

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03026

研究課題名(和文) 動的架橋ゲルを用いた時空間制御型スマート医用システムの創出

研究課題名(英文) Design of Spatiotemporally Controllable Smart Medical Systems Using Dynamic Cross-linked Gels

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動的架橋として生体分子複合体形成や光二量化を用いて動的架橋ゲルを合成し、その利用によって時間的・空間的に制御できるスマート医用システムの創出を目指した。特に、薬物を動的架橋部位に利用したゲルを合成し、その動的構造変化による薬物放出の制御を行った。また、分子認識能を有する動的架橋ゲルと金属とのハイブリッド化により、新しい生体分子センサーを調製した。さらに、生体分子応答性や光応答性を示す動的架橋ゲルを細胞培養環境(スマートニッチ)として利用し、スマート細胞制御システムの構築も試みた。

研究成果の概要(英文)：In this study, dynamic gels were designed using biomolecular complexes and photo-dimerization as dynamic cross-links, and spatiotemporally controllable medical systems were developed using their gels. Dynamic gels with model drugs as dynamic cross-links regulated the drug release by the conformational change of the gel networks. Dynamic gels with molecular recognition sites were formed on gold sensor chips, enabling us to detect a target biomolecule sensitively and selectively. Biomolecule- and photo-responsive dynamic gels were strategically designed as smart scaffolds for regulating cell behavior.

研究分野：機能性高分子

キーワード：刺激応答性ゲル 動的架橋 生体分子複合体 DDS 細胞制御 センサーチップ 分子認識 表面パター

## 1. 研究開始当初の背景

外部環境変化にตอบสนองして構造変化する刺激応答性ゲルは、ドラッグデリバリーシステム(DDS)や診断センサーなどへの医療応用を目指して精力的に研究されている。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变化にตอบสนองするゲルであり、特定の分子にตอบสนอง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。

研究代表者は、腫瘍マーカーや内分泌かく乱科学物質などの標的分子を認識して体積変化する刺激応答性ゲル(分子応答性ゲル)の一般的合成方法を提案し、様々な分子応答性ゲルを合成してきた。さらに、最近、光二量化基を導入した光応答性ポリマーが光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る構造変化に基づいており、外部刺激にตอบสนองした時間的・空間的なネットワーク構造変化を利用した薬物放出や簡易診断、細胞培養の時空間制御が可能であることを示している。

## 2. 研究の目的

本研究では、動的架橋として生体分子複合体形成や光二量化を用いて動的架橋ゲルを合成し、その利用によって時間的・空間的に制御できるスマート医用システムの創出を目指した。具体的には、薬物を動的架橋部位に利用したゲルを合成し、その動的構造変化による薬物放出の制御を行った。また、分子認識能を有する動的架橋ゲルと金属センサーチップとのハイブリッド化により、新しい生体分子センサーを調製した。さらに、生体分子応答性や光応答性を示す動的架橋ゲルを細胞培養環境(スマートニッチ)として利用し、スマート細胞制御システムの構築も試みた。このような動的架橋構造を導入したスマートゲルを利用することにより、時空間制御型スマート医用システムの構築の可能性を検討した。下記に主な研究項目を列挙する。

- (1) 動的架橋構造変化を利用した薬物放出制御
- (2) 動的架橋ゲル/金属ハイブリッドを用いた診断システムの構築
- (3) 動的架橋ゲルを用いた細胞制御技術の開発

## 3. 研究の方法

(1) 動的架橋構造変化を利用した薬物放出制御  
リガンドとしてシクロデキストリン(CD)を導入したポリペプチド鎖と、モデル薬物としてのビスフェノール A(BPA)およびレスベラトロール(RSV)との2:1複合体であるCD-BPA-CD複合体やCD-RSV-CD複合体を形成させた状態で、架橋剤を用いてゲル化させることにより、動的架橋としてCD-BPA-CD複合体およびCD-RSV-CD複合体を有する動的架橋ゲルを合成した。さらに、これらのゲルからBPAやRSVを除去することにより、モデル薬物に対する認識サイトを有する分子インプリントゲルを調製した。この分子インプリントゲルの膨潤率のpH依存性を調べ、ポリペプチド鎖の高次構造と膨潤率との関係を検討した。さらに、pH変化にตอบสนองしたポリペプチド鎖の構造変化に伴うゲルの膨潤率変化と、そのゲルからの

BPAおよびRSVの放出挙動を調べた。

## (2) 動的架橋ゲル/金属ハイブリッドを用いた診断システムの構築

原子移動ラジカル重合(ATRP)により表面プラズモン共鳴センサー(SPR)チップ表面に、標的タンパク質のレクチン(コンカナバリン A(ConA))に対する認識サイトを有する分子インプリントゲル層を形成させた。まずSPR金チップ表面上にATRP開始基として臭化アルキル基を導入した後、側鎖グルコース含有モノマー(GEMA)とリン脂質類似モノマー(MPC)とをATRPにより共重合させ、ConAインプリントゲル層を形成させた。X線光電子分光装置(XPS)や原子間力顕微鏡(AFM)を用いてSPRチップ表面に形成されたゲル層の構造を解析した。さらに、SPR装置を用いて、標的分子にตอบสนองしたSPRシグナル変化を調べた。

## (3) 動的架橋ゲルを用いた細胞制御技術の開発

まず、四分岐ポリエチレングリコール(Tetra-PEG)の鎖末端にビオチンを導入した。このビオチン化Tetra-PEG水溶液にアビジンを加えたときの粘弾性変化を調べた。また、光応答性動的架橋としての光二量化基含有モノマーを合成し、ポリエチレングリコール(PEG)マクロモノマーやポリジメチルシロキサン(PDMS)マクロモノマーと共重合することにより、光照射すると光二量化により架橋構造が形成される光応答性動的架橋ポリマーを合成した。光二量化基導入PEGの緩衝液に光照射した際の動的粘弾性を測定した。また光二量化基導入PDMSフィルム表面にフォトマスクを通して光照射した際の表面構造変化を調べた。さらに、光二量化PEGゲルや光二量化PDMSフィルムの表面上で細胞培養も行った。

## 4. 研究成果

### (1) 動的架橋構造変化を利用した薬物放出制御

モデル薬物としてのBPAやRSVとCDとの複合体を可逆架橋として導入したポリペプチド鎖からなる動的架橋ゲルは、pH変化によってペプチド鎖がランダムコイルから $\alpha$ -ヘリックスへと構造転移することが明らかとなった。このゲルからBPAやRSVを除去することによって分子インプリントゲルを合成し、BPAやRSVの吸着量を測定した結果、ポリペプチド鎖の構造転移によって吸着量が大きく変化することがわかった。さらに、分子インプリントゲル内にBPAやRSVを架橋点として内包させると、pH変化に伴うポリペプチド鎖の構造変化により、BPAやRSVの結合能を変化させることができ、その放出挙動を制御することに成功した(図1)。これまでゲルからの薬物放出は膨潤率変化によって制御されてきたが、このゲルでは膨潤率が低下している条件下で、薬物の結合能が大きく低下し、薬物を放出することが明らかになった。したがって、従来のようなゲル内の薬物の拡散に基づく機構ではなく、分子認識サイトと薬物との結合能の変化に基づく機構によって薬物放出のON-OFF制御に成功した。

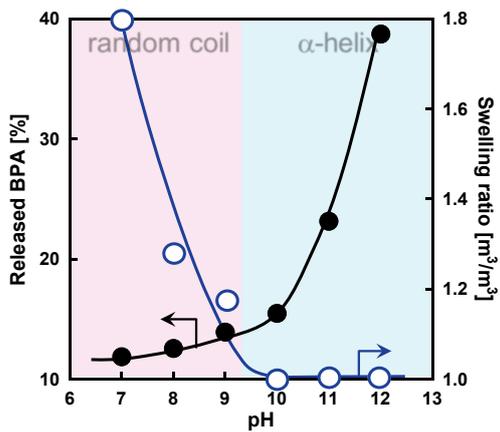


図 1 BPA 含有ポリペプチドゲルの膨潤率と BPA 放出挙動に及ぼす pH の影響

(2) 動的架橋ゲル/金属ハイブリッドを用いた診断システムの構築

SPR センサーの金基板表面上に ATRP 開始剤を導入した後、リガンドモノマーとして GEMA と MPC との共重合により ConA インプリントゲル層を形成させた。XPS 測定と AFM 構造観察によって、SPR センサーチップ表面に ConA インプリントゲル層の形成が確認された。SPR センサーを用いて、標的 ConA に対する ConA インプリントゲルおよびノンインプリントゲルの SPR シグナル変化を調べた結果、ノンインプリントゲルに比較して ConA インプリントゲルの方が大きな SPR シグナル変化を示し、高い結合定数を有することがわかった(図 2)。また、ConA とは異なるレクチンに対しては、ConA インプリントゲルの SPR シグナルは全く変化せず、MPC 成分の存在によって非特異的吸着が著しく抑制されることも明らかとなった。したがって、分子インプリント法によって標的分子に対する明確な認識サイトを形成でき、さらにゲルを構成する高分子として生体成分の非特異的吸着を抑制できる MPC 成分を利用することにより、S/N 比の高い SPR センサーチップを調製することができた。

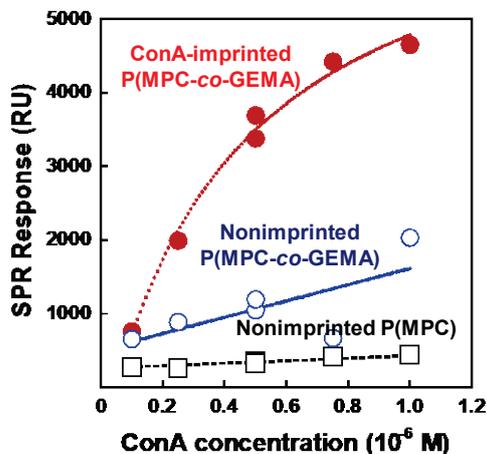


図 2 標的 ConA に対する ConA インプリントゲルおよびノンインプリントゲルの SPR シグナル変化

(3) 動的架橋ゲルを用いた細胞制御技術の開発  
まず、Tetra-PEG の末端にビオチンを導入したビオチン化 Tetra-PEG にアビジンを添加すると、ゾル状態からゲル状態へと瞬時に変化した。またそのゾルゲル相転移挙動は、ポリマー濃度やアビジン/ビオチン比に大きく依存した(図 3)。さらに、アビジン添加によって形成されたゲルに、過剰のビオチンを加えると、ゲル状態から再びゾル状態へと変化した。このような分子にตอบสนองするゾルゲル相転移ポリマーは細胞制御用の足場材料として有望である。

光二量化基導入 PEG 誘導体ポリマー水溶液に光照射すると、ゾル状態からゲル状態へと変化した。また、光照射時間の増加に伴って、生成するゲルの弾性率も増加し、光照射によってゲル表面の弾性率を制御できることがわかった。次に、光照射時間によって弾性率の異なるゲルを調製し、その表面で細胞培養を行った結果、弾性率の高いゲルの方がより多くの細胞を接着した。さらに、フォトマスクを通して光照射することにより、弾性率の異なるパターン化表面を有するゲルを調製すると、その表面では細胞パターンを形成することも見出した。

光二量化基を導入した PDMS 誘導体ポリマーから溶媒キャストによってフィルムを調製した後、フォトマスクを通した光照射を行うと、明確なパターン化表面を形成できることがわかった。このパターン化表面上で細胞培養すると、光未照射領域に細胞が集まり、明確な細胞パターンを形成した。AFM を利用した表面弾性率測定により光照射部位と未照射部位との明確な弾性率の差異が確認でき、細胞接着挙動は材料の表面弾性率が大きく影響していることが示唆された。

以上のように動的架橋を利用することによって表面弾性率を制御でき、細胞パターンなどの細胞制御が可能になることが明らかとなった。

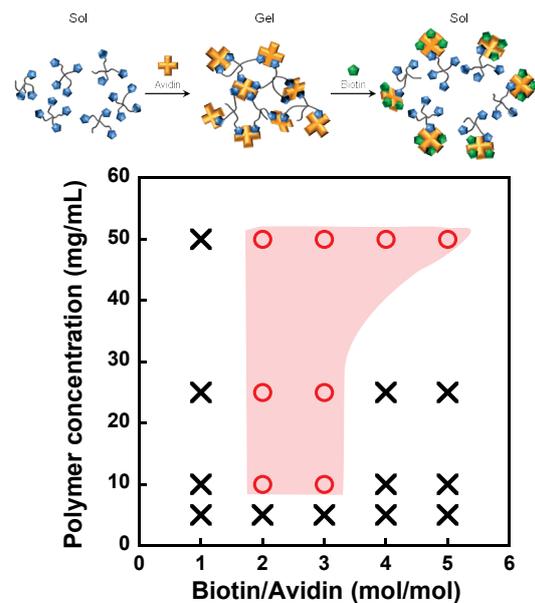


図 3 ビオチン化 Tetra-PEG とアビジンとの複合体形成によるゾルゲル相転移挙動

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 14 件)

1. R. Naraprawatphong, A. Kawamura, T. Miyata, Preparation of Molecularly Imprinted Hydrogel Layer SPR Sensor Chips with Lectin-Recognition Sites via SI-ATRP, *Polym. J.*, **50**, 261-269 (2018). DOI: 10.1038/s41428-017-0013-7 (査読有)
2. C. Norioka, K. Okita, M. Mukada, A. Kawamura, T. Miyata, Biomolecularly Stimuli-Responsive Tetra-Poly(ethylene glycol) That Undergoes Sol-Gel Transition in Response to a Target Biomolecule, *Polym. Chem.*, **8**, 6378-6385 (2017). (Back cover) DOI: 10.1039/c7py01370a (査読有)
3. C. Norioka, A. Kawamura, T. Miyata, Mechanical and Responsive Properties of Temperature-Responsive Gels Prepared via Atom Transfer Radical Polymerization, *Polym. Chem.*, **8**, 6050-6057 (2017). (Back cover) DOI: 10.1039/c7py01323j (査読有)
4. K. Matsumoto, A. Kawamura, T. Miyata, Conformationally Regulated Molecular Binding and Release of Molecularly Imprinted Polypeptide Hydrogels That Undergo Helix-Coil Transition, *Macromolecules*, **50**, 2136-2144 (2017). DOI: 10.1021/acs.macromol.6b02688 (査読有)
5. K. Matsumoto, B. D. B. Tiu, A. Kawamura, R. C. Advincula, T. Miyata, QCM Sensing of Bisphenol A Using Molecularly Imprinted Hydrogel/Conducting Polymer Matrix, *Polym. J.*, **48**, 525-532 (2016). DOI: 10.1038/pj.2016.23 (査読有)
6. R. Naraprawatphong, G. Kawanaka, M. Hayashi, A. Kawamura, T. Miyata, Development of Protein-Recognition SPR Devices by Combination of SI-ATRP with Biomolecular Imprinting Using Protein Ligands, *Molecular Imprinting*, **4**, 21-30 (2016). DOI: 10.1515/molim-2016-0003 (査読有)
7. 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). DOI: 10.1246/cl.150464 (査読有)

[学会発表](計 45 件)

1. T. Miyata, Stimuli-Responsive Zwitterionic Polymer Particles and Capsules with Dynamic Crosslinks, 3rd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials (ICBZM 2017), The University of Tokyo, Tokyo, Japan (2017. 10. 19). (招待講演)
2. T. Miyata, Rational Rational Design of Stimuli-Responsive Gels Using Dynamic Crosslinks and Their Various Applications, 11th

International Gel Symposium (GelSympo 2017), Nihon University, Chiba, Japan (2017. 3. 7). (招待講演)

3. T. Miyata, Rational Design of Stimuli-Responsive Polymeric Materials Using Photocrosslinking and Their Applications, RadTech Asia 2016, Hilton Tokyo Odaiba, Japan (2016. 10. 26). (招待講演)
4. T. Miyata, Rational Design of Stimuli-responsive Biomaterials Using Biomolecular Complex Crosslinks, 2016 The 2nd International Symposium on Biointerface Science and Engineering -4th Hoffman Family Symposium, National Taiwan University, Taiwan (2016. 9. 21). (招待講演)
5. T. Miyata, Responsive Membrane Materials for Medical and Environmental Applications, The 10th Conference of Aseanian Membrane Society (AMS10), Nara Kasugano International Forum IRAKA, Japan (2016. 7. 29). (招待講演)
6. T. Miyata, Designs of Stimuli-Responsive Bioconjugated Gels with Dynamic Crosslinks and Their Smart Functions, IUPAC 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (APME 2015), Yokohama, Japan (2015. 10. 19). (招待講演)
7. T. Miyata, Stimuli-Responsive Hydrogels with Biomolecular Complexes as Dynamic Crosslinks, International Science & Nature Congress (ISNaC) 2015 -International Symposium on Materials Science and Nanotechnology (ISMSN), Kuala Lumpur, Malaysia (2015. 9. 21). (招待講演)

[図書](計 4 件)

1. 宮田隆志, 高分子基礎科学 One Point 第 6 巻 高分子ゲル, 共立出版, 173 (2017).
2. A. Kawamura, T. Miyata, Biosensors, Biomaterials Nanoarchitectonics (ed, M. Ebara), Elsevier, 362 (157-176) (2016).
3. A. Kawamura, T. Miyata, pH-Responsive Polymer, Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials (eds, S. Kobayashi, K. Mullen), Springer, 2672 (1619-1626) (2015).
4. 宮田隆志, 生体分子認識ゲル, DDS キャリア作製プロトコル集(丸山一雄 監修), シーエムシー出版, 262 (194-203) (2015).

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称:細胞培養用基材, その製造方法, および細胞培養用基材における物性の制御方法

発明者:宮田隆志, 河村暁文, 松田安叶

権利者:学校法人関西大学

種類:特許

番号:特願 2016-093920

出願年月日:2016年5月9日

国内外の別:国内

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<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

川崎 英也(KAWASAKI, Hideya)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号:50322285