

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：幹細胞培養用基材の開発
2. 研究開発代表者：関口 清俊（大阪大学蛋白質研究所）
3. 研究開発の成果

iPS 細胞研究中核拠点および疾患・組織別実用化研究拠点との緊密な連携のもと、医療用ヒト iPS 細胞の樹立、培養・増幅、分化誘導に有用なフィーダーフリー培養基材の開発と事業化を目的とし、以下の3項目について研究開発を進めた。

①ヒト iPS 細胞培養用 511E8 フラグメントの製造および活性評価

PMDA から求められた安全性試験を実施し、生物由来原料基準に適合した臨床グレードのヒト iPS 細胞培養用基材 511E8 フラグメントの製造・販売を分担機関の（株）ニッピが開始した（商品名：iMatrix511MG）。またヒト 293 細胞を用いて 511E8 フラグメントを調製し、同様に調製した他のラミニンアイソフォームの E8 フラグメントと組み合わせた“ラミニンパネル”を作製した。このラミニンパネルを用いて、様々な細胞への分化誘導に好適な培養基材を各拠点と共同して検索した（③参照）。

②細胞シート作製用コラーゲン結合性 CBD-511E8 フラグメントの製造および活性評価

iPS 細胞から分化誘導した細胞（網膜色素上皮細胞など）を CBD-511E8 フラグメントを担持させたコラーゲンゲル上で培養すると、対照のコラーゲンゲル上で培養した細胞よりも細胞シートの極性化が早まるとともに、シート形成が安定化されることを見出した（理化学研究所および株式会社ヘリオスとの共同研究）。また、CBD-511E8 フラグメントの活性をコラーゲンコートプレート上でのインテグリン結合活性を指標として定量的に評価する方法を確立した。

③ラミニン 511 以外のアイソフォームの E8 フラグメントの製造および活性評価

昨年度までの研究から血管内皮細胞への分化誘導にはラミニン 411E8 フラグメントが有効であり、心筋細胞の純化・濃縮にはラミニン 211/221E8 フラグメントが有効であることが明らかとなっている。これらの E8 フラグメントを生物由来原料基準に適合した組換え蛋白質として製造し、速やかに再生医療で利用できるようにするため、これらフラグメントを安定に高発現する CHO 細胞（cGMP 規格）のクローンの取得を進めた。411E8 フラグメントについては目標値を超える発現量を示すクローンの取得に成功し、試験製造を分担機関の（株）ニッピで行った。また、CHO 細胞への遺伝子導入法を改良し、高発現クローンが従来法よりも短時間で取得できるようになった。

これと並行して iPS 細胞の分化誘導に有効なラミニン E8 フラグメントの探索を各拠点と連携して進めた。具体的には、ラミニンパネルを用い、中胚葉・巨核球細胞への分化誘導に有効な基材、骨格筋細胞への分化誘導に有効な基材（以上、京都大学 iPS 細胞研究所との共同研究）、眼組織細胞、胆管細胞への分化誘導に有効な基材（以上、大阪大学医学系研究科および薬学研究科との共同研究）を探索し、それぞれの分化誘導系で有効なラミニン E8 フラグメントを特定した。また、生体から分離した骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）の培養・増幅に適したラミニン E8 の組み合わせを特定した（東京医科歯科大学との共同研究）。