

細胞膜上の分子認識を介して細胞機能进行操作する  
生体模倣合成高分子の創製

中川 泰宏

2018年 2月

筑波大学大学院博士課程  
数理物質科学研究科博士論文  
博士(工学)

細胞膜上の分子認識を介して細胞機能を操作する  
生体模倣合成高分子の創製

中川 泰宏  
物質・材料工学専攻

# 目次

目次	i
1 章 緒言	1
1-1 生命活動における分子認識	1
1-2 高分子材料による薬剤の高機能化	1
1-3 生体内で高分子を利用する際の分子設計	3
1-4 高分子材料による治療法の開発	5
1-5 本論文の主題と構成	7
参考文献	8
2 章 アポトーシス細胞膜模倣モノマー及びポリマーの作製	11
2-1 緒言	11
2-1-1 アポトーシス細胞の抗炎症活性	11
2-1-2 アポトーシス細胞の特異的な細胞膜構造	12
2-1-3 ホスファチジルセリンによる抗炎症活性と治療応用	14
2-1-4 炎症について	11
本章における目的	14
2-2 実験	15
2-2-1 アポトーシス細胞模倣高分子の合成戦略	15
2-2-2 <i>t</i> -Bu/BOC-MPS の合成	16
2-2-3 <i>t</i> -Bu/BOC-MPS の重合及び脱保護	17
2-3 結果	18
2-3-1 <i>t</i> -Bu/BOC-MPS の合成	18
2-2-2 <i>t</i> -Bu/BOC-MPS の重合及び脱保護	20
2-4 結言	21
参考文献	22
3 章 アポトーシス細胞膜模倣高分子の抗炎症活性の評価	25
3-1 緒言	25
3-2 実験	25
3-2-1 細胞の調製	25
3-2-2 細胞毒性評価 (Alamar blue assay)	27
3-2-3 共焦点顕微鏡による像観察	27
3-2-4 濃度依存的抗炎症活性の評価 (SEAP reporter gene assay)	27
3-2-5 共培養時間依存的抗炎症活性の評価	29
3-2-6 マクロファージに対する poly(MPS)分配量の定量	29
3-2-7 MPC との共重合による影響の評価	29
3-3 結果	30
3-3-1 poly(MPS)の細胞毒性	30
3-3-2 poly(MPS)のマクロファージへの取込み	30

3-3-3	炎症性刺激によるマクロファージの形態変化と poly(MPS)添加による抑制	32
3-3-4	濃度依存的抗炎症活性の評価	33
3-3-5	共培養時間依存的抗炎症活性の評価	34
3-3-6	poly(MPS)の添加濃度依存的なマクロファージへの取込みの評価	35
3-3-7	MPC との共重合による抗炎症活性効率の効率化	36
3-4	結言	37
	参考文献	39
4	高分子反応による汎用高分子への抗炎症活性部位の導入	41
4-1	緒言	41
4-2	実験	42
4-2-1	水酸基含有高分子の作製	42
4-2-2	高分子反応による水酸基含有高分子に対する PS 基の導入	44
4-2-3	作成した高分子の細胞毒性・抗炎症活性の評価	45
4-3	結果	46
4-3-1	水酸基含有高分子の作製	46
4-3-2	高分子反応による水酸基含有高分子に対する PS 基の導入	46
4-3-3	作成した高分子の細胞毒性・抗炎症活性の評価	50
4-4	結言	51
	参考文献	52
5	糖認識機能を有するレクチン模倣高分子の作製	53
5-1	緒言	53
5-2	実験	56
5-2-1	糖認識モノマーの合成	56
5-2-2	温度応答性糖認識ポリマー(レクチン模倣ポリマー)の合成	57
5-2-3	単糖、二糖とレクチン模倣ポリマーの相互作用強度の評価	57
5-2-4	糖アレイ解析を用いたレクチン模倣ポリマーの糖認識機能の評価	58
5-3	結果	58
5-3-1	糖認識モノマーの合成	58
5-3-2	温度応答性糖認識ポリマー(レクチン模倣ポリマー)の合成	58
5-3-3	単糖、二糖とレクチン模倣ポリマーの相互作用強度の評価	59
5-3-4	糖アレイ解析を用いたレクチン模倣ポリマーの糖認識機能の評価	61
5-4	結言	65
	参考文献	66
6	結言	68
	発表リスト	69

## 1章 緒言

### 1-1 生命活動における分子認識

生命活動において、分子認識は生物学的プロセスの基本にして必須の相互作用である。呼吸、代謝、タンパク質産生、免疫などの生体の自己恒常性維持に不可欠な生体活動の根幹には、ATP-酵素、レセプター-リガンド、DNA-タンパク質、RNA-リボソーム、抗原-抗体、糖-レクチンなどの様々な分子認識機構が存在する(Fig.1-1)。生体分子認識を我々に利するよう制御する物質は薬剤として開発され、今日では様々な場面で活用されている。例えば、抗がん剤として知られているニボルマブは活性化T細胞の表面に発現している Programmed Death-1(PD-1)に対するモノクローナル抗体である。癌細胞は PD-1 に対するリガンドを呈示することで活性化T細胞を抑制し、免疫による攻撃を回避している。ここにニボルマブを投与することで癌細胞の免疫回避システムは無効化され、結果として抗腫瘍効果が発現する事が知られている<sup>1,2</sup>。その他にも、抗生物質、抗アレルギー剤、ホルモン剤、免疫抑制剤など様々な薬剤が開発・利用されており、その全てが何らかの形で生体分子認識を制御している。

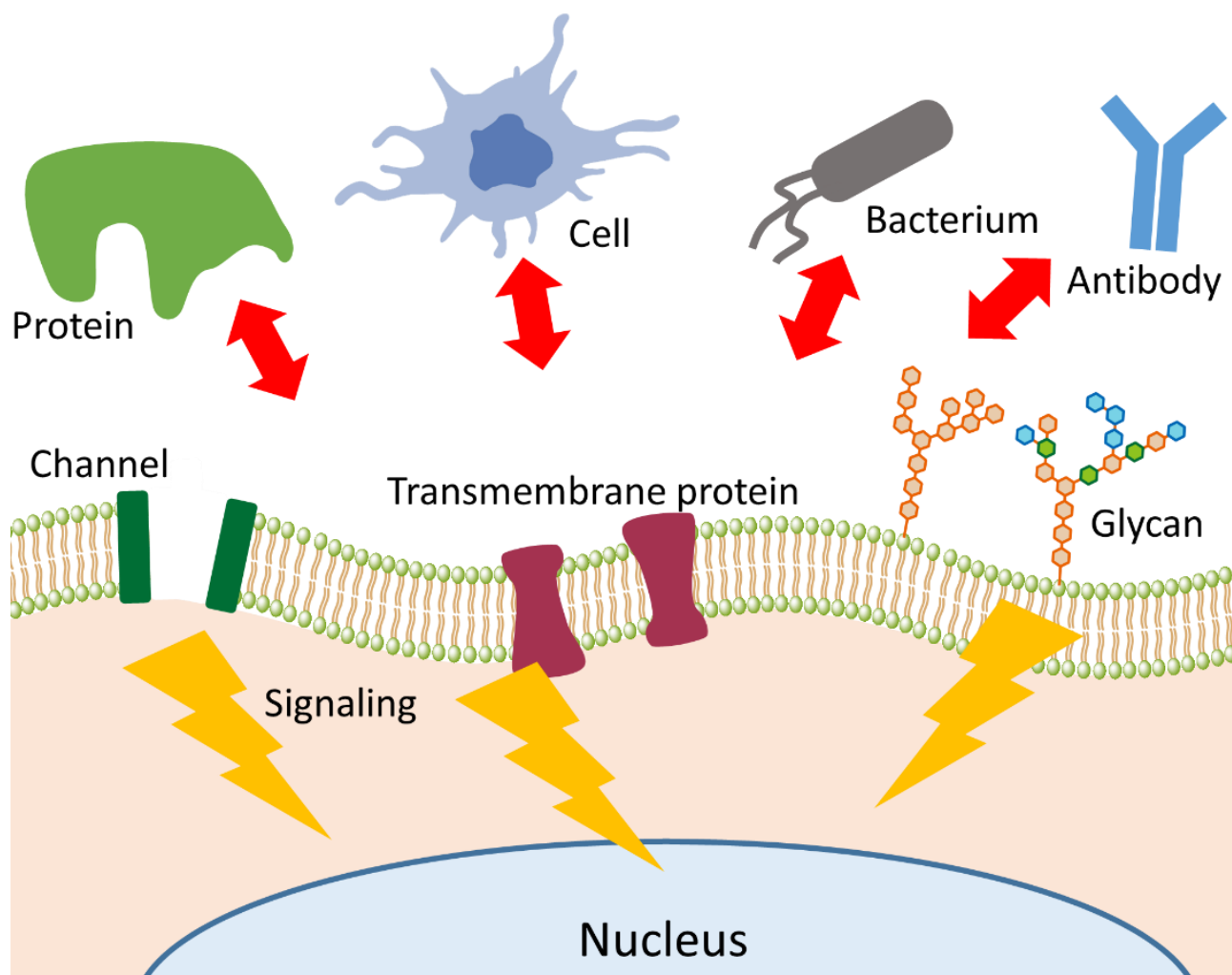


Fig. 1-1 細胞膜上における様々な分子認識機構

### 1-2 高分子材料による薬剤の高機能化

近年では、薬剤と高分子材料を複合することで薬理活性の高機能化が達成されている。この概念によって作製される高分子-薬剤や高分子-リボソーム複合体はポリマーナノメディシンと呼ばれ、分子量の向上によ

る血中滞留性の向上や Enhanced Permeability and Retention (EPR)効果による腫瘍組織に対する指向性の獲得が達成されている。

片岡らの研究グループによって報告されている高分子ミセルによる抗がん剤の効率的な腫瘍部位への送達は、高分子と薬剤を組み合わせることによって高機能化が達成された顕著な例である<sup>3,5</sup>。高分子ミセルとは親水性のセグメントと疎水性のセグメントからなるブロック共重合体が水中で疎水セグメントが自己組織的に集合することで形成するナノサイズの構造体である。このナノサイズの集合体は疎水性のコアの周囲を親水性のセグメントが覆うような構造(コア-コロナ構造)を有しており、それゆえに高い血中安定性を有している。片岡らは疎水性の抗がん剤であるアドリアマイシンを内包したナノミセルをもちいて、革新的な *in vivo* 抗がん活性の向上を達成し、同時に EPR 効果によるがん組織への選択的集積や、*in vivo* における効果的な抗腫瘍治療の実現を成し遂げている。

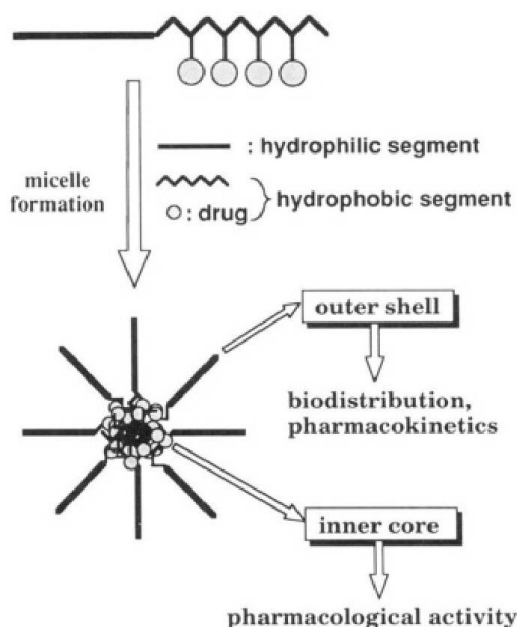


Fig. 1-2 高分子材料による疎水性薬剤の封入による高機能化例<sup>6</sup>

しかしながら、新規の高分子材料を体内で使用するため、承認審査のプロセスにおいて臨床応用まで時間を要しているという現状も無視できない。この問題に対して Luigi Cattel らの研究グループは抗がん剤であるパクリタキセルとヒト血清アルブミンを複合させた Abraxane®と呼ばれる抗腫瘍剤が疎水性の抗がん剤を高分子と複合することで優れた治療効果を達成し、かつスムーズな臨床応用を達成した<sup>7</sup>。アルブミンは優

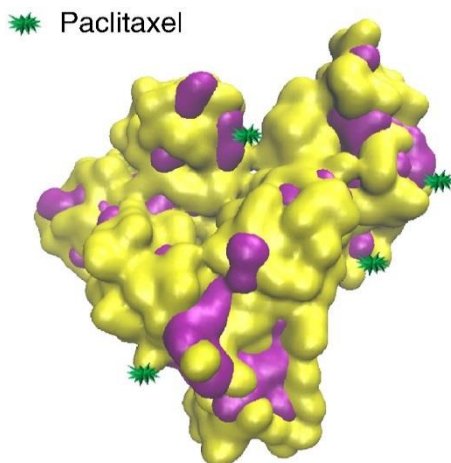


Fig. 1-3 生体由来タンパク質との複合による疎水性薬剤の高機能化例  
(黄部: アルブミン親水部, 紫部: アルブミン疎水部)<sup>8,9</sup>

れた水溶性や広い動物種に渡る分布、腫瘍組織に選択的に濃縮されるという特徴を有しており、抗がん剤の運び手として優れた性質を有するタンパク質である。実際に今日では肺がんや膵臓がんの治療に使用されており、年商 90 億円を超えるほど広く活用されている。

### 1-3 生体内で高分子を利用する際の分子設計

高分子を生体内で活用するという視点からも、生体分子との相互作用について考慮することは重要である。体内で使用される材料は一般にバイオマテリアルと呼ばれるが、この研究分野の最初期では生体適合性を考慮せずに材料が選択されてきたため、生体に対しての病原性や毒性が報告されていた。この問題については免疫に関する分子生物学的観点からの理解が深まるとともに、生体内での生体分子・細胞との相互作用を最小限に留めるという材料設計が主流として研究されるようになり、材料表面の物理化学的性質(親水性・表面電荷・散漫構造・相分離等)を制御することにより優れた免疫回避型バイオマテリアルが開発されてきた<sup>10</sup>。

例えばポリエチレングリコール(PEG)は今日最も有名な非イオン性の免疫回避バイオマテリアルである。PEG は工業的に製造可能なポリエーテル化合物であり、界面活性剤、潤滑剤、医薬品、化粧品に広く使用されている<sup>11</sup>。PEG は、水分子と PEG 骨格中の酸素原子との間に水素結合を容易に形成するため、水に対して優れた親和性を示すことが知られている。このような PEG の水への優れた親和性は血液適合性材料の分野で注目をあつめるようになり、1980 年代初頭から盛んに研究されるようになった<sup>12</sup>。PEG によって修飾される表面は、PEG の片末端のみを対象表面に固定化することによって、反対側の鎖末端が自由に動くことができるよう設計されてきた。この親水性高分子鎖は、生体分子に対して非汚染性を付与することが知られている。例えば、ポリスチレン表面への PEG ブラシ修飾がタンパク質吸着を効果的に減少させることが知られている<sup>13</sup>。加えてより最近では、異なる分子量の PEG(6kDa : 2.5kDa=9 : 1w/w)によって表面をコーティングすることで、タンパク質の非特異的吸着をより強力に抑制することが示されている<sup>14</sup>。Fig. 1-6 に示すように、この優れたタンパク質汚染耐性は、高密度の PEG グラフト鎖による生体分子の接触の抑制に由来する事も報告されている。加えて、生体適合性については水との親和性のみが重要であるというこれまでの見地から、この発見は非付着表面を議論する際には界面エネルギーや排除体積効果(散漫構造)の重要性を示す発見となっている。

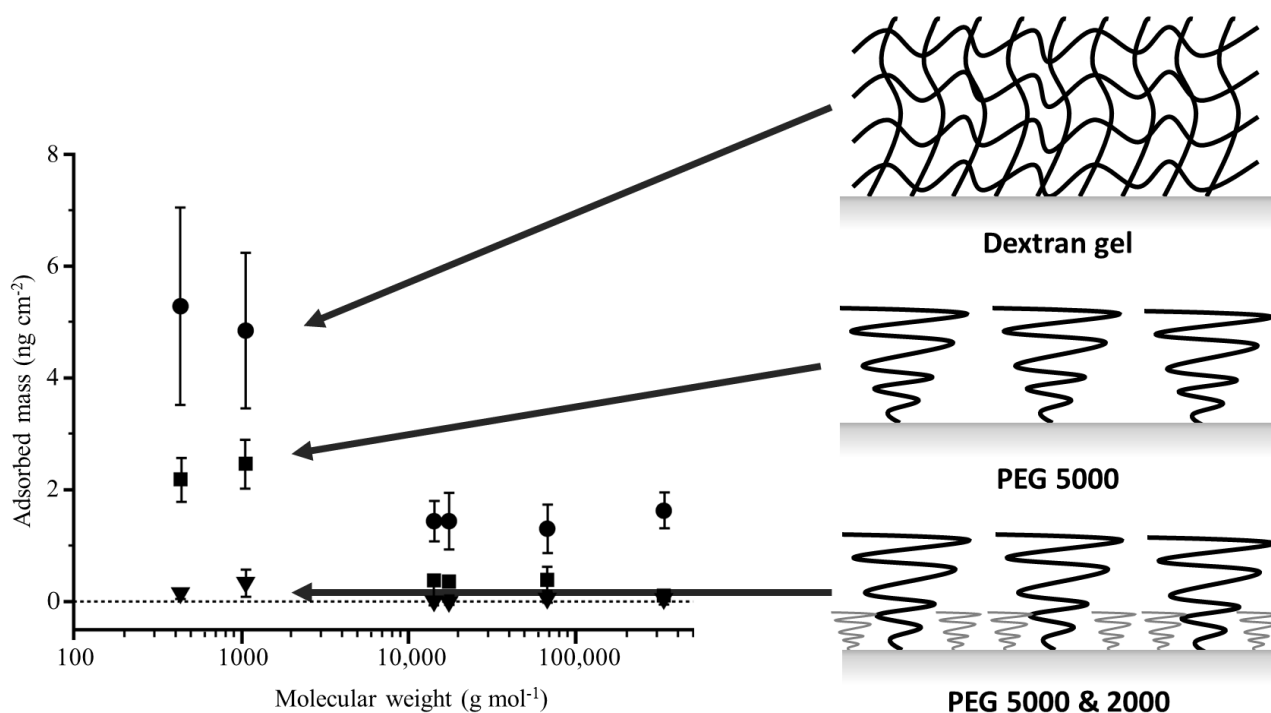


Fig. 1-6 ポリエチレングリコール(PEG)修飾によるタンパク質非特異吸着の抑制<sup>14</sup>

この発見は非付着表面を議論する際には界面エネルギーや排除体積効果(散漫構造)の重要性を示す発見となっている。

anion/cation		zwitterion	
monomer/polymer name	chemical structure	monomer/polymer name	chemical structure
Acrylic acid		Allylamine hydrochloride	
<i>N</i> -3-(Dimethylamino) propylmethacrylamide		Sodium polyacrylate	
Sodium poly-L-glutamate		MPC; 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine	
Sodium 4-vinylbenzenesulfonate		SBMA; 2-Methacryloyloxyethyl dimethyl-3-sulfopropyl ammonium hydroxide	
Poly-L-lysine hydrobromide		CBMA; 2-Methacryloyloxyethyl dimethyl carboxyethyl ammonium hydroxide	

Fig. 1-7 イオン性生体適合高分子材料の例

PEGは非イオン性のバイオマテリアルであるが、イオン性の免疫回避バイオマテリアルも開発されている。イオン性の免疫回避バイオマテリアルは、「カチオン性」、「アニオン性」および「双性」の3種に分類できる (Fig. 1-7)。一般に、双性物質は、陰イオンおよび陽イオン物質よりも優れた免疫回避能力を有する事が知られている。その他にも、アニオン性モノマーであるメタクリル酸とカチオン性モノマーであるジメチルアミノプロピルメタクリルアミドの共重合体において、1:1となるように共重合を行った物が最も優れた生体適合性を示すことが報告されている<sup>15</sup>。非イオン性モノマーの共重合体を除く他のタイプの生体適合性材料として、双性イオン性モノマーの一般的なポリマーとしてはモノマー単位で双生イオンを有する、Sulfobetaine Methacrylate (SBMA)<sup>16</sup>、2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)<sup>17</sup>、また Carboxybetaine Methacrylate (CBMA)<sup>18</sup>がよく知られている。

バイオマテリアルの開発という観点では、生体分子を模倣するという材料設計戦略も効果的である。代表的な例として、石原らによって開発された細胞膜の主要構成成分であるホスファチジルコリンの頭部基であるホスホリルコリン基を側鎖に有する poly(2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine) (poly(MPC))が知られている<sup>17</sup>。MPCの優れた点はその生体適合性だけでなく機械的安定性や汎用性の高さも優れており、人工関節(アクアラ®、京セラメディカル)、心血管ステント(エンデバー®: Medtronic)、左室補助装置(EVAHEART®、Sun Medical)酸素供給器(PrimO2x®: Sorin)、およびソフトコンタクトレンズ(Proclear®: Cooper Vision)など、多岐にわたる商品展開が行われている。一般的に、優れた特性を示すバイオマテリアルを商品化するためには大量かつ安定な材料供給が必要であり、そのためには科学・材料メーカーとの協力が不可欠である。加えて、医療機器メーカーによってその材料を用いたデバイスが製造され、最終的にはその安全性と機能が評価され、臨床使用が認可される必要がある。このプロセスの突破は非常に難しいが、MPCはこれらの障壁を突破し、幅広く活用されている免疫回避バイオマテリアルのロールモデルとして知られている。



### 1-4 高分子材料による治療法の開発

先述のような免疫回避バイオマテリアルの次なる戦略として、材料自身が生理活性を有し、高分子材料のみによって治療効果を誘導するという概念が近年報告されるようになってきた。従来の免疫回避型バイオマテリアルは材料表面の物理化学的性質(親水性、表面電荷、散漫構造、相分離構造など)を制御することで優れた生体適合性を達成してきたが、次世代のバイオマテリアルは、免疫機能を操作することで治療効果を得るという戦略が取られている。<sup>19-21</sup> 具体的には、免疫を活性化することで治療効果を得ようとする戦略(免疫活性化型バイオマテリアル)と、免疫寛容を誘導する事で治療効果を得ようとする戦略(免疫寛容バイオマテリアル)の二種が提唱されている(Fig, 1-4)。この免疫活性・寛容バイオマテリアルは高分子材料が積極的に細胞をはじめとした生理分子と積極的に相互作用し、かつ目的とする生理分子を意図するように制御する必要があるため、従来の物理化学適性質だけではなく、生化学的な性質を制御する必要がある。

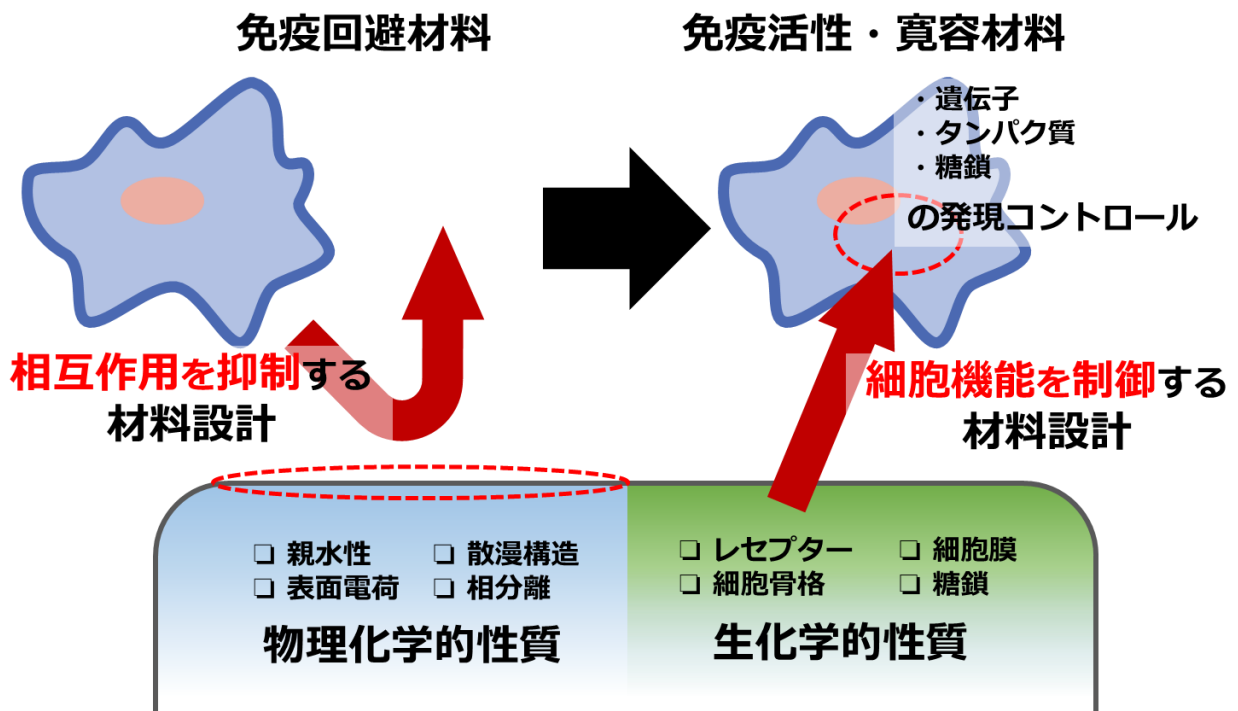


Fig. 1-4 免疫回避材料から免疫活性・抑制材料へ

例えば、長崎らの研究グループは生体親和性を有するポリエチレングリコール鎖の側鎖・末端にラジカルスカベンジャーである 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシド(TEMPO)を担持させた活性酸素(ROS)除去能を有する高分子材料を開発している<sup>22</sup>。TEMPO は一般に安定な有機フリーラジカルであり、元は有機合成における酸化反応の触媒として利用された歴史を持ち、ラジカル生成反応を検出するためのラジカルスカベンジャーとして利用されてきた。このような背景から長崎らは、炎症領域での ROS 除去にこの TEMPO のラジカルスカベンジャー能力に着目した<sup>23</sup>。炎症部位では通常、大量の ROS が産生されることが知られており、この酸化的ストレス環境が動脈硬化などの様々な疾患を引き起こされるため、スカベンジャーによる ROS の除去は極めて効果的である。しかし一方で活性酸素はミトコンドリアにおける細胞内好気性呼吸に必須な分子でもあるため、不要な ROS のみを選択的に除去する必要があった。つまり、TEMPO などの低分子量のプロローブは濃度勾配によってミトコンドリア内に拡散し得、好気呼吸を阻害するという問題点があった。ここで長崎らは TEMPO 分子を PEG ポリマー鎖につなぎ止めることによって TEMPO が細胞膜を透過するのを防ぎ、細胞外環境中の不要な ROS を選択的に除去することに成功した<sup>24</sup>。このレドックス活性を有する高分子材料は、医薬品、医療機器、化粧品、高級品、および健康食品を含む多くの分野で有用であることが追って報告されている。一例として、TEMPO 担持 PEG を経口投与によるアルツハイマー病をモデル化するマウスの認知機能の改善や、手術後の術部位における非特異的な組織再接着を予防するといった優れた機能が報告

されている<sup>24,25</sup>。



Fig. 1-5 ラジカルスカベンジャーと高分子材料との複合による高機能化例<sup>24</sup>

このように、単体では薬剤として用いることが困難であったものの高機能化・生体適合性の上昇が達成される一方で、Kopeček らは細胞膜上のレセプターを高分子材料によって操作することによって、細胞自身の機能発現を制御することに成功している。Kopeček らは poly-*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (poly(HPMA))、Anti-CD20 抗体、Coiled-Coil peptide E(CCE)/Coiled-Coil peptide K(CCK) ペプチド二量体を用いることで B 細胞に発現している CD20 を多量化することで癌細胞にアポトーシスを誘導することに成功した<sup>26,27</sup>。具体的な設計概念は Fig1-6 にあるように、オリゴペプチド 1 に結合した抗 CD20 Fab' 抗体断片が CD20 + B 細胞の表面に発現している CD20 に付加し、これとオリゴペプチド 1 に相補的なオリゴペプチド 2 を複数担持した poly(HPMA) が、コンジュゲートを形成することで、CD20 の多量化が誘導される。CD20 はデスレセプターリガンドとして知られており、これが多量化することでその細胞のアポトーシスが誘導される。つまり Kopeček らは高分子のみを用いて腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することに成功している。このアプローチは薬物を

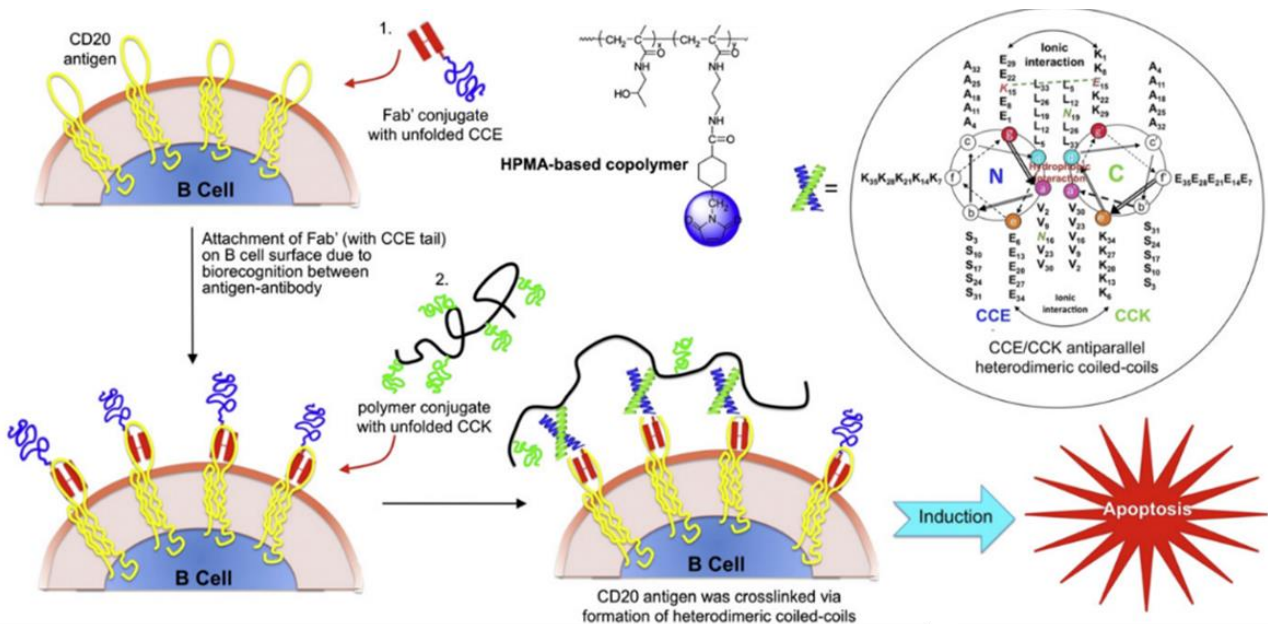


Fig. 1-6 細胞膜上のレセプターを操作する高分子材料の設計<sup>28</sup>

使用せず、免疫に依存しない新しいナノメディシンのアプローチ法であり、それ単体でも従来の治療法である化学療法や免疫療法よりも大きな利点を有するだけでなく、既存の治療法と組み合わせて使用することでさらなる相乗効果が期待できる。これに加え Kopeček らは B 細胞だけでなくリンパ腫やリンパ性白血病細胞に対しても同様の技術を応用することで癌細胞へのアポトーシス誘導を成功している<sup>29,30</sup>。

### 1-5 本論文の主題と構成

本章では生体内における分子認識や、それを利用した薬剤の作用機序について紹介した。加えて、生体分子や薬剤を制御・高機能化するための高分子材料についても紹介を行い、高分子材料が生体分子をコントロールすることの可能性や有用性について紹介した。このような背景のもと、著者は自身が生体分子認識機能、及び生理的活性を有する高分子材料の創出を本研究の主題とした。1-4 で述べたように現在では高分子材料のみによる炎症抑制や、高分子材料を用いて細胞表面の生理分子の認識を介した細胞機能の制御が達成されている一方で、細胞表面の生理分子の認識を介した免疫寛容の誘導は未だ報告されていない。そこで、高分子材料によって認識・操作する対象の生理分子として、細胞膜を構成する分子であるリン脂質と、細胞の最表面に存在している糖鎖に着目し、これらを模倣・認識可能な高分子材料の開発を行い免疫機能の制御について議論を行った。

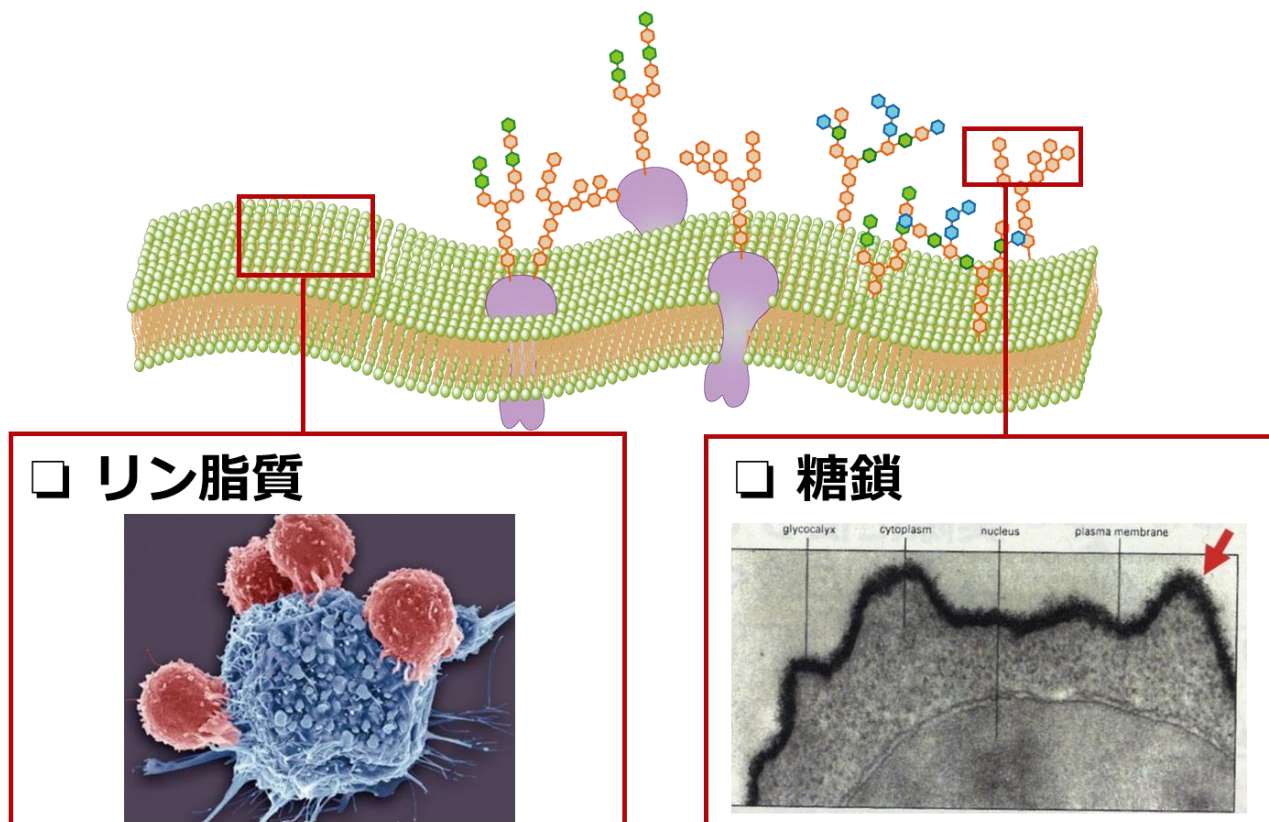


Fig. 1-6 免疫抑制機能を有する生理分子<sup>31</sup>

以上を踏まえ第2章では免疫細胞に対して生理活性を有する生体分子としてホスファチジルセリンに着目し、ホスファチジルセリンの機能性官能基を有するメタクリル系モノマーの開発を行い、高分子の分子設計による高機能化について述べる。第3章では第4章ではさらなる機能化を目指して非ラジカル重合系の高分子材料に対して導入手法を開発した。第5章では抗菌剤として活用されており、且つ *cis*-diol と特異的に共有結合を形成することで知られている Benzoxaborole 基を重合性官能基化し、これの糖認識機能を評価した。

## 参考文献

- 1 Wang, C.; Thudium, K. B.; Han, M.; Wang, X.-T.; Huang, H.; Feingersh, D.; Garcia, C.; Wu, Y.; Kuhne, M.; Srinivasan, M.; Singh, S.; Wong, S.; Garner, N.; Leblanc, H.; Bunch, R. T.; Blanset, D.; Selby, M. J.; Korman, A. J., *In Vitro* Characterization of the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab, BMS-936558, and *In Vivo* Toxicology in Non-Human Primates. *Cancer Immunology Research* **2014**, *2*, 846-856.
- 2 Sharma, P.; Allison, J. P., The future of immune checkpoint therapy. *Science* **2015**, *348*, 56-61.
- 3 Yokoyama, M.; Inoue, S.; Kataoka, K.; Yui, N.; Okano, T.; Sakurai, Y., Molecular design for missile drug: Synthesis of adriamycin conjugated with immunoglobulin G using poly(ethylene glycol)-block-poly(aspartic acid) as intermediate carrier. *Die Makromolekulare Chemie* **1989**, *190*, 2041-2054.
- 4 Yokoyama, M.; Miyauchi, M.; Yamada, N.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K.; Inoue, S., Characterization and Anticancer Activity of the Micelle-forming Polymeric Anticancer Drug Adriamycin-conjugated Poly(ethylene glycol)-Poly(aspartic acid) Block Copolymer. *Cancer Research* **1990**, *50*, 1693-1700.
- 5 Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K., Improved synthesis of adriamycin-conjugated poly(ethylene oxide)-poly(aspartic acid) block copolymer and formation of unimodal micellar structure with controlled amount of physically entrapped adriamycin. *Journal of Controlled Release* **1994**, *32*, 269-277.
- 6 Yokoyama, M.; Kwon, G. S.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Seto, T.; Kataoka, K., Preparation of micelle-forming polymer-drug conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **1992**, *3*, 295-301.
- 7 Dosio, F.; Brusa, P.; Crosasso, P.; Arpicco, S.; Cattel, L., Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel-albumin conjugate. *Journal of Controlled Release* **1997**, *47*, 293-304.
- 8 Desai, N., Challenges in Development of Nanoparticle-Based Therapeutics. *The AAPS Journal* **2012**, *14*, 282-295.
- 9 Stirland, D. L.; Nichols, J. W.; Miura, S.; Bae, Y. H., Mind the gap: A survey of how cancer drug carriers are susceptible to the gap between research and practice. *Journal of Controlled Release* **2013**, *172*, 1045-1064.
- 10 Hench, L., Biomaterials. *Science* **1980**, *208*, 826-831.
- 11 Becher, P., Review of: "Alkylene Oxides and Their Polymers" (Surfactant Science Series, Vol. 35). F. E. Bailey, Jr. and J. V. Koleske. vi+261 pp. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1991. \$125. *Journal of Dispersion Science and Technology* **1992**, *13*, 247-248.
- 12 Harris, J. M., Introduction to biotechnical and biomedical applications of poly(ethylene glycol). In *Poly*

(ethylene glycol) Chemistry, Springer: 1992; pp 1-14.

- 13 Österberg, E.; Bergström, K.; Holmberg, K.; Schuman, T. P.; Riggs, J. A.; Burns, N. L.; Van Alstine, J. M.; Harris, J. M., Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations: Comparison to PEG. *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, *29*, 741-747.
- 14 Nagasaki, Y.; Kobayashi, H.; Katsuyama, Y.; Jomura, T.; Sakura, T., Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *309*, 524-530.
- 15 Kitano, H.; Nagaoka, K.; Tada, S.; Gemmei-Ide, M.; Tanaka, M., Structure of Water Incorporated in Amphoteric Polymer Thin Films as Revealed by FT-IR Spectroscopy. *Macromolecular Bioscience* **2008**, *8*, 77-85.
- 16 Kitano, H.; Mori, T.; Takeuchi, Y.; Tada, S.; Gemmei-Ide, M.; Yokoyama, Y.; Tanaka, M., Structure of Water Incorporated in Sulfobetaine Polymer Films as Studied by ATR-FTIR. *Macromolecular Bioscience* **2005**, *5*, 314-321.
- 17 Ishihara, K.; Aragaki, R.; Ueda, T.; Watanabe, A.; Nakabayashi, N., Reduced thrombogenicity of polymers having phospholipid polar groups. *Journal of Biomedical Materials Research* **1990**, *24*, 1069-1077.
- 18 Carr, L. R.; Xue, H.; Jiang, S., Functionalizable and nonfouling zwitterionic carboxybetaine hydrogels with a carboxybetaine dimethacrylate crosslinker. *Biomaterials* **2011**, *32*, 961-968.
- 19 筏義人, 人工臓器用材料に対する生体反応. *化学と生物* **1990**, *28*, 522-529.
- 20 Sawyer, P. N.; Burrowes, C.; Ogoniak, J.; Smith, A. O.; Wesolowski, S. A., IONIC ARCHITECTURE AT THE VASCULAR WALL INTERFACE. *ASAIO Journal* **1964**, *10*, 316-319.
- 21 森有一, *人工臓器* **1981**, *10*, 993.
- 22 Yoshitomi, T.; Miyamoto, D.; Nagasaki, Y., Design of Core-Shell-Type Nanoparticles Carrying Stable Radicals in the Core. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 596-601.
- 23 Samuni, A.; Krishna, C. M.; Mitchell, J. B.; Collins, C. R.; Russo, A., Superoxide Reaction with Nitroxides. *Free Radical Research Communications* **1990**, *9*, 241-249.
- 24 Toh, K.; Yoshitomi, T.; Ikeda, Y.; Nagasaki, Y., Novel redox nanomedicine improves gene expression of polyion complex vector. *Science and Technology of Advanced Materials* **2011**, *12*, 065001.

- 25 Yoshitomi, T.; Nagasaki, Y., Development of silica-containing redox nanoparticles for medical applications. *Biomaterials Science* **2015**, *3*, 810-815.
- 26 Wu, K.; Liu, J.; Johnson, R. N.; Yang, J.; Kopeček, J., Drug-Free Macromolecular Therapeutics: Induction of Apoptosis by Coiled-Coil-Mediated Cross-Linking of Antigens on the Cell Surface. *Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 1493-1497.
- 27 Zhang, R.; Yang, J.; Chu, T.-W.; Hartley, J. M.; Kopeček, J., Multimodality Imaging of Coiled-Coil Mediated Self-Assembly in a “Drug-Free” Therapeutic System. *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 1054-1065.
- 28 Wu, K.; Yang, J.; Liu, J.; Kopeček, J., Coiled-coil based drug-free macromolecular therapeutics: In vivo efficacy. *Journal of Controlled Release* **2012**, *157*, 126-131.
- 29 Chu, T.-W.; Kopeček, J., Drug-free macromolecular therapeutics - a new paradigm in polymeric nanomedicines. *Biomaterials Science* **2015**, *3*, 908-922.
- 30 Chu, T.-W.; Kosak, K. M.; Shami, P. J.; Kopeček, J., Drug-free macromolecular therapeutics induce apoptosis of patient chronic lymphocytic leukemia cells. *Drug Delivery and Translational Research* **2014**, *4*, 389-394.
- 31 Vella, F., Molecular biology of the cell (third edition): By B Alberts, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts and J D Watson. pp 1361. Garland Publishing, New York and London. 1994. *Biochemical Education* **1994**, *22*, 164-164.

## 2章 アポトーシス細胞膜模倣モノマー及びポリマーの作製

### 2-1 緒言

#### 2-1-1 炎症について

生物が生存していくためには遺伝情報に基づいた自己内部環境恒常性の維持が不可欠であり、生物はそのための機構を数多く有している。炎症反応はその一角を担う反応であり、生体組織内における非自己物質の処理を担う機構である。非自己物質とはウイルスや細菌等の微生物や外傷によって埋没した外異物、ガン・腫瘍化した自己細胞や、外的刺激によって死滅した細胞組織であり、ヒトを始めとする脊椎動物における炎症反応は、食細胞機構(細胞性免疫)が血管系の発達によって高機能化されたものである(液性免疫)。細胞性免疫は主に好中球、マクロファージ、樹状細胞による貪食機構やNK細胞によって成り立っており、液性免疫はB細胞による抗体の生産によって支配されている。また、T細胞は2つの免疫系のレギュレーターとして重要な役割を担っている。これらの免疫細胞は抗原抗体反応やホルモン、サイトカイン等によって互いに調節しあい、常に綿密なバランスの上に成り立っている。更に、これら免疫細胞が生産するサイトカインが、異物を取り除いた後の傷ついた組織の修復や血管新生を誘導することが知られている。つまり、炎症反応とは、細胞や組織が刺激・変質・損傷を受けた際に始まる再生・修復プロセスの最初期に始まる反応であり、生体の自己恒常性の維持に不可欠な反応である。上記のように生物は自己の恒常性を維持するために炎症反応・免疫反応を有効活用しているが、一度バランスが崩れると、様々な疾病の原因となる事が明らかとなっている。例えば、長期間に渡る刺激や著しい刺激によって引き起こされる慢性的な炎症が、ガンや慢性心不全、メタボリックシンドロームを誘発することが報告されている<sup>12, 24, 25</sup>。

#### 2-1-2 アポトーシス細胞の抗炎症活性

アポトーシス細胞死とは遺伝的にプログラムされた高度な制御機構による能動的な細胞死であり、生物個体の発生・恒常性の維持に必須の意義と役割を持った細胞死形態として知られている。アポトーシス細胞の形態的な特徴として、細胞核の染色体凝集、DNAのヌクレオクソーム単位での断片化、細胞核の断片化、細胞表面微絨毛の消失、細胞質の凝集、細胞膜表面の変性などが挙げられる。凝集した細胞質はアポトーシス小体と呼ばれ、マクロファージを始めとする免疫細胞に貪食され細胞死を完了する。従来、アポトーシス細胞の非炎症的な細胞死はこのようなマクロファージによる貪食作用のみによって説明されてきた。しかし近年、アポトーシス細胞の能動的な炎症反応抑制機構が報告されている。例えば、免疫細胞とアポトーシス細胞を共培養した際に免疫細胞による炎症性サイトカイン産生量の減少と抗炎症性サイトカイン産生量の増加が報告されている<sup>1</sup>。この抗炎症活性はアポトーシス細胞が持つ特有の表面構造によって起因することが明らかとなっている。

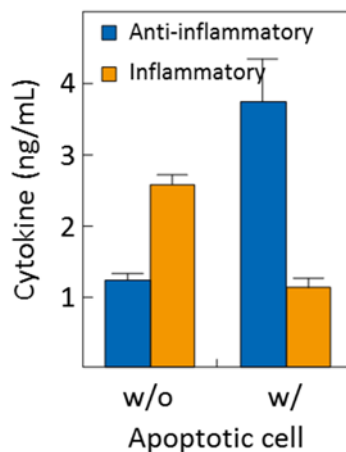


Fig. 2-1 アポトーシス細胞の添加によるサイトカイン産生パターンの変化<sup>1</sup>

### 2-1-3 アポトーシス細胞の特異的な細胞膜構造

細胞膜はリン脂質を主成分とした二重層構造を有している。リン脂質は親水性の頭部と疎水性の炭化水素鎖から構成されている両親媒性の物質であり、哺乳類の細胞膜におけるリン脂質の主要成分として、sphingomyelin(Sph)、phosphatidylcholine(PC, PtdCho)、phosphatidylethanolamine(PE)、phosphatidylserine(PS, PtdSer)、phosphatidylinositol(PI)がよく知られている(Fig. 2-2)<sup>19</sup>。

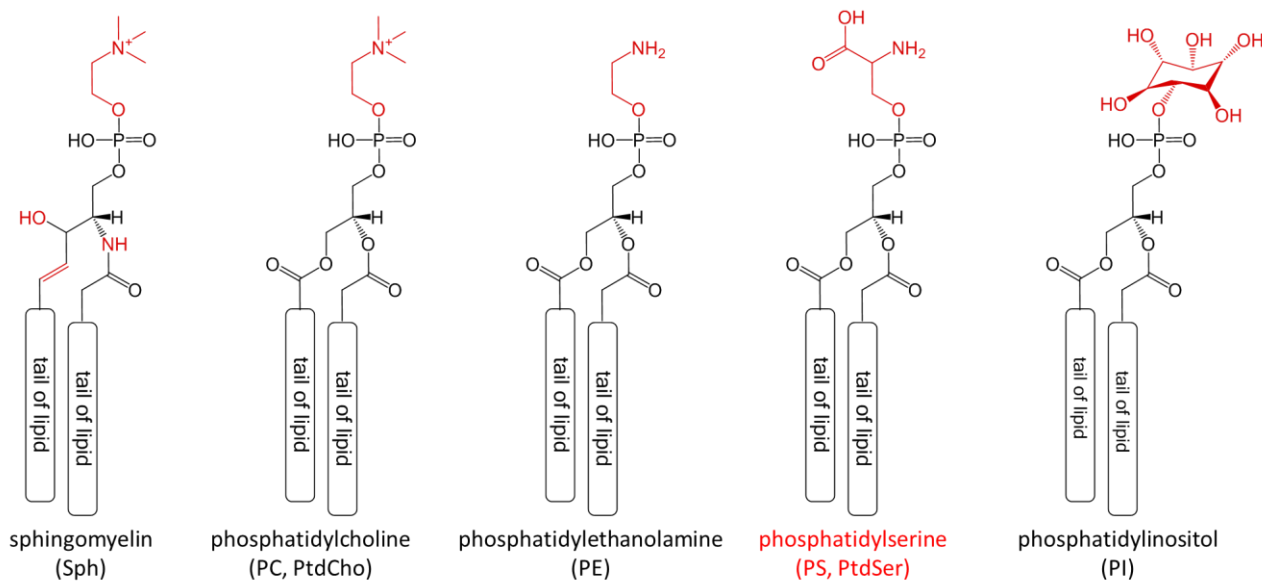


Fig. 2-2 細胞膜を構成する主要なリン脂質



Verkleij らの報告によると、通常の細胞においてこれらのリン脂質は二重膜中に均等に存在しておらず、リン脂質の種類によって細胞膜の内側、外側に偏在するとされており、具体的な存在比も明らかとなっている (Fig. 2-3、Fig. 2-4)<sup>2,3</sup>。

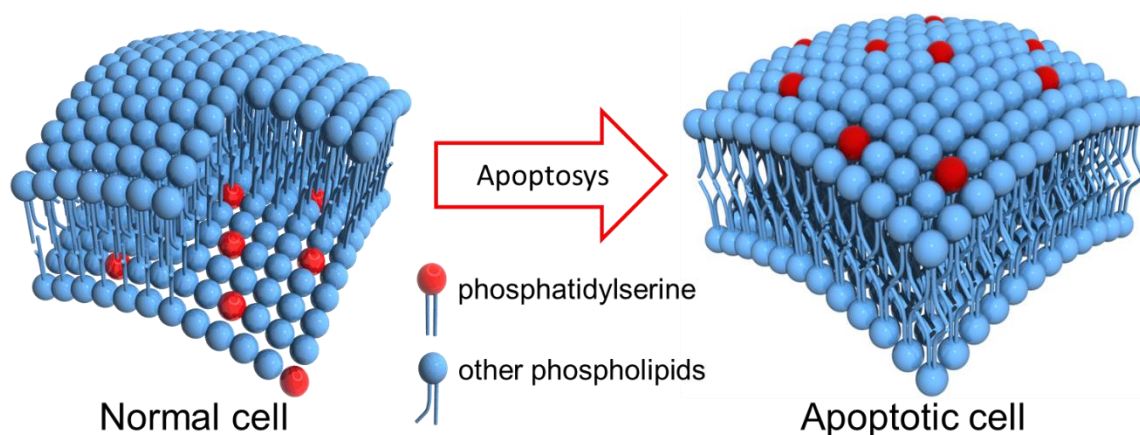


Fig. 2-3 アポトーシスの進行による細胞膜におけるリン脂質対称性の変化

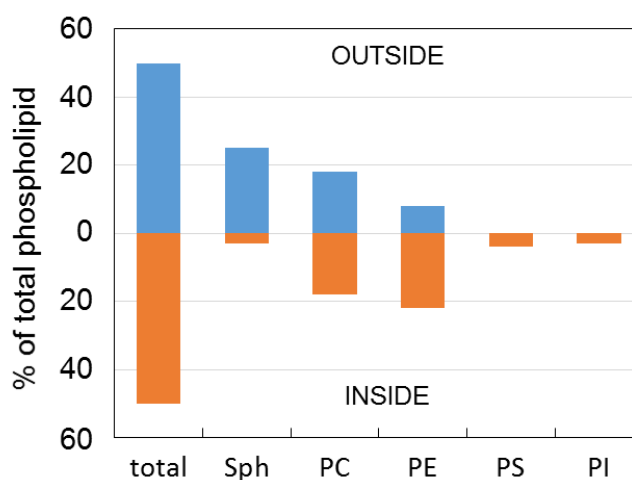


Fig. 2-4 細胞膜中におけるリン脂質分配の割合<sup>21</sup>

細胞膜がこのような非対称性を有する理由として、PtdSer や PI といった負電荷を有するリン脂質を選択的に細胞質側へ能動輸送する膜貫通タンパク質フリッパーゼが知られている<sup>4,5</sup>。また、細胞質に存在するフォドリンタンパクの胞骨格であるスペクトリンへの結合によって、PtdSer、PI の非対称配置が安定化されることも明らかとなってきた (Fig. 2-5)<sup>6,7</sup>。

ところがアポトーシス細胞では、このリン脂質二重膜の非対称性が崩れるということが知られている (Fig. 2-3)。フォドリンの分解や細胞骨格の脆弱化による細胞質側での安定性の減少やフリッパーゼ活性の減少が、非対称性消失の原因であるとされている<sup>8</sup>。更に、スクランブラーゼというリン脂質二重膜を攪拌する役割を持つ膜貫通タンパク質の活性化も報告されている<sup>9</sup>。

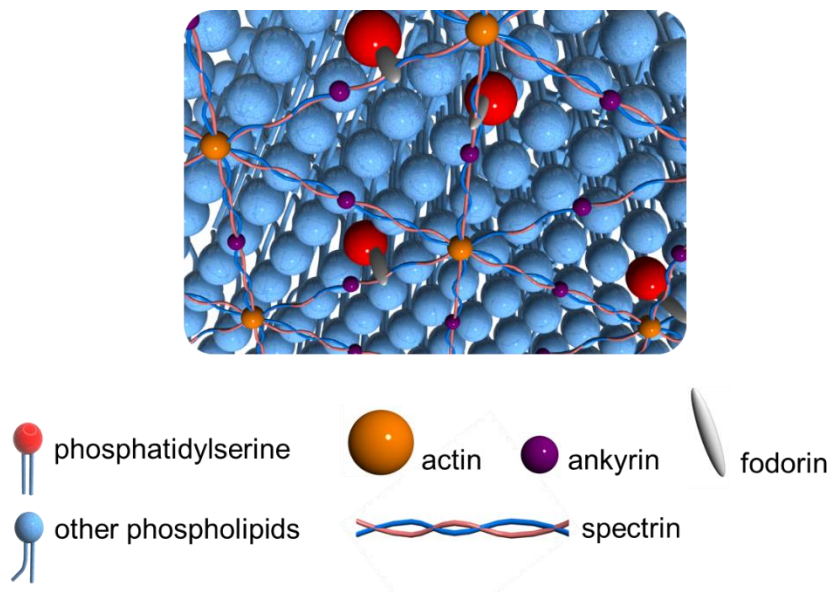


Fig. 2-5 フォドリンによるホスファチジルセリンの細胞骨格への固定<sup>19,24,25</sup>

このような機序によって細胞外部へ露出した PtdSer は eat me シグナルとして働き、トロンボスポンジン・CD36 を筆頭とする様々な分子・機構によって免疫細胞に認識されることが報告されている<sup>10,11</sup>。

#### 2-1-4 ホスファチジルセリンによる抗炎症活性と治療応用

従来、アポトーシス細胞に露出するホスファチジルセリンは、eat me シグナルとして働き、マクロファージに対する貪食作用を亢進する事が唯一の役割であるとされてきた。しかし、近年の分子生物学・免疫学の発展に伴い、様々な生理活性を有することが明らかとなってきた。中でも免疫細胞に対するサイトカイン産生パターンの調節機能による炎症抑制効果が特にユニークであり、この機能によって様々な治療効果が報告されている。たとえば、アポトーシス細胞やホスファチジルセリンリポソームを用いた場合の

- (i) 心不全の予防効果：抗炎症性サイトカイン生産(IL-10、TGF- $\beta$ )による、活性酸素・NO<sub>x</sub>の生産抑制、T細胞の成熟・遊走の抑制、制御性T細胞の増加、Prostaglandin E2(PGE<sub>2</sub>)の生産促進、心筋組織の線維化の抑制、心筋細胞の延伸抑制<sup>12-19</sup>
- (ii) アルツハイマー病の予防効果：TGF- $\beta$ による、ミクログリア活性の抑制、アミロイド $\beta$ 蓄積の抑制、活性酸素種・NO<sub>x</sub>産生の抑制<sup>20,21</sup>
- (iii) 骨粗鬆症の予防効果：TGF- $\beta$ ・PGE<sub>2</sub>による、破骨細胞前駆体の細胞融合による成熟の抑制、樹状細胞の成熟抑制<sup>22,23</sup>

が報告されている。何れの疾病についても *in vivo* における優れた治療効果が報告されており、ホスファチジルセリンによる治療の高い有効性を示している。また、本治療法は分子標的薬ではなく、ホスファチジルセリンをリポソームとして使用するため、治療コストが格段に低いことも利点としてあげられる。

#### 2-1-5 本章における目的

本章ではここまでで、アポトーシス細胞・ホスファチジルセリンが持つ抗炎症活性や治療への応用について述べてきた。本章では、抗炎症治療の現状やアポトーシス細胞の抗炎症活性の知見を元に、アポトーシス細胞を模倣した高分子材料を開発し、抗炎症活性を有するバイオマテリアルという新しい概念とその合成手法、活用形態の提案を行う。本章ではまず、ホスファチジルセリンの抗炎症活性部位であるホスホリルセリ

ン基を有するメタクリル系モノマー、およびポリマーの合成を検討した。

## 2-2 実験

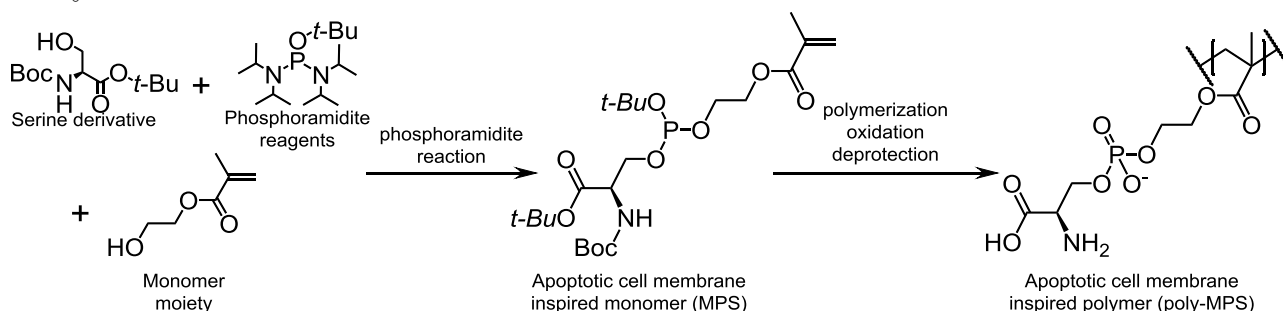
Hydroxyl ethyl methacrylate (HEMA)、Imidazole hydrochloride、2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (V-70)、Sodium chloride (NaCl)、Sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、dichloromethane (super dehydrated)、ethyl acetate, hexane, ethanol、*N,N*-dimethylformamide (DMF)、dimethyl sulfoxide-d<sub>6</sub>、acetonitrile for LC/MS は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。Trifluoroacetic acid、2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC)、dichloromethane-d<sub>2</sub> は東京化成工業株式会社(東京)より購入した。*tert*-butyl tetraisopropylphosphorodiamidite、*tert*-butyl hydroperoxide solution はシグマアルドリッチジャパン(東京)より購入した。*N*- $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-serine *tert*-butyl ester は渡辺化学工業株式会社(広島)より購入した。sodium hydroxide (NaOH) 株式会社 同仁化学研究所(熊本)より購入した。

### 2-2-1 アポトーシス細胞模倣高分子の合成戦略

本章では、ホスファチジルセリンの頭部基である PS 基を側鎖に持つようなメタクリル系モノマーの設計を行った。基本的に、高分子の機能化には二種のアプローチがあり、予め調製した高分子に対して機能性官能基を導入する手法と、機能性官能基を有するモノマーを合成しておき、これを対象のモノマーと共重合するという2つの道筋が存在する。この観点から言うと、本章における PS 基含有モノマーの合成は後者に位置づけることができる。

PS 基含有モノマー(MPS)は DNA の固相合成に用いられるホスホロアミダイト法にて合成した。簡潔に述べると、乾燥 dichloromethane 中で、*N*- $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-serine *tert*-butyl ester、*tert*-butyl tetraisopropylphosphordiamidite、及び 2-hydroxyethyl methacrylate(HEMA)を imidazole hydrochloride 存在下で当量反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィによって精製を行うことで透明粘調体の MPS を得た (Scheme 1)。得られた MPS の化学構造は <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance (NMR)、<sup>13</sup>C NMR、<sup>31</sup>P NMR、Mass Spectrometry(MS)、によってそれぞれ評価を行った。結果として、全ての測定において予測値とほぼ同等の値を得たため、MPS の有意な合成が確認できた。次に、MPS をフリーラジカル重合にて重合することで poly-MPS の合成を試みた。熱安定試験によって MPS は 40 °C 以上の条件では比較的不安定であることが確認できていたため、10 時間半減期温度が 30 °C である V-70 を重合開始剤として用いて Dimethylformamide / Ethanol 溶媒にて重合反応を行い、酸化、脱保護反応を経て poly-MPS を得た。Poly-MPS の重合、酸化、脱保護については <sup>1</sup>H NMR、<sup>31</sup>P NMR、Gel Permeation Chromatography(GPC)によって有意に進行していることを確認した。

本章では、アポトーシス細胞が有する特異的な膜構造を模倣したホスホリルセリン含有高分子を、モノマーの段階から合成することに成功し、重合することでアポトーシス細胞膜模倣高分子を作製することに成功した。

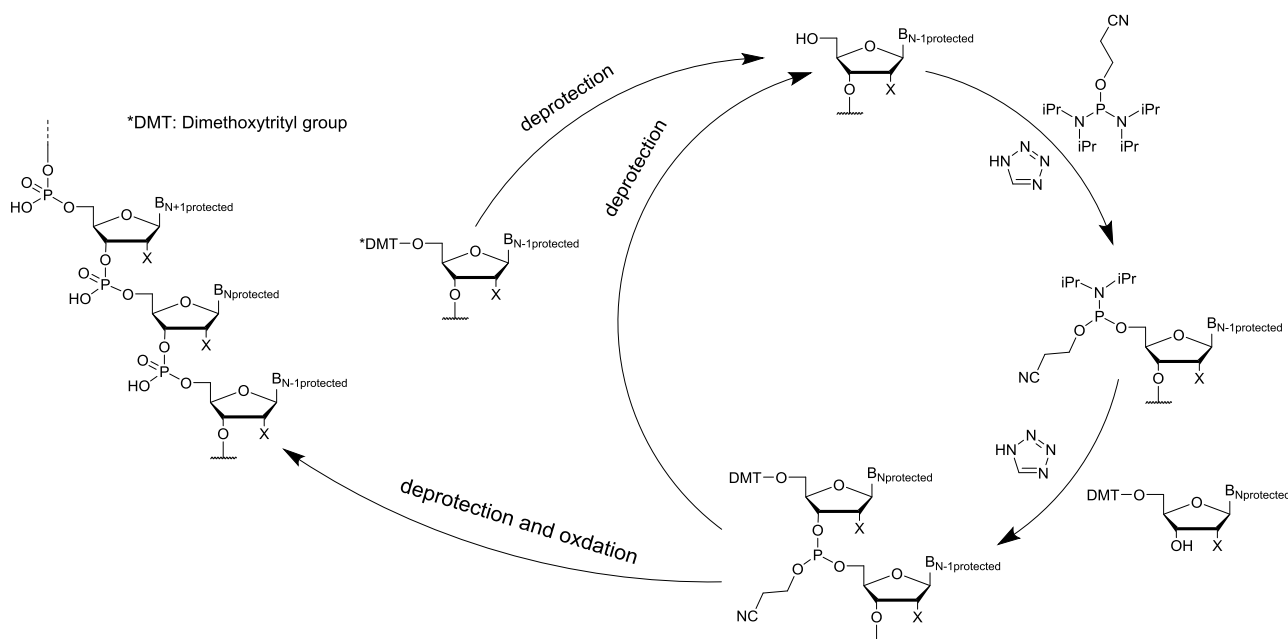


Scheme 2-1 アポトーシス細胞模倣高分子合成のアウトライン

Phosphoramidite method (ホスホロアミダイト法)とはオリゴヌクレオチドの固相合成法として開発され

たキャッピング反応である。ホスホロアミダイト試薬は今日の DNA の固相合成の根幹を担う試薬であり、反応の制御性、汎用性共に非常に優れた反応である。オリゴヌクレオチドにおける本反応は①ホスホロアミダイト試薬によるオリゴヌクレオチド末端の水酸基保護、②ヌクレオチド鎖の伸長、③脱保護、という3つの反応からなっている(Scheme 2-2)。

本反応で特に優れている点は反応制御性であり、中核を担う化合物がホスホロアミダイト試薬である。本試薬は中心のリン原子が脱離能の異なる3つの保護器によって保護されている形を有している。ホスホロアミダイト試薬で最も容易に脱離する保護器としてジイソプロピルアミンが使用されている。ジイソプロピルアミン基はイミダゾール環やテトラゾール環によって容易に脱離し、脱離後のアミダイト試薬のリン原子が水酸基と結合し、亜リン酸エステルを形成することが知られている。

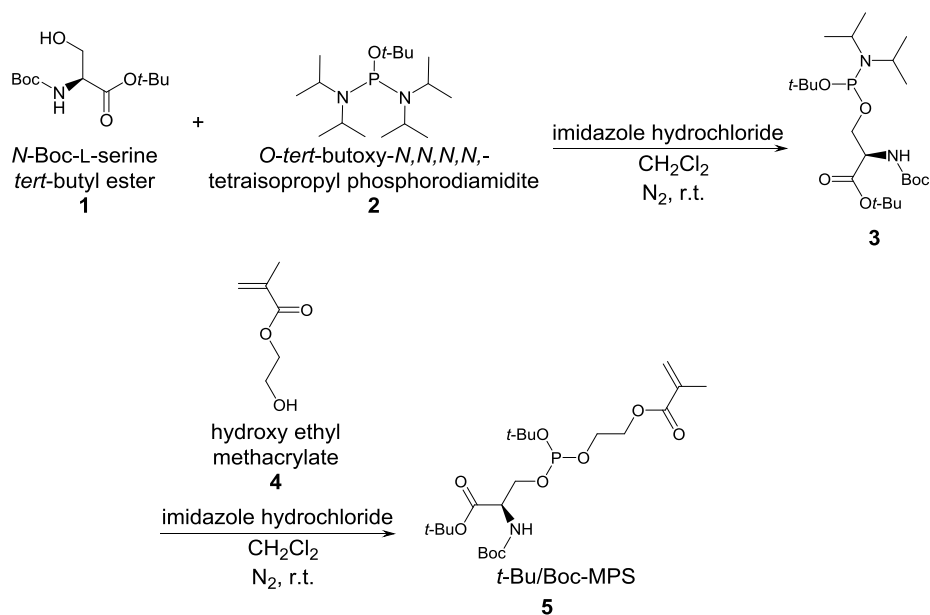


Scheme 2-2 ホスホロアミダイト方による DNA の合成

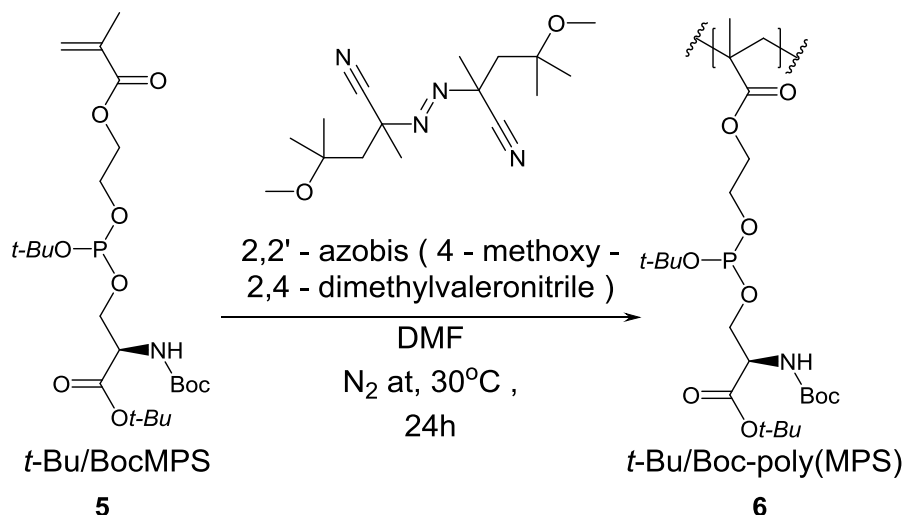
以上より、水酸基を有するモノマーをスターティングマテリアルとすることで、モノマー由来の水酸基とセリン誘導体由来の水酸基の間にリン酸エステルを形成することが可能であると予想した。

### 2-2-2 *t*-Bu/BOC-MPS の合成

窒素雰囲気、氷冷条件下にて *N*-Boc-*L*-serine *tert*-butyl ester **1** 33 mmol と *O*-*tert*-butoxy-*N,N,N,N*-tetraisopropyl phosphorodiamidite **2** 30 mmol を dichloromethane 200 mL に混和し、imidazole hydrochloride を 8.7 mmol 加え、室温で 21 時間攪拌した。反応系に HEMA **4** 30 mmol を加えた後、imidazole hydrochloride 84 mmol を 3 回に分け 45 分毎に添加した。150 分後に 5 wt% NaCl 水溶液で洗浄し、dichloromethane にて抽出し、粗精製油を得た(Scheme 2-3)。得られた粗精製油を薄層クロマトグラフィ、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(移動相: hexane / ethyl acetate = 3 : 1)により精製を行った。

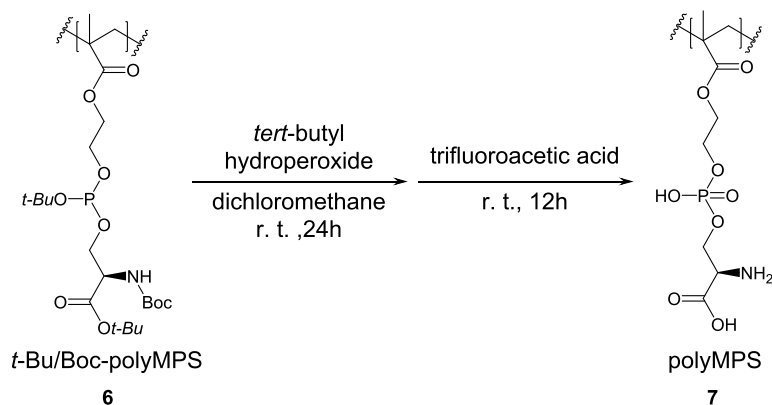
Scheme 2-3 *t*-Bu/Boc-MPS の合成2-2-3 *t*-Bu/BOC-MPS の重合及び脱保護

*t*-Bu/Boc-MPS **5** を 1 M の濃度となるように dimethylformamide に溶解し、氷冷下で攪拌した。2,2'-azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (V-70) を molar ratio = monomer : V-70 = 100 : 1 となるように系に加え、凍結脱気操作を 3 回おこなった。系内を窒素置換し、30°C で 24 時間攪拌することで重合を行った後、スペクトラ/ポア 7, MWCO 1000 を用いて dichloromethane 中、0°C にて透析を行い、乾燥することで白色粉体である *t*-Bu/Boc-poly(MPS) **6** を得た (Scheme 2-4)。

Scheme 2-4 *t*-Bu/Boc-MPS の重合

Scheme 2-3 にて得た白色固体 **6** を dichloromethane 中に混和し 0 °C に冷却した後、*tert*-butyl hydroperoxide を *t*-Bu/Boc-polyMPS の垂リン酸エステルに対して 2 当量添加し、室温で 24 時間攪拌した。反応溶媒をロータリーエバポレータにて除去後、*t*-Bu/Boc-polyMPS が含有する *t*-Bu, BOC 基に対して 3 当量の trifluoro acetic acid (TFA) を加え、室温で 12 時間反応を行った。反応溶媒をロータリーエバポレータにて除去したのち、10 mL の蒸留水を加えスペクトラ/ポア 7, MWCO 1000 に封入後、0°C の冷却条件下で 0.01 M 4NA(EDTA•4Na) 水溶

液にて2回、イオン交換水にて3回透析操作を行った。透析液を回収し、凍結乾燥操作を行うことによって白色固体を回収した(Scheme 2-5)。



Scheme 2-5 *t*-Bu/Boc-polyMPS **6** の酸化脱保護反応

## 2-3 結果

### 2-3-1 *t*-Bu/BOC-MPS の合成

Scheme 2-2 によって得られた粗精製油を hexane / ethyl acetate = 3 : 1 の混合溶液を展開溶媒として用いる薄層クロマトグラフィによって粗精製油に含まれる化合物の評価を行った。Boc-*L*-serine *tert*-butyl ester **1** を B、*O*-*tert*-butoxy-*N,N,N,N*-tetraisopropyl phosphorodiamidite **2** を D、反応中間物 **3** を I、HEMA **4** を H、粗精製油を F と定義した(Fig. 2-6)。R<sub>f</sub> = 0.55 のスポットが目的物であると予想した(Fig. 2-6)。他の低 R<sub>f</sub> 値(R<sub>f</sub> = 0.00 - 0.15)のスポットは副生成物であるジイソプロピルアミン塩酸塩やイミダゾール塩酸塩、HEMA ダイマー **8**(Fig. 2-7)であると予想した。

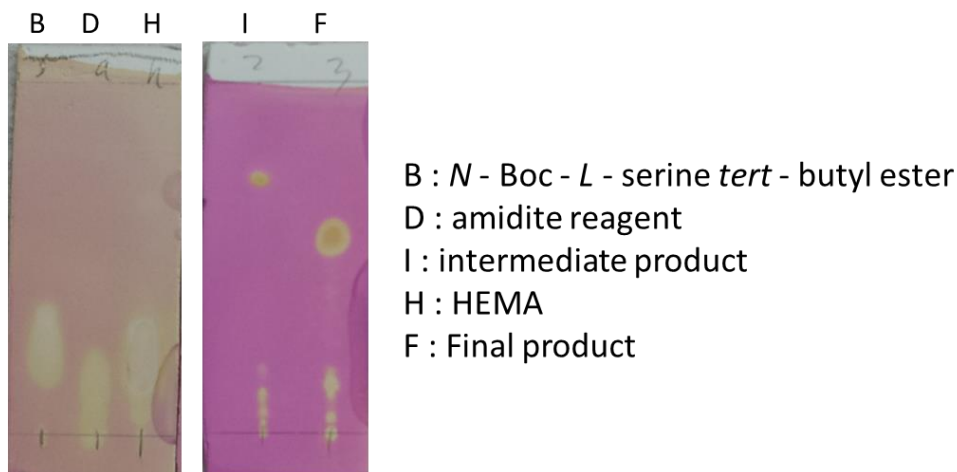


Fig. 2-6 薄層クロマトグラフィによる反応の追跡

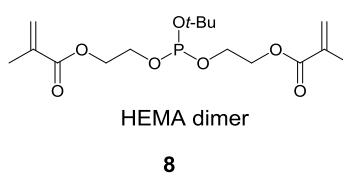


Fig. 2-7 予想される *t*-Bu/Boc-MPS 合成の副生成物

薄層クロマトグラフィの結果を踏まえ、粗精製油の精製を行った。hexane / ethyl acetate = 3 : 1 の混合溶液を展開溶媒としてシリカゲルカラムクロマトグラフィを行い、Rf 値 = 0.55 のフラクションを回収・濃縮し、DMSO-*d*<sub>6</sub> 中で <sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定を行った(Fig. 2-8)。

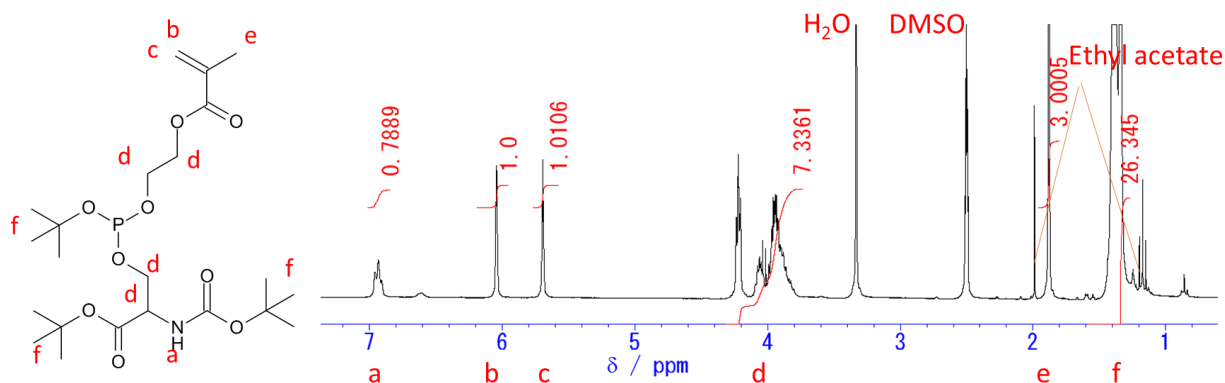


Fig. 2-8 *t*-Bu/Boc-MPS の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

Fig. 2-8 より、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの全てのピーク位置と積分値の同定が可能であった。また、本反応の有意性を評価するため ZAPLOUS LC/MS システム(AMR, 東京)を用いて Mass Spectrum (MS)を測定した(Fig. 2-9)。Fig. 2-9 で3つの目的物のピーク( $m/z = 437.75$ 、 $493.42$ 、 $516.29$ )を得た。以上の結果より、*t*-Bu/Boc-MPS **5** の合成は有意に進行したといえる。

Fig. 2-9 で、目的物のピークだけでなく、副生成物由来と予想されるピーク( $m/z = 532.26$ 、 $568.92$ )も確認した。この副生成物は、本来 *O*-*tert*-butoxy-*N,N,N,N*-tetraisopropyl phosphorodiamidite **2** に対して HEMA **4** と *N*-Boc-*L*-serine *tert*-butyl ester **1** が一つずつ付加する所を、*N*-Boc-*L*-serine *tert*-butyl ester が2つ付加したものであると予想した(Fig. 2-10)。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおける本反応副生成物のスペクトル図は目的物 **5** のピークとほぼ一致するため、副生成物由来のピークを検出することは不可能であった。しかし、HEMA 由来のピーク(b,c位)と *N*-Boc-*L*-serine *tert*-butyl ester **1** 由来のピーク(f位)の積分値を比較することによって、副生成物 **9** の混入率を評価可能である。多量の副生成物 **8** が混入している場合、*N*-Boc-*L*-serine *tert*-butyl ester 由来ピークの積分値の上昇が予想されるが、Fig. 2-8 では *N*-Boc-*L*-serine *tert*-butyl ester **1** 由来ピークの積分値の上昇は確認できなかった。そのため、副生成物の混入量は微量であると予想された。加えて副生成物 **9** は重合基を有していないため、重合反応後の精製操作にて完全に除去することが容易である。よって、本サンプルをモノマーとして活用することに問題は無いと結論付けた。

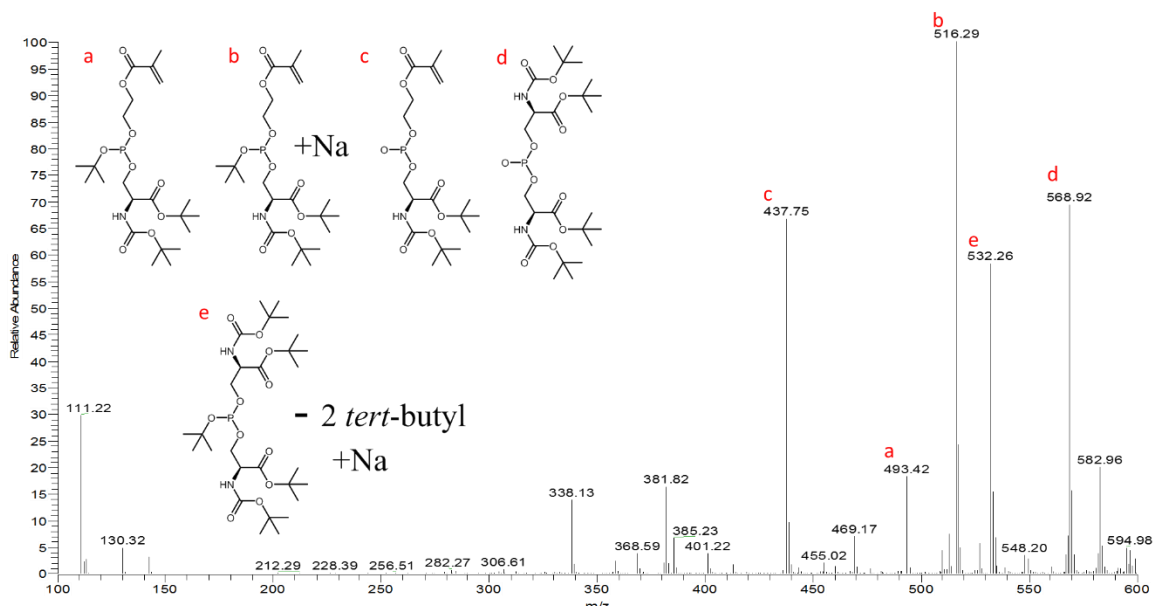


Fig. 2-9 MS 測定による精製の評価

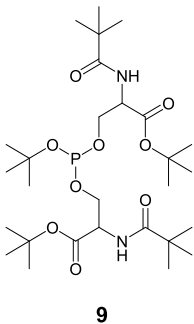


Fig. 2-10 MS により予想される副生成物の化学構造

### 2-2-2 *t*-Bu/BOC-MPS の重合及び脱保護

Scheme 2-3 にて得られた白色固体を DMSO-d<sub>6</sub> 中で <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した(Fig. 2-11)。

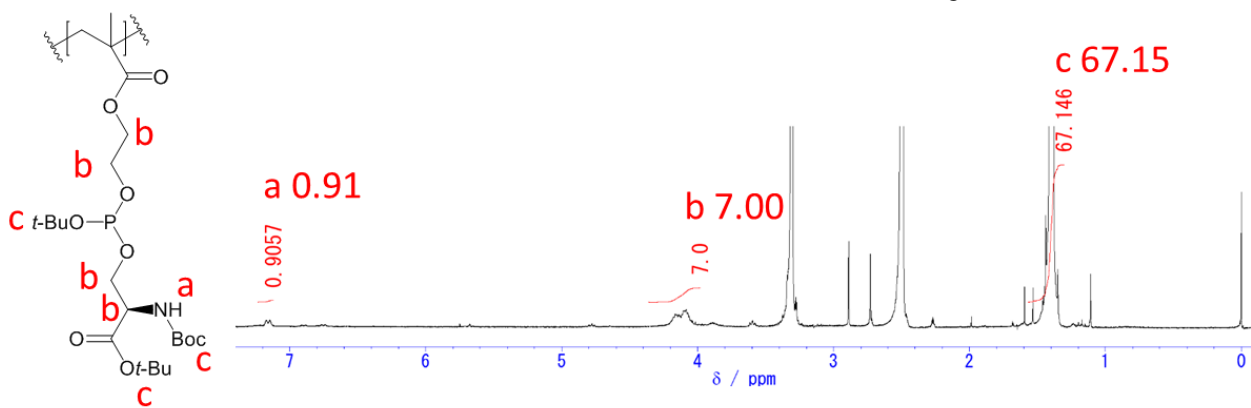
Fig. 2-11 *t*-Bu/BOC-polyMPS 6 の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

Fig.2-11 において、5.5-6.0ppm に存在していたビニル基由来のピークの消失を確認し、重合の有意な進行を確認した。



次に、Scheme 2-4 にて得られた白色固体を重水中で  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定した(Fig. 2-12)。

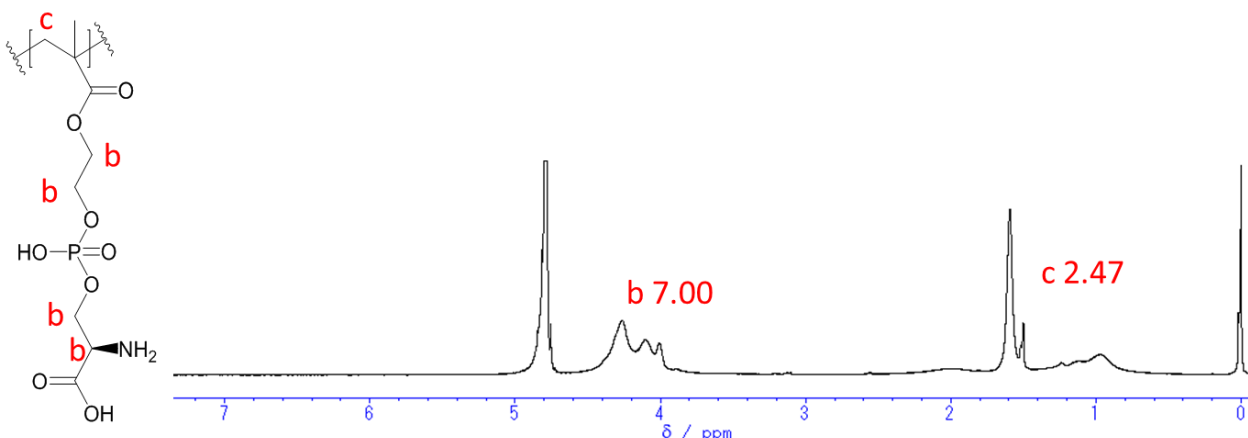


Fig. 2-12 polyMPS 7 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

Fig.2-12において、1.5ppm に存在していた *t*-Bu 基由来のピークの消失を確認し、脱保護の有意な進行を確認した。

## 2-4 結言

本章では、キーマテリアルとなるホスファチジルセリンやアポトーシス細胞の生理活性、及び研究背景について述べ、次いでホスファチジルセリン含有高分子の合成について述べた。

PS 基含有モノマー(MPS)は DNA の固相合成に用いられるホスホロアミダイト法にて合成した。得られた MPS の化学構造は  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance (NMR)、 $^{13}\text{C}$  NMR、Mass Spectrometry(MS)によってそれぞれ評価を行い、全ての測定において予測値とほぼ同等の値を得た。この結果より MPS の有意な合成を確認した。次に、MPS をフリーラジカル重合にて重合することで poly(MPS)の合成を試みた。V-70 を重合開始剤として用いて Dimethylformamide / Ethanol 溶媒にて重合反応を行い、酸化、脱保護反応を経て poly(MPS)を得た。Poly(MPS)の重合、酸化、脱保護反応については  $^1\text{H}$  NMR、Gel Permeation Chromatography(GPC)によって確認し、すべての結果で有意な反応の進行を示唆する結果を得た。つまり本章では、アポトーシス細胞が有する特異的な膜構造を模倣したホスホリルセリン含有高分子を、モノマーの段階から合成することに成功し、重合することでアポトーシス細胞膜模倣高分子を作製することに成功した。

## 参考文献

- 1 Voll, R. E.; Herrmann, M.; Roth, E. A.; Stach, C.; Kalden, J. R.; Girkontaite, I., Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **1997**, *390*, 350-351.
- 2 Verkleij, A. J.; Post, J. A., Membrane Phospholipid Asymmetry and Signal Transduction. *J Membr Biol* **2000**, *178*, 1-10.
- 3 Verkleij, A. J.; Zwaal, R. F. A.; Roelofsen, B.; Comfurius, P.; Kastelijn, D.; van Deenen, L. L. M., The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1973**, *323*, 178-193.
- 4 Segawa, K.; Kurata, S.; Yanagihashi, Y.; Brummelkamp, T. R.; Matsuda, F.; Nagata, S., Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* **2014**, *344*, 1164-1168.
- 5 Tanaka, K.; Fujimura-Kamada, K.; Yamamoto, T., Functions of phospholipid flippases. *The Journal of Biochemistry* **2011**, *149*, 131-143.
- 6 Williamson, P.; Schlegel, R. A., Back and forth. *Molecular Membrane Biology* **1994**, *11*, 199-216.
- 7 Mombers, C.; De Gier, J.; Demel, R. A.; van Deenen, L. L. M., Spectrin-phospholipid interaction: A monolayer study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1980**, *603*, 52-62.
- 8 Vanags, D. M.; Pörn-Ares, M. I.; Coppola, S.; Burgess, D. H.; Orrenius, S., Protease Involvement in Fodrin Cleavage and Phosphatidylserine Exposure in Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 31075-31085.
- 9 Suzuki, J.; Umeda, M.; Sims, P. J.; Nagata, S., Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* **2010**, *468*, 834.
- 10 Xiong, W.; Frasch, S. C.; Thomas, S. M.; Bratton, D. L.; Henson, P. M., Induction of TGF- $\beta$ 1 Synthesis by Macrophages in Response to Apoptotic Cells Requires Activation of the Scavenger Receptor CD36. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e72772.
- 11 Somersan, S.; Bhardwaj, N., Tethering and tickling. *a new role for the phosphatidylserine receptor* **2001**, *155*, 501-504.
- 12 Nian, M.; Lee, P.; Khaper, N.; Liu, P., Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circulation Research* **2004**, *94*, 1543-1553.

- 13 Libby, P.; Ridker, P. M.; Maseri, A., Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* **2002**, *105*, 1135-1143.
- 14 Nakamura, H.; Umemoto, S.; Naik, G.; Moe, G.; Takata, S.; Liu, P.; Matsuzaki, M., Induction of left ventricular remodeling and dysfunction in the recipient heart after donor heart myocardial infarction: new insights into the pathologic role of tumor necrosis factor-alpha from a novel heterotopic transplant-coronary ligation rat model. *Journal of the American College of Cardiology* **2003**, *42*, 173-181.
- 15 Deten, A.; Volz, H. C.; Briest, W.; Zimmer, H.-G., Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovascular Research* **2002**, *55*, 329-340.
- 16 Bayir, H.; Fadeel, B.; Palladino, M. J.; Witasz, E.; Kurnikov, I. V.; Tyurina, Y. Y.; Tyurin, V. A.; Amoscato, A. A.; Jiang, J.; Kochanek, P. M.; DeKosky, S. T.; Greenberger, J. S.; Shvedova, A. A.; Kagan, V. E., Apoptotic interactions of cytochrome c: Redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2006**, *1757*, 648-659.
- 17 Gallucci, S.; Lolkema, M.; Matzinger, P., Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nature Medicine* **1999**, *5*, 1249.
- 18 Jonuleit, H.; Schmitt, E.; Schuler, G.; Knop, J.; Enk, A. H., Induction of Interleukin 10-Producing, Nonproliferating Cd4<sup>+</sup> T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine* **2000**, *192*, 1213-1222.
- 19 Harel-Adar, T.; Mordechai, T. B.; Amsalem, Y.; Feinberg, M. S.; Leor, J.; Cohen, S., Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 1827-1832.
- 20 Hashioka, S.; Han, Y.-H.; Fujii, S.; Kato, T.; Monji, A.; Utsumi, H.; Sawada, M.; Nakanishi, H.; Kanba, S., Phosphatidylserine and phosphatidylcholine-containing liposomes inhibit amyloid  $\beta$  and interferon- $\gamma$ -induced microglial activation. *Free Radical Biology and Medicine* **2007**, *42*, 945-954.
- 21 Nolan, Y.; Martin, D.; Campbell, V. A.; Lynch, M. A., Evidence of a protective effect of phosphatidylserine-containing liposomes on lipopolysaccharide-induced impairment of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Journal of Neuroimmunology* **2004**, *151*, 12-23.
- 22 Wu, Z.; Ma, H. M.; Kukita, T.; Nakanishi, Y.; Nakanishi, H., Phosphatidylserine-Containing Liposomes Inhibit the Differentiation of Osteoclasts and Trabecular Bone Loss. *The Journal of Immunology* **2010**, *184*, 3191-3201.
- 23 Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B., Oxidative stress, inflammation, and cancer: How

are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *49*, 1603-1616.

### 3章 アポトーシス細胞膜模倣高分子の抗炎症活性の評価

#### 3-1 緒言

本章では、第2章にて作製した poly(MPS)の生理活性を評価しする。

Poly(MPS)は抗炎症活性を有することを目的として設計されたが、生体内で使用するという前提であるため毒性の有無を評価する必要がある。毒性試験の手法として、Alamar Blue Assayにてマウス腹腔マクロファージ(RAW264.7)と、ヒト子宮頸がん由来細胞(HeLa)における poly(MPS)の濃度依存的細胞生存率を評価した。その後、poly(MPS)の RAW264.7 に対する濃度・時間依存的抗炎症活性を SEAP Reporter Gene Assay を用いて評価を行った。また、蛍光標識を施した poly(MPS)を作製し、RAW264.7 と共培養を行った場合の取り込み挙動を共焦点顕微鏡にて観察を行った。同時に蛍光プレートリーダーにて RAW264.7 に対する poly(MPS)の分配量を算出し、RAW264.7 に対する poly(MPS)の分配量と抗炎症活性の関連について議論を行った。また、この実験を行う際に、LPS(lipopolysaccharide:炎症性刺激因子)による RAW264.7 のアメーバ様伸展が確認された一方で poly(MPS)の添加によりこのアメーバ様伸展は抑制されていた。

最後に、実際の細胞膜におけるホスファチジルセリンが占める割合が約 10%であるという点に着目し、PS 基含有高分子がより厳密にアポトーシス細胞膜を模倣するよう 90 mol% の MPC(2.Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine; ホスファチジルコリン模倣モノマー)とランダム共重合体である poly(MPS-*st*-MPC)を作製し、ホスホリルセリン濃度を統一した際の抗炎症活性の誘導効率を評価した。

#### 3-2 実験

*tert*-butyl hydroperoxide、Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose D5671, Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose D5796, Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline D8537 はシグマアルドリッチジャパン(東京)より購入した。RAW-blue cells mouse macrophage reporter cell line, LPS-EK (E. coli K12), QUANTI-Blue, normocin, and alamarblue cell viability reagents は InvivoGen(CA, USA)より購入した。Zeocin selection antibiotic was Lifetechnologies (CA, USA)より購入した。Penicillin - streptomycin mixed solution は ナカライテスク(京都)より購入した。Fetal bovine serum triple 0.1  $\mu$ m sterile filtered は ATCC より購入した。2,2'-azobis (4 - methoxy - 2,4 - dimethylvaleronitrile) (V-70)、ethanol、*N,N*-dimethylformamide (DMF) は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。Trifluoroacetic acid、2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC)は東京化成工業株式会社(東京)より購入した。

##### 3-2-1 細胞の調製

細胞の培養に関わる操作は、全てクリーンベンチ内の無菌環境にて行った。

###### (i) 培地調製

Fetal Bovine Serum (FBS)を 56 °C に加温した湯浴で 30 分加温し、Heat inactivated FBS を作製した。Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose D5671、Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose D5796 の二つの培地を 1:1 の割合で混和し、4.5 g/L glucose, 2 mM L-glutamine, DMEM を調製した。これに Heat inactivated FBS を 10 vol%となるように加え、終濃度が 100  $\mu$ g/mL となるように Normocin、50 U/mL - 50  $\mu$ g/mL となるように Penicillin - Streptomycin Mixed Solution を添加し、培地を得た。培地の構成成分及び添加物最終濃度を Table 3-1 にまとめた。

Table 3-1 培地の構成成分及び添加物最終濃度

reagent	concentration
glucose	4.5 g/L
L-glutamine	2mM
heat inactivated FBS	10 vol%
Normocin	100 µg/mL
Penicillin	50 U/mL
Streptomycin	50 µg/mL

## (ii) 細胞の解凍、初代株培養

凍結しているクライオバイアルを実験用手袋の指部分に入れ、37°C に加温済の湯浴にて素早く解凍した。凍結部位が完全に溶けきる前にクライオバイアルを湯浴から出し、素早くクリーンベンチ中に移し、37°C の加温済培地 10 mL に混和した。細胞懸濁液を遠心し(1000 rpm、3 min)、上澄みを除去し、新たに培養培地を 10 mL 加え、再懸濁した。細胞懸濁液を 100 mm Tissue Culture Dish(IWAKI)に 10 mL ずつ分注し、CO<sub>2</sub> インキュベーターに移し、37°C、5 %CO<sub>2</sub> 条件にて 12 時間静置した。当操作によって得られた RAW CELL 細胞を P1 (Passage 1) と定義した。

## (iii) 細胞の継代

ディッシュに播いた細胞が 80%コンフルエントであることを確認した後、細胞の継代を直ちに行った。セルスクレーパー(BD Falcon)を用いてディッシュから RAW CELL を剥がし細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管に移して遠心して(1000 rpm、3 min)上澄みを捨て、細胞懸濁濃度が初期の 1/2 - 1/8 倍となるよう培養培地を加え、再懸濁した。得た細胞懸濁液を 10 mL ずつ 100 mm ディッシュに播種した。1/8 の濃度で播種した場合 80 %コンフルエントに達するまで 2-3 日を要した。継代操作を行う毎に細胞株の Passage を一回毎に追加して記録していった(例：3 回継代細胞株の passage=4)。

## (iv) 細胞のセレクション

セルスクレーパーを用いてディッシュから RAW CELL を剥がし細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管に移して遠心して(1000 rpm、3 min)上澄みを捨て、細胞懸濁濃度が初期の 1/2 - 1/8 倍となるよう培養培地を加え、再懸濁した。細胞懸濁液に Zeocin Selection Antibiotic を終濃度 200 µL/mL となるように添加した。得た細胞懸濁液を 10 mL ずつ 100 mm ディッシュに播種した。本操作は 4 継代毎に継代操作に代わり行われた。

## (v) 細胞の凍結

Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose D5671、Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose D5796、FBS、dimethyl sulfoxide (DMSO)を Table 3-2 の割合にしたがって混和し、細胞凍結溶液とした。

Table 3-2 凍結培地の調製

Solution	ratio
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose D5671	35 vol%
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose D5796	35 vol%
FBS	20 vol%
dimethyl sulfoxide (DMSO)	10 vol%

セルスクレーパーを用いてディッシュから RAW CELL を剥がし、細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管に移し遠心して(1000 rpm、3 min)上澄みを捨て、濃度がスクレーパー時の 8-10 倍となるよう凍結培地を加え再懸濁した。得た凍結用細胞懸濁液を 1 mL ずつ凍結保存用バイアルに移し、アルミホイルにて遮光し、ディープフリーザーにて冷却した。24 時間後にディープフリーザーからローケータープラス凍結保存システム(Thermo SCIENTIFIC)に移し長期冷凍保存した。

### 3-2-2 細胞毒性評価 (Alamar blue assay)

Raw 264.7 と HeLa の細胞懸濁液を濃度が  $2.7 \times 10^5$  cells/mL となるように培養培地をそれぞれ調製した。この溶液を 96 Well/Flat Bottom MICROPLATE (IWAKI) の well 毎に 80  $\mu$ L ずつ加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件にて 24 時間静置した。その後、poly(MPS)、及び poly(MPC) を培地にそれぞれ 500 mM、400 mM、300 mM、200 mM、100 mM、50 mM、10 mM、1 mM、0.1 mM、0 mM の濃度で溶解した溶液を調製し、各 well に 10  $\mu$ L ずつ添加した。24 時間同様条件で培養した後、Alamar blue solution を 10  $\mu$ L 添加し、同条件で 2 時間インキュベートした後に fluorescent plate reader (excitation;  $\lambda = 550$ , emission;  $\lambda = 590$ )にて蛍光強度を測定した。

### 3-2-3 共焦点顕微鏡による像観察

Poly(MPS)を Tetramethylrhodamine (TRITC)修飾した。Poly(MPS)を 1mM となるよう炭酸バッファに溶解し、0.1 当量となるよう TRITC を添加し、遮光・室温にて 3 時間攪拌した後、溶液を遮光条件にて限外濾過を行うことで TRITC-poly(MPS)を作製した。Raw 264.7 を  $5 \times 10^4$  cells/mL の播種濃度でスライドガラス上に 200  $\mu$ L 播種した。24 時間 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件にて培養後、濃度が 50 mM となるように TRITC-poly(MPS)を添加し、24 時間同条件で培養した。その後、培地を除去し PBS で 3 回洗浄したのちにパラホルムアルデヒドにて細胞を固定化した後に Hoechst 染色を行い、顕微鏡用像観察サンプルを作製した。共焦点レーザー顕微鏡(ライカ マイクロシステムズ: TCS SP5)を用いて共焦点像を撮影した。

### 3-2-4 濃度依存的抗炎症活性の評価 (SEAP reporter gene assay)

#### (i) 使用高分子

本アッセイは、RAW BLUE CELL における poly(MPS)の存在、非存在による(LPS)刺激応答を評価する。目的高分子である poly(MPS)の他に、コントロールとしてリン脂質系高分子である poly(MPC)を用いて poly(MPS)の抗炎症活性を評価した(Fig. 3-1)。

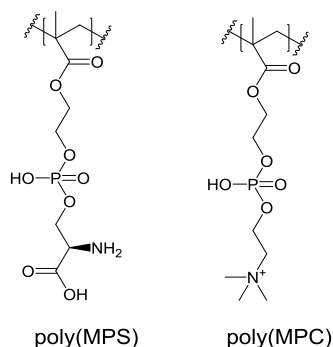


Fig. 3-1 SEAP reporter gene assay に使用した試料の化学構造

## (ii) 試料溶液の調製

Poly(MPS)、poly(MPC)をマイクロチューブに 500 mmol 秤量し、1 mL の培養培地を加え、クリーンベンチ内に移した。各試料を完全に溶解した後、PURADISC 25AS (Whatman, Lot 156019)を先端に取り付けた 1 mL シリンジによって濾過滅菌を行った。回収した 500 mM 溶液を培養培地(Table 3-2)にて希釈し、400 mM、300 mM、200 mM、100 mM、50 mM、10 mM、1 mM、0.1 mM の濃度溶液を得た。試料を全く含まない培養培地を 0 mM 溶液と定義した。

## (iii) LPS 溶液の調製

LPS をマイクロチューブ上で秤量した。秤量結果を元に LPS 濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるよう PBS を加え、LPS が完全に溶解するまで攪拌した。LPS の溶解を目視で確認した後、PURADISC 25AS (Whatman, Lot 156019)と 25 mL シリンジを用いて濾過することで滅菌した。

## (iv) 細胞懸濁液の調製

セルスクレーパーを用いてディッシュから RAW CELL を剥がし細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管にて遠心して(1000 rpm、3 min)上澄みを捨て、10 mL の培養培地を加え再懸濁し、細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を 10  $\mu\text{L}$  ずつ Counting Slides, Dual Chamber for Cell Counter (BIO-RAD, CA, USA)に加え、Automated Cell Counter, TC20 (BIO-RAD, CA, USA)を用いることで細胞懸濁液の濃度を測定した。測定結果を元に、細胞懸濁液濃度が  $2.7 \times 10^5$  Cells/mL となるように培養培地を調製した。SEAP reporter gene assay は 4 回、5 回、6 回継代後の細胞株(P5、P6、P7)を用いて各 1 回測定を行った。

## (v) 試料、細胞の播種

Poly(MPS)、poly(MPC)の 500 mM、400 mM、300 mM、200 mM、100 mM、50 mM、10 mM、1 mM、0.1 mM、0 mM 溶液を 96 Well/Flat Bottom MICROPLATE (IWAKI, code 3860-096)の 1well 毎に 20  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。同手順を空きの well で行い、最終的に各試料・濃度溶液が 2 well ずつ導入されたプレートを 3 枚作製した。試料溶液を加えた well に対して、 $2.7 \times 10^5$  Cells/mL 細胞懸濁液を 180  $\mu\text{L}$  加え、CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件にて 24 時間静置した。



## (vi) LPS の添加

細胞の播種 24 時間後にプレートを CO<sub>2</sub> インキュベーターからクリーンベンチ内に移した。試料溶液を加えた well に対して LPS 溶液 10  $\mu$ L を添加した。LPS 添加のコントロール用の well には、PBS を 10  $\mu$ L ずつ添加した。プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーターに移し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件にて 24 時間静置した。

## (vii) 吸光度測定

QUANTI-Blue を 100 mL の milliQ water に混和し、QUANTI-Blue 測定溶液とした。96well black/clear, Tissue Culture Treated Plate Flat bottom (BD Falcon)の各 well に QUANTI-Blue 測定溶液を 180  $\mu$ L 加えた。LPS 添加 24 時間後のプレートをクリーンベンチ内に移した。培養プレートの各 well の上澄みを回収し、吸光度測定用 96well プレートの QUANTI-Blue 測定溶液を加えた well に 20  $\mu$ L ずつ添加し、37 °C で 30 分インキュベートした。インキュベート後、Microplate spectrophoto Meter (Beckmark Plus, BIO RAD)にて吸収波長  $\lambda = 650$  nm にて各 well の吸光度を測定し、表にまとめた。

**3-2-5 共培養時間依存的抗炎症活性の評価**

Raw 264.7( $5 \times 10^4$  cells/200  $\mu$ L)を 96-well ディッシュに播種し、濃度が 50 mM となるよう poly(MPS)を添加した。それぞれのプレートごとに 0, 1, 3, 6, 12 時間培養し、それぞれ 0.2  $\mu$ g のリポ多糖類(LPS)を添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件にて 24 時間静置した。それぞれのサンプルの上清を 90  $\mu$ L ずつ回収し、10  $\mu$ L の QUANTI-Blue assay solution を添加し、37°C で 1 時間整地した。その後サンプルの吸光度( $\lambda = 620$ )を吸光高度計にて測定し RAW264.7 における NF- $\kappa$ B の発現量を評価した。

**3-2-6 マクロファージに対する poly(MPS)分配量の定量**

Poly(MPS)を Alexa Fluor 488 修飾した。Poly(MPS)を 1mM となるよう炭酸バッファに溶解し、0.1 当量となるよう Alexa Fluor 488-NHS ester を添加し、遮光・4°C にて 24 時間攪拌した後、溶液を遮光条件にて限外濾過を行うことで Alexa 488-poly(MPS)を作製した。90  $\mu$ L の Raw 264.7 溶液( $1.1 \times 10^5$  cells/mL)を 96well ディッシュに播種し、7°C、5%CO<sub>2</sub> 条件にて 24 時間培養した。その後、500 mM、400 mM、300 mM、200 mM、100 mM、50 mM、10 mM、1 mM、0.1 mM、0 mM の濃度となるよう調製した Alexa-poly(MPS)溶液をそれぞれ 10 $\mu$ L ずつ添加した。24 時間同条件で培養した後、上清を除去し、PBS で 3 回洗浄した後に蛍光プレートリーダーにて well ごとの Alexa488 の蛍光強度を測定した。

**3-2-7 MPC との共重合による影響の評価**

MPS と MPC のランダム共重合体を作製した。MPC (4.5 mmol)、*t*-Bu/BOC-MPS(0.50 mmol)、V-70 (50  $\mu$ mol) を 4mL の DMF/ethanol 共溶媒(DMF:ethanol = 2mL: 2mL)に溶解し、窒素バブリングを 30 分行うことで溶存酸素を除去した。30°C で 24 時間重合を行い、得た溶液を透析膜(MWCO = 1000、外液 ethanol)にて透析した。4 回外液を変えた段階で内容物を回収、乾燥した。得られた透明個体を 10 mL の ethanol に再度溶解し、*tert*-butyl hydroperoxide (10 mmol)を添加し、室温で 3 時間攪拌した。反応後、溶液を透析膜(MWCO = 1000、外液 ethanol)にて透析した。4 回外液を変えた段階で内容物を回収、乾燥した。得られた透明個体を 10mL の ethanol に再度溶解し、5mL の trifluoroacetic acid を添加、12 時間室温で攪拌した。その後、反応溶媒をロータリーエ

バポレータにて留去し、0.01 M NaOH 水溶液で2回、脱イオン水で4回透析を行った(MWCO = 1000、4°C)。最終的に透析溶液を回収し、凍結乾燥操作を行うことで poly(MPS-*st*-MPC)を白色固体として得た。Raw 264.7 を  $5 \times 10^4$  cells/200  $\mu$ L の濃度で 96 well ディッシュに播種し加えて、ホスファチジルセリンの濃度が 5 mM となるよう poly(MPS)、poly(MPS)と poly(MPC)の混合溶液、poly(MPS-*st*-MPC)をそれぞれ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件にて 24 時間静置した。炎症性刺激としてリポ多糖類(LPS)を添加し、さらに 24 時間培養した。上清を回収し、QUANTI-Blue 測定溶液とした SEAP reporter gene assay を行うことでそれぞれのサンプルにおける炎症活性を評価した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 poly(MPS)の細胞毒性

まず、作製した poly(MPS)の生体適合性を評価するための一評価として、子宮頸がん由来細胞株(HeLa)及び、マウス腹腔由来マクロファージ株(RAW264.7)において、種々の濃度(0-50mM)における細胞生存性を Alamar blue assay にて 3-3-2 に準拠する形で評価した。結果として HeLa、及び RAW264.7 の両条件において濃度依存的細胞活性の低下が無いということを確認した(Fig. 3-2)。この結果は、poly(MPS)を抗炎症治療のアプリケーションとして応用していく上で必須の条件である生体適合性について一定の条件で保証するものである。

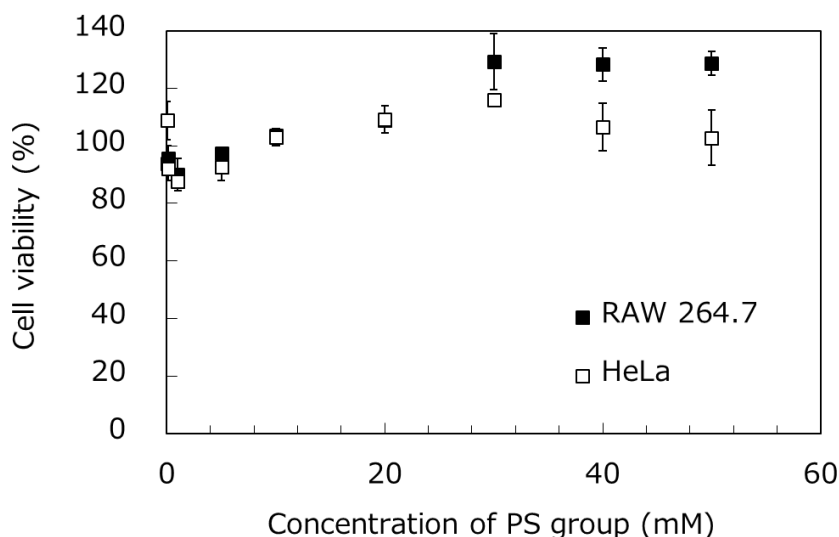


Fig. 3-2 Alamar Blue Assay による poly(MPS)の細胞毒性評価

#### 3-3-2 poly(MPS)のマクロファージへの取込み

3-2-3 にて撮影した共焦点像を Fig. 3-5 にまとめた。アポトーシス細胞やホスファチジルセリンリポソームをマクロファージに添加した場合これらはマクロファージに貪食されることが知られているが、poly(MPS)を添加した場合貪食されるか否かは明らかとなっていない(Fig. 3-3, 3-4)<sup>1,2</sup>。

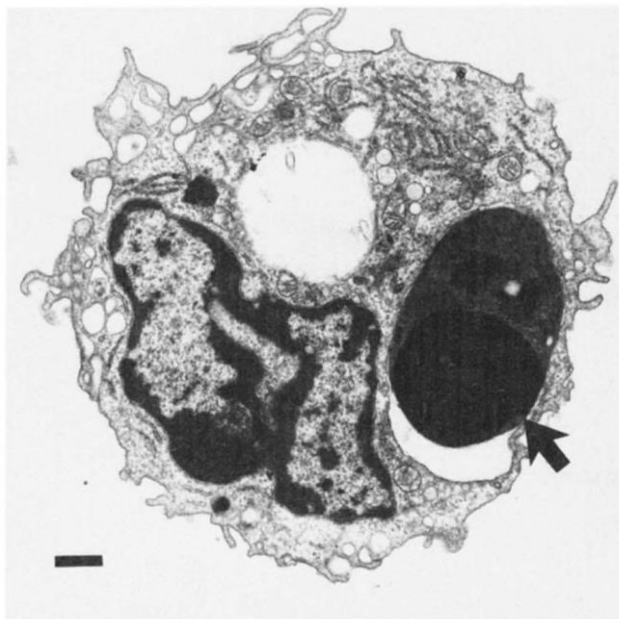


Fig. 3-3 マクロファージに貪食されたアポトーシス胸腺細胞の電子顕微鏡写真<sup>2</sup>

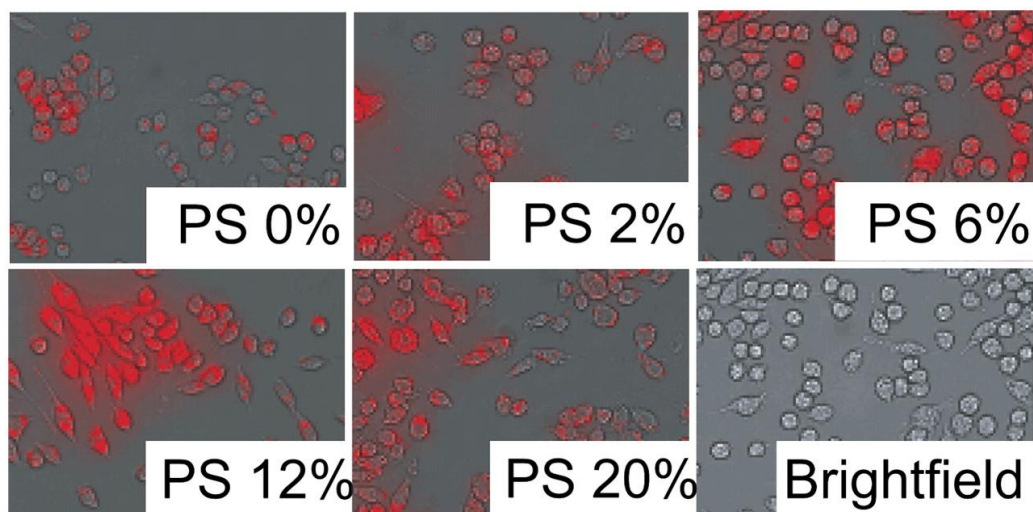


Fig. 3-4 蛍光修飾 PtdSer リポソーム処理 RAW 細胞で処理した蛍光顕微鏡画像<sup>1</sup>

これを踏まえ、マクロファージと poly(MPS)を共培養した場合の poly(MPS)がたどる運命を明らかにするため、poly(MPS)を TRITC 標識し、共焦点顕微鏡で観察することにより poly(MPS)のマクロファージにおける存在領域を評価した。Fig. 3-5 より、poly(MPS)の細胞質内への 3 次元的な広がりを確認した。マクロファージのアポトーシス細胞の認識において、MGF-E8 を介したインテグリンによる認識と、Gas6 を介した MER-TK による認識の二種類の認識経路が知られている(Fig. 3-6)<sup>3,6</sup>。加えて、 $\alpha\beta 5$  インテグリンによる認識は PtdSer 提示物質の貪食を誘発するレセプターであり、MER-TK による PtdSer 認識は抗炎症活性の発現を誘発するとされており、本結果は PtdSer の細胞質への分配、つまり少なくとも  $\alpha\beta 5$  インテグリンを介して poly(MPS)が認識されていることを示唆している。また、これら 2 つの経路は独立しているように思えるが、FAK を介して相互作用をしていることが知られており、完全には独立して居ないため、本結果は poly(MPS)が抗炎症活性を有することを示唆する結果の一例として考えられる。

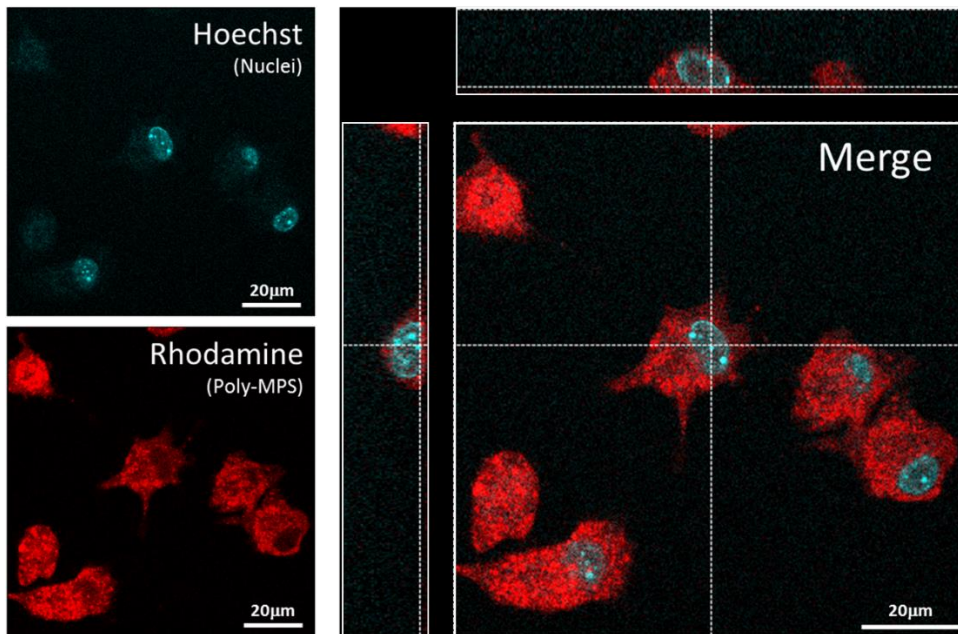


Fig. 3-5 共焦点顕微鏡による poly(MPS)の局在位置の観察

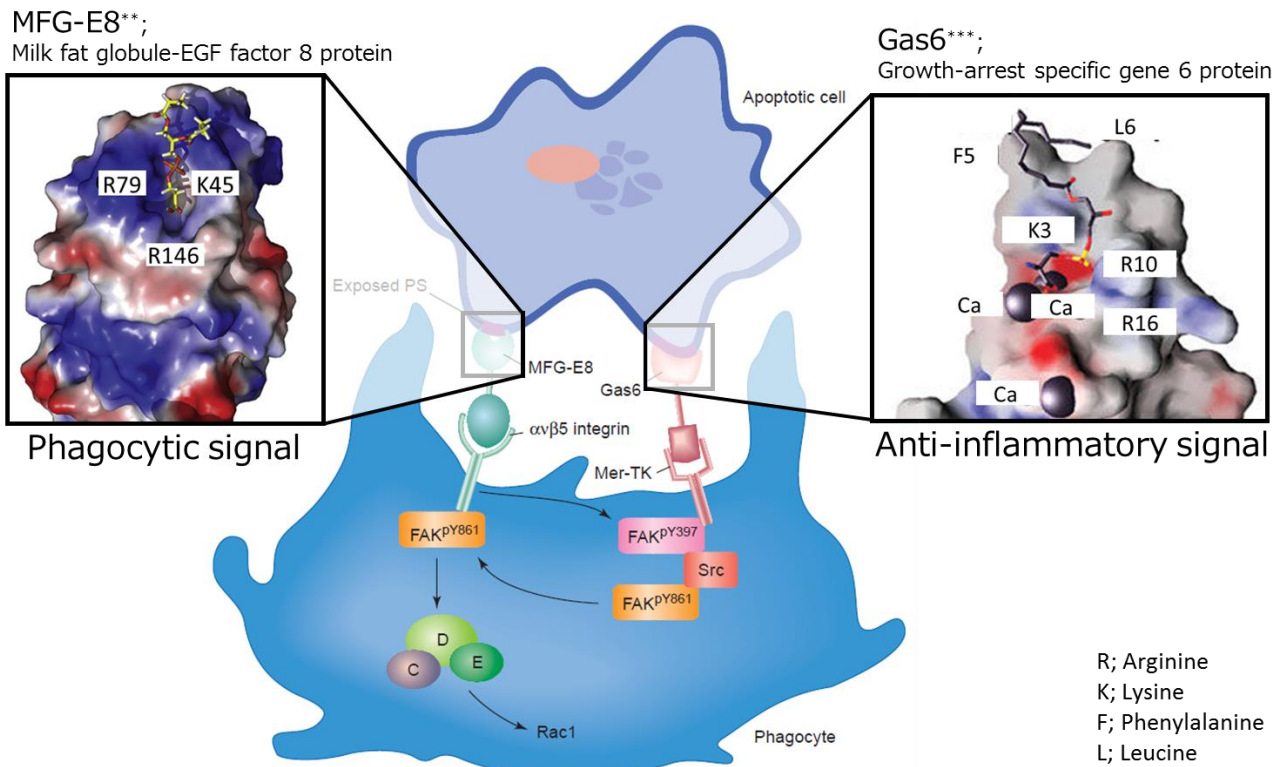


Fig. 3-6 マクロファージに発現している PtdSer レセプター

### 3-3-3 炎症性刺激によるマクロファージの形態変化と poly(MPS)添加による抑制

次に、作製した poly(MPS)の免疫抑制能を評価した。一般に、マクロファージの形態と発現型には一定の相関があることが知られているため、細菌由来 LPS 添加の有無と、poly(MPS)添加の有無の計 4 条件で RAW264.7 における形態の変化を観察した(Fig. 3-7)。Fig. 3-7 より、LPS (+)、poly(MPS) (-)条件にてマクロファージのア

メーバ状の伸展が確認された。一方で、poly(MPS) (+)の群では、LPS 添加によるアメーバ状伸展が抑制されていることが確認できる。これらの写真を元に細胞あたりの仮足数についてのグラフを作製し、RAW264.7 の幾何学的構造と発現型には一定の相関があることが知られており、一般的に抗炎症タイプの発現型の場合、線形に伸展する事が知られている。また Porcheray らによると、多能性造血幹細胞に分化を促す炎症性サイトカインである M-CSF や GM-CSF の添加によって RAW264.7 はアメーバ様に進展することが報告されている<sup>7-10</sup>。本観測による RAW264.7 のアメーバ様伸展もこれに類する事が予想され、poly(MPS)添加による進展抑制から、poly(MPS)の抗炎症活性の発現を示唆する結果であることが予測される。

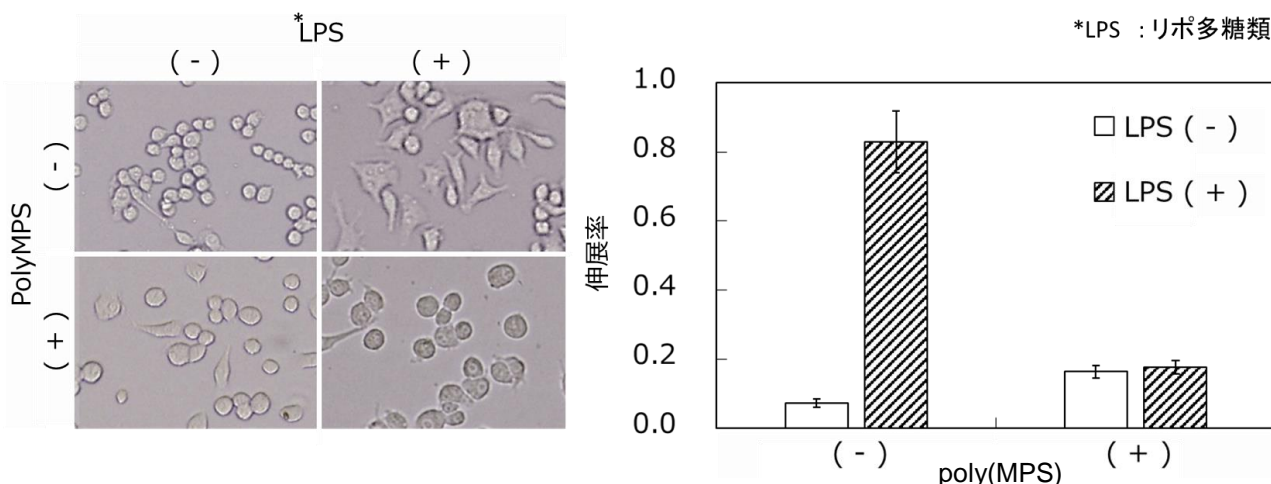


Fig. 3-7 poly(MPS)添加によるマクロファージの形態変化

### 3-3-4 濃度依存的抗炎症活性の評価

次に、poly(MPS)の用量依存的な免疫抑制を RAW264.7 に添加することによって評価を行った。3-2-4 に準拠する形で実験を行い、Fig. 3-8 の結果を得た。結果として、poly(MPS)における用量依存的な NF-κB の発現抑制が確認された。特に 5mM 以上の濃度にて顕著な抑制効果を確認した。一方で比較対象群の poly(MPC)ではこのような NF-κB の発現量に有意差は確認されなかった(Fig. 3-9)<sup>11,12</sup>。NF-κB は全ての細胞に広く発現している炎症性の転写因子であり、この因子の発現はその細胞が炎症を引き起こしていることを意味する。その為、本研究において創出された poly(MPS)が NF-κB の発現を抑制したということは poly(MPS)が抗炎症活性を有するという事を強く支持する結果である(Fig. 3-10)<sup>13,14</sup>。

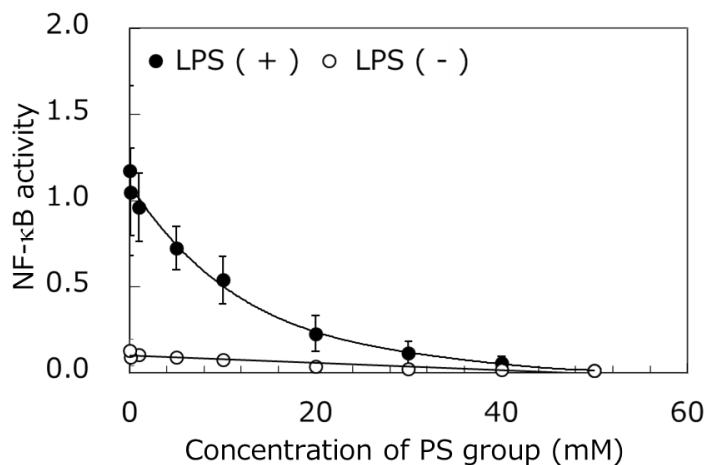


Fig. 3-8 poly(MPS)の濃度依存的抗炎症活性の評価

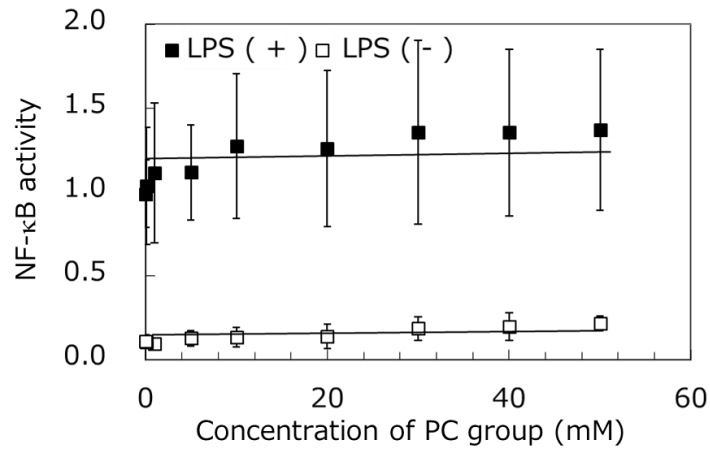


Fig. 3-9 poly(MPC)の濃度依存的抗炎症活性の評価

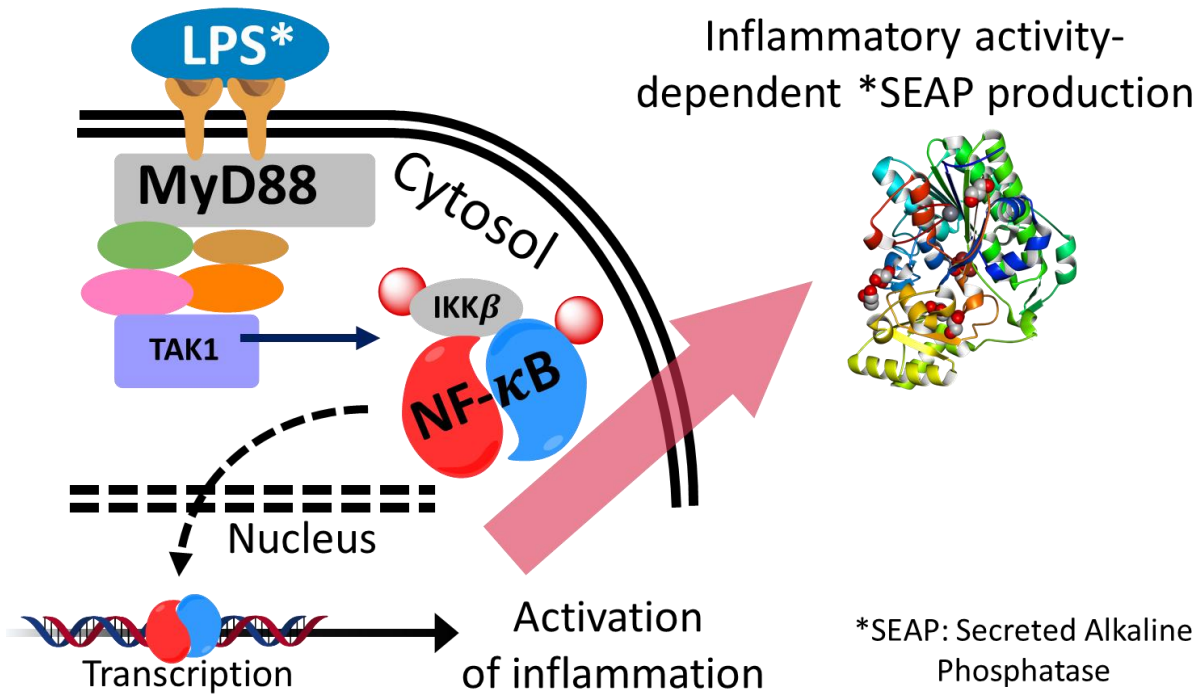


Fig. 3-10 SEAP reporter gene assay の模式図

### 3-3-5 共培養時間依存的抗炎症活性の評価

次に poly(MPS)の共培養の時間依存性を評価した(0,1,3,6,12 時間)。実験操作は 3-2-5 に準拠して行った。Fig. 3-11 より、0 時間、1 時間において NF-κB の発現量に有意差は認められず、抗炎症活性は発現していなかった。しかし一方で、3 時間以降では共培養時間依存的に炎症活性が有意に抑制されていることを確認した。

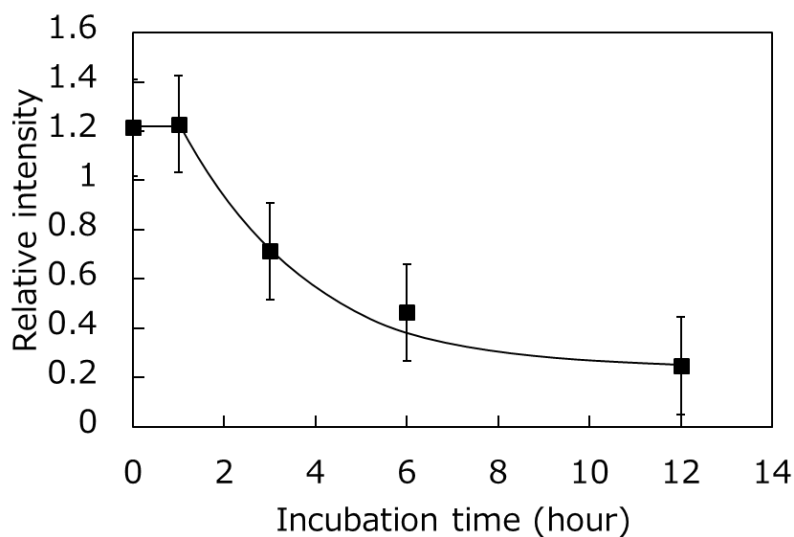


Fig. 3-11 poly(MPS)共培養依存的抗炎症活性の評価

### 3-3-6 poly(MPS)の添加濃度依存的なマクロファージへの取込みの評価

Poly(MPS)の抗炎症活性とマクロファージへの分配量には相関があることが予想されたため、Alexa488 で修飾した poly(MPS)を作製し(Alexa 488-poly(MPS))、RAW264.7 と種々の濃度で共培養し、添加濃度依存的な RAW264.7 細胞内への移行量を蛍光プレートリーダーにて評価を行い、Fig. 3-12 にまとめた。結果として、10 mM 以上の濃度で有意なマクロファージへの poly(MPS)分配が確認された。一方で、40mM 以上ではマクロファージへの分配量は変化しておらず、マクロファージの poly(MPS)取り込み量は添加濃度 40mM にて飽和していた。また、1 細胞あたりの poly(MPS)分配量と抗炎症活性の発現度合いを比較した結果 Fig. 3-13 のようなグラフが作成でき、RAW264.7 が抗炎症活性を有意に示すためには 50 pg/cells 以上の poly(MPS)分配が必要であるということが明らかとなった。

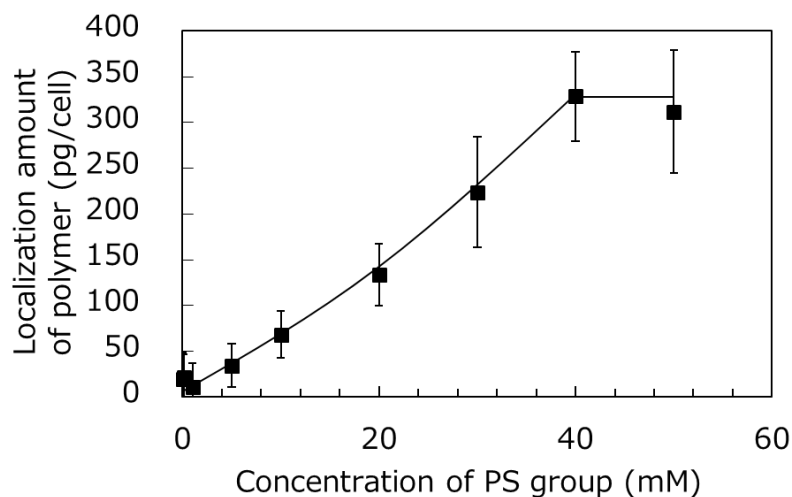


Fig. 3-12 poly(MPS)濃度依存的なマクロファージへの分配

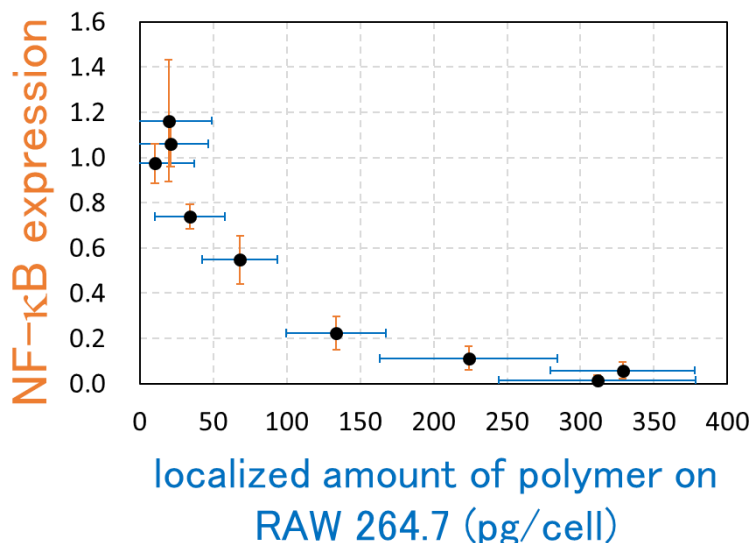


Fig. 3-13 poly(MPS)の1細胞への分配量と抗炎症活性の相関

### 3-3-7 MPC との共重合による抗炎症活性効率の効率化

これまで使用してきた poly(MPS)はホモポリマーであり、純粋な MPS 成分のみを側鎖に有する高分子材料である。しかし、実際のアポトーシス細胞膜はホスファチジルセリンのみによって構成されていることはなく、その9割近くは電氣的に中性なリン脂質に占められており、ホスファチジルセリンはこれらの電氣的に中性な細胞膜の中に浮かんでいるように存在している。そこで我々はよりアポトーシス細胞膜に近い構造を有するリン脂質様高分子として MPS と MPC のランダム共重合体(poly(MPS-*st*-MPC))を設計し、LPS 添加時の NF-κB 発現量を定量し、poly(MPS)単体、poly(MPS)と poly(MPC)の 9:1 の混合した場合とそれぞれ比較した。それぞれの添加量はホスホリルセリン基単位で 5mM となるように統一した(Fig. 3-13)。結果として、poly(MPS)のみ添加した群(青)と poly(MPS)と poly(MPC)を 1:9 で添加した群(赤)では NF-κB 発現量に統計的有意差が出なかったのに対し、poly(MPS-*st*-MPC)添加群(緑)は他のポリマー添加群と比して有意な NF-κB 発現の低下が観察された。マクロファージの PtdSer は種々のタンパク質によるオプソニン化の後にレセプターに結合することで認識されることが知られおり、アポトーシス細胞、及びホスファチジルセリンリポソームの認識については PtdSer 頭部が有するアニオンチャージを認識している機序と、頭部の3次元的構造を認識していることが知られている。poly(MPS-*st*-MPC)がホモポリマーと比して優れた抗炎症活性を示した理由として、ランダム共重合体とすることで、ポリマーの表面電荷が、実際のアポトーシス細胞に近づいた事により、オプソニン化効率が向上したことが考えられる。



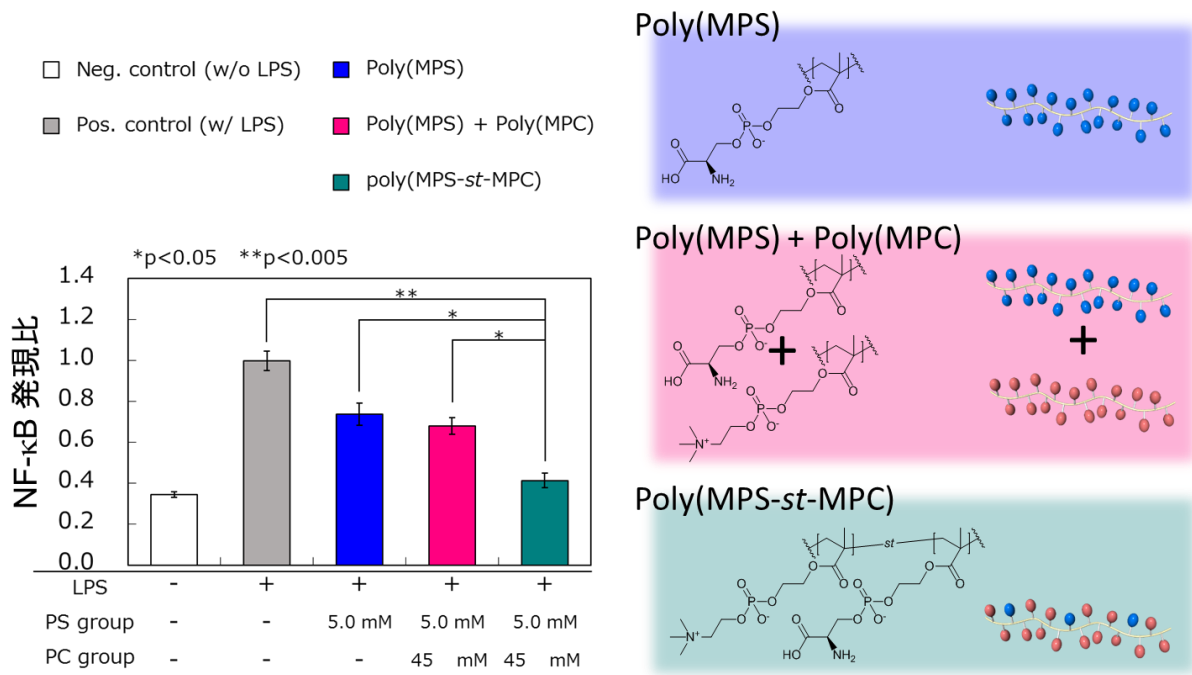


Fig. 3-13 poly(MPS)の重合形態が抗炎症活性に与える影響

### 3-4 結言

本章では、第2章で作製した poly(MPS)の生理活性を評価した。まず、poly(MPS)の細胞毒性を評価し、RAW 264.7 と HeLa に対しては 0-50 mM 全ての濃度領域において高い細胞生存率を示し poly(MPS)の優れた生体適合性が明らかとなった。次に、poly(MPS)の用量依存的な炎症抑制効果を評価した。炎症性刺激として Lipopolysaccharide(LPS)を添加した場合の RAW 264.7 における NF-κB の発現量を SEAP reporter gene assay にて定量することで評価を行い、用量依存的な抗炎症活性が明らかとなった。これらの結果はマクロファージの生理活性を損なうことなく炎症性の核内転写因子である NF-κB の発現を抑制したことを意味している。

また、LPS を添加した場合の RAW 264.7 はアメーバ様伸展を示す事が確認できたが、ここに poly(MPS)を添加した際にはこのアメーバ様伸展が抑制されることを著者は見出した。マクロファージのアメーバ様伸展は炎症刺激に伴う事が報告されており、特にマクロファージコロニー刺激因子の添加によって顕著に引き起こされる事が知られている。つまり、このマクロファージの幾何学的形状変化も poly(MPS)の抗炎症活性の発露を支持している。また、共焦点顕微鏡や蛍光プレートリーダーを用いて蛍光標識 poly(MPS)の RAW 264.7 における局在位置や 1 細胞に対する分配量を明らかとした。マクロファージはホスファチジルセリンレセプターをその表面に有するため、poly(MPS)をマクロファージへと播種した場合、poly(MPS)はマクロファージ表面に固着するか、それを介して貪食されることが予想された。結果としては、蛍光標識した poly(MPS)はマクロファージの細胞質中に分配することが共焦点顕微鏡象より明らかとなった。また、1 細胞に対する分配量も系中に添加する高分子の量に依存して上昇する傾向が確認できた。一方で、添加する poly(MPS)が 40 mM に達した際に飽和を迎えることが明らかとなった。また、この結果から 1 細胞への poly(MPS)の分配量と抗炎症活性の発現には一定の相関が存在し、明確な閾値(50 pg/cell)が存在することが明らかとなった。この閾値はそれ単体では意味を持たないが、今後 poly(MPS)の抗炎症活性の効率化を志向する場合に一定の基準値として重要な値となる。また、poly(MPS)の共培養時間に依存した抗炎症活についても評価し、poly(MPS)の抗炎症性の発現には少なくとも 1 時間の共培養が必要であるということが明らかとなった。これらの結果から、著者は poly(MPS)(アポトーシス細胞模倣高分子)がマクロファージに認識された場合、高分子自体がマクロファージに取り込まれると同時に、マクロファージの炎症刺激への応答性を抑制するというを確認した。この免疫抑制挙動は実際のアポトーシス細胞の挙動と類似しており、炎症性刺激を加える前に予め抗炎症刺

激を加えなければならない点なども類似点として挙げられる。

最後に、実際の細胞膜におけるホスファチジルセリンが占める割合が約 10%であるという点に着目し、PS 基含有高分子がより厳密にアポトーシス細胞模倣を模倣するよう 90 mol% の MPC (2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine; ホスファチジルコリン模倣モノマー) とランダム共重合体である poly(MPS-*st*-MPC) を作製し、ホスホリルセリン濃度を統一した際の抗炎症活性の誘導効率を評価した。Poly(MPS)、poly(MPS) と poly(MPC) の混合条件 (混合比 1:9)、poly(MPS-*st*-MPC) (重合比 1:9) の 3 条件でそれぞれホスホリルセリン基の濃度が 5mM となるよう先述の RAW 264.7 の炎症モデルに播種した結果、MPS と MPC のランダム共重合体 (poly(MPS-*st*-MPC)) のみが有意に NF- $\kappa$ B を抑制するという結果を得た。この結果は、抗炎症作用という観点では、よりアポトーシス細胞に近い構造を有する高分子材料がより優れた結果を示すということを示しており、アポトーシス細胞模倣高分子の分子設計の重要度を示した。

## 参考文献

- 1 Maiseyeu, A.; Mihai, G.; Kampfrath, T.; Simonetti, O. P.; Sen, C. K.; Roy, S.; Rajagopalan, S.; Parthasarathy, S., Gadolinium-containing phosphatidylserine liposomes for molecular imaging of atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* **2009**, *50*, 2157-2163.
- 2 Fadok, V. A.; Voelker, D. R.; Campbell, P. A.; Cohen, J. J.; Bratton, D. L.; Henson, P. M., Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology* **1992**, *148*, 2207-2216.
- 3 Platt, N.; da Silva, R. P.; Gordon, S., Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends in Cell Biology* **1998**, *8*, 365-372.
- 4 Ye, H.; Li, B.; Subramanian, V.; Choi, B.-H.; Liang, Y.; Harikishore, A.; Chakraborty, G.; Baek, K.; Yoon, H. S., NMR solution structure of C2 domain of MFG-E8 and insights into its molecular recognition with phosphatidylserine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828*, 1083-1093.
- 5 Huang, M.; Rigby, A. C.; Morelli, X.; Grant, M. A.; Huang, G.; Furie, B.; Seaton, B.; Furie, B. C., Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nat Struct Mol Biol* **2003**, *10*, 751-756.
- 6 Graham, D. K.; DeRyckere, D.; Davies, K. D.; Earp, H. S., The TAM family: phosphatidylserine-sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nature Reviews Cancer* **2014**, *14*, 769.
- 7 Porcheray, F.; Viaud, S.; Rimaniol, A. C.; Léone, C.; Samah, B.; Dereuddre-Bosquet, N.; Dormont, D.; Gras, G., Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clinical and Experimental Immunology* **2005**, *142*, 481-489.
- 8 Ushach, I.; Zlotnik, A., Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology* **2016**, *100*, 481-489.
- 9 Thorens, B.; Mermoud, J.-J.; Vassalli, P., Phagocytosis and inflammatory stimuli induce GM-CSF mRNA in macrophages through posttranscriptional regulation. *Cell* **48**, 671-679.
- 10 Cates, E. C.; Fattouh, R.; Wattie, J.; Inman, M. D.; Goncharova, S.; Coyle, A. J.; Gutierrez-Ramos, J.-C.; Jordana, M., Intranasal Exposure of Mice to House Dust Mite Elicits Allergic Airway Inflammation via a GM-CSF-Mediated Mechanism. *The Journal of Immunology* **2004**, *173*, 6384-6392.
- 11 Ishihara, K.; Oshida, H.; Endo, Y.; Watanabe, A.; Ueda, T.; Nakabayashi, N., Effects of phospholipid adsorption

- on nonthrombogenicity of polymer with phospholipid polar group. *Journal of Biomedical Materials Research* **1993**, *27*, 1309-1314.
- 12 Jawanda, M.; Lai, B. F. L.; Kizhakkedathu, J. N.; Ishihara, K.; Narain, R., Linear and hyperbranched phosphorylcholine based homopolymers for blood biocompatibility. *Polymer Chemistry* **2013**, *4*, 3140-3146.
- 13 Lin, T. h.; Pajarinen, J.; Lu, L.; Nabeshima, A.; Cordova, L. A.; Yao, Z.; Goodman, S. B., NF- $\kappa$ B as a Therapeutic Target in Inflammatory-Associated Bone Diseases. *Advances in protein chemistry and structural biology* **2017**, *107*, 117-154.
- 14 Gilmore, T. D., Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **2006**, *25*, 6680.

## 4章 高分子反応による汎用高分子への抗炎症活性部位の導入

### 4-1 緒言

2章では、メタクリル系モノマーである HEMA に対して PS 基を導入することで MPS モノマーを合成し、ラジカル重合にて高分子量体である poly(MPS)を合成した。続く3章では作製した poly(MPS)が抗炎症活性を有することを明らかとした。加えて、ホスファチジルコリン模倣モノマーである MPC とのランダム共重合体は MPS 単体のホモポリマーと比してより効率的に抗炎症活性を誘導した。これら結果は MPS を活用する上でラジカル重合可能なコモノマーと併用する上では大きな利点であるが、メタクリル系モノマーであるが故に、非ビニル系の高分子材料への応用は困難であった。

今日バイオマテリアルとして広く活用されている非ビニル系の高分子として poly ethylene glycol(PEG)や poloxamer、poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL)等のポリエーテル、ポリエステル系の高分子がよく知られている<sup>1-34</sup>。これらの高分子は優れた生体適合性や生分解性など、生体内で活用する際に優れた特性を有するため現在では様々な医療デバイスの基盤材料として使用されている。このような優れた機能性高分子に対する抗炎症活性部位の簡便な導入法を確立できれば、これまで以上に優れた医療デバイスの作製が可能となる。先述の通り高分子にアポトーシス細胞由来の抗炎症活性部位(PS 基)を導入する手法として PS モノマーを合成し、これを重合する方法と、すでに調製された高分子に対して高分子反応を用いることによって PS 基を付加するという方法が適応可能である。

以上を踏まえ著者は、MPS の合成に利用したホスホロアミダイト法を調整済みの高分子材料に応用する手法を開発した。PS 基を付加するための高分子材料として、poly( $\epsilon$ -caprolactone)、poloxamer、poly(BMA-*st*-HEMA)、poly (NIPAAm-*st*-HEAAm)を選択した(BMA; Butyl methacrylate, NIPAAm; *N*-isopropyl acrylamide, HEAAm; 2-hydroxyethyl acrylamide)。poly( $\epsilon$ -caprolactone)は開環重合、poly(BMA-*st*-HEMA)と poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)はフリーラジカル重合にて作製した。これらの4種の高分子はいずれもそれぞれ側鎖、もしくは末端に水酸基を有しており、この水酸基に対して PS 基を導入した(Fig. 4-1)。

また、本検討にて得られた PS 修飾 poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) (poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS)の RAW 264.7 における用量依存的な細胞毒性を Alamar Blue Assay にて、抗炎症活性を SEAP reporter gene assay にて測定した。

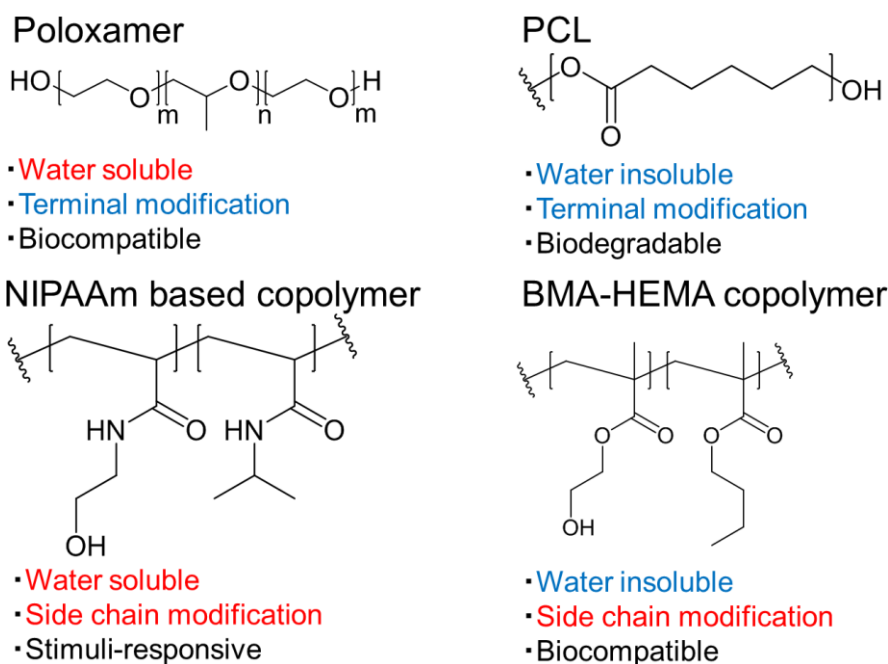


Fig. 4-1 高分子反応により PS 基を導入する高分子

## 4-2 実験

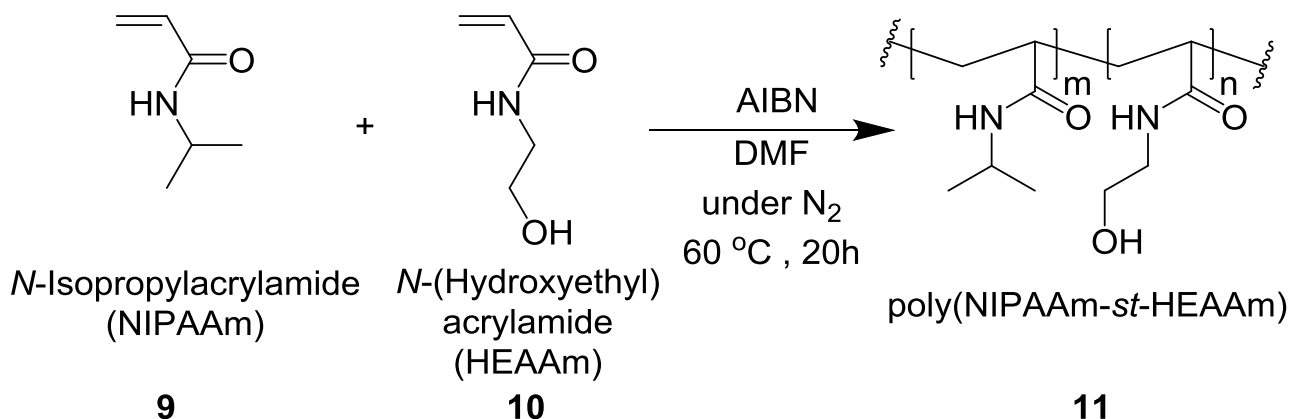
Butyl methacrylate (BMA), hydroxyl ethyl methacrylate (HEMA), *N*-isopropyl acrylamide (NIPAAm), poly(ethyleneimine) (PEI) ( $M_w = 10.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ), 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN), triethylamine (TEA), diisopropylamine, sodium chloride (NaCl), sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sodium hydroxide (NaOH), alumina activated, lithium bromide, dichloromethane (super dehydrated), ethyl acetate, hexane, ethanol, *N,N*-dimethylformamide (DMF), acetonitrile, 2-propanol, dimethyl sulfoxide- $d_6$ , and chloroform- $d$  は和光純薬株式会社(大阪)より購入した。 *N*-(2-hydroxyethyl) acrylamide (HEAAm),  $\epsilon$ -caprolactone, pentaerythritol, Tin (II) 2-ethylhexanoate, and trifluoroacetic acid 東京化成工業株式会社(東京)より購入した。 Pluronic® F127, *tert*-butyl tetraisopropylphosphordiamidite, *tert*-butyl hydroperoxide, Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose D5671, Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose D5796, Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline D8537 はシグマアルドリッチジャパン(東京)より購入した。 *N*- $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-serine *tert*-butyl ester は渡辺化学工業株式会社(広島)より購入した。 RAW-blue cells mouse macrophage reporter cell line, LPS-EK (E. coli K12), QUANTI-Blue, normocin, and alamarblue cell viability reagents は InvivoGen (CA, USA)より購入した。 The Zeocin selection antibiotic was Lifetechnologies (CA, USA)より購入した。 Penicillin - streptomycin mixed solution は ナカライテスク(京都)より購入した。 Fetal bovine serum triple 0.1  $\mu\text{m}$  sterile filtered は ATCC より購入した。

### 4-2-1 水酸基含有高分子の作製

#### (i) poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)の合成

*N*-isopropylacrylamide **9** 80 mmol と HEAAm **10** 20 mmol、AIBN 1 mmol を 100 mL の DMF に溶解し、0 °C にて 30 分窒素バブリングすることにより溶存酸素を除去したのち、60 °C にて 20 時間攪拌することで重合反応を進行した。その後、反応溶液に THF を追加し、30 倍量の diethyl ether に滴下し、析出物を回収・乾燥することで poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **11** を得た(Scheme 4-1)。

$^1\text{H NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ - $d$ , 300 MHz):  $\delta = 1.00$ - $1.30$  ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , broad, 6mH),  $\delta = 2.50$  ( $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CONH-})-\text{CH}_2$ -in the chain, s,  $1_{(m+n)}$ H),  $\delta = 3.60$ - $3.80$  ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ , broad, 2nH),  $\delta = 3.90$ - $4.10$  ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , broad, 1mH). GPC:  $M_n = 17,900 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $M_w/M_n = 2.16$

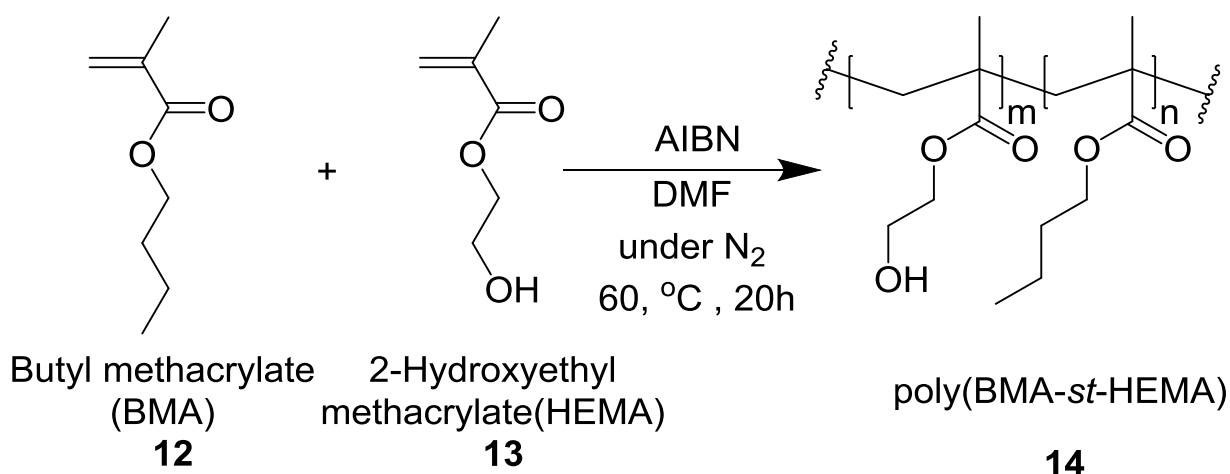


Scheme 4-1 poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)の合成

(ii) poly(BMA-*st*-HEMA)の合成

BMA **12** 80 mmol、HEMA **13** 20 mmol、AIBN 1mmol を 100 mL の DMF に溶解し、0 °C にて 30 分窒素バブリングすることにより溶存酸素を除去したのち、60 °C にて 20 時間攪拌することで重合反応を進行した。その後、反応溶液を透析膜(スペクトラ ポア 7/ MWCO; 1000)に移し、外液をアセトンとした透析を行い 12 時間毎に外液交換操作を 6 回行った段階で内容溶液を真空乾燥することで poly(BMA-*st*-HEMA) **14** を得た (Scheme 4-2)。

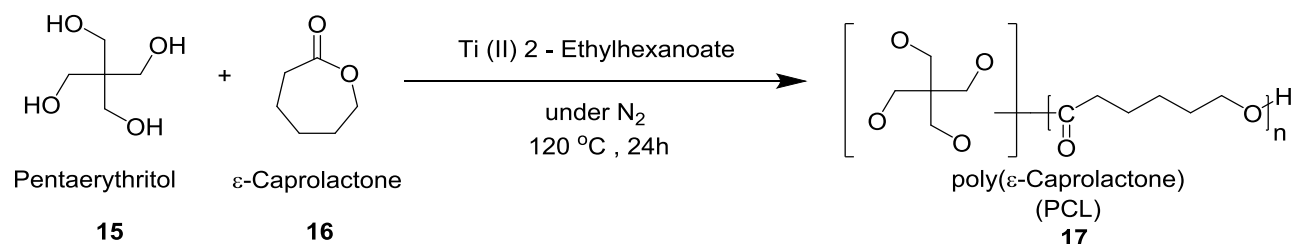
<sup>1</sup>H NMR: (CDCl<sub>3</sub>-d, 300 MHz): δ = 0.80-1.10 (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>3</sub> in the chain broad, 6<sub>m</sub>H), δ = 1.40 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, s, 2<sub>m</sub>H), δ = 1.60 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, s, 2<sub>m</sub>H), δ = 1.80-2.00 (-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(COO-)CH<sub>2</sub>- in the chain, broad, 2<sub>(m+n)</sub>H), δ = 3.80 (-CH<sub>2</sub>-OH, s, 2<sub>n</sub>H), δ = 4.00 (-COO-CH<sub>2</sub>- in the BMA site, s, 2<sub>m</sub>H), δ = 4.10 (-COO-CH<sub>2</sub>- in the HEMA site, s, 2<sub>n</sub>H). GPC: M<sub>n</sub> = 19,900 g mol<sup>-1</sup>, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 2.58

Scheme 4-2 poly(BMA-*st*-HEMA)の合成

## (iii) poly(ε-caprolactone)の合成

Pentaerythritol **15** 2 mmol を乾燥した二口フラスコに入れ、終夜真空乾燥した。反応容器を窒素雰囲気下におき、ε-caprolactone **16** 80 mmol と 3 滴の Ti (II) 2-ethylhexanoate を系に加えた 120 °C で 24 時間攪拌した。反応溶液に 300 mL の THF を加え、hexane / diethylether = 1/1 の混合溶媒に滴下することで白色粉末を得た。得られた個体を THF 200 mL に再度溶解し、hexane / diethylether = 1/1 の混合溶媒に滴下、析出物を終夜真空乾燥することで poly(ε-caprolactone) **17** を得た。(Scheme 4-3)

<sup>1</sup>H NMR: (CDCl<sub>3</sub>-d, 300 MHz): δ = 1.25-1.45 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO-, broad, 2<sub>n-1</sub>H), δ = 1.50-1.70 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO-, broad, 4<sub>n-1</sub>H), δ = 2.20-2.40 (-OCO-CH<sub>2</sub>-, broad, 2<sub>n-1</sub>H), δ = 3.60 (CH<sub>2</sub>-OH terminal of chain, t, 2H), δ = 4.00-4.20 (-CH<sub>2</sub>-OCO-, broad, 2<sub>n-1</sub>H). GPC: M<sub>n</sub> = 10,200 gmol<sup>-1</sup>, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1.31

Scheme 4-3 poly( $\epsilon$ -caprolactone)の合成

## (iii) 高分子合成の評価

作製した高分子の重合比については $^1\text{H}$  NMR spectroscopy (JEOL, Tokyo, Japan)、及び gel permeation chromatography (JASCO International, Tokyo, Japan),によって測定した。

## 4-2-2 高分子反応による水酸基含有高分子に対する PS 基の導入

窒素雰囲気、氷冷条件下にて *N*-Boc-*L*-serine *tert*-butyl ester **1** 20 mmol と *O*-*tert*-butoxy-*N,N,N,N*-tetraisopropyl phosphorodiamidite **2** 20 mmol を dichloromethane 200 mL に混和し、imidazole hydrochloride を 4.4 mmol 加え、室温で 21 時間攪拌した。反応溶液を 4 つに分け、それぞれの反応系に poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **11**、 poly(BMA-*st*-HEMA) **14**、 poly( $\epsilon$ -caprolactone) **17**、 Pluronic® F127 **18** (5.5 mmol/水酸基) を加えた後、それぞれの反応溶液に imidazole hydrochloride 14 mmol を 3 回に分け 45 分毎に添加した。150 分室温で攪拌した後透析膜(スペクトラ ポア 7/ MWCO; 1000)、2-propanol を用いて 4°C の条件で透析を行った。3 日間透析を行った後、透析内容液に *tert*-butyl peroxide 15 mmol を加え、室温で 4 時間攪拌した後透析膜(スペクトラ ポア 7/ MWCO; 1000)、2-propanol を用いて 4°C の条件で透析を行った。2 日間透析を行ったのち、内容液を回収し、真空乾燥することで poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-*t*-Bu/BOC-PS **19**、 poly(BMA-*st*-HEMA)-*t*-Bu/BOC-PS **20**、 poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*t*-Bu/BOC-PS **21**、 Pluronic -*t*-Bu/BOC-PS **22** を得た。poly (NIPAAm-*st*-HEAAm)-*t*-Bu/BOC-PS **19**、 poly(BMA-*st*-HEMA) -*t*-Bu/BOC-PS **20**、 poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*t*-Bu/BOC-PS **21**、 Pluronic-*t*-Bu/BOC-PS **22** をそれぞれ 2g ずつ秤量し、20 mL の dichloromethane に溶解し、trifluoroacetic acid 5 mL を添加し 12 時間室温で攪拌した。そのご、反応溶媒を真空乾燥にて完全に除去し、2-propanol に溶解し透析膜(スペクトラ ポア 7/ MWCO; 1000)を用いて 2-propanol 中、4°C で透析を行った。12 時間毎に外液を交換し、2-propanol で 4 回 0.01 M 4NA(EDTA $\cdot$ 4Na) 水溶液にて 2 回、イオン交換水にて 4 回透析操作を行った。透析液を回収し、凍結乾燥操作を行うことによって、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **23**、 poly(BMA-*st*-HEMA)-PS **24**、 poly( $\epsilon$ -caprolactone)-PS **25**、 Pluronic-PS **26** をそれぞれ回収した (Scheme 4-4)。

本反応で得られた poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-*t*-Bu/BOC-PS **19**、 poly(BMA-*st*-HEMA)-*t*-Bu/BOC-PS **20**、 poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*t*-Bu/BOC-PS **21**、 Pluronic -*t*-Bu/BOC-PS **22**、 poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **23**、 poly(BMA-*st*-HEMA)-PS **24**、 poly( $\epsilon$ -caprolactone)-PS **25**、 Pluronic-PS **26** については $^1\text{H}$  NMR スペクトル測定を行った。

加えて、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **23**、 poly(BMA-*st*-HEMA)-PS **24**、 poly( $\epsilon$ -caprolactone)-PS **25**、 Pluronic -PS **26** における $^{31}\text{P}$  NMR による PS 基導入の評価を行った。

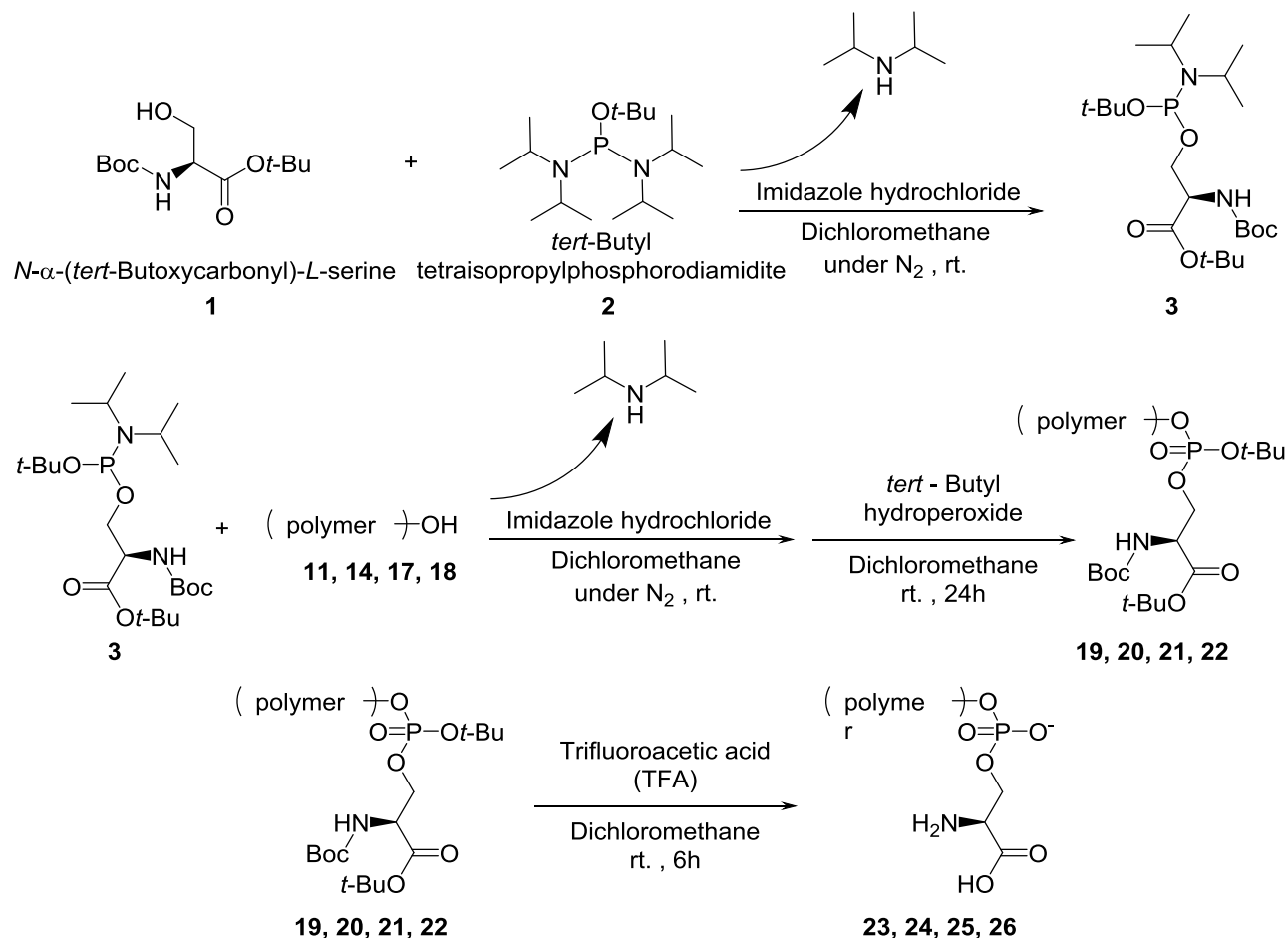
$^1\text{H}$  NMR of poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS (**23**): ( $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ , 300 MHz):  $\delta = 1.00\text{-}1.20$  ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , broad, 6H),  $\delta = 1.44$  ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , multi, 27H),  $\delta = 3.80\text{-}4.10$  ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , broad, 1H).

$^1\text{H}$  NMR of poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS (**19**): ( $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ , 300 MHz):  $\delta = 0.80\text{-}1.10$  ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_3$  in the chain broad, 6H),  $\delta = 1.40$  ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , s, 2H),  $\delta = 1.50$  ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , multi, 27H),  $\delta = 1.60$  ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ , s, 2H).



$^1\text{H NMR}$  of PCL-PS (20): ( $\text{CDCl}_3$ -d, 300 MHz):  $\delta = 1.20$ - $1.40$  ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCO}-$ , broad, 2H),  $\delta = 1.45$  ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , multi, 27H),  $\delta = 1.50$ - $1.70$  ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCO}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCO}-$ , broad, 4H),  $\delta = 2.20$ - $2.40$  ( $-\text{OCO}-\text{CH}_2-$ , broad,  $2_{n-1}\text{H}$ ),  $\delta = 4.00$ - $4.20$  ( $-\text{CH}_2-\text{OCO}-$ , broad, 2H).

$^1\text{H NMR}$  of Pluronic-PS (21): ( $\text{CDCl}_3$ -d, 300 MHz):  $\delta = 1.00$ - $1.10$  ( $-\text{CH}_3$ , broad, 3H),  $\delta = 1.45$  ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , multi, 27H).



Scheme 4-4 高分子反応による水酸基含有高分子に対する PS 基の導入

### 4-2-3 作成した高分子の細胞毒性・抗炎症活性の評価

#### (i)細胞毒性の評価

RAW264.7 を  $5 \times 10^4$  cells/90  $\mu\text{L}$  の濃度で 96 well cell culture plate (IWAKI) に播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件にて 24 時間静置することで RAW264.7 を培養した。PEI、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS をそれぞれ  $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \text{ mg/mL}$ 、and  $10 \text{ mg/mL}$  の濃度となるように添加し同条件で 24 時間培養した。その後、培養液を除去、PBS で 2 回洗浄し 90  $\mu\text{L}$  の培地と 10  $\mu\text{L}$  の Alamar Blue 溶液を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件にて 1 時間静置した。その後、fluorescent plate reader (Perkin Elmer, 1420 multilabel counter, MA, USA) (excitation;  $\lambda = 550$ , emission;  $\lambda = 590$ )にて蛍光強度を測定した。

#### (ii)抗炎症活性の評価

RAW264.7 を  $1 \times 10^5$  cells/180  $\mu\text{L}$  の濃度で 96 well cell culture plate (IWAKI) に播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件にて

12 時間静置することで RAW264.7 を培養した。poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS をそれぞれ 1  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\text{mg/mL}$ , and 10  $\text{mg/mL}$  の濃度となるように添加し同条件で 24 時間培養した。その後、LPS(E. Coli K12)を濃度が 1  $\mu\text{g/mL}$  となるように添加し、同条件で 24 時間培養を行った。QUANTI-Blue solution を使用手続きどおりに調整し、これを 90  $\mu\text{L}$  96 well cell culture plate に分注した。これに培養液の上澄み 10  $\mu\text{L}$  をそれぞれ添加し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベートした。吸光プレートリーダー (Benchmark Plus, BIO-RAD, CA, USA) ( $\lambda = 620 \text{ nm}$ )にて吸光度を測定することによって系中の分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)の量を比較することで Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa\text{B}$ )の発現量を評価した。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 水酸基含有高分子の作製

4 種の高分子における  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy、及び gel permeation chromatography の測定結果を以下に示す (Table 4-1)。

Table 4-1 前駆体ポリマーの分子量及びモノマー重合比

	$M_n$ ( $\text{g mol}^{-1}$ ) <sup>a)</sup>	$M_w$ ( $\text{g mol}^{-1}$ ) <sup>a)</sup>	$M_w/M_n$ <sup>a)</sup>	In feed (mol%) <sup>b)</sup>	
poly(NIPAAm- <i>st</i> -HEAAm) ( <b>11</b> )	$17.9 \times 10^3$	$38.5 \times 10^3$	2.16	NIPAAm 81.0	HEAAm 19.0
poly(BMA- <i>st</i> -HEMA) ( <b>14</b> )	$19.9 \times 10^3$	$51.5 \times 10^3$	2.58	BMA 77.6	HEMA 22.4
PCL ( <b>17</b> )	$10.2 \times 10^3$	$13.4 \times 10^3$	1.31	-	-
Pluronic ( <b>18</b> )	$10.5 \times 10^3$	$12.3 \times 10^3$	1.17	PEO 77.4	PPO 22.6

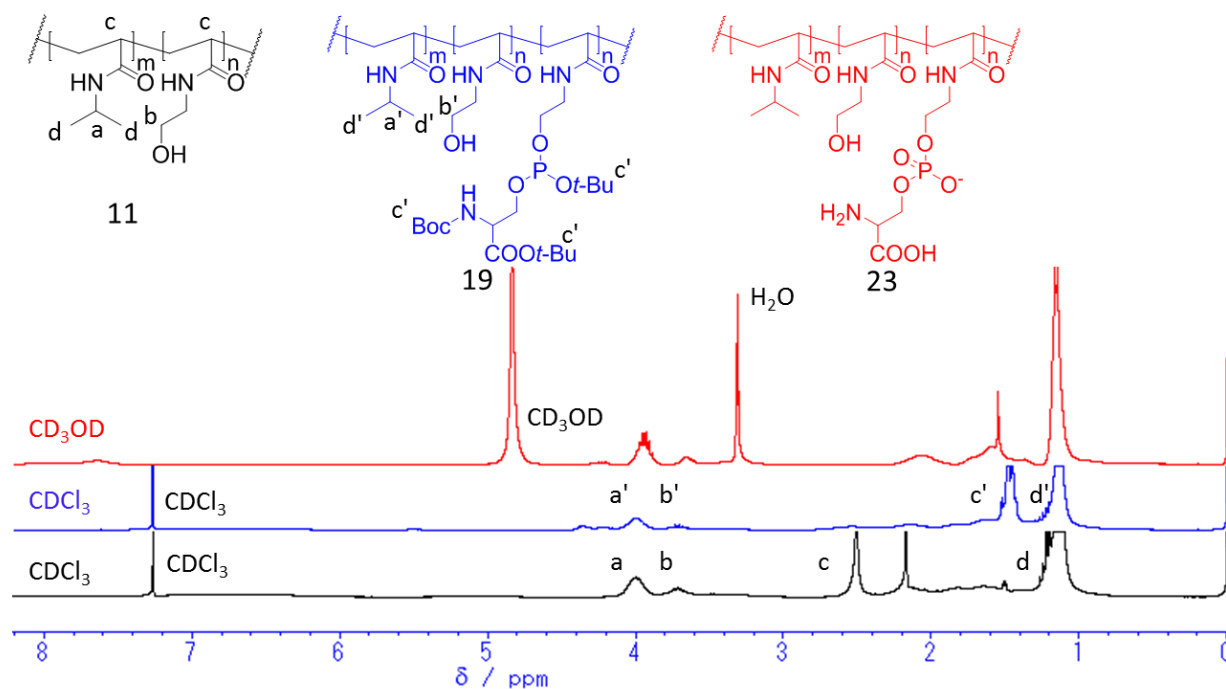
<sup>a)</sup> Determined by GPC using DMF with 10 mM lithium bromide (LiBr), and calculated using poly(methyl methacrylate) (PMMA) standards.

<sup>b)</sup> Determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy with  $\text{CDCl}_3$ -d.

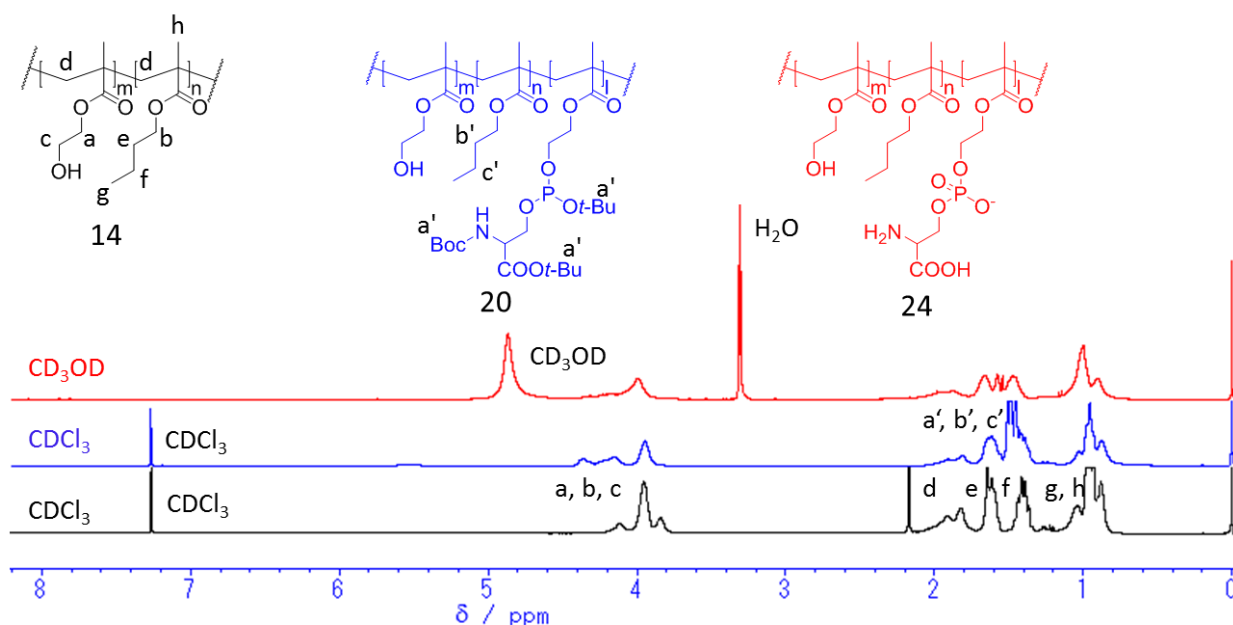
#### 4-3-2 高分子反応による水酸基含有高分子に対する PS 基の導入

(i) poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)に対する導入の評価

poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **11**、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-*t*-Bu/BOC-PS **19**、及び poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **23** の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルと化学構造式を Fig. 4-1 にまとめた。Fig. 4-1 では PS 導入前、導入後、脱保護後のスペクトルが示されており、*tert*-Bu 基と BOC 基に由来する ppm=1.4 付近のピークについて議論可能であった。結論として、PS 基導入によって *tert*-Bu 基と BOC 基由来のピークの出現が確認でき、脱保護操作によって *t*-Bu 基と BOC 基由来のピークの消失が確認できた。以上の結果より、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **11** に対する PS 基の導入が有意に進行している事が明らかとなった。導入率は 84.6%であった。

Fig. 4-1  $^1\text{H}$  NMR スペクトルによる poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)に対する PS 基導入の評価(ii) poly(BMA-*st*-HEMA)に対する導入の評価

poly(BMA-*st*-HEMA) **14**、poly(BMA-*st*-HEMA)-*t*-Bu/BOC-PS **20**、poly(BMA-*st*-HEMA)-PS **24** の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルと化学構造式を Fig. 4-2 にまとめた。Fig. 4-2 では PS 導入前、導入後、脱保護後のスペクトルが示されており、*tert*-Bu 基と BOC 基由来する ppm=1.4 付近のピークについて議論可能であった。結論として、PS 基導入によって *tert*-Bu 基と BOC 基由来のピークの出現が確認でき、脱保護操作によって *tert*-Bu 基と BOC 基由来のピークの消失が確認できた。以上の結果より、poly(BMA-*st*-HEMA) **14** に対する PS 基の導入が有意に進行している事が明らかとなった。導入率は 81.9%であった。

Fig. 4-2  $^1\text{H}$  NMR スペクトルによる poly(BMA-*st*-HEMA)に対する PS 基導入の評価

(iii) poly( $\epsilon$ -caprolactone)に対する導入の評価

poly( $\epsilon$ -caprolactone) **17**、poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*t*-Bu/BOC-PS **21**、poly( $\epsilon$ -caprolactone)-PS **25** の  $^1\text{H NMR}$  スペクトルと化学構造式を Fig. 4-3 にまとめた。Fig. 4-3 では PS 導入前、導入後、脱保護後のスペクトルが示されており、*tert*-Bu 基と BOC 基に由来する ppm=1.4 付近のピークについて議論可能であった。結論として、PS 基導入によって *t*-Bu 基と BOC 基由来のピークの出現が確認でき、脱保護操作によって *t*-Bu 基と BOC 基由来のピークの消失が確認できた。以上の結果より、poly( $\epsilon$ -caprolactone) **17** に対する PS 基の導入が有意に進行している事が明らかとなった。導入率は 69.6%であった。

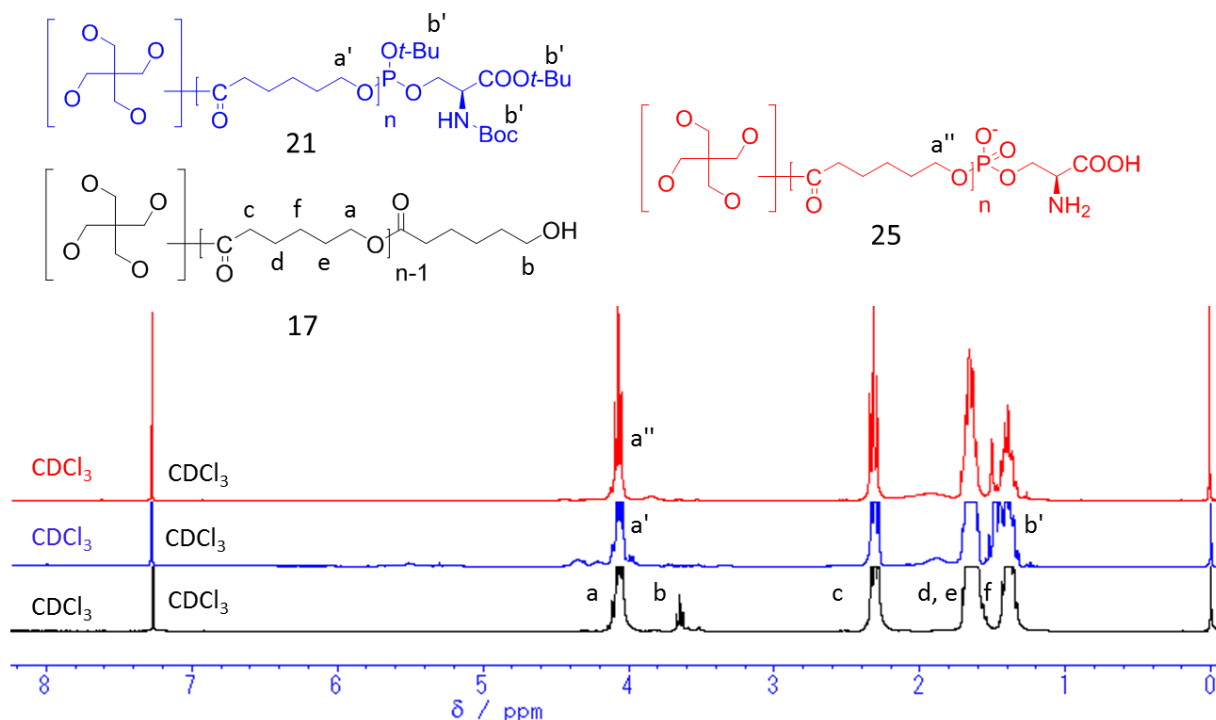
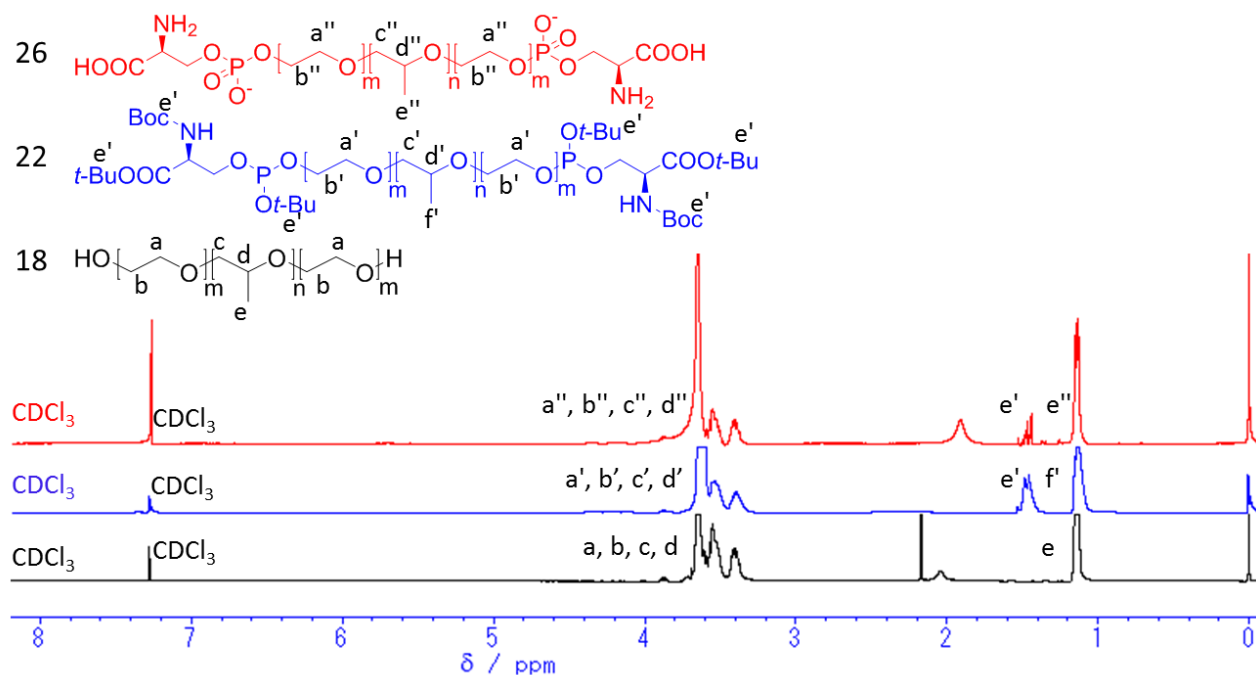


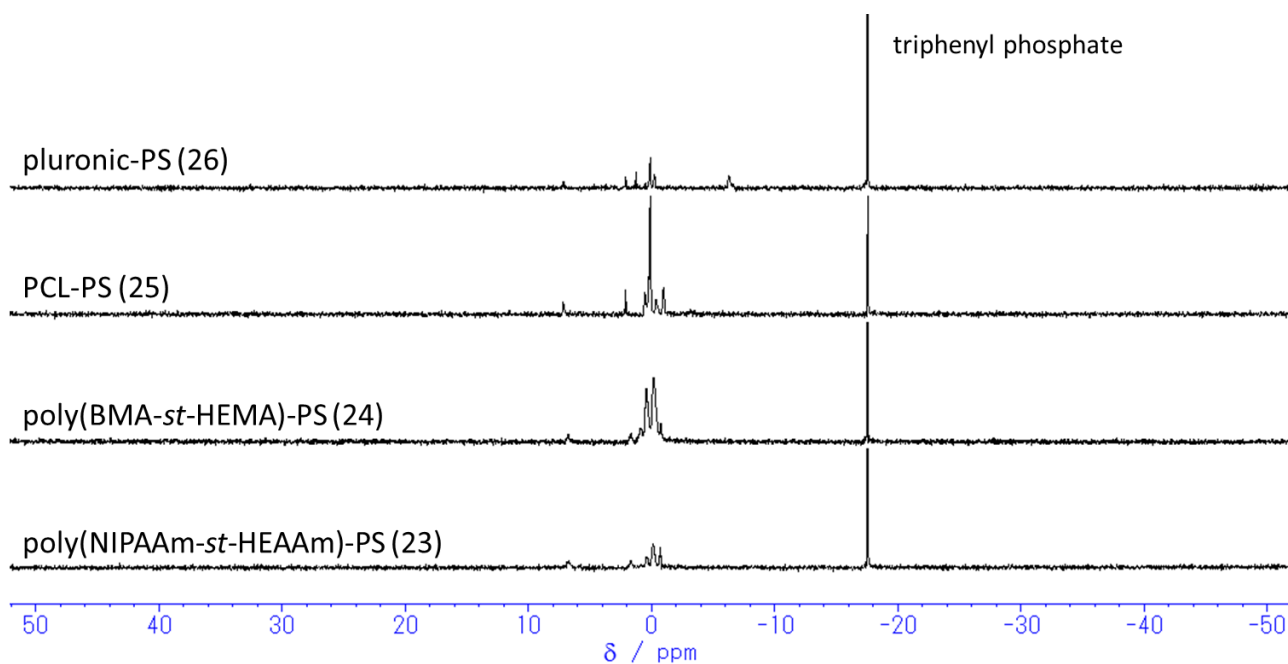
Fig. 4-3  $^1\text{H NMR}$  スペクトルによる poly( $\epsilon$ -caprolactone)に対する PS 基導入の評価

## (iv) Pluronic に対する導入の評価

Pluronic **18**、Pluronic-*t*-Bu/BOC-PS **22**、Pluronic-PS **26** の  $^1\text{H NMR}$  スペクトルと化学構造式を Fig. 4-4 にまとめた。Fig. 4-4 では PS 導入前、導入後、脱保護後のスペクトルが示されており、*tert*-Bu 基と BOC 基に由来する ppm=1.4 付近のピークについて議論可能であった。結論として、PS 基導入によって *tert*-Bu 基と BOC 基由来のピークの出現が確認でき、脱保護操作によって *tert*-Bu 基と BOC 基由来のピークの消失が確認できた。以上の結果より、Pluronic **18** に対する PS 基の導入が有意に進行している事が明らかとなった。導入率は 14.1%であった。

Fig. 4-4  $^1\text{H}$  NMR スペクトルによる Pluronic に対する PS 基導入の評価(v)  $^{31}\text{P}$  NMR による PS 基導入の評価

poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **23**、poly(BMA-*st*-HEMA)-PS **24**、poly( $\epsilon$ -caprolactone)-PS **25**、Pluronic-PS **26** における  $^{31}\text{P}$  NMR 測定を行い、Fig. 4-5 にまとめた。本反応にて導入した PS 基は 5 価のリン酸エステルを有しており、 $^{31}\text{P}$  NMR においてリン酸エステルは 0ppm 周辺にピークを生ずることが知られている。Fig. 4-5 では、今回合成を試行した 4 つの高分子全てにおいて 0ppm 付近にリン酸エステル由来のピークを確認した。ピーク自体は単ピークではなく複数に分かれており、不純物を含んでいる可能性があるが、この結果は水酸基を含有する高分子に対して PS 基の導入が行われたことを示唆する結果であると考えられる。

Fig. 4-5  $^{31}\text{P}$  NMR 測定による PS 基導入の評価

### 4-3-3 作成した高分子の細胞毒性・抗炎症活性の評価

高分子反応にて PS 基を導入した高分子の細胞毒性について RAW264.7 を用いて評価した。poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **11**、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS **23**、及び PEI を任意の濃度で RAW264.7 に播種した場合の細胞生存率を Fig. 4-6 にまとめた。PEI は多価のポリカチオン性的高分子でありポリアニオンである DNA とポリイオンコンプレックスを形成することが知られており、遺伝子送達担体としてよく使用されている<sup>5</sup>。この PEI は比較対象群として使用しており、10  $\mu\text{g/mL}$  から細胞生存率が 50%を切り、毒性を示し始めることが明らかとなった。一方で poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **11**、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS **23**、では 1 mg/mL の濃度域までは細胞は死滅しておらず、低毒性を示していることが明らかとなった。また、PS 基の導入前後で poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) と poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS 間の濃度依存細胞毒性のプロファイルに有意差が見られなかった。このことは、PS 基の導入による毒性の上昇は見られなかったことを示唆している。

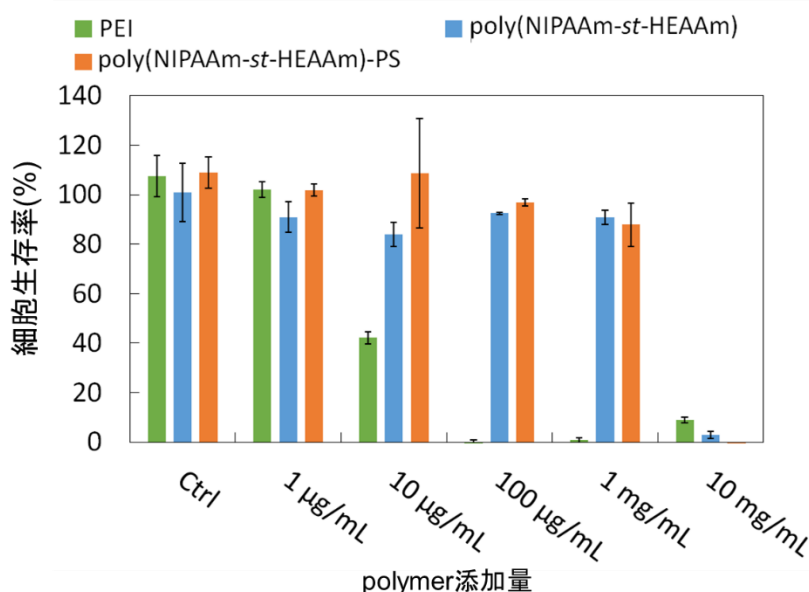
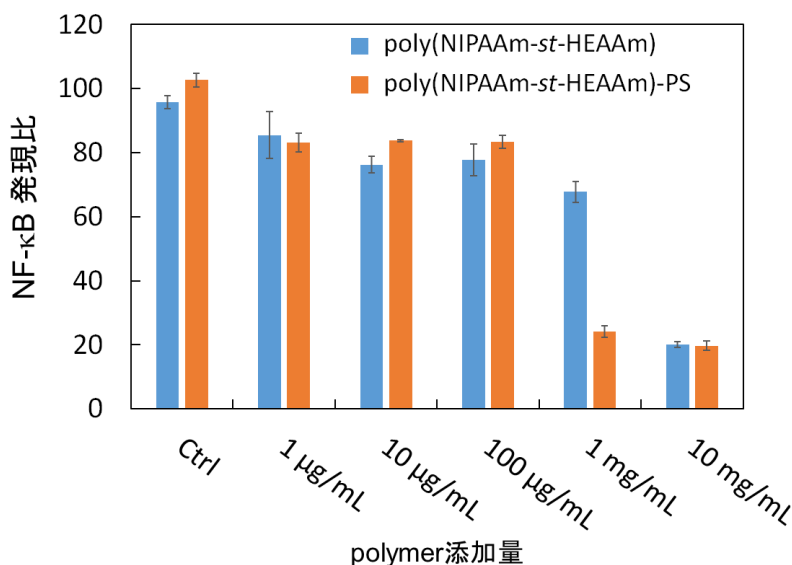


Fig. 4-6 PS 基導入高分子(poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS)の細胞毒性試験

次に、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **11**、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS **23** の RAW264.7 に対する抗炎症活性について評価を行った(Fig. 4-7)。10 mg/mL の濃度では poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) **11**、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS **23** 共に NF- $\kappa$ B の発現は見られなかった。これは、Fig.4-6 から分かる通り、10 mg/mL の濃度ではどちらのサンプルにおいてもほとんどの細胞が死滅しているため、NF- $\kappa$ B の発現に起因して産生するアルカリフォスファターゼがそもそも賛成されていないことに起因すると考えられる。一方で、1 mg/mL の濃度域では未反応の poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)ではコントロール群と同様の NF- $\kappa$ B 発現を示しているのに対し、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS では顕著な NF- $\kappa$ B 発現の低下が確認された。Fig. 4-6 における同濃度域の細胞生存率は比較対象群と変わらない値を示しているため、1 mg/mL の濃度における poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS における NF- $\kappa$ B の抑制は、PS 基の導入による抗炎症活性の発現に起因すると考えられる。

Fig. 4-7 PS 基導入高分子(poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS)の抗炎症活性試験

#### 4-4 結言

2章では、メタクリル系モノマーである HEMA に対して PS 基を導入することで MPS モノマーを合成し、ラジカル重合にて高分子量体である poly(MPS)を合成した。3章では作製した poly(MPS)が抗炎症活性を有することを明らかとした。加えて、ホスファチジルコリン模倣モノマーである MPC とのランダム共重合体は MPS 単体のホモポリマーと比してより効率的に抗炎症活性を誘導することを明らかとした。これら結果は MPS を活用する上でラジカル重合可能なコモノマーと併用する上では大きな利点であるが、メタクリル系モノマーであるが故に、非ビニル系高分子材料への応用は困難であった。非ビニル系高分子としては poly ethylene glycol(PEG)や poloxamer、poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL)等のポリエーテル、ポリエステル系高分子がよく知られている。これらの高分子は優れた生体適合性や生分解性など、生体内で活用する際に優れた特性を有するため現在では様々な医療デバイスの基盤材料として使用されている。このような優れた機能性高分子に対する抗炎症活性部位の簡便な導入法を確立できれば、これまで以上に優れた医療デバイスの作製が可能となる。

以上を踏まえ本章では、MPS 合成に利用したホスホロアミダイト法を重合済みの高分子材料に応用する手法を開発した。PS 基を付加するための高分子材料として、poly( $\epsilon$ -caprolactone), poloxamer, poly(BMA-*st*-HEMA), poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)を選択した(BMA; Butyl methacrylate, NIPAAm; *N*-isopropyl acrylamide, HEAAm; 2-hydroxyethyl acrylamide)。poly( $\epsilon$ -caprolactone)は開環重合、poly(BMA-*st*-HEMA)と poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)はフリーラジカル重合にて作製した。これらの4種の高分子はいずれもそれぞれ側鎖、もしくは末端に水酸基を有しており、この水酸基に対して PS 基を導入した。各高分子の水酸基に対して 5 当量の *N*- $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-serine *tert*-butyl ester と *tert*-butyl tetraisopropylphosphordiamidite を dichloromethane 中で反応を行った。得られた高分子に対して 3 当量の *tert*-butyl peroxide を用いてリン原子を酸化し、次いで 3 当量の trifluoroacetic acid と反応することで脱保護反応を行った。

得られた4種の高分子を  $^{31}\text{P}$  NMR によって測定し結果、いずれのスペクトルにもリン酸エステル由来のピークを確認し、ホスホロアミダイト法が有意に進行していることを確認した。また、 $^1\text{H}$  NMR 分光法によって PS 基の導入率を算出した結果、poly( $\epsilon$ -caprolactone), poloxamer, poly(BMA-*st*-HEMA), poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)に対する導入率はそれぞれ、69.6%、14.1%、81.9%、84.6%であった。

また、得られた PS 修飾 poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) (poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS)の RAW 264.7 における用量依存的な細胞毒性を Alamar Blue Assay にて、抗炎症活性を SEAP reporter gene assay にて測定した。結果として、1 mg/mL の濃度域における低細胞毒性と NF- $\kappa$ B 活性の抑制を同時に確認した。NF- $\kappa$ B は炎症のプロモー

ターの役割を果たす転写因子であるため、RAW 264.7 における NF- $\kappa$ B の抑制は炎症活性の抑制を意味している。本章における到達点は、①種々の反応高分子が有する水酸基に対して PS 基を導入することに成功した点、②得られた PS 修飾高分子は優れた生体親和性を示しながらも、濃度に依存して抗炎症活性を発現したという 2 点である。第 3 章におけるアプローチの優位性はポリエーテルやポリエステル系のラジカル重合で調製が困難な高分子の末端に PS 基を導入することが可能である点、重合後の高分子を使用することから PS 修飾前後で高分子全体の分子プロファイルに大きな変化が起こりづらい点の二点である。しかし、導入に際しては副反応の制御が困難であるという側面もあり、副生成物が高分子鎖に担持されてしまうという問題点を抱えていた。本章では合成を行う際に、より厳密な化学当量の制限を行うことでこの問題点を解決した。

## 参考文献

- 1 Becher, P., Review of: "Alkylene Oxides and Their Polymers" (Surfactant Science Series, Vol. 35). F. E. Bailey, Jr. and J. V. Koleske. vi+261 pp. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1991. \$125. *Journal of Dispersion Science and Technology* **1992**, *13*, 247-248.
- 2 Harris, Z.; Zalipsky, S., *Poly(ethylene Glycol)*. American: 1997.
- 3 Dumortier, G.; Grossiord, J. L.; Agnely, F.; Chaumeil, J. C., A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research* **2006**, *23*, 2709-2728.
- 4 Goldberg, D., A review of the biodegradability and utility of poly(caprolactone). *Journal of environmental polymer degradation* **1995**, *3*, 61-67.
- 5 Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G., Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **1999**, *60*, 149-160.



## 5章 糖認識機能を有するレクチン模倣高分子の作製

### 5-1 緒言

本章では、生体において糖鎖-レクチン相互作用が炎症、胚発生、細胞発生、および腫瘍進行などの多くの生物学的プロセスにおいて重要な役割を演じることに着目し、糖認識機能を有する高分子を作製し、その基本的な糖認識機能の評価を行った。レクチンとは微生物・動植物に存在するタンパク質または糖タンパク質のうち、特定の構造を有する糖・糖鎖を特異的に認識するタンパク質の総称である<sup>1</sup>。ヒトにおける糖-レクチン相互作用でおそらく最も有名な例は ABO 式血液型による血液型診断である。ABO 式血液型とは 1901 年に Landsteiner によって発見された概念であり、赤血球膜の表面に存在している糖鎖(ABO 式血液型抗原決定基)の種類によって大まかに 4 種類の血液型に分類される<sup>2</sup>。今日では輸血の際にまず議論される要素となっている。このように細胞生物学的な側面から見ると細胞表面に存在する糖鎖は、細胞の表現型を直接的に分析または同定するための理想的な標的であると考えられる。大きな理由として、糖鎖が細胞表面の最も外側に存在するという点、細胞表面糖鎖のプロファイルは、生物学的・組織学的において独立を保っているということ、たとえ同一種であっても発生、細胞の活性化、分化、悪性形質転換、炎症といった生理応答のステージの変化によって糖鎖プロファイルが変化するという事が挙げられる<sup>3,4</sup>。つまり糖鎖-レクチン相互作用は広範に渡る生物学的現象において細胞の種類やその状態を表していると言える。更に糖鎖において興味深いことは、この情報自体が我々の遺伝子に直接コードされておらず、発現および活性が細胞内外の環境変化によって著しく影響を受ける多数のグリコシダーゼやグリコシルトランスフェラーゼといった酵素の複雑な系によってコントロールされるという点である。

糖-レクチン相互作用はその特異性からガンや慢性疾患の検出に有効であるといった実用的な研究成果も報告されている。例えば、肝臓がんにおける $\alpha$ -フェトプロテイン N 型糖鎖のフコシル化やフコース $\alpha$ 1-3 結合の増加、子宮体がんにおける H 型糖鎖の発現、膵臓がんにおけるフコシル化糖鎖の増加など、様々な発現型の変化が報告されており腫瘍マーカーとして利用されている<sup>5-8</sup>。このように、いわばバイオマーカー的な利用法が一般的となっている糖鎖であるが、近年では再生医療分野の発展に伴い、iPS 細胞の分離技術として糖鎖-レクチン相互作用が商業ベースで利用されるようになってきた。平林、舘野らのグループは、レクチンマイクロアレイ法により、未分化 iPS 細胞に特異的に発現している糖鎖(H1 型[Fuca1-2Gal $\beta$ 1-3GlcNAc (GalNAc)]、H3 型(Fuca1-2Gal $\beta$ 1-3GlcNAc)、Lewis B 型(Fuca1-2Gal $\beta$ 1-3GalNAc))と特異的に結合するグラム陰性菌より単離された TNF- $\alpha$ 様リコンビナントレクチン rBC2LCN を発見した<sup>9-11</sup>。平林、舘野らのグループは、このレクチンに蛍光色素や緑膿菌毒素をコンジュゲートさせることによって未分化 iPS 細胞のイメージング・除去技術を確立すると同時に、膵臓がんにも iPS 細胞と同様の糖鎖が発現していることに着目し、膵臓がんにおける抗体医薬に変わるレクチン医薬という概念も提唱している<sup>12,13</sup>。

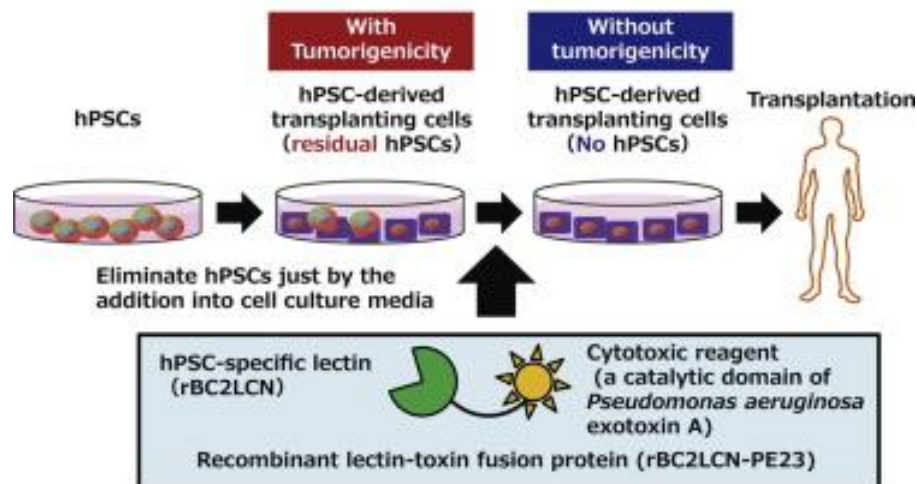


Fig. 5-1 未分化 iPS/ES 細胞除去技術の概要<sup>14</sup>

このように糖鎖は細胞腫毎に特異な糖鎖構造を有しており、細胞同士の情報伝達や細胞間相互作用の仲介を担う生命分子であることがわかる。これに加え、糖鎖が自己・非自己の判別に利用されていることに関与することも知られている。一般的に人間の細胞が取り扱える糖鎖の構成要素は10種程度でありこの構成要素の組み合わせや結合様式の組み合わせは多様であるが、糖鎖を合成する酵素と産生物には厳密な特異性があるため、その細胞種・生物種に特異的な糖鎖構造をそれぞれ有する事が知られている。例えば病原菌やウイルスが細胞に感染する際に最初に認識する部分は感染先の糖鎖であるし、これらを除く免疫系が認識する部分も細菌・糖鎖表面の糖鎖である。このような背景から糖鎖-レクチン相互作用を制御する技術は将来的に免疫系を操作し得る可能性を有している。実際に、白血球に発現している Sialyl Lewis X と呼ばれる糖鎖と、血管内皮細胞に発現しているセレクチンとの相互作用を阻害するセレクチン阻害剤である(Rivipansel® ; GlycoMimetics)は鎌状赤血球症における炎症性の vao-occlusiv crisis(VOC)の効果的な治療薬であると注目を集めている。<sup>15</sup>

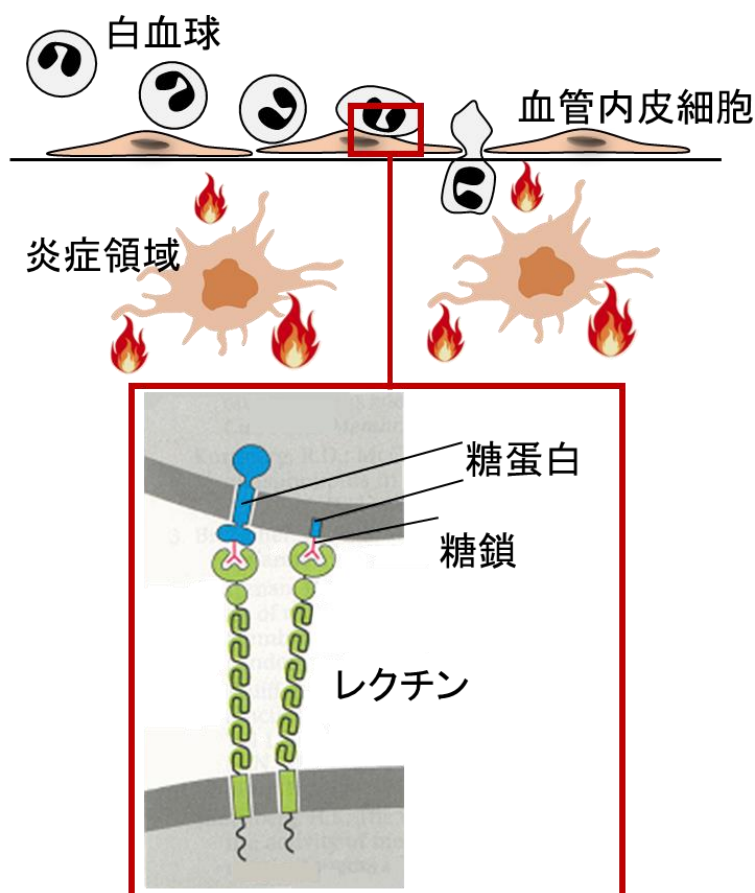


Fig. 5-2 白血球の炎症部位への浸潤と糖鎖-レクチン相互作用の関係

このように近年では糖鎖-レクチン相互作用の制御に関しての有用性は強く示されている一方で、レクチンがタンパク質骨格であるが故の分子設計自由度の限界が技術的制約になっている。このレクチンの構造的に弱いとされる部分を解決するために、様々な研究者によってレクチンの合成アナログの開発が試みられている。このような背景のもと、cis-diol と可逆的な共有結合を形成することが可能なフェニルボロン酸(PBA)が糖を認識するための官能基として注目を集めている。PBA の実際の利用法として、グルコース濃度上に応じてインスリンを放出する自己調節型のデリバリーシステムが報告されている<sup>16</sup>。

このように PBA は糖認識や糖応答デバイスに関して非常に有望な手段であるが、PBA-糖相互作用の安定性は pH に大きく依存する事が知られている。PBA のホウ酸部分の pKa は約 9 であり、糖との強い相互作用を示すためにはホウ素原子が 4 価である必要がある。つまり生理学的 pH(7.4)での効率的な糖認識は比較的困難である(Fig. 5-3)。

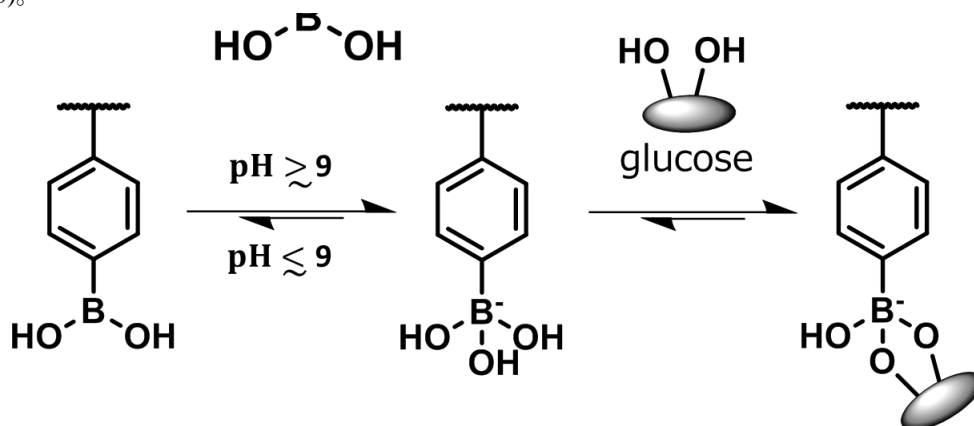


Fig. 5-3 フェニルボロン酸(PBA)の化学構造と糖認識メカニズム

このような背景のもと、D.Hall らの研究グループは benzoxaborole と呼ばれるホウ素を含有する官能基ボロン酸よりも低い pH 領域基置いて糖へ高い親和性を示すことが見出した(Fig. 5-4)<sup>17</sup>。この官能基は実際に、PBS 中(pH=7.4)でグルコースやガラクトースに対して高い親和性を示すことが報告されており、これを高分子化することで糖応答性のスマート高分子が報告されるようになってきた<sup>18,19</sup>。

このような背景のもと、benzoxaborole 基は新たな糖・糖鎖認識プローブとしての可能性を秘めているが、一方で種々の糖や糖鎖との具体的な相互作用について明らかになっていないことが多い。そこで本章では、benzoxaborole 基に重合性官能基を付加した benzoxaborole モノマー(MAAmBO; 5-methacrylamide-1,2-benzoxaborole)を設計し、これを温度応答性高分子である NIPAAm と HEAAm との共重合体(poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO))を作製した(Fig. 5-5)。

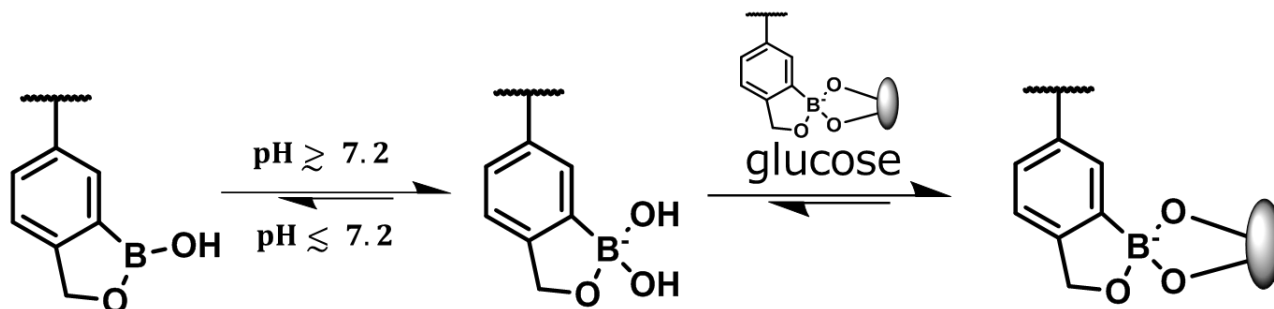


Fig. 5-4 benzoxaborole の化学構造と糖認識メカニズム

## 5-2 実験

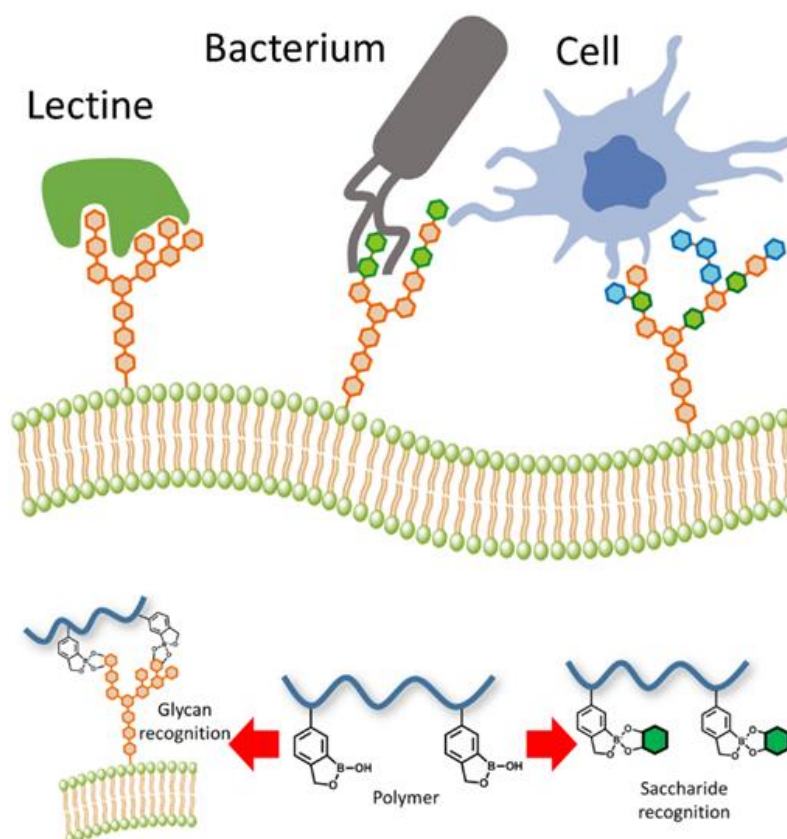
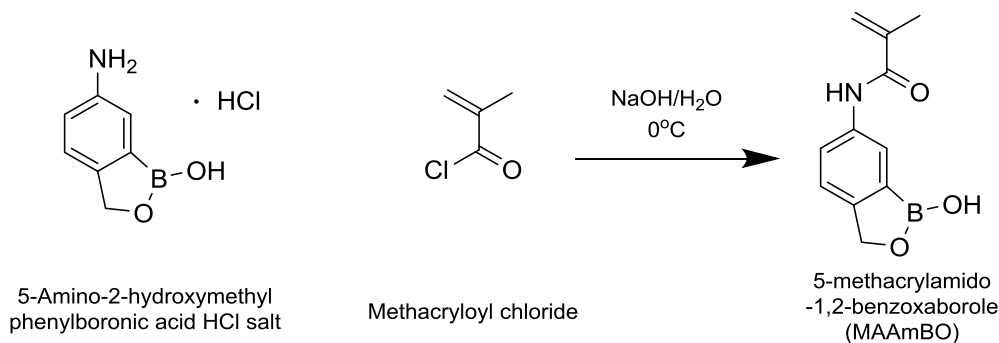


Fig. 5-5 細胞表面糖鎖による生体分子認識とレクチン模倣高分子の模式図

5-Amino-2-hydroxymethylphenylboronic acid HCl salt は Combi-Blocks 社 (CA, USA)より購入した。Methacryloyl chloride、D-glucose、L-glucose、2-deoxy-D-glucose、D-fructose、D-psicose、D-maltose、D-trehalose、D-lactose、isomaltotriose は東京化成工業株式会社(東京)より購入した。*N*-Isopropyl acrylamide (NIPAAm)、*N*-hydroxyethyl acrylamide (HEAAm)、2-(2-carboxyethylsulfanylthiocarbonylsulfanyl)propionic acid (CSTSP)、ethanol、*N,N*-dimethylformamide (DMF)、*n*-hexane、benzene、dimethyl sulfoxide (DMSO)、1,2-ethanedithiol、DL-dithiothreitol (DTT)、sodium hydroxide、hydrochloric acid、alumina、deuterium oxide、は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA)と Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)はシグマアルドリッチジャパン(東京)より購入した。Cy3- maleimide は Thermo Fisher Scientific (MA, USA)より購入した。

## 5-2-1 糖認識モノマーの合成

5-Amino-2-hydroxymethylphenylboronic acid HCl salt (5.0 g, 26.95 mmol) を 2N NaOH 水溶液 (20 mL) に溶解し、0°C に冷却した。15 分攪拌し、methacryloyl chloride (5.5 mL, 56.5 mmol)を滴下し、氷浴下で 3 時間攪拌した。1N HCl を反応系に滴下することで中和を行い、乳白色の析出物を回収し、0.1N HCl で洗浄し、終夜真空乾燥を行うことで 5-methacrylamido-1,2-benzoxaborole(MAAmBO)を得た(Scheme 5-1)。

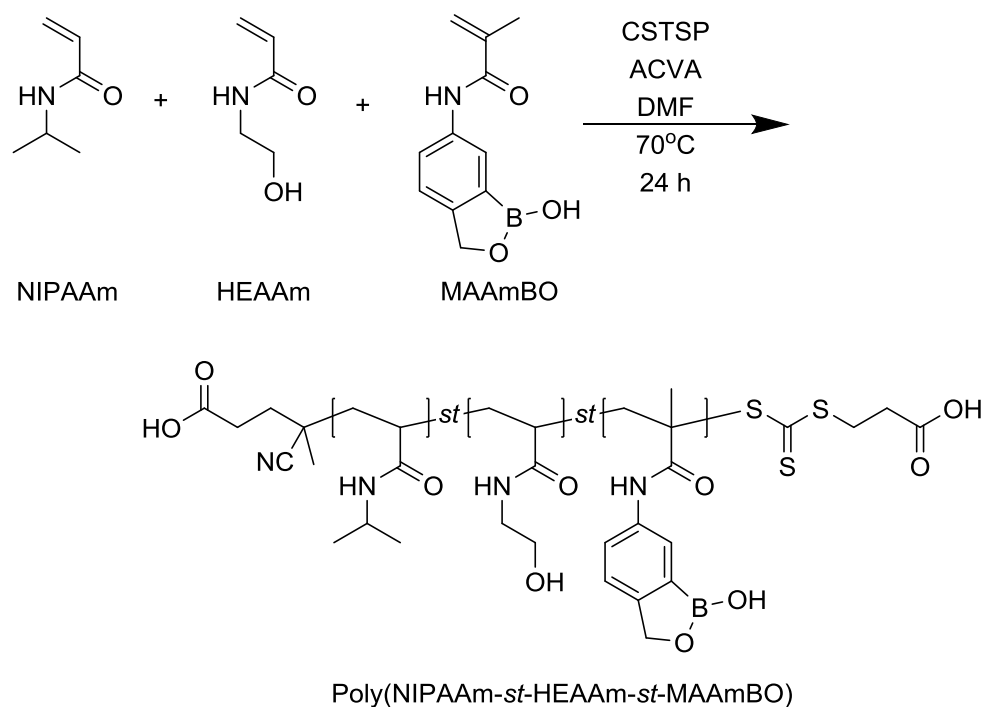


Scheme 5-1 5-methacrylamido-1,2-benzoxaborole(MAAmBO)の合成

### 5-2-2 温度応答性糖認識ポリマー(レクチン模倣ポリマー)の合成

NIPAAm (267 mg, 2.36 mmol)、HEAAm (114 mg, 0.990 mmol)、MAAmBO (64.0 mg, 0.295 mmol)、CSTSP (7.56 mg, 29.7  $\mu\text{mol}$ )、ACVA (1.70 mg, 6.06  $\mu\text{mol}$ )を 6.6 mL の DMF に溶解した。-30  $^\circ\text{C}$  条件下で窒素バブリングを行うことで溶存酸素を除去し、70  $^\circ\text{C}$  で 24 時間重合反応を行った。重合後、反応溶液にアセトンを加え、diethyl ether に滴下することで粉末状の poly(NIPAAm-st-HEAAm-st-MAAmBO)を得た(Scheme 5-2)。

$^1\text{H NMR}$ : ( $\text{D}_2\text{O}$  with 10mM NaOH, 300 MHz):  $\delta = 3.10\text{-}3.40$  (NH- $\text{CH}_2$ -, broad, 2H),  $\delta = 3.77\text{-}4.00$  (-CH( $\text{CH}_3$ ) $_2$ -, broad, 1H),  $\delta = 7.00\text{-}7.60$  (Bn, broad, 3H). GPC:  $M_n = 9.6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $M_w/M_n = 1.40$ .



Scheme 5-2 poly(NIPAAm-st-HEAAm-st-MAAmBO)の合成

### 5-2-3 単糖、二糖とレクチン模倣ポリマーの相互作用強度の評価

Poly(NIPAAm-st-HEAAm-st-MAAmBO)を濃度が 5mg/mL となるように PBS に溶解した。この溶液に 1、5、10 mg/mL となるように D-glucose、D-fructose、D-psicose、L-glucose、D-deoxyglucose、D-maltose、D-trehalose、

isomaltotriose をそれぞれ添加し、紫外可視分光光度計(V-650)(JASCO)を用いて温度変化による濁度変化を測定した。

#### 5-2-4 糖アレイ解析を用いたレクチン模倣ポリマーの糖認識機能の評価

作製した poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)の種々の糖鎖との相互作用強度を糖鎖マイクロアレイ法にて評価した。複合糖質マイクロアレイは、館野らによって報告された方法と同様に調製した。また、結合アッセイも同様に実施した。Cy3 標識 poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)をプロービング緩衝液(0.8%NaCl、1%(v/v) Triton-X、1mM MnCl<sub>2</sub>、1mM CaCl<sub>2</sub>含有 25mM Tris-HCl、pH7.4)に溶解し、マイクロアレイにチャージした(100 $\mu$ L/well)。20 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートし、エバネッセント活性化蛍光スキャナー SC-Profiler(Moritex、Tokyo)を用いて蛍光画像を得た。各スポットのエバネッセント蛍光強度は、バックグラウンド値を参照に差し引いて算出した。

### 5-3 結果

#### 5-3-1 糖認識モノマーの合成

5-2-1 にて得た白色粉末を DMSO-d<sub>6</sub> に溶解し、<sup>1</sup>H NMR 測定を行った(Fig. 5-6)。結果として、全てのピーク位置と積分値の同定が可能であった。

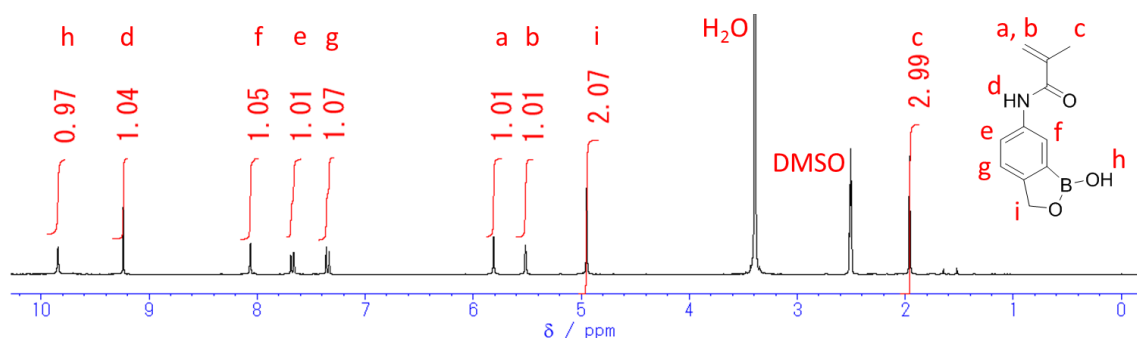
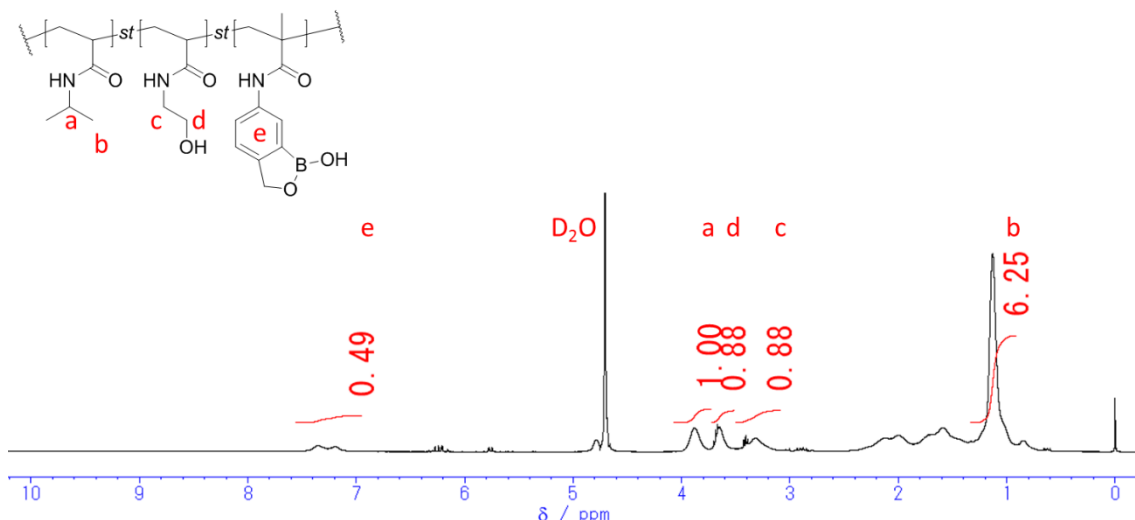


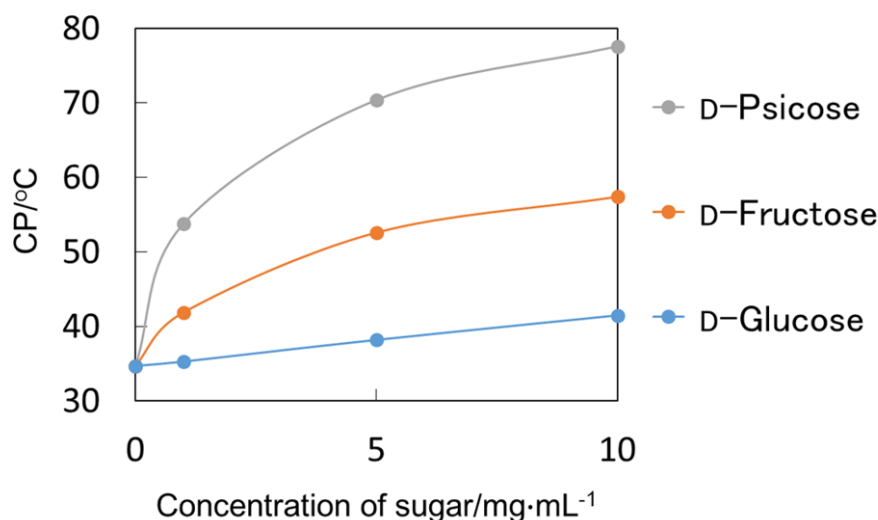
Fig. 5-6 5-methacrylamido-1,2-benzoxaborole(MAAmBO)の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

#### 5-3-2 温度応答性糖認識ポリマー(レクチン模倣ポリマー)の合成

5-2-2 にて作製した poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)を 0.1N の NaOD/D<sub>2</sub>O 溶液に溶解し、<sup>1</sup>H NMR 測定を行った(Fig. 5-7)。このスペクトルにおいて、 of NIPAAm, HEAAm, and MAAmBO can be assigned as follows: NIPAAm 由来のピークは $\delta = 3.9$  ppm に位置し(メチン基; a)、HEAAm 由来のピークは $\delta = 3.3$  ppm に(メチロール基; c, d)、MAAmBO 由来のピークは $\delta = 7.2$ -7.4 に見られた(芳香環; e)。これらのピークと積分値を比較することで、NIPAAm、HEAAm、MAAmBO の重合比は 62 : 27 : 11 (mol%)であると算出できた。

Fig. 5-7 poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

### 5-3-3 単糖、二糖とレクチン模倣ポリマーの相互作用強度の評価

Fig. 5-8 単糖添加における poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)溶液の曇点のシフト

poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)の PBS 溶液の温度依存的濁度変化を評価した。具体的には、加温する際に波長 $\lambda=500\text{nm}$ の参照光を照射し、透過光強度が50%に減衰した温度を曇点( $T_{CP}$ )と定義し、この $T_{CP}$ の変化量によって高分子と糖の相互作用の強度を議論した。Fig. 5-7ではD-glucose、D-fructose、D-psicoseの添加によるpoly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)の曇点の変化をプロットした。溶液温度が $30^\circ\text{C}$ の場合は全ての条件で溶液は透明であったが、温度の上昇に伴って無添加、D-glucose、D-fructose、D-psicoseの順に白濁していった。poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)のみの $T_{CP}$ は $34.8^\circ\text{C}$ であった。また、各糖の濃度 $10\text{mg/mL}$ におけるD-glucose、D-fructose、D-psicoseの $T_{CP}$ 変化量( $\Delta T_{CP}$ )はそれぞれ、 $6.8^\circ\text{C}$ 、 $22.7^\circ\text{C}$ 、 $42.9^\circ\text{C}$ であった。この傾向は、D-プシコースがMAAmBOに対して最も高い親和性を有することを示唆している。BenzoxaboroleのD-glucose、D-fructoseに対する具体的な解離定数 $K_a$ はそれぞれ $28 \pm 4$ および $336 \pm 43(\text{M}^{-1})$ であると報告されている。したがって、Benzoxaboroleに対するD-psicoseの $K_a$ 値はフルクトースと比して高いことが予測できる。D-glucoseと比較してD-fructoseの $\Delta CP$ が大きい理由として、D-glucoseよりも還元型のアルデヒド構造

を 1000 倍取りやすいことに起因すると予測できる。

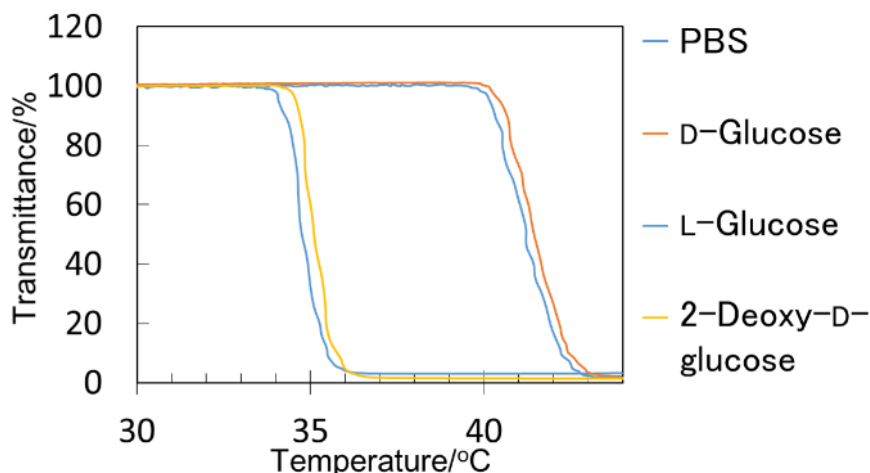


Fig. 5-9 グルコース誘導体添加条件における poly(NIPAAm-st-HEAAm-st-MAAmBO)溶液の温度依存性濁度

次に、MAAmBO の単糖の光学活性認識能を D-glucose、L-glucose を用いて評価を行った。加えて、水酸基を一つ除去したグルコース(D-deoxyglucose)における温度変化における濁度プロファイルも測定した(Figure 5-9)。結果として、D-glucose と L-glucose における温度変化における濁度プロファイルはほぼ同じ形状を示した。この結果はMAAmBOはグルコースの光学活性を認識しないという結果を示唆している。また、D-deoxyglucose の濁度変化プロファイルは糖非添加群と同様の形状を示した。D-glucose と D-deoxyglucose の分配係数 LogP はそれぞれ-3.6、-2.9 であり (estimated by ChemAxon)、値としての違いは小さいにもかかわらず、このような大きな差が得られた。この原因として D-deoxyglucose の水酸基が一つ少ないことによる親水性の低下が問題ではなく、2 位の水酸基が除かれた事による benzoxaborole との相互作用の低下が主な理由であると考えられる。

Fig. 5-10 は 2 糖(D-maltose、D-trehalose)、3 糖 (isomaltotriose) をそれぞれ 10mg/mL の濃度で添加した場合の poly(NIPAAm-st-HEAAm-st-MAAmBO)溶液(5mg/mL in PBS)の温度依存的濁度変化を示している。ポリマーのみの曇点は 34.4°C であり、種々の糖を添加した場合の曇点はそれぞれ D-maltose 34.5°C、D-trehalose 34.8°C、isomaltotriose 36.6°C であった。二糖・三糖の添加における曇点のシフトは D-glucose のそれと比して小さい

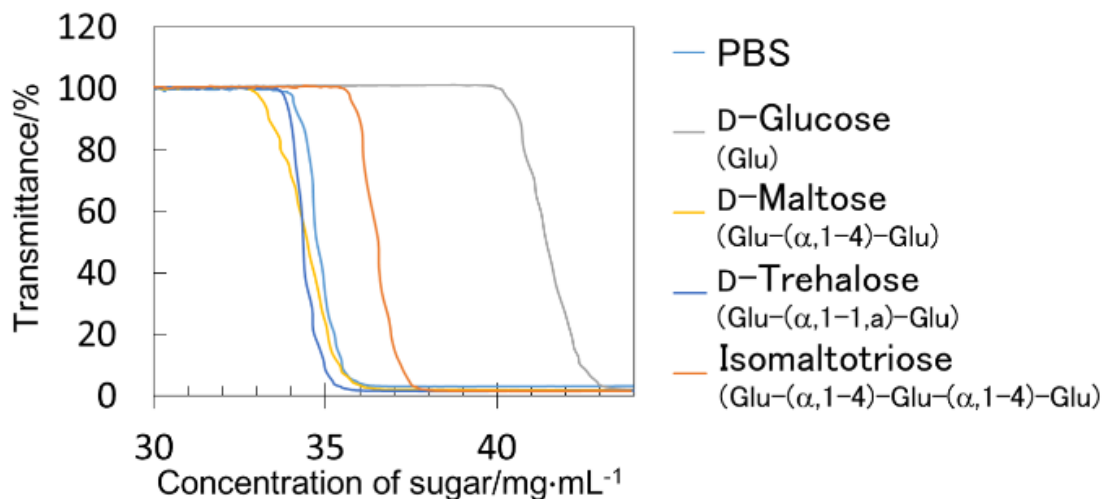


Fig. 5-10 二糖・三糖添加条件における poly(NIPAAm-st-HEAAm-st-MAAmBO)溶液の温度依存性濁度変化



ことが確認できる。測定条件的に質量で濃度を統一しているため、モル濃度で計算を行うと二糖は約半分、三糖では約 1/3 となり、曇点シフトの低下の一因であるとかんがえられる。しかし一方で、糖分子は強い親水性を有するため、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)と同数の糖が相互作用した場合、分子量の大きな糖と相互作用した高分子鎖がより親水化する事が予想される。つまりこの結果が示すことは、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)における糖認識において、新疎水性の物性変化は糖の分子量の大きさによりも相互作用する糖の量による寄与がより支配的であることが予想できる。

#### 5-3-4 糖アレイ解析を用いレクチン模倣ポリマーの糖認識機能の評価

計 98 種の一般的な糖・糖蛋白と poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)との相互作用強度を、糖アレイを用いて測定した(Fig. 5-11)。Fig. 5-11 ではトランスフェリン・チログロブリン及びアシアロ、アガラクト修飾体に特異的な相互作用を示唆する結果を示している。トランスフェリン、チログロブリンには共に N 型糖鎖を有する糖タンパク質であり、アシアロ TF,TG はタンパク上に生えている N 型糖鎖端のシアル酸を除去した糖タンパクである。また、アガラクト TF は N 型糖鎖端のシアル酸を保持しているガラクトースまでを除去したモデルであり、理論上 N-アセチルグルコサミンを最末端に有するモデルである。結果を見ると、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)はネイティブな TF,TG と比してアシアロ TF,TG とより強く相互作用する傾向を示し、一方でアガラクト化した TF では上昇した相互作用は減少し、ネイティブな TF と同様の値を示した。この結果から、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)はアシアロ化された N 型糖鎖と選択的に相互作用するとみることができ、他のガラクトース末端を有する糖鎖との特異的な相互作用は確認できなかった。この結果は、MAAmBO、及び poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)はネイティブ TFTG、と相互作用すること、また TF,TG 上の N 型糖鎖がアシアロ化された場合更に強く認識することを示している。

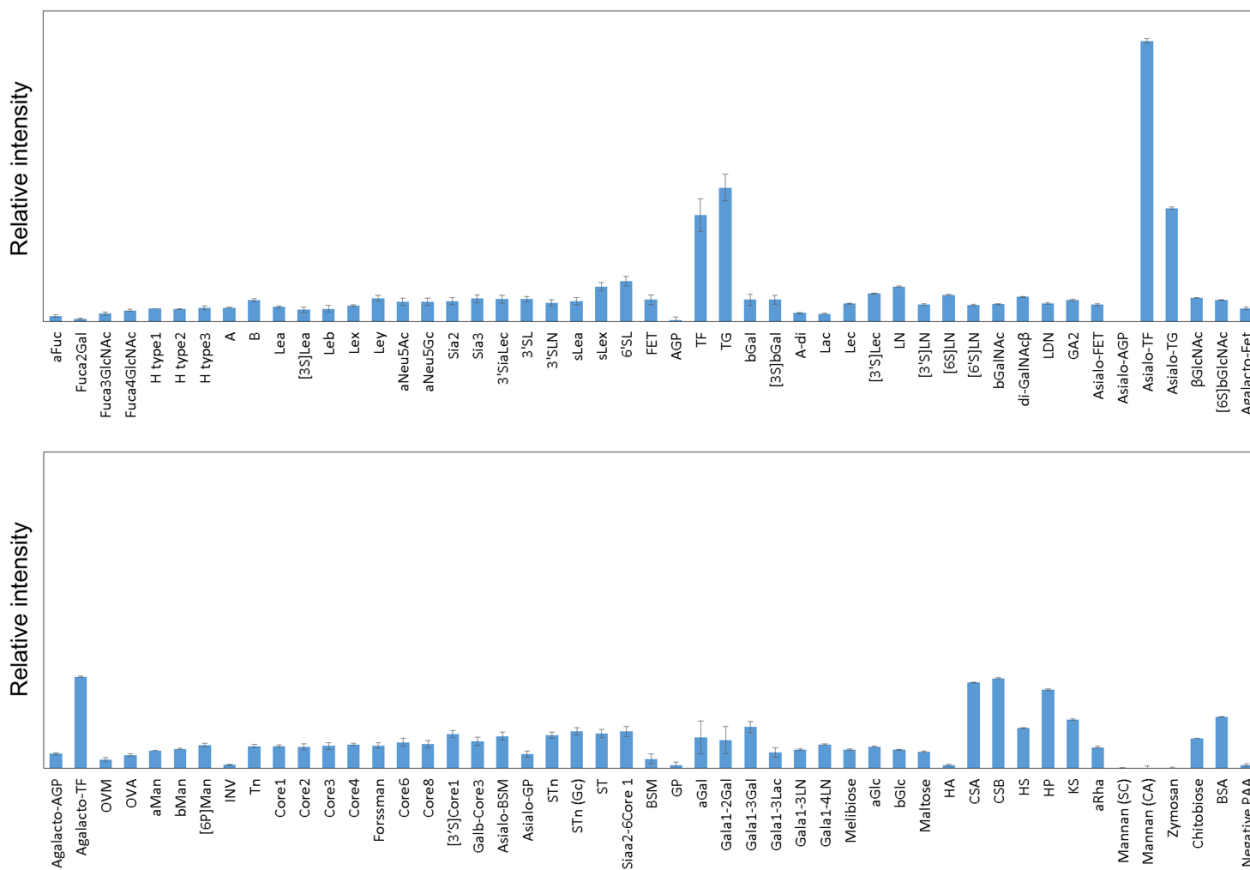


Fig. 5-11 糖鎖マイクロアレイ解析を用いた poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)の糖鎖認識特異性

Table 5-1 糖鎖マイクロレイにて評価を行った糖鎖の短縮名、提示様式、糖鎖構造 (前半)

Number	ID	Trivial name	Presentation	Glycans	Co.	Cat#
1	1	$\alpha$ Fuc	PAA	Fuc $\alpha$ 1-PAA	Gly cotech	01-007
2	100	Fuc $\alpha$ 2Gal	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-019
3	101	Fuc $\alpha$ 3GlcNAc	PAA	Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-024
4	102	Fuc $\alpha$ 4GlcNAc	PAA	Fuc $\alpha$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-025
5	2	H ty pe1	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-037
6	3	H ty pe2	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	08-034
7	4	H ty pe3	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Gly cotech	08-060
8	5	A	PAA	GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	08-091
9	6	B	PAA	Gal $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	08-092
10	7	Le <sup>a</sup>	PAA	Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-035
11	103	[3S]Le <sup>a</sup>	PAA	(3OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-040
12	8	Le <sup>b</sup>	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	08-042
13	9	Le <sup>x</sup>	PAA	Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-036
14	10	Le <sup>y</sup>	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	08-043
15	11	$\alpha$ Neu5Ac	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-PAA	Gly cotech	01-012
16	12	$\alpha$ Neu5Gc	PAA	Neu5Gc $\alpha$ 2-PAA	Gly cotech	01-051
17	13	Sia2	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-PAA	Gly cotech	08-064
18	14	Sia3	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-PAA	Gly cotech	01-081
19	15	3'SiaLe <sup>c</sup>	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-078
20	16	3'SL	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-038
21	17	3'SLN	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-077
22	18	sLe <sup>a</sup>	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	08-044
23	19	sLe <sup>x</sup>	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-045
24	20	6'SL	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-039
25	21	FET	Gly coprotein	Fetuin (Complex-ty pe N-gly cans and O-gly cans)	Sigma	F3004
26	22	AGP	Gly coprotein	$\alpha$ 1-acid gly coprotein (Complex-ty pe N-gly cans-)	Sigma	G9885
27	23	TF	Gly coprotein	Transferrin (Complex-ty pe N-gly cans)	Sigma	T3309
28	24	TG	Gly coprotein	Porcine thy roglobulin (Complex and high-mannose-ty pe N-	Sigma	T1126
29	25	$\beta$ Gal	PAA	Gal $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-004
30	27	[3S] $\beta$ Gal	PAA	(3OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-015
31	104	A-di	PAA	GalNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-017
32	28	Lac	PAA	Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-021
33	29	Le <sup>c</sup>	PAA	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-020
34	30	[3'S]Le <sup>c</sup>	PAA	(3OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-062
35	31	LN	PAA	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-022
36	32	[3'S]LN	PAA	(3OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-061
37	105	[6S]LN	PAA	Gal $\beta$ 1-4(6OSO <sub>3</sub> )GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-066
38	33	[6'S]LN	PAA	(6OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-068
39	26	$\beta$ GalNAc	PAA	GalNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-011
40	106	di-GalNAc $\beta$	PAA	GalNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-070
41	34	LDN	PAA	GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-057
42	35	GA2	PAA	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	08-074
43	36	Asialo-FET	Gly coprotein	Asialo fetuin (Desialy lated complex-ty pe N- and O-gly cans)	Sigma	F3004 (Acid-
44	37	Asialo-AGP	Gly coprotein	Asialo $\alpha$ 1-acid gly coprotein (Desialy lated complex-ty pe N-	Sigma	G9885 (Acid-
45	38	Asialo-TF	Gly coprotein	Asialo transferrin (Desialy lated complex-ty pe N-gly cans)	Sigma	T3309 (Acid-
46	39	Asialo-TG	Gly coprotein	Asialo porcine thy roglobulin (Desialy lated complex-ty pe N-	Sigma	T1126 (Acid-
47	40	$\beta$ GlcNAc	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-009
48	41	[6S] $\beta$ GlcNAc	PAA	(6OSO <sub>3</sub> )GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Gly cotech	01-016
49	42	Agalacto-Fet	Gly coprotein	Agalacto fetuin (Agalactosy lated complex-ty pe N- and O-	Sigma	F3004
50	43	Agalacto-AGP	Gly coprotein	Agalacto $\alpha$ 1-acid gly coprotein (Agalactosy lated complex-ty pe N-	Sigma	G9885

Table 5-2 糖鎖マイクロアレイにて評価を行った糖鎖の短縮名、提示様式、糖鎖構造 (後半)

Number	ID	Trivial name	Presentation	Glycans	Co.	Cat#
51	44	Agalacto-TF	Gly coprotein	Agalacto transferrin (Agalactosylated complex-type N-glycans)	Sigma	T3309
52	45	OVN	Gly coprotein	Ovomucoid (Complex-type N-glycans)	Sigma	T2011
53	46	OVA	Gly coprotein	Ovalbumin (Hybrid-type N-glycans)	Sigma	A2512
54	47	$\alpha$ Man	PAA	Man $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-005
55	48	$\beta$ Man	PAA	Man $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-050
56	49	[6P]Man	PAA	(6OPO <sub>3</sub> )Man $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-006
57	50	INV	Gly coprotein	Yeast invertase (High mannose-type N-glycans)	Sigma	I4504
58	51	Tn	PAA	GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-010
59	52	Core1	PAA	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	08-023
60	53	Core2	PAA	Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-083
61	54	Core3	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-071
62	55	Core4	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-089
63	56	Core5	PAA	GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-026
64	57	Core6	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-072
65	58	Core8	PAA	Gal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-028
66	59	[3'S]Core1	PAA	(3OSO <sub>2</sub> )Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	08-069
67	60	Gal $\beta$ -Core3	PAA	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-116
68	61	Asialo-BSM	Gly coprotein	Asialo bovine submaxillary mucin (Tn)	Sigma	M3895 (Acid)
69	62	Asialo-GP	Gly coprotein	Asialo human glycoporphin MN (T)	Sigma	A9791 (Acid)
70	63	STn	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-059
71	64	STn (Gc)	PAA	Neu5Gc $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-107
72	65	ST	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-088
73	66	Sia $\alpha$ 2-6Core 1	PAA	Gal $\beta$ 1-3(Neu5Ac $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-113
74	67	BSM	Gly coprotein	Bovine submaxillary mucin (Sialyl Tn)	Sigma	M3895
75	68	GP	Gly coprotein	Human glycoporphin (Disialyl T and sialyl Tn)	Sigma	G5017
76	69	$\alpha$ Gal	PAA	Gal $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-003
77	107	Gal $\alpha$ 1-2Gal	PAA	Gal $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-056
78	108	Gal $\alpha$ 1-3Gal	PAA	Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-018
79	70	Gal $\alpha$ 1-3Lac	PAA	Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-075
80	71	Gal $\alpha$ 1-3LN	PAA	Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-079
81	72	Gal $\alpha$ 1-4LN	PAA	Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-110
82	73	Melibiose	PAA	Gal $\alpha$ 1-6Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-063
83	74	$\alpha$ Glc	PAA	Glc $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-001
84	75	$\beta$ Glc	PAA	Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-002
85	76	Maltose	PAA	Glc $\alpha$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotech	01-054
86	77	HA	BSA	Hyaluronic acid-BSA	Seikagaku	400720
87	78	CSA	BSA	Chondroitin Sulfate A-BSA	Seikagaku	400655
88	79	CSB	BSA	Chondroitin Sulfate B-BSA	Seikagaku	400660
89	80	HS	BSA	Heparan Sulfate-BSA	Seikagaku	400700
90	81	HP	BSA	Heparin-BSA	Calbiochem	375095
91	82	KS	BSA	Keratan Sulfate-BSA	Seikagaku	400760
92	83	$\alpha$ Rha	PAA	Rhamnose $\alpha$ 1-PAA	Glycotech	01-008
93	84	Mannan (SC)	Gly coprotein	<i>S. cerevisiae</i> mannan	Sigma	M7504
94	85	Mannan (CA)	Gly coprotein	<i>C. albicans</i> mannan	Takara	MG001
95	86	Zy mosan	Gly coprotein	Zy mosan	Sigma	Z4250
96	97	Chitobiose	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotech	08-057
97	98	BSA	BSA	-	Sigma	A7638
98	99	Negative PAA	PAA	-	Glycotech	01-000

## 5-4 結言

本章にて作製した高分子の主要構成成分は NIPAAm から成り立っており、NIPAAm は温度に応答して水に対する相溶性を大きく変化させる挙動を示すことが知られており、また、その際の温度は高分子鎖の親水性に大きく影響をうけることが知られている。これを踏まえ、得られた高分子を PBS 中に溶解し、単糖(D-glucose、D-fructose、D-psicose)を種々の濃度で添加し、加温していった際の PBS に対する相溶性の変化を追跡した。溶液温度が 30°C の場合は全ての条件で溶液は透明であったが、温度の上昇に伴って無添加、D-glucose、D-fructose、D-psicose の順に白濁していった。また、糖種・濃度依存的な高分子溶液の  $T_{CP}$  (Cloud point) の変化も確認できた。濃度 10mg/mL における D-glucose、D-fructose、D-psicose の  $T_{CP}$  変化量( $\Delta T_{CP}$ )はそれぞれ、6.8°C、22.7°C、42.9°C であった。この傾向は、D-psicose が benzoxaborole に対して最も高い親和性を有することを示唆している。次に、Benzoxaborole 基の光学活性識別能についてグルコース誘導体を用いて評価した。結果として、D-glucose、L-glucose、どちらを添加した高分子溶液においても、同様の温度依存濁度変化プロファイルを示した。このことは、benzoxaborole が単糖の認識に於いては光学活性を認識し得ないということを示唆している。一方で、通常のグルコースよりも一つ水酸基が少ない 2-deoxy-D-glucose を添加した条件では、糖未添加群と同様の濁度プロファイルを示した。通常のグルコースは、4 つの水酸基を有し、組み合わせとして、3 組の cis-diol を有しているが、2-deoxy-D-glucose では 2 位の水酸基が失われているため、cis-diol は 1 組のみしか存在していない。この構造上の差が、2-deoxy-D-glucose が benzoxaborole に対して相互作用を示さない原因であると考えた。また、poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO) の 2 糖、3 糖への相互作用強度も評価した。D-glucose、D-maltose、D-trehalose、isomaltotriose (10mg/mL) の  $T_{CP}$  はそれぞれ 41.4°C、34.5°C、34.4°C、36.6°C ( $\Delta T_{CP}$  = 6.8、-0.3、-0.2、1.8) であった。興味深いことに、2 糖、及び 3 糖は単糖と比して  $\Delta T_{CP}$  が小さいことが明らかとなった。この原因として、本実験系は添加する糖の量を質量で固定していたため、同じ質量の糖を加えていても、系中の糖分子の数に差が生じたことが原因として考えられる。

最後に著者は、複合糖質マイクロアレイを用いて作製した高分子と計 98 種の糖鎖との相互作用強度を測定した。GP (ヒトグリコホリン) はネガティブコントロール(Negative PAA)と同様の親和性を示したが、Asialo-TF は約 100 倍の親和性を示した。また、CSA(コンドロイチン硫酸)および HS(ヘパラン硫酸)のようなムコ多糖類も MAAmBO と相互作用することを示し、Negative PAA と比較して約 40 倍の親和性を示した。トランスフェリン(TF)、アシアロトランスフェリン(Asialo-TF) およびアガラクトトランスフェリン(Agalacto-TF)については、興味深い結合強度の傾向が観察された。トランスフェリンは N 型糖鎖を表面に担持する糖タンパク質である。アシアロトランスフェリンは、アシアロ化(末端脱シアル酸化)された N 型糖鎖を有するトランスフェリンであり、アガラクトトランスフェリンは、末端ガラクトースとシアル酸が除去された N 型糖鎖を担持する糖タンパク質である。傾向として、天然のトランスフェリンと比してアシアロ化されたトランスフェリンは約 2.5 倍の親和性を示したが、アガラクト化したトランスフェリンでは天然トランスフェリンと同様の親和性を示した。この結果は単純に benzoxaborole とガラクトースの高親和性を示唆するものであるが、一方でガラクトース担持アレイ(aGal)に対して良い親和性を示していない。このような結果から、benzoxaborole はトランスフェリン上のアシアロ化された N 型糖鎖と特異的に識別するというを示唆するものであると考えられる。

本章では、温度応答性高分子の速やかな相転移挙動と Benzoxaborole 基の糖認識機能を組み合わせることで、棟種・添加濃度に応じた温度依存濁度プロファイルを測定することに成功し、MAAmBO が単糖、二・三糖に対する親和性を評価することに成功した。加えて、糖鎖固定化マイクロアレイを用いることで実際に生体内に存在している種々の糖鎖に対する親和性について一定の知見を得ることに成功した。

## 参考文献

- 1 Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N., What should be called a lectin? *Nature* **1980**, *285*, 66.
- 2 LANDSTEINER, K., Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Kli Wchnschr* **1901**, *14*, 1132-1134.
- 3 Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- 4 Gagneux, P.; Varki, A., Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* **1999**, *9*, 747-755.
- 5 Ohno, M.; Nishikawa, A.; Koketsu, M.; Taga, H.; Endo, Y.; Hada, T.; Higashino, K.; Taniguchi, N., Enzymatic basis of sugar structures of  $\alpha$ -fetoprotein in hepatoma and hepatoblastoma cell lines: Correlation with activities of  $\alpha$ 1-6 fucosyltransferase and N-acetylglucosaminyltransferases III and V. *International Journal of Cancer* **1992**, *51*, 315-317.
- 6 Hada, T.; Kondo, M.; Yasukawa, K.; Amuro, Y.; Higashino, K., Discrimination of liver cirrhosis from chronic hepatitis by measuring the ratio of Aleuria aurantia lectin-reactive serum cholinesterase to immunoreactive protein. *Clinica Chimica Acta* **1999**, *281*, 37-46.
- 7 Aoki, D.; Nozawa, S.; Iizuka, R.; Kawakami, H.; Hirano, H., Differences in lectin binding patterns of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma, with special reference to staining with Ulex europeus agglutinin I and peanut agglutinin. *Gynecologic Oncology* **1990**, *37*, 338-345.
- 8 Okuyama, N.; Ide, Y.; Nakano, M.; Nakagawa, T.; Yamanaka, K.; Moriwaki, K.; Murata, K.; Ohigashi, H.; Yokoyama, S.; Eguchi, H.; Ishikawa, O.; Ito, T.; Kato, M.; Kasahara, A.; Kawano, S.; Gu, J.; Taniguchi, N.; Miyoshi, E., Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *International Journal of Cancer* **2006**, *118*, 2803-2808.
- 9 Tateno, H.; Toyota, M.; Saito, S.; Onuma, Y.; Ito, Y.; Hiemori, K.; Fukumura, M.; Matsushima, A.; Nakanishi, M.; Ohnuma, K.; Akutsu, H.; Umezawa, A.; Horimoto, K.; Hirabayashi, J.; Asashima, M., Glycome Diagnosis of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Lectin Microarray. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 20345-20353.
- 10 Šulák, O.; Cioci, G.; Delia, M.; Lahmann, M.; Varrot, A.; Imberty, A.; Wimmerová, M., A TNF-like trimeric lectin domain from Burkholderia cenocepacia with specificity for fucosylated human histo-blood group antigens. *Structure* **2010**, *18*, 59-72.

- 11 Liang, Y.-J.; Kuo, H.-H.; Lin, C.-H.; Chen, Y.-Y.; Yang, B.-C.; Cheng, Y.-Y.; Yu, A. L.; Khoo, K.-H.; Yu, J., Switching of the core structures of glycosphingolipids from globo- and lacto- to ganglio-series upon human embryonic stem cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 22564-22569.
- 12 Tateno, H.; Saito, S.; Hiemori, K.; Kiyoi, K.; Hasehira, K.; Toyoda, M.; Onuma, Y.; Ito, Y.; Akutsu, H.; Hirabayashi, J.,  $\alpha$ 2–6 sialylation is a marker of the differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *Glycobiology* **2016**, *26*, 1328-1337.
- 13 Shimomura, O.; Oda, T.; Tateno, H.; Ozawa, Y.; Kimura, S.; Sakashita, S.; Noguchi, M.; Hirabayashi, J.; Asashima, M.; Ohkohchi, N., A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin–Drug Conjugate (LDC). *Molecular Cancer Therapeutics* **2018**, *17*, 183-195.
- 14 Tateno, H.; Onuma, Y.; Ito, Y.; Minoshima, F.; Saito, S.; Shimizu, M.; Aiki, Y.; Asashima, M.; Hirabayashi, J., Elimination of Tumorigenic Human Pluripotent Stem Cells by a Recombinant Lectin-Toxin Fusion Protein. *Stem Cell Reports* **2015**, *4*, 811-820.
- 15 Zhang, D.; Xu, C.; Manwani, D.; Frenette, P. S., Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood* **2016**, *127*, 801-809.
- 16 Matsumoto, A.; Ishii, T.; Nishida, J.; Matsumoto, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., A Synthetic Approach Toward a Self-Regulated Insulin Delivery System. *Angewandte Chemie* **2012**, *124*, 2166-2170.
- 17 Bérubé, M.; Dowlut, M.; Hall, D. G., Benzoboroxoles as Efficient Glycopyranoside-Binding Agents in Physiological Conditions: Structure and Selectivity of Complex Formation. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6471-6479.
- 18 Lu, H.; Wang, Y.; Li, L.; Kotsuchibashi, Y.; Narain, R.; Zeng, H., Temperature- and pH-Responsive Benzoboroxole-Based Polymers for Flocculation and Enhanced Dewatering of Fine Particle Suspensions. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7*, 27176-27187.
- 19 Wang, Y.; Li, L.; Kotsuchibashi, Y.; Vshyvenko, S.; Liu, Y.; Hall, D.; Zeng, H.; Narain, R., Self-Healing and Injectable Shear Thinning Hydrogels Based on Dynamic Oxaborole-Diol Covalent Cross-Linking. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2016**, *2*, 2315-2323.

## 6章 結言

本論文では、細胞膜上の分子認識機構を介して生理機能を制御可能な高分子の設計を行い、細胞の生理活性を制御しうる高分子の創製に成功した。その結果を以下にまとめる。

1章では生体内における分子認識の重要性や、高分子材料を用いて細胞を操作する手法の重要性について論じた。加えて、生体模倣という視点から高分子を設計した場合の高機能性についても紹介した。これら2点の材料設計戦略を元に、幅広い応用を目指した高分子設計の議論を行った。

2章では、アポトーシス細胞が有する抗炎症部位(PS 基)を側鎖に有するメタクリル系モノマー(MPS)の合成に成功した。また、MPSの重合体であるpoly(MPS)の合成も同時成功した。メタクリル系モノマーは他種のビニル系モノマーと共重合が可能であるため、さらなる機能化が見込まれる。

3章ではpoly(MPS)の生理活性を評価した。まず、poly-MPSをマクロファージに播種した場合、炎症活性を抑制することが明らかとなった。その際、蛍光標識を行ったpoly-MPSをマクロファージに添加した場合、マクロファージ膜上ではなく細胞質へと移行するという知見を得た。加えて、マクロファージへと移行するpoly-MPSの量と抗炎症活性にはある一定の相関が存在することが明らかとなり、具体的には1細胞につき50 pg以上のpoly(MPS)が分配された場合に炎症活性が有意に抑制されるという結果を得た。また、MPSとMPC(ホスファチジルコリン模倣モノマー)とランダム共重合が可能であるということも明らかとし、MPSとMPCのランダム共重合体により優れた抗炎症活性を有するということが明らかとなった。この結果はアポトーシス細胞模倣高分子を合成する上で、高度な分子設計が可能であることを示すと同時に分子設計の重要性を示す結果となった。

4章では、抗炎症活性を有するホスホリルセリン基(PS 基)をラジカル重合系ではない、ポリエーテル・エステル系の高分子や、重合後の高分子に対して簡便に導入する手法を確立した。同時に作製したPS導入高分子が抗炎症活性を有することを明らかとした。本章の成果はPCLやPEG、Ploxamerといった生体応用実績のある高分子材料に対する効率的な機能付加(抗炎症活性の付加)が可能であるということを示唆する結果であり、2章の結果と本章の合成手法を併用することで、今日バイオマテリアルとして活用されている高分子材料の殆どを機能化可能であることが明らかとなった。

5章では、糖認識機能を有する高分子(benzoxaborole 基含有高分子)を作製し、単糖、二糖、三糖、及び糖鎖に対してそれぞれ親和性を有することが明らかとなった。単糖における相互作用強度において、グルコース、フルクトース、ブシコースの順に強くなっていくことが確認できた。また、グルコースの光学異性体を用いた評価によってbenzoxaboroleが光学異性体を見分け得ないという知見を得た。また、二糖、三糖における認識の種類・濃度依存的な認識強度を評価し、単糖と比べると非常に弱いという結果を得た。また、実際の細胞膜上に担持されている種々の糖鎖(計98種)に対する特異的認識能について、マイクロアレイ法によって評価した結果、糖鎖、糖蛋白種に依存して特異的な相互作用が確認できた。これらの結果は今回作製した高分子が人工レクチンとしての活用可能性を示している。

これまでの生体材料開発において材料自身が生理活性を有するというコンセプトは希であったが、本論文は一定のレベルでこのコンセプトを実現した。今後は、抗炎症効果や糖認識機能を有する高分子が様々な疾病の治療に応用展開することが期待される。また、“材料による治療”という概念のさらなる普及を期待する。



## 発表リスト

## 【学術誌への掲載】

1. Ryo Takai, Rio Kurimoto, **Yasuhiro Nakagawa**, Yohei Kotsuchibashi, Koki Namekawa, and Mitsuhiro Ebara, “Towards a Rational Design of Zeolite-Polymer Composite Nanofibers for Efficient Adsorption of Creatinine”  
*J. Nanometer*. **2016**, Article ID 5638905, pp7.
2. Diana Diaz-Dussan, **Yasuhiro Nakagawa**, Yi-Yang Peng, Leslie V. Sanchez C, Mitsuhiro Ebara, Piyush Kumar, and Ravin Narain, *ACS Macro Lett.* **2017**, 6(7), 768-774.
3. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi, Masanobu Naito, and Mitsuhiro Ebara, “Apoptotic Cell Membrane-Inspired Polymer for Immunosuppression”, *ACS Macro Letters* **2017**, 6 (9), 1020-1024.
4. **Yasuhiro Nakagawa**, Hiroaki Tateno, and Mitsuhiro Ebara, “Investigation of Selective Recognition of Sugars using Lectin-inspired Temperature-responsive Polymers”, *Chemistry Letters* **2018**, 47 (2), 134-137.
5. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi, and Mitsuhiro Ebara, “Rational Design of Anti-inflammatory Polymers Inspired by Apoptotic Cell Death using Phosphoramidite Chemistry”, *Polymer* **2018**, 134, 85-93.

## 【その他執筆】

1. 新山瑛理, **中川泰宏**, 荏原充宏: バイオマテリアル(菊池明彦編), 特集: 免疫系とバイオマテリアル「免疫反応を制御する高分子材料の設計」, 日本バイオマテリアル学会, 2015年.
2. Yohei Kotsuchibashi, **Yasuhiro Nakagawa**, and Mitsuhiro Ebara, “Biomaterials Nanoarchitectonics; 2.1 - Nanoparticles”, 2016, Elsevier.
3. **Yasuhiro Nakagawa**, Mitsuhiro Ebara  
“Materials Nanoarchitectonics: Nano-Technology to Nano-Architectonics; 6.4 - Immunoengineering” in press, Wiley.

## 【国際会議における発表】

1. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Mitsuhiro Ebara and Takao Aoyagi  
“Synthesis and Characterization of Phosphoryl Serine-derived Temperature-responsive Polymers for Anti-inflammatory Therapy”  
**MANA International Symposium 2014**, つくば、2014年3月5-7日(ポスター発表)

2. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Mitsuhiro Ebara and Takao Aoyagi  
“Synthesis and characterization of phosphoryl serine-derived temperature-responsive polymers for anti-inflammatory therapy”  
**International Symposium on Smart Biomaterials - 2nd Hoffman Family Symposium** -, つくば、2014年3月24-25日(ポスター発表)
3. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Mitsuhiro Ebara and Takao Aoyagi  
“Synthesis and Characterization of Phosphoryl Serine-derived Polymers”  
**NIMS Conference 2014**、つくば、2014年7月1-2日(ポスター発表)
4. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Mitsuhiro Ebara and Takao Aoyagi  
“Synthesis and Characterization of Phosphoryl Serine-derived Polymers for Anti-inflammation”  
**The 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC 2014)**、つくば、2014年12月2-5日(ポスター発表)
5. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara  
“Apoptotic Cell Membrane-inspired Nanomaterials for Anti-inflammatory Therapy.”  
**MANA International Symposium 2015**、つくば、2013年3月11-13日(ポスター発表)
6. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara  
“Apoptotic Cell Membrane-inspired Nanomaterials for Anti-inflammatory Therapy.”  
**International Symposium on Smart Biomaterials - 3rd Hoffman Family Symposium** -, Chonnam, Korea,  
2015年3月19-20日
7. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Mitsuhiro Ebara and Takao Aoyagi  
“Immunosuppressive Effect of Apoptotic Cell Membrane Mimetic Materials”  
**NIMS Conference 2015**、  
つくば、2015年7月14-15日(ポスター発表)
8. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Mitsuhiro Ebara and Takao Aoyagi  
“Phosphatidylserine-based Polymers for Immune Cell Activity Control”  
**International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology**、  
つくば、2015年7月29-30日(ポスター発表)
9. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara  
“Apoptotic Cell Membrane-inspired Nanomaterials for Immunomodulation”  
**MANA International Symposium 2016**、  
つくば、2016年3月9-11日(ポスター発表)

10. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara  
“Apoptotic Cell Membrane-inspired Nanomaterials for Immunomodulation”  
**MANA International Symposium 2016**,  
つくば、2016年3月9-11日(ポスター発表)
11. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara  
“Immunomodulatory Effects of Apoptotic Cell Membrane Mimetic Materials on Macrophages”  
**2nd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology**,  
Mauritius、2016年8月1-4日(ポスター発表)
12. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara  
“Apoptotic cell membrane inspired polymers for immunomodulation”  
**Tsukuba Global Science Week 2016**,  
つくば、2016年9月17-19日(ポスター発表)
13. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara  
“Apoptotic cell membrane inspired polymers for immunomodulation”  
**2016 2nd International Symposium on Biointerface Science and Engineering**,  
Taiwan、2016年9月21-23日(ポスター発表)
14. **Yasuhiro Nakagawa**, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara  
“Design of Apoptotic Cell Membrane Mimetic Polymers for Anti-inflammatory Therapy”  
**The 11th SPSJ International Polymer Conference**,  
Fukuoka、2016年12月13-16日(ポスター発表)

【国内学会における発表】

1. **中川 泰宏**、齋藤 充弘、荏原 充宏、青柳 隆夫  
“アポトーシス細胞の細胞膜表面を模倣した炎症制御能を有する新規材料の開発”  
**第35回日本バイオマテリアル学会大会**,  
東京、2013年11月25-26日(ポスター発表：日本語)
2. **中川 泰宏**、齋藤 充弘、荏原 充宏、青柳 隆夫  
“アポトーシス細胞膜表面構造を模倣したホスホリルセリン基含有高分子の合成と評価”  
**つくば医工連携フォーラム 2014**,  
つくば、2014年1月28日(ポスター発表：日本語)
3. **中川 泰宏**、齋藤 充弘、荏原 充宏、青柳 隆夫  
“アポトーシス細胞膜表面構造を模倣したホスホリルセリン基含有高分子の合成と評価”  
**第63回高分子学会年次大会**,  
名古屋、2014年5月28-30日(口頭発表：英語)

4. 中川 泰宏、齋藤 充弘、荏原 充宏、青柳 隆夫  
“炎症治療を目指したアポトーシス細胞模倣高分子の合成と評価”  
つくば医工連携フォーラム 2015、  
つくば、2015年1月23日(ポスター発表：日本語)
5. 中川 泰宏、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“Synthesis and Characterization of Apoptotic cellular membrane mimetic polymers for Anti-inflammatory Therapy”  
第64回高分子学会年次大会、  
北海道、2015年5月27-29日(口頭発表：英語)
6. 中川 泰宏、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“抗炎症治療を目的としたホスファチジルセリン誘導體含有高分子の合成と評価”  
第64回高分子学会年次大会、  
北海道、2015年5月27-29日(ポスター発表：日本語)
7. 中川 泰宏、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“抗炎症治療へむけたアポトーシス細胞模倣インテリジェント高分子の開発”  
第25回インテリジェント材料・システムシンポジウム、  
東京、2016年1月8日(口頭：日本語)
8. 中川 泰宏、齋藤 充弘、荏原 充宏、青柳 隆夫  
“抗炎症治療を目指したアポトーシス細胞膜模倣高分子の開発”  
つくば医工連携フォーラム 2016、  
つくば、2016年1月22日(ポスター発表：日本語)
9. 中川 泰宏、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“『高分子材料による炎症治療』を目的としたアポトーシス細胞模倣高分子の開発”  
第65回高分子学会年次大会、  
神戸、2016年5月25-27日(口頭発表：日本語)
10. 中川 泰宏、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“アポトーシス細胞模倣高分子による $\beta$ アミロイド誘発性神経炎症の抑制効果”  
第65回高分子学会年次大会、  
神戸、2016年5月25-27日(ポスター発表：日本語)
11. 中川 泰宏、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“Immunomodulatory Effect of Apoptotic Cell Membrane Inspired Polymer (MPS) for Post-inflammatory Therapy”  
第65回高分子討論会、  
神奈川、2016年9月14-16日(口頭発表：英語)
12. 中川 泰宏、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“脳内免疫細胞による炎症を抑制しうるアポトーシス細胞膜模倣型リン脂質ポリマー(MPS)の合成と評価”

**第65回高分子討論会、**

神奈川、2016年9月14-16日(ポスター発表：日本語)

13. 米岡 修一郎、朴 基哲、**中川 泰宏**、荏原 充宏、塚原 剛彦  
“Synthesis and Evaluation of Poly[Nisopropylacrylamide]-based Boron Containing Polymer Nanomicelle”  
**第65回高分子討論会、**  
神奈川、2016年9月14-16日(口頭発表：英語)
14. 米岡 修一郎、**中川 泰宏**、荏原 充宏、塚原 剛彦  
“フェニルボロン酸誘導体ベンゾキソボロールポリマーによる不活化センダイウイルス(HVJ-E)の機能化”  
**第65回高分子討論会、** 神奈川、2016年9月14-16日(ポスター発表：日本語)
15. **中川 泰宏**、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“材料による抗炎症治療の実現に向けたアポトーシス細胞模倣高分子の合成と評価”  
**日本化学会秋季事業 第6回 CSJ 化学フェスタ 2016、**  
東京、2016年11月14-16日(ポスター発表：日本語)
16. **中川 泰宏**、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“抗炎症治療を目的としたアポトーシス細胞膜模倣高分子の合成と評価”  
**日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2016、**  
福岡、2016年11月21-22日(ポスター発表：日本語)
17. **中川 泰宏**、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“抗炎症治療を目指したアポトーシス細胞膜模倣高分子による免疫改質効果”  
**第26回 日本MRS年次大会、**  
横浜、2016年12月19-22日(口頭発表：日本語)
18. 米岡 修一郎、朴 基哲、**中川 泰宏**、荏原 充宏、塚原 剛彦  
“ホウ素中性子捕捉療法用薬剤を志向した新規ポリマーナノミセルの合成と細胞毒性評価”  
**第12回再処理・リサイクル部会セミナー、**  
東京、2016年12月26日(口頭発表：日本語)
19. **中川 泰宏**、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“アポトーシス細胞を模倣したリン脂質系高分子の抗炎症能評価”  
**つくば医工連携フォーラム 2017、**  
つくば、2017年1月20日(ポスター発表：日本語)
20. **中川 泰宏**、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏  
“Design of Apoptotic Cell Membrane Mimetic Polymers and Its Immunosuppressive Effect”  
**第66回高分子学会年次大会、**  
千葉、2017年5月29-31日(口頭発表：英語)
21. **中川 泰宏**、齋藤 充弘、青柳 隆夫、荏原 充宏

“ベンゾキサポロール基含有高分子による糖認識機能とその特異性の評価”

第66回高分子学会年次大会、

千葉、2017年5月29-31日(ポスター発表：日本語)

22. **中川 泰宏**、館野 浩章、荏原 充宏

“アポトーシス細胞に特異的な膜構造を模倣したホスファチジルセリンポリマー(MPS)の抗炎症効果”

第70回日本酸化ストレス学会学術集会、

つくば、2017年6月28-29日(口頭発表：日本語)

【受賞など】

1. Yasuhiro Nakagawa ”Outstanding Student Award for Poster Presentation”  
(International Symposium on Smart Biomaterials) March, 2015.
2. 中川 泰宏 ”優秀ポスター賞”  
(第64回高分子年次大会) 2015年5月
3. 中川 泰宏 “トビタテ！留学JAPAN 第3期奨学生 採用”  
2015年6月
4. 中川 泰宏 ”平成28年度 NIMS 理事長賞(貢献賞)”  
2016年4月
5. 中川 泰宏 “優秀ポスター発表賞”  
(日本化学会秋季事業 第6回 CSJ 化学フェスタ 2016) 2016年12月
6. Yasuhiro Nakagawa “Editor’s Choice, Cover Picture 採用”  
(Chemistry Letters 2018, 47(2))

【報道】

日刊工業新聞 紙面掲載 17面 2013年9月11日

Science Portal Web 掲載 2013年11月11日

産経新聞 紙面掲載 27面 2014年3月27日

日本経済新聞 紙面掲載 35面 2014年4月18日

SANSPO.COM オンライン掲載 2014年4月21日

産経新聞 紙面掲載 24面 2014年4月21日

日本経済新聞 紙面掲載 37面 2015年9月29日

常陽新聞 紙面掲載 1面 2016年7月13日

朝日新聞 紙面掲載 28面 2016年10月5日

読売新聞 紙面掲載 33面 2016年7月13日

毎日新聞 紙面掲載 31面 2016年7月23日

読売新聞 紙面掲載 33面 2016年10月23日  
茨城新聞 紙面掲載 19面 2017年1月18日  
NHK NEWS WEB オンライン掲載 2016年12月2日  
The Economist September 16th 2017, p.71  
NHK ニュース (茨城県域) 2016年12月1日  
NHK ニュース (茨城県域) 2016年12月1日  
茨城ニュース いば6 2016年12月1日  
茨城ニュース 845 2016年12月1日

#### 【広報活動】

サイエンスアゴラ 2013, 2013年11月  
つくばアクションプロジェクト(T-ACT)にて学生オーガナイザーとして企画「サイエンス・コミュニケーショントレーニング」の発案・運営, 2014年11月-2015年4月  
茨城空港科学イベント, 2014年7月  
つくば科学フェスティバル 2014, 2014年11月  
平成27年度 NIMS 一般公開, 2015年4月  
つくば科学出前レクチャー, 2015年6-10月  
つくばサイエンスラボ 2015, 2015年11月  
平成28年度 NIMS オープンハウス, 2016年4月  
イノベーションキャンパス in つくば 2016, 2016年8月  
美濃市青少年健全育成「市民のつどい2016」, 2016年10月  
つくばサイエンスラボ 2016, 2016年11月  
科学フェスタ in 茨城空港, 2016年11月  
平成29年度 小・中・高校生の科学体験学習支援事業 (笠間市立南小学校), 2017年1月  
平成29年度 NIMS 一般公開, 2017年4月  
いばらき子ども大学, 2017年8月  
つくばサイエンスラボ 2017, 2017年11月  
第5回科学の甲子園ジュニア全国大会, 2017年12月  
平成29年度 小・中・高校生の科学体験学習支援事業 (堺町立静小学校), 2018年2月

## 【謝辞】

博士課程を修了するにあたり終始暖かく、多大なご支援・ご指導と激励を賜りました、筑波大学大学院 数理物質研究科学科 准教授 荏原 充宏 博士に深く感謝申し上げます。

博士論文の執筆にあたり、ご指導・ご助言を賜りました筑波大学大学院 数理物質科学研究科 教授 長崎 幸夫 博士、教授 Guoping Chen 博士、准教授 内藤 昌信 博士、准教授 田口 哲志 博士に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、丁寧なご指導・ご助言を賜りました日本大学 理工学部 物質応用化学科 教授 青柳 隆夫 博士、大阪大学 医学系研究科特任准教授 齋藤 充弘 博士、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 細胞グライコーム標的技術グループ グループ長 舘野 浩章 博士、北海道大学大学院 生命科学院生命科学 准教授 山崎 智彦 博士、大阪大学医学部附属病院 未来医療開発部 特任准教授 李 千萬 博士に深く感謝申し上げます。

日々の実験・研究室生活においてご指導くださいました、物質・材料研究機構 グループリーダー 中西 淳 博士、主任研究員 上木 岳士 博士、主任研究員 吉川 千晶 博士、ICYS 研究員 宇都 甲一郎 博士、山本 翔太 博士、静岡理工科大学 講師 小土橋陽平 博士、日本医療科学大学 保健医療学部 助教授 滑川 亘希 博士、法政大学 生命科学部 環境応用化学科・理工学研究科 井戸田 直和 専任講師に深く感謝申し上げます。

2015年9-12月まで留学先としてお世話になりました、University of Alberta Chemical and Materials Engineering 教授 Ravin Narain 博士、Yinan Wang 博士、Diana Diaz 氏、Dan Zhang 氏、Yi-Yang Peng 氏、Christopher Afacan 氏、Han Lu 氏、Pallavi Bhambri 氏、Juan David Tibocha Bonilla 氏に深く感謝申し上げます。

本研究の進行にあたり、日々の生活を支えていただいた Giancarlo Forte 博士、Kim Young-Jin 博士、Wei-Chin Lin 博士、Mano Sharmy Saimon 博士、Baiyao Xu 博士、Qinghui Shou 博士、岡田 孝春 博士、佐藤 健 博士、安田 翔吾 氏、秋元 優徳 氏、吉武 春佳 氏、新山 瑛理 氏、高井 僚 氏、野村 奈生人 氏、田辺 貫太 氏、柘植 美礼 氏、矢野 宥人 氏、大内 創介 氏、Elfire Polat 氏に感謝申し上げます。

また、日々の生活で切磋琢磨し、支え合えた同期の仲間として、栗本 理央 博士、杉浦 栞理 博士、水田 亮 博士 (五十音順)に感謝申し上げます。

日々の研究業務を遂行するにあたり、事務手続きなどで幅広く手助け頂きました、荏原 愛 博士、廣山 昌子 氏、金田 尚子 氏、笠屋 しいな 氏、佐伯 純子 氏、飛鷹 房子 氏、松本 美友希 氏、伊藤 芳江 氏に感謝申し上げます。

アウトリーチ活動を行うにあたり多大なるご支援をいただきました、物質・材料研究機構 MANA アウトリーチチームの葉山 雅 氏、立石 美紀氏、松井 龍也 氏、津毛 邦仁 氏、Difei Miao 氏に深く感謝申し上げます。



本研究は、NIMS ジュニア研究員として遂行されたものであり、この支援があつてこそ有意義な五年間を過ごすことができたものであり、ここに感謝の意を示します。

私、中川泰宏が筑波大学大学院にて過ごすことができた実りある5年間は、筑波大学の職員の皆様、物質・材料研究機構の職員の皆様、筑波大学の先輩・同期・後輩の皆様をはじめとした、私に関わって下さった全ての方々の尽きないご理解・ご協力の元に成り立っておりました。私に関わって下さいました全ての方々に今一度、心より御礼申し上げます。

最後に、日頃から温かく見守り支えて頂いた家族に心より感謝致します。

2018年2月

中川 泰宏