JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	新規凍結保護物質の合成とその応用
Author(s)	松村，和明
Citation	低温生物工学会誌 = Cryobiology and cryotechnology，62(1): 11-15
Issue Date	2016
Type	Journal Article
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/16966
Rights	本著作物は低温生物工学会の許可のもとに掲載するものです。This material is posted here with permission of the Japanese Society for Cryobiology and Cryotechnology. Copyright (C) 2016 低温生物工学会. 松村 和明，低温生物工学会誌 = Cryobiology and cryotechnology，62(1)，2016，pp.11-15. http://dx.doi.org/10.20585/cryobolcryotechnol.62.1_11
Description	

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

低温生物工学会誌〔Cryobiology and Cryotechnology〕, Vol. 62, No. 1, 11～15, 2016

新規凍結保護物質の合成とその応用

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

Development of Novel Polymeric Cryoprotectants and Their Applications

Kazuaki MATSUMURA

School of Materials Science, Japan Institute of Science and Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292, Japan
(Corresponding author, e-mail: mkazuaki@jaist.ac.jp)

We developed novel cryoprotective agents from carboxylated ε-poly-L-lysines (COOH-PLLs) for cell cryopreservation as alternatives to dimethyl sulfoxide (DMSO). The polymeric agents showed excellent cell viability profile for most cell types, including human mesenchymal stem cells. We investigated the molecular mechanism of cryopreservation of the polymers by using solid-state nuclear magnetic resonance (NMR). The NMR data suggested that DMSO and COOH-PLLs differently affect the states and mobility of water and solutes in ice. The polyampholytes cryoprotectants showed highly ice recrystallization inhibition properties and we are developing vitrification solution for stem cells and tissue-engineered constructs cryopreservation using the ability. Through in situ crosslinking via click chemistry, the polyampholyte cryoprotectant could become a cell scaffold hydrogel with cryoprotective properties for tissue engineering application. We also discovered novel protein delivery method by using freeze concentration mechanism by using the polyampholyte as a cryoprotectant and protein nanocarrier.

(Received Aug. 17, 2015; Accepted Aug. 26, 2015)

緒　　言

医学・生物学の研究を進めていく上で，細胞の凍結保存は欠かせない技術となっている．細胞の凍結保存は，一般には10%程度のジメチルスルホキシド（DMSO）もしくはグリセリン等の低分子凍結保護物質の溶液を用いて行われる．この手法は1950年代に確立された手法であり[1]，現在では細胞バンクなどでごく一般的に用いられている技術である．しかし，DMSOには細胞毒性があることと，細胞によっては分化因子として働くこと[2]が知られており，特に再生医療用途の幹細胞の凍結に使用すると，潜在的に分化のリスクを伴うこととなる．しかし，新たな凍結保護物質の探索に関する研究はほとんどなされていない．そこで我々は，新規凍結保護物質の探索とその機序解明を目的とし，研究を進めてきた．

第5回低温生物工学会奨励賞受賞講演
[Key words: Cryopreservation, Polyampholytes, Regenerative medicine; 凍結保存，両性電解質高分子，再生医療]

カルボキシル化ポリリジンの細胞凍結保護効果

我々のグループではこれまで，両性電解質高分子であるカルボキシル化ポリリジンが細胞の凍結保護効果を持つことを示してきた[3-5]．ε-ポリリジンはアミノ基を側鎖に持つポリアミノ酸で，食品添加物として広く用いられている．ただし，中性領域においてプラスに帯電しているため，中和する目的で無水

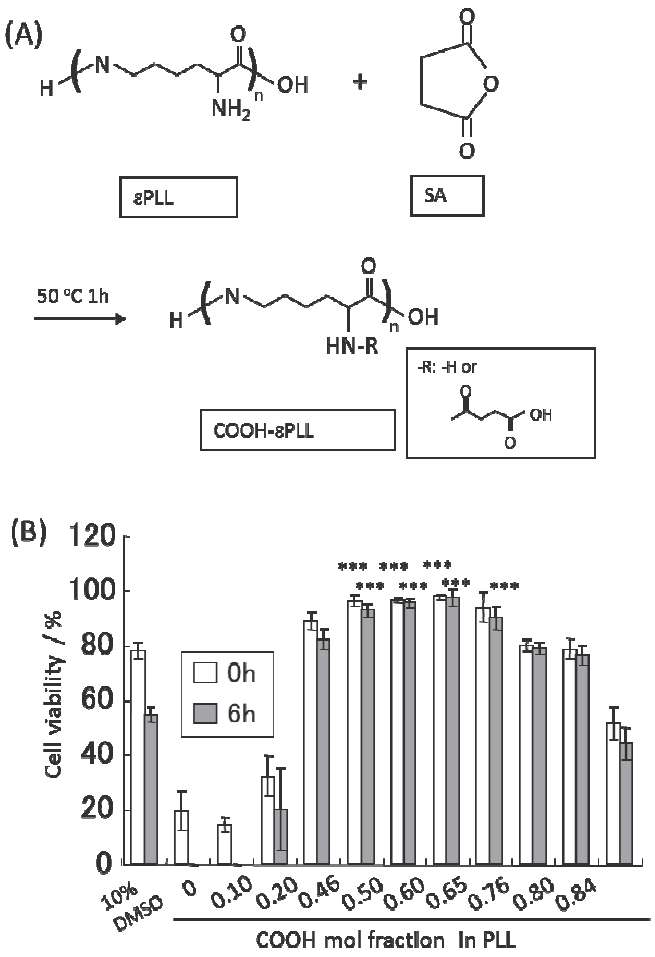

Fig. 1. Cryoprotective properties of carboxylated PLL. (A) Synthesis of calboxylated PLL and (B) cell viability after cryopreservation with carboxylated PLL with various calboxylateion ratios.

コハク酸(SA)を反応させ両性電解質とした(Fig. 1A). アミノ基に対してカルボキシル基の導入量を半分以上にすると細胞毒性が極端に低くなり，IC_{50} の値で数%濃度となることがわかった．この両性電解質高分子化合物の培地溶液(7.5 w/w%)を作成し，L929 細胞を懸濁させ，-80℃のフリーザー中で放置という簡易な手法で凍結したところ，ほぼすべての細胞が生存することがわかった(Fig. 1B) [3]. このポリマー溶液の場合，血清の添加を必要とせず，無血清の10%DMSO 溶液で凍結した場合に比べ高い生存率であった．両性電解質高分子のカルボキシル基とアミノ基の比率が重要であり，カルボキシル基が 65%から 80%程度で最も高い効果が得られた（カルボキシル基の導入量を括弧内に入れて，PLL(0.65)，PLL(0.75)と表記する）．また，高分子の濃度は 5%以上で顕著な保護効果を示し，溶液の浸透圧は約 650 mOsm と生理的条件下より高い値の時に最も効果が高かった．これは細胞内の水を脱水するという保護効果の機序と密接に結びついている．この凍結保存液を用いて，ヒト間葉系幹細胞を含む種々の初代細胞，樹立細胞の効率的な凍結保存が可能となっている [4,5].

固体 NMR による凍結保護機序の解明

一般的に細胞懸濁液を凍結した場合，細胞外凍結と細胞内凍結とに分けて凍結現象を考える [6]．細胞外凍結は細胞内凍結よりも先に起こり，氷の結晶による物理的細胞障害が主な細胞ダメージである．その後に起こる細胞内凍結はより致命的であり，細胞内小器官の破壊を伴う．一般的な細胞凍結保護物質は，この細胞内凍結を防ぐことにより機能していると言われる [7]．溶液が凍結する際，氷の結晶から溶質が排除され，細胞外溶液などの残存溶液中の塩濃度は上昇する. すると, 細胞内外で浸透圧差が生じ，細胞内が脱水される．これにより温度低下時に細胞内部がガラス化することで細胞内氷晶形成を回避していると説明される．PLL(0.65)は細胞内に容易に浸透しないことから，細胞外から脱水を制御している可能性が示唆されるが, 詳細な検討はされておらず, 新規な測定手法の開発が必要であった. そこで, 我々は, 凍結時の溶液挙動, 特に, 高分子自体と塩（NaCl）の挙動を調べるため，固体 NMR 測定を利用し，凍結時のイオンの挙動を調べた.

7.5%PLL(0.65)溶液，10%DMSO 溶液，10%アルブミン溶液，10%PEG 溶液および生理的食塩水を室温から-40℃まで種々の温度で固体 ^{23}Na-NMR 測定を行った．^{23}Na-NMR の結果を示す(Fig. 2A)．各水溶液の凍結時の Na の挙動をそのピーク強度から評価したところ, 食塩水では-21℃付近で水と塩化ナトリウムが共晶を形成して固体へ変化するため，それ以下の温度ではほとんど Na は観察されなくなる．一方，DMSO ではそのような相転移は見られず，ピークは広幅化しながらも面積強度はほぼ一定を保っていた. PLL(0.65)では同じく共晶による相転移は見られな

かったが, 凍結中のピークの広幅化は DMSO 等よりもさらに顕著となり, -11℃以下の低温領域で急速に広幅化し観測されなくなった. NaCl 水溶液では相転移後の Na の量がほぼ 0 となるが, DMSO 系では Na の量は凍結後も一定である．一方，PLL(0.65)の系では-25℃以下で Na のシグナル強度が減少することがわかった(Fig. 2B)．このことから PLL(0.65)溶液は凍結時にナトリウム成分の運動性を抑制し，あたかも高分子に束縛された固体のように振る舞わせることで浸透圧への寄与を弱めていると予想された. また，

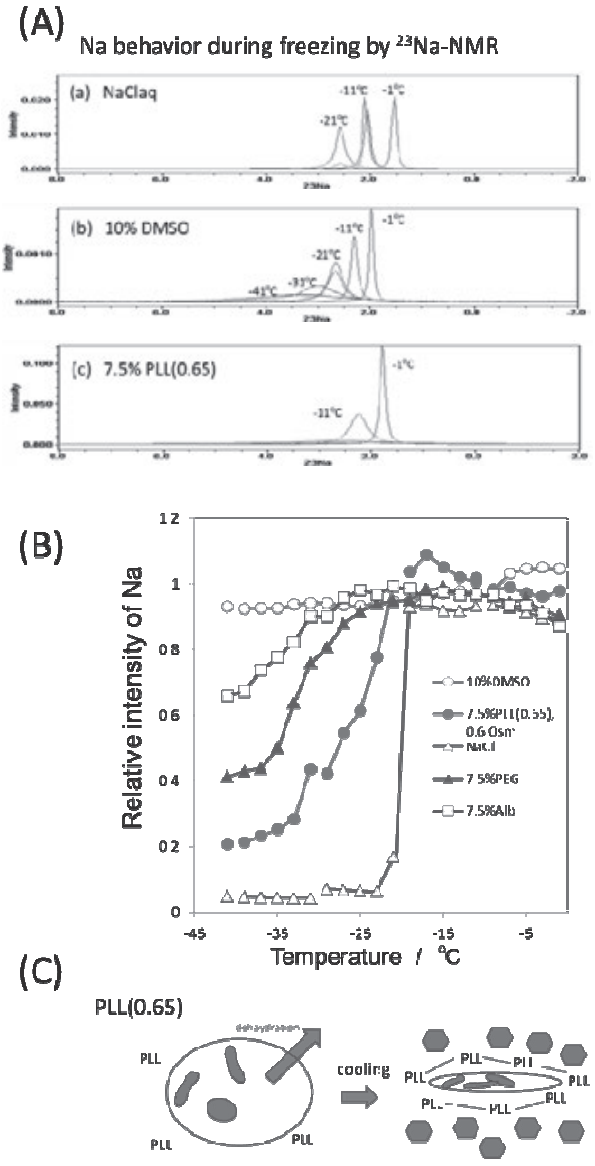

Fig. 2. (A) ^{23}Na-NMR spectra of various solutions during freezing. (B) Relative Na amount during freezing. (C) Proposed mechanism of cryoprotective properties of PLL(0.65).

高分子鎖自体のプロトンも低温時に大きく運動性が抑制されることから，PLL(0.65)が低温時に，塩や水をその内部にトラップした可逆的なマトリックスを形成していることが示唆される．以上のことから，PLL(0.65)が凍結に伴う急激な浸透圧変化を弱めるバッファーとして機能することで凍害保護作用を果たしているという機序を提案した(Fig. 2C)[8]．カルボキシル化ポリリジンは，DMSO とは異なる機序で凍結保護を行っている可能性があり，新しい凍結保護技術の創製に繋がることが期待される．

再生医療用細胞シートの凍結保存

PLL(0.65)を用いた凍結保存液は，すでに多数の種類の細胞の凍結保存に有効であることを示しており[3]，再生医療用の幹細胞の凍結保存液として注目されつつある．しかし一方で，二次元や三次元に組織化した細胞構造体の凍結保存は容易ではない．
ガラス化保存は，急速に凍結することで水の結晶化を抑え，ガラス状態で固化させるため，氷晶によるダメージが無い．そのため一般的に保存が困難な大きな細胞や受精卵などの凍結保存に利用されている[9]．

我々は，PLL(0.65)が氷の結晶成長を抑制する作用を見いだし[10]，その性質を利用して効果の高いガラス化液の作成を行った．軟骨細胞シートの効率的なガラス化保存にこの高分子を用いることで，高い生存率とシートの形状安定性の向上が見られ，臨床応用に向けてさらなる研究が進展中である[11]．この技術により再生医療で得られた組織をストックしておくことが可能となり，再生医療が業として成り立つための基盤技術となり得る．

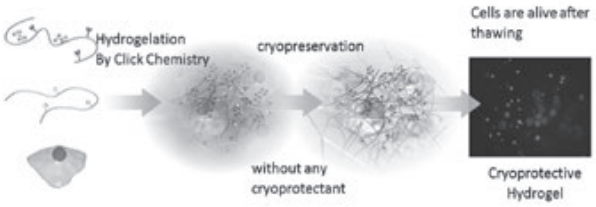

Fig. 3. Schematic illustration of the concept of cryoprotefctive hydrogel.

バイオマテリアル用途への展開

1. 凍結保護作用を持つ細胞カプセル化ゲルの創成

本高分子は，細胞の外部から凍結障害を防止している．この点は明らかにDMSOとは異なる点であり，また，高分子化合物であると言うことを利用することで，凍結保護という物性をマテリアルとして生かすことが可能なのでは無いかと考えた．PLL(0.65)はアミノ基とカルボキシル基を持つため，化学修飾により容易にゲルを形成させることが可能であるという特徴を持つ．そこで，両性電解質凍結保護ポリマーにアジド基およびアルキン基を導入することで，クリックケミストリー反応により容易に架橋が起こり，ゲル化することを確かめた[12]．ここで使用した反応は，アジド基とジベンジルシクロオクチンによる付加環化反応であり，この反応はひずみで促進されるため銅を触媒として用いる必要がなく，細胞への毒性が低いため[13]，細胞のカプセル化ゲルとして有用である．このゲル化反応を用いることで，凍結保護ポリマーで凍結保存しておいた幹細胞を溶解後，毒性無く細胞を封入することが可能である．このような細胞封入システムは，インジェクタブルゲルとしての応用も考えられる．

アジド基を導入した両性電解質デキストラン溶液にL929細胞を懸濁させ，アルキン導入デキストランを用いて*in situ*ゲル化を行い，そのまま-80℃のフリーザーにて凍結した後の解凍後の細胞の生存をLive/deadアッセイキットを用いて蛍光顕微鏡で観察したところ，ゲル中の細胞はほぼ生存していた．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DMSO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(Fig. 3)．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．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ハイドロゲルを創出することが可能であった．今後，細胞の増殖能を付与する，分解を制御するなど様々な検討が必要であるが，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．

2. 凍結濃縮を利用したタンパク質デリバリーの研究

凍結時に溶質が氷晶から押し出されて残存液体が濃縮される凍結濃縮メカニズムを用いて，タンパク質の細胞内効率的デリバリー技術を開発した．ε-ポリリジンを無水コハク酸で処理し，無水コハク酸の一部をドデセニル無水コハク酸に変えて疎水性部位を導入した両性電解質高分子を合成し，自己組織化高分子ナノ粒子を作成した．そのナノ粒子にタンパク質を吸着させ，凍結保護剤の存在下で細胞と混合して凍結し，解凍した際に，細胞膜へのタンパク質ナノキャリア複合体の集積を確認した．その後，培養を経て，タンパク質/ナノキャリア複合体の細胞内への取り込みが確認された(Fig. 4)[14]．疎水化両性電解質高分子ナノ粒子は細胞毒性が低く，細胞膜との親和性がある程度高いため，凍結濃縮後に細胞膜近

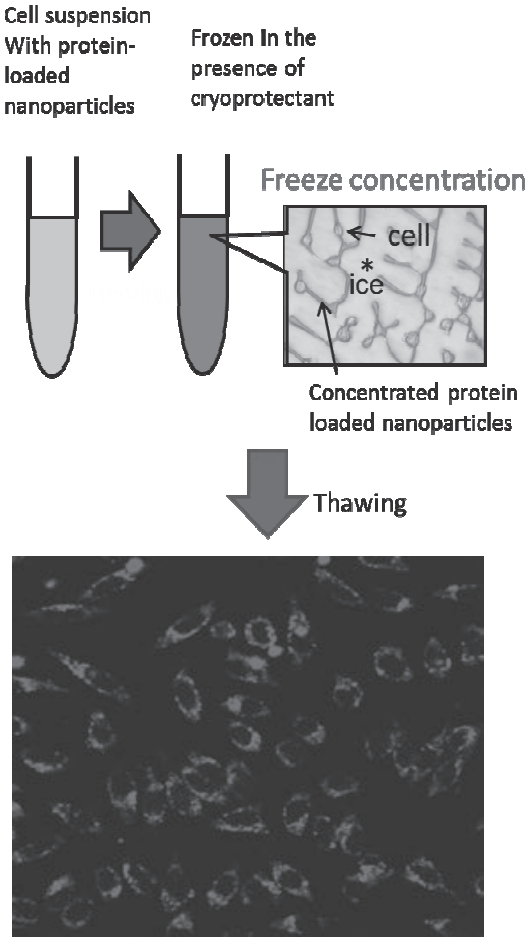

Fig. 4. Schematic illustration of the concept of protein delivery method via freeze concentration. Cell suspension was mixed with protein/nanocarrier complex and frozen in the presence of polymer cryoprotectant. Cell after thawing were seeded and internalization of protein was enhanced (stained protein was localized in the cytosol).

辺に濃縮されたタンパク質/高分子ナノキャリア複合体が効率よく細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれたと考えられる．この新しい簡易な手法は，例えば樹状細胞を標的とした抗原取り込みの促進による免疫療法などに応用が可能であり，遺伝子デリバリーへの展開も期待できる．

ま　と　め

高分子化学を用いたバイオマテリアルの研究を通じて，偶然発見した細胞の凍結保護物質を手がかりに，低温生物工学の世界へと足を踏み入れたが，その応用の広さだけでなく，基礎科学としての深さに魅了され, ここまでいくつかの材料を提案してきた．これからも低温生物工学とバイオマテリアルの架け橋となるべく研究を継続していきたい．

謝　　辞

本研究を進めるにあたり，玄丞烋教授（京都工芸繊維大学）には学生時代から現在まで多大なるご指導賜りましたことを深く感謝の意を表したい．本低温生物工学会研究奨励賞は，共同研究者を含め，多くの先生方からのご指導とご支援によるものであり，ここに心から感謝申し上げたい．

文　　献

1) Lovelock JE, Bishop MW: Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide, Nature, **183**, 1394-1395 (1959)
2) Young DA, Gavrilov S, Pennington CJ, Nuttall RK, Edwards DR, Kitsis RN, Clark IM: Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes, Biochem Biophys Res Commun, **32**, 759-765 (2004)
3) Matsumura K, Hyon SH: Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties, Biomaterials, **30**, 4842-4849 (2009)
4) Matsumura K, Bae JY, Hyon SH: Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation, Cell Transplant, **19**, 691-699 (2010)
5) Matsumura K, Bae JY, Kim HH, Hyon SH: Effective vitrification of human induced pluripotent stem cells using carboxylated ε–poly-L-lysine, Cryobiology, **63**, 76-83 (2011)
6) Mazur P, Seki S, Pinn I, Kleinhans FW, Edashige K: Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes, Cryobiology, **51**, 29-53 (2005)
7) Mazur P: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, Cryobiology, **14**, 251-272 (1977)
8) Matsumura K, Hayashi F, Nagashima T, Hyon SH: Evaluation of freezing behaviors of carboxylated poly-L-lysine possessing cryoprotective properties by solid-state NMR, Cryobiol Cryotechnol, **57**, 131-134 (2011)
9) Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT: Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos: adapting a proven method for flash-cooling protein crystals to the cryopreservation of live cells, Nat Biotechnol, **17**, 1234-1236 (1999)
10) Vorontsov DA, Sazaki G, Hyon SH, Matsumura K, Furukawa Y: Antifreeze effect of carboxylated ε-poly-L-lysine on the growth kinetics of ice crystals, J Phys Chem B, **118**, 10240-10249 (2014)
11) Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J. Nagashima H: Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets, BMC Biotechnology, **13**, 58 (2013)
12) Jain M, Rajan R, Hyon SH, Matsumura K: Hydrogelation of dextran-based polyampholytes with cryoprotective properties via click chemistry, Biomater Sci, **2**, 308-317 (2014)
13) Xu J, Filion TM, Prifti F, Song J: Cytocompatible poly(ethylene glycol)-co-polycarbonate hydrogels crosslinked by copper-free, strain-promoted “click” Chemistry, Chem –Asian J, **6**, 2730-2737 (2011)
14) Ahmed S, Hayashi F, Nagashima T, Matsumura K: Protein cytoplasmic delivery using polyampholyte nanoparticles and freeze concentration, Biomaterials, **35**, 6508-6518 (2014)