



令和2年11月11日

「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ずらい難溶性薬剤の溶解剤，凍結保存剤を開発～

【本研究成果のポイント】

- 細胞に対しては、「難溶性薬剤の溶解剤」あるいは「凍結保存剤」として有機溶媒の中でも比較的毒性の低いジメチルスルホキシド (DMSO) が消去法的に選択されるが、その毒性は本来無視できない。本研究チームが開発した、細胞膜に対して相互作用の少ない溶媒（双性イオン液体の一種）は、DMSO よりも細胞毒性が低いことが明らかとなった。また当該双性イオン液体は、「難溶性薬剤の溶解剤」や「凍結保存剤」として有効であった。
- これらの結果は、「細胞専用の非水溶媒」を積極的に設計可能であることを示すものである。
- 双性イオン液体がシスプラチン（抗がん剤）を薬剤の効果を維持したまま溶解できる唯一の低毒性溶媒であることを証明した。今後、細胞の基礎研究から医学的応用にわたって DMSO が不適な場面で、双性イオン液体が広汎に使用される溶媒となり得る。

金沢大学理工研究域生命理工学系の黒田浩介准教授、がん進展制御研究所の平田英周准教授らは、「細胞専用の非水溶媒」という概念を構築しました。

一般的に非水溶媒の中で、細胞に対して最もよく用いられる溶媒はジメチルスルホキシド (DMSO) であるとされています。DMSO は有機溶媒であり、その毒性は有機溶媒の中では低いとされていますが、DMSO の毒性は完全に無視できるものではなく、汎用的に利用されているような極低濃度（例えば 0.1 wt%）でも細胞の機能に悪影響を与えます。しかし、それに代わる（あるいは超える）溶媒があるという発想はこれまでになく、消去法的に DMSO が使われ続けてきました。

本研究グループは、DMSO が細胞内へ浸透し、DNA やタンパク質と相互作用することが毒性を発揮する原因の1つであることに注目し、細胞内へ浸透しない溶媒を合成しました。具体的にはカルボン酸アニオンとイミダゾリウムカチオンを有する双性型のイオン液体（以下、双性イオン液体）を用いました。双性イオン液体は電荷を有していることから細胞膜を通過せず、細胞への毒性が DMSO よりも低いことが分かりました。また、双性イオン液体は iPS 細胞やゼブラフィッシュ胚に対しても悪影響を与えず、薬剤の溶解剤および凍結保存剤としても利用できることが明らかとなりました。これらの事実は、これまで概念として存在していなかった「細胞専用の非水溶媒」を我々人間が自由に設計できることを明示しています。

双性イオン液体を利用することで、ライフサイエンス分野の基礎研究から実際の医療までさまざまな分野の進歩が期待されます。双性イオン液体はこれまで調整が困難であった難溶性の高濃度シスプラチン（抗がん剤）の溶媒としても機能することが今回明らかになりました。今後、iPS 細胞関連を含め、有機溶媒ではこれまで不可能であった応用へと双性イオン液体が展開されていき、21 世紀のライフサイエンス分野の革新につながる可能性をも秘めています。

本研究成果は、2020 年 11 月 11 日 10 時（英国時間）に英国化学誌「*Communications Chemistry*」のオンライン速報版で公開される予定です。

【研究の背景】

細胞や組織を扱うライフサイエンス分野では、しばしば有機溶媒を使用する場面があります。その場面を大別すると「難溶性薬剤の溶解剤（※1）」と「凍結保存剤（※2）」に分類することができます（図 1）。例えば「難溶性薬剤の溶解剤」用途としては、抗がん剤、ホルモン、抗ウイルス薬、抗生物質などかなり多くの種類の薬剤が水に溶けないため、それらの効果をテスト、あるいは実際に投与する際に有機溶媒が使われています。一方「凍結保存剤」用途としては、精子、卵子、造血幹細胞、iPS 細胞などその他ほとんど全ての細胞を凍結保存するときに有機溶媒が使われています。このように、有機溶媒の使用は基礎研究から応用医学まで広く関連しています。

有機溶媒の中でもジメチルスルホキシド（DMSO）が最もよく使われており、その理由としては、有機溶媒の中では低毒性であることが挙げられます。しかしながら、DMSO はあくまでも“有機溶媒の中では低毒性”であり、広汎に利用されているような極低濃度（例えば 0.1 wt%）でも細胞に影響を与えることが知られています。これらの事実は、DMSO は数ある有機溶媒の中から消去法的に選択され使用されてきたという歴史的経緯を持っていることに加えて、DMSO を超える溶媒がこれまでに開発されてこなかったことを示しています。

【研究成果】

DMSO は細胞膜を通過し、タンパク質や DNA と相互作用することで毒性を発揮することが知られています。そこで今回本研究チームは、細胞膜を通過しない溶媒を合成することで、DMSO を超えるような溶媒を提案できるのではないかと考えました。具体的には、イオン液体（※3）と呼ばれる第三の液体を基本構造として選定しました。イオン液体の構造は数十万種類あるとされていますが、本研究チームは今回、アミノ酸のように 1 つの構造の中に正電荷と負電荷を併せ持つ双性イオン型のイオン液体（双性イオン液体、※4）を作製しました。今回作製した双性イオン液体はアミノ酸の一種であるヒスチジンに比較的類似した構造を有し（図 2、以下「本双性イオン液体」と記載）、細胞膜との相互作用が小さくなるように設計することで毒性を下げることに成功しました。毒性については、各濃度の双性イオン液体を加えた培地中でヒト線維芽細胞を 24 時間培養した後の生存数を指標としました。2, 10% (w/v) の双性イオン液体中での生存細胞数は約 100, 80%でしたが、2, 10% (v/v) の DMSO 溶液中では約 90, 30%でした（図 3A）。そ

のため、双性イオン液体は従来から低毒性とされる DMSO よりも毒性が低いことが示されました。

さらに、双性イオン液体は iPS 細胞や胚への悪影響が少ないことが分かりました。iPS 細胞は DMSO などの有機溶媒に触れるとその分化が誤誘導されることが知られていますが、双性イオン液体は誤誘導を惹起しませんでした (図 3B)。またゼブラフィッシュ胚の発生において、5% (v/v) DMSO が高い毒性と催奇形性を示したのに対し、5% (w/v) 双性イオン液体は毒性および催奇形性を示しませんでした (図 3C)。これらのことから、双性イオン液体は単純に細胞を死滅させないだけでなく、細胞本来の働きを保つことができる溶媒であることが明らかとなりました。これらのことは、DMSO よりも本双性イオン液体が細胞にとって好ましい溶媒であることを示しています。

次に、「難溶性薬剤の溶解剤」としての双性イオン液体 (もしくはその水溶液) の能力をテストしました。17 種の薬剤を試したところ、9 種類の薬剤を溶解することができ、そのうち 2 種類は DMSO および水の双方に溶解しない薬剤でした。また、溶解できた非水溶性薬剤のうち、現在でもしばしば使用されるシスプラチンという抗がん剤については、興味深い挙動を確認しました。シスプラチンは DMSO に溶解することで抗がん剤としての効果を失うことが知られていますが、本双性イオン液体に溶解した場合には抗がん剤としての効果を保っており、ヒト乳がん細胞を死滅させることができました (図 4)。これらのことから、シスプラチンの効果を保ち、かつ低毒性な、新たな溶媒を提案できました。

最後に、「凍結保存剤」としての双性イオン液体の能力をテストしました。培地や血清などを含まない 5% (w/v) 双性イオン液体水溶液を用いてヒト繊維芽細胞を凍結保存した後の生存細胞数は、市販品の凍結保存剤を用いた場合と同等でした (図 5)。市販の凍結保存剤はすでに長い期間を経て最適化されてきたものであり、シンプルな水溶液で同等の性能を示したことは驚くべきことです。今後、最適化を行うことで、市販の凍結保存剤を凌駕する凍結保存剤を開発できることが予想されます。加えて、凍結保存剤としての双性イオン液体溶液は、以下のような特徴を持ちます。

- (1) 血清などを含まず夾雑物が無く、再生医療用途などに適しています。
- (2) 双性イオン液体は化学合成のみで作製できるので、ウイルスのコンタミネーションなどのリスクを下げることができ、再生医療用途に適しています。
- (3) 安価に製造が可能です。(一般的な凍結保存剤：約 1 万円/100 mL, 本双性イオン液体水溶液：約 200 円/100 mL)
- (4) ポリペプチド (の誘導體) やタンパク質を含まないため、生体への未知の影響が少ないと期待されます。

以上のことから、本研究チームが今回提案した本双性イオン液体は DMSO よりも毒性が低く、「難溶性薬剤の溶解剤」および「凍結保存剤」として非常に良い性能を示すことが明らかとなりました。これらの事実は、これまで概念として存在していなかった「細胞専用の非水溶媒」を我々人間が自由に設計できることを示しています。細胞専用の非水溶媒を積極的に設計できることは、これまで“消去法で選ばれてきた DMSO”に対する依存から脱却可能であることを明示しています。

【社会的意義・今後の展開】

今後は、基礎から応用まで幅広く研究を行うことにより、双性イオン液体を「難溶性薬剤の溶解剤」および「凍結保存剤」として実用化を目指します。例えば基礎研究としては、類似イオンの種類は千種類を超えるため、最適な双性イオン液体を探索します。応用研究としては、シスプラチンの溶媒としての利用や、iPS 細胞の凍結保存剤としての利用などを推進していきたいと考えています。

さらに、DMSO では達成不可能な応用へと展開していく予定です。ライフサイエンス分野においては、DMSO の使用が好まれない場面が多く存在します。例えば上記の通り、iPS 細胞に対して DMSO を用いると iPS 細胞の分化が誤誘導されてしまうことが知られており、このような系では薬剤の溶解剤や凍結保存剤としての DMSO の使用が好まれません。このような場面を乗り越えられる、新たな溶媒として双性イオン液体は 21 世紀のライフサイエンスを革新していく可能性を秘めています。

ライフサイエンス分野において細胞や生体組織を扱う研究者の数は世界で数百万人と推定されており、そのほとんどの研究者が有機溶媒に多かれ少なかれ依存しています。しかしその一方で、有機溶媒の影響を正確に確かめることは非常に困難であり、無視できるものと決めつけて扱ってしまっている部分があります。その中で無視してはいけない影響について、双性イオン液体を使うことで解き明かすことが初めて可能になります。本研究はその最初の一步ですが、将来的に世界に与えるインパクトは極めて大きいと考えています。

【このような溶媒が提案されていなかった背景・解決したきっかけ】

これまで、DMSO などの有機溶媒が細胞に及ぼす影響は無視できるものとして扱われてきたため、代替溶媒を開発しようという試みすらほとんどなされてきませんでした。その一方で、これまでイオン液体などの新規溶媒は化学分野において独自の発展を続けてきた経緯があり、また、生体毒性が高いことでも知られていたため、生物分野への応用はほとんど検討されてきませんでした。したがって、低毒性溶媒の開発から生物分野への応用を一貫して行った研究はこれまでに報告がありません。

しかし、金沢大学においては、本学のテニユア・トラック教員が発表・意見交換するセミナーがきっかけとなり、化学から生物学まで一貫しての研究を実現することができました。

テニユア・トラック制度は優秀な若手研究者を育てる制度ですが、金沢大学では分野に捉われずテニユア・トラック教員を集めて発表・意見交換をする、ユニークな場を設けています。そのセミナーにて化学を専門とする黒田准教授と、生物学を専門とする平田准教授が会うことによって、これまでにない融合研究を生み出すことができました。さらに令和元年度より科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 ACT-X「生命と化学」が開始し、このような未踏の融合領域を力強く後押しいただきました。最終的には金沢大学理工研究域生命理工学系の小林功助教によるゼブラフィッシュ胚の研究や宮崎大学キャリアマネジメント推進機構の宇都卓也助教によるコンピューターシミュレーション分子動力学による本双性イオン液体と細胞膜との相互作用

の計算といった、最初は全く想定していなかったところまで広がり、今回の論文にて新規概念を提唱するに至りました。

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 ACT-X「生命と化学」研究領域における「生命科学のためのジメチルスルホキシドを超える Universal solvent」（研究者：黒田浩介）（JPMJAX1915）、日本学術振興会科学研究費助成事業（18K14281, 17K07181）、日本学術振興会卓越研究員事業の支援を受けて実施されました。

< ライフサイエンスにおける有機溶媒の使用例 >



図1 本研究の概要

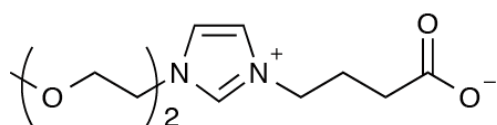


図2 本双性イオン液体の構造

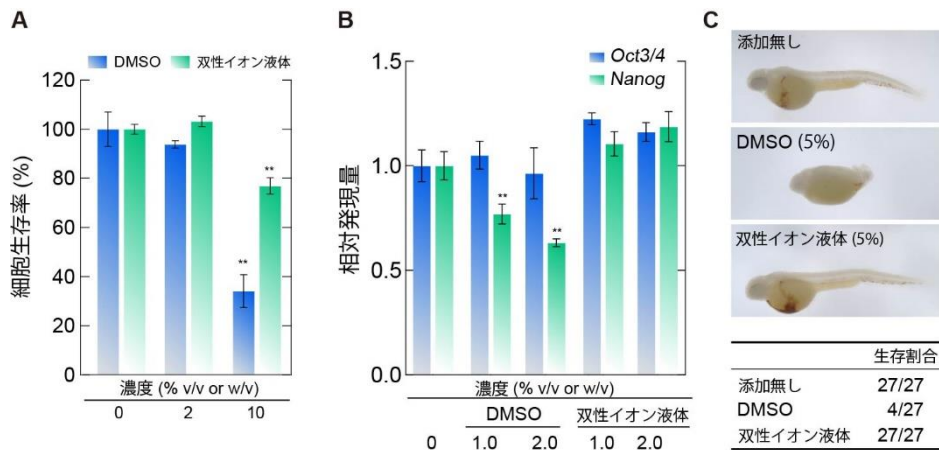


図3 双性イオン液体の各細胞・組織への毒性および悪影響。(A) 細胞の生存率 (ヒト繊維芽細胞), (B) 未分化マーカー (ヒト iPS 細胞), (C) ゼブラフィッシュ胚の発生への影響。

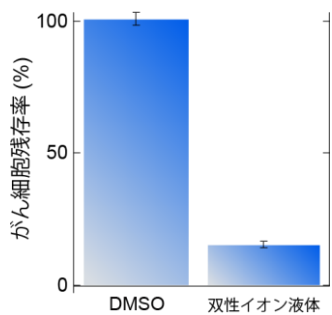


図4 双性イオン液体 (50%水溶液) に溶解したシスプラチンを添加したときのヒト乳がん細胞の生存率。DMSO も 50%水溶液として使用。

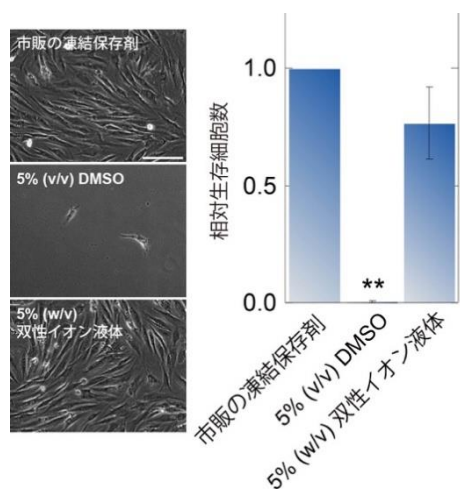


図5 双性イオン液体を用いてヒト繊維芽細胞を凍結保存した後の生存率 (残りの 95% は培地ではなく超純水)。

【掲載論文】

雑誌名：Communications Chemistry

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

(ライフサイエンス専用に開発された、ジメチルスルホキシドに代わる新規の双性イオン溶媒)

著者名：Kosuke Kuroda, Tetsuo Komori, Kojiro Ishibashi, Takuya Uto, Isao Kobayashi, Riki Kadokawa, Yui Kato, Kazuaki Ninomiya, Kenji Takahashi, Eishu Hirata

(黒田浩介¹, 小森鉄雄², 石橋公二郎³, 宇都卓也⁴, 小林功¹, 角川立樹², 加藤優衣², 仁宮一章⁵, 高橋憲司¹, 平田英周^{3,6})

1. 金沢大学理工研究域生命理工学系
2. 金沢大学自然科学研究科自然システム学専攻博士前期課程
3. 金沢大学がん進展制御研究所
4. 宮崎大学キャリアマネジメント推進機構
5. 金沢大学新学術創成機構
6. 金沢大学ナノ生命科学研究所

掲載日時：2020年11月11日10時（英国時間）にオンライン版掲載

DOI：10.1038/s42004-020-00409-7

【用語解説】

※1 難溶性薬剤の溶解剤

薬剤は非水溶性のものが多く、細胞の培地（水溶液）に直接添加してその薬効を試験することができない。そのため一度、有機溶媒に溶解させてから培地へと添加することがほとんどである。このとき、ほとんど全てのケースで DMSO が最初に選択される。なお、薬ではないが色素も非水溶性のものが多く、同様に有機溶媒を使って添加される。

※2 凍結保存剤

細胞は生き物であり、必ず老化が起こる。また、遺伝子の突然変異も起こる。そのため、細胞をそのままの状態を保つためには、凍結（-80～-200℃）による生命活動の停止が必要である。しかし、そのまま細胞を凍結すると、細胞の内外で氷晶が形成され物理的に細胞が破壊されるとされている。そこで凍結保存剤を添加し、細胞の内外で氷晶が形成されることを防ぐ必要がある。そのメカニズムは多岐にわたり、双性イオン液体は非浸透性凍結保存剤に分類される。

※3 イオン液体

100℃以下で液体の塩を指す。水と有機溶媒に次ぐ“第三の液体”とも呼ばれる。電荷を有していることから水とも有機溶媒とも異なる相互作用を示す。そのプラスイオン（カチオン）とマイナスイオン（アニオン）の組み合わせは自由で、数十万種類ものイオン液体があるとされている。その構造の自由度の高さから、求める物性や相互作用を有するイオン液体を自由に設計し、合成することができる。

※4 双性イオン液体

イオン液体の中で、正電荷と負電荷が一つのイオン構造内にあるもの。言い方を変えると、イオン液体のアニオンとカチオンが共有結合で結ばれたものである。アミノ酸のように双性イオンは通常固体であるが、柔軟な構造を導入することで液化できる。双性イオン液体の歴史は長くなく、扱っている研究グループは極めて少ない。そのため「双性イオン液体」という単語そのものはまだ正式な学術用語として認められていない。なお、これまでには、上智大学理工学部物質生命理工学科の藤田正博教授がこの用語を使用している。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学理工研究域生命理工学系 准教授

黒田 浩介（くろだ こうすけ）

TEL：076-234-4809

E-mail：kkuroda[at]staff.kanazawa-u.ac.jp

■JST 事業に関すること

科学技術振興機構戦略研究推進部

寺下 大地（てらした だいち）

TEL：03-6380-9130 FAX：03-3222-2066

E-mail：act-x[at]jst.go.jp

■広報担当

金沢大学総務部広報室広報係

本田 彩子（ほんだ あやこ）

TEL：076-264-5024

E-mail：koho[at]adm.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学理工系事務部総務課総務係

吉田 和史 (よしだ かずちか)

TEL : 076-264-6821

E-mail : s-somu[at]adm.kanazawa-u.ac.jp

科学技術振興機構広報課

TEL : 03-5214-8404 FAX : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp