

新無血清培地 STK2 のヒト間葉系幹細胞増殖における有用性について

石川 格,^{*,a} 澤田留美,^a 加藤幸夫,^{b,c} 辻 紘一郎,^b
 邵 金昌,^c 山田貴史,^a 加藤玲子,^a 土屋利江^a

The Effectivity of the Novel Serum-free Medium STK2 for Proliferating Human Mesenchymal Stem Cells

Itaru ISHIKAWA,^{*,a} Rumi SAWADA,^a Yukio KATO,^{b,c} Koichiro TSUJI,^b

Jinchang SHAO,^c Takashi YAMADA,^a Reiko KATO,^a and Toshie TSUCHIYA^a

^aDivision of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,

Tokyo 158-8501, Japan ^bGraduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3

Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan and ^cJST Innovation Plaza Hiroshima,

3-10-23 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan

(Received October 3, 2008; Accepted December 12, 2008; Published online January 23, 2009)

To apply human mesenchymal stem cells (hMSC) to regenerative medicines, it is necessary to multiply hMSC *in vitro* in a short period. In addition, it is desirable that the medium which is used for the hMSC multiplication is not supplemented with the serum, because the addition of the serum has risks of infection. In this study, we cultured hMSC with three kinds of medium used for multiplying hMSC (DMEM, MSCGM, STK2) and compared hMSC proliferation in each medium. As a result, it was confirmed that hMSC proliferation was significantly higher in STK2 medium which is a novel serum-free medium developed for hMSC multiplication. Moreover, we compared the hMSC proliferation in these media under the environment that assumed bone reproduction. When we cultured hMSC in each medium with hydroxyapatite (HAp), the proliferative inhibition by HAp depended on the additive amount, and the degree of the proliferative inhibition was different among the media but the lowest inhibitory effect was observed in STK2 medium.

Key words—mesenchymal stem cell; serum-free medium cell; proliferation; hydroxyapatite; stem cell culture

緒 言

ヒト間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cell; hMSC) は、骨、軟骨、脂肪、神経、肝臓等の細胞へ分化可能で、受精卵を使用する ES 細胞と比較して倫理面での問題点も少ないことから、細胞組織医療機器の材料として最も実用に近いものの 1 つである。しかし、生体内から得られる hMSC の数は限られるため、細胞組織医療機器へ応用するためには *in vitro* で hMSC を増殖培養する過程を経なければならない。その際、治療期間短縮及び低コスト化のためには、できるだけ短期間に必要な細胞数が得られることが望ましい。

従来、研究に用いる hMSC の培地には、細胞の増殖を良好にするためにウシ血清あるいは自家ヒト

血清が添加されることが一般的である。しかし、細胞組織医療機器の材料として hMSC を利用することを想定すると、血清の使用には問題点が多い。ウシ血清の使用は、感染リスク、すなわち、プリオンや病原性ウイルス等が存在する危険性がある。一方、ヒト血清を得るためには患者から比較的多量の血液を採取しなければならないため、患者に身体的負担を課すことになる。また、ウシ血清ではロットによって、ヒト血清では年齢や個体差によって良好な hMSC 増殖が得られない場合があるなど、必要な細胞数を安定的に得る上でも血清の使用は問題となる。このような問題点を回避するため、hMSC を増殖培養するための無血清培地についての研究・開発が行われている。^{1,2)}

このような背景から、本研究では、hMSC 増殖時の培地として使用されている 3 種の培地 (血清を添加して使用される培地 2 種と無血清培地 1 種) で hMSC を培養し、各培地における hMSC 増殖を比

^a国立医薬品食品衛生研究所療品部, ^b広島大学大学院医歯薬学総合研究科, ^cJST イノベーションプラザ広島
 *e-mail: itaru@nihs.go.jp

較した。

また、細胞組織医療機器への応用例として培養骨移植を想定し、ハイドロキシアパタイト (HAp) を添加したそれぞれの培地で hMSC を培養して細胞増殖を比較した。培養骨移植の手順としては、細胞の足場となる材料に hMSC を播種して培養し、骨芽細胞へ分化誘導して移植する方法が考えられる。HAp は、骨の無機成分と組成が近く、培養骨移植において足場として使用される代表的な材料の 1 つである。その一方、HAp は、たんぱく質や核酸など、多くの生体物質を吸着する性質が知られている。^{3,4)} また、イオン交換によってイオンの溶出が生じる性質がある。⁴⁾ そのため、HAp 存在下での培養では、吸着作用やイオン溶出による培地成分への影響が考えられる。このことから、HAp が hMSC の増殖に与える影響を培地間で比較することを目的としてこの実験を行った。

材料と方法

1. 細胞及び培地 ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) は Lonza Walkersville, Inc. (以下 Lonza 社) より購入した (Lot No. 5F0138)。

比較に用いた培地は以下の 3 つである。

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を添加した培地 (MSCBM, MCGS) ともに Lonza 社。以下 MSCGM と略記)

- 無血清培地 STK2 [DS ファーマバイオメディカル株]

DMEM 及び MSCGM は、10% のウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) を含む状態で使用した。DMEM には InterGen 社の FBS (Lot No. RB53110)、MSCGM には MCGS 付属の FBS を添加した。

2. 各培地における hMSC 増殖比較 hMSC は事前に DMEM (10% FBS) で培養していたものを、96 ウェルプレートに 2000 cells/100 μ l 培地 (約 6000 cells/cm²) で播種した。その際、hMSC を血清の入っていない DMEM で 3 度洗浄し、それぞれの培地へと懸濁した。そして、4 日間培養後に crystal violet 染色法^{5,6)} を行い、590 nm 波長における吸光度から細胞増殖を比較した ($n=8$)。各培地での hMSC 増殖の有意差を Tukey 検定により確認

した。

3. ハイドロキシアパタイト (HAp) 混合下での細胞増殖の比較 ハイドロキシアパタイト (HAp) 粉末を各培地 (DMEM, MSCGM, STK2) に混合し、HAp 粉末と hMSC とが直接接触する状態で培養して、細胞増殖を比較した。また、固形粉末が培養環境に加わることによる物理的ストレスの影響がない状態で HAp による培地組成の変化の影響のみを調べるために、HAp 混合培地の上澄みでも同様の細胞増殖比較を行った。

まず、上記の実験と同様に 96 ウェルプレートに hMSC を播種した。1 日間培養したのち、各ウェルの培地を、HAp 粉末を混合した各培地の懸濁液又はその上澄み 200 μ l と交換した。HAp は、共沈法により調製したもの⁷⁾ を使用した。HAp 添加培地は、HAp 添加後 1 日間インキュベータ内に置いたものを用いた。HAp 添加培地の上澄みは、HAp 懸濁培地を 600 G で 10 分間遠心して採取した。各培地に対する HAp の混合割合は 0, 0.1, 1, 10, 100 mg/ml とした ($n=4$)。培地交換後 4 日間培養し、TetraColor ONE [生化学バイオビジネス株] による検定を行った。波長 450 nm (対照波長: 630 nm) での吸光度から細胞数を比較した。コントロールとの統計的有意差を、Dunnett の多重比較検定により調べた。また、各濃度における培地間の比較を Tukey 検定によって行った。

結果及び考察

1. 各培地の hMSC 増殖比較 DMEM・MSCGM・STK2 のそれぞれの培地で hMSC を 4 日間培養し、crystal violet 染色法で吸光度測定を行った結果を Fig. 1 に示す。crystal violet 染色法は、crystal violet が核を染色する性質を利用して細胞数を定量化する方法であり、吸光度が細胞数に比例することが示されている。この結果では、STK2 培地で培養すると DMEM を用いた場合に対して 2 倍以上、MSCGM を用いた場合に対しては 1.5 倍以上細胞が多かった。Figure 2 は、各培地で培養 4 日目の hMSC の位相差顕微鏡像である。いずれの培地を用いた場合でも、本実験条件下では細胞の形態に大きな違いは観察されなかった。STK2 を開発した加藤らは、STK2 と DMEM で hMSC の培養を行い、35 日間の培養の結果、STK2 では DMEM に対

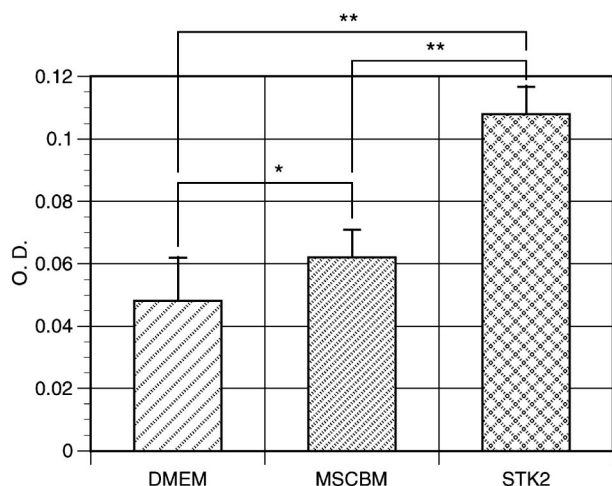


Fig. 1. Comparison of the hMSC Proliferation, Measured by Means of Crystal Violet Assay

The optical density was measured at a wavelength of 590 nm. Values are expressed as mean \pm S.D. (* p <0.05, ** p <0.01).

して 20 倍の細胞が得られたことを報告している。⁸⁾ 本研究でも、4 日間の培養で、STK2 での細胞増加度が DMEM や MSCGM と比較して有意に高いことが確認された。

2. ハイドロキシアパタイト (HAp) 存在下での細胞増殖の比較 各培地で HAp と hMSC とを直接接触させて培養した結果を Fig. 3 に、HAp 添加培地の上澄みで培養した結果を Fig. 4 に示す。両グラフの値は、TetraColor ONE 法での吸光度測定値である。TetraColor ONE は、成分である WST-8 が細胞内の脱水素酵素により還元された際に光の吸収波長が変化することを利用しており、一定環境下においては吸光度が細胞数に比例することが示されている。⁹⁾ ただし、このような原理に基づく検定では、検体の種類や濃度によって各細胞の脱水素酵素の活性に変化がある場合には生細胞数と一致しない可能性がある。¹⁰⁾ 本研究では、TetraColor ONE 法を生細胞数の定量に用いたが、得られた値は各細胞の活動量をも含めた影響を反映していると考えられる。

Figure 3 より、HAp 粉末と hMSC を直接接触させた培養では、10 mg/ml を超える混合量では、すべての培地で顕著な細胞増殖の低下が認められた。一方、1 mg/ml 以下の添加では、DMEM 及び MSCGM の細胞増殖は、HAp 添加量に依存して阻害された。しかし、STK2 での培養では、同条件下で増殖阻害が認められなかった。HAp による増殖

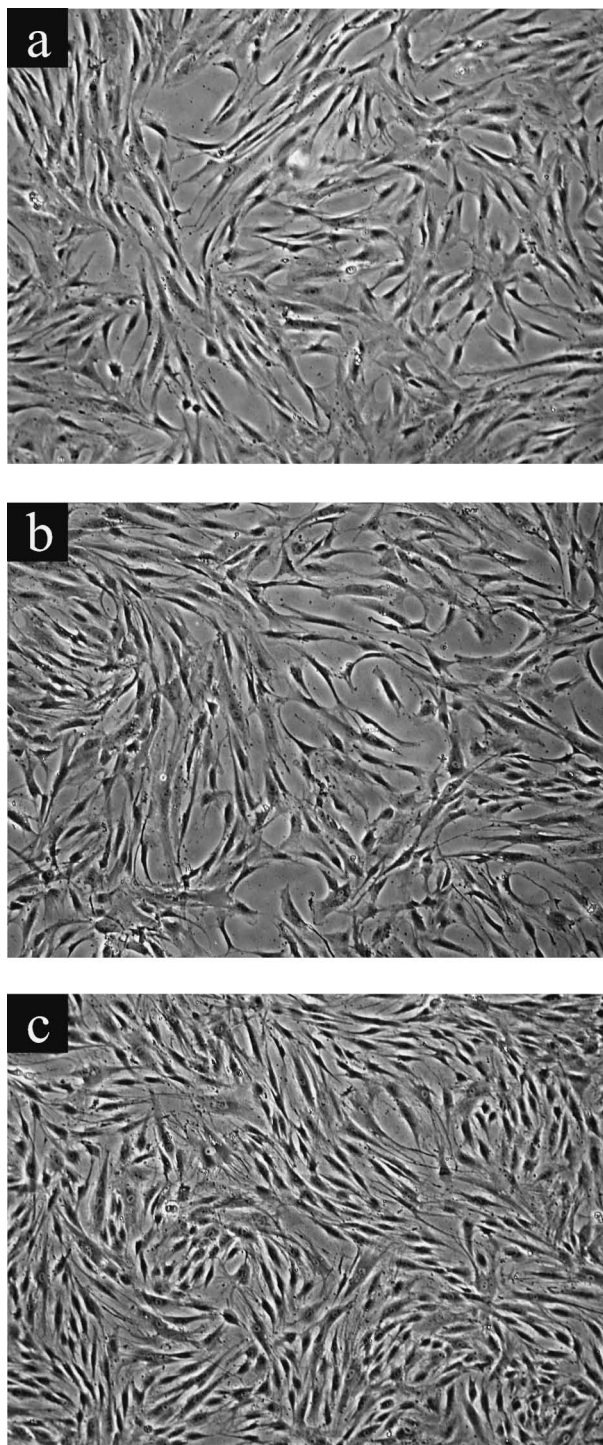


Fig. 2. Phase Difference Images of hMSC Cultured in Each Medium

(a): DMEM, (b): MSCGM, (c): STK2.

阻害は、HAp への細胞増殖因子等の吸着や HAp からのイオン溶出による培地組成の変化が要因として考えられる。

HAp 混合培地の上澄みによる培養結果でも、10 mg/ml 以上の添加量では各培地で hMSC の増殖が

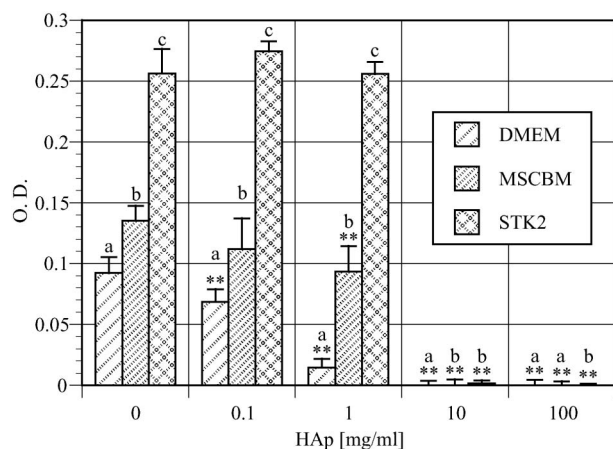


Fig. 3 Cell Proliferation/Viability Comparison (hMSC and HAp are Directly-contacted) in the TetraColor ONE Assay

The optical density was measured at a wavelength of 450 nm with a reference wavelength of 630 nm. Data were expressed as mean \pm S.D. The significance of differences for the control was analyzed by Dunnett's multiple-comparison test (* p <0.05, ** p <0.01). The significance of differences between the media in each concentration was analyzed by Tukey's test (a, b, c: different letters are p <0.05).

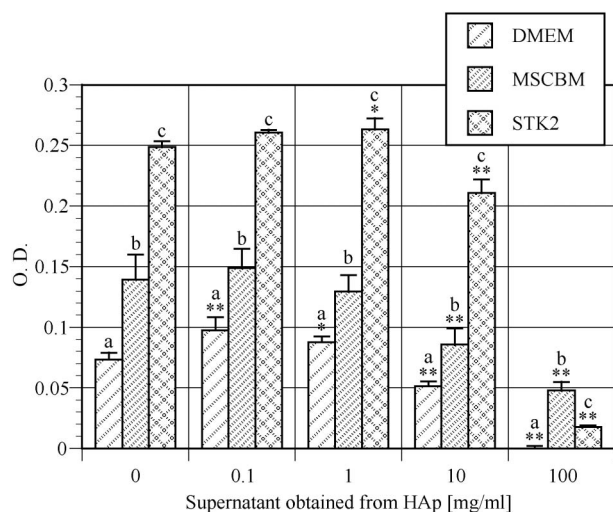


Fig. 4 Cell Proliferation/viability Comparison (hMSC was Cultured by Supernatant Solution Obtained from HAp) in the TetraColor ONE Assay

The optical density was measured at a wavelength of 450 nm with a reference wavelength of 630 nm. Data were expressed as mean \pm S.D. The significance of differences for the control was analyzed by Dunnett's multiple-comparison test (* p <0.05, ** p <0.01). The significance of differences between the media in each concentration was analyzed by Tukey's test (a, b, c: different letters are p <0.05).

阻害された (Fig. 4). 一方, 1 mg/ml 以下の添加量では増殖阻害が認められず, 直接接触培養の場合と比べると全体として増殖阻害作用が小さい傾向に

あった. これは, HAp 粉末から溶出する過剰イオンの程度が上澄みでは少ないので細胞毒性が低いことや, 上澄みでの培養では培養中に培地成分がさらに吸着されて失われることがないためであると考えられる. 10 mg/ml 以下の添加量においては, STK2 での細胞増殖は, DMEM・MSCGM を上回る結果だった.

結 論

今回の結果より, 短期間に必要な細胞数を得る上で, 比較した培地の中では STK2 の利用は有効であると考えられる. また, 無血清であるため, 血清の添加に伴う感染やロット差といった問題が生じない点でも大きな利点である. ただし, 無血清の STK2 培地の安全性については検討が必要であろう. また, STK2 は HAp の添加による増殖阻害作用の影響が少なかった. このことから HAp を足場とする培養骨の作成においても細胞増殖の面で有効性があると考えられる.

REFERENCES

- 1) Mannello F., Tonti G. A., *Stem Cells*, **25**, 1603–1609 (2007).
- 2) Liu C.-H., Wu M.-L., Hwang S.-M., *Biochem. Eng. J.*, **33**, 1–9 (2007).
- 3) Ozeki K., Aoki H., Fukui Y., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **19**, 1753–1757 (2008).
- 4) Shimabayashi S., *Gypsum & Lime*, **243**, 99–107 (1993).
- 5) Saotome K., Morita H., Umeda M., *Toxic. in Vitro*, **3**, 317–321 (1989).
- 6) Banu N., Tsuchiya T., Sawada R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **77A**, 84–89 (2006).
- 7) Tamai M., Nakaoka R., Isama K., Tsuchiya T., *Key Eng. Mater.*, **309–311**, 97–100 (2006).
- 8) Kato Y., the 5th Medical Devices Forum, Tokyo, 2007.
- 9) Ishiyama M., Miyazano Y., Sasamoto K., Ohkura Y., Ueno K., *Talanta*, **44**, 1299–1305 (1997).
- 10) Nakaoka R., Tsuchiya T., *Mater. Trans.*, **43**, 3122–3127 (2002).