



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット心筋細胞の凍結保存におけるジメチルスルホキシドの有効性評価
Author(s)	宮村, 謙一郎; 永山, 昌史; 郷原, 一寿 他
Citation	低温生物工学会誌, 56(2), 111-117
Issue Date	2010-10-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51699
Rights	利用は著作権の範囲内に限られる.
Type	journal article
File Information	CaC56-2_111-117.pdf



[原著論文]

ラット心筋細胞の凍結保存におけるジメチルスルホキシドの有効性評価

¹北海道大学大学院 工学研究院 応用物理学部門²株式会社プライマリーセル宮村 謙一郎¹, 永山 昌史¹, 郷原 一寿¹, 平 敏夫², 清水 恭子², 酒井 雅人², 内田 努¹

Evaluation of Viability of Cryopreserved Rat Cardiac Myocytes and Effects of Dimethyl Sulfoxide Concentration on Cryopreservation

Kenichiro MIYAMURA¹, Masafumi NAGAYAMA¹, Kazutoshi GOHARA¹, Toshio TAIRA², Kyoko SHIMIZU², Masato SAKAI², and Tsutomu UCHIDA¹¹Division of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University, N13 W8 Kita-ku, Sapporo 060-8628, Japan²Primary Cell Co., Ltd., N21W12 Kita-ku, Sapporo, 001-0021, Japan

Cryopreserved cardiac myocytes are expected to be useful for the development of new drug against heart disease. However, the appropriate cryopreservation process for cardiac myocytes has not been established yet. Therefore, in this study, we evaluate the effectiveness of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the cryopreservation of cardiac myocytes by three measurements: 1) the total viability (including cardiac myocytes) just after thawing with trypan blue staining, 2) the observation of morphology of cardiac myocytes for 7 days culture by real-time phase contrast microscopy and immunofluorescent staining, and 3) the variation of their beating rates for 7 days after thawing.

The total viabilities of cryopreserved cells with 3 v/v% to 20 v/v% DMSO concentration were higher than those without DMSO. Thawed cells contracted regularly and spontaneously during culture, as did the non-cryopreserved cells. The immunofluorescence observation indicated that the thawed cardiac myocytes expressed α -actinin. Therefore, cardiac myocytes could be survived by the cryopreservation with DMSO concentrations between 3 v/v% and 20 v/v%, which had the normal contraction rates during culture for 7 days. (Received Oct. 31, 2009; Accepted Feb. 1, 2010)

緒 言

心筋細胞は心臓を構成する細胞であり、近年、個体を用いた動物実験の代わりとして薬理学的解析等に用いられるようになってきた¹⁾。心臓や心筋細胞の凍結保存研究は1950年代から進められており²⁾、凍結保存期間の影響等について検討されてきた³⁾。

[Key words: Dimethyl sulfoxide, Cardiac myocytes, Cryopreservation; ジメチルスルホキシド, 心筋細胞, 凍結保存]

しかしながら、分化した心筋細胞は分裂能をほとんど有しておらず⁴⁾、凍結保存が困難な細胞とされている。凍結保存技術の評価方法としては、一般的に融解した細胞の生存率測定が行われる。心筋細胞の場合もこうした評価が行なわれてきたが⁵⁾、初代培養心筋細胞の調製時には繊維芽細胞、内皮細胞等の非心筋細胞も含まれるため、十分な評価方法とは言えない。また融解した細胞の機能性評価として、培養初期での拍動の有無を調べた研究もあるが⁶⁾、非凍結細胞(コントロール)に比べて機能が低下しているかどうかの定量的評価はなされていない。

(2)

そこで、本研究では初代培養心筋細胞を凍結保存する技術開発を行ない、融解した心筋細胞の機能を評価する手法を検討した。具体的には、多くの細胞に有効であると考えられているジメチルスルホキシド (DMSO) を凍結保護剤として⁷⁾、凍結保存を行なった。そして、凍結保存した細胞の生存率と機能回復率を定量化するため、融解後の細胞に対し、1) トリパンプルー染色による細胞生存率、融解後7日間に亘る2) 形態観察と、3) 同期拍動数測定を行い、コントロールとの比較を行なった。培養最終日には免疫蛍光染色を行い、心筋細胞を確認した。これらの評価方法から凍結保存した細胞の生存率や拍動機能の正常性について評価した。さらに、DMSO濃度を3~20 v/v%の間で変化させ、DMSOの心筋細胞に対する凍結保護作用の濃度依存性を調べた。

材料および方法

1. 実験材料

1・1, 心筋細胞調製方法

細胞は新生子ラット心室由来心筋細胞を使用した。心臓は生後2~4日齢の新生子ラットから摘出されたものを使用した。細胞の分散処理として、心臓から分離した心室に対し、コラゲナーゼで37℃・15分間の酵素処理を3回行なった。得られた分散細胞を培養容器に撒き、接着性の高い非心筋細胞を容器に接着させることにより、懸濁液から非心筋細胞を除去した⁸⁾。最終的に培養液中に 2.0×10^5 cells/mlの濃度で分散させた細胞懸濁液を調製した。心筋細胞の培養液はダルベッコ変法イーグル培地：ハムF12 (1:1) 混合培地に、ウシ胎児血清 10%, ペニシリン 10 units/ml, ストレプトマイシン 10 µg/mlを加えたものである。

1・2, 凍結・融解方法

まず、培養液に3~20 v/v%のDMSO (SIGMA社製)を加え、凍結用培養液を作成した。上述の細胞懸濁液中の培養液をこの凍結用培養液に置換し、クライオチューブ (Nunc社製)に1 mLずつ分注した。その後、クライオチューブを-80℃のディープフリーザー中に静置することで細胞 (懸濁液)を凍結させ、保存温度 $-78.2 \pm 0.9^\circ\text{C}$ の条件下で7日間保存した。本凍結法での冷却速度は約 $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ であっ

た。DMSO濃度条件は0, 3, 5, 8, 10, 15, 20 v/v%とし、各条件で3回以上の実験を行なった。

7日間の保存後、クライオチューブを37℃の恒温槽に浸すことで、凍結細胞の急速融解を行なった。融解後、凍結保護剤を直ちに通常培養液と置換した。

1・3, 培養方法

融解し、通常培養液と置換した細胞は、培養ディッシュに 1.0×10^5 cells/mm²の密度で撒き、37℃、湿度100%, 5%CO₂:95%airの条件下で7日間培養した。融解した細胞 (凍結融解細胞)の正常性を評価するため、同じロットの細胞を凍結させず、コントロールとして上記と同様の条件下で7日間培養した。

2. 心筋細胞の凍結保存法の評価方法

心筋細胞の拍動機能の正常性と生存率を、凍結融解細胞の正常性の指標として、以下の方法から評価した。

2・1, 細胞生存率測定

トリパンプルー (SIGMA社製)を用いて、融解直後の細胞を染色した。血球計算盤から測定した20個程度の細胞のうち、トリパンプルーにより染まっていない細胞を生存細胞として、1試料につき8回の測定を行ない平均し、生存率を測定した。そして、同じロットのコントロールの生存率を100%として規格化を行なった。各条件において3回から5回の実験を行ない、その平均値をその条件における細胞生存率とした。各実験における複数回の実験データのうち、最大値と最小値を平均値からの偏差として表した。

2・2, 形態観察

融解後7日間に亘って培養し、その形態変化の様子を、蛍光位相差顕微鏡 (OLYMPUS社製, IX 71)を用いて位相差観察した。観察中の温度変化を防ぐため、ステージ上は $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に調整した。そして、心筋細胞の接着・伸展・分裂の様子を、コントロールと凍結融解細胞とで比較した。

2.3. 免疫蛍光染色

培養 7 日後の心筋細胞の存在と形態などを確認するため、心筋細胞マーカーとして知られる α -アクチニンの免疫蛍光染色を行なった。

まず、7 日間培養した細胞を 4%パラホルムアルデヒドにより固定した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) による洗浄後、0.5%トリトン X を用いて膜透過処理を施し、再び PBS にて洗浄した。ウシ胎児血清アルブミンを用いたブロッッキング処理の後、マウスモノクローナル抗 α -アクチニン (サルコメア) 抗体 (SIGMA 社製) を 1 次抗体、Alexa Flour 546 anti-mouse IgG (MolecularProbes 社製) を 2 次抗体として α -アクチニンを蛍光標識した。同時に、ヘキスト 33342 (和光純薬社製) を用いて、細胞核を蛍光標識した。最後に褪色防止剤を加え、カバーガラスにより密閉した。観察には蛍光位相差顕微鏡を用い、観察倍率 100 倍として、各実験のコントロールと凍結融解細胞において、それぞれ任意の 30 視野について位相差像と蛍光像を比較観察した。

2.4. 拍動数測定

凍結融解細胞の拍動機能の回復程度を定量化するために、顕微鏡を用いた形態観察時に、複数の細胞との同期的な拍動 (同期拍動) が確認された日、及びその後の同期拍動数の日変化を観測した。さらに、培養 7 日間における最大の拍動数 (最高拍動数) をコントロールにおける最高拍動数で除した値を、最高拍動数回復率として定義した。なお、同期拍動数は観察倍率 100 倍として、各実験のコントロールと凍結融解細胞において、それぞれ任意の 4 視野でカウントし、平均した。そして、各条件において 3 回から 5 回の実験を行ない、その平均値をその条件における拍動数とした。また、各条件において複数回の実験データのうち、最大値と最小値を平均値からの偏差として表した。

結果と考察

1. 細胞生存率測定

DMSO を用いて凍結した細胞においては同じロットのコントロール細胞で計測した値に比べ、各実験とも 40%以上の細胞が生存し、DMSO を用いない場合に比べて高い生存率を得た (Fig. 1)。これよ

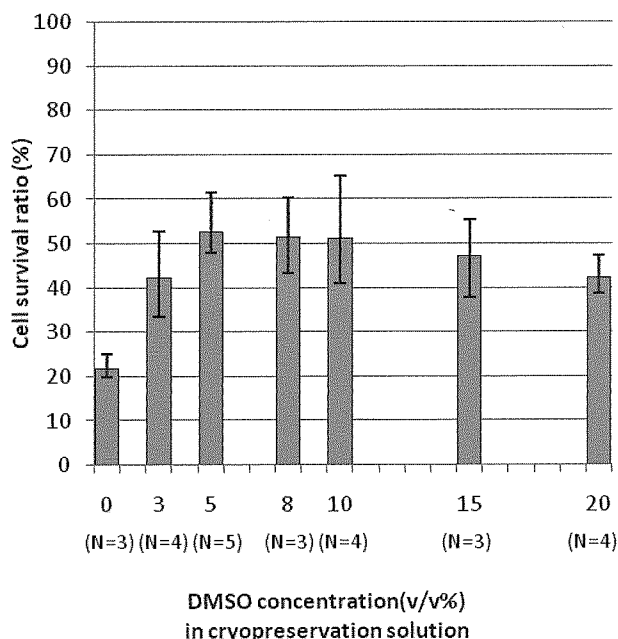


Fig. 1 Post-thaw viability measured by trypan blue. Error bar represents the largest deviation range. N indicates the number of experiments.

り、本実験の凍結方法に対して DMSO が凍結保護剤として有効であると考えられる。

また、DMSO 濃度を変えた場合の細胞生存率については、いずれも平均 40~50%程度で差は見られなかった。

2. 形態観察・免疫蛍光染色

まず、評価の基準となるコントロール細胞について観測を行なった結果、細胞は培養 1 日目にはディッシュ上に接着し、伸展した (Fig. 2a)。また、培養 1 日目から個々の心筋細胞の拍動、および隣接する心筋細胞との同期拍動が観察された。培養日数が進むにつれ、細胞が伸展・増殖し、基板が細胞で埋め尽くされると (細胞単層形成)、視野全体が一様に拍動するようになった (Fig. 2b)。その後、培養 7 日目まで一様に拍動を続けた (Fig. 2c)。培養 7 日目後の α -アクチニンによる免疫蛍光染色により、拍動していた細胞が心筋細胞であることを確認した (Fig. 2d)。

これに対し凍結融解細胞は、培養 1 日目には接着し伸展したが、コントロールに比べると細胞の数はいずれも少なかった (Fig. 3a)。これは Fig. 1 で観測した結果と一致する。接着・伸展した細胞のうち

(4)

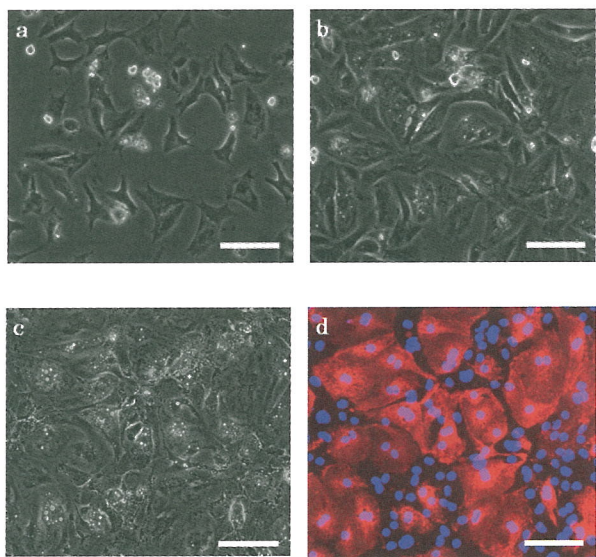


Fig. 2 Morphology of control cardiac myocytes. a, initial culture at 1day in vitro (DIV1); b, after single layer formation (DIV3); c, end of culture (DIV7); d, expression of sarcomeric α -actinin (red) in cardiac myocytes and hoechst33342 (blue) in cell nuclei with immunofluorescence staining. The scale bars indicate 100 μ m.

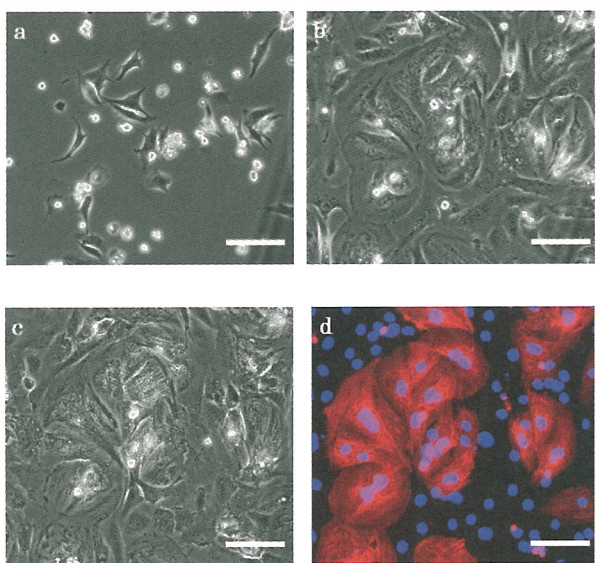


Fig. 3 Morphology of cultured cardiac myocytes cryopreserved for 7days at -80°C including DMSO 5v/v%. a, initial culture (DIV1); b, after single layer formation (DIV3); c, end of culture (DIV7); d, expression of sarcomeric α -actinin (red) in cardiac myocytes and hoechst (blue) in cell nuclei with immunofluorescence staining. The scale bars indicate 100 μ m.

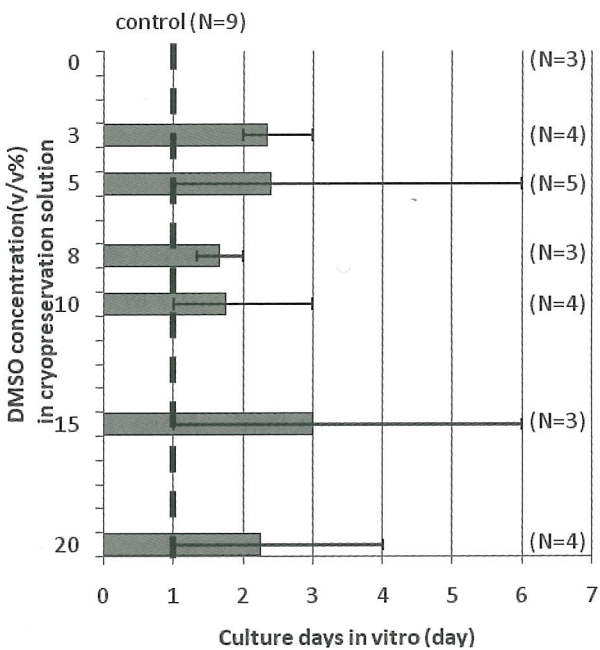


Fig. 4 Starting date of the synchronous beating in cryopreserved cells. Dotted line represents average value of control. Error bar represents the largest deviation range. N indicates the number of experiments.

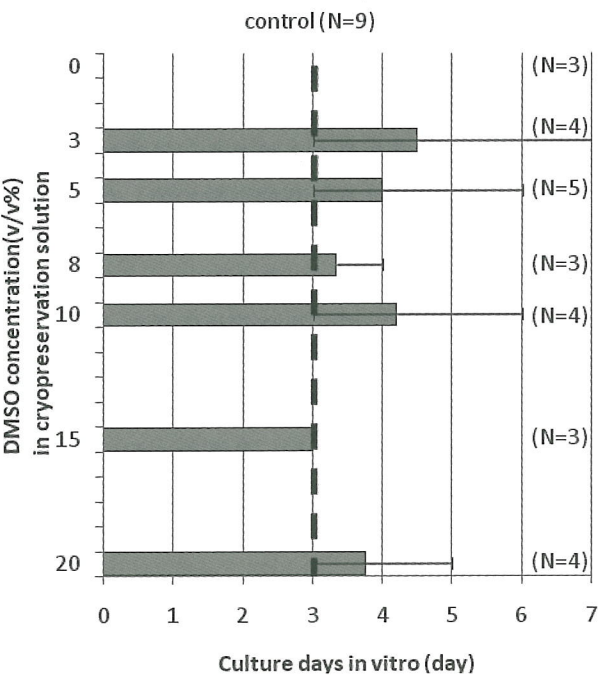


Fig. 5 Completing date of the cell monolayer formation in cryopreserved cells. Dotted line represents average value of control. Error bar represents the largest deviation range. N indicates the number of experiments.

拍動する細胞が確認され、コントロールと同様に隣接する心筋細胞同士が接触すると同期拍動を始めた。その後、細胞単層を形成すると、基板全体が一様に同期拍動するようになった (Fig. 3b)。その後、コントロールと同様に培養 7 日目まで一様に拍動を続けた。また、免疫蛍光染色により拍動していた細胞に α -アクチニンの発現を確認した (Fig. 3c,d)。

コントロールと凍結融解細胞の同期拍動開始日を Fig. 4 に示す。DMSO を用いた凍結融解細胞ではいずれの濃度においても同期拍動する事を確認した。ただし同期拍動を始める時期は、いずれの条件もコントロールと同じかやや遅れる傾向にあった。また DMSO を用いなかった細胞では同期拍動は確認されなかった。

コントロールと凍結融解細胞の細胞単層形成日を Fig. 5 に示す。コントロールではいずれも 3 日目に細胞単層を形成したのに対し、DMSO を用いて凍結した細胞においてはコントロールと同じか、やや遅れる傾向にあった。また、DMSO を用いなかった細胞においては細胞単層を形成しなかった。

3. 拍動数測定

コントロールにおいて、同期拍動は培養 1 日目に観察された。また、培養 7 日間における最高拍動数は 120~150 beats/min 程度で、培養 2 日目から 3 日目の間、すなわち細胞単層形成前後に記録された。

次にコントロールと凍結融解細胞の最高拍動数観察日と最高拍動数を比較したところ、凍結融解細胞は、最高拍動数観察日がコントロールに比べてほぼ同じかやや遅れる傾向にあった (Fig. 6)。これは同期拍動開始日と細胞単層形成日がコントロールに比べて遅れる事に起因すると考えられる。

DMSO を用いた凍結融解細胞の最高拍動数回復率は、いずれの濃度においてもコントロールの 70% 以下となった (Fig. 7)。この原因の一つとして、心筋細胞の密度が低下すると拍動数が低下するという先行研究から⁹⁾、凍結・融解の傷害により細胞密度が低下した可能性が示唆された。そこで本研究の細胞に対しても、コントロールとして培養する細胞の密度を 1/5 としたところ、最高拍動数回復率が $79 \pm 10\%$ 程度となる結果を得た。

また、免疫蛍光染色像より全細胞数中の心筋細胞数の割合を見積もったところ、全体の 20% 程度存在

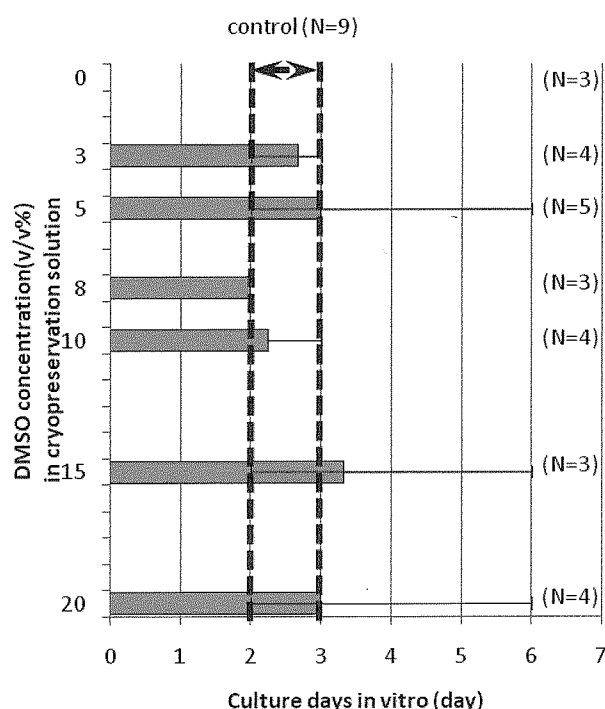


Fig. 6 Observal date of the maximum synchronous beating rate in cryopreserved cells. Dotted lines represent average value of control. Error bar represents the largest deviation range. N indicates the number of experiments.

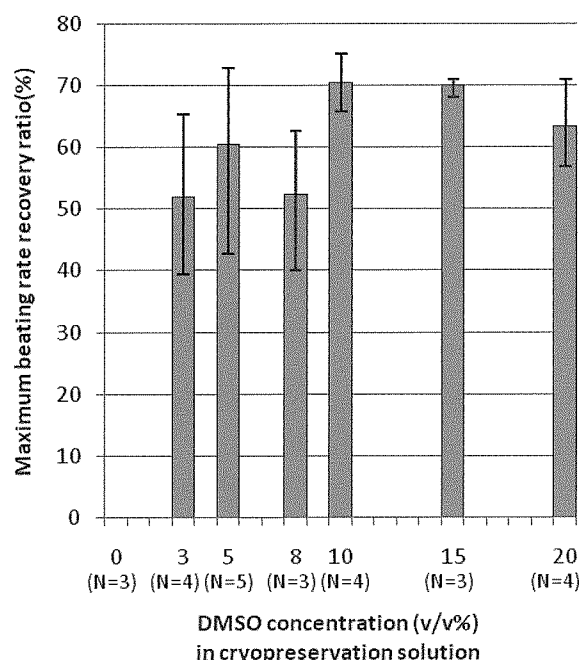


Fig. 7 Maximum beating rate recovery ratio for cryopreserved cells. Error bar represents the largest deviation range. N indicates the number of experiments.

(6)

する事が分かった。これはコントロールで得られた画像から求められた心筋細胞の割合の約半分程度であった (Fig. 2d)。非心筋細胞は分裂増殖するのに対し、心筋細胞はほとんど分裂増殖しない事から⁴⁾、融解直後においては同割合以上の心筋細胞が存在していた事と考えられる。

以上のことから、凍結融解細胞の最高拍動数がコントロールに比べて低下した原因は、凍結融解過程において細胞密度が減少したことによって生じたと考えられる。今後、培養中の細胞増殖率や心筋細胞の拍動数の密度依存性などを定量化することで、融解時の心筋細胞生存率を検証する必要があるだろう。

一方、3~20 v/v%の DMSO 濃度において、最高拍動数回復率は、50~70%とデータのばらつき範囲内にあり、大きく変わらなかった。DMSO は細胞に毒性を発揮すると考えられているが¹⁰⁾、融解後すぐに置換すれば、最大 20 v/v%程度の濃度では心筋細胞の拍動機能に対しては大きな影響を及ぼさないと考えられる。

本研究の凍結法とほぼ同じ、冷却速度約-10 °C/min、保存温度-80°C、保存期間 7 日間、DMSO を凍結保護剤として用いた新生子ラット大脳皮質由来神経細胞の凍結保存実験では、DMSO 濃度 10 v/v% が最大生存数となるような DMSO 濃度依存性が見られた¹¹⁾。本研究の結果、心筋細胞についてはここまで明瞭な DMSO 濃度依存性は見られなかった。このことから、心筋細胞は神経細胞に比べて DMSO の毒性に対しての感受性が低いのではないかと考えられる。

結 言

冷却速度約-10 °C/min、保存温度-80°C、保存期間 7 日間、DMSO を凍結保護剤として用いた新生子ラット心室由来初代培養心筋細胞の凍結保存においては、未凍結の心筋細胞に比べて 40~50%程度が生存する事が確認された。また、生存したものについては未凍結の心筋細胞と同様に接着・伸展・拍動する事を確認した。更にその拍動の機能についても、最高拍動数回復率は 70%以下となったが、未凍結の心筋細胞と同じように拍動する事を確認した。またそれらの細胞は α -アクチニンを発現していることを免疫蛍光染色法で確認した。

以上の結果から、本研究で用いた凍結保存法が心筋細胞の拍動機能まで維持することを確認した。また、DMSO は心筋細胞の凍結保護剤として有効であることが示された。なお、DMSO の濃度依存性については 3 v/v%から 20 v/v%において、生存率と拍動機能に対して有意な違いは見られなかった。

文 献

- 1) Simpson, P., McGrath, A. and Savion, S.: Myocyte Hypertrophy in Neonatal Rat Heart Cultures and Its Regulation by Serum and by Catecholamines, *Circulation Research*, **51**, 787-801 (1982)
- 2) Smith, A.: problems in the resuscitation of mammals from body temperatures below 0°C, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, **147**, 533-544 (1957)
- 3) Yokomuro, H., Mickle, A. G. D., Weisel, R. and Li, R.: Optimal conditions for heart cell cryopreservation for transplantation, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **242**, 109-114 (2003)
- 4) Tamamori-Adachi, M., Ito, H., Sumrejkanchanakij, P., Adachi, S., Hiroe, M., Shimizu M., Kawauchi J., Sunamori M., Marumo F., Kitajima S., and Ikeda M.: Critical Role of Cyclin D1 Nuclear Import in Cardiomyocyte Proliferations, *Circulation Research*, **92**, e12-e19 (2003)
- 5) Alink, G. M., Verheul, C. C. and Offerijns, F. G. J.: Isolation and Low Temperature Preservation of Adult Rat Heart Cells, *Cryobiology*, **14**, 399-408 (1977)
- 6) 圓本剛司, 本村昇, 中嶋俊介, 高橋章之, 和田行雄, 岡隆宏: 単離心筋細胞の凍結保存, *低温医学*, **22**, 251-256 (1996)
- 7) フランクスフェリックス: 「低温の生物物理と生化学」, 村勢則郎, 片桐千代訳, 北海道大学図書刊行会, 北海道, p.174-180 (1989)
- 8) Kakinuma, Y., Miyauchi, T., Yuki, K., Murakoshi, N., Goto, K. and Yamaguchi, I.: Mitochondrial Dysfunction of Cardiomyocytes Causing Impairment of Cellular Energy Metabolism Induces Apoptosis, and Concomitant Increase in Cardiac Endothelin-1 Expression, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **36**, S201-S204 (2000)

- 9) Orita, H., Fukusawa, M., Hirooka, S., Uchino, H., Fukui, K. and Washio, M.: Modulation of cardiac myocyte beating rate and hypertrophy by cardiac fibroblasts isolated from neonatal rat ventricle, *Japanese Circulation Journal*, **57**, 912-920 (1993)
- 10) Hak, A. M., Offerijns, F. G. J. and Verheul, C. C.: Toxic Effects of DMSO on Cultured Beating Heart Cells at Temperatures above Zero, *Cryobiology*, **10**, 244-250 (1973)
- 11) Motomura, J., Uchida, T., Nagayama, M., Gohara, K., Taira, T., Shimizu, K. and Sakai, M.: Effects of additives and cooling rates on cryopreservation process of rat cortical cells, *In "Physics and Chemistry of Ice"*, W. F. Kuhs, ed., RSC Publishing, Cambridge, p.409-416 (2007)