

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

総論の部

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---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

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-----15

第一節 添加剤による hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾の向上-----15

- 1-a 低分子量 PEG 脂質誘導体の合成と質量分析
- 1-b 有機溶剤、CD、低分子量 PEG 脂質誘導体による細胞傷害性の評価
- 1-c 有機溶剤の添加による修飾向上効果
- 1-d NMR による CD と PEG 脂質誘導体の分子間相互作用解析
- 1-e CD の添加による修飾向上効果
- 1-f CD 共存下での血清濃度が修飾におよぼす影響
- 1-g CD を添加した際の修飾の安定性評価
- 1-h 考察

第二節 超音波照射による hMSC 表面への PEG 脂質誘導体修飾の向上-----29

- 2-a 超音波照射手技の確立
- 2-b 超音波照射による細胞傷害性の評価
- 2-c 超音波照射による修飾向上効果

2-d	超音波照射が分化能におよぼす影響	
2-e	考察	
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	38
第一節	hMSC の接着能評価法の確立	39
1-a	接着細胞数にもとづく接着能評価法の確立	
1-b	流れ場における移動速度にもとづく接着能評価法の確立	
1-c	hLSME 表面における ICAM-1 発現量の測定	
1-d	考察	
第二節	PEG 脂質誘導体の修飾が hMSC の接着能におよぼす影響	43
2-a	plastic dish への接着に対する影響	
2-b	hLSME への接着に対する影響	
2-c	hLSME 上での移動速度に対する影響	
2-d	考察	
第三節	ペプチドリガンド導入低分子量 PEG 脂質誘導体の修飾による hMSC の接着増強	49
3-a	ペプチドリガンド導入低分子量 PEG 脂質誘導体の合成と質量分析	
3-b	hLSME への接着に対するペプチド修飾の効果	
3-c	hLSME 上での移動速度に対するペプチド修飾の効果	
3-d	考察	
結論		55
謝辞		57
実験の部		
第一章	実験の部	58
第二章	実験の部	62
第三章	実験の部	65
引用文献		69

総論の部

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。

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。

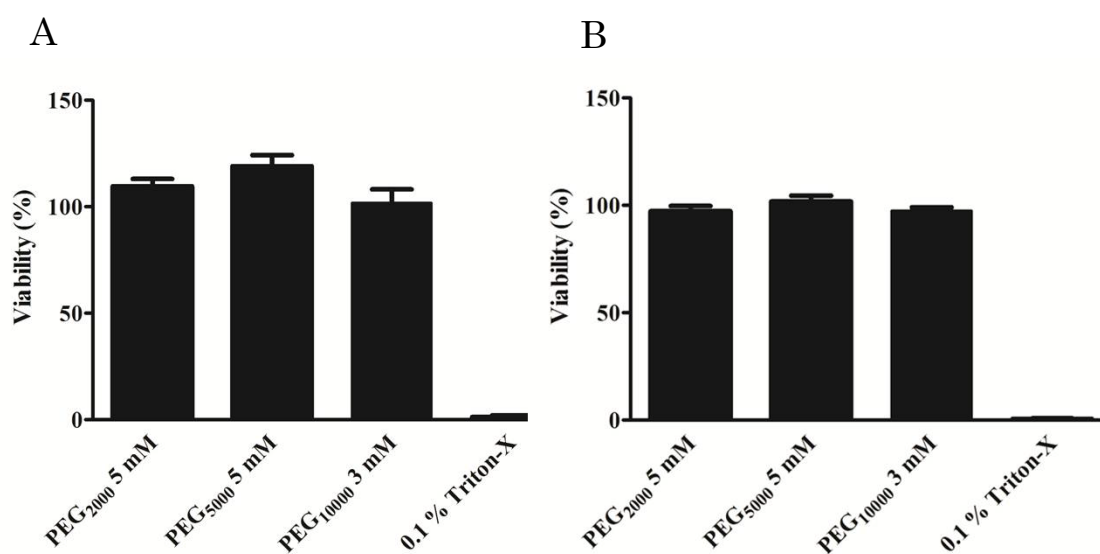


Fig. 1 Cell viability of hMSCs treated with Flu-PEG-DSPE.

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)。

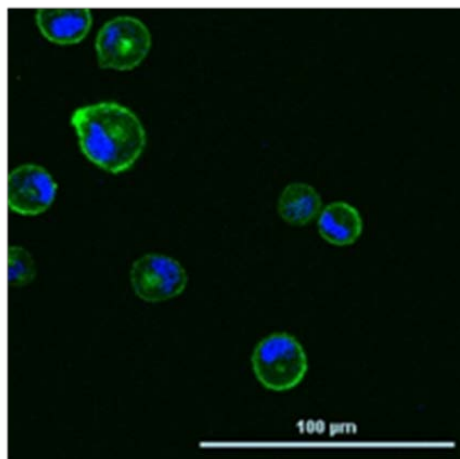


Fig. 2 Observation of modified hMSC.

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 ble (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。

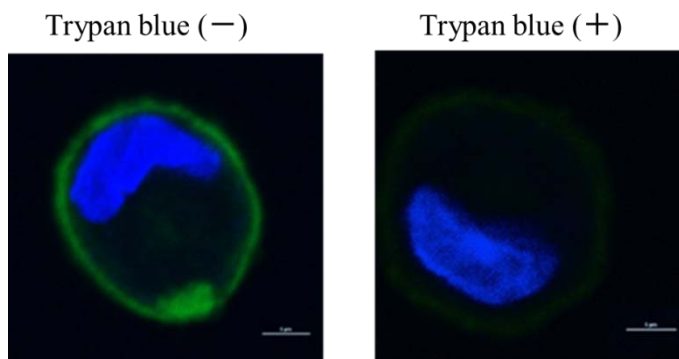


Fig. 3 Effect of TB on fluorescence on hMSC surface.

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)。

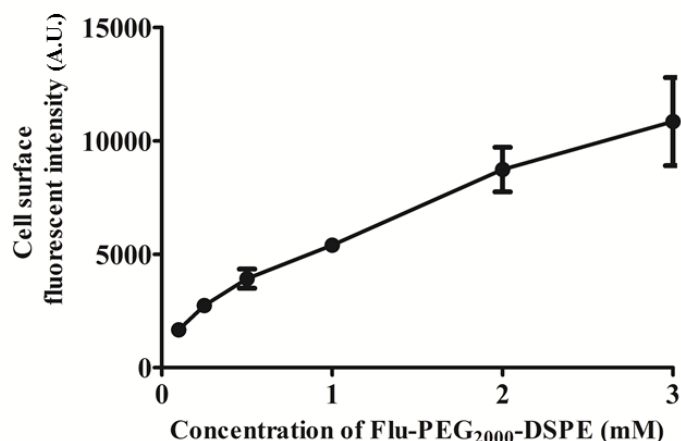


Fig. 4 Influence of concentration of Flu-PEG-DSPE on cell surface modification efficiency.

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)。

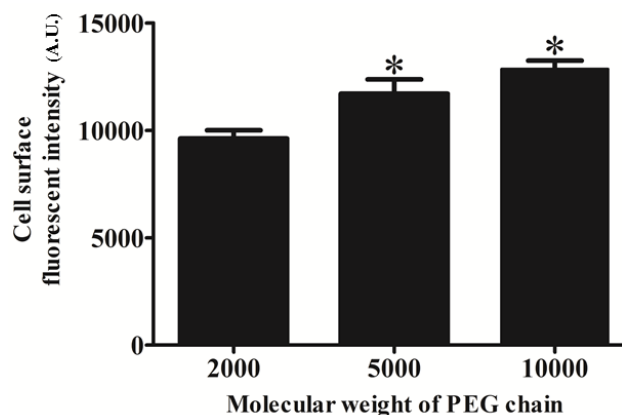


Fig. 5 Influence of the molecular weight of the PEG chain on cell surface modification efficiency.

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)。

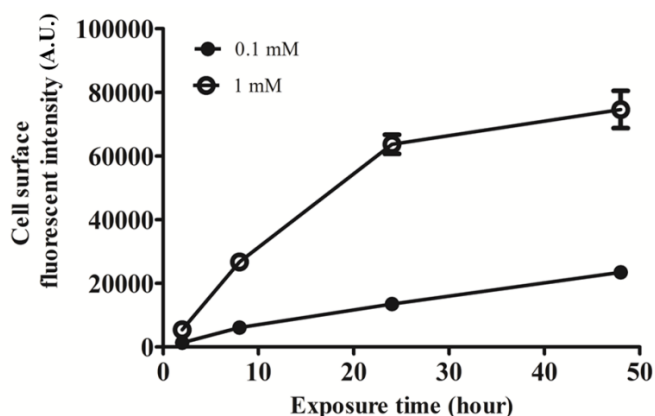


Fig. 6 Influence of exposure time on cell surface modification efficiency.

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。

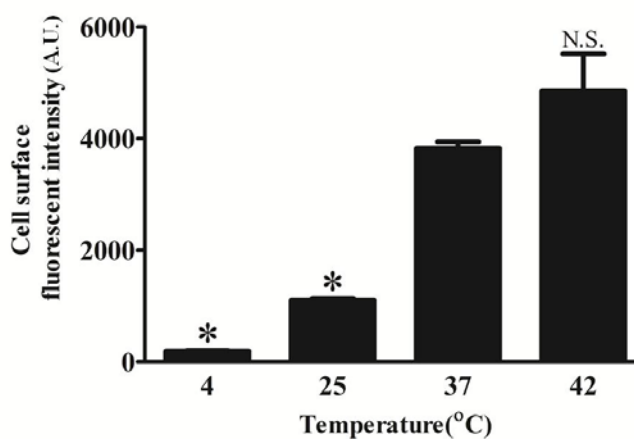


Fig. 7 Influence of temperature on cell surface modification efficiency.

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)。

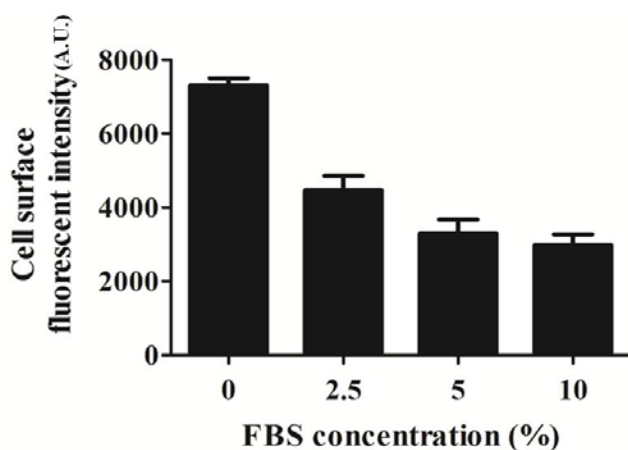


Fig. 8 Influence of FBS concentration on cell surface modification efficiency.

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)。

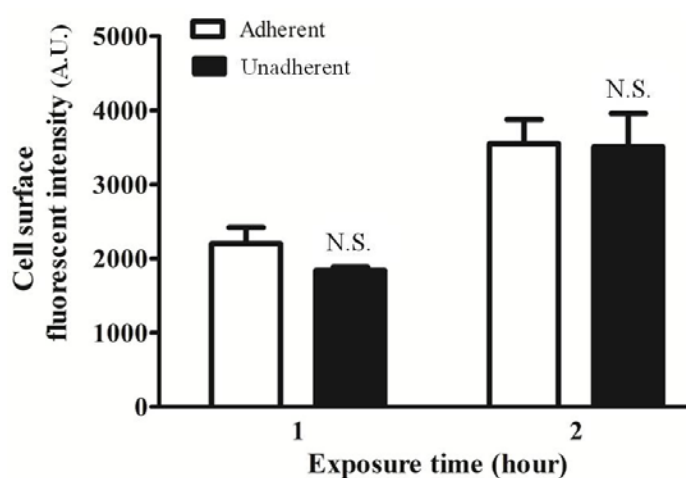


Fig. 9 Influence of incubation method on cell surface modification efficiency.

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)。

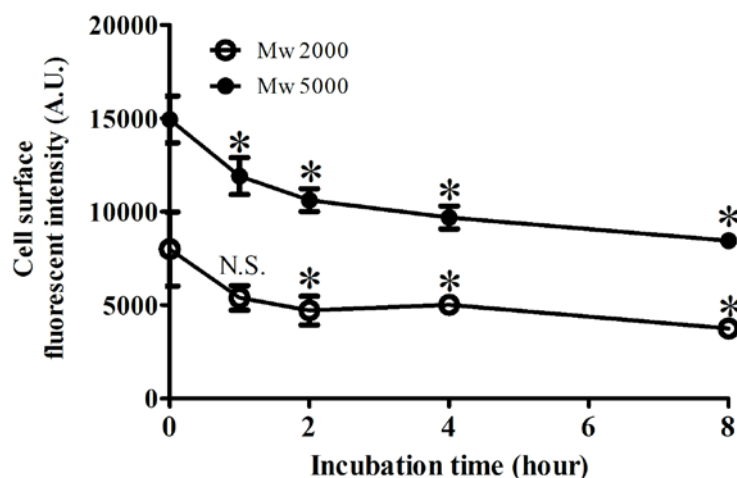
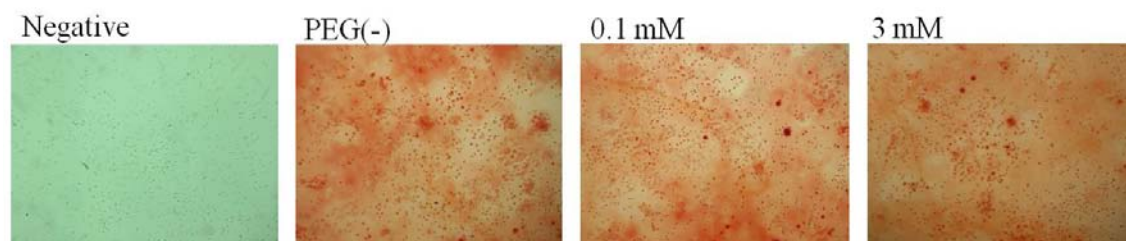


Fig. 10 Stability of hMSC surface modification with Flu-PEG-DSPE. Unadherent hMSCs were modified with 1 mM Flu-PEG-DSPE for 2 h at 37 °C, and modified hMSCs were suspended in the medium containing 10 % FBS and rotated at 3-s intervals for the indicated times at 37 °C in an incubator. Statistical significance 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、初代培養マウス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およぼさないことが示された。

A



B

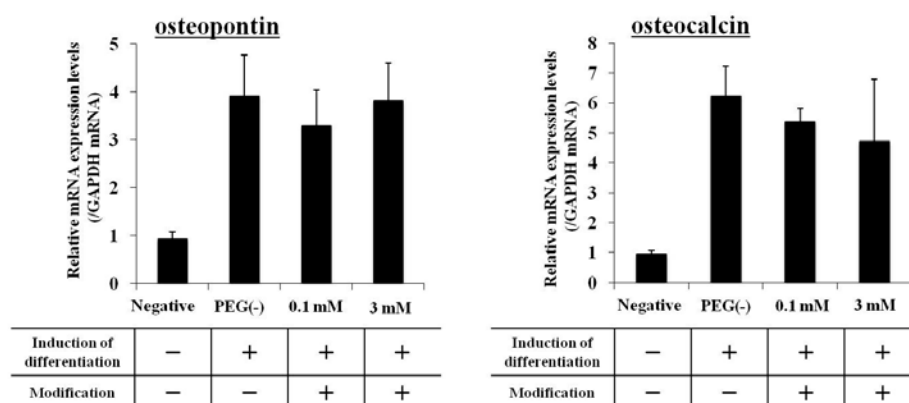


Fig. 11 Influence of mMSC surface modification with PEGylated lipid on osteogenic differentiation.

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およぼさないことが示された。

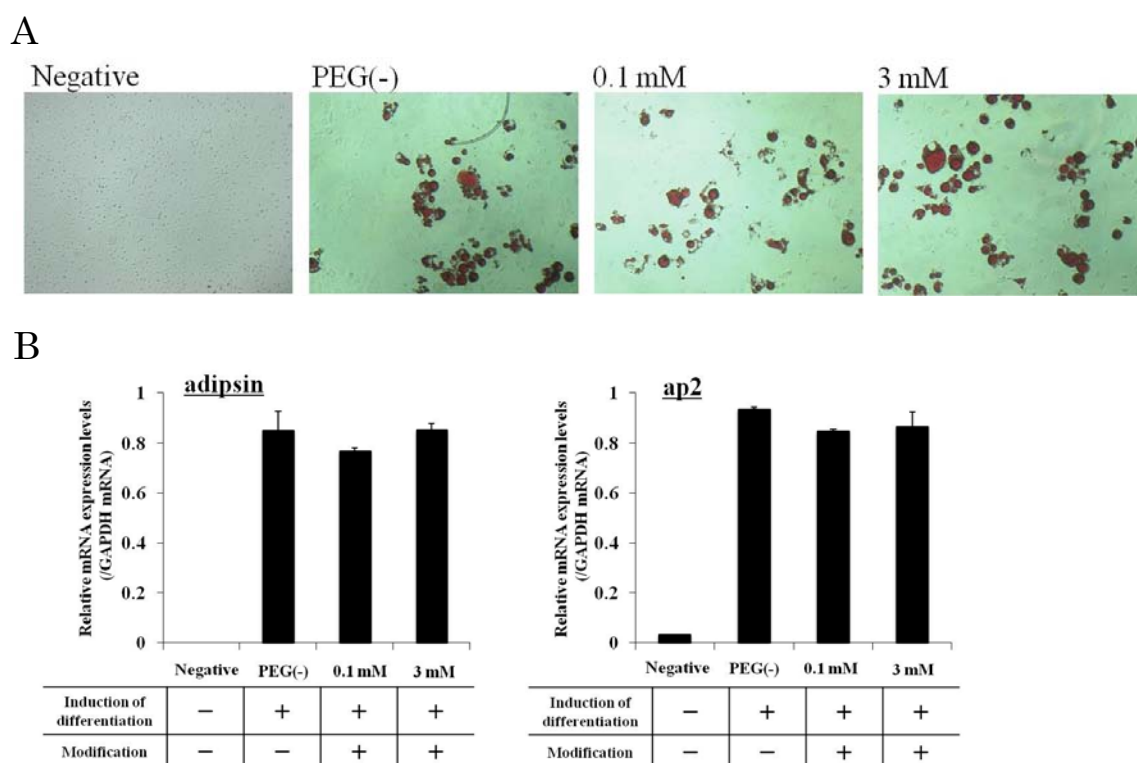


Fig. 12 Influence of mMSC surface modification with PEGylated lipid on adipogenic differentiation.

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。

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

前章における検討の結果、修飾量に影響をおよぼす因子を明らかにし、その影響の程度を整理できた。しかしながら、1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを用いて24時間培養を行った後でも、hMSC表面に修飾されたPEG脂質誘導体量はhMSCに加えた量の約0.3%であり、培養液中で細胞膜表面へ修飾できるPEG脂質誘導体の利用効率は低かった。また、高修飾量のhMSCを調製するためには、長時間の培養や、高濃度のPEG脂質誘導体溶液を用いる必要があった。したがって、PEG脂質誘導体のhMSC表面への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、PEG脂質誘導体は疎水性基であるDSPE同士が相互作用して会合体を形成し、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のではないかと考えた。実際、前章でPEG脂質誘導体の修飾に用いた濃度は100 μ M~3 mMだったが、一方で、本研究で用いているPEG脂質誘導体と同じDSPEを脂質部分に持ち、PEG鎖分子量が約2000のPEG脂質誘導体の臨界ミセル濃度は2~10 μ Mであることが報告されている^{42,43}。したがって、修飾の際にPEG脂質誘導体の一部は培養液中で会合体を形成していると考えられる。そこで、会合体形成の抑制により、培養液中で単量体として存在するPEG脂質誘導体量を増加させれば、細胞膜との相互作用が増大し、細胞膜表面へのPEG脂質誘導体の修飾量も増大できると考えた。

本章では、各種物質の添加や、超音波照射による外部刺激によって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。

第一節 添加剤によるhMSC表面へのPEG脂質誘導体修飾の向上

DSPEと同じ長さのアルキル鎖を持つステアリン酸ナトリウムは水溶液中でミセルを形成するが、methanol (MeOH)やethanol (EtOH)を加えると臨界ミセル濃度が上昇し、ミセルが不安定化されることが報告されている⁵⁹。したがって、MeOH、EtOHはPEG脂質誘導体の会合体形成を抑制し、修飾量向上効果を示すことが期待できる。また、MeOHと同程度の溶解度パラメータを有し、脂溶性の高い薬物を生細胞へ添加する際の溶解補助剤として用いられているdimethyl sulfoxide (DMSO)^{60,61}も、PEG脂質誘導体の会合体形成を抑制し、修飾向上効果を示すことが期待できる。

cyclodextrin (CD)は、D-グルコースが環状に結合したオリゴ糖であり、分子環内に疎水性化合物を内包する⁶²⁻⁶⁵。そのため、グルコースがそれぞれ6、7、8つ結合した α CD、 β CD、 γ CDや、その誘導体は疎水性化合物の可溶化剤、安定化剤として用いられている⁶²⁻⁶⁵。特に α CDおよび β CDは、それぞれ、両親媒性分子である4,4'-bpy-N-(CH₂)₁₀-OC₆H₃-3,5-tBu₂⁶⁶およびperfluoroalkyl surfactant⁶⁷の会合体の形成を抑制することが報告されている。したがって、CDもPEG脂質誘導体の会合体形成の抑制が期待できる。一方、メチル化 β CD (M β CD)は、細胞膜からコレステロールを引き抜き⁶⁸、細胞膜の流動性を上昇させることが知られており⁶⁹⁻⁷¹、他のCD種と異なる機序でPEG脂質誘導体の修飾に関与する可能性も考えられる。

そこで本節では、PEG脂質誘導体を用いたhMSCの修飾における、3種類の有機溶剤(MeOH、EtOH、DMSO)と4種類のCD(α CD、M β CD、 β CD、 γ CD)の添加の影響について検討した。

1-a 低分子量PEG脂質誘導体の合成と質量分析

低分子量かつ分子量分布の無いPEG脂質誘導体(EG unit; 2, 6, 12, 24)を合成し、質量分析を行ったところ、いずれも理論分子量とほぼ一致する結果を得た(Fig. 13)。

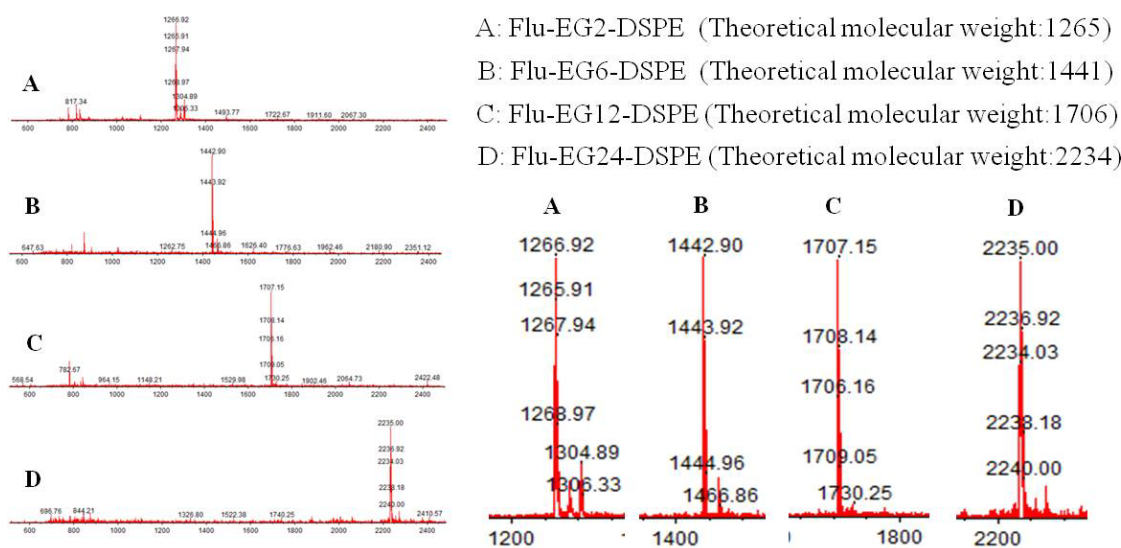


Fig. 13 Mass spectra of Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24).

Molecular weights of synthesized Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24) were analyzed by MALDI-TOFMS (Matrix assisted laser desorption/ ionization- time of flight mass spectrometry).

1-b 有機溶剤、CD、低分子量 PEG 脂質誘導体による細胞傷害性の評価

本節で添加剤として用いる有機溶剤および CD の、接着 hMSC に対する細胞傷害性を評価した。有機溶剤(MeOH、EtOH、DMSO)については 1、2.5、5、10、20 %の濃度で行い、CD (α CD、M β CD)については、5、10、25、50 mM の濃度で行った。その結果、有機溶剤については 10 %以上の濃度かつ 60 分以上の培養時間の群におけるほぼ全てで生存率が顕著に低下し、細胞傷害性が認められた(Fig. 14)。CD については 25 mM 以上の濃度かつ 30 分以上の培養時間の群におけるほぼ全てで生存率が顕著に低下し、細胞傷害性が認められた(Fig. 15)。そのため、以後の PEG 脂質誘導体の修飾に際しては、有機溶剤については 10 % 以下の濃度かつ 30 分以下の培養時間、CD については 10 mM 以下の濃度かつ 30 分以下の培養時間で行うこととした。

また、4 種類の低分子量 PEG 脂質誘導体(EG unit: 2, 6, 12, 24)を有機溶剤や CD を用いて接着 hMSC に導入した際の細胞傷害性を評価した。低分子量 PEG 脂質誘導体は水溶性が低く、そのままでは DMEM に溶解しないため、あらかじめ少量の DMSO に溶解し、5 mM の α CD を含む DMEM に加えた。また、DMSO の最終濃度は 5 %とした。結果、0.5 mM の Flu-EG2-DSPE、Flu-EG6-DSPE および 0.05 mM の Flu-EG12-DSPE、Flu-EG24-DSPE を用いて 30 分培養した群は、PEG 脂質、DMSO、CD を加えずに培養した群と比較していずれも顕著な生存率の低下を示さなかった(Fig. 16)。

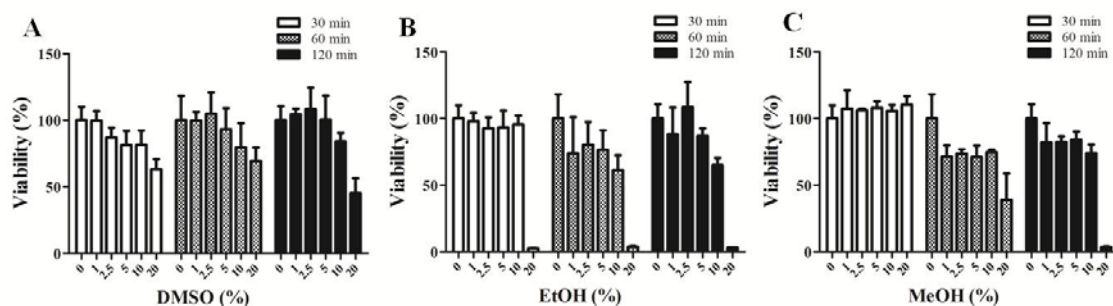


Fig. 14 Cell viability of hMSCs treated with organic solvents.

Cell viability of hMSCs was evaluated by CCK-8 assay following treatment with 1, 2.5, 5, 10, 20 % of DMSO (A), EtOH (B) and MeOH (C) for 30, 60 and 120 min in 10 % FBS containing DMEM at 37 °C . Each result represents the mean \pm S.D. (n=4).

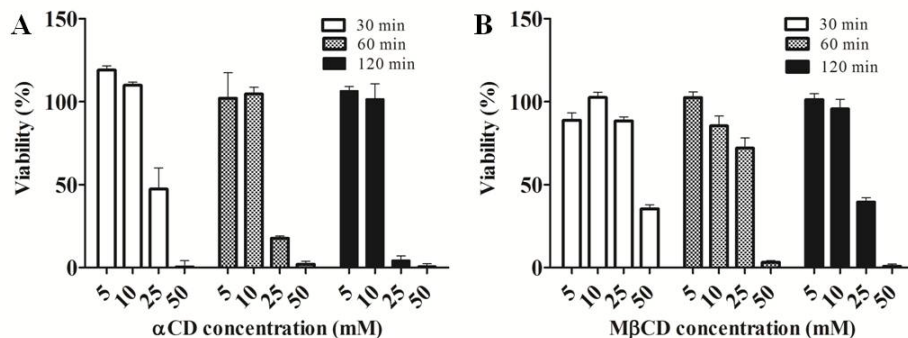


Fig. 15 Cell viability of hMSCs treated with αCD and MβCD.

Cell viability of hMSCs was evaluated by CCK-8 assay following treatment with 5, 10, 25 and 50 mM of αCD (A) and MβCD (B) for 0.5, 1 and 2 hours in 10 % FBS containing DMEM at 37 °C. Each result represents the mean ± S.D. (n=4).

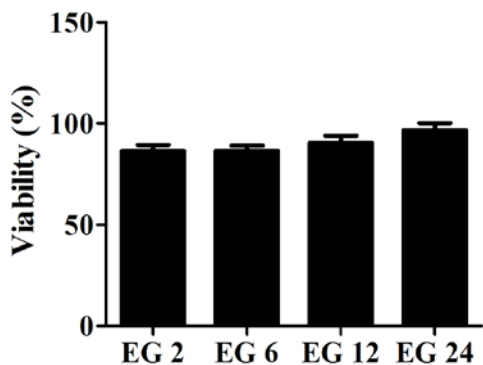


Fig. 16 Cell viability of hMSCs treated with Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24).

Cell viability of hMSCs was evaluated by CCK-8 assay following treatment with 0.5 mM of Flu-EG2-DSPE, 0.5 mM of Flu-EG6-DSPE, 0.05 mM of Flu-EG12-DSPE and 0.05 mM of Flu-EG24-DSPE for 0.5 hour at 37 °C in DMEM containing 5 mM of αCD and 5 % of DMSO. Each result represents the mean ± S.D. (n=5).

1-c 有機溶剤の添加による修飾向上効果

有機溶剤の添加によるPEG脂質誘導体修飾の向上効果を検証するため、非接着hMSCを1、10%のMeOH、EtOH、DMSOおよび0.1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で30分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、全ての有機溶剤添加群で添加濃度依存的に細胞表面蛍光強度が増大した(Fig. 17)。特に10%のMeOHを加えた群が最も修飾向上効果が高く、有機溶剤未添加群と比べて約10倍の細胞表面蛍光強度を示した。

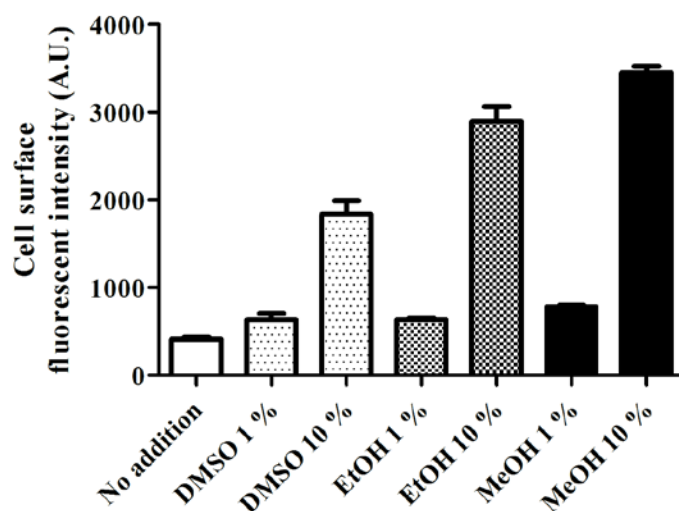


Fig. 17 Influence of addition of organic solvent on cell surface modification.

Unadherent hMSCs were incubated with 0.1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE and 1 and 10 % of DMSO, EtOH and MeOH at 37 °C for 0.5 h. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

1-d NMRによるCDとPEG脂質誘導体の分子間相互作用解析

CDに包接された化合物は、¹HNMRにおけるシグナルの化学シフト値が変化し^{66, 67, 72}、ポリマーにCDが包接した場合は、部分的に化学シフト値が変化することによってシグナルの幅が広く変形する⁷³。そこで、CDとPEG脂質誘導体の分子間相互作用を確認するため、1 mMもしくは10 mMの α CDおよびM β CDと、1 mMのCH₃-PEG₂₀₀₀-DSPEを混和して¹HNMRスペクトルを測定した。CDおよびDSPE-PEG-CH₃の予測化学シフト値はCHEMDRAW (Ver 6.0)を用いて算出した (Fig. 18)。測定の結果、両者を混合した群では、CH₃-PEG₂₀₀₀-DSPEのアルキル鎖のプロトンに該当する1.1-1.2 ppm付近のシグナル幅が広くなり、特に10 mMの α CD添加群(1)では1.3 ppm付近に新しいシグナルが出現した(Fig. 19)。これらの結果から、CDはPEG脂質誘導体の脂質部分を包接していることが確認された。

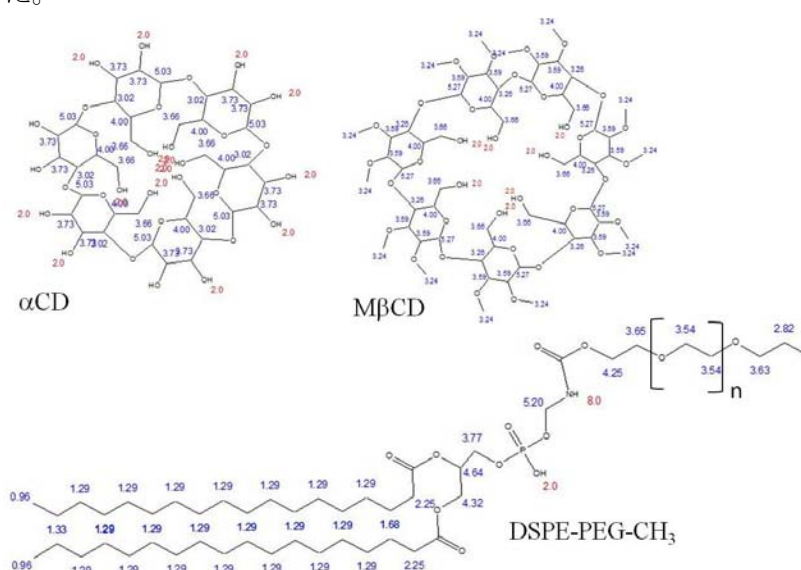
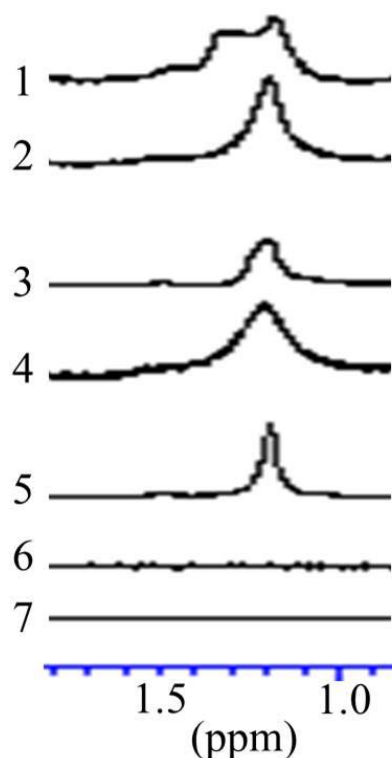


Fig. 18 Predicted chemical shift.

Chemical shift of α CD, M β CD and DSPE-PEG-CH₃ was calculated by CHEMDRAW (Ver 6.0).



No.	PEG-DSPE	α CD	M β CD
1	1 mM	10 mM	—
2	1 mM	1 mM	—
3	1 mM	—	10 mM
4	1 mM	—	1 mM
5	1 mM	—	—
6	—	10 mM	—
7	—	—	10 mM

Fig. 19 ^1H NMR spectra.

^1H NMR spectra of $\text{CH}_3\text{-PEG}_{2000}\text{-DSPE}$, αCD , M βCD and the mixture of $\text{CH}_3\text{-PEG}_{2000}\text{-DSPE}$ and αCD or M βCD (0.9-1.8 ppm) were analyzed. $\text{CH}_3\text{-PEG}_{2000}\text{-DSPE}$ and CDs were solved in D_2O for measurement.

1-e CDの添加による修飾向上効果

CDがPEG脂質誘導体の脂質部分を包接することが確認できたため、次にCDの添加によるPEG脂質誘導体修飾の向上効果を検証した。非接着hMSCを0.1、0.25、0.5、1、2.5、10 mMの αCD および0.1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で30分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、 αCD 濃度依存的に細胞表面蛍光強度が増大し、10 mMの αCD 添加群ではCD未添加群と比べて約80倍の細胞表面蛍光強度を示した (Fig. 20)。

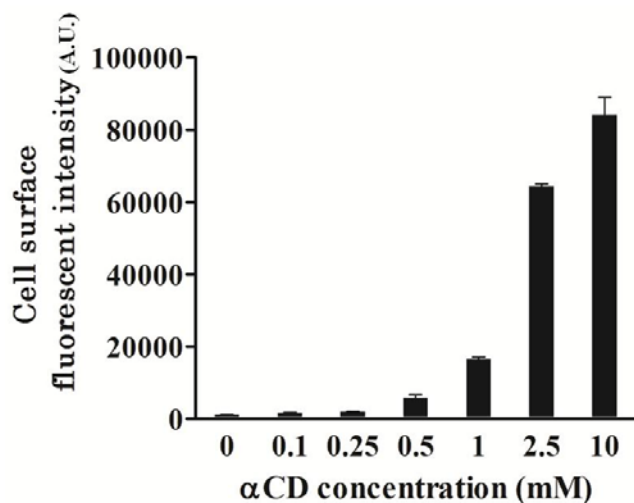
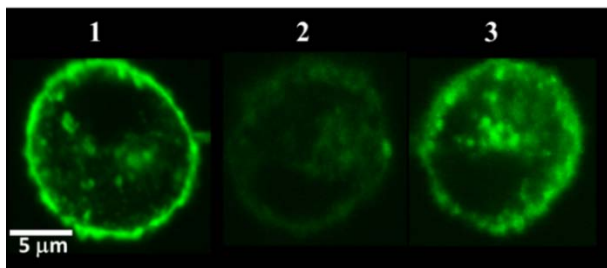


Fig. 20 Influence of addition of αCD on cell surface modification.

Unadherent hMSCs were modified with 0.1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE and 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 and 10 mM of αCD at 37 °C for 0.5 h. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

次に、0.1、1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEのみを含むDMEM中で120分培養した非接着hMSCと、0.1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEおよび10 mMの α CDを含むDMEM中で10分培養した非接着hMSCを共焦点蛍光顕微鏡で観察した。いずれのhMSCについても細胞表面に蛍光が観察されたが、CDを加えた群(1)は修飾時間が短く、修飾に用いたPEG脂質誘導体濃度が低いにもかかわらず、細胞表面に強い蛍光が確認された (Fig. 21)。



No.	1	2	3
Flu-PEG ₂₀₀₀ -DSPE	0.1 mM	0.1 mM	1mM
α CD	10 mM	—	—
Incubation time	10 min	120 min	120 min

Fig. 21 Influence of CD on cell surface modification.

Unadherent hMSCs were modified by 0.1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE with or without 10 mM of α CD were observed by confocal microscope. Scale bars, 5 μ m.

そこで、CD種による修飾向上効果の違いを評価するため、非接着hMSCを1、2.5、5、10 mMの4種のCD (α CD、M β CD、 β CD、 γ CD) および0.1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で30分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、全てのCD濃度において細胞表面蛍光強度は α CD、M β CD、 γ CD、 β CDの順で高かった (Fig. 22)。また、 α CD、M β CDは5 mMで細胞表面蛍光強度がほぼプラトーに達したのに対し、 γ CD、 β CDでは10 mMまでCD濃度にほぼ比例して細胞表面蛍光強度が増大した。

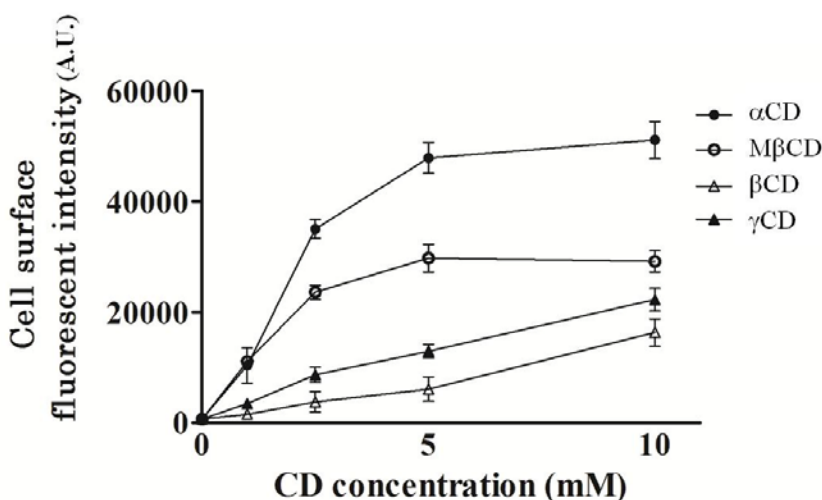


Fig. 22 Influence of different CD on cell surface modification.

Unadherent hMSCs were modified with 0.1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE and 1, 2.5, 5 and 10 mM of α CD, M β CD, β CD and γ CD at 37 °C for 0.5 h. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

α CD共存下でのPEG鎖分子量による修飾への影響を評価するため、非接着hMSCを 0.1、1、10 mM の α CD および 0.1 mM の Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE、Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE、Flu-PEG₁₀₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で 30 分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 α CD添加群においてもPEG鎖分子量が低いほど修飾量は多く、 α CD濃度が高い群ほどその傾向は顕著であった (Fig. 23)。

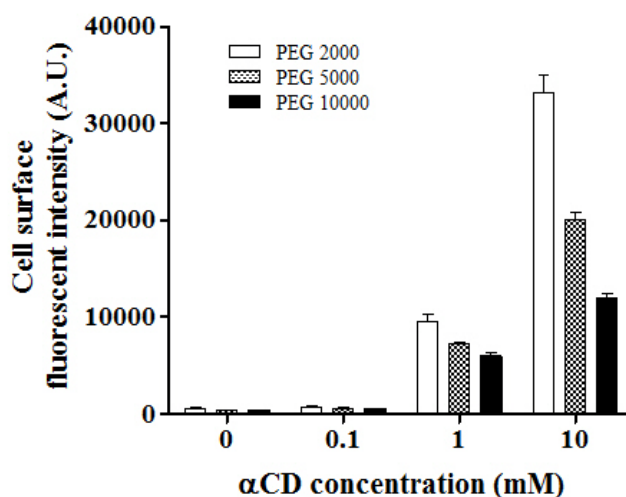


Fig. 23 Influence of addition of α CD on cell surface modification with various Flu-PEG-DSPE (PEG Mw: 2000, 5000 and 10000).

Unadherent hMSCs were modified with 0.1 mM of Flu-PEG-DSPE (molecular weight of PEG is 2000, 5000 and 10000) and 0.1, 1 and 10 mM of α CD at 37 °C for 0.5 h. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

次に、4種類の低分子量PEG脂質誘導体に対して同様の検討を行うため、非接着hMSCを1、2、5 mMの α CD、5%のDMSOおよび0.1 mMの各Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24)含むDMEM中で30分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PEG脂質誘導体に対しても、 α CDの添加による修飾向上効果が確認された (Fig. 24)。また、いずれの α CD濃度群においてもPEG鎖分子量が低いほど細胞表面蛍光強度は低くなり、Fig. 23とは逆の傾向を示した。これはPEG脂質誘導体の水溶性の違いに起因すると考えられる。

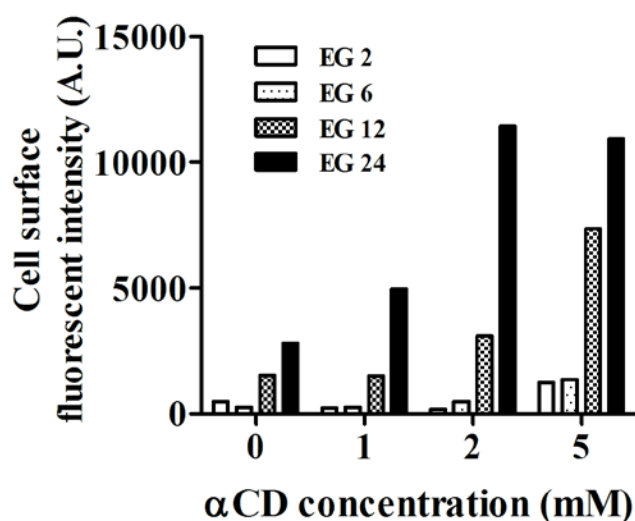


Fig. 24 Influence of addition of α CD on cell surface modification with various Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24).

Unadherent hMSCs were modified with 0.1 mM of Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24) for 0.5 hour at 37 °C in DMEM containing 1, 2, 5 mM of α CD and 5 % of DMSO. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. (n = 1).

M β CDは細胞膜からコレステロールを引き抜く作用を有することが知られており⁶⁸⁻⁷¹、その作用がPEG脂質の修飾に影響をおよぼしている可能性が考えられる。そこで、その影響を検討するため、非接着hMSCを10 mMのM β CDを含むDMEM中で10分間培養した後、培養液を0.1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEMに交換し10分間培養した前処理群と、これまでと同様に10 mMのM β CDおよび0.1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で10分間培養した共存群において両者の細胞表面蛍光強度を測定した。その結果、共存群では顕著に細胞表面蛍光強度が増大したのに対し、前処理群ではM β CD未添加群と同程度の細胞表面蛍光強度を示した(Fig. 25)。このことからPEG脂質誘導体の修飾を向上するためには、PEG脂質誘導体とM β CDが同時に培養液中に存在することが必要であることが明らかとなった。

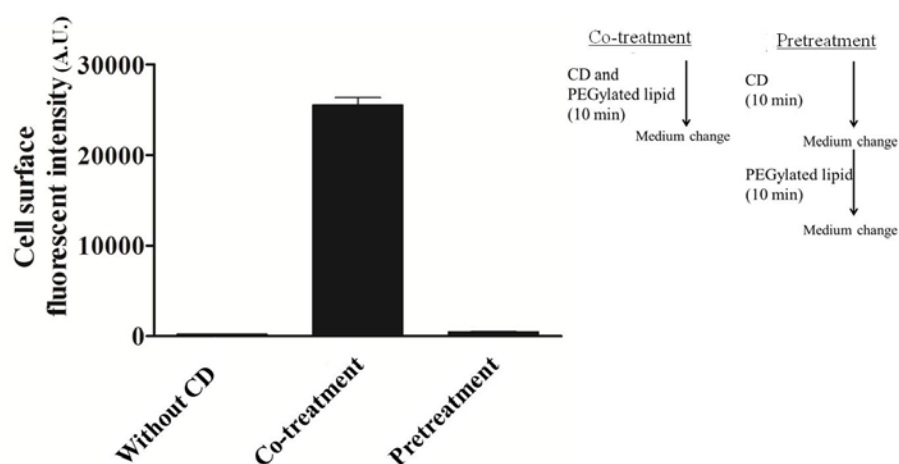


Fig. 25 Influence of procedure for CD addition on cell surface fluorescent intensity.

Unadherent hMSCs were modified with 0.1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE and 10 mM of M β CD together or respectively for 10 min. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. (n=3).

1-f CD 共存下での血清濃度が修飾におよぼす影響

α CD共存下での細胞表面修飾へのFBS濃度の影響を評価するため、10 mMの α CDおよび0.1 mMのFlu-PEG₂₀₀₀-DSPEを含む異なるFBS濃度のDMEM中で非接着hMSCを30分培養し、細胞表面蛍光強度を測定した。その結果、10%までのFBS濃度では、FBS濃度の増大に伴い細胞表面蛍光強度が増大したが、20%の群は10%群より低下した(Fig. 26)。

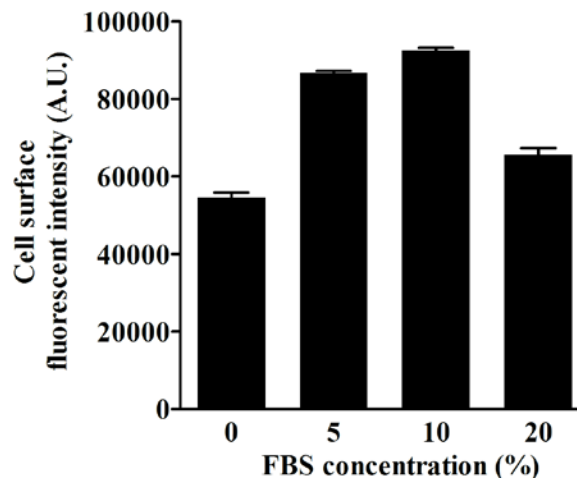


Fig. 26 Influence of FBS concentration on cell surface modification in the presence of CD.

Unadherent hMSCs were modified with 0.1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE and 10 mM of α CD in DMEM containing 0, 5, 10 and 20 % FBS at 37 °C for 0.5 h. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

1-g CD を添加した際の修飾の安定性評価

α CDの共存下、Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEおよびFlu-PEG₁₀₀₀₀-DSPEで修飾したhMSCについて、修飾の安定性を評価するため、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。その結果、8 時間転倒混和後には修飾直後と比べて分子量 2000 の群では 44 %、分子量 10000 の群では 26 %の細胞表面蛍光強度を示した (Fig. 27)。

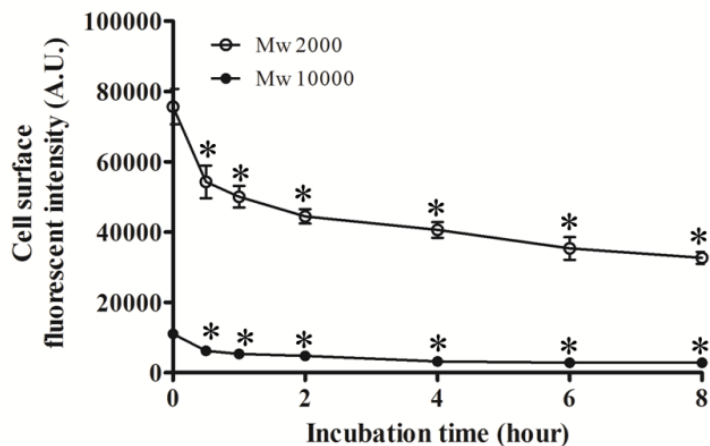


Fig. 27 Stability of hMSC surface modification with Flu-PEG-DSPE enhanced with α CD.

Unadherent hMSCs were modified with 0.1 mM Flu-PEG-DSPE and 10 mM of α CD for 30 min 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).

さらに、 α CD、DMSO と共に 4 種類の低分子量 PEG 脂質誘導体で修飾した hMSC についても同様の検討を行ったところ、8 時間転倒混和後には修飾直後と比べて EG2 の群では 78 %、EG6 の群では 71 %、EG12 の群では 65 %、EG24 の群では 65 %の細胞表面蛍光強度を示した (Fig. 28)。

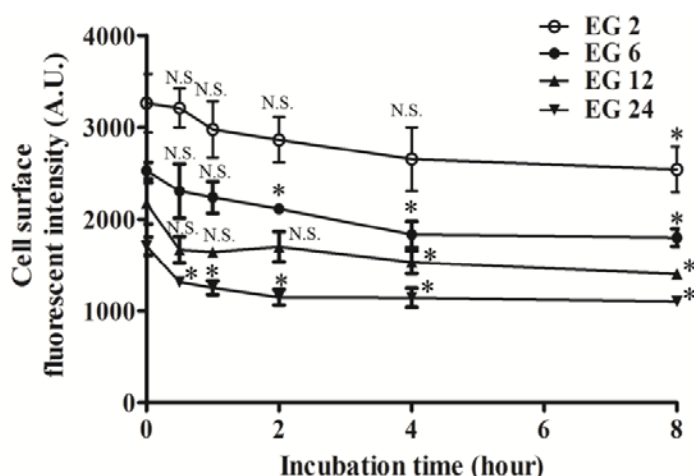


Fig. 28 Stability of hMSC surface modification with Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24) enhanced with α CD. Unadherent hMSCs were modified with 0.1 mM of Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24) for 0.5 hour at 37 °C in DMEM containing 5 mM of α CD and 5 % of DMSO. Then, modified hMSCs were suspended in 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-h 考察

本節では、3種類の有機溶剤と4種類のCDを添加剤としてPEG脂質誘導体と共にhMSCに加えて修飾を行い、修飾向上効果を検討した。

まず、接着hMSCに対する有機溶剤およびCDの細胞傷害性の評価を行い(Figs. 14, 15)、有機溶剤については10%以下の濃度かつ30分以下の培養時間、CDについては10 mM以下の濃度かつ30分以下の培養時間の条件であれば細胞傷害性が認められないことを確認した。

3種類の有機溶剤の添加による修飾向上効果を検証したところ、全ての有機溶剤添加群において、添加濃度依存的に修飾量が増大した(Fig. 17)。修飾向上効果はMeOH、EtOH、DMSOの順に高く、10%のMeOHを加えた群は、未添加群と比べて約10倍の修飾量を示した。この結果は、有機溶剤の添加によってPEG脂質誘導体の脂質部分同士の相互作用が弱まり、会合体と単量体の平衡が、単量体の量が増える方向へ変化したことに起因すると考えられる。

CDは、両親媒性分子の会合体形成を抑制する作用があり^{66, 67}、さらにCDがそれらの両親媒性分子に対して包接することの確認に¹HNMRによる分析が用いられている^{66, 67, 72, 73}。CDに包接された化合物は¹HNMRシグナルの化学シフト値が変化することが知られており^{66, 67, 72}、ポリマーにCDが包接した場合は、ポリマーのプロトンの一部だけが化学シフト値の変化を起こし、シグナルの幅が広がることが報告されている⁷³。そこで、PEG脂質誘導体に対するCDの包接を確認するため、CHEMDRAW(Ver 6.0)を用いて算出したDSPE-PEG-CH₃の予測化学シフト値(Fig. 18)におけるDSPE部分のプロトンが該当する範囲で測定したところ、CD添加群では、DSPE由来のシグナルの幅が広くなり、 α CDを10倍モル比で添加した群では新しいシグナルが出現した(Fig. 19)。これらの結果から、CDはPEG脂質の脂質部分を包接していることが確認された。

次に、 α CDの添加によるPEG脂質誘導体の修飾向上効果を検討したところ、 α CDの添加

濃度依存的に修飾量が増大し、10 mMの α CD添加群ではCD未添加群と比べて約 80 倍の修飾量を示した (Fig. 20)。さらに、 α CDを添加して修飾したhMSCを共焦点蛍光顕微鏡で観察すると、修飾時間が短く、修飾に用いたPEG脂質誘導体濃度が低いにもかかわらず、細胞表面に強い蛍光が確認された (Fig. 21)。4 種類のCDについても修飾向上効果を評価したところ、全てのCDは修飾向上効果を示し、 α CD、M β CD、 γ CD、 β CDの順でその効果が高かった (Fig. 22)。また、 α CD、M β CD は5 mMで修飾量がほぼプラトーに達したのに対し、 γ CD、 β CDでは 10 mMまでCD濃度にほぼ比例して修飾量が増大した。CDと疎水性化合物の相互作用の強さには、CDの内径と疎水性化合物の分子サイズが大きく影響し、最も内径が小さい α CDは鎖状の細長い分子、 β CDは芳香環を有する分子、 γ CDはステロイドなどの嵩高い分子に対して強く相互作用する⁶²⁻⁶⁵。今回の検討で α CDが最も高い修飾向上効果を示した理由は、脂質部分が鎖状の細長い分子であるため他のCDよりも強く相互作用し、PEG脂質誘導体の会合体形成を抑制する効果が最も高かったことに起因すると考えられる。また、M β CDが β CDより高い修飾向上効果を示した理由は、メチル化によって脂質部分との相互作用が増大したことに起因すると考えられる。一方、 γ CDは β CDより内径が大きくアルキル鎖に対する相互作用は β CDより低いと考えられるが、実際には β CDより高い修飾向上効果を示した。プロスタグランジン(PG)に対してCDを添加すると、 α CDはPGのアルキル鎖一本に対して包接し、 β CDはPGの五員環に対して包接し、 γ CDはPGのアルキル鎖二本を同時に包接することが報告されている^{63, 74}。したがって、 γ CDはDSPEの二本のアルキル鎖を同時に包接することができるため、 β CDよりも強くDSPEに対して相互作用し、 β CDよりも高い修飾向上効果を示したと考えられる。

α CD 共存下における PEG 鎖分子量が修飾に与える影響を検討したところ、PEG 鎖分子量が大きいほど修飾量は低かった (Fig. 23)。前章 1-d において、高濃度の PEG 脂質誘導体溶液を用いて長時間修飾を行った場合、時間の延長に伴う修飾量の増大が緩やかになり (Fig. 6)、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りにくくなる可能性が考えられた。本検討でも CD の添加によって修飾量が多くなったため、同様の現象が起こったと考えられる。また、PEG 鎖分子量が高いほど hMSC 表面での立体障害が大きくなり、修飾量が低くなったと考えられる。また、前章 1-c で行った CD 非共存下での検討 (Fig. 5) では、PEG 鎖分子量が少ないほど修飾量は少なかったが、いずれの群も修飾量が少ないため PEG 鎖の立体障害の影響が小さく、PEG 鎖分子量の低下に伴う単量体の量の減少が修飾量に影響したと考えられる。また、4 種類の低分子量 PEG 脂質誘導体 (EG unit : 2, 6, 12, 24) を用いて、細胞傷害性が認められない (Fig. 16) 条件下で、 α CD 存在下における PEG 鎖分子量が修飾に与える影響を確認したところ、PEG 鎖分子量が低いほど修飾量が少なかった (Fig. 24)。これは、PEG 鎖分子量が低いほど PEG 脂質誘導体の水溶性が低く、脂質部分の相互作用が強まり、単量体の量が減少したことに起因すると考えられる。

M β CDは細胞膜からコレステロールを引き抜く作用を有し⁶⁸、M β CDで処理された細胞は細胞膜の流動性が向上することが報告されている⁶⁹⁻⁷¹。そこで、あらかじめhMSCにM β CD

だけを加えて培養した後、PEG脂質誘導体だけを加えて培養した場合、修飾向上効果はほとんど認められなかった (Fig.25)。このことからPEG脂質誘導体の修飾を向上するためには、M β CDがPEG脂質誘導体と同時に培養液中に存在することが必要であり、M β CDがhMSCにおよぼす作用はPEG脂質誘導体の修飾にはほとんど寄与していないことが示唆された。

FBS濃度が修飾へ与える影響を α CD共存下で確認したところ、10%までのFBS濃度では、FBS濃度の増大に伴い修飾量が増大したが、20%の群は10%群より低い修飾量を示した (Fig. 26)。PEG脂質誘導体の脂質部分を包接したCDは、親水性の残基を外側に向けた構造を取るため、CDが包接したPEG脂質誘導体はCDが解離した後、細胞膜へ修飾されると予測される (Fig. 29)。CDに包接された化合物は、包接競合剤となる疎水性化合物の存在下で解離が促進されることが報告されている^{75, 76}。したがって、FBS中に含まれる α CDと親和性の高い成分が、PEG脂質誘導体と α CDの解離に寄与する可能性が考えられる。一方、前章 1-d のCD非共存下での検討 (Fig. 8) においてFBS濃度の増大と共に修飾量が低下したことから、CD共存下ではFBSは単量体の量を増加、減少する両方の作用を示すと考えられる。その結果、10%のFBS濃度の群が最も高い修飾量を示したと考えられる。

α CDの添加が修飾の安定性におよぼす影響を検討するため、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、経時的に修飾量を測定したところ、 α CD存在下で平均分子量2000、10000のPEG鎖をもつPEG脂質誘導体で修飾したhMSCはそれぞれ44、26%の残存率を示した (Fig. 27)。Fig. 10とFig. 27における平均分子量2000のPEG鎖をもつPEG脂質誘導体で修飾した群を比較すると、8時間後の残存率がほぼ同等であった。したがって、修飾の際のCDの添加は修飾の安定性に影響しないと考えられる。また、 α CD、DMSOと共にEG unitが2、6、12、24の低分子量PEG脂質誘導体で修飾したhMSCについても同様の検討を行ったところ、順に78、71、65、65%の残存率を示し (Fig. 28)、PEG鎖分子量が低いほど8時間後の残存率が高かった。したがって、PEG鎖分子量が低いほど修飾の安定性が高いと考えられる。

以上、本節では、PEG脂質誘導体のhMSC表面への修飾において、有機溶剤およびCDの添加による修飾向上効果を評価し、いずれの添加剤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、¹HNMR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。

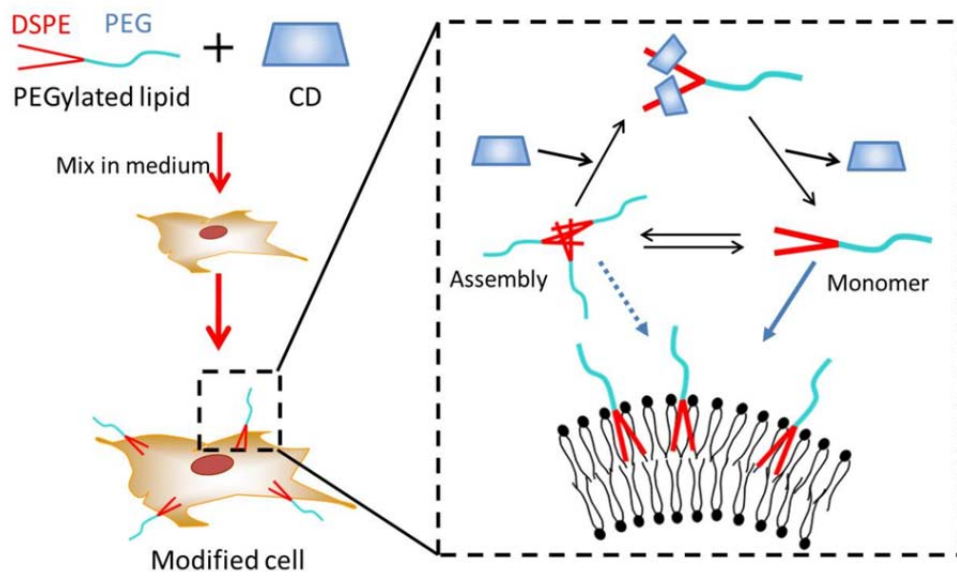


Fig. 29 Estimated mechanism about effect of CD on cell surface modification with PEGylated lipid.

第二節 超音波照射による hMSC 表面への PEG 脂質誘導体

修飾の向上

本研究で用いている PEG₂₀₀₀-DSPE と、Distearoyl phosphatidylcholine (DSPC) および コレステロールから構成されるリポソームに calcein を内包した後、超音波を照射すると、照射強度、照射時間に依存してリポソームが崩壊し、calcein が漏出することが報告されている⁷⁷⁾。したがって、超音波照射は脂質同士が相互作用した構造を乱す働きがあると考えられる。そこで、PEG 脂質誘導体に超音波を照射すると、会合体の構造が不安定化され、単量体として分散する PEG 脂質誘導体が増大することで修飾量を向上できると考えた。

一方、細胞に対して超音波を照射すると、振幅に依存して細胞膜の透過性、流動性が増加し⁷⁸⁾、照射後の細胞膜に小孔が形成されることも報告されている⁷⁹⁾。したがって、超音波照射は単量体の細胞膜への移行を促す効果も期待できる。

そこで本節では、PEG 脂質誘導体による hMSC の修飾における超音波照射の影響について検討した。さらに、MSC に対して超音波の照射を 1 日 1 回のペースで 3 日から 4 週間にわたり継続すると、MSC の骨細胞への分化が誘導されることが報告されている⁸⁰⁻⁸²⁾ため、本研究で使用した超音波照射条件における分化への影響も評価した。

2-a 超音波照射手技の確立

超音波照射が与える作用は、エネルギーの発生に伴う熱的作用⁸³⁻⁸⁵⁾と、放射圧や振動による機械的作用^{78, 86-88)}に大別される。PEG 脂質誘導体による修飾に超音波照射を利用する場合、熱的作用によって培養液の温度が上昇すると考えられ、hMSC の機能に対する悪影響が懸念される。そこで本節の検討では、hMSC、PEG 脂質誘導体、Opti-MEM が入ったチューブを所定温度の水浴に浸け、超音波照射中の培養液温度を一定に保って行うこととした (Fig. 30)。

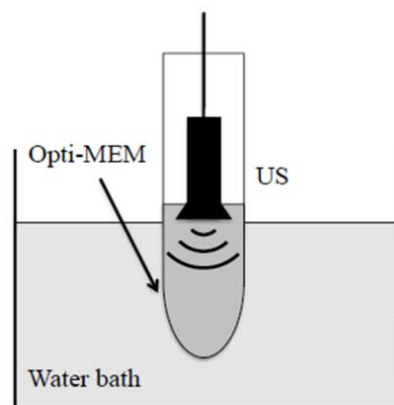


Fig. 30 Diagram of ultrasound (US) irradiation.

まず水浴温度の最適化のため、37 °C に温めた Opti-MEM 0.3 mL が入ったチューブを所定温度に設定した水浴に浸け、5、10 分間超音波を照射した後にチューブ内の培養液温度を測定した。その結果、照射強度が 3.0 W/cm² の条件下では、水浴温度を 32 °C に設定した場合に培養液温度が 37 °C に保たれた (Fig. 31)。

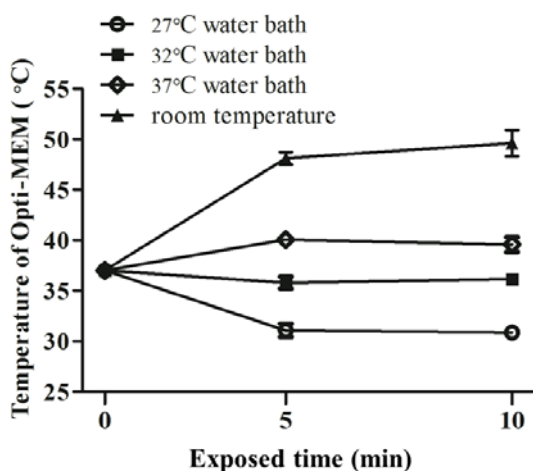


Fig. 31 Effect of sonication on water bath temperature. Opti-MEM was exposed to US at 3.0 W/cm² in 27, 32 and 37 °C water bath and at room temperature (25 °C). Each result represents the mean ± S.D. (n=3)

同様の方法で、様々な照射強度や Opti-MEM 体積で超音波照射を行い、チューブ内の温度が 37 °C に保たれる最適水浴温度を探索した (Table. 3)。そこで、以後の検討では各照射条件に合わせて最適化した温度に水浴温度を設定し、培養液温度を 37°C に保った条件で超音波照射を行った。

Table. 3 Optimized temperature of water bath for keeping Opti-MEM in 37 °C.

Opti-MEM volume (mL)	US irradiation intensity (W/cm ²)	Optimized temperature (°C)
0.3	1.0	36
0.3	2.0	35
0.3	3.0	32
0.3	4.0	30
0.5	3.0	34
1.0	3.0	36

2-b 超音波照射による細胞傷害性の評価

超音波照射の hMSC に対する傷害性を評価するため、0.3 mL の Opti-MEM に分散した hMSC に対して異なる強度および時間で照射を行った。hMSC を 96well plate に播種し、播種直後、播種 24 時間後にそれぞれ細胞傷害性を評価した。照射を行っていない hMSC 群を 100 % として生存率を算出したところ、3.0 W/cm² で 20 分間もしくは 4.0 W/cm² で 10 分間照射した群では播種直後、播種 24 時間後いずれにおいても生存率の顕著な低下が認められ、細胞傷害性が確認された (Fig. 32)。

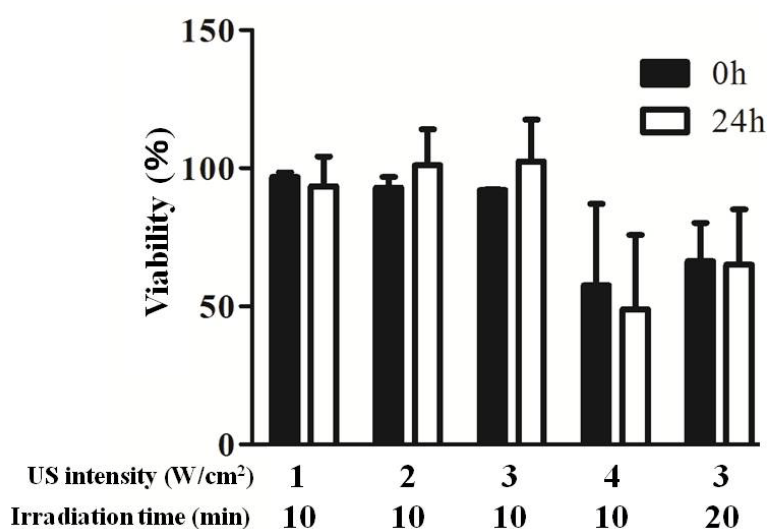


Fig. 32 Cell viability of hMSCs exposed to US.

hMSCs were exposed to US at 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 W/cm² for 10 and 20 min, or treated with 0.1% Triton X for 2 hour as a negative control. Cell viability of hMSCs was evaluated by CCK-8 assay immediately after irradiation (0 h) or after an incubation period of 24hour (24 h) in DMEM containing 10 % FBS at 37 °C. Each result represents the mean ± S.D. (n = 4).

次に、PEG脂質誘導体修飾に超音波照射を利用することによる細胞傷害性について評価するため、3 mMのFlu-PEG₅₀₀₀-DSPEを加えて3.0 W/cm²で10分間照射を行った。PEG脂質を加えず、同条件で超音波照射だけを行った群に対する生存率を算出したところ、PEG脂質誘導体の修飾を行った群において生存率の顕著な低下は認められず、PEG脂質誘導体修飾に超音波照射を利用することによる細胞傷害性は認められなかった(Fig. 33)。

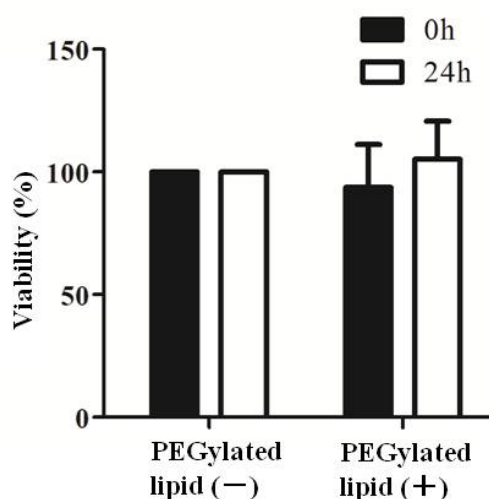


Fig. 33 Cell viability of hMSCs treated with PEGylated lipid and exposed to US.

hMSCs were exposed to US at 3.0 W/cm² for 10 min in 3 mM of Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE containing medium. Cell viability of hMSCs was evaluated by CCK-8 assay immediately after treatment (0 h) or after an incubation period of 24hour (24 h) in DMEM containing 10% FBS at 37 °C. Each result represents the mean ± S.D. (n = 4).

2-c 超音波照射による修飾向上効果

Flu-PEG₅₀₀₀-DSPEを含むOpti-MEMおよびhMSCをチューブに入れ、超音波照射を行った後、各hMSCの細胞表面蛍光強度を測定した。まず、培養液体積がhMSC表面のPEG脂質誘導体修飾量におよぼす影響を検討するため、0.3, 0.5, 1 mLの体積で照射を行ったところ、いずれの照射群でも非照射群より高い細胞表面蛍光強度を示し、照射群間で比較すると、体積が少ないほど細胞表面蛍光強度は高かった(Fig. 34)。そこで、以下の検討は全て 0.3 mLの体積で実施した。

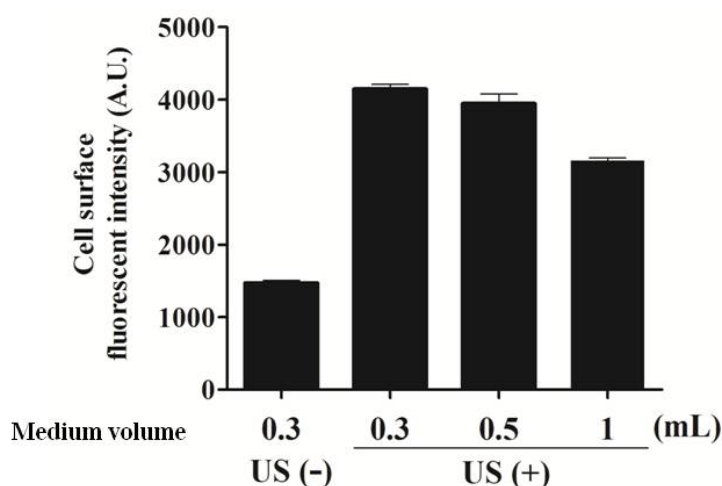


Fig. 34 Influence of medium volume on effect of US irradiation on cell surface modification.

hMSCs were exposed to US (US intensity; $3.0\text{W}/\text{cm}^2$) in 0.1 mM of Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE containing medium at 37°C for 10 min. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. ($n = 3$).

超音波照射の強度がhMSC表面のPEG脂質誘導体修飾量におよぼす影響を検討するため、 $1.0\sim 4.0\text{W}/\text{cm}^2$ の範囲で照射を行ったところ、強度の増大とともに細胞表面蛍光強度は増大し、 $3.0\text{W}/\text{cm}^2$ で照射した群では非照射群の約2倍の細胞表面蛍光強度を示した (Fig. 35)。

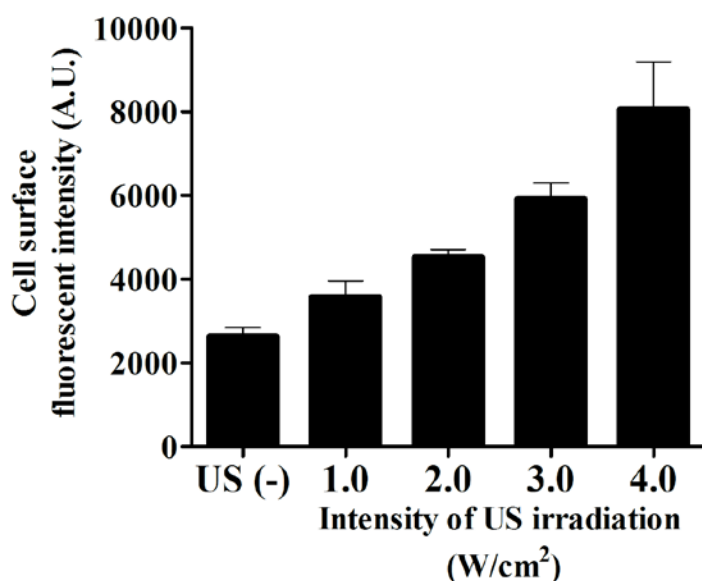


Fig. 35 Influence of US intensity on cell surface modification.

hMSCs were exposed to US (US intensity; $1.0\sim 4.0\text{W}/\text{cm}^2$, medium volume; 0.3 mL) in 0.1 mM of Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE containing medium at 37°C for 10 min. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. ($n = 3$).

超音波照射時間が hMSC 表面の PEG 脂質誘導体修飾量におよぼす影響を検討するため、1~20 分の範囲で超音波を照射したところ、超音波照射群の細胞表面蛍光強度は修飾時間の延長に伴い直線的に増加した。また、いずれの修飾時間においても超音波照射群は非照射群の約 2 倍の細胞表面蛍光強度を示した(Fig. 36)。

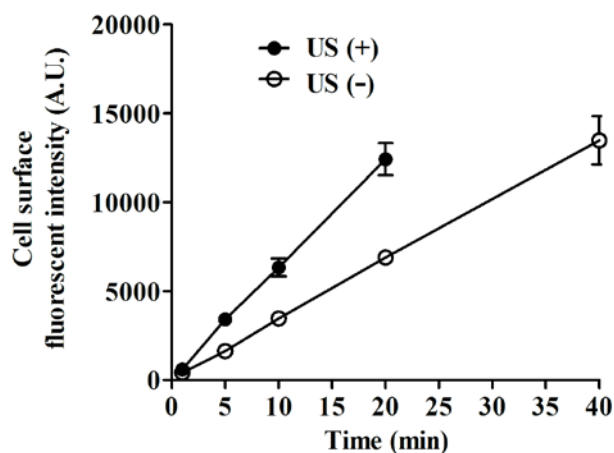


Fig. 36 Influence of US irradiation time on cell surface modification.

hMSCs were incubated in 0.1 mM of Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE containing medium at 37 °C. In US (+) group, hMSCs were exposed to US (US intensity; 3.0 W/cm², medium volume; 0.3 mL) for 1, 5, 10, 20 min, and in US (-) group, hMSCs were incubated 1, 5, 10, 20, 40 min.

Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean ± S.D. (n = 3).

PEG 脂質誘導体濃度が超音波照射による修飾向上効果におよぼす影響を検討するため、10~500 μM の範囲の PEG 脂質誘導体濃度で修飾を行い、超音波照射群と非照射群の hMSC 表面の PEG 脂質誘導体修飾量を比較したところ、いずれの濃度条件でも、照射群は非照射群より高い細胞表面蛍光強度を示した(Fig. 37A)。また、各濃度における非照射群に対する照射群の細胞表面蛍光強度の比を算出したところ、濃度が高いほど比が高かった(Fig. 37B)。

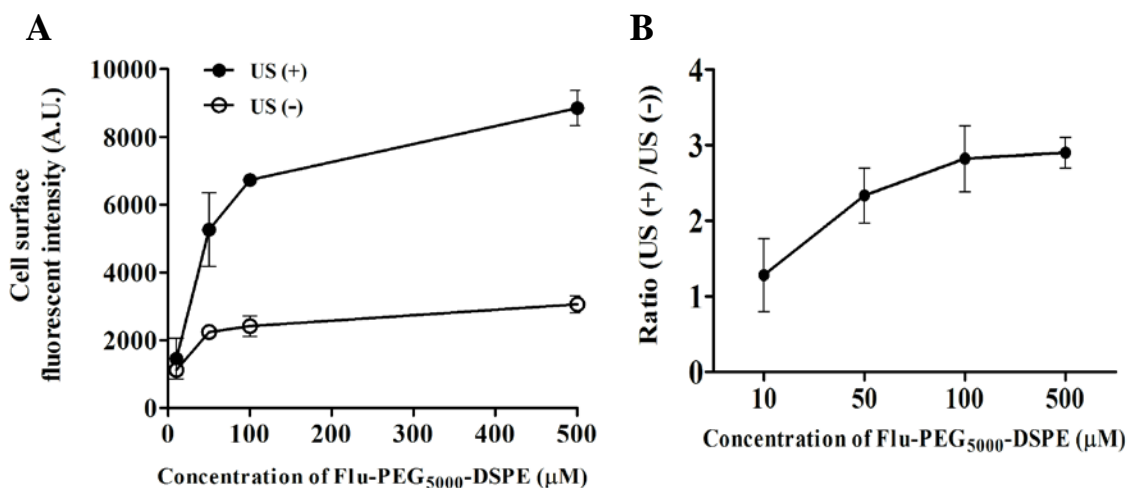


Fig. 37 Influence of concentration of Flu-PEG-DSPE on effect of US irradiation on cell surface modification.

hMSCs were modified in various concentration of Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE containing medium at 37 °C for 10 min. In US (+) group, hMSCs were exposed to US (US intensity; 3.0 W/cm², medium volume; 0.3 mL). Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean ± S.D. (n = 3) (A). Ratio of cell surface fluorescent intensity of US (+) group to US (-) group was calculated. (B)

2-d 超音波照射が分化能におよぼす影響

超音波照射は、MSCの骨細胞への分化を誘導する働きがあることが報告されている⁸⁰⁻⁸²⁾ため、本検討で行った超音波照射によって骨分化が誘導されないことを検証する必要がある。そこで、mMSCを用い、本節で行った条件で超音波を照射したmMSCおよび非照射mMSCを通常の培養液中で最長 3 週間培養した後、骨分化アッセイを行った。また、超音波照射を行わずに骨分化誘導培養液中で培養したmMSCをpositive群として比較した。3 週間培養後の各mMSCに対し骨細胞染色を行ったところ、positive 群では細胞が赤く染色され、骨細胞への分化が確認されたが、全ての超音波照射群および非照射群では染色が認められなかった (Fig. 38A)。次いで、1, 2, 3 週間培養した時点の各mMSCに対してRT-PCRを行い、骨分化マーカーであるosteopontinのmRNA量を測定したところ、全ての超音波照射群は、非照射群とほぼ同等かつpositive群よりも明らかに低いmRNA量を示した (Fig. 38B)。以上の結果から、今回行った超音波照射条件ではmMSCの骨細胞への分化は誘導されないことが確認された。

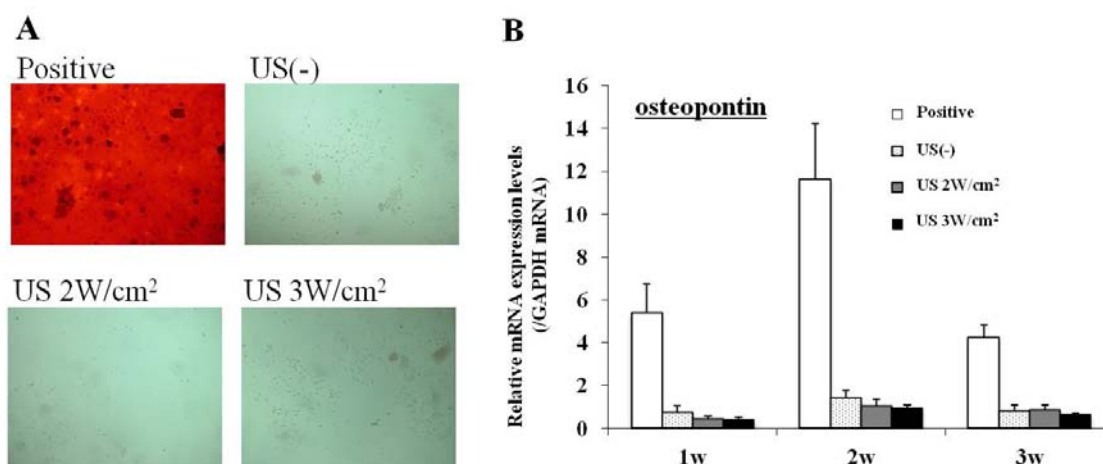


Fig. 38 Influence of US irradiation to mMSCs on osteogenic differentiation.

Osteogenic differentiation of US exposed (medium volume; 0.3 mL, US intensity; 2.0 and 3.0W/cm²) and unexposed mMSCs cultured in normal medium were evaluated. As positive control, unexposed mMSCs cultured in osteogenic differentiation medium were evaluated. Staining of differentiated osteogenic cells (red) from the mMSCs cultured for 3 weeks by staining with Alizarin Red (A). RT-PCR analysis of RNA markers of osteogenesis. Expression of osteopontin was evaluated in the mMSCs cultured for 1, 2 and 3 weeks. Each result represents the mean \pm S.D. (n=3) (B).

さらに、PEG脂質誘導体の修飾に超音波照射を利用した場合でも分化能に対する影響が無いことを検証するため、Flu-PEG₅₀₀₀-DSPEを含むDMEM中で超音波を照射し修飾を行ったmMSCについて、これまでと同様の方法で骨および脂肪分化誘導を行った後、分化アッセイを行った。修飾、超音波照射、分化誘導をいずれも行わなかったmMSC (negative) 群、修飾および超音波照射を行わず、分化誘導だけを行ったmMSC群と比較した。結果、骨分化誘導を行った全ての群で細胞の染色および、negative群よりも明らかに高い骨分化マーカーmRNA量を示した (Fig. 39A, B)。また、脂肪分化誘導を行った全ての群で細胞の染色および、negative群よりも明らかに高い脂肪分化マーカーmRNA量を示した (Fig. 40A, B)。

以上の結果から、超音波照射を利用したPEG脂質誘導体の細胞表面修飾は、mMSCの骨および脂肪細胞への分化能に影響をおよぼさないことが確認された。

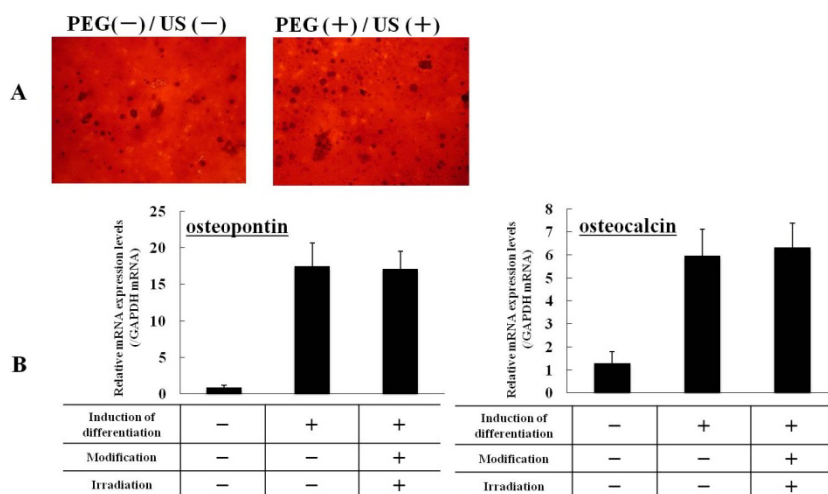


Fig. 39 Influence of mMSC surface modification with PEGylated lipid on osteogenic differentiation

Osteogenic differentiation of mMSCs exposed to US (US intensity; 3.0W/cm², medium volume; 0.3 mL) in 3 mM of Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE containing medium at 37 °C for 10 min and cultured in osteogenic differentiation medium for 3weeks were evaluated (PEG(+)/ US(+)). And, untreated mMSCs cultured in differentiation medium were evaluated (PEG(-)/ US (-)), in addition as negative control, untreated 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 ± S.D. (n=3) (B).

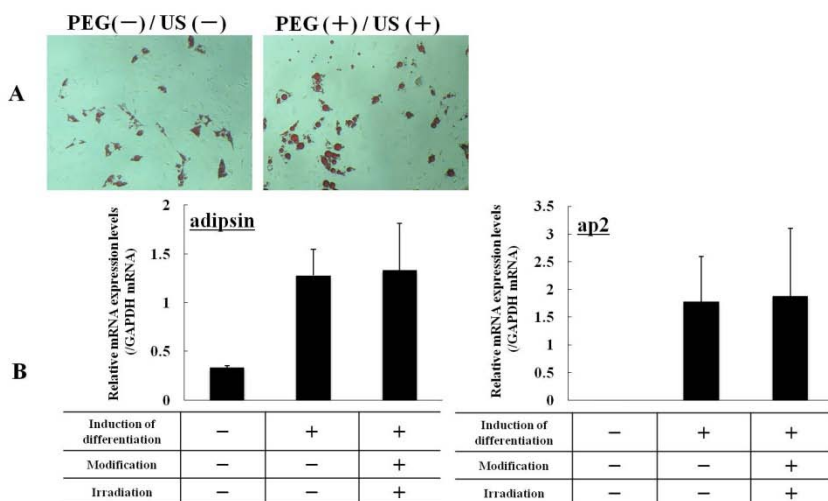


Fig.40 Influence of mMSC surface modification with PEGylated lipid on adipogenic differentiation

Adipogenic differentiation of mMSCs exposed to US (US intensity; 3.0W/cm², medium volume; 0.3 mL) in 3 mM of Flu-PEG₅₀₀₀-DSPE containing medium at 37 °C for 10 min and cultured in adipogenic differentiation medium for 3weeks were evaluated (PEG(+)/ US(+)). And, untreated mMSCs cultured in differentiation medium were evaluated (PEG(-)/ US (-)), in addition as negative control, untreated 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 adipisin and ap2 in the mMSCs were evaluated. Each result represents the mean ± S.D. (n=3) (B).

2-e 考察

本節では、超音波照射の利用による PEG 脂質誘導体の修飾向上効果を検討した。また、超音波照射が MSC の分化能におよぼす影響について検討を行った。

超音波照射が照射対象物に与える作用は、照射エネルギーの吸収に伴う熱的作用⁸³⁻⁸⁵)と、振動やキャビテーションなどの機械的作用(非熱的作用)^{78, 86-88})に大別される。PEG脂質誘導体の修飾に超音波照射を利用する場合、熱的作用による培養液の温度上昇が予想される。前章 1-dでの検討の結果、PEG脂質誘導体で修飾する際の培養液温度が上昇すると、修飾量が増大することが明らかになっており(Fig. 7)、熱的作用は修飾の向上に寄与すると考えられるが、一方で過剰な温度上昇はhMSCの機能に対する悪影響が懸念される。そこで本検討では、超音波照射の機械的作用による効果だけを検証するため、hMSC、PEG脂質誘導体、培養液が入ったチューブを水浴に浸け、超音波照射中のチューブ内の培養液温度を一定に保って行うこととした(Fig. 30)。チューブ内の培養液温度は水浴の設定温度に依存したため(Fig. 31)、培養液温度が 37°Cに保たれる水浴の設定温度を照射条件ごとに探索し(Table. 3)、以後の検討では、最適化した温度に水浴温度を設定し、培養液温度を 37°Cに保った条件で超音波照射を行った。

まず、異なる培養液体積でhMSCに対して超音波照射を利用し、PEG脂質誘導体の修飾を行ったところ、全ての照射群は非照射群より高い修飾量を示し、照射群間で比較すると、体積が少ないほど修飾量が多かった(Fig. 34)。次に、培養液量を一定にし、異なる照射強度で同様の検討を行ったところ、照射強度が高いほど修飾量は多く、細胞傷害性が認められなかった照射条件(3.0 W/cm²、0.3 mL、10 分; Figs. 32, 33)では、非照射群の約 2 倍の修飾量を示した(Fig. 35)。したがって、超音波照射の利用はPEG脂質誘導体の修飾を向上する効果があり、その効果は照射エネルギーに依存すると考えられる。また、培養液体積が多いほど修飾量が低かったことから、チューブ内で超音波の減衰が起こっていることが示唆された。

以上の結果より、超音波照射による修飾向上効果が確認できたため、培養液体積、超音波照射強度を一定にし、修飾向上効果に対する修飾時間、PEG 脂質誘導体濃度の影響を評価した。まず、異なる修飾時間で検討を行ったところ、超音波照射群の修飾量は、時間の延長に伴って直線的に増加し、いずれの修飾時間においても超音波照射群は非照射群の約 2 倍の修飾量を示した(Fig. 36)。また、異なる PEG 脂質誘導体濃度で検討を行ったところ、いずれの濃度でも超音波照射群は非照射群より修飾量が多く(Fig. 37A)、さらに濃度の増大と共に非照射群に対する照射群の修飾量の比が向上した(Fig. 37B)。したがって、PEG 脂質誘導体濃度が高いほど、超音波照射による修飾向上効果は高いと考えられる。

超音波照射は、MSCの骨細胞への分化を誘導する働きがあることが報告されている⁸⁰⁻⁸²)。したがって、超音波照射を利用してPEG脂質誘導体で修飾したMSCを移植治療に用いるためには、超音波照射によってMSCが骨細胞へ分化しないこと、そして超音波照射を利用し

て修飾したMSCが分化能を維持していることを確認する必要がある。そこで、前章と同様、mMSCを用いた検討を行ったところ、超音波照射後に通常の培養液中で培養したmMSCは、骨細胞染色で染色されず、骨分化マーカーのmRNA量は骨分化誘導を行ったpositive群より明らかに低いことから、骨細胞へ分化していないことが確認された(Fig. 38 A, B)。過去の報告では、超音波照射によってMSCを骨細胞へ分化する際、1日1回のペースで、3日から4週間にわたり、20分以上の照射を継続していた⁸⁰⁻⁸²)。一方、本研究で実施した超音波照射条件は、照射回数が1回で照射時間が短いため骨細胞への分化が誘導されなかったと考えられる。また、超音波照射を利用してPEG脂質誘導体で修飾した後に骨および脂肪分化誘導培養液中で培養したmMSCは、それぞれ正常に骨および脂肪細胞に分化した(Figs. 39, 40)。したがって、本節で行った超音波照射を利用したPEG脂質誘導体の細胞表面修飾は、MSCの骨および脂肪細胞への分化能に影響をおよぼさないことが示された。

以上、本節では、超音波照射による外部刺激によって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

MSCは、IL-6、IL-10、IL-1ra、PGE2、TSG-6などの炎症抑制、免疫調節に関わる様々な液性因子の産生能^{11-14, 89-94)}を持ち、分化^{7,10,11,55-58)}によって損傷組織を補完し、組織に対する修復効果を示す。また、MSCは骨髄や皮下脂肪から採取可能な体性幹細胞であり、近年注目を集めているES細胞^{95, 96)}やiPS細胞^{97, 98)}と比べて安全性に優れ、既に人への移植治療も行われている。現在、骨髄に由来するMSCを主体とする細胞製剤 (Prochymal®)は、移植片対宿主病^{12, 13)}に対する治療薬として承認され、さらにクローン病^{8, 17)}、心筋梗塞¹⁶⁾、1型糖尿病¹⁵⁾に対する臨床試験も進められている。

心筋細胞を心筋梗塞モデルラットの心筋内に移植した場合、移植4日後に投与した細胞の10%しか残存していないことが報告されている¹⁸⁾。また、ヨーロッパで行われた自己筋芽細胞の移植による重症心不全に対する臨床試験では、30か所に分けて心筋内への移植を行った場合でも、移植した細胞の移植部位からの流出が原因で有効な治療効果が得られなかったと報告されている⁴⁾。したがって、MSCを用いた細胞治療においては、移植したMSCの損傷部位への集積や生着を促進するため、損傷部位との親和性を向上する手法の開発が必要だと考えられる。

細胞間の接着には、細胞表面に存在する様々な接着関連分子が重要な役割を果たしている。炎症組織に高発現するケモカイン(SDF-1)に対する受容体(CXCR4)を高発現させたMSCをマウス下肢虚血モデルに血中投与すると、通常MSCを投与した場合と比較して、MSCの虚血部位への集積が増大し、血流の回復効果が向上することが報告された⁹⁹⁾。このように、MSCに内在する接着関連分子数の増大はMSCの損傷部位への接着向上に有効である。

そこで本章では、まず、hMSCとhLSMEとの接着を評価する方法を確立した。次に、これらの評価法を用いて、PEG鎖の分子量やPEG脂質誘導体の修飾量がhMSCの接着能におよぼす影響、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PEG脂質を介して表面に修飾したhMSCとhLSMEとの接着におよぼす効果を検証した。

第一節 hMSC の接着能評価法の確立

前章の検討において、分子量が異なる PEG 鎖からなる PEG 脂質誘導体で、様々な修飾量の hMSC を短時間で調製することが可能となった。そこで次に、機能分子を導入した PEG 脂質誘導体で修飾した hMSC の接着能を評価する必要がある。

調製した各 hMSC の接着能を比較するためには、一度に多くの群を評価できる方法が必要である。これまで、ICAM-1 抗体で修飾した mMSC と血管内皮細胞との接着の評価では、培養皿上の内皮細胞に mMSC を添加、共培養した後、顕微鏡で撮影した画像から接着した mMSC の数を計数する方法を用いたという報告がある²⁵⁾。この方法はマルチウェルプレートを用いて行えるため、同じ条件で多くの群の評価を行うことができるが、顕微鏡で一度に撮影できる面積には限界があり、細胞数の計数にも時間がかかる。そこで本研究では、血管内皮細胞を接着させたマルチウェルプレート上に量子ドットを用いて蛍光標識した hMSC を加えて共培養し、接着した hMSC と血管内皮細胞の数の比を、FACS での蛍光強度の違いで識別した各細胞の細胞数から算出し、接着能の指標とする方法を考案した。

また、MSC は、白血球¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾と同様に、炎症組織の血管内皮細胞に対して、一過性の接着と解離を繰り返しながら移動し、減速した後接着に至ると考えられている^{14, 103-105)}。したがって、*in vitro* における hMSC の接着能評価においても、このような実際の血管内で起こっている現象を再現して評価する方法が必要である。Langer らは、E-セレクトインを底部にコーティングしたチャンバー内に、E-セレクトイン親和性ペプチドで修飾した hMSC を培養液とともに流し、顕微鏡で撮影した画像から平均移動速度を算出している²⁴⁾。この方法は、一定流速の流れ場の中での挙動を観察するという点で、静置で共培養する方法よりも血管内の環境に近い。本研究では、実際の血管内に近づけるために、血管内皮細胞上で同様の方法を実施した。また、接着に至るまでの過程を正確に評価するためには、移動速度の変化を経時的に評価する必要があると考え、大阪大学新井らにより開発された、画面上の複数の輝点を同時に連続的に追跡できる Particle Track and Analysis (PTA) を利用し、底部に血管内皮細胞が接着したチャンバー内に一定の流速で hMSC を流し、撮影した動画を PTA で解析することで、hMSC の血管内皮細胞上での移動速度の変化を解析し、接着能を評価する方法を考案した。

1-a 接着細胞数にもとづく接着能評価法の確立

本実験ではまず、プラスチック表面への hMSC の接着を評価した。多くの群を一度に評価するため、hMSC を 96 well plate に 5×10^4 cells/well で播種し、1 時間培養後に PBS で 2 回洗浄し、その後各 well に接着した hMSC 数をもとに接着能を評価した。接着した hMSC 数の測定は、細胞傷害性測定の際、生細胞数の測定に用いた cell counting kit を用い、生細胞

数の指標となる 450 nmの吸光度から接着能を評価した。

ヒト肝類洞血管内皮細胞(hLSME)に対するhMSCの接着能を評価する場合、2種類の細胞を識別する必要がある。そこで、細胞への取り込みを促進するためpolyamidoamine デンドリマーを結合した赤色量子ドット¹⁰⁶⁾を含む培養液中でhMSCを培養し、蛍光標識した。なお、この際、fluoresceinの蛍光と互いに影響しない波長域の蛍光特性をもつ量子ドットを選択した。12 well plateにhLSMEを 2×10^5 cells/wellで播種後 24 時間培養し、コンフルエントに接着していることを確認した。その後、hMSCを 3×10^5 cells/wellで播種し、30分共培養した後、PBSで2回洗浄し、各wellに接着したhMSCとhLSMEを合わせて回収した。回収した細胞の赤色蛍光強度をFACSで分析し、蛍光強度の違いからhMSCとhLSMEを識別し、それぞれの細胞数の比(hMSC細胞数 / hLSME細胞数) を接着率と定義して接着能の指標とした(Fig. 41)。

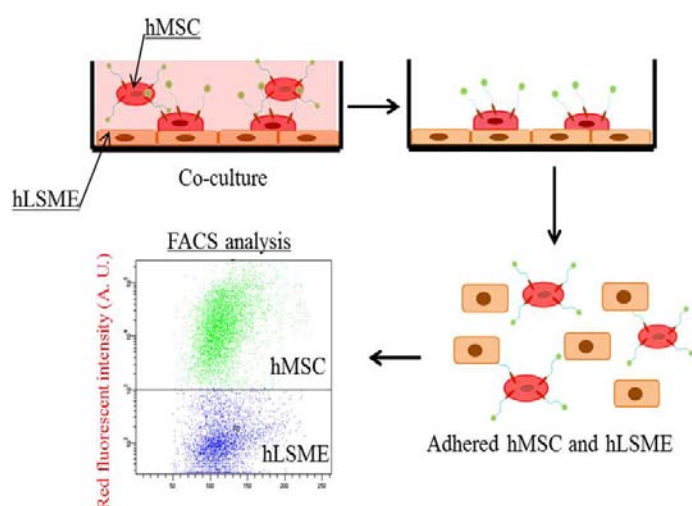


Fig. 41 Determination of ratio of adhered hMSC and hLSME.

1-b 流れ場における移動速度にもとづく接着能評価法の確立

フローチャンバー^{107, 108)}の底部にhLSMEを 7.5×10^4 cells/laneで播種後 24 時間培養し、コンフルエントに接着していることを確認した。その後、赤色量子ドット¹⁰⁶⁾で蛍光標識し、 1×10^6 cells/mLに調製したhMSC分散液を 3.6 mL/hourの一定流速でチャンバー内に流し、hLSME上を流れるhMSCの挙動を撮影した (Fig. 42)。なお、細胞の移動速度に影響するチャンバー内のせん断応力は 0.1 dyn/cm^2 であり、撮影時は蛍光顕微鏡の焦点をhLSMEに合わせて撮影することで、hLSMEに接しながら流れるhMSCだけを評価した。

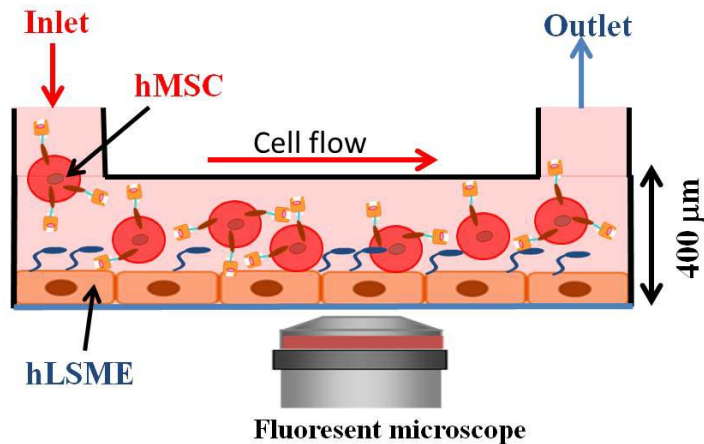


Fig. 42 Diagram of observation of moving hMSC on hLSME.

流れ場の中で hLSME 上を移動する hMSC の移動速度の変化を解析できれば、減速～接着に至る過程が評価でき、hMSC の挙動を正確に再現することができる。そこで、撮影した動画を image J および PTA を用いて解析した。各細胞の 0.25 sec ごとの移動距離から各瞬間の移動速度を算出し、経過時間に対してプロットした。また、各細胞の速度の違いを比較するため、動画内に写っていた時間と動画内での総移動距離から平均移動速度を算出した。

1-c hLSME 表面における ICAM-1 発現量の測定

炎症誘導性のタンパク質である tumor necrosis factor- α (TNF- α)¹⁰⁹⁻¹¹¹ を含む培養液中で hLSME を培養することで、炎症組織における hLSME モデルを構築した。炎症誘導を確認するため、炎症組織の血管内皮細胞に特異的に高発現する intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) の発現量を免疫染色によって評価したところ、TNF- α 処理 (100 ng/mL, 4 時間) によって、hLSME における ICAM-1 の発現量は約 20 倍に増大し、ICAM-1 の発現誘導が確認された (Fig. 43)。そこで今後の検討では、今回の条件で処理した hLSME を炎症 hLSME モデルとして用いた。

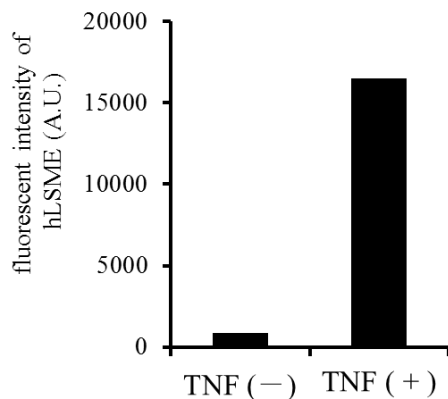


Fig. 43 Expression of ICAM-1 on hLSME treated with TNF- α . hLSMEs were incubated in CS-C medium supplemented with 100 ng/mL of TNF- α for 4 h. Expression level of ICAM-1 on hLSME was evaluated by immunoassay with fluorescein conjugated ICAM-1 antibody.

1-d 考察

本節では、hMSC の接着能を評価する方法を、多くの群を短時間で評価できる、実際の血管内で起こっている現象を正確に再現できる、という二つの観点から確立した。

まず、マルチウェルプレート上でhMSCを培養し、接着したhMSC数を元に評価する方法を確立した。hLSME上での共培養法では、量子ドット¹⁰⁶⁾によるhMSCの蛍光標識とFACSによる測定を組み合わせることで、細胞数の比を接着能の指標とする新しい評価法を確立できた(Fig. 41)。これまでは、共培養した後に接着したMSCを顕微鏡で撮影し、撮影画像を元に計数した接着MSC数から接着能が評価されていた²⁵⁾が、ウェル内の一部分についてしか評価ができなかった。対して、今回確立した手法はウェル内の全ての細胞に対する評価が行える上、短時間で多くの群を評価できる点で有用である。

次に、フローチャンバー^{107, 108)}内を移動するhMSCを撮影し、動画から得られる移動速度を元に評価する方法を確立した。特に、移動速度の解析にPTAを用いることで、hLSME上を流れるhMSCの速度変化を時系列で解析する新しい評価法を確立できた(Fig. 42)。これまで、流れ場におけるMSCの接着能は、チャンバー内を移動するMSCの平均移動速度から評価されていた^{22, 24)}。しかし、MSCの表面には、白血球の炎症組織への集積¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾に関わる分子であるケモカイン受容体群の一部が発現していることが知られている^{14, 105)}ため、MSCは炎症組織の血管内皮細胞に対して一過性の接着と解離を繰り返しながら移動する白血球と同様の挙動¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾を示すものと考えられる。したがって、MSCの観察には血管内皮細胞上で減速しながら移動し、接着に至る過程を正確に評価することが必要であると考えられ、今回確立した手法はhMSCの血管内での挙動をこれまでより正確に再現できる点で有用である。

また、単球などから産生される炎症性サイトカインであるTNF- α は、血管内皮細胞に対し接着関連分子の発現を誘導する作用が報告されている¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾。炎症組織における血管内皮細胞モデルを構築するため、TNF- α を含む培養液中でhLSMEを培養すると、炎症組織の血管内皮細胞に特異的に高発現するICAM-1の発現量が約20倍に増加(Fig. 43) し、炎症 hLSMEモデルを構築できた。

以上、本節で確立した評価法を用いて、次節以降 PEG 脂質誘導体で修飾した hMSC の接着能を評価した。

第二節 PEG 脂質誘導体の修飾が hMSC の接着能におよぼす影響

PEG脂質を介したhMSC表面への機能分子修飾において、PEG鎖は、PEG脂質誘導体の水溶性、修飾された機能分子の可動性、機能分子と細胞膜表面との距離に影響すると考えられる¹¹²⁾。一方、PEGで修飾したリポソームはPEG鎖分子量が高いほどin vitroで細胞へ取り込まれにくいことが報告されている¹¹³⁾。これは、リポソームに修飾されたPEG鎖が、リポソームと細胞膜との相互作用を非特異的に阻害したことに起因すると考えられ、細胞間の接着においても、hMSCの接着がPEG鎖分子量や修飾量に依存して阻害されることが予想される。したがって、PEG脂質誘導体によるhMSC表面への修飾において、hMSCの接着能にPEG鎖がおよぼす影響を評価する必要がある。

そこで本節では、分子量が異なるPEG鎖からなるPEG脂質誘導体で、それぞれ修飾量を変えて調製したhMSCのhLSMEに対する接着能を評価した。

2-a plastic dish への接着に対する影響

修飾量および修飾されたPEG鎖分子量の異なる様々なhMSCを調製し、96 well plateへ接着した細胞数をcell counting kitを用いて測定した。また各hMSC表面のPEG脂質誘導体修飾量を測定した。接着した細胞数の指標となる450 nmの吸光度とhMSC表面の蛍光強度をプロットしたところ、修飾を行った全ての群は、未修飾群(NT)より接着したhMSC数が少なく(Fig. 44)、PEG脂質誘導体の修飾量が多いほど接着したhMSC数が少なかった。一方、PEG鎖分子量の違いによる影響について、細胞表面蛍光強度が同程度の群で比較すると、分子量2000の群と比較して分子量5000、10000の群は接着したhMSC数が少なかった。したがって、PEG脂質誘導体の修飾量、PEG鎖分子量の増大と共に、hMSCのplastic dishへの接着能が低下するという傾向が認められた。

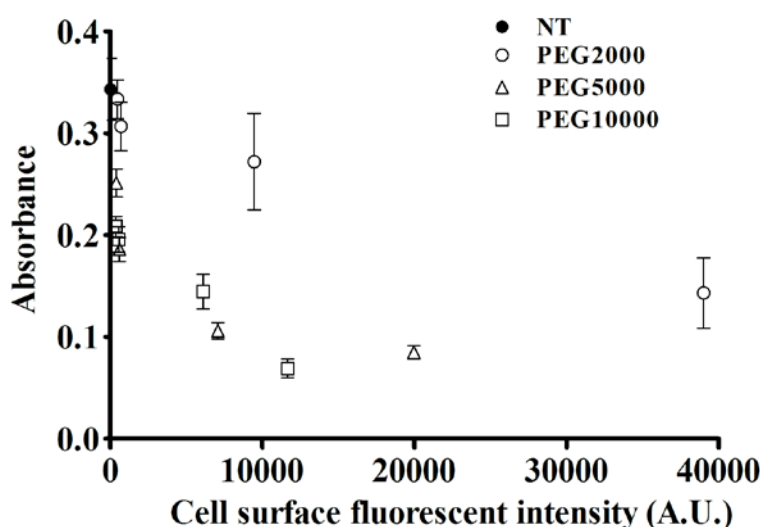


Fig. 44 Influence of hMSC surface modification with various PEGylated lipid on the adhesion on plastic dish.

Unadherent hMSCs were incubated with 0.1 mM of Flu-PEG-DSPE (molar mass of PEG is 2000, 5000 and 10000) and 0, 0.1, 1 and 10 mM of α CD for 30 min. The hMSCs were seeded on plastic dish and measured the number of adhered hMSCs evaluated from the absorbance of cell counting kit Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

2-b hLSME への接着に対する影響

ガラスボトムdishに接着したhLSME上に赤色量子ドット¹⁰⁶⁾を用いて蛍光標識したhMSCを同細胞数加えて30分、60分共培養した。共培養後に接着した各dish内のhMSCを蛍光顕微鏡で観察したところ、Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEで修飾した群は、未修飾群と比べて接着数が明らかに少なかった(Fig. 45)。

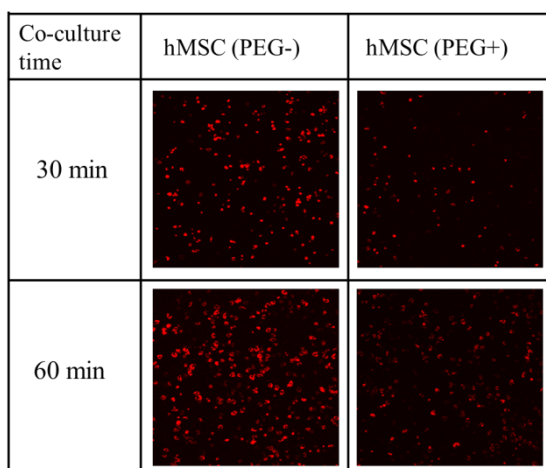


Fig. 45 Fluorescence microscopy of adhered hMSC on hLSME monolayers.

After labeling with red QD, unadherent hMSCs were incubated with 0.1 mM of Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE and 5 mM of α CD for 30 min. The modified or unmodified hMSCs were seeded on adhered hLSME. After co-culture for 30 or 60 min, adhered hMSCs were observed in fluorescent microscopy.

そこで、修飾量および修飾されたPEG鎖分子量の異なる様々なhMSCを調製し、hLSMEとの接着能およびPEG脂質誘導体の修飾量を測定した。各hMSC群のhLSMEに対する接着率およびhMSC表面のfluorescein由来の蛍光強度をプロットしたところ、修飾を行った全ての群は、未修飾群(NT)より低い接着率を示した(Fig. 46)。また、PEG鎖分子量の違いによる影響について細胞表面蛍光強度が近い群間で比較すると、分子量2000の群と比較して分子量5000、10000の群は接着率が低かった。したがって、plastic dishにおける検討と同様、PEG脂質誘導体の修飾量、PEG鎖分子量の増大と共に、hMSCのhLSMEへの接着能が低下するという傾向が認められた。

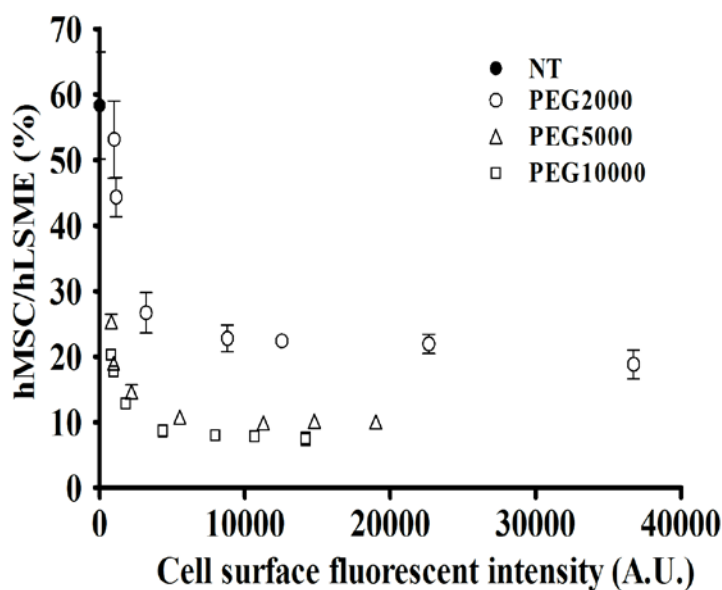


Fig. 46 Influence of hMSC surface modification with Flu-PEG-DSPE on the adhesion on hLSME.

After labeling with red QD, unadherent hMSCs were incubated with 0.1 mM of Flu-PEG-DSPE (molar mass of PEG is 2000, 5000 and 10000) and 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5 mM of α CD for 0.5 h at 37 °C in. The modified or unmodified hMSCs were seeded on adhered hLSME. After co-culture for 30 min, the ratio of the number of adhered hMSCs and hLSMEs were calculated. Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

さらに、低分子量 PEG 脂質誘導体を用いて同様の検討を行ったところ、細胞表面蛍光強度と接着率は Fig. 46 と似た相関を示したが、EG2 量体群においては、細胞表面蛍光強度が増加しても接着率は低下せず、さらにその接着率は未修飾群とほぼ同等であった (Fig. 47)。したがって、EG2 量体は今回検討した PEG 脂質誘導体の中で hMSC の接着を阻害する作用が最も低いと考えられる。

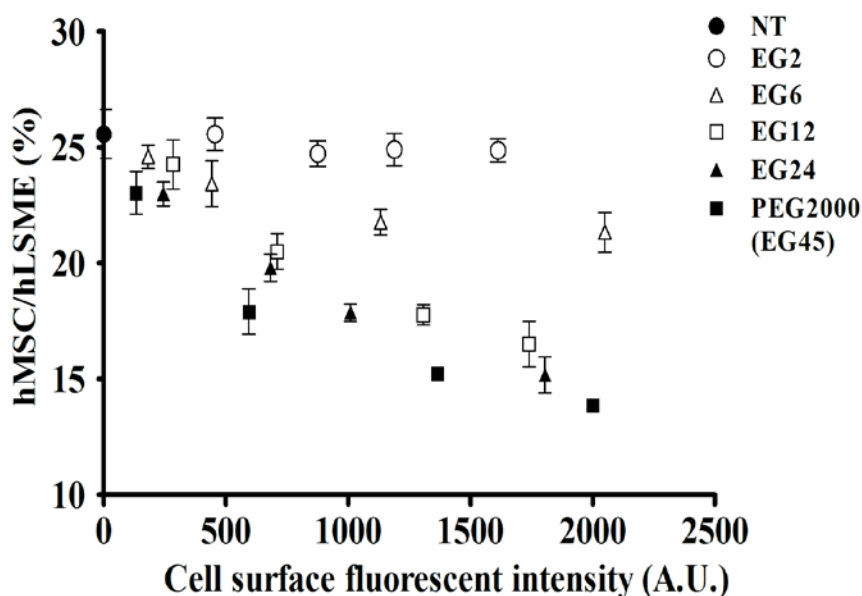


Fig. 47 Influence of hMSC surface modification with Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24, 45) on the adhesion on hLSME.

After labeling with red QD, unadherent hMSCs were incubated with various concentration of Flu-PEG-DSPE (EG unit: 2, 6, 12, 24, 45) for 0.5 h at 37 °C in DMEM containing 5 mM of α CD and 5 % of DMSO. The modified or unmodified hMSCs were seeded on adhered hLSME. After co-culture for 30 min, the ratio of the number of adhered hMSCs and hLSMEs were calculated Cell surface fluorescent intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometer. Each result represents the mean \pm S.D. (n = 3).

2-c hLSME 上での移動速度に対する影響

Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE、Flu-PEG₁₀₀₀₀-DSPEでそれぞれ修飾したhMSCおよび未修飾hMSCについて、それぞれ流れ場におけるhLSME上での挙動を撮影した。さらに動画から、各細胞の各瞬間の移動速度および平均移動速度を評価した。各hMSCの各瞬間の移動速度の経時変化を追跡した結果、いずれの修飾群も未修飾群と比べて速度が大きかった (Fig. 48 A, B, C)。さらに、平均移動速度解析の結果、いずれの修飾群も未修飾群と比べて群平均値、群中央値がともに大きく、Flu-PEG₂₀₀₀-DSPEで修飾した群は、未修飾群より約 40 %群平均値が大きかった(Fig. 49 A, B)。以上の結果から、流れ場で移動するhMSCに対してもPEG鎖の修飾によって接着能が低下することが確認された。

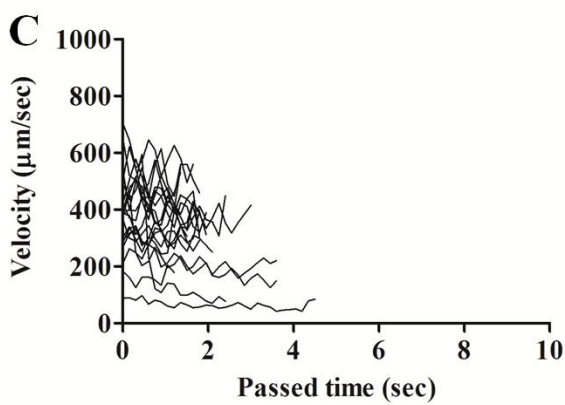
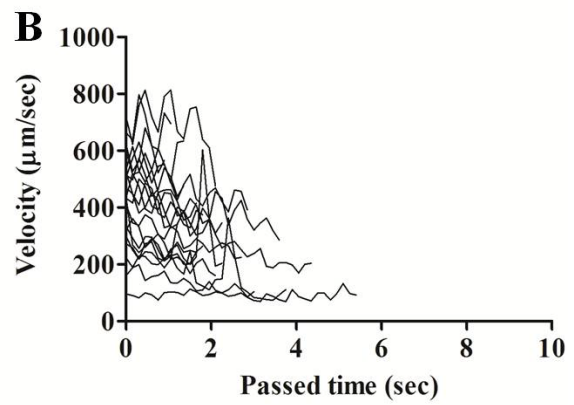
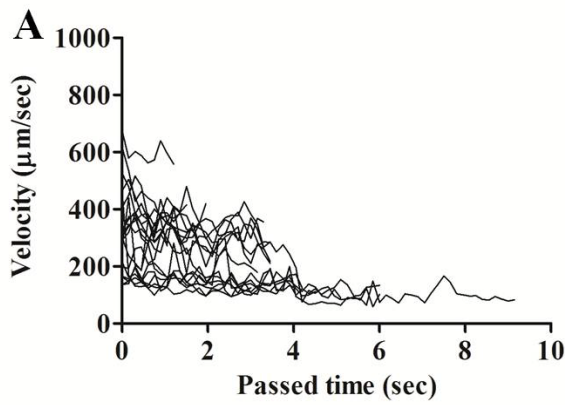
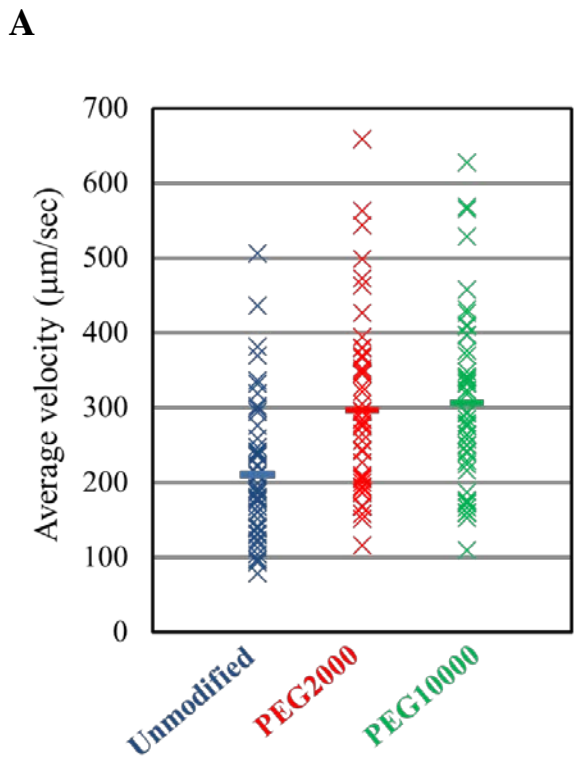


Fig. 48 Time profile of velocity of moving hMSCs on hLSME.

Moving velocity of unmodified hMSCs (A), modified hMSCs with 0.1 mM Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE and 1 mM αCD (B) and modified hMSCs with 0.1 mM Flu-PEG₁₀₀₀₀-DSPE and 10 mM αCD (C) on monolayers of hLSME on chamber (N=20).



	Average (µm/sec)	Median (µm/sec)
Unmodified	210.72	187.85
PEG2000	296.46	278.80
PEG10000	306.01	284.89

Fig. 49 Average velocity of hMSCs on hLSME.

Average velocity of unmodified hMSCs, modified hMSCs with 0.1 mM Flu-PEG₂₀₀₀-DSPE and 1 mM αCD and modified hMSCs with 0.1 mM Flu-PEG₁₀₀₀₀-DSPE and 10 mM αCD on hLSME monolayers on chamber (N=50) (A). Average and median value of average velocity of various groups (B).

2-d 考察

本節では hMSC に対して修飾する PEG 脂質誘導体の PEG 鎖分子量や修飾量が hMSC の接着能におよぼす影響を評価した。

PEG鎖で修飾した薬物や薬物キャリアは、血中安定性が向上し、細胞への取り込みが低下する¹¹³⁻¹¹⁷。これは、酵素、抗体、細胞などの血中の物質との相互作用をPEG鎖が非特異的に阻害するためだと考えられている。実際、PEG鎖で修飾したリポソームはPEG鎖分子量が高いほど*in vivo* の血中安定性が高く、*in vitro*で細胞へ取り込まれにくいことが報告されており¹¹³、hMSCの接着においてもPEG鎖分子量や修飾量に依存して接着が阻害されることが予想された。したがって、PEG鎖を介してhMSC表面に修飾されるリガンドの効果を活かすためには、修飾されたPEG鎖がhMSCの接着能にどのような影響をおよぼすかについて評価する必要がある。

平均分子量が 2000、5000、10000 のPEG鎖をもつPEG脂質誘導体で修飾したhMSCを用い、plastic dishへの接着能におよぼす影響を検討したところ、修飾量、PEG鎖分子量の増大と共に接着能が低下するという傾向を示した(Fig. 44)。さらに、hLSME上で共培養した蛍光標識hMSCを蛍光顕微鏡で観察したところ、PEG脂質誘導体で修飾した群は、未修飾群と比べて接着したhMSC数が明らかに少なかった(Fig. 45)。そこで、平均分子量が 2000、5000、10000 のPEG鎖をもつPEG脂質誘導体で修飾したhMSCを用い、hLSMEへの接着能におよぼす影響を検討したところ、plastic dishにおける検討と同様、修飾量、PEG鎖分子量の増大と共に接着能が低下するという傾向を示した(Fig. 46)。したがって、hMSC表面に修飾されたPEG鎖は、その分子量、修飾量に依存してhLSMEに対する接着を阻害すると考えられた。そこで低分子量PEG脂質誘導体で修飾したhMSCについて同様の検討を行ったところ、ほとんどの群ではFig. 46と同様の傾向を示したが、EG2量体で修飾した群だけは、修飾量の増大に伴う接着率の低下が認められず、未修飾群と同等の接着率を示した(Fig. 47)。したがって、EG2量体は今回検討したPEG脂質誘導体の中でhMSCの接着を阻害する作用が最も低いと考えられる。一方でPEG鎖はPEG脂質誘導体の水溶性に寄与し、修飾されたリガンドの可動性に関わる¹¹²ため、PEG鎖が長いほど修飾量の向上やリガンドの認識には有利だと考えられる。実際、EG2量体をリンカーとするPEG脂質誘導体はそのままでは培養液に溶けないほど水溶性が低く、修飾される量も少ないが(Fig.24)、本研究ではリンカーに起因する接着の阻害を考慮し、EG2量体をリンカーとするリガンド導入PEG脂質誘導体を合成することとした。

未修飾 hMSC および、平均分子量 2000、10000 の PEG 鎖をもつ PEG 脂質誘導体で修飾した hMSC について、hLSME 上の各瞬間の移動速度を解析した結果、いずれの群でもほとんどの細胞は時間経過と共に減速した(Fig. 48 A, B, C)。一方、各群を比較すると、修飾を行った 2 群は、未修飾群と比べて移動速度が大きい hMSC が多かった。さらに、平均移動速度を算出した結果、修飾を行った 2 群は、未修飾群と比べて群平均値、群中央値と

もに大きく、平均分子量が 2000 の PEG 鎖で修飾した群は、未修飾群よりも約 40 % 大きい群平均値を示した(Fig. 49A, B)。これらの結果は、血管内を移動する hMSC に対しても PEG 鎖の修飾による接着阻害効果が表れることを示唆するものである。したがって、PEG 脂質を介した hMSC へのリガンド修飾によって hMSC の接着能を増強するためには、リンカーに起因する接着の阻害を考慮した材料設計が必要だと考えられる。

以上、本節では、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、3 種類の方法で評価した。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 量体をリンカーとする 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。そこで次節では、リンカーに起因する接着の阻害を考慮し、EG2 量体をリンカーとするリガンド導入 PEG 脂質誘導体を合成することとした。

第三節 ペプチドリガンド導入低分子量 PEG 脂質誘導体の

修飾による hMSC の接着増強

組織・臓器が損傷を受けると炎症反応が誘引され、白血球の一種である好中球が炎症部位に集積する^{102, 118}。好中球の炎症部位への集積は、ケモカイン受容体を介した遊走^{119, 120}、セレクトリンリガンドを介した初期の弱い接着^{118, 121, 122}、インテグリンを介した後期の強い接着¹²³⁻¹²⁵によって引き起こされる。インテグリンの一種である lymphocyte function associated antigen 1(LFA-1)¹²⁶⁻¹²⁸は、炎症反応によって血管内皮細胞表面に高発現する ICAM-1^{129, 130}に対して特異的な親和性を有しており、このLFA-1/ICAM-1の結合^{131, 132}が好中球の炎症組織への集積に強く関わっている。

MSCは好中球と同様のケモカイン受容体の一部を発現していることが報告されており^{14, 105}、炎症部位へ遊走する働きを持つことが知られている。しかしながら、炎症組織に高発現するICAM-1と結合するLFA-1は、MSCにほとんど発現していないことが報告されている^{14, 133, 134}。したがって、MSCに対して、ICAM-1と結合するリガンドを表面に修飾することにより、炎症組織との接着能を増強できると考えた。リガンドの設計に関しては、LFA-1の中でも、ICAM-1のD1ドメインと特異的かつ多点的に結合することが知られる配列であるITDGEAを選択した¹³⁵。

本節では、前節において修飾後も hMSC の接着能を阻害しなかった EG2 量体(EG2)をリンカーとし、末端に ITDGEA の配列からなるペプチドを結合した脂質誘導体を合成し、このペプチドリガンド導入低分子量 PEG 脂質誘導体での修飾による hMSC の接着能増強効果を検証した。

3-a ペプチドリガンド導入低分子量 PEG 脂質誘導体の合成と質量分析

EG2量体の末端に6残基のアミノ酸(ICAM-1認識配列:ITDGEA、random配列:EDIAGT、reverse配列:AEGDTI)を結合した3種類のPeptide-EG2を固相合成法で合成した。さらにDSPEとの脱水縮合後、アミノ酸の保護基を脱保護することで3種類のPeptide-EG2-DSPEを得た。得られた化合物の質量分析を行ったところ、いずれも同様のシグナルを示し、理論分子量(1535)より40~70高い値を示した(Fig. 50)。これはアミノ酸側鎖のCOOH基やDSPEのリン酸基に対するナトリウム(分子量23)、カリウム(分子量39)などの一価の陽イオンの付加¹³⁶⁻¹³⁸によるものと考えられる。

A : ITDGEA-EG2-DSPE
 B : TGAIDE-EG2-DSPE
 C : AEGDTI-EG2-DSPE

ITDGEA : ICAM recognition sequence
 TGAIDE : Random sequence
 AEGDTI : Reverse sequence

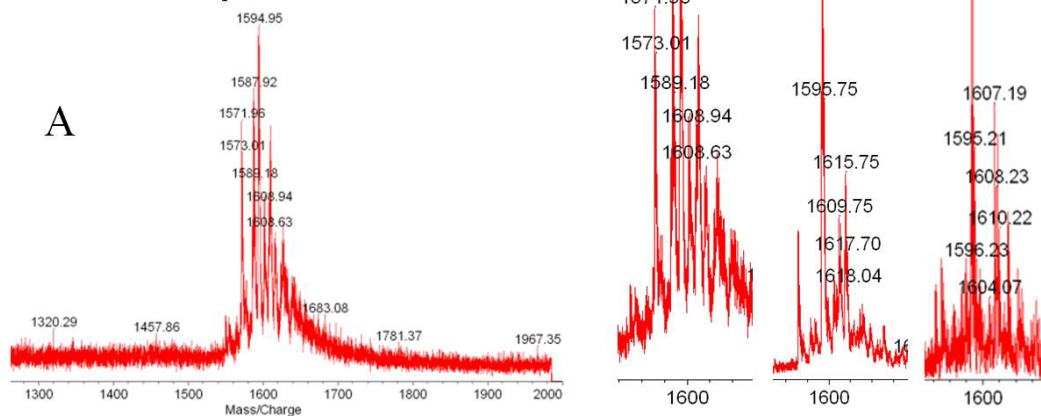


Fig. 50 Mass spectra of Peptide-EG2-DSPE.

Molecular weight of synthesized Peptide-EG2-DSPE (Theoretical molecular weight : 1535) was analyzed by MALDI-TOFMS (Matrix assisted laser desorption/ ionization- Time of flight mass spectrometry).

3-b hLSME への接着に対するペプチド修飾の効果

合成した各 peptide-EG2-DSPE で修飾した hMSC の、ICAM-1 高発現 hLSME への接着率を測定した。すると、ICAM-1 認識配列(ITDGEA)ペプチド修飾群は、未修飾群、random 配列(EDIAGT)ペプチド修飾群、reverse 配列(AEGDTI)ペプチド修飾群よりも有意に高い接着率を示した(Fig. 51)。また、random 配列ペプチド修飾群、reverse 配列ペプチド修飾群は未修飾群と有意な差が無く、接着能増強効果が配列特異的であることが確認された。

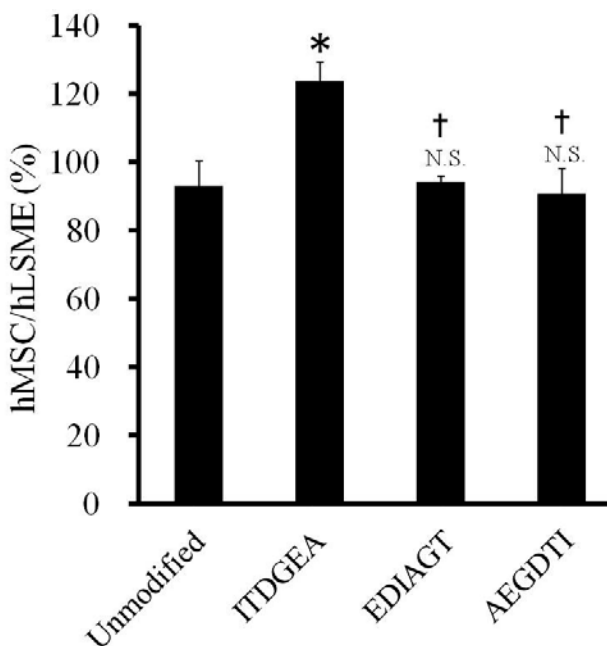


Fig. 51 Influence of hMSC surface modification with peptide-EG2-DSPE on the adhesion on hLSME.

After labeling with red QD, unadherent hMSCs were incubated with 0.05 mM of peptide-EG2-DSPE, 5 mM α CD and 5 % DMSO for 30 min. The modified or unmodified hMSCs were seeded on adhered hLSME. After co-culture for 30 min, the ratio of the number of adhered hMSCs and hLSMEs were calculated. * $P < 0.05$ and N.S.(not significant), compared with unmodified group, † $P < 0.05$, compared with ITDGEA (ICAM-1 recognition sequence) group by Tukey's test.

3-c hLSME 上での移動速度に対するペプチド修飾の効果

合成した Peptide-EG2-DSPE で修飾した hMSC と未修飾 hMSC について、一定流速の流れ場における ICAM-1 高発現 hLSME 上での挙動を撮影した。さらに動画から、各細胞の各瞬間の移動速度および平均移動速度を評価した。各 hMSC の各瞬間の移動速度の経時変化を追跡した結果、認識配列ペプチド修飾群は、未修飾群、reverse 配列ペプチド修飾群と比べて移動速度が小さい hMSC が多く存在していた (Fig. 52 A, B, C)。さらに、平均移動速度解析の結果、認識配列群は、未修飾群、reverse 配列群と比べて群平均値、群中央値ともに小さくなり、認識配列群は未修飾群よりも群平均値が約 40 %小さかった (Fig. 53 A, B)。以上の結果から、流れ場で移動する hMSC に対してペプチド配列特異的に接着能が増強された。

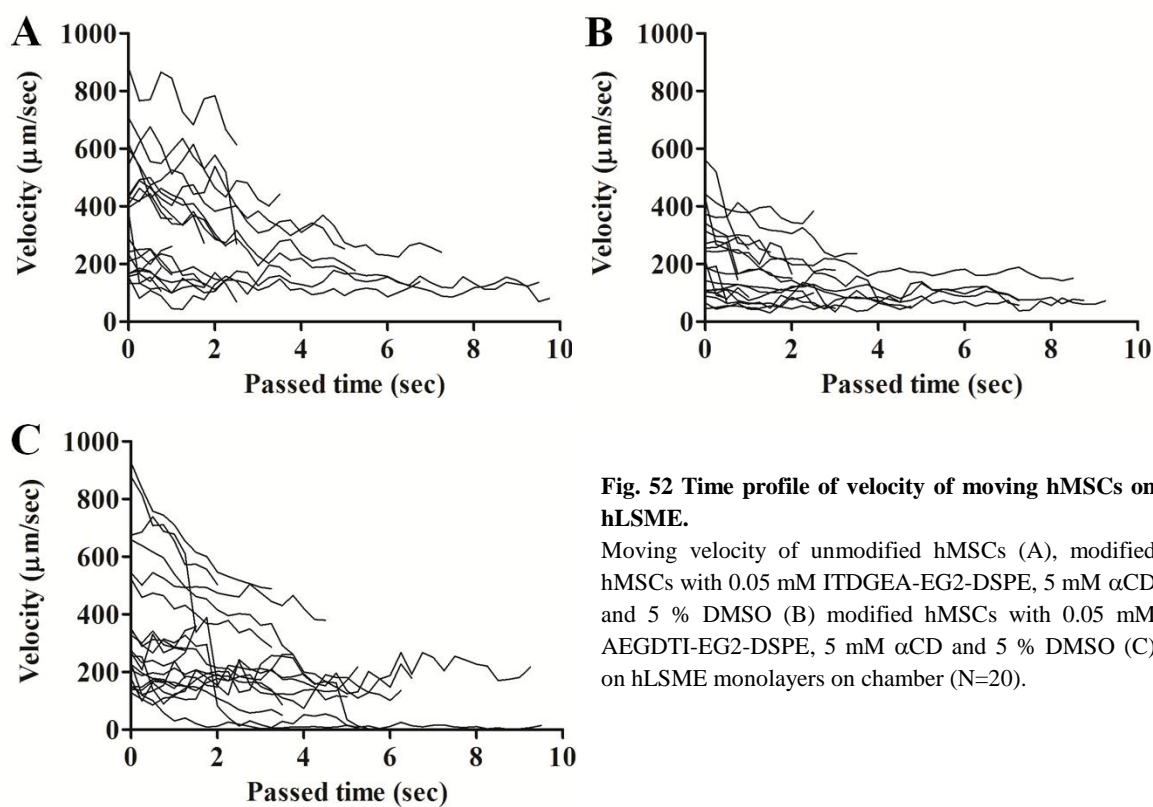
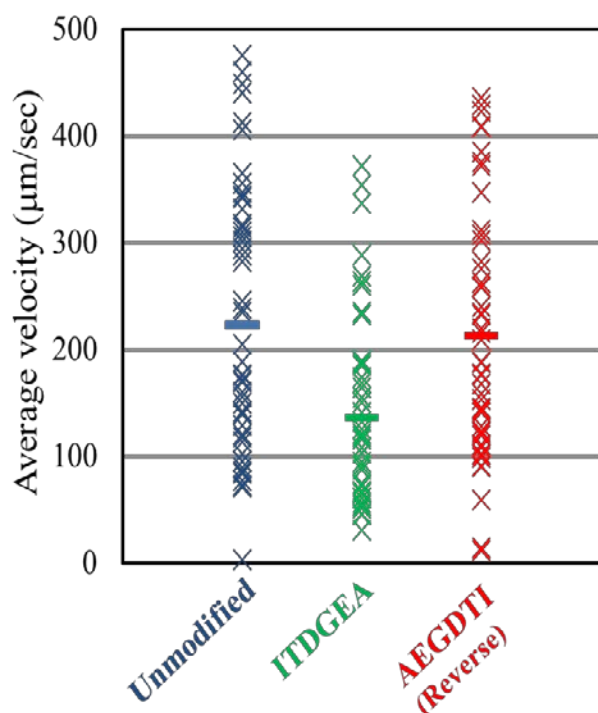


Fig. 52 Time profile of velocity of moving hMSCs on hLSME.

Moving velocity of unmodified hMSCs (A), modified hMSCs with 0.05 mM ITDGEA-EG2-DSPE, 5 mM αCD and 5 % DMSO (B) modified hMSCs with 0.05 mM AEGDTI-EG2-DSPE, 5 mM αCD and 5 % DMSO (C) on hLSME monolayers on chamber (N=20).

A**B**

	Average (µm/sec)	Median (µm/sec)
Unmodified	222.88	175.69
ITDGEA	135.61	115.93
AEGDTI (Reverse)	211.91	177.09

Fig. 53 Average velocity of hMSCs on hLSME.

Average velocity of unmodified hMSCs, modified hMSCs unmodified hMSCs, modified hMSCs with 0.05 mM ITDGEA-EG2-DSPE and 5 mM α CD and 5 % DMSO and with 0.05 mM AEGDTI-EG2-DSPE, 5 mM α CD and 5 % DMSO on hLSME monolayers on chamber (N=50) (A). Average and median value of average velocity of various groups (B).

3-d 考察

本節では、ICAM-1 に対する高い親和性を有するペプチドをリガンドとして hMSC に導入し、hLSME に対する接着増強効果を検証した。

MSCは、好中球が炎症組織へ接着する際に関わるセレクチンリガンド^{118, 121, 122}、インテグリン¹²³⁻¹²⁵をほとんど発現していない。そこで、好中球の強い接着に関わるインテグリンの一種であるLFA-1^{126-128, 131, 132}の機能をMSCに対して新しく付与することで、炎症組織に対する高い接着増強効果が得られると考えた。LFA-1 のリガンドであるICAM-1^{129, 130}は炎症組織の血管内皮細胞に特異的に高発現し、今回用いるhLSMEの炎症モデルにおいてもICAM-1 の発現が増加する(Fig. 43)ことを確認している。また、mMSCをICAM-1 抗体で修飾すると、血管内皮細胞に対する接着能が向上することが報告されている²⁵。そこで、ICAM-1 に対する親和性の高いリガンドをhMSCに修飾することが炎症組織に対する親和性の向上に有効だと考えた。

LFA-1 とICAM-1 の相互作用は、LFA-1 の IドメインとICAM-1 の D1 ドメインの間で起こることが報告されている^{131, 132}。また、LFA-1 におけるICAM-1 認識部位のアミノ酸配列を6残基ずつそれぞれ切り出してICAM-1 が高発現しているがん細胞に加え、LFA-1 を発現しているT細胞の接着を比較したところ、ITDGEA配列をもつペプチドがICAM-1 に対して最も強く結合し、最も高い接着抑制効果を示した¹³⁵。したがって、本検討ではITDGEA

配列をもつペプチドをリガンドとして用いることとした。そこで、固相合成法によって、EG2 量体の末端に 6 残基のアミノ酸(ICAM-1 認識配列:ITDGEA、random配列:EDIAGT、reverse配列:AEGDTI) を結合したPeptide-EG2 を合成した。このアミノ酸配列は側鎖に COOH基を持つため、Peptide側鎖の保護基をつけたまま、PeptideのC末端のCOOH基と DSPE末端のNH₂基を選択的に脱水縮合した。反応後、側鎖を脱保護し、精製した Peptide-EG2-DSPEの質量分析を行ったところ、合成した 3 種類のPeptide-EG2-DSPEは、いずれも同様のシグナルを示し、理論分子量より 40~70 程度高い結果を示した (Fig.50)。これはアミノ酸側鎖のCOOH基やDSPEのリン酸基に対するナトリウム(分子量 23)、カリウム(分子量 39) などの一価の陽イオンの付加¹³⁶⁻¹³⁸)によるものと考えられる。

合成した 3 種類の Peptide-EG2-DSPE で修飾した hMSC を、ICAM-1 高発現 hLSME 上で静置共培養し、接着能を評価したところ、ICAM-1 認識配列ペプチド修飾群は、未修飾群よりも有意に高い接着率を示し、ペプチドの修飾による接着増強効果が確認された(Fig. 51)。また、random 配列ペプチド修飾群、reverse 配列ペプチド修飾群の接着率はいずれも未修飾群と有意な差が無く、ICAM-1 認識配列ペプチド修飾群より有意に低い接着率を示したことから、その効果はペプチドの配列特異的であることが確認された。したがって、hMSC 表面に修飾した ITDGEA 配列のペプチドが hLSME 表面の ICAM-1 と特異的に結合し、hMSC の接着を促進したと考えられる。

次に、未修飾 hMSC および Peptide-EG2-DSPE (ICAM-1 認識配列ペプチド、reverse 配列ペプチド) で修飾した hMSC について、流れ場における ICAM-1 高発現 hLSME 上との相互作用を移動速度から評価した。その結果、ICAM-1 認識配列ペプチド修飾群は、未修飾群、reverse 配列ペプチド修飾群と比べて速度が大きい hMSC が少なく、撮像領域に流れ込んできた時点で既に速度が小さい hMSC が多かった。また、未修飾群と reverse 配列ペプチド修飾群には明らかな差は認められなかった(Fig. 52 A, B, C)。これは修飾したペプチドと hLSME 表面に発現する ICAM-1 の特異的な結合によって hMSC が減速する効果が大きく表れたものと考えられる。さらに、平均移動速度を解析した結果、認識配列ペプチド修飾群は、未修飾群、reverse 配列ペプチド修飾群と比べて群平均値、群中央値ともに小さくなり、認識配列ペプチド修飾群は未修飾群よりも群平均値が約 40 % 小さかった。(Fig. 53 A, B)。また、未修飾群と reverse 配列群は群平均値、群中央値共に同等だった。これらの結果から、hMSC 表面へのペプチド修飾は血管内を移動する hMSC に対しても血管内皮細胞との相互作用を向上するものと期待される。加えて、未修飾群と reverse 配列群は流れ場における移動速度に大きな違いは無く、EG2 量体が流れ場においても hMSC の接着能を阻害しないことが示された。

これまでに炎症組織に発現するケモカインの受容体の発現を増加することで、MSCの損傷部位への集積が向上することが報告されている^{19, 21)}が、これらの研究で対象としたケモカイン受容体はMSCに内在する分子であった。対して本研究でリガンドとして用いたペプチドの由来となるLFA-1 はMSCに元々発現していないことが報告されており^{14, 133, 134)}、

MSCに新しい機能を付加した点で意義が大きく、今後in vivoにおける生着や治療効果の向上についても期待できる。また、PEG脂質誘導体を用いた修飾法は、簡便に短時間で安全に細胞表面へリガンドで修飾できる点で、細胞移植への応用に適しており、任意にリガンドを選択できる点で今後のさらなる展開も期待できる。

以上、本節では、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、質量分析によって目的の化合物が得られていることを確認した。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。

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 量体をリンカーとする 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。

謝辞

終わりに臨み、本研究の実施にあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 橋田 充 教授に衷心より深甚なる謝意を示します。

また、終始御懇切なる御助言、御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科 山下 富義准教授、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 川上 茂教授、京都大学学際融合教育研究推進センター 樋口 ゆり子講師に謹んで深く感謝の意を表します。

併せて、PTA の解析について貴重な御助言を賜りました大阪大学産業科学研究所 生体分子機能科学研究分野 新井 由之助教に深く感謝の意を表します。

さらに、実験の一部に御協力頂きました京都大学薬学部 大城 康平様、京都大学大学院薬学研究科 小田 敬昌学士、並びに京都大学大学院薬学研究科 薬品動態制御学分野 教室員一同に深謝致します。

最後に、研究に専心できる環境を与えて下さった父 幸雄、母 かがりに深く感謝致します。

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。

第二章 第一節 実験の部

【1】 試薬

Flu-PEG-DSPE、PBS、DMEM、トリパンブルー、fluorescein-NHS を使った実験は第一章と同じものを用いた。 α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-CHCA)は島津製作所株式会社から購入した。Methanol、Ethanol、クロロホルムはナカライテスク社から購入した。N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIPCI)、ピペリジン、DMSO は和光純薬株式会社から購入した。各種 cyclodextrin (CD)はシグマ社から購入した。carboxyl-PEG-Fmoc (EG2, 6, 12, 24)は Quanta Biodesign 社から購入した。

【2】 質量分析

目的化合物を溶媒に溶解し、マトリックス(4-CHCA 溶液；溶媒：50 %アセトニトリル、50 % 水)と等量混合後、384 well plate 上に滴下し、風乾した後、AXIMA-CFR(島津製作所株式会社製)を用いて測定した。

【3】 蛍光分子導入低分子量 PEG 脂質の合成および精製

DSPEとcarboxyl-PEG-Fmoc (EG2, 6, 12, 24)を1:2のモル比でクロロホルムに溶解し、DIPCI存在下、50°Cで一晩振盪した。反応液にピペリジンを加えて室温で30分振盪することでFmoc基を脱保護した後、減圧下でピペリジンおよび溶媒を蒸発させ、得られた残存物をクロロホルムに再溶解し、透析膜に入れ(EG2および6の群はスペクトラポアMWCO1000、EG12および24の群はスペクトラポアMWCO2000；いずれもフナコシ社製)、メタノールに対して1日透析し、さらに水に対して2日透析することで未反応のPEG、脱保護されたFmoc基を除去し、凍結乾燥することでNH₂-PEG-DSPEを得た。

次にNH₂-PEG-DSPE (EG2, 6, 12, 24)とFluorescein-NHSをクロロホルム中に溶解し、室温で振盪した。得られた各化合物を質量分析し、未反応のNH₂-PEG-DSPEシグナルが検出されなくなるまで反応を続けた。反応完了後、透析によって未反応のfluoresceinを除去し、凍結乾燥することでFlu-PEG-DSPE (EG2, 6, 12, 24)を得た。

【4】 細胞傷害性測定

96 well plate に hMSC を播種し、37°Cで24時間培養した後、各 well に添加剤もしくは低分子量 PEG 脂質誘導体を含む DMEM を添加し、37°Cで30、60、120分培養した。第一章第一節実験の部【4】に準じた方法で細胞傷害性の評価を行った。

【5】 細胞表面蛍光強度測定

第一章実験の部【7】に準じた方法で細胞表面蛍光強度を測定した。

【6】 hMSC の共焦点蛍光顕微鏡観察

第一章実験の部【8】に準じた方法で hMSC の観察を行った。

【7】 ^1H NMR測定

測定時の溶媒として用いる D_2O はCambridge Isotope Laboratoriesから購入した。測定はJEOL RESONANCE社のECS 400 NMR Spectrometerを用いた。

【8】 統計学的解析

統計学的解析は、第一章実験の部【14】と同様の方法で行った。

第二章 第二節 実験の部

【1】 試薬

Flu-PEG-DSPE、PBS、DMEM、トリパンプルー、Opti-MEM、aprotinin、10% formalin、insulin、indomethacin、dexamethasone、3-isobutyl-1-methylxanthine、Oil Red O、 β -glycerol phosphate、ascorbate 2-phosphate、alizarin red、amphotericin B を使った実験は第一章と同じものを用いた。

【2】 MSC への超音波照射

ポリスチレンチューブ (BD Bioscience 社製) に MSC と PEG 脂質を含む Opti-MEM を加えて最終体積を 0.3 mL に合わせ、所定温度の水浴 (アズワン社製) 内に設置した。超音波照射は、Sonopore-4000 (ネッパジーン社製) を用いて行った。直径 6 mm のプローブをポリスチレンチューブ内の Opti-MEM の水面につけ、超音波を照射した。

【3】 超音波照射による細胞傷害性の測定

PEG 脂質を含む Opti-MEM 0.3 mL および hMSC をチューブに入れ、超音波を照射した。照射後の hMSC を 96 well plate に播種し、播種直後もしくは 37°C で 24 時間培養した後、第一章第一節実験の部【4】に準じた方法で細胞傷害性の評価を行った。

【4】 細胞表面蛍光強度測定

第一章実験の部【7】に準じた方法で細胞表面蛍光強度を測定した。

【5】 初代培養マウス MSC の採取

第一章実験の部【10】に準じた方法で初代培養マウス MSC の採取を行った。

【6】 骨分化誘導・Alizarin Red 染色

第一章実験の部【11】に準じた方法で骨分化誘導・Alizarin Red 染色を行った。

【7】 脂肪分化誘導・Oil Red O 染色

第一章実験の部【12】に準じた方法で脂肪分化誘導・Oil Red O 染色を行った。

【8】 Real time PCR

第一章実験の部【13】に準じた方法で Real time PCR を行った。

【9】 統計学的解析

統計学的解析は、第一章実験の部【14】と同様の方法で行った。

第三章 第一節 実験の部

【1】試薬

Flu-PEG-DSPE、PBS、DMEM、トリパンブルー、PD10 カラムを使った実験は第一章と同じものを用いた。Glycineは和光純薬社から購入した。Qdot® 655 ITK™ Amino (PEG) Quantum Dots (NH₂-PEG-QD)はインビトロジェン社から購入した。PAMAM dendrimer generation 4.0 (PAMAM)、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)はシグマ社から購入した。Bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3) はThermo Fisher Scientific社から購入した。NAP-5 カラム はGEヘルスケア社から購入した。

【2】plastic dish への接着評価

96 well plateにhMSC を 5×10^4 cells/wellの密度で播種し、1 時間培養した後PBSで 2 回洗浄した。第一章第一節実験の部【4】に準じた方法で各well の吸光度を測定した。

【3】細胞表面蛍光強度測定

第一章実験の部【7】に準じた方法で細胞表面蛍光強度を測定した。

【4】ヒト肝類洞血管内皮細胞 (hLSME)培養

hLSME は DS ファーマ社から購入した。hLSME は DS ファーマ社から購入した CS-C 培養液中で培養した。

【5】PAMAM導入量子ドット(PAMAM-QD)の合成¹⁰⁶⁾

8 μ MのNH₂-PEG-QD と 0.5 mMのBS3 溶液を室温で1 時間攪拌した後、NAP-5 カラムに通して精製した。QDのアミノ基に対して 40 倍モル比のPAMAMを精製液に加え、室温で2 時間攪拌した。さらにglycine (最終濃度 50 mM) を加えて 15 分攪拌することで、QDに対するPAMAMの反応を止め、PD10カラム によって精製した。反応後のPAMAM-QD の蛍光強度を測定し、濃度既知のNH₂-PEG-QDを用いて作成した検量線を用いて濃度を算出した。

【6】hLSME への接着評価

hMSCが接着したdishに 5 nMのPAMAM-QDを含むDMEMを加えて4 時間培養することでhMSCを蛍光標識した。hLSMEを 2×10^5 cells/wellで播種し、24 時間培養した 12 well plateにhMSCを 3×10^5 cells/wellで播種し、37 °Cで 30 分共培養した後、PBSで 2 回洗浄し、未接着のhMSCを除去した。トリプシン処理によって接着したhMSCおよびhLSMEを回収し、2 種類の細胞を含む分散液をフローサイトメトリーで分析し、655 nmの蛍光強度が 1000 より高い細胞をhMSC、低い細胞をhLSMEと識別し、両者の細胞数の比を測定し

た。hLSMEの細胞数に対するhMSCの細胞数の比を接着率として算出した。

【7】 ICAM-1 発現量の測定

TNF- α を含むCS-C培養液中で培養したhLSMEをトリプシン処理によって回収し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のICAM-1(CD54) antibody-FITCを含むPBS中を加え、氷上で1時間静置した。その後hLSMEを0.1%のBSAを含むPBSで洗浄し、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。

【8】 hLSME 上での移動速度評価

フローチャンバー (μ -Slide6(VI)-flow through ; ibidi社製)^{107, 108})にhLSMEを 7.5×10^4 cells/laneで播種し、24時間培養した後、100 ng/mLのTNF- α を含むCS-C培養液に交換し4時間培養した。【6】と同様の方法で蛍光標識したhMSCを 1×10^6 cells/mLに調製し、チャンバー内に一定速度(流速: 3.6 mL/hour、せん断応力: 0.1 dyn/cm²)で流した。流速はシリンジポンプ (アズバイオ社製)で制御した。hLSME上を流れるhMSCの挙動を蛍光顕微鏡に接続したカメラで撮影した(顕微鏡: Nikon Ti-E Nikon社製、カメラ: ORCAD2 浜松ホトニクス社製、ソフト: NIS Elements Nikon社製、撮影時間: 10 sec、蛍光露光時間: 3 msec、撮影速度: 20 frame/sec)。撮影した動画をimage JのプラグインであるParticle Track and Analysis (PTA)を用いて解析した。継時的移動速度は、各hMSCの0.25 secごとの移動距離から算出した。また、各hMSCの平均移動速度は動画に写っていた時間および動画内での総移動距離から算出した。

第三章 第二節 実験の部

【1】 試薬

Flu-PEG-DSPE、PBS、DMEM、トリパンブルーを使った実験は第一章と同じものを用いた。 α CDは、第二章第一節と同じものを用いた。CS-C培養液、PAMAM導入QD、TNF- α を使った実験は第三章第一節と同じものを用いた。

【2】 plastic dish への接着評価

plastic dish への接着評価は第三章第一節実験の部【2】に準じた方法で行った。

【3】 細胞表面蛍光強度測定

第一章実験の部【7】に準じた方法で細胞表面蛍光強度を測定した。

【4】 hLSME への接着評価

hLSME への接着評価は第三章第一節実験の部【6】に準じた方法で行った。

【5】 hLSME 上での移動速度評価

hLSME 上での移動速度評価は第三章第一節実験の部【8】に準じた方法で行った。

第三章 第三節 実験の部

【1】 試薬

PBS、DMEM、トリパンブルーを使った実験は第一章と同じものを用いた。 α CD、DMSO、N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIPCI)を使った実験は第二章第一節と同じものを用いた。CS-C 培養液、PAMAM 導入 QD、TNF- α を使った実験は第三章第一節と同じものを用いた。Fmoc-N-amido-PEG2-acid は Quanta Biodesign 社から購入した。NovaSyn Fmoc-Gly-TGT resin、Fmoc-Ile-OH (I)、Fmoc-Thr(tBu)-OH (T)、Fmoc-Gly-OH (G)、Fmoc-Glu(OtBu)-OH (E)、Fmoc-Ala-OH (A)、Boc-Ile-OH (I)、Boc-Glu(OtBu)-OH (E)、Boc-Ala-OH (A)は Novabiochem 社から購入した。Fmoc-Asp(OtBu)-OH (D)は BACHEM 社から購入した。1-hydroxybenzotriazole (HOBt)は渡辺化学工業株式会社から購入した。メタノール、アセトニトリルの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) グレード品は和光純薬株式会社から購入した。ヘキサンはナカライテスク社から購入した。ICAM-1(CD54) antibody-FITC は AbD 社から購入した。Bovine serum albumin (BSA) はシグマ社から購入した。

【2】 質量分析

第二章第一節実験の部【2】に準じた方法で質量分析を行った。

【3】 EG2-保護ペプチドの合成、精製

NovaSyn Fmoc-Gly-TGT resinに対してDMFに溶解したFmoc-N-amido-PEG2-acidおよび2種の反応促進剤 (HOBt、DIPCI)を加え、室温で2時間振盪することで反応させた。反応終了後、溶媒を除き、resinを洗浄した後、20%のピペリジンDMF溶液を新たにresinに加えて30分振盪することで保護基であるFmoc基を除去した。その後、同様の手技でFmoc-保護アミノ酸の反応と保護基の除去を繰り返し、最後の残基はBoc-保護アミノ酸を用いて反応を行った。加えるFmoc-N-amido-PEG2-acid、Fmoc-保護アミノ酸、Boc-保護アミノ酸、反応促進剤の量は、resin表面の反応点に対して4倍モル量とした。全ての残基を反応させた後、resinを洗浄、乾燥し、脱離液 (酢酸 : 2,2,2-Trifluoroethanol : Dichloromethane = 1 : 1 : 3)を加えて2時間振盪することでBoc-保護ペプチド-EG2をresinから脱離した。脱離液をナスフラスコへ回収し、ヘキサンを加えてエバポレートすることで溶媒を揮発させ、Boc-保護ペプチド-EG2を得た。Boc-保護ペプチド-EG2を少量のクロロホルムに溶解し、HPLCで精製した (カラム : 5C₁₈AR-II (ナカライテスク社)、移動相 : メタノール/アセトニトリル = 1/1)。

【4】 DSPE-EG2-ペプチドの合成、精製

精製したBoc-保護ペプチド-EG2、DSPE、DIPCIをモル比 2 : 1 : 8 でクロロホルムに溶解し、50°Cで一晩振盪することでEG2 末端のCOOH基とDSPE末端のNH₂基を反応させた。反応液をエバポレートし、得られた固形物にTrifluoroacetic acid (TFA)を加えて室温で2時間振盪することでペプチドの保護基を脱離した。反応液を再度エバポレートし、得られた固形物をクロロホルムに溶解し、透析膜(スペクトラポア MWCO 1000 フナコシ社製)に入れ、メタノールに対して1日透析した。さらに透析後液を新しい透析膜(スペクトラポア MWCO 3500 フナコシ社製)に入れ、水に対して2日透析した後、凍結乾燥した。

【5】 hLSME への接着評価

hLSME への接着評価は第三章第一節実験の部【6】に準じた方法で行った。

【6】 hLSME 上での移動速度評価

hLSME 上での移動速度評価は第三章第一節実験の部【8】に準じた方法で行った。

【7】 統計学的解析

統計学的解析は、第一章実験の部【14】と同様の方法で行った。

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. Mirotso, 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.

[59] M.S. Akhter, S.M. Al-Alawi, Influence of alcohols on the critical micelle concentration of micellar solutions, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 164 (2000) 247-255.

[60] H. Igimi, S. Asakawa, R. Tamura, F. Yamamoto, H. Shimura, DMSO Preparation as a direct solubilizer of calcium bilirubinate stones, *Hepato-Gastroenterology*, 41 (1994) 65-69.

[61] C. MacDonald, W. Lyzenga, D. Shao, R.U. Agu, Water-soluble organic solubilizers for in vitro drug delivery studies with respiratory epithelial cells: Selection based on various toxicity indicators, *Drug Delivery*, 17 (2010) 434-442.

[62] M.E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (2007) 645-666.

[63] M.E. Davis, M.E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3 (2004) 1023-1035.

[64] E.M.M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochemistry*, 39 (2004) 1033-1046.

[65] T. Loftsson, D. Hreinsdottir, M. Masson, Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 302 (2005) 18-28.

- [66] Y. Suzaki, T. Taira, D. Takeuchi, K. Osakada, Competing supramolecular assembly of amphiphiles to form micelles or pseudorotaxanes, *Organic Letters*, 9 (2007) 887-890.
- [67] G.M. Nicolle, A.E. Merbach, Destruction of perfluoroalkyl surfactant aggregates by beta-cyclodextrin, *Chemical Communications*, (2004) 854-855.
- [68] C.A. Lopez, A.H. de Vries, S.J. Marrink, Molecular Mechanism of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction, *Plos Computational Biology*, 7 (2011).
- [69] H. Ohvo, J.P. Slotte, Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: Effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate, *Biochemistry*, 35 (1996) 8018-8024.
- [70] R. Zidovetzki, I. Levitan, Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1768 (2007) 1311-1324.
- [71] C.M. Hawes, H. Wiemer, S.R. Krueger, B. Karten, Pre-synaptic defects of NPC1-deficient hippocampal neurons are not directly related to plasma membrane cholesterol, *Journal of Neurochemistry*, 114 (2010) 311-322.
- [72] A. Harada, H. Adachi, Y. Kawaguchi, M. Kamachi, Recognition of alkyl groups on a polymer chain by cyclodextrins, *Macromolecules*, 30 (1997) 5181-5182.
- [73] A. Hashidzume, A. Harada, Macromolecular recognition by cyclodextrins. Interaction of cyclodextrins with polymethacrylamides bearing hydrophobic amino acid residues, *Polymer*, 47 (2006) 3448-3454.
- [74] F. Hirayama, K. Uekama, H. Koinuma, Molecular-dynamics of prostaglandin-F2-alpha-cyclodextrin complexes in aqueous-solution, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 28 (1980) 1975-1980.
- [75] S. Rozou, E. Antoniadou-Vyza, Chromatographic behaviour of naproxen-cyclodextrin complexes stationary phase C8 alkyl chain as competitor for the drug release from cyclodextrin cavity, *Journal of Chromatography A*, 1041 (2004) 187-193.
- [76] T. Hara, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama, Enhanced bioavailability of a new thiazolidine derivative FPFS-410, an antidiabetic and lipid-lowering drug, after oral administration of its hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex to bile duct-cannulated rats, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95 (2006) 1771-1782.
- [77] M. Afadzi, C.e.L. Davies, Y.H. Hansen, T. Johansen, O.K. Standal, R. Hansen, E.A. Nilssen, B. Angelsen, Effect of ultrasound parameters on the release of liposomal calcein, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 38 (2012) 476-486.
- [78] J.A. Ewe, W.N. Wan Abdullah, R. Bhat, A.A. Karim, M.T. Liang, Enhanced growth of lactobacilli and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk upon ultrasound-treatment, *Ultrasonics Sonochemistry*, 19 (2012) 160-173.
- [79] Y. Taniyama, K. Tachibana, K. Hiraoka, T. Namba, K. Yamasaki, N. Hashiya, M. Aoki, T. Ogihara, K. Yasufumi, R. Morishita, Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound,

Circulation, 105 (2002) 1233-1239.

[80] E.F. Sant'Anna, R.M. Leven, A.S. Viridi, D.R. Sumner, Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression, *Journal of Orthopaedic Research*, 23 (2005) 646-652.

[81] K. Sena, R.M. Leven, K. Mazhar, D.R. Sumner, A.S. Viridi, Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 31 (2005) 703-708.

[82] C.H. Lai, S.C. Chen, L.H. Chiu, C.B. Yang, Y.H. Tsai, C.S. Zuo, W.H.S. Chang, W.F. Lai, Effects of low-intensity pulsed ultrasound, dexamethasone/TGF-beta 1 and/or BMP-2 on the transcriptional expression of genes in human mesenchymal stem cells: chondrogenic vs. Osteogenic differentiation, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 36 (2010) 1022-1033.

[83] K. Hynynen, The threshold for thermally significant cavitation in dog thigh muscle in vivo, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 17 (1991) 157-169.

[84] C. Bougrier, C. Albasi, J.P. Delgenes, H. Carrere, Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability, *Chemical Engineering and Processing*, 45 (2006) 711-718.

[85] F. Baffigi, C. Bartoli, Influence of the ultrasounds on the heat transfer in single phase free convection and in saturated pool boiling, *Experimental Thermal and Fluid Science*, 36 (2012) 12-21.

[86] L.H. Thompson, L.K. Doraiswamy, Sonochemistry: Science and engineering, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 38 (1999) 1215-1249.

[87] D. Dalecki, Mechanical bioeffects of ultrasound, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 6 (2004) 229-248.

[88] C.R. Hickenboth, J.S. Moore, S.R. White, N.R. Sottos, J. Baudry, S.R. Wilson, Biasing reaction pathways with mechanical force, *Nature*, 446 (2007) 423-427.

[89] A.J. Nauta, W.E. Fibbe, Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells, *Blood*, 110 (2007) 3499-3506.

[90] R.H. Lee, A.A. Pulin, M.J. Seo, D.J. Kota, J. Ylostalo, B.L. Larson, L. Semprun-Prieto, P. Delafontaine, D.J. Prockop, Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6, *Cell Stem Cell*, 5 (2009) 54-63.

[91] K. Nemeth, B. Mayer, E. Mezey, Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands, *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 88 (2010) 5-10.

[92] T.J. Myers, F. Granero-Molto, L. Longobardi, T.S. Li, Y. Yan, A. Spagnoli, Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10 (2010) 1663-1679.

[93] E. Ben-Ami, S. Berrih-Aknin, A. Miller, Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases, *Autoimmunity Reviews*, 10 (2011) 410-415.

[94] D.J. Prockop, J.Y. Oh, Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of

- Inflammation, *Molecular Therapy*, 20 (2012) 14-20.
- [95] J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, J.M. Jones, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282 (1998) 1145-1147.
- [96] F. Bretzner, F. Gilbert, F. Baylis, R.M. Brownstone, Target populations for first-in-human embryonic stem cell research in spinal cord injury, *Stem Cell*, 8 (2011) 468-475.
- [97] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126 (2006) 663-676.
- [98] Y. Mochiduki, K. Okita, Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications, *Biotechnology Journal*, 7 (2012) 789-797.
- [99] Y. Shiba, M. Takahashi, T. Hata, H. Murayama, H. Morimoto, H. Ise, T. Nagasawa, U. Ikeda, Bone marrow CXCR4 induction by cultivation enhances therapeutic angiogenesis, *Cardiovascular Research*, 81 (2009) 169-177.
- [100] S.Q. Chen, R. Alon, R.C. Fuhlbrigge, T.A. Springer, Rolling and transient tethering of leukocytes on antibodies reveal specializations of selectins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 3172-3177.
- [101] B.A. Imhof, M. Aurrand-Lions, Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes, *Nature Reviews Immunology*, 4 (2004) 432-444.
- [102] K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nature Reviews Immunology*, 7 (2007) 678-689.
- [103] H. Yagi, A. Soto-Gutierrez, B. Parekkadan, Y. Kitagawa, R.G. Tompkins, N. Kobayashi, M.L. Yarmush, Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing, *Cell Transplantation*, 19 (2010) 667-679.
- [104] S.K. Kang, I.S. Shin, M.S. Ko, J.Y. Jo, J.C. Ra, Journey of Mesenchymal Stem Cells for Homing: Strategies to Enhance Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy, *Stem Cells International*, (2012).
- [105] Y.J. Wu, R.C.H. Zhao, The Role of Chemokines in Mesenchymal Stem Cell Homing to Myocardium, *Stem Cell Reviews and Reports*, 8 (2012) 243-250.
- [106] Y. Higuchi, C. Wu, K.L. Chang, K. Irie, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots for efficient labeling of primary cultured mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 32 (2011) 6676-6682.
- [107] N. Nishimichi, H. Hayashita-Kinoh, C. Chen, H. Matsuda, D. Sheppard, Y. Yokosaki, Osteopontin undergoes polymerization in vivo and gains chemotactic activity for neutrophils mediated by integrin $\alpha 9\beta 1$, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011) 11170-11178.
- [108] V. Aldridge, A. Garg, N. Davies, D.C. Bartlett, J. Youster, H. Beard, D.P. Kavanagh, N. Kalia, J. Frampton, P.F. Lalor, P.N. Newsome, Human mesenchymal stem cells are recruited to injured liver in a $\beta 1$ -integrin and CD44 dependent manner, *Hepatology*, 56 (2012) 1063-1073.
- [109] Y.H. Chen, S.J. Lin, H.H. Ku, M.S. Shiao, F.Y. Lin, J.W. Chen, Y.L. Chen, Salvianolic acid B

attenuates VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF-alpha-treated human aortic endothelial cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 82 (2001) 512-521.

[110] J.M. Cook-Mills, T.L. Deem, Active participation of endothelial cells in inflammation, *Journal of Leukocyte Biology*, 77 (2005) 487-495.

[111] Z. Zhou, M.C. Connell, D.J. MacEwan, TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells, *Cell Signal*, 19 (2007) 1238-1248.

[112] E.P. Botosoa, M. Maillason, M. Mougin-Degraef, P. Remaud-Le Sac, J.F. Gestin, Y. Jacques, J. Barbet, A. Faivre-Chauvet, Antibody-Hapten Recognition at the Surface of Functionalized Liposomes Studied by SPR: Steric Hindrance of Pegylated Phospholipids in Stealth Liposomes Prepared for Targeted Radionuclide Delivery, *Journal of Drug Delivery*, 2011 (2011) 368535.

[113] T. Yuda, K. Maruyama, M. Iwatsuru, Prolongation of liposome circulation time by various derivatives of polyethyleneglycols, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19 (1996) 1347-1351.

[114] S. Mishra, P. Webster, M.E. Davis, PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles, *European Journal of Cell Biology*, 83 (2004) 97-111.

[115] M.S. Rosendahl, D.H. Doherty, D.J. Smith, S.J. Carlson, E.A. Chlipala, G.N. Cox, A long-acting, highly potent interferon alpha-2 conjugate created using site-specific PEGylation, *Bioconjugate Chemistry*, 16 (2005) 200-207.

[116] F.M. Veronese, G. Pasut, PEGylation, successful approach to drug delivery, *Drug Discovery Today*, 10 (2005) 1451-1458.

[117] H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, M. Oishi, Y. Nagasaki, Y. Kihira, M. Ueno, H. Kobayashi, H. Kikuchi, H. Harashima, Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid, *Gene Therapy*, 14 (2007) 68-77.

[118] M.L. Arbones, D.C. Ord, K. Ley, H. Ratech, C. Maynardcurry, G. Otten, D.J. Capon, T.F. Tedder, Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice, *Immunity*, 1 (1994) 247-260.

[119] L. Cartier, O. Hartley, M. Dubois-Dauphin, K.H. Krause, Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases, *Brain Research Reviews*, 48 (2005) 16-42.

[120] P. Panina, M. Mariani, D. D'Ambrosio, Chemokine receptors in chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *Current Drug Targets*, 7 (2006) 669-674.

[121] U.M. Walter, A.C. Issekutz, Role of E- and P-selectin in migration of monocytes and polymorphonuclear leucocytes to cytokine and chemoattractant-induced cutaneous inflammation in the rat, *Immunology*, 92 (1997) 290-299.

[122] U.M. Walter, A.C. Issekutz, The role of E- and P-selectin in neutrophil and monocyte migration in

- adjuvant-induced arthritis in the rat, *European Journal of Immunology*, 27 (1997) 1498-1505.
- [123] M.A. Williams, J.S. Solomkin, Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning, *Journal of Leukocyte Biology*, 65 (1999) 725-736.
- [124] E.Y. Choi, S. Santoso, T. Chavakis, Mechanisms of neutrophil transendothelial migration, *Frontiers in Bioscience*, 14 (2009) 1596-1605.
- [125] I.D. Campbell, M.J. Humphries, Integrin Structure, Activation, and Interactions, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3 (2011).
- [126] S.D. Marlin, T.A. Springer, Purified intercellular-adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), *Cell*, 51 (1987) 813-819.
- [127] H.P. Heidenkummer, A. Kampik, Intercellular-adhesion molecule-1 (ICAM-1) and leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) expression in human epiretinal membranes, *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 230 (1992) 483-487.
- [128] H. Yusuf-Makagiansar, M.E. Anderson, T.V. Yakovleva, J.S. Murray, T.J. Siahhaan, Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases, *Medicinal Research Reviews*, 22 (2002) 146-167.
- [129] A. vandeStolpe, P.T. vanderSaag, Intercellular adhesion molecule-1, *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 74 (1996) 13-33.
- [130] K.A. Roebuck, A. Finnegan, Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression, *Journal of Leukocyte Biology*, 66 (1999) 876-888.
- [131] M. Shimaoka, T. Xiao, J.H. Liu, Y.T. Yang, Y.C. Dong, C.D. Jun, A. McCormack, R.G. Zhang, A. Joachimiak, J. Takagi, J.H. Wang, T.A. Springer, Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation, *Cell*, 112 (2003) 99-111.
- [132] S. Kang, C.U. Kim, X.L. Gu, R.M. Owens, S.J. van Rijn, V. Boonyaleepun, Y.X. Mao, T.A. Springer, M.M. Jin, Complex Structure of Engineered Modular Domains Defining Molecular Interaction between ICAM-1 and Integrin LFA-1, *Plos One*, 7 (2012).
- [133] S. Gronthos, D.M. Franklin, H.A. Leddy, P.G. Robey, R.W. Storms, J.M. Gimble, Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells, *Journal of Cellular Physiology*, 189 (2001) 54-63.
- [134] L.L. Hou, H. Cao, D.M. Wang, G.R. Wei, C.X. Bai, Y. Zhang, X.T. Pei, Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro, *International Journal of Hematology*, 78 (2003) 256-261.
- [135] H. Yusuf-Makagiansar, T.V. Yakovleva, B.A. Tejo, K. Jones, Y.B. Hu, G.M. Verkhivker, K.L. Audus, T.J. Siahhaan, Sequence recognition of alpha-LFA-1-derived peptides by ICAM-1 cell receptors: Inhibitors of T-cell adhesion, *Chemical Biology & Drug Design*, 70 (2007) 237-246.
- [136] S. Fuchs, T. Kapp, H. Otto, T. Schoneberg, P. Franke, R. Gust, A.D. Schluter, A surface-modified dendrimer set for potential application as drug delivery vehicles: Synthesis, in vitro toxicity, and

intracellular localization, *Chemistry-a European Journal*, 10 (2004) 1167-1192.

[137] S. Fuchs, H. Otto, S. Jehle, P. Henklein, A.D. Schluter, Fluorescent dendrimers with a peptide cathepsin B cleavage site for drug delivery applications, *Chemical Communications*, (2005) 1830-1832.

[138] F. Garcia-Martin, L.J. Cruz, R.A. Rodriguez-Mias, E. Giralt, F. Albericio, Design and synthesis of FAJANU: a de novo C(2) symmetric cyclopeptide family, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (2008) 3194-3202.