

# 実用性の高い治療用細胞 —脱分化脂肪細胞(DFAT)— GLP製造を目指したDFAT製造用培養容器の開発

日本大学 医学部 機能形態学系 細胞再生・移植医学分野 教授 松本 太郎

Taro Matsumoto, Department of Functional Morphology Division of Cell Regeneration and Transplantation, Nihon University School of Medicine

## 目的・背景

間葉系幹細胞(MSC)は患者自身の身体から調製でき、腫瘍原性がなく移植安全性が高いため、多くの臨床研究が行われている。一方、MSCは培養後もヘテロな細胞集団で、その品質は個体差が大きく、ドナー年齢や基礎疾患に影響されるといった問題点がある(図1)。再生医療を万人に適用できる一般的な治療にするためには、より安定した品質の多能性細胞を低コストに調整する技術が望まれる。

脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cell: DFAT)は成熟脂肪細胞を天井培養という方法で脱分化させることにより得られるMSCと同等の多能性を有する細胞である(図2)。

DFATは少量の脂肪組織から均質なMSC様細胞を大量調製できる技術であるため、実用性の高い治療用細胞ソースとして期待できる。

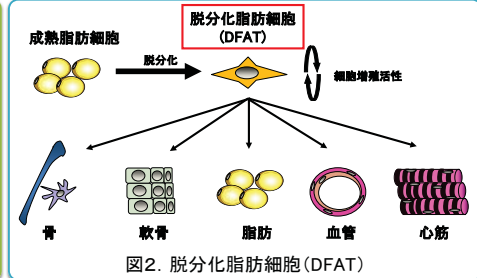
◆ **培養骨髄MSC製剤 (Prochymal<sup>TM</sup>):**  
患者の負担なし。製品の安全性がある程度担保されており、急性疾患にも対応できるが、HLA不一致の他家移植となる。バンキングシステムの構築は困難。

◆ **新鮮SVF細胞 (Adipose-derived regenerative cell: ADRC):**  
自家移植可能で、培養を必要としないが、細胞の均一性が保てない。細胞数確保のため、ある程度侵襲性の高い操作(腰椎麻酔下250 mlの脂肪吸引術)が必要となる。

↓

より低侵襲性に原材料を採取でき、均質な多能性細胞を低コストで大量調製できる技術が望まれる。

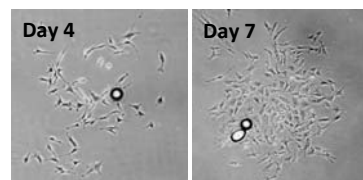
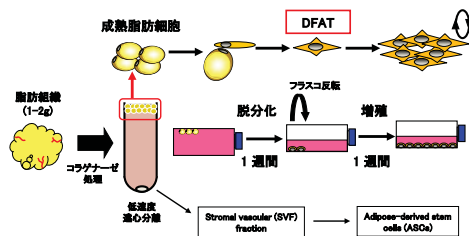
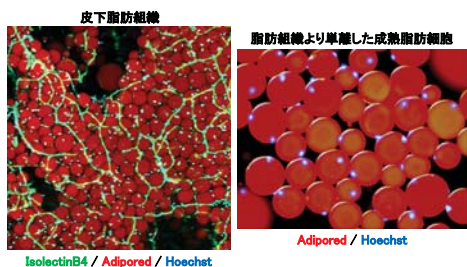
図1. 現在のMSC治療の動向と問題点



特許 第5055611号 (JP), 第5055613号 (JP, GB, DE, FR)

## 原理・方法

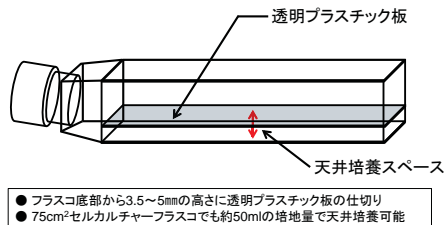
脂肪組織は非常に血管が豊富な組織であるが、コラゲナーゼ消化とフィルトレーション、低速度の遠心分離を行なうことで、成熟脂肪細胞と間質血管系分画(SVF)とに分離することが可能である(図3, 4)。単離した成熟脂肪細胞を、培養液で満たしたフラスコ内で培養すると、フラスコ天井側に付着した後、非対称性に分裂を開始し、線維芽細胞を産生する。この産生された線維芽細胞様の細胞(DFAT)は対称性に分裂を繰り返し、コロニーを形成する(図5)。さらにフラスコを反転して増殖用培地で培養することにより、培養開始から約2週間ほどでコンフルエントに到達するまで増殖する。一方SVF細胞を付着培養して得られる細胞が、脂肪組織由来幹細胞(ASC)であり、DFATとは起源が異なる。



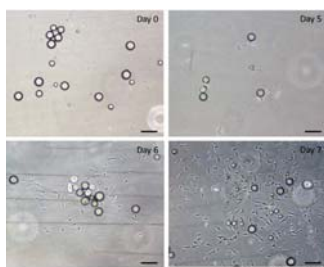
今回、我々は成熟脂肪細胞を長期間培養する方法として確立している天井培養法を従来法に比べより少量の培地で簡便に行なえる大容量培養容器を開発することを目的とした。

## 結果

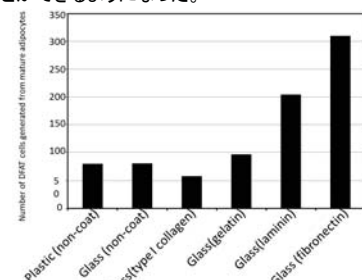
**結果①:** 臨床使用を想定した場合、75cm<sup>2</sup>セルカルチャーフラスコといったより大型のフラスコを用いて天井培養をする必要がある。今回の発明では市販の75cm<sup>2</sup>セルカルチャーフラスコを改造し、フラスコ底部から3.5~5mmの高さに透明プラスチック板の仕切りがある脱分化培養用フラスコを作製した(図6)。本発明により、フラスコを反転して培養する必要がなくなり、通常の細胞を培養する状態で天井培養が行えるようになった。また、フラスコを培地で満たす必要がなくなったことから、75cm<sup>2</sup>セルカルチャーフラスコでも約50mlの培地量で天井培養が可能となった。また、フラスコを培地で満たすことによって起こりうる培地が漏れる問題、細菌感染が起こりやすい問題そしてガス交換が不十分になる問題を解決した。



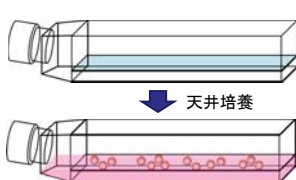
**結果②:** この脱分化培養用フラスコを用いてヒト成熟脂肪細胞を培養した結果、フラスコを反転する必要がないため播種直後より通常の倒立顕微鏡観察が可能となり、天井培養の継時的観察が容易となった(図7)。



**結果③:** この脱分化培養用フラスコにおける細胞接着面をラミニンまたはファイブロンectinでコーティングすることにより、従来法より約3~5倍の効率で脂肪細胞の脱分化を誘導することができるようになった。



## まとめ



- ◆ 75cm<sup>2</sup>セルカルチャーフラスコ内部に、フラスコ底部から3.5~5mmの高さに透明プラスチック板を設置した脱分化培養用フラスコを作製したことにより、フラスコ内部を培地で満たすことなく天井培養が可能となり、播種直後より倒立顕微鏡下での観察が容易となった。
- ◆ 細胞接着面のコーティングを変えることにより、従来法と比べてより高効率に脂肪細胞の脱分化を誘導することが可能となった。

## 今後の展望

### 脱分化培養フラスコの利点

- ◆ 熟練した技能を必要とした脂肪細胞の天井培養をより簡便、確実そして安全に行えるようになり、セルプロセッシング・アイソレータ内での易操作性を実現しており、治療用細胞としてのDFAT調製を目的とした臨床グレードの培養容器に応用することができる。
- ◆ 脂肪細胞の脱分化過程を一般の倒立顕微鏡にて簡単に観察できるようになったことから、天井培養を用いた多くの脂肪細胞研究の発展が期待できる。

### 改良の余地がある点

- ◆ 透明プラスチック板を天井にした状態で培養を継続するため、天井培養時に必要な培地量が培地交換時にも必要となる。そのため底部から透明プラスチック板の高さをより低くすることで必要培地量を軽減できるか検討する必要がある。
- ◆ 細胞の回収性を高める構造にする必要がある。

## 日本大学産官学連携知財センター (NUBIC)

〒102-8275 東京都千代田区九段南4-8-24 日本大学会館

Tel: 03-5275-8139 Fax: 03-5275-8328 E-mail: nubic@nihon-u.ac.jp

http://www.nubic.jp