

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03528

研究課題名(和文)腎移植の生着率向上を目指した血管内皮細胞の表面修飾剤の創成

研究課題名(英文)Cell surface engineering of endothelial cell for improving kidney transplantation outcomes

研究代表者

寺村 裕治 (TERAMURA, Yuji)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：10365421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓移植は有効な移植療法であるが、その生着率は未だに低い。本研究では、細胞を保護して自然免疫反応による攻撃を防ぐ細胞表面修飾剤の創成に取り組んだ。細胞膜表面を修飾できるpoly(ethylene glycol)結合脂質とヘパリンとの結合体を合成し、評価を行った。ヘパリン脂質は脂質二分子膜に導入され、抗凝固活性を保持し、またヒト全血中で、細胞が起因となる血液凝固を抑制できることがわかった。このことは、臓器移植時の虚血再灌流傷害において、グリコカリックスを失った血管内皮に対して、糖鎖ネットワークの再構成が可能であることを示唆しており、虚血再灌流傷害を抑制できることを示唆する結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腎臓移植において虚血状態にさらされた血管内皮細胞を、特異的に保護して自然免疫反応による攻撃を防ぐことのできる細胞表面修飾剤の創成に取り組んだ研究である。ここで提案する細胞表面修飾剤は、すべての臓器移植や細胞移植、脳梗塞、心筋梗塞などの虚血が関与する多くの病気に対する治療法として利用でき、大きなインパクトを与えることができる。

研究成果の概要(英文)：Kidney transplantation is effective transplantation therapy for renal failure patients of the end stage. However, the survival rate of the transplanted kidney is still low. In this project, we studied the polymeric materials which can selectively modify the cell surface to protect from an attack by innate immune systems. Here we focused on poly(ethylene glycol)-conjugated phospholipid (PEG-lipid) for cell surface modification and its heparin conjugates and evaluated the function. We found that lipid bilayer membrane could be modified with heparin-lipids with keeping anticoagulant activity, and blood coagulation and clotting were inhibited. From this result, we can reconstruct glycocalyx-like structure on the endothelium of kidney by the heparin-lipid, and protect the cell surface by the cell surface modification.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：腎臓移植 虚血再灌流障害 細胞表面修飾 PEG脂質 ヘパリン

1. 研究開始当初の背景

末期腎不全の患者に対して行われる腎臓移植は有効な移植療法である。腎臓移植は、臓器移植の一つであるが、我々は2つの腎臓を有しており、その一つを提供できるために他の臓器移植と比較しても腎臓移植件数は多いことが知られている。そのため、欧米のみならず日本においても、移植医療として定着しつつある。しかしながら、心停止ドナーから提供を受けた腎臓移植後の生着率は未だに低く、移植5年後には25%、10年後には50%と腎臓が機能不全に陥ってしまい、再移植を余儀なくされている。臓器移植においてドナー不足は深刻な問題であり、この生着率を上げる研究は非常に重要な取り組みである。

この低い生着率の要因は、移植直後に起きる虚血再灌流障害が大きな原因の一つであることが明らかにされている。主に、移植した腎臓の血管内皮がレシピエントの新鮮血にさらされた際に起きる細胞傷害性の免疫反応である。この虚血再灌流障害は、様々な免疫反応が複雑に関与しており、未だに効果的な薬剤や治療法はない。ドナーから提供された腎臓を移植まで保存溶液中で冷蔵保存するために、腎臓内は虚血状態になっている。その期間は、およそ12-24時間程度であるが、血管内皮細胞のphenotypeが変化するには十分な時間であり、実際に、E-セレクトインの過剰発現やグリコカリックスの消失などが見られる。この状態の腎臓を、レシピエントへ移植すると、レシピエントの血液が流入して、活性酸素の発生、凝固系・補体系の活性化から自然免疫系が活性化され、血栓の形成、血管内皮細胞への細胞傷害だけでなく、腎臓組織まで攻撃を受けてしまい、腎機能へのダメージが生じ、最終的には、生着率が低下することに繋がる。

本研究では、腎臓移植において虚血状態にさらされた血管内皮細胞を、特異的に保護して自然免疫反応による攻撃を防ぐことができる細胞表面修飾剤の創成に取り組んだ研究である。まず、ポリエチレングリコール(PEG)結合脂質の誘導体により、細胞表面をコーティングして、どの制御因子が、虚血状態の血管内皮細胞に対して、細胞保護に効果的かを調べることを試みた。本研究で提案する細胞表面修飾剤は、すべての臓器移植や細胞移植、脳梗塞、心筋梗塞などの虚血が関与する多くの病気に対する治療法として利用でき、大きなインパクトを与えることができる。

これまで研究代表者の寺村は、PEG脂質を利用したカプセル化技術を利用して、免疫拒絶反応を抑制できる生体適合性の高い細胞表面の改変に取り組み、特に移植直後に起きる膵ランゲルハンス島(膵島)や間葉系幹細胞(MSC)の免疫反応の制御に取り組んできた。これらの細胞を患者へ移植した直後には、凝固反応や自然免疫が活性化されるため、多くの膵島やMSCが細胞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。この細胞移植に見られる一連の細胞障害性の免疫反応は、腎臓移植における虚血再灌流障害に近い現象であり、我々が取り組んできた細胞表面修飾技術を応用したアプローチが利用できるものと考え、腎臓移植の血管内皮の保護に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、虚血再灌流傷害の際には血管内皮表面のグリコカリックスと呼ばれる糖鎖が欠損することに注目し、これと同等の機能を有するヘパリンを選択し、PEG脂質への結合体を試み、凝固・補体系の活性化回避のための血管内皮の糖鎖コーティング材料の創製を目的とした。細胞膜表面を修飾できるPEG結合脂質に、フラグメントヘパリンを化学結合したヘパリン脂質を合成し、機能評価並びに脂質膜表面修飾時の生理活性を評価した。

3. 研究の方法

ヘパリン脂質の合成は次の通りである [1]。ヘパリンを酸で処理して低分子化し、フラグメントヘパリンの末端をアルデヒド基にした [2]。また、細胞膜を修飾できる材料であるPEGと脂質を結合させたマレイミド結合PEG脂質 [3]に対して、システイン末端のオリゴペプチドであるポリリジンペプチド(KnC, n=0,1,2,4,8)を結合し、カチオン末端PEG脂質(KnC-PEG脂質, n=0,1,2,4,8)を合成した。フラグメントヘパリンのアルデヒド基とKnC-PEG脂質のアミノ基からなるシッフ塩基構造を還元し[2]、ヘパリン脂質を合成した。各KnC-PEG脂質へのフラグメントヘパリンの結合数は、フルオレスカミンによるアミノ基定量によって定量した。ここで、未反応のリジン由来のアミノ基は無水コハク酸(SA)で処理し、カルボキシル基に置換した(ヘパリン脂質(-), n=0,1,2,4,8)。ヘパリン脂質の活性は水晶振動子微量天秤(QCM)法で評価した。ヘパリンは凝固系制御因子アンチトロンビン(AT)と結合することで、ATの活性を高めることが知られている。そこで、ATとの特異的結合能を評価することで、ヘパリン脂質の機能評価を実施することが可能である。疎水性表面である1-dodecanethiolの単分子膜表面(CH₃-SAM)にヘパリン脂質を

導入し、ウシ血清アルブミン(BSA)でブロックした後、AT を導入、その結合量を評価した。また、ヘパリン脂質のアミノ基に対する SA 処理の効果を調べるために、BSA 吸着量及び続く AT 吸着量への影響を評価した。

また、ヘパリン脂質の評価のために、モデル細胞としてリポソームを利用し、その表面へのヘパリン脂質の導入を評価した。リポソーム (Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) : cholesterol = 1 : 1 (モル比) , 粒径はおよそ 100nm) をエクストルージョン法により作製し、ヘパリン脂質を表面に導入し、リポソームの抗 FXa 活性を評価した。粒径並びに多分散度(PDI)および表面電荷を動的光散乱測定装置により評価した。また、細胞を用いた評価として、人由来の MSC をヘパリン脂質(-) (n=1, 8)で修飾し、蛍光 AT を反応させた後、共焦点顕微鏡(CLSM)で観察およびフローサイトメトリー(FCM)で蛍光強度の定量をした。次にループモデルによる hMSC のヒト全血に対する血液適合性試験を行った [4]。ヘパリン脂質で修飾した hMSC を 1×10^5 [cells/mL] の濃度で混合したヒト全血(2.5mL, 0.5 IU/mL のヘパリンを含む)をチューブに入れ、22rpm で回転させ、37°C で 1 または 2 h インキュベーションした後に血小板数を測定した。

4. 研究成果

フロレスカミンによるアミノ基定量では、各ヘパリン脂質において、KnC-PEG 脂質に比べアミノ基の 60-90%が消失していた(表 1)ことが分かりフラグメントヘパリンと KnC-PEG 脂質とが結合していることがわかった。また、反応効率並びに各ヘパリン脂質の分子量を算出した。PEG 脂質末端のリジンの数が増加すると 1 分子に導入できるフラグメントヘパリンの数も増加することがわかった。

Table 1. The composition and molecular weight of fHep-lipid

	Theoretical number of fHep per PEG-lipid	Reacted NH ₂ (%)	Calculated number of fHep per PEG-lipid	Calculated MW (kDa)
fHep-C-lipid	1	61	0.6	10
fHep-K1C-lipid	2	88	1.8	17
fHep-K2C-lipid	3	91	2.7	23
fHep-K4C-lipid	5	90	4.5	34
fHep-K8C-lipid	9	89	8.0	56

QCM では各ヘパリン脂質で特異的 AT 結合能が確認できた。また、コントロール群では AT 結合はほとんど見られなかった(図 1)。また SA 処理したヘパリン脂質 (-) において AT 吸着量に影響を与えることが無いことがわかった。また、SA 処理により、BSA 吸着量に関しては大きく抑制し、タンパク質の非特異吸着のみを抑制することが分かった。以上よりヘパリン脂質が凝固系活性を持つことが明らかとなった。特にヘパリン脂質 (n=8) では一分子当たりの AT 結合効率が最大であった。

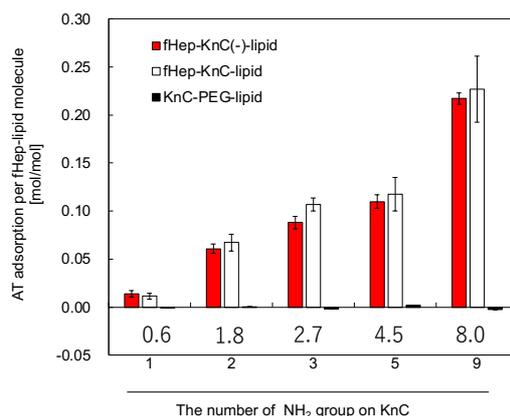


Fig. 1 AT-binding test by QCM

ヘパリン脂質で修飾したリポソームでは、抗 FXa 活性を示したが、コントロール群である無修飾のリポソームでは活性は無かった。また、リポソーム表面にヘパリン脂質を修飾すると、その粒径が増加(15-25nm 程度)し、リポソーム同士の凝集が抑えられ、PDI の増加が抑制された。また、ヘパリン脂質で修飾されたリポソームでは、コントロール群と比べ表面の電荷(ゼータ電位)が減少することが分かった。このことより、ヘパリン脂質がリポソーム表面に修飾されたことが示された。以上の結果から、脂質二分子膜を有するリポソーム表面にヘパリン脂質が導入されており、かつ抗凝固活性を保持していることが分かった。

次に、ヘパリン脂質で修飾した hMSC の観察を共焦点レーザー顕微鏡で行ったところ、無処

理のコントロール群では細胞表面に蛍光が見られなかった一方で、ヘパリン脂質で修飾した hMSC では細胞膜表面に蛍光が確認できた(図 2A)。フローサイトメトリーによる各 hMSCs 表面の蛍光 AT の定量評価では、特異的な蛍光 AT 由来の蛍光を検出できた (図 2B)。これより、ヘパリン脂質は細胞膜表面を修飾し、AT 結合活性を示すことがわかった。また、ヘパリン脂質で修飾した hMSC を混合したヒト血液では、未処理の hMSC、K1C-PEG 脂質で修飾した hMSC と比較して、インキュベーション後の血小板凝集が抑制された(図 2C)。この結果は、hMSCs 表面が引き起こす血液凝固がヘパリン脂質修飾により抑制されたことを示している。このことは、臓器移植時の虚血再灌流傷害において、グリコカリックスを失った血管内皮に対して、ヘパリン脂質修飾による糖鎖ネットワークの再構成が可能であることを示唆しており、虚血再灌流傷害を抑制できることを示唆する結果である。

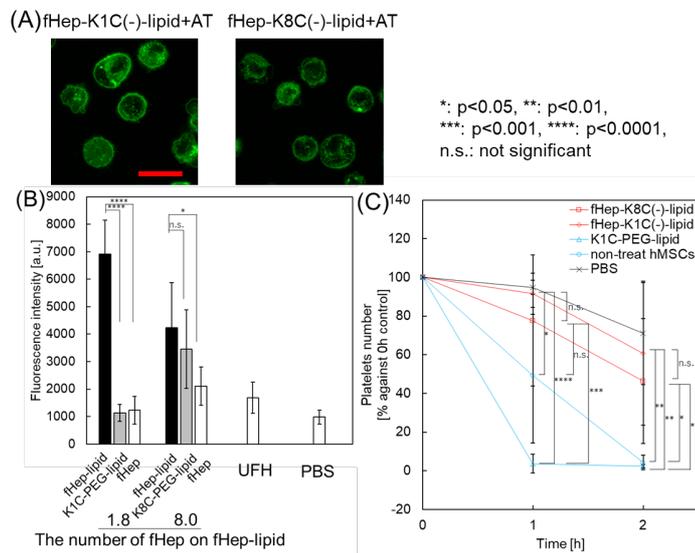


Fig. 2 Cell surface modification of hMSC with heparin-lipids and the blood loop study

【参考文献】

- 1) K. Asawa, et al., *Adv. Funct. Mater.*, **31**, 2008167. 2) Scott A., et al., *Colloids Surf. B*, **2015**, 132, 253. 3) Y. Teramura, et al., *Transplantation*, **2009**, 88, 624. 4) S. Asif, et al., *Macromol. Biosci.*, **2019**, 1800485.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 9件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshihara Akifumi, Watanabe Sayumi, Goel Isha, Ishihara Kazuhiko, Ekdahl Kristina N., Nilsson Bo, Teramura Yuji	4. 巻 253
2. 論文標題 Promotion of cell membrane fusion by cell-cell attachment through cell surface modification with functional peptide-PEG-lipids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120113 ~ 120113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2020.120113	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 Teramura Yuji, Ekdahl Kristina Nilsson, Fromell Karin, Nilsson Bo, Ishihara Kazuhiko	4. 巻 36
2. 論文標題 Potential of Cell Surface Engineering with Biocompatible Polymers for Biomedical Applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 12088 ~ 12106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c01678	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 Asawa Kenta, Ishihara Kazuhiko, Ekdahl Kristina N., Nilsson Bo, Teramura Yuji	4. 巻 31
2. 論文標題 Cell Surface Functionalization with Heparin Conjugated Lipid to Suppress Blood Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2008167 ~ 2008167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adfm.202008167	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 Asif Sana, Asawa Kenta, Inoue Yuuki, Ishihara Kazuhiko, Lindell Bjorn, Holmgren Robin, Nilsson Bo, Ryden Anneli, Jensen Waern Marianne, Teramura Yuji, Ekdahl Kristina N.	4. 巻 19
2. 論文標題 Validation of an MPC Polymer Coating to Attenuate Surface Induced Crosstalk between the Complement and Coagulation Systems 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 1800485 ~ 1800485
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 Noiri Makoto, Asawa Kenta, Okada Naoya, Kodama Tomonobu, Murayama Yuichi, Inoue Yuuki, Ishihara Kazuhiko, Ekdahl Kristina N, Nilsson Bo, Teramura Yuji	4. 巻 107
2. 論文標題 Modification of human MSC surface with oligopeptide PEG lipids for selective binding to activated endothelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1779 ~ 1792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36697	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 Toda Shota, Fattah Artin, Asawa Kenta, Nakamura Naoko, N. Ekdahl Kristina, Nilsson Bo, Teramura Yuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Optimization of Islet Microencapsulation with Thin Polymer Membranes for Long-Term Stability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 755 ~ 755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi10110755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ekdahl Kristina N, Fromell Karin, Mohlin Camilla, Teramura Yuji, Nilsson Bo	4. 巻 20
2. 論文標題 A human whole-blood model to study the activation of innate immunity system triggered by nanoparticles as a demonstrator for toxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science and Technology of Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 688 ~ 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14686996.2019.1625721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shota Toda, Artin Fattah, Kenta Asawa, Naoko Nakamura, Kristina N Ekdahl, Bo Nilsson and Yuji Teramura	4. 巻 10
2. 論文標題 Optimization of Islet Microencapsulation with Thin Polymer Membranes for Long-Term Stability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi10110755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shodai Togo, Ken Sato, Ryuzo Kawamura, Naritaka Kobayashi, Makoto Noiri, Seiichiro Nakabayashi, Yuji Teramura, and Hiroshi Y. Yoshikawa	4. 巻 4
2. 論文標題 Quantitative Evaluation of the Impact of Artificial Cell Adhesion via DNA Hybridization on E-cadherin-Mediated Cell Adhesion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 APL Bioengineering	6. 最初と最後の頁 16103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5123749	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 Tomoyuki Azuma, Taishi Matsushita, Vivek Anand Manivel, Kristina N Ekdahl, Bo Nilsson, Yuji Teramura and Madoka Takai	4. 巻 31
2. 論文標題 Poly(2-aminoethyl methacrylate)-based polyampholyte brush surface with carboxylic groups to improve blood compatibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biomater Sci Polym Ed	6. 最初と最後の頁 679, 693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09205063.2019.1710900	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 Kazuhiko Ishihara, Satoru Yanokuchi, Yuji Teramura, Kyoko Fukazawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Combination of two antithrombogenic methodologies for preventing thrombus formation on a poly(ether ether ketone) substrate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Colloid Surface B	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.col surfb.2020.111021	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 寺村裕治、石原一彦	4. 巻 38
2. 論文標題 細胞表面の工学的改質がもたらすバイオメディカル分野における可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオマテリアル	6. 最初と最後の頁 132, 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuji Teramura
2. 発表標題 Cell surface engineering for biomedical applications
3. 学会等名 第7回中国 - 日本ナノメディシンシンポジウム（JSPS二国間交流事業）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺村 裕治
2. 発表標題 細胞表面工学を利用した細胞・臓器移植への展開
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺村裕治, Sana Asif, Alireza Biglarnia, Kristina Nilsson-Ekdahl, Marianne Jensen-Waern, Bo Nilsson
2. 発表標題 PEG脂質による血管内皮のコーティングとブタ腎移植における虚血再灌流障害の保護効果
3. 学会等名 第22回日本異種移植研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺村裕治
2. 発表標題 細胞表面工学を利用した細胞・臓器移植への展開
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------