

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25702029

研究課題名(和文)低インフラ地域でも利用可能な感染症バイオマーカーの早期検出法の開発

研究課題名(英文)Design of clickable smart polymers for enrichment of biomarkers

研究代表者

荏原 充宏 (Mitsuhiro, Ebara)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA准主任研究者

研究者番号：10452393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、安定した電気供給や清潔な飲料水などの入手が困難な低インフラ地域(途上国や被災地)などでも利用可能なエネルギー源(例えば摩擦熱や太陽光など)によって駆動する環境応答性ポリマーを用いた早期診断システムの開発を行うことを目的とした。その結果、クリック反応可能な温度応答性ポリマーを用いることで、汚染水や夾雑物存在下でも感染症バイオマーカーを熱濃縮可能であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We have developed a series of nano-sized temperature-responsive polymer-protein conjugates that separate and enrich analytes from solution and enable detection. Because smart conjugates bind analytes in solution prior to separation, conjugate-analytes binding avoids steric and mass transport limitations associated with surface-based techniques. Thus, the "smart" polymer-based diagnostic systems could enrich dilute salivary samples, overcoming the problem of low power supply in the developing world while retaining the advantages of a rapid and reversible capture and concentration abilities.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：スマートポリマー バイオマーカー 早期診断 温度応答性 感染症

1. 研究開始当初の背景

本研究では、Global Health に向けた革新的技術の開発のため、安定した電気供給や清潔な飲料水などの入手が困難な低インフラ地域（途上国や被災地）などでも利用可能な早期診断システムの開発を目指す。現在、世界 70 億人のうち、1/2 は衛生面で問題を抱え、1/3 は電気が使えず、1/5 がまともな水が飲めない環境で生活しているといわれている。また、そのうちおよそ 50 億人もの人々が 1 日 2 ドル未満で生活しており、そのほとんどがアフリカやインドなどの開発途上国で暮らしている [C.K. Prahalad, Pearson Prentice Hall, 2009]。こうした地域では、毎年 1000 万人以上が 5 歳まで生きられずに死亡しており、その死因の半分以上が早期に適切な診断・治療を受ければ助かるような epidemics（マalaria、結核、インフルエンザなどの疫病）である。事実、HIV 感染症では、早期に発見し適切な時期から抗 HIV 薬による多剤併用療法 (HAART 療法) を行えば、AIDS の発症を予防できるようになってきた。また、マalaria も AIDS、結核とともに世界 3 大感染症の一つに数えられ、毎年 3 億人が感染しているが、早期に抗マalaria 薬を投与することでその治療効果が得られるようになってきた。それにも関わらず患者数が拡大傾向にあるのは、病院が近くにない地域では再び来院するのが困難であり、3 分の 1 の患者は検査結果を取りに来ず治療が遅れると同時に二次感染が拡大するためである [G. Tao et al., J. Acquir. Immune. Defic. Syndr., 22, 395, 1999]。

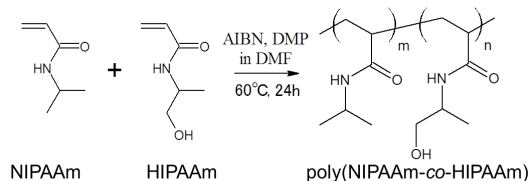
2. 研究の目的

通常、先進国においては注射器を用いて採血されたサンプルが標準検査機関に送られ、専門的なスタッフのもと、分離・精製などの処理が施されたのち、免疫検査やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法による遺伝子解析などがなされ、最終的に診断がなされる。この方法を用いれば、pg/mL オーダーのバイオマーカーの検出も可能であるが、その煩雑な操作と検出時間、およびコスト面において多くの問題を抱えている。一方で、イムノクロマト法などの簡便なポイント・オブ・ケア (POC) 検査を用いてのバイオマーカーの検出は安価で迅速であるが、その検出感度は $\mu\text{g/mL}$ と低い。そこで本研究では、インフルエンザ、マalaria、HIV などによる感染初期の微量濃度 (ng/mL) を、POC 診断で検出可能なレベル ($\mu\text{g/mL}$) まで簡便に濃縮する技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

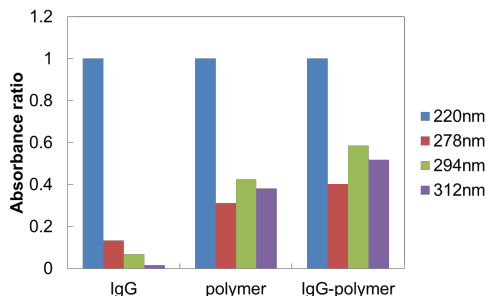
抗体にポリマーを修飾すると抗原抗体反応の効率を著しく低下させることが知られているため、本研究では、抗原抗体反応後に温度応答性ポリマーを抗体に修飾する。この際、汚染水や夾雑物存在下でも室温・無触媒で反

応させるため、シクロオクチンとアジド基とのクリック反応を用いる。シクロオクチンを側鎖に有する新規モノマーおよびポリマーの合成を行う。作製した抗体 温度応答性ポリマー複合体を体温で凝集・沈殿させ、抗原の濃縮を試みる。この際、ニトロセルロース膜上での濃縮効率を様々な条件 (温度、濃度、流速など) で評価する。バイオマーカーの検出にはいくつかの汎用な呈色反応を試みる。金コロイドの場合、あらかじめ金コロイドに温度応答性ポリマーの末端に反応させておく。また酵素基質反応を用いる場合は、あらかじめポリマーの末端に酵素を反応させておく。



4. 研究成果

まず、クリック反応可能な温度応答性ポリマーを作製するため、シクロオクチン基を導入した温度応答性ポリマーを合成した。この反応は他のトリアゾール環を形成させるクリック反応とは異なり、金属触媒を必要とせず、シュタウディンガー反応よりも 100 倍以上も反応効率が良いことが知られている。すなわち、シクロオクチンを側鎖に有する温度応答性ポリマーを用いることで、汚染水や夾雑物存在下でもアジド化抗体との反応が進むものと期待できる。次に、HIV のバイオマーカーの一つである抗 p24 抗体にアジド基を導入し、温度応答性ポリマーとクリック反応することに成功した。この反応が汚染水や夾雑物存在下でも進行することを確認するため、泥水、尿、血液などを用いて反応を確かめた。さらに、ニトロセルロース膜上での呈色反応を確認し、温度による濃縮によって目視によっても微量バイオマーカーの検出が可能であることが明らかとなった。



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 28 件)

(1) K. Uto, S. S. Mano, T. Aoyagi, M. Ebara,

"Substrate Fluidity Regulates Cell Adhesion and Morphology on Poly(ϵ -caprolactone)-Based Materials", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(3), 446-453 (2016). 査読有

(2) P. Y. Mengsteab, K. Uto, A. S.T. Smith, S. Frankel, E. Fisher, Z. Nawas, M. Ebara, D.-H. Kim, "Reorganization of Cardiomyocyte Anisotropy in Response to Dynamic Nanotopographic Cues", *Biomaterials*, 86, 1-10 (2016). 査読有

(3) T. Okada, E. N., K. Uto, T. Aoyagi and M. Ebara, "Inactivated Sendai Virus (HVJ-E) Immobilized Electrospun Nanofiber for Cancer Therapy", *Materials*, 9(1), 12 (2016). 査読有

(4) S. S. Mano, K. Uto, T. Aoyagi, M. Ebara, "Fluidity of Biodegradable Substrate Regulates Carcinoma Cell Behavior: A Novel Approach to Cancer Therapy", *AIMS Materials Science*, 3(1), 66-81 (2016). 査読有

(5) T. Okada, K. Uto, T. Aoyagi, M. Ebara, "Design of Hemagglutinable Viral-Mimetic Surfaces with A Monolayer of Inactivated Sendai Virus (HVJ-E)", *Biomaterials Science*, 4, 96-103 (2016). 査読有

(6) R. Garrett, E. Niiyama, Y. Kotsuchibashi, K. Uto, M. Ebara, "Biodegradable Nanofiber for Delivery of Immunomodulating Agent in the Treatment of Basal Cell Carcinoma", *Fibers*, 3, 478-490 (2015). 査読有

(7) H.-L. Che, H. Jeong L., K. Uto, M. Ebara, W. J. Kim, T. Aoyagi, I.-K. Park, "Simultaneous Drug and Gene Delivery from The Biodegradable Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers for The Treatment of Liver Cancer", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15, 7971-7975 (2015). 査読有

(8) Y. Kotsuchibashi, M. Ebara, A. S. Hoffman, R. Narain, Takao Aoyagi, "Temperature-responsive Mixed Core Nanoparticle Properties Determined by The Composition of Statistical and Block Copolymers in The Core". *Polymer Chemistry*, 6, 1693-1697 (2015). 査読有

(9) Y. Wang, Y. Kotsuchibashi, K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi, Y. Liu, R. Narain, "pH and Glucose Responsive Nanofibers for the Reversible Capture and Release of Lectins". *Biomaterials Science*, 3, 152-162 (2015). 査読有

(10) Y. Kotsuchibashi, M. Ebara, T. Sato, Y. Wang, R. Rajender, D. G. Hall, R. Narain, T. Aoyagi, "Spatio-Temporal Control of Boroxole-Sugar based Gels Structure via Photoinduced Proton Transfer". *Journal of Physical Chemistry B*, 119, 2323-2329 (2015). 査読有

(11) M. Ebara, Takao Aoyagi, "Photo-induced Control of Smart Polymer Systems via pH Jump Reaction". *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 27 (4), 467-469 (2014). 査読有

(12) Q. Shou, K. Uto, W.-C. Lin, T. Aoyagi, M. Ebara, "Near-infrared Light-induced Remote

Activation of Surface Shape-memory to Direct Cell Orientations". *Macromolecular Chemistry and Physics*, 215, 2473-2481 (2014). 査読有

(13) M. Ebara, M. Akimoto, K. Uto, K. Shiba, G. Yoshikawa, T. Aoyagi, "Focus on The Interlude Between Topographic Transition and Cell Response on Shape-memory Surfaces". *Polymer*, 55, 5961-5968 (2014). 査読有

(14) Q. Shou, K. Uto, M. Iwanaga, M. Ebara, T. Aoyagi, "Near infrared light-responsive shape memory poly(ϵ -caprolactone) films that actuate in physiological temperature range". *Polymer Journal*, 46, 492-498 (2014). 査読有

(15) D. Mosqueira, S. Pagliari, K. Uto, M. Ebara, S. Romanazzo, C. Escobedo-Lucea, J.Nakanishi, A. Taniguchi, O. Franzese, P. D. Nardo, M. J. Goumans, E. Traversa, P. Pinto-do-Ó, T. Aoyagi, G. Forte, "Hippo Pathway Effectors Control Cardiac Progenitor Cell Fate by Acting as Dynamic Sensors of Substrate Mechanics and Nanostructure". *ACS NANO*, 8(3), 2033-2047 (2014). 査読有

(16) K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi, "Temperature-responsive poly(ϵ -caprolactone) cell culture platform with reversibly tunable nano-roughness and elasticity for control of myoblast morphology". *International Journal of Molecular Science*, 15 (1), 1511-1524 (2014). 査読有

(17) K. Namekawa, M. T. Schreiber, T. Aoyagi, M. Ebara, "Fabrication of zeolite-polymer composite nanofibers for removal of uremic toxins from kidney failure patients". *Biomaterials Science*, 2, 674-679 (2014). 査読有

(18) M. Ebara, K. Uto, N. Idota, T. Aoyagi, "The Taming of The Cell: Shape-memory Nanopatterns Direct Cell Orientation". *International Journal of Nanomedicine*, 9, 117-126 (2014). 査読有

(19) T. Omura, M. Ebara, J. J. Lai, X.Yin, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, "Design of Smart Nanogels that Respond to Physiologically Relevant pH Values and Temperatures". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14, 2557-2562 (2014). 査読有

(20) C. Jiang, H. Takehara, K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi, T. Ichiki, "Evaluation of Microvalves Developed for Point-of-Care Testing Devices Using Shape-Memory Polymers". *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 26 (5), 581-585 (2013). 査読有

(21) Y. Kotsuchibashi, Y. Wang, Y.-J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi, R. Narain, "Simple Coating with pH-Responsive Polymer-Functionalized Silica Nanoparticles of Mixed Sizes for Controlled Surface Properties." *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5, 10004-10010 (2013). 査読有

(22) Y.-J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi, "A Smart Hyperthermia Nanofiber with Switchable Drug

Release for Inducing Cancer Apoptosis.” *Advanced Functional Materials*, 23, 5753-5761 (2013). 査読有

(23) H. Takehara, C. Jiang, K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi, T. Ichiki, “Novel Microfluidic Valve Technology Based on Shape Memory Effect of Poly(ϵ -caprolactone)”. *Applied Physics Express*, 6, 037201 (2013). 査読有

(24) M. Ebara, J. M. Hoffman, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, J. J. Lai “A photo-induced nanoparticle separation in microchannels via pH-sensitive surface traps.” *Langmuir*, 29(18), 5388-5393 (2013). 査読有

(25) T. Sato, M. Ebara, S. Tanaka, T.-A. Asoh, A. Kikuchi, T. Aoyagi “Rapid self-healable poly(ethylene glycol) hydrogels formed by selective metal-phosphate interactions”. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 10628-10635 (2013). 査読有

(26) T. Okada, K. Uto, M. Sasai, C. M. Lee, M. Ebara, T. Aoyagi “Nano-decoration of Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-E) Using Layer-by-Layer Assembly Technique.” *Langmuir*, 29(24), 7384-7392 (2013). 査読有

(27) M. Ebara, K. Uto, N. Idota, J. M. Hoffman, T. Aoyagi “Re-writable and shape-memory soft matter with dynamically tunable microchannel geometry in a biological temperature range.” *Soft Matter*, 9, 3074-3080 (2013). 査読有

(28) Y. Kotsuchibashia, Y. Zhang, M. Ahmed, M. Ebara, T. Aoyagi, R. Narain “Fabrication of FITC-doped silica nanoparticles and study of their cellular uptake in the presence of lectins.” *Journal of Biomedical Materials Research: Part A.*, 101A(7), 2090-2096 (2013). 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) 荻原充宏, “『スマートポ』を用いた未来医療”, 第 19 回原子炉研コロキウム, 東京工業大学, 2016 年 3 月 22 日 .

(2) Mitsuhiro Ebara. “Smart Nanofibers for Stick-on Anticancer Treatment.” The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM), Hawaii, USA, December 15, 2015.

(3) Mitsuhiro Ebara. “Shape-memory Nanopatterns for Shaping Cell Fate.” The 9th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering, Hawaii, USA, November 15, 2015.

(4) 荻原充宏, “21 世紀の医療材料スマートポリマーの開発と癌治療への応用”, 第 53 回日本癌治療学会学術集会, 京都, 2015 年 10 月 30 日 .

(5) Mitsuhiro Ebara. “Smart Hyperthermia Nanofiber Meshes With ‘ON-Off’ Drug Release for Cancer Therapy.” *Biomaterials international* 2015, Kenting, Taiwan, June 3rd, 2015.

(6) 荻原充宏, “Smart Polymer Technologies

for Cancer Therapy”, 日本化学会 第 95 春季年会, 千葉, 2015 年 3 月 27 日.

(7) Mitsuhiro Ebara. “Shape-memory Surfaces for Shaping Cell Fate.” International Symposium on Smart Biomaterials 2015, Gwangju, Korea, March 20th, 2015.

(8) Mitsuhiro Ebara. “Shape-Memory Surfaces for Directing Cell Fate.” International Symposium on Materials and Nanotechnology, Jeju, South Korea, November 3rd, 2014.

(9) 荻原充宏, “環境応答性材料の未来医療への挑戦”, 第 35 回日本アフェレス学会学術大会, 京王プラザホテル, 2014 年 9 月 28 日.

(10) 荻原充宏, “Smart polymer technologies for biomedical applications”, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科セミナー, 2014 年 9 月 10 日.

(11) Mitsuhiro Ebara. “Shape-Memory Surfaces for Directing Cell Fate.” 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Chicago, USA, August 26, 2014.

(12) Mitsuhiro Ebara. “Photo-induced Control of Smart Polymer Systems via pH Jump Reaction.” The 31st International Conference of Photopolymer Science and Technology, Chiba, Japan, July 10, 2014.

(13) Mitsuhiro Ebara. “Shape-memory Nanopatterns Direct Cell Orientation.” CIMTEC 2014 6th Forum on New Materials, Montecatini Terme, Italy, June 17, 2014.

(14) Mitsuhiro Ebara. “Smart Materials to Direct Stem Cell Fate.” FNUSA-ICRC International Conference, Brno, Czech Republic, May 7, 2014.

(15) Mitsuhiro Ebara. “Smart Anticancer Nanofibers That Allows the Simultaneous Use of Chemo- and Thermo-therapy.” Trends in NanoTechnology 2014, Tokyo, Japan, January 30, 2014.

(16) 荻原充宏, “スマートポリマーを用いた途上国医療への取り組み”, 第 18 回関西大学先端科学技術シンポジウム～次世代医療を革新するスマートバイオマテリアルの創出～, 関西大学, 2014 年 1 月 24 日.

(17) Mitsuhiro Ebara. “Smart ‘On-off’ Switchable Surfaces with Carbohydrate Residues for Selective Adhesion and Collection of Cells.” 246th ACS National Meeting & Exposition, Indianapolis, USA, September 10, 2013.

(18) Mitsuhiro Ebara. “Smart Polymer Technologies for Global Health.” SAS-IVF-JST Workshop, Smolenice, Slovakia, July 11, 2013.

〔図書〕(計 13 件)

(1) 栗本理央, 高井僚, 小土橋陽平, 荻原充宏, “災害時に透析患者を救うナノファイバーの開発”, 特集 1/メディカル: 進化する医療技術・医療材料, WEB Journal, 10, 7-9(2015).

(2) 荻原充宏, “スマートポリマーを用いた細胞メカノバイオロジー”, 高分子科学最近の進歩, 高分子, 64, 272-276 (2015).

- (3) 新山瑛理, 中川泰宏, 荏原充宏, ‘免疫反応を制御する高分子材料の設計’, 特集: 免疫系とバイオマテリアル, バイオマテリアル-生体材料-, 33(2), 144-153 (2015).
- (4) 荏原充宏, “生分解性形状記憶ポリマー”, 進化する医療用バイオベースマテリアル, 第5編 25章, 244-250 (2015), シーエムシー出版. 分担執筆
- (5) 荏原充宏, ‘スマートポリマーの医療応用’, 特集: 機能性新素材, 成型加工, vol.26, No.8, 376-381 (2014).
- (6) Katsuhiko Ariga, Kohsaku Kawakami, Mitsuhiro Ebara, Yohei Kotsuchibashi, Qingmin Ji, Jonathan P Hill, “Bioinspired Nanoarchitectonics as Emerging Drug Delivery Systems” New Journal of Chemistry, 38, 5149-5163 (2014).
- (7) 荏原充宏, ‘指で温めて病原体を検出するスマート診断システム’, 機能材料, シーエムシー出版, 34(7), 46-52 (2014).
- (8) 荏原充宏, 青柳隆夫, ‘スマートゲルのバイオサイエンスへの応用’, ゲルテクノロジーハンドブック—機能設計・評価・シミュレーションから製造プロセス・製品まで—, エヌ・ティー・エス, 第4編 5章 3節, 769-774 (2014). 分担執筆.
- (9) Mitsuhiro Ebara. “Chapter 14 Cell-Based Bioconjugates.” Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, Edited by R. Narain, Wiley, 357-369, (2014). 分担執筆
- (10) 荏原充宏, ‘生分解性プラスチックを活用した形状記憶高分子の開発’, 特集・新しい環境対応材料・技術・用途展開, 月刊 Polyfile, 50(594), 32-35 (2013).
- (11) 荏原充宏, 宇都甲一郎, 青柳隆夫 ‘生分解性高分子’ 再生医療叢書 2 組織工学, 岡野光夫, 大和雅之編集, 朝倉書店, 1-24 (2013). 分担執筆
- (12) 荏原充宏, 齋藤充弘, ‘免疫反応を制御可能な未来型バイオマテリアルの設計—Immunobioengineering’— Drug Delivery System, 日本 DDS 学会, 28-2, 135-148 (2013).
- (13) 荏原充宏, 宇都甲一郎, 青柳隆夫 ‘基材の構造力学的性質による細胞機能の制御’ 特集 細胞接着の制御 生体の科学, 64(3), 194-198 (2013).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

- (1) 名称: ナノ粒子及びその製造方法
 発明者: 小土橋陽平, 青柳隆夫, 荏原充宏
 権利者: 国立研究開発法人 物質・材料研究機構
 番号: 特願 2014-130172
 出願年月日: 2014 年 6 月 25 日
 国内外の別: 国内
- (2) 名称: エチレン - ビニルアルコール共重合体またはポリビニルアルコール機能化方法並びにエチレン - ビニルアルコール共重

合体またはポリビニルアルコール機能化剤
 発明者: 小土橋陽平, 荏原充宏
 権利者: 国立研究開発法人 物質・材料研究機構
 番号: 特願 2015-198316
 取得年月日: 2015 年 10 月 6 日
 国内外の別: 国内

(3) 名称: 産生信号誘発ポリマーの合成方法, 産生信号誘発モノマー前駆体及び産生信号誘発ポリマー前駆体
 発明者: 荏原充宏, 青柳隆夫
 権利者: 国立研究開発法人 物質・材料研究機構
 番号: 特願 2014-227661
 取得年月日: 2014 年 11 月 10 日
 国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

- (1) 名称: アジド基又はアルキン基を有するイソプロピルアクリルアミド誘導体およびその重合体
 発明者: ジョンホフマン, 青柳隆夫, 荏原充宏
 権利者: 国立研究開発法人 物質・材料研究機構
 番号: 特許登録第 5818245 号
 取得年月日: 2015 年 10 月 9 日
 国内外の別: 国内
- (2) 名称: 被覆 HVJ-E 及び被覆 HVJ-E の製造方法
 発明者: 荏原充宏, 宇都甲一郎, 青柳隆夫, 李千萬
 権利者: 国立研究開発法人 物質・材料研究機構
 番号: 特許登録第 5904434 号
 取得年月日: 2016 年 3 月 25 日
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nims.go.jp/bmc/group/smartbiomaterials/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荏原 充宏 (EBARA, Mitsuhiro)

国立研究開発法人 物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA 准主任研究者

研究者番号: 10452393