

再生医療用細胞培養基質の開発

谿口 征雅*・関口 清俊

ヒト胚性幹細胞 (ES細胞) の樹立, そして, ヒト体細胞初期化技術による人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の樹立により, ヒトES/iPS細胞を代表とする多能性幹細胞は現実的な再生医療や創薬における細胞ツールとして注目されている¹⁻³⁾. 近年, ヒトES/iPS細胞からさまざまな臓器の実質細胞に分化誘導できることが報告されており, ヒトES/iPS細胞を用いた再生医療は実用化に向けて着実に進んでいる. 一方, 医療用細胞には有効性と安全性が担保された品質が求められており, ヒトES/iPS細胞の樹立・維持・分化誘導時における培養試薬は成分既知かつゼノフリーであることが強く望まれる. 近年, 細胞外マトリックス (ECM) タンパク質であるラミニンがヒトES/iPS細胞の樹立・維持・分化誘導時のゼノフリー培養基質として有用であることが徐々に明らかとなっている. 本稿では, 多能性幹細胞の樹立・維持・分化誘導における培養基質に焦点を当て, 再生医療分野における培養基質の現状と課題を概説する.

細胞培養における培養基質の生物学的的重要性

接着性細胞を生体外で培養する際, 細胞の足場となる分子 (培養基質) は液性因子 (細胞増殖因子など) や基礎培地と並び, 欠くことのできない重要な因子である. では, 培養基質は接着性細胞にどのような影響を与えるのか? 血球系細胞などを除くほとんどの細胞は培養基質に接着し, 生存・増殖・極性化・分化などの挙動を制御するシグナルを受け取る. 一般的な株化細胞の場合, プラスティック製の培養皿と動物血清を含む培地を用いた培養が標準方法とされている. この際に細胞はプラスティックに直接接着する訳ではなく, 培養皿に吸着した血清由来のECMタンパク質 (=天然の培養基質) や細胞自身が分泌した接着分子を介して培養皿に接着する. 細胞はECMタンパク質に接着することで, アノイキス (未接着細胞が起こすアポトーシス) を回避して生存を維持し, 同時に, 細胞増殖因子による増殖シグナルの入力が促される (“細胞増殖の足場依存性” と呼ばれる). これら現象は接着性細胞で普遍的に見られる現象であり, 細胞のECMタンパク質への接着は細胞にとって必須のイベントである⁴⁾.

ECMタンパク質への細胞の接着は主にインテグリン

と呼ばれる細胞膜受容体が担っている. インテグリンは α 鎖 (18種類) と β 鎖 (8種類) からなるヘテロ2量体分子であり, 24種類のアイソフォームが報告されている⁵⁾. この中の少なくとも17種類がECMタンパク質をリガンドとすることが知られている. これらはラミニン結合型 ($\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha7\beta1$), RGD結合型 ($\alpha5\beta1$, $\alpha8\beta1$, $\alphaV\beta3$, $\alphaV\beta5$, $\alphaV\beta6$, $\alphaV\beta8$, $\alphaIIb\beta3$), コラーゲン結合型 ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$, $\alpha11\beta1$), EMILIN結合型 ($\alpha4\beta1$, $\alpha9\beta1$) の4種類に大別される. つまり, インテグリンはECM分子なら何にでも結合するわけではなく, 特定の組合せが存在する. このことは, “ECMタンパク質と細胞に発現するインテグリンとの組合せ” が細胞培養時の培養基質選択に強く関与することを示している.

ヒトES/iPS細胞の樹立・維持における培養基質

ヒトES/iPS細胞の樹立・維持・分化誘導や組織幹細胞の培養においては, 培養基質の選択が特に重要であり, 培養の可否を決定する. たとえば, 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培養基質は, 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.

ヒトES/iPS細胞は樹立の黎明期よりフィーダー細胞 (線維芽細胞) との共培養により維持されてきた. フィーダー細胞はヒトES/iPS細胞の増殖や分化形質の維持を促進する液性因子を供給することに加え, 生存に必要なECMタンパク質も供給することが知られている. そのため, フィーダー細胞との共培養法はヒトES/iPS細胞の標準的な培養方法であるだけでなく, 造血幹細胞など他の幹細胞の培養でも使われている. しかし, フィーダー細胞が分泌する未知成分が持ち込まれる可能性があるため, 医療応用を前提としたヒトES/iPS細胞の培養でフィーダー細胞を使うことには安全性の担保が大きな課題となる. この点を克服するために, これまでにさまざまな培養基質が開発されている. 代表的な培養基質を表1に示す. ヒトES/iPS細胞の培養基質は主に“ラミニン型” と“ビトロネクチン型” に分類することができる.

*著者紹介 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 (招聘研究員) E-mail: yu-tani@protein.osaka-u.ac.jp

表1. ヒトES/iPS細胞の培養に用いられる代表的な接着基質

基質名	由来	ゼノフリー	添加法
ラミニン型			
Matrigel®	マウス肉腫	×	未検定
ラミニン-521	ヒト組換え体	○	×
ラミニン-511E8	ヒト組換え体	○	○
ビトロネクチン型			
ビトロネクチン	ヒト組換え体	○	△(*)
Synthemax®	化学合成品	○	未検定

*細胞塊での継代で対応

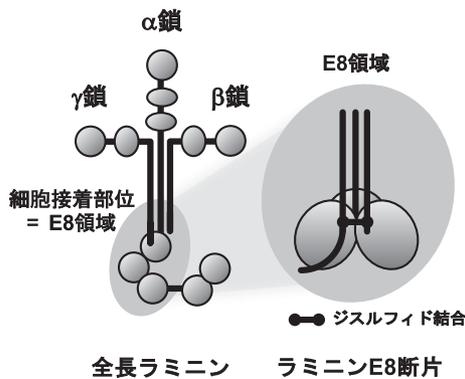


図1. ヒトラミニン-511の構造とラミニン-511E8の該当部位

以下に代表的な接着基質を取りあげて概説する。

ラミニン型培養基質 ECMタンパク質であるラミニンを主体とした培養基質である。ラミニンはα鎖, β鎖, γ鎖から構成されるヘテロ3量体分子であり, 主に基底膜と呼ばれる薄いシート状のECMに存在する(図1)⁶⁾。5種類のα鎖(α1~5), 3種類のβ鎖(β1~3), 3種類のγ鎖(γ1~3)が同定されており, α鎖-β鎖-γ鎖の組合せが異なる少なくとも12種類のアイソフォームが同定されている(表2)。ラミニンの種類はその構成因子(α鎖-β鎖-γ鎖)により表されている。たとえば, α1鎖-β1鎖-γ1鎖で構成されるアイソフォームはラミニン-111, α5鎖-β1鎖-γ1鎖で構成されるアイソフォームはラミニン-511と呼ばれる。

もっともよく使用されるラミニン型培養基質がマトリゲル(商品名: Matrigel®やGeltrex®など)である⁷⁾。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-111, 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-111が主たる細胞接着分

表2. ラミニンアイソフォームの種類と主な発現部位

種類	α鎖	β鎖	γ鎖	主な発現部位
111	α1	β1	γ1	中枢神経系など
121	α1	β2	γ1	
211	α2	β1	γ1	筋細胞やシュワン細胞など
221	α2	β2	γ1	
213	α2	β1	γ3	中枢神経系(限局的発現)
311	α3	β1	γ1	上皮細胞(特に, 扁平重層上皮)
321	α3	β2	γ1	
332	α3	β3	γ2	
411	α4	β1	γ1	毛細血管の内皮細胞・脂肪細胞
421	α4	β2	γ1	
511	α5	β1	γ1	広範の上皮細胞
521	α5	β2	γ1	

子として機能する。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, 組換え体と比べると安価である。また, ROCK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。しかし, 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制約が多い。

ヒト組換えラミニンとしてはラミニン-521やラミニン-511E8[商品名: iMatrix-511, 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]が使用されている(図1)⁸⁻¹⁰⁾。これらラミニンは, ヒトES/iPS細胞に対する接着活性が非常に高く, Y-27632非存在下でも単一細胞レベルまで分散して播種することが可能である。この結果, 細胞を効率よく大量に調製できる。実際に, ラミニン-511E8上でヒトiPS細胞を培養する際, 1回の継代で培養皿1枚から100枚に増やすことが可能である¹¹⁾。また, ゼノフリーであることから医療用ヒトES/iPS細胞の培養基質としての条件を満たしている。一方, ヒト組換えラミニンの調製には動物細胞の発現系を用いる必要があるため, 精製品はマトリゲルより割高となる。

培養基質を用いて細胞を培養する際には, あらかじめ培養基質を培養皿にコーティングしてから細胞を播種する。この手順は細胞培養技術の標準法として広く使われている。ヒトES/iPS細胞の培養においても, 「ラミニン-511E8やラミニン-521を培養皿にコーティングした後に細胞を播種する」という標準法が取り入れられている。事前にコーティングすることは多くの研究者に受け

入れられているため、その作業に疑問を持つ研究者は少ないと思われる。培養基質を培養皿にコーティングする工程は、①コーティング液の調製、②コーティング液の培養皿への分注、③コーティング待ち、からなる。これらの工程は時間がかかるうえに、工程①と②にはヒューマンエラーが入る恐れがある。細胞培養加工施設で品質が担保されたヒトES/iPS細胞を大量に調製する場合、たとえ自動培養装置などを使ったとしても培養基質のコーティングに要する工程の一つでも減らせることが望ましい。近年、これら工程を減らす画期的な手法が開発された。一つ目は、宮崎らによって開発された“ラミニン-511E8添加法”と呼ばれる手法である¹²⁾。ヒトES/iPS細胞の懸濁液にラミニン-511E8を直に添加することで、事前のコーティングなしに培養を開始できる。つまり、コーティングする工程が不必要になる。二つ目は、“ラミニン-511E8の安定化法”である。プレートにコーティングされたラミニンは乾燥に対する感受性が高く、失活しやすい。この失活を防ぐために、血清アルブミンが安定化剤として機能する。血清アルブミンはラミニン-511E8を含むラミニン-E8断片でのみ安定化効果を示し、全長ラミニンではその効果を発揮しない。この安定化剤の添加により、ラミニン-511E8をプレコートしたプレートや即時利用可能なラミニン-511E8コーティング溶液が開発されている。

ビトロネクチン型培養基質 ビトロネクチンは細胞培養時に使用する血清の主たる接着基質である。大腸菌で組換え体を調製できることから複数社から低価格で購入することができる。ヒトES/iPS細胞で用いる組換えビトロネクチンは細胞接着部位がN末端部に露出されるようデザインされている¹³⁾。組換えビトロネクチンの細胞接着活性は組換えラミニン-521やラミニン-511E8より低いが、ROCK阻害剤(Y-27632やthiazovivinではない)などとの併用により、単一細胞まで分散したヒトES/iPS細胞の培養も可能となっている。

ビトロネクチン型培養基質は化学合成品も開発されている(商品名:Synthemax[®])¹⁴⁾。その構造は、ビトロネクチンの細胞接着部位(RGD配列)を含む短いペプチド鎖を合成ポリマーなどに付加したものである。ゼノフリーに加えてγ線滅菌が可能であり、化学合成品の利点となっている。ヒトES/iPS細胞に対する接着活性はマトリゲルに匹敵し、継代時には細胞塊での播種が推奨されている。

ラミニン型/ビトロネクチン型培養基質の相違点 ヒトES/iPS細胞を、フィーダー細胞を使わずに培養するためにさまざまな培養基質が開発・試験されているが、

なぜラミニン型とビトロネクチン型の培養基質がヒトES/iPS細胞の培養によく利用されているのか? 「ECMタンパク質と細胞に発現するインテグリンとの組合せが細胞培養時の培養基質選択に強く関与している」と前述したが、まさに、ヒトES/iPS細胞に発現するインテグリンの種類がこれに深く関わっている。ヒトES/iPS細胞に発現する主たるインテグリンは $\alpha6\beta1$ と $\alphaV\beta5$ である^{7,15)}。 $\alpha6\beta1$ インテグリンはラミニン-521/-511E8の主たる受容体であり、高い結合親和性を示す^{10,16)}。この高い親和性が、単一細胞レベルまで分散したヒトES/iPS細胞を速やかにラミニン-521/-511E8に接着させ、未分化性を維持したまま増殖させることを可能としている。実際に、ラミニン-511E8に接着したヒトES細胞には生存シグナル(PI3K-AKT経路)と細胞増殖シグナル(ERK経路)の活性化が観察される⁸⁾。一方、 $\alphaV\beta5$ インテグリンはビトロネクチンの主たる受容体であり、両者の相互作用は高い親和性を示すが、 $\alpha6\beta1$ インテグリンとラミニン-521/-511E8の親和性と比較すると1/10程度である⁸⁾。このことが、ビトロネクチンが単一細胞分散での継代には適していない原因の一つとなっている。

細胞接着活性という点ではラミニン型培養基質に軍配が上がるが、コストという点においてはビトロネクチン型培養基質の方が優っている。組換えビトロネクチンは大腸菌を使用して製造できるのに対し、ラミニンは組換え体の発現に糖鎖の付加や3量体形成のプロセスが必要であり、動物細胞の発現系が最良の選択肢となる。また、ビトロネクチンの細胞接着部位はRGD配列を含む短いペプチド鎖で再現することが可能であるのに対して、ラミニン-521/-511E8の細胞接着部位は部分的にしか決定されていない。そのため、ラミニン-521/-511E8と同程度の細胞接着活性を示す化学合成品はまだ存在しない。組換えラミニンのコストを下げるためには製造単価を下げる以上の努力が必要である。

ヒトES/iPS細胞の分化誘導と培養基質

ヒトES/iPS細胞の分化誘導は目的の機能を有する細胞を得るための手段であり、液性因子や低分子化合物などを用いてさまざまなシグナル伝達経路を活性化・抑制することで達成される。主には発生学・分子生物学などから得られた知見を元に添加する液性因子や低分子化合物が選択される一方、使用されている培養基質としてはマトリゲル、フィブロネクチン、コラーゲンなどが多い。しかし、再生医療での標的細胞は上皮細胞・神経細胞・筋細胞であり、これら細胞は生体内において基底膜のラミニンを接着基質として利用している(表2)¹⁷⁾。近年、

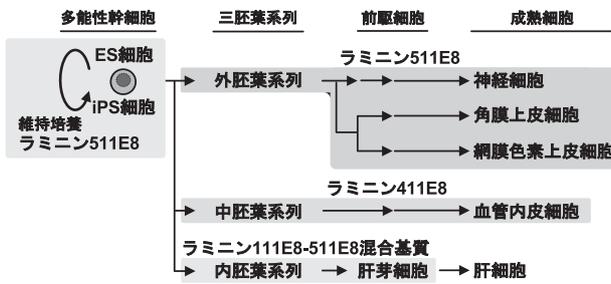


図2. 分化誘導時に使用するラミニンアイソフォームの代表例

分化誘導においてラミニンを培養基質とすることで効率的に分化誘導を進めることが可能になっている。以下にラミニンを用いたゼノフリー分化誘導の代表例を概説する(図2)。

ドーパミン (DA) 産生神経細胞 DA産生神経細胞はパーキンソン病の治療用細胞として期待されている。土井らが開発した、ラミニン-511E8上での培養とsphere培養を組み合わせた分化誘導方法¹⁸⁾と、ラミニン-111E8上に再播種した後に分化誘導を開始する方法¹⁹⁾がある。両方法ともDA産生神経細胞の前駆細胞まで分化誘導し、得られた細胞を患部に移植する。ラミニン-511E8を用いた方法で調製されたDA産生細胞は前臨床試験(カニクイザルのパーキンソン病モデル個体)でその有効性が証明されている²⁰⁾。

網膜色素上皮細胞・角膜上皮細胞 網膜色素上皮細胞や角膜上皮細胞の機能障害や消失は失明の原因となる。このような視覚障害を多能性幹細胞由来細胞の移植により治療する研究が臨床段階まで進んでいる。

網膜色素上皮細胞への分化誘導は、胚様体形成による眼胞(視覚器発生の初期構造物)の誘導とラミニン-511E8/521基質上での平面培養を組み合わせた方法が開発されている²¹⁾。

角膜上皮細胞への分化誘導は主に2種類の方法が開発されている。一つ目は、ラミニン-511E8上でヒト多能性幹細胞から二次元組織体を形成させ、その二次元組織体から分取される角膜上皮細胞前駆細胞をラミニン-511E8上で角膜上皮細胞に分化させる林らの方法である²²⁾。この方法で作製した二次元組織体は網膜や網膜色素上皮細胞などを含んでおり、視覚器関連細胞を得るためのソースとして期待されている。二つ目は浮遊培養とラミニン-521/IV型コラーゲンとの混合基質上での平面培養を組み合わせた方法である²³⁾。浮遊培養時に添加する液性因子を変えることで網膜色素上皮細胞へ分化させることも可能である。

血管内皮細胞 ヒト多能性幹細胞由来の血管内皮細胞

胞は、細胞性人工血管の作製や心筋/肝細胞などとの混合移植など多岐にわたる利用方法が考えられる。主に2種類の分化誘導方法が開発されている。一つ目は、ラミニン-511E8とラミニン-411E8(ヒトラミニン-411のE8領域の組換え体)を組み合わせた太田らの分化誘導法である²⁴⁾。この方法のミソは、細胞をラミニン-511E8上で中胚葉へ分化誘導した後に、ラミニン-411E8上に再播種するところにある。この操作により中胚葉細胞群は血管内皮細胞への分化が進むよう強く促され、結果として95%以上の高い純度で血管内皮前駆細胞を調製することができる。生体内で血管内皮細胞はラミニン-411を主たる接着基質として利用していることを考慮すれば、適切な液性因子とラミニン-411との組合せが中胚葉細胞群を血管内皮細胞へ効率的に分化させることは不思議ではない。二つ目はラミニン-521上で一貫通貫に分化誘導する方法である²⁵⁾。1種類の基質のみを用いるため簡易な方法ではあるが、CD31を指標とした磁気細胞分離で血管内皮前駆細胞を分取する必要がある。

肝実質細胞 肝実質細胞は薬物代謝の中心を担う細胞であり、創薬分野における薬物の代謝や毒性試験への応用が期待されている。肝実質細胞への分化誘導では主に2種類の方法が開発されている。一つ目は、ラミニン-511E8/521基質上で肝実質様細胞まで一貫通貫に分化誘導する方法である²⁶⁾。得られる肝実質細胞様細胞の分化度が初代肝実質細胞より低く、胆管上皮細胞のマーカー分子(サイトケラチン-19)の発現が強い。二つ目は、ラミニン-111E8/511E8混合基質を用いた高山らの分化誘導法である²⁷⁾。この方法は三つの手順からなる。①ラミニン-111E8/511E8混合基質上での肝芽細胞様細胞への分化誘導、②ラミニン-111E8上での肝芽細胞様細胞の純化および、③ラミニン-111E8/IV型コラーゲン混合基質上での肝実質細胞様細胞への成熟化である。得られる肝実質細胞様細胞は急性肝障害モデルマウスに対して肝細胞増殖因子依存的な延命効果を示す。

幹細胞培養用の接着基質の展望

本稿では、ヒトES/iPS細胞の培養とその分化誘導におけるラミニン分子の有用性を概説した。単一または複数種のラミニン分子を用いて多能性幹細胞から標的細胞まで効率的に分化誘導できる技術が次々と開発されている。分化誘導時に添加する液性因子の選択と同様に、発生学や組織学の知見に立脚したラミニン分子の選択が効率的な分化誘導と分化後細胞の維持培養の研究開発をさらに加速させるであろう。近年、ヒト骨格筋サテライト細胞のニッチ環境をラミニン-E8で模倣することで未分

化状態を維持したまま培養することができる技術が開発された²⁸⁾。さまざまな組織幹細胞のニッチ環境におけるECMタンパク質の組成を解析することで、標的幹細胞を生体外で安定に培養できる日はそう遠くないと思われる。

近年、organ(s)-on-a-chipと呼ばれる生体を模倣した小型デバイスの開発が進んでいる²⁹⁾。分化細胞を用いて微小培養環境で単一臓器の機能を再現することに加えて、臓器間の相互作用をも模倣できることから、創薬分野での応用が期待されている。今後、ゼノフリー培養基質である組換えラミニンやラミニン-E8が再生医療用細胞の製造やorgan(s)-on-a-chipなどの創薬ツールに対して大きく貢献す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) Ilic, D. *et al.*: *Stem Cells*, **35**, 17 (2017).
- 4) 関口清俊編著：再生医療のための細胞生物学, p. 1, コロナ社 (2007).
- 5) Hynes, R. O.: *Cell*, **110**, 673 (2002).
- 6) Yamada, M. *et al.*: *Curr. Top. Membr.*, **76**, 197 (2015).
- 7) Xu, C. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 971 (2001).
- 8) Miyazaki, T. *et al.*: *Nat. Commun.*, **3**, 1236 (2012).
- 9) Rodin, S. *et al.*: *Nat. Commun.*, **5**, 3195 (2014).
- 10) Ido, H. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **282**, 11144 (2007).
- 11) Nakagawa, M. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 3594 (2014).
- 12) Miyazaki, T. *et al.*: *Sci. Rep.*, **7**, 41165 (2017).
- 13) Chen, G. *et al.*: *Nat. Methods*, **8**, 424 (2011).
- 14) Melkounian, Z. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **28**, 606 (2010).
- 15) Braam, S. R. *et al.*: *Stem Cells*, **26**, 2257 (2008).
- 16) Taniguchi, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **284**, 7820 (2009).
- 17) Miner *et al.*: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**, 255 (2004).
- 18) Doi, D. *et al.*: *Stem Cell Rep.*, **2**, 337 (2014).
- 19) Kirkeby, A. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **20**, 135 (2017).
- 20) Kikuchi, T. *et al.*: *Nature*, **548**, 592 (2017).
- 21) Plaza Reyes, A. *et al.*: *Stem Cell Rep.*, **6**, 9 (2016).
- 22) Hayashi, R. *et al.*: *Nature*, **531**, 376 (2016).
- 23) Hongisto, H. *et al.*: *Stem Cell Res. Ther.*, **8**, 291 (2017).
- 24) Ohta, R. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 35680, (2016).
- 25) Nguyen, M. T. X. *et al.*: *Stem Cell Rep.*, **7**, 802 (2016).
- 26) Kanninen, L. K. *et al.*: *Biomaterials*, **103**, 86 (2016).
- 27) Takayama, K. *et al.*: *Hepatol. Commun.*, **1**, 1058 (2017).
- 28) Ishii, K. *et al.*: *Stem Cell R.*, **10**, 568 (2018).
- 29) Prantil-Baun, R. *et al.*: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **58**, 37 (2018).