

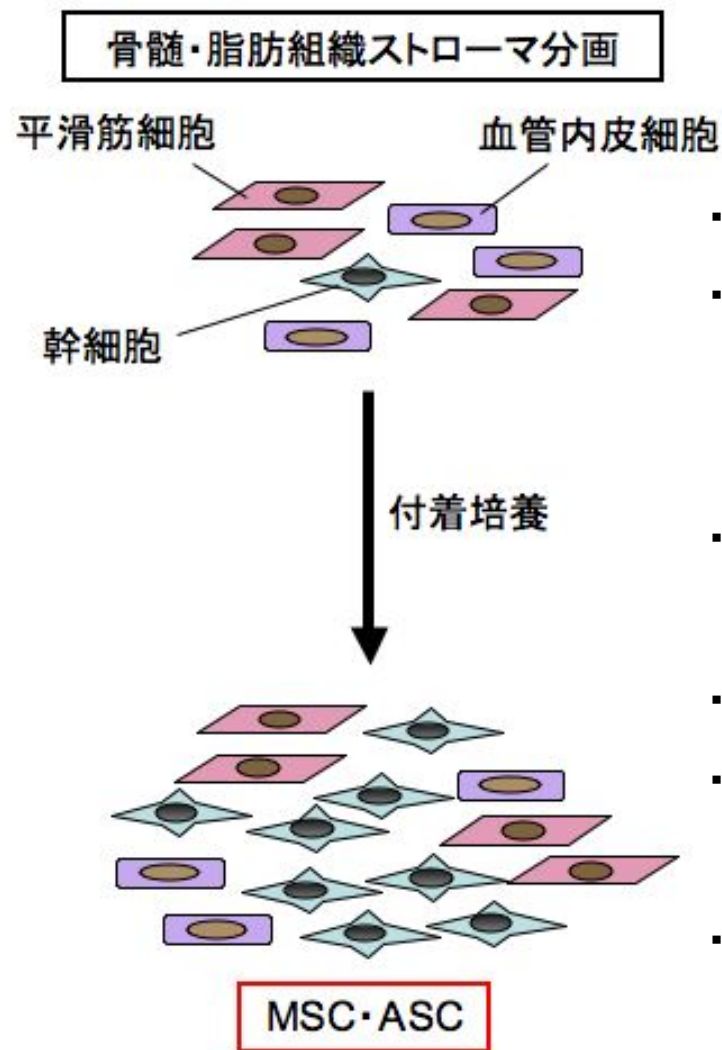
培養MSCの特性

- ◆ 活発な増殖活性 (CFU-Fコロニー形成能) と多分化能を示す
(骨、軟骨、腱、脂肪、骨格筋、心筋、平滑筋、血管内皮、神経など)
- ◆ 種々の液性因子分泌による組織修復・血管新生作用を有する
- ◆ 腫瘍原性がないと考えられている
- ◆ 高い免疫制御能を有する (T細胞増殖抑制、Treg誘導作用など)
- ◆ 傷害組織へのホーミング能を有する

MSC判定基準 (2006年国際細胞治療学会のMinimal criteria)

- ・ 陽性マーカー: CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺
- ・ 陰性マーカー: リンパ球マーカー (CD11b/14⁻, CD18/CD73⁻, CD45⁻),
造血幹細胞マーカー (CD34⁻), 主要組織適合抗原 (HLA-DR⁻)
- ・ 骨、軟骨、脂肪細胞への分化能

細胞治療用ドナー細胞としてのMSCの問題点・課題



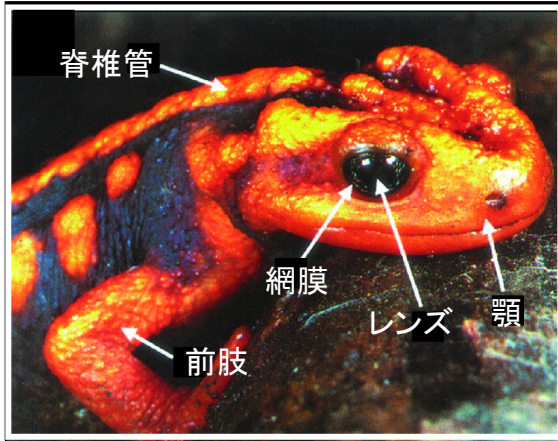
異種細胞の混入が多い。

- ・ 調製時に他細胞の混入が避けられない
- ・ MSC自体もヘテロな細胞集団
(特異的マーカーなし、前駆細胞などが含まれている可能性大)
- ・ 局在する組織による形質の違いが指摘されている
- ・ 継代培養により形質が変化する
- ・ 長期培養により発がん性獲得するとの報告あり
- ・ 既に存在するがんを増悪させる可能性あり

理想的な再生医療用細胞ソース

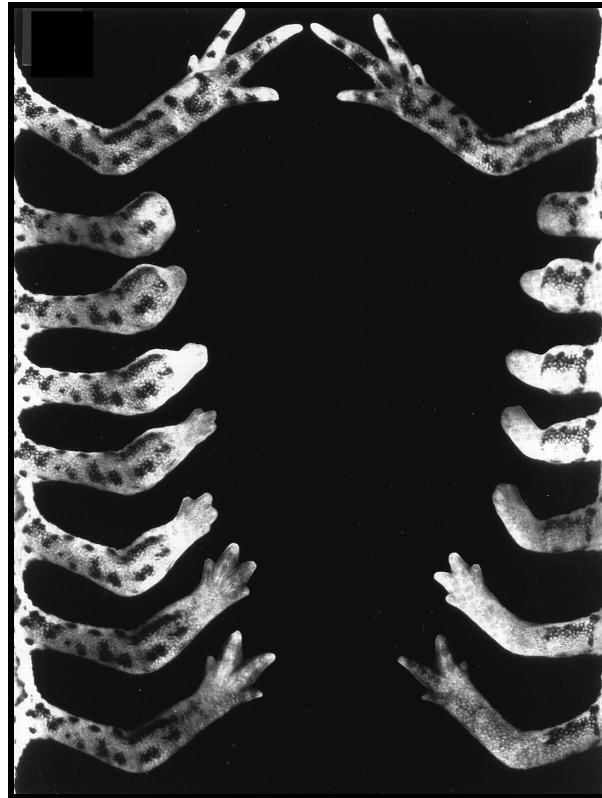
- ・ 低侵襲性に細胞が採取できる。
- ・ 細胞を容易に増殖させることができる。
- ・ 万能性または多分化能を有する。
- ・ 安全に移植できる。（純度が高く、均質な細胞を移植できる。腫瘍原性がない。）
- ・ 自家移植にも他科移植（細胞バンク）にも対応できる。

イモリの肢再生は成熟細胞の脱分化によって誘導される

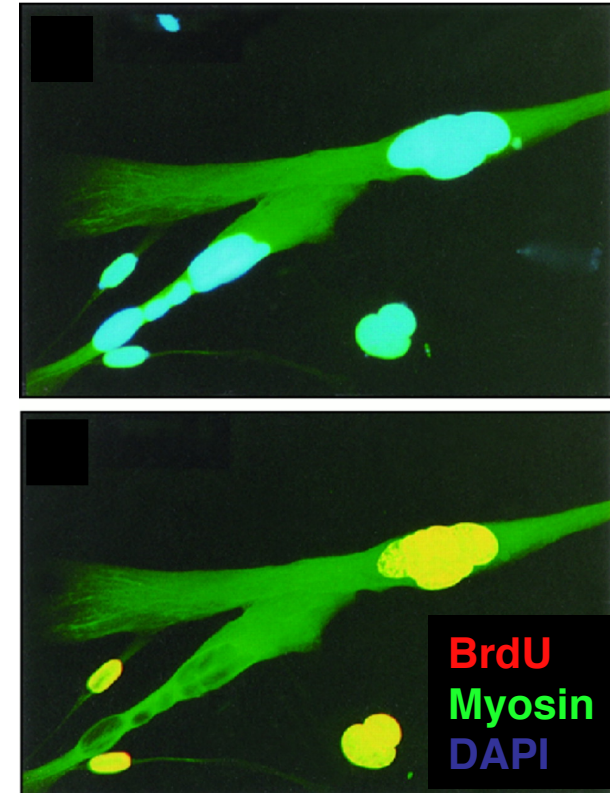


中外製薬ライフ・サイエンス・シリーズより

再生芽の形成

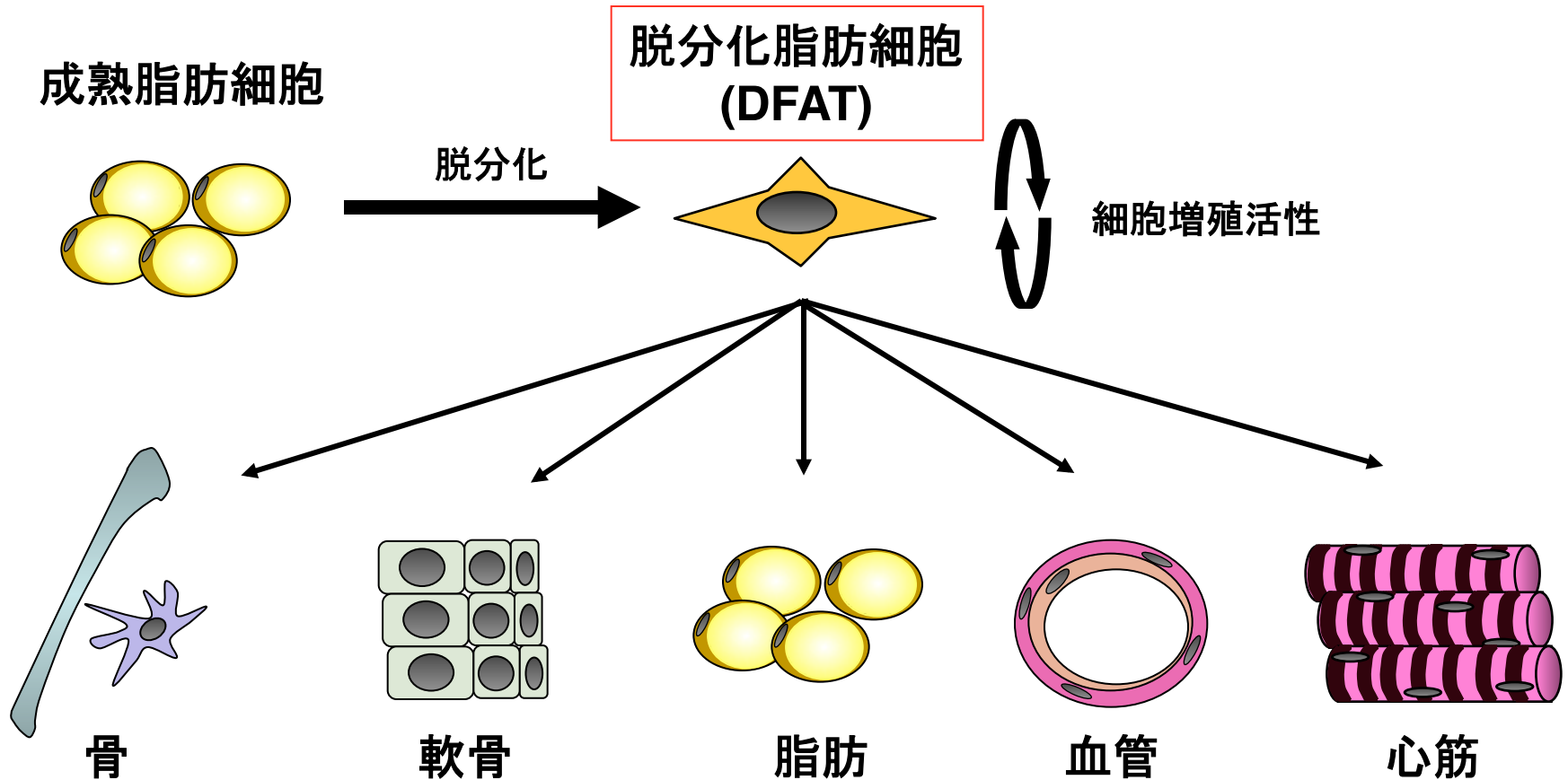


筋肉細胞



Brockes JP, Science 1997, 276:81

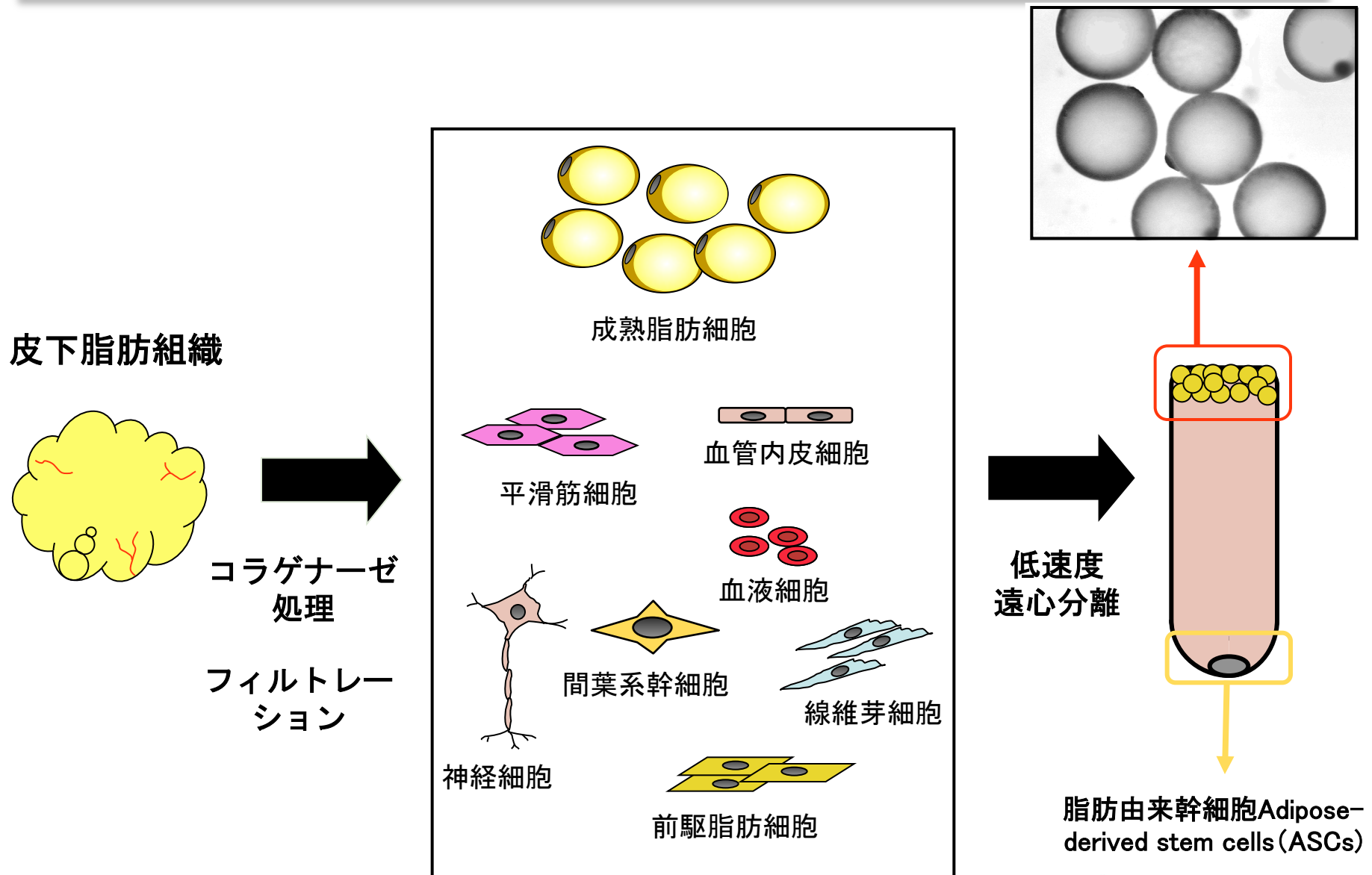
Dedifferentiated fat (DFAT) cells



加野浩一郎 (国際特許出願PCT/JP2004/007322)

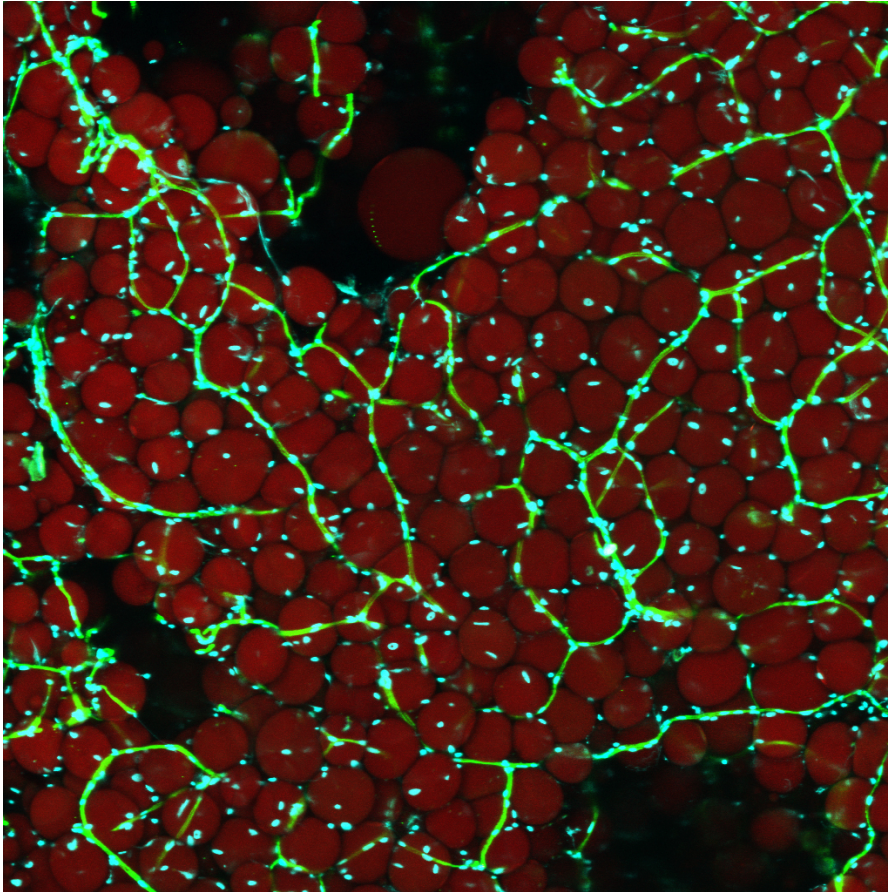
Matsumoto T et al. J Cell Physiol, 2008, 215:210-222

DFATの調製法(成熟脂肪細胞の単離)



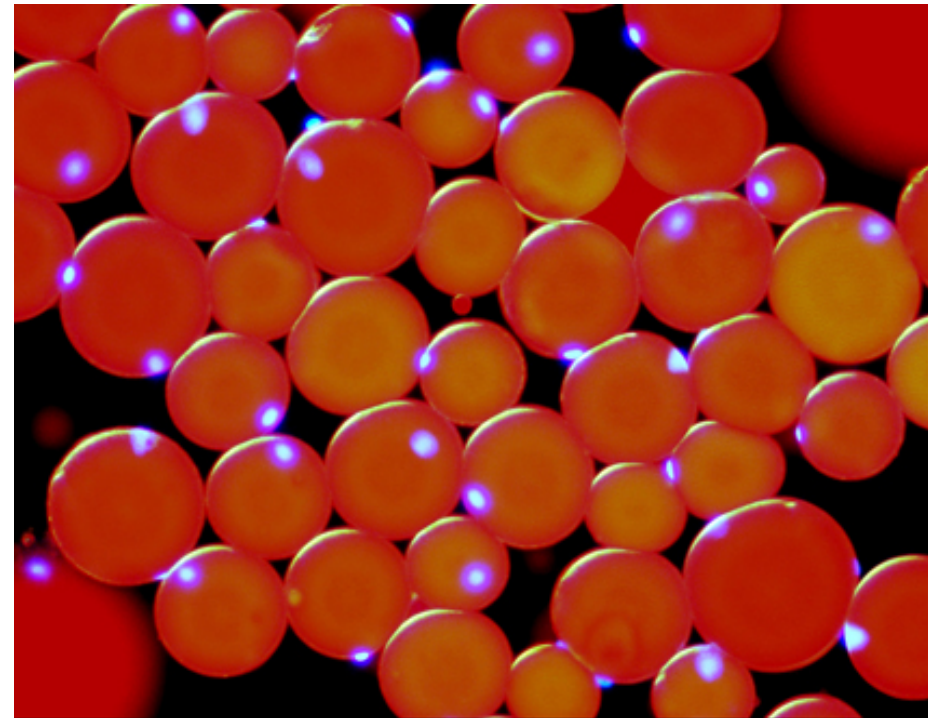
ヒト脂肪組織と脂肪細胞

皮下脂肪組織



IsolectinB4 / Adipored / Hoechst

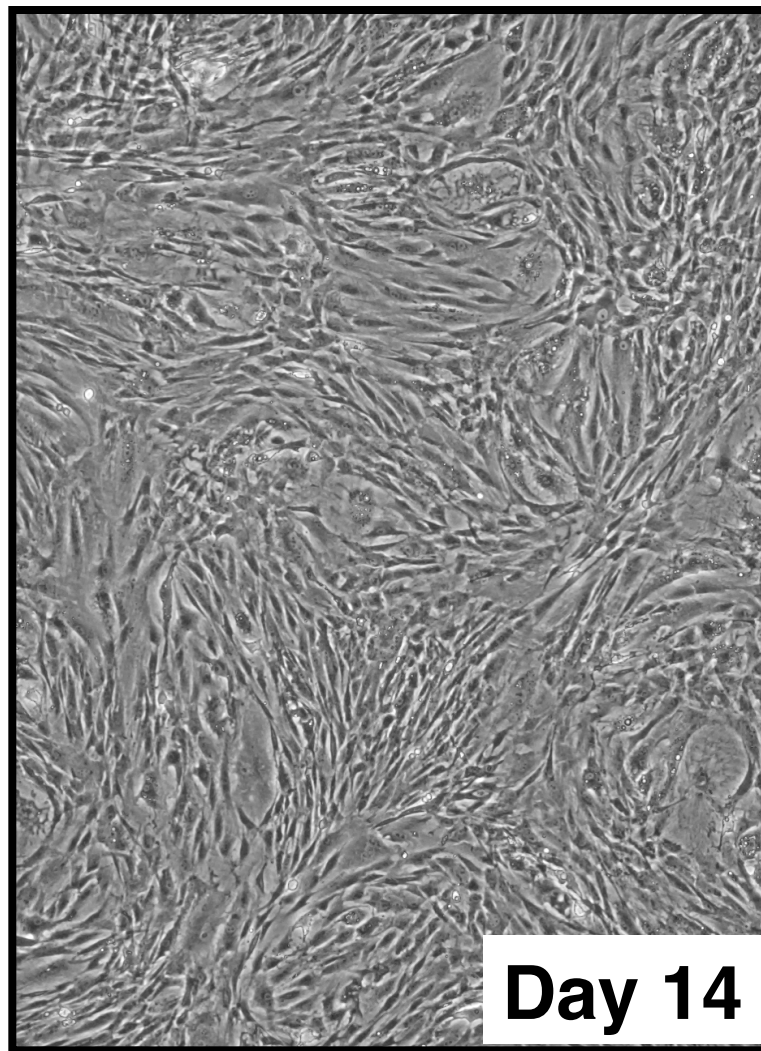
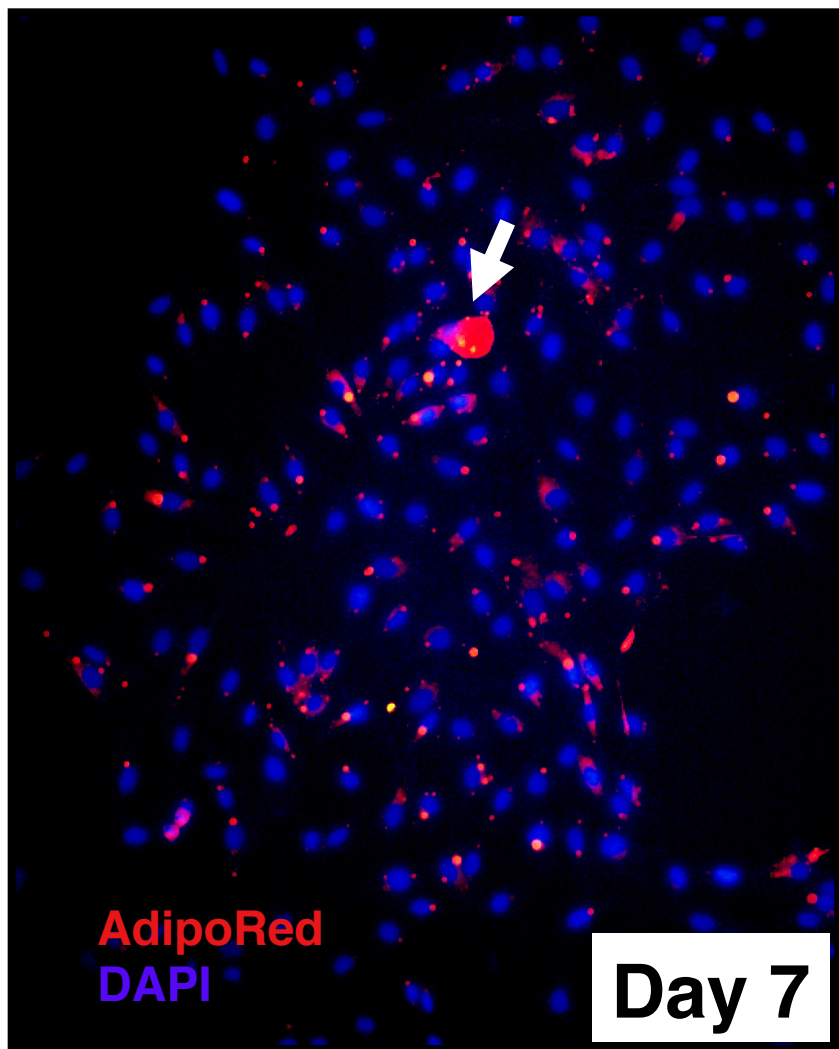
脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞



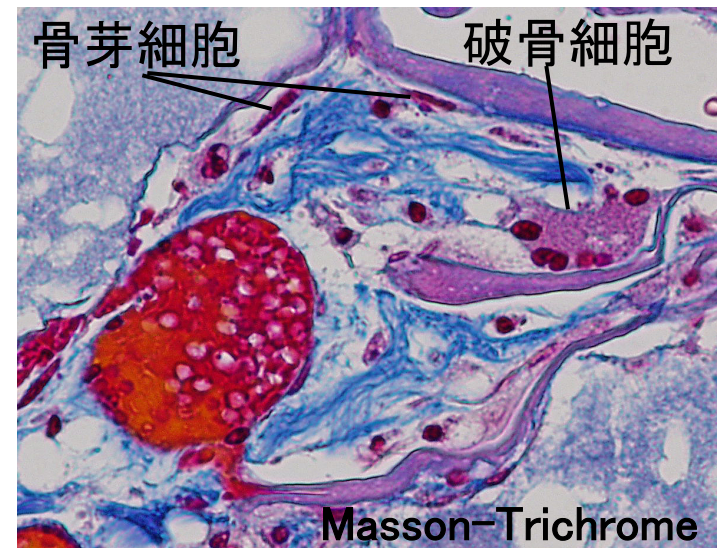
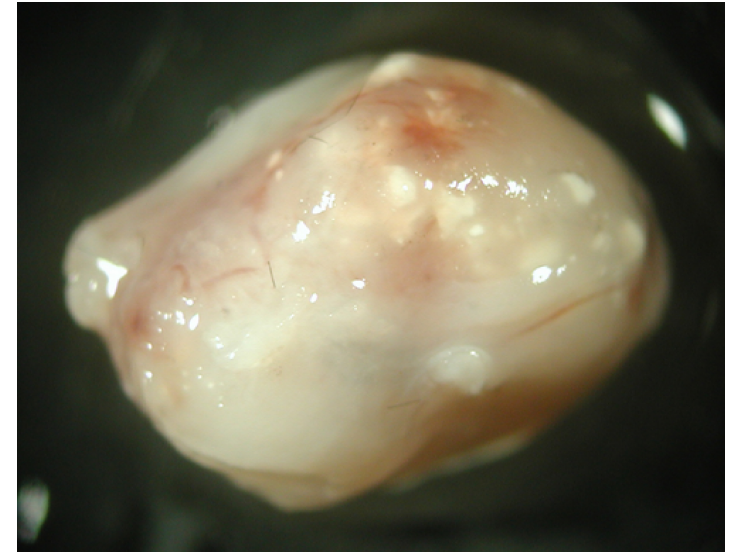
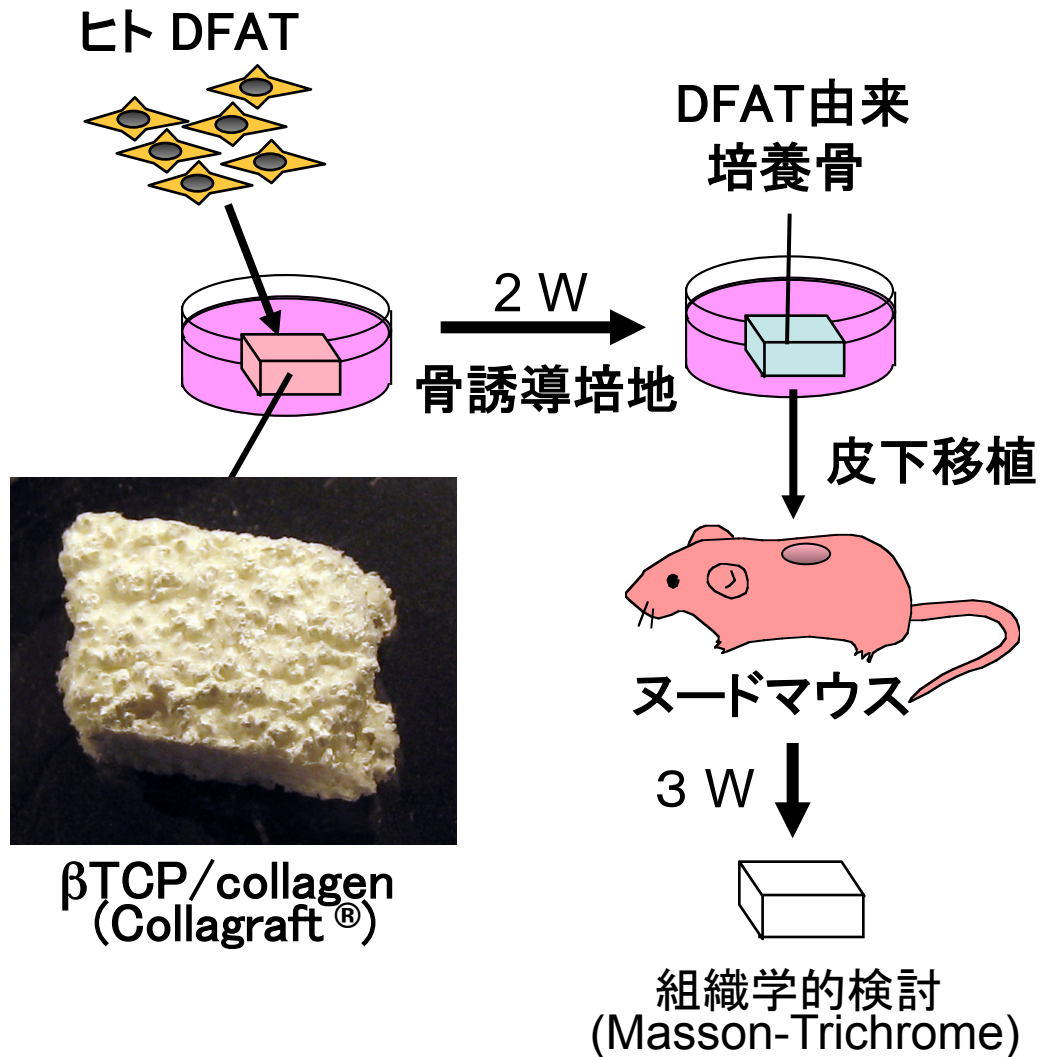
Adipored / Hoechst



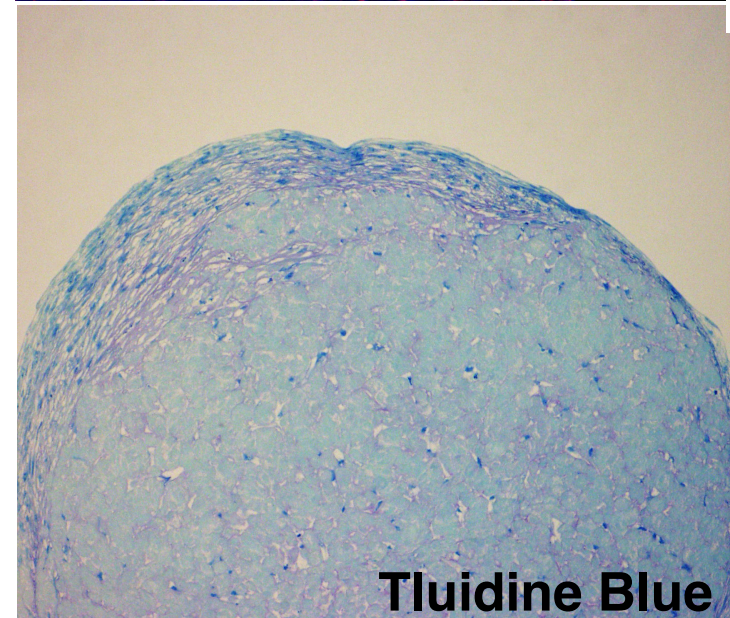
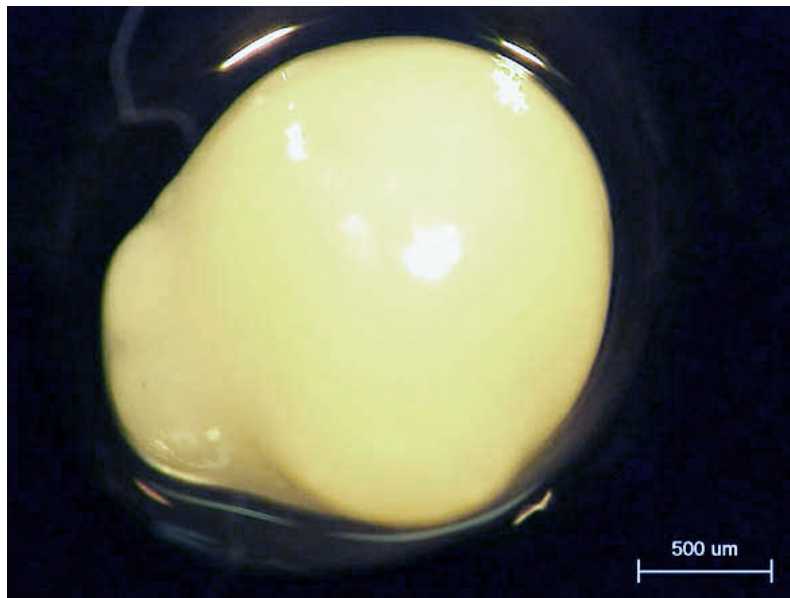
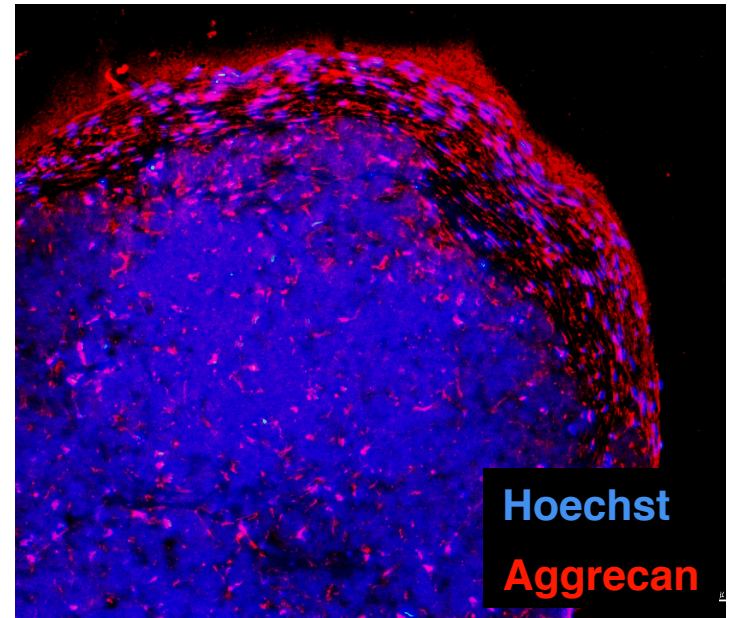
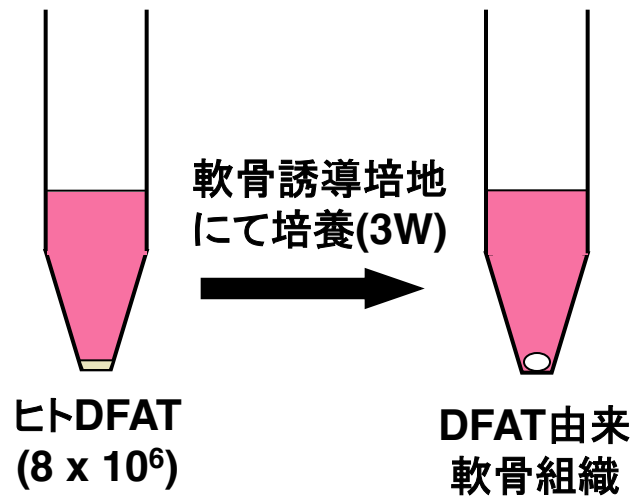
脱分化培養による細胞形態変化



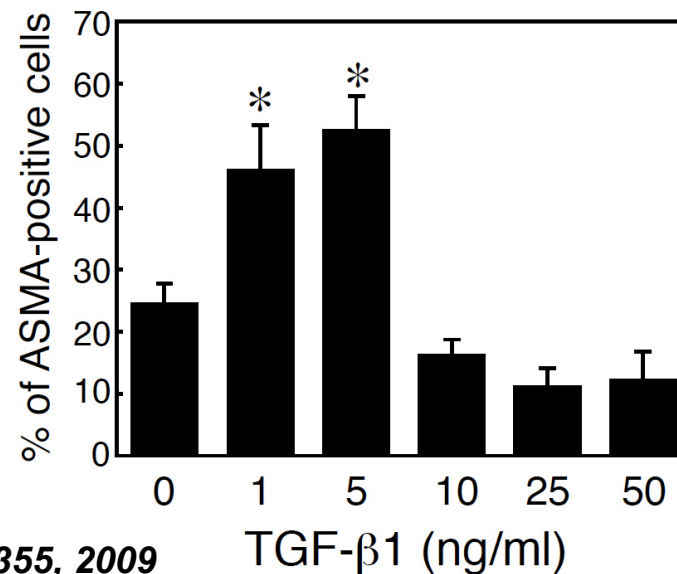
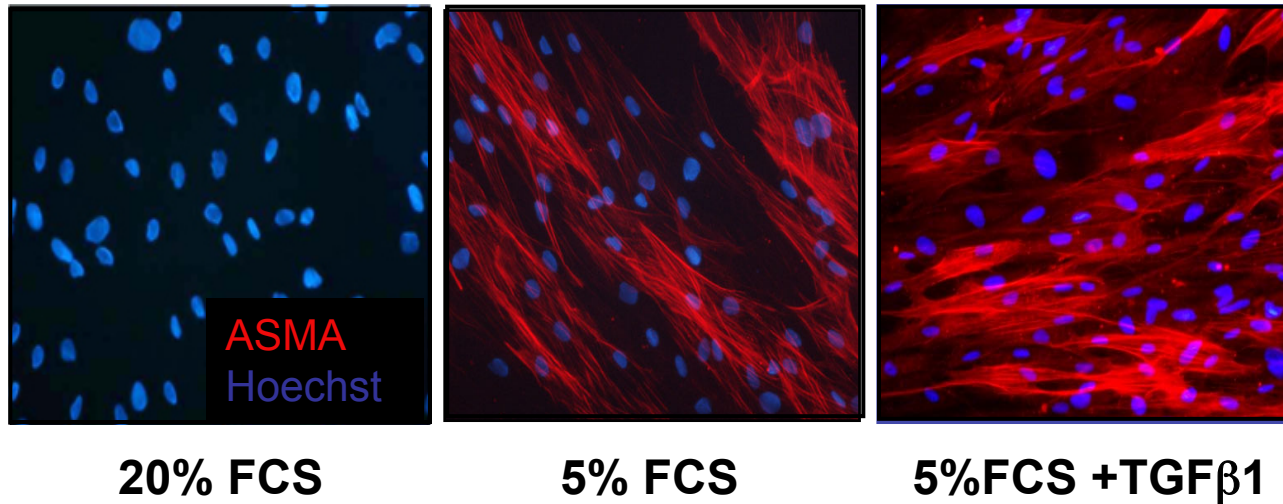
ヌードマウス皮下移植によるDFATの骨分化誘導実験



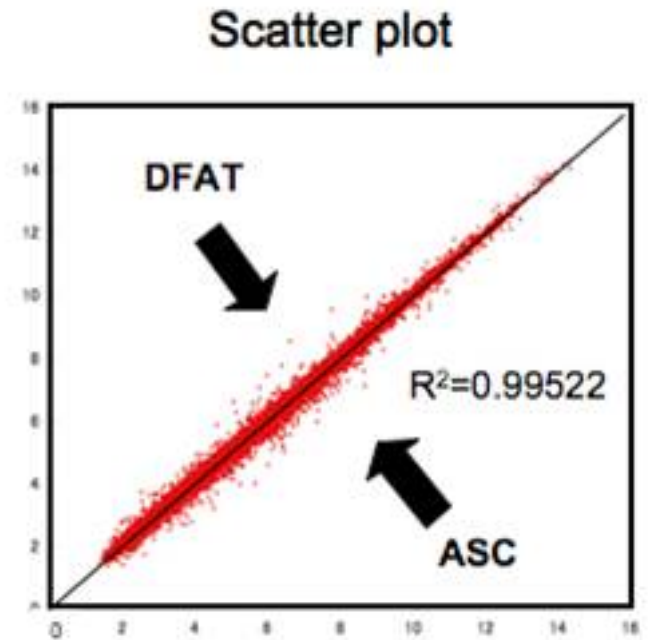
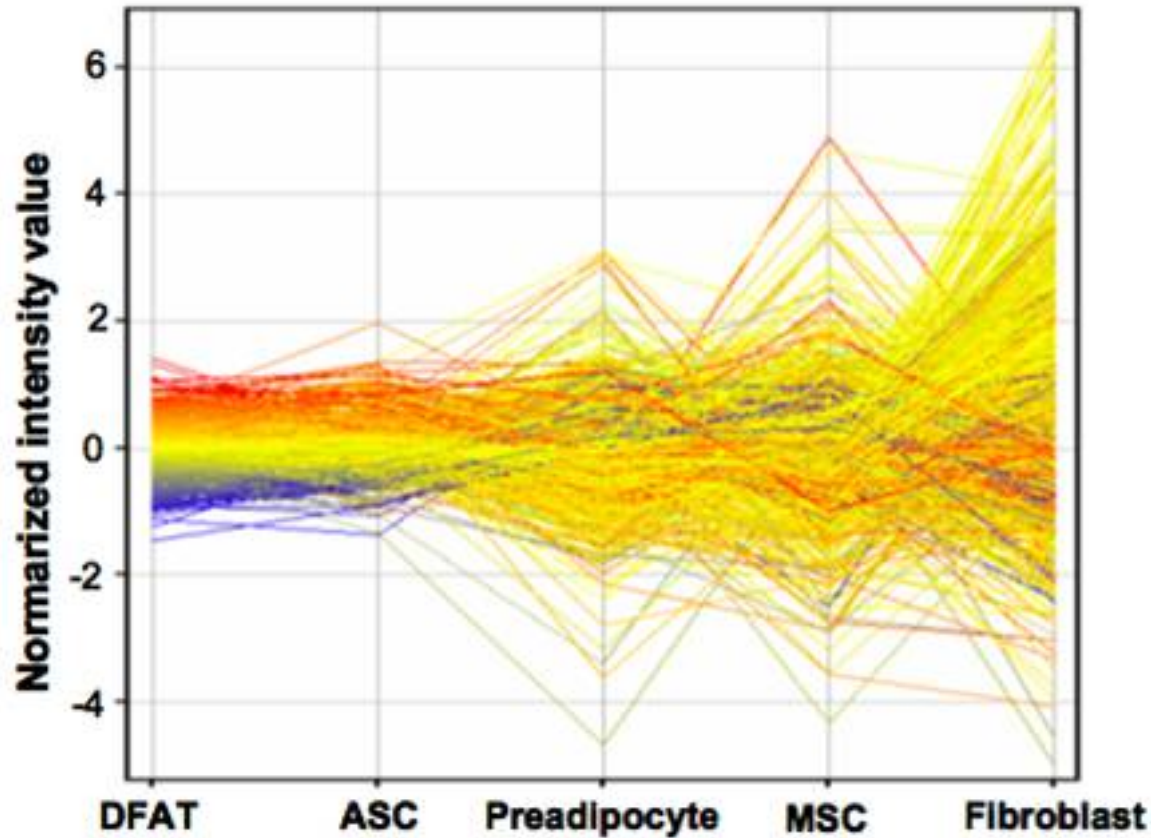
ペレット培養にて誘導されたヒトDFAT由来軟骨組織



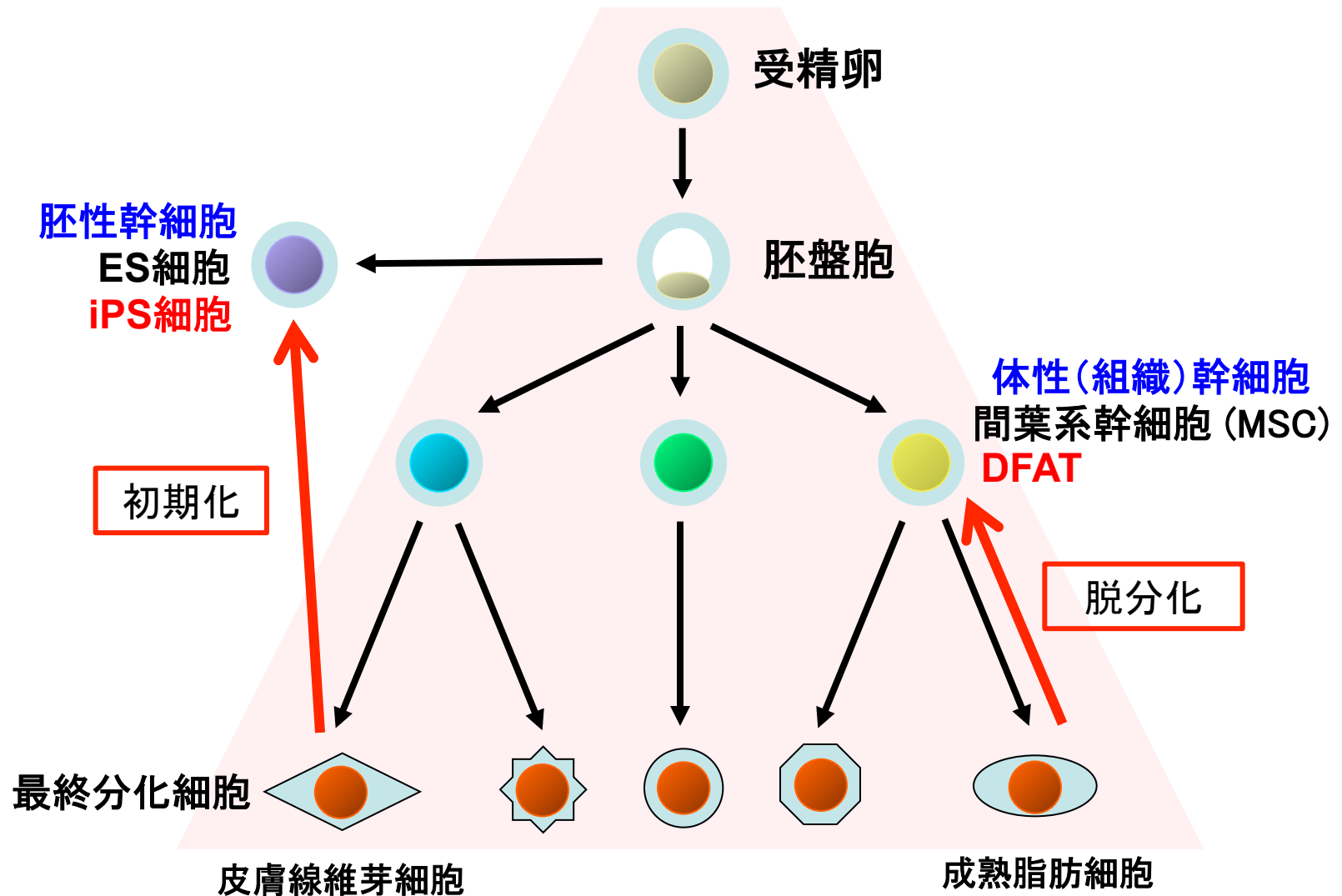
ヒトDFAT はin vitroにおいて筋線維芽細胞に分化する



DFATと間葉系細胞との遺伝子発現差異の比較 (DNAマイクロアレイ法)



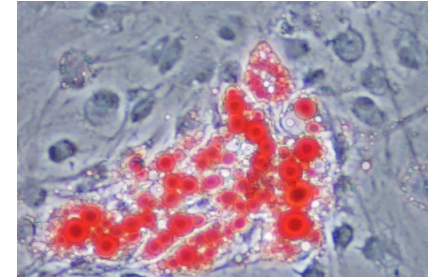
成熟細胞を用いた治療用細胞の誘導



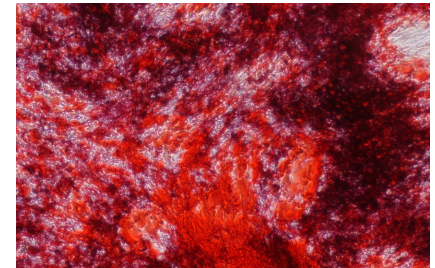
DFATはドナ一年齢に無関係に多分化能を有する

81yo M

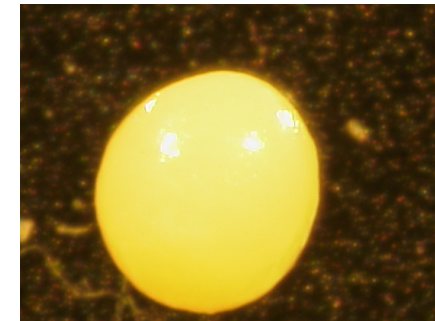
Donor age	Sex	Passage	Adipogenic	Osteogenic	Chondrogenic
2	F	P3	+	+	+
4	M	P5	+	3+	+
7	M	P5	+	2+	+
10	M	P3	±	+	+
10	M	P8	+	+	+
16	M	P4	2+	3+	+
46	F	P7	+	3+	+
58	F	P4	2+	2+	+
68	M	P4	2+	+	+
69	F	P6	+	+	+
75	F	P3	2+	2+	+
77	F	P2	3+	3+	+
81	M	P3	2+	2+	+



脂肪誘導 (Oil red-O)



骨誘導 (Alizarin-red S)

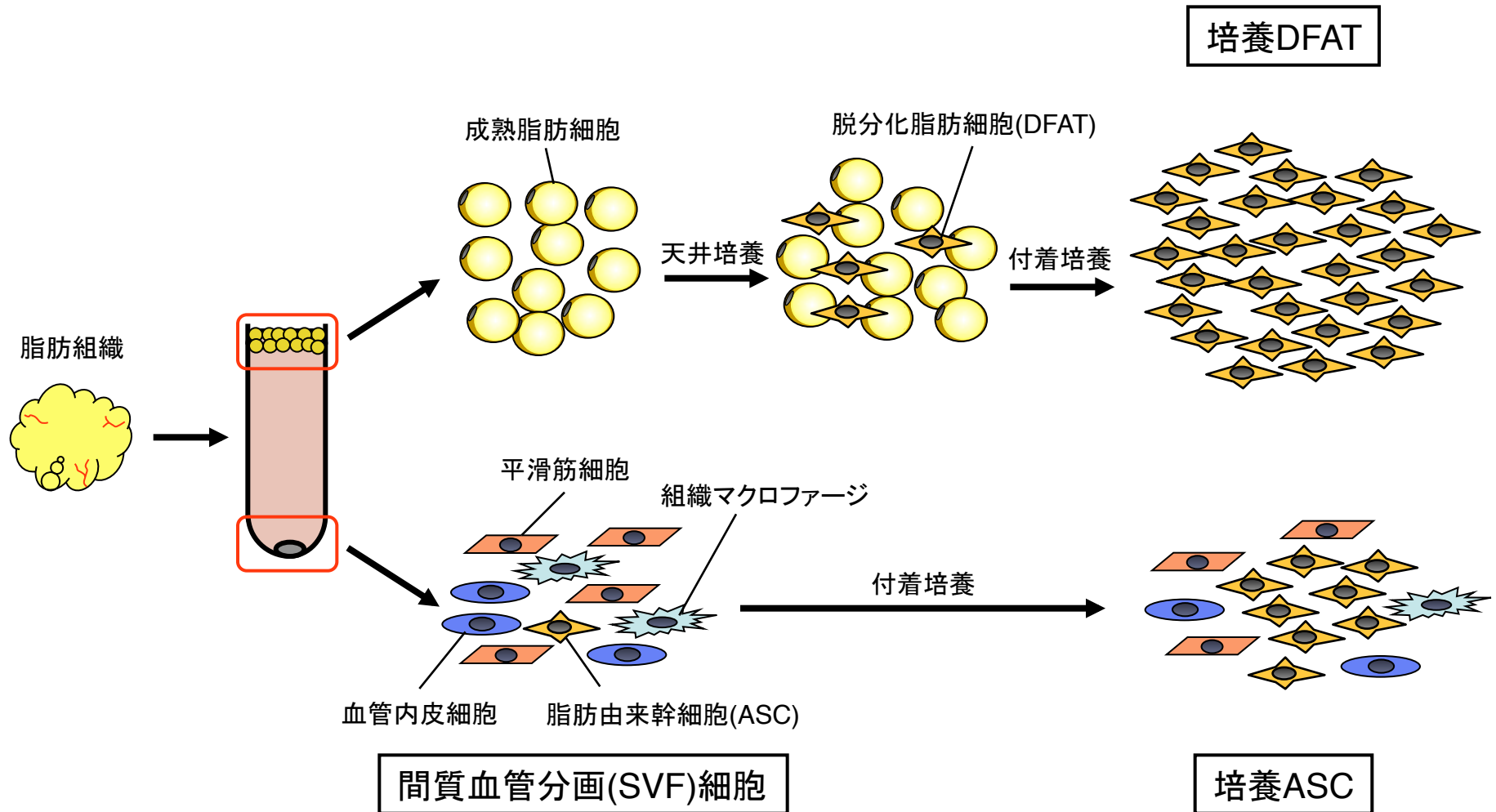


軟骨誘導 (Pellet culture)

分化誘導4週間後に評価。

脂肪分化 (Oil red-O), 骨分化 (ALP stain, Alizerin-red S), 軟骨分化 (Pellet culture, Aggrecan stain)

DFATは少量の脂肪組織から大量調製が可能である



10 ml吸引脂肪から得られる細胞の比較

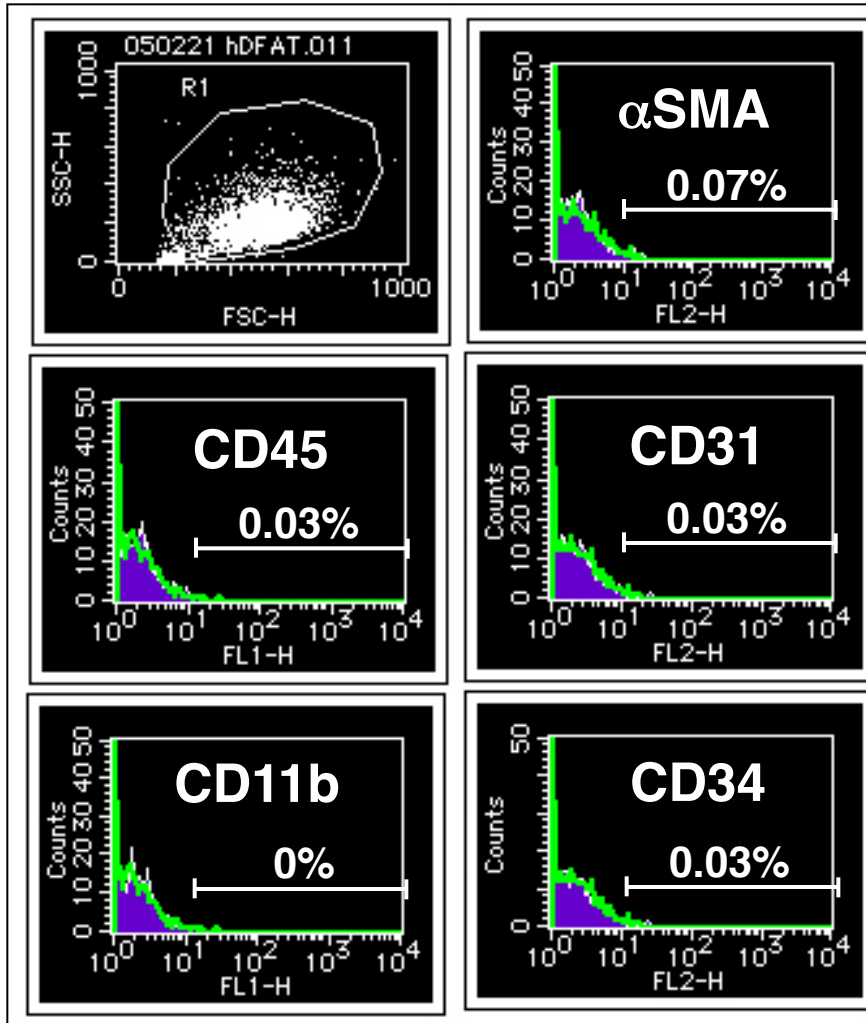
10 ml 吸引脂肪組織



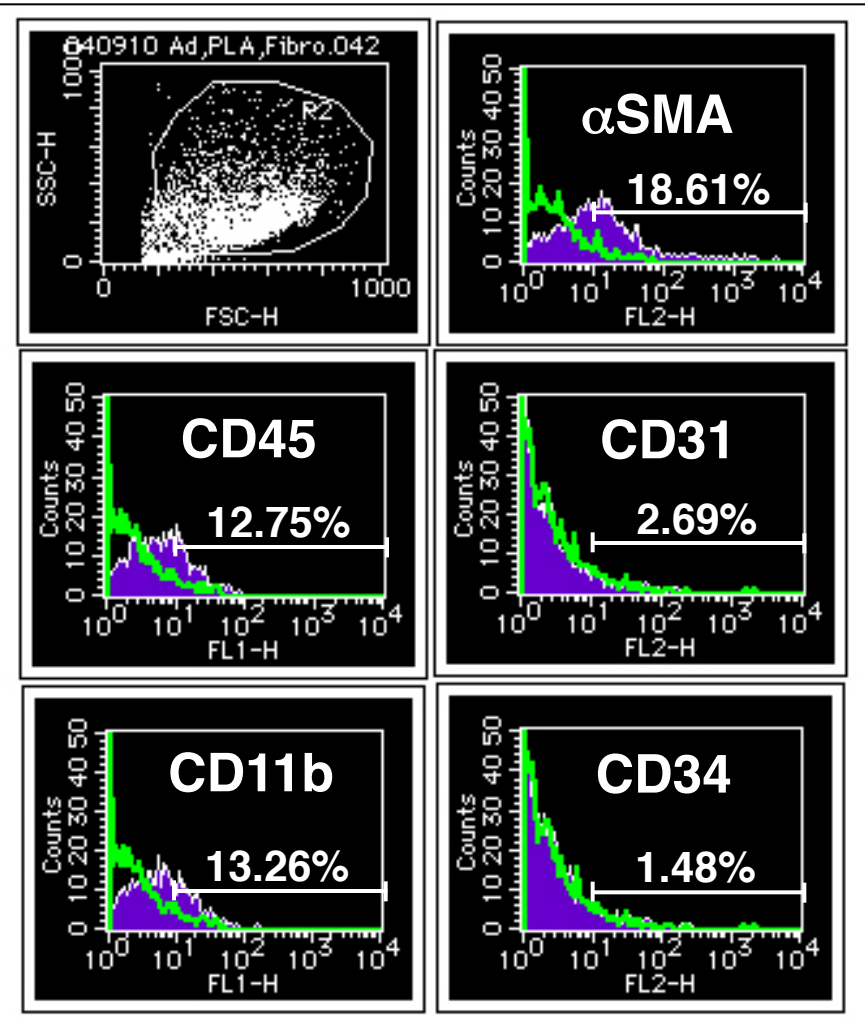
	細胞数	付着・ 増殖細胞数	播種細胞 密度 (/cm ²)	培養面積 (T-25フラ スコ枚数)	初代培養 で得られ る細胞数
成熟脂肪 細胞	1x10 ⁶ (100万)	4x10 ⁵ (40万)	2x10 ³	1,250cm ² (50枚)	DFATs 1.4x10 ⁸
SVF細胞	2x10 ⁶ (200万)	8x10 ⁴ (8万)	5x10 ⁴	100cm ² (2枚)	ASCs 5.6x10 ⁶

DFATはASCに比べ均一な細胞群である

DFAT



ASC

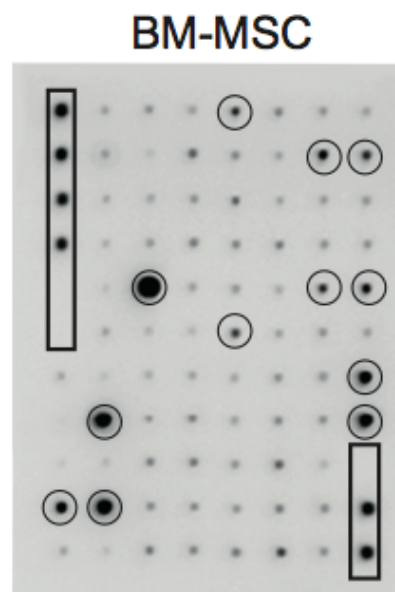
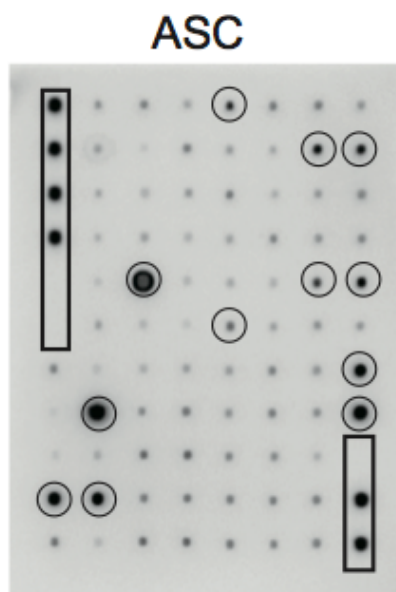
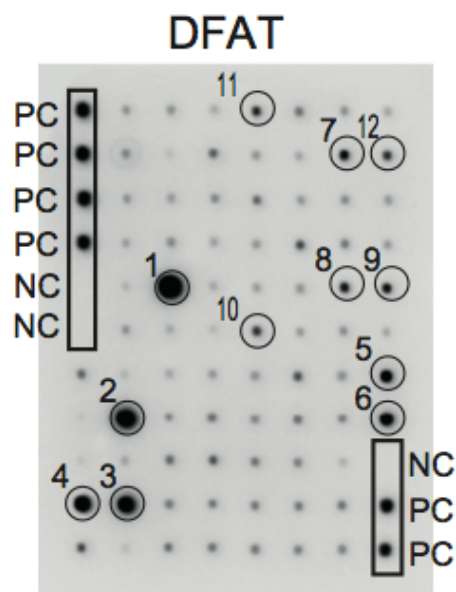


Matsumoto T et al. J Cell Physiol, 215:210, 2008

移植用ドナー細胞としてのDFATの利点

- ◆ 約1-2gの脂肪組織(10-20 mlの吸引脂肪)から大量調製が可能。
 - | MSC・ASCに比べ採取に伴う侵襲が少ない。
 - | 重症心不全、重度熱傷など全身状態不良の症例でも自家移植が可能
- ◆ ドナ一年齢に関係なく多能性細胞が調製できる。
 - | 高齢者・骨粗鬆症などに対する自家移植が可能。
- ◆ MSC・ASCに比べ、他細胞の混入が非常に少ない。
 - | 移植に伴うリスクが低い。
 - | 継代早期に移植できる。
- ◆ 手術時に破棄される脂肪組織を利用したバンキングシステムの構築が容易。
 - | 他家移植への適応も有望(急性期疾患、遺伝性疾患など)

培養ヒトDFATの発現サイトカイン解析



No	Cytokine name
1	MCP-1
2	IL-6
3	IL-8
4	GRO
5	TIMP-1
6	TIMP-2
7	IGFBP-4
8	LIF
9	TGF- β 2
10	BDNF
11	Oncostatin M
12	Osteoprotegenin

低酸素刺激により分泌が亢進するタンパク

PIGF

Thrombopoietin

VEGF-A

PARC

SDF-1

IGFBP-3

TGF β -1

IL-16

TGF β -3

PDGF-BB

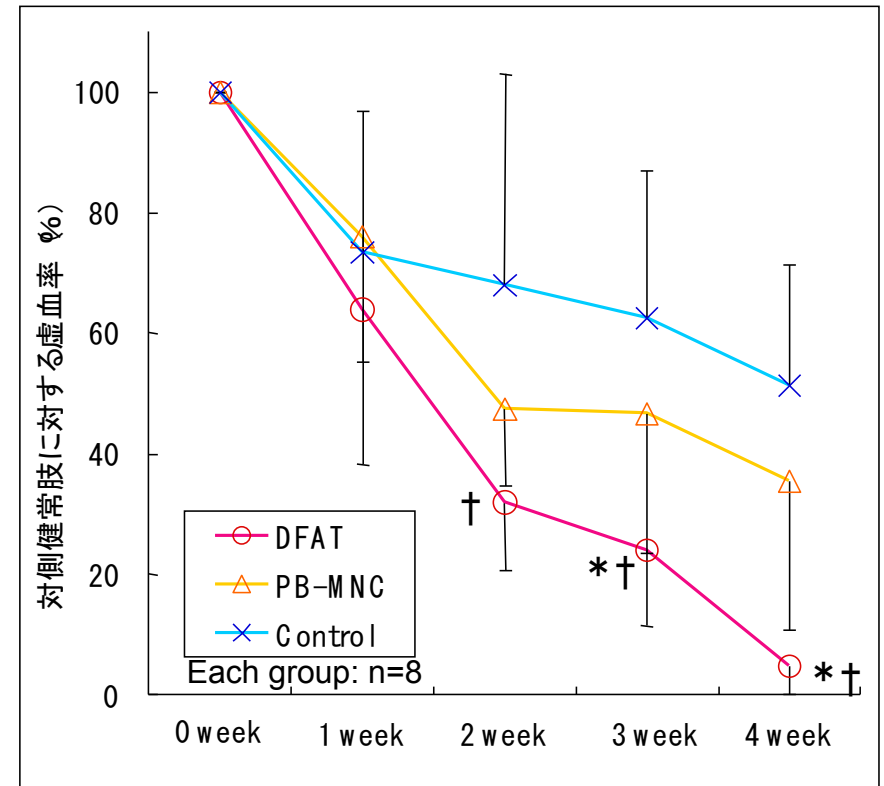
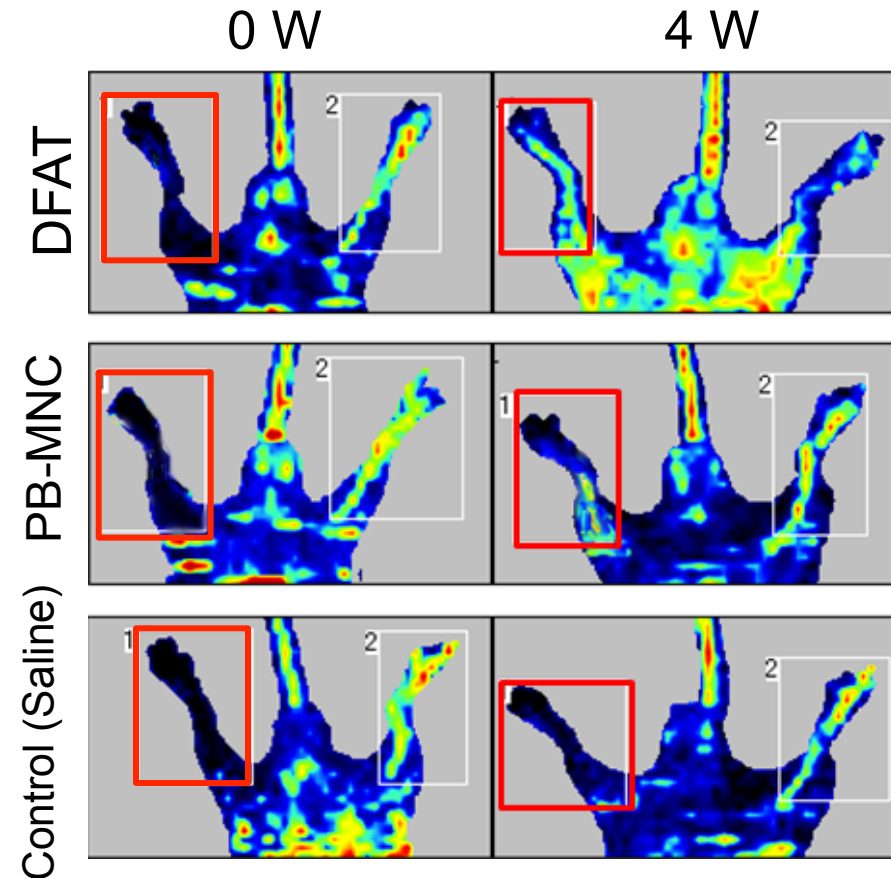
FGF-6

NT-4

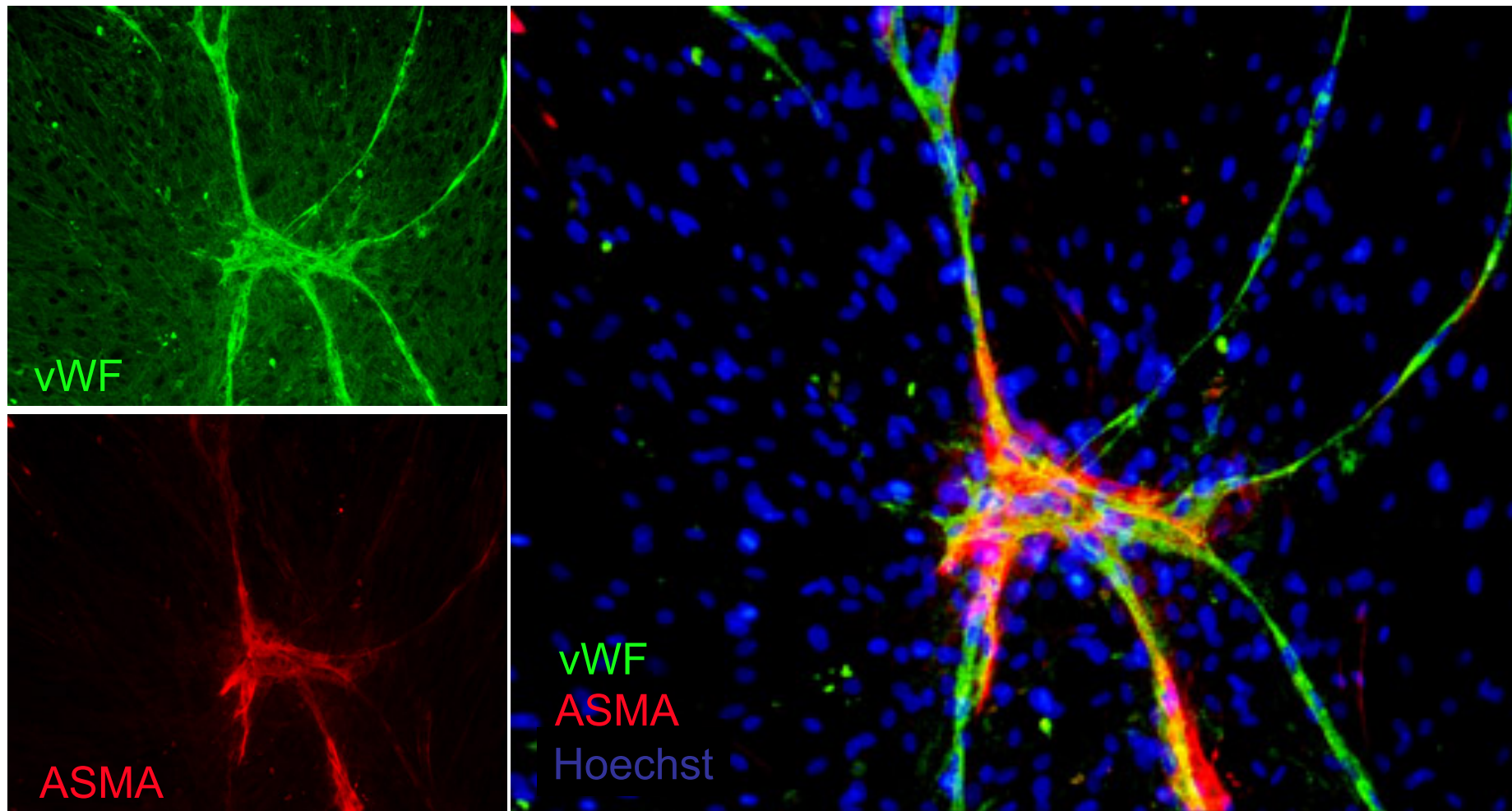
FGF-7

Leptin

SCIDマウス下肢虚血モデルにおいてDFATは末梢血単核球より高い血流改善効果を示す



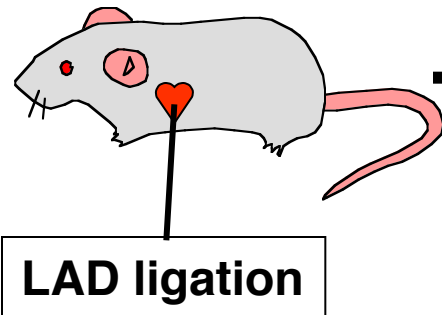
HUVECとの共培養系においてDFATはペリサイト様細胞へと形質転換する



KURABO血管新生キット (+ hDFAT 2×10^4)

ラット急性心筋梗塞モデルに対するDFAT移植の効果

SD rat (6-8 weeks old)



1 h

Cell transplantation

8 W

Evaluation

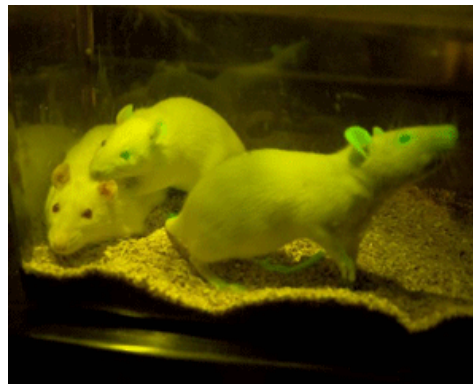
- DFATs from GFP tg rats (1×10^5 /0.1 ml saline)

or

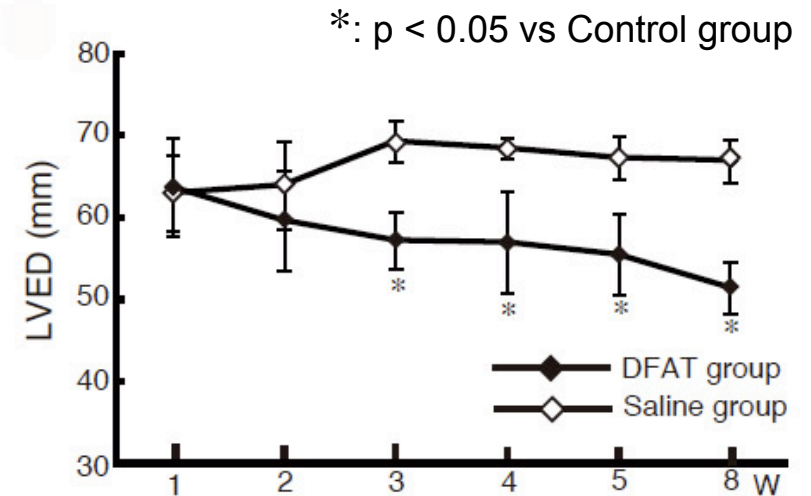
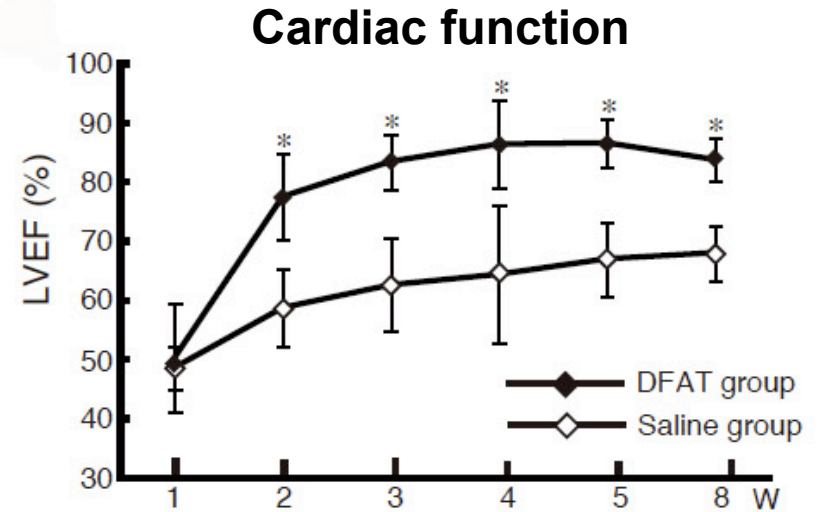
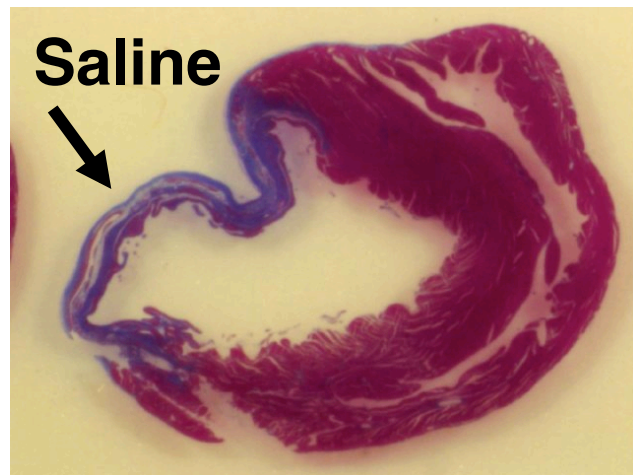
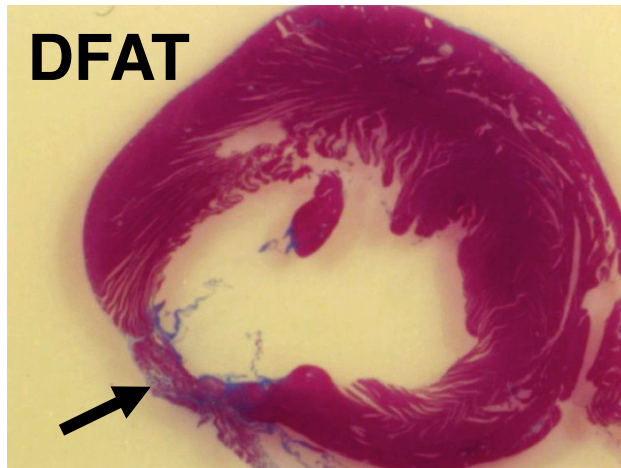
- Saline (Control, 0.1 ml)

Intramyocardial injection
(Each group, n = 8)

- Histology
Masson-Trichrome
- IHC
Anti-GFP Ab
Anti- α sarcomeric actin
- Cardiac function (UCG)
EF
LVED

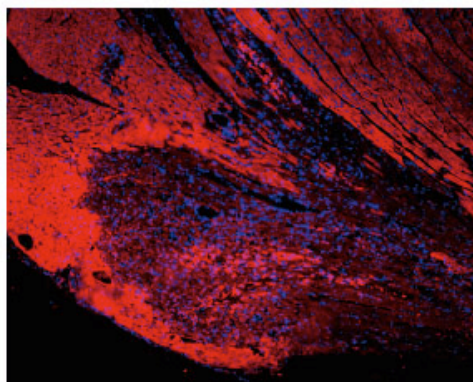
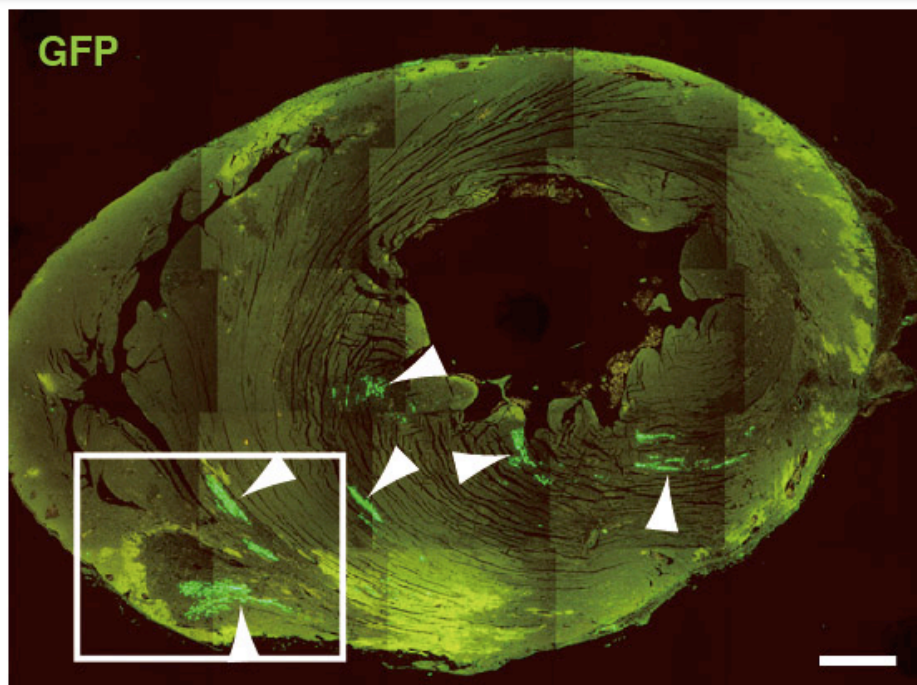


ラットAMIモデルにおいてDFAT移植は 瘢痕面積を縮小させ、心機能を改善する

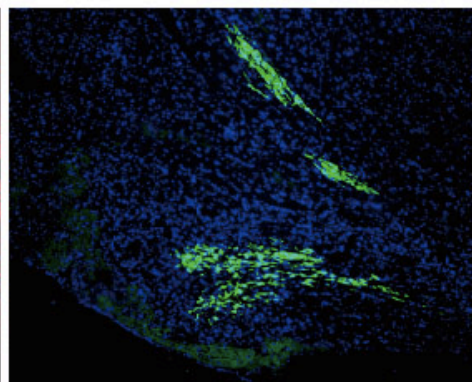


移植したDFATは梗塞部位に効率的に生着する

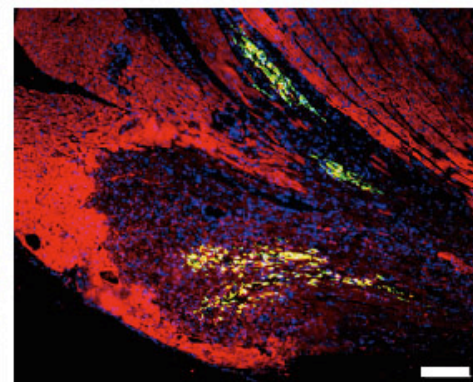
DFAT移植
5週間後



Sr/DAPI

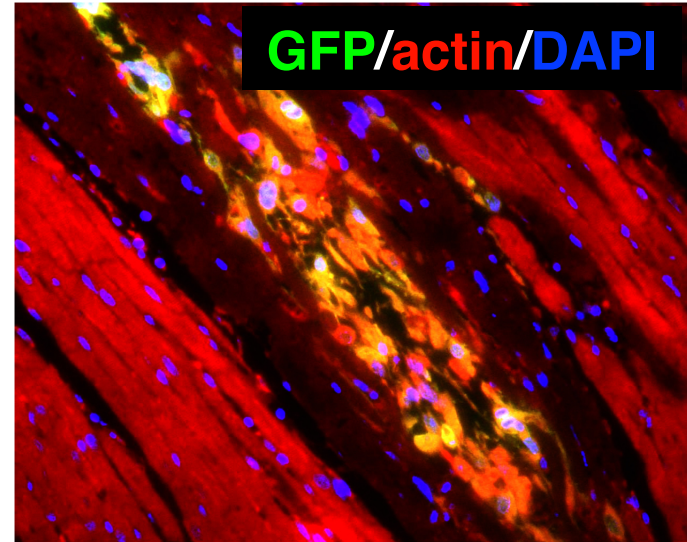
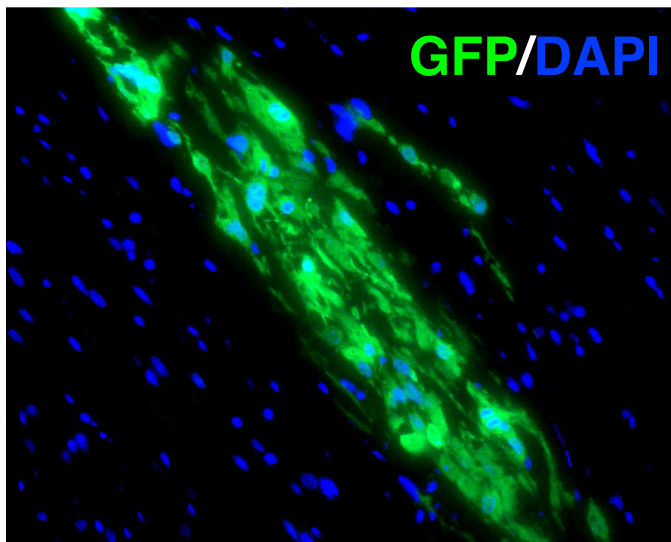
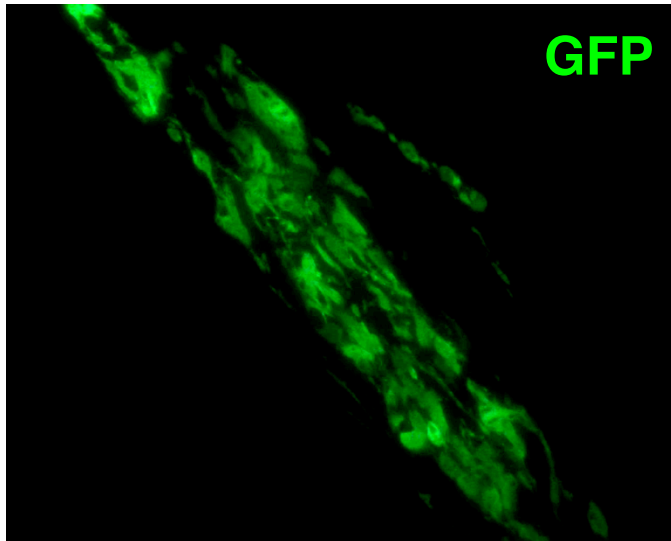


GFP/DAPI



Sr/GFP/DAPI

梗塞部位にてDFATは一部心筋に分化する (Day 14)



臨床(GMP)グレードに適合したDFAT調製法の検討



独立行政法人

科学技術振興機構

Japan Science and Technology Agency

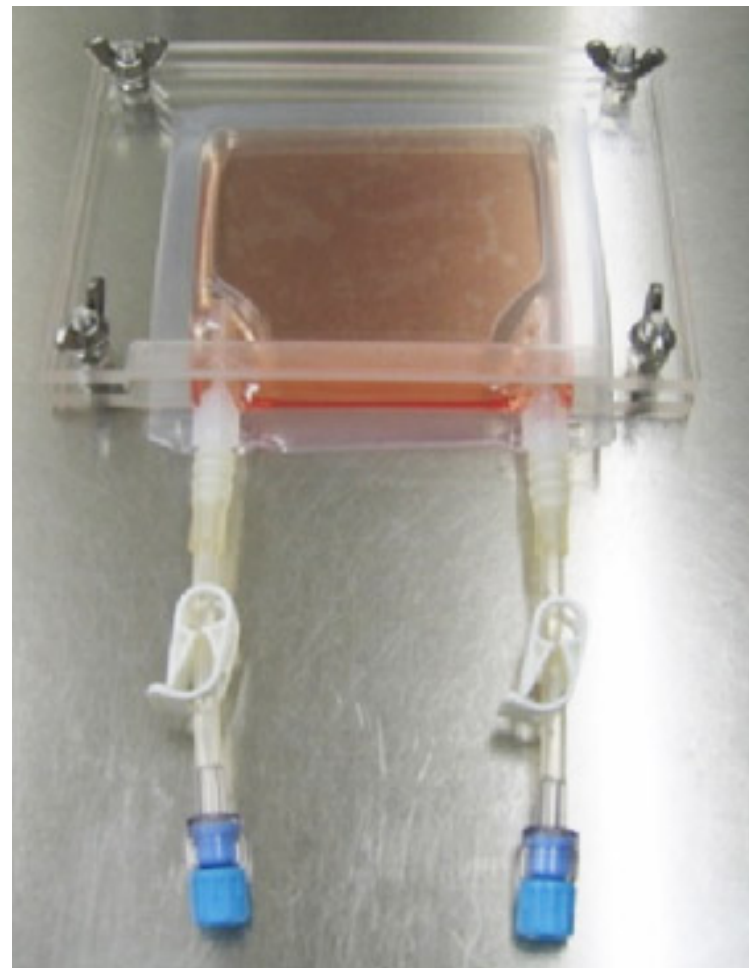
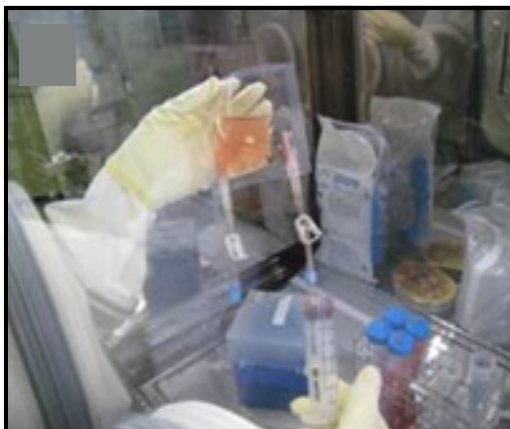
平成20年度産学共同シーズイノベーション化事業

「顕在化ステージ」

「脱分化脂肪細胞を細胞源とする再生医療の実現化」

(ニプロ株式会社, 日本大学)

セルプロセッシング・アイソレータ内での細胞調製



DFAT細胞治療が期待できる疾患

- ◆ 重症虚血性疾患 (PAD, IHD)
- ◆ 骨粗鬆症に伴う難治性骨折
- ◆ 重症熱傷に伴う創傷治癒促進
- ◆ 萎縮性膀胱による腹圧性尿失禁
- ◆ 臍帯血移植の生着不全予防
- ◆ 造血幹細胞移植に伴うGVHD予防・治療

DFAT細胞治療のポテンシャル

- ◆ 低コストの細胞治療・再生医療が可能となる
(大規模なCPC, 増殖因子, 抗体選別など必要なし)
- ◆ 高齢者の代謝変性疾患に対応し、QOLを改善
(骨粗鬆症や変形性関節症に伴う難治性骨折などを治癒させる能力)
- ◆ 万人に適応可能な未来の一般医療となる可能性
(高齢者、小児、全身状態不良の患者などに対する自家細胞治療が可能)

DFATに関する特許取得状況

powered by 特許庁 and Google

(19)	 Europäisches Patentamt European Patent Office Office européen des brevets	(11)	EP 1 637 590 B1
(12) EUROPEAN PATENT SPECIFICATION			
(45) Mention of the grant of the patent: 19.10.2011 Bulletin 2011/42		(51) Int. Cl.: C12N 5/074 (2010.01)	
(21) Application number: 04734379.3		(86) International application number: PCT/JP2004/007322	
(22) Date of filing: 21.05.2004		(87) International publication number: WO 2004/111211 (23.12.2004 Gazette 2004/52)	
(54) DIFFERENTIATED CELLS ORIGINATING IN PRECURSOR FAT CELLS AND METHOD OF ACQUIRING THE SAME			
DIFFERENZIERTE ZELLEN MIT URSPRUNG IN VORLÄUFERFETTZELLEN SOWIE VERFAHREN ZUR GEWINNUNG DAVON			
CELLULES DIFFERENTIEES ISSUES DE PRECURSEURS D'ADIPOCYTES ET LEUR PROCEDE D'OBTENTION			
(84) Designated Contracting States: AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LI LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR		(72) Inventor: • KANO, Koichiro, c/o Nihon University Tokyo 1028275 (JP)	
(30) Priority: 13.06.2003 JP 2003170011		(74) Representative: Wakerley, Helen Rachael	
(43) Date of publication of application:			

❌ PCT/JP2004/007322

前駆脂肪細胞由来の分化細胞及びその取得方法

ブタ及びマウスの成熟脂肪細胞由来の前駆脂肪細胞株を用い、分化転換誘導することにより、他の機能を有する細胞を取得する方法及び該方法により取得された他の機能を有する細胞に関する。本発明により、ブタ及びマウスの成熟脂肪細胞由来の前駆脂肪細胞株を分化転換誘導することにより、骨芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、神経細胞を取得することができた。さらに、マウスの成熟脂肪細胞由来の前駆脂肪細胞株を分化転換誘導することにより、上皮細胞を取得することができた。

2011年10月ヨーロッパ国際特許取得
(登録国: フランス・ドイツ・英国)