

ヒト骨髄単核球の播種密度の最適化による 高品質な間葉系幹細胞培養法の確立

学位申請者

山口大学大学院 医学系研究科 博士後期課程

保健学専攻 生体情報検査学領域

永井 寛之

目次

要旨.....	1
第1章 緒論	
1.1. 再生医療の歩み.....	2
1.2. 再生医療における間葉系幹細胞.....	4
1.3. 自己骨髄間葉系幹細胞を用いた肝臓再生療法.....	4
1.4. 間葉系幹細胞の製造における課題.....	4
第2章 単核球の播種密度の最適化による高品質な間葉系幹細胞培養法の確立	
2.1 研究の目的.....	6
2.2 材料と方法.....	7
2.3 結果.....	11
2.4 考察.....	20
結論.....	24
謝辞.....	25
参考文献.....	26

要旨

間葉系幹細胞（MSC）は、再生医療において有用な細胞である。MSC の培養工程の初期に、組織から抽出した単核球を培養容器に播種し、MSC の単離を行う。単離工程において、単核球の播種密度を最適化することで、単離後の MSC の収量や分化能が向上することが報告されている。しかし、単核球の播種密度が MSC の品質に影響する機構は明らかになっていない。

我々はその機構を明らかにする為、ヒト骨髄単核球を様々な播種密度（ 4.0×10^4 、 1.25×10^5 、 2.5×10^5 、 6.3×10^5 、 1.25×10^6 cells/cm²）で培養し、単核球の播種密度と MSC のコロニー形成過程との関係を解析した。播種密度が高い条件（ 6.3×10^5 、 1.25×10^6 cells/cm²）では、培養容器に接着した MSC 同士の距離が小さく、互いの増殖スペースが制限される為、早期に高密度に達した。一方、低い播種密度（ 4.0×10^4 、 1.25×10^5 cells/cm²）では、MSC は単一細胞由来のコロニーを形成し、コロニーの直径や密度は様々な形態を示した。コロニーを継時観察したところ、高い増殖能力を持つ MSC は、培養時間の経過に伴い、全体におけるその割合が増加した。それに対して、増殖能力が低い MSC は肥大化し、老化が進行した。老化細胞は剥離処理の時間を調整することで除去できることを見出した。単核球の播種密度が低い条件で、上記機構により、増殖能が高い MSC の純度が向上することが明らかになった。この機構をもとに単離工程のパラメータを最適化し、得られた MSC の増殖能と分化能を評価した。単核球の播種密度が高い条件（ 1.25×10^6 cells/cm²）と比較し、最適化した条件（播種密度： 1.25×10^5 cells/cm²）から得られた MSC は、高い増殖能を示し、骨以外の脂肪や軟骨への分化能が有意に上昇した。

本研究により、高品質な MSC の純度を向上させる方法として、(1) 単一細胞由来のコロニーを形成させる為に単核球の播種密度を最適化すること、(2) 高い増殖能を持つ MSC の割合を増やす為に培養期間を調整すること、(3) 老化細胞を除去できる剥離処理の時間を設定することを提案する。

第一章

緒論

1.1 再生医療の歩み

日本および世界の再生医療は急速な成長を遂げてきた。日本で、京都大学 山中伸弥 教授がマウスの皮膚線維芽細胞から人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell : iPS 細胞) を樹立し、2006 年、世界に向けてその研究成果を発表した [1]。その翌年、ヒト iPS 細胞の樹立が成功したことを発表し、2012 年にノーベル医学・生理学賞を受賞した [2]。その後、日本において、再生医療の実用化を進める動きが大きく進展した。2014 年、「再生医療の安全性の確保等に関する法律 (再生医療等安全性確保法)」と「医薬品、医療機器などの品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律 (薬機法)」の 2 つの法律が施行された。前者は、再生医療を国民に迅速に、かつ安全に提供することを目的とする。再生医療を提供する医療機関から外部施設・企業への細胞製造委託が可能になり、医療機関、および製造施設に安全性基準を設けた。後者の法律は、従来の医薬品や医療機器と異なる再生医療で使用する細胞加工物を「再生医療等製品」と新しく定義し、早期承認制度を導入し、再生医療の普及が加速した。法律の整備とともに、大学の研究機関や企業を中心に、臨床研究や実用化に向けた技術開発が進んだ。

その成果の一つとして、毎年のように、新しい再生医療等製品が誕生し、現在、承認された製品は 17 品目にのぼる (Table 1) [3]。温度応答性培養皿によりシート状に加工した細胞シート、遺伝子改変技術によりがん細胞への攻撃性を高めたキメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T 細胞)、抗炎症性作用や組織修復を行う間葉系幹細胞を使用した製品等がある。

Table 1. 承認された再生医療等製品 (2023年1月現在)

No	製品名 (承認された年)	一般的名称	製造販売業者	対象疾患
1	ジェイス (2007年)	ヒト(自家) 表皮由来細胞シート	(株) ジャパン・テイ ユ・エンジニアリング	重症熱傷、先天性巨大色素性母斑、 栄養障害型表皮水疱症及び接合部型表皮水 疱症
2	ジャック (2012年)	ヒト(自家) 軟骨由来組織	(株) ジャパン・テイ ユ・エンジニアリング	膝関節における外傷性軟骨欠損症又は離断 性骨軟骨炎
3	テムセル®HS 注 (2015年)	ヒト(他家) 骨髄由来間葉系幹細胞	JCR ファーマ (株)	造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病
4	ハートシート (2015年※)	ヒト(自家) 骨格筋由来細胞シート	テルモ(株)	虚血性心疾患による重症心不全
5	ステミラック®注 (2018年※)	ヒト(自家) 骨髄由来間葉系幹細胞	ニプロ(株)	脊髄損傷に伴う神経症候及び機能障害
6	キムリア点滴静注 (2019年)	ヒト(自家) キメラ抗原受容体 T 細胞	ハルテイファーマ (株)	B 細胞性急性リンパ芽球性白血病、 びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
7	コラテジェン筋注用 4 mg (2019年※)	プラスミドベクター	アンジェス(株)	慢性動脈閉塞症 (閉塞性動脈硬化症及びバージャー病)
8	ゾルゲンスマ点滴静注 (2020年)	ウイルスベクター	ハルテイファーマ (株)	脊髄性筋萎縮症
9	ネピック (2020年)	ヒト(自家) 角膜輪部由 来角膜上皮細胞シート	(株) ジャパン・テイ ユ・エンジニアリング	角膜上皮幹細胞疲弊症
10	イエスカクタ点滴静注 (2021年)	ヒト(自家) キメラ抗原受容体 T 細胞	第一三共(株)	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、原発性 縦隔大細胞型 B 細胞リンパ腫、形質転換濾 胞性リンパ腫、高悪性度 B 細胞リンパ腫
11	ブレヤンジ静注 (2021年)	ヒト(自家) キメラ抗原受容体 T 細胞	ブリストル・マイヤーズ スクイ ブ(株)	再発又は難治性の大細胞型 B 細胞リンパ 腫、再発又は難治性の濾胞性リンパ腫
12	オキュラル (2021年)	ヒト(自家) 口腔粘膜由 来上皮細胞シート	(株) ジャパン・テイ ユ・エンジニアリング	角膜上皮幹細胞疲弊症
13	デリタクト注 (2021年※)	遺伝子組み換えウイルス	第一三共(株)	悪性神経膠腫
14	アロフィセル注 (2021年)	ヒト(他家) 脂肪由来幹細胞	武田薬品工業 (株)	複雑痔瘻
15	サクラシー (2022年)	ヒト羊膜基質使用ヒト (自家) 口腔粘膜由来上 皮細胞シート	ひろさき L I (株)	角膜上皮幹細胞疲弊症
16	アベクマ点滴静注 (2022年)	ヒト(自家) キメラ抗原受容体 T 細胞	ブリストル・マイヤーズ スクイ ブ(株)	再発又は難治性の多発性骨髄腫
17	カービクティ点滴静注 (2022年)	ヒト(自家) キメラ抗原受容体 T 細胞	ヤンセンファーマ(株)	再発又は難治性の多発性骨髄腫

※条件および期限付き承認

1.2 再生医療における間葉系幹細胞

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell : MSC) は、中胚葉性組織由来の体性幹細胞である。骨髄、脂肪、臍帯など様々な組織から採取できるため、再生医療にとって有用な細胞源として注目されてきた [4、5]。骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞など様々な系統の細胞に分化できることから、組織工学の材料として広く利用されている [6、7]。骨や軟骨などの様々な欠損部位の修復や治療のために、MSC の大量培養技術や効率的な分化方法が研究されてきた。さらに、MSC 自身が抗炎症作用や免疫調節作用を持ち、脳梗塞や心筋梗塞などの様々な疾患において、パラクライン効果による治癒効果が報告され、臨床における有効性が証明されてきた [8、9]。それに加え、近年、MSC が産生する細胞外小胞 (Extracellular vesicles) が注目されており、セルフリー治療薬の実用化に向けた研究が進められている [10]。これらの特徴から、臨床現場での活用が急速に進み、重要視されてきている。

1.3 自己骨髄間葉系幹細胞を用いた肝臓再生療法

山口大学大学院 医学系研究科 消化器内科学では、肝移植が唯一の根治療法とされていた非代償性肝硬変症に対して、自己骨髄細胞投与が肝線維化および肝機能を回復させることを見出した [11]。2003 年、「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (Autologous Bone Marrow Cell infusion : ABMi 療法)」を開始し、山形大学、国立国際医療研究センター、韓国延世大学との共同研究の下、安全性および有効性を確認した。しかし、ABMi 療法では、非代償性肝硬変患者に対して 400mL の自己骨髄液が必要であり、全身麻酔下で骨髄採取を行う。患者への負担が大きく、ABMi 療法を実施できない症例が少なからず存在した。そこで、より低侵襲な治療法として、局所麻酔下で採取した骨髄液から単離培養する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた低侵襲肝臓療法を開発した [12-15]。この治療法は 2020 年 9 月から、医師主導型治験 (UMIN-CTR Trial No.UMIN000041461) を開始し、現在、臨床での評価を進めている。

1.4 間葉系幹細胞の製造における課題

臨床において MSC の有用性が証明されるとともに、MSC を製造する施設・企業の数は増加している。しかし、製造において、いくつかの懸念や課題がある [5]。例えば、MSC の増殖能や分化能は、ドナーの年齢や健康状態に大きく依存する。ドナーの年齢が大きくなると、増殖能、分化能、免疫抑制能が低下する [16]。加齢に伴う酸化ストレス、DNA 損傷、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化が細胞内部で蓄積する [17-19]。これらの変化は、*p16* や *p21* などの細胞周期停止に関わる遺伝子や、Wnt シグナルや *Runx2* などの分化制御遺伝子に影響する。その結果、MSC の増殖能や分化能が低下する恐れがある。このような MSC を原料として製造をスタートした場合、製造期間が長くなる、もしくは、製造を中止するケースが発生しうる。特に自家細胞を原料とする場合に

は、そのリスクはより大きくなる。それに加えて、MSC の品質が安定しない要因となり、治療効果にも影響しうる。これらの問題を解決するためには、MSC を安定的に製造する技術の確立が必須である。

第 2 章

単核球の播種密度の最適化による高品質な間葉系幹細胞 培養法の確立

2.1. 研究の目的

MSC の製造を安定化する技術として、これまで多数の要素技術が開発されてきた。低酸素培養、無血清培地、単離方法、拡大培養における MSC の播種密度など多くのパラメータが検討されてきた [20]。

これらの要素技術の中で、我々は、MSC の単離工程に着目した。単離工程とは、組織から分離した単核球 (Mononuclear cell) を培養容器に播種し、培養しながら、MSC の純度を高める工程を指す。単核球はリンパ球、単球、造血幹細胞等の血球系細胞を多く含み、MSC は単核球全体の中で僅か 0.001-0.01% しか存在しない。MSC は局所的に集団 (コロニー) を形成しながら増殖する一方、不純物となる血球系細胞は培養中に浮遊させ、培地交換を繰り返し行い、取り除く。この単離工程において、他の研究グループから、単核球の播種密度を最適化することで、MSC の収量が増加することが報告されている [20-22]。しかし、この効果が生じる機構は明らかになっておらず、単核球の播種密度と MSC の品質との関係性について十分な説明はなされていない。そのため、製造の初期工程で重要なパラメータであるにも関わらず、最適な条件を決定することが困難であった。そこで、我々はその課題に対して、次の 2 つの目的を達成する為に、MSC の単離工程に関する研究を行った。

- 目的 1. 単核球の播種密度が MSC の品質に影響する機構を明らかにすること
- 目的 2. 見出した機構から単離工程を最適化し、培養した MSC を評価すること

2.2 材料と方法

2.2.1. 材料

ヒト骨髄由来単核球は Lonza (Basel, Switzerland) から購入した。健康なドナーの全骨髄から Ficoll 密度勾配分離 (GE Healthcare, ORD, USA) により単核球を抽出し、これを凍結保存した。本研究では、5つのロットを使用した。ドナーは、HIV/HBV/HCV 陰性の女性および男性で、年齢は 22-35 歳であった。

2.2.2. ヒト骨髄由来 MSC の単離と培養

単核球を解凍し、10%ウシ胎児血清 (FBS) (ニチレイバイオサイエンス、東京、日本) および 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシン (高田薬品、埼玉、日本) 添加の Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) と混合した。細胞を様々な密度で培養容器に播種し、5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した (CO_2 インキュベータ、PHC、東京、日本)。培地は 2-3 日ごとに交換し、培養 7 日目に 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iMatrix-511 (Nippi、東京、日本) を添加した Stem Fit for MSC medium (味の素、東京、日本) に置換した。MSC のコロニーが高密度になった時点で、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Thermo Fisher Scientific) で細胞を洗浄し、その後、トリプシン (TrypLE Select Enzyme (1 \times), Thermo Fisher Scientific) を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間、細胞を剥離した。剥離した細胞を遠沈管に回収後、300 $\times g$ で 5 分間遠心分離した (AX シリーズ遠心機、TOMY、東京、日本)。ペレットを新しい培地に懸濁し、5,000 cells/cm² で新しい培養容器に播種した。

2.2.3. タイムラプスイメージング

培養プレート上で培養した単核球を、マルチエリアタイムラプスイメージング顕微鏡 (EVOS, Thermo Fisher Scientific) により 24 時間ごとに観察した。タイムラプス画像を基に、MSC が高密度になるタイミングと倍化時間を計測し、「増殖の速い細胞」と「増殖の遅い細胞」に分類した。倍化時間は、培養時間と変化した細胞数から算出した。MSC の数は ImageJ ソフトウェア (NIH 社) を用いてカウントした。

2.2.4. 老化関連 β -ガラクトシダーゼ染色

Senescence-Associated β -galactosidase (SA- β -gal) 染色により、老化細胞を検出した。染色は、市販のキット (Senescence Detection Kit, Bio-Vision, MA, USA) を用いて行った。簡潔に手順を記すと、細胞をホルマリンで固定した後、基質である X-gal と染色溶液を加えた。37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間インキュベートし、SA β -gal 活性を示す細胞が青色に変化した。染色された細胞を顕微鏡で観察した (EVOS, Thermo Fisher Scientific)。

2.2.5. フローサイトメトリー

継代数 2 で凍結した細胞を解凍し、FcR Blocking Reagent (Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) で 4 °C、15 分間ブロックし、蛍光色素抗体で標識した。死細胞は 7-AAD (BD Biosciences, NJ, USA) で染色し、フローサイトメーター (FACS Verse; BD Biosciences) で解析を行った。抗ヒト抗体 (CD45、CD73、CD90、CD105) は BioLegend (CA, USA) から購入した。

2.2.6. シングルセルクローニングアッセイ

単核球を解凍し、10%FBS と 5 µg/mL ゲンタマイシンを添加した DMEM 培地と混合し、 1×10^4 cells/ウェルずつ 96 ウェルプレート (Corning, NY, USA) に播種した。MSC は、骨髄由来単核球のうち、0.001–0.01% 存在することから、この密度で播種すると 1 コロニー/ウェルが形成されると仮定した [23]。ヒト骨髄由来 MSC の単離と培養には、前述した同手順で行った。

2.2.7. コロニー形成アッセイ

継代数 2 および 3 の細胞を、10%FBS および 5 µg/mL ゲンタマイシンを添加した DMEM 中で 60 mm ディッシュ (Corning) に 100 個ずつ播種した。14 日間の培養後、コロニーをクリスタルバイオレットで染色し、コロニー数を手動でカウントした。

2.2.8. 定量的リアルタイム PCR

市販のキット (KURABO、大阪、日本) を用いて、細胞から Total RNA を抽出した。これを市販のキット (東洋紡、大阪、日本) を用いて cDNA に逆転写した。FastSYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, MA, USA) と RT 反応液の 1 mL aliquots を用いて定量的 PCR を実施した。サンプルの増幅は、StepOnePlus™ システム (Applied Biosystems) を用いて、最終容量 20 µL で次のプログラムで反応させた: 初期の熱変性 95 °C 20 秒、その後、60 °C 30 秒でアニーリングと 95 °C 3 秒での熱変性を 40 サイクルした。次のプライマーを使用した (Table 2) : *Ki67*、*PCNA*、および *β-actin*。相対的な fold-change 値を計算するために、CT 値は、インターナルコントロールとして *β-actin* を使用して標準化した。

Table 2. 使用したプライマー

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>Ki67</i>	Forward: GGAACAGCCTCAACCATCAG Reverse: CCACTCTTTCTCCCTCCTCTC	210
<i>PCNA</i>	Forward: TGGAGAACTTGGAAATGGAAA Reverse: GAACTGGTTCATTCATCTCTATGG	95
<i>β-actin</i>	Forward: CGGGACCTGACTGACTACCT Reverse: CTCCTTAATGTCACGCACGA	96

2.2.9. 遺伝子発現の連続解析 (SAGE) 解析

トランスクリプトーム解析のため、単核球の播種密度が低い条件 (1.25×10^5 cells/cm²) と高い条件 (1.25×10^6 cells/cm²) で得られた MSC から RNA を調製した。Maxwell RSC simplyRNA Cell Kit (Promega, WI, USA) を用いて、細胞から total RNA を抽出した。ライブラリ作成には Ion Ampliseq Transcriptome Human Gene Expression Kit (Life Technologies) を使用した。Ion Proton 次世代シーケンサーで解析ビーズのライブラリを作成し、Ion 540 Kit (Life Technologies) を用いて Ion Proton 次世代シーケンサーでシーケンシングを行った。Gene set enrichment analysis (GSEA) は、R programming software で解析した。単核球の播種密度が低い条件 (1.25×10^5 cells/cm²) で得た MSC における Protein-coding differentially expressed genes (DEG) を、単核球の播種密度が高い条件 (1.25×10^6 cells/cm²) で得た MSC と比較して、変化率 2.0 をカットオフ値として同定した。

2.2.10. 分化誘導アッセイ

脂肪細胞への分化のために、メーカーの手順書 (R&D Systems, MN, USA) に従い、継代数 3 の細胞を 24 ウェルプレート (Corning) に 2.1×10^4 cells/cm² で播種した。分化誘導培地として、10% FBS、1 × adipogenic supplement (hydrocortisone、isobutylmethylxanthine、indomethacin)、100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin を加えた MEM α (Thermo Fisher Scientific) を使用し、細胞を 21 日間培養した。その後、ホルマリン固定し、Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4) 抗体 (R&D Systems)、Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) で染色した。骨芽細胞への分化のために、継代数 2 の細胞を 48 ウェルプレート (Corning) に 4.2×10^3 cells/cm² で播種し、市販の分化誘導培地 (Sartorius, Göttingen, Germany) で 21 日間培養した。その後、Alizarin Red と Hoechst 33342 で染色した。Alizarin Red 染色は市販のキット (COSMO BIO, 東京, 日本) を用いて行った。軟骨細胞への分化は、15 mL フィルターチューブ (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) に 6.3×10^4 cells と 1.25×10^5 cells の細胞をそれぞれ分化誘導培地で懸濁し、播種した。培地は、10 ng/mL TGF- β 1 (Merck, Darmstadt, Germany)、100 nM dexamethasone (Merck)、50 μ g/mL

ascorbic acid (東京化成、東京、日本)、100 µg/mL sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific) および 1% ITS + Premix (Corning) を添加した D-MEM/F12 medium (Thermo Fisher Scientific) で、スフェアを形成させ、21 日間培養した。培養後、ホルマリン固定を行い、パラフィン切片を作製し、アルシアンブルーで染色した。各標本を顕微鏡で観察した (EVOS)。

2.2.11. 統計解析

データは、平均値±標準誤差で示した。統計解析は、JMP Pro ソフトウェア (SAS Institute、NC、USA) を用いて行った。データは Student の t-test を使用して分析した。差は $p < 0.05$ で統計的な有意差があるとした。

2.3 結果

2.3.1. 単核球の播種密度の違いによる MSC コロニー形成時期の違い

単核球の播種密度に関連した過去の研究を調査したところ、広範囲な播種密度 (4×10^3 – 1×10^6 cells/cm²) で検討されていた [20-22]。これらの研究と製造コストの面から、いくつかの播種条件 (4.0×10^4 、 1.25×10^5 、 2.5×10^5 、 6.3×10^5 、 1.25×10^6 cells/cm²) を設定して培養を行った。最初に、MSC コロニーをクリスタルバイオレットで染色し、コロニー形成が起こるタイミングを比較した (図 1A)。 6.3×10^5 cells/cm² と 1.25×10^6 cells/cm² は 7 日目、 2.5×10^5 cells/cm² は 9 日目、 1.25×10^5 cells/cm² は 11 日目、 4.0×10^4 cells/cm² は 13 日目にコロニーが発生し、播種密度が高いほど、コロニー形成の時期が早くなる傾向が確認された。さらに、各条件下で培養時間が長くなると、細胞の凝集が進行した。培養時間が長期化すると、コロニー内の細胞がオーバーコンフルエントになり、培養容器からコロニーが剥がれるものがあった。このことから、適切な密度で細胞を回収する必要性が伺えた。図 1A に示すように、播種密度が高いほど高密度化は早く進行した。この結果から、培養容器に接着した MSC 間の距離が小さいほど、コロニーが高密度になりやすいと推測した。それを確認する為に、サイズの異なる培養容器に同数の単核球を播種し、播種密度を変えたときのコロニー分布を比較した (図 1B)。播種密度が小さくなるにつれて、コロニー間の距離は大きくなった。 1.25×10^6 cells/cm² の高い密度では、コロニーは不明瞭で、高密度に達している細胞の占める面積の割合は大きかった。中程度の密度である 2.5×10^5 cells/cm² では、コロニーは直径 2mm 以上となり、部分的にコロニー同士が重なりあっていた。 4.0×10^4 cells/cm² の低密度では、コロニーの直径は 1.0–6.5 mm で、細胞密度は密から疎なものまで様々であった (図 1C)。

これらの結果は、単核球の播種密度が MSC のコロニー形成に顕著な影響を及ぼしていることを示唆している。 6.3×10^5 cells/cm² や 1.25×10^6 cells/cm² のような高密度の場合、培養容器に接着した MSC 間の距離が短くなる。その後、MSC は増殖し、コロニーを形成するが、互いに重なり合い、増殖に利用できるスペースが制限される。そのため、細胞が高密度に達するタイミングがより早くなった。一方、 4.0×10^4 cells/cm² や 1.25×10^5 cells/cm² の低い密度条件では、単一細胞由来のコロニーが形成された。これらの条件では、MSC が増殖するための十分なスペースが確保されている。そのため、これらのコロニー内部の高密度化はより遅くなった。

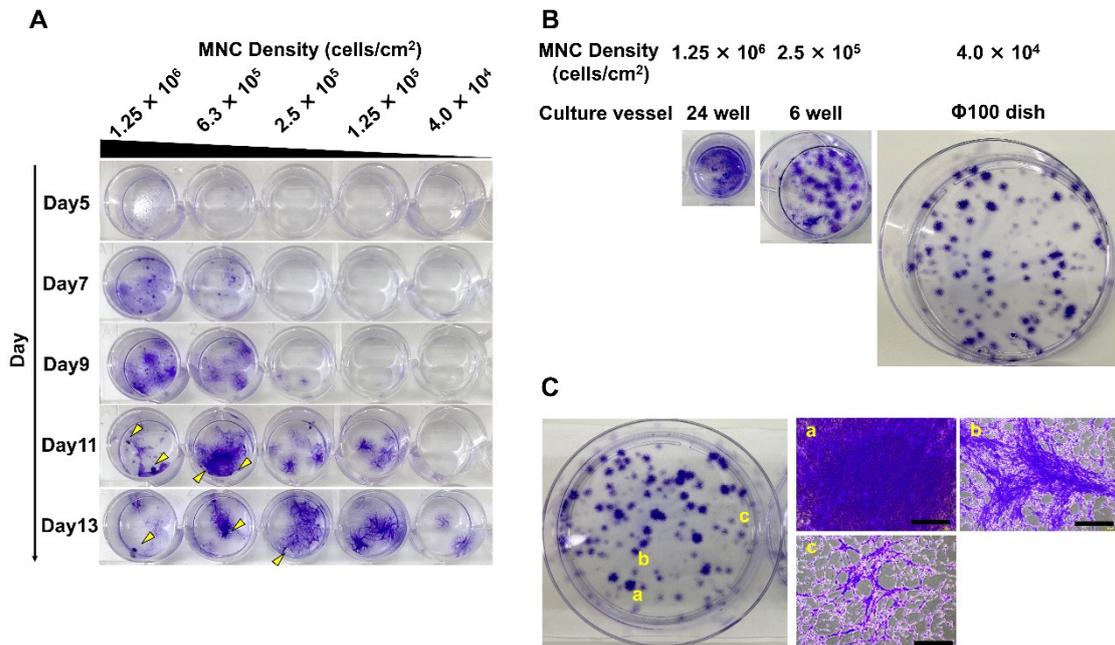


図 1. 単核球の播種密度の違いにより、間葉系幹細胞 (MSC) コロニーの高密度に達するタイミング、分布、形態が異なる。(A) 単核球を様々な播種密度 (4.0×10^4 、 1.25×10^5 、 2.5×10^5 、 6.3×10^5 、 1.25×10^6 cells/cm²) で培養した。MSC コロニーをクリスタルバイオレットで経時的に染色した。矢印は凝集した細胞を示す。(B) 同数の単核球を異なる面積の培養容器 (24 ウェルプレート、6 ウェルプレート、100mm ディッシュ) に播種した。培養後、MSC コロニーをクリスタルバイオレットで染色した。(C) 単核球の播種密度が低い条件 (4.0×10^4 cells/cm²) で形成されたコロニーのパターンを示す。スケールバーは 500 μ m を表す。(a) 高い密度のコロニー、(b) 中程度の密度のコロニー、(c) 低い密度のコロニーを示す。

2.3.2. 単核球の播種密度が低い条件では、増殖能の優劣により、質の異なる MSC 間で数に大きな差が生じる

単核球の播種密度が低い条件下で形成されたコロニーは、サイズや密度に個体差が見られた (図 1C)。その多様性に着目し、個々のコロニー内の MSC の増殖を経時的に顕微鏡観察した。播種密度が低い条件 (1.25×10^5 cells/cm²) では、細胞数は、撮影したポジション間でのばらつきが顕著であった。培養時間が経過するにつれ、ポジション間の差がより顕著になった (図 2A、C)。次に、倍化時間と全体に対する各ポジションの細胞数の比率を算出した (図 2D)。培養 5 日目から 9 日目にかけて、増殖の速い細胞群の割合が増加し、逆に増殖の遅い細胞群の割合が減少していることが分かった。これは、培養時間の経過とともに、増殖速度の速い細胞の割合が優勢になることを示している。一方、高密度条件 (1.25×10^6 cells/cm²) では、撮影したポジション間でのばらつきが小さく、増殖率は一様のパターンを示した (図 2B、C)。

さらに、 1.25×10^5 cells/cm² の単核球の播種密度が低い条件では、増殖能が低い細胞は、時間の経過とともに、肥大化する傾向が見られた (図 2A)。肥大化した細胞は SA- β -Gal 陽性であり、老化していることを確認した (図 2E)。老化細胞のトリプシン剥離処理は 5 分以上かかる傾向があった。5 分間処理することで、老化細胞以外の正常な細胞を回収することができた (図 2F)。

これらの結果から、単核球の播種密度が低い条件では、MSC の増殖能力の優劣により、時間の経過とともに、増殖能の速い MSC の割合が優位になることが分かった。それに加えて、トリプシン試薬による剥離処理時間を調整することで、老化細胞を培養容器に残し、除去できることを確認した。したがって、増殖能力の優れた MSC を高い純度で回収することができた。

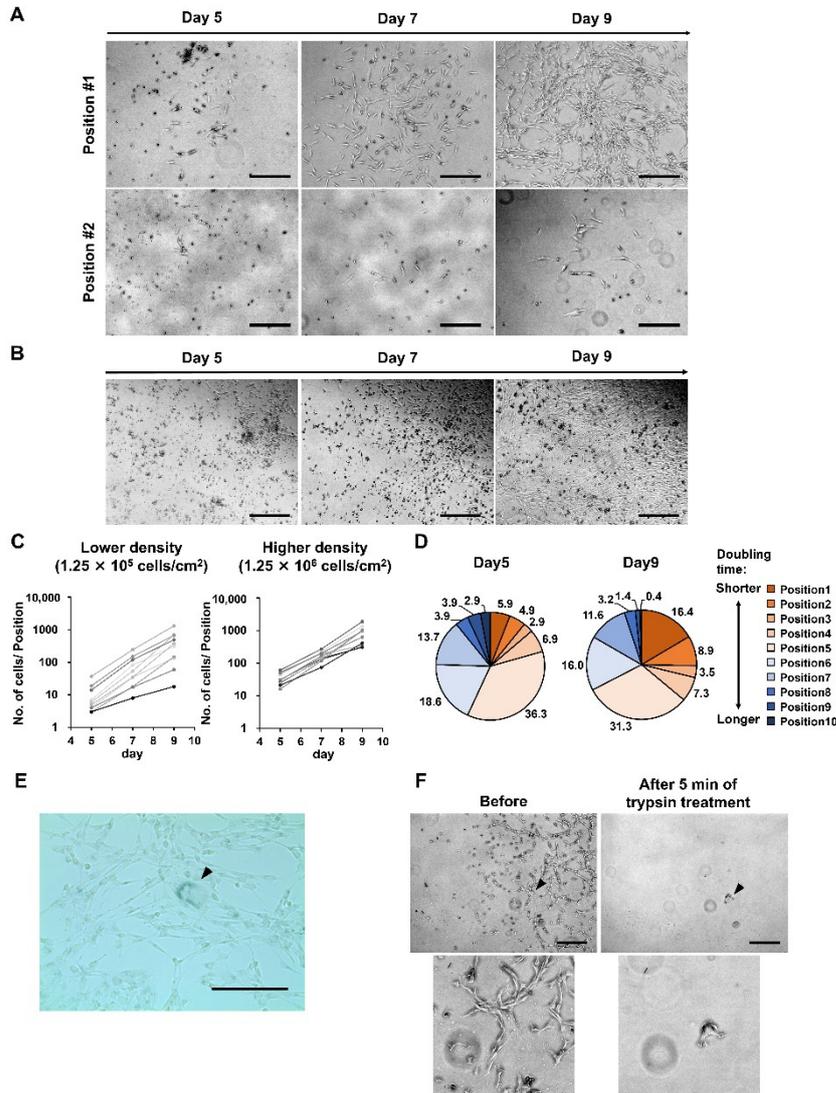


図 2. 単核球の播種密度が低い条件で、増殖能力の優劣により、高い増殖能を持つ MSC の割合が優位になる。(A、B) 各コロニーを位相差顕微鏡で経時的に観察した。スケールバーは $500 \mu\text{m}$ を表す。(A) 播種密度が低い場合 (1.25×10^5 cells/cm²) と (B) 播種密度が高い場合 (1.25×10^6 cells/cm²) の例を示す。(C) 各播種密度で形成されたコロニーのポジション毎の細胞数の変化を示す。(D) 播種密度が低い条件 (1.25×10^5 cells/cm²) において、全細胞数に対する各ポジションの細胞数の割合。各ポジションは、倍加時間に基づいて色分けした。グラフ中の数値は%を示す。(E) 低い播種密度で観察された肥大化細胞を、老化関連 β -ガラクトシダーゼ (SA- β -Gal) 染色で染色した。矢印は肥大した老化細胞を示す。スケールバーは $200 \mu\text{m}$ を表す。(F) 播種密度が低い条件下で形成させた MSC コロニーを 5 分間、トリプシン試薬による剥離処理を行った。処理前と処理後の同じポジションを顕微鏡で観察した。矢印は、剥離処理後に残った老化細胞を示す。スケールバーは $200 \mu\text{m}$ を表す。

2.3.3. 単核球の播種密度の違いが CD45 陽性細胞の残存に影響する

MSC のコロニー形成過程に加えて、単核球の播種密度の違いにより、血球系細胞の残存にも差が見られた (図 3A)。同じ回数 of 培地交換を実施したが、播種密度が高い条件下 (1.25×10^6 cells/cm²) では、より血球系細胞が残存した。一方、播種密度が低い条件下 (1.25×10^5 cells/cm²) では、血球系細胞は大きく減少した。それぞれの細胞を回収後、フローサイトメーター (FACS) を用いて CD45 陽性細胞の割合を解析した。CD45 陽性細胞の割合は、単核球の播種密度が低い条件で、播種密度が高い条件より有意に減少していた ($p < 0.0001$ 、図 3B)。

単核球の播種密度を低くすることで、残存する血球系細胞の割合が減少し、採取した細胞中の MSC の純度が向上することが確認された。

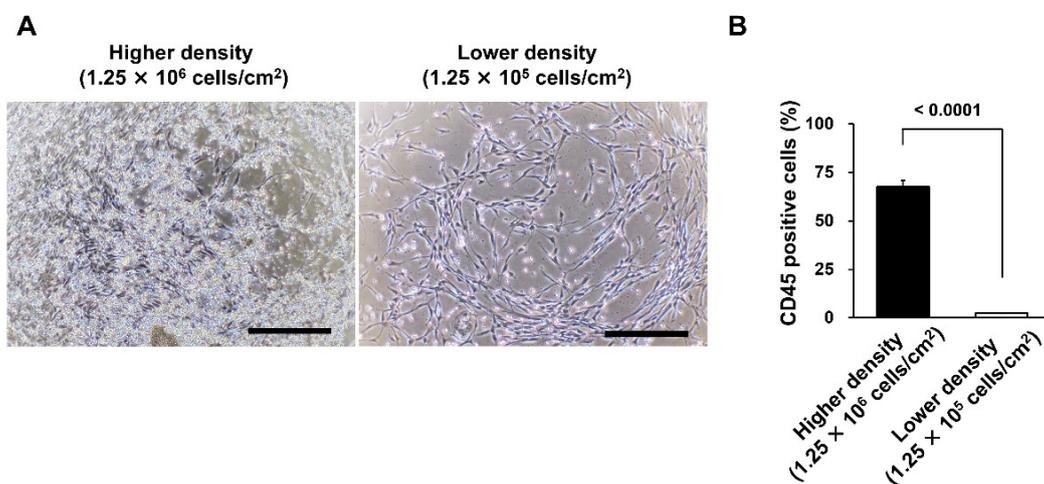


図 3. 単核球の播種密度が異なると、残存する CD45 陽性細胞の割合が変化する。(A) 異なる播種密度 (1.25×10^5 cells/cm² と 1.25×10^6 cells/cm²) で播種し、MSC コロニーが形成されたときに、位相差顕微鏡で残存する血球系細胞を観察した。スケールバーは 500 μ m を示す。(B) FACS を用いて CD45 陽性細胞の割合を定量化した。p 値は Student の t 検定で算出した。

2.3.4. 早期にコロニーを形成した MSC 群は、継代後において高い増殖能を示す

単核球の播種密度が低い条件のもとでは、培養時間が経過するにつれて、増殖速度の速い細胞の割合が優勢になった (図 2D)。そこで、これらの増殖速度の速い細胞が継代後も増殖能力を維持しているかどうかを調べた。シングルセルクローニングアッセイを用いて、各コロニーの増殖速度、形態、遺伝子発現を評価した (図 4A)。コロニー毎に、継代後の増殖速度や細胞形態に大きな違いが見られ、それはコロニー形成のタイミングと相関していた (図 4B-D)。コロニーを早く形成した細胞群は、速い増殖速度を維持し、細胞サイズの小さい均一な集団であった。一方、コロニー形成が遅いグループは、増殖が遅く、細胞サイズが大きく、ばらつきが大きいことが分かった。遺伝子発現を、リアルタイム PCR で評価した。コロニー形成が早い細胞群は、*Ki67* と *PCNA* が高い発現を示した (図 4E)。

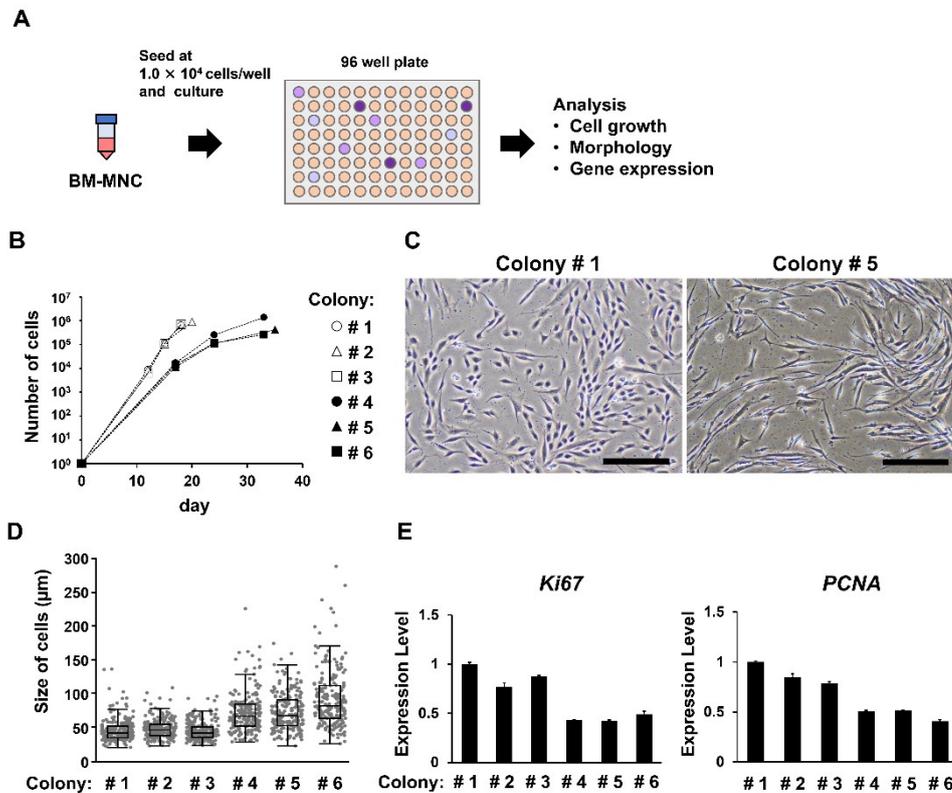


図 4. コロニー形成のタイミングと継代後の間葉系幹細胞の特性との関係性の評価

(A) シングルセルクローニングアッセイの模式図。単核球を 1×10^4 cells/ウェルで播種し、1 ウェルあたり 1 コロニーを形成させた後、継代した。各コロニーから培養した MSC を特性評価した。(B) 回収細胞数の推移。(C) 早期に形成されたコロニー (colony #1) と後期で形成されたコロニー (colony #5) から培養した細胞の位相差顕微鏡画像。スケールバーは $300 \mu\text{m}$ を表す。(D) 顕微鏡画像から得られた細胞サイズの定量データ。(E) 継代数 3 の細胞における *Ki67* と *PCNA* の遺伝子発現をリアルタイム PCR により取得したデータ。

2.3.5. 単核球の播種密度が低い条件で単離した MSC は、高い増殖能と分化能を持つ

単核球の播種密度が低い条件 (4.0×10^4 、 1.25×10^5 cells/cm²) では、増殖能の高い MSC の純度が高く、5 分間のトリプシン処理により老化細胞を除去できることがわかった (図 2D、2F)。この方法で得た MSC の品質を評価するため、MSC のコロニー形成過程に明確な差があった単核球の播種密度が高い条件 (1.25×10^6 cells/cm²) と最適化した低い播種密度の条件 (1.25×10^5 cells/cm²) で、単離した MSC を比較した。各条件で得られた MSC の増殖速度、形態、コロニー形成能、遺伝子発現を比較した。低い播種密度の条件から得られた細胞は、高い播種密度の条件から得られた細胞よりも回収細胞数が多く、倍化時間が有意に短かった ($p < 0.01$ 、図 5A、B)。さらに、これらの細胞は、シングルセルクローニングアッセイで観察された早期にコロニー形成した細胞群と同様に、小さい細胞サイズを持つ均一な集団だった (図 5C、D)。低い播種密度の条件から得た細胞は、高いコロニー形成能を示した (図 5E、F)。また、*Ki67* や *PCNA* の高発現も認められ、増殖活性の向上が示唆された (図 5G)。低い播種密度の条件で得られた細胞で特異的に発現している遺伝子群の機能を調べるため、SAGE 解析を行った (図 5H)。その結果、M 期、細胞周期チェックポイントなどの細胞周期に関連した遺伝子群の変化が確認された (図 5H)。

次に、FACS を用いて表面抗原を解析した結果、両条件で MSC 特異的なマーカーの発現を確認した (図 6A)。最後に、細胞の分化能を評価した (図 6B)。骨芽細胞への分化においては、条件間で有意な差は認められなかった (図 6C)。しかし、脂肪細胞への分化において、FABP4 陽性細胞の割合は、低い播種密度の条件の方が高い播種密度の条件よりも有意に高かった ($p < 0.0001$ 、図 6D)。軟骨細胞への分化において、低い播種密度の条件から得た細胞は、形成したスフェアの内部に高密度の軟骨基質をもち、軟骨様組織のサイズが有意に大きくなった ($p < 0.0001$ 、図 6B、E)。これらの結果から、単核球の播種密度が低い条件で得られた MSC は、より高い分化効率を持つことが確認できた。

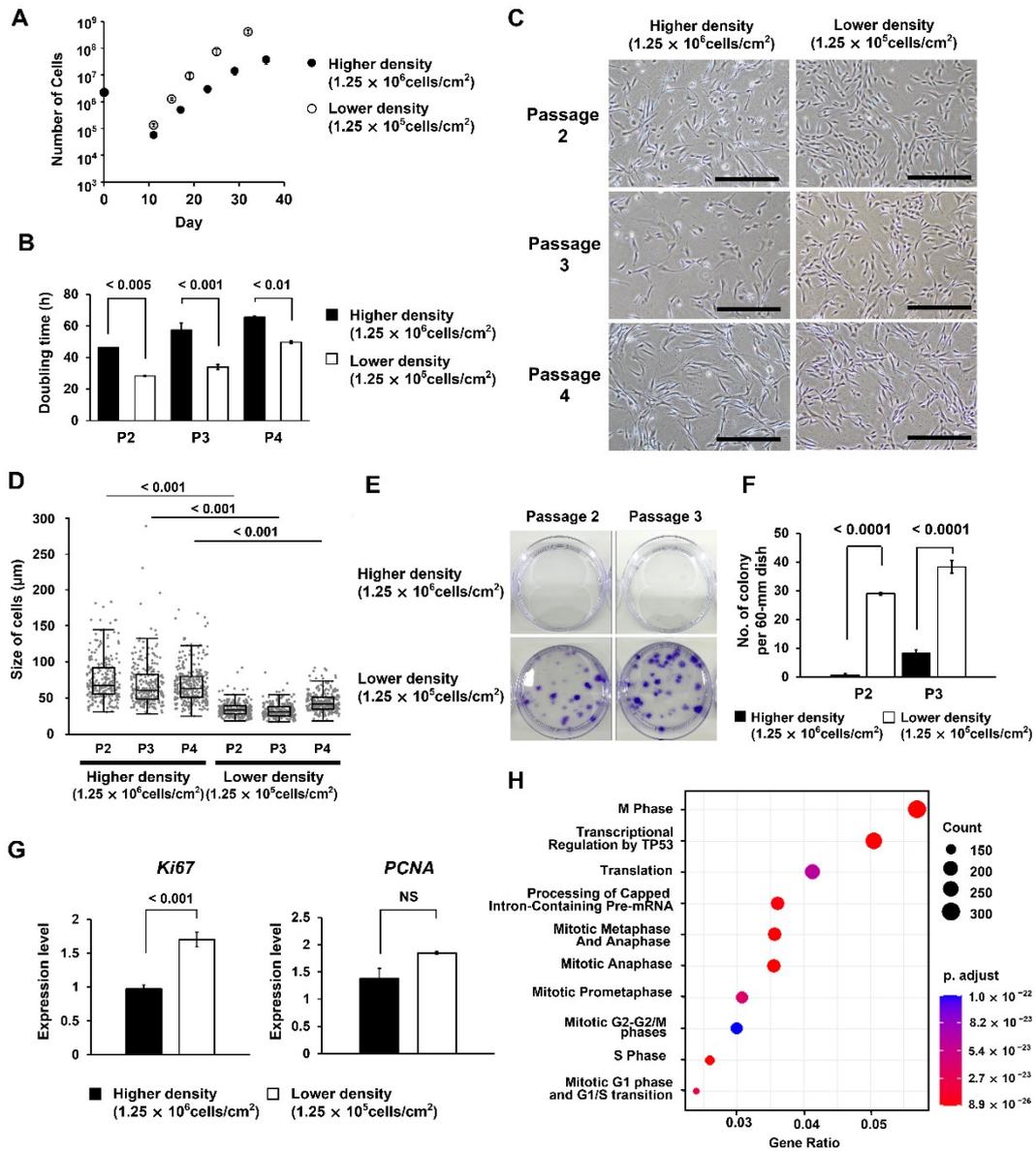


図 5. 単核球の播種密度が低い条件 (1.25×10^5 cells/cm²) と高い条件 (1.25×10^6 cells/cm²) で単離した間葉系幹細胞 (MSC) の特性の比較 (A) 回収細胞数の推移。(B) 継代数 2-4 における細胞の倍加時間。(C) 継代数 2-4 における細胞の位相差顕微鏡画像。スケールバーは 500 μm を表す。(D) 顕微鏡画像から細胞のサイズを定量化したデータ。(E) コロニーアッセイの結果。60 mm ディッシュに継代数 2・3 の細胞を 100 個ずつ播種した。14 日間培養した後、コロニーをクリスタルバイオレットで染色した。(F) コロニーアッセイで形成されたコロニー数を定量化したデータ。(G) 継代数 2 の細胞の *Ki67* と *PCNA* の遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析したデータ。(H) SAGE 解析により、播種密度が低い条件で得られた MSC において特異的に発現していた遺伝子群の機能を示す。p 値は Student の t 検定で算出した。NS は有意差がなかったことを表す。

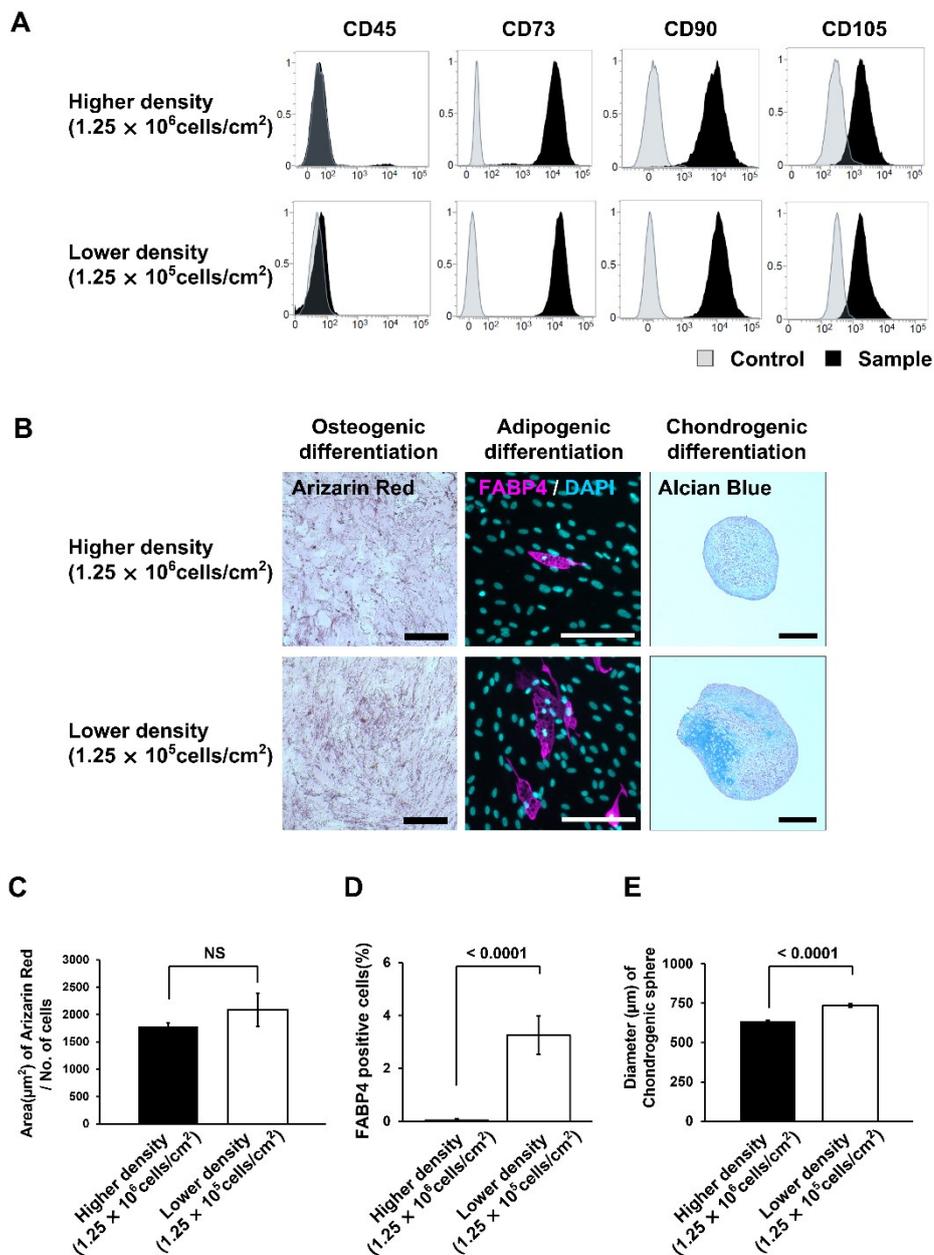


図 6. 単核細胞の播種密度が低い条件 (1.25×10^5 cells/cm²) と高い場合 (1.25×10^6 cells/cm²) で単離した間葉系幹細胞 (MSC) の表面抗原と分化能の比較 (A) 継代数 2 の細胞をフローサイトメトリー (FACS) により CD45、CD73、CD90 および CD105 表面抗原を解析したデータ。(B) 骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に分化誘導した画像。スケールバーは 200 μm を表す。(C) 21 日間、骨芽細胞へ分化誘導した細胞のアリザリンレッド染色領域の面積。(D) 21 日間、脂肪細胞へ分化誘導した Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4) 陽性細胞の割合。(E) 21 日間、軟骨細胞へ分化誘導した軟骨様組織のサイズ。p 値は Student の t 検定で算出した。NS は有意差がなかったことを表す。

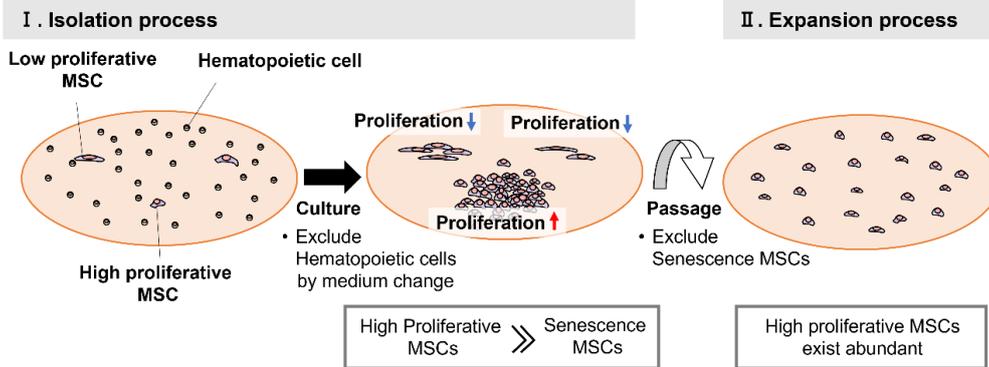
2.4. 考察

本研究の一連の実験から、単核球を比較的低い密度で播種することにより、増殖能の高い MSC の純度を向上させる機構を見出すことができた。低い播種密度の条件では、単一細胞由来のコロニーがより容易に形成される。さらに、培養時間が経過するにつれて、増殖能が優れた MSC の割合が増加した。増殖能が優れた細胞は着実に増加し、それに対して増殖能が劣る細胞は肥大化し、老化することが確認された。老化に伴い、細胞はフォーカルアドヒージョンやアクチンフィラメントの発達により、培養容器表面との接着が強くなる [24、25]。そのため、トリプシンでの剥離処理時間を短くすることで、老化細胞を培養容器に残し、除去できた。このアプローチにより、増殖能の高い MSC を選択し、純度の高い状態で回収することが可能になった。MSC の分化能は、増殖能と相関がある [26]。この方法で得られた細胞は、その後の培養においても、高い増殖能と分化効率をもち、優れた品質を示した (図 7A)。

一方、単核球の播種密度が高い場合、MSC のコロニー同士が重なり、血球系細胞が残存するため、MSC の増殖領域が制限される。したがって、細胞密度はより早い段階で最大に達した。我々の実験から、それらの高密度した細胞は広い領域で発生していることが確認された。その結果、細胞間での接触阻害により、増殖が抑制された細胞が大量に生成される [27]。さらに、増殖能力の異なる MSC の割合の差はわずかしかない状態で回収される。それらの要因が影響し、その後の培養で、全体的な増殖能が低かったと考えられる (図 7B)。

上記に記した機構の説明の一部は、滑膜由来単核球の播種密度が MSC の増殖能や分化能に影響を与えることを報告した Nakamura らの研究と一致する [28]。彼らは MSC の収量を最大化する鍵は、細胞間の接触阻害を最小化するため、単細胞由来のコロニーを形成することであると述べている。それに加えて、我々は、新たに二つの知見を見出した。第一に、培養時間を調整することで、高い増殖能を持つ MSC の純度が向上することを示した。これまでの研究で、MSC の増殖速度は個体差があることが分かっている [29、30]。我々は、個々の MSC の挙動が全体の特性を変化させる関係を示すことができた。第二に、老化細胞を除去する容易な剥離処理法を示した。この処理は、がん幹細胞や上皮細胞などの選別に用いられている「Differential Trypsinizaion」と呼ばれる手法であり、MSC の単離工程の条件と相性が良い [31、32]。我々の最適化した手法は、骨髄以外の他の細胞種にも適用できると考えている。Segawa らは、骨髄、脂肪、滑膜、筋肉など様々な組織から単核球を採取し、単核球の播種密度を下げるに従い、単一細胞由来のコロニーが多くなり、それらのコロニーは多様なサイズと密度を示した [33]。これらの特徴を持つ細胞では、培養時間の経過に伴い、高い増殖能を持つ MSC の純度が向上すると期待される。

A. MNC Lower seeding density



B. MNC Higher seeding density

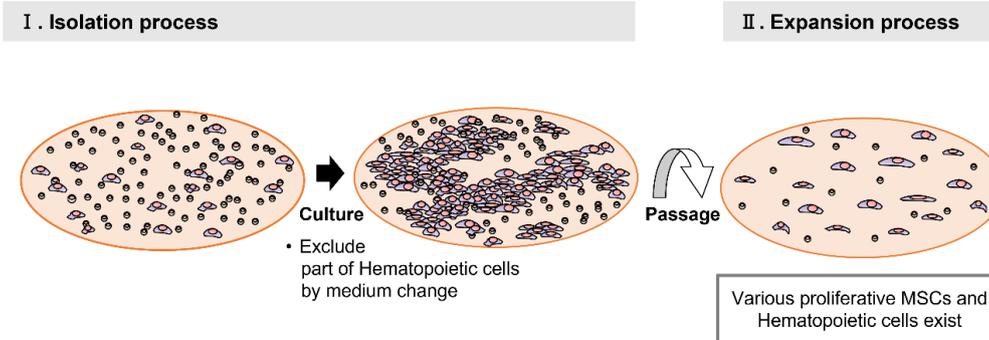


図 7. 異なる単核球の播種密度における間葉系幹細胞 (MSC) コロニー形成の概要。

(A) 単核球の播種密度が低い条件 (4.0×10^4 、 1.25×10^5 cells/cm²) でのコロニー形成過程。(B) 単核球の播種密度が高い条件 (6.3×10^5 、 1.25×10^6 cells/cm²) でのコロニー形成過程。

MSC は、増殖能と分化能に関して階層的な構造を形成するヘテロな集団である [26, 34]。非対称分裂が起こると、自己複製を維持する細胞とそうでない細胞に分裂し、階層構造が形成される [13]。これらの細胞の運命は、エピジェネティックな変化によって決定する [18, 19]。生体内では、加齢に伴う老化細胞の蓄積により、細胞老化関連分泌形質 (senescence-associated secretory phenotype: SASP) を介して MSC の量が減少する。さらに、BMI、糖尿病、放射線治療などの要因によって、反復ストレスが生じる。細胞内の活性酸素は、ミトコンドリアに蓄積し、DNA 損傷、細胞周期の停止、ミトコンドリアの機能不全を引き起こす。これらの因子は、MSC の増殖能と分化能に影響を与える [35, 36]。このような状況において、増殖能・分化能の高い細胞を効率的に分離することは、製造の安定化や治療効果を高める手段として有効である。Mabuchi らは、LNGFR、Thy-1、V-CAM1 をマーカーとして、増殖能の高い MSC を同定し、REC (Rapid Expansion Clones) と呼び、セルソーターを用いて容易に分離可能なことを実証した [29]。REC に対して、我々の手法で得られた MSC は、細胞サイズに類似性があり、高い増殖能と高い分化能をもつことが確認された。また、REC は優れた遊走能を示し、マウスに静脈内投与したところ、REC は肺血管に捕捉されることはなかった。今後、我々の手法で得た MSC を臨床応用するために *in vivo* で評価し、特に生体内動態に着目したい。

増殖能の高い細胞を選別する手法として、セルソーターと我々が見出した手法を比較すると、我々の手法は分離の純度が低くなると推測する。そのため、継代回数が増えるにつれて、選別の効果は減少する傾向にあった。しかし、我々の手法は、高価な装置や抗体を必要とせず、初期の播種密度を調整するだけでよい為、製造現場で容易に実施でき、安全面で優れる利点がある。また、セルソーターはせん断応力によって細胞に悪影響を与える可能性がある。大量の単核球を使用する場合、処理速度の関係で、より長い処理時間が必要となり、細胞の増殖にも影響しうる [37-39]。

上記のような MSC の特性への影響に加え、単核球の播種密度は、血球系細胞の残存にも影響した。我々は、播種密度が高い条件下では、単球間または単球と MSC との間の相互作用が増強されると仮説を立てた。マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) は、単球からマクロファージへの分化を誘導する重要な制御因子の 1 つである [40]。低酸素状態では、MSC から M-CSF の分泌が促進され、その結果、MSC 周辺に多くのマクロファージが付着することが報告されている [41]。単核球の播種密度が高い条件下で、広い範囲で MSC の高密度化が起こることで、局所的な酸素欠乏が生じる可能性がある。この局所的な低酸素状態が、MSC からの M-CSF の分泌を促進する引き金となりうる。我々の過去の研究において、残存する CD45 陽性細胞はマクロファージであることを確認している [12]。これらの細胞が、MSC が増殖する領域を限定し、十分な数の MSC を回収する妨げになる恐れがある。さらに、回収した細胞懸濁液中の MSC の純度が低下する。これらの状況は、回収後の継代において、効果的な密度で MSC を播種することを困難にする。単核球の播種密度を低くすることは、血球系細胞の残存を大幅に減らし、MSC の製造の安定化に繋がると考える。

この研究にはいくつかの限界がある。まず、倫理的な配慮から市販の単核球を使用した。単核球の純度や増殖能は、ドナーの健康状態や製造工程によって異なる可能性がある。従って、患者由来の細胞や製造工程によって播種密度を調整する必要があるかもしれない。第二に、基本的な培養条件は我々独自の製造手順に基づいている。各製造施設で使用される試薬や材料は異なる為、この点は考慮されていない。

結論

本研究の遂行によって、単核球の播種密度が MSC の品質に影響する機構が明らかになった。単核球の播種密度を低くし、単一細胞由来のコロニーを形成させた条件では、培養時間が経過するにつれて、高い増殖能を持つ MSC の割合が増加した。一方、低い増殖能の MSC はより急速に肥大化し、老化が進行した。短時間の剥離処理により、老化細胞を除去可能なことを見出した。この機構により、高い増殖能を持つ MSC の純度を高めた状態で回収できる。以上のことから、MSC の品質向上のために、(1) 単一細胞由来のコロニーを形成させる為に単核球の播種密度を最適化すること、(2) 高い増殖能を持つ MSC の割合を大きくするために培養時間を調整すること、(3) 老化細胞を排除できる剥離処理時間を設定することの3点を提案したい。本手法は、今後の MSC の製造の効率化・安定化に寄与するものである。さらに、MSC の品質向上は治療効果の向上につながることを期待される。今後、我々の見出した手法の臨床的意義を検証することに注力したい。

謝辞

本研究の遂行および関連論文作成に際し、ご指導とご高配を賜り、山口大学大学院 医学研究科 消化器内科学講座 高見太郎 教授に深謝の意を表します。

博士後期課程への入学と消化器内科学講座での経験を導いていただいた山口大学 坂井田功 名誉教授、ならびに山口大学大学院医学研究科 生体情報検査学領域 野島順三 教授に深甚なる敬意と感謝を表します。

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始熱心なご指導とご鞭撻を賜り、産業医科大学 生体産業研究所 職業性腫瘍学 藤澤浩一 教授、ならびに山口大学大学院 医学研究科消化器内科学講座 松本俊彦 講師に深く感謝します。

山口大学大学院において、様々なご支援と貴重なご助言を賜りました山口大学大学院 医学系研究科 生体情報検査学領域 西川潤 教授、山口大学大学院 医学系研究科 生体情報検査学領域 山本健 教授や諸先生方に厚く感謝いたします。

本研究の遂行に際し、様々なご支援を賜り、山口大学大学院 医学系研究科 消化器内科学講座 技術研究員 山田磨理子 様、大田久美江 様、堀田里紗 様に深く感謝します。

博士後期課程への入学、本研究の遂行に際し、澁谷工業株式会社の皆様に様々なご支援と貴重な御助言をいただきました。故 澁谷弘利 前社長、澁谷英利 社長、中俊明 副社長、米田健二 上席執行役員、越田一郎 部長、再生医療システム本部の皆様に心より深く感謝申し上げます。

最後に、山口大学大学院での研究に際し、長きにわたり支えてくれた家族に感謝します。

参考文献

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–676
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861–872.
3. 行政独立法人 医薬品医療機器総合機構. 新再生医療等製品の承認品目一覧. <https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/review-information/ctp/0004.html>
(参照 2022-12-13)
4. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. *Cell Transplant* 2016, 25 (5) , 829–848.
5. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: A review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion (Paris)* 2014, 54 (5) , 1418–1437.
6. Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon KI, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering *Biomedical Materials* 2010
7. Stoltz JF, Huselstein C, Schiavi J, Li YY, Bensoussan D, Decot V, De Isla N. Human stem cells and articular cartilage tissue engineering *Curr Pharm Biotechnol.* 2012, 13 (15) , 2682-91
8. Namioka T, Namioka A, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Onodera R, Suzuki J, Sasaki Y, Nagahama H, Kocsis JD, Honmou O. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of chronic cerebral infarction. *J Neurosurg* 2019, 131 (4) , 1289–1296.
9. Lee RH, Pulin AA, Seo M J, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop D J. Intravenous hmscs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009, 5 (1) , 54–63.
10. Chen YS, Lin EY, Chiou TW, Harn HJ. Exosomes in clinical trial and their production in compliance with good manufacturing practice *Tzu Chi Med J* 2020 32 (2) : 113–120
11. Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006, 24 (10) , 2292–2298.
12. Tanimoto H, Terai S, Taro T, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow. *Cell Tissue Res* 2013, 354 (3) , 717–728.
13. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004, 40 (6) , 1304–1311.
14. Matsuda T, Takami T, Sasaki R, Nishimura T, Aibe Y, Paredes BD, Quintanilha LF, Matsumoto T, Ishikawa T, Yamamoto N, Tani K, Terai S, Taura Y, Sakaida I. A canine liver fibrosis model to develop a therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow-derived cells. *Hepatol Commun.* 2017, 1 (7) 、 691-703
15. Nishimura T, Takami T, Sasaki R, Aibe Y, Matsuda T, Fujisawa K, Matsumoto T, Yamamoto N, Tani K, Taura Y, Sakaida I. Liver regeneration therapy through the

- hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model. *PLOS ONE* 2019, 14 (1)
16. Liu J, Ding Y, Liu Z, Liang X. Senescence in mesenchymal stem cells: functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies. *Front Cell Dev Biol* 2020 8: 258
 17. Sidler C, Kovalchuk O, Kovalchuk I. Epigenetic Regulation of Cellular Senescence and Aging. *Front. Genet.* 2017, Sep 26;8:138.
 18. Hussain A, Tebyaniyan H, Khayatan D. The Role of Epigenetic in Dental and Oral Regenerative Medicine by Different Types of Dental Stem Cells: A Comprehensive Overview. *Stem Cells Int.* 2022, Jun 9;2022:5304860.
 19. Wang R, Wang Y, Zhu L, Liu Y, Li W. Epigenetic Regulation in Mesenchymal Stem Cell Aging and Differentiation and Osteoporosis. *Stem Cells Int.* 2020, Sep 10;2020:8836258.
 20. Bieback K, Schallmoser K, Klüter H, Strunk D. clinical protocols for the isolation and expansion of mesenchymal stromal cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2008, 35 (4) , 286–294.
 21. Zahedi M, Parham A, Dehghani H, Mehrjerdi HK. equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: optimization of cell density in primary culture. *Stem Cell Investig* 2018, 5 (October) , 1–8.
 22. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006, 24 (2) , 462–471.
 23. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca JD, Moorman M A, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (1979) 1999, 284 (5411) , 143–147.
 24. Fuhrmann A, Engler A J. The Cytoskeleton Regulates Cell Attachment Strength. *Biophys J* 2015, 109 (1) , 57–65.
 25. Cho KA, Sung JR, Yoon SO, Ji HP, Jung WL, Kim HP, Kyung TK, Ik SJ, Sang CP. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279 (40) , 42270–42278.
 26. Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. Human Mesenchymal Stem Cells Self-Renew and Differentiate According to a Deterministic Hierarchy. *PLoS One* 2009, 4 (8) .
 27. Marceau K, Ruttle PL, Shirtcliff EA, Essex MJ, Susman EJ, Studies A, Hospital RI, Studies F, Orleans N. Human Bone Marrow Stromal Cell Confluence: Effects on Cell Characteristics and Methods of Assessment. *Cytotherapy* 2015, 57 (6) , 742–768.
 28. Nakamura K, Tsuji K, Mizuno M, Koga H, Muneta, T, Sekiya I. Initial cell plating density affects properties of human primary synovial mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 2019, 37 (6) , 1358–1367.
 29. Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. LNGFR+THY-1+VCAM-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports* 2013, 1 (2) , 152–165.
 30. Mizuno M, Katano H, Shimozaki Y, Sanami S, Ozeki N, Koga H, Sekiya I. Time-Lapse Image Analysis for Whole Colony Growth Curves and Daily Distribution of the Cell Number per Colony during the Expansion of Mesenchymal Stem Cells. *Sci. Rep.* 2019, Nov. 14;9 (1) :16835.

31. Owens RB, Smith HS, Hackett AJ. Epithelial cell cultures from normal glandular tissue of mice. *J Natl Cancer Inst.* 1974 Jul;53 (1) :261-9.
32. Morata-Tarifa C, Jiménez G, García MA, Entrena JM, Griñán-Lisón C, Aguilera M, Picon-Ruiz M, Marchal J. A. Low Adherent Cancer Cell Subpopulations Are Enriched in Tumorigenic and Metastatic Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Induced Cancer Stem-like Cells. *Sci. Rep.* 2016, Jan 11;6:18772.
33. Segawa, Y, Muneta T, Makino H, Nimura A, Mochizuki T, Ju YJ, Ezura Y, Umezawa A, Sekiya I. Mesenchymal Stem Cells Derived from Synovium, Meniscus, Anterior Cruciate Ligament, and Articular Chondrocytes Share Similar Gene Expression Profiles. *J. Orthop. Res.* 2009, 27 (4) , 435–441.
34. Rennerfeldt DA, van Vliet KJ. Concise Review: When colonies are not clones: Evidence and implications of intracolony heterogeneity in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2016, 34 (5) , 1135–1141.
35. Bruedigam C, Eijken M, Koedam M, Peppel J, Drabek K, Chiba H, Leeuwen JPTM. A new concept underlying stem cell lineage skewing that explains the detrimental effects of thiazolidinediones on bone Stem Cells 2010 28 (5) :916-27
36. Gnani D, Crippa S, Volpe LD, Rossella V, Conti A, Lettera E, Ravis S, Ometti M, Fraschini G, Bernardo ME, Micco RD. An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program *Aging Cell* 2019 18 (3)
37. Andrä I, Ulrich H, Dürr S, Soll D, Henkel L, Angerpointner C, Ritter J, Przibilla S, Stadler H, Effenberger M, Busch DH, Schiemann M. An evaluation of T-cell functionality after flow cytometry sorting revealed P38 MAPK activation. *Cytometry Part A* 2020, 97 (2) , 171–183.
38. Ryan K, Rose RE, Jones DR, Lopez PA. sheath fluid impacts the depletion of cellular metabolites in cells afflicted by sorting induced cellular stress (SICS) . *Cytometry Part A* 2021, 99 (9) , 921–929.
39. Pfister G, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. An evaluation of sorter induced cell stress (SICS) on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after different sort conditions - Are your sorted cells getting SICS? *J Immunol Methods* 2020, 487 (October) , 112902.
40. Tushinski RJ, Oliver IT, Guilbert LJ, Tynan PW, Warner JR, Stanley ER. Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy *Cell* 1982 28, 71–81.
41. Takizawa N, Okubo N, Kamo M, Chosa N, Mikami T, Suzuki K, Yokota S, Ibi M, Ohtsuka M, Taira M, Yaegashi T, Ishisaki A, Kyakumoto S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture. *Exp Cell Res* 2017, 358, 411-420.