

脱分化脂肪細胞 (DFAT) 調製キットを用いて製造した 治験用細胞製品の特性解析

松本太郎¹⁾, 副島一孝²⁾, 樫村勉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⁾, 菓子本美和¹⁾

Characterization of cell products for clinical trials produced using the dedifferentiated fat cell (DFAT) preparation kit

Taro MATSUMOTO¹⁾, Kazutaka SOEJIMA²⁾, Tsutomu KASHIMURA²⁾, Yuxin LI¹⁾, Tomohiko
KAZAMA¹⁾, Kazuhiro HAGIKURA¹⁾, Chii YAMAMOTO¹⁾, Yuki NAGAOKA¹⁾, Miwa
KASHIMOTO¹⁾

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得られる、間葉系幹細胞 (MSC) に類似した多能性細胞である。我々は、細胞治療に用いる臨床グレード DFAT を簡便かつ効率良く製造できる「DFAT調製キット」を開発し、このキットを用いた治験用製品の製造方法を確立した。この方法により製造した最終製品について、規格試験および特性解析を行った結果、凍結融解後もすべての検体で、品質や治療活性が保持されていることが確認された。また最終製品の長期保存試験においても、液体窒素下で12ヶ月間保存後に品質や特性が維持されていることを確認した。今後、この最終製品を用いた細胞治療の医師主導治験を実施する予定である。

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 cell (MSC) は患者自身の体から調製できるが、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、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。脱分化脂肪細胞 Dedifferentiated fat cell (DFAT) は、成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養して作られるMSCに類似した多能性細胞である¹⁾。DFATはドナーの影響を受けず、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といった特長を有することから、実用性の高い再生医療用の細胞として期待できる。

我々は、これまでに臨床グレードのDFAT製造法を確立し、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臨床研究を実施し、安全性と高い有効性を確認している。また、医師主導治験に向けた準備として、臨床グレードDFAT製造法の改良と最終製品の形状変更を行った。具体的には、既存の細胞培養フラスコより簡便かつ効率的にDFAT調製を可能とする「天井培養フラスコ」を独自に開発した。またDFAT調製用培地に関して、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) の代替としてヒト血小板溶解物 (Human platelet lysate: hPL) を用いることにより、動物由来成分を含まない「ゼノフリー化」を達成した。また最終製品の形状を新鮮細胞懸濁液から長期保存可能な凍結細胞懸濁液に変更した。そして、この天井培養フラスコを主要構成パーツとし、高効率で安価にDFATを製造できる「DFAT調製キット」を開発した。さらにこのキットを用いた治験用製品の製造法及び品質

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

責任者連絡先: 松本太郎, matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

管理法を確立した。

本研究は、この治験用製品の製造法に従い、健常ボランティア脂肪組織から臨床グレードDFAT（凍結製品）の試験製造を行った。そして製造された治験用最終製品を融解し、規格試験や特性解析試験を行い、品質や性能が担保されたDFATが再現性よく製造できるか検証した。またDFAT最終製品の長期保存試験を行い、長期保存後もその品質や特性が保持されているか検討を行った。

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実施した（承認番号：RK-220111-1）。DFATの原料となるヒト脂肪組織は、健常ボランティアから同意取得した後、局所麻酔下に5～10 mLの脂肪吸引を行い研究に使用した。脂肪組織の採取は脂肪吸引術に熟練した形成外科の医師が担当した。DFAT調製キットを用いた治験用製品の製造は、日本大学医学部リサーチセンター細胞加工施設（CPF）に設置されたセルプロセッシングアイソレータ内で実施した。DFAT調製キットの内容と本キットを用いた治験用製品の製造工程をそれぞれ、図1、図2に示す。脂肪細胞単離工程は、脂

肪組織をコラゲナーゼ（Liberase MNP-S GMP grade）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、低速度遠心分離を行い、成熟脂肪細胞を浮遊層として単離した。単離した成熟脂肪細胞分画を調製用ゼノフリー培地に懸濁し、天井培養フラスコの仕切板下面に播種した。細胞培養はインキュベータ内で37℃、5%CO₂条件下で行った。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）を用いて細胞を剥離し、T-225フラスコ8枚に9 × 10⁵ cells/flaskで播種し、7日間拡大培養を行った。培養終了後、細胞剥離液を用いて細胞を剥離し、凍結保護液（CP-1™ High Grade）に懸濁した。細胞懸濁液を5 × 10⁶ cells/mLの細胞濃度で3 mLずつ凍結保存バッグに梱包し、ディープフリーザー（-80℃）で24時間保存後、液体窒素（-196℃）液相下に凍結保存した。こうして製造された凍結保存バッグ入り凍結細胞懸濁液を治験用最終製品として扱った。

治験用最終製品の融解方法は、液体窒素タンクから取り出した最終製品を事前に37℃に加温したウォーターバスに入れ、急速融解した。融解した細胞は、最終製品の規格試験として、生細胞数、生細胞率、表面抗原確認試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験を実施した。生細胞数、生細胞率の評価は、生細胞と死細胞を蛍光試薬（AO/PI法）で染色し、自動蛍光セルカウンター（LUNA-FX7™）により測定した。表面抗原確認試験は、フローサイトメトリー（Cytoflex）によるCD105、CD90、CD73、CD31、CD45、HLA-DR陽性細胞率を測定した。エンドトキシン試験は、定量・比濁法（日本薬局方準拠）、マイコプラズマ否定試験は、NAT法（7株、3回測定）、無菌試験は、直接法（日本薬局方準拠）で行った。エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験は、信頼性

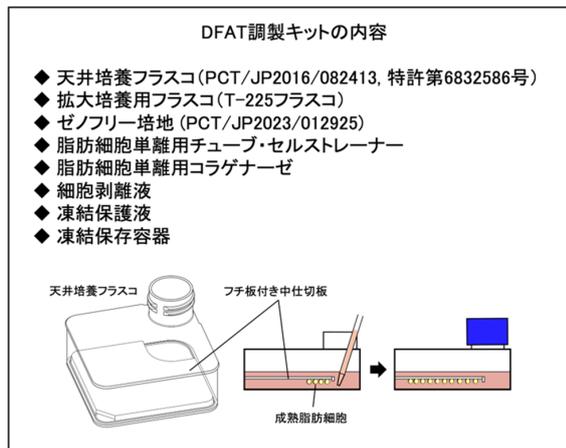


図1 DFAT調製キットの内容

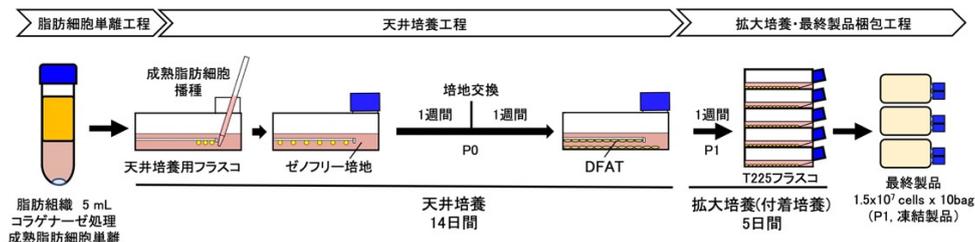


図2 治験用製品の製造工程

基準を満たした条件下で測定するため、外部試験施設に委託し、それぞれ事前に反応干渉因子試験、分析バリデーション、適合性試験を行った上で実施した。

最終製品の特性解析として、融解した最終製品を用いて、プラスチック面への付着能、細胞増殖能、コロニー形成能、多分化能を評価した。また最終製品調整時の培養上清を用いて、血管新生能、生理活性物質の分泌能、目的外生理活性物質の分泌能を評価した。プラスチック面への付着能は、最終製品を再播種し、1, 3, 7日後に培養ディッシュへの接着の有無を位相差顕微鏡で観察し評価した。細胞増殖能は、最終製品を再播種し、1, 3, 7日後にWST-1アッセイにて吸光度を測定することにより評価した。コロニー形成能は、最終製品を再播種し増殖させた後、CFU-Fアッセイを行い、コロニー形成率を算出した。多分化能は、最終製品を再播種し増殖させた後、各種分化誘導培地で一定期間培養し、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞への分化を評価した。血管新生能は、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の管腔形成アッセイを用いて、最終製品調整時の培養上清の管腔形成能を評価した。生理活性物質の分泌能は、培養上清中のHepatocyte growth factor (HGF), Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) のタンパク濃度をELISA法で定量評価した。目的外生理活性物質の分泌能は、培養上清中のInterferon- γ (IFN- γ), Tumor necrosis factor- α

(TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) のタンパク濃度をELISA法で定量評価した。

また最終製品の長期保存試験として、液体窒素下に12ヶ月間、凍結保存した検体 (n=3) を融解し、生細胞数、生細胞率、細胞表面抗原試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験、再播種1日後の付着能、再播種3日後の増殖能、再播種後の多分化能 (脂肪、骨、軟骨、平滑筋) を評価した。

3. 結果

最終製品の規格試験の結果を表1に示す。検討を行った5検体 (Lot. a~Lot. e) の融解後の生細胞数は4.9~6.9 $\times 10^6$ cells/mL、生細胞率は88.1~95.7%であり、いずれも管理基準 (生細胞数1 $\times 10^6$ cells/mL以上、生細胞率70%以上) を満たしていた。表面抗原確認試験では、陽性マーカーであるCD105, CD90, CD73の陽性率が、それぞれ96.7~98.6%, 98.8~99.5%, 92.0~99.0%、陰性マーカーであるCD31, CD45, HLA-DRの陽性率が、それぞれ0.15~0.51%, 0.07~1.12%, 0.13~0.62%であり、すべて管理基準 (陽性マーカー80%以上、陰性マーカー5%未満) を満たしていた。エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験は、5検体ともすべての項目で陰性であることを確認した。以上より、検討を行った5検体において、規格試験の管理基準値から逸脱することなく、最終製品を製造できることを確認した。

表 1. 治験用最終製品の規格試験結果

工程	試験項目	試験結果					管理値	
		Lot. a	Lot. b	Lot. c	Lot. d	Lot. e		
規格試験 最終製品 (凍結細胞懸濁液)	生細胞数	6.1 $\times 10^6$	5.4 $\times 10^6$	6.9 $\times 10^6$	6.0 $\times 10^6$	4.9 $\times 10^6$	1 $\times 10^6$ /mL以上	
	生細胞率	92.8	95.7	88.1	93.9	91.7	70%以上	
	表面抗原確認試験	CD105	98.1	98.1	96.7	98.6	98.3	80%以上
		CD90	99.1	99.5	99.3	98.8	99.0	
		CD73	98.1	99.0	92.5	97.4	92.0	
		CD31	0.18	0.15	0.36	0.16	0.51	5%未満
		CD45	0.17	0.07	0.55	0.61	1.12	
	HLA-DR	0.23	0.13	0.41	0.24	0.62		
	エンドトキシン試験	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
	マイコプラズマ否定試験	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
無菌試験	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性		

最終製品の特性解析の結果を表2, 図3, 図4に示す。検討を行った3検体 (Lot. c, Lot. d, Lot. e) はいずれも融解後のプラスチック面への付着能を有し、付着後の細胞増殖は良好であった。CFU-Fアッセイによるコロニー形成能試験では、3検体ともにコロニー形成が認められ、その形成率はLot. c 23.3%, Lot. d 18.7%, Lot. e 10.3%であった。多分化能の評価では、3検体ともに脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞への分化能を有することが確認

された。HUVEC管腔形成アッセイを用いた血管新生能試験では、3検体ともにHUVECの管腔形成が誘導される所見が認められ、*in vitro*での血管新生能を有することが確認された。生理活性物質の分泌能試験では、検討を行った4検体 (Lot. a, Lot. b, Lot. c, Lot. d) の培養上清中のHGF濃度が7,649~16,234 pg/mL, VEGF濃度が1,304~1,645 pg/mL, SDF-1濃度が2,789~8,683 pg/mL, MCP-1濃度が1,417~1,956 pg/mLであり、生体内で治療活性を示す十分

表 2. 治験用最終製品の特性解析結果のまとめ

試験項目	試験結果				
	Lot.a	Lot.b	Lot.c	Lot.d	Lot.e
プラスチック面への付着能	-	-	付着能あり	付着能あり	付着能あり
細胞増殖能	-	-	増殖能あり	増殖能あり	増殖能あり
CFU-Fコロニー形成能	-	-	形成能あり (23.3%)	形成能あり (18.7%)	形成能あり (10.3%)
多分化能 (脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞)	-	-	多分化能あり	多分化能あり	多分化能あり
血管新生能 (血管内皮細胞管腔形成能)			管腔形成能あり	管腔形成能あり	管腔形成能あり
培養上清HGF濃度	8720 pg./mL	16234 pg./mL	7649 pg./mL	13842 pg./mL	-
培養上清VEGF濃度	1645 pg./mL	1350 pg./mL	1304 pg./mL	1622 pg./mL	-
培養上清SDF-1濃度	8683 pg./mL	4095 pg./mL	5035 pg./mL	2789 pg./mL	-
培養上清MCP-1濃度	1417 pg./mL	1439 pg./mL	1956 pg./mL	1647 pg./mL	-

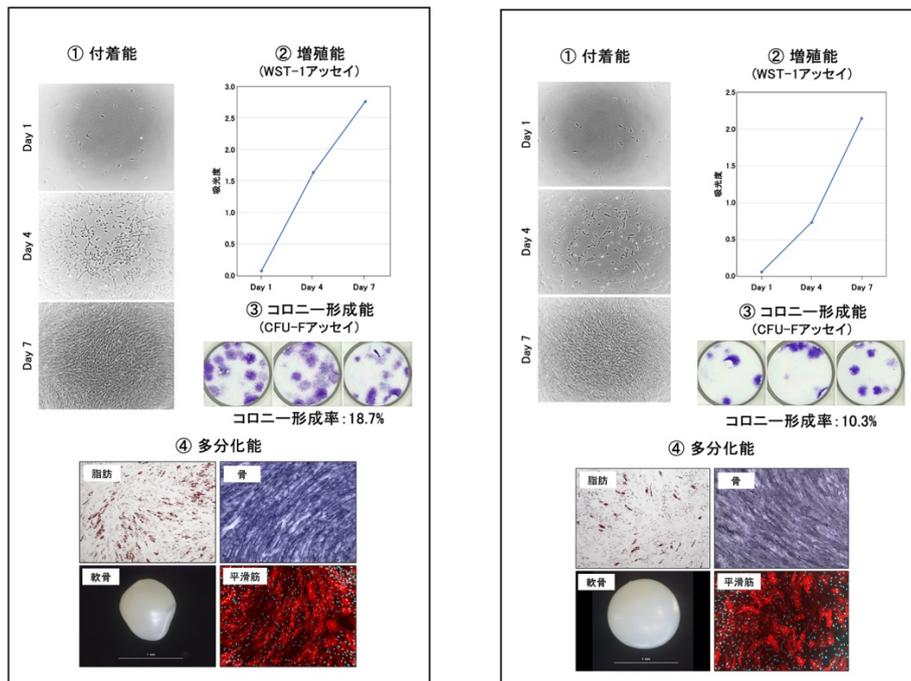


図 3 治験用最終製品の特性解析結果 (Lot. dおよびLot. eの結果)

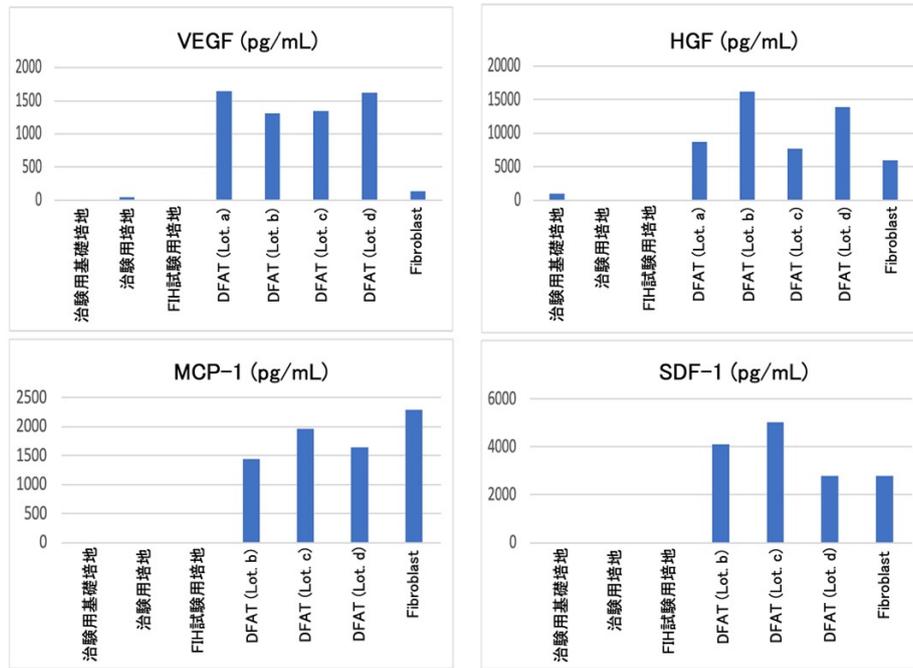


図 4 治験用最終製品の培養上清中の生理活性物質濃度

な濃度の液性因子が分泌されていることが確認された。これらの液性因子は、DFAT調製に用いる培地中にはほとんど検出されなかったことから (図4)、DFATから分泌されていることが示された。またこれらの液性因子は、皮膚線維芽細胞 (Fibroblast) の培養上清でも検出されたが、DFAT培養上清に比べてその濃度が低い傾向があり、特にVEGFやHGFの分泌濃度はDFATに比べて明らかに低いことが示された。一方、目的外生理活性物質の分泌評価として測定した培養上清中のIFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β のタ

ンパク濃度は、ELISA法にてほとんど検出感度以下であった。以上より、検討を行った最終製品は融解後も細胞増殖能、多分化能、血管新生能、生理活性物質分泌能を維持していることが明らかになった。

最終製品の長期保存試験の結果を表3に示す。液体窒素下に長期保存された最終製品の品質試験及び特性解析を行った結果、検討を行った3検体 (Lot. a, Lot. b, Lot. c) における凍結保存期間12ヶ月まで生細胞数、生細胞率、細胞表面抗原発現プロファイルは、いずれも管理基準 (生細胞数 1×10^6 cells/mL

表 3. 治験用最終製品の長期保存試験の結果

試験項目	12ヶ月保存試験・試験結果				
	Lot.a	Lot.b	Lot.c	規格値	
生細胞数	4.83×10^6 /mL	4.76×10^6 /mL	6.24×10^6 /mL	1×10^6 /mL以上	
生細胞率	94.6%	96.7%	93.3%	70%以上	
細胞表面抗原試験	CD73	97.04%	99.23%	88.15%	80%以上
	CD90	95.35%	99.57%	96.56%	
	CD105	96.15%	97.53%	87.54%	
	CD31	0.10%	0.07%	0.02%	5%未満
	CD45	0.21%	0.14%	0.15%	
	HLA-DR	0.16%	0.06%	0.07%	
エンドキシン試験	陰性	陰性	陰性	陰性	
マイコプラズマ否定試験	陰性	陰性	陰性	陰性	
無菌試験	陰性	陰性	陰性	陰性	
プラスチック面への付着能	付着能あり	付着能あり	付着能あり	付着能あり	
細胞増殖能 (Doubling Time: DT)	増殖能あり (DT19.8h)	増殖能あり (DT18.8h)	増殖能あり (DT15.8h)	増殖能あり	
多分化能 (脂肪、骨、軟骨、平滑筋)	多分化能あり	多分化能あり	多分化能あり	多分化能あり	

以上、生細胞率70%以上)を満たしていた。また再播種後のプラスチック付着能、細胞増殖能、多分化能もすべての検体で保持されていた。細胞倍加時間(DT)は、Lot. a: 19.8時間、Lot. b: 18.8時間、Lot. c: 15.8時間であり、いずれも高い増殖能が保持されていることが明らかになった。またいずれの検体もエンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験は陰性であった。以上より、DFAT調製キットにより製造された治験用最終製品は、少なくとも液体窒素下の凍結保存にて12ヶ月は安定的にその品質と細胞特性が保持されていることが示された。

4. 考察

今回、DFAT調製キットを用いた治験用製品の製造プロトコールに従い、製造した治験用最終製品の規格試験及び特性解析を行った結果、融解後もMSCの最小基準²⁾に合致する表面抗原発現プロファイルを示し、細胞増殖能、多分化能、血管新生能、生理活性物質(HGF、VEGF、SDF-1、MCP-1)の分泌能が維持されていることが確認された。この製造プロトコールに従い製造した治験用最終製品(凍結細胞懸濁液)は、臨床研究で用いた新鮮細胞懸濁液と同様に、移植による高い血流改善効果が期待できると思われる。

HGFとVEGFは血管内皮細胞に作用し、血管新生を誘導する主要増殖因子である。またHGFは血管内皮細胞のみならず、ペリサイトにも作用し、血管の成熟化に関与する³⁾。SDF-1やMCP-1には、末

梢血より単球・マクロファージを動員する作用があり、これらの血液細胞の動員が、虚血組織における血管新生や側副血管のリモデリングを促進することが報告されている⁴⁾。DFATは移植部位でこのような種々の血管新生促進因子を分泌することにより、血流改善効果を発揮すると考えられる。

治験用最終製品の安全性に関しては、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験を実施し、これらの汚染がないことが確認された。また目的外生理活性物質として測定した炎症性サイトカイン(IFN- γ 、TNF- α 、IL-16)濃度もすべて検出限度以下であった。これらの結果より、治験用最終製品が一定の安全性を示すことが確認された。今後、治験用最終製品の核型解析、軟寒天コロニー形成試験、免疫不全マウスを用いた反復投与毒性試験などを実施し、移植安全性を検証する予定である。そして、治験用最終製品の品質、安全性、治験プロトコールに関するPMDA RS戦略相談を実施し、機構の合意を取得したのちに、この治験用最終製品を用いた細胞治療の医師主導治験を開始する予定である。

脂肪由来治療用細胞として現在広く臨床応用されている脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells: ASC)、間質血管分画(Stromal vascular fraction: SVF)細胞と、今回確立した治験用DFATとの差異を表4に示す。DFATは患者の負担、調製効率、細胞品質、治療コストといった面で、高い優位性を示すと考えられる。

表 4. DFATと他の脂肪由来治療用細胞との比較

項目	DFAT	ASC	SVF細胞
患者の負担 脂肪採取量 (麻酔法)	低い <10mL (局所麻酔)	比較的低い 30~50mL (静脈麻酔)	高い 200~300mL (全身麻酔)
培養期間	約3週間	約6週間	培養不必要
最小継代数	第1継代	第3継代	-
得られる細胞数	5億個	1千万~1億個	100万~1億個
1回の組織採取で可能な 治療回数	3回以上	1回	1回
幹細胞の純度	高い >99.9%	比較的高い >99%	非常に低い 0.2-1%
品質のばらつき	少ない	大きい	非常に大きい
治療コスト	低	中	高

5. 結語

DFAT調製キットを用いた製造プロトコールに従って試験製造を行った治験用最終製品は、液体窒素下に12ヶ月間保存後もDFATとしての品質及び特性を保持し、高い治療活性が期待できることが明らかになった。今後、この治験用最終製品を用いた細胞治療の医師主導治験を実施する予定である。

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) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach 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.
- 3) Kaga T, Kawano H, Sakaguchi M, Nakazawa T, Yanai Y, Morishita R. Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation: differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Vascular Pharmacology* 2012; 57 (1) : 3-9.
- 4) van Royen N, Hoefer I, Bottinger M, Hua J, Grundmann S, Voskuil M, et al. Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circulation Research* 2003; 92: 218-225.