

実施課題名：凍結保護ポリマー溶液の低温時の分子ダイナミクス測定による凍結保護機序の解明

【背景】

我々はこれまで、細胞懸濁液に混ぜるのみで凍結時のダメージを軽減出来る高分子化合物を報告してきた。その機序の解明の手法として、固体NMRによる低温時の塩、水、高分子の状態や物性を調べることで機序の解明を進めている。両イオン性凍害保護ポリマーの機序として、 -25°C 以下の低温時に水の粘性を急上昇させることによる溶液のガラス化、塩の運動性制御による細胞脱水の制御などが重要なパラメータであるということを示している。今回は、両イオン性ポリマーの官能基の違いにより凍害保護活性が大きく変化する例を見出したので、固体NMR法を用いて、凍結時のこれらパラメータを測定し、その構造と機能の相関を見ることで機序の一般化を試みる。これにより、高分子の分子設計による新しい凍結保護ポリマーの開発が可能となり、再生医療や移植医療における重要なテーマである組織の凍結保存技術の確立が期待出来るだけでなく、固体NMRの新しい応用技術の開発にも貢献できる。

【実施内容】

2009年に我々が初めて見出したポリマー性凍害保護剤であるPLL-SAの機序解明の試み(理研NMR施設のイノベーション創出事業、トライアルユースを利用させていただきました。)から明らかになった知識に基づいて、様々な両イオン性ポリマーを分子設計してきた。その内、電荷を担う官能基の違いにより大きく凍害保護活性が変化する興味深い例が見出されたので、それが、どのような機序によりもたらされるのか明らかにする目的で、凍結下の高分子溶液を対象に固体NMRを用いて実験を行った。

図1は今回測定に用いた保護効果の高いpoly(VA/AA/DMAEA)と保護効果の低いpoly(AMPS/APTAC)の構造を示す。実験では、凍結条件下での残存水の存在量、線幅、緩和時間、Naイオンの化学シフトや存在状態、緩和時間等を観測し、データを比較検討した。その結果、予想していた -25°C 以下の低温領域ではなく、図2に示すように、 0°C から -10°C 領域という高温領域で特徴的な違いが観測された。凍害保護活性の高いpoly(VA/AA/DMAEA)では -10°C 条件で30%以上残存水が残っているのに対し、活性の低いpoly(AMPS/APTAC)では20%以下しか残っていなかった。このことは、ポリマーの官能基の電荷が、配位水の挙動のみならず、バルク水の挙動にまで影響していることを意味し、非常に興味深い結果が得られた。

Fig. 1

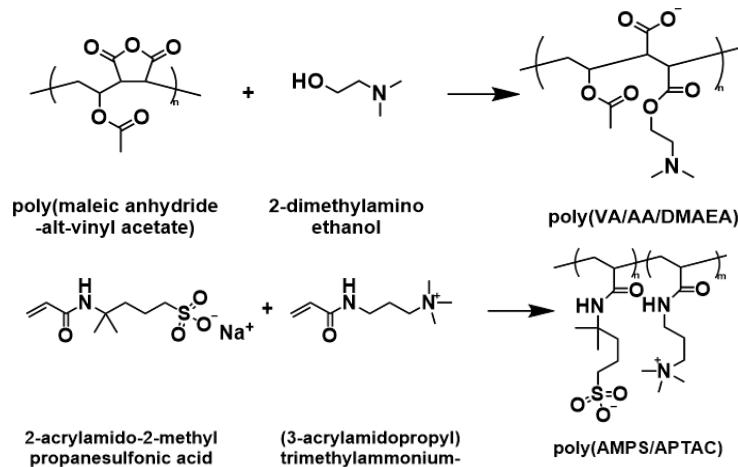
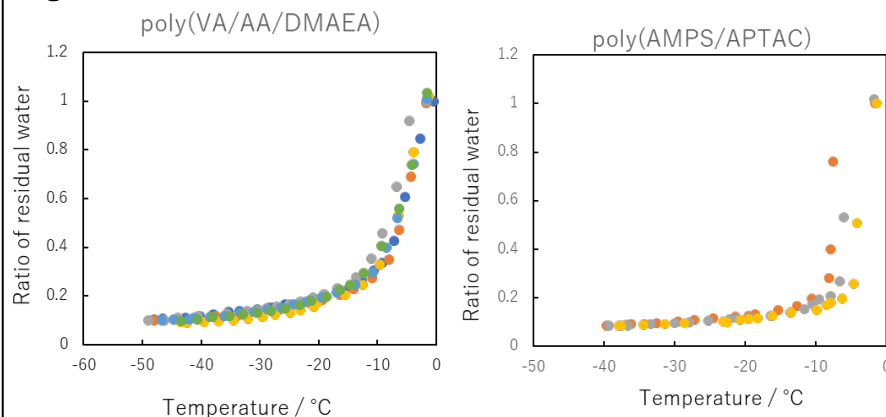


図1 Poly(AMPS/APTAC)とPoly(VA/AA/DMAEA)の構造

Fig. 2

図2 ^1H NMRによる凍結時の残存水量の変化。
左:Poly(VA/AA/DMAEA)、右:Poly(AMPS/APTAC)

NMR 共用プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF22-01-050			
利用課題名	凍結保護ポリマー溶液の低温時の分子ダイナミクス測定による凍結保護機序の解明			
所属機関	北陸先端科学技術大学院大学			
所属部署	先端科学技術研究科			
役職・氏名	役職	教授	氏名	松村和明
利用実施時期、及び期間	2022年 10月 1日～2023年 3月 31日 総利用日数: 12日 <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

我々はこれまで、細胞懸濁液に混ぜるのみで凍結時のダメージを軽減出来る両性電解質高分子化合物を報告してきた。その機序の解明の手法として、固体 NMR により、凍結時の塩、水、高分子の状態や物性を調べることで機序の解明を行って来ており、昨年度理研 NMR グループ(林文晶博士)との共著論文として発表した。これまでわかっていることは、 -25°C 以下の低温時に水の粘性を急上昇させることによる溶液のガラス化、塩の運動性制御による細胞脱水の制御などが重要なパラメータであるということである。今回は、官能基の異なる様々な両性電解質高分子におけるこれらパラメータを測定し、その構造と機能の相関を見ることを試みる。これにより、高分子の分子設計による新しい凍結保護ポリマーの開発が可能となり、再生医療や移植医療における重要なテーマである組織の凍結保存技術の確立が期待出来るだけでなく、固体 NMR の新しい応用技術の開発にも貢献できる。

2. 成果の概要

実施内容

両性電解質高分子による細胞の凍結保護効果のメカニズムを議論するため、凍結した高分子溶液中での水分子、塩イオン、高分子のダイナミクスを固体 MAS-NMR 測定により調べた。2009 年に我々が初めて見出したポリマー性凍害保護剤である PLL-SA の機序解明の試み(理研 NMR 施設のイノベーション創出事業、トライアルユースを利用させていただきました。)から明らかになった知識に基づいて、様々な両イオン性ポリマーを分子設計してきた。その内、電荷を担う官能基の違いにより大きく凍害保護活性が変化する興味深い例が見出されたので、それが、どのような機序によりもたらされるのか明らかにする目的で、凍結下の高分子溶液を対象に固体 NMR を用いて実験を行った。実験は、およそ -50°C から室温までの温度範囲で ^1H -および ^{23}Na -NMR 測定を行った。測定では、凍結条件下での残存水の存在量、線幅、緩和時間、Na イオンの化学シフトや存在状態、緩和時間等を観測し、データを比較検討した。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

これまでの検討結果から、PLL-SAのような両性電解質高分子溶液の凍害保護のためには、 -25°C 以下の低温下で残存水由来の信号の急速な広幅化とNa信号の中央遷移とサテライト遷移の特徴的な振る舞いを特徴とする溶液の高粘性化とNaイオンのポリマーによるトラップが必要と考えられた。そのため、今回の測定においても、 -25°C 以下の低温状態において何らかの差異が出るものと予想していた。ところが、凍結保護効果の高いpoly(VA/AA/DMAEA)やpoly(MVE/DMAEA/AA)溶液と凍結効果の低いpoly(AMPS/APTAC)溶液を比較すると、予想された -25°C 以下ではなく、むしろ $0\sim-10^{\circ}\text{C}$ という高温側で大きな違いが観測された。より具体的には、凍害保護活性の高いpoly(VA/AA/DMAEA)では -10°C 条件で30%以上残存水が残っているのに対し、活性の低いpoly(AMPS/APTAC)では20%以下しか残っていなかった。このことは、ポリマーの官能基の電荷が、配位水の挙動のみならず、バルク水の挙動にまで影響していることを意味し、非常に興味深い結果が得られた。

成果発表

松村和明、Cryopreservation Conference 2022、11/17、岡崎(オンライン併催)

高分子による細胞凍結保存—その基礎と応用 (invited lecture)

松村和明、第41回整形外科バイオマテリアル研究会、12/10 福井、Invited lecture

細胞凍結保護高分子化合物の基礎と応用

今後の展開

今回得られた凍結状態における分子の挙動が、凍害保存の機序とどのように関連しているかを引き続き調べていく必要がある。各ポリマーの構造や凍害保護効果と、溶液物性の相関を詳細に調べることで、高分子化合物による凍結保護作用のメカニズムを明らかとする。これにより、新たなより活性の高い凍結保護高分子の分子設計が可能となり、再生医療などへの応用を目指す。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

再生医療分野では、細胞シートや細胞塊など、疾患治療用の細胞構造体の開発が盛んとなっている。一方で、これら構造体は、凍結保存法が確立されていない。このような三次元の高次構造体組織は、作成に非常に時間がかかるため、長期保存しておくことで、必要な時にすぐに使用可能となる。そこで、今回の測定で機序を明らかとすることで、細胞や組織の凍結保護効果を最大限に引き出すための分子設計をすることにつながれば、新しい効果の高い高分子凍結保護剤により、細胞や組織バンクの形成が可能となることで、再生医療の産業化の実現を期待している。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

イノベーション創出事業当時から利用させていただいておりますが、非常に細やかなデータ採取および解析をさせていただいており、感謝しています。

5. 今後のNMR共用プラットフォームに対する期待

このまま継続して論文化を目指したいと考えています。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (O) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

8. 利用施設

理化学研究所

固体 700MHz

利用期間 1: 2022 年 10 月 17 日～2022 年 10 月 21 日

利用期間 2: 2023 年 2 月 1 日～2023 年 2 月 3 日

利用期間 3: 2023 年 3 月 13 日～2023 年 3 月 16 日

利用期間 4: 2023 年 3 月 27 日～2023 年 3 月 30 日

9. その他の利用施設