

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650295

研究課題名(和文) アポトーシス細胞を模倣した抗炎症スマート粒子の設計と新たな急性疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Design of apoptotic cell membrane mimetic smart polymers for treatment of acute heart failure

研究代表者

荏原 充宏 (Ebara, Mitsuhiro)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点・MANA研究者

研究者番号：10452393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症部位(心筋梗塞部位)での微妙な環境変化(熱やpHなど)に応答してフォスファチジルセリン(PS)を“on-off”で提示するアポトーシス細胞模倣型スマート粒子の開発を行った。まず、PSの活性部位を側鎖に有する新規PS誘導体モノマーの合成を行った。次にPSモノマーと温度応答性ポリマーとの共重合体(PS-ポリマー)を合成した。合成したポリマーは抗炎症性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We newly synthesized monomers with phosphatidylserine (PS) group to examine the potential ability of apoptotic cell-mimetic polymers as an alternative tool for anti-inflammatory therapy. We polymerized monomer, and evaluated physical properties and anti-inflammatory activity of the obtained polymer. Increased secretion of anti-inflammatory cytokines from macrophages was observed when exposed to PS-polymers.

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：バイオマテリアル 炎症細胞 スマート材料 急性疾患 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

重篤な疾患の根本治療として細胞の注入療法による再生医療が近年注目を集めているが、細胞の生着率がほんの数%にすぎないこと、細胞の培養工程に関する多大な費用がかかることなどの問題点から、臨床現場でのインフラはいまだ普及していない。そして何より、細胞を採取してから移植するまでにかかる培養日数を考えると、緊急性の高い急性期の患者（例えば急性心筋梗塞など）を救うことは難しい。一方で、抗炎症剤や細胞成長因子などを用いた薬物療法は、その効果は一過性に過ぎず、従来の対処療法と同様に頻回投与が必要となる。

2. 研究の目的

最近の研究から、急性期の生体の炎症反応に対して、アポトーシスを起こした細胞が、細胞膜表面に露出するフォスファチジルセリン(PS)を介して免疫反応を制御するシグナルを出すという報告がなされている。具体的には、PSは正常細胞では細胞膜の内側に局在するのに対し(OFF状態)、アポトーシスを起こすと細胞膜の外へと局在を変え(ON状態)、マクロファージなどによる炎症を回避する。そこで本研究では、炎症部位（心筋梗塞部位）での微妙な環境変化（熱やpHなど）に応答してPSを“on-off”で提示するアポトーシス細胞模倣型スマート粒子の開発を目的とする。本研究の遂行により、細胞治療の高い治療効果と、薬物療法の汎用性・簡便性を併せ持つ、新しい治療法（マテリアルセラピー）の創出が期待できる。

3. 研究の方法

(1) PSの活性部位を側鎖に有する新規PS誘導体モノマーの分子設計を行い、合成する。

(2) 合成したPSモノマーと温度応答性のN-isopropylacrylamide (NIPAAm)およびその誘導体との共重合体(PSポリマー)を合成する。高分子の相転移温度は37~40付近に設定する。この際、分子量、共重合性比、PSモノマー分布などを精密に制御するため、可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合法を用いてランダム共重合体やブロック共重合体を合成する。

(3) PS基の活性の評価を行う。PSと認識結合するたんぱく質(アネキシンV etc.)を用いて、37(OFF状態)と40(ON状態)におけるPSの表面密度を調べる。

(4) 薬物の放出

PS粒子が炎症細胞の抗炎症作用に与える影響について調べる。肺胞マクロファージを用

い、炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインのレベルをEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)により測定する。

4. 研究成果

平成23年度には、フォスファチジルセリン(PS)の活性部位を側鎖に有する新規PS誘導体モノマーの分子設計を行い、合成した。合成スキームとしては、diisopropylamine、phosphorus trichloride、benzyl alcoholからO-benzyl N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidite (BTIPDA)を合成した。平成24年度には、N-isopropyl acrylamide (NIPAAm)とhydroxymethyl acrylamide (HMAAm)をAIBNを用いてDMF中でフリーラジカル重合し、diethyl ether中に再沈殿することでNIPAAm-HMAAm copolymerを得た(NIPAAm:HMAAm=4:1)。超脱水ジクロロメタン中でBTIPDA、imidazole hydrochloride、NZL-serine benzyl ester、NIPAAm-HMAAm copolymer(1)を当量で反応させCbz-PS-(NIPAAm-HMAAm) copolymerを得た。tert-butyl hydroperoxideを追加して亜リン酸エステルを酸化し、NaHSO₃とNaHCO₃でクエンチング後diethyl etherによる再沈殿とhot waterによる熱沈殿による精製後、Pd-blackを分散した酢酸中に溶解し、水素雰囲気下で激しく攪拌した。反応溶液をセライトろ過することでPd-blackを除去し、diethyl etherで再沈殿することでPS-(NIPAAm-HMAAm) copolymerを得た(図1)。まず図2には溶液中での温度応答性挙動を示す。

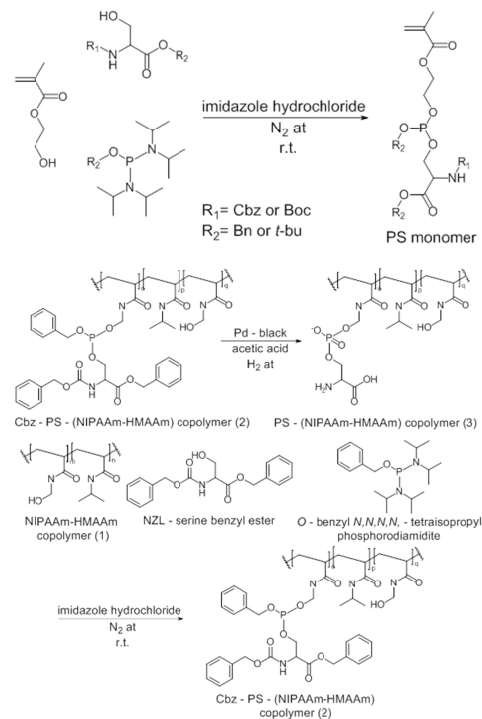


図1. PSモノマーおよびポリマーの合成法

平成25年度には、PS基の活性の評価を行った。PSと認識結合するたんぱく質(アネキシンV etc.)を用いて、37 (OFF状態)と40 (ON状態)におけるPSの表面密度を調べた結果、高温側においてPS基がより表面に露出していることが明らかとなった。また、PSポリマーが炎症細胞の抗炎症作用に与える影響について調べた。マクロファージが産生する炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6, IL-1 β etc.)および抗炎症性サイトカイン(IL-10, TGF β etc.)のレベルをEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)により測定した結果、PSポリマーの抗炎症効果が確認できた。

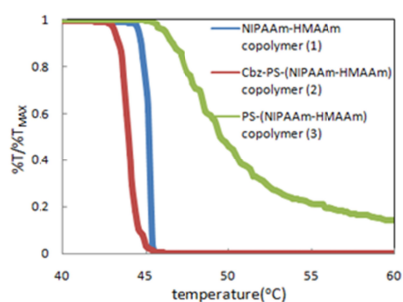


図2 . PSポリマーの温度応答性挙動

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15件)

D. Mosqueira, S. Pagliari, K. Uto, M. Ebara, S. Romanazzo, C. Escobedo-Lucea, J. Nakanishi, A. Taniguchi, O. Franzese, P. D. Nardo, M. J. Goumans, E. Traversa, P. a Pinto-do-Ó, T. Aoyagi, G. Forte, " Hippo pathway effectors control cardiac progenitor cell fate by acting as dynamic sensors of substrate mechanics and nanostructure. " ACS NANO, 8, 2033-2047 (2014). DOI:10.1021/nn4058984 査読有

K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi, " Temperature-responsive poly(ϵ -caprolactone) cell culture platform with reversibly tunable nano-roughness and elasticity for control of myoblast morphology ". International Journal of Molecular Science, 15, 1511-1524 (2014). DOI:10.3390/ijms15011511 査読有

M. Ebara, K. Uto, N. Idota, T. Aoyagi, " The taming of the cell: shape-memory nanopatterns direct cell orientation ". International Journal of Nanomedicine, 9,

117-126 (2014). DOI:10.2147/IJN.S50677 査読有

T. Omura, M. Ebara, J. J. Lai, X. Yin, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, " Design of smart nanogels that respond to physiologically relevant pH values and temperatures ". Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 14, 2557-2562 (2014). DOI:10.1166/jnn.2014.8551 査読有

Y.-J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi, " A Smart Hyperthermia Nanofiber with Switchable Drug Release for Inducing Cancer Apoptosis. " Advanced Functional Materials, 23, 5753-5761 (2013). DOI: 10.1002/adfm.201300746 査読有

M. Ebara, J. M. Hoffman, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, J. J. Lai " A photo-induced nanoparticle separation in microchannels via pH-sensitive surface traps. " Langmuir, 29, 5388-5393 (2013). DOI: 10.1021/la400347r 査読有

M. Ebara, K. Uto, N. Idota, J. M. Hoffman, T. Aoyagi " Shape-memory surface with dynamically tunable nano-geometry activated by body heat. " Advanced Materials, 24, 273-278 (2012). DOI: 10.1002/adma.201102181 査読有

Y.-J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi, " A smart nanofiber web that captures and release cells. " Angewandte Chemie International Edition, 51, 10537-10541 (2012). DOI:10.1002/anie.201204139 査読有

P. Techawanitchai, M. Ebara, N. Idota, T.-A. Asoh, A. Kikuchi, T. Aoyagi " Photo-switchable control of pH-responsive actuators via pH jump reaction. " Soft Matter, 8, 2844-2851 (2012). DOI:10.1039/C2SM07277G 査読有

P. Techawanitchai, M. Ebara, N. Idota, T. Aoyagi " Light-induced spatial control of pH-jump reaction at smart gel interface. " Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 99, 53-59 (2012). DOI:10.1016/j.colsurfb.2011.09.039 査読有

Y. Kotsuchibashi, M. Ebara, T. Aoyagi, R. Narain, " Fabrication of dual-responsive polymer functionalized silica nanoparticles via a simple thiol-ene click chemistry. " Polymer Chemistry, 3, 2545-2550 (2012). DOI:10.1039/C2PY20333B 査読有

P. Techawanitchai, N. Idota, K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi " A smart hydrogel-based time bomb triggers drug release mediated by pH-jump reaction. " Science and Technology of Advanced Materials, 13,

064203 (2012).
DOI:10.1088/1468-6996/13/6/064202 査読有

Y.-J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi “ Temperature-responsive electrospun nanofibers for "on-off" controlled dextran release. ” Science and Technology of Advanced Materials, 13,064203(2012). DOI:0.1088/1468-6996/13/6/064203 査読有

Y. Kotsuchibashi, Y. Zhang, M. Ahmed, M. Ebara, T. Aoyagi, R. Narain, “ Fabrication of FITC-doped silica nanoparticles and study of their cellular uptake in the presence of lectins. ” Journal of Biomedical Materials Research: Part A, 101A(7), 2090-2096 (2013). DOI:10.1088/1468-6996/13/6/064207 査読有

N. Idota, M. Ebara, Y. Kotsuchibashi, R. Narain, T. Aoyagi “ Novel temperature-responsive polymer brushes with carbohydrate residues facilitate selective adhesion and collection of hepatocytes. ” Science and Technology of Advanced Materials, 13, 064206 (2012). DOI:0.1088/1468-6996/13/6/064206 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

中川泰宏, 齋藤充弘, 荻原充宏, 青柳隆夫: “ アポトーシス細胞膜表面構造を模倣したホスホリルセリン基含有高分子の合成と評価 ” 第 63 回高分子学会年次大会、2014/05/27-29, 名古屋

Y. Nakagawa, A. Saito, M. Ebara, T. Aoyagi: “ Synthesis and Characterization of Phosphoryl Serine-derived Temperature-responsive Polymers for Anti-inflammatory Therapy ” International Symposium on Smart Biomaterials, 2014/03/24-25, Tsukuba

Y. Nakagawa, A. Saito, M. Ebara, T. Aoyagi: “ Synthesis and Characterization of Phosphoryl Serine-derived Temperature-responsive Polymers for Anti-inflammatory Therapy ” MANA Symposium 2014, 2014/03/05-07, Tsukuba

中川泰宏, 齋藤充弘, 荻原充宏, 青柳隆夫: “ アポトーシス細胞膜表面構造を模倣したホスホリルセリン基含有高分子の合成と評価 ” つくば医工連携フォーラム 2014、2014/01/28, つくば

中川泰宏, 齋藤充弘, 荻原充宏, 青柳隆夫: “ アポトーシス細胞の細胞膜表面を模倣した炎症制御能を有する新規材料の開発 ” 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、2013/11/25-26, 東京

荻原充宏, 金榮鎮, 青柳隆夫 : “ 自己発

熱に応答して薬物を放出するハイパーサーミアナノファイバーの作製 ” 第 62 回高分子学会年次大会、2013/05/29-31, 京都.

M. Ebara, Y. Kim, T. Aoyagi : “ Smart Nanofiber Webs for “On-off” Release of Cells and Drugs ” 2013 Annual Meeting of the Society For Biomaterials, 2013/04/10-13, Boston, USA.

Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi : “ A Smart Hyperthermia Nanofiber with Controlled Drug Release for Improved Cancer Therapy ” 2nd International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba, 2013/03/19-22, Japan.

Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi : “ Smart nanofibers for “on-off” switchable release of cell/drug ” つくば医工連携フォーラム 2013 医工連携の Hub 化~つくば、2013/01/29、つくば.

金榮鎮, 荻原充宏, 青柳隆夫 : “ On-demand Encapsulation and Release of Cells using On-off Switchable Fibrous Hydrogels ” 第 24 回高分子ゲル研究討論会、2013/01/16-17、東京.

金榮鎮, 荻原充宏, 青柳隆夫 : “ 温度応答性ナノファイバーを用いた薬物の “On-Off” 放出制御 ” 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、2012/11/26-27、仙台.

T. Aoyagi, Y. Kim, M. Ebara : “ Smart Biomaterials Design for Nano-biotechnology ” 6th International Workshop on Advanced Materials Science, 2012/10/30 - 2012/11/02, Ha Long City, Vietnam.

Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi : “ A New Class of Smart Fibrous-Hydrogel that Cell Capture and Release ” 7th International Symposium on Stimuli-Responsive Materials, 2012/10/21-23, Santa Rosa, USA.

Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi : “ Thermo-crosslinkable and temperature-responsive fibrous hydrogel via electrospinning for “on-off” controlled dextran release ” ゲルワークショップイン名古屋、2012/09/21-22

Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi : “ Photo-crosslinkable and Thermo-Responsive Nanofiber Webs for ‘On-Off’ Switches of Cell Capture/Release ” NanoBio Seattle2012, 2012/07/23-26, Seattle, USA.

〔図書〕(計 11 件)

M. Ebara. “ Chapter 14 Cell-Based Bioconjugates. ” Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, Edited by R.

Narain, Wiley, 357-369, (2014). 分担執筆
Y. Kotsuchibashi, M. Ebara, R. Narain.
“ Chapter 12 Silica Nanoparticle
Bioconjugates. ” Chemistry of
Bioconjugates: Synthesis, Characterization,
and Biomedical Applications, Edited by R.
Narain, Wiley, 327-343, (2014). 分担執筆

蟹江慧, 荻原充宏, 加藤竜司, ‘ 生体分子・
高分子を用いたバイオマテリアルの開発～
細胞と化学の狭間に秘められた可能性～ ’,
化学, vol.69, No.6, 68-69 (2014).

G. Forte, S. Pagliari, F. Pagliari, M.
Ebara, P. D. Nardo, T. Aoyagi “Toward the
generation of patient-specific patches for
cardiac repair.” Stem Cell Reviews and
Reports, 9(3), 313-325 (2013)
DOI:10.1007/s12015-011-9325-8

荻原充宏, 宇都甲一郎, 青柳隆夫 ‘ 生分解
性高分子 ’ 再生医療叢書 2 組織工学、岡
野光夫、大和雅之編集、朝倉書店、1-24 (2013).
分担執筆

荻原充宏, 齋藤充弘, ‘ 免疫反応を制御可
能な未来型バイオマテリアルの設計
Immunobioengineering ’ Drug Delivery
System、日本 DDS 学会, 28-2, 135-148
(2013).

荻原充宏, 宇都甲一郎, 青柳隆夫 ‘ 基材の
構造力学的性質による細胞機能の制御 ’ 特
集 細胞接着の制御 生体の科学、64(3),
194-198 (2013).

Kohsaku Kawakami and Mitsuhiro
Ebara. “Chapter 10 Nanotechnology in
Drug Delivery Systems” Manipulation of
Nanoscale Materials, 242-258, (2012).
DOI:10.1039/9781849735124-00242

荻原充宏, 青柳隆夫, ‘ スマートバイオマ
テリアルの応用 ’ ケミカルエンジニアリ
ング、化学工業社、57(4), 31-36 (2012).

K. Kawakami, M. Ebara, H. Izawa, N. M.
Sanchez-Ballester, J. P. Hill, and K. Ariga.
“Supramolecular approaches for drug
development” Current Medicinal
Chemistry, 19(15), 2388-2398 (2012). ISSN:
0929-8673

荻原充宏, ‘ スマートゲル表面 ’ 特集スマ
ートゲルの最新動向 機能材料、シーエム
シー出版、32(3), 6-12 (2012).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：架橋ポリマーゲル - 処理体の製造方法、
架橋性ポリマー内包 - 配位結合性ポリマ
ーゲル、架橋性ポリマー内包 - 配位結合性ポリ
マーゲル - 処理体、架橋ポリマー内包 - 配位
結合性ポリマーゲル - 処理体及び架橋ポリ

マーゲル - 特別構造処理体

発明者：青柳隆夫、荻原充宏、佐藤健

権利者：物質材料研究機構

種類：特許

番号：特願 2014-094421

出願年月日：2014 年 5 月 1 日

国内外の別：国内

名称：細胞間情報伝達分子産生信号誘発機能

高分子及びその合成方法

発明者：荻原充宏、青柳隆夫

権利者：物質材料研究機構

種類：特許

番号：特願 2013-236845

出願年月日：2013 年 11 月 15 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nims.go.jp/bmc/group/smartbiomaterials/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

荻原 充宏 (EBARA MITSUHIRO)

物質材料研究機構・国際ナノアーキテクトニ

クス研究拠点・MANA 研究者

研究者番号：10452393

(2) 研究分担者

(なし)

(3) 連携研究者

(なし)