

京都大学	博士 (薬学)	氏名	高藤 義正
論文題目	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		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>成熟した組織細胞や間葉系幹細胞 (MSC) の移植による組織の再生や修復は、有効な治療法として既に臨床で用いられている。MSC移植による治療効果を向上させる方法として、心筋梗塞モデルマウスにおいて、炎症組織特異的に発現する分子に対する受容体を高発現させたマウスMSCを血管内投与すると、心筋梗塞部位へのMSCの集積数が増大し治療効果が向上することが報告され、治療標的組織に対する細胞接着の改善を目的とした、臨床応用が可能なMSCの細胞表面修飾法の開発が期待されている。細胞表面を機能分子を用いて人工的に修飾する方法としては、遺伝子導入により目的分子の発現を増大させる方法に加えて、細胞膜上の分子と機能分子を化学結合させる方法などもある。しかし、遺伝子導入による方法は発現までに時間がかかる上に発現量のばらつきも大きく、一方、化学結合法には細胞膜上の分子の機能を損なう懸念がある。そこで申請者は、細胞との混和により脂質部分が細胞膜に相互作用することで、短時間かつ簡便な手技で均一に細胞表面に修飾でき、かつ細胞膜上の分子には作用しないポリエチレングリコール (PEG) 脂質誘導体を用いた修飾法に着目した。本研究では、機能分子を結合したPEG脂質誘導体を用いたhMSC表面の修飾における、修飾効率に影響を与える因子の解析と、修飾効率を向上させる技術の開発を行ったのち、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を接着に関わるリガンドペプチドを導入したPEG脂質誘導体で修飾し、血管内皮細胞に対する接着を評価して、機能分子による細胞表面修飾の細胞移植治療における有効性を検証した。</p> <p>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</p> <p>PEG脂質誘導体を用いた機能分子の細胞表面導入において、修飾量の測定は重要な問題である。そこで、fluoresceinを導入したPEG脂質誘導体を合成し、hMSC表面を修飾したのち、フローサイトメトリー法 (FACS) とトリパンプルーによる細胞表面の蛍光消光を組み合わせてhMSC表面の蛍光強度を測定し、修飾量の指標とした。様々な条件下で修飾を行った結果、修飾時間の延長、PEG脂質誘導体添加濃度の上昇、培地温度の上昇とともに修飾量は増大し、培地中に添加した血清濃度の上昇とともに減少した。</p> <p>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</p> <p>PEG脂質誘導体は脂質部分が細胞膜へ相互作用することにより細胞表面に導入されるが、PEG脂質誘導体は水中で脂質部分をコアとした会合体を形成することが報告され、これが細胞修飾の妨げとなることが予想される。そこで、各種物質の添加や超音波照射により、会合体形成を阻害することでPEG脂質誘導体修飾量の増大が得られると考え、検討を行った。有機溶剤もしくはcyclodextrin (CD) を添加剤としてPEG脂質誘導体とともにhMSCに加えたところ、メタノールの添加により修飾量が最大で約10倍、<math>\alpha</math>CDの添加</p>			

により修飾量が最大で約80倍増大した。また、hMSCとPEG脂質誘導体を混和する際に超音波照射を併用することにより、修飾量が最大で約2倍増大した。また、これらの添加剤や超音波照射の併用によるPEG脂質誘導体の修飾量増大効果は、hMSCへの傷害性が認められない条件下で得られることが示された。一方これらの修飾操作がMSCの基本的特性に与える影響を調べるため、マウスから採取した初代培養MSCを用いて骨、脂肪への分化能を評価したところ、PEG脂質誘導体による修飾や超音波照射を受けただけではMSCは通常培地中で骨細胞、脂肪細胞に分化することはなく、一方、分化誘導培地中では骨細胞、脂肪細胞に分化した。以上の結果より、MSCの細胞機能に顕著な影響を与えることなく、細胞表面をPEG脂質誘導体を用いて修飾する手法が確立された。

### 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

細胞接着に関連するIntercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)に対し特異的に結合するLymphocyte function associated antigen-1(LFA-1)のアミノ酸配列において、ICAM-1認識部位に該当する6残基アミノ酸からなるペプチドを、リガンドとしてPEG脂質誘導体に導入したのち、hMSC表面を修飾し、血管内皮細胞に対する接着の増強が得られるか検討した。まず、伸展したヒト肝類洞血管内皮細胞(hLSME)上にhMSCを播種し、共培養後に接着したhMSCとhLSMEの細胞数の比をFACSで測定し、hMSCの接着を評価する手法を確立した。次に、PEG部分の分子量が異なるPEG脂質誘導体を用いて修飾したhMSCの接着を評価した結果、PEG鎖分子量の増大に伴いhMSCの接着が低下することを見出した。そこで、エチレングリコール2量体をスペーサーに用いてペプチドを導入した脂質誘導体を合成し、hMSCを修飾してその接着を評価したところ、修飾を行っていないhMSCと比べてペプチド配列特異的に接着が増大することを確認した。

以上、申請者は、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、修飾量に影響を及ぼす因子を整理すると共に、有機溶剤、シクロデキストリン共存あるいは超音波照射併用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大を得た。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。

(論文審査の結果の要旨)

間葉系幹細胞 (MSC) による細胞移植治療において、炎症組織特異的に発現する分子に対する受容体を高発現させたマウスMSCを心筋梗塞モデルマウスに血管内投与すると、心筋梗塞部位へのMSCの集積数が増大し治療効果が向上することが報告され、治療標的組織に対する細胞接着の改善を目的としたMSCの細胞表面修飾法の開発が期待されている。機能分子を用いた細胞表面の人工的な修飾法としては、遺伝子導入による方法に加えて、細胞膜上の分子と機能分子を化学結合させる方法もあるが、前者では発現までに時間がかかる上に発現量のばらつきも大きく、一方、後者では細胞膜上の分子の機能を損なう懸念がある。そこで申請者は、細胞との混和により脂質部分が細胞膜に相互作用することで、短時間かつ簡便な手技で均一に細胞表面を修飾でき、かつ細胞膜上の分子には作用しないポリエチレングリコール (PEG) 脂質誘導体を用いた修飾法に着目し、修飾効率の向上を図ると共に、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を接着に関わるリガンドペプチドを導入したPEG脂質誘導体で修飾し、血管内皮細胞に対する接着を評価して、細胞移植治療における有効性を検証した。

最初に、fluoresceinを導入したPEG脂質誘導体を合成しhMSC表面を修飾したのち、フローサイトメトリー法 (FACS) とトリパンプルーによる細胞表面の蛍光消光を組み合わせhMSC表面の蛍光強度を測定し表面修飾量を定量する方法を確立した。各種条件下で修飾を行った結果、修飾時間の延長、PEG脂質誘導体添加濃度の上昇、培地温度の上昇とともに修飾量は増大し、培地中に添加した血清濃度の上昇とともに減少した。PEG脂質誘導体は脂質部分が細胞膜へ相互作用することにより細胞表面に導入されるが、水中ではPEG脂質誘導体は脂質部分をコアとした会合体を形成し細胞修飾を妨げる可能性がある。そこで、会合体形成を阻害することで修飾量の増大が得られると考え、有機溶剤もしくはcyclodextrin (CD) を添加剤としてPEG脂質誘導体とともにhMSCに加えた結果、メタノールの添加により修飾量が最大で約10倍、 $\alpha$  CDの添加により修飾量が最大で約80倍増大した。また、hMSCとPEG脂質誘導体を混和する際に超音波照射を併用することにより、修飾量が最大で約2倍増大した。これらの処理はhMSCに傷害を与えず、またマウスから採取した初代培養MSCを通常培地中においては骨や脂肪細胞に分化させないことが確かめられた。一方、骨細胞、脂肪細胞への分化を誘導する分化誘導培地中では正常な分化を阻害しないことも確認され、MSCの細胞機能に顕著な影響を与えることなく、細胞表面をPEG脂質誘導体を用いて修飾する手法が確立された。

さらに、細胞接着に関連するintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) に対し特異的に結合するlymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) のアミノ酸配列中のICAM-1認識部位に該当する6残基アミノ酸からなるペプチドをリガンドとして導入したPEG脂質誘導体を用いてhMSC表面を修飾し、血管内皮細胞に対する接着の増強が得られるか検討した。まず、伸展したヒト肝類洞血管内皮細胞 (hLSME) 上にhMSCを播種し共培養後に接着したhMSCとhLSMEの細胞数の比をFACSで測定することによりhMSCの接着

を評価する手法を確立し、PEG部分の分子量が異なるPEG脂質誘導体を用いて修飾したhMSCの接着を評価した結果、PEG鎖分子量の増大に伴いhMSCの接着が低下することを見出した。そこで、エチレングリコール2量体をスペーサーに用いてペプチドを導入した脂質誘導体を合成しhMSCを修飾して、血管内皮細胞に対する接着を評価した結果、ペプチド配列特異的に接着が増大した。さらに、底面にヒト肝類洞血管内皮細胞を接着させたフローチャンバー中の細胞の移動を蛍光顕微鏡で観察した結果、リガンドによる相互作用を反映した修飾hMSCを移動速度の低下が確認された。

以上、申請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を行い、修飾条件を確立した後、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表面に導入し、ペプチド配列特異的なhLSMEに対するhMSC接着の増大およびフローチャンバー中における移動の低下を得た。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、細胞の動態を制御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。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものとする。また、平成26年2月25日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものとする。公表に際しては、（当分の間）当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとするものとする。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降