

奨励金No.1593

ヒト iPS 細胞由来スフェロイドの凍結プロセス設計基盤

林 勇佑
東京大学 助教



Design platform for the freezing process of human iPS cell-derived spheroids

Yusuke Hayashi
The University of Tokyo, Assistant Professor

ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の実用化にあたり、細胞凍結を伴う保存・輸送が必須となる。現在、臨床応用で用いられる多くのヒト iPS 細胞由来製品は、細胞凝集体である「スフェロイド」を経て得られる。しかし、現代の技術では、スフェロイド状態での凍結には課題があり、製品製造の大きな障害となっているため、凍結プロセスを確立することが急務である。本研究では、解凍後のスフェロイド品質を予測するハイブリッドモデルを新規に構築し、凍結プロセスの運転可能領域を決定した。

In practical application of regenerative medicine using human iPS cells, storage and transportation involving cell freezing are essential. Currently, many human iPS cell-derived products used in clinical applications are obtained through “spheroids,” which are cell aggregates. However, with current technology, there are challenges in freezing cells in the spheroid state, which is a major obstacle to product manufacturing. Hence, there is an urgent need to establish freezing processes for the spheroids. In this study, a hybrid model that can evaluate the quality of spheroids after thawing was established to determine the operable region of the freezing process.

1. 研究内容

スフェロイド凍結プロセスのモデル化の概要を図1に示す。スフェロイドは、バイアル内で凍結保護剤に浸漬させたのち、一定速度 B [K min^{-1}] で冷却するものとした。このとき、スフェロイド

は、半径 R [m] の均質球体であるとし、凍結保護剤が見かけの拡散係数 D_{app} [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] で拡散するものとした。

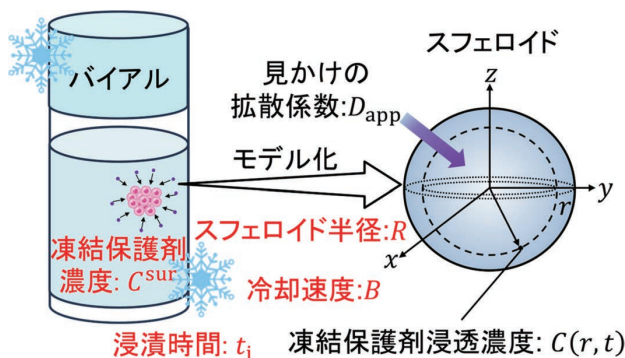


図1 モデル化の概要

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \left(\frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial T}{\partial r} \right) \quad (1)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{\text{app}} \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (2)$$

$$\frac{dV_{\text{sph}}}{dt} = A_{\text{sph}} L_p \Pi \quad (3)$$

$$V_{\text{ice}} = \sum_{i=1}^{N_{\text{ice}}} \frac{4}{3} \pi r_{\text{ice},i}^3 \quad (4)$$

$$r_s = f(V_{\text{sph}}, V_{\text{ice}}) \quad (5)$$

スフェロイドの凍結プロセスモデルを式(1)～

(5)により定式化した。スフェロイド内部の熱伝導を式(1)、スフェロイド内部の物質移動を式(2)、スフェロイドの体積変化を式(3)、スフェロイド内部における氷晶形成を式(4)、スフェロイド内部の細胞生存率を式(5)のように定式化した。ここで、 T : 温度 [K]、 α : 熱拡散係数 [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]、 V_{sph} : スフェロイド体積 [m^3]、 A_{sph} : スフェロイド表面積 [m^2]、 L_P : 膜透過係数 [$\text{m s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$]、 Π : 浸透圧差 [Pa]、 V_{ice} : スフェロイド内部の氷晶体積 [m^3]、 N_{ice} : スフェロイド内部の氷晶数 [-]、 $r_{\text{ice},i}$: 氷晶半径 [m]、 r_s : スフェロイド内部の細胞生存率である。なお、細胞生存率モデルは、Mazur らの「2 因子仮説¹⁾」に基づき、スフェロイド内部における氷晶体積とスフェロイドの体積変化量の関数として定式化した。なお、シミュレーションの際には、ヒト iPS 細胞由来スフェロイドによる熱伝導への影響やバイアルの上・底面での伝熱、バイアル内の対流はなく、ヒト iPS 細胞由来スフェロイドおよび細胞内氷晶は常に球形をしており、溶液とバイアルの境界では熱流束が等しいとした。また、 $\alpha = 1.4 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ 、 $D_{\text{app}} = 5.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ とした。

既往研究²⁾によって報告された、複数の DMSO 濃度 C に対する細胞生存率 r_s を利用して、細胞生存率モデル（式(5)）のパラメータを推定した。パラメータ推定には、Levenberg-Marquardt 法を用いた。既往研究での実験値と、推定したパラメータを用いて算出した r_s の計算値を図2に示す。なお、 $C=0 \text{ M}$ での r_s の実験値は0.10と仮定した。推定したパラメータによる計算値は、実験値に対して良好な一致 ($R^2=0.87$) が見られた。これ以降は、ここで推定したパラメータを活用して検討を行った。なお、生存率が $C=1.0 \text{ M}$ 付近で極大となるのは、 $C<1.0 \text{ M}$ では保護効果が不足する一方で、 $C>1.0 \text{ M}$ では DMSO による細胞毒性が発現しているためであると考えられる。

スフェロイド半径 R と凍結保護剤浸漬時間 t_p を変化させたときのスフェロイド内部の細胞生存率

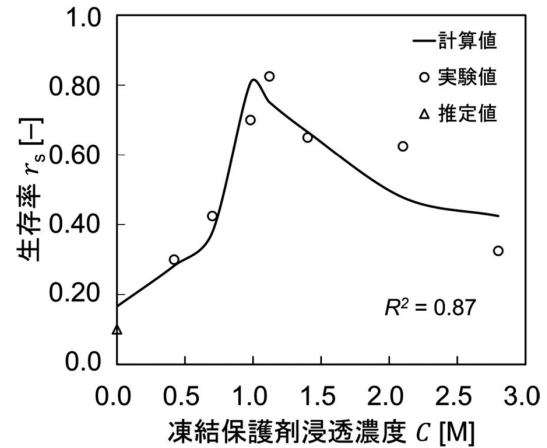


図2 生存率曲線

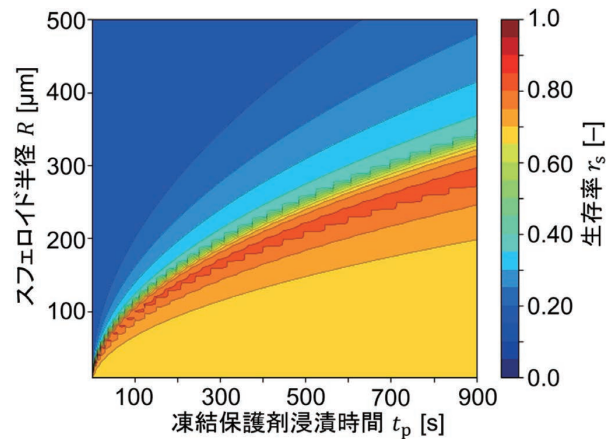


図3 生存率分布

r_s の分布を図3に示す。なお、冷却速度は 1.0 K min^{-1} とした。この結果より、 r_s の観点から考えると、各 t_p に対して最適な R 、各 R に対して最適な t_p があることが分かった。つまり、解凍後に高い細胞生存率を達成するためには、培養プロセスにて R を、凍結プロセスの前処理にて t_p を適切に管理する必要があると言える。

解凍後のスフェロイド内部の細胞生存率が0.70以上、スフェロイド内に含まれる生細胞数が 5.0×10^3 以上、凍結保護剤浸漬時間が900 s以下、という制約条件を与えた場合における凍結プロセスの運転可能領域を図4に示す。 t_p が大きくし、 R をうまく調整することで、ヒト iPS 細胞由来スフェロイド凍結プロセスが運転可能であることが分かった。このように、品質や生産に関する条件

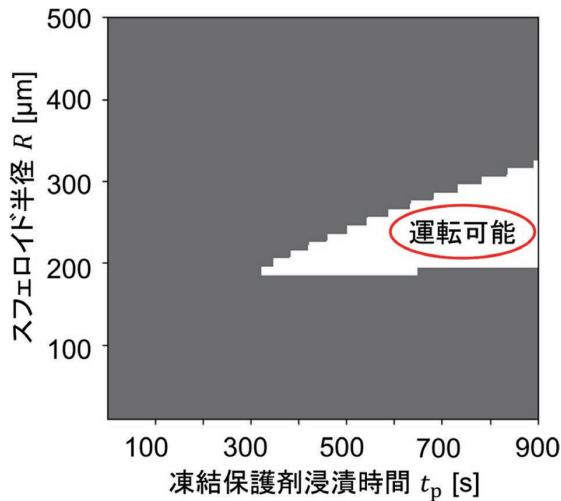


図4 凍結プロセスの運転可能領域

に応じて、凍結プロセスの運転可能領域を決定できるようになった。

スフェロイドを対象とした凍結プロセス設計モデルを新規に構築した。そして、構築したモデルを用いたシミュレーションにより、品質や生産に関する条件に応じて、凍結プロセスの運転可能領域を決定できるようになった。今後は、実験によるモデルおよび評価結果の妥当性検証を行うことで、スフェロイドの凍結プロセス実現につながると考えられる。

参考文献

- 1) Mazur, P., *et al.*, “A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from Chinese hamster tissue-culture cells,” *Experimental Cell Research*, 71, 345-355 (1972).
- 2) Ma, X., *et al.*, “Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters,” *Cryobiology*, 60, 184-191 (2010).

2. 発表（研究成果の発表）

1. Masaharu Fujioka, Yusuke Hayashi, Hirokazu Sugiyama, “A model-based approach to determining feasible parameter ranges of freezing processes for stem cell-derived

spheroids”, 11th Asian Symposium on Process Systems Engineering (PSE Asia 2024), Penang, Malaysia