

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0230

研究課題名（和文）細胞間接着を導くジッパー状分子の創製と細胞間相互作用の時空間的解析手法の確立（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Creation of zipper-like molecules for inducing intercellular adhesion and analysis of intercellular interaction(Fostering Joint International Research)

研究代表者

寺村 裕治 (Teramura, Yuji)

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：10365421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

渡航期間：12ヶ月

研究成果の概要（和文）：これまで申請者が取り組んできたポリエチレングリコール結合脂質（PEG 脂質）を利用したカプセル化技術を利用して、膵島や間葉系幹細胞の表面をカプセル化し、免疫拒絶反応を抑制できる生体適合性の高い細胞移植技術の確立に取り組むことを目的としていた。共同研究先であるスウェーデン ウプサラ大学のBo Nilsson 教授のグループでは、臨床での細胞移植の研究実績があり、共同研究をスムーズに行うことができた。本共同研究では、特に移植直後に起きる免疫反応の制御に取り組むこと目指し、その制御に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病治療を目的とした膵ランゲルハンス島（膵島）移植、様々な疾患の治療に検討されている間葉系幹細胞（MSC）および腎疾患に対する腎臓移植では、移植直後の炎症反応が原因で、細胞傷害を受けるため、生着率が大きく低下する。そのため、本研究成果は、細胞移植や臓器移植の生着率の向上に大きく寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：In this Fostering Joint International Research, we aimed to establish cell-micro encapsulation methods to prevent immune rejection reactions based on technique using poly (ethylene glycol)-conjugated phospholipid (PEG-lipid). We successfully collaborated with Prof Bo Nilsson in Uppsala University (in Sweden), who has been working with clinical cell transplantation. In this study, we focused on the cellular surface modification to inhibit immune responses which occurred immediately after transplantation, and succeeded in the regulation with PEG-lipids.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：細胞表面修飾 細胞移植 臓器移植 PEG脂質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

本国際共同研究では、科学研究費補助金 若手研究 (A) (H26-H29) 「細胞間接着を導くジッパー状分子の創製と細胞間相互作用の時空間的解析手法の確立」を国際共同研究へと発展させることを目的としていた。ジッパー状分子であるポリエチレングリコール結合脂質 (PEG 脂質) の誘導体を利用して、細胞表面を生理活性物質やレシピエント由来など細胞 (血管内皮細胞など) で表面修飾を行い、糖尿病治療を目的とした膵ランゲルハンス島 (膵島) 移植、様々な疾患の治療に検討されている間葉系幹細胞 (MSC) および腎疾患に対する腎臓移植での成績向上を目指し、免疫抑制剤を使用しない移植療法の探索を目的としていた。

これまで申請者が取り組んできた PEG 脂質を利用した細胞によるカプセル化技術を利用して、膵島表面をカプセル化し (バイオ人工膵臓)、免疫拒絶反応を抑制できる生体適合性の高いバイオ人工膵臓の作製に取り組むことを目指していた。共同研究先であるスウェーデン ウプサラ大学の Bo Nilsson 教授のグループでは、臨床での膵島移植ならびにバイオ人工膵臓に関する研究実績があり、共同研究をスムーズに行うことができる。本共同研究では、特に移植直後に起きる免疫反応の制御に取り組むことを目指していた。患者の肝臓内へ膵島細胞を移植する直後には、凝固反応や自然免疫が活性化されるため、多くの膵島が傷害を受けて死滅することが知られており、移植成績が大きく低下する理由の一つとして知られている。また、膵島移植を行うと、患者は、一生に亘り免疫抑制剤を服用しなければならない。そこで、申請者は、抗凝固剤であるヘパリンで膵島表面をカプセル化できれば、この細胞傷害を抑制でき移植成績が向上され、さらに免疫抑制剤の服用を回避できる可能性があると考えた。同様な細胞傷害反応が MSC を移植した際にも起きることが知られている。そのため、膵島細胞のみならず、MSC の細胞表面をヘパリンで被覆することで、細胞保護が可能になり、生着率の向上が実現できるものと考えた。また、細胞移植後、長期に渡って細胞が機能するために、安定性の高い薄膜のカプセル膜の検討も行なった。

2. 研究の目的

2.1. 細胞膜のヘパリン化

機能を有する細胞の移植は新しい治療法であり、再生医療の実現のためには、安全で効果的な細胞移植療法の確立が求められている。これまでに様々な細胞移植が提案されてきているが、移植後の生着率が低いことが問題である。1型糖尿病治療を目的とした膵ランゲルハンス島 (膵島) 移植を例にあげる。ドナーから単離した膵島を、レシピエントの静脈から流し込み、肝臓内へ移植する。肝臓内へトラップされた膵島細胞からインスリン分泌が行われて、レシピエントの血糖値がコントロールされる。ただ、膵島を血液へ流し込むと、膵島表面は新鮮血液と接触するために、凝固反応や補体活性反応が引き起こされ、さらに炎症反応が引き起こされる。この一連の免疫反応が生じるために、移植直後に多くの膵島が破壊されることが知られている。この細胞傷害反応は、間葉系幹細胞や肝細胞を移植した際にも同様に起きることが分かっており、この反応を制御することが、細胞移植の生着率を向上することにつながる。我々は、両親媒性高分子であるポリエチレングリコール結合脂質 (PEG 脂質) 誘導体を細胞の表面修飾剤として利用し、細胞移植の生着率の向上を目指している。

本研究では、間葉系幹細胞をヒト血液と混合した際に起きる凝固反応を抑制することを目的として、抗凝固剤であるヘパリンを細胞表面に固定化した。ここでは、ヘパリンと高い親和性のある短鎖ペプチドを PEG 鎖末端に結合し、細胞表面へのヘパリンの固定化を試みた。また、ヒト血液と混合し、凝固系や補体系の活性化について詳細に検討した。

2.2. 細胞の薄膜カプセル

本研究では、全く新しいコンセプトのコーティング・素材技術を用いて長期間安定なカプセルを開発する。本研究におけるカプセル化方法の大きな特徴は、実質体積変化が起きず、免疫系から細胞を保護することができるカプセルを作成できる点である。PEG 脂質を PBS に溶解させると PEG 脂質溶液内ではミセルが形成される。PEG 脂質溶液内で形成された多数のミセルを過剰量のポリマーで固定する事で実質体積変化が起きない免疫隔離膜を作成した。免疫隔離機能を有する且つ、数ミクロンの超薄膜を実現する為には積層過程を繰り返す必要があった。そこで、モデル細胞として、ヒト赤血球とインスリン産生細胞を用いて検討した。

3. 研究の方法

3.1. 細胞膜のヘパリン化

PEG 鎖末端にマレイミド基が導入したポリエチレングリコール結合脂質 (Mal-PEG 脂質) の合成は、既報に従い合成した。ヘパリンと高い親和性を有する 3 種類の短鎖ペプチドである HBPI: WQPPRARIC, HBPII: CWGGRARARARARARARA, HBPIII: CNSAHRTRGRQRS を使用した。N あるいは C 末端に存在するシステインのチオール基が、PEG 鎖末端のマレイミド基と反応して、PEG 脂質へペプチドを導入することができる。また、本実験では、ヘパリンが 70 分子結合したヘパリン結合体を使用した。まず、PEG 脂質に導入した短鎖ペプチドとヘパリンの親和性を調べるために、SPR 装置を利用した。3 種類のペプチドに関して、ヘパリン結合性とアンチトロンビン結合性を調べた。また、培養細胞である CCRF-CEM を用いて、細胞毒性試験を行った。ヒト血液を用いた生体適合性試験は、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を使用した。全血

と細胞を混合し、37°Cで1時間反応させた後、血小板数を測定した。また、凝固系パラメーターである TAT、補体系パラメーターである C3a, sC5b-9 を ELISA により計測した。

3.2. 細胞の薄膜カプセル

Mal-PEG-conjugated phospholipid (Mal-PEG-lipid, maleimidyl polyethyleneglycol-conjugated phospholipid) を以下のように合成した。N-Hydroxysuccinimidyl- ω -maleimidyl polyethylene glycol (200 mg, NHS-PEG-Mal, Mw: 5000, NOF Corporation, Tokyo, Japan) と triethylamine (50 mL, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) と 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylethanolamine (20 mg, DPPE, NOF Corporation) を dichloromethane (Sigma-Aldrich Chemical Co) に溶解させ、48 時間室温でかき混ぜた。沈殿後、Mal-PEG-lipid は白色粉末として得られた(190 mg, 収率 80 %)。予め、採取したヒト全血から白血球、血小板、血漿を EDTA 入り PBS と遠心分離を数回行い、取り除いておく。細胞(200 μ L, 7.8×10^6 cells/mL) を Mal-PEG-lipid (100 μ L, 50 mg/mL in PBS) と混合させ、穏やかに攪拌を行い、氷上で 30 分間静置した。その後、8-arm PEG-SH (100 μ L, 5 mg/mL, in PBS, pH 7.4; hexaglycerol octa(mercaptoethyl) polyoxyethylene, MW: 20 kDa, NOF Corporation) (Fig. 3) を添加し、即座に激しく攪拌を行い、5 分間氷上で静置した。PBS containing bovine serum albumin (BSA; 10 mg/mL, Sigma-Aldrich Chemical Co.) (BSA/PBS) を加え、遠心分離する事で細胞を 2 回洗った。その後、4-arm PEG-Mal (100 μ L, 50 mg/mL, in PBS, pH 7.4; pentaerythritol tetra[3-(3-maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl]-polyoxyethylene, MW: 40 kDa, NOF Corporation) を加え、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った(積層工程 1 回のサンプル)。膜厚を厚くするために、この工程を繰り返した。細胞に Mal-PEG-lipid (100 μ L, 50 mg/mL in PBS) を加え、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。細胞懸濁液に 8-arm PEG-SH 溶液 (100 μ L, 5 mg/mL, in PBS) を加え、即座に激しく攪拌を行い、5 分間氷上で静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った。4-arm PEG-Mal 溶液 (100 μ L, 50 mg/mL, in PBS) を添加し、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った(積層工程 2 回のサンプル)。更に、膜厚を厚くするために、この工程を繰り返した。細胞に Mal-PEG-lipid (100 μ L, 50 mg/mL in PBS) を加え、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。赤血球懸濁液に 8-arm PEG-SH 溶液 (100 μ L, 5 mg/mL, in PBS) を加え、即座に激しく攪拌を行い、5 分間氷上で静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った。4-arm PEG-Mal 溶液 (100 μ L, 50 mg/mL, in PBS) を添加し、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った(積層工程 3 回のサンプル)。その後、それぞれのサンプルに以下のように合成した Albumin-FITC 溶液(20 μ L, 4.0 mg/mL) を添加し、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った。Albumin-FITC は、予め Albumin-FITC 溶液(10 mg/mL, 1.2 mL, Sigma-Aldrich) と Traut's reagent (10 mg/mL, 25 μ L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) から作製した。その溶液を 1 時間室温で穏やかに攪拌した。その後、Thiolated albumin (albumin-SH) は spin column (Thermo Fisher Scientific) で精製した。

4. 研究成果

4.1. 細胞膜のへパリン化

PEG 鎖末端に結合した短鎖ペプチド (HBPI, II, III) のへパリン結合活性を調べるために、SPR 測定を行った (Fig. 1)。金薄膜上にメチル基を末端に有する SAM (CH_3 -SAM) を作製し、ペプチド結合 PEG 脂質を導入した。次に、へパリンを流したところ、3 種類すべてのペプチドに対して、へパリンの結合が見られた。コントロールとして、ランダム配列のペプチドを使用した場合には、へパリンの結合は見られなかった (Fig. 1)。続いて、アンチトロンビン (AT) を流したところ、AT の結合が見られたものの、HBPI では、HBPII と HBPIII と比較して、その結合量は有意に低く、へパリン活性が低下しているものと考えられた。このことから、HBPII と HBPIII では、PEG 脂質を介して固定化したへパリンの抗凝固活性化が保持されているものと考えられた。続いて、CCRF-CEM 細胞を用いて、HBPII-PEG 脂質と HBPIII-PEG 脂質による細胞毒性試験を行った。HBPII-PEG 脂質を処理した場合には、高い細胞毒性が見られたのに対し、HBPIII-PEG 脂質では、細胞毒性は見られず、へパリンを固定化させた後も細胞毒性を示さなかった。これは、カチオン性を有する HBPII が細胞膜へ影響を与えたものと考えられた。次に、HBPIII-PEG 脂質を用いて、hMSC をへパリンにより表面修飾し、ヒト血液を用いて血液適合性試験を行った。へパリンの AT 結合活性を調べるために、hMSC を HBPIII-PEG 脂質とへパリンで処理した後、Alexa488 で蛍光標識した AT を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。Fig. 2 に示すように、hMSC の細胞表面にのみ蛍光が見られたことから、へパリンが固定化されていることが分かった。次に、hMSC、3 種類のペプチドを用いて、へパリンをコーティングした hMSC をヒト血液と混合し、1 時間インキュベートし、血液適合性を調べた。未処理の hMSC の場合では、血小板数は著しく減少し、ほとんどゼロであったのに対して、へパリンコーティングした hMSC では、いずれのペプチドでも血小板の凝集が抑制できることが分かった。また、凝固系マーカーである TAT も、血小板の結果と相関し、へパリンコーティングを行った hMSC では低い値を示しており、凝固系の活性化も抑制されていることが分かった (Fig. 3)。

補体系パラメーターである C3a と sC5b-9 の測定からも、ヘパリンコーティングを行うことで、補体系の活性化が抑制できることが分かり、凝固系だけでなく、補体系も抑制できることが分かった。特に、HBPIII を用いた場合が、より効果的な活性を示しており、hMSC の表面修飾に適していることが分かった。

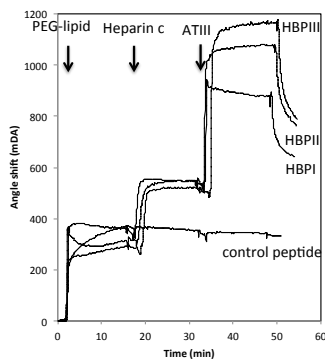


Fig. 1 SPR analyses of interactions between heparin-binding peptides and heparin conjugates with AT.

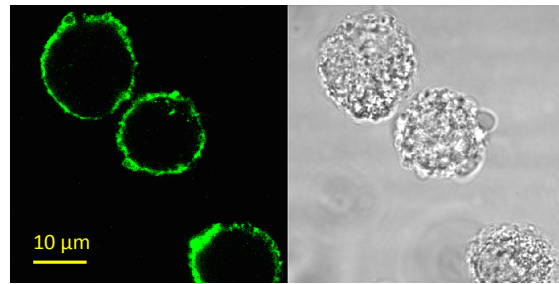


Fig. 2 hMSC coated with heparin conjugates. Cells were treated with HBPII-PEG-lipid and heparin conjugates, and then Alexa488-AT was added for confocal microscopy observation.

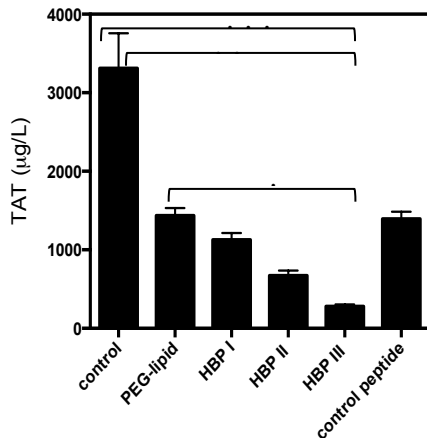


Fig. 3 Blood compatibility test of hMSC modified with heparin conjugates: generation of TAT (n = 5).

4.2. 細胞の薄膜カプセル

本研究で行った積層回数による超薄膜カプセルの変化では、20 nm～25 nm のミセルを積層過程でより多く取り込んだ方が長期的に安定であった (Fig. 4, 5)。また、細胞の径に対してミセルの径は非常に小さいので、実質的な体積変化が起きない長期安定的な薄膜が形成されたと考えられた。また、10、20、40kDa の異なる分子量の 4-arm PEG-Mal を用いたカプセル化細胞 (赤血球) を 44 日間観察した結果、40kDa の 4-arm PEG-Mal が最も強い蛍光を保持していることが明らかになった。また、イスリン分泌細胞である beta-TC-6 も同様の結果であった。

4 分岐型高分子の分子量はスペーサーの長さに関係していて、分子量が大きいとスペーサーが長くなる。つまり、最もスペーサーが長い 40 kDa の 4-arm PEG-Mal の反応性が高く、より多くの架橋箇所が存在したと考えた。また、このカプセルに結合したヘパリンは活性を持っていたことも確認でき、他の生理活性物質との高い適合性を示した。超薄膜カプセルの作成には 40 kDa の 4-arm PEG-Mal で構成された超薄膜が最も長期安定的であった。また、このカプセルは生理活性物質と高い適合性があったので、その物質由来の新たな機能を持つ事ができると期待される。

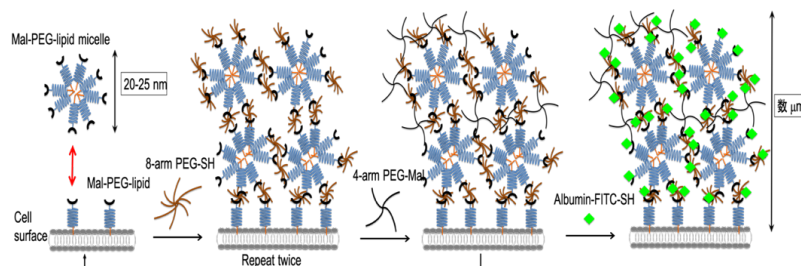


Fig. 4 高分子薄膜の積層方法

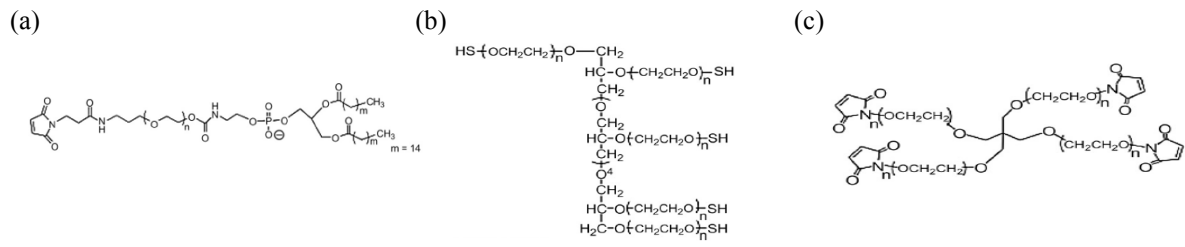


Fig. 5 (a) Mal-PEG-lipid, (b) 8-arm PEG-SH, (c) 4-arm PEG-Malの構造式

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 9件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sana Asif, Kenta Asawa, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, Bjorn Lindell, Robin Holmgren, Bo Nilsson, Anneli Ryden, Marianne Jensen-Waern, Yuji Teramura, Kristina N Ekdahl	4. 巻 -
2. 論文標題 Validation of an MPC polymer coating to reduce surface-induced cascade system activation in whole blood in in vitro and in vivo models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 e1800485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.201800485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Akifumi Yoshihara, Ryota Sekine, Takayuki Ueki, Yasuhito Kondo, Yoshiyuki, Sunaga, Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Yuji Teramura and Madoka Takai	4. 巻 67
2. 論文標題 Rapid and highly efficient capture and release of cancer cells using polymeric microfibers immobilized with enzyme-cleavable peptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 32, 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sana Asif, Kristina Nilsson-Ekdahl, Karin Fromell, Elisabet Gustafson, Andreea Barbu, Katarina Le Blanc, Bo Nilsson, and Yuji Teramura	4. 巻 35
2. 論文標題 Heparinization of cell surfaces with short peptide-conjugated PEG-lipids regulates thromboinflammation in transplantation of human MSCs and hepatocytes	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 194-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2016.02.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kristina Nilsson-Ekdahl, Yuji Teramura, Osama A. Hamad, Sana Asif, Claudia Dorhkop, Karin Fromell, Elisabet Gustafson, Jaan Hong, Huda Kozarcanin, Petra Magnusson, Marcus Huber-Lang, Peter Garred, Bo Nilsson	4. 巻 274
2. 論文標題 Dangerous liaisons: Complement, coagulation, and kallikrein/kinin crosstalk act as a linchpin in the events leading to thromboinflammation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 245-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.12471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kristina N Ekdahl, Shan Huang, Bo Nilsson, Yuji Teramura	4. 巻 28
2. 論文標題 Complement inhibition in biomaterial- and biosurface-induced thromboinflammation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Seminars in Immunology	6. 最初と最後の頁 268-277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.smim.2016.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 寺村裕治
2. 発表標題 臨床で役に立つ医工学研究を目指して - 細胞移植と臓器移植を中心に -
3. 学会等名 第69回医用高分子研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Teramura
2. 発表標題 Cell surface engineering using amphiphilic polymers for cell manipulation
3. 学会等名 Symposium for Crossing Borders in Medical Nanoscience and Biomaterials, Karolinska Institute, Stockholm (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Teramura
2. 発表標題 Cell surface engineering for biomedical application
3. 学会等名 Seminar series in Crossing-Borders, Karolinska Institute, Stockholm (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺村裕治
2. 発表標題 高分子による細胞の表面修飾技術を利用して、細胞・臓器移植における免疫 反応の制御に挑む
3. 学会等名 第56回茨城地区活動講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuji Teramura, Sana Asif, Kristina Ekdahl, Elisabet Gustafson, Katarina Le Blanc, Bo Nilsson
2. 発表標題 Heparinization of cell surface with short peptide-conjugated PEG-lipids for regulation of thromboinflammation
3. 学会等名 2nd International Conference on Immune Responses to Biosurfaces: Mechanisms and Therapeutic Interventions（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ニルソン ボー (Nilsson Bo)	ウプサラ大学・Department of Immunology, Genetic and Pathology・Professor	