

マイオリッジが開発する MSC培地のアプリケーション



2種類のマイオリッジ開発MSC培地による間葉系幹細胞の増殖および分化能の検討

実験方法

細胞株 : 脂肪由来間葉系幹細胞 (以下MSC) 及び骨髄由来MSC

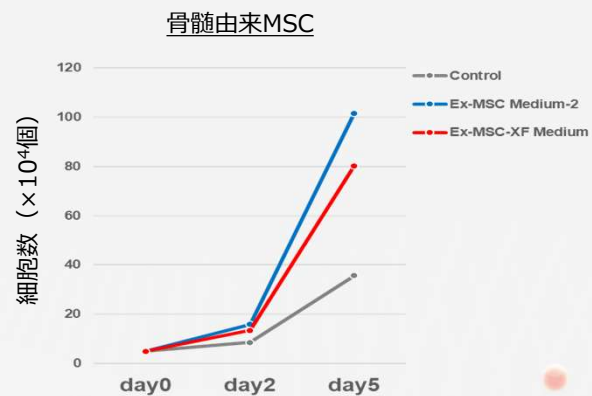
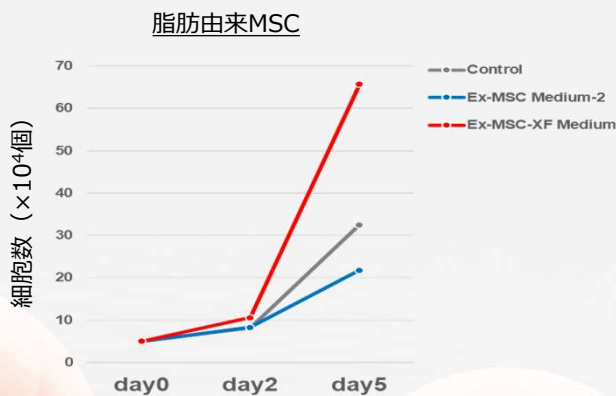
培地 : 10%FBS-αMEM、Ex-MSC XF Medium (Cat.# ME-09H00152)、Ex-MSC Medium-2 (Cat.#ME-09B00252)
Ex-MSC Medium-2はマイオリッジが開発した無血清MSC用培地である。これをベースにゼノフリー化した培地がEx-MSC XF Mediumである。

方法 : 脂肪又は骨髄由来MSCを各培地で 5×10^4 cells/wellとなるように播種し、低酸素環境 (5%O₂、5%CO₂)で培養を開始した (Day 0)。1回以上継代後のDay 5まで培養し、継代時及びDay 5に細胞数をカウントした。また、Ex-MSC XF Medium及びEx-MSC Medium-2で培養したDay 5のMSCをサンプリングし、各種表面マーカー (CD29、CD73、CD90、CD105) 発現をフローサイトメーターで解析した。更にDay 5まで培養した骨髄由来MSCを用いて脂肪および骨への分化誘導を行った後、Oil Red-O染色で脂肪分化能、及びアリザリンレッド染色で骨分化能を評価した。

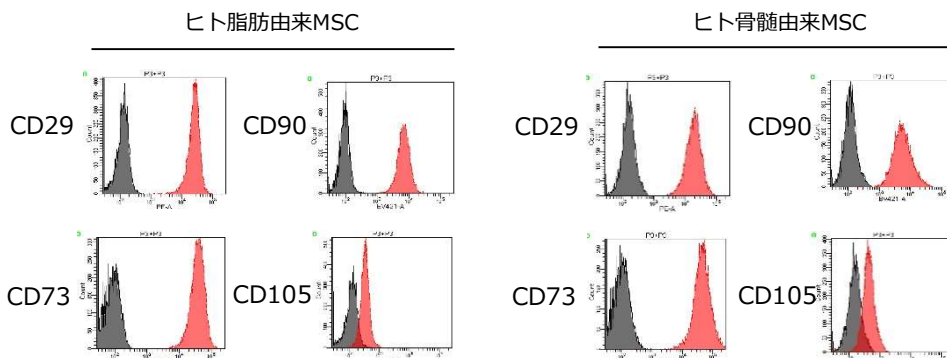
結果

■異なる組織由来MSCにおける細胞増殖の違い

脂肪由来MSCについて、Ex-MSC XF Mediumは、Day 2からDay 5にかけてControlの10%FBS-αMEMと比較し、顕著に高い増殖性を示した。Ex-MSC Medium-2はControlよりも増殖速度が低くなった。細胞形状の変化や増殖停止、種類の異なる細胞の選択的増殖 (コンタミ促進) などは認められず、各細胞の培地適合性についてはドナーごとに検討することが望ましいと考えられた。



■Ex-MSC-XF Mediumで培養した脂肪及び骨髄由来MSCにおけるMSC陽性マーカー発現



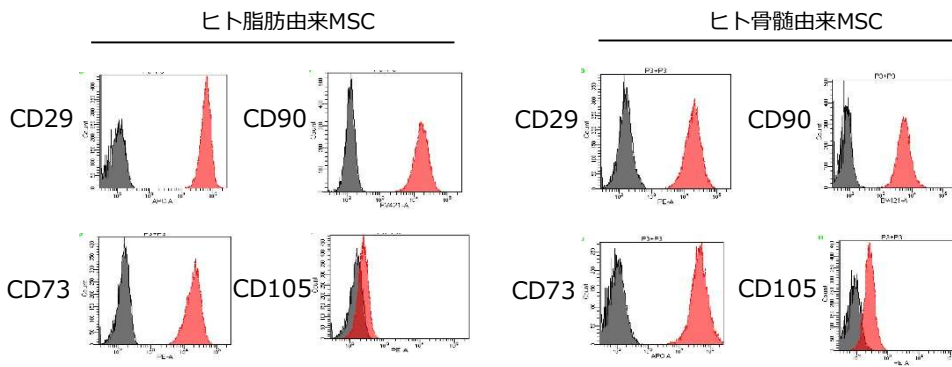
Ex-MSC-XF Mediumで培養した脂肪及び骨髄由来MSCにおける各種MSC陽性マーカーは何れも発現が認められた。

■ コントロール
二次抗体のみで染色 (アイソタイプ)
■ 各ターゲット
各ターゲットの抗体+二次抗体で染色



マイオリッジが開発する MSC培地のアプリケーション

■ Ex-MSC Medium-2で培養した異なる組織由来MSCにおけるMSC陽性マーカー発現



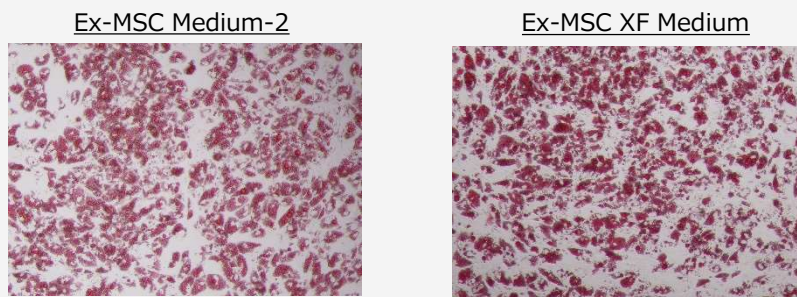
Ex-MSC Medium-2で培養した脂肪あるいは骨髄MSCにおける各種MSC陽性マーカーは何れも発現が認められた。

■ コントロール
二次抗体のみで染色 (アイソタイプ)
■ 各ターゲット
各ターゲットの抗体+二次抗体で染色

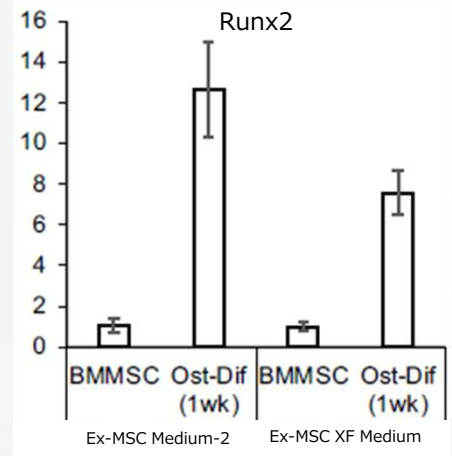
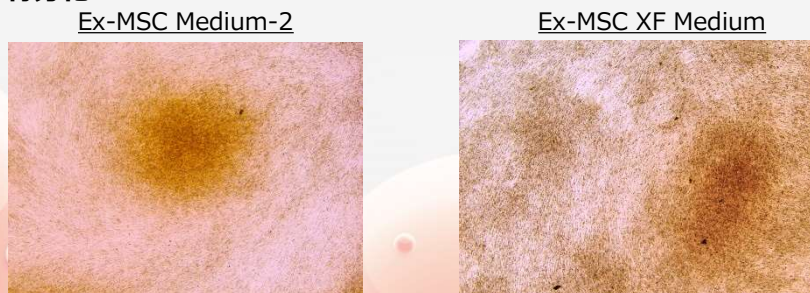
■ Ex-MSC XF Medium及びEx-MSC Medium-2で培養した骨髄由来MSCの脂肪及び骨分化

骨髄由来MSCについて、脂肪及び骨への分化能を検討した結果、何れの培地においてもそれぞれの細胞への分化が認められた。また、骨分化マーカー遺伝子であるRunx2の発現上昇が骨分化誘導開始後1週間で認められた。

脂肪分化



骨分化



まとめ

Ex-MSC XF Mediumは脂肪及び骨髄由来MSCの増殖性及びMSC陽性マーカー発現において良好な結果を示した。一方、Ex-MSC Medium-2は骨髄由来MSCでは良好な結果を示したものの、脂肪由来MSCに対しては、増殖性及びCD105の発現が低下した。脂肪及び骨への分化能はどちらの培地共に有することが確認できた。

以上の結果から、Ex-MSC Medium-2とそれをベースに開発したEx-MSC XF Mediumとは、細胞株間で異なる挙動を示すことが分かり、最良の結果を得るためには研究目的に応じた条件設定の実施が望ましいことが示唆された。

研究者からのコメント

MSCは基礎研究だけでなく臨床でも広く使われている細胞です。組織からのMSCの樹立や維持培養は容易ですが、培養環境や血清のロット変化によりストレスを蓄積し細胞老化、変質を起こしやすい細胞でもあります。また、培養条件の違いにより、偏った特性の細胞が増えてしまうという問題も知られています。無血清系は安定したMSC培養を行う上で有効な培養方法です。Ex-MSC Medium-2、Ex-MSC XFでは、複数回継代後も形態の変化、増殖力の低下を引き起こすことなく、安定的なMSCの培養を行うことができました。