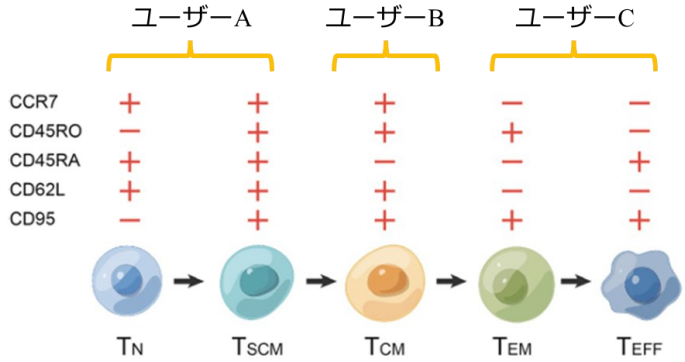
当社T細胞用培地の基本コンセプト

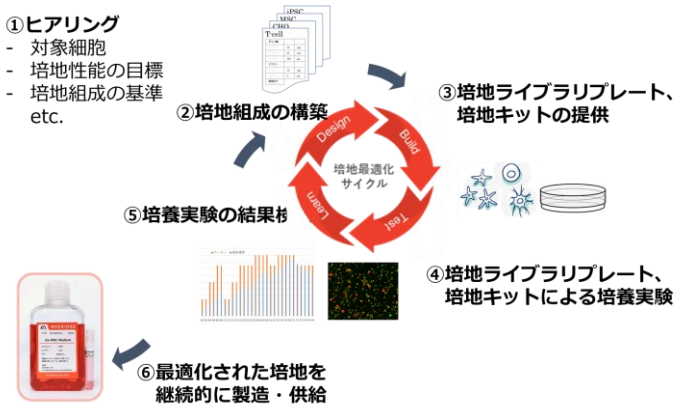
Myoridge
Application No.8

背景、コンセプト1

【T細胞分化イメージ】



細胞培養培地は基礎検討から臨床開発において単一種類の培地（ex: 市販培地）が使用されていることが多く、特にプライマリー細胞検討において各細胞が有する性能を十分に発揮できていない状況が多いと考えられる。例えば、培養後に未分化維持、中程度分化、あるいはエフェクター段階のT細胞集団を最終産物として検討することが想定されるが（ユーザーA/B/C)、単一種類培地ではそれらに対応することは困難である。

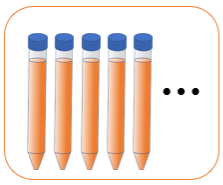


当社は上記課題を解決するために、左記の培地最適化サイクルを回すことで、各ユーザーが求めるT細胞培地を提供する。当社T細胞培地は基本は無血清あるいはゼノフリーであるが、ユーザー要望により変更も可能である。

https://doi.org/10.1186/s40364-022-00434-9

背景、コンセプト2

基礎培地ライブラリ



MEM,
DMEM
RPMI1640
F10,
F12・・・

×

サプリメント

タンパク質ライブラリ

EGF, FGF, VEGF,
IL-2, IL-6・・・
CSF, TNF, HGF,
TGF, BMP,
CCL・・・

×

低分子ライブラリ

プロテアーゼ阻害剤
キナーゼ阻害剤
ROCK阻害剤
シグナル阻害剤
・・・

→ ユーザーに応じ最適化

培地は基礎培地とサプリメントから構成されるが、各サプリメントの性能を最大限発揮させるには、最適な基礎培地が必要となる。T細胞培養の場合はRPMI1640が汎用されるが、当社の検討からはRPMI1640ではない基礎培地のほうが各種サプリメント性能が亢進する組合せも見出されている。

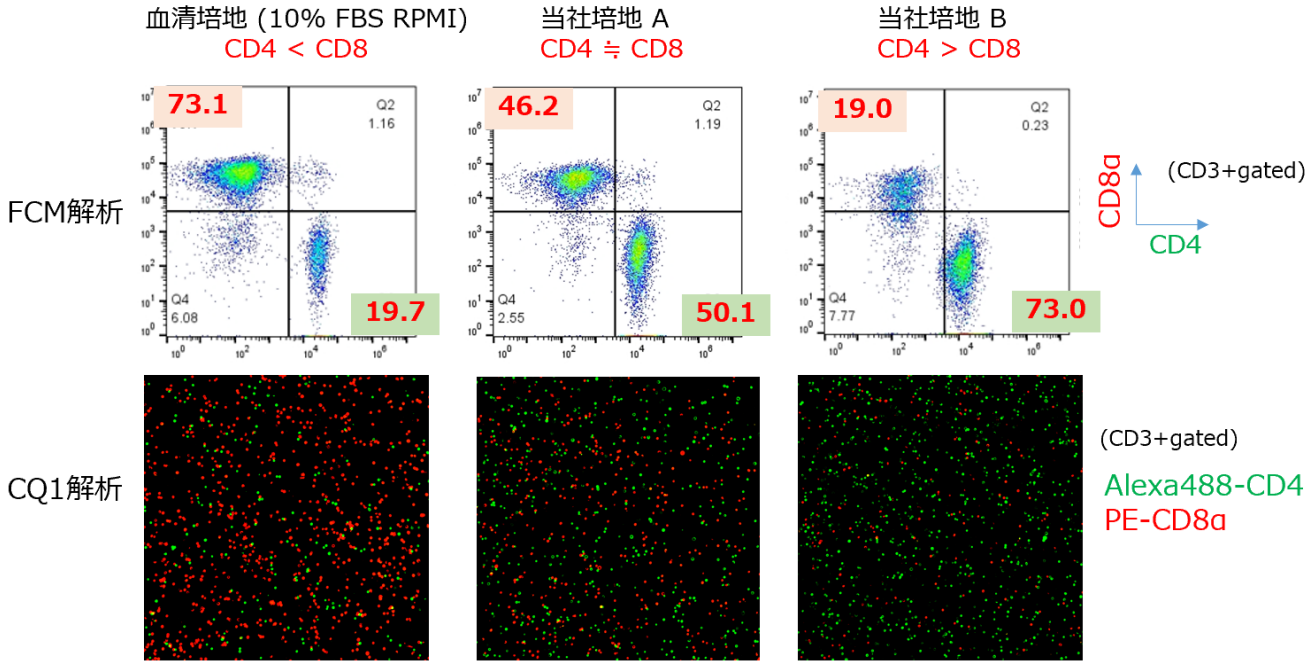
当社T細胞用培地による細胞表現型のコントロール例（CD4/CD8比、当社内検討）

Myoridge
Application No.8

方法・結果1

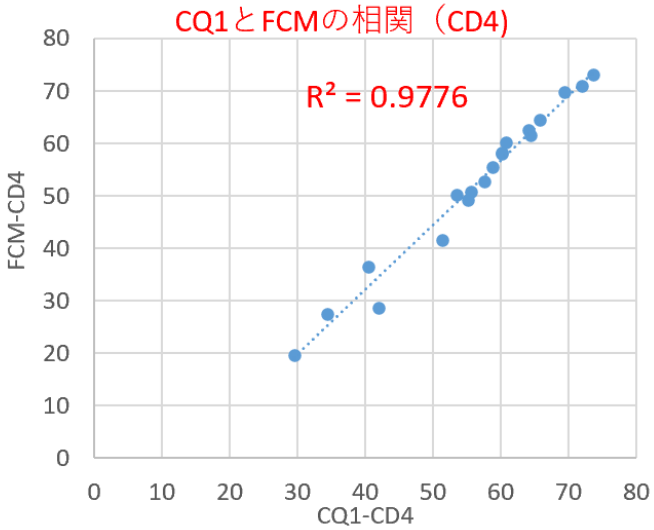
(手法) 1 × 10^6 PBMCsをOKT3/IL-2 (10ng/ml)で10日間培養。その後、CD4/CD8比をFCM、あるいはCQ1(横河電機製）で測定した。

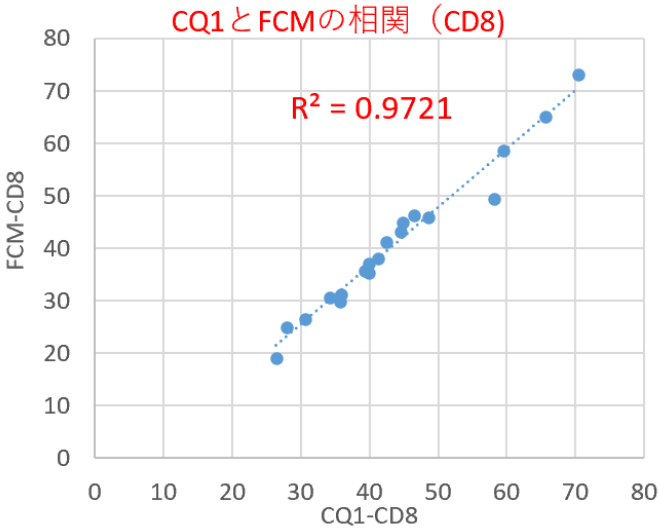
(結果) ・同一PBMC及び同一刺激を実施した場合でも、CD4/CD8比は各培地により変化した。
・増殖倍率はコントロール培地（10% FBS RPMI)と当社培地 A, Bで同程度であった。



(手法) 20種の異なる培地で上記PBMCをOKT3/IL-2 (10ng/ml)で10日間培養。その後、CD4/CD8比をFCM、あるいはCQ1で測定した。

(結果) CD4/CD8比はFCMとCQ1解析で高い相関を示した。FCMは必要細胞数が1 x 10^5程度なのに対しCQ1は使用サンプル数が1 x 10^3程度で実施可能であることから、各PBMC検体の小スケールでのスクリーニング解析に適していることが示唆された。





当社T細胞用培地による細胞表現型のコントロール例（CAR-T細胞誘導、外部機関検討）

Myoridge
Application No.8

方法・結果2 (CAR-T細胞誘導、AGC株式会社様)

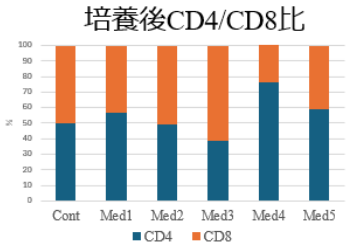
(背景) 三菱ケミカル株式会社と当社は、T細胞用培地の共同開発を進めている。その検討において、24well/6wellの小スケール中のT細胞培養に関し、IL-2濃度依存的な増殖性を示し幼若性を示す候補培地が出現した。これら結果を基にAGC株式会社（以下「AGC」）が実施しているCAR-T細胞の誘導系に複数培地を提供し、評価を実施した。

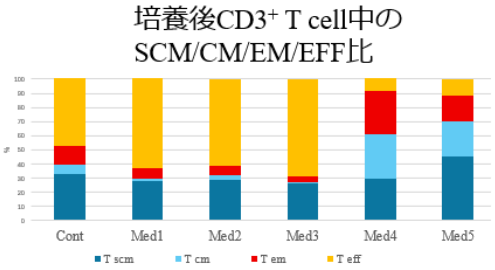
(手法) 過去にAGC内で実績のあるPBMCを使用し、所定プロトコールに従いCAR-Tを誘導する際にContに加え当社培地Aに類するMed1-5を使用し、増殖性・CAR陽性率・FCM解析を実施した。

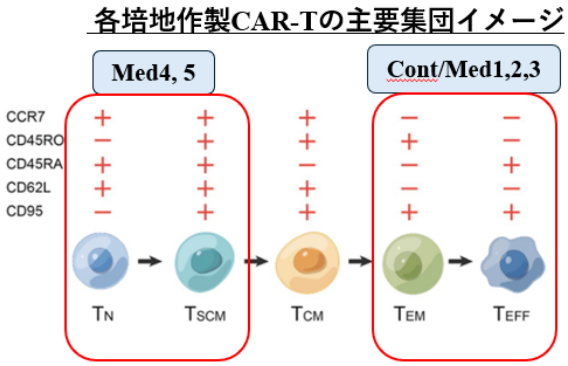
(結果) Cont培地と比較し、増殖性の点ではMed1-5の中でMed1が最も優れ、表面抗原パターンはCont培地と同様にCM/EFF優位となった。一方、Med4, 5はSCM/CM集団が多く検出され、とりわけMed5は増殖性はCont培地と同等であった。

(まとめ) 6種培地はCont/Med1-3, Med4-5に大別され、増殖性、幼若性の点において最も優れているのはMed5となった。一方、Med1は増殖性及び短期間での抗腫瘍効果が期待できる結果となった。

	Cont	Med1	Med2	Med3	Med4	Med5
基礎培地	AGC調達	A	B	C	B	B
サプリメント	AGC調達	D	D	D	E	F
総細胞増殖率 (%)	640	789	572	519	537	641
CAR陽性率 (%)	28	10	15	12	18	22







（AGC株式会社　お問い合わせ先）
URL: https://www.agc.com/contact/index.html#product5

まとめ

培地の組成を最適化することにより各ユーザーが求めるフェノタイプを誘導できることが示唆された。本検討は健常人検体を使用したものであり、今後は増殖不良検体など条件が不利な場合でも同様のフェノタイプ制御が可能か検討する予定である。