

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

細胞凍結保存法の技術の確立

分担研究者：西下 直希

（公財）先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 研究・細胞評価グループ

研究要旨

細胞保管事業において、有害事象発生時は冷凍保管している細胞を解凍し、細胞検査を実施しなければならない。しかしながら現行の細胞保管技術においては、ES/iPS細胞やその分化誘導細胞、シート状にした網膜細胞等の解凍後の細胞の生存率が低いこと、操作が繁雑であることなどが技術上の課題とされている。今年度は、ES/iPS細胞の保管技術の開発に焦点を置き、feeder lessで種々の剥離条件と種々の細胞保存凍結剤を組み合わせ、簡便な緩慢冷却法で細胞を保管し、迅速法で効率良く解凍できる技術開発を行った。その結果ES/iPS細胞を75% TripLE Select 25% EDTAで剥離しCryoStemで凍結保存したものが解凍後最も生存率が良かった。

【研究要旨】

ES/iPS細胞の保管技術において、解凍後の細胞生存率が低いこと、解凍後の2-3継代の幹細胞の増殖率が低いことが、細胞保存技術に対する技術的な課題とされてきた。そこで種々の条件で培養している細胞を操作が簡便な緩慢冷却法及び急速解凍法を用いて効率良く保存する技術開発を行った。

【研究目的】

有害事象発生時の冷凍保存細胞を解凍して検査する時に、冷凍保管技術の良し悪しが、解凍後の細胞の生存率に直接関与するため、細胞の保管の開発は必須である。その際、Feeder-less、single cell suspension、cell clump、sheet状態での保存方法の最適化を行うことを目標とした。

【研究方法】

ES/iPS細胞の細胞検査技術開発として種々の凍結保存液・緩慢冷却法を用いて細胞濃度で凍結と解凍を実施した。凍結液としてはCP1、CP1+ HAS、Cryostem、TC

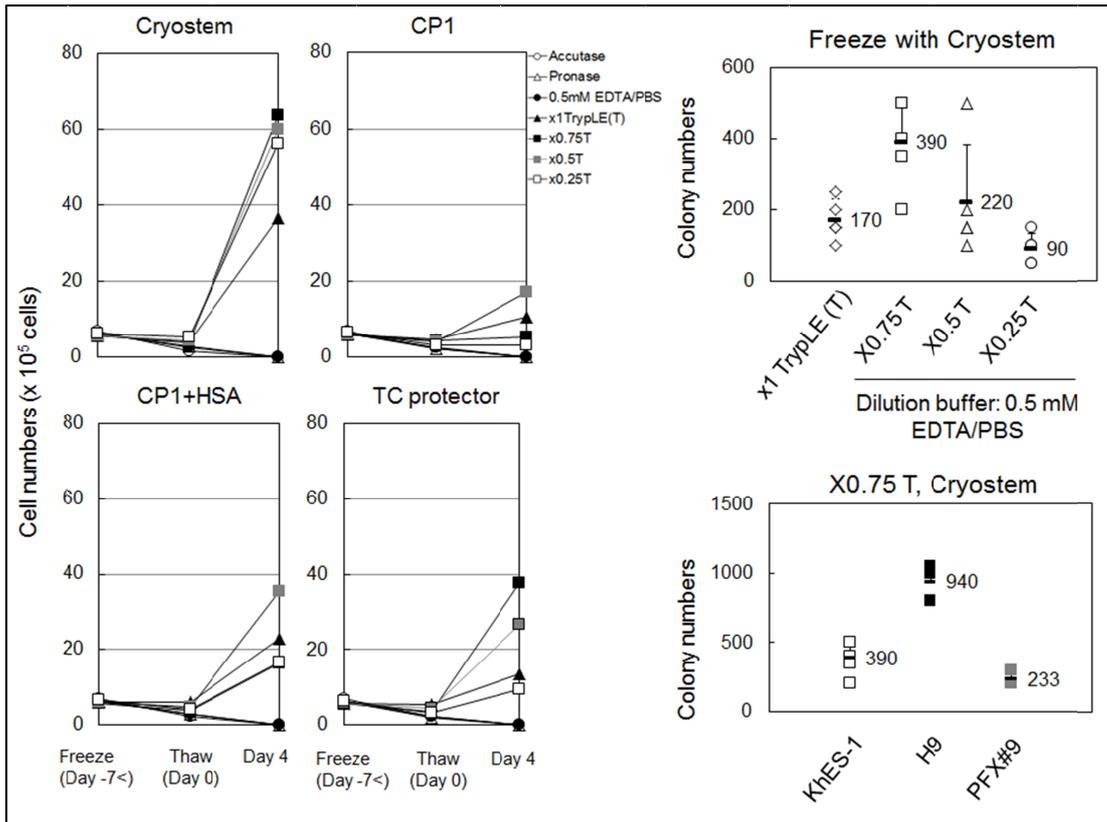
Protectorなどを使った。また凍結剤は剥離剤との組み合わせで凍結能が評価されるため、これらの凍結剤に加えTripLE SelectとEDTAの混合剤(1:0、0.75:0.25、0.5:0.5、0.25:0.75、0:1)、pronase等との組み合わせで評価した。

凍結は操作が簡便な緩慢法を用い、凍結は37℃ water bathを用いる急速解凍法を用いた。解凍後の細胞の生存率とP1以降の細胞増殖率を測定した。細胞はES細胞2種 KhES-1とH9、iPS細胞は201B7とPFX#9を用いた。

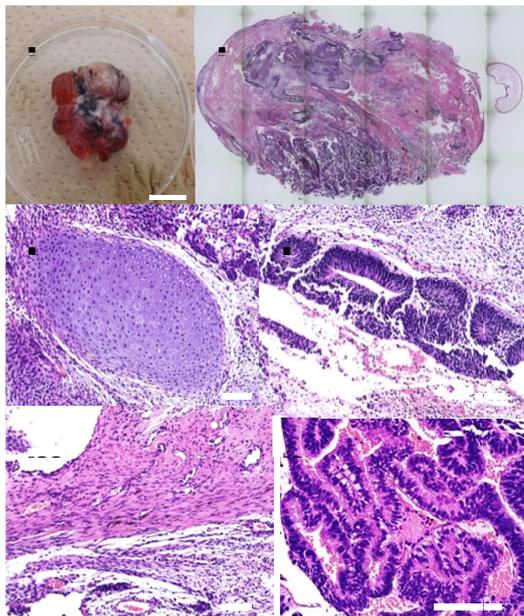
【研究結果】

iPS細胞やES細胞は、0.75TripLE Select: EDTAで剥離し、CryoStemで緩慢凍結した場合、解凍後の生存率が最も高かった。

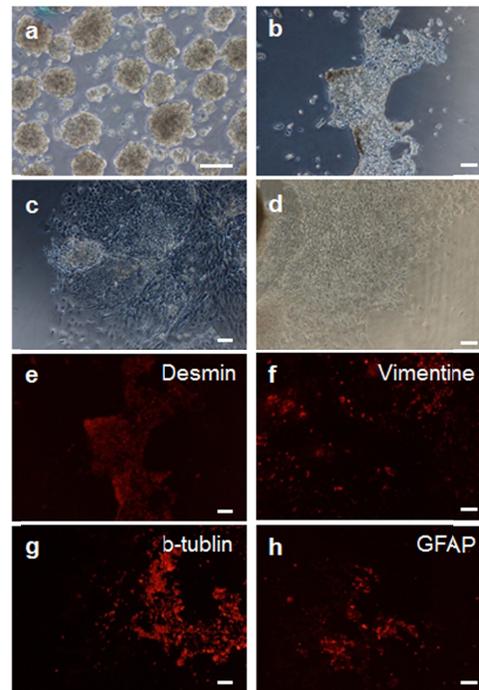
各種細胞剥離剤と細胞凍結剤を用いた冷凍保存細胞を解凍した後の生存率の比較



解凍後の細胞の分化能を奇形腫形成で評価した (in vivo 検査)



解凍後の細胞の分化能を in vitro 分化誘導で評価した



また、解凍後Passage3で細胞の増殖率は、凍結前の状態まで回復した。またEB形成や in vitro分化能、in vivo分化能などが保持されていた。

【考察】

On feeder での ES/iPS 細胞の保管技術に関しては、今年度 New York の Springer 出版社から protocol 集として出版した。また feeder-less については本研究成果を publish した。 ("An effective freezing/thawing method for human pluripotent stem cells cultured in chemically-defined and feeder-free conditions" Naoki Nishishita, Marie Muramatsu and Shin Kawamata, American Journal of Stem Cells in press 2015 ; in press)

今後は最終分化細胞の保管技術とりわけ iPS細胞由来REP sheetの解凍後の生存率をどのように高めるかを研究課題としたい。