

- 臨床的研究. 第 110 回日本薬理学会関東部会 (6月5日、2004年、静岡). シンポジウム「セリン/スレオニンキナーゼ阻害薬の基礎と臨床への展開」
- 38) 吉田昌義、榊元章浩、伊藤 昭、井上修二郎、福本義弘、廣岡良隆、下川宏明、砂川賢二: LMT 相当病変の AMI に対して PCPS 下の Y ステントにて救命し得た症例. 第 9 6 回日本循環器学会九州地方会 (6月26日、2004年、熊本)
- 39) 堤 孝樹、山本博昭、榊元章浩、福本義弘、廣岡良隆、比嘉えりか、井上博雅、小島武士、中西洋一、下川宏明、砂川賢二: 無症状で発見された右内胸動脈-肺動脈ろうの一例. 第 9 6 回日本循環器学会九州地方会 (6月26日、2004年、熊本)
- 40) 荒木周一郎、井口孝介、榊元章浩、吉田昌義、福本義弘、伊藤 昭、廣岡良隆、下川宏明、砂川賢二: 急性期にタコツボ型の左室収縮不全を認め、回復期のアセチルコリン負荷で冠微小循環不全が疑われた一例. 第 9 6 回日本循環器学会九州地方会 (6月26日、2004年、熊本)
- 41) 福本義弘、下川宏明、大井啓司、阿部弘太郎、上徳豊和、伊藤 昭、竹下 彰、砂川賢二: 重症虚血性心疾患に対する非侵襲性体外衝撃波治療の開発. 第 4 回心血管再生・アポトーシスフォーラム (7月3日、2004年、東京)
- 42) 福本義弘、下川宏明、大井啓司、阿部弘太郎、上徳豊和、伊藤 昭、竹下 彰、砂川賢二: 重症虚血性心疾患に対する非侵襲性体外衝撃波治療の開発. 第 10 回成人病の病因・病態の解明に関する研究会 (7月3日、2004年、軽井沢)
- 43) 下川宏明: 内皮由来弛緩因子と活性酸素. 第 10 回北海道活性酸素・フリーラジカル研究会 (7月10日、2004年、札幌)
- 44) 下川宏明: 動脈硬化の治療標的としての Rho-kinase の重要性. 第 41 回日本臨床分子医学会学術集会 (7月16日、2004年、福岡) Translational Research Forum I 「Metabolic Syndrome の分子基盤と新たな治療展開」
- 45) 下川宏明: 血管病の克服を目指した展開医療の実践. 第 8 回信州ハートクラブ (7月17日、2004年、松本)
- 46) 服部 剛、阿部弘太郎、東みどり子、松本泰治、廣木潤子、向井 靖、江頭泰博、盛重邦雄、下川宏明: 血管リモデリングの治療標的としての Rho-kinase の意義. 第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 (7月23-24日、2004年、福岡). シンポジウム「血管リモデリングの制御」
- 47) 東みどり子、下川宏明: Angiotensin II 誘発性心血管肥大における Rho-kinase の関与. 第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 (7月23-24日、2004年、福岡). シンポジウム「血管リモデリングの制御」
- 48) 阿部弘太郎、下川宏明: Rho-kinase を標的とした原発性肺高血圧治療の新しい分子治療法の開発. 第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 (7月23-24日、2004年、福岡). シンポジウム「血管リモデリングの制御」
- 49) 上徳豊和、大井啓司、下川宏明: 低出力体外衝撃波を用いた重症虚血性心疾患に対する非侵襲性血管新生療法の開発. 第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 (7月23-24日、2004年、福岡). シンポジウム「血管リモデリングの制御」
- 50) 松本泰治、上徳豊和、大井啓司、阿部弘太郎、下川宏明: 選択的 CCR2 ケモカイン

- 受容体阻害薬である Propagermanium は動脈硬化プラタ冠動脈におけるステント留置後の内膜肥厚形成を抑制する。第36回日本動脈硬化学会学術総会（7月23-24日、2004年、福岡）。シンポジウム「血管リモデリングの制御」
- 51) 下川宏明：虚血性心疾患と EPA。第9回東京ブロック JELIS 研究会（7月31日、2004年、東京）
- 52) 森川敬子、的場哲哉、窪田 洋、畠中 真、藤木貴子、下川宏明：内皮由来過分極因子(EDHF)の産生における Cu, Zn-SOD の役割。第2回血液・血管オルピス（8月28-29日、2004年、神戸）
- 53) 市来俊弘、小野弘樹、下川宏明、砂川賢二：血管平滑筋における Mst1 の機能。第5回血管病研究会（8月21日、2004年、名古屋）
- 54) 阿部弘太郎、下川宏明：肺高血圧症の新たな治療標的としての Rho-kinase の意義。第4回 Cardiovascular Medicine 21 フォーラム（8月21日、2004年、東京）
- 55) 下川宏明：動脈硬化における Rho-kinase の関与。第52回日本心臓病学会学術集会（9月13-15日、2004年、京都）【教育講演】
- 56) 下川宏明：狭心症治療の実際と新しい治療法の展望。第52回日本心臓病学会学術集会（9月13-15日、2004年、京都）【ランチョンセミナー】
- 57) 福本義弘、下川宏明、竹下 彰、砂川賢二：重症虚血性心臓病に対する非侵襲性体外衝撃波療法の開発。第52回日本心臓病学会学術集会（9月13-15日、2004年、京都）
- 58) 福本義弘、下川宏明、竹下 彰、砂川賢二：肺高血圧に対する新たな治療戦略：Rho キナーゼ阻害薬。第52回日本心臓病学会学術集会（9月13-15日、2004年、京都）
- 59) 廣岡良隆、榊元章浩、田川辰也、下川宏明、竹下 彰、砂川賢二：心不全患者の血管拡張反応異常における Rho-kinase の役割。第52回日本心臓病学会学術集会（9月13-15日、2004年、京都）
- 60) 大井啓司、下川宏明、廣木潤子、上徳豊和、阿部弘太郎、竹下 彰：ポックリ病患者由来のレムナントリポ蛋白分画はセロトニン誘発性冠攣縮性反応を惹起する。第52回日本心臓病学会学術集会（9月13-15日、2004年、京都）
- 61) 大井啓司、下川宏明、上徳豊和、竹下 彰、砂川賢二：低出力体外衝撃波を用いた重症虚血性心臓病に対する非侵襲性血管新生療法の開発 -基礎的検討-。第52回日本心臓病学会学術集会（9月13-15日、2004年、京都）
- 62) 上徳豊和、下川宏明、阿部弘太郎、大井啓司、樋詰貴登士、砂川賢二：急性心筋梗塞後の左室リモデリングに対する非侵襲性体外式衝撃波治療の開発。第52回日本心臓病学会学術集会（9月13-15日、2004年、京都）
- 63) 下川宏明：虚血性心疾患の成因における Rho-kinase の意義。東海医学会講演会（9月22日、2004年、伊勢原）
- 64) 下川宏明：重症虚血性心臓病に対する体外衝撃波治療の開発。福岡労災保険指定病院協会学術講演会（10月26日、2004年、福岡）
- 65) 下川宏明：虚血性心疾患治療の最前線 -この1年間の動向-。第23期循環器内科学生涯講座（10月28日、2004年、福岡）
- 66) T. Hattori, H. Shimokawa, Rho-kinase as a novel therapeutic target in the

- treatment of cardiovascular diseases. 第1回日本血管生物医学会（11月4-6日、2004、淡路島）【シンポジウム】 New strategy for suppression of disease.
- 67) T. Fujiki, H. Shimokawa, K. Morikawa, H. Kubota, M. Hatanaka, T. Matoba, MAH. Talukder, A. Takeshita, K. Sunagawa. Endothelium-derived hydrogen peroxide accounts for the enhancing effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on EDHF-mediated relaxations in mice. 第1回日本血管生物医学会（11月4-6日、2004、淡路島）【シンポジウム】 New strategy for suppression of disease.
- 68) K. Morikawa, T. Kubota, T. Matoba, T. Fujiki, M. Hatanaka, H. Shimokawa. Important role of superoxide dismutase in EDHF-mediated relaxations of human mesenteric arteries. 第1回日本血管生物医学会（11月4-6日、2004、淡路島）【シンポジウム】 New strategy for suppression of disease.
- 69) K. Abe, T. Uwatoku, K. Oi, T. Hizume, T. Hattori, H. Shimokawa. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. 第1回日本血管生物医学会（11月4-6日、2004、淡路島）【シンポジウム】 New strategy for suppression of disease.
- 70) T. Uwatoku, H. Shimokawa, K. Abe, K. Oi, T. Hizume, K. Sunagawa. Extracorporeal cardiac shock wave therapy suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in pigs. 第1回日本血管生物医学会（11月4-6日、2004、淡路島）【シンポジウム】 New strategy for suppression of disease.
- 71) 樋詰貴登士、下川宏明、久保千春：血清コルチゾールの持続高値はブタ冠動脈の過収縮反応を惹起する—Rho-kinase 経路の関与—, 第2回日本循環器心身医学会（11月27日、2004年、名古屋）
- 72) 下川宏明, Rho-kinase 阻害薬の将来展望. Sunrise Stroke Session for Rho-kinase inhibitors（12月11日、2004年、東京）

#### D. 知的財産の出願・登録状況

- 1) 特許名：心血管病の治療又は予防の為の  
医薬組成物  
発明者：下川宏明  
出願人：三共株式会社  
出願日：2004年1月29日  
出願番号：2004-21864
- 2) 特許名：MRI用造影剤  
発明者：片山佳樹、下川宏明、山本竜広  
出願人：(株)産学連携機構九州  
国際出願日：2004年2月3日  
国際出願番号：PCT/JP2004/001063  
国際公開日：2004年9月10日

# 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：細胞内シグナルに応答する遺伝子発現制御剤の開発では、新たに、プロテインキナーゼ C(PKC)、HIV プロテアーゼに応答するキャリアーの開発に成功した。また、PKC 応答型キャリアーの開発に伴い、PKC $\alpha$ 特異的な基質設計を行い、マウスを用いて、がん組織で特異的にリン酸化される基質を見出した。プロテインキナーゼ A(PKA)に応答するキャリアーでは、種々の薬物刺激に伴う細胞内の PKA 活性化と遺伝子発現制御能の相関を検討し、本キャリアーを用いたときの遺伝子発現応答が、確かに細胞内 PKA の活性化に基づくものであることを証明した。血管傷害部位診断用の機能化造影剤開発にあたっては、これまでに見出したエバンスブルー誘導体型の造影剤が、ApoE ノックアウトマウスでの動脈硬化病変を造影可能であることを見出した。さらに、エバンスブルー誘導体を用いる血管病変ターゲティング概念を応用した DDS 用高分子ミセル形成材料の開発にも成功した。

### A. 研究目的

遺伝子を標的細胞選択に選択的に送達せしめることは、極めて重要な条件であるが、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、遺伝子治療では、現在では臨床応用は細胞選択性が必要とされない場合に限定されている。これまでの DDS における標的細胞へのターゲティングは、細胞表面に存在する特異的マーカー分子を利用する戦略が主流である。しかしながら、このような手法は臓器選択性を実現するには、ある程度有効な手法であるが、例えばがんをはじめとするような、疾患細胞に特異的なマーカーが利用できないことが多く、臨床的に優位な差を示すには至っていない。そこで、本研究では、細胞表面ではなく、内部に着目し、細胞内シグナルを利用する全く新しい細胞特異的 DDS の概念を創製することを目的としている。がんをはじめ、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。そこで、細胞にとって重要かつ一般性があり、種々の疾患に関連して異状活性化が見られるプロテインキナーゼ類とプロテアーゼ類を対象に、特定のシグナルの活性化に反応して、導入遺伝子を活性化できるインテリジェントなキャリアー分子を開発することを目的とする。ここでは、幾つかのガンで異状亢進が見られる PKA、PKC $\alpha$  に反応するシステム、及びウイルス疾患の治療の例として HIV プロテアーゼに反応するシステムの開発を目指した。

また、血管造影剤に関しては、血管全体を造影するものはなく、血管障害部位を選択的に造影でき、診断において有力な手段を提供する新規機能性造影剤の開発と、動脈硬化病変部位診断能の評価、および、同様のターゲティングメカニズムを利用した、血管病変への特異的 DDS 材料の開発を目指した。

## B. 研究方法

### PKAシグナル応答型遺伝子導入剤の性能評価

開発したPKA応答型遺伝子制御材料（基質ペプチドグラフト型ポリアクリルアミド）を用い、ルシフェラーゼをコードしたプラスミドと複合体として、HVJエンベロップに封入してNIH3T3細胞に導入した。この際、細胞を予め各種薬剤で刺激しておいた。導入後のルシフェラーゼ発光量から、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を評価した。また、同様の試薬で刺激した細胞にCREBを有する遺伝子カセットに組み込んだルシフェラーゼをリポフェクションにより導入し、発現量を評価することで、細胞内PKAの活性を評価した。

### PKC $\alpha$ 選択的基質の設計と評価

ガン組織で頻度高く亢進しているPKC $\alpha$ に着目し、種々の被リン酸化能を有する選択的基質の設計を試みた。種々のタンパクのPKC $\alpha$ によるリン酸化サイトの周辺配列をリストアップし、コンセンサス配列を設計後、リン酸化部位の周辺アミノ酸を系統的に変化させたペプチドを種々固相合成により合成して、

質料分析法を用いてPKC $\alpha$ によるリン酸化能を評価した。

### PKC $\alpha$ シグナル応答型遺伝子導入剤の開発

前項で開発した基質ペプチド配列を用い、これを側鎖に有する高分子型遺伝子キャリアーを合成した。すなわち、基質を合成する際にアミノ末端にN-メタクリロイルアラニンを導入して重合可能なマクロモノマーを合成し、アクリルアミドとラジカル共重合により合成した。得られた高分子を用いて遺伝子発現制御能を無細胞系遺伝子発現系、およびゲル電気泳動を用いて評価した。

### 機能化造影剤の評価

既に関連している機能化造影剤（図1）に関しては、昨年度、造影剤としての基礎能力を単離血管標本とバルーン障害血管のin vivoMRI検出により評価した（図2）。今年度は、同様の実験をApoEノックアウトマウスを用いて行ない、動脈硬化病変（不安定プラーク）の造影が可能であるかをT1強調法で画像化して評価した。

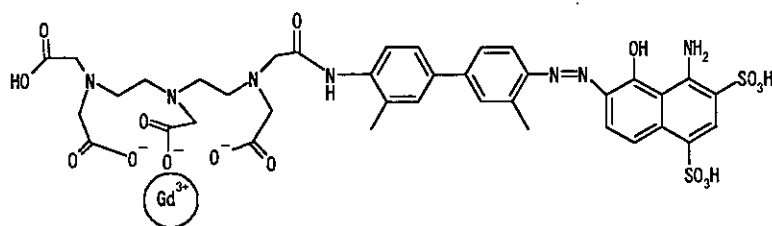


図1 機能化造影剤の構造

### 血管病変特異的DDS材料の開発と基礎評価

造影剤に用いた血管傷害部位認識分子（エバンスブルー誘導体）を有する図3に示した構造の3元共重合高分子を合成した。合成は、各ユニットを有するビニルモノマーを合成してラジカル共重合によった。精製は、透析とゲルクロマトグラフィーによった。

合成した高分子の基礎物性評価としては、動的光散乱法により形成したナノ粒子の粒径

を評価した。血管傷害部位への集積能の基礎評価は、ブタ大動脈切片を展開し、半分の内皮を機械的に傷害した標本に本高分子より形成されたナノ粒子の溶液で処理して、目視により評価した。また、ナノ粒子形成時に疎水性薬物であるドキシソルピシンを共存させて内包し、透析実験により外水相に漏れてくるドキシソルピシンの量を吸光分析により計測して、放出能を評価した。

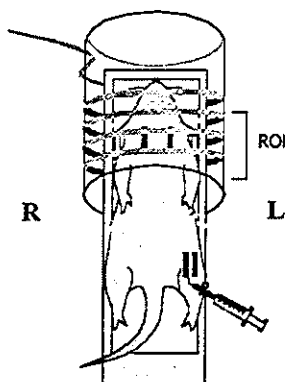


図2 in vivo MRI 造影実験法  
造影剤を大腿静脈から注入  
後、大動脈部位をMRI 撮像

新規DDS(Drug Delivery System)の開発

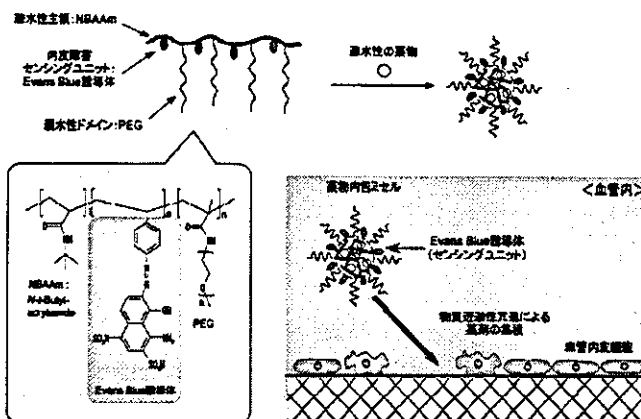


図3 血管病変部位特異的 DDS 材料

C. 研究成果

PKAシグナル応答型遺伝子導入剤の性能評価

開発したPKA応答型遺伝子送達材料を用い、昨年度までに確立した条件によりルシフェラーゼをコードした発現用ベクターDNAと混合して複合体を形成した。この複合体を、センダイウイルス由来のエンベロップ (HJVエンベロップ) に封入し、種々の薬物で刺激した細胞に導入した。複合体のルシフェラーゼ発現能と、CREBアッセイによる細胞内PKA活性の比較を図4に示した。Controlは、ルシフェラーゼ遺伝子をそのままHVJエンベロップで導入したものである。結果として、フォルスコリンで刺激した細胞でのみ遺伝子発現が活性化された。一方、CREBアッセイより、

この結果は細胞内PKA活性と相関していた。

PKC $\alpha$ 選択的基質の設計と評価

種々の基質配列を設計合成し、質料分析で基質能力評価した結果、PKC $\alpha$ に対する特異性に優れ、基質能力が互いに異なる3種類の基質ペプチド (図5) の設計に成功した。基質能力としては、PKC60が最も高く、PKC62, PKC64の順に低くなっている。

しかし、図6に示すようにマウスの各種臓器および組織のライゼートを調製して、それらの内在性PKC $\alpha$ によるリン酸化を評価したところ、基質能力の優れたPKC60と62では、いずれの臓器 (正常組織) でもリン酸化が進行してしまい、臓器間、特にガン組織とのコントラストが得られないことが分かった。一

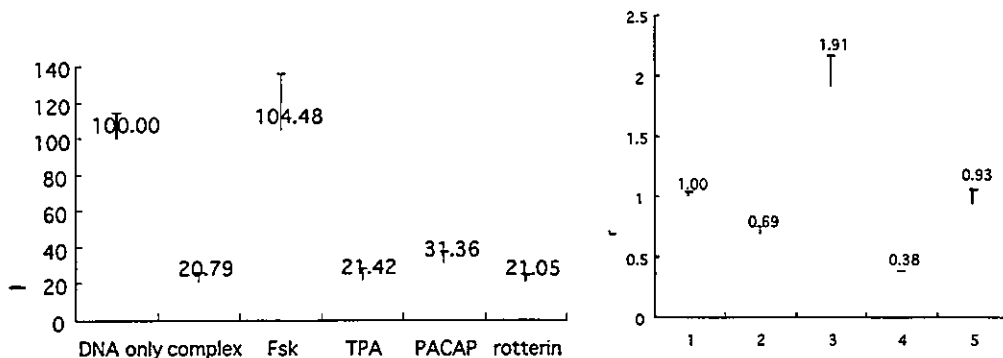


図4 左: Luciferase expression 結果. stimulation: Fsk 50 $\mu$ M, TPA 1 $\mu$ M, PACAP 10 $\mu$ M, rottlerin 20 $\mu$ M, 1:control 2:PACAP(10 $\mu$ M) 3:Fsk(50 $\mu$ M) 4:TPA(1 $\mu$ M) 5:Rottlerin(20 $\mu$ M)。右: CREB assay 結果 1:control 2:PACAP(10 $\mu$ M) 3:Fsk(50 $\mu$ M) 4:TPA(1 $\mu$ M) 5:Rottlerin(20 $\mu$ M)

方、最も基質能力としては劣っていたPKC64では、メラノーマで顕著なリン酸化が起こり、脾臓を除く他の組織ではリン酸化されないという良好なコントラストを示した。

- 1) PKC 60 : LRVQN phosphoSLRRRR cationの数 (5)、MW 1520.8
- 2) PKC 62 : LRKRK phosphoFRRRK cationの数 (8)、MW 1597.99
- 3) PKC 64 : FKKQG phosphoFAKKK cationの数 (5)、MW 1363.68

図5 設計したPKC $\alpha$ 基質配列

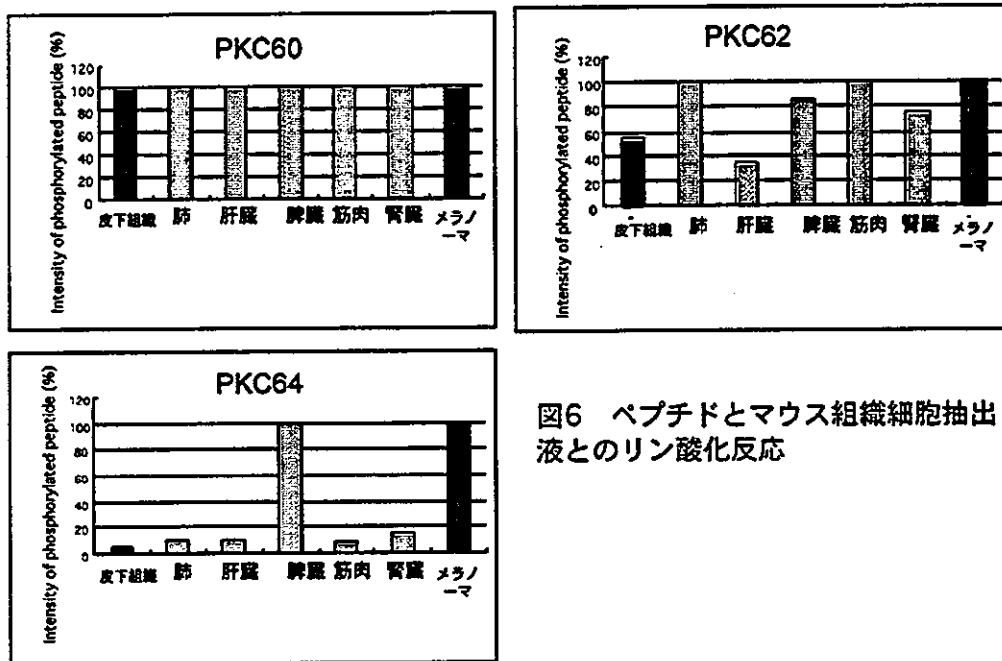


図6 ペプチドとマウス組織細胞抽出液とのリン酸化反応

#### PKC $\alpha$ シグナル応答型遺伝子導入剤の開発

図7に示したような構造を有するPKC62,62,64をそれぞれ組み込んだ高分子型遺伝子制御剤を合成した。これとDNAにより複合体を形成後、ゲル電気泳動を行うと、高分子のペプチド部分のカチオンとDNAリン酸残基のアニオンの荷電比が1以上になると複合体は泳動しなくなった。この溶液にPKC $\alpha$ を作用させると、元のDNAに基づくバンドが観察され、複合体が崩壊してDNAが開放されることが示唆された。また、無細胞系タンパ

ク発現系を用いて評価したところ、PKA応答型システムの場合と同様、複合体形成時には遺伝子の発現がほとんど完全に抑制され、PKC存在下では、その発現が完全に回復することが分かった。

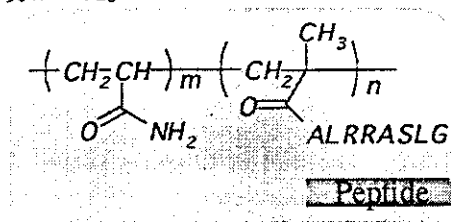


図7 PKC 応答型遺伝子送達材料

### 機能化造影剤の評価

図1に示した構造の機能化造影剤を用い、ApoEノックアウトマウスを用いて、in vivo MRIイメージングでT1強調画像により、動脈硬化病変の検出を試みたところ、図8の様に良好に大動脈上に存在する不安定プラークを検出することに成功した。このイメージング画像のシグナルの位置は、摘出した大動脈を展開した際の病変の位置と完全に一致していた。

### 血管病変特異的 DDS 材料の開発と基礎評価

図3に示した構造の3元共重合型DDS材料を合成した。その場合、導入するPEGユニットの導入比を種々変化させたところ、動的散乱の結果より、PEGユニットが5mol%以上で高分子ミセル型ナノ粒子を形成することが分かった。そこで、次にこれらの材料で調製したナノ粒子を用いて、血管単離標本を用いた結合実験を行った。図9に結果を示す。

ナノ粒子を形成しないPEGが1mol%の1PEGポリマーは、血管事態への吸着が見られなかった。一方、PEGユニットが10mol%と多

### 血管片との相互作用実験

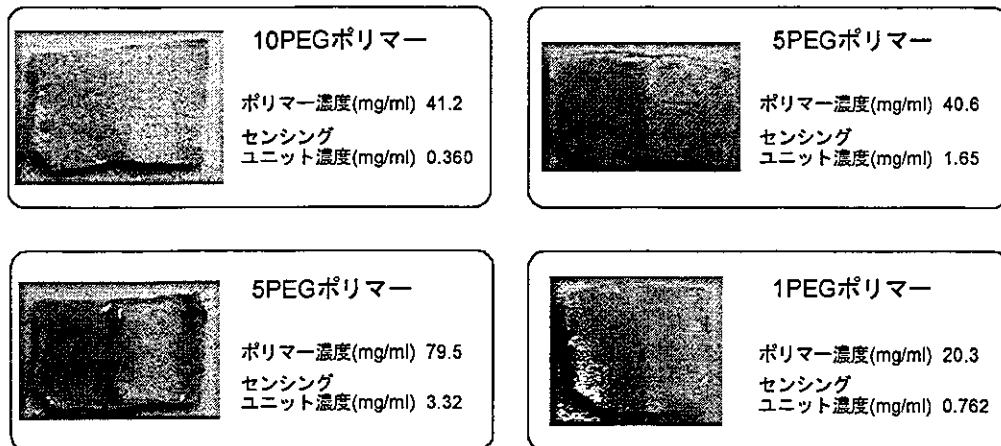
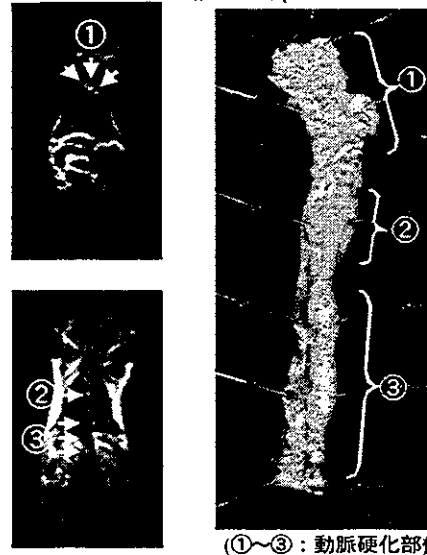


図9 プタ大動脈展開標本を用いた血管内皮傷害部位認識能評価

摘出標本(Sudan Red 染色)



(①~③) : 動脈硬化部位

図8 ApoE ノックアウトマウス の下行大動脈部位の造影像 (左) と当該血管の展開標本 (右)

くなると、血管障害部位への吸着は悪くなった。結果としてPEGユニットが5mol%の高分子が最も顕著な血管内皮傷害部位への吸着能を示した。

次に、ナノ粒子にドキシソルピシンを内包して、粒子からの放出タイムコースを評価した



結果を図10に示す。結果としてドキシソルピシンは、20 から 25 時間の間ナノ粒子から徐放可能であった。

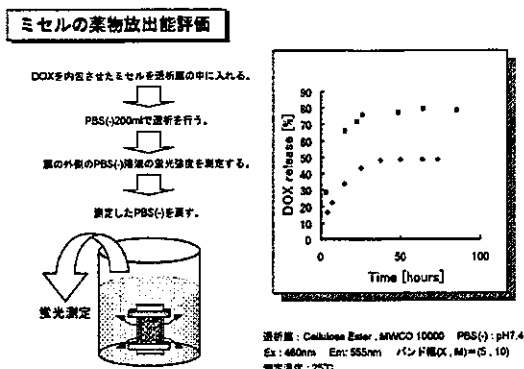


図 10 ナノ粒子からのドキシソルピシン放出タイムコース

#### D. 考察

##### PKAシグナル応答型遺伝子導入剤の性能評価

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に应答して遺伝子の転写を活性化する分子を開発してきた。昨年度までに、この制御剤を用いて遺伝子との複合体を形成させ、HVJエンベロップにより細胞へ導入する手法を確立した。今回、細胞内で見られる導入遺伝子の発現変化が、確かに細胞内PKA活性化に基づくものであることを、種々の薬物刺激で比較して証明した。PKA活性の評価は、PKAが活性化すると転写活性可能を有するようになるCREBに应答するCREプロモーターを有する遺伝子カセットを用いた。これにレポーター遺伝子としてルシフェラーゼを組み込んで、リポフェクタミンによって細胞に導入して、その発現を計測することにより評価した。結果で示したように、CREBアッセイでの結果と、実際に本高分子型制御剤を用いた導入遺伝子の発現結果は完全に一致しており、この事実は、前年度に確認した無細胞系での遺伝子の転写制御が、実際に細胞内においても働き、その

際、確かに細胞内PKAの活性化に伴って遺伝子発現を引き起こさせていることを証明しているものと考えられる。この結果は、本遺伝子制御概念が、実際に細胞特異的遺伝子治療法の手法として基本的に適用可能であることを示すものである。

##### PKC $\alpha$ 選択的基質の設計と評価

種々のタンパクのPKC $\alpha$ によるリン酸化サイトの周辺アミノ酸配列から種々の配列のペプチドを設計し、被リン酸化能とPKA、および他のPKCサブタイプとの選択性を評価して、3種類のそれぞれ基質能力の異なるPKC $\alpha$ 特異的基質を設計することに成功した。当初、基質ペプチドの設計においては、選択性はもちろんであるが、できるだけ基質能力の高いものを設計する方針であった。ところが、今回、マウスの各種組織のライゼートを用いて基質のリン酸化を検討したところ、あまりにも基質能力が優れたものでは、正常組織でも、内在性の標的プロテインキナーゼでリン酸化されてしまい、対象とする疾患組織とのコントラストが得られないことが明らかとなった。今回では、最も基質能力としては低かったPKC64が極めて優れたガン組織特異的リン酸化を受けることを見出した。この基質は、がん治療用の細胞選択的遺伝子治療法の開発に有用であると考えられる。また、今後、疾患ごとに標的とする細胞内シグナルの異常細胞と正常細胞の間での活性のレベルと差を評価して、最適の基質を設計する必要があることが分かった。

##### PKC $\alpha$ シグナル応答型遺伝子導入剤の開発

今回、設計したPKC $\alpha$ 特異的基質を用いて、グラフト型高分子-ペプチドコンジュゲートを合成した。得られた高分子は全て、電気泳動と無細胞タンパク発現系において、PKC $\alpha$ 活性依存的な良好な遺伝子制御能を有していた。これらの結果は、これまで検討してきた

PKAに応答する遺伝子制御剤の考え方が、他のプロテインキナーゼシグナルにも適用できる一般性のある概念であることを示している。また、PKC $\alpha$ は、今回メラノーマを用いた実験からも分かるように、多くのガンで特異的に異状活性化していることが知られており、PKC64の基質を用いた遺伝子制御剤を用いる遺伝子治療法は、極めてがん細胞選択性の高い新しい遺伝子治療法を開発する有用な材料であると期待できる。

#### 機能化造影剤の評価

昨年度開発したエバンスブルーを基本構造とした血管内皮傷害部位特異的新規MRI造影剤の動脈硬化病変（不安定プラーク病変）の診断能を、動脈硬化が顕著に進行するApoEノックアウトマウスを用いて行った。その結果、マウスの上行、および下行大動脈部位のT1強調画像において、MRIシグナルが得られ、しかも、摘出した大動脈を展開して確認したところ、MRIシグナルの位置は、完全に病変部位の位置と一致していた。この結果は、本造影剤が動脈硬化病変を診断できる能力を有することを示しており、非常に興味深い結果である。また、そのシグナル強度は、マウスの週齢の伴い病変が重篤化するにつれ顕著になり、病変の進行や治療効果の診断もできる可能性がある。現在、同様のターゲティング分子（エバンスブルー誘導体）を用いたフェライトナノ粒子の開発も進めており、さらに高感度な造影剤が得られるものと期待している。

#### 血管病変特異的DDS材料の開発と基礎評価

造影剤の開発により見出した血管障害部位特異性を有するエバンスブルー誘導体を高分子ミセル型ナノ粒子表面に担持した構造を形成可能な血管傷害部位指向性DDS用材料を設計、合成した。その結果、PEGユニットが一定量以上なければナノ粒子は形成できないこ

とがわかった。これは、エバンスブルー誘導体のみではナノ粒所の親水性シェルを形成するには不十分であることを意味している。PEGは、血中投与において血清タンパクへの吸着を抑制し、血中滞留時間を延長する効果を有するため、一定量以上導入することは返って好ましい。ただし、10mol%以上導入してしまうと、今度は血管の内皮傷害部位への吸着も阻害されてしまうことがわかった。これは、今回の材料が、高分子主鎖に直接エバンスブルー誘導体を連結したため、余りにもPEGユニットが多くなると、これがナノ粒子表面を完全に覆ってしまうことによりエバンスブルー誘導体が血管内皮傷害部位に接触できないことに基づくと考えられる。これを避けるためには、今後、PEGの末端にエバンスブルー誘導体を連結することが有効であると考えられる。ただし、今回合成した構造の材料であっても、PEGが5mol%である場合には、200nm程度のナノ粒子を形成し、血管内皮傷害部位への特異的吸着を達成することができた。また、この粒子の内部には疎水コアが形成されており、これに疎水分子であるピレンやドキシソルピシンを効率よく内包することが可能であった。また、内包した分子の放出タイムコースを評価したところ、25時間にわたって、放出の初期バーストなしに徐放可能であることがわかった。したがって、この粒子は血管病変治療用の材料として期待できると考えられた。

#### 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遺伝子制御剤の検討をさらに進め、細胞内でのPKAの活性に応答している事実を突き止めた。また、本概念をガン組織で顕著に亢進しているPKC $\alpha$ に対する応答材料に拡張し、がん細

胞特異的な基質ペプチドの設計に成功すると共に、新規にPKC $\alpha$  応答型の遺伝子制御材料を設計、合成した。この材料は、PKA 応答型材料と同様に、遺伝子と複合体を形成して発現を抑制し、しかも、PKC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。この成果は、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新しい遺伝子治療法の開発に大きく近づく成果である。

機能化造影剤としては、昨年度開発した、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有する独自の造影剤が、動脈硬化病変を診断可能であることを示した。これまでにこのような性能を有する造影剤はなく、極めて有望であると考えられる。さらに、同様のセンシング概念を DDS 材料にも応用して、高分子ミセル型ナノ粒子カプセルの開発にも成功した。この粒子は、血管傷害部位に特異的に吸着して、内包した薬剤を徐放できることから、血管治療用の材料として非常に期待できると考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. K. Kawamura, J. Oishi, J-H. Kang, K. Kodama, T. Sonoda, M. Murata, T. Niidome, Y. Katayama. Intracellular Signal-Responsive Gene Carrier for Cell-Specific Gene Expression. *Biomacromolecules* 2004, ASAP
2. T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, F. Hyodo, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, H. Utsumi, Y. Katayama. In vivo MR Detection of Vascular Endothelial Injury Using A New Class of

MRI Agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14: 2787-2790.

3. T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, Y. Katayama. First Functionalized MRI Contrast Agent Recognizing Vascular Lesions. *Anal. Sci.* 2004, 20: 5-7.
4. T. Sonoda, S. Shigaki, T. Nagashima, O. Okitsu, Y. Kita, M. Muarata, Y. Katayama. Mass-Tag Technology for Monitoring of Protein Kinase Activity Using Mass Spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14: 847-850.
5. 片山佳樹、山本竜広、下川宏明. 内皮傷害部位を特異的に診断できる造影剤. *Bio Medicinal Quick Review Net.* 2004. 4009: 1-5.
6. 片山佳樹. ケミストからみたポストゲノム10～プロテオミクスにおける質量分析～. *Dojin News.* 2004, 110: 10-16.

### 2. 学会発表

- 1) 野上貴司、園田達彦、村田正治、秋吉一成、片山佳樹. リン酸化シグナル応答型ナノゲル微粒子. 日本化学会第 84 春季年会 2004 年 3 月
- 2) 大石 潤、河村健司、園田達彦、村田正治、片山佳樹. プロテインキナーゼシグナル応答型遺伝子転写制御システム. 日本化学会第 84 春季年会 2004 年 3 月
- 3) 井上雄介、濱口裕三、園田達彦、村田正治、稲森和紀、片山佳樹. 2D-SPR を利用した細胞内リン酸化シグナル検出システムの開発. 日本化学会第 84 春季年会 2004 年 3 月
- 4) 野上貴司、園田達彦、村田正治、秋吉一成、片山佳樹. 細胞内リン酸化シグナル応

- 答型ナノゲル微粒子. 第 53 回 高分子学会年次大会 2004 年 5 月
- 5) 大石 潤、河村健司、園田達彦、村田正治、片山佳樹. プロテインキナーゼシグナル応答型遺伝子導入剤の開発とその評価. 第 53 回 高分子学会年次大会 2004 年 5 月
- 6) 生田健次郎、山本竜広、阿部弘太郎、上徳豊和、大井啓司、村田正治、下川宏明、片山佳樹. 血管内障害を認識する薬物キャリアの合成と基礎評価. 第 53 回 高分子学会年次大会 2004 年 5 月
- 7) 浦崎哲彦、山本竜広、生田健次郎、村田正治、吉満研吾、下川宏明、片山佳樹. 熱応答型 MRI 造影剤の合成と基礎評価. 第 65 回分析化学討論会・2004 年 5 月
- 8) 河村 健司・大石 潤・園田 達彦・村田 正治・片山 佳樹. 細胞内プロテアーゼシグナル応答型遺伝子送達システムの構築. 第 53 回 高分子学会年次大会 2004 年 5 月
- 9) 井上雄介、濱口裕三、園田達彦、村田正治、稲森和紀、片山佳樹. 2D-SPR を利用した細胞シグナル動態解析法の開発. 第 41 回化学関連支部合同九州大会 2004 年 7 月
- 10) 生田健次郎、山本竜広、阿部弘太郎、上徳豊和、大井啓司、村田正治、下川宏明、片山佳樹. 血管内障害を認識する薬物キャリアの開発. 第 41 回化学関連支部合同九州大会 2004 年 7 月
- 11) 浦崎哲彦、山本竜広、生田健次郎、村田正治、吉満研吾、下川宏明、片山佳樹. 熱応答型 MRI 造影剤の合成と造影能の評価. 第 41 回化学関連支部合同九州大会 2004 年 7 月
- 12) 浦崎哲彦、山本竜広、生田健次郎、村田正治、吉満研吾、下川宏明、片山佳樹. 温度応答型 MRI 造影剤の開発. 第 22 回九州分析化学若手の会 夏季セミナー・2004 年 7 月
- 13) 河村健司、大石潤、村田正治、片山佳樹. 細胞内シグナルに反応して遺伝子転写を制御できる遺伝子送達法. 第 14 回バイオ・高分子シンポジウム 2004 年 7 月
- 14) Yoshiki Katayama, Kenji Kawamura, Jun Ohishi, Masaharu Murata. Intracellular Signal-responsive Gene Carrier for Novel Cellular Specific Regulation of Gene Expression. 第 41 回高分子国際会議 (IUPAC Macro2004) 2004 年 7 月
- 15) 大石 潤、河村健司、園田達彦、村田正治、片山佳樹. 細胞内シグナル応答型遺伝子発現制御システムの開発. 第 41 回化学関連支部合同九州大会 2004 年 7 月
- 16) 大石 潤、河村健司、園田達彦、村田正治、片山佳樹. 細胞内シグナルに反応して遺伝子を制御する高分子-DNA 複合体. 高分子若手講演会 2004 年 8 月
- 17) 浦崎哲彦、山本竜広、生田健次郎、大井啓司、上徳豊和、阿部弘太郎、村田正治、吉満研吾、下川宏明、片山佳樹. 血管内皮障害を認識する新規 MRI 造影剤の合成と評価. 日本分析化学会第 53 年会・2004 年 9 月
- 18) 生田健次郎、山本竜広、阿部弘太郎、上徳豊和、大井啓司、村田正治、下川宏明、片山佳樹. 血管内障害を認識する薬物キャリアの機能評価. 第 53 回高分子討論会 2003 年 9 月
- 19) 大石 潤、河村健司、園田達彦、村田正治、片山佳樹. D-RECS(1) プロテインキナーゼシグナル応答型遺伝子発現制御システムの創製. 第 53 回高分子討論会 2004 年 9 月
- 20) 野上貴司、園田達彦、村田正治、秋吉一

- 成、片山佳樹. D-RECS(2)リン酸化シグナル応答型材料の開発. 第 53 回高分子討論会 2003 年 9 月
- 21) Kota Kodama, Yoko Shoji, Hideki Nakashima, Jeong-Hun Tang, Kenji Kawamura, Jun Ohishi, Takuro Niidome and Yoshiki Katayama. Artificial gene regulation system responding to HIV protease. APIPS-JPS 2004 2004 年 10 月
- 22) 大石 潤、河村健司、園田達彦、村田正治、新留琢郎、片山佳樹. 細胞対話型分子を利用した新規遺伝子制御システム. ナノメディシン・シンポジウム 2004 年 11 月
- 23) 片山佳樹. 細胞対話型分子システムを用いる革新的遺伝子送達概念の創製. ナノメディシン・シンポジウム 2004 年 11 月
- 24) 児玉耕太、東海林洋子、中島秀喜、姜貞勲、河村 健司、大石 潤、新留 琢郎、片山佳樹. Artificial gene regulation system responding to HIV protease. ナノメディシン・シンポジウム 2004 年 11 月
- 25) 大石 潤 河村健司 園田達彦 村田正治 片山佳樹. 細胞内シグナル応答型遺伝子発現制御システムの開発. 高分子九州支部特別講演会 2004 年 11 月
- 26) 児玉耕太、東海林洋子、中島秀喜、姜貞勲、河村 健司、大石 潤、新留 琢郎、片山佳樹. HIV 治療を目的としたインテリジェントナノキャリアーの設計. 第 10 回大阪市立大学ナノサイエンス・ナノテクノロジーフォーラム・2004 年 11 月
- E. 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

光リビングラジカル重合反応による温度感応性高分子の合成研究

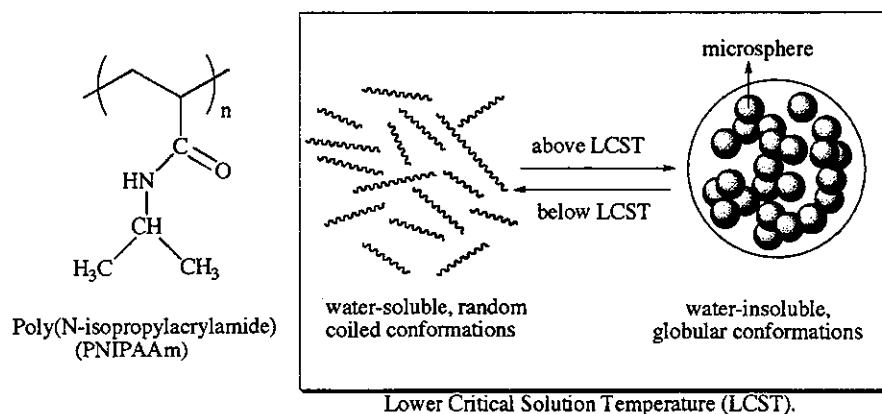
分担研究者 新名主 輝男（九州大学先端物質化学研究所分子集積化学部門教授）

研究要旨：温度感応性高分子は下限溶液臨界温度 (LCST: lower critical solution temperature) 以上では水に溶けておりコイル状構造を取るが、臨界温度以下では溶解度が急激に減少して球状構造に変化すると予想される。また、臨界ミセル濃度 (CMC: critical micelle concentration) 以上では超分子集合体（ミセル）の形成も期待され、高分子構造の温度依存性に興味を持たれる。この目的のために、下限臨界温度の異なる三種類のモノマー、N-isopropylacrylamide (LCST 32 °C) , N-cyclopropyl-acrylamide (44.5 °C)、および acryloylpyrrolidine (56 °C) から構成される三ブロック共重合体 PNIPAAm-PNCPAAm-PprrAAm を、イニファタ（重合開始・移動・停止剤）を用いる光リビングラジカル重合反応により合成することにして反応条件の最適化を行った。目的の三ブロック共重合体は収率良く得られたが、ポリマーの分子量は単分散ではなく、副反応がおこなっていることが予測されたので、他のイニファタを用いて反応条件を検討している。

A. 研究目的・方法

poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) で代表される温度感応性高分子は、下限溶液臨界温度 (LCST) 以下では水に溶けておりランダムコイル状構造を取るが、臨界温度以上では溶解度が急激に減少して球状構造に変化すると予想される (Scheme 1)<sup>1)</sup>。例えば、合成目標の三ブロック共重合体 PNIPAAm-PNCPAAm-

PprrAAm は、下限臨界温度の異なる三種類のモノマー、N-isopropylacrylamide (LCST 32 °C) , N-cyclopropylacrylamide (44.5 °C) および acryloylpyrrolidine (56 °C) から構成されており<sup>2,3)</sup>、この高分子は水溶液中 32 °C ( $T_A$ ) 以下では水に溶解してコイル状構造を取ると予想される (Scheme 2)。32 °C 以上になると poly(isopropylacrylamide) 部分は球状に変化し、

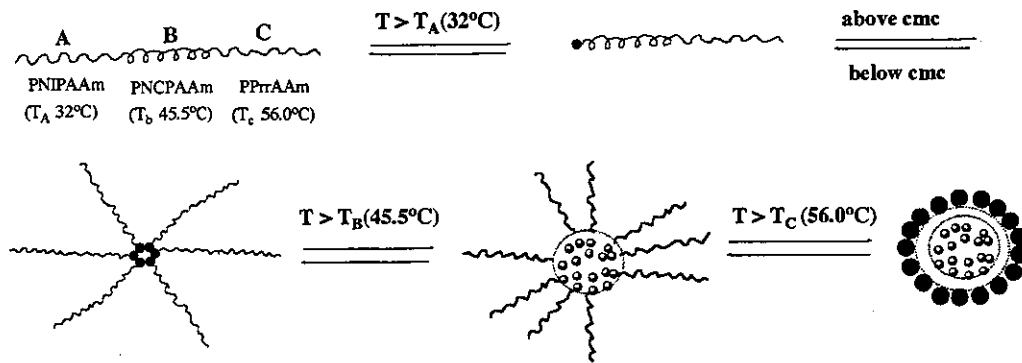


Scheme 1. Thermo-responsive polymer.

臨界ミセル濃度(CMC)以上の濃度では集合体を形成する<sup>4)</sup>。45.5 °C( $T_B$ )以上になると poly(N-cyclopropylacrylamide)部分が球状構造になり、56 °C( $T_C$ )以上では poly(acryloylpyrrolidine)部分も球状構造を取るようになり、多層核・外核構造体が形成されると考えられる。

このような acrylamide 類を構成単位とする温度感応性高分子を精密に合成する方法を確立し、合成した高分子構造の温度および濃

度依存性を明らかにすることを本研究の目的とする。更に、基材表面に温度感応性ブロック共重合体を構築して、膜構造の温度依存性を膜厚等の測定により観測し、将来的には、このような温度に依存する構造変化や集合体形成を生体材料として役立てる予定である。本研究では、高分子合成法としてイニファタ(重合開始・移動・停止剤)を用いる光リビングラジカル重合反応を利用する。



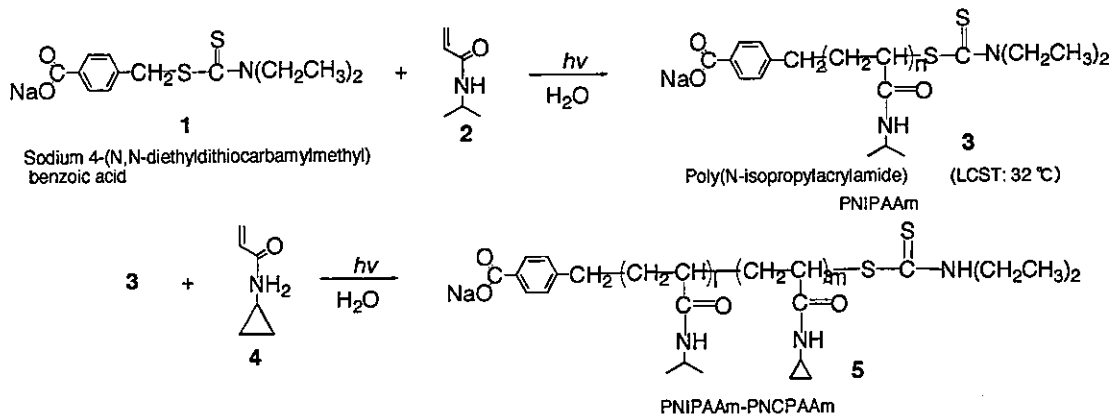
$T_A, T_B, T_C$ : LCSTs for polymer A, B, and C. cmc: critical micelle concentration.

Scheme 2. Controlled chain structure, reversible self-assembling and nanoparticulation with multiple core-shell structures.

## B 研究成果

合成目標として三ブロック共重合体 7 (PNIPAAm-PNCPAAm-PPrAAm) [poly(N-isopropylacrylamide-block-poly(N-cyclopropylacrylamide)-block-poly(acryloylpyrrolidine)) を、大津らによ

って開発されたジチオカルバメートの光リビングラジカル重合反応を用いて合成した<sup>5)</sup>。実際には、光イニファタとして松田らによって開発された水溶性の sodium 4-(N,N-diethyldithiocarbamylmethyl)benzoic acid 1 を用いた<sup>6)</sup>



Scheme 3. Synthesis of PNIPAAm and PNIPAAm-PNCPAAm.

重合反応は、石英ガラス容器に光イニフアタ 1 (2 mM)、N-isopropylacrylamide (40 mM) 2、および水(500 mL)を入れ、窒素ガスを通じながら高圧水銀灯 (400W)を外部照射した。15分照射後、反応溶液を減圧濃縮した後に透析を行い、溶液を減圧濃縮して poly(N-isopropylacrylamide) 誘導体 3 を得た (75%) (Scheme 3)。この条件下では、照射時間の増大に比例してモノマーが消費され、15

分照射後ではモノマーの約 80%が反応した (Figure 1)。生成した高分子の分子量 ( $^1\text{H NMR}$  スペクトルで測定) も 15 分照射までは、照射時間に比例して増加した。光照射後の平均分子量は、GPC 分析(東ソー、TOSOH TSKgel,  $\alpha$ -3000, 10 mM の LiBr を含む DMF, polystyrene 検量線を使用)により 3500 と求められた。

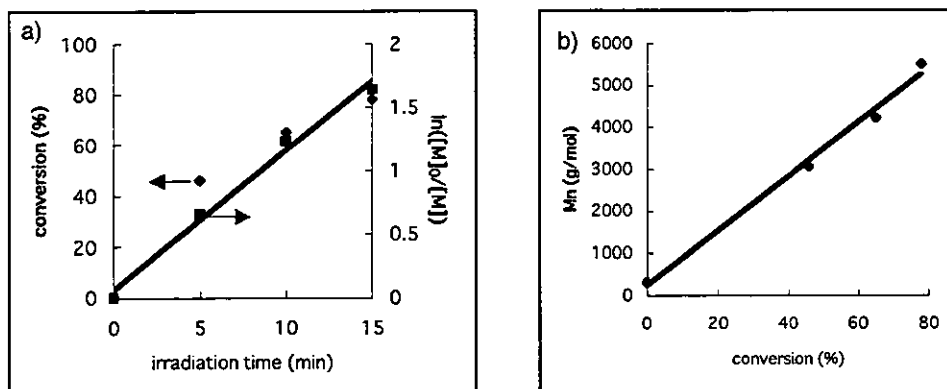


Figure 1. a) Conversion and  $\ln([M]_0/[M])$  plots vs irradiation time. b) Dependence of molecular weights on conversion. The  $M_n$  values were estimated by  $^1\text{H NMR}$  spectra. Conditions: Room temperature, [N-isopropylacrylamide] = 40mM, [N-isopropylacrylamide]:[sodium 4-(N,N-diethyldithiocarbamyl)-benzoic acid] = 20:1, UV power=400W.

続いてこの poly(N-isopropylacrylamide) 誘導体 3 の水溶液 (0.37 mM) に N-cyclopropylacrylamide 4 (7.4 mM) を加えて 15 分間光照射を行い、poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(N-cyclopropylacrylamide) 5

(PNIPAAm-PNCPAAm) を得た (76%)。照射時間 15 分までは、モノマー 4 の消費速度および生成物の分子量は照射時間の増大とともに増加し、15 分照射後の平均分子量は 5500 であった (GPC) (Figure 2)。

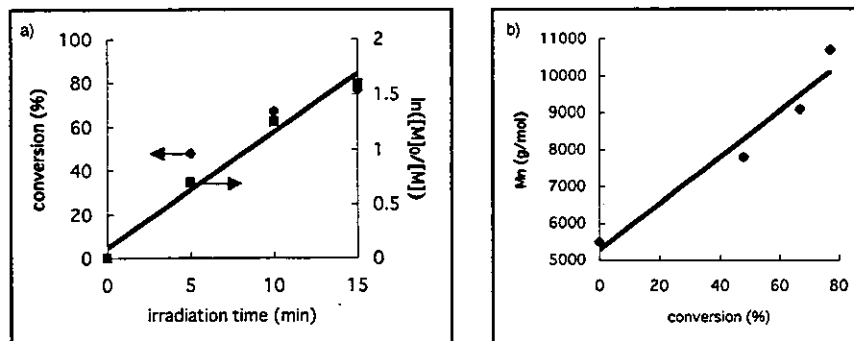


Figure 2. a) Conversion and  $\ln([M]_0/[M])$  plots vs irradiation time. b) Dependence of molecular weights on conversion. Conditions: Room temperature, [N-cyclopropylacrylamide] = 40mM, [N-cyclopropylacrylamide]:[PNIPAAm] = 20:1, UV power = 400W.



更に、この共重合体 5 (0.28 mM) に acryloylpyrrolidine 6 (5.6 mM) を混ぜて 15 分間光照射を行い、poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(N-cyclopropylacrylamide)-block-poly(acryloylpyrrolidine) 7 (PNIPAAm-

PNCpAAm-PPrrAAm) を得た (70%)。この範囲では生成物の分子量は照射時間の増大とともに増加し、15 分照射後の平均分子量は 7000 (GPC) であった (Figure 3)。このようにして、目的の三成分ブロックコポリマー 7 を合成した。

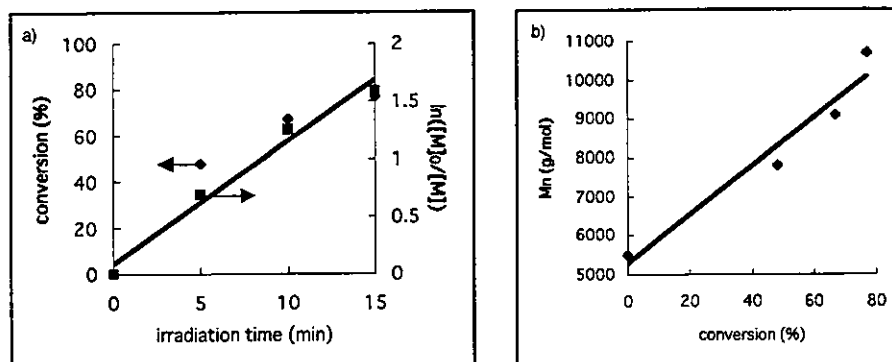
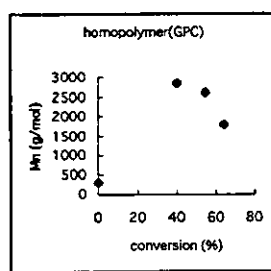
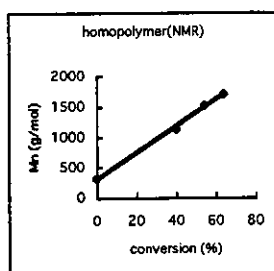
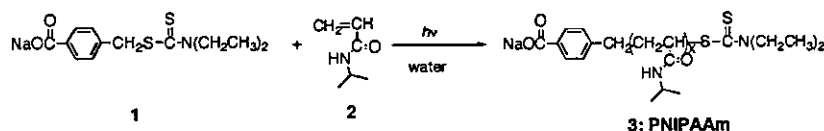


Figure 3. a) Conversion and  $\ln([M]_0/[M])$  plots vs irradiation time. b) Dependence of molecular weights on conversion. Conditions: Room temperature, [N-cyclopropylacrylamide] = 40mM, [N-cyclopropylacrylamide]:[PNIPAAm] = 20:1, UV power = 400W.

合成した一三成分ブロックコポリマー 3-7 の分子量を GPC 法 (TOSOH TSKgel,  $\alpha$ -3000, DMF) により測定すると、それぞれ幅広いピークが現れ、しかも一ピーク以上が観測された。これはポリマーが溶液状態で水素結合により会合しているためではないかと予想されたので、水素結合を切断するために臭化リチウムを含む DMF を用いて再測定したところ (TOSOH TSKgel,  $\alpha$ -3000, 10 mM の LiBr を含む DMF)、それぞれ一ピークが観測された。

しかし、シグナル幅は依然として広く、期待した狭い分子量分布得られなかった。そこで、この反応条件を最適化することにした。まず、光イニフィエータ 1 と N-isopropylacrylamide 2 の比を 1:15, 1:20, 1:30 に変化させて反応を行ったところ、1:15 の場合が最も良い結果を与えた (Figure 4)。この条件で、二、三成分ブロックコポリマー 5、7 も合成した (Figures 5, 6)。



[1]:[2] = 1:15

time (min)	4	8	12
conversion (%)	40	55	64
$\ln([M]_0/[M])$	0.52	0.79	1.02
DPh (x)	7.2	10.7	12.4
Mn (NMR)	1120	1516	1708
Mn (GPC)	2846	2604	1789
PDI	4.39	3.94	4.91

Figure 4. a) Conversion and  $\ln([M]_0/[M])$  plots vs irradiation time. b) Dependence of molecular weights on conversion. Conditions: Room temperature, N<sub>2</sub> bubbling, [2] = 30mM, [2]:[1] = 15:1, UV power = 400W.

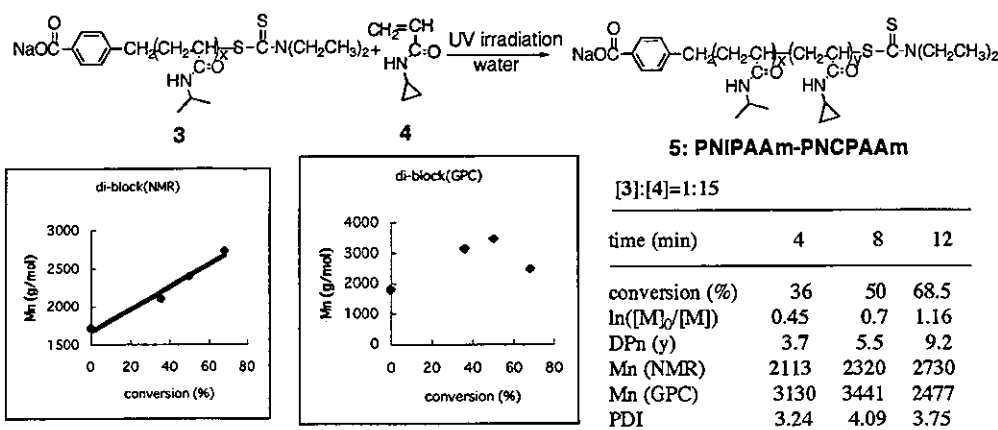


Figure 5. a) Conversion and  $\ln([M]_0/[M])$  plots vs irradiation time. b) Dependence of molecular weights on conversion. Conditions: Room temperature,  $N_2$  bubbling, [4] = 30mM, [4]:[3] = 15:1, UV power=400W.

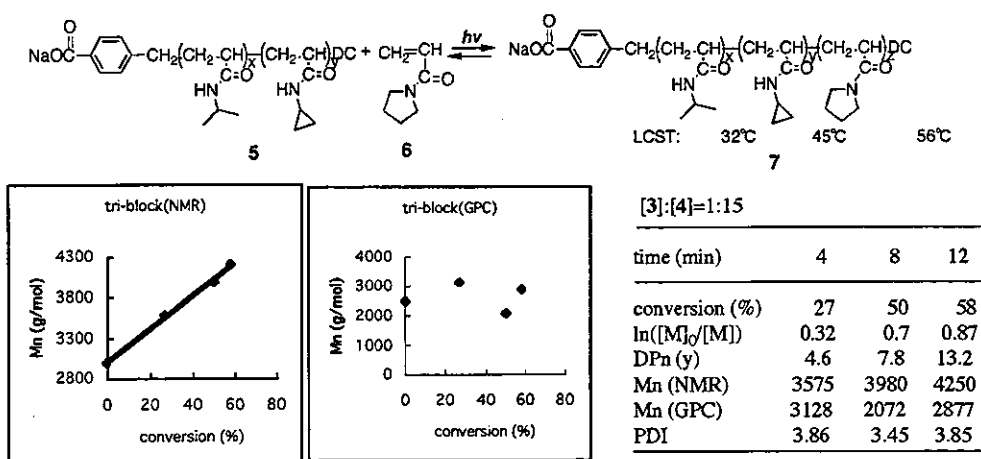


Figure 6. a) Conversion and  $\ln([M]_0/[M])$  plots vs irradiation time. b) Dependence of molecular weights on conversion. Conditions: Room temperature,  $N_2$  bubbling, [6] = 30mM, [6]:[5] = 15:1, UV power=400W.

しかしながら、GPC 法で測定した分子量は Figure 4-6 に示す通り単分散系ではなく、それぞれ 12 分照射後の PDI 値は、4.91 (3), 3.75 (5), 3.85 (7) と大きな値を示したことから、これらの反応は光リピングラジカル重合反応の他に、副反応を伴っていることが予想される。また、光イニフィアタ 1 と N-isopropylacrylamide 2 の比を 1:30 にすると一ブロックポリマー 3 の PDI 値は 1.6 に改善されるが、分子量が大きくなりすぎる欠点があり ( $M_n > 30,000$ )、更なる反応条件の検討が必要である。

### C. 考察・結論

以上のように溶液重合により目的の三成分ブロック共重合体 7 は合成できたものの、PDI 値が大きいため反応は副反応を伴っていると予想され、更に反応条件を最適化する必要がある。現在、ジチオカルバメート基を持つ他の光イニフィアタを用いて光リピングラジカル重合反応を検討している。単分散の三成分ブロック共重合体 7 が合成できれば、高分子構造の温度・濃度依存性を紫外可視吸収スペクトル、蛍光スペクトル、動的光散乱等により調べる予定である。また、最適化した重合反応条件を用いてガラス表面上にこの三成分ブロックコポリマーを合成して<sup>7)</sup>、このが

リマー鎖の構造変化の温度依存性を透過型顕微鏡観察により調べる予定である<sup>8)</sup>。現在のところ、高分子末端はカルバメートとカルボキシル基であるが、分子集積挙動はこれら末端基の性質に大きく依存すると予想されるので、今後、末端基が様々に異なる高分子も合成する予定である。

#### D. 参考文献

- (1) (a) Y. Maeda, T. Nakamura, I. Ikeda, *Macromolecules* 2001, 34, 1319. (b) I. C. Barker, J. M. G. Cowie, T. N. Huckerby, D. A. Shaw, I. Soutar, L. Swanson, *Macromolecules* 2003, 36, 7756.
- (2) N. A. Plate, T. L. Lebedeva, L. I. Valuev, *Polymer, J.* 1999, 31, 21.
- (3) (a) S. Itoh, *Kobunshi Ronbunshu*, 1989, 46, 437. (b) S. Itoh, *Kobunshi Ronbunshu*, 1998, 47, 467.
- (4) J. E. Chung, M. Yokoyama, T. Aoyagi, Y. Sakurai, T. Okano, *J. Controlled Release* 1998, 53, 119-130.
- (5) (a) T. Otsu, M. Yoshida, *Macromolecule Chem. Rapid Commun.* 1982, 3, 127. (b) T. Otsu, K. Yamshita, K. Suda, *Macromolecules*. 1987, 19, 287 (c) S. Ito, K. Mizoguchi, M. Suda, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 1987, 467-474.
- (6) N. Morikawa; T. Matsuda, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 2002, 167.
- (7) T. Matsuda, M. Kaneko, S. Ge, *Biomaterials* 2003, 24, 4507.
- (8) (a) S. Kidoaki, Y. Nakayama, T. Matsuda, *Langmuir* 2001, 1080. (b) S. Kidoaki, S.

Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, *Langmuir* 2001, 2402.

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. R. Nogita, K. Matchara, T. Oda, Y. Sakamoto, C. Lim, M. Yasutake, T. Kumagai, T. Shimo, C. W. Jefford, T. Shinmyozu. Photochemical Study of [3<sub>n</sub>]Cyclophane and Emission Spectral Properties of [3<sub>n</sub>]Cyclophanes (n=2-6). *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 13732-13741.
2. H. Takemura, M. Kotoku, M. Yasutake, T. Shinmyozu. 9-Fluoro-18-hydroxy[3.3]metacyclophane: Synthesis and Estimation of a C-F...H-O Hydrogen Bond. *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 2019-2024.

##### 2. 学会発表

- 1) 崔 学東、新名主 輝男、松田 武久. Synthesis and Properties of Multi-stage Temperature-sensitive Copolymer via Quasi-living Radical Photopolymerization Technique. 日本化学会西日本大会講演予稿集 F2-07、平成16年10月、大分大学
- 2) 崔 学東、新名主 輝男、松田 武久. Synthesis and Properties of Multi-stage Temperature-sensitive Copolymer. 第41回化学関連支部合同九州大会講演予稿集 3\_5.64、平成16年7月、北九州国際会議場

#### 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

電界紡糸法による組織工学骨格基材の機能的設計：  
生分解性ポリマーナノ・マイクロファイバーメッシュの作製

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： 機械的特性に優れた生分解性ポリマーである poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) を、電界紡糸法によりナノ・マイクロファイバーメッシュ化し、組織工学骨格基材作製のための基礎検討を行った。PLCL ナノ・マイクロファイバーメッシュの構造特性、機械的特性、および細胞との相互作用特性の評価を行うとともに、ファイバー自体への生理的機能付与の試みとしてコラーゲンやヘパリンを混練したナノファイバーメッシュを開発した。これらの PLCL ナノファイバーメッシュ骨格基材は、細胞の良好な接着・増殖特性、生体組織との力学的適合性の設計しやすさ、生体内での非毒性の分解吸収特性、などの利点を有しており、組織再生を適切に誘導し得る医用デバイスの構成素材としての応用可能性が期待される。

A. 研究目的

高電圧電場を用いたポリマー紡糸技術である電界紡糸法は、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、電界紡糸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検討している。昨年度までに、種々のポリマーの電界紡糸ナノ・マイクロファイバー化を行い、それらのファイバーの機能的三次元配置技術として積層・接合・配向制御電界紡糸法

を新しく開発し、マイクロデバイス化の基礎検討として小口径人工血管用の筒状構造体のコンプライアンス設計を行った。本年度は組織再生誘導に適した電界紡糸骨格基材の構築のため、機械的特性に優れた生分解性ポリマーである poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) のナノ・マイクロファイバーメッシュ化を検討するとともに、ファイバー自体への生理的機能付与の試みとしてコラーゲンやヘパリンを混練したナノファイバーメッシュを開発した

B. 研究方法

電界紡糸装置は、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。poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)を適当な溶媒 (THF または HFIP 等) 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・