

細胞外小胞を利用した治療用製剤の製造におけるPSアフィニティ法の有用性評価

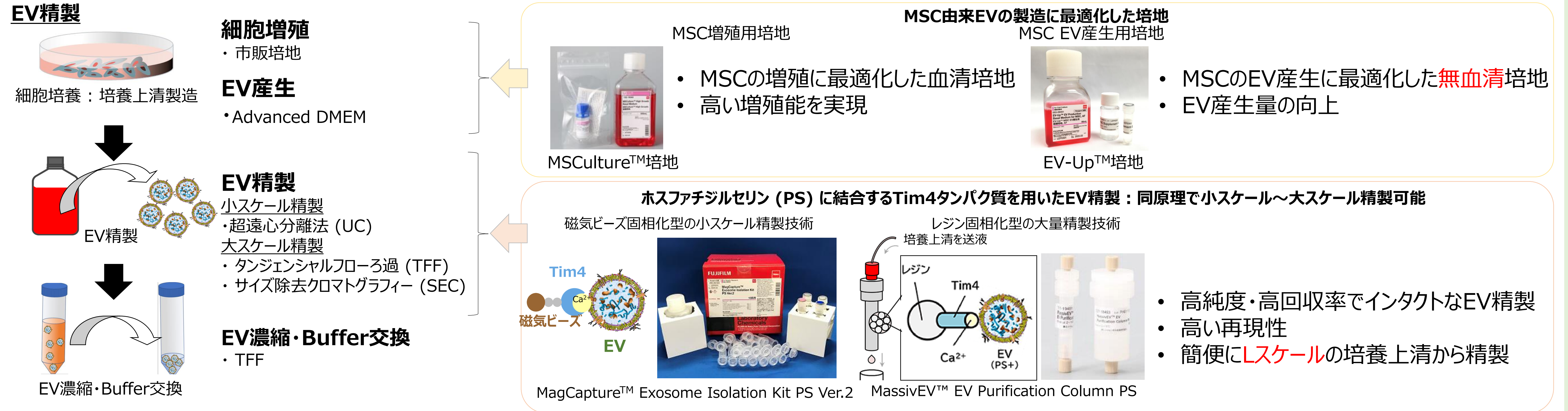
山根 昌之¹, 神保 遼², 石止 貴将¹, 請川 亮¹, 西部 隆宏¹, 阿部 寛幸², 土屋 淳紀³, 寺井 崇二²

- 1) 富士フイルム株式会社 バイオサイエンス&エンジニアリング研究所
- 2) 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 消化器内科学分野
- 3) 山梨大学 医学部 内科学講座消化器 内科学教室

要旨

細胞外小胞（Extracellular Vesicle、EV）は、細胞が放出する脂質二重膜の小胞であり、脂質、核酸、タンパク質といった多様な生理活性物質を含んでいる。近年、間葉系幹細胞（MSC）由来のEVが疾患治療効果を有することが明らかとなり、医療における治療用製剤としての利用への期待が高まっている。これまでに、EVの精製には超遠心分離法、タンジェンシャルフロー過法、サイズ排除クロマトグラフィー法などの手法が提案されてきたが、我々はEV表面のホスファチジルセリン（PS）を標的とした、少ない工程で高い再現性が期待できるアフィニティ精製技術、PSアフィニティ法を開発している。このPSアフィニティ法は、リッタースケールの培養上清からのEV大量精製にも対応可能である。また、我々はEV製造に最適化した培地についても検討し、高性能な培地を開発している。この培地はMSCの成長およびEVの生成を最適化するために設計されており、PSアフィニティ法と併せて使用することで、さらに優れた性能を発揮することが期待される。今回の研究では、治療用製剤の製造を想定したEV精製工程におけるPSアフィニティ法の有用性を評価するため、EVの回収率、純度および生物活性について他の精製技術と比較した。その結果、回収率および純度のいずれにおいても、PSアフィニティ法で精製したEVが優れていることが確認された。さらに、インターフェロンγで刺激した脂肪組織由来MSCのEVが有する抗炎症マクロファージ誘導効果を指標に生物活性を評価したところ、PSアフィニティ法で精製したEVは他の精製法よりも高い生物活性を示した。これらの結果から、PSアフィニティ法はEVを利用した治療用製剤の精製工程において有用な技術である可能性が示され、また我々の高性能な培地と組み合わせることで、より効果的な治療用製剤の開発に寄与できると考えられる。

治療領域に必須なEV精製フローと我々が開発したEV製造技術

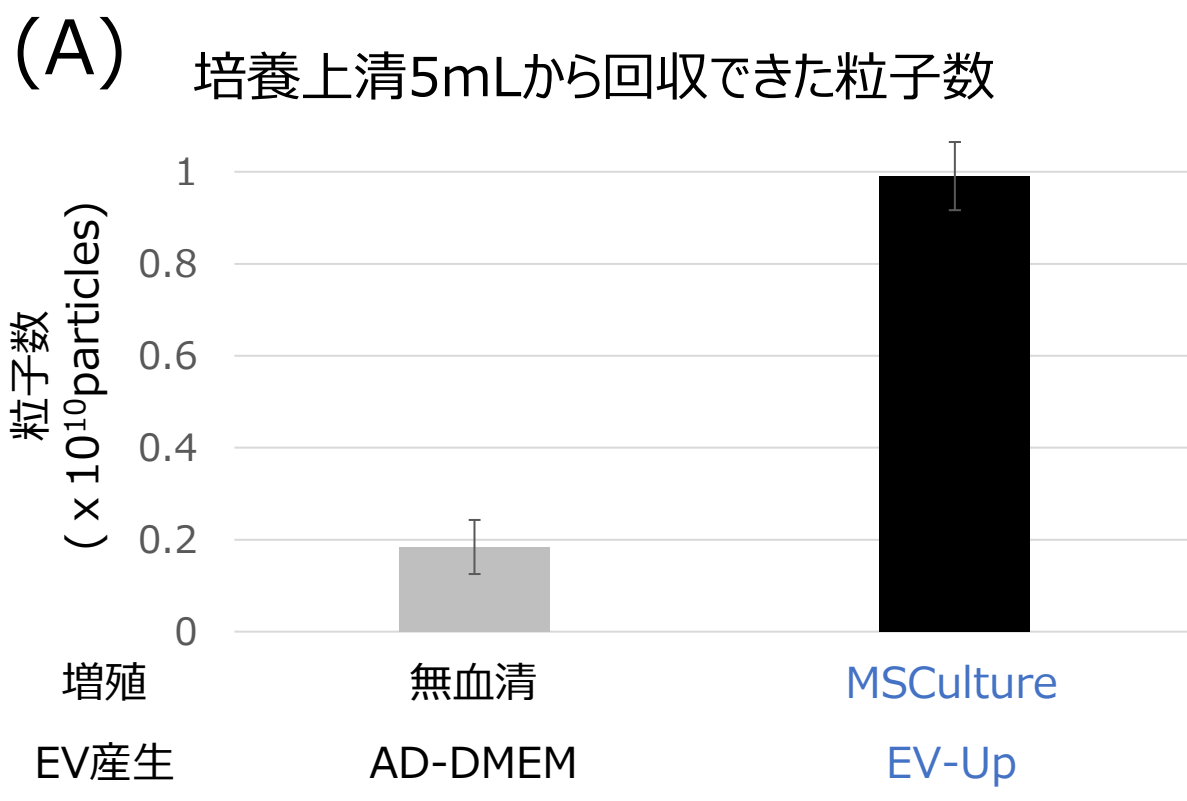


開発したEV製造用培地の性能評価

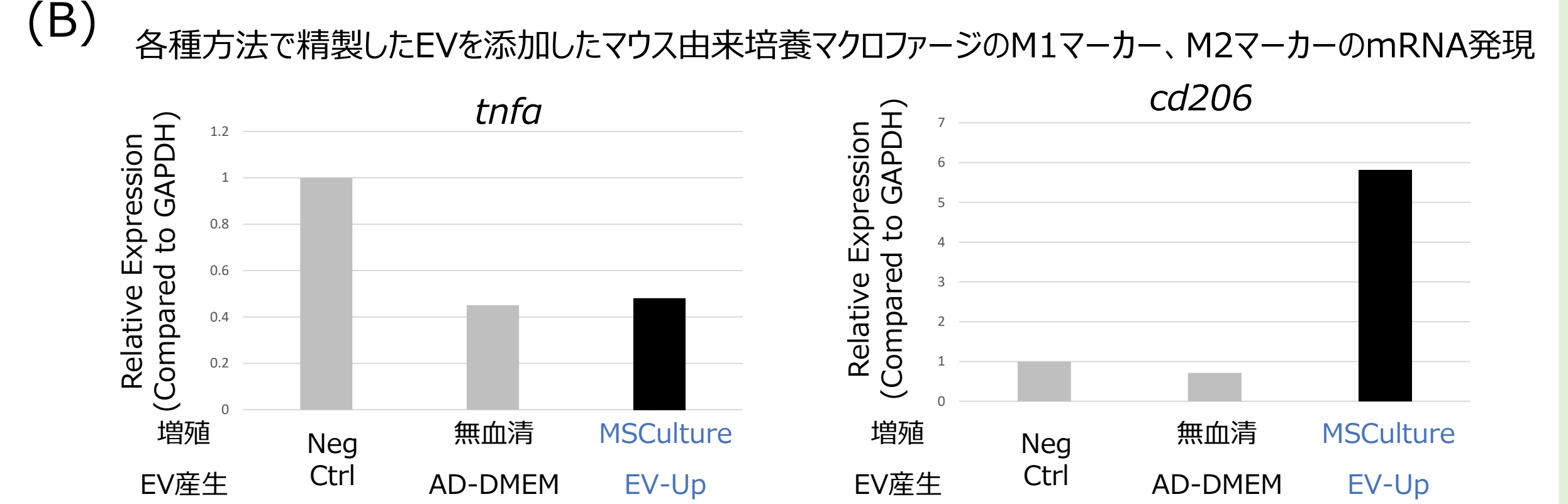
実験方法

- ①増殖培地を用いて一定量まで脂肪組織由来（AD）MSCを拡大インターフェロンγ（IFNγ）を添加
拡大培地：無血清培地（市販品）or MSCulture™培地
- ②EV産生用培地に置換
EV産生用培地：Advanced DMEM（血清不含）or EV-Up培地
- ③EV精製
EV精製方法：UC
- ④EV解析
解析方法：粒子数、抗炎症活性

粒子数解析



EVの抗炎症効果解析



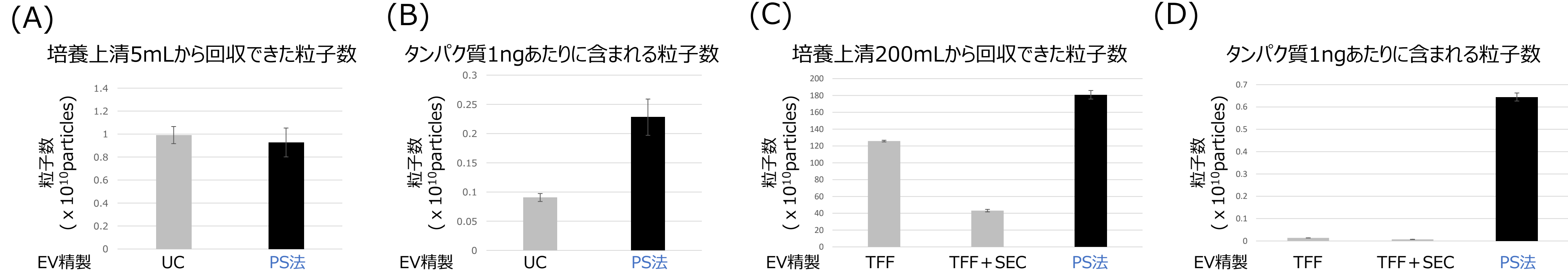
(A) AD MSC培養上清から各手法で回収されたEV粒子数。(B) 各法で精製されたEVを添加したマウス由来培養マクロファージのM1およびM2マーカーレベルのRT-PCR解析結果。開発した培地を使用することで、EV産生量とEV活性が大幅に向上した。

PSアフィニティ法を用いたEV精製の回収率、純度評価

実験方法

- ①IFNγで刺激したAD MSCの培養上清をMSCulture™培地とEV-Up™を用いて調製
- ②種々のEV大量精製技術を用いてEVを精製
小スケール：PSアフィニティ法、UC
大スケール：PSアフィニティ法、TFF、TFF + SEC
- 精製方法の詳細
小スケール：5mL培養上清からの精製
大スケール：200mL培養上清からの精製
- ③EV解析
解析方法：粒子数、純度

粒子数・純度解析



小スケール精製

大スケール精製

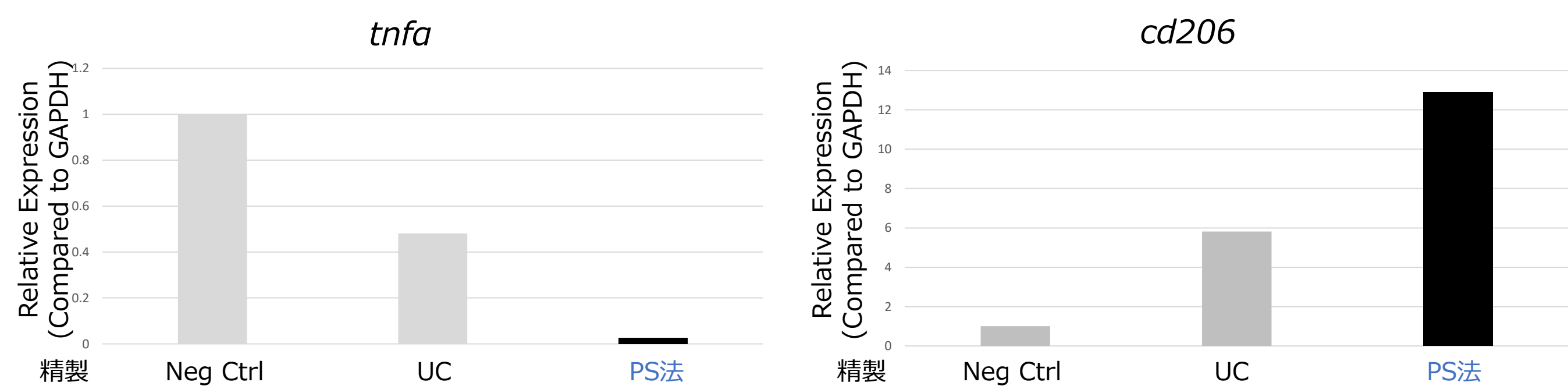
(A),(C) AD MSCの培養上清から各手法で回収されたEV粒子数。(B),(D) EVサンプルの総タンパク質1ngに含まれるEV粒子数。EV回収率、純度共にPSアフィニティ法で精製されたEVが優れていることが示唆された。

PSアフィニティ法を用いて精製したEVの抗炎症活性評価

実験方法

- ①IFNγで刺激したAD MSCの培養上清をMSCulture™培地とEV-Up™を用いて調製
- ②EV精製
EV精製方法：PSアフィニティ法、UC
- ③EV解析
解析方法：抗炎症活性

EVの抗炎症効果解析



各精製方法で精製されたEVを添加したマウス由来培養マクロファージのM1およびM2マーカーレベルのRT-PCR解析結果。PSアフィニティ法で精製したEVでは抗炎症活性が大幅に向上した。

まとめ

- 我々が開発した培地を使用することによりEVの産生量とEVの抗炎症活性が向上した。
- PSアフィニティ法は高回収率、高純度の精製とEVの抗炎症活性の向上を可能にすることが示された。
- PSアフィニティ法を利用したEVの大量精製手法も高回収率、高純度でのEVの精製が可能であることが確認された。
- 今後は、四塩化炭素誘発肝線維症モデルマウスを用いた試験で大量精製したEVの効果を確認する予定である。

COI

筆頭者は富士フイルム株式会社の社員です。