

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870267

研究課題名(和文)両性電解質高分子による凍結ダメージ回避機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of cryoprotective mechanisms of polyampholytes

研究代表者

松村 和明(Matsumura, Kazuaki)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・准教授

研究者番号：00432328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ポリリジンにカルボキシル基を導入した両性電解質高分子を合成し、細胞の凍結保護効果があることを報告してきたが、その機序については不明な点が多かった。固体NMRを使用することで、両性電解質高分子が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可能性が示唆された。精密重合の手法を用いて合成した両性電解質高分子にも凍結保護活性を持つ事を調べ、その機序が膜保護活性に関与することをリポソームとの相互作用から確認した。両性電解質高分子化合物は、既存の凍結保護物質とは異なる機序で凍結保護を行っている可能性があり、新しい凍結保護技術の創製に繋がる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：We synthesized partially carboxylated poly-L-lysine and discovered its cryoprotective property. This interesting phenomenon is characteristic of polymers with high electron charge, especially polyampholytes. We proposed that polyampholytes exert their cytoprotective action by protecting cells against stresses such as drastic changes in soluble space size and osmotic pressure during freezing by using solid-state NMR. Synthetic cryoprotectants revealed that the mechanisms related with the membrane protection properties of these polyampholytes by using liposome as a model membrane. The cryoprotective mechanisms are different from those of current available cryoprotectants. The novel findings might lead to the development of new effective cryoprotectants.

研究分野：高分子化学

キーワード：凍結保存 両性電解質高分子 バイオマテリアル 再生医療

1. 研究開始当初の背景

現在、高分子材料を用いたバイオマテリアル研究の成果が臨床応用されつつある。例えば、温度応答性高分子や、タンパク質の吸着を防ぐリン脂質ポリマーなどが数多く研究され、臨床応用されている。そういった中でリン脂質ポリマーやベタインポリマーに代表される両性電解質高分子化合物が生体親和性に優れていることが報告され、新規バイオマテリアルとして注目を浴びている[1,2]。我々は、両性電解質高分子化合物の持つ特異な性質を発見し、バイオマテリアル・再生医療用への応用を目指して研究を続けてきた。その特異な性質とは、細胞の凍結保護効果である。細胞は液体窒素中で凍結保存され、必要ときに解凍して使用される。凍結保存技術は古くから研究され、ジメチルスルホキシド(DMSO)などの低分子保護剤を添加して凍結する技術がすでに確立されている[3]。しかし保存できない細胞や DMSO の毒性など問題点も多く残されている。我々はこれまでに、両性電解質高分子であるカルボキシル化ポリリジン(εPLL)を合成し(図 1)、DMSO に代わる新規な凍結保護剤としてその細胞保護効果について種々の検討を行ってきた[4,5]。高分子のみで凍結保護を行うという発想そのものがほとんど無く、両性電解質高分子が細胞を凍結障害から保護するという報告はきわめて独創的であった。

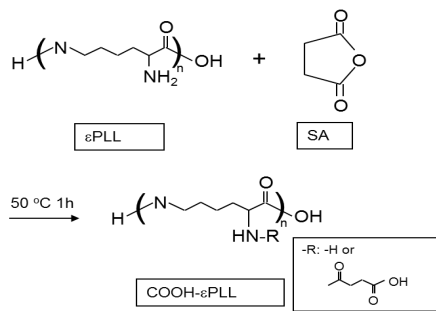


図1 カルボキシル化ポリリジンの合成

これまでにポリリジン中のカルボキシル基とアミノ基の比率の最適化を行い、特に再生医療用幹細胞の凍結保存技術としての確立を目指して研究を行ってきたところ、DMSO とは全く異なる機序で細胞の凍結保護が行われている可能性があることがわかってきている。DMSO は、細胞膜を通過し、細胞内の氷晶の形成を抑制することで細胞内凍結による致命的ダメージを回避していると言われる。しかし、両性電解質高分子は、蛍光標識から細胞内へはほとんど進入していないことが明らかとなっている。従って致命的な細胞内凍結の抑制を細胞外から行っている可能性があるが、そのような機構は低

温生物学の常識では考えられず、正確な機序はわかっていない。我々は細胞外からの保護作用として2つの仮説を立てた。一つは脱水効果への影響であり、もう一つは細胞膜保護作用である。

致命的な傷害をもたらす、細胞内の氷晶形成を抑制するために、細胞内を脱水する必要がある。凍結により細胞周囲の溶液が濃縮される現象を凍結濃縮と呼ぶが、この現象を両性電解質高分子がうまく制御している可能性を検討した。細胞外からの凍結保護作用が説明可能であれば、細胞内への浸透なしに細胞を凍結保護できることになり、細胞内への残存による毒性の無い新規な安全性の高い凍結保護剤として再生医療等への応用に期待できる。また、そのような性質が他の両性電解質高分子に共通してみられる性質なのかを明らかにするため、精密高分子合成の手法を用いて、両性電解質高分子化合物を合成し、その凍結保護効果および低温での溶液物性を調べ、比較した。合成高分子化合物の場合、分子量の制御や共重合させるモノマーを変化させることにより種々の高分子化合物を創出できるため、どのような官能基が効果を及ぼしているのか、分子量の影響はどうか、また細胞膜との親和性を上げるために疎水性基を導入することなどにより膜保護の観点からも詳細な検討が可能である。機序として考えられる二つ目の要因である膜保護については、合成両性電解質高分子に対する疎水性部位導入量等の影響を確認し、リポソーム等の人工細胞膜モデルの保護効果を調べることにより解析する。また、蛍光標識高分子を用いて細胞学的に検証することも可能である。

[1]Ishihara K, et.al. Polym J. 22;355-360 (1990)

[2] Kitano H, et al., Langmuir 21; 11932-11940 (2005)

[3]Polge C, Nature 164, 666 (1949)

[4]Matsumura K, et al.,Biomaterials 30: 4842-4849 (2009)

[5] Vrana N et al., J Tissue Eng Regen Med, 6, 280-290. (2012)

2. 研究の目的

これまで我々は、細胞の凍結保護活性を持つ両性電解質高分子化合物を創成し、再生医療用細胞の凍結保存に有用であることを報告してきた。本研究の目的は両性電解質高分子の凍結挙動解析による保護作用機序の解明である。両性電解質高分子溶液を温度可変固体 NMR により、水(氷)および塩との相互作用から分子の状態を観察し、凍結時の溶液挙動を調べる。この手法により、本高分子による凍結保護作用のみならず、不明な点多かった細胞の凍結保存の機序も明らかになると期待される。また、再生医療用途の細胞や組織などの凍結保存といった応用も期

待できるだけでなく、高分子溶液の低温での物性解析により新知見を採取できる点で意義深い研究である。

3. 研究の方法

平成 25 年度

(1) 両性電解質高分子溶液の低温時の挙動の NMR 評価

固体 ^1H -NMR および ^{23}Na -NMR にて、すでに凍結保護作用の確認されているカルボキシル化ポリリジン-塩化ナトリウム水溶液を測定する。比較対象として、凍結保護作用のある 10% DMSO/塩化ナトリウム水溶液、保護作用のない生理食塩水、非電解質高分子であるポリエチレングリコール(PEG)、タンパク質であるアルブミンの食塩水溶液を用いた。温度を -40 程度から 1-2 刻みで室温程度までの温度範囲で測定し、水のプロトンの強度から残存水量を定量し、各溶液の凍結時の自由水量を評価する。これにより細胞が物理的に占有できる体積の温度変化がわかる。また、塩の濃縮度合いも推定できる。 ^{23}Na -NMR では同じくピーク強度から塩の運動性が評価できる。

(2) 膜保護作用の解明

細胞外水溶液の凍結時挙動が細胞の脱水に及ぼす影響に加えて、細胞膜自体を外側から保護する作用があるかどうかを調べる。

具体的には、FITC で標識した両性電解質高分子化合物溶液中で細胞を凍結し、解凍後の膜への吸着と生存率との関係を共晶点レーザー顕微鏡を用いて調べる。これまで通常の蛍光顕微鏡で観察したところ、膜への吸着が凍結直後にのみ観察されたという結果が得られており、詳細な検討を続けていく。さらに比較対象として蛍光標識した PEG やアルブミンでも膜への吸着挙動を調べ、凍結保護効果との相関を調べる。顕微鏡用冷却ステージを用いて凍結時の *in situ* 観察を行う。

平成 26 年度

(1) 両性電解質高分子の合成

カルボキシル化ポリリジンのみならず、他の両性高分子電解質を合成し、比較検討する。プラスの電荷を持った側鎖を 3 級アミンとした両性電解質高分子は可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合によりリビング重合で合成できることが知られており、分子量を制御した高分子を作成することが可能である。例えばジメチルアミノエチルメタクリレート (DMAEMA) とメタクリル酸 (MA) の共重合体ポリ (DMAEMA-co-MA) を重合し、保護効果を確認する。分子量や電荷のバランスが異なる共重合体や疎水性基を導入した共重合体なども合成する。これらの両性電解質高分子溶液の細胞凍結保護作用を比較する。予備実験では合成の両性電解質高分子でも凍結保護効果が見られた。これは全く新しい知見であり、両性電解質特有の特性である可能性がある。

(2) 両性電解質高分子溶液の低温時の挙動の

NMR 評価

26 年度は(1)で作成した各種ポリマーの、固体 NMR 測定を行い、高分子鎖の動き、会合状態、水および Na との相互作用を評価する。当年度は塩濃度や高分子濃度の影響も調べることにより、実際の凍結保護作用と比較しながら溶液の凍結挙動を詳細に調べる。

(3) 膜保護作用の解明

リポソームを作成し、リン脂質の保護作用を評価する。具体的には、リポソームを作成し、中に蛍光物質を入れておくことで、凍結後の膜障害の様子を外側に漏れ出した蛍光物質により評価することが可能である。リン脂質を変えることで高分子化合物とリポソームの相互作用を評価でき、電荷や疎水効果が保護に及ぼす影響を詳細に調べることが可能である。

合成両性電解質高分子にブチルメタクリレートなどの疎水性部位やヒドロキシエチルメタクリレートなどの親水性基を導入し、親水、疎水性の影響を確認する。これは細胞膜との親和性が影響していると考えられるので、これらポリマーとリポソームの相互作用を調べる。

以上の結果から両性電解質高分子の凍結保護活性機序を総合的に推察する。その機序に基づいた分子設計を行い、機能性高分子化合物の創製などの新たな研究につなげる。

4. 研究成果

(1) 両性電解質高分子の低温時の挙動

両性電解質高分子化合物の脱水効果への影響に関して知見を得るために、凍結中の水、高分子、塩を評価する最も適した手法として、固体 NMR を選び、その可能性を探った。固体 NMR では凍結時の粘性の変化および会合等に伴うプロトンや Na の運動性を評価することが可能である。これにより、高分子鎖の運動性、会合状態、塩の運動性と温度の関係から、溶液の状態を総合的に解析することができる手段を確立した。一般に細胞を含む溶液が凍結する際は、細胞外がまず凍結する。その際に溶質が押し出されることにより凍結濃縮が起こり、細胞外で浸透圧が上昇することにより細胞が脱水される。しかし、通常、このような細胞の脱水は急激に起こるため、細胞が修復不可能なダメージを受けることが凍結障害の原因と言われている。そこで、本ポリマーではこの急激な脱水をうまく制御できる機構が存在するのではないかと仮説を立てた。つまり、高分子が水や塩と相互作用することで塩をトラップし、浸透圧の急上昇を防ぎ、細胞を適度に脱水する様な系と成っているという仮説である。そのような状態では、細胞内の凍結が起こる前に細胞内の余分な水分が除去され、低温でガラス状態となるためにダメージが回避されると考えられる。固体 ^1H -NMR および ^{23}Na -NMR にて、凍結保護作用のあるカルボキシル化ポリリジン (COOH-PLL) / 生理食塩水溶液の低温時に

ける高分子鎖、水分子およびナトリウム分子の動きを測定した。対照としてジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液、ポリエチレングリコール (PEG) 溶液、生理食塩水の測定も行った。-40 から室温までの温度範囲で測定し、水のプロトンの信号強度から残存水を定量したところ、DMSO 溶液で最も残存水量が多くなり、COOH-PLL では PEG よりも残存水量は少なかった。必ずしも残存水のみで凍結保護能を評価出来るわけでは無いことが分かった。²³Na-NMR の結果を図 2 に示す。各水溶液の凍結時の Na の挙動をそのピーク強度から評価したところ、食塩水では -21 付近で水と塩化ナトリウムが共晶を形成して固体へ変化するためそれ以下の温度ではほとんど Na は観察されなくなる。一方、DMSO ではそのような相転移は見られず、ピークは広幅化しながらも面積強度はほぼ一定を保っていた。COOH-PLL では同じく共晶による相転移は見られなかったが、凍結中のピークの広幅化は DMSO 等よりもさらに顕著となり、-11 以下の低温領域で急速に広幅化し観測されなくなった。NaCl 水溶液では相転移後の Na の量がほぼ 0 となるが、DMSO 系では Na の量は凍結後も一定である。一方、COOH-PLL の系では -25 以下で Na のシグナル強度が減少することが分かった。このことから COOH-PLL 溶液は系を何らかの不均一な状態へ変え、一方のナトリウム成分の運動性を抑制し、あたかも高分子に束縛された固体のように振る舞わせることで浸透圧への寄与を弱めていると予想された。以上のことから、COOH-PLL が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結保護作用を果たしている可能性が示唆された。カルボキシル化ポリリジンは、DMSO とは異なる機序で凍結保護を行っている可能性があり、新しい凍結保護技術の創製に繋がることと期待される(図 3 参照)。

また、我々は、RAFT 重合により合成した両性電解質高分子 (Poly-DMAEMA-co-MA) にも

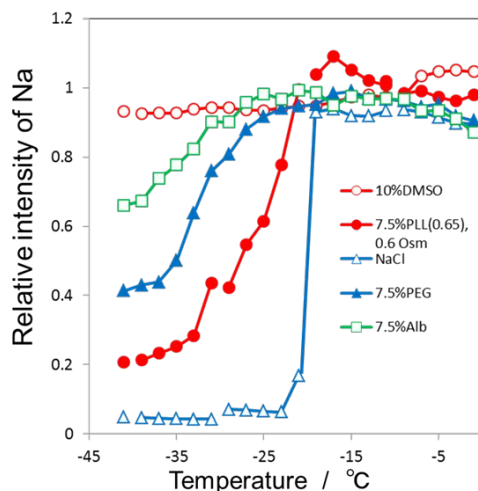


図2 低温時のNaのピーク強度

凍結保護作用があることを示し、疎水性基の導入により高価を向上させることが可能であることを見いだした。これは凍結時の細胞膜との相互作用を示唆している。合成の両性電解質高分子も同様の NMR 測定をしたところ、興味深い事に、凍結保護効果を強く示す (Poly-DMAEMA-co-MA) では、比較的高温時でも (-20)高分子鎖の運動性が減少するが、凍結保護能をほとんど持たない高分子では、かなり低い温度 (-40)でも分子の運動性は保たれている事がわかった。これは、イオンや水をその高分子マトリックスにトラップする能力が、比較的高温状態でも両性電解質高分子には備わっていると言うことができ、同じく凍結に伴う浸透圧の急激な変化を抑制していると考えられる。

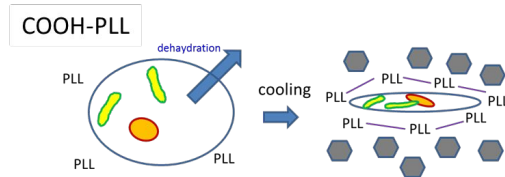


図3 COOH-PLLによる凍結保護のメカニズム

(2)膜保護に関する研究

蛍光物質を導入したりリポソームを作成し、凍結時の膜の傷害による蛍光物質の漏れから、膜保護活性について検討した。その結果、合成の両性電解質高分子に対して疎水性を増した方が膜保護効果が高い事が分かった。この結果は、凍結保護効果と相関が高く、引き続き、より詳細な膜保護活性を調べるため、電子スピン共鳴法 (ESR) により、凍結時の高分子の膜での局在を調べた。16-DOXYL-stearic acid と 5-DOXYL-stearic acid の二つの ESR スピンラベルを用い、これらのラベル化合物の凍結時の局在性から、同時に存在する高分子の膜における局在を評価したところ、疎水性の高分子ほど膜内部に侵入する事が分かった。すなわち、疎水性両性電解質高分子の方が膜とよく相互作用することで凍結・解凍時に膜を保護していることが示唆された。また、CCD カメラを用いた氷晶形成抑制効果の測定でも、疎水性を付与した高分子の方が、氷晶の成長を抑制することが確認された。これらの結果を総合すると、両性電解質高分子は、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、氷晶形成を阻害することで物理的なダメージから膜を保護することで総合的に凍結保護作用を示す事が示唆される結果となった。

また、本研究を遂行するに当たり、凍結時の濃縮を制御することを利用した新たな試みとして、凍結濃縮時による有用物質の膜近辺への集積技術を利用したタンパク質デリバリーに関する知見も得られた。また、両性電解質高分子によるタンパク質の凝集抑制効果の発見など、研究の異分野への発展も認められる。

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7件)

1. Rajan R, Matsumura K. Preparation of novel synthetic cryoprotectants. *Cryobiology and Cryotechnology* (査読有り)60, 2014, 99-103.
2. Ahmed S, Hayashi F, Nagashima T, Matsumura K, Protein Cytoplasmic Delivery using Polyampholyte Nanoparticles and Freeze Concentration. *Biomaterials* (査読有り) 36, 2014, 6508-6518.
3. Matsumura K, Kim HH, Hyon SH, Hypothermic preservation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells by Polyampholytes, *Curr Nanosci* (査読有り), 10, 2014, 222-226.
4. Vorontsov DA, Sazaki G, Hyon SH, Matsumura K, Furukawa Y, Antifreeze Effect of Carboxylated ϵ -Poly-L-lysine on the Growth Kinetics of Ice Crystals, *J Phys Chem B* (査読有り), 118, 2014, 10240-10249.
5. Jain M, Rajan R, Hyon SH, Matsumura K, Hydrogelation of dextran-based polyampholytes with cryoprotective properties via click chemistry. *Biomater Sci* (査読有り), 2, 2014, 308-317.
6. Matsumura K. Cryoprotective polyampholytes hydrogel. *Cryobiology and Cryotechnology* (査読有り), 59, 2013, 111-115.
7. Matsumura K, Hayashi F, Nagashima T, Hyon SH. Cryoprotective properties of polyampholytes. *Cryobiology and Cryotechnology* (査読有り)59, 2013, 23-28.

[学会発表](計14件)

1. Matsumura K. Protein Cytoplasmic Delivery by Freeze Concentration. JAIST Japan-India Symposium on Materials Science, 2015.3.2-3.3, 北陸先端科学技術大学院大学、能美市、石川県
2. Matsumura K. Biomaterials In Tissue Engineering and Cryopreservation. JAIST-IISc Joint Symposium, 2015.2.26-2.28, バンガロール、インド
3. Jain M, Matsumura K. Self Healing Soft Bio-Nanocomposite Hydrogel Based on Laponite and Cryoprotective Polyampholyte. The 10th SPSJ International Polymer Conference, 2014.12.2-12.5, エポカル筑波、筑波市、茨城県
4. Rajan R, Matsumura K. Disparate membrane interaction of structurally analogous synthetic polyampholytes with cryoprotective properties. The 10th SPSJ

International Polymer Conference, 2014.12.2-12.5, エポカル筑波、筑波市、茨城県

5. 松村和明、凍結保護作用を持つ高分子の開発とそのバイオメディカル応用、第36回日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-11.18、タワーホール船堀、江戸川区、東京都

6. Rajan R, Matsumura K. Interaction of polyampholytes with cell membrane and its effect on cryopreservation properties. 第36回日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-11.18、タワーホール船堀、江戸川区、東京都

7. Rajan R, Matsumura K. Synthesis of novel polyampholytes with disparate cryoprotective properties and elucidation of mechanism of cryopreservation. 第3回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会、2014.10.14、福井大学、福井市、福井県

8. Rajan R, Matsumura K. Novel polymeric cryoprotectant and its mode of action on cells. IUMRS-ICA2014 (International Union of Materials Research Societies-International Conference in Asia), 2014.8.25-8.29、福岡大学、福岡市、福岡県

9. Rajan R, Matsumura K. Preparation of novel synthetic polyampholytes, 第59回低温生物工学会、2014.6.28-6.29、九州大学、福岡市、福岡県

10. Ahmed S, Matsumura K. Self assembly of Polyampholytes as potential carriers for drug delivery induced by freeze concentration. 第二回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会、2013.12.16、富山大学、富山市、富山県

11. Ahmed S, Matsumura K. Freezing assisted protein delivery by using polymeric cryoprotectant. MRS Fall meeting 2103, 2013.12.1-12.6. Boston, USA.

12. Rajan R, Matsumura K. Cryopreservation of cells using synthetic polymers via living polymerization and the effect of hydrophobicity. International Symposium on Advanced Materials 2013, 2013.10.17, 北陸先端科学技術大学院大学、能美市、石川県

13. Matsumura K. Biomedical application of polyampholytes, International Symposium on Advanced Materials 2013, 2013.10.17, 北陸先端科学技術大学院大学、能美市、石川県

14. 松村和明、両性電解質高分子を用いた細胞及び細胞構造体の凍結、日本動物細胞工学会 2013年度大会、2013.7.18-7.19、福井大学、福井市、福井県

[図書](計1件)

1. Kazuaki Matsumura, Minkle Jain, Robin Rajan. CRC Press, Cell and Material Interface: Advances in Tissue Engineering, Biosensor, Implant, and Imaging Technologies. 2015, in press.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 和明 (MATSUMURA KAZUAKI)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアル

サイエンス研究科・准教授

研究者番号：00432328

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし