

論文

ゲル化温度が向上したゼラチンを保護材として用いた 細胞シート輸送システム

大藪 淑美^{*1)} 井田 昌孝^{*2)} 畑山 博哉^{*1)} 柚木 俊二^{*1)} 平岡 陽介^{*2)}

Cell-sheet transportation system using a gelatin with improved gelation temperature as a cell protection material

Yoshimi Ohyabu^{*1)}, Masataka Ida^{*2)}, Hirosuke Hatayama^{*1)}, Shunji Yunoki^{*1)}, Yosuke Hiraoka^{*2)}

Regenerative medicine using living cells frequently employs "cell-sheet engineering", which fabricates cell monolayer for transplantation. When the cell monolayers are transported among facilities, the quality of the cells degrades easily due to shear stress. To address this issue, we fabricated a gelatin (HTG) with a gelation temperature (T_g) that is much higher than that of previous gelatins, and developed a novel cell-sheet transplantation system using HTG as a cell protection material. In order to achieve protection using this HTG gel, this system allows cell-sheets to be collected by injecting HTG gel heated to 37 °C onto the cell-sheets from the top, transporting the cell-sheets without temperature control, and then dissolving the HTG gel at 37 °C. Using this method, cell-sheets containing NIH3T3 cells could be collected with a cell survival rate in excess of 90%. In contrast, a control experiment using a commercially available gelatin with a lower T_g failed to protect the cell-sheets because of a failure in preventing the cell-sheets from being detached from the dish before the gelation of the gelatin sol. The cell sheet transportation system using HTG is a promising system for establishing regenerative medicine.

キーワード：ゼラチン, 細胞輸送

Keywords : Gelatin, Cell transportation

1. はじめに

薬事法が改正され, 再生医療の実用化が加速しつつある。再生医療で用いられる細胞は, 生体材料と複合化され, あるいは細胞シートに加工されて利用される。特に, 細胞シートに加工する技術すなわち“細胞シート工学”は再生医療の臨床研究に広く利用され, 国内外で多くの臨床研究や治験が進んでいる⁽¹⁾⁻⁽³⁾。温度応答性ポリマーでコートされた

温度応答性培養皿で培養された細胞は, 温度を下げるだけで培養皿から剥離して, 化学的, 物理的にも損傷を受けずに, 細胞自身の接着タンパク質を保持したまま移植できる技術である^{(4),(5)}。

細胞シートは, 細胞加工施設で専門の培養士により加工され, 医療機関へと既存の輸送手段によって輸送される。しかし, 細胞シートを用いた再生医療の実用化を目前にして, 細胞の品質を低下することなく輸送する技術が確立し

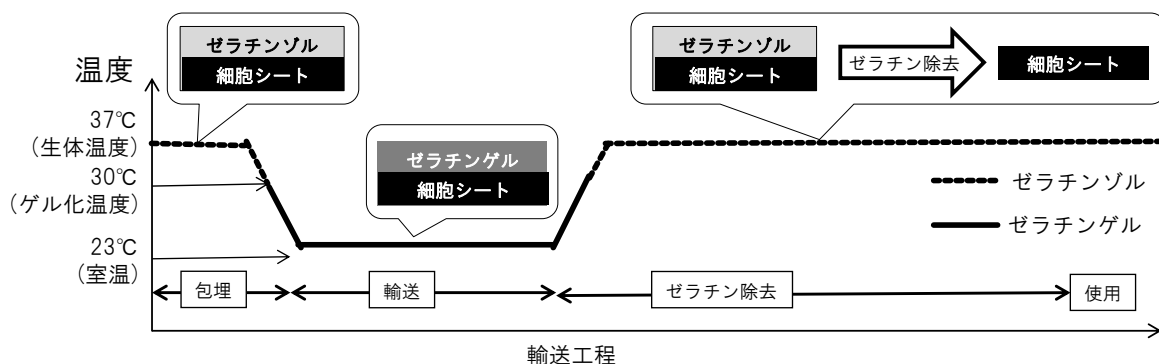


図 1. ゼラチンゲルを用いた細胞シート輸送

事業名 平成 25 年度 研究成果最適展開支援プログラム A-STEP
シーズ顕在化

*1) バイオ応用技術グループ

*2) 新田ゼラチン株式会社 経営企画部 ライフサイエンス室

ていない問題が顕在化した。培養状態の細胞シートをそのまま輸送すると、輸送時に液体が振動してシヤーストレスを細胞に与え、細胞の分化・脱分化が起こる。

輸送環境温度が 27°C を下まわると、培養皿から細胞シートが剥離して品質が低下する。よって、伝統的な凍結保存法は利用できない。現状では厳密な温度管理のもと細胞状態で輸送されているが、再生医療の普及に向けて輸送方法の簡素化が強く求められている。

そこで我々は、ゲルで細胞シートを包埋して物理的にシートを押さえ、シヤーストレスや剥離の問題を回避する方法を提案した。図 1 に示すように 30°C でゲルを形成して細胞シートを包埋し、厳密な温度管理なく室温で輸送したのち、生体温度 37°C まで昇温すると速やかに融解し、細胞を低侵襲に回収することができるゼラチンがあれば、簡便ならびに安定して細胞シートを輸送できると仮説を立てた。既存のゼラチンのゲル化温度は 23°C 付近であり⁶⁾、細胞シートの輸送には使えない。本研究では、ゲル化温度 T_g を飛躍的に高めたゼラチン HTG を開発し、HTG を用いて細胞シートを包埋して形状を維持し、高い生存率を維持したまま輸送できる可能性を見出した。

2. 実験方法

2.1 材料 HTG の調製と評価には、ブタ由来コラーゲン水溶液（新田ゼラチン株式会社製、pH3 希塩酸溶媒、濃度 0.3 %）、beMatrix gelatin LS-H（新田ゼラチン株式会社製）、およびリン酸緩衝生理食塩水（Dulbecco's PBS）調製用タブレット（Sigma-Aldrich Co.製、D-PBS）を用いた。細胞培養にはマウス皮膚線維芽細胞 NIH3T3（理化学研究所バイオリソースセンター提供、RCB2726）、仔ウシ血清（MP Biomedicals LLC 製、CELLect®, CS）、Dulbecco's Modified Eagle's Medium（Sigma-Aldrich Co.製、DMEM）、および細胞分散液（Life Technology Co.製、0.25% トリプシン）、細胞シート回収用温度応答性細胞培養皿（セルシード株式会社製、UpCell®）および 35 mm 細胞培養皿（Corning Inc.製）0.5% トリパンプルー染色液（ナカライテスク株式会社製）を用いた。

2.2 製造 我々が開発した非分解型ゼラチンの調製法⁶⁾を用いて、ブタ組織由来コラーゲン水溶液の熱変性により T_g の異なる HTG を製造した。D-PBS を溶媒とした濃度 5% の HTG 水溶液を調製し、各種実験に供した。汎用ゼラチンは beMatrix gelatin LS-H を D-PBS に溶解して、濃度 1~5% に調製した。

2.3 ゼラチンの物性評価

(1) 弾性率測定および傾斜試験 動的粘弾性測定装置（Thermo Fisher Scientific Inc.製、HAAKE MARS III）を用いてゲルの弾性率を測定した。40°C で融解した汎用ゼラチン水溶液 2 ml を 35 mm 細胞培養皿に加えて、4°C で 1 時間ゲル化させたのち、23°C で 1 時間静置した。室温にて、内径 20 mm の平行平板センサーを用いて応力制御モード（1 Pa の一定せん断応力）で周波数 1 Hz の微小振動を与えた時の

貯蔵弾性率 (G') を測定した。センサーとゲルの滑りを防ぐため、上部センサーにはサンドペーパーを貼り付けて使用した。

動的粘弾性測定を実施した後、ゼラチンゲルに対して傾斜試験を実施した。ゲルが入った培養皿を 90° 傾斜し、ゲルの崩壊が生じるかどうかを確認した。動的粘弾性から得られた G' と傾斜試験結果を比較し、崩壊が生じない下限の G' を決定した。

(2) ゲル化時間測定 動的粘弾性測定装置を用いて HTG のゲル化時間を測定した。60°C で融解した 5% HTG 水溶液 3 ml をフタ付きセンサー（DC60/1Ti、内径 60 mm、コーン角度 1°）に設置し、冷却 (-1.2°C/min) して一定の温度に静置したのち、 G' が 30 min 後に 50 Pa となる温度を T_g -max とした。

(3) 輸送工程のゲル化挙動 細胞輸送を想定した温度プロファイルによる HTG の G' の変化を測定した。センサーおよび HTG の添加方法は 2.3 (2) と同様とした。次の 4 段階の温度設定で、 G' を測定した。① 50°C から 37°C に冷却 (-1.2°C/min) して 10 min 静置した。② 37°C から各サンプルのゲル化温度に冷却 (-1.2°C/min) して 60 min 静置した。③ 各サンプルのゲル化温度から 23°C に冷却 (-1.2°C/min) して 60 分間静置した。④ 23°C から 37°C に加温 (1.2°C/min) して 60 min 加温した。

2.4 HTG を用いた細胞輸送の有効性試験 細胞シートを HTG で包埋して室温での細胞形態の観察と細胞回収後の生存率を定量し、HTG を用いた細胞輸送の可能性を評価した。UpCell® でマウス線維芽細胞 NIH/3T3 をオーバークンプレメントになるように培養して細胞シートを作製し、37°C で融解した HTG 水溶液を D-PBS で洗浄した細胞シートに加え、30°C のサーモプレート上でゲル化させて包埋した。ゲル化直後の細胞シートの形状を目視で観察し、シートが剥離しないことを確認した。ゲル化直後および 23°C にて 7 日間静置した後の細胞形態を、倒立顕微鏡（オリンパス株式会社製、IX53）を用いて観察した。

その後、37°C で HTG を融解させて除去し、D-PBS で洗浄した。細胞分散液を加えて、顕鏡下で剥離を確認したのち、培養液を加えて分散させた。トリパンプルー染色液を細胞分散液に等量加えて、血球計算盤を用いて青く染色された死細胞と未染色の生細胞を計測し、細胞生存率を求めた。

3. 結果

3.1 実用的なゲル化温度の決定法 ゼラチン濃度を変えたゲルの傾斜試験において、崩壊した場合としない場合のゲルの写真を図 2 に示す。濃度を低くしてゲル弾性率が低下すると、シャーレの傾斜によってゲルが崩壊した。ゼラチン濃度を 0.5% ごとに作製した場合、崩壊しなかった最低濃度 1.5% の G' は 50 Pa であった。そこで、細胞シート保護材としての実用的な弾性率を $G' \geq 50$ Pa と規定した。

次に、再生医療における細胞操作の迅速性を考慮し、実

用的なゲル化時間を 30 min として, ゼル状態から 30 min 後に $G' = 50 \text{ Pa}$ となる設置温度の決定方法を検討した。このような温度を直接求めることは困難なので, 任意の設定温度 T におけるゲル化時間 Tg を求め, T vs Tg のプロットから最小二乗法によって得られる近似式を用いた。設置温度を変えた 3 点の実験から直線性の良好な近似式が得られたため, 近似式の Tg に 30 min を代入し, ゼル状態から 30 min 後に $G' = 50 \text{ Pa}$ となる設置温度 $Tg\text{-max}$ を決定した。

3.2 $Tg\text{-max}$ の測定 HTG および汎用ゼラチンの $Tg\text{-max}$ 測定結果を表 1 に示す。HTG の $Tg\text{-max}$ は 30.8°C であり, 汎用ゼラチンと比べて 7°C 高く, 温度応答性培養皿からの細胞シートの剥離温度 (27°C) を超えた。

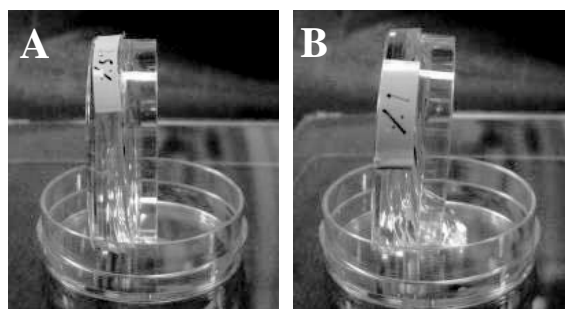


図 2. 異なる濃度の汎用ゼラチンの傾斜によるゲルの外観
A:1.5%汎用ゼラチン, B:1%汎用ゼラチン

表 1. 5%HTG および汎用ゼラチンの $Tg\text{-max}$

試料名	$Tg\text{-max}(^\circ\text{C})$
HTG	30.8
汎用ゼラチン	23.8

3.3 輸送工程におけるゲル化挙動 輸送工程を想定した温度プロファイルによる HTG の G' の変化を図 3 に示す。 $Tg\text{-max}$ 近傍の温度 (30°C) で急激にゲル化し, 60 分後には G' が 260 Pa に達した。 23°C への温度降下でゲル化が促進され G' が 1000 Pa を超えたが, その後の 37°C への温度上昇で急激にゾル化した。

3.4 HTG を用いた細胞輸送の有効性試験 融解した HTG 水溶液を細胞シート上に流し込み, 30°C に静置すると, シートの剥離を生じさせずに HTG がゲル化した。一方, 汎用ゼラチンでは $Tg\text{-max}$ である 23°C でゲル化させると, ゲル化前に細胞シートが培養皿の周辺から隔離して収縮していた。

HTG で細胞シートを包埋する前および 7 日後の細胞形態の観察結果を図 4 に示す。7 日後の細胞は包埋前と変わらず, 剥離した細胞はなく, 伸展した形態を維持していた。包埋時間と細胞の生存率を表 2 に示す。7 日後においても 90% を超える生存率を維持していた。HTG の細胞シート包埋により, 細胞シートの形状, 細胞の形態および細胞生存率を維持されていた。

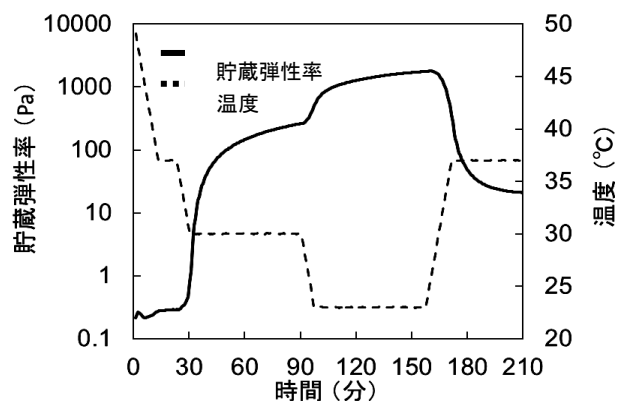


図 3. ゼラチン A の輸送工程におけるゲル化挙動

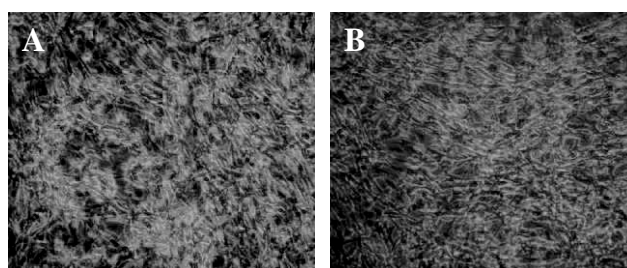


図 4. ゼラチンゲルによる包埋作業前後細胞形態
A:ゼラチンゲルによる包埋前, B:包埋 7 日後

表 2. シート包埋後の細胞生存率

包埋時間(日)	0	2	7
細胞生存率(%)	99.3 ± 0.5	96.3 ± 0.4	92.0 ± 10.2

4. 考察

「ゼラチンは室温以上の温度においてほとんど固まらない」という常識を覆し, 30°C で速やかにゲル化するゼラチンを世界に先駆けて開発した。このゼラチン HTG を用いて, 温度応答性培養皿で作製した細胞シートを保護することができた。これまで開発されてきた細胞輸送システムは基本的に容器の開発・改良である⁽⁷⁾が, いずれも培養液や緩衝液中で輸送する方法が利用されている。これら液中輸送では細胞輸送へのシェアストレスの印加を避けられず, 振動・衝撃で生存率の低下や形質変化(品質劣化)が生じる。このため長距離・長時間の輸送には適さない。一方, 本開発の HTG のゾルゲル転移を用いた細胞シートを包埋・固定して輸送・回収する技術は, 輸送時の細胞へのシェアストレスの問題を解決するのみならず, 温度管理のための特殊容器や設備が不要となる画期的な輸送システムである。

従来の輸送技術としては, 液中輸送のほか, 古典的な凍結保存法^{(8),(9)}をそのまま細胞輸送のための一次保存として応用する試みもある。凍結細胞は安定した状態で簡便に輸送できることが利点であるが, 細胞への侵襲性が高いことや, 融解後に細胞の状態が安定するまで使用できないなどエンドユーザーにおいてはいくつかの欠点がある。HTG を

用いた輸送システムは、細胞を凍結せず、接着細胞も接着状態を維持したまま輸送することができるために高い細胞生存が期待されることや、ゲルを洗い流せば接着した状態の細胞を即刻使用できるなど、従来の凍結細胞輸送システムの欠点も克服されている。

温度応答性のゾル-ゲル転移能を有するゼラチンを活用した新しい細胞シート輸送システムの実現には、HTGの存在が欠かせない。汎用ゼラチンは T_g が低いため、冷蔵(10°C以下)でゲル化させる必要があった。温度応答性培養皿を用いた細胞シートにとって、シートの剥離を惹起する温度降下は禁忌である。我々はゼラチンの T_g を高めるためにその分子構造と T_g の関係を明らかにし、ゼラチンの高分子量化によって T_g が向上することを見出した⁽¹⁰⁾。その知見を基に開発されたHTGは30°Cでも活発にゲル化する。このため、温度応答性培養皿で作製された細胞シートを、剥離温度より高い温度においてゲル状態になったゼラチンにより物理的に押さえつけることが可能になった。

物理的に押さえつけることができても、短期的に細胞死に至るようでは、細胞輸送は実現しない。本研究で実験したHTG包埋は、室温かつPBS溶媒という細胞にとって低温環境下かつ栄養飢餓環境下で行われた。一般に栄養飢餓環境下で室温に放置されると、接着細胞は剥離して細胞死に至るが、HTGに包埋された細胞シートは、同様の環境下で7日間生存率が高く維持された。HTGゲルという硬い細胞接着性マトリクスに包埋されたことが有効であったのか、あるいは細胞を低温(低代謝)かつD-PBS溶媒(貧栄養)環境に置いたことが有効だったのか、現時点では不明である。これら環境因子のいずれか、あるいは両方によって細胞周期が休止期(G0期)へと移行して休眠した可能性を考えている。休眠化現象が実証されれば、安全かつ確実な短期細胞保存システムの創出にも展開が期待される。

今後、HTGを活用した細胞輸送システムの早期実用化を進める。HTG水溶液を用いた細胞保護の工程において、細胞品質に影響を与える因子がすべて検証されたわけではない。各因子の影響を明らかにし、細胞輸送プロトコルを確立することが課題である。

5. まとめ

我々は、高い T_g を持つゼラチンHTGを保護材として用いた新しいコンセプトの細胞輸送システムを開発した。移植用の培養組織を遠隔地まで高品質で輸送すること、さらにはゼラチンを簡便に洗浄して即利用可能な形で供給することは、再生医療の普及と産業化を現実とするための画期的なブレークスルーとなる。本研究で開発されたHTGは、いまだ模索が続く細胞輸送を簡便化・迅速化し、国際標準化をも視野に入れる。

謝辞

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構平成25年度研究成果最適展開支援プログラムA-STEPシーズ顕在化(課題番号AS2511353P)の支援を受けて実施された。

(平成28年7月6日受付, 平成28年8月8日再受付)

文 献

- (1) C. Burillon, L. Huot, V. Justin, S. Nataf, F. Chapuis, E. Decullier, O. Damour, K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, N. Maeda, H. Watanabe, K. Yamamoto, S. Nagai, A. Kikuchi, Y. Tano, T. Okano: "Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency", *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, Vol.53, pp.1325-1331 (2012)
- (2) Y. Sawa, S. Miyagawa, T. Sakaguchi, T. Fujita, A. Matsuyama, A. Saito, T. Shimizu, T. Okano, T. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, A. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, Y. Tano: "Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case", *Surg. Today*, Vol.42, 2, pp.181-184 (2012)
- (3) T. Ohki, M. Yamato, M. Ota, R. Takagi, D. Murakami, M. Kondo, R. Sasaki, H. Namiki, T. Okano, M. Yamamoto: "Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets", *Gastroenterology*, Vol.143, 3, pp.582-588 (2012)
- (4) M. Yamato, M. Utsumi, A. Kushida, C. Konno, A. Kikuchi, T. Okano: "Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without dispase by reducing temperature", *Tissue Eng.*, Vol.7, pp.473-480 (2001)
- (5) M. Harimoto, M. Yamato, M. Hirose, C. Takahashi, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano: "Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes", *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol.62, pp.464 (2002)
- (6) Y. Ohyabu, H. Hatayama and S. Yunoki: "Evaluation of gelatin hydrogel as a potential carrier for cell transportation", *J Biosci Bioeng.*, Vol.118, 1, pp.112-115, (2014)
- (7) 中島亮太, 千田直子, 野崎貴之, 小林豊茂, 武田志津: 「再生医療に向けた細胞シートの自動培養装置と輸送技術」 *Innovative R&D Report*, Vol.95, 6, pp.478-485(2013)
- (8) T. Hikichi, S. Wakayama, E. Mizutani, Y. Takashima, S. Kishigami, Van Thuan N., H. Ohta, Bui HT, S. Nishikawa, T. Wakayama: "Differentiation Potential of Parthenogenetic Embryonic Stem Cells is Improved by Nuclear Transfer", *Stem Cells*, Vol.25, pp.46-53 (2007)
- (9) N. Nishishita, M. Muramatsu, S. Kawamata: "An effective freezing/thawing method for human pluripotent stem cells cultured in chemically-defined and feeder-free conditions", *Am. J. Stem. Cells* Vol.4, 1, pp.38-49 (2015)
- (10) Y. Ohyabu, S. Yunoki, H. Hatayama, Y. Teranishi: "Fabrication of high-density collagen fibril matrix gels by renaturation of triple-helix collagen from gelatin", *Int J Biol Macromol.*, Vol.62, pp.296-303 (2013)