

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

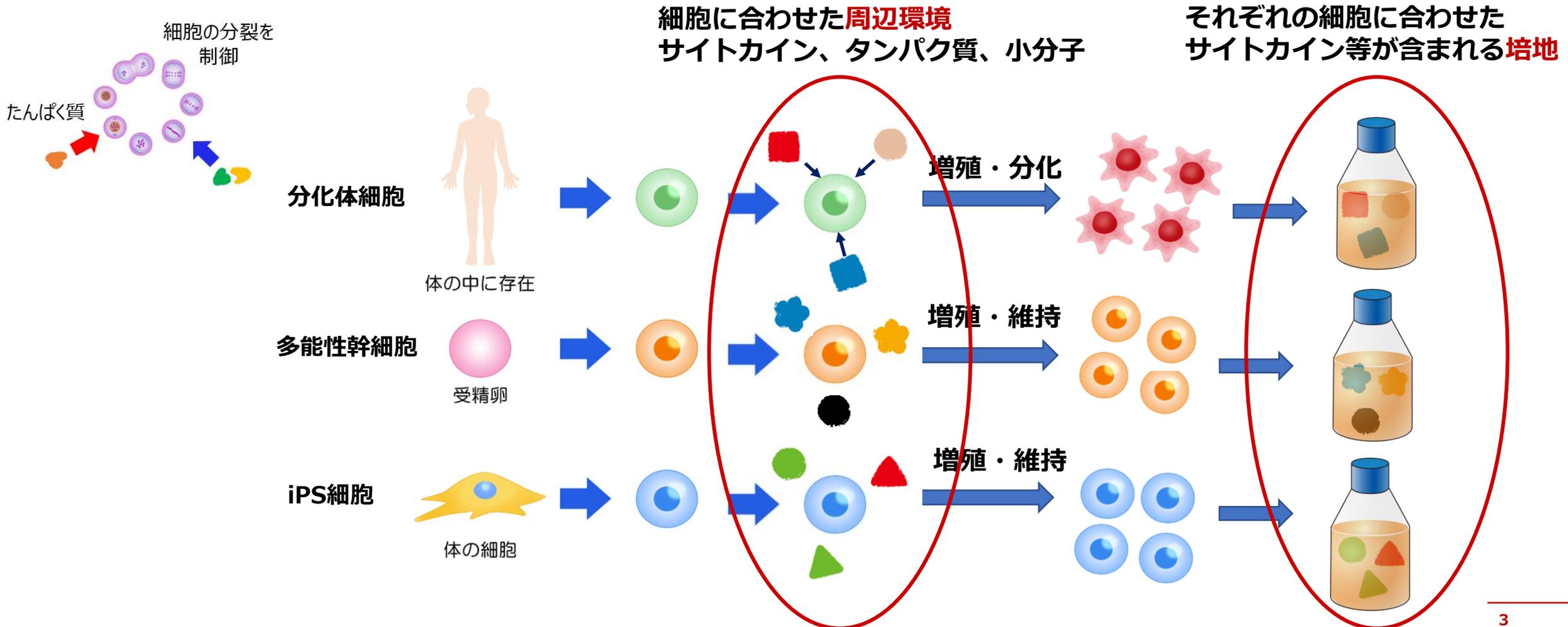


沿革	
2016年8月	京都大学発スタートアップ 株式会社マイオリッジ設立  京都大学 KYOTO UNIVERSITY
2016年9月	株式会社リバナエス主催「TECHPLANTER第3 回バイオテックグランプリ」最優秀賞受賞
2017年1月	NEDO 「研究開発型ベンチャー支援事業/ 起業家候補（スタートアップイノベ ーター）募集」に採択
2018年7月	NEDO「研究開発型ベンチャー支援事業/ シード期の研究開発型ベンチャーに対する 事業化支援」に採択
2020年12月	米Avery Therapeutics社との臨床用心筋細 胞技術ライセンスアウト契約締結
2021年11月	培地製品“Ex-All 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



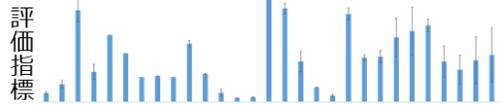
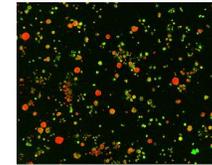
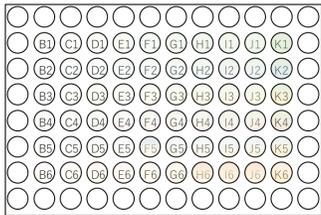
候補培地, サプリメント



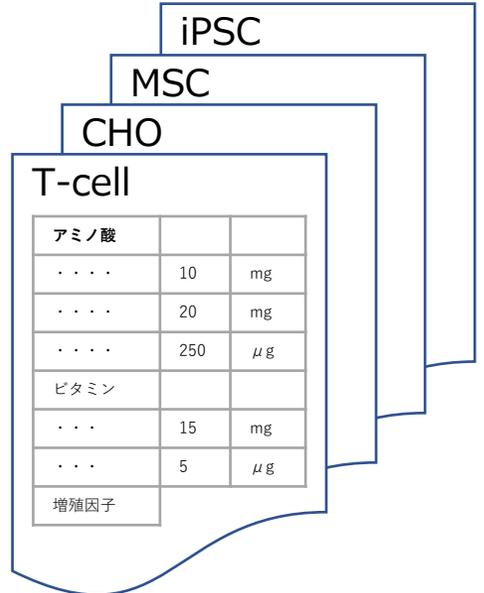
独自の培地成分データベース

- 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
・
・

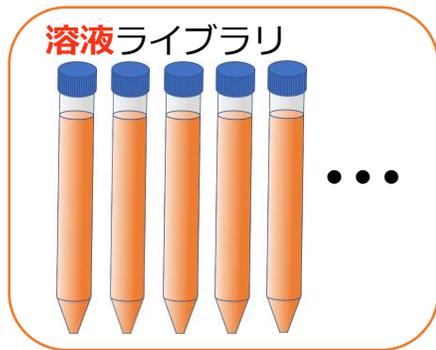
96ウェルプレートと共焦点定量イメージサイトメーターを用いたHTSシステム



候補培地

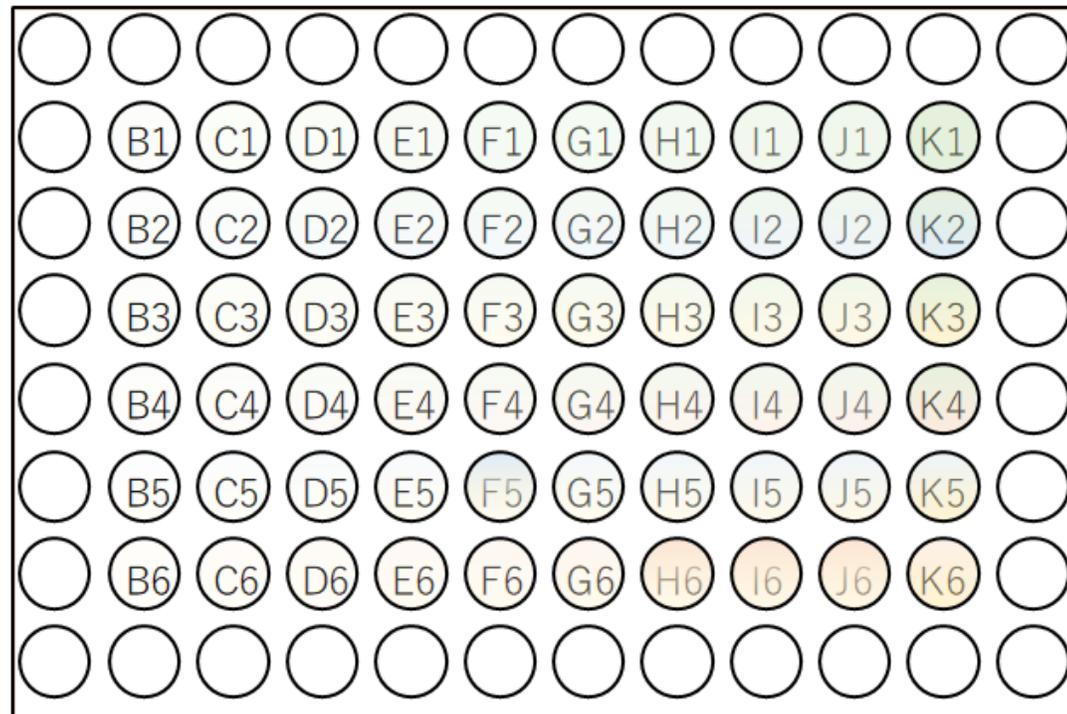


Confidential



培地ライブラリプレート・96 well

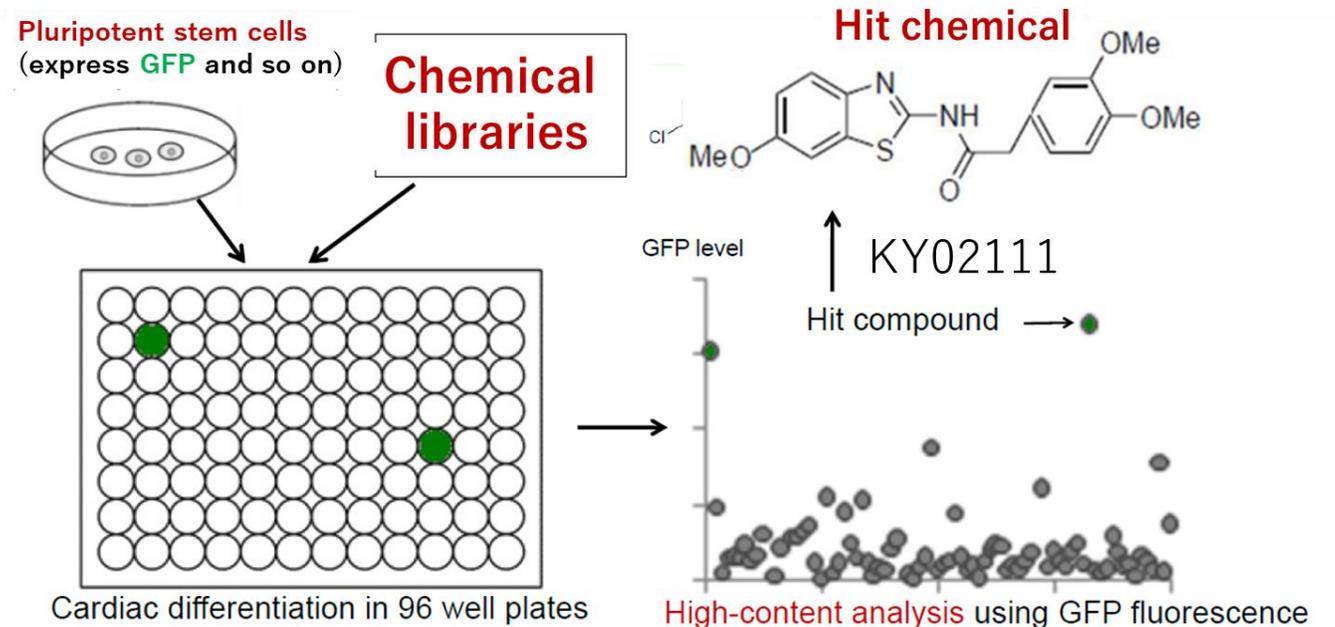
- ✓ 1枚当たり60パターン of 培地組合せ
- ✓ 枚数を増やして数百～数千パターンも可能



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

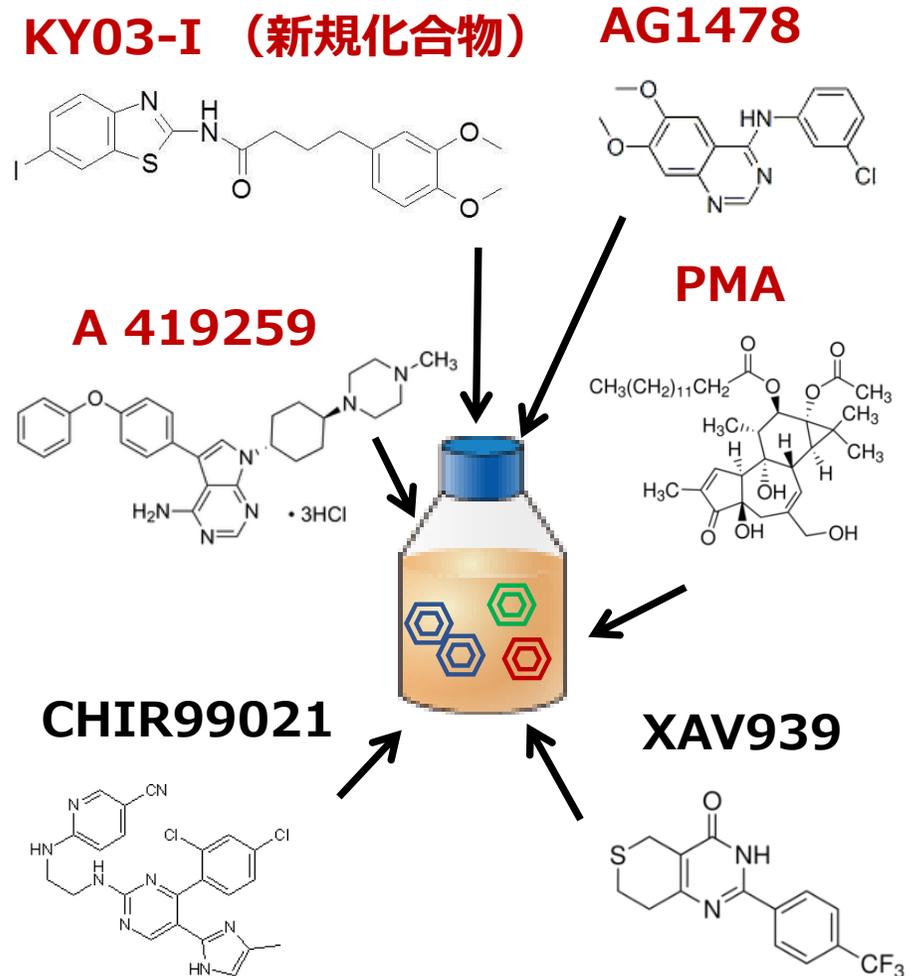
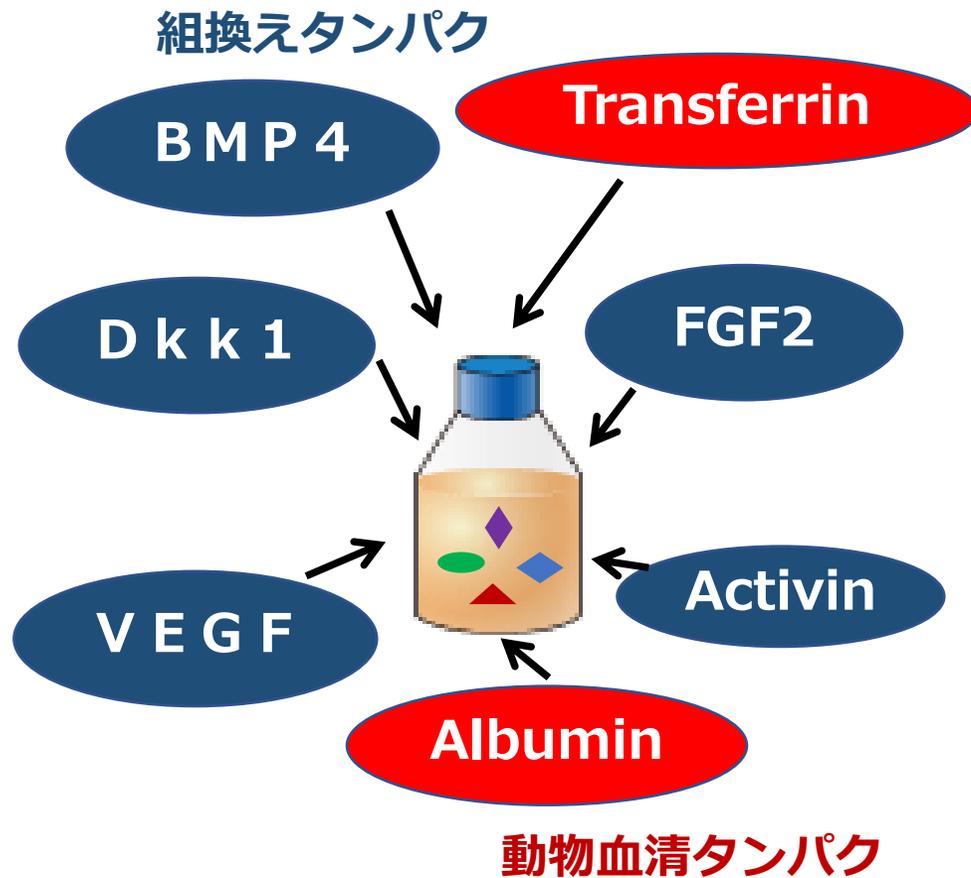


**世界初：低分子化合物とアミノ酸のみ
(完全プロテインフリー) の培地**

- 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



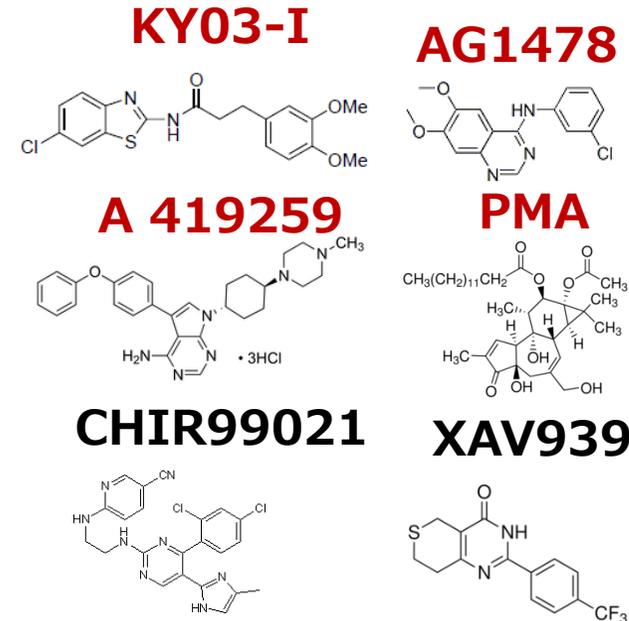
低分子化合物とアミノ酸のみで細胞分化 (世界初の細胞培養技術)

新規化合物を用いたiPS-心筋細胞誘導法



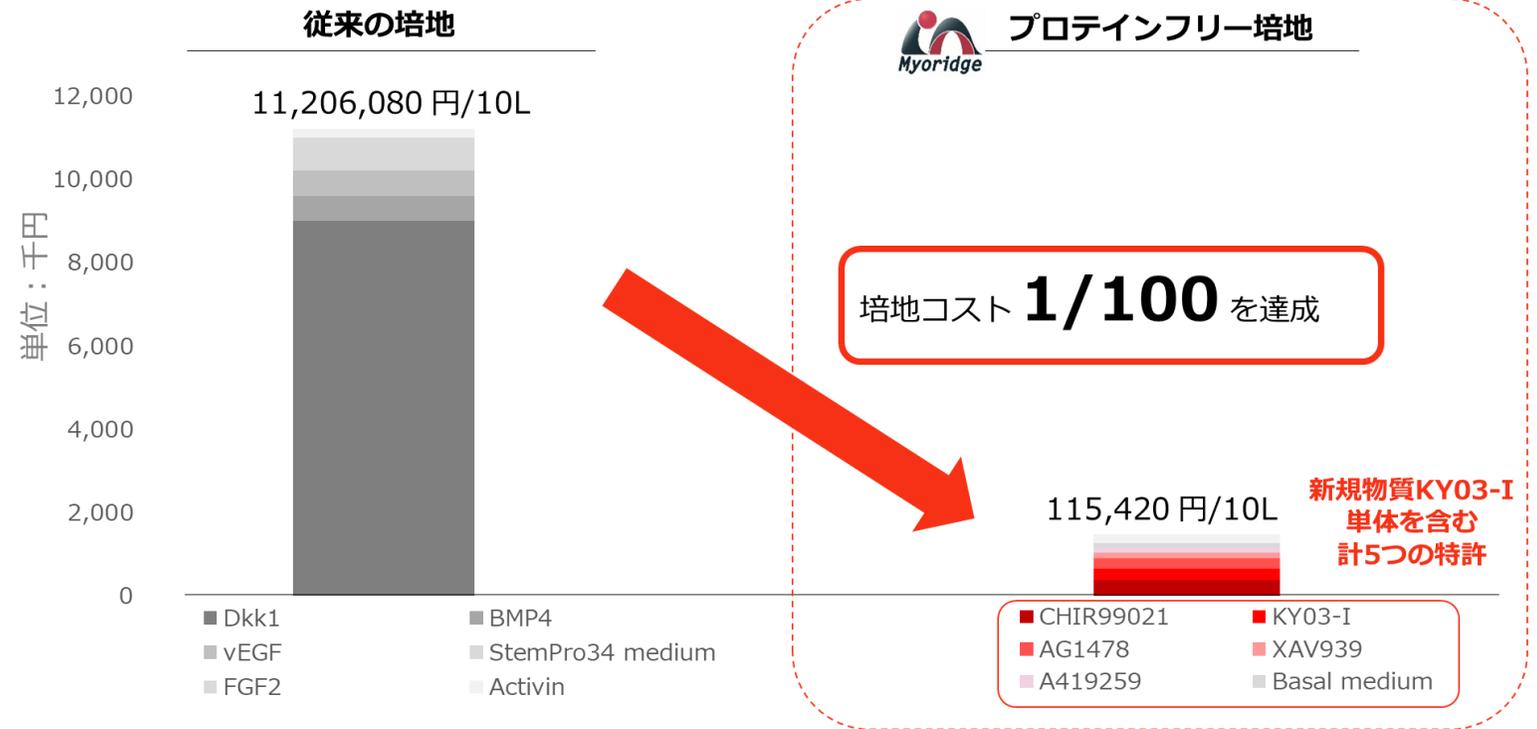
低分子化合物とアミノ酸のみで心筋誘導 完全プロテインフリー

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

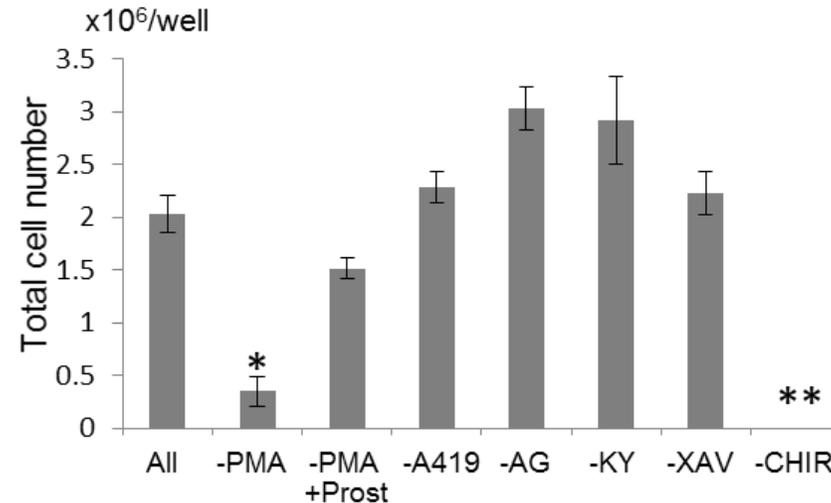
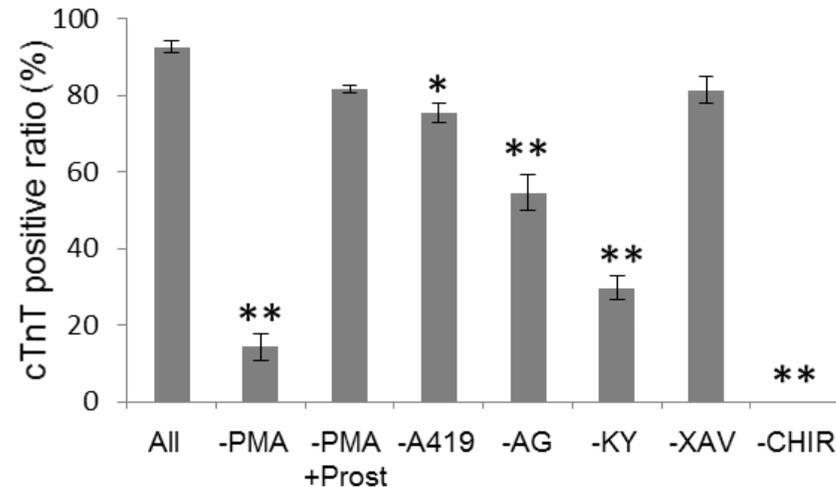
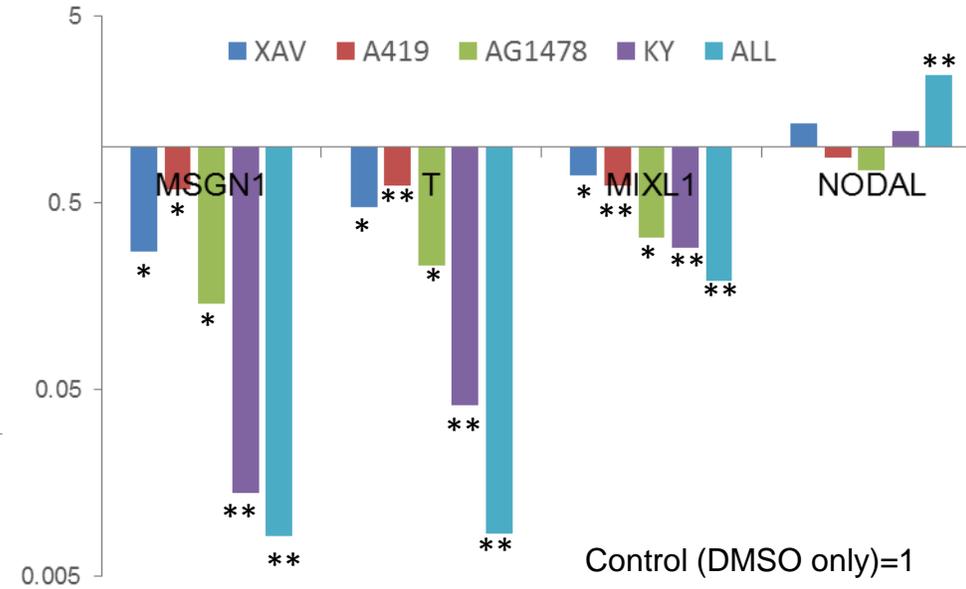
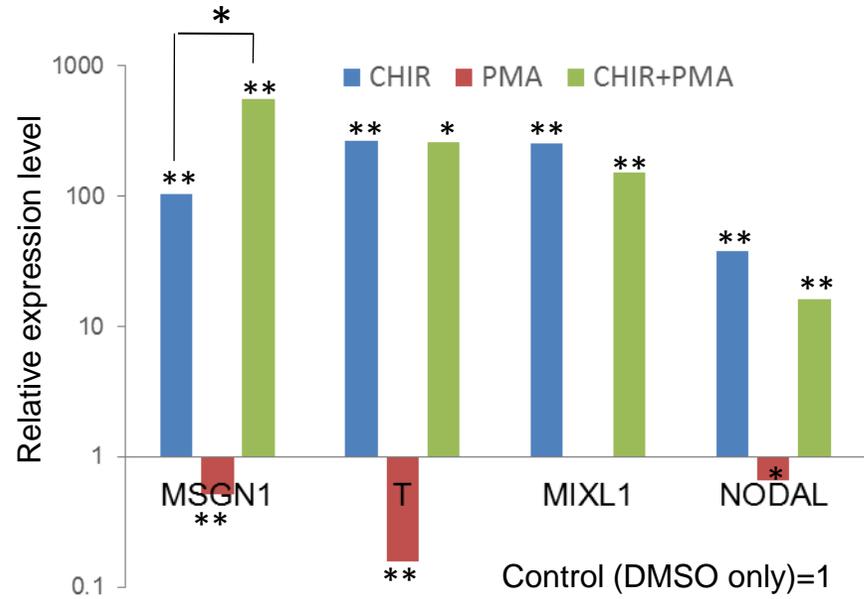
低分子化合物類：細胞の増殖、生存、分化に働く生理活性分子

その他：糖、脂質、pH緩衝/指示剤など

Confidential

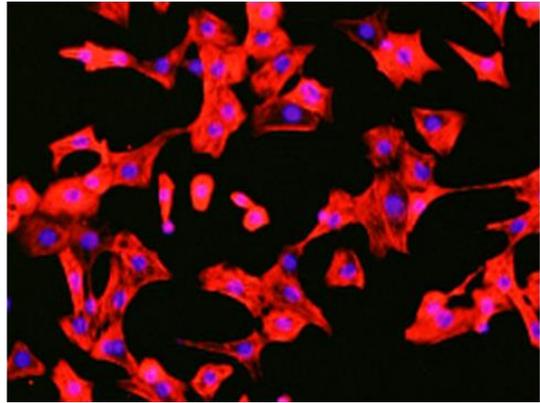
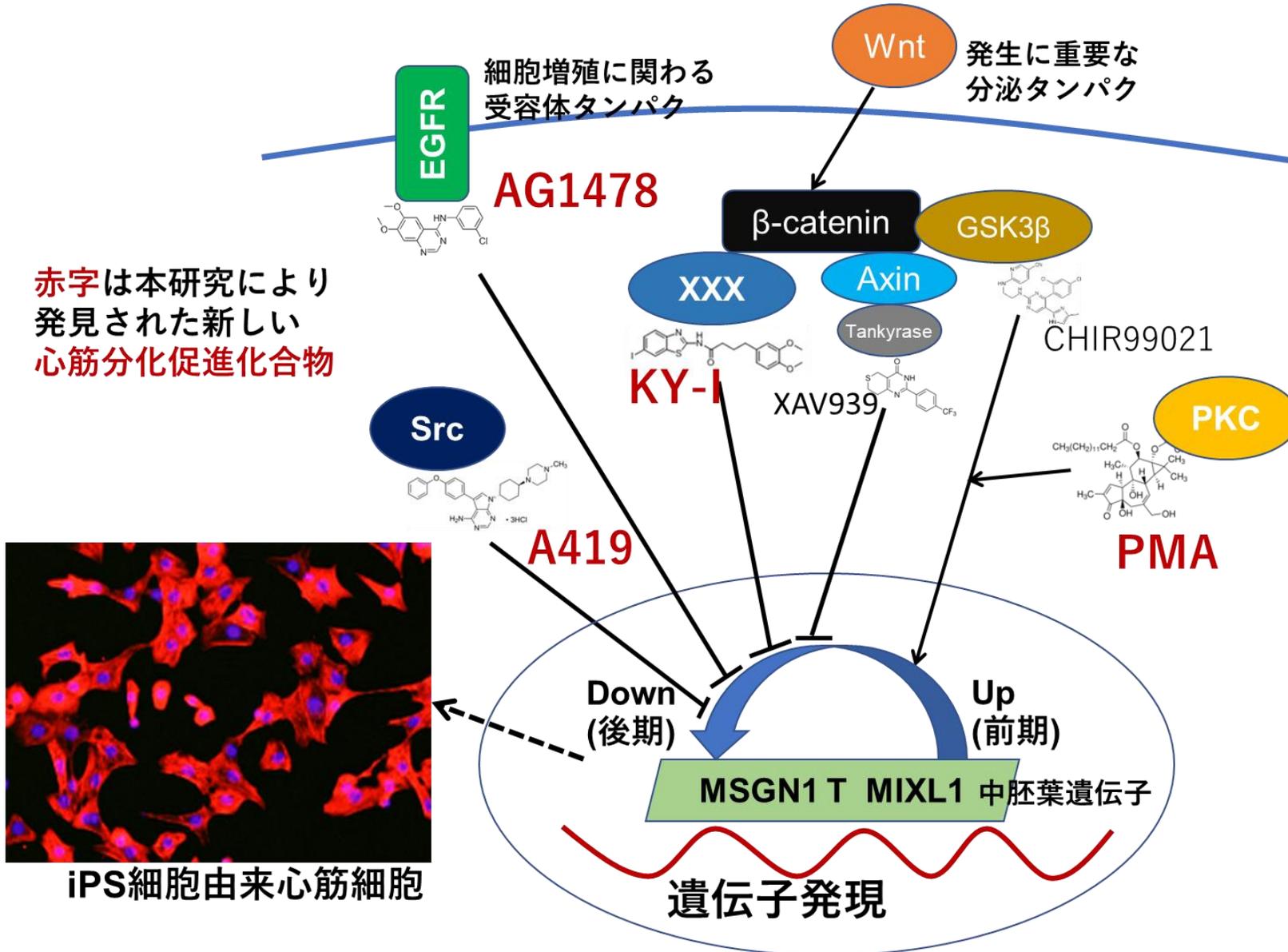
低分子がiPS細胞中胚葉遺伝子発現と細胞増殖を制御

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



iPS細胞由来心筋細胞

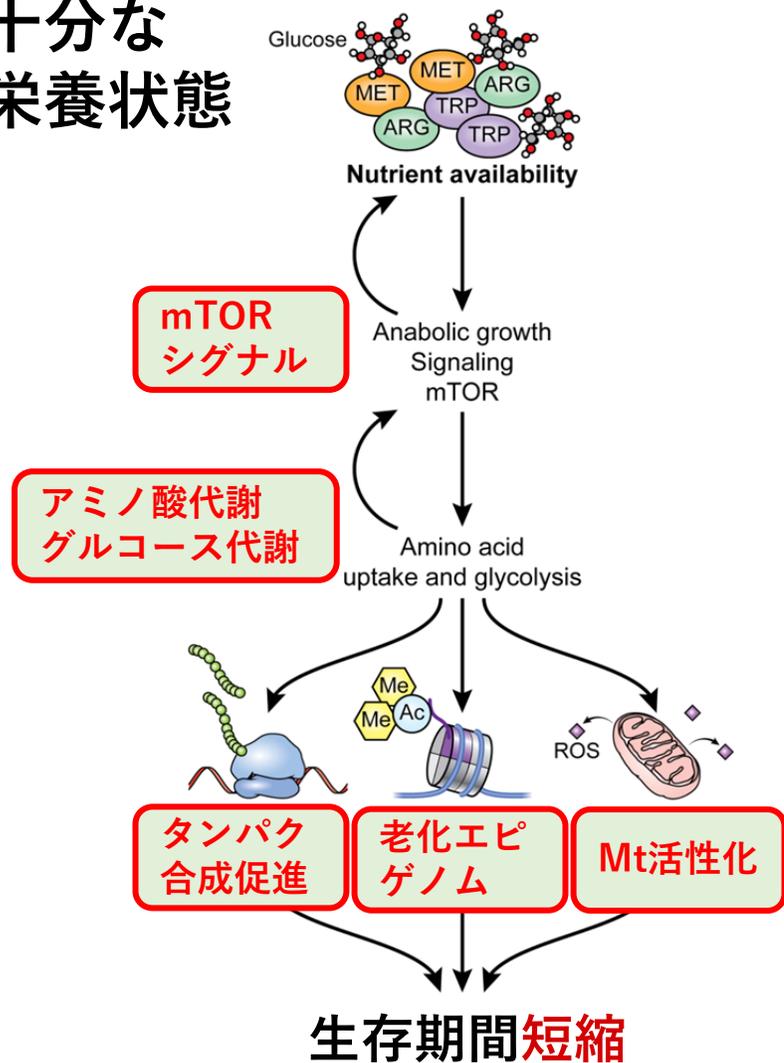
細胞に適したアミノ酸、ミネラル、ビタミン、糖などが細胞状態を適切に維持する

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

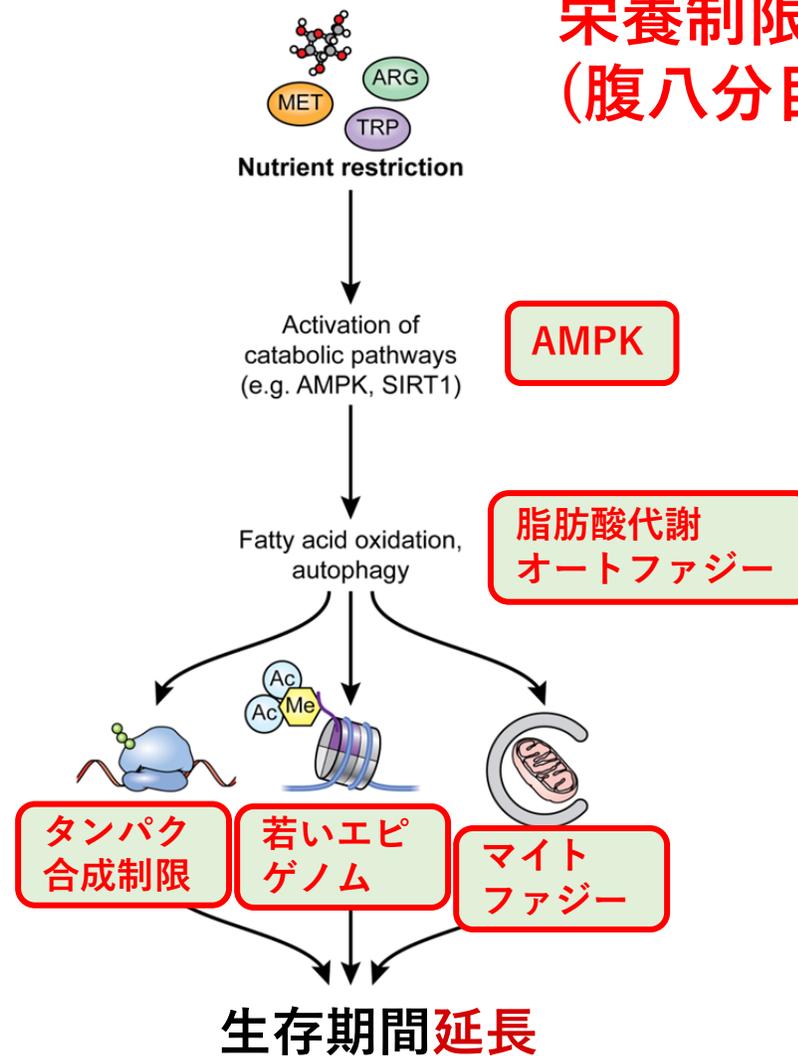
合成培地によるT細胞分化の制御

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

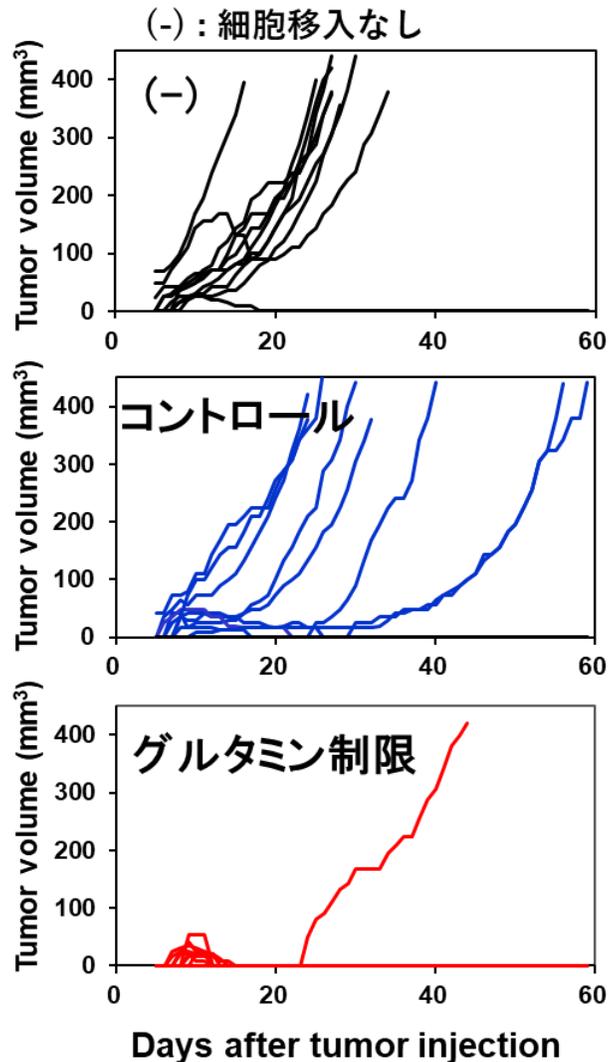


栄養制限 (腹八分目)



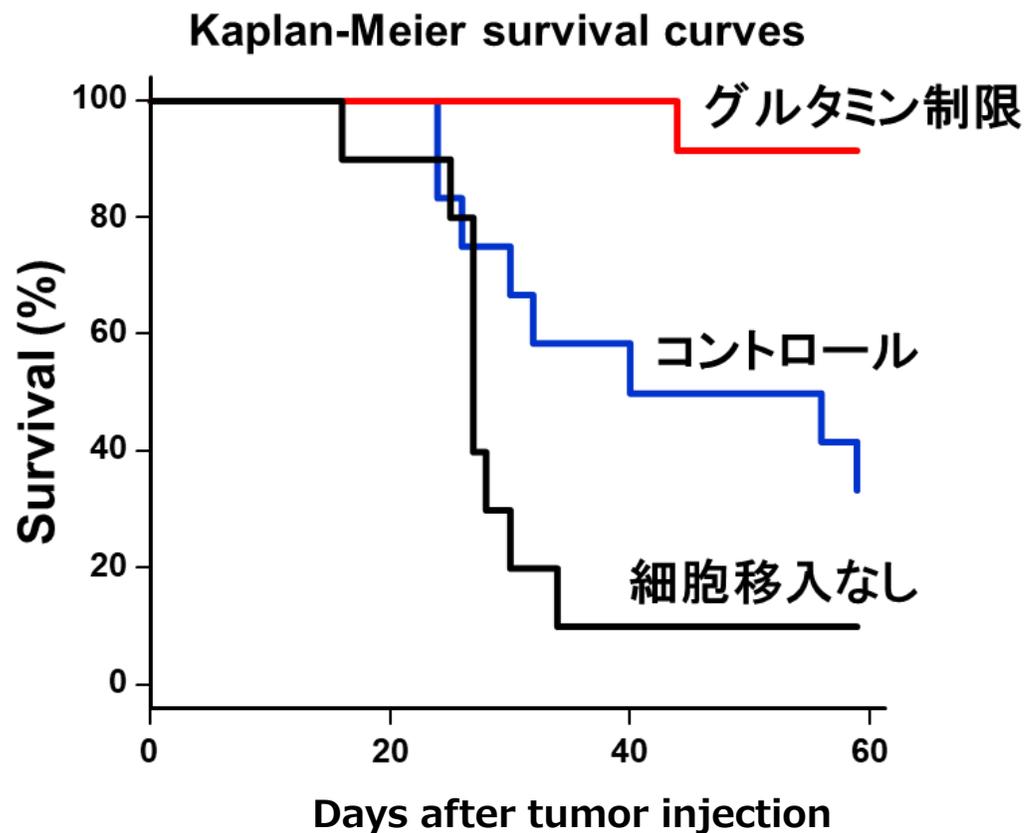
Rigel J. Kishton et al.
Cell Metabolism 2017

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)。

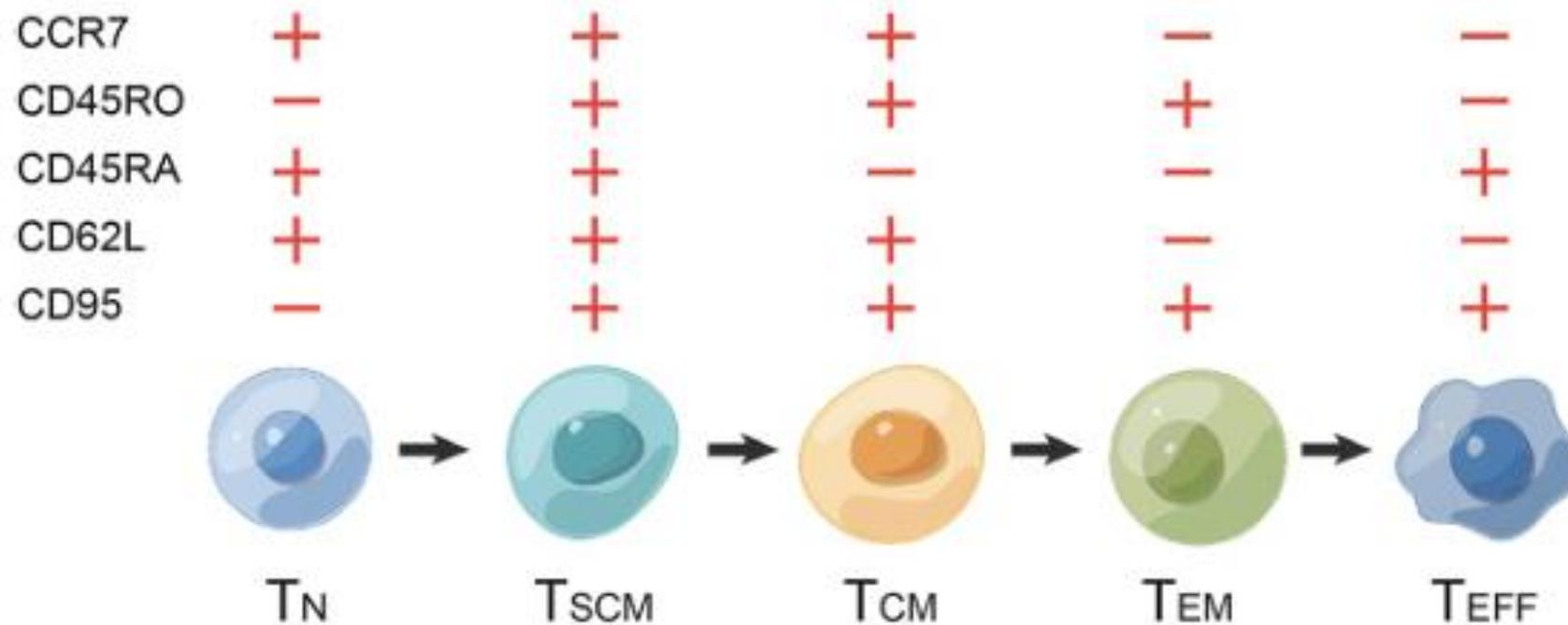
生存率



Nabe et al. *Cancer Science* (2019)

【当社のT細胞培地概要】

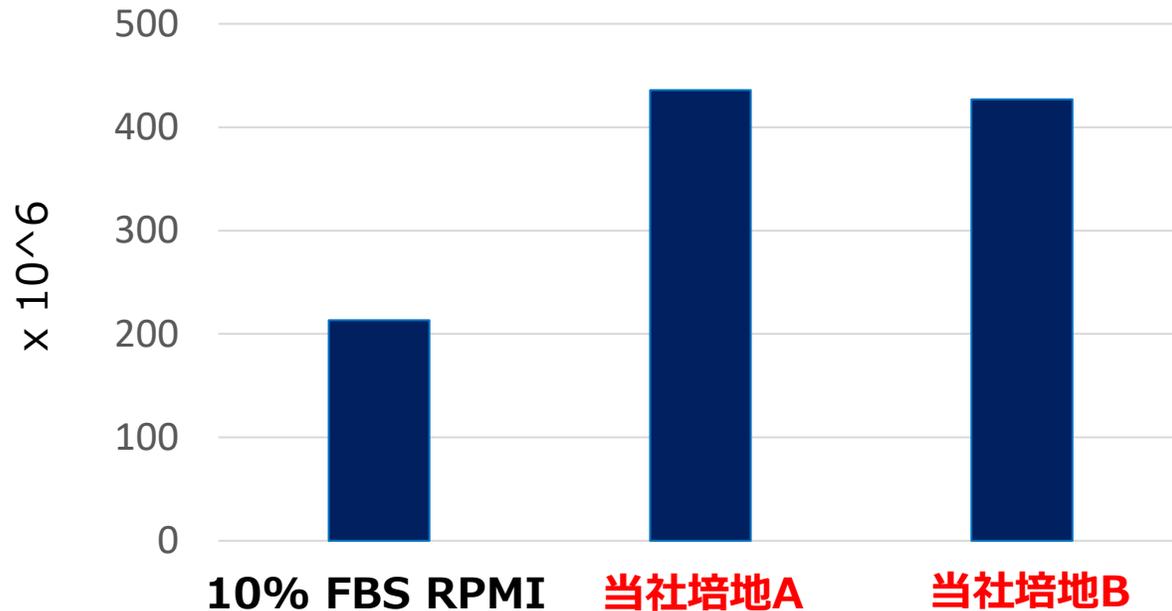
- ・ 無血清又はxeno-freeであり、培地組成の全てが把握可能
- ・ 細胞分離不要で目的のCD4/CD8比 T細胞誘導（以下スライド参照）
- ・ ユーザー要望に応じ、 $T_N \sim T_{EFF}$ 全てのフェノタイプを培地組成違いで誘導
- ・ ヒトだけではなく、マウスT細胞展開への転用改良中



実施例①：T細胞用培地（ヒトPBMCを11日間培養）

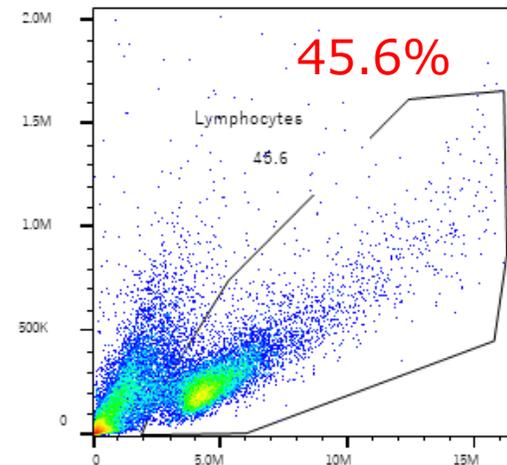
当社培地は血清培地と比較して高い増殖性・生存率を示す

播種細胞数は 1×10^6

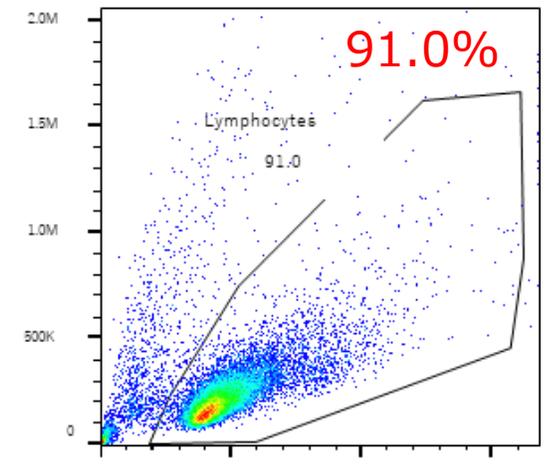


培養後のFSC/SSC解析

10% FBS RPMI



当社培地A



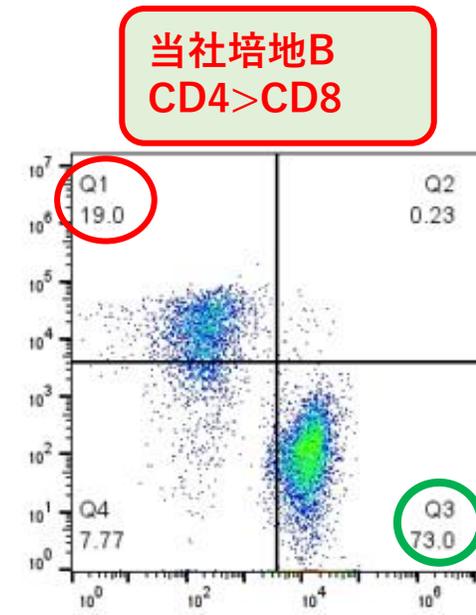
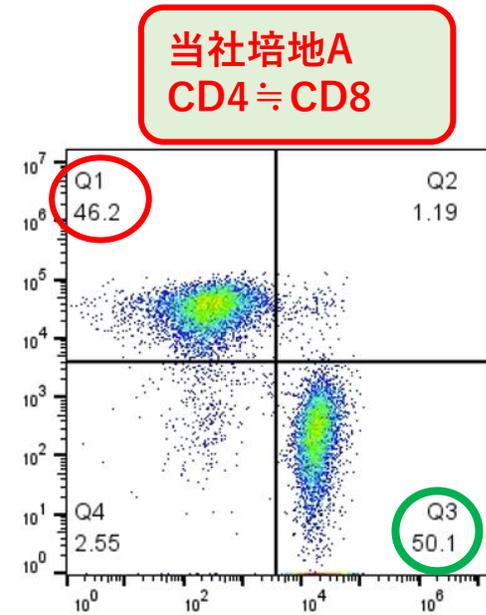
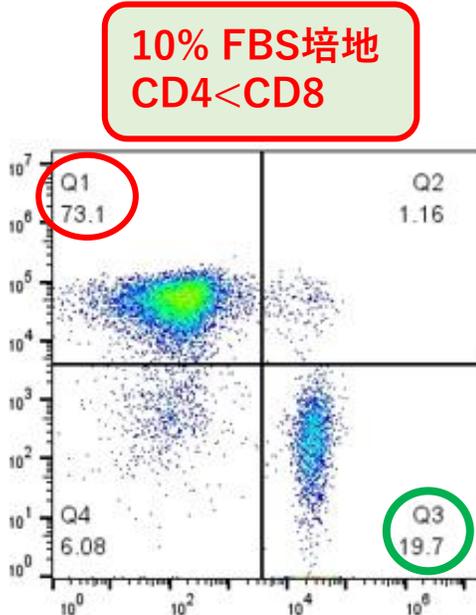
SSC
FSC

Confidential

実施例②：T細胞用培地（ヒトPBMCを11日間培養）

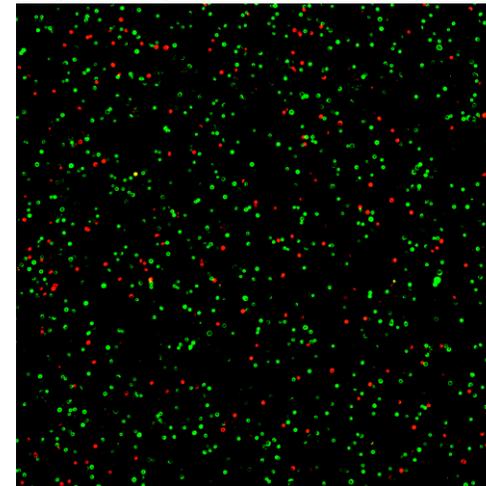
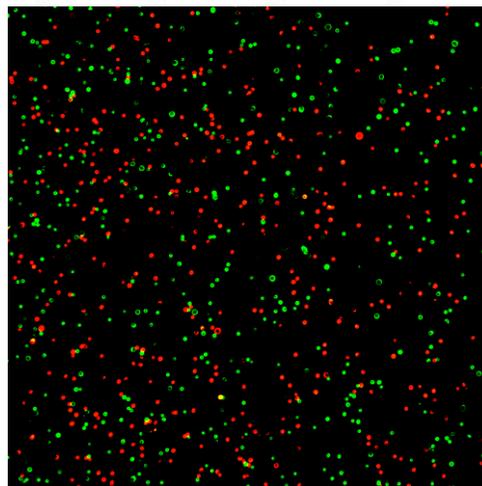
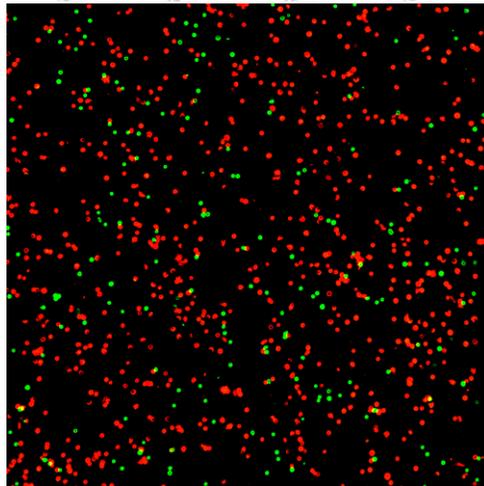
同一検体スタートでも、培地成分違いによりCD4/CD8比に変化が生じる

FCM解析



CD8 (CD3+gated)
CD4

CQ1解析



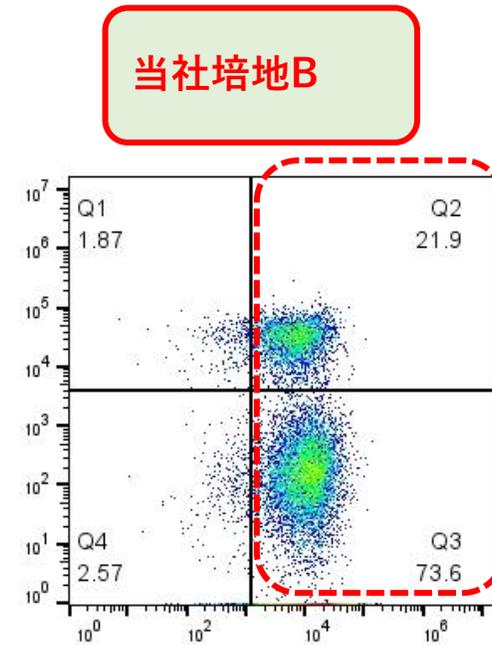
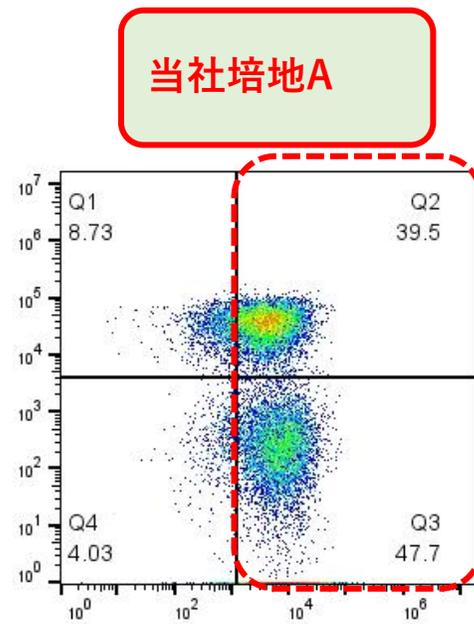
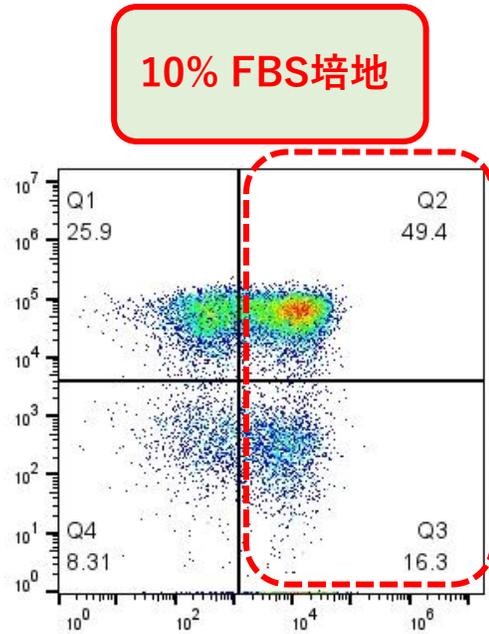
(CD3+gated)
Alexa488-CD4
PE-CD8a

Confidential

実施例③：T細胞用培地（ヒトPBMCを11日間培養）

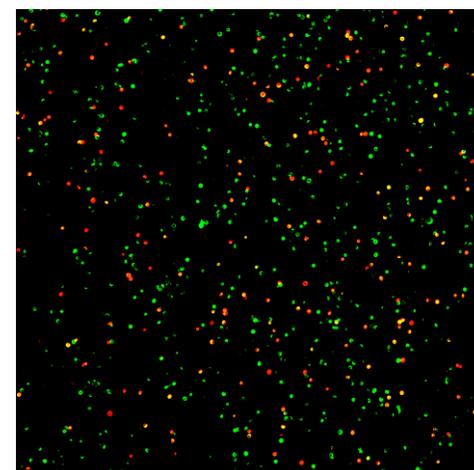
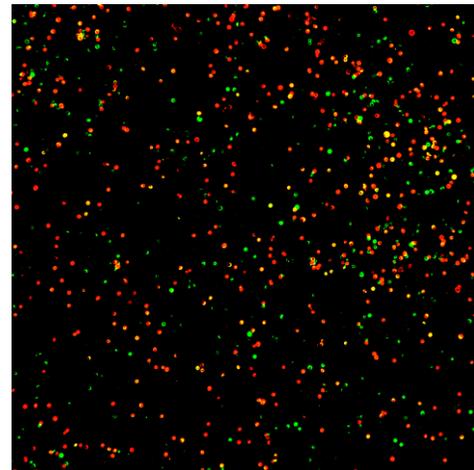
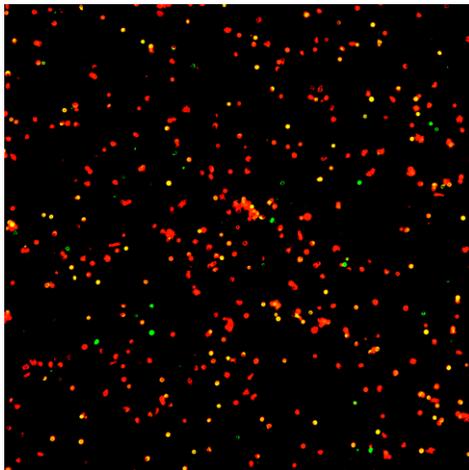
同一検体スタートでも、当社培地A,BはCD62Lの発現を高く維持する傾向がある

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

