

P-14-9

世界最小・最軽量を目指した閉鎖型培養装置の開発

中島 義基¹、泉 賢二²、木場 直哉²、竹本 国夫³、塚原 正義¹第23回日本再生医療学会総会
2024.3.21-23
新潟コンベンションセンター、新潟市
¹公益財団法人 京都大学iPS細胞研究財団
²株式会社東海ヒット
³セルバイオ株式会社

背景と目的:

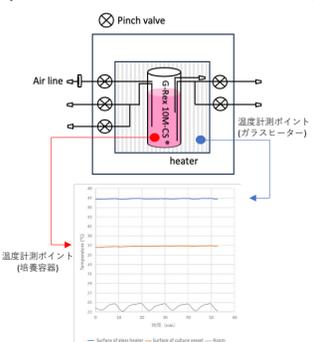
我々はコンパクトでありながら 10^8 個程度の細胞培養が可能な閉鎖型培養装置を開発する目的で、市販の小型閉鎖型培養容器であるG-Rex10M-CS®(Wilson Wolf社)をベースに改良を行い、iPS細胞の樹立・培養・分化誘導が可能な装置を作製した。G-Rex10M-CS®は7日間の長期培養にも適することから、細胞が分泌した成分(培養上清)を閉鎖的に採取し解析した。



(a) Gas feeder, (b) Culture area, (c) Controller, (d) Glass heater

装置概要 (培養容量 100mL)

(幅195mm×奥行105mm×高さ225mm)

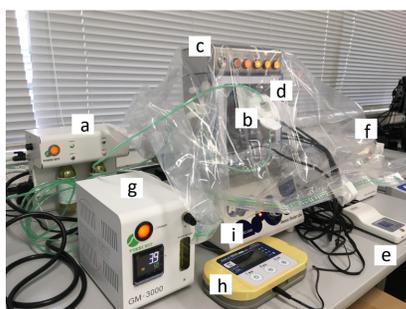
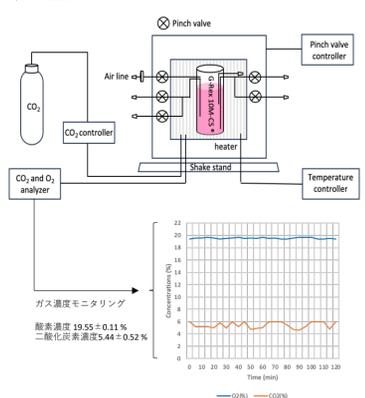


ガラスヒーターパネルを装置前面に実装し温度管理が可能
4つの流路と1つのAir lineは、電動のピンチバルブで開閉管理が可能

2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima

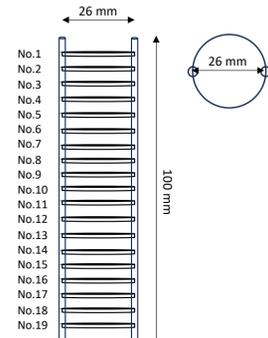
2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima

装置コンセプト (ポータブル式)

(a) Gas feeder, (b) Culture area, (c) Controller, (d) Glass heater, (e) Temperature controller, (f) Power supply, (g) CO₂ controller, (h) CO₂ and O₂ analyzer, (i) Shaker stand

Air Lineへ直接ガスを供給する方式とガスを袋へ供給する方式を選択可能

2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima

多層プレート概要 (培養面積 100.89 cm²)

多層プレート

再生医療用プラスチック
ロット管理
↓
プレートの加工工程
(オプショ)
表面塗工工程
↓
精密洗浄工程
↓
無菌室での組み立て工程
↓
包装工程
↓
減菌工程
↓
異物検査工程
↓
各社の協力による

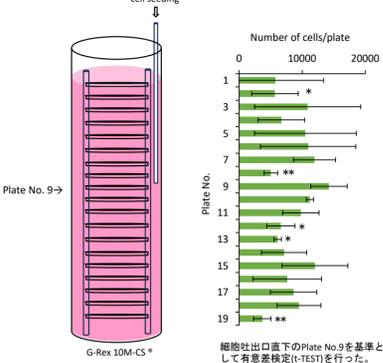
G-Rex 10M-CS®
(内部に多層プレートを入れた状態)

多層プレートを組み込み、iPS細胞等の接着細胞培養が可能

2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima

2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima

細胞播種 (ヒト歯髄細胞)



培地の比重 (1.015 g/ml)
細胞の比重 (1.054~1.058 g/ml)
培地と細胞の比重差は5%以内であり培地の比重調整は不要

全プレートに対する平均細胞附着数は
 1.64×10^6 cells であった。
[播種細胞数(1×10^6 cells)の16.4%が多層プレートへ接着した]

接着細胞数のplate間差は、Plate No.9を基準として、
8621.60 cells/plate (±2830.24 cells/plate)
プレート間差は、18.0%

培地の比重調整を行わずに細胞播種後に細胞は接着した
平均の接着細胞数は、8621.60 cells/plate

2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima

培養上清の解析

(Quantibody® Human Periodontal Disease Array)
歯髄細胞と、歯髄細胞由来iPS細胞から分化誘導した歯原性上皮細胞の培養上清を比較

Table 1. human periodontal disease array

Protein Symbol	Protein name	Control (tooth pulp cell)	iPS cell-derived odontogenic epithelial cells	P Value	n
CRP	C-reactive protein	0.27 ± 0.21	0.00 ± 0.01	0.11	3
IFNγ	Interferon γ protein	0.00 ± 0.01	0.04 ± 0.03	0.14	3
IL-1a	Interleukin 1 alpha	1.14 ± 0.55	0.93 ± 0.49	0.68	3
IL-1b	Interleukin 1 beta	0.57 ± 0.17	0.98 ± 0.25	0.10	3
IL-2	Interleukin-2	1.27 ± 1.96	20.24 ± 15.40	0.13	3
IL-4	Interleukin-4	0.05 ± 0.08	0.47 ± 0.39	0.19	3
IL-6	Interleukin-6	245.99 ± 76.19	2.02 ± 1.21	< 0.01	3
IL-8	Interleukin-8	9.38 ± 3.98	0.04 ± 0.03	< 0.05	3
IL-10	Interleukin-10	0.00 ± 0.00	0.27 ± 0.16	0.06	3
IL-12	Interleukin-12	0.22 ± 0.20	0.47 ± 0.31	0.36	3
IL-17	Interleukin-17	0.00 ± 0.00	3.96 ± 5.18	0.43	3
MIP-1a	Macrophage Inflammatory Protein 1 a	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	3
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9	15.24 ± 4.32	25.48 ± 9.56	0.20	3
MMP-13	Matrix metalloproteinase-13	0.50 ± 0.42	1.15 ± 0.39	0.15	3
OPG	Osteoprotegerin	107.76 ± 13.32	4.30 ± 2.88	< 0.01	3
OPN	Osteopontin	135.78 ± 73.61	216.46 ± 89.20	0.34	3
Osteocalcin	Osteocalcin	15.74 ± 5.36	3.59 ± 2.89	< 0.05	3
RANK	Receptor activator of nuclear factor κ B	2.11 ± 1.36	9.88 ± 14.18	0.45	3
TGFβ1	TGF-beta 1	132.02 ± 98.26	3130.55 ± 2291.49	0.11	3
TNFα	tumor necrosis factor alpha	1.94 ± 3.01	619.59 ± 741.95	0.27	3

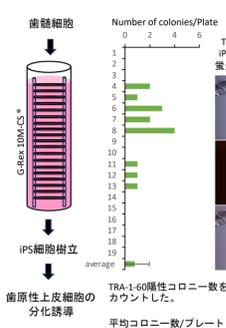
Protein concentrations (pg/mL) (mean ± standard deviation).

歯髄細胞の培養上清は、Osteoprotegerin(OPG)の発現が有意に高い

オステオプロテグリン (osteoprotegerin : OPG) は、骨芽細胞、線維芽細胞、肝細胞など多様な細胞から産生される破骨細胞分化抑制因子

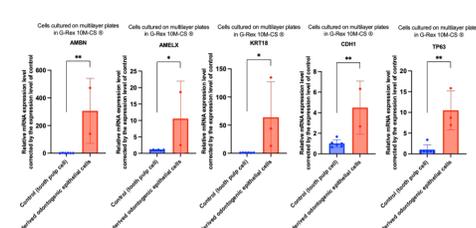
2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima

iPS細胞樹立



分化誘導 (歯原性上皮細胞)

分化マーカー遺伝子のmRNA発現解析



多層プレート1セットにつき15個のiPS細胞コロニーが認められた
歯原性上皮細胞マーカーmRNAの有意な増加、タンパク質発現を認めた

2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima

培養上清の解析

(プロテオーム解析)
歯髄細胞と、歯髄細胞由来iPS細胞から分化誘導した歯原性上皮細胞の培養上清を比較

Table 2. List of proteins that were highly expressed in "iPS cell-derived odontogenic epithelial cells" compared to controls by proteome analysis

Protein Symbol	Protein name	Control (tooth pulp cell)	iPS cell-derived odontogenic epithelial cells	P Value	n
JGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	14.46 ± 1.94	18.53 ± 1.63	0.07	3
LTF	Lactotransferrin	17.58 ± 0.48	21.58 ± 3.52	0.16	3
A2H	Alpha-2-macroglobulin	15.13 ± 1.25	21.11 ± 3.80	0.08	3
AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	15.32 ± 0.12	21.80 ± 3.11	< 0.05	3
C3	Complement C3	13.64 ± 0.34	19.14 ± 3.04	0.05	3
HBB	Hemoglobin subunit beta	22.85 ± 0.40	24.70 ± 0.42	< 0.05	3
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	13.87 ± 0.74	19.51 ± 0.67	< 0.01	3
LAMC1	Laminin subunit gamma-1	22.85 ± 0.40	24.70 ± 0.42	< 0.05	3
HPX	Hemopoietin	13.56 ± 0.61	22.30 ± 1.40	< 0.01	3
COLGB1	Colgin subfamily B member 1	16.58 ± 0.47	17.70 ± 0.25	< 0.05	3
LAMA5	Laminin subunit alpha-5	25.50 ± 0.64	27.40 ± 0.81	0.05	3
TGFB3	Transforming growth factor beta-3 proprotein	14.58 ± 0.99	16.45 ± 0.35	0.05	3
LAMB1	Laminin subunit beta-1	23.00 ± 0.59	25.08 ± 0.34	< 0.05	3

Value of change in magnification after Log₂ conversion.

歯原性上皮細胞は、alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG)の発現が有意に高い

プロテインAとしても知られるα-2-HS-糖タンパク質(AHSG)は、胎児血液に豊富に含まれる胎児の発達、骨組織の形成など関与する。

2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima

第23回 日本再生医療学会総会

まとめ:

閉鎖型培養装置を使い閉鎖培養を行うと一般環境下においてもiPS細胞の樹立・培養・分化誘導が可能。

多層プレートを用いて接着細胞からiPS細胞を樹立・培養・分化誘導が可能。

COI 開示

発表者名: ©中島義基

演題発表内容に関連し、発表者らに開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

2024.3.21-23. CiRAF Yoshiki Nakashima