

「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、昨年度の研究立上げに引き続いて研究を本格化する時期であり、昨年度同様に研究代表者と共同研究者とのあいだでの十分な協議をもとに研究全体の目的ならびに本年度研究計画を共有認識しつつ、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本格的に実施した。

具体的には、由井グループはリガンド導入ポリロタキサンと認識タンパク質との相互作用を速度論的に解析するとともに、ポリロタキサンへのリガンド導入法を新たに開発し、更にはポリロタキサン・ループ表面設計法を検討した。石原グループは、昨年度に引き続き2-メタクク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中の水の運動性・状態について解析するとともに、MPC からなる高分子ブラシ構造表面を作製した。山岡グループは、動的特性の異なるスキャホールド材料群の構築と、これらに対する炎症反応と組織再生反応の評価軸の構築を完了した。岸田グループは、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ることを目的として、生体接着技術としての応用を検討した。また、参加研究者全員が一堂に会した研究報告会や若手研究者を中心とした検討会を数カ月おきに実施して、研究目的の徹底と研究連携体制の強化を更に図った。

2. 研究実施内容

由井グループ

まず、①19 年度に確立した方法に基づき、マンノース導入ポリロタキサンを合成した。マンノース導入数の異なるマンノース導入ポリロタキサンを FITC 結合コンカナバリン A (ConA) との錯形成を通して、錯形成に伴う蛍光消光法を観測することにより速度論的解析を行った。これより、マ

ンノース導入量の増加に従い会合定数が高い値を示すことが確認できた。現在、表面プラズモン共鳴法を用いリガンド-レセプター間の相互作用を速度論的に解析している。

次に、②クリック反応を用いた新規リガンド導入方法の開発を行っている。アジド化された α -CD を合成し、ポリエチレングリコールを用いてポリロタキサンを合成した。アジド基導入ポリロタキサンとプロパルギル基を修飾した各種生化学的リガンドとをクリック反応させることにより、モデル糖鎖リガンドが導入されたポリロタキサンを合成した。これについては現在、論文投稿準備中である。

また、③動的特性を有する界面の創成を目的として、ポリロタキサンが基板に対して水平(ループ型)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、金基板固定化用官能基として SH 基を導入した。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チオアセテート(SAc)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合成し、更に α -CD の水酸基をメチル化することにより水溶性のポリロタキサンを合成した。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行い、水晶発振子マイクロバランス測定・赤外反射吸収分光法・X線光電子分光法等を用い、表面組成評価を行った。ポリロタキサンをループ型またはグラフト型に固定化した表面の精密設計を行い、表面特性評価を行った。また、新規動的表面としてポリロタキサンヒドロゲル表面の設計にも着手した。

石原グループ

当該年度は昨年度に引き続き、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)内の水の状態を示差走査熱量(DSC)測定により解析し、リン脂質極性基周辺の水和構造を考察した。加えて、高分子交互積層法および表面開始リビングラジカル重合法を利用し、MPC を含む様々な種類の双性イオン型のナノ構造を基板表面に構築した。これらはバイオマテリアル界面でのタンパク質吸着挙動と水の運動性との関係を明確にし、この特性を表面の化学構造に基づいて制御するための基盤研究として不可欠である。

リン脂質極性基周辺の水和構造を考察するため、ゲル内に含まれる不凍水量を解析した。PMPC ハイドロゲルは同等の膨潤率を有する他のハイドロゲルと比較して高い不凍水量であった。これは poly(MPC)鎖の高い水和能を示唆した。さらに、算出される poly(MPC)一本鎖あたりの不凍水数から、poly(MPC)鎖周辺には 20 個程度の水分子からなる集合体(クラスター水)が存在することが示唆された¹⁾。

ポリマーの化学構造を制御して熱力学的に不安定な相分離構造を安定化し、リン脂質極性基の界面における配向を固定化する新しい概念を提案し、従来のポリマーに比較して短時間で親水性を示す系を確立した²⁾。また、高分子交互積層法を用いて構築したリン脂質ポリマーハイドロゲル層により、簡便に金属表面を高い生体親和性表面に改質する方法論を確立した³⁾。

代表的なリビングラジカル重合法のひとつである原子移動リビングラジカル重合(ATRP)法によりシリコン基板表面にブラシ構造を作製した。フォスホベタイン型の MPC に加え、スルホベタイン型(SBMA)およびカルボキシベタイン型(CBMA)の構造を側鎖に有するメタクリル酸を使用した。作製されたグラフト層の厚さから、PMPC、PSBMA および PCBMA ブラシのグラフト密度はそれぞれ

0.26、0.34 および 0.69 chains/nm²と算出された。これらの結果は双性イオン構造を側鎖に有するモノマーユニットからなる高密度ポリマーブラシ構造が作製されていることを示した。グラフト基板表面に吸着するタンパク質量は開始剤部位が固定化された基板の 15%以下に低減された。今後は構築されたポリマーブラシ表面の水分子の運動性の解析や原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定によるタンパク質の吸着力測定などを予定している。

山岡グループ

含水材料中の動的な水溶性高分子鎖の化学構造・分子量・分子運動性を制御したマトリックス群をスキャホールドとする組織再生において、その界面に対する炎症反応と組織再生反応との相関を解明し、これらを制御することで能動的に組織再生を誘導する多次的なバイオ界面を構築する。本年度は、主に動的特性の異なるスキャホールド材料群の構築と、これらに対する炎症反応と組織再生反応の評価軸の構築を完了した。

従来、組織再生スキャホールドとして使用されているポリ乳酸多孔質体は、分子運動性に乏しく皮膚や心筋などの軟組織の再生には必ずしも優れていない。そこで、ポリ乳酸にポリエチレングリコールセグメントを導入した含水性マルチブロック共重合体ゲルを合成した。これらの両材料から、フィルムを作製し、ラット背部皮下埋入後の炎症反応を、顆粒球やマクロファージの遊走、血管新生、カプセル化反応と、炎症や創傷治癒の促進や阻害を誘導するといわれる代表的なサイトカインの発現量を指標として詳細に検討した。その結果、含水層中の高分子鎖の動的特性が、カプセル化反応、好中球やマクロファージの遊走性を優位に減少させることが明らかとなった。なお、血管新生に関しては、これら両物質に対する明らかな違いは認められていない。移植フィルム周辺組織における局所サイトカインの発現量を調べた結果、含水性ゲルは、調査した範囲のサイトカインの発現をほとんど誘導しないことがわかった。一方ポリ乳酸では、移植後 7 日以内に、発現量の変化が認められたことから、今後、サイトカインを含む網羅的遺伝子発現のパターンを解析することにより、分子運動性と生体反応との関係を模索する。

先の、炎症反応抑制は、分子鎖の動的特性がもたらすバイオイナート特性（組織非刺激特性）であり、受動的炎症反応抑制である。一方で、能動的に炎症反応を抑制するためのチャレンジとして、生体内で補体系を抑制する分子である CRIT-H17 ペプチド、および、菌体が補体系から逃れるために利用する Efp-C ペプチドを、動的スパーサーを介して結合した。これらのバイオ界面に対する炎症を、*in vivo*にて検討した結果、有効な炎症抑制活性を確認した。

さらに、組織再生を誘導するリガンド分子としてラミニン由来 AG73 ペプチドを選択し、これらを結合させたポリ乳酸誘導体バイオ界面上で、PC12 細胞株の神経突起の伸長が認められた⁸⁾。すでに、チューブ状人工神経への成型方法も確立しており、次年度以降は *in vivo* 評価を進める。これらのペプチド配列に加え、含水性動的配列としてエラスチン由来繰返し配列を有する複合人工タンパクの大腸菌発現システム構築が完了し、次年度以降はそれらを用いた動的材料の開発を試みる。

岸田グループ

コラーゲンと高分子の混和を実現するために、熱と振動によって生体組織中のコラーゲン三重鎖構造が一部解離し、他の分子と融合することで融着がおこるとの作業仮説を提唱し、組織接着に特化した装置の開発を行ってきた。当該年度は昨年度に引き続き、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

を得ることを目的として、生体接着技術としての応用を検討した。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を想定し、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を確認した。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。極性成分の接着への関与が考えられたため、これまでに接着が観察されなかったポリエチレンを表面改質し、接着現象を観察した。空気、酸素、アンモニア等の雰囲気中でコロナ放電処理を行い、表面に水酸基、カルボキシル基、アミノ基をそれぞれ導入した。これを用いて、ナノ振動接着装置による生体接着を観察したところ、酸素含有表面に於いて接着強度が得られた。しかしながら、その強度は例えばビニロン等と比較して低く、表面官能基の関与は明確になったものの、高い接着強度を実現するためにはその他の要因が存在することが明らかとなった。組織接着用材料を調製する目的で、コラーゲンの溶解性と架橋法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。今後はこれを用いて、高分子マトリクスあるいは生体組織との複合化が可能であるか否かを検討し、生体接着現象の理解のための基本材料とする。

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学、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
 - ・示唆走査熱量測定による poly(MPC) ゲルおよび poly(Me(EG)nMA) ゲル内の水の状態解析
 - ・PMPC 鎖周辺の水和モデルについての考察
 - ・表面開始リビングラジカル重合法によるポリマーブラシ構造の作製

(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により誘導される炎症・再生などの生態応答の解析システム構築
 - ・特異的リガンド導入による慢性炎症の抑制

・組織再生性動的分子鎖ペプチド分子の生合成

(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

- ・ナノ振動融着法を用いた高分子・生体組織間の接着
- ・生体組織構造を目指したコラーゲン組織体の作製と特性検討

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

石原グループ

1. Toshinori Morisaku, Junji Watanabe, Tomohiro Konno, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara, “Hydration of phosphorylcholine groups attached to highly swollen polymer hydrogels studied by thermal analysis”, *Polymer*, 49, 4652-4657 (2008)
2. Koji Futamura, Ryosuke Matsuno, Tomohiro Konno, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara, “Rapid development of hydrophilicity and protein adsorption resistance by polymer surface bearing phosphorylcholine and naphthalene Groups”, *Langmuir* 24, 10340-10344 (2008)
3. Jiyeon Choi, Tomohiro Konno, Ryosuke Matsuno, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, “Surface immobilization of biocompatible phospholipid polymer multilayered hydrogel on titanium alloy”, *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 67, 216-223 (2008)

山岡グループ

4. K. Sawada, D. Terada, T. Fujisato, T. Yamaoka, and S. Kitamura, Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(6), 943-949 (2008)
5. T. H. Ying, D. Ishii, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, K. Sudesh, R. Samian, M. Fujita, M. Maeda, and T. Iwata, Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response, *Biomaterials*, 29, 1307-1317(2008)
6. S. Kakinoki, A. Panitch, D. A. Tirrell, and T. Yamaoka, Fundamental Studies on Genetically Engineered Elastin Model Peptides for Biomaterials, *Peptide Science* 2007,427-428 (2008)
7. Miskon, T. Yamaoka, S-H. Hyon, M. Kodama, and H. Uyama, Preservation of Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate, *Tissue Engineering*, E-pub, 2009 Jan 13 (2008)
8. S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami and T. Yamaoka, Modification

of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo (Lactic Acid) Conjugates, Peptide Science 2008, 449-450 (2009)

9. D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, and T. Iwata. In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers, Biomacromolecules, 10(2), 237-242 (2009)

岸田グループ

10. Nam K, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T, Kitamura S, Kishida A, Study on the physical properties of the tissue-engineered blood vessel via chemical cross-linking and polymer-tissue cross-linking, J. Artif. Organs, 12, 47-54 (2009).

未発行論文

由井グループ

11. N. Yui, R. Katoono, A. Yamashita, Functional Polyrotaxanes for drug delivery, Adv. Polym. Sci., in press (2008).
12. N. Yui, Supramolecular mobility in polyrotaxanes exploits biomedical functions, Macromol. Symp., in press (2008).
13. Dae Hyeok Yang, Ryo Katoono, Jun Yamaguchi, Yoshiko Miura, Nobuhiko Yui, Dynamic Surface Based on Polyrotaxane Loops on a Solid Substrate, Macromolecules, submitted (2009).

山岡グループ

14. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka, Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components, Journal of Artificial Organs, in press (2009)

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)