

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463179

研究課題名(和文) 磁場を利用した骨髄間葉系幹細胞の凍結保存法の確立

研究課題名(英文) Cryopreservation of rat MSCs by use of a programmed freezer with magnetic field.

## 研究代表者

加来 真人 (Kaku, Masato)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：10325194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系幹細胞の凍結保存を行った結果、磁場強度0.1mTの条件下で解凍直後の細胞生存率、および解凍後の細胞増殖能は最大値を示した。磁場を付与した群、磁場無し群、および未凍結群の3群において骨分化能、脂肪分化能を比較した結果、未凍結群と磁場を付与した群では有意な差が認められなかったが、磁場無し群、Direct群ではその分化能が有意に低下していた。これらの群における欠損部骨再生の組織学的観察を行った結果、未凍結群と磁場を付与した群では移植24週経過時において、骨再生が観察されたが、磁場なし群においては16、24週では欠損部中央付近を中心としてわずかな再生骨組織を形成するにとどまった。

研究成果の概要(英文)：Survival and proliferation rates of MSCs were significantly higher in CAS freezer than in the non-magnetic freezer. Alizarin positive reaction, large amount of calcium quantification, and greater alkaline phosphatase activity were shown in both the non-cryopreserved and CAS groups after osteogenic differentiation. Moreover, Oil Red O staining positive reaction and high amount of PPAR and FABP4 mRNAs were shown in both the non-cryopreserved and CAS groups after adipogenic differentiation.

Animal studies indicate that MSCs survival and proliferation rates were significantly higher in the CAS group than in the Direct group. In the Control and CAS groups, a large amount of new bone formation and a suture-like gap was identified 24 weeks after transplantation, whereas only a small amount of new bone formation was observed in the Direct group.

研究分野：再生医療

キーワード：骨髄間葉系幹細胞 凍結保存 磁場 細胞移植 骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

現在、口蓋裂患者の治療には、一次口蓋形成手術が一般的に行われており、摂食・構音機能の回復が図られる。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は患者にとって大きな負担であるため、新たな手法が期待される。一方、骨髄中には骨芽細胞や軟骨細胞への分化が可能な間葉系幹細胞 (MSCs) が含まれており、歯科領域では口蓋裂患者への骨再生、歯周治療、インプラント埋入時の骨造成などへの臨床応用が期待されている。しかしながら、欠損部が大きい場合や再手術を要する場合には、MSCs を再度骨髄より採取する必要があり、患者に大きな負担がかかることから、細胞の長期保存が不可欠であると考えられてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、磁場を利用した CAS フリーザーを用いて MSCs の凍結保存を行い、その有用性を検討することにより自家 MSCs 移植の応用範囲を拡大することを目的とした。まず、最終到達温度、植氷時間、磁場強度および凍害防止剤の違いが凍結保存後の MSCs の生存率と増殖能に対する影響を検討した。次に、凍結処理が培養 MSCs の分化能に与える影響を検討するため、骨分化能、および脂肪分化能について未凍結群との比較を行った。さら

に、1年間凍結保存を行ったラット MSCs をラット頭蓋骨に作製した骨欠損部に移植し、4、8、12、24週目に組織学的観察を行い、凍結後の MSCs の骨および縫合部組織再生能について検討を行った。

## 3. 研究の方法

磁場を利用したプログラムフリーザーが骨髄由来 MSCs の

生存に及ぼす影響

### 1) 細胞採取と培養

2 - 1) 至適最終到達温度, 植氷時間, 磁場強度についての検討

### 2 - 2) 細胞生存率および細胞増殖能の検討

凍結保存した MSCs の分化能について

#### 1) 骨芽細胞への分化

##### 1 - 1) 細胞採取と培養

##### 1 - 2) アリザリン染色

##### 1 - 3) DNA 定量

##### 1 - 4) アルカリフォスファターゼ活性

##### 1 - 5) カルシウム定量

#### 2) 脂肪細胞への分化

##### 2 - 1) 細胞採取と培養

##### 2 - 2) Oil Red O 染色

##### 2 - 3) 遺伝子発現量の比較

凍結保存した MSCs の骨および縫合部再生能の検討

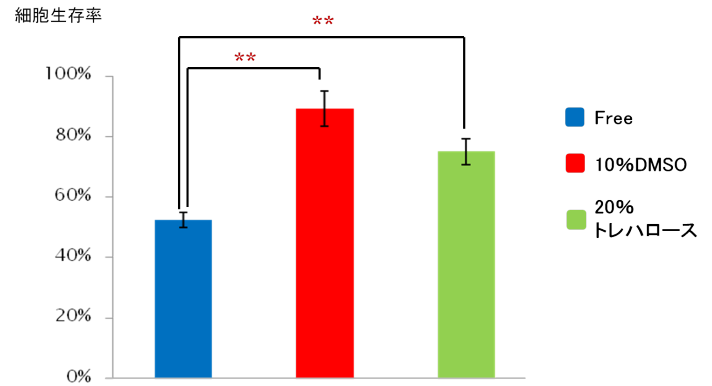
##### 1) 細胞の凍結

- 2) 骨欠損部の作製
- 3) 頭頂骨骨欠損部への移植
- 4) X線写真撮影
- 5) 組織学的観察
- 6) 有意差検定

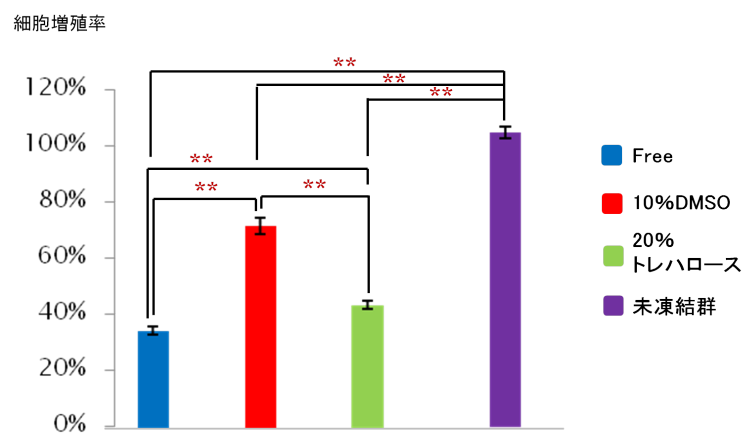
#### 4. 研究成果

1. 凍結保存液に 10%DMSO を用い、最終到達温度 -30℃、植氷時間 15 分間、磁場強度 0.1mT の条件下で MSCs を凍結保存した結果、解凍直後の細胞生存率は約 90%であった。また、解凍後 48 時間培養した細胞については約 70%の細胞増殖能を示した。

凍害防止剤として 20%トレハロースを用いた場合、解凍直後の細胞生存率は約 75%を示したものの、細胞増殖能は約 45%と小さい値を示した。DMSO にトレハロースを添加した群は 20%トレハロース群および凍害防止剤を含まない群と比較し、良好な結果が得られたが、10% DMSO 群と比較すると生存率、増殖能ともに有意に小さい値を示した(図 1、2)。

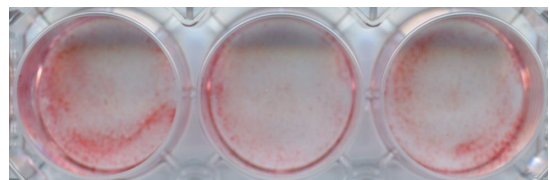


(図 1) 解凍直後の細胞生存率

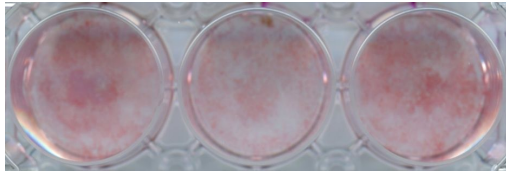


(図 2) 48 時間培養後の細胞増殖能

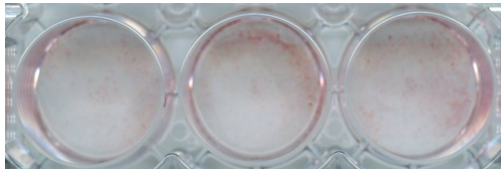
2. CAS 群、磁場無し群、Direct 群、および未凍結群の 4 群において骨分化能、脂肪分化能を比較した結果、未凍結群と CAS 群では有意な差が認められなかったが、磁場無し群、Direct 群ではその分化能が有意に低下していた(図 3)。



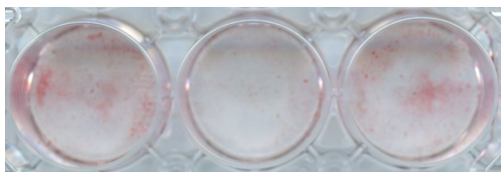
(図 3 - 1 : 未凍結群アリザリン染色)



(図3 - 2 : CAS 群アリザリン染色)



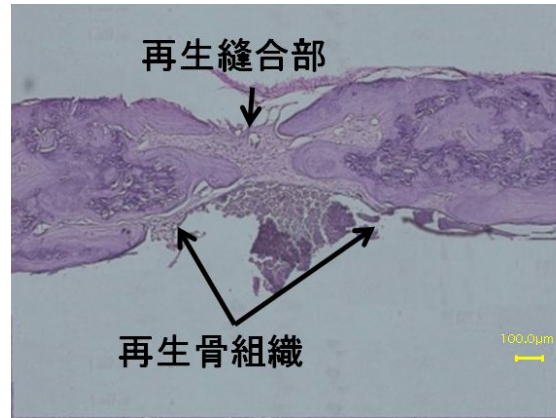
(図3 - 3 : 磁場なし群アリザリン染色)



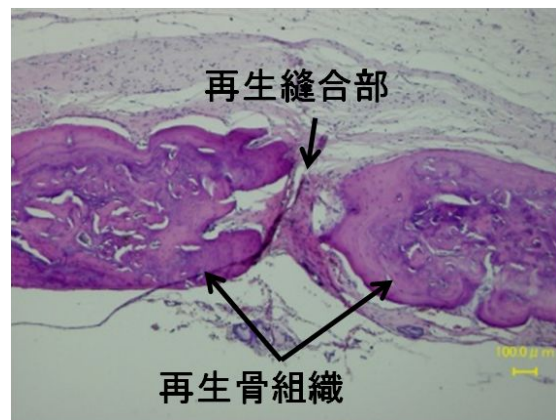
(図3 - 4 : Direct 群アリザリン染色)

3. CAS 群、Direct 群、未凍結群および未処置群の 4 群における欠損部骨再生の組織学的観察を行った結果、MSCs 移植後 4、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は顕著な骨新生を認め、移植 24 週経過時には、さらに骨再生が進み、血管、結合組織に富む縫合部の再生が観察された。一方、Direct 群および未処置群においては 16、24 週では欠損部中央付近を中心とせずかな再生骨組織を形成するにとどまり、縫合部組織の再生も確認できなかつた(図4)。

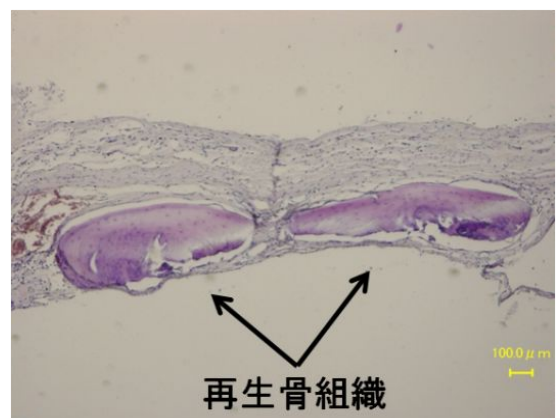
つた(図4)。



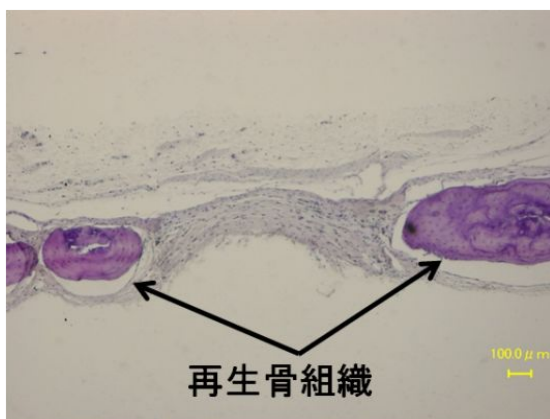
(図4 - 1 : 未凍結群)



(図4 - 2 : CAS 群)



(図4 - 3 : Direct 群)



(図4 - 4 : 無処置群)

以上の結果より、磁場を利用したプログラムフリーザーにおける MSCs の至適凍結条件が明らかになった。また、凍結後の MSCs は、高い生存率および増殖能を有するのみならず、分化能においても凍結前と比較して差のないことが明らかとなった。さらに、組織レベルにおいても、移植後に骨と縫合組織の再生が生じることが示された。このことから、MSCs の長期凍結保存とその後の移植が可能であり、さまざまな治療における有用性が明確に実証された。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Kojima S-I., Kaku M., Kawata T., Motokawa M., Sumi H., Shikata H., Abonti TR., Kojima S-T., Yamamoto T., Tanne K., Tanimoto K., Cranial suture-like gap and bone regeneration after transplantation of cryopreserved MSCs by use of a programmed freezer with magnetic field in rats. Cryobiology, 70, 262-268, 2015. (査読有り)
  2. Kaku M., Koseki H., Kojima S-I., Sumi H., Shikata H., Kojima S-T., Motokawa M., Fujita T., Tanimoto K., Tanne K., Cranial bone regeneration after cranioplasty using cryopreserved autogenous bone by a programmed freezer with a magnetic in rats. Cryo letters, 35:451-461, 2014. (査読有り)
  3. Kojima S., Kaku M., Kawata T., Sumi H., Shikata H., Abonti TR., Kojima S-T., Fujita T., Motokawa M., Tanne K. Cryopreservation of rat MSCs by use of a programmed freezer with magnetic field. Cryobiology, 67, 258-263, 2013. (査読有り)
- [学会発表](計5件)
- 1: A case of autotransplantation of a cryopreserved tooth with magnetic field programmed freezer.: Shikata H., Kaku M., Motokawa M., Kojima S., Sumi H., Kojima S., Tanne K., Tanimoto K.: American association of orthodontists meeting (San Francisco, CA, USA), May 15-19, 2015.
  - 2: 磁場を利用したプログラムフリーザーによる間葉系幹細胞の凍結、解凍を行った MSCs の骨再生誘導能への影響: 四方花佳, 加来 真人, 小島 俊逸, 角 明美, 小島 将督, 山本 多栄子, 河田 俊嗣, 丹根 一夫, 谷本 幸太郎.: 第74回日本矯正歯科学会大会(福岡), 2015.
  - 3: 磁場を利用したプログラムフリーザーによる間葉系幹細胞の凍結、解凍を行った MSCs の骨再生誘導能への影響: 四方花佳, 加来 真人, 小島 俊逸, 谷本 幸太郎.: 第39回日本口蓋裂学会総会・学術集会(東京), 2015年11月18~20日.
  - 4: ラット正中矢状縫合部骨欠損へ移植した凍結骨髄由来間葉系幹細胞の組織再生誘導能: 小島俊逸, 加来真人, 小島将督, 谷本幸太郎.: 第38回日本口蓋裂学会(札幌), 2014年5月29~30日.
  - 5: 磁場を利用したラット骨髄由来間葉系幹細胞の長期凍結保存法の確立: 小島俊逸, 加来真人, 河田俊嗣, 本川雅英,

藤田 正, 大谷淳二, 角 明美, 四方花  
佳, 丹根一夫.: 第46回広島大学歯学会  
総会 (広島), 2013年6月8日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
有限会社スリーブラケッツ  
<http://www.teethbank.jp/list.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加来真人 (Kaku Masato)  
広島大学・大学病院・講師  
研究者番号: 10325194

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

( )

研究者番号: