

吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析

風間智彦¹⁾, 山元智衣¹⁾, 長岡悠紀¹⁾, 萩倉一博¹⁾, 加野浩一郎²⁾, 相川佳之³⁾, 松本太郎¹⁾

Preparation method and functional analysis of dedifferentiated fat cells derived from liposuction fat

Tomohiko KAZAMA¹⁾, Chii YAMAMOTO¹⁾, Yuki NAGAOKA¹⁾, Kazuhiro HAGIKURA¹⁾, Koichiro KANO²⁾, Yoshiyuki AIKAWA³⁾, Taro MATSUMOTO¹⁾

要旨

我々は成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) が間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) に類似した多能性を示すことを報告してきた。今回、ヒト吸引脂肪サンプルを用いてDFATを調製し、調製に必要な至適組織量、細胞純度、造腫瘍性の有無などについて検討を行った。その結果、約2 mLの吸引脂肪組織から異種細胞混入率0.1%未満といった高純度のDFATを大量調製することに成功した。調製されたDFATは骨、軟骨、脂肪への多分化能を示し、また軟寒天コロニー形成試験や免疫不全マウスへの移植実験にて造腫瘍性を示さないことを明らかにした。DFATは低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できる。

1. はじめに

我々は、成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) が、高い増殖能と間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) に類似する多分化能を示すことを明らかにした¹⁾。皮下脂肪組織は、油滴を豊富に含む成熟脂肪細胞に加え、結合組織や神経、血管を豊富に含む組織である。そのため、皮下脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離するためには、まず組織を機械的に細切後、コラゲナーゼ処理にて消化し、成熟脂肪細胞を単離する必要がある。我々は、ドナーの負担が少なく、より簡便で効率的なDFAT調製法を模索し、瘦身目的などで行なわれる脂肪吸引法に着目した。そして切除脂肪組織のみならず吸引脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞からDFATが調製可能であることを明らかにした。脂肪吸引法による脂肪組織採取の利点として、採取に伴う皮膚切開が3

～4 mm径と小さく、低侵襲で感染のリスクが低いことや、前処置としてエピネフリン・キシロカイン添加生理食塩水 (チューメセント液) を脂肪組織へ注入し膨潤させるため、成熟脂肪細胞の単離が容易なゲル状の脂肪組織が採取できることが挙げられる。

今回、DFATを細胞源とする細胞治療の臨床応用に向け、脂肪吸引法により採取されたヒト吸引脂肪組織を用いて、DFAT調製に必要な至適組織量、調製されたDFATの細胞特性、造腫瘍性の有無などについて検討を行なった。

2. 対象及び方法

本研究は日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った (承認番号RK-160209-6)。脂肪吸引を受ける患者からインフォームドコンセントを得た上で、破棄予定の吸引脂肪組織の提供を受け、DFAT調製に用いた。コラゲナー

1) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

2) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科

3) 湘南美容クリニック

松本太郎: matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

ぜ処理を行う脂肪組織の量を1~5 mLに設定し、単離される成熟脂肪細胞の数を定量評価後、天井培養によるDFATの調製を行った。DFATおよび脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) の調製は既報¹⁾に従い実施した。同一ドナーに由来する吸引脂肪組織よりDFATならびにASCを調製し、細胞純度解析として、初代 (P0) から第3継代 (P3) 細胞のMSC陽性マーカー (CD73, CD90, CD105) ならびに陰性マーカー (CD31, CD45, HLA-DR) の陽性細胞率をフローサイトメトリーにて計測した。また多分化能解析として、DFATを脂肪、骨、軟骨分化誘導培地にてそれぞれ3週間培養し、脂肪分化はオイルレッドO染色、骨分化はアルカリフォスファターゼ染色及びアルザリンレッドS染色、軟骨分化はペレット培養による軟骨様細胞凝集体の形成を評価した。DFATの軟寒天コロニー形成試験は、0.2%アガー含有専用培地に懸濁したDFATを96穴マイクロプレートに播種し、14日間培養後、形成されるコロニー数を計測した。陽性コントロールとしてHela S3細胞、陰性コントロールとしてヒト線維芽細胞 (WI-38細胞) を同時に評価した。マウス皮下移植による造腫瘍性試験 (公益財団法人実験動物中央研究所に委託実施) では、DFATまたはASCを免疫不全NOGマウスの右側腹部皮下にそれぞれ1 x

10⁷ cells/頭ずつ移植した (DFAT群 n=7, ASC群 n=10)。移植日から観察期間終了まで、週1回、体重測定と腫瘍の有無の確認を行った。16週間後に剖検および移植部位の病理組織学的検査を行った。また抗ヒトビメンチン抗体を用いた免疫組織染色により移植部位におけるヒト由来細胞の有無を評価した。個体数、投与経路、移植細胞数などはWHOガイドラインTRS978で推奨されている方法に準拠して実施した。

3. 結果

DFAT調製に必要な吸引脂肪組織の至適組織量を検討した結果、組織量2 mLから機械的細切を必要とせず、コラゲナーゼ処理のみで、容易に成熟脂肪細胞を単離することが可能であった。2 mLの吸引脂肪組織からは、約200 mLの成熟脂肪細胞浮遊液が採取でき、この中には約2 x 10⁵個の成熟脂肪細胞が存在することが明らかになった。単離された成熟脂肪細胞を用いて天井培養すると、培養4日後に成熟脂肪細胞はフラスコ天井面に接着し、培養10日後には成熟脂肪細胞よりDFATのコロニー形成が確認された (図1)。細胞純度解析を行った結果、この方法にて調製したDFATのMSC陽性マーカーの陽性率は90%以上であり、MSC陰性マーカーの陽

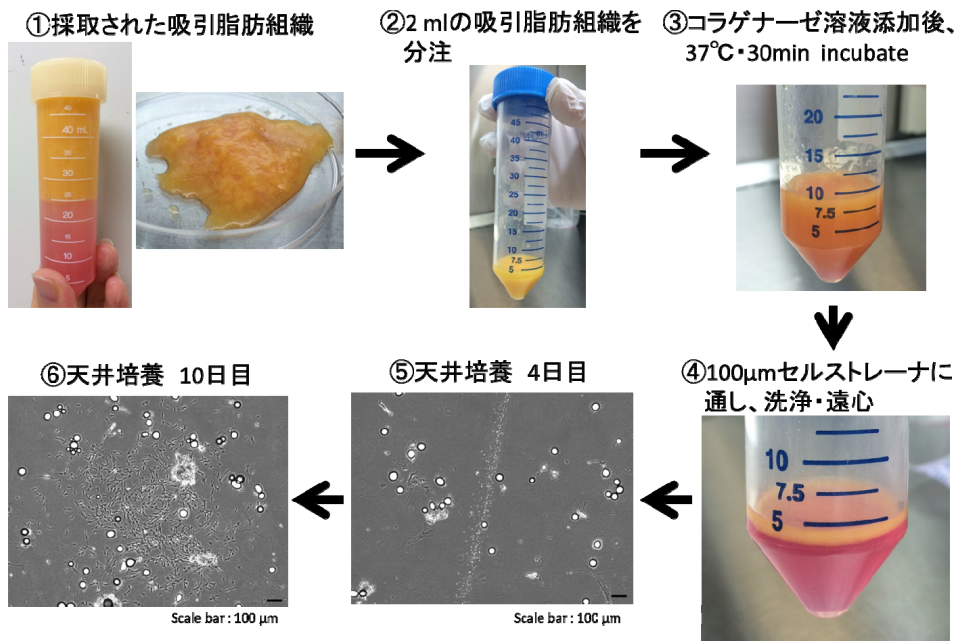


図1 ヒト吸引脂肪組織からのDFATの調製と細胞の形態変化

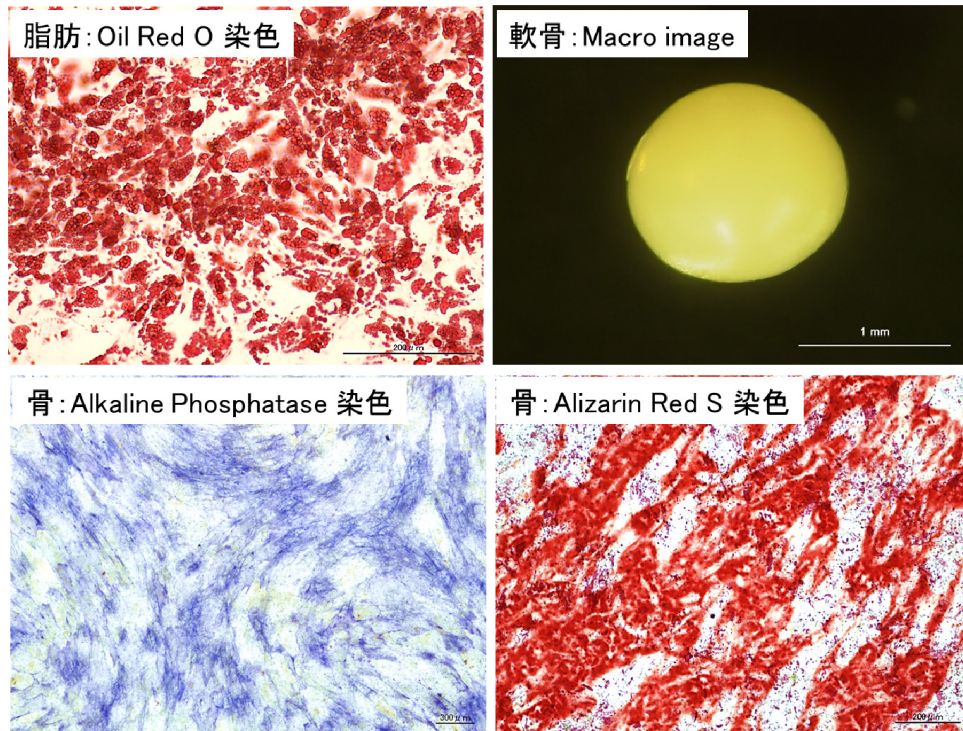


図2 ヒト吸引脂肪組織より調製したDFATの多分化能解析

性率は0.1%未満であった。一方同一組織から調製したASCではP0において陰性マーカーの陽性率がDFATに比べて有意に高い傾向にあった。多分化能解析を行った結果、この方法にて調製したDFATは、脂肪、骨、軟骨への高い分化能を示すことが確認された(図2)。軟寒天コロニー形成試験では、DFATは2回の試験共にすべてのウェルでコロニー形成は確認されなかった。NOGマウス皮下移植による造腫瘍性試験では、16週の観察期間終了時においてDFAT群、ASC群ともに腫瘍形成は認められなかった。また病理組織学的検査においても腫瘍性変化及び細胞の増殖性を示す所見は認められなかった。移植部皮膚では、DFAT群、ASC群ともに抗ヒトビメンチン抗体陽性細胞が確認された。以上の結果よりDFAT細胞はASCと同様に造腫瘍性はないと判定した。

4. 考察

本研究では、約2 mLの吸引脂肪組織から機械的な細切を必要とせず、コラゲナーゼ処理のみで約 2×10^5 個の成熟脂肪細胞を単離することができ、この成熟脂肪細胞からDFATの製造が可能であることを明らかにした。この結果とDFATの増殖特性から勘

案すると、5~10 mLの吸引脂肪組織を採取すれば、通常の細胞治療に必要な細胞数($10^7 \sim 10^8$ cells)を第3継代以内に獲得できると推測される。5~10 mLの吸引脂肪組織は、局所麻酔下にカニューラ付き20 mLシリンジといった簡便な医療器具を用いて、閉鎖系で低侵襲性に採取することができる。このように少量の脂肪吸引法を用いて調製されたDFATは、組織採取に伴う患者の負担を最小限とし、汚染の可能性が低く安全に調製できるといった点で、既存の治療用細胞に比べても優位性が高いと考えられる。

ヒト吸引脂肪組織より調製したDFATの特性解析を行った結果、DFATは、MSCに特徴的に発現する細胞表面マーカー(CD73, CD90, CD105)を高発現するとともに、骨、脂肪、軟骨への多分化能を示し、国際細胞治療学会(International Society for Cellular Therapy: ISCT)で定義されているヒトMSCの基準を満たしていた²⁾。また異種細胞の混入を示す陰性マーカー(CD31, CD45, HA-DR)の陽性率はいずれも0.1%未満であり、ASCに比べて有意に低かった。これはDFATが成熟脂肪細胞を単離してから調製されるため、血液細胞や血管構成細胞などの混入が起こりにくいことに起因していると考えられる。高純

度の細胞を培養初期から得られるといったDFATの特性は、この細胞を自家細胞医薬品として開発する上で有利に働くと思われる。ヒト細胞加工製品の安全性指標としては、特に腫瘍原性に関する安全性評価が重要であり、造腫瘍性試験の実施が求められている。今回、吸引脂肪組織より調製したDFATの軟寒天コロニー形成試験ならびにNOGマウス皮下移植による造腫瘍性試験を行なった結果、ヒト吸引脂肪組織より調製したDFATに造腫瘍性が認められないことを確認するに至った。DFATはすでに臨床使用されているASCと同様に、移植安全性の高い細胞であることが予想される。今後、DFAT細胞治療の臨床研究開始に向け、脂肪吸引法を用いた臨床グレードDFATの製造法を確立するとともに、より詳細な安全性試験や性能試験の実施が望まれる。

5. 結 語

約2mlという少量の吸引脂肪組織から高純度かつ多分化能を有するDFATを大量調製できることが明らかとなった。また、ヒト吸引脂肪組織より調製されたDFATは造腫瘍性を認めず、安全に移植できることが示唆された。DFATは低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できる。

文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215: 210-222.
- 2) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.