

令和 3 年 10 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08735

研究課題名（和文）難治性皮膚潰瘍に対する他家細胞移植を見据えた積層細胞シート凍結保存法の開発

研究課題名（英文）Development of cryopreservation method for allogeneic cell sheet

研究代表者

白澤 文吾（SHIRASAWA, Bungo）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80444719

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、一晚細胞が培養された細胞培養容器の蓋をした状態で3Dフリーザーを用いて凍結後に-80℃で保存した場合、細胞生存率が約60%以上の結果となった。また、本研究から、3Dフリーザー凍結は、同じ細胞保存液であっても、凍結条件によっては、高い細胞生存率を生み出す可能性があることが示唆された。

3Dフリーザーでの細胞凍結は、細胞シートを作製時の高密度細胞でも凍結保存可能な凍結方法になる可能性があることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3Dフリーザーの凍結条件によっては、細胞シート作製の為に必要となる高濃度な細胞密度であっても、非凍結細胞と同程度の細胞生存率を生み出すことができる結果であった。そのため、今後、更に3Dフリーザーの凍結条件を検討することで、非凍結と同等の治療効果を持つ凍結保存可能な細胞シート作製法に繋がり、3Dフリーザーに凍結法は、臨床応用可能な、高品質な他家細胞シート移植の急性期疾患への適用を実現させる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study showed that cell viability was more than 60% when cell culture vessels with lid were frozen using 3D freezer. This study suggested that 3D freezer could generate high cell viability even under the same cell preservation solution depending on the conditions. 3D freezer might make it possible to freeze high density cells for making cell sheet.

研究分野：細胞移植

キーワード：細胞シート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療である細胞移植治療は、これまでに治療法がない疾患を治癒させることができる可能性があり、現在、世界中で活発に研究開発されている。細胞移植の一つの方法として、細胞をシート化して移植する細胞シート技術が確立されている。この細胞シート移植の長所としては、細胞懸濁液を移植する方法と比較して、確実に、移植する箇所に細胞を定着させることが可能なことである。細胞シート移植は、移植箇所に移植したい細胞数を確実に移植することで高い治療効果を発揮すると考えられている。

移植する細胞には、2種類ある。それは、細胞移植を受ける患者由来の細胞である自家細胞と、細胞移植を受ける患者本人ではなく、他人由来の他家細胞である。移植する細胞を選択するとき、自家細胞および他家細胞は、それぞれ長所と短所がある。

自家細胞の細胞シート作製には「細胞シートの素になる細胞を患者から単離し増殖させる」および「細胞シートを作製する」という比較的長期間の細胞培養・加工工程が存在し、さらに「細胞シート毎の品質の違い」も見られることから、細胞シート移植の急性期疾患への適用は現状厳しく、また、手間暇かけて作製した細胞シートを患者へ届けるに至らない事態も否定できない。

しかし逆に言えば、細胞シートをあらかじめ作製し保存することが出来れば、細胞シート移植による疾患治療の効率化につながる。さらに、他者の細胞に由来する他家細胞シートの移植が可能になれば、細胞シートを低コストで製造が可能になり、細胞シートの普及に繋がる。

細胞シートを保存する方法として、凍結が考えられるが、臨床応用された細胞シート凍結法は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞シートの凍結保存法の確立をすることである。細胞シートの凍結保存法が確立されれば、安定的に急性期疾患に対する細胞シート移植が可能となり、他家細胞シート移植治療の可能性を広げる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

細胞を細胞シート作製時の細胞濃度で 24-well plate に播種するために、24-well plate の 1 ウェルに、ヒト線維芽細胞を 5×10^5 cells/2mL で播種し、一晚培養した。培地は、AIM-V medium CTS (ThermoFisherScientific 社) と HFD-1(+) (株式会社細胞科学研究所) を 1:1 で混合し、血清濃度が 2% であった。

(2) 細胞シート凍結と解凍

24-well plate に播種されて一晚培養した細胞のウェルから培養液が除去され、1 ウェルに細胞保存液 300 μ l が入れられた。細胞保存液としては、STEM-CELLBANKER (ゼノアックリソース株式会社) バンバンカー hRM (日本ジェネティクス株式会社) STEM-CELLBANKER DMSO Free (ゼノアックリソース株式会社) が使用された。細胞は、3D フリーザー (#KSS-40BLW-2400V、古賀産業株式会社) を使用して、24-well plate で凍結された。3D フリーザーの凍結時の条件として、24-well plate の培養蓋がある状態で凍結 (フタあり) 24-well plate の培養蓋がない状態で凍結 (フタなし) 培養蓋の代わりに 24-well plate にシール (#BF-400-S、Axygen® Breathable Sealing Film) を貼付した状態で凍結 (シール) の 3 種類が検討された。3D フリーザーの凍結設定温度は、-35、-45、-55 で検討した。また、3D フリーザーとの凍結を比較するために、細胞凍結として、培地を細胞保存液に置換後に、24-well plate を -80 フリーザーで凍結した群 (直接 -80) も実施した。

3D フリーザーで凍結された 24-well plate は、ドライアイス搬送後に、-80 フリーザーに 1 時間保管された。

-80 から取り出された 24-well plate は、Thermo Plate (株式会社東海ヒット) を利用して 37、12~14 分で解凍された。

解凍後、細胞保存液が除去され、ウェルは PBS で 2 回洗浄後、培地 (AIM-V medium CTS : HFD-1(+)) が 1:1 で、血清濃度が 2% が加えられた。コントロールとなる非凍結細胞の 24-well plate も同様に、PBS 洗浄後に、培地が加えられた。細胞は 3 日間培養されたが、その培養条件は、37、5%CO₂ で 2 日間培養後、33、5%CO₂、2%O₂ で 1 日間培養であった。

(3) 細胞生存評価

CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS、プロメガ社) を使用して細胞生存が評価された。3 日間培養された 24-well plate のウェルから培養液が除去され、1 ウェルに MTS 試薬を含む溶液 500 μ l が入れられ、37、5%CO₂、1 時間で培養された。2030

ARVO X シリーズ マルチラベルリーダー（パーキンエルマー社）を使用して 490 nm の吸光度が測定された。コントロールとなる非凍結細胞の細胞生存率を 100 として、凍結解凍された細胞の生存率を計算した。MTS 試薬を含む溶液 500 μ l の組成は、AIM-V medium CTS 200 μ l、HFD-1(+) 200 μ l、MTS 試薬 100 μ l、血清濃度 2% であった。

4. 研究成果

3D フリーザーで凍結時に、24-well plate の蓋をせずに凍結した場合（フタなし）、凍結温度にかかわらず、STEM-CELLBANKER とバンバンカー hRM で凍結した場合の細胞生存率は約 70% 以上であったが、STEM-CELLBANKER DMSO Free の細胞生存率は 60% 未満であった。

3D フリーザーで凍結時に、24-well plate の蓋をして凍結した場合（フタあり）、および、蓋の代わりにシールを貼付した場合（シール）の細胞生存率は、凍結温度および細胞保存液にかかわらず、約 60% 以上であった。

3D フリーザーによる凍結をせずに、培養液を細胞保存液に置換後に -80 $^{\circ}$ C フリーザーに入れた場合（直接 -80 $^{\circ}$ C）、STEM-CELLBANKER とバンバンカー hRM での細胞生存率は約 60% 以上であったが、STEM-CELLBANKER DMSO Free での細胞生存率は、約 40% 未満であった。

これらの結果から、今回検討した凍結条件では、細胞を直接 -80 $^{\circ}$ C フリーザーで凍結するよりも、3D フリーザーで細胞を凍結後に、細胞を -80 $^{\circ}$ C フリーザーで凍結した方が、細胞生存率が高い結果であった。また、3D フリーザーで凍結する場合、細胞培養容器に蓋およびシールを貼付して、細胞を凍結することで、細胞生存率が高い結果となった。

細胞シート作製時の高濃度な細胞密度であっても、3D フリーザーの凍結条件によっては、非凍結細胞（コントロール）と同程度の細胞生存率となる結果であった。

そのため、今後、更に 3D フリーザーの凍結条件を検討することで、非凍結と同等の治療効果を持つ凍結保存可能な細胞シート作製法に繋がり、3D フリーザーの凍結は、高品質な他家細胞シート移植の急性期疾患への適用を実現させる可能性がある。

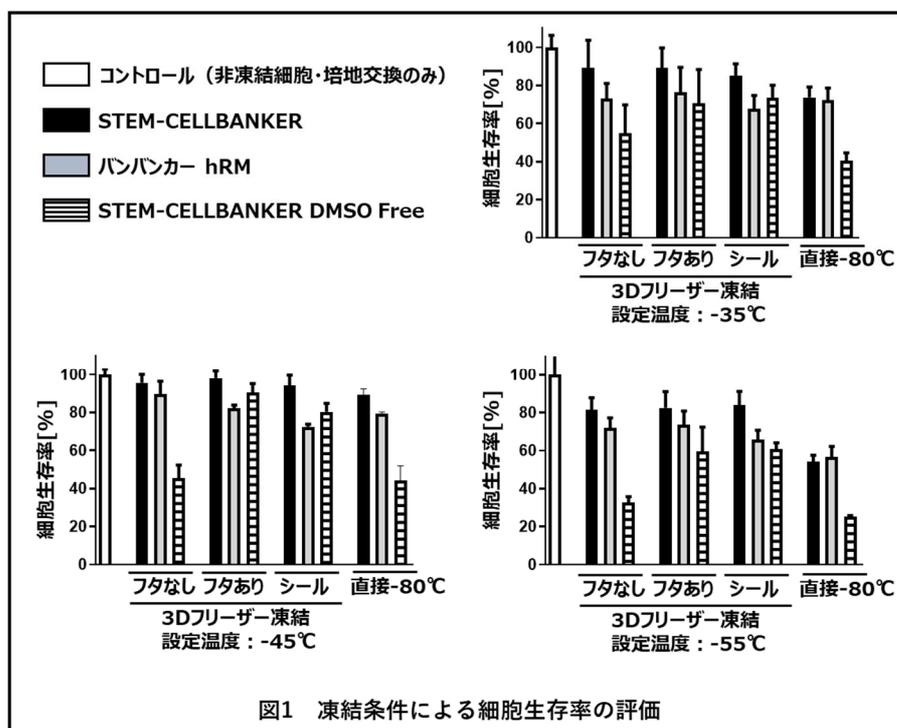


図1 凍結条件による細胞生存率の評価

< 参考文献 >

Mizoguchi T, Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Suzuki R, Murata T, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K. Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(1):201-211. doi: 10.1159/000489767.

Nagase T, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Suehiro K, Shirasawa B, Morikage N, Hamano K. Allogeneic fibroblast sheets accelerate cutaneous wound healing equivalent to autologous fibroblast sheets in mice. *Am J Transl Res*. 2020 Jun 15;12(6):2652-2663.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suehiro Y, Takemoto Y, Nishimoto A, Ueno K, Shirasawa B, Tanaka T, Kugimiya N, Suga A, Harada E, Hamano K	4. 巻 38
2. 論文標題 Dclk1 Inhibition Cancels 5-FU-induced Cell-cycle Arrest and Decreases Cell Survival in Colorectal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 6225-6230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura K, Morikage N, Nishino-Fujimoto S, Furutani A, Shirasawa B, Hamano K	4. 巻 19
2. 論文標題 Current Status and Perspectives on Pharmacologic Therapy for Abdominal Aortic Aneurysm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Drug Targets	6. 最初と最後の頁 1265-1275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1389450119666171227223331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藤田 陽、藏澄宏之、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 当院における心臓血管外科術後のDSWI発症予防と治療戦略
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症に対する経カテーテル大動脈弁置換術の適応を拡大すべきか
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藤田 陽、藏澄宏之、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 心筋梗塞後心室隔穿孔に対する3次元infarct exclusion法の治療成績
3. 学会等名 第78回山口県臨床外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藤田 陽、藏澄宏之、鈴木 亮、森景則保、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 若年者の胸腹部解離性大動脈瘤に対するEVAR completionの1例
3. 学会等名 第62回関西胸部外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 慢性透析患者に対する単独冠動脈バイパス術の治療成績
3. 学会等名 第62回関西胸部外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藤田 陽、藏澄宏之、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 心筋梗塞後心室中隔穿孔に対する3-dimensional infarction exclusion法の当科における治療成績
3. 学会等名 第24回日本冠動脈外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藏澄宏之、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 80歳以上の高齢者に対する単独冠動脈バイパス術の治療成績
3. 学会等名 第24回日本冠動脈外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 慢性腎不全患者に対する冠動脈バイパス術の治療成績
3. 学会等名 第24回日本冠動脈外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田陽、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 弓部大動脈瘤に対する弓部大動脈人工血管全置換術の治療成績
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藏澄宏之、鈴木亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 HOCMに伴うMRに対して胸腔鏡補助下右小開胸経僧帽弁の中隔心筋切除と僧帽弁形成術を施行した1例
3. 学会等名 第115回日本循環器学会中国地方会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	濱野 公一 (HAMANO Kimikazu) (60263787)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究 分担者	上野 耕司 (UENO Koji) (30736070)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------