



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | iPS細胞シート凍結法における品質評価と凍結容器の開発   |
| Author(s)    |   |
| Citation     | 令和2（2020）年度学部学生による自主研究奨励事業<br>研究成果報告書．2021  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/80648">https://hdl.handle.net/11094/80648</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 令和2年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

|   |  |          |                |    |    |
|---|--|----------|----------------|----|----|
| ふりがな<br>氏名  | ふくだ めぐみ<br>福田 めぐみ  | 学部<br>学科 | 工学部<br>応用自然科学科 | 学年 | 2年 |
| ふりがな<br>共同<br>研究者氏名   |  | 学部<br>学科 |                | 学年 | 年  |
|   |  |          |                |    | 年  |
|   |  |          |                |    | 年  |
| アドバイザー<br>氏名  | 紀ノ岡 正博   | 所属       | 工学研究科          |    |    |
| 研究課題名   | iPS 細胞シート凍結法における品質評価と凍結容器の開発   |          |                |    |    |
| 研究成果の概要   | 研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽竊にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。) |          |                |    |    |
| <p>I. はじめに</p> <p>本研究において、当初の研究計画では iPS 細胞を用いて細胞シートを作成し、細胞シートの凍結に向けての実験を行う予定であった。しかし、実験にかかる期間を考慮した上で、今回はヒト骨格筋筋芽細胞を用いて細胞シートを作成・凍結法の品質評価に関する実験を行なった。筋芽細胞での実験によって凍結法が確立された後に iPS 細胞でも同様もしくは類似の凍結法を試み、品質評価することで当初の研究課題である「iPS 細胞シート凍結法における品質評価・凍結容器の開発」に繋げることができると展望する。</p> <p>II. 研究目的</p> <p>再生医療のさらなる普及を目指すためには、細胞シートの長期ストックが可能となることが求められる。そのためには凍結保存する必要があるが、細胞シートの凍結はシート上の細胞の環境の違いを考慮する必要があることから、細胞単体の凍結法とは異なる。シート状の位置によって、凍結までにかかる時間が変化すると考えられるためである。</p> <p>そこで本研究においては、緩慢法で細胞シートを凍結・解凍した場合に具体的にどのような問題点があるのかを明らかにし、新たな細胞シート凍結法の提案への第一歩を探る。</p> <p>III. 研究計画</p> |  |          |                |    |    |

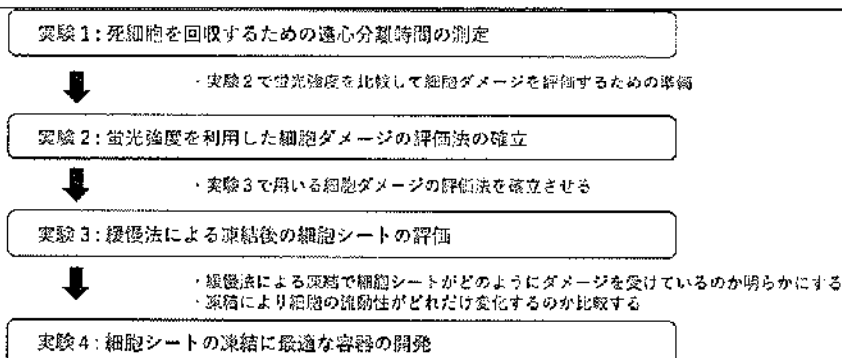


Fig.1 Study Plan

## IV. 研究方法

## 実験Ⅰ 死細胞を回収するための遠心分離時間の測定

筋芽細胞を 10 % FBS を含む高濃度グルコース培地で培養した後、細胞を回収し、遠心分離後に懸濁した。その後懸濁液を二等分し、再度遠心分離したのちに凍結溶液に保護剤を含むものと含まないものに分け、1mL バイアル中で緩慢法によって凍結した。

解冻後それぞれの細胞を等分し、異なる時間で遠心分離にかけた。遠心分離で回収された沈殿に 5mL の培地を加え再懸濁し、そのうち 200  $\mu$ L をエッペンチューブにとり、細胞数を測定した。

## 実験Ⅱ 蛍光強度を利用した凍結による細胞ダメージの評価

筋芽細胞を 10 % FBS を含む高濃度グルコース培地で培養した後、細胞を回収し、CellTracker Orange<sup>TM</sup> で染色した。凍結前の細胞懸濁液を一部 6-well plate で培養し、培養皿に接着後 0 時間後と 72 時間後で In Cell Analyzer にて観察した。残った細胞懸濁液は、再度遠心分離したのちに凍結溶液に保護剤を含むものと含まないものに分け、1mL バイアル中で緩慢法によって凍結した。72 時間後、解冻した細胞を 6-well plate に播種し、培養皿底面に接着後 In Cell Analyzer によって観察した。それぞれ観察された画像を Image J によって解析し、その蛍光強度を比較した。

## 実験Ⅲ 緩慢法による凍結後の細胞シートの評価

## (a) 均質な積層細胞シートの準備

筋芽細胞を 10 % FBS を含む高濃度グルコース培地で培養した後、細胞を回収し CellTracker Orange<sup>TM</sup> と CellTracker Green<sup>TM</sup> で染色した。細胞シートの 1 層目は CellTracker Green<sup>TM</sup>、2~5 層目は CellTracker Orange<sup>TM</sup>、で染色されたものを用いた。その後、UpCell 24-well plate の温度応答性表面に置かれたテフロンリングの内側に細胞を播種し、24 時間培養後に単層細胞シートを得た。この単層細胞シートを、温度応答性表面の感受温度に合わせて培養することでゼラチンスタンプ上に貼りつけた。この操作を 3 回繰り返して、3 層の積層細胞シートを (b) UpCell 24-well plate 上、もしくは (c) ibidi dish 上に得た。

## (b) 細胞シートの凍結

UpCell 上の細胞シートの上に Cell Shifter を静かに起き、感受温度以下で 30 分静置し、Cell Shifter と共に細胞シートを回収した。その後、Cell shifter 面を下にして 15mL クライオバイアルに細胞シートを移し、さらにその上に Cell Shifter を置いた。凍結保護剤を含む溶液を 600  $\mu$ L 添加した後に、-80 $^{\circ}$ C にて 48 時間凍結した。

## (c) シート上での細胞ダメージの分布の観測・品質評価

Ibidi dish 上に得た細胞は凍結せず、シート作成後 0 時間後と 48 時間後に In Cell Analyzer と confocal laser scanning microscope で蛍光画像を撮影した。また、UpCell 上から回収後に凍結

された細胞シートは、凍結後 48 時間で解凍し、CellShifter を用いて ibidi dish の上に移した。その後、解凍後 0 時間後と 48 時間後において In Cell Analyzer と confocal laser scanning microscope で蛍光画像を撮影した。

In Cell Analyzer で撮影された画像より、細胞シート上の蛍光強度の分布を比較し、凍結によるダメージの分布を観察した。また、confocal laser scanning microscope によって得られた画像から、凍結の有無によって積層シート内での細胞の流動性がどのように変化したのかを観察することで品質評価した。

## V. 実験結果

### 実験 I 死細胞を回収するための遠心分離時間の測定

各遠心分離時間における、回収された細胞数を以下の Table1 に示す。

Table.1 Cell counting result of the cells frozen with FBS(10%DMSO)

| (n=1)       | 5min               | 8min               |
|-------------|--------------------|--------------------|
| alive cells | $1.47 \times 10^5$ | $1.34 \times 10^5$ |
| dead cells  | $6.89 \times 10^3$ | $5.85 \times 10^3$ |
| total cells | $1.54 \times 10^5$ | $1.40 \times 10^5$ |

Table.2 Cell counting result of the cells frozen with FBS(10%DMEM)

| (n=1)       | 8min               | 13min              | 18min              | 23min              |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| alive cells | $3.62 \times 10^4$ | $5.18 \times 10^4$ | $7.82 \times 10^4$ | $4.01 \times 10^4$ |
| dead cells  | $4.89 \times 10^4$ | $6.42 \times 10^4$ | $7.06 \times 10^4$ | $5.87 \times 10^4$ |
| total cells | $8.50 \times 10^4$ | $1.16 \times 10^5$ | $1.48 \times 10^5$ | $9.86 \times 10^4$ |

### 実験 II 蛍光強度を利用した凍結による細胞ダメージの評価

計測されたサンプルの、Image J で解析された値を以下の Table 3 に示す。

Table.3 Quantified fluorescence intensity

| (n=10)               | 0 h                | 48 h (0 h after thawing) |
|----------------------|--------------------|--------------------------|
| Control (non-frozen) | $2.61 \times 10^4$ |                          |
| FBS (10% DMSO)       |                    | $1.61 \times 10^4$       |
| FBS (10% DMEM)       |                    | not detected             |

### 実験 III 緩慢法による凍結後の細胞シートの評価

In Cell Analyzer と confocal microscope での観察によって蛍光画像が得られた(Fig.2)。ただし、像を可視化するために画像のコントラストはそれぞれに調節されている。保護剤を含まない溶液で凍結された細胞シートについては、解凍後も培養皿底面に接着せず、培地内を漂っていたために焦点が定まらず、confocal microscope での観察は為されなかった。また confocal microscope で撮影された画像については、染色した色の違いによって細胞の流動性を確認するため白黒の画像では判断できず、本誌には掲載しない。

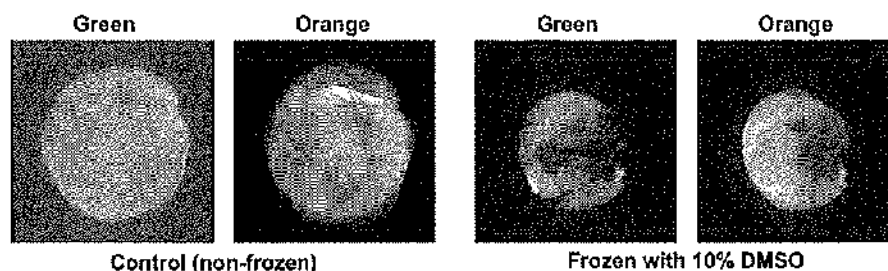


Fig.2 Images from In Cell Analyzer (0 h after stacking/thawing)

## VI. 考察

### 実験Ⅰ 死細胞を回収するための遠心分離時間の測定

Table2 に示す通り、18 分まで遠心分離時間を増やすほど多くの細胞を得られたが、これは T 検定においても有意差が示された。そのため、今後の実験においては 18 分を死細胞を回収するための遠心分離時間として設定した。また、23 分の遠心時間で回収できる細胞数が落ちたのは、長い遠心分離によって細胞が細かくちぎれていった可能性が考えられる。他にも、従来の遠心分離時間である 8 分では懸濁液中の細胞の多くがまだ回収しきれていないということがわかった。

ただし、これらのデータはそれぞれ 1 つのサンプルから得た懸濁液の細胞数を計測したものであるため、今後も同じ手順で実験を続けてサンプル数を多くし、再現性を確認する必要があると考える。

### 実験Ⅱ 蛍光強度を利用した凍結による細胞ダメージの評価

保護剤を含まずに凍結された細胞に関しては、解凍後に In Cell Analyzer では蛍光が検出されなかった。これは、①細胞がほとんど死んでしまっていた可能性と②細胞がダメージを受けたことで色素が流出した可能性が考えられるが、いずれの場合においても、保護剤を含んで凍結されたものと比べて蛍光強度に差が出ていたことになる。よって実験Ⅲにおいては、細胞シート上の損傷をみる指標として蛍光の強度差を用いても良いと考えられた。

また、播種から 48 時間経過後に control data の蛍光画像は撮影されなかった。これは蛍光強度が大幅に減少しており蛍光強度の比較に用いられないと考えられたためである。培養する中で細胞の成長や増殖に伴い、1 細胞内の色素濃度が減少したと考えられる。実験Ⅱの今後の展望としては、解凍後 48 時間の細胞の挙動を観察することで凍結後の細胞の生死を確認することなどが考えられる。

また、遠心分離時間を調節することで死細胞も回収することを試みたが、観察するためには死細胞の存在下では生細胞に焦点を当てられないことから、懸濁液全体ではなく細胞個体 1 つ 1 つの蛍光強度を比較した。

### 実験Ⅲ 緩慢法による凍結後の細胞シートの評価

保護剤を含まずに凍結した細胞シートは、解凍後も培養皿底面に接着せず、培地内を漂っていたことから凍結後は大半の細胞が死んでいたと考えられる。

In Cell Analyzer で撮影した画像については、凍結したサンプルの画像より、シート上で

内側に位置している細胞の方が蛍光強度が落ちているような様子が見て取れる。よって内側に位置する細胞の方が凍結による損傷を受けたことが予想される。また、Confocal microscopeによって撮影された画像によると、保護剤を含んで凍結した細胞も、凍結をしなかったもの比べて48時間培養後の細胞の挙動に大きな差は見られなかった。これより、細胞シートを凍結しても保護剤を含んでいれば、細胞は解冻後も生存し、その細胞内の働きは保たれているということが示唆される。また Fig.2 より、凍結を経た細胞シートの直径が小さくなっていたり、シート内に亀裂が入っていることがわかるが、これは観察から、凍結による影響よりも、細胞シートが接着する前にゼラチンスタンプを溶かしたことで細胞シートが培地中を漂っていたことの影響が大きいと考える。

実験Ⅰと同様に、今回はそれぞれ1サンプルずつしか準備できなかった。そのため、今後とも同じ手順で実験を続けてサンプル数を多くし、再現性を確認する必要があると考える。

## VII. まとめ

実験ⅠとⅡにおいては新たな細胞の損傷の評価法を確立させることを試みた。蛍光強度を比較することは確実性は保たないが、損傷の目安として用いることが可能ではないかと考えられた。また、実験Ⅲにおいては実際に細胞シートを凍結し、解冻後の細胞の挙動を観察した。凍結・解冻後の挙動から、凍結されなかった細胞シートと変わらない働きを持っていたと言える。ただし、シートの形状が小さくなって変化している点については、今後も改善を試みていく必要があると考える。