

脂質誘導体を用いた間葉系幹細胞表面の
機能分子修飾に関する研究

2013

高 藤 義 正

目次

諸言	1
第一章 hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾に影響をおよぼす因子の検討	
総論の部	2
1-a PEG 脂質誘導体による細胞傷害性の評価	
1-b TB による細胞表面の蛍光消光の確認	
1-c PEG 脂質誘導体の量と構造が修飾におよぼす影響	
1-d PEG 脂質誘導体で修飾する際の培養条件の影響	
1-e 修飾された PEG 脂質誘導体の分子数および密度算出	
1-f 修飾の安定性評価	
1-g 修飾が分化能におよぼす影響	
1-h 考察	
実験の部	15
引用文献	19
第二章 hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾を向上させる手法の開発(要約版)	
総論の部	24
実験の部	25
第三章 ペプチドリガンド導入 PEG 脂質誘導体修飾による hMSC の血管内皮細胞への接着増強(要約版)	
総論の部	26
実験の部	27
結論	28

諸 言

細胞は生体を構成する基本単位であり、生命活動の維持のため、生体内の異変に対処する複雑な機能を備えている。近年の分子生物学や細胞生物学の発展とともに、細胞の機能に関する理解が深まり、細胞移植が新しい治療法として注目されるようになってきた。特に、損傷した組織・臓器の再生や修復に対しては細胞移植が有効な治療法になると考えられ、皮膚細胞¹⁾、角膜細胞²⁾、心筋細胞^{3, 4)}、血管内皮前駆細胞⁵⁾、筋芽細胞⁶⁾、間葉系幹細胞 (MSC)⁷⁻¹⁷⁾については、臨床において再生治療が開始されている。

細胞移植においては、移植した細胞の損傷部位への集積が治療効果を決定する重要な因子となる。しかし、ラットの心筋に心筋細胞を局所注射した場合でも、投与した細胞の約10%しか心筋組織に集積しないことが報告されており¹⁸⁾、細胞を治療の標的部位へ集積させるための工夫が必要である。心筋梗塞モデルマウスに対し、遺伝子導入により炎症組織に対する親和性を持つ分子(CCR-1)を高発現させたMSCを移植することで、梗塞部位へのMSCの集積、ならびに心筋の線維化に対する治療効果を改善できることが報告された¹⁹⁾。したがって、細胞表面の接着関連分子数の増加は、細胞による治療効果の向上に有効だと考えられる。

細胞表面の接着関連分子の数を増やす方法として、遺伝子導入法¹⁹⁻²¹⁾、細胞膜上の分子との化学結合²²⁻²⁴⁾、脂質誘導体と細胞膜の相互作用²⁵⁻²⁷⁾を利用して修飾する方法などが知られている。その中で、著者は治療においては簡便性、安全性に優れた細胞表面修飾法が必要であると考え、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質誘導体を用いた修飾法²⁸⁻³³⁾に注目した。すなわち、PEGをリンカーとして両末端に脂質と機能分子を結合したPEG脂質誘導体は、脂質部分が細胞膜に相互作用し、細胞に加えるだけで細胞表面に機能分子を導入できる。またPEG脂質誘導体は、既にリポソーム製剤の材料として用いられている³⁴⁻³⁷⁾ので、生体への安全性に関する情報が揃っており、また、内在性分子を直接化学結合により修飾する方法²²⁻²⁴⁾と比較して、内在性分子に対する影響は少ないと考えられる。

そこで本研究では、まず、蛍光修飾 PEG 脂質誘導体を用いた細胞表面への修飾量の評価法を確立し、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)を用いて PEG 脂質誘導体の修飾量に影響をおよぼす因子の検討を行った。また、低分子化合物や超音波照射を利用して、PEG 脂質誘導体による細胞表面修飾の効率を向上する手法の開発を行った。さらに PEG 脂質を介して細胞間接着に関わる機能分子で hMSC に表面修飾し、ヒト肝類洞血管内皮細胞 (hLSME)に対する接着能を増強することに取り組んだ。

以下、三章にわたり得られた知見を論述する。

総論の部

第一章 hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾に影響を

およぼす因子の検討

hMSC 表面へ修飾された機能分子による接着能増強効果には、その修飾量が大きく影響すると考えられるため、修飾量に影響をおよぼす因子を明らかにする必要がある。そのため、この検討には PEG 脂質誘導体の修飾量を厳密に測定できる手法による評価が必要である。

これまで、hMSC表面分子へ修飾されたペプチド²²⁾や抗体²⁵⁾の修飾量は、蛍光標識したペプチドおよび抗体を用いて修飾されたMSCの蛍光強度から評価されていた。そこで本研究では、fluoresceinで標識された蛍光標識PEG脂質誘導体を合成し、蛍光強度による修飾量の評価を行うこととした。しかしこの場合、蛍光標識されたPEG脂質は細胞膜だけでなく細胞内部にも分布するため、hMSC表面に修飾された量を正確に評価することができないので、それを解決する方法の開発が必要となる。

トリパンブルー (TB) は、近接したfluoresceinの蛍光を消光することが知られている³⁸⁻⁴¹⁾。また、TBは、生細胞の細胞膜をほとんど透過せず、損傷を受けた死細胞の細胞膜だけを通過するため、生細胞と死細胞の識別に利用されている。これらのTBの性質を利用すると、fluoresceinで蛍光標識された *Candida* 菌を貪食させた好中球にTBを添加することにより、好中球表面に付着した *Candida* 菌の蛍光だけが消光されるので、好中球に貪食された *Candida* 菌の量を蛍光強度から定量できる⁴⁰⁾。そこで、蛍光標識PEG脂質誘導体で修飾したhMSCを用いて、TBを添加せず測定したhMSCの蛍光強度から、TBを添加してhMSC表面の蛍光を消光させたhMSCの蛍光強度を差し引くことで、hMSC表面に修飾されたPEG脂質誘導体の蛍光強度だけを測定できると考え、TBを用いたhMSC表面に修飾されたPEG脂質誘導体の定量法を確立した。

次に、修飾量に影響をおよぼす因子として、PEG 脂質誘導体の濃度、PEG 鎖の分子量など、PEG 脂質誘導体の量や形状が修飾量におよぼす影響を評価した。また、PEG 脂質誘導体を細胞へ添加する際の培養条件として、時間、温度、培養液中のウシ胎児血清(FBS)濃度の影響も評価した。さらに、生体から採取された MSC は、純化や増殖のため、培養皿に一度接着させて培養した後に移植される場合があることを考慮し、PEG 脂質で修飾する時の細胞の培養方法として、細胞が接着した培養皿に PEG 脂質誘導体を含む培養液を加えて培養する方法と、PEG 脂質誘導体を含む培養液中に hMSC を分散し、培養液を転倒混和する方法を用い、それぞれの方法で修飾した場合の修飾量を比較した。また、表面修飾された hMSC を生体内へ投与することを考慮し、PEG 脂質誘導体の修飾の安定性評価を目的に、

FBS を含む培地中における hMSC 表面の修飾量を経時的に測定した。さらに、PEG 脂質誘導体の修飾が MSC の骨細胞、脂肪細胞への分化能におよぼす影響を確認した。

1-a PEG 脂質誘導体による細胞傷害性の評価

本研究では、細胞表面のPEG脂質誘導体修飾量の測定のため、fluoresceinを末端に導入したFluorescein-PEG-distearoylphosphatidylethanolamine (Flu-PEG-DSPE)を実験に用いた。PEG部分の分子量が異なる3種類のFlu-PEG-DSPE (PEG鎖平均分子量2000、5000、10000)を合成し、まず培養皿に接着したhMSCもしくは培養液中に分散したhMSCに対する傷害性を評価した。Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEおよびFlu-PEG₅₀₀₀-DSPEは5 mMでDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)に対して溶解した。Flu-PEG₁₀₀₀₀-DSPEは5 mMで溶解しなかったため、3 mMで実施した。修飾を行わなかった群の生存率を100%としてFlu-PEG-DSPEを含む培養液中で処理した群の生存率を算出したところ、いずれの処理群でも生存率の低下はほとんど認められなかった(Fig. 1)。本結果から、Flu-PEG-DSPEによる修飾はhMSCに対する細胞傷害性が無いことが示され、以後の実験では本検討で用いた濃度以下で修飾を行うこととした。

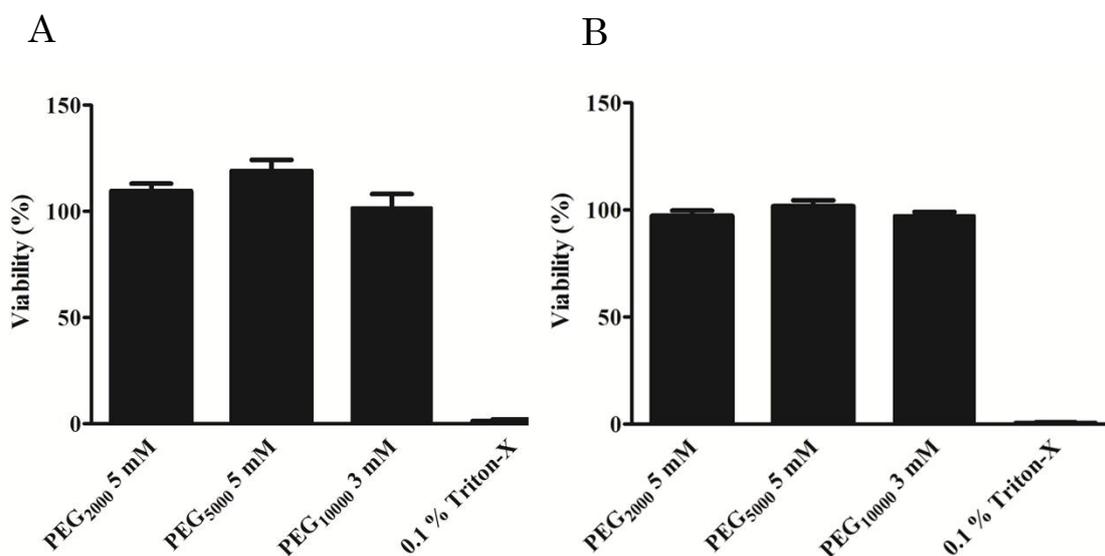


Fig. 1 Cell viability of hMSCs treated with Flu-PEG-DSPE.

Cell viability of hMSCs was evaluated by CCK-8 assay following treatment with 5 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE or Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE, 3 mM Flu-PEG₁₀₀₀₀-DSPE and 0.1% Triton X as a negative control for 4 h at 37°C under adhered (A) or dispersed (B) condition. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 4).

1-b TBによる細胞表面の蛍光消光の確認

Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEで修飾したhMSCを共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、観察を行った全てのhMSC表面にfluorescein由来の蛍光が確認された (Fig. 2)。しかし、hMSC内部にも蛍光が確認され、修飾の際にPEG脂質の一部がhMSC内に取り込まれることが示唆された。そこで、修飾したhMSCにTBを添加してhMSC表面の蛍光を消光することで、hMSC内部に取り込まれたPEG脂質誘導体の蛍光強度だけを測定し、TBを添加しないhMSCの蛍光強度から差し引くことでhMSC表面に修飾されたPEG脂質誘導体の蛍光強度だけを測定することとした。

まず、蛍光標識リポソームを用いてTBの蛍光消光効果を検証した。蛍光分子が内包されないリポソームを調製するため、DSPGとコレステロールから構成されるリポソームを調製した後、Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEを混合して加温することで、fluoresceinが表面に導入された蛍光リポソームを得た。導入前のリポソーム粒子径は 122.3 ± 1.7 nm、導入後のリポソーム粒子径は 126.5 ± 6.0 nmであり、導入前後で顕著な変化は認められなかった。この蛍光リポソーム分散液に 0~10 v/v %のTBを加えた後、蛍光光度計で蛍光強度を測定したところ、TB添加量依存的に蛍光強度は低下し、10 v/v% 群では蛍光はほぼ観察されなかった (Table. 1)。

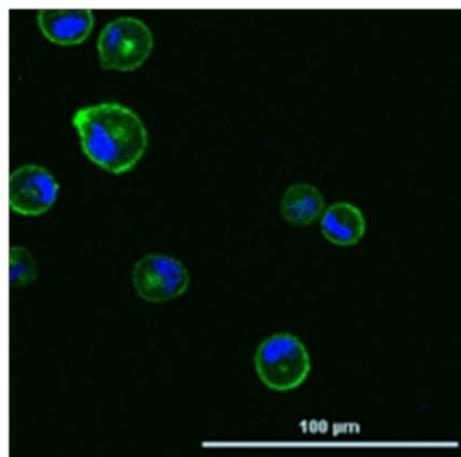


Fig. 2 Observation of modified hMSC.

Fluorescent images of hMSCs modified with Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE were observed by confocal microscopy. Scale bar, 100 μm

Table. 1 Quenching effect of trypan blue on fluorescein introduced liposome.

Trypan blue (v/v %)	Fluorescent intensity of fluorescein introduced liposome	Ratio (%)
0	2600860	100.0
1	510820	19.6
2	211710	8.1
5	38940	1.5
10	2410	0.1

次に、修飾を行ったhMSCに10 v/v %のTBを加えて観察したところ、TB添加群のhMSC表面の蛍光は著しく減弱した(Fig. 3)。このことからリポソームの場合と同様に、hMSC表面の蛍光がTBによって消光できることが確認された。

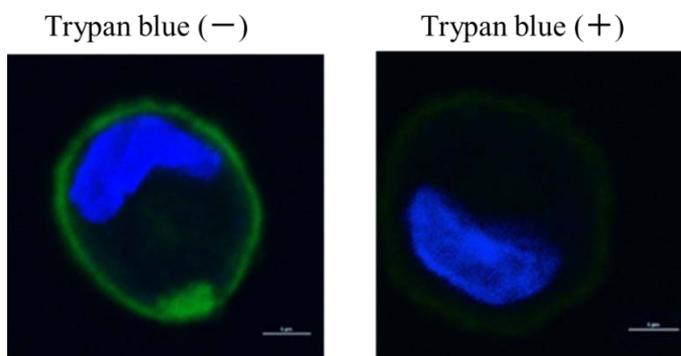


Fig. 3 Effect of TB on fluorescence on hMSC surface.

Fluorescent images of hMSCs modified with Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE with or without trypan-blue were observed by confocal microscopy. Scale bars, 5 μm.

この結果を踏まえ、TB未添加群、10 v/v %のTBを添加した群における各hMSCの蛍光強度をフローサイトメーター(FACS)で測定し、TB未添加群の蛍光強度の中央値からTB添加群の蛍光強度の中央値を差し引いた値をhMSC表面の蛍光強度とし、以下の検討ではこの値をPEG脂質誘導体修飾量の指標とした。

1-c PEG脂質誘導体の量と構造が修飾におよぼす影響

PEG脂質誘導体濃度がhMSC表面のPEG脂質誘導体修飾量におよぼす影響について評価するため、非接着hMSCを0.1、0.25、0.5、1、2、3 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で2時間培養することで修飾を行った。各hMSCの細胞表面蛍光強度をFACSで測定した結果、PEG脂質濃度の増大とともに細胞表面蛍光強度は増大した (Fig. 4)。

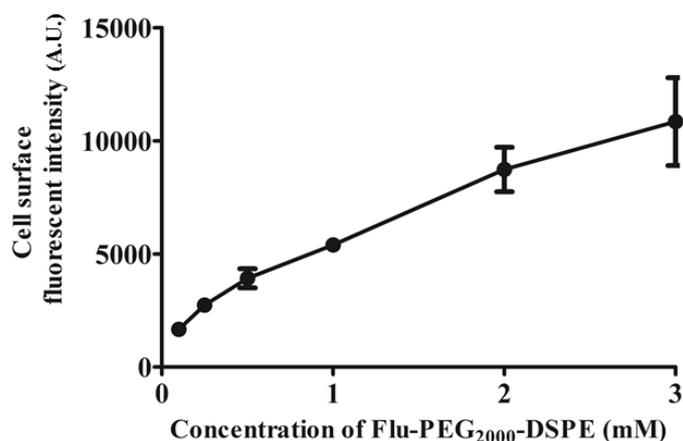


Fig. 4 Influence of concentration of Flu-PEG-DSPE on cell surface modification efficiency.

Unadherent hMSCs were incubated for 2 h at 37 °C with different concentrations of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE. The cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometry. Each result represents the mean ± S.D. (n = 3).

修飾に用いるPEG脂質誘導体のPEG鎖分子量がhMSC表面のPEG脂質誘導体修飾量におよぼす影響について評価するため、1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE、Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE、Flu-PEG₁₀₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で2時間培養することで修飾を行った。修飾後の各hMSCの細胞表面蛍光強度をFACSで測定した結果、PEG鎖分子量が大きいほど細胞表面蛍光強度は高かった (Fig. 5)。

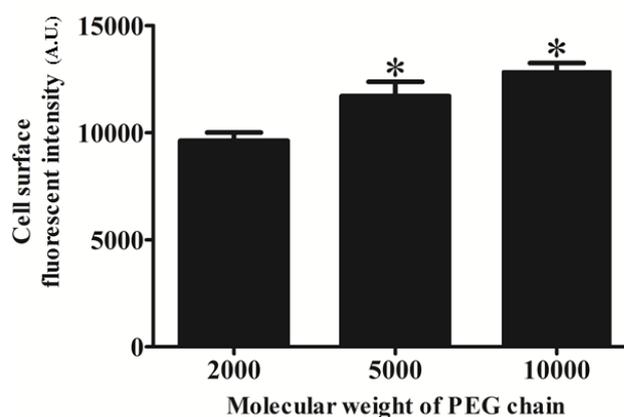


Fig. 5 Influence of the molecular weight of the PEG chain on cell surface modification efficiency.

Unadherent hMSCs were incubated with 1 mM of Flu-PEG-DSPE for 2 h at 37°C. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3). Statistical significance was evaluated by Dunnett's test versus the group with a molecular weight of 2000 (*P < 0.05).

1-d PEG 脂質誘導体で修飾する際の培養条件の影響

PEG脂質誘導体の修飾時間がhMSC表面のPEG脂質誘導体修飾量におよぼす影響について評価するため、hMSCが接着した12 well dishに0.1 mMおよび1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEMを加え、2、8、24、48時間培養することで修飾を行った。修飾後の各hMSCの細胞表面蛍光強度をFACSで測定した結果、0.1 mMで修飾した群は、時間の延長と共に細胞表面蛍光強度が直線的に増大した。一方、1 mMで修飾した群は、24時間までは0.1 mM群同様、直線的に細胞表面蛍光強度が増大したが、その後の24時間の培養では細胞表面蛍光強度の増大が緩やかになった (Fig. 6)。

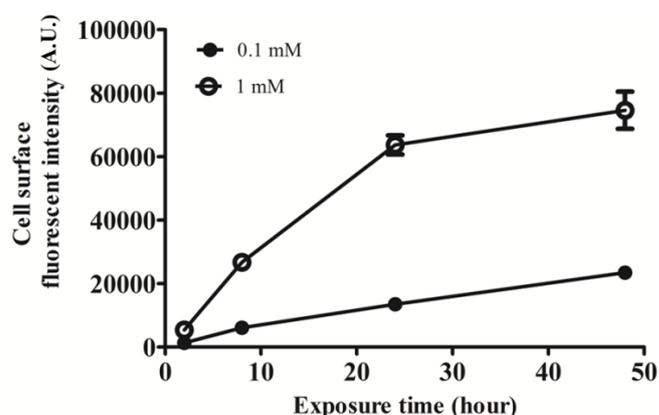


Fig. 6 Influence of exposure time on cell surface modification efficiency.

Adherent hMSCs were incubated with 0.1 and 1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE at 37°C for the indicated times. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

修飾時の培養液温度がhMSC表面のPEG脂質誘導体修飾量におよぼす影響について評価するため、hMSCが接着した 12 well dishに 0.1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEMを加え、4、25、37、42 °Cで 2 時間培養することで修飾を行った。各hMSCの細胞表面蛍光強度をFACSで測定した結果、温度の上昇とともに細胞表面蛍光強度は増大した (Fig. 7)。37 °Cで修飾した群は、4 °Cで修飾した群の約 20 倍、25 °Cで修飾した群の約 3 倍の細胞表面蛍光強度を示したが、42 °Cで修飾した群との間には有意な差は認められなかった。

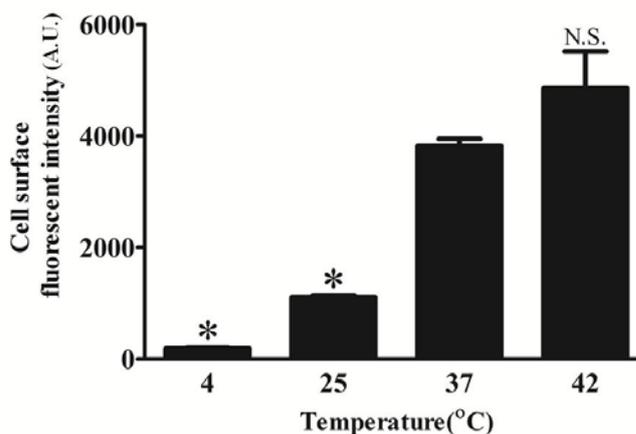


Fig. 7 Influence of temperature on cell surface modification efficiency.

Adherent hMSCs were incubated with 0.1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE for 2 h at each temperature. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3). Statistical significance was evaluated by Dunnett's test versus the group at 37 °C (*P < 0.05; N.S., not significant).

培養液に添加するウシ胎児血清(FBS)濃度がhMSC表面のPEG脂質誘導体修飾量におよぼす影響について評価するため、非接着hMSCを0、2.5、5、10 %のFBSおよび 0.1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で 2 時間培養することで修飾を行った。修飾後の各hMSCの細胞表面蛍光強度をFACSで測定した結果、FBS濃度の向上とともに細胞表面蛍光強度は減少し、FBS中の成分がPEG脂質誘導体の修飾を阻害する働きを有することが示唆された(Fig. 8)。

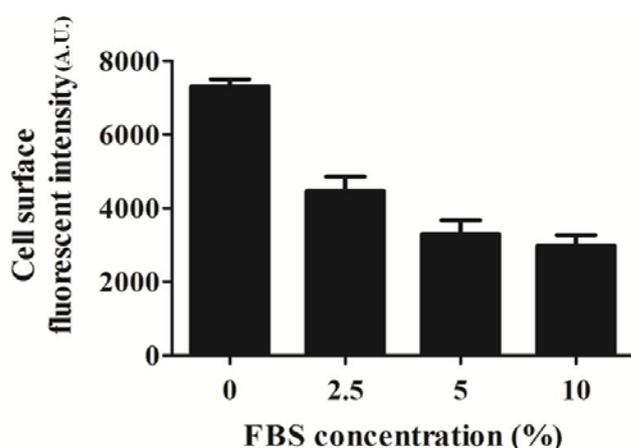


Fig. 8 Influence of FBS concentration on cell surface modification efficiency.

Unadherent hMSCs were incubated with 100 μ M of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE for 2 h at 37 °C in DMEM containing, 2.5 %, 5 %, 10 % FBS or not. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

本研究では、plastic dishに接着したhMSCにPEG脂質誘導体を含むDMEMを加えて培養し、その後トリプシン処理を行ってplastic dishから剥がして回収する方法と、plastic dishに接着したhMSCをトリプシン処理を行って剥がした後、PEG脂質誘導体を含む培養液中に分散し、培養液を転倒混和する方法を用いて修飾を行っている。培養法の違いがhMSC表面のPEG脂質誘導体修飾量におよぼす影響について評価するため、それぞれの培養法で、1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEMを用い1、2時間培養することで修飾を行った。修飾後の各hMSCの細胞表面蛍光強度をFACSで測定した結果、いずれの培養時間においても培養法の異なるhMSC群間で細胞表面蛍光強度に有意な差は認められなかった (Fig. 9)。

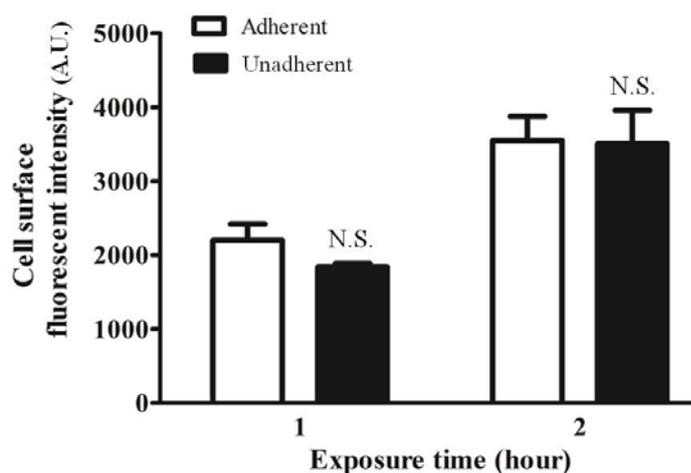


Fig. 9 Influence of incubation method on cell surface modification efficiency. hMSCs were incubated under 2 cell conditions [adherent (□) or unadherent (■)] using 0.1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE for 1 and 2 h at 37 °C. In the unadherent condition, hMSCs were dispersed in the medium containing Flu-PEG-DSPE and rotated at 3-s intervals in an incubator. Each result represents the mean ± S.D. (n = 3). Statistical significance was evaluated by Student's *t*-test versus the adherent group at each exposure time (N.S., not significant).

1-e 修飾された PEG 脂質誘導体の分子数および密度算出

Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEで修飾したhMSCに界面活性剤を加えて溶解し、蛍光光度計を用いて測定した溶解液の蛍光強度と濃度既知のFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE 検量線から、1 つのhMSCの表面もしくはhMSC内部に存在するFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE分子の数を算出した。次に、hMSC表面に修飾されたFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE分子の数を、FACSで測定したhMSC表面とhMSC内部の蛍光強度の比(S/I比)から算出し、さらにhMSCの直径を 15 μmと仮定した場合の修飾密度を算出した。1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で 24 時間修飾したhMSCにおいて、1 細胞あたりに 3.42×10⁸ のFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE分子が修飾されており、hMSC表面において、2.07 nm²あたりに 1 分子のFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEが修飾されていた(Table. 2)。また、24 時間修飾群において、培養液に加えたFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE分子数に対して、全てのhMSC表面に修飾されたFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE分子数は約 0.3 %だった。

Table. 2 The number and density of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE molecules on hMSC surface.

Incubation time (h)	Fluorescent intensity of lysate	Whole cell fluorescent intensity		S/I ratio	The number of Flu-PEG-DSPE molecule introduced on cell surface (per cell)	The area of one Flu-PEG-DSPE molecule introduced on cell surface. (nm ²)
		Without TB	With TB			
1	4.03E+04	6.92E+03	4.29E+03	0.61	2.68E+07	26.35
3	7.51E+04	2.28E+04	1.29E+04	0.77	6.08E+07	11.61
6	1.16E+05	3.87E+04	2.07E+04	0.87	1.03E+08	6.87
12	1.81E+05	6.29E+04	2.67E+04	1.35	2.02E+08	3.49
24	2.80E+05	1.02E+05	3.90E+04	1.63	3.42E+08	2.07

Adhered hMSCs were incubated with 1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE for 1, 3, 6, 12, and 24 h at 37 °C in DMEM containing 10% FBS. The fluorescence intensity of the cell lysate was measured by fluorometer. Whole cell fluorescence intensity was measured by flow cytometer (FACS). S/I ratio, the number and density of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE on hMSC surface were calculated.

S/I ratio: ratio of the fluorescence intensity of the cell surface to that of the inside of cell.

1-f 修飾の安定性評価

PEG脂質誘導体の修飾を行ったhMSCを移植する場合、生体内での修飾の安定性が重要になる。そこで、PEG脂質誘導体で修飾したhMSCを 10 %のFBSを含む 37 °CのDMEM中で最大 8 時間転倒混和し、所定時間後にサンプリングし、細胞表面蛍光強度を測定した。Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEおよびFlu-PEG₅₀₀₀-DSPE を用いて修飾を行ったhMSCについて検討したところ、1 時間後には両群ともに細胞表面蛍光強度は修飾直後と比べて約 70 ~80 %に低下した。その後も時間経過と共に低下したが、低下の程度は徐々に緩やかになり、8 時間転倒混和後には修飾直後と比べてFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEで修飾した群では 47 %、Flu-PEG₅₀₀₀-DSPEで修飾した群では 57 %の細胞表面蛍光強度を示した (Fig. 10)。

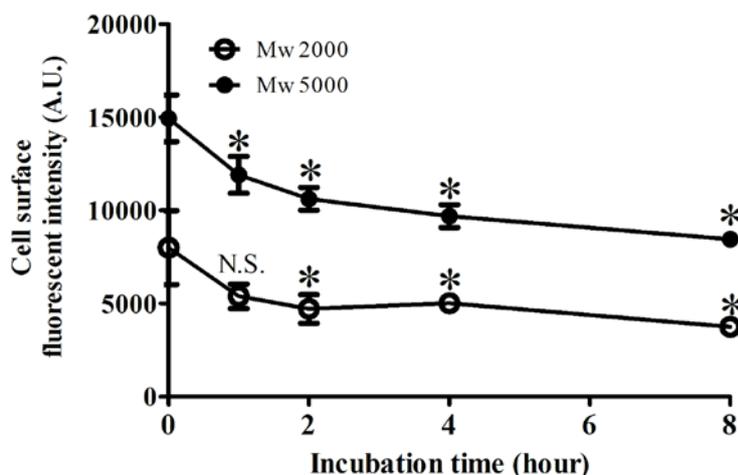
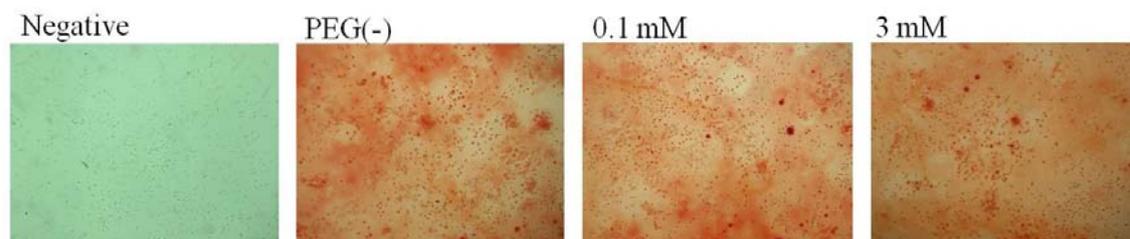


Fig. 10 Stability of hMSC surface modification with Flu-PEG-DSPE. Unadherent hMSCs were modified with 1 mM Flu-PEG-DSPE for 2 h at 37 °C, and modified hMSCs were suspended in the medium containing 10 % FBS and rotated at 3-s intervals for the indicated times at 37 °C in an incubator. Statistical significance was evaluated by Dunnett's test versus a 0 hour group at each molecular weight (*P < 0.05; N.S., not significant).

1-g 修飾が分化能におよぼす影響

MSCの移植による治療には、MSCが分化能を有することが必要であり、PEG脂質誘導体の表面修飾がMSCの分化能に影響をおよぼさないことを検証する必要がある。そこで、マウス初代培養MSC(mMSC)を0.1、3 mMのFlu-PEG₅₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で2時間培養することで修飾した後、骨分化誘導培養液中で3週間もしくは脂肪分化誘導培養液中で2週間培養した。分化の有無を確認するため、各細胞に対して骨分化、脂肪分化アッセイを行った。修飾および分化誘導を行わなかったmMSCをnegative群とし、修飾を行わず、分化誘導だけを行ったmMSCを未修飾 (PEG(-))群として比較した。骨分化誘導を行った各mMSCに対し骨細胞染色を行ったところ、全ての修飾群および未修飾群で細胞が赤く染色された (Fig. 11A)。次いで、各mMSCに対してRT-PCRを行い、骨分化マーカーであるosteopontin、osteocalcinのmRNA量を測定したところ、全ての修飾群は、未修飾群とほぼ同等かつnegative群よりも明らかに高いmRNA量を示した(Fig. 11B)。以上の結果から、PEG脂質誘導体による細胞表面修飾は、mMSCの骨細胞への分化能に影響を及ぼさないことが示された。

A



B

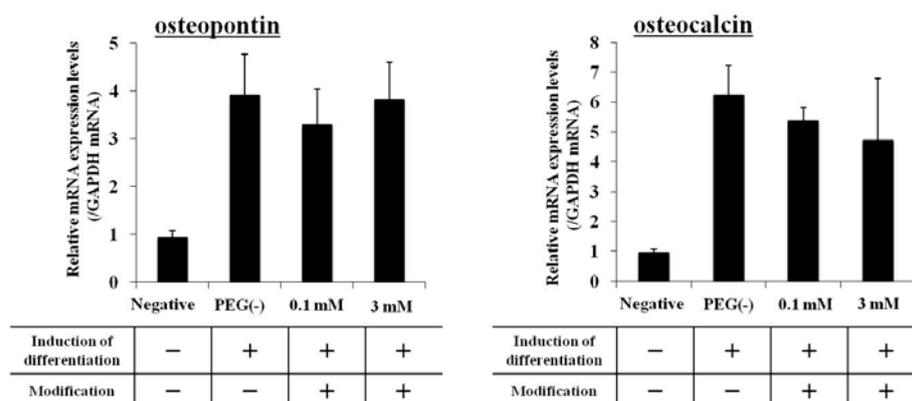


Fig. 11 Influence of mMSC surface modification with PEGylated lipid on osteogenic differentiation.

Osteogenic differentiation of mMSCs modified with 0.1 mM and 3 mM of Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE and cultured in osteogenic differentiation medium for 3 weeks were evaluated. As negative control, unmodified mMSCs cultured in normal medium were evaluated. Staining of differentiated osteogenic cells (red) from the mMSCs by staining with Alizarin Red (A). RT-PCR analysis of RNA markers of osteogenesis. Expression of osteopontin and osteocalcin in the mMSCs were evaluated. Each result represents the mean \pm S.D. (n=3) (B).

また、脂肪分化誘導を行った各 mMSC に対し脂肪細胞染色を行ったところ、全ての修飾群および未修飾群で細胞が赤く染色され、脂肪細胞への正常な分化が確認された (Fig. 12 A)。次いで、各 mMSC に対して RT-PCR を行い、脂肪分化マーカーである adipsin、ap2 の mRNA 量を測定したところ、全ての修飾群は、未修飾群とほぼ同等かつ negative 群よりも明らかに高い mRNA 量を示した (Fig. 12B)。以上の結果から、PEG 脂質誘導体の細胞表面修飾は、mMSC の脂肪細胞への分化能に影響を及ぼさないことが示された。

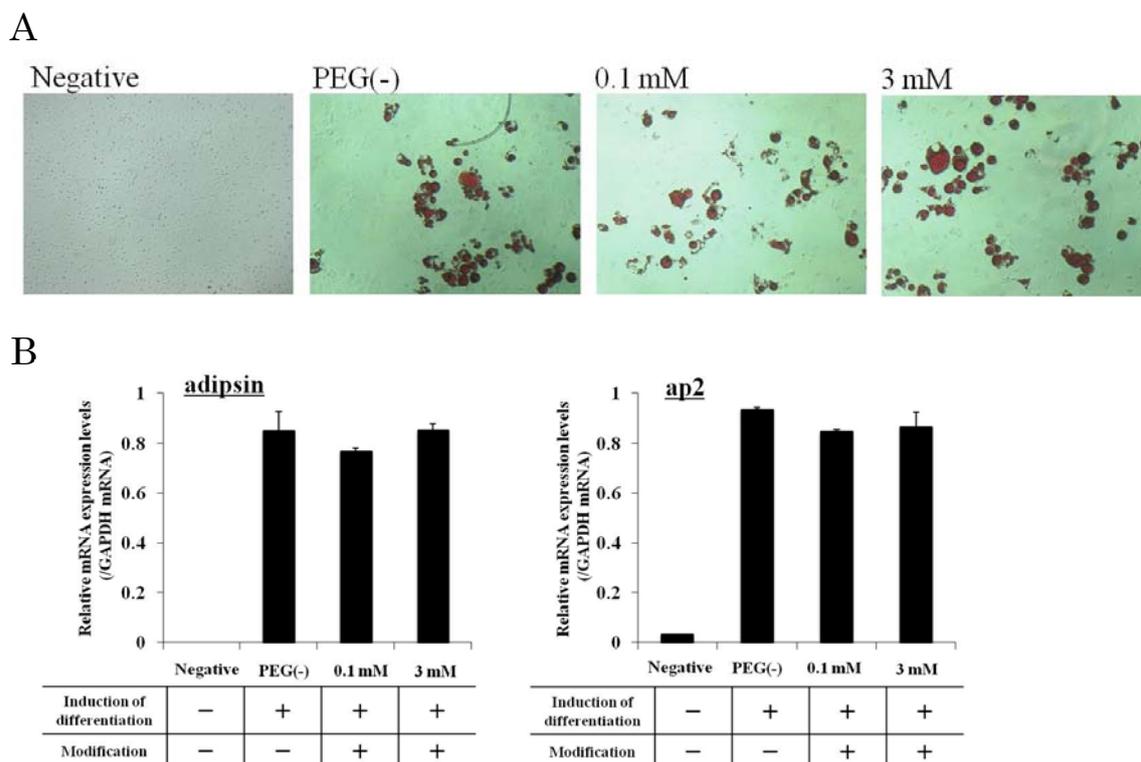


Fig. 12 Influence of mMSC surface modification with PEGylated lipid on adipogenic differentiation.

Adipogenic differentiation of mMSCs modified with 0.1 mM and 3 mM of Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE and cultured in adipogenic differentiation medium for 3 weeks were evaluated. As negative control, unmodified mMSCs cultured in normal medium were evaluated. Staining of differentiated adipogenic cells (red) from the mMSCs by staining with Oil Red O (A). RT-PCR analysis of RNA markers of adipogenesis. Expression of adipsin and ap2 in the mMSCs were evaluated. Each result represents the mean \pm S.D. (n=3) (B).

1-h 考察

本章では、hMSC 表面に修飾された PEG 脂質誘導体量だけを測定する手法を確立し、PEG 脂質誘導体濃度、PEG 鎖分子量、修飾時間、温度、FBS 濃度、修飾時の培養方法の違いの 6 つの因子について、それぞれ修飾量に対する影響を検討した。また、PEG 脂質誘導体修飾が初代培養マウス MSC の骨分化、脂肪分化におよぼす影響を確認した。

hMSC表面へのPEG脂質誘導体を用いた機能分子修飾において、まず修飾量を厳密に評価できる手法が必要である。これまでに行われたペプチド²²⁾や抗体²⁵⁾のMSC表面への修飾に関する報告では、その修飾量は蛍光標識したペプチドおよび抗体を用いて修飾されたMSCの蛍光強度から評価されていた。そこで、fluoresceinを結合したPEG脂質誘導体を合成し、蛍光強度による修飾量の評価に用いることとした。まず、本検討で用いるPEG脂質誘導体は、3 mMもしくは5 mMの高濃度でhMSCに添加しても細胞傷害性を示さず(Fig.1)、PEG脂質誘導体を用いて修飾を行ったhMSCを共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、全てのhMSCの表面にfluorescein由来の蛍光が確認され(Fig. 2)、修飾材料としての安全性、有効性が確認された。一方で撮影した顕微鏡画像ではhMSCの内部にも蛍光が確認され、修飾中にPEG脂質誘導体がhMSCの取り込み機構によって細胞内に取り込まれることが示唆された。

Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEで修飾したリポソーム、hMSCにTB³⁸⁻⁴¹⁾を添加すると、リポソーム(Table. 1)、hMSC表面(Fig. 3)の蛍光が消光した。そこで、修飾したhMSCにTBを添加した後、FACSを用いてhMSC内部の蛍光強度だけを測定し、TB未添加hMSC群の蛍光強度から差し引くことでhMSC表面だけの蛍光強度を算出することとした。この方法はhMSC表面に修飾されたPEG脂質誘導体量だけを測定できる有用な測定法だと言える。

hMSC表面へ修飾された機能分子による接着能増強効果は修飾量に依存すると考えられるため、次に修飾量に影響をおよぼす因子の検討を行った。その結果、修飾に用いるPEG脂質誘導体濃度の増大、修飾時間の延長に伴って修飾量はほぼ直線的に増大した(Figs. 4, 6)。また、修飾に用いるPEG脂質誘導体のPEG鎖分子量が大きい群ほど修飾量が多く(Fig. 5)、修飾時の培養液温度が高いほど修飾量は多かった(Fig. 7)。一方で、培養液に添加するFBS濃度が高いほど修飾量は少なかった(Fig. 8)。さらに、PEG脂質誘導体で修飾する際のhMSCの培養方法の違いは修飾量に有意な差を示さなかった(Fig. 9)。今回用いたPEG脂質誘導体と似た構造を持つMaleimide-PEG₁₉₀₀-DSPEは水中で会合体を形成することが報告されており⁴²⁻⁴³⁾、Flu-PEG-DSPEの一部は培養液中でDSPE同士が相互作用して会合体を形成していると考えられる。したがって、PEG脂質誘導体の細胞表面への修飾には、会合体から単量体が解離する過程と単量体が細胞膜へ修飾される過程が関わっていると考えられる。PEG鎖分子量が大きくなると、PEG脂質誘導体の水溶性が高まり、単量体としての溶解性が向上し、単量体の存在比が増加したため修飾量が増大した(Fig. 5)と考えられる。また、FBS中に含まれる成分がPEG脂質誘導体と相互作用し、細胞膜への修飾を阻害したため、

FBS濃度が高くなると修飾量が低減した(Fig. 8)と考えられる。また、温度の上昇に伴って細胞膜の流動性が向上することが報告されており⁴⁴⁻⁴⁷、培養液温度の変化は単量体の細胞膜への修飾過程に寄与している可能性が考えられる。

hMSC表面に修飾されたPEG脂質誘導体の分子数、修飾密度を算出したところ、1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で 1、24 時間修飾したhMSCは、それぞれ一細胞あたりに 2.68×10^7 、 3.42×10^8 のFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE分子が修飾されていた (Table. 2)。hMSC表面分子へ化学結合によって蛍光標識ペプチドで修飾する場合、一細胞あたりの修飾ペプチド分子数は $1.5 \times 10^7 \sim 9.0 \times 10^7$ であることが報告されており²⁴、脂質を介した修飾法は化学結合法と同等かそれ以上の数の分子を細胞表面に修飾可能であると考えられる。

1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE溶液中で修飾を行った場合、24 時間以降修飾量の増大が緩やかになった(Fig. 6)。また、1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE溶液中で 24 時間修飾を行ったhMSC表面におけるPEG脂質誘導体の修飾密度を算出した結果、分子量 2000 のPEG鎖が約 1.4 nmの間隔で修飾されていることが推定された (Table. 2)。Andradeらは、分子量が約 2000 のPEGをplastic表面に修飾する場合、PEG鎖間隔が 1~2 nm 以下だとタンパクの表面への吸着が阻害されることを報告している^{48, 49}。したがって、修飾量が多い場合、修飾されたPEG鎖の立体障害によって新たな修飾が起こりづらくなった可能性が考えられる。

放射性物質(RI)を取り込ませてRI標識したMSCをマウスに尾静脈投与すると、1.5 時間後に大部分のRIが肺に分布し、血中には 5 %以下しか分布せず、その後時間経過と共に他の組織への分布が増大することが報告されている⁵⁰。したがって、移植されたMSCのほとんどは一旦肺に集積した後、血流に乗って他の組織へ移行すると考えられ、移植後のPEG脂質誘導体の修飾の安定性を考慮する必要がある。そこでin vitroで安定性評価を行ったところ、今回修飾に用いた平均分子量 2000、5000 のPEG鎖をもつPEG脂質誘導体は、10 %のFBSを含む 37°CのDMEM中で 8 時間転倒混和した後もそれぞれ 47、57 %がhMSC表面に残存する(Fig. 10)ことが確認された。また、経時的な修飾量の低下パターンは両群で似ており、転倒混和開始後に大きく低下し、その後時間経過と共に低下が緩やかになった(Fig. 10)。したがって、hMSCに対する修飾が不安定なPEG脂質誘導体と、安定に修飾されたPEG脂質誘導体が存在すると考えられる。

MSCは、骨、軟骨、筋肉、神経、脂肪などの体を構成する組織の細胞に対する多分化能をもつ幹細胞⁵¹⁻⁵⁴であり、MSCによる損傷組織の修復効果には、標的組織の細胞への分化による損傷部位の補完効果が寄与している^{7,10,11,55-58}といわれている。したがって、PEG脂質誘導体による修飾をMSCの移植治療に適用するためには、修飾がMSCの分化能に影響をおよぼさないことを確認する必要がある。化学結合法によってMSCを機能分子で修飾した報告では、修飾を行ったMSCが骨細胞および脂肪細胞に対して正常に分化し、修飾がMSCの分化能に影響しないことを確認している²²。そこで、mMSCを用いた検討を行ったところ、PEG脂質誘導体で修飾したmMSCは正常に骨細胞、脂肪細胞へ分化し(Fig. 11, 12)、修飾が骨細胞、脂肪細胞への分化能に影響しないことが確認された。

以上、本章では、hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾にどのような因子が影響をおよぼすのかを検討するため、PEG 脂質誘導体の細胞表面への修飾量を測定する手法を開発し、PEG 脂質誘導体濃度、PEG 鎖分子量、修飾時間、温度、FBS 濃度、修飾時の培養方法の違いが修飾量におよぼす影響を明らかにした。また、hMSC 表面に修飾された PEG 脂質誘導体の分子数を算出し、化学結合による修飾法と同等数以上の分子で修飾できることを明らかにした。さらに、PEG 脂質誘導体の修飾が MSC の骨分化、脂肪分化に影響しないことを確認した。したがって、MSC に対する機能分子修飾において、PEG 脂質誘導体を用いた修飾は有効な方法だと期待される。

実験の部

第一章 実験の部

【1】 試薬

NH₂-PEG-distearoyl phosphatidyl ethanolamine (DSPE)、distearoylphosphatidyl glycerol (DSPG)、コレステロールは日本油脂株式会社より購入した。5 %糖液は大塚製薬株式会社から購入した。Fluorescein-N-hydroxysuccinimide (NHS)はThermo Scientific社より購入した。penicillin streptomycin glutamine (PSG)、Opti-MEMはインビトロジェン社より購入した。アセトン、トリパンブルー、aprotininはナカライテスク社より購入した。PD10 カラムおよびCL-4BゲルはGEヘルスケア社より購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)およびウシ胎児血清 (FBS) はGIBCO 社より購入した。Phosphate buffered saline (PBS (-))粉末は日水製薬株式会社より購入した。Cell Counting Kit (CCK-8) は同仁堂株式会社より購入した。Hoechst 33342 は Life Technologies社より購入した。4 % paraformaldehyde (PFA)液、10% formalinは和光純薬株式会社より購入した。insulin、indomethacin、dexamethasone、3-isobutyl-1-methylxanthine、Oil Red O、β-glycerol phosphate、ascorbate 2-phosphate、alizarin red、amphotericin Bはシグマ社から購入した。

【2】 蛍光分子導入 PEG 脂質誘導体の合成および精製

分子量 2000、5000 および 10000 のPEG鎖をもつNH₂-PEG-DSPEとFluorescein- NHS を1:2のモル比でアセトン中に溶解し、室温で一晩振盪した。反応液をPD10カラムに加え、高分子量分画を回収し、未反応のFluoresceinを除去し、凍結乾燥することでFlu-PEG-DSPEを得た。

【3】 ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)培養

hMSC は理研セルバンクから譲渡された UE7T-13 株を用いた。hMSC は 10% FBS、1000 U/mL penicillin G、100 µg/L streptomycin を添加した DMEM 中で培養した。

【4】 PEG 脂質誘導体の細胞傷害性測定

接着 hMSC については、96 well plate に hMSC を播種し、37°C で 24 時間後培養した後、各 well に Flu-PEG-DSPE を含む DMEM を添加し 37°C で 4 時間培養した。Flu-PEG-DSPE を含まない DMEM で各 well を洗浄した後、CCK-8 solution を加え 30 分培養し、培養後の各 well の培養液 100 µL を吸光度測定のため新しい 96 well plate に移した。非接着 hMSC については、プラスチックチューブ内で Flu-PEG-DSPE を含む DMEM 中に

hMSC を分散し、37 °C で 4 時間チューブを転倒混和（3 秒毎に 1 回転）した。チューブを遠心し hMSC を沈降させ、培養液を Flu-PEG-DSPE を含まない DMEM に交換した。交換後の hMSC 分散液を 96 well plate に播種し、CCK-8 solution を加え 30 分培養し、培養後の各 well の培養液 100 μ L を吸光度測定のため新しい 96 well plate に移した。吸光度計 (Bio-Rad Model 550 microplate reader, Bio-Rad 社製) を用いて、各 well の 450 nm における吸光度を測定した。PEG 脂質で修飾していない群の吸光度を 100 % とし、各群の吸光度を相対値として評価した。0.1 % TritonX を含む DMEM 中で 4 時間培養した群をネガティブコントロールとした。

【5】 fluorescein リポソームの調製

クロロホルムに溶解した DSPG、コレステロール（モル比 3 : 2）をエバポレートし、5 % 糖液を加え 65 °C で 30 分振盪した後、バスソニケーションを 10 分間、ポールソニケーションを 3 分間行い、0.45 μ m シリンジフィルターに通すことでリポソームを得た。調製時のリポソーム構成脂質に対して 25 % モル量の Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE を混合し、60 °C で 1 時間振盪後、CL-4B ゲル充填カラムに投入し、fluorescein 導入リポソーム分画を回収した。fluorescein 導入リポソーム分散液の蛍光強度は蛍光光度計 (Fluoromax-4, HORIBA 社製) を用いて測定し、リポソームの粒子径は Zetasizer Nano ZS (Malvern 社製) を用いて測定した。

【6】 トリパンブルー (TB) による hMSC 表面の蛍光消光の確認

hMSC を 0.1 mM の Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE 中で 2 時間培養した後、Hoechst 33342 を添加し核染色を行った。この hMSC を PBS 中に分散し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Nikon A1R MP confocal imaging system, Nikon 社製) で観察した。さらに PBS 中に最終体積比が 10 % になるように TB を添加し、再度観察した。

【7】 細胞表面蛍光強度の測定

Flu-PEG-DSPE を用いて修飾した hMSC を PEG-DSPE を含まない新鮮な DMEM で 30 分洗浄した後、2 つのグループに分け、PBS および 10 v/v% のトリパンブルーを含む PBS にそれぞれ分散し、フローサイトメーター (BD FACS Canto II, BD Biosciences 社製) を用いて細胞の蛍光強度を測定した。各細胞群に対し、一度に 10000 個の生細胞について蛍光強度測定を行い、10000 個の細胞の蛍光強度の中央値を各細胞群の蛍光強度として評価した。TB 未添加群の蛍光強度から TB 添加群の蛍光強度を差し引いた値を細胞表面蛍光強度として評価した。

【8】 hMSC の共焦点蛍光顕微鏡観察

Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE を用いて修飾した hMSC を 4 % PFA を用いて固定した後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i confocal laser scanning microscope, Olympus 社製)

を用いて観察した。

【9】 hMSC 表面に修飾された PEG 脂質の分子数および密度測定

Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEで修飾したhMSCを2つのグループに分け、一方はフローサイトメーターを用いて細胞表面蛍光強度を測定した。他方は細胞数を計測後、界面活性剤を添加して溶解し、蛍光光度計を用いて溶解液の蛍光強度を測定した。フローサイトメーターで測定したhMSC表面およびhMSC内部の蛍光強度の比と、蛍光光度計で測定したhMSC溶解液の蛍光強度から、hMSC表面に修飾されたFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEに由来する蛍光強度を算出した。濃度既知のFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE溶液の蛍光強度から検量線を作成し、溶解液中のhMSC数から1つのhMSCの表面に修飾されたFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE分子数を算出した。さらにhMSCの直径を15 μmと仮定した場合のFlu-PEG₂₀₀₀-DSPE分子の表面密度を算出した。

【10】 初代培養マウス MSC の採取

C57BL/6 マウス (6 週齢、雌) の大腿骨および脛骨内の細胞を 10 %のFBS、1 %のPSG、100 ng/mLのamphotericin Bおよびaprotininを含むDMEM中に分散し、24 well plateに1×10⁶ cells/mLで播種した。37 °Cで培養を行い、2 日後、4 日後に培養液を交換することで接着していない細胞を除去した。1 週間後、plateに接着していた細胞を初代培養マウス MSC (mMSC)として用いた。

【11】 骨分化誘導・Alizarin Red 染色

10 mM β-glycerol phosphate、0.1 μM dexamethasone、50 μg/mL ascorbate 2-phosphate を含むDMEM 中にmMSCを分散し、96 well plateに2×10⁴ cells/wellで播種した。37 °Cで培養を行い、週3回培養液を交換し、3週間培養したmMSCを室温で20分間10% formalinで処理した後、Alizarin Redで20分間染色した。

【12】 脂肪分化誘導・Oil Red O 染色

5 μg/mL insulin、50 μM indomethacin、1 μM dexamethasone、0.5 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine を含むDMEM中でmMSCを分散し、96 well plateに1×10⁵ cells/wellで播種した。37 °Cで培養を行い、週2回培養液を交換し、2週間培養したmMSCを室温で10% formalin中で20分間処理した後、0.5% Oil Red O で20分間染色した。

【13】 Real time PCR

GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (シグマ社)を用いて MSC 中の全 RNA を抽出し、PrimeScript® RT reagent Kit (タカラバイオ社)により逆転写反応を行った。各 mRNA(ap2, adipsin, osteocalcin, osteopontin, gapdh)量は SYBER® Premix Ex Taq (タカラバイオ社)を利用し、Lightcycler Quick System 350S (Roche Diagnostics 社)による

Real time PCR により測定した。なお、プライマーには以下の配列を用いた。

ap2 に対するプライマー： 5'-GGG ATT TGG TCA CCA TCC G-3' (forward)、5'-CCA GCT TGT CAC CAT CTC G-3' (reverse)

adipsin に対するプライマー： 5'-AGA CCC CTA CCC TTG CAA TAC G-3' (forward)、5'-TGT TAC CAT TTG TGA TGT TTT CGA TC-3' (reverse)

osteocalcin に対するプライマー： 5'-TGC TTG TGA CGA GCT ATC AG-3' (forward)、5'-GAG GAC AGG GAG GAT CAA GT-3' (reverse)

osteopontin に対するプライマー： 5'-TCA CCA TTC GGA TGA GTC TG-3' (forward)、5'-ACT TGT GGC TCT GAT GTT CC-3' (reverse)

gapdh に対するプライマー： 5'-TCT CCT GCG ACT TCA ACA-3' (forward)、5'-GCT GTA GCC GTA TTC ATT GT-3' (reverse)。

mRNA のコピー数は thermal-cycler software ('Arithmetic Fit Point analysis' for the Lightcycler)を用いて作成した検量線から算出した。各 mRNA の発現レベルは gapdh に対する相対値によって評価した。

【14】統計学的解析

有意差検定では、二群間の比較にはスチューデント t 検定を用いた。また、多群間比較においては Analysis of variance (ANOVA) を行い、Dunnett's 法もしくは Tukey 法により検定した。全 p 値は両側であり、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

引用文献

- [1] G.G. Gallico, N.E. O'Connor, C.C. Compton, O. Kehinde, H. Green, Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium, *New England Journal of Medicine*, 311 (1984) 448-451.
- [2] G. Pellegrini, C.E. Traverso, A.T. Franzi, M. Zingirian, R. Cancedda, M. De Luca, Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium, *Lancet*, 349 (1997) 990-993.
- [3] P. Menasché, A.A. Hagège, M. Scorsin, B. Pouzet, M. Desnos, D. Duboc, K. Schwartz, J.T. Vilquin, J.P. Marolleau, Myoblast transplantation for heart failure, *Lancet*, 357 (2001) 279-280.
- [4] P. Menasché, O. Alfieri, S. Janssens, W. McKenna, H. Reichenspurner, L. Trinquart, J.T. Vilquin, J.P. Marolleau, B. Seymour, J. Larghero, S. Lake, G. Chatellier, S. Solomon, M. Desnos, A.A. Hagège, The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation, *Circulation*, 117 (2008) 1189-1200.
- [5] B. Assmus, V. Schächinger, C. Teupe, M. Britten, R. Lehmann, N. Döbert, F. Grünwald, A. Aicher, C. Urbich, H. Martin, D. Hoelzer, S. Dimmeler, A.M. Zeiher, Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI), *Circulation*, 106 (2002) 3009-3017.
- [6] A.R. Williams, B. Trachtenberg, D.L. Velazquez, I. McNiece, P. Altman, D. Rouy, A.M. Mendizabal, P.M. Pattany, G.A. Lopera, J. Fishman, J.P. Zambrano, A.W. Heldman, J.M. Hare, Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling, *Circulation Research*, 108 (2011) 792-796.
- [7] M.F. Pittenger, B.J. Martin, Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circulation Research*, 95 (2004) 9-20.
- [8] D. Garcia-Olmo, M. Garcia-Arranz, D. Herreros, I. Pascual, C. Peiro, J.A. Rodriguez-Montes, A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation, *Diseases of the Colon & Rectum*, 48 (2005) 1416-1423.
- [9] R.Z. Shi, Q.P. Li, Improving outcome of transplanted mesenchymal stem cells for ischemic heart disease, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376 (2008) 247-250. M
- [10] L.D. Meirelles, A.M. Fontes, D.T. Covas, A.I. Caplan, Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20 (2009) 419-427.
- [11] B. Parekkadan, J.M. Milwid, Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics, *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol 12, 12 (2010) 87-117.
- [12] J.Y. Weng, X. Du, S.X. Geng, Y.W. Peng, Z. Wang, Z.S. Lu, S.J. Wu, C.W. Luo, R. Guo, W. Ling, C.X. Deng, P.J. Liao, A.P. Xiang, Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD, *Bone Marrow Transplantation*, 45 (2010) 1732-1740.

- [13] K. LeBlanc, F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M.E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R.M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, O. Ringden, M. Dev Committee European Grp Blood, Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study, *Lancet*, 371 (2008) 1579-1586.
- [14] H.K. Salem, C. Thiemermann, Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status, *Stem Cells*, 28 (2010) 585-596.
- [15] R. Jiang, Z. Han, G. Zhuo, X. Qu, X. Li, X. Wang, Y. Shao, S. Yang, Z.C. Han, Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study, *Front Med*, 5 (2011) 94-100.
- [16] J. Roncalli, P. Lemarchand, Autologous bone marrow cells and ischemic cardiomyopathy, *Future Cardiology*, 7 (2011) 603-607.
- [17] F. de la Portilla, F. Alba, D. Garcia-Olmo, J.M. Herrerias, F.X. Gonzalez, A. Galindo, Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial, *International Journal of Colorectal Disease*, 28 (2013) 313-323.
- [18] M. Zhang, D. Methot, V. Poppa, Y. Fujio, K. Walsh, C.E. Murry, Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33 (2001) 907-921.
- [19] J. Huang, Z. Zhang, J. Guo, A. Ni, A. Deb, L. Zhang, M. Mirotsov, R.E. Pratt, V.J. Dzau, Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing CCR1 increases cell viability, migration, engraftment, and capillary density in the injured myocardium, *Circulation Research*, 106 (2010) 1753-1762
- [20] Z. Cheng, L. Ou, X. Zhou, F. Li, X. Jia, Y. Zhang, X. Liu, Y. Li, C.A. Ward, L.G. Melo, D. Kong, Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance, *Molecular Therapy*, 16 (2008) 571-579.
- [21] W. Chen, M. Li, Z. Li, Z. Yan, H. Cheng, B. Pan, J. Cao, C. Chen, L. Zeng, K. Xu, CXCR4-transduced mesenchymal stem cells protect mice against graft-versus-host disease, *Immunology Letters*, 143 (2012) 161-169.
- [22] D. Sarkar, P.K. Vemula, W.A. Zhao, A. Gupta, R. Karnik, J.M. Karp, Engineered mesenchymal stem cells with self-assembled vesicles for systemic cell targeting, *Biomaterials*, 31 (2010) 5266-5274.
- [23] D. Sarkar, J.A. Spencer, J.A. Phillips, W. Zhao, S. Schafer, D.P. Spelke, L.J. Mortensen, J.P. Ruiz, P.K. Vemula, R. Sridharan, S. Kumar, R. Karnik, C.P. Lin, J.M. Karp, Engineered cell homing, *Blood*, 118 (2011) e184-191.
- [24] H. Cheng, M. Byrska-Bishop, C.T. Zhang, C.J. Kastrup, N.S. Hwang, A.K. Tai, W.W. Lee, X.Y. Xu, M. Nahrendorf, R. Langer, D.G. Anderson, Stem cell membrane engineering for cell rolling using peptide conjugation and tuning of cell-selectin interaction kinetics, *Biomaterials*, 33 (2012) 5004-5012.
- [25] I.K. Ko, T.J. Kean, J.E. Dennis, Targeting mesenchymal stem cells to activated endothelial cells,

Biomaterials, 30 (2009) 3702-3710.

[26] I.K. Ko, B.G. Kim, A. Awadallah, J. Mikulan, P. Lin, J.J. Letterio, J.E. Dennis, Targeting improves MSC treatment of inflammatory bowel disease, *Molecular Therapy*, 18 (2010) 1365-1372.

[27] T.J. Kean, L. Duesler, R.G. Young, A. Dadabayev, A. Olenyik, M. Penn, J. Wagner, D.J. Fink, A.I. Caplan, J.E. Dennis, Development of a peptide-targeted, myocardial ischemia-homing, mesenchymal stem cell, *Journal of Drug Targeting*, 20 (2012) 23-32.

[28] K. Kato, C. Itoh, T. Yasukouchi, T. Nagamune, Rapid protein anchoring into the membranes of Mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glycol) derivatives, *Biotechnology Progress*, 20 (2004) 897-904.

[29] S. Miura, Y. Teramura, H. Iwata, Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane, *Biomaterials*, 27 (2006) 5828-5835.

[30] Y. Teramura, H. Chen, T. Kawamoto, H. Iwata, Control of cell attachment through polyDNA hybridization, *Biomaterials*, 31 (2010) 2229-2235.

[31] U. Tomita, S. Yamaguchi, Y. Sugimoto, S. Takamori, T. Nagamune, Poly(ethylene glycol)-Lipid-Conjugated Antibodies Enhance Dendritic Cell Phagocytosis of Apoptotic Cancer Cells, *Pharmaceuticals (Basel)*, 5 (2012) 405-416.

[32] K. Tatsumi, K. Ohashi, Y. Teramura, R. Utoh, K. Kanegae, N. Watanabe, S. Mukobata, M. Nakayama, H. Iwata, T. Okano, The non-invasive cell surface modification of hepatocytes with PEG-lipid derivatives, *Biomaterials*, 33 (2012) 821-828.

[33] U. Tomita, S. Yamaguchi, Y. Maeda, K. Chujo, K. Minamihata, T. Nagamune, Protein cell-surface display through in situ enzymatic modification of proteins with a poly(Ethylene glycol)-lipid, *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (2013) 2785-2789.

[34] D.M. Vail, R. Chun, D.H. Thamm, L.D. Garrett, A.J. Cooley, J.E. Obradovich, Efficacy of pyridoxine to ameliorate the cutaneous toxicity associated with doxorubicin containing pegylated (Stealth) liposomes: A randomized, double-blind clinical trial using a canine model, *Clinical Cancer Research*, 4 (1998) 1567-1571.

[35] D. Hoarau, P. Delmas, S. David, E. Roux, J.C. Leroux, Novel long-circulating lipid nanocapsules, *Pharmaceutical Research*, 21 (2004) 1783-1789.

[36] P.M. Fracasso, K.A. Blum, M.K. Ma, B.R. Tan, L.P. Wright, S.A. Goodner, C.L. Fears, W. Hou, M.A. Arquette, J. Picus, A. Denes, J.E. Mortimer, L. Ratner, S.P. Ivy, H.L. McLeod, Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin and the multidrug-resistance modulator, valspodar, *British Journal of Cancer*, 93 (2005) 46-53.

[37] P.G. Rose, Pegylated liposomal doxorubicin: Optimizing the dosing schedule in ovarian cancer, *Oncologist*, 10 (2005) 205-214.

[38] J.D. Loike, S.C. Silverstein, A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate

- between attached and ingested glutaraldehyde-fixed red-blood-cells in phagocytosing murine macrophages, *Journal of Immunological Methods*, 57 (1983) 373-379.
- [39] E.S. Vanamersfoort, J.A.G. Vanstrijp, Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes, *Cytometry*, 17 (1994) 294-301.
- [40] S. Busetto, E. Trevisan, P. Patriarca, R. Menegazzi, A single-step, sensitive flow cytofluorometric assay for the simultaneous assessment of membrane-bound and ingested *Candida albicans* in phagocytosing neutrophils, *Cytometry Part A*, 58A (2004) 201-206.
- [41] G.K. Srivastava, R. Reinoso, A.K. Singh, I. Fernandez-Bueno, D. Hileeto, M. Martino, M.T. Garcia-Gutierrez, J.M.P. Merino, N.F. Alonso, A. Corell, J.C. Pastor, Trypan Blue staining method for quenching the autofluorescence of RPE cells for improving protein expression analysis, *Experimental Eye Research*, 93 (2011) 956-962.
- [42] T. Ishida, D.L. Iden, T.M. Allen, A combinatorial approach to producing sterically stabilized (Stealth) immunoliposomal drugs, *FEBS Letters*, 460 (1999) 129-133.
- [43] P.S. Uster, T.M. Allen, B.E. Daniel, C.J. Mendez, M.S. Newman, G.Z. Zhu, Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time, *FEBS Letters*, 386 (1996) 243-246.
- [44] B. Aroeti, Y.I. Henis, Effects of fusion temperature on the lateral mobility of Sendai virus glycoproteins in erythrocyte membranes and on cell fusion indicate that glycoprotein mobilization is required for cell fusion, *Biochemistry*, 27 (1988) 5654-5661.
- [45] E.A. Reits, J.J. Neefjes, From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells, *Nature Cell Biology*, 3 (2001) E145-147.
- [46] A.V. Samsonov, I. Mihalyov, F.S. Cohen, Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes, *Biophysical Journal*, 81 (2001) 1486-1500.
- [47] A.K. Kenworthy, B.J. Nichols, C.L. Remmert, G.M. Hendrix, M. Kumar, J. Zimmerberg, J. Lippincott-Schwartz, Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface, *Journal of Cell Biology*, 165 (2004) 735-746.
- [48] S.I. Jeon, J.H. Lee, J.D. Andrade, P.G. Degennes, Protein surface interactions in the presence of polyethylene oxide 1 simplified theory, *Journal of Colloid and Interface Science*, 142 (1991) 149-158.
- [49] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials*, 27 (2006) 4356-4373.
- [50] A. Mukherjee, S. Tipnis, H.D. Sarma, G. Ravindran, G. Samuel, C. Viswanathan, M. Venkatesh, Radiolabeling of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for in vivo tracking, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 27 (2012) 614-619.
- [51] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells,

Science, 284 (1999) 143-147.

[52] R.J. Deans, A.B. Moseley, Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses, *Experimental Hematology*, 28 (2000) 875-884.

[53] P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, P.G. Robey, Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications, *Stem Cells*, 19 (2001) 180-192.

[54] Y.H. Jiang, B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, R.E. Schwartz, C.D. Keene, X.R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J.B. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W.C. Low, D.A. Largaespada, C.M. Verfaillie, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature*, 418 (2002) 41-49.

[55] G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, J. Middleton, Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, *Stem Cells*, 25 (2007) 2739-2749.

[56] H. Koga, T. Muneta, T. Nagase, A. Nimura, Y.J. Ju, T. Mochizuki, I. Sekiya, Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit, *Cell and Tissue Research*, 333 (2008) 207-215.

[57] Z. Pasha, Y. Wang, R. Sheikh, D. Zhang, T. Zhao, M. Ashraf, Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium, *Cardiovascular Research*, 77 (2008) 134-142.

[58] N.K. Satija, V.K. Singh, Y.K. Verma, P. Gupta, S. Sharma, F. Afrin, M. Sharma, P. Sharma, R.P. Tripathi, G.U. Gurudutta, Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13 (2009) 4385-4402.

第二章 hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾を向上させる手法の開発

総論の部

諸言

前章において、修飾量に影響をおよぼす因子について整理したが、修飾の際の PEG 脂質誘導体の利用効率は低く、修飾効率を向上する手法の開発が必要だと考えた。両親媒性の分子は水中で疎水性部分同士が会合し、ミセルや脂質二重層を形成する。したがって、脂質 PEG 脂質誘導体の DSPE 同士が相互作用して会合体を形成し、細胞膜への修飾が阻害されている可能性が考えられる。そこで、本章では有機溶剤、cyclodextrin (CD)の添加や、超音波照射による外部刺激を用いることによって、PEG 脂質誘導体の会合体の形成を抑制し、hMSC 表面への修飾効率の向上に取り組んだ。

結果

methanol (MeOH)、ethanol (EtOH)、dimethyl sulfoxide (DMSO)を添加してPEG 脂質誘導体の修飾を行うと、いずれの場合もhMSC表面への修飾量が増大した。修飾向上効果は、MeOH、EtOH、DMSOの順に高かった。次に、 α CD、 $M\beta$ CD、 β CD、 γ CDを添加してPEG脂質誘導体の修飾を行ったところ、いずれのCDもMeOHより修飾向上効果が高く、特に α CDが最も高かった。また、 α CDを添加すると水溶性の低い低分子量PEG脂質誘導体の修飾量も向上した。また、 1 HNMR分析により、 α CDがPEG脂質誘導体の脂質部分に包接することを確認した。最後に、PEG脂質誘導体とhMSCを分散させた培養液が入ったチューブを所定温度の水浴に浸けて培養液温度を 37 °Cに保ちながら超音波を照射したところ、超音波照射により修飾量が増大した。

考察

有機溶剤の添加、CD の添加、および超音波照射により、hMSC 表面への修飾量が向上した。有機溶剤は、脂溶性の高い物質同士の相互作用を弱めることが知られ、また、本研究において、CD は PEG 脂質誘導体の脂質部分へ包接したことが確認された。また、超音波照射により培養液中のリポソームが崩壊することが知られており、さらに、本研究では、照射中の培養液の温度を一定にして超音波照射の機械的刺激の効果の影響だけを検証できるような実験系を設定した。以上より、PEG 脂質誘導体の会合体形成が抑制された結果、単量体として分散する PEG 脂質が増えたことで hMSC 表面への修飾量が向上したと考えられる。

実験の部

【1】¹HNMR測定

測定時の溶媒としてD₂Oを用い、測定化合物を溶解し、測定した。

【2】超音波照射

ポリスチレンチューブに hMSC と PEG 脂質誘導体を含む培養液を加えて、一定温度の水浴内に設置した。プローブをポリスチレンチューブ内の培養液の液面につけ、超音波を照射した。

その他、細胞傷害性測定、細胞表面蛍光強度測定、hMSC の蛍光顕微鏡観察、初代培養マウス MSC の採取、骨分化誘導・Alizarin Red 染色、脂肪分化誘導・Oil Red O 染色、Real time PCR、統計学的解析は第一章 実験の部に準じた方法で行った。

第三章 ペプチドリガンド導入 PEG 脂質誘導体修飾による hMSC の血管内皮細胞への接着増強

総論の部

諸言

本章では、前章における検討により確立した PEG 脂質誘導体を用いた hMSC の表面修飾法を用いて、細胞間接着に関わるリガンドを hMSC 表面に修飾し、炎症組織の血管内皮細胞との親和性の増強効果を検討した。まず、接着を評価する方法として、一度に多群の評価が可能な培養皿上の血管内皮細胞と MSC を一定時間共培養する方法と、生体内で血流のある中で接着と解離を繰り返しながら減速して接着に至る過程をチャンバー内に再現し、一定流速の流れ場の中で移動する細胞を顕微鏡撮影した動画から評価する方法を確立した。これらの評価法を用いて、接着における PEG 鎖長の影響、炎症組織の血管内皮細胞に特異的な親和性を持つペプチドをリガンドとして修飾した hMSC の接着能増強を検証した。

結果

予め量子ドットで蛍光標識した hMSC をヒト肝類洞血管内皮細胞 (hLSME) 上で一定時間共培養した後、回収された全ての細胞数と蛍光標識された細胞数を FACS で計測し、蛍光標識された細胞を hMSC、標識されていない細胞を hLSME として、hLSME に対して接着した hMSC 数の比率を計算し、その比率を接着能の指標とする方法を構築した。流路の底部に hLSME を培養したチャンバー内に、蛍光標識された hMSC を一定の流速中で流し、蛍光顕微鏡で hLSME の上を移動する hMSC をリアルタイムイメージングで撮影した。得られた動画から hMSC の各瞬間の移動速度、平均移動速度を算出し、移動速度から接着能を評価する方法を構築した。

異なる分子量の PEG 鎖をもつ PEG 脂質誘導体を、異なる量修飾した hMSC を調製し、それぞれの接着能を評価したところ、PEG 鎖分子量、修飾量の増大に伴い接着能が低下した。低分子量 PEG 脂質誘導体を修飾した場合は、接着能がほとんど低下しなかった。

低分子量の PEG をリンカーとし、リガンドとしてペプチドを導入したりリガンド導入 PEG 脂質誘導体を合成した。これを用いてリガンドで修飾された hMSC の hLSME との接着能を評価した結果、hLSME 上で共培養した後に接着する hMSC 数が増加し、hLSME 上を移動する hMSC の速度が低減した。また、その効果は未修飾の hMSC および、逆配列のペプチドで修飾した hMSC と比較して高かった。

考察

共培養後に接着した hMSC 数から接着能を評価する方法は、多くの群を短時間で評価できる点で有用であると考えられる。また、hMSC の移動速度から接着能を評価する方法は、移動速度の変化を解析できる点や、実際の血管内で起こっている現象を正確

に再現できる点で有用であり、それぞれ目的に合わせて評価法を選択することが重要であると考えられる。

PEG 鎖の鎖長や修飾量の増大により、hMSC の接着が低下した。PEG 鎖は、誘導体の水和性やリガンドとの距離や柔軟性の調整において重要である一方、薬物や薬物キャリアに修飾された PEG 鎖は、被修飾物と酵素、抗体、細胞などの血中の物質との相互作用を非特異的に阻害する作用があることが知られており、細胞の表面修飾においても、同様の作用が影響したと考えられる。PEG 脂質誘導体を利用した hMSC の接着能増強において、PEG 鎖の鎖長や修飾量の最適化が重要である。

ICAM-1 に認識されるペプチドで修飾した hMSC の接着増強効果は、未修飾の MSC より高く、ペプチドのアミノ酸配列依存的であった。PEG 脂質誘導体を用いた接着関連分子の細胞表面修飾技術は、*in vivo* においても細胞の集積や治療効果の向上に寄与できる可能性が示された。

実験の部

【1】ペプチドリガンド導入 PEG 脂質誘導体の合成

固相合成法によって、低分子量の PEG を末端にもつペプチドを合成し、HPLC で精製した。次に PEG-ペプチドと DSPE との脱水縮合によって両者を結合した。透析によって精製し、凍結乾燥後、ペプチド-PEG-DSPE を得た。

【2】hLSME への接着評価

蛍光標識した hMSC を、hLSME が接着したマルチウェルプレートに播種し、共培養した。未接着の hMSC を除去し、接着した hMSC および hLSME を回収し、蛍光強度の違いから各細胞を識別してそれぞれの細胞数を計測し、細胞数の比を算出した。この細胞数の比を接着率として定義し、接着能の指標とした。

【3】hLSME 上での移動速度評価

蛍光標識した hMSC を、hLSME が接着したフローチャンバー内に一定流速で流し、hLSME 上を移動する hMSC を蛍光顕微鏡に接続したカメラで撮影した。動画を解析し、hMSC の各瞬間の移動速度および平均移動速度を算出した。

その他、細胞表面蛍光強度測定、hMSC の蛍光顕微鏡観察、統計学的解析は第一章 実験の部に準じた方法で行った。

結論

以上、著者は三章に渡り、PEG 脂質誘導体を用いた hMSC 表面への機能分子修飾によって hMSC の接着能を増強する手法の開発に取り組み、hMSC 表面へのペプチドリガンド修飾による接着能増強に関する検討を行い、以下の結論を得た。

第一章 hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾に影響をおよぼす因子の検討

hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾にどのような因子が影響をおよぼすのかを検討するため、PEG 脂質誘導体の細胞表面への修飾量を測定する手法を開発し、PEG 脂質誘導体濃度、PEG 鎖分子量、修飾時間、温度、FBS 濃度、修飾時の培養方法の違いが修飾量におよぼす影響を明らかにした。また、hMSC 表面に修飾された PEG 脂質誘導体の分子数を算出し、化学結合による修飾法と同等数以上の分子で修飾できることを明らかにした。さらに、PEG 脂質誘導体の修飾が MSC の骨分化、脂肪分化に影響しないことを確認した。

第二章 hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾を向上させる手法の開発

PEG 脂質誘導体の疎水性基である DSPE 同士が相互作用して会合体を形成する結果、会合体の外側の PEG 鎖が細胞膜との相互作用を阻害することが、PEG 脂質誘導体による hMSC への修飾効率が低い原因であると考え、有機溶剤や CD の添加、または超音波照射による会合体形成の抑制を利用し、hMSC 表面への修飾効率を向上させることができた。

まず、有機溶剤または CD の添加により、いずれの場合も修飾向上効果を示し、特に α CD が最も高い効果を示すことを見出した。 α CD は、 ^1H NMR の分析において PEG 脂質誘導体の脂質部分を包接することが明らかとなり、包接によって PEG 脂質誘導体の会合体の形成を抑制することで修飾向上に寄与していることが示唆された。また、PEG 脂質誘導体修飾の安定性を評価したところ、 α CD を添加して修飾しても修飾の安定性に顕著な変化は認められなかった。したがって、MSC に対する機能分子修飾において、有機溶剤もしくは CD の添加は修飾の向上に有効だと期待される。

次に、超音波照射によって PEG 脂質誘導体での hMSC 表面の修飾を向上することを考え、修飾が向上されることを見出した。また、本節で実施した超音波照射条件では MSC の分化能に影響をおよぼさないことを確認した。本手法は CD の添加と比べると修飾向上効果は低いものの、修飾を向上する手法の一つとして有効だと考えられる。

第三章 ペプチドリガンド導入 PEG 脂質誘導体修飾による hMSC の血管内皮細胞への接着増強

PEG 脂質誘導体で修飾した hMSC の接着能を評価することを目的に、静置培養後の接着 hMSC 数から評価する方法と、フローチャンバーを用いて流れ場で移動する hMSC の移動速度から評価する方法を構築した。

hMSC 表面に修飾された PEG 鎖が hMSC の接着におよぼす影響について、静置培養後の接着 hMSC 数から plastic dish および hLSME に対する hMSC の接着能を評価したところ、修飾された PEG 鎖分子量および修飾量の増大に伴って hMSC の接着能は低下した。一方で、EG2 量をリンカーとする PEG 脂質誘導体で修飾した hMSC の接着能は未修飾 hMSC と同等だった。また、フローチャンバーを用いて流れ場で移動する hMSC の移動速度を算出したところ、PEG 鎖による接着阻害効果が確認された。

LFA-1/ICAM-1 の相互作用に関与し、ICAM-1 に対し高い親和性を有するペプチドを結合した低分子量 PEG 脂質を合成した。合成したペプチド結合低分子量 PEG 脂質で修飾した hMSC の、ICAM-1 高発現 hLSME に対する接着能を評価したところ、静置共培養後の接着率の向上、流れ場における移動速度の低減が確認された。また、これらの接着能増強効果はアミノ酸配列特異的であった。したがって、PEG 脂質誘導体による hMSC 表面へのリガンド修飾は、hMSC の接着能の増強に有効な手法であると考えられる。

以上、著者は、間葉系幹細胞を対象として PEG 脂質誘導体を用いた細胞膜表面修飾法の開発に取り組み、修飾量に影響をおよぼす因子を整理すると共に、有機溶剤、CD 共存あるいは超音波照射による修飾量増大法の開発を行った。また、本手法を用いて細胞接着関連分子に親和性を持つペプチドを hMSC 表面に導入することにより、hLSME に対する hMSC 接着のペプチド配列特異的な増強を得た。以上の知見は、PEG 脂質誘導体を用いた細胞の機能分子修飾によって、細胞を標的指向化できる可能性を示したものであり、今後の細胞移植治療の展開に対して有用な情報を提供するものとする。