

Title	両性電解質高分子ハイドロゲルによる細胞のカプセル化と凍結
Author(s)	松村, 和明
Citation	低温生物工学会誌 = Cryobiology and cryotechnology, 59(2): 111-115
Issue Date	2013-10-15
Type	Journal Article
Text version	publisher
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/14724">http://hdl.handle.net/10119/14724</a>
Rights	Copyright (C) 2013 低温生物工学会. 松村 和明, 低温生物工学会誌 = Cryobiology and cryotechnology, 59(2), 2013, 111-115. <a href="http://dx.doi.org/10.20585/cryobolcryotechnol.59.2_111">http://dx.doi.org/10.20585/cryobolcryotechnol.59.2_111</a>
Description	

低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], Vol. 59, No. 2, 111~115, 2013

## 両性電解質高分子ハイドロゲルによる細胞のカプセル化と凍結

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科  
松村和明

### Cryoprotective Polyampholytes Hydrogel

Kazuaki MATSUMURA

*School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292 Japan*

Recently we showed that carboxylated poly-L-lysine, which is classified as a polyampholyte, has a cryoprotective effect on cells in solution without any other cryoprotectants. The recent study suggests that extra cellular environment might affect the cell viability after cryopreservation. Cryopreservation of cell-containing constructs is in high demand in tissue-engineering applications to produce the tissue-engineered products “off-the-shelf”. However, cryopreservation of regenerated tissues including cell sheets and cell constructions is not easy compared to cell suspensions. In this study, we attempted to make cell scaffolds using polyampholytes for the development of the novel cryoprotective cell hydrogel scaffolds. Cells encapsulated with such in situ hydrogels can be cryopreserved well without addition of any cryoprotectants. Thus, these hydrogels can serve as scaffolds with cryoprotective properties that also provide structural integrity to tissue constructs.

(Received Jul. 5, 2013; Accepted Aug. 7, 2013)

### 緒 言

培養細胞を利用した研究は生物学や医学分野において欠かせないものであり、受精卵や精子などの生殖細胞や血液細胞なども凍結保存されている。また、再生医療に有用な幹細胞を含む生物資源物質の維持、保管は主に液体窒素などを用いた低温保存により行われている。液体窒素温度下で保存することにより化学反応を停止させ、劣化や変性を防ぐことができる。しかし、温度を低下させる際に起こる水の結晶化等によるダメージを防ぐため、様々な凍結保護物

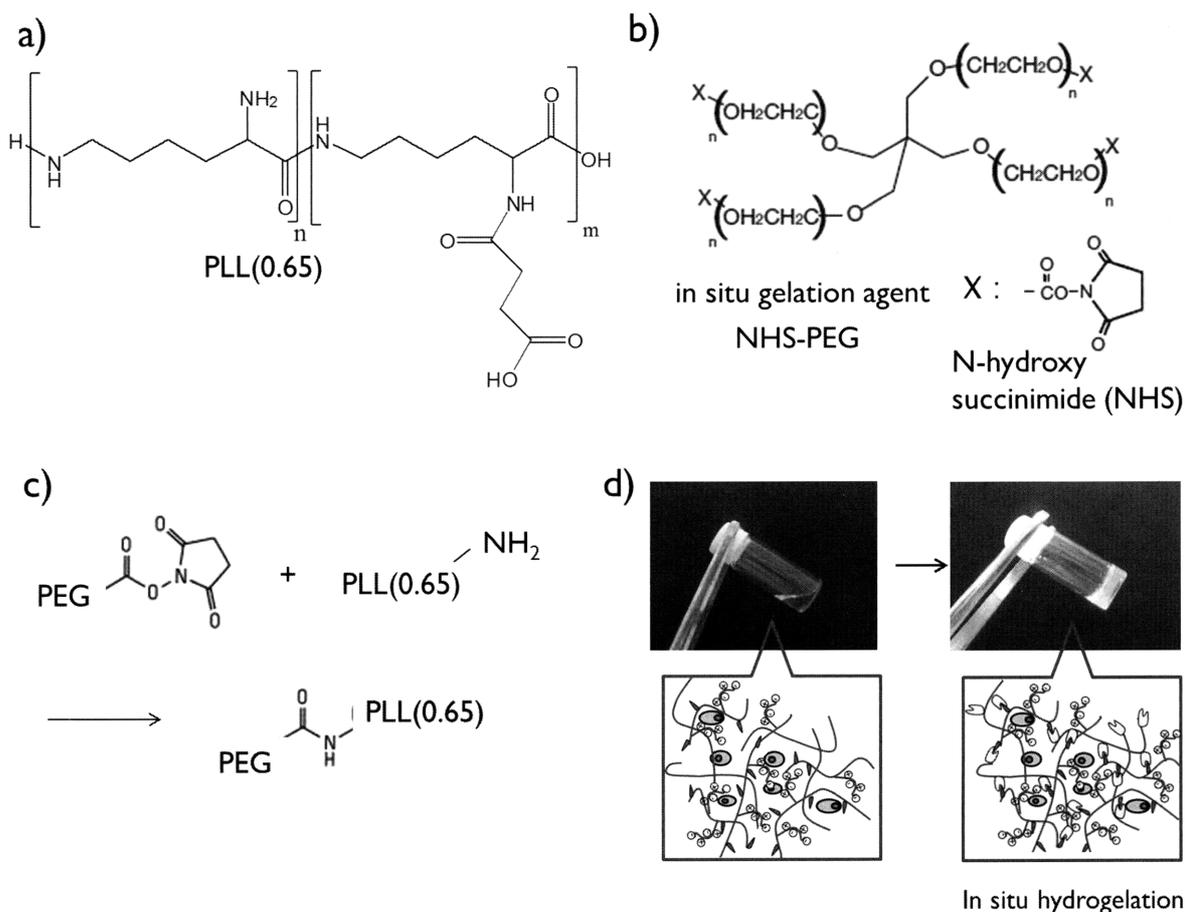
質の添加や温度降下条件の検討等改善すべき点は多く残されている。

我々はこれまでにはポリアミンであるポリリジンにカルボキシル基を導入した両性高分子電解質を合成し、ある範囲のアミノ基とカルボキシル基の割合を持つ高分子化合物で非常に効果の高い凍結保護効果があることを発見し、ジメチルスルホキシド (DMSO) やタンパク質を含まない様々な培養細胞の凍結保存法を開発してきた<sup>1-5)</sup>。その細胞の凍結保護の機序は未だ不明な点も多いが、凍結時の細胞外からの適度な脱水による細胞内凍結の抑制がその主な原因であろうと考えられる<sup>6)</sup>。そのような細胞外からの凍結保護機構を持つ高分子化合物であれば、ゲル化させて細胞を中に封入した状態でも凍結が可能なのでは無いかと考えた。今回は毒性の低い架橋剤

第 58 回低温生物工学会研究報告 4.

[Key words: Cryopreservation, Hydrogel, Regenerative medicine; 凍結保存, ハイドロゲル, 再生医療]

(30)



**Fig. 1.** Hydrogel formation of PLL(0.65). a) structure of PLL(0.65), b) structure of NHS-PEG, c) reaction between NHS-PEG and PLL(0.65), d) schematic illustration of hydrogel formation including cells.

を用いて両性電解質高分子ゲルを形成し、細胞封入体の作成を検討した。また両性電解質高分子ゲル自体にも凍結保護効果があるかを調べ、その再生医療応用への展開の可能性を探ることを目的とした。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

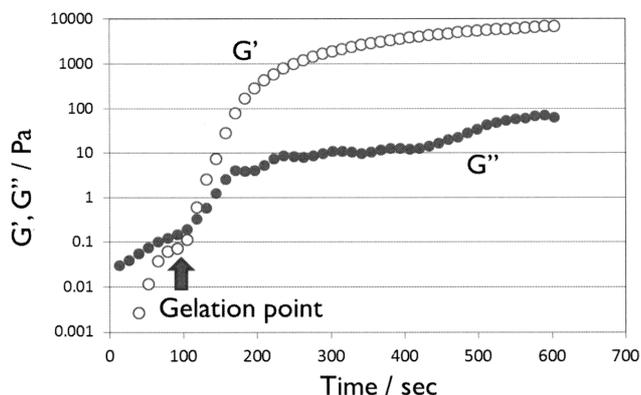
$\epsilon$ -ポリ-L-リジン(PLL、分子量約 4000, 25 w/w%水溶液)は、無水コハク酸(SA)を加えて 50°Cで 1 時間付加反応させ、アミノ基をカルボキシル化した。カルボキシル基の導入量は、加えた無水コハク酸の量に応じてほぼ 100%に近い反応率で行われ、0~100 mol%まで任意の割合でアミノ基をカルボキシル基に変換することが可能であった(Fig. 1a)。以下、これまで最

も高い凍結保護活性を示した 65 mol%のカルボキシル基導入率のもの(以下 PLL(0.65)と略す)を実験に使用した<sup>1)</sup>。

### 2. ゲル化反応

PLL(0.65)の in situ ゲル化反応は、PLL(0.65)分子中のアミノ基と N ヒドロキシスクシンイミド基を持つマルチアームポリエチレングリコール(NHS-PEG, Fig. 1b)とのアミド形成反応により行った(Fig. 1c, d)。15-25%の PLL(0.65)/細胞培養用培地(ダルベッコ改変培地(DMEM))溶液の細胞懸濁液(L929 細胞、 $1 \times 10^6$ /mL)と 10-20%の NHS-PEG 水溶液を混合し、最終濃度 10%となるように牛胎児血清(FBS)を添加し、ゲル化させた。ゲル化時間は動的粘弾性測定装置(レオメータ AR2000ex, TA instruments)を用い、混合後の溶液の貯蔵弾性率が損失弾性率を上回るまでの時間として算出した。測定は室温で 1 Hz, 100%のひずみ制御条件で行った。

### 3. ゲル中での細胞の凍結保存



**Fig. 2.** Gelation time evaluation of PLL(0.65) and NHS-PEG mixture solution.

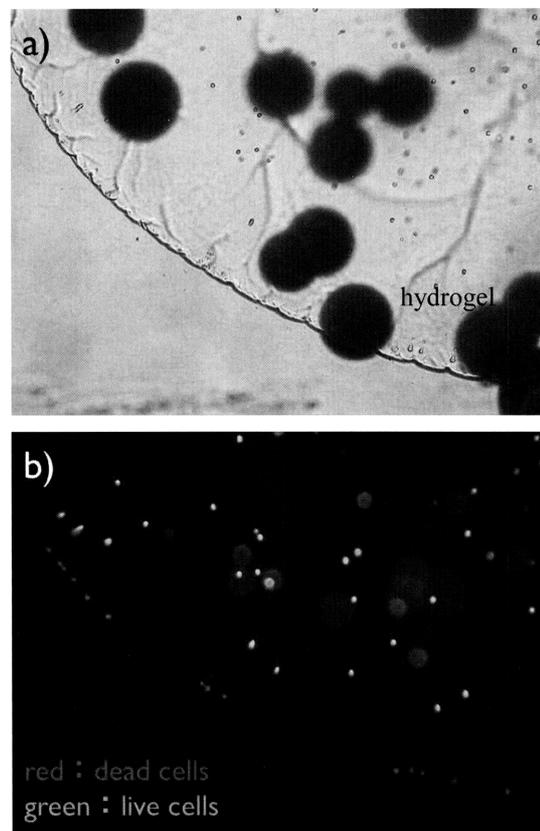
L929 細胞を懸濁した PLL(0.65)溶液を上記手法でゲル化し、そのゲルを凍結保護物質の添加無しにそのまま $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザー中に放置することにより凍結した。1週間後解凍し、培養に供した。解凍は $37^{\circ}\text{C}$ にあらかじめ暖めた培養液を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ のインキュベータで放置することにより行った。解凍後の生存率は、Live-Dead アッセイ(Life Technologies)を用い、生細胞を Calcein AM による緑色蛍光染色、死細胞はエチジウムブロマイドによる赤色染色で評価し、算出した。

### 結果および考察

#### 1. ゲルの形成

以前の研究より PLL(0.65)は濃度 7.5%以上で良好な凍結保護活性を持つことがわかっている<sup>1)</sup>。そこで、今回は PLL(0.65)の濃度がゲル中最終濃度で 7.5%および 10%になるように調整した。添加する NHS-PEG の量はゲル化時間及びゲルの強度に関係する。Fig. 2 は最終濃度 PLL(0.65)10%、NHS-PEG6.7%で混合した溶液のゲル化過程の動的粘弾性測定の結果である。図から明らかなように約 100 秒で貯蔵弾性率  $G'$ が損失弾性率  $G''$ を上回っていることがわかる。一般に粘弾性体において、 $G'$ は弾性的な性質を、 $G''$ は粘性的な性質を示し、 $G'/G''$ が大きくなる事は弾性の割合が増加することを示す。つまり硬化の進行である。ゲル化点は硬化反応が進行し、分子量無限大と見なせる網目構造が形成された瞬間に液体から固体への相転移が起こった点と考

えられ、すなわち  $G'=G''$ が成立する点がゲル化点と定義される<sup>7)</sup>。上記結果では、実際には溶液を混合



**Fig. 3.** Fluorescent microphotographs of cell encapsulated polyampholytes hydrogel after freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$  without any cryoprotectants. a) bright field, b) dark field. Cells were stained with a live/dead viability staining kit. Live cells were stained green, whereas dead cells were stained red.

してから測定機にセットするまでの時間 100 秒を加えた 200 秒がゲル化時間ということになる。PLL(0.65)の濃度を 7.5%にした場合のゲル化時間は 300 秒、NHS-PEG の濃度を 10%にした場合のゲル化時間は 120 秒であった。ゲル化時間は基質(PLL(0.65))と架橋剤(NHS-PEG)の濃度に依存することが確認された。また、ゲルの強度の指標として平衡弾性率を挙げることができる。これはゲル化後に一定の値にまで収束した  $G'$ で表され、Fig. 2 のゲルの場合は約 10 kPa であることがわかる。このゲルの平衡弾性率も基質濃度と架橋剤濃度に影響され、それぞれの濃度が高いほど平衡弾性率も高くなり、

(32)

固いゲルが出来ることがわかった。一般的な生体内の細胞環境を模したコラーゲンゲルの硬さが大体 1 kPa から 10 kPa 程度であることから<sup>8)</sup>、今回の凍結保護機能を持つゲルとして、平衡弾性率約 10 kPa となる組成である、10%PLL(0.65)、6.7%NHS-PEG を細胞包埋ゲルとして選んだ。

## 2. ゲル中での細胞の凍結

PLL(0.65) 溶液中に L929 細胞を懸濁させ、NHS-PEG を用いて *in situ* ゲル化を行い、そのまま  $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザーにて凍結した後の解冻後の細胞の生存を Live/dead アッセイキットを用いて蛍光顕微鏡で観察した。Fig. 3 からわかるようにゲル中の細胞はほぼ生存していた。一方、ハイドロゲルの周囲近辺にある細胞は死んでいることがわかった。これは、ゲルは培養用 well 中にピペットから滴下させたドロップレットの状態で作成したため(Fig. 4 の最下図参照)、周囲はゲルが少なく、凍結時に細胞がむき出しになるなどして十分な凍結保護を受けられなかったためではないかと考えられる。

次に、凍結した細胞包埋ゲル中の解冻後の細胞の Live/dead アッセイによる生死判定染色を、ゲルの下部から頂点に向かって焦点をずらしながら撮影した結果を Fig. 4 に示す。所々赤く染まった死細胞も散見されるが、ゲルの内部位置によらず均一に凍結保護されている様子が観察された。計数した結果、細胞の生存率(生存細胞/全細胞)は 90%程度であった。これらの結果より、本研究で開発した *in situ* 両性電解質高分子ハイドロゲルは、その中に細胞を包埋することで、他のジメチルスルホキシドなどの凍結保護物質の添加を必要とせず、細胞を凍結保存出来ることが確認された。すなわちゲル自体に凍結保護活性があることが示唆される。細胞外に存在するゲルが凍結保護に有効であるということから、凍結時の脱水のコントロールが保護の機序に関与していると推察される。

解冻後、継続して培養した時の細胞の様子を Fig. 5 に示した。1 日目ではゲル中に細胞が包埋されたままの状態でも伸展や増殖は見られなかった(Fig. 5a)。一方、4 日後にはゲルの大半が溶解し、漏れ出た細胞がディッシュ上に増殖している様子が観察された(Fig. 5b)。凍結後の細胞が生存しており、増殖能を持っていることを確認することが出来た。し

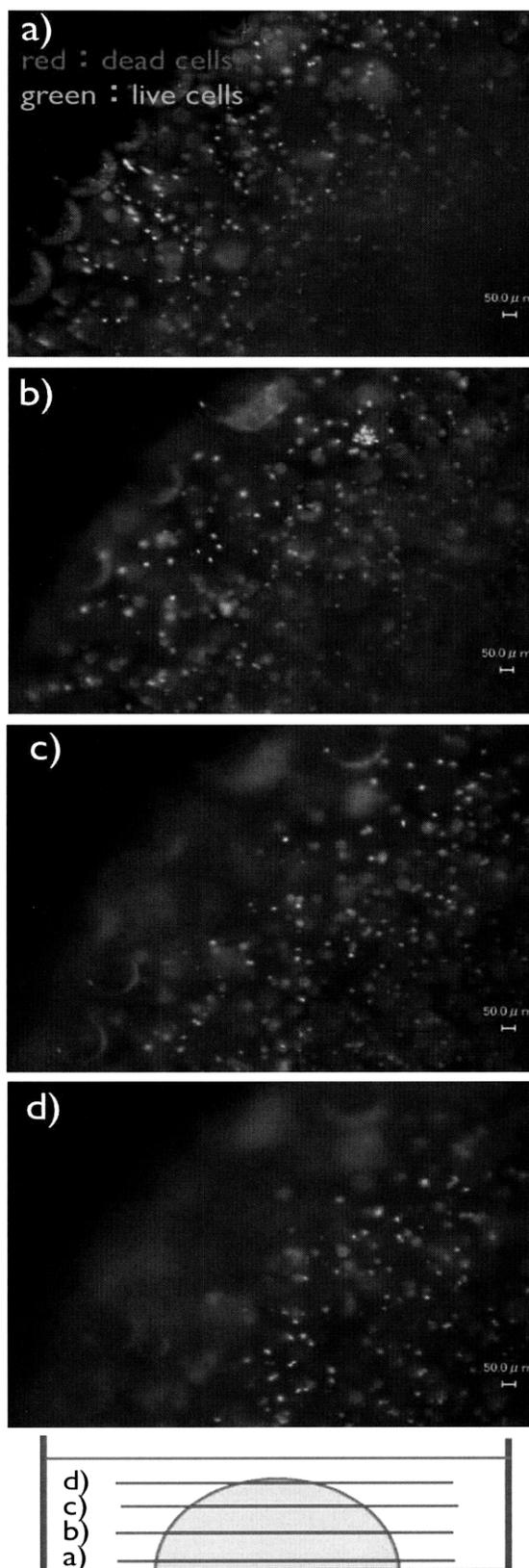
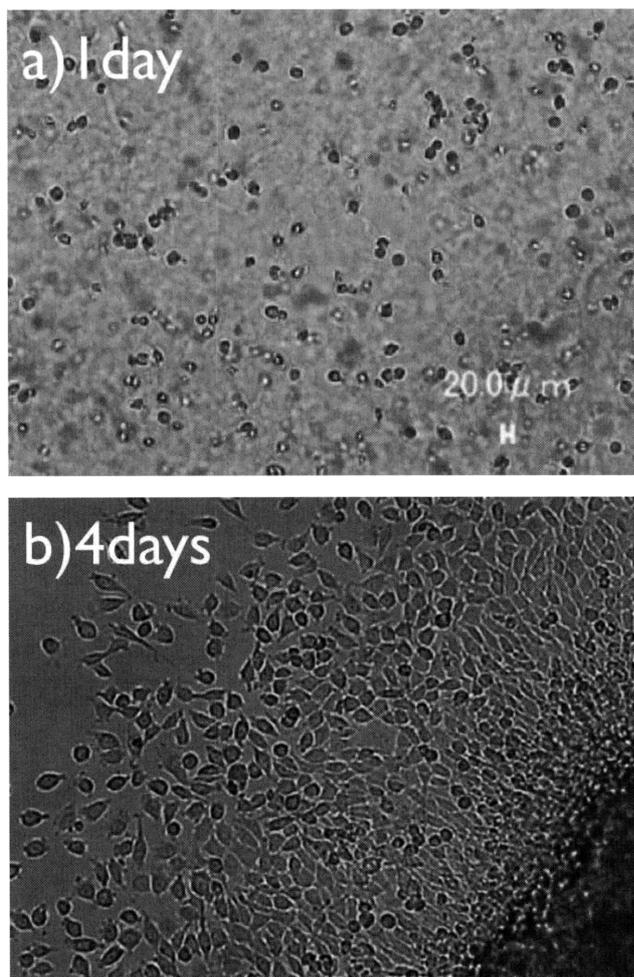


Fig. 4. Live/dead assay of L929 encapsulated polyampholytes hydrogels after freezing. 3D images from bottom (a) to apex (d) of hydrogel.

かしゲルが予想より早く溶解してしまったため、もし今後細胞の培養用足場への展開を検討する場合、もう少し分解の制御が出来るような設計にする必要がある。

以上のことから、両性電解質高分子をゲル化させることで、細胞を包埋したまま凍結保存出来る材料を創出することが可能であった。凍結保護活性のある細胞足場材料としての応用が期待できる。



**Fig. 5.** Microphotographs of L929 cells encapsulated in polyampholyte hydrogel after a) 1 day, b) 4 days culture after cryopreservation.

## 文 献

- 1) Matsumura, K. and Hyon, S. H. : Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties, *Biomaterials*, **30**, 4842-4849 (2009)
- 2) Matsumura, K., Bae, J.Y. and Hyon, S. H. : Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation, *Cell Transplant.*, **19**, 691-699 (2010)
- 3) Vrana, N., Matsumura, K., Hyon, S. H., Geever, L., Kennedy, J., Lyons, J., Higginbotham, C., Cahill, P. and McGuinness, G. : Cell encapsulation and cryostorage in PVA/gelatin cryogels: Incorporation of carboxylated  $\epsilon$ -poly-L-lysine as cryoprotectant, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **6**, 280-290 (2012)
- 4) Matsumura, K., Bae, J. Y., Kim, H. H. and Hyon, S. H. : Effective vitrification of human induced pluripotent stem cells using carboxylated  $\epsilon$ -poly-L-lysine, *Cryobiology*, **63**, 76-83 (2011)
- 5) Matsumura, K., Hayashi, F., Nagashima, T. and Hyon S. H. : Long-term cryopreservation of human mesenchymal stem cells using carboxylated poly-L-lysine without the addition of proteins or dimethyl sulfoxide, *J. Biomater. Sci. Polym.*, **24**, 1484-1497 (2013)  
10.1080/09205063.2013.771318
- 6) Matsumura, K., Hayashi, F., Nagashima, T. and Hyon S. H. : Cryoprotective properties of polyampholytes, *Cryobiol. Cryotechnol.*, **59**, 23-28 (2013)
- 7) Chambon, F., Petrovic, Z. S., MacKnight, W. J. and Winter, H. H. : Rheology of model polyurethanes at the gel point, *Macromolecules*, **19**, 2146-2149 (1986)
- 8) Even-Ram, S., Artym, V. and Yamada, K. M. : Matrix control of stem cell fate, *Cell*, **126**, 645-647 (2006)