

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870078

研究課題名(和文) 生体吸収性人工血管の実現に向けた抗血栓性と内皮化に優れた合成生分解性材料の創製

研究課題名(英文) Development of biodegradable antithrombotic biomaterials capable of endothelialization towards resorbable artificial blood vessels

研究代表者

福島 和樹 (FUKUSHIMA, Kazuki)

山形大学・理工学研究科・助教

研究者番号：70623817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エーテル基を側鎖に含む脂肪族ポリカーボネートを合成し、それが血小板を粘着させず(抗血栓性)、血管を構築する細胞は接着させ(内皮化能)、さらに酵素によって分解される(生分解性)材料であることを確認した。また、その過程で原料となるモノマー類の新規合成ルートの開発にも成功した。本材料は、抗菌ポリマーへの応用で赤血球への毒性(溶血性)を低減させる効果も示している。今後、「血管組織の再生に伴って分解・吸収される人工血管」への応用を軸に、生分解性・血液適合性・細胞接着性を必要とする医療デバイスへの広範な展開を目指す。

研究成果の概要(英文)：This study has yielded aliphatic polycarbonates with an ether side chain demonstrating the selective cell adhesive property where little platelets adhere but endothelial cells and smooth muscle cells were adsorbed well. The polycarbonates were also found to be degradable in the presence of lipase. Moreover, a new synthetic route to the cyclic carbonate monomers with functional side chain has been established in the process of developing the new polycarbonates. The antithrombotic polycarbonates can be applied to decreasing hemolytic property of a cationic antimicrobial polycarbonate. These findings will be exploited for further developments of medical devices that require biodegradability, blood compatibility, and cell adhesive property.

研究分野：高分子合成、生分解性高分子、バイオマテリアル

キーワード：生分解性ポリマー 抗血栓性 細胞接着性 機能性ポリマー バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

血管系疾患は、我が国の主要死因の1つであり、薬剤治療、カテーテル治療やバイパス手術の他、人工血管を用いた血管代替術が実施されている。ポリエチレンテレフタレート (PET) やポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 等の現行の人工血管材料では内径 4 mm 以下の小口径部位に適用できないのが課題となっている。

(1) 国内外の人工血管材料開発の動向

上記の主たる理由は内腔部の血栓形成による閉塞である。近年、組織工学や再生医療の観点から、ポリ-L-乳酸 (PLLA) やポリプロラクトン (PCL) などの生体内での分解吸収性を示す合成高分子を用いた血管再生治療も検討されているが、これらも表面での血小板粘着が問題となり、生体外で表面を血管内皮細胞で被覆 (内皮化) して移植するなどの処理が必要である。

つまり、血小板を粘着させない抗血栓性と細胞接着性を付与した合成生分解性ポリマーが創出できれば、血管再生治療のための吸収性人工血管として有用である。抗血栓性を示す合成高分子として、ポリエチレングリコール (PEG) や石原ら (東大) のリン脂質ポリマー (PMPC)、田中ら (山形大) のポリ (2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA) が既に実用化されている (図 1 参照)。ただし、水溶性の PEG や PMPC は単独では血管材料に使用できず、表面特性が内皮化に適さない。PMEA は非水溶性で親水的表面特性を示し、血管内皮細胞の接着も確認されているが [引用文献 1]、PMPC と同様に非分解性のため生体吸収性人工血管には応用できない。

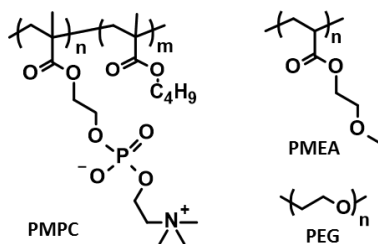


図 1. 既存の抗血栓性ポリマー

(2) 機能化した生分解性ポリマー

そこで、PMEA 同様の表面機能を持つ生分解性ポリマーの開発が期待されるが、これまで合成されてきた側鎖に機能性官能基を持つ PLLA や PCL 誘導体はモノマーの合成法や安定性に問題があり普及していない。最近では PLLA や PCL などの脂肪族ポリエステルが分解時に酸を生成し、生体内で炎症反応を引き起こすことも問題視されている。

(3) これまでの研究成果と着想への経緯

ポリトリメチレンカーボネート (PTMC) は生分解性があり、柔軟性や低細胞毒性が確認されている他、分解時に酸を生成しないため炎症反応の心配も少ないことが特徴である。

筆者はこれまでに側鎖に置換基を導入した PTMC 誘導体を用いて薬剤キャリア、遺伝子キャリア、ハイドロゲル、抗菌剤などを開発してきた [引用文献 2, 3]。そして最近、メトキシエチル (ME) 基を側鎖に持つ PTMC 誘導体 (PMEMTC; 図 2) を合成し、PMEA と同様に非水溶性だが比較的親水的な表面特性を示すことを確認した。このため、良好な抗血栓性や細胞接着性が期待される一方、水飴状の形状で機械強度が乏しいことから固体材料への応用には構造改変が必須となる。

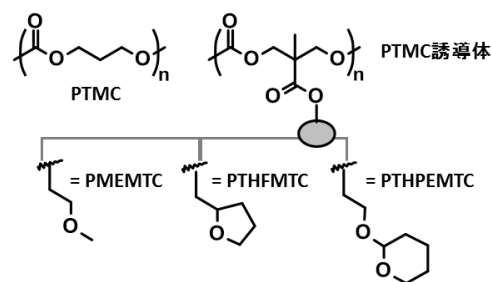


図 2. 本研究で開発した新規 PTMC 誘導体

田中らによれば、PMEA の抗血栓性には側鎖のエーテル基の水和およびその界面水和水の構造が大きく影響するとされている [引用文献 4]。一方で、PTMC 誘導体には主鎖にも水和に関与しうる酸素原子が存在することから、ME 基よりも優れた抗血栓性・細胞接着性を示す側鎖構造が存在する可能性がある。そこで筆者は、テトラヒドロフランやジオキサランが直鎖エーテルより水との混和性が高いことに着目し、環状エーテルや類似の環状アセタール構造を側鎖に導入した PTMC 誘導体にも PMEMTC と同程度かそれ以上の抗血栓性や細胞接着性が見込まれるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の最終ゴールは「血管組織の再生に伴って分解・吸収される足場機能を持った人工血管 (生体吸収性人工血管)」の実現である。本研究計画期間ではそのための生分解性ポリマーを創製する基盤技術・知見の蓄積を主として、抗血栓性と内皮化に有効な側鎖構造を同定する。

具体的には (1) PMEMTC の抗血栓性、細胞接着性の評価、(2) 図 2 に示した側鎖構造を持つ PTMC 誘導体の合成と基本物性 (溶解性、熱特性) の解析、(3) 界面水和に着目した PTMC 誘導体の抗血栓性、細胞接着性に寄与する構造因子の解明、(4) PMEMTC の機械強度の向上、に取り組む。

3. 研究の方法

(1). PMEMTC の抗血栓性、細胞接着性、生分解性の評価

PMEMTC のスピンコート基板上でのヒト血小板 (hPLT) の粘着およびヒト臍帯静脈内

皮細胞 (HUVEC)、ヒト大動脈平滑筋細胞 (AoSMC) の培養 37°C, 1 h 後の接着を調べた。また、水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いて、PMEMTC のリパーゼによる酵素分解が有効か重量変化より確認した。

(2). PTMC 誘導体の合成と特性解析

図 3 の通り、2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピオン酸 (bis-MPA) より、モノマー THF-MTC および THPE-MTC を合成し、その開環重合によって得られた各ポリマーの分子量、水に対する接触角、熱特性を調べた。

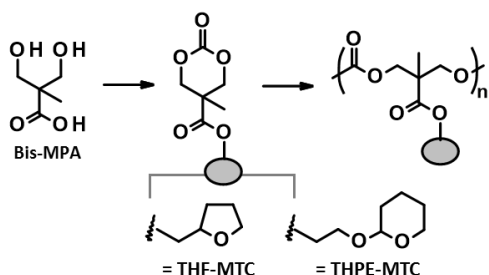


図 3. Bis-MPA からの PTMC 誘導体の合成

(3). PTMC 誘導体の抗血栓性、細胞接着性に寄与する構造因子の解明

PMEMTC および PTMC やその他市販の脂肪族ポリエステル、血小板粘着性、タンパク質吸着、含水状態の熱特性を調べ、界面水と細胞接着に寄与する構造因子の解明を行った。

(4). PMEMTC の機械強度の向上

①重合技術の改良による PMEMTC の高分子量化、②架橋構造の導入、③ポリウレタン化、④高強度 PLLA との複合化、によって機械強度のある抗血栓性・生分解性材料の創出を検討した。

4. 研究成果

(1). PMEMTC の抗血栓性、細胞接着性の評価

PMEMTC と各対照ポリマー上の各細胞の接着数を、PET 上の接着数で規格化したグラフを図 4 に示す。

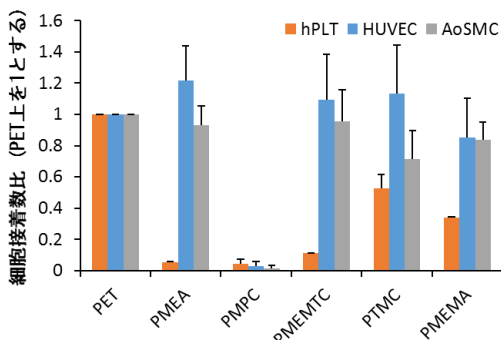


図 4. 各ポリマー上での細胞接着性

PET および PTMC、ポリ(2-メトキシエチルメタクリレート) (PMEMA)、PMEA、PMPC を

対照として使用した。

図 4 より、PMEMTC は PMEA や PMPC と同程度に血小板の粘着を抑制し、一方で、血管を構成する HUVEC や AoSMC の接着は他の細胞接着性ポリマー (PET, PMTC, PMEMA) と同程度の効果を示すことがわかった。特に、「血小板は粘着せず、血管内皮細胞は接着する」接着選択性は、PMEA に次いで高く、生分解性ポリマーでは初例となった。

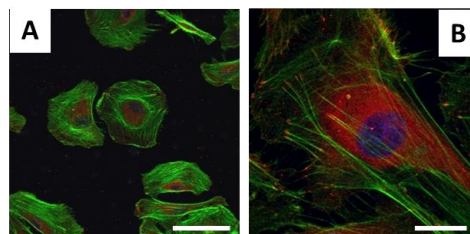


図 5. PMEMTC 上の HUVEC (スケール A: 50 μm, B: 20 μm). (A) 培養 1 時間, (B) 培養 1 日. (緑: 細胞骨格, 赤: 接着斑, 青: 細胞核)

また、図 5 より、PMEMTC 上で HUVEC が培養時間の進行とともに、成長 (伸展) していることがわかる。これは、PMEMTC が血管組織の再生のための足場としても十分に機能することを示唆するものである。

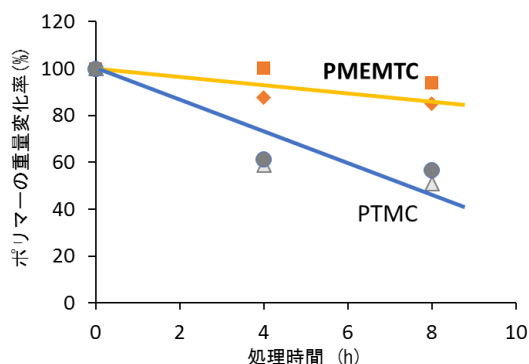


図 6. PMEMTC と PTMC の酵素分解挙動

図 6 にはリパーゼ (Thermomyces lanuginosus 由来) 溶液中での PMEMTC と PTMC の重量の経時変化を示している。PTMC が 8 時間で 40% 程度の重量減少を示しているのに対して、PMEMTC は 15% 程度の重量減少に留まっていたが、酵素分解性は確認された。本試験は酵素濃度を高めた加速条件で行っており、実際の生体内での分解を反映するものではない。分解については、組織の再生に伴う消失が理想とされる一方、材料には組織の十分な構築までは力学強度の維持が求められるため、今後の更なる解析と調整が必要である。

(2). PTMC 誘導体の合成と特性解析

①. 新規モノマー合成経路の開発

PMEMTC のモノマーと異なって、通常、THF-MTC や THPE-MTC のような複雑な側鎖を有するモノマーは bis-MPA より多段階の工

程を経由してを合成される。従来法では、発火性のあるパラジウム触媒を用いた水素化分解や高価な試薬の使用を必要としていた[引用文献 5, 6]。より安全で簡便な手法として、筆者は図 7 に示すような、アンモニウム塩型環状カーボネート (TEA-MTC) のワンポット合成とその後のプロトン化によって得られる H-MTC を前駆体としたモノマー合成法を開発した。

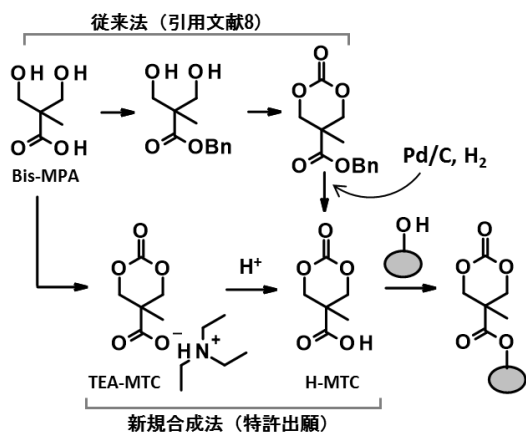


図 7. 新規環状カーボネート合成法

TEA-MTC は bis-MPA より 1 段階で高収率で得られ (90%)、その後のプロトン化も 75% で進行する。結果として、新規合成法では H-MTC が 2 段階工程で 67.5% の収率で得られる。一方、従来法は 3 段階工程で 60% の収率となっており、本手法による環状カーボネートモノマーの生産性の向上が達成されたと言える。

②. PTHFMTC, PTHPEMTC の特性解析

前述の新規手法に基づき、THF-MTC および THPE-MTC を合成し、有機分子触媒を用いた開環重合を行った。得られたポリマーの分子量はそれぞれ、PTHFMTC (M_n 5,500, D_M 1.12)、PTHPEMTC (M_n 9,400, D_M 1.16) となった。

表 1. 各ポリマーの水に対する接触角 ^{a, b}

	接触角 (度)	標準偏差
PET	77.2	±0.80
PMEA	42.4	±0.46
PMEMTC	60.0	±1.41
PTHFMTC	61.4	±1.97
PTHPEMTC	58.3	±5.10
PTMC	76.2	±0.97
PMEMA	67.2	±0.94

^{a, b} 液滴法. $n = 5$

次にこれらポリマーの水に対する接触角を測定したところ、表 1 のような結果を得た。PMEA と比較すると PMEMTC も含めて疎水的な表面と言えるが、血小板粘着の多い PET や PTMC と比べると親水的な表面特性を示していることがわかる。一方、PTHFMTC や PTHPEMTC の接触角は PMEMTC と同程度と

なり、炭素数の増加による疎水性の増加が環状エーテル構造の高い水和能によって低減された結果ではないかと考えられる。

(3). PTMC 誘導体の抗血栓性、細胞接着性に寄与する構造因子の解明

材料表面上への細胞接着に際し、細胞は一般に材料表面に吸着したタンパク質を認識して接着する。酵素免疫吸着測定 (EIISA) 法によって、PMEMTC 上に吸着し、細胞の付着に関与するため活性化したフィブリンノーゲン (血小板の粘着に関与するタンパク質) とフィブロネクチン (血管細胞の接着に関与するタンパク質) の量を測定したところ、それぞれ、血小板粘着および細胞接着数を反映する結果となった。

タンパク質の材料表面への吸着は、表面の形態、電荷、柔軟性その他、界面の水和構造によっても大きく影響される。そこで、材料界面の水和水の構造をある程度予測するのに有効とされる含水ポリマーの示差走査熱量測定 (DSC) から、血小板粘着の抑制に関連するとされる中間水 (0° C 以下の低温で融解・結晶化する水) の有無を調べ、界面水和と細胞接着に寄与する構造因子について検討した。

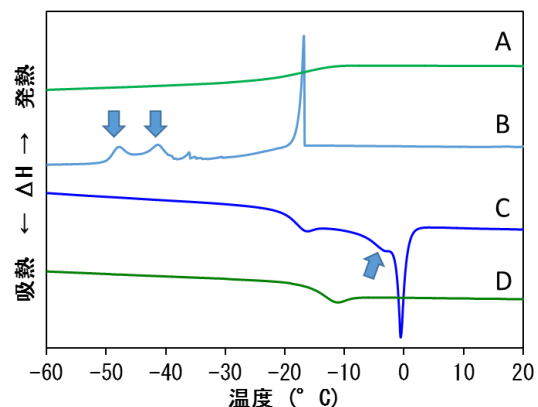


図 8. PMEMTC の DSC 曲線 (5° C/min). (A, B) 降温, (C, D) 昇温. (A, D) 乾燥状態, (B, C) 4.9wt.% 含水状態. 矢印が中間水を示す。

PMEMTC の DSC 解析結果を図 8 に示す。乾燥状態のポリマーはガラス転移しか示さない。つまり含水状態で見られるピークはポリマー中に含まれる水の結晶化およびその融解を示す。このうち、降温曲線 B の -20° C 付近、および昇温曲線 C の 0° C 付近に見られるシャープなピークは通常の水の転移である。PMEA やその他の抗血栓性ポリマーでは、昇温曲線において、低温での水の再結晶化と融解が見られているが、PMEMTC では低温融解ピーク (矢印) のみ確認され、再結晶化ピークは見られなかった。ただし、降温測定時に -50~-40° C 付近に水の低温結晶化 (矢印) が見られ、ポリマー構造との相互作用によって水の結晶構造が乱されていることに起因する。広義に中間水とは中間的にポリマー鎖と相互作用した水を指

し、この PMEMTC は PMEA 同様に血小板の粘着を抑制していることから、ここで観測された低温で結晶化・融解している水も以降、本紙では中間水と定義する。

同様の中間水は、含水状態の PTHFMTC や PTHPEMTC においても観測されたことから、これらの PTMC 誘導体に関して良好な抗血栓性の発現が十分に期待できることを支持する結果となった。結果として、PTMC 骨格への含エーテル側鎖の導入が、抗血栓性の付与に非常に有効であることが明らかとなった。

水とに寄与する構造因子として、含酸素構造が考えられる。PMEA における側鎖のエステル基 (COO) は中間水の形成に寄与しないとされているが、PTMC や脂肪族ポリエステルのように主鎖のエステル基は水とおよび中間水の形成にどのように影響するのか調べるため、PTMC と PCL の他、ポリ (p-ジオキサン) (PDO) とポリ (バレロラクトン) (PVL) の血小板粘着と含水状態の DSC 測定を行った。

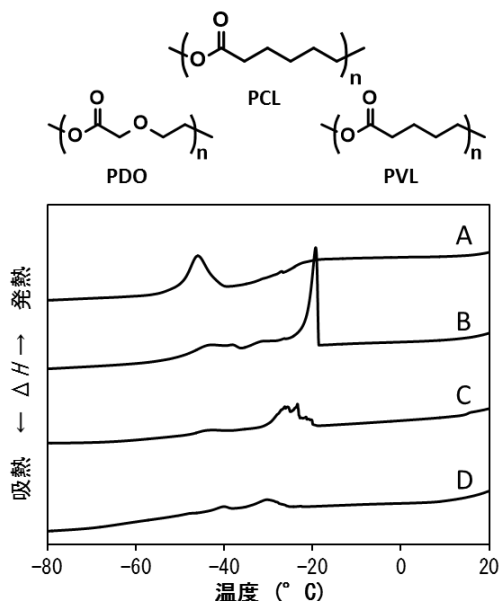


図 9. 含水させた脂肪族ポリエステル類の DSC 降温曲線 (5° C/min). (A) PTMC, (B) PDO, (C) PVL, PCL.

各脂肪族ポリエステルに含水状態において、水の低温結晶化が確認され、PTMC では PMEMTC に見られた中間水と類似したピークが確認されたが、血小板粘着は十分に抑制されているとは言い難い結果であった。これより、おそらく含水 PMEMTC に見られるより低温側の水の結晶化は抗血栓性と関連する中間水と位置付けることができるが、その他の DSC の降温過程で見られる水の低温結晶化ピークの扱いには更なる検討が必要である。

(4). PMEMTC の機械強度の向上

①. PMEMTC の高分子量化

厳重な脱水操作を経て重合を行うことに

よって Mn 2 万を超える分子量が達成できたが、力学特性は向上しなかった。

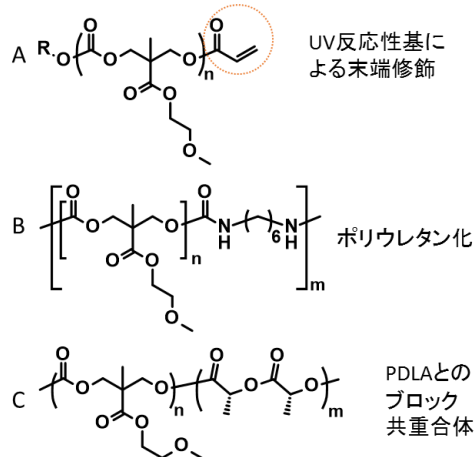


図 10. PMEMTC の機械強度の向上策

②. 架橋構造の導入

UV 反応性のアクリロイル基によって PMEMTC の末端を修飾し、架橋させたところ、自己支持性のあるフィルムが得られた。一方で、血小板粘着性は通常の PMEMTC よりも微増する結果となった。現在、引き続き架橋密度、前駆体の分子量を検討中である。

③. ポリウレタン化

両末端に水酸基を有する PMEMTC を合成し、ジイソシアネートとの重付加反応により Mn 2-6 万のポリカーボネートウレタンを合成した。PMEMTC セグメントの分子量が 2000-5000 のとき、柔軟でゴム弾性を示す形状となり、また血小板粘着性も PMEMTC と同程度かそれ以下となった。今後さらに、セグメント長やジイソシアネートの構造の検討を行い、最適化を行っていく。

④. 高強度 PLLA との複合化

高い力学強度を有する PLLA との複合化のため、ポリ-D-乳酸 (PDLA) と PMEMTC のブロック共重合体を合成し、PLLA 上へのコーティングを行った。PDLA の組成が 40% でもブロック共重合体のコーティング表面は PMEMTC と同等の低い血小板粘着性を示した。今後、様々な形状の PLLA 材料への応用を検討していく。

(5). その他

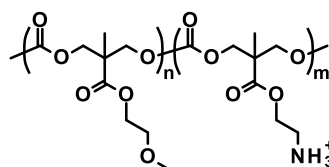


図 11. 抗菌ポリマーへの応用

PMEMTC の血小板に不活性な表面特性は、カチオン性ポリカーボネート抗菌剤の赤血球への破壊作用 (溶血) の低減にも有効であることを見出した。

<引用文献>

- ①. M. Tanaka et al., Biomaterials vol. 21, pp. 1471-1481, 2000.
- ②. Y. Li et al., Angew. Chem. Int. Ed., vol. 52, pp. 674-678, 2013.
- ③. F. Nederberg et al., Nature Chem. Vol. 3, pp. 409-414, 2011.
- ④. S. Morita et al., Langmuir vol. 23, pp. 3750-3761, 2007.
- ⑤. R. Prutt et al., Chem. Commun. Pp. 114-116, 2008.
- ⑥. D. P. Sanders et al., J. Am. Chem. Soc., vol. 132, pp. 14724-14726, 2010.

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2件)

- ①. K. Fukushima (1番/6名), "Evaluation of the hemocompatibility of hydrated biodegradable aliphatic carbonyl polymers with a subtle difference in the backbone structure based on the intermediate water concept and surface hydration" Polym. J. 査読有, 印刷中. doi: 10.1038/pj.2015.22
- ②. M. Tanaka, K. Fukushima (6番/6名), "Design of biocompatible and biodegradable polymers based on intermediate water concept" Polym. J. 査読有, vol. 47, 2015, pp. 114-121. doi: 10.1038/pj.2014.129

[学会発表] (計33件)

- ①. K. Fukushima 他6名, "Synthesis of aliphatic polycarbonate-urethanes with an ether side chain and their blood compatibility", 第64回高分子年次大会, 2015年5月28日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- ②. K. Fukushima 他5名, "Blood Compatible Antimicrobial Polymers with Degradable Backbone", 26th Annual Conference for European Society of Biomaterials (ESB2014), 2014年9月1日, リバプール(英国)
- ③. K. Fukushima 他5名, "Facile and practical route to a versatile intermediate of substituted cyclic carbonates offering diverse smart biomaterials", 248th American Chemical Society National Meeting, 2014年8月10日, サンフランシスコ(米国)
- ④. 福島和樹 他3名, 「エーテル基を側鎖に含む脂肪族ポリカーボネートが示す抗血栓性と水和特性の解析」, 第35回日本バイオマテリアル学会大会, 2013年11月25日, タワーホール船堀(東京都)
- ⑤. K. Fukushima 他2名, "Biodegradable

polycarbonate with an ether side chain for application to blood compatible scaffold", The 13th Pacific Polymer Conference (PPC2013), 2013年11月19日, 高雄(台湾)

[産業財産権]

○出願状況(計3件)

名称: 抗菌性ポリマー及びその製造方法並びに用途

発明者: 福島和樹, 岸昂平, 佐々木彩乃, 佐藤千香子, 田中賢

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願2014-097237

出願年月日: 平成26年5月8日

国内外の別: 国内

名称: 抗血栓性材料としての生体親和性ポリマー及びその中間体として有用な環状カーボネート並びにその製造方法

発明者: 田中賢, 福島和樹, 井上裕人, 佐藤千香子, 佐々木彩乃

権利者: 同上

種類: 特許

番号: W02014133102 A1

出願年月日: 平成26年2月27日

国内外の別: 国外

名称: 環状カーボネートの製造方法

発明者: 田中賢, 福島和樹, 井上裕人, 佐藤千香子, 佐々木彩乃

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特開2014-227412

出願年月日: 平成25年5月27日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://polyweb.yz.yamagata-u.ac.jp/~fukushimagroup/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島和樹 (FUKUSHIMA, Kazuki)

山形大学 大学院理工学研究科・助教

研究者番号: 70623817

(2) 研究協力者

田中賢 (TANAKA, Masaru)

山形大学 大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 00322850