

酵素触媒を活用した高分子ハイドロゲルの作製と医療応用に向けた基礎研究

森山, 幸祐

<https://doi.org/10.15017/1500669>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

氏 名 : 森山 幸祐

論 文 名 : 酵素触媒を活用した高分子ハイドロゲルの作製と
医療応用に向けた基礎研究

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

高分子ハイドロゲルは、高分子鎖から構成されるネットワークに溶媒を包含するにより生じるユニークな特性から、基礎から応用に至る幅広い分野において利用されている。特に、組織工学やドラッグデリバリーシステム等の医療分野への応用を目的とした場合、生理活性を有する小分子やタンパク質、あるいは細胞そのものに対して穏和な条件下でゲル形成が可能であることが望まれる。酵素反応を利用したハイドロゲル作製法はこの条件を満たしており、また、酵素濃度を変化させることでゲル化速度を容易に制御できる点は、魅力的な特性であると考えられる。本研究では、酵素として過酸化水素(H_2O_2)存在下においてフェノール性水酸基(Ph-OH基)間の重合反応を触媒する西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)に着目し、その触媒反応を利用した高分子ハイドロゲルの作製を試みた。

本小論の構成は以下の通りである。

第一章は序論であり、高分子ハイドロゲルの基材と作製法に関する既往の研究例と、医療分野における高分子ハイドロゲルの応用例について纏めた。

第二章では、HRP触媒反応を用いることで、タンパク質が部位特異的に固定化された機能性ハイドロゲルの作製を試みた。合成高分子の一種である直鎖型ポリエチレングリコール(PEG)の両末端にHRPの基質であるPh-OH基を修飾した新規高分子材料(PEG-Ph-OH)を用いた。また、対象タンパク質としてはビタミンの一種であるビオチンと強く相互作用するストレプトアビジン(SA)を選択し、遺伝子工学的手法によりそのC末端側にPh-OH基を持つアミノ酸であるチロシンを含むペプチドタグを導入した組換えSAを用いた。PEG-Ph-OH、組換えSA及びHRP混合溶液中に、 H_2O_2 水溶液を添加することでSAが固定化されたハイブリッドゲルを調製した。得られたハイブリッドゲルは、その内部にビオチン化した小分子やタンパク質を固定化することが可能であったことから、組換えSAが機能を失うことなく高分子ネットワーク内に組み込まれていることが明らかとなった。以上より、HRP触媒反応を利用した機能性ハイドロゲルの作製に成功した。

第三章では、前章で合成したPEG-Ph-OHゲル化剤の医療用材料としての有用性を評価した。具体的には分子量の異なるPEG-Ph-OHを合成し、ゲル化剤の分子量がハイドロゲルの物理特性に及ぼす影響を検討した。その結果、PEG-Ph-OHの分子量及び各成分の濃度を変化させることで、高分子水溶液のゲル化時間を数秒~数分の範囲内で制御することができた。また、得られるゲルの膨潤率並びに貯蔵弾性率等の物理特性の制御も可能であったことから、PEG-Ph-OHはインジェクタブルゲルとして利用可能な材料であることが明らかとなった。また高分子水溶液に哺乳類由来細胞を分散さ

せた後、HRP触媒反応を作用させることで、ゲル内への細胞包括を行った結果、 H_2O_2 濃度を適切に設定することで細胞の生存率を高く維持したまま、ゲル内に包埋することが可能であった。

第四章では、既往のHRP触媒反応を利用したゲル化法の問題点であった H_2O_2 水溶液の外部添加が不要な新たなゲル化システムの確立を目指した。酸化剤として細胞毒性を示す H_2O_2 水溶液を、高分子とHRPの混合溶液中に外部から添加する手法では、系中において一時的且つ局所的に H_2O_2 が高濃度となる。そこで、系中に自発的に発生する H_2O_2 を利用する系の構築のため、フェノキシラジカルからチオール基（SH基）へのラジカル転移反応に着目し、SH基間の架橋と H_2O_2 分子の生成が連動する新たなゲル化システムを確立した。具体的には、SH基が修飾された4分岐型PEG、HRPの混合水溶液中に小分子フェノール誘導体を添加することで、生理条件下においてジスルフィド結合を架橋点としたハイドロゲルが得られた。ゲル内への細胞包括を試みた結果、包括細胞は極めて高い生存率を維持していた。また、システイン水溶液を用いたゲルの溶解により、高い生存率を維持したまま細胞を回収することも可能であった。以上のことから、本ゲル化法は包括対象物に対し穏和で安全性の高いゲル化法であることが示された。

第五章では本小論の総括を行い、本研究の今後の展望について述べた。

〔作成要領〕

1. 用紙はA4判上質紙を使用すること。
2. 原則として、文字サイズ10.5ポイントとする。
3. 左右2センチ，上下2.5センチ程度をあげ，ページ数は記入しないこと。
4. 要旨は2,000字程度にまとめること。
(英文の場合は，2ページ以内にまとめること。)

5. 図表・図式等は随意に使用のこと。
6. ワードプロ浄書すること（手書きする場合は楷書体）。

この様式で提出された書類は，「九州大学博士学位論文内容の要旨及び審査結果の要旨」の原稿として写真印刷するので，鮮明な原稿をクリップ止めで提出すること。