

動的核スピン偏極による細胞内氷晶の選択的構造解析

株式会社東レリサーチセンター 中田 克

1. Introduction

細胞や臓器の凍結保存は、畜産、食品および再生医療分野において、貴重な細胞や食料資源を長期・安定的に保管・使用するために重要な技術である。凍結保存における細胞障害としては、主に細胞内での氷晶形成による細胞内構造や細胞膜が物理的に破壊されることが懸念されている。凍結保存時における細胞保護を目的として使用される凍結保護剤は、主に細胞内氷晶形成を抑制することをターゲットとして研究・開発が進められている。しかし、細胞の凍結保存過程においては凍結保護剤そのものの細胞毒性や細胞内外の浸透圧バランスによる細胞の体積変化・脱水、酸化ストレスなどによる障害などさまざまな物理的、生物的な要因が競合的に細胞障害を引き起こしていると考えられ、凍結保存における細胞障害の詳細メカニズムは未解明の課題である。

凍結保護剤は 1949 年の Polge ら(Nature, 164(1949)666)によるグリセロールの凍結保護効果の発見を契機にジメチルスルホキシド(DMSO)、エチレングリコール(EG)やプロピレングリコールなど低分子系保護剤、さらにはポリエチレングリコールやポリビニルピロリドン(PVP)などの高分子系保護剤の研究・開発が行われている。凍結保護剤の開発促進のためには、保護剤による細胞障害抑制効果の物理的な評価法を確立し、保護メカニズムを解明することが重要である。申請者は保護剤として PVP を用いた凍結細胞について、SPring-8 BL24XU の μ -ビーム X 線回折により細胞内外の氷晶構造解析を行い、細胞内の氷の結晶子サイズが細胞外に比べてわずかに小さいことを見出した(低温生物工学会誌, 67(2021)15)。しかし、光学顕微鏡では凍結細胞の内外で明瞭な明暗差が確認されたことに比べて、X 線回折ではその差異は曖昧であった。さらに μ -ビーム X 線回折では 1 個の細胞のみを対象としていること、統計精度(実際の生存率評価では数 100 個の細胞を対象)に不安が残っている。

そこで 2020AM0024 課題では PVP を保護剤として細胞懸濁液中の多数の細胞、数 nm スケールの氷晶構造を対象としながら、細胞内の氷晶構造情報を選択的に抽出することを目的として動的核スピン偏極小角中性子散乱(DNP-SANS)を実施した。本課題では DMSO/EG を凍結保護剤として用い、昨年度課題と比較を行うこととした。

2. Experiment

培養したマウス胎仔胚由来の C3H10T1/2 細胞を回収し、TEMPOL とラジカルクエンチャー(Mn-EDTA)を添加した 15wt% DMSO/15wt% EG/PBS 溶液(DE 溶液)で懸濁し、懸濁液試料を調製し、4.2 K と 1.2 K で DNP-SANS 実験を実施した。加速器出力は 720 kW であり、各条件で 0.5 時間積算した。

予備実験として細胞無しの DE 溶液についてクエンチャー有無による DNP-NMR で H 偏極率(PH)を測定した。また、細胞懸濁液については細胞濃度を変えて DNP-NMR を測定し、細胞内の選択的偏極の検証を行った。

3. Results

4.2 K における DNP-NMR から得られた偏極度の結果を Fig. 1 に示す。目視観察と X 線回折の結果から、PVP 50wt%溶液ではアモルファス氷、DE 溶液では微細な氷晶、PBS では粗大な氷晶がそれぞれ形成されていた。Fig. 1(a)から氷晶が微細なほど偏極度が高いことが確認された。氷晶が形成され、氷晶外に TEMPOL が排除されることで系全体へのスピン拡散の伝達が阻害された結果、氷晶サイズと偏極度の相関が現れたと考える。

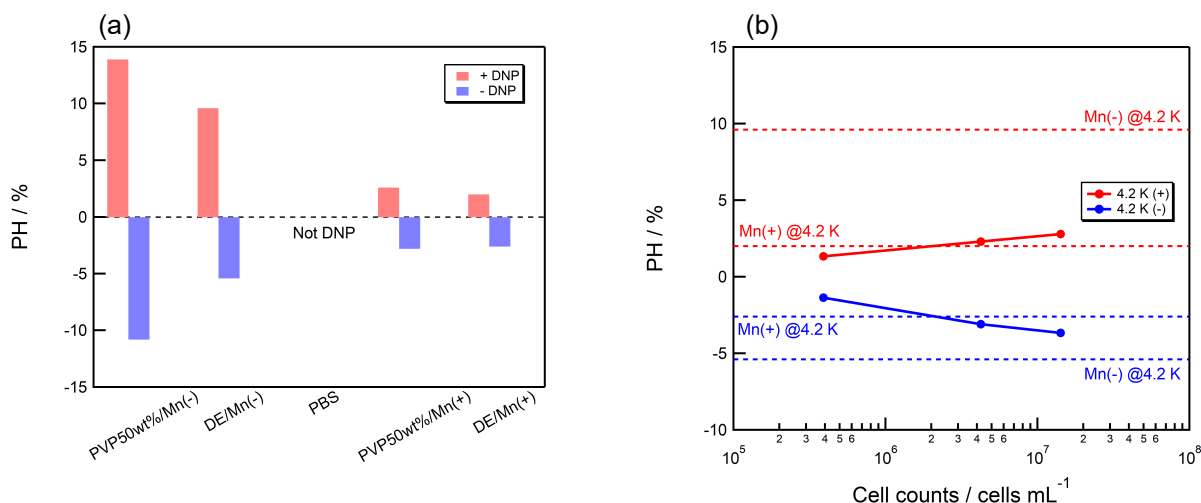


Figure 1. (a) Polarization degree of H, PH, in solutions evaluated with DNP-NMR at 4.2 and 1.2 K. Mn(-) and Mn(+) represent absence and presence of Mn-EDTA, respectively. (b) PH against cell concentration in cell suspensions of DE solution. Dashed lines represent the PH values of DE solution without cells.

また、ラジカルクエンチャーを添加した系(Mn(+))では、無添加の系(Mn(-))に比べて顕著に偏極度が小さく、ラジカルクエンチャーによるDNP抑制を検証することができた。Fig. 1(b)には偏極度の依存性を示した。細胞濃度が増加するにしたがって、偏極度が向上していることから細胞内を選択的に偏極できている可能性が高いと考える。Fig. 1(b)の破線は細胞無し溶液で得られた偏極度であるが、 10^7 cells/mL では偏極度が小さく十分な偏極度を達成するためには 10^{10} cells/mL程度の細胞濃度の懸濁液が必要なことが推察される。さらに細胞濃度が小さい系では、細胞無/ラジカルクエンチャー有の系に比べて偏極度が小さいことから、細胞の存在によって細胞外の氷晶形成の挙動が変化していることが想像された。なお、1.2 K では細胞無/クエンチャー有の系でも偏極度が高く(50~60%)、明瞭な細胞濃度依存性が確認されなかったことから、細胞外も偏極されていると推察される。

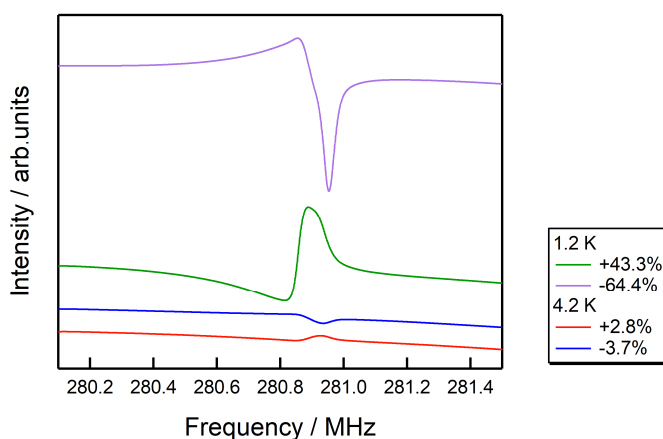


Figure 2. DNP-NMR spectra for cell suspension of DE solution of 10^7 cells/mL at 4.2 and 1.2 K.

Fig. 2に細胞懸濁液(10^7 cells/mL)のDNP-NMRスペクトルを示す。細胞内のみが偏極されているであろう4.2 Kでは単成分のNMRスペクトルが検出されたが、細胞外も偏極されているであろう1.2 Kではショルダー状のNMRスペクトルが検出された。これは細胞内外の異なる状態のH核(氷あるいは細胞由来)を分離して評価できている可能性を示すものであり、非常に興味深い結果である。

4. Conclusion

本課題では、2020AM0024 に引き続きラジカルクエンチャーを用いて細胞内のみを選択的に偏極できることを検証した。細胞内の氷晶構造については、散乱コントラストを詳細に評価し、偏極率が異なる SANS データの解析を継続する。

1.2 K の DNP-NMR で観測された 2 成分の NMR スペクトルを解析し、細胞内のみが偏極されているであろう 4.2 K の結果と比較し、細胞内外の NMR 信号を分離できるか試み、各成分の偏極度を用いた DNP-SANS データの解析を検討する。