

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300182

研究課題名（和文）

生体分子応答性ゲルの合成とインテリジェント医用システムの構築

研究課題名（英文）

Synthesis of Biomolecule-Responsive Gels and Construction of Intelligent Biomedical Systems

研究代表者

宮田 隆志 (MIYATA TAKASHI)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：50239414

研究成果の概要（和文）：

本研究では、新規な医用システムを構築するためのスマートバイオマテリアルとして、様々なシグナル生体分子に応答する生体分子応答性ゲルを合成した。さらに、生体分子応答性ゲルを用いて、自律応答型 DDS や診断センサーなどの開発を試みた。特に、二種類の方法でゲル内に生体分子を組織化することによって、疾病のシグナルとなる抗原や糖鎖などに対する生体分子応答性ゲルとして応答膨潤型の生体分子架橋ゲルと応答収縮型の生体分子インプリントゲルを合成し、DDS や診断システムへの応用を試みた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, biomolecule-responsive gels that underwent changes in the volume in response to a signal biomolecule were prepared as smart biomaterials for constructing novel bio-systems. Furthermore, self-regulated drug delivery systems (DDS), diagnostic sensors and so on were developed using biomolecule-responsive gels. We synthesized biomolecule-crosslinked gels and biomolecule-imprinted gels that swell and shrink in response to a signal biomolecule such as an antigen and a saccharide, and tried to apply their gels to DDS and diagnostic sensors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：インテリジェント材料，高分子ゲル，刺激応答性ゲル，バイオコンジュゲーション

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、pH や温度などの外部環境の変化を感知して体積変化する刺激応答性ゲルが、ドラッグデリバリーシステム(DDS)や診断センサーなどに利用できるインテリジェント医用材料として注目されている。しかし、これ

までに報告されている刺激応答性ゲルは温度などの物理化学的変化に応答するゲルがほとんどである。

(2) このような刺激応答性ゲルを DDS や診断センサーなどの医用システムへ利用するた

めには、疾病のシグナルとなるタンパク質等の生体分子を認識して応答する生体分子応答性ゲルの開発が強く要望されている。

(3) 研究代表者はこれまでに生体分子応答性ゲルの一般的合成方法を検討し、抗原や腫瘍マーカー等のシグナル生体分子に応答する生体分子応答性ゲルを合成してきた。

2. 研究の目的

本研究では、新規な医用システムを構築するためのスマートバイオマテリアルとして、様々なシグナル生体分子に応答する生体分子応答性ゲルの合成を目指した。さらに、このような生体分子応答性ゲルを利用することにより、シグナル生体分子に応答した DDS や診断センサーシステムなどのような世界的に例のない新規なインテリジェント医用システムの構築を試みた。具体的には次の 4 項目を主な目的とした。

(1) 新規な生体分子応答性ゲルの合成

様々な生体分子複合体を利用することにより、応答膨潤型および応答収縮型の生体分子応答性ゲルを合成する。

(2) 自律応答型薬物放出システムの開発

生体分子に応答して薬物放出制御できる自律応答型 DDS システムの開発を試みる。

(3) 新規なゲル診断システムの開発

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)や表面プラズモン共鳴(SPR)を利用した生体分子応答性ゲルセンサーシステムを開発する。

(4) 自律応答型細胞培養システムの開発

細胞培養基板上に生体分子応答性ゲル層を形成させる方法を検討し、細胞培養システムへの応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、新規な医用システムを構築するためのスマートバイオマテリアルとして、様々な生体分子応答性ゲルの合成とそれを用いた DDS や診断センサー、細胞培養システムの開発を次のような方法で試みた。

(1) 新規な生体分子応答性ゲルの合成

リガンドとして抗体やレクチンなどを利用し、それとターゲット生体分子との複合体を架橋点として用いることにより、新規な生体分子応答性ゲルを合成した。その際に、2種類の生体分子複合体を導入した相互侵入網目(IPN)ゲルや高分子架橋剤を用いた生体分子応答性ゲルを合成し、その構造と応答挙動との関係を検討した。さらに、pH 応答性成分を導入し、応答機能を制御できる生体分

子応答性ゲルの合成を試みた。

(2) 自律応答型薬物放出システムの開発

生体分子応答性ゲルを用いて薬物の放出制御を試みた。特に、シグナル生体分子の存在の有無による薬物放出制御機能について検討し、自律応答型薬物放出システムの開発を目指した。また、生体分子応答性ゲルを薬物キャリアとして利用することを目的とし、無乳化剤乳化重合法によって生体分子応答性ゲル微粒子を合成した。

(3) 新規なゲル診断システムの開発

FRET のドナーとして利用する量子ドット(QD)の表面に、ラジカル重合によって生体分子応答性ゲル層の形成を試みた。また、応答収縮型の DNA インプリントゲルに FRET ドナーとアクセプターを導入し、その DNA 応答挙動について検討した。さらに、原子移動ラジカル重合(ATRP)法を用いて SPR センサーチップ表面上に標的生体分子リガンドを導入した生体分子コンジュゲートゲル層を形成させた。

(4) 自律応答型細胞培養システムの開発

自律応答型細胞培養システムを開発するため、細胞培養基板上に生体分子応答性ゲル層の形成を試みた。まず ATRP 法の重合開始基を基板表面上に導入し、ATRP 法によってゲル薄膜層を形成するための合成条件を検討した。

4. 研究成果

(1) 新規な生体分子応答性ゲルの合成

①ゲル架橋点として分子複合体を導入したゲルを合成する際に、主鎖に荷電基を有する高分子を用いた場合、pH などによってその分子応答性が異なることを明らかにした。さらに、その荷電基の状態と分子応答挙動との関係についても検討した。

②異なる抗原抗体複合体を架橋点とした2種類の網目が相互に絡み合った相互侵入網目(IPN)構造を有するゲルを合成した。2種類の異なる抗原抗体複合体からなる IPN ゲルは、複数抗原の存在を感知して膨潤率変化を示した。このように複数の生体分子を同時に認識して応答するゲルを初めて合成し、DDS やセンサーへの応用の可能性を示した。

③生体分子インプリント法によって腫瘍マーカー応答性ゲルを合成する際の架橋剤の影響について検討し、適当な分子量の高分子架橋剤を利用することにより、その応答挙動を向上できることが明らかとなった(図1, 2)。

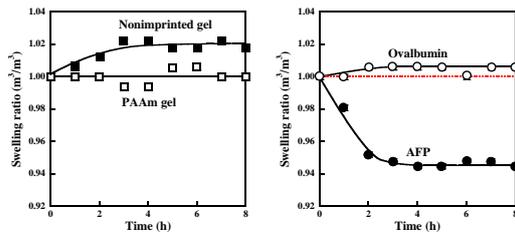


図 1 高分子架橋剤を用いた腫瘍マーカー応答性ゲルの糖タンパク質認識応答挙動

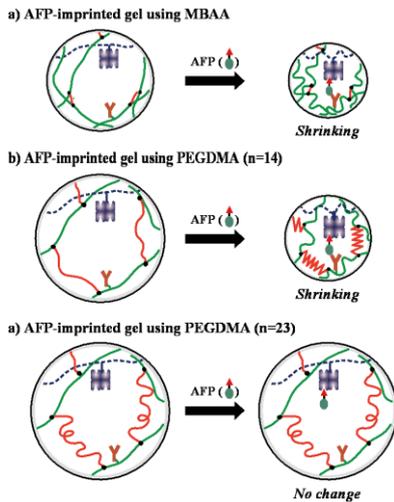


図 2 腫瘍マーカー応答性ゲルの収縮挙動に及ぼす架橋剤の分子量効果

(2) 自律応答型薬物放出システムの開発

①抗原応答性ゲル膜を調製し、モデル薬物として分子サイズの異なるビタミン B₁₂ とヘモグロビンの透過実験を行った。抗原応答性ゲル膜は、外部溶液中に抗原が存在しない場合には分子サイズの大きなヘモグロビンの透過を抑制し、分子サイズの小さいビタミン B₁₂ はわずかな透過が観察された。しかし、外部溶液中に抗原が存在すると、ヘモグロビンの透過が観察されるようになり、ビタミン B₁₂ の透過も促進された。さらに、外部抗原濃度の増加に伴ってモデル薬物の透過速度も増加し (図 3)、標的生体分子に反応して薬物放出を自律制御できる DDS 材料としての応用の可能性を示すことができた。

②無乳化剤乳化重合により、抗原抗体複合体や糖-レクチン複合体などの生体分子複合体を架橋点として導入した生体分子複合体架橋ナノゲルを合成した。生体分子複合体架橋ナノゲルは抗原やグルコースの存在を感知して粒径変化させた。さらに、その生体分子応答性ナノゲルに薬物を内包させることができた。このように生体分子に反応して粒径変化させる分子応答性ナノゲルはこれまで報告されておらず、新規な DDS 用キャリアとしての応用が期待できる。

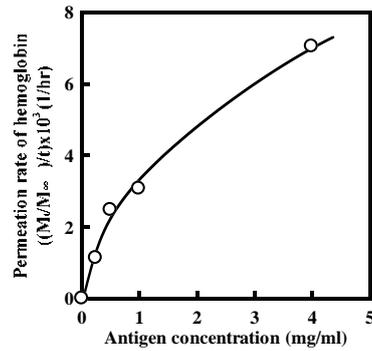


図 3 抗原応答性ゲル膜の薬物透過速度に及ぼす外部抗原濃度の影響

(3) 新規なゲル診断システムの開発

①FRET のドナーとして QD を利用し、その表面に FRET アクセプターを有する生体分子応答性ゲルの形成を試みた。しかし、ラジカル重合によるゲル形成時に QD が失活して蛍光強度が著しく低下した。したがって、QD 表面に生体分子応答性ゲル層を形成させる際、QD を失活させない重合方法の検討が必要であると考えられた。

②ATRP 法を用いて SPR センサーチップ表面上に標的分子リガンドを導入した生体分子コンジュゲートゲル層を形成させた (図 4)。標的分子がそのゲル内に吸着されると次第に SPR シグナルが変化し、標的分子センサーとして利用できることを明らかにした。さらに、その生体分子リガンド導入ゲル層の膜厚と SPR シグナルとの関係を検討し、膜厚制御によって SPR シグナルを向上させることがわかった。

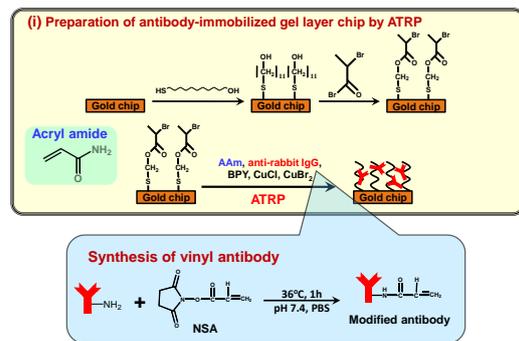


図 4 ATRP 法を用いた SPR チップ表面上での生体分子コンジュゲートゲル層の形成

(4) 自律応答型細胞培養システムの開発

基板表面上に生体分子応答性ゲル薄膜を調製する方法を検討した。まず、ATRP 法の重合開始剤となる Br を基板表面上に導入する方法を検討した。さらに、それを開始点として ATRP 法によりゲル薄膜層を形成することに成功した。しかし、細胞培養に適したゲ

ル層の形成には至らず、現在もその重合条件を検討中である。最適なゲル層を形成させる重合条件を明らかにすることができれば、今後、実際に細胞培養を行い、新規な細胞培養システムへの応用の可能性について検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① T. Miyata, T. Hayashi, Y. Kuriu, T. Uragami, Responsive Behavior of Tumor-Marker-Imprinted Hydrogels Using Macromolecular Cross-linkers, *J. Mol. Recognit.*, **25**, 336-343 (2012). DOI: 10.1002/jmr.2190 査読有
- ② A. Kawamura, Y. Hata, T. Miyata, T. Uragami, Synthesis of Glucose-Responsive Bioconjugated Gel Particles Using Surfactant-Free Emulsion Polymerization, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, in press. DOI:10.1016/j.colsurfb.2011.10.008 査読有
- ③ T. Miyata, N. Asami, Y. Okita, T. Uragami, Controlled Permeation of Model Drugs through a Bioconjugated Membrane with Antigen-Antibody Complexes as Reversible Crosslinks, *Polym. J.*, **42**, 834-837 (2010). DOI: 10.1038/pj.2010.76 査読有
- ④ T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, Structural Design of Stimuli-Responsive Bioconjugated Hydrogels That Respond to a Target Antigen, *J. Polym. Sci., Polym. Phys.*, **47**, 2144-2157 (2009). DOI: 10.1002/polb.21812 査読有

[学会発表] (計 3 2 件)

- ① 宮田隆志, 分子応答性スマートゲルの創成, 第 20 回ポリマー材料フォーラム, 東京, 143-144 (2011. 11. 25). (招待講演)
- ② T. Miyata, Bioconjugated Hydrogels That Respond to a Target Biomolecule, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Honolulu (2010. 12. 18). (招待講演)
- ③ T. Miyata, Responsive Behavior of Biomolecularly Imprinted Hydrogels Having Biomolecules as Ligands, The 6th International Meeting on Molecular Imprinting (MIP2010), New Orleans, 77 (2010. 8. 10). (招待講演)
- ④ T. Miyata, Smart Hydrogels Exhibiting Biomolecule-Responsive Behavior, Annual Spring Meeting of Polymer Society of Korea, Daejeon, Korea (2009. 4. 10). (招待講演)

[図書] (計 6 件)

- ① T. Miyata, Biomolecule-Responsive Hydrogels, *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook* (eds. R. M. Ottenbrite, K. Park, T. Okano), Springer, 65-86 (2010).
- ② 宮田隆志, 生体分子応答性ゲル, 食品・化粧品・医療分野へのゲルの利用 (西成勝好, 梶原莞爾, 長崎幸夫, 金田 勇監修), シーエムシー出版, 168-177 (2010).
- ③ 宮田隆志, 生体分子応答性ゲル (第 II 部 第 8 章), *CSJ カレントレビュー-01 驚異のソフトマテリアル-最新の機能性ゲル研究* (日本化学会編), 化学同人, 97-103 (2010).
- ④ 宮田隆志, スマート 3 次元高分子ネットワーク-分子応答性ゲル-, *超分子サイエンス&テクノロジー-基礎からイノベーションまで-* (国武豊喜監修), エヌ・ティール・エス出版, 454-463 (2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 複数物質応答性ゲルおよびその製造方法並びにその利用

発明者: 宮田隆志, 浦上 忠

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構, 学校法人関西大学

種類: 特許権

番号: 特願 2011-43017

出願年月日: 2011 年 2 月 28 日

国内外の別: 国内

[その他]

- ① 関西大, 光で微細模様-樹脂開発, タンパク質転写-低コストの加工, 有望, 日経産業新聞 (2011 年 7 月 19 日) (10 面)
- ② 関大, 表面形状自在に変わるフィルムを開発, 日刊工業新聞 (2011 年 5 月 23 日) (24 面)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 隆志 (MIYATA TAKASHI)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号: 5 0 2 3 9 4 1 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岩崎 泰彦 (IWASAKI YASUHIKO)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号: 9 0 2 8 0 9 9 0