

# 治療用細胞としての脱分化脂肪細胞 (DFAT) Dedifferentiated fat cells (DFAT) for therapeutic cells

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 (Purpose and Background)

近年、骨髄や脂肪組織の間質細胞より得られる間葉系幹細胞 (MSC) が高い増殖能力と多分化能を有することが明らかにされ、MSCを用いた細胞治療の臨床試験が開始されている。MSCは不全臓器を根治できる可能性を秘めていることから大きな期待がかけられている。しかしながら、MSCにも様々な問題点が残ったままであり(図1)、再生医療を万人に適用できる一般的な治療方法にするためには、簡便かつ純度の高い細胞を大量調製できることが望まれる。

我々はヒトを含む様々な動物種の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で体外培養することにより、得られる細胞群(脱分化脂肪細胞、Dedifferentiated fat cell: DFAT)が高い増殖能と多分化能を獲得することが明らかになった(図2)。

◆培養BM-MSC製剤 (Prochymal™):  
ドナーの負担なし。製品の安全性が担保されており、急性疾患にも対応できるが、MHC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 (ADRCs):  
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。

低侵襲性・安全に採取調整でき、純度が高く、均質なMSC自家移植にも他科移植(細胞バンク)にも対応できるMSC

図1. 現在のMSC治療の動向と問題点

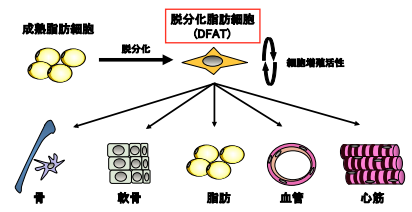


図2. 脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT)

## 原理・方法 (Principles and Methods)

脂肪組織中の脂肪細胞は毛細血管と直接接して栄養を受けていると言われており、脂肪組織は非常に毛細血管に富んだ組織である(図3左)。脂肪組織をコラゲナーゼ消化後、低速度の遠心分離を行なうことで、浮力の高い成熟脂肪細胞のみが溶液上部に集積することで容易に単離することが可能である(図3右)。

単離した成熟脂肪細胞を、培養液で満たし、培養面を天井にしたプラスチック内で培養すると、成熟脂肪細胞はプラスチック天面に集まり、ここで徐々に脂肪滴が小さくなっていくと共に接着性を獲得する。そして1週間後には線維芽細胞様の細胞が増殖し始める。このようにして得られたDFATは、プラスチックを反転して増殖用培地で培養することにより、1週間ほどでコンプレックスに到達するまで増殖させることが可能である(図4, 5)。

皮下脂肪組織

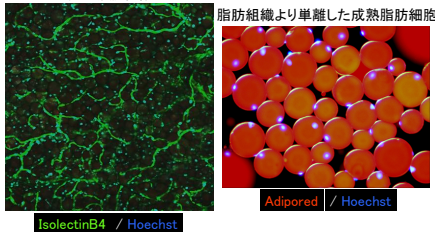


図3. 脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞

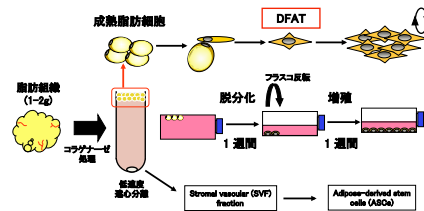


図4. 成熟脂肪細胞の単離と天井培養によるDFATの調整法

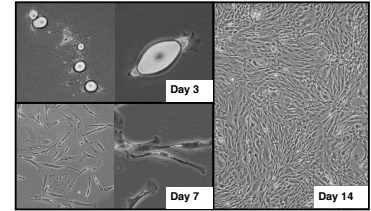


図5. 天井培養による成熟脂肪細胞の形態変化

我々はDFATの治療用細胞としての特性解析を行なった。

- ①同一脂肪組織からのDFATならびにASCsの作製効率
- ②ドナー年齢間におけるDFATの多分化能解析
- ③DFATと間葉系細胞との遺伝子発現差異の比較
- ④DFATとASCsにおける純度解析(混入細胞の割合)

## 結果・まとめ (Summary and the results)

結果①: 同一脂肪組織より調製したDFATならびにASCsそれぞれの細胞数において、DFATはASCsと比べて約25倍多く調製することができることを明らかにした。

	細胞数	附着増殖細胞数	播種細胞密度 (1-cm <sup>2</sup> )	培養面積 (T-25プラスチック板)	初代培養で得られる細胞数
成熟脂肪細胞	1x10 <sup>6</sup> (100万)	4x10 <sup>5</sup> (40万)	2x10 <sup>3</sup>	1,250cm <sup>2</sup> (50枚)	DFATs 1.4x10 <sup>8</sup>
SVF細胞	2x10 <sup>6</sup> (200万)	8x10 <sup>4</sup> (8万)	5x10 <sup>4</sup>	100cm <sup>2</sup> (2枚)	ASCs 5.6x10 <sup>6</sup>

図6. 同一脂肪組織からのDFATならびにASCsの作製効率

結果②: 我々はすでに30例以上のドナーから脂肪組織の提供を受け、DFATを調製しているが、検討した範囲では、2歳から81歳に至るまですべてのドナーよりDFATが調製可能であり、またそのすべてが多分化能(脂肪細胞・骨細胞・軟骨細胞)を有していることを明らかにした。

Donor age	Sex	Passage	Adipogenic	Osteogenic	Chondrogenic
2	F	P3	+	+	+
4	M	P5	+	3+	+
7	M	P5	+	2+	+
10	M	P3	±	+	+
10	M	P8	+	+	+
16	M	P4	2+	3+	+
46	F	P7	+	3+	+
58	F	P4	2+	2+	+
68	M	P4	2+	+	+
69	F	P6	+	+	+
75	F	P3	2+	2+	+
77	F	P2	3+	3+	+
81	M	P3	2+	2+	+

図7. ドナー年齢間におけるDFATの多分化能解析

結果③: DNAマイクロアレイ法によるDFATの遺伝子発現パターンを間葉系細胞と比較した結果、DFATは、fibroblast, 骨髄MSC, preadipocyte, ASCsの順に遺伝子発現プロファイルが類似していることがわかり、ASCsの遺伝子発現プロファイルと99% identicalであるということが明らかになった。

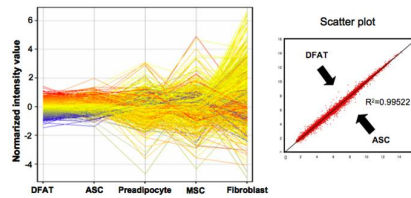


図8. DFATと間葉系細胞との遺伝子発現差異の比較

結果④: DFATとASCsのfirst passageにおける混入細胞の比較では、ASCが18.6%の平滑筋細胞、約3%の血管内皮細胞、13.3%の単球がコンタミネーションしていた。これに対してDFATではこのようなコンタミネーションがほとんどなかった。

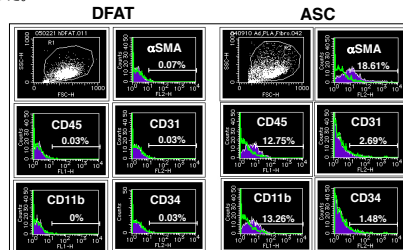


図9. DFATとASCsにおける純度解析(混入細胞の割合)

まとめ: DFATは少量の脂肪組織から効率よく大量調製が可能であり、ドナー年齢に関係なく多分化能細胞が調製可能である。また、調製されたDFATは、脂肪組織より単離された成熟脂肪細胞のみからの由来となることから、他細胞の混入がほとんどない純度の高い細胞集団として得られる(図10, 11)。これらのことから、全身状態不良の患者や高齢者など、今まで自己幹細胞移植が困難と考えられてきた患者に対する新規再生医療用ドナー細胞として有望であると思われる。

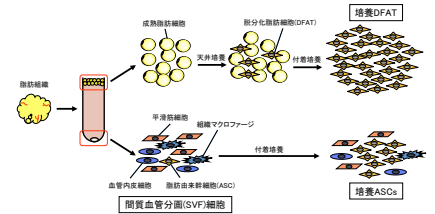


図10. DFATとASCsにおける調製効率の比較

- ◆約1gの脂肪組織から効率よく大量調製が可能
  - MSC-ASCに比べ採取に伴う侵襲が少ない
  - 重症心不全、重度熱傷など全身状態不良の症例でも自家移植が可能
- ◆ドナー年齢に関係なく多分化能細胞が調製できる
  - 高齢者・骨粗鬆症などに対する自家移植が可能
- ◆他細胞の混入がほとんどない純度の高い細胞集団
  - 移植に伴うリスクが低い
  - 産後早期に移植できる
- ◆手術時に破壊される脂肪組織を利用したバンキングシステムの構築が容易
  - 他家移植への適応も有望(急性期疾患、遺伝性疾患など)

図11. 治療用細胞としてのDFATの利点

## 応用分野・用途 (Applications)

- ◆低コストの細胞治療・再生医療が可能となる(大規模なOP、増殖因子、抗体選別など不要なし)
- ◆万人に適用可能な未来の一般医療となる可能性(高齢者、小児、全身状態不良の患者などに対する自家細胞治療が可能)
- ◆高齢者の代謝性疾患に対応し、QOLを改善(骨粗鬆症や変形性関節症に伴う痛性骨析などを治療させる能力)

図12. DFAT細胞治療のポテンシャル

- ◆重症虚血性疾患 (PAD, IHD)
- ◆骨粗鬆症に伴う難治性骨折
- ◆重症熱傷に伴う創傷治療促進
- ◆萎縮性膀胱による膀胱性尿失禁
- ◆膵血管移植の生着不全予防
- ◆造血幹細胞移植に伴うGVHD予防・治療

図13. DFAT細胞治療が期待できる疾患