

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700488

研究課題名（和文） 新規凍害防御剤による幹細胞の効率的保存

研究課題名（英文） Effective preservation of stem cells with novel developed cryoprotectant

研究代表者 松村和明（MATSUMURA KAZUAKI）
京都大学・再生医科学研究所・研究員
研究者番号：00432328

研究成果の概要（和文）：

ポリリジンを無水コハク酸と反応させることによりカルボキシル基を導入し、様々なカルボキシル基導入量のカルボキシル化ポリリジンを作成した。そのカルボキシル基導入量が 65mol% 程度の化合物に凍結保護作用があることが確認され、ラット、ヒトの間葉系幹細胞、ヒト脂肪由来幹細胞、マウス iPS 細胞、ヒト iPS 細胞の凍結保存において既存物質である DMSO の代替物質として応用可能であることを示した。機序に関しても調べた結果、細胞膜の保護作用および凍結時の急激な浸透圧変化を抑制する作用が関係していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We synthesized carboxylated poly-L-lysine by the reaction of poly-L-lysine (PLL) with succinic anhydride for the cryoprotective agents of living cells. Culture medium solutions of PLL with 65 mol% of amino groups carboxylated showed excellent post-thaw survival efficiency of various cell lines and rat, mouse, human mesenchymal stem cells and mouse and human induced pluripotent stem cells. Thus those polyampholytes can replace DMSO as new materials for cryoprotective agents. We elucidated the mechanisms of cryoprotective properties of those polyampholytes. The mechanisms would be involved with the membrane protective activity and inhibition of rapid increase of osmolarity during freezing by ion trapping to those polyampholytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体機能材料・凍結保存

1. 研究開始当初の背景

幹細胞の凍結保存には従来毒性が高く、分化

に影響を及ぼす可能性のある DMSO と安全性に問題のある血清タンパクが使用されてき

た。また、凍結保存の困難な細胞も存在し、安全で効率の高い凍結保護剤の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

細胞への毒性の低い、また効率の高い凍結保護剤を開発し、幹細胞の凍結保存を DMSO、タンパクフリーで行うこと。および本保護剤の機序の解明。

3. 研究の方法

ε ポリ L リジン (PLL) を無水コハク酸を反応させることにより、カルボキシル基を導入したカルボキシル化 PLL を合成し、その細胞凍結保護能が種々の幹細胞の凍結にも応用可能かどうかを検討した。カルボキシル化度は L929 細胞や他の細胞株でも最も良好な結果が得られている 65mol% とした。

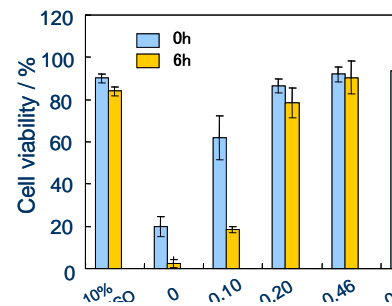
幹細胞はラット骨髄由来間葉系幹細胞、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞、ヒト脂肪由来幹細胞、マウス人工多能性幹 (iPS) 細胞、ヒト iPS 細胞である。

また、今ポリマーが細胞を凍結保存できるメカニズム解明に関して、細胞膜との相互作用および低温時の水との相互作用という観点から細胞生物学および分析化学的手法を用いて検討を行った。

4. 研究成果

まず、多様な細胞種でも同様に凍結保存が可能かを調べたところ、Caco2 や MG63, HUBEC や骨芽細胞など 20 種類以上のマウス、ラット、ヒト細胞で DMSO を使用した既存の保存液と同等またはそれ以上の保存効果が得られることがわかり、汎用性を確認した。

次にラット間葉系幹細胞、ヒト間葉系幹細胞、ヒト脂肪由来幹細胞をカルボキシル化ポリリジンを用いて凍結保存したところ、すべての株で DMSO 系と同等の解凍後生存率が得られた。図 1 に示したのは、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の解凍後生存率と、ポリリジンのカルボキシル化度との関係である。65%程度で 90%以上の解凍後生存率が得られている。また、これらの細胞の分化能を調べたところ、解凍後も骨、軟骨、脂肪への分化能が維持されていることを確認した。



次にマウスの iPS 細胞も凍結保存を行ったところ、カルボキシル化ポリリジン水溶液のみでも凍結保存は可能であったが、さらにエチレングリコールを併用することでより高い保存活性が得られることが確認された。ヒトの iPS 細胞は通常コロニーで増殖し、シングルセルの状態にするとアポトーシスを起こすことから一般にはコロニーの状態での凍結保存することが望ましい。しかしその場合、解凍後の生存率が 1%以下となることから、効率的保存法が開発が望まれている。カルボキシル化ポリリジン溶液にエチレングリコール、スクロースを混合した溶液において凍結後、解凍時に ROCK 阻害剤を添加することで生存率を 30%程度にまで向上することが可能となった。また、解凍したヒト iPS 細胞の未分化能、多能性も保たれていることを確認した。これらの結果より、血清や DMSO などの安全性に問題のある化合物を用いることなく化学合成のみの高分子化合物水溶液により有用幹細胞の凍結保存が可能となった。

機序に関する研究も同時に行った。まず、カルボキシル化ポリリジン以外の両性高分子電解質でも同様な保護作用が見られるかを検討するために、ポリアクリル酸にアジポジヒドラジドをカルボジイミド法により導入したアミノ基導入ポリカルボン酸および、アミノ基導入デキストランに対して無水コハク酸でカルボキシル基を導入した両性電解質高分子を合成した。これらの水溶液においても一定の細胞凍結保護効果が見られたことから、高分子鎖中の電荷が何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。次に固

体 NMR 法において低温時のカルボキシル化ポリリジンと水の挙動を調べた結果、DMSO やエチレングリコールとは異なる挙動が観察された。

溶媒の水や溶質である食塩の挙動に関しても固体 NMR を用いて観測し、凍害保護作用との関係について調べた。その結果、ポリマー存在下では凍結条件でも水中の残存水に高濃度に濃縮された状態で溶けていることが分かった。また、凍結時の水や食塩の定量解析の結果から、この高濃度のポリマー溶液は共存する水や食塩をトラップし、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のではないかという仮説を立てることができた。

FITC ラベルしたカルボキシル化ポリリジンを作成し、細胞膜との相互作用を検討した。その結果、37 度での培養時には細胞膜との親和性が低く、吸着は起こらないが、凍結時に強く膜と相互作用し、何らかの保護作用を行っていることが示唆された。また、その相互作用は解凍後 37 度の培養に戻すことにより弱まり、速やかに膜より脱着することも示され、低毒性の原因であることが示唆された。以上の結果より、両性電解質高分子化合物がその膜保護効果およびイオン性側鎖による凍結濃縮抑制効果により凍結時に細胞を障害から保護していることが示唆されたことから、再生医療に有用な幹細胞の安全かつ効率的凍結保存に大きな寄与を与えることが確認された。本保存剤は高分子であることからさらに検討を重ねることで再生医療用機能性材料としての応用も視野に入れた研究へと発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

松村和明、Jung Yoon Bae, 玄 丞侏. Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation. Cell Transplantation 2010: 19, 611-619.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 松村和明、裴庭胤、玄 丞侏 Successful vitrification of human iPS cells 第 38 回日本低温医学会 2010. 11. 12 東京
- ② 松村和明、玄 丞侏 Successful cryopreservation of human mesenchymal stem cells and vitrification of human induced pluripotent stem cells using carboxylated poly-L-lysine. 47th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (CRYO-2010). 2010. 7. 20 Bristol, UK
- ③ 松村和明、玄 丞侏 Novel low toxic cryoprotective agents as alternatives to DMSO. The 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs (CRYO). 2010. 5. 27 Valencia, Spain
- ④ 松村和明、裴庭胤、玄 丞侏 新規ガラス化法によるヒト iPS 細胞の凍結保存 第 9 回日本再生医療学会 2010/3/18-19 広島
- ⑤ 松村和明・玄 丞侏 Development of Polyampholytic Cryoprotective Agents as Alternatives to DMSO. 2nd TERMIS world congress. 2009/8/31-9/3 ソウル・韓国
- ⑥ 松村和明、林 文晶、長島敏雄、玄 丞侏. ポリリジン由来両性高分子電解質による細胞凍結保護作用 第 58 回高分子討論会 2009/9/16-18 熊本
- ⑦ 松村和明、玄 丞侏 ポリリジン由来両性電解質ポリマーによる細胞凍結保存効果 第 31 回バイオマテリアル学会 2009/11/16-17 京都

[図書] (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 和明 (MATSUMURA KAZUAKI)

京都大学・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：00432328

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし