

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	四方花佳
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
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			
論文審査担当者			
主 査	教授	杉田 誠	印
審査委員	教授	天野 秀昭	
審査委員	准教授	武知 正晃	
〔論文審査の要旨〕			
<p>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。著者が所属する研究室では、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。</p> <p>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。</p> <p>本研究では、CAS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。</p> <p>大阪大学より提供されたヒト滑膜由来MSCsを用いてCASにより最終到達温度-30℃、磁場強度0.1mT、植氷時間15分で凍結した群 (CAS群) と、-150℃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。</p> <p>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</p>			

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、ALP, OPN, 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-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ALPおよびOPNの発現は経時的に増加を示した。PCNAについては16週から24週に減少を認めた。

以上の結果から、本論文は磁場を利用したプログラムフリーザーがMSCsの凍結保存に有用であることを明らかとし、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。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。