



Title	トレハロースを用いたAQP4過剰発現CHO細胞の凍結保存における脱水作用と凍結保護効果の解明
Author(s)	松尾, 董
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第16829号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16829
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99674
Type	doctoral thesis
File Information	Sumire_Matsuo_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 松尾 董

学 位 論 文 題 名

トレハロースを用いた AQP4 過剰発現 CHO 細胞の凍結保存における脱水作用と凍結保護効果の
解明

(Elucidation of the dehydration and cryoprotective effects of trehalose in the cryopreservation of
AQP4-overexpressing CHO cells)

細胞の凍結保存は、細胞の 7 割を占める水の凍結と解凍の過程を適切に制御することで、細胞内の生命活動を停止させ長期間保存する技術である。すでに実用化されている技術でもあり、畜産業では家畜の生殖細胞の保存、医療分野では生殖医療、研究分野では実験細胞や微生物を凍結保存するために使用されている。近年では再生医療への応用や実験細胞の需要増加のため、その需要は高まっている。しかし現在の技術では凍結保存できない細胞が多数存在しており、凍結保存技術のメカニズム解明が求められている。

現在では凍結時の溶質濃縮による細胞の損傷と、細胞内部で氷晶が形成され損傷するという二因子仮説が広く受け入れられている。これらの因子は凍結速度によって変化し、適切な凍結速度では細胞外に氷が形成されることで細胞が脱水され、細胞内部の氷の形成が抑制される細胞が生存するとされている。しかし二因子仮説では凍結濃縮による脱水以外は考慮されておらず、脱水量等の定量的な議論もされていないという問題点が存在する。また現在では一般的に使用されている、解凍後生存率を高めるための凍結保護剤 (CPA) についても十分考慮されていない。CPA は氷晶成長を抑制して解凍後生存率を高めるために添加される物質である。初めに発見された CPA であるグリセロールや、現在一般的に使用されるジメチルスルホキシド (DMSO) は、細胞膜を透過して細胞内外で働くため効果が高い。しかし細胞に対して毒性があり、安全な凍結保存技術を目指した代替 CPA の開発が行われている。本研究では、動植物が耐凍性を獲得するために用いている二糖類のトレハロースに注目した。トレハロースは細胞膜非透過性のため DMSO ほどの効果は見出されていないが、凍結条件下でなくとも細胞を脱水することができ、凍結中の脱水の効果を明瞭に区別できるというメリットがある。一方で、トレハロースの凍結保護効果は諸説あり、まだ完全には明らかになっていない。

これまでは細胞種によって膜透水性が異なり、膜透水性の低い細胞が凍結保存できないとされてきた。そこで本研究では、細胞膜に水輸送タンパク質であるアクアポリンの一種 (AQP4) を遺伝子操作により発現させた細胞とそうでない通常細胞を用い、同種で膜透水性の異なる細胞で凍結保存における脱水の影響を調べた。この細胞系を用いた先行研究では、DMSO を CPA として用いて AQP4 を過剰発現させた細胞を急速 (120 °C/min) に凍結させた時、通常細胞と比べて高い生存率が示された。これは、細胞膜の透水性が高いために凍結までの時間が短くとも脱水ができるためと考えられているが、細胞内の DMSO による凍結保護効果を完全に分離できていない。

本研究では、細胞の凍結保存過程における脱水のタイミングと脱水量が解凍後生存率に与える影響を明らかにするとともに、トレハロースの凍結保護効果について明らかにして、凍結保存のメカニズムを定量的にとらえることを目的とした。

論文の構成として、第2章では細胞膜透過性 CPA である DMSO と、細胞膜透過性 CPA であるトレハロースを用い、細胞凍結時の脱水のタイミングと量が解凍後生存率に及ぼす影響を調べた。2章2節では、凍結速度を 1~200 °C/min の範囲で変化させ、解凍後生存率を測定した。その結果、80 °C/min 以上の急速凍結では、CPA の違いによらず AQP 過剰発現細胞の生存率が高くなった。このことから、CPA の種類によらず、AQP4 を通した脱水が解凍後生存率を高めることが確かめられた。一方 80 °C/min 以下の緩慢凍結では AQP 過剰発現の有無によらずトレハロースを用いた細胞の生存率が、凍結速度が遅いほど低下した。これらの結果を受け2章3節では、凍結過程の中で細胞からの脱水がいつ起きているかを調べた。CPA を含む溶液中で単一細胞の収縮速度を測定する実験系を構築し、細胞からの脱水速度の温度依存性を測定した結果、CPA 含有培地に細胞を浸漬させると細胞からの脱水は、AQP4 を通さなくても5分以内に完了することが分かった。さらに AQP4 過剰発現細胞は、通常細胞に比べて低い温度でも透水性を維持することがわかった。このことから、緩慢凍結では細胞外溶液の凍結が完了する前に CPA による脱水が完了し、急速凍結条件下では低温に達した後も AQP4 を通した脱水が維持され、細胞内凍結が抑制されて生存率が高くなったと考えられた。また2章4節では、脱水によって細胞が損傷するかどうかについて、生存率とアポトーシス率を調べた。トレハロース含有培地に浸漬させて凍結前に脱水する過程では、37 °Cでは細胞に損傷を与え、4 °Cでは細胞に損傷を与えないものの、生存率も向上しないことが分かった。また凍結中の凍結濃縮環境を模擬した低温、高濃度での細胞の脱水過程では、凍結濃縮による高濃度の溶液によって低温でも細胞が損傷することが示唆された。以上の結果から2章5節では、凍結解凍後の生存率を左右する脱水は、氷晶形成から溶液の凍結までの間に発生すると結論づけた。つまり急速凍結 (80 °C/min 以上) では、溶液が凍結するまでの時間は短い、AQP4 を通した脱水により十分に脱水されて生存率が向上した。一方で緩慢凍結 (80 °C/min 以下) では、凍結完了までの時間が長いため、凍結濃縮による過度な脱水が生存率を低下させたと結論づけた。

第3章では、トレハロースの凍結保護効果を明らかにするため、凍結液をトレハロース水溶液に変えて凍結保存実験を行い、生存率のトレハロース濃度依存性を調べた。これにより、培地に含まれる電解質成分がトレハロースの凍結保護効果に及ぼす影響を調べた。その結果-80 °Cで凍結させた場合、通常細胞では低濃度 (500mM 以下) において培地を用いた時よりも高い生存率が見いだされた。一方で通常細胞の高濃度 (500mM 以上) の条件と、AQP4 過剰発現細胞を用いた実験では、含有培地と水溶液で同程度の生存率となった。この通常細胞の特異な高生存率は、溶媒中のイオン濃度を上昇させると低下することが分かった。これらの結果から、トレハロースの凍結保護効果は電解質によって低下させられるメカニズムであることが分かった。

以上の結果を踏まえ第4章では、生存率に影響する脱水のタイミングの検証と、膜透水性を変化させた時の効果、および CPA による凍結保護効果を考慮したモデルを構築し、現有の二因子仮説を再考した。