

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14190

研究課題名（和文）細胞内水分子ダイナミクスの測定による細胞の凍結保護メカニズムの解明に関する研究

研究課題名（英文）Measurement of intracellular water dynamics to understand cryopreservation mechanism of cells

研究代表者

松浦 弘明 (Matsuura, Hiroaki)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：50847994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞や細胞凍結保護物質水溶液を対象に、誘電分光による分子ダイナミクスの測定やソーレ強制レイリー散乱法による物質輸送性質の測定を行い、その成果として、(1)脱水された細胞内における遅いダイナミクスを示す水の割合の増加、(2)環境負荷が小さい保護物質として期待される深共晶溶媒の誘電分光におけるKramers-Kronigの関係を用いた解析の有効性と、その分子ダイナミクスの変化、(3)低温高圧力下で氷晶によるダメージを避けながら細胞を保存するための定積凍結における、細胞生存率と水分子緩和時間の関係、を含む細胞低温保存プロセスの設計・最適化につながる知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、様々な現象に関わる複雑な細胞凍結保存プロセスに関する物理化学的理解につながりうるという学術的意義に加えて、その理解に基づく細胞凍結保存プロセスの効率化が実現されれば、再生医療や生殖医療等の最先端医療の進展に寄与するという社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In this study, measurements of the molecular dynamics of intracellular water were carried out by the dielectric spectroscopy, with the aim of understanding the effects of cryoprotective agents. Jurkat cells suspended in aqueous sucrose solutions of different concentrations were examined, which revealed the two types of intracellular water (bulk-like water and hydration water with slower molecular dynamics), and the increasement of intracellular slower water in dehydrated cells.

研究分野：熱工学

キーワード：バイオ熱工学 水分子ダイナミクス 誘電分光 凍結保護物質 細胞凍結保存

1. 研究開始当初の背景

細胞の凍結保存は、通常 -80°C 以下の極低温環境に細胞をおく事で水を媒介とした生化学反応を抑える技術であり、これにより細胞を自由なタイミングで解凍して使用することが可能になる。この技術は再生医療や生殖医療(不妊治療)における重要性はもちろん、COVID-19のような未知の感染症に対する治療や予防の手段として期待される細胞療法の実用化にも欠かせないものである。

ただ単に細胞を冷却していくだけでは細胞内に氷の結晶(氷晶)が生成される場合があり、これが細胞に対して不可逆的なダメージを与えてしまうため、氷晶生成を抑えるために凍結操作前に凍結保護物質の添加が行われる。ジメチルスルフォキシド(DMSO)が保護物質として通常用いられているが、その問題点として細胞毒性のため解凍時に速やかに除去する必要があることや、細胞の分化能への影響などが指摘されており、新規な凍結保護物質を用いた細胞凍結保存プロセスの確立が求められている。しかしながら凍結保護物質の添加による凍結保護のメカニズムには未解明の部分が多く、また保護物質の種類だけではなく細胞の冷却速度や保存容器等の条件が関わる複雑な現象であるため、それぞれの細胞種について経験則に基づいて凍結保存が試みられる場合が多い。

従って細胞の凍結保存プロセスには最適化の余地があると言えるが、そのためには保存過程における細胞内の現象についての定量的な理解が重要となる。

2. 研究の目的

細胞内の氷の核生成頻度と関連があると考えられる細胞内の水分子ダイナミクスや凍結保護物質水溶液の分子ダイナミクス、物質輸送性質の測定を通して、細胞凍結保存プロセスの設計・最適化に寄与する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

下記の誘電分光およびソーレー強制レイリー散乱法を用いて、分子ダイナミクスと物質輸送性質に関する実験的知見をそれぞれ集積する。

(1) 誘電分光

誘電分光は電磁場と物質の相互作用を調べる分光法であり、印加する交流電場の周波数に対する複素誘電率 $\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon''$ (j は虚数単位)の変化を解析することで、物質の分極のダイナミクスを調べることができる。永久双極子を持つ分子は、交流電場の周波数が低い場合には電場の振動に対応して向きを変える(配向)が、周波数が高くなるにつれ分子の配向は交流電場に追従できなくなり、分極の大きさを表す誘電率実部は小さくなる(図1)。誘電率虚部は、交流電場への分極の遅れの大きさを表し、そのピーク周波数は分子のダイナミクスに対応する誘電緩和時間を特徴付ける。分子が置かれた環境により誘電緩和スペクトルは変化するため、これを解析することで分子のダイナミクスに関する情報が得られる [1]。

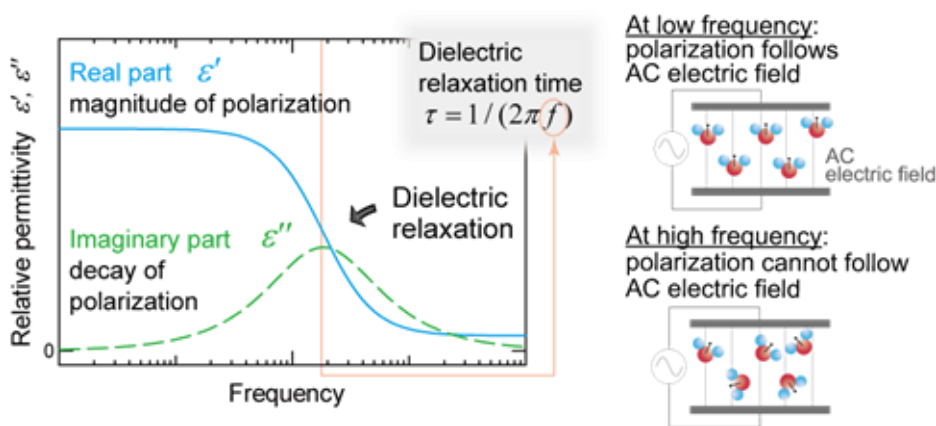


図1 誘電緩和

(2) ソーレー強制レイリー散乱法

図2にソーレー強制レイリー散乱法[2]の原理図を示す。試料内部で加熱用レーザーを2光束干渉させると、温度分布に対応した濃度分布がソーレー効果により形成される。加熱を止めると温度分布の均一化に続いて物質拡散が起こる。これらの過程で温度分布、濃度分布による周期的な屈折率分布が回折格子として働くため、観察用レーザーの入射により回折光が生じる。この回折光の強度変化から物質輸送現象を評価することができる。

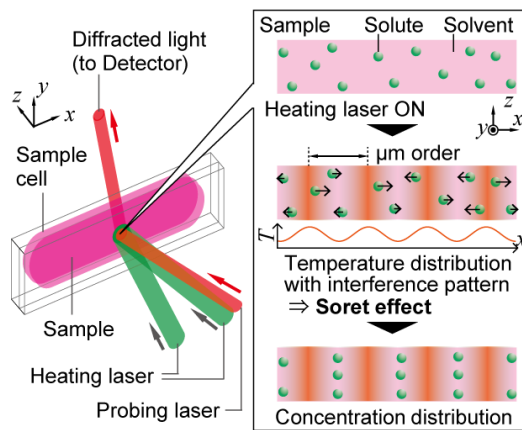


図2 ソーレー強制レイリー散乱法の原理

4. 研究成果

主な成果を下記に挙げる。

(1) 細胞内水分子のスローダイナミクスに関する検討

スクロース水溶液に懸濁したヒト由来 Jurkat 細胞の誘電分光では、図3のように水分子由来の緩和が2つの Debye 型の重ね合わせとして表されることが分かった[1]が、それらに対応する2つの緩和時間の比について、リゾチーム(タンパク質)水溶液に関する分子動力学(MD)シミュレーションの結果[3]との比較を行った。この結果、2つの緩和時間の比は同程度であり、またその濃度依存性についても同様の傾向がみられ、細胞内水分子についての2つの Debye 緩和のうち低周波側のものが、細胞内の生体高分子等との相互作用により遅いダイナミクスを示す水分子を特徴づけることを支持する知見が得られた。また、イースト細胞に対する誘電分光を行ない、ヒト由来 Jurkat 細胞と同様に水分子由来の緩和が2つの Debye 型緩和の重ね合わせとして表されることを明らかにした。

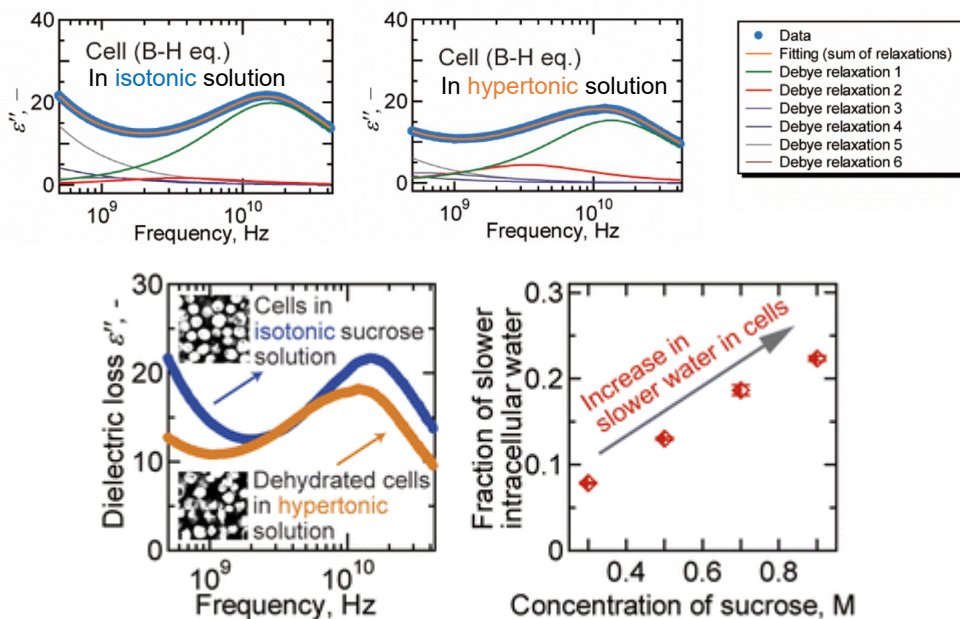


図3 スクロース水溶液に懸濁した Jurkat 細胞の誘電スペクトルの解析と、遅いダイナミクスを示す水の割合の細胞脱水による変化 [1]

(2) 深共晶溶媒の分子ダイナミクスの測定

生体分子の安定化作用が期待され、細胞凍結保護物質としての検討も行われ始めている深共晶溶媒について、誘電スペクトルの取得および物質輸送の測定に関する検討を行った。塩化コリン-エチレングリコール(CC-EG)、塩化コリン-グリセロール(CC-glycerol)の誘電分光では、Kramers-Kronig の関係を用いることで導電率成分の寄与がない誘電率虚部スペクトルを得る手法[4]が効果的であることを示した。また、ソーレー強制レイリー散乱法を用いて深共晶溶媒の信号を取得するための測定パラメタの検討を行い、物質拡散由来の信号を取得する方法を確立した。

(3) 定積凍結(isochoric cryopreservation)を利用した細胞の保存に関する検討

定積チャンバーに細胞懸濁液を入れ、低温に保つことにより高圧力下で氷晶によるダメージ

を避けながら細胞を保存するための検討を行った。超々ジュラルミンを用いた定積凍結用高圧チャンバーを設計し、これを用いた定積凍結保存による細胞生存率と、誘電分光を用いて求めた水分子緩和時間の関係について整理した。

<引用文献>

- [1] Hiroaki Matsuura, Kiyoshi Takano, Ryo Shirakashi, Slow water dynamics in dehydrated human Jurkat T cells evaluated by dielectric spectroscopy with the Bruggeman–Hanai equation, *RSC Advances*, Vol. 13, 20934-20940 (2023). <https://doi.org/10.1039/d3ra02892e>
- [2] Hiroaki Matsuura, Yuji Nagasaka, Soret forced Rayleigh scattering instrument for simultaneous detection of two-wavelength signals to measure Soret coefficient and thermodiffusion coefficient in ternary mixtures, *Review of Scientific Instruments*, Vol. 89, (2018) 024903. <https://doi.org/10.1063/1.5013292>
- [3] Kang Hu, Hiroaki Matsuura, Ryo Shirakashi, Stochastic Analysis of Molecular Dynamics Reveals the Rotation Dynamics Distribution of Water around Lysozyme, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 126, (2022), 4520-4530. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c00970>
- [4] Hiroaki Matsuura, Ryo Shirakashi, Exclusion of DC conductivity effect from dielectric loss spectrum using Kramers-Kronig relations for evaluation of slow dynamics of water molecules, *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 61, (2022), 068003. <https://doi.org/10.35848/1347-4065/ac6af6>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroaki Matsuura, Ryo Shirakashi	4. 巻 61
2. 論文標題 Exclusion of DC conductivity effect from dielectric loss spectrum using Kramers-Kronig relations for evaluation of slow dynamics of water molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 68003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ac6afe	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 -
1. 著者名 Junkai Zhang, Hiroaki Matsuura, Ryo Shirakashi	4. 巻 45
2. 論文標題 Prediction of Water Relaxation Time Using Near Infrared Spectroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Food Process Engineering	6. 最初と最後の頁 e14095
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfpe.14095	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 Kang Hu, Hiroaki Matsuura, Ryo Shirakashi	4. 巻 126
2. 論文標題 Stochastic Analysis of Molecular Dynamics Reveals the Rotation Dynamics Distribution of Water around Lysozyme	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 4520-4530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.2c00970	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 Matsuura Hiroaki, Takano Kiyoshi, Shirakashi Ryo	4. 巻 13
2. 論文標題 Slow water dynamics in dehydrated human Jurkat T cells evaluated by dielectric spectroscopy with the Bruggeman/Hanai equation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 20934 ~ 20940
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d3ra02892e	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 -

1. 著者名 Zhang Junkai, Matsuura Hiroaki, Shirakashi Ryo	4. 巻 46
2. 論文標題 A method for measuring dielectric relaxation of water by NIR spectroscopy: Applicability and application to measurement of water diffusion coefficient	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Food Process Engineering	6. 最初と最後の頁 e14335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jfpe.14335	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松浦弘明, 高野清, 白樫了
2. 発表標題 誘電分光による細胞内水分子ダイナミクスの測定に関する研究 (氷点下での誘電スペクトル取得と解析)
3. 学会等名 第59回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Junkai ZHANG, Hiroaki MATSUURA, Ryo SHIRAKASHI
2. 発表標題 Rotational Relaxation Time of Water: an IR approach
3. 学会等名 第59回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦弘明, 白樫了
2. 発表標題 深共晶溶媒の分子ダイナミクス・物質拡散の測定に関する研究 (塩化コリン-エチレングリコール, 塩化コリン-グリセロール系について)
3. 学会等名 第43回日本熱物性シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦弘明, ZHANG Junkai, 白樫了
2. 発表標題 誘電分光による細胞内水分子ダイナミクスの測定 (ヒト由来Jurkat細胞およびイースト細胞に関する検討)
3. 学会等名 第60回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松浦弘明, 白樫了
2. 発表標題 ロックイン検出を組み合わせたソーレー 強制レイリー散乱法による物質輸送現象 センシング技術の開発
3. 学会等名 第44回日本熱物性シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroaki Matsuura
2. 発表標題 Exclusion of Ohmic loss effect from dielectric loss spectra using Kramers-Kronig relations for evaluation of slow dynamics of water molecules
3. 学会等名 22nd European Conference on Thermophysical Properties (ECTP2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroaki Matsuura
2. 発表標題 Slow dynamics of water in human cells measured by dielectric spectroscopy
3. 学会等名 China-Japan Heat Transfer Symposium 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------