

研 究 報 告 書

「複機能性高分子による循環器治療バイオマテリアルの創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研 究 者: 網代 広治

1. 研究のねらい

2016年の日本人死亡数約130万人に対して原因を分類すると、第1位のがん(約38万人)に続いて、循環器系疾患は第2位(約34万人)で大部分を占めている(出典:2017年、厚生労働省)。超高齢社会において健康寿命を延伸させるためにも新しい医療器具の開発は重要といえる。循環器系疾患の治療器具として、金属製のステントやプラスチック製のバルーンがあるが、薬物溶出の機能など生分解性材料の活用が望まれる。

一方、医療用素材のうち高分子材料は分子レベルで設計できるため種々の機能性付与が可能である。例えば、ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)などの感熱応答性高分子が医用高分子として知られている。しかし、主鎖がビニルポリマー骨格であるため、生分解性を示さず、埋植材料として用いることが難しい。生分解性高分子としては、ポリ乳酸などのエステル系高分子材料が多く用いられている。一方、ポリトリメチレンカーボネート(PTMC)も生分解性を示し用いられている。このPTMC骨格へ置換基を導入すると、様々な機能性高分子材料が構築できる。しかし、ほとんどの場合、置換基はエステル基やアミド基を介して導入している。するとせっかく高分子主鎖が分解しても酸性有機化合物を生成せず安定なpHを保てるというPTMCの特徴が活かしきれないと考えた。例えば、我々は「感熱応答性」・「生分解性」・「ホモポリマー」という特徴を同時に有するPTMC誘導体を報告した(H. Ajiro et al., *Macromolecules* 2012, 45, 2668)。中でも生体温度に極めて近い感熱応答性(下限臨界温度: LCST= 31℃～35℃)をシャープな相転移挙動で示すポリマーが得られたため、実用的なバイオマテリアルとして利用が期待できる。

そこで、なおポリ乳酸などと比べると、種々の機能性置換基をPTMC側鎖に導入する際に、エステル基やアミド基を避けた、いわゆる「エステルフリー型」とした場合では、加水分解後に発生する酸性有機化合物の生成を抑えることができ、安全性も高くなると期待できる。

そこで本研究課題では、循環器系疾患に必要とされる種々の機能性と生分解性を提供可能なPTMC誘導体を合成する。その際様々な機能性置換基を導入することで、応答温度・生体適合性・力学的強度を制御した新しい高分子素材を開発することを狙いとした。

2. 研究成果

(1)概要

エステルフリー型PTMCを得るために、種々の機能性置換基をエーテル結合を介してポリトリメチレンカーボネートの側鎖へ導入した。そのために、モノマーから新規化合物を合成した。たとえば、トリメチレンカーボネート(TMC)の側鎖にオリゴエチレングリコール(OEG)鎖を導入すると、得られるポリマーは温度によって水溶性が変化する感熱応答性を示した。また、カルボン酸の導入によるpH応答性や、クマリンによる光架橋性を付与させることができた。主に感熱応答性高分子に、溶媒効果、pH効果、光応答性など、種々の環境下で示される効果を整理した。

上述のポリマーの分解挙動を調べたところ、通常のPTMCがリパーゼで加水分解が加速されるのに対して得られたポリマーはゆっくりと加水分解が進行した。これらは導入した親水

性置換基が影響しているものと考えられる。続いて、材料化を目指しポリマーを架橋剤によってハイドロゲル化を行った。ハイドロゲルは、種々の温度で親水性やサイズを変化させることができた。また、親水性ポリマーを開始剤として TMC を重合させることで、親水性疎水性ブロック共重合体を調製した。この共重合体はディップコート法により薄膜化すると、リン酸緩衝水溶液の環境下で安定に存在することが示された。これらのハイドロゲルおよび薄膜に用いたポリマーの力学的強度として、粘弾性、圧縮試験、および引張試験を行った。さらに、熱的性質を調べるために示差熱分析および熱分解測定を行った。

PTMC 誘導体による機能化を目指す一方で、不足する物性を補うために、他の種々の高分子材料についても展開した。例えば、ポリ乳酸(PLA)の高分子末端に、バニリンを結合させた末端修飾ポリ乳酸を調製した。末端に有するアルデヒド基を利用して、親水性置換基をイミン化によって結合させると、ナノ粒子を調製可能であった。さらに pH 変化によってイミン基が脱離して、PLA の疎水性凝集を引き起こさせると、炎症など特定の pH 環境下において生分解性高分子を凝集させることが可能で、新しい薬物送達システムとして期待できる。

最後に生体適合性を評価した。まず、接触角による親水性評価とその温度効果を調べた。室温と体温付近の温度範囲で親水性和疎水性が変化する要旨が観察された。また、タンパク質吸着や血小板粘着試験によりバイオマテリアルとしての生体適合性を評価した。

(2) 詳細

研究テーマA「機能性 PTMC 誘導体を提供する新規モノマーの設計と合成」

側鎖にオリゴエチレングリコール(OEG)を導入したエステルフリー型の TMC 誘導体を基にして種々の機能性 PTMC 誘導体を合成した。図1は、3 ユニットおよび 4 ユニットの OEG を有し、さらにメチル基およびエチル基を有する TMC 誘導体のホモポリマーの化学構造である。まず、これらのホモポリマーの水溶液について、温度に対する濁度の変化を調べるとポリ(1)では 33°C、ポリ(2)では 72°C だったのに対し、ポリ(3)では 37°C を示した。室温と体温の間で鋭く相転移するポリマーが得られた。

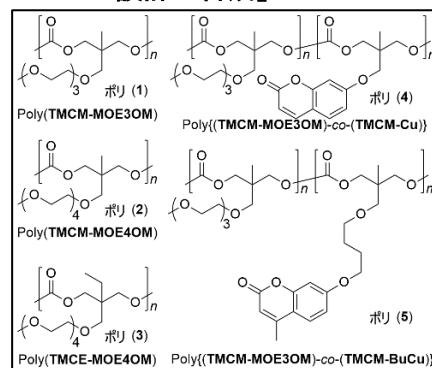


図 1. PTMC 誘導体の化学構造

次に光架橋反応性を付与することを目的とし、クマリンを導入したポリ(4)およびポリ(5)を合成した。その感熱応答性を図2に示す。クマリンを含むモノマーを 1mol% 有する共重合体の場合(図 2a)に比べて、10mol% 有する共重合体の場合(図 2b)では、応答温度が低温側に示されたが、UV 照射によって架橋させると 30 度以上のほぼ同等の温度に示した(図 2c)。一方、ポリ(5)では親水性が反映されて 38°C 程度に示された(図 2d)。

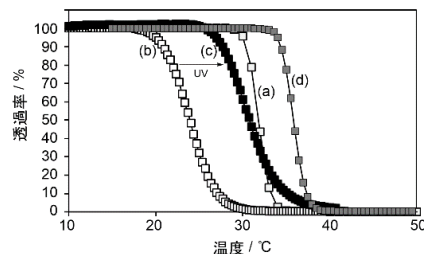


図 2. PTMC 誘導体の感熱応答性

(研究成果論文: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2017, 55, 3466.)

研究を進めてゆくうちに、PTMC 系の物性を補うために、PTMC 骨格以外の生分解性高分子および生体適合性高分子についても展開する運びとなった。例えば生分解性高分子

であるポリ乳酸(PLA)に機能性を付与させるために、高分子末端に種々の修飾を検討した。開始剤にバニリンなど、芳香族系の水酸基を用いても調製可能であり、高分子主鎖のキラリティが末端構造へ影響を及ぼすことも明らかとした。力学的特性および熱的特性を向上させるステレオコンプレックス化に関連するため、これらの知見は有用であった。

(研究成果論文: *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 1014.)

研究テーマB「PTMC 誘導体の高分子構造制御と材料特性制御」

図 1 におけるポリ(1)およびポリ(3)について、加水分解試験を行った。通常置換基を有しない PTMC は、酵素リパーゼによって加水分解が促進されるが、アルカリ性および酸性条件下ではあまり加水分解は促進されないということが知られている(Z. Zhang et al., *Biomaterials* **2006**, *27*, 1741.)。ところが、本研究課題で用いたポリ(1)およびポリ(3)はいずれも、全く逆の加水分解挙動を示した。加水分解試験におけるポリ(1)のプロトン NMR による分析を比較した結果を図 3 に示す。

加水分解前のプロトン NMR スペクトル(図 3a)において、高分子主鎖と側鎖に由来するピークを比較することで加水分解率を算出した。0.01mol/L の水酸化ナトリウム水溶液では、4 週間後には完全に加水分解が進行した(図 3b)のに対して、酵素(リパーゼ)では 4 週間後に約 57%(図 3c)および 9 週間

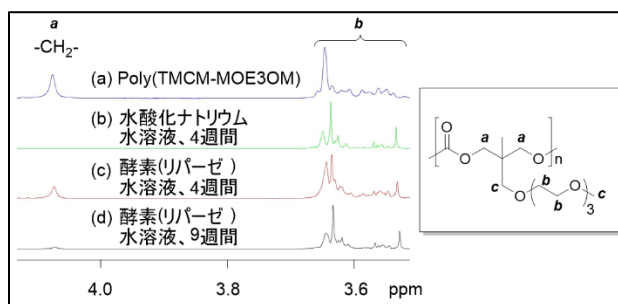


図 3. PTMC 誘導体加水分解の分析

後に約 88%(図 3d)の加水分解が確認された。これらの結果は質量分析および分子量分析によっても確認され、側鎖の置換基の親水性が加水分解速度に影響することが示された。

(研究成果論文: *Polym. Degrad. Stab.* **2016**, *130*, 78.)

材料化するために、ポリ(1)を骨格としたハイドロゲルを調製した。クマリンを導入したポリ(4)およびポリ(5)では、現在までにゲル化を達成できていない。これは、ポリ(1)の高分子量化に問題があるため、架橋点を出合わせても網目構造を構築できるほどの分子量

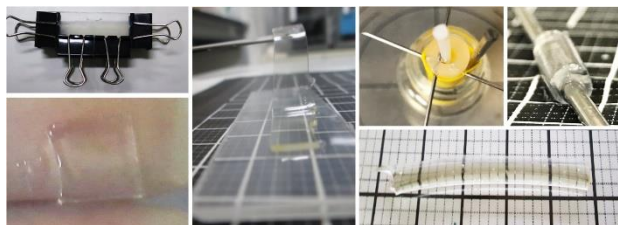


図 4. PTMC 誘導体加水分解の分析

が得られないことが原因と考えられる。そこで、分子内に TMC 部分を 2 つ有する、いわゆる架橋剤を合成し、ゲル化を試みた。その結果、板状やチューブ状など、様々な形状のハイドロゲルを得ることができた(図 4)。

ポリ(1)は室温では水溶性ポリマーとなるため、薄膜化するために疎水性 TMC とブロック共重合体を合成した。ポリ(1)の末端に存在する水酸基を開始剤と見立てて、TMC を重合することで得られ、分子量分析およびプロトン NMR によりブロック共重合体であることを確認した。ここで得られた親水性疎水性ブロック共重合体を、ステンレススチールおよびポリエチレン基板上にディップコート薄膜を形成させたところ、リン酸緩衝溶液中で安定に薄膜として存在し、その表面の様子を SEM で観察し、ラフネスを確認した。

一方、PLA を用いた材料化について、pH 応答性ナノ構造制御を達成した。ポリ乳酸合成の開始剤としてバニリンを利用すると、高分子末端にアルデヒド基を導入可能である。ここで得られる末端バニリン修飾 PLA と、親水性一級アミン化合物とを反応させると、アルデ

ヒドがイミン化して結合し、親水性疎水性ブロック共重合体ができる。このポリマーは疎水性部分をコアとしたナノ粒子を形成する。ここで、これらのナノ粒子を懸濁しているところへ

pH 環境が変化すると、イミン部分が解離して親水性部分が脱離する。すると、疎水性だけとなった PLA が凝集しクモの巣状構造を形成する(図 5)。これらの構造変化を利用すれば、炎症部位などの pH 環境が変化する特定の部分を認識して、生分解性高分子を凝集可能であり、新しい薬物送達システム(DDS)としての利用が期待できる。

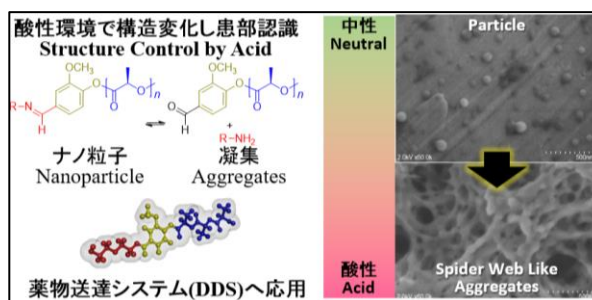


図 5. 末端修飾ポリ乳酸のナノ構造制御

(研究成果論文: *Macromol. Chem. Phys.* **2016**, *217*, 2679. 特許: 特願 2015-164121)

研究テーマC「循環器治療に適切な PTMC 誘導体の生体適合性制御」

PTMC 誘導体としてポリ(1)と PTMC の共重合体のディップコート薄膜を調製して、その生体適合性を評価した。まず接触角により親水性を調べると、約 60 度～80 度と基板によって変化した。温度による効果はほとんど見られなかった。これは疎水性成分である PTMC が 10 倍以上含まれているためと考えられる。タンパク質吸着および血小板粘着試験では、基板のステンレススチールおよびポリエチレンに比べて同等の程度であった。

一方、PTMC 誘導体のハイドロゲルでは、接触角が 10℃では 52 度程度であったのに対し 37℃では 106 度まで変化した。

一方、PTMC 骨格の材料の力学的強度に問題点を見出した。これを解決するために、PTMC 系ポリマー合成の際に同じ出発物質ジオールを用いた新規ポリウレタン材料へ展開した。剛直な主鎖に短い OEG 鎖を導入したことで、高い力学的強度と生体適合性を同時に付与させたポリウレタン材料を創ることができた。

(研究成果論文: *Macromolecules* **2017**, *50*, 6529.)

以上をまとめると、独自の TMC 誘導体ポリ(1)を骨格として、循環器治療材料をターゲットとした新しい高分子を合成した。さらに、これらを薄膜化およびハイドロゲル化するために、親水性疎水性ブロック共重合体や架橋剤を利用して、材料化を達成した。得られた薄膜やハイドロゲルの力学的特性と熱的特性を解析し、生体適合性を評価した。PTMC 誘導体で不足する物性についてはポリ乳酸等、他の高分子を用いることでナノ構造制御や力学的強度の向上を付与することができた。

3. 今後の展開

PTMC 誘導体によるハイドロゲルを温度によってサイズが変化させ、循環器治療器具のような伸縮昨日として利用しようとした。本研究課題では、サイズ変化を付与させることができたが、そのサイズ変化は乾燥状態と比較すると、長さで 1.3 倍(25℃)から 1.1 倍(37℃)という比率であった。これを実用的なサイズ変化にするために、今後は架橋条件の更なる最適化と共重合体の利用を検討したい。また、ある程度サイズを保つことが必要と思われる治療、例えば脳動脈瘤の充填剤としての利用などへ展開したい。

一方、PTMC 誘導体によるハイドロゲルでは、その力学的強度が低かった。そのため、PTMC の素材の良い点を活かすため、今後まずは金属スtentやバルーンのコーティング素材として、展開したい。ここでは感熱応答性を活かした親疎水性の変化による、タンパク質、血小板、および細胞の吸着制御へ展開したい。

本研究課題で様々な PTMC 誘導体を調製し、不足する物性を補おうと検討している間に、他の高分

子骨格の高分子材料にも研究が派生した。ポリ乳酸、ポリ(*N*-ビニルアミド)誘導体、およびポリウレタンの各高分子はそれぞれの高分子主鎖に基づく物性を有する材料として活用したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況は、概ね達したと自己評価している。エステルフリー型の PTMC 誘導体をモノマーレベルで多数分子設計し、実際に生体温度付近で感熱応答する 2 種類のホモポリマーを利用するに至った。材料化では、ハイドロゲルの生成のために高分子量体が得られないという問題点に直面した。しかし、架橋剤を新たに設計することで、再現よくハイドロゲルを作製することに成功した。ハイドロゲルでは、感熱応答性が反映されて、低温では親水性に、体温付近では疎水性に変化した。サイズもある程度の大きさを制御することができ、当初提案で期待していた材料を創ることができた。一方で、力学的強度が低く、金属代替材料としての物性は今後の課題と言える。そのため、親水性疎水性ブロック共重合体へと展開し薄膜としての利用を検討した。さらに、PTMC 誘導体とは異なる高分子材料の利用を検討し、高い力学的特性と生体適合性を同時に付与するポリウレタンの創製に至った。

研究の進め方について、さきがけの研究課題が採択された当時は、大阪大学臨床医工学融合研究教育センターの特任准教授であったが、半年後に奈良先端科学技術大学院大学に、テニュアトラック教員として、研究室を主宰する立場となった。そのため、博士研究員や学生(のべ 11 名)を指導する研究実施体制となった。研究費の執行状況では、1 年目にグローブボックス、2 年目にレオメータを購入するなど、大型装置を研究室に入れることができ、研究環境を整えることができた。新しい研究室を立ち上げるときにさきがけの予算を執行することができたため、本プロジェクトに専念する研究環境を整えることができ、今後の研究室運営の基礎を築くことができた。

研究成果の科学技術では、エステルフリー型の PTMC 誘導体という特徴的な生分解性高分子を多く報告し、特に学会発表では 77 件、論文では 24 報投稿することができた。社会・経済へは、特許出願 4 件や産学連携として企業との共同研究 3 件に至ったこと、国際共同研究として 2 か国を訪問し議論するなど、波及効果が見込まれる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

研究目的は、概ね順調に達成しているものと認められる。採択時の研究計画から始めて、領域会議で議論していくうちに、新しい分子設計を取り入れて修正をかけていったことは特筆に値する。例えば、高分子量体を得ることに苦労していた時に、架橋剤を工夫したり、共重合体を合成したりすることで、目的とする感熱応答性と生分解性の機能を付与した薄膜材料およびハイドロゲル材料を得ることに成功した。力学的強度についてはポリ乳酸やポリウレタンをうまく使うことで新しい材料を調製している。今後は、本材料系でないと発現できないという唯一無二の特徴をアピールできるように、さらなる研究活動を期待する。

産学連携では、JST の SciFos 活動にも参画した。この経験を実際に活かして、特許出願のみならず、実際に企業との共同研究につなげることができたことも評価に値する。

また国際的にも本さきがけ研究の成果が認められ、タイ国の高分子学会では Key Note の招待講演として招待された。

本さきがけ研究者としての活躍が認められ、奈良先端科学技術大学院大学で PI として研究室を主宰するテニュアトラック教員として異動することとなり、研究者としての飛躍につながった。今後

は分子技術の概念をますます育み、多くのすぐれた学生を卒業生として輩出してゆくことが見込まれる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Daisuke Aoki, Hiroharu Ajiro, “Design of Polyurethane Composed of Only Hard Main Chain with Oligo(ethylene glycol) Units as Side Chain Simultaneously Achieved High Biocompatible and Mechanical Properties”, *Macromolecules* **2017**, *50*(17), 6529–6538.
2. Nalinthip Chanthaset, Yoshikazu Takahashi, Yoshiaki Haramiishi, Mitsuru Akashi, Hiroharu Ajiro, “Control of Thermoresponsivity of Biocompatible Poly(trimethylene carbonate) with Direct Introduction of Oligo(ethylene glycol) under Various Circumstances”, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2017**, *55*(20), 3466–3474.
3. Kai Kan, Mitsuru Akashi, Hiroharu Ajiro, “Polylactides bearing vanillin at chain end provided dual dynamic interactions: stereocomplex formation, and nanostructure control”, *Macromol. Chem. Phys.* **2016**, *217*(24), 2679–2685.
4. Kai Kan, Michiya Fujiki, Mitsuru Akashi, Hiroharu Ajiro, “Near-Ultraviolet Circular Dichroism of Achiral Phenolic Termini Induced by Nonchromophoric Poly(L,L-lactide) and Poly(D,D-lactide)”, *ACS Macro Letters*, **2016**, *5*, 1014–1018.
5. Yoshiaki Haramiishi, Nalinthip Chanthaset, Kai Kan, Mitsuru Akashi, Hiroharu Ajiro, “Contrast Effect on Hydrolysis of Poly(trimethylene carbonate) Depending on Accelerated Species Due To the Hydrophilic Oligo(ethylene glycol) Units at Side Groups”, *Polym. Degrad. Stab.* **2016**, *130*, 78–82.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 4件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1.

○

Hiroharu Ajiro, [*Invited] “Preparation of Multi-functional Hydrogels and Thin Films Using Poly(trimethylene carbonate) Bearing Oligoethylene Glycol Units”, Asian International Symposium – Polymer – The 97th CSJ Annual Meeting, 3A2–27, March 18th 2017, Yokohama (Japan).

2.

○Hiroharu Ajiro, [*Invited Keynote] “Functionalization of Poly(trimethylene carbonate) and Polylactide by Molecular Technology Approach” Annual Meeting, the International Polymer Conference of Thailand (PCT-6), BIOMAT-KN1, June 30th – July 1st 2016, Bangkok (Thailand).

3.

○Hiroharu Ajiro, Shogo Ito, Mitsuru Akashi, [*Invited] “Synthesis of polylactides bearing antibacterial moiety at chain end” The 2nd International Symposium for Green-Innovation Polymers (GRIP2015), page 12, Hawaii (USA), December 15th –16th 2015.

4.

カン 凱, 網代 広治, 明石 満, 「末端修飾と高分子間相互作用を利用したポリ乳酸系材料の創製」, 高分子論文集 –特集号–医用高分子〔総合論文〕

5.

網代広治, “複機能性ポリトリメチレンカーボネート誘導体の設計”, 化学経済, 2016, 63(9), 54–58.

6.

網代広治, “末端修飾と高分子間相互作用によるポリ乳酸の複機能化”, 化学工業 [特集]次世代高効率材料の開発, 2016, 67(6) 12–20.

7.

Hiroharu Ajiro, Yoshiaki Haramiishi, Nalinthip Chanthaset, Mitsuru Akashi, “Polymer Design Using Trimethylene Carbonate with Ethylene Glycol Units for Biomedical Application”, Polym. J. [Focus Review] 2016, 48, 751–760.