

臨床グレード脱分化脂肪細胞 (DFAT) 製造用 ゼノフリー培地の開発

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

Development of xeno-free media for the production of clinical grade dedifferentiated fat cells (DFAT)

Taro MATSUMOTO¹⁾, Kazutaka SOEJIMA²⁾, Tsutomu KASHIMURA²⁾, Yuxin LI¹⁾,
Tomohiko KAZAMA¹⁾, Kazuhiro HAGIKURA¹⁾, Chii YAMAMOTO¹⁾, Yuki NAGAOKA¹⁾

要旨

成熟脂肪細胞から「天井培養法」により誘導される脱分化脂肪細胞 (DFAT) は、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事ができることから、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、ウシ胎仔血清 (FBS) の代替としてヒト血小板溶解物 (hPL) を用いることにより、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。また臨床グレードDFATを効率良く製造できるhPLの至適濃度や基礎培地の検討を行った。さらに健常ボランティア脂肪組織を用いたDFATの試験製造を行い、再現性よく臨床グレードDFATが製造できることを確認した。このような調製培地の最適化により従来法に比べより安全で高効率に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、移植安全性が高いため、広く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。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¹⁾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。

培養細胞を人体に移植する際には、安全性の観点から、その培地や調整試薬には動物由来の成分が含まれないいわゆる「ゼノフリー」が望ましいとされている。従来のDFAT調製法では、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) を含んだ培地の使用が必

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

須であった。このため最終製品の梱包時に十分な洗浄操作を行い、最終製品からウシ由来タンパク質を除去する必要があった。そしてこの洗浄操作により、最終製品の細胞数が大きく減少してしまうという問題点があった。また十分な洗浄を行っても最終製品中のウシ由来成分を完全に除去することはできないため、ウシ蛋白にアレルギーがある患者には投与できないなど、移植安全性に問題が残った。我々は、種々の培養条件を検討した結果、血清代替物として、ヒト血小板溶解物 (Human platelet lysate, hPL) を用いることにより、成熟脂肪細胞から DFAT を誘導し増殖させることができることを明らかにした。本研究では、臨床グレード DFAT 製造法の最適化を目指し、hPL の至適濃度や基礎培地の検討を行った。また健常ボランティア脂肪組織を用いた DFAT の試験製造を行い、安定的に臨床グレード DFAT が製造できるか検証した。

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, RK-220111-1)。ヒト脂肪組織は被験者より同意取得後、脂肪吸引により採取された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1に示す。

脂肪組織 2mL をコラゲナーゼ (Liberase MNPS GMP grade, Roche) にて 37°C, 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。天井培養には以下の組成の培地を用いた。血清代替物として、hPL は ① UltraGRO™-PURE (UltraGRO, AventaCell

BioMedical), ② Human Platelet Lysate (Stem Cell Technologies), ③ PLTGold™ Human Platelet Lysate (Sigma-Aldrich) を使用した。hPL 濃度は 5% を基準として、0.5 ~ 20% の範囲で検討した。また対照となる血清代替物として、ヒト MSC 用基礎培養液アニマルフリー添加剤 CiMS-sAF (sAF, 細胞科学研究所) を用いた。基礎培地としては、CSTI303-MSC (CSTI, 細胞科学研究所) または CiMS-BM (CiMS, 細胞科学研究所) を用いた。単離した成熟脂肪細胞分画 100 μL を上記の各培地 30mL に懸濁し、天井培養用フラスコ (サンプラテック) の仕切板下面に播種した後、仕切板上部に各培地 20mL を加えた。細胞はインキュベータ内 (37°C, 5% CO₂) 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-225 フラスコ 8 枚に 9×10^5 cells/flask で播種し 7 日間付着培養を行った。細胞形態の変化は経時的に位相差顕微鏡にて写真撮影を行った。細胞数の計測はトリパンブルーで死細胞を染色後、自動セルカウンター TC20 (Bio-Rad) を用いて測定した。

健常ボランティア脂肪組織を用いた試験製造では、5% UltraGRO 含有 CiMS 培地を用いて、上記製造法に従い 14 日間天井培養を行った後、継代し 7 日間付着培養を行った。細胞剥離液を用いて細胞剥離後、細胞数を計測するとともに、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原発現試験を行った。フローサイトメトリー用抗体は 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

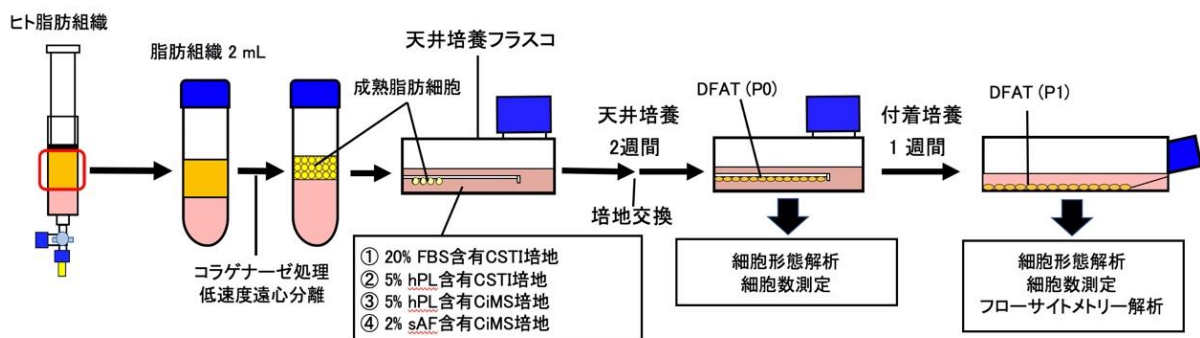


図 1 DFAT 調製法と実験プロトコルの概要

各サンプルに添加した。細胞表面抗原の測定は、CytoFLEXフローサイトメーター（Beckman Coulter）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CytExpertソフトウェア（Beckman Coulter）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、標的抗原に対する陽性細胞率を測定した。

3. 結果

最初にFBSの代替品としてhPLを用いてヒト成熟脂肪細胞からDFATを誘導できるか検討した。各種培養条件下における細胞の形態変化を図2に示す。

その結果、従来培地（20% FBS含有CSTI）と同様に、5% hPL含有培地（5% UltraGRO含有CSTI, 5% UltraGRO含有CiMS）でも紡錘形の形態を示すDFATを誘導、増殖させることが可能であった。一方、MSC培養用無血清培地（2% sAF含有CiMS）では、少数のDFATが誘導されたが、これらを効率よく増殖させることはできなかった。またこれらの5% hPL含有培地を用いることにより、継代培養による細胞増殖も良好であることを確認した。以上の結果より、hPLを含有したゼノフリー条件下で、ヒ

ト成熟脂肪細胞からDFATを誘導、増殖させることに成功した。

次にhPL製品の種類に依存せずDFATが誘導可能か明らかにする目的で、各種市販品のhPLを用いてヒト成熟脂肪細胞からDFATを誘導できるか検討した。その検討結果を図3に示す。

3種類のhPL製剤（hPL-#1: AdventaCell BioMedical社製UltraGRO™-PURE, hPL-#2: StemCell Technologies社製Human Platelet Lysate, hPL-#3: Sigma Ardrich社製PLTGold Human Platelet Lysate）を5%含有した培地は、20% FBS含有培地を用いた場合と同様に、天井培養によるDFATの製造が可能であった。またいずれの5% hPL含有培地も20% FBS含有培地に比べ、増殖能に優れている傾向が確認された。これらの結果より、hPLは普遍的に脂肪細胞の脱分化を誘導しDFATを増殖できることが明らかになった。

次に、効率よく成熟脂肪細胞からDFATを誘導し増殖させるhPLの至適濃度の検討を行った。3名のドナーから採取した脂肪組織を用いて各種濃度のhPL（UltraGRO）含有CiMS培地で成熟脂肪細胞の天井培養を行い、14日後に誘導、増殖したDFATの細胞数を評価した。その結果、DFATを効率良く誘導、増殖させるhPLの至適濃度は5%～15%であった（図4）。またDFATを誘導できるhPLの最低濃度

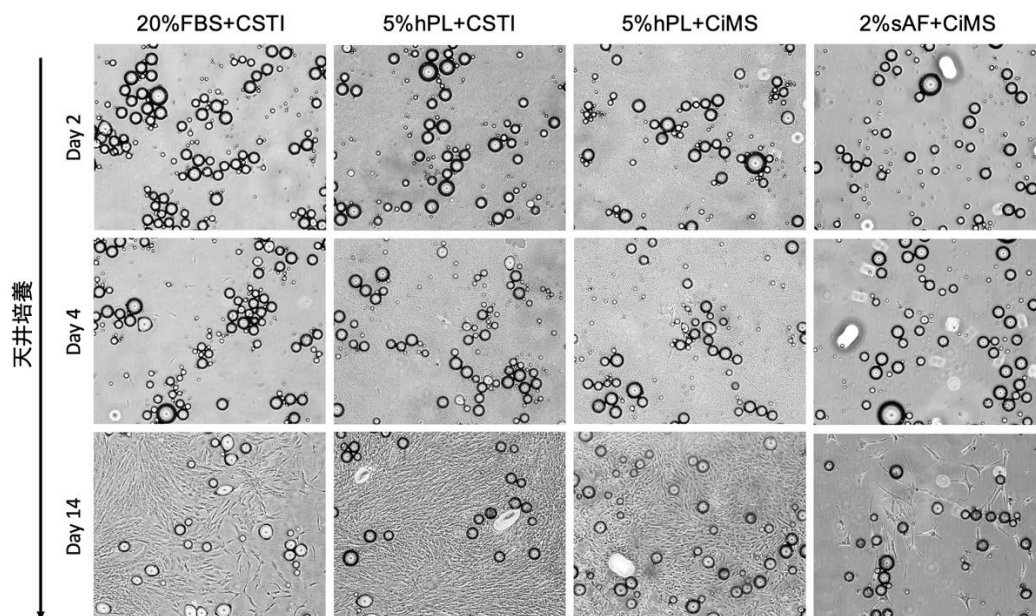


図2 各種培養条件による細胞形態変化

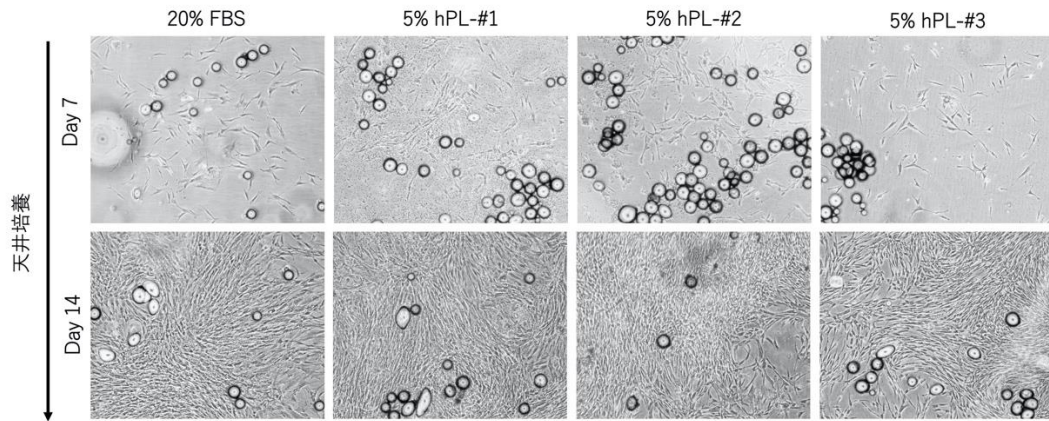


図3 各種hPL製品による細胞形態変化

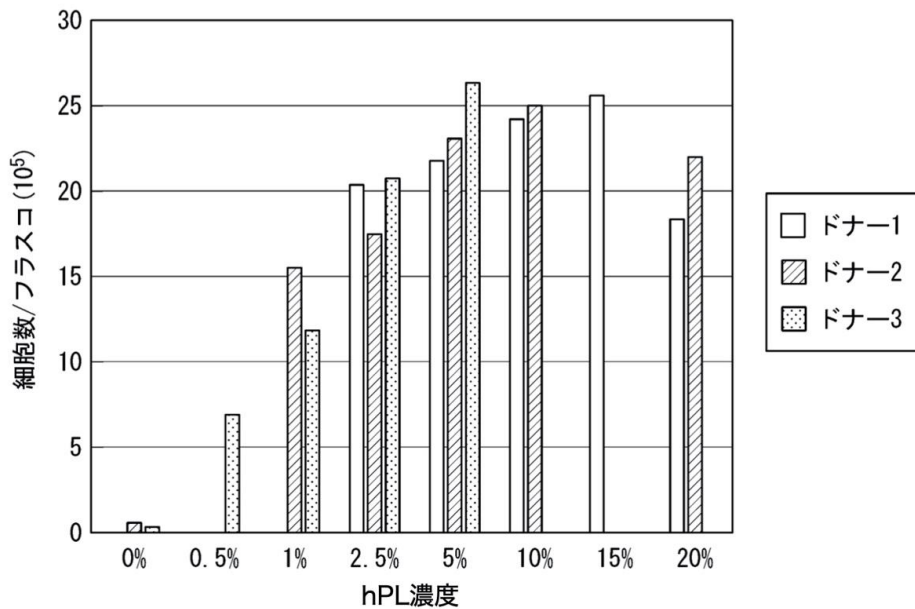


図4 各種hPL濃度によるDFAT細胞数

は0.5%であった。この検討結果より、臨床グレードDFATの調製用培地として、5% hPL (UltraGRO) 含有 CiMS を使用することとした。

次に実際に健常ボランティア脂肪組織から、5% hPL (UltraGRO) 含有 CiMS 培地を用いて、DFATの試験製造を行った。計5例の試験製造を行った結果、全ての症例で再現性良くDFATを誘導、増殖させることができた。天井培養2週間後には、1フラスコあたり 8×10^6 以上のDFATを安定的に調製できることが明らかになった(図5)。また継代培養を行った結果、培養21日目には、最終製品として 1.5×10^8 以上のDFATを調製できることを確認した。

次に培養21日目の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6に示す。MSCマーカーであるCD73, CD90, CD105はすべての症例で90%以上陽性であり、MSC陰性マーカーであるCD31, CD45, HLA-DRの陽性率は0.5%以下であった。以上の結果より、5% hPL (UltraGRO) 含有 CiMS 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が再現性良く調製できることが示された。

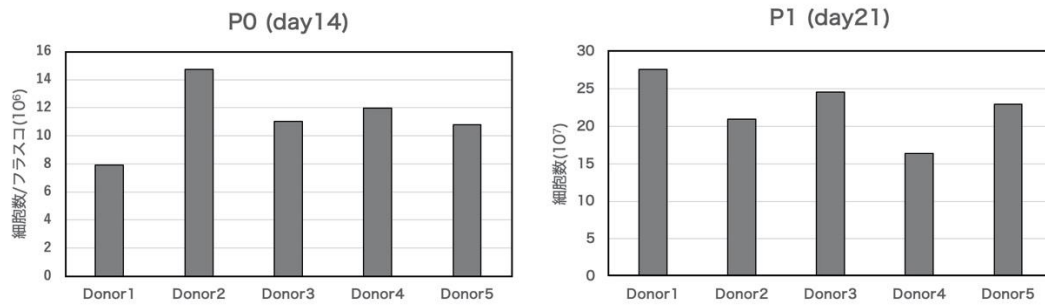


図5 試験製造により得られたDFATの細胞数

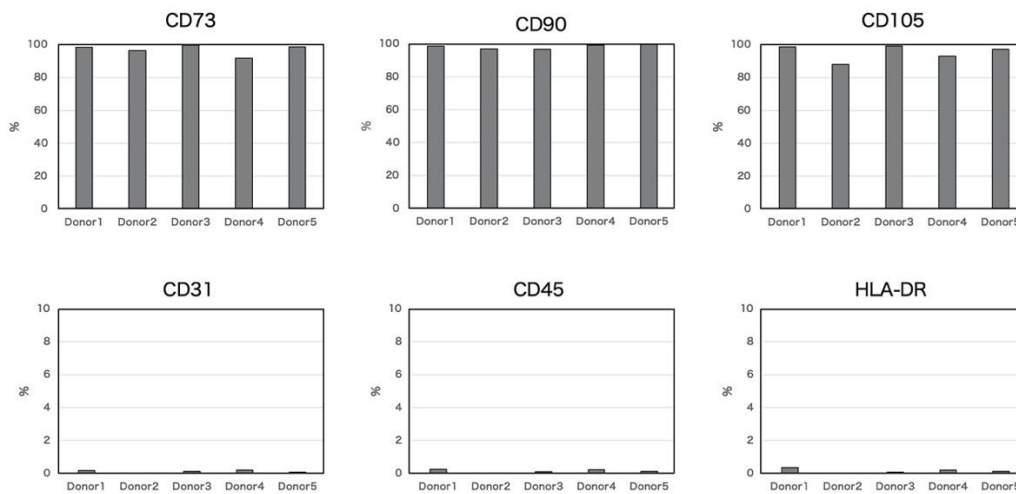


図6 試験製造により得られたDFATの細胞表面抗原試験

4. 考 察

これまでDFATを調製する方法として、20%という高濃度のFBSを含有した培地で天井培養を行うことが標準的な調製法であった。本研究ではFBSの代替としてhPLを用いても効率良くDFATを誘導、増殖できることを明らかにした。そしてhPLと適切な基礎培地との組み合わせにより、動物由来成分を含まない「ゼノフリー培地」を確立した。hPLの至適濃度の検討を行った結果、5%といった比較的低濃度で、現法である20% FBSと遜色なくDFATを誘導、増殖できることが明らかになった。hPLは近年MSCの増殖用培地として利用が広まっている添加物である²⁾。hPLには血小板由来成長因子(PDGF)、インスリン用成長因子(IGF-1)、形質転換成長因子ベータ(TGF-β)といった複数の成長因子が含まれ、これらの成長因子がDFATの増殖に寄与していると推測される。一方、これらの成長因子を個別に添加しても、脂肪細胞からDFATは誘導さ

れないことから、DFATの誘導(成熟脂肪細胞の脱分化)には、hPLに含まれる成長因子以外の生理活性物質が重要な役割を担っていることが示唆される。

5% hPL含有培地(5% UltraGRO含有CiMS培地)を用いて、健康ボランティア脂肪組織からDFATの試験製造を試みた結果、検討を行った5症例中全例で再現性良くDFATを調製することが可能であった。調製されたDFATの細胞表面抗原プロファイルは、国際細胞治療学会が定めたMSCの最小基準³⁾を満たしていた。調製効率として、脂肪組織5mLから3週間の培養期間(第1継代細胞)で 1.5×10^8 cellsのDFATが調製できることを確認した。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

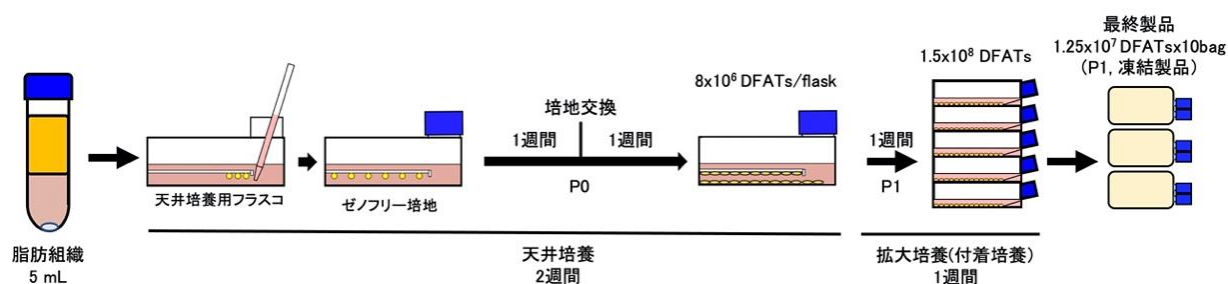


図7 治験用製品の製造工程

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。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。

5. 結 語

本研究では血清代替物としてhPLを用いることにより、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。また臨床グレードDFAT製造に用いるhPLの至適濃度や基礎培地を確定した。さらに健常ボランティア脂肪組織を用いたDFATの試験製造を行い、再現性よく臨床グレードDFATが製造できることを確認した。このDFAT調製用培地の最適化により、従来法に比べより安全で高効率に臨床グレードDFATを調製できるようになった。本研究成果はDFAT細胞治療を広く普及させることに寄与することが予想される。

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, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215(1): 210-222.
- 2) Astori G, Amati E, Bambi F, Bernardi M, Chierigato K, Schafer R, et al. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 93.
- 3) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Corten-

bach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-317.