

## 脱分化脂肪細胞 (DFAT) 調製用天井培養フラスコと ゼノフリー培地の性能評価

松本太郎<sup>1)</sup>, 副島一孝<sup>2)</sup>, 檜村 勉<sup>2)</sup>, 李予昕<sup>1)</sup>,  
風間智彦<sup>1)</sup>, 萩倉一博<sup>1)</sup>, 山元智衣<sup>1)</sup>, 長岡悠紀<sup>1)</sup>

### Performance evaluation of ceiling culture flasks and xeno-free medium for the preparation of dedifferentiated fat (DFAT) cells

Taro MATSUMOTO<sup>1)</sup>, Kazutaka SOEJIMA<sup>2)</sup>, Tsutomu KASHIMURA<sup>2)</sup>, Yuxin LI<sup>1)</sup>,  
Tomohiko KAZAMA<sup>1)</sup>, Kazuhiro HAGIKURA<sup>1)</sup>, Chii YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Yuki NAGAOKA<sup>1)</sup>

#### 要旨

脱分化脂肪細胞 (DFAT) は、成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養して作られる間葉系幹細胞 (MSC) に類似した多能性細胞である。DFATは少量の脂肪組織から均質な治療用細胞を大量に作ることができることから、実用性の高い再生医療の細胞源として期待できる。我々は、DFAT細胞治療を広く普及させるために、簡便・効率的にDFAT調製を可能とする「天井培養フラスコ」を開発した。またウシ胎仔血清 (FBS) 等の動物由来成分を含まず、DFATの調製を可能とする「ゼノフリー培地」の開発に成功した。本研究では、この「天井培養フラスコ」と「ゼノフリー培地」を用いて調製したDFATの形質や多分化能を検討した。その結果、これらの組み合わせで調製したDFATは、従来法に比べより簡便で高効率にDFATを調製できることが明らかになった。

#### 1. はじめに

再生医療によく用いられる間葉系幹細胞 Mesenchymal stem cells (MSC) は患者自身の骨髓液や脂肪組織などから培養調製でき、未分化な状態で移植しても腫瘍形成せず安全性が高いため、多くの疾患に対して臨床応用が行われている。一方、MSCは患者の年齢や病状により細胞の品質にばらつきが生じやすく、均質性が低いといった問題点がある。また現在上市されているMSC製剤は保険償還価格が1,000万円を超え、非常に高額な治療となっている。MSCによる細胞治療を普及させるためには、簡便・安価に大量調製可能で、患者を選ばず均質で安定した性能を示すMSC製造技術の確立が望まれる。

Matsumotoら<sup>1)</sup>は、成熟脂肪細胞を天井培養法という方法で培養することによって得られる細胞群 (脱分化脂肪細胞 Dedifferentiated fat cells: DFAT) が、MSCに類似した高い増殖能と多分化能を獲得

することを明らかにした。DFATは、①患者の年齢や基礎疾患に影響されず安定的に調製できる、②少量の脂肪組織サンプルから高効率に大量調製できる、③初代培養から均質な細胞が得られる、といった利点を有することから実用性の高い治療用細胞ソースとして有望であると考えられる。我々の研究グループでは、自施設内に設置された細胞加工施設 (CPF) においてアイソレータを用いた臨床グレードのDFAT製造法を確立し、2020年より重症下肢虚血患者を対象とした自家DFATを用いた血管再生細胞治療のFirst-in-Human臨床試験を実施中である。DFAT細胞治療を広く社会実装するためには、汎用性が高く、より安全、安価にDFATを調製する技術が求められる。既存のDFAT調製法には、①市販のT12.5フラスコを用いて天井培養を行うため、細胞播種等に高度な培養手技が必要、②DFATを誘導するために高濃度 (20%) のウシ胎仔血清 (FBS) を含

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) 日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野  
松本太郎: matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

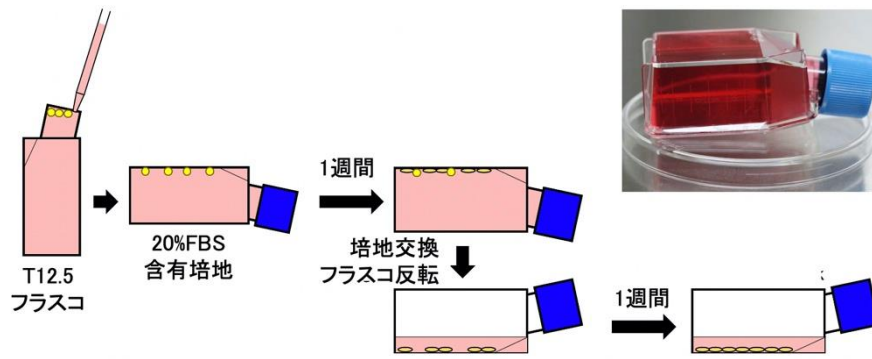


図1 既存のDFAT調製法の概略

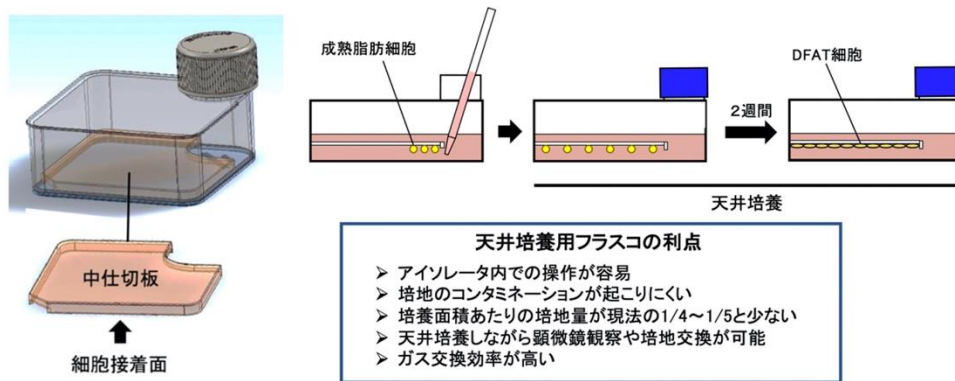


図2 天井培養フラスコの構造と利点

有した培地が必要、③最終製品が新鮮細胞懸濁液であるため、調製後24時間以内に移植しなくてはならない、といった問題点があった(図1)。

天井培養に用いるフラスコに関して、我々は、より簡便・効率的にDFAT調製を可能とする「天井培養フラスコ」を開発し、製品化した(図2, 国際特許取得:PCT/JP2016/082413)。

またDFAT調製用培地に関して、種々のFBSを使用しない培養条件を検討した結果、適切な濃度の血清代替物と基礎培地を組み合わせることにより、動物由来成分を含まず、生物由来原料基準に適合した「ゼノフリー培地」の開発に成功した(特許出願中)。本研究では、ヒト脂肪組織から「天井培養フラスコ」と「ゼノフリー培地」を用いて製造したDFATの特性解析や多分化能を検討した。

## 2. 対象及び方法

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実施した(承認番号:

RK-160209-6)。ヒト脂肪組織は43歳女性から同意取得後、外科手術時に廃棄される脂肪組織の提供を受け実験に使用した。実験プロトコルの概要を図3に示す。

脂肪組織2mLをコラゲナーゼ(Liberase MNP-S GMP grade, Roche)にて37℃, 30分間処理後、セルストレーナーを用いて未消化組織を濾過した。その後、低速度遠心分離(135×g, 1分間)を行い、成熟脂肪細胞を浮遊層として単離した。天井培養フラスコに浮遊層100μL(成熟脂肪細胞 $2 \times 10^5$  cells)を播種し、天井培養を行った。培養条件として、従来法である①20% FBS含有CSTI303-MS C培地(細胞科学研究所)、または新たに開発した②FBS不含有ゼノフリー培地を用いて、インキュベータ内(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)で培養した。天井培養7日後に培地交換を行い、14日後にPBSで2回洗浄後、細胞剥離液TrypLE™ Select Enzyme(Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞を剥離し、T-75フラスコに $1 \times 10^6$  cells/dishで播種し継代培養を行った。細胞形態

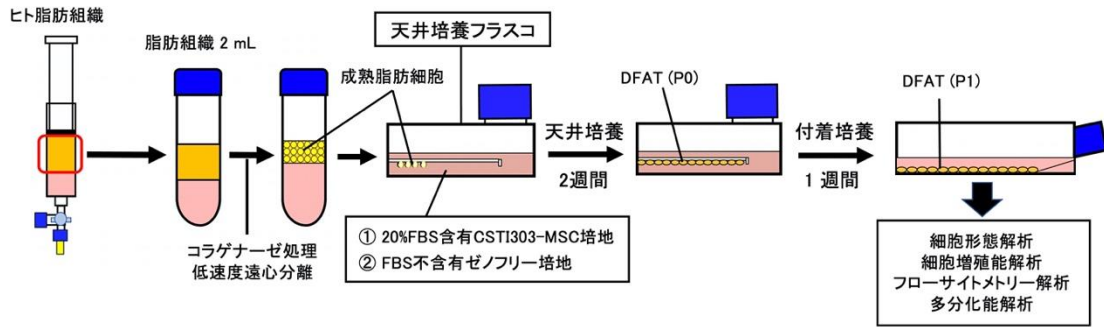


図3 実験プロトコール

の変化は経時的に位相差顕微鏡にて写真撮影を行った。

フローサイトメトリー解析は、第2継代細胞を用いて既報<sup>2)</sup>に従い実施した。抗体はPE標識抗ヒトCD73, CD90, CD105, CD31, CD45, HLA-DR抗体 (BD Biosciences) を用いた。死細胞を検出するため7-Aminoactinomycin D (7AAD, BD Biosciences) を各サンプルに添加した。細胞表面抗原の測定は、FACSAria™フローサイトメーター (Becton Dickinson) を使用し、フォワードスキャッター (FSC) およびサイドスキャッター (SSC) をゲーティング後、7AAD陰性分画をゲーティングし、生細胞のみを解析した。解析はFlowJoソフトウェア (FlowJo, LLC) を用いて行った。アイソタイプコントロールの蛍光強度とサンプルの蛍光強度を比較し、ヒストグラムを作成した。

脂肪、骨分化能の解析は、第2継代細胞を用いて既報<sup>2)</sup>に従い実施した。脂肪分化誘導は、細胞を24ウェルプレートに $6 \times 10^4$  cells/wellで播種し、脂肪分化誘導培地 (Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation medium 2, Promo Cell) で培養した。14日後に4%パラホルムアルデヒドで固定後、60% Oil red O染色液 (Sigma Aldrich) を室温で20分間反応させた。超純水で3回洗浄後、光学顕微鏡下に写真撮影を行った。骨分化誘導は、細胞を24ウェルプレートに $6 \times 10^4$  cells/wellで播種し、骨分化誘導培地 (Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation medium, Promo Cell) で培養した。14日後に4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.16% naphtol AS-TR phosphate (Sigma-Aldrich), 0.8% Fast Blue BB (Wako) を37°C, 1時間反応させ、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色を行った。また他のウェルでは、

1% Alizarin red S染色液 (Sigma Aldrich) を室温で3分間反応させ細胞のカルシウム沈着を可視化した。超純水で3回洗浄後、光学顕微鏡下に写真撮影を行った。

### 3. 結果

最初に天井培養フラスコとFBS不含有ゼノフリー培地を用いて、ヒト脂肪細胞の天井培養を行い、従来法と同様にDFATを誘導できるか検討した。細胞の形態変化を図4に示す。その結果、20% FBS含有培地、ゼノフリー培地ともに、天井培養4日後より紡錘型の脂肪滴を持たないDFATの出現が認められた。天井培養7日後には、DFATのコロニー形成がフラスコの各所に認められた。天井培養14日後には、両培養条件共にほぼコンフルエントに到達するまで増殖した。また継代培養後も両培養条件共に良好に増殖する所見が認められた。細胞の増殖速度は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地で高い傾向にあった。また細胞形態は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地でより小型で細長い形態を示した。天井培養フラスコで天井培養14日後に得られたDFATの細胞数は $2 \times 10^7$  cells/flaskであった。以上の結果より、天井培養フラスコとFBS不含有ゼノフリー培地を用いることにより、既存の方法に比べても良好な効率でDFATを調製できることが明らかになった。

次に上記培養条件で調製したDFATのフローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析を行った。MSCマーカーおよびMSC陰性マーカーの発現プロファイルを図5に示す。20% FBS含有培地、ゼノフリー培地ともに、MSCマーカーであるCD73, CD90, CD105は90%以上陽性であり、MSC陰性マーカー

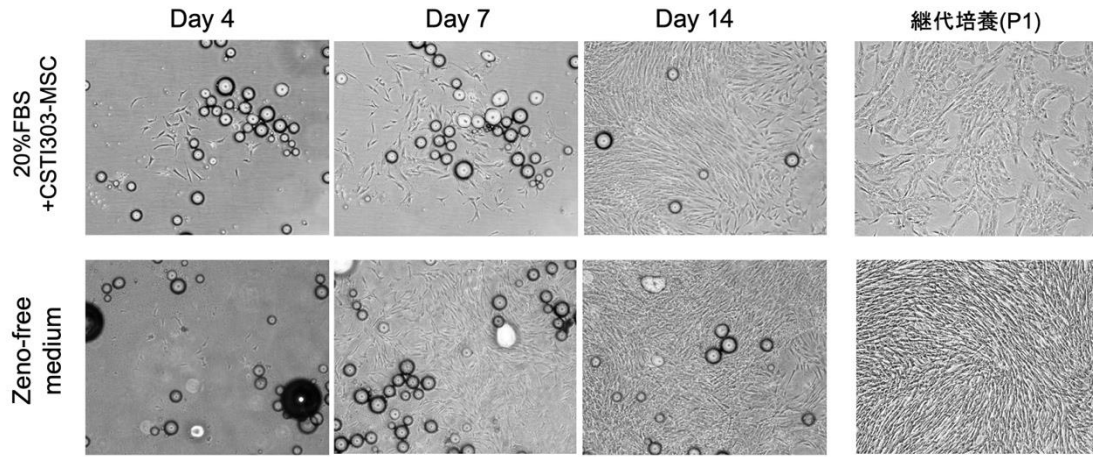


図 4 成熟脂肪細胞の天井培養および継代培養による形態変化

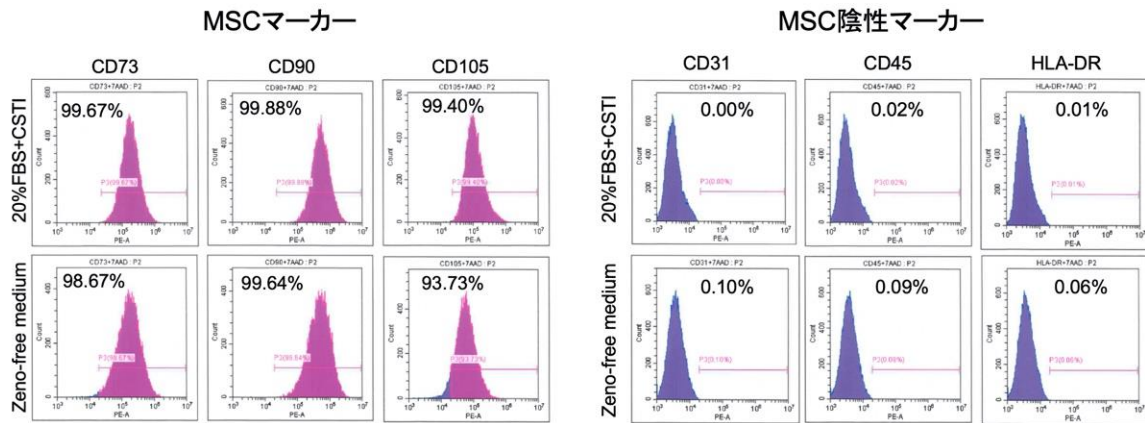


図 5 DFATのMSC陽性・陰性マーカーの発現プロファイル

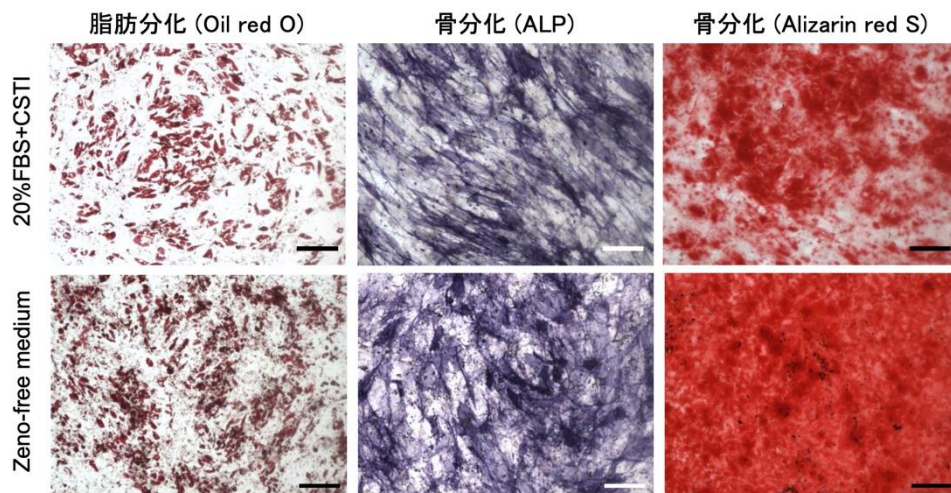


図 6 DFATの多分化能解析 (Scale bars: 200 μm)

であるCD31, CD45, HLA-DRの陽性率は0.1%以下であった。以上の結果より、FBS不含有ゼノフリー培地を用いた調製法でも、既存の方法と同等の均質性が高いMSCの形質を示すDFATが調製されることが示された。

次に上記培養条件で調製したDFATの多分化能解析を行った。結果を図6に示す。脂肪分化誘導14日後のOil red O染色像では、20% FBS含有培地、ゼノフリー培地ともに、Oil red O陽性の脂肪滴を有する脂肪細胞の出現が多数認められた。Oil red O陽性細胞の出現頻度は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地で高い傾向にあった。

骨分化誘導14日後のALP染色像では、20% FBS含有培地、ゼノフリー培地ともに、大部分の細胞がALP陽性を示した。またAlizarin red S染色像でも同様に、両培地ともに大部分の細胞がAlizarin red S陽性を示し、カルシウム沈着した骨芽細胞への分化を示した。ALP陽性細胞、Alizarin red S陽性細胞の出現頻度は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地で高い傾向にあった。以上の結果よりFBS不含有ゼノフリー培地を用いた調製法では、既存の方法と同等またはそれ以上の効率で多分化能を有するDFATが調製されることが明らかになった。

#### 4. 考 察

本研究では高効率で簡便に臨床グレードDFATを製造するために開発した「脱分化培養フラスコ」と「ゼノフリー培地」を用いて、実際に多分化能を有するDFATが調製できるか検討した。その結果、このフラスコと培地の組み合わせにより、従来法に比べてより高効率に均質で多分化能を有するDFATを調製できることが明らかになった。DFATの誘導効率については、天井培養フラスコを用いることによ

り、播種細胞濃度 $2 \times 10^5$  cells/flaskの脂肪細胞から2週間の培養で $2 \times 10^7$  cells/flaskのDFATが調製可能であった。これは従来法のT12.5フラスコを用いた調製法に比べ、約5倍高い調製効率であった。天井培養フラスコを用いることにより調製効率が高まった理由として、従来法に比べ気相が十分に確保できるためガス交換効率が高くなったこと、またDFATが増殖できるスペースが、フラスコ中仕切り板の天井面のみならず、フラスコ底面にも拡大したことなどが考えられた。従来の20% FBS含有培地と新たに開発したゼノフリー培地との比較では、両者ともMSCの最小基準<sup>3)</sup>を満たす細胞表面抗原プロファイルと多分化能を示すことが確認された。さらにDFATの増殖能や骨、脂肪への分化能は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地で高くなる傾向が認められた。これはゼノフリー培地に含まれる血清代替物の生物学的活性がよりDFATの増殖能や多分化能に適したものである可能性が示唆された。今後、血清代替物の至適濃度を決定することにより、よりコストパフォーマンスに優れた製造法が確定すると思われる。現在開発を進めている治験用製品の製造工程を図7に示す。

今回性能評価を行った結果、天井培養フラスコやゼノフリー培地の使用により、脂肪組織5mLから約3週間の培養期間（第1継代細胞）で $5 \times 10^8$  cellsのDFATが調製できると試算される。今後より汎用性を高めるために、天井培養フラスコやゼノフリー培地に加え、最終製品梱包用の細胞凍結バッグや脂肪細胞単離用チューブなどを構成パーツとする「DFAT調製キット」を完成させる予定である。このキットの使用により一定の品質のDFATを多くの細胞加工施設で製造することが可能となり、また最終製品を複数バッグからなる凍結製品とすることに

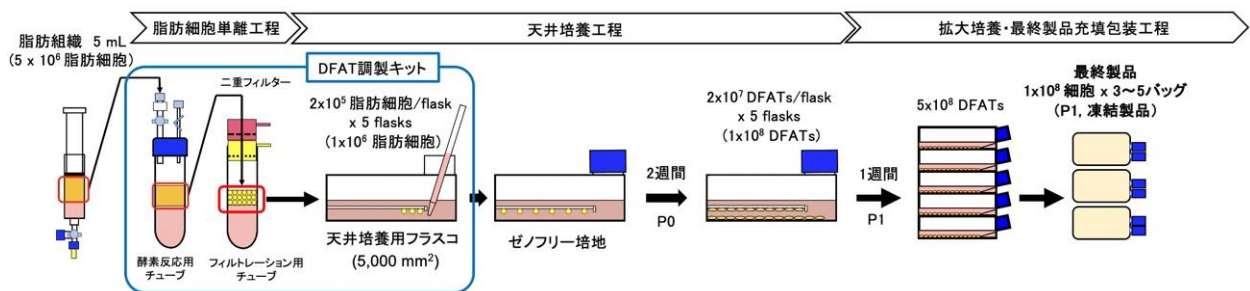


図7 治験用DFATの製造工程

より、長期間保存ができ複数回投与にも対応できるようになる予定である。

## 5. 結 語

本研究では治験用DFATを製造するために開発した「脱分化培養フラスコ」と「ゼノフリー培地」を用いて、実際に多分化能を有するDFATが調製できるか検討した。その結果、これらの組み合わせで調製したDFATは、従来法に比べより簡便で高効率にDFATを調製できることが明らかになった。このような製造法の改良により、汎用性や安全性が高く、安定した品質が担保された自家DFAT細胞医薬品の開発につながることを期待される。

## 謝 辞

本研究は令和3年度日本大学学術研究助成金（社会実装研究）を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。

## 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 (1) : 210-222.
- 2) Tanimoto K, Matsumoto T, Nagaoka Y, et al. Phenotypic and functional properties of dedifferentiated fat cells derived from infrapatellar fat pad. *Regen Ther.* 2022; 19: 35-46.
- 3) 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 (4) : 315-317.