

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年12月18日(18.12.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/199754 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12M 3/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 5/0735 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/062449
- (22) 国際出願日: 2014年5月9日(09.05.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2013-123554 2013年6月12日(12.06.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 関口 清俊(SEKIGUCHI, Kiyotoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 筒井 仰(TSUTSUI, Ko); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 岩谷 龍(IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京阪堂島ビル3階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

[続葉有]

(54) Title: CELL CULTURE EQUIPMENT COATED WITH LAMININ FRAGMENTS IN DRY STATE

(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

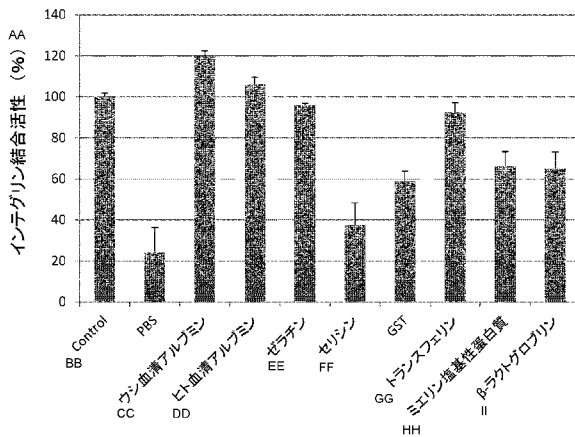


FIG. 6:  
 AA Integrin binding activity  
 BB Control  
 CC Bovine serum albumen  
 DD Human serum albumen  
 EE Gelatin  
 FF Sericin  
 GG Transferrin  
 HH Myelin basic protein  
 II β-Lactoglobulin

(57) Abstract: Provided is cell culture equipment in which surfaces contacting cells are coated in a dry state with laminin fragments having integrin  $\alpha 6 \beta 1$  binding activity, or a modified form thereof, wherein the cell culture equipment is characterized in that the laminin fragments are of at least one type selected from laminin  $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$  and laminin  $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$ .

(57) 要約: 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変体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  $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$  およびラミニン  $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$  から選択される少なくとも1種であることを特徴とする、細胞培養器具。



WO 2014/199754 A1

- 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
(規則 5.2(a))

## 明 細 書

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

### 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ （ラミニン511）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511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511は $\alpha 6 \beta 1$ 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511のE8フラグメント（ラミニン511E8）は、全長のラミニン511と同等の $\alpha 6 \beta 1$ 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511E8上で可能であることを見出し、ヒトラミニン511E8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）。

[0004] ヒトラミニン511E8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511E8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511E8溶液を培養器に加え、 $4^\circ\text{C}$ で一夜または室温 $\sim 37^\circ\text{C}$ で1～3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511E8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511E8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511E8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。

#### 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.

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:10.103

8/ncomms2231, 2012.

非特許文献4 : Doi T, Thyboll J, Kortessmaa J, Jansson K, Iivanainen A, Parvardeh M, Timpl R, Hedin U, Swedenborg j, Tryggvason K. Recombinant human laminin-10 ( $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ ). 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ およびラミニン $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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

[2] 前記(1)において、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 $\alpha 6 \beta 1$ 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、その3倍以上の濃度のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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、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E8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 $\alpha 6 \beta 1$ 結合活性を有しないラミニンフラグメントがラミニン $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ 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、 $\beta$ -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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ およびラミニン $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$ 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、ミエリン塩基性蛋白質、 $\beta$ -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 $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ のE8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 $\alpha 6 \beta 1$ 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乾燥によるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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であり、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。

[14] コーティングされる蛋白質が、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であり、 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下の濃度のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 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、その3倍以上の濃度のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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であり、 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下の濃度のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 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、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。

[16] ラミニンフラグメントが、ラミニンE8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 $\alpha 6 \beta 1$ 結合活性を有しないラミニンフラグメントがラミニン $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ 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、 $\beta$ -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 $\alpha 6 \beta 1$ 結合活性を有するラミニンフラグメントが、ラミニン $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ およびラミニン $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$ 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。

[20] ラミニンフラグメントが、ラミニンE8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 $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ を「ラミニン511」、ラミニン $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$ を「ラミニン521」、ラミニン $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ を「ラミニン211」と記す。他のラミニンも同様に略記する。ラミニンE8フラグメントを「ラミニンE8」と記し、E8フラグメントを単に「E8」と記す。

### 発明の効果

[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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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

[0012] [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、 $\alpha 6 \beta 1$ 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。

[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、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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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] B S A 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。

[図11] ヒトラミン 5 1 1 E 8 および全長ヒトラミン 5 1 1 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 5 2 1 E 8 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 2 1 1 E 8 のヒトラミン 5 1 1 E 8 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  $\beta$  1 鎖 E 8 フラグメントの N 末端部に付加したヒトラミン 5 1 1 E 8 ( P l u s # 3 ラミン E 8 ) 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  $\alpha$  5 鎖 E 8 フラグメントの C 末端部に付加したヒトラミン 5 1 1 E 8 ( P l u s # 5 ラミン E 8 ) 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16] パールカンのヘパラン硫酸鎖結合ドメインを  $\alpha$  5 鎖 E 8 フラグメントの C 末端部に付加したヒトラミン 5 1 1 E 8 ( P l u s # 5 ラミン E 8 ) 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 i P S 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

#### [0013] [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  $\alpha 6 \beta 1$  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、ポリビ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。

[0014] ラミニンは、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖および $\gamma$ 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。 $\alpha$ 鎖は $\alpha 1 \sim \alpha 5$ の5種類、 $\beta$ 鎖は $\beta 1 \sim \beta 3$ の3種  
類、 $\gamma$ 鎖は $\gamma 1 \sim \gamma 3$ の3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 $\alpha 6 \beta 1$ 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511およびラミニン521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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 結合活性を失活しない限り、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖および  
 $\gamma$ 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 $\alpha 6$   
 $\beta 1$ 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。

[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E8が好ましい。ラミニンE8は、マウスラミニン $\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$ （以下「  
マウスラミニン111」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 l  
aminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuron  
al 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111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111のE8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111以外のラミニンをエラスターゼで消化してE8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E8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111のE8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。

本発明に用いられるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 結合活性を有するラミニンフラグメントは、ヘテロ3量体を形成しているラミニン511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521のフラグメントであることが好ましく、ラミニン511E8および／またはラミニン521E8であることが好ましい。

[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。

[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] 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、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖および $\gamma$ 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Ido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  $\alpha$ -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Ido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  $\gamma$  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。

[0020] 主要な哺乳動物のラミニンを構成する $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 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。

[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

[0022] ラミニンE8は、 $\alpha$ 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「 $\alpha$ 鎖E8」と記す）、 $\beta$ 鎖のC末端フラグメント（以下「 $\beta$ 鎖E8」と記す）および $\gamma$ 鎖のC末端フラグメント（以下「 $\gamma$ 鎖E8」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170kDaである。 $\alpha$ 鎖E8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。 $\beta$ 鎖E8は通常約220～約230個のアミノ酸からなる。 $\gamma$ 鎖E8は通常約240～約250個のアミノ酸からなる。 $\gamma$ 鎖E8のC末端部から3番目のグルタミン酸残基はラミニンE8の細胞接着活性に必須である（Hiroyuki Ido, A

ya 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  $\gamma$  chains in integrin binding by laminins" *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 11144-11154, 2007.)。

[0023] 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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、ビトロネクチン、ネフロネクチン、オステオポンティン、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、ビトロネクチン、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、アグリン、XVII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- $\beta$  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°C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。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°C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iPS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iPS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、7

0%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。

[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。

[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。

[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℃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iPS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iPS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。

[0032] 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。

[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 $\alpha 6 \beta 1$  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 $\alpha 6 \beta 1$  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] 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、 $\beta$ -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、 $\beta$ -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、 $\alpha 6 \beta 1$  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。

[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]

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 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等の乾燥によるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$  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、 $\alpha 6 \beta 1$  活性フラグメント等の乾燥によるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$  結合活性の低下を抑制する活性低下抑制剤を提供する。 $\alpha 6 \beta 1$  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 $\alpha 6 \beta 1$  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、 $\beta$ -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 $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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。

[0037] [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、HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] ]などでpH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。

[0038] 上記(1)の細胞培養器具を製造する場合、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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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。

[0039] （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、PBS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。

[0040] (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。

[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 $\alpha 6 \beta 1$ 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。

[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。

[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] 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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511E8またはラミニン521E8）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 $\alpha 6 \beta 1$ 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。

[0047] 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うけなかった。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。

## 実施例

[0048] 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。

[0049] 〔ヒト組換えラミニン511E8の作製〕

ヒト組換えラミニン511E8（以下、「511E8」と記す）は、Idora (Hiroyuki Ido, Aya Nakamura, Reiko Kobayashi, Shunsuke Ito, Shao

liang Li, Sugiko Futaki, and Kiyotoshi Sekiguchi, "The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin  $\gamma$  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。

[0050] 最初に、クローニング用プラスミド pBluescript KS (+) (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EcoRVの5'側に6×HisタグをコードするDNA、HA (ヘマグルチニン) タグをコードするDNA、またはFLAGタグをコードするDNAが挿入された3種類のpBluescript KS (+) をそれぞれ作製した。

(i) 6×His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) HA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) FLAG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)

[0051] 次に、 $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の全長塩基配列を含むプラスミド (Ido et al., J. Biol. Chem., 279, 10946-10954, 2004.) を鋳型として、以下のプライマーを用いたPCRを行い、各鎖の $\alpha 5$  (Ala<sup>2534</sup>-Ala<sup>3327</sup>)、 $\beta 1$  (Leu<sup>1561</sup>-Leu<sup>1786</sup>)、 $\gamma 1$  (Asn<sup>1362</sup>-Pro<sup>1608</sup>) に相当する領域を増幅した。

(iv)  $\alpha 5$ 鎖E8フラグメント増幅用プライマー

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

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

(v)  $\beta$  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)  $\gamma$  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)

[0052] 増幅した cDNA を、タグ配列を付加した pBluescript KS (+) のマルチクローニング部位の EcoRV 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 cDNA を制限酵素 EcoRI と HindIII で切り出し、哺乳細胞用発現ベクター pSecTag2B (インビトロジェン) の当該部位に挿入し、ヒト  $\alpha$  5 鎖 E 8 フラグメント (N 末端側に 6 X His タグを含む)、ヒト  $\beta$  1 鎖 E 8 フラグメント (N 末端側に HA タグを含む)、ヒト  $\gamma$  1 鎖 E 8 フラグメント (N 末端側に FLAG タグを含む) の発現ベクターをそれぞれ作製した。

[0053] 511E8 の発現は、作製した各鎖の発現ベクターをヒト腎臓由来 293F 細胞 (インビトロジェン社より購入) に導入して行った。300ml の 293F 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  個/ml) にトランスフェクション試薬 293fectin (商品名、インビトロジェン) および Opti-MEM (商品名、インビトロジェン) を用いて各鎖発現ベクターを  $180 \mu\text{g}$  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  $1000 \times g$  で 10 分間遠心し、その上清をさらに  $15,000 \times g$  で 30 分間遠心し、細胞や不溶物を除去した。培養上清に 5ml の Ni-NTA agarose (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。Ni-NTA agarose を回収し、TBS (-) (Ca、Mg を含まないトリス緩衝生理的食塩水) および  $10 \text{ mM}$  イミダゾール/TBS (-) で洗浄したのち  $200 \text{ mM}$  イミダゾール/TBS (-) で溶出した。溶出画分は SDS-PAGE および銀染色により確認し、511E8 が溶出された画分に 2ml の ANTI-FLAG M2 affinity

GeI (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 mM PMSFを含むTBS (-) で洗浄後、100 μg/ml FLAG peptide (シグマ) を含むTBS (-) で溶出した。溶出フラクションを銀染色で確認し、511E8の溶出された画分を合わせてTBS (-) に対して透析を行った。

[0054] [ヒト組換えラミニン521E8の作製]

ヒト組換えラミニン521E8 (以下、「521E8」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α5鎖E8フラグメント (N末端側に6XHisタグを含む)、ヒトβ2鎖E8フラグメント (N末端側にHAタグを含む)、ヒトγ1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、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。ヒトβ2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 β 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1~111 (以下、「Pin-D1/2/3」と記す) を融合させたラミニン改変体 (以下、「Plus #3ラミニンE8」と記す)、およびヒト組換えラミニン511E8のC末端部にヒトパールカンのドメイン1 (以下、「Pin-D1」と記す) を融合させたラミニン改変体 (以下、「Plus #5ラミニンE8」と記す) を作製した。

[0056] Plus #3 ラミニンE8の作製に用いるPin-D1/2/3融合ヒトラミニン $\beta$ 1鎖E8フラグメント発現ベクターは、国際公開公報第2012/137970号の記載に従い、5'側から順に、マウスIg- $\kappa$ 鎖V-J2-Cシグナルペプチド、Pin-D1/2/3、HAタグ、 $\beta$ 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Pin-D1/2/3融合ヒトラミニン $\beta$ 1鎖E8フラグメント発現ベクターを、ヒト $\alpha$ 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 $\gamma$ 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。

[0057] Plus #5 ラミニンE8の作製に用いるPin-D1融合ヒトラミニン $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。

(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' -ATATGGATCCTGGAAAAGCCCGGGGCTCTGGCAAGAGCTTGCTGTCTCTGCATCAGGCCCCAGGCCCGG-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 $\alpha$ 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, Nao ko 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、P l n D 1 に相当する領域 (G l y<sup>25</sup> - P r o<sup>196</sup>) にH i s タグをC末端に付加した配列をコードするD N A断片を増幅した。

(ii) P l n D 1 配列増幅用プライマー

5' -ATATATATGGATCCGGGCTGAGGGCATACGATGGCTTGTCTCTG-3'

(forward、配列番号15、制限酵素B a m H I 認識配列が含まれている)

5' -ATATATATGCGGCCCGCCTAATGATGATGATGATGATGTGGGAACTGGGGCACTGTGCCAG-3'

(reverse、配列番号16、制限酵素N o t I 認識配列が含まれている)

得られたD N A断片を制限酵素B a m H I とN o t I で消化し、D N A断片2とした。

ヒトラミン $\alpha$ 5鎖E8フラグメント発現ベクターを制限酵素A s c I とN o t I で消化して得られたヒトラミン $\alpha$ 5鎖E8フラグメントのN末端部分 (M e t<sup>1</sup> - A s p<sup>610</sup>) を含む発現ベクター断片に、上記のD N A断片1および2を挿入し、P l n - D 1 融合ヒトラミン $\alpha$ 5鎖E8フラグメント発現ベクターを完成させた。

[0059] P l n - D 1 融合ヒトラミン $\alpha$ 5鎖E8フラグメント発現ベクターを、ヒト $\beta$ 1鎖E8フラグメント (N末端側にH A タグを含む) 発現ベクターおよびヒト $\gamma$ 1鎖E8フラグメント (N末端側にF L A G 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、ラミン511E8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。

## [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 $\alpha$ 2鎖E8フラグメント（N末端側に6XHISタグを含む）、ヒト $\beta$ 1鎖E8フラグメント（N末端側にHAGタグを含む）、ヒト $\gamma$ 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 $\alpha$ 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  $\beta$  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。

## [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。

[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）

／0.1 mg/mLタイプIVコラゲナーゼ（ライフテクノロジーズ #17104-019）／20% Knock Out 血清代替（ライフテクノロジーズ #10828-028）／1  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>溶液を用いてフィーダー細胞を除去した後、0.5  $\times$  TrypLE Select（ライフテクノロジーズ #12563-011）を加えて37°C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10  $\mu$ M 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、5.11E8を0.5  $\mu$ g/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  $\times$  10<sup>4</sup>または2.6  $\times$  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5.11E8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5.11E8P1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% Knock Out 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細胞をディスパーゼII(ロシュアプライドサイエンス #4942078)を加えて37℃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℃で4分間処理した。細胞は、終濃度10 $\mu$ M 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 $\mu$ g/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 $\times$ 10<sup>4</sup>または2.6 $\times$ 10<sup>4</sup> cell/wellの密度で播種し、5% CO<sub>2</sub>/95% Air、37℃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(pH7.4)(ライフテクノロジーズ #10010-023)で0.5~16 $\mu$ g/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2cm<sup>2</sup>/well)に終濃度が0.125~4 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>の範囲になるようにウェルあたり500 $\mu$ l加え、4℃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(pH7.4)で洗浄し、TeSR2/NutriStem 1:1混合培地を加えて使用まで37℃

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 (pH7.4) で洗浄後、0.5×TrypLE Selectを加え37℃で4分間処理し、10μM 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℃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 #86R-1KT) を用いて、添付の推奨プロトコールに従って行った。

[0066] 結果を図1に示した。図1に示す結果から、201B7細胞は0.125 μg/cm<sup>2</sup>の低濃度511E8コートウェルでは十分に増殖できず、また2~4 μg/cm<sup>2</sup>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ることが明らかとなった。すなわち、201B7細胞の増殖には511E8を0.25~1 μg/cm<sup>2</sup>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。

[0067] [実施例2：コーティング後の乾燥による511E8の活性低下]

至適濃度 (0.5 μg/cm<sup>2</sup>) でコーティングした511E8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iPS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511E8に対するα6β1インテグリンの結合活性は、Idora (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、PBS (pH 7.4) で  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した  $5.11 \times 10^8$  を 96 ウェルマイクロプレート (ベクトン・ディッキンソン #353072、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、 $4^\circ\text{C}$  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。プレートを PBS (pH 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。  $10 \text{ nM}$   $\alpha 6 \beta 1$  インテグリンを  $1 \text{ mM}$   $\text{MnCl}_2$  存在下で 3 時間反応させた後の結合量を、 $490 \text{ nm}$  での発色基質の吸光度として測定した。

[0068] 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  $5.11 \times 10^8$  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。

[0069] ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) の  $5.11 \times 10^8$  への接着は、 $\alpha 6$  インテグリンおよび  $\beta 1$  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  $5.11 \times 10^8$  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 iPS 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  $5.11 \times 10^8$  プレートでヒト iPS 細胞を培養することにより検証した。 $5.11 \times 10^8$  を  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度で実施例 1 と同様に 24 ウェルカルチャープレートにコーティングし、PBS (pH 7.4) で洗浄後、室温で 1 時間風乾した。乾燥させていない  $5.11 \times 10^8$  コーティングプレートをコントロールとした。 $5.11 \times 10^8 \text{ P1}$  の  $201 \text{ B7}$  細胞および  $\text{MGP1}$  の  $\text{Tic}$  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。

[0070] 結果を図 3 に示した。(A) は  $201 \text{ B7}$  細胞、(B) は  $\text{Tic}$  細胞の結果である。両細胞株とも  $5.11 \times 10^8$  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。

[0071] [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511E8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PBS (pH7.4)で0.25~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ で一晩コーティングを行った。プレートをPBS (pH7.4)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、10nM  $\alpha 6 \beta 1$ 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 #TH22

3)、0.5% Tween 20 (シグマ # P 5 9 2 7)、10%ポリエチレングリコール平均分子量4000 (PEG 4000、シグマ # 2 4 - 3 6 8 0)、10%ポリエチレングリコール6000 (PEG 6000、ナカライテスク # 2 8 2 5 4)、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 # 2 5 3 2 2 - 6 8 - 3)、1%アルギニン (ナカライテスク # 0 3 3 2 1)、1%グリシン (シグマ # 1 2 - 1 2 1 0 - 5)、1%リシン (ナカライテスク # 2 0 8 0 6)、1%プロリン (ナカライテスク # 2 9 0 0 1)、0.1%ウシ血清由来アルブミン (BSA、シグマ # A 7 9 0 6 - 1 0 0 G)、0.05%ゼラチン from porcine skin (シグマ # G 1 8 9 0 - 1 0 0 G) をそれぞれ  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  (終濃度  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) の 5 1 1 E 8 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  $4^\circ\text{C}$  で一晩コーティングし、乾燥後の 5 1 1 E 8 の活性を評価した。

[0074] 実際には、5 1 1 E 8 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 - P E - 3 0 - 2 3 1 A L) で密閉して、 $4^\circ\text{C}$  で 1 週間保存したプレートの  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリン結合活性 ( $10 \text{nM}$   $\alpha 6 \beta 1$  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 5 1 1 E 8 を別の 96 ウェルマイクロプレートに  $4^\circ\text{C}$  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  $10 \text{nM}$   $\alpha 6 \beta 1$  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。5 1 1 E 8 のみをコートして乾燥、保存した場合 (図中、none) では、5 1 1 E 8 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% 程度までにしか低下しなかつ

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)、 $\beta$ -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 $4^\circ\text{C}$ 一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%として、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511E8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511E8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511E8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511E8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、511E8とゼラチンをそれぞれPBS（pH7.4）で希釈し、511E8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（pH7.4）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511E8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511E8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] 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 $5.11 \times 10^8$ とゼラチンをコーティングし、1時間乾燥させた後の $10 \text{ nM } \alpha 6 \beta 1$ 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 $5.11 \times 10^8$ 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 $5.11 \times 10^8$ 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 $5.11 \times 10^8$ 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 $5.11 \times 10^8$ 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 $5.11 \times 10^8$ 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、 $5.11 \times 10^8$ 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。 $5.11 \times 10^8$ は終濃度が $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるように添加し、 $4^\circ\text{C}$ で一晩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 (pH 7.4)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、 $5.11 \times 10^8$ を加える、(2) 活性低下抑制剤と $5.11 \times 10^8$ 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)  $5.11 \times 10^8$ を一晩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 (pH 7.4)で洗浄し、室温

で24時間乾燥させ、10 nM  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリンの結合を測定した。511 E 8を終濃度0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ でコーティングし、乾燥させていないコーティングプレートでの10 nM  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリン結合量(490 nm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 $\rightarrow$ 511 E 8、条件(2)はGelatin+511 E 8、条件(3)は511 E 8 $\rightarrow$  Gelatinと表記した。図8から明らかなように、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、511 E 8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511 E 8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511 E 8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°Cで保管した。一定期間の保管後、プレートを取り出し、201 B 7細胞を実施例1と同様に単一細胞に分散させ、 $2.6 \times 10^3 \text{ cell}/\text{cm}^2$ 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。

[0086] 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 $5.11 \times 10^8$ 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 $5.11 \times 10^8$ 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。

[0087] [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 (pH 7.4) で希釈した $5.11 \times 10^8$ 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 $4^\circ\text{C}$ で一晩コーティングし、PBS (pH 7.4) で洗浄後、室温で一晩乾燥した。 $4^\circ\text{C}$ 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 $5.11 \times 10^8$ の活性低下抑制効果の指標とした。測定前日にPBS (pH 7.4) で希釈した $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の $5.11 \times 10^8$ を別の96ウェルマイクロプレートに $4^\circ\text{C}$ で一晩コーティングし、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。

[0088] 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。

[0089] [実施例10： $5.11 \times 10^8$ および全長ラミニン511に対する活性低下抑制効果の検討]

$5.11 \times 10^8$ に対する活性低下抑制剤の効果が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511を用いて効果の比較を行った。全長ラミニン511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、 $5.11 \times 10^8$ 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 (pH 7.4)で希釈し、終濃度300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のBSAまたはゼラチンと混ぜて4°Cで一晩コーティングした。プレートをPBS (pH 7.4)で洗浄後、室温で24時間乾燥させ、10 nM  $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンの結合を測定した。

[0090] 結果を図11に示した。縦軸は各濃度の511E8または全長ラミニン511を単独でコーティングし、乾燥させずに測定した10 nM  $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン結合量(490 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、511E8、全長511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。511E8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511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、511E8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。

[0091] [実施例11: 521E8に対する活性低下抑制効果]

511E8以外のラミニンE8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、521E8を用いて効果の比較を行った。521E8はラミニン521に由来するE8フラグメントで、 $\alpha 5$ 鎖E8断片、 $\gamma 1$ 鎖E8断片は511E8と共通であるが、 $\beta$ 鎖は511E8とは異なる $\beta 2$ 鎖E8断片からなる。実施例4と同様の方法で511E8および521E8を終濃度で0.5または1.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるようにPBS (pH 7.4)で希釈し、終濃度500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のBSA、ゼラチンまたはヒト血清アルブミ

ン (HSA) と混合して4℃で一晩コーティングした。プレートはPBS (pH 7.4) で洗浄後、室温で1時間乾燥させ、10 nM  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリンの結合を測定した。

[0092] 結果を図12に示した。縦軸は各濃度の511E8を単独でコーティングし、乾燥させずに測定した10 nM  $\alpha 6 \beta 1$  インテグリンの結合量 (490 nmの吸光度) を100%とした相対活性を示す。なお、 $\alpha 6 \beta 1$  インテグリンに対する511E8と521E8の結合親和性はほぼ同じであることがTaniguchi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、 $\alpha 6 \beta 1$  インテグリンの結合量を示す490 nm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511E8、521E8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511E8、521E8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。

[0093] 図12から明らかなように、乾燥処理を1時間行なった場合、521E8のインテグリン結合活性は511E8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、BSA、ゼラチンまたはHSAを同時添加することにより、511E8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511E8に限定されず、他のラミニンアイソフォームのE8フラグメントに対しても発揮されることが示された。

[0094] [実施例12: 211E8の511E8に対する活性低下抑制効果]

511E8以外のラミニンE8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E8フラグメントとしては、それ自体が $\alpha 6 \beta 1$  インテグリン結合活性を持たないラミニン211のE8フラグメント (以下、211E8) を使用した。具体的には、PBS (pH 7.4) で希釈し

た $5.11 \times 10^8$  (終濃度 $0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )と $2.11 \times 10^8$  (終濃度を $0, 0.8, 1.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ に調製)を混合して $4^\circ\text{C}$ で一晩96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PBS (pH 7.4)で洗浄後、室温で24時間乾燥させ、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン ( $10 \text{ nM}$ )の結合を測定した。なお、 $2.11 \times 10^8$ が $\alpha 6 \beta 1$ 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)。

[0095] 結果を図13に示した。 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン結合活性は、 $0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の $5.11 \times 10^8$ をコーティングし、乾燥させずに測定した場合の結合量 ( $490 \text{ nm}$ の吸光度が $1.07$ )を $100\%$ とした相対値で表示した。図13から明らかなように、 $2.11 \times 10^8$ 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 $30\%$ まで回復し、 $2.11 \times 10^8$ を $1.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 添加すると約 $80\%$ までインテグリン結合活性が回復した。この結果から、 $5.11 \times 10^8$ の活性低下抑制剤として他のラミニンE8を使用できることが示された。また、BSA、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E8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。

[0096] [実施例13：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 $5.11 \times 10^8$ 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 $\beta 1$ 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 $5.11 \times 10^8$ 改変体であり、Plus #5ラミニンE8は $\alpha 5$ 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 (pH 7.4)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 $37^\circ\text{C}$ 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、 $10\text{nM}$ 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（ $490\text{nm}$ 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°C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 μg/cm<sup>2</sup>)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 μg/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。

## 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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 $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ およびラミニン $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$ 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 $\alpha 6 \beta 1$ 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

[請求項2] 前記(1)において、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請求項1に記載の細胞培養器具。

[請求項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 $\alpha 6 \beta 1$ 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、その3倍以上の濃度のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 結合活性を有しないラミニンフラグメントがコーティングされてい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

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、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請求項1に記載の細胞培養器具。

[請求項5] ラミニンフラグメントが、ラミニンE8フラグメント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6] 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ラミニン $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ のフラグメント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、 $\beta$ -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請求項1~7のいずれかに記載の細胞培養器具。

[請求項9] 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 $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ およびラミニン $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$ 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

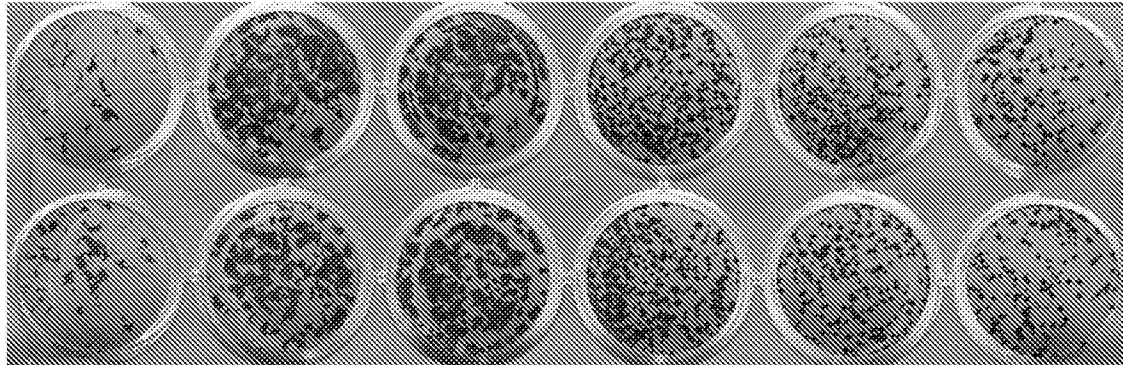
(C) コーティングされた蛋白質を乾燥する工程を含むことを特徴とする製造方法。

- [請求項10] 哺乳動物細胞の培養方法であって、請求項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。
- [請求項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請求項10に記載の培養方法。
- [請求項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、ミエリン塩基性蛋白質、 $\beta$ -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 $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ のE8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 $\alpha 6 \beta 1$ 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乾燥によるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 結合活性の低下を抑制する活性低下抑制剤。

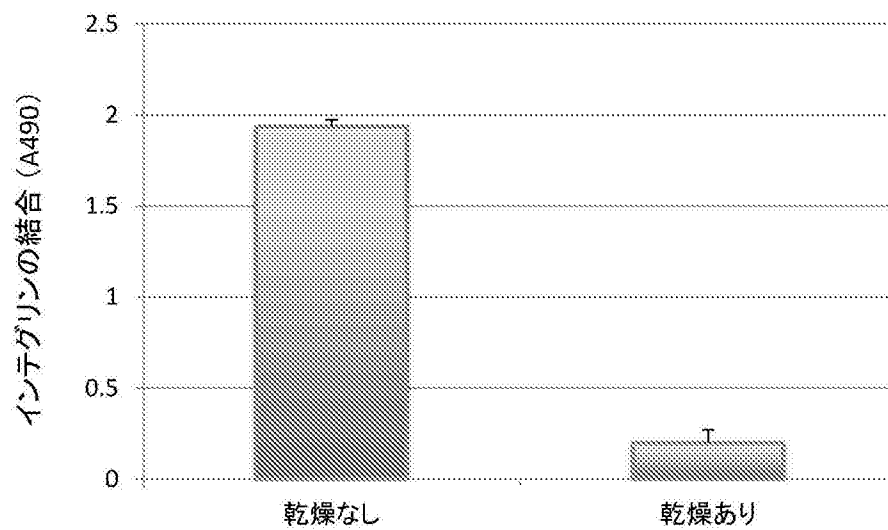
[図1]

511E8濃度 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

0.125    0.25    0.5    1    2    4



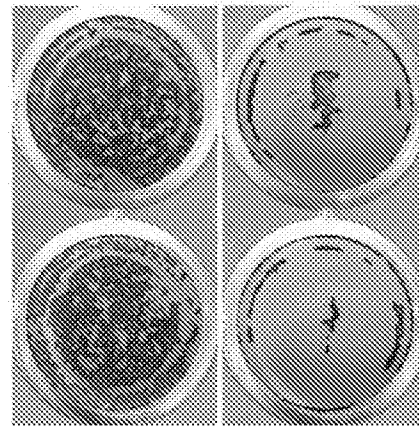
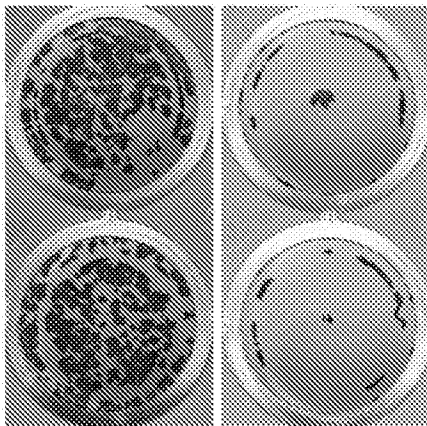
[図2]



[図3]

(A) 201B7

(B) Tic



なし

あり

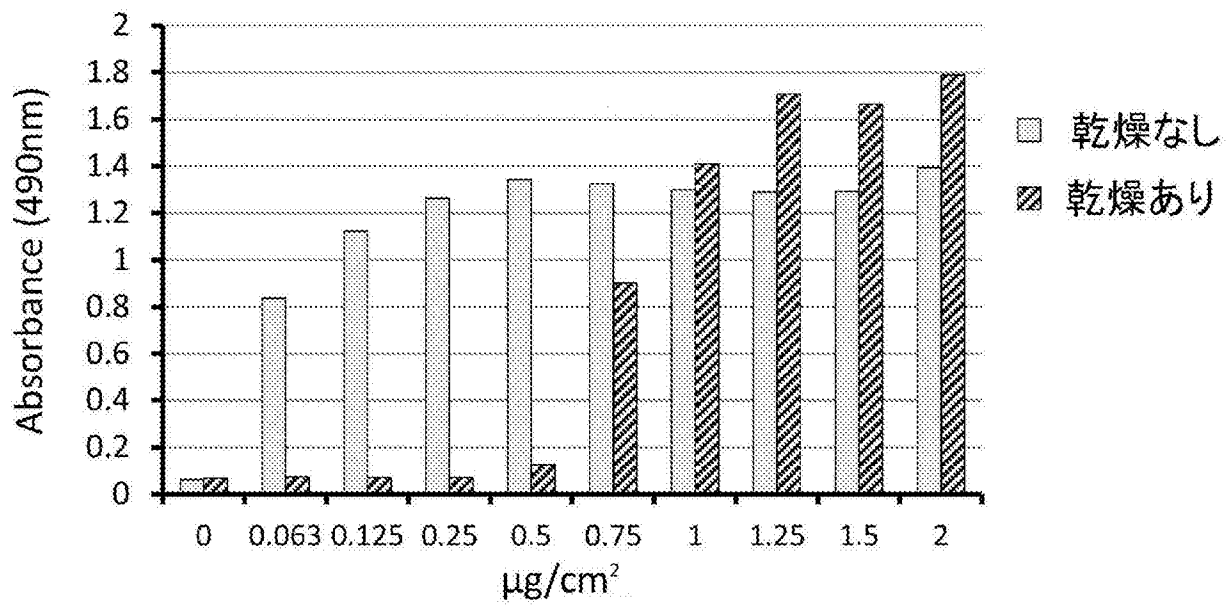
なし

あり

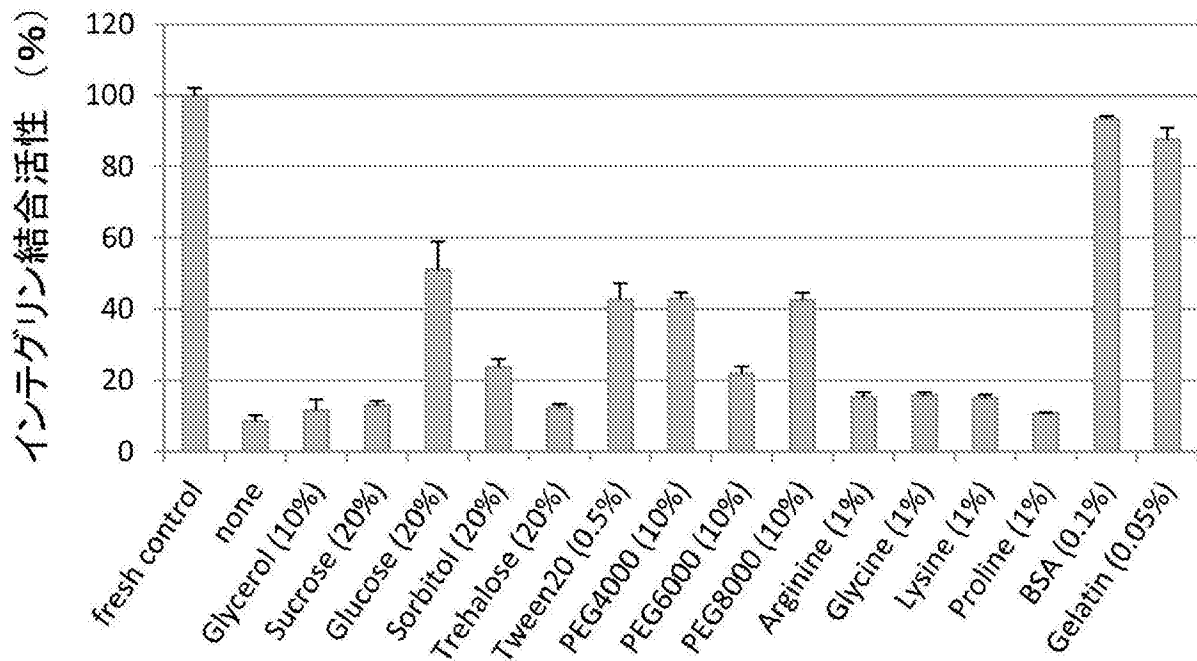
乾燥

乾燥

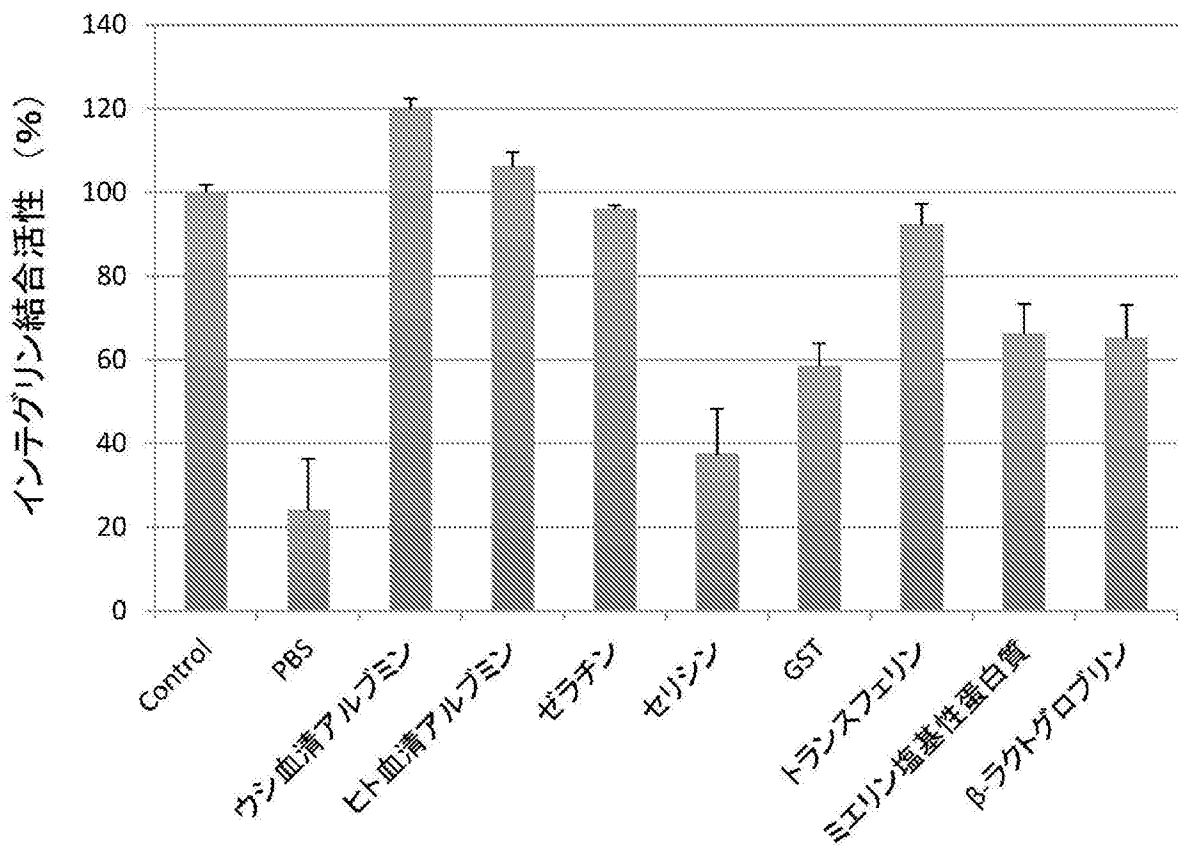
[図4]



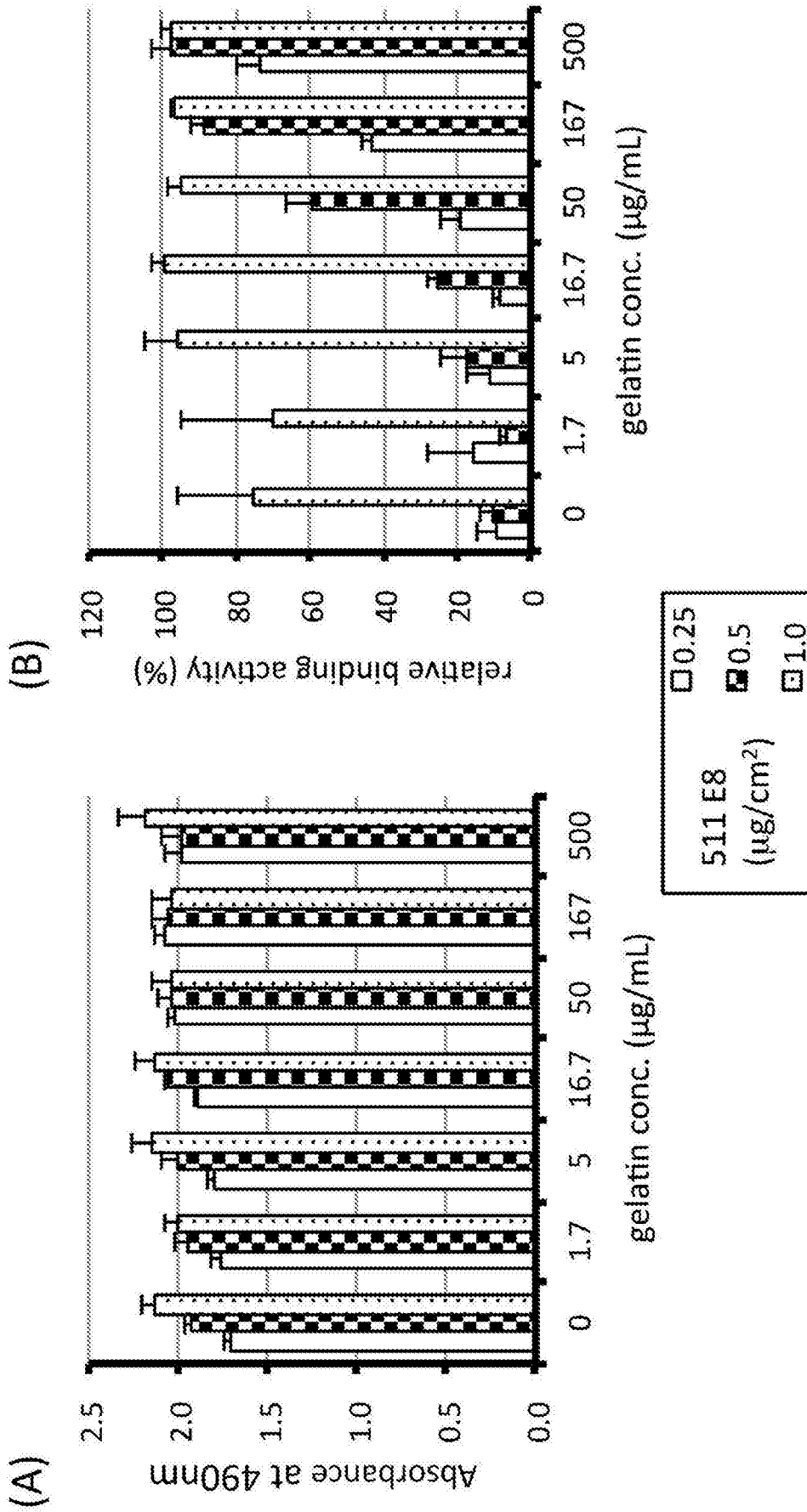
[図5]



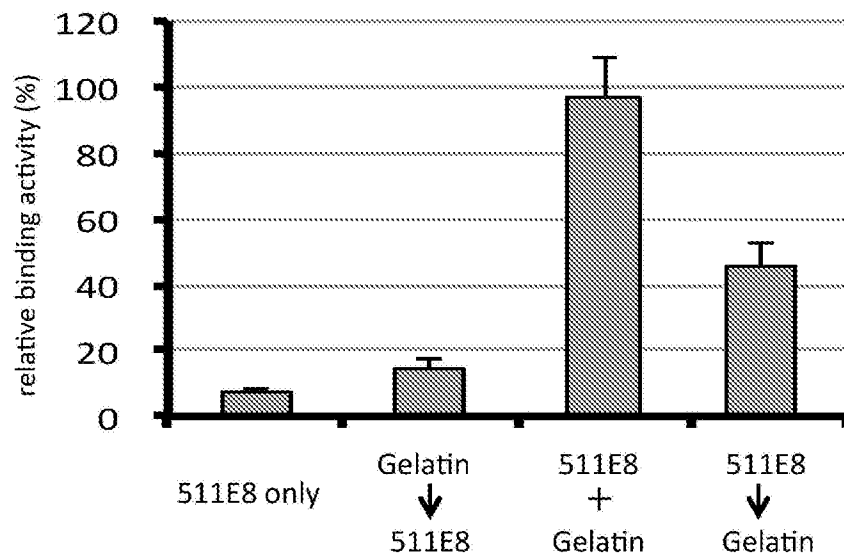
[図6]



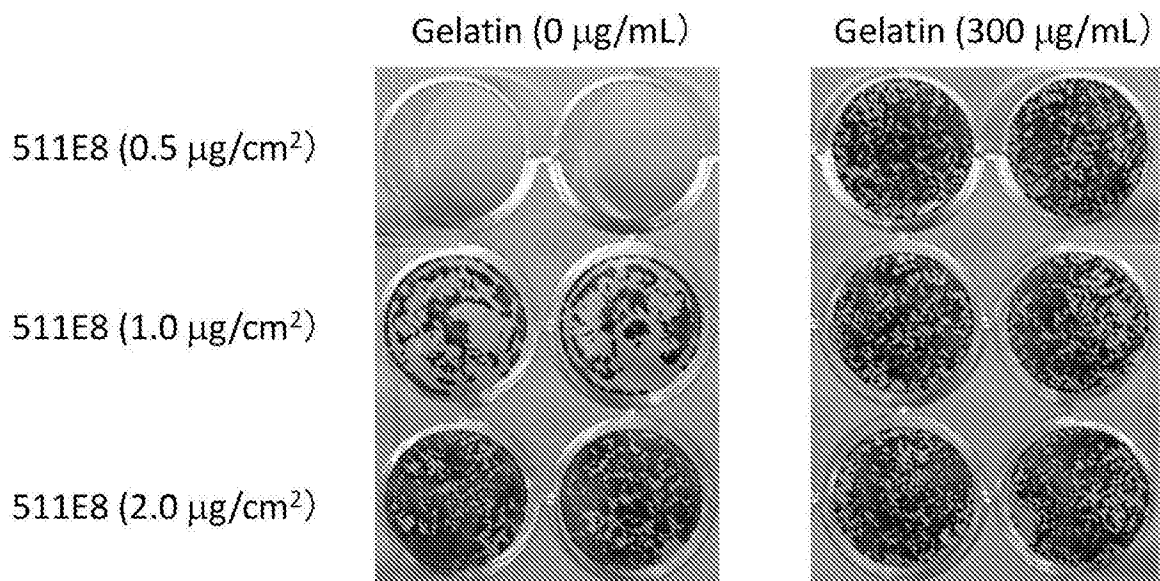
[7]



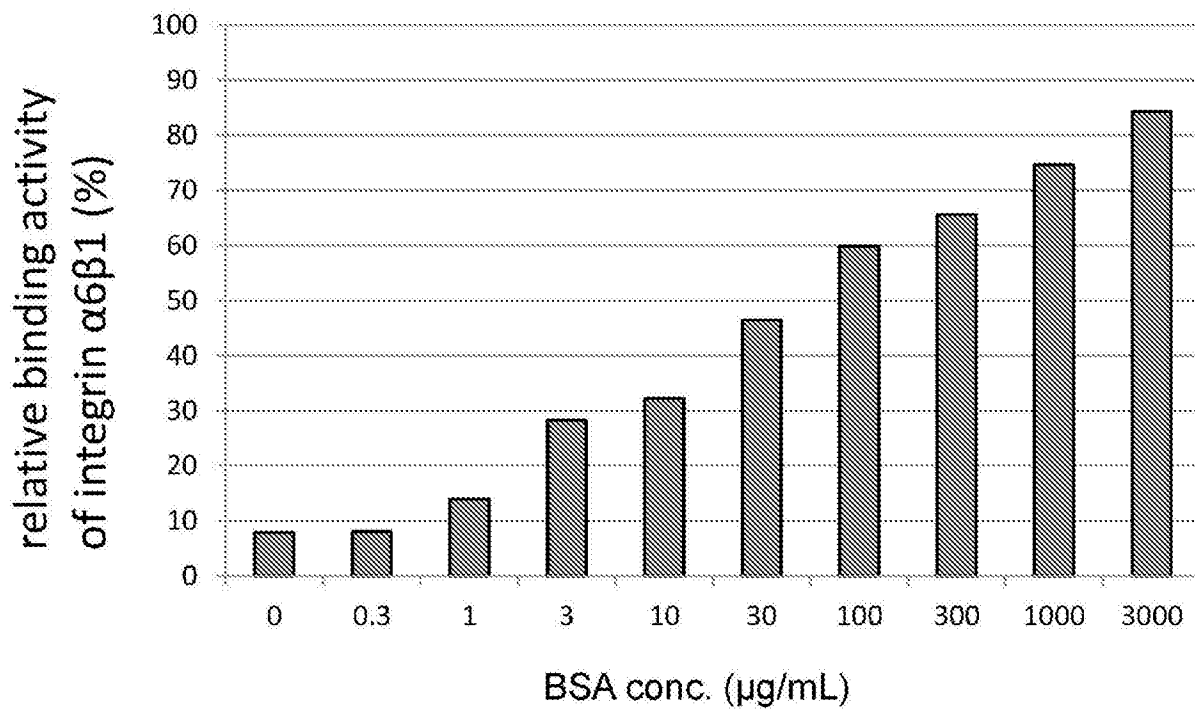
[8]



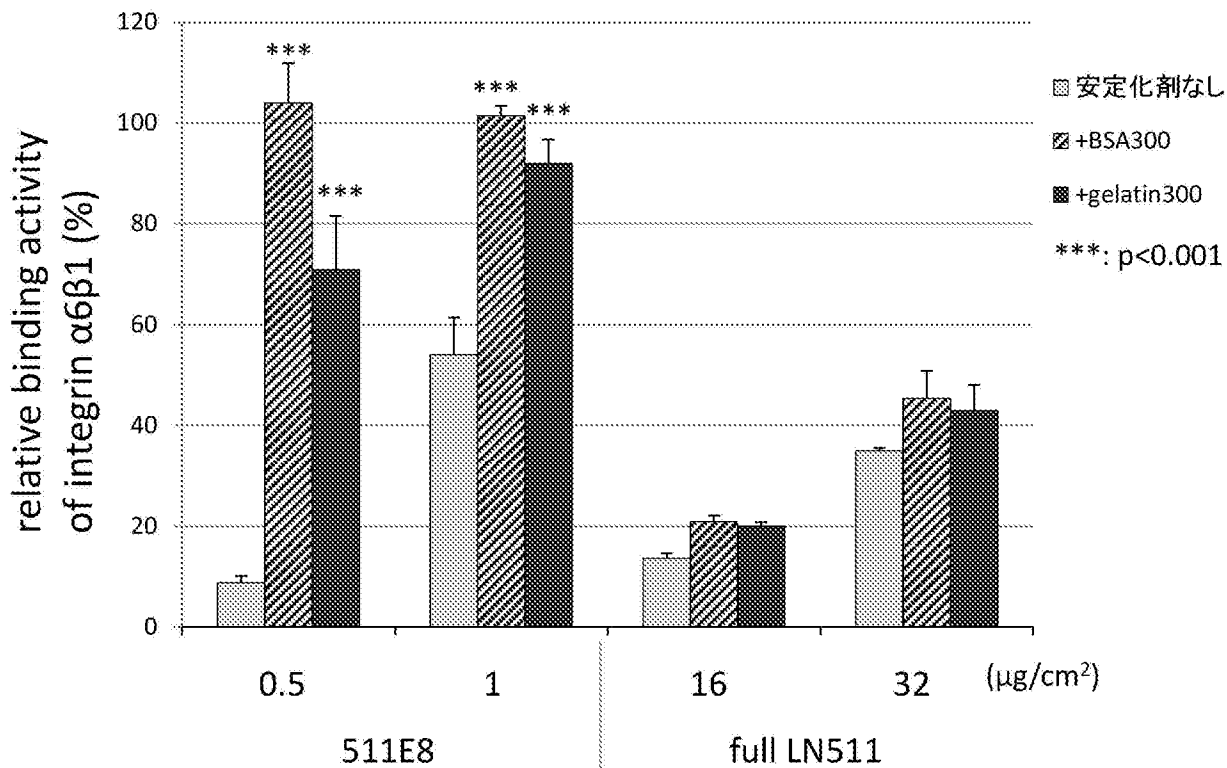
[9]



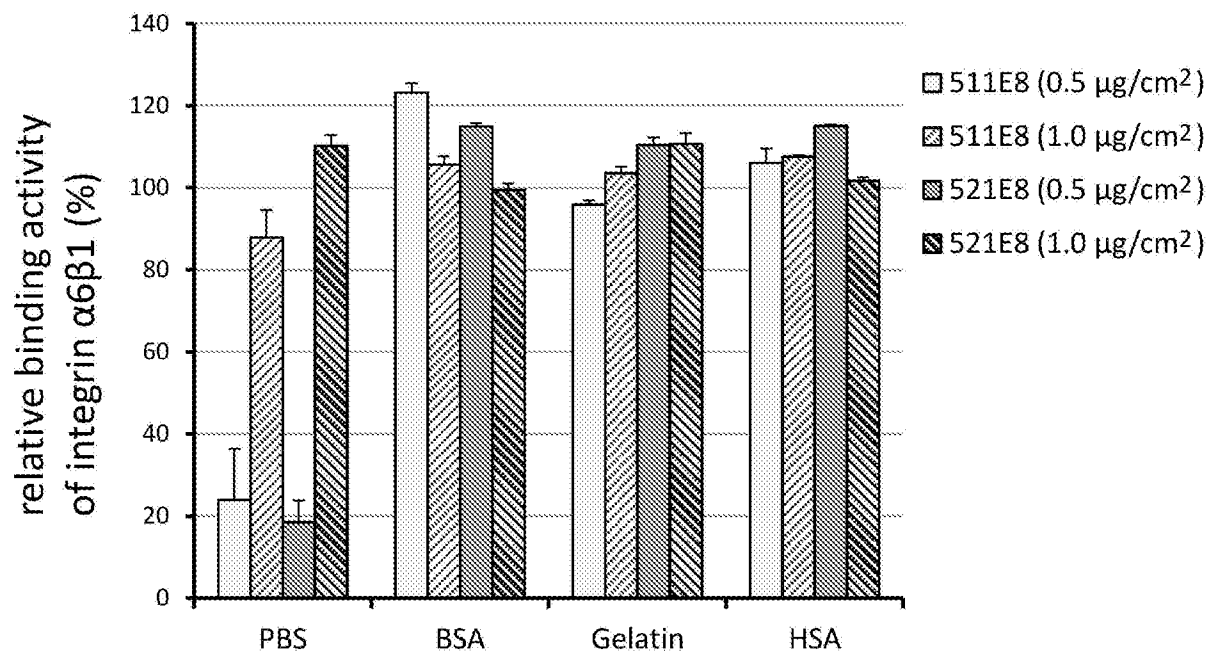
[図10]



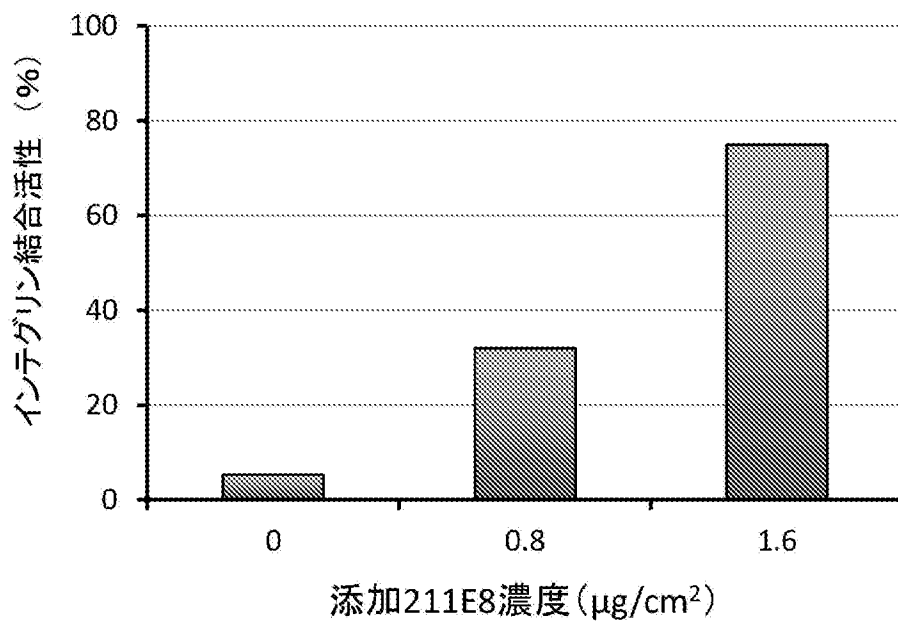
[図11]



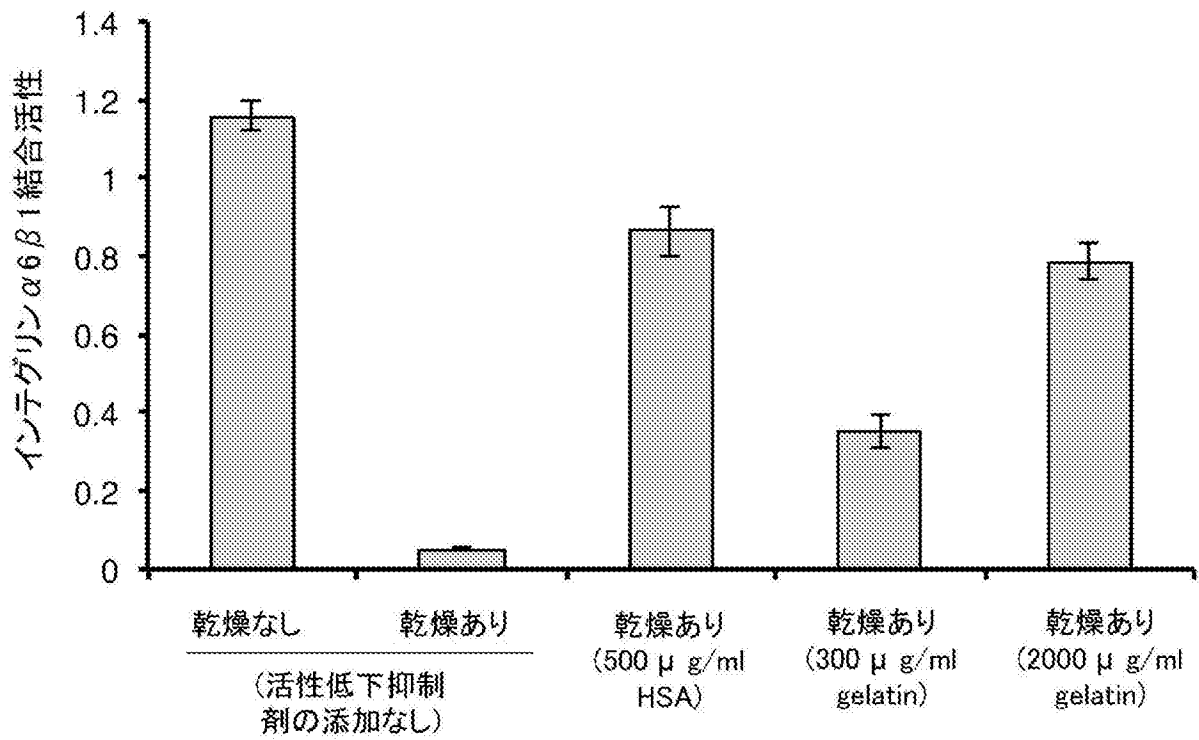
[図12]



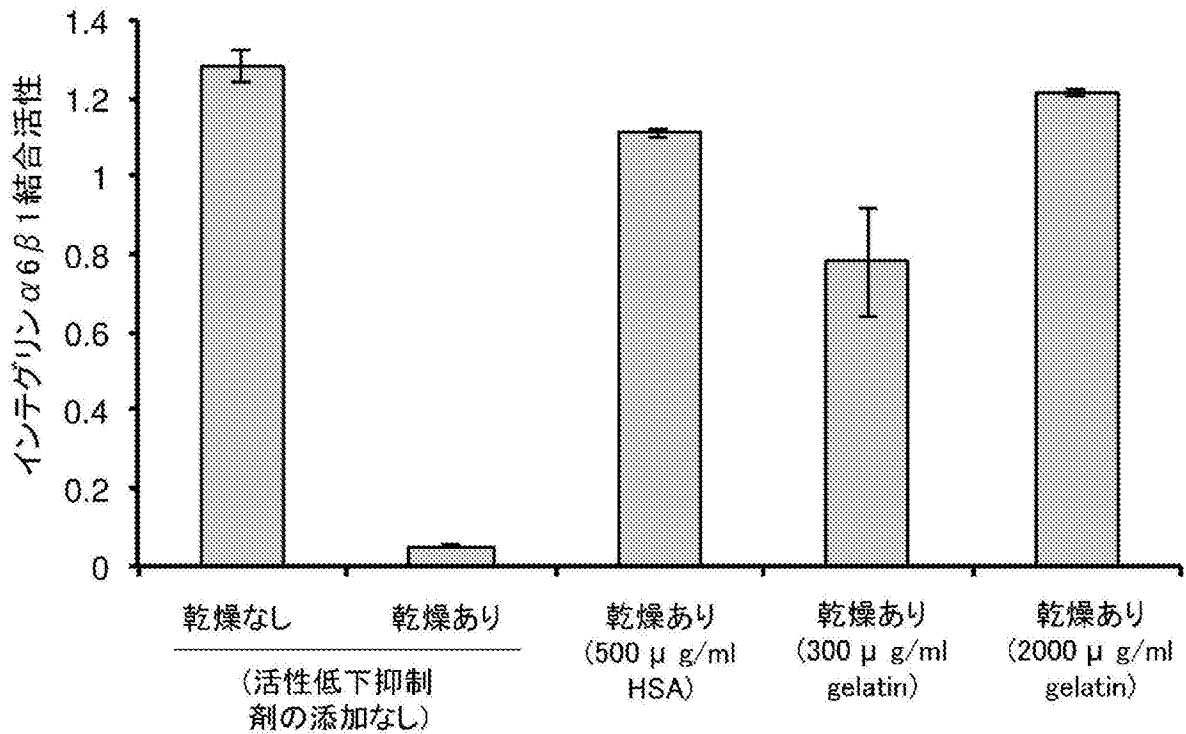
[図13]



[図14]

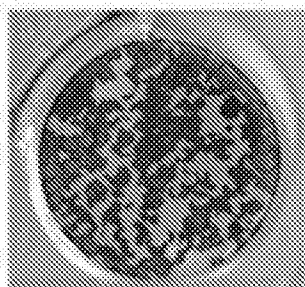


[図15]

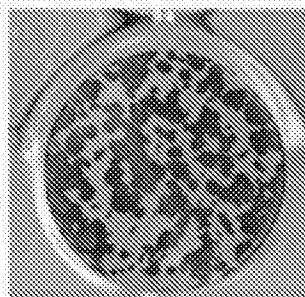


[図16]

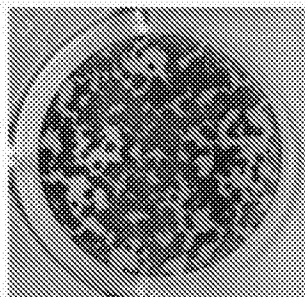
乾燥あり  
(2000  $\mu$  g/ml  
gelatin)



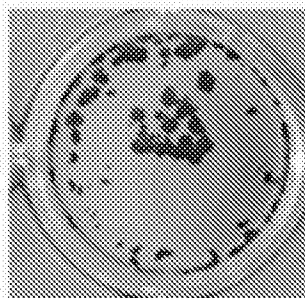
乾燥あり  
(300  $\mu$  g/ml  
gelatin)



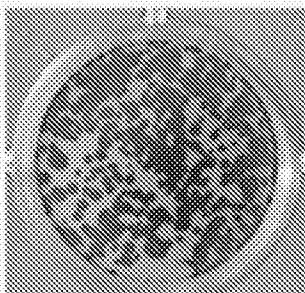
乾燥あり  
(500  $\mu$  g/ml  
HSA)



乾燥あり  
(活性低下抑制  
剤の添加なし)



乾燥なし  
(活性低下抑制  
剤の添加なし)



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/062449

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12M3/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12M3/00, C12N5/0735, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Thomson Innovation

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 06-098757 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 12 April 1994 (12.04.1994), claims 1, 2, 4; examples (Family: none)	1-11/12
Y/A	JP 08-173144 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 09 July 1996 (09.07.1996), claims 1, 3, 5; paragraphs [0021] to [0022]; examples (Family: none)	1-11/12

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22 July, 2014 (22.07.14)	Date of mailing of the international search report 12 August, 2014 (12.08.14)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/062449

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2011-078370 A (Osaka University, Kyoto University), 21 April 2011 (21.04.2011), entire text; particularly, claim 2; paragraphs [0004], [0011], [0019] & US 2012/0220031 A1 & EP 2487236 A1 & WO 2011/043405 A1 & CN 102597217 A	1-11/12
Y/A	MIYAZAKI T., et al., Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells, NATURE COMMUNICATIONS, 2012.12.04, Vol. 3, No. 1236, P. 1-10, doi:10.1038/ncomms2231, entire text	1-11/12
Y/A	MIYAZAKI T., et al., Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, Vol. 375, P. 27-32, Abstract	1-11/12
Y/A	NISHIUCHI R., et al., Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: A comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant $\alpha 3\beta 1$ , $\alpha 6\beta 1$ , $\alpha 7\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins, MATRIX BIOLOGY, 2006, Vol. 25, P. 189-197, Abstract	1-11/12
A	IDO H., et al., The Requirement of the Glutamic Acid Residue at the Third Position from the Carboxyl Termini of the Laminin $\gamma$ Chains in Integrin Binding by Laminins, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2007.04.13, Vol. 282, No. 15, P. 11144-11154, entire text	1-12
A	JP 2011-079795 A (Osaka University, Japan Institute of Leather Research), 21 April 2011 (21.04.2011), paragraph [0009] (Family: none)	7,12

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)n		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12M3/00, C12N5/0735, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, Thomson Innovation		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/ A	JP 06-098757 A（住友ベークライト株式会社）1994.04.12, 請求項 1、2及び4、実施例等（ファミリーなし）	1-11/ 12
Y/ A	JP 08-173144 A（住友ベークライト株式会社）1996.07.09, 請求項 1、3及び5、段落【0021】-【0022】、実施例等（ファミ リーなし）	1-11/ 12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22.07.2014	国際調査報告の発送日 12.08.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 鈴木 崇之 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B   4152

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/ A	JP 2011-078370 A (国立大学法人大阪大学、国立大学法人京都大学) 2011.04.21, 全文、特に、請求項2、段落【0004】、段落【0011】、及び、段落【0019】 & US 2012/0220031 A1 & EP 2487236 A1 & WO 2011/043405 A1 & CN 102597217 A	1-11/ 12
Y/ A	MIYAZAKI T., et al., Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells, NATURE COMMUNICATIONS, 2012.12.04, Vol. 3, No. 1236, P. 1-10, doi:10.1038/ncomms2231、全文	1-11/ 12
Y/ A	MIYAZAKI T., et al., Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, Vol. 375, P. 27-32, Abstract 等	1-11/ 12
Y/ A	NISHIUCHI R., et al., Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: A comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant $\alpha 3 \beta 1$ , $\alpha 6 \beta 1$ , $\alpha 7 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 4$ integrins, MATRIX BIOLOGY, 2006, Vol. 25, P. 189-197, Abstract 等	1-11/ 12
A	IDO H., et al., The Requirement of the Glutamic Acid Residue at the Third Position from the Carboxyl Termini of the Laminin $\gamma$ Chains in Integrin Binding by Laminins, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2007.04.13, Vol. 282, No. 15, P. 11144-11154, 全文	1-12
A	JP 2011-079795 A (国立大学法人大阪大学、財団法人日本皮革研究所) 2011.04.21, 段落【0009】 (ファミリーなし)	7, 12