

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300175

研究課題名(和文) 動的架橋構造を導入したスマートバイオマテリアルの創成と医療応用

研究課題名(英文) Preparation of Smart Biomaterials Using Dynamic Crosslinks and Their Biomedical Applications

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規なスマートバイオマテリアルとして標的生体分子を認識して体積変化する刺激応答性ゲル(生体分子応答性ゲル)、ナノ粒子、そしてナノ薄膜を調製し、その応答挙動を利用することによってドラッグデリバリーシステム(DDS)や診断システムなどの革新的医療システムの構築を目指した。さらに、動的架橋構造として光二量化基を導入した光応答性シリコン系ポリマーを合成し、光照射による表面パターンニングとそれを用いたマイクロコンタクトプリンティングや細胞培養基材の開発も試みた。

研究成果の概要(英文)：In this study, biomolecularly stimuli-responsive gels, particles and films with molecular complexes as dynamic crosslinks were strategically designed as smart biomaterials for constructing novel medical systems. The hydrogels, particles and films underwent changes in the volume in response to a target biomolecule. We developed self-regulated drug delivery systems (DDS) and diagnostic sensors using the biomolecularly stimuli-responsive gels, particles and films. In addition, photo-responsive polymers with micro-patternable surfaces were synthesized using photo-dimerization moieties as dynamic crosslinks. Photo-irradiation to the photo-responsive polymers through photo-masks resulted in the formation of micropatterns. The micropatterned surfaces were applied to microcontact printing and cell cultures.

研究分野：高分子化学

キーワード：スマートバイオマテリアル 高分子ゲル 動的架橋 応答材料 インテリジェント材料 刺激応答性 DS センサー材料

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可能なスマートバイオマテリアル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 pH や温度などの物理化学的変化に応答するゲルであり、特定の分子に応答する刺激応答性ゲルとしてはグルコース応答性ゲルのみであった。

(2) 研究代表者は、疾病シグナルとなる特定の生体分子を認識して体積変化する刺激応答性ゲル (生体分子応答性ゲル) の一般的合成方法を提案し、抗原や腫瘍マーカーに応答する生体分子応答性ゲルを世界に先駆けて合成してきた。さらに、生体分子応答性ゲルを利用することにより、生体分子の存在をシグナルとして捉えて薬物放出を制御する DDS も提案した。

(3) 最近、研究代表者は、光二量化基を導入したシリコン系ポリマーが光照射で表面形状を変化させ、簡便に表面パターンニングできることを見出した。これらはいずれも動的な架橋形成によって体積が変化することに基づいており、細胞培養基材や簡易診断デバイスへ利用できるスマートバイオマテリアルとして期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、新規なスマートバイオマテリアルとして、標的生体分子を認識して体積変化する生体分子応答性ゲルおよびそのナノ粒子を合成し、その応答挙動を利用することによって DDS や診断システムなどの革新的医療システムの構築を目指した。さらに、動的架橋構造として光二量化基を導入した光応答性シリコン系ポリマーを合成し、光照射による表面パターンニングとそれを用いたマイクロコンタクトプリントや細胞培養基材の開発も試みた。具体的には次の4項目を主な目的とした。

- (1) 動的架橋構造を導入したソフトマテリアルの創成
- (2) 生体分子応答性 DDS の構築
- (3) 革新的ゲル診断システムの構築
- (4) 光応答性ポリマーによる表面パターンニングシステムの構築

3. 研究の方法

本研究では、革新的医療システムを可能にするスマートバイオマテリアルとして、生体分子複合体や光二量化基を動的架橋点として導入することにより、標的生体分子に応答する生体分子応答性ゲルや表面パターンニング可能な光応答性ポリマーを合成する。そのために以下のような方法により新しいスマートバイオマテリアルを設計した。

- (1) 動的架橋構造を導入したソフトマテリアルの創成

動的架橋点として生体分子複合体を利用し、生体分子に応答して膨潤収縮する分子応答性ゲルやゾルーゲル相転移する刺激応答性ポリマーを合成した。特に相互侵入編目 (IPN) に二種類の抗原抗体結合を導入し、二種抗原に応答して膨潤する複数生体分子応答性ゲルを調製した。また4分岐ポリエチレングリコール (PEG) にビオチンを導入し、アビジンとの複合体形成によってゾルーゲル相転移するポリマーを合成した。

- (2) 生体分子応答性 DDS の構築

ソープフリー乳化重合法により親水性度の低いモノマー、PEG 架橋剤モノマーおよび分子複合体モノマーを共重合することにより分子応答性ゲル微粒子を合成した。さらに、標的分子存在下での粒径変化を動的散乱法によって評価した。

- (3) 革新的ゲル診断システムの構築

表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーのチップ上に原子移動ラジカル重合 (ATRP) の開始剤を導入し、生体分子存在下でリガンドモノマーを重合する分子インプリント法により分子認識ゲル薄膜を調製した。さらに SPR センサーを用いて標的分子に対する分子認識ゲル薄膜の応答挙動を調べた。また緩衝液中で金ナノ粒子表面に生体分子リガンドを有するゲル層を形成させる方法も検討した。

- (4) 光応答性ポリマーによる表面パターンニングシステムの構築

自由体積の大きなシリコン系ポリマーに動的架橋点として光二量化基を導入し、二量化反応により架橋形成する光応答性ポリマーを合成した。この光応答性ポリマーフィルムに光照射したときの表面の物理的および化学的構造変化を検討した。さらにフォトマスクを通した光照射によってそのポリマーフィルム表面にパターン形成させ、その表面を利用したタンパク質マイクロコンタクトプリンティングや細胞培養などを試みた。

4. 研究成果

- (1) 動的架橋構造を導入したソフトマテリアルの創成

複数の抗原抗体結合を有する IPN ゲルを合成し、その構造と応答挙動との関係を検討した。その結果、一方の抗原が存在しても IPN ゲルは僅かしか膨潤しなかったが、2種類の抗原が同時に存在する場合に最も顕著に膨潤した (図1)。したがって、複数の抗原抗体結合を有する IPN ゲルは複数タンパク質応答性を示すことがわかった。さらに複数生体分子応答性 IPN ゲル膜を調製し、モデル薬物の透過実験を行った。その結果、複数の標的生体分子が存在する場合に薬物放出速度が急激に増加することがわかった。

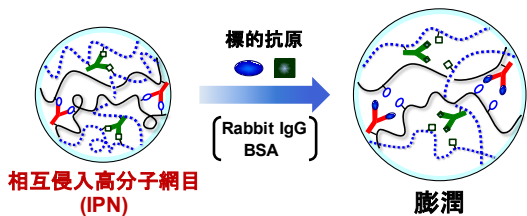


図1 二種類の抗原抗体結合を有する IPN ゲルの複数抗原応答挙動

また、末端にビオチンを導入した4分岐ポリエチレングリコールを合成し、アビジン存在下でのゲル化を確認した。これにフリーのビオチンを添加すると再びゾル状態へと変化した(図2)。したがって、標的分子に反応してゾルゲル相転移する刺激応答性ポリマーの設計が可能になった。

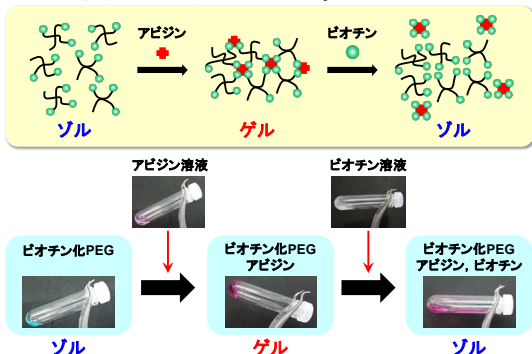


図2 ビオチン化4分岐PEGの分子応答性ゾルゲル相転移挙動

(2) 生体分子応答性 DDS の構築

新規な薬物キャリアとしてソープフリー乳化重合法を利用することにより、レクチン-糖鎖複合体を架橋点として導入したグルコース応答性ゲル微粒子を合成した。このゲル微粒子はグルコース濃度に応答して膨潤率を可逆的に変化させた(図3)。このようなグルコース応答性膨潤収縮挙動は、架橋点として作用しているレクチン-糖鎖複合体からなる可逆的架橋の構造変化に基づくことが明らかとなった。さらに、抗原抗体結合を動的架橋として有する抗原応答性ゲル微粒子も合成した。これらの生体分子応答性ゲル微粒子を合成する際の重合条件を検討した。得られた生体分子応答性ナノ粒子はコア-シェル構造を持ち、薬物キャリアとしての有用性も示された。

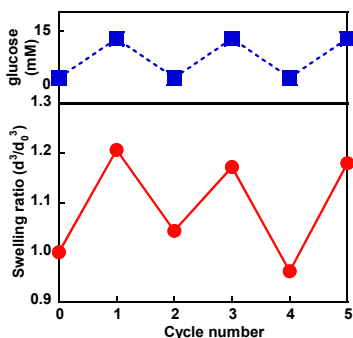


図3 糖-レクチン複合体含有ゲル微粒子の可逆的グルコース応答挙動

また、動的架橋点としてジスルフィド結合を有するモノマーを用いたソープフリー乳化重合法により酸性条件下と還元環境下の二重刺激に応答して膨潤するゲル微粒子も合成した。さらに、そのナノ粒子の構造を詳細に検討し、粒子表面近傍にジスルフィド結合が多く存在することを明らかにした。この微粒子は酸性かつ還元環境下で薬物放出することも明らかとなった。

(3) 革新的ゲル診断システムの構築

SPR センサーのチップ上に、ATRP 法により抗体固定化ゲル薄膜を形成させた。SPR センサーチップに抗体を直接固定化した場合に比較して、ゲル層内に3次的に抗体を固定化した方がより大きな SPR シグナル変化を示すことが明らかとなった。

また、標的分子としてレクチン(ConA)を、そのリガンドとして側鎖糖含有モノマー(GEMA)を用いた分子インプリント法を利用し、ATRP 法により SPR 基板表面に ConA インプリントゲル薄膜を調製した。ノンインプリントゲル薄膜に比較して ConA インプリントゲル薄膜は大きな SPR シグナル変化を示し、分子インプリント法によって明確な分子認識サイトの形成が確認された(図4)。このゲル薄膜はイオン強度などの外部刺激によりネットワーク構造を変化させ、その生体分子結合能が大きく変化した。

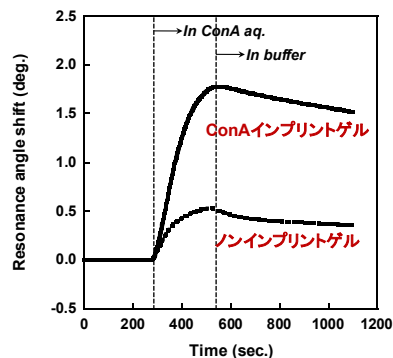


図4 ConA インプリントゲルとノンインプリントゲルの SPR シグナル変化

さらに、生体分子応答性ゲル内に金ナノ粒子を均一分散させる方法を検討した。その結果、金ナノ粒子の表面に重合性官能基を導入することにより、新規な金ナノ粒子モノマーの調製に成功した。これと各種モノマーとを共重合することにより、金ナノ粒子均一分散ゲルを調製することができた。

(4) 光応答性ポリマーによる表面パターンニングシステムの構築

ケイ皮酸ビニル (CVi) とポリジメチルシロキサン (PDMS) マクロモノマーとを共重合することにより、動的架橋点として光二量化基を有する光応答性ポリマー (PVCi-g-PDMS) を合成した。この PVCi-g-PDMS からなるフィルムを作製し、フォトマスクを通した光照射により表面パタ

ーニングを試みた。その結果、フォトマスクの形状に応じてフィルム表面に明確な凹凸が形成された。さらに、光照射時間と表面形状変化との関係を明らかにし、表面パターンニングの最適条件を見出した。このパターン化された表面をマイクロコンタクトプリント用のスタンプとして利用することにより、タンパク質をパターンニングできることがわかった。また、パターン化された表面上で細胞培養を行い、基板表面のパターンに応じた細胞パターンが観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

- ① K. Matsumoto, A. Kawamura, T. Miyata, Structural Transition of pH-responsive Poly(L-lysine) Hydrogel Prepared via Chemical Crosslinking, *Chem. Lett.*, **44**, 1284-1286 (2015). 査読有
DOI: 10.1246/cl.150464
- ② Y. Shiraki, K. Tsuruta, J. Morimoto, C. Ohba, A. Kawamura, R. Yoshida, R. Kawano, T. Uragami, T. Miyata, Preparation of Molecule-Responsive Microsized Hydrogels via Photopolymerization for Smart Microchannel Microvalves, *Macromol. Rapid Commun.*, **36**, 515-519 (2015). 査読有
DOI: 10.1002/marc.201400676
- ③ Y. Kuriu, A. Kawamura, T. Uragami, T. Miyata, Formation of Molecularly Imprinted Hydrogel Thin Layers with Lectin Recognition Sites on SPR Sensor Chips by Atom Transfer Radical Polymerization, *Chem. Lett.*, **43**, 825-827 (2014). 査読有
DOI: 10.1246/cl.140103
- ④ A. Kawamura, T. Kiguchi, T. Nishihata, T. Uragami, T. Miyata, Target Molecule-responsive Hydrogels Designed by Molecular Imprinting Using Bisphenol A as a Template, *Chem. Commun.*, **50**, 11101-11103 (2014). 査読有
DOI: 10.1039/C4CC01187B

〔学会発表〕(計25件)

- ① T. Miyata, Designs of Stimuli-Responsive Bioconjugated Gels with Dynamic Crosslinks and Their Smart, IUPAC 11th International Conference on advanced Polymers via Macromolecular Engineering (APME 2015), Pacifico Yokohama Conference Center, Kanagawa (2015.10.19). (招待講演)
- ② T. Miyata, Stimuli-Responsive Hydrogels with Biomolecular Complexes as Dynamic Crosslinks, 2015 International Science & Nature Congress (ISNaC) 2015 International Symposium on Materials Science and Nanotechnology (ISMSN), Kuala Lumpur, Malaysia (2015.9.21). (招待講演)
- ③ T. Miyata, Biologically Stimuli-Responsive Gels with Dynamic Crosslinks, 22nd Polymer

Networks Group Meeting (PNG) & 10th Gel Symposium (GelSympo), University of Tokyo, Tokyo (2014.11.11). (招待講演)

- ④ T. Miyata, Responsive Bioconjugated Gels with Dynamic Crosslinks, 2013 MRS Fall Meeting, Boston, USA (2013.12.3). (招待講演)

〔図書〕(計8件)

- ① A. Kawamura, T. Miyata, Biosensors, Biomaterials Nanoarchitectonics (ed, M. Ebara), Elsevier, 157-176 (2016)
- ② T. Miyata, Target Biomolecule-responsive Hydrogels, RSC Smart Materials No.14, Chemosensitive Materials: Stimulation by Chemical and Biological Signals (ed. Hans-Jo'rg Schneider), RSC Publishing, 408-443 (2015).
- ③ A. Kawamura, T. Miyata, Biologically Stimuli-Responsive Hydrogels, Intelligent Stimuli-Responsive Materials: From Well-Defined Nanostructures to Applications (ed, Q. Li), Wiley, Chapter 10, 335-362 (2013).
- ④ T. Miyata, Biomolecule-sensitive Hydrogels, RSC Smart Materials No.3, Smart Materials for Drug Delivery: Volume 2 (eds. C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro), RSC Publishing, 261-289 (2013).

〔産業財産権〕

○出願状況(計5件)

名称: 多刺激応答性物質およびその形態変更方法ならびに多刺激応答性分子

発明者: 宮田隆志, 河村暁文, 大熊幸平

権利者: 学校法人関西大学

種類: 特許権

番号: 特願 2014-148499

出願年月日: 2014年7月22日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/sentan/>

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: 50239414

(2) 研究分担者

岩崎 泰彦 (IWASAKI, Yasuhiko)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号: 90280990