

## 提案書

### 脱分化脂肪細胞 (DFAT) 培養上清液を用いた化粧品開発

#### 【背景】

近年の幹細胞研究の進展により、幹細胞は種々の分化細胞に分化するのみならず、多種の液性因子を分泌し、組織修復や免疫制御に関与することが明らかにされている。中でも脂肪組織から単離できる脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells: ASC) は、大量の幹細胞を比較的 low 侵襲性に採取できることから細胞治療や化粧品の原料として活用されている。実際にヒト幹細胞順化培養エキスを配合した化粧品が商品化に至っている。幹細胞培養上清に含まれる液性因子は皮膚の線維芽細胞を活性化させ、コラーゲンなどの分泌を促進させることにより、皮膚組織再生、抗老化、シワ・たるみ改善などの効果を発揮すると考えられている。一方、ヒト ASC は、①ドナーによる個体差が大きい安定した性能が得られない、②増殖する力は強いが有限であるため、1ドナーから大量の培養上清が得られない、③長期継代により液性因子の分泌量が低下してくる、といった欠点がある。

脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cells: DFAT) は、成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することによって得られる ASC に類似した高い増殖活性と多分化能を有する細胞である。ASC に比べ DFAT は、①より少量 (約 5ml) の脂肪組織から調製できるため、ドナーの負担が少ない、②異種細胞の混入がほとんどないため、継代培養早期より安全で安定した性能を示す、③調製に必要な培地量が少なく培養期間も短くて済むため、調製コストが押さえられる、といった特長がある。またヒト DFAT の培養上清には、皮膚再生・活性化に係わるサイトカインや、皮膚線維芽細胞に作用して細胞増殖やコラーゲンの産生を促進するサイトカインが豊富に含まれていることが明らかになっている (図)。以上より DFAT 培養上清は、ASC 培養上清に比べより高性能で安価な化粧品の原材料となることが期待できる。さらに遺伝子導入技術を用いて DFAT の不死化細胞株を作成することにより、長期継代培養を行っても安定した性能を保持した培養上清を大量に得ることができると予想される。

#### 【目的】

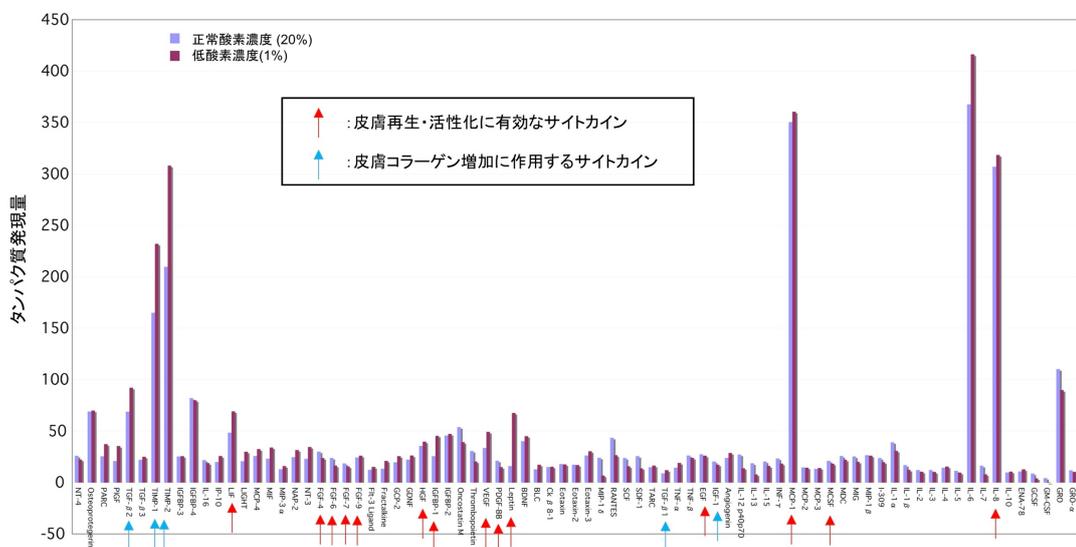
ヒト不死化 DFAT を用いた高性能で安価な培養上清製造技術を開発し、これを原材料とした化粧品開発を行う。

## 【方法】

- ① ヒト脂肪組織から DFAT を調製し、遺伝子導入技術を用いて不死化細胞株を作成する (SV40 LargeT 抗原などの不死化遺伝子をレンチウイルスベクターを用いて導入、3-4 株を作成予定)。
- ② 上記不死化 DFAT の培養上清を採取し、成分分析を行う。含有するサイトカイン、タンパク質、活性型ペプチドなどの濃度を測定する (成分分析はマルチプレックスアレイ、質量分析法を用いる予定)。
- ③ 成分分析の結果より皮膚再生作用、線維芽細胞の増殖・コラーゲン産生作用が高い細胞株を選別する。また有効成分をより効率的に採取する培養条件 (低酸素培養、紫外線照射、ビタミン添加など) を決定する。
- ④ 上記検討にて最適化した DFAT 培養上清を適当な方法 (アルコール濃縮後、凍結乾燥など) で安定化し、化粧品の原材料として用いる。

## 【期待される成果】

老化した皮膚線維芽細胞を活性化し、コラーゲン産生を高める作用をもったヒト幹細胞培養上清を、安定的に大量製造することができる。この培養上清を製造するコストは従来の ASC 培養上清に比べ約 1/2 で済む予定である。この培養上清を原材料として製造した化粧品は、液剤、クリーム剤、軟膏、ジェル剤、乳液剤などに適用させることが可能で、皮膚のたるみ、しわ、むくみを除去する高い効用が期待できる。



皮膚再生・活性化に有効なサイトカイン：

MCP-1, IL-8, LIF, Leptin, VEGF, HGF, IGFBP-1, PDGF-BB, EGF, IGF-1, FGF-4, FGF-6, FGF-7, FGF-9

皮膚コラーゲン増加に作用するサイトカイン：TIMP-1, TIMP-2, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IGF-1

低酸素刺激により分泌増加するサイトカイン：TIMP-1, TIMP-2, Leptin, VEGF, LIF, IGFBP-1, TGF- $\beta$ 2