

再生医療に不可欠な細胞分離技術

榎本 詢子¹・福田 淳二²

薬剤を用いる従来の方法では治療が難しい疾患に対し、細胞そのものを用いる細胞移植や再生医療が新しい医療として注目されている。たとえば、造血幹細胞移植は白血病などの難治性疾患において、すでに世界各国で臨床研究が行われている。しかしながら、造血幹細胞は、骨髓細胞10万個に1個の頻度でしか存在せず、取得が難しい。また、iPS細胞（人工多能性幹細胞）を用いた再生医療では、特定の臓器細胞へ分化させた細胞群に未分化な細胞が残存し、体内で腫瘍を形成することが危惧されている。200万個の移植細胞にたった20個の未分化細胞が混入すると100%の確率（ $n=5$ ）でテラトーマ（奇形腫）が発生することがマウスを用いた実験で報告されている¹⁾。すなわち、必要な、あるいは不要な細胞を分離する技術が細胞移植や再生医療の分野において強く求められている。この技術には、超高精度で目的の細胞を分離できること、分離プロセスが細胞にダメージを与えないこと、治療に必要な大量の細胞を短時間で分離できること、などが求められる。

現在用いられている細胞分離技術は、大きく以下の3つに分類される²⁾。すなわち、i) 物理化学的な方法、ii) 生物物理学的な方法、iii) アフィニティーを利用する方法である。i) 物理化学的な方法とは、遠心分離法や、分離膜を用いるもの、水性二相系など、細胞のサイズ、密度、接着性などの違いを利用した分離法である。これらの技術は簡便であるが、分離精度が一般に低いことから、分離プロセスの最初のステップに用いられることが多い。ii) 生物物理学的な方法とは、たとえば誘電泳動³⁾やフィールドフロー分画を利用して分離する手法である。この手法では、細胞の電気特性や屈曲性に基づいて分離を行うため、抗体などで細胞を標識する必要がないという利点がある。iii) アフィニティーを利用する方法は、モノクローナル抗体などが結合した蛍光色素や磁気ビーズを用いるフローサイトメトリーや磁気細胞分離法がある。フローサイトメーターは、市販装置で1秒間に数万個の細胞を分離処理できるレベルに達している。また、高感度かつ定量的な測定や、多重パラメーター解析ができることから、希少細胞の選択的分離に用いることが可能な技術である。しかしながら、抗体を使って標識

した細胞を分散状態として用意する必要がある、壁付着性の細胞はその種類によっては分散状態にある時間が延長するに従ってダメージを受ける。磁気細胞分離装置は、フローサイトメーターと比べて操作が容易であり、短時間での分離や高い分離精度を有する。しかしながら、磁気ビーズはそのまま細胞膜表面に残り、また細胞内に取り込まれて細胞に障害を及ぼすことも知られている。さらに抗体を用いるフローサイトメーターと磁気細胞分離装置に共通する課題は、目的細胞に特異的に結合する抗体が見つからない場合の分離法の確立である。その場合、抗体の代わりにアプタマーが利用できる可能性がある⁴⁾。アプタマーは、Cell SELEXと呼ばれる手法で対象細胞にのみ結合する塩基配列を見つけ出すことが可能であり、また一定の品質のものを大量に合成することができる。

今後、細胞移植や再生医療を本格化させるためには、高精度で、非侵襲的に、大量に細胞を分離する技術が不可欠である。既存のアプローチのみでは、これらをすべて満たすことができないのは明らかであり、近年、これらの従来の細胞外部からのアプローチではなく、細胞の代謝の違いなどを利用する方法も提案されている⁵⁾。この手法では、未分化なES細胞やその他の細胞から心筋細胞を分離するために、基本的な栄養源であるグルコースを培地から除去し、心筋細胞のエネルギー源となる乳酸を添加した培地に変更した。その結果、心筋細胞を最大で99%にまで精製できることを見いだした。このようにして精製した心筋細胞は、免疫不全マウスに移植しても腫瘍を形成しないことが示されている。

今後はこのようなまったく新しいアイデアと既存の方法とを組み合わせた細胞の分離技術の確立が必要であろう。

- 1) Lawrenz, B. *et al.*: *Cytherapy*, **6**, 212 (2004).
- 2) Diogo, M. M. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 2699 (2012).
- 3) Labeed, F. H. *et al.*: *PLoS ONE*, **6**, e25458 (2011).
- 4) Guo, K. T. *et al.*: *Stem Cells*, **24**, 2220 (2006).
- 5) Tohyama, S. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **12**, 127 (2013).