

論文内容要旨

新規プログラムフリーザーを用いた間葉系
幹細胞の凍結保存法の開発

主指導教員：谷本 幸太郎教授

(応用生命科学部門 歯科矯正学)

副指導教員：二川 浩樹教授

(統合健康科学部門 口腔生物工学)

副指導教員：加来 真人講師

(応用生命科学部門 歯科矯正学)

四方 花佳

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

論文内容要旨

論文題目

新規プログラムフリーザーを用いた間葉系幹細胞の凍結保存法の開発

学位申請者 四方 花佳

論文内容要旨

一般に生体組織の凍結時には、細胞内に存在する水分子が結晶化し、クラスターを形成することにより凍害が生じるとされている。そのため、現在行なわれている凍結保存法では、解凍後の細胞生存率とその後の細胞増殖能の低下が大きな問題であった。我々は、これまでに磁場を利用したプログラムフリーザー (Cells Alive System :CAS) を用いて水分子の結晶の成長の抑制を図り、歯根膜組織、骨組織、ならびに間葉系幹細胞 (MSCs) の長期保存法を検討してきた。

一方、解凍時においても水分子の再結晶化によりクラスター形成が生じ、凍害を引き起こすと考えられているが、現在のところ、恒温槽を用いた解凍が行われるだけであり、凍害を防止する有効な手段は報告されていない。

本研究では、CAS フリーザーを用いてヒト滑膜由来 MSCs およびラット骨髄由来 MSCs の凍結保存を行った上で、解凍時においても磁場を付与した場合の、MSCs の生存と増殖能に与える影響を検討した。さらに、磁場を付与しながら凍結、解凍を行ったラット骨髄由来 MSCs を頭蓋骨に作製した骨欠損部に移植した場合の骨再生について評価した。

大阪大学より提供されたヒト滑膜由来 MSCs を用いて CAS フリーザーにより最終到達温度 -30°C 、磁場強度 0.1 mT 、植氷時間 15 分で凍結した群 (CAS 群) と、 -150°C のディープフリーザーに直接投入した群 (Direct 群) の 2 群を設定した。また、細胞保存液として 10%ジメチルスルホキシド (Me₂SO) 含有群 (Me₂SO 群) および Me₂SO 不含有群 (Me₂SO 不含有群) を設定し、それぞれ解凍後の細胞生存率と増殖能に及ぼす影響を評価した。

さらに、生後 4 週齢ラットの大腿骨より MSCs を単離培養した後、凍結方法、細胞保存液、ならびに解凍方法が MSCs の生存と増殖能に及ぼす影響について検討を行った。

細胞の凍結条件は、最終到達温度 -30°C 、磁場強度 0.1 mT 、植氷時間 15 分で凍結した群 (CAS 群)、と磁場を付与しないプログラムフリーザーで凍結した群 (磁場なし群) の 2 群を用いて比較検討した。また、細胞保存液の条件は、Me₂SO 不含有群、2.5%Me₂SO 群、10%Me₂SO 群の 3 群について検討を行った。解凍条件については、磁場を付与しながら解凍を行う CAS 解凍群、 37°C の恒温槽にて解凍を行う normal 解凍群を設定し、同様に検討を行った。

最後に、凍結後の MSCs の骨再生誘導能を検討するため、ラット頭蓋骨に直径 6 mm の骨欠損を作製し、1 週間凍結保存を行ったラット骨髄由来 MSCs を欠損部へ移植し、8、16、

24 週後に同部の組織採取を行い組織学的に観察した。なお、コントロールとして未凍結の MSCs を移植したラット（未凍結群）を用いた。その後、MSCs 移植部位における骨分化、および細胞増殖能のマーカーとして、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、PCNA 陽性細胞の局在を免疫組織化学的に検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. ヒト滑膜由来 MSCs において、解凍直後の細胞生存率は最終到達温度 -30°C 、磁場強度 0.1 mT 、植氷時間 15 分で CAS フリーザーにて凍結を行った CAS 群が約 63.8%、Direct 群が約 53.0%であった。7 日間培養後の細胞増殖能は CAS 群が最大で 97.6%、Direct 群が最大で 98.6%と両群に有意差は認められなかった。
また、Me2SO 群、Me2SO 不含有群での細胞生存率は、共に 60 %代であったが、一週間培養後の細胞増殖能は Me2SO 群が 94.1%と有意に高い値を示した。
2. ラット骨髄由来 MSCs において、最終到達温度 -30°C 、磁場強度 0.1 mT 、植氷時間 15 分の条件で凍結した CAS 群が、磁場なし群と比較して解凍直後の細胞生存率、および細胞増殖能は有意に大きな値を示した。また、解凍直後の細胞生存率、および細胞増殖能は Me2SO 含有率の低下とともに、小さい値を示し、10%、2.5%Me2SO、0%Me2SO 含有群間で有意差が認められた。解凍法においては、磁場を付与しながら解凍することにより、解凍直後の細胞生存率に差は認められないものの、細胞増殖能は normal 解凍群と比較して有意に高い値を示した。
3. Me2SO 不含有 CAS 群、2.5%Me2SO-CAS 群、10%Me2SO-CAS 群、磁場なし群および未凍結群において、欠損部の組織学的観察を行った結果、MSCs 移植後 8 週目では、新生骨面積に大きな差は認められなかった。移植 16 週後では、CAS 群および未凍結群で骨新生が認められ、移植 24 週経過時においては、全ての CAS 群においてさらなる骨再生が観察された。また、10%Me2SO-CAS 群においては未凍結群と同等の骨再生を認めた。一方、磁場なし群においては 16、24 週で欠損部中央部にわずかな再生骨組織が形成されるにとどまった。
4. 10%Me2SO-CAS 群の MSCs 移植部位におけるアルカリフォスファターゼ、およびオステオポンチンの発現は経時的に増加を示した。PCNA については経時的に減少を認めた。

以上の結果より、磁場を利用したプログラムフリーザーは MSCs の凍結保存に有用であることが明らかとなった。また、その効果は解凍時にも磁場を付与することにより、さらに、高まることが示された。