

組織再建をめざした脂肪組織からの成体幹細胞の増殖技術の開発

研究成果活用プラザ東海における育成研究 平成14年度採択課題
「組織再建をめざした脂肪組織からの成体幹細胞の増殖技術の開発」

代表研究者：〔国立大学法人名古屋大学・大学院医学系研究科
教授 鳥居修平〕



組織再建に利用できる自家幹細胞を、あらゆる年齢、性別、病状の患者から、安全、迅速、簡便、大量に増殖させる技術を開発した。この技術では、わずか1gの皮下脂肪と200MLの血液を患者から採取し、脂肪組織を酵素処理して細胞にまで分散させ、遠心分離して沈降する細胞を集め、これを2%の患者血清を含む培養液中で培養する。この方法によって、骨、脂肪、軟骨、筋肉に分化する間葉系幹細胞が選択的に増殖することを発見した。この幹細胞は旺盛かつ無限に増殖するので、通常の組織再建手術に必要となる10億個の自家幹細胞を3週間以内に準備できる。このような性質を持つ幹細胞（物質）およびその調製法（方法）をPCT出願した。

研究内容、研究成果

脂肪組織をコラゲナーゼ処理して分散させた細胞集団(Stromal Vascular Fraction (SVF))を高濃度(20%)の牛胎児血清を含む培地で培養すると、多様な形態の繊維芽状細胞(図1b)は長期にわたって増殖を続け(図1a)、得られた細胞集団は、低頻度で間葉系細胞への分化能力を示す。これとは対照的に、低濃度(2%)の牛胎児血清と20 ng/mlのFGF-2を含む培地でSVF細胞を培養すると、丸みを帯びて小型の細胞群(図1c)が旺盛に増殖する。この小型細胞はほぼ無限の自己更新能力を示す。逆説的だが、高血清培地の場合と比べると低血清培地では細胞がより早く増殖しただけでなく、少なくとも60日間にわたって15回の継代が可能であった(図1a)。この方法で、わずか1グラムの皮下脂肪から得た20万個のSVF細胞から、10億個の自家幹細胞が2週間で得られた。低血清培養のもう一つの利点は、高頻度で間葉系細胞に分化する均一な幹細胞集団がわずか数継代で得られることである。低血清培養で増殖した細胞を脂肪分化誘導培地におくと、15日後にはその95%以上が豊富な細胞内油滴を蓄積した脂肪細胞に分化する(図1d)。骨分化誘導培地中に3週間おくと、von Kossa法で染色されるアルカリ性フォスファターゼを高レベルで均一に発現するようになる(図1e)。軟骨への分化能力も持っており、大半の細胞がアルシャン青で染色されるコンドロイチン硫酸陽性細胞に誘導される(図1f)。このように、我々は脂肪由来SVF細胞を2%血清とFGF-2を含む培地で培養するだけで、間葉系幹細胞が選択的に増殖することを発見した。

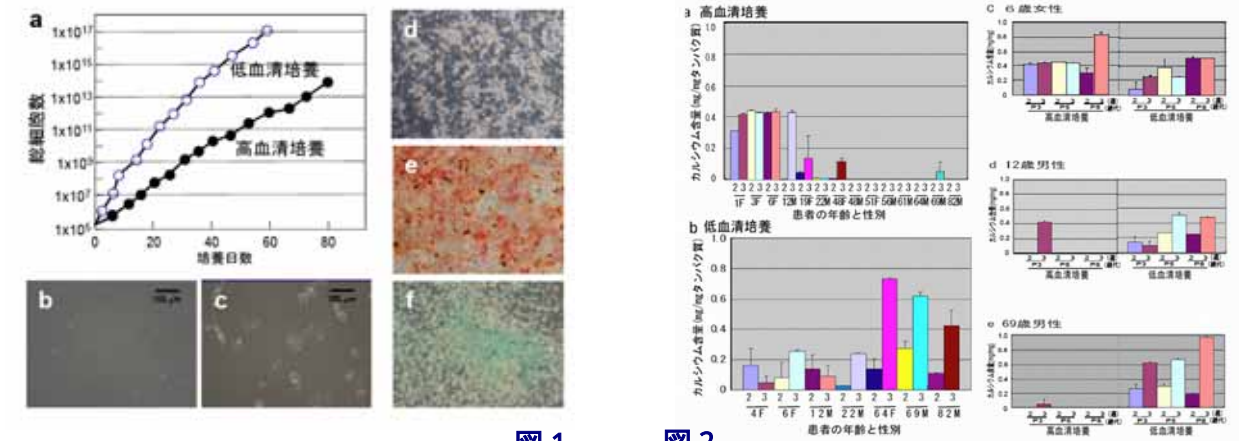
いろいろな年齢の患者の皮下脂肪から得たSVF細胞を高血清培地で増殖させて骨への分化能力をカルシウム蓄積能で評価したところ、12-19歳領域で明確な骨分化能力の低下が見られた(図2a)。ところが、低血清培地で培養すると、この骨分化性間葉系幹細胞の年齢依存的枯渇は見られなくなり、64、69および82歳の患者からでも高いカルシウム蓄積能力をもつ細胞が得られた(図2b)。図2aと2bでは、SVF細胞を高血清と低血清培地で3代培養した骨分化性間葉系幹細胞の年齢依存的な増殖を示したが、図2cから2eには、図示した年齢の患者から得たSVF細胞を5代および8代培養した結果も付け加えた。低血清培養による選択的な増殖効果は5代目でほぼ完了していることが明らかである。このことは、骨分化性間葉系幹細胞の前駆細胞は高齢患者の脂肪組織にもわずかに含まれており、これが低血清培養によって選択的に増殖することを意味する。

倫理的観点からだけでなく、プリオンなどの動物性感染症病原体の混入を防ぐためにも、直接的に臨床適用する幹細胞の培養系からは動物由来物質を排除すべきである。また、ヒト間で感染する病原体の混入を避けるには、牛胎児血清(FBS)の代わりに患者本人かの血清を用いるのが最善である。そこで、市販の18歳男性、19歳女性と29歳男性からの成人血清(HAS)を用いて、22歳男性患者から得たSVF細胞の低血清培養において、牛胎児血清が成人血清で置換できるか否かを試した。その結果、成人血清を用いた方が良い細胞増殖が得られ、1グラムの皮下脂肪から得た百万個のSVF細胞を3週間で百億個以上の間葉系幹細胞に拡大培養できること

が判った。さらに、ヒト血清培地で増殖させた幹細胞は、牛胎児血清培地で増殖させた細胞に比べて高い脂肪と骨への分化能力を示すことも判った。低血清培養では少量の血清で十分なので、1グラムの皮下脂肪と100mlの血清を患者本人から採取できれば、2週間以内に10億個の自家幹細胞が用意できることが明らかになった。

今後の展開、将来の展望

今我々は、切除しやすく豊富にある脂肪組織を患者自身から安全に採取して、本人の組織修復・再生治療に必要な十分量の自家幹細胞を簡便かつ迅速に用意する方法を開発した。この成果を事業化するに当たっての最大の問題点は、世界で最も厳しいとされる日本社会の倫理・安全感覚の障壁である。この事業が日本社会の認知を得られるかは、容易には予測できない。2003年に改正された薬事法では、幹細胞による治験を医師主導で行うことを認めた。Cell Processing Center(CPC)と連携しながら、治験実績を積み上げることが当面の方策となる。他方で、欧米での治験・認可を得て事業展開を試行し、その成果を日本に逆輸入する方策も考えねばならない。これらには相当な時間を要すると考えられるので、正攻法のヒトへの臨床適用に加えて、ペット動物への適用も事業化の方向性として考えなければならない。今回の成果を利用した技術・製品開発の事業化も考えられる。例として、医薬・薬効スクリーニング用の不死化ヒト間葉系幹細胞の販売が挙げられる。これは、脂肪、骨、軟骨に特異的に作用する医薬の大規模スクリーニング系に利用することができる。また、幹細胞に特異的に作用する医薬・健康食品の開発に、今回の成果を利用することも考えられる。さらに、ヒト幹細胞の活性を指標とする創薬標的分子の確立にも有効利用できる可能性がある。



研究体制

代表研究者
名古屋大学・大学院医学系研究科（形成外科） 教授 鳥居修平

研究者
北川 泰雄（名古屋大学）、小堀 雅登（協和発酵工業株式会社）、山口 弘毅（科学技術振興機構）
高松 真二（科学技術振興機構）、尾前 馨（科学技術振興機構）、亀井 譲（名古屋大学）
高田 徹（名古屋大学）、鳥山 和宏（あいち小児保健医療センター）新美 友章（名古屋大学）

共同研究機関
名古屋大学（大学院医学系研究科、大学院生命農学研究科）
協和発酵工業株式会社（先端バイオ研究所）

研究期間

平成15年3月 ~ 平成17年9月