

ヒトiPS細胞のマイクロキャリア培養用基材としての ラニン511E8断片の有用性

美濃部 晃平¹⁾、戎 富美^{1), 2)}、谿口 征雅^{1), 2)}、関口 清俊^{1), 2)}

1)株式会社マトリクスーム 2)大阪大学蛋白質研究所

P-17-6

背景および目的

マイクロキャリア培養は従来の接着培養に比べ効率的な大量培養が可能であることから、再生医療用ヒト多能性幹細胞を安定的に大量調製する培養方法として注目されている。以前、我々はラニン511の組換え断片 (LM511E8) が多能性幹細胞の培養用基材として有効であることに着目し、LM511E8とマイクロキャリアを組み合わせたヒトiPS細胞 (hiPSC) のマイクロキャリア培養が可能であることを報告した。今回、LM511E8の高い細胞接着活性を活かした新たなマイクロキャリア培養方法を報告する。従来のマイクロキャリア培養では、マイクロキャリアへの細胞接着効率を高めるため、細胞播種後に静置の工程を挟むことが定法となっている。本研究はLM511E8を用いることで静置することなく連続的に攪拌すること (連続攪拌培養) が可能であるか検証し、さらに他の培養基材と比較することでLM511E8の有用性を示すことを目的とする。

実験材料および方法

【バイリアクター】5 mLシングルユースバイリアクター (ABLE Co. & Biott, Co.)

【マイクロキャリア】ポリスチレン 表面無処理マイクロキャリア (Corning Inc.)

【基質】LM511E8

Vitronectin (Thermo Fisher Inc.)

【マイクロキャリア量】11.2 mg (約4 cm²)

【コーティング量】0.5 μg/cm² (37°C, 3時間)

【培地】StemFit AK02N (AJINOMOTO CO., INC.)

【hiPS細胞株】1383D6

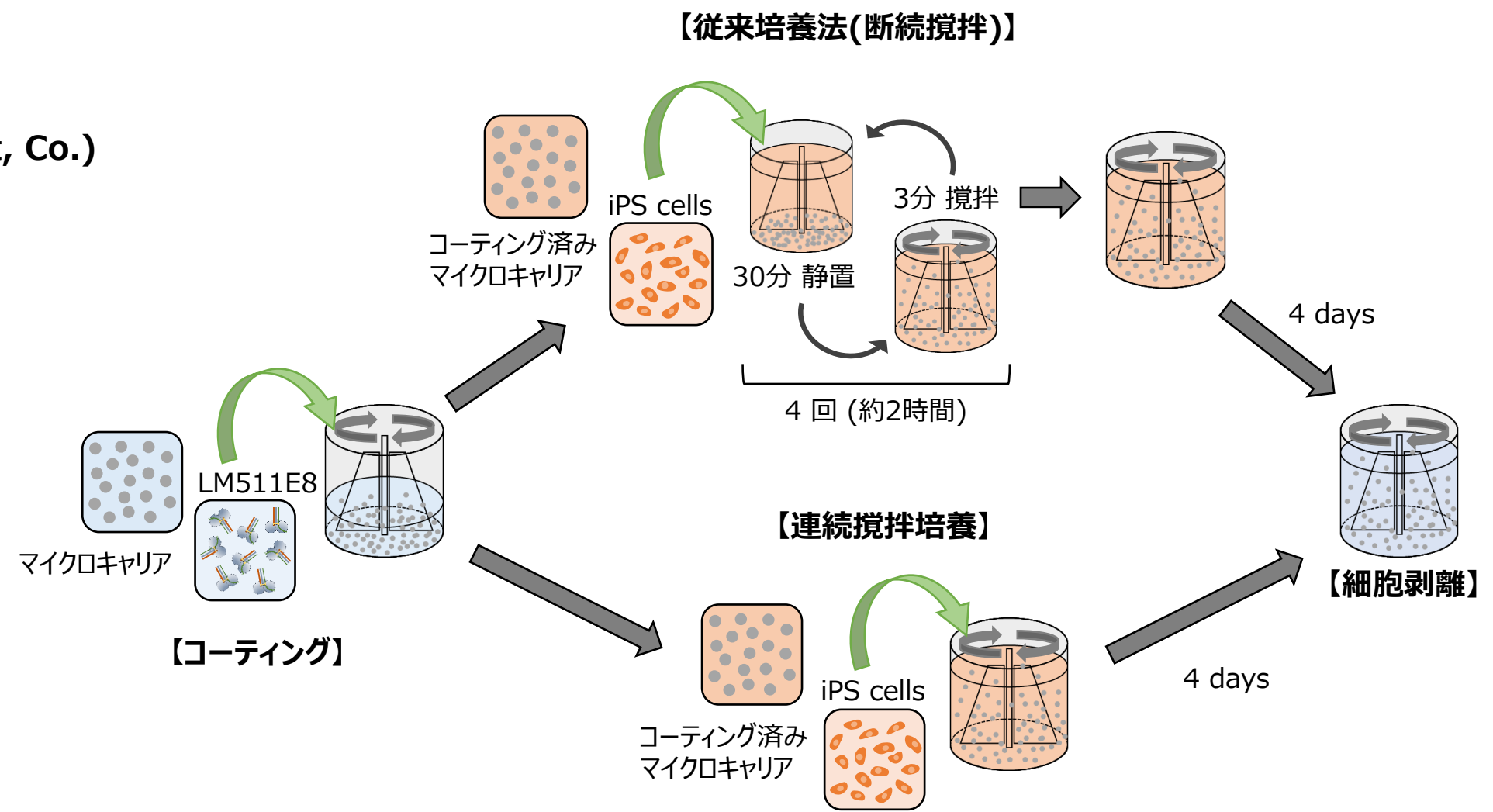
【細胞播種数】3.0×10⁵ cells/bioreactor (7.5×10⁴ cells/cm²)

【攪拌速度】40 rpm

【培養日数】4日間

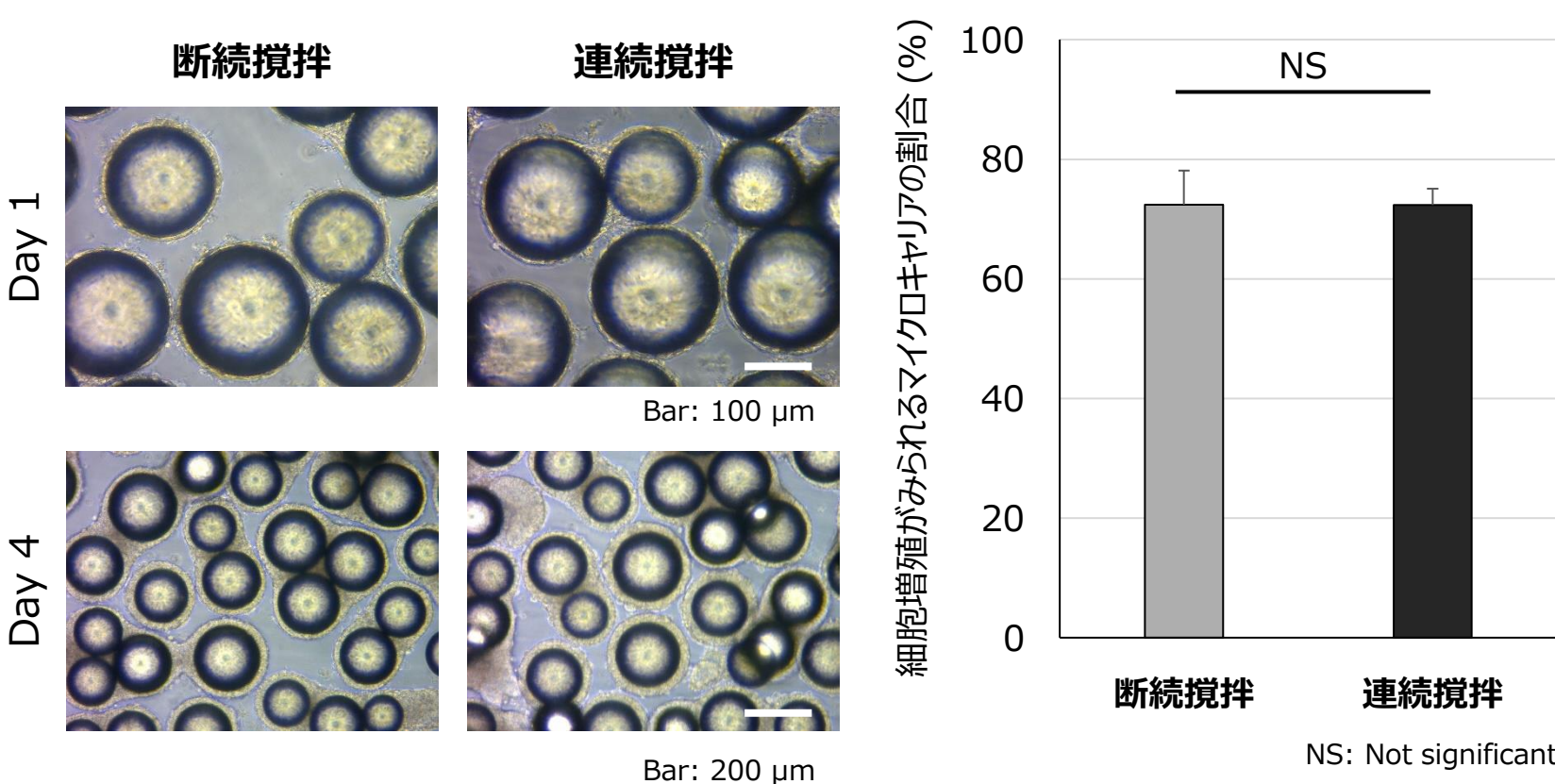
【細胞剥離液】5 mM EDTA/PBS (-)

【剥離処理時間】15分



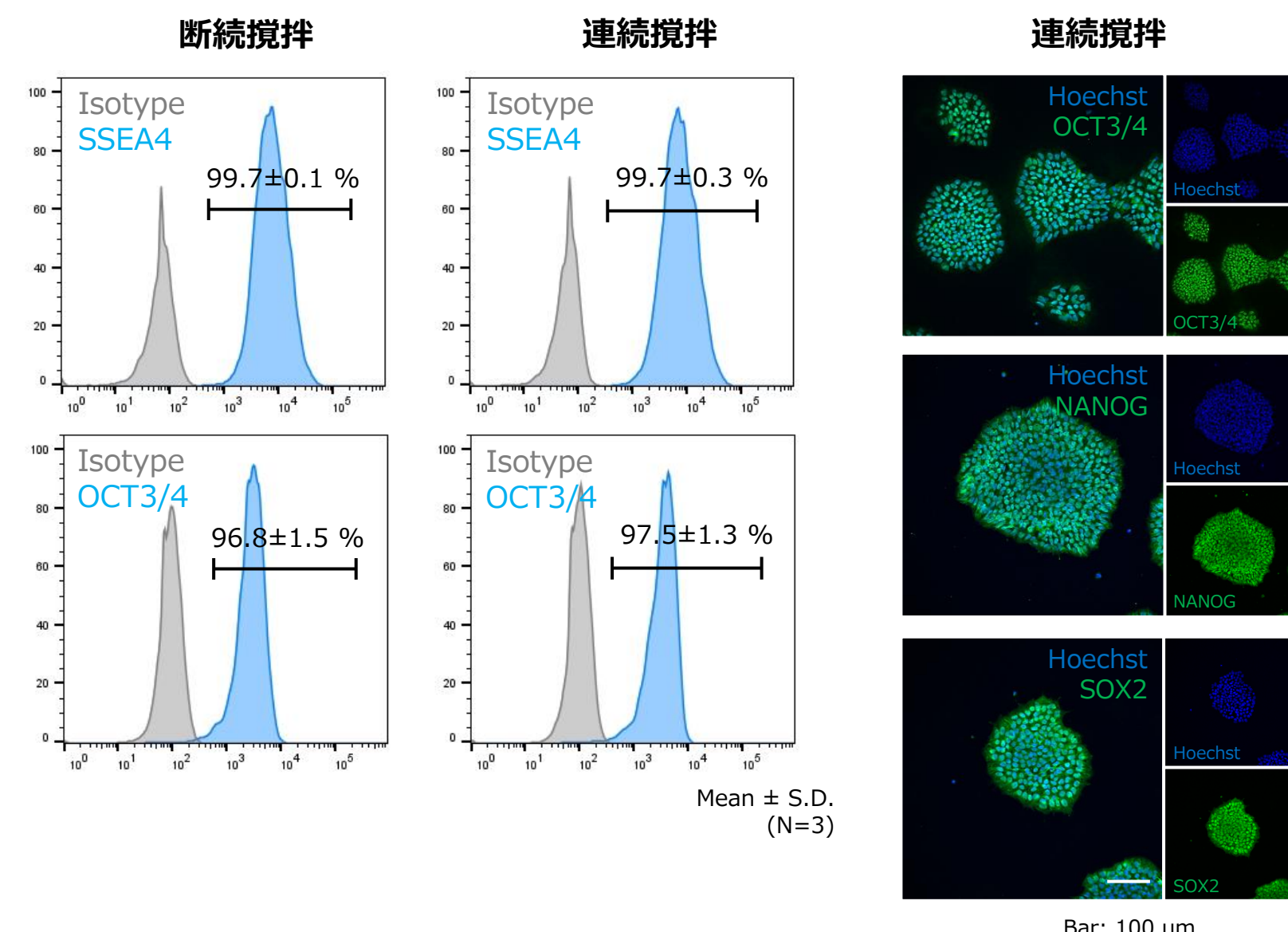
LM511E8コートマイクロキャリアにおける攪拌条件の比較

a 細胞接着・増殖活性



攪拌条件の違いによるマイクロキャリアへの細胞接着および増殖
攪拌条件にかかわらずほとんど全てのマイクロキャリアに細胞が接着していた。
4日間培養後の細胞増殖がみられるマイクロキャリアの割合、細胞収量に差はなかった。

b 未分化性維持

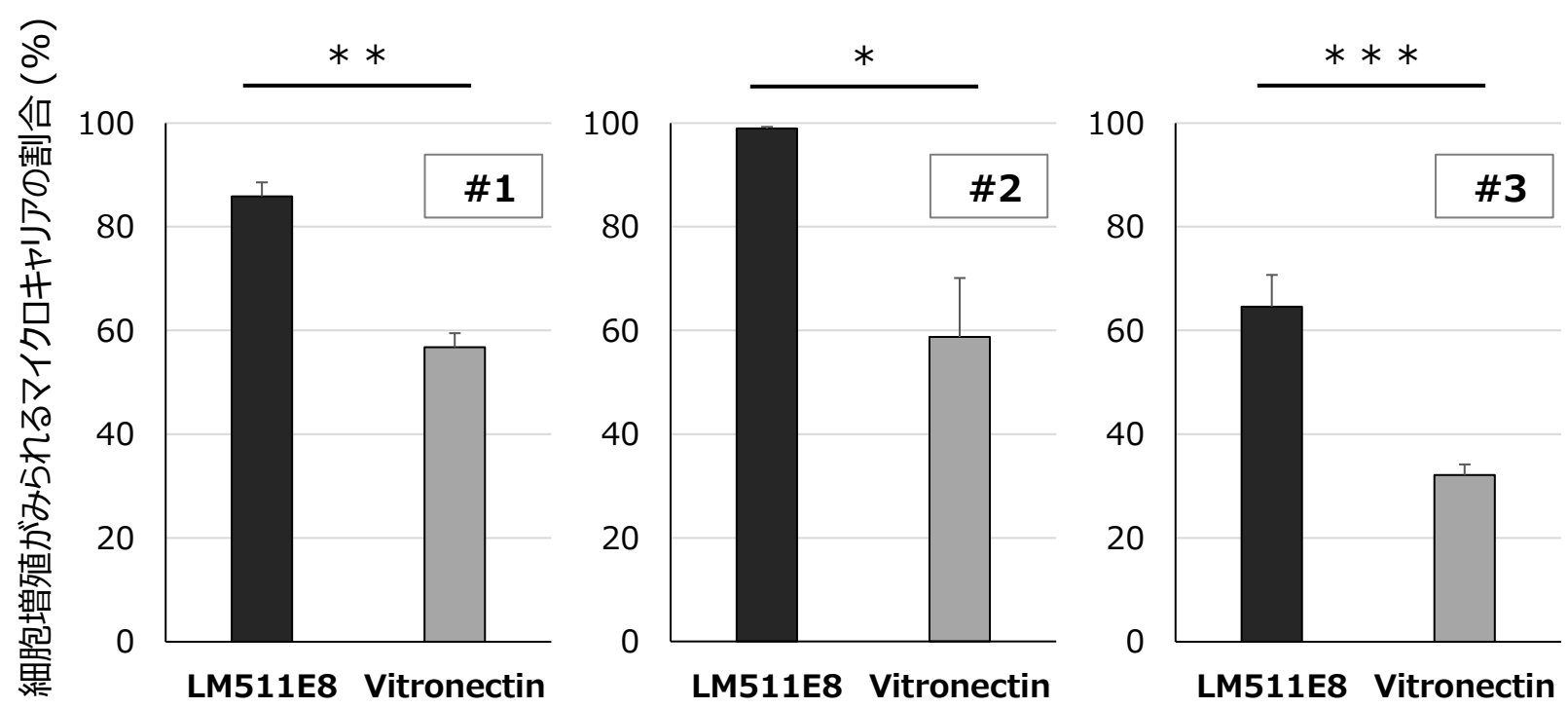
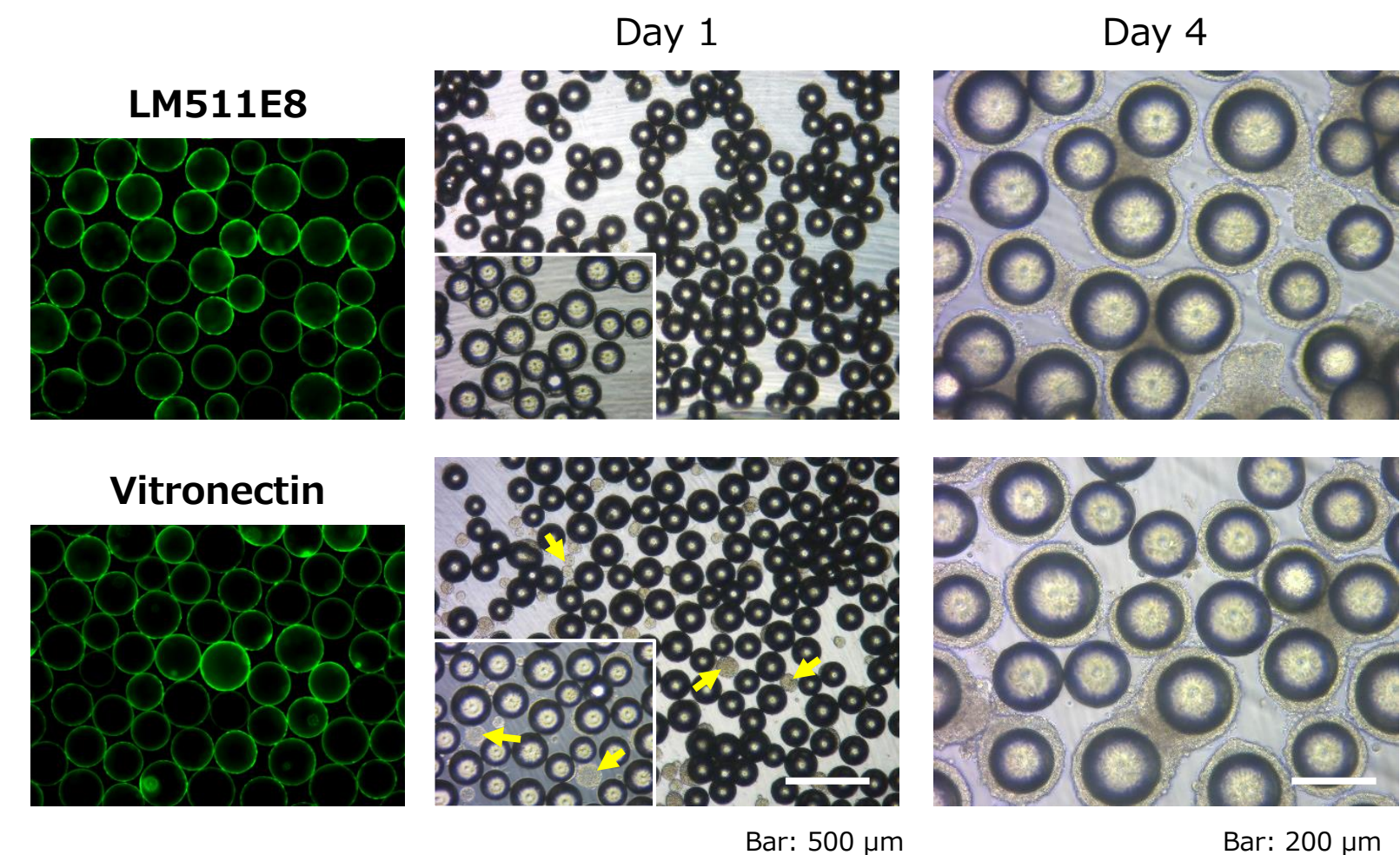


未分化性維持の検証
攪拌条件にかかわらず未分化マーカー (SSEA4, OCT3/4, NANOG, SOX2) を発現しており、未分化性を維持していた。

LM511E8をコーティングしたマイクロキャリアは連続攪拌培養が可能

連続攪拌培養におけるビトロネクチンとの比較

コーティングおよび細胞接着・増殖活性



* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (n=3)

	LM511E8	Vitronectin
細胞数 (cells)	2.4±0.1×10 ⁶	1.0±0.2×10 ⁶
細胞増殖率 (folds)	8.2±0.3	3.3±1.0

Mean ± S.D. (N=3)

基質の違いによるマイクロキャリアへの細胞接着および増殖
LM511E8、ビトロネクチンともにマイクロキャリア全体をコーティングできていた。
LM511E8をコートしたマイクロキャリアはほとんど全てのマイクロキャリアに細胞が接着していた。
それに対し、ビトロネクチンをコートしたマイクロキャリアでは細胞凝集塊が多く観察された (黄矢印)。
LM511E8はビトロネクチンに比べ細胞増殖がみられるマイクロキャリアの割合が高かった。
さらに、LM511E8コートのマイクロキャリアからはビトロネクチンコートに比べ、2倍以上の細胞数が得られた。

連続攪拌培養においてはLM511E8がビトロネクチンよりも有効

まとめ

- LM511E8をコートしたマイクロキャリアは、連続攪拌培養において断続攪拌と同等の細胞接着・増殖活性を示し、増殖した細胞は未分化性を維持していた。
→ LM511E8コートのマイクロキャリアは連続攪拌培養が可能
 - LM511E8をコートしたマイクロキャリアはビトロネクチンをコートしたマイクロキャリアに比べ、細胞の接着・増殖活性が高く、得られる細胞数も2倍以上多かった。
→ 連続攪拌培養におけるLM511E8の有用性を確認
- ⇒ LM511E8はヒトiPS細胞の連続攪拌培養に最適な培養用基材である