

生物由来原料基準に適合した培地を用いて骨髄単核細胞から骨芽細胞を得る製造フロー

高垣 謙太郎*, 伴 慶子, 佐伯 尚史; 富士フイルム和光純薬(株)
埼玉県戸田市新曽南3-17-35, *kentaro.takagaki@fujifilm.com

Abstract

再生医療を行う際の出発材料として様々な細胞が提案されている。なかでも、間葉系幹細胞 (MSCs) は、脂肪や骨髄といった組織から分離・培養を行うための方法論が確立されており、世界中で盛んに研究がおこなわれている。MSCsは、特定の条件下で骨芽細胞に分化することから、歯槽骨再生や顎骨再生など歯科・口腔外科領域での利用が期待されている。我々はこれまでに、異種成分を含まず (Xeno-Free) 増殖性能に優れたMSCs用無血清増殖培地 (PRIME-XV MSC XSFM MDF1、再生医療等製品材料適格性確認書取得済。以下、MDF1と略す。) 及び、Xeno-Freeで骨芽細胞分化を高効率に誘導する骨分化培地 (OS-002) を開発した。今回は、MDF1を用いて骨髄単核細胞から骨髄由来MSCsを分離する方法、MDF1を用いて骨髄由来MSCsを拡大培養した結果、OS-002を用いて得られた細胞を骨芽細胞に分化させた結果を紹介する。本検討により、生物由来原料基準に適合した培地だけを用いた製造フローにより、骨髄単核細胞から骨芽細胞を効率よく得られることを明らかにした。

Methods

実験材料
骨髄由来単核細胞はLonza社から購入した (2M-125C)。初代培養は、Cell-Bind加工されたT-25あるいはT-75フラスコ(Corning #3289, #3290)をSyntheMax II (Corning #3535)でコーティングの上、使用した。コーティングはSyntheMax IIを 25 ug/mLの濃度で水に溶解したものをフラスコに加え、室温で1時間処理することで行った。継代培養および骨分化誘導はCell-Bind加工された6 well plateあるいは24 well plate (Corning #3337, #3335)を用いて行った。

初代培養
融解後、PRIME-XV MSC XSFM MDF1 (富士フイルム和光純薬 #552-37463)あるいは10%血清を含むMEMαに懸濁し、T-25フラスコに播種した。培地交換時は、培養上清中に含まれる非接着細胞を遠心にて回収し、フラスコに戻すことを行った。

継代培養
細胞は、6 well plateに播種し、n=3で行った。細胞はTrypLE Select (Thermo Fisher #12563029)で回収し、Vi-Cell XR (Beckman Coulter)で細胞数を計測した。

骨分化誘導
24 well plateに、 3×10^4 cells/wellで細胞を播種し、MEMα + 10% FBS (Negative Control)、MEMα + 10% FBS、50 μM Ascorbic Acid、100 nM Dexamethasone、10 mM β-Glycerophosphate (一般的に用いられる血清含有骨分化培地)あるいはOS-002 (生物由来原料基準に準じた原料で構成された新規開発品)で14日間培養を行った。培地交換は1週間に3回の頻度で行った。分化誘導後の細胞は、Alizarin Red Sで染色し、分化の程度を評価した。同時にmRNAを採取し、qPCR法でOsteocalcinの発現を確認した。

Results

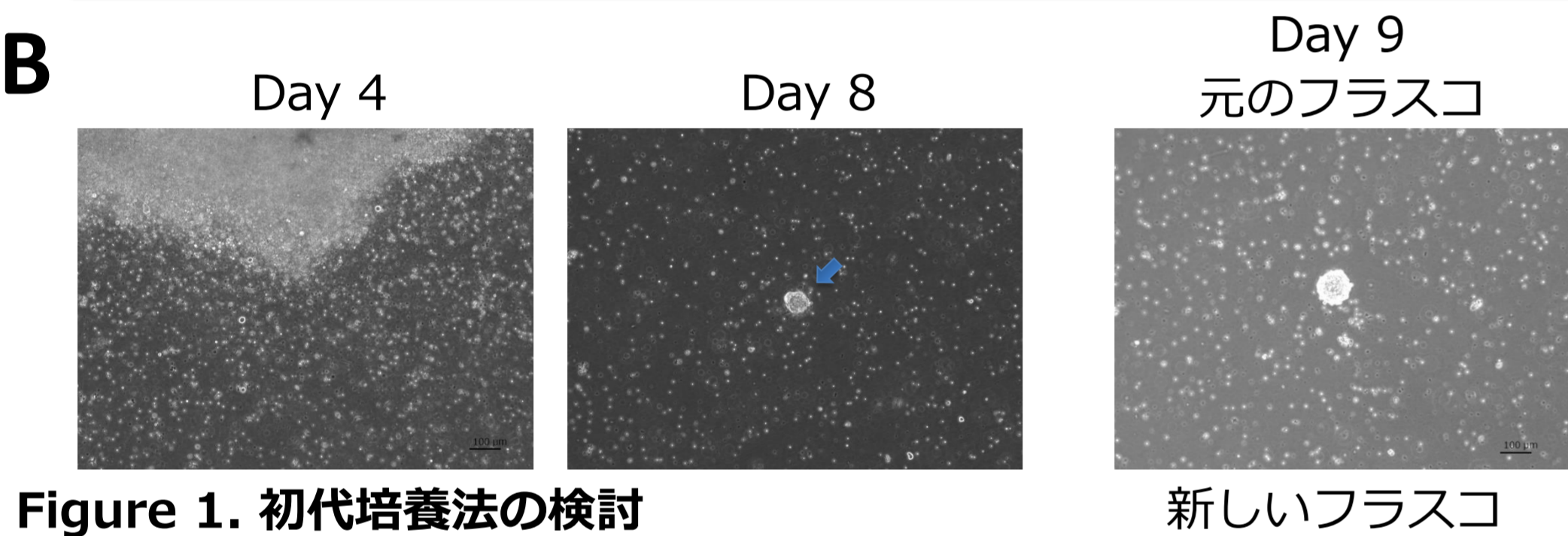
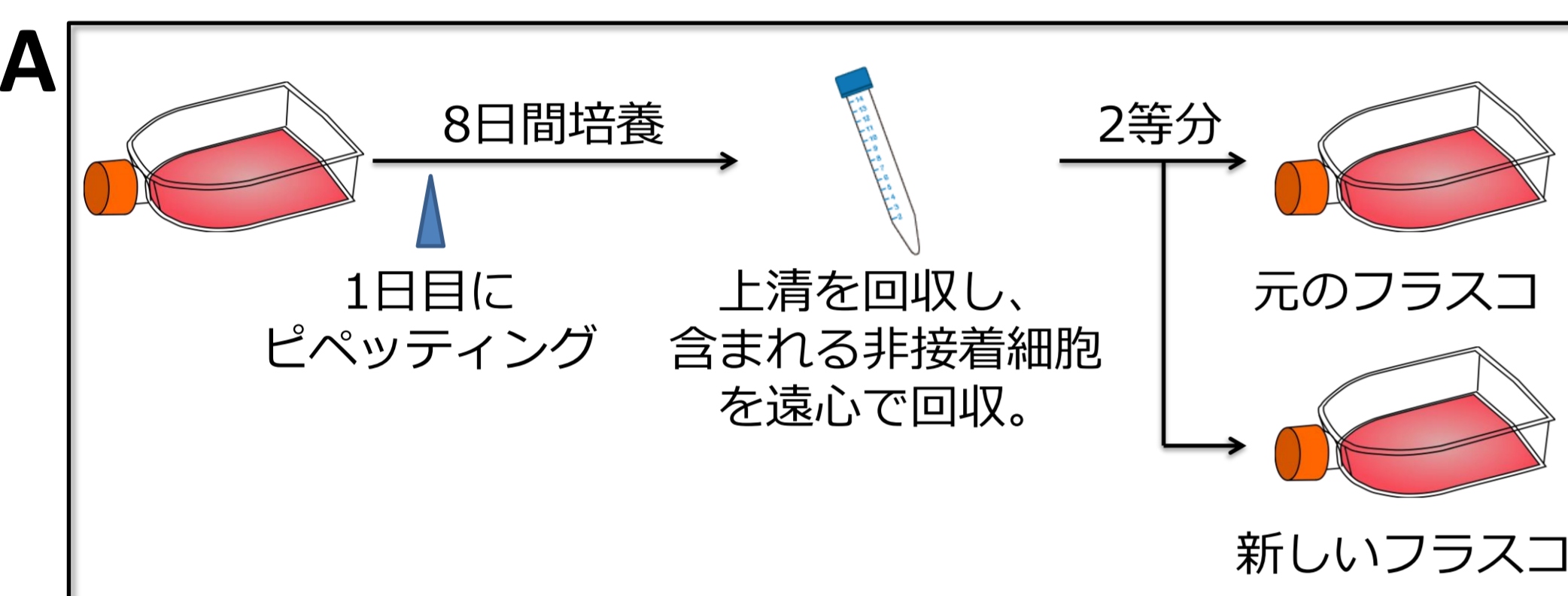


Figure 1. 初代培養法の検討

(A) 実験の模式図。(B) 培養中の写真。培養開始直後に、培地のゲル化が生じるため、これをピペッティングにてほぐす。Day 4の写真で示すように、繊維状の浮遊物が依然として残っている。Day 8では、繊維状の浮遊物がほぼ消失し、上清中に凝集した細胞が確認できる。上清中の非接着細胞を、新しいフラスコに移すと速やかに接着細胞が現れる。一方、元のフラスコに戻しても接着細胞は現れない。

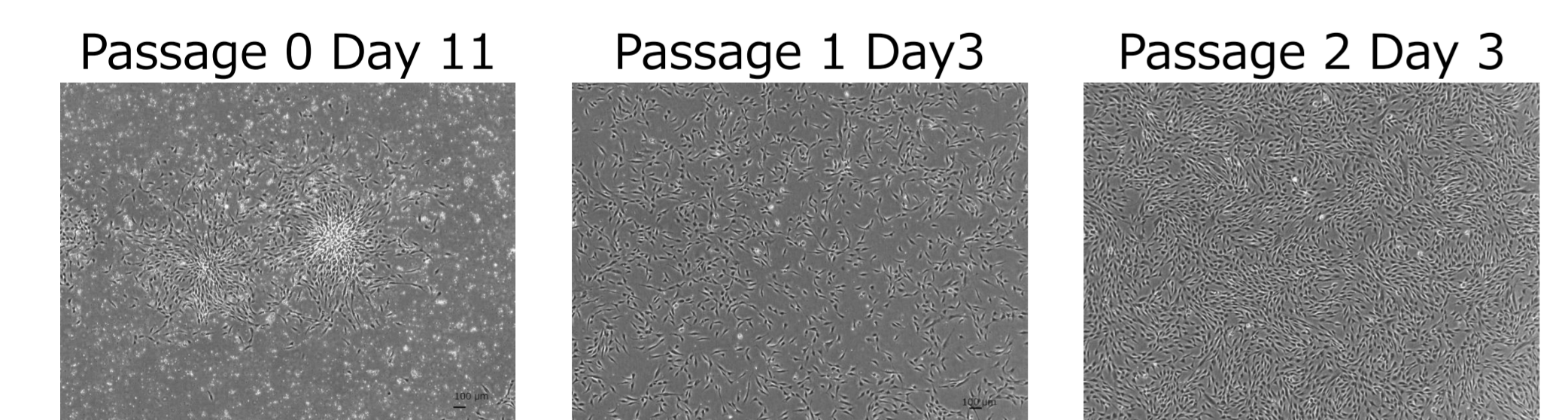


Figure 2. 得られた細胞の継代

Passage 1以降は、SyntheMax IIによるコーティングを行っていない。得られた細胞は間葉系幹細胞の特徴である紡錘形を示し、問題なく継代することができる。

使用培地	培養日数	継代数	取得細胞数
MDF1	17	Passage 2	2.832×10^7
MEMα + 10% FBS	24	Passage 2	4.75×10^6

Table 1. MDF1と血清含有培地を用いた初代培養の比較

8×10^6 の骨髄由来単核細胞から、上述のプロトコルに従い間葉系幹細胞を分離した際の結果。血清含有培地では培地のゲル化は生じず、新しいフラスコに移し替えを行わなくても細胞の接着は見られるが、得られる細胞数は少ない。後の実験は、Passage 2終了時に作製した凍結ストックを用いて実施している。

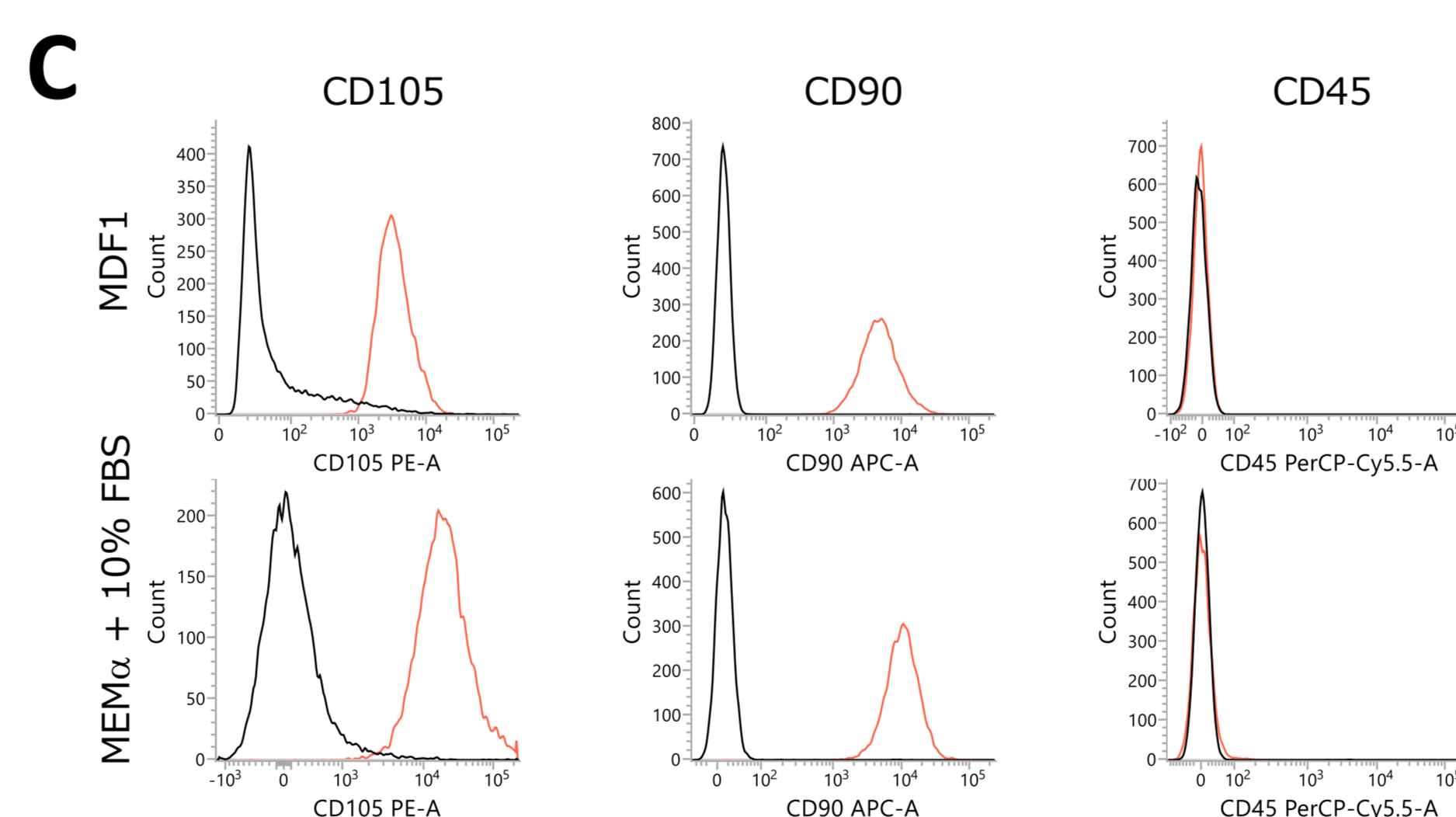
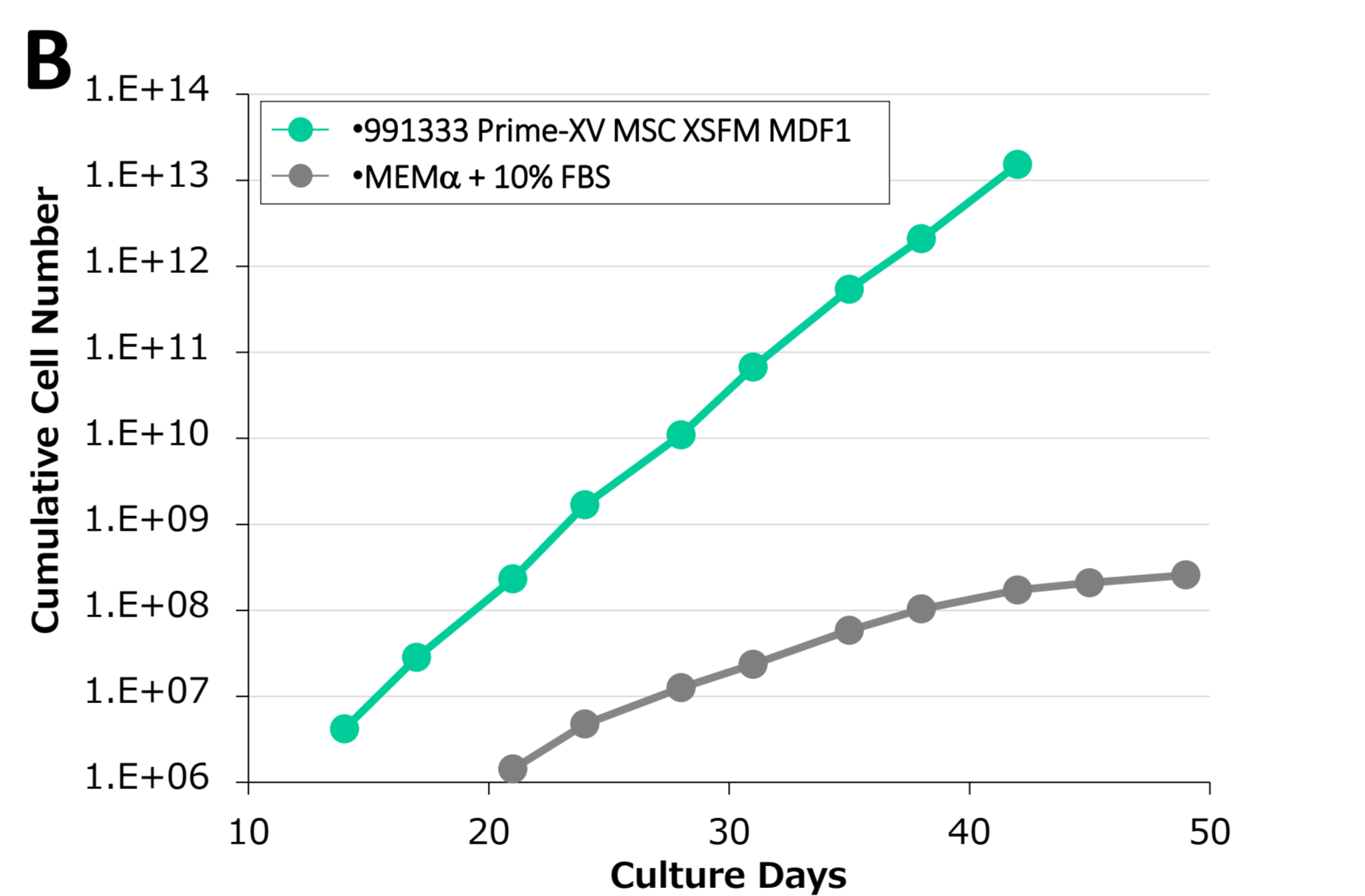
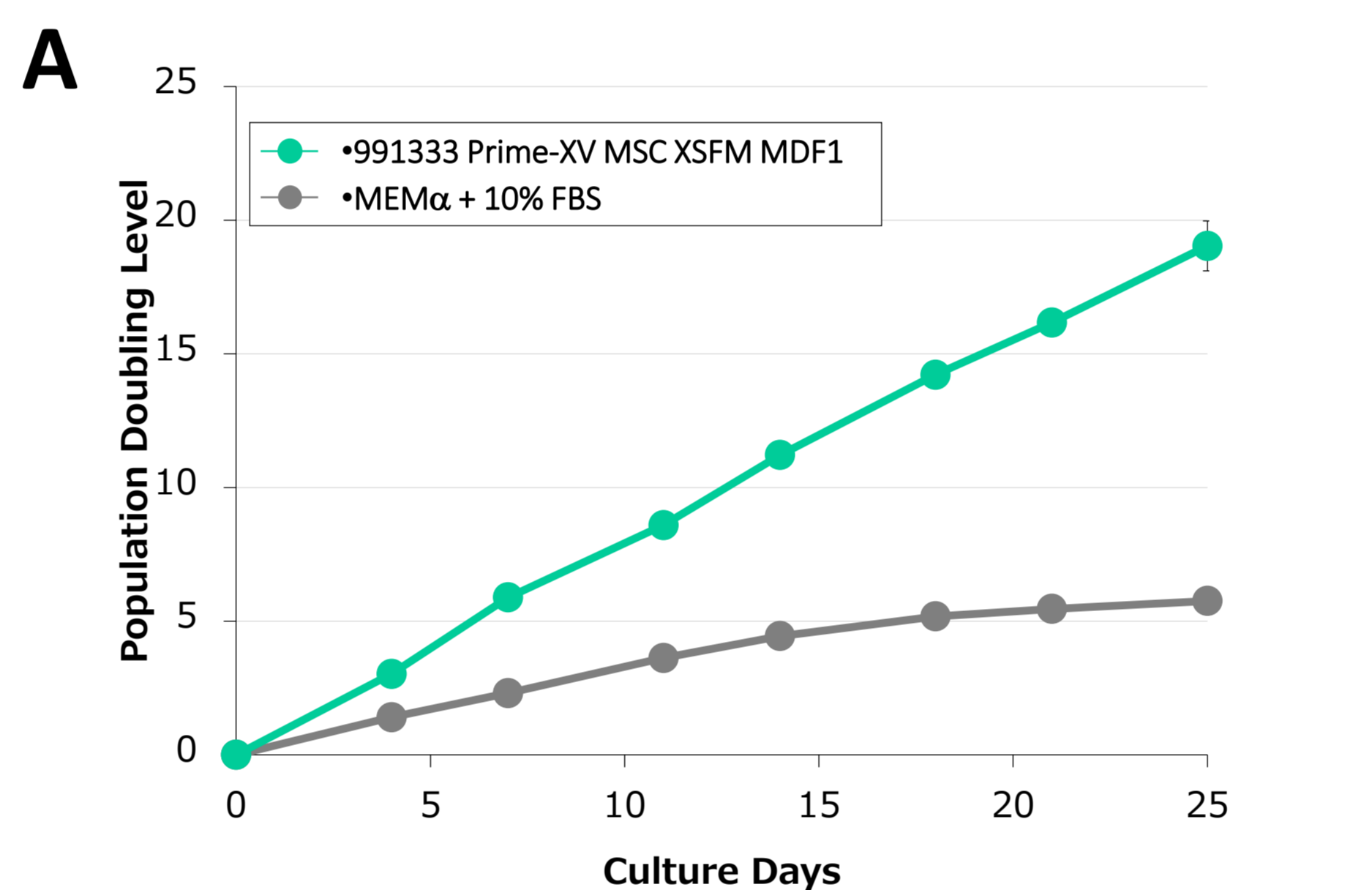


Figure 3. 得られた細胞の長期培養

(A) 得られた細胞を、それぞれの培地で7継代 (Passage 3~Passage 9) した際の増殖曲線。(B) 培養開始時からの日数と、全量を継代したと仮定した場合の積算細胞数。(C) Passage 9終了時の細胞表面マーカー。MDF1は、血清含有培地に比して優れた増殖性能を示し、9継代を経て積算細胞数は15兆に達する。この時、表面マーカーは間葉系幹細胞の要件を維持している。

使用培地	培養日数	継代数	必要培地量
MDF1	21	Passage 3	約700 mL
MEMα + 10% FBS	38	Passage 6	約1,200 mL

Table 2. 1×10^8 細胞を得るのに必要な日数および培地量の比較

必要培地量は、継代時にT-75フラスコあたり 5×10^5 細胞 (MDF1を用いた場合)、あるいは 1×10^6 細胞 (血清含有培地を用いた場合)播種し、フラスコあたり10 mLの培地を使用すると仮定した場合の数値。MDF1を用いることで、短期間に必要な細胞を得ることができる。

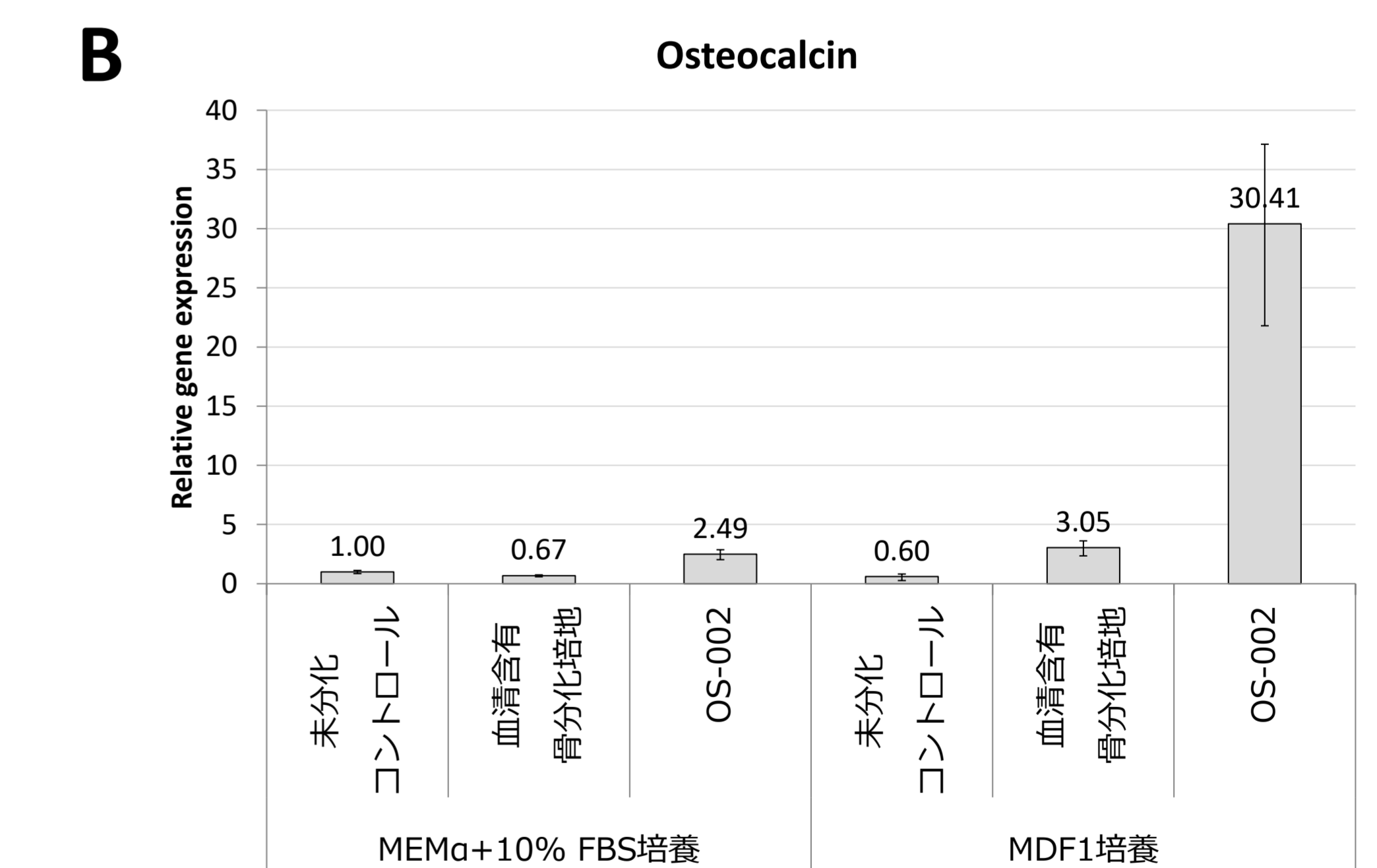
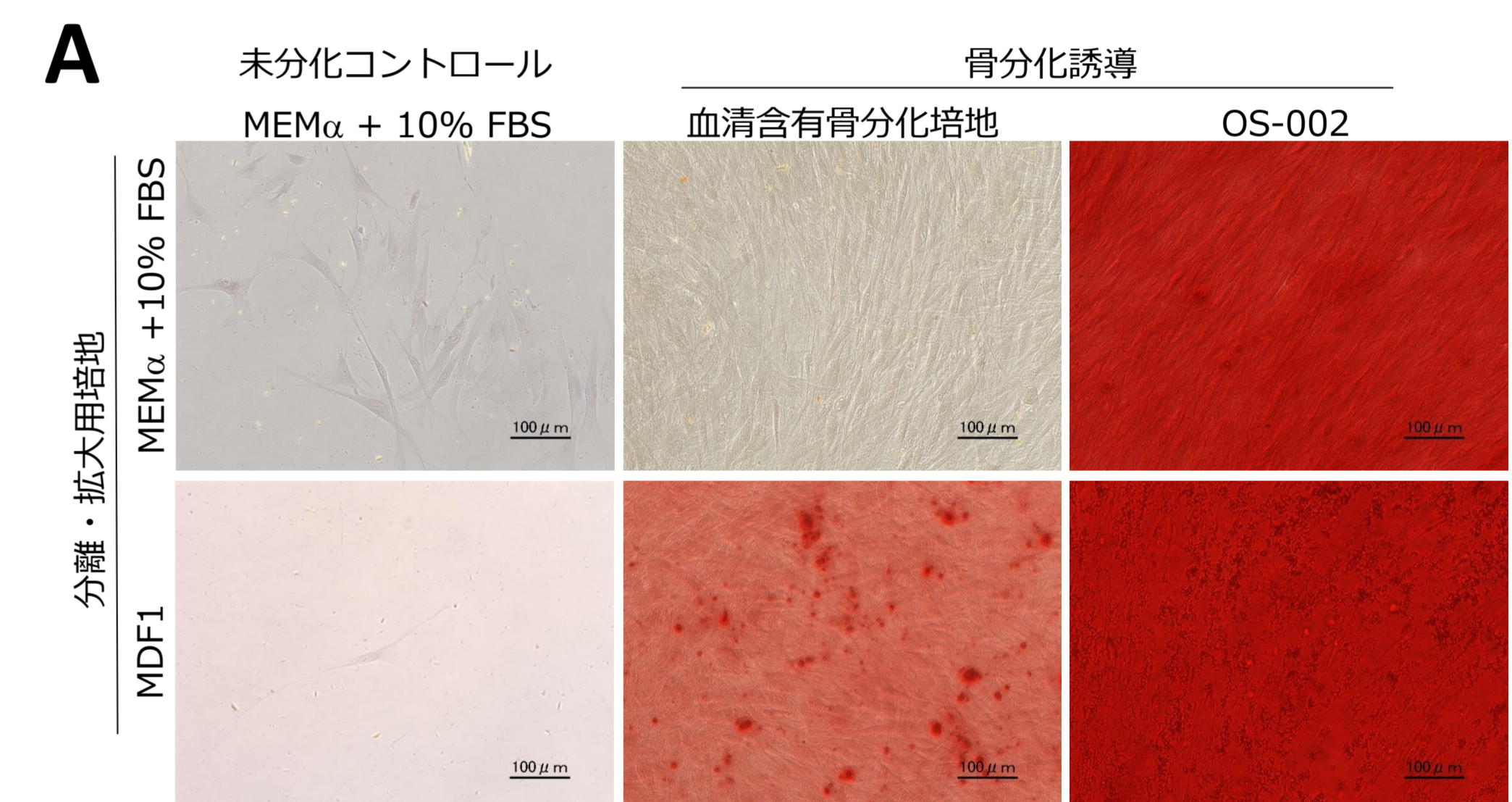


Figure 4. 得られた細胞の骨分化誘導

MEMα + 10% FBSあるいはMDF1を用いて骨髄単核細胞から分離した間葉系幹細胞を3継代し、必要な数のPassage 6細胞を得た。血清含有骨分化誘導培地あるいはOS-002で14日間培養し、骨分化を誘導した。(A)細胞をAlizarin Red Sで染色した写真。MDF1で分離した細胞は、MEMα + 10% FBSで分離した細胞に比べてAlizarin Red Sで強く染色された。また、OS-002で培養した場合、血清含有骨分化培地で培養した場合より強く染色された。(B)mRNAを調整し、骨分化マーカーであるOsteocalcinの発現量を測定した結果。Alizarin Red S染色とOsteocalcinの発現は良く相関する。

Conclusions

- 骨髄由来単核細胞から接着細胞を得る際に、培養開始1週間でフラスコの交換を実施することが重要であることが明らかとなった。
- MDF1を用いることで、骨髄由来単核細胞から分離した間葉系幹細胞は、特徴を維持したまま長期間の培養が可能であった。
- 新規骨分化培地 (OS-002)は、MDF1を用いて分離培養された間葉系幹細胞の骨分化を高効率に分化させることができた。

COI

筆頭演者は、過去1年間 (4月~3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。