

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21881

研究課題名（和文）繰り返し応力集中を自動回避する超分子系生体組織接着剤の設計

研究課題名（英文）Design of supramolecular tissue adhesives for automatically avoiding repetitive stress concentration

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、リボフラビンを介した光架橋性ポリロタキサンを設計し、生体組織へのアンカーリングを試みた。リボフラビン存在下でアミノ基を修飾したポリロタキサンは光架橋し、15分以内にヒドロゲルを形成した。このヒドロゲルを用いてマウス線維芽細胞を培養すると、細胞はよく接着し、伸展した。さらに、ブタ大動脈の表面で光架橋すると、アミノ基を修飾したポリロタキサンは組織と強く接着した。これを組織の切開部に塗布して光架橋することで、切開部からの液漏れを止めることに成功した。このように光架橋型ポリロタキサンは、超分子を基盤とした組織接着性バイオマテリアルとして生体組織の修復・再生に応用できる可能性を有している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体材料と生体組織との吻合部におけるそれぞれの弾性率不一致（コンプライアンスミスマッチ）は、生物学的および材料学的観点から大きな課題となっている。例えば人工血管の場合、コンプライアンスミスマッチが大きいほど血流に擾乱が生じ、血栓形成や内膜肥厚が誘発される。また血流や血管収縮など連続的な繰り返し応力負荷による吻合部の疲労破壊や断裂が懸念される。ポリロタキサンは生体組織間で強く結合しながら生体組織の伸縮・変形に柔軟に追従することによって、接着界面での応力集中を自動的に回避する全く新しい機構を有する生体組織接着剤として期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we designed a riboflavin-mediated photocrosslinkable polyrotaxane for anchoring to biological tissues. In the presence of riboflavin, the amino group-modified polyrotaxanes photo-crosslinked and formed hydrogels within 15 minutes. When mouse fibroblasts were cultured on the hydrogels, the cells adhered and spread on the hydrogels. Furthermore, when photocross-linked on the surface of porcine aorta, the amino group-modified polyrotaxanes strongly adhered to the tissue. By applying this, the leakage of fluid from the incision of porcine aorta was successfully stopped. Thus, photocrosslinked polyrotaxane has the potential to be applied to repair and regeneration of biological tissues as a tissue-adhesive biomaterials based on supramolecules.

研究分野：バイオマテリアル科学

キーワード：ポリロタキサン 超分子 生体組織接着剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体材料と生体組織との吻合部におけるそれぞれの弾性率不一致(コンプライアンスミスマッチ)は、生物学的および材料学的観点から大きな課題となっている。例えば人工血管の場合、コンプライアンスミスマッチが大きいほど血流に擾乱が生じ、血栓形成や内膜肥厚が誘発される。また血流や血管収縮など連続的な繰り返し応力負荷による吻合部の疲労破壊や断裂が懸念される。そのため、接着剤と生体組織間で強く結合しながら、生体組織の伸縮・変形に伴う接着界面での応力集中を自動的に回避する全く新しい機構を有する生体組織接着剤の設計が求められている。そこで本研究では、超分子ポリロタキサンに着目した。ポリロタキサンは、多数の環状分子の空洞部を直鎖状高分子鎖が貫通し、その両末端を高い原子団(封鎖基)で封鎖した分子集合体である。その代表的な組み合わせとして、環状分子である $\alpha$ -シクロデキストリン( $\alpha$ -CD)と直鎖状高分子であるポリ(エチレングリコール)(PEG)がある。 $\alpha$ -CDには種々の官能基を修飾することができるため、例えばカルボキシ基やアミノ基を導入することによって生体由来分子と共有結合させることが可能である。またこの $\alpha$ -CDがPEG鎖に沿って自在に可動しうる構造特性を活用することによって、高分子マトリックスに高い強度や靱性を賦与することも期待できる。例えば $\alpha$ -CD部位を介して架橋したポリロタキサンヒドロゲルでは変形に伴って架橋点が移動するため、非常に優れた力学特性をもつことが報告されている。このようなポリロタキサンを応用するで、生体組織の伸縮・変形にともなう接着マトリックス内部の応力集中を自動的に回避できると仮説を立てた。しかしながら、これまで生体組織接着剤としてのポリロタキサンの活用はほとんど検討されてこなかった。特に、生体内で使用可能な合成試薬や化学反応を選定し、如何に安全にポリロタキサンを生体組織に接着させるのかについて、その方法論が全く議論されてこなかった。そこで本研究ではこれらの課題を解決するために、リボフラビン(RBF)の活用に着想した。RBFはビタミンB2として知られ、牛乳や緑黄色野菜などに含まれ細胞の成長・発達・機能に不可欠な栄養素である。またRBFの過剰摂取による毒性なども確認されていない。RBFはUV-A光(320~400nm)照射によりコラーゲンを架橋する光増感剤として作用することも知られており、すでに円錐角膜の治療として臨床応用されている。そこで今回、ポリロタキサンの接着マトリックスを構築するためにRBFを活用した光架橋と生体組織接着を試みた。

### 2. 研究の目的

“生体組織との高い接着性”と“組織変形にともなう繰り返し応力集中を回避する動的機械特性”を兼備する新規超分子系生体組織接着剤の設計を目的とする。アミノ基を修飾したポリロタキサンをRBFを介して光架橋することにより、生体組織に強固に接着したポリロタキサンヒドロゲルマトリックスを構築する。

### 3. 研究の方法

#### 3. 1 アミノ基およびメチル基を修飾したポリロタキサンの合成およびヒドロゲルの作製

両末端にアミノ基を修飾したPEGと $\alpha$ -CDを水中で混合し、擬ポリロタキサンを得た。続いて、両末端のアミノ基にアダマンタン誘導体を導入することでポリロタキサンを調製した後、その $\alpha$ -CD部位にメチル(Me)基およびアミノ(AE)基を修飾した(AEMe-PRX)。その際、アミノ基が光架橋反応に与える効果を調べるためにAE基修飾数の異なるAEMe-PRXを4種合成した。また参照試料として、メチル基のみを修飾したポリロタキサン(Me-PRX)を合成した。ポリロタキサンヒドロゲルを調製するためにRBF/PBS溶液(0.08 mg mL<sup>-1</sup>)にAE基修飾数の異なる一連のAEMe-PRXを溶解させた。その際、AEMe-PRXの濃度が10、50、100および200 mg mL<sup>-1</sup>となるよう調整した。各溶液を30 $\mu$ Lずつポリスチレン表面に滴下し、UV LED(365 nm, 7.03 mW cm<sup>-2</sup>)を用いて光架橋を施した(図1)。

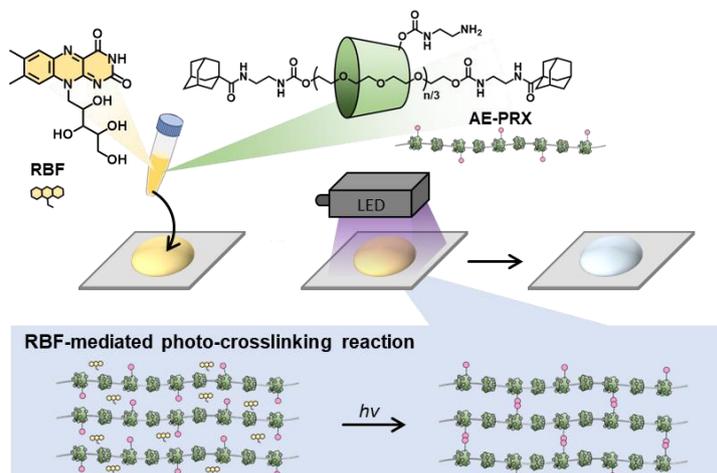


図1 AEMe-PRX ヒドロゲルの作製

### 3. 2 ポリロタキサンの毒性評価

マウス胚から樹立した線維芽細胞株である BALB/3T3 クローン A31 を、American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より入手し、毒性評価に使用した。BALB/3T3 細胞は、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン・ストレプトマイシンを含む DMEM 培地を用いて培養した。BALB/3T3 細胞を 96 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  細胞/ウェルの密度で播種し、24 時間培養した。AEMe-PRX をそれぞれ異なる濃度 ( $2.6 \times 10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$  から  $20.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) でウェルに加え、さらに 24 時間インキュベーションした後、細胞増殖アッセイキットを用いて細胞毒性を評価した。呈色した反応溶液は、マイクロプレートリーダーを用いて波長 450 nm の吸光度を測定した。

### 3. 3 生体組織への接着試験

ポリロタキサンの組織接着性評価には、家畜用のブタ (約 6 ヶ月齢) から採取した大動脈組織を使用した。RBF ( $0.08 \text{ mg mL}^{-1}$ ) と AEMe-PRX を混合した溶液を  $50 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$  の長方形にカットした大動脈組織上に滴下した。UV-A 光を 60 分間照射した後、ゲルの形成および組織への接着性を評価した。

次に大動脈組織を用いてリークテストを実施した。ブタの大動脈を管状のまま約 250 mm の長さで切断した。この大動脈の中央部付近の一部 (約 5 mm) を切開したところ、充填した PBS が切開部分から漏れ出ることを確認した。つぎに AEMe-PRX と RBF を含む混合溶液を 5mm の切開部に塗布し、UV-A 光を照射することで、切開部を接着することができるか否かについて評価した。

## 4. 研究成果

ポリロタキサンに水溶性を賦与するために、 $\alpha$ -CD 部位にメチル基を修飾した。81.1 分子の  $\alpha$ -CD と PEG ( $M_n=20200$ ) からなるポリロタキサンに対してヨードメタンを用いてメチル基を導入したところ、 $\alpha$ -CD1 分子あたり 10.8 分子の Me 基が修飾された。 $\alpha$ -CD 分子には理論上最大 18 分子の Me 基を導入することができるため、その置換率は約 60%であった。つぎに Me 基を修飾した  $\alpha$ -CD 部位にエチレンジアミンを用いて AE 基を修飾した。MePRX に対するエチレンジアミンの仕込み比を調整することで、AE 基数の異なる 4 種の AEMe-PRX を合成した。 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルより各ポリロタキサンに修飾された AE 基が、5.5 (AE6Me-PRX)、12.3 (AE12Me-PRX)、33.2 (AE33Me-PRX)、41.2 (AE41Me-PRX) であることを算出した。つぎに、RBF を用いた AEMe-PRX のゲル化条件について検討した。AE 基修飾数の異なる AEMe-PRX を RBF/PBS 溶液 ( $0.08 \text{ mg mL}^{-1}$ ) に溶かし、AEMe-PRX の濃度が 10 から  $200 \text{ mg mL}^{-1}$  になるように調整した。AE6Me-PRX と AE12Me-PRX ではポリロタキサン濃度に関わらずヒドロゲルの形成は認められなかったが、AE33Me-PRX と AE41Me-PRX ではそれぞれ  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  と  $200 \text{ mg mL}^{-1}$  の濃度でヒドロゲルの形成を確認した。また、RBF 非存在下 UV-A 光照射群および RBF 存在下 UV-A 光非照射群ではヒドロゲルの形成は確認されなかった。これらの結果は、ポリロタキサンヒドロゲルを形成するためには AE 基修飾したポリロタキサンおよび RBF、UV-A 照射の 3 要素のすべてが必要であることを示唆している。作製したヒドロゲルの膨潤特性を評価するために、室温で PBS 中のサイズ変化を観察した。AE33Me-PRX と AE41Me-PRX ヒドロゲルのサイズは、15 分以内に 4.1 倍、3.8 倍に増大した。AE33Me-PRX ヒドロゲルのサイズは 24 時間後に 8.1 倍まで増加したが、AE41Me-PRX ヒドロゲルのサイズ変化はほとんど認められなかった。この結果は、AE41Me-PRX ヒドロゲルは、AE33Me-PRX ヒドロゲルより架橋密度が高い可能性を示唆している。

AEMe-PRX の細胞毒性について細胞増殖アッセイキットを用いて解析したところ、 $2.6 \times 10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$  から  $20.0 \text{ mg mL}^{-1}$  の濃度範囲において AEMe-PRX に有意な細胞毒性は認められなかった。例えば AEMePRX ヒドロゲルを用いて細胞培養を行う場合、ポリマー重量と培地量から換算した AEMePRX 濃度は約  $12.0 \text{ mg mL}^{-1}$  となるが、そのようなポリマーが高濃度な環境においても AEMePRX は細胞毒性を示さないことが分かった。また AE33Me-PRX と AE41Me-PRX ヒドロゲルを用いて BALB/3T3 細胞を良好に培養することも可能であり、細胞接着率はそれぞれ  $31.6\% \pm 15.1\%$ 、 $40.9\% \pm 10.1\%$ 、細胞の伸展面積はそれぞれ  $607.1 \pm 225.7 \mu\text{m}^2$  および  $896.9 \pm 174.6 \mu\text{m}^2$  であった。

最後にブタ大動脈をモデル組織として、AE33Me-PRX および AE41Me-PRX ヒドロゲルの組織接着性を評価した。AEMe-PRX と RBF を含む PBS 溶液を生体組織の上に  $30 \mu\text{L}$  滴下し、UV-A 光を 60 分間照射した。その後、PBS 溶液中に浸漬することによって洗浄した。AEMe-PRX ヒドロゲルをポリスチレン表面上で作製した場合、PBS に浸けてから 10 分以内にヒドロゲルが自発的にポリスチレン表面から剥離したが、生体組織上で作製した場合にはそのような剥離は認められなかった。さらに、ヒドロゲルが接着した生体組織を垂直方向、水平方向、回転方向に伸張させると、ヒドロゲルは組織の変形に柔軟に従った。すなわち AEMe-PRX ヒドロゲルは強固かつ柔軟に生体組織と接着したことを示唆している。また約 5 mm の切開を加えたブタ大動脈を使用したリークテストにより、AEMe-PRX ヒドロゲルの光

架橋によって切開部を塞ぐことができることを実証した(図 2)。以上より、アミノ基を有するポリロタキサンを RBF の存在下で UV-A 光照射することでヒドロゲルを形成させるとともに生体組織表面に接着させることに成功した。In situ 光架橋型ポリロタキサンは、強靱で柔軟な組織接着剤、止血剤をはじめ、インジェクタブルヒドロゲル、3 次元プリンティング用ヒドロゲルとして生体組織の修復するためのバイオマテリアルとして期待できる。

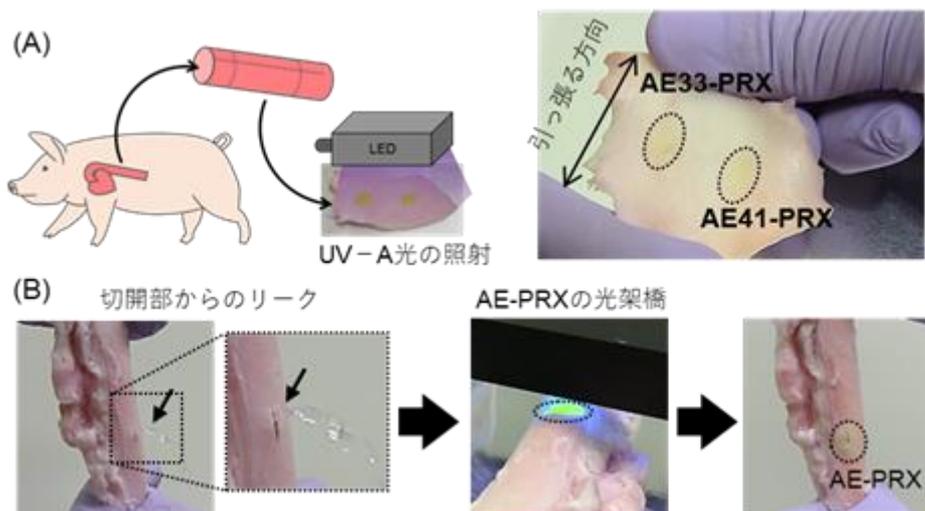


図 2. 生体組織に対するポリロタキサンヒドロゲルの接着

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- (1) Masahiro Hakariya, Yoshinori Arisaka, Hiroki Masuda, Tetsuya Yoda, Takanori Iwata, Nobuhiko Yui, Suppressed migration and enhanced cisplatin chemosensitivity in human cancer cell lines by tuning the molecular mobility of supramolecular biomaterials, *Macromolecular Bioscience* in press (2023), DOI: 10.1002/mabi.202200438 査読あり
- (2) Yuka Tanaka-Takemura, Yoshinori Arisaka, Masahiro Hakariya, Hiroki Masuda, Ryo Mikami, Ruriko Sekiya-Aoyama, Takanori Iwata, Tetsuya Yoda, Takashi Ono, Nobuhiko Yui, Independent roles of molecular mobility and zeta potential on supramolecular surfaces in the sequence of RAW264.7 macrophage responses, *Macromolecular Bioscience* 22 (11), 2200282 (2022), DOI: 10.1002/mabi.202200282 査読あり
- (3) Atsushi Tamura, Dae Hoon Lee, Yoshinori Arisaka, Tae Woong Kang, Nobuhiko Yui, Post-cross-linking of collagen hydrogels by carboxymethylated polyrotaxanes for simultaneously improving mechanical strength and cell proliferation, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 8 (2), 588-597 (2022), DOI: 10.1021/acsbomaterials.1c01521 査読あり
- (4) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Anchoring  $\alpha$ -cyclodextrin-based polyrotaxanes to biological tissues via riboflavin-mediated photo-crosslinking, *Materials Letters* 290, 129460 (2021), DOI: 10.1016/j.matlet.2021.129460 査読あり

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：有坂 慶紀

ローマ字氏名：ARISAKA Yoshinori

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：生体材料工学研究所

職名：助教

研究者番号（8 桁）：70590115

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hakariya Masahiro, Arisaka Yoshinori, Masuda Hiroki, Yoda Tetsuya, Iwata Takanori, Yui Nobuhiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Suppressed Migration and Enhanced Cisplatin Chemosensitivity in Human Cancer Cell Lines by Tuning the Molecular Mobility of Supramolecular Biomaterials	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2200438 ~ 2200438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202200438	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Takemura Yuka, Arisaka Yoshinori, Hakariya Masahiro, Masuda Hiroki, Mikami Ryo, Sekiya Aoyama Ruriko, Iwata Takanori, Yoda Tetsuya, Ono Takashi, Yui Nobuhiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Independent Roles of Molecular Mobility and Zeta Potential on Supramolecular Surfaces in the Sequence of RAW264.7 Macrophage Responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2200282 ~ 2200282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202200282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura Atsushi, Lee Dae Hoon, Arisaka Yoshinori, Kang Tae Woong, Yui Nobuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Post-Cross-Linking of Collagen Hydrogels by Carboxymethylated Polyrotaxanes for Simultaneously Improving Mechanical Strength and Cell Proliferation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 588 ~ 597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.1c01521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arisaka Yoshinori, Yui Nobuhiko	4. 巻 290
2. 論文標題 Anchoring $\alpha$ -cyclodextrin-based polyrotaxanes to biological tissues via riboflavin-mediated photo-crosslinking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Letters	6. 最初と最後の頁 129460 ~ 129460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matlet.2021.129460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	有坂 慶紀  (Arisaka Yoshinori)  (70590115)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教    (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------