

Cryopreserved spontaneous spheroids from compact
bone-derived mesenchymal stromal cells for
bone tissue engineering
(骨再生治療を目的とした皮質骨由来間葉系間質細胞による
スフェロイドの凍結保存)

董 宏偉

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員：各務 秀明 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived
mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering

HONGWEI DONG

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Hideaki Kagami)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

【目的】

浮遊状態で細胞塊を形成するスフェロイド培養法は、従来のシャーレ上で行う平面培養と比較して優れた幹細胞の選択的培養法であることが知られている。また、われわれのグループでは、特殊な低接着性プレートを用いることで、効率的に高い幹細胞性を有する自発的スフェロイドの形成を行う方法を開発し、報告してきた。マウス皮質骨由来間葉系間質細胞（compact bone-derived mesenchymal stromal cells: CB-MSCs）から形成された自発的スフェロイドは、優れた幹細胞性や、高い骨分化能を有する。この細胞を再生医療

に応用するためには凍結保存方法の確立が望まれるが、これまで自発的スフェロイドの凍結保存方法については十分な検討が行われていなかった。本研究では、このCB-MSCsから形成された自発的スフェロイドを用いて、凍結保存と解凍が幹細胞性や骨分化能、およびin vivoにおける骨形成能に与える影響について検討した。

【材料と方法】

3週令雄C57BL/6Jマウスを麻酔薬の過量投与によって安楽死させた後、大腿骨および脛骨を取り出し、細切してコラゲナーゼにて処理を行った。得られた細胞を基礎培地（ α -MEM+10%牛

胎児血清+bFGF)にて平面培養を行い、CB-
MSCsを得た。2継代目の細胞をスフェロイド形
成用の低接着性シャーレに播種することで、自発
的スフェロイドを得た。24時間後にスフェロイド
を回収し、5、10、15、20%のジメチルスルホキ
シド(DMSO)とともに緩徐凍結法にて -80°C
まで冷却し、その後液体窒素中で保管した。解凍
後、WST-8およびLDH(細胞増殖/細胞毒性アッ
セイキット、同仁化学研究所)を用いて、生存細
胞数と細胞障害の程度を測定した。次に凍結保護
剤による凍結前のスフェロイド(非凍結群)と凍
結解凍後のスフェロイド(凍結群)の体性幹細胞
マーカー、多能性幹細胞マーカー、および骨分化
マーカーの発現を比較した。また、7日間骨分化
誘導培地にて分化誘導後、骨分化マーカーの発現
を調べた。次に非凍結群および凍結群のスフェロ
イドと、これらを骨分化誘導後の細胞をそれぞれ
 β -TCPブロック(オスフェリオン、オリンパス
テルモバイオマテリアル)へ播種し、SCIDマウ
スの背部皮下へ埋入した。4週後に摘出・固定し、
脱灰、包埋、薄切してHematoxylin-eosinにて
染色し、組織学的検討を行った。

【結果】

解凍後の細胞生存率は5% DMSOの群で最も
高く、細胞障害の程度もこの群が最も低かった。
この条件で凍結したスフェロイドについて、体性
幹細胞マーカーであるCD29、CD44、CD105、

Sca1、多能性幹細胞マーカーであるSSEA1、
Sox2、Oct4、Nanog、KLF4および骨分化能のマ
ーカーであるOCN、OPN、Col1A1、BSA、Os-
terixの発現を比較したところ、非凍結群と凍結
群で有意差は認められなかった。骨分化誘導後、
非凍結群と凍結群のALP活性はそれぞれ $1.28 \pm$
 0.19 と 1.46 ± 0.39 で、有意差は認められなかつた。
また、骨分化マーカーであるBSP、Osterix、
DMP1の発現も、非凍結群と凍結群の間で有意差
は認められなかった。SCIDマウスへ移植後4週
のサンプルを解析したところ、凍結群では非凍結
群と同程度の骨組織の再生が認められ、さらに、
骨分化誘導を行わない場合でも、分化誘導を行っ
た自発的スフェロイドと同程度の骨形成がみられ
た。

【結論】

CB-MSCsによる自発的スフェロイドを調製
し、凍結保護剤であるDMSOの濃度の最適化を
試みたところ、5%で最も高い生存率が得られた。
この条件で凍結保存を行った自発的スフェロイド
では幹細胞性、骨分化能、および骨形成能が維持
されており、凍結保存を行っていない自発的ス
フェロイドと同程度であった。適切な凍結保存方
法を選択することで、CB-MSCsによる自発的ス
フェロイドは利便性の高い骨再生用の細胞源とな
ることが示唆された。