

図2 細胞製造における4Mの一例

### 3 化学合成足場材 Ceglu の特徴と基本性能

材料開発を通じた iPS 細胞の産業化促進への貢献を目指し、足場材に着目して検討を進めた。iPS 細胞培養の分野では常識となっているが、水溶性タンパク質の自然吸着を基本原理とする培養容器への表面処理方法は、ラボスケールでは大きな問題にならないが、製造に使用する産業用資材として捉えた際には制御が困難であるため、改善の余地があると考えられた。そこで、ラボから製造スケールまで一貫して使用可能な表面処理剤としての足場材の開発を行った。

生体親和性材料として知られるポリビニルアルコール誘導体をベースに、iPS 細胞に適した官能基設計およびフィブロネクチンモチーフ修飾をすることにより、インテグリン接着を通して iPS 細胞の接着維持が可能な化学合成足場材 Ceglu™ を開発した。これはアルコール溶液であるため、コーティング後に乾燥させることにより、均一な足場材表面を形成可能である。即ち、従来の成行きの自然吸着とは全く異なり、制御性を有した産業的なアプローチであり、多様な培養基材上に均一な培養表面の形成が可能である。

Ceglu 塗工済み培養容器での iPS 細胞培養性能の検証を行った。無血清培地中での安定的な iPS 細胞の接着および増殖が可能であり、一般的に用いられているタンパク質足場材ピトロネクチン様のコロニーの形成が確認された (図3)。種々の市販無血清培地における培養性を評価し

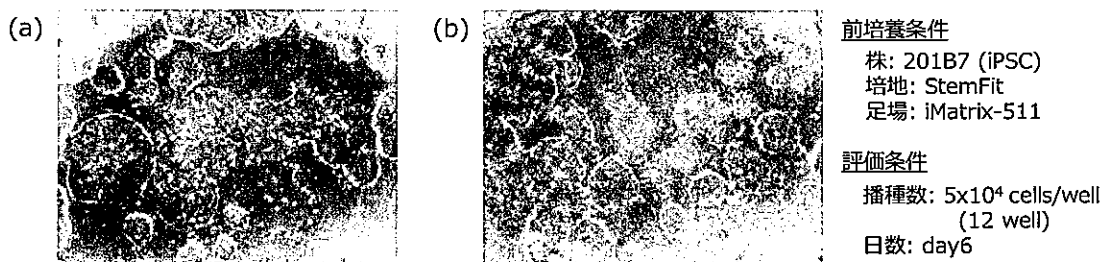


図3 iPS 細胞コロニー比較  
(a) Ceglu, (b)ピトロネクチン

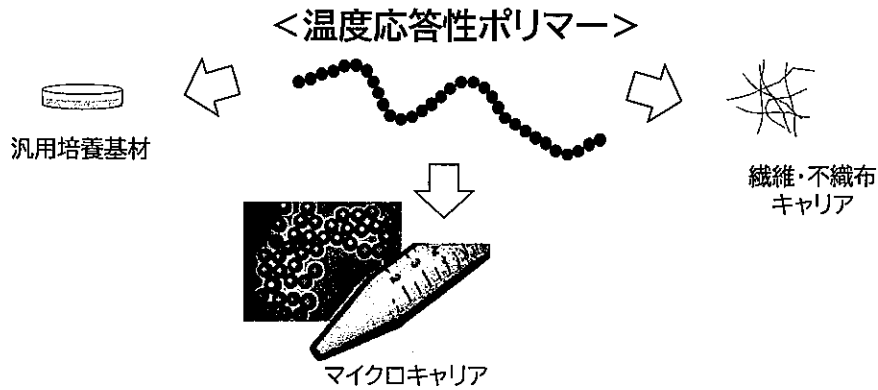


図2 東ソーの温度応答性ポリマーコーティング技術

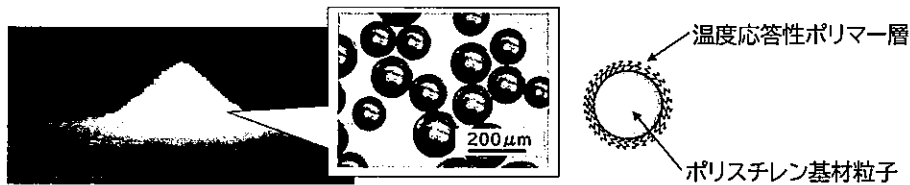


図3 温度応答性マイクロキャリア

マイクロキャリアは直径 100~300  $\mu\text{m}$  程度の粒子状の培養基材で、表面に細胞が接着して増殖する。マイクロキャリアは培養液中で攪拌等により浮遊させながら用いる。そこで我々は、ポリスチレン製の基材粒子に独自組成の温度応答性ポリマーを塗布した温度応答性マイクロキャリアを開発した(図3)。Vero細胞, HeLa細胞やヒトMSCを用いて性能を評価した結果, 細胞増殖性は市販の汎用マイクロキャリアと同等以上であり(図4), そして培養液を常温(約25 $^{\circ}\text{C}$ )としてから攪拌を加えることで, 細胞を剥離回収できることも実証した(図5)。

さらに温度応答性により剥離した細胞の品質の指標として, 細胞接着タンパク質の一つであるインテグリン量を評価した。各種培養基材から剥離回収したMSCを抗インテグリン抗体で蛍光標識しFACSで評価したところ, 温度応答性マイクロキャリアから剥離回収したMSCでは, 市販汎用マイクロキャリアからプロテアーゼで剥離回収した同細胞の2倍以上のインテグリン量を確認し, 細胞の品質が良好であることを実証することができた(図6)。

一般にマイクロキャリアは平面培養に比べより小さな設置面積(フットプリント)での大量培養を可能とする培養基材である。実際に平面培養と比較してどれほどの違いが生じるか見てみたい。他家間葉系幹細胞(MSCs)のためには $10^{10}$ 個程度, ワクチン原液ウイルスのためには $10^{10}\sim 10^{12}$ 個程度の細胞が求められる(表1)<sup>7)</sup>。これほどの大量の細胞を得るには, スタックプレートにして約160段が必要となる。それに対してマイクロキャリア培養では20~30Lのバイオリアクターの使用で済み, 設置面積の点で大きな利点がある(図7)。

## 第4章 細胞外マトリックスを活用した再生医療

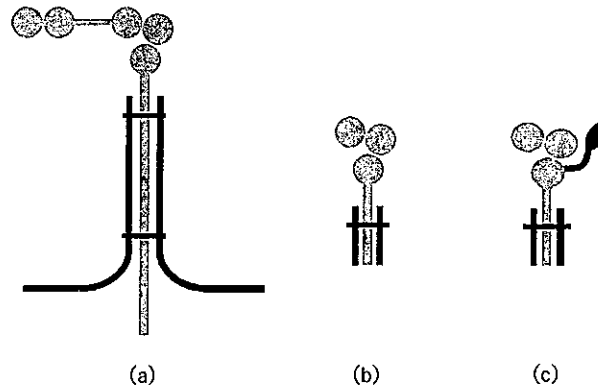


図1 ラミニンタンパク質の模式図

- (a)全長のラミニンタンパク質： $\alpha$ 鎖のC末端側（上部）に、インテグリン結合活性を持つGドメインが存在する。
- (b)ラミニン E8 断片タンパク質 (iMatrix)：ラミニン $\alpha$ 鎖のインテグリン結合活性部位を含む、細胞接着活性を持つラミニン断片タンパク質である。
- (c)パルカン結合型ラミニン E8 断片タンパク質 (P-LME8)：ラミニン E8 断片にパルクンの D1 ドメインを融合したキメラタンパク質であり、ラミニンシグナルと成長因子シグナルを同時に入力することで、細胞内部の伝達シグナルを増強する機能を持つ細胞培養基質である。

望ましい。目的細胞に合わせた最適なラミニンアイソフォームの選択方法は、標的細胞におけるインテグリンないしラミニンの発現パターンをアイソフォームレベルで調べることである。生体内においては、細胞は自身が分泌した ECM に接着することが往々にして起こっており、「標準細胞が、生体内で接着している ECM を培養基質として選択する」ことが、高い細胞生存率、細胞集団の均一性および分化誘導効率の上昇につながる。

### 3 ラミニン 511-E8 断片の開発

ヒト ES/iPS 細胞の足場となるラミニン 511 タンパク質は、分子量が約 750 kDa と巨大であり、この点が組換えタンパク質として大量に生産する際のボトルネックとなっていた。関口ら（大阪大学）は、インテグリン結合機能を担う最小機能単位として約 150 kDa の C 末端の E8 フラグメント (LM511-E8) に着目し、組換えタンパク質として生産するための高効率な発現系と高純度の精製系を確立した（図 1 (b)）。LM511-E8 は全長のラミニン 511 と同じ立体構造のインテグリン結合部位を保持しており、分子同士の結合活性は同等であるが、細胞接着活性は全長のラミニン 511 よりも LM511-E8 の方が高いという特徴を持つ。これは、ラミニン 511 のインテグリン結合部位以外のタンパク質相互作用部位が除かれていることが理由と考えられる。

細胞生物学分野における LM511-E8 の最大の貢献は、iPS 細胞の「単細胞継代」を可能にした点である。従来のマウス線維芽細胞をフィーダー細胞として用いた場合には、コロニー継代と呼