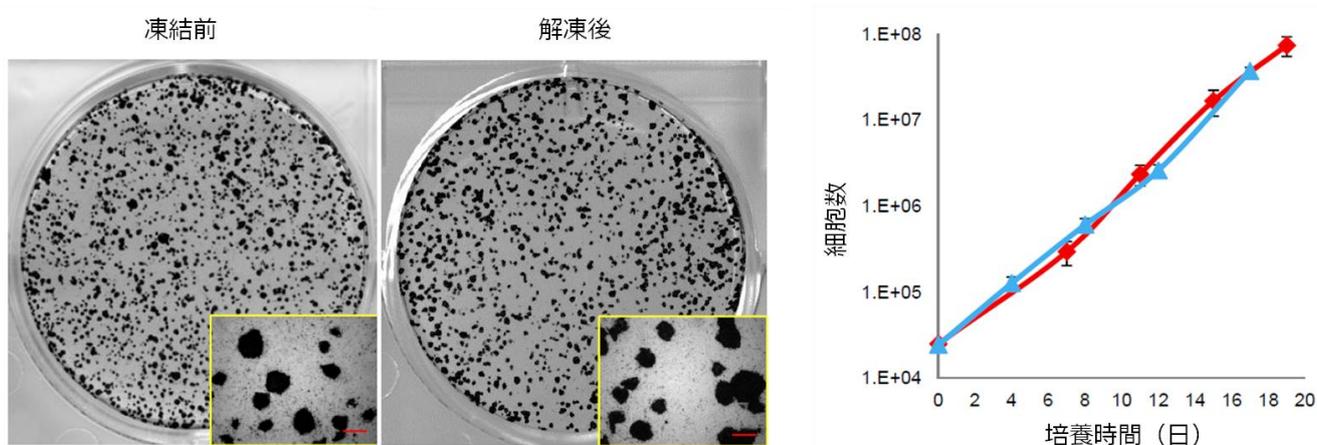


ヒト多能性幹細胞の新しい凍結保存試薬を開発

2014年2月13日

ヒト多能性幹細胞は、再生医療の切り札として注目を集める一方、非常にデリケートで扱いが難しいことでも知られる。播種時の細胞密度や継代のタイミング、操作時のちょっとしたストレスですぐに性質が変わってしまったり、死んでしまったりするのだ。凍結保存によるダメージは特に大きく、凍結・解凍に際して多くの細胞をロスしてしまうことが技術的なボトルネックとなっていた。ヒト ES/iPS 細胞の臨床応用を前に、ヒト多能性幹細胞に特化した、簡便で安価で効率のよい、新たな凍結保存方法の開発が求められていた。

理研 CDB の芥 照夫 元研究員と今泉 啓太郎 元研究員（幹細胞研究グループ、西川 伸一 元グループディレクター：2013年3月に終了）らは、臍帯血幹細胞や造血幹細胞の保存に用いる既存の細胞凍結保存試薬を改良し、ヒト多能性幹細胞に特化した新たな細胞凍結保存試薬を開発した。この成果は公益財団法人 先端医療振興財団・川真田 伸 副事業統括らとの共同研究で進められ、オンライン科学誌 *PLOS ONE* に2月12日付けで掲載された。なお、今回開発した細胞凍結保存試薬「CP-5E」は、細胞剥離液「Pronase/EDTA」との組み合わせによる新しいヒト多能性幹細胞の凍結保存システムとして理研と極東製薬工業が共同で国際特許を出願している。



(左) 凍結前後のヒト iPS 細胞株 201B7 の ALP 染色像。凍結前後でコロニー数はほとんど変わらない。
 (右) 細胞増殖曲線。解凍後 (赤) も凍結前 (青) と同等の増殖力を維持している。

細胞内に大きな氷の結晶を作らせないことが、細胞凍結時のダメージを防ぐ最大のポイントだ。現在最も広く用いられているガラス化法は、液体窒素を用い、細胞を高濃度の抗凍結剤の中で一気に凍結させる。しかし、凍結時のスピードが非常に重要であることから手技の習熟が必須であり、一度に大量の細胞を凍結するのも不向きだった。一方、より簡便な緩慢凍結法は、凍結保存試薬に懸濁しディープフリーザー内で一晩かけてゆっくり凍らせるだけと、専門的な技術は不要だ。しかし、細胞へのダメージが大きく、解凍時の細胞のロスが極めて大きかった。そこで、開発の足がかりとしたのは、20年以上前から臍帯血幹細胞や造血幹細胞の凍結保存に用いられてきた試薬。この試薬の組成を元に、ヒト多能性幹細胞の緩慢凍

結に最適化した新たな細胞凍結保存試薬の開発を目指した。

細胞の凍結保存の効率は、直前に行う細胞解離（コロニーを小さな細胞塊に分ける）の操作に大きく影響される。細胞解離の度合いによって細胞塊のサイズが変わると、細胞が凍結保存溶液に晒される面積が変わるためだ。そこで、既存の 5 つの細胞解離試薬（Pronase/EDTA, trypsin/EDTA, Dispase II, Collagenase IV, CTK）の中から、ヒト多能性幹細胞の凍結保存に最適なものを検討した。細胞凍結には、現在造血幹細胞株の緩慢凍結に用いられている溶液の組成を一部改変して用い、各種細胞解離試薬で処理後に凍結・解凍した細胞を ALP 染色して、生存率を調べた。その結果、Pronase/EDTA を用いると細胞生存率が 44% と最も高く、細胞塊の大きさのばらつきが小さいことが分かった。一方、trypsin/EDTA では細胞生存率が半分以下で細胞塊のサイズもばらつきが大きく、その他の試薬では解凍後に細胞が全滅していた。

次に芥らは、Pronase/EDTA と相性の良い、ヒト多能性幹細胞に最適な細胞凍結保存溶液を検討した。細胞保護作用のある溶剤を添加した 5 種類の溶液を新たに調合し、比較検討したところ、エチレングリコール (EG) を含む溶液を用いたとき、解凍後の細胞生存率が最も高いことが判明。さらに添加量を検討し、EG 5% を含む溶液「CP-5E」 [6% ヒドロキシエチルスターチ (HES) , 5% DMSO, 5% EG/生理食塩水] が最適であることを示した。この溶液を Pronase/EDTA と組み合わせて用いると、複数のヒト iPS 細胞株およびヒト ES 細胞株の解凍後の細胞生存率は実に 80% 以上であった。

最後に、凍結後の細胞の評価を行った。凍結前後の細胞を 3 継代 (20 日間) にわたり培養し、増殖の様子を調べると、凍結前後で増殖力に違いは見られなかった。また、凍結前後で多能性マーカー遺伝子の発現にも変化はなく、in vitro の分化誘導実験でも問題なく内・中・外胚葉の三胚葉すべてへ分化した。マウスの皮下に移植するとテラトーマを形成することも確認し、開発した凍結保存法により「多能性」が損なわれることはない結論付けた。さらに、核型解析を行い染色体構造に異常がないことも確認している。

今回開発したヒト多能性幹細胞凍結保存試薬は、動物成分やタンパク質を含まないことも大きな特徴だ。可能な限りシンプルな組成することで、BSA やヒト血清に見られるロット間のばらつきや異種病原体への感染といったリスクを回避できた。また、細胞解離試薬とのパッケージとして開発したことで、より簡便で効率のよいヒト多能性幹細胞の凍結保存を可能にした。「再生医療や創薬の分野でヒト多能性幹細胞の需要が高まる中、簡単・安価・高効率・安全なハンドリング方法の確立は必須です。本研究が、ヒト多能性幹細胞研究をスタートさせる技術的ハードルを下げ、基礎研究のみならず応用研究を加速させるきっかけとなれば」と西川グループディレクターは語った。