

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650262

研究課題名(和文) PEG脂質と外部刺激を利用した新規細胞膜表面修飾法の開発

研究課題名(英文) Development of cell surface modification with PEGylated lipid and external stimulation

研究代表者

樋口 ゆり子 (Higuchi, Yuriko)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・講師

研究者番号：40402797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜表面への機能分子の修飾は、細胞の機能制御を通して、細胞治療の治療効果向上に繋がる技術となり得る。中でもPEG脂質と細胞膜の相互作用を利用した細胞膜表面修飾は、細胞の種類を問わず修飾できる点、混和するだけで簡単に修飾できる点で臨床応用への期待が高いが、一方で、修飾効率の向上が課題である。本研究では、超音波照射やシクロデキストリン添加により、細胞培養液中でミセル様集合体を形成するPEG脂質の分散を促進することにより、細胞膜修飾効率の向上に成功した。

研究成果の概要(英文)：Control of cell function by cell surface modification with functional molecule is a promising way to improve cell therapy. Cell surface modification through the association between cell membrane and PEGylated lipid is suitable for clinical application because PEGylated lipid could be modified on any type of cell and could be modified only by incubating with cells. However, modification efficiency is not high. In this study, ultrasound irradiation or addition of cyclodextrin could improve cell surface modification with PEGylated lipid by inhibiting the formation of PEGylated lipid assembly in the medium.

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：幹細胞 PEG脂質 細胞膜表面修飾 超音波

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜表面に免疫に関わる抗原や接着分子などの機能分子を修飾する技術は、細胞治療の治療効果向上に繋がる重要な技術である。動物実験では、遺伝子導入により細胞膜表面に目的のタンパク質を発現させる方法が汎用されているが、臨床では、遺伝子導入効率の低さや、タンパク質の発現までに長時間かかることが問題となる。また、別の方法として、官能基選択的な縮合反応を利用し、細胞膜表面に発現するタンパク質に対して目的の分子を化学修飾する方法も開発されている。しかしながら、タンパク質の中の結合標的となる官能基の精密な制御や、標的タンパク質選択的な化学修飾は困難である。これらの方法と比較し、PEG 脂質を用いた細胞膜表面修飾は、修飾に必要な時間が短い、細胞と混合するだけで修飾できるので操作が簡便である、細胞の種類に関わらず修飾できる、などの点において臨床応用に有用な方法となりうる。

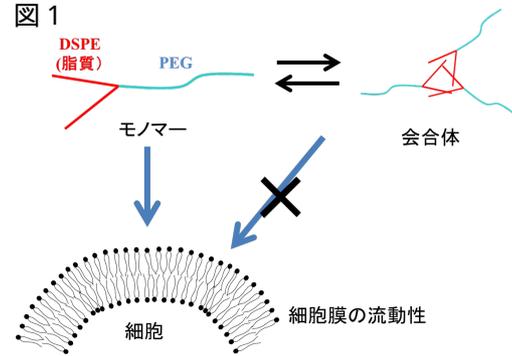
これまで、我々を含むいくつかの研究グループにより、PEG 脂質を細胞と混和することにより、細胞膜表面を修飾する方法に関する研究が報告されている。混和により細胞膜表面へ分子を導入する場合、高濃度の PEG 脂質と細胞を混和しても、細胞膜表面へ導入される分子は全体の 10% 以下であった。また、修飾量を向上させるためには、遺伝子発現に必要な時間よりは短いものの、10 時間程度インキュベーションする必要がある。したがって、PEG 脂質を利用した細胞膜表面の臨床での応用を目指す場合、修飾効率を向上させる方法が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、PEG 脂質による細胞膜表面への導入効率を向上させることである。PEG 脂質と細胞を混和して細胞膜表面を修飾する時に修飾効率を左右する可能性のある各条件を検討したところ、添加する PEG 脂質の濃度、インキュベーションする時間に加え、インキュベーション時の培地の温度が高い方が修飾効率が高いことを明らかにした。この結果より、以下の 2 つの仮説を立てた。1 つは、PEG 脂質が培地中でミセル様の形態をとる結果、表面に露出した PEG が細胞膜との相互作用を阻害するが、高温になると分子振動によりミセル様の形態が部分的に壊れるために細胞膜表面への相互作用が促進された可能性、もう 1 つは、加熱により細胞膜の流動性が高くなったために、PEG 脂質が細胞膜表面と相互作用しやすくなった可能性である (図 1)。しかしながら、細胞を含む培地を加熱して細胞膜表面の修飾効率を向上するには限度があり、現実的ではない。そこで、本研究では、加熱以外の方法で、外部刺激や化合物の添加により、培地中における PEG 脂質のミセル様の形態を破壊し分散させる、または細胞膜の流動性を高くすること

により、PEG 脂質による細胞膜表面への導入効率を向上させる可能性を検討した。

図 1



### 3. 研究の方法

**Fluorescein 修飾 PEG 脂質の合成:** NH<sub>2</sub>-PEG-DSPE と fluorescein-NHS をモル比 1:2 でアセトン中に混合し、室温で一晩反応させた後 PD10 カラムで未反応の fluorescein-NHS を除去し精製した。

**細胞:** ヒト由来間葉系幹細胞株 hMSCs (UE7T-13; RCB2160, Riken Cell Bank) は 10% FBS および penicillin-streptomycin-L-glutamine を添加した DMEM を用いて培養した。

**細胞膜表面に修飾された fluorescein-PEG-DSPE の定量:** fluorescein-PEG-DSPE を含む培地中で細胞を一定時間培養した後、遠心分離により細胞膜に相互作用しなかった fluorescein-PEG-DSPE を除去した。得られた細胞に 10% 血清入りの DMEM を加え、37°C で 30 分間転倒混和し、遠心分離した。得られた細胞を 2 群に分け、一方にだけ最終濃度が 0.05% になるようにトリパンプルーを添加し、それぞれ FACS で蛍光強度を測定した。トリパンプルー未添加の細胞の蛍光強度からトリパンプルーを添加した細胞の蛍光強度を引いた値を細胞膜表面への fluorescein-PEG-DSPE の修飾量の指標とした。

**超音波照射による細胞膜表面修飾法:** fluorescein-PEG-DSPE を含む培地または細胞分散液を丸底のチューブに入れ、恒温槽につけて、直径 6 mm のプローブ (KP-L6) を用いて一定時間超音波照射 (Sonopore-4000: frequency, 2.069 MHz; duty, 50%; burst rate, 10 Hz; intensity, 1.0-4.0 W/cm<sup>2</sup>) を行った。

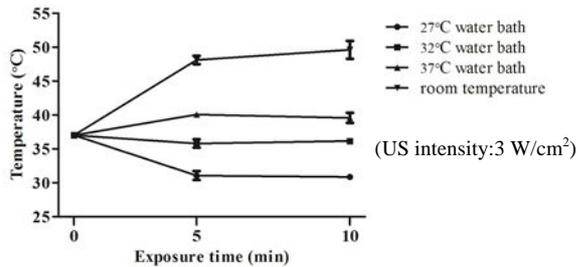
**細胞生存率の評価:** 細胞をトリプシンではがして回収し、超音波照射などを行った後、96wellplate に播種し、直後または 24 時間培養後に CCK-8 assay を行った。

### 4. 研究成果

**超音波照射時の培地の温度制御:** 室温で OptiMEM に対して 5~10 分超音波を照射したところ、培地の温度が 45°C に上昇した。そこで、恒温槽の中に培地の入ったチューブを入れて超音波を照射したところ、培地の温度の上昇が小さくなった。1, 2, 3, 4 W/cm<sup>2</sup> の強さの超音波を 10 分照射する間、培地の温度

を 37°C に保つことが可能な恒温槽の水温を調べたところ、それぞれ 36, 35, 32, 30°C であった (図 2)。よって、以降の実験では、それぞれ最適な水温中で超音波を照射することにした。

図 2

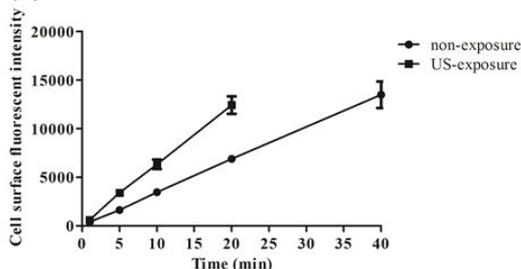


細胞生存率に対する超音波照射の影響: 細胞に 1, 2, 3, W/cm<sup>2</sup> の超音波を 10 分間照射し、直後または 24 時間後において、細胞生存率はほぼ 100% であった。さらに、PEG-DSPE を含有する培地中で 1, 2, 3 W/cm<sup>2</sup> の超音波を 10 分間照射した場合も細胞生存率への影響はほとんど認められなかった。しかしながら、超音波の強度が 4 W/cm<sup>2</sup> で 10 分間照射した場合、または、3 W/cm<sup>2</sup> で 20 分間照射した場合、細胞の生存率は約 60% にまで減少した。

PEG 脂質を用いた細胞膜表面修飾に対する超音波の強度および照射時間の影響:

fluorescein-PEG-DSPE の濃度が 0.1 mM の培地に細胞を分散させて、1~3 W/cm<sup>2</sup> の超音波を 10 分間照射した細胞の膜表面の蛍光強度は、超音波照射をしなかった場合と比較して有意に高かった。また、超音波の強度が強いほど、細胞膜表面の蛍光強度が高かった。また、3 W/cm<sup>2</sup> の超音波で照射時間を 1~20 分まで延長したところ、照射時間が長いほど細胞膜表面の蛍光強度が強かった。また、超音波照射した場合は、超音波照射しなかった場合の約半分の時間で同程度の細胞膜の蛍光強度が得られた。したがって、超音波の照射強度が強いほど、また照射時間が長いほど、PEG-DSPE による細胞膜表面の修飾効率が高くなり、さらに、超音波照射した場合は、超音波照射しない場合の約半分の時間で修飾できることが明らかとなった (図 3)。

図 3



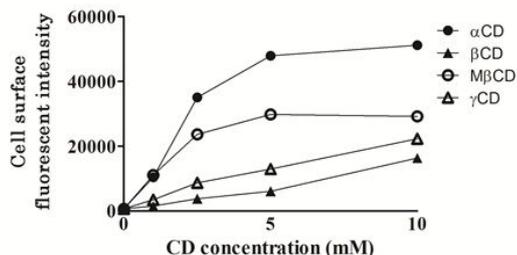
超音波照射を利用した細胞膜表面修飾における PEG 脂質の濃度の影響: fluorescein-PEG-DSPE の濃度が 0.01, 0.05, 0.1,

0.5 mg/ml の培地中に細胞を分散し、3 W/cm<sup>2</sup> の強度で 10 分間超音波を照射したところ、fluorescein-PEG-DSPE の濃度が濃いほど細胞膜表面の蛍光強度が高かったが、0.1 と 0.5 mg/ml では、蛍光強度が約 1.3 倍しか増加しなかった。超音波照射しない場合も同様の傾向が認められたが、いずれの濃度においても超音波照射した場合の細胞膜の蛍光強度が照射しない場合と比較して有意に高かった。したがって、超音波照射による細胞膜表面の修飾において PEG 脂質の濃度が高い程、修飾の効率が高いが、高濃度では修飾量が飽和することが明らかになった。

PEG 脂質を用いた細胞膜表面修飾における有機溶媒の影響: 脂溶性の高い試薬などを細胞に添加する際に溶解補助に利用される有機溶媒 MeOH, EtOH, DMSO について、まず、細胞生存率への影響がほとんど認められない濃度およびインキュベーション時間を確認した。いずれも 10% 以下、30 分以内では細胞生存率への影響が小さいことが確認できた。そこで、各有機溶媒 10% と fluorescein-PEG-DSPE を含む培地中で細胞を 30 分間転倒混和した後、細胞膜表面の蛍光強度を比較したところ、いずれも有機溶媒を用いた場合も有機溶媒を用いない場合と比較して蛍光強度が有意に高かった。

PEG 脂質を用いた細胞膜表面修飾におけるシクロデキストリンの影響: 0~10 mM の  $\alpha$ CD、M $\beta$ CD、 $\beta$ CD、 $\gamma$ CD と fluorescein-PEG-DSPE を含む培地中で細胞を 30 分間転倒混和した後、細胞膜表面の蛍光強度を比較したところ、いずれも CD の濃度が高いほど細胞膜表面の蛍光強度が高かった。また、同濃度の CD を添加した場合の蛍光強度は、 $\alpha$ CD、M $\beta$ CD、 $\beta$ CD、 $\gamma$ CD の順に高く、 $\alpha$ CD、M $\beta$ CD については 5 mM と 10 mM では蛍光強度はほぼ同程度であった (図 4)。

図 4

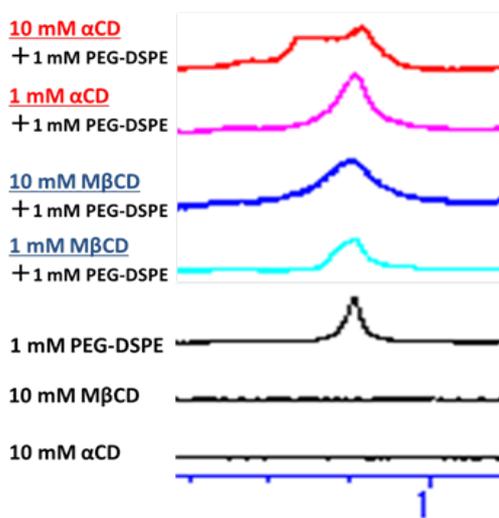


M $\beta$ CD は、細胞膜のコレステロールを引き抜く作用が報告されている。そこで、予め M $\beta$ CD を作用させた後、fluorescein-PEG-DSPE だけを含む培地中で細胞を転倒混和した群、fluorescein-PEG-DSPE のみを含む培地中で転倒混和した群、M $\beta$ CD と fluorescein-PEG-DSPE が共存する培地中で転倒混和した群の細胞膜表面の蛍光強度を比較したところ、共存した場合のみ有意に蛍光強度が高く、その他の 2 群は同程度であった。M $\beta$ CD による前処理は PEG 脂質による細胞

膜表面修飾にほとんど影響せず、細胞膜のコレステロールを引き抜く作用は、細胞膜表面修飾に影響しないと考えられる。また、 $\alpha$ CD、M $\beta$ CD について、10 mM で 30 分以内であれば、細胞生存率への影響はほとんど認められなかった。

fluorescein-PEG-DSPE とシクロデキストリンの相互作用の評価：CD に包接された化合物は、 $^1\text{H}$ NMR におけるシグナルの化学シフト値が変化する。ポリマーに CD が包接した場合は、部分的に化学シフト値が変化することによってシグナルの幅が広がる。そこで、 $\alpha$ CD または M $\beta$ CD と fluorescein-PEG-DSPE を混和した後、 $^1\text{H}$ NMR スペクトルを測定したところ、アルキル鎖のプロトンに該当する 1.1~1.2 ppm のシグナル幅が広がった (図 5)。 $\alpha$ CD の場合は、1.3 ppm に新しいシグナルが出現した (図 5)。これらの結果から、 $\alpha$ CD、M $\beta$ CD は、DSPE のアルキル鎖を包接していることが示唆された。

図 5



## 結論

培地中における PEG 脂質のミセル様の形態形成を阻害する目的で、有機溶媒や CD を添加したところ、PEG 脂質による細胞膜表面の修飾効量を増大させることができた。CD に関しては、細胞膜表面の修飾量の増大は、 $\alpha$ CD、M $\beta$ CD、 $\beta$ CD、 $\gamma$ CD の順に高かった。 $^1\text{H}$ NMR の結果から、 $\alpha$ CD、M $\beta$ CD は、PEG 脂質のアルキル鎖と相互作用していることが明らかとなった。一方、恒温槽中で超音波照射による培地の温度上昇の影響を無視できる条件で、超音波照射すると、PEG 脂質による細胞膜表面修飾量を増大させることができた。

以上、CD の添加や超音波照射により、PEG 脂質を用いた細胞膜表面修飾の効率を向上させることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshimasa Takafuji, \*Yuriko Higuchi, Atsushi

Muro, Kohei Oshiro, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, \*Mitsuru Hashida: Factors influencing the surface modification of mesenchymal stem cells with fluorescein-pegylated lipids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 36(11) 1731-1738 (2013).

〔学会発表〕(計 5 件)

「PEG 脂質を用いた間葉系幹細胞表面修飾における超音波の効果」大城康平、樋口ゆり子、高藤義正、川上 茂、山下富義、橋田 充、第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012 年 10 月 20 日、武庫川女子大学薬学部浜甲子園キャンパス (兵庫)

「表面プラズモン共鳴測定による hICAM-1 と ICAM-1 認識配列を含むペプチドとの親和性の評価」創剤フォーラム第 18 回若手研究会、山口 徹、樋口ゆり子、川上 茂、山下富義、橋田 充、2012 年 11 月 17 日、徳島大学薬学部長井記念ホール (徳島)

「PEG 脂質を用いた間葉系幹細胞修飾における超音波照射による修飾率改善」樋口ゆり子、大城康平、高藤義正、川上 茂、山下富義、橋田 充、日本薬物動態学会第 27 年会、2012 年 11 月 20 - 22 日、タワーホール船堀 (東京)

「短鎖 PEG 脂質による幹細胞表面修飾と細胞間接着の関係」小田敬昌、樋口ゆり子、高藤義正、川上 茂、山下富義、橋田 充、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013 年 7 月 4-5 日、京都テルサ (京都)

「間葉系幹細胞への機能付与を目的としたペプチド結合短鎖 PEG 脂質の開発」小田敬昌、樋口ゆり子、高藤義正、山下富義、橋田 充、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10 月 12 日、同志社女子大学 京田辺キャンパス (京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

樋口ゆり子 (HIGUCHI, Yuriko)

京都大学学際融合教育研究推進センター・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定講師

研究者番号：40402797

### (2) 連携研究者

川上 茂 (KAWAKAMI, Shigeru)

長崎大学医歯薬学総合研究科・医薬品情報学・教授

研究者番号：20322307