学位論文

「Differentiation and proliferation potencies of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells after 1- to 20- year cryopreservation」

（1－20 年にわたり長期凍結保存したヒト骨組織由来間葉系細胞の分化能・増殖能の検討）

指導教授名　武田　啓

申請者氏名　杉本　佳香

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

〈背景〉

現在日本において口唇口蓋裂患者は新生児500人に1人の頻度で認められる先天性疾患である。その治療においては口腔外科・形成外科分野・言語を含む耳鼻咽喉科分野・産科小児科分野そして歯科分野による集学的アプローチが必要とされる。その中で骨移植は様々な時期に施行される可能性がある治療であり、顎裂部が最初の骨移植部位となる。顎裂部骨移植の目的は、①顎裂隣在歯の支持骨不足を補う②顎裂隣在歯の移植骨への萌出誘導③歯の矯正歯科的移動の場の確保④上顎歯列弓拡大・歯の配列後の後戻り防止⑤歯槽提の形成⑥鼻翼基部の陥凹の改善⑦鼻口腔瘻の閉鎖、である。このため永久犬歯萌出前の5歳から8歳頃に顎裂部への骨移植を行っているが、両側口唇口蓋裂や顎裂幅の広い片側口唇口蓋裂症例など、一度に十分量の骨形成が得られずに複数回の手術を要することも少なくない。また腸骨採取部位における合併症として感染や創の哆開、血腫、退行性神経損傷、上前腸骨棘の疲労骨折等も起こりえる。複数回手術が必要となった場合でも、採骨部の侵襲が最小限となるべく、我々は余剰海綿骨から骨組織由来間葉系細胞を得て、凍結保存を行い、手術時に再移植が可能であるか、多分化能や骨形成能、安全性を確認し、臨床応用に関して検討を重ねてきた。そこで本研究では、20年もの長期にわたる凍結保存による老化の影響と、多分化能及び骨形成能に関し調査し検討した。

〈対象・方法〉

当科にて顎裂部骨移植を行った症例の余剰腸骨海綿骨より得られたhuman Bone Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells (hBT-MSCs) を凍結保存した検体約20年目から1年目までの年代各3検体ずつ、合計15検体を解凍、再培養し本研究に用いた。生死判定はカルセイン－エチジウムホモダイマーⅢ染色後、共焦点顕微鏡で観察を行い、Water-Soluble Tetrazolium (WST) 法による細胞増殖試験を1週間行った。老化増殖因子であるSenescence-associated β-galactosidase(SA-βgal)はその過剰蓄積の有無を共焦点顕微鏡で観察した。分化能は骨・脂肪分化・非分化誘導群の3群で行った。骨分化、脂肪分化能は4週間培養継続し、アリザリンレッドS染色、カルシウム定量、オイルレッド染色を行い検討した。

〈結果〉

生死判定では凍結年数が長いほど生細胞が減り、老化判定では5年以降は同様な陽性反応を示し、年数依存性は認めなかった。細胞増殖試験では凍結年数による統計的有意

差は認めなかった。骨分化能及び脂肪分化能はそれぞれ非誘導群に比較し誘導群は統計的有意差をもって生成されているのを確認した。しかし各年代間での誘導群同士の有意差は認めなかった。

〈考察〉

長期凍結保存する際に知られる細胞に与える影響としては、細胞が凍結する際におこる障害として、細胞内氷晶形成に伴う物理的損傷と、凍結進行時の細胞内の高浸透圧化に伴う損傷の2つが知られている。また凍結速度（freezing rate）は、凍結融解(frozen-thawed)後の細胞の生存率に影響する最も重要な因子と考えられている。更に凍結細胞の解凍時には細胞内に形成された氷晶が大きくなる現象、再氷晶化(recrystallization）が発生する。今までの我々の凍結・保管・解凍の手順を振り返ると、細胞障害の中でも解凍時の再氷晶化に伴う障害が生じている可能性が高いことが推察された。しかし、今回のように20年もの長期凍結保存された間葉系細胞でも多分化能を有することが確認されたのは、より簡便な保存方法での凍結が可能となりうる点で、臨床応用を進める上でも、福音となりえる。

今回凍結された検体が凍結年数に依存し老化するものなのか、老化細胞の一種であるSA-βgalを老化の指標として細胞染色し確認した。今回継代数は2継代にそろえ、使用した細胞自体も細胞採取時年齢は若年であった。凍結という過程を経ることで高いβ-galactosidaseの活性が見られた。これは染色の結果に限って言えば凍結年数に依存せず、5年でも20年目と同様の高い活性がみられた。これら高いβ-galactosidaseの活性が見られた細胞の分化能の高さ(潜在能の高さ)に関しては、骨芽細胞分化能及び脂肪滴の発現に相関はみられず、高い分化能を有していた。今回の研究では、凍結により経時的に老化が進行する可能性は低いと推察された。

〈結論〉

20年間凍結保存した検体でも骨分化能及び脂肪分化能を有していることが分かった。しかしその分化能は骨分化あるいは脂肪分化のどちらかに傾く傾向があることが推定された。5年以降凍結した場合は年数を問わず同様の老化変化を呈し、凍結による老化は経時的には進行しない可能性が示唆された。長期凍結保存された検体に関して、我々のcell sourceは倫理面、安全面で優れている自家組織であることからも今後の臨床応用に有益と考えられた。

目次

頁

1．序論 ---------- 1

2．方法

2-1.　ヒト骨組織由来間葉系細胞（hBT-MSCs）の凍結保存と再培養---------- 1
2-2.　生死判定---------- 2
2-3.　細胞老化判定---------- 3
2-4.　細胞増殖試験---------- 3
2-5.　骨分化誘導・脂肪分化誘導---------- 3
2-6.　分化能の評価---------- 3
2-6-1.　骨分化能の評価---------- 3
①アリザリンレッドＳ染色---------- 3
②カルシウム定量---------- 4
2-6-2.　脂肪分化能の評価---------- 4
オイルレッド染色---------- 4
2-7.　統計解析---------- 4

3．結果

3-1.　生死判定---------- 4
3-2.　細胞老化判定---------- 5
3-3.　細胞増殖試験---------- 5
3-4.　各種分化能の確認---------- 5
3-4-1.　骨分化能について---------- 5
①アリザリンレッドＳ染色---------- 5
②カルシウム定量---------- 5
3-4-2.　脂肪分化能について---------- 5
オイルレッド染色---------- 5

4．考察

4-1.　凍結保存に関して---------- 6
4-2.　凍結により細胞は老化するかについて---------- 8
4-3.　長期凍結保存検体の安全性と今後の展望に関して---------- 9

5．総括 ---------- 9

6．今後の課題 ---------- 10

7．謝辞 ---------- 10

8．引用文献 ---------- 11

9．業績目録 ---------- 15

（10．図表 ---------- 16）

1．序論

骨組織は絶えず骨形成と吸収とを繰り返しており、常に古い骨が新しい骨に置き換わる現象を生じている活発な代謝機構を持ち、自然修復能の優れた組織である。しかし外傷や先天性疾患など、複雑な骨折や広範囲の骨欠損においては自然治癒が期待できないため骨移植手術を行う。骨移植には、自身の骨を移植する方法(自家骨移植)、他人の骨を移植する方法(他家骨移植)、並びに人工材料を移植する方法(人工骨移植)などがある。自家骨移植は骨再生が最も期待できるが、健常部を侵襲して骨を採取しなければならず、その量にも限りがある。他家骨移植は貯蔵した骨を用いるため、大量に使用できるという利点はあるが、他家骨の不均一性、移植免疫反応さらに感染のリスクが高いという問題点がある。一方人工骨は工業製品のため安定的に供給することができるが、人工骨は無機材料であり、これらのみでは生体内への移植により新生骨誘導能を発揮するのは困難である[1)]。唇顎口蓋裂は、日本人の新生児約500人に1人の頻度で認められる疾患である。機能獲得から形態改善まで多岐の目的のため複数回の手術を要し、正常咬合の獲得は重要な治療目的の一つである。このためには顎裂の骨欠損部に骨性再建をして歯牙の適切な萌出誘導を促す必要がある。現在、顎裂部に対しては自家腸骨海綿骨移植が一般的な治療である[2) 3)]。この顎裂部骨移植の初回手術時期は永久前歯が萌出する5～8歳時であるが、一度の骨移植で目的を達しえるとは限らず、低年齢で海綿骨が十分に採取できない症例や移植骨が吸収される症例などでは手術が複数回必要となる。そこで我々は、この手術侵襲を軽減する目的で再生医工学による代替骨の開発研究を行っている。代替骨の研究では一般にcell sourceを骨髄穿刺により得られる間葉系幹細胞としているのに対して、我々は顎裂部骨移植時にdonorとして用いられる腸骨組織の余剰となった骨組織から、初代培養でout growthしてくる間葉系細胞[4) 5)]の臨床応用を目差して基礎研究を行っている。これまでにhBT-MSCsの分離・増殖・凍結保存法を確立し[6)]、長期に凍結保存されたhBT-MSCsによるハイブリッド型人工骨の開発[7)]、またマウスにおける背部皮下組織内[8)]と、更にラットの頭蓋骨欠損部モデル作成時[9)]のhBT-MSCsの骨形成能の確認、さらに10年以上長期凍結保存した検体の骨分化能及び安全性に関し報告[10)]してきた。今回は20年間長期凍結保存したhBT-MSCsの骨・脂肪分化能、増殖能や凍結による形質変化・老化等について検討し、長期保存の課題点を精査した。

2．方法

北里大学倫理委員会において承認(倫理承認番号；B12-101)のもと、当科にて顎裂部骨移植を行った症例の余剰腸骨海綿骨より得られたhBT-MSCsを凍結保存後、これを解凍、再培養し用いた。対象検体は20年目、15年目、10年目、5年目、1年目までの年代各3検体ずつ、延べ15例（男性6例、女性9例）で、年齢は5歳～17歳で平均7.7歳であった。（Table.1）細胞増殖試験で使用される検体は多少異なるため、Table.2で個別に記載した。全例腸骨海綿骨から採取した検体を用いた。基礎疾患は口唇口蓋裂以外有していなかった。

2-1. 初代培養とヒト骨組織由来間葉系細胞(hBT-MSCs)の凍結保存・再培養

顎裂部骨移植手術時に余剰となった腸骨は、25 ㎠ flask(Sumitomo Bakelite Co, Tokyo, Japan)内で、10% FBS(Sigma-Aldrich MO, USA)、抗生物質（100U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin)、1 ng/ml bFGF添加α-minimum essential medium（以下α-MEM培地)(Life Technologies Corporation, CA, USA)を用い、5%CO_2、37℃の条件下で培養し、1週間に2回培地交換をした。細胞がSubconfluentになったら、75 ㎠ flaskに継代し、細胞数を計測後、遠心分離(1,000～2,000rpm, 3-5 minutes, 4℃)し、アスピレーターで上清を取り除いた。5×10^5-5×10^6個の細胞に対し血清含有のCELLBANKER™(Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd. Fukushima, Japan)1mlを加え優しくピペッティング後、凍結用チューブに分注し、ドライアイス上に静置凍結後、-80℃のdeepfreezerに保管し凍結保存した。細胞を使用する際には、凍結しておいた凍結用チューブを37℃温浴で振りながら迅速に融解させ、直ちに培養する培地10ml程度に混和した。遠心分離(1,000～2,000rpm, 3-5 minutes, 4℃)し、アスピレーターで上清を取り除いた。α-MEM培地で懸濁し、T25 ㎠ flaskに移し5%CO_2、37℃の条件下で再培養した。subconfluentを確認し、用いるすべての検体を2継代に揃え、実験に供した。

2-2. 生死判定

解凍時35 ㎜ガラスディッシュ（IWAKI. AGC TECHNO GLASS Co., Ltd. Shizuoka. Japan)に1×10^4/50 μl となるよう細胞を播種し、Live/Dead cell Staining Kit Ⅱ（TAKARA BIO INC. Tokyo, Japan）を用いてカルセインーエチジウムホモダイマーⅢ染色を行った後、倒立共焦点蛍光顕微鏡LSM710, LSM780 Systems(LSM Software ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy, Germany)で観察した。

2-3. 細胞老化判定

コラーゲンコート付き35㎜ガラスディッシュ（IWAKI. AGC TECHNO GLASS Co.,Ltd.Shizuoka.Japan)に1×10^4/50 μl となるよう細胞を播種し、Cellular Senescence Detection kit-SPIDER-βGal（DOJINDO LABORATORIES,Kumamoto,Japan）を用いてSA-β-gal染色を行った後、倒立共焦点蛍光顕微鏡LSM710,LSM780 Systems(LSM Software ZEN 2012,Carl Zeiss Microscopy, Germany)で観察した。

2-4. 細胞増殖試験

細胞増殖試験には以下の検体を用いた。凍結保存後、平均年齢7.3歳（5〜17歳）の男性12人と女性9人の合計21個の検体で、凍結保存されていない3個の検体も追加となった。(Table.2)。すべての症例は腸骨海綿骨から採取し、患者にはCLP以外の基礎疾患はみられなかった。Cell Counting Kit-8(DOJINDO LABORATORIES、Kumamoto,Japan）を用い、96wellプレートに0.5×10^4、0.25×10^4cell/wellずつ検体を播種した。0、1、3、5、7日目にWST-8を発色試薬として加え、450nmにおける吸光度をプレートリーダーSpectraMaxM2(MolecularDevices,Ca,USA）で計測し、Lambert-Beerの法則にのっとり、吸光度より細胞数を換算し、増殖曲線を作成した。

2-5.骨分化誘導、脂肪分化誘導

6well プレートに細胞数が1×10^5cells/well となるよう播種し、4週間分化誘導を行った。培地交換は週2回行った。骨分化誘導培地は10% FBS 添加 α -MEM 培地(Dexamethazone0.1μM / Ascorbic acid0.05mM/β-glycerophosphate10mM を添加)を用いて行った。脂肪分化誘導培地は10% FBS 添加 α -MEM 培地(Insulin10μg/ml/Isobutylmethylxanthine0.5mM /Dexamethazone1μM/Indomethacin 0.2mM を添加)を用いて行った。非誘導群は α -MEM 培地で、4週間培養を行った。

2-6 分化能の評価

2-6-1.骨分化能の評価

① アリザリンレッドS染色

細胞表面をリン酸緩衝食塩水（PBS）(−)2回洗浄後、100%エタノールで固定した。1.3%Alizarin Red S 溶液(Wako Pure Chemical Corporation,Osaka,Japan)を用いて2

分間染色し、蒸留水で3回洗浄して過剰の染色溶液を除去した後、細胞を乾燥させ、観察した。

② カルシウム定量

細胞表面をPBS(－)で3回洗浄後、0.5NHClでカルシウムを抽出し、エスパ・Ca (NIPRO、Osaka、Japan) を用い、アルセナゾⅢ法でカルシウムの定量を行った。

2-6-2. 脂肪分化能の評価

オイルレッド染色

PBS(－)で2回洗浄後、10%ホルマリン溶液で固定した。その後蒸留水で洗浄し、60%イソプロパノールで洗浄した。Oil Red溶液(Sigma-Aldrich.Mo,USA)で20分間染色した。染色後60%イソプロパノール溶液及びPBSで洗った。その後光学顕微鏡で観察した。脂肪滴生成量はImage J version 1.36b(National Institutes of Health, USA Http//: rsb. Info. nih. gou/ij/)の解析ソフトを用いて、細胞数、総面積、平均サイズ、%面積を求めた。

2-7. 統計分析

細胞生存率と老化の判定、Oil Red染色の評価、細胞数、総面積、平均サイズ、%面積の計算には、解析ソフトウエアImage J version 1.36b(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. http://rsb.info.nih.gov/ij/)を使用し行った。ImageJソフトウェアを使用して、細胞老化試験では蛍光度を分析した。非パラメトリック試験であるSteel-Dwass 試験とWilcoxon試験を用いて細胞増殖試験及びCa産生量の検定を行った。すべての値は平均±平均の標準誤差 (SEM) として示し、$P < 0.05$を統計的に有意であるとした。これらの検定にはJMP®Pro 14.2 software (SAS Institute Inc.、Cary、NC、USA) を使用して統計分析を実施した。

3．結果

3-1. 生死判定

生死判定において、5年以降から死細胞の割合が増加したが、生細胞染色では形の崩れはみられなかった。10年以降生細胞の割合は高いが、形の崩れが散見されるようになり、20年目には生細胞の割合も減り、細胞の膨化、膜の乱れ、形の崩れも目立つようになった (Figure.1)。形状に変化はあったが、年齢グループ間で細胞数に有意差はなかった ($P > 0.05$) (Figure.2)。また、総面積、面積、平均サイズに有意差はなかっ

た。

3-2. 細胞老化判定

5年以降すべての細胞にSA-β-gal陽性細胞を認め、老化物質の蓄積が見られた(Figure.3)。細胞老化染色の%面積は1年目の検体では検出されなかったが、5年目のすべての検体で検出された。しかし、どの年代間にも有意差はなく（P > 0.05)、細胞数、総面積、平均サイズにも有意差はなかった（Figure.4)。また、%面積も同様の結果の蛍光強度が測定された（Figure.5AおよびFigure.5B)。

3-3. 細胞増殖試験

増殖曲線の増殖の数は保存期間の長さによる明らかな差は認められなかった。
(P > 0.05)(Figure.6)。

3-4. 各種分化能の確認

3-4-1. 骨分化能について

①アリザリンレッドS染色

対照群に比して全体的によく染色された。全ての検体において、骨芽細胞分化能を確認することができた(Figure.7)。

②カルシウム定量

非分化誘導群(コントロール群)の平均測定値は0.2956であり、顕著な生産はなかったことを示している。 値は、各年代間の3つの検体の平均値から計算した。誘導群では有意な骨形成が観察された（Figure.8)。1年目のカルシウム生成量が最も低く、5年目と10年目が同程度の生成量を認め、15年、20年と経過すると生成量が低下したが、1年目よりもこれらの生成量は多く認めた。すべての誘導群とコントロール群間でSteel-Dwass試験を実行し、すべての年代間で有意差を認めた（* P < 0.05)。ただし誘導群間において、各年代間同士での統計的有意差は生じなかった。
(P > 0.05)(Figure.8)。

3-4-2. 脂肪分化能について

オイルレッドO染色

15年目までの検体ではいずれも脂肪滴を確認した(Figure.9)。20年目を過ぎると、確認できた細胞滴が乏しくなった。非分化誘導群(コントロール群)との間には有意差がみられ、脂肪滴の生成を統計学的に確認できた。（P ＜ 0.05）10年間凍結保存された検体では、染色された細胞の数は少なかったが、3つの年代間の検体すべてが同様に染色され、脂肪細胞の分化能が確認された（Figure.9)。 ImageJソフトウェアを使用して、脂肪滴の数、総面積、%面積、平均サイズを測定および統計解析を行った。誘導群すべてのペア間でSteel-Dwass試験を行ったが、有意差はみられなかった。誘導群とコントロール群のすべての年代間を比較したところ、有意差が見られた。

（P ＜ 0.05）（Figure.10）

4.考察

4考察

4.1　凍結保存に関して

細胞を長期間保存する必要がある場合、凍結保存は細胞の性質を変えずに保存する方法として古くから試みられてきた。当科では20年以上前から同一の技師による指導の下同じ手技で凍結、保存を行ってきた。FBSは数年ごとにマイナーチェンジされるため、3～5種類の血清サンプルを取り寄せ、FBS lot checkを行った後、同じ由来細胞(腸骨海綿骨)での1週間程度の細胞増殖能を調べ、使用している血清と同等の増殖能を持つものを選択して使用しているが、ほぼ3～5年毎に使用メーカーも切り替わる。このような条件のもと、当科において長期凍結保存の細胞における有用性を鑑みた。一般的に凍結時に細胞が受ける障害[11]は、細胞内氷晶形成に伴う物理的損傷と、凍結進行時の細胞内の高浸透圧化に伴う障害の2つが知られている。また凍結速度（freezing rate）は、凍結融解(frozen-thawed)後の細胞の生存率に影響する最も重要な因子と考えられている。凍結速度が速すぎると[12]、細胞内氷晶が形成されこれがオルガネラに障害を与え、細胞壁を破壊するため解凍時に細胞融解をきたしてしまう。一方遅すぎると[13]、細胞外溶液の凍結に伴い細胞外高浸透圧化がおこり過冷却状態の細胞内から水分が移動し細胞内脱水が進行する。

最適な凍結速度は細胞の大きさと水分透過性の2つの独立した因子に依存し[14]、造血幹細胞の場合はプログラムfreezerを用いた-1℃／分の冷却速度が最適とされているが[15]、-3℃／分までは許容範囲とされている。この冷却速度[16]は、-70～-80℃のfreezerに始めから直接静置するだけでも得られるため、現在臨床現場で広く用いられている。

この速度で冷却すると細胞内脱水は軽度で、形成される氷晶もオルガネラや細胞壁を破壊しない大きさにとどまり、細胞の viability が保たれるとされる[17]。この点において、冷却速度に関してはドライアイス上に即時保管、運搬し-80℃の deep freezer に直接静置している当科の方法は、細胞内氷晶の形成が最小限に抑えられている可能性は高い。凍結細胞の解凍時には細胞内に形成された氷晶が大きくなる現象[18]、再氷晶化（recrystallization）が発生する。これによる細胞の物理的損傷を防ぐには、細胞を急速に加温する必要があるといわれている[19]。一般には 90～100℃／分以上の加温速度が推奨されている。我々は解凍時に 37℃の恒温槽にいれ解凍するため、このような 90～100℃／分での加温速度にはしていない。さらに凍結保存液は細胞内凍害保護薬と細胞外凍害保護薬の 2 種に分けられ、前者は dimethylsulfoxide(DMSO)や glycerol があり、最も広く用いられている。後者には hydoxyethylstarch(HES), dextran 等があげられる。いくつかの研究により、細胞内凍害保護薬と細胞外凍害保護薬の併用がより有効であることが判明した[20][21]。当科が使用しているのは、市販の凍結保存液であり、10%DMSO 血清含有タイプの製品で、細胞外凍害保護薬との併用 type ではない。今までの我々の凍結・保管・解凍の手順を振り返ると、細胞障害の中でも解凍時の再氷晶化に伴う障害が生じている可能性が高いことが推察された。われわれは 10 年以上凍結保存した hBM-MSCs に骨、脂肪分化する能力を持っていることを報告[10]しており、更に in vivo での骨新生に関しても同様に報告[9]しており、その潜在能力の高さにおいて一定の評価を得ている。細胞活性が停止する[22]といわれる-196℃による瞬間凍結では、その長期保存成績において、最長 41 年間保存後患者自身に再投与するという臨床応用の報告[23]もされている。そのような超低温ではない、-80℃での長期凍結保存による検体の viability に関する報告は、4～8 年など散見[24][25]されているが、われわれが実験に用いた検体は 20 年もの間-80℃の deep freezer での凍結保存された hBT-MSCs であり、今回のように 20 年もの長期凍結保存された間葉系細胞でも多分化能を有することが確認されたのは、より簡便な保存方法での凍結が可能となりうる点で、臨床応用を進める上でも、福音となりえる。一般的に凍結保存液の(当科の使用している CELLBANKER™ を含め)、解凍時生存率 80% 以上であることを保証する期間は製造日より 3～5 年といわれている。これらの年月を過ぎてからも、凍結保存された hBT-MSCs は分化能を有していた。また分化能・増殖能など凍結保存期間によってほぼ差のないデータとなった(Figure. 4～6)。細胞凍結に伴う細胞内氷結後の解凍壊死[26]（細胞膜が破壊されたなど）による浮遊死細胞は、遠心分離・上清吸引の過程で除去されるために、染色時死細胞と

してカウントされるのは膜構造の保たれたものだけとなる。今回細胞凍結保存液の保存期間外に達した5年以降から、生死染色により明らかになった死細胞の割合が増加したが、生細胞染色では形の崩れはみられなかった。10年以降生細胞の割合は高いが、形の崩れが散見されるようになり、20年目には生細胞の割合も減り、形の崩れも目立った(Figure.1)。生死細胞判定から推察するに、解凍時生き残り、再培養という負荷を経て分化誘導される細胞はそれだけのストレスに耐えうる強い細胞のため培養できたと考えられる。以上から、20年経過した長期凍結保存検体であっても、分化能を保ち、細胞として利用可能であることが示唆された。

4.2　凍結により細胞は老化するかについて

今回凍結された検体が凍結年数に依存し老化するものなのか、老化細胞の一種であるSenescence-associated β-galactosidase(SA-βgal)を老化の指標として細胞染色し確認した。中性pH付近で示されるβ-galactosidase活性は、X-Galを基質として青色の発色を示す度合いから計測されてきた。これまでに、β-galactosidase活性は細胞もしくは組織レベルでの報告が数多くなされている[27]。継代を長期に重ねた細胞では高い活性が検出され、その活性の増加が継代数に比例する等の結果から、老化のマーカーとして広く知られる[28]ようになった。一般に細胞の寿命は細胞老化とクライシスの2段階で律則されており、前者が細胞周期制御因子によるG1停止、後者が45年前にHeyflic[29]により発見された,細胞が本来有する分裂寿命が尽きたためにおこる不可逆的な増殖停止、すなわちテロメアが限界サイズまで短縮したことによるとされている。hBM-MSCsの増殖には限界があり、ES細胞やがん細胞と異なりテロメラーゼ活性が非常に弱く、理論的にテロメア短縮による絶対寿命が存在する。分裂寿命は細胞供給者の年齢が高いほど短くなる傾向[30][31]を示し、継代を重ねるごとにβ-Galactosidase活性が誘導される[28][32]。増殖停止した状態では、細胞自体は極めて大型化し、扁平になり、増殖期の細胞とは明らかに異なる様相を呈する。hBT-MSCsのこの特性の変化は形態として増殖直前に顕著であるといわれる。さらに形質(形態・分化能)も変化すると報告されている。今回継代数は2継代にそろえ、使用した細胞自体も細胞採取時年齢は平均で7.9歳と若年であった。凍結という過程を経ることで高いβ-galactosidaseの活性が見られた。これは染色の結果に限って言えば凍結年数に依存せず、5年でも20年目と同様の高い活性がみられた(Figure.2)。これら高いβ-galactosidaseの活性が見られた細胞の分化能の高さ(潜在能の高さ)に関しては、骨芽細胞分化能及び脂肪滴の発現に相

関はみられず、高い分化能を有していた(Figure.4～6)。今回の研究では、凍結により経時的に老化が進行する可能性は低いと推察された。

4.3　長期凍結保存検体の安全性と今後の展望に関して

10年もの長期凍結保存した検体の安全性に関して、当教室では染色体の形態検査，がん抑制遺伝子である p53 遺伝子の異常の有無とがん遺伝子の一つである myc 遺伝子の発現の評価と、G-band 法を用いて形態学的検査を行い、これらの検査では異常は認められなかった[10]。安全かつ安定な自家組織を用いた hBT-MSCs の培養は、感染リスクや異物、免疫機構の点より有用な手法である。現在同種 MSC を用いた基礎研究が盛んにおこなわれ、同種移植をしても一般的に MSC は免疫抑制効果があり、それ故免疫反応を惹起することはないといわれている[33]が、免疫寛容が誘導されず、免疫原性を持つことを示した報告も散見[34) 35]される。唇顎口蓋裂児に関して言及すれば、幼少時における複数回の手術と、そのドナーとしての傷跡の軽減も望めることから、初回手術時(口唇形成時)に上顎骨の一部を採取し、混合歯列期における顎裂部骨移植の時期に、凍結保存しておいた検体を用い、さらに思春期以降に行われる唇裂鼻修正の際にも再度培養、使用することを我々は目指している。今回20年長期保存によるこれらの結果より、一連の治療の臨床応用が可能になる道筋が得られたと考える。我々が目差すこれらの手術に用いるのは自家組織を用いた治療であることから、同種 MSC のような免疫拒絶の心配も軽減される。20年近く凍結保存された hBT-MSCs は高いβ-Galactosidase 活性が認められた。しかし明らかな分化能の低下は認められなかった。今回 n 数が少ないゆえ、個々のポテンシャルに依存した結果と推定されるものが多かった。我々の研究室では、最長20年間凍結保存されたヒト由来の細胞はほとんど現存しない。今後の目標は、再現性を確保するために、現在保存されている15年の凍結保存細胞を使用して、5年後の20年の凍結保存細胞になる実験で同様の実験を行うことである。骨細胞再生のための適切な凍結および解凍方法を解明し、凍結中および凍結後の細胞老化の原因を特定し、防止方法を開発するために、さらなる研究が必要と考える。

5．総括

本研究により、20年間凍結保存した検体でも骨分化能及び脂肪分化能を有していることが分かった。しかしその分化能は骨分化あるいは脂肪分化のどちらかに傾く傾向があることが推定された。5年未満の凍結保存検体では老化の影響を受けず、問題なく使用

できる可能性があること、および5年以降凍結した場合は年数を問わず同様の老化変化を呈し、凍結による老化は経時的には進行しない可能性が示唆された。これらより長期凍結保存された検体に関して今後の臨床応用に有益と考えられた。

6．今後の課題

今回の研究により、凍結により老化は経時的に進行しない可能性が示唆されたが、これがドナー由来の潜在能力に依存するものであるか、追加試験を積み重ね、臨床応用へと向けることが今後の検討課題である。また将来の展望としては、自家移植のみならず、同種移植への応用を視野に入れたいと考えている。20 年来の凍結保存検体は現存数が少ない為、追試を 5～10 年単位で計画する必要がある。更に代替骨組織作成においての適切な凍結解凍方法の検討、凍結による老化細胞などの発生原因の解明とその対策等についても今後の検討課題と考えている。

7．謝辞

本研究は文部科学省研究補助金(C) (17K11852)の助成を受けて行ったものである。

本研究には北里大学医学部病態・診療系　曽根由美子様の多大な貢献があったことを特記し心から感謝を申し上げます。また、北里大学病院の多くの部署にご協力いただいたことを記し、ご助力いただいた皆様に感謝を申し上げます。

北里大学医学部形成外科・美容外科　武田啓先生・山崎安晴先生の温かいご指導、同医局員各先生のご協力を賜って本研究が行えたことを深謝し心より感謝を申し上げます。

８．引用文献

1. 勝部好裕,弓場俊輔,大串始:間葉系幹細胞を使った骨再生,骨格系　再生医療叢書 6.脇谷滋之,鄭雄一,朝倉書店,東京,2012,p92-110.
2. Orth D, Howard RD. An improved appliance for the pre-surgical orthodontic preparation of the cleft case for secondary bone grafting. Br J Plast Surg 1969;22:90-3.
3. Boyne PJ, Sands NR. Secondary bone grafting of residual alveolar and palatal clefts. J Oral Surg 1972;30:87-92.
4. Wongchuensoontorn C, Liebehenschel N, Schwarz U, Schmelzeisen R, Gutwald R, Ellis E 3rd, et al. Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible--a case report. J Craniomaxillofac Surg 2009;37:155-61.
5. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors. J Craniomaxillofac Surg 2012; 40: 2-7
6. Shimakura Y, Yamazaki Y, Uchinuma E. Experimental study on bone formation potential of cryopreserved human bone marrow mesenchymal cell/hydroxyapatite complex in the presence of recombinant human bone morphogenetic protein-2. J Craniofac Surg 2003;14:108-16.
7. Matsuo A, Yamazaki Y, Takase C, Aoyagi K, Uchinuma E. Osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured with autologous serum. J Craniofac Surg 2008;19:693-700.
8. Takeda A, Yamazaki Y, Baba K, Ishiguro M, Aoyagi K, Ikemoto S, et al. Osteogenic potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells cultured in autologus serum: a preliminary study. J Oral Maxillofac Surg 2012;70:e469-76.
9. Sugimogo T, Yamazaki Y, Kumazawa K, Sone Y, Takeda A, Uchinuma E. The significance of performing osteogenic differentiation in human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells. J Oral Tissue Engin 2013;11:103-12.
10. Kumazawa K, Sugimogo T, Yamazaki Y, Takeda A, Uchinuma E. Osteogenic potential, multipotency, and cytogenetic safety of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation. Kitasato Med J

2014;44:95-103.

11. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. Science 1970;168:939-49.
12. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology 1977;14:251-72.
13. Bank H, Mazur P. Relation between ultrastructure and viability of frozen-thawed Chinese hamster tissue-culture cells. Exp Cell Res 1972;71:441-54.
14. Mazur P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. Ann N Y Acad Sci 1965;125:658-76.
15. Leibo SP, Mazur P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. Cryobiology 1971;8:447-52.
16. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. Cryobiology 1966;2:181-92.
17. Forman SJ, Blume KG, Thomas ED. Bone Marrow Transplantation. Blackwell Scientific Publications, Boston, MA, USA 1994:299-308.
18. Luyet BJ, Rapatz G. Patterns of ice formation in some aqueous solutions. Biodynamica 1958;8:1-68.
19. Leibo SP, Farrant J, Mazur P, Hanna MG Jr, Smith LH. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol. Cryobiology 1970;6:315-32.
20. Makino S, Harada M, Akashi K, Taniguchi S, Shibuya T, Inaba S, et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 degrees C without rate-controlled freezing. Bone Marrow Transplant 1991;8:239-44.
21. Nadamanee A, Schmidt GM, Sniecinsky I et al. Storage of unfractionated bone marrow(BM) without rate-controlled freezing is equivalent to standard technique for short time storage. Blood 1991;78:251A
22. Asano T, Kenmochi T, Isono K. Organ preservasion. Nihon Geka Gakkai Zasshi 1996;97:958-63.
23. 隅田幸雄, 北村妙子, 本村昇, 斎藤綾, 山本晋一, 他；ヒト骨髄幹細胞の長期凍結保存

法(—196℃、最長 41 年)に関する研究—各種増殖因子使用下での繰り返し凍結及び生体内または生体外継代培養法 Repetitive Freeze-Thaw-in vivo or-in vitro subculture(RFTIVIVTSC)による保存期間の延長法と間葉細胞資源としての抹消静脈と皮下脂肪組織の培養成績；Jpn J Transfus Cell Ther 2016;60:94-5.

24. MiyamotoY, Ikeuchi M, Noguchi H, Hayashi S. Long-term cryopreservation of human and other mammalian cells at -80° C for 8 years. Cell Medicine 2018;10:1-7.
25. Bogdanova A, Berzins U, Nikulshin S, Skrastina D, Ezerta A, Legzdina D, et al. Characterization of human adipose-derived stem cells cultured in autologous serum after subsequent passaging and long term cryopreservation. J Stem Cells 2014;9:135-48.
26. Leibo SP. Cryobiology of immune competent cells. In: Charles MS, Ivan L, editors. The immune system. Basel: Karger; 1981. p. 66-76.
27. Gary RK, Kindell SM. Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. Anal Biochem 2005;343:329-34.
28. Yumura W, Imasawa T, Suganuma S, Ishigami A, Handa S, Kubo S, et al. Accelerated tubular cell senescence in SMP30 knockout mice. Histol Histopathol 2006;21:1151-6.
29. Heyflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961;25:585-621.
30. Umezawa A. Replicative cellular aging of mesenchymal stem cells. Regenerative Medicine 2008;7:49-52.
31. Zhang K, Ikeda Y, Kasugai S, Ikeda M. Extended culture conditions for multipotent bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Kokubyo Gakkai Zasshi 2016;83:13-24.
32. Goberdhan P.D., Xinhua L, George B, Meileen A, Glynis S, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Cell Biology 1995;92:9363-9367
33. Lalu M.M., McIntyre L,Pugliese C, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells(SafeCell).a systematic review and meta-analysis of

clinical trials. PLoS 2012;7:e47559

34. Kotobuki N, et al. In vivo survival and osteogenic differentiation of allogeneic rat bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs).Cell Transplant 2008;17:705-712

35. Eliopoulos N, et al. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class Ⅰ-and class class Ⅱ-mismatched recipient mice. Blood 2005;106:4057-4065

9．業績目録

（Ⅰ）原　著

1．Sugimoto Y、Yamazaki Y、Moriyama K、Sugimoto T、Kumazawa K、Baba K、Sone Y、Takeda A：Differentiation and proliferation potencies of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation-Comparison among cells stored for 1, 5, 10, 15, and 20 years. Regenerative Therapy, (in press)

2．Moriyama K、Yamazaki Y、Sugimoto Y、Sugimoto T、Kumazawa K、Baba K、Sone Y、Takeda A：Difference in pluripotency of jawbone- and iliac bone-derived mesenchymal cells. Kitasato medical journal,50(1),18-26,2020

3．Baba K、Yamazaki Y、Sone Y、Sugimoto Y、Moriyama K、Sugimoto T、Kumazawa K、Shimakura Y、Takeda A：An in vitro long-term study of cryopreserved umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma containing growth factors-PDGF-BB,TGF-β,and VEGF.J Craniomaxillofac Surg 47:668-675, 2019

4．Sugimoto Y、Takeda A、Akimoto M、Sugimoto T、Kajita S、Uchinuma E:Investigation of factors affecting postoperative recurrence of basal cell carcinomas. Kitasato medical journal,46(1),47-52,2016

（Ⅱ）著　書

なし

（Ⅲ）総説・講座

1．杉本　孝之、杉本　佳香、武田　啓：北里大学形成外科・美容外科における片側唇裂初回手術のデザインについて.The Japanese Journal of Plastic Surgery 61(増刊号),S65-S73

（Ⅳ）症例・臨床治験・その他

1．君塚　幸子、山崎　安晴、杉本　佳香、森山　和の、杉本　孝之、石川　心介、石渡　靖夫、武田　啓：下顎頭吸収を伴う骨格性下顎後退症に対して顎矯正手術を施行した2例.北里医学、48(1)：33～40, 2018

10. 図表

Group	Age	Sex	Underlying disease	Cryopreservation period, y
20	17	F	CLAP	20
20	9	F	CLAP	20
20	7	M	LCLA	19
15	8	F	LCLAP	17
15	5	M	LCLA	16
15	11	F	CLAP	16
10	5	F	RCLA	11
10	12	M	Bil.CLAP	11
10	5	M	Bil.CLAP	11
5	8	F	Bil.CLAP	5
5	5	F	LCLAP	5
5	6	F	RCLAP	5
1	5	M	RCLAP	1
1	5	F	LCLAP	1
1	8	M	RCLA	1

Table 1. Donor characteristics for confirmation of differentiation ability and period of stained specimens.

Bil.CLAP, bilateral cleft lip, alveolus and palate; CLAP, cleft lip, alveolus and palate; LCLA, left cleft lip and alveolus; LCLAP, left cleft lip, alveolus and palate; RCLA, right cleft lip and alveolus; RCLAP, right cleft lip, alveolus and palate

Group	Age	Sex	Underlying disease	Cryopreservation period, y
20	8	F	Bil.CLAP	21
20	9	M	CLAP	20
20	7	M	LCLA	19
15	8	F	LCLAP	17
15	5	M	LCLA	16
15	7	F	LCLAP	16
10	5	F	RCLA	11
10	12	M	Bil.CLAP	11
10	5	M	Bil.CLAP	11
10	6	M	LCLA	11
10	17	M	Mul. facial Fx	10
5	10	M	LCLA	5
5	8	F	Bil.CLAP	5
5	5	F	LCLAP	5
5	6	F	RCLAP	5
1	5	M	RCLAP	1
1	5	F	LCLAP	1
1	8	M	RCLA	1
0	6	M	Bil.CLAP	0
0	7	F	RCLAP	0
0	5	M	Bil.CLAP	0

Table 2

Donor characteristics for cell proliferation and cryopreservation period.

Mul. facial Fx, multiple facial fractures

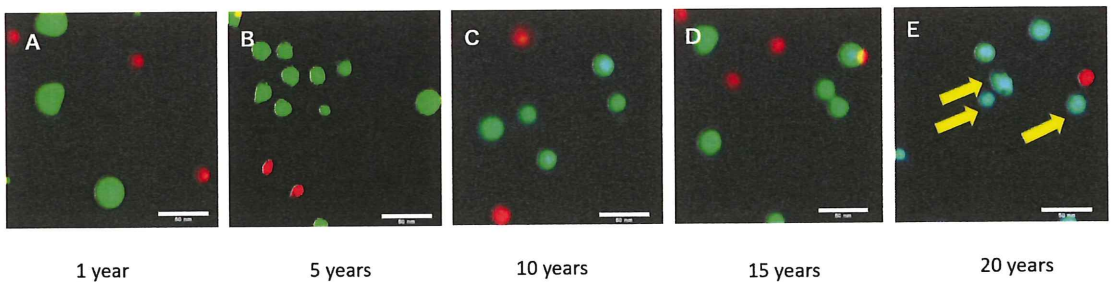


Fig. 1. Live/dead cells.

Live and dead cell staining. Live cells, green fluorescence; dead cells, red fluorescence. In samples cryopreserved for 1 year, living and dead cells had a regular round shape. In 5-year cryopreserved samples, live cells showed no loss of shape; dead cells were slightly disrupted. In samples cryopreserved for 10-15 years, the proportion of viable cells remained high, but the shape of some 15-year cells had deteriorated. Viability in 20-year cryopreserved cells had proportionately decreased, and cells that were swollen had a disrupted membrane or had lost their shape (arrows). (A) 1 year, (B) 5 years, (C) 10 years, (D) 15 years, (E) 20 years (bar = 50 μm).

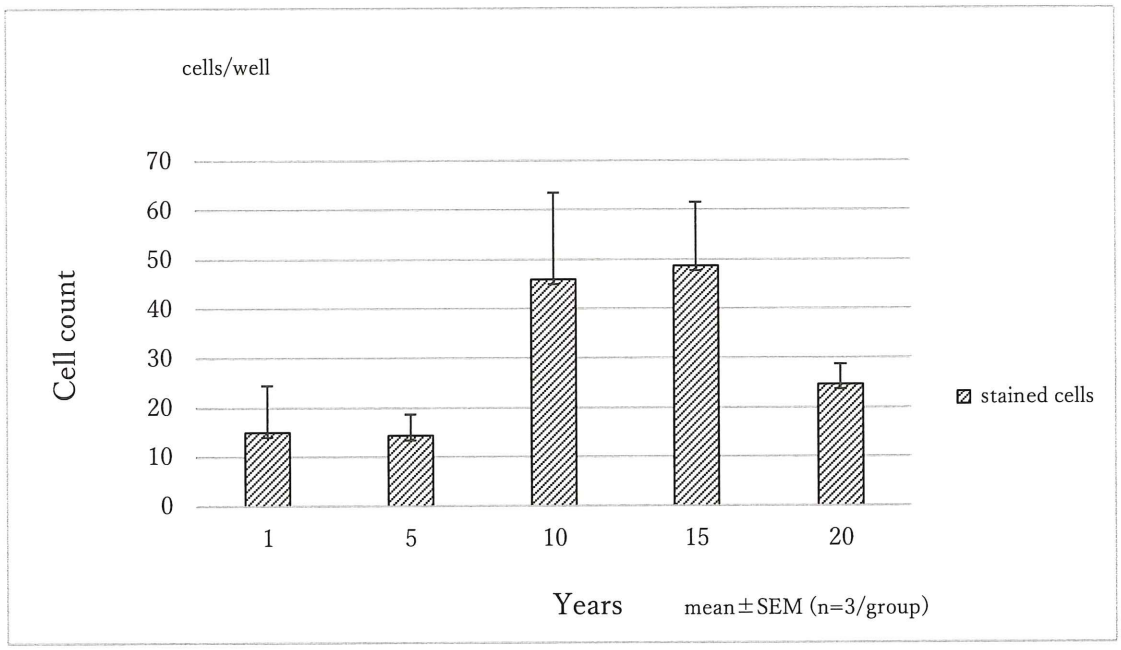


Fig. 2. Live and dead cell counts.

The Steel-Dwass test revealed no significant differences in cell counts. ($P > 0.05$).

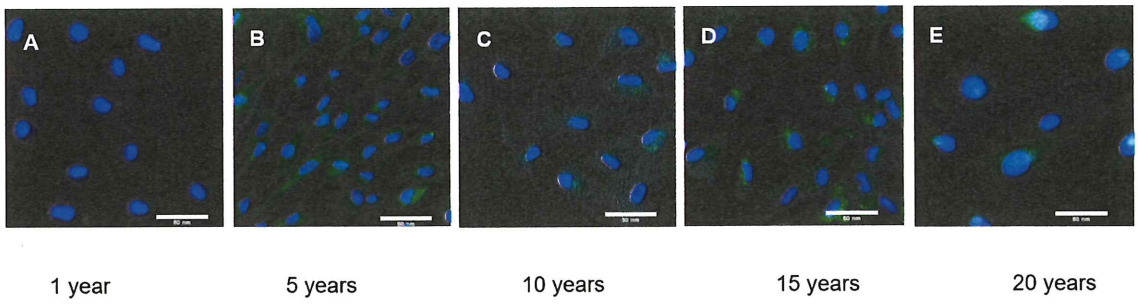


Fig. 3. Cellular senescence.

SPiDER-βgal-positive cells emit green fluorescence, and their nuclei are stained dark blue. SA-βgal-positive cells were found in all samples cryopreserved for ≥5 years.

(A) 1 year, (B) 5 years, (C) 10 years, (D) 15 years, (E) 20 years (bar = 50μm).

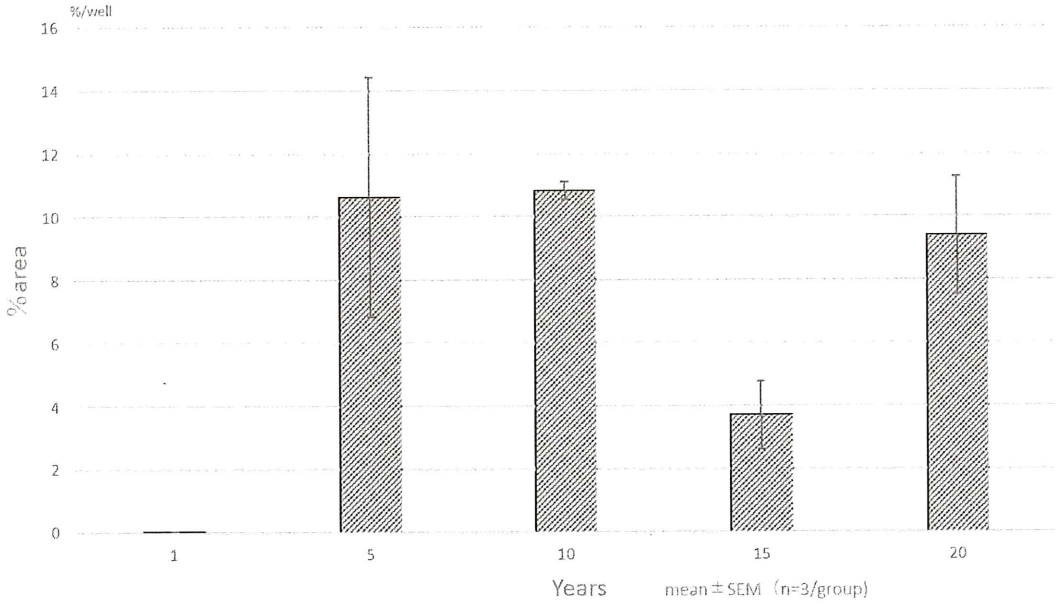


Fig. 4. %area of cellular senescence.

The Steel-Dwass test was performed, and no significant difference was found in the %area.

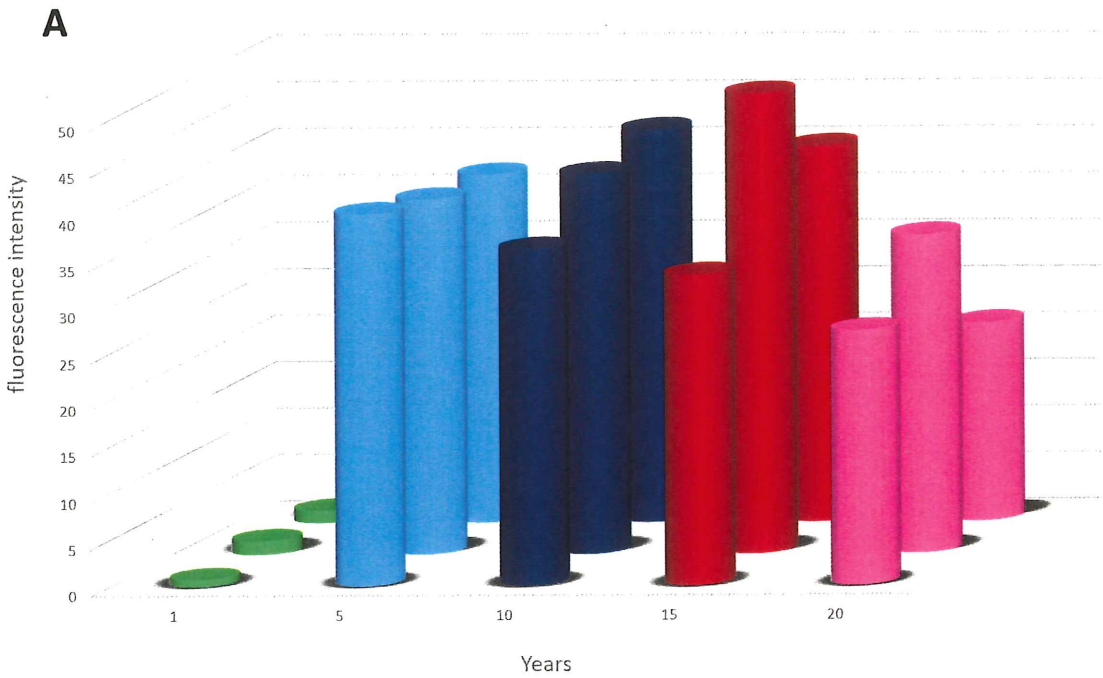


Fig. 5. Cellular senescence and fluorescence intensity of the three samples in each age group is shown.

Fig. 5A, Average data.

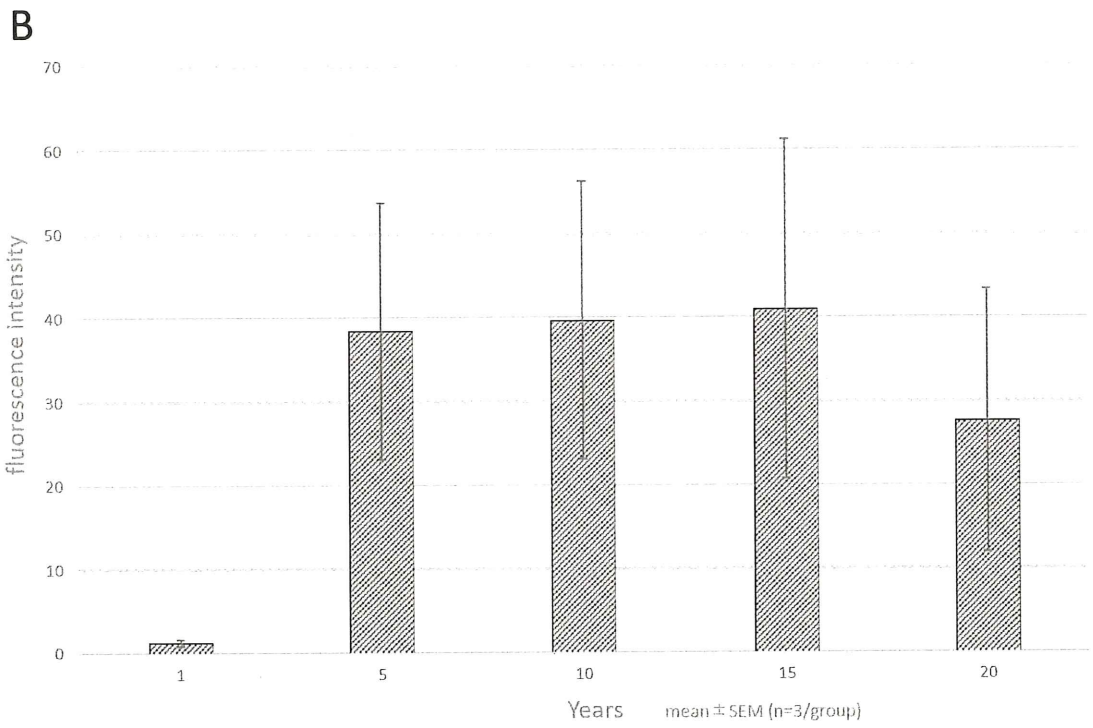


Fig. 5B, Results from the Steel-Dwass test. Data represent the mean ± SEM (n = 3/group) ($P > 0.05$).

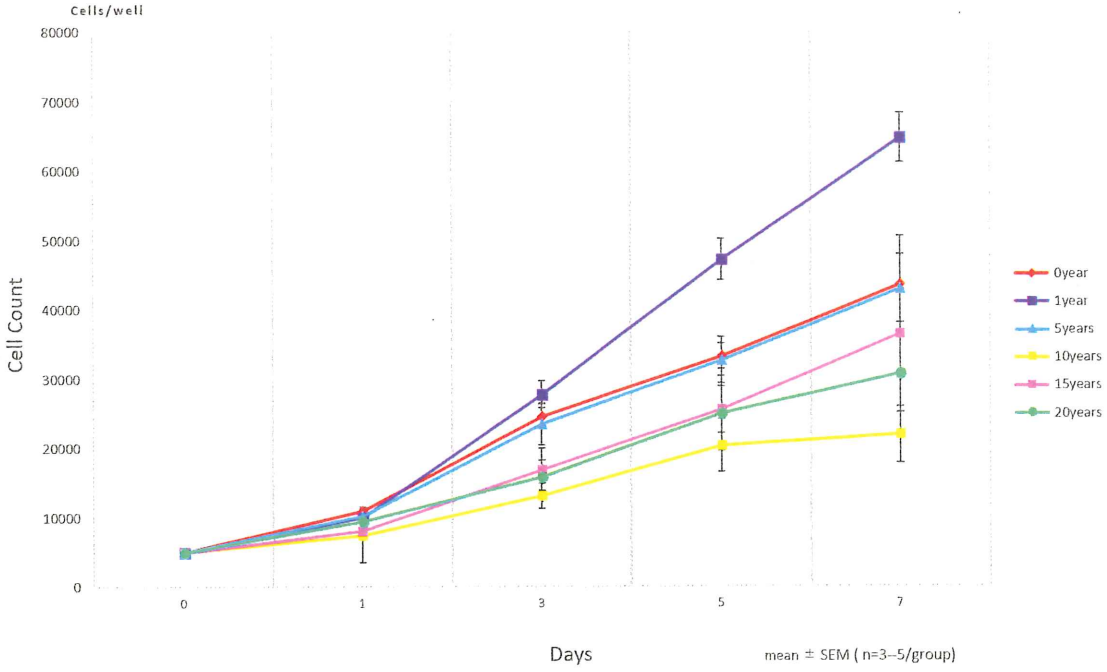
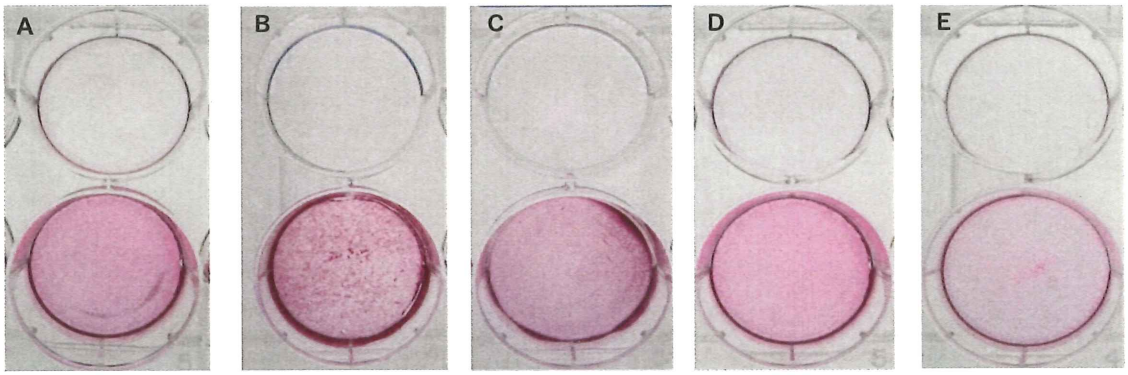


Fig. 6. Cell proliferation curves

Cell proliferation curves including samples that were not cryopreserved (0 years). The rate of cell proliferation tended to be faster, and the cell count on day 7 was greater for cells cryopreserved for a shorter period (e.g., 1 year) or not cryopreserved. For cells cryopreserved for ≥10 years, the proliferation rate no longer accelerated rapidly, but the number of cells increased at a constant rate. Data represent mean ± SEM (n = 3-5/group) for six independent experiments. The Steel-Dwass test was performed between the pairs of all the groups, but there were no significant differences.



1 year 5 years 10 years 15 years 20 years

Fig. 7. Alizarin Red S staining.

All the samples in the osteogenic differentiation group were stained regardless of the length of cryopreservation (Lower dishes), while no samples in the nondifferentiation induction group were stained (Upper dishes).

(A) 1 year, (B) 5 years, (C) 10 years, (D) 15 years, (E) 20 years.

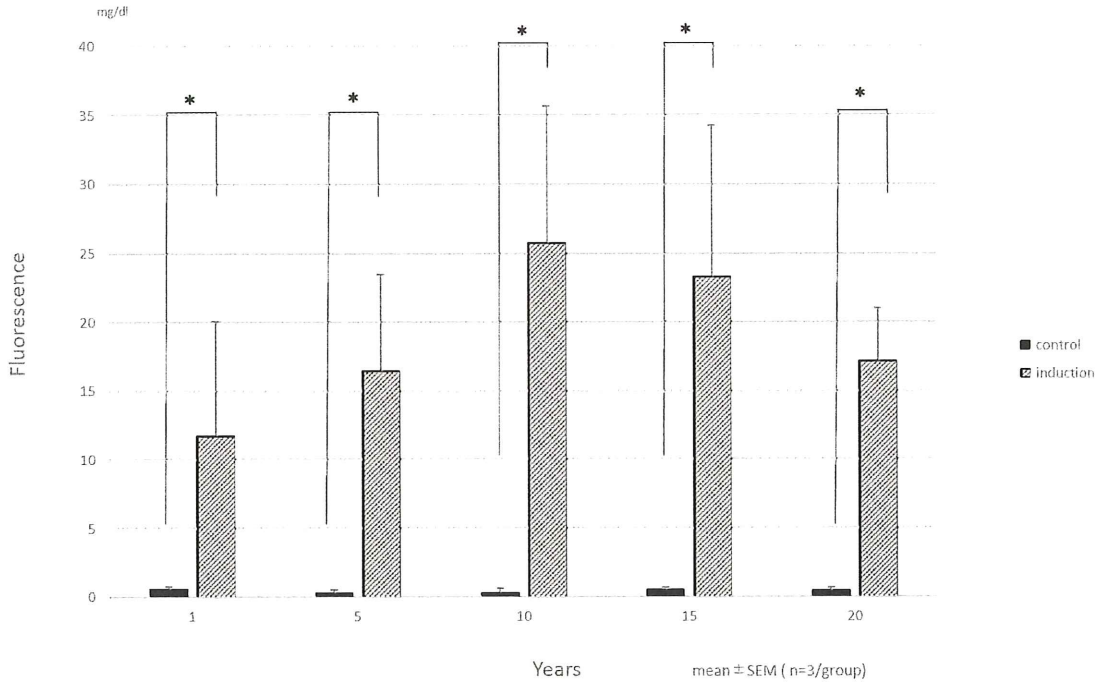
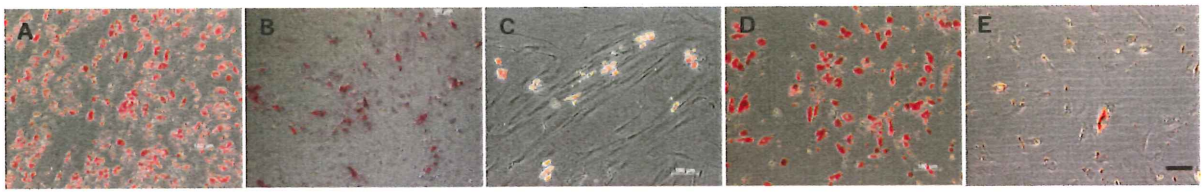


Fig. 8. Ca quantitation.

Data represent the mean ± SEM (n = 3/group) for 10 independent experiments. Steel-Dwass tests were performed between all the induced and noninduced group pairs. There were significant differences between all the age groups in the induction and control groups ($P < 0.05$). Wilcoxson tests were performed between each of the age groups in the induction and control groups ($P < 0.05$). There were no significant differences between the age groups in the induction group.



1 year 5 years 10 years 15 years 20 years

Fig. 9. Oil Red staining.

Cells containing red-stained lipid droplets are cells that underwent adipocyte differentiation. Lipid droplets were confirmed in all samples cryopreserved for ≤15 years. In samples cryopreserved for 20 years, lipid droplets were scarce.

(A) 1 year, (B) 5 years, (C) 10 years, (D) 15 years, (E) 20 years

(bar = 100 μm).

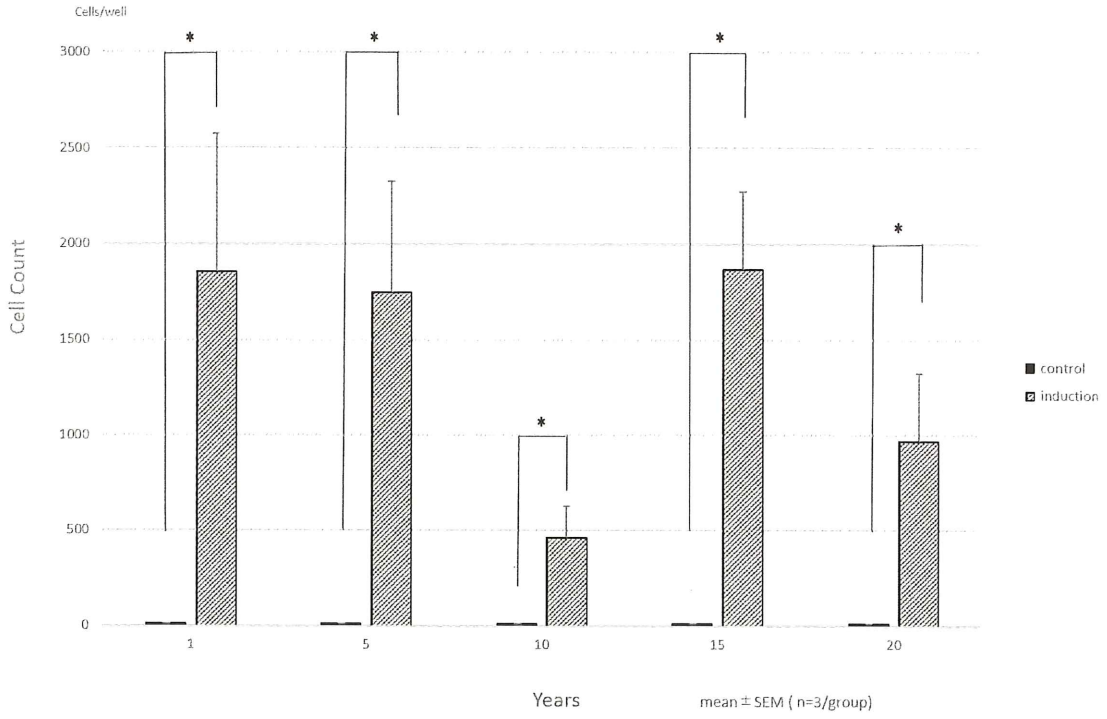


Fig. 10. Cell count of Oil Red staining.

Wilcoxson tests were performed between each of the age groups in the induction and control groups ($P < 0.05$).