



Title	凍結細胞の温度変動による応答特性に関する研究
Author(s)	奥田, 淳
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/103198
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (奥 田 淳)

論文題名 凍結細胞の温度変動による応答特性に関する研究

論文内容の要旨

再生医療分野における細胞製品の普及に伴い、細胞の凍結保存および輸送が従来以上に広く行われつつある。保管中の入出庫による一時的な温度上昇・下降 (Transient Warming Events, TWEs) の発生は避けられず、細胞の品質への影響が懸念されている。細胞製品は生きた細胞で構成されており、物理的環境の変化に対して多様な生物学的応答を示す。このため、細胞製造においては細胞に加わる物理化学的な「入力」と、それに伴う品質変化を生物学的な「出力」として捉え、その応答特性に基づいて工程を設計することが、品質維持の観点から極めて重要である。本研究では、細胞内のガラス転移温度を下回る温度域に着目し、温度サイクル付与による応答を解析することにより、入力と出力の関係性および変換過程を理解することを試みた。これにより、TWEsに対する凍結細胞の応答特性を明らかにし、保管時の温度管理設計の基礎となる知見を得ることを目的とした。

まず温度サイクル (入力) と生存性に与える影響 (出力) との関係性を理解するため、ヒトiPS細胞 (hiPSC) の凍結サンプルに対して条件 (温度域およびサイクル回数) を変化させて温度サイクルを付与し、生存性評価を行った。評価指標として、解凍直後の生細胞の凍結前の生細胞数に対する割合を示す回復率 (β) および24時間後の接着細胞割合を示す接着率 (α)、それらにより導き出される生存細胞ポテンシャル (P) を定義した。温度変動条件は温度域 ($-170\sim-80^{\circ}\text{C}$) および温度サイクル回数 ($0\sim70$ サイクル) を変化させた条件を対象とした。温度域の検討では、 -115°C を超える条件で α の低下が顕著となり、凍結保存液のガラス転移温度を上回る温度帯が細胞損傷の要因となることが示唆された。温度サイクル回数を変化させ評価した結果からは、 β には変化は認められなかったが、 α は20サイクルまで低下し、その後は一定の水準に収束するという、遅発的かつ非線形な応答を示した。これにより生存性への影響のサイクル回数依存性と、ガラス転移温度を指標とした応答性を持つことが理解された。さらに、骨髓由来のhMSCを用いた同様の評価では生存性の低下が認められなかったことから、細胞種によってTWEsに対する応答特性が異なる可能性が示された。

次に、温度サイクル (入力) による生存性変化 (出力) への変換過程を理解することを目的に、細胞内の応答を可視化・定量するため、ラマン分光法およびフローサイトメトリーを用いて解析を行った。ラマン分光法では、DMSOを含む凍結保存液 (CPA) のガラス転移温度 (T_g) を超える温度域において、細胞内のDMSOシグナルがサイクル数とともに増加する細胞が確認された。また、シトクロムcの酸化に伴うラマンシグナルの消失は、温度変動直後 (解凍後約3分以内) に生じており、DMSOの移動によって誘導されている可能性が示唆された。フローサイトメトリーの結果からは、ミトコンドリア膜電位を喪失した細胞 (TMRE-) がサイクル数に応じて増加し、非接着細胞の割合と同様の傾向を示すことが確認された。得られた結果より、温度サイクルにより局所環境に依存したDMSOの移動、シトクロムcの酸化、ミトコンドリアの損傷、細胞死の誘導による接着不全という一連の段階的に誘導される非同期的応答過程が示唆され、細胞応答に対する理解を深化した。

得られた知見から、凍結細胞の温度サイクルに対する生存性への影響の関係を整理し、その変換過程の核となる一連の事象を捉えたことにより細胞応答を解釈した。この解釈により、温度変動への応答特性として品質劣化を伴う可能性があることから、最終的な (すなわち投与の際の) 品質基準を設定し、それを満たすための管理条件の設定が不可欠であることを示した。本研究では管理条件の設定における細胞製品の応答特性の解釈の道筋を示した。さらにガラス転移温度といった材料の物性、細胞種ごとの感受性の違いを考慮する必要性が示唆された。実運用へ展開を考える上では、保管する細胞全ての温度をモニターすることは現実的に困難であることを考慮する必要がある。入出庫操作による物理化学的入力、室温曝露時間や出庫回数といった操作条件によって決定されるため、操作条件と物理化学的入力との関係を理解し、これに基づいて操作条件を決定することが求められる。以上により、温度変動による応答特性の解釈、管理条件の設定、操作条件の決定といった段階による、細胞製品の温度管理設計を論理的に構築するための戦略を示した。この知見は細胞製品の流通実現、標準化に貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (奥 田 淳)			
		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	内山 進

論文審査の結果の要旨

本論文は、再生医療に用いられる細胞製品の凍結保存中に避けられず発生する温度変動（Transient Warming Events, TWEs）が、細胞の生存性および品質に与える影響に関して、その応答特性を解析し、温度管理設計において重要な事象を解釈したものである。

第 1 章では、細胞治療の普及に伴い、細胞製品の凍結保存および輸送が広く行われつつある現状と、保管中の入出庫による一時的な温度変動が細胞品質へ与えるリスクについて概説し、本研究の目的を温度変動（物理化学的な入力）と細胞生存性への影響（生物学的な出力）の関係性と変換過程（細胞応答）の解釈として明確に設定している。

第 2 章では、ヒト iPS 細胞（hiPSC）を用い、温度域およびサイクル回数を変化させた条件下での温度サイクルの付与実験を実施し、生存性指標（回復率 β 、接着率 α 、生存細胞ポテンシャル P ）による定量評価を行っている。凍結保存液のガラス転移温度（ T_g ）である -115°C を超える条件で α が低下することから、 T_g 前後の物性変化が応答に関与する可能性が示されている。この点は実運用上の注意すべき管理温度帯に関する示唆を与える有用な知見であると評価される。また、温度サイクルによる α の変化に関しては、環境制御式の温度サイクル試験において、20 回以降は一定値に収束する非線形な傾向が得られている。これは、先行研究で報告された、ヒト間葉系幹細胞／間質細胞（hMSC）を用いた室温暴露式の温度サイクル試験における継続的な α の低下とは異なる挙動である。本論文ではこの相違の検証として、hMSC を用いた室温暴露式での再現試験および環境制御式での比較試験が行われており、室温暴露式では継続的な α の低下を起こすことが実証されている。また、hiPSC では α の低下が見られたのに対し、hMSC では同様の低下が確認されなかったことから、細胞種ごとの温度変動に対する感受性の違いが明確に示されている。このように先行研究との差異の検証を通じて実験条件と材料による生存性への影響の違いを論理的に整理することができおり、得られた知見は温度サイクル試験方式による温度条件の違い、また細胞種による温度変動感受性の違いといった温度管理設計を行う上で考慮すべきポイントを示している。

第 3 章では、細胞内の応答を可視化・定量化するためにラマン分光法およびフローサイトメトリーを用いた解析を実施し、第 2 章での α の低下を引き起こすメカニズムを調べられている。ラマン分光法では温度サイクルに伴う DMSO の細胞内移動、シトクロムの酸化と見られる挙動が確認され、フローサイトメトリーではミトコンドリア膜電位の喪失といった応答が確認されている。なかでも、低温下での Slit scanning 技術により DMSO の移動に伴うシトクロム c の酸化シグナルの消失が解凍後約 80 秒という極めて短時間で生じることが確認されており、この分野において最新の計測技術を適用することで初めて得られた重要な知見である。得られた結果と、先行する DMSO による細胞毒性や細胞死シグナルに関する知見とを統合し、DMSO の移動、シトクロム c の酸化、ミトコンドリアの損傷、細胞死の誘導、接着不全（ α の低下）に至るまでの一連の細胞応答過程を提案しており、これは現象を理解する上での示唆を与える有用な知見である。

第 4 章では、以上の実験的知見に基づき、凍結細胞の温度応答特性を踏まえた管理条件・操作条件の設計論を論理的に整理している。すべての細胞の温度を常時モニタリングすることが現実的でないことから、室温曝露時間や出庫回数といった操作条件を介して物理化学的入力を制御し、最終製品の品質基準を満たすことの重要性が示されている。

以上のように、本論文は細胞製品の保管における品質維持に不可欠な温度管理設計に関し、細胞製品の応答特性を解釈し、これに基づく理論的枠組みと実証的知見を提供した点で学術的に高い価値を有するものである。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。