

機関番号：53801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21800086

研究課題名（和文） 有機-無機ハイブリッドナノ構造を誘起する機能性糖類系バイオマテリアルの開発

研究課題名（英文） Development of Functional Polysaccharide-Biomaterials Inducing Organic-Inorganic Hybrid Nano-structure

研究代表者

山根 説子（YAMANE SETSUKO）

沼津工業高等専門学校・物質工学科・助教

研究者番号：00550477

研究成果の概要（和文）：

失った歯・骨組織を元通りにする再生医療の実現のため、再生の場を提供する足場材料を合成した。足場には、有機物の軟らかさ・多様性と、無機物の硬さを併せ持つ多機能性有機-無機ハイブリッドゲルを設計した。歯・骨再生に効くタンパク質を内包できる疎水性多糖ナノ粒子に、歯・骨の無機成分であるリン酸カルシウムを複合化して固め、ゲル化したところ、歯・骨再生の過程で重要と考えられているナノ構造体を誘起しうる有機-無機ハイブリッドゲルが得られた。

研究成果の概要（英文）：

Organic-inorganic hybrid hydrogels were synthesized as a functional scaffold for regeneration of the defective parts of bone and teeth. Hydrophobized polysaccharides nanogels were used as nucleus for calcium phosphate mineralization. These hybrid nanoparticles were then cross-linked to prepare hybrid hydrogel. The hybrid hydrogels induced nano-sized helical ribbon of intermediate structure of formation of hydroxyapatite.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2010 年度	980,000	294,000	1,274,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,060,000	618,000	2,678,000

研究分野：生体材料工学

科研費の分科・細目：工学，医用生体工学・生体材料学

キーワード：有機-無機ハイブリッド，糖，リン酸カルシウム，DDS

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯・骨再生を促進する有機-無機ハイブリッド足場材料：疾患や事故で失われた歯や骨組織を自身の治癒力で元通りにする再生医療の実現には、再生の場を提供する足場材料開発が必要である。歯・骨再生の足場は欠損部分を細胞で埋める多孔質性，生分解性に加え，再生を促すタンパク質薬物の長期放出，

骨の無機成分であるリン酸カルシウム生成促進が重要である。既存の足場にセラミックスや高分子があるが，各素材のみでは上記の全機能の発現は難しい。そこで，有機物と無機物を複合化することにより，有機物の軟らかさ・多様性と，無機物の硬さを併せ持つ多機能性足場(ゲル)の創製が可能となる。

(2) ナノ構造体を誘起する材料：有機-無機ハイブリッドとして、これまでに種々の疎水化多糖とリン酸カルシウムの複合化が行われている。中でも、トリカルボン酸置換プルランを核としてリン酸カルシウムと複合化させたところ、興味深いナノ構造体として、直径 50 nm 程度の無機物からなるヘリカルリボンが透過型電子顕微鏡(TEM)にて観察された。リン酸カルシウム系で、ヘリックス状のナノ構造体を人工的に作製した研究は他に例を見ない。ヘリカルリボンは複合化過程で現れ、その後はヒドロキシアパタイト(HAp)ナノ結晶へと変化した。HAp 結晶化前にヘリカルリボンが生成する現象は、ウシのエナメル質形成において報告されているが、詳細は分かっていない。硬組織において HAp 結晶が生成するまでにヘリカルリボンを經由しているとすれば、この機構の解明および、ヘリカルリボンを誘起しうる材料は、歯・骨再生に用いる足場材料に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) ヘリカルリボンおよびヘリカルリボンを経て生成するリン酸カルシウム結晶(HAp)の機構を調べ、その知見を足場材料の設計に利用する。

(2) ヘリカルリボンを誘起しうる機能性多糖を用いて多糖-リン酸カルシウムハイブリッドゲル(足場材料)を合成する。

3. 研究の方法

(1) 複合化は pH 変化により有機物を核として無機物を析出させる pH-gradient 法を用いた。まず、HAp 分散水に二酸化炭素ガスを吹き込み酸性にし、HAp を溶解した。ろ過して不純物を取り除き、ろ液のカルシウム濃度を決定した後、核となる疎水化多糖を添加した。25 °C で 8 時間攪拌して二酸化炭素を蒸散し、pH を上昇させ、それに伴いリン酸カルシウムを析出させた。

(2) ヘリカルリボンおよびヘリカルリボンから HAp が形成する機構を調べるため、種々の糖存在下で pH-gradient 法を行い、TEM にて経時観察を行った。糖はヒアルロン酸(HA, 粘度平均分子量 120kDa)、コンドロイチン硫酸(ChS)、トリカルボン酸コレステロール置換プルラン((COOH)₃CHP, プルラン平均分子量 100kDa)、トリカルボン酸コレステロール置換プルランアクリレート((COOH)₃CHPOA, プルラン平均分子量 100kDa)を用いた(Fig. 1)。カルシウムは全てのサンプルにおいて終濃度 2.0 mM に調整した。

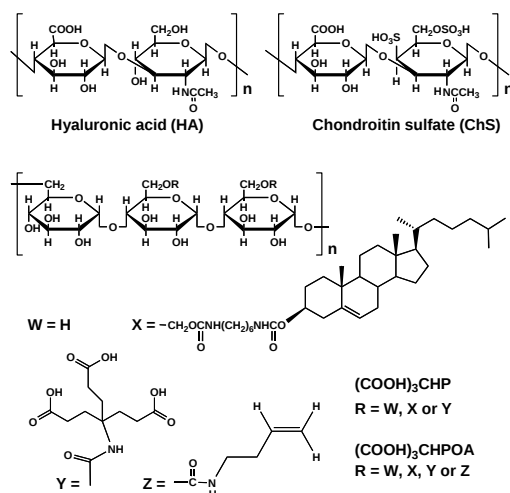


Fig. 1 方法 (2) で用いた糖

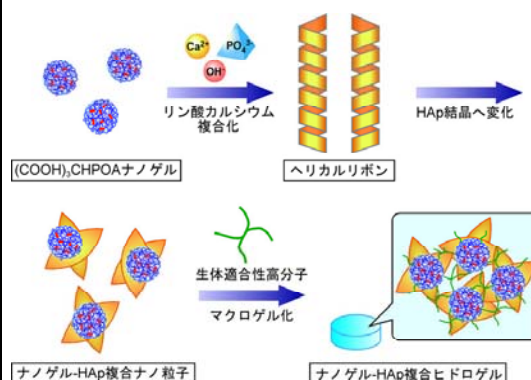


Fig. 2 ハイブリッドゲル合成の模式図

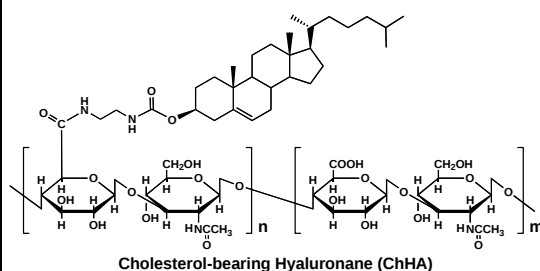


Fig. 3 コレステロール置換ヒアルロン酸

(3) ハイブリッドゲルは二通りの方法で合成した。

① (COOH)₃CHPOA-リン酸カルシウムハイブリッドゲルの合成(Fig. 2)：コレステリル基導入率が 1.1/100 単糖のコレステロール置換プルラン(CHP)にトリカルボン酸とアクリロイル基を導入して(COOH)₃CHPOA を合成した。(COOH)₃CHPOA を水に溶かし、プローブ型超音波装置にて分散し、0.22 μm 親水フィルターにて不純物を除去して(COOH)₃CHPOA ヒドロゲルナノ粒子(ナノゲル)を得た。(COOH)₃CHPOA ナノゲルを核に用い pH-gradient 法にてリン酸カルシウム複合化を行った。複合化にて得

られた $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ -リン酸カルシウム複合体を凍結乾燥して再溶解させ、架橋剤として末端基にチオールを有する分岐ポリオキシエチレン (PEG-SH, 日油) を添加して混合し、マクロゲルを作製した。

② コレステロール置換ヒアルロン酸 (ChHA)-リン酸カルシウムハイブリッドナノ粒子の合成 (Fig. 3) : リン酸カルシウム形成に作用しうるカルボン酸を有するヒアルロン酸に疎水性基としてコレステロールを置換し、ChHA ナノ粒子を新規に合成した。ChHA を水に溶解させ、 $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ と同様の方法にてナノ粒子を形成させた。ChHA ナノ粒子がコレステリル基の相互作用にてナノ粒子を形成したか確認するため、メチル- β -シクロデキストリン ($\text{m}\beta$ -CD) との相互作用について、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いて調べた。また、タンパク質との相互作用として、モデルタンパク質に蛍光標識ウシ血清アルブミン (FITC-BSA) を用いて、SEC 測定にて調べた。次に、ChHA ナノ粒子を核に用い pH-gradient 法にてリン酸カルシウム複合化を行い、TEM にて形態観察した。

4. 研究成果

(1) 研究の方法 (2) の成果 : 核 (終濃度 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) に用いた HA, ChS, $(\text{COOH})_3\text{CHP}$, $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ 存在下において、複合化途中の攪拌約 3 時間後にヘリカルリボンが観察された (Fig. 4(a), (c))。複合化終了後 (攪拌 8 時間後) ではヘリカルリボンは消失し、その代わりに針状結晶へと変化した (Fig. 4(b), (d))。制限視野電子線回折像 (SAED) を調べたところ、ヘリカルリボンはハローパターンが現れ、アモルファスまたは低結晶性リン酸カルシウムであることが示唆された。一方、針状結晶は HAp と同定された。以上より、今回用いた糖はヘリカルリボン形成を誘起することが示された。また、 $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ においては終濃度を変化させて pH-gradient 法を行った結果、終濃度 1.0 および $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ではヘリカルリボンが観察されたのに対し、終濃度 $16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ではヘリカルリボン様の無機物が観察された (Fig. 5)。詳細に観察すると、無機ナノ粒子が寄り集まってヘリカルリボンを形成している、またはヘリカルリボンに $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ が吸着した様な構造体であった。以上より、核に用いた糖がヘリカルリボン形成に寄与したことが示唆された。リン酸カルシウムがヘリカルリボンを人工的に形成させた研究は他に例を見ない。今後の展望として、ヘリカルリボンの同定及び、糖以外の核を用いて pH-gradient 法を行い、有機物の構造とヘリカルリボン形成の関係について検討する必要がある。

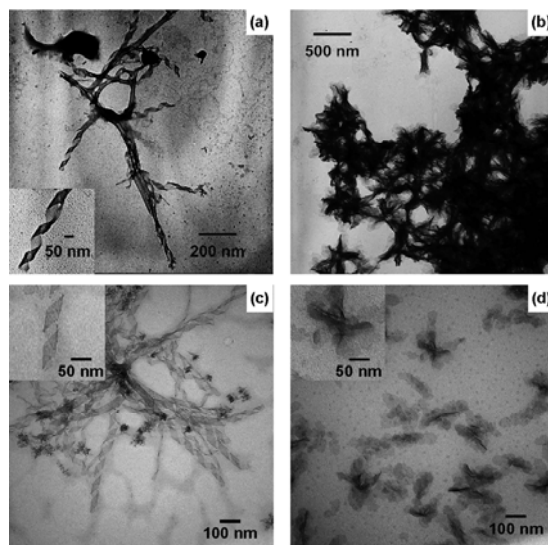


Fig. 4 pH-gradient 法にて合成した糖-リン酸カルシウム複合体の TEM 像 (無染色) (a) HA 存在下攪拌 3 時間後; (b) HA 存在下複合化終了後; (c) $(\text{COOH})_3\text{CHP}$ 存在下攪拌 2.5 時間後; (d) $(\text{COOH})_3\text{CHP}$ 存在下複合化終了後

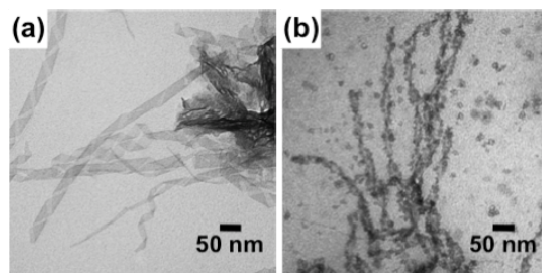


Fig. 5 $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ 存在下で生成した無機物の TEM 像 (無染色), $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ 濃度 (a) $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; (b) $16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

(2) 研究の方法 (3) の成果 : $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ -リン酸カルシウムハイブリッドゲル (以下①に述べる) および、ChHA-リン酸カルシウムハイブリッドナノ粒子 (以下②に述べる) が得られた。

① $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ -リン酸カルシウムハイブリッドゲル : $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ を合成した結果、トリカルボン酸 3.9/100 単糖、アクリロイル基 25.9/100 単糖の置換率となったことを ^1H NMR スペクトルより確認した。 $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ は上記研究成果 (1) より、ヘリカルリボンを形成し、複合化終了後には分散した HAp ナノ粒子が観察された。HAp ナノ粒子は動的光散乱 (DLS) 測定にて約 200 nm の粒径を示し、TEM 像の大きさと一致した。 $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ 終濃度 $16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ で複合化させた $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ -リン酸カルシウム複合体を一度凍結乾燥させて再溶解させ、PEG-SH とアクリロイル基 : チオール基 = 1 : 0.04 となるように反応させたと

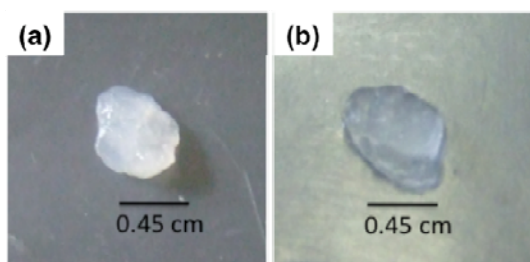


Fig. 6 架橋後のゲル, (a) $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ -リン酸カルシウムハイブリッドゲル; (b) $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ ゲル(コントロール)

ころ, ゲルが得られた (Fig. 6). コントロールとしてリン酸カルシウムと複合化させていない $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ も PEG-SH 添加によりゲルが得られた. 得られたゲルを室温にて約 1 ヶ月間静置させたところ, コントロールの複合化していない $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ ゲルは完全に分解したのに対し, $(\text{COOH})_3\text{CHPOA}$ -リン酸カルシウムハイブリッドゲルは完全には分解せず, 形状を維持していた. 以上より, リン酸カルシウム複合化により構造が安定化され, 分解されにくい性質の付与が示唆された. 今後は, ハイブリッドゲルの空孔率や分解速度等の詳細な構造解析および, タンパク質の取込み・放出等について検討する必要がある. 以上より, 本手法により多糖-リン酸カルシウムハイブリッドゲルが合成できた. 有機-無機ハイブリッドをビルディングブロックとしてゲル化した報告は少なく, 本手法で得られるハイブリッドゲルは, 分解速度の調節など精密な制御の設計が期待できる.

② ChHA-リン酸カルシウムハイブリッドナノ粒子: ChHA を合成した結果, コレステリル基 2.8/100 単糖の置換率となったことを ^1H NMR スペクトルより確認した. DLS 測定より, ChHA は粒径 160 nm, 多分散指数 0.105 の比較的単分散なナノ粒子を形成することが分かった. これをサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 測定したところ, ナノ粒子に由来するピークが確認できた. そこへ $\text{m}\beta\text{-CD}$ を添加したところ, ナノ粒子由来のピークが消失した. $\text{m}\beta\text{-CD}$ が ChHA ナノ粒子のコレステリル基と包接作用を起こし, それによりナノ粒子が崩壊したと考えられる. 以上より, ChHA はコレステリル基の相互作用にてナノ粒子を形成したことが示された. ChHA とタンパク質の相互作用を調べるため, ChHA 終濃度 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, FITC-BSA $0.50 \text{ }\mu\text{M}$, 37°C で 3 時間静置した後に SEC 測定したところ, FITC-BSA のピークが減少し, それに対して ChHA ナノ粒子由来のピーク強度が増大した (Fig. 7). 以上より, ChHA ナノ粒子は FITC-BSA と複合体を形成することが示され, タンパク質キャリアへの応用が可能であると考えられる.

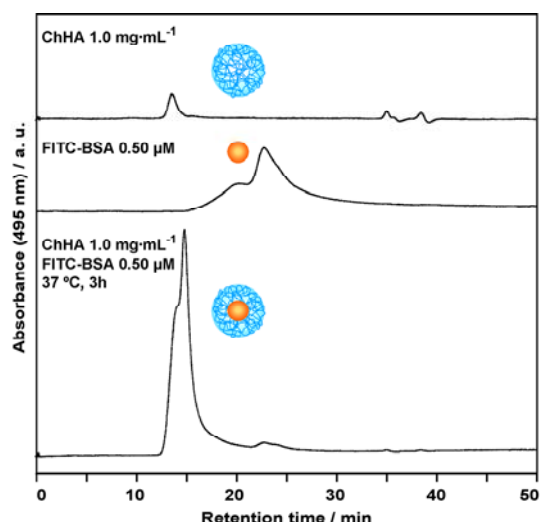


Fig. 7 ChHA, FITC-BSA およびそれらの複合体の SEC 測定

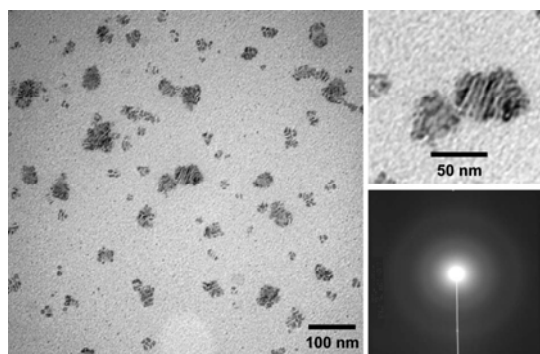


Fig. 8 ChHA-リン酸カルシウムハイブリッドナノ粒子の TEM 像(無染色)と制限視野電子線回折像

次に, ChHA ナノ粒子を核に用いてリン酸カルシウム複合化を行ったところ, アモルファス状のリン酸カルシウム (ACP) ナノ粒子が TEM にて観察された (Fig. 8). コントロールとして行ったヒアルロン酸存在下では, HAp 凝集体の沈殿が生じたのに対し, ChHA ナノ粒子存在下では複合化終了後も ACP ナノ粒子が観察された. さらに, この ACP ナノ粒子は約 1 ヶ月後にも分散状態を保持し, すぐれたコロイド分散性を示した. 以上より, ChHA ナノ粒子はコロイド分散性にすぐれたリン酸カルシウム形成に寄与しうることが分かった. HA を骨格としたナノ粒子の報告はあるが, HA からなるナノ粒子とリン酸カルシウム複合体の報告例は少ない. 本研究により ChHA ナノ粒子の機能とリン酸カルシウムの性質を併せ持つ, 多機能性材料の合成が期待される. 今後は, ChHA に重合性基としてアクリロイル基等を置換し, ChHA-リン酸カルシウムハイブリッドナノ粒子をビルディングブロックとしたマクロゲル化を行う.

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2件)

- (1) 山根説子, バイオメディカル応用に向けた有機-無機ナノハイブリッド, 化学工業, 査読無, Vol.62, 2011, 35-39
- (2) 山根説子, 菅原彩絵, 秋吉一成, バイオメディカル応用に向けた有機-無機ナノハイブリッド, 沼津工業高等専門学校研究報告, 査読無, Vol.45, 2010, 345-350

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 山根説子, 日吉結姫, 黒須啓, 佐々木善浩, 澤田晋一, 秋吉一成, 疎水化ヒアルロン酸-リン酸カルシウム複合ナノ粒子の合成, 第60回高分子年次大会, 2011.5.25~27, 大阪
- (2) 黒須啓, 佐々木善浩, 山根説子, 澤田晋一, 秋吉一成, 多糖ナノゲルによるリン酸カルシウムのナノ構造制御, 第60回高分子年次大会, 2011.5.25~27, 大阪
- (3) 黒須啓, 山根説子, 佐々木善浩, 秋吉一成, 多糖によるリン酸カルシウム複合材料のナノ構造制御, 第59回高分子討論会, 2010年9月15~17日, 北海道
- (4) 佐々木善浩, 黒須啓, 山根説子, 秋吉一成, 多糖-無機ナノハイブリッドの創製と機能, 第59回高分子学会年次大会, 2010年5月26~28日, 横浜
- (5) 黒須啓, 山根説子, 佐々木善浩, 清水繁, 秋吉一成, 多糖ナノゲルを用いるアパタイトナノ微粒子の作製, 第59回高分子学会年次大会, 2010年5月26~28日, 横浜
- (6) 佐々木善浩, 黒須啓, 山根説子, 秋吉一成, 有機-無機ハイブリッドナノゲルの創製と機能, 日本化学会第90春季年会, 2010年3月26~29日, 大阪
- (7) 黒須啓, 佐々木善浩, 山根説子, 澤田晋一, 秋吉一成, 多糖ナノゲルによるリン酸カルシウムのナノ構造制御, 日本化学会第90春季年会, 2010年3月26~29日, 大阪
- (8) Yoshihiro SASAKI, Setsuko YAMANE, Kazunari AKIYOSHI, Organic-Inorganic Hybrid Polysaccharide Nanogels Crosslinked with Siloxane, 8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers (FBPS2009), 2009年5月20~23日, Mishima, JAPAN
- (9) Yoshihiro SASAKI, Setsuko YAMANE, Kazunari AKIYOSHI, Organic-Inorganic Dual Crosslinked

Nanogels for Potential Biomedical Applications, 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2009年7月18-22日, Copenhagen, Denmark

6. 研究組織

(1)研究代表者

山根 説子 (YAMANE SETSUKO)

沼津工業高等専門学校・物質工学科・助教

研究者番号: 00550477

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: