

再生医療等製品および周辺産業の発展に向けて
再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システム開発の成果報告
平成30年12月21日伊藤謝恩ホール

複数化合物を用いた安定品質・低コスト培地開発

長谷川 光一
京都大学 高等研究院
物質-細胞統合システム拠点(iCeMS)



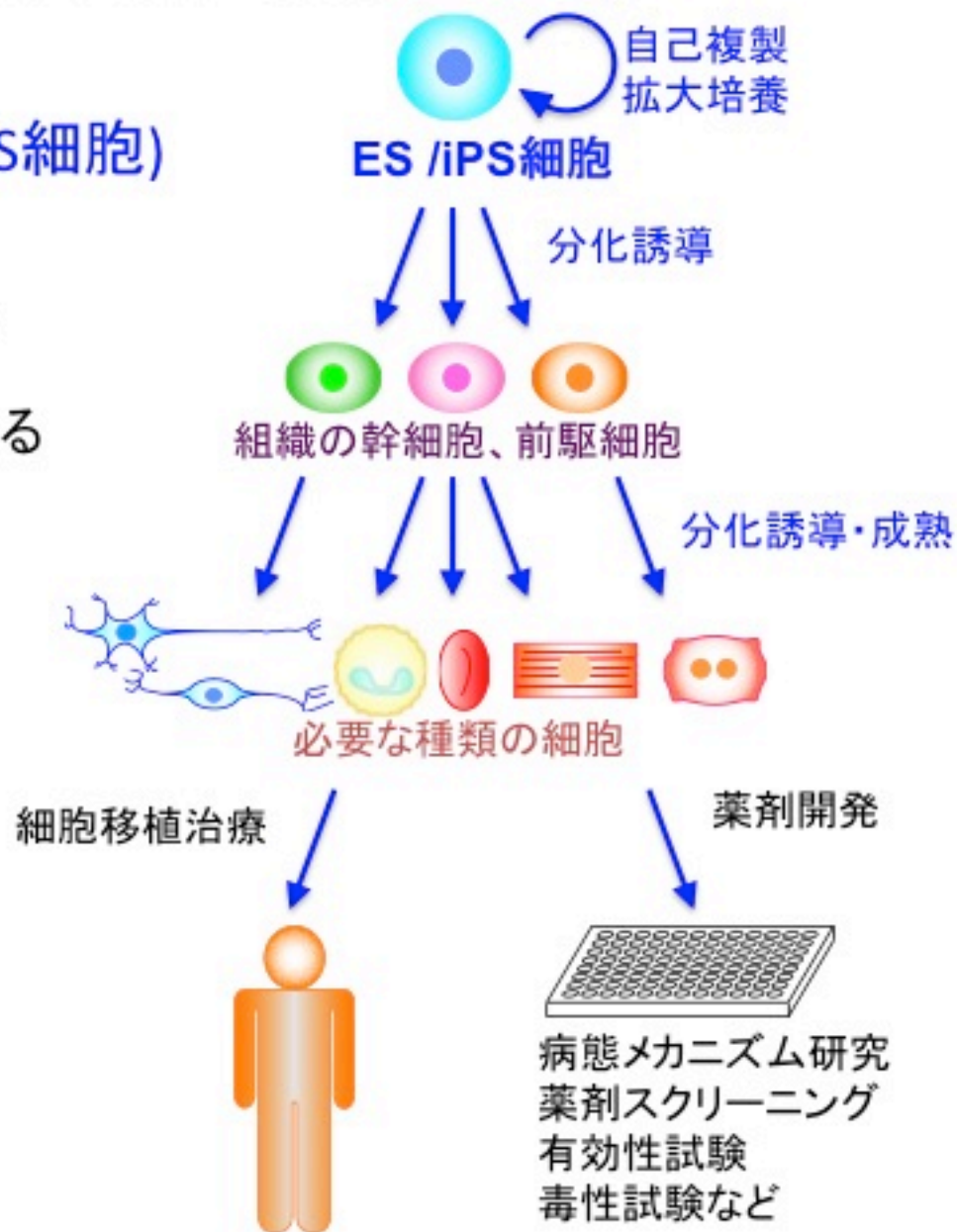
ヒト多能性幹細胞

Human Pluripotent Stem Cells (hPSCs)

Embryonic stem cells (ES細胞)

Induced pluripotent stem cells (iPS細胞)

- 正常な細胞
- 無限に増える (自己複製・拡大培養)
- 体を構成する全ての細胞に分化できる (多能性: Pluripotency)
- ヒト細胞が有効な様々なことに応用できる

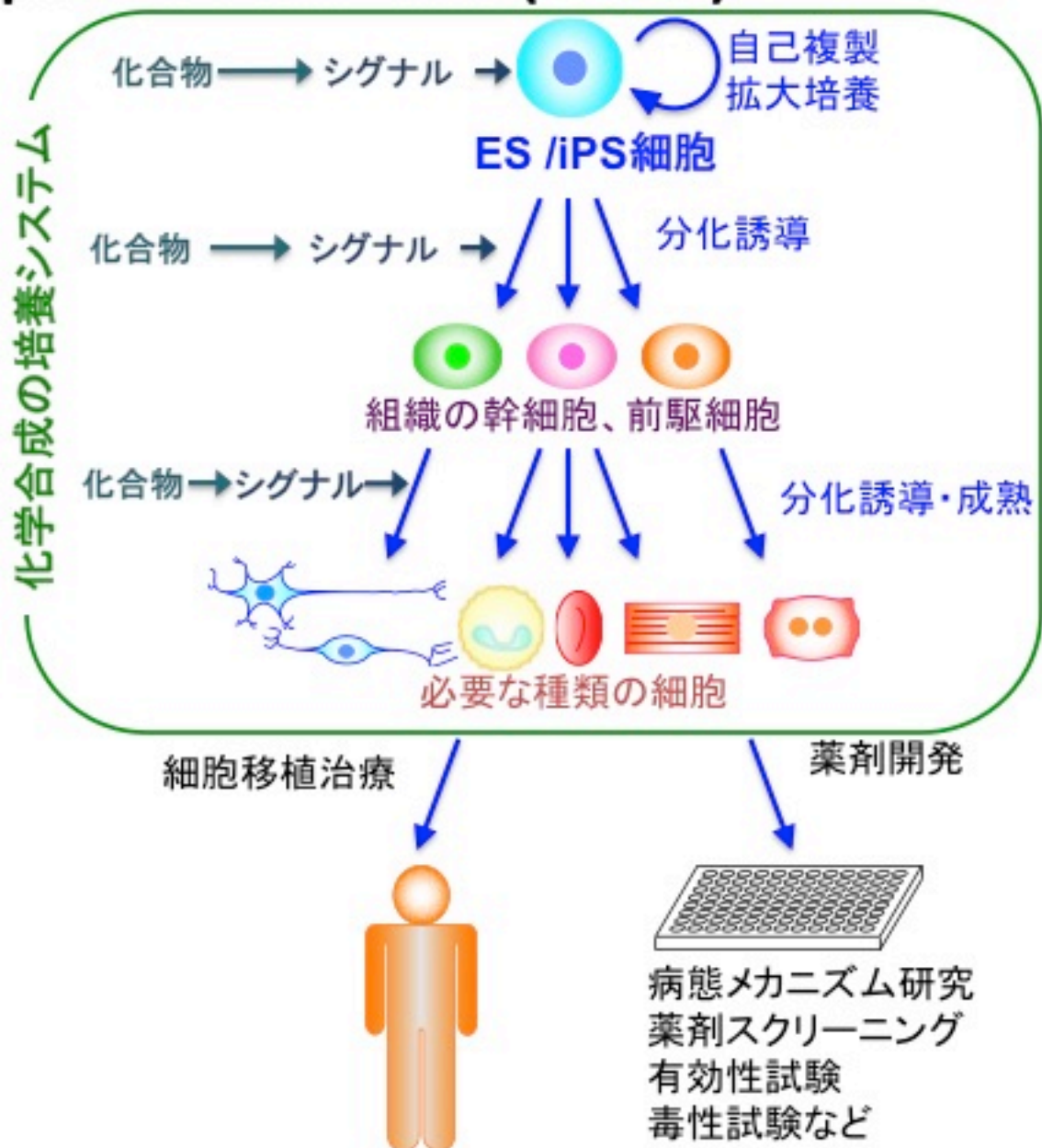


ヒト多能性幹細胞

Human Pluripotent Stem Cells (hPSCs)

・化学合成培養システムが開発できれば、感染リスクの軽減や品質管理が容易になり、低価格で安全・安定に細胞を供給可能になる。

・自己複製や分化に関わるシグナル経路を解明し、そのシグナルを化合物で制御する。



ヒトES/iPS細胞の培養システムとその添加物の比較

古典的なフィーダー細胞との共培養 (2000年、アメリカ) Amit M et al. Dev. Biol. (2000)

血清置換物

bFGF

フィーダー細胞が提供する因子

フィーダー細胞

ゼラチン(接着基質)

最もスタンダードなxeno- & feeder-free培地 (TeSR培地など) (2006年、アメリカ) Ludwig TE et al. Nature Biotech. (2006)

血清置換物

高濃度のbFGF

高濃度のActivin/Nodal

他の成長因子

Matrigel等(接着基質)

1Lの価格: 92000円(研究用) ~ 132000円(医療用)(販売価格)

最もシンプルなスタンダード培地 (E8培地) (2011年、アメリカ) Chen G et al. Nature Methods (2011)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

Nodal/TGF β

Vitronectin断片(接着基質)

1Lの価格: 49000円(研究用)(販売価格)(医療用の価格は1.2~1.4倍程度?)

日本ではスタンダードとなりつつある培地 (StemFit培地) (2014年、日本) Nakagawa M et al. Sci Rep (2014)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

TGF β

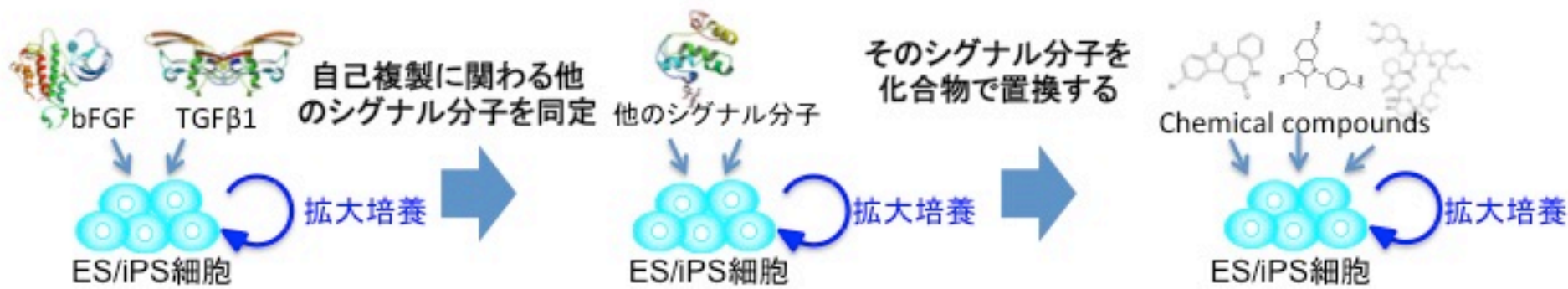
アルブミン

Laminin断片(接着基質)

1Lの価格: 70000円(研究用) ~ 90000円(医療用)(販売価格)

これらの培地は高濃度の増殖因子タンパク質であるbFGFとTGF β が必須であり、高品質培地で大量に細胞を製造することは非常に高価である。

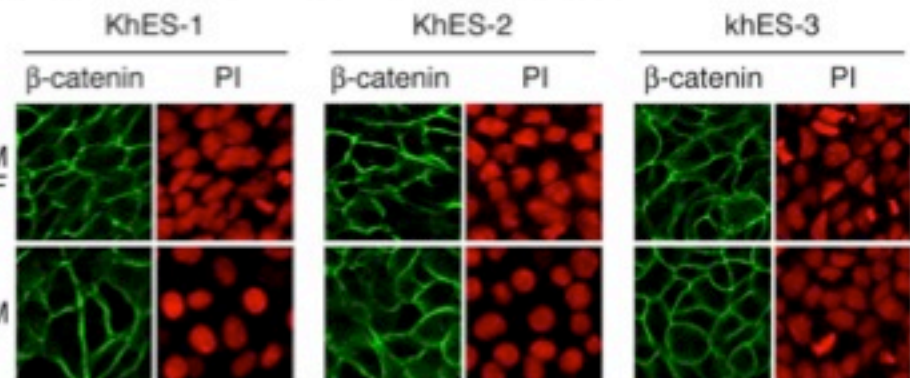
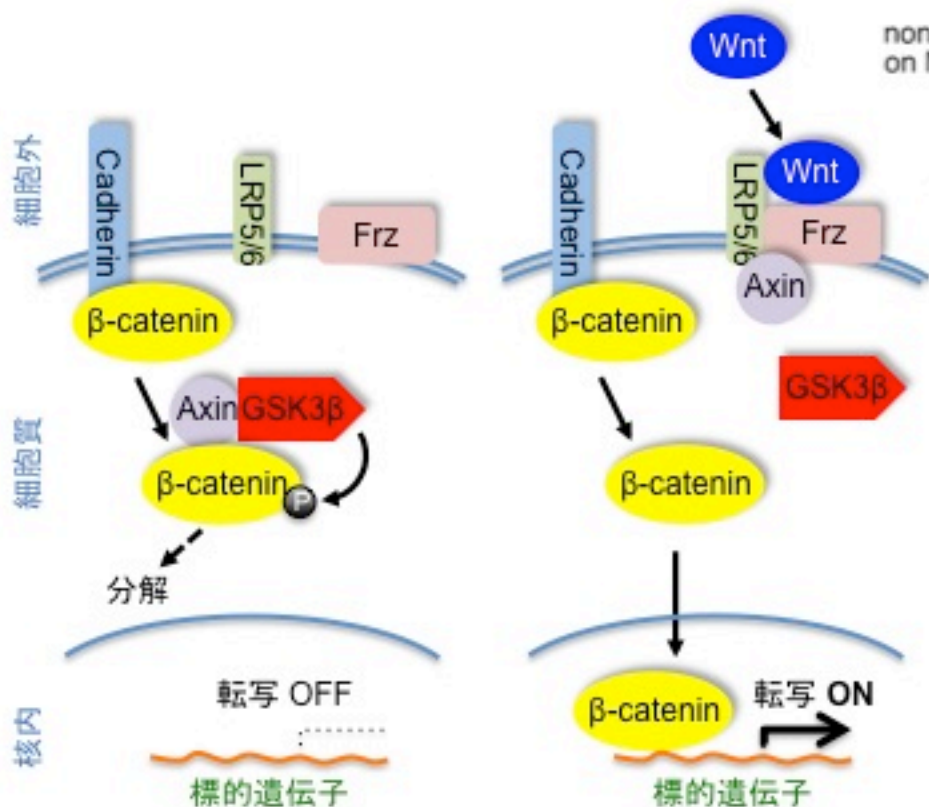
しかし現在まで、bFGFやTGF β を置換可能な化合物は得られていない。



bFGF/TGFβ以外でES/iPS細胞を維持可能と考えられるシグナル「Wnt」

～Wntシグナルとその多能性幹細胞における効果～

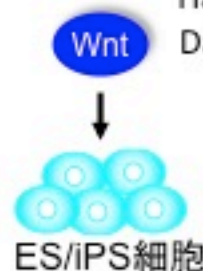
古典的Wntシグナル経路



ヒトES/iPS細胞においてWntシグナルは2つの効果をもたらす

- 1, 生存性と増殖性を高める
- 2, 分化を誘導してしまう

Dravid G et al. (2005) Stem Cells
 Hasegawa K et al. (2006) Stem Cells
 Davidson KC et al. (2012) PNAS

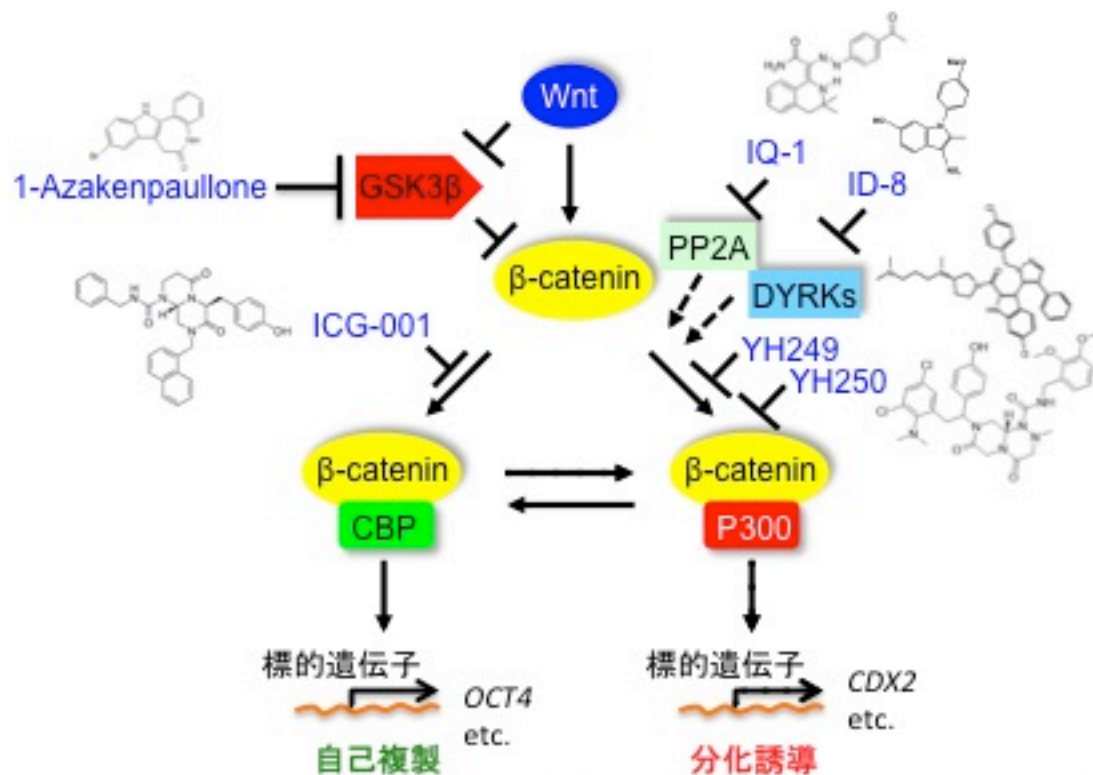


自己複製(増殖) 分化誘導

これらの効果をコントロールし、分化を誘導せずに生存・増殖を高められないか？
 化合物のスクリーニング

WntシグナルによるヒトES/iPS細胞の自己複製と分化を 制御可能な化合物の合成・スクリーニング

ヒトES/iPS細胞でのWntシグナル機構モデル



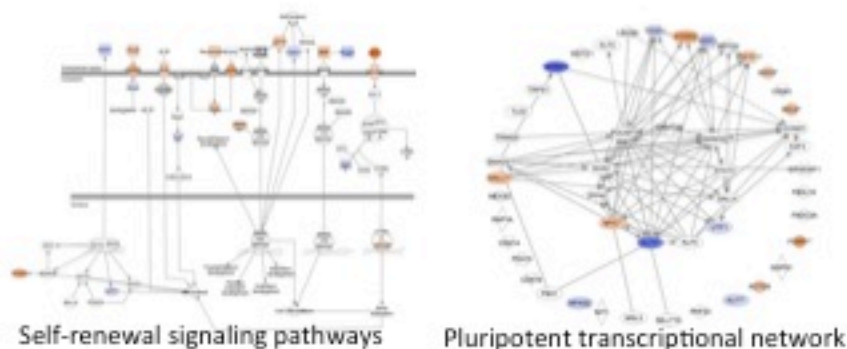
Azakenpaullone とID-8で、ヒトES/iPS細胞がbFGF/TGFβ非依存的に自己複製できることを発見
しかし、この条件では、ヒトES/iPS細胞の増殖速度は遅かった

ヒトES/iPS細胞の増殖に関わるシグナルとそれを制御可能な化合物の探索

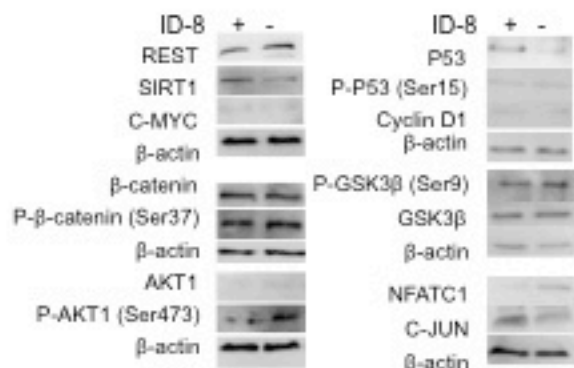
RNAseqトランスクリプトーム解析

Sample	Supplements	Phenotype
●	GSK3i ID-8	Slow growth, compact colony
●	GSK3i ID-8 bFGF	Fast growth, compact colony
●	GSK3i ID-8 TGFβ1	Slow growth, compact colony
●	GSK3i ID-8 bFGF TGFβ1	Fast growth, compact colony
●	GSK3i bFGF TGFβ1	Fast growth, differentiation
●	ID-8 bFGF TGFβ1	Fast growth, compact colony
●	bFGF TGFβ1	Fast growth, flat colony

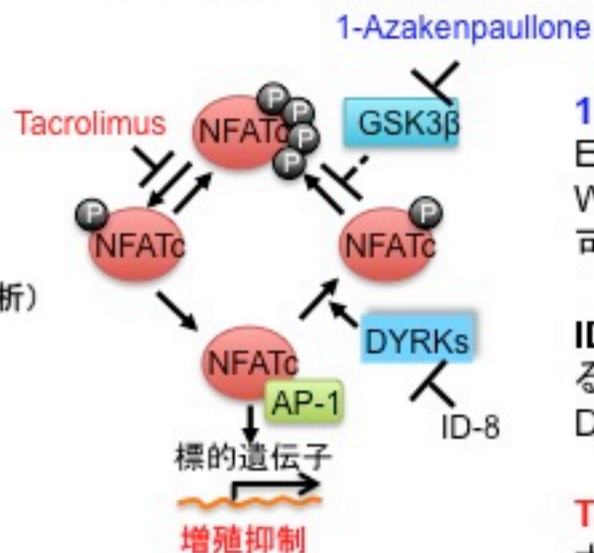
増殖・自己複製のハブとなる経路の推定(パスウェイ・ネットワーク解析)



働いているシグナル経路の同定(リン酸化解析や局在解析など)



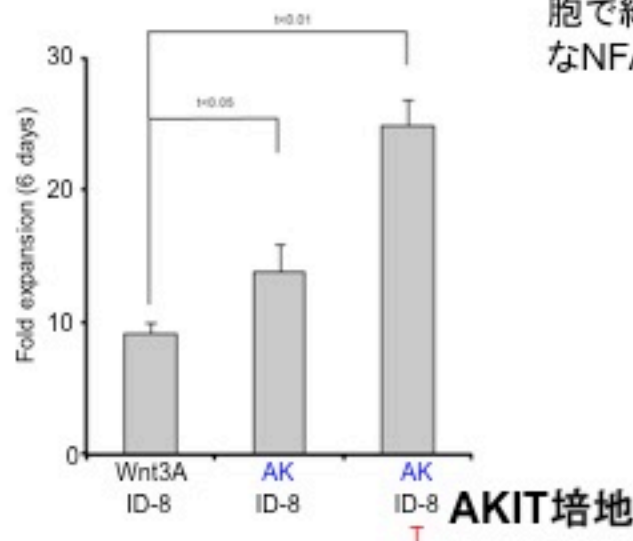
同定したシグナル経路を制御可能な化合物の収集と小規模スクリーニング



1-Azakenpallone: ヒトES/iPS細胞で効果的にWntシグナルを活性化可能なGSK3阻害剤

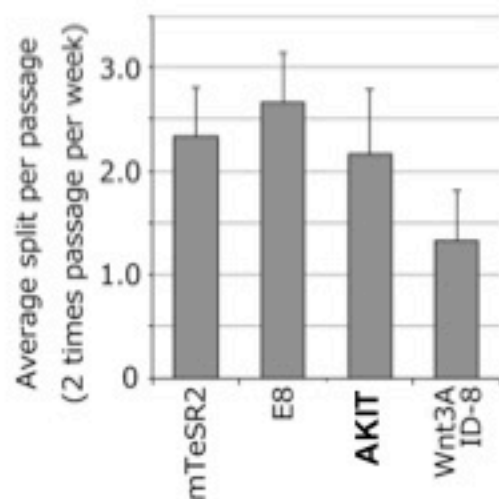
ID-8: Wntシグナルによる分化誘導を抑制可能なDYRK1/2阻害剤

Tacrolimus: Wntシグナル下でヒトES/iPS細胞で細胞増殖を促進可能なNFATc経路の阻害剤

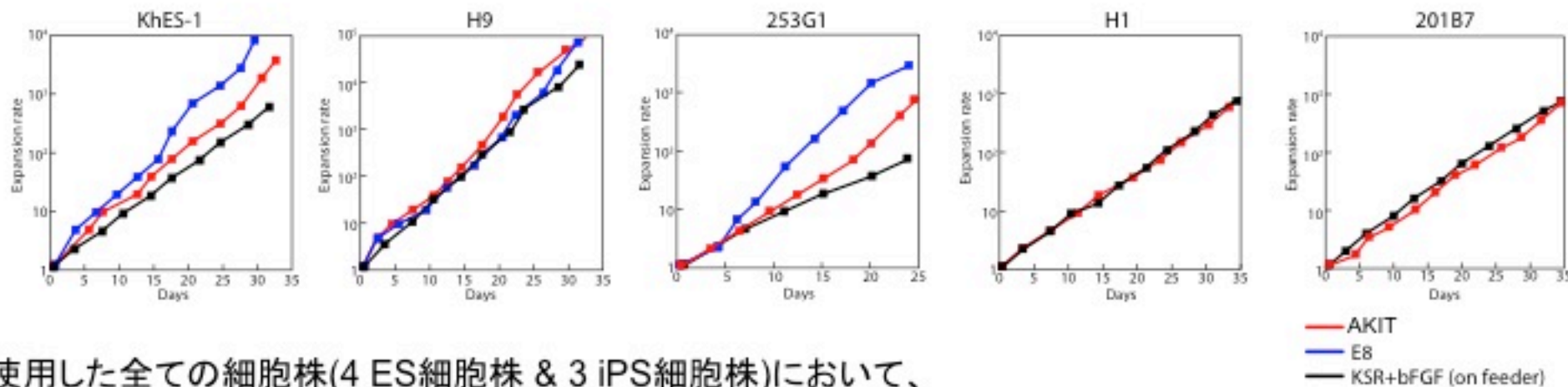
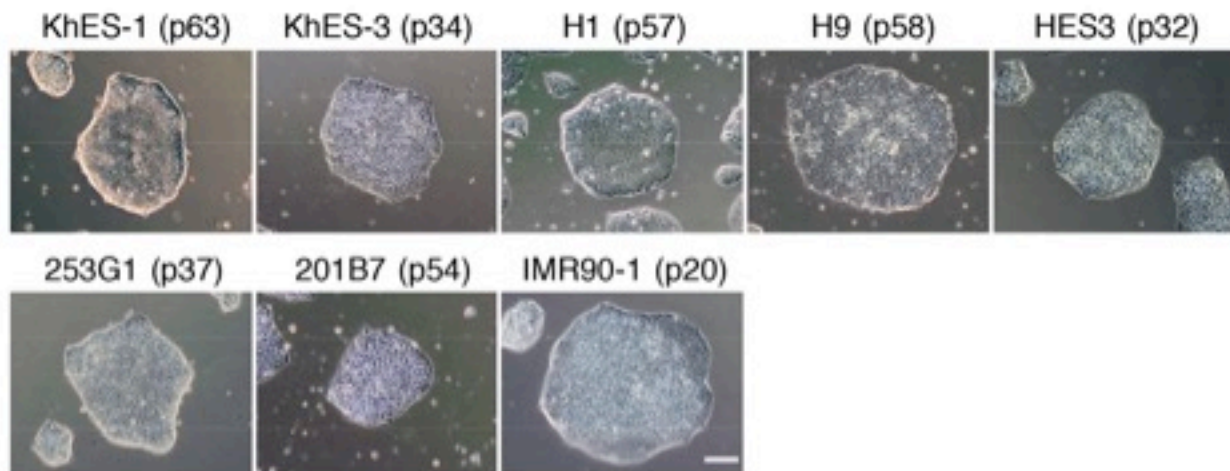


AKIT培地はヒトES/iPS細胞を長期に拡大培養可能

Cellular expansion

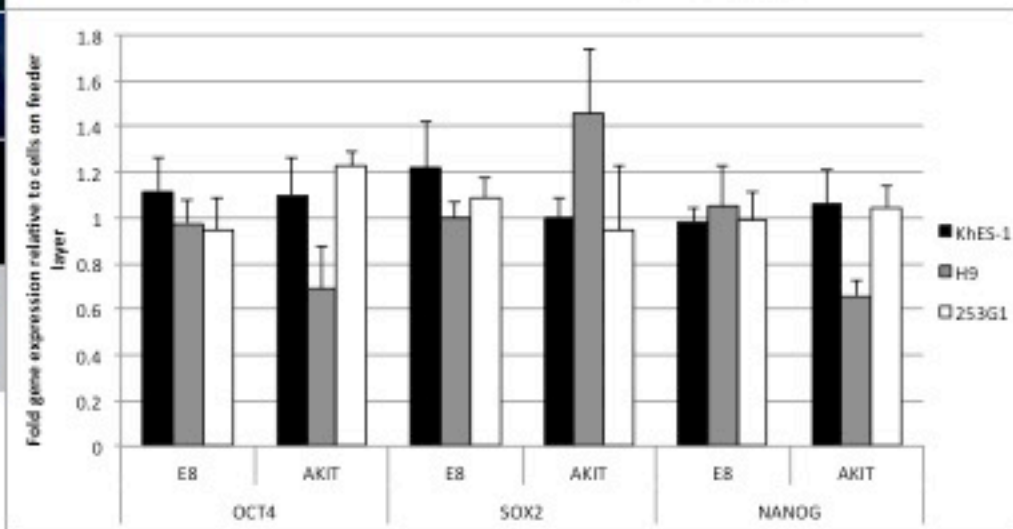
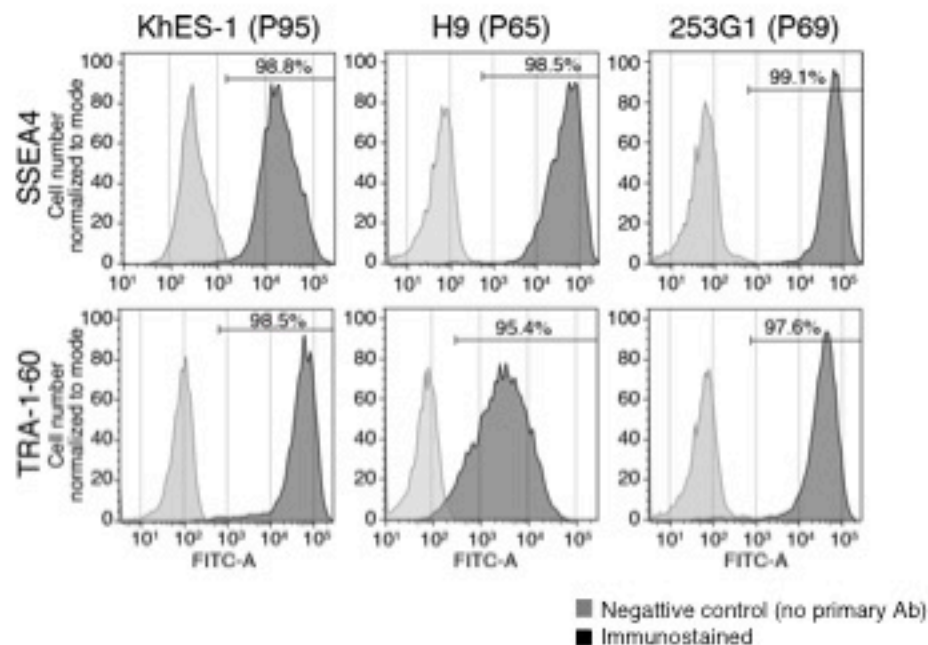
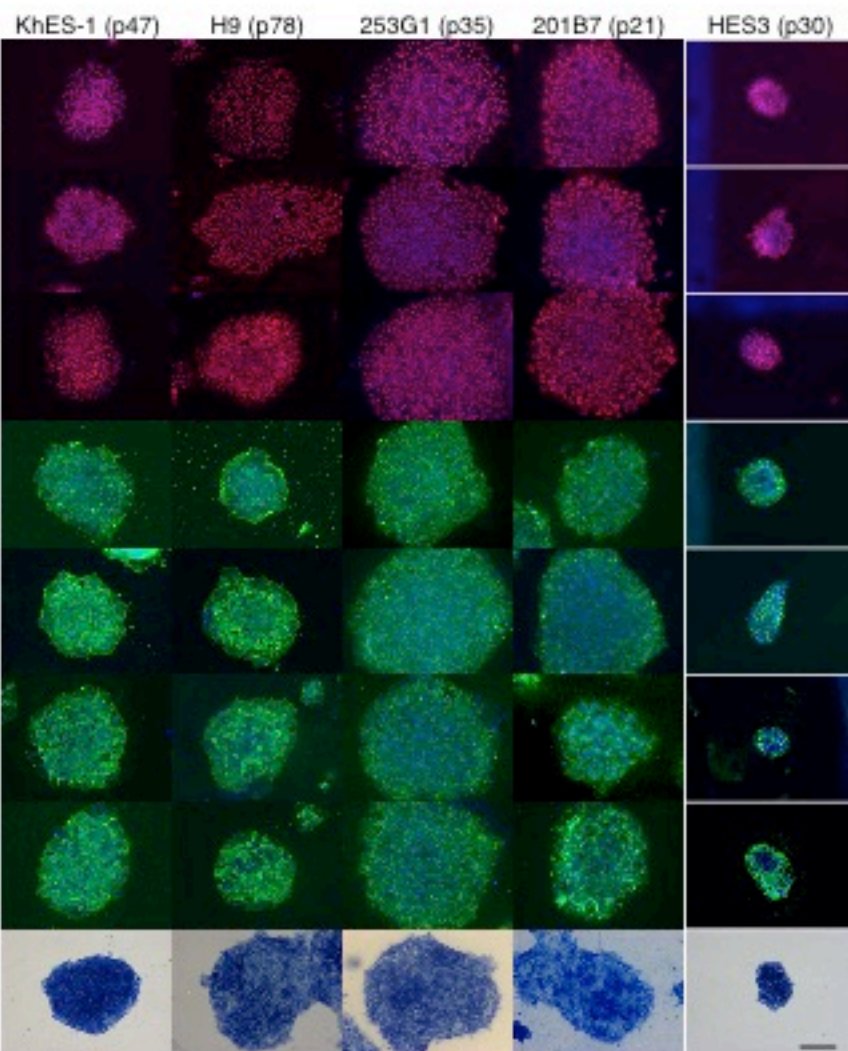


Cell and colony morphology



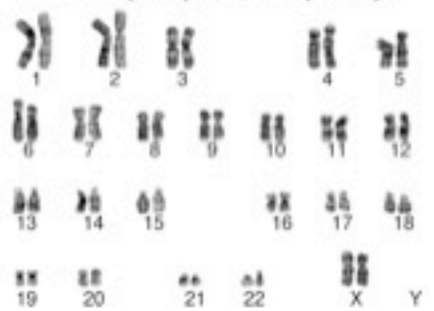
使用した全ての細胞株(4 ES細胞株 & 3 iPS細胞株)において、非タンパク質の乖離溶液を使用して拡大培養できた。高濃度bFGF含有培地(mTeSR1やE8培地)より若干増殖は劣るもののフィーダー細胞依存培養システムとは同等の増殖を示した。

AKIT培地はヒトES/iPS細胞を未分化に保つ

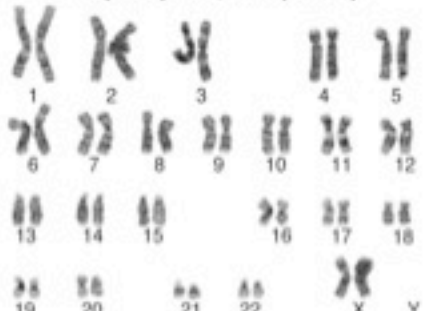


AKIT培地はヒトES/iPS細胞の遺伝子変異を加速しない

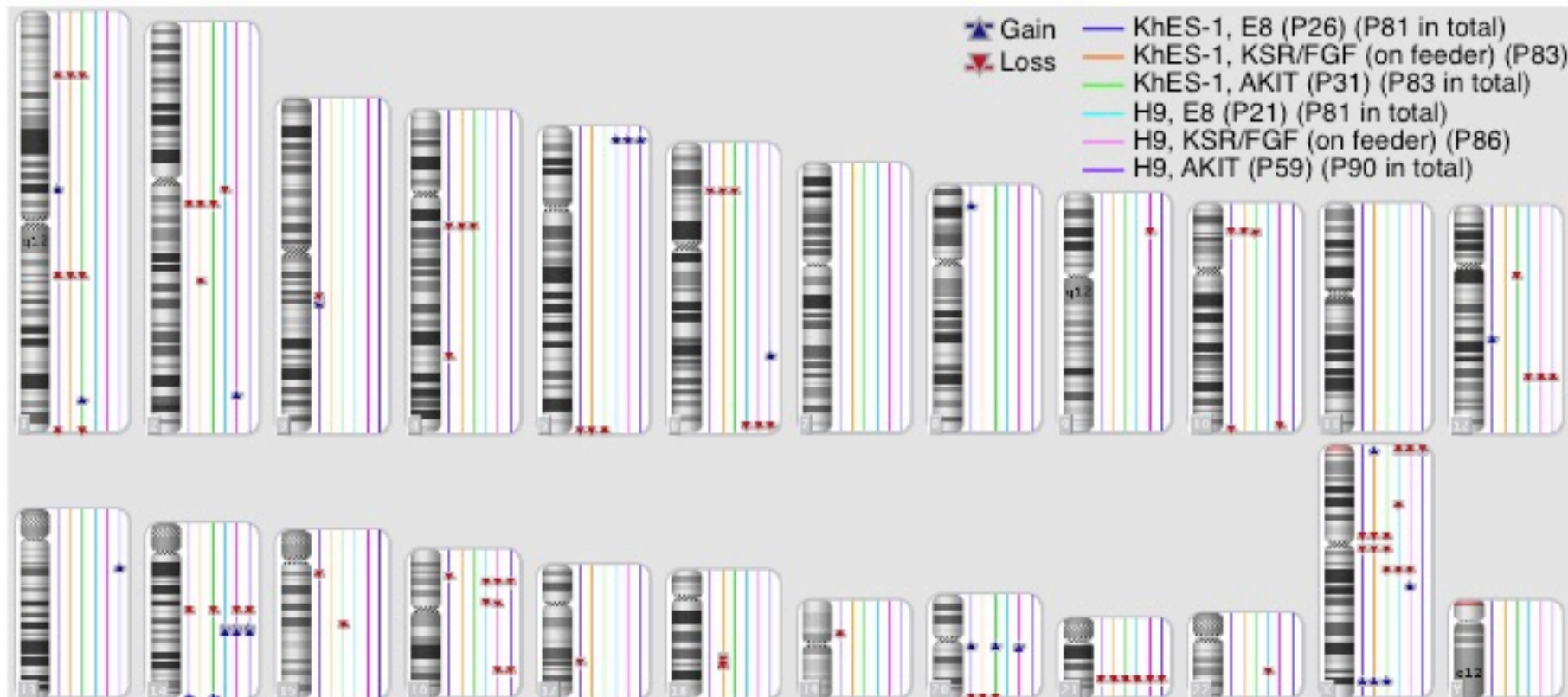
KhES-1 (P49): 46, XX (n=50)



H9 (P33): 46, XX (n=50)



253G1 (P25): 46, XX (n=50)



AKIT培地はヒトES/iPS細胞の遺伝子変異を加速しない (TP53がん抑制遺伝子の例)

これまでにヒトES/iPS細胞で報告されている変異箇所

	Genomic position (hg19)	Genomic DNA alteration	Coding change	Base detected and frequency (%)		
				KhES-1 in AKIT rep1	KhES-1 in AKIT rep2	KhES-1 in AKIT rep3
Reported mutation	17:7578479	C>T (G>A)	P151S	G (100)	G (100)	G (100)
	17:7578406	C>T	R175H	C (100)	C (100)	C (100)
	17:7578388	C>T	R181H	C (100)	C (100)	C (100)
	17:7578271	T>C	H193R	T (100)	T (100)	T (100)
	17:7577570	C>T	M237I	C (100)	C (100)	C (100)
	17:7577548	C>T	G245S	C (100)	C (100)	C (100)
	17:7577548	C>A	G245C	C (100)	C (100)	C (100)
	17:7577539	C>T (G>A)	R248W	G (100)	G (100)	G (100)
	17:7577538	C>T	R248Q	C (100)	C (100)	C (100)
	17:7577139	C>T (G>A)	R267W	G (100)	G (100)	G (100)
	17:7577121	G>C	R273G	G (100)	G (100)	G (100)
	17:7577120	C>A	R273L	C (100)	C (100)	C (100)
	Polymorphism	17:7579472	C or G	P72 or R72	C (49), G (51)	C (48), G (52)

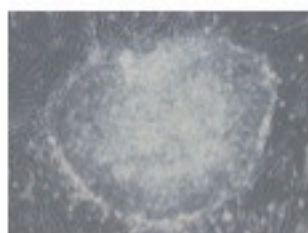
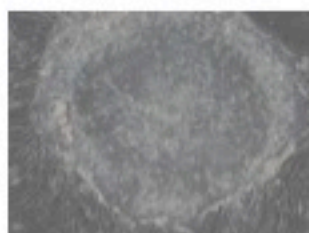
AKIT培地はiPS細胞作製に使用可能

ヒト皮膚線維芽細胞からのiPS細胞作製
Human dermal fibroblast (HDF)

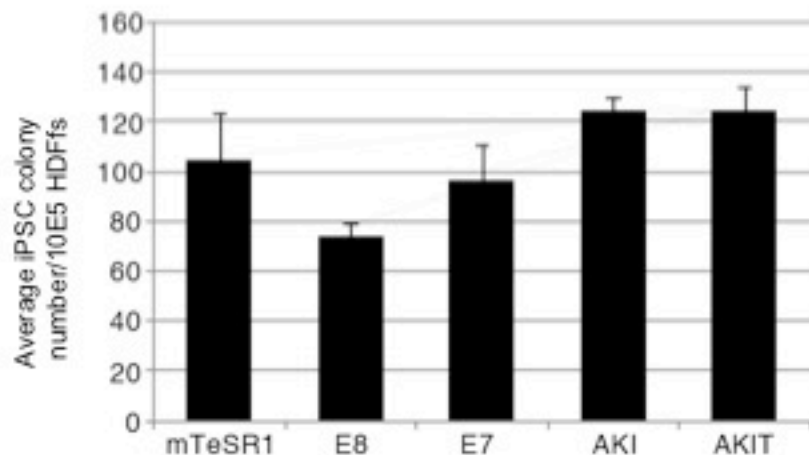
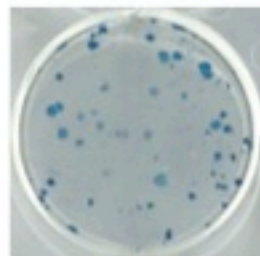
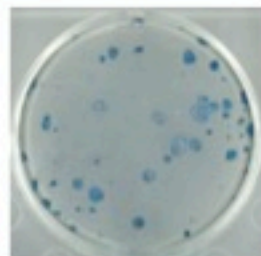
E7
(E8-TGFβ1)

AKIT

Colony morphology
(day 19)



ALP staining
(day 22)

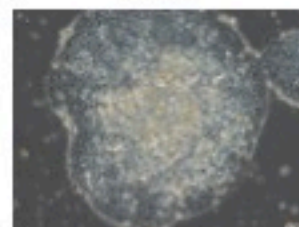
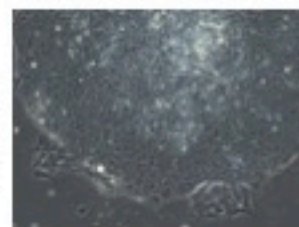


ヒト末梢血単核細胞からのiPS細胞作製
Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

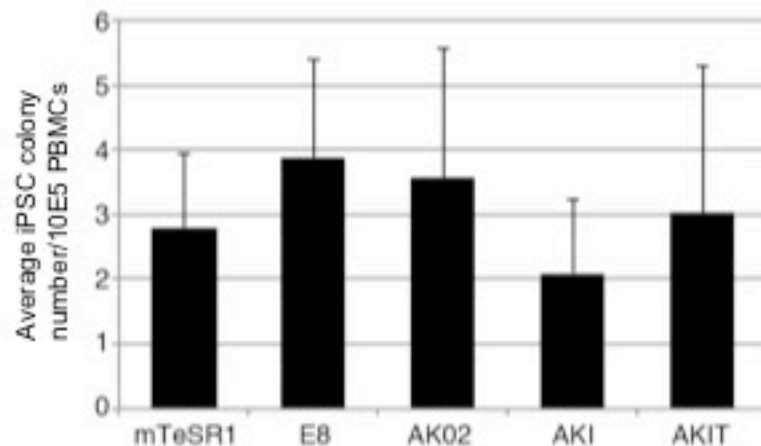
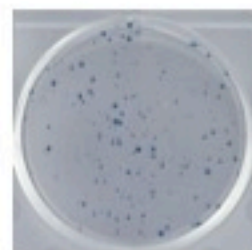
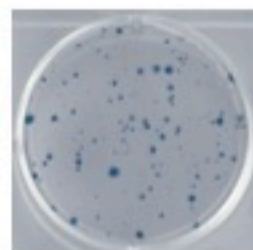
StemFit AK02
(bFGF, TGFβ, Albumin)

AKIT

Colony morphology
(day 14)

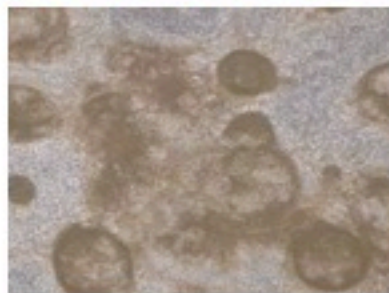
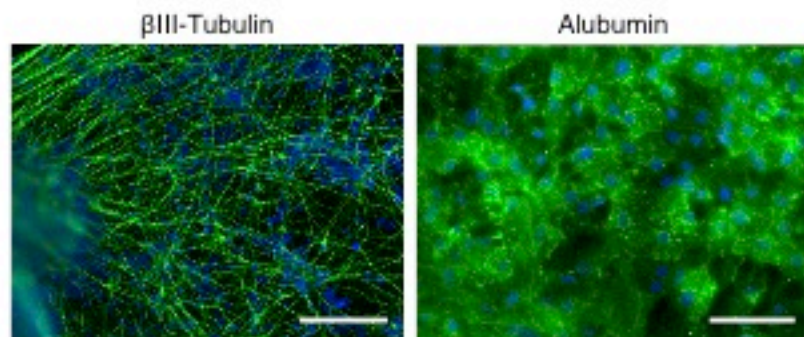
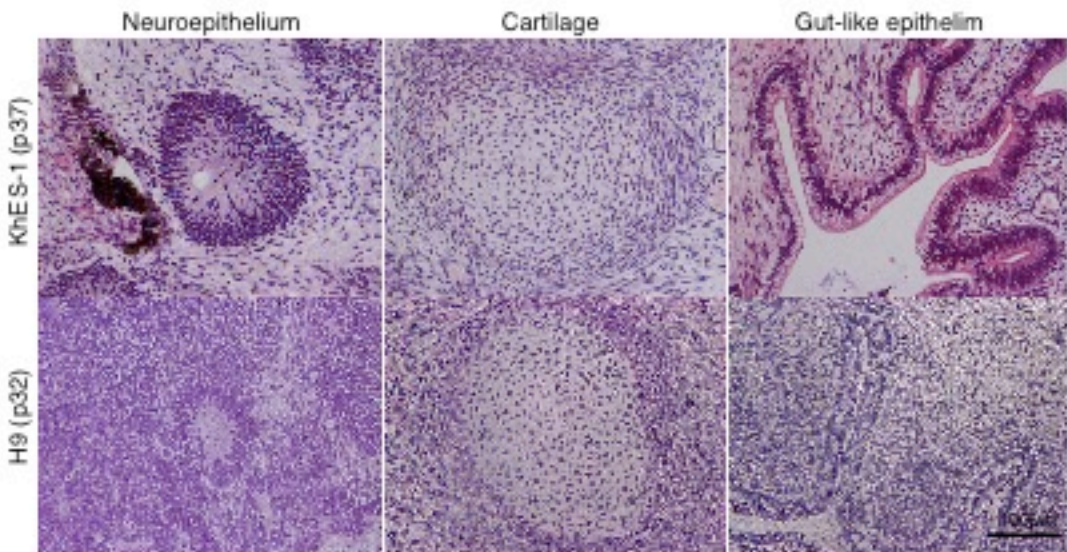
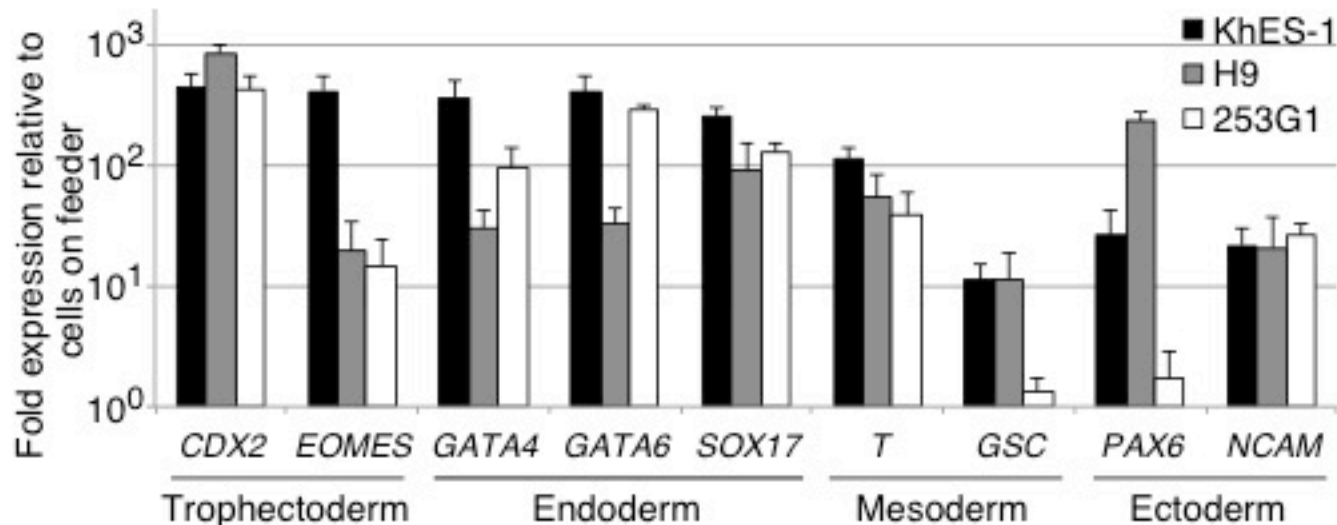


ALP staining
(day 15)



AKIT培地はヒトES/iPS細胞の多分化能を維持可能

AKI培地で培養した細胞は、一般的な分化誘導法にそのまま使用可能



無フィーダーのヒトES/iPS細胞の培養システムとその添加物の比較

最もスタンダードなxeno- & feeder-free培地 (TeSR培地など) (2006年、アメリカ) Ludwig TE et al. Nature Biotech. (2006)

血清置換物

高濃度のbFGF

高濃度のActivin/Nodal

他の成長因子

Matrigel等 (接着基質)

1Lの価格: 92000円 (研究用) ~ 132000円 (医療用) (販売価格)

最もシンプルなスタンダード培地 (E8培地) (2011年、アメリカ) Chen G et al. Nature Methods (2011)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

Nodal/TGF β

Vitronectin断片 (接着基質)

1Lの価格: 49000円 (研究用) (販売価格) (医療用の価格は1.2~1.4倍程度?)

日本ではスタンダードとなりつつある培地 (StemFit培地) (2014年、日本) Nakagawa M et al. Sci Rep (2014)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

TGF β

アルブミン

Laminin断片 (接着基質)

1Lの価格: 70000円 (研究用) ~ 90000円 (医療用) (販売価格)

開発した安価で成長因子を含まない培地 (AKIT培地) (2018年、日本) Yasuda S et al. Nature Biomed Eng (2018)

インスリン・トランスフェリン

GSK3阻害剤

DYRK阻害剤

NFATc阻害剤

Laminin断片 (接着基質)

培地1Lの価格: 8000円 (各成分の購入価格の合計)

AKIT培地を基にした培地の市販化



SODATT™

- Serum-free
- Xeno-free
- bFGF/TGFβ-free
- Feeder-free
- Chemically defined

 GlycoTechnica

開発中

ヒトiPS細胞用 未分化維持培地


Kanto Reagents



Points!

- ◆ 低タンパク質
- ◆ 優れた操作性
- ◆ 高い増殖性と良好な未分化維持

ヒトiPS細胞の培養には頻りに培地交換が必要であり、実験者の負担となっておりました。関東化学では従来の培地交換作業が不要になる、ヒトiPS細胞の培養に最適な培地を新たに開発いたしました。

※本製品は、京都大学から技術移転を受け開発された製品です。

 Kanto Kagaku

他にも数社(日本、米国、韓国、インドなど)で検討中

無フィーダーのヒトES/iPS細胞の培養システムとその添加物の比較

最もスタンダードなxeno- & feeder-free培地 (TeSR培地など) (2006年、アメリカ) Ludwig TE et al. Nature Biotech. (2006)

血清置換物

高濃度のbFGF

高濃度のActivin/Nodal

他の成長因子

Matrigel等 (接着基質)

1Lの価格: 92000円 (研究用) ~ 132000円 (医療用) (販売価格)

最もシンプルなスタンダード培地 (E8培地) (2011年、アメリカ) Chen G et al. Nature Methods (2011)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

Nodal/TGF β

Vitronectin断片 (接着基質)

1Lの価格: 49000円 (研究用) (販売価格) (医療用の価格は1.2~1.4倍程度?)

日本ではスタンダードとなりつつある培地 (StemFit培地) (2014年、日本) Nakagawa M et al. Sci Rep (2014)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

TGF β

アルブミン

Laminin断片 (接着基質)

1Lの価格: 70000円 (研究用) ~ 90000円 (医療用) (販売価格)

開発した安価で成長因子を含まない培地 (AKIT培地) (2018年、日本) Yasuda S et al. Nature Biomed Eng (2018)

インスリン・トランスフェリン

GSK3阻害剤

DYRK阻害剤

NFATc阻害剤

Laminin断片 (接着基質)

培地1Lの価格: 8000円 (各成分の購入価格の合計)

開発した安価で成長因子・トランスフェリンを含まず、さらに増殖の良い培地 (AKIV培地) 未発表

インスリン

GSK3阻害剤

DYRK阻害剤

化合物5種

Laminin断片 (接着基質)

培地1Lの価格: 10800円 (各成分の購入価格の合計)

ニプロ株式会社において、バッグ自動培養装置による大量培養を実施中

無フィーダーのヒトES/iPS細胞の培養システムとその添加物の比較

最もスタンダードなxeno- & feeder-free培地 (TeSR培地など) (2006年、アメリカ) Ludwig TE et al. Nature Biotech. (2006)

血清置換物

高濃度のbFGF

高濃度のActivin/Nodal

他の成長因子

Matrigel等 (接着基質)

1Lの価格: 92000円 (研究用) ~ 132000円 (医療用) (販売価格)

基質10cm²の価格: 100円 (研究用)

最もシンプルなスタンダード培地 (E8培地) (2011年、アメリカ) Chen G et al. Nature Methods (2011)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

Nodal/TGF β

Vitronectin断片 (接着基質)

1Lの価格: 49000円 (研究用) (販売価格) (医療用の価格は1.2~1.4倍程度?) 基質10cm²の価格: 60円 (研究用) ~ 300円 (医療用)

日本ではスタンダードとなりつつある培地 (StemFit培地) (2014年、日本) Nakagawa M et al. Sci Rep (2014)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

TGF β

アルブミン

Laminin断片 (接着基質)

1Lの価格: 70000円 (研究用) ~ 90000円 (医療用) (販売価格)

基質10cm²の価格: 270円 (研究用) ~ 430円 (医療用)

開発した安価で成長因子を含まない培地 (AKIT培地) (2018年、日本) Yasuda S et al. Nature Biomed Eng (2018)

インスリン・トランスフェリン

GSK3阻害剤

DYRK阻害剤

NFAT α 阻害剤

Laminin断片 (接着基質)

培地1Lの価格: 8000円 (各成分の購入価格の合計)

基質10cm²の価格: 270円 (研究用) ~ 430円 (医療用)

開発した安価で成長因子・トランスフェリンを含まず、さらに増殖の良い培地 (AKIV培地) 未発表

インスリン

GSK3阻害剤

DYRK阻害剤

化合物5種

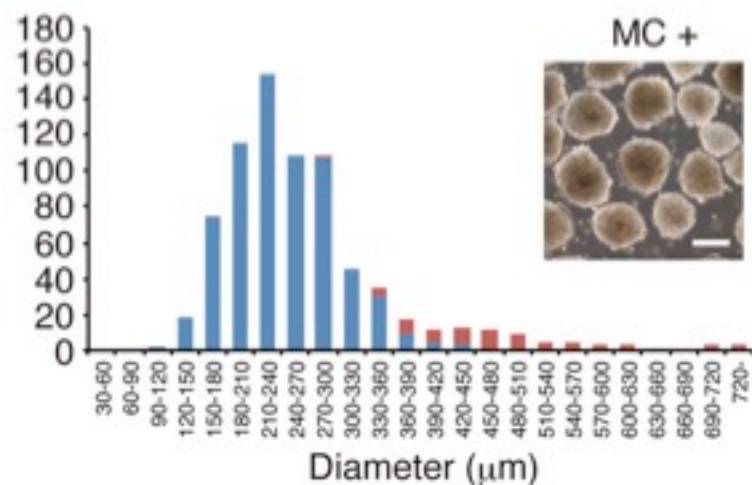
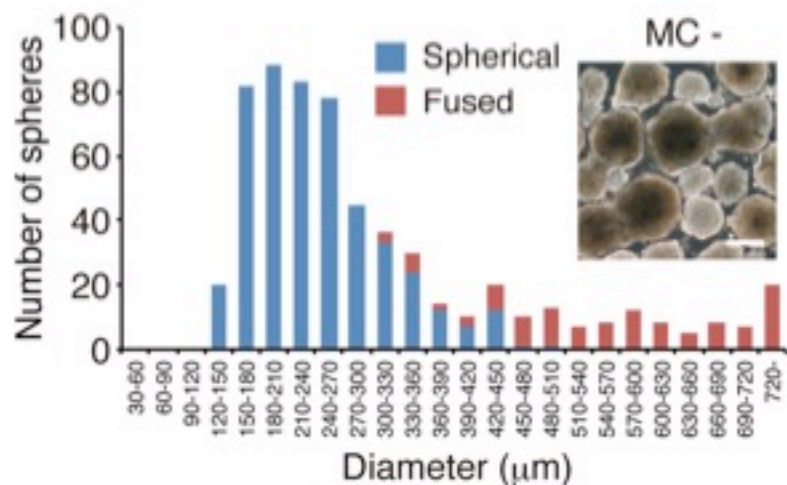
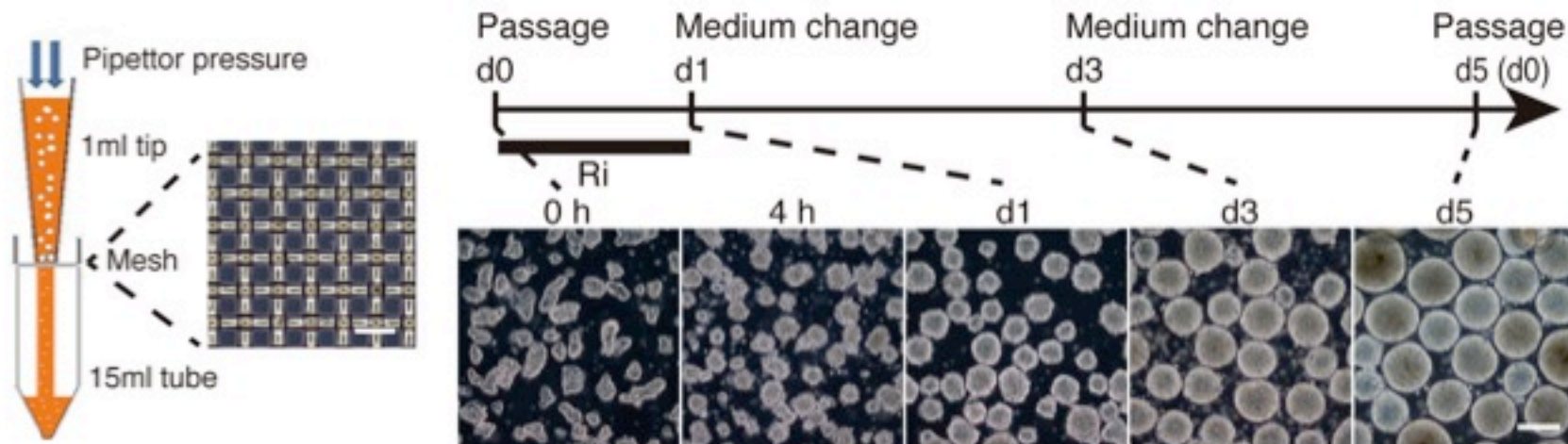
Laminin断片 (接着基質)

培地1Lの価格: 10800円 (各成分の購入価格の合計)

基質10cm²の価格: 270円 (研究用) ~ 430円 (医療用)

細胞外基質を使用しない三次元浮遊培養システムに適した培地の開発

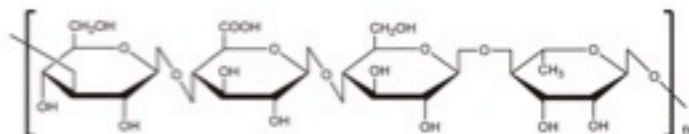
京大・中辻研と日産化学が開発したスフェア培養システム



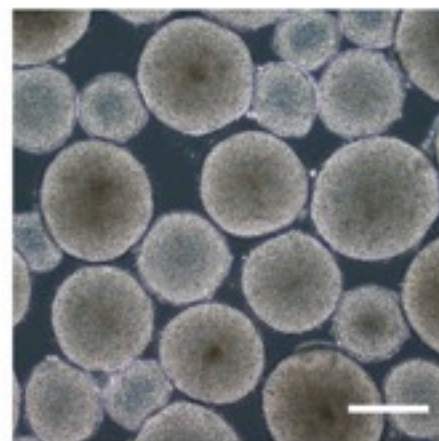
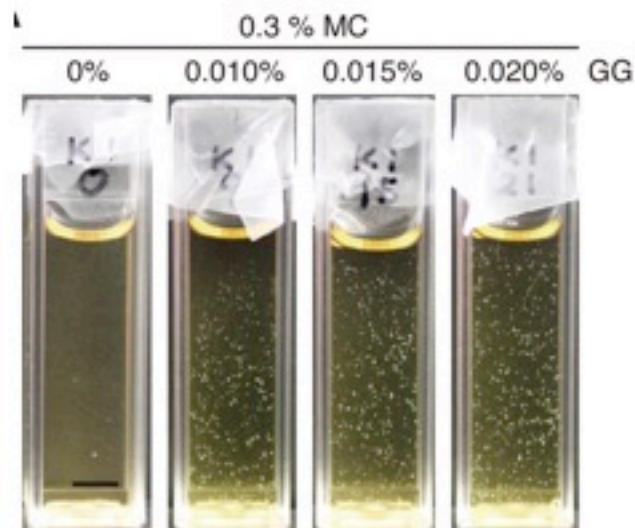
メッシュフィルターを通す継代法で均一な細胞塊を作製
メチルセルロース(MC)の添加により均一なスフェアによる拡大培養

京大・中辻研と日産化学が開発した3次元スフェア培養システム ～攪拌操作なしでの浮遊培養システム～

Low-Acyl Gellan Gum (GG) polymer



[D-Glc(β1→4)D-GlcA(β1→4)D-Glc(β1→4)L-Rha(α1→3)]_n



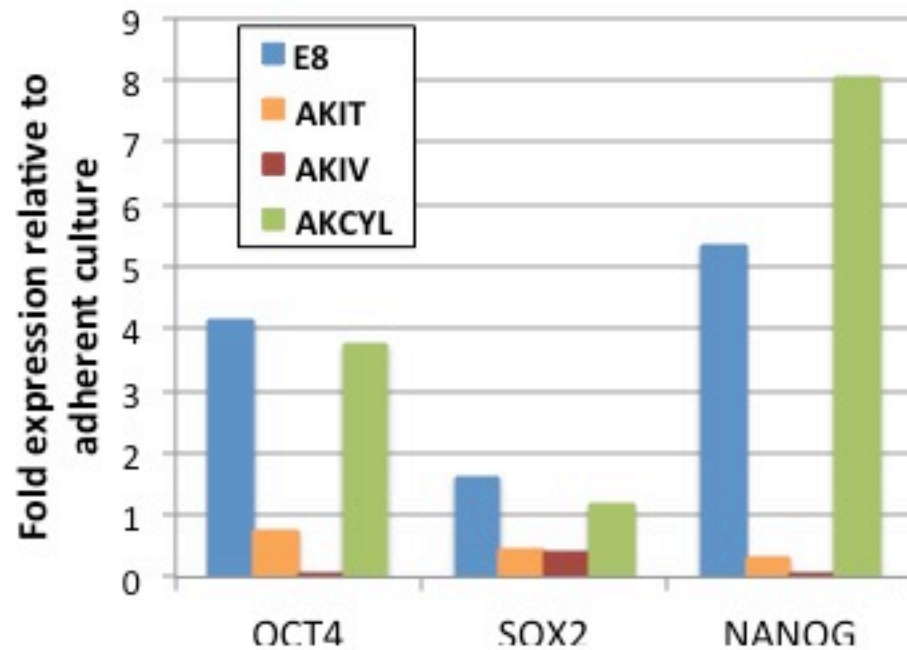
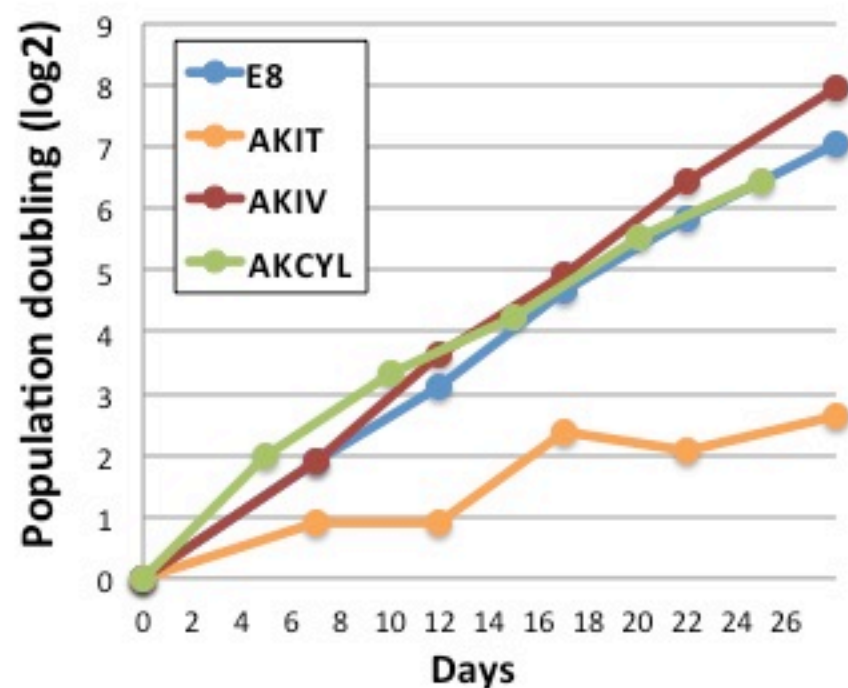
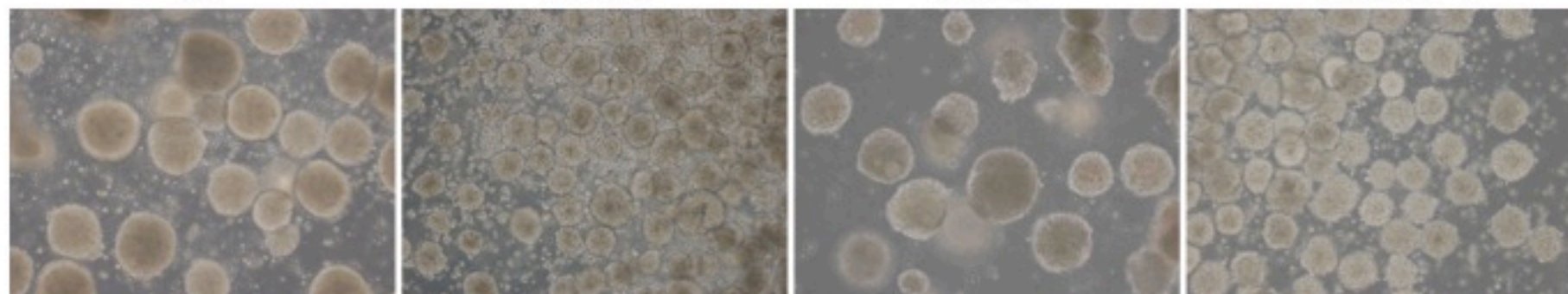
3次元スフェア浮遊培養システムに適した合成培地の開発

E8

AKIT

AKIV

AKCYL



無フィーダーのヒトES/iPS細胞の培養システムとその添加物の比較

最もスタンダードなxeno- & feeder-free培地 (TeSR培地など) (2006年、アメリカ) Ludwig TE et al. Nature Biotech. (2006)

血清置換物

高濃度のbFGF

高濃度のActivin/Nodal

他の成長因子

Matrigel等 (接着基質)

1Lの価格: 92000円 (研究用) ~ 132000円 (医療用) (販売価格)

基質10cm²の価格: 100円 (研究用)

最もシンプルなスタンダード培地 (E8培地) (2011年、アメリカ) Chen G et al. Nature Methods (2011)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

Nodal/TGF β

Vitronectin断片 (接着基質)

1Lの価格: 49000円 (研究用) (販売価格) (医療用の価格は1.2~1.4倍程度?) 基質10cm²の価格: 60円 (研究用) ~ 300円 (医療用)

日本ではスタンダードとなりつつある培地 (StemFit培地) (2014年、日本) Nakagawa M et al. Sci Rep (2014)

インスリン・トランスフェリン

高濃度のbFGF

TGF β

アルブミン

Laminin断片 (接着基質)

1Lの価格: 70000円 (研究用) ~ 90000円 (医療用) (販売価格)

基質10cm²の価格: 270円 (研究用) ~ 430円 (医療用)

開発した安価で成長因子を含まない培地 (AKIT培地) (2018年、日本) Yasuda S et al. Nature Biomed Eng (2018)

インスリン・トランスフェリン

GSK3阻害剤

DYRK阻害剤

NFATc阻害剤

Laminin断片 (接着基質)

培地1Lの価格: 8000円 (各成分の購入価格の合計)

基質10cm²の価格: 270円 (研究用) ~ 430円 (医療用)

開発した安価で成長因子・トランスフェリンを含まず、増殖の良い培地 (AKIV培地) 未発表

インスリン

GSK3阻害剤

DYRK阻害剤

化合物5種

Laminin断片 (接着基質)

培地1Lの価格: 10800円 (各成分の購入価格の合計)

基質10cm²の価格: 270円 (研究用) ~ 430円 (医療用)

開発した安価で成長因子・トランスフェリンを含まず、3次元浮遊培養用培地 (AKCYL培地) 未発表

インスリン

GSK3阻害剤2種

化合物2種

(Gellan gum) (Methylcellulose)

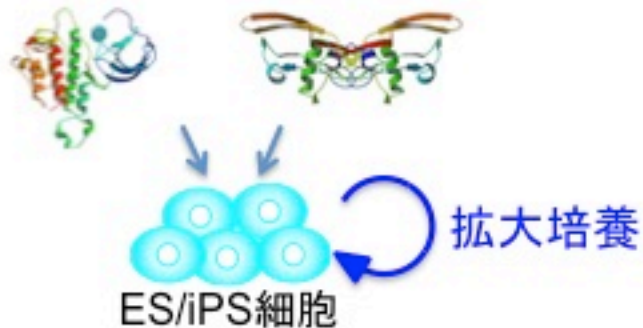
培地1Lの価格: 約9000円 (各成分の購入価格の合計)

富士フィルムにおいて、自動浮遊培養装置による大量培養を実施中

まとめ

これまでの培養システム

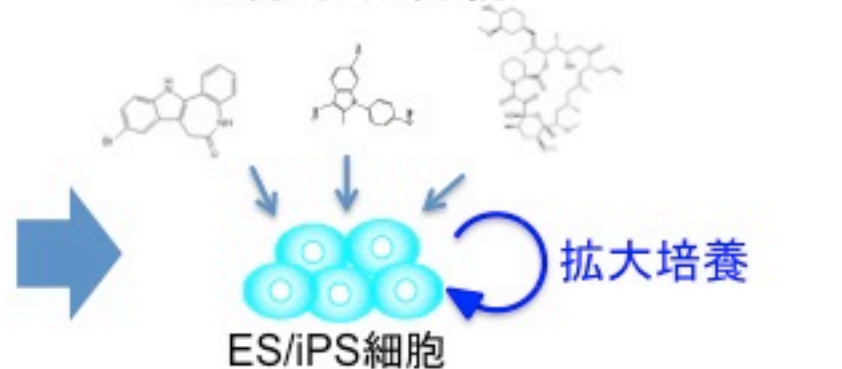
成長因子タンパク質



細胞外基質タンパク質

開発した培地を用いた培養システム

小分子化合物



ポリマー

謝辞

Lab member:

吉田則子
安田晋也
池田達彦

Hosein Shahsavarani
Neha Vartak
Bhavana Nayar
Sushrut Dahoke



Collaborators:

京都大学
中辻憲男
末盛博文

The University of Melbourne
Martin F Pera
Christine Wells

University of Southern California
Michael Khan

大阪大学
樋口雄介

Funding Support:

Japan Agency for Medical Research and Development (AMED), Japan



New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO), Japan



Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Japan



Department of Biotechnology (DBT), India



California Institute for Regenerative Medicine (CIRM), USA

