

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12687

研究課題名(和文) 側鎖配列が制御されたモデル高分子を用いた高分子構造 - 生体適合性相関の解明

研究課題名(英文) Elucidation of polymer structure-biocompatibility relationship using model polymers with controlled side-chain sequences

研究代表者

小林 慎吾 (Kobayashi, Shingo)

九州大学・先端物質化学研究所・特任准教授

研究者番号：70625110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：側鎖配列が制御された新規定序性ポリオレフィンを合成し、構造と機能との相関性に関する検討から、生体適合性発現にかかる機序の解明と、抗血栓性材料への応用を目指した研究を行った。柔軟なポリエチレン主鎖を持つポリマー5種、剛直なシクロオレフィンポリマー主鎖を持つポリマー8種の合成に成功した。いずれの主鎖構造の場合でもPMEAに匹敵する抗血栓性と、コート膜安定性を発現する高分子が見出された。固体NMR法を用いた評価結果から、生体温度で高分子と水がより均一に混和している高分子ほど高い抗血栓性を発現していることが分かった。得られた高分子は、膜型人工肺などの表面コート材として有用であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子材料が発現する生体適合性を制御するためには、高分子材料-生体間相互作用の詳細を解明する必要がある。側鎖配列が制御された新規ポリオレフィンの構造-機能相関に関する本研究成果から、生体適合性高分子に必要な構造的・物性的特徴について理解を深めることができた。本研究で得たポリオレフィン系高分子は、疎水性が極めて高いにも関わらず高い抗血栓性を示し、優れた膜安定性をも示す。本研究成果は、従来の親水性・水溶性高分子に代わる新たな生体適合性材料の設計指針を示すものであり、その応用が期待されるとともに、医療分野における新しいバイオマテリアルの設計や医療デバイス開発、組織工学の進展に寄与することができる。

研究成果の概要(英文)：Novel polyolefins with controlled side-chain arrangements were synthesized, and the structure-function correlation was investigated to elucidate the mechanism of biocompatibility. Additionally, their potential application as anti-thrombogenic coating materials was explored. Five polymers with flexible polyethylene backbones and eight polymers with rigid cycloolefin polymer backbones were successfully synthesized. In both main chain structures, the polymers exhibited antithrombotic properties comparable to PMEA and demonstrated superior coating film stability. Solid-state NMR evaluations showed that polymers in which the polymer and water were more homogeneously miscible at biological temperatures exhibited higher antithrombotic properties. The obtained polymers were found to be useful as surface coating materials for extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) devices.

研究分野：高分子化学

キーワード：精密重合 定序性高分子 regio選択的重合 Grubbs触媒 開環メタセシス重合 血液適合性材料 バイオマテリアル

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体はタンパク質、核酸、多糖類などで構成された生体高分子複合体であり、例えば酵素などのタンパク質が発現する極めて高い機能は、厳密に制御されたアミノ酸配列に基づく高次構造の発現と、分子内/分子間の特異的/非特異的相互作用の制御によって達成されている。一方、合成高分子では、発現する物理化学的性質や生体適合性がそのモノマー配列に大きく影響を受けることが認識されていながら、生体と接触することを前提に用いられる医療用途においても、そのモノマー配列の制御にまで注意が払われることはないのが現状である。これは偏に、モノマー配列の制御にかかる高分子合成上の困難さに起因していると言える。

(1) 高分子の側鎖構造制御によるタンパク質吸着挙動の制御法の発見

我々は、炭素鎖長の異なる ω -メトキシアルキル基を側鎖に導入したポリアクリレート類について、発現する血小板粘着抑制能の変化と機序の解明に関する研究を行ってきた。その過程で、抗血栓性材料として臨床応用が達成されているポリ(2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA) の側鎖長を変更し、より疎水化したポリ(3-メトキシプロピルアクリレート) (PMC3A) が PMEA と同等の血小板粘着抑制能を発現することを見出した。また、その機能が極めて高いタンパク質吸着抑制能の発現に起因し、側鎖炭素鎖長の緻密な制御によりタンパク質吸着量を連続的に変化させ得ることを明らかにした (*Biomacromolecules*, 2017, 18, 4214.)。この結果は、高分子の生体適合性が、その一次構造に起因する高分子-タンパク質間相互作用によって規定されていることを示しており、高分子の一次構造と表面吸着タンパク質の挙動とを結ぶ機序を解明できれば、高分子の化学構造の適切な改変により、発現する生体親和性や材料表面への細胞接着挙動を自在かつ厳密に制御可能であることを示している。

(2) 側鎖間隔が制御された高分子を用いた水和状態 - 抗血栓性関連の証明

PMEA が血小板粘着抑制能を発現する機序については詳細な検討の結果が報告されており (*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2019, 92, 2043. など) その側鎖構造に起因した「中間水」と呼ばれる特異的な水和状態が、PMEA 表面における血中タンパク質の吸着と変性の抑制に関与しているとされている。この知見から、PMEA 側鎖の化学構造を変化させず、その導入間隔のみを緻密に制御すれば、側鎖-水相互作用の状態は変わらず、血小板粘着抑制能を系統的に変化させられると推察された。実際に、我々が見出した regio 選択的開環メタセシス重合法を用いて PMEA 側鎖の間隔が制御された高分子を合成して検証を行った結果、側鎖間隔の変更に伴って中間水量は増減し、中間水量と発現する血小板粘着抑制能は極めて高い相関性を示すことを確認できた (*Macromolecules*, 2020, 53, 19, 8570.)。この結果は、高分子の一次構造を厳密に制御すれば、水を介して行われる高分子-タンパク質間の相互作用を制御でき、タンパク質吸着挙動の制御を通じて、発現する生体親和性の制御が可能であることを明確に示している。

2. 研究の目的

本研究課題では、我々が独自に見出したビニル型高分子の側鎖配列制御を達成する合成手法を用いて新規規定序性高分子を合成し、得られた高分子の生体適合性材料への応用研究を通じ、生体親和性高分子の構造-機能相関について明らかにするとともに、高分子の側鎖配列制御による生体適合性の制御を達成することを目的とした。

3. 研究の方法

前述の PMEA はポリエチレンを主鎖骨格として有し、その側鎖には 2 炭素に 1 本の 2-メトキシエトキシカルボニル基が導入されている。PMEA においては、側鎖官能基と水の相互作用の状態が分光学的手法を用いた解析により明らかにされており、中間水はエーテル部分と相互作用していることが分かっている。また、申請者がこれまでに報告した血液適合性高分子 (*Biomacromolecules* 2017, 18, 1609.; 特願 2019-187569 など) の物理化学的特徴について固体 NMR 法を用いて解析した結果、高分子と水が共存する環境下において、とくに主鎖の運動性が高いことが重要であることを示唆する結果が得られている。

そこで本研究では、高分子主鎖の運動性の差異に関する解析と考察を行うため、合成する高分子の主鎖構造をポリオレフィン類に限定し、柔軟な主鎖構造としてポリエチレン骨格、剛直な主鎖構造としてシクロオレフィンポリマー骨格を選定した。加えて、側鎖官能基と水の相互作用の状態をより明確に解析するため、導入する側鎖官能基の構造を可能な限り統一・単純化した。

高分子の合成には regio 選択的開環メタセシス重合法を用い、主鎖二重結合に対して水素添加反応を行うことで側鎖間隔が制御された官能基化ポリオレフィンを得た。生体親和性評価はヒト血液を用いた血小板粘着試験によって行った。材料と水の相互作用に関する評価は、水の接触角測定、DSC 法を用いた水和状態の解析、固体 NMR 法を用いた高分子と水の運動性の解析を行った。得られた結果から生体親和性高分子の構造-機能相関について考察した。

4. 研究成果

(1) ポリエチレン主鎖を有する高分子の合成

ポリエチレンを主鎖に有する高分子は図1に示すスキームに従って合成を行った。得られた高分子のNMR、GPCを用いた構造解析の結果、側鎖間隔が制御され、3-メトキシプロピル基が2、4、5、7、8炭素おきに導入された高分子が得られていることを確認した。数平均分子量は20~96 kg/mol、分子量分布は1.4~1.9であった。

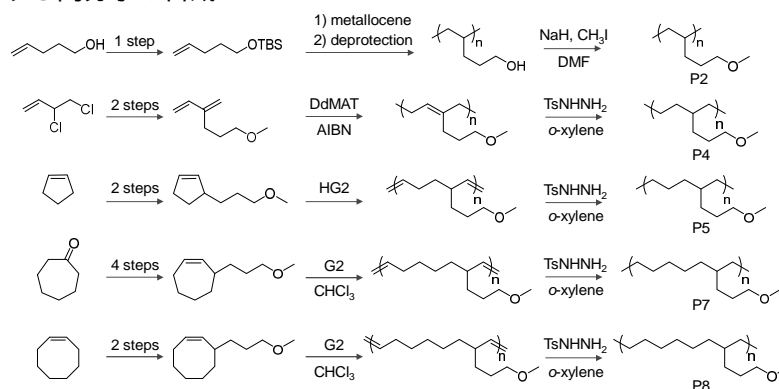


図1. ポリエチレンを主鎖骨格とした高分子の合成

(2) シクロオレフィンポリマー主鎖を有する高分子の合成

シクロオレフィンポリマーを主鎖に有する高分子は、図2に示すスキームに従って合成を行った。また、合成した5種のポリマーの化学構造を示した。第三世代 Grubbs 触媒を用いた重合はリビング的に進行し、GPC測定で得られた数平均分子量はポリエチレンを主鎖とする高分子との比較を行うのに十分な程度に高く、分子量分布はリビング重合であることを示唆するものであった。これらの高分子についても、NMR測定により構造を解析し、目的の化学構造を有する高分子が得られていることを確認した。

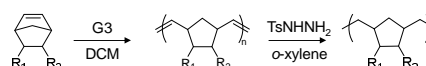


図2. シクロオレフィンポリマーを主鎖骨格とした高分子の合成

(3) 高分子の水和状態解析

得られた高分子について PBS(-)を用いた含水試料を作成し、DSC測定による水和状態の解析を行った。その結果、いずれの高分子についても降温過程の-40℃付近に水の凍結に由来するピークが観察され、中間水に帰属可能な水が存在していることが確認できた。ポリエチレン主鎖を有する高分子(図3)では、これまでの当研からの報告と同様に、側鎖間隔の拡大に伴って中間水量が低下する様子が観察された。シクロオレフィンポリマー主鎖を有する高分子ではポリエチレン主鎖を有する高分子と比較して中間水量は減少し、おおよそ主鎖骨格の構造から予想された通りの結果となった。しかし、側鎖密度が同一であるにもかかわらず、側鎖の立体配置によって水和水量が大きく異なることが明らかとなった。また、シクロペンタン環の構造を変更したポリマーでは、類似の化学構造を有するシクロオレフィンポリマーと比較して2倍近い中間水量が確認された。これは、剛直な高分子主鎖中に加えた変更を反映したものであると考えられ、高分子主鎖への水和により高分子-高分子間の疎水性相互作用が阻害され、可塑効果を受けたことによるものであると推察される。水和水量からは高分子の可塑化による含水率の上昇が見て取れる一方で、過疎化によるガラス転移温度の低下は、いずれの高分子でも小さかった。得られた高分子をスピコートした基板を作成し、水の接触角測定を行った結果、最小で54度(P2)、最大で92度(P8)を示した。シクロオレフィンポリマーの場合もPMEA(45度)と比較して大きく疎水化された高分子であることが分かった。

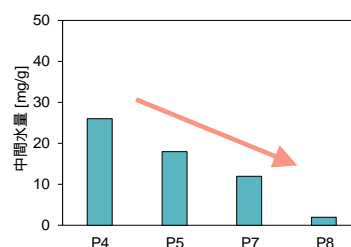


図3. DSC法により定量されたポリエチレンを主鎖とする高分子の中間水量 (PBS(-))

(4) 血小板粘着試験による抗血栓性評価

合成したポリマーをコートした基板を用いて血小板粘着試験を行ない、基板上に粘着した血小板の数、および形態についてSEM観察による評価を行った。その結果を図4に示す。ポリエチレン主鎖を有する高分子のシリーズ(図4)では、これまでに報告を行ってきた通りの傾向が観察され、側鎖間隔の拡大に伴う血小板粘着数の増加が確認できた。とくにP4よりも高い側鎖密度の範囲では、臨床応用が達成されているPMEAと同程度の血小板粘着抑制能を発現していることが分かった。P2~P8はポリ-シクロオレフィンの側鎖末端にメトキシ基を導入した構造とみなすことができ、おおよそ炭素鎖で構成されるような高分子であっても、構造設

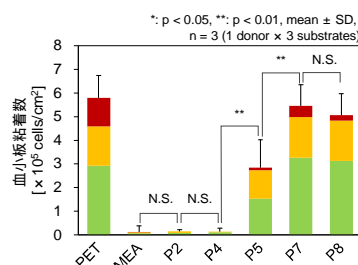


図4. ポリエチレンを主鎖とする高分子の血小板粘着試験の結果

計が適切であれば抗血栓性材料としての機能を付与できることが分かった。シクロオレフィンポリマーのシリーズでは、側鎖の密度や構造によって血小板粘着抑制能が変化することが分かった。シクロオレフィンポリマーもまた炭化水素鎖で構成されている疎水的なポリマーであり、かつ極めて剛直 (=高ガラス転移温度) なポリマーである。従来の生体親和性高分子の設計指針 (柔軟かつ親水的) に反するポリシクロオレフィン類の中にも良好な血小板粘着抑制能を発現する構造体を見出したことは、今後の生体親和性高分子の設計に大きく資するものである。

(5) 固体 NMR 法を用いた高分子中の水の運動性評価

高分子中に拡散した水の運動性は、血小板粘着抑制能との相関性を示すことが指摘されており、水の運動性が高い高分子ほど良好な血小板粘着抑制能を示すと考えられている。そこで、合成したポリマーに重水を含浸させ、固体 NMR を用いた ^2H 核の緩和時間測定を行うことで運動性の評価を行った。その結果を図 5 に示す。非晶性高分子中に拡散した水は、高分子との相互作用により拘束され、運動性が低下する。しかし、含水率が高くなると水 - 水相互作用によりクラスター化し、その運動性が上昇するため、含水率に対する緩和時間の変化率は、高分子 - 水相互作用を考察する上で有用である。ポリエチレン主鎖の場合では、側鎖密度が大きい P2 と P4 において、高分子中に拡散した水の運動性の含水率依存性が低いことが分かった。この結果は、高分子 - 水相互作用が水 - 水相互作用よりも優位であることを示しており、高分子中に均一に水が分散していることを示唆している。図 5 の右には、剛直なシクロオレフィンポリマー主鎖のうち、評価が完了したもののについて結果を示した。ポリマー、ポリマー いずれの場合も緩和時間変化の含水率依存性は PME A と同程度であることが分かった。しかし、切片は PME A よりも短時間側となっており、シクロオレフィンポリマー中の水は、PME A よりも低い運動性を持っていることが示唆された。主鎖構造の異なる高分子について比較した結果からは、高分子中に水が均一に拡散している高分子ほど血小板粘着抑制能が高い傾向があるといえるが、ポリマーのような例外も見られた。高分子中の水の運動性だけでなく、高分子主鎖自体の運動性についても評価を行っていく必要があることが示唆された。

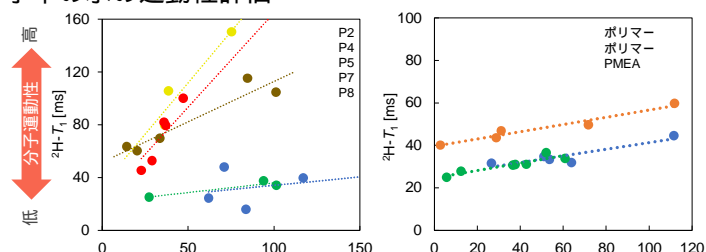


図5. 固体 ^2H NMR法を用いた高分子中の水の緩和時間測定結果。ポリエチレン主鎖 (左) とシクロオレフィンポリマー主鎖 (右)

(6) まとめ

以上、本研究助成による研究成果から、高分子の側鎖導入間隔の制御は、材料が発現する水和状態の制御を可能にし、発現する生体親和性の制御を達成できることが再確認された。また、高分子主鎖の構造が異なるポリオレフィン系高分子について検討を行った結果、柔軟な主鎖、剛直な主鎖いずれの場合も、水と均一に混和する高分子であるほど高い生体親和性を発現する傾向があることが分かった。また、ポリオレフィンとして認識されるような、およそ炭素鎖で構成される剛直な高分子であっても、化学構造が適切であれば生体親和性材料たりえることを示した。本研究課題で合成したポリオレフィン系高分子は疎水性が高く、血液・体液と接触させて用いるような医療機器の表面コート材で問題となる膜安定性が極めて高い。昨今のコロナ禍で広く認知されるようになった体外式膜型人工肺 (ECMO) の PP、TPX 製ガス交換膜部などに利用でき、長期間の使用にも耐えうる優れた医療機器の開発に資する。

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 Shingo Kobayashi, Atsushi Sugasaki, Yosuke Yamamoto, Yuta Shigenoi, Airi Udaka, Aki Yamamoto, and Masaru Tanaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Enrichment of Cancer Cells Based on Antibody-Free Selective Cell Adhesion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 4574-4556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsbmaterials.2c00662	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 Liu Shichen, Kobayashi Shingo, Nishimura Shin nosuke, Ueda Tomoya, Tanaka Masaru	4. 巻 59
2. 論文標題 Effect of pendant groups on the blood compatibility and hydration states of poly(2-oxazoline)s	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Polymer Science	6. 最初と最後の頁 2559 ~ 2570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pol.20210410	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 Liu Shichen, Kobayashi Shingo, Sonoda Toshiki, Tanaka Masaru	4. 巻 22
2. 論文標題 Poly(tertiary amide acrylate) Copolymers Inspired by Poly(2-oxazoline)s: Their Blood Compatibility and Hydration States	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 2718 ~ 2728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.1c00411	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 Kobayashi Shingo, Tanaka Masaru	4. 巻 8
2. 論文標題 Design of biomaterials through direct ring-opening metathesis polymerisation of functionalised cyclic alkenes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Systems Design & Engineering	6. 最初と最後の頁 960 ~ 991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d3me00063j	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林慎吾, 吉田健人, 田中賢
2. 発表標題 新規ポリオレフィン系抗血栓性高分子の合成と水和状態の解析
3. 学会等名 第51回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 梓, 小林慎吾, 田中 賢
2. 発表標題 側鎖末端の親水性官能基が高分子の水和状態と抗血栓性に与える影響
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 梓, 小林慎吾, 田中 賢
2. 発表標題 側鎖末端の親水性官能基が高分子の水和状態と抗血栓性に与える影響
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 梓, 小林慎吾, 田中 賢
2. 発表標題 側鎖末端の親水性官能基が高分子中の水分子の凍結融解に与える影響
3. 学会等名 2021年度九州ブロック学術講演会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 馬越 千晶, 小林 慎吾, 田中 賢
2. 発表標題 高分子側鎖の構造と間隔が水の低温結晶形成に与える影響
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会/第8回アジアバイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 馬越 千晶, 小林 慎吾, 田中 賢
2. 発表標題 高分子側鎖の構造と間隔が水の低温結晶形成に与える影響
3. 学会等名 化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 小林 慎吾, 岡崎 恭貴, 守田 和樹, 田中 賢
2. 発表標題 側鎖カルボニル基の位置が異なるPMEA類似体の精密合成：その水和状態と血液適合性
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 馬越千晶, 園田敏貴, 小林慎吾, 田中賢
2. 発表標題 高分子側鎖の構造と間隔が水の低温結晶形成に与える影響
3. 学会等名 第70回高分子年次大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 山本梓、小林慎吾、田中賢
2. 発表標題 共重合により水和状態を制御した含硫黄高分子の抗血栓性評価
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 小林慎吾、浜崎海大、田中賢
2. 発表標題 官能基化ポリシクロオレフィンの水和状態と抗血栓性
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 小林慎吾、山本梓、田中賢
2. 発表標題 含硫黄側鎖の酸化状態が生体適合性と水和状態に与える影響
3. 学会等名 第52回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 浜崎海大、小林慎吾、田中賢
2. 発表標題 剛直な主鎖を有する官能基化シクロオレフィンポリマーの水和状態解析と抗血栓性評価
3. 学会等名 第13回CSJ化学フェスタ2023
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 浜崎海大、小林慎吾、田中賢
2. 発表標題 官能基化シクロオレフィンポリマーの水和状態解析と抗血栓性評価
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 浜崎海大、小林慎吾、田中賢
2. 発表標題 官能基化シクロオレフィンポリマーの水和状態解析と抗血栓性評価
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年～2023年

〔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
研究協力者	田中 賢 (Tanaka Masaru) (00322850)	九州大学・先導物質化学研究所・教授 (17102)	
研究協力者	穴田 貴久 (Anada Takahisa) (30398466)	九州大学・先導物質化学研究所・准教授 (17102)	

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
---------	---------