

iPS細胞維持培養の独自培地の開発

梅景 雅史、塚原 正義

公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団 細胞調製施設



公益財団法人
京都大学 iPS細胞研究財団

【背景・目的】

再生医療に用いるiPS細胞維持培地は、多くが市販の維持培地を使用している。しかしながら、市販の培地はすべての組成を開示されていなものが多い。GMP体制下でiPS細胞を製造する場合においては、組成が不明な培地を使用していくことはGMP管理上好ましいことではない。また、サプライヤーの事情などにより培地の供給が不能となった場合のリスクは大きい。そこで我々はiPS細胞維持培地の再構成を行った。

本発表では、独自培地と市販培地を用いて増殖能、心筋分化能の比較検討を行った結果について報告する。

StemFit AK03（味の素）をコントロールとし、Basal Medium、 Supplement1とSupplement2に分けて検討した。細胞は、AK03とLaminin-511 E8の培養システムで樹立したiPS細胞研究財団のFf-MH 23s01株を使用した。評価はExcellent>Good>Poor>Badで表した。

Excellent	Good	Poor	Bad
AK03同等	ES様形態を保持 増殖可能	ES様形態を不保持 増殖困難	増殖不良

培地組成	Basal Medium	Supplement 1	Supplement 2
Stem Fit AK03	A soln.	B soln.	C soln.
CiRA_F medium (Proprietary medium)	• DMEM • MEM • DMEM Ham's F-12 • IMDM • RPMI1640	• Insulin • Transferrin • Sodium Selenite • Albumin	• bFGF • TGF-β1/β3 • ID-8

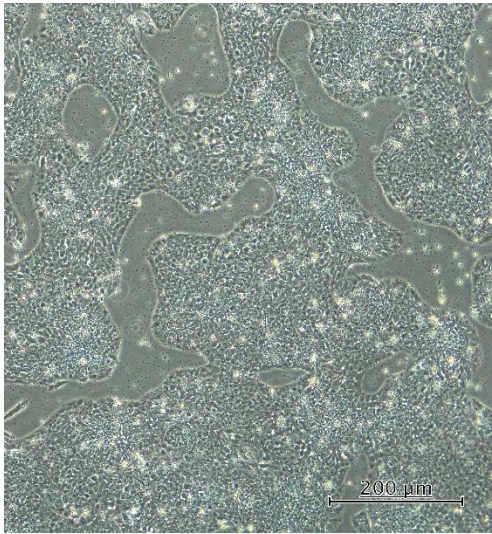
Cell: Ff-MH 23s01

Substrate: LN511-E8

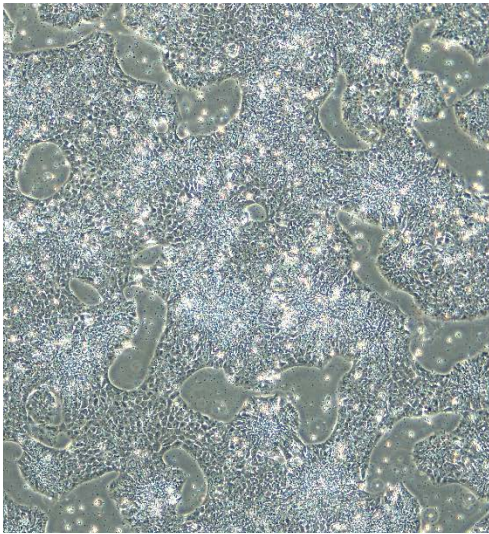
基礎培地の検討

Name	Basal Media	B soln.	C soln.	Result
A	DMEM	+	+	Bad
B	DMEM Ham's F-12	+	+	Excellent
C	IMDM	+	+	Excellent
D	MEM	+	+	Bad
E	AK03	+	+	Excellent

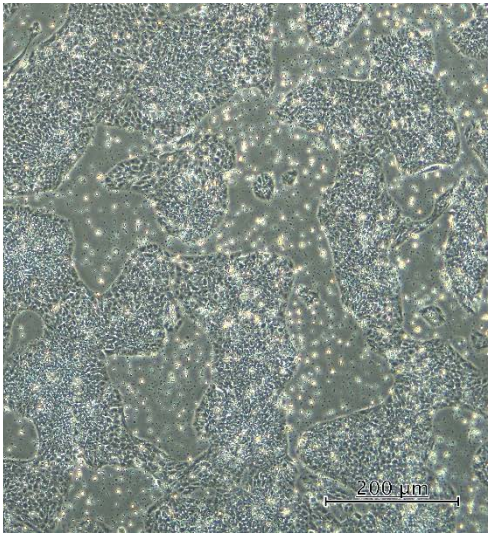
B



C



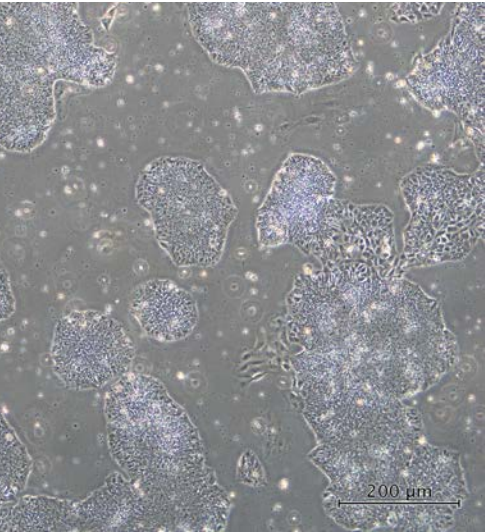
E



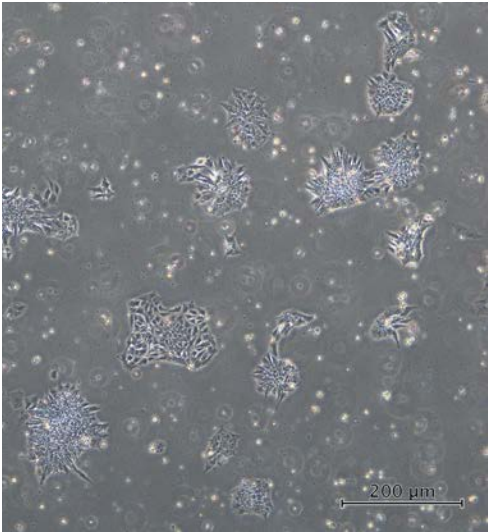
サプリメント1の検討

Name	Basal Media	Albumin	Insulin	Transferrin	Sodium Selenite	B soln.	C soln.	Result
N	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	-	+	Good
O	IMDM	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	-	+	Poor
Q	AK03	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	-	+	Good
E	AK03	-	-	-	-	+	+	Excellent

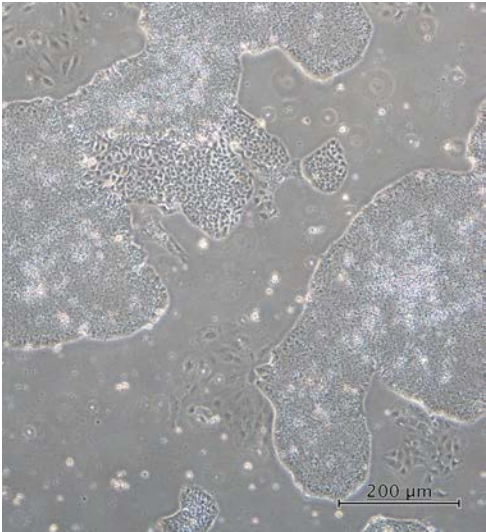
N



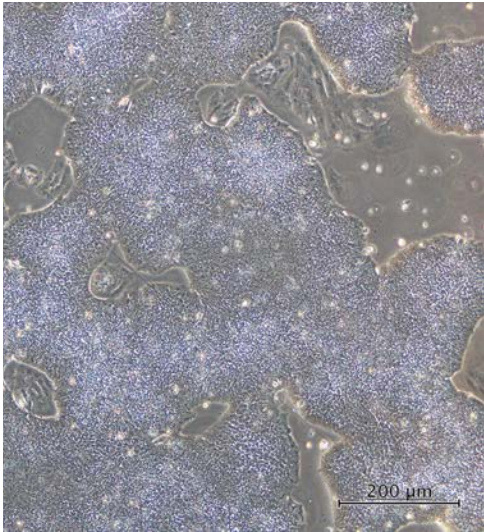
O



Q



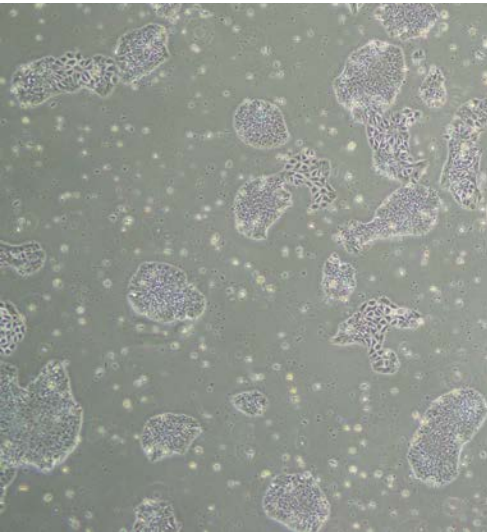
E



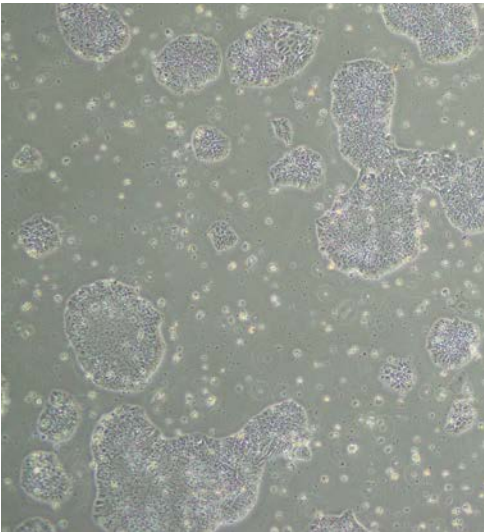
サプリメント2 FGFの濃度

Name	Basal Media	Albumin	Insulin	Transferrin	Sodium Selenite	TGF-β1/β3, ID-8	bFGF	B / C soln.	Result
X	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	TGF-β1 : 2ng/mL	125ng/mL	-	Good
Y	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	TGF-β1 : 2ng/mL	25ng/mL	-	Good
Z	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	TGF-β1 : 2ng/mL	5ng/mL	-	Poor
A1	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	TGF-β1 : 0ng/mL	125ng/mL	-	Bad
E	AK03	-	-	-	-	-		B+C	Excellent

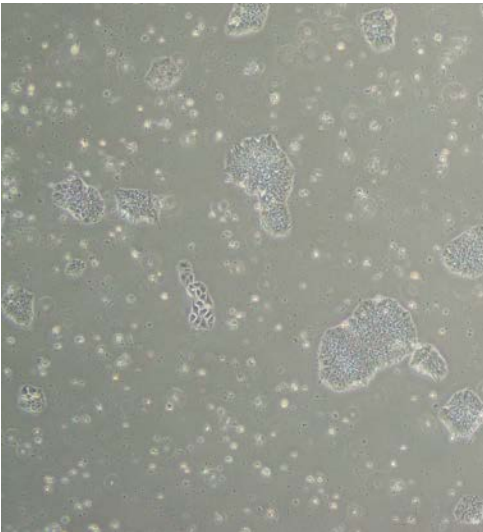
X



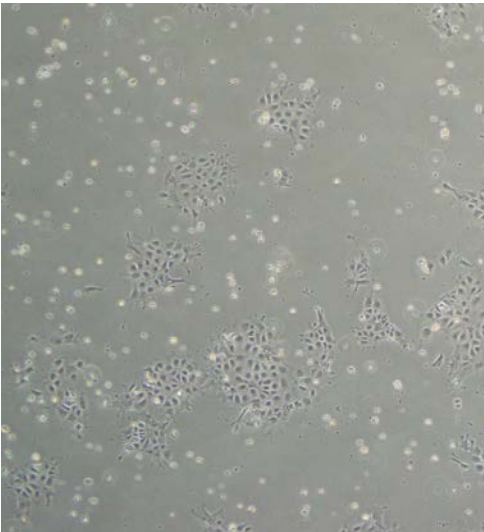
Y



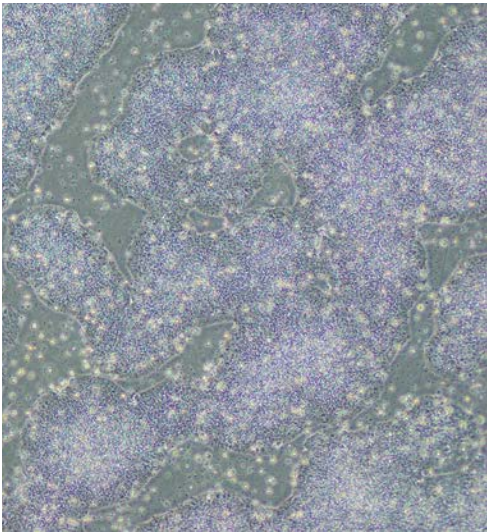
Z



A1

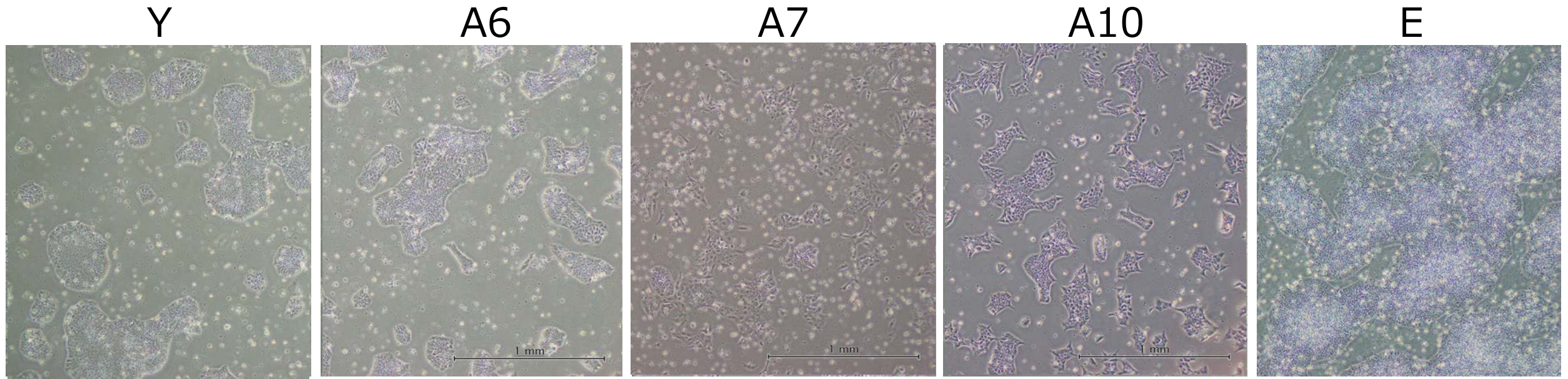


E



サプリメント2 TGF-βの検討

Name	Basal Media	Albumin	Insulin	Transferrin	Sodium Selenite	TGF-β1/β3, ID-8	bFGF	B / C soln.	Result
Y	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	TGF-β3 : 2ng/mL	25ng/mL	-	Good
A6	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	TGF-β1 : 2ng/mL	25ng/mL	-	Good
A7	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	ID-8 : 500nM	25ng/mL	-	Poor
A10	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	ID-8 : 2500nM	25ng/mL	-	Good
E	AK03	-	-	-	-	-		B+C	Excellent



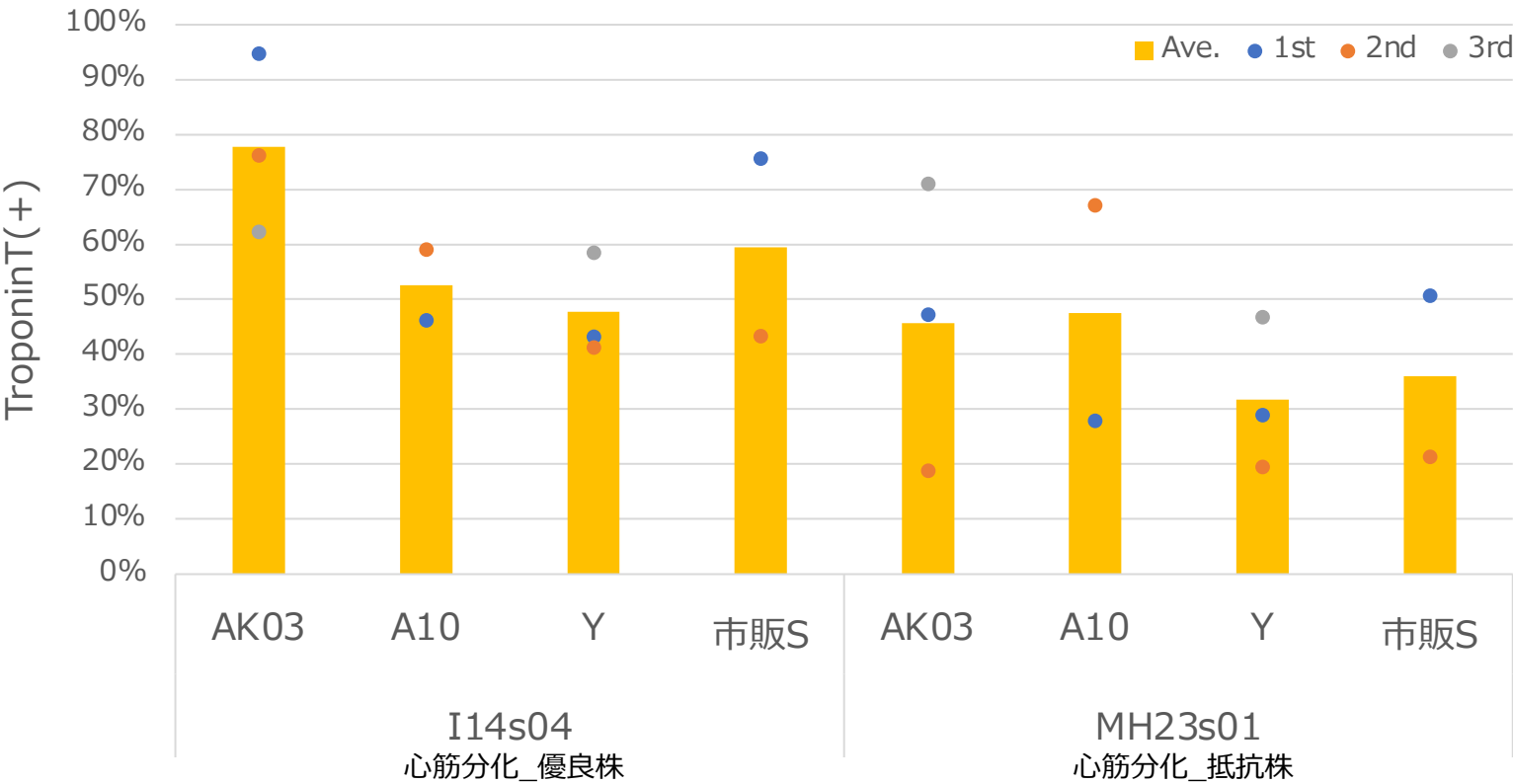
培地組成のまとめ

	Excelent	Good	Poor	Bad
Basal Media	AK03	DMEM Ham's F-12	IMDM	DMEM, MEM, RPMI1640
bFGF		25ng/mL > 125ng/mL	5ng/mL	0ng/mL
TGF-β1/β3、ID-8		TGF-β3 = TGF-β1	ID-8	
ID-8		2500nM	500nM	
Albumin		1mg/mL		
Insulin		100ug/mL		
Transferrin		100ug/mL		
Sodium selenite		10nM		

CiRA_Fの候補

Name	Basal Media	Seeding	Growth	Transferrin	Sodium Selenite	TGF-β1/β3, ID-8	bFGF	B / C soln.	Result
Y	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	TGF-β3 : 2ng/mL	25ng/mL	-	Good
A10	DMEM Ham's F-12	1mg/mL	100ug/mL	100ug/mL	10nM	ID-8 :2500nM	25ng/mL	-	Good

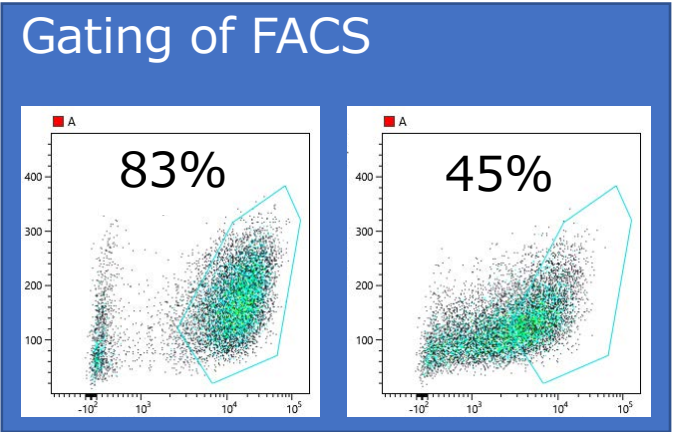
CiRA_F培地を使用した心筋細胞誘導効率



心筋誘導方法 (CiRA 吉田研究室)

	Medium
Day 0	Aggregation medium
Day 1	2× Induction medium 1
Day 3	Induction medium 2
Day 6 or 7-11	Induction medium 3
Day 12-15	Induction medium 3

評価方法 FACSによるTroponinT陽性率



1. 短期の培養が可能なiPS細胞を維持する培地を再構成することができた。
2. 再構成した培地で短期間維持したiPS細胞を心筋細胞へ誘導することができた。
3. 心筋細胞への分化誘導効率は大きな差はなかった。
4. AK03 培地は、再構成培地と比較してiPS細胞培養の安定性が優れていた。

市販培地への置き換え

AK03 からAK03 以外の市販培地へ置き換えを行った後、心筋細胞分化誘導による分化能を評価した。

Without Adaptation

Maintenance culture (LN511)	Pre culture Day0 (LN511, VTN)	Pre culture Day1 or 2 (LN511, VTN)	Pre culture Day 5-7 (LN511, VTN)	Myocardial differentiation
AK03	AK03 + Y	AK03, 市販培地1, 市販培地2,市販培地3	Each medium	Differentiation medium

With Adaptation

Maintenance culture (LN511)	Pass 1 Day0 (LN511, VTN)	Pass 1 Day1 or 2 (LN511, VTN)	Pass ... 5 or 8-10 (LN511, VTN)	Pre culture (LN511, VTN)	Myocardial differentiation
AK03	AK03 + Y	AK03, 市販培地1, 市販培地2,市販培地3	AK03, 市販培地1, 市販培地2,市販培地3	Each medium	Differentiation medium

Adaptation

市販培地培養後の心筋誘導効率

Troponin-T陽性率

	ECM	Term	AK03	市販培地		
				市販培地1	市販培地2	市販培地3
I14s04	LN511	Day5-7	90.17%(+)	84.42%(+)	75.48%(+)	92.27%(+)
		Day50-70	94.74%(+)	76.67%(+)	93.42%(+)	92.55%(+)
	VTN	Day5-7	92.12%(+)	94.04%(+)	72.56%(+)	93.27%(+)
		Day30	77.23%(+)	2.82%(-)	7.64%(-)	ND
MH23s01	LN511	Day5-7	35.19%(-)	51.94%(-)	42.34%(-)	46.90%(-)
		Day50-70	63.44%(-)	80.03%(+)	63.73%(+)	37.78%(-)
	VTN	Day5-7	11.69%(-)	64.08%(-)	29.68%(-)	72.43%(+)
		Day30	64.09%(-)	0.00%(-)	11.35%(-)	ND

I14s04 : を基準に ± 5 % をマゼンダで示した。

MH23s01 : を基準に ± 30 % をマゼンダで示した。

1. 再構成した培地による短期の培養は可能であるが、AK03 のiPS細胞培養の安定性が優れていた。
2. 心筋分化不良株であるMH23s01を以下の方法で分化効率を改善できた。
 - No tame : Essential 8 – VTN
 - Tame : StemUp – LN511
3. 心筋細胞の分化誘導効率は、異なる培地への短期間の培養だけでも改善した。
4. 心筋細胞の分化誘導効率は、異なる培地へのTamingによっても改善した。

iPS細胞維持培養の独自培地の開発

梅景 雅史

公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団 細胞調製施設

筆頭演者は、過去1年間（1月～12月）において、
本演題の発表に関して開示すべきCOIはありません。