

Seleksjon og dyrkning av humane mesenchymale celler

Av Marianne Sand Dyrhaug, bioingeniør ved Avdeling for celleterapi, Kreftklinikken Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF. Artikkelen baserer seg på en posterpresentasjon som ble holdt på International Society of Cellular Therapy Congress i Berlin 2006.

Sammendrag

GMP-produksjon av humane mesenchymale celler (MSC) for klinisk bruk har vært problematisk fordi man har manglet godkjent medium. I forskningssammenheng brukes medium som ikke er godkjent for klinisk bruk, og i tillegg er det vanlig å supplere mediet med føtalt kalveserum (FCS) for å oppnå optimale vekstbetingelser. FCS er svært rikt på vekstfaktorer, men siden det også kan være en potensiell kilde til overføring av prioner og ulike virus, må det unngås i klinisk sammenheng.

Vi testet et klinisk godkjent medium, fra MacoPharma. Som erstatning for FCS benyttet vi platerikt AB-plasma (PRP). Vi sammenlignet cellenes egenskaper, fenotype, vekst og differensiering i dette mediet med tilsvarende celler dyrket i MEM α - eller DMEM-medium tilsatt kalveserum. Forsøkene ble gjort på både MSC fra benmarg og på ADAS-celler (adipose-derived adult stem cells) fra fettvev. ADAS-celler er multipotente stamceller som har samme evne til differensiering som cellene fra benmargen. Siden de er lett tilgjengelige, er de interessante med tanke på klinisk bruk.

Oppmerksomheten rundt stamceller og mulig anvendelse av disse i klinikken har vært stor de senere år, og kartlegging og karakterisering av ulike stamceller og identifisering av deres opphav er et stort forskningsområde. De hematopoietiske stamcellene fra benmargen er best karakterisert, og benmargen er det organet vi vet mest om som kilde for stamceller. Vi vet nå at celler med stamcelleegenskaper finnes

i de fleste vev i kroppen.

Mikromiljøet i benmargen regulerer proliferasjonen, modningen og differensieringen av de hematopoietiske stamcellene. Dette mikromiljøet består av stromale celler, som man antar stammer fra en pluripotent celle i benmargen. Man trodde lenge at benmargsstoma kun var et strukturelt rammeverk for de hematopoietiske stamcellene i benmargen. Nå vet vi at stroma består av en heterogen gruppe celler av endoteliale celler, fibroblaster, adipocytter og osteogene celler som har både negativ og positiv regulerings effekt på proliferasjon og differensiering av de hematopoietiske cellene (1,2). Tidlig på 70-tallet ble det vist at non-hematopoietiske celler i benmargstroma har evne både til selvfornyelse og differensiering til benvev, fett, brusk, muskler og sener (figur 1) (3).

Cellene ble beskrevet som colony-forming-unit-fibroblasts (CFU-F). Cellene hører embryologisk til mesoderm, som de hematopoietiske stamcellene, og de kalles i dag mesenchymale stamceller (MSC), (mesenchyme: del av den embryonale mesoderm, bestående av løst pakke, udifferensierte celler). Cellenes egenskaper gjør at MSC kan være godt egnet til å reparere ulike typer vev.

Det er også vist at MSC har immunmodulerende effekt, og derfor kanskje kan brukes til å dempe avstøtingsreaksjoner ved allotransplantasjoner (4, 5). Dessuten er det kjent at MSC kan ha en støttefunksjon for de hematopoietiske cellene etter høydosebehandling med autolog stamcellestøtte (6).

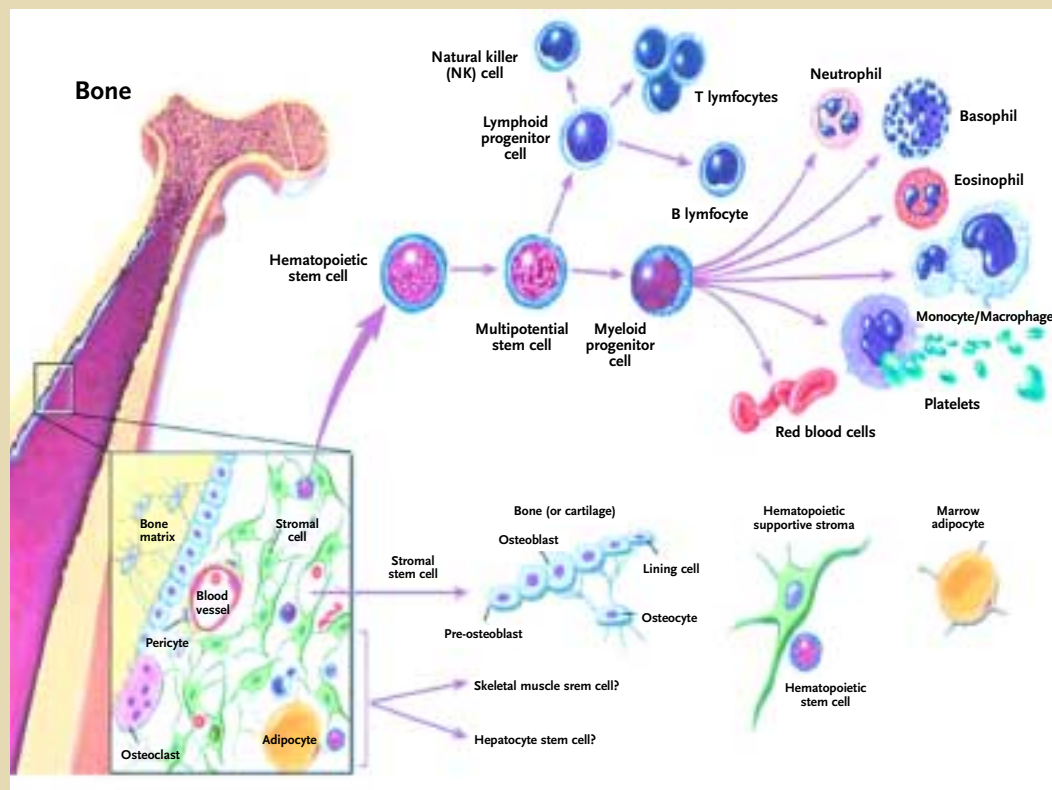
Fettvev har også sitt opphav i mesoderm og inneholder en heterogen stromal cellepopulasjon. Studier har vist at det finnes multipotente stamceller i fettvev som har sammenfallende egenskaper med de mesenchymale stamcellene i benmargen (7). Disse cellene har fått betegnelsen ADAS-celler (adipose-derived adult stem cells).

I klinisk sammenheng er fettvev som stamcellekilde interessant fordi fett er lett tilgjengelig, inngrepet krever ingen anestesi og fettvevet er cellerikt.

Vi ønsket å sammenligne vekst og egenskaper til mesenchymale stamceller fra benmarg og fettvev når disse ble dyrket i ulike typer medium.

Tabell 1, Ex-vivo ekspansjon av MCS og ADAS-celler i de ulike medier.

Type medium	BM-MSC, x ekspansjon	ADAS, x ekspansjon
MEM α /DMEM-medium m/FCS	6	7
LP02 medium m/PRP	20	34



Figur 1. Hematopoietisk og stromal stamcelle-differensiering.
© 2001 Terese Winslow
(assisted by Lydia Kibiuk).

Materiale og metode

Isolering av ADAS-celler

I samarbeid med kirurgisk avdeling mottok vi fettvev som ble fjernet i forbindelse med plastisk rekonstruksjon. Pasientene ble informert før inngrepet og hadde gitt sitt samtykke til at cellene kunne brukes til forskning. Prosedyren for å isolere ADAS-celler baserte seg på en metode beskrevet av Hauner et al. (8) og videreutviklet i forbindelse med en masteroppgave utført ved Avdeling for cellerterapi, RRHF (9). Cellematerialet fra fett suging ble brakt til laboratoriet umiddelbart etter inngrepet og deretter vasket flere ganger med steril, romtemperert PBS-buffert.

Materialet ble deretter overført til 50 ml buffer pH 7,4 bestående av Krebs-Ringer (Sigma-Aldrich) bufret med 24 mM HEPES (Sigma-Aldrich), collagenase 1,5 mg/ml (Sigma-Aldrich) og bovint serumalbumin 20 mg/ml (StemCellTechnologies Ltd.). Etter 60 minutter ble det delvis oppløste cellematerialet filtrert gjennom et sterilt nylonnett med porestørrelse 250 µm til et nytt rør og sentrifugert. Modne fettceller fløt opp og supernatanten ble kastet. Cellepellet (stromal vascular fraction) ble resuspendert i erytrocytt-lyseringsbuffer for å fjerne erytrocytter.

Etter ytterligere vask ble cellene overført til dyrkningsflasker for videre kultur med DMEM-medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F12 Ham 1:1, Sigma-Aldrich) tilsatt 10% FCS (Biowest, Loire Valley, France) - eller LP02 medium (MacoPharma, Tourcoing, Frankrike) tilsatt 2,5 % pla-

terikt AB-plasma (PRP). Platekonsentrat fra blodgivere ble fordelt i passende volumer før nedfrysning og tint for hvert oppsett. Begge typer medium ble tilsatt Glutamax og penicillin 100U/ml + streptomycin 0,1 mg/ml (Invitrogen). Glutamax er en mer stabil form av glutamin som er nødvendig for cellenes energiproduksjon og for protein- og nucleinsyresyntesen. Antibiotika tilsettes for å hindre infeksjon i kulturene.

Isolering av mesenchymale celler fra benmarg

Benmarg ble høstet fra friske, frivillige givere. Mononucleære celler ble deretter isolert ved hjelp av Lymphoprep™ (AXIS-SHIELD) for å blant annet fjerne røde celler. Cellene ble vasket og resuspendert i de aktuelle medier: MEMα medium (Invitrogen Life Technologies) tilsatt 10% føtalt kalveserum (Biowest, Saveen Werner) eller LP02 medium med platerikt plasma, og cellene ble deretter overført til dyrkningsflasker for videre kultur.

Mesenchymale celler adhererer til plast. Dette ble utnyttet for å anrike de cellene vi ønsket å gå videre med. Etter to døgn ble non-adherente celler fjernet og adherente celler ble dyrket videre i flasker. 50% medium ble skiftet hver tredje dag og cellene ble splittet ved cirka 80% konfluens i flaskene. Ved hver passasje ble celler frosset for senere eksperimenter. Vi benyttet hovedsakelig celler fra fjerde passasje til senere karakterisering. Tabell 1 viser de ulike cellenes (BM-MSC og ADAS) ekspansjon i ulike medier.

Dyrking og differensiering

Cellenes evne til å danne kolonier (CFU-F) er en kontroll på at cellene bevarer sine stamcelleegenskaper. ADAS-celler og MSC fra benmarg som hadde gått til konfluent monolayer i fjerde passasje i de mediene vi ønsket å sammenligne, ble sådd ut i ulike konsentrasjoner i MesenCult Basal Medium (StemCell Technologies) tilsatt et vekstsupplement (StemCell Technologies). Vi lot kulturene gå i 14 dager før mediet ble fjernet og koloniene farget med krystallviolett (se tabell 2).

Differensiering: For å se på differensiering til adipocytter (fett) og osteoblaster (ben) lot vi cellene gå i dyrkningsmediene vi ønsket å sammenligne til flaskene var konfluente. Dyrkningsmediet ble fjernet og erstattet med differensieringsmedium. Vi benyttet ferdige kit fra StemCell Technologies (Mesencult Basal Medium tilsatt henholdsvis Adipogenic Stimulatory Supplements eller Osteogenic Stimulatory kit med dexamethasone, β -glyserolfosfat og ascorbinsyre). Differensieringsmediet ble skiftet to ganger i uken. De samme cellene ble dyrket parallelt uten differensieringsmedium og farget for negativ kontroll.

Etter 21 dager ble det laget cytospinn som senere ble farget på Avdeling for Patologi.

Fenotyping: Per i dag finnes ikke veldefinerte antigenmarkører på mesenchymale stamceller, og det er derfor vanskelig å isolere disse cellene fra andre stromale celler. Det er en heterogen cellepopulasjon man undersøker, og fenotypen kan påvirkes av hvordan materialet taes ut, celletettheten i kulturene og de ulike medier som benyttes. Det har derfor vært

Tabell 2, CFU-F. Tabellen viser ADAS-celler fra forskjellige givere og i ulike passasjer, dyrket i de ulike medier. (Antall kolonier/ 2×10^3 celler sådd ut).

Celler testet	Antall CFU-F LP02 medium m/PRP	Antall CFU-F MEM α /DMEM-medium m/FCS
ADAS X, 3. passasje	50	80
ADAS X, 6. passasje	2	24
ADAS III, 6. passasje	3	60
ADAS V, 6. passasje	2	40

Tabell 3, Fenotyping av mesenchymale celler

Antistoff- panel	BM-MSc		ADAS	
	MEM α med FCS	LP02 med PRP	DMEM med FCS	LP02 med PRP
CD13	+++	+++	+++	+++
CD14	Neg	Neg	Neg	Neg
CD31	Neg	Neg	Neg	Neg
CD34	Neg	Neg	Neg	Neg
CD45	Neg	Neg	(+)	(+)
CD90	+++	+++	+++	+++
CD105	+++	+++	+++	+++

en diskusjon om det er de samme cellene man undersøker i de ulike prosjektene og miljøene.

På slutten av 70-tallet beskrev Simmons og Torok-Storb (10) det første monoklonale antistoffet, Stro-1, som spesifikt er rettet mot stromale prekursorceller i human benmarg. Cellesortering på Stro-1 positive celler har vist en anriking av CFU-F, og Stro-1 (CD 90) brukes derfor som en positiv markør.

Det er også viktig å vise at MSC er negative på de hematopoietiske markørene CD34 og CD45. CD13 og CD105 er uspesifikke, positive markører for benmargsstroma, mens CD14 som uttrykkes på monocytter skal være negativ. CD31, som blant annet uttrykkes på endoteliale celler, skal også være negativ på MSC.

Cellenes fenotype ble bestemt ved enkeltmerking med PE-konjugerte monoklonale antistoffer; IgG1PE (BD), CD13PE (DAKO), CD14PE (DAKO), CD31PE (BD), CD34PE (BD), CD45PE, CD90PE (PharMingen), CD105 (Ansell) og kjørt på Becton Dickinson FACSort flowcytometer (se tabell 3).

Cytokinprofil: Vi ønsket å undersøke om cellene endrer cytokinprofil avhengig av hvilket medium de ble dyrket i, med og uten føtalt kalveserum. Cellenes produksjon av cytokiner er interessant å se på i forhold til at mesenchymale celler har vist seg å kunne dempe gvh-reaksjoner, og fordi cellene kan stimulere hematopoiesen gjennom sekresjon av ulike cytokiner i miljøet.

Vi lot celler gå i kultur 72 timer i de ulike mediene før supernatanten ble tatt av og frosset. Alle prøver ble tint og kjørt samtidig, og cytokinkonsentrasjon ble målt med 27 plex kit på BIO-RAD Bio-Plex system, (BIO-RAD Laboratories, Inc. Hercules CA) (se tabell 4).

Resultater

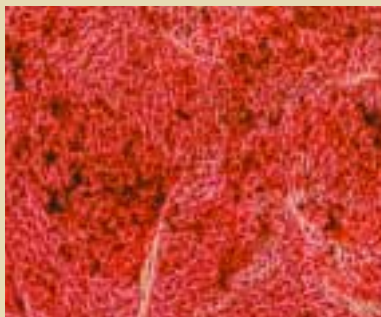
Ex vivo ekspansjon: Tabell 1 viser at celler som har gått i LP02 medium med platerikt plasma har en hurtigere vekst/større evne til proliferasjon enn celler dyrket i standard medium med FCS.

Klonogen vekst: Tabell 2 viser ulike ADAS-celler i forskjellige passasjer. Våre data tyder på at den klonogene evnen er noe dårligere når cellene dyrkes i medium uten FCS. Vi så tilsvarende tendens på MSC fra BM.

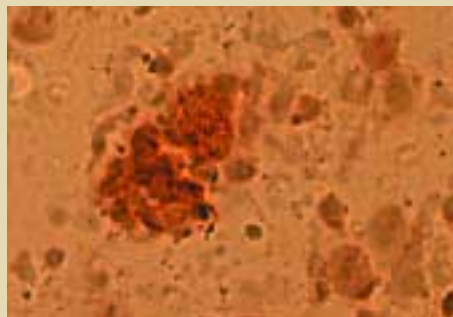
Evnen til kolonidannelse ser også ut til å avta i sterkere grad i senere passasjer når cellene dyrkes uten kalveserum. Våre forsøk kan tyde på at celler som skal kunne brukes klinisk bør være i tidlige passasjer når det benyttes medium uten tilsetning av kalveserum.

Fenotype: Tabell 3 viser resultatene av fenotyping med flowcytometri. Fenotypingen ble utført på celler i fjerde passasje, og vi så ingen vesentlige forskjeller på MSC fra BM og ADAS-celler, og cellene beholdt samme fenotype i begge medier.

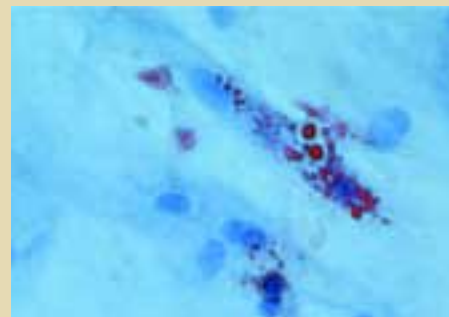
Eksempler på differensiering av ADAS-celler



Bilde 1. ADAS-celler dyrket i LP02-medium med PRP, differensiert til osteoblaster og farget med von Kossa.



Bilde 2. ADAS-celler dyrket i LP02-medium med PRP, differensiert til osteoblaster og farget med alkalisk fosfatase.



Bilde 3. ADAS celler dyrket i LP02-medium med PRP, differensiert til adipocytter og farget med Oil Red O.

Cytokinprofil: Tabell 4 viser cytokinkonsentrasjonen målt i pg/ml i mediet fra de ulike cellekulturene. Verdiene er mean-verdi av to eller tre individuelle cellekulturer.

Våre resultater tyder på at cellene ikke endrer cytokinprofil i vesentlig grad selv om føtalt kalveserum i mediet erstattes med platerikt plasma.

Differensiering: Våre data viser at MSC fra benmarg og ADAS-celler kan differensiere til adipocytter og osteoblaster selv om cellene har vært dyrket uten kalveserum i primærkulturen. Bilder 1-3 viser ADAS-celler dyrket i LP02-medium tilsatt platerikt plasma. Bilde 1 og 2 viser differensiering til osteoblaster, farget med henholdsvis van Kossa og alkalisk fosfatase. Bilde 3 viser ADAS-celler som har differensiert til adipocytter og fettdråpene er påvist med Oil Red O. Vi fant tilsvarende differensiering også for MSC fra benmarg som hadde gått i LP02-medium med platerikt plasma før differensiering.

Diskusjon og konklusjon

Ut i fra våre studier ser det ut til at mesenchymale celler fra benmarg og ADAS-celler fra fettvev viser god proliferasjon og beholder samme evne til differensiering også når de dyrkes i LP02 medium med platerikt plasma. Fenotypen ser også ut til å bevares i forhold til de samme cellene dyrket i standard medium med føtalt kalveserum.

Fettvev er svært cellerikt, og dessuten lettere tilgjengelig enn benmarg. Derfor kan fettvev være en viktig stamcellekilde i klinisk sammenheng.

Platerikt plasma er veldig rikt på vekstfaktorer, og resultatene i tabell 1 viser at cellene får en sterk økning i ekspansjon når dette benyttes som supplement i mediet. Kanskje dette også kan forklare resultatene i tabell 2, hvor det ser ut til at cellene mister den klonogene evnen i større grad når de dyrkes over mange passasjer. Andre publikasjoner har også vist at mesenchymale celler gradvis mister sine karakteristiske stamcelleegenskaper når de dyrkes ex vivo (13).

Flere forsøk må imidlertid utføres for å kunne si noe om mekanismene bak dette.

Andre studier (12) har dessuten vist at sjansen for spontanmutasjoner og transformasjon til maligne celler øker når celler går i kultur over mange passasjer. Dette tilsier at mesenchymale celler som skal brukes klinisk må være fra tidlige passasjer.

Mesenchymale celler skiller ut en rekke cytokiner, som vist i tabell 4.

Cytokinutskillelsen fra cellene viser noen endringer når mediet endres, selv om profilen i grove trekk er uforandret (se tabell 4). IL-8 avtar vesentlig for mesenchymale celler fra

Tabell 4, cytokinprofil og medium

Cytokin	ADAS i DMEM m/FCS	ADAS i LP02 medium m/PRP	MSC-BM i MEM α medium m/FCS	MSC-BM i LP02 medium m/PRP
IL-6	5570	2390	4577	5934
IL-8	590	753	2334	53
IL-10	6	13	9	15
INF- γ	103	98	45	27
TNF- α	19	27	<10	12
MCP-1	144	991	736	1322
IL-1ra	13	22	25	6
FGF basic	20	8	19	26
GM-CSF	9	11	<10	<10
IL-7	4	9	<10	15
IL-12	6	12	<10	15
G-CSF	10	25	<10	<10
Eotaxin	21	42	<10	<10
IP-10	35	29	16	<10
VEGF	2470	6778	6868	14070
GCS-F	<10	<10	<10	25

(IL-2, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17, MIP-1a, MIP-1b og PDGF-BB var negative i alle eksperimenter.)

benmarg når medium med kalveserum erstattes med LPO₂ med PRP, uten at vi ser den samme tendensen når det gjelder ADAS-celler. Vi ser en svak motsatt tendens for IL-6. Vi ser også en økning av MCP-1 og VEGF for begge celletypene når medium med kalveserum erstattes med LPO₂ med PRP. VEGF har en viktig rolle i angiogenesen, og videre dyrestudier gjøres for å studere hvilken rolle de mesenchymale cellene har på nydannelse av kar. Vi studerer også in vivo hvilken evne MSC har til å danne benvev(11). Dette kan være interessant i forbindelse med mulig reparasjon av skjellettsskader etter strålebehandling.

Referanser

- Verfaillie CM: Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. *Blood*. 82: 1045-2053, 1993.
- Pittenger MF, Mackay AM., Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Graig S, Marsak DR: Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-147, 1999.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE: Growth kinetics, self-renewal and osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 64, 278-294, 1997.
- Tse WT, Pendleton D, Beyer W, D'Andrea A, Guinan EC: Bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) suppress T-cell activation without inducing anergy. *Cytotherapy* 3: 417a, 2001.
- Le Blanc K et al.: Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004 May 1; 363(9419):1439-41.
- Le Blanc K et al.: Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 May; 11 (5): 321-34. Review.
- Gimble JM, Guilac F: Adipose Derived Adult Stem Cells: Isolation, characterization and differentiation potential. *Cytotherapy Review*. 2003.
- Hauner H., Entermann G., Wabisch M., Gaillard D., Ailhaud G., Negrel R., Pfeiffer E.F.: Promoting Effect of Glucocorticoids on the Differentiation of Human Adipocyte Precursor Cells Cultured in a Chemically Defined Medium. *The American Society for Clinical Investigation, Inc*. 84. 1663-1670, 1989.
- Berntsen Jacobsen BM, Aagaard Willadsen L.: Adipose Derived Adult Stem Cells, Isolation and Characterization, Masteroppgave 2004 ved Universitetet for miljø-og biovitenskap (UMB).
- Simmons PG, Torok-Storb B.: Identification of stromal cells in human bone marrow by a novel monoclonal antibody Stor-1. *Blood* 78:55-62, 1991.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WWK, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orcard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK.: Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine* 5 (3), 309-313, 1999.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa J C, Lloyd AC, Bernad A.: Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation *Cancer Res* 2005; 65: (8) April 15, 2005.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Ghaffari FH, Ghavamzadeh A, Nikbir B.: Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*. 2006; 7: 14.

Abstract

Selection and Culturing of Human Mesenchymal Cells

GMP production of mesenchymal cells for therapeutic purposes has been hampered by lack of a clinical grade medium and by the use of foetal calf serum (FCS). In the present study we tested a clinical grade medium, LPO₂ (MacoPharma, Tourcoing, France) supplemented with human AB platelet enriched plasma (PRP). We looked at cell characteristics and growth with regard to the phenotype of the cells, the ability of the cells to ex vivo differentiate into adipocytes and osteoblasts, and the cytokine profile of the cells. All the experiments were performed on mesenchymal cells from bone marrow (MSC), and on adipose-derived adult stem cells (ADAS-cells) from adipose tissue. ADAS cells seem to have the same multilineage potential as MSC from bone marrow. Since they are easily obtained, it is proposed that they may be promising candidate cells for further studies on tissue engineering.

Fagartiklene i Bioingeniøren er fagfelleverderte

Bioingeniøren praktiserer fagfellevurdering av fagartiklene. Det vil si at alle fagartikler som kommer på trykk under vignetten FAG er vurdert av referee. De som deltar i Bioingeniørens refereeordning må oppfylle følgende krav: Minimum mastergradskompetanse, har/har hatt selvstendig rolle i forskningsarbeid,

relevant yrkeserfaring i forhold til den aktuelle artikkelen, publisert i fagvitenskapelige tidsskrift.

Vi ønsker å knytte til oss flere referee. Skriv en epost til biored@nito.no hvis du fyller kravene eller kjenner andre som gjør det.