

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19300170

研究課題名（和文） 刺激応答型ポリロタキサンを用いた多価リガンド運動性制御に基づく細胞代謝調節

研究課題名（英文） Modulation of cellular metabolism based on controlling the mobility of multivalent ligands using stimuli-responsive polyrotaxanes

研究代表者

由井 伸彦（YUI NOBUHIKO）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：70182665

研究成果の概要（和文）：

刺激応答型ポリロタキサンによる細胞応答の制御を目指して、各種ルーズフィット型ポリロタキサンの合成ならびに刺激応答特性の解析、およびマンノース導入ポリロタキサンの認識タンパク質および細胞との相互作用の解析を行った。ポリロタキサンの有する環状分子の可動性に基づいた追加包接挙動や温度応答性、認識タンパク質との結合性亢進、マクロファージからの抗炎症性サイトカイン産生などが明らかとなり、分子運動性を有するリガンドが細胞応答を調節する上で有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

In order to aim at controlling cellular response via stimuli-responsive polyrotaxanes, the preparation of a variety of polyrotaxanes, the characterization of their properties, and the protein and cellular responses to these polyrotaxanes were performed. Macromolecular inclusion of loose-fit polyrotaxane, temperature-responsive polyrotaxane formation, enhanced binding of mannose-conjugated polyrotaxane with specific protein, and the production of anti-inflammatory cytokine from macrophages were clarified in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

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：細胞工学、生体機能材料、リガンド導入ポリロタキサン、多価相互作用

1. 研究開始当初の背景

細胞機能を人為的に制御するため、遺伝子工学的手法を用いた生理活性タンパク質の発現制御や、水溶性高分子や微粒子にリガンドを導入してレセプターを介した遺伝子導入が近年行われている。生体はナノ空間レベルで精密に分子間相互作用を調節しており、

それを模倣するためにはナノレベルでのリガンド導入を精密かつ任意に行う技術が必要となる。こうした背景のもとに従来から両親媒性高分子などの自己組織化によって表面にナノレベルでリガンドを導入する方法が盛んに行われてきたが、レセプターの空間的配置に応じて柔軟にリガンド分子の位置

を移動できるようなバイオマテリアル設計は不可能であった。

これに対して研究代表者らは、ポリロタキサン中の環状分子に導入したリガンドが線状高分子鎖に沿って自由に運動(移動・回転)できる特徴を活かして、レセプター・タンパク質との多価相互作用を飛躍的に充進する特徴を見いだしてきた。そこで、線状高分子鎖と CD との相互作用を任意に制御できる超分子構造因子を明らかにし、リガンド運動性の ON-OFF 調節とそれによるモデルレセプタータンパク質の分子認識性への影響を検討することを考案した。

2. 研究の目的

本研究では、多数の生体認識リガンド導入 α -シクロデキストリン(α -CD)空洞部を貫通したポリエチレングリコール(PEG)-ポリエチレンジイミン(PEI)・ジブロック共重合体両末端をキャップしたポリロタキサンを合成し、その外部刺激に応答した α -CD 運動性の ON-OFF 調節から膜タンパク質との多価結合性を制御し、最終的にはリガンド運動性の ON-OFF 調節に基づいた細胞代謝機能の制御を目指す。最終的には、外部刺激に応じた膜タンパク質とリガンドとの多価結合性の ON-OFF 調節によって、細胞内外代謝への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) γ -CD と PEG からなるルーズフィット型ポリロタキサンの合成と包接特性解析: γ -CD と PEG との包接錯体を調製し、その上で PEG 末端に β -CD 誘導体を導入して、複数の γ -CD 分子空洞部を PEG が一分子貫通した骨格を有するルーズフィット型ポリロタキサンの合成を検討した。更に、このポリロタキサンの有する γ -CD 空洞の余剰空間に対する各種水溶性高分子鎖の包接錯体形成を分光学的に解析した。

(2) α -CD とポリ乳酸-PEG・トリブロック共重合体とからなるポリロタキサンの自己集合化による調製:PEG を開始剤としたラクチドの開環重合によりポリ乳酸-PEG-ポリ乳酸のトリブロック共重合体を調製し、これと α -CD との包接錯体形成を経由して親-疎水性のポリロタキサンを合成した。更に、このポリロタキサンの水分散性を動的な光散乱測定により解析した。

(3) β -CD とダンベル型末端 PEG からなるルーズフィット型ポリロタキサンの温度応答型形成特性解析:PEG 末端に嵩高いダンベル型置換基を導入し、 β -CD との混合に際して加熱時に平衡が包接錯体形成に偏る性質を利用して、温度応答型ポリロタキサン形成を試みた。更に、 β -CD を複数連結したダイマーおよびテトラマーを調製し、温度応答型

ポリロタキサン形成を、ネットワーク形成による粘弾性挙動に着目して解析した。

(4) リガンド導入ポリロタキサン設計のためのアジド化ポリロタキサンの合成:モノ、ジ、トリアジド化 CD を調製し、これと PEG (分子量 3000、20000) との包接錯体を調製し、それをもとにしたアジド基密度を制御したポリロタキサンの合成を無溶媒系および有機溶媒系にて検討した。

(5) マンノース導入ポリロタキサンのコンカナバリン A(Con A)との多価相互作用の速度論的解析:Con A 固定化密度の異なる金基板を調製し、それを利用してマンノース導入ポリロタキサンの結合を表面プラズモン共鳴分光により速度論的に解析した。更には、蛍光物質(FITC あるいはローダミン)を導入した Con A を用いて、マンノース導入ポリロタキサンとの結合におけるマンノース可動性の効果を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により解析した。

(6) マンノース導入ポリロタキサンとの相互作用によるマクロファージの応答:マクロファージ様株化細胞(J774.1 細胞)を用いて、マンノースレセプター介在型エンドサイトーシスを細胞形態観察により、更にはエンドサイトーシスによる J774.1 細胞のサイトカイン産生を抽出 RNA から逆転写により変換した cDNA の PCR 増幅によって検討し、得られた結果をマンノース導入 CD、マンノース導入ポリアクリルアミド、マンナンの場合と比較した。

4. 研究成果

(1) γ -CD と PEG からなるルーズフィット型ポリロタキサンの合成と包接特性解析: γ -CD と PEG からなる包接錯体の両末端に β -CD 誘導体を導入したところ、再現性よく定量的に所望のルーズフィット型ポリロタキサンを得た。PEG が一分子包接されたルーズフィット型構造形成の単一性は、質量分析ならびに末端 β -CD 誘導体へのアダマンタンカルボン酸の包接挙動の Job プロットにより確認した。ポリロタキサンを塩基性環境下で可溶化し別途 PEG を添加して再び中性に戻して得られたポリロタキサンには、加えた PEG が包接されていることが広角 X 線回折により判明し、この包接錯体形成が可逆的であることも明らかとなった(図 1)。また、ポリロタキサン中の γ -CD を部分的にメチル化して水溶性とし、中性環境下で各種水溶性高分子(PEG および PEI)を添加したところ、これら高分子

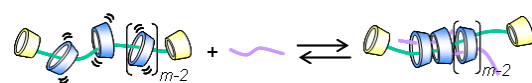


図 1. ルーズフィット型ポリロタキサンによる高分子の可逆的な追加包接

鎖の追加包接が NMR および ITC 測定によって確認された。追加包接挙動は PEI において著しく、また分子量の影響が認められ、ポリロタキサン之余剰空間を利用した追加高分子包接が世界で初めて証明された。

(2) α -CD とポリ乳酸-PEG・トリブロック共重合体とからなるポリロタキサンの自己集合化による調製：得られたポリロタキサンの DMSO 溶液を調製し、その水に対する透析によってポリロタキサンの自己集合体を得た (図 2)。この自己集合体は、合成の出発物質であるトリブロック共重合体の 2 倍の大きさの粒径を有していることが動的光散乱測定によりわかった。更には、モデル薬物としてカルセインの導入を検討したところ、自己集合体内部にカルセインの内包水層を有することも明らかとなった。

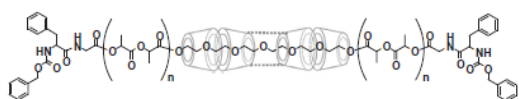


図 2. α -CD とポリ乳酸-PEG・トリブロック共重合体とからなるポリロタキサン

(3) β -CD とダンベル型末端 PEG からなるルーズフィット型ポリロタキサンの温度応答型形成特性解析：PEG 末端に適切な大きさのダンベル型置換基を導入することにより、過熱をトリガーとした超分子ネットワーク形成、および希釈によるネットワーク解離を可逆的に制御可能な系を構築することが明らかとなった。その際に、形成する超分子ネットワークは、ダンベル型 PEG の分子量、連結された β -CD 数によって制御可能であることが明らかとなった。これらは、本来は包接錯体を形成しない組み合わせである β -CD と PEG とにおいて、適切な末端基設計によって温度にตอบสนองしてポリロタキサンを形成する機能を付与することが可能であることを示しており、今後のポリロタキサン設計指針として有用であると考えている。

(4) リガンド導入ポリロタキサン設計のためのアジド化ポリロタキサンの合成： α -CD へのアジド基の導入によって水に対する溶解性が著しく低下したため、通常の α -CD と PEG とからなるポリロタキサンと同様な方

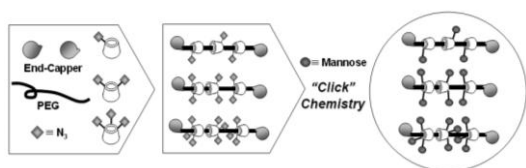


図 3. クリック反応によるモノー、ジマー、トリマンノース導入ポリロタキサンの合成

法では合成できなかった。また、無溶媒系での合成では収率が著しく低く、実用的でない事も判明した。そこで種々の有機溶媒系で検討したところ、DMSO : 水 (1 : 1) 混合溶媒系で 30%以上の収率で合成できることが分かった。また、包接錯体形成と末端キャップ反応とを連続して実施できることから、従来よりも簡便にポリロタキサンを合成することも明らかとなった。これらポリロタキサンにクリック反応を利用して各種リガンド (マンノースやホスホリルコリン基) を導入したところ、定量的にリガンドを導入できることがわかった (図 3)。

(5) マンノース導入ポリロタキサンのコンカナバリン A (Con A) との多価相互作用の速度論的解析：ポリロタキサンは、従来から報告されているポリアクリルアミドに導入したマンノースや天然多糖であるマンナンよりも有意に Con A 固定化表面と相互作用し、その結合定数は 100 倍以上であった (図 4)。ポリロタキサン中では、PEG 分子量 20000 が 3000 よりも、ジマンノース系がモノマンノースやトリマンノース系よりも結合定数が大きく、多価結合における空間的配置の重要性が示唆された。こうしたマンノース導入

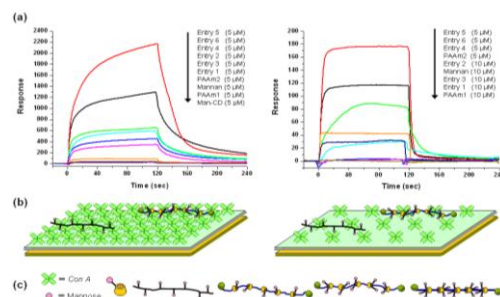


図 4. 高密度 (左) および低密度 (右) Con A 固定化表面へのマンノース導入ポリロタキサン結合の SPR センサーグラム

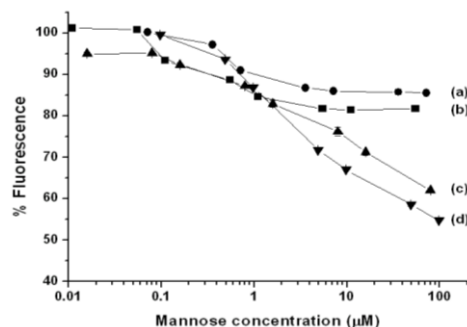


図 5. マンノース導入高分子の FITC-およびローダミン導入 Con A との結合による FRET 解析. (a)および(b): ポリアクリルアミド、(c)および(d): ポリロタキサン

ポリロタキサンにおける Con A 表面との高い結合定数は、速度論的解析によって結合速度定数の増大によるものであることがわかり、界面における動的因子の効果が裏付けられた。更に、異なる蛍光分子を導入した Con A を用いて、モノマンノース導入ポリロタキサンと Con A との相互作用を解析したところ、マンノース濃度上昇に伴った有意な FRET が認められ、マンノースと Con A との結合が隣接した CD の接近によってもたらされることが裏付けられ、Con A との多価相互作用における CD 可動性の効果が分光学的に実証された (図 5)。

(6) マンノース導入ポリロタキサンとの相互作用によるマクロファージの応答: マンノース導入ポリロタキサンを用いた際に J774.1 細胞の形態変化が最も著しく、先の SPR 解析での結果を裏付けるような多価相互作用がマクロファージにおいて確認された。更に遺伝子解析によってサイトカイン産生を検討したところ、マンノース導入ポリロタキサンでは炎症性サイトカインである組織壊死因子 (TNF- α) レベルが有意に上昇していたのに対して、マンノース導入ポリロタキサンでは抗炎症性サイトカインである変換成長因子 (TGF- β 1) レベルが上昇し

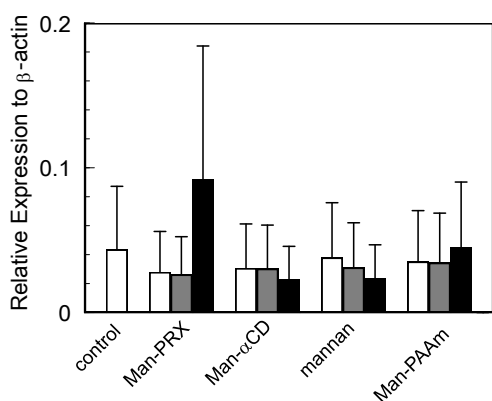


図 6. 48 時間後のマクロファージからの TGF- β 1 産生

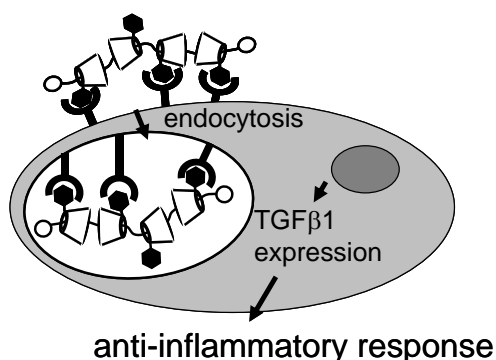


図 7. マンノース導入ポリロタキサンとの結合によるマクロファージの抗炎症性サイトカイン産生

ていた (図 6)。このことは、マンノース導入ポリロタキサンが単に効率的にマクロファージに結合するだけでなく、抗炎症性機能の誘導に効果的であることを示唆している (図 7)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① H. Hyun, N. Yui, Ligand accessibility to receptor binding sites enhanced by movable polyrotaxanes, *Macromolecular Bioscience*, 11, published online, 2011, 査読有
- ② T. Ehashi, H. Hyun, N. Yui, Anti-inflammatory response of mannose-conjugated polyrotaxane endocytosed by macrophage, *Macromolecular Research* 19, in press, 2011, 査読有
- ③ H. Hyun, N. Yui, Azidated polyrotaxanes for facile and efficient functionalization via click chemistry, *Macromolecular Rapid Communications*, 32, 326-221, 2011, 査読有
- ④ K. Nagahama, J. Ohmura, H. Sakaue, T. Ouchi, Y. Ohya, N. Yui, Preparation of nano-aggregates through self-assembly of amphiphilic polyrotaxane composed of PLLA-PEG-PLLA triblock copolymer and α -cyclodextrin, *Chemistry Letter*, 39, 250-251, 2010, 査読有
- ⑤ N. Yui, R. Katoono, A. Yamashita, Functional cyclodextrins polyrotaxanes for drug delivery, *Advances in Polymer Sciences*, 222, 55-77, 2009, 査読有
- ⑥ N. Yui, Supramolecular mobility in polyrotaxanes exploits biomedical functions, *Macromolecular Symposia*, 279, 158-162, 2009, 査読有
- ⑦ Y. Ohya, S. Takamido, K. Nagahama, T. Ouchi, R. Katoono, N. Yui, Polyrotaxane composed of poly-L-lactide and alpha-cyclodextrin exhibiting protease-triggering hydrolysis, *Biomacromolecules*, 10, 2261-2267, 2009, 査読有
- ⑧ A. Takahashi, R. Katoono, N. Yui, Loose-Fit Polyrotaxane Composed of γ -CD and Single PEG Chain: Making Room in γ -CD Cavity for Additional Inclusion Complexation, *Macromolecules*, 42, 8587-9589, 2009, 査読有

[学会発表] (計 23 件)

- ① H. Hyun, N. Yui, Kinetic analysis for multivalent interaction between mannose-conjugated polyrotaxanes and Con A-immobilized surface through SPR study,

- International Conference on Biomaterials Science 2011, 2011年3月17日, つくば
- ② N. Yui, Supramolecular polyrotaxanes as dynamic biomaterials, The 9th France-Japan DDS Symposium, 2010年9月27日, 熊本
 - ③ 由井伸彦, ポリロタキサンの構造的特徴に基づいたバイオマテリアルの設計, 第22回万有札幌シンポジウム, 2010年7月3日, 札幌
 - ④ H. Hyun, 上遠野亮, 三浦佳子, 由井伸彦, マンノース導入ポリロタキサンと Con A 固定化表面との間の多価相互作用における速度論的解析, 第27回シクロデキストリンシンポジウム, 2010年9月6日, 金沢
 - ⑤ N. Yui, Exploiting polyrotaxane structures as advanced biomaterials, JAIST-CNSI Workshop, 2010年1月18日, 北陸先端科学技術大学院大学
 - ⑥ 由井伸彦, バイオマテリアルとしての動的表面設計, 第10回リング・チューブ超分子研究会, 2009年12月11日, 東京大学柏キャンパス
 - ⑦ 高橋明裕, 上遠野亮, 由井伸彦, PEG と γ -CD からなる1分子鎖“すかさか”ポリロタキサン, 第26回シクロデキストリンシンポジウム, 2009年9月9日, 宇都宮市民ホール
 - ⑧ 大矢裕一, 長濱宏治, 高御堂成剛, 坂上浩美, 大内辰郎, 由井伸彦, ポリ乳酸を主軸とする生分解性ポリロタキサンのプロテアーゼをトリガーとした超分子解離による分解挙動, 第38回医用高分子シンポジウム, 2009年7月27日, 東京大学先端科学技術研究センター
 - ⑨ 齋藤祐介, 山口順, 上遠野亮, 三浦佳子, 由井伸彦, 糖鎖導入ポリロタキサンの多価相互作用への寄与, 第38回医用高分子シンポジウム, 2009年7月27日, 東京大学先端科学技術研究センター

[図書] (計1件)

- ① 由井伸彦 (分担執筆), エステーエス, 超分子サイエンス&テクノロジー (国武豊喜・監修), 2009年, 1186-1191 (総ページ数1340)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由井 伸彦 (YUI NOBUHIKO)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号: 70182665

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: