

学術研究助成金〔社会実装研究〕成果報告書

令和 7 年 4 月 30 日

氏 名： 松本 太郎
所属・資格： 医学部・教授
実施研究所： 医学部・総合医学研究所

1 研究課題

脱分化脂肪細胞調製キットの開発

2 研究期間

令和 3 年度 ～ 令和 4 年度

※令和 3 年度 ～ 令和 5 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3 研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏 名	部科校・資格	役 割 分 担
研究代表者	松本 太郎	医学部・教授	研究の総括・キットの最適化
研究分担者	副島 一孝	医学部・教授	キットの性能評価に関する脂肪組織の採取
	檜村 勉	医学部・准教授	キットの性能評価に関する脂肪組織の採取
	李 予昕	医学部・准教授	キットの性能評価に関する品質管理試験・非臨床有効性試験
	風間 智彦	医学部・助教	キットの性能評価に関する細胞製造・非臨床有効性試験

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
株式会社サンプラテック	DFAT 調製キットの製造担当
日水製薬株式会社	DFAT 基礎培地の製造担当

※ホームページ等での公開（☒可・☐否）いずれかをチェックしてください。
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

4 研究目的

研究の全体構想及び本研究の具体的な目的について記述してください。

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、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。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。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ことができることから、低コストで実用性の高い再生医療の細胞源として期待できる。研究代表者らは、日本大学医学部リサーチセンター細胞加工施設(CPF)において臨床グレードの 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中である。またより簡便・効率的に DFAT 調製を可能とする「天井培養フラスコ」を開発し、製品化するに至っている。さらに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」の開発に着手している。

本研究の目的は、この DFAT 調製キットの最適化を行い、最も効率良く安定的に DFAT を製造できる調製キットを完成させる。そして、この調製キットを用いて製造した DFAT の規格試験や非臨床試験を行い、品質や性能が担保された DFAT が再現性よく調製できることを確認する。これらの研究を通じて本調製キットにて製造した DFAT の品質、安全性、有効性が治験水準に到達していることを確認し、最終的に企業への導出を目指す。本調製キットを完成させ社会実装させることにより、均質で安定した性能を示す臨床グレード DFAT を一般の細胞加工施設でも簡便に製造できるようになる。将来的には現在先行している MSC を用いた細胞治療の大部分をより安全・安価なものとして普遍的に発展させる可能性がある。

5 実装研究の概要

本研究課題では、(1) DFAT 調製キットの最適化、(2) DFAT 調製キットを用いた最終製品の製造 (3) 最終製品の非臨床安全性試験、(4) 医薬品医療機器総合機構(PMDA)相談の 4 項目を実施した。

(1) DFAT 調製キットの最適化

- 外科手術時に廃棄される脂肪組織を用いて DFAT 調製キットの各構成パーツ及び試薬類の選定及びそれらの性能を評価した。成熟脂肪細胞単離用チューブに関しては、廃液用チューブと酵素処理用チューブの試作品を委託製造した。これらの試作品を使って実際に成熟脂肪細胞の単離を行い、チューブに付属するトランスファーキャップの形状や寸法などの最適化を行った。
- 天井培養フラスコに関しては、再現性よく DFAT を製造・回収できる脂肪細胞の播種手順やトリプシンによる細胞剥離手順を確定した。
- DFAT 調製用培地に関しては、臨床研究で使用している 20%ウシ胎仔血清 (FBS) 含有培地に比べて、DFAT の誘導効率および増殖効率に優れる基礎培地およびヒト以外の動物由来成分を含まない (ゼノフリー) 血清代替物を複数候補より選定した。そして脱分化培養お

よび拡大培養に適した血清代替物の至適濃度範囲を決定した。

- ゼノフリー培地と天井培養フラスコを用いて脂肪細胞の播種細胞数、培地交換時期、継代培養時期などを検討し、DFAT 製造に最適な条件を確定した。
- 最終製品を凍結保存するために必要な凍結保護液と凍結保存容器に関しては、複数の市販品や研究用試作品を使って、凍結解凍後の DFAT の生存率、フラスコへの接着率、接着後の細胞増殖能などを比較検討した。そして DFAT 凍結保存に最も適した凍結保護液および凍結保存容器を決定した。
- この凍結保護液と保存容器を用いて実際に DFAT を一定期間凍結保存後、解凍し特性解析を行った結果、解凍後も DFAT 特有の細胞表面マーカーを発現し、接着能と増殖能を維持していることが確認された。
- 以上より令和 3 年度中に当該年度の達成目標である DFAT 調製キットの最適化を完了することができた。
- ゼノフリー培地に関する発明に関し、令和 4 年 3 月に NUBIC を通じて特許出願を行った（発明の名称：ヒト脱分化脂肪細胞の製造方法及びヒト成熟脂肪細胞からヒト脱分化脂肪細胞を製造するための培地、発明者：松本太郎、風間智彦、長岡悠紀、出願番号：特願 2020-052876）。

(2) DFAT 調製キットを用いた最終製品の製造

- 本研究の実施に先立ち臨床研究計画書を作成し、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会にて審査を受け実施承認を得た（RK-220111-1）。
- 令和 3 年度は、健常ボランティア（1 例）から採取した皮下脂肪組織(10 mL)から、DFAT 調製キットを用いて、最終製品の試験製造（コールドラン）を行った。同時に製造工程の各段階における工程内管理試験および最終製品の規格試験の実施項目およびその基準値を決定した。そして実際に健常ボランティアから製造した最終製品の生細胞数、生細胞率、細胞純度などがこの規格に適合していることを確認した。
- 令和 4 年度は DFAT 調製キットを用いて、計 7 症例の脂肪組織から最終製品の試験製造（コールドラン）を行った。その結果、すべての症例で工程内管理試験および規格試験の基準値から逸脱することなく最小単位（8 バッグ）を上回る 10 バッグ以上の最終製品を製造することができた。また凍結保存した最終製品の一部を溶解し、規格試験を行った結果、生細胞数、生細胞率、細胞純度といったパラメーターが最終製品の規格に適合していることを確認した。
- 令和 5 年度は PMDA から提示された追加検討項目を実施するため、さらに 4 症例の脂肪組織から最終製品の試験製造を行った。そしてすべての症例で工程内管理試験および規格試験の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。
- 凍結保存した最終製品の一部を溶解し、特性解析試験として、プラスチック面への付着能、細胞増殖能、コロニー形成能、脂肪・骨・軟骨・平滑筋への多分化能、生理活性物質分泌能、目的外生理活性物質の分泌能の評価を行い、検討したすべてのサンプルで治療用細胞とし

ての特性を保持していることを確認した。

- 最終製品の安定性の評価として、原料輸送時安定性試験、最終製品を用いた長期保存試験、輸送時安定性試験、凍結融解後の安定性試験を行った。その結果、DFAT 調製キットを用いて製造した最終製品の貯蔵条件、有効期間、凍結融解後の使用法を決定するに至った。
- 令和 3 年度に NUBIC を通じて特許出願を行ったゼノフリー培地（ヒト脱分化脂肪細胞の製造方法及びヒト成熟脂肪細胞からヒト脱分化脂肪細胞を製造するための培地、特願 2020-052876）に関して、PCT 出願を目指して、JST の各国移行出願費用支援に応募した結果、2023 年 1 月に採択されるに至った。
- ゼノフリー培地を含む DFAT 調製キットを用いて再現性良く DFAT が製造できることを示した実施例のデータを追加した上で、2023 年 3 月に PCT 出願を完了した(発明の名称：ヒト脱分化脂肪細胞の製造方法及びヒト成熟脂肪細胞からヒト脱分化脂肪細胞を製造するための培地、発明者：松本太郎、風間智彦、長岡悠紀、出願番号: PCT/JP2023/012925)。

(3) 最終製品の非臨床安全性試験

- 令和 4 年度、DFAT 調製キットを用いて製造した最終製品の in vitro 非臨床安全性試験として核型解析試験および軟寒天コロニー形成試験を実施試験機関に委託し実施した。
- 核型解析試験では検討したすべてのヒト DFAT 細胞に核型異常（構造異常ならびに異数性）がないことを確認した。
- 軟寒天コロニー形成試験では、検討した一部のヒト DFAT 細胞に足場依存性増殖を疑わせるコロニー形成が認められた。コロニー形成が認められた理由として、試験に使用した増殖培地に含まれるヒト血小板血漿の沈殿物を足場にコロニー形成した可能性があることが判明したため、増殖培地を変更して再試験を実施した。その結果、ヒト DFAT 細胞に足場依存性増殖を疑わせるコロニー形成は認められず、ヒト DFAT に造腫瘍性が無いことが確認された。

(4) PMDA 相談

- DFAT 調整キットを用いて製造した最終製品の特性解析、長期保存試験、凍結融解後の安定性試験などのデータをまとめ、PMDA 相談資料を作成した。そして 2023 年 3 月 28 日に PMDA RS 戦略相談事前面談を実施した。この事前面談を通じて、治験用 DFAT 製品の品質および安全性に係る合意取得に向けて各種留意事項が伝達され、対面助言に向けた要点整理をすることができた。
- 令和 5 年度は、PMDA の助言に従い、計画・実施した非臨床安全性試験の実施状況をまとめるとともに、最終製品を用いた特性解析や安定性試験を追加実施した。そして令和 6 年 3 月 5 日に治験用 DFAT の「非臨床安全性試験の充足性」に関する PMDA 対面助言を実施し、機構の合意を取得した。
- 令和 6 年 3 月 28 日に治験用 DFAT の「品質」に関する PMDA 対面助言を実施し、最終製品の生物由来原料基準への適応状況、工程内管理試験・規格・試験方法の適切性、安定性試

課題番号	社 21-1202
------	-----------

【様式 6 社会実装研究】

験、製造工程由来不純物及び副成分の安全性評価に関して機構の合意を取得した。

6 学会発表等

実装研究によって得られた研究成果の発表状況（学会発表，成果物展示，プレス発表等）について記入してください。
要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
副島一孝， <u>檜村勉</u> ， <u>風間智彦</u> ， <u>松本太郎</u>	第 21 回日本再生医療学会総会	皮膚再生医療の現状と展望	2022 年 3 月
<u>松本太郎</u>	第 7 回 Nephrology Expert Conference	脱分化脂肪細胞が拓く未来の再生医療	2022 年 7 月
<u>松本太郎</u> ， <u>風間智彦</u> ， <u>李予昕</u> ， <u>檜村勉</u> ， <u>副島一孝</u> ，他	第 54 回日本動脈硬化学会総会・学術集会	重症下肢虚血を対象とした脱分化脂肪細胞移植による血管再生細胞治療	2022 年 7 月
<u>松本太郎</u>	BioJapan/再生医療 Japan2022	脱分化脂肪細胞による低コスト・低侵襲細胞治療	2022 年 10 月
<u>松本太郎</u>	第 45 回 Tonomachi Cafe	細胞製造技術が拓く再生医療の最前線 脱分化脂肪細胞による再生医療の実用化	2022 年 12 月
<u>松本太郎</u>	BioJAPAN2023	重症下肢虚血に対する脱分化脂肪細胞を用いた自家細胞医薬品の開発	2023 年 10 月
<u>松本太郎</u> ， <u>副島一孝</u> ， <u>檜村勉</u> ， <u>李予昕</u> ， <u>風間智彦</u> ，他	第 4 回日本フットケア・足病医学会年次学術集会	脱分化脂肪細胞を用いた血管再生細胞治療の実用化	2023 年 12 月
<u>松本太郎</u> ， <u>李予昕</u> ， <u>風間智彦</u> ， <u>檜村勉</u> ， <u>副島一孝</u> ，他	第 45 回日本炎症・再生医学会	包括的高度慢性下肢虚血に対する自家脱分化脂肪細胞(DFAT)移植による血管再生細胞治療	2024 年 7 月

7 著書・雑誌論文

実装研究によって得られた研究成果の発表状況（著書，雑誌等）について記入してください。
著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
--------	-------------	-----	----	---------

課題番号	社 21-1202
------	-----------

【様式 6 社会実装研究】

Tanimoto K, <u>Kazama T</u> , <u>Matsumoto T</u> , et al.	Regenerative Therapy/ Phenotypic and functional properties of dedifferentiated fat cells derived from infrapatellar fat pad.	19 巻	2022 年 1 月	Elsevier・JSRM
Sawada H, <u>Kazama T</u> , <u>Matsumoto T</u> , et al.	Journal of Orthopaedic Surgery and Research/ Bone marrow-derived dedifferentiated fat cells exhibit similar phenotype as bone marrow mesenchymal stem cells with high osteogenic differentiation and bone regeneration ability.	18 巻・1 号	2023 年・ 1 月	BMC

8 本研究課題に関するその他の発表（新聞、一般雑誌掲載等）

- 松本太郎：第 45 回 Tonomachi Café ～細胞製造技術が拓く再生医療の最前線～
KingSkyFront Lifescience Portal（YouTube 動画配信
<https://www.youtube.com/watch?v=31mvrtFqOX8>）2022 年 12 月，
- 松本太郎：研究発表「脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた血管再生医療」，第 1 回日本大学本
部記者懇談会 2023 年 5 月 26 日
- 松本太郎：日本大学 Web 研究発表会，脱分化脂肪細胞(DFAT)による細胞治療開発，
(YouTube 配信 <https://www.youtube.com/watch?v=iNOVoTSw9Gc&t=19s>) 2024 年 3 月 7
日

9 その他の成果

- 松本太郎，加野浩一郎：日本大学全学共通科目「自主創造の基礎」授業用ビデオ，日本大学
の教育・研究を知る 学部横断型共同研究 2022 年 3 月
- 松本太郎：2022 年度 Kawasaki-NEDO Innovation Center Startup Hands on Program 採択
（事業プラン名 DFAT 細胞医薬品開発・製造受託事業）2022 年 9 月
- 松本太郎：第 4 期日本大学理事長・学長特別研究 採択（2022～2024 年度 研究課題名：
日本大学発技術を用いた再生・細胞治療の実用化に向けた学部横断的研究）2021 年 11 月
- 松本太郎：2023 年度研究開発型ベンチャー企業成長支援事業(Kawasaki Deep Tech
Accelerator)採択（事業名:DFAT 細胞医薬品開発事業）2023 年 7 月 5 日
- 松本太郎：日本大学医学部オープンキャンパス 模擬講義「日本大学発技術によるユニーク
な再生医療」 2023 年 8 月 5 日
- 松本太郎：令和 6 年度日本大学特別研究 採択（2024～2025 年度 研究課題名：脱分化脂
肪細胞を用いた細胞治療の臨床試験と適応拡大に向けた学際的研究）2024 年 1 月 29 日

課題番号	社 21-1202
------	-----------

【様式 6 社会実装研究】

- 松本太郎：公開シンポジウム開催；AMED 再生医療実用化研究事業 日本大学医学部公開シンポジウム「包括的高度慢性下肢虚血(CLTI) あなたの足をどう守る?」, 日本大学医学部, 2024 年 2 月 17 日

1 0 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年 月日	取得年 月日
ヒト脱分化脂肪細胞の製造方法及びヒト成熟脂肪細胞からヒト脱分化脂肪細胞を製造するための培地	特許権	<u>松本太郎</u> <u>風間智彦</u> 長岡悠紀	日本大学	特願 2020-052876	令和 4 年 3 月 29 日	
ヒト脱分化脂肪細胞の製造方法及びヒト成熟脂肪細胞からヒト脱分化脂肪細胞を製造するための培地	特許権	<u>松本太郎</u> <u>風間智彦</u> 長岡悠紀	日本大学	PCT/JP2023/012925	令和 5 年 3 月 29 日	

1 1 今後の展開

実用化の基となる成果を、連携組織に引渡す（引渡した）時期、引渡し後の事業計画（実施時期、事業内容、事業化後大学の役割分担があればその内容等）について、可能な限り具体的に記入してください。

本研究では、最適化した DFAT 調製キットを用いて、規格試験および非臨床試験実施した結果、品質および性能が担保された臨床グレード DFAT が再現性良く調製できることを確認した。また、PMDA との対面助言を通じて、当該調製キットを用いて製造された治験用 DFAT について、「品質」および「非臨床安全性試験の充足性」について PMDA の合意を得ることができた。

これらの成果を踏まえ、令和 6 年度には、2 社の医薬品開発製造受託機関(CDMO)への技術移管を実施し、細胞製造に関する標準作業手順書(SOP)を完成させた。その結果、両 CDMO が有する細胞培養加工施設において、臨床グレード DFAT が製造可能となった。このうち 1 社では、セルプロセッシングアイソレーターを用い、細胞医薬品製造に適した GCTP 省令に準拠した製造環境下でのプロセスを確立しており、令和 8 年度に開始を予定している包括的高度慢性下肢虚血(CLTI)に対する医師主導治験に向けた治験用製品の製造を担う計画である。また、もう 1 社では、安全キャビネットを用いた、より低コストで効率の良い製造法を確立した。本製造法は、再生医療等安全性確保法に基づき、自由診療として実施される再生医療に応用していく予

【様式 6 社会実装研究】

定である。第一弾として、令和 8 年に日本大学医学部附属板橋病院にて開始した自家 DFAT の関節内投与による変形性膝関節症を対象とした臨床研究では、当該 CDMO の細胞培養加工施設で DFAT の委託製造を行っている。

社会実装に向けた事業計画としては、令和 8 年度を目途に DFAT 技術を基盤とした大学発認定スタートアップの設立を計画している。本スタートアップを通じて、DFAT 細胞医薬品の製造販売を担う企業へのライセンスアウトを実施し、契約一時金およびマイルストーン収入を得るビジネスモデルを構築する方針である。さらに、自由診療領域においても、同スタートアップを介して、DFAT を用いた細胞治療を提供する医療機関向けに製造受託などの再生医療提供サービスの展開を予定している。対象疾患は、変形性膝関節症にとどまらず、学部横断的に進行中の前臨床試験の成果をもとに、慢性期脳梗塞、難治性皮膚潰瘍、難治性歯周病などへの適応拡大を視野に入れている。