

無血清培地R:STEM medium for MSC High Growthを用いて培養した 間葉系間質細胞の特性解析

○石川格靖、岡本大樹、阿部正通、田中順子、大田美和、倉田隼人、西田浩之、
杉本昇平、高尾美佐子、伊藤昌志、野中秀紀、小池哲央、本間陽一、山田哲正

ロート製薬株式会社

無血清培地R:STEM medium for MSC High Growthを用いて培養した 間葉系間質細胞の特性解析

ロート製薬株式会社
石川格靖

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は以下の通りです。

雇用関係 ロート製薬株式会社

背景と目的

【ヒトおよび動物成分不含有培地の検討】

- ・肝硬変やCOVID-19重症肺炎などの治療方法として間葉系幹細胞（Mesenchymal stromal cell, MSC）を用いた再生医療等製品の開発が検討されている（引用：<https://www.rohto.co.jp/ir/library/meeting/>）
- ・MSC製剤の投与によって患者に望ましくない健康被害をもたらさないようにするために感染源の混入リスクに対して最大限留意する必要がある（引用：ミニマム・コンセンサス・パッケージより）
- ・MSCを培養する際に使用する培地には種々のタンパク質などが含まれているが多くはヒトを含む動物もしくは動物細胞が起源となっている
- ・感染源の混入リスクを最大限抑えるためには培地を構成する成分は非動物由来成分が望ましいと考え新規培地処方を検討した

【培地処方の検討および培養細胞の特性解析】

- ・MSCは培地に含まれる因子によってその特性を変化させることが知られている*
- ・各疾患におけるMSCの作用機序の全貌は未だ明らかにされていないがMSCが産生する液性因子も関与していると考えられている*
- ・MSCが産生する液性因子のうち代表的なものにHGF（Hepatocyte Growth Factor）およびVEGF（Vascular Endothelial Growth Factor）がある*（*引用：O. Levy, et al., *Sci. Adv.*, 2020, Vol.6, eaba6884）
- ・両因子の産生を促すことができる培地組成をスクリーニングし動物成分を含まない*R:STEM medium for MSC High Growth*を開発した
- ・本培地で培養した細胞が産生する液性因子を網羅的に定量し評価した
- ・本細胞における免疫抑制効果および血管新生促進効果を*in vitro*アッセイ系で評価した

培地処方の設計

【処方条件】

- ・感染性などに考慮しヒトおよび動物が原料となる成分を含まない
- ・生物由来原料基準を考慮して二次原料までさかのぼり上記成分を含まない
- ・ロート製薬株式会社が治験薬を製造する際に使用している培地と比較して同等の品質が確認できるもので構成されること
- ・上記に加えて同一の培地製造工程で製造できること

【検討方法】

ロート製薬株式会社が保有する低分子および高分子ライブラリーを用いた

- ① MSCのHGFおよびVEGF産生量を促進する因子を探索した
- ② 細胞増殖性能を高める因子の組み合わせを探索した

培地処方の設計 液性因子産生量の向上

【結果】

スクリーニングの結果
HGFおよびVEGFの産生を刺激する
因子Xがヒットした

濃度依存的な影響が認められた

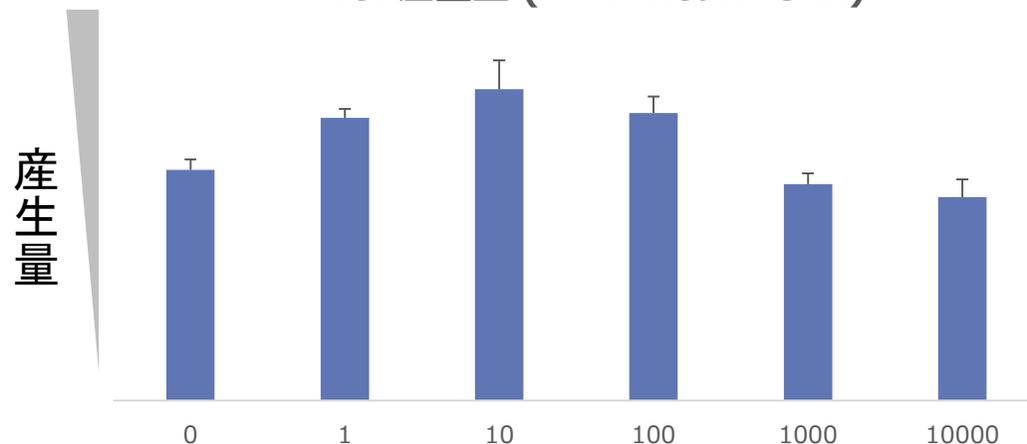
スクリーニング結果例



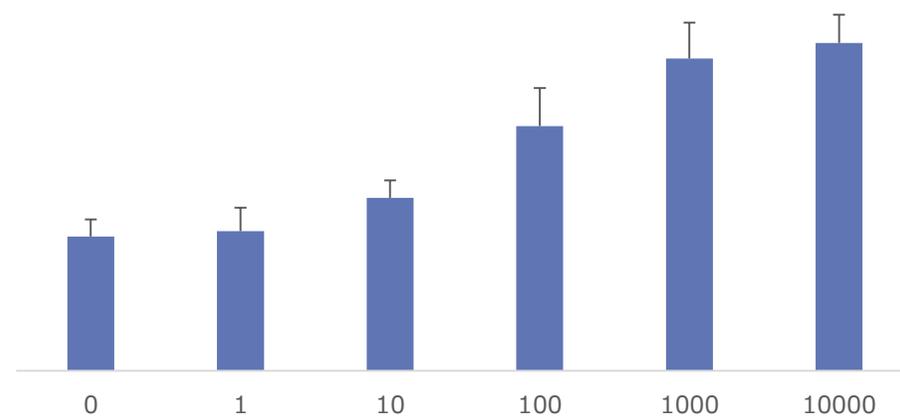
繰り返し

刺激因子Xによる濃度依存的な影響を確認した

HGF産生量 (n=4 mean+S.E.)



VEGF産生量 (n=4、mean+S.E.)



因子Xの濃度

因子Xの濃度

追加因子の検討 増殖性能の評価

【方法】

培地の増殖性能をWST-8 (DOJINDO社) および回収細胞数で評価した

PDL: Population doubling level 分裂回数

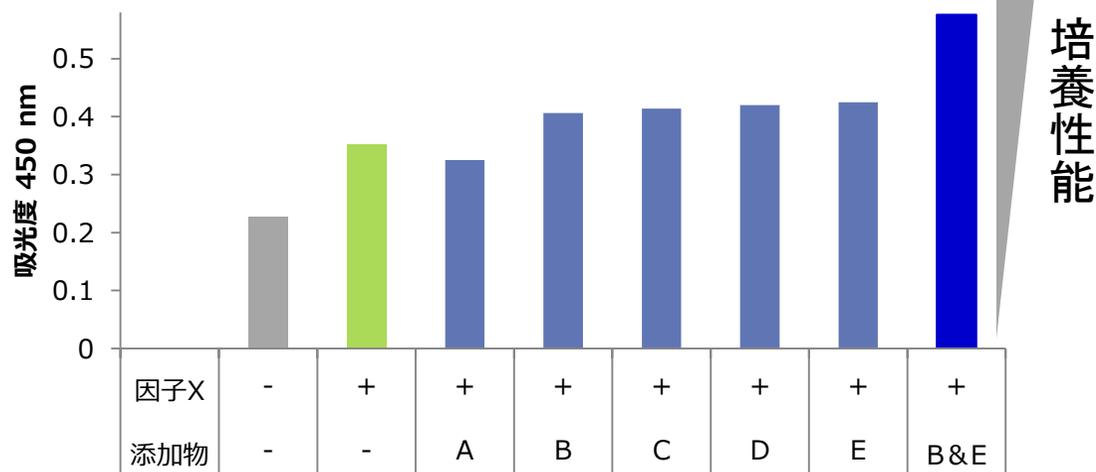
【結果】

因子XおよびBとEの組み合わせによって培養性能が高まることがわかり

R:STEM mediumを開発した

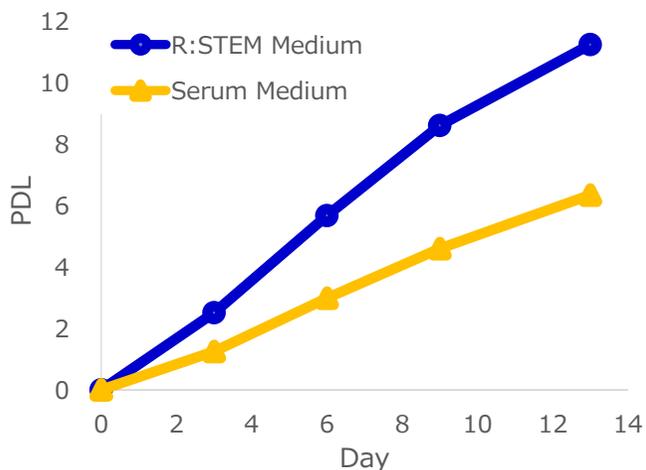
本培地は**血清培地以上の培養性能を示した**

● 培養性能検討

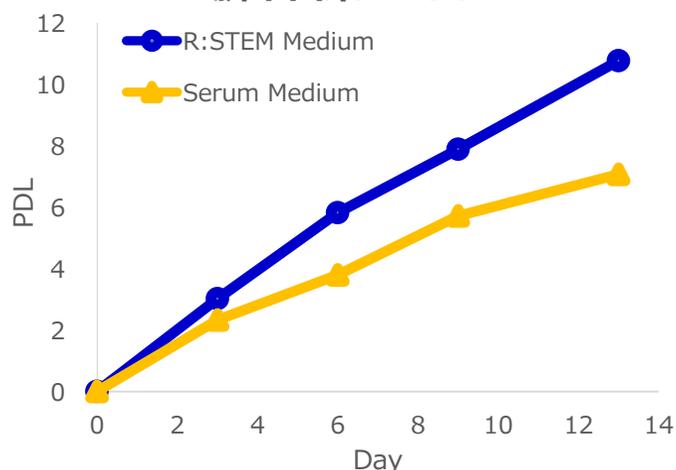


● 各組織由来MSCに対する細胞培養性能

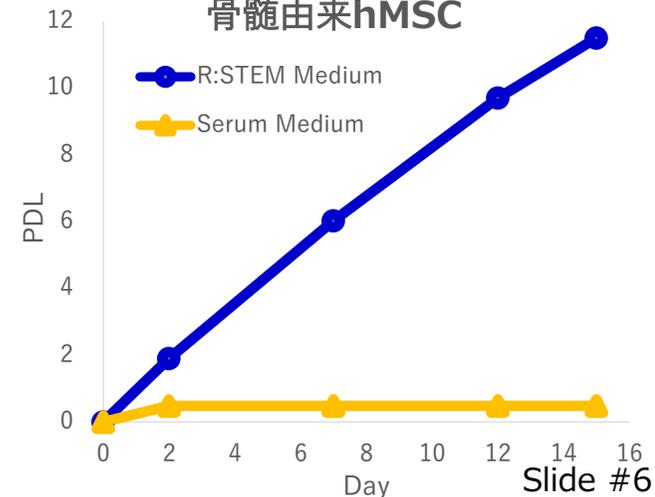
脂肪由来hMSC



臍帯由来hMSC



骨髄由来hMSC



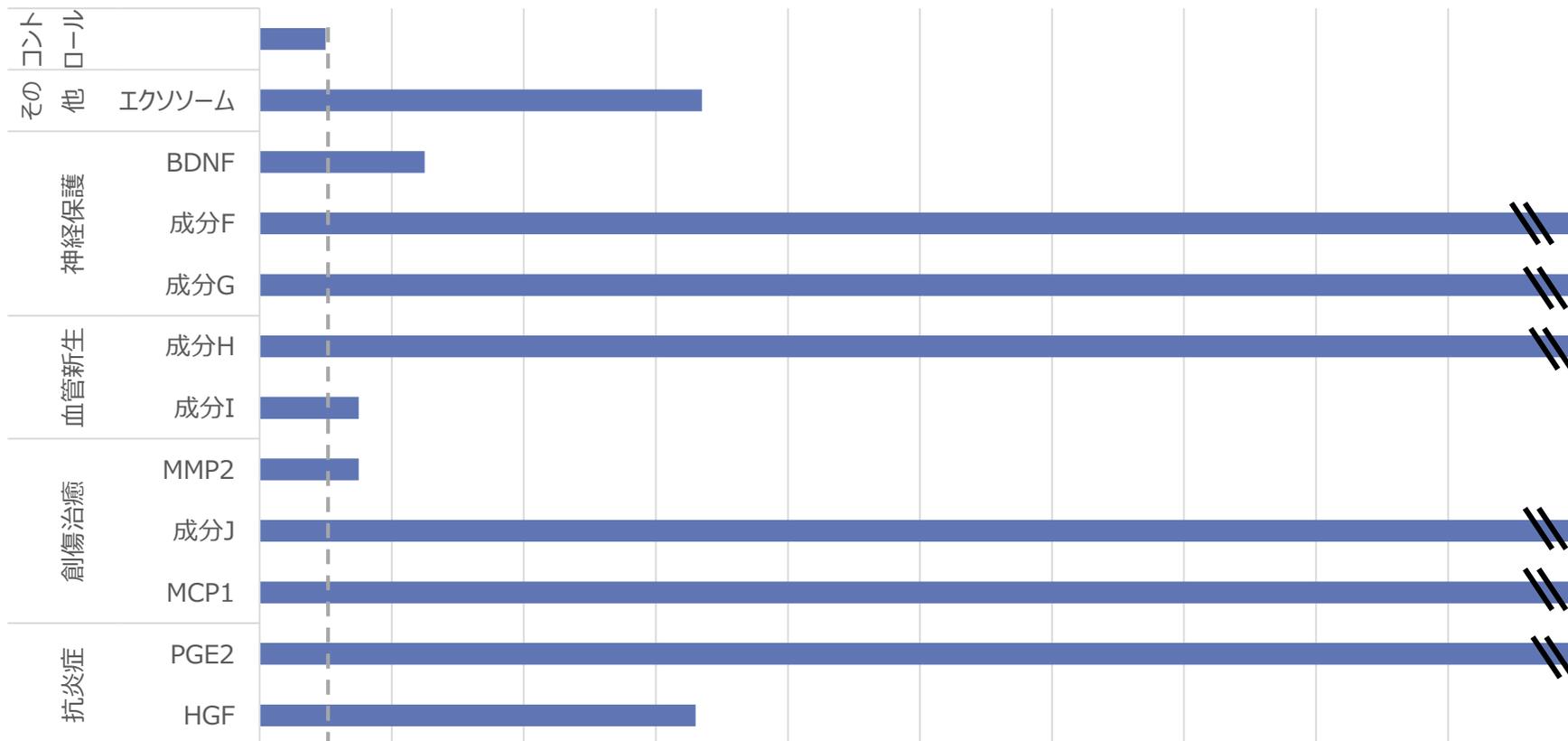
液性因子産生量の網羅的解析

液性因子およびエクソソーム産生量（特許出願中 PCT/JP2021/4711）

【方法】 MSCをR:STEMおよび市販培地で培養し3-4日間培養後の培養上清中に含まれる各種因子の濃度をELISAで測定した

【結果】 **R:STEM Mediumで培養した細胞は液性因子やエクソソーム産生量が従来の培地に比べて多いことが示唆された**

R:STEM mediumで培養した細胞における液性因子の比産生量



MSC規格に関する評価 および初代培養の検討

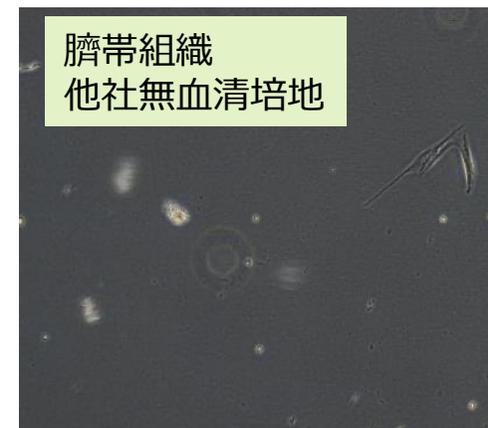
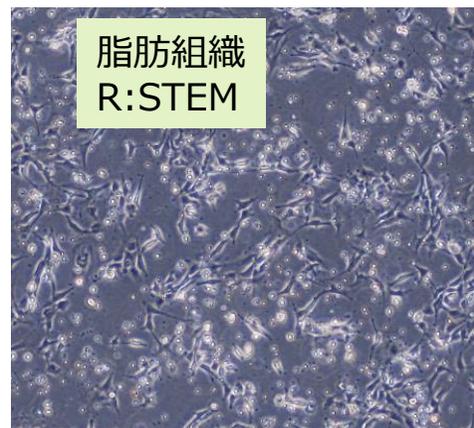
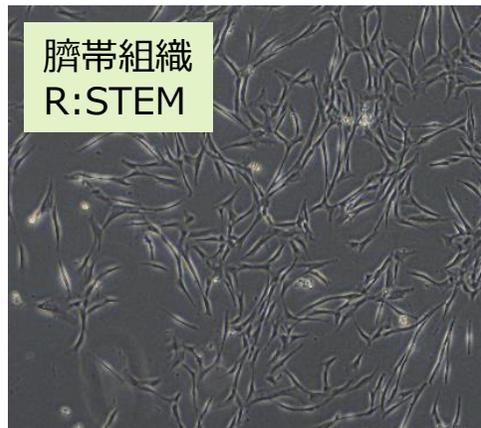
初代培養

【方法】

各組織をロート社製組織分散液で処理しフラスコに播種した。適宜培地交換を行い5-10日間培養したのち細胞観察を行った。

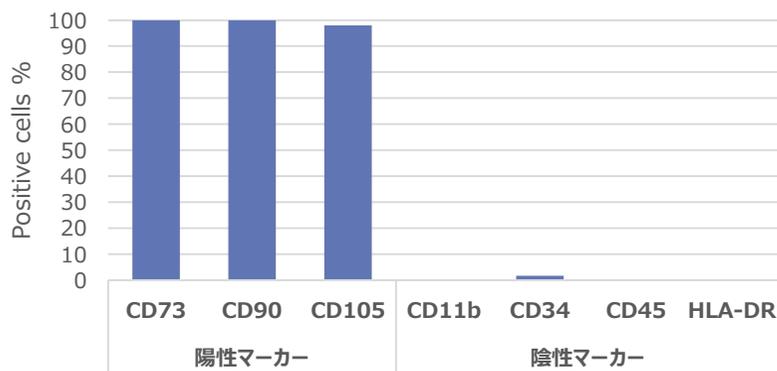
【結果】

組織からMSCを分離培養することが可能である



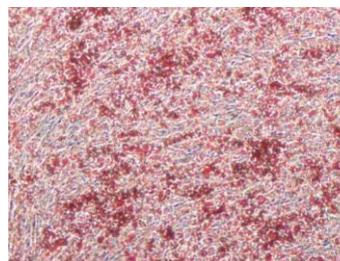
細胞表面マーカー/分化能

【結果】 国際細胞治療学会基準のプロファイルを示した

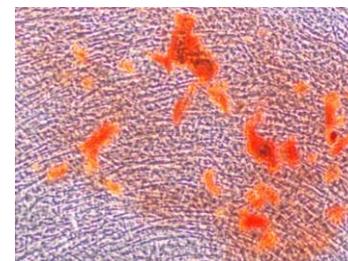


【方法】LONZA社ヒト脂肪由来MSCをR:STEMでP4まで培養したのちflow cytometryを用いて表面マーカーを解析した結果を解析した

脂肪細胞



骨芽細胞



軟骨細胞



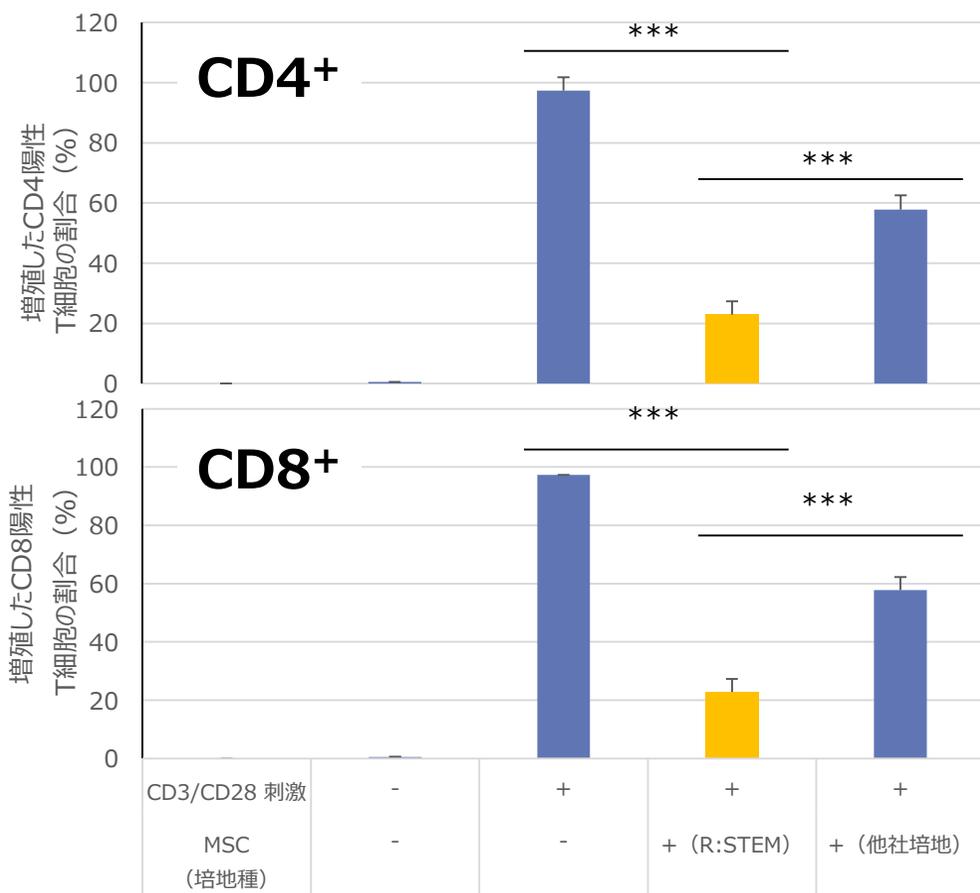
【方法】LONZA社ヒト脂肪由来MSCをR:STEMでP4まで培養したのちP5で分化誘導させたのち各染色液で染色した
脂肪：オイルレッドO, 骨芽：アリザリンレッドS, 軟骨：アルシアンブルー

免疫抑制に係わる評価 (特許出願中 PCT/JP2021/4711)

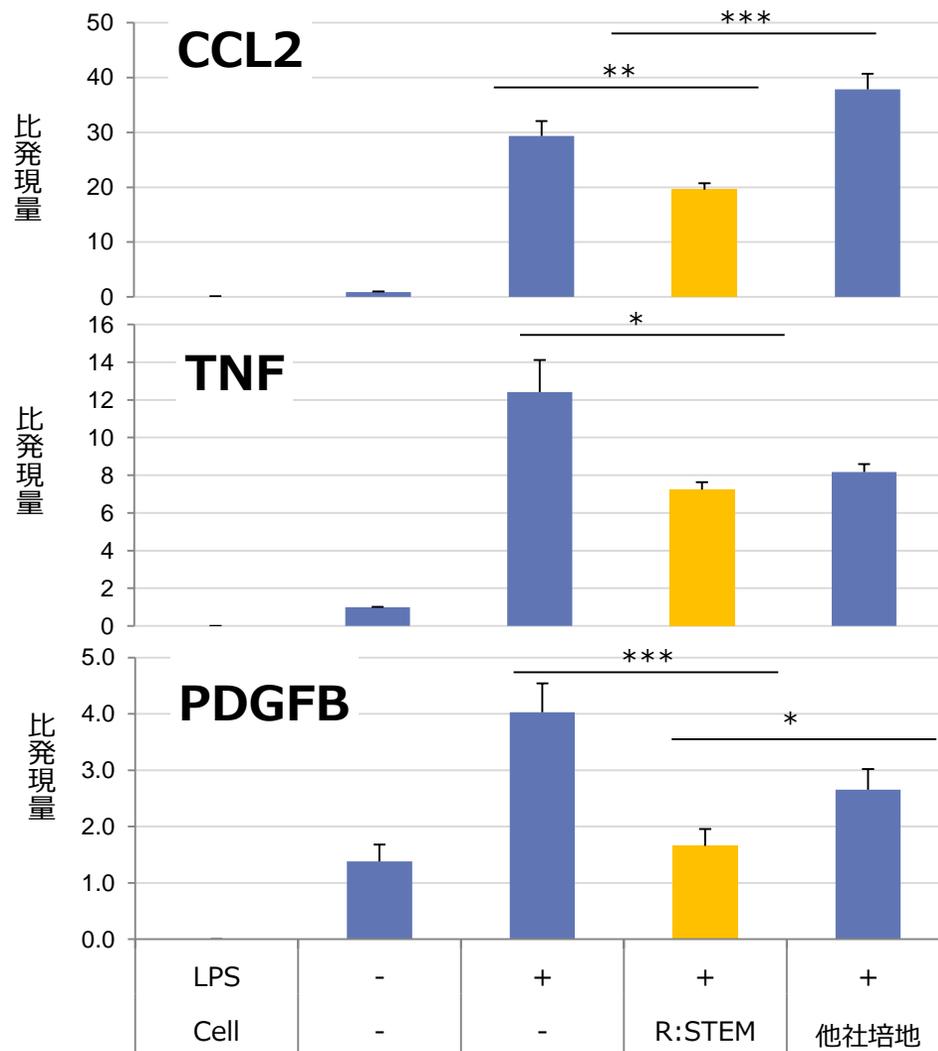
T細胞の増殖抑制

【方法】ヒト末梢血単球あるいはTHP-1マクロファージを刺激しT細胞の増殖あるいはマクロファージを活性化した際の、MSCによる抑制効果を評価した。N=3, mean+S.E. t-test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$

【結果】免疫抑制効果が高い可能性が示唆された



マクロファージの活性化抑制



Tube Formationに対する評価

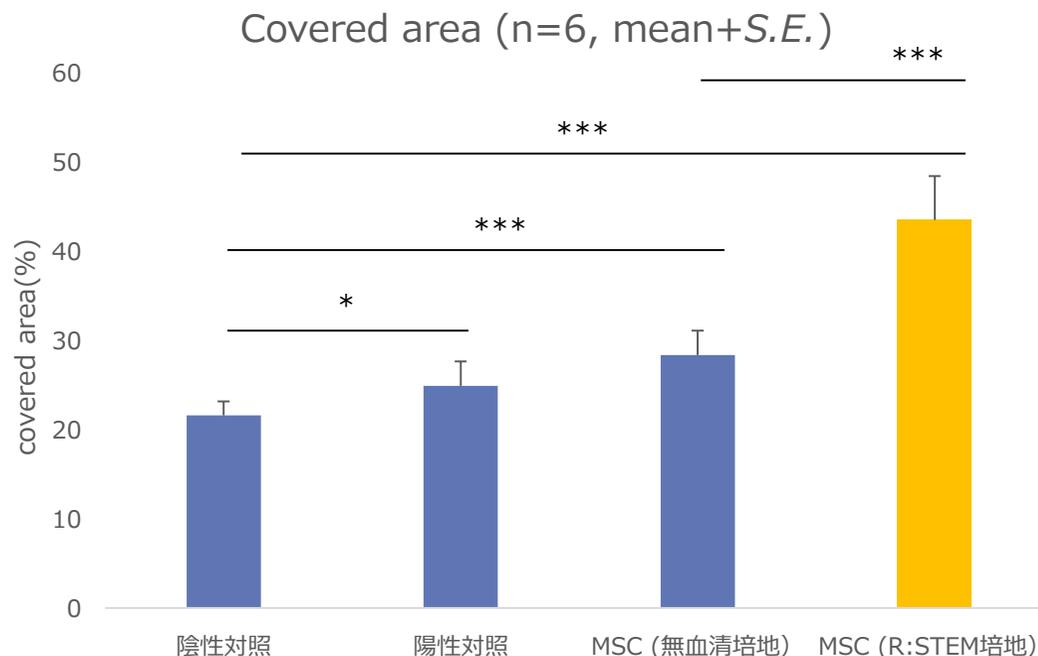
【方法】

各培地で培養したMSCをConditioned mediumにて培養し、上清を回収した。回収した上清を用いてHUVEC細胞における血管新生効果进行评估した。

【結果】

MSCはTube formationを促進し、R:STEM培地は比較的その効果が強いと示唆された。

t-test *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$

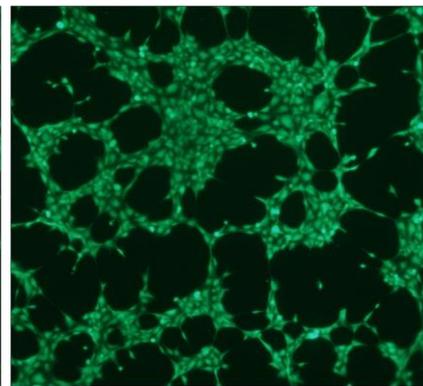
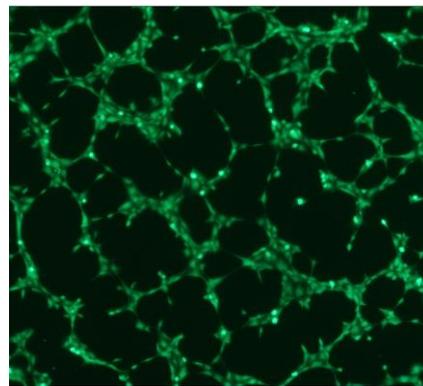
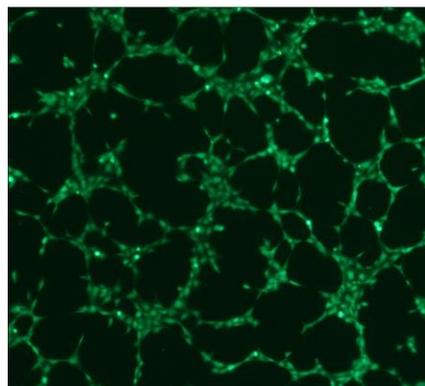
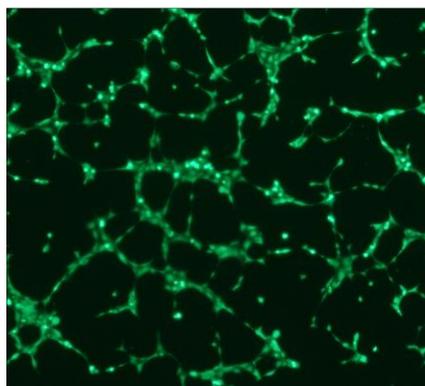


陰性対照

陽性対照

MSC (無血清培地)

MSC (R:STEM培地)



まとめ

- 刺激因子XによってMSCが産生する種々の**液性因子産生量が向上する**可能性のあることを見出した
- 因子Xをベースとして増殖刺激因子を探索したところ
複数の因子の組み合わせによって**MSCの増殖能を向上**させる可能性を見出した
- 検討結果を活用してR:STEM Medium for MSC High Growthを開発し
本培地で培養したMSCの特性解析を行ったところ
市販されている他の培地よりも本培地で培養したMSCは
比較的**高い免疫抑制効果や血管新生効果を示す**ことが示唆された