

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6101351号  
(P6101351)

(45) 発行日 平成29年3月22日(2017.3.22)

(24) 登録日 平成29年3月3日(2017.3.3)

(51) Int. Cl.			F I		
<b>C 1 2 M</b>	<b>3/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 M	3/00	Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/074</b>	<b>(2010.01)</b>	C 1 2 N	5/074	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	5/10	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/0735</b>	<b>(2010.01)</b>	C 1 2 N	5/0735	
<b>C O 7 K</b>	<b>14/78</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	14/78	

請求項の数 7 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2015-522654 (P2015-522654)  
 (86) (22) 出願日 平成26年5月9日(2014.5.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/062449  
 (87) 国際公開番号 W02014/199754  
 (87) 国際公開日 平成26年12月18日(2014.12.18)  
 審査請求日 平成27年11月11日(2015.11.11)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-123554 (P2013-123554)  
 (32) 優先日 平成25年6月12日(2013.6.12)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(出願人による申告)平成24年度、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構、健康安心イノベーションプログラム「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発/ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」に係る委託業務、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 504176911  
 国立大学法人大阪大学  
 大阪府吹田市山田丘1番1号  
 (74) 代理人 100077012  
 弁理士 岩谷 龍  
 (72) 発明者 関口 清俊  
 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法  
 人大阪大学内  
 (72) 発明者 筒井 仰  
 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法  
 人大阪大学内  
 審査官 鈴木 崇之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラミニンフラグメントが乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞と接触する表面に、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体が乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具であって、

インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントがラミニン 5 1 1 E 8 フラグメントおよびラミニン 5 2 1 E 8 フラグメントから選択される少なくとも1種のラミニン E 8 フラグメントであり、

改変体が、前記インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントにパールカンのヘパラン硫酸鎖結合ドメインを付加した改変体であり、

以下の(1)または(2)であることを特徴とする細胞培養器具。

(1) 細胞と接触する表面に、1.5 μg/cm<sup>2</sup>以下の濃度のインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、その3倍以上の濃度のインテグリン 6 1 結合活性を有しないラミニン 2 1 1 E 8 フラグメントが乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具

(2) 細胞と接触する表面に、1.5 μg/cm<sup>2</sup>以下の濃度のインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、その2.0倍以上の濃度のラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質が乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具

【請求項2】

ラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質が、ゼラチン、ヒト血清アルブミン、ウ

シ血清アルブミン、トランスフェリン、ミエリン塩基性蛋白質、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびコラーゲンからなる群より選択される1種以上であることを特徴とする請求項1に記載の細胞培養器具。

【請求項3】

細胞と接触する表面に、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメント  
またはその改変体のみが乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具であって、

インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントがラミニン 5 1 1  
E 8 フラグメントおよびラミニン 5 2 1 E 8 フラグメントから選択される少なくとも  
も1種のラミニン E 8 フラグメントであり、

改変体が、前記インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントにパール  
カンのヘパラン硫酸鎖結合ドメインを付加した改変体であり、

細胞と接触する表面に、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメント  
またはその改変体が  $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上の濃度でコーティングされていることを特徴  
とする細胞培養器具。

【請求項4】

請求項1または2に記載の細胞培養器具の製造方法であって、

(A) コーティングされる全蛋白質を含むコーティング溶液を調製する工程、

(B) 細胞培養器具の細胞と接触する表面に所望の全蛋白質をコーティングする工程、および

(C) コーティングされた蛋白質を乾燥する工程

を含むことを特徴とする製造方法。

【請求項5】

哺乳動物細胞の培養方法であって、請求項1～3のいずれかに記載の細胞培養器具を用いることを特徴とする培養方法。

【請求項6】

哺乳動物細胞が、ES細胞、iPS細胞もしくは体性幹細胞またはこれらの細胞から分化した細胞である請求項5に記載の培養方法。

【請求項7】

ゼラチン、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、トランスフェリン、ミエリン塩基性蛋白質、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、コラーゲンおよびラミニン 2 1 1 のE 8 フラグメントからなる群より選択される1種以上を有効成分とし、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体の乾燥によるインテグリン 6 1 結合活性の低下を抑制する活性低下抑制剤であって、

インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントがラミニン 5 1 1  
E 8 フラグメントおよびラミニン 5 2 1 E 8 フラグメントから選択される少なくとも  
も1種のラミニン E 8 フラグメントであり、

改変体が、前記インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントにパール  
カンのヘパラン硫酸鎖結合ドメインを付加した改変体である活性低下抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養器具に関するものであり、詳細にはインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体が乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ヒトES細胞やヒトiPS細胞などのヒト多能性幹細胞は、その再生医療への応用が世界的に注目されている。ヒト多能性幹細胞を再生医療に応用するためには、これら幹細胞を安全かつ安定的に培養、増幅する培養技術の開発が必要である。特に、フィーダー細胞

10

20

30

40

50

を使用せず、かつ異種動物由来の成分を含まない（ゼノフリー）条件下での安定した培養法の開発は、喫緊の課題となっている。

【0003】

本発明者らは、初期胚の多能性幹細胞がラミニン 5 1 1（ラミニン 5 1 1）を主要成分とする基底膜を足場としていることに着目し、ヒトラミニン 5 1 1 の組換え蛋白質が、ヒト ES 細胞のフィーダーフリー培養基質として有用であることを世界に先駆けて報告した（非特許文献 1 参照）。また、本発明者らは、ラミニン 5 1 1 は 6 1 インテグリンに対して非常に高い親和性を持つこと、および、ラミニン 5 1 1 の E 8 フラグメント（ラミニン 5 1 1 E 8）は、全長のラミニン 5 1 1 と同等の 6 1 インテグリン結合活性を有することを報告した（非特許文献 2 参照）。さらに、本発明者らは、従来困難であった多能性幹細胞の単一分散による継代培養がラミニン 5 1 1 E 8 上で可能であることを見出し、ヒトラミニン 5 1 1 E 8 がヒト多能性幹細胞のフィーダーフリー培養基質として極めて有効であることを報告した（特許文献 1、非特許文献 3 参照）。

10

【0004】

ヒトラミニン 5 1 1 E 8 を基質として細胞を培養するには、培養器の表面にヒトラミニン 5 1 1 E 8 を予めコーティングしておく必要がある。ヒト多能性幹細胞を培養する場合は、 $0.25 \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  になるようにヒトラミニン 5 1 1 E 8 溶液を培養器に加え、4 で一夜または室温  $\sim 37$  で 1  $\sim$  3 時間インキュベートすることによりコーティングを行う。しかし、培養器の表面にコーティングされたラミニンやその活性フラグメントは乾燥により失活し易く（非特許文献 4 参照）、実際、本発明者らは、培養器表面にコーティングしたヒトラミニン 5 1 1 E 8 が、乾燥後徐々に活性を失うことを確認している。ヒトラミニン 5 1 1 E 8 をヒト多能性幹細胞の培養基質として再生医療等で広く利用するためには、培養器表面にコーティングしたヒトラミニン 5 1 1 E 8 の活性を乾燥状態で長期間安定に維持するための技術開発が求められている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】国際公開公報第 2011/043405 号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Miyazaki T, Futaki S, Hasegawa K, Kawasaki M, Sanzen N, Hayashi M, Kawase E, Sekiguchi K, Nakatsuji N, Suemori H. Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375:27-35, 2008.

30

【非特許文献 2】Taniguchi Y, Ido H, Sanzen N, Hayashi M, Sato-Nishiuchi R, Futaki S, Sekiguchi K. The C-terminal region of laminin beta chains modulates the integrin binding affinities of laminins. *J Biol Chem.* 284:7820-7831, 2009.

【非特許文献 3】Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K, Kawase E. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 3,1236. Doi:10.1038/ncomms2231, 2012.

40

【非特許文献 4】Doi T, Thyboll J, Kortessmaa J, Jansson K, Iivanainen A, Parvathani M, Timpl R, Hedin U, Swedenborg J, Tryggvason K. Recombinant human laminin-10 (5 1 1). *J Biol Chem*, 277, 12741-12748, 2002.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、ヒト幹細胞のフィーダーフリー培養基質として利用可能なラミニンフラグメントの活性を乾燥状態で長期間安定に維持するための技術を見出し、ヒト幹細胞のフィーダーフリー培養基質として利用可能なラミニンフラグメントがその活性を維持したまま乾

50

乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、上記課題を解決するために、以下の発明を包含する。

[1] 細胞と接触する表面に、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体が乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具であって、該ラミニンフラグメントがラミニン 5 1 1 およびラミニン 5 2 1 から選択される少なくとも1種のフラグメントであり、以下の(1)、(2)または(3)であることを特徴とする細胞培養器具。

(1) 細胞と接触する表面に、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体のみが乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具

(2) 細胞と接触する表面に、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、インテグリン 6 1 結合活性を有しないラミニンフラグメントが乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具

(3) 細胞と接触する表面に、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、ラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質が乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具

[2] 前記(1)において、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体が  $0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上の濃度でコーティングされていることを特徴とする前記[1]に記載の細胞培養器具。

[3] 前記(2)において、 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下の濃度のインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、その3倍以上の濃度のインテグリン 6 1 結合活性を有しないラミニンフラグメントがコーティングされていることを特徴とする前記[1]に記載の細胞培養器具。

[4] 前記(3)において、 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下の濃度のインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、その20倍以上の濃度のラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質がコーティングされていることを特徴とする前記[1]に記載の細胞培養器具。

[5] ラミニンフラグメントが、ラミニン E 8 フラグメントであることを特徴とする前記[1]に記載の細胞培養器具。

[6] インテグリン 6 1 結合活性を有しないラミニンフラグメントがラミニン 2 1 1 のフラグメントであることを特徴とする前記[1]に記載の細胞培養器具。

[7] ラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質が、ゼラチン、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、トランスフェリン、ミエリン塩基性蛋白質、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびコラーゲンからなる群より選択される1種以上であることを特徴とする前記[1]に記載の細胞培養器具。

[8] 細胞と接触する表面に所望の全蛋白質をコーティングした後、乾燥させることにより製造されることを特徴とする前記[1]~[7]のいずれかに記載の細胞培養器具。

[9] 細胞と接触する表面に、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体が乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具の製造方法であって、該ラミニンフラグメントがラミニン 5 1 1 およびラミニン 5 2 1 から選択される少なくとも1種のフラグメントであり、(A)コーティングされる蛋白質を含むコーティング溶液を調製する工程、(B)細胞培養器具の細胞と接触する表面に所望の全蛋白質をコーティングする工程、および(C)コーティングされた蛋白質を乾燥する工程を含むことを特徴とする製造方法。

[10] 哺乳動物細胞の培養方法であって、前記[1]~[8]のいずれかに記載の細胞培養器具を用いることを特徴とする培養方法。

[11] 哺乳動物細胞が、ES細胞、iPS細胞もしくは体性幹細胞またはこれらの細胞から分化した細胞である前記[10]に記載の培養方法。

[12] ゼラチン、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、トランスフェリン、ミエ

10

20

30

40

50

リン塩基性蛋白質、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、コラーゲンおよびラミニン 2 1 1 の E 8 フラグメントからなる群より選択される 1 種以上を有効成分とし、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体の乾燥によるインテグリン 6 1 結合活性の低下を抑制する活性低下抑制剤。

【0009】

[13] コーティングされる蛋白質が、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体のみであり、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体が  $0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上の濃度でコーティングされることを特徴とする前記 [9] に記載の製造方法。

10

[14] コーティングされる蛋白質が、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、インテグリン 6 1 結合活性を有しないラミニンフラグメントであり、 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下の濃度のインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、その 3 倍以上の濃度のインテグリン 6 1 結合活性を有しないラミニンフラグメントがコーティングされることを特徴とする前記 [9] に記載の製造方法。

[15] コーティングされる蛋白質が、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、ラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質であり、 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下の濃度のインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、その 20 倍以上の濃度のラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質がコーティングされることを特徴とする前記 [9] に記載の製造方法。

20

[16] ラミニンフラグメントが、ラミニン E 8 フラグメントであることを特徴とする前記 [9] に記載の製造方法。

[17] インテグリン 6 1 結合活性を有しないラミニンフラグメントがラミニン 2 1 1 のフラグメントであることを特徴とする前記 [9] に記載の製造方法。

[18] ラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質が、ゼラチン、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、トランスフェリン、ミエリン塩基性蛋白質、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびコラーゲンからなる群より選択される 1 種以上であることを特徴とする前記 [9] に記載の製造方法。

[19] インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントが、ラミニン 5 1 1 およびラミニン 5 2 1 から選択される少なくとも 1 種のフラグメントであることを特徴とする前記 [12] に記載の活性低下抑制剤。

30

[20] ラミニンフラグメントが、ラミニン E 8 フラグメントであることを特徴とする前記 [12] または [19] に記載の活性低下抑制剤。

【0010】

以下、ラミニン 5 1 1 を「ラミニン 5 1 1」、ラミニン 5 2 1 を「ラミニン 5 2 1」、ラミニン 2 1 1 を「ラミニン 2 1 1」と記す。他のラミニンも同様に略記する。ラミニン E 8 フラグメントを「ラミニン E 8」と記し、E 8 フラグメントを単に「E 8」と記す。

【発明の効果】

40

【0011】

本発明によれば、ヒト多能性幹細胞のフィーダーフリー培養基質として利用可能なインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントが乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具およびその製造方法ならびに当該細胞培養器具を用いる哺乳動物細胞の培養方法を提供することができる。また、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントの乾燥によるインテグリン 6 1 結合活性の低下を抑制する活性低下抑制剤を提供することができる。本発明の細胞培養器具は、製造後長期の保存が可能であり、長期保存後においても幹細胞をフィーダーフリー環境下で良好に培養することができる。

【図面の簡単な説明】

50

## 【 0 0 1 2 】

【図1】ヒトiPS細胞の増殖におけるヒトラミン511E8濃度依存性を確認した結果を示す図である。

【図2】ヒトラミン511E8をプレートにコーティング後乾燥させ、61インテグリン結合活性を検討した結果を示す図である。

【図3】ヒトラミン511E8をプレートにコーティング後乾燥させ、ヒトiPS細胞の接着、増殖に及ぼす影響を検討した結果を示す図であり、(A)は201B7細胞、(B)はTic細胞の結果である。

【図4】ヒトラミン511E8コーティング後の乾燥によるインテグリン結合活性低下の濃度依存性を検討した結果を示す図である。

10

【図5】各種活性低下抑制剤候補物質の効果を評価した結果を示す図である。

【図6】各種蛋白質による活性低下抑制効果を検討した結果を示す図である。

【図7】3段階のヒトラミン511E8濃度と7段階のゼラチン濃度を組み合わせて活性低下抑制効果の濃度依存性を検討した結果を示す図であり、(A)はコーティング後乾燥せずに61インテグリン結合活性を測定した結果、(B)はコーティング後乾燥させて61インテグリン結合活性を測定した結果である。

【図8】活性低下抑制剤の添加時期を検討した結果を示す図である。

【図9】活性低下抑制剤の効果の持続性を検討するために、コーティング後乾燥させたプレートを8週間保管し、ヒトiPS細胞を7日間培養した結果を示す図である。

【図10】BSAの濃度依存的な活性低下抑制効果を検討した結果を示す図である。

20

【図11】ヒトラミン511E8および全長ヒトラミン511に対する活性低下抑制効果を検討した結果を示す図である。

【図12】ヒトラミン521E8に対する活性低下抑制効果を検討した結果を示す図である。

【図13】ヒトラミン211E8のヒトラミン511E8に対する活性低下抑制効果を検討した結果を示す図である。

【図14】パールカンのヘパラン硫酸鎖結合ドメインを1鎖E8フラグメントのN末端部に付加したヒトラミン511E8(Plus#3ラミンE8)に対する活性低下抑制効果を検討した結果を示す図である。

【図15】パールカンのヘパラン硫酸鎖結合ドメインを5鎖E8フラグメントのC末端部に付加したヒトラミン511E8(Plus#5ラミンE8)に対する活性低下抑制効果を検討した結果を示す図である。

30

【図16】パールカンのヘパラン硫酸鎖結合ドメインを5鎖E8フラグメントのC末端部に付加したヒトラミン511E8(Plus#5ラミンE8)を活性低下抑制剤の存在下または非存在下でコーティングした後乾燥させたプレート上でヒトiPS細胞を1週間培養した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 1 3 】

〔細胞培養器具〕

本発明は、細胞と接触する表面に、インテグリン61結合活性を有するラミンフラグメントまたはその改変体が乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具を提供する。細胞培養器具は動物細胞の培養に使用できるものであれば特に限定されないが、哺乳動物細胞の培養に使用できるものが好ましく、哺乳動物の幹細胞の培養に使用できるものがより好ましく、ヒトの幹細胞の培養に使用できるものがさらに好ましく、ヒト多能性幹細胞の培養に使用できるものが特に好ましい。具体的には、例えば、ガラス製またはプラスチック製のシャーレ、フラスコ、マルチウェルプレート、カルチャースライド、マイクロキャリア、ポリピニリデンフルオリド膜等のポリマー膜などが挙げられる。

40

## 【 0 0 1 4 】

ラミンは、鎖、鎖および鎖の3本のサブユニット鎖からなるヘテロ3量体分子である。鎖は1~5の5種類、鎖は1~3の3種類、鎖は1~3の3

50

種類が知られており、それらの組み合わせで少なくとも12種類以上のアイソフォームが存在する。本発明に用いられるラミニンは、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンであればよいが、中でもラミニン 5 1 1 およびラミニン 5 2 1 から選択される少なくとも1種であることが好ましい。

#### 【0015】

本発明に用いられるラミニンは、インテグリン 6 1 結合活性を有するフラグメントまたはその改変体であることが好ましい。ラミニンフラグメントは、インテグリン 6 1 結合活性を失活しない限り、鎖、鎖および鎖の少なくとも1つ以上が全長より短いフラグメントからなるラミニンフラグメントであればよい。好ましくはヘテロ3量体を形成しているラミニンフラグメントである。ラミニンフラグメントがヘテロ3量体を形成していることは、ラミニンフラグメントを SDS - PAGE に供し、バンドの数を検出すること等により確認できる。ラミニンフラグメントがインテグリン 6 1 結合活性を有していることは、固相結合アッセイ等により確認することができる。

10

#### 【0016】

ヘテロ3量体を形成しているラミニンフラグメントの中でも、インテグリン結合活性の強さ、組換えタンパク質としての発現効率等の観点からラミニン E 8 が好ましい。ラミニン E 8 は、マウスラミニン 1 1 1 (以下「マウスラミニン 1 1 1」と記す)をエラスターゼで消化して得られたフラグメントの中で、強い細胞接着活性をもつフラグメントとして同定されたものである (Edgar D., Timpl R., Thoenen H. The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J.*, 3:1463-1468, 1984.; Goodman SL., Deutzmann R., von der Mark K. Two distinct cell-binding domains in laminin can independently promote nonneuronal cell adhesion and spreading. *J. Cell Biol.*, 105:589-598, 1987.)。マウスラミニン 1 1 1 以外のラミニンについてもエラスターゼで消化した際にマウスラミニン 1 1 1 の E 8 に相当するフラグメントの存在が推定されるが、マウスラミニン 1 1 1 以外のラミニンをエラスターゼで消化して E 8 を分離、同定した報告はない。したがって、本発明に用いられるラミニン E 8 は、ラミニンのエラスターゼ消化産物であることを要するものではなく、マウスラミニン 1 1 1 の E 8 と同様の細胞接着活性を有し、同様の構造を有し、同程度の分子量を有するラミニンのフラグメントであればよい。

20

本発明に用いられるインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントは、ヘテロ3量体を形成しているラミニン 5 1 1 のフラグメントおよび/またはヘテロ3量体を形成しているラミニン 5 2 1 のフラグメントであることが好ましく、ラミニン 5 1 1 E 8 および/またはラミニン 5 2 1 E 8 であることが好ましい。

30

#### 【0017】

ラミニンの由来は特に限定されず、各種生物由来のラミニンを用いることができる。好ましくは哺乳動物由来のラミニンである。哺乳動物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ等が挙げられるが、限定されない。なかでもヒト由来のラミニンを用いることが特に好ましい。ヒトの再生医療材料を得るためにヒト幹細胞を培養する場合には、培養系から異種生物由来の成分を排除するゼノフリー条件を満たす培養環境が求められることから、ヒト由来のラミニンを用いることが好ましい。

40

#### 【0018】

ラミニンは天然型であってもよく、その生物学的活性を維持したまま、1個またはそれ以上のアミノ酸残基が修飾された修飾型であってもよい。ラミニンフラグメントの製造方法は特に限定されず、例えば、全長ラミニンをエラスターゼ等のタンパク質分解酵素で消化し、目的のフラグメントを分取、精製する方法や、組換えタンパク質として製造する方法などが挙げられる。製造量、品質の均一性、製造コスト等の観点から、組換えタンパク質として製造することが好ましい。なお、全長ラミニンは、例えば、ラミニン高発現細胞から精製する方法や、組換えタンパク質として製造する方法などにより製造することができる。

#### 【0019】

50

組換え全長ラミニン、組換えラミニンフラグメントは、公知の遺伝子組換え技術を用いることにより製造することができる。組換えラミニン、組換えラミニンフラグメントの製造方法としては、例えば、鎖、鎖および鎖の各全長タンパク質または部分タンパク質をコードするDNAをそれぞれ取得し、これをそれぞれ発現ベクターに挿入し、得られた3種類の発現ベクターを適切な宿主細胞に共導入して発現させ、3量体を形成しているタンパク質を公知の方法で精製することにより製造することができる。組換えラミニン(全長)の製造方法としては、例えばI d o ら (Hiroyuki Ido, Kenji Harada, Sugiko Futaki, Yoshitaka Hayashi, Ryoko Nishiuchi, Yuko Natsuka, Shaoliang Li, Yoshinao Wada, Ariana C. Combs, James M. Ervasti, and Kiyotoshi Sekiguchi, "Molecular dissection of the -dystroglycan- and integrin-binding sites within the globular domain of human laminin-10" *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 10946-10954, 2004.) の方法などが挙げられるが、これに限定されるものではない。組換えラミニンE8の製造方法としては、例えばI d o ら (Hiroyuki Ido, Aya Nakamura, Reiko Kobayashi, Shunsuke Ito, Shaoliang Li, Sugiko Futaki, and Kiyotoshi Sekiguchi, "The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin chains in integrin binding by laminins" *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 11144-11154, 2007.) の方法が挙げられるが、これに限定されるものではない。

10

## 【0020】

主要な哺乳動物のラミニンを構成する鎖、鎖、鎖をコードする遺伝子の塩基配列情報および各鎖のアミノ酸配列情報は、公知のデータベース(GenBank等)から取得することができる。表1に、ヒトを含む主な哺乳動物について、ラミニンを構成する各鎖のアクセッション番号を示す。これら以外の各種生物由来のラミニン構成鎖の塩基配列情報およびアミノ酸配列情報も同様に公知のデータベース(GenBank等)から取得することができる。

20

## 【0021】

【表 1】

	アミノ酸配列	塩基配列
ヒトラミニン $\alpha$ 1 鎖	NP_005550	NM_005559
ヒトラミニン $\alpha$ 2 鎖	NP_000417	NM_000426
ヒトラミニン $\alpha$ 3 鎖	NP_000218	NM_000227
ヒトラミニン $\alpha$ 4 鎖	NP_002281	NM_002290
ヒトラミニン $\alpha$ 5 鎖	NP_005551	NM_005560
ヒトラミニン $\beta$ 1 鎖	NP_002282	NM_002291
ヒトラミニン $\beta$ 2 鎖	NP_002283	NM_002292
ヒトラミニン $\beta$ 3 鎖	NP_000219	NM_000228
ヒトラミニン $\gamma$ 1 鎖	NP_002284	NM_002293
ヒトラミニン $\gamma$ 2 鎖	NP_005553	NM_005562
ヒトラミニン $\gamma$ 3 鎖	NP_006050	NM_006059
マウスラミニン $\alpha$ 5 鎖	NP_001074640	NM_001081171
マウスラミニン $\beta$ 1 鎖	NP_032508	NM_008482
マウスラミニン $\gamma$ 1 鎖	NP_034813	NM_010683
ラットラミニン $\alpha$ 5 鎖	NP_001178538	NM_001191609
ラットラミニン $\beta$ 1 鎖	NP_001100191	NM_001106721
ラットラミニン $\gamma$ 1 鎖	NP_446418	NM_053966

10

20

## 【 0 0 2 2 】

ラミニン E 8 は、鎖の C 末端フラグメントから球状ドメイン 4 および 5 が除かれたフラグメント（以下「鎖 E 8」と記す）、鎖の C 末端フラグメント（以下「鎖 E 8」と記す）および鎖の C 末端フラグメント（以下「鎖 E 8」と記す）が 3 量体を形成したフラグメントであり、3 量体の分子量は約 150 ~ 約 170 kDa である。鎖 E 8 は通常約 770 個のアミノ酸からなり、N 末端側の約 230 アミノ酸が 3 量体形成に関わる。鎖 E 8 は通常約 220 ~ 約 230 個のアミノ酸からなる。鎖 E 8 は通常約 240 ~ 約 250 個のアミノ酸からなる。鎖 E 8 の C 末端部から 3 番目のグルタミン酸残基はラミニン E 8 の細胞接着活性に必須である (Hiroyuki Ido, Aya Nakamura, Reiko Kobayashi, Shunsuke Ito, Shaoliang Li, Sugiko Futaki, and Kiyotoshi Sekiguchi, "The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin chains in integrin binding by laminins" The Journal of Biological Chemistry, 282, 11144-11154, 2007.)。

30

40

## 【 0 0 2 3 】

本発明に用いられるラミニンフラグメントの改変体としては、例えば、インテグリン 6-1 結合活性を有するラミニンフラグメントに細胞接着分子または増殖因子結合分子が結合している改変ラミニンが挙げられる (国際公開公報第 2012/137970 号参照)。細胞接着分子としては、例えば、インテグリンと結合する細胞接着分子 (フィブロネクチン、コラーゲン、ピトロネクチン、ネフロネクチン、オステオポンチン、MAEG、テネイシン、SVEP1、TGF- $\beta$ 1 latency associated peptide、TGF- $\beta$ 3 latency associated peptide など)、膜結合型プロテオグリカンと結合する細胞接着分子 (フィブロネクチン、ピトロネク

50

チン、ネフロネクチン、ラミニンなど)、ジスコイジンドメイン受容体と結合する細胞接着分子、ジストログリカンと結合する細胞接着分子(ラミニンなど)、細胞表面の糖鎖と結合する細胞接着分子(Concanavalin A、Dolichos biflorus agglutinin、Arachis hypogaea agglutinin、Ricinus communis agglutinin、Wheat germ agglutininなど)が好ましい。

増殖因子結合分子としては、例えば、パールカン、アグリニン、XVIIII型コラーゲン、シンデカン1~4、グリピカン1~6などのヘパラン硫酸プロテオグリカン、latent TGF-binding protein 1~4などが好ましい。

#### 【0024】

ラミニンフラグメントの改変体は、公知の遺伝子組換え技術を用いることにより組み換えタンパク質として製造することができる。公知の細胞接着分子および増殖因子結合分子の塩基配列情報およびアミノ酸配列情報は、公知のデータベース(GenBank等)から取得することができる。

#### 【0025】

本発明の細胞培養器具は、以下の(1)、(2)、(3)のいずれかであればよい。

(1)細胞と接触する表面に、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体のみが乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具

(2)細胞と接触する表面に、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性を有しないラミニンフラグメントが乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具

(3)細胞と接触する表面に、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体と、ラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質が乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具

すなわち、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性を有するラミニンフラグメントまたはその改変体(以下、「 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等」と記す)が乾燥状態でコーティングされている細胞培養器具は、上記(1)、(2)または(3)の形態で提供されることにより、製造後長期の保存が可能となり、長期保存後においてもインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  依存的な細胞接着と、それに続く細胞増殖を低下させることなく、ヒト幹細胞をフィーダーフリー環境下で良好に培養できる。

#### 【0026】

上記(1)の細胞培養器具において、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性を有する  $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等のコーティング濃度は、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等をコーティング後乾燥させた場合のインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性が、同じ濃度の  $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等が乾燥していない状態でコーティングされている場合のインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性に対して、60%以上となる濃度が好ましく、70%以上となる濃度がより好ましく、80%以上となる濃度がさらに好ましく、90%以上となる濃度がさらに好ましく、95%以上となる濃度が特に好ましい。インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性の比較は、例えば後述する実施例2に記載の方法で行うことができる。具体的には、適当な濃度に調製した  $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等の溶液を96ウェルマイクロプレートに添加して4℃で一晩コーティングし、PBSで洗浄した後室温で1時間乾燥したプレートと、PBSで洗浄した後乾燥していないプレートに、それぞれインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  を添加して3時間反応させた後の結合量を測定することにより行うことができる。

#### 【0027】

上記(1)の細胞培養器具において、ラミニンE8が $0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上の濃度でコーティングされていれば、通常実施例2に記載の方法で活性を測定したときに、ラミニンE8が乾燥していない状態でコーティングされている場合の60%以上の活性となる。

$\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等のコーティング濃度は、 $0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上であればよく、好ましくは $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上、より好ましくは $1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上、さらに好ましくは $1.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上、さらに好ましくは $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上である

10

20

30

40

50

。上限は特に限定されないが、製造コストおよび効果の点で高濃度を用いる利益はなく、好ましくは  $5.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下である。

【0028】

上記(2)の細胞培養器具において、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等のコーティング濃度は、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等をコーティングし、室温で1時間乾燥させた後、密封して4週で8週間保存したときに、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性またはヒト i P S 細胞の増殖活性が低下する濃度であることが好ましい。活性の低下の程度は、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等が乾燥していない状態でコーティングされている場合と比較して70%以下が好ましく、60%以下がより好ましく、50%以下がさらに好ましい。 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等と同時にコーティングするインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性を有しないラミニンフラグメント(以下、「他のラミニンフラグメント」と記す)のコーティング濃度は、ラミニンフラグメントと同時にコーティングすることにより、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等が乾燥していない状態でコーティングされている場合のインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性またはヒト i P S 細胞の増殖活性に対して、60%以上の活性が維持できる濃度が好ましく、70%以上の活性が維持できる濃度がより好ましく、80%以上の活性が維持できる濃度がさらに好ましく、90%以上の活性が維持できる濃度がさらに好ましく、95%以上の活性が維持できる濃度が特に好ましい。

10

【0029】

上記(2)の細胞培養器具において、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等のコーティング濃度は上記の条件を満たす濃度であればよく、特に限定されない。 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等のコーティング濃度は  $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下であることが好ましく、より好ましくは  $1.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下、さらに好ましくは  $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下、さらに好ましくは  $0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下である。下限は、 $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上が好ましい。すなわち、 $0.2 \sim 1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  が好ましく、 $0.2 \sim 1.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  がより好ましく、 $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  がさらに好ましく、 $0.2 \sim 0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  がさらに好ましい。

20

【0030】

他のラミニンフラグメントは、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性を有しないラミニンフラグメントであれば特に限定されないが、好ましくはヘテロ3量体を形成しているラミニンフラグメントであり、より好ましくはラミニンE8である。なかでも、ラミニン211のフラグメントが好ましく、ヘテロ3量体を形成しているラミニン211フラグメントがより好ましく、ラミニン211E8がさらに好ましい。他のラミニンフラグメントは一種のみを用いてもよく、二種以上を組み合わせて用いてもよい。他のラミニンフラグメントのコーティング濃度は、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等のコーティング濃度の3倍以上であればよく、好ましくは4倍以上、より好ましくは5倍以上である。上限は特に限定されず、例えば300倍以下とすることができる。ラミニンフラグメントまたはその改変体のコーティング濃度が低いほど、他のラミニンフラグメントのコーティング濃度を高くすることが好ましい。

30

【0031】

上記(3)の細胞培養器具において、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等のコーティング濃度は、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等をコーティングし、室温で1時間乾燥させた後、密封して4週で8週間保存した時に、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性またはヒト i P S 細胞の増殖活性が低下する濃度であることが好ましい。活性の低下の程度は、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等が乾燥していない状態でコーティングされている場合と比較して70%以下が好ましく、60%以下がより好ましく、50%以下がさらに好ましい。ラミニンフラグメントと同時にコーティングするラミニンまたはそのフラグメント以外の蛋白質(以下、「他の蛋白質」と記す)のコーティング濃度は、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等と同時にコーティングすることにより、ラミニンフラグメントが乾燥していない状態でコーティングされている場合のインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  結合活性またはヒト i P S 細胞の増殖活性に対して、60%以上の活性が維持できる濃度が好ましく、70%以上の活性が維持できる濃度がよ

40

50

り好ましく、80%以上の活性が維持できる濃度がさらに好ましく、90%以上の活性が維持できる濃度がさらに好ましく、95%以上の活性が維持できる濃度が特に好ましい。

【0032】

上記(3)の細胞培養器具において、6-1活性フラグメント等のコーティング濃度は上記の条件を満たす濃度であればよく、特に限定されない。6-1活性フラグメント等のコーティング濃度は $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下であることが好ましく、より好ましくは $1.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下、さらに好ましくは $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下、さらに好ましくは $0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下である。下限は、 $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上が好ましい。すなわち、 $0.2 \sim 1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ が好ましく、 $0.2 \sim 1.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ がより好ましく、 $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ がさらに好ましく、 $0.2 \sim 0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ がさらに好ましい。

10

【0033】

他の蛋白質は特に限定されず、どのような蛋白質でもインテグリン6-1結合活性を有するラミニンフラグメントの乾燥によるインテグリン6-1結合活性の低下を抑制することができる。好ましくは水溶性蛋白質である。また、他の蛋白質の分子量は特に限定されないが、分子量が10000以上であることが好ましい。他の蛋白質の分子量は15000以上であることがより好ましく、20000以上であることがさらに好ましく、30000以上であることがさらに好ましく、40000以上であることがさらに好ましく、60000以上であることがさらに好ましい。

【0034】

20

他の蛋白質として、具体的には、例えば、ゼラチン、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、トランスフェリン、ミエリン塩基性蛋白質、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、セリシン、コラーゲンなどが挙げられる。好ましくはゼラチン、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、トランスフェリン、ミエリン塩基性蛋白質、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼまたはコラーゲンであり、より好ましくはゼラチン、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミンまたはトランスフェリンであり、さらに好ましくはゼラチンまたはヒト血清アルブミンである。他の蛋白質は一種のみを用いてもよく、二種以上を組み合わせ用いてもよい。他の蛋白質のコーティング濃度は、6-1活性フラグメント等のコーティング濃度の20倍以上であればよく、好ましくは100倍以上、より好ましくは500倍以上、さらに好ましくは1000倍以上である。上限は特に限定されず、例えば5000倍以下とすることができる。

30

【0035】

ゼラチンを用いる場合、細胞培養用途に使用される公知のゼラチンを好適に用いることができる。本発明の細胞培養器具を再生医療用の細胞培養に用いる場合は、医療用途の安全性が確認されているゼラチンを用いることが好ましい。医療用途の安全性が確認されているゼラチンとして、ニッピハイグレードゼラチン(ニッピ)、メディゼラチン(ニッピ)などが挙げられる。

【0036】

[活性低下抑制剤]

40

上記他のラミニンフラグメントおよび他の蛋白質は、いずれも6-1活性フラグメント等の乾燥によるインテグリン6-1結合活性の低下を抑制する活性低下抑制剤の有効成分として有用である。したがって、本発明は、6-1活性フラグメント等の乾燥によるインテグリン6-1結合活性の低下を抑制する活性低下抑制剤を提供する。6-1活性フラグメント等としては、ラミニン511またはラミニン521のインテグリン6-1結合活性を有するフラグメントが好ましく、ラミニン511E8またはラミニン521E8がさらに好ましい。本発明の活性低下抑制剤の有効成分は、ゼラチン、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、トランスフェリン、ミエリン塩基性蛋白質、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、コラーゲンおよびラミニン211のE8フラグメントからなる群より選択される1種以上であることが好ましい。本

50

発明の活性低下抑制剤は、本発明の培養器具を用いて細胞を培養する際に、培養細胞のインテグリン 6 1 依存的な細胞接着と、それに続く細胞増殖の低下を抑制することができる。

【 0 0 3 7 】

〔細胞培養器具の製造方法〕

本発明の細胞培養器具は、以下の製造方法により製造することができる。

( A ) コーティング溶液を調製する工程

コーティング溶液は、コーティングされる蛋白質を含む溶液である。コーティング溶液は、一種の蛋白質を含むものでもよく、二種以上の蛋白質を含むものでもよい。複数の蛋白質をコーティングする場合、作業の効率化と簡便性の点で、コーティングするすべての蛋白質を含むコーティング溶液を調製することが好ましい。コーティング溶液に含まれる蛋白質の濃度は、培養器具の細胞と接触する表面におけるコーティング濃度を考慮して、目的のコーティング濃度になるように適宜設定すればよい。コーティング溶液に用いることができる溶媒は、蛋白質の活性を低下させない溶媒であれば特に限定されないが、水性溶媒が好ましい。一般に蛋白質の溶媒として用いられる中性の緩衝液を好適に用いることができる。具体的には、リン酸、クエン酸、ホウ酸、酢酸、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、H E P E S [ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ] など、p H を中性付近に合わせた生理食塩液などが挙げられる。コーティング溶液は、ろ過滅菌等の滅菌処理を行うことが好ましい。

【 0 0 3 8 】

上記( 1 )の細胞培養器具を製造する場合、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントを含むコーティング溶液を調製すればよい。

上記( 2 )の細胞培養器具を製造する場合、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントを含むコーティング溶液と、他のラミニンフラグメントを含むコーティング溶液を別々に調製してもよく、両者を含むコーティング溶液を調製してもよい。コーティングされる全蛋白質が含まれるコーティング溶液を調製することが好ましい。

上記( 3 )の細胞培養器具を製造する場合、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントを含むコーティング溶液と、他の蛋白質を含むコーティング溶液を別々に調製してもよく、両者を含むコーティング溶液を調製してもよい。コーティングされる全蛋白質が含まれるコーティング溶液を調製することが好ましい。

【 0 0 3 9 】

( B ) 細胞培養器具の細胞と接触する表面に所望の全蛋白質をコーティングする工程

細胞培養器具のコーティングしようとする表面に、コーティング溶液を接触させ、一定時間静置または緩やかに振盪することにより、コーティング溶液に含まれる蛋白質をコーティングすることができる。細胞培養容器の底面をコーティングする場合は、コーティング溶液を容器内に添加すればよい。シート状または膜状の細胞培養器具の表面をコーティングする場合は、コーティングする領域にコーティング溶液を重層すればよい。複数のコーティング溶液を用いる場合は、複数のコーティング溶液を順次添加または重層することにより、所望の全蛋白質をコーティングすることができる。ここで、「所望の全蛋白質をコーティングする」とは、コーティングされる蛋白質が2種以上である場合に、1種目の蛋白質のコーティング終了後に2種目の蛋白質をコーティングするのではなく、2種以上の全蛋白質を同時にコーティングすることを意味する。コーティング条件は特に限定されないが、4 で約2 ~ 18時間、または室温 ~ 37 で約0 . 5 ~ 6時間行えばよい。所定時間経過後、添加または重層したコーティング溶液を除去する。コーティング溶液除去後、コーティングされた表面を洗浄することが好ましい。洗浄液は特に限定されないが、P B S 等の緩衝生理食塩液を用いることが好ましい。本工程は、クリーンルーム内、クリーンベンチ内などの無菌環境下で行うことが好ましい。

【 0 0 4 0 】

( C ) コーティングされた蛋白質を乾燥する工程

乾燥方法は特に限定されず、自然乾燥、減圧乾燥等の周知の方法を用いることができる

。乾燥温度は、コーティングされた蛋白質が変性または失活しない温度であればよく、室温で好適に行うことができる。通常約2 ～約40 の範囲であればよく、好ましくは約4 ～約37 、より好ましくは約10 ～約30 、さらに好ましくは約15 ～約25 である。乾燥時間は特に限定されず、目視により液体の残存がなく、コーティングの表面が乾燥していることを確認できた時点で乾燥を終了することができる。細胞培養器具の形状、コーティング溶液の組成、乾燥方法、乾燥温度等の条件に応じて、予め最適な乾燥時間を設定することが好ましい。本工程は、クリーンルーム内、クリーンベンチ内などの無菌環境下で行うことが好ましい。

#### 【0041】

コーティングされた蛋白質を乾燥する工程の後に、乾燥した蛋白質を滅菌する工程を設けてもよい。滅菌方法としては、ガンマー線滅菌、電子線滅菌、エックス線滅菌などの放射線滅菌、紫外線滅菌などが好ましく用いられる。蛋白質を変性させる恐れがある滅菌法、例えばエチレンオキサイドガス滅菌などの化学的滅菌や、高熱をかける高圧蒸気滅菌などは用いないほうがよい。滅菌工程を設けることにより、本発明の細胞培養器具の製造を厳密な無菌条件下で行う必要がなくなり、製造コストを抑制することができる。

10

#### 【0042】

このようにして製造された細胞培養器具は、密封包装することにより長期間安定に保存することができる。保存温度は室温以下であることが好ましく、より低温（例えば、約4 ）で保存することが好ましい。本発明者らは、コーティング蛋白質を乾燥後、密封包装して4 で保存した細胞培養器具は、少なくとも20週間経過後においても良好なインテグリン 6 1 結合活性を有し、ヒトiPS細胞が良好に増殖したことを確認している。

20

#### 【0043】

##### 〔哺乳動物細胞の培養方法〕

本発明は、上記本発明の細胞培養器具を用いて哺乳動物細胞を培養する培養方法を提供する。本発明の細胞培養器具を用いることにより、従来フィーダー細胞を用いて培養している細胞を、フィーダー細胞を用いることなく培養することが可能となる。また、本発明の細胞培養器具を用いることにより、ヒト多能性幹細胞を単一細胞に分散して培養することが可能となる。

#### 【0044】

本発明の培養方法は、どのような哺乳動物細胞の培養にも適用できるが、幹細胞の培養に適用することが好ましい。幹細胞は、自己複製能と多分化能を持った細胞を意味し、体性幹細胞、多能性幹細胞などが含まれる。体性幹細胞としては、神経幹細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞などが挙げられる。多能性幹細胞としては、ES細胞（胚性幹細胞）、iPS細胞（人工多能性幹細胞）、mGS細胞（多能性生殖幹細胞）、ES細胞と体細胞との融合細胞などが挙げられる。より好ましくは多能性幹細胞であり、さらに好ましくはES細胞、iPS細胞である。また、本発明の培養方法は、上記幹細胞から分化した細胞の培養にも好適に用いることができる。幹細胞から分化した細胞には幹細胞を分化誘導した各種細胞が含まれる。すなわち、本発明の培養方法は、幹細胞から最終分化細胞に至る過程における種々の分化段階の細胞の培養に好適に用いることができる。哺乳動物は特に限定されず、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ等が挙げられる。なかでもヒトが好ましい。すなわち、本発明の培養方法は、ヒト幹細胞およびヒト幹細胞から分化した細胞の培養に用いることが好ましい。また、本発明の培養方法を用いてヒト幹細胞またはヒト幹細胞から分化した細胞の培養を行う場合には、ヒト由来の改変ラミニンを用いることが好ましい。

30

40

#### 【0045】

本発明の培養方法で哺乳動物細胞を培養する際に使用する培地は特に限定されず、培養対象の細胞に応じて、推奨される公知の培地を用いることができる。また、具体的な培養手順は特に限定されず、培養対象の細胞に応じて、推奨される公知の培養手順に従い培養することが好ましい。

#### 【0046】

50

ヒト幹細胞を医療で利用するためには、細胞の培養法を標準化し、医療の現場で誰でもヒト幹細胞を培養できるようにする必要がある。そのためには、細胞培養法をできる限りルーチン化する必要があり、細胞培養器具についてもインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントが予めコーティングされたものが製品化され、利用できることが望ましい。本発明により、インテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメント（例えば、ラミニン 5 1 1 E 8 またはラミニン 5 2 1 E 8）を至適濃度でコーティングした細胞培養器具を長期間安定に保存することが可能となるため、予めインテグリン 6 1 結合活性を有するラミニンフラグメントがコーティングされた細胞培養器具の製品化が可能となる。このようなコーティング済みの培養器具を利用することにより、細胞培養操作を効率的に行えるだけでなく、コーティングの際の個人誤差を排除することができ、ヒト幹細胞を用いる医療の普及に大きく貢献することが期待される。

10

## 【 0 0 4 7 】

発明者らは、細胞培養器具の表面にコーティングしたラミニンフラグメントの活性を乾燥状態で長期間安定に維持するための技術開発を進める過程で、大過剰のゼラチン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン等を同時にコーティングすることにより、ラミニンフラグメントの乾燥による活性低下が抑制され、乾燥していない場合と同等の活性が維持できることを見出した。常識的には、大過剰のゼラチン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン等を同時にコーティングすれば、これらがラミニンフラグメントの培養器具への吸着を拮抗的に阻害し、結果としてラミニンフラグメントのコーティングが著しく損なわれると考えられる。しかし実際には、大過剰のゼラチン等の共存下でラミニンフラグメントをコーティングしても該ラミニンフラグメントのコーティング量および活性はほとんど影響を受けなかった。その理由は不明であるが、従来技術常識に照らせば、全く予想外の結果であるといえる。

20

## 【 実施例 】

## 【 0 0 4 8 】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 【 0 0 4 9 】

〔ヒト組換えラミニン 5 1 1 E 8 の作製〕

ヒト組換えラミニン 5 1 1 E 8（以下、「5 1 1 E 8」と記す）は、I d o ら（Hiroyuki Ido, Aya Nakamura, Reiko Kobayashi, Shunsuke Ito, Shaoliang Li, Sugiko Futaki, and Kiyotoshi Sekiguchi, “The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin chains in integrin binding by laminins” The Journal of Biological Chemistry, 282, 11144-11154, 2007）に記載の方法に従い、以下のように作製した。

30

## 【 0 0 5 0 】

最初に、クローニング用プラスミド p B l u e s c r i p t K S ( + )（Stratagene社）を鋳型として、以下の3種類のプライマーセットを用いてPCRを行い、プラスミドのマルチクローニング部位内の E c o R V の 5 ' 側に 6 x H i s タグをコードする D N A、H A（ヘマグルチニン）タグをコードする D N A、または F L A G タグをコードする D N A が挿入された3種類の p B l u e s c r i p t K S ( + ) をそれぞれ作製した。

40

(i) 6 x H i s タグ導入用プライマー

5' -ATGATGATGAAGCTTATCGATACCGT-3' (forward、配列番号 1)

5' -CATCATCATGATATCGAATTCCTGCA-3' (reverse、配列番号 2)

(ii) H A タグ導入用プライマー

5' -ATCATATGGATAAAGCTTATCGATACCGT-3' (forward、配列番号 3)

5' -GTGCCAGATTATGCAGATATCGAATTCCT-3' (reverse、配列番号 4)

(iii) F L A G タグ導入用プライマー

5' -ATCCTTGTAATCAAGCTTATCGATACCGT-3' (forward、配列番号 5)

5' -GTGCCAGATTATGCAGATATCGAATTCCT-3' (reverse、配列番号 4)

50

## 【 0 0 5 1 】

次に、 5 鎖、 1 鎖、 1 鎖の全長塩基配列を含むプラスミド ( Ido et al., J. Bio l. Chem., 279, 10946-10954, 2004.) を鋳型として、以下のプライマーを用いた P C R を行い、各鎖の 5 ( A l a<sup>2534</sup> - A l a<sup>3327</sup> )、 1 ( L e u<sup>1561</sup> - L e u<sup>1786</sup> )、 1 ( A s n<sup>1362</sup> - P r o<sup>1608</sup> ) に相当する領域を増幅した。

(iv) 5 鎖 E 8 フラグメント増幅用プライマー

5' -GCTGCCGAGGATGCTGCTGGCCAGG-3' ( forward、配列番号 6 )

5' -CTAGGCAGGATGCCGGCGGGCTGA-3' ( reverse、配列番号 7 )

(v) 1 鎖 E 8 フラグメント増幅用プライマー

5' -CTTCAGCATAGTGCTGCTGACATTG-3' ( forward、配列番号 8 )

5' -TTACAAGCATGTGCTATACACAGCAAC-3' ( reverse、配列番号 9 )

(vi) 1 鎖 E 8 フラグメント増幅用プライマー

5' -AATGACATTCTCAACAACCTGAAAG-3' ( forward、配列番号 10 )

5' -CTAGGGCTTTTCAATGGACGGGGTG-3' ( reverse、配列番号 11 )

## 【 0 0 5 2 】

増幅した c D N A を、タグ配列を付加した p B l u e s c r i p t K S ( + ) のマルチクローニング部位の E c o R V 部位に挿入した後、5' 側のタグをコードする配列を含めて増幅した c D N A を制限酵素 E c o R I と H i n d I I I で切り出し、哺乳細胞用発現ベクター p S e c T a g 2 B ( インビトロジェン ) の当該部位に挿入し、ヒト 5 鎖 E 8 フラグメント ( N 末端側に 6 X H i s タグを含む )、ヒト 1 鎖 E 8 フラグメント ( N 末端側に H A タグを含む )、ヒト 1 鎖 E 8 フラグメント ( N 末端側に F L A G タグを含む ) の発現ベクターをそれぞれ作製した。

## 【 0 0 5 3 】

5 1 1 E 8 の発現は、作製した各鎖の発現ベクターをヒト腎臓由来 2 9 3 F 細胞 ( インビトロジェン社より購入 ) に導入して行った。300 ml の 2 9 3 F 細胞 ( 1 . 0 × 1 0<sup>6</sup> 個 / m l ) にトランスフェクション試薬 2 9 3 f e c t i n ( 商品名、インビトロジェン ) および O p t i - M E M ( 商品名、インビトロジェン ) を用いて各鎖発現ベクターを 1 8 0 μ g ずつ同時にトランスフェクトし、72 時間培養を行ったのち、培養液を回収した。培養液は 1 0 0 0 × g で 1 0 分間遠心し、その上清をさらに 1 5 , 0 0 0 × g で 3 0 分間遠心し、細胞や不溶物を除去した。培養上清に 5 m l の N i - N T A a g a r o s e ( キアゲン ) を添加し一晩インキュベートして目的タンパク質を吸着させた。N i - N T A a g a r o s e を回収し、T B S ( - ) ( C a、M g を含まないトリス緩衝生理的食塩水 ) および 1 0 m M イミダゾール / T B S ( - ) で洗浄したのち 2 0 0 m M イミダゾール / T B S ( - ) で溶出した。溶出画分は S D S - P A G E および銀染色により確認し、5 1 1 E 8 が溶出された画分に 2 m l の A N T I - F L A G M 2 a f f i n i t y G e l ( シグマ ) を添加し、4 で一晩巡回させた。ゲルをエコノカラムに移し 1 m M P M S F を含む T B S ( - ) で洗浄後、1 0 0 μ g / m l F L A G p e p t i d e ( シグマ ) を含む T B S ( - ) で溶出した。溶出フラクションを銀染色で確認し、5 1 1 E 8 の溶出された画分を合わせて T B S ( - ) に対して透析を行った。

## 【 0 0 5 4 】

〔ヒト組換えラミニン 5 2 1 E 8 の作製〕

ヒト組換えラミニン 5 2 1 E 8 ( 以下、「5 2 1 E 8」と記す ) は、上記ヒト組換えラミニン 5 1 1 E 8 の作製方法に準じて作製した。すなわち、ヒト 5 鎖 E 8 フラグメント ( N 末端側に 6 X H i s タグを含む )、ヒト 2 鎖 E 8 フラグメント ( N 末端側に H A タグを含む )、ヒト 1 鎖 E 8 フラグメント ( N 末端側に F L A G タグを含む ) の各発現ベクターをヒト腎臓由来 2 9 3 F 細胞にトランスフェクトし、72 時間培養を行ったのち、培養液を回収し、ラミニン 5 1 1 E 8 と同様に N i - N T A a g a r o s e と A N T I - F L A G M 2 a f f i n i t y G e l を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。ヒト 2 鎖 E 8 フラグメントの発現ベクターは T a n i g u c h i らの方法 ( Yukimasa Taniguchi, Hiroyuki Ido, Noriko Sanzen Maria Hayashi, Ryoko Sato-

10

20

30

40

50

Nishiguti, Sugiko Futaki, and Kiyotoshi Sekiguchi, "The C-terminal region of laminin chains modulates the integrin binding affinities of laminins" *The Journal of Biological Chemistry*, 7820-7831, 2009)に記載の方法に従い、調製した。

【0055】

〔パールカンのヘパラン硫酸鎖結合ドメインを付加したラミニン511E8の作製〕

ヒト組換えラミニン511E8のN末端部にヘパラン硫酸鎖結合部位を含むヒトパールカンのドメインI~III(以下、「Pln-D1/2/3」と記す)を融合させたラミニン511E8のC末端部にヒトパールカンのドメインI(以下、「Pln-D1」と記す)を融合させたラミニン511E8のN末端部にヘパラン硫酸鎖結合部位を含むヒトパールカンのドメインI~III(以下、「Pln-D1/2/3」と記す)を融合させたラミニン511E8の作製した。

10

【0056】

Plus #3ラミニンE8の作製に用いるPln-D1/2/3融合ヒトラミニン5鎖E8フラグメント発現ベクターは、国際公開公報第2012/137970号に記載に従い、5'側から順に、マウスIg-鎖V-J2-Cシグナルペプチド、Pln-D1/2/3、HAタグ、1鎖E8をそれぞれコードするDNA断片をつなぎ合わせて作製した。このPln-D1/2/3融合ヒトラミニン5鎖E8フラグメント発現ベクターを、ヒト5鎖E8フラグメント(N末端側に6XHisタグを含む)発現ベクターとヒト1鎖E8フラグメント(N末端側にFLAGタグを含む)発現ベクターと混合してヒト腎臓由来293F細胞にトランスフェクトし、72時間培養を行ったのち、培養液を回収した。培地中に分泌されたPlus #3ラミニンE8は、ラミニン511E8と同様にNi-NTA agaroseとANTI-FLAG M2 affinity Gelを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

20

【0057】

Plus #5ラミニンE8の作製に用いるPln-D1融合ヒトラミニン5鎖E8フラグメント発現ベクターは、以下のようにして作製した。まず、ヒトラミニン5鎖E8フラグメント発現ベクターを鋳型として、以下のプライマーを用いてPCRを行い、ヒトラミニン5鎖E8フラグメントのC末端部分(Leu<sup>611</sup>-Pro<sup>813</sup>)とヒトラミニン1鎖G3-G4ドメイン間リンカー配列(DAEDSKLLPEPRAFP、配列番号12)をコードするDNA断片を増幅した。

30

(i) リンカー配列導入のための増幅用プライマー

5'-CCTCAAGCGGCTGAACACGACAGGCG-3' (forward、配列番号13)

5'-ATATGGATCCTGAAAAGCCGGGGCTCTGGCAAGAGCTTGCTGTCCTCTGCATCAGGCCCCAGGCCCGG-3'

(reverse、配列番号14、制限酵素BamHI認識配列が含まれている)

得られたDNA断片を制限酵素AscI(この制限酵素の認識配列はヒトラミニン5鎖E8フラグメントのC末端部分をコードするDNA配列内に存在する)とBamHIで消化し、DNA断片1とした。

【0058】

次に、ヒトパールカン発現ベクター(Shaoliang Li, Chisei Shimono, Naoko Norioka, Itsuko Nakano, Tetsuo Okubo, Yoshiko Yagi, Maria Hayashi, Yuya Sato, Hitomi Fujisaki, Shunji Hattori, Nobuo Sugiura, Koji Kimata and Kiyotoshi Sekiguchi, "Activin A Binds to Perlecan through Its Pro-region That Has Heparin/Heparan Sulfate Binding Activity", *Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36645-36655, 2010)を鋳型として、以下のプライマーを用いてPCRを行い、PlnD1に相当する領域(Gly<sup>25</sup>-Pro<sup>196</sup>)にHisタグをC末端に付加した配列をコードするDNA断片を増幅した。

40

(ii) PlnD1配列増幅用プライマー

5'-ATATATATGGATCCGGGCTGAGGGCATACGATGGCTTGTCTCTG-3'

(forward、配列番号15、制限酵素BamHI認識配列が含まれている)

5'-ATATATATGCGCCGCCTAATGATGATGATGATGATGTGGAACTGGGGCACTGTGCCAG-3'

50

(reverse、配列番号16、制限酵素NotI認識配列が含まれている)

得られたDNA断片を制限酵素BamHIとNotIで消化し、DNA断片2とした。

ヒトラミニン 5鎖E8フラグメント発現ベクターを制限酵素AscIとNotIで消化して得られたヒトラミニン 5鎖E8フラグメントのN末端部分(Met<sup>1</sup>-Asp<sup>610</sup>)を含む発現ベクター断片に、上記のDNA断片1および2を挿入し、Pln-D1融合ヒトラミニン 5鎖E8フラグメント発現ベクターを完成させた。

【0059】

Pln-D1融合ヒトラミニン 5鎖E8フラグメント発現ベクターを、ヒト 1鎖E8フラグメント(N末端側にHAタグを含む)発現ベクターおよびヒト 1鎖E8フラグメント(N末端側にFLAGタグを含む)発現ベクターと混合してヒト腎臓由来293F細胞にトランスフェクトし、72時間培養を行ったのち、培養液を回収し、ラミニン511E8と同様にNi-NTA agaroseとANTI-FLAG M2 affinity Gelを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

10

【0060】

〔ヒト組換えラミニン211E8の作製〕

ヒト組換えラミニン211E8(以下、「211E8」と記す)は、上記ヒト組換えラミニン511E8の作製方法に準じて作製した。すなわち、ヒト 2鎖E8フラグメント(N末端側に6XHisタグを含む)、ヒト 1鎖E8フラグメント(N末端側にHAタグを含む)、ヒト 1鎖E8フラグメント(N末端側にFLAGタグを含む)の各発現ベクターをヒト腎臓由来293F細胞にトランスフェクトし、ラミニン511E8と同様にNi-NTA agaroseとANTI-FLAG M2 affinity Gelを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。ヒト 2鎖E8フラグメントの発現ベクターはTaniguchiらの方法(Yukimasa Taniguchi, Hiroyuki Ido, Noriko Sanzen Maria Hayashi, Ryoko Sato-Nishiguti, Sugiko Futaki, and Kiyotoshi Sekiguchi, "The C-terminal region of laminin chains modulates the integrin binding affinities of laminins" The Journal of Biological Chemistry, 7820-7831, 2009)に記載の方法に従い、調製した。

20

【0061】

〔ヒトiPS細胞201B7株の培養方法〕

ヒトiPS細胞201B7株は、理化学研究所バイオリソースセンターから入手し(#HPS0063)、推奨される培養方法に従って、マイトマイシンC処理により不活化したフィーダー細胞SNL76/7(ECACC #07032801)上で4ng/mLヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF、シグマ #F0291)を含む霊長類ES培養用培地(リプロセル #RCHEMD001)を用いて維持培養した。評価試験のためには、維持培養している201B7細胞を、511E8をコーティングした6ウェルカルチャープレート(ベクトン・ディッキンソン #353046)上に単一細胞に分散した状態で播種し、6~8日無フィーダー細胞条件で培養後、使用した。

30

【0062】

具体的には、フィーダー細胞上で維持培養した201B7細胞のコロニーから0.25%トリプシン(ライフテクノロジーズ #15090-046)/0.1mg/mLタイプIVコラゲナーゼ(ライフテクノロジーズ #17104-019)/20%KnockOut血清代替(ライフテクノロジーズ #10828-028)/1μM CaCl<sub>2</sub>溶液を用いてフィーダー細胞を除去した後、0.5xTrypLE Select(ライフテクノロジーズ #12563-011)を加えて37℃で4分間処理した。細胞はPBS(pH7.4)(ライフテクノロジーズ #10010-023)で洗浄後、終濃度10μM Y27632(メルクミリポア #688000)を含むTeSR2(ステムセル #05860)とNutriStem(バイオリジカルインダストリーズ #05-100-1)の1:1混合培地を加え、セルスクレーパーとピペッティングにより単一細胞に分散した。細胞数をカウントした後、511E8を0.5μg/cm<sup>2</sup>でコーティングした6ウェルカルチャープレート上に細胞を1.3x10<sup>4</sup>または2.6x10<sup>4</sup> cell

40

50

1 / well の密度で播種し、5% CO<sub>2</sub> / 95% Air、37 °C の湿潤条件下で Y27632 を含む TeSR2 / NutriStem 1 : 1 混合培地で培養した。播種後 1、3 日目および 5 日目以降の毎日、TeSR2 / NutriStem 1 : 1 混合培地 (Y27632 不含) を交換し、6 ~ 8 日目において細胞が培養面積の 80% 程度まで拡大した時点で実験に供した (フィーダー上での維持から 511E8 で一継代パッセージを経た細胞という意味で、以下、この細胞を 511E8P1 と呼ぶ)。

#### 【0063】

〔ヒト iPS 細胞 Tic 株の培養方法〕

ヒト iPS 細胞 Tic 株は、JCRB 細胞バンクから入手し (# JCRB1331)、推奨される培養方法に従って、マイトマイシン C 処理により不活化した初代マウス胎仔線維芽細胞 (MEF、メルクミリポア # PMEF-H) フィーダー上で 10 ng / mL ヒト bFGF を含む Tic 維持用培地を用いて維持培養した。Tic 維持用培地は、20% KnockOut 血清代替 / 非必須アミノ酸 (ライフテクノロジーズ # 11140-050) / 2 mM L-グルタミン (ライフテクノロジーズ # 25030-081) / 0.1 mM 2-メルカプトエタノール (ライフテクノロジーズ # 21985-023) を含む KnockOut DMEM / F-12 培地 (ライフテクノロジーズ # 12660-012) である。評価試験のためには、維持培養している Tic 細胞を、マトリゲルをコーティングした 6 ウェルカルチャープレート上に単一細胞に分散した状態で播種し、6 ~ 8 日無フィーダー細胞条件で培養後、使用した。

#### 【0064】

具体的には、フィーダー細胞上で維持培養した Tic 細胞をディスペルゼ II (ロシュアプライドサイエンス # 4942078) を加えて 37 °C で 7 分間処理後、TrypLE Express (ライフテクノロジーズ # 12605-010) を加え 37 °C で 4 分間処理した。細胞は、終濃度 10 μM Y27632 を含む mTeSR1 (ステムセル # 05850) を加え、セルスクレーパーとピペッティングにより単一細胞に分散した。細胞数をカウントした後、ヒト ES 細胞用マトリゲル (ベクトン・ディッキンソン # 354277) を 3 μg / cm<sup>2</sup> でコーティングした 6 ウェルカルチャープレート上に細胞を 1.3 × 10<sup>4</sup> または 2.6 × 10<sup>4</sup> cell / well の密度で播種し、5% CO<sub>2</sub> / 95% Air、37 °C の湿潤条件下で Y27632 を含む mTeSR1 培地で培養した。播種後 1、3 日目および 5 日目以降の毎日 mTeSR1 培地 (Y27632 不含) を交換し、6 ~ 8 日目において細胞が培養面積の 80% 程度まで拡大した時点で実験に供した (フィーダー上での維持からマトリゲルコート上で一継代パッセージを経た細胞という意味で、以下、この細胞を MGP1 と呼ぶ)。

#### 【0065】

〔実施例 1 : ヒト iPS 細胞の増殖における 511E8 濃度依存性の確認〕

511E8 を PBS (pH 7.4) (ライフテクノロジーズ # 10010-023) で 0.5 ~ 16 μg / mL に希釈し、24 ウェルセルカルチャープレート (ベクトン・ディッキンソン # 353047、培養面積 2 cm<sup>2</sup> / well) に終濃度が 0.125 ~ 4 μg / cm<sup>2</sup> の範囲になるようにウェルあたり 500 μl 加え、4 °C で一晩 (約 18 時間) ゆるやかに振盪しながらコーティングを行った。コーティング後、PBS (pH 7.4) で洗浄し、TeSR2 / NutriStem 1 : 1 混合培地を加えて使用まで 37 °C

CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した。511E8P1 の 201B7 細胞は、PBS (pH 7.4) で洗浄後、0.5 × TrypLE Select を加え 37 °C で 4 分間処理し、10 μM Y27632 を含む TeSR2 / NutriStem 1 : 1 混合培地中で単一細胞に分散した。細胞数をカウントした後、511E8 をコーティングしてある 24 ウェルカルチャープレート上に細胞を 1.3 × 10<sup>3</sup> cell / cm<sup>2</sup> の密度で播種し、5% CO<sub>2</sub> / 95% Air、37 °C の湿潤条件下で培養した。播種後 1、3、5、6 日目に TeSR2 / NutriStem 1 : 1 混合培地 (Y27632 不含) を交換し、7 日目にアルカリホスファターゼ染色により細胞の増殖と状態を評価した。アルカリホスファターゼ染色は白血球アルカリホスファターゼキット (シグマアルドリッチ # 86

10

20

30

40

50

R - 1 K T ) を用いて、添付の推奨プロトコールに従って行った。

【 0 0 6 6 】

結果を図 1 に示した。図 1 に示す結果から、2 0 1 B 7 細胞は  $0.125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の低濃度 5 1 1 E 8 コートウェルでは十分に増殖できず、また  $2 \sim 4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  のような高濃度でコートした場合にも、コロニーは形成されるものの十分に大きくならないことが明らかとなった。すなわち、2 0 1 B 7 細胞の増殖には 5 1 1 E 8 を  $0.25 \sim 1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度でコートするのが適当であることが示された。また、アルカリホスファターゼ活性は未分化状態で活性が高く維持される未分化マーカーのひとつであり、すべての条件で増殖してきた細胞コロニーはアルカリホスファターゼ染色で陽性を示していたので、未分化状態が維持されていたものと考えられた。

10

【 0 0 6 7 】

〔実施例 2 : コーティング後の乾燥による 5 1 1 E 8 の活性低下〕

至適濃度 ( $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) でコーティングした 5 1 1 E 8 が乾燥後に保存可能かどうか検証するために、コーティングしたプレートを 1 時間乾燥し、インテグリンの結合活性およびヒト i P S 細胞の接着、増殖への影響を調べた。

プレートにコートした 5 1 1 E 8 に対する  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリンの結合活性は、I d o ーら (J. Biol. Chem., 282, 11144-11154, 2007) に記載の方法に従って測定した。具体的には、P B S (p H 7 . 4) で  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した 5 1 1 E 8 を 9 6 ウェルマイクロプレート (ベクトン・ディッキンソン # 3 5 3 0 7 2、培養面積  $0.32 \text{cm}^2/\text{well}$ ) に終濃度  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  になるように  $80 \mu\text{L}$  加え、4 度で一晩 (約 1 8 時間) ゆるやかに振盪しながらコーティングを行った。プレートを P B S (p H 7 . 4) で洗浄し、室温で 1 時間風乾した。乾燥していないプレートをコントロールとした。1 0 n M  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリンを 1 m M M n C l <sub>2</sub> 存在下で 3 時間反応させた後の結合量を、4 9 0 n m での発色基質の吸光度として測定した。

20

【 0 0 6 8 】

結果を図 2 に示した。図 2 から明らかなように、 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度でコーティングされた 5 1 1 E 8 を 1 時間乾燥条件下にさらすことで、その  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリン結合活性は極端に低下することが明らかとなった。

【 0 0 6 9 】

ヒト胚性幹細胞 (E S 細胞) の 5 1 1 E 8 への接着は、 $\alpha 6 \beta 1$  インテグリンおよび  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンに対する阻害抗体を同時に処理することで阻害される (Miyazaki et al. Nature Communications, 3:1236. doi:10.1038/ncomms2231, 2012)。プレートにコーティングされた 5 1 1 E 8 の  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリン結合活性は乾燥によって低下するので、ヒト i P S 細胞の接着や増殖にも影響がでることが予想される。この可能性を、実際に乾燥させた 5 1 1 E 8 プレートでヒト i P S 細胞を培養することにより検証した。5 1 1 E 8 を  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度で実施例 1 と同様に 2 4 ウェルカルチャープレートにコーティングし、P B S (p H 7 . 4) で洗浄後、室温で 1 時間風乾した。乾燥させていない 5 1 1 E 8 コーティングプレートをコントロールとした。5 1 1 E 8 P 1 の 2 0 1 B 7 細胞および M G P 1 の T i c 細胞を実施例 1 と同様に単一細胞に分散させ、 $1.3 \times 10^3 \text{cell}/\text{cm}^2$  の密度で播種し、7 日目にアルカリホスファターゼ染色で細胞の形態を観察した。

30

40

【 0 0 7 0 】

結果を図 3 に示した。(A) は 2 0 1 B 7 細胞、(B) は T i c 細胞の結果である。両細胞株とも 5 1 1 E 8 を乾燥させていないプレートでは増殖できたが、1 時間乾燥したプレートでは十分に増殖できなかった。これは図 2 で示した乾燥による  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリン結合活性の低下によるものと考えられた。

【 0 0 7 1 】

〔実施例 3 : コーティング後の乾燥によるインテグリン結合活性低下の濃度依存性〕

図 2 で示した乾燥による 5 1 1 E 8 のインテグリン結合活性の低下が、どのようなコーティング濃度で起こるのかを検討した。実施例 2 と同様に P B S (p H 7 . 4) で 0 . 2

50

5 ~ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した 511E8 を 96 ウェルマイクロプレートに終濃度 0.063 ~ 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  になるように 80  $\mu\text{L}$  加え、4 で一晩コーティングを行った。プレートを PBS (pH 7.4) で洗浄後、室温で 1 時間風乾した。乾燥していないプレートをコントロールとした。実施例 2 と同様の方法で、10 nM 61 インテグリンの結合量を測定した。

#### 【0072】

結果を図 4 に示した。乾燥なしの場合のインテグリン結合量は 0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  までコーティング濃度の増加に伴って上昇し、それ以上のコーティング濃度では同程度の結合が認められた。一方、乾燥させた場合 0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  またはそれより低いコーティング濃度では図 2 に示した結果と同様に、インテグリン結合量は著しく低下したが、0.75  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  のコーティング濃度では乾燥なしの条件に比べて 30% 程度しか結合量は低下せず、1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上のコーティング濃度では乾燥なしの条件に比べて同等またはそれ以上のインテグリン結合活性を示した。すなわち、プレートにコーティングされた 511E8 の乾燥に対する感受性はコーティング濃度に依存することが明らかとなった。

#### 【0073】

〔実施例 4：活性低下抑制剤候補物質のスクリーニング〕

511E8 をさまざまな物質と同時にコーティングし、乾燥条件下における 511E8 の活性低下を抑制できるかどうかを検証した。

活性低下抑制剤の候補として 10% グリセロール (和光純薬工業 #075-00616)、20% スクロース (シグマ #28-0010)、20% グルコース (和光純薬工業 #049-31165)、20% ソルビトール (シグマ #S-3889-500G)、20% トレハロース (林原 #TH223)、0.5% Tween 20 (シグマ #P5927)、10% ポリエチレングリコール平均分子量 4000 (PEG 4000、シグマ #24-3680)、10% ポリエチレングリコール 6000 (PEG 6000、ナカライテスク #28254)、10% ポリエチレングリコール 8000 (PEG 8000、MP バイオメディカルズ #25322-68-3)、1% アルギニン (ナカライテスク #03321)、1% グリシン (シグマ #12-1210-5)、1% リシン (ナカライテスク #20806)、1% プロリン (ナカライテスク #29001)、0.1% ウシ血清由来アルブミン (BSA、シグマ #A7906-100G)、0.05% ゼラチン from porcine skin (シグマ #G1890-100G) をそれぞれ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (終濃度 0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) の 511E8 と PBS (pH 7.4) 中で混合して 96 ウェルマイクロプレート (培養面積 0.32  $\text{cm}^2/\text{well}$ ) に 80  $\mu\text{L}$  加えて 4 で一晩コーティングし、乾燥後の 511E8 の活性を評価した。

#### 【0074】

実際には、511E8 と各候補薬剤を混ぜてコーティングした後、PBS (pH 7.4) で洗浄し、室温で 24 時間乾燥させ、さらにプレート周囲をパラフィルムでシールした状態で密封型包装材 (ドライキープアルミ袋、佐々木化学薬品 #T-PE-30-231AL) で密閉して、4 で 1 週間保存したプレートの 61 インテグリン結合活性 (10 nM 61 インテグリンの結合量) を測定した。測定前日に PBS (pH 7.4) で希釈した 0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  の 511E8 を別の 96 ウェルマイクロプレートに 4 で一晩コーティングし、その後乾燥させていないコーティングプレートでの 10 nM 61 インテグリン結合量 (490 nm の吸光度) を 100% として、各候補薬剤存在下での乾燥後のインテグリン結合活性を比較した。

#### 【0075】

結果を図 5 に示した。511E8 のみをコートして乾燥、保存した場合 (図中、none) では、511E8 のみをコートして乾燥していないコントロールに比べて結合活性が 10% 以下に低下していた。候補薬剤のうち、グルコースなどインテグリン結合活性が約 40% 程度までにはしか低下しなかったものも複数あったが、BSA またはゼラチンを添加した場合には、ともにインテグリン結合活性が 90% 程度で維持されていた。実際、クラスカルウォリス検定と Dunn の多重比較の結果、BSA またはゼラチンはともに有意水

10

20

30

40

50

準 1 % で有意差が認められた。この結果は、BSA やゼラチン、またはそれに類する蛋白質が、活性低下抑制剤として強い効果を有する可能性を示唆している。

【0076】

〔実施例 5 : BSA、ゼラチン以外の蛋白質による活性低下抑制効果〕

実施例 4 において活性低下抑制効果が高かった BSA およびゼラチンは蛋白質である。そこで、蛋白質であればいずれも乾燥条件で活性低下抑制効果があるのか、特定の蛋白質でのみ活性低下抑制効果があるのかを調べるため、複数の蛋白質について同様に乾燥条件下における  $5.11 \times 10^8$  の活性低下抑制効果を検証した。

【0077】

実施例 4 で用いたウシ血清アルブミンおよびゼラチンの他に、ヒト血清アルブミン (Bio-Pure HSA、バイオロジカルインダストリーズ #05-720-1D)、セリシン (Pure Sericin、和光純薬工業 #167-22681)、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST、サーモフィッシャーサイエンティフィック #20237)、トランスフェリン (ベクトン・ディッキンソン #354204)、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP、メルクミリポア #13-104)、 $\alpha$ -ラクトグロブリン A (シグマ #L7880) をそれぞれ終濃度  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  になるように、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  (終濃度  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) の  $5.11 \times 10^8$  と混ぜて、実施例 4 と同様に 96 ウェルマイクロプレート (培養面積  $0.32 \text{cm}^2/\text{well}$ ) に  $80 \mu\text{L}$  加えて 4 晩コーティングした。コーティングしたプレートを PBS (pH 7.4) で洗浄後、室温で 1 時間乾燥させ、 $10 \text{nM}$   $\alpha_6 \beta_1$  インテグリンの結合を測定した。実施例 4 と同様に、 $5.11 \times 10^8$  を終濃度  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  でコーティングし、乾燥させていないプレートでの  $10 \text{nM}$   $\alpha_6 \beta_1$  インテグリン結合量 ( $490 \text{nm}$  の吸光度) を 100% とし、各蛋白質存在下での乾燥後のインテグリン結合活性を比較した。

【0078】

結果を図 6 に示した。いずれの蛋白質も活性低下抑制なしの条件 (PBS) より高いインテグリン結合活性を示したが、BSA、ゼラチン以外では特にヒト血清アルブミン、トランスフェリンで強い活性低下抑制効果が認められた。すなわち、乾燥による  $5.11 \times 10^8$  の活性低下に対する抑制効果は、ある特定の蛋白質によってのみ付与されるものではなく、強弱の程度はあるものの、蛋白質全般にそのような活性低下抑制効果があると考えられる。

【0079】

〔実施例 6 : 蛋白質成分による活性低下抑制効果の濃度依存性〕

実施例 4 および実施例 5 で 96 ウェルマイクロプレートに  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  でコーティングした  $5.11 \times 10^8$  の希釈液濃度は  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  に相当し、活性低下抑制剤として用いた BSA やゼラチンはそれぞれ  $5.11 \times 10^8$  蛋白質量の 500 倍および 250 倍多く加えていたことになる。そこで、吸着した  $5.11 \times 10^8$  のインテグリン結合活性が活性低下抑制剤の量によって影響を受けないかを検証した。具体的には、 $5.11 \times 10^8$  とゼラチンをそれぞれ PBS (pH 7.4) で希釈し、 $5.11 \times 10^8$  は終濃度が 0.25、0.5 または  $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  になるように、ゼラチンは終濃度が  $1.7 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$  になるように混ぜて実施例 4 と同様に 96 ウェルマイクロプレートにコーティングした。PBS (pH 7.4) で洗浄後、乾燥せずに  $10 \text{nM}$   $\alpha_6 \beta_1$  インテグリンの結合を測定した。

【0080】

結果を図 7 (A) に示した。いずれの  $5.11 \times 10^8$  濃度においてもゼラチンの増加によってインテグリン結合活性が低下することはなかった。 $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の場合では最大 500 倍量のゼラチンが存在しても、そのインテグリン結合活性は維持されており、むしろ、ゼラチンの添加によって高濃度の  $5.11 \times 10^8$  と同等のレベルまで結合活性が上昇していた。ゼラチンが  $\alpha_6 \beta_1$  インテグリンに対する結合活性を持たないことは周知の事実であり、実際、図には示していないが、 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  のゼラチンを単独でコーティングした場合、 $\alpha_6 \beta_1$  インテグリン結合活性はまったく検出されなかった。

【0081】

10

20

30

40

50

次に、乾燥条件下における活性低下抑制効果の濃度依存性を調べた。図7(A)と同じ組み合わせで511E8とゼラチンをコーティングし、1時間乾燥させた後の10nM  $\alpha$ 6  $\beta$ 1インテグリンの結合を測定した。

#### 【0082】

結果を図7(B)に示した。実施例3でも示したように、 $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の511E8単独では乾燥によってそれほど失活は認められず、その濃度でのゼラチン添加による結合活性の変化は認められなかった。 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の511E8に対してはゼラチンによる活性低下抑制効果の濃度依存性が認められ、ゼラチン16.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ まではインテグリン結合活性は失活しており、167  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では乾燥なしのときの結合活性が維持されていた。50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゼラチン添加では弱い活性低下抑制効果が認められた。 $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の511E8に対しては、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゼラチン添加でもインテグリン結合活性は70%程度まで減弱しており、167  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では40%程度と活性低下抑制効果に濃度依存性は認められたものの効果の強さは $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の511E8のときより全体的に弱かった。すなわち、蛋白質成分による活性低下抑制効果には濃度依存性があり、さらにその効果の強さには511E8の濃度も関係することが明らかとなった。

#### 【0083】

〔実施例7：活性低下抑制剤の添加時期の検討〕

活性低下抑制剤を添加する最適な時期を検証するために、511E8コーティングと同時、あるいはその前後に活性低下抑制剤を添加して、その後の乾燥における活性低下抑制効果を調べた。511E8は終濃度が $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるように添加し、4で一晚96ウェルマイクロプレートにコーティングした。活性低下抑制剤として終濃度300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゼラチンを以下の3条件で添加した。(1)PBS(pH7.4)で希釈した活性低下抑制剤をプレートに加え、室温で3時間プレコーティングした後、511E8を加える、(2)活性低下抑制剤と511E8をあらかじめ混合し、両者を同時にプレートに加えてコーティングする、(3)511E8を一晚コーティングした後、活性低下抑制剤を加えて室温で3時間ポストコーティングする。コーティング後は、プレートをPBS(pH7.4)で洗浄し、室温で24時間乾燥させ、10nM  $\alpha$ 6  $\beta$ 1インテグリンの結合を測定した。511E8を終濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ でコーティングし、乾燥させていないコーティングプレートでの10nM  $\alpha$ 6  $\beta$ 1インテグリン結合量(490nmの吸光度)を100%として、各条件での乾燥後のインテグリン結合活性を比較した。

#### 【0084】

結果を図8に示した。図中では、条件(1)はGelatin 511E8、条件(2)はGelatin+511E8、条件(3)は511E8 Gelatinと表記した。図8から明らかのように、調べた3条件のうちゼラチンを同時に添加した場合(条件(2))がもっとも活性低下抑制効果が高く、24時間という厳しい乾燥条件でもコントロールと同程度の結合活性を維持していた。図には示していないが、条件(1)で乾燥させずに $\alpha$ 6  $\beta$ 1インテグリンの結合を測定した場合は、511E8単独と同程度のインテグリン結合活性が認められることを確認してある。この結果から、活性低下抑制の効果は、同時にコーティングを行うことでもっとも発揮されやすいことが明らかとなった。

#### 【0085】

〔実施例8：活性低下抑制剤の効果の持続性〕

活性低下抑制剤によって511E8のインテグリン結合活性は乾燥後も維持されることが明らかになったが、その活性が乾燥状態で長期間維持されるかを次に検証した。24ウェルセルカルチャープレートに終濃度0.5、1.0、2.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるようにPBS(pH7.4)で希釈した511E8を単独または300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゼラチン存在下でコーティングし、室温で1時間乾燥させた後、実施例4と同様の方法で密封し、4で保管した。一定期間の保管後、プレートを取り出し、201B7細胞を実施例1と同様に単一細胞に分散させ、 $2.6 \times 10^3 \text{ cells}/\text{cm}^2$ の密度で播種し、7日目にアルカリホスファターゼ染色で細胞の形態を観察した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 6 】

8週間保管したプレートの結果を図9に示した。図9から明らかなように、活性低下抑制剤がないと $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ではヒトiPS細胞はほとんど増殖できず、 $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のウェルでも $2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の条件に比べて増殖の程度は悪かった。一方、活性低下抑制剤を添加したウェルではいずれの $5 \times 10^8$ の濃度でも、十分な増殖が認められた。以上の結果は、活性低下抑制剤とともに $5 \times 10^8$ をコーティングしたプレートは乾燥状態で長期間保管可能であることが示唆された。

## 【 0 0 8 7 】

〔実施例9：BSAの濃度依存的な活性低下抑制効果〕

実施例6と同様な方法で、終濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるようPBS(pH7.4)で希釈した $5 \times 10^8$ に $3000 \mu\text{g}/\text{mL}$ までの各種濃度のBSAを加えて96ウェルマイクロプレートに4で一晚コーティングし、PBS(pH7.4)で洗浄後、室温で一晩乾燥した。4で1週間保管後に、 $10 \text{ nM}$   $\alpha 6$   $\beta 1$ インテグリンの結合量を測定し、BSAの濃度による $5 \times 10^8$ の活性低下抑制効果の指標とした。測定前日にPBS(pH7.4)で希釈した $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の $5 \times 10^8$ を別の96ウェルマイクロプレートに4で一晚コーティングし、乾燥させずに測定した $10 \text{ nM}$   $\alpha 6$   $\beta 1$ インテグリンの結合量( $490 \text{ nm}$ の吸光度)を100%として、各BSA濃度のインテグリン結合活性を比較した。

10

## 【 0 0 8 8 】

結果を図10に示した。図10から明らかなように、図5および図6で示されたBSAの活性低下抑制効果は、ゼラチンと同様に濃度依存性があり、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で高いインテグリン結合活性の維持が確認された。この結果から、活性低下抑制効果が認められた蛋白質全般に、その効果には濃度依存性があることが示唆された。

20

## 【 0 0 8 9 】

〔実施例10： $5 \times 10^8$ および全長ラミニン $5 \times 10^8$ に対する活性低下抑制効果の検討〕

$5 \times 10^8$ に対する活性低下抑制剤の効果は他の蛋白質を培養基質としてコーティングする場合にも同様に認められるかを調べるために、全長ラミニン $5 \times 10^8$ を用いて効果の比較を行った。全長ラミニン $5 \times 10^8$ はIdora(J. Biol. Chem., 279, 10946-10954, 2004)に記載の方法に従い作製し、使用した。実施例4と同様な方法で実験を行った。すなわち、 $5 \times 10^8$ の場合は終濃度が $0.5$ または $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるように、全長ラミニンの場合は終濃度が $16.0$ または $32.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるようにPBS(pH7.4)で希釈し、終濃度 $3000 \mu\text{g}/\text{mL}$ のBSAまたはゼラチンと混ぜて4で一晚コーティングした。プレートをPBS(pH7.4)で洗浄後、室温で24時間乾燥させ、 $10 \text{ nM}$   $\alpha 6$   $\beta 1$ インテグリンの結合を測定した。

30

## 【 0 0 9 0 】

結果を図11に示した。縦軸は各濃度の $5 \times 10^8$ または全長ラミニン $5 \times 10^8$ を単独でコーティングし、乾燥させずに測定した $10 \text{ nM}$   $\alpha 6$   $\beta 1$ インテグリン結合量( $490 \text{ nm}$ の吸光度)を100%とした相対活性を示す。活性低下抑制剤を添加しない場合、24時間の乾燥により、 $5 \times 10^8$ 、全長 $5 \times 10^8$ ともにインテグリン結合活性の著しい低下が認められた。乾燥による活性低下に対する活性低下抑制剤の効果は、二元配置分散分析とBonferroni法で解析した。 $5 \times 10^8$ では、BSAまたはゼラチンを添加した場合、どの条件でも有意水準0.1%で有意な活性低下の抑制が認められた。一方、全長ラミニン $5 \times 10^8$ に対してはどの条件でもその効果に有意性は認められなかった(有意水準5%)。この結果から、BSAやゼラチン等の活性低下抑制剤の効果は、他の蛋白質を培養基質としてコーティングする場合にも同様に認められるものではなく、該蛋白質の形状やアミノ酸配列等の分子的性状によって大きく異なることが示唆された。すなわち、 $5 \times 10^8$ と同様な形状を持つ等、分子的性状の類似した他の蛋白質に対して、同様の効果を示すことが示唆された。

40

## 【 0 0 9 1 】

〔実施例11： $5 \times 2 \times 10^8$ に対する活性低下抑制効果〕

50

5 1 1 E 8 以外のラミニン E 8 でも同様の活性低下抑制効果が得られるかを調べるために、5 2 1 E 8 を用いて効果の比較を行った。5 2 1 E 8 はラミニン 5 2 1 に由来する E 8 フラグメントで、5 鎖 E 8 断片、1 鎖 E 8 断片は 5 1 1 E 8 と共通であるが、鎖は 5 1 1 E 8 とは異なる 2 鎖 E 8 断片からなる。実施例 4 と同様の方法で 5 1 1 E 8 および 5 2 1 E 8 を終濃度で 0.5 または 1.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  になるように P B S (p H 7.4) で希釈し、終濃度 5 0 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の B S A、ゼラチンまたはヒト血清アルブミン (H S A) と混合して 4 で一晩コーティングした。プレートは P B S (p H 7.4) で洗浄後、室温で 1 時間乾燥させ、1 0 n M  $\alpha$  6 1 インテグリンの結合を測定した。

#### 【 0 0 9 2 】

結果を図 1 2 に示した。縦軸は各濃度の 5 1 1 E 8 を単独でコーティングし、乾燥させずに測定した 1 0 n M  $\alpha$  6 1 インテグリンの結合量 (4 9 0 n m の吸光度) を 1 0 0 % とした相対活性を示す。なお、 $\alpha$  6 1 インテグリンに対する 5 1 1 E 8 と 5 2 1 E 8 の結合親和性はほぼ同じであることが T a n i g u c h i らにより既に報告されている (J. Biol. Chem., 284, 7820-7831, 2009)。本実施例においても、 $\alpha$  6 1 インテグリンの結合量を示す 4 9 0 n m の吸光度は、乾燥させずに測定した場合、0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  の 5 1 1 E 8、5 2 1 E 8 でそれぞれ 2.62  $\pm$  0.05 (平均値  $\pm$  標準偏差)、2.75  $\pm$  0.02、1.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  の 5 1 1 E 8、5 2 1 E 8 でそれぞれ 2.96  $\pm$  0.03、2.83  $\pm$  0.11 であり、ほぼ同じであった。

#### 【 0 0 9 3 】

図 1 2 から明らかなように、乾燥処理を 1 時間行なった場合、5 2 1 E 8 のインテグリン結合活性は 5 1 1 E 8 と同様の失活パターンを示した。すなわち、1.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  でコーティングした場合は乾燥による失活がほとんど認められないのに対して、0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  でコーティングした場合には著しいインテグリン結合活性の低下が認められた。この乾燥による結合活性の低下は、B S A、ゼラチンまたは H S A を同時添加することにより、5 1 1 E 8 の場合と同様、ほぼ完全に回避された。すなわち、これらの活性低下抑制剤の効果は 5 1 1 E 8 に限定されず、他のラミニンアイソフォームの E 8 フラグメントに対しても発揮されることが示された。

#### 【 0 0 9 4 】

〔実施例 1 2 : 2 1 1 E 8 の 5 1 1 E 8 に対する活性低下抑制効果〕

5 1 1 E 8 以外のラミニン E 8 にも乾燥による活性低下を抑制する効果があるかを検討した。添加する E 8 フラグメントとしては、それ自体が  $\alpha$  6 1 インテグリン結合活性を持たないラミニン 2 1 1 の E 8 フラグメント (以下、2 1 1 E 8) を使用した。具体的には、P B S (p H 7.4) で希釈した 5 1 1 E 8 (終濃度 0.4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) と 2 1 1 E 8 (終濃度を 0、0.8、1.6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  に調製) を混合して 4 で一晩 9 6 ウェルマイクロプレートにコーティングした。プレートを P B S (p H 7.4) で洗浄後、室温で 2 4 時間乾燥させ、 $\alpha$  6 1 インテグリン (1 0 n M) の結合を測定した。なお、2 1 1 E 8 が  $\alpha$  6 1 インテグリン結合活性を持たないことは、発明者らにより確認されている (Taniguchi et al. J. Biol. Chem., 284, 7820-7831, 2009)。

#### 【 0 0 9 5 】

結果を図 1 3 に示した。 $\alpha$  6 1 インテグリン結合活性は、0.4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  の 5 1 1 E 8 をコーティングし、乾燥させずに測定した場合の結合量 (4 9 0 n m の吸光度が 1.07) を 1 0 0 % とした相対値で表示した。図 1 3 から明らかなように、2 1 1 E 8 を 0.8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  添加するとインテグリン結合活性が約 3 0 % まで回復し、2 1 1 E 8 を 1.6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  添加すると約 8 0 % までインテグリン結合活性が回復した。この結果から、5 1 1 E 8 の活性低下抑制剤として他のラミニン E 8 を使用できることが示された。また、B S A、ゼラチン等の蛋白質を活性低下抑制剤として使う場合と比べて、他のラミニン E 8 は極めて少量で乾燥時の活性低下を抑制する効果を発揮することが明らかとなった。

#### 【 0 0 9 6 】

〔実施例 1 3 : ラミニンフラグメント改変体に対する活性低下抑制効果 (1) 〕

ラミニンフラグメント改変体でも同様の活性低下抑制効果が得られるかを調べるために、パールカンのヘパラン硫酸鎖結合ドメインを付加した2種類の511E8改変体(Plus #3ラミニンE8およびPlus #5ラミニンE8)を用いて効果の比較を行った。Plus #3ラミニンE8は1鎖E8フラグメントのN末端部にパールカンのドメインI~IIIを付加した511E8改変体であり、Plus #5ラミニンE8は5鎖E8フラグメントのC末端部にパールカンのドメインIを付加した改変体である。実施例4と同様の方法でPlus #3ラミニンE8あるいはPlus #5ラミニンE8を終濃度で0.56  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  になるようにPBS (pH7.4)で希釈し、ヒト血清アルブミン(HSA; 終濃度500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )またはゼラチン(終濃度300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ または2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )と混合したのち、96ウェルマイクロプレート上に37で1時間コーティングした。コーティングしたプレートは、コーティング液を除去した後、室温で22時間乾燥させ、10 nMの $\alpha_6\beta_1$ インテグリンの結合を測定した。なお、Plus #3ラミニンE8あるいはPlus #5ラミニンE8を単独でコーティングした後、乾燥させずに $\alpha_6\beta_1$ インテグリンの結合を測定した値を対照として用いた。

#### 【0097】

Plus #3ラミニンE8の結果を図14に、Plus #5ラミニンE8の結果を図15にそれぞれ示した。縦軸は $\alpha_6\beta_1$ インテグリンの結合量(490 nmの吸光度)を示す。図14および図15から明らかなように、Plus #3ラミニンE8およびPlus #5ラミニンE8をそれぞれ単独でプレートにコーティングした後に乾燥させると、インテグリン結合活性が著しく低下した。一方、ヒト血清アルブミンやゼラチンを添加して乾燥させた場合は、インテグリン結合活性の低下が抑制された。特に、図15に示したように、Plus #5ラミニンE8では、ヒト血清アルブミンやゼラチンの添加により、乾燥後でも約90%のインテグリン結合活性が保持されていた。これらの結果は、本発明の活性低下抑制剤の効果はラミニンフラグメントに限定されず、ラミニンフラグメント改変体に対しても発揮されることを示している。

#### 【0098】

〔実施例14：ラミニンフラグメント改変体に対する活性低下抑制効果(2)〕

ラミニンフラグメント改変体に対する活性低下抑制剤の効果をさらに検証するため、Plus #5ラミニンE8(終濃度0.56  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )をコーティングした24ウェルセルカルチャープレート(ベクトン・ディッキンソン #353047)およびPlus #5ラミニンE8(終濃度0.56  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )にヒト血清アルブミン(HSA; 終濃度500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )またはゼラチン(終濃度300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ もしくは2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を添加してコーティングした24ウェルセルカルチャープレートを用意し、室温で22時間乾燥させた後、ヒトiPS細胞(201B7細胞)を $7 \times 10^3$  cell/cm<sup>2</sup>の密度で播種し、5% CO<sub>2</sub>/95% Air、37の湿潤条件下で1週間培養した。培地にはTeSR2/NutriStem 1:1混合培地を用いた。また、Plus #5ラミニンE8(終濃度0.56  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )をコーティングした24ウェルセルカルチャープレート上に乾燥工程を挟まずに201B7細胞を播種し、同様に1週間培養した。1週間培養後のヒトiPS細胞の増殖状態を、アルカリホスファターゼ染色により評価した。

#### 【0099】

結果を図16に示した。図16から明らかなように、Plus #5ラミニンE8をコーティングしたプレート上にヒトiPS細胞を播種すると、511E8をコーティングしたプレート上と同等の細胞増殖が観察され、Plus #5ラミニンE8がヒトiPS細胞用の培養基質として有効であることが示された。生じたヒトiPS細胞のコロニーはアルカリホスファターゼ染色で均一な陽性反応を示しており、未分化性が維持されていると考えられた。一方、活性低下抑制剤を添加せずにPlus #5ラミニンE8のみをコーティングしたプレートを乾燥させると、著しい細胞増殖の低下が観察された。しかし、終濃度300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上でヒト血清アルブミンやゼラチンを添加してPlus #5ラミニンE8をコーティングした場合は、乾燥後でもヒトiPS細胞の増殖の低下は観察されず、乾

10

20

30

40

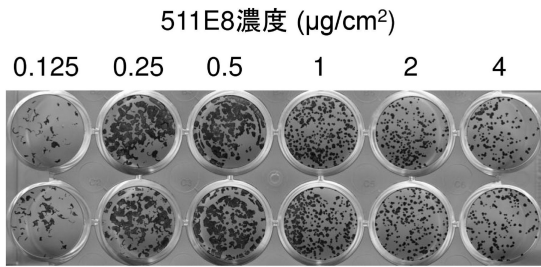
50

燥せずにPlus # 5ラミニンE8をコーティングした場合と同等あるいはそれ以上の細胞の増殖が認められた。また、アルカリホスファターゼ染色の陽性所見から、細胞の未分化性も保持されていると考えられた。以上の結果は、本発明の活性低下抑制剤の効果はラミニンフラグメントに限定されず、ラミニンフラグメント改変体に対しても発揮されることを示している。

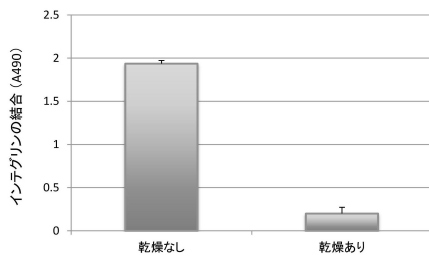
【0100】

なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

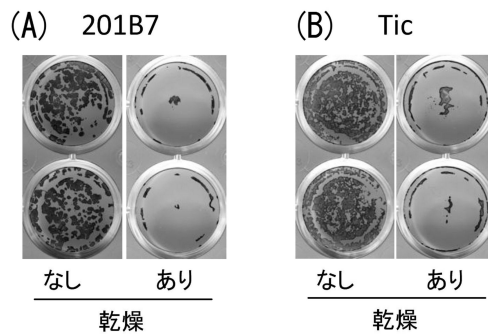
【図1】



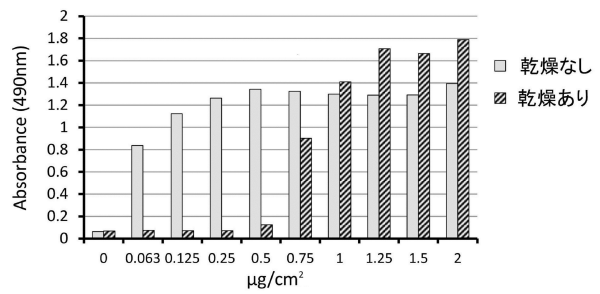
【図2】



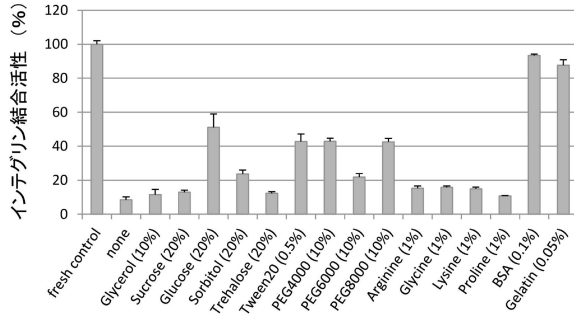
【図3】



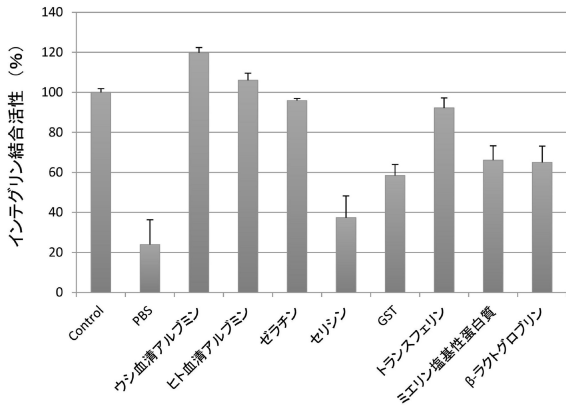
【図4】



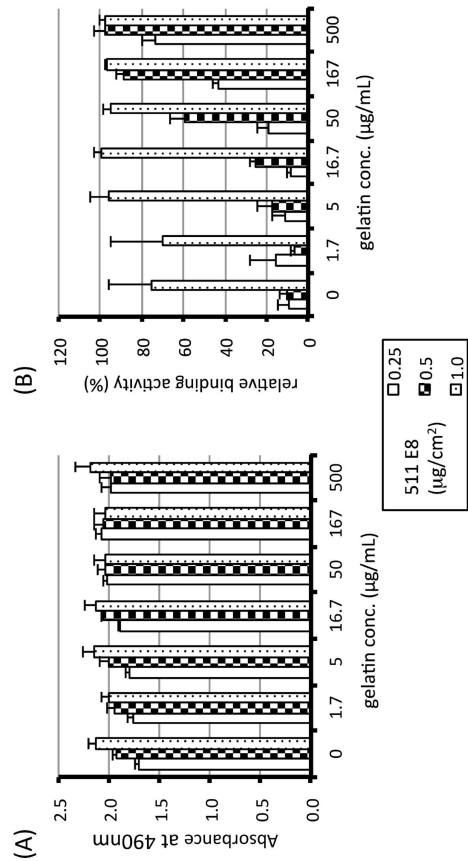
【 図 5 】



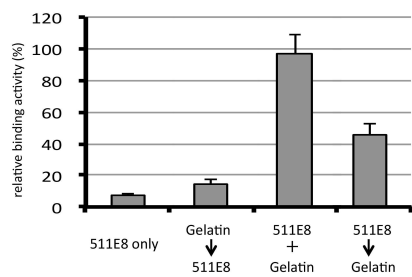
【 図 6 】



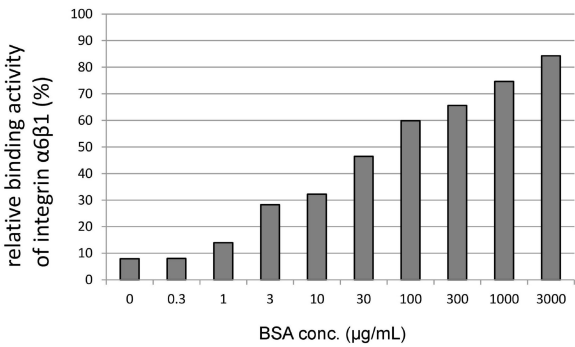
【 図 7 】



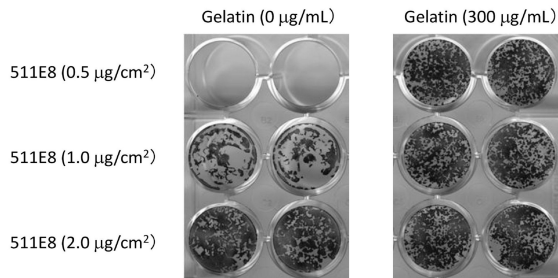
【 図 8 】



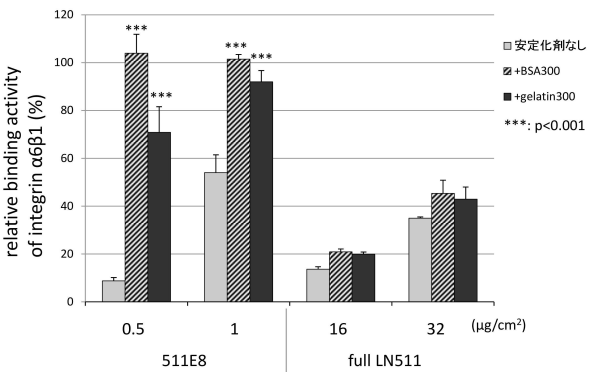
【 図 10 】



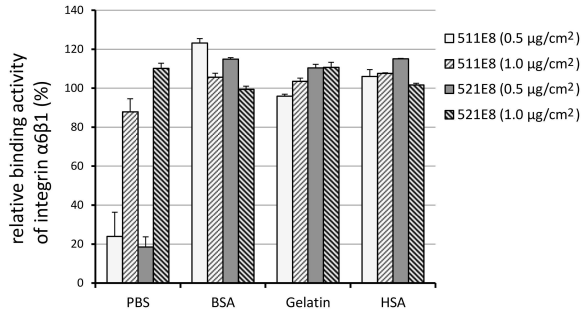
【 図 9 】



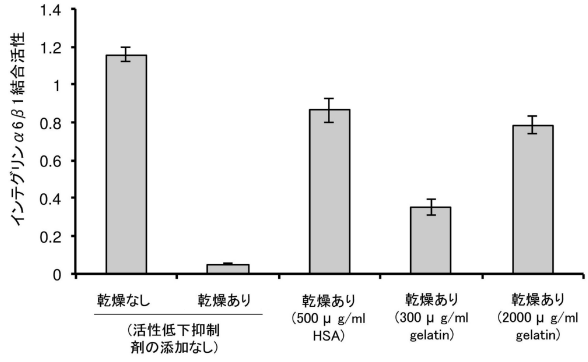
【 図 11 】



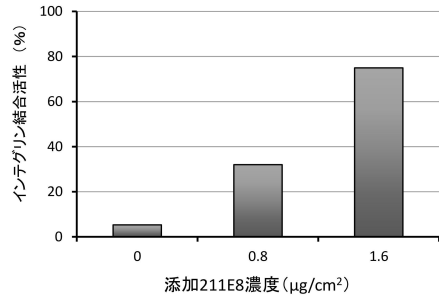
【 図 1 2 】



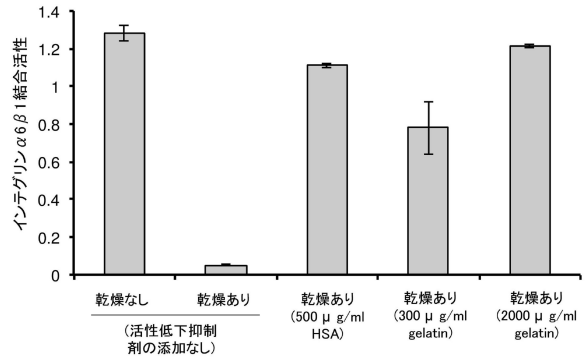
【 図 1 4 】



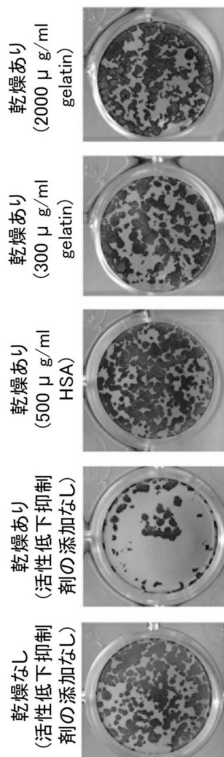
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



**【配列表】**

0006101351000001.app

## フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平06-098757(JP,A)  
特開平08-173144(JP,A)  
特開2011-078370(JP,A)  
特開2011-079795(JP,A)  
NATURE COMMUNICATIONS, 2012年12月4日, Vol. 3, No. 1236, pp. 1-10  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008年, Vol. 375, pp. 27-32  
MATRIX BIOLOGY, 2006年, Vol. 25, pp. 189-197  
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2007年4月13日, Vol. 282, No. 15, pp. 11144-11154

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 3/00  
C07K 14/78  
C12N 5/0735  
C12N 5/074  
C12N 5/10  
C12N 15/09  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
PubMed  
DWPI(Thomson Innovation)