

両性電解質高分子を利用した高次細胞構造体の凍結保存技術の開発

研究代表者

松村 和明 北陸先端科学技術大学院大学



1. 研究の背景と達成目標

再生組織の保存という問題は、実際の産業化に向けて、必要なときに必要な組織を迅速に供給するためには欠かすことのできない基盤技術である。しかしながら細胞の保存に比べて問題点が多い組織の凍結保存は、これまで確立されていない。申請者は、既存の細胞凍結保護材料であるジメチルスルホキシド (DMSO) の代替物として毒性の低い両性電解質高分子を開発してきた。再生組織の凍結保存に着目し、材料の性質を最大限利用することで、これまでにない画期的な凍結保存法を開発することを目標とした。

①新規に開発した DMSO に代わる凍結保護剤を用い、細胞構造体の凍結保存技術の開発を行うこと。細胞シートや三次元形状の高次構造体の凍結法を検討し、簡易かつ高効率の凍結保存技術を確立する。

②凍結保護剤自体を細胞の足場材料として形成し、その中もしくはその表面で細胞を培養することで、凍結可能な細胞シート、細胞構造体の創製を行う。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・申請者が開発した新規凍結保護性高分子、カルボキシル化ポリリジンの氷晶形成抑制効果を用い、間葉系幹細胞シート、三次元培養体、培養皮膚などの高次構造体の効率的なガラス化保存法を確立した。
- ・化学修飾カルボキシル化ポリリジンを用い、細胞懸濁液と混合してゲル化する、凍結保護活性を持つ *in situ* ハイドロゲルを創成し、新規再生医療用足場材料として期待できる材料を開発した。

本研究成果により、医療用再生組織の長期凍結保存が可能となり、今後の再生医療の産業応用の基盤技術として期待できる。

3. 研究成果

本研究では、水の再結晶化抑制効果のあるカルボキシル化ポリリジンを用い、比較的遅い凍結スピードでガラス化可能な溶液を開発した。その結果、細胞シートのような弱い再生組織を、液体窒素の蒸気によりガラス化させることが可能となり、

組織のひび割れや細胞のはく離、死滅を防いだガラス化凍結法を確立した。図1に示すように、既存の DAP213 というガラス化液および COOH-PLL の含まれていない、エチレングリコール/スクロース溶液では、 $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ という緩慢な速度で凍結した場合、ガラス化が達成できず、解凍後に細胞はほぼ死滅してしまった(赤色:死細胞)。一方、COOH-PLL を 10%含有した液で同じ速度で凍結した場合、ガラス化が起り、細胞シートはほぼ完全な状態で回復させることが可能であった(緑:生細胞)。この技術は、

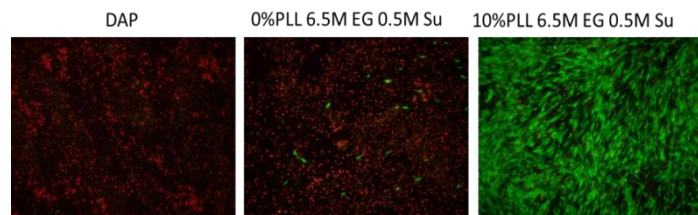


Figure 1. Live/dead assay of vitrified mesenchymal stem cell sheets (left) with conventional vitrification solution, (mid) without COOH-PLL and (right) with 10% COOH-PLL at $0.1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ frozen speed.

培養皮膚や三次元足場材料中に増殖させた細胞塊においても用いることが可能であり、有用性の高い技術と期待できる。

次に、COOH-PLL にアジド基およびアルキン基を導入することで、細胞懸濁液を混合するだけでゲル化するシステムを構築した。この場合、図 2 に示すように、ゲル中に埋入した細胞は、外部から凍結保護物質の添加無しに凍結保存が可能であり、ゲル自体に凍結保護効果があることを確認した。ゲルに細胞接着性タンパクである RGD や分解性のエステル結合を導入することで、細胞接着性および生分解性を付与することにも成功した。本技術は、凍結保護活性を持った次世代機能性再生医療用材料としての応用が期待される。

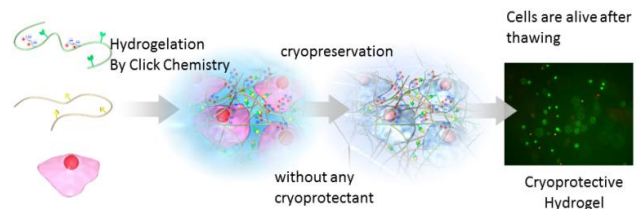


Figure 2. Schematic illustration of in situ cell encapsulation in cryopreservable hydrogel

4. 今後の展開

再生細胞シートや培養皮膚などの比較的薄い三次元組織を、効率よく凍結保存できる手法を確立した。さらに大きな組織の凍結保存技術へと発展させることにより、様々な再生組織の凍結ストックを作成することが容易になり、再生医療の産業化の促進に貢献出来るものと期待が持てる。また、ハイドロゲル中での細胞の凍結技術に関しては、低温生物学的にも学術的に興味深い知見であり、細胞親和性や分解性の制御により次世代機能性足場材料としての応用を視野に入れた研究を行っていく予定である。

5. 発表実績

論文

1. Rajan R, Jain M, Matsumura K. Cryoprotective properties of completely synthetic polyampholytes via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization and the effects of hydrophobicity. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 24, 1767-1780 (2013)
2. Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H. Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. *BMC Biotechnology*, 3, 58 (2013)
3. Matsumura K. Cryoprotective polyampholytes hydrogel. *Cryobiology Cryotechnology*, 59, 111-115 (2013)
4. Jain M, Rajan R, Hyon SH, Matsumura K. Hydrogelation of dextran-based polyampholytes with cryoprotective properties via click chemistry. *Biomater. Sci.*, 2, 308-317 (2014) (selected as a Journal Cover)

書籍

1. 松村和明：再生医療における臨床研究と製品開発 第2章 第2節[4] 細胞の凍結・解凍方法 pp133-137 (2013)技術情報協会

講演

1. Kazuaki Matsumura, Biomedical application of polyampholytes, International Symposium on Advanced Materials 2013, 2013/10/17, Ishikawa
2. 松村和明, 両性電解質高分子を用いた細胞および細胞構造体の凍結 日本動物細胞工学会 2013年度大会, 2013/7/19, 福井
3. Kazuaki Matsumura, Polymer Cryoprotectants and their Biomedical Applications International Workshop on Functional Polymer Surface and Interface, 2013/3/19, Ishikawa