

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09128

研究課題名（和文）次世代積層心筋幹細胞シート凍結保存法の開発

研究課題名（英文）Development for cryopreservation for multilayered cell sheets

研究代表者

桂 春作（KATSURA, Syunsaku）

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40457304

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）：我々は、細胞シートを凍結する保存方法を検討するために、凍結装置として、再生医療向け3Dフリーザー、および、プログラムフリーザーを使用した。また、細胞保存液は11種類を検討した。3Dフリーザーによる細胞シート凍結は、最適な細胞保存液を選択することで可能であることが示された。また、今回の研究結果は、凍結させたい細胞に対して、最適な凍結装置、細胞保存液を検討することが重要であることを示すものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで臨床応用可能な細胞シート凍結法は存在しなかったが、本研究では、3Dフリーザーを使用することで、細胞シート凍結が可能になることを示した。細胞シートを凍結することが出来れば、製造コストを下げる事が可能になる為、再生医療に要する価格が下がり、再生医療の普及に貢献することができる。また、本研究結果は、これまで凍結保存が難しいと考えられていた細胞に対して、3Dフリーザーおよび細胞保存液の検討が有用であることを示唆していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To verify freezing methods of cell sheets, 3D Freezer and Program Freezer were used in this study. Eleven cell preservation solutions were used in this experiment. Our data showed that cell sheet freezing using a 3D Freezer was possible by selecting optimal cell preservation solutions. This results suggested that it was important to look into combination of freezing devices and cell preservation solutions for cells to be frozen.

研究分野：小児外科

キーワード：細胞シート凍結

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、本邦の再生医療等製品および臨床研究において、細胞シート移植は様々な疾患に対して応用されているが、細胞シート製造におけるコストは非常に高い。その原因の一つに、細胞シートを凍結保存する方法が確立されていないことが挙げられる。

細胞移植のコストを下げるためには、いくつかの方法が考えられ、その一つが他家細胞の利用である。自家細胞移植では、患者毎に細胞を培養するために、培養日数が必要となるために、細胞培養加工施設の使用のコストが他家細胞よりも割高になる。

細胞シート移植において、他家細胞移植の利点をさらに活かす方法として、予め、他家細胞を以下の方法で凍結保存することが出来れば、細胞シート移植までの培養日数を短縮することが出来るために、コストを下げる事が可能となり、細胞シート移植治療の普及に繋がる。

i) 細胞シート作製直前の状態で凍結保存

ii) 細胞シートの状態で凍結保存

しかし、現在、臨床応用可能で、細胞シートを構成する細胞の生存および品質を維持できる凍結法は、確立されていない。そこで、本研究では、食品分野で利用されている 3D フリーザーに注目し、新しい細胞シートの凍結方法の確立を試みることにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞シートを下記の状態で 3D フリーザーおよびプログラムフリーザーで凍結後に、保存し、解凍後の細胞の生存率および分泌因子を解析することで、細胞シートが凍結可能であるか否か検討することである。

i) 細胞シート作製直前の状態で凍結保存

ii) 細胞シートの状態で凍結保存

3. 研究の方法

(1) ヒト線維芽細胞シート

ヒト線維芽細胞が、24-well plate に対しては、1 ウェルに 5×10^5 cells/2mL 培地、12-well plate に対しては、1 ウェルに 1×10^6 cells/4mL 培地で播種され、3 日間培養された。細胞シート作製の為に、10PU/mL ディスパーゼで処理することで、ヒト線維芽細胞シートが作製された。

(2) 細胞保存液

1 ウェルに対する細胞保存液量は、24-well plate では 300 μ l、12-well plate では 1000 μ l とし、下記の 11 種類の細胞保存液が使用された。a~c は DMSO 含有細胞保存液であり、d~k は DMSO を含有していない細胞保存液である。

実験での記号	細胞保存液の商品名	メーカー名
a	STEM-CELLBANKER® GMP grade	ZENOAQ RESOURCE CO., LTD
b	Bambanker® hRM	Nippon Genetics Co., Ltd.
c	Bambanker	Nippon Genetics Co., Ltd.
d	STEM-CELLBANKER® DMSO Free GMP grade	ZENOAQ RESOURCE CO., LTD
e	Cell Reservoir One (without DMSO)	Nacalai Tesque, Inc.
f	Cryo Scarless DMSO Free	BioVerde
g	Bambanker DMSO Free	Nippon Genetics Co., Ltd.
h	Stem Cell Keep	BioVerde
i	ThelioKeep	BioVerde
j	Cellvation	Protide Pharmaceuticals, Inc.
k	Repro Cryo RM	REPROCELL

(3) 凍結保存

凍結装置として、再生医療向け 3D フリーザー (# KRM-7BR-200B、株式会社コガサン)、および、プログラムフリーザー (ストレックス社) が使用された。

24-well plate および 12-well plate を再生医療向け 3D フリーザーで、-35℃、20 分間の凍結後、24-well plate および 12-well plate を -80℃ で 2 時間保管した。

24-well plate をプログラムフリーザーにより、以下の条件で凍結した。

始めに、4℃、5 分、次に、-30℃までは -2℃/分で冷却、そして、-30℃、5 分後に、-80℃までは -1℃/分で冷却した。プログラム終了後、24-well plate を -80℃ で 2 時間保管した。

(4) 細胞生存率アッセイおよび ELISA アッセイ

細胞生存率は、MTS 試薬 (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay、プロメガス社) で評価され、非凍結線維芽細胞を 100% として計算した。

培養液中の HGF および TGF- β 1 の濃度は、R&D Systems® ELISA Kits (# DHG00B and # DB100B, R&D Systems) で測定された。

4. 研究成果

(1) 細胞シート作製直前の状態で凍結保存

図 1 は、ヒト線維芽細胞を 24-well plate に播種して 3 日間培養後に、各細胞保存液と凍結装置で凍結後に、-80°C で保管し、解凍後の細胞生存率を評価した結果である。

図 1 の A~D の結果は以下である。

A : プログラムフリーザー凍結。解凍して 24 時間後の細胞生存率

B : プログラムフリーザー凍結。解凍して 3 日後の細胞生存率

C : 再生医療向け 3D フリーザー凍結。解凍して 24 時間後の細胞生存率

D : 再生医療向け 3D フリーザー凍結。解凍して 3 日後の細胞生存率

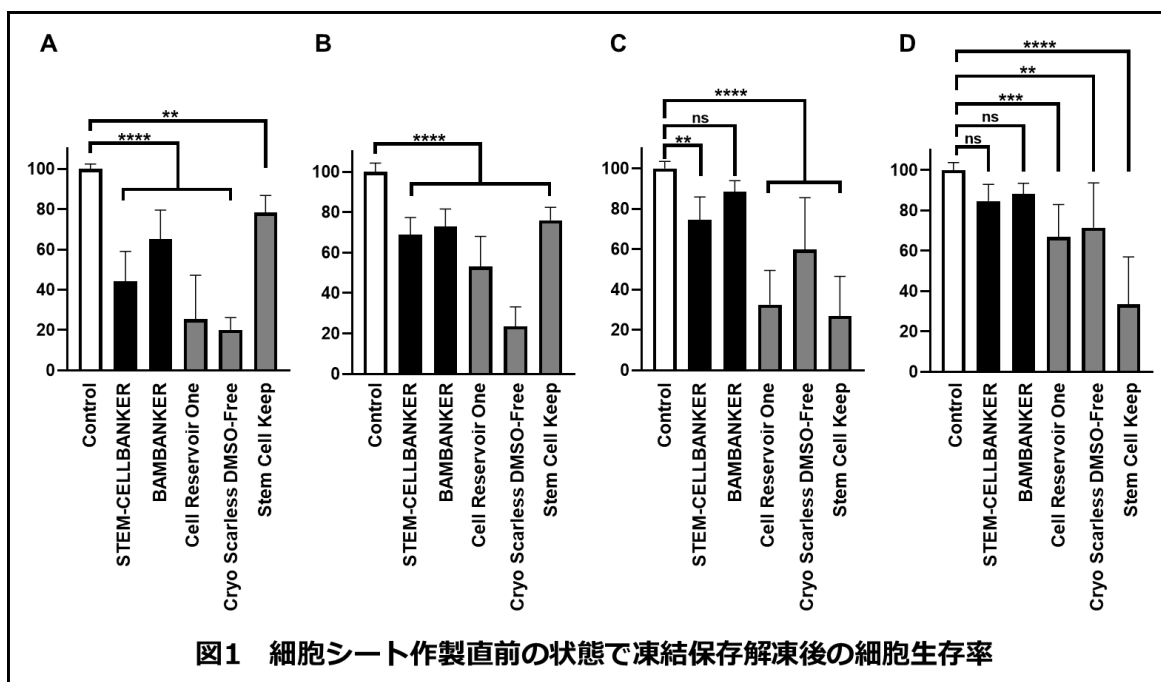


図1 細胞シート作製直前の状態で凍結保存解凍後の細胞生存率

プログラムフリーザー凍結では、細胞保存液として、Stem Cell Keep を使用した場合、解凍して 24 時間および 3 日後の細胞生存率は約 80% という高い細胞生存率を示す結果であった。

再生医療向け 3D フリーザー凍結では、細胞保存液として、STEM-CELLBANKER® GMP grade および Bambanker を使用した場合、解凍して 24 時間および 3 日後の細胞生存率は約 80% という高い細胞生存率を示す結果であった。

(2) 細胞シートの状態で凍結保存

図 2 は、ヒト線維芽細胞を 12-well plate に播種して 3 日間培養後に、ディスペルゼ処理で作製した細胞シートを各細胞保存液と再生医療向け 3D フリーザー凍結装置で凍結後に、-80°C で保管し、解凍後の細胞生存率および細胞シートが分泌した HGF、TGF- β 1 を測定した結果である。

図 2 の A~D の結果は以下である。

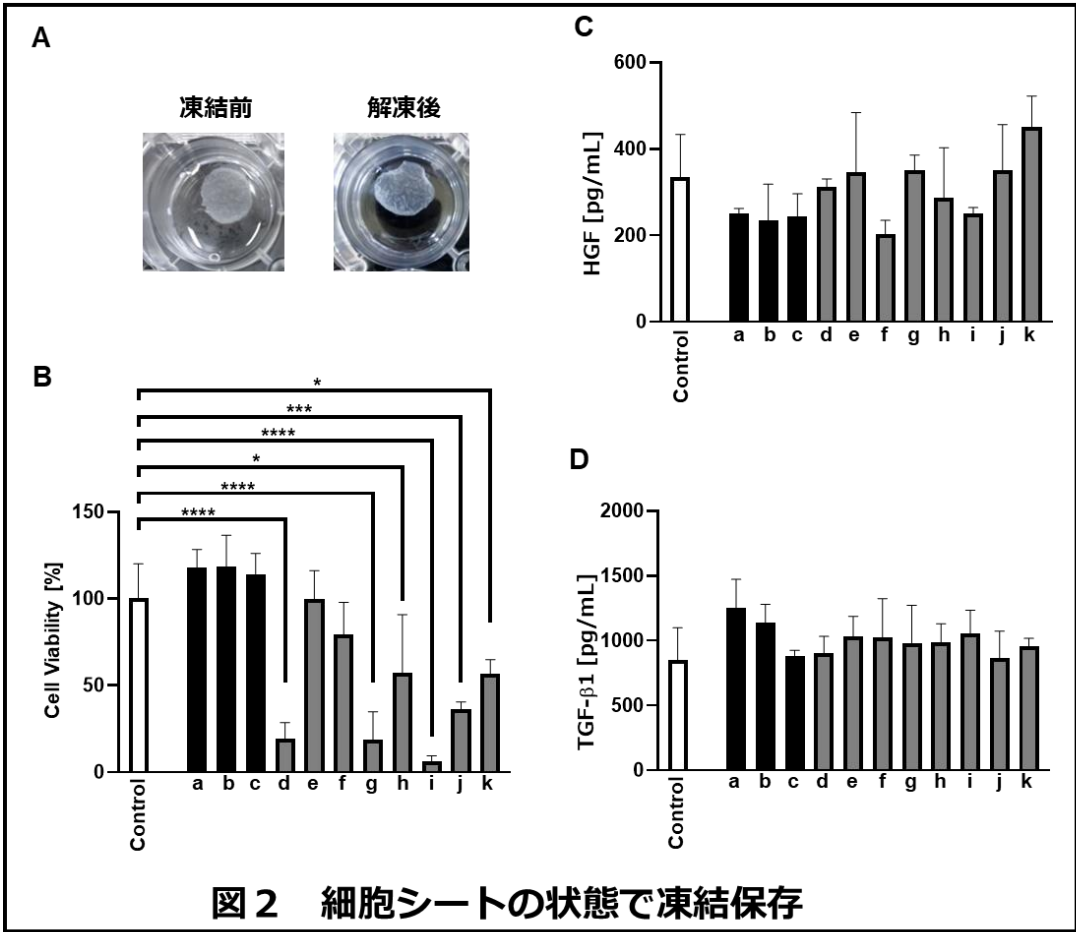
A : Bambanker® hRM での凍結前後のヒト線維芽細胞シートの写真

B : 再生医療向け 3D フリーザー凍結。解凍して 3 日後の細胞生存率

C : 再生医療向け 3D フリーザー凍結。解凍して 3 日後の培養上清の HGF 濃度

D : 再生医療向け 3D フリーザー凍結。解凍して 3 日後の培養上清の TGF- β 1 濃度

図 2A が示すように、凍結前後でヒト線維芽細胞シートの形態が大きく変化することはなかった。細胞シートの状態で、再生医療向け 3D フリーザーで凍結したところ、STEM-CELLBANKER® GMP grade、Bambanker® hRM、Bambanker、Cell Reservoir One (without DMSO)、Cryo Scarless DMSO Free の細胞保存液では、Control である非凍結線維芽細胞シートと比較して、細胞生存率に有意差はなかった。解凍して 3 日後の培養上清の HGF 濃度および TGF- β 1 濃度は、Control に対して、11 種類の細胞保存液は有意差はなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ueno Koji, Ike Soichi, Yamamoto Naohiro, Matsuno Yutaro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Katsura Shunsaku, Shirasawa Bungo, Hamano Kimikazu	4. 巻 28
2. 論文標題 Freezing of cell sheets using a 3D freezer produces high cell viability after thawing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101169 ~ 101169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101169	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桂春作、井上貴之、濱野公一
2. 発表標題 プレクチン遺伝子異常による幽門閉鎖合併型先天性表皮水疱症の1例
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上貴之、桂春作、濱野公一
2. 発表標題 後腹膜奇形腫の術後にHirschsprung病と診断した21 trisomyの1例
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桂春作、井上貴之、濱野公一
2. 発表標題 メッケル憩室を原因とした絞扼性腸閉塞症の2例
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上貴之、桂春作、濱野公一
2. 発表標題 Anomalous congenital bandによる腸閉塞症を呈した新生児の1例
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------