

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18834

研究課題名(和文)トレハロースの細胞内導入による細胞凍結保存メカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on cryopreservation mechanism of intracellular trehalose introduced through trehalose transporter

研究代表者

内田 努 (UCHIDA, TSUTOMU)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：70356575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、通常細胞内へ入らないトレハロースが細胞内に入った時高い凍結保護効果を示す要因について、トレハロース輸送タンパク質(TRET1)を発現させた細胞と発現させない通常の細胞とを用いて、実験的に明らかにすることを目標とした。従来細胞内水がトレハロースによりガラス化していると考えられていたが、粉末X線回折や示差熱量測定の結果は主に氷1h結晶の存在を示唆しており、THz分光の結果は氷点下で液体相の存在の可能性を示す温度帯があることがわかった。今後はこれらの計測手法による詳細な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「細胞の凍結保存」技術は、水産業・畜産業では既存の技術として半世紀前より利用されている。しかしそのため近年の進歩した科学技術による学術的解明は進んでおらず、凍結・保存プロトコルの改善策の検討や凍結困難細胞種への適応技術についての研究は遅れている。本研究成果は、凍結保存のプロセスを科学的に明らかにすることを目的としており、それによる既存技術の改良や、需要の高い凍結困難細胞腫(たとえばニューロンや心筋細胞等)への適応技術開発に資する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the mechanism of the high cryoprotective effect of intracellular trehalose experimentally. Since trehalose is not transported into the cell spontaneously, we used two CHO-K1 cells as the model cell, one of which is expressing the trehalose transporter (TRET1) and another is not. It has been thought that the intracellular water was vitrified by the intracellular trehalose, but the results of powder X-ray diffraction and differential calorimetry merely indicates the existence of ice 1h crystal below the melting point. The results of THz spectroscopy show the possibility of the presence of a liquid phase at that low temperature conditions. More detailed examinations by these measurement methods are necessary in the future.

研究分野：低温生物学、雪氷学、結晶成長学、物理化学

キーワード：トレハロース 凍結保存 トレハロース輸送体 細胞内水 ガラス化 氷結晶

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の凍結保存技術は、グリセリンの凍結保護作用の発見以降大きく発展し、農業・畜産・水産等の産業界で広く用いられている。また動物愛護の観点から、薬理実験に動物を使わず細胞を用いるようになってきており、近年細胞の需要が増加している。そのため細胞の安定供給のため、凍結保存は不可欠な技術となってきている。しかし、需要の高い神経細胞や心筋細胞などは未だ凍結困難な細胞種である。これは細胞の凍結保存メカニズムが解明されておらず、細胞種ごとに最適な凍結条件を探索しているためである。

現在注目されている超急速凍結ガラス化法は、細胞内に氷結晶が生成しないよう高濃度のガラス化液を用いて、圧力と温度を変化させている。この手法は細胞内水をガラス化できる点で有効であるが、一度に凍結できる量が少なく高濃度の添加剤を用いるため、産業利用には適応が難しい。これに対し緩慢凍結法は、凍結できる細胞量が多いため有効であるが、細胞内水の凍結制御が難しく、細胞膜透過性のジメチルスルフォキシド (DMSO) など細胞毒性のある化学物質を凍結保護剤として添加する必要がある。そこで細胞親和性の高い凍結保護剤の開発が望まれている。提案者らはトレハロースなどの二糖類が氷結晶成長を抑制する効果があることを見出し^{1)~3)}、代替凍結保護剤としての効果を検討している。しかしこれらの物質は細胞膜を透過しないため、十分な保護効果が得られていない⁴⁾。

2007年にKikawadaらがトレハロース輸送体 (TRET1) を任意の細胞に発現させられることを見出し、トレハロースを細胞に負荷をかけず細胞内に輸送できる実験系を構築した⁵⁾。そこでTRET1を発現した細胞と通常細胞とを用いることで、細胞内のトレハロースが細胞保護効果を発揮するかを検討でき、トレハロースの凍結保護メカニズムを解明できると考え、本研究課題の構想に至った。

参考文献 1) 内田努他, 特許第 4195932, 2008. 2) T. Uchida *et al.*, J. Crystal Growth, 299, 125, 2007. 3) T. Uchida & S. Takeya, PCCP 12, 15034, 2010. 4) T. Uchida *et al.*, in Crystal Growth 2, InTech, 203, 2012. 5) T. Kikawada *et al.*, PNAS, 104, 11585, 2007.

2. 研究の目的

本研究は、トレハロースを細胞内に導入するタンパク質(TRET1)を発現したモデル細胞 (CHO細胞) と通常の CHO 細胞とを用いて、トレハロースが細胞内へ導入されると緩慢凍結させた細胞内でどのような働きで細胞の生存が維持されるのかを明らかにする。その要因の一つとして細胞内水の凍結状況の違いがあると考え、凍結・融解後に生存率の高い凍結保存条件と低い条件下で凍結された細胞試料に対し、粉末 X 線回折法や飛行時間型中性子線回折法を用いて細胞内水の凍結状態を物理化学的に調べる挑戦的な手法を開発する (研究開始当初の目的)。このユニークな細胞系と挑戦的な技術開発により、トレハロースによる凍結保護メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、TRET1を発現した CHO-K1 細胞 (CHO-TRET1 細胞) と通常の CHO-K1 細胞 (CHO-vector 細胞) とをモデル細胞系として、トレハロースを凍結保護剤としたときの、以下の 2 つの実験を行う (図 1)。

(1) トレハロースの細胞内導入による凍結保存メカニズムの解明

(2) 細胞内外の水の状態の計測技術開発

そしてそれらの結果からトレハロースによる細胞保護メカニズムを解明することを目的とする。

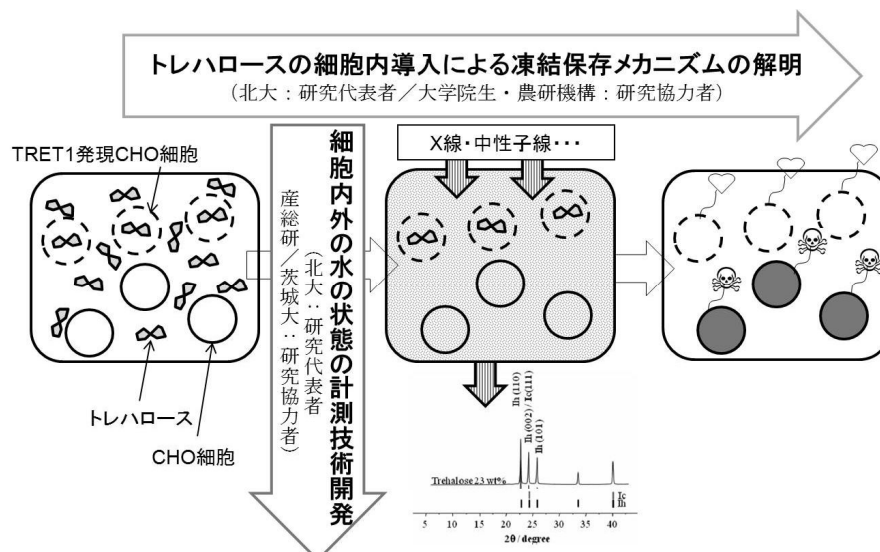


図 1: 研究課題と研究協力体制 (実験開始時)

(1)トレハロースの細胞内導入による凍結保存メカニズムの解明：

CHO-TRET1 細胞と CHO-vector 細胞 (図 2)は、研究協力者の農業・食品産業技術総合研究機構 (農研機構) 黄川田主任研究員より提供を受ける。このユニークな細胞試料を用い、トレハロースを含む凍結液による凍結保存実験を行い、解凍後の細胞の生存率を調べ、生存率の凍結保存条件 (トレハロース濃度、凍結温度等) 依存性を明らかにする。その結果から、トレハロースが細胞内に導入されたことで生存率向上にどう影響するか解明する。

この研究は(2)で行う実験条件ともなるため、迅速にかつ網羅的に行う必要がある。そこで初年度に自動細胞計測装置を導入し、多くのパラメータに対して再現性の高い実験を効率よく行い、最適な保存条件を短期間で見出すことを目指す。

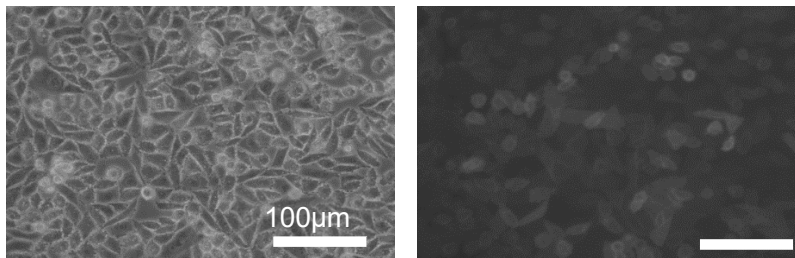


図 2：TRET1 を発現した CHO-K1 細胞 (左：位相差顕微鏡像、右：蛍光物質を標識した TRET1 を蛍光顕微鏡で観察し、発現を確認)

(2) 細胞内外の水の状態の計測技術開発

細胞内外の水がどのように凍結しているのかを観測するために、CHO-TRET1 細胞と CHO-vector 細胞とを同じ条件で凍結させた試料に対して示差熱量測定や粉末 X 線回折測定 (研究協力者：産総研竹谷主任研究員) 飛行時間型中性子線回折測定等を行い、それらの差から細胞外と細胞内との凍結状態の違いを検討する。なお研究開始時の予備実験により、中性子線回折測定が本研究の目標に対して十分な成果を期待できない可能性が明らかになったため、液相の検出感度が高いと期待される THz 分光法 (研究協力者：名古屋大工学研究科竹家講師) を適応することとした。

初年度は、実際に細胞の実験を開始するに先立ち、多孔質物質をモデルとしてトレハロース水溶液を用いた予備実験を行う。細胞と同程度の大きさを持つガラスビーズを用いて細胞外水を模擬し、サブミクロンオーダーの細孔を持つガラスビーズ大の Porous glass を用いて細胞内水を模擬することとした。そして 2 年目に、(1)の結果から最も生存率の高い凍結条件と低い条件とを抽出し、それらの条件のもとで凍結させた CHO-TRET1 細胞と CHO-Vector 細胞を用いて粉末 X 線回折測定や THz 分光測定を行い、細胞内外の水の凍結状態を区別して観測する技術を開発する。

そして課題(1)、(2)から得られた結果から、トレハロースによる細胞保護メカニズムを解明する。すなわち、細胞内に導入されたトレハロースが細胞内水をどのような固体にして細胞を生存状態で凍結しているのかを、実験的に解明する。

4. 研究成果

(1) トレハロースの細胞内導入による凍結保存メカニズムの解明

CHO-TRET1 細胞と CHO-vector 細胞を用いて、凍結保護剤として添加するトレハロースの濃度や凍結温度を変化させながら凍結保存実験を実施し、凍結・解凍後の生存率を、本研究で導入した自動細胞計測装置を用いて調べた。その結果、細胞外トレハロース濃度が 400 ~ 500mM、凍結温度が -100 程度の緩慢凍結条件で、CHO-TRET1 細胞の高い生存率が得られることがわかった (図 3)。すなわちトレハロースが細胞内へ輸送されることにより、CHO 細胞の凍結保護効果が顕著に増加することが実験的に示された。なおこれらの結果は、国際英文誌に発表した (発表論文)。

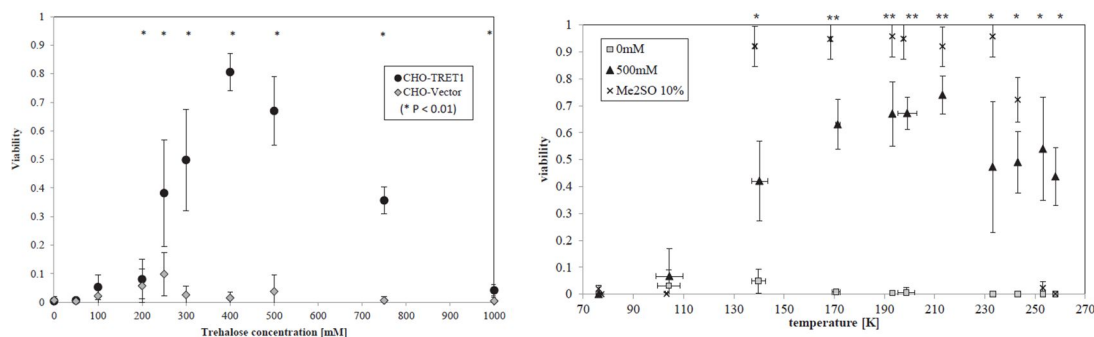


図 3：トレハロースを用いた CHO 細胞の凍結保存実験：(左)凍結温度 -80 の時のトレハロース濃度依存性、(右)トレハロース濃度 0mM と 500mM の時の CHO-TRET1 細胞の凍結温度依存性 (比較として DMSO 10%の実験も行った)。(発表論文 より転載)

そこで、この条件が何によって決まっているのかを調べるため、凍結前の細胞の健全性や、細胞内へ輸送されたトレハロース量の測定などを行った。凍結前の細胞の健全性の測定とは、凍結前にトレハロースを細胞内へ輸送するためトレハロース入りの培地の中で数時間 37 の恒温槽中で静置するのだが、その間に細胞が弱ってしまう割合を測定した。具体的には、細胞が細胞外トレハロースの浸透圧による脱水ストレス等によって弱ってアポトーシスを起こしていないかを、自動細胞計測装置のアポトーシス検知機能を用いて測定した。その結果、細胞外のトレハロースによる浸透圧の影響で、CHO-vector 細胞のみならず CHO-TRET1 細胞もややアポトーシスが起きていることがわかった。また細胞内へ輸送されたトレハロース量については、研究協力者の研究施設にある高感度液体クロマトグラフィを用いて測定を行い、実際に細胞内にどの程度のトレハロースが輸送されているのかを計測した。これらの成果を総合し、トレハロースによる CHO-TRET1 細胞の凍結保存効果のメカニズムについて検討を行った。現在その成果について検討を行い、論文をすすめているところである。

また細胞の凍結保存を利用するためには、その効果がどれほど維持されるかを評価しなくてはならないと考え、長期間保存した場合の生存率変化を調べた。上記最適条件で凍結させた細胞(1週間保存後の生存率が0.7以上の、トレハロースを凍結保護剤として用いた CHO-TRET1 細胞試料)について、-80 で保存した時の保存期間依存性を自動細胞計測装置で計測した。その結果、凍結後1年間はほとんど生存率の低下は無く、良好な保存状態であることがわかった。しかし1年以上経過すると、徐々に生存率が低下し始めることがわかった。この効果がトレハロース特有のものかどうかを調べるため、DMSOを用いて凍結保存した CHO 細胞と比較したところ、同じように生存率の低下は見られたもののその時間が3年以上と長いことがわかった。この結果から、細胞内外のトレハロースによる細胞保護効果が、細胞内の水の構造変化だけで説明できるわけではないことが示唆された。なおこの結果については国際会議で発表を行い(学会発表)、国内英文誌にて誌上発表した(発表論文)。

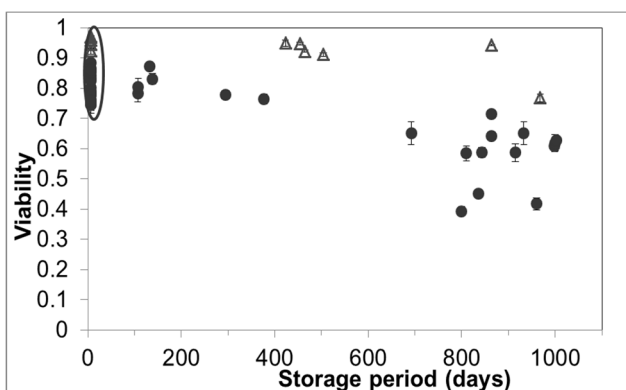


図4: -80におけるCHO-TRET1細胞の凍結保存期間依存性。印: 500mMトレハロース、印: 10%DMSO (発表論文より転載)

この効果がトレハロース特有のものかどうかを調べるため、DMSOを用いて凍結保存した CHO 細胞と比較したところ、同じように生存率の低下は見られたもののその時間が3年以上と長いことがわかった。この結果から、細胞内外のトレハロースによる細胞保護効果が、細胞内の水の構造変化だけで説明できるわけではないことが示唆された。なおこの結果については国際会議で発表を行い(学会発表)、国内英文誌にて誌上発表した(発表論文)。

(2) 細胞内外の水の状態の計測技術開発

初年度は、微細な孔隙を有する Porous glass やガラスビーズ等の微粒子(平均直径 10~30 μ m)を細胞(CHO-K1細胞の平均直径は約 10 μ m)の模擬試料として、予備実験を行った。Porous glass 内の微細な(100nm以下)細孔中の溶液は「細胞内水」を、Porous glass やガラスビーズの微粒子間の溶液は「細胞外水」を模擬しており、凍結液の固化条件等を把握するための実験系の構築と計測法の開発を行った。凍結試料の測定法としては、融点の測定を示差熱量計で行った(研究代表者が実施)。また産総研・竹谷主任研究員の協力の下、粉末 X 線回折測定により H₂O 相の結晶状態を計測した。なお飛行時間型中性子線回折測定については、媒体として重水を高濃度に含有する必要があることから、細胞毒性が高いことや細胞内の水の構造化に関して得られた結果の妥当性を検証することが難しいと判断し、当初の予定を変更して本研究の測定には用いないこととした。その代わりに、名古屋大学・竹家講師の協力の下、THz 分光測定により低温条件下での液体(過冷却)相の存在について計測することとした。

500mM のトレハロース含有水溶液を加え -80 で凍結させた模擬試料を計測した結果、模擬試料中には氷 I_h 結晶が主に形成されていることが確認され、「トレハロースが細胞内外の溶液のガラス化を誘導して細胞の生存を維持している」という従来の説を積極的に支持する結果が得られなかった。しかしその試料を昇温させながら測定を行ったところ、500mM のトレハロースにより生じるモル凝固点降下(およそ -2)よりもはるかに低い温度(約 -30)から結晶の融解が生じている可能性が示唆された。この温度域がトレハロース水溶液のガラス化温度とおおよそ一致しているため、トレハロースが細胞内外の水の構造化に何らかの影響を及ぼしている可能性は否定できない。

そこで2年目には、微粒子の代わりに実際に CHO 細胞を用い、細胞分散溶液の凍結試料の計測に挑戦した。その結果、示差熱量測定、および粉末 X 線回折測定では、課題(1)で調べた条件の範囲内では氷 I_h 結晶の存在だけが示された。一方 THz 分光測定では、他手法で氷 I_h 結晶のみ観測されていた低温領域(-80 近傍)で、液相によると思われる THz 波の吸収が観測された。現在予備実験の結果と比較しながら、得られた信号が細胞内外のどこの情報に当たるかを

検討しているが、試料量の少なさから確証のある結論には至っていない。しかし 0 以下での液相の存在は、凍結状態での細胞の機能維持や細胞内水のガラス化・再結晶化現象に大きな影響を及ぼすと考えられるので、その存在の検証や量的把握等更なる検討が必要である。

今後は、課題(1)についてはトレハロースが凍結保護効果を発現するメカニズムをより直接的に明らかにする実験を進め、課題(2)については用いた計測手法を細胞の測定に適すようチューニングし、より定量的で詳細な検討を進めていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

T. Uchida, M. Furukawa, T. Kikawada, K. Yamazaki, K. Gohara (2019): Viabilities of long-term cryopreserved CHO-TRET1 cells with trehalose and DMSO. *Bulletin of Glaciological Research*, 査読有, **37**, 2019, in press, DOI: 10.5331/bgr.18A03.

内田努(2019): 生物とガスハイドレート, *えなるみくず*, 査読無, **98**, 52-55.

T. Uchida, R. Kitora, K. Gohara (2018): Temperature dependence of synchronized beating of cultured neonatal rat heart-cell networks with increasing age measured by multi-electrode arrays. *Trends in Medicine*, 査読有, **18**(4), 1-10, DOI: 10.15761/TiM.1000145.

内田努(2018): ガスハイドレートの基礎, *冷凍*, 査読無, **93**, 581-585.

長島大典, 安田啓太, 内田努, 大村亮(2018): 氷点下温度域におけるクラスレート水和物, *冷凍*, 査読無, **93**, 600-605.

V. Istomin, E. Chuvilin, B. Bukhanov, T. Uchida (2017): Pore water content in equilibrium with ice or gas hydrate in sediments. *Cold Regions Science and Technology*, 査読有, **137**, 60-67.

V. Istomin, E. Chuvilin, B. Bukhanov, T. Uchida (2017): Thermodynamic study of residual water content in sediments in equilibrium with gas hydrates. *Proc. 9th Int. Conf. Gas Hydrates (ICGH9)*, Denver, U.S.A., 査読無, 1994-1-7.

T. Uchida, K. Shimada, R. Tanabe, T. Kubota, D. Ito, K. Yamazaki, K. Gohara (2017): Xenon pressure dependence on the synchronized burst inhibition of rat cortical neuronal network cultured on multi-electrode arrays. *IBRO Reports*, 査読有, **3**, 45-54, DOI: 10.1016/j.ibror.2017.09.001.

T. Uchida, M. Furukawa, T. Kikawada, K. Yamazaki, K. Gohara (2017): Intracellular trehalose via transporter TRET1 as a method to cryoprotect CHO-K1 cells. *Cryobiology*, 査読有, **77**, 50-57, DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.05.008.

〔学会発表〕(計5件)

内田努, 古川真帆, 黄川田隆洋, 山崎憲慈, 郷原一寿: 細胞の凍結保存における凍結保護剤の役割に関する研究. 水関連研究ミニシンポジウム、東京(日本ペイントホールディングスセミナー室) 2019.2.19.

内田努, 古川真帆, 黄川田隆洋, 山崎憲慈, 郷原一寿: トレハロース輸送体を発現した CHO-K1 細胞の凍結保存における保存期間依存性. 雪氷研究大会(2018・札幌) 札幌(北海道科学大学) 2018.9.10. (地震のため誌上発表: https://doi.org/10.14851/jcsir.2018.0_151)

T. Uchida, M. Fufukawa, T. Kikawada, K. Yamazaki, K. Gohara: Storage-period dependence in cryopreservation of CHO-TRET1 cells with trehalose. *Int. Sympo. on Cryosphere and Biosphere*, 2018.3.15, 歴彩館(京都府京都市).

V. Istomin, E. Chuvilin, B. Bukhanov, T. Uchida: Thermodynamic study of residual water content in sediments in equilibrium with gas hydrates. *9th Int. Conf. Gas Hydrates (ICGH9)*, 2017.6.30, Denver Marriott City Center (Denver, U.S.A.).

内田努, 古川真帆, 黄川田隆洋, 山崎憲慈, 郷原一寿: CHO 細胞の凍結保存に最適な細胞内トレハロース濃度の推定. 第62回低温生物工学会年会、2017.5.21、北海道大学(北海道札幌市)

〔図書〕〔産業財産権〕

特になし。

〔その他〕

特になし。

6 . 研究組織

(1)研究分担者:(0名)

(2)研究協力者:(計3名)

研究協力者氏名:黄川田 隆洋 主任研究員(農業・食品産業技術総合研究機構)

ローマ字氏名:Takahiro Kikawada

協力内容:細胞の提供、細胞内へ輸送されたトレハロース量の測定

研究協力者氏名:竹谷 敏 主任研究員(産業技術総合研究所)

ローマ字氏名:Satoshi Takeya

協力内容:多孔質体、および細胞懸濁液の凍結体の粉末 X 線回折測定

研究協力者氏名:竹家 啓 講師(名古屋大学工学研究科)

ローマ字氏名:Kei Takeya

協力内容:多孔質体、および細胞懸濁液の凍結体の THz 分光測定

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。