

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670837

研究課題名(和文) 変動磁場を用いた新たな細胞・組織の凍結保存方法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel cell and tissue freezing technology using variable magnetic field

研究代表者

各務 秀明 (Kagami, Hideaki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80242866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療の普及には細胞を遠方まで輸送する技術が重要である。しかしながら、細胞は輸送によりダメージを受けるため、現在の技術では高い生存率を保ったままでの長時間輸送は困難である。その解決のためには、凍結による輸送が効果的である。また、再生医療で用いられる細胞は患者本人、あるいはドナー由来の細胞であり、必要時に採取することは負担が大きい。あらかじめ採取して凍結保存することで、安定した細胞の供給が可能となる。本研究では、変動磁場を用いて、食品で使用されている技術を応用した新たな細胞保管技術を開発した。また、幹細胞の保管方法として、組織を直接凍結し、解凍後に幹細胞を採取する方法の有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：For the wide acceptance of regenerative medicine, the development of cell transportation technology is important. However, currently available technologies are not capable to transport living cells for a long distance. Accordingly, freezing is a promising approach to solve this problem. Tissue engineering utilize cells from patient or donors. Harvesting cells at each treatment is a burden for patients. Cell freezing technology is also beneficial for the stable supply of stem cells. In this study, freezing technology from food industry was introduced and modified to achieve higher living ratio after freeze-thaw cycle. Furthermore, we also investigated the usefulness of direct tissue freezing strategy, which enables cultivation of stem cells from frozen tissue in the future.

研究分野：口腔外科学

キーワード：凍結保存法 凍結生物学 細胞 再生医療 解凍

1. 研究開始当初の背景

再生医療は基礎研究から実用化を視野に置く段階になっているが、実用化に向けた最重要課題の一つは、細胞の安全な輸送方法の確立である。培養細胞は生きたまま輸送する必要があるが、通常細胞をシャーレ等から酵素によって剥離し、培養に用いた培養液を極力洗浄して除去した後、生食水等に懸濁して搬送される。これは、培養中に本来ヒトへ投与することを想定されていない試薬を使用するためである。しかしながら、生食水に懸濁した状態の細胞は長時間生存することは困難であり、臨床上安全に輸送できるのは院内、あるいは近隣の医療施設に限られてしまうのが現状である。一方、細胞の輸送に最も適した状態は、凍結である。凍結された細胞は長期間保存可能であるのみならず、振動や栄養供給の問題を回避することができる。しかしながら、現在の凍結方法は細胞の凍結保護剤を添加することが必要であり、凍結保護剤の細胞毒性のため、投与前に解凍後の細胞を再び洗浄する必要がある。洗浄には専用の施設や技術者が必要であるため、せっかく凍結により輸送を行うことができても、一般の医療施設では使用することはできない。しかしながら、凍結保護剤を用いない凍結が可能となれば、解凍後ただちに細胞を患者へ投与することが可能であり、施設の有無を問わず、あらゆる施設で細胞治療が可能となる。

2. 研究の目的

再生医療の普及には、細胞を遠方まで輸送する技術が重要である。しかしながら、細胞は輸送中の温度変化や振動、あるいは栄養供給の不足によりダメージを受けるため、現在の技術では高い生存率を保ったままでの長時間輸送は困難である。この問題を解決するためには凍結状態での輸送が望ましいが、凍結には細胞毒性のある凍結保護剤の使用が必須であるため、解凍後ただちに細胞を投与することはできない。近年、変動磁場を用いる新たな凍結方法が開発され、食品などで実用化されている。本研究では、この変動磁場による凍結法の原理をさらに進め、誘導電流制御による新たな細胞凍結技術の開発を行う。磁場のみでなく細胞に流れる誘導電流を制御することで凍結保護効果を高め、凍結保護剤を用いない細胞凍結技術を実用レベルまで到達させる。

3. 研究の方法

本申請では、マウス皮膚組織、および皮膚組織由来の線維芽細胞を用いて、凍結保護剤を用いない条件における細胞凍結方法を開発する。初めに線維芽細胞を用意し、変動磁場を用いたプログラムフリーザー(CAS システム)を用いて、これまでの予備実験で得られた条件を中心に、磁場の強度と周波数を最適化する。細胞は解凍後の生存率、翌日の生存率、および継代された細胞の増殖率を検討す

る。さらに、独自に作製した誘導電流の発生装置を用いて直流と交流を印加し、それぞれの電圧をコントロールすることで細胞内に流れる誘導電流のレベルを変化させる。この誘導電流レベルの最適化に加えて、生体に安全な添加物を用いることで、目標とする生存率(50%)を目指す。細胞に対する凍結方法に一定の効果が得られた場合には、組織のまま凍結するための条件についても検討し、同様に最適化を行う。

4. 研究成果

本研究では、マウス皮膚由来線維芽細胞を用意し、変動磁場を発生するプログラムフリーザーを用いて解凍後の生存率、翌日の生存率、および継代された細胞の増殖率を検討した。具体的には P1 のマウス線維芽細胞を用い、 5×10^5 個の細胞を 1ml の 100% PBS に懸濁して凍結チューブに入れ、強度(電圧)および変化率(周波数)を変化させ、細胞凍結を行った。翌日、凍結した細胞を解凍し、生細胞数をカウントした後、10cm ディッシュに播種した。培養1日後、細胞を回収して再び生細胞数をカウントし、生細胞数と精細胞率を産出した。細胞は 10Hz、1V において最も高い生存率を示し、磁場を用いない場合の生存率と比較して平均 5 倍となった(図1)。生存率は実験によるバラツキがあるものの、20 - 45% の間で変動した。

次に、組織のまま凍結するための条件についても検討した。剃毛したマウス皮膚から径 5mm 大の組織を切り出した。丁寧に脂肪組織を除去し、始めに 10% DMSO を含む培地中で凍結を行った。解凍後に explant culture を行い、細胞数、幹細胞マーカーの発現、コ

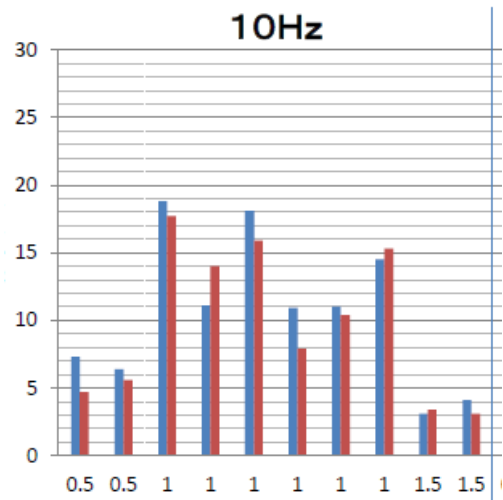


図1 凍結解凍翌日の生存率

ラーゲンの産生能を測定した。コントロールとして、凍結を行わずに培養した細胞を細胞の状態凍結、解凍したものをを用いた。得られた細胞は CD105 など幹細胞マーカーを発現し、そのプロファイルはほぼ直接培養を行った群と同様であった(図2, 図3)。

Tube 6 (DMSO frozen mouse C CD49b, CD29, CD105)

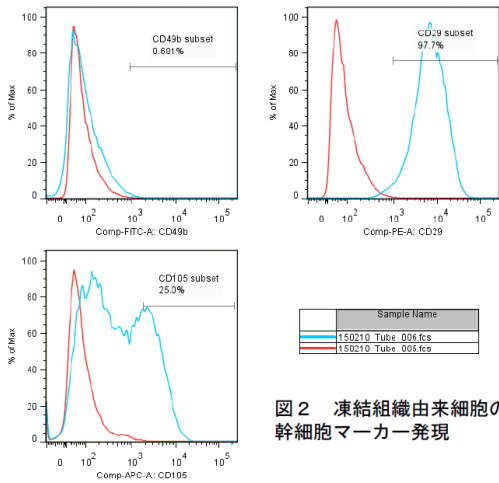


図2 凍結組織由来細胞の幹細胞マーカー発現

Tube 2 (no freeze mouse C CD49b, CD29, CD105)

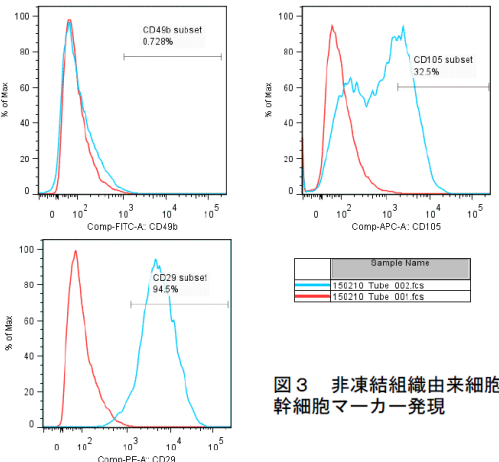


図3 非凍結組織由来細胞の幹細胞マーカー発現

一方凍結保護材を用いない条件では、十分な生細胞数を得ることが困難であった。直流および交流を印加可能な装置を用いてさまざまな条件下で解凍直後（図4）および継代後の細胞増殖率（図5）を測定した。生存率は総合的には印加による有意な改善を認める条件を見いだすことはできなかった。

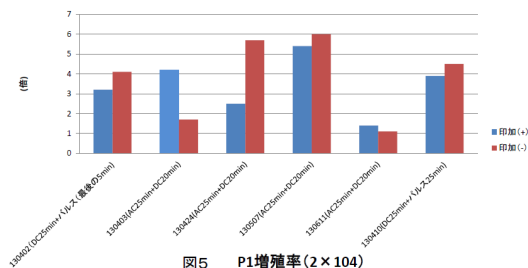


図5 P1増殖率(2×10⁴)

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 6件)

Kagami H. The potential use of cell-based therapies in the treatment of oral diseases.

Oral Dis. (査読有) in press

Akiyama H, Kobayashi K, Ichimura M, Tone H, Nakatani M, Inoue M, Tojo A and

Kagami H. Comparison of Manual and Automated Cultures of Bone Marrow Stromal Cells for Bone Tissue Engineering.

J Bioeng Biosci (査読有) in press.

Zhang Y, Li X, Chihara T, Mizoguchi T,

Hori A, Udagawa N, Nakamura H,

Hasegawa H, Taguchi A, Shinohara A,

Kagami H. Comparing immunocompetent and immunodeficient mice as animal

models for bone tissue engineering. Oral

Dis. (査読有) in press.

Osanai H, Kuroiwa H, Uchida K, Kagami H.

Yamada K, Taguchi A. Sonographic

appearances of cervical lymph nodes in

healthy young Japanese adults: Association

with age, sex, and body mass index. J Clin

Ultrasound. (査読有) in press

Yamada S, Uchida K, Iwamoto Y, Sugino N,

Yoshinari N, Kagami H. Taguchi A.

Panoramic radiography measurements,

osteoporosis diagnoses and fractures in

Japanese men and women. Oral Dis. (査読

有) in press

Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H.

Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R.

Characterization of time-course

morphological features for efficient

prediction of osteogenic potential in human

mesenchymal stem cells. Biotechnol Bioeng.

(査読有) Vol.111, No.7, 2014,

pp1430-1439.

Xia D, Sumita Y, Liu Y, Tai Y, Wang J,

Xia D, Sumita Y, Liu Y, Tai Y, Wang J,

Uehara M, Agata H, Kagami H, Fan Z, Asahina I, Wang S, Tran SD. GDFs promote tenogenic characteristics on human periodontal ligament-derived cells in culture at late passages. Growth Factors. (査読有) Vol. 31, No. 5, 2013, 165-713.

Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. PLoS One. (査読有) Vol. 8, No. 2, 2013, e55082.

〔学会発表〕(計 12件)

長内秀、内田啓一、高田匡基、落合永隆、嶋田勝光、杉野紀幸、黒岩博子、山田真一郎、望月慎恭、藤木知一、各務秀明、篠原淳、長谷川博雅、田口明 上顎洞内部に広範囲に進展した含歯性嚢胞の1例 NPO法人日本歯科放射線学会 第219回関東地方会・第34回北日本地方会 第22回合同地方会(松本歯科大学)

山田真一郎、内田啓一、杉野紀幸、吉成伸夫、各務秀明、田口明 パノラマX線写真による骨粗鬆症スクリーニング指標と骨粗鬆症診断歴および骨粗鬆症性骨折歴との関 NPO法人日本歯科放射線学会 第219回関東地方会・第34回北日本地方会 第22回合同地方会(松本歯科大学)

堀暁子、縣秀樹、上嶋伸知、東條有伸、各務秀明 骨髄単核球による放射線性唾液腺萎縮の機能回復 第13回日本再生医療学会総会 2014.3.4-6 (京都国際会議場)

張以鳴、李憲起、千原隆弘、篠原淳、各務秀明 Effect of immunological reaction on the process of bone regeneration. 第1回日本骨免疫会議. 2014.7.4 (沖縄万国津梁館)

小林明人、定岡直、高田匡基、柴田玲、谷川徹、八上公利、各務秀明、篠原淳 アディポネクチンノックアウトが下顎骨骨密度に及ぼす影響 2014.7.12 第78回松本歯科大学歯学会 (松本歯科大学)

各務秀明、下顎大臼歯部の欠損にインプラント治療を行った1症例 2014.9.11 第44回日本口腔インプラント学会学術大会 (東京国際フォーラム)

各務秀明、井上実、田口明、朝比奈泉 「自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生臨床研究：長期経過に関する検討」 2014.9.13 第44回日本口腔インプラント学会学術大会 (東京国際フォーラム)

小林明人、八上公利、下地茂弘、丸川和也、高田匡基、各務秀明、篠原淳「アディポネクチンは下顎関節突起と下顎骨体部の骨密度に対し逆に作用する」 2014.10.18 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会 (幕張メッセ)

千原隆弘、李憲起、篠原淳、各務秀明 免疫応答が骨再生過程に及ぼす影響に関する検討. 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2014.10.18(幕張メッセ)

森こずえ、丸川和也、千原隆弘、宮林秀企、李憲起、落合永隆、嶋田勝光、杉野紀幸、内田啓一、長谷川博雅、田口明、篠原淳、各務秀明 上顎前歯部歯根膜周囲に生じた腺腫様歯原性腫瘍の1例 2014.11.8 第15回長野県口腔外科談話会 (松本歯科大学)

斉藤安奈、高田匡基、下地茂弘、小林明人、各務秀明、篠原淳ビスフォスフォネート関連顎骨骨壊死発症予測に関する臨床的検討 2014.11.8 第15回長野県口腔外科談話会(松本歯科大学)

李憲起、千原隆弘、篠原淳、各務秀明 免疫正常マウスを用いた骨再生過程の解

析．第 18 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会．2014.11.29（ビッグハード出雲）

〔図書〕（計 2 件）

Sumita Y, Asahina I, Tran SD, Agata H, Inoue M, Tojo A, Kagami H. Potential cell-based therapies for irreversibly damaged salivary glands and atrophic alveolar bone. "New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine - Official Book of the Japanese Society for Regenerative Medicine", ed. Hibi H, and Ueda M., Open access, 2014, Intech.

Kagami H. Optimization of stem cell expansion, storage, and distribution. Chapter 25, in "Stem Cell Biology and Tissue engineering in Dental Science", Eds. Ajaykumar Vishwakarma, Paul Sharpe, Songtao Shi and Murugan Ramalingam. pp. 323-331, 2014 Elsevier.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

各務 秀明（KAGAMI, Hideaki）

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80242866

(2)研究分担者

相良 洋（SAGARA Hajime）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50145041

(3)連携研究者

李 憲起（LI Kenki）

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：60350831