

研究終了報告書

「生命科学のためのジメチルスルホキシドを超える Universal solvent」

研究期間：2019 年 10 月～2022 年 3 月

研究者：黒田 浩介

1. 研究のねらい

生命科学において、水の次に高頻度で使用する溶媒は、有機溶媒の中では毒性が低いジメチルスルホキシド (DMSO) である (図 1)。DMSO は「細胞の凍結保存剤」や、



図 1 本研究のねらい

「細胞に対する薬剤添加時の溶媒」などとして永らく用いられ、universal solvent として扱われている。しかし DMSO はあくまでも“有機溶媒の中では低毒性”であり、例えば 1～2% 程度の添加でも細胞を殺してしまう。さらに、例えば 0.1% などの低濃度であっても、細胞の機能へ悪影響を及ぼすことが知られている。しかしながらこれまで、DMSO の代わりは探されてこなかった。その理由としては、有機溶媒は調べ尽くされており、DMSO よりも低毒性な溶媒が存在するかもしれない、という発想がなかったことが挙げられる。

ここで私はイオン液体 (100 °C 以下で液体の塩) と呼ばれる比較的新しい溶媒に注目した。しかし、基本的にイオン液体は毒性が高く、細胞には適用できない。その一方で、2017 年に私は大腸菌への毒性が非常に低い“双性型のイオン液体 (双性イオン液体、図 2)”を開発し、セルロース系バイオエタノールの高効率生産を達成した。本研究では、この双性イオン液体が大腸菌だけではなく、「ヒト細胞に対しても低毒性であること」を明らかにすることを第一の目的とした。さらに、その双性イオン液体を「細胞の凍結保存剤」および「難溶性薬剤の添加溶媒」として利用することを第二の目的とした。そしてさらに、双性イオン液体を使って、DMSO では実現困難な「タンパクフリー凍結保存剤」および「シスプラチンの添加溶媒」の開発を第三の目的とした。シスプラチンは疎水性の抗がん剤であるが、DMSO へ溶解することでその抗がん作用を失うことが知られている。

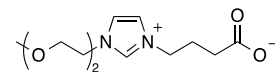


図 2 低毒性な双性イオン液体 OE₂imC₃C の構造

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、「細胞の凍結保存剤」および「非水溶性の薬剤の溶媒」として利用できる、低毒性な新規溶媒として“双性イオン液体”を提案した。具体的な成果を以下に示す。

＜双性イオン液体の毒性＞

双性イオン液体の細胞毒性は、DMSO の毒性よりも低いことがわかった。また、DMSO は細胞周期を止めてしまうことや幹細胞の分化を誤誘導することが知られている。その一方で双性イオン液体の場合には、そのような悪影響が見られないことがわかった[成果論文 1]。

＜双性イオン液体を用いた細胞の凍結保存＞

双性イオン液体の水溶液を用いることで、細胞を凍結保存できた。その効率は市販の凍結保存剤と同等であった[成果論文 1]。これにより、タンパクフリーの凍結保存剤を開発することができた。さらに、本研究の本来の主旨からはずれるものの、双性イオン液体と DMSO の混合溶液を用いて凍結保存を行ったところ、凍結に弱い細胞を凍結保存できた[成果論文 3]。この混合溶液を用いると、凍結に弱いとされる細胞も凍結保存できた。

＜双性イオン液体を用いた難溶性薬剤の溶解＞

双性イオン液体を用いることで、水に溶けない薬剤および、水にも DMSO にも溶解しない薬剤を溶解できた[成果論文 1]。さらに、天然の双性イオン(トリメチルグリシン)水溶液でも難溶性薬剤の溶解が可能であることを示した[成果論文 2]。

トリメチルグリシンを含む双性イオン液体の溶液は、疎水性の抗がん剤であるシスプラチンを溶解できた。シスプラチンは DMSO に溶解した場合にその抗がん作用を失うことが知られており、代替溶媒が期待されている。双性イオン液体で溶解したシスプラチンはその抗がん作用を保っていた。これらのことから双性イオン液体は、シスプラチンを溶解できる世界で初めての低毒性溶媒であることが示された。

以上のことより、「1. 研究のねらい」で示した 3 つの目標をすべて達成できた。

(2) 詳細

① 双性イオン液体の毒性 [成果論文 1]

①-1. 細胞毒性

私がこれまでに開発した、双性イオン液体 ($\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$, 図 2) のヒト線維芽細胞への毒性を詳細に検討した。 $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ を含む培地で 24 時間培養したところ、非常に毒性が低く、その毒性は DMSO よりも低かった(図 3)。例えば、10% (w/v) 双性イオン液体溶液中で培養した時の細胞の生存率は約 80%であったが、10% (v/v) DMSO 溶液中での生存率は 35%であった。同様の傾向は、他種のヒト線維芽細胞・マウス繊維芽細胞でも観察された。

また、細胞の生死のみならず、細胞の機能に対する阻害についても検討を行った。DMSO は、細胞周期を止めてしまうことが知られているが、 $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ を添加した場合では、細胞周期に対して影響を与えないことがわかった。

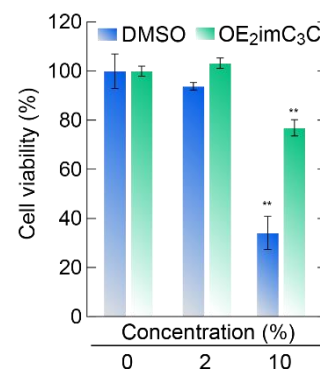


図 3 2% DMSO もしくは $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ 中で 24 時間培養した後のヒト線維芽細胞の生存率。*DMSO は % (v/v), $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ は % (w/v)。以下同様。

また、DMSO は iPS 細胞などの幹細胞の分化を“誤誘導”してしまうことが知られている。DMSO を 2% (v/v) 添加すると、未分化マーカーである Nanog の発現量が減少した(図 4)。OE₂imC₃C を 2% (w/v) 添加した場合には、未分化マーカーの発現量が維持され、未分化状態を維持できることがわかった。

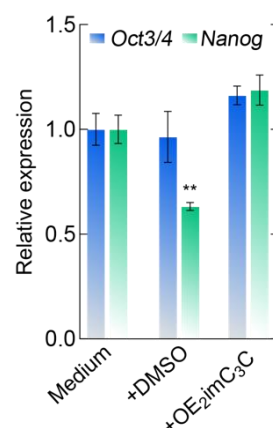


図 4 2% DMSO もしくは OE₂imC₃C 中で培養した iPS 細胞における未分化マーカー発現量

①-2. 生物への毒性

細胞のみならず、生物への毒性についても検討を行った。はじめに、ゼブラフィッシュ胚への毒性への毒性を検討した(図 5)。ゼブラフィッシュ胚へ 5% (v/v) の DMSO を添加したときには、27 匹中 23 匹が死亡し、残る 4 匹も奇形を示した。その一方で 5% (w/v) の OE₂imC₃C を添加したときには 27 匹中 27 匹が生存しており、奇形を示さなかった。



図 5 5% DMSO もしくは OE₂imC₃C 中で発生したゼブラフィッシュ胚の様子と生存率

①-3. その他の毒性

微生物への毒性についても検討しており、毒性が低いことがわかっている。また、双性イオン液体の構造とその毒性の相関、また低毒性である分子メカニズムについても明らかにしている。^{1, 2}

② 凍結保存剤としての双性イオン液体

②-1. 双性イオン液体による細胞の凍結保存

5% (w/v) の OE₂imC₃C 水溶液を用い、-85 °C で細胞を凍結保存した。9 種の細胞のうち、5 種では効率良く凍結保存できた[成果論文 1]。その凍結保存効率、市販の凍結保存剤を用いた場合と遜色なかった(図 6)。市販の凍結保存剤は、数十年かけて最適化された複雑な混合物(DMSO、アルブミンタンパクなど)であり、OE₂imC₃C を超純水に溶かしたのみで同等の性能を示したことは驚きである。これにより、目標の一つである「タンパクフリー凍結保存剤の開発」を達成することができた。その一方で、残りの 4 種の細胞については、OE₂imC₃C 水溶液を用いた場合、市販の凍結保存剤を用いた場合よりも凍結保存効率が悪かった。そこで、双性イオン液体を新たに 17 種合成し、最適な双性イオン液体種の探索を行った。しかし、それぞれ凍結保存効率に違いがあったものの、例えば BOSC(ヒト腎細胞)を効率良く凍結保存できる双性イオン液体は見つからなかった(図 7、DMSO 非添加のサンプルを参照)[成果論文 3]。

そのため次に、OE₂imC₃C を用いたときの凍結保存のメカニズムの解明を行った。凍結保存時に細胞が傷害を受ける理由は、細胞の

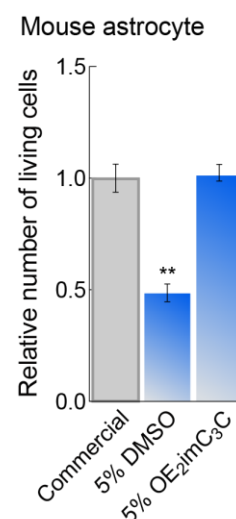


図 6 各溶液を利用して凍結保存した後のマウスアストロサイト細胞の生存率。(Commercial は市販の凍結保存剤)

** : p<0.01

「外」と「内」で氷晶が形成され、物理的にダメージを受けるためである。

OE₂imC₃C は水との相互作用が強く、細胞の外側の氷晶形成を抑制していることがわかった。その一方で、OE₂imC₃C は細胞内へ浸透しないことがわかっており、細胞の内側に関しては、直接的に氷晶形成を抑制できない。そこで詳細に調べたところ、OE₂imC₃C の添加による浸透圧上昇を介した細胞内脱水によって氷晶形成を抑制していることがわかった[成果論文 3]。この細胞内脱水が不十分な細胞(上記 BOSC など)に関しては、双性イオン液体だけでは凍結保存できないことが示唆された。

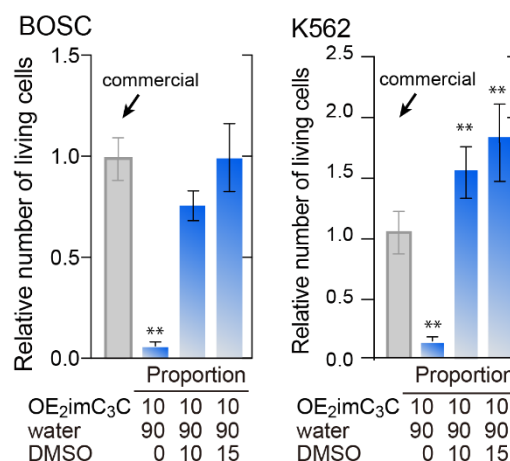


図 7 OE₂imC₃C 溶液、OE₂imC₃C/DMSO 混合溶液を用いて凍結保存した後の BOSC 細胞、K562 細胞の細胞生存率。**: p<0.01 (Commercial は市販の凍結保存剤)

②-2. 双性イオン液体 + DMSO 混合溶液による凍結保存

上記の通り、双性イオン液体は細胞“非浸透性”であり、細胞内の氷晶を直接的に抑制できない。そのため、本来の主旨からは外れるものの、細胞“浸透性”の凍結保存剤である DMSO と組み合わせた。その結果、高い凍結保存効率を得られた(図 7)。さらに、凍結に弱い細胞(K562, OVMANA)も凍結保存することができた[成果論文 3]。この結果について、MD シミュレーションを利用して詳細に検討したところ、OE₂imC₃C が DMSO の毒性を緩和していることが示唆された。

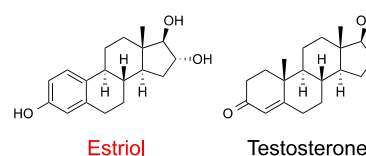
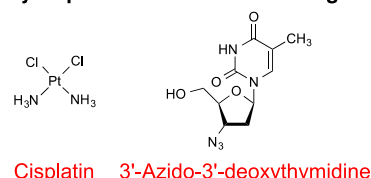
③ 難溶性薬剤の添加溶媒としての双性イオン液体

③-1. OE₂imC₃C への薬剤の溶解

構造の異なる 17 種類の薬剤について、OE₂imC₃C への溶解性を検討した。1 wt%の薬剤を OE₂imC₃C へ加え、常温および 80℃で攪拌し、薬剤が溶解するか確認した。その結果、図 8 に赤色で示す薬剤が溶解した[成果論文 1]。DMSO と比べると溶解する薬剤の種類が少なかったが、DMSO には溶解しない薬剤(Adenosine 3'-phosphate)や、DMSO にも水にも溶解しない薬剤(Zoledronic acid monohydrate、Insulin)を溶解することも分かった。溶解した薬剤の構造をみていくと、双性イオン液体は比較的高極性な薬剤分子を溶解できることがわかった。双性イオン液体は電荷を有し、高い水素結合能を有することがこの理由であると推察される。これらのことから、双性イオン液体は難溶性薬剤の添加溶媒として利用可能であった。

次に、非水溶性の抗がん剤であるシスプラチンに着目した。シスプラチンは DMSO に溶解した場合にその抗がん作用を失うことが知られており、代替溶

Hydrophobic DMSO-soluble drug



Hydrophobic DMSO-insoluble drug

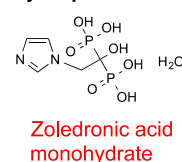


図 8 溶解を検討した薬剤分子の例。OE₂imC₃C へ溶解した薬剤は赤で名称を表記してある。

媒が期待されている。その

一方で、OE₂imC₃C に溶解した場合には、シスプラチンの抗がん作用が保たれていることが分かった(図 9)。これらの結果より、シスプラチンの抗がん効果を保ったまま溶解できる低毒性溶媒を世界で初めて開発することができた[成果論文 1]。

③-2. 天然の双性イオンへの薬剤の溶解

天然の双性イオンに注目し、トリメチルグリシン、L-カルニチン(図 10)を用いて検討を行った。この 2 種類の双性イオンは固体であるが、高濃度水溶液として用いたところ、OE₂imC₃C と同様にいくつかの疎水性薬剤を溶解できた。さらに

OE₂imC₃C と同様に、シスプラチンを溶解することができ、その抗がん作用が保たれていることも明らかにした[成果論文 2]。

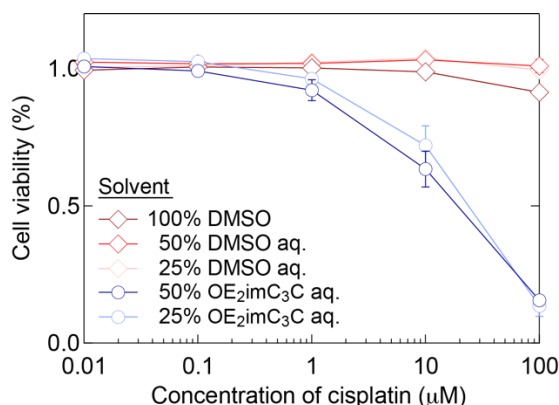


図 9 OE₂imC₃C 水溶液、DMSO 水溶液中へ溶解したシスプラチンを投与した後のヒト乳がん細胞の生存率 aq.: 水溶液

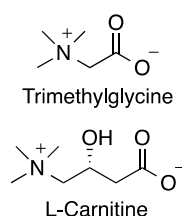


図 10 トリメチルグリシン、L-カルニチンの構造

☆ ACT-X 研究を通じて実現した、当 ACT-X 研究領域内外の研究者や産業界との連携

本研究は「凍結保存剤・溶媒の開発」であるため応用範囲が広く、物理化学から生化学・生理学まで多くの分野で共同研究依頼を受けている。共同研究も多く始まっており、次ページ成果論文 1~3 も共同研究で得た成果を含んでいる。

また、関連する海外との共同研究も論文になっている^{1, 2}。この共同研究がきっかけで、Dr. Ferreira は JSPS 外国人特別研究員(欧米短期)として、2022 年 6 月から半年間、私の研究室で研究をする予定である。

ACT-X 研究者との共同研究も 3 件実施中、1 件検討中である。岐阜大学・平田先生との共同研究では、非常に不安定なタンパク質の凍結保存を可能にした³。

- 1 T. Komori, J. L. Anderson, K. Kuroda* (13 著者中 13 番目) et al., *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2021, **9**, 11825–11836. [IF: 8.2]
- 2 F. Jesus, A. M. Ferreira, K. Kuroda (8 著者中 4 番目), S. P. M. Ventura*, *Green Chem.*, 2021, **23**, 3683–3692. [IF: 10.2]
- 3 T. Hirata*, T. Takekiyo*, Y. Yoshimura*, Y. Tokoro, T. Ishizaki, Y. Kizuka, K. Kuroda*, *RSC Adv.*, in press (2022)

3. 今後の展開

これまでの 3 年間で、DMSO の代替溶媒として双性イオン液体を利用できることがわかった。さらにシスプラチンの溶解・添加など、DMSO では実現できないことの一部を、双性イオン液体に



よって達成できた。次の展開としては、「DMSO の使用が不適当な細胞に対して、双性イオン液体を適用すること」を考えている。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

目標については、この3年間で全て達成することができた。凍結保存剤としてはタンパクフリーを達成し、薬剤溶媒としてはシスプラチンの添加を達成できた。また、それらの目標を大きく超えた成果も出ている。凍結保存においては、凍結に弱い細胞などを保存することができた。薬剤の溶解においては、天然の双性イオン液体を使ってシスプラチンを溶解することができた。これらのことから、研究目的は達成でき、当初の予想を大きく超えて良い成果を得ることができた。

【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

3年間を通じて常時、学生2名(学部4年生、修士学生)とともに研究を行ってきた。「凍結保存」と「薬剤の溶解」に本研究のテーマが分かれているため、それぞれ1名ずつ補助してもらい、研究が大きく進展した。研究費は、主に細胞培養関連の備品・消耗品および、双性イオン液体合成の消耗品として利用した。化学合成と比べて細胞関連は消耗品が高価であったが、ACT-Xの研究費で十分に賄うことができ、スムーズに研究を行うことができた。研究に必須な備品を、必要なタイミングで揃えることができ、進捗状況が予想を上回る状況下でも、研究を滞りなく推進することができた。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

双性イオン液体は、「ライフサイエンスにおいて DMSO しか溶媒の選択肢がない」状況を解決し、ライフサイエンス研究における基盤を広く支える溶媒となり得る。そのため、多くのライフサイエンス研究について新たな可能性を開拓できると考えている。

双性イオン液体は大きな展開へと広がっていく可能性を十分に秘めている。その根幹をゼロから本研究で構築できたことは価値が高い。その証拠に、多くの研究機関との共同研究が始まっている。基礎・土台となる成果を出し、さらに応用展開を期待できるところまで来られたことは高い自己評価をして良いと考えている。

【その他】

ACT-Xの成果などを受け、2020年3月より准教授に昇任した。また、ACT-Xの成果を受けて、金沢大学の学内プロジェクト(先魁プロジェクト)を発足し、“イオン液体×ライフサイエンス”に関する国際拠点(大学・研究所との連携、産学連携など)の形成へ向けて活動している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

究期間累積件数: 7件

1. K. Kuroda*, T. Komori, K. Ishibashi, T. Uto, I. Kobayashi, R. Kadokawa, Y. Kato, K. Ninomiya, K. Takahashi, E. Hirata.



Non-aqueous, zwitterionic solvent as an alternative for dimethyl sulfoxide in the life sciences,

Commun. Chem. 3, 163 (2020) [IF: 6.6]

ライフサイエンスにおける非水溶媒として、双性イオン液体が有効であることを発見した。ライフサイエンスでの非水溶媒のスタンダードとして DMSO が知られるが、双性イオン液体は DMSO よりも低毒性であることがわかった。また、DMSO は iPS 細胞の分化を「誤誘導」してしまうことが知られるが、双性イオン液体は誤誘導しなかった。このことは幹細胞研究において、双性イオン液体が有望な溶媒であることを示している。さらに双性イオン液体は、難溶性薬剤の添加溶媒および細胞の凍結保存剤としても有効であった。

2. R. Kadokawa, T. Fujie, G. Sharma, K. Ishibashi, K. Ninomiya, K. Takahashi, E. Hirata, K. Kuroda*.

High loading of trimethylglycine promotes aqueous solubility of poorly water-soluble cisplatin.

Sci. Rep. 11, 9770 (2021) [IF: 4.4]

双性イオン液体は我々が開発した人工イオンであり、医薬品業界へ展開するには、その安全性が法的に認可される必要がある。本研究では、双性イオン液体の代わりに、既に食品添加物として利用されている双性イオンの一種、トリメチルグリシンを使うことを発想した。トリメチルグリシン水溶液は、難水溶性の抗がん剤であるシスプラチンを溶解することができ、それを利用してヒト乳がん細胞を死滅させることができた。DMSO に溶解した場合にはシスプラチンの抗がん作用が失われるため、トリメチルグリシン水溶液は優れた溶媒である。

3. Y. Kato, T. Uto, D. Tanaka, K. Ishibashi, A. Kobayashi, M. Hazawa, R. W. Wong, K. Ninomiya, K. Takahashi, E. Hirata, K. Kuroda*.

Synthetic zwitterions as efficient non-permeable cryoprotectants.

Commun. Chem., in press (2021) [IF: 6.6]

我々はこれまでに、双性イオン液体が「細胞へ浸透しないタイプ」の凍結保存剤として効果的であることを報告している[成果論文 1]。本論文では、詳細な凍結保存メカニズムについて検討した。その結果として、双性イオン液体だけでは、細胞内の氷晶形成を十分に抑制できていない場合もあることがわかった。そこで、DMSO などの「細胞へ浸透するタイプ」の凍結保存剤と組み合わせ、細胞内の氷晶形成の抑制を試みた。それにより従来、凍結に弱いとされる細胞でさえも効率良く凍結保存できた。

(2)特許出願

研究期間全出願件数:2 件(特許公開前のものも含む)

1	発 明 者	黒田浩介、平田英周
	発 明 の 名 称	非プロトン性双性イオンを用いた未分化促進剤及び凍結保護剤
	出 願 人	JST
	出 願 日	2020/5/8
	出 願 番 号	PCT/JP2020/18668
	概 要	双性イオン液体を利用して、細胞を凍結保存できることを見いだした。また、iPS 細胞の培地へ双性イオン液体を添加したとき、未分化



		マーカーの上昇が見られたため、未分化促進剤としても利用できることが示唆されている。
--	--	---

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

☆新聞掲載

北陸中日新聞:2021 年 12 月 27 日

北國新聞:2021 年 12 月 21 日

北國新聞:2020 年 11 月 18 日

☆招待講演・依頼講演

○黒田浩介、「溶けない薬剤を溶かす! ~人エイオンの生命科学への活用~」、第 38 回 腫瘍病理セミナー、金沢医科大学、2021 年 1 月 依頼講演

○黒田浩介、平田英周、「zwitterion を用いた凍結保存」、Cryopreservation Conference 2020、オンライン開催、2020 年 11 月 特別講演

☆プレスリリース

“「細胞専用の非水溶媒」という概念を構築～細胞に悪影響を与えづらい難溶性薬剤の溶解剤、凍結保存剤を開発～”、金沢大学・JST、2020 年 11 月 11 日

☆国際シンポジウム開催(主催)

“Aiming the fusion of chemistry and life science”, 8th November, 2021. オンライン開催

