

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,  
Projects for Technological Development

研究開発課題名： (日本語) 幹細胞培養用基材の開発  
(英語) Development of culture substrates for pluripotent stem cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 蛋白質研究所 教授 関口 清俊  
所属 役職 氏名： (英語) Institute for Protein Research, Osaka University  
Professor, Kiyotoshi Sekiguchi

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)  
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

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を進めている。平成 28 年度は、コラーゲン結合性ラミニン E8 フラグメント（CBD-E8 フラグメント）の有用性の検証、およびヒト iPS 細胞の分化誘導に有用なラミニン E8 フラグメントの製造および活性評価に取り組み、以下の成果を得た。

CBD-E8 フラグメントを担持させたコラーゲンゲル（CBD-E8/コラーゲンゲル）上でヒト iPS 細胞を培養し、マトリゲル上で培養した場合と比較検討した。CBD-E8/コラーゲンゲル上で培養した iPS 細胞はアルカリホスファターゼで強染される球状のコロニーを生じたが、マトリゲル上では網目状に連結された不定形のコロニーを生じ、アルカリホスファターゼの染色性も CBD-E8/コラーゲンゲルより低下していた。また、CBD-E8/コラーゲンゲル上で生じた球状コロニーの内部には腔ができており、腔周囲の細胞は初期胚のエピブラストを連想させる形態を有していた。これらの結果は CBD-E8/コラーゲンゲルがマトリゲルとは異なる活性を有する新たな幹細胞用三次元培養基材として利用可能であることを示している。なお、分担機関の（株）ニッピでは、CBD-511E8 フラグメントを安定発現する CHO 細胞株のラージスケール培養を実施して、CBD-511E8 フラグメントを大量製造する態勢を整えた。

ヒト iPS 細胞の分化誘導用基材として既に有用性が確認されたラミニン 121E8（中胚葉・巨核球分化誘導に有効：京都大学 iPS 細胞研究所・江藤浩之教授との共同研究の成果）、ラミニン 211E8/221E8（心筋細胞の純化に有効：大阪大学大学院医学研究科・澤芳樹教授との共同研究の成果）、ラミニン 411E8（血管内皮細胞の分化誘導に有効：京都大学 iPS 細胞研究所・中畑龍俊教授、斎藤潤准教授との共同研究の成果）に加えて、角膜上皮細胞の分化誘導にラミニン 332E8 が有効であることを大阪大学医学研究科・西田幸二教授との共同研究により明らかにした。また、東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科・赤澤智宏教授との共同研究により、複数のラミニン E8 フラグメントを組み合わせた筋衛星細胞の培養プロトコルを策定するとともに、京都大学 iPS 細胞研究所の桜井英俊准教授と共同して、iPS 細胞から効率よく骨格筋幹細胞を分化誘導する新規ラミニン E8 フラグメントを同定した。これらの成果を踏まえて、ラミニン 121E8、221E8、332E8 をそれぞれ安定に高発現する cGMP 規格の CHO 細胞株を取得し、医療応用可能な組換えラミニン E8 フラグメントの製造に向けた態勢を整えた。ラミニン 411E8 および 511E8 については CHO 細胞安定発現株を取得済みであり、今年度の成果をもって“5 種類のラミニン E8 フラグメントを高発現する CHO 細胞クローンをすべて取得する”という開発終了時の達成目標を達成した。また、CHO 細胞安定発現株のクローニング法を改良し、従来よりも高効率かつ短時間でラミニン E8 安定発現細胞株を取得するプロトコルを策定した。

(英文概要)

We aimed to develop culture substrates optimized for establishment, cultivation and expansion, and directed differentiation of human iPS cells, particularly those for clinical use, through collaboration with the Centers participating in the Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine. We focused our efforts on (i) the development of collagen-based three-dimensional (3D) culture substrates using laminin fragments endowed with collagen binding activity, and (ii) verification of the advantage of various laminin fragments in directed iPS cell differentiation and isolation of CHO cell clones stably expressing laminin fragments. The major achievements are as follows.

Collagen gels endowed with the laminin's cell-adhesive activity (designated LM-E8/collagen gels) were assessed for their capability as culture substrates for human iPS cells, as compared with Matrigel, a widely used 3D culture substrates for stem cells. Cells grown on LM-E8/collagen gels yielded sphere-like colonies that were strongly positive for alkaline phosphatase activity and included lumen(s), the morphology reminiscent of early implanted embryos. In contrast, cells grown on Matrigel yielded colonies that were connected into mesh-like structures and only moderately positive for alkaline phosphatase activity. These results suggest that LM-E8/collagen gels may offer novel 3D culture substrates having an advantage over Matrigel. Nippi, Inc, the subsidiary institution of this project, performed large-scale culture of the CHO cell line expressing collagen-binding laminin E8 fragment and refined the protocols for purification of the recombinant fragment from the culture supernatants, thereby establishing the framework for large-scale production of the laminin fragment for commercialization.

In addition to the laminin E8 fragments that have been proven advantageous for directed differentiation of human iPS cells, i.e., 121E8 for differentiation into mesodermal cells and megakaryocytes, 221E8 for enrichment of iPS cell-derived cardiomyocytes, and 411E8 for differentiation into endothelial progenitors, we demonstrated that 332E8 facilitates the iPS cell differentiation into corneal epithelial cells (collaboration with Prof. Koji Nishida of Osaka University). We also found that a combinatorial use of laminin E8 fragments enhances the growth of Pax7-positive muscle satellite cells and established a protocol for efficient cultivation of muscle satellite cells (collaboration with Prof. Chihiro Akazawa of Tokyo Medical and Dental University). An efficient procedure for induction of muscle stem cells from iPS cells has also been elaborated using a modified laminin E8 fragment (collaboration with Prof. Hidetoshi Sakurai of Kyoto University). Given these achievements that validate the advantage of various laminin E8 fragments as culture substrates for directed differentiation, we isolated stable clones of cGMP-banked CHO cells that produce recombinant 121E8, 221E8, and 332E8 fragments, respectively, for large-scale production of these fragments that are compatible with the biological raw materials standards in Japan. Thus, we achieved one of the final goals of this project, i.e., "establishment of CHO cell clones each producing large-amount of recombinant laminin E8 fragment having distinct laminin alpha chains". We also improved the procedures for isolation of CHO cell clones stably expressing recombinant laminin E8 fragments.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Takayama K, Mitani S, Nagamoto Y, Sakurai F, Tachibana M, Taniguchi Y, Sekiguchi K, Mizuguchi H. Laminin 411 and 511 promote the cholangiocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 474, 91-6.
2. Ohta R, Niwa A, Taniguchi Y, Suzuki NM, Toga J, Yagi E, Saiki N, Nishinaka-Arai Y, Okada C, Watanabe A, Nakahata T, Sekiguchi K, Saito MK. Laminin-guided highly efficient endothelial commitment from human pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2016, 6, 35680.
3. Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, Sasamoto Y, Taniwaki Y, Takayanagi H, Tsujikawa M, Sekiguchi K, Quantock AJ, Nishida K. Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nat Protoc.* 2017, 12, 683-696.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Generation of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells under chemically defined condition for cell transplantation, ポスター, Takayama K, Hagihara Y, Sekiguchi K, Morio T, Ohara, O, Tachibana M, Sakurai F, and Mizuguchi H, International society for stem cell research 2016, 2016/6/22-25, 国外.
2. Untangling the complexity of the extracellular matrix: From the matrixome database to the innovation of stem cell technology, 口頭（マイスターレクチャー）, 関口清俊, 第48回日本結合組織学会学術大会, 2016/6/24-25, 国内.
3. New generation matrix supports efficient myogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells, 口頭, 趙明明, 関口清俊, 櫻井英俊, 第4回若手による骨格筋細胞研究会, 2016/11/14, 国内.
4. Untangling the complexity of the extracellular matrix: From the matrixome database to the innovation of stem cell technology, 口頭（招待講演）, Sekiguchi, K, Mini-Symposium on Extracellular Matrix and Stem Cells, 2016/11/28-29, 国外.
5. New generation matrix supports efficient myogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells, ポスター, 趙明明, 関口清俊, 櫻井英俊, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
6. 上皮間葉相互作用の場としての基底膜に着目した次世代培養基材の開発, 口頭（シンポジウム）, 関口清俊, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/9, 国内.
7. コラーゲン結合活性を付加したラミニン断片の作製：コラーゲン基質にラミニン様活性を与えるツールの開発, ポスター, 佐藤（西内）涼子, 李紹良, 戎富美, 関口清俊, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/9, 国内.

8. 急性心筋梗塞モデルラットにおける組織特異的細胞外基質と ONO1301 の投与による治療効果についての検討, ポスター, 寒川延子, 宮川繁, 福寫五月, 齋藤充弘, 原田明希摩, 増田茂夫, 小田(望月)紀子, 佐藤(西内)涼子, 関口清俊, 澤芳樹, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
9. 移植医療応用のためのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と品質評価, 口頭, 高山和雄, 秋田尚毅, 関口清俊, 森尾友宏, 小原収, 櫻井文教, 水口裕之, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
10. 筋サテライト細胞のラミニン結合活性における受容体解析, ポスター, 村上紀里香, 鈴木喜晴, 石井佳菜, 木倉直美, 馬淵洋, 須藤絵里子グレース, 関口清俊, 赤澤智宏, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
11. ラミニンアイソフォームは iPS 細胞からの眼細胞発生を制御する, 口頭, 柴田峻, 林竜平, 大久保徹, 工藤裕司, 片山明彦, 梅純子, 八木恵美子, 本間陽一, 関口清俊, 西田幸二, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. マトリクソーム研究の過去・現在・未来, 口頭, 関口清俊, 大阪大学蛋白質研究所マトリクソーム科学(ニッピ)寄附研究部門開設記念シンポジウム, 2016/6/2, 国内.
2. 細胞外マトリックスの多様性とテーラーメイド培養基材, 口頭(特別講演), 関口清俊, 幹細胞の培養法・培養工学のためのコンソーシアム・第1回シンポジウム, 2016/10/15, 国内.
3. マトリクソーム研究が拓く次世代幹細胞培養技術:iMatrix-511 から始まる日本発再生医療イノベーション, 口頭(基調講演), 関口清俊, 第2回再生医療ベンチャー創設支援セミナー, 2017/2/14, 国内.

### (4) 特許出願

(非公開版に記載)

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,  
Projects for Technological Development

研究開発課題名： (日本語) 幹細胞培養用基材の開発  
(英語) Development of culture substrates for pluripotent stem cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 蛋白質研究所 寄附研究部門教授 関口 清俊  
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University, Institute for Protein Research,  
Professor of Donated Fund Research, Kiyotoshi Sekiguchi

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 幹細胞培養用基材の開発  
開発課題名： (英語) Development of culture substrates for pluripotent stem cells

研究開発分担者 (日本語) 株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所 所長 服部俊治  
所属 役職 氏名： (英語) Nippi Research Institute of Biomatrix, Director, Shunji Hattori

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：大阪大学・蛋白質研究所・関口清俊 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 理科教育 CSR 活動, 服部俊治, 山本卓司, 広田亜里彩, 下野知性, 江泉善光, 小倉孝之, 中鉢円, 青少年のための科学の祭典, 2016/7/30-31, 国内.
2. 理科教育 CSR 活動, 服部俊治, 山本卓司, 中鉢円, 小倉孝之, 水野一乗, 市川学園高校 ニッピ研究所見学実習, 2016/5/11, 国内.
3. 女性の研究力向上 上位職をふやすために, 服部俊治, ダイバーシティ研究環境実現イニシアティブ事業シンポジウム, 2016/12/13, 国内.
4. 尿であなただのロコモがわかる? ロコモ自己管理を目指して, 服部俊治, アクティブフォーオール拠点合同シンポジウム 2016 超スマートになるための健康イノベーション, 2016/12/9, 国内.

(4) 特許出願

該当なし