

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16102

研究課題名(和文) 間葉系間質細胞株を用いた再生医療等製品の開発における培養法の最適化

研究課題名(英文) Optimization of large-scale culture methods for adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell lines

研究代表者

宇留賀 友佳子 (URUGA, Yukako)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：70464831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞のうち脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)は比較的容易に細胞を得ることができる点において再生医療等製品の有用なソースである。我々はASCから脂肪組織由来間葉系間質細胞株(ASCL)を樹立、同細胞から分化させた血小板様細胞(ASCL-PLC)を用いた再生医療等製品の製造を目指している。本研究では再生医療等製品製造のためのASCLの大量製造法を開発、これらの製造法を用いたASCLから得られる血小板様細胞(ASCL-PLC)を取得し、これらの細胞に対し医療応用に適した品質試験項目を決定することができた。本研究で得られた結果は再生医療等製品の開発加速につながるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は脂肪組織由来の血小板様細胞をはじめとした脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた再生医療等製品の製造への適用が可能であり、再生医療等製品の開発加速につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ASCs) are useful raw materials for regenerative medicine products. We have established an adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell line (ASCL) from ASC, and aim to produce regenerative medical products using platelet-like cells (ASCL-PLC) which differentiated from ASCL. In this study, we developed a large-scale culture method of ASCLs for the manufacture of regenerative medical products. We were able to obtain platelet-like cells (ASCL-PLCs) from ASCLs and to determine specification and test methods of ASCL-PLCs. We believe that the results obtained in this study will accelerate the development of regenerative medicine products.

研究分野：血液学

キーワード：間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell, MSC)は骨髄、臍帯血や脂肪組織などから採取が可能な組織由来の体性幹細胞の一種であり中胚葉系細胞への分化のみならず、肝細胞や神経細胞への分化も報告されている。中でも脂肪組織由来間葉系間質/幹細胞(Adipose tissue derived stromal cell, ASC)は手術等で廃棄予定の皮下脂肪組織を利用することができるため、比較的容易にかつ安全に細胞が採取できるという点において有用なソースである。

我々はこれまでに ASC が造血系の中でも特に巨核球分化に必要な遺伝子群を有していることを見出し、これらの細胞を用いた無血清培養系での巨核球/血小板分化誘導に成功し、これらの細胞を用いた医療応用への検討を行ってきた。そのような中で、細胞ソースである ASC 自体の増殖や分化のロットごとの不安定性が医療応用に際し問題となることが明らかとなった。これは、ASC の樹立段階で様々な細胞の混入が避けられないことが一因と考えられた。この解決策として、我々は ASC の精製・株化細胞である脂肪組織由来間葉系間質細胞株(Adipose tissue derived stem cell line, ASCL)を樹立した。ASCL は他の間葉系幹細胞と同様の細胞表面抗原発現パターンを呈し、性質を保持したまま安定して増殖し、ASC と同様に血小板様細胞(ASCL-derived platelet like cells, ASCL-PLC)へ分化した。さらに、ASCL-PLC はヒト血小板と類似した形態や止血機能を発揮するだけでなく、損傷部位への細胞塗布においてヒト血小板の持つ創傷治癒効果を上回る組織修復促進及び止血能を有することが自験データより明らかとなった。

以上の検討結果より医療応用・製造に適した ASCL を用いて、これらの細胞から得られる血小板様細胞 (ASCL-PLC) 産生の技術を発展させ、新しい再生医療等製品の開発に向け 1) 医療応用可能な大量培養法の確立、2) ASCL-PLC の品質を担保する特性の検討及び評価法の確立、を目的とした研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は 1) ASCL の大量培養法の確立、2) ASCL-PLC の再生医療等製品としての品質を担保する特性の検討及び評価法の確立、である。本研究で得られた結果は再生医療等製品の開発加速につながるものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究では(1)ASCL を用いた拡大培養法の検討 (2) ASCL-PLC の表面抗原解析 (3) ASCL-PLC 含有/分泌因子解析 (4) (1)~(3)で得られた知見を反映した組織損傷モデルマウスを用いた ASCL-PLC の機能検討を行う。本研究期間内で上記(1)から(4)までを行い、現在までに得ているデータ等も踏まえ、培養法の確立及び ASCL-PLC の特性評価を行う。

(1) 間葉系間質細胞株を用いた拡大培養法の検討

前検討として通常フラスコを用いた拡大培養を行う。これらの細胞数を基準とし、拡大培養デバイスを用いた大量培養法を検討、細胞増殖速度、形態変化などを評価項目とし、性質を保持したまま増殖能が最も高くなる条件を決定する。

(2) 間葉系間質細胞株由来血小板様細胞の表面抗原解析

網羅的細胞表面抗原解析によって得られたデータを元に、小スケール培養で得られた血小板様細胞の表面抗原についてフローサイトメトリーを用いてヒト血小板と比較し、ASCL-PLC を特徴づける表面抗原の検索を行う。また、大量培養デバイスを用いて得られた ASCL-PLC についても小スケール ASCL-PLC と同様の結果が得られるか検討する。

(3) 間葉系間質細胞株由来血小板様細胞含有/分泌因子解析

小スケール培養で得られた ASCL-PLC の含有/分泌因子について、拡大培養で得られた ASCL-PLC についても同様の解析を行い、品質を担保する評価項目について検討を行う。

(4) 組織損傷モデルマウスを用いた間葉系間質細胞株由来血小板様細胞の機能検討

組織損傷モデルマウスを用い、拡大培養法を用いて得られた ASCL-PLC を塗布し、止血能及び組織修復能を肉眼的、組織学的に評価する。損傷部位の組織に対し免疫染色、マイクロアレイ法などを用いて塗布細胞の治癒過程での効果を検証する。

4. 研究成果

(1) 間葉系間質細胞株を用いた拡大培養法の検討

最初に多層フラスコを用いた拡大培養法の事前検討結果をふまえ、大量培養法として報告されている大量培養デバイスを用いた培養法、マイクロキャリアを用いた培養法の検討を行った。大量培養デバイスを用いた培養法については、多層フラスコを用いた方法と同様の播種濃度、培地交換頻度にて同等の増殖を得ることができた。培地構成成分についても数種類の項目にて検討を行い、増殖能を保持した培養が可能な培地成分を決定した。

決定した条件下で、大量培養デバイスを用いた培養を複数回繰り返し、バイオリクターを用

いた 5-10L 規模の ASCL-PLC 培養を安定的に実施できる ASCL の拡大培養を実施することができた。

マイクロキャリアを用いた培養法の検討では、小スケールにて本細胞に適したマイクロキャリアの選定を行い、マイクロキャリアを用いた至適培養条件の検討を行った。概ね至適条件の候補は得られたものの、大量培養デバイスを用いた大量培養と同等の培養スケールを得るには十分ではなく、培養の安定性(細胞増殖速度、増殖能)を得ることが困難であるという結果となった。この理由として ASCL は培養の場における接着が増殖において重要であり、マイクロキャリアは面積や培養表面加工等の面で増殖の場としては十分でない可能性が考えられた。

以上より大量培養デバイスを用いた培養法を選択し以後の検討を進めた。

(2) 間葉系間質細胞株由来血小板様細胞の表面抗原解析

小スケール培養で得られた ASCL-PLC の細胞表面抗原の網羅的検討では、ASCL-PLC は組織修復において有効と考えられる特徴的な複数の表面抗原発現をヒト血小板より多く認めた。これらは目的物質(ASCL-PLC)の機能評価に有用であると考えられた。大量培養デバイスを用いた製造法においても同様の表面抗原の発現を認めることができた。

(3) 間葉系間質細胞株由来血小板様細胞含有/分泌因子解析

大量培養デバイスを用いた培養では、臨床応用スケールでの ASCL-PLC を得ることができた。またこれらの大量培養法で得られた ASCL-PLC に対する特性解析では ASCL-PLC は組織修復において有効と考えられる数種類のサイトカインの分泌を認めた。大量培養においても同等の性質をもった ASCL-PLC が得られたことを確認することができ分泌因子の評価は、ASCL-PLC の機能評価に有用であると考えられた。

(2)で得られた結果と併せて同時に表面抗原解析および分泌因子の評価は、ASCL-PLC の機能評価に有用であると考えられた。ASCL-PLC に対し同様の評価項目を用いることによって、培養法の妥当性を検討する計画とした。

(4) 組織損傷モデルマウスを用いた間葉系間質細胞株由来血小板様細胞の機能検討

大量培養デバイスを用いた ASCL の拡大培養及び 10L スケールの「バイオリアクターを用いて得られた ASCL-PLC」を用いて、in vivo 非臨床試験を実施した。マウス創傷モデルを用いて皮膚潰瘍部に ASCL-PLC を塗布し組織修復能を肉眼的、組織学的に検討した。肉眼的評価では経時的に潰瘍の面積を評価し、同時に潰瘍部の病理組織検査を実施した。肉眼的評価では陰性コントロール群に比較し有意差をもって潰瘍面積の縮小が認められた。これらの in vivo 試験の検討の結果は in vitro での ASCL-PLC の特性解析結果(各種創傷治癒関連生理活性物質の細胞外への分泌)と矛盾しない結果であり、大量培養法にて製造された ASCL-PLC の有効性を認めることができた。また、in vitro の特性評価法が in vivo での有効性を担保することも明らかとなった。以上により、ASCL の大量デバイスを用いた培養法の有効性及び大量培養法をもって得られた ASCL-PLC の in vitro 評価法(各種生理活性物質の測定)の有用性が示唆され、同手法は再生医療等製品製造へ応用可能な製造法であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------