

令和元年6月4日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01389

研究課題名(和文) 光応答性UCST型高分子の構築とスフェロイド形成制御

研究課題名(英文) Design of photo-responsive ureido polymers

研究代表者

嶋田 直彦 (Shimada, Naohiko)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：10423972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生理的条件下において高温溶解型の相分離挙動を示すウレイド高分子を培養細胞に添加した際、相分離温度以下で細胞凝集塊を形成し、相分離温度以上で単層へと戻ることを見出した。本研究は細胞にとってストレスの高い温度刺激ではなく光刺激によって相分離を起こす光応答性ウレイド高分子を作製し、細胞形態制御を光刺激によって行うことを目的とした。光応答性化合物であるアゾベンゼンを導入したウレイド高分子を設計、合成したところ、光照射によって相転移温度を変化させることが可能であった。この現象を利用して細胞培養用パターン化基板を作成したところ、スフェロイドと単層培養状態を一つのプレート上で達成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、光応答性高分子の添加と光照射の有無によってスフェロイド培養と単層培養を切り換えられる点である。このような材料は今までに存在しておらず非常に特徴的である。さらに、任意の大きさに光照射することができるフォトマスクを使うことで、スフェロイド径の制御が可能と考えられる。また、一つの培養皿で、再播種することなく、培養形態をシームレスに切り換えられることから、注目した一つの細胞がスフェロイド中と単層培養中において形態や遺伝子発現がどのように変化するかを、リアルタイムに調べることができ、学術的に意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that cells cultured as monolayer are aggregated to form spheroid by addition of UCST-type thermoresponsive ureido polymers blow phase separation temperature. However, thermal change as a stimulus may cause cell damages due to changing metabolism or biomolecular denaturation in the cell. In this study, we designed ureido polymers having azobenzene derivatives(Azo-PVU), which are photo sensitive molecules, for photo-responsive phase separation change. Azo-PVU showed photo-responsive phase change under cell culture condition. Also, we demonstrated that cell morphology could be controlled by local photo irradiation on the cell culture dish where the phase separated ureido polymer are deposited.

研究分野：生体高分子

キーワード：温度応答性高分子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

生理的条件下で低温溶解型（LCST 型）の相転移挙動を示す温度応答性高分子は数多く報告されている。特にポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)の発見は、医工学分野に革新的な進歩をもたらし、近年では数多くのバイオマテリアルやバイオテクノロジーへの応用がなされている。一方で、生理的条件下において LCST 型とは逆の温度応答性を示す高温溶解型(UCST 型)の高分子は非常に例が少なく、また相変化する温度（相転移温度あるいは相分離温度）も体温より低いため、バイオマテリアルへの応用がなされていなかった。近年、生理的条件下において、体温以上の相転移温度を有するいくつかの UCST 型高分子が報告されているが、バイオマテリアルへの応用は報告されていない。

我々は 2011 年にポリアリルウレア等のウレイド基を有する高分子（ウレイド高分子）が生理的条件下において UCST 型の相分離挙動を示し、分子量やウレイド基の導入率をコントロールすることで相分離温度を幅広い温度範囲（5–65°C）で自由に設定できることを示した。このような性質を利用して簡便かつ迅速なタンパク質分離やコアにウレイド高分子を持つ高分子ミセルによるモデル薬物内包等、バイオマテリアルの応用例を示してきた。また、最近、ウレイド高分子を培養液に添加しておくことで、温度変化をトリガーとしたスフェロイド（細胞凝集塊）培養と単層培養の制御ができることを示した。その原理は以下のように考えている。相分離温度以下（25 °C）において生じるウレイド高分子濃厚溶液が培養皿底面に付着する。そのため、細胞-培養皿表面間の相互作用が阻害され、細胞-細胞間の接着が向上しスフェロイドが形成する。相分離温度以上（37 °C）では培養皿底面に付着していた高分子濃厚溶液が培養液と相溶するため、細胞は培養皿表面の相互作用ができるようになり、単層状態に戻る。このように温度刺激によってスフェロイド培養と単層培養を切り替える培養方法は非常にユニークな手法であると思われる。しかし、温度刺激は細胞の代謝に大きく影響を与えてしまうことが懸念される。

### 2. 研究の目的

生理的条件下において高温溶解型の相分離挙動を示すウレイド高分子は世界的にも珍しい高分子である。我々はウレイド高分子が細胞に与える影響を調べたところ、細胞は相分離温度以下で細胞凝集塊を形成し、相分離温度以上で単層へと戻ることを見出した。しかし、温度刺激による培養状態の制御は細胞にとってストレスが高いと考えられる。本申請では、細胞にとって低ストレスな光刺激によって相分離を起こす光応答性ウレイド高分子を作製し、照射による細胞形態制御を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 光応答性ウレイド高分子- アゾベンゼン基導入ポリビニルウレア (Azo-PVU)の合成

N-ビニルホルムアミドを重合し、NaOH で処理することでポリビニルアミンを得た。得られたポリビニルアミンをシアン酸カリウムと反応することでポリビニルウレア(PVU)を合成した。光応答性アゾベンゼン誘導体をポリビニルウレアに縮合させることでアゾベンゼン基導入ポリビニルウレア (Azo-PVU, 図 1)を得た。アゾベンゼンの導入率は NMR 測定によって求めた。

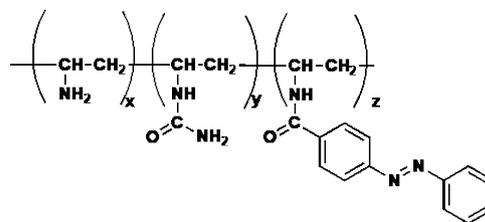


図 1 Azo-PVU の構造式

#### (2) 光照射反応

UV 照射には  $\lambda_{\text{max}}$ :372 nm, 30 mW の LED ライトを、Vis 照射には  $\lambda_{\text{max}}$ :453 nm, 40 mW の LED ライト(FOLS-01:澤木工房)をそれぞれ使用した。MilliQ に溶解させたポリマー溶液(2.0 mg/mL)を 10 mm の石英 8 連セルに 60  $\mu$ L 添加し、室温においてセルの横から光照射を行なった。相転移の可逆性を測定する際は 35 °C において 10 mM HEPES-NaOH(pH 7.5) 150 mM NaCl に分散させたポリマー溶液(1.0 mg/L)に対して光照射を行なった。また、顕微鏡観察の際は 340-390 nm のフィルター(U-FUW, OLYMPUS)を付けた水銀ランプ(130 W) (U-HGLGPS, OLYMPUS)を用いて UV 照射を行なった。また、異性化に影響を与えない光刺激として 530-550 nm のフィルター (U-FGW, OLYMPUS) を付けた水銀ランプを用いて光照射を行なった。

#### (3) 透過率曲線

ポリマー溶液の透過率の温度依存性は紫外-可視分光光度計(V-630:日本分光)を用いて、700 nm での透過率を測定した。2 分間光照射を行なったポリマー溶液に対して 20 mM HEPES-NaOH(pH 7.5) 300 mM NaCl を等量加えることで終濃度を 10 mM HEPES-NaOH(pH 7.5) 150 mM NaCl とした。温度を 1 °C/min の速度で降温させ 700 nm での透過率を測定した（ヒステリシス測定の場合は降温測定後、昇温測定を行なった）。700 nm の透過率が低下し始める温度を相転移温度(Tp)として算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 光異性化評価

PVU 側鎖に導入されたアゾベンゼンの異性化について、吸収スペクトル測定によって確認した。光照射前の Azo-PVU は 320 nm 付近に大きな吸収を持つことが分かり、熱的に安定度の高いトランス体の存在割合が大きいことが確認された。このサンプルに対して UV を 120 s 照射するとトランス体由来である 320 nm 付近のピークが小さくなり、シス体由来である 450 nm 付近のピークが大きくなった。このことから Azo-PVU 側鎖のアゾベンゼンが UV 照射によってトランスからシスへの光異性化が生じることが明らかとなった。

UV 照射時間による吸収スペクトルの変化を測定すると、Azo-PVU の光異性化は 60 s 程度で平衡状態になっていることが明らかとなった。このことを踏まえて今後の実験では平衡状態にするために光照射時間を 120 s とした。

また UV を照射した後のサンプルに対して Vis を照射すると 320 nm のピークが増大し、450 nm のピークが減少したことから(図 2)、シスからトランスへの光異性化も生じることが明らかとなった。つまり、この結果から Azo-PVU 側鎖のアゾベンゼンは、アゾベンゼンの特徴である照射波長による可逆的な異性化を有することが示された。

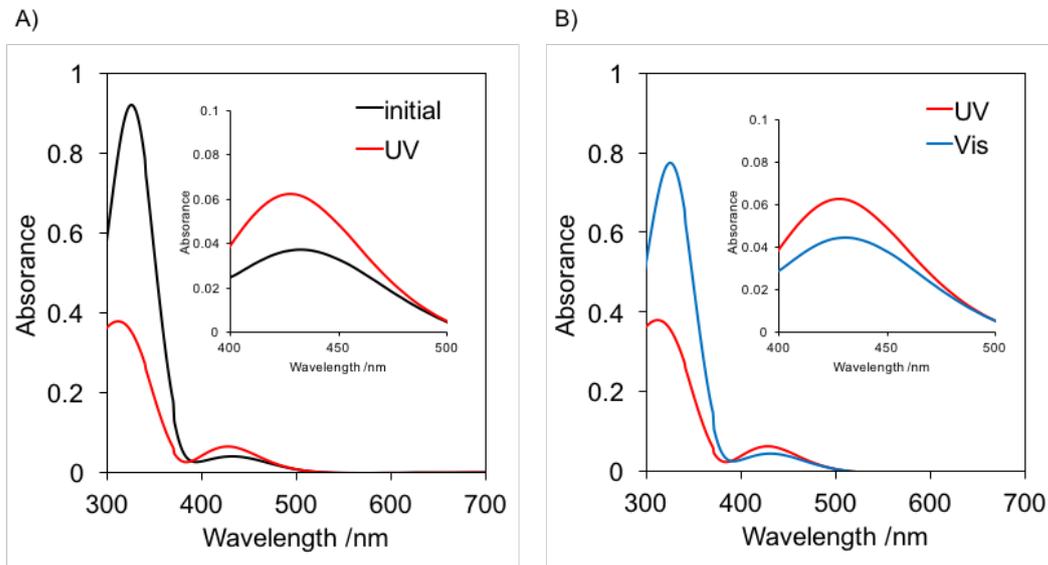


図 2 光照射後の Azo-PVU の吸収スペクトル

##### (2) 光異性化にともなった UCST 挙動の評価

Azo-PVU の光応答性を評価するために、UV または Vis を照射した溶液の透過率の温度依存性を測定した(図 3)。Vis を照射した Azo-PVU 溶液の  $T_p$  が 36 °C であるのに対して、UV 照射した場合の  $T_p$  は 28 °C となり、UV 照射によって  $T_p$  が低下することが確認された。また、UV/Vis どちらの場合においても、降温過程と昇温過程では相転移温度に約 5 °C のヒステリシスが存在した。

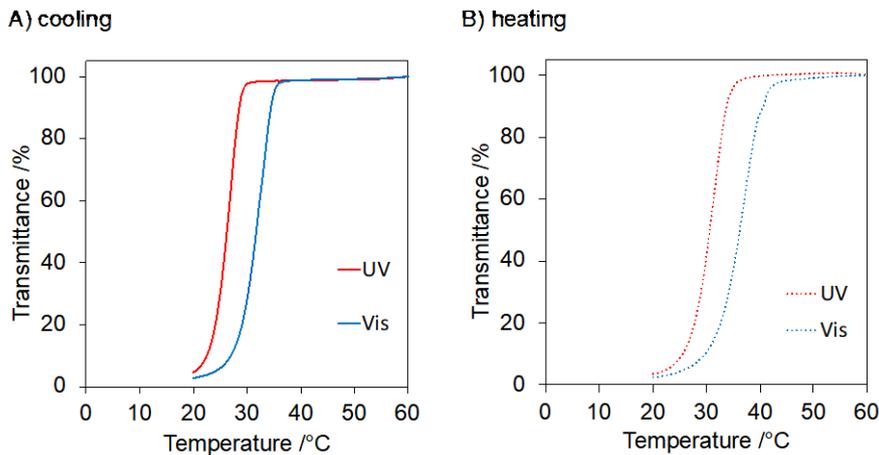


図 3 光照射後の Azo-PVU の透過率曲線

アゾベンゼン導入率と Azo-PVU の光応答性について評価するために、導入率の異なる様々な Azo-PVU を合成し  $T_p$  の変化を評価した。UV 照射、Vis 照射後の  $T_p$  はアゾベンゼン導入率の増加と共に、直線的に増加することが明らかとなった。さらに UV 照射後、Vis 照射後の  $T_p$  の差( $\Delta T_p$ )もアゾベンゼン導入率と比例関係であることが確認され、最大約 11 °C の  $\Delta T_p$  を示した高分子を得ることができた。LCST 型の高分子である pNIPAM にアゾベンゼンを導入した poly(Azam-co-NIPAM)では、 $\Delta T_p=2.0\sim 4.0$  °C でほぼ一定であることから、Azo-PVU は LCST 型の高分子に比べて、光刺激による  $\Delta T_p$  のシフトがより大きいことが示された。

### (3)光刺激による相転移制御

Azo-PVU の  $T_p$  が光刺激によって変化することを用いて、等温状態での光照射による相転移制御を試みた。37 °C において不溶化状態であるアゾベンゼン基を 4 モル%含む Azo-PVU に UV を 2 分間照射すると Azo-PVU が溶解することが明らかとなった。これは UV 照射によって  $T_p$  が 41 °C から溶液の温度である 37 °C より低い 32 °C に変化したためであると考察される。さらに溶解状態の Azo-PVU に Vis を 2 分間照射すると、再び不溶化することも観察されたことから、可逆的に相転移を光によって制御できることが明らかとなった(図 4)。

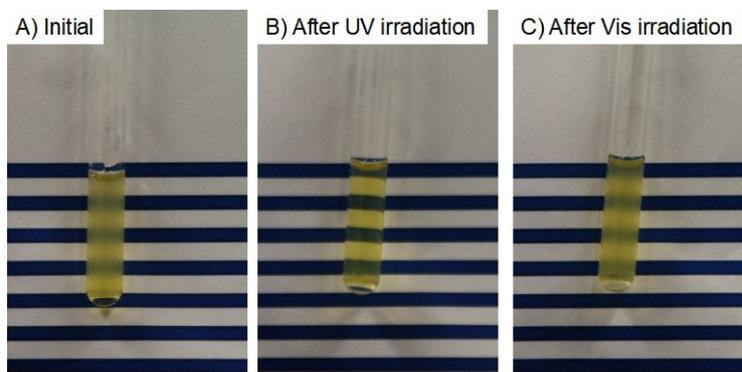


図 4 光照射による Azo-PVU の相分離制御

### (4)光照射によるパターン化培養基板の作成

Azo-PVU 溶液をカルチャーディッシュに添加後、 $T_p$  以下の温度である室温で静置し、カルチャーディッシュの底を顕微鏡観察すると、Azo-PVU は  $T_p$  以下で液滴であるコアセルベートを形成していることが明らかとなった。このことより Azo-PVU は従来のウレイド高分子同様にコアセルベート滴形成を伴う相転移挙動を示すことがわかった。局所的に UV(340-390 nm)を照射すると、UV 照射部分のコアセルベートが溶解する現象を確認した(図 5)。これは UV を照射した部分の Azo-PVU のみが光異性化によって  $T_p$  が 36 °C から 28 °C に低下したことにより、局所的な相転移が生じたためである。このパターン化基板に NIH3T3 細胞や HeLa 細胞を播種し、培養を行った。光照射によって基板底面のコアセルベートが溶解したエリアにおいて、細胞は伸展・接着している様子が観察された。一方で光未照射部位においては細胞凝集塊であるスフェロイドが形成していた。従来の温度変化によって培養形態を制御する場合、細胞の代謝等に影響を与える侵襲的問題点があったが、光応答性ウレイド高分子を使うことで、低侵襲的な光照射によって形態を制御できる可能性が示された。

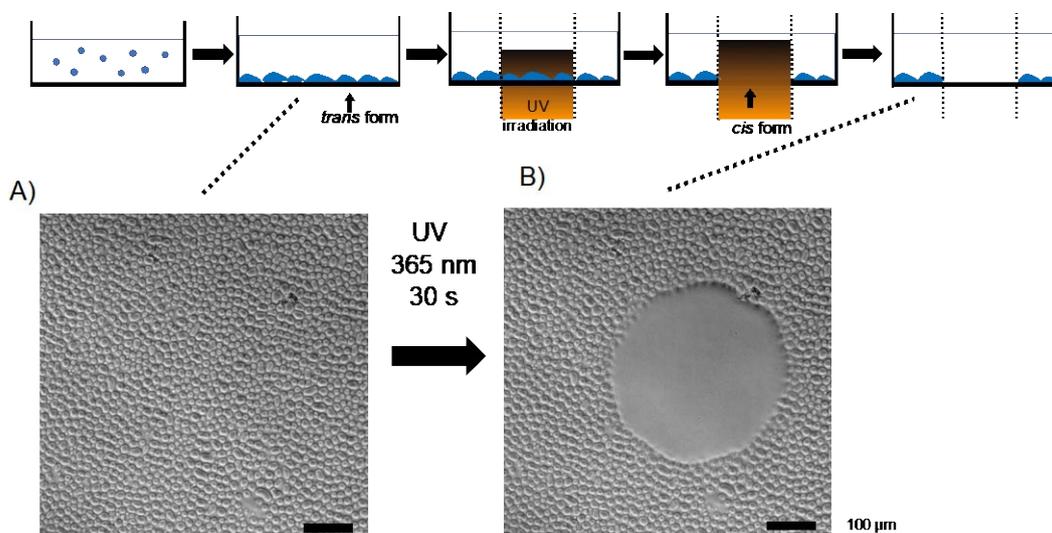


図 5 パターン化基板の作成

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Naohiko Shimada, Taira Sasaki, Takakuni Kawano, and Atsushi Maruyama, Rational Design of UCST-type Ureido Copolymers Based on a Hydrophobic Parameter, *Biomacromolecules* **19**, 4133-4138 2018 査読有
- ② Sotaro Kuroyanagi, Naohiko Shimada, Shota Fujii, Tadaomi Furuta, Atsushi Harada, Kazuo Sakurai, and Atsushi Maruyama Highly Ordered Polypeptide with UCST Phase Separation Behavior, *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 1261-1268 2019 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① 畔柳奏太郎、嶋田直彦、丸山厚 ウレイドポリペプチドの二次構造が UCST 型相転移挙動に与える影響 第 65 回高分子討論会 2016 年
- ② 佐々木泰、嶋田直彦、丸山厚、疎水基導入によるウレイド高分子の合理的な感温性設計 第 45 回医用高分子シンポジウム 2016 年
- ③ 嶋田直彦、齋藤美奈子、丸山厚、UCST 型温度応答性高分子を使った細胞培養形態スイッチング 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 2016 年
- ④ 嶋田直彦 齊藤 美奈子 丸山 厚、温度応答性 ウレイド高分子による 細胞培養形態制御 第 46 回医用高分子シンポジウム 2017 年
- ⑤ 佐々木泰、嶋田直彦、丸山厚、素側鎖高分子の温度応答に親水性および疎水性が与える影響、第 12 回相模ケイ素・材料フォーラム、2017 年
- ⑥ 嶋田直彦・佐々木泰・丸山厚、親疎水基を有するウレイド高分子の UCST 挙動とバイオマテリアルへの応用、第 66 回高分子討論会、2017 年
- ⑦ 池内尚、嶋田直彦、丸山厚、アゾベンゼンを有する UCST 型ウレイド高分子の設計と光応答性の評価、第 66 回高分子討論会、2017 年
- ⑧ 池内尚、嶋田直彦、丸山厚、アゾベンゼンを有する UCST 型ウレイド高分子の合成と相転移の光制御評価、第 39 回日本バイオマテリアル学会大会、2017 年
- ⑨ 池内尚、嶋田直彦、村山恵司、浅沼浩之、丸山厚、UCST 型ウレイド高分子へのアゾベンゼン基導入による相転移の光制御、第 67 回高分子学会年次大会、2018 年
- ⑩ 畔柳奏太郎、嶋田直彦、藤井翔太、櫻井和朗、丸山厚、UCST 型挙動を示すシトルリン共重合体の高次構造評価、第 67 回高分子学会年次大会、2018 年
- ⑪ 嶋田直彦・佐々木泰・丸山厚、アシル基導入ウレイド高分子の UCST 型挙動、第 48 回医用高分子シンポジウム、2018 年
- ⑫ 嶋田直彦、池内尚、村山 恵司、浅沼 浩之、丸山厚、アゾベンゼン基導入 UCST 型ウレイド高分子の相分離挙動の光制御、第 40 回バイオマテリアル学会大会、2018 年
- ⑬ Naohiko Shimada, UCST-Type Ureido Polymers as Biomaterials, China-Japan Joint Symposium on Biomaterials 2018 (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

- ① 嶋田直彦 丸山厚、エヌ・ティーエス、刺激応答性高分子ハンドブック 2018 年 (総ページ数 806 ページ)

〔産業財産権〕

なし

## 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：丸山 厚

ローマ字氏名：(Maruyama, atsushi)

※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。