

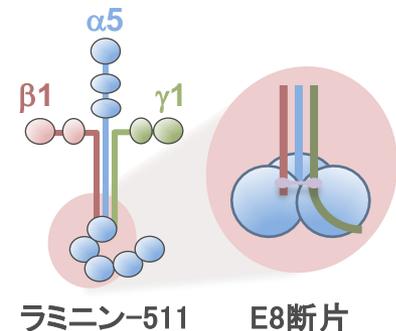
再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発の成果報告
～再生医療等製品および周辺産業の発展に向けて～
平成30年12月21日（金） 伊藤謝恩ホール

再生医療用幹細胞培養基材の開発

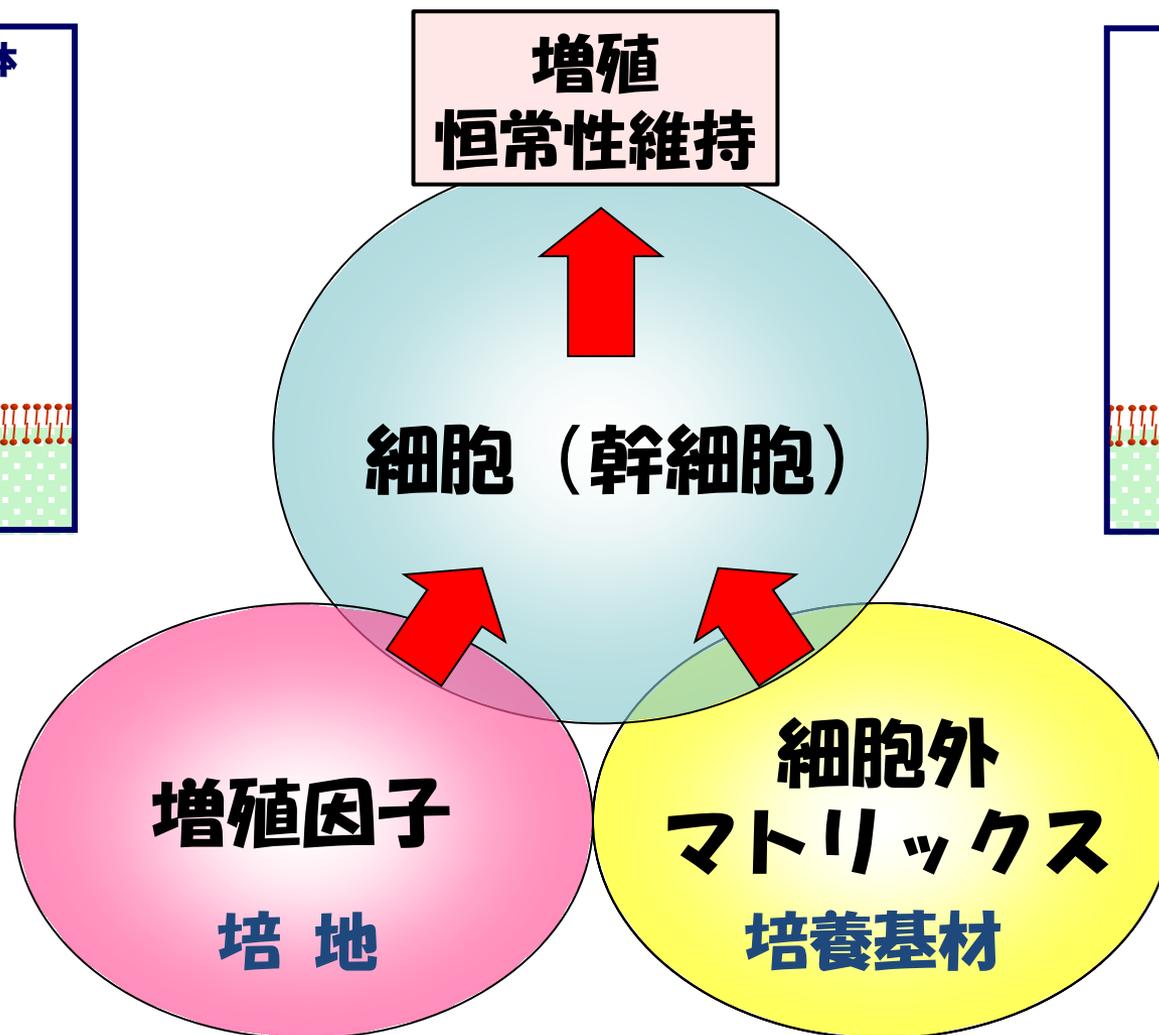
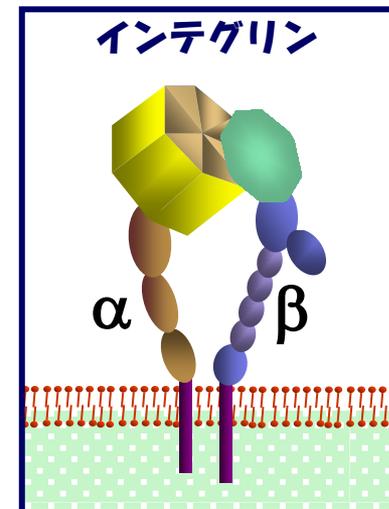
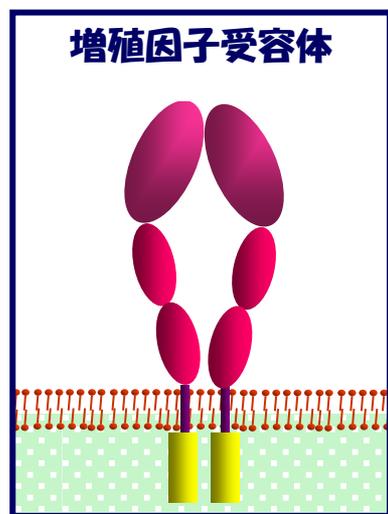
～自動培養装置への実装に向けて～

大阪大学 蛋白質研究所

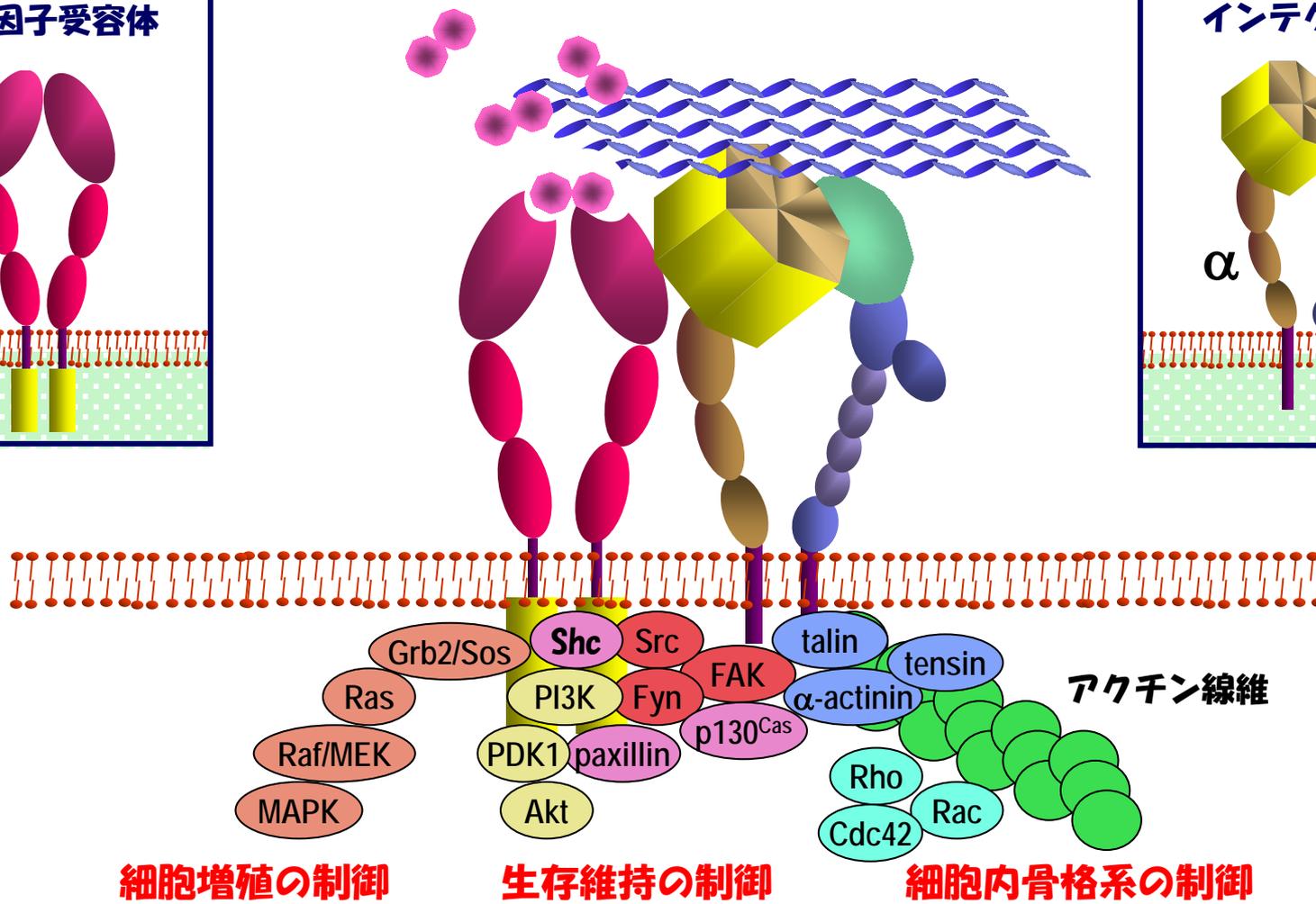
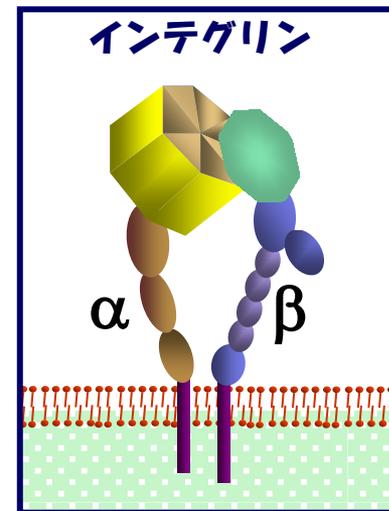
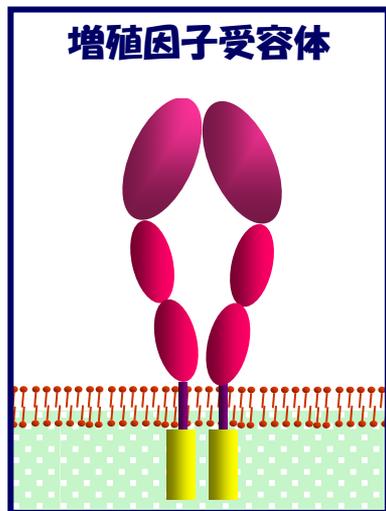
関口 清俊



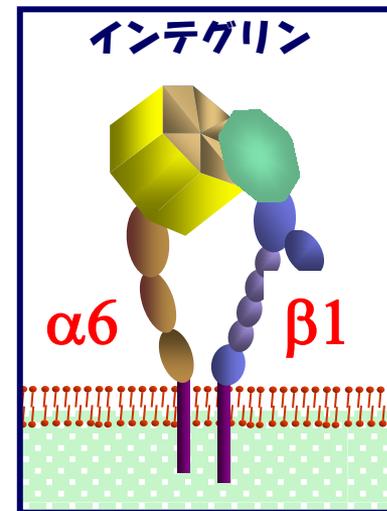
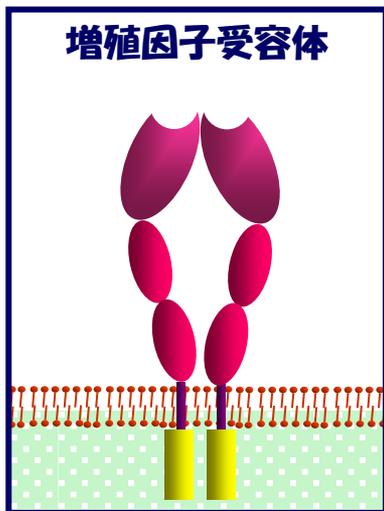
幹細胞の培養における足場（細胞外マトリックス）の重要性



幹細胞の培養における足場（細胞外マトリックス）の重要性



多能性幹細胞を培養するための最適な足場（培養基材）は何か



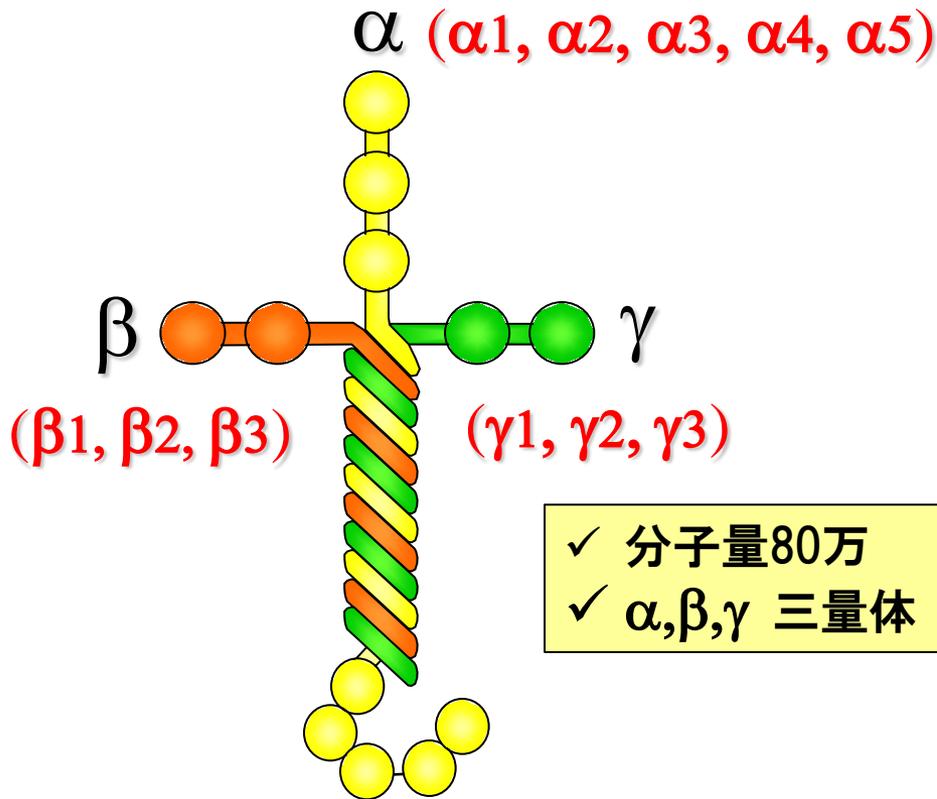
基底膜ラミニンの受容体
ラミニン⁵¹¹

“インテグリン $\alpha 6\beta 1$ ”
ヒト多能性幹細胞

増殖因子
培地

細胞外
マトリックス
培養基材

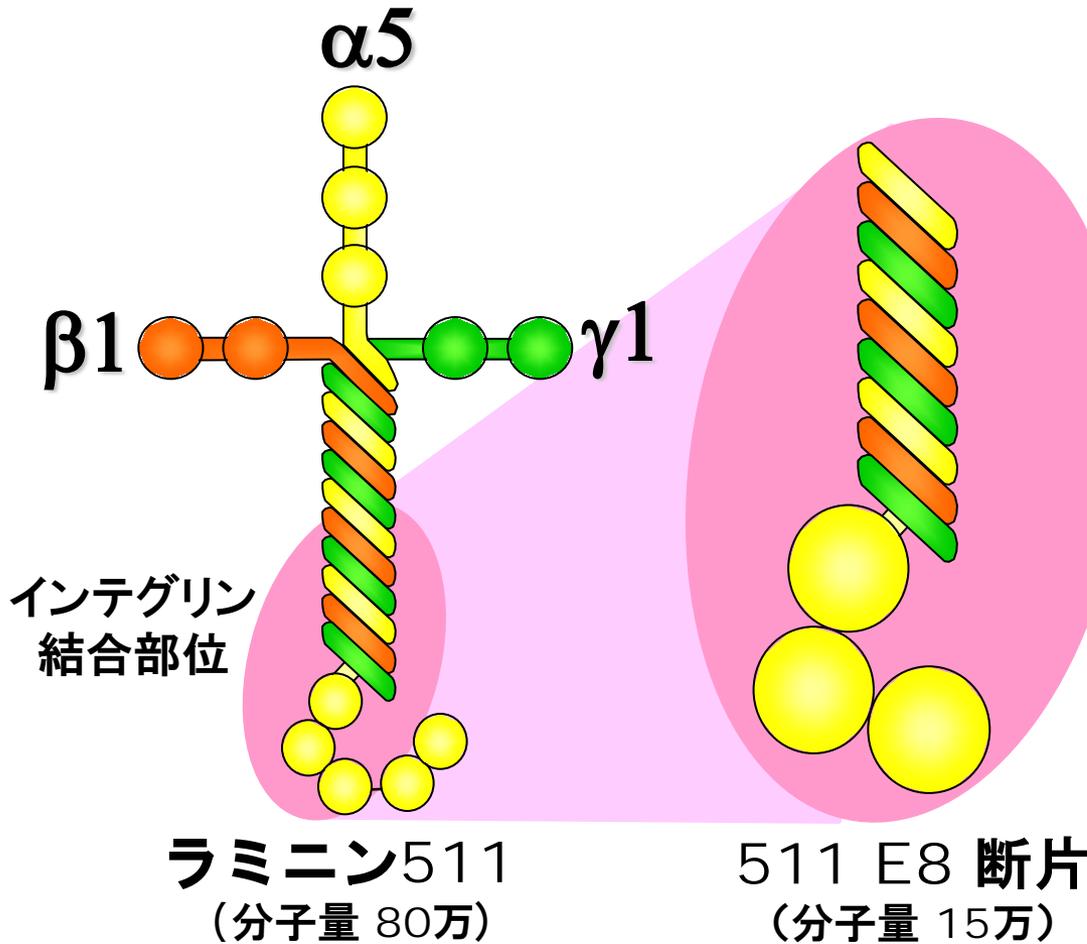
基底膜の主要構成分子 ラミニン



	α	β	γ
Laminin-111	α1	β1	γ1
Laminin-211	α2	β1	γ1
Laminin-121	α1	β2	γ1
Laminin-221	α2	β2	γ1
Laminin-332	α3	β3	γ2
Laminin-311	α3	β1	γ1
Laminin-321	α3	β2	γ1
Laminin-411	α4	β1	γ1
Laminin-421	α4	β2	γ1
Laminin-511	α5	β1	γ1
Laminin-521	α5	β2	γ1
Laminin-213	α2	β1	γ3

- ラミニン511は初期胚の多能性幹細胞の生理的な足場である
- ラミニン511はインテグリン $\alpha_6\beta_1$ の最も高親和性のリガンドである

ラミニン511のインテグリン結合部位：511 “E8” 断片



- ラミニン511のインテグリン結合活性をほぼ100%保持

Ido et al. *J Biol Chem*, 2007

Ido et al. *J Biol Chem*, 2008

Taniguchi et al. *J Biol Chem*, 2009

Taniguchi et al. *BBRC*, 2017

Takizawa et al. *Sci Adv*, 2017

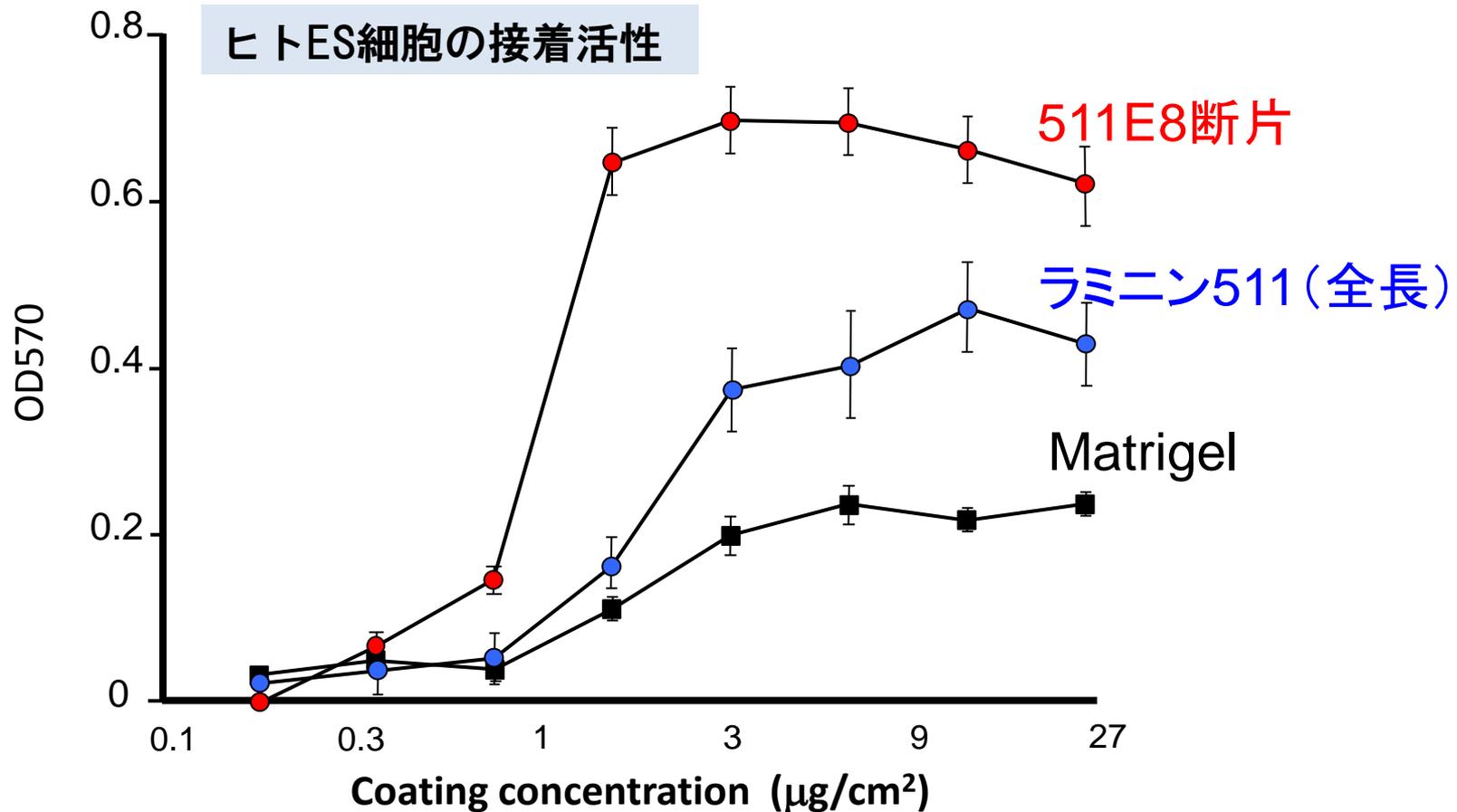
- 組換え蛋白質の収量が格段に向上
(大量調製が容易)

- 培養器にコーティングしたとき、
全長ラミニン511よりも細胞接着活性が強い

Miyazaki et al. *Nat Commun*, 2012

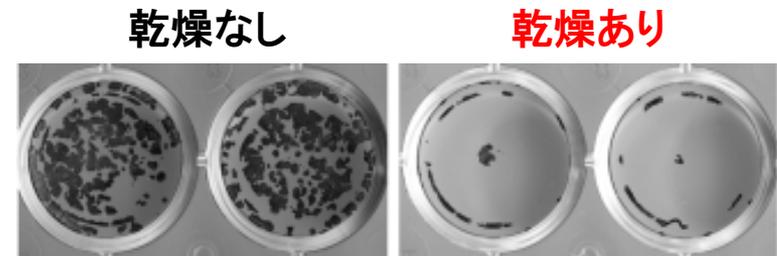
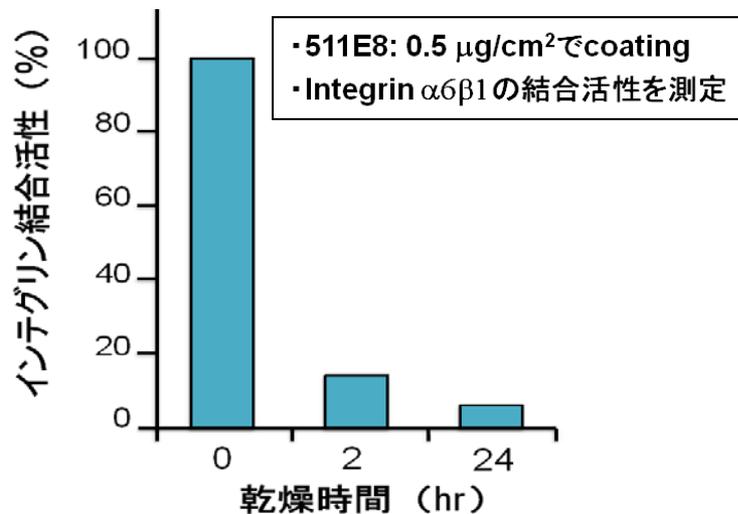
511E8断片は全長ラミニン511よりも細胞接着活性が強い

ヒトES/iPS細胞を他の株化細胞と同じように単一細胞分散で継代可能



ラミニン511E8断片の課題：自動培養装置への実装に向けて

課題その① コーティング後に乾燥させると失活する



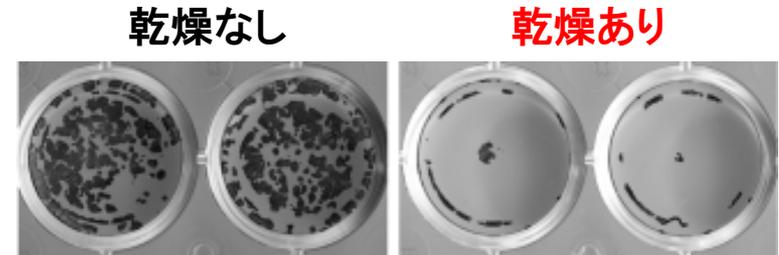
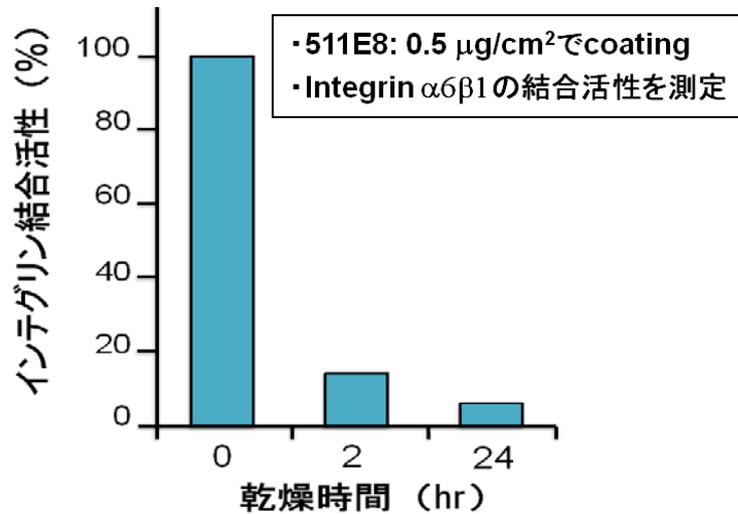
・511E8: 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ でcoating
・24 h乾燥後、ヒトiPS細胞を播種して、7日間培養

➡ コーティングは用事調製が原則(作り置きができない)

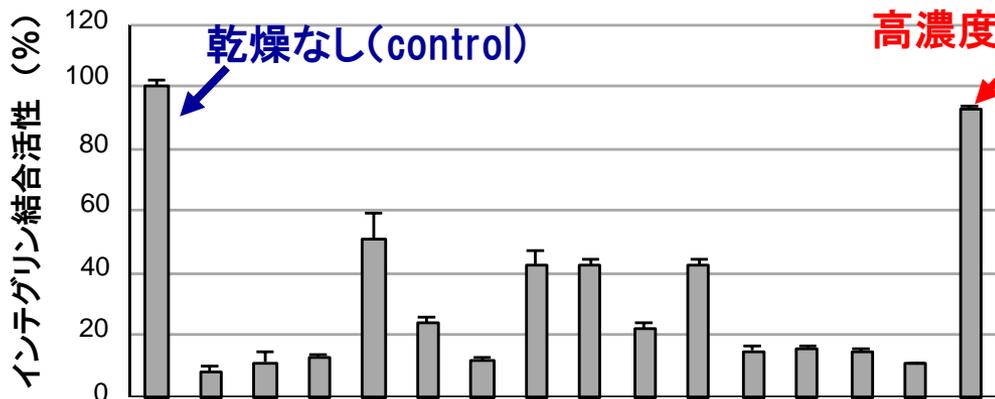
【対策】 乾燥による失活を抑制する安定化剤の探索

ラミニン511E8断片の課題：自動培養装置への実装に向けて

課題その① コーティング後に乾燥すると速やかに失活する



・511E8: 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ でcoating
・24 h乾燥後、ヒトiPS細胞を播種して、7日間培養



アルブミン
無添加



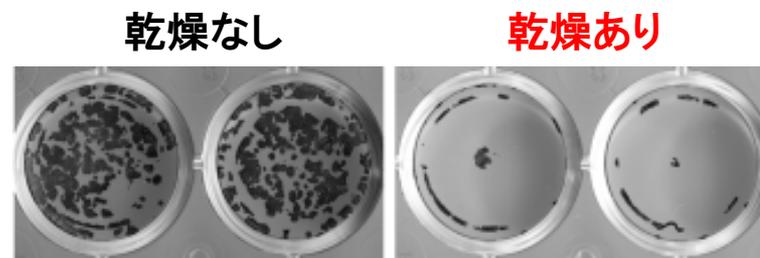
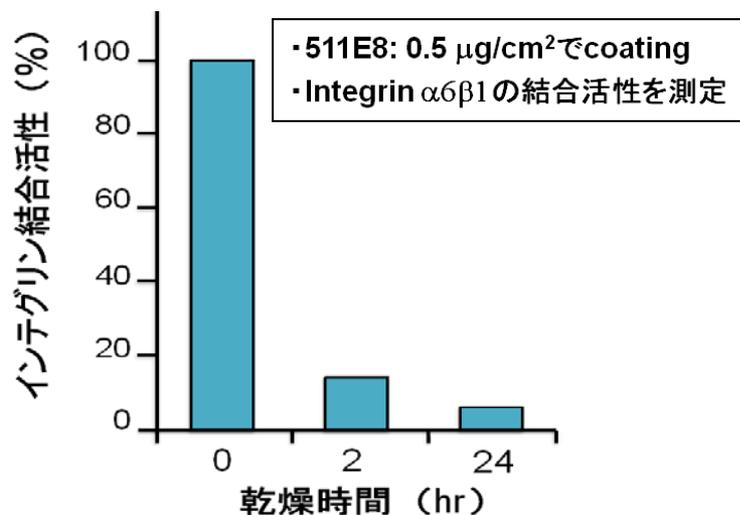
アルブミン
0.5 mg/mL



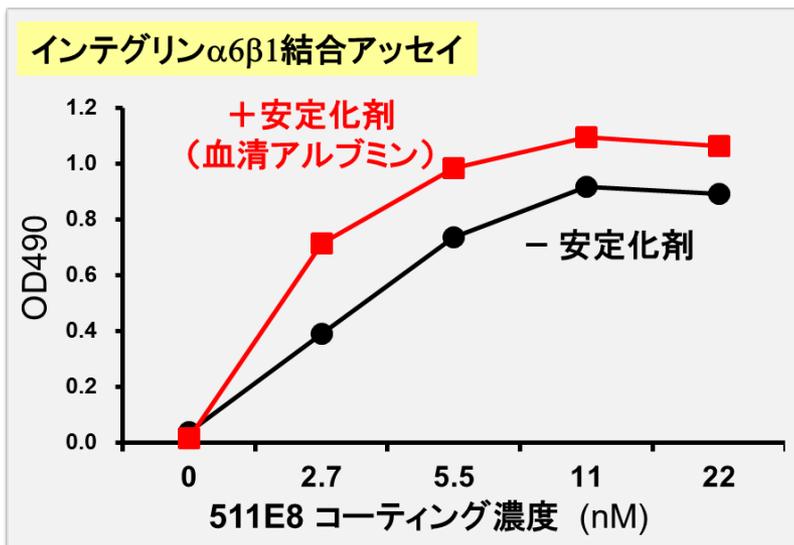
*乾燥後、1年間4°Cで保管

ラミニン511E8断片の課題：自動培養装置への実装に向けて

課題その① コーティング後に乾燥すると速やかに失活する



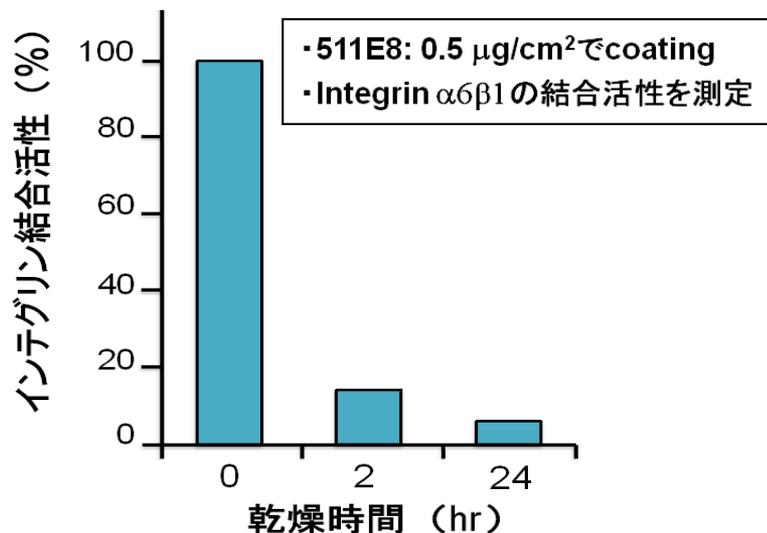
・511E8: 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ でcoating
・24 h乾燥後、ヒトiPS細胞を播種して、7日間培養



- 高濃度の血清アルブミンを添加してコーティングすると、インテグリン活性が有意に増加する
- この添加効果は全長ラミニンでは認められず、511E8断片に特徴的な性質である

ラミニン511E8断片の課題：自動培養装置への実装に向けて

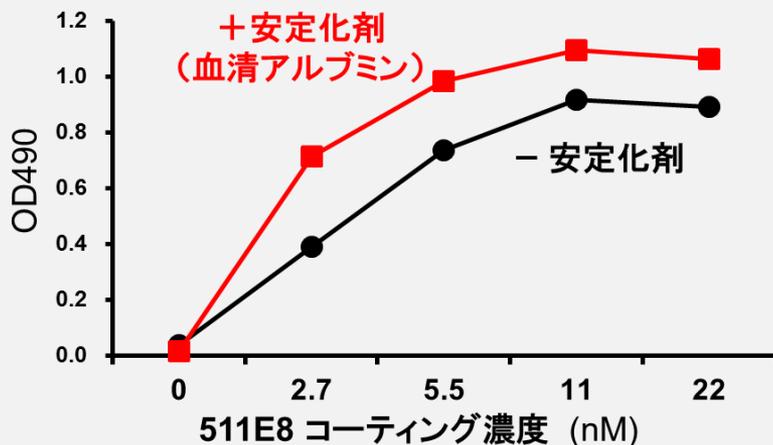
課題その① コーティング後に乾燥すると速やかに失活する



Quick iMatrix-511 “プレコートディッシュ”
(平成29年5月販売開始)



インテグリン $\alpha6\beta1$ 結合アッセイ



Easy iMatrix-511

“1×コーティング液”
(平成29年4月販売開始)

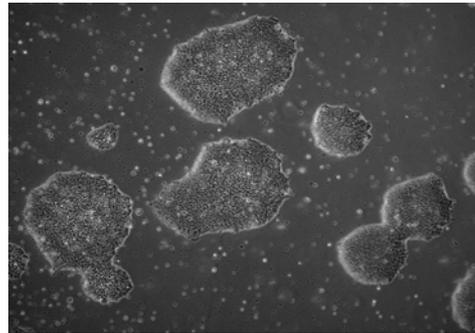


ラミニン511E8断片の課題：自動培養装置への実装に向けて

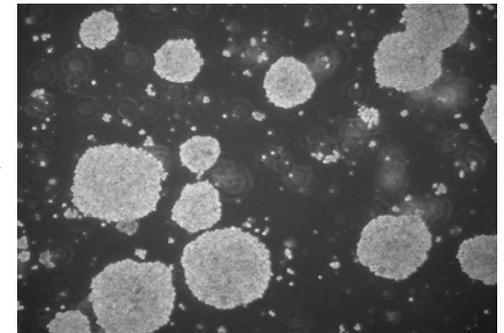
課題その② 接着力が強すぎ、細胞剥離にスクレーパー操作が必要

- コーティング: 511E8 (0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
- 409B2細胞、1週間培養
- 剥離条件: TrypLE/0.5 mM EDTA, 37°C×10分

剥離処理前

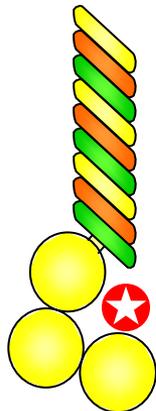


剥離処理後

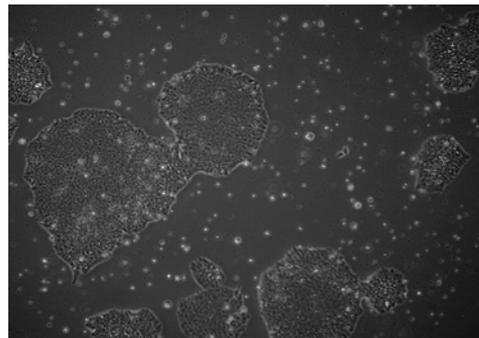


【対策】強い接着力は保持しつつ、細胞剥離が容易な培養基質の開発

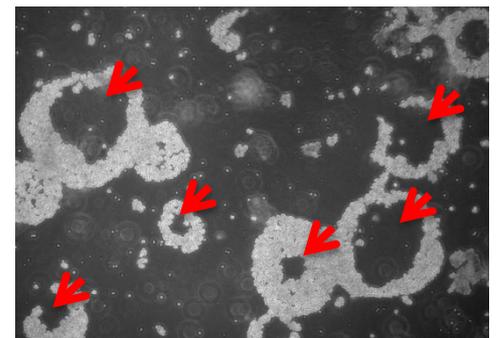
⇒ラミニン511E8改変体



剥離処理前



剥離処理後



ラミニン511E8断片の課題：自動培養装置への実装に向けて

課題その② 接着力が強すぎ、細胞剥離にスクレーパー操作が必要

⇒細胞剥離が容易なラミニン511E8改変体の開発

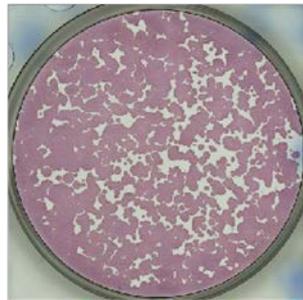
【5継代後】

AP染色

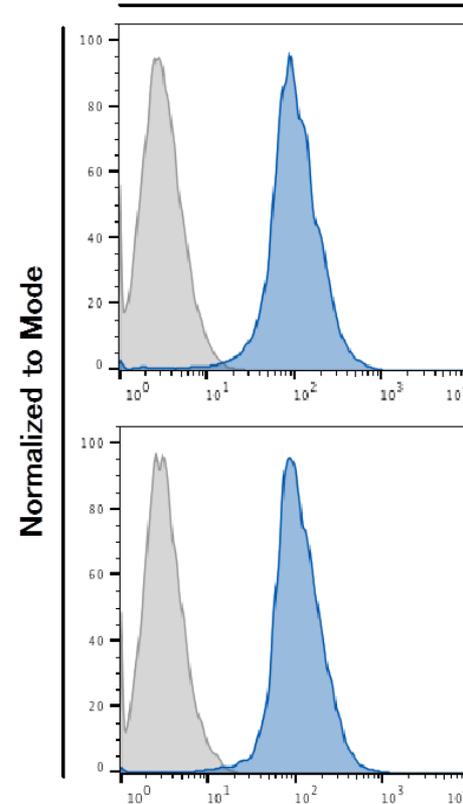
従来型



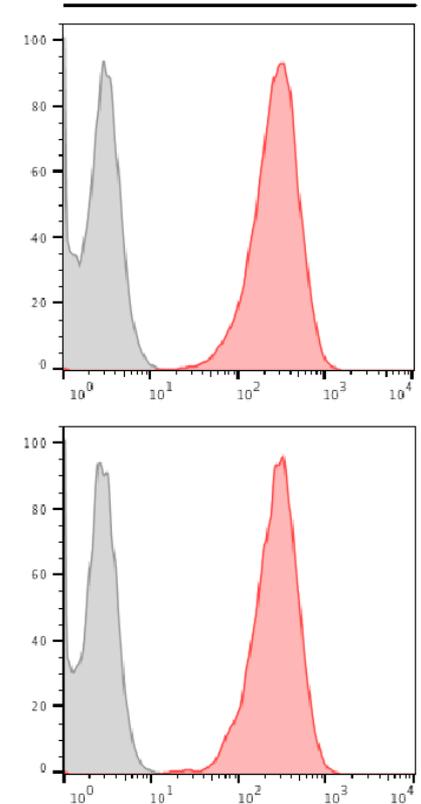
改変型



OCT-3/4



SSEA-4



ラミニン511E8断片の課題：自動培養装置への実装に向けて

課題その① コーティング後に乾燥すると失活する



“1×コーティング液”

乾燥による失活を抑制し、コーティング後の
活性が増強される安定化技術の開発

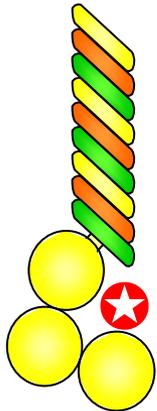
“プレコートディッシュ”



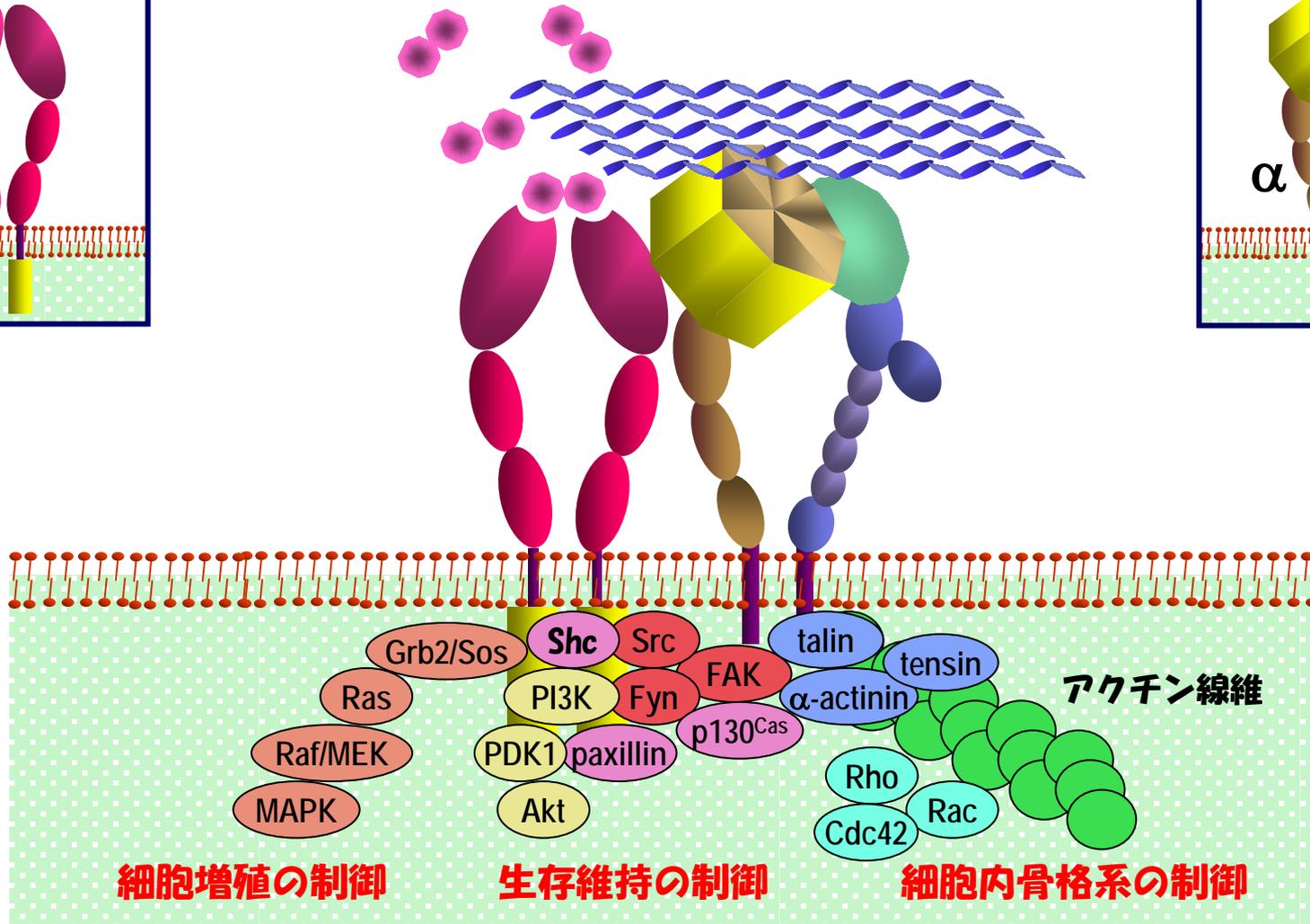
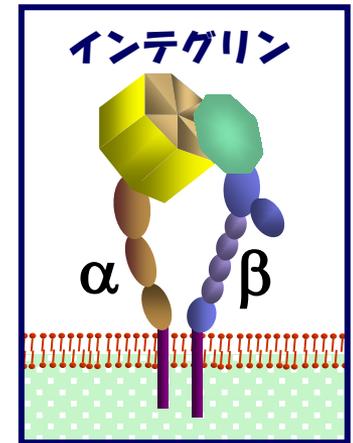
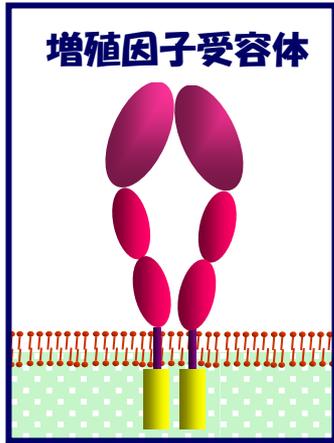
課題その② 接着力が強く、細胞剥離にスクレーパー操作が必要



強い接着力は保持しつつ、細胞剥離が容易なE8改変体を創製

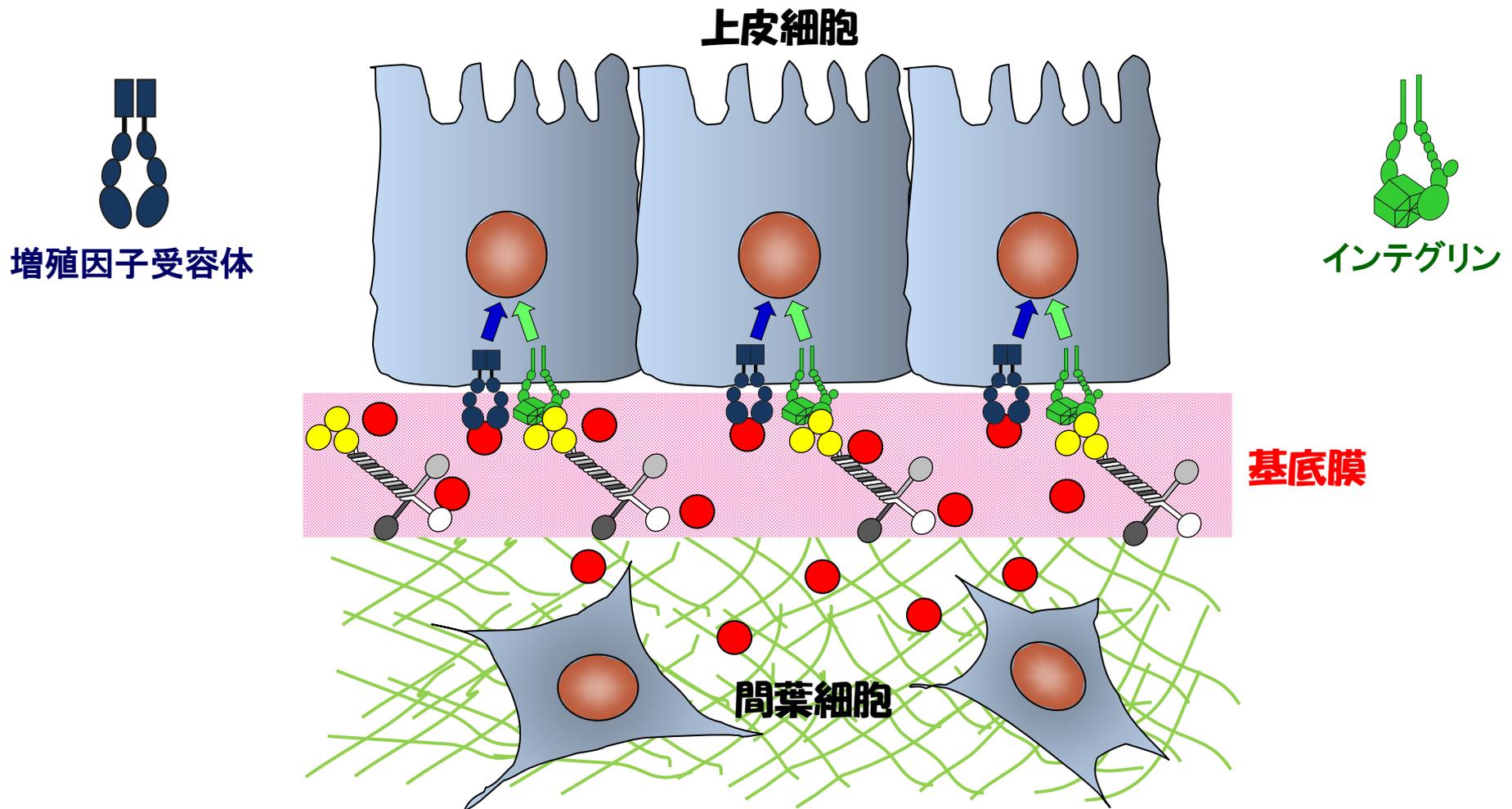


増殖因子シグナルとマトリックスシグナルを統合入力する 次世代型ラミニンE8断片の開発

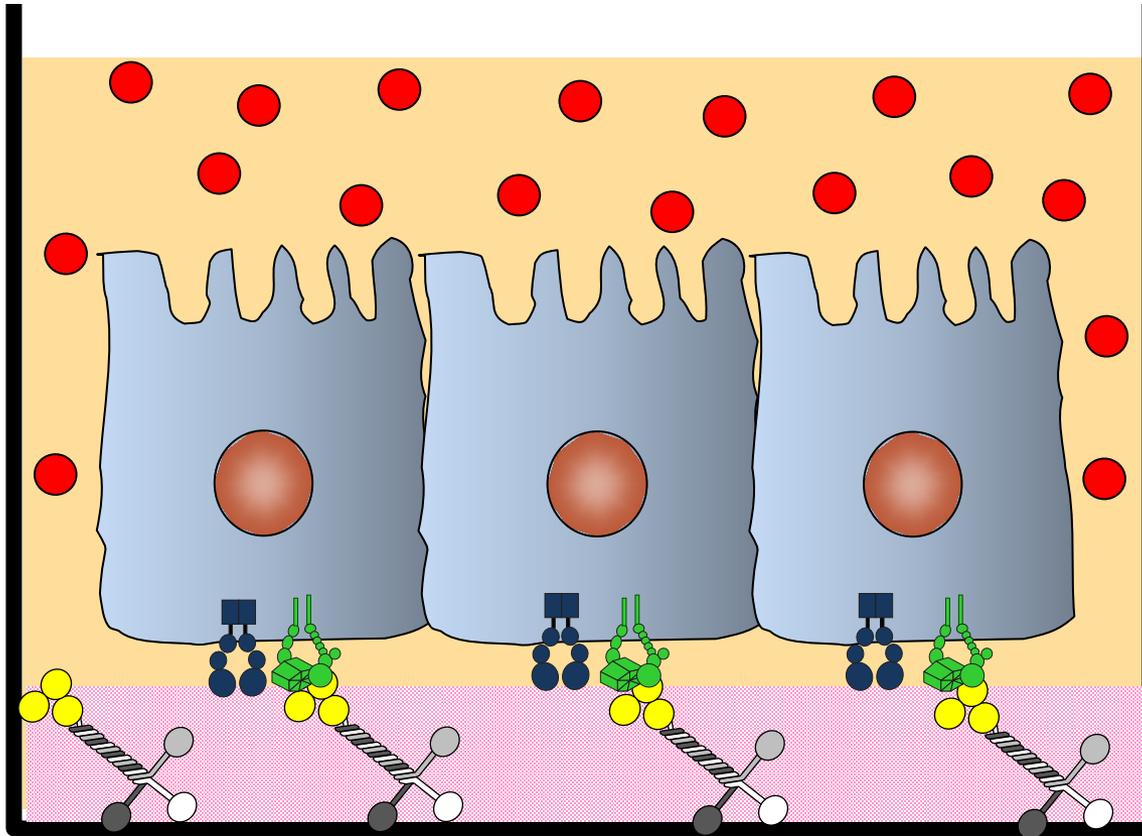


増殖因子シグナルとマトリックスシグナルを統合入力する 次世代型ラミニンE8断片の開発

基底膜に接着した細胞: 増殖因子シグナルとマトリックスシグナルは
基底側から協調的に入力される



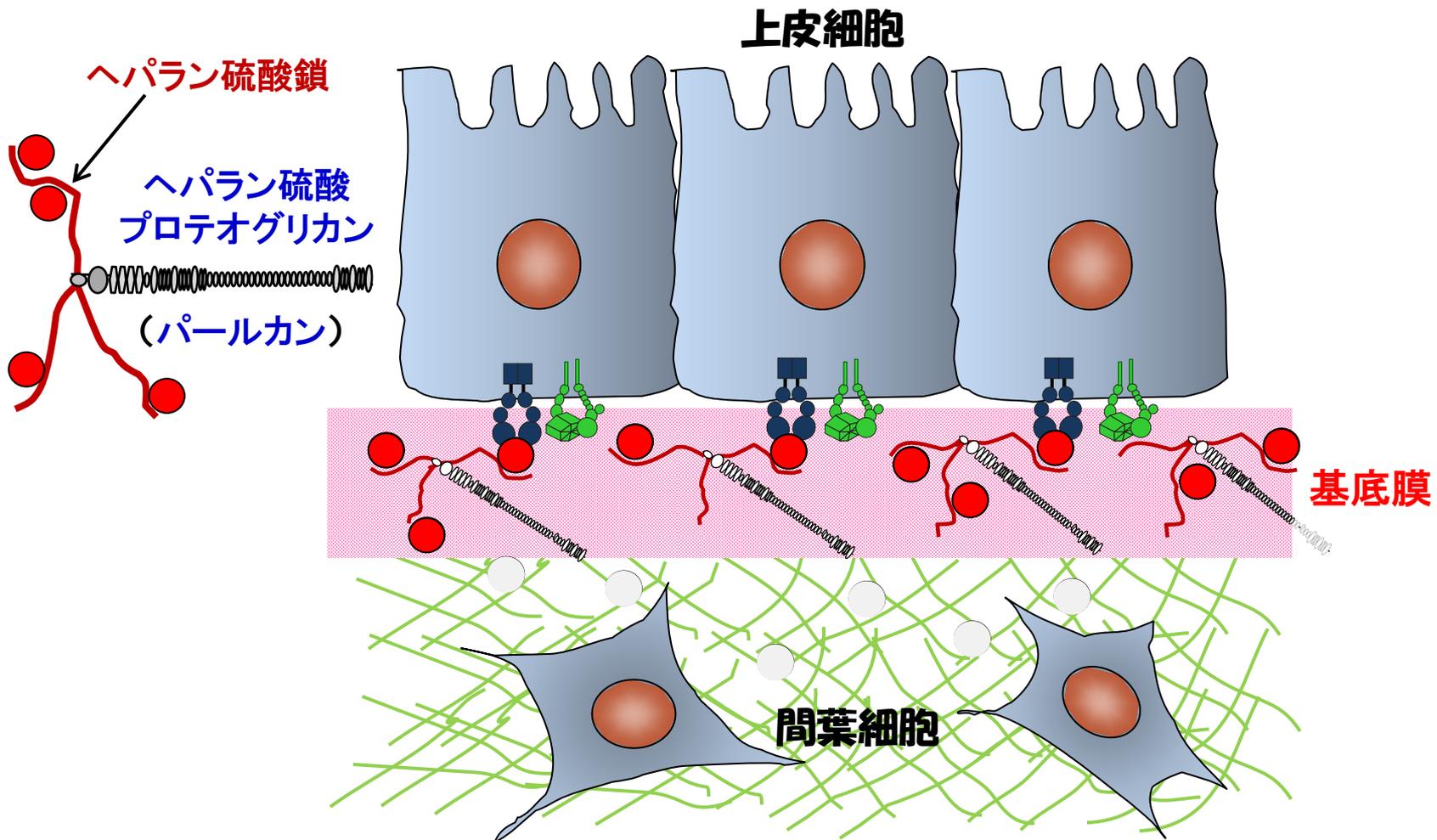
増殖因子シグナルとマトリックスシグナルを統合入力する 次世代型ラミニンE8断片の開発



基底側で待機している増殖因子受容体は十分な増殖因子を受け取ることができない

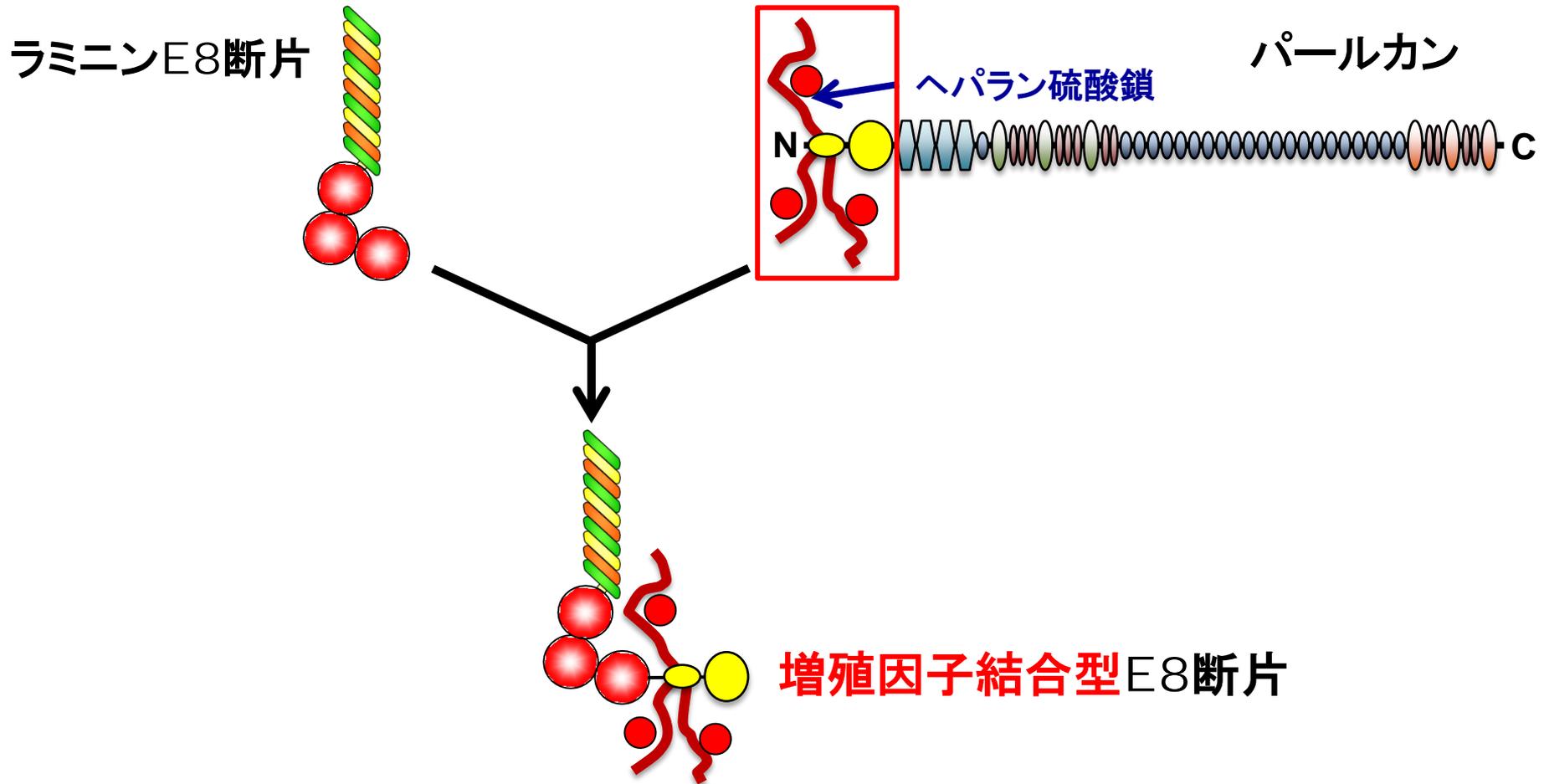
増殖因子シグナルとマトリックスシグナルを統合入力する 次世代型ラミニンE8断片の開発

基底膜の主要成分ヘパラン硫酸プロテオグリカン(パールカン)は増殖因子を捕捉する



増殖因子シグナルとマトリックスシグナルを統合入力する 次世代型ラミニンE8断片の開発

へパン硫酸鎖を担持させた増殖因子結合型ラミニンE8断片の開発
～パールカンとラミニンE8断片のキメラ分子の創製～



増殖因子シグナルとマトリックスシグナルを統合入力する 次世代型ラミニンE8断片の開発

インテグリンシグナルと増殖因子シグナルが協調して入力される培養環境

