

### ドキソルビシン頸動脈組織中濃度 (ng/mg)

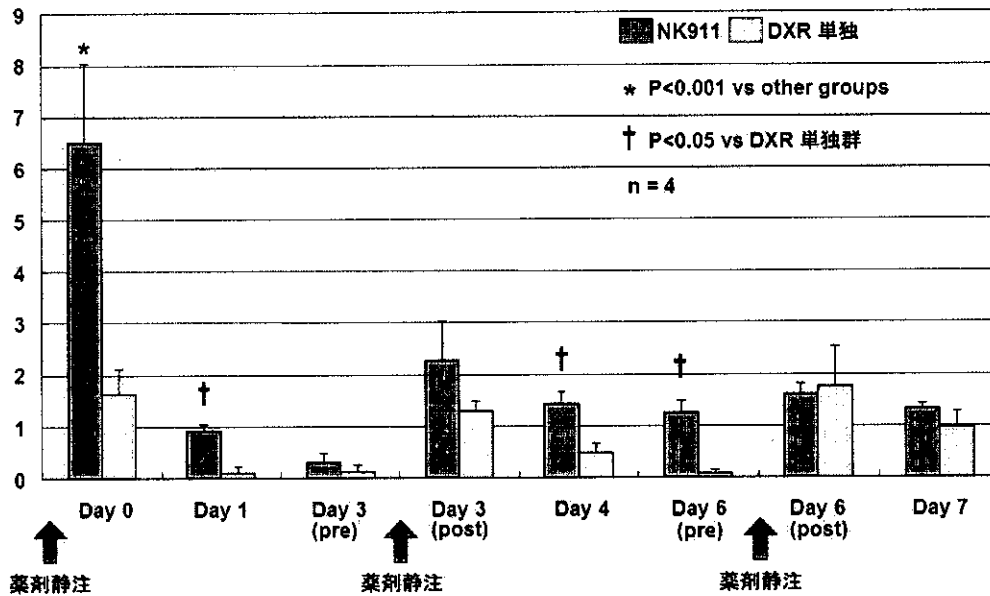


図 6

#### D. 考察

本研究により、ドキソルビシン含有ナノカプセルである NK911 が、ドキソルビシン単独と比較し有意にバルーン傷害後ラット頸動脈における動脈硬化病変の形成を抑制し、またその抑制効果は、より重度な病変でも確認された。また NK911 は傷害血管局所に高濃度にドキソルビシンを送達することも明らかとなった。このように NK911 は、腫瘍組織のみならず、血管透過性を有する本モデルにおいても、その増殖抑制作用を機序として、再狭窄予防において有効な治療法となる可能性が示唆された。また一方で NK911 は、本実験における最高投与量(10mg/kg)付近においてもモデル動物に対して特記すべき副作用を示さなかった。過去の報告では、実験動物レベルでは最大 24mg/kg までその安全性が確認されており、ミセル化による薬物送達の組織選択性

の向上およびそれに伴う内包ドキソルビシンの非特異的毒性の軽減が得られている。本薬剤 NK911 による最大の利点はその非侵襲性と組織選択性であり、今後のさらなるミセル自体の性能の向上が期待される。また同時に現在我々はモノクロタリンラット肺高血圧モデルにおいても、肺血管床において著しく血管透過性が亢進していることを確認しており、現在、NK911 の肺高血圧症に対する効果を検討中である。

#### E. 結論

本研究により、ドキソルビシン搭載ナノカプセルである NK911 は、血管形成術後の病変形成抑制に対し有効であり、かつ安全・非侵襲的な治療法であることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsumoto Y, Hattori T, Oi K, Matsuda T, Kataoka K, Akira T.

Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats.

*Circ Res.*, in press (2003).

2) 上徳 豊和, 下川 宏明.

ナノ診断・ナノ治療が開く新しい薬物治療.

*Drug Delivery System* 2002;17:471-477.

3) Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, matoba T, Kunihiro I, Morikawa K, Ito M, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A.

Involvement of Rho-kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries.

*Arterioscler Throm Vasc Biol.*  
2002;22:243-248.

## 2. 学会発表

1) Annual Scientific Meeting of the American Heart Association (November 17-20, 2002, Chicago, USA)

Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsumoto Y, Hattori T, Takeshita A. Application of nanotechnology for the prevention of neointimal formation after balloon injury in rats. *Circulation*. 106 (Suppl II):II-150, 2002.

## E. 知的財産の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許名：新規な血管狭窄治療剤又は予防剤

発明者：下川宏明

出願人：日本化薬株式会社

出願日：2002年3月15日

出願番号：2002-7222

### 2. 実用新案登録：なし

### 3. その他：なし

# 厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業） 分担研究報告書

## 機能的ナノ生体材料

分担研究者 片山 佳樹（九州大学大学院工学研究院助教授）

**研究要旨：**プロテインキナーゼ A（以下 PKA と略す）活性化を感知して内包薬物を徐放するナノカプセルのための材料を設計、開発した。開発した材料は、37℃で平均粒径 100～200nm のナノ粒子を形成し、PKA 活性にตอบสนองして崩壊した。その際、粒子の疎水性コアに内包した分子を徐放する事に成功した。また、材料に組み込むペプチド配列を種々変化させることで、応答性を自由にコントロールできる事を明らかにした。また、PKA にตอบสนองして導入遺伝子の発現を活性化できる人工遺伝子導入剤のための基礎材料の開発にも成功した。この材料は、遺伝子と強固な複合体を形成して、遺伝子の発現を抑制し、PKA 活性により、この複合体を崩壊させる事で遺伝子発現を回復させた。

一方、内皮細胞剥離部位を感知する機能化造影剤の開発に関しては、Evans Blue 誘導体を分子内に有するガドリニウム錯体の開発に成功し、これが実際にブタ大動脈切片において内皮剥離部位に特異的に吸着し、MRI イメージングによって、該当部位を掲出できる事を見出した。

### A. 研究目的

薬物や遺伝子の送達においては、標的細胞選択性を発揮する事は本質的な問題であるが、現在、必ずしも満足できる状況には無いといえる。そのため、薬理活性の強い薬物の投与や、遺伝子治療などでは、現在臨床に応用できるのは、細胞選択性がなくてもよいケースに限られている。一方で、細胞は、内部に細胞内情報伝達系と呼ばれる複雑な反応系を有しており、これら細胞内シグナルのバランスの上に正常な生命活動が営まれている。ガンをはじめ、多くの疾患では、特定の細胞シグナルが持続的に活性化していることが知られており、これを利用すれば、正常細胞と異常細胞の見分けが可能であると考えられるが、これまで細胞シグナルに着目した考え方は存在しなかった。本研究では、疾患に関連するこれらの細胞内シグナルにตอบสนองして薬理活性を開放する薬物カプセルや導入遺伝子の発現

を活性化する遺伝子導入剤など、新しい概念で細胞選択性を発揮する分子システムを開発し、現在の薬物送達手法の問題点を解決しようとするものである。

また、血管造影剤に関しては、現在は血管全体を造影するものが用いられているが、血管障害部位を選択的に造影できれば、診断において有力な手段を提供する。このような背景のもと、本研究では、内皮剥離部位を特異的に認識し、造影できる機能化造影剤の開発を目指している。

### B. 研究方法

#### PKA シグナル応答型薬物カプセルの合成法

PKA 応答型薬物カプセルの基本設計においては、PKA 選択的基質ペプチドを感熱性高分子であるポリ N-イソプロピルアクリルアミドにポリエチレングリコールユニットと共にグラフトした 3 元共重合体高分子を基本

骨格とした。基質ペプチドは、末端に重合性のビニル基を有するマクロモノマーを、Fmoc法を基本とする固相合成により合成した。合成したペプチド配列を図1に示す。また、重合性のポリエチレングリコールユニットとして末端アミノ型ポリエチレングリコールにメタクリル酸活性エステルを反応させることで合成した。さらに、得られたペプチド型マクロモノマーとポリエチレングリコール型マクロモノマーをイソプロピルアクリルアミドとともに、ラジカル共重合して目的の高分子を得た。

#### **PKA シグナル応答型薬物カプセルの物性評価**

合成した材料の粒子形成能および、PKAシグナル応答性は、動的光散乱法により評価した。また、内包分子の放出挙動は、蛍光性分子であるダンシルアニリンの蛍光スペクトル変化を測定する事により評価した。

#### **PKA シグナル応答型遺伝子導入材料の合成**

PKA 応答型遺伝子導入材料の開発に関しては、基本分子設計は、PKA 選択的基質ペプチドをグラフトした水溶性のポリアクリルアミドとした。ペプチド型マクロモノマーの合成は、前述の PKA シグナル応答型薬物カ

プセルでの方法と全く同様にした。また、これとアクリルアミドとの共重合もまったく同様の方法によった。合成したペプチド配列は、図1の peptide1 と全く同じ物である。

#### **PKA シグナル応答型遺伝子導入剤の性能評価**

開発した材料と遺伝子との複合体の形成および PKA シグナルによる崩壊に関する評価は、ゲル電気泳動法におけるバンド位置の変化から評価した。また、その遺伝子発現制御は、セルフリーのタンパク合成キットを用いた。

#### **機能化造影剤の合成**

機能化造影剤に関しては、図2の構造を有する分子を設計合成した。

合成は、方末端のアミノ基を Boc 保護したジメチルベンジジンと無水 DTPA を反応後、アルカリ処理にて残った DTPA 酸無水物を加水分解し、次いで、TFA 処理により脱 Boc 後、アゾカップリングにより目的物を得た。

#### **機能化造影剤の評価**

機能化造影剤の性能評価は、ブタ大動脈切片を開き、資料の片側の内皮細胞をメスで剝離したものを造影剤溶液で処理した後、洗浄して、目視および MRI イメージングにより行った。

PGPK-1:peptide 1= GLRRASLG

PGPK-2:peptide 2=AcLRRASLDprNH<sub>2</sub>

PGPK-3:peptide 3= ALRRASLE

PGPK-4:peptide 4=AcELRRASLDprNH<sub>2</sub>

図1 合成した基質ペプチド配列

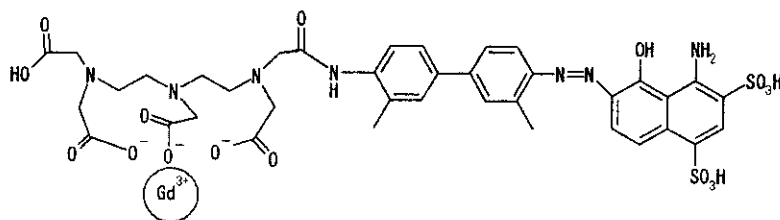


図2 機能化造影剤の構造

### C. 研究成果および考察

#### PKA シグナル応答型薬物カプセル

合成した peptide 1 を有する共重合体 PGPK1 は、37°Cにおける光散乱測定において、平均粒径 100~200nm の高分子型ナノ粒子を形成することが明らかとなった。また、この粒子に活性型 PKA を作用させたところ、当該粒子が徐々に減少し、変わって、非常に小さなフラクションが増加してくるのが観察された (図 3)。また、その他のペプチド配列を有する PGPK ポリマーでは、peptide 2 を有するものは、逆に PKA シグナルにตอบสนองして粒子が安定化し、peptide 3, 4 では、peptide1 に比べ、PKA にตอบสนองしての粒子の崩壊がより顕著であった。特に、peptide 4 を有する高分子では、非常に感度良く PKA にตอบสนองして粒子が崩壊した。

そこで、次に peptide 4 を有する高分子を用い、粒子内部にダンシルアニリンを内包して、PKA の作用による蛍光変化を計測した。その結果を図 4 に示す。これより、PKA により崩壊した粒子から効率よく内包分子を徐放できることが明らかとなった。

#### PKA シグナル応答型遺伝子導入剤

合成した高分子を遺伝子と種々の濃度比で混合し、ゲル電気泳動により複合体の形成を泳動の遅れから評価した。また、PKA 添加後

の泳動距離の変化から、複合体の崩壊を評価した。図 5 にその結果を示す。すなわち、高分子を遺伝子に混合していくと、濃度依存性に遺伝子の泳動が遅れ、PKA の添加によってその泳動の遅れが完全にキャンセルされる結果を得た。また、無細胞型タンパク合成系により、このシステムにおけるタンパク発現の変化を評価した。遺伝子はルシフェラーゼをコードするものを用い、タンパクの発現は、ルシフェラーゼの発光強度を尺度とした。結果を図 6 に示す。遺伝子が高分子と複合体を形成している場合、タンパクはほぼ完全に抑制された。一方、この系に PKA を添加すると、タンパクの発現はほぼ元のレベルにまで回復した。しかし、別種のプロテインキナーゼであるプロテインキナーゼ C (PKC) を添加しても、タンパク発現は全く回復しなかった。

#### 機能化造影剤

図 7 にブタ大動脈切片を用いた結果を示す。

合成した造影剤は、色素ユニットを有しているため、血管への吸着が目視できる。得られた化合物は、内皮を剥離した部分にのみ吸着していた。また、同じ切片を MRI イメージングしたところ、内皮剥離部位に特異的なシグナルが観察された。

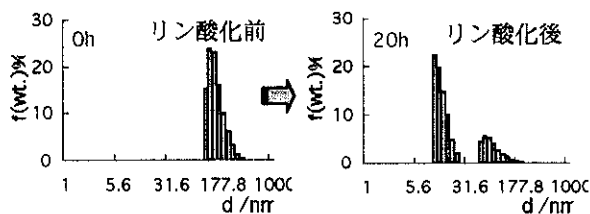


図3 プロテインキナーゼAシグナルによる粒系変化

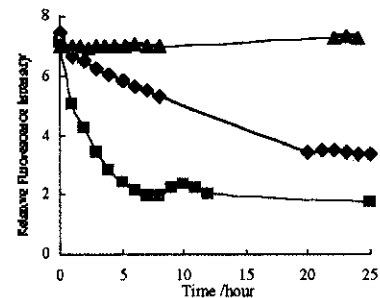


図4 ナノ粒子からのダンシルアニリンの放出  
0.3mg/mL NIPAM-PEPEP5, 0.2mM ATP,  
20 $\mu$ M N-dansyl aniline and 10mM MgCl<sub>2</sub>  
in PBS(-).  $\Delta$ ex : 340nm. Measurement  
temperature : 34.0°C

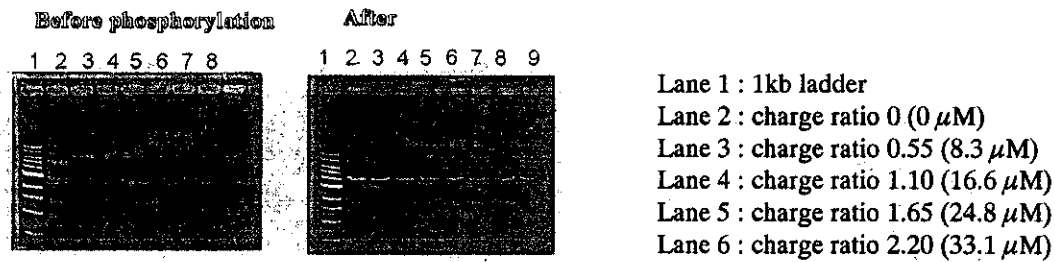


図5 高分子-遺伝子複合体の形成と崩壊

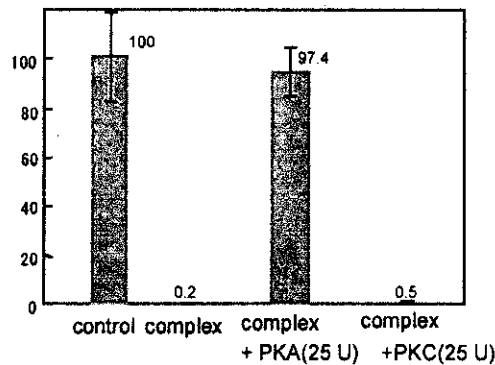


図6 PKA シグナル選択的遺伝子発現制御

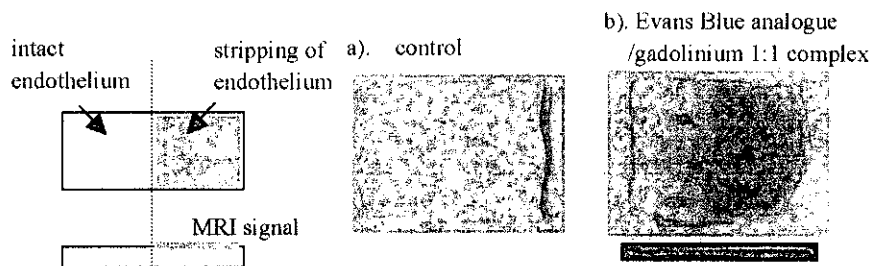


図7 血管サンプル造影結果

#### D. 考察

##### PKA シグナル応答型薬物カプセル

プロテインキナーゼ (タンパクリン酸化) シグナルは、細胞内シグナルの中でも最も重要なシグナルである。タンパク質においては、リン酸化反応は、水和の増大、アニオン荷電の出現、水素結合サイトの出現という 3 つの因子によりタンパクの構造変化を引き起こし、その活性を変化させる。このことを利用すれば、人工の高分子においてもリン酸化反応による大きな物性の変化を生じさせる事ができ

るはずである。

標的プロテインキナーゼシグナルに応答して崩壊する薬物カプセルの設計においては、感熱性高分子を基本とした高分子ミセルをデザインした。まず、その前段階として、N-イソプロピルアクリルアミドと片末端をメタクリロイル化したプロテインキナーゼ A (以下 PKA と略す) に対する選択的基質ペプチドを共重合した高分子を合成した。この高分子は、相転移温度以上で水に不溶となり沈殿するが、この温度は、リン酸化により上昇する

事を見出した。すなわち、温度を適当に取れば、リン酸化前には水に不溶で、リン酸化後には水溶性にする事が可能である事が分かった。これは、リン酸基の導入による高分子鎖の水和の増大によることが考えられる。そこで、この高分子にさらにポリエチレングリコールユニットをグラフトした高分子を合成したところ、これが水中でナノ粒子を形成し、それが標的とするキナーゼシグナルで崩壊して内包物を放出する事が分かった(図3, 4)。また、導入する基質ペプチドの配列を検討した結果、応答の方向や程度は、ペプチド基質の総荷電のリン酸化に伴う変化が重要であることを見出した。得られた知見を利用し、リン酸化部位を高分子主鎖近傍に位置し、さらにリン酸化によりペプチド総荷電が0から-2に変化するよう設計した peptide 4 を有する高分子は、非常に鋭敏に PKA に応答して物性を変化させ、生理条件で理想的な応答をする粒子の開発に成功した(図4)。本カプセルは、PKA シグナル非存在下では、内包分子の漏洩は全く見られず、PKA シグナル存在下でのみ活性依存的に内包分子を徐放した。

#### プロテインキナーゼシグナル応答型遺伝子転写制御

タンパク質リン酸化シグナルを遺伝子導入、発現制御系へ応用する試みとして、PKA に応答して遺伝子の転写を活性化する分子を開発した。これは、ポリアクリルアミド等の水溶性高分子にカチオン性の PKA 選択的基質ペプチドをグラフトしたものである。まず、本高分子が DNA と静電的相互作用により強固な複合体を形成し、これが PKA シグナルにより崩壊する事をゲル電気泳動で確認された。また、cell free の発現系での実験におけるルシフェラーゼ発現系で、本高分子が DNA と複合体を形成した場合、遺伝子の発現をほ

んど完全に抑制できる事、さらに、PKA シグナルにより、発現を完全に回復できる事、また、他のセリンスレオニンキナーゼである PKC では全く回復せず、標的シグナルに選択的であった(図3)。この機能は、リン酸化に伴う高分子鎖へのアニオン荷電の導入により、複合体の安定性が低下する事に起因すると考えられる。また、mRNA の定量結果から、この制御が実際に転写レベルで起こっている事を確認した。細胞毒性も、使用濃度では全く問題はなかった。

#### 機能化造影剤

今回合成した機能化造影剤分子は、ブタ大動脈切片において、内皮剥離部位に選択的に吸着する事を見出した。エバンスブルーは、本来組織吸着性が高い色素であり、内皮細胞が剥離した部分ではコラーゲンなどの細胞外基質が露出するため、吸着するものと考えられる。実際、MRI イメージングでも、該当する部分にシグナルが得られ、基本的に内皮剥離部位での選択的イメージングが可能である事が明らかとなった。

#### E. 結論

これまで例のなかった細胞内シグナルに応答する材料として PKA シグナルに応答する材料を開発する事ができた。まず、薬物カプセルに関しては、PKA シグナルに選択的に応答して崩壊するナノ粒子形成材料の開発に成功し、内包薬物が PKA シグナルにより徐放される事を見出した。また、同様に基質ペプチドをグラフトした高分子型材料として、PKA シグナル応答型遺伝子導入材料の開発を試みた。この材料は、遺伝子と複合体を形成して発現を抑制し、しかも、PKA シグナルにより、その複合体が崩壊することで遺伝子発現を、ほぼ元のレベルまで回復させる事ができた。本材料は、当初の目的の標的プロ

テインキナーゼシグナルが亢進した細胞でのみ遺伝子を発現させることのできるシステムの実現の基礎となる成果である。

機能化造影剤としては、内皮細胞剥離部位に選択的に吸着できるセンサー分子として、エバンスブルー誘導体を設計、合成し、これが実際に目的の性能を有する事を、ブタ大動脈切片を用いて実験により確認する事ができた。さらに、このセンサー分子にガドリニウム錯体を連けるした分子を開発して、MRI イメージングにより、血管切片において内皮細胞剥離部位に特異的なシグナルを得ることに成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) NOR-1: a nitric oxide releasing agent for calibrating low levels of nitric oxide by the chemiluminescence method  
Y. UEKI, H. NAKAMURA, K. MATSUMOTO, T. TOMINAGA, S. MIYAKE, Y. KITA, Y. KATAYAMA, S. FUKUYAMA, Y. HIRASAWA, K. YOSHIDA, K. EGUCHI.  
Blood Coagulation and Fibrinolysis, Vol. 13, No. 2, 75-80 (2002)
- 2) Strategies and Development of Molecular Probes for Nitric Oxide Monitoring.  
Y. KATAYAMA, N. SOH, M. MAEDA.  
Bull Chem Soc. Jpn, Vol. 75, 1681-1691 (2002年).
- 3) Intracellular signal-responsive artificial gene regulation for novel gene delivery.  
Y. KATAYAMA, K. FUJII, E. ITO, S. SAKAKIHARA, T. SONODA, M. MURATA, M. MAEDA.  
Biomacromolecules, Vol. 3, No. 5, 905-909 (2002).
- 4) Ratiometric direct detection of nitric oxide using novel signal-switching

mechanism.,

N. SOH, T. IMATO, K. KAWAMURA, M. MAEDA, Y. KATAYAMA

Chem. Commun., No. 22, 2650-2651 (2002).

- 5) Functional regulation of biomolecule using DNA-conjugation.

T. ANADA, T. KANO, W. KAKU, Y. KATAYAMA, M. MAEDA, M. MURATA

Nucleic Acids Res. Suppl., No. 2, 269-270 (2002).

- 6) Sencing of Second Messengers Using Oligopeptides

Y. KATAYAMA, Y. OHUCHI, M. MAEDA, H. HIGASHI, Y. KUDO

Biomedical Diagnostic Science and technology (Marcel Dekker), Chapter 13, 243-258 (2002).

- 7) 導入した遺伝子が患部細胞内だけで機能する新しい遺伝子治療法

片山佳樹

遺伝子医学, Vol. 6, No1, (2002年2月).

### 2. 学会発表

- 1) 第49回応用物理学関連連合講演会シンポジウム

リン酸化シグナル応答型分子

片山 佳樹

- 2) 平成14年度遺伝子・デリバリー研究会夏季セミナー

細胞内シグナル応答型材料の開発と遺伝子発現制御への応用

片山 佳樹

- 3) 第6回化学とマイクロシステム研究会

細胞シグナル応答型材料の開発と医薬・創薬への応用

片山 佳樹

- 4) 日本化学会第81春季年会

細胞内キナーゼシグナル応答型遺伝子転写制御システム

伊藤悦子・園田達彦・安藤友一・片山佳



- 樹・前田瑞夫
- 5) 日本化学会第81春季年会  
細胞内プロテアーゼシグナル応答型遺伝子発現制御システムの構築  
藤井 健司・榊原 茂基・片山 佳樹・前田 瑞夫
- 6) 第51回高分子学会年次大会  
細胞内リン酸化シグナル応答型遺伝子発現制御システム  
伊藤悦子・園田達彦・安藤友一・片山佳樹・前田瑞夫
- 7) 第51回高分子学会年次大会  
細胞内プロテアーゼシグナル応答型遺伝子発現制御システム  
藤井 健司・榊原 茂基・片山 佳樹・前田 瑞夫
- 8) 第51回高分子学会年次大会  
細胞内プロテアーゼシグナルに反応する遺伝子発現制御システムの構築  
榊原茂基、河村健司、藤井健司、片山佳樹、前田瑞夫
- 9) 第39回化学関連支部合同九州大会  
細胞内プロテアーゼシグナル応答型遺伝子転写/発現制御系の開発  
河村 健司・藤井 健司・榊原 茂基・片山 佳樹・前田 瑞夫
- 10) 第39回化学関連支部合同九州大会  
細胞内リン酸化シグナル応答型遺伝子転写/発現制御システムの開発  
伊藤 悦子・園田 達彦・片山 佳樹・前田 瑞夫
- 11) 第39回化学関連支部合同九州大会  
細胞内プロテアーゼシグナル応答型遺伝子転写/発現制御系の開発(1)  
藤井 健司・河村 健司・榊原 茂基・片山 佳樹・前田 瑞夫
- 12) 第51回高分子討論会  
細胞内プロテアーゼ応答型遺伝子送達システム  
河村 健司・藤井 健司・榊原 茂基・村田 正治・前田 瑞夫・片山佳樹
- 13) 第51回高分子討論会  
細胞内リン酸化シグナル応答型材料の創製  
伊藤悦子・園田達彦・安藤友一・前田瑞夫・片山佳樹
- 14) 第51回高分子討論会  
細胞内プロテアーゼ応答型分子システム  
藤井 健司・河村 健司・榊原 茂基・村田 正治・前田 瑞夫・片山 佳樹
- 15) 第51回高分子討論会  
細胞内プロテインキナーゼ応答型分子システム  
園田達彦・伊藤悦子・村田正治・前田瑞夫・片山佳樹
- 16) 九州地区高分子若手研究会  
細胞内カスパーゼシグナル応答型遺伝子発現制御系の開発  
藤井 健司・河村 健司・榊原 茂基・村田 正治・前田 瑞夫・片山 佳樹
- 17) 第12回バイオ・高分子シンポジウム  
細胞内シグナル応答性材料の開発  
片山佳樹・榊原茂基・○園田達彦・藤井健司・伊藤悦子・河村健司・村田正治
- E. 知的財産の出願・登録状況**  
現在、機能化造影剤に関しては、特許取得を準備中。

# 厚生労働科学研究費補助金（萌芽の先端医療技術推進研究事業）

## 分担研究報告書

### Photocurable Liquid Biodegradable Copolymer: Synthesis of Acrylate-endcapped Trimethylene Carbonate-based Copolymers, Photocuring and Hydrolytic Behaviors

分担研究者 新名主 輝男（九州大学有機化学基礎研究センター助教授）

**Abstract :** A series of photocurable liquid biodegradable trimethylene carbonate (TMC)-based (co) prepolymers were prepared by ring-opening copolymerization, in which TMC and/or L-lactide were polymerized with a low-molecular-weight PEG (mol. wt. 200, 600, or 1,000) or trimethylene propane (TMP). Resultant (co) oligomers were paste, viscous liquid or liquid at room temperature, depending on the monomer composition and molecular ratio. And subsequently acrylate-endcapping was performed at terminal ends of liquid-type (co) oligomers for visible-light inducing photocuring. More than 90% of acrylation was attained. Upon visible-light irradiation, the gel yield increased with photoirradiation time, photointensity, and camphorquinone concentration. The photocured copolymers obtained from a low molecular weight PEG (PEG200) and a low molecular alcohol (TMP) showed lower weight loss, water uptake, and swelling depth than copolymers obtained from PEG1000. Young's moduli of outermost surface region and subsurface of the photocured copolymer films were decreased with an increase of those hydrophilicity and immersion time. Copolymers obtained from PEG were hydrophilic and not cell adhesive. Otherwise, copolymer obtained from TMP showed cell adhesion and proliferation. These photocurable polymers with different hydrolytical characteristics and cell adhesivity can be considered to be useful for fabrication micro-stereolithograph photoconstructs, which is now under study.

#### A. Purpose

Aliphatic polyesters, currently used as a matrix or a scaffold in implant devices, are solid. If a liquid biodegradable polymer can be rapidly transformed to a solid by visible-light photoirradiation in the presence of radical generator, such photocurable versatility can be useful for various medical applications. Our previous studies showed that trimethylene carbonate (TMC)/  $\epsilon$ -caprolactone (CL) copolymers endcapped with photoreactive groups such as coumarin, phenylazide, and acrylate were liquid, but converted to solid upon photoirradiation.

Low molecular weight poly (TMC) is a viscous

liquid. In this study, we prepared a series of liquid acrylated TMC-based biodegradable polymers, which was obtained by polymerization with a low molecular weight PEG as an initiator and subsequently acrylate-endcapped. The visible - light-induced photocuring characteristics, hydrolytic behaviors, and cell adhesivity were evaluated.

#### B. Methods

TMC-based prepolymers were prepared using TMC as monomer and poly (ethylene glycol)(PEG) (mol. wt. 200 or 1,000) or trimethylene propane (TMP) as an initiator and tin(II)2-ethylhexanoate as a catalyst at almost full

conversion. Subsequently hydroxyl groups at terminal ends of prepolymers were esterified using an excess of acryloyl chloride.

Visible-light-induced photocuring characteristics were investigated with different conditions such as light intensity, camphorquinone concentration, and liquid film thickness.

The degradation behaviors in PBS were determined from weight loss, water uptake, and microscopic changes observed under scanning electron microscope (SEM) for dried samples and atomic force microscope (AFM) in water.

Swelling depth was measured with a confocal laser-scanning microscope (LSM). To characterize the changes of elastic properties of the copolymers during hydrolysis, microscopic indentation test was performed by an AFM. Young's modulus of outermost surface region and subsurface, and thickness of highly swollen layer were calculated from the force-indentation curves.

Adhesion, spread, and proliferation of fibroblasts (Swiss3T3) were carried out on the photocured films with or without 4-week immersion in PBS.

### C. Results and Discussion

Table 1. Liquid acrylate-endcapped copolymers

Polymer Code	Acrylate end-capped prepolymer <sup>a</sup>			Photocured film		
	Initiator	TMC : Initiator	Acrylated ratio(%)	Gel yield Max (%)	Contact angle Advancing	Contact angle Receding
T/P1ka	PEG 1000	1 : 0.077	97	92.7	23.8 ± 1.62	— <sup>b</sup>
T/P1kb	PEG 1000	1 : 0.029	99	86.1	27.9 ± 5.26	9.3 ± 2.03
T/P200a	PEG 200	1 : 0.074	99	92.3	55.9 ± 0.99	20.3 ± 1.10
T/P200b	PEG 200	1 : 0.247	90	97.9	41.5 ± 2.55	27.0 ± 3.56
T/TMP	TMP	1 : 0.168	92	97.8	59.2 ± 1.50	47.4 ± 5.33

a) determined by <sup>1</sup>H-NMR. b) rapidly swelled and almost wet.

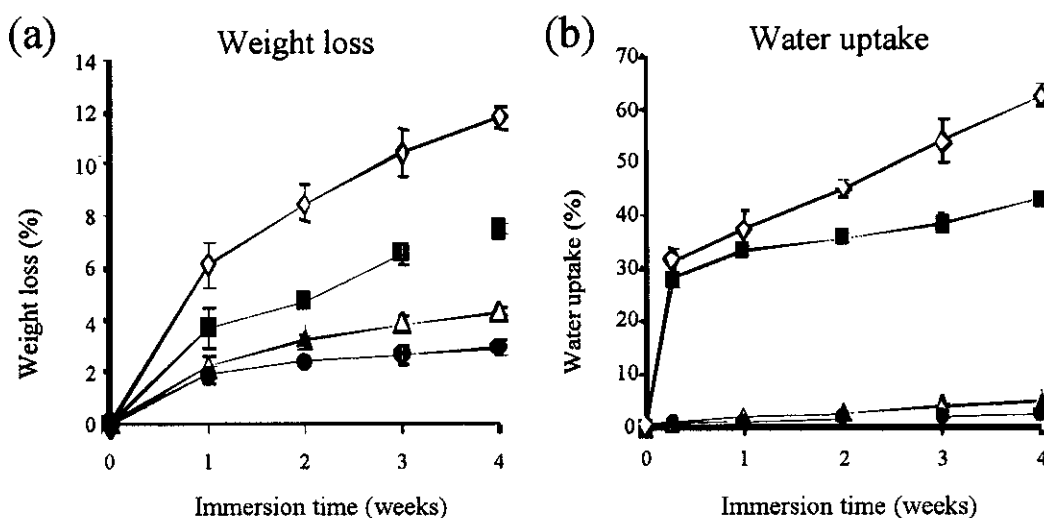


Figure 1. (a) The weight loss and (b) water uptake of photocured (co) polymer films (P(T/P1kb) (■), P(T/P200b) (○), P(T/TMP) (▲), and P(T/L/P1k) (◇)) during degradation (n=3).

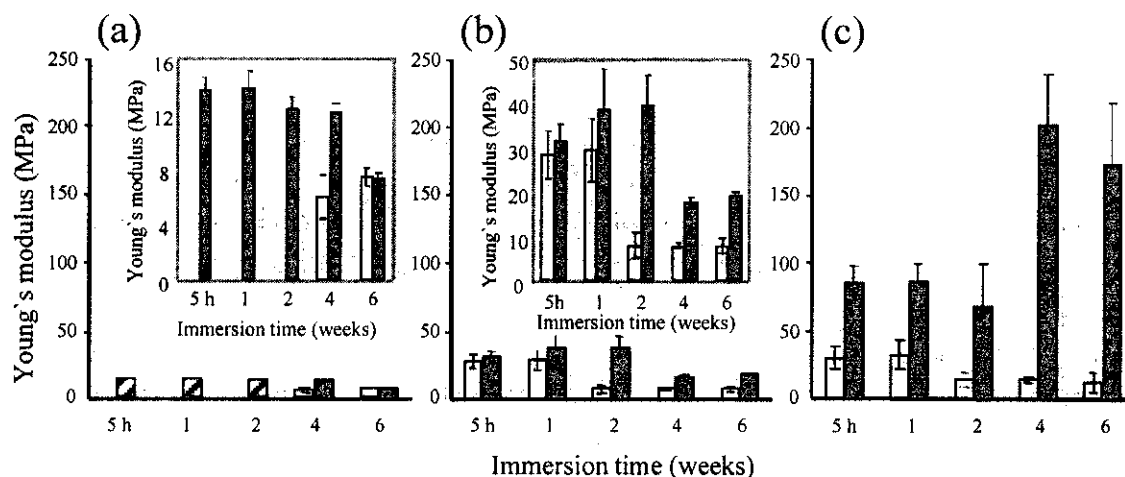


Figure 2. Hertz model for a conical tip and or for flat-ended cylindrical tip applied Young's moduli of the outermost surface region (□) and subsurface (■) fitted from force-indentation curves (a) P(T/P1kb), (b) P(T/P200b), and (c) P(T/TMP) (n=10).

(1) TMC-based prepolymers were paste, viscous liquid, or liquid at room temperature, depending on the composition and molar ratio of the monomer to the hydroxyl groups of the initiator (Table 1). (2) Under visible-light irradiation at higher light intensity (100 and 200 mW/cm<sup>2</sup>) for over 10 sec. of irradiation, the gel yield of over 90% was obtained, irrespective of acrylated polymers. (3) Irrespective of type of acrylated polymers, weight loss and water uptake of the photocured films gradually increased with the immersion time. The photocured films of copolymers (T/P200b and T/TMP) exhibited much smaller weight loss (Figure 1a) and much lower water uptake (Figure 1b) than (T/P1ka). (4) SEM images showed that surfaces of higher degradable copolymers were more roughened upon immersion into water than those of less biodegradable copolymer. (5) Both surface and bulk region were highly swellable for TMC-based copolymer (T/P1ka), whereas swelling was limited to non-swellable (T/P200b) and (T/TMP). (6) Young's moduli of outermost surface region and subsurface of the photocured films except for subsurface of (T/TMP) decreased with immersion time. Young's moduli of the three copolymer

films increased with the following order: (T/P1ka) < (T/P200b) < (T/TMP) (Figure 2). These trends suggest that Young's modulus of the copolymer film decreases with an increase of its hydrophilicity. (7) Copolymers obtained from PEG as an initiator, (T/P1ka) and (T/P200b), were hydrophilic and not cell adhesive. Otherwise, hydrophobic copolymer (T/TMP) showed cell adhesion and proliferation. These photocurable copolymers with different hydrolytical characteristics and cell adhesivity can be considered to be useful for fabricating micro-stereolithograph photoconstructs, which is now under study.

#### D. Conclusion

These photocurable polymers with different hydrolytical characteristics and cell adhesivity can be considered to be useful for fabrication micro-stereolithograph photoconstructs, which is now under study.

E. Publication : none

F. Patent : none

## 厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

### 分担研究報告書

#### 電界紡糸（electrospinning）法による機能的人工細胞外マトリックス・骨格基材のナノ設計・ナノ加工とそのマイクロデバイス化技術の開発

分担研究者 木戸秋 悟 （九州大学大学院医学研究院医用工学助教授）

**研究要旨：**電界紡糸（electrospinning）技術を応用して種々の医用材料用ポリマーをナノ・マイクロファイバー化するとともに、その構造制御の条件を調べた。その知見を活用し、ナノ・マイクロファイバーメッシュを積層化・混合化した機能的マトリックスを作製法を開発した。異なる機能を有する各種ポリマーを複合的に混合・積層することで、組織工学材料に用いる高機能の人工細胞外マトリックス・骨格基材のナノ設計・ナノ加工が可能になる。そのマイクロデバイス化への応用例として外径 5 mm のチューブ状構造体の加工を試み、小口径人工血管のプロトタイプの作製に成功した。

#### A. 研究目的

高電圧電場を用いたポリマー紡糸法である electrospinning (ELSP) は、他の紡糸法では得ることが困難なナノ・スケールサイズの直径のファイバーを生成できる。この方法では、天然の細胞外マトリックスの微視的構造によく似た、ナノスケールファイバーから成るメッシュ構造を簡便に作製することが可能なため、近年、人工細胞外マトリックスや医療デバイスの骨格基材等の組織工学材料構築への新たな応用可能性が期待されている。本研究では、ELSP 法を応用して種々の医用材料用ポリマーのナノ・マイクロファイバーメッシュ構造の設計・加工技術を確立し、新たな機能的人工細胞外マトリックスの構築法を開発するとともに、そのマイクロデバイス化への応用を目的とした。本年度はその遂行にあたり、以下の 4 点の課題に取り組んだ。

- 1) 種々のポリマーの ELSP ナノ・マイクロファイバー化
- 2) SP ファイバーの構造制御法の検討

- 3) 機能的マトリックス・骨格基材化への応用可能性の検討

- 4) マイクロデバイス化

#### B. 研究方法

ELSP 装置は、直流高電圧電源 (Max : 30kV)、インフュージョンポンプ、ステンレスニードルシリンジ、および導体コレクタを連結・配線して作成した。光反応性基導入ゼラチン、タイプ I コラーゲン、poly(lactide-co-ε-caprolactone)、セグメント化ポリウレタン、poly(ethylene glycol) 等の各ポリマーそれぞれについて、適当な溶媒に溶かしたポリマー溶液をシリンジにセットした後、ポリマー濃度・流速・印加電圧・シリンジーコレクタ間距離を変化させて射出し、コレクタ上に堆積した不織布の微視的構造を走査電顕観察により調べた。マイクロデバイス化の際のマンドレル・トラバース装置は、ELSP 装置との組み合わせが可能なように本研究において特注して作成したものをを用いた。回転するマン

ドレル上に上記各種ポリマーを ELSP 装置によって射出し、生成したナノ・マイクロファイバーを連続的に巻取って、ナノ・マイクロファイバーメッシュからなるチューブ状構造体を作成した。

## C. 研究成果および考察

**1. 種々のポリマーの ELSP ナノ・マイクロファイバー化：**人工細胞外マトリックスを構築する際に用いる要素ポリマーとして、光誘起ゲル化能を有する光反応性基導入ゼラチン、高い細胞接着性を提供するタイプ I コラーゲン、および生分解性と高い機械的強度を示す poly(lactide-co-ε-caprolactone) を取り上げ、それぞれについて ELSP を行ったところ、いずれのポリマーも溶媒・ポリマー濃度・流速・印加電圧・シリンジーコレクタ間距離を適切に選択・調節することにより、ナノ・マイクロファイバー化することができた (図 1 a~c)。また、医療用デバイスの骨格基材の構築に用いる要素ポリマーとして取り上げたセグメント化ポリウレタンについても、これらの各ポリマーと同様にマイクロファイバー化することが可能であった (図 1 d)。

**2. ELSP ファイバーの構造制御法の検討：**溶媒の種類・ポリマー濃度・流速・印加電圧・シリンジーコレクタ間距離等の ELSP 操作時のパラメータが ELSP 産物の微視的構造に与える影響を調べたところ、特にポリマー濃度およびシリンジーコレクタ間距離の増大に対して、ビーズ状構造→ファイバー→ファイバー径の増大、の構造制御が可能であることがわかった (図 2：光反応性基導入ゼラチンの場合)。このような構造制御は本年度取り上げた他の各種ポリマーについても同様に見られる一般的な特性であることもわかった。このような構造制御法は細胞外マトリックスや骨格基材のナノ・マイクロレベルでの構造設

計や、細胞との相互作用の調節等の組織工学的制御要因として活用可能であると考えられる。

## 3 機能的マトリックス・骨格基材化への応

**用可能性の検討：**上述の方法で得られる各種要素ポリマーのナノ・マイクロファイバーメッシュを機能的マトリックスおよび骨格基材の構築に応用するための新しい技術・方法論の開発を目指し、ELSP の新しい操作法として積層・混合 ELSP 法を考案した (研究代表者による発案：図 3)。ELSP 法では二つ以上のシリンジを用いて異なるポリマーを逐次的・連続的に飛ばすことにより、簡便に異なるポリマーのナノ・マイクロファイバーメッシュの積層構造を作製することができる。実際に、下層にセグメント化ポリウレタン、中層に光反応性基導入ゼラチン、上層にコラーゲン、の各ナノ・マイクロファイバーメッシュの積層マトリックスを作製することができた (図 4)。このような手法で、異なる機能・特性を有する要素ポリマーのナノ・マイクロファイバーメッシュを適切に積層・混合化することができれば、ナノ・マイクロレベルで三次元的によく設計され機能的配置された新しい高機能マトリックスや三次元組織体の構築の基礎技術となり得ると考えられる。また、セグメント化ポリウレタンの場合では、ELSP 法によってナノ・マイクロファイバーメッシュ化することにより顕著に伸縮性が向上するなど (図 5)、骨格基材の高機能化にも ELSP 法が極めて有効であることが確認された。

**4 マイクロデバイス化：**上述の検討課題 3 において見いだされた機能的マトリックス・骨格基材化の手法を応用して実際の医療デバイスを構築する技術を実現するため、本年度は小口径人工血管のプロトタイプとしてのチューブ状構造体の作製を検討した。ELSP 装置とマンドレル・トラバース装置を組み合わ

せることにより (図 6)、ELSP メッシュをチューブ状構造体として回収することを試みた結果、セグメント化ポリウレタンのマイクロファイバーメッシュからなる外径 5 mm のチューブ状構造体を作製できた (図 7)。この

ELSP ポリウレタンチューブは非常に伸縮性が高くしなやかであり、実際の血管との高い機械的適合性を期待できるものと考えられる。

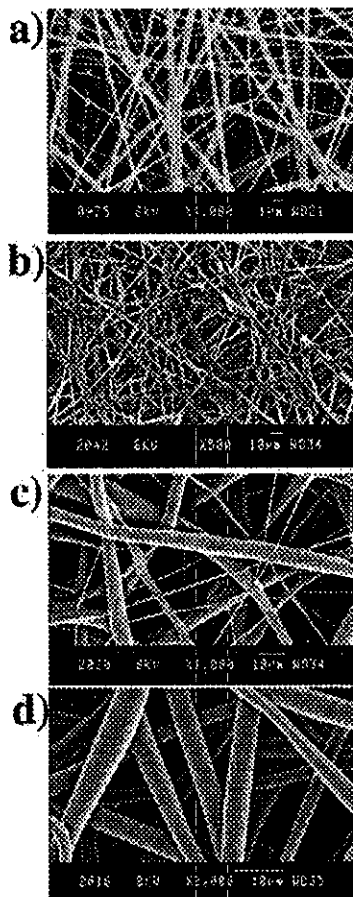


図 1

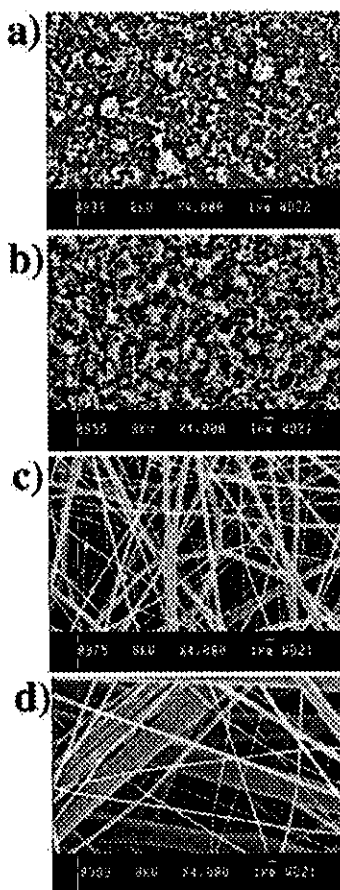


図 2

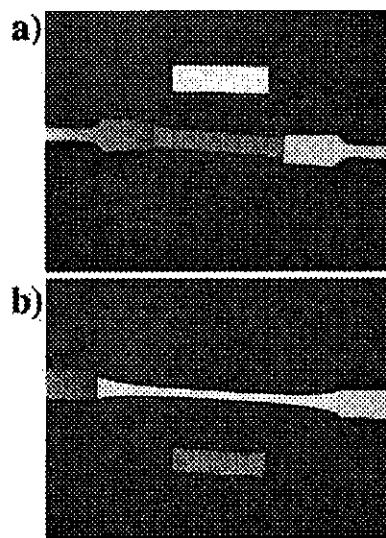


図 3

図 1 : Electrospinning 法により作製した組織工学材料用各種高分子のナノ・マイクロファイバーの電子顕微鏡像。a) 光反応性基導入ゼラチン、b) タイプ I コラーゲン、c) poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)、d) セグメント化ポリウレタン。

図 2 : 光反応性基導入ゼラチンの Electrospinning 産物のナノ構造制御。a) ビーズ状構造、b) ネットレス状構造、c) ナノファイバー構造、d) ナノファイバーとマイクロファイバーの共存。

図 3 : 二つのジェットを用いたナノ・マイクロファイバーメッシュの積層化。

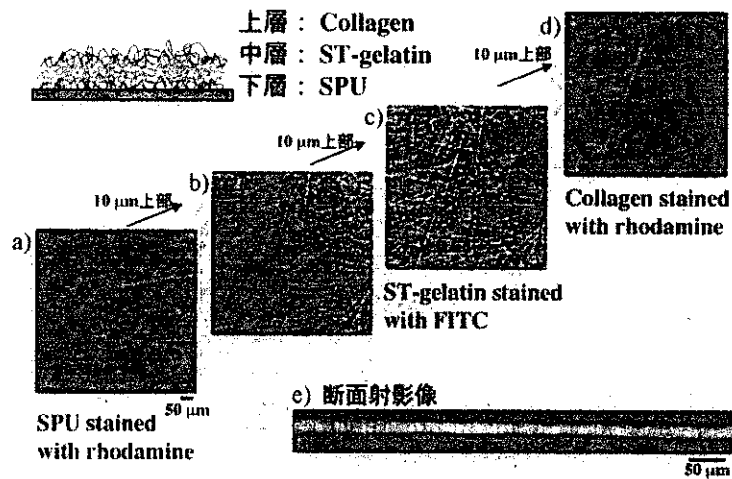


図 4：積層化ナノ・マイクロファイバームッシュの作製例。a) 最下層に作製したセグメント化ポリウレタンのローダミン染色マイクロファイバームッシュ、b) 10μm 上方の SPU メッシュ、c) 中層に作製した光反応性基導入ゼラチンの FITC 染色ナノファイバームッシュ、d) 最上層に作製したコラーゲンのローダミン染色マイクロファイバームッシュ。

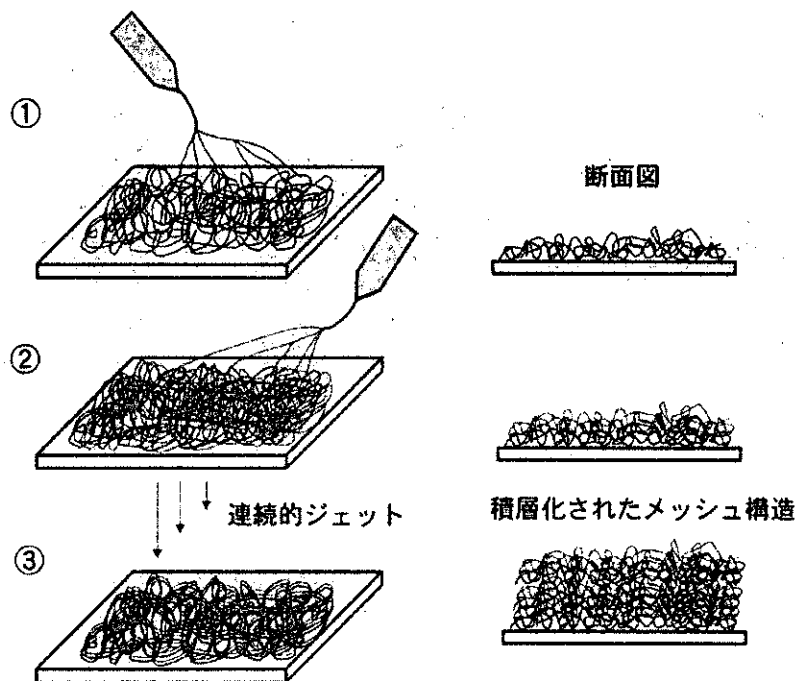


図 5：Electrospinning 法により作製した、セグメント化ポリウレタンのナノ・マイクロファイバールームの伸縮性の向上。a) と b) において、上：ELSP 法による SPU フィルム、下：押し出し製法による SPU フィルム。



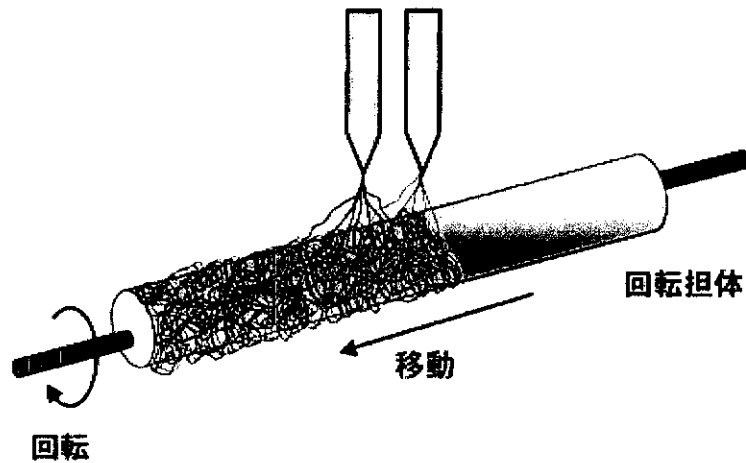


図 6 : 積層化・相互侵入・混合化 Electrospinning 法を応用した機能的ナノ・マイクロファイバーメッシュチューブの作製法。

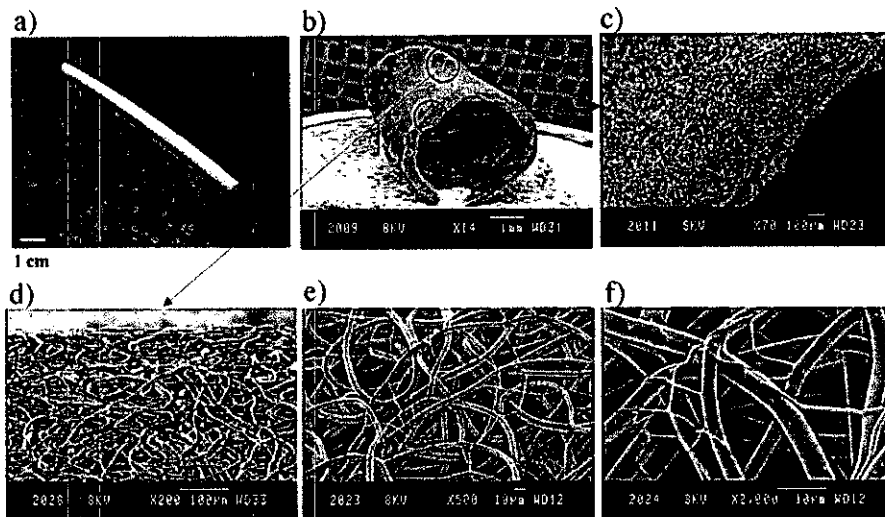


図 7 : 作製されたセグメント化ポリウレタンのマイクロファイバーメッシュチューブ。a) 外観、b) ~ f) 電子顕微鏡像。

#### D. 結論

本年度は、ELSP 法を活用して (1) 組織工学用各種要素ポリマーのナノ・マイクロファイバー化、(2) そのナノ・マイクロスケールでの構造制御法の確立、(3) ナノ・マイクロファイバーメッシュの積層・混合化技術の開発、および (4) ナノ・マイクロファイバー

メッシュからなる機能的微小径人工血管のプロトタイプ作製、の 4 点の課題の遂行に成功した。次年度はこれらの成果をさらに発展させ、新しい機能的人工細胞外マトリックス・骨格基材の設計・加工・作製を行うとともに、生体内での機能評価・生体適合性評価を行う。

**E. 研究発表**

**1. 論文発表**

1) S. Kidoaki and T. Matsuda

Mechanistic aspects of protein/material interactions probed by atomic force microscopy.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 23, 153-163, 2002.

2) S. Kidoaki, K. Yoshikawa, T. Matsuda

Correlation between the degree of development of apical actin stress fibers and the microelasticity of apical membrane observed in Swiss 3T3

fibroblasts

Exp. Cell. Res. 2003 (submitted)

**2. 学会発表**

1) 木戸秋悟、松田武久

Electrospinning による機能性ナノファイバーと組織工学

第24回バイオマテリアル学会、東京、2002年11月

**F. 知的財産の出願・登録状況：なし**

## 厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

### 分担研究報告書

#### 新しい設計概念による遺伝子キャリア

分担研究者 新海 征治（九州大学大学院工学研究院応用化学部門教授）

**研究要旨：**最近、我々のグループが見い出した $\beta$ -1,3-グルカン類の多糖が、RNA/DNA と相互作用して複合体を形成するという現象を利用して、A-T、G-C の組み合わせに依存しない全く新たに「純国産」の遺伝子関連テクノロジーを開拓する。

#### A. 研究目的

中国に古代から伝わる漢方薬の処方の中に、多糖を多く含むある種のキノコが滋養強壮に良く、特に婦人科の疾病の治癒に有効である事が記載されている。近代科学は、 $\beta$ -1,3-グルカンがその有効成分であり、体内に入った $\beta$ -1,3-グルカンはマクロファージに取り込まれ免疫系を活性化する事を明らかにした。現在では、国内の製薬メーカーから、 $\beta$ -1,3-グルカン類の一種であるレンチナンやシゾフィランが子宮ガンの筋肉注射製剤として発売されている。しかし、その生理活性の分子生物学的なメカニズムはまったく不明なままである。

一方、我々は、糖鎖の分子認識メカニズムを応用し、精密分子識別能を持つ宿主分子の構築を試みて来た。この中で、有機ゲル超分子をマトリックス上に糖鎖を固定化することに成功した。このようにして作製された分子組織体は、極めてユニークな超分子構造を有すると同時に特異的な分子認識能力を示した。これは、超分子構造のナノオーダーの周期性・規則性と、糖を構成する原子オーダーの規則性の両因子が相乗的に働いた、全く新しいタイプの分子認識メカニズムであり、「1

次元分子認識システム」として世界的に認知されるに至っている。

このような「1次元分子認識システム」の立場から自然界の物質を眺めると、生体はこの原理を巧みに利用してDNAやタンパクの高次構造を制御している。その中でも、我々は特に天然に存在する $\beta$ -1,3-グルカン類の3重螺旋に注目した。この螺旋構造は、加熱や極性有機溶媒に溶解することによって崩壊し、3本のランダムなコンフォメーションを有する糖鎖に変化する。しかし、ランダムな糖鎖を室温で水溶液中に戻すと3重螺旋へと可逆的に回復する。このプロセスはDNAの2螺旋形成に極似している上に、 $\beta$ -1,3-グルカン類の3重螺旋構造がDNAの2重螺旋構造に極めて類似している。この事より、核酸が系内に存在する状況で糖の螺旋構造の再生を行うと、核酸と多糖があらたな複合体を形成すると予想した。この予想は正しく、カードラン、シゾフィラン、レンチナン等のすべての $\beta$ -1,3-グルカン類で、核酸と多糖の複合体の形成が起こることを世界で初めて発見した。

DNAやRNAと相互作用する化合物は遺伝子工学上重要であり、ポストゲノムやプロテオミクスの技術開発の中で、極めて広範な

応用範囲がある。さらに、 $\beta$ -1,3-グルカンは、体内での安全性が既に実証済みの化合物であり、実用化への障害が少ないと予想される。この様に、天然に存在し且つ安全な材料で、核酸と相互作用する材料が発見されたことの意義は極めて大きい。本研究では、この1次元分子認識システムを用いて DNA や RNA を人工的に制御（マニピュレート）する方法論の確立を目指す。

## B. 研究方法、研究成果及び考察

### (a) NMR と X 線による複合体の構造解析：

多糖・DNA の3重螺旋複合体の構造は、計算化学を基に予測した最安定構造であり、X 線解析により原子座標まで正確に決定されてはいない。また、もっとも重要である結合様式の詳しい構造に関してはまったく未知である。複合体の構造解析は基礎科学の見地からも、また  $\beta$ -1,3-グルカンを化学修飾によって機能化のデザインをする為にも、精密な

構造に関する知見は極めて重要と考える。プロジェクトの終了間際に、低分子量のカードランでも核酸と複合体を形成することを見出した。この系を利用して、NMR と X 線結晶解析を実施し、複合体の構造および多糖・核酸の相互作用の精密な分子メカニズムを解明しつつある。

### (b) 理論計算からの構造予測

X 線結晶解析や NMR による構造解析とともに、水素結合の役割、添加塩効果、疎水性相互作用などについても計算化学的手法を駆使して検討し、その安定化要因が相補的水素結合の形成に大きく依存することを見出した。また、カチオン性置換基導入による複合体の安定化効果についても予測する。

### (c) $\beta$ -1,3-グルカンの化学修飾手法の確立

$\beta$ -1,3-グルカンは遺伝子マニピュレーターを構築するにあたり理想的なインターフェ

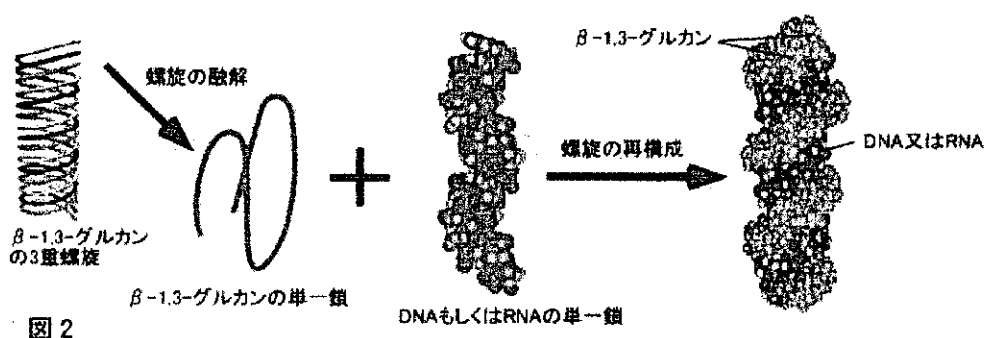
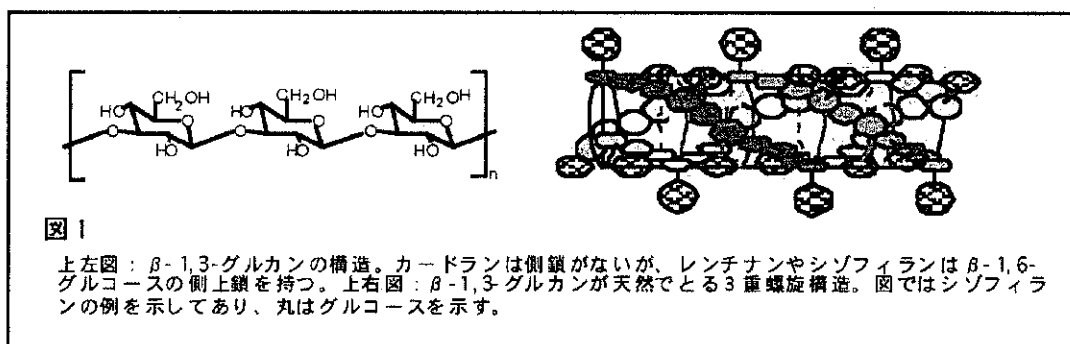


図2  $\beta$ -1,3-グルカンの螺旋の再構成時に形成される、多糖2:核酸1からなる新しい3重螺旋の形成。