

全血由来血小板濃厚液から調製した血小板溶解液の間葉系幹細胞増幅培養における有用性

藤原 満博¹⁾ 若本志乃舞¹⁾ 秋野 光明¹⁾ 布施 久恵¹⁾ 加藤 志歩¹⁾
内藤 祐¹⁾ 生田 克哉²⁾ 鳥本 悦宏¹⁾ 紀野 修一¹⁾³⁾

Platelet lysate (PL) は、fetal bovine serum (FBS) に代わる mesenchymal stem cell (MSC) の増幅培養の培地添加物として期待されている。PL の材料として、血小板通過型白血球除去 (白除) フィルターによる白除全血から調製した whole blood-derived platelet concentrate (WB-PC) を用いた。その WB-PC から調製した PL (WB-PL) の MSC 増幅培養における有用性を、apheresis PC (Aph-PC) から調製した PL (Aph-PL) と比較した。

MSC の増殖に係る成長因子の濃度は、WB-PL と Aph-PL で同等であった。WB-PL の MSC 増殖促進作用は、Aph-PL に比べると有意に弱かったがその差は僅かであり、FBS に比べて有意に強かった。WB-PL または Aph-PL で培養した MSC は、MSC に特徴的な膜抗原発現パターンと脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への 3 系統の分化能を維持していた。

以上の結果より、WB-PL は、MSC 増幅培養において Aph-PL の代替となる可能性が示唆された。

キーワード：全血、血小板溶解液、間葉系幹細胞、血小板通過型白血球除去フィルター

緒 言

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞など様々な細胞に分化可能¹⁾であり、再生医療、細胞治療への臨床応用が進められている。そのためには、必要な細胞数まで生体外で増幅培養する必要がある。国際細胞・遺伝子治療学会は、MSC の定義として、通常の培養下においてプラスチック・ディッシュに接着すること、CD105, CD73, CD90 の発現が陽性、CD45, CD34, CD11b または CD14, CD19 または CD79 α , HLA-DR の発現が陰性であること、さらに、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への 3 系統の分化能を有することを最低基準と提案している²⁾。これまで MSC の増幅培養にはウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS) が使用されてきたが、異種抗原による免疫反応や人獣感染症の伝播のリスク等からヒト由来の FBS 代替物が望まれている³⁾⁴⁾。ヒト血小板溶解液 (platelet lysate : PL) は、顆粒内に様々な成長因子を含有している血小板を種々の方法で溶解させたもの⁵⁾で、MSC 増幅培養において FBS の代替となることが Doucet らによって 2005 年に初めて報告された⁶⁾。以来、PL

を用いて増幅した MSC の細胞治療の臨床試験が行われている^{7)~10)}。

海外では、血小板製剤 (platelet concentrate : PC) には成分採血装置によって調製される成分由来 PC (apheresis-derived platelet concentrate : Aph-PC) と全血の分離による buffy coat (BC) または platelet rich plasma (PRP) のプールによる全血由来 PC (whole blood-derived PC : WB-PC) があり、それぞれを材料として Aph-PC 由来 PL (Aph-PL) と WB-PC 由来 PL (WB-PL) が調製されている^{5)11)~20)}。Aph-PL および WB-PL を含むヒト PL の MSC の培養のための使用に関するメタ解析において、ヒト PL は MSC の増殖を FBS よりも有意に亢進させることが示されている²¹⁾。また Aph-PL, WB-PL とともに MSC に特徴的な膜抗原発現パターンおよび 3 系統への分化能に影響しないことも多くの検討で示されている⁶⁾¹⁵⁾¹⁷⁾²¹⁾。Aph-PL と WB-PL の MSC 増幅に対する作用を直接比較した報告は少ないが、Fekete ら²²⁾ は両者に有意な違いはなかったとしている。また、メタ解析では、MSC の増殖速度に、成分由来 PC, BC 由来 PC および PRP 由来 PC という PL の開始材料

1) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター

2) 北海道赤十字血液センター

3) 現 日本赤十字社血液事業本部

連絡責任者：秋野 光明, E-mail : m-akino@hokkaido.bc.jrc.or.jp

〔受付日：2024 年 1 月 4 日, 受理日：2024 年 8 月 23 日〕

の違いは認められなかった²¹⁾.

本邦においては、Aph-PLの調製の検討^{23)~25)}がなされており、Aph-PLで増幅したMSCの細胞治療の臨床試験が既に実施されている²⁶⁾。しかし、全てのPCがAph-PCであるので、WB-PLの調製は行われておらず、有効性も確立していない。WB-PCの調製は、血小板製剤の安定供給維持のための一方策と考えられる。さらに、WB-PCから調製されるWB-PLが、Aph-PLと同等の効果を持てば、輸血用血液製剤としての有効期限を超過したWB-PCを再生医療・細胞治療のための材料として有効利用することもできる。そこで本検討では、血小板通過型白血球除去(白除)フィルターによって白除した全血から調製したWB-PCを材料としてWB-PLを調製し、MSCの増幅培養の培地添加物としての有用性をAph-PLと比較した。

方 法

1. WB-PCの調製

献血の同意説明書により同意の得られた健常人ドナー14人から採血した400ml全血、4または5バッグを22°Cで一晩保管後、採血翌日に血小板通過型白除フィルター(WB-SPフィルター:TERUMO BCT社)²⁷⁾²⁸⁾により白除した。その白除全血をBC調製用の全血バッグシステム(TERUMO IMUFLEX CRCバッグ:TERUMO BCT社)に移し替え、大容量遠心機(9900:KUBOTA社)にて一次遠心(3,868×g, 9min, 22°C)後、自動分離装置(T-ACE II+:TERUMO BCT社)により、血漿、赤血球、BCに分離した。BCは2時間、室温で静置後、BCプーリングキット(TERUFLEX BP-KIT:TERUMO BCT社)に無菌接合した。BCを血漿(235ml)でリンス後、1バッグにプールし、大容量遠心機にて二次遠心(585×g, 22°C)後、T-ACE II+によりWB-PCを分離した。得られたWB-PCは、X線照射(15Gy)後、22°Cで血小板の機能評価試験終了まで(採血後6日目:採血日を1日目とする)振とう保存した。

2. PLの調製

Aph-PLの材料として、期限切れとなり輸血に使用できないAph-PCのうち、上述のWB-PCと同程度の血小板濃度かつ単位数のものを用いた。WB-PCは血小板の機能評価試験終了後、Aph-PCは期限切れ後、一旦、4°Cにて保存した。それぞれ採血後8~9日目に、容量に応じて血液分離バッグ(KBP-200C, KBP-300CまたはKBP-66DCバッグ:SBカワスミ社)に無菌的に移し替え、バッグ毎、-80°Cにて凍結した。混入赤血球濃度が著しく高値であったWB-PCについては、バッグに移し替える前に遠心法による赤血球除去を行った。PLの調製は、既報¹⁴⁾に準じ一回の凍結融解と遠心により行った。-80°Cにて凍結したPCを4°Cにて融解後、250ml

遠心ボトル(Corning社)に移し、大容量遠心機(KUBOTA社)にて遠心(4,000×g, 15min, 室温)した。得られた遠心上清を250ml遠心ボトルに移し、同条件にて再遠心した。得られた遠心上清を0.45μm及び0.2μmのNalgen Rapid-Flow Filter(Thermo Scientific社)にて段階的にフィルター処理し、最終ろ液をPLとした(Fig. 1)。PLは分注し、使用するまで-80°Cにて保存した。

3. 成長因子濃度の測定

PL中の以下の成長因子濃度は、各ELISA kit(R & D systems社)にて測定した:platelet derived growth factor-BB(PDGF-BB, DBB00), endothelial cell growth factor(EGF, DEG00), basic fibroblast growth factor(bFGF, DFB50), transforming growth factor-β1(TGF-β1, DB100C)。

4. MSCの増幅

Lonza社から購入したパッセージ(Passage:P)2の培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を、細胞増殖試験にはP3まで、その他の試験にはP4まで増幅培養して使用した。増幅培養では、MSCをMSC basal medium(Lonza社)を用いて、T-75フラスコ(Corning社)に播種(5,000個/cm²の細胞密度)し、37°C, 5%CO₂条件下にて培養した。Trypsin-EDTA(Lonza社)を用いて細胞を回収し、継代した。

5. 細胞増殖試験

最終濃度40μg/mlのgentamicin(高田製薬社)を添加したα-minimal essential medium(α-MEM:Life Technologies Europe B.V.社)を基礎培地とした。基礎培地に10%WB-PL, 10%Aph-PLまたは10%FBSをそれぞれ添加し、MSCの細胞増殖試験の培地とした。PLの添加においては、ゲル化を防ぐため、ヘパリン(最終濃度2U/ml:持田製薬社)を添加した。FBSは、Equitech-Bio, Gibco, Sigma Aldrich社製の3バッチを使用した。各FBSは非働化せずにそのまま用いた。P3まで増幅したMSC(ドナー3名)を、上記培地にて、12穴プレート(Corning社)に5,000個/cm²で播種し、37°C, 5%CO₂条件下で4日間培養した。MSCをtrypsin-EDTA処理して回収した。回収した細胞の一部をacridine orange/propidium iodide(Logos BioSystems Inc.社)染色し、生細胞を自動蛍光細胞計数装置(Luna-FL:Logos Biosystems Inc.社)にて計測し細胞数を算出した。回収した細胞は、12穴プレート(Corning社)に5,000個/cm²で再び播種し、同様の操作をP6まで繰り返した。

Population doublings(PD)は、以下の式で求めた。

$$PD = [\log_{10}(N_h) - \log_{10}(N_i)] / \log_{10}(2)$$

N_h: 回収時の細胞数, N_i: 播種細胞数

Cumulative population doublings(CPD)は、継代毎において得られたPDの総和とし、本検討ではP3からP6までを算出した。

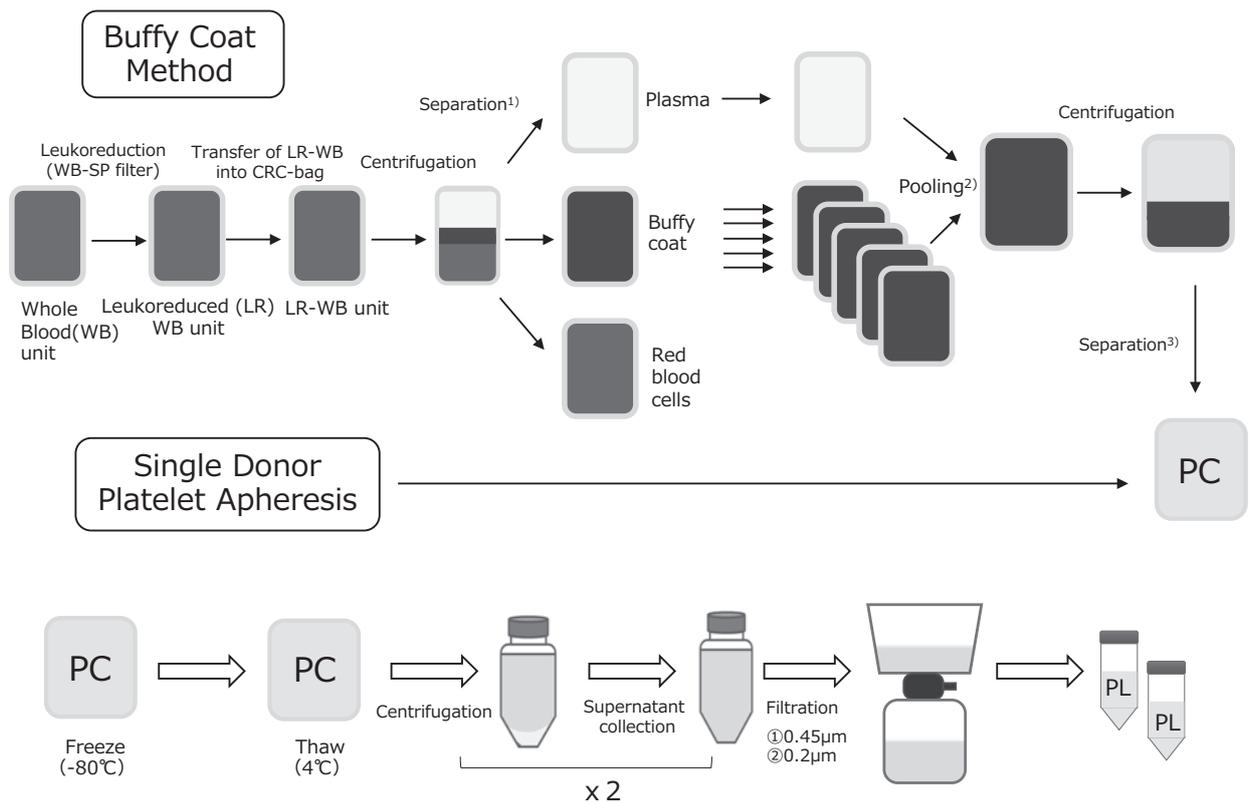


Fig. 1 Schematic illustration of the WB-PL and Aph-PL production process in this study.

¹⁾ Separation of leuko-reduced whole blood unit after centrifugation was carried out with T-ACE II⁺.

²⁾ Pooling of BCs and plasma was carried out with a TERUFLEX BP-KIT.

³⁾ Separation of pooled BCs after centrifugation was carried out with T-ACE II⁺.

Table 1 Antibodies used for flow cytometric analysis of surface marker expression of MSCs grown in medium supplemented with 10% FBS, 10% WB-PL or 10% Aph-PL.

| antibody | conjugate | company | clone |
|-----------------------------|-----------|---------------|----------|
| HLA-DR | FITC | BioLegend | L243 |
| CD105 | FITC | BD Pharmingen | 266 |
| CD73 | PE | BD Pharmingen | AD2 |
| CD90 | PE/cy7 | BioLegend | 5E10 |
| CD44 | FITC | BC | J.173 |
| CD166 | PE | BC | 3A6 |
| CD45 | FITC | BD Bioscience | HI30 |
| CD34 | PE | BD Bioscience | 8G12 |
| CD14 | PE/cy7 | BioLegend | 63D3 |
| CD19 | PE | BioLegend | HIB19 |
| Isotype control mouse IgG1 | FITC | BD Pharmingen | MOPC-21 |
| Isotype control mouse IgG1 | PE | BD Bioscience | X40 |
| Isotype control mouse IgG1 | PE | BioLegend | MOPC-21 |
| Isotype control mouse IgG1 | PE/cy7 | BioLegend | MOPC-21 |
| Isotype control mouse IgG2a | FITC | BioLegend | MOPC-173 |

BD; Becton Dickinson, BC; Beckman Coulter.

6. MSCの細胞膜抗原解析

P4まで増幅培養したMSCを、10%WB-PL、10%Aph-PLまたは10%FBSをそれぞれ添加した基礎培地で培

養した。コンフルエントに達したMSCをtrypsin-EDTAにて回収し、2%FBS含有PBSに再懸濁した。抗体染色は、Table 1に示す蛍光標識マウス抗ヒトモノクローナ

Table 2 Comparison of WB-PC and Aph-PC used for PL preparation.

| | WB-PC (n=3) | Aph-PC (n=5) |
|--|----------------------------|--------------|
| Anticoagulant | CPD | ACD-A |
| Donor number | 4 ~ 5 /unit | 1/unit |
| Volume (ml) | 170 ± 1 | 213 ± 20 |
| Platelet concentration (10 ⁴ /μl) | 109 ± 31 | 116 ± 17 |
| Leukocyte count (10 ⁶ /unit) | 0.02 ± 0.02 | not tested |
| RBC concentration (/μl) | 432 ± 340 (694, 47.5, 555) | not tested |
| Storage period before PC freezing (days) | 8 ~ 9 | 9 |

ル抗体をMSC懸濁液に添加し、室温、20分反応させ、MSCの細胞表面抗原を染色した。陰性対照として、各抗体のアイソタイプコントロール抗体を使用した。それぞれの抗原について陽性率を、フローサイトメーター (FC500: Beckman Coulter社) にて測定した。死細胞は、7ADD Viability Dye (Beckman Coulter社) により除外した。

7. MSCの分化能試験

MSCの脂肪分化、骨分化および軟骨分化能の試験は、既報¹⁴⁾に準じた。P4まで増幅培養したMSCを、10% WB-PL、10% Aph-PLまたは10% FBSをそれぞれ添加した基礎培地で37°C、5%CO₂条件下で5日間培養した。MSCをtrypsin-EDTAで回収し、24穴プレートに10,000個/cm²の細胞密度で播種した。脂肪分化の場合は、10% PLまたは10%FBSを添加した基礎培地で3日間培養後、骨分化の場合は2日間培養後、培地をそれぞれ脂肪分化培地 (StemPro Adipogenesis Differentiation Kit: Life Technologies社) および骨分化培地 (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit: Life Technologies社) に置き換え、37°C、5%CO₂条件下で培養した。脂肪分化では分化誘導後14日目に、骨分化では21日目に、細胞を4%パラホルムアルデヒド含有PBSで固定後、それぞれ、Oil Red O (Cayman Chemical Company社) 染色 (室温、15分)、1% Alizarin-red S (Sigma-Aldrich社) 染色 (室温、15分) を行った。軟骨細胞への分化能試験では、10%WB-PL、10% Aph-PLまたは10% FBSをそれぞれ添加した基礎培地で5日間培養したMSCをtrypsin-EDTAで回収し、1.6×10⁷個/mlの細胞密度の細胞懸濁液5μlを、24穴プレートの中心に滴下し37°C、5%CO₂条件下で30分インキュベーションした。その後、軟骨分化培地 (StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit: Life Technologies社) を添加した。分化誘導後、14日目に細胞を4%パラホルムアルデヒド含有PBSで固定し、1% Alcian-blue (Sigma Aldrich社) 染色 (室温、30分) を行った。各分化誘導の陰性対照として、10% FBS含有基礎培地で培養したMSCを使用した。

8. 統計解析

測定値は、平均±標準偏差で表記した。WB-PLとAph-PLの成長因子濃度の比較は、対応のないt検定を用い

た。膜抗原の陽性率におけるWB-PL、Aph-PLおよびFBSの比較ではone way ANOVAで検定後、Tukey's testを用いた。細胞増殖におけるWB-PL、Aph-PLおよびFBSの比較ではtwo way repeated measures ANOVAで検定後、Tukey's testを用いた。いずれの場合も、危険率(P)5%未満を有意とした。統計処理にはGraphPad Prism version 9.0 (Graphpad Software社) を用いた。

9. 研究倫理

本研究は、日本赤十字社研究倫理委員会の承認を受け実施した (倫理承認番号2016-010-1)。

結 果

1. WB-PCの性状

調製したWB-PC(n=3)の血小板数は2.88±0.86×10¹¹個で、1バッグは15単位相当、2バッグは10単位相当であった。容量は250±15mlであった。10単位相当の1バッグは、260mlで、10単位PCの容量基準の上限(240ml)を超過した。いずれも、良好なスワーリングが観察され、凝集塊は認められなかった。残存白血球数は0.02±0.02×10⁶個で、いずれも本邦の白除の基準を満たしていた。混入赤血球濃度は、それぞれ9,840個/μl、47.5個/μl、5,840個/μlであった。PL調製に用いたWB-PCとAph-PCの性状をTable 2に示した。血小板濃度は、両者に有意差は認められなかった。混入赤血球濃度が高値であった2バッグについては、凍結前に赤血球除去を行い、それぞれ、694個/μl、555個/μlに低減した (Table 2)。

2. 成長因子濃度

PDGF-BB、EGF、bFGF、TGF-β1の濃度において、WB-PLとAph-PLの間に有意差は認められなかった (Table 3)。

3. MSC増殖促進作用

10%WB-PLを含有する培地で培養したMSCのCPDは、P4からP6のいずれにおいても、10% Aph-PLで培養したMSCのCPDよりも僅かではあるが、有意に低値であった (Fig. 2)。一方、10%WB-PLまたは10% Aph-PLをそれぞれ含有する培地で培養したMSCのCPDは、P4からP6のいずれにおいても、10%FBSを含有

Table 3 Growth factor concentrations in WB-PL and Aph-PL.

| | WB-PL (n=3) | Aph-PL (n=5) | P value |
|-----------------|-------------|--------------|-----------------|
| PDGF-BB (ng/ml) | 13.3±3.5 | 14.4±3.7 | <i>p</i> = 0.70 |
| EGF (pg/ml) | 1,653±174 | 1,607±199 | <i>p</i> = 0.75 |
| bFGF (pg/ml) | 120.2±32.7 | 122.6±47.9 | <i>p</i> = 0.94 |
| TGF-β1 (ng/ml) | 90.4±21.3 | 108.0±36.1 | <i>p</i> = 0.48 |

Results are expressed as mean ± SD of three WB-PL and five Aph-PL batches.

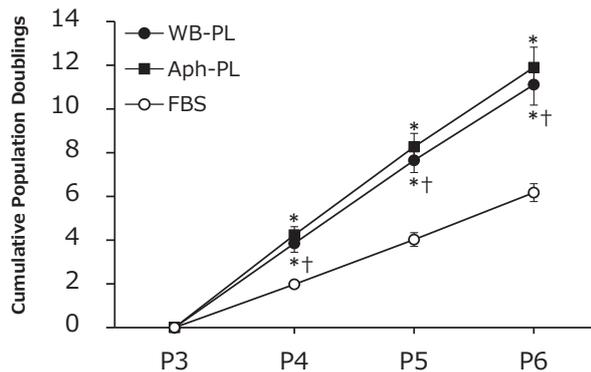


Fig. 2 Cumulative population doublings of MSCs grown in medium supplemented with 10% FBS, 10% WB-PL or 10% Aph-PL.

Three batches of FBS, three batches of WB-PL and five batches of Aph-PL were used to assess cumulative population doublings of MSCs from three donors through P3 to P6.

Data are expressed as mean ± SD at the end of each passage.

**p* < 0.05 compared to FBS. †*p* < 0.05 compared to Aph-PL.

する培地で培養した MSC の CPD よりも有意に高値であった (Fig. 2). P6 において, WB-PL, Aph-PL, FBS をそれぞれ含有する培地で培養した MSC の CPD は, 11.11 ± 0.93 , 11.90 ± 0.92 および 6.17 ± 0.41 であった (Fig. 2).

4. MSC の細胞膜抗原解析

10%WB-PL, 10%Aph-PL, 10%FBS をそれぞれ含有する培地で培養した MSC は, いずれも CD105, CD73, CD90, CD44, CD166 が陽性 (> 90%), かつ, CD45, CD34, CD14, HLA-DR, CD19 が陰性 (< 2%) であった (Table 4). 10%WB-PL を含有する培地で培養した MSC は, 10% Aph-PL を含有する培地で培養した MSC に比べ, CD105 陽性率が有意に高かったが, その他の膜抗原の陽性率に差は認められなかった. 10%FBS を含有する培地で培養した MSC と比較すると, WB-PL または Aph-PL を含有する培地で培養した MSC の CD 105 陽性率と, Aph-PL を含有する培地で培養した MSC の CD73 陽性率が有意に低かった (Table 4).

5. MSC の分化能

MSC を 10%WB-PL, 10%Aph-PL, 10% FBS でそれぞれ培養後, 継代し, 脂肪細胞, 骨芽細胞, 軟骨細胞への分化誘導をおこなった. 脂肪細胞への分化誘導群では, 各条件にて培養した MSC は, 中性脂肪の脂肪滴を検出する Oil red O 染色により, いずれも赤色に染まる脂肪滴の蓄積が認められた. 分化誘導をしていないコントロール群では, 脂肪滴は認められなかった. 骨芽細胞への分化誘導群では, カルシウム沈着を検出する Alizarin red S 染色により, 各条件にて培養した MSC は, いずれも赤色に染まるカルシウム沈着像を示した. コントロール群では, MSC は紡錘形を維持し, カルシウム沈着は認められなかった. 軟骨細胞への分化誘導群では, 各条件にて培養した MSC は, それぞれ細胞塊を形成し, 酸性ムコ多糖類を検出する Alcian blue により染色された. コントロール群では, 紡錘形の細胞の伸展が認められ, 細胞塊は形成されなかった (Fig. 3).

考 察

全血からの BC 法での PC 調製では, 製剤の白除は製剤毎に行われるが, 白除フィルターにより白除した全血から分離調製すれば, 一回の白除工程で白除 3 製剤が調製できることになる. しかし, 現在使用されている全血白除フィルターは, 血小板も捕捉するため, 白除後の全血から血小板製剤を調製することはできない. 一方, 海外において市販されている血小板通過型白除フィルターによって白除した全血から, PRP 法および BC 法により, 血小板, 赤血球, 血漿の白除 3 製剤が調製できることが報告されている²⁷⁾²⁸⁾. そこで, 本邦における WB-PC の調製方法の検討の一つとして, このフィルターを用いて白除した全血から BC 法に準じて WB-PC を調製した. 今回, 4~5 バッグの BC のプールによって 10~15 単位の PC を調製することができた. また, 調製後 5 日までの血小板凝集および低浸透圧ショック回復率を指標とした血小板機能は良好であることを確認した (データ未掲載). しかし, 10 単位相当の 2 バッグ中 1 バッグの容量は, 10 単位 PC の容量基準の上限である 240ml を超えていた. また WB-PC の混入赤血球濃度は, Aph-PC に比べて高値であること²⁹⁾が報告さ

Table 4 Surface marker expression of MSCs grown in medium supplemented with 10% FBS, 10% WB-PL or 10% Aph-PL.

| Surface Marker (%) | FBS | WB-PL | Aph-PL |
|--------------------|-------------|----------------|--------------|
| CD105 | 98.7 ± 0.47 | 95.5 ± 0.95* † | 93.7 ± 0.82* |
| CD90 | 99.7 ± 0.05 | 99.8 ± 0.07 | 99.8 ± 0.05 |
| CD73 | 99.3 ± 0.15 | 98.7 ± 0.74 | 98.2 ± 0.43* |
| CD44 | 99.9 ± 0.06 | 99.9 ± 0.03 | 99.9 ± 0.04 |
| CD166 | 99.7 ± 0.13 | 99.4 ± 0.23 | 99.5 ± 0.18 |
| CD45 | 0.33 ± 0.13 | 0.01 ± 0.02* | 0.03 ± 0.02* |
| CD34 | 0.59 ± 0.14 | 0.55 ± 0.35 | 0.34 ± 0.12 |
| CD14 | 0.69 ± 0.44 | 0.39 ± 0.25 | 0.33 ± 0.21 |
| CD19 | 0.03 ± 0.02 | 0.05 ± 0.07 | 0.04 ± 0.04 |
| HLA-DR | 0.47 ± 0.17 | 0.76 ± 0.24 | 0.77 ± 0.42 |

Data are shown as mean percentages of positive cells ± SD. Three batches of FBS, three batches of WB-PL, and five batches of Aph-PL were used to compare MSC phenotype.

*p < 0.05 compared to FBS.

†p < 0.05 compared to Aph-PL.

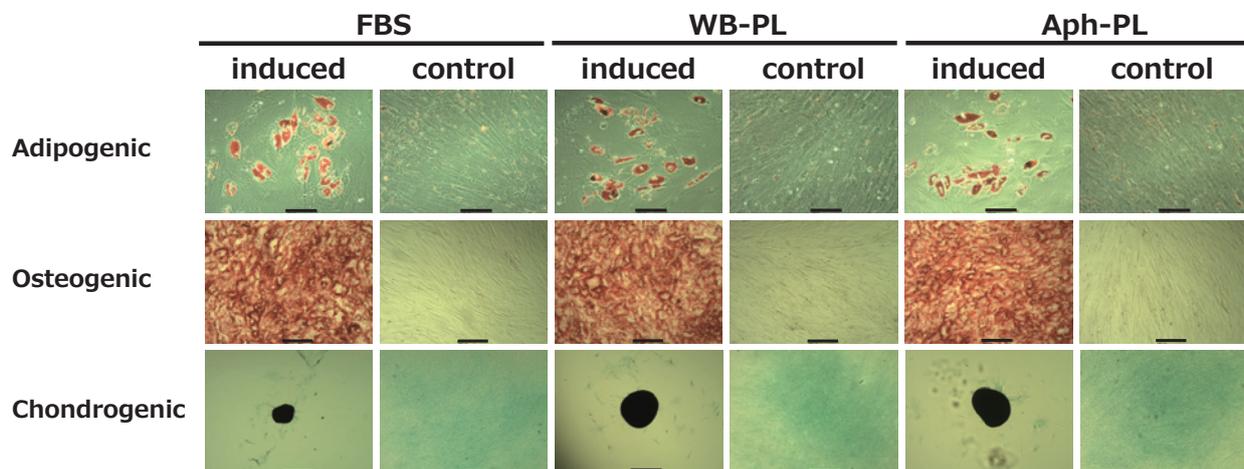


Fig. 3 Tri-lineage differentiation potential of MSC grown in medium supplemented with 10% FBS, 10% WB-PL or 10% Aph-PL.

One batch of FBS (Equitech-Bio), three batches of WB-PL and five batches of Aph-PL were used to compare MSC tri-lineage differentiation. MSCs grown under different conditions were cultured in adipogenic media for 14 days and stained with Oil Red O. The lipid droplets appear red on microscopy (top row, scale = 100 μm). MSCs were cultured in osteogenic media for 21 days, and osteoblasts stained positive with alizarin red (middle row, scale = 200 μm). MSCs were cultured in chondrogenic media for 14 days and stained with alcian blue (bottom row, scale = 500 μm). A representative image in each culture condition for MSC expansion is shown. A repeat experiment using different MSCs showed the same results.

れているが、今回得られた WB-PC の混入赤血球濃度は、3 バッグ中 2 バッグが 5,000 個/μl を超えていた。従って、適正な容量と混入赤血球濃度の低減のために、二次遠心後の T-ACE II[®] による分離条件の最適化が課題として考えられた。

本邦の Aph-PC から調製される Aph-PL は、FBS に比し同等以上の MSC 増殖促進作用があることが報告されている²³⁾。また、Aph-PL で培養した MSC の細胞表面抗原の発現が維持され、核型解析によって検出される染色体レベルの変異は認められなかったことが報告されている²³⁾。こうした検討をもとに、FBS の代替と

して Aph-PL で自家 MSC を培養し、脳梗塞患者に投与する再生治療が臨床治験として開始されている²⁶⁾。さらに、期限切れとなった Aph-PC から調製した Aph-PL は FBS に比べて強い MSC 増殖促進作用を有することを確認している²⁵⁾。そこで、今回調製した WB-PC を材料として調製した WB-PL が、MSC 増幅培養における培地添加物として有用かどうかについて、MSC の増幅と MSC の細胞膜抗原発現パターンおよび分化能への影響を Aph-PL と比較した。

成長因子である PDGF-BB、bFGF、TGF-β1、EGF は、MSC のコロニー形成に必要とされ、また PDGF-

BB, bFGF, TGF- β 1 は, PL による MSC の至適な増殖に重要とされる²²⁾³⁰⁾. 今回調製した WB-PL と Aph-PL において, これらの成長因子濃度には, 有意差は認められなかった (Table 3). PL 中の成長因子濃度は, 材料とする PC の血小板濃度や単位数に相関し, MSC 増殖促進作用に影響する¹⁶⁾²³⁾. 本検討では用いた WB-PC と Aph-PC の血小板濃度には有意差はなかったことから, PC 調製法の違い自体は成長因子濃度に影響しないと考えられた. なお, 本検討では, 1 回の凍結・融解にて WB-PL と Aph-PL を調製し, 比較した. それは, 細胞増幅のための GMP グレードのヒト PL に関する国際輸血学会フォーラムにおいて, 参加した 7 つの施設のうち, 2 施設は 1 回の凍結・融解による血小板溶解で PL を調製していたこと³¹⁾, また, Fekete ら²²⁾が 2 回の凍結・融解と 1 回の凍結・融解では, MSC の増幅に有意な影響がなかったと報告していたためである. しかしながら, 複数回の凍結・融解を行うことにより, 得られる成長因子濃度が高くなること³²⁾, また, 3 回以上の凍結・融解では 3 回未満の凍結・融解に比べ MSC 増幅における細胞倍加時間の短縮が報告されていること²¹⁾から, MSC 増幅のための PL 調製においては, 3 回以上の凍結・融解が望ましいと考える.

調製した WB-PL の MSC 増殖促進作用は, P3 から P6 までの継代における CPD の評価において, Aph-PL の MSC 増殖促進作用に比べ, 僅かではあるが有意に弱かった (Fig. 2). しかし, いずれの PL も, FBS よりも有意に強い MSC 増殖促進作用を示した (Fig. 2). MSC 増殖促進作用を評価するためには, MSC の増殖限界まで確認することが望ましいが, 少なくとも, P3 から P6 までの継代の結果は, 海外の Aph-PL および WB-PL を用いた多くの検討において, FBS に比べて MSC の増殖を亢進させるという結果と一致している¹⁹⁾²¹⁾. なお, FBS にはロット間差が知られているが, 本検討では, 3 バッチの内, 一つはロットチェックが不要とされる MSC 専用の Gibco 製の FBS を用いた. また他の二つの FBS も, MSC 専用の FBS と同等の値を示したことから, 用いた FBS の MSC 増殖促進作用が不良であった可能性は低いと考えられる.

国際細胞・遺伝子治療学会が提唱する MSC に特徴的な膜抗原発現パターンの基準は, CD105, CD73, CD90 の発現が陽性 (>95%), CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR の発現が陰性 (<2%) である²⁾. WB-PL で培養した MSC は, Aph-PL で培養した MSC とは CD105 の陽性率以外には差はなく, いずれの抗原に関しても基準を満たしていた (Table 4). また MSC にて高発現が知られている CD44 及び CD166 の陽性率も >95% であった. Aph-PL で培養した MSC の CD105 の陽性率は, 95% を下回ったが, 他の報告²¹⁾と同様に >90%

であった. よって, WB-PL または Aph-PL で培養した MSC は, MSC に特徴的な膜抗原発現パターンを維持することが示唆された (Table 4).

また, 定性的な評価ではあるが, WB-PL または Aph-PL で培養した MSC は, 脂肪細胞, 骨芽細胞, 軟骨細胞への分化能を有しており, WB-PL および Aph-PL は, いずれも MSC の 3 系統への分化能を維持することが示唆された (Fig. 3).

Fekete ら²²⁾は, BC 法で調製した WB-PC と Aph-PC から 2 回の凍結融解によりそれぞれ約 5 l の PL を調製し, MSC の増殖や性状への影響を比較している. その報告にて, PDGF-BB, bFGF, TGF- β 1 を含む成長因子の濃度と MSC の増殖促進作用において WB-PL と Aph-PL の間に有意差は認められなかったこと, また, それぞれの PL で培養した MSC は, MSC の細胞膜抗原発現パターンおよび 3 系統への分化能を維持していたことが示されている. 本検討では, MSC 増殖促進作用に WB-PL と Aph-PL で僅かな差が認められた点が Fekete ら²²⁾の結果と異なるが, この違いは WB-PC の調製法や PL の調製法が異なるためであるかもしれない.

PL は, FBS が保有する異種抗原による免疫反応や人獣感染症の伝播のリスク等から FBS に替わる MSC 増幅培養のサプリメントとして期待されているが, ヒト血液製剤由来であることによる本来的な病原体伝播のリスクがある. そのため, 原料となる PC の調製工程において, あるいは PL 調製後, さらにはその両工程において病原体不活化を行うことが検討されている^{33)~35)}. 一方, ヒト由来の血液製剤を使用せず, 化学的に合成された無血清培地での MSC 増幅培養の検討も進められ, 既に数種の無血清培地が市販されている³⁶⁾³⁷⁾. しかし, 多くの無血清培地は接着因子を欠いているため, 無血清培地での MSC 増幅培養には, 培養ディッシュに MSC の接着や成長を支持する細胞外マトリックスの構成タンパクのプレコーティング, あるいは細胞外マトリックス機能をもたせた特別な培養ディッシュが必要とされる³⁶⁾³⁷⁾. また, MSC の種類によって至適な無血清培地を選択する必要があることも指摘されている³⁷⁾. 従って, 無血清培地での MSC 増幅培養の臨床への応用も, さらに多くの検討を要する領域であると考えられる.

以上, 血小板通過型白除フィルターによって白除した全血から調製した WB-PC を材料として調製した WB-PL の MSC 増殖促進作用は, P6 までの継代の結果では, Aph-PL に比べて有意に弱かったが, その差は僅かであり, FBS に比べて有意に強かった. さらに WB-PL は, MSC の細胞膜抗原発現パターンと分化能を維持していることから, 再生医療のための MSC 増幅培養において Aph-PL の代替となる可能性が示唆された. WB-PC は, 現在本邦においては製造されていないが, 将来的

な献血者不足対策として製造された場合に、輸血用血液製剤としてだけでなく、再生医療・細胞治療の材料にも有効利用できる可能性が考えられる。

著者のCOI開示：著者は日本赤十字社職員である。

謝辞：本検討を実施するにあたり多大なるご協力を頂きました。林 宜亨氏、テルモ BCT 株式会社の山崎 裕輔氏、テルモ株式会社富士宮工場の細江 薫氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143—147, 1999.
- 2) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315—317, 2006.
- 3) Even MS, Sandusky CB, Barnard ND: Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnol*, 24: 105—108, 2006.
- 4) Hemedda H, Giebel B, Wagner W: Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 16: 170—180, 2014.
- 5) Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, et al: Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 76: 371—387, 2016.
- 6) Doucet C, Ernou I, Zhang Y, et al: Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*, 205: 228—236, 2005.
- 7) von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, et al: Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant*, 43: 245—251, 2009.
- 8) Introna M, Lucchini G, Dander E, et al: Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20: 375—381, 2014.
- 9) Sánchez-Guijo F, Caballero-Velázquez T, López-Villar O, et al: Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20: 1580—1585, 2014.
- 10) Gjerde C, Mustafa K, Hellem S, et al: Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Res Ther*, 9: 213, 2018.
- 11) Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, et al: Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*, 211: 121—130, 2007.
- 12) Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, et al: Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol*, 36: 1014—1021, 2008.
- 13) Pérez-Ilzarbe M, Díez-Campelo M, Aranda P, et al: Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion*, 49: 1901—1910, 2009.
- 14) Mojica-Henshaw MP, Jacobson P, Morris J, et al: Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*, 15: 1458—1468, 2013.
- 15) Capelli C, Domenghini M, Borleri G, et al: Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant*, 40: 785—791, 2007.
- 16) Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, et al: Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 213: 18—26, 2007.
- 17) Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, et al: Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 47: 1436—1446, 2007.
- 18) Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, et al: Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, 27: 2331—2341, 2009.
- 19) Guiotto M, Raffoul W, Hart AM, et al: Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. *J Transl Med*, 15: 351, 2020.
- 20) González MB, Cuerva RC, Muñoz BF, et al: Optimization of human platelet lysate production and pathogen reduction in a public blood transfusion center. *Transfusion*, 62: 1839—1849, 2022.
- 21) Palombella S, Perucca Orfei C, Castellini G, et al: Systematic review and meta-analysis on the use of human platelet lysate for mesenchymal stem cell cultures: comparison with fetal bovine serum and considerations on the production protocol. *Stem Cell Res & Ther*, 13: 142, 2022.

- 22) Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, et al: Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy*, 14: 540—554, 2012.
- 23) Tan C, Shichinohe H, Wang Z, et al: Feasibility and efficiency of human bone marrow stromal cell culture with allogeneic platelet lysate-supplementation for cell therapy against stroke. *Stem Cells Int*, 2016: 6104780, 2016.
- 24) Notodihardjo SC, Morimoto N, Kakudo N, et al: Comparison of the efficacy of cryopreserved human platelet lysate and refrigerated lyophilized human platelet lysate for wound healing. *Regenerative Therapy*, 10: 1—9, 2019.
- 25) 若本志乃舞, 藤原満博, 名村喜一郎, 他: 再生医療・細胞治療で使用される細胞の増幅に添加する血小板溶解液 (Platelet lysate) の調製方法と評価の検討. *血液事業*, 42: 98—99, 2019.
- 26) Shichinohe H, Kawabori M, Iijima H, et al: Research on advanced intervention using novel bone marrow stem cell (RAINBOW): a study protocol for a phase I, open-label, uncontrolled, dose-response trial of autologous bone marrow stromal cell transplantation in patients with acute ischemic stroke. *BMC Neurol*, 17: 179, 2017.
- 27) Paunovic D, van der Meer P, Kjeldsen-Kragh J, et al: Multicenter evaluation of a whole-blood filter that saves platelets. *Transfusion*, 44: 1197—1203, 2004.
- 28) Snyder EL, Whitley P, Kingsbury T, et al: In vitro and in vivo evaluation of a whole blood platelet-sparing leukoreduction filtration system. *Transfusion*, 50: 2145—2151, 2010.
- 29) Cavagnetto C, Alejo Blanco R, McKenna H, et al: Residual red cells in blood components: A multisite study of fully automated enumeration using a hematology analyzer. *Transfusion*, 61: 568—578, 2021.
- 30) Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG: Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*. *Br J Haematol*, 97: 561—570, 1997.
- 31) Strunk D, Lozano M, Marks DC, et al: International Forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation: summary. *Vox Sang*, 113: 80—87, 2018.
- 32) Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, et al: Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion*, 57: 1058—1065, 2017.
- 33) Viau S, Chabrand L, Eap S, et al: Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 12: e0181406, 2017.
- 34) Barro L, Su Y-T, Nebie O, et al: A double-virally-inactivated (intercept-solvent/detergent) human platelet lysate for in vitro expansion of human mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 59: 2061—2073, 2019.
- 35) Viau S, Eap S, Chabrand L, et al: Viral inactivation of human platelet lysate by gamma irradiation preserves its optimal efficiency in the expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 59: 1069—1079, 2019.
- 36) Cimino M, Gonçalves RM, Barrias CC, et al: Xeno-free strategies for safe human mesenchymal stem/stromal cell expansion: Supplements and coatings. *Stem Cells Int*, 2017: 6597815, 2017.
- 37) Bui HTH, Nguyen LT, Than UTT: Influences of xeno-free media on mesenchymal stem cell expansion for clinical application. *Tissue Eng Regen Med*, 18: 15—23, 2021.

USEFULNESS OF PLATELET LYSATE PREPARED FROM WHOLE BLOOD-DERIVED PLATELET CONCENTRATE FOR EXPANSION CULTURE OF MESENCHYMAL STEM CELLS

*Mitsuhiro Fujihara*¹⁾, *Shinobu Wakamoto*¹⁾, *Mitsuaki Akino*¹⁾, *Hisae Fuse*¹⁾, *Shiho Kato*¹⁾, *Yu Naito*¹⁾, *Katsuya Ikuta*²⁾, *Yoshihiro Torimoto*¹⁾ and *Shuichi Kino*¹⁾³⁾

¹⁾Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

²⁾Hokkaido Red Cross Blood Center

³⁾Japanese Red Cross Blood Service Headquarters

Abstract:

Platelet lysate (PL) is expected to replace fetal bovine serum (FBS) as a medium additive for expansion cultures of mesenchymal stem cells (MSCs). As a material for PL, we used whole blood-derived platelet concentrate (WB-PC), prepared from leukocyte-reduced whole blood using a platelet-saving leukocyte reduction filter. We compared the usefulness of the WB-PC-derived PL (WB-PL) for MSC expansion culture with that of apheresis PC (Aph-PC)-derived PL (Aph-PL).

The concentrations of growth factors involved in MSC proliferation were comparable between WB-PL and Aph-PL. The MSC proliferation-promoting activity of WB-PL was significantly weaker than that of Aph-PL, but the difference was slight, and significantly stronger than that of FBS. MSCs cultured in WB-PL or Aph-PL maintained the membrane antigen expression pattern characteristics of MSC and tri-lineage differentiation potential into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes.

These results suggest that WB-PL may be an alternative to Aph-PL in MSC expansion culture.

Keywords:

whole blood, platelet lysate, mesenchymal stem cells, platelet-saving leukocyte reduction filter