

ヒト血小板溶解物(hPL) : UltraGROとオリジナル培地のご紹介

コラジェン・ファーマ株式会社 代表取締役 能勢博 様

島津ダイアグノスティクス株式会社 法人営業部 CC営業グループ

UltraGRO®

細胞培養培地サプリメント ヒト血小板溶解物製剤



 Made in USA

UltraGRO®の特長

- 細胞培養に必要なサイトカインや増殖因子が豊富。
- 原材料は米国の輸血用血小板製剤であり、トレーサビリティが担保。
- 原材料は米国FDAガイドラインに従って各種病原体の試験実施済。
- 多くの供血者の血小板をプールして製造、性能のロット間差が少ない。
- ロット毎に品質試験を実施し、試験成績書あり。

細胞治療に使用される幹細胞（間葉系幹細胞＝MSC）の大量培養には血清成分の添加が不可欠 → 以下の点で解決が必要な課題多数

ウシ胎児血清（FBS）添加の場合

- ウィルス・プリオン等の感染源混入の可能性
- 目的とする効果のロット間差
- 残留タンパク質の抗原性によるアレルギー発症の可能性
- 供給国限定による安定供給の不確実性
- ロット毎に生物由来原料基準適合性を確保する必要あり

患者様の自己血から分離した血清の場合

- 細胞が多数必要な場合の多量採血による患者様の身体への負担
- 患者様が老齢の場合に増殖刺激能低下の可能性
- 採血・分離・保存に要する手間と費用

血清を必要としない完全合成培地

- 未だ供給が限定的・価格の問題、完全な置換は難しいのが現状

培養添加サプリメントとしてのヒト血小板溶解物



先に挙げた特性により

- FBSもしくは患者様自己血清を完全に置換可能でそれらのデメリットを克服可能
- さらにより少量での使用でも高い増殖効果が得られ経済性に優れる



現在、世界のMSC細胞治療でのFBSに対する使用比率は7：3と逆転

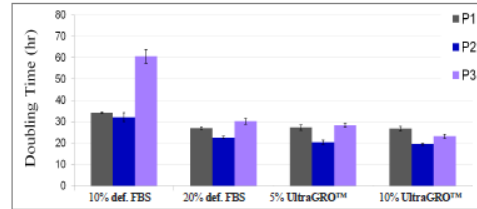
UCMSC, α -MEM

臍帯由来

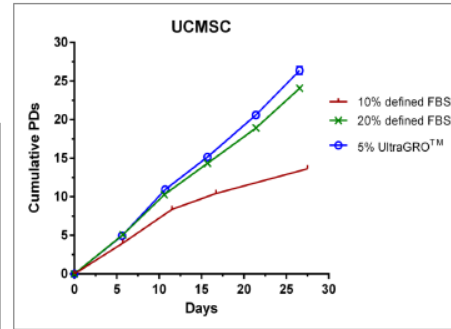
The total cell number, compared with 20% Defined FBS

5% UltraGRO™ 3X↑

Doubling Time 25 hours



Gwowe, 2013



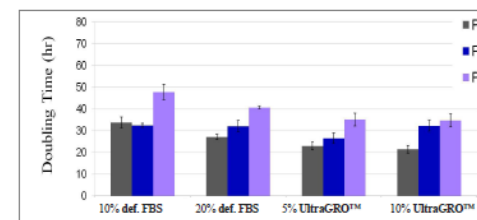
BMSC, α -MEM

骨髓由来

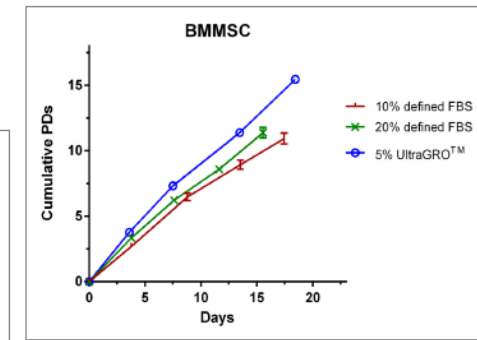
The total cell number, compared with 20% Defined FBS

5% UltraGRO™ 3X↑

Doubling Time 28 hours



GwoWei, 2013



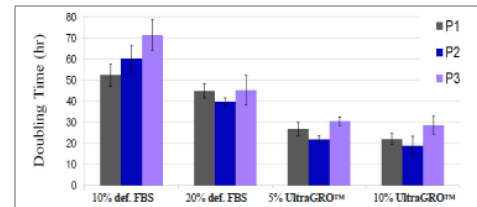
ADMSC, α -MEM

脂肪由来

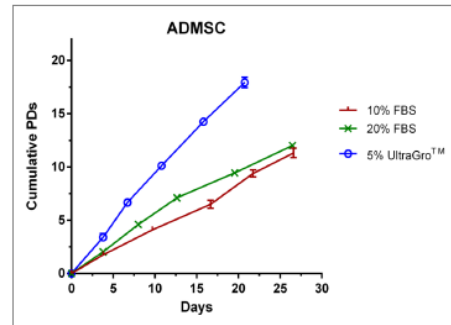
The total cell number, compared with 20% FBS

5% UltraGRO™ 74X↑

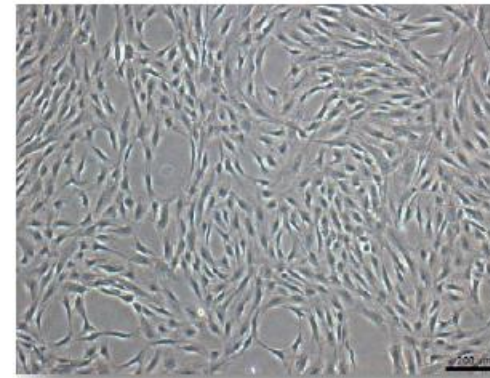
Doubling Time 26 hours



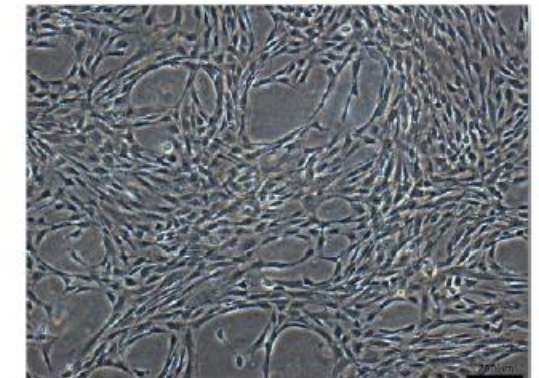
Gwowe, 2013



FBS

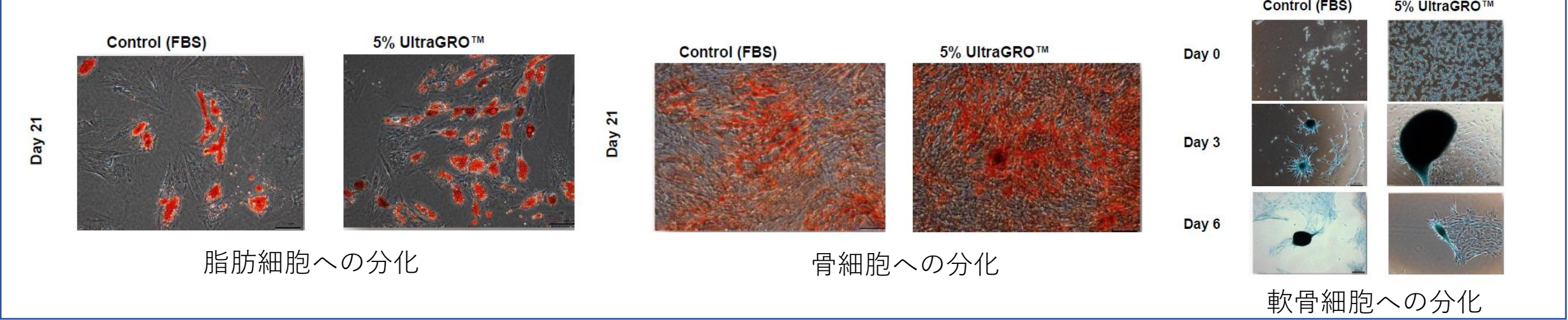


UltraGRO™

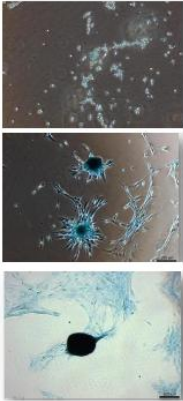


FBSとの比較① 各組織由来MSCに対する増殖能および形態への影響

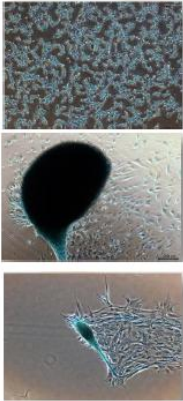
より低濃度 (FBS 20%に対し 5%) で細胞増殖能が格段に上昇、また細胞形態に差異は認められない



Control (FBS)



5% UltraGRO™



軟骨細胞への分化

	Cell Type	Supplement	CD105	CD90	CD73	CD44	CD45	CD34
臍帶由来	UCMSC	20% FBS	99.77	99.92	91.33	97.93	0.13	0.35
		5% UltraGRO™	99.04	99.98	99.99	99.79	0.02	0.37
脂肪由来	ADMSC	20% FBS	99.82	99.93	97.96	98.6	0.06	0.06
		5% UltraGRO™	99.72	99.38	96.37	97.21	0.00	0.10
骨髓由来	BMMSC	20% FBS	99.73	99.76	96.66	96.53	0.05	0.16
		5% UltraGRO™	99.86	99.94	97.92	99.59	0.02	0.02
CD11b, CD19, CD34, CD45 and HLA-DR <2% under ISCT criteria								

FBSとの比較② 組織分化能（上）または細胞特性指標（下）への影響

MSCの各組織への分化能、表面抗原の発現にほとんど差異は認められない

▪ *Fibroblast growth factor-2 (FGF2), platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and transforming growth factor (TGF)- β are the growth factors which are important for MSCs proliferation.*

Exp Cell Res. 2003;287(1):98-105

Blood. 2008;112(2):295-307

J Biomed Biotechnol. 2010;2010:795385

N=12

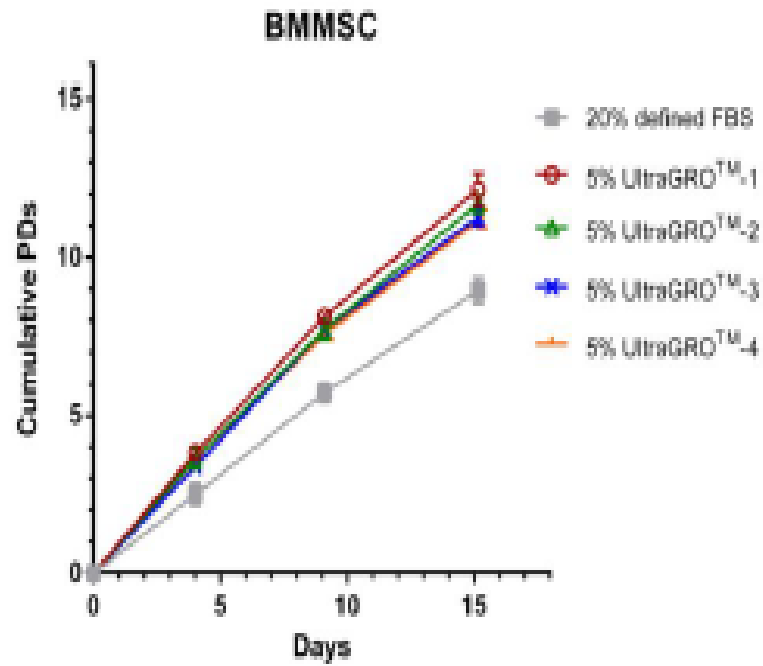
Analyzed Sample	PDGF-AB (ng/ml)	PDGF-BB (ng/ml)	FGF (ng/ml)	EGF (ng/ml)	TGF- β 1 (ng/ml)
UltraGRO™	41.97 $\pm$ 18.52	22.75 $\pm$ 8.88	8.88 $\pm$ 5.12	4.57 $\pm$ 1.55	104.15 $\pm$ 29.69

*ELISA based assays from R&D System

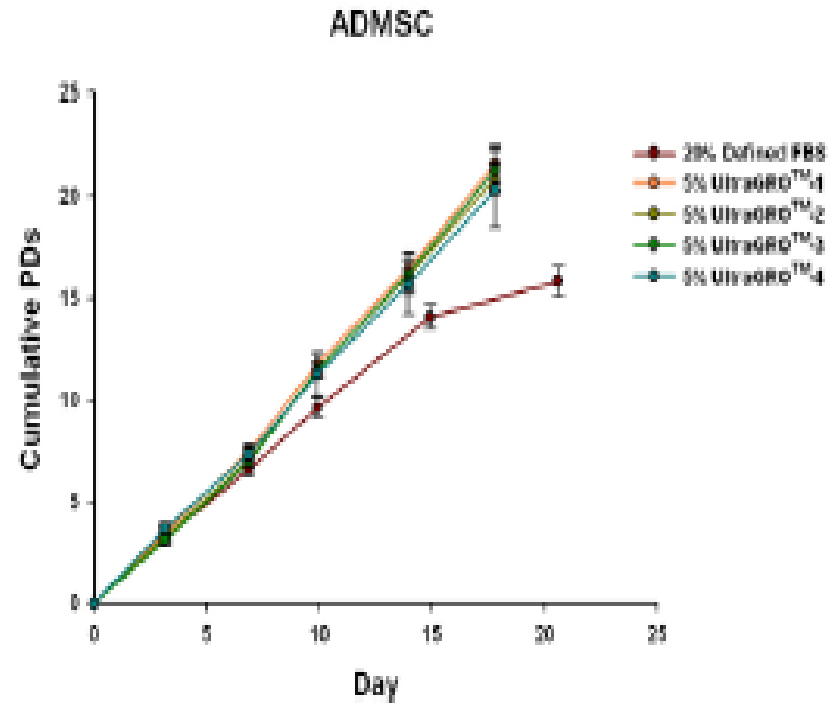
品質管理① 細胞増殖因子

各ロット毎にELISAにより測定、上記濃度範囲で含有していることを確認

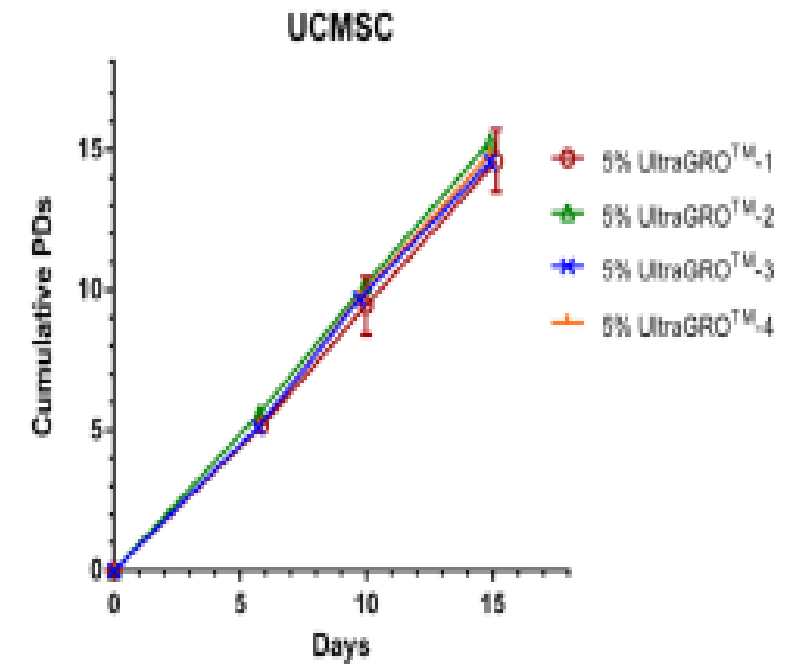
骨髓由来



脂肪由来



臍帯由来



品質管理② ロット間での細胞増殖速度

骨髓、脂肪および臍帯由来MSCいずれでもロット間差は小さいことを確認

製品ラインナップ

UltraGRO®
(Heparin追加投与必要)



UltraGRO®-Advanced



UltraGRO®-PURE

(Heparin追加投与不要)

製品名	特徴	臨床使用	容量	Cat. No.	Order No.
UltraGRO®-Advanced (Research grade)	Heparin添加済 (ブタ由来の製剤)	不可	50mL	HPCFDCRL05	KP011
			100mL	HPCFDCRL10	KP012
			500mL	HPCFDCRL50	KP013
UltraGRO®-Advanced (GMP grade)	Heparin添加済 (ブタ由来の製剤)	お問い合わせ ください。	50mL	HPCHXCRL05	KP014
			100mL	HPCHXCRL10	KP015
			500mL	HPCHXCRL50	KP016
UltraGRO®-PURE (Research grade)	Heparin代替物添加済 Xeno Freeを実現！	不可	50mL	HPCFDCGL05	KP020
			100mL	HPCFDCGL10	KP021
			500mL	HPCFDCGL50	KP022
UltraGRO®-PURE (GMP grade)	Heparin代替物添加済 Xeno Freeを実現！	可能 (γ線照射版)	50mL	HPCHXCGL05	KP023
			100mL	HPCHXCGL10	KP024
			500mL	HPCHXCGL50	KP025

今まで提示してきたUltraGRO®の特性は各製品とも全く変わりありません

UltraGRO®-PURE GI, GMP grade

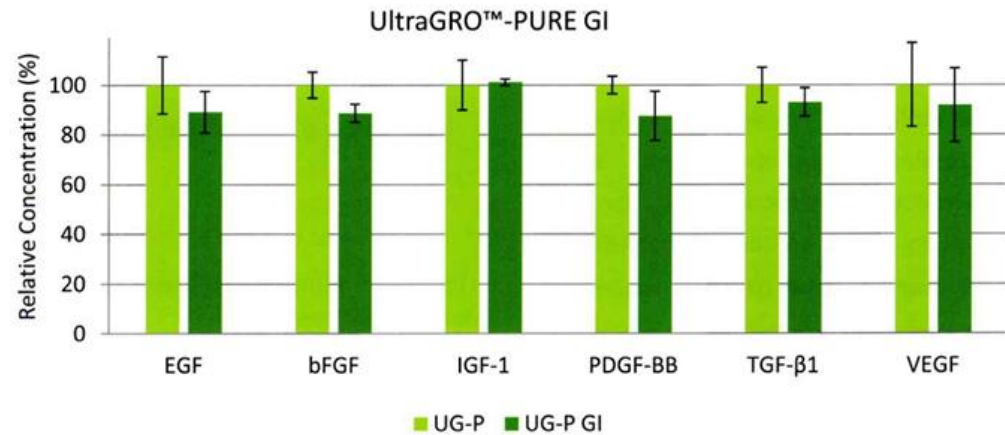


Fig. 2: Growth factors retained comparable cytokine levels after receiving gamma irradiation.

- UltraGRO®-PURE GI, GMP gradeは、
- ①Heparin代替物を添加しXeno Freeを実現！
 - ②γ線照射によりウイルス感染リスクを排除！
 - ③非照射版と遜色なく臨床での使用可能！

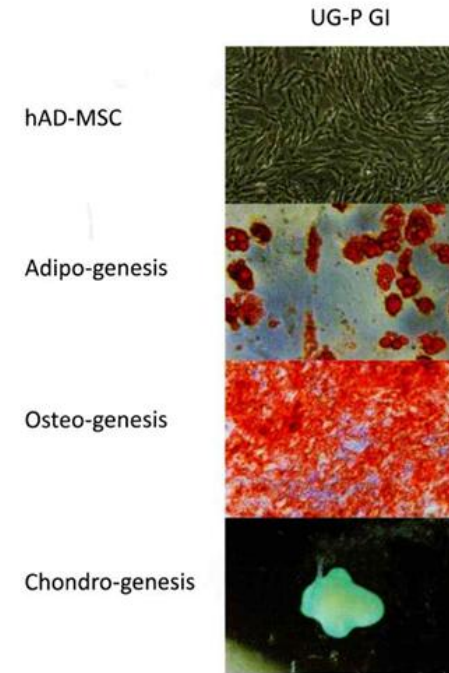


Fig.3: Human adipose tissue derived MSCs retain tri-lineage differentiation capability after cultured in UltraGRO™-PURE GI supplemented medium for three passages.

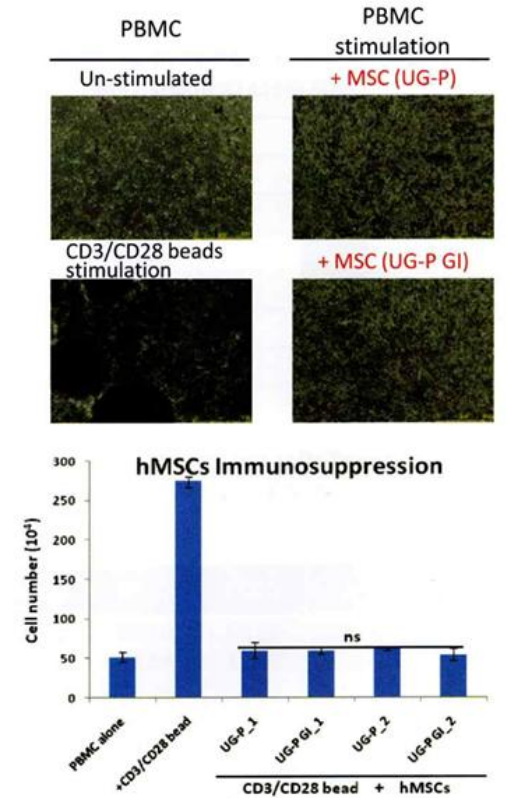


Fig.4: MSCs retained immunomodulation potency

本日のトピックス

MSF培地

MSH培地

MSH-EV培地

NS-A2培地

DCO-K培地

ヒト間葉系幹細胞増殖用培地 MSF-BM

- 本製品は“UltraGRO™”を添加した場合、基礎培地よりも高い増殖支持能を示します
- ウシ胎児血清(FBS)を添加した基礎培地より、MSCの未分化状態を維持したまま高い増殖率で培養できます
- PMDA(医薬品医療機器総合機構)より**再生医療等製品材料適格性確認書**を取得しています
- FBS低濃度(終濃度2%)の専用サプリメントも選択可能です



ヒト血小板由来細胞培養添加物

UltraGRO™



FBSの代わりに使用できるヒト血小板由来の細胞培養添加物です。

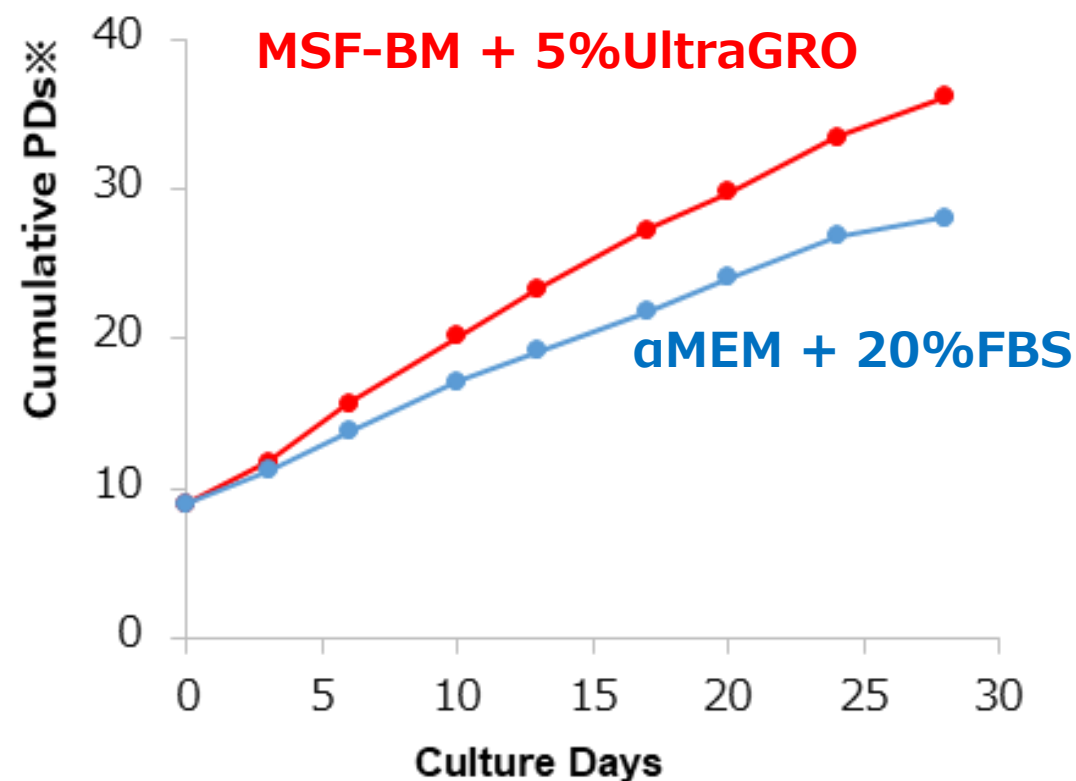
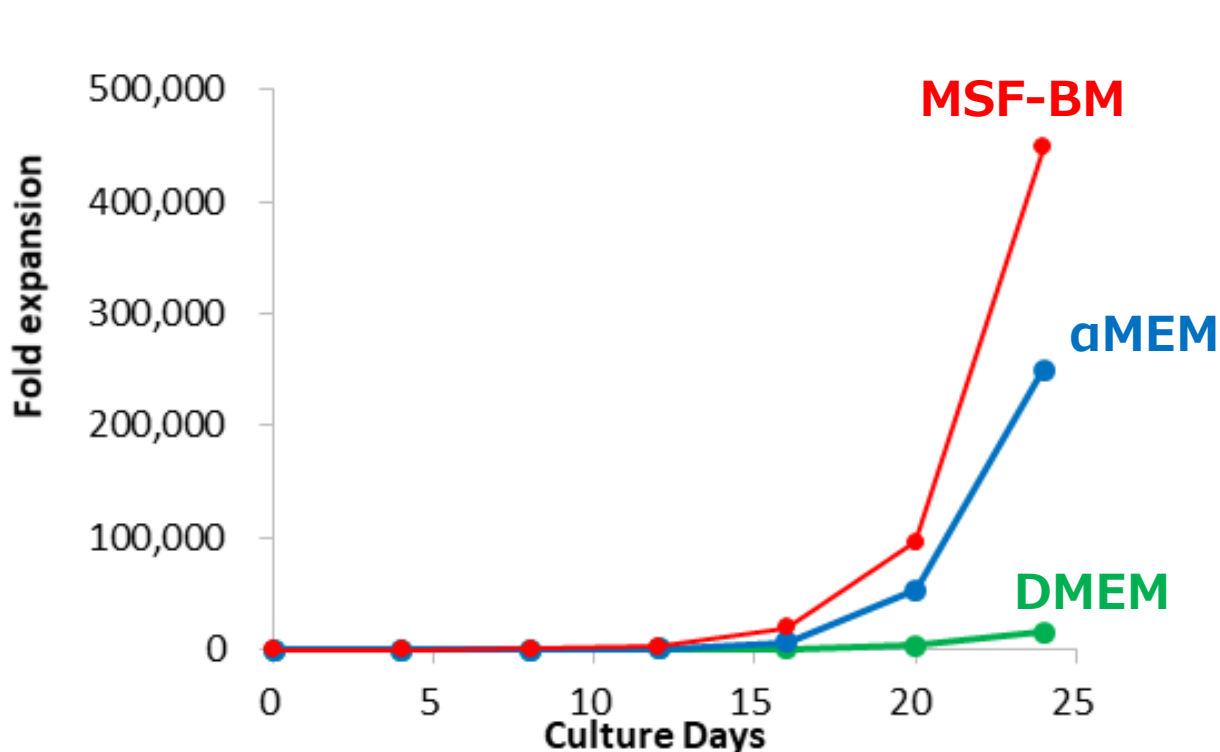
- 豊富な増殖因子とサイトカインを含みます。
- 各種幹細胞培養において、FBSよりも低濃度で置き換えが可能で、増殖率も同等以上です。
- 多くの供血者の血小板をプールして製造しているため、ロット間差が少ないです。

AventaCell
BioMedical Corp

国内発売元：コラジェン・ファーマ(株)

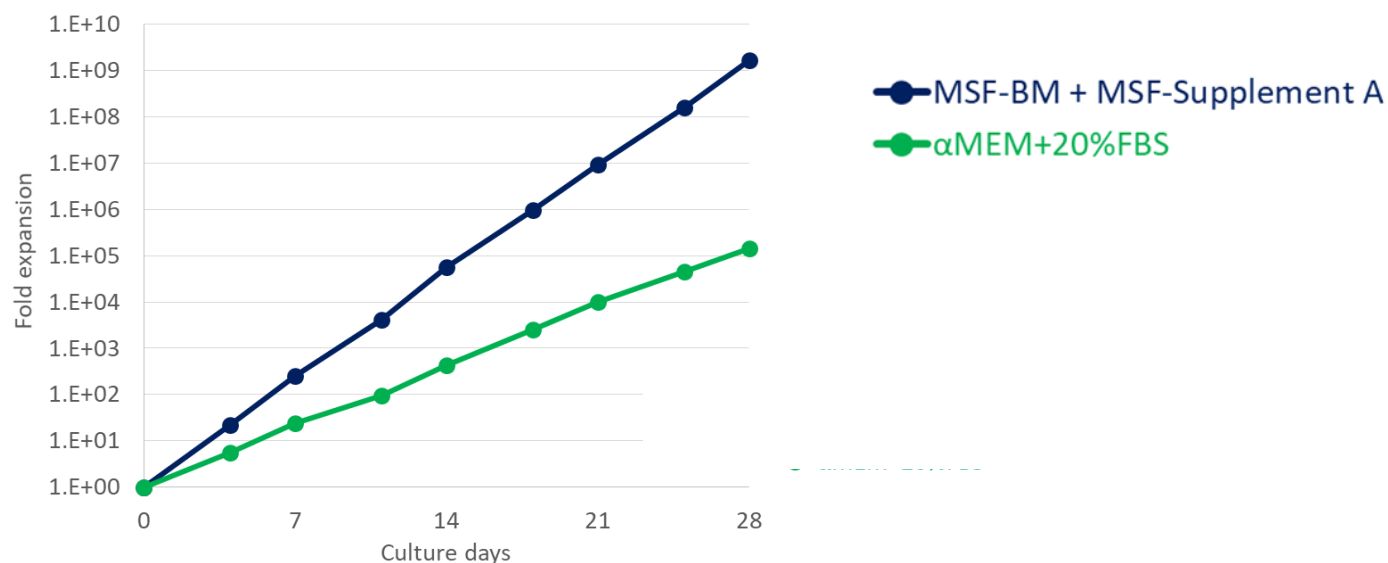
MSF培地とUltraGRO™

- 各培地にUltraGRO™を5%添加し、脂肪由来間葉系幹細胞を用いて、増殖支持能を比較しました。その結果、MSF-BMは、DMEMおよびαMEMと比較して、高い増殖支持能を示しました
- 脂肪由来間葉系幹細胞において、UltraGRO™を5%添加したMSF-BMでは、20%FBSを添加したαMEMより、良好な増殖が得られます



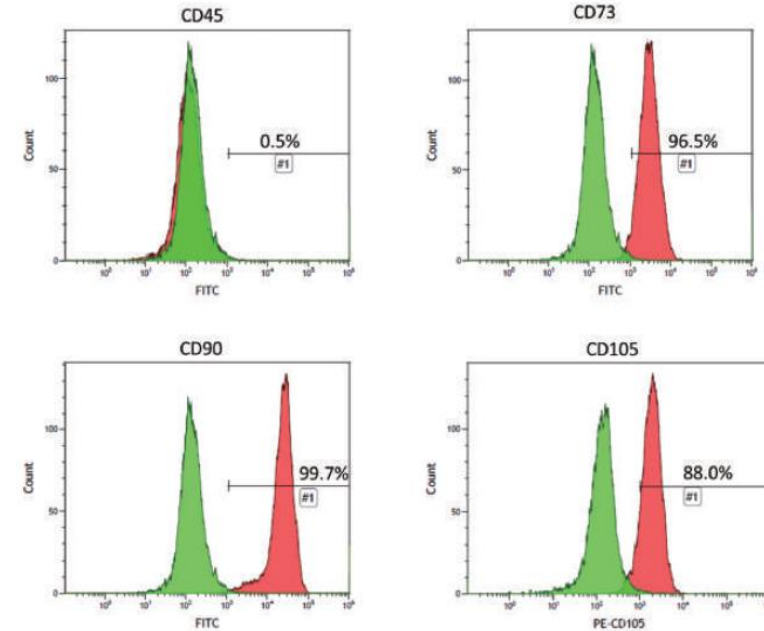
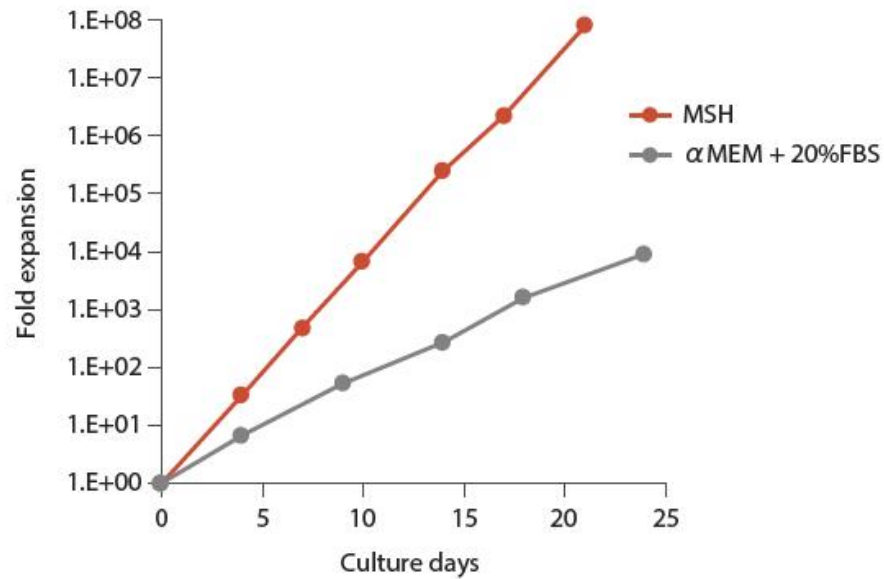
MSF-BM用 低血清サプリメント MSF-Supplement A

- ヒト間葉系幹細胞（MSC）の拡大培養用に開発された、低血清（終濃度2%）サプリメントです（FBSはγ線処理）
- 脂肪由来MSC、骨髄由来MSC、天井培養により脱分化した脂肪細胞などにお使いいただけます
- MSF-BMと組み合わせることにより、脂肪由来MSCの良好な増殖、および、未分化能の維持が可能になります



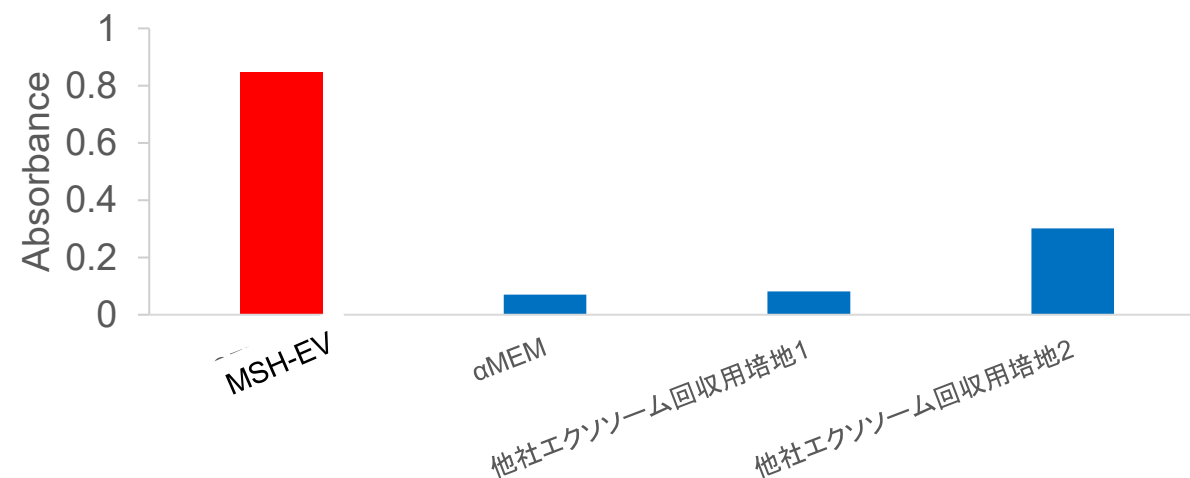
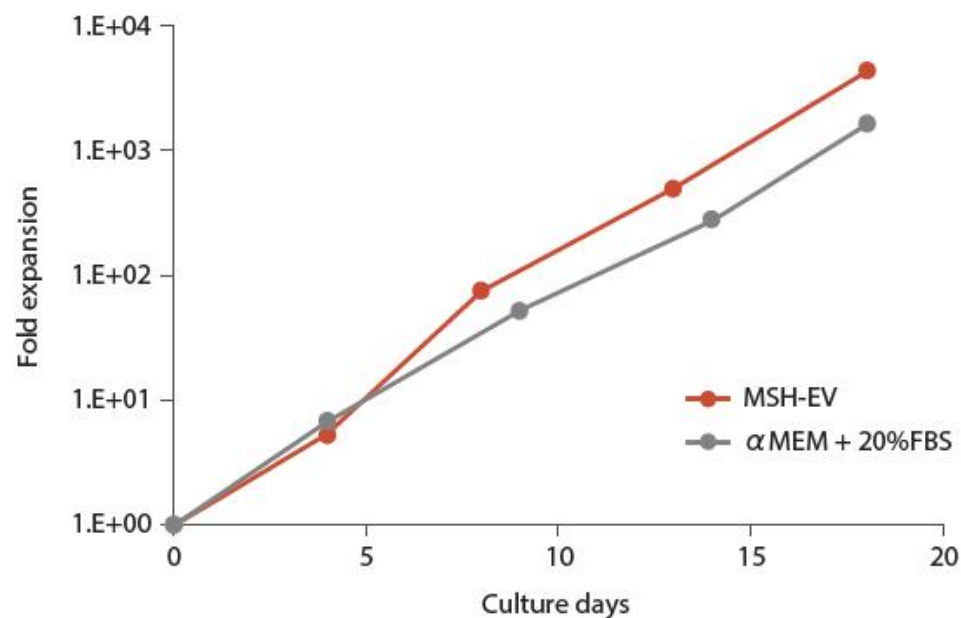
ヒト間葉系幹細胞用無血清培地 MSH

- 異種動物由来成分不含(ゼノフリー)の無血清培地です
- 本製品は、ヒト間葉系幹細胞を分化能を維持したまま増殖させることが可能です。20%FBS添加αMEM培地と比較し、優れた増殖性を示します



エクソソーム産生用培地 MSH-EV

- 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(Chemically Defined)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



リンパ球用無血清培地 NS-A2

- 免疫細胞療法用に開発された無血清培地
- 異種動物由来タンパク質成分不使用の培養液（ゼノフリー）
- タンパク質はヒト血清アルブミン(医薬品グレード)、ヒトインスリン(組換え)のみ使用
- 抗CD3抗体等の使用により活性化末梢血Tリンパ球の高い増殖を支持
 - 抗原特異的細胞傷害性T細胞（CTL）の調製に使用
 - 難治性ウイルス感染症(ヒトパピローマウイルス(子宮頸がん)、EBウイルス(関連リンパ腫))

News & Information



2023年12月13日

iPS細胞由来レジデントメモリーT細胞で子宮頸がん治療 — 健康人由来 ゲノム編集技術で拒絶反応軽減 —

順天堂大学大学院医学研究科 血液内科学の古川芳樹大学院生、石井翠助教、安藤美樹教授、細胞療法・輸血学の安藤純教授、産婦人科学の寺尾泰久教授、およびスタンフォード大学医学部幹細胞生物学・再生医療研究所の中内啓光教授らの共同研究グループは、健康な人から樹立した iPS 細胞にゲノム編集を行うことで、その iPS 細胞から作製したヒトパピローマウイルス¹特異的細胞傷害性T細胞(CTL)²が、患者の免疫細胞から拒絶されずに子宮頸がんを強力に抑制できることを明らかにしました。さらに、その iPS 細胞由来 CTL³が大量の組織レジデントメモリーT細胞⁴を含むために高い細胞傷害活性を持つことを解明したことより、難治性子宮頸がんに対して、有望な新規治療法となりうる可能性を示しました。本成果は、来夏にも開始を予定している子宮頸がんを対象とした iPS 細胞由来 CTL 療法の医師主導試験の基礎的データとなるものです。

本論文は、Cell 系の学術雑誌「Cell Reports Medicine」のオンライン版で2023年12月12日付け（米国東部時間）で先行公開されました。

本研究成果のポイント

- 健康人由来 iPS 細胞をゲノム編集することで、同種免疫反応を軽減した CTL の作製に成功
- その iPS 細胞由来 CTL は豊富に組織レジデントメモリーT細胞を含むため、もとの CTL と比較して、より強力に子宮頸がんを抑制できることを発見

Cell Reports Medicine

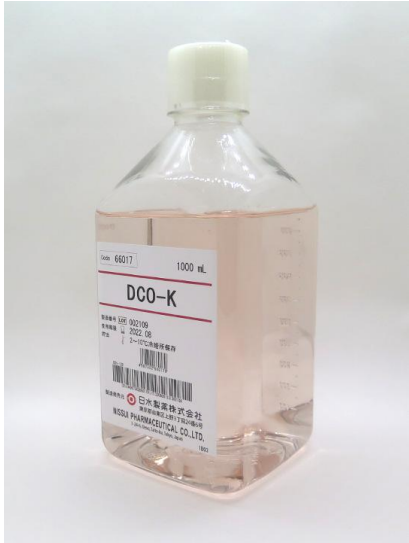


Article

iPSC-derived hypoimmunogenic tissue resident memory T cells mediate robust anti-tumor activity against cervical cancer

Yoshiki Furukawa,^{1,8} Midori Ishii,^{1,8} Jun Ando,^{1,2} Kazuya Ikeda,³ Kyomi J. Igarashi,⁴ Shintaro Kinoshita,¹ Yoko Azusawa,² Tokuko Toyota,¹ Tadahiro Honda,¹ Mahito Nakanishi,⁵ Koichi Ohshima,⁶ Ayako Masuda,⁷ Emiko Yoshida,⁷ Mari Kitade,⁷ Matthew Porteus,³ Yasuhisa Terao,⁷ Hiromitsu Nakauchi,^{4,*} and Miki Ando^{1,9,*}

ヒト樹状細胞分化用培地 DCO-K



- 再生医療等製品材料適格性確認書を取得
- 異種動物由来成分不含
- ヒト血小板溶解物（HPL）等の添加により培養後の収率、生存率が向上
- ヒト単球から樹状細胞の効率の良い分化が可能
→インターフェロンα誘導樹状細胞(IFN-DC)の調製に使用
(金沢医科大学病院 再生医療センター)



Article

Interferon- α -Induced Dendritic Cells Generated with Human Platelet Lysate Exhibit Elevated Antigen Presenting Ability to Cytotoxic T Lymphocytes

Ippei Date ¹, Terutsugu Koya ^{1,2}, Takuya Sakamoto ^{1,2}, Misa Togi ^{1,2}, Haruhiko Kawaguchi ¹, Asuka Watanabe ¹, Tomohisa Kato Jr. ³ and Shigetaka Shimodaira ^{1,2,*}

Vaccines 2021,9(1), 10

<https://dx.doi.org/10.3390/vaccines9010010>



Article

Clinical Trial on the Safety and Tolerability of Personalized Cancer Vaccines Using Human Platelet Lysate-Induced Antigen-Presenting Cells

Terutsugu Koya ^{1,2}, Kenichi Yoshida ², Misa Togi ^{1,2}, Yo Niida ³, Sumihito Togi ³, Hiroki Ura ³, Shuichi Mizuta ⁴, Tomohisa Kato, Jr. ⁵, Sohsuke Yamada ⁶, Takeo Shibata ⁷, Yi-Chang Liu ^{8,9}, Shyng-Shiou Yuan ¹⁰, Deng-Chyang Wu ¹¹, Hirohito Kobayashi ¹², Taiju Utsugisawa ¹³, Hitoshi Kanno ¹³ and Shigetaka Shimodaira ^{1,2,5,13,*}

Cancers 2023, 15(14), 3627

<https://doi.org/10.3390/cancers15143627>