

## 研究課題別評価

1 研究課題名: バイオインターフェイスにおいて組織化された水分子の機能

2 研究者氏名: 田中 賢

3 研究の狙い:

医療デバイスは血液や組織液などに直接触れるため、異物反応がなく、血液適合性および組織適合性など生体適合性をもつ材料が要求される。医療デバイスが使用される環境はウェットであり、生命現象の反応場となっている水分子に着目すると、この水分子はタンパク質や細胞の接着形態や機能発現の場を形成しており、この水分子のクラスター構造やダイナミクスが医療用デバイス材料に要求される生体適合性に影響している。本研究では、フェムト秒パルス赤外レーザーを組み込んだ多光子励起顕微分光装置を開発し、生きた細胞との界面で組織化された生体分子(高分子鎖-水分子-タンパク質ポリペプチド鎖-細胞膜表面糖鎖)の多元構造の解明を目指す。

4 研究成果:

### ① 生体適合性発現メカニズムの解明

Poly(2-methoxyethyl acrylate)(PMEA)表面は、細胞に対する活性化が軽微であり、表面に吸着したタンパク質の構造変化が小さいことを明らかにした。その理由として、PMEA が有する特異的な水の構造が重要な役割を果たしていることを見いだした。

具体的には、示差走査熱量計(DSC)を用いて、飽和含水した PMEA 中の水の構造を調べたところ、 $-100^{\circ}\text{C}$ からの昇温過程で水のコールドクリスタリゼーション(CC)に由来するシャープな発熱ピークが $-40^{\circ}\text{C}$ 付近に観測された。また、CC の出現直後に六方晶の氷晶の形成が X 線回折より観測されたことから、この低温結晶化はアモルファスの氷から結晶性の氷への転位であることを見いだした。一方、生体適合性の悪い高分子ではこのような水の存在は認められなかった。PMEA 類似体や共重合体について、DSC の各転位における熱量から、高分子中に存在する水を①自由水： $0^{\circ}\text{C}$ 付近で融解する水、②中間水： $-40^{\circ}\text{C}$ 付近で低温結晶化する水、③不凍水： $-100^{\circ}\text{C}$ においても凍結しない水と定義し、それぞれの量を求め、生体適合性との相関性を調べたところ、CC として観測される中間水量が細胞接着/活性化に強く影響を及ぼしていることを見いだした。CC は生体適合性高分子の代表例であるコラーゲン、細胞膜表面に水和層を形成する役割を担っている多糖にも共通して観測されたことから、PMEA 表面の水はタンパク質や細胞表面の水の構造と類似していると考えられる。

### ② 生体適合性高分子表面の水の構造

中間水の構造や運動性を明らかにするために、フェムト秒パルス赤外レーザーを組み込んだ多光子励起顕微分光装置の開発を行った。幅広い波長の光をプローブとして、界面選択的な分光法である2光子励起顕微ラマン分光や和周波発生分光などの新手法と、NMR, 振動分光, X線散乱, 誘電緩和, 表面自由エネルギーなど従来法による測定結果から、(1)高い分子運動性を有する PMEA 鎖に弱く束縛され、低温下でも分子運動性の高い水の存在、(2)中間水は自由水と不凍水との界面に存在、(3)中間水は高分子表面にも安定に存在することが示唆された。

特に、生体適合性高分子の含水量(不凍水、中間水、自由水の各含水量)を変えた表面に対して、赤外パルス励起光(波長 650~1100 nm)からの散乱光を分光する2光子励起顕微ラマン分光(Z軸スキャン)により、高分子表面の水の構造を解析した結果、PMEA 表面に含水した水の O-H 伸縮振動ピークは、より束縛を受けていないと考えられる  $3400/\text{cm}$  にピークを示し、生体適合性の優れた表面は水分子の構造の破壊効果が小さいことが明らかになった。

### ③ 新規生体適合性高分子の設計・合成

PMEA と同様 の 中間水 を 有 す る 高 分 子 を 新 規 合 成 し た 。 poly(tetrahydrofurfuryl acrylate)(PTHFA)、poly [2-(2-ethoxyethoxy)ethyl acrylate] (PEEA) とその類似体表面は、表面が血液細胞をはじめ各種生体適合性マーカーに対し活性化が低く、優れた生体適合性を示すことを

見出した。また、PEEA およびその類似体は下限臨界共溶温度(LCST)を有することがわかり、生体適合性と温度応答性を併せ持つ高分子の合成に成功した(国内外特許出願済み)。

#### ④ 自己組織化パターン材料による新しいバイオインターフェイス

高分子溶液を高湿度下でキャストするだけで、孔径の均一な多孔質薄膜が様々な生体適合性材料で作製できることを利用して、その多孔質薄膜の3次元構造制御に成功した。体内埋め込み型治療器具表面にもこの膜を作製することができた。多孔質薄膜表面に粘着テープを張って剥離することによって、剥離破断面(テープ側と基板側)にナノピラー構造を作製した。ナノピラー構造の前駆体となる多孔質薄膜の材質、孔径、膜厚や剥離方法を変えることで、突起の長さや太さ、間隔の制御が可能であった。

また、特定の孔径の多孔質薄膜上で、血管系、消化器系、神経系などの正常細胞の増殖性や機能を上昇させることに成功した。一方、胆管由来がん細胞を、特定の孔径の多孔質薄膜上で、培養したところ、がん細胞の増殖性・細胞死を抑制できることを見いだした。

### 5 自己評価:

3年間の研究を通じて、これまで不明であった生体適合性発現のメカニズム解明と新たな分子設計と合成にチャレンジすることができた。熱分析で観測される特異的な水の構造を足がかりとして、バイオ界面で組織化された水および生体分子の多元構造と高分子鎖や水分子の構造・運動性を調べることができた。界面選択的な手法である2光子分光と従来の分析技術による高分子表面の水の構造解析と中間水を有する新規高分子の合成により、「自由水と不凍水の間の特性を有する中間水の存在が重要である」という仮説の実証を行うことができたと考えている。界面の水の構造は細胞の接着性—非接着性にも深く関係している。極めて複雑・難解な生体と材料との相互作用を明らかにするために、領域内共同研究ができたのは大きな財産となった。

今後は、本仮説をどこまで一般論にできるか、中間水の構造や分子運動性のさらなる解明とそれが形成されるメカニズム(本質)の解明が課題である。また、新規分子設計指針(水の構造:中間水)に基づいて合成した生体適合性高分子と自己組織化を利用したパターン化技術を融合し、カテーテルやステントなどのバイオメディカルデバイスの表面に最適な物性(潤滑性、抗血栓性、組織適合性)を付与する技術の開発も行っていきたい。さらに、孔径の均一な多孔質薄膜によるがん細胞の増殖や細胞死制御とそのメカニズムについて詳細に検討し、副作用のない新しい再生医療用デバイスやがん治療デバイスの開発設計指針の提案も目指したい。

以上、本研究により得られた分子設計と自己組織化による微細加工の融合により、高齢化社会を支える再生医療技術への展開を図りたい。細胞・生体分子と材料表面の詳細な解析、相互作用の本質解明により、安全性が高く、医療事故がなく、患者の生活の質、病後の生活の質(QOL)を向上し、健やかな生活が可能になるような製品開発に結びつく材料開発を行いたい。

### 6 研究総括の見解:

田中賢研究員は、バイオインターフェイスでの組織化された水分子の機能について、生体適合性をもつ材料開発の観点から明確にしている。特に、界面での水の構造と生体適合性との関係について、明らかにしており、この結果より、今後の材料開発の指針につながる事が期待される。

### 7 主な論文等:

#### 原著論文

- (1) M. Tanaka, A. Mochizuki, N. Ishii, T. Motomura, T. Hatakeyama, Study on Blood Compatibility of Poly(2-Methoxyethylacrylate) — Relationship between Water Structure and Platelet Compatibility in Poly(2-methoxyethylacrylate-co-2-hydroxyethylmethacrylate) — , *Biomacromolecules*, **3**, 36-41, 2002.
- (2) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Shiroya, T. Motomura, K. Shimura, M. Onishi, Y. Okahata, Study on Kinetics of Early stage Protein Adsorption and Desorption on Poly(2-methoxyethylacrylate)

- (PMEA) Surface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **203**, 195–204, 2002.
- (3) K. Sato, M. Tanaka, K. Hasebe, M. Takebayashi, K. Nishikawa, T. Kawai, M. Matsushita, S. Todo, M. Shimomura, Preparation of the honeycomb patterned porous film of biodegradable polymer for tissue engineering scaffolds, *International Journal of Nanoscience*, **1**(5,6) 689–693, 2002.
  - (4) M. Ide, T. Mori, K. Ichikawa, H. Kitano, M. Tanaka, A. Mochizuki, H. Oshiyama, W. Mizuno, Structure of Water Sorbed into Poly(MEA-*co*-HEMA) Films As Examined by ATR-IR Spectroscopy, *Langmuir*, **19**, 429–435, 2003.
  - (5) Y. Miwa, M. Tanaka, H. Oshiyama, A. Mochizuki, Study on structure of water in poly(2-methoxyethylacrylate)(PMEA) and poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (PHEMA) by <sup>2</sup>H solid-state NMR., *Biomaterials-Seitaizairyo (J. Jpn. Soc. Biomater.)*, **21**(2), 143–149, 2003.
  - (6) S. Ye, S. Morita, G. Li, H. Noda, M. Tanaka, K. Uosaki, M. Osawa, Interfacial Molecular Structure Changes in Poly(2-methoxyethyl acrylate) Thin Films Induced by Absorption of Bisphenol A. An Infrared and Sum Frequency Generation (SFG) Study, *Macromolecules*, **36**, 5694–5703, 2003.
  - (7) H. Yabu, M. Tanaka, K. Ijro, M. Shimomura, Preparation of honeycomb patterned polyimide films by self-organization, *Langmuir*, **19**, 6297–6300, 2003.
  - (8) M. Tanaka, Blood Compatibility of Poly(2-methoxyethyl acrylate) – Design of Novel BioInterfaces, *Koubunshi Ronbunshuu*, **60**(8), 415–427, 2003.
  - (9) M. Tanaka, A. Mochizuki, Effect of water structure on blood compatibility – Thermal analysis of water in poly(meth)acrylate –, *J. Biomed. Mater. Res.* **68A**(3), 684–695, 2004.
  - (10) G. Li, S. Morita, S. Ye, M. Tanaka, M. Osawa, Bisphenol QCM and IRRAS Characterization of Bisphenol A Absorption in the Poly(acrylate) Thin Films, *Anal. Chem.* **76**, 788–795, 2004
  - (11) M. Tanaka, Design of Novel BioInterfaces (I) –Blood compatibility of poly(2-methoxyethyl acrylate)–, *Bio-Medical Materials and Engineering (Bio-Med. Mater. Eng.)*, in press (2004).
  - (12) M. Tanaka, M. Takebayashi, M. Miyama, J. Nishida, M. Shimomura, Design of Novel BioInterfaces (II) –Fabrication of self-organized porous polymer film with highly uniform pores–, *Bio-Med. Mater. Eng.*, in press (2004).

その他国際会議議事録に 15 件

### 総説・解説・著書

- (1) 田中 賢, 竹林允史, 深山真史, 西川和孝, 西田仁, 佐藤雄久, 長谷部清, 大久保尚, 蒲池浩文, 河合朋明, 松下通明, 藤堂省, 西川雄大, 下村政嗣, 新しいバイオメディカルインターフェース – 高秩序多孔質膜の自発的形成 –, *化学工業*, **53**(12), 901–906, 2002.
- (2) 田中 賢, 化学のフロンティア 2002 – はばたけ若き研究者たち, 新規生体適合性高分子材料 – 次世代医療を切り拓くバイオインターフェース –, *化学と工業*, **55**(2), 149–152, 2002.
- (3) 田中 賢, 人工臓器を支える高分子材料 – ポリ(2-メトキシエチルアクリレート)の生体適合性発現機構 –, *未来材料*, **2**(10), 2–5, 2002.
- (4) 田中 賢, 高秩序自己組織化薄膜による細胞の分化機能制御, *Advanced Life Science*, **2**, 56–57, 2003.
- (5) 田中 賢, 竹林允史, 下村政嗣, 特集ナノテク/バイオなど次世代注目技術と微細加工機器・システム 自己組織化によるナノマテリアル, *M&E*, **1**(8), 190–195, 2003.
- (6) 田中 賢, 自己組織化材料とバイオマテリアル, *バイオマテリアル – 生体材料 –, 21*(4), 337, 2003.
- (7) M. Matsushita, H. Kamachi, H. Ohkubo, S. Matsumoto, T. Morita, S. Kobayashi, K. Sato, M.

Tanaka, M. Shimomura, S. Todo, Reconstitution of liver tissue through tissue engineering, *Surgery Frontier*, **10**(3), 21-24, 2003.

- (8) 田中 賢, 一高度先端治療デバイスー人工臓器の表面を生体適合化するマテリアル, *BIO INDUSTRY*(バイオインダストリー), **20**(12), 59-70, 2003.
- (9) 田中 賢, 特集/次世代科学技術の展望 次世代医療を切り拓くバイオメディカルインターフェース, *化学工業*, **55**(1), 56-61, 2004.
- (10) 田中 賢, 世代別座談会 高分子を語る, *高分子*, **53**(1), 1-12, 2004.
- (11) 田中 賢, 抗血栓性高分子表面と水の構造, *高分子*, **53**(3), 157, 2004.
- (12) 田中 賢, 下村政嗣, 自己組織化によるナノマテリアルの創成と応用, 第11講, ハニカム構造フィルムのバイオメディカル応用, NTS, 275-292, 2004.
- (13) 田中 賢, 下村政嗣, バイオナノエンジニアリングマテリアル, 自己組織化パターン表面の創製と機能, 第1編, 第8章, pp72-84, 2004. 監修 石原一彦, フロンティア出版

#### 特許

田中 賢, 伊土直子, 下村政嗣, 温度応答性と生体適合性を併せ持つ高分子, 特願 2003-091281. (および PCT 出願)

他 10 件

#### 招待講演

- (1) M. Tanaka, Blood compatibility of poly(2-methoxyethyl acrylate) - Design of novel bio-interfaces -, Second International Conference on New Biomedical Materials: Basic and Applied Studies, 2003. 5-8 April, 2003 (Cardiff, UK)

他 27 件

その他一般発表 50 件

#### 受賞

- (1) 2002 春季第 47 回応用物理学会 第 12 回応用物理学会「講演奨励賞」受賞(2002 年 3 月)

規則的な孔径を有する自己組織化多孔性膜を用いたバイオインターフェイス

田中 賢, 竹林 允史, 下村政嗣

- (2) 第3回日本再生医療学会総会, 「優秀演題」受賞(2004 年 6 月),

自己組織化による血管系組織再生用スキャフォールドの作製

田中 賢, 高山あい子, 下村政嗣

他 4 件