

生命科学におけるデザインブル溶媒 「双性イオン液体」

Designable solvents “Zwitterionic liquids” in life sciences

黒田 浩介
Kosuke Kuroda

金沢大学理工研究域生命理工学系(准教授)
Faculty of Biological Science and Technology, Institute of Science and Engineering, Kanazawa University (Associate professor)

KEYWORD ▶ 双性イオン液体 凍結保存 薬剤溶解

はじめに

01

生命科学において、最も高頻度で使用される非水溶媒は、ジメチルスルホキシド(DMSO)である(図1)。DMSOは毒性が比較的 low、[難溶性薬剤の溶媒][細胞の凍結保存剤]として長らく使われている。しかし、DMSOは“有機溶媒の中では低毒性”にすぎず、例えば1~2%の添加でも細胞へダメージを与える。さらに、0.1%のような低濃度の添加でも細胞の機能に悪影響を及ぼす。しかし、現在に至るまでDMSOの代替品は探索されていない。その理由として、“有機溶媒は既に研究し尽くされており、DMSOより低毒性な溶媒が存在する”という発想が欠けていたことが挙げられる。

ここで我々はイオン液体¹⁾に注目した。しかし、イオン液体は基本的に毒性が高く、細胞に対しては使用できないものが多い^{2, 3)}。その一方で2017年に我々は、大腸菌への毒性が低い“双性イオ

ン液体(OE₂imC₃C, 構造は図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⁴⁾。さらに、この双性イオン液体が大腸菌だけでなく、動物細胞に対しても低毒性であることを明らかにした。この双性イオン液体は、DMSOに代わる生命科学用の非水溶媒、すなわち[難溶性薬剤の添加溶媒]および[細胞の凍結保存剤]として使用できることが分かった。本稿はこの生命科学的应用について紹介する。

OE₂imC₃Cの毒性

02

2-1. 細胞毒性

OE₂imC₃Cを含む培地で24時間、ヒト線維芽細胞(hNF-1)を培養した結果、毒性が低いことが分かった。その毒性は、DMSOよりも低かった(図3)⁵⁾。例えば、10% (w/v) OE₂imC₃C水溶液中で培養した場合、細胞の生存率は約80%だったが、10% (v/v) DMSO水溶液中では生存率が35%だった。同様の傾向は、他種のヒト線維芽細胞やマウス線維芽細胞でも観察された。



図1 生命科学の非水溶媒

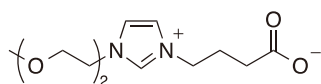


図2 低毒性な双性イオン液体OE₂imC₃Cの構造

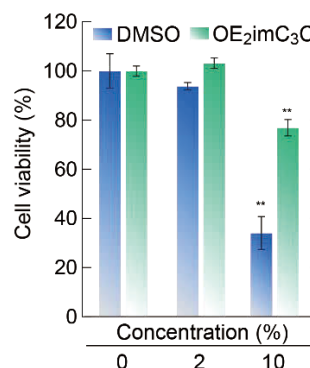


図3 2% DMSO(左)もしくは OE₂imC₃C (右)中で24時間培養した後のヒト線維芽細胞の生存率。
*DMSOは% (v/v), OE₂imC₃Cは% (w/v)。以下同様。

細胞の機能に対する影響も検討した。DMSOは細胞周期を停止させるが、 OE_2imC_3C は細胞周期に影響を与えなかった⁵⁾。また、DMSOはiPS細胞などの幹細胞の分化を誤誘導する⁶⁾。DMSOを2% (v/v)添加すると、未分化マーカー*Nanog*の発現量の減少が確認された(図4)。一方、 OE_2imC_3C を2% (w/v)添加した場合、未分化マーカーの発現量が維持され、iPS細胞が未分化状態を維持できていることが示唆された⁵⁾。

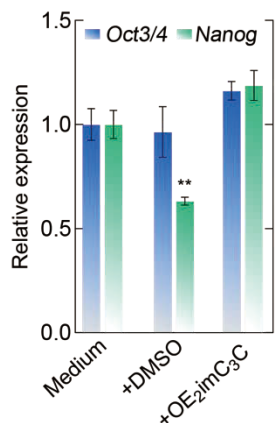


図4 2% DMSOもしくは OE_2imC_3C 中で培養したiPS細胞における未分化マーカー(Oct 3/4, 左;Nanog, 右)発現量。

2-2. イオン液体の毒性メカニズムと、双性イオン液体が低毒性な理由

典型的なイオン液体は毒性が高い。毒性の指標のひとつとして EC_{50} がある。 EC_{50} とは、被験物質(イオン液体)を添加しない場合と比べ、細胞の増殖が半分になるときのイオン液体濃度である(= EC_{50} が高いほど毒性が低い)。たとえばIPC-81細胞を用いたときの $[C_8mim]Cl$ (図5左)の EC_{50} は、わずか0.002 wt%である⁷⁾。このことは、1Lのペットボトル中に耳かきわずか1、2杯の $[C_8mim]Cl$ を添加すると、IPC-81細胞の増殖を阻害することを意味する。メタノールの EC_{50} がおよそ5 wt%⁷⁾であることと比較しても $[C_8mim]Cl$ の毒性が高いことは明らかである。これを利用して逆に、イオン液体を抗がん剤や殺菌剤として利用するという

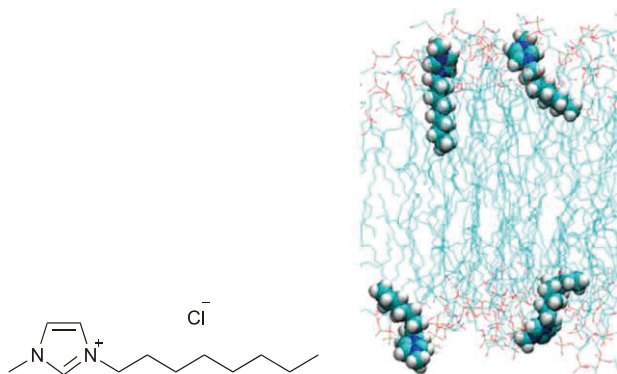


図5 (左) $[C_8mim]Cl$ の構造、(右)細胞膜と、挿入された $[C_8mim]^+$ カチオン。Adapted with permission from the literature (*J. Phys. Chem. B*, 2014, 118, 10444-10459). Copyright 2014 American Chemical Society.

報告も多数出版されている⁸⁻¹⁰⁾。

イオン液体の毒性メカニズム¹¹⁾のひとつとして、「カチオンアルキル鎖が細胞膜に挿入され、細胞膜が破壊される」ことが知られる(図5右)。カチオンアルキル鎖の挿入は、次に示す2段階のステップで起こる。①イオン相互作用により、カチオンが細胞膜ヘッドグループのリン酸基へ接近する。②疎水性相互作用により、カチオンアルキル基が細胞膜アシル基(長鎖アルキル基)と強く相互作用し、細胞膜へ挿入される。そのため、以上のメカニズム①もしくは②のいずれかを抑制することで低毒性化できると考えられる。我々は、極性の高い官能基であるアニオン部位をカチオンアルキル鎖の末端に導入し、上記②の疎水性相互作用を抑制した。これが、現時点で判明している「双性イオン液体が低毒性な理由」である。DMSOとは異なり、 OE_2imC_3C は細胞内部へ浸透しないことも示されており、これが細胞の機能を阻害しない理由であると考えられる。

2-3. ゼブラフィッシュへの毒性

ゼブラフィッシュ胚への毒性評価を行った(図6)。ゼブラフィッシュ胚に5% (v/v)のDMSOを添加した場合、27匹中23匹が死亡し、残る4匹も奇形を示した。それとは対照的に、5% (w/v)の OE_2imC_3C を添加した場合、総て生存し、奇形を示さなかった。このことから、生体においても OE_2imC_3C の安全性が確認された⁵⁾。



図6 5% DMSOもしくは OE_2imC_3C 中で発生したゼブラフィッシュ胚の様子と生存率。

難溶性薬剤の添加溶媒としての OE_2imC_3C

03

3-1. OE_2imC_3C への薬剤の溶解

17種類の薬剤について、 OE_2imC_3C または OE_2imC_3C 水溶液への溶解性を調査した。1 wt%の薬剤を溶液に添加し、常温および80℃で攪拌し、薬剤が溶解するかを確認した。その結果、図7に示されているように、一部の薬剤が溶解したことが確認された⁵⁾。DMSOには溶解しない薬剤(アデノシン3'-リン酸など)や、DMSOと水の両方に溶解しない薬剤(ブレドロン酸一水和物、インスリン)が OE_2imC_3C に溶解した。これにより、双性イオン液体が難溶性薬剤の添加溶媒として有用であることが示された。

次に、非水溶性の抗がん剤であるシスプラチンに焦点を当てた。シスプラチンは、DMSOに溶解した場合にその抗がん作用が失われることが知られている。しかし、 OE_2imC_3C に溶解した場合、シスプラチンの抗がん作用が維持された(図8)。これらの結果から、シスプラチンの抗がん効果を維持できる低毒性溶媒を開発できた⁵⁾。

3-2. 天然の双性イオンへの薬剤の溶解

OE₂imC₃Cは低毒性だが新規化合物であり、人体への安全性についての証拠は未だない。そのため、既に食品添加物などとして使用されている天然の双性イオンに焦点を当て、トリメチルグリシンとL-カルニチンを調査した。これら2つの双性イオンは固体だが、高濃度の水溶液として使用することで、いくつかの疎水性薬剤を溶解できた。さらに、OE₂imC₃Cと同じく、シスプラチンの抗がん作用を維持したまま溶解できることも明らかにした¹²⁾。

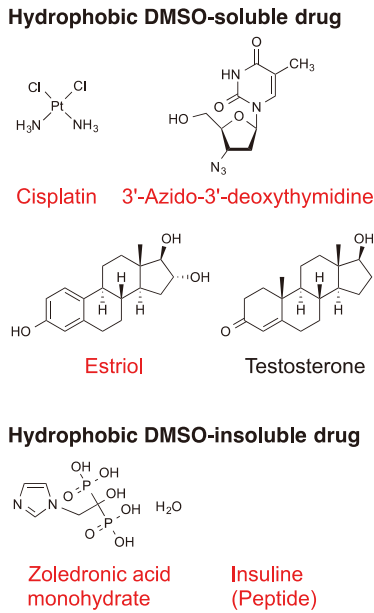


図7 溶解を検討した薬剤分子の例。OE₂imC₃Cへ溶解した薬剤は赤で名称を表記してある。

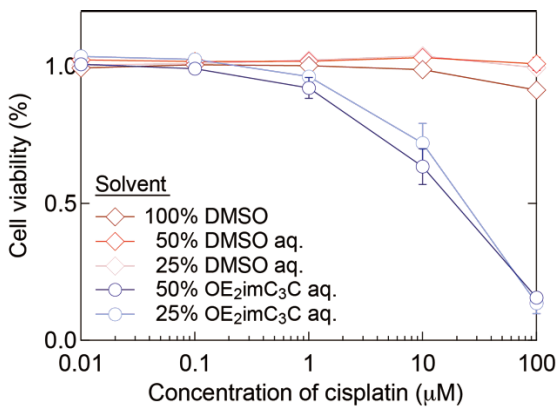


図8 OE₂imC₃C水溶液、DMSO水溶液中へ溶解したシスプラチンを投与した後のヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231)の生存率。aq.: 水溶液

凍結保存剤としてのOE₂imC₃C

4-1. OE₂imC₃Cによる細胞の凍結保存

5% (w/v)のOE₂imC₃C水溶液を使用し、細胞を-85°Cで凍結保存した。9種の細胞のうち、5種は効果的に凍結保存できた⁵⁾。このときの凍結保存効率は、市販の凍結保存剤 (Culture Sure、富士フィルム和光純薬株式会社) を使用した場合と遜色なかった (図9)。市販の凍結保存剤は、数十年にわたり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構成) である。そのため、OE₂imC₃Cを超純水に溶かすだけで同等の性能を示したことは驚嘆に値する。一方、残りの4種の細胞については、OE₂imC₃C水溶液ではうまく凍結保存できなかった (図10、DMSO非添加のサンプルを参照)。そのため、OE₂imC₃C以外の双性イオンを17種類合成し、最適な双性イオンを探した。しかし、上記4種の細胞を効果的に凍結保存できる双性イオンは見つからなかった¹³⁾。

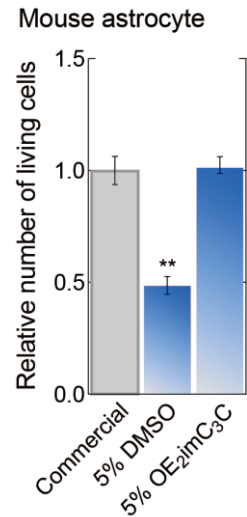


図9 各溶液を利用して凍結保存した後のマウスアストロサイト細胞の生存率。(Commercialは市販の凍結保存剤) **: p<0.01

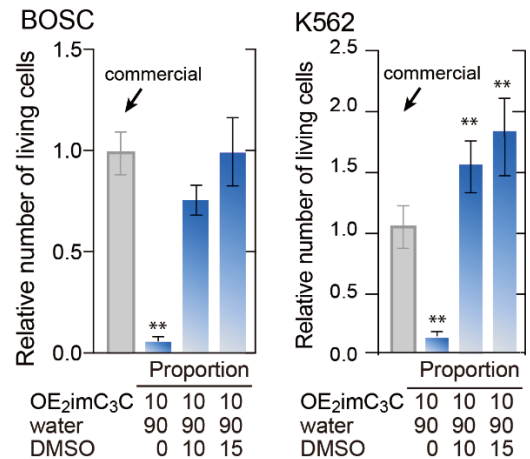


図10 OE₂imC₃C溶液、OE₂imC₃C/DMSO混合溶液を用いて凍結保存した後のBOSC細胞、K562細胞の細胞生存率。*: p<0.01 (Commercialは市販の凍結保存剤)

原因を分析するため、 OE_2imC_3C による凍結保護メカニズムを分析した。細胞が凍結時に傷害を受ける理由は、細胞の「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。 OE_2imC_3C 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分かった。しかし、 OE_2imC_3C は細胞内に浸透しないため、細胞の内部に関しては直接的に氷晶形成を抑制できない。詳細な調査の結果、 OE_2imC_3C の添加による浸透圧上昇によって、細胞内が脱水され、間接的に細胞内での氷晶形成が抑制されていた¹³⁾。したがって、 OE_2imC_3C でうまく凍結保存できない細胞は、細胞内での脱水が不足していることが示唆された。

4-2. OE_2imC_3C + DMSO混合溶液による細胞の凍結保存

前述の通り、 OE_2imC_3C は細胞内に直接浸透せず、細胞内の氷晶を直接的に抑制することはできない。このため、従来の研究方針からは外れるものの、細胞内に浸透する凍結保存剤、すなわちDMSOを OE_2imC_3C 水溶液に添加した。その結果、上記4種の細胞についてもうまく凍結保存できた(図10)。さらに、凍結に対して弱い細胞(K562、OVMANA)も効果的に凍結保存できた。この結果について、分子動力学シミュレーションを用いて詳細に検討したところ、 OE_2imC_3C がDMSOの毒性を軽減している可能性も示唆された¹³⁾。

4-3. OE_2imC_3C + DMSO混合溶液による細胞塊(スフェロイド)・組織の凍結保存

スフェロイドは生体定着性が高いなどの特長をもつため、再生医療の生体材料として重要である。しかしその一方で、スフェロイドの凍結保存は難しいことが知られ、適した凍結保存剤が求められている。

4-2.で開発した OE_2imC_3C + DMSO混合溶液は、スフェロイドの凍結保存に対しても有効であった(図11)。スフェロイド専用の凍結保存剤は市販されていないため、市販の凍結保存剤との比較は難しい。しかし少なくとも、分散細胞用の市販の凍結保存

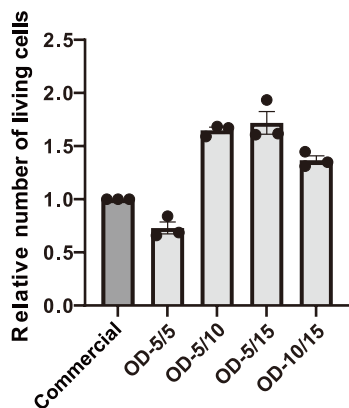


図11 OE_2imC_3C /DMSO混合溶液を用いて凍結保存した後の555細胞スフェロイドの細胞生存率。OD-5/5は OE_2imC_3C /DMSO/水 = 5/5/90 (w/w/w)を示す。(Commercialは市販の分散細胞用の凍結保存剤)

剤よりも、 OE_2imC_3C + DMSO混合溶液は効率良くスフェロイドを凍結保存できた。さらに、マウス・ヒト腫瘍組織の凍結保存に対しても OE_2imC_3C + DMSO混合溶液は有効であった¹⁴⁾。

おわりに

05

我々は、低毒性溶媒 OE_2imC_3C を「細胞の凍結保存剤」および「非水溶性薬剤の溶媒」として提案した。双性イオン液体はDMSOの代替溶媒としても使用できるが、DMSOが使用できない(またはDMSOでは不十分な)場合に特に有用であると考えられる。たとえば、以下のような場合に有効であると想定される。

- ① 細胞が未分化である場合。
- ② 薬剤がDMSOに溶解しない(溶解度が低い)場合。
- ③ DMSOでは細胞の凍結保存効率が十分ではない場合。

これらを含め、多彩な問題を解決することにより、双性イオン液体が生命科学界の基礎を広く押し上げていくことを期待している。

また、この研究は学際的な挑戦でもある。双性イオン液体には多くの応用可能性がある一方で、我々の発想力には限界がある。本稿を読んで、「双性イオン液体を使用するとこんなことができる!」と考える方がいらっしゃれば、ぜひご連絡いただきたい。

最後に、「双性イオン液体」という単語についても注記しておく。液体の双性イオンは種類が少なく、まだあまり研究が進んでいない。そのため、その単語自体が正式に確立されていない。英語でも同様であり、zwitterionic liquidなのかliquid zwitterionなのか定まっていない。日本で同様の研究を行っているのはおそらく、藤田先生(上智大学)のグループ¹⁵⁾と我々のグループだけであり、さらに藤田先生の科研費の報告書(2015年)にて「双性イオン液体」という単語が見つかったため、この表現を使用させていただいた。

謝辞

本研究は、ACT-X「生命と化学」(JST)、A-STEPトライアウトタイプ(JST)、スーパーハイウェイ事業(JST)、科研費学術変革領域研究(B)、基礎生物学研究所 共同利用研究、金沢大学 先魁プロジェクト2020、2022によって支援されたものです。ゼブラフィッシュ毒性は小林功准教授(金沢大)に、浸透圧測定は田中大介 資源保存ユニット長(農研機構)に、分子動力学シミュレーションは宇都卓也准教授(宮崎大)にご協力いただきました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、図表の一部は生化学第94巻 pp298-301(2022)より転載しております。

参考文献

1. T. Welton. Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chem Rev* 1999, 99, 2071-2083
2. D. Zhao, Y. Liao, and Z. Zhang. Toxicity of ionic liquids. *CLEAN - Soil, Air, Water* 2007, 35, 42-48
3. S.M. Lee, W.J. Chang, A.R. Choi, and Y.M. Koo. Influence of ionic liquids on the growth of *Escherichia coli*. *Korean J Chem Eng* 2005, 22, 687-690
4. K. Kuroda, H. Satria, K. Miyamura, Y. Tsuge, K. Ninomiya, and K. Takahashi. Design of wall-destructive but membrane-compatible solvents. *J Am Chem Soc* 2017, 139, 16052-16055
5. K. Kuroda, T. Komori, K. Ishibashi, T. Uto, I. Kobayashi, R. Kadokawa, Y. Kato, K. Ninomiya, K. Takahashi, and E. Hirata. Non-aqueous, zwitterionic solvent as an alternative for dimethyl sulfoxide in the life sciences. *Commun Chem* 2020, 3, 163
6. S. Chetty, F.W. Pagliuca, C. Honore, A. Kweudjeu, A. Reznia, and D.A. Melton. A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation. *Nat Methods* 2013, 10, 553-556
7. J. Ranke, K. Mölter, F. Stock, U. Bottin-Weber, J. Poczobutt, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. Filser, and B. Jastorff. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and *wst-1* cell viability assays. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004, 58, 396-404
8. J. Gravel, and A.R. Schmitzer. Imidazolium and benzimidazolium-containing compounds: From simple toxic salts to highly bioactive drugs. *Org Biomol Chem* 2017, 15, 1051-1071
9. A.R. Dias, J. Costa-Rodrigues, M.H. Fernandes, R. Ferraz, and C. Prudencio. The anticancer potential of ionic liquids. *ChemMedChem* 2017, 12, 11-18
10. J. Pernak, K. Sobaszekiewicz, and I. Mirska. Anti-microbial activities of ionic liquids. *Green Chem* 2003, 5, 52-56
11. G.S. Lim, J. Zidar, D.W. Cheong, S. Jaenicke, and M. Klähn. Impact of ionic liquids in aqueous solution on bacterial plasma membranes studied with molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B* 2014, 118, 10444-10459
12. R. Kadokawa, T. Fujie, G. Sharma, K. Ishibashi, K. Ninomiya, K. Takahashi, E. Hirata, and K. Kuroda. High loading of trimethylglycine promotes aqueous solubility of poorly water-soluble cisplatin. *Sci Rep* 2021, 11, 9770
13. Y. Kato, T. Uto, D. Tanaka, K. Ishibashi, A. Kobayashi, M. Hazawa, R.W. Wong, K. Ninomiya, K. Takahashi, E. Hirata, and K. Kuroda. Synthetic zwitterions as efficient non-permeable cryoprotectants. *Commun Chem* 2021, 4, 151
14. T. Ishizaki, Y. Takeuchi, K. Ishibashi, N. Gotoh, E. Hirata, and K. Kuroda. Cryopreservation of tissues by slow-freezing using an emerging zwitterionic cryoprotectant. *Sci Rep* 2023, 13, 37
15. M. Yoshizawa-Fujita, T. Tamura, Y. Takeoka, and M. Rikukawa. Low-melting zwitterion: Effect of oxyethylene units on thermal properties and conductivity. *Chem Commun* 2011, 47, 2345-2347