

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300166
 研究課題名（和文）スマートバイオマテリアルとしての生体分子応答性ゲルの創製とその応用
 研究課題名（英文）Preparation of Biomolecule-Responsive Gels as Smart Biomaterials and Their Applications
 研究代表者
 宮田 隆志（MIYATA TAKASHI）
 関西大学・化学生命工学部・教授
 研究者番号：50239414

研究成果の概要：

本研究では、ドラッグデリバリーシステム(DDS)や医療診断センサーに利用できる新規なバイオマテリアルとして、様々なシグナル生体分子に応答する生体分子応答性ゲルの合成を試みた。特に、抗原や DNA などに応答して膨潤収縮する生体分子応答性ゲルの合成方法を確立し、その構造と応答挙動との関係を明らかにした。さらに、このような生体分子応答性ゲルの自律応答型 DDS や診断システムなどへの応用を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,400,000	0	7,400,000
2007年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	2,340,000	17,540,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：インテリジェント材料, ゲル

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、pH や温度などに応答する刺激応答性ゲルがドラッグデリバリーシステム(DDS)やインテリジェント細胞培養システムなどに利用されており、刺激応答性ゲルは次世代バイオマテリアルとして非常に注目されている。

(2) 医療分野などへの応用を目的とした場合、疾病のシグナルとなるタンパク質などの生体分子を認識して応答する生体分子応答

性ゲルの開発が強く要望されていた。しかし、その一般的な合成戦略が確立していないため、生体分子応答性ゲルはほとんど報告されていない状況であった。

(3) 研究代表者らは、これまでに生体分子複合体をゲルの可逆的架橋点として利用することにより、標的分子に対して応答膨潤する生体分子架橋ゲルや応答収縮する生体分子インプリントゲルの合成に世界で初めて成功していた。

2. 研究の目的

本研究では、ドラッグデリバリーシステム (DDS) や医療診断センサーに利用できる新規なバイオマテリアルとして、様々なシグナル生体分子に反応する生体分子応答性ゲルの合成を試みた。さらに、生体分子応答性ゲルを用いることによって、自律応答型 DDS や診断システムなどの構築を目指した。

(1) 新規な生体分子応答性の合成

抗原抗体結合や二本鎖 DNA を架橋点として利用することにより、標的分子を認識して膨潤収縮する新規な生体分子応答性ゲルの合成を試みた。

(2) 生体分子応答性ゲルのセンサー素子としての応用

蛍光ドナーからアクセプターへの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を利用することにより、生体分子応答性ゲルが反応する際に蛍光強度変化を示すセンサー材料の調製を目指した。

(3) 生体分子応答性ゲルを用いた薬物放出制御

生体分子応答性ゲルを利用し、シグナル生体分子に反応して薬物放出を制御できるシステムの提案を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規な生体分子応答性の合成

- ① 抗原抗体複合体をゲル架橋点として導入した抗原応答性ゲルの構造と応答挙動について検討した。
- ② 二本鎖 DNA をゲル架橋点として導入することにより、DNA 配列を認識して膨潤する DNA 応答性ゲルを合成した。
- ③ 腫瘍マーカー応答性ゲルを合成し、その構造と応答挙動との関係を検討した。

(2) 生体分子応答性ゲルのセンサー素子としての応用

- ① 高分子ゲル内における蛍光ドナーからアクセプターへの蛍光共鳴エネルギー (FRET) 現象を検討した。
- ② クロモフォア導入 DNA 応答性ゲルを合成し、FRET を利用したセンシングシステムを検討した。

(3) 生体分子応答性ゲルを用いた薬物放出制御

- ① 抗原応答性ゲル膜を調製し、抗原濃度に反応したモデル薬物の透過挙動を調べた。

4. 研究成果

(1) 抗原応答性ゲルの構造と応答挙動

抗原抗体複合体をゲル架橋点として利用することにより、抗原に反応して膨潤する抗原応答性ゲルを合成した。本研究では、抗原応答性ゲルを合成する際の条件と得られたゲルの構造が応答挙動に及ぼす影響を調べ、以下のような成果が得られた。

- ① 抗原および抗体への重合性官能基の導入量が得られた抗原応答性ゲルの応答挙動に大きく影響することがわかった。
- ② より多くの抗原抗体複合体をゲル架橋点として導入することにより、抗原応答性を向上できることが明らかとなった。
- ③ 抗原抗体複合体を導入したゲルの抗原応答性挙動は、標的抗原が存在するときゲルの架橋密度が減少するためであることが実験的に証明された (図 1, 2)。

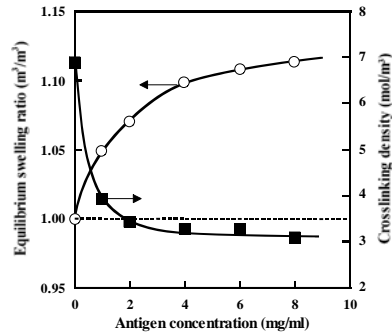


図 1 抗原応答性ゲルの膨潤率と架橋密度変化

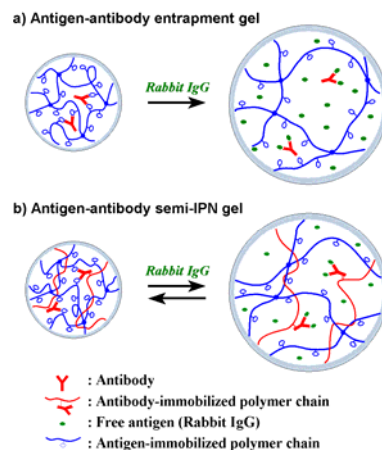


図 2 抗原応答性ゲルの抗原応答機構

(2) DNA 応答性ゲルの合成

二本鎖 DNA をゲル架橋点として導入し、標的 DNA を認識して膨潤する DNA 応答性ゲルの合成を試みた。その結果、以下のような成果が得られた。

- ① 一塩基ミスマッチを有する二本鎖 DNA を架橋点として導入したゲルは、完全相補となる DNA 存在下で次第に膨潤した (図 3)。
- ② 様々な配列を有する DNA に対する DNA

架橋ゲルの応答挙動を調べた結果、その配列によって異なる応答性を示した。

- ③ 二本鎖 DNA 架橋ゲルの膨潤率測定の結果、標的 DNA 存在下でゲル架橋密度が次第に減少することがわかった (表 1)。
- ④ したがって、DNA 架橋ゲルの DNA 応答性膨潤挙動は、架橋点として導入した DNA と標的 DNA との鎖交換によって架橋密度が減少するためであることが明らかとなった。

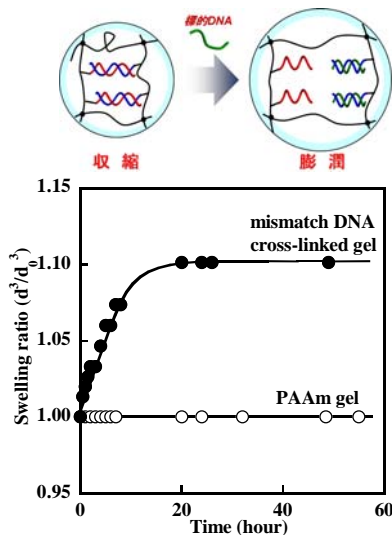


図 3 DNA 架橋ゲルの DNA 応答性膨潤挙動

表 1 DNA 架橋ゲルの弾性率と架橋密度

	G (kPa)	v_e (mol/m ³)
Only buffer	24.9	42.92
In Fullmatch DNA	15.4	29.18

(3) 腫瘍マーカー応答性ゲルの構造と応答挙動

腫瘍マーカーとして利用されている糖タンパク質を鋳型として用い、そのリガンドとしてレクチンと抗体を用いた生体分子インプリント法によって腫瘍マーカー応答性ゲルを合成し、その構造と応答挙動を検討した。

- ① ゲル架橋点としてポリエチレングリコール(PEG)鎖を有する架橋剤を利用し、腫瘍マーカーインプリントゲルを合成した。
- ② 腫瘍マーカーインプリントゲルは腫瘍マーカーが存在すると次第に収縮した。
- ③ 従来の低分子架橋剤を用いたゲルに比較して、PEG 鎖を有する高分子架橋剤を用いて合成したゲルの方がより顕著な腫瘍マーカー応答性を示した (図 4)。

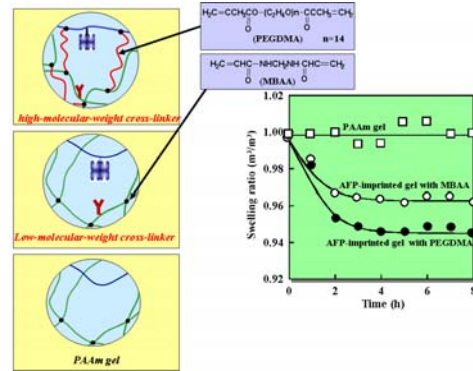


図 4 異なる架橋剤を利用した腫瘍マーカーインプリントゲルの腫瘍マーカー応答性

(4) クロモフォア導入ゲルへのモデル分子の吸着と蛍光共鳴エネルギー移動

生体分子応答性ゲルをセンサーなどに利用するため、第一段階としてゲル内における蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)現象について検討し、次のような成果が得られた。

- ① 蛍光ドナー分子を導入したポリアクリル酸ゲル(PAAc)の合成に成功した。
- ② 蛍光ドナー導入 PAAc ゲルに正電荷を有する蛍光アクセプターを吸着させると、蛍光ドナーからアクセプターへの FRET 挙動が観測された (図 5)。
- ③ 蛍光寿命を測定し、その緩和時間を求めることによって、ゲル内で蛍光ドナーが結合している網目の運動性に二種類のモードが存在することがわかった。
- ④ したがって、ゲル内においても蛍光ドナーからアクセプターへの FRET 挙動が観測され、センサー素子として利用する場合に有用なシステムであると考えられた。

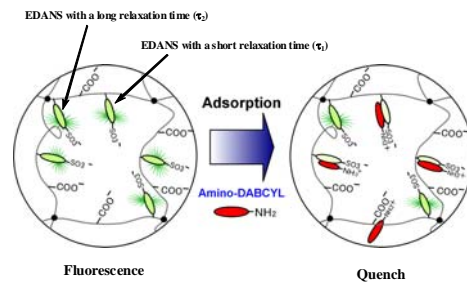


図 5 ゲル内における FRET 挙動

(5) クロモフォア導入DNA応答性ゲルの FRET 挙動

二本鎖 DNA 架橋ゲルに蛍光ドナーとアクセプターを導入し、その FRET 挙動を調べた結果、以下のような成果が得られた。

- ① 架橋点として導入する二本鎖 DNA に蛍光ドナーとアクセプターを結合させたクロモフォア導入 DNA 架橋ゲルの合成に成功した。

- ② 標的 DNA 存在下でクロモフォア導入 DNA 架橋ゲルも次第に膨潤し, DNA 応答性を示した。
- ③ クロモフォア導入 DNA 架橋ゲルが標的 DNA に応答して膨潤する際, 蛍光ドナーからアクセプターへの FRET 挙動が大きく変化し, その蛍光強度も大きく増加した (図 6)。
- ④ クロモフォア導入 DNA 架橋ゲルは標的 DNA に応答して膨潤率と蛍光強度を同時に変化させることから, バルクゲルではなく, 薄膜化することによって DNA センサーとして利用することが期待できる。

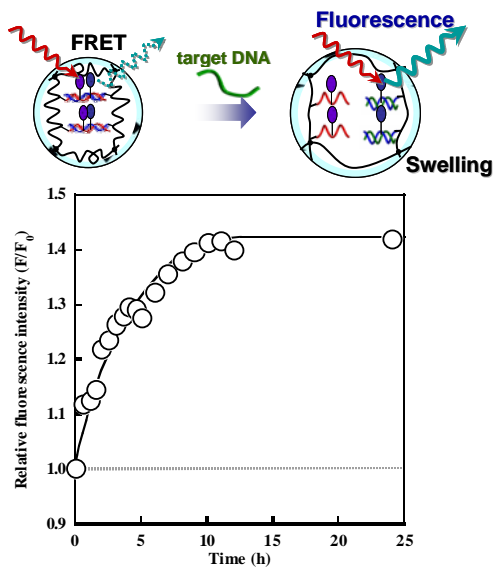


図 6 標的 DNA に応答したクロモフォア導入 DNA 架橋ゲルの蛍光強度変化

(6) 抗原応答性ゲルを用いた薬物放出制御

抗原抗体複合体を架橋点として導入したゲル膜を調製し, 抗原濃度に応答したモデル薬物の透過挙動を調べた。その結果, 以下のような成果が得られた。

- ① 抗原応答性ゲル膜は, 外部抗原濃度が高い場合にはモデル薬物を透過させたが, その濃度が低下すると薬物放出を抑制した (図 7)。
- ② モデル薬物のサイズによって抗原応答性透過挙動は異なり, 薬物放出を制御するための最適なゲル網目サイズにゲル構造を設計する必要が示された。
- ③ したがって, 抗原応答性ゲルは身体の異常などを示すシグナルとなる生体分子に応答して薬物放出を制御できるシステムを構築する上で有用であると考えられた。

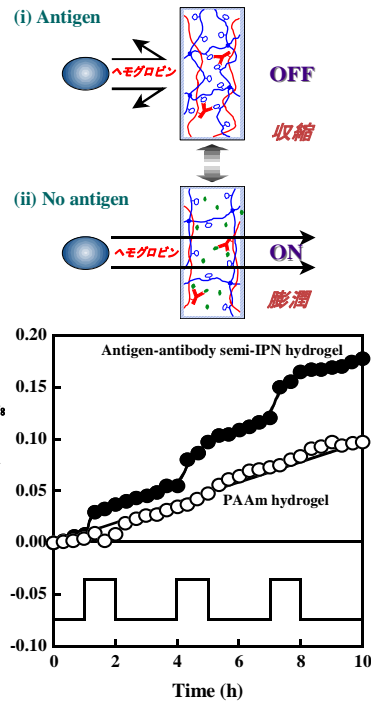


図 7 抗原応答性ゲル膜による薬物透過挙動

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 4 件)

- ① T. Miyata, Smart Hydrogels That Respond to Target Biomolecules, *Adv. Sci. Tech.*, 57, 15-21 (2008). 査読有
- ② K. Okawa, T. Miyata, T. Urugami, Fluorescence Resonance Energy Transfer by Quencher Adsorption into Hydrogels Containing Fluorophore, *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.*, 44, 3245-3252 (2006). 査読有
- ③ T. Urugami, K. Ueguchi, M. Watanabe, T. Miyata, Preparation of Urease-Immobilized Polymeric Membranes and Their Function, *Catalysis Today*, 118, 158-165 (2006). 査読有
- ④ T. Miyata, N. Asami, K. Okawa, T. Urugami, Rapid Response of a Poly(acrylamide) Hydrogels Having Semi-Interpenetrating Polymer Network (semi-IPN) Structure, *Polym. Adv. Tech.*, 17, 794-797 (2006). 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① T. Miyata, Preparation of Smart Hydrogels that Respond to Target Biomolecules, Japan-Korea Polymer Young Scientist Symposium (招待講演), 2008 年 10 月 23 日, Niigata
- ② 宮田隆志, 分子複合体を利用したス

マートソフトマテリアルの創成 (受賞講演), 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 25 日, 大阪

③ T. Miyata, Biomolecule-Responsive Hydrogels Prepared by Molecular Imprinting (招待講演), 5th International Workshop on Molecular Imprinting (MIP2008), 2008 年 9 月 7 日, Kobe

④ 宮田隆志, 生体分子応答性ゲルの創製 (招待講演), 第 24 回日本DDS学会学術集会, 2008 年 6 月 29 日, 東京

⑤ T. Miyata, Smart Hydrogels That Respond to Target Biomolecules (招待講演), 3rd International Conference Smart Materials, Structures and Systems (CIMTEC2008), 2008 年 6 月 9 日, Acireale

⑥ 宮田隆志, 大庭千尋, 大川香織, 浦上 忠, 標的DNA に応答するバイオコンジュゲートゲルの構造と配列認識挙動, 高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 29 日, 神奈川

⑦ T. Miyata, Y. Hishida, K. Okawa, T. Urugami, T. Uchi, Y. Ohya, SNPs Recognition Behavior of DNA-Responsive Hydrogels Prepared by Biomolecular Imprinting, The 10th Pacific Polymer Conference, 2007 年 12 月 6 日, 神戸

⑧ 宮田隆志, 南辻 睦, 浦上 忠, クロモフォアを導入したDNA 応答性ゲルの合成とその認識応答挙動, 日本バイオマテリアル学会, 2007 年 11 月 26 日, 大阪

⑨ 宮田隆志, 大川香織, 大庭千尋, 治下正志, 浦上 忠, 生体分子を認識する刺激応答性ゲルの構造と認識応答挙動, 繊維学会秋季研究発表会, 2007 年 10 月 26 日, 京都

⑩ 宮田隆志, 生体分子認識能を有するスマートソフトマテリアルの創製 (展望講演), 化学工学会第 39 回秋季大会, 2007 年 9 月 13 日, 札幌

⑪ T. Miyata, N. Asami, T. Urugami, Preparation of Smart Membranes That Control Drug Permeation in Response to Target Biomolecules (招待講演), The Fourth Conference of Aseanian Membrane Society (AMS4), 2007 年 8 月 17 日, Taipei

⑫ T. Miyata, K. Okawa, C. Ohba, M. Jige, Tadashi Urugami, Smart Bioconjugated Hydrogels That Respond to Target Biomolecules, GelSymposium2007, 2007 年 8 月 6 日, 東京

〔図書〕 (計 4 件)

① T. Miyata, Biomolecule-Responsive Gels: Design of Smart Gels Using Biomolecular Interactions, Bottom-Up Nanofabrication: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films (eds. K. Ariga, H. S. Nalwa), American

Scientific Publishers, Volume 6, Chapter 9, 137-150 (2009).

② 宮田隆志, 生体分子応答性ゲル, 環境調和型新材料シリーズ-生体材料, 日刊工業新聞社, 178-186 (2008).

③ 宮田隆志, 生体分子応答性ゲル, 医療用ゲルの最新技術と開発 (吉田 亮監修), シーエムシー出版, 127-144 (2008).

④ 宮田隆志, 接着と界面化学, 接着ハンドブック第 4 版 (日本接着学会編), 日刊工業新聞社, 2.1 章, 31-55 (2007).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 核酸応答性ゲルおよびその製造方法ならびにその利用

発明者: 宮田隆志, 浦上 忠

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構, 学校法人関西大学

種類: 特許権

番号: 特願 2008-116058

出願日: 2008 年 4 月 25 日

国内外の別: 国内

名称: 核酸応答性ゲルおよびその製造方法ならびにその利用

発明者: 宮田隆志, 浦上 忠, 大川香織

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構, 学校法人関西大学

種類: 特許権

番号: 特願 2007-5227 (特願 2006-6712 の国内優先権主張)

出願日: 2007 年 1 月 12 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

平成 20 年度 高分子学会 Wiley 賞 受賞

「分子複合体を利用したスマートソフトマテリアルの創成」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 隆志 (MIYATA TAKASHI)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号: 50239414