


Myoridge Co. Ltd.

目的細胞の特性を引き出す培地最適化 ～心筋細胞分化培地とT細胞用培地の応用例～

株式会社マイオリッジ

| 会社名 | 株式会社マイオリッジ |
|---------|---|
| 代表取締役 | 牧田 直大 |
| 設立年月 | 2016年8月 |
| メールアドレス | info@myoridge.co.jp |
| 電話番号 | 075-585-4560 |
| 住所 | 〒606-8305 京都府京都市左京区吉田河原町14番地 公益財団法人京都技術科学センター 本館B5号室 |

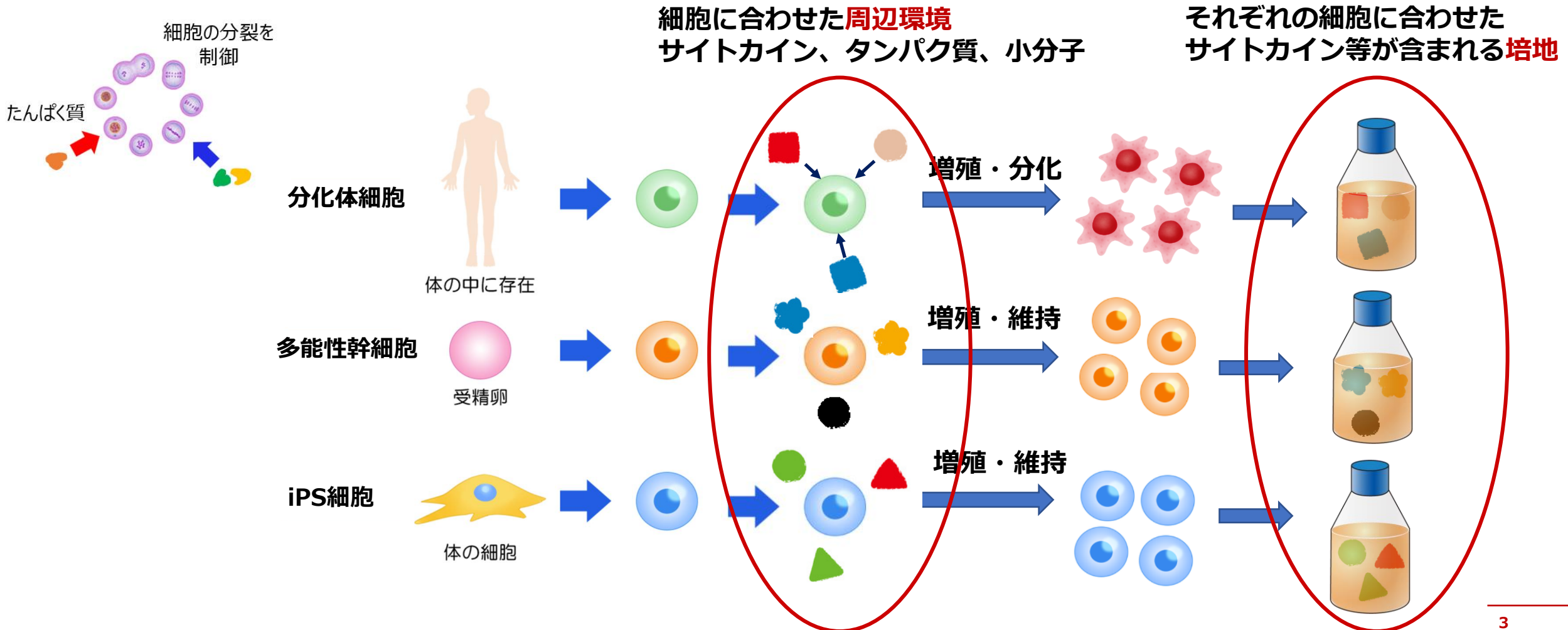


| 沿革 | |
|----------|---|
| 2016年8月 | 京都大学発スタートアップ 株式会社マイオリッジ設立  京都大学 KYOTO UNIVERSITY |
| 2016年9月 | 株式会社リバネス主催「TECHPLANTER第3 回バイオテックグランプリ」最優秀賞受賞 |
| 2017年1月 | NEDO 「研究開発型ベンチャー支援事業/ 起業家候補（スタートアップイノベ ーター）募集」に採択 |
| 2018年7月 | NEDO「研究開発型ベンチャー支援事業/ シード期の研究開発型ベンチャーに対する 事業化支援」に採択 |
| 2020年12月 | 米Avery Therapeutics社との臨床用心筋細 胞技術ライセンスアウト契約締結 |
| 2021年11月 | 培地製品“Ex-All in One”の販売開始 |
| 2022年4月 | 住友化学株式会社,株式会社三菱ケミカルHD, 凸版印刷株式会社と資本業務提携契約締結 |
| 2022年6月 | 事業拡張に伴い、京都大学イノベーション ハブから現住所へ移転（ラボ面積 2.5倍） |
| 2022年12月 | 培地製品“Ex-MSC Medium”の販売開始 |

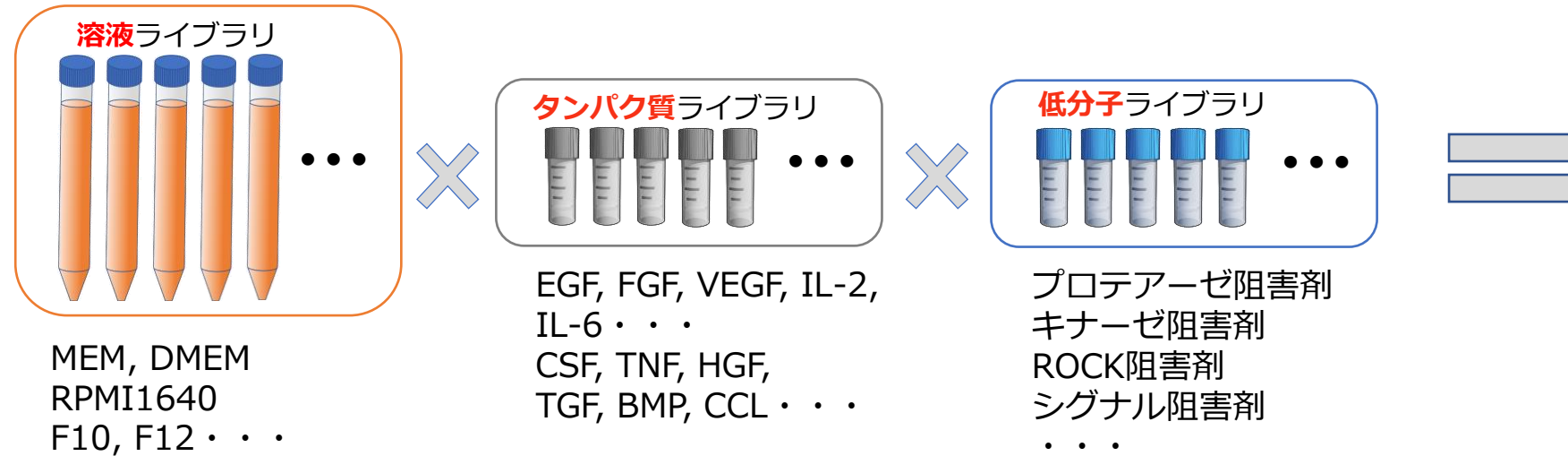
細胞とその周辺環境について

細胞微小環境とは

細胞微小環境は生体内で細胞がその性質を維持するために必要な微小環境。幹細胞や分化した体細胞は生涯を通して未分化状態や分化状態を維持するが、培養に伴って増殖能や機能が低下する。このことから、細胞がその性質を維持するためには適切な環境が必要であると考えられている。



培地開発サービス_マイオリッジのコア技術



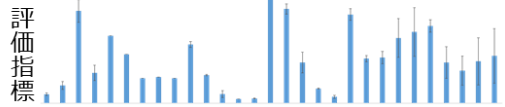
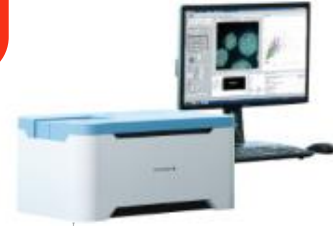
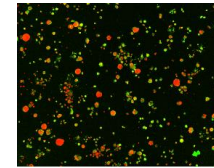
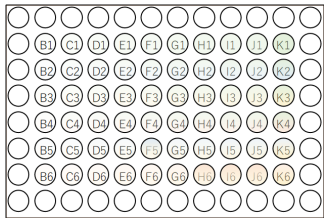
候補培地, サプリメント



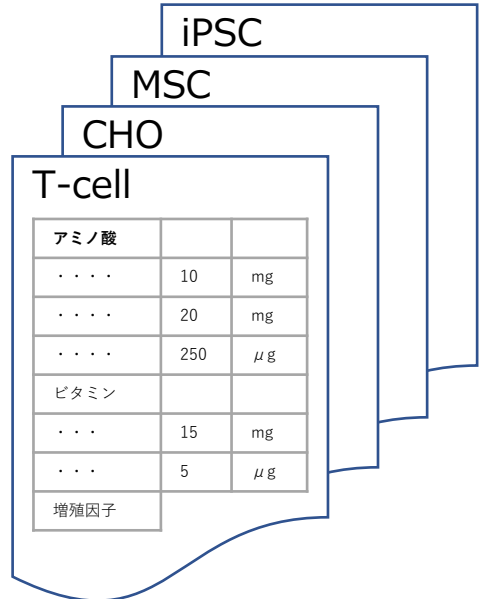
独自の培地成分データベース

- DMEM
アミノ酸
・
・
・
ビタミン
・
・
- 増殖因子
(サイトカイン)
・
・
・
・
接着因子
・
- 低分子
・
・
・
可食性成分等
・
・

96ウェルプレートと共焦点定量イメージサイトメーターを用いたHTSシステム

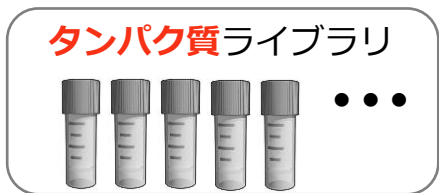
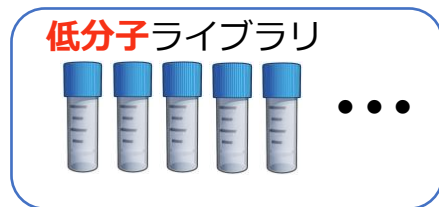
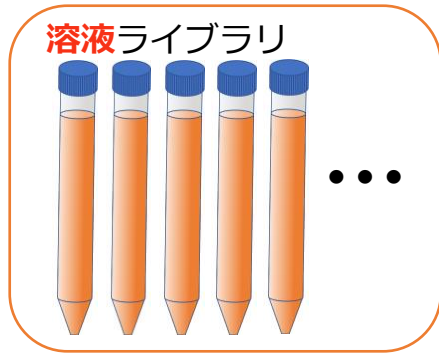


候補培地



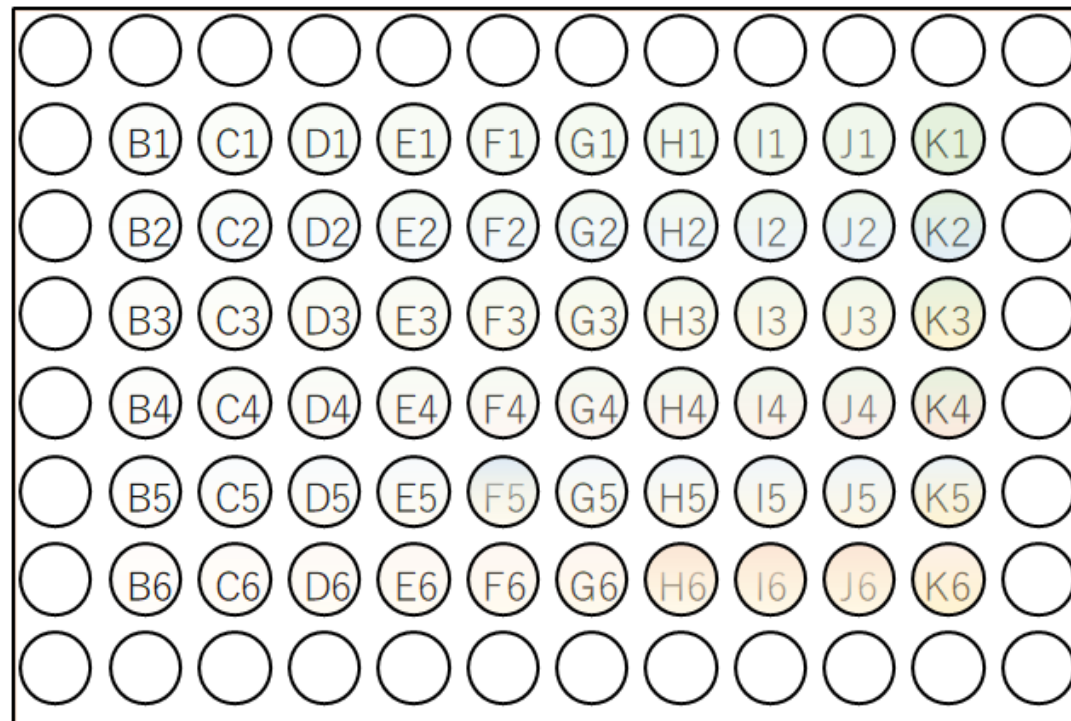
| アミノ酸 | | |
|-------|-----|----|
| | 10 | mg |
| | 20 | mg |
| | 250 | μg |
| ビタミン | | |
| | 15 | mg |
| | 5 | μg |
| 増殖因子 | | |

Confidential



培地ライブラリプレート・96 well

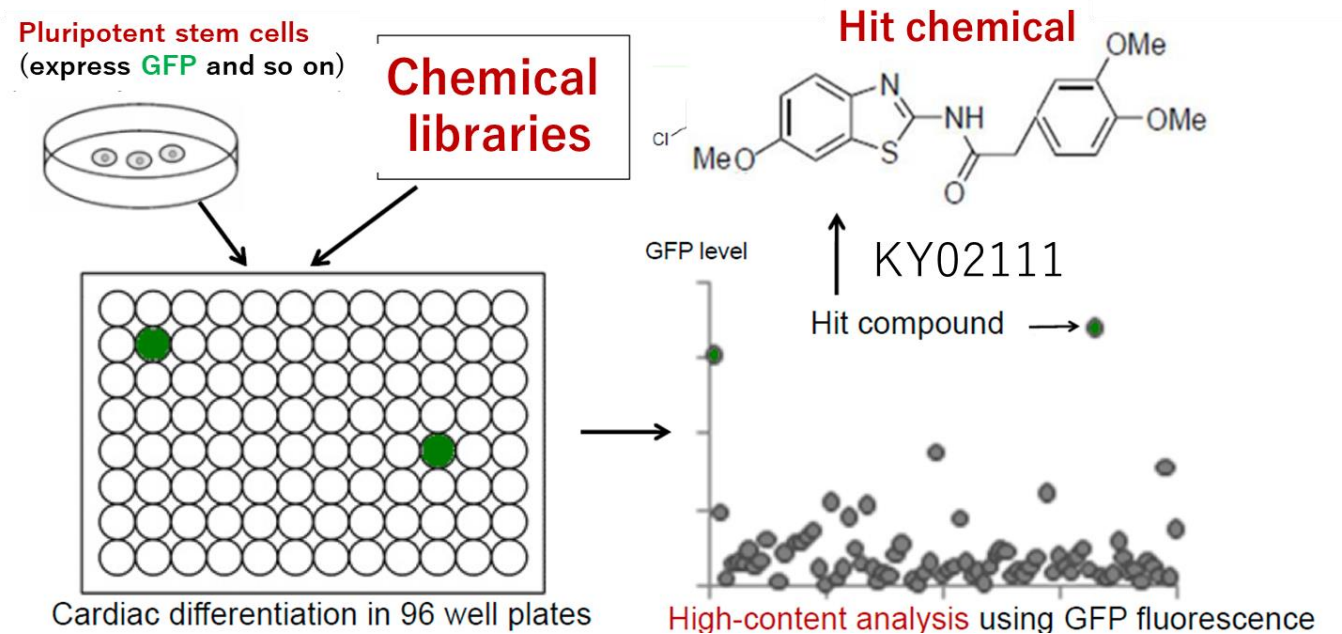
- ✓ 1枚当たり60パターン of 培地組合せ
- ✓ 枚数を増やして数百～数千パターンも可能



合成培地によるiPS-心筋細胞分化の制御

■プロテインフリー分化誘導法

スクリーニング化合物 (KY03-I) を用いることで、血清・動物由来のタンパク質・サイトカインが不要

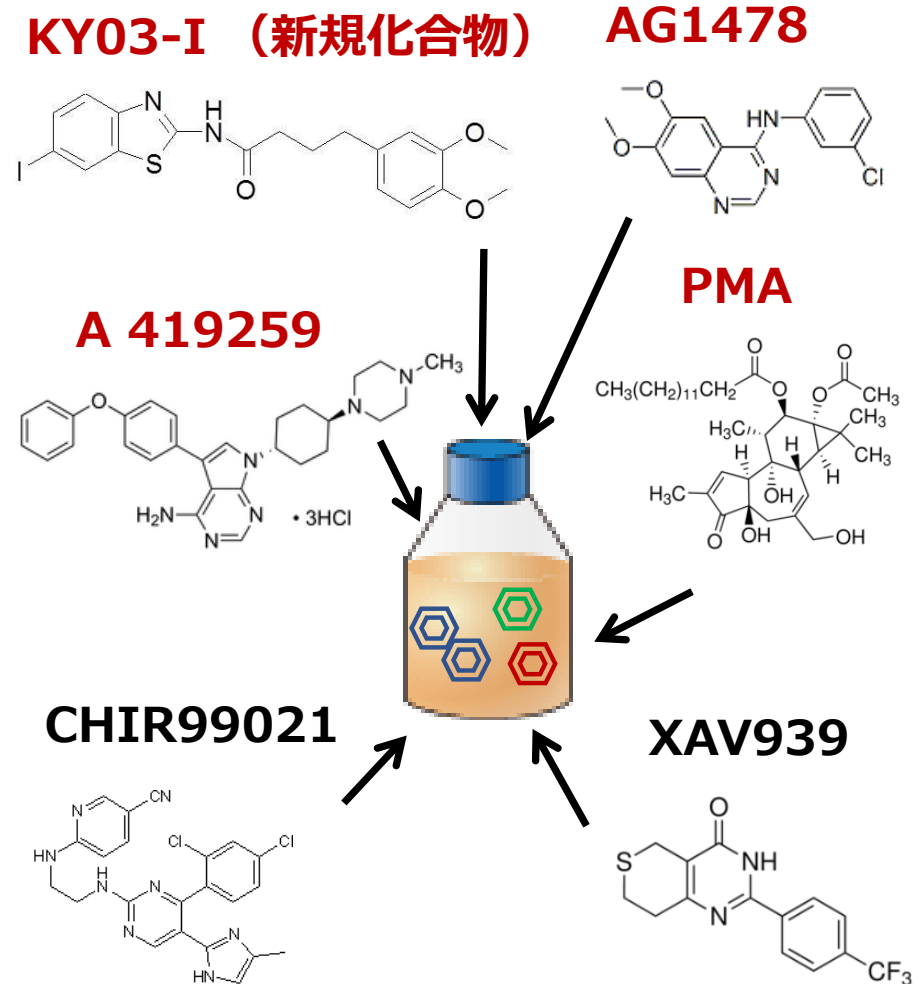
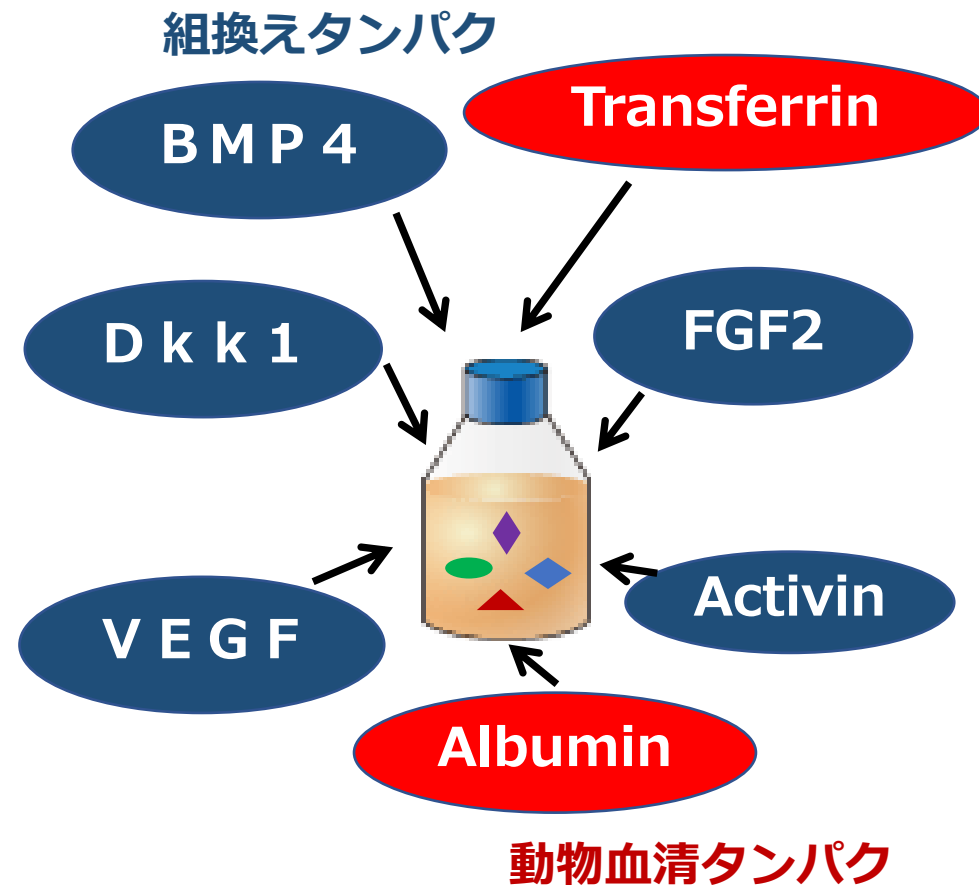


**世界初：低分子化合物とアミノ酸のみ
(完全プロテインフリー) の培地**

- 動物由来物による感染リスクを回避可能
- 従来法と比較して安価で効率よく心筋細胞を分化誘導

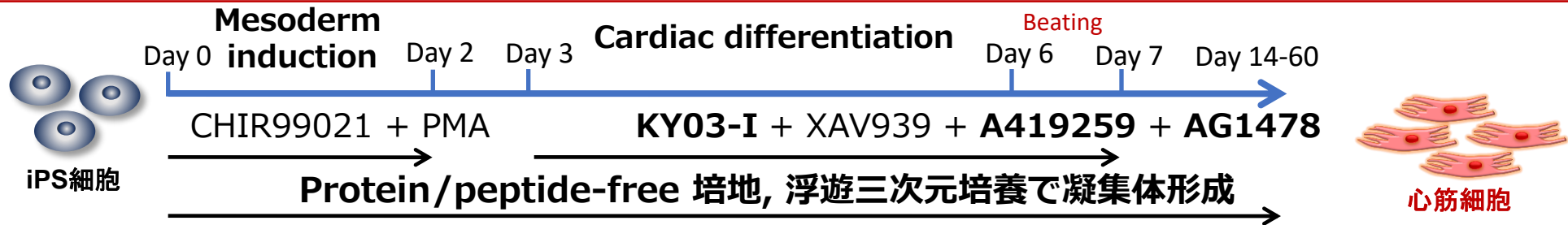
新規化合物で培養タンパク質を置換

培養液に含まれるタンパク質 → すべて低分子化合物に



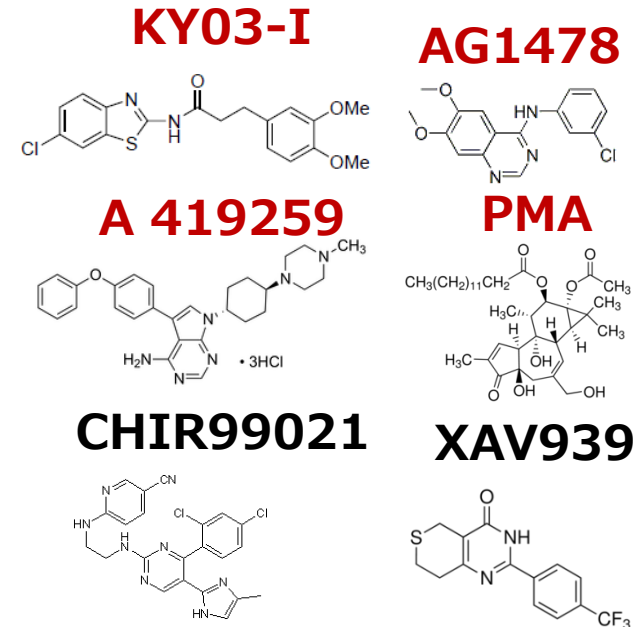
低分子化合物とアミノ酸のみで細胞分化 (世界初の細胞培養技術)

新規化合物を用いたiPS-心筋細胞誘導法



低分子化合物とアミノ酸のみで心筋誘導 完全プロテインフリー

| サイトカイン培地 | 10L 価格 | プロテインフリー培地 | 10L 価格 |
|-------------------------|-------------------|-------------------------|----------------|
| StemPro34 medium* | 500,000 | Basal mediumA | 8,400 |
| Penicillin-Streptomycin | 4,000 | Basal medium B | 6,200 |
| L-glutamine | 1,880 | 6 supplements | 9,320 |
| Ascorbic acid | 200 | PMA | 1,500 |
| BMP4 | 600,000 | CHIR99021 | 30,000 |
| FGF2 | 300,000 | KY03-I | 20,000 |
| Activin | 200,000 | XAV939 | 10,000 |
| Dkk1 | 9,000,000 | AG1478 | 20,000 |
| vEGF | 600,000 | A419259 | 10,000 |
| Total cost (yen) | 11,206,080 | Total cost (Yen) | 115,420 |

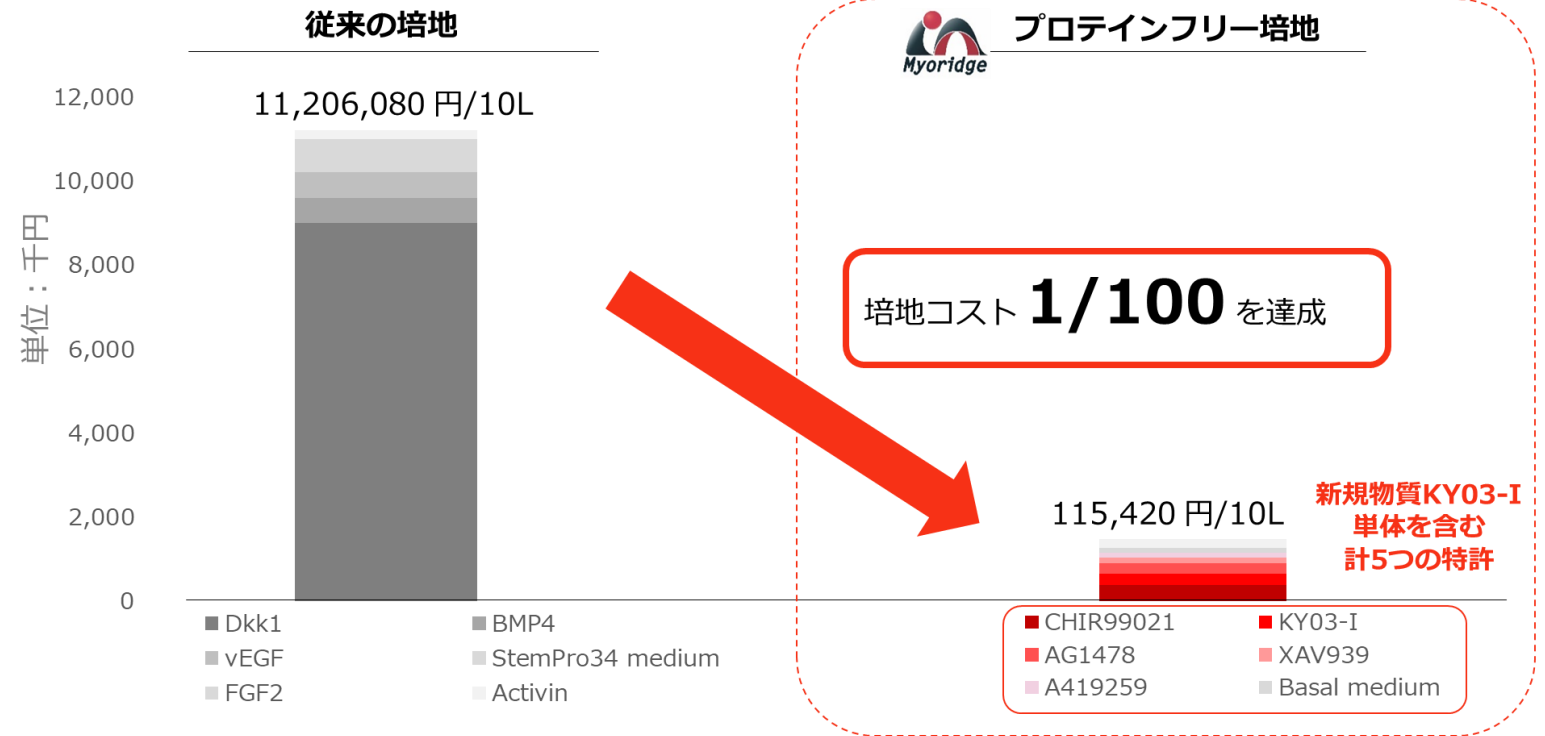


- ・ 低コスト培地 (1/100の材料費)

・ 感染リスクが少ない (Xeno-free)
- ・ 高純度心筋 (ガン化リスク低)

・ 安定に心筋誘導

心筋プロテインフリー培地によるコスト低減



心筋シートの拍動 (約5cm)

iPS-心筋細胞用プロテインフリー合成培地 全組成



| | |
|--|------|
| L-Ascorbic acid | mg/L |
| Calcium Chloride CaCl2 | mg/L |
| Calcium Chloride Dihydrate CaCl2 · 2H2O | mg/L |
| Choline Chloride | mg/L |
| Creatine | mg/L |
| Copper(II) sulfate pentahydrate CuSO4 · 5H2O | mg/L |
| D-Biotin | mg/L |
| D-Glucose | mg/L |
| D-Pantothenic Acid · 1/2Ca | mg/L |
| Ferrous sulfate heptahydrate FeSO4 · 7H2O | mg/L |
| Ferric nitrate nonahydrate Fe(NO3)3 · 9H2O | mg/L |
| Folic Acid | mg/L |
| Glycine | mg/L |
| HEPES | mg/L |
| Hypoxanthine | mg/L |
| L-Alanine | mg/L |
| L-Arginine hydrochloride | mg/L |
| L-Asparagine · H2O NH2COCH2CH(NH2)COOH · H2O | mg/L |
| L-Aspartic Acid | mg/L |
| L-Carnitine hydrochloride | mg/L |
| L-Cysteine hydrochloride monohydrate | mg/L |
| L-Cystine dihydrochloride | mg/L |
| L-Glutamic Acid | mg/L |
| L-Glutamine | mg/L |
| L-Histidine hydrochloride monohydrate | mg/L |
| Linoleic Acid | mg/L |
| L-Isoleucine | mg/L |
| L-Leucine | mg/L |
| L-Lysine hydrochloride | mg/L |
| L-Methionine | mg/L |
| L-Phenylalanine | mg/L |
| L-Proline | mg/L |
| L-Serine | mg/L |
| L-Threonine | mg/L |
| L-Tryptophan | mg/L |
| L-TYROSINE DISODIUM SALT | mg/L |
| L-Valine | mg/L |
| Magnesium chloride hexahydrate | mg/L |
| Magnesium sulfate MgSO4 | mg/L |
| myo-Inositol | mg/L |
| Niacinamide | mg/L |

| | |
|-------------------------------------|------|
| Phenol Red sodium salt | mg/L |
| Potassium Chloride | mg/L |
| potassium nitrate | mg/L |
| Putrescine dihydrochloride | mg/L |
| Pyridoxal hydrochloride | mg/L |
| Pyridoxine hydrochloride | mg/L |
| Sodium pyruvate | mg/L |
| Riboflavin | mg/L |
| Sodium Bicarbonate | mg/L |
| Sodium Chloride | mg/L |
| Sodium Phosphate Dibasic Na2HPO4 | mg/L |
| Sodium dihydrogen phosphate NaH2PO4 | mg/L |
| Sodium selenite | mg/L |
| Thiamine hydrochloride | mg/L |
| Thioctic Acid | mg/L |
| Thymidine | mg/L |
| Vitamin B12 | mg/L |
| Zinc sulfate heptahydrate | mg/L |
| CHIR99021 | μ M |
| PMA | μ M |
| KY03-I | μ M |
| XAV939 | μ M |
| AG1478 | μ M |
| A-419259 | μ M |

全65種類の組成で構成される。

無機塩ミネラル類：ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、カリウムなど

アミノ酸類：必須アミノ酸、非必須アミノ酸など

ビタミン類：ビタミンCなど

低分子化合物類：細胞の増殖、生存、分化に働く生理活性分子

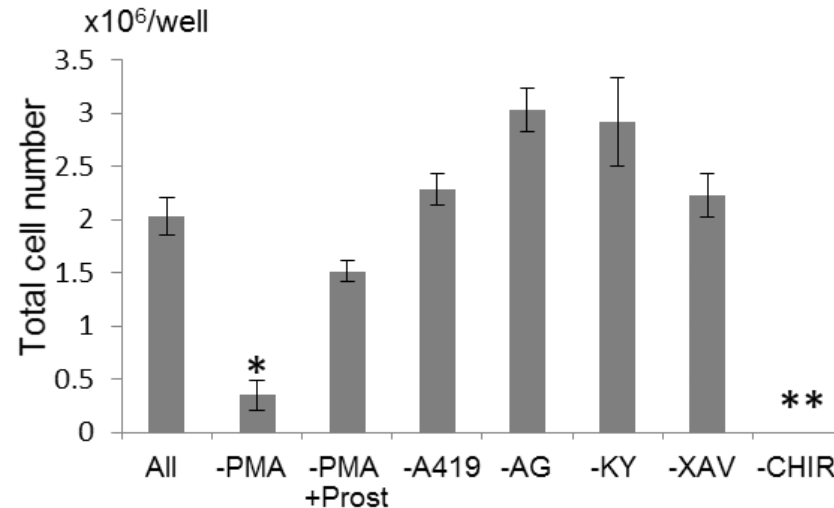
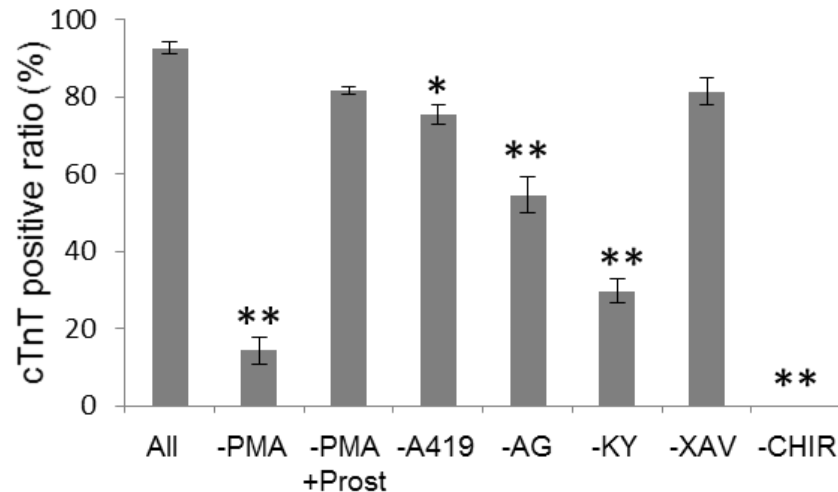
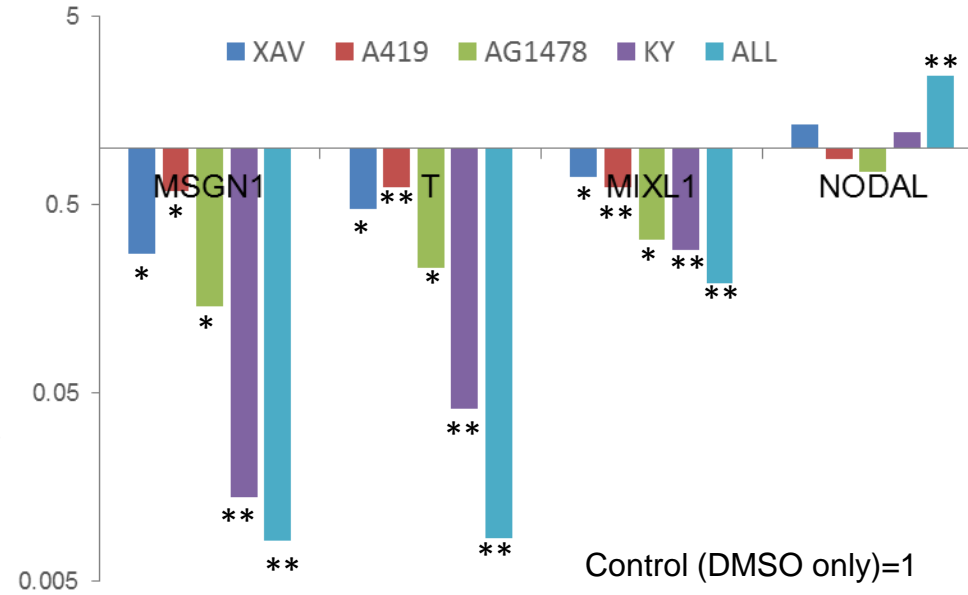
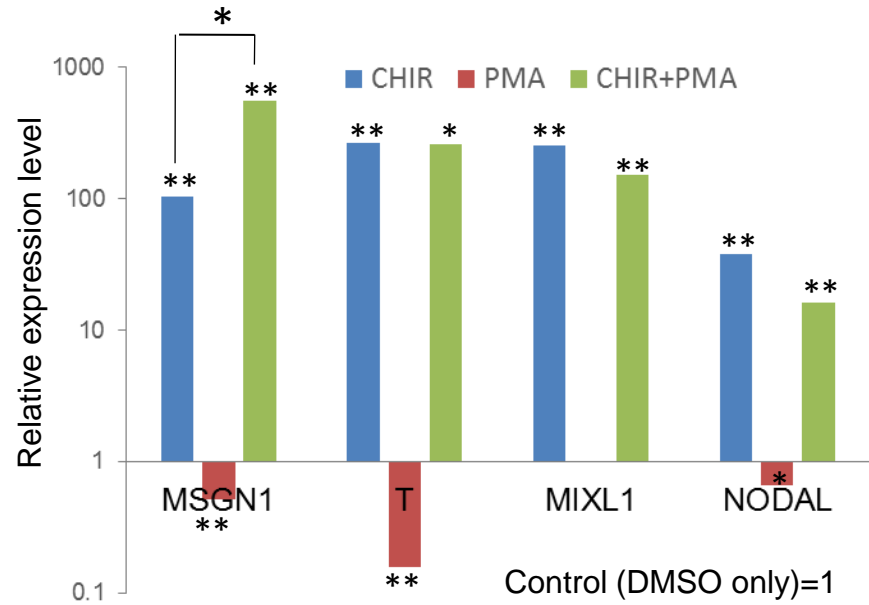
その他：糖、脂質、pH緩衝/指示剤など

Confidential

低分子がiPS細胞中胚葉遺伝子発現と細胞増殖を制御

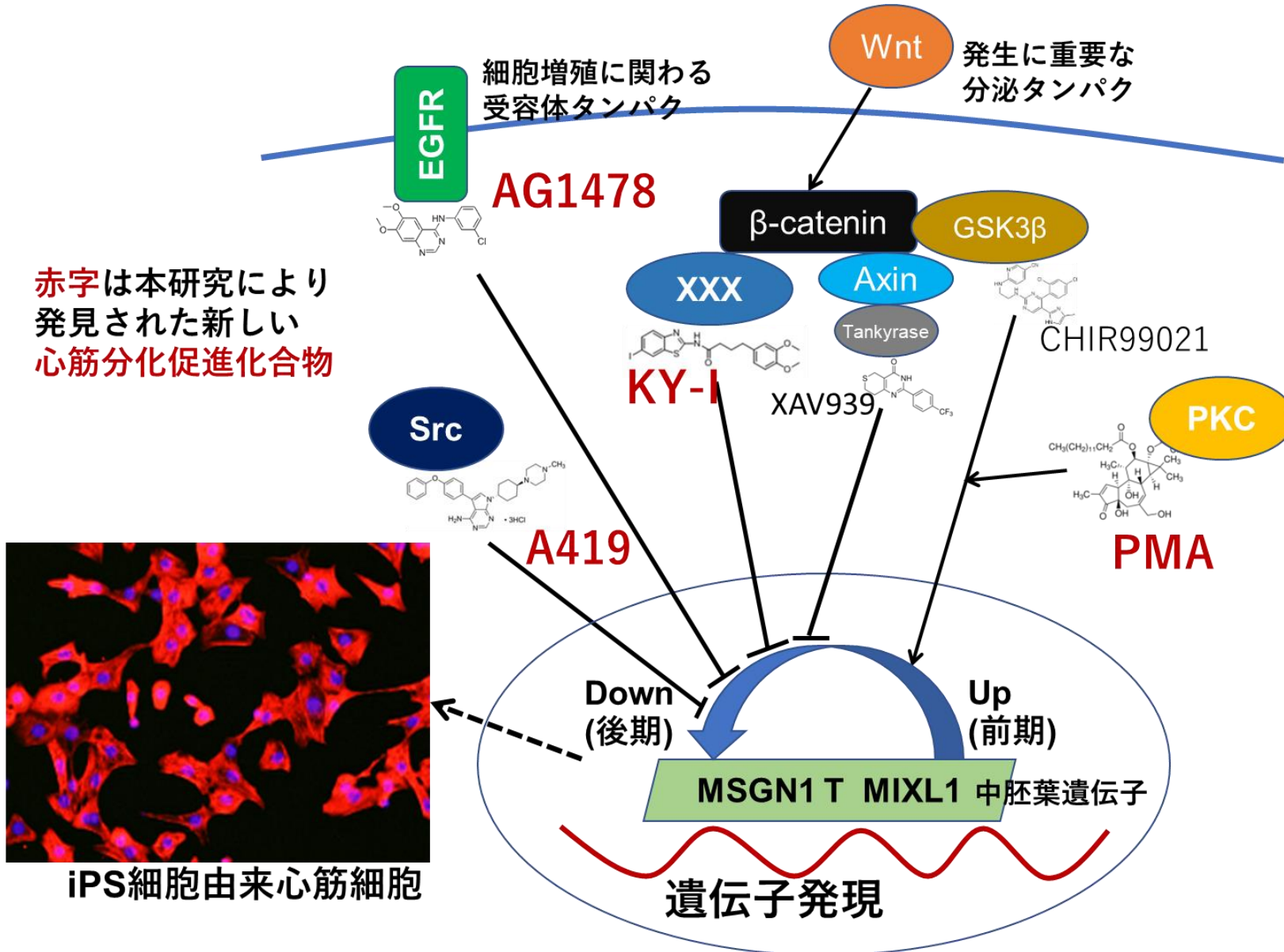


CHIR and PMA treatment (d0-2) KY03-I, XAV, A419 and AG1478 treatment (d3-4)



Confidential

低分子類の合成培地で心筋細胞分化を制御する



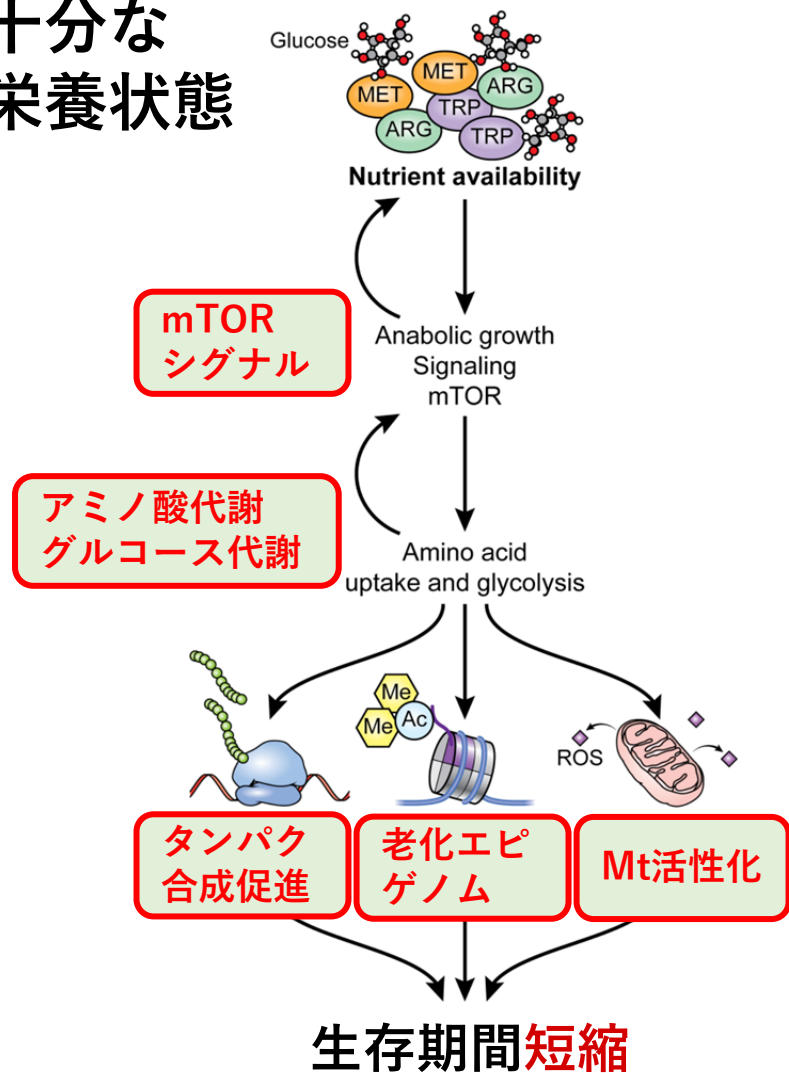
細胞に適したアミノ酸、ミネラル、ビタミン、糖などが細胞状態を適切に維持する

| | |
|--|------|
| L-Ascorbic acid | mg/L |
| Calcium Chloride CaCl2 | mg/L |
| Calcium Chloride Dihydrate CaCl2 · 2H2O | mg/L |
| Choline Chloride | mg/L |
| Creatine | mg/L |
| Copper(II) sulfate pentahydrate CuSO4 · 5H2O | mg/L |
| D-Biotin | mg/L |
| D-Glucose | mg/L |
| D-Pantothenic Acid · 1/2Ca | mg/L |
| Ferrous sulfate heptahydrate FeSO4 · 7H2O | mg/L |
| Ferric nitrate nonahydrate Fe(NO3)3 · 9H2O | mg/L |
| Folic Acid | mg/L |
| Glycine | mg/L |
| HEPES | mg/L |
| Hypoxanthine | mg/L |
| L-Alanine | mg/L |
| L-Arginine hydrochloride | mg/L |
| L-Asparagine · H2O NH2COCH2CH(NH2)COOH · H2O | mg/L |
| L-Aspartic Acid | mg/L |
| L-Carnitine hydrochloride | mg/L |
| L-Cysteine hydrochloride monohydrate | mg/L |
| L-Cystine dihydrochloride | mg/L |
| L-Glutamic Acid | mg/L |
| L-Glutamine | mg/L |
| L-Histidine hydrochloride monohydrate | mg/L |
| Linoleic Acid | mg/L |
| L-Isoleucine | mg/L |
| L-Leucine | mg/L |
| L-Lysine hydrochloride | mg/L |
| L-Methionine | mg/L |
| L-Phenylalanine | mg/L |
| L-Proline | mg/L |
| L-Serine | mg/L |
| L-Threonine | mg/L |
| L-Tryptophan | mg/L |
| L-TYROSINE DISODIUM SALT | mg/L |
| L-Valine | mg/L |
| Magnesium chloride hexahydrate | mg/L |
| Magnesium sulfate MgSO4 | mg/L |
| myo-Inositol | mg/L |
| Niacinamide | mg/L |

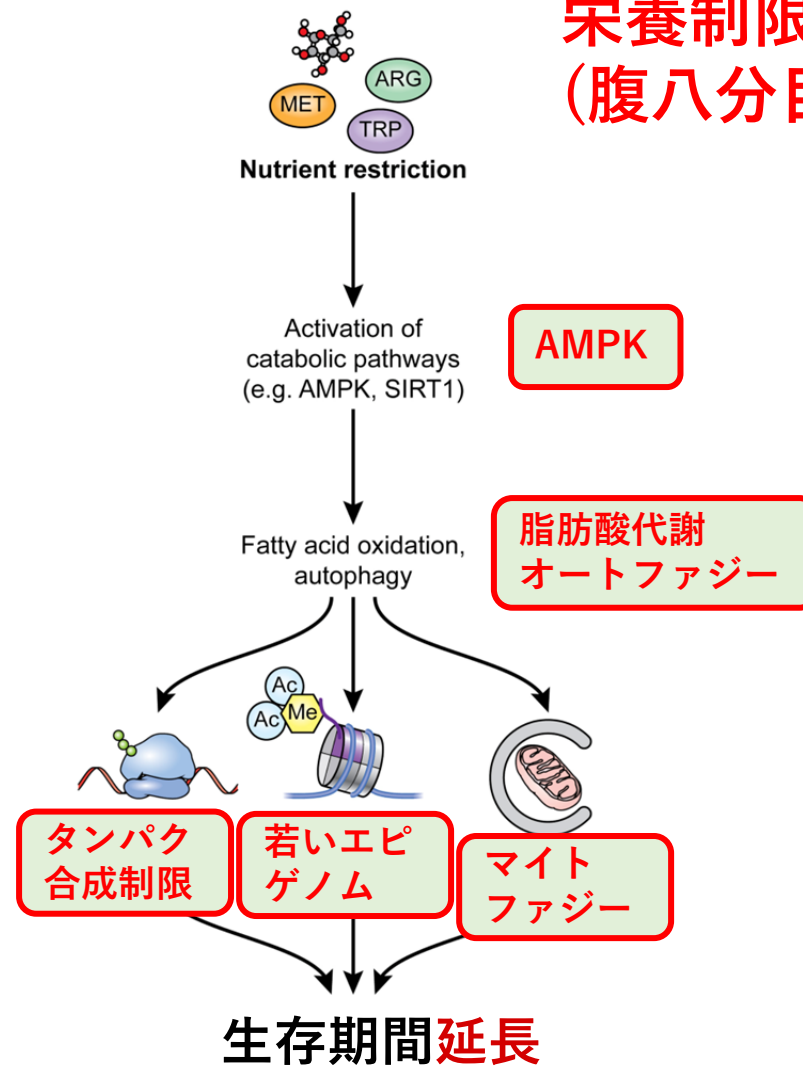
合成培地によるT細胞分化の制御

過栄養培地 (ex:血清培地) は特に生体に戻した際に生存期間が低い傾向にある。

十分な 栄養状態

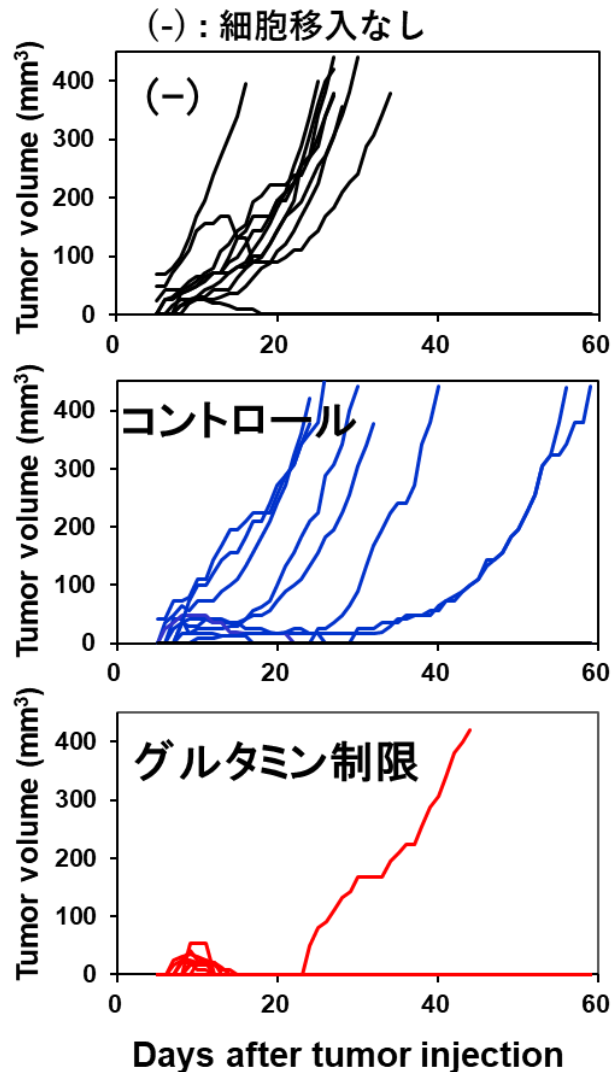


栄養制限 (腹八分目)



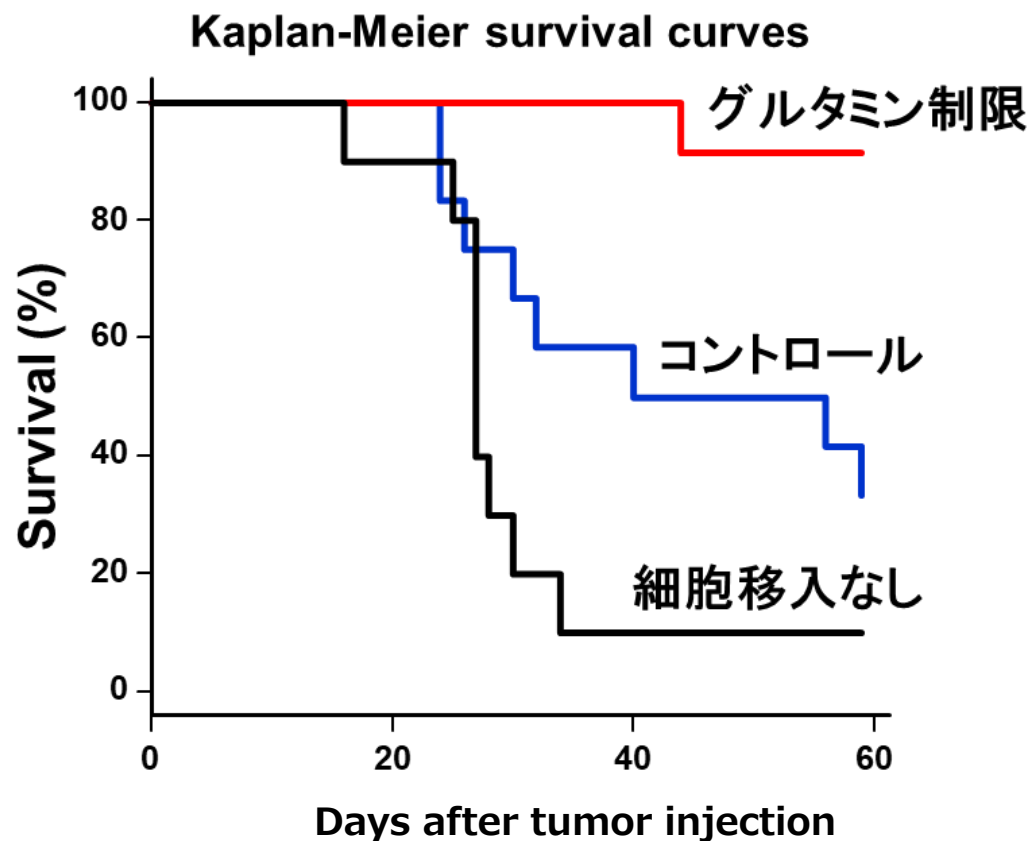
Rigel J. Kishton et al.
Cell Metabolism 2017

腫瘍体積



低グルタミン条件で培養したマウスCD8 T細胞は高い抗腫瘍活性を発揮する(愛媛大学論文データ)。

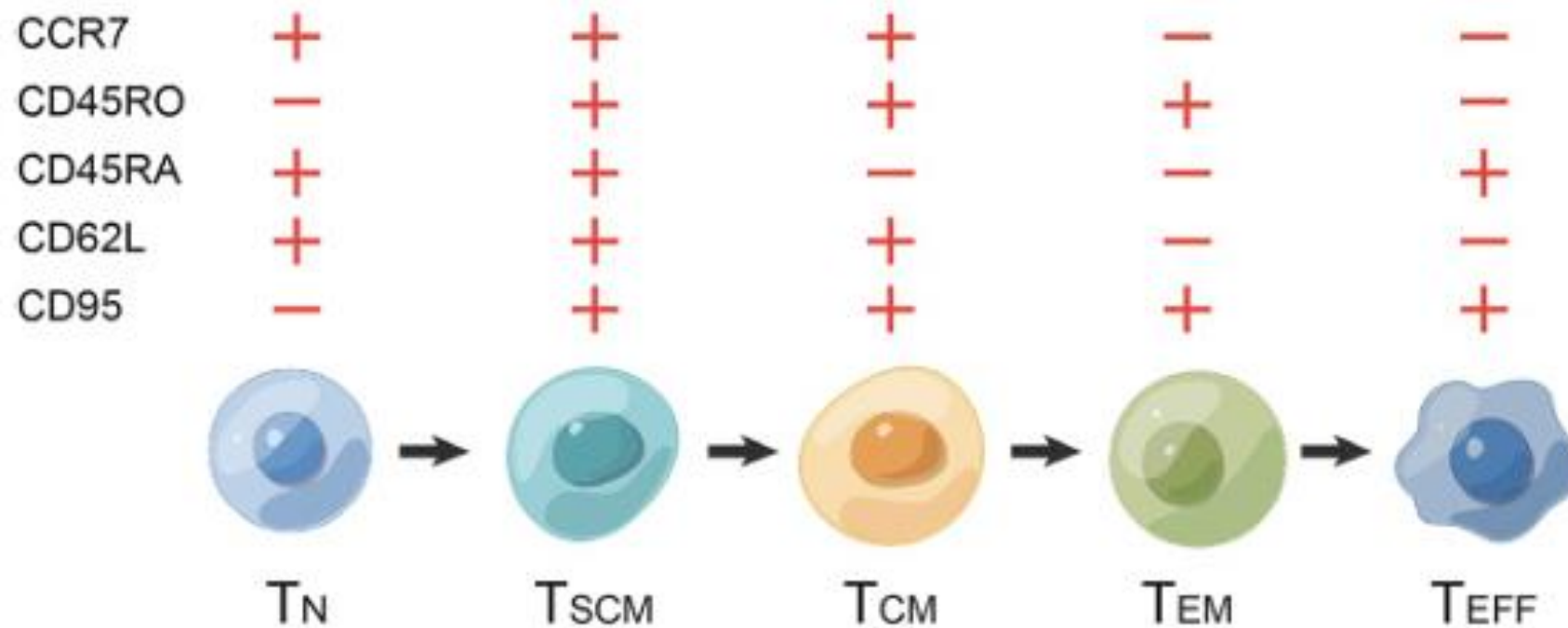
生存率



Nabe et al. *Cancer Science* (2019)

【当社のT細胞培地概要】

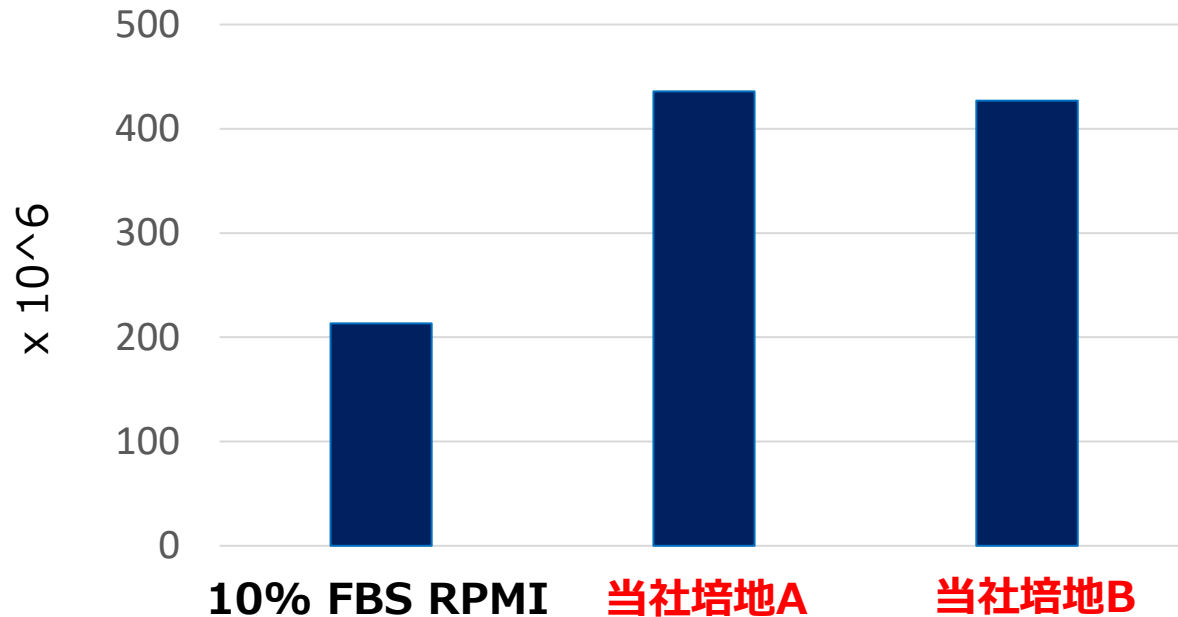
- ・ 無血清又はxeno-freeであり、培地組成の全てが把握可能
- ・ 細胞分離不要で目的のCD4/CD8比 T細胞誘導（以下スライド参照）
- ・ ユーザー要望に応じ、 $T_N \sim T_{EFF}$ 全てのフェノタイプを培地組成違いで誘導
- ・ ヒトだけではなく、マウスT細胞展開への転用改良中



実施例①：T細胞用培地（ヒトPBMCを11日間培養）

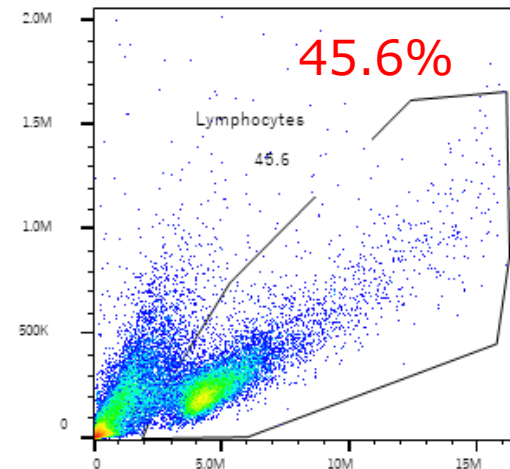
当社培地は血清培地と比較して高い増殖性・生存率を示す

播種細胞数は 1×10^6

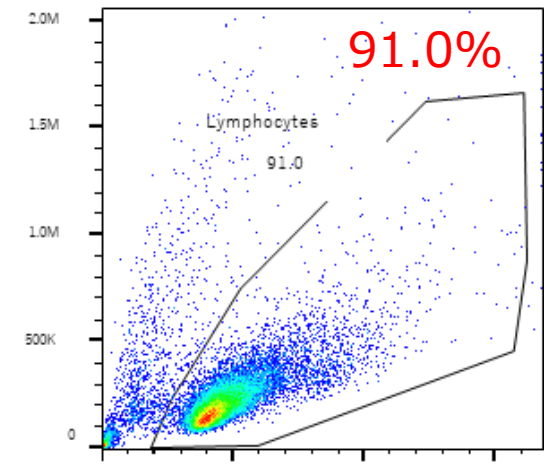


培養後のFSC/SSC解析

10% FBS RPMI



当社培地A



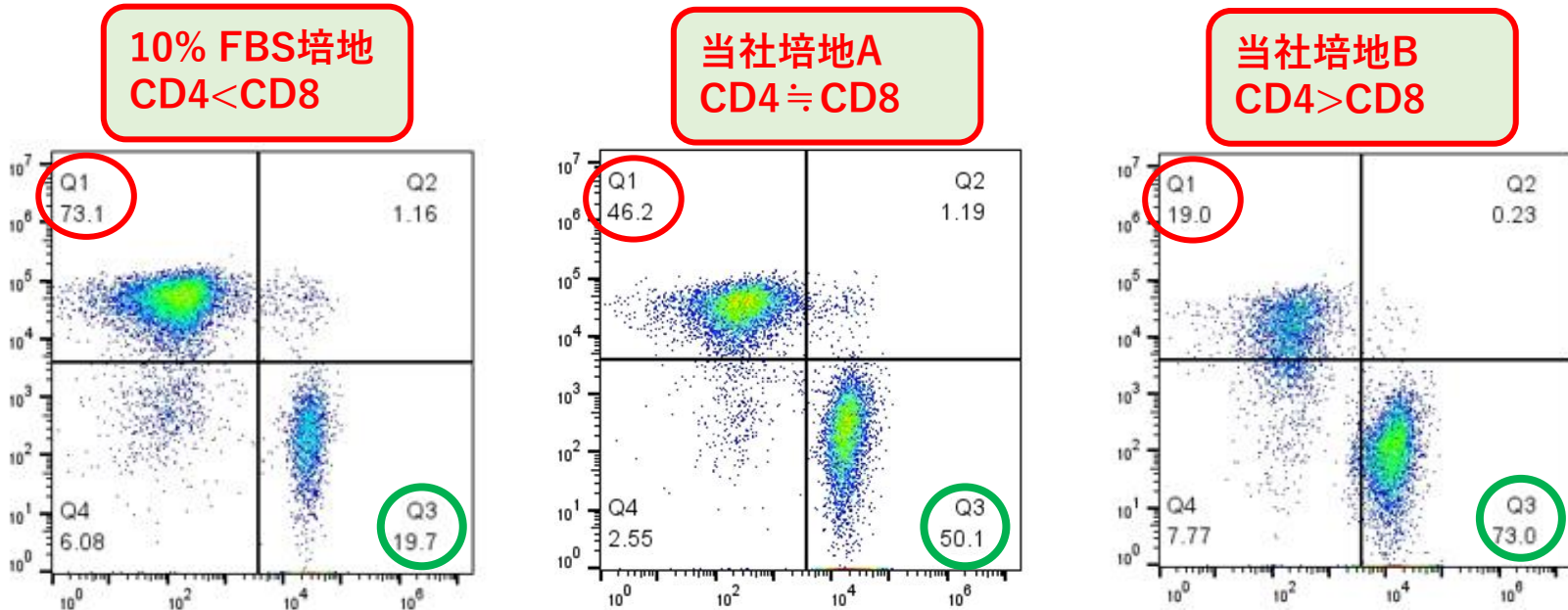
SSC
FSC

Confidential

実施例②：T細胞用培地（ヒトPBMCを11日間培養）

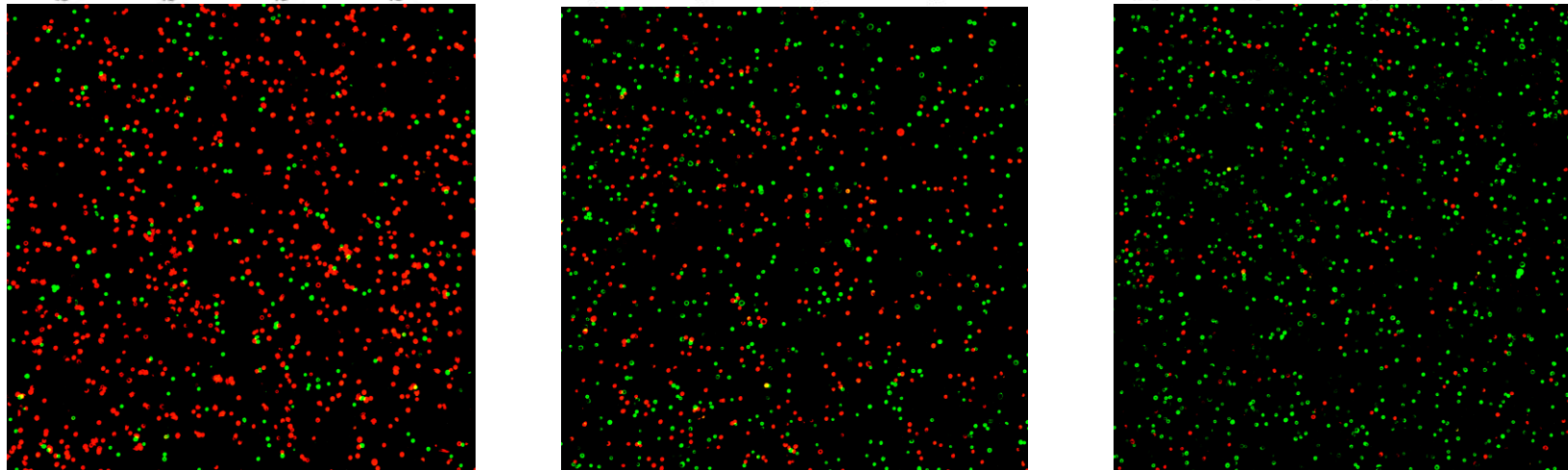
同一検体スタートでも、培地成分違いによりCD4/CD8比に変化が生じる

FCM解析



CD8 (CD3+gated)
CD4

CQ1解析



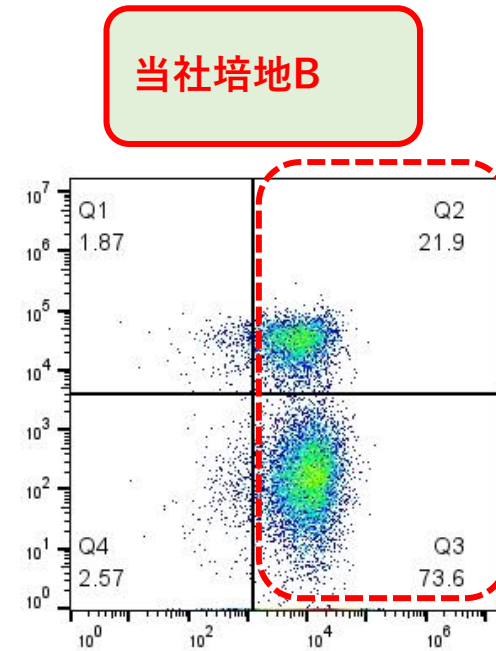
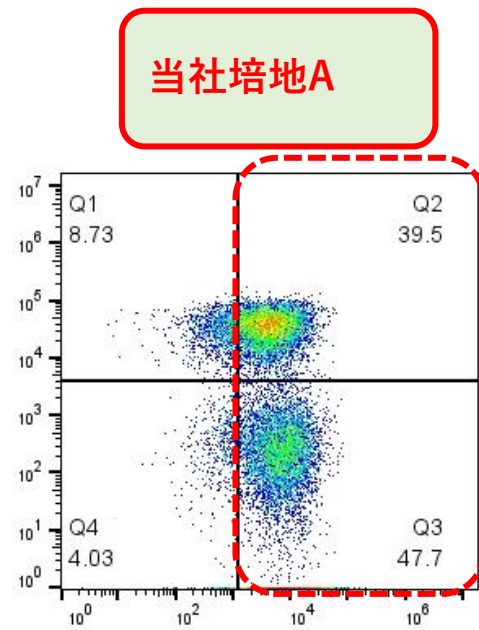
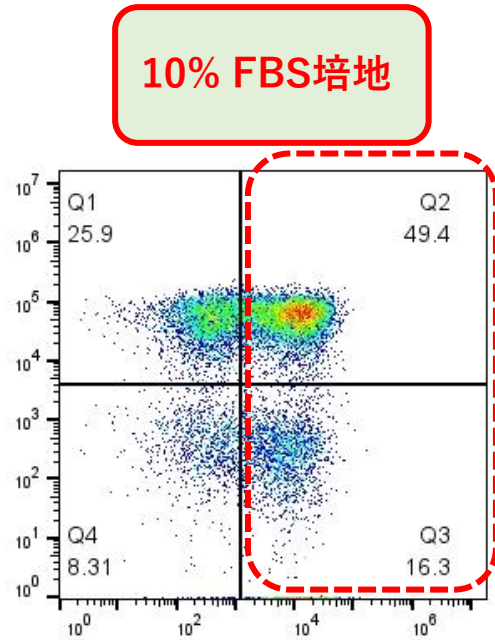
(CD3+gated)
Alexa488-CD4
PE-CD8a

Confidential

実施例③：T細胞用培地（ヒトPBMCを11日間培養）

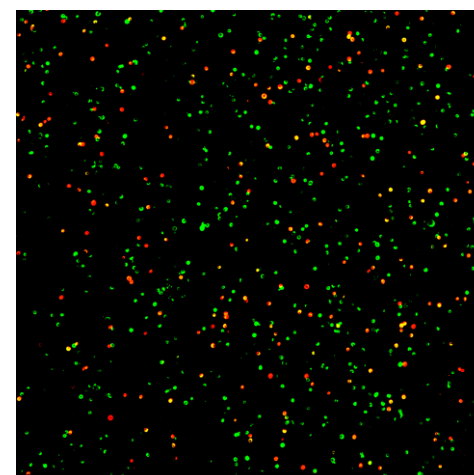
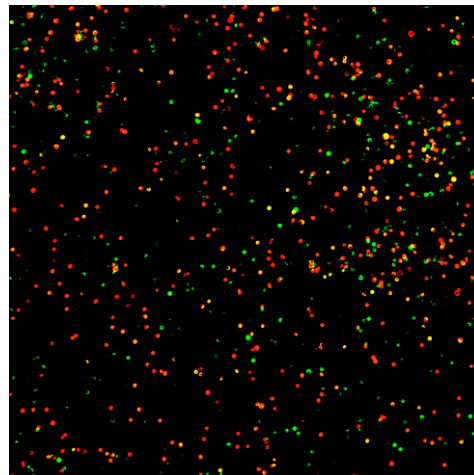
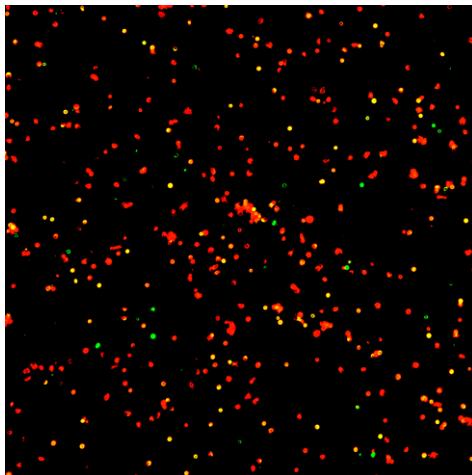
同一検体スタートでも、当社培地A,BはCD62Lの発現を高く維持する傾向がある

FCM解析



CD8 (CD3+gated)
CD62L

CQ1解析



(CD3+gated)

Alexa488-CD62L
PE-CD8a

Confidential

- ・ 当社T細胞培地は、血清培地と比較して高い増殖性と細胞生存率を示しました。
- ・ 培地組成を変化させることにより、培養後のCD4/CD8比やCD62L発現割合をコントロールすることが可能となっています。
- ・ 今後はこれらの培地制御によって得られたT細胞について、特にin vivo機能評価を計画しております。

培地製品と培地開発サービスで“細胞”製品の産業化に貢献



お問い合わせ先 : takahashi@myoridge.co.jp

