

# 主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	西 山 雄 一 郎
<b>主 論 文 題 名</b> 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)				
<b>(内容の要旨)</b> 幹細胞は、遺伝子異常、疾患、外傷などで損傷した細胞や変性した細胞を含む病態の治療における、再生医療の細胞資源としての可能性を秘めている。なかでも、ヒト人工多能性幹細胞由来神経幹/前駆細胞 (human induced Pluripotent Stem Cell derived-Neural Stem/Progenitor Cells: hiPSC-NS/PCs) は、齧歯類、霊長類の亜急性期脊髄損傷に対する有効性が示され、その臨床応用が期待されている。しかし現行の分化誘導法では、細胞移植の至適時期である亜急性期に間に合わないため、臨床応用では、hiPSC-NS/PCsを凍結保存して使用する他家移植を計画している。そのためには、安全かつ効率的な細胞保存法の確立が重要である。凍結保存は、臨床での使用に際し、幹細胞を適切な条件を維持しつつ、長期間保存することができるが、緩慢凍結法やガラス化法といった従来の凍結保存法は細胞生存率や細胞毒性などにおいてそれぞれ長所、短所を有していた。 本研究では、磁場下プログラムフリーザー (Cells Alive System: CAS) を用いて、新しい緩慢凍結法を開発し、hiPSC-NS/PCsにおける凍結保存の影響を検討した。継代後3日目または6日目に、200万個または500万個のhiPSC-NS/PCsを、CASまたは従来の凍結処理容器を用いて、凍結保存液STEM CELL-BANKER <sup>®</sup> で凍結した。CASは磁場を0.22~0.29mT、0.30~0.40mT、0.37~0.50mTの3群間で検討した。0.22~0.29mT、0.30~0.40mTの磁場下で凍結させると、凍結時期、凍結細胞数によらず、従来の緩慢凍結法と比較し、凍結融解後の細胞生存率は有意に向上し、継代後6日目に200万個で0.30~0.40mT磁場下に凍結させると最も生存率が高かった (生存率: 約70%)。継代後3日目または6日目に200万個で0.30~0.40mT磁場下に凍結させたhiPSC-NS/PCsは、ニューロスフェア径も凍結処理容器と比較し保たれており、細胞増殖能や分化能も凍結前と同等であり、凍結融解の与える影響も少ないと考えられた。さらに凍結融解したhiPSC-NS/PCsは、遺伝子発現解析においても凍結前のhiPSC-NS/PCsと同等であり、凍結融解が遺伝子発現に与える影響も少ないと考えられた。 本研究により新たに開発したCASによる凍結保存法は、融解後の細胞生存率を向上させ、増殖能、分化能、遺伝子発現にも大きな影響を与えなかったことから、脊髄損傷に対する細胞移植による再生医療の臨床応用に向けたhiPSC-NS/PCsの凍結保存およびバンク化に極めて有用であると考えられた。				