News Release

2014 年 1 月 8 日
京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
大阪大学蛋白質研究所
味の素株式会社
株式会社ニッピ

細胞移植に適した新しいヒト iPS 細胞の樹立・維持培養法を確立

ポイント

- ラミニンと新たに開発した培地を用いて、フィーダー細胞を使わず、動物由来成分を含まない条件で、ヒト iPS 細胞の樹立と効率的な培養方法を開発した。得られた iPS 細胞は各種細胞へと分化する能力を持っていた。
- この方法で、ヒト ES 細胞を維持培養することも可能であった。

1．要旨

中川誠人講師（京都大学 CiRA）、山中伸弥教授（京都大学 CiRA）らの研究グループは、大阪大学、味の素株式会社（以下「味の素社」）との共同研究において、細胞移植治療に適した人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の新しい樹立・維持培養法を確立しました。

ヒトの iPS/ES 細胞を再生医療として多くの患者さんに利用して頂けるようになるためには、ヒト以外の動物由来の物質を含まず、安定して生産するために極力工程数が少ない方法で iPS 細胞を樹立・維持培養することが望まれます。しかし、これまでの方法では、iPS/ES 細胞を培養するために、培地中には血清などの動物由来の成分が多数含まれており、またフィーダー細胞 [1]を使うことで作業工程が多くなっていました。

中川講師らの研究グループは、フィーダー細胞の代わりに、関口清俊教授ら（大阪大学蛋白質研究所）が開発したリコンビナント [2]ラミニン-511 E8 断片 [3]を使い、味の素社と開発した動物由来の成分が含まれていない（Xf: xeno-free）培地 [4]でヒト iPS/ES 細胞を維持培養できることを見出しました。この方法を用いると、ヒトの iPS/ES 細胞は容易に扱うことができ、染色体に異常なく長期間にわたって安定して継代培養することができます。

ヒトの皮膚や血液の細胞からフィーダー細胞を使わず（Ff: Feeder-free）、動物由来の成分を含まない培地で作製した iPS 細胞は、免疫不全マウスに移植すると、テラトーマの形成が観察され、

三胚葉に分化する能力を確認できました。また、ここで作製した iPS 細胞はドーパミン産生細胞やインスリン産生細胞、血液細胞へと分化させる事ができました。

これらの結果は、今回開発した新しい feeder-free かつ xeno-free の培養システムで、ヒト iPS 細胞を樹立・維持培養することが可能であることを示しています。この方法は、ヒトへの細胞移植に最も適したグレードの iPS 細胞をつくるためだけではなく、創薬や毒性試験・疾患モデルなどの領域でも有効利用されることが期待されます。この研究成果は 1 月 8 日（英国時間）に英国科学誌「Scientific Reports」に掲載されます。

2．研究の背景

既に 米国ジェロン社は ES 細胞から作製した神経細胞を用いて脊髄損傷の臨床試験を始めました（経営上の理由から中止）。また米国アドバンスド・セル・テクノロジー社は ES 細胞から作製した細胞を用いて眼疾患の臨床試験をおこない、成果をあげています。2013 年 7 月には理化学研究所発生・再生総合科学研究センターの髙橋政代博士らのグループによる、加齢黄斑変性に対する世界初の iPS 細胞を使った臨床研究が正式に厚生労働省に認められ、いよいよ iPS/ES 細胞を使った治療が本格的にヒトで行われる日が近づいてきています。

通常、ヒト iPS/ES 細胞を研究で使用する際には、マウスのフィーダー細胞や、ウシの血清を含んだ培地が広く使われています。フィーダー細胞の準備には多くの時間と労力が必要で、フィーダー細胞を育てる培地にはウシ胎児血清が含まれているのが通常です。しかしこうした煩雑な操作や動物由来の成分は、最終的に得られる細胞の品質を不安定にする要因となるため、移植に使う細胞に要求される GMP 基準を満たすためには、血清などの動物由来の成分をできるだけ取り除く必要があります。

これまでに、フィーダー細胞の代わりとなるタンパク質や動物由来成分を含まない培地は開発されていましたが、ヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞を安定的に効率よく培養できる組み合わせは得られていませんでした。

3．研究結果

<u>ヒト iPS 細胞用の新しい培養システムの開発</u>

中川講師らのグループはフィーダー細胞の代わりとして、ラミニン-511 に着目しました。ラミニン-511 の短い断片であるラミニン-511 E8 断片（LN511E8）がヒト iPS 細胞や ES 細胞の維持に有効であり、またタグをつけたリコンビナント（rLN511E8）を使うことで大量にかつ高純度のものが得られるため、rLN511E8 をフィーダー細胞の代わりとして採用しました。

次に rLN511E8 を使った環境でヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞の培養に最適な xeno-free 培地を選出しました。テスト培地の作成と培養による検証を繰り返し、効率よく iPS 細胞を維持増殖させることができる成分の組み合わせを見出しました（味の素社との共同開発）。

新しいシステムでの iPS 細胞樹立

iPS 細胞から誘導した細胞を移植するためには、iPS 細胞の樹立過程も feeder-free かつ xeno-free である必要があります。今回開発した rLN511E8 と培地を使うことで、線維芽細胞や血液細胞（T 細胞・T 細胞以外の細胞・臍帯血細胞）から iPS 細胞を樹立することが出来ました。(Fig.1)

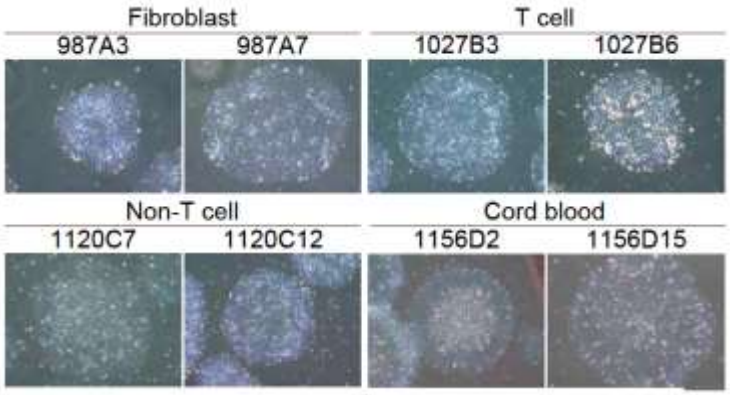

Fig. 1 Feeder-free かつ Xeno-free の条件下で樹立した iPS 細胞

線維芽細胞・血液細胞（T 細胞・T 細胞以外の細胞）・臍帯血細胞からそれぞれ iPS 細胞を樹立することが出来た。

分化能力の確認

また、feeder-free かつ xeno-free の環境で樹立・培養した iPS 細胞の分化能力について検討しました。iPS 細胞の分化能力を調べる方法として、iPS 細胞を免疫不全マウスに移植しテラトーマの形成を観察する方法がよく使われています。今回開発した feeder-free かつ xeno-free の環境で作製した iPS 細胞はテラトーマを形成し、3胚葉すべてに分化する能力を示しました（Fig. 2）。また、臨床応用に向けて必要となる代表的な細胞種として、神経細胞・血液細胞・インスリン産生細胞へと iPS 細胞を分化誘導したところ、いずれの細胞にも分化する能力があることも示しました(Fig. 3)。

Fig. 2 Feeder-free かつ Xeno-free で作製した T 細胞由来の iPS 細胞の分化能力

ヘマトキシリン・エオシン染色の写真。左から内胚葉・中胚葉・外胚葉の細胞に分化した iPS 細胞。Feeder-free かつ Xeno-free で樹立した iPS 細胞は 3 胚葉のすべてに分化する能力を持っていた。（Scale bar, 100 μm）

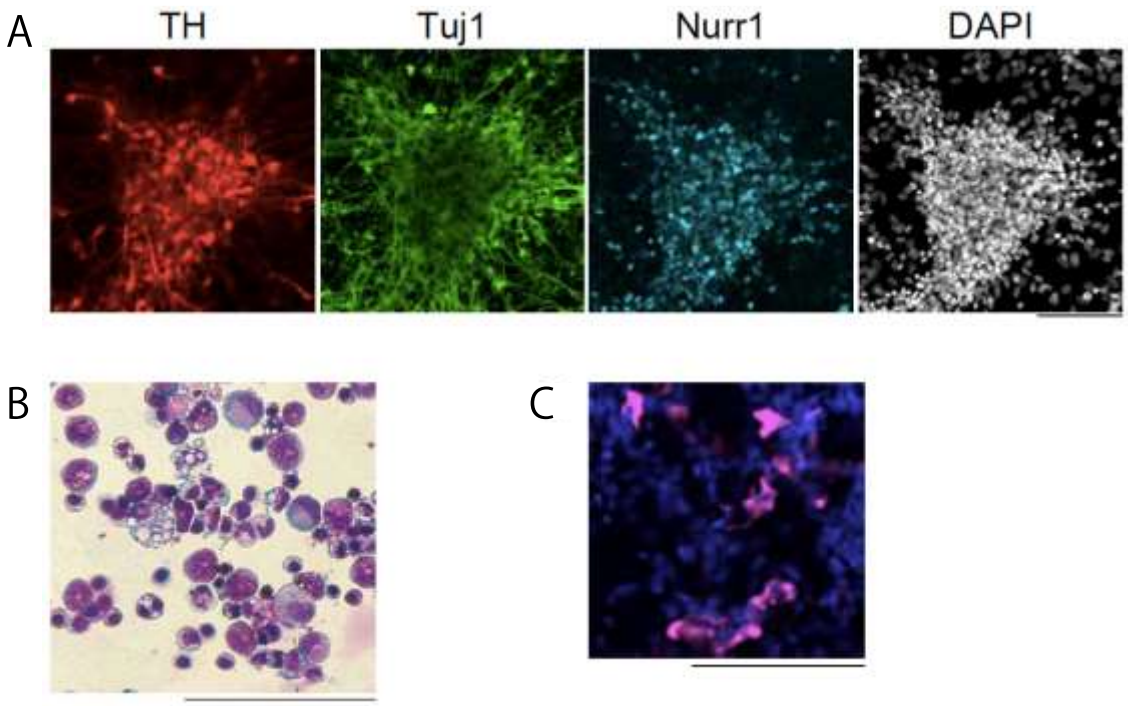

Fig. 3 Feeder-free かつ Xeno-free で作製した T 細胞由来の iPS 細胞の分化能力
iPS 細胞から分化した、A ドーパミン産生細胞（蛍光写真）、B 血液細胞（ギムザ染色）、C インスリン産生細胞（蛍光写真） (Scale bar, 100 μm)

４．まとめ

今回新しく開発した feeder-free かつ xeno-free の樹立・培養方法を用いることで、フィーダーを使った方法と比べても遜色のない、高効率での iPS 細胞の維持培養が可能となりました。この方法は操作が容易であり、発展性・再現性に優れており、GMP に準拠した医療に使用するヒト iPS 細胞を作製する方法として有効です。さらに、薬剤スクリーニングや基礎研究へも幅広く応用出来ると考えられます。

５．論文名、著者およびその所属

○ 論文名

“A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells”

○ ジャーナル名

Scientific Reports

○ 著者

Masato Nakagawa[1*], Yukimasa Taniguchi[2], Sho Senda[3], Nanako Takizawa[1], Tomoko Ichisaka[1], Kanako Asano[1], Asuka Morizane[1], Daisuke Doi[1], Jun Takahashi[1], Masatoshi Nishizawa[1], Yoshinori Yoshida[1], Taro Toyoda[1], Kenji Osafune[1], Kiyotoshi Sekiguchi[2], and Shinya Yamanaka[1,4]

*） 責任著者

○ 著者の所属機関
1　京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）
2　大阪大学蛋白質研究所
3　味の素株式会社　イノベーション研究所
4　グラッドストーン研究所

６．本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- 文部科学省　再生医療の実現化プロジェクト
- 内閣府　最先端研究開発支援プログラム（FIRST）
- 文部科学省　科学研究費補助金
- 独立行政法人　新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）　＜大阪大学＞
- 文部科学省　橋渡し研究支援推進プログラム　＜大阪大学＞

７．用語説明

1) フィーダー細胞
目的の細胞を培養する際、培養条件を整える補助的な役割をもつ細胞。通常は薬剤処理によって分裂できないように処理されている。iPS 細胞の培養の際には、マウス胎仔由来の線維芽細胞などがフィーダー細胞として用いられている。

2) リコンビナント
遺伝子組換え技術によって人工的に作製されたタンパク質のこと。印をつけることで他のタンパク質と容易に見分けることが出来るようになる。

3) ラミニン-511 E8 断片
ラミニン-511 は初期胚の多能性幹細胞が足場とする接着蛋白質。ヒト ES/iPS 細胞に対して非常に強い接着活性を示す。ラミニン-511 E8 はラミニン-511 の活性部位を含む断片であり、全長のラミニン-511 と同等以上の細胞接着活性を有する。また、リコンビナント蛋白質の大量調製が容易である。ラミニン-511 E8 断片は“iMatrix-511”の商品名で株式会社ニッピが製造・販売している。

4) 味の素社製培地
京都大学 CiRA と味の素社が共同開発中の培地。動物由来の成分を含まず、iPS 細胞を未分化の状態で極めて効率的に多量に増殖させることができる。この培地は StemFit®の商品名で味の素社が日本の一部の医学施設に提供を開始している。

本件担当：　京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
研究支援部門　国際広報室　和田濵
TEL: 075-366-7005　　FAX: 075-366-7023
Email: cira-pr@cira.kyoto-u.ac.jp