

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20350108

研究課題名(和文) 高次構造制御による生体材料の高機能化

研究課題名(英文) Study on functionalization of biomaterials by controlling the high order structure

研究代表者

小林 尚俊 (KOBAYASHI HISATOSHI)

独立行政法人物質・材料研究機構・生体材料センター・グループリーダー

研究者番号：90354266

研究成果の概要(和文)：

細胞膜上の受容体や接着分子の分子認識はナノメートルの大きさに規定されており、材料表面への生体分子(タンパク、脂質、糖鎖)の吸脱着や細胞の接着・非接着などを人工的に制御するためには、ナノメートルオーダーの分子設計からマイクロマクロの高次構造の制御が必須不可欠である。そこで、生体材料の構造制御による機能向上およびその機構解明を試みた。具体的には高分子ファイバー及び濃厚ブラシを対象とし、①「ファイバーの二次/三次元配列構造の制御」および②「濃厚ポリマーブラシの三次元構造制御」を行い、その生体機能特性を詳しく調べた。得られた知見から、機能化された新規細胞足場材料のコンセプトが開発された。

研究成果の概要(英文)：

The size of the receptor on the cellular membrane and the recognition of the adhesion molecules are regulated in nanometer order. Therefore it is necessary to design and to control the 3D structure of the materials. In this consequence, we try to understand the real cell recognition mechanism on the functionalized biomaterials by controlling the material nano-micro-macro structure. In this research, we aimed (1) "control of the second/three-dimensional array structure of the fiber" and (2) "three-dimensional structural control of the concentrated polymer brush", and the bodily function characteristic was examined in detail. From the results, the concept of the new type of the tissue engineering scaffolds was developed.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 7,800,000  | 2,340,000 | 10,140,000 |
| 2009年度 | 5,200,000  | 1,560,000 | 6,760,000  |
| 2010年度 | 1,600,000  | 480,000   | 2,080,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：高分子・繊維材料

キーワード：高分子機能材料

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜上の受容体や接着分子の分子認識はナノメートルの大きさに規定されており、材料表面への生体分子(タンパク、脂質、糖

鎖)の吸脱着や細胞の接着・非接着などを人工的に制御するためには、ナノメートルオーダーの分子設計からマイクロマクロの高次構造の制御が必須不可欠である。そこで、わ

たしたちのグループでは、これまでに (1) 電界紡糸法による高分子ナノファイバーを用いた細胞足場材料の開発および (2) 精密表面グラフト重合による生体適合性表面の開発を行ってきた:

(1) 生分解性のポリグリコール酸(PGA)と細胞接着能を有するコラーゲンを用い、直径がマイクロからナノオーダーまで制御されたPGA-コラーゲンの“複合体ファイバー”の作製に初めて成功し、得られる不織布状ファイバーへの細胞接着挙動がファイバーの直径に依存すること、すなわちファイバー径がマイクロではなくナノメートルサイズの方がより細胞接着を誘起することを実験的に明らかにしている。

(2) 最近、リビングラジカル重合法と称される新しい精密重合法を表面グラフト重合法に利用することで、分子量や分子量分布など構造の明確なポリマーを従来法に比べ桁以上高い密度で材料表面にグラフトすることが可能となった。得られる濃厚ポリマー(表面占有率にして約40%以上)は、良溶媒中で伸び切り鎖に匹敵するほど高度に伸張しており、その特異な構造を反映して、従来の準希薄ポリマーブラシとは全く異なる物性・機能を発現することがわかっている。これまでに、リビングラジカル重合法の利用により親水性ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレート(PHEMA)ブラシの濃厚ブラシを作製することに成功し、得られる濃厚ブラシ表面がその特異な構造を反映して、同種キャスト膜や準希薄ブラシ表面に比較して、タンパクの非特異的吸着や細胞接着を飛躍的に抑制することを見出している。いずれのPHEMA表面も接触角測定では親水性に大きな違いはなく、上述の結果はブラシの高密度化が生み出す特異な構造・ダイナミクスに由来すると考えられる

## 2. 研究の目的

上述の研究成果は、同種ポリマーでも、その物理的構造に依存して機能特性が大きく変化することを示唆する。そこで、本研究課題では生体材料の構造制御による機能向上およびその機構解明を目指し、高分子ナノファイバーおよび基材表面にグラフトされたポリマーブラシ層の高次構造を、物理的または化学的に精密制御することで生体材料としての機能特性を向上させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本課題では、電界紡糸法により得られる“高分子ファイバー”および表面開始リビングラジカル重合法により得られる“濃厚ブラシ”の高次構造を、物理的手法または化学的手法により精密制御し、得られる構造と生体機能との相関性について検討した。具体的には(I)表面開始リビングラジカル重合法および強磁場を用いたナノファイバーの二次元・三次元配列制御、(II)濃厚ブラシの高密度化、(III)パターンニングによる濃厚ブラシの三次元構造制御を行い、細胞との相互作用を検討した。

## 4. 研究成果

### I: ナノファイバーの高次構造制御

#### (1) 短線維化電界紡糸ファイバーの開発

一般的に、電界紡糸技術では、連続したファイバーから成る不織布またはスポンジ状の構造体しか作成できない。この限定された構造により、生体材料としての利用範囲や性能に限界があった。そこで、電界紡糸ファイバーを用いた生体材料の新しい展開を目指し、リビングラジカル重合と称される精密重合法を用いてファイバー表面の表面改質を行うとともにファイバーの短線維化を試みた(図1)。まず、原始移動ラジカル重合(ATRP)の開始基を有する4-vinylbenzyl-2-bromopropionate (VBP)とスチレン(ST)のランダム共重合を行った。得られた共重合体 poly(ST-*r*-VBP) ( $M_n = 105200$ ,  $M_w/M_n = 2.82$ )を用いて、電解紡糸を行い、直径  $593 \text{ nm} \pm 74 \text{ nm}$  の電界紡糸ファイバー(不織布)を得た。次に、この不織布を含む styrene sodium sulfonate (SSNa), フリー開始剤,  $\text{Cu(I)Br}$ ,  $\text{Cu(II)Br}_2$ , 2,2'-bipyridine の 1/3 v/v% メタノール/水の溶液を Ar 雰囲気下、30度で加熱した。重合後、フリーポリマーの  $M_n$ ,  $M_w/M_n$  を GPC 測定により決定した。 $M_n$  は重合率に対して直線的に増加し、重合率から算出される理論分子量をほぼ一致した。分子量分布も 1.2 程度と比較的狭く、重合がリビング的に進行していることが確認された。 $M_n$ 、グラフト量、および表面積からグラフト密度は約 0.22

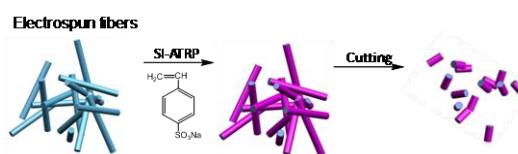


図 1. 濃厚ブラシ被覆短線維化ファイバーの作成スキーム。

chains/nm<sup>2</sup>(表面占有率≒30%)と算出され、濃厚ポリマーブラシであることがわかった。

さらに、得られた濃厚ブラシ被覆ファイバーをホモジナイザーにより切断した。切断時間と共に長さが短く、かつ規格化されることが確認された。切断3時間の短繊維化ファイバー(平均長=11±17 μm)は水中で良く分散することが確認された。この分散性は、親水性 PSSNa ブラシ(表面組成)と短繊維化(構造)によるものである。得られた短繊維化に対して角膜実質細胞を播種したところ、細胞と短ファイバーは数十~百 μm の凝集塊を形成した。また、凝集塊内部に細胞が均一に存在することが確認された(図 3)。これらの成果から、本短線維は、新規細胞足場材料やスフェロイド促進材料としての応用が期待される。

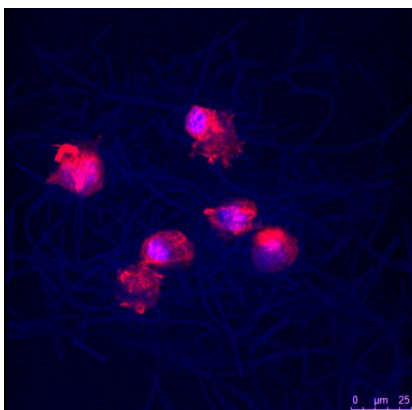


図 3. 短繊維ファイバー-角膜実質細胞複合体の共焦点レーザー顕微鏡像

## (2) ナノファイバーからなるモデル培養環境における細胞挙動に関する研究

生体組織を構築している細胞外マトリクスは、コラーゲン線維をはじめとして、種々のナノファイバーから構成されている。そこで、細胞培養用のモデル環境として、電界紡糸法によりナノファイバーを作製し、ナノファイバーが細胞挙動に及ぼす影響について検討を行った。まず、電界紡糸法により直径 500nm~10μm で任意の直径を有するポリグリコール酸(PGA)-コラーゲン二成分ファイバーを作製した。次に、ファイバー単繊維に対するマウス由来繊維芽細胞(L929)およびヒト血管内皮細胞(HUVEC)の接着挙動をタイムラプス観察した。図 2 に結果を示す。繊維軸方向に伸長接着していた L929 はナノファイバー上で球状に収縮し、分裂した後に再び繊維に沿って接着している様子がわかる。一方、HUVEC は分裂挙動開始時に繊維軸方向の両端にコブ状のアンカーを形成

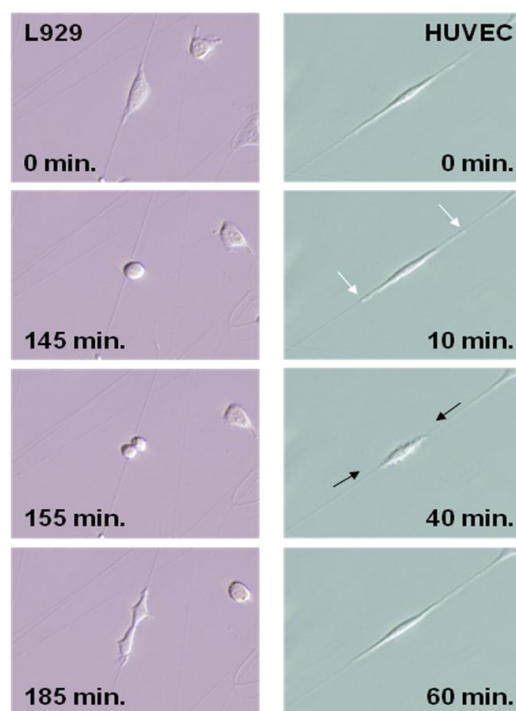


図 2. PGA-コラーゲン単線維に対する細胞の接着挙動. 左: L929、右: HUVEC.

し、両方向へ牽引することで分裂挙動を開始するが、アンカーが破断または滑動することで分裂過程は中断され、再び繊維に沿って接着し直している様子が伺える。観察 64 時間の間、HUVEC は分裂することなく同様の挙動をくり返した。細胞-繊維材料との相互作用をさらに詳しく調べるため、現在、繊維の数を 2、3、・・・本と増やし、同様の実験を検討している。

## (3) 強磁場を用いたファイバーの配列化

ファイバーベース生体材料の高機能化においては、ファイバー単繊維の表面特性に加え、その高次構造の制御も重要である。まず、高次構造化する技術の確立を検討した。魚コラーゲンファイバーや(1)で得られた短線維などを水溶液中、12-13Tの磁場を引加した。印加時間や濃度などを最適化することで、ファイバーを一方向に配向凝集することに成功した。また、(1)で得られた短線維と角膜実質細胞を13Tの強磁場中12時間培養したところ、通常培養と同様に、細胞がファイバーに接着することが確認された。配列構造が細胞接着挙動に与える影響については、現在も引き続き検討中である。また、この短線維ファイバー分散体と細胞を相互作用させるとファイバー構造内に細胞が分散した 3D細胞-足場複合体が形成されることが判明し、新たな足場材料としての可能性が示唆された。こ

の系に関しては更なる発展を目指して現在詳細な検討を開始した（データ未発表）。

### II:濃厚ポリマーブラシの高次構造制御 1

ルイス酸を用いたグラフト鎖の分子内制御（タクティシティ）を行う予定としていたが、予備的検討で今のところ有用な知見が得られていないため、今後、反応条件などを見直す必要がある。

### III:濃厚ポリマーブラシの高次構造制御 2

レジストを塗布したシリコン基板表面に電子線リソグラフィ技術を用いて、数十 nm から数十  $\mu\text{m}$  サイズの種々のパターンを描写した。次いで、この基板に、表面開始 ATRP の重合開始剤を固定化し、レジストを除去したのち重合を行った。しかし、レジストの完全な除去が難しく、重合前と同じパターンを確認することができなかった。そこで、MMA を ATRP によりシリコン基板上にグラフトし ( $0.5\text{chains}/\text{nm}^2$ )、得られたブラシ表面に電子線リソグラフィでパターンを描写した。その結果、明確なパターンを得ることができた。現在、ポリマーブラシを PMMA から生体適合性ポリマー（PHEMA, PPEGMA など）に変えて、ポリマーブラシのパターン化を検討している。

#### 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 11 件）

1. Chen S, Hirota N, Okuda M, Takeguchi M, Kobayashi H, Hanagata N, Ikoma T, Microstructures and rheological properties of tilapia fish-scale collagen hydrogels with aligned fibrils fabricated under magnetic fields. *Acta Biomater*, 7(2), 644-652, 2011、査読有
2. Yoshikawa C, Hashimoto Y, Hattori S, Honda T, Zhang K, Terada D, Kishida A, Tsujii Y, Kobayashi H, Suppression of Cell Adhesion on Well-defined Concentrated Polymer Brushes of Hydrophilic Polymers. *Chem Lett*, 39(2), 142-143, 2010、査読有
3. Kishida A, Funamoto S, Negishi J, Hashimoto Y, Nam K, Kimura T, Fujisato T, Kobayashi H, Tissue engineering with natural tissue matrices(5th Forum on New Materials, 2010, Part E, Stafa-Zuerich, Switzerland). *Advances in Science and Technology*, 76,125-132, 2010、査読有
4. Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Honda T, Hattori S, Nam K, Kimura T, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H et

al, Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, 31(14), 3941-3948, 2010、査読有

5. Yokoyama Y, Hattori S, Yoshikawa C, Yasuda Y, Koyama H, Takato T, Kobayashi H, Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric. *Mater Lett*, 63(9-10), 754-756, 2009、査読有  
他 6 件

〔学会発表〕（計 71 件）

1. 吉川千晶、Zhang K、Zawadzak E、小林尚俊、「生体材料応用に向けた新規電界紡糸ナノファイバーの開発：[1]表面修飾と短繊維化」つくば医工連携フォーラム 2011、2011/01/26、つくば
2. 小林尚俊、吉川千晶、Zawadzak E、Zhang K、廣田憲之、「生体材料応用に向けた新規電界紡糸ナノファイバーの開発：[2]強磁場を用いた配列化。」つくば医工連携フォーラム 2011、2011/01/26、つくば
3. Kobayashi H, "toward early neovascularization and tissue ingrowths into the scaffold; Three-dimensional Nanofiber fabric consisted of PGA-Collagen composites prepared by using wet bath collector."、India-Japan seminar on Nanomaterials for therapeutics & diagnosi、2010/10/29、インド
4. 寺田堂彦、吉川千晶、Zhang K、Tiwari A、服部晋也、本田貴子、生駒俊之、小林尚俊、「Cathodic Electrospinning of Chitosan.」、ESB2010、2010/09/11-2010/09/15、フィンランド
5. 寺田堂彦、吉川千晶、服部晋也、本田貴子、生駒俊之、小林尚俊、「ナノファイバーを用いた細胞培養環境の作製と細胞挙動に関する基礎的検討」、つくば医工連携フォーラム 2010、2010/01/13、つくば
6. 寺田堂彦、吉川千晶、服部晋也、本田貴子、生駒俊之、小林尚俊、「ナノファイバーによる細胞培養モデル環境の作製と細胞挙動に関する研究」、第 31 回日本バイオマテリアル学会大会、2009/11/16-2009/11/17、京都
7. 寺田堂彦、吉川千晶、服部晋也、本田貴子、生駒俊之、小林尚俊、「ナノファイバーからなるモデル培養環境における細胞挙動に関する研究」、第 58 回高分子討論会、2009/09/16-2009/09/18、熊本
8. 寺田堂彦、小林尚俊、服部晋也、本田貴子、吉川千晶、生駒俊之、「ナノファイバーを用いたモデル表面上での細胞挙動に関する

る基礎的検討」、第 38 回医用高分子シンポジウム、2009/07/27-2009/07/28、東京

独立行政法

9. Kobayashi H, Yoshikawa C, Dobashi Y, Hattori S, Honda T, Yokoyama Y, "Nanofiber sponge consisted of polymer-protein composite for vascular invasion bed."、E-MRS、2008/09/15-2008/09/19、ポーランド
10. 小林尚俊、横山敬郎、服部晋也、吉川千晶、本田貴子、「ナノファイバーの高次構造制御による生体反応性評価」、平成 20 年度繊維学会年次大会、2008/06/18-2008/06/20、東京  
他 61 件

[図書] (計 7 件)

1. 小林尚俊、日刊工業出版、環境調和型新材料シリーズ生体材料 総論 1 生体材料の実際、3.3 高分子、各論 3.8 「ナノファイバー」、3-218、2008
2. Kobayashi H, Yokoyama Y, Yoshikawa C, Igarashi S, Hattori S, Honda T, Koyama H, Takato T, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Biomaterials in Asia "Nanofiber-based Scaffolds for Tissue Engineering" Edited by Tateishi T, 2008  
他 5 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

名称：高分子ファイバーの製造方法  
発明者：小林尚俊、寺田堂彦  
権利者：(独)物質・材料研究機構  
種類：特許  
番号：特願 2010-108171  
出願年月日：2010 年 05 月 10 日  
国内外の別：国内

名称：繊維片製造方法  
発明者：小林尚俊、吉川千晶、Zhang K  
権利者：(独)物質・材料研究機構  
種類：特許  
番号：特願 2010-197279  
出願年月日：2010 年 09 月 03 日  
国内外の別：国内  
他 3 件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 尚俊 (KOBAYASHI NAOHISA )  
独立行政法人物質・材料研究機構・生体材料センター・グループリーダー  
研究者番号：90354266

### (2) 研究分担者

吉川 千晶 (YOSHIKAWA CHIAKI)  
独立行政法人物質・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：10447930

### (3) 研究協力者

服部 晋也 (HATTORI SHINYA)  
独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・ポスドク  
研究員  
研究者番号：30469762