

氏名	ことぶきのりこ 壽典子
学位の種類	博士（再生医科学）
学位記番号	乙第1号
学位授与年月日	平成18年 1月 6日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow derived mesenchymal cells (冷凍保存したヒト骨髄由来間葉系細胞の生存率と骨化能)
学位論文審査委員	(主査) 押村光雄 (副査) 畠義郎 汐田剛史

## 学位論文の内容の要旨

間葉系幹細胞は多分化能が報告されており、再生医療への実用化が期待されている。申請者はこれまでに間葉系幹細胞を *in vitro* の生体材料上で骨分化誘導し、作製された細胞と生体材料とのハイブリッド（再生培養骨）を患者に移植するという臨床応用研究に携わってきた。これまでのところ、初代培養した間葉系幹細胞、すなわち冷凍保存を経していない間葉系幹細胞のみが臨床応用研究に使用されていた。しかし、この間葉系幹細胞が冷凍保存可能であり、かつ解凍後の細胞が高い生存率と分化能を保持していれば、再生医療への応用範囲が広がると考えられる。

本論文では冷凍保存したヒト間葉系細胞の生存率と、非冷凍間葉系細胞と比較した骨分化能を28症例の間葉系細胞を使用して網羅的に解析した。

### 方法

インフォームドコンセントを行った上で得られた28症例の骨髄から間葉系細胞を増殖させた。これらの細胞は15%ウシ血清と抗生物質存在下の $\alpha$ MEM培地(Invitrogen)で維持培養される。これらの細胞をトリプシン処理後、 $2 \times 10^4$  cells/wellで12wellプレートに播種し、二週間の骨分化誘導を行った（対照群）。また $5 \times 10^5$  cells/mLの細胞濃度で冷凍保存液（セルバンカー、十慈フィールド）中に保存した。保存温度は $-80^{\circ}\text{C}$ であり、特別なプログラムフリーズは行っていない。これらの冷凍保存した細胞を解凍し、生存率を死細胞のPI染色を原理とした細胞生存率測定器（ヌクレオカウンター）にて測定した。その後12wellプレートに播種し、二週間の骨分化誘導を行った（比較群）。

骨分化誘導因子は0.07 mM アスコルビン酸と10 mM  $\beta$ グリセロリン酸、そして100 nM デキサメサゾンである。また、FACS解析用にT-75フラスコに播種し、表面抗原の発現解析を行っ

た。使用した抗体は CD14, CD34, CD29, CD45, CD105, HLA-DR である。骨分化誘導後の細胞は骨分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性とカルシウム量をそれぞれ定量した。

## 結 果

28 症例の骨髄から間葉系細胞を得た。そのうち、15 症例の間葉系細胞は冷凍保存と平行して、冷凍を経ずに骨分化誘導を行った。21 症例の冷凍保存した細胞の生存率は解凍後すぐに測定した。その生存率は 71.9-100%の範囲であり、平均 90%と高かった。また、その生存率は冷凍保存期間(0.3-37 ヶ月)に依存せず、維持されていた。

FACS による表面抗原の発現解析から冷凍・非冷凍保存細胞ともに血球系細胞のマーカーである CD14, CD34, CD45 は陰性かつ HLA-DR も陰性であることから、抗原提示細胞の存在も否定できる。また、MSC で高発現すると言われている CD29, CD105 はともに陽性であった。Kolmogorov-Smirnov 2 sample test からも冷凍・非冷凍細胞の発現パターンに差がないことが確認された。

つぎに、冷凍保存した間葉系細胞が骨分化能を保持しているか確認するために、解凍後の細胞を 12 well plate に播種し、2 週間骨分化誘導を行った。アルカリホスファターゼ活性・カルシウム量の定量値を 2 週間骨分化誘導した非冷凍細胞と比較してみると、アルカリホスファターゼ活性値は有意差がなかった。このことから、冷凍保存は間葉系幹細胞の骨分化能に影響を与えていないことがわかる。ただ、冷凍保存細胞のカルシウム量は非冷凍保存細胞よりも若干少なく、骨化が遅れている傾向にあった。しかし、冷凍保存細胞のうち、短期間冷凍保存した群(6 ヶ月以内)と長期間冷凍保存した群(33-37 ヶ月)で骨分化能を比較しても、アルカリホスファターゼ活性値やカルシウム量に有意差は見られず、長期の冷凍保存にも間葉系細胞は耐えうると確認された。

## 考 察

再生医療の発展に伴い、培養細胞が再生培養組織(生体材料と細胞のハイブリッド)を作製するのに広く用いられるようになってきた。また、申請者はこれまでに 30 例以上のヒト間葉系細胞を骨髄より分離培養して生体材料上で骨分化誘導させることで、変形性関節症や骨腫瘍などの手術に使用可能な再生培養骨を作製してきた。現在は患者自己由来の間葉系細胞を用い、冷凍保存を経ない細胞を使用しているが、今回の結果で、冷凍保存細胞も非冷凍細胞と同様の骨分化能を保持していることが確認されたので、今後冷凍保存細胞による再生医療も可能になると考えられる。

骨髄中に含まれる間葉系幹細胞の数は年齢とともに減少すると言われていることから、若い年齢の時に骨髄を採取し間葉系細胞を増殖させて冷凍保存しておき、必要なときに自分の間葉系細胞を解凍して用いることもできる。つまり、間葉系細胞バンクという構想である。

間葉系幹細胞は骨・軟骨以外にも神経や肝臓などの細胞へも分化することが報告されており、疾病の根治の手段として有用であることから、冷凍間葉系細胞が高い生存率と分化能を維持して

いることを確認した本論文は、再生医療の発展にとって重要な布石である。

## 結 論

冷凍保存したヒト間葉系細胞は0.3〜37ヶ月の保存を経ても平均90%の生存率を維持しており、冷凍を経ない間葉系細胞と同様の骨分化能を有していた。このことから、冷凍保存したか間葉系細胞の再生医療への有用性が示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、冷凍保存間葉系幹細胞と初代培養間葉系幹細胞の骨分化能を比較したものであり、冷凍保存間葉系幹細胞の再生医療への応用を検討したものである。その結果、冷凍保存間葉系幹細胞は長期間保存されたものでも約90%の生存率を有しており、骨分化能も初代培養細胞と遜色ないものであることが確認された。また、冷凍保存間葉系幹細胞は表面抗原発現も初代培養間葉系幹細胞と比較して変化していないことから、間葉系幹細胞としての基本的性質も維持していることが確認された。本論文は患者由来間葉系幹細胞の冷凍保存が可能であることを示しており、現在行われている初代培養の間葉系幹細胞をもちいた再生医療のみならず、冷凍保存間葉系幹細胞を用いた再生医療応用も可能であることを示唆したものであり、再生医療分野で明らかに学術水準を高めたものと認める。