

学 位 論 文 要 旨

氏 名 杉本 佳香



論 文 題 目

「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 承 認 印

武 田 啓



「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)

氏名 杉本 佳香

<はじめに>

長期凍結保存したヒト: human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (hBM-MSCs)の骨分化能、増殖能や凍結による形態変化について検討し、今後の臨床応用に向けての課題を検討した。

<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 hBM-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

Calcein/EthD 染色後、共焦点顕微鏡で観察を行った。

▼細胞老化判定

老化増殖因子である SA- β gal はその過剰蓄積の有無を共焦点顕微鏡で観察した。

▼細胞増殖試験

平均年齢 7.3 歳 (範囲、5~17 歳) の男性 11 人と女性 9 人の合計 21 個の検体と、凍結保存されていない 3 個の検体の 24 検体を用いて WST 法による細胞増殖試験を 1 週間行った。

▼骨分化誘導、脂肪分化誘導

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、Alizarin Red 染色、Ca 定量、Oil Red 染色を行い検討した。

▼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、細胞老化試験では蛍光度に関し、ImageJ ソフトウェアを使用して測定した。非パラメトリック試験である Steel-Dwass 試験と Wilcoxon 試験を用いてそれぞれの検定を行った。すべての値は平均 \pm 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。

<結果>

▼生死判定

年代を経るごとに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 ($P > 0.05$)。また、総面積、面積、平均サイズに有意差はなかった。

▼細胞老化判定

5 年目以降のすべての検体で SA- β -gal 陽性細胞が検出された。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。

▼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 ($P>0.05$)

▼骨分化誘導、脂肪分化誘導

骨分化能及び脂肪分化能はそれぞれ非誘導群(コントロール)に比較し誘導群は統計的優位さ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>

①凍結保存に関して

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。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しており、更にin vivoでの骨新生に関しても同様に報告しており、その潜在能力の高さにおいて一定の評価を得ている。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(当科の使用しているCELLBANKERを含め)の解凍時生存率80%以上であることを保証する期間は製造日より3~5年といわれているが、これらの年月を過ぎてからも、分化能を有していた。分化能・増殖能など年代的にあまり変わらないデータとなった。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、形の崩れが目立った。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。

②凍結により細胞は老化するかについて

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。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。凍結による老化は進んでいない可能性が示唆され、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今後の臨床応用に有益と考えられた