biomicrodluidics, 11, 044109 (2017).

Matsuo, T., Masumoto, H., Tajima, S., Ikuno, T., Katayama, S., Minakata, K., Ikeda, T., Yamamizu, K., Tabata, Y., Sakata, R., and Yamashita, K.: Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells, Scientific Reports, 5:16842 (2015).

Matsuura, K., Wada, M., Shimizu, T., Haraguchi, Y., Sato, F, Sugiyama, K., Konishi, K., Shiba, Y., Ichikawa, H., Tachibana, A., and other 4 authors: Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., **425**, 321-327 (2012).

McDevitt, T.C., Angello, J.C., Whitney, M.L., Reinecke, H., Hauschka, S.D., Murry, C.E., and Stayton, P.S.: In vitro generation of differentiated cardiac myofibers on micropatterned laminin surfaces. J. Biomed. Mater. Res 60, 472–479 (2002).

Miyagawa, S. and Sawa, Y.: Building a new strategy for treating heart failure using Induced Pluripotent Stem Cells, Journal of cardiology, **72**, 445-448 (2018).

Miyagawa, S., Sawa, Y., Sakakida, S., Taketani, S., Kondoh, H., Memon, I.A., Imanishi, Y., Shimizu, T., Okano, T., and Matsuda, H.: Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: their integration with recipient

myocardium, Transplantation, **80**, 1586-1595 (2005).

Miyamoto, S., Katz, B.Z., Lafrenie, R.M., and Yamada, K.M.: Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis, Annals of the New York Academy of Sciences, **857**, 119-129 (1998).

Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., Yamada, M., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K., and Kawase, E.: Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells, Nat. Commun., **3**, 1236 (2012).

Moreira, J, L., Cruz, P, E., and Santana, P, C.: Formation and disruption of animal cell aggregates in stirred vessels: mechanisms and kinetic studies. Chem. Eng. Sci. **50**, 2747-2764 (1995).

Nakano, K., Nanri, N., Tsukamoto, Y., and Akashi, M.: Mechanical activities of self-beating cardiomyocyte aggregates under mechanical compression, Sci Rep, **11**, 15159 (2021).

Nakazato, T., Miyagawa, S., Uemura, T., Liu, L., Li, J., Sasai, M., Harada, A., Toda, K., and Sawa, Y.: Engineered three-dimensional cardiac tissues maturated by dynamic culture in a rotating wall vessel bioreactor remodel the diseased heart in the rat infarction model, Circulation, **142**, A13559 (2020).

Nath, S. C., Horie, M., Nagamori, E., and 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).

Nath, S. C., Tokura, T., Kim, M. H., and Kino-oka, M.: Botulinum hemagglutinin-mediated in situ break-up of human induced pluripotent stem cell aggregates for high-density suspension culture, Biotechnol. Bioeng., **115**, 910-920 (2018).

National Aeronautics and Space Administration: Educational brief: NASA's bioreactor, growing cells in a microgravity environment, 1-20 (2002). https://er.jsc.nasa.gov/seh/cell_growth_in_zero_g.pdf（2021 年 12 月現在）

Ngo, T.X., Nagamori, E., Kikuchi, T., Shimizu, T., Okano, T., Taya, M., Kino-oka, M.: Endothelial

cell behavior inside myoblast sheets with different thickness, Biotechnol. Lett. **35**, 1001-1008 (2013).

Nishi, M., Matsumoto, R., Dong, J., and Uemura, T.: Engineered bone tissue associated with vascularization utilizing a rotating wall vessel bioreactor, J. Biomed. Mater. Res. A, **101**, 421-427 (2012).

Nishiguchi, A., Matsusaki, M., Miyagawa, S., Sawa, Y., and Akashi, M.: Dynamic nano-interfaces enable harvesting of functional 3D-engineered tissues, Adv. Healthcare Mater., **4**, 1164–1168 (2015).

Obradovic, B., Martin, I., Padera, R.F., Treppo, S., Freed, L.E., and Vunjak-Navakovic, G.: Integration of engineered cartilage, J. Orthop. Res., **19**, 1089-1097 (2001).

Ohgushi, M. and Sasai, Y.: Lonely death dance of human pluripotent stem cells: ROCKing between metastable cell states. Cell, **21**, 274-282 (2011).

Ohyabu, Y., Kida, N., Kojima, H., Taguchi, T., Tanaka, J., and Uemura, T.: Cartilaginous tissue formation from bone marrow cells using rotating wall vessel (RWV) bioreactor, Biotechnol. Bioeng., **95**, 1003-1008 (2006).

Okamura, A., Zheng, Y. W., Hirochika, R., Tanaka, J., and Taniguchi, H.: In-vitro reconstitution of hepatic tissue architectures with neonatal mouse liver cells using three-dimensional culture, J Nanosci Nanotechnol, **7**, 721-725 (2007).

Olmer, R., Haase, A., Merkert, S., Cui, W., Palecek, J., Ran, C., Kirschning, A., Scheper, T., Glage, S., Miller, K., Curnow, E. C., Hayes, E. S., Martin, U.: Long term expansion of undifferentiated human iPS and ES cells in suspension culture using a defined medium. Stem Cell Res., 5, 51-64 (2010).

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 Meth., 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., and Nakatsuji, N.: A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production, Stem Cell Rep., **2**, 734-745 (2014).

Palecek, S.P., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H., Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F.: Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. Nature, **385**, 537-540 (1997).

Pei, M., Solchaga, L.A., Seidel, J., Zeng, L., Vunjak-Novakovic, G., Caplan, A.I., and Freed, L.E.: Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds: FASEB J., **16**, 1691-1694 (2002).

Puente, B. N., Kimura, W., Muralidhar, S. A., Moon, J., Amatruda, J. F., Phelps, K. L., Grinsfelder, D., Rothermel, B. A., Chen, R., Garcia, J. A., and other authors: The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response, Cell, **157**, 565-579 (2014).

Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S.R., Anuradha, E., Paul Slomon, F.D.: 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications, J. Cellular Physiol. **230**, 16-26 (2015).

Reiser, P. J., Portman, M. A., Ning, X. H., and Schomisch Moravec, C.: Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles, Am J Physiol Heart Circ Physiol, **280**, H1814-1820 (2001).

Reiser, P.J., Portman, M.A., Ning, X.H., and Moravec, C.S.: An cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles.Am J Physiol Heart Circ Physiol.

Rhee, H.W., Zhau, H.E., Pathak, S., Multani, A.S., Pennanen, S., Visakorpi, T., and Chung, L.W.K.: Permanent phenotypic and genotypic changes of prostate cancer cells cultured in a three-dimensional rotating-wall vessel, In vitro Cell Dev. Biol. Anim., **37**, 127-140 (2001).

Ridley, A.J.: Rho GTPase signalling in cell migration, Curr. Opin. Cell Biol., **36**, 103-112 (2015).

Roh, T.T., Chen, Y., Paul, H.T., Guo, C., Kaplan, D.L.: 3D bioengineered tissue model of the large intestine to study inflammatory bowel disease, Biomaterials, **225**, 119517 (2019).

Roy, F.B. and Berx, G.: The cell-cell adhesion molecule E-cadherin, Cellular and Molecular Life Sciences, **65**, 3756–3788 (2008).

Rungarunlert, S., Klincumhom, N., Tharasanit, T., Techakumphu, M., Pirity, M. K., and Dinnyes, A.: Slow turning lateral vessel bioreactor improves embryoid body formation and cardiogenic differentiation of mouse embryonic stem cells, Cell Reprogram., **15**, 443-458 (2013).

Russell, B., Curtis, M. W., Koshman, Y. E., and Samarel, A. M.: Mechanical stress-induced sarcomere assembly for cardiac muscle growth in length and width, J Mol Cell Cardiol, **48**, 817-823 (2010).

Sakaguchi, K., Shimizu, T., Horaguchi, S., Sekine, H., Yamato, M., Umezu, M., and Okano, T.: In vitro engineering of vascularized tissue surrogates, Scientific Reports, **3**, 1316 (2013).

Salameh, A., Wustmann, A., Karl, S., Blanke, K., Apel, D., Rojas-Gomez, D., Franke, H., Mohr, F.W., Janousek, J., and Dhein, S.: Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43, Circ. Res., **106**, 1592–1602 (2010).

Salameh, A., Wustmann, A., Karl, S., Blanke, K., Apel, D., Rojas-Gomez, D., Franke, H., Mohr, F. W., Janousek, J., and Dhein, S.: Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43, Circ Res, **106**, 1592-1602 (2010).

Santini, M.T. and Rainaldi G.: Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology. Pathobiol., 67, 148-157 (1999).

Selden, C. and Fuller, B.: Role of bioreactor technology in tissue engineering for clinical use and therapeutic target design, **5**, 32, doi:10.3390/bioengineering5020032 (2018)

Shafa, M., Sjonnesen, K., Yamashita, A., Liu, S. Y., Michalak, M., Kallos, M. S., and 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).

Sharma, S., Raju1, R., Sui1, S., and Hu, W.S.: Stem cell culture engineering – process scale up and beyond, Biotechnol. J., **6**, 1317–1329 (2011).

Shimizu, I. and Minamino, T.: Physiological hypertrophy and pathological hypertrophy, J. Molecular

and Cellular Cardiology, 97, 245-262 (2016)

Shioi, T., Kang, P.M., Douglas, P.S., Hampe, J., Yballe, C.M., Lawitts, J., Cantley, L.C., and Izumo, S.: The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice, EMBO J., 19, 2537-2548 (2000).

Simpson, D.G, Decker, M.L., Clark, W.A., and Decker, R.S.: Contractile activity and cell-cell contact regulate myofibrillar organization in cultured cardiac myocytes, J. Cell Biol., 123, 323-336 (1993).

Sladkova, M, and De Peppo, G.M.: Bioreactor Systems for Human Bone Tissue Engineering, Processes, **2**, 494-525 (2014).

Sougawa, N., Miyagawa, S., and Sawa, Y.: Large-scale differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by stirring-type suspension culture, Pluripotent Stem-Cell Derived Cardiomyocytes, 23-27 (2021).

Stanley, W. C., Recchia, F. A., and Lopaschuk, G. D.: Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart, Physiol Rev, **85**, 1093-1129 (2005).

Stephen, M. D., Dang, G. N., Jinny, C., Joseph, I. E., and Peter, W. Z.: Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture, Stem Cells, **22**, 275-282 (2004).

Steven, F. K., Dannielle, S. F., and Alisa, M. C.: Hypo- and hyperglycemia impair endothelial cell actin alignment and nitric oxide synthase activation in response to shear stress, Plos One, **8**, 6, e66176 (2013).

Stover, A. E. and Schwartz, P. H.: Adaptation of human pluripotent stem cells to feeder-free conditions in chemically defined medium with enzymatic singlecell passaging, Methods Mol. Biol., **767**, 137-146 (2011).

Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N., and Nakatsuji, N.: Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage, Biochem. Biophys. Res. Commun., **345**, 926-932 (2006).

Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C.L. and Burke, B.: Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy, J. Cell Biol. **147**, 913– 920 (1999).

Sutherland, R.M.,Sordat, B., Bamat, J., Gabbert, H., Bourrat, B., and Mueller-Klieser, W.: Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma, Cancer Res., **46**, 5320-5329 (1986).

Sydney, R.: A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart, J. Physiol., 4, 29-42 (1883).

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

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

Takeuchi, M.: The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis, Development, 102, 639-655 (1988).

Teo, A., Mantalaris, A., Song, K., and Lim M.: A novel perfused rotary bioreactor for cardiomyogenesis of embryonic stem cells, Biotechnol Lett., 36, 974-960 (2014).

Thavandiran, N., Dubois, N., Mikryukov, A., Massé, S., Beca, B., Simmons, C. A., Deshpande, V. S., McGarry, J. P., Chen, C. S., Nanthakumar, K., and other authors: Design and formulation of functional pluripotent stem cell-derived cardiac microtissues, Proc Natl Acad Sci U S A, **110**, E4698-4707 (2013).

Thomas, C.H., Collier, J.H., Sfeir, C.S., and Healy, K.E.: Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 1972– 1977 (2002).

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S, Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J, Marshall, V.S., and Jones, J.M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science, 6, 1145-

1147 (1998).

Unsworth, B. R. and Lelkes, P. I.: Growing tissues in microgravity, Nat. Med., **4**, 901-907, (1998).

Varley, M.C., Markaki, A.E., and Brooks, R.A.: Effect of Rotation on Scaffold Motion and Cell Growth in Rotating Bioreactors, Tissue Engineering Part A, 23, 522-534 (2017).

Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B. and Treisman, R.: Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL, Science, **316**, 1749– 1752 (2007).

Vergani, L., Grattarola, M., and Nicolini, C.: Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. Int J Biochem Cell Biol **36**, 1447–1461 (2004).

Vunjak-Novakovic, G., Martin, I., Obradovic, B., Treppo, S., Grodzinsky, A.J., Langer, R., Freed, L.E.: Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage, J. Orthop. Res., **17**, 130-138 (1999).

Wang, N., Tytell, J. D., and Ingber, D. E.: Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **10**, 75–82 (2009).

Wang, Y., Chou, B. K., Dowey, S., He, C. X., Gerecht, S., and Cheng, L. Z.: 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).

Werner, J. C., Sicard, R. E., and Schuler, H. G.: Palmitate oxidation by isolated working fetal and newborn pig hearts, Am J Physiol, **256**, E315-321 (1989).

Winkle, A. P. V., Gates, I. D., and Kallos, M. S.: Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation, Cells Tissues Organs, **196**, 34-47 (2012).

Wu, J., Rostami, M. R., Olaya, D. P. C., and Tzanakakis, E. S.: Oxygen transport and stem cell aggregation in stirred-suspension bioreactor cultures, PLoS One, **9**, e102486 (2014).

Yamada, K.M. and Geiger, B.: Molecular interactions in cell adhesion complexes, Current Opinion in Cell Biology, **9**, 76-85 (1998).

Yan, L., Liu, G., and Wu, X.: Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells in

mechanical environment show improved osteochondral activity via upregulation of LncRNA H19, J. Ortho. Trans., **26**, 111-120 (2021).

Yao, T. and Asayama, Y.: Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues, Reprod Med Biol. 16, 99–117 (2017).

Zhang, W., Kong, C.W., Tong, M.H., Chooi, W.H., Huang, N., Li, R.A., and Chan, B.P.: Maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (hESC-CMs) in 3D collagen matrix: effects of niche cell supplementation and mechanical stimulation, Acta Biomater, **49**, 204–217 (2017).

Zweigerdt, R., Olmer, R., Singh, H., Haverich, A., and Martin, U.: Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture, Nat. Protoc., **6**, 689-700 (2011).

謝辞

本研究を遂行するにあたり, 終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 紀ノ岡正博 教授，植村壽公 特任教授に深甚の謝意を表します．また，論文作成にあたり，有益なご助言およびご校閲を賜りました大阪大学大学院工学研究科 大政健史 教授，内山進 教授に厚く感謝申し上げます．さらに，研究活動に関するご指導，ご助言のみならず, 研究室生活全般にてお世話になりました大阪大学大学院工学研究科 金美海 准教授，堀口一樹 助教に心から感謝申し上げます.

株式会社ジェイテックコーポレーションの森田健一 様，松井翼 様，楠本憲司 様，上村葉 様，西田朱里 様および同社の皆様には，本研究において使用した回転浮遊培養システムに関する技術指導等を含め，多大なるご支援を賜りました．深く感謝申し上げます.

大阪大学大学院医学系研究科の澤芳樹 教授，宮川繁 教授，劉莉 特任准教授，寒川延子 特任助教，中里太郎 先生をはじめとする先生方には，第 3 章 ヒト iPS 細胞由来心筋組織の培養に関する研究を行う機会，また当該研究に関する貴重なご議論，培養技術指導等を賜りました．この場をお借りして厚く御礼申し上げます.

さらに，大阪大学大学院工学研究科 生物プロセスシステム工学領域 (紀ノ岡研究室) および共同研究講座の先生方，事務補佐員・実験補助員・特任研究員の皆様，卒業生の先輩方・同期・後輩，そして現役学生諸氏，皆様の支えなくして，筆者が本博士論文をまとめ上げることはできませんでした．心より御礼申し上げます.

最後に，長きにわたり大学・大学院で学ぶ機会を与えて下さり，さらに生活面，精神面で支えて頂いた家族の皆様，そして同じく博士後期課程に進学し，互いに支え合いながら苦楽を共にした友人の皆様に，深い感謝の意を表して謝辞と致します.