

論文審査の要旨及び担当者

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	西山 雄一郎
論文審査担当者	主 査	整形外科	中 村 雅 也	
	内科学	福 田 恵 一	解剖学	松 尾 光 一
	生理学	柚 崎 通 介		
学力確認担当者：			審査委員長：福田 恵一	
			試問日：平成28年 1月29日	
(論 文 審 査 の 要 旨)				
論文題名：Safe and efficient method for cryopreservation of human induced pluripotent stem cell-derived neural stem and progenitor cells by a programmed freezer with a magnetic field (磁場下プログラムフリーザーによる安全かつ効率的なヒト人工多能性幹細胞由来神経幹/前駆細胞の凍結保存)				
<p>脊髄損傷に対するヒトiPSC細胞由来神経幹/前駆細胞 (iPSC-neural stem/progenitor cells : iPSC-NS/PCs) を用いた他家移植治療では、iPSC-NS/PCsを凍結保存しておく必要があり、凍結融解がiPSC-NS/PCsに及ぼす影響を検討した。継代後6日目に200万個の細胞をneurosphereの形態で、従来の凍結処理容器を用いて凍結すると生存率は34%であったが、Cells Alive System (CAS) を用いると生存率が66.6%になること、また凍結融解後のiPSC-NS/PCsは凍結前と同等の増殖能、分化能、遺伝子発現プロファイルを有していることを明らかにした。</p> <p>審査では、凍結前、融解直後、融解後短期間培養した細胞を移植し、生着率や増殖率を検討すべきであると問われた。これまでの移植実験の結果から、融解直後と融解後短期間培養した細胞間で生着と増殖に差はなかったと回答された。また、凍結融解が腫瘍形成に関連している可能性、遺伝子発現変化が持つ意味、またheat shock protein関連遺伝子の変化について問われた。凍結前、融解後の細胞でいずれも腫瘍形成を認めなかったこと、凍結前、融解後の細胞間で細胞死や増殖に関わる遺伝子発現に変化がみられなかったことから、腫瘍化への関与は低いと考えるが、融解後の細胞が移植後に増加しており、さらに長期間経過観察すべきであったと回答された。また遺伝子発現解析では腫瘍関連遺伝子についても詳細に検討すべきであり、今後の検討課題と回答された。次にneurosphereが均一に凍結されているのかという質問に対して、neurosphere内部の細胞まで凍結保存液が浸透するように一定時間浸していたため、均一に凍結されneurosphere内部の細胞も融解後に生存したと考える回答された。また、ガラス化法は細胞内氷晶形成を防げるが、その機序に関して質問された。高濃度の凍結保護剤を含む凍結保存液中に細胞を入れると、細胞内が脱水し、その後急速に凍結させることで氷晶形成が起きないと回答された。さらに、凍結保存液の検討およびCASの条件設定について問われた。本研究では臨床応用できる凍結保存液に着目して検討したため、その他の保存液は検討しなかったが、生殖医療で行われてきたように凍結保存液をさらに改良することで、生存率の向上につながる可能性はあると回答された。また、凍結開始時の温度上昇を抑える工夫やCASの設定条件をさらに詳細に検討することで生存率が向上する可能性はあるものの、他の細胞を用いた先行研究に基づき、設定条件を絞って研究したと回答された。最後にCASの優位性を証明するために、磁場をかけずに凍結することで磁場の影響を詳細に検討できたと指摘され、今後の検討課題と回答された。</p> <p>以上のように、本研究は検討すべき課題を残しているものの、脊髄損傷に対するiPSC-NS/PCs移植治療の臨床応用に不可欠で、iPSC-NS/PCsの凍結保存におけるCASの条件を最適化した点、それに伴い生存率が向上した点において有意義な研究であると評価された。</p>				