

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 3 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14943

研究課題名（和文）選択的かつ独立に結合情報を発信する多重蛍光標識腫瘍マーカー認識ナノ空間クラスター

研究課題名（英文）Molecularly imprinted polymers bearing nanocavities targeting different biomarker proteins prepared via post-imprinting modifications

研究代表者

竹内 俊文（Takeuchi, Toshifumi）

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：70179612

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまで煩雑な分子認識素子のパターンニング無しでは困難とされてきた、同時かつ選択的・独立的に情報を発信する多重蛍光標識分子認識ナノ空間クラスターの構築を、分子インプリンティングとポストインプリンティング修飾技術を駆使して達成した。このような方法論はこれまで報告されておらず独創的であると同時に、量産可能であることから産業的にも魅力的で社会的波及効果がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで煩雑な分子認識素子のパターンニング無しでは困難とされてきた複数標的分子の結合情報に対して、同時かつ選択的・独立的に情報を発信する多重蛍光標識分子認識ナノ空間クラスターを自在に構築することを現実のものとする本研究の成果は、人工高分子材料が生体材料を凌駕する成果となる可能性を秘めている。また、ワンポット合成と逐次PIMは自動化が容易に可能なことから大量生産も視野に入る。従って、プロテオミクスなどの基礎研究から、疾病の早期発見のための診断技術への応用、さらにはin vivoイメージング、臓器選択的DDSやナノメディシンの領域まで広い範囲で、学術的にも産業的にも大きな波及効果がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, one-pot synthesis of nanocavities on a substrate, which can recognize biomarker proteins, were demonstrated using a molecular imprinting technique, and after the nanocavities formation, post-imprinting modifications were carried out, where fluorescence dyes were introduced into each recognition cavities to achieve detection of biomarkers. I believe that this technique may provide a new way to obtain molecularly imprinted polymers to diagnose diseases.

研究分野：分子認識材料

キーワード：分子インプリンティング ポストインプリンティング修飾 分子認識 バイオマーカー タンパク質

1. 研究開始当初の背景

分子インプリンティングは、材料マトリクス内に、特定の分子に対して相互作用が可能な部位もつ分子サイズ相補的ナノ空間(分子鑄型)を構築する技術である[竹内, ラジカル重合ハンドブック, pp.723-740, NTS, 2010]。捕捉したい分子(鑄型分子)と機能性モノマーの複合体を形成後、架橋剤を添加して共重合する。形成されたゲルマトリクス内から鑄型分子を除去することにより、鑄型分子に対する相補的結合空間をもつ分子鑄型(MIP)を得る。最近申請者は、MIP内の分子認識空間に重合後修飾を施すポストインプリンティング修飾(PIM)[Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 12765; Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 13023]を開発し、蛍光レポーター分子の導入および低親和性結合部位を無効化して、標的分子の結合情報の選択的可視化に成功した[Chem. Commun. 2014, 50, 134]。

2. 研究の目的

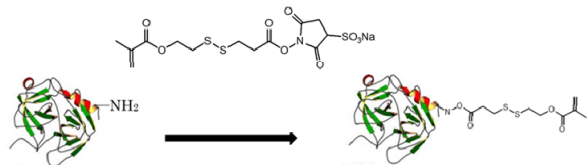
本研究では、腫瘍マーカー混合物に対する鑄型(混合MIP)を作製し、多段階PIMを施すことで、複数の腫瘍マーカーに対し同時かつ選択的・独立にそれらの結合情報を発信できる多重蛍光標識腫瘍マーカー認識ナノ空間クラスターを構築する。具体的には、まず、(1)腫瘍マーカーに disulfide を介して重合可能なメタクリロイル基を導入する。(2)あらかじめ自己組織化膜を介して Phenylboronic acid 基(糖鎖相互作用基)とブロモ基(重合開始基)を導入した金スパッタガラス基板に、腫瘍マーカー上の糖鎖を介してメタクリロイル化腫瘍マーカーを固定化する。(3)腫瘍マーカーと相互作用可能な官能基をもつ機能性モノマーと架橋剤を加え、表面開始原子移動ラジカル重合で基板にゲルマトリクスを形成する。disulfide を介して共重合された腫瘍マーカーを還元切断す

ることで混合MIPを得る。続いてPIMとして、(4)腫瘍マーカー除去後に結合空間に残されているチオール基へそれぞれ異なる蛍光色素を個別標識することで、複数の腫瘍マーカーに対して同時かつ選択的・独立的に結合情報を発信する多重蛍光標識腫瘍マーカー認識ナノ空間クラスターを創製する。

3. 研究の方法

本研究では、モデル腫瘍マーカーとして、前立腺疾患マーカーである前立腺特異抗原(PSA)と肝臓疾患マーカーである α -fetoprotein (AFP)を用いた。PSA 認識空間に Alexa Fluor 594、AFP 認識空間に Alexa Fluor 647 を独立して導入した PSA/AFP-MIP 薄膜基板は以下のようにして調製した。リファレンス基板として、PSA 認識空間のみをもつ PSA-MIP 薄膜基板および AFP 認識空間のみをもつ AFP-MIP 薄膜基板も調製した。(1) PSA および AFP へのメタクリロイル基の導入(リンカー: disulfide)

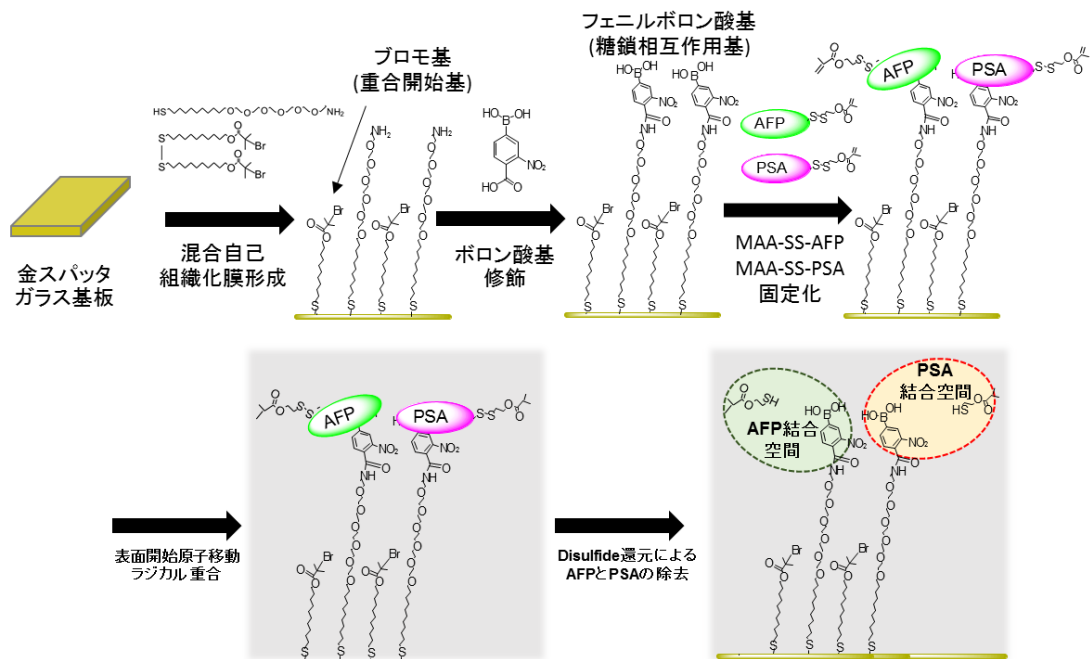
disulfide をもつメタクリル酸誘導体の活性エステルを用いて、PSA および AFP へ disulfide を介してメタクリロイル基導入する。

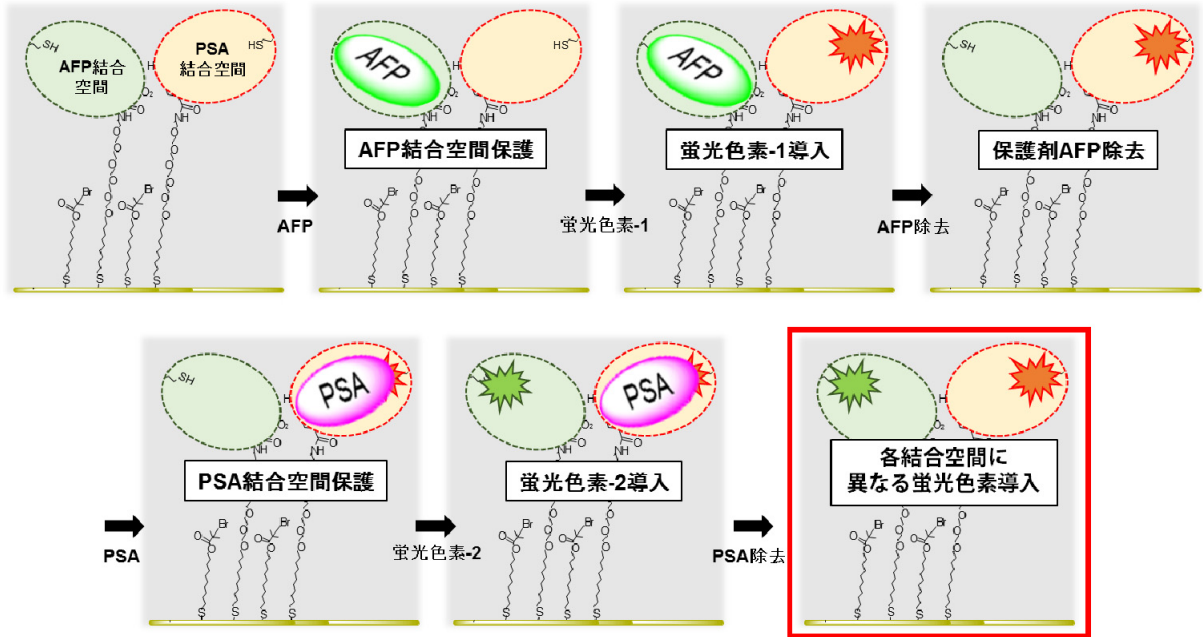


(2) メタクリロイル化 PSA および AFP の修飾基板上への固定化

①修飾基板の作製

金スパッタガラス基板に bis[2-(2-bromoisobutyryloxy)undecyl]disulfide および amino-EG6-undecanethiol を用いて、1:1 混合自己組織化単分子膜(SAM)を作製した。続いて、基板上的アミノ基に対し、糖鎖と環





状ジエステルを形成する 4-carboxy-3-nitrophenylboronic acid (CNPBA)をアミンカップリングで導入した。

② メタクリロイル化PSAおよびAFPの固定化
メタクリロイル化 PSA および AFP を基板上に滴下することで、PSA および AFP 上にある糖鎖の cis-diol と CNPBA が環状ジエステル結合を形成し、メタクリロイル化 PSA および AFP が固定化される。

(3) 表面開始原子移動ラジカル重合による PSA および AFP 結合空間の構築

①表面開始原子移動ラジカル重合

PSA および AFP と相互作用可能な機能性モノマー-pyrrolidyl methacrylate (PyM)、生体適合性があり、共雑タンパク質の非特異的吸着を抑制する 2-methacryloxyethyl phosphorylcholine (MPC)、親水性架橋剤として、methylenebisacrylamide (MBAA) を使い、2,2'-bipyridyl、CuBr₂、ascorbic acid を加えて重合を開始し、40°C、60 min 表面開始原始移動ラジカル重合を行った。

② Disulfide 還元による PSA および AFP の除去

重合反応終了後、基板を tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP)で処理し、disulfide を還元し、続いて NaCl 水溶液、SDS 水溶液に浸漬することで、PSA と AFP を除去し、PSA_AFP-MIP 薄膜基板を得た。

(4) PIM：結合空間選択的蛍光色素導入

PSA_AFP-MIP 薄膜基板上的 PSA 結合空間と AFP 結合空間に異なる蛍光色素を導入するため、以下の操作を行った。

① PSA 結合空間への選択的蛍光色素導入

作製した PSA および AFP 結合空間をもつ MIP 薄膜基板上に AFP 希薄溶液、引き続き Alexa Fluor 594 を滴下し、PSA 結合空間のみに Alexa Fluor 594 を標識した。

② AFP 結合空間への選択的蛍光色素導入

PSA 結合空間に Alexa Fluor 594 を標識し

た MIP 薄膜基板上に、希薄 PSA 溶液、引き続き、Alexa Fluor 647 を滴下し、AFP 結合空間のみに Alexa Fluor 647 を標識した。

(5) 結合実験

蛍光分子を導入した PSA_AFP-MIP 薄膜基板に対する PSA と AFP の結合実験は以下の通りである。下に示した蛍光測定条件下で、それぞれの濃度が 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL になるように調製した PSA・AFP 混合溶液(10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4)に 5 min インキュベートした際の蛍光強度の変化を測定した。

Alexa Fluor 594

- ・励起フィルター:510 nm~550 nm
- ・蛍光フィルター:570 nm~620 nm

Alexa Fluor 647

- ・励起フィルター:605 nm~650 nm
- ・蛍光フィルター:670 nm~720 nm

対物レンズ ×5

露光時間 0.1 sec

同一基板上的 3 点平均(基板内 n=3)

また、相対蛍光強度変化は以下の式に従い算出した。

$$\text{蛍光強度変化} = \frac{(\text{タンパク質各濃度での蛍光強度} - \text{タンパク質 0 ng/mL での蛍光強度})}{(\text{タンパク質 0 ng/mL での蛍光強度} - \text{蛍光導入前の蛍光強度})}$$

4. 研究成果

(1) MIP 薄膜への蛍光分子の導入の確認

蛍光色素を導入する前後における蛍光強度を測定することで、蛍光分子の導入を確認した。以下のように、両色素が PSA_AFP-MIP 薄膜基板に導入されているのが確認された。

・Alexa Fluor594

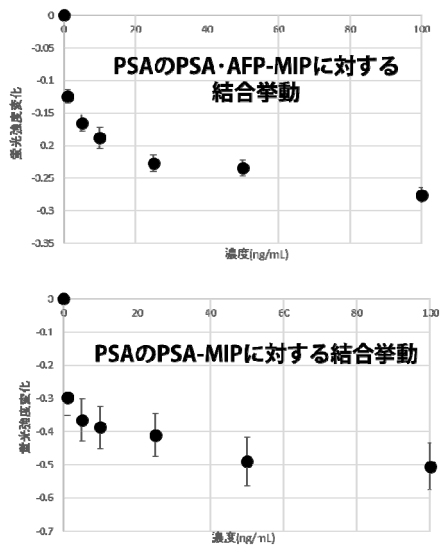
蛍光導入前	114.25
蛍光導入後	122.46
蛍光導入量	8.21(±1.6)

- Alexa Fluor647
 蛍光導入前 111.93
 蛍光導入後 116.62
 蛍光導用量 4.69 (±0.8)

(2) 結合実験

① PSA の PSA_AFP-MIP および PSA-MIP に対する結合

下図のように、PSA は、PSA と AFP の両方の結合空間をもつ PSA_AFP-MIP 薄膜基板と PSA のみの結合空間をもつ PSA-MIP 薄膜基板に対して、同様の結合プロファイルを示した。従って、AFP 存在下でも、PSA の結合空間が形成可能であることがわかった。

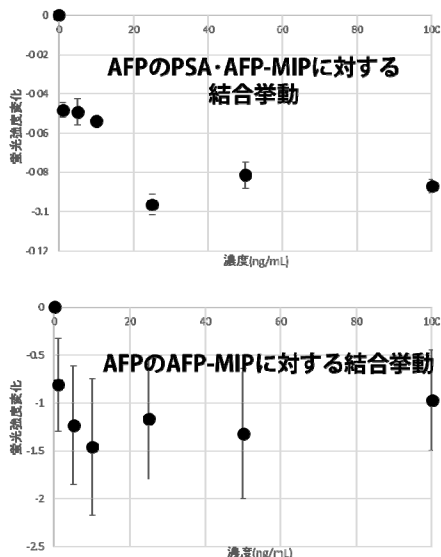


蛍光測定の結果を用いてカーブフィッティング法(デルタグラフ使用)により、PSA_AFP-MIP および PSA-MIP に対する PSA の結合定数を算出したところ、 $1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ および $3.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ と算出され、PSA に対して高い親和性をもつ結合空間が形成されたことが示唆された。

② AFP の PSA_AFP-MIP および AFP-MIP に対する結合

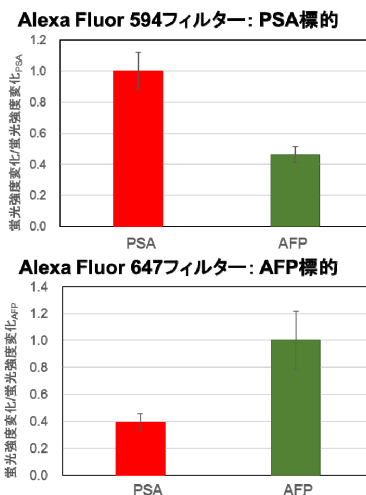
次図のように、AFP は、PSA と AFP の両方の結合空間をもつ PSA_AFP-MIP 薄膜基板と AFP のみの結合空間をもつ AFP-MIP 薄膜基板に対して、同様の結合プロファイルを示し、PSA 存在下でも、AFP の結合空間が形成可能であることがわかった。単独 AFP インプリンティングで作製した AFP-MIP 薄膜基板の状態が悪く再現性が低い結果となった。過去同様の条件[Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 13023]では、そのようなことが起こらなかったため、この現象は改善可能であると結論付けている。

蛍光測定の結果を用いてカーブフィッティング法(デルタグラフ使用)により、PSA_AFP-MIP に対する AFP の結合定数を算出したところ、 $3.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ と算出され、AFP に対して高い親和性をもつ結合空間が形成されたことが示唆された。



③ 選択性

PSA および AFP をそれぞれ PSA_AFP-MIP 薄膜基板にインジェクトし、Alexa Fluor 594 および Alexa Fluor 647 のフィルターを用いて蛍光強度測定した。



上図のように、フィルターの交換で、PSA と AFP の蛍光強度変化の差が観察され、設計どおり、PSA 認識空間には Alexa Fluor 594、AFP 認識空間には Alexa Fluor 647 が導入された PSA_AFP-MIP 薄膜基板が調製できたことが明らかとなった。

これまで煩雑な分子認識素子のパターンニング無しでは困難とされてきた複数標的分子の結合情報に対して、同時かつ選択的・独立的に情報を発信する多重蛍光標識分子認識ナノ空間クラスターを自在に構築することを現実のものとする本研究の成果は、人工高分子材料が生体材料を凌駕する成果となる可能性を秘めている。また、ワンポット合成と逐次 PIM は自動化が容易に可能なことから大量生産も視野に入る。従って、プロテオミクスなどの基礎研究から、疾病の早期発見のための診断技術への応用、さらには in vivo イメージング、臓器選択的 DDS やナノメディシンの領域まで広い範囲で、学術的にも産業的にも大きな波及効果がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Kamon, Y., Takeuchi, T. Molecularly Imprinted Nanocavities Capable of Ligand-Binding Domain and Size/Shape Recognition for Selective Discrimination of Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms, *ACS Sensors*, 2018, 3, 580-586. 査読有
DOI: 10.1021/acssensors.7b00622
2. Suda, N., Sunayama, H., Kitayama, Y., Kamon, Y., Takeuchi, T. Oriented, molecularly imprinted cavities with dual binding sites for highly sensitive and selective recognition of cortisol, *Royal Society Open Science*, 2017, 4, 170300 査読有
DOI: 10.1098/rsos.170300
3. Kitayama, Y., Takeuchi, T. Fabrication of Redox-Responsive Degradable Capsule Particles by a Shell-Selective Photoinduced Cross-Linking Approach from Spherical Polymer Particles, *Chemistry - A European Journal*, 2017, 23, 12870-12875. 査読有
DOI: 10.1098/rsos.170300
4. Takeuchi, T., Kitayama, Y., Sasao, R., Yamada, T., Toh, K., Matsumoto, Y., Kataoka, K. Molecularly Imprinted Nanogels Acquire Stealth In Situ by Cloaking Themselves with Native Dysopsonic Proteins, *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56, 7088-7092. 査読有
DOI: 10.1002/anie.201700647
5. Sunayama, H., Kitayama, Y., Takeuchi, T. Regulation of protein-binding activities of molecularly imprinted polymers via post-imprinting modifications to exchange functional groups within the imprinted cavity, *Journal of Molecular Recognition*, 2017, 31, e2633. 査読有
DOI: 10.1002/jmr.2633
6. Nakai, S., Sunayama, H., Kitayama, Y., Nishijima, M., Wada, T., Inoue, Y., Takeuchi, T. A Regioselective Molecularly Imprinted Reaction Field for the [4+4] Photocyclodimerization of 2-Anthracenecarboxylic Acid, *Langmuir*, 2017, 33, 2103-2108. 査読有
DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b04104
7. Horikawa, R., Sunayama, H., Kitayama, Y., Takano, E., Takeuchi, T. Programmable signaling molecular recognition nano-cavity prepared by molecular imprinting and post-imprinting modifications, *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55, 13023-13027. 査読有
DOI: 10.1002/anie.201605992
8. Sunayama, H., Ohta, T., Kuwahara, A., Takeuchi, T. Fluorescent Signaling Molecularly Imprinted Polymers for

Antibiotics Prepared via Site-Directed Post-Imprinting Introduction of Plural Fluorescent Reporters within the Recognition Cavity, *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 55, 13023-13027. 査読無

DOI: 10.1039/c6tb02000c

9. Takeuchi, T., Hayashi, T., Ichikawa, S., Kaji, A., Masui, M., Matsumoto, H., Sasao, R. Molecularly imprinted tailor-made functional polymer receptors for highly sensitive and selective separation and detection of target molecules, *Chromatography*, 2016, 37, 43-64. 査読有
DOI: 10.15583/jpchrom.2016.007
 10. Kamon, Y., Inoue, N., Mihara, E., Kitayama, Y., Ooya, T., Takeuchi, T. Hydrophilic crosslinked-polymeric surface capable of effective suppression of protein adsorption, *Applied Surface Science*, 2016, 378, 467-472. 査読有
DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.04.028
 11. Matsuura, R., Tawa, K., Kitayama, Y., Takeuchi, T. A plasmonic chip-based bio/chemical hybrid sensing system for the highly sensitive detection of Creactive protein, *Chemical Communications*, 2016, 52, 3883-3886. 査読有
DOI: 10.1039/C5CC07868G
 12. Murase, N., Taniguchi, S., Takano, E., Kitayama, Y., Takeuchi, T. Molecularly imprinted nanocavity-based fluorescence polarization assay platform for cortisol sensing, *Journal of Materials Chemistry B* 2016, 52, 1770-1777. 査読有
DOI: 10.1039/c5tb02069g
 13. Kuwata, T., Uchida, A., Takano, E., Kitayama, Y., Takeuchi, T. Molecularly imprinted polymer arrays as synthetic protein chips prepared by transcription-type molecular imprinting by use of protein-immobilized dots as stamps, *Analytical Chemistry*, 2015, 87, 11784-11791. 査読有
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03134
- [学会発表] (計 45 件)
1. Takeuchi, T. Molecularly imprinted polymers based on zwitterionic materials capable of protein recognition, 3rd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials, 2017
 2. 林 智彦、砂山 博文、香門 悠里、北山 雄己哉、竹内 俊文、ポストインプリント官能基修飾によるバイオマーカータンパク質認識ナノ空間創製、第 39 回日本バイオマテリアル学会大会、2017
 3. 森重 貴裕、香門 悠里、高野 恵里、北山 雄己哉、竹内 俊文、肝がんマーカー糖タンパク質を高感度検出可能な分子インプリントセンシングシステム、第 39 回日本

- バイオマテリアル学会大会、2017
4. 佐伯 哲郎、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文、標的糖タンパク質を選択的に検出可能な配向性分子インプリントポリマー薄膜の創製、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017
 5. 砂山 博文、竹内 俊文、多段階ポストインプリメンティング修飾によるタンパク質結合空間の機能制御、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017
 6. 佐伯 哲郎、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文、標的糖タンパク質を選択的に認識する配向性分子インプリントポリマー薄膜の創製、第 66 回高分子学会年次大会、2017
 7. 砂山 博文、堀川 諒、北山 雄己哉、竹内 俊文、バイオマーカータンパク質の高感度センシングを目指した多段階ポストインプリメンティング修飾による分子インプリントポリマー、日本薬学会第 137 年会、2017
 8. Sunayama, H., Takeuchi, T., Regulation of protein recognition activities of molecularly imprinted polymer by site-directed post-imprinting modifications, 日本化学会第 97 春季年会、2017
 9. 松本 大樹、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文、前立腺特異抗原検出のための分子インプリントポリマーナノ薄膜の創製、日本分析化学会第 65 年会、2016
 10. 松本 大樹、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文、前立腺特異抗原認識空間を有するポストインプリメンティング修飾分子インプリントポリマー薄膜の創製、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016
 11. Takeuchi, T., Sasao, R., Kitayama, Y. Protein-imprinted nanocarriers for drug delivery system, MIP 2016
 12. Sunayama, H., Takeuchi, T. Post-imprinting modification on molecularly imprinted polymers for regulation of molecular binding activity, MIP 2016
 13. 堀川 諒、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文、ポストインプリメンティング修飾によるバイオマーカータンパク質の高感度検出材料の創製、第 65 回高分子学会年次大会、2016
 14. 松本 大樹、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文、前立腺特異抗原を高感度に検出する分子インプリントポリマー薄膜の構築、第 65 回高分子学会年次大会、2016
 15. 松浦 亮、高野 恵里、田和 圭子、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文、分子インプリントポリマー修飾プラズモニクチップによるヒト血清アルブミンの高感度プラズモニクセンシング、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016
 16. Sunayama, H., Takeuchi, T., Bio-inspired Post-polymerization Modifications of Molecularly Imprinted Protein Recognition Nanocavity for Acquiring Signal

Transducing Function of Binding Events into Fluorescence Change. Pacificchem 2015

17. Horikawa, R., Sunayama, H., Kitayama, Y., Takeuchi, T., Highly sensitive signaling molecularly imprinted nanocavity for biomarker proteins prepared via post-imprinting in-cavity functionalization, Pacificchem 2015
18. Takeuchi, T., Horikawa, R., Oshita, A., Sunayama, H., Kitayama, Y., Molecular recognition cavities for selective sensing of biologically active compounds prepared by molecular imprinting and following post-imprinting modifications, 16 th Tetrahedron Symposium, 2015
19. Matsuura, R., Kitayama, Y., Tawa, K., Takeuchi, T., Highly Sensitive Sensing of C-Reactive Protein Using Synthetic Polymer Receptor-Grafted Plasmonic Chips Based on Grating Coupled Surface Plasmon-Field Enhanced Fluorescence, 4th International Conference on Bio-Sensing Technology, 2015

学会発表他 26 件

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Takeuchi, T., Sunayama, H., Takano, E., Kitayama, Y., Springer, Post-imprinting and in-cavity functionalization, In: Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology, 2015, 231 (95-106)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 検出対象の分析用センサ作製用基材、検出対象の分析用センサ、及び検出対象の分析

発明者: 竹内 俊文、北山雄己哉

権利者: 神戸大学

種類: 特許

番号: 2017-105588

出願年月日: 平成 29 年 5 月 29 日

国内外の別: 国内

名称: 分子インプリントポリマーの製造方法、分子インプリントポリマー、および標的タンパク質の検出方法

発明者: 竹内 俊文、砂山博文、高野恵里、濱田和幸、田和圭子

権利者: 神戸大学、システム・インスツルメンツ(株)

種類: 特許

番号: 特願 2016-39470

出願年月日: 平成 28 年 3 月 1 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fnc.scitec.kobe-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 俊文 (TAKEUCHI, Toshifumi)

神戸大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 70179612