JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	両性電解質高分子の構造と凍結保護効果の相関および細胞内浸透による凍結保存
Author(s)	山﨑, 椋太
Citation	
Issue Date	2024-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/19076
Rights	
Description	Supervisor: 松村 和明, 先端科学技術研究科, 博士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

氏名	山 﨑 椋 太		
学位の種類	博士（マテリアルサイエンス）		
学位記番号	博材第 581 号		
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 22 日		
論文題目	Cryopreservation by intracellular permeation of polyampholytes and correlation between polymer structure and cryoprotective effect		
論文審査委員	松村　和明	北陸先端科学技術大学院大学	教授
	栗澤　元一	同	教授
	松見　紀佳	同	教授
	都　英次郎	同	准教授
	遊佐　真一	兵庫県立大学	准教授

論文の内容の要旨

During cryopreservation, cryoprotectants are used to protect cells from cryoinjury. Currently, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) is commonly used as a cryoprotectant. However, since DMSO is highly cytotoxic and membrane-permeable, it must be removed promptly after freezing and thawing. Polyampholytes have high cryoprotective effects, but the cryoprotective mechanism is poorly understood. In this thesis, I focused on elucidating the cryoprotective mechanism of polyampholytes and their application to cryopreservation using intracellular permeation.

In Chapter 2, in addition to the previously reported poly(2-(dimethyl amino)ethyl methacrylate/methacrylic acid) (pD), I synthesized poly(vinyl acetate/acrylic acid (AA)/2-(dimethyl amino)ethyl acrylate (DMAEA)) (pV) and poly(methyl vinyl ether/AA/DMAEA) (pM) with alternating cations and anions, and poly(2-acrylamido-2-methyl propanesulfonic acid/(3-acrylamidopropyl)trimethyl ammonium chloride) (pA) with a higher degree of dissociation, and correlated their cryoprotective effects and polymer structures. The cell recovery rate of the alternating array pV was the highest and comparable to that of carboxylated ε-poly-L-lysine (PLL). Cryoprotective effect of pA was the lowest, and measurements of residual water volume by temperature variable solid state magic angle spinning NMR showed that freezing of bulk water was significantly higher. In addition, the tendency of vitrification and trapping of Na ions was observed in the higher temperature range of pV and PLL, which showed high cryoprotective effect, suggesting that the ability to adjust salt concentration and vitrification during freezing by trapping salt or water is important for the cryoprotective effect of amphoteric electrolyte polymers.

In Chapter 3, we attempted to enhance the cryoprotective effect by utilizing the permeation of the zwitterionic polymer poly(sulfobtaine) into cells. Furthermore, we synthesized a copolymer of DMSO, a cell-permeable cryoprotectant, and 2-(methyl sulfinyl)ethyl methacrylate (MSEMA), which has the same methyl sulfinyl group, and confirmed its cryoprotective effect. Intracellular permeation was confirmed by the fluorescently modified polymer, and the polymer was found to easily counter diffuse by incubating at 37 °C for about 30 minutes after permeation. Poly(SPB) and poly(SPB/MSEMA10) improved the cell recovery rate by about 20 or 30% through intracellular permeation. Cell recovery rate after counter diffusion of the polymer at 37 °C was comparable to

that before polymer permeation, and the cell pellets alone can be cryopreserved after polymer permeation, indicating that poly(SPB) can improve cryoprotection by intracellular permeation.

This study revealed that vitrification and salt/water trapping are important for cryoprotection of polyampholytes. This understanding of the cryoprotection mechanism will provide important guidelines for the molecular design of cryoprotectants in the future. Furthermore, the ability of zwitterionic polymers to reversibly permeate into cells and enhance their cryoprotective effects offers the potential for cryopreservation of more complex three-dimensional cellular structures such as spheroids, and the ability of artificial polymers to It is expected that this will open up new avenues for development.

[keyword] Cryopreservation, Polyampholytes, solid-state MAS NMR, Intracellular permeation

論文審査の結果の要旨

本論文は、高分子凍結保護剤の機序解明とその細胞組織凍結保存への応用展開を目指したものである。細胞の凍結保護剤は 1940 年代に報告があり、現在ではジメチルスルホキシド(DMSO)が最も良く使われている。DMSO は効果が高く安価であるが、毒性や細胞の分化への影響もあることから、特に再生医療分野では代替物質が望まれている。これまで、高分子系の凍結保護物質であるカルボキシル化ポリリジンについて、固体 NRM により凍結時の水や塩、ポリマー鎖のダイナミクスを調べた結果、細胞の脱水を制御していることが報告されている。本研究では、様々な構造を持った両性電解質高分子水溶液の凍結時の固体 NMR による塩及び水の挙動を詳細に明らかにすることで、構造と活性の相関を解明することを目的とした。その結果、解離度の高いスルホン酸塩と 4 級アミンを側鎖に持つ両性電解質高分子では、バルク水の凍結が早い段階でおきることで急激な塩の濃縮による浸透圧障害のため、保護効果が低い結果となることがわかった。また、交互共重合体の両性電解質高分子では、低温における水のガラス化および塩の高分子への強い相互作用により、凍結時に脱水に最適な浸透圧になるように調整されることが高い凍結保護効果につながったと考えられる結果を得た。また、分子量も凍結時の塩や水分子の挙動に大きな影響を及ぼすことが確認され、おおむね凍結保護効果をうまく説明出来るパラメータを評価することに成功した。この結果により、新たな高分子系の凍結保護物質の分子設計を行うための指針を得ることが可能となった。次に、ベタイン構造を持つ双性イオンポリマーが細胞膜を通過するということを利用し、DMSO 類似構造を持つ高分子とベタイン高分子の共重合体を合成し、細胞内に凍結保護高分子を導入することを試みた。この共重合体はエンドサイトーシスを介することなく細胞内に浸透し、また洗浄により速やかに除去する事が可能であった。この高分子溶液に細胞を浸漬し、細胞外の液体を除去した外部保護液がない条件で凍結したところ、効率よく凍結保存することが可能であった。この成果は、現状では凍結が困難であるサイズの大きな細胞や組織の凍結保存への応用に道筋をつける結果となった。

以上、本研究では、今後期待される再生医療などの実用化に有用な凍結保存技術において、高分子保護剤の分子設計に関する指針を示し、またその新しい評価方法を提唱した。また、凍結保存が困難な組織などの高次構造体の凍結保護を可能とする高分子についての知見を得るなど、学術的にも産業応用上にも貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。