

「ナノ界面技術の基盤構築」
平成 19 年度採択研究代表者

由井 伸彦

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科・教授

分子運動操作を基盤とした多次元のバイオ界面

1. 研究実施の概要

本研究では、ナノメートルオーダーの分子間力に基づいて分子運動を任意に操作する事によって、生体分子や細胞を取り巻く水分子・細胞情報伝達を制御するリガンド分子・細胞膜タンパク質・周囲組織に配慮し、デバイス-生体界面における自然治癒過程を理想的に誘導する事を目的としている。本年度は研究立上げの重要な時期であり、劈頭に研究代表者と共同研究者とのあいだで協議を十分に行って研究全体の目的ならびに本年度研究計画の位置づけや役割を十分にメンバー間で認識した。その上で、研究代表者を中心とした各グループの基盤となる研究を実施した。具体的には、由井グループはポリロタキサンにおける分子運動性の制御方法の確立を目指して分子運動性を確保したポリロタキサン表面設計法を主に検討し、石原グループは水の運動性・状態について解析して高分子界面設計につなげる検討を開始し、山岡グループは炎症反応解析法の確立を目指した評価系の立ち上げを実施し、岸田グループは生体軟組織と種々の高分子との接着を詳細に検討して目的に適した高分子の探索を行った。また、平成20年3月25日には参加研究者全員が一堂に会して年度報告会を実施し、研究目的の徹底と研究連携体制の強化を図りつつ、来年度に向けての研究連携について協議した。特に、キックオフミーティングやサイトビジットなどを通じて得られたアドバイスや本年度の成果について協議し、万全の研究体制の構築に努めた。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

石原グループ

当該年度は、界面での水の運動性を解析できる手法について検討を進めた。特に、核磁気共鳴(NMR)測定法における緩和時間測定からバルク水の状態を解析する基盤技術を確立した。すな

わち、疎水性基が極性基近傍に配置した構造を持つリン脂質極性基を側鎖に有する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)からなるハイドロゲル(PMPC ハイドロゲル)内の水の状態をパルス NMR 測定法により解析した。比較対照として、ヒドロキシル基を側鎖に有するポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)ハイドロゲル(PHEMA ハイドロゲル)を使用した。パルス NMR 測定法により得られるスピンスピン緩和時間(T_2)に着目し、両ハイドロゲル内の自由水の含率や水分子の運動性を評価した。PHEMA ハイドロゲルの自由水含率は、平衡膨潤状態(平衡膨潤率: 45.3%)において 5.9%程度であったのに対し、同程度の膨潤率を有する PMPC ハイドロゲル(膨潤率: 44.9%)の自由水含率は 70.6%程度と有意に高い値であった。更に、平衡膨潤状態の PMPC ハイドロゲル(平衡膨潤率: 91.9%)の自由水含率は 95.3%に達し、PMPC ハイドロゲルに含まれる水の大部分がバルクの水と同じ運動性を有することがわかった。

以上の結果より、ポリマーハイドロゲル内の MPC ユニットおよび HEMA ユニット近辺の水和モデルについて考察した。MPC ユニット周辺の水は、MPC ユニットの側鎖に存在するメチル基と疎水性水和するため、水分子同士の水素結合に干渉しない、つまりその構造化の程度が非常に小さいと考えられる。一方 HEMA ユニット周辺の水は、HEMA ユニット側鎖に存在するヒドロキシル基と水素結合を通じて相互作用するため、その運動性が強く束縛されると考えられる。このように、パルス NMR 測定法により、ポリマーハイドロゲル内の水の状態解析を行う基盤技術が確立できた(発表論文1, 2)。今後は、アミノ酸および核酸など双性イオン構造の極性基周辺の水の状態解析や、原子間力顕微鏡によるポリマー表面のナノ摩擦特性解析などを予定している。

由井グループ

まず、①複数のリガンドを導入したポリロタキサンとモデルタンパク質(コンカナバリンA, ConA)との溶液中における多価相互作用に対する速度論的解析を目的として、ポリロタキサン中の環状分子である α -シクロデキストリン(α -CD)に水溶性官能基としてカルボン酸及び ConA に対する認識部位としてマンノースを導入する方法を検討した。具体的には、平均分子量 20,000 のポリエチレングリコール(PEG)と α -CD からなるポリロタキサンを既報に従い合成し、 α -CD の水酸基にコハク酸部位を導入し、ナトリウム塩とすることで水溶性を獲得した。一方、このカルボン酸部位へ導入するためのアミノ基修飾されたマンノース誘導體を合成し、カルボン酸化ポリロタキサンとの縮合条件の検討を開始した。合成完了後は、FITC 結合 ConA との錯形成、または表面固定化 ConA との錯形成を通して、それぞれ錯形成に伴う蛍光偏光解消、表面吸着量変化などを観測することにより、速度定数を算出する予定である。また、これと併行してカチオン性ポリロタキサンについても合成し、カチオン認識タンパク質との多価相互作用性も検討した(発表論文3)。

次に、②細胞膜と同様の動的性質を有する界面の生成を目的として、ポリロタキサンが基板に対して水平(ブリッジ型)または垂直(グラフト型)に結合した基材の設計と、表面に固定化するための官能基を導入したポリロタキサンの合成を行った。具体的には、平均分子量 3,000 の PEG と α -CD からなるポリロタキサンのキャップ分子に、基板固定化用官能基として SH 基またはプロパルギル基を導入する方法を検討した。これまでにキャップ分子として用いてきた Z-チロシンの水酸基に予め SAc 基またはプロパルギル基を適切なスペーサーを介して導入し、このキャップ分子を用いてポリ

ロタキサンをそれぞれ新たに合成した。このうち、SAc 末端を有するポリロタキサンに対し加水分解後、金基板上への固定化反応を予備的に行い、QCM から固定化を示唆する結果が得られた。ここで得られた予備的知見を基に、固定化条件および基板上における組成(ブリッジ型/グラフト型)の解析を予定している。同時に、細胞膜表面を動的構造面から模倣した設計も開始する。

山岡グループ

バイオマテリアル表面と炎症との相関性に関する統一的知見は得られておらず、これを制御することは未だ困難である。特に、生体内で細胞と細胞外マトリックスとの間で構築されるような相互制御が確立された関係を人工的に構築するためには、多次元的な動的界面の構築が要求される。そこで、人工的にこれらの動的構造を再現した含水層を構築し、その中の高分子鎖の運動性に基づく急性炎症反応の軽減と慢性炎症への移行の阻害を図った。現在のところ、含水性に富む基材表面では、慢性炎症、特に長期に亘るカプセル化反応を軽減させる効果が見出された。さらに、好中球・マクロファージ・線維芽細胞などの炎症に関与する細胞の活性を経時的かつ詳細に追跡することで、バイオマテリアルに対する生体反応を系統的に解明できると考え、*in vivo*でのこれらの生体反応の追跡系の確立を進めた。特にマクロファージを中心とする抗原提示細胞の浸潤が、用いる材料によって大きく影響される過程が明確となり、これらの経時的変化を組織学的・分子生物学的に解明するとともに、慢性炎症反応の完全なる支配を進める。

一方、これまでに、大腸菌発現システムによるエラスチン様タンパク質((VPGIG)₄₀)の合成方法の確立、およびラミニン由来神経伸長活性配列(IKVAV)によるポリ乳酸表面への活性化付与に成功してきた。そこで、生体における動的界面の模倣を目的とし、エラスチン/ラミニン複合型人工タンパク質の設計と合成に着手した。まず、Ban I 粘着末端を両端に持つエラスチン様繰返し配列(VPGIG)₄をコードしたDNAカセットを、TAクローニング法により得た。また、酵素切断サイトを有するラミニン由来の神経突起伸長活性配列をコードしたDNAが導入されたプラスミドを作製し、先に得られた(VPGIG)₄-DNAカセットをBsa I切断サイトへ導入することによって機能化(VPGIG)₄をコードしたプラスミドを得た。これらのプラスミドDNAを発現用ベクターに挿入し、今後、目的タンパクの発現の程度を検証するとともに、それらを用いた動的界面を*in vivo*で詳細に検討する。

岸田グループ

本研究では、熱振動状態におけるコラーゲンと高分子鎖の状況について詳細に検討し、生体軟組織とより強く接着できる高分子の分子設計指針を得て、これを合成し、生体接着材としての応用を検討する。本年度は、種々の高分子を用い、接着条件(温度・振動条件・圧着力)を変化させて、血管および皮下組織などの生体軟組織と強固に接着する高分子の探索を行った。候補材料として、側鎖あるいは主鎖に水素結合性官能基を有する高分子、ガラス転移点が30℃以下で融点が150℃以下の高分子を挙げていたが、熱測定装置での測定が装置の不良と感度不足により実施できなかったため、これらについては次年度で引き続き検討する。本年度に入手した素材のうちで、ビニロン、セグメント化ポリウレタンおよびセルロースにおいて高い接着強度が得られた。これらの高分子は、いずれも水素結合成分(水酸基・アミド基等)を含んでおり、当初の予想に沿った結果が得られたと考えている。また、組織接着用材料を検討する目的で、コラーゲンの溶解性について

検討を行った。コラーゲン分子の構造を緩和させ、高分子の分子鎖と複合化することは、熱による処理のみではエネルギーが高すぎると考え、低いエネルギーでコラーゲンの構造を緩和する方法論について検討を行った。緩衝液と有機溶媒を混合することで溶解性の制御法を見いだした。今後はこれに熱を加えることによって、高分子マトリクスとの複合化が可能であるか否かを検討する。

3. 研究実施体制

(1) 由井グループ

① 研究分担グループ長: 由井 伸彦 (北陸先端科学技術大学院大、教授)

② 研究項目「超分子リガンド界面による細胞代謝制御」

- ・マンノース導入ポリロタキサンの合成
- ・表面固定化用ポリロタキサンの合成

(2) 石原グループ

① 研究分担グループ長: 石原 一彦 (東京大学、教授)

② 研究項目「生体分子非認識界面創製」

- ・パルス核磁気共鳴法によるハイドロゲル内の水の状態解析
- ・PMPC および PHEMA ハイドロゲルのスピンスピン緩和時間測定
- ・PMPC および PHEMA の水和モデルについての考察

(3) 山岡グループ

① 研究分担グループ長: 山岡 哲二 (国立循環器病センター研究所、部長)

② 研究項目「親水性鎖の動的特性と特異的リガンド導入による慢性炎症の抑制」

- ・細胞増殖分化リガンド分子の探索とその動的固定化
- ・高機能性人工細胞外マトリクスの設計と生合成
- ・生体反応の定量的試験系の確立

(4) 岸田グループ

① 研究分担グループ長: 岸田 晶夫 (東京医科歯科大学、教授)

② 研究項目「コラーゲンと高分子の物理的複合化に関する研究」

- ・高分子-生体接着現象の解明
- ・生体接着用マトリクスの設計と合成
- ・低エネルギー生体接着機構の探索

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Toshinori Morisaku, Junji Watanabe, Tomohiro Konno, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara, Hydration of phosphorylcholine group bearing biocompatible polymer hydrogels studied by thermal analysis, *Polymer*, submitted (2008 2月投稿中)
2. Kazuhiko Kitano, Ryosuke Matsuno, Tomohiro Konno, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara, Nanoscale Evaluation of Lubricity and Biocompatibility on Well-defined Polymer Brush Surfaces using QCM-D and AFM, *Langmuir*, submitted (2008 3月投稿中)
3. Hideto Utsunomiya, Ryo Katoono, N. Yui, T. Sugiura, Y. Kubo, Y. Kato, A. Tsuji, Cationic Polyrotaxanes effectively inhibit Uptake via Carnitine/Organic Cationic Transporter without Cytotoxicity, *Macromol. Biosci.* **8**, in press (2008)