

令和 2 年 11 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19767

研究課題名（和文）歯周病治療用足場材料の設計指針の創出

研究課題名（英文）Design of a scaffold for periodontal disease treatment

研究代表者

田中 賢（Tanaka, Masaru）

九州大学・先導物質化学研究所・教授

研究者番号：00322850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：歯周組織再生用の足場材料には、優れた生体親和性が要求される。本研究では、poly(2-methoxyethyl acrylate)と同じ化学組成を有し、側鎖のエステル結合部分が反転した構造を有するポリ(3-メトキシプロピオン酸ビニルエステル)（PMePVE）を新規に合成し、水和状態と生体親和性との相関について検討した。PMePVEはPMEAと同程度の優れた生体親和性を示し、中間水が存在することが明らかとなった。側鎖炭素数を増加したPMePVE類似体や、分子量を制御した高分子の合成を行った結果、側鎖の結合様式を変更することで側鎖の運動性を制御し、各水の組成を変更できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は世界で最も蔓延している病気であり、我が国の成人の7割が罹患している。歯周病は全身疾患にも関与しており、歯周病治療は高齢社会における大きなニーズとなっている。歯周病細菌が歯周組織に感染し歯周組織の破壊が進行するので、本来の歯周組織の構造と機能を修復するための歯周組織再生技術が必要である。本研究では、申請者が世界で初めて発見した足場材料の水和構造制御による細胞の選択的接着現象に着目し、ヒト歯根膜（PDL）細胞の接着、増殖、機能を制御できる生体親和性足場材料による新しい歯周病治療戦略を考案する。また、全身疾患に関与する歯周病治療に対して新たな学術的視点を与える。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a scaffold for periodontal ligament (PDL) cells culture, biocompatibility is one of the essential factors. When a material comes in contact with fluids, various biological responses are evoked on the polymer surface. Among the responses, an immune reaction is the significant problem. Because PDL cells adherence onto polymer surfaces, the main step toward the immune reaction, is mediated by the denatured adsorbed protein, inhibiting the adsorption and denaturation of the proteins is one of the simplest methods. We have reported that poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) shows excellent biocompatibility. The chemical structure of PMEA is composed of an acrylate backbone and monomethoxy terminated ethylene glycol sidechain. If the placement of the ester unit in the PMEA framework is inverted, the polymer becomes a poly(vinyl acetate) derivative, poly(3-methoxypropionic acid vinyl ester). We synthesized this polymer, and found great potential as a PDL cell scaffold.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：足場材料 バイオ界面 歯周病

1. 研究開始当初の背景

歯周病は世界で最も蔓延している病気であり、我が国の成人の7割が罹患している。歯周病は全身疾患にも関与しており、歯周病治療は高齢社会における大きなニーズとなっている。歯周病細菌が歯周組織に感染し歯周組織の破壊が進行するので、本来の歯周組織の構造と機能を修復するための歯周組織再生技術が必要である。歯周組織は、歯根膜・歯槽骨・セメント質・歯肉から構成されており、複数の細胞で口腔界面が形成されている。近年、細胞シートや増殖因子による臨床試験が進行しているが、各細胞の増殖や機能が異なるので歯周組織の再生は困難である。したがって、歯周病治療に適用可能な歯周組織再生能力を含む生体親和性に優れた足場材料の開発が求められている。

2. 研究の目的

申請者が世界で初めて発見した足場材料の水和構造制御による細胞の選択的接着現象に着目し、本研究では、ヒト歯根膜(PDL)細胞の接着を制御できる生体親和性足場材料による新しい歯周病治療戦略を提案する。生体親和性高分子である poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) と同じ化学組成を有し、側鎖のエステル結合部分が反転した構造を有するポリ(3-メトキシプロピオン酸ビニルエステル) (PMePVE) を合成し、含水状態での水和構造と生体親和性との相関関係を明らかにするために、リビングラジカル重合の一種である可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により数平均分子量(M_n)が同程度のPMEAとPMePVEを合成し、これらの高分子が発現する水和構造の解析および生体親和性評価を通じ、足場材料としての高分子の側鎖が水和構造、および生体親和性へ与える影響について検討した。

3. 研究の方法

モノマーであるMEAとPMePVE、開始剤にアゾビスシクロヘキサノカルボニトリル(ABCN)、3種類の連鎖移動剤(CTA)を用いてRAFT重合を行った。得られた高分子の化学構造は、 ^1H NMRにより確認し、GPC測定により分子量、分子量分布を評価した。得られた高分子の物性として、水の静的接触角により親水性・疎水性評価を行った。また、各高分子の水和構造解析は、得られた高分子を脱イオン水中に3日間浸漬させることで含水資料を調整し、示差走査熱量測定(DSC)を用いて評価を行った。測定結果より3種類の水和構造に分類し、各水の定量化を行った。抗血栓性の評価として、血小板粘着試験を行った。また、タンパク質の総吸着量を μBCA 法により測定した。また、分子量を制御した高分子表面に吸着したフィブリノーゲンの血小板粘着部位の露出量をELISA法により測定した。さらに、液中原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、細胞と足場材料の接着界面を高感度解析することにより、口腔界面における細胞-材料間相互作用を規定する因子の解明を行う。

4. 研究成果

合成した高分子の化学構造を ^1H NMRにより解析した結果、目的とする高分子の合成に成功していることを確認した。またGPC測定により M_n が2万程度の分子量が制御された高分子の合成に成功していることを確認した。次に、各高分子が水と接触した際に発現する水和構造について、含水試料を用いたDSC測定を行い、その解析結果から各水の量の定量化を行った。PMEAとPMePVEを比較すると、両者の不凍水量は同程度であったが、PMePVEでは中間水量や自由水量が増加する傾向が得られた。PMePVE側鎖は主鎖と酸素を介して結合しているのに対し、PMEAは二重結合を有するカルボニル基が主鎖に直接結合していることから、PMePVEの方が側鎖の運動性が向上していると考えられる。すなわち、高分子側鎖の運動性の向上に伴い、高分子と相互作用する水の運動性も向上していることが予想された。

次に、分子量を制御した高分子の親水・疎水性の評価として水の静的接触角を評価した結果、液滴法においては、分子量を制御した高分子の方が、フリーラジカル重合で合成した高分子よりも親水的な表面になることがわかった。一方、水中気泡法においては、合成法の違いに関係なく親水的な値を示し、同程度の値を示すことがわかった。このことから、分子量を制御した高分子は、水が接触する環境下において、高い表面自由エネルギーを有していることがわかった。

各基板上に吸着するタンパク質の吸着量と構造変化について、 μBCA 法およびELISA法により解析を行った。その結果、PMEAとPMePVE上に吸着したタンパク質の吸着量や構造変化は、フリーラジカル重合で合成したPMEAと同程度であることがわかった。

以上の結果から、分子量を制御した高分子の水和構造解析により、高分子側鎖の運動性を制御することで各水の組成を変更できる可能性が示唆された。また、分子量分布を制御した高分子は、フリーラジカル重合で合成した高分子よりも親水的な表面を形成し、より大きな表面自由エネルギーを有するものと考えられる。生体親和性に関する評価の結果、分子量分布を制御した高分子は、フリーラジカル重合で合成した高分子と同程度にタンパク質吸着量や構造変化を抑制した結果が得られた。この吸着タンパク質の状態に応じてPDL細胞の接着、増殖が安全に制御できることが分かった。このことから、運動性の観点から分子量を制御し側鎖構造を変更することで、新たな生体親和性高分子を設計できる可能性が示された。

また、歯周病治療には、PDL細胞などの接着、増殖、分化、機能を制御できるインプラント

可能で安全な足場材料の開発が極めて重要である。しかし、ヒト間葉系幹細胞などに比べ、PDL細胞の性質や細胞-材料間相互作用に関するデータが少なかった。本研究では、この相互作用に強く影響する、細胞接着の足場になる含水時の材料表面のナノ構造変化に着目した。AFMを用いた研究において、生体親和性に強く影響を与える特定の水和構造である中間水を有する高分子/水界面に数十ナノメートルスケールの微細構造が自発的に形成されていることが確認された。このような規則的な微細構造は、中間水を有さない高分子においては観測されず、この微細構造の制御が、細胞の接着挙動に影響していることが示唆された。この微細構造は、高分子/水界面領域における高分子と水の相分離現象に起因しており、それにより形成された「Polymer-rich相」と「Water-rich相」が、それぞれ微細構造の凸部、凹部として観察されていると考えられる。血清培地中に含まれる血清タンパク質の吸着サイトを調べたところ、微細構造における「Polymer-rich相」に選択的に吸着することが示唆された。以上の結果から、含水時のナノ微細構造のサイズや間隔によるタンパク質吸着サイトの変化を利用したPDL細胞接着挙動制御の可能性が考えられる。歯周病治療に必要なPDL細胞などの接着、増殖、分化、機能を制御できるインプラントの表面に処理するコーティング材の設計を行う際にも重要な知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

F. Khan, M. Tanaka, Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 17 (2018).
DOI: 10.3390/ijms19010017

W. Lee, S. Kobayashi, M. Nagase, Y. Jimbo, I. Saito, Y. Inoue, T. Yambe, M. Sekino, G. G Malliaras, T. Yokota, M. Tanaka, T. Someya, A Nonthrombogenic, Stretchable, Active Multielectrode Array using Organic Electrochemical Transistors, *Science Advances*, 4(10), eaau2426 (2018).
DOI: 10.1126/sciadv.aau2426

T. Ueda, D. Murakami, M. Tanaka, Analysis of interaction between interfacial structure and fibrinogen at blood-compatible polymer/water interface. *Frontiers in Chemistry, Polymer Surface Chemistry: Biomolecular Engineering and Biointerfaces*, 6, 542 (2018).
DOI: 10.3389/fchem.2018.00542

D. Murakami, N. Mawatari, T. Sonoda, A. Kashiwazaki, M. Tanaka, Effect of Molecular Weight of Poly(2-methoxyethylacrylate) on Interfacial Structure and Blood Compatibility. *Langmuir*, 35, 2808-2813 (2019).
DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02971

〔学会発表〕(計 7件)

入江 俊也, 荒津 史裕, 蔡 孟諭, 小林 慎吾, 田中 賢
中間水を有する生体適合性高分子による細胞運動の制御
高分子学会年次大会 2017年5月

上田智也, 北原洋子, 村上大樹, 田中 賢
原子間力顕微鏡によるPMEA類似体高分子の界面構造/タンパク質間相互作用の直接解析
第46回医用高分子シンポジウム 2017年7月

Masaru Tanaka

Design of soft-biomaterials based on the interfacial water structure for advanced medical devices
10th International Symposium on Organic Molecular Electronics (ISOME 2018) (招待講演) (国際学会) 2018年6月

田中 賢

界面水制御による生体親和性高分子の設計
第14回関西支部若手の会 (招待講演) 2018年12月

田中 賢

生体親和性材料による血中循環癌細胞の分離と回収
第77回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2018年9月

田中 賢

生体親和性高分子による血中循環がん細胞（CTC）の分離回収技術
第 58 回日本臨床化学会年次学術集会（招待講演）2018 年 8 月

田中 賢

エンジニアリングネットワーク・ワークショップ- 生物のもつ耐性機能と工学の融合 -（招待講演）2019 年 3 月

〔図書〕(計 1 件)

田中 賢, 第 4 節 バイオマテリアルの表面処理・複合化プロセスと機能評価, 第 1 項 高分子系バイオマテリアル, 粉体・ナノ粒子の表面処理・複合化技術 - 基礎から応用まで -, テクノシステム, p251-256 (2018).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：細胞接着用粒子および細胞の捕捉方

発明者：田中 賢

権利者：九州大学

種類：特願

番号：特願 2019-069462

出願年：2019 年

国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小林慎吾

ローマ字氏名：KOBAYASHI, Shingo

研究協力者氏名：村上大樹

ローマ字氏名：MURAKAMI, Daiki

研究協力者氏名：荒津史裕

ローマ字氏名：ARATSU, Fumihito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。