

幹細胞用培養基質の開発：現状と課題

谿口 征雅*・関口 清俊

胚性幹細胞 (ES細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS細胞) に代表される多能性幹細胞は組織幹細胞とともに再生医療を実現可能にする有用な細胞ツールである^{1,2)}。細胞移植治療においては、ヒト多能性幹細胞から分化誘導した細胞を $10^5 \sim 10^{10}$ 個準備する必要があると考えられている³⁾。ヒト多能性幹細胞を安全に (= 使用する試薬のすべての組成が同定されている)、安定に (= 未分化性が維持され、かつ、染色体異常が生じない)、効率よく大量調製するための基盤技術の開発は再生医療を実現するための喫緊の課題である。本項では、近年の研究進捗が著しいヒトES/iPS細胞の培養技術に焦点を当て、特に培養に用いられる足場となる分子 (接着基質) の現状と課題を概説する。

ヒトES/iPS細胞用培養基質の開発の現状

1998年のThomsonらによるヒトES細胞の樹立以来、ヒトES/iPS細胞はフィーダー細胞との共培養が標準的な培養方法となっている¹⁾。フィーダー細胞は細胞の生存・増殖・未分化性維持に必要な液性因子を供給するとともに、細胞が接着する足場を提供する役割も担う。フィーダー細胞との共培養は造血幹細胞など他の幹細胞でも使われている応用範囲の広い培養法である。しかし、フィーダー細胞との共培養系ではフィーダー細胞由来の未同定の成分が持ち込まれるため、医療応用を前提としたヒトES/iPS細胞の培養で使うには安全性の担保が大きな課題となる。高品質のフィーダー細胞を安定に供給・維持することも容易ではない。フィーダー細胞に付随するこれらの問題を回避するためには、フィーダー細胞を使わないヒトES/iPS細胞の培養法の開発が不可欠である。

接着性細胞が増殖するためには足場となる接着基質が必要である⁴⁾。接着基質のない環境下では、たとえ増殖因子が存在していても細胞は増殖することができず、アポトーシスを引き起こして自ら死滅する (ガン化した細胞を除く)。細胞培養にはポリスチレン製の培養皿が使われるが、細胞はポリスチレンに直接接着する訳ではなく、培養皿の表面に吸着した動物血清由来の接着分子や細胞自身が分泌した接着分子を介して培養皿に接着し、足場を確保している。細胞表面にはこれら接着分子と結合する受容体が存在し、この受容体を介して細胞の生存を維持し、増殖を促すシグナルが入力される。これは血球細胞などを除くほとんどの細胞に当てはまる動物細胞

の基本的な特性であり、“細胞増殖の足場依存性”と呼ばれている。この特性は接着性細胞であるヒトES/iPS細胞にも当然当てはまる。また、足場の確保は多能性幹細胞を未分化な状態で維持する上でも必要である。接着活性の低い基質上でヒトES/iPS細胞を培養すると、接着できずに死滅する細胞が増えるだけでなく、未分化性が維持できない細胞の割合が増加する。ヒトES/iPS細胞を素早く接着させる基質は、単に効率よく細胞を増殖させるだけでなく、安定に未分化状態を維持する上でも有効である。

これまでにさまざまな接着基質がヒトES/iPS細胞の培養に使用されてきた。これらは天然基質と合成基質に大別される (表1)。天然基質の多くは生体内で細胞が足場としている細胞外マトリックスタンパク質であり、ラミニンやビトロネクチンがよく利用される。また、細胞間接着分子であるE-カドヘリンも接着基質として利用可能である。一方、合成基質はそれ自身が細胞接着活性をもつ合成高分子や細胞接着活性をもつオリゴペプチドを担持させた合成高分子であり、前者の例としてはpoly[2-(methacryloyloxy)ethyl dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide] (PMEDSAH)、後者の例としてはSynthemax[®]があげられる。ヒトES/iPS細胞を接着させる活性の強さは天然基質の方が合成基質よりも優れているが、均質な製品を安定に供給できる点では合成基質が勝っている。また、天然基質の多くは組換えタンパク質であるため、合成基質と比較して製造コストが高むという問題がある。接着の強さは継代時の生着率や細胞の増幅効率に大きく影響する。医療応用を目的としてヒトES/iPS細胞を大量培養する場合、培養の安定性と増

表1. 多能性幹細胞の培養に用いられる代表的な接着基質

基質名	由来	操作性* ¹⁾	単価* ²⁾
Matrigel [®]	マウス肉腫	△	90
Geltrex [®]	マウス肉腫	△	90
ビトロネクチン	ヒト組換え体	△	50
ラミニン-511	ヒト組換え体	△	2,840
ラミニン-521	ヒト組換え体	○	1,720
ラミニン-511E8	ヒト組換え体	○	430
E-カドヘリン	ヒト組換え体	△	210
PMEDSAH	化学合成品	△	—
Synthemax [®]	化学合成品	△	170

*¹⁾ 単一細胞に分散した細胞の培養が可能かどうかで評価

*²⁾ 35 mm ディッシュ1枚のコーティング単価 (円)

* 著者紹介 大阪大学蛋白質研究所細胞外マトリックス研究室 (特任研究員) E-mail: yu-tani@protein.osaka-u.ac.jp

幅効率の観点から接着活性が強い天然基質が現時点では選択されることになる。以下に代表的な接着基質を取りあげて概説する。

マトリゲル マトリゲルはマウス Engelbreth-Holm-Swarm 肉腫の粗抽出物であり、その主成分はラミニン、ニドゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、IV型コラーゲンである(これらの中でラミニンが主たる接着基質として働く)。ヒト多能性幹細胞用の製品が Matrigel[®] や Geltrex[®] という商品名で販売されている。マトリゲルはフィーダー細胞を使わずにヒトES細胞が培養できる接着基質として最初に報告され⁵⁾、現在でもヒトES/iPS細胞の標準的な接着基質として利用されている。ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase) 阻害剤である Y-27632 と組み合わせることで単一細胞まで分散したヒトES/iPS細胞の培養も可能である⁶⁾。マトリゲルはマウス肉腫組織から大量に調製することができるため、他の天然基質と比べると安価であるが、分子組成が完全に解明されている訳ではなく、ロット差が大きいこともあり、医療用のヒトES/iPS細胞の培養に使うには問題が多い。

ビトロネクチン ビトロネクチンは血清中に含まれる代表的な接着分子である。大腸菌を用いた発現系で組換え体を調製することができるため、低価格の精製品が複数社から市販されている(表1)。ビトロネクチンはヒトES/iPS細胞に発現する $\alpha V\beta 5$ インテグリンと呼ばれる接着分子受容体と結合し、細胞を接着させる。マトリゲルとはほぼ同等の接着活性をもつ⁷⁾。ラミニン-511/521やその活性フラグメントであるラミニン-511E8と比べるとヒトES/iPS細胞に対する接着活性は弱く、単一細胞分散での継代には適していない。

ラミニン ラミニンは基底膜と呼ばれる薄いシート状の細胞外マトリックスの主要構成分子である(図1、ラミニンに関する詳細は後述)。ヒトでは少なくとも12種類のアイソフォームが同定されている。それらの中でもラミニン-511/-521と呼ばれる2種類のアイソフォームがヒトES/iPS細胞の培養に利用されている^{8,9)}。ラミニン-511/-521はマトリゲルやビトロネクチンよりヒトES/iPS細胞に対する接着活性が強く、継代時の細胞の生着率が他の基質よりも高いのが大きな特徴である。組換え体の調製には動物細胞の発現系を用いる必要があるため、精製品は他の接着基質より高額である(表1)。現在、BioLamina社からヒト組換えラミニン-511とラミニン-521が販売されている。BioLamina社は、継代の際にラミニン-511を用いる場合はヒトES/iPS細胞を細胞塊で再播種する、一方、ラミニン-521を用いる場合は単一細胞に分散して再播種することを推奨している。

ラミニン-511E8 ラミニン-511E8はヒトラミニン-511の細胞接着部位を含む領域(E8領域)の組換え体である(図1)。ラミニン-511と結合する細胞膜受容体は

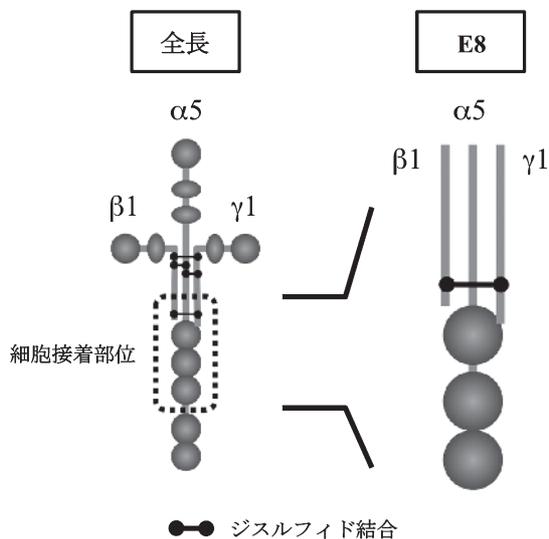


図1. ヒトラミニン-511の構造とラミニン-511E8の該当部位

$\alpha 6\beta 1$ インテグリンであるが、この組換え体は全長のラミニン-511と同程度の $\alpha 6\beta 1$ インテグリン結合活性を保持している¹⁰⁾。ラミニン-511はインテグリンだけでなく、ニドゲンやヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの基底膜分子とも結合する多機能分子であるが、ラミニン-511E8はインテグリン結合部位だけを含む、細胞接着に特化した組換え断片となっている。分子量は全長ラミニン-511の5分の1であり、サイズが小さい分、動物細胞での発現効率が全長ラミニン-511より高い。ラミニン-511/-521と同様、ヒトES/iPS細胞を接着させる活性はマトリゲルやビトロネクチンよりも高く、Y-27632を使用することなく単一細胞まで分散したヒトES/iPS細胞を培養・継代することができる¹¹⁾。ラミニン-511E8はiMatrix-511という商品名で(株)ニッピから販売されている。

E-カドヘリン 細胞間の接着分子であるE-カドヘリンも接着基質として利用されている¹²⁾。E-カドヘリンの細胞外ドメインを免疫グロブリンGのFc領域に連結し、2量体化させた組換えタンパク質がStemAdhereTMという商品名で市販されている。E-カドヘリンはCa²⁺の非存在下ではトリプシンなどの消化酵素で分解されやすく、継代時にトリプシンなどを使うと細胞表面のE-カドヘリン発現量が低下して、細胞の生着率が低下する問題点が指摘されている。

PMEDSAH PMEDSAHはヒトES細胞の培養で使用可能な完全合成基質である¹³⁾。PMEDSAHを固相化した培養器を用い、ヒトES細胞を未分化な状態を維持したまま25継代まで培養できることが示されている。ただし、完全合成培地を用いた培養実績は乏しい。

Synthemax[®] Synthemax[®]はアクリレートにアルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)配列を含む

オリゴペプチドを共有結合させた基質である¹⁴⁾。RGD配列を含むペプチドには細胞接着活性があり、ヒトES/iPS細胞はSynthemax[®]のRGD配列を主たる足場としている。ヒトES/iPS細胞に対してマトリゲルに匹敵する接着活性を示す。Synthemax[®]はCORNING社より購入できる。

ヒトES/iPS細胞を医療応用するためには、細胞を安全かつ安定的に、そして効率よく大量調製する必要がある。将来的に自動培養装置の導入を念頭においた場合、細胞の生着率が高く、かつ単一細胞まで画一的に分散して継代できる培養法は、細胞塊（コロニー）を適度の大きさに砕いて継代する従来法よりも遥かに効率的で、プロトコルの標準化も容易である。細胞塊のまま継代する従来法では、細胞を解離し過ぎると生着率が悪くなり、細胞塊が大きすぎると分化が起きやすいというジレンマがある。ラミニン-511/521やラミニン-511E8は天然基質の中でもヒトES/iPS細胞に対する接着活性が特に強く、単一細胞での継代培養に適している。実際、ラミニン-511E8を基質して用いた場合、単一細胞分散とY-27632と組み合わせることにより、培養皿1枚のヒトiPS細胞を1回の継代操作で一挙に100枚に増幅することが可能である¹⁵⁾。

ヒトES/iPS細胞用基質としてのラミニンの有用性： その分子的基盤

なぜラミニン-511/521やラミニン-511E8は他の接着基質よりもヒトES/iPS細胞に対して強い接着活性を示すのか。その理由を理解するためには、ラミニンとその細胞膜受容体であるインテグリンについてさらに踏み込んだ説明が必要となる。以下、ラミニンとその受容体であるインテグリンの構造と機能について、必要となる背景知識を整理してみよう。

ラミニン分子の構造と発現 ラミニンは α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖からなる分子量約45万～80万のヘテロ3量体タンパク質である(図1)⁴⁾。哺乳動物においては、5種類の α 鎖、3種類の β 鎖、3種類の γ 鎖が同定されており、これらの組合せにより、少なくとも12種類のアイソフォームの存在が確認されている。ラミニンは基底膜において二つの重要な機能を担っている。一つは自身を含むさまざまな基底膜分子と結合して超分子会合体を形成する機能であり、もう一つは細胞表面の受容体と結合して細胞を接着させる機能である。ラミニンは上皮細胞、神経細胞、筋細胞など多種多様な細胞の接着分子として機能する。興味深いことに、細胞の種類によって足場となるラミニンアイソフォームは異なる。たとえば、心筋細胞は $\alpha 2$ 型ラミニン(ラミニン-211/221)を足場とするが、表皮の基底細胞は $\alpha 3$ 型ラミニン(ラミニン-311/321/332)や $\alpha 5$ 型ラミニン(ラミニン-511/521)を足場としている。

マウスES細胞の由来元である内部細胞塊の細胞群もラミニンを足場として利用しており、そのアイソフォームはラミニン-511である¹⁶⁾。ヒト内部細胞塊がマウス同様にラミニンを足場として利用しているか否かは不明であるが、ヒトES細胞が $\alpha 5$ 型ラミニンを発現していることはよく知られている^{8,17)}。

細胞表面のラミニン受容体 ラミニン受容体は、インテグリンと非インテグリン(ジストログリカン、シンデカンなど)に分類される。先行研究から、ヒトES/iPS細胞はインテグリン依存的にラミニンに接着していることがわかっている。インテグリンは膜1回貫通型の α 鎖と β 鎖からなるヘテロ2量体分子である。ヒトでは、18種類の α 鎖と8種類の β 鎖が存在しており、24種類のアイソフォームが同定されている。この中で、細胞外マトリックスタンパク質に結合するものは17種類ある。これらはラミニン結合型($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$)、RGD結合型($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$, $\alpha IIb\beta 3$)、コラーゲン結合型($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$)、EMILIN結合型($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$)の4種類に大別される。ヒトES/iPS細胞ではラミニン結合型($\alpha 6\beta 1$)とRGD結合型($\alpha V\beta 5$)の発現が高いことが報告されている^{7,8)}。ヒトES/iPS細胞の接着基質としては、これまでラミニンやビトロネクチンが使われてきた。これはラミニン(特にラミニン-511/521)とビトロネクチンがそれぞれ $\alpha 6\beta 1$ と $\alpha V\beta 5$ の高親和性リガンドであるためである。しかし、ラミニン-511/521とビトロネクチンではインテグリンに対する結合親和性に大きな違いがある。結合の強さを解離定数(Kd)で表すと、ラミニン-511/521と $\alpha 6\beta 1$ のKdは0.7～0.8 nM、ビトロネクチンと $\alpha V\beta 5$ のKdは～10 nMであり¹¹⁾、ラミニンの方がビトロネクチンよりも一桁以上結合力が強い。この違いは、インテグリンを介して細胞内に入力される生存シグナルや細胞遊走シグナルの強さに反映され¹¹⁾、ラミニン-521やラミニン-511E8上では単一細胞まで分散したヒトES/iPS細胞が培養できるのに対して、ビトロネクチン上ではそれが困難であるという大きな違いを生み出す。

ES/iPS細胞用基質としてのラミニン-511E8の有用性

ラミニン-511E8はラミニン-511の細胞接着部位、具体的にはインテグリン結合部位だけを含む組換え断片である。であれば、両者間で接着基質としての活性に差はないのではないか、と思われるかもしれない。実際に $\alpha 6\beta 1$ に対する結合親和性を測定してみると、ラミニン-511E8のKdは全長ラミニン-511とほぼ同じである。しかし、ヒトES/iPS細胞を培養してみると、ラミニン-511E8の方がラミニン-511よりも明らかに接着活性が強く、それに伴い細胞の増殖も有意に亢進している。

$\alpha 6\beta 1$ インテグリンに対する親和性が同じでありなが

ら、なぜラミニン-511E8はラミニン-511よりもヒトES/iPS細胞を強く接着させることができるのか。その理由はまだ憶測の域をでないが、いくつかの可能性が考えられる。ラミニン-511E8はラミニン-511よりも分子サイズが格段に小さく、培養皿に吸着した分子がより密に集積した領域が生じやすい。インテグリンを介した細胞接着とシグナル伝達には、インテグリンが細胞膜上でマイクロクラスターを形成する必要があると考えられている。より密に集積したラミニン-511E8はラミニン-511よりもインテグリンのクラスター形成を誘導しやすく、結果として細胞の接着と増殖が亢進すると考えられる。また、培養皿に吸着した分子の配向性がラミニン-511E8とラミニン-511の間で異なっている可能性も残されている。培養皿に吸着するとき、ラミニン-511E8の方がインテグリンと易結合性の配向をとり、細胞接着に利用可能な有効分子数が多くなる可能性がある。

組換え体の発現・精製という観点でも、ラミニン-511E8は有利である。分子サイズが小さい分、組換え体の発現効率がよく、収量も多い。また、他の細胞外マトリックス分子との結合部位を持たないため、ラミニン-511よりも高純度の精製品が得られ、比活性も高い。さらにラミニン-511E8を使うメリットはこれだけに限らない。ヒト線維芽細胞や血球系細胞からヒトiPS細胞を樹立する際、ラミニン-511E8を基質に使用すると、iPS細胞の樹立から大量調製までを一気通貫に行なうことができる¹⁵⁾。また、ラミニン-511E8上で培養することを前提にしたヒトES/iPS細胞用の完全合成培地が開発されている(StemFit® AK03培地・味の素(株)、2016年販売予定)。「ヒトES/iPS細胞の培養は敷居が高い」と考えられがちであるが、ラミニン-511E8とこの培地を使うと、通常の不死化細胞と同じ感覚でヒトES/iPS細胞を培養することができる。

幹細胞培養用の接着基質の課題と展望

本稿では、“ヒトES/iPS細胞を安全・安定・効率的に大量調製するために最適な培養基質”という観点から、これまでに開発された接着基質を概説した。接着活性という点で見れば、ラミニン-511/-521やラミニン-511E8が現時点でもっとも有効な接着基質といえるが、解決すべき課題も残されている。何よりもラミニンの問題点は単価が高いことである。この点を解決するためには、①細胞接着活性を高めた改良型組換えラミニンを開発し、より少ない量で培養できるようにする、②製造の工程や規模を見直し、製造単価を下げる、といった努力が必要である。

近年、ヒトES/iPS細胞から組織幹細胞や臓器前駆細胞を作製する研究が進み、黄斑変性疾患ではヒトiPS細胞から分化誘導した網膜色素前駆細胞を使う臨床治験が

始まっている。あくまで患者に移植されるのは未分化な幹細胞ではなく、分化させた前駆細胞であり、移植用の前駆細胞を効率よく、そして安全かつ安定に分化誘導する技術開発が世界中で進められている。分化誘導研究では、どうしてもサイトカインに代表される液性因子に注目が集まりがちである。しかし、前駆細胞を効率的に調製するためには接着基質の選択が成否の鍵を握っている。ヒトiPS細胞からドーパミン神経前駆細胞を分化誘導する場合、基質にラミニン-511E8を用いることで従来法の20倍以上の効率で前駆細胞を得ることができる¹⁸⁾。ちなみに、ラミニン-511は神経幹細胞が足場とするラミニンアイソフォームの一つである。また、ヒトiPS細胞由来の肝幹前駆細胞を大量調製するときは、ラミニン-111が接着基質として有効である¹⁹⁾。肝幹前駆細胞はラミニン-411/-511上でも増殖するが、その増殖活性はラミニン-111に劣る。ラミニン-211上では増殖がみられない。これらの結果は、肝幹前駆細胞がラミニン-111を足場として好むことを示している。部分切除した肝臓が再生するとき、増殖中の肝細胞の周囲に $\alpha 1$ 型ラミニンが発現することが知られており²⁰⁾、ラミニン-111は肝臓前駆細胞の“ニッチ”として機能していると考えられる。

幹細胞の培養技術においては、多能性幹細胞の培養法からその分化誘導法に研究開発の重点が移りつつある。細胞ごとに最適化した接着基質の同定とそれを利用した多能性幹細胞の分化誘導法・大量培養法の研究開発が再生医療研究の新たなブレークスルーになることを期待したい。

文 献

- 1) Thomson, J. A. *et al.*: *Science*, **282**, 1145 (1998).
- 2) Takahashi, K. *et al.*: *Cell*, **131**, 861 (2007).
- 3) Serra, M. *et al.*: *Trends Biotechnol.*, **30**, 350 (2012).
- 4) 関口清俊：再生医療のための細胞生物学, p. 12, コロナ社 (2007).
- 5) Xu, C. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 971 (2001).
- 6) Watanabe, K. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **25**, 681 (2007).
- 7) Braam, S. R. *et al.*: *Stem Cells*, **26**, 2257 (2008).
- 8) Miyazaki, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **375**, 27 (2008).
- 9) Rodin, S. *et al.*: *Nat. Commun.*, **5**, 3195 (2014).
- 10) Ido, H. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **282**, 11144 (2007).
- 11) Miyazaki, T. *et al.*: *Nat. Commun.*, **3**, 1236 (2012).
- 12) 赤池敏宏ら：再生医療, **11**, 338 (2012).
- 13) Villa-Diaz, L. G. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **28**, 581 (2010).
- 14) Melkoumian, Z. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **28**, 606 (2010).
- 15) Nakagawa, M. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 3594 (2014).
- 16) Klaffky, E. *et al.*: *Dev. Biol.*, **239**, 161 (2001).
- 17) Rodin, S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **28**, 611 (2010).
- 18) Doi, D. *et al.*: *Stem Cell Reports*, **2**, 337 (2014).
- 19) Takayama, K. *et al.*: *Stem Cell Reports*, **1**, 322 (2013).
- 20) Kikkawa, Y. *et al.*: *Exp. Cell Res.*, **305**, 99 (2005).