

Title	Development of a vitrification method for preserving human myoblast cell sheets for myocardial regeneration therapy
Author(s)	大河原, 弘達
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72191
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 大河原 弘達	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 澤 芳 樹
	副 査 大阪大学教授 高 島 成 二
副 査 大阪大学教授 坂 田 泰 史	
論文審査の結果の要旨	
<p>重度心不全に対する新たな治療法の一つとして、骨格筋筋芽細胞シート移植による再生治療が期待されているが、汎用性は低く、この治療を普及させるためには有効な保存方法が必要である。</p> <p>本論文では、急速凍結法により凍結保存された骨格筋筋芽細胞シートが、凍結前の新鮮な細胞シートと同等の品質を示すかを検証した。</p> <p>細胞の生存率、細胞シートの外観形状、細胞外基質等は、急速凍結の前後で差は認められなかった。また、心筋梗塞モデルラットに急速凍結後の細胞シートを移植した結果、新鮮な細胞シートを移植した群と同等の心機能改善効果が認められた。これらの事から、細胞シートを急速凍結法により凍結保存することで、新鮮な細胞シートと同等に形態や生理活性を維持しながら長期間の保存が可能である事が示唆された。</p> <p>本論文の内容は、今後の重症心不全に対する骨格筋筋芽細胞シート移植治療の普及と、汎用性を向上させる為の重要な成果であり、学位に値するものと認める。</p>	

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	大河原 弘達
論文題名 Title	Development of a vitrification method for preserving human myoblast cell sheets for myocardial regeneration therapy (心筋再生治療におけるヒト骨格筋筋芽細胞シートのガラス化凍結保存法の開発)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>当科では、重度心不全に対する新たな治療法の一つとして、骨格筋筋芽細胞シート移植による再生治療を開発し、再生医療等製品として保険収載されるに至った。治療用の細胞シートは極めて衛生度の高い細胞培養加工施設(CPC)での調製が必須であり、移植が実施可能な施設は限定される。この細胞シートの保存技術が確立すれば、CPCで加工された細胞シートを遠方へ搬送することが可能となり、細胞シート治療の汎用性の向上が期待される。一方で、受精卵や胚を凍結する際には、それらの構造や個々の細胞を破壊せずに保存する事が可能な、ガラス化凍結(急速凍結)法が臨床でも応用されている。</p> <p>骨格筋筋芽細胞シートを急速凍結することで、新鮮な骨格筋筋芽細胞シートと同等に形態や生理活性を維持し、長期間保存することが可能であるかを検討した。</p> <p>〔方法(Methods)〕</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ヒト骨格筋筋芽細胞を温度応答性培養皿(Up-Cell)に播種し($1 \times 10^6/cm^2$)、細胞シートを作製した。 ・ 細胞シートを急速凍結液(『Stem Cell Keep』組成：6.5Mエチレングリコール、0.75Mスクロース、10% w/v carboxylated ϵ-poly-L-lysine)に5分間浸漬後、メッシュで両面を挟み、更にフィルムで密閉して液体窒素液面上で急速凍結した。 ・ 凍結した細胞シートを液体窒素中で2日間、1週間、1ヶ月間、3ヶ月間保存した。 ・ 凍結した細胞シートを融解し(凍結群)、新鮮な細胞シート(新鮮群)と形態や機能を比較した。 ・ nude ratの心筋梗塞モデルに新鮮群と凍結群の細胞シートを移植し、4週後の心機能をエコーで評価した。 <p>〔成績(Results)〕</p> <p>①細胞シートの外観は、3ヶ月間凍結保存した後も新鮮群と同様に円形膜状が維持されていた。②細胞生存率は、3ヶ月間凍結保存した後も新鮮群と同等であった。(新鮮群：$86.1 \pm 1.4\%$、凍結群：$82.7 \pm 2.5\%$ (n.s.))。③HE染色を行った結果、新鮮群と凍結群の両群ともに、細胞間に間隙は認められなかった。④ECMを構成するFibronectinの免疫染色を行った結果、Fibronectinは新鮮群と凍結群の両群ともに細胞間に局在し、同じ抗体を用いたwestern blotでは、3ヶ月間は発現量の差が認められなかった。また、Collagen I、N-Cadherin、Integrin $\alpha 5$の免疫染色やwestern blotにおいても同様に両群間で差は認められなかった。⑤細胞間接着の様子を電子顕微鏡で観察した結果、両群とも細胞間に間隙を認めなかった。⑥ミトコンドリアを電子顕微鏡で観察した結果、両群とも形態が維持されcristaeの構造も確認された。⑦血管新生を促すVEGFとHGFのrealtime-PCRを行った結果、新鮮群に比べ凍結群で遺伝子発現が有意に増加した(VEGF/GAPDH；新鮮群：1.0 ± 0、凍結群(3ヶ月)：2.3 ± 0.4 ($p < 0.01$) HGF/GAPDH；新鮮群：1.0 ± 0、凍結群(3ヶ月)：$2.3 \pm 0.4\%$ ($p < 0.01$))。⑧HGFのELISAを行った結果、新鮮群よりも凍結群において発現量が有意に増加した(HGF；新鮮群：$652 \pm 125 pg/\mu L$、凍結群(3ヶ月)：$1161 \pm 222 pg/\mu L$ ($p < 0.01$))。VEGFのELISAを行った結果、新鮮群よりも凍結群において発現量が有意に減少した(VEGF；新鮮群：$1711 \pm 141 pg/\mu L$、凍結群(3ヶ月)：$505 \pm 119 pg/\mu L$ ($p < 0.01$))。⑨心筋梗塞モデルに細胞シートを移植した結果、移植4週後の凍結群において新鮮群と同等の心機能改善効果を認めた(EF；新鮮群：(移植前)$40.9 \pm 2.1\%$→(移植後)$53.6 \pm 4.2\%$ ($p < 0.01$)、凍結群：(移植前)$40.1 \pm 2.1\%$→(移植後)$50.4 \pm 4.5\%$ ($p < 0.01$))。⑩移植4週後の心臓の組織解析の結果、左室線維化率、細胞短軸径、微小血管数においても同様に凍結群は新鮮群と同等の改善効果を認めた。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>骨格筋筋芽細胞シートを急速凍結することで、新鮮な骨格筋筋芽細胞シートと同等に形態や生理活性を維持しながら長期間保存することが可能であり、臨床応用の可能性が示唆された。</p>	