

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05512

研究課題名(和文) バイオマテリアルの生体適合性制御を達成する高分子合成法の開発

研究課題名(英文) Development of synthesis strategies for controlling the biocompatibility of polymeric materials

研究代表者

小林 慎吾 (Kobayashi, Shingo)

九州大学・先導物質化学研究所・特任准教授

研究者番号：70625110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Regio選択的な開環メタセシス重合法を適用可能なモノマー構造の拡張と、得られた高分子の血液適合性材料への応用を目指した研究を行った。官能基を導入した種々のシクロアルケン類を合成し、Grubbs触媒を用いた開環メタセシス重合を行った結果、重合はregio選択的に進行し、側鎖の配列が制御された新規定序性高分子が得られた。得られた高分子の含水試料についてDSC測定を用いた水和構造の解析を行った結果、側鎖の密度と、その運動性を向上させる構造とした場合に発現する中間水量が増加した。得られた高分子のヒト血小板粘着試験を行った結果、中間水発現量の増加に伴って血液適合性が向上することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Functionalized cycloalkenes having hydrophilic functional groups [e.g., (2-methoxyethoxy)carbonyl, hydroxyl] were synthesized and polymerized by Grubbs catalyst to expand the scope of Ring-opening metathesis polymerization (ROMP). A variety of functional groups were successfully introduced and the ROMP of monomers were proceeded in a regioselective manner to afford novel polycycloalkenamers possessing precisely placed side-chain branches. Hydration water structure in the obtained polymers was analyzed by using DSC measurement, revealed that the amount of intermediate water was increased with the increase of side chain density and molecular mobility. The blood-compatibility of obtained polymers was investigated and the number of adhered platelets was decreased with increasing the amount of intermediate water. This result is indicating that blood-compatibility of polymer materials can be controlled by tuning the chemical structure of polymers.

研究分野：高分子化学

キーワード：開環メタセシス重合 血液適合性材料 regio選択的重合 定序性高分子 Grubbs触媒 精密重合 生体適合性高分子

1. 研究開始当初の背景

(1) 高分子が発現する生体適合性と水和構造の関係

生体適合性を示す高分子には一般に、水酸基、エチレングリコール(EG)鎖、ペプチド鎖、ペタイン類、糖鎖など、水と高い親和性を示す官能基が導入されている。申請者の所属する研究室では、高分子の一次構造とその水和構造、および発現する生体適合性について研究を進めており、特に高い生体適合性を示す材料[例えばポリ(2-メトキシエチルアクリレート)(PMEA)、ポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)(PMPC)、多糖類、タンパク質など]には、親水性官能基と水の相互作用により不凍水、中間水、自由水からなる水和構造が形成され、高分子に弱く束縛された結合水(中間水)の量とタンパク質の吸着量やその変性度には相関が見られることを報告してきた(図1)。

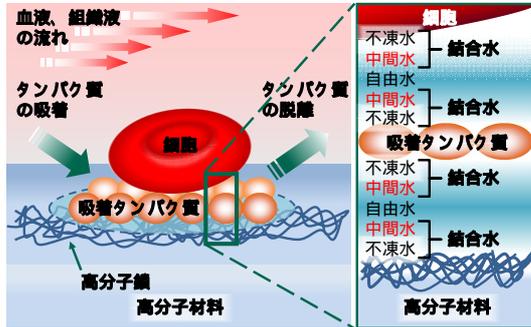


図1. バイオ界面の模式図(右図は組織化された水の階層構造)

(2) 高分子の一次構造制御による生体適合性の制御に関する基礎的な知見

高分子主鎖の8炭素ごとにEG鎖が必ず導入された定序性高分子を合成し、発現する中間水量と血小板粘着数の関係を調べた結果、EG鎖長の増加に伴って中間水量は増加し、血小板粘着数が減少することが分かった(図2)。特にEG鎖長がm=2以上の場合に血小板

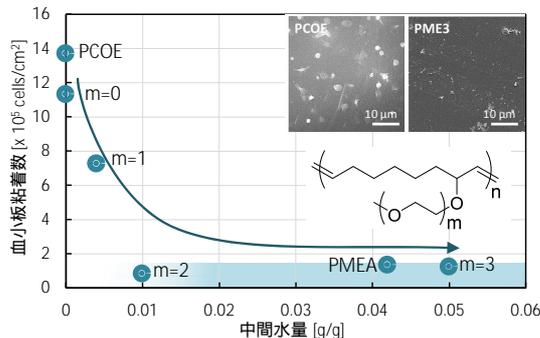


図2. EG鎖導入高分子の中間水量と血小板粘着数の関係。粘着の顕著な抑制効果が認められ、実際に臨床応用されているPMEAに匹敵する血液適合性を発現することが明らかになった。この材料が高い血液適合性を発現した要因を調べるため、表面吸着タンパク質(フィブリノゲン:Fbn)の変性度を酵素結合免疫吸着(ELISA)測定によって評価した結果、中間水量の増加に伴ってFbnの変性が軽微になり、血小板粘着が抑制されていることを確認し

た。この結果は、高分子の一次構造制御によって導入する官能基の種類、数、置換位置、配列等を制御すれば材料の水和構造が制御でき、材料表面でのタンパク質の吸着、変性挙動の制御を通じて、これを認識する細胞挙動の制御が可能であることを示している。

(3) Regio選択的な開環メタセシス重合を用いた側鎖配列が制御された高分子の合成

申請者は、Grubbs触媒を用いた開環メタセシス重合(ROMP: Ring-Opening Metathesis Polymerization)において、cis-シクロオクテン(COE)の特定の位置(アリル位)に置換基を導入した場合に、regio, stereo選択的なROMPが進行することを独自に見出した(図3)。この重合法で得られる高分子は、側鎖-側鎖間の炭素数が制御され(regio制御)かつ主鎖二重結合の立体構造がtrans-構造に制御された(stereo制御)新規定序性高分子である。現在までに、本法におけるregio, stereo選択性はモノマーに導入した置換基と、触媒上の配位子およびポリマー鎖との立体反発によってほぼ一義的に発現することを確認しており、フェニル基を導入したモノマーの重合を行った場合では、頭-尾型結合の割合が99.9%以上かつtrans-二重結合の割合が98%以上という、極めて高度なregio, stereo選択的な重合が進行することを見出している。

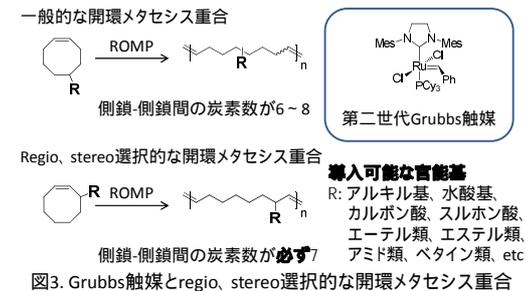


図3. Grubbs触媒とregio, stereo選択的な開環メタセシス重合

2. 研究の目的

<高分子の一次構造制御による生体適合性の制御>

上記の背景に示したこれまでの研究成果を踏まえて、regio選択的なROMP法をさらに拡張し、導入する官能基の種類や配列をより厳密に制御すれば、高分子の一次構造制御を通じて、材料が発現する生体適合性の緻密な制御を達成できるのではないかと考えた。そこで本研究では、側鎖配列が制御された高分子の合成と、その生体適合性材料への応用に関する研究を通じ、高分子の一次構造制御による生体適合性の制御を達成することを目的とした。

具体的には、下記の項目について研究を行い、regio選択的な開環メタセシス重合法の一般化を目指した高分子合成と、得られた高分子の構造と血液適合性の相関について新たな知見を得た。

Regio選択的なROMP法を用いた側鎖配列

が制御された高分子の合成

側鎖配列が制御された高分子の水和構造の解明

高分子構造と血液適合性の相関性の解明

3. 研究の方法

(1) 官能基化環状モノマーの regio 選択的 ROMP 法による重合

本研究で重合に用いたモノマーの構造および得られる高分子は、下記のスキーム (図 4~5) に示した。メトキシエチルカルボニル基を導入した高分子の合成では、環員数の異なるシクロアルケン誘導体をモノマーとして合成し、水酸基を導入した高分子では、その置換位置と導入様式が異なるシクロオクテン誘導体を合成した。

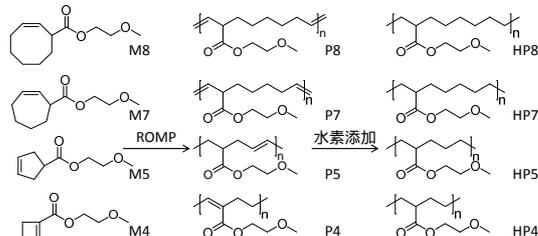


図4. PMEA側鎖を導入したモノマーの構造と得られる高分子

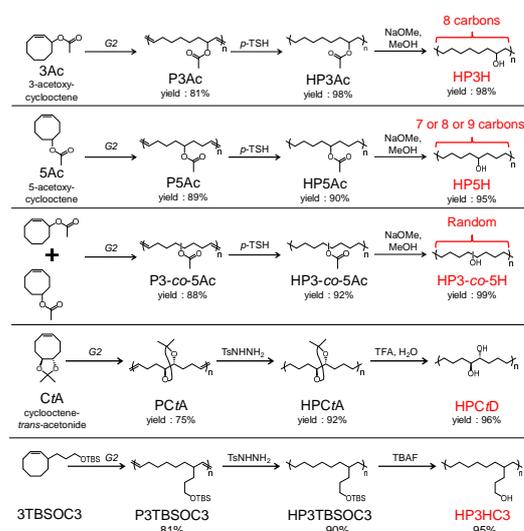


図5. 水酸基を保護したモノマーの構造と得られる高分子

合成した官能基化モノマーの ROMP は、第二世代 Grubbs 触媒 (G2) を用い、窒素雰囲気下、 CHCl_3 中、室温で行った。得られた高分子の構造は ^1H NMR、 ^{13}C NMR、DEPT、HMQC、H-H COSY を用いて解析し、GPC 測定により分子量評価を行った。

(2) 得られた高分子の水和構造、および血液適合性評価

材料表面の親水性評価には接触角測定法を用い、水和構造は含水させた各高分子試料について示差走査熱量計 (DSC) 測定を行うことで解析した。血液適合性の評価は、ヒト全血より調整した血小板懸濁液を材料表面に接触させ、血小板の粘着数と形態を観察することで行った。

4. 研究成果

(1) Regio 選択的な ROMP 法を用いた側鎖配列が制御された高分子の合成

図 4 に示したメトキシエチル基を導入したモノマーの G2 を用いた ROMP では、いずれの環員数の場合にも重合が進行し、側鎖間の炭素数が制御された高分子を得ることに成功した。得られたポリマーの構造について NMR 測定を用いた解析を行った結果、いずれの場合も高い Head-to-tail 規則性を有するポリマーであることが確認でき、側鎖が 8 炭素、7 炭素、5 炭素、4 炭素おきに導入された高分子を得ることができた。

図 5 に示した水酸基を導入したポリマーの ROMP を用いた合成では、分子間水素結合によるものと思われる不溶化が観察されたため、保護 - 脱保護反応を経由した高分子合成を行った。モノマーへの水酸基の導入位置を変更し、単独重合、および共重合を行うことにより、側鎖配列の規則性が異なる 3 種の高分子を合成することに成功した。また、水酸基の導入数、導入様式が異なるモノマーの ROMP についても、保護 - 脱保護法を用いることで目的とする高分子の合成に成功した。

上記で得られたポリマーは全て、*p*-トルエンスルホニルヒドラジドを用いた水素添加反応により、主鎖の二重結合を還元したポリマーに変換して以下の検討に用いた。

(2) 得られた高分子の水和構造および親水性評価

上記で得られた高分子について、含水試料を用いた DSC 測定を行い、水和構造の解析を行った。その結果、すべての高分子において中間水に帰属することが可能な水の低温結晶形成が観察された。DSC チャートのピーク面積 (熱量) から中間水量を算出した結果、側鎖をメトキシエトキシカルボニル基に固定し、その導入間隔を変更した高分子では、側鎖の導入間隔を 5 炭素おきにした場合に、水の低温結晶形成による発熱ピークの面積が最も大きいことが分かった。一方、PBS 溶液を用いて含水させた試料を用いた場合は、側鎖密度の低下に伴って発現する中間水量が減少していく傾向が観察された。(図 6)

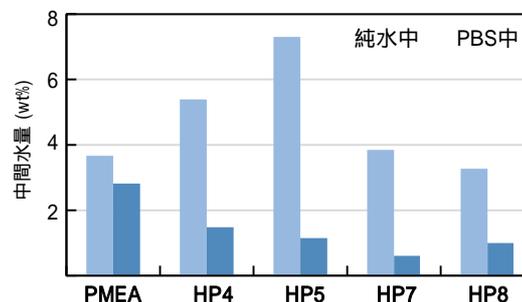


図6. 側鎖間隔が異なる高分子の中間水量の定量結果

水酸基を導入した高分子の水和構造解析では、水酸基の配列がより高い規則性を持っている高分子ほど発現する中間水量が増加

していることが明らかとなった。また、規則的に導入する水酸基の数を増加させた場合や、水酸基を運動性の高い側鎖末端に導入した場合にも、中間水量を増加させることが可能であった。(図7)

上記で合成した全ての高分子を PET 基板上にスピンコートし、液滴法、水中気泡法を用いた水の静的接触角測定により、材料表面の親水性評価を行った。その結果、概ね中間水の発現量が多い高分子ほどより親水的な表面を形成していることが分かった。

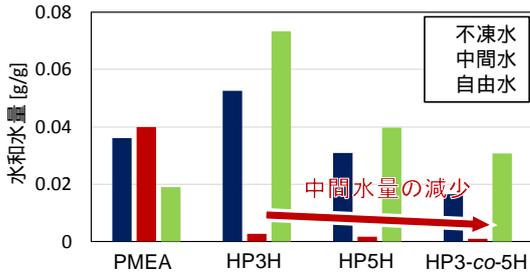


図7. 水酸基配列の規則性が異なる高分子の中間水量の定量結果

(3) 得られた高分子の血液適合性評価

得られたポリマーをコートした PET 基板を用いて血小板粘着試験を行い、基板上に粘着した血小板の数、および形態について SEM 観察による評価を行った。その結果、概ね発現した中間水量に応じた血小板粘着抑制能を示していることが確認された。

メトキシエトキシカルボニル基の側鎖間隔を変更した高分子では、側鎖間隔の減少に伴う中間水量の増加に従って、血小板粘着抑制能が向上していくことが確認された。(図8) その一方、側鎖導入間隔が狭いものほどタンパク質の吸着量が増加する、という興味深い傾向が得られ、側鎖導入間隔の変更により、吸着するタンパク質の量、変性度を制御できる可能性が見いだされた。

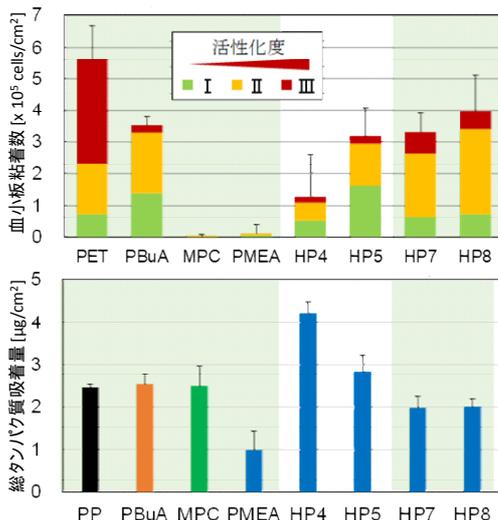


図8. 上) PMEa類似体が発現する血小板粘着抑制能
下) PMEa類似体へのタンパク質吸着量

水酸基を導入した高分子においても同様の傾向は観察され、水酸基配列の規則性が高

く、発現している中間水量が多いものほど血小板粘着を抑制していることが確認された。その一方、水酸基の導入様式を変更し、炭素側鎖の末端に水酸基を導入した高分子では、中間水量の大きな増加が認められたにもかかわらず、ユニット当たり同数の水酸基を導入した高分子と比較して血小板粘着抑制能が大きく変わることはなかった。この結果は、これまでに観察されていた、高分子が発現する中間水量と血小板粘着抑制能の相関からは外れる結果であり、高分子の化学構造 - 水和構造 - 生体適合性の相関と、その作用機序を解明する鍵を握る現象であると考えている。(図9)

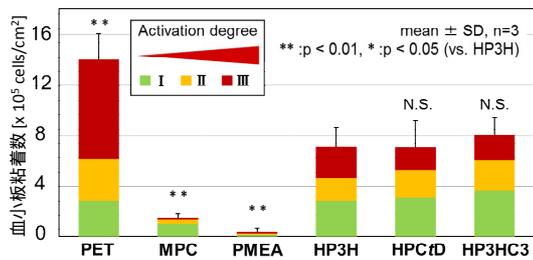


図9. 水酸基導入高分子が発現する血小板粘着抑制能

以上、基盤(C)による本研究助成による成果から、高分子の一次構造制御の中でも側鎖の導入間隔を制御することにより、材料が発現する水和構造の制御が達成できることが分かった。また、発現する水和構造は、官能基の密度およびその運動性によって変更可能であるという知見を得た。また、発現する水和構造の制御を通じて、高分子材料が発現する血液(生体)適合性の制御を達成可能であるという知見を得た。今後は、材料中の水和構造と高分子側鎖の運動性との相関性について固体 NMR 法を用いた検討などを行い、高分子の化学構造制御による水和構造および生体適合性の制御の達成にむけ、高分子のデザイン、合成、開発を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計12件)

- 1) Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)s: A nonthrombogenic polymer family with tunable protein adsorption. Shingo Kobayashi, Miyuki Wakui, Yukihisa Iwata, and Masaru Tanaka *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 4214-4223.
- 2) Synthesis and Thrombogenicity Evaluation of Poly(3-methoxypropionic acid vinyl ester): a candidate for blood compatible polymer. Kazuhiro Sato, Shingo Kobayashi, Asuka Sekishita, Miyuki Wakui and Tanaka Masaru *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1609-1616.
- 3) Synthesis of Sequence-Specific Polymers with Amide Side-chains via Regio-/stereoselective Ring-opening Metathesis Polymerization of 3-Substituted

cis-Cyclooctene.

Kohei Osawa, Shingo Kobayashi, and Masaru Tanaka

Macromolecules **2016**, *49*, 8154-8161.

- 4) Regioselective Ring-Opening Metathesis Polymerization of 3-Substituted Cyclooctenes with Ether Side-Chains. Shingo Kobayashi, Kosaku Fukuda, Maiko Kataoka, and Masaru Tanaka
Macromolecules **2016**, *47*, 114-121.
ほか 8 件

〔学会発表〕(計 86 件)

- 1) Shingo Kobayashi, “A Study on Blood-compatibility of Polymers with Precisely Designed Molecular Architectures” Japan - Taiwan Bilateral Polymer Symposium 2017, 2017, Sept. 5-8, Yonezawa, Yamagata, Japan. (招待講演)
- 2) Shingo Kobayashi, Miyuki Wakui, Rikiya Sato, Masaru Tanaka, “A study on blood compatibility of poly(ω -alkoxyalkyl acrylate)s”, 第 66 回高分子学会年次大会, 2017 年 5 月 29 ~ 31 日, 幕張メッセ.
- 3) 泉井美幸, 小林慎吾, 佐藤力哉, 田中賢, poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成および抗血栓性評価, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016 年 11 月 21 ~ 22 日, 福岡国際会議場.
- 4) 園田敏貴, 小林慎吾, 田中賢, “開環メタセシス重合による側鎖間隔を制御した PMEA 類似体の合成”, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016 年 5 月 25 ~ 27 日, 神戸国際会議場
- 5) Shingo Kobayashi, Kousaku Fukuda, Keisuke Herai, Maiko Kataoka, Kohei Osawa, and Masaru Tanaka, “Synthesis and blood compatibility evaluation of sequence-specific polymers via regioselective ROMP”, Pacifichem 2015, 2015, Dec. 15-20, Honolulu, HI, USA.
ほか国際学会計 26 件、国内学会計 60 件。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ポリマー、ポリマー溶液およびポリマー被覆基盤

発明者: 田中賢、小林慎吾、泉井美幸

権利者: 山形大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-214795

出願年月日: 2015 年 10 月 30 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

田中賢研究室 九州大学先導物質化学研究所 ソフトマテリアル学際化学分野

<http://www.soft-material.jp/>

田中賢研究室 山形大学大学院 理工学研究科 バイオ化学工学専攻

<http://www.bio-material.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小林 慎吾 (KOBAYASHI, Shingo)

九州大学・先導物質化学研究所・特任准教授

研究者番号: 7 0 6 2 5 1 1 0