

令和元年5月15日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05800

研究課題名(和文)天然アミノ酸由来のビニルモノマーを基盤とするスマート高分子材料の開発研究

研究課題名(英文)Development of Smart Polymer Materials from Natural Amino Acid-Based Vinyl Monomers

研究代表者

東 信行(Higashi, Nobuyuki)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：10156557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の主な目的は、天然アミノ酸由来のビニルモノマーの系統的合成と高分子化ならびにそれらビニルポリマーの機能特性とくに外部刺激応答性を検討して、新たなスマート高分子材料を開拓することである。得られた成果の概要は次の通りである。まず、水中での熱転移温度の異なるポリマーブロックを有するジブロックポリマーを精密合成し、これが昇温過程でミセル形成を伴うユニークな相転移現象を示すことを見出した。次いで、ガラス基板上へ系を移し、熱応答性細胞足場材としての有用性を明らかにした。最後に、このポリマーがヒドロゲルを形成することに着目して、細胞包含型インジェクタブルゲルとしても有用であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然の構造タンパクの一種であるエラスチンは、熱に反応して極性スイッチング可能な興味深い特性を有している。一方、エラスチンないしはその類似ペプチドを人工合成するためには、多くの労力と時間を要し、しかも大量合成も容易ではない。本研究ではこうした天然タンパクを見習って、アミノ酸由来ビニルモノマーの重合により、簡便に大量に高分子化するという発想のもと、高い安定性と機能性をもつ生体適合型高分子材料を開発するという発想に至った。とくにアミノ酸由来ビニルポリマーの精密合成に基づく高度な構造制御についての知見は、学術的意義が大きく、同時に生体材料としての展開は社会的な波及効果も十分に大きいものがある。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this study is to develop a smart polymeric material from amino acid-derived vinyl polymers that exhibit novel functions such as external stimuli-responsiveness. The following results were obtained: (1) diblock polymers, composed of two segments having different phase transition temperatures, have been successfully prepared by using RAFT polymerization, have shown unique phase transition behaviors accompanying with a micelle formation, (2) these polymer brushes prepared on glass plate have worked as a thermo-responsive cell scaffold, and finally (3) when the solution concentration was increased, these amino acid-derived polymers have formed hydrogels that exhibit an injectable property with maintaining the cell viability.

研究分野：高分子化学を基盤とした新規な生体関連高分子の開発

キーワード：アミノ酸由来ビニルポリマー リビングラジカル重合 多重温度応答性ブロックポリマー 表面グラフト重合 細胞シート 刺激応答性ヒドロゲル インジェクタブルゲル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

刺激応答型高分子は、医療や環境さらにはエネルギー分野に至るまで幅広い領域において、スマート・ソフトマテリアルとして注目を集めている。特に系外から容易に与えることができる温度(熱)刺激は、実用的観点からも興味深い。温度応答性高分子には、その水溶液が LCST (下限臨界溶液温度)を越えると脱水して分子間凝集が起こり白濁し、それ以下の温度にすると溶解して透明になるという熱可逆的な相分離挙動を示すものがある。合成高分子の代表的なものにポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)がある。温度応答性は生体高分子にも認められ、構造タンパクの一種であるエラスチンがその代表例である。我々はエラスチンの興味深い特性に着目して、エラスチン類似ペプチド(ELP)ならびにそのポリマーハイブリッドを合成し、感熱材料への応用を検討してきた。ここで問題となるのは、ELP の合成に固相合成法を採用していることから、時間と手間を要し、また、反応試薬の特殊性からコストがかかることも負担となる。DNA 組み換え法も有用であるが、実験操作が煩雑でやはり大量合成が困難であるなど問題が多い。これらの点を克服すべく、PNIPAM の分子構造も考慮に入れながら、天然アミノ酸をビニルモノマー化することを考えた。これによりラジカル重合による高分子化が可能となり、安価な原料による大量合成が容易に行えることから、一気に上記問題がクリアーできることを期待した。

2. 研究の目的

本研究の最大の特徴は、天然タンパク質の構造や機能を見習ってアミノ酸由来のモノマーからなるビニルポリマーの系統的合成とそれら水溶液の熱的特性の体系化を行うことにある。従来のポリペプチド合成や人工高分子とのハイブリッドに比べて、本系の優れた点は、天然アミノ酸をベースにしていることから、生体適合性が期待できることは勿論のこと、従来のラジカル重合による高分子化が容易となり、さらにリビングラジカル重合法(ATRP や RAFT 法)を適用することで、構造が明確で多様な分子形態(ブロック、グラフトなど)をもつ高分子の大量合成も可能となることである。具体的には(1)アミノ酸ポリマーの系統的合成と熱応答性の検討、(2)多様な分子形態のポリマー合成と応答機能の検討を行い、LCST/UCST(上限臨界溶液温度)特性を示す固体表面、熱応答性ハイドロゲル等々、医療診断用素材、生体反応場あるいは細胞足場材などを指向した応用を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) まず、アミノ酸の種類、とくに側鎖基の疎水性を考慮して、系統的なビニルモノマーの合成ならびにラジカル重合による単独重合体の合成を行う。合成したアミノ酸由来ビニルポリマーの水への溶解性をまず検討して、その熱的特性を知るために濁度の温度依存性の測定ならびに示差走査熱量計による熱分析を行う。より広範な転移温度を導くために共重合によるコポリマーを合成し、上記の方法により転移現象を明らかにする。転移モードを制御するために、側鎖アミノ酸のCOOH基のメチルエステル化を試みる。
- (2) ブロックやグラフトポリマーの精密合成を、ATRP 法や RAFT 法を駆使して実施する。各セグメントはアミノ酸の種類を適宜変えて、転移温度やモードが異なるように設計する。ブロック・グラフトポリマーの水溶液中での熱的特性を検討する。さらに、固体基板上でのアミノ酸モノマーの表面グラフト重合を行い、細胞の接着性や伸展性を調べて、熱刺激に応答した極性のスイッチング機能を持つ生体適合型材料表面の構築も目指す。
- (3) DDS への応用を見据えて適切な基質の保持・放出の実験を行う。分子集合体自身がアミノ酸由来ポリマーから構成されることから、生体分子の保持には好都合である。三次元ネットワーク化したハイドロゲルの系は、人工 ECM(細胞外マトリックス)の足場材としての有用性を検討する。

4. 研究成果

(1) 温度応答性を示すアミノ酸由来ビニルポリマーの精密設計

アミノ酸由来ビニルポリマーは、通常のラジカル重合法により上述のアミノ酸モノマーを重合することで簡単に調製することができる。我々は、カルボキシ末端をメチルエステル化した種々のアミノ酸由来ビニルポリマーを合成し、これらが水中で LCST 挙動を示すこと、またその転移温度がアミノ酸種により大きく異なることを見出した。図 1a はアミノ酸としてアラニン、 β -アラニン、グリシンを採用したビニルポリマーの水中における濁度 (600 nm) の温度依存性を示したものである。いずれのポリマーも LCST 挙動を示すが、グリシン型は 72°C、 β -アラニン型は 45°C、アラニン型は 18°C に転移温度を持ち、アミノ酸種の疎水性度に応じて低くなることがわかった。また、興味深いことに、これらのアミノ酸モノマーを共重合することにより LCST を任意に変化させることができた。図 1b は一例としてグリシン/アラニン共重合ビニルポリマーの例を示した。組成比を変えることで 18-72°C の範囲で LCST をチューニングすることが可能である。すなわち、アミノ酸由来ビニルモノマーのみで、目的の使用温度にあわせてテーラーメイドに高分子を設計することが可能となった。

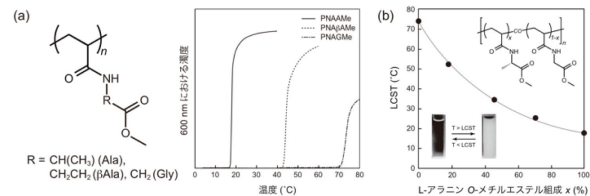


図 1 アミノ酸由来ビニルポリマーの温度応答性

(2) アミノ酸由来ビニルポリマーのブロック化とその特異な温度応答性

RAFT 重合法を用いて多分散度 $D \leq 1.2$ の制御されたアラニン *O*-メチルエステル/ β -アラニン *O*-メチルエステル共重合ブロックポリマーを合成し、水中でユニークな温度応答挙動を示すことを見出した。すなわち、水中で 15°C から濁度の上昇が見られ、26°C から 33°C にかけて一度減少した後に再び濁度が上昇する、三段階の温度応答挙動を示すことがわかった (図 2)。TEM、AFM および DLS 分析を用いて温度上昇に伴う会合状態の変化を追跡した結果、一段階目の濁度の増加はアラニンセグメントの相転移に起因する凝集、二段階目の濁度の減少はアラニンセグメントを疎水性コア、 β -アラニンを親水性シェルとしたミセル構造への転移、三段階目の濁度の増加は β -アラニンシェルの相転移に伴うミセルの凝集によることが明らかとなった。このような特異な温度応答挙動の発現には各ブロック長のバランスが強く影響を及ぼすことも提案した。このように特異な温度応答挙動を示すブロックコポリマーは、温度をコントロールすることで二種類の疎水性ナノ空間を構築することが可能であることが明らかとなった。

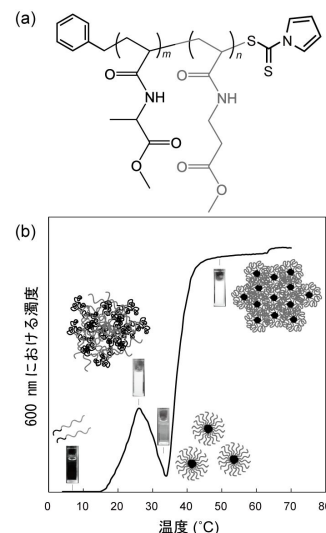


図 2 アミノ酸由来ブロックコポリマーの特異な温度応答性

(3) アミノ酸由来ビニルポリマーブラシによる細胞培養スキャフォールドの創成

表面開始 ATRP を用いて種々のアミノ酸由来ビニルポリマーを修飾させたガラス基板 (図 3a) を作成した。図 3b は溶液中で同時合成したフリーの各ポリマーの水中における温度応答挙動を示している。ATRP で合成した場合においても、ポリマー組成に応じて LCST が変化していることがわかる。次に、基板表面のポリマーブラシの温度応答性を液中気泡法による接触角測定を用いて検討した (図 3c)。グリシンのほうがアラニンに比べて親水性が高いため、グリシン組成が大きくなるほど総じて高い接触角となっている。また、ポリマーブラシは温度に応答して構造転移しており、LCST 以上では転移前と比較して疎水的な表面を作り出していることがわかる。このように、アミノ酸由来ビニルポリマー修飾基板は温度によって親水-疎水スイッチングが可能な表面として振る舞う。アミノ酸由来ポリマーブラシは、LCST が 13°C (アラニン組成 $x=1$)、22°C ($x=0.7$) および 25°C ($x=0.66$) であるため、

細胞培養温度である 37°C は LCST 以上である。そこで、LCST が 13 および 25°C の基板を用いて NIH/3T3 細胞の培養を行った。それぞれの基板上で細胞が 80% コンフルエントに達するまで培養を行い、その後 LCST 以下まで冷却した。図 4 はそのときの様子であり、比較としてポリマー未修飾基板（開始剤修飾基板）上における細胞の挙動も合わせて示した。 $x=1$ および $x=0.66$ 基板では細胞シートが得られたが、ポリマー未修飾基板では細胞の剥離は見られず、ポリマーブラシの相転移が細胞の剥離を誘発させていることがわかる。このように、アミノ酸由来ビニルポリマーはその温度応答性に基づき、細胞足場材料として機能する事が明らかとなった。

(4) 細胞足場材としてのインジェクタブルゲル

最後に、三次元ネットワーク化に挑戦すべく ABA 型のトリブロックポリマー (1) の精密合成とその温度応答性について検討した。このポリマー水溶液の希釈下での濁度の温度依存性を図 5c に示す。低温域 (5°C) では透明な水溶液が、昇温に伴って 18°C 付近より濁度が増し LCST 型の相転移を示した。さらに昇温すると、平坦部を経て第 2 の LCST 転移を示した。それぞれの LCST 現象は各ブロックに基づくものであると考えられるが、それらの温度が対応するホモポリマーの LCST に必ずしも一致しないことから、特異な分子間相互作用にもとづく特徴的な集合構造を形成していることが予想される。各温度における水溶液の AFM や TEM 観察、動的光散乱 (DLS) 測定により、図 5b に模式的に示すようなフラワー様ミセルを経るモデルが妥当であると結論づけた。高濃度条件下 ($30\text{ wt}\%$) で各温度 ($5, 22, 35, 70^{\circ}\text{C}$) における挙動を検討した。図 6a に各温度におけるポリマー水溶液の状態を示した。 5°C では透明なゾル状態であったが、温度上昇に伴い白濁し、 22 および 35°C ではハイドロゲルを形成した。その後、 50°C で流動性が増加し、 70°C で再びハイドロゲルを形成した。これは温度上昇に伴って A ブロックの疎水性相互作用がネットワーク構造の架橋点として作用しているものと考えられる。この溶液の $10\text{-}40^{\circ}\text{C}$ における動的粘弾性の測定により、A ブロックの LCST 以上で貯蔵弾性率 (G') が損失弾性率 (G'') を上回る典型的なゲル型挙動を示した (図 6b) が非共有結合により形成されているため安定ではなく、温度上昇によ

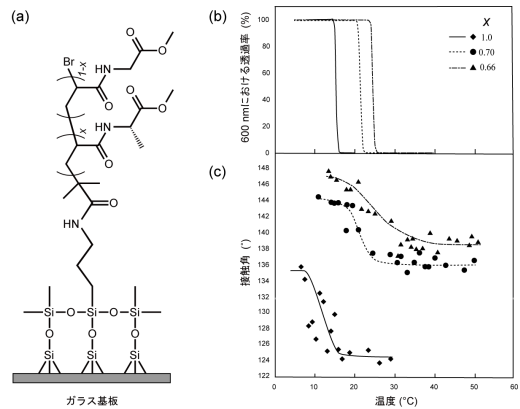


図 3 ガラス基板上でのアミノ酸ビニルポリマーブラシの調製；親疎水スイッチング表面の構築

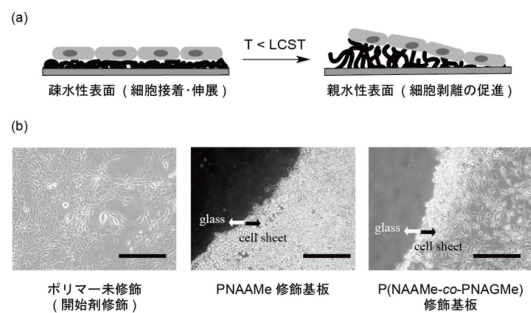


図 4 アミノ酸ビニルポリマーブラシによる感熱的細胞シートの回収

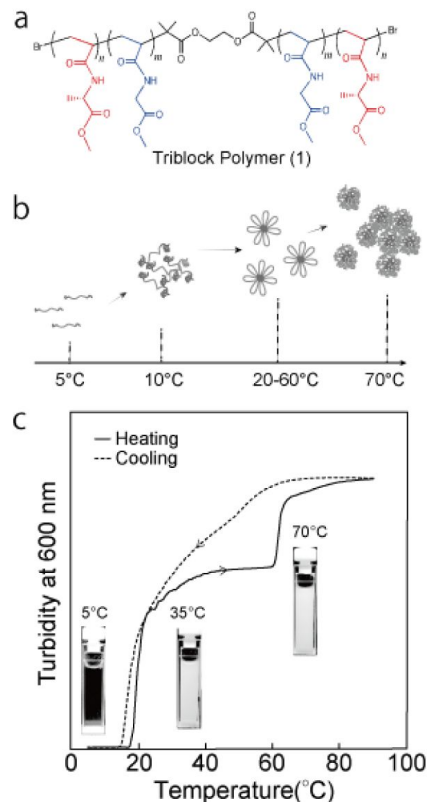


図 5 アミノ酸トリブロックポリマー (1) のフラワーミセルを経由する相転移モデル

り組換えが生じることで熱力学的に安定なフラワーミセルが形成され、ネットワークの架橋密度が低下するためと考えた。また、このハイドロゲルは自己修復特性を示し、同時にインジェクタブル特性も有していることを明らかにした。

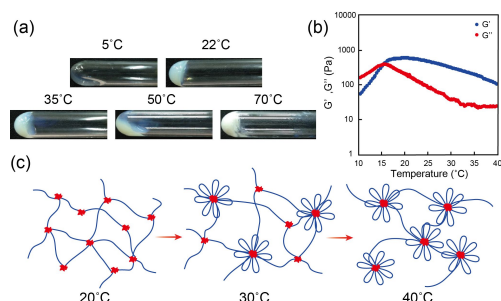


図6 アミノ酸トリブロックポリマー (1) の温度応答性ゾル・ゲル転移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

S. Nishimura, N. Higashi, T. Koga, A Novel Thermo-responsive Multiblock Architecture Composed of A Sequential Peptide and An Amino Acid-derived Vinyl Polymer: Toward Protein-mimicking Single-chain Folding, *Chem. Commun.*, **査読有**, **55**, 1498-1501 (2019).

DOI: 10.1039/c8cc09051c

N. Higashi, S. Matsubara, S. Nishimura, T. Koga, Stepwise Thermo-responsive Amino Acid-derived Triblock Vinyl Polymers: ATRP Synthesis of Polymers, Aggregation and Gelation Properties via Flower-like Micelle Formation, *Materials*, **査読有**, **11**, 424 (2018).

DOI: 10.3390/ma11030424

N. Higashi, A. Hirata, S. Nishimura, T. Koga, Thermo-Responsive Polymer Brushes on Glass Plate Prepared from a New Class of Amino Acid-Derived Vinyl Monomers and Their Applications in Cell-Sheet Engineering, *Colloid Surf. B: Biointerfaces*, **査読有**, **159**, 39-46 (2017).

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.068

S. Nishimura, N. Higashi, T. Koga, Facile Synthesis of Multiblock Copolymers Containing Sequence-Controlled Peptides and Well-Defined Vinyl Polymers by Nitroxide Mediated Polymerization, *Chem. Eur. J.*, **査読有**, **23**, 15050-15058 (2017).

DOI: 10.1002/chem.201703655

N. Higashi, D. Sekine, T. Koga, Temperature Induced Self-Assembly of Amino Acid-Derived Vinyl Block Copolymers via Dual Phase Transitions, *J. Colloid Interface Sci.*, **査読有**, **500**, 341-348 (2017).

DOI: 10.1016/j.jcis.2017.04.027

〔学会発表〕(計12件)

山野 宰・東 信行・古賀智之、RAFT 重合法を利用した配列制御型アミノ酸由来ビニルポリマーのワンポット合成、第67回高分子学会年次大会、2018年

T. Koga, Y. Oatari, H. Motoda, N. Higashi, Fast pH-Responsive Supramolecular Hydrogel from Peptide-Polymer Hybrid, 24th Polymer Networks Group Meeting, 2018

S. Nishimura, S. Matsubara, N. Higashi, T. Koga, Thermo-Responsive Hydrogel from Amino Acid-Derived Triblock Vinyl Polymers via Flower-Like Micelle Formation, 24th Polymer Networks Group Meeting, 2018

西村慎之介・東 信行・古賀智之、ペプチドとビニルポリマーを構成要素とするマルチブロック型高分子の One-Pot 合成、第66回高分子学会年次大会、2017年

平住智佳子・東 信行・古賀智之、アミノ酸由来ビニルポリマーからなる pH/温度二重応答性ジブロックポリマー、第65回高分子討論会、2017年

佐々木景亮・東 信行・古賀智之、RAFT 重合法を利用したアミノ酸由来ビニルポリマーの精密合成と温度応答性、日本化学会第97春季年会、2017年

平田絢葉・東 信行・古賀智之、細胞足場材料への応用を目指した温度応答性アミノ酸由来ポリマーブラシの創成、第54回同志社大学ハリス理化学研究所発表会、2016年

西村慎之介・古賀智之・東 信行、アミノ酸由来ビニルポリマーを用いた温度応答性ハイドロゲルの精密設計、第33回関西地区ペプチドセミナー、2016年

〔図書〕(計1件)

西村慎之介, 古賀智之, 東 信行, (株) エヌ・ティ・エス、アミノ酸を基盤とする刺激応答性ポリマーの設計 第2章 分子設計 第14節「刺激応答性高分子ハンドブック」2018、153

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。