

エクソソーム研究用培地に関する取り組み

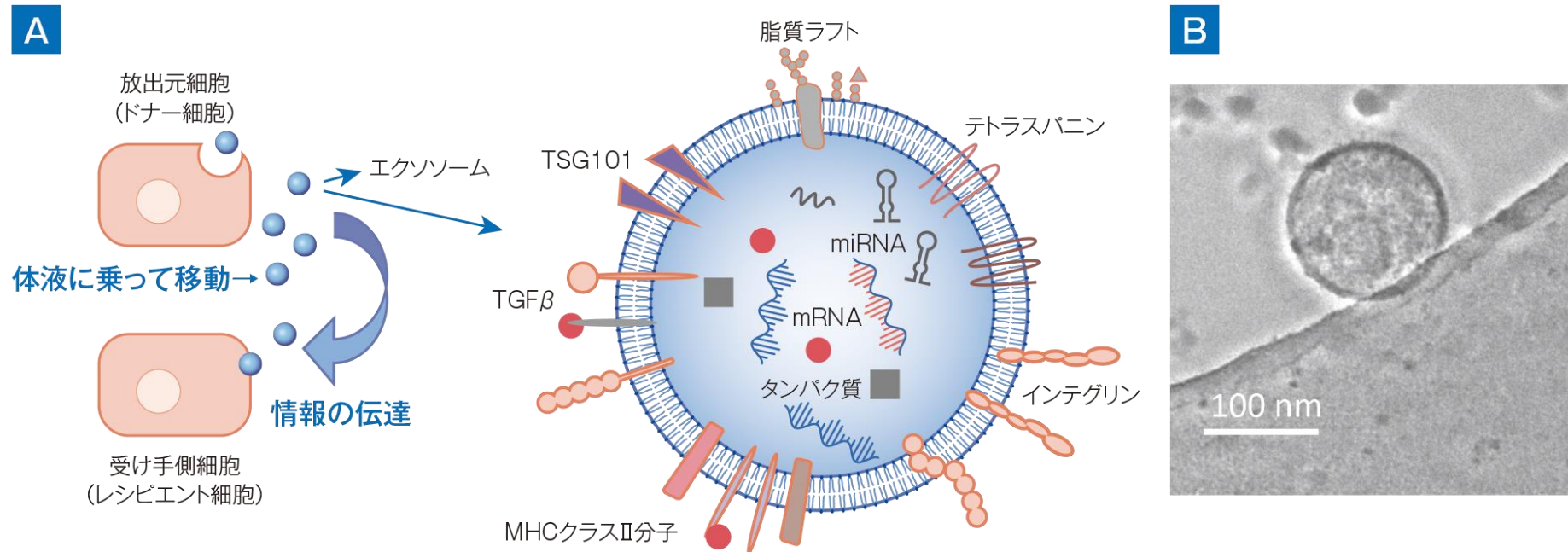
2024年5月23日

島津ダイアグノスティクス株式会社

CC営業部

背景

- エクソソーム（または、Extracellular Vesicle : EV）とは
 - 細胞が分泌する粒径が50～200 nmの小胞
 - タンパク質や、miRNAなどが含まれており、細胞間の情報伝達に使用されている
 - 診断や医薬品への応用研究が世界中で行われている

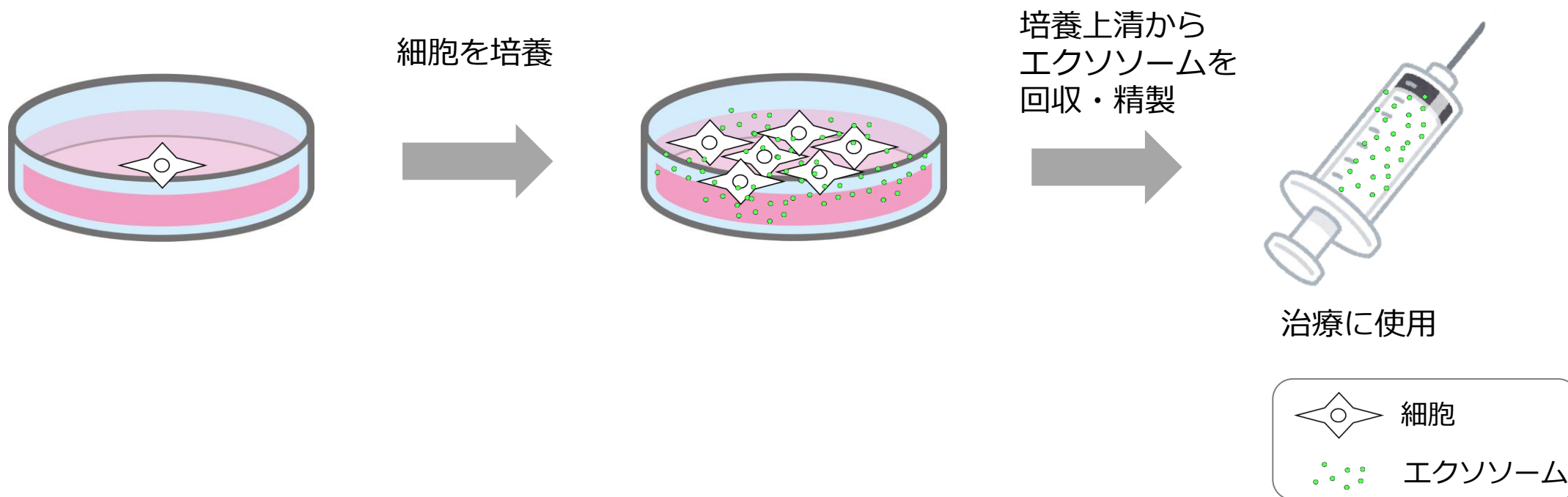


ベックマン・コールター社WEBページより転載

背景

- エクソソームを用いた医薬品

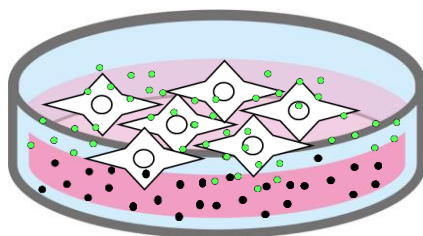
- 細胞ではなく、エクソソームを人体に投与し、各種疾患を治療する
- 免疫原性が低いため、細胞を用いた再生医療と比べ安全性が高い、他家細胞が使用できる、などのメリットがあるとされている
- 樹状細胞、間葉系幹細胞（MSC）などに由来するエクソソームが注目されている



エクソソーム産生に用いられる培地の課題

- あるユーザーのニーズ

- 市販の培地には大量の微粒子（エクソソームと同じ粒子径）が混入している。エクソソームを精製しても、これらを除くことができない。これらが何らかのトラブルの原因になる可能性がある
- 微粒子の混入が少ない培地があると良い



限外ろ過などでエクソソーム精製



培地由来の微粒子が混入

- 何らかのトラブルの原因となる可能性



細胞



エクソソーム



培地に混入している微粒子

**MSC由来エクソソーム産生用培地：
MSH-EV**

MSC由来エクソソーム産生用培地：MSH-EV

エクソソーム産生用培地 MSH-EV-BM/Supplement A

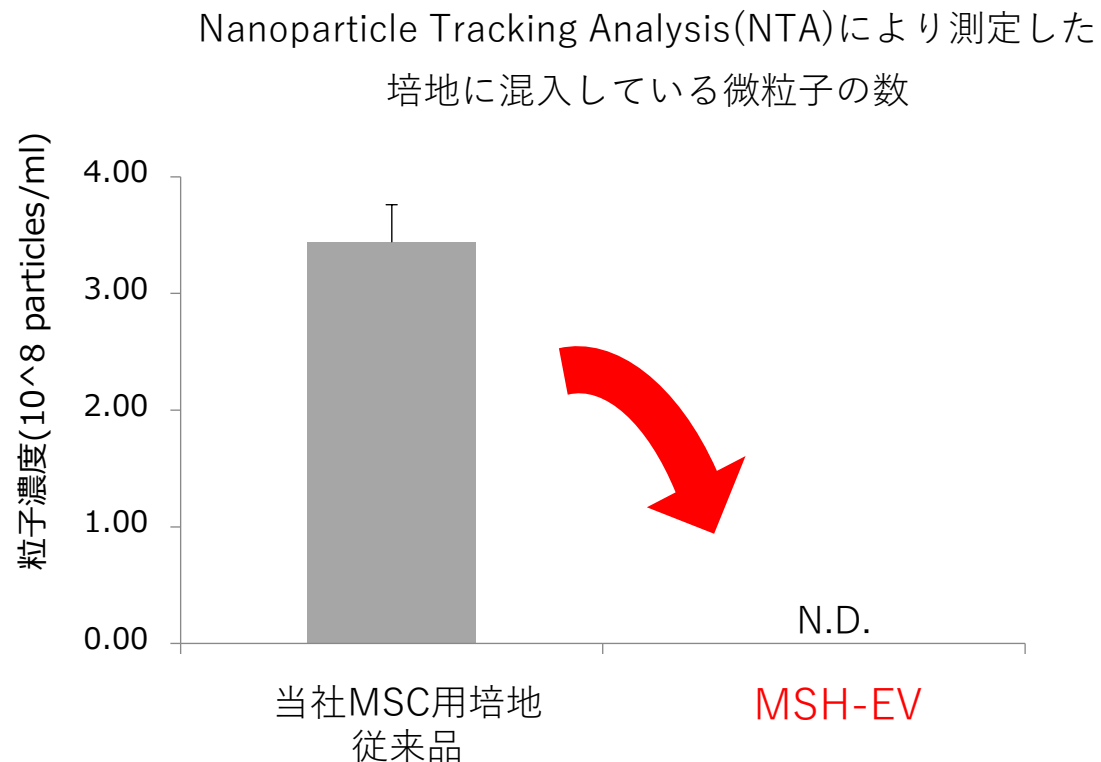
MSH-EVはヒト間葉系幹細胞(MSC)のエクソソーム産生用完全合成培地です。

- 微粒子の混入が少ないため*、超遠心や限外ろ過によるエクソソーム精製時に培地由来の粒子の混入を抑えることができます。
*Nanoparticle Tracking Analysisによる検出限界以下(機種：NanoSight)
- 同一の培地で拡大培養から、エクソソーム産生まで対応可能です。



MSH-EV : 培地中の微粒子混入量

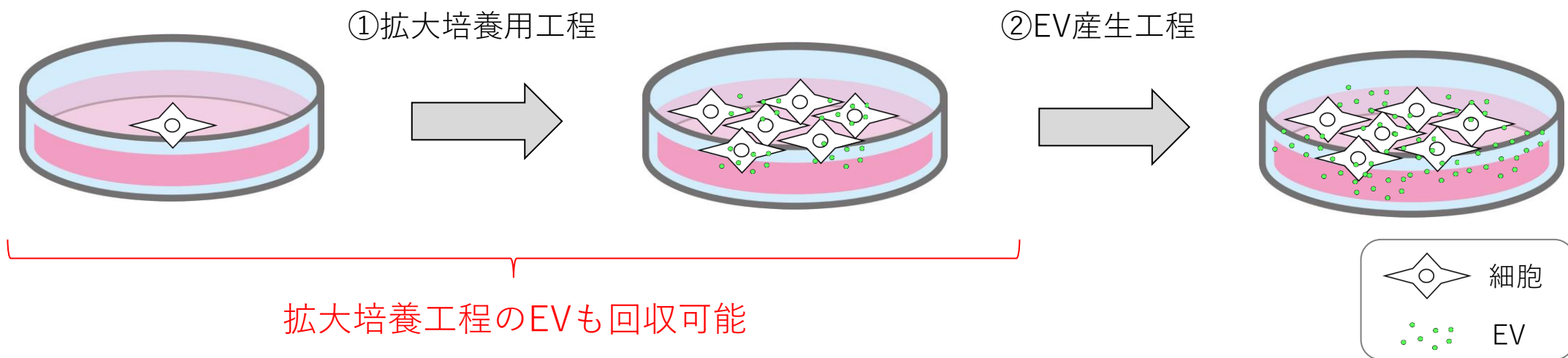
- MSH-EVは、当社MSC用培地従来品より微粒子の混入が少ない
 - エクソソーム精製時に培地由来の微粒子の混入を抑えることができる



MSH-EVのご紹介

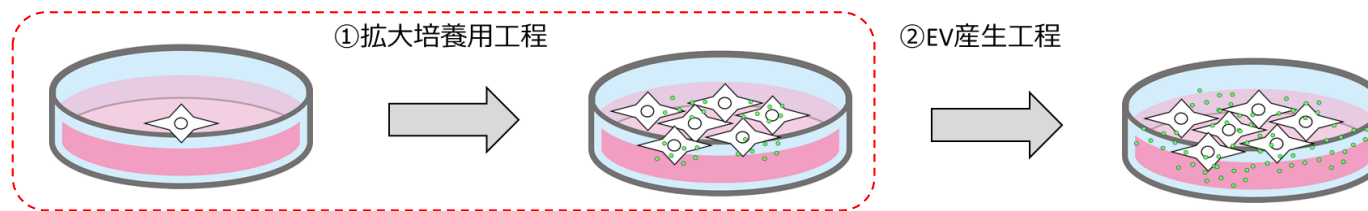
- 特長

- 培地由来の粒子が少ないため、**拡大培養工程の培養上清からもEVを回収できる**



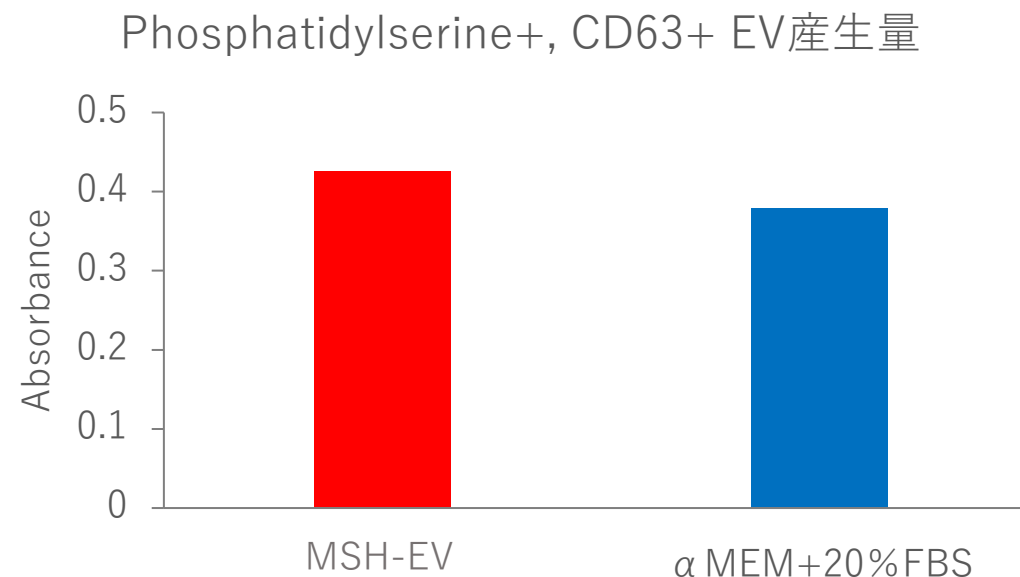
MSH-EVのhMSC-EV産生支持能の評価

- MSH-EVの**拡大培養工程**での使用例



試験方法

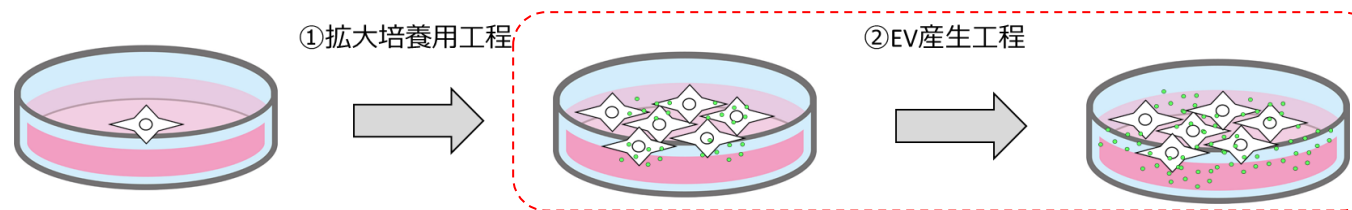
- hAd-MSCを解凍し、6-well plate上で異なる2種類の拡大培養用培地で5日間培養した
- 細胞をPBSで3回洗浄し、他社エクソソーム回収用培地に交換し、さらに2日間培養した
- 上清中のEV量をELISAにより測定した（測定キット：PS Capture Exosome ELISA kit）



MSH-EVで拡大培養したMSCから、αMEM+20%FBSで培養したものと同程度のEVが得られた

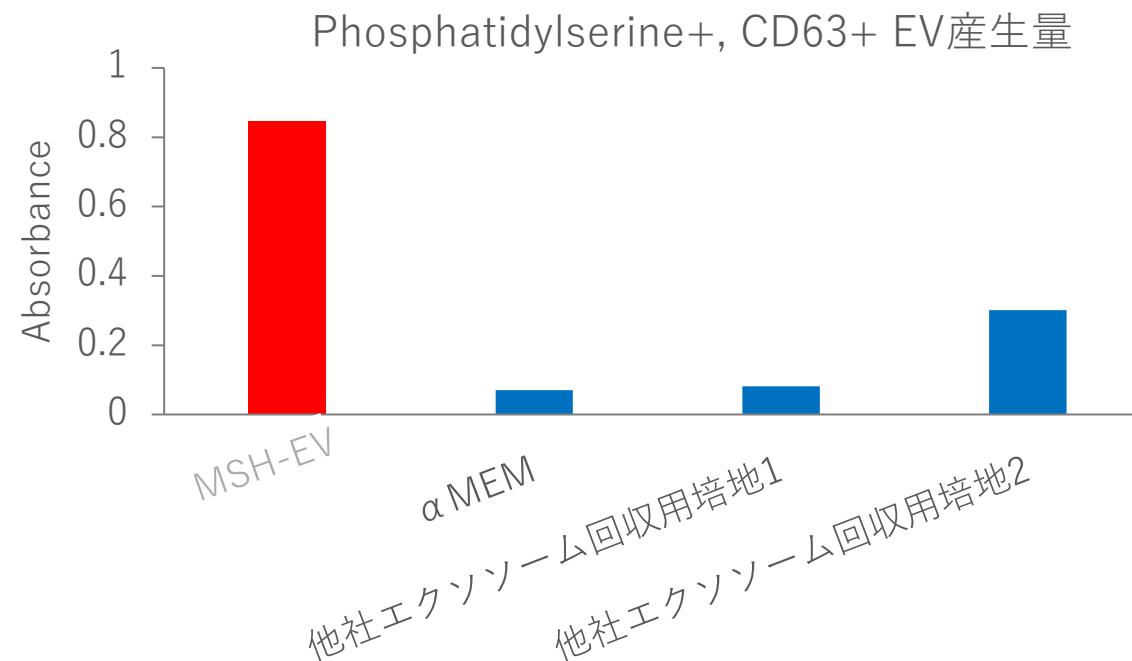
MSH-EVのhMSC-EV産生支持能の評価

- MSH-EVのEV産生工程での使用例



試験方法

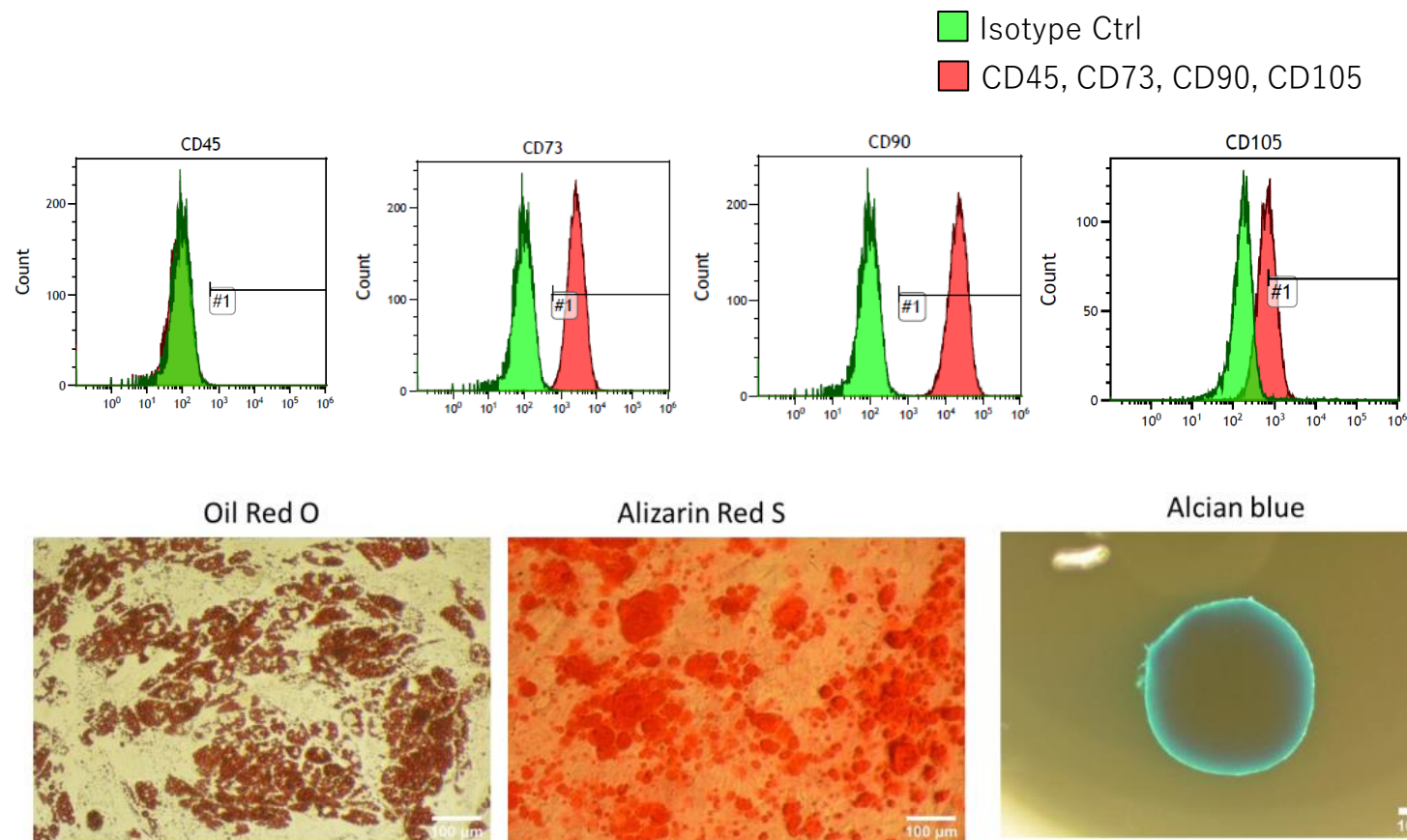
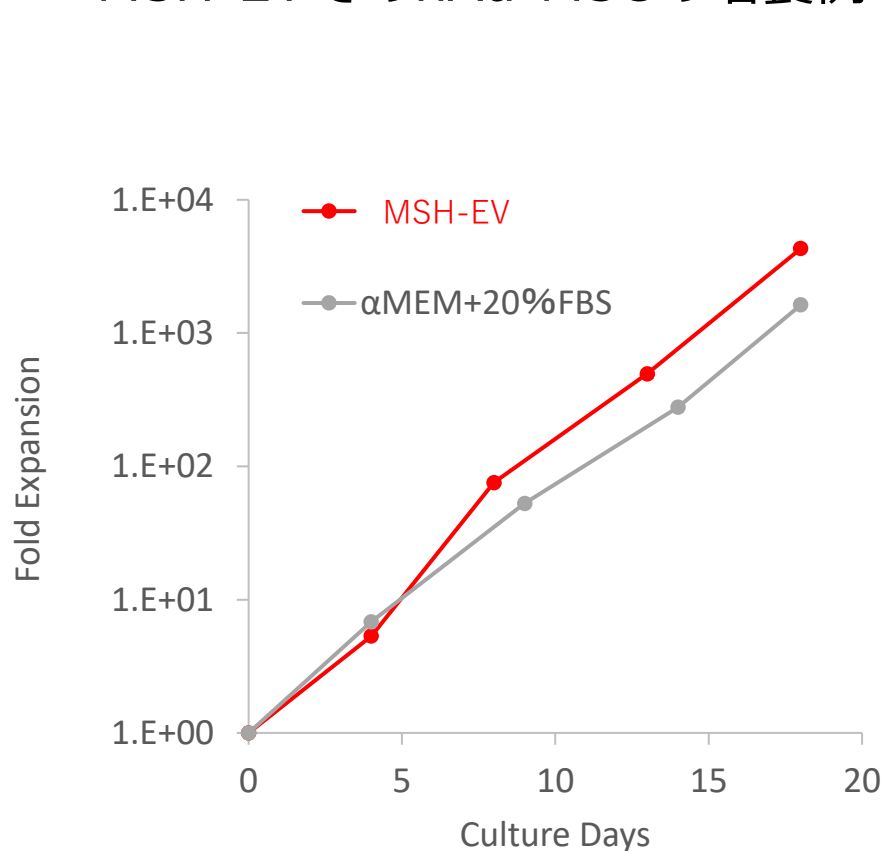
- hAd-MSCを解凍し、6-well plate上でMSH-EVで5日間培養した
- 細胞をPBSで3回洗浄し、異なる4種類のEV回収用培地に交換し、さらに2日間培養した
- 上清中のEV量をELISAにより測定した（測定キット：PS Capture Exosome ELISA kit）



MSH-EVでは、古典培地、他社EV回収用培地よりも、多くのEVが産生された

MSH-EV : MSCの増殖・マーカー発現

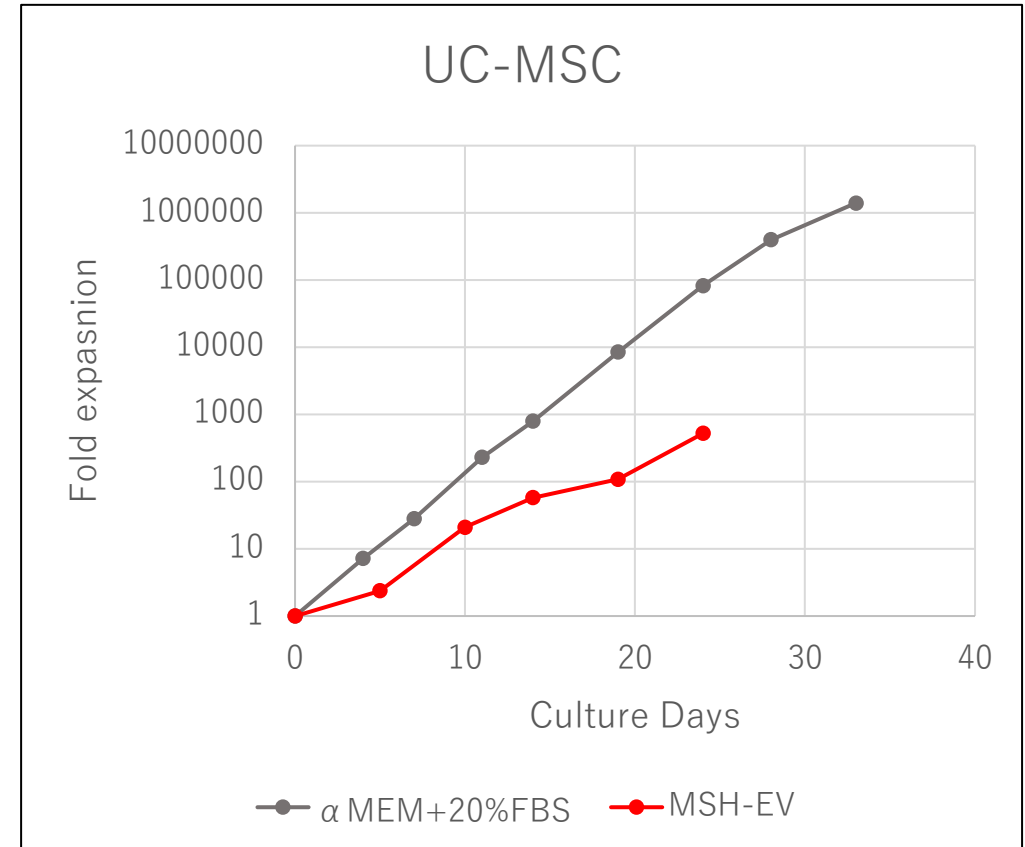
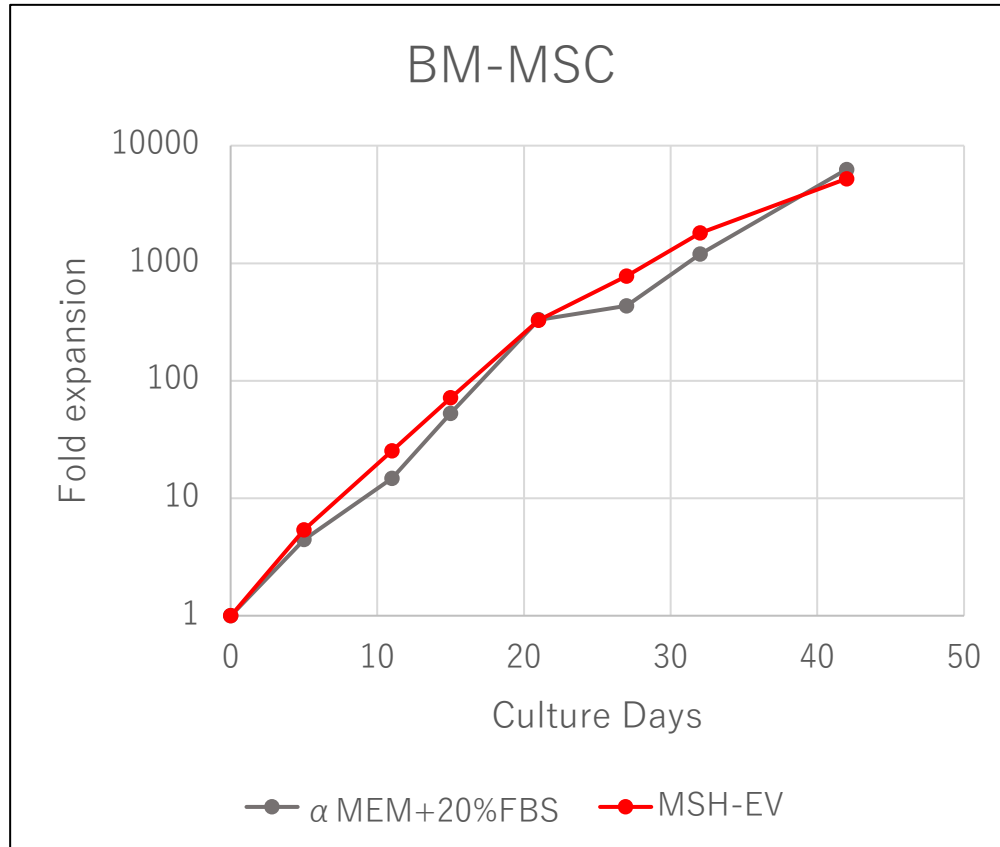
- MSH-EVでのhAd-MSCの培養例



MSH-EVは、血清含有αMEMと同程度の増殖支持能を示した

MSH-EVで約1か月間培養したhAd-MSCは、MSCマーカーを発現しており、脂肪、骨芽、軟骨細胞への分化能を有していた

MSH-EVの増殖データ



ヒト骨髄由来幹細胞ではMSH-EVは古典培地+20%FBSと同程度の増殖傾向を示したが、ヒト臍帯由来幹細胞では古典培地+20%FBSの方が増殖が良好であった
→UC-MSCでは拡大培養工程にはMSH培地を用い、EV産生工程でMSH-EVを使用することを推奨する

まとめ

- MSH-EV
 - 培地由来粒子が少なく、EV産生・回収に適したhMSC用完全合成培地
 - 他社培地や古典培地より高いEV産生量
 - 拡大培養工程・EV産生工程の両方で使用可能
 - カスタマイズにより、hMSCの大量・長期間培養も可能

気道上皮細胞由来エクソソーム産生用培地： AEC-J1

開発の経緯

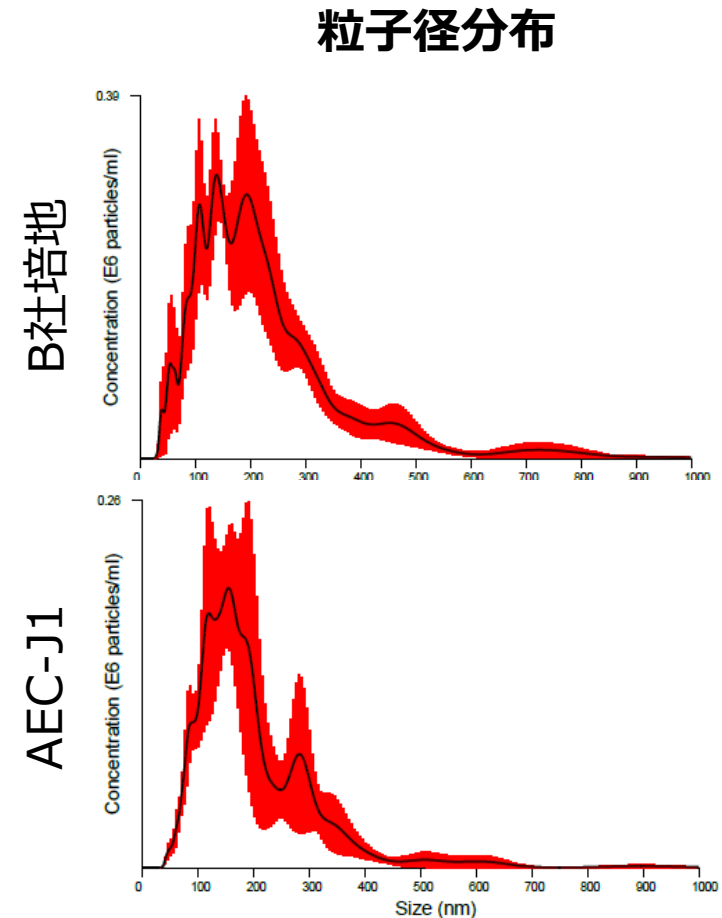
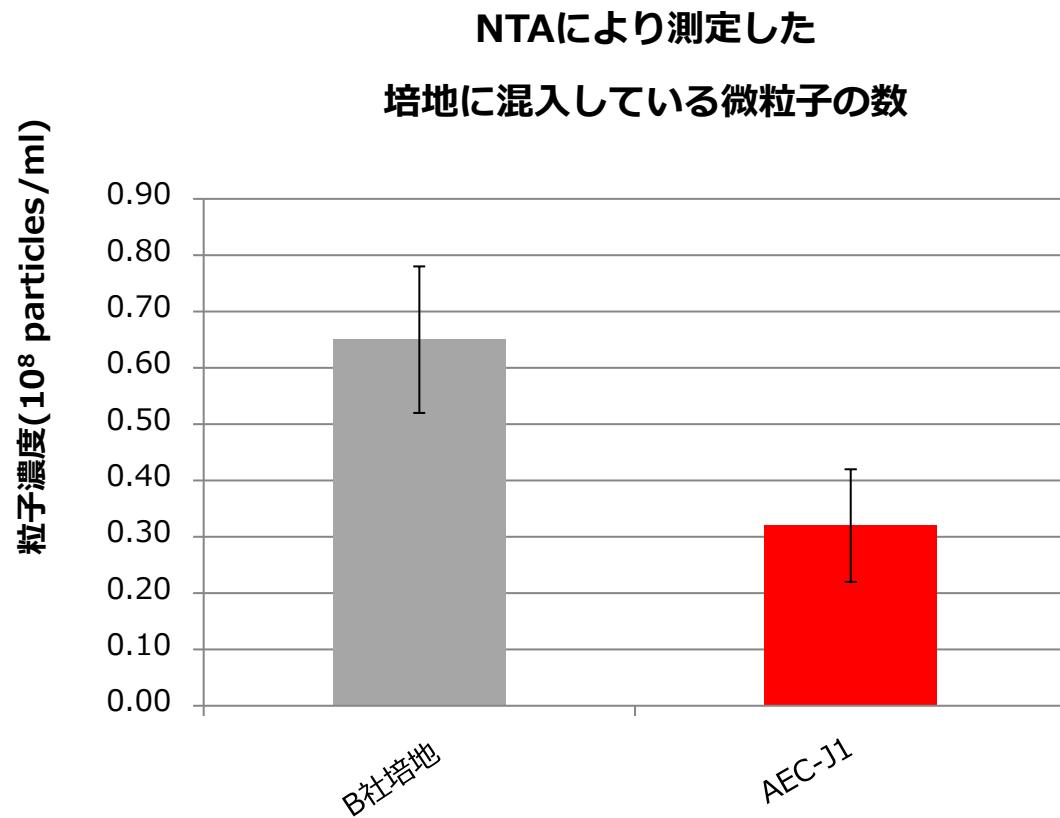
- 東京慈恵会医科大学、総合医科学研究センター次世代創薬研究部、藤田雄先生が**気道上皮細胞由来エクソソーム**を用いた肺疾患の治療を検討していた
- 以下の要件を満たし、臨床用途に使用できる培地が必要であった
 - 動物由来成分不含
 - 微粒子の混入が少ないもの
 - 市販の気道上皮細胞用培地（A社培地、B社培地）と同等の性能
 - ✓ 細胞が同程度増殖し、老化しない
 - ✓ 産生されるエクソソームの量・質が同等
- 上記の要望に基づき、気道上皮細胞用培地**AEC-J1（動物由来成分不含）**を開発した

市販の気道上皮細胞用培地の課題

	A社培地	B社培地
動物由来成分	含有	不含
組成情報の提供	-	不可

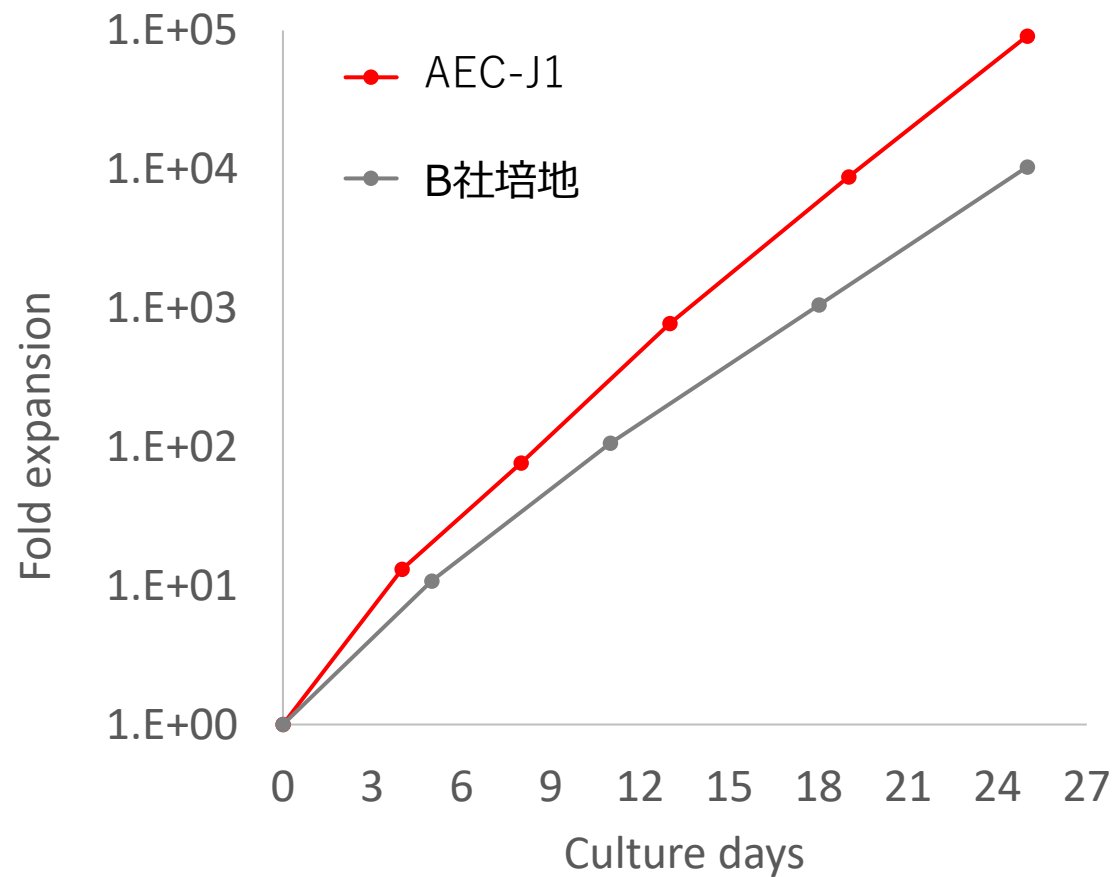
AEC-J1：培地中の微粒子混入量

- AEC-J1は、B社培地よりも微粒子の混入が少ない
 - エクソソーム精製時に培地由来の微粒子の混入を抑えることができる



AEC-J1：細胞の増殖・老化

気道上皮細胞の増殖

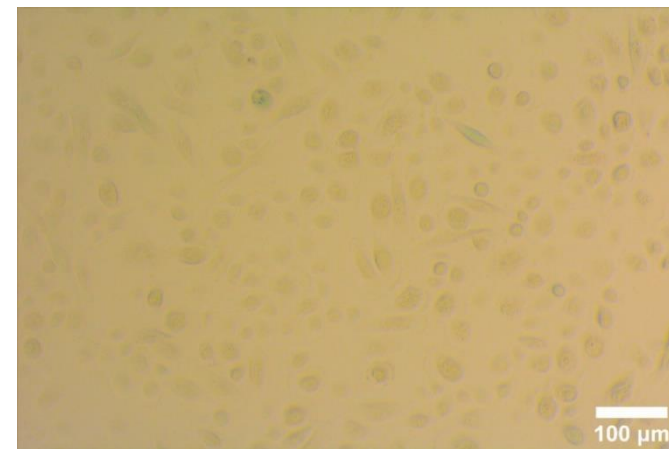


AEC-J1は、B社培地と同等以上の増殖支持能を示した

7継代目

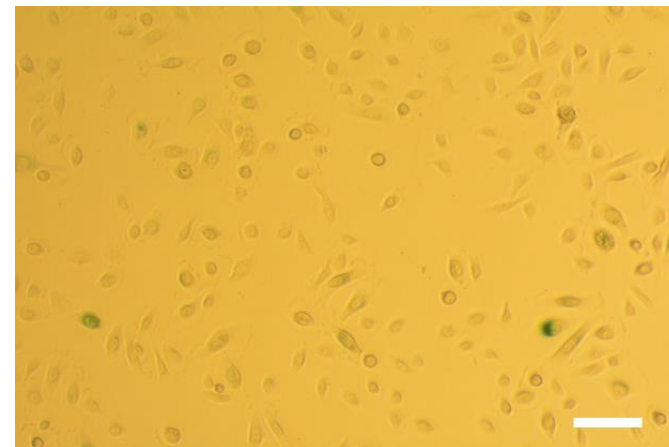
老化細胞

AEC-J1



約3.5%

B社培地

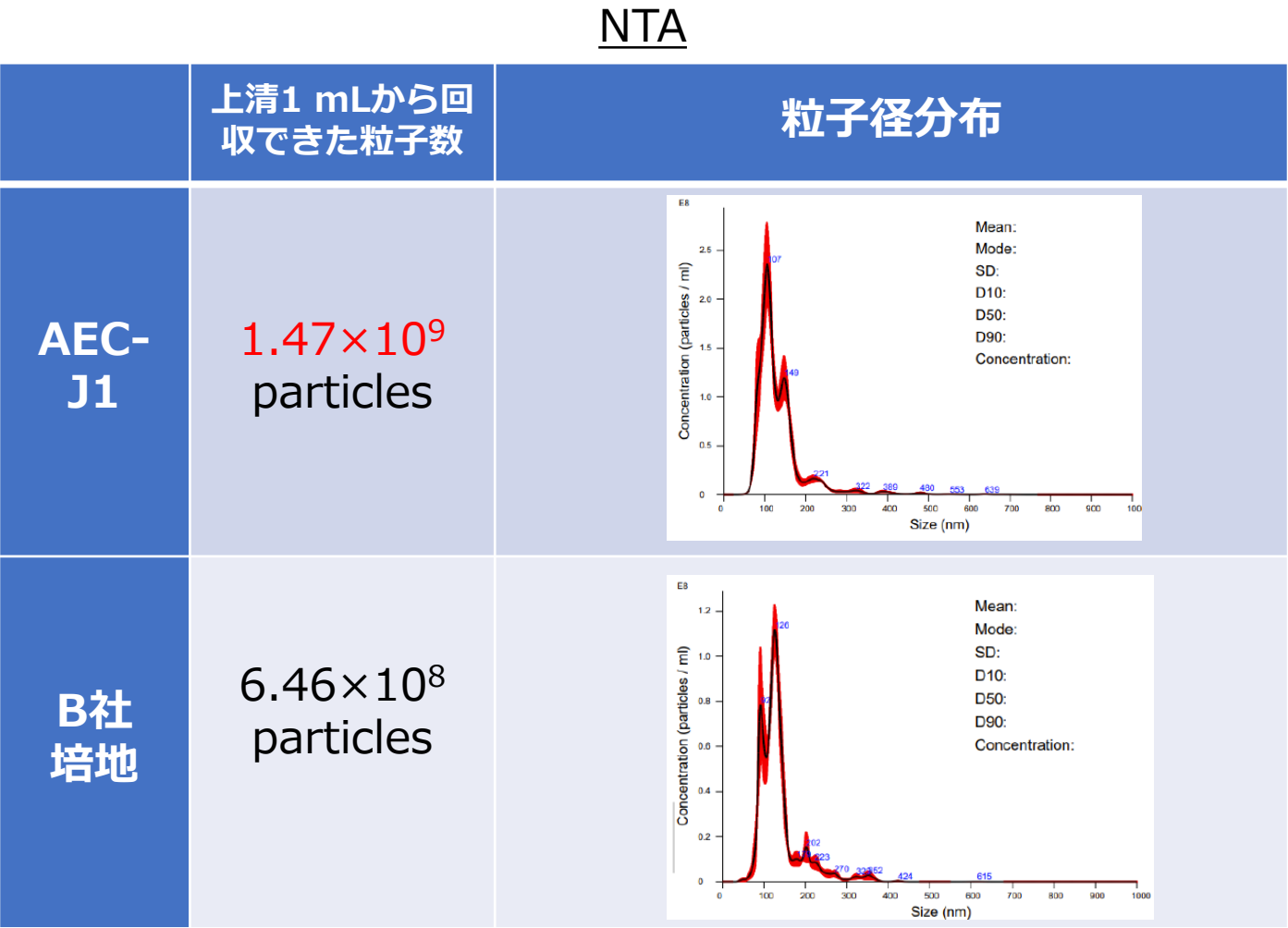
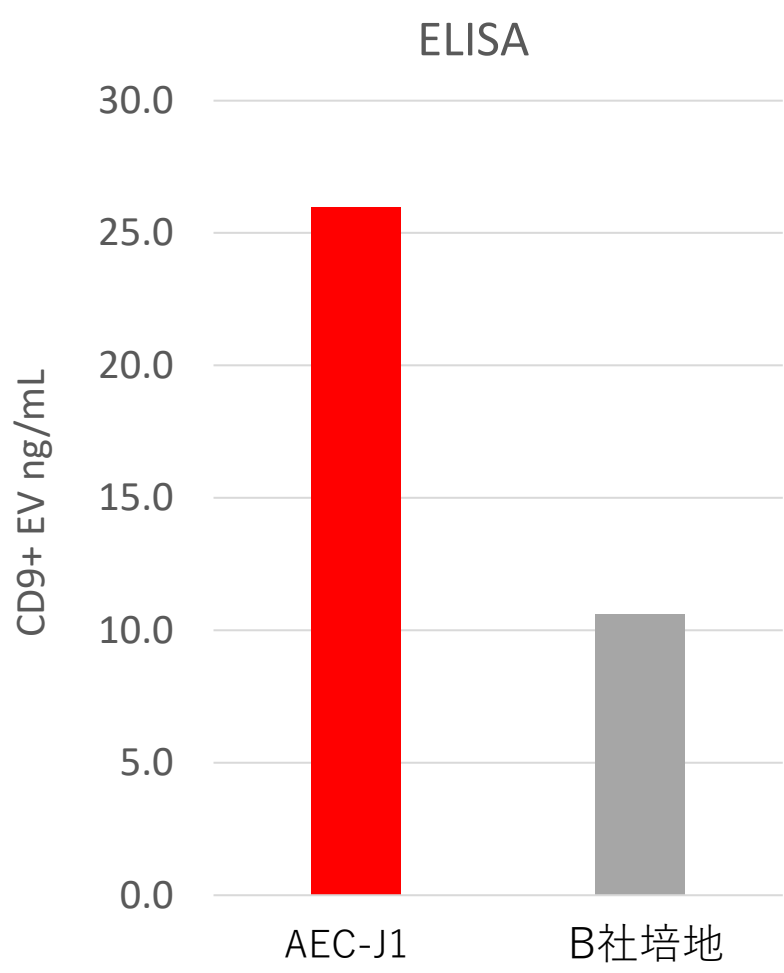


約3.2%

AEC-J1で培養した細胞の老化はB社培地と同程度であった

AEC-J1 : エクソソーム産生量・粒子径分布

- AEC-J1で培養した気道上皮細胞では、B社培地の2倍以上のエクソソームが産生された

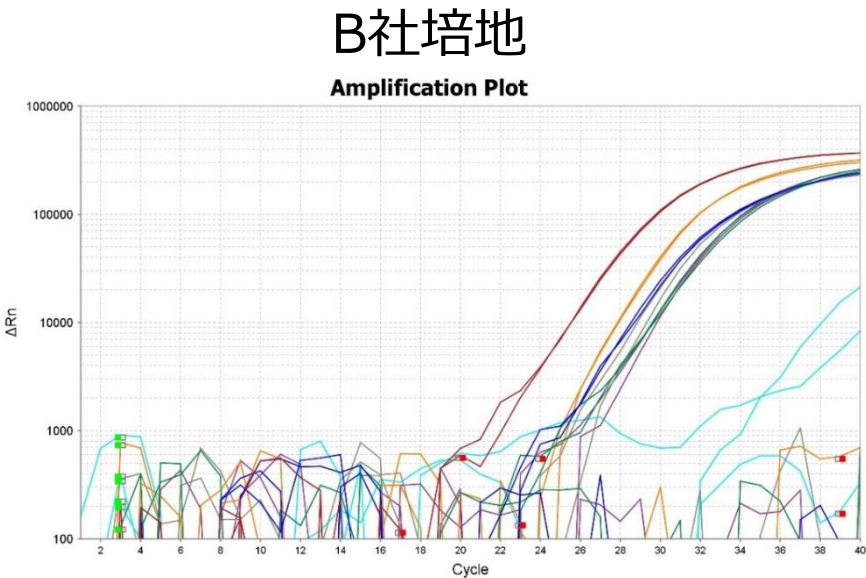
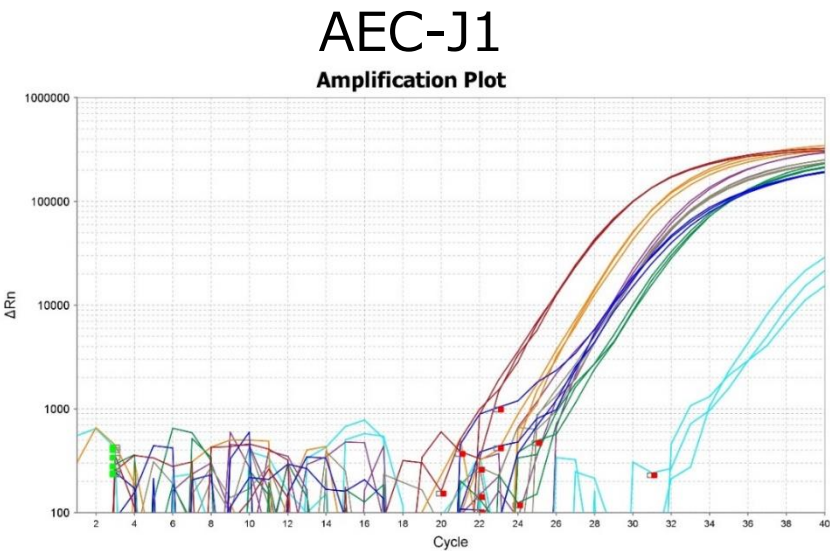


AEC-J1 : エクソソーム内のmiRNA発現解析 (qPCR)

- AEC-J1で培養した気道上皮細胞のエクソソームは、B社培地の場合と同程度のmiRNAを含有
 - エクソソームの質もB社培地と同等と考えられた

エクソソーム内の6種のmiRNAのCt値

	miR-16	miR-26a	miR-26b	miR-141	miR-148a	miR-200a
AEC-J1	26.486	30.033	31.004	28.370	29.929	29.797
B社培地	26.491	29.702	30.725	28.876	29.897	30.752



AEC-J1：社内評価のまとめ

評価項目	評価方法	AEC-J1	B社培地
動物由来成分	-	○（不含）	○（不含）
培地に混入している粒子量	Nanoparticle Tracking Analysis	○（少）	○（少）
細胞増殖・老化	細胞培養	○	△
エクソソーム産生量	ELISA、Nanoparticle Tracking Analysis	○	△
エクソソーム内のmiRNA	qPCR	○	○

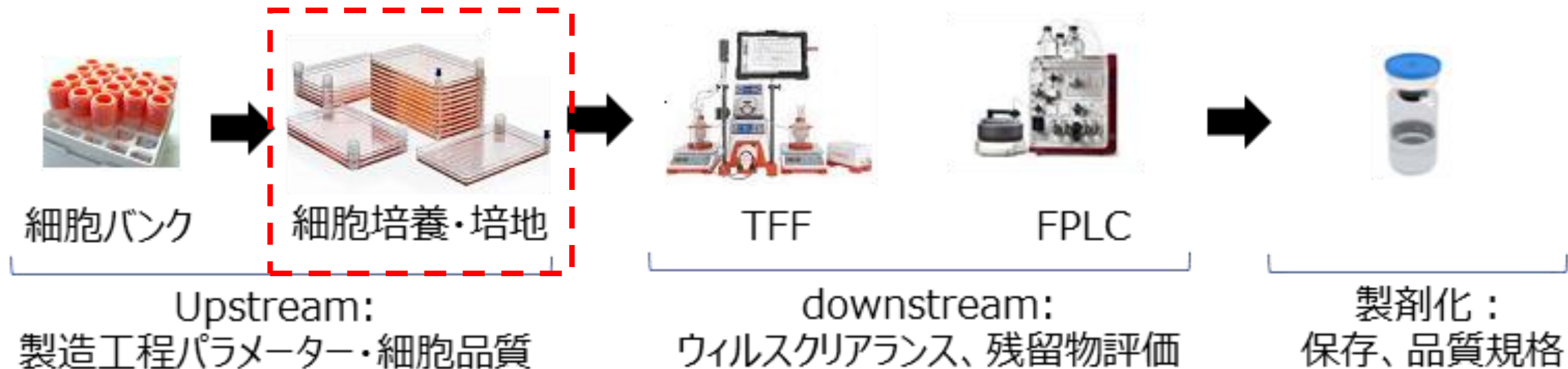
AEC-J1：慈恵医大での評価

- AEC-J1は要件を満たしていることが確認された
 - 気道上皮細胞由来エクソソームのGMP製造に使用する計画

評価項目	評価方法	AEC-J1	A社培地
動物由来成分	-	○（不含）	×（含有）
培地に混入している粒子量	Nanoparticle Tracking Analysis	○（少）	×（多）
細胞増殖・老化	細胞培養	◎	○
エクソソーム産生量	Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis	○	○
エクソソーム内のmiRNA	qPCR	○	◎
<i>in vitro</i> 薬効評価	線維芽細胞に対する抗線維化効果	○	○
<i>in vivo</i> 薬効評価	肺線維化モデルマウスに対する抗線維化効果	○	○

エクソソームを用いた医薬品の製造基盤技術構築に向けて

エクソソーム医薬品の製造工程



島津ダイアグノスティクスは、培地の開発・供給により、
エクソソーム医薬品の実用化に貢献する

カスタマイズ事例

・ MSH-EVを用いたhMSCの大量・長期間培養

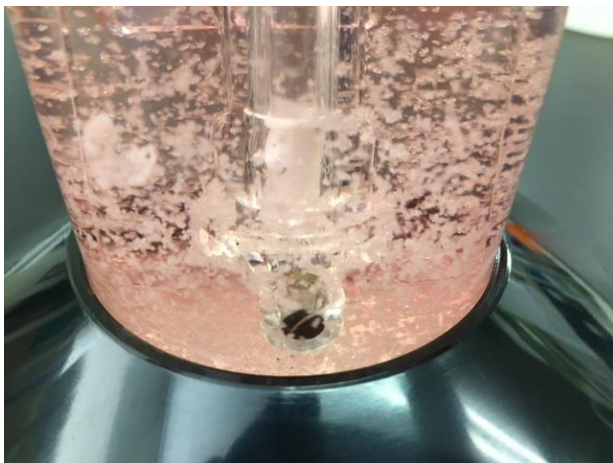
カスタマイズ事例

あるユーザー様の要望

「hMSCをマイクロキャリアを用いて大量に長期間培養し、大量のEVを製造したい」

MSH-EVを用いたhMSCのマイクロキャリア培養

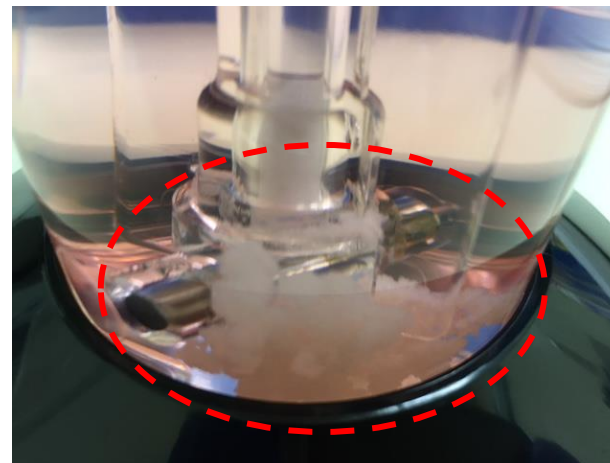
Day 6



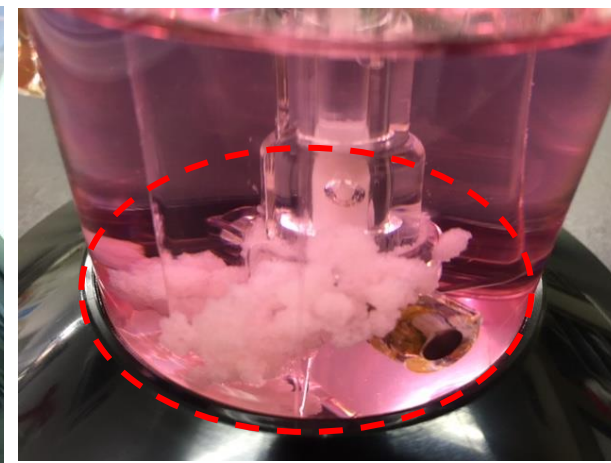
Day 8



Day 11

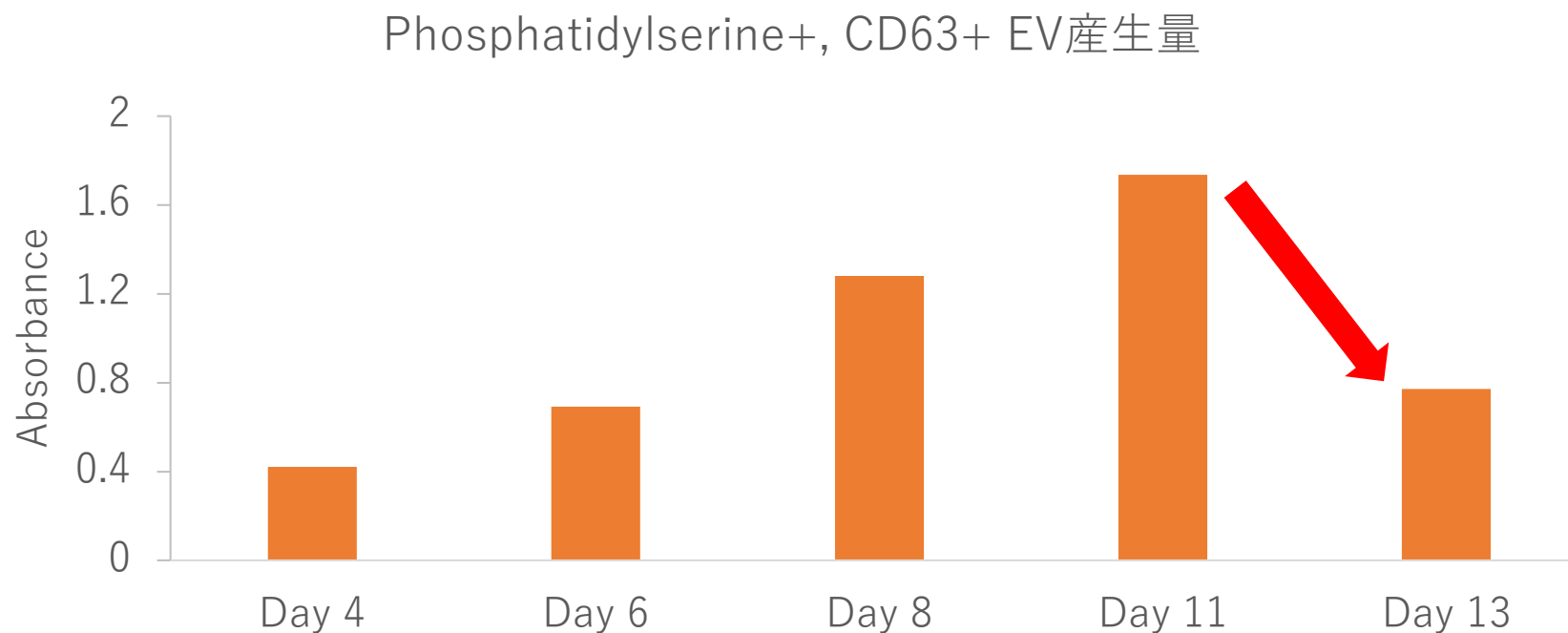


Day 13



細胞とマイクロキャリアが巨大な凝集体を形成してしまった

カスタマイズ事例



培養の後半でEV産生量が低下してしまった

- マイクロキャリアの過度な凝集により、凝集体内部の細胞に栄養が行きわたらず、細胞生存率が低下したためと推察された

マイクロキャリア凝集の改善

MSH-EVに改良を加え、マイクロキャリア培養時の細胞凝集を抑制した（⇒以降、**MSH-EV改**）

MSH-EV



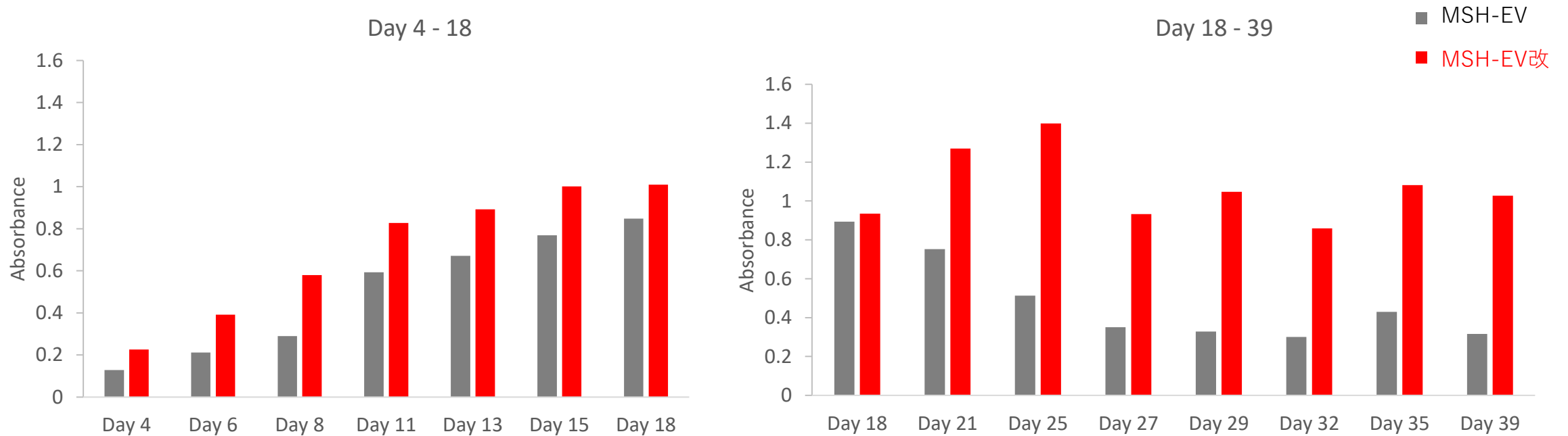
MSH-EV改



マイクロキャリア凝集の改善

- EV産生量（ELISA）

Phosphatidylserine+, CD63+ EV産生量



MSH-EV改では、改良前と比べ、**培養後半のEV産生量が高く維持されていた**

➤ 凝集が抑制され、細胞生存率が向上したためと推察された

培地組成の改良に関する取り組み

培地成分分析サービスのご紹介

2024年5月23日

島津ダイアグノスティクス株式会社

CC営業部

培地成分分析サービス

培地中に含まれるアミノ酸、ビタミン、糖、核酸、有機酸を含む成分分析が可能です

特徴

- **培地中に含まれる95 成分の一斉分析**

培養前後の培地成分の変化、細胞から分泌される代謝物等に対してLC-MSを用いた成分分析を行います

- **細胞の培養工程管理に重要な指標や培地改良のヒントのご提案**

お客様のニーズに最適な培地を実現するためのデータを提供いたします

- **細胞培養用培地の分析から製造まで対応可能**

お問合せ

お見積り

ご発注

検体送付

成分分析

結果報告

改良培地
ご検討

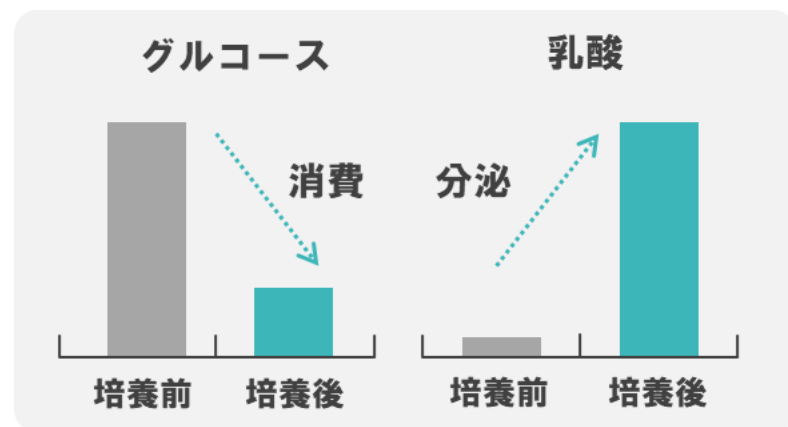
検体受領後10営業日以内でご報告

培地成分分析サービス

アミノ酸、ビタミン、糖、核酸、有機酸を含む
95 成分の一斉分析



■ 注目したい成分の測定値を比較



Internal Standard	Amino Acid and Derivatives	Vitamins
2-Isopropylmalic acid	2-Aminoadipic acid	4-Aminobenzoic acid
	4-Aminobutyric acid	Ascorbic acid
	4-Hydroxyproline	Ascorbic acid 2-phosphate
Sugars	5-Glutamylcysteine	Biotin
Gluconic acid	5-Oxoproline	Choline
Glucosamine	Alanine	Cyanocobalamin
Hexose (Glucose)	Alanyl-glutamine	Ergocalciferol
Sucrose	Arginine	Folic acid
Threonic acid	Asparagine	Folinic acid
	Aspartic acid	Lipoic acid
	Citrulline	Niacinamide
Nucleic acid associated compounds	Cystathionine	Nicotinic acid
Adenine	Cysteine	Pantothenic acid
Adenosine	Cystine	Pyridoxal
Adenosine monophosphate	Glutamic acid	Pyridoxine
Cytidine	Glutamine	Riboflavin
Cytidine monophosphate	Glutathione	Tocopherol acetate
Deoxycytidine	Glycine	
Guanine	Glycyl-glutamine	Others
Guanosine	Histidine	2-Aminoethanol
Guanosine monophosphate	Isoleucine	2-Ketoisovaleric acid
Hypoxanthine	Kynurenine	3-Methyl-2-oxovaleric acid
Inosine	Leucine	4-Hydroxyphenyllactic acid
Thymidine	Lysine	Citric acid
Thymine	Methionine	Ethylenediamine
Uracil	Methionine sulfoxide	Fumaric acid
Uric acid	N-Acetylaspatic acid	Glyceric acid
Uridine	N-Acetylcysteine	Histamine
Xanthine	Ornithine	Isocitric acid
Xanthosine	Oxidized glutathione	Lactic acid
	Phenylalanine	Malic acid
	Pipecolic acid	O-Phosphoethanolamine
Antibiotics	Proline	Putrescine
Penicillin G	Serine	Pyruvic acid
	Threonine	Succinic acid
	Tryptophan	
	Tyrosine	
	Valine	

培地成分分析サービス ご依頼の手順

お申込み

- 培地成分分析サービス申込書へ記入→当社へ送付
- 当社より試験計画書を提示、代理店様よりお見積提示

送付

- 代理店様を経由しご発注
- 測定検体を当社へご送付

測定

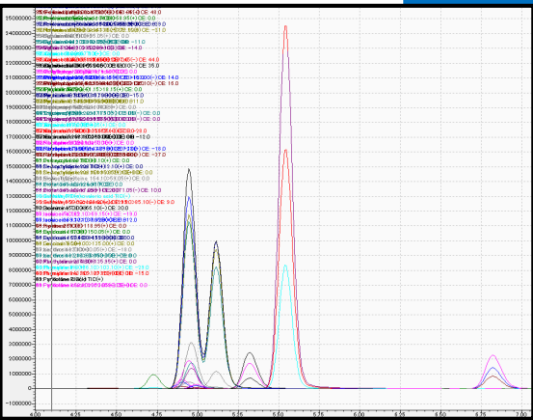
- 検体測定

報告

- 報告(PDF もしくは 紙媒体)

検体受領から
10営業日以内に報告

分析報告書例



島津ダイアグノスティクス株式会社 培地成分分析サービス 受付No. XXXXXX

分析結果報告書

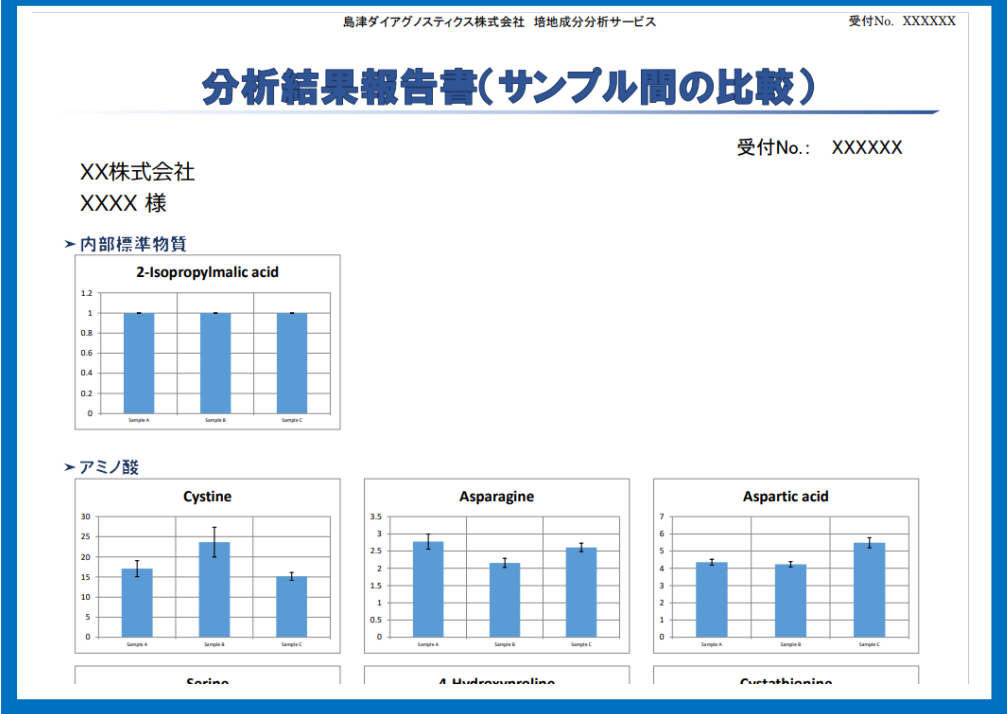
株式会社 XXXX 様

日：2023 年 XX 月 XX 日
付No.:
日：2023 年 XX 月 XX 日

比は、内部標準 (2-Isopropylmalic acid) のピーク面積に対する各化合物のピーク面積比 (三重測定の平均値)

化合物 Gr.	化合物名	Sample A		Sample B		Sample C	
		面積比	標準偏差	面積比	標準偏差	面積比	標準偏差
標準物質	2-Isopropylmalic acid	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
	Cystine	17.06	1.99	23.66	3.72	15.15	0.98
	Asparagine	2.78	0.22	2.16	0.13	2.61	0.12
	Aspartic acid	4.36	0.17	4.24	0.16	5.49	0.30
	Serine	2.48	0.12	4.38	0.24	2.59	0.19
	4-Hydroxyproline	14.23	0.45	ND	0.00	15.47	0.79
	Cystathionine	0.17	0.02	ND	0.00	0.20	0.01
	Glycine	0.15	0.01	0.31	0.01	0.17	0.01
	Glutamine	0.55	0.03	0.91	0.05	0.40	0.06
	Cysteine	0.05	0.01	0.09	0.01	0.04	0.02
	Threonine	5.28	0.15	21.06	2.03	5.41	0.18

報告書① (測定値)



報告書② (グラフ)

各成分の測定値は定量ではなく、内部標準(2-Isopropylmalic acid)のピーク面積に対する各化合物のピーク面積比(三重測定の平均値)で表記されています。

培地成分分析サービス よくあるご質問

依頼の方法について

- ・ 申込書に必要事項を記入し、ご送付ください。

申込書はどこにありますか？

- ・ HPよりDLしてご使用ください

報告までどのくらいかかるの？

- ・ 基本的に検体受領後10営業日以内に報告書を提

必要サンプル量はどのくらい？どんな状態でおく

- ・ 300 μ Lになります。冷凍状態でご送付ください

95成分以外の物質も測定可能ですか？

- ・ 記載成分以外の測定も対応が可能な場合がございます。ご相談ください。

費用が知りたいです。

- ・ サンプルの内容、数量により費用が変動いたします。お問い合わせください。

細胞培養培地

安全性試験関連

受託サービス

技術情報

サポート

セミナー案内

ホーム > 受託サービス > 細胞培養液分析サービス > 細胞培養プロファイリング培地成分分析サービス

受託サービス

> 細胞の安全性試験

> 安全性試験試薬導入サポート

> 細胞培養液分析サービス

> 細胞培養プロファイリング
培地成分分析サービス

> 残留抗生物質試験

> 受託試験業務全般

細胞培養プロファイリング 培地成分分析サービス

細胞培養中の培地成分の変化や環境の把握に

当社の培地成分分析サービスは培地中に含まれるアミノ酸、ビタミン、糖、核酸、有機酸を含む多成分の一斉分析が可能です。細胞培養に伴う成分や代謝物などの変化・傾向の把握をすることで、より適した培地のご提案もさせていただきます。

