

学位論文要旨

フェニルボロン酸導入グルコース応答性ゲルに関する研究

小島 裕

機械（マシン）は、外力に抵抗し得る物体の結合からなり、一定の相対運動をなし、外部から与えられたエネルギーを有用な仕事に変形するものと定義されており、身の回りにあるマシンの例を挙げると、エンジンやモーターがある。これらのマシンは、ほとんどが金属や無機化合物から構成されている。一方で、医療分野において、生体適合性の観点から有機化合物で構成されるマシンが望まれ、盛んに研究が行われている。有機化合物のみからなるマシンの構成要素の一つとして、刺激応答性ゲルがある。

ゲルとは、溶媒に不溶の三次元網目構造を持つ高分子およびその膨潤体と定義される。このゲルに刺激応答性分子を修飾したものを刺激応答性ゲルという。これは、熱・電気・光・pH変化・特定分子の存在などの外界の情報を感知して応答する分子マシンとして機能する。例えば、刺激に応答して崩壊する、刺激に応答して膨潤する、あるいは、刺激に応答して収縮するなどの機能をマシンに付与することができる。

本研究では、ゲルに糖応答性を持たせるために、糖応答性分子であるフェニルボロン酸（PBA）を用いた。PBAは、糖を含めたポリオール構造を有する化合物と可逆的にエステル結合を形成し、負電荷を帯びる性質を持つ。このPBAを、ゲルを構成する高分子鎖の末端に、ゲルの主鎖構造中に、または、ゲルの架橋点に、導入することで刺激応答性ゲルとして機能することが期待できる。

シクロデキストリン（CyD）は、グルコースが連なった環状オリゴ糖である。CyDの持つ空孔には、化合物を包接することができる。包接される分子は、低分子のみならず、ポリエチレングリコール（PEG）などの高分子もあり、ロタキサン（RX）やポリロタキサン（PRX）を形成する。これらを構成する環状分子と線状分子の間には化学的な結合が存在しないため、環状分子は線状分子上で回転したり、線状分子に沿ってスライドすることができる特徴を持つ。また末端にかさ高い基を有さないシュード（ポリ）ロタキサン（p(P)RX）の場合、スライドにより可逆的な崩壊と再形成が生じ得る。このような構造をゲルに組み込むことにより、ゲルの高機能化が期待できる。

本研究では、ゲル網目構造の各部位にフェニルボロン酸を導入することで分子マシンとして機能するグルコース応答性ゲルを調製した。さらにシクロデキストリンを組み合わせることでそのゲルの高機能化を試みた。

このようなグルコースに応答して反応するゲルを組み込んだ分子マシンは、糖尿病の診断や治療への応用が期待できる。

第1章では、グルコースに応答して崩壊するマシンの調製を目指して、高分子鎖の末端にPBAを導入したPBA-PEGを用いて、刺激応答性材料の調製を行った。PBA-PEGとヒドロキシル基を多く持つPVAを組み合わせることにより、ゲルが得られた。このゲルは、グルコースを添加することで、崩壊した。また、PBA-PEGと α -CyDあるいは γ -CyDを組み合わせることにより、pPRXが得られた。これらのpPRXの刺激応答性を濁度変化により評価した。どちらのpPRXもグルコースの添加により溶解した。しかし、pPRXをペンタエリスリトールで繋いでゲル化させることを試みたが、pPRXの溶解性を制御することが困難であったことから、達成できなかった。

第2章では、ゲルの主鎖構造中に PBA を導入し、グルコースに応答して膨潤あるいは収縮するゲルの調製を行った。主鎖分子として重合可能で親水性のアクリルアミドを用い、ラジカル重合によりゲルを調製した。主鎖に PBA を導入したゲルは、グルコース含有緩衝液に浸すことで、ゲル質量が増加し、ゲルが膨潤した。さらに、グルコース含有緩衝液とグルコース非含有緩衝液に繰り返し浸すことで、ゲル質量の増減が観察され、ゲルが膨潤-収縮の繰り返し応答を示すことが明らかになった。このゲルの膨潤メカニズムは、PBA とグルコースが結合することで PBA が負電荷を帯び、この負電荷によって、対イオンが引き寄せられてゲル中の浸透圧が上昇し、水が流入するによると考えられる。主鎖に PBA とともに3級アミノ基を導入したゲルは、グルコース含有緩衝液に浸すことで、ゲル重量が減少し、ゲルが収縮した。グルコース含有緩衝液-塩酸-グルコース非含有緩衝液と外液を変更することで繰り返しの質量の増減が観察され、ゲルの収縮-膨潤が繰り返し生じることが明らかとなった。このゲルの収縮メカニズムには、両性イオンの静電的引力と電荷の打ち消しあいによるゲル内浸透圧の減少に加えて、グルコースによる架橋が寄与していると考えられる。主鎖に導入する官能基の構成を変えることで、グルコースに応答して膨潤または収縮するゲルが調製可能であることが示された。また、これらのゲルを用いて、グルコースメーターやゲルバルブのようなマシンの作製が可能であることを示した。

第3章では、ゲルの架橋点に PBA を導入したグルコース応答性スライドリングゲル (PBA-SRgel) の調製を行った。PEG と α -CyD からなる PRX を、1か所に PBA を修飾した塩化シアヌルで架橋し、ゲルを調製した。PBA-SRgel は、糖含有緩衝液に浸すことで、質量が増加した。PBA を導入する部位を架橋点に変えてもグルコースに応答して膨潤するゲルが調製可能であることが示された。また、構造破壊において、スライドリング架橋に関連すると思われる特異な挙動を示すことを明らかとした。

第4章では、応答性の向上やより良い繰り返し応答性を目指して、架橋部分がスライドして伸縮するゲルの調製を行った。すなわち、架橋部分に片末端にビニル基、もう片末端にかさ高い基をもつ PEG と γ -CyD からなるロタキサン構造を組み込むことによって、架橋構造が伸びるゲルを調製した。このゲルをグルコース含有緩衝液に浸すことで、ゲル質量の増加あるいは減少が観察された。さらに、第2章のゲルと比較して低いグルコース濃度における膨潤および収縮の応答性が向上することが示された。また、ビニル基を修飾した PRX を用いてゲルを調製することで、ポリロタキサン構造を架橋点に持つゲルを調製した。このゲルにおいても、グルコース含有緩衝液に浸すことで、ゲル質量の増加あるいは減少が観察された。グルコース含有緩衝液とグルコース非含有緩衝液に繰り返し浸すことで、ゲル質量の増減が観察された。架橋部分にロタキサン構造をもつゲルと比較して、ひずみを元に戻そうという効果が加わり、繰り返し応答性が改善されることが示された。

これらの成果をもとに、グルコースへの結合性の改善や架橋密度の最適化を行うことで、より高い機能を有する刺激応答性ゲルの調製が可能と考えられる。

研究で得られたゲルは、その性能を向上させることによって、薬学分野で以下のような応用が考えられる。すなわち、グルコースに応答して収縮するゲルと膨潤するゲルを組み合わせることによるステロイドや向精神薬などを服用中の患者に生じる薬剤性高血糖の副作用発現をチェックする血糖測定マシンや、インスリンなどの血糖降下薬を含有または保持させておき、グルコースに応答して崩壊もしくは収縮するゲルからなるゲルバルブを含む薬物放出マシンなどへの応用が可能と期待できる。

Thesis abstract

Study on glucose-responsive gels with phenylboronic acid

Yu kojima

Machines are defined as things consisting of a combination of objects able to resist external force, to perform pre-determined relative motion, and to transform external energy into useful work. Examples include engines and motors. Most of these are composed of metals or inorganic compounds. On the other hand, in the medical field, a machine composed of organic compound is desirable from the perspective of biocompatibility and that has been actively studied. One of the machine elements composed of only organic compounds is stimuli-responsive gel.

Gels are defined as insoluble polymers having three dimensional network structures in solvents, and their swollen form. A gel modified with stimuli-responsive molecules is called a stimuli-responsive gel. This functions as a molecular machine that senses and responds to external information such as heat, electricity, light, pH change, and the presence of specific molecules. For example, it can provide a machine with an ability to respond to stimuli and disintegrate, or to respond to stimuli and swell, or to respond to stimuli and shrink.

In this study, I used phenylboronic acid (PBA) which is a sugar-responsive molecule to achieve sugar-responsiveness in gels. PBA reversibly forms an ester bond with a polyol compound, including sugar. By introducing PBA to a polymer terminal to form a gel, to a main chain to form a gel or to a cross-link point to form a gel, that gel can be expected to function as a stimuli-responsive gel.

Cyclodextrin (CyD) is a cyclic oligosaccharide composed of several D-glucoses bound by an α -1,4-glycosidic bond. CyD composed of seven or nine glucose units is called α -CyD or γ -CyD. The CyD cavity can hold a compound. The trapped molecules can be not only small molecules but also a polymer such as polyethylene glycol (PEG). By trapping the molecules, CyD can form rotaxane (RX) or polyrotaxane (PRX). It has a characteristic that the cyclic molecules can rotate on the axis molecules and slide along the axis molecules, so that there is no chemical bond between the cyclic molecules and the axis molecules of the (P)RX. In addition, in the case of pseudo(poly)rotaxane (p(P)RX) which does not have a bulky moiety on the end, it can reversibly disintegrate and re-form by the sliding of the cyclic molecules. Higher functionalization of a gel can be expected by incorporating this kind of structure.

In this study, I prepared glucose-responsive gels that work as molecular machines by introducing PBA to each moiety of gel network structures. In addition, I tried high functionalization of gels by combining CyD.

In chapter one, I prepared stimuli-responsive materials using PBA-modified PEG (PBA-PEG) aiming for a preparation of glucose-responsive disintegration machines. The PBA-PEG is a PEG with PBA molecules introduced to both ends. The gel is obtained by combining PBA-PEG and polyvinyl alcohol which has many hydroxyl groups. This gel disintegrated by adding glucose. Moreover, pPRX(PBA-PEG/CyD)s are obtained by combining PBA-PEG and α -CyD or γ -CyD. Stimuli-responsiveness of those pPRX(PBA-PEG/CyD)s is evaluated by turbidity change measurement. Both pPRX(PBA-PEG/CyD)s dissolved by adding glucose. However, gelations were tried by connecting pPRX(PBA-PEG/CyD)s and pentaerythritol, and a gel was not obtained because it was difficult to control the solubility of the pPRX(PBA-PEG/CyD)s.

In chapter two, I prepared gels to respond to glucose and swell or to respond to glucose and shrink by introducing PBA to a main chain to form a gel. Gels were prepared by radical polymerization using a polymerizable and

hydrophilic acrylamide as the main chain molecule. The gel with PBA introduced on the main chain increased its weight and swelled when immersed in the 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) buffer with glucose. Moreover, the increase and decrease of this gel weight was observed by repeatedly immersing it in the HEPES buffer with and without glucose. It was revealed that this gel show repeated responsiveness of swelling and shrinking. The swelling mechanism of this gel is thought to be as follows. PBA takes on negative charges by binding with glucose. The negative charges attract counter ions increasing gel osmotic pressure and water flows into the gel. The gel with PBA and a tertiary amino group introduced on the main chain decreased its weight and shrank when immersed in the HEPES buffer with glucose. By changing the external solution in the order of an HEPES buffer with glucose, next an HCl aqueous solution, and then an HEPES buffer, a cyclic decrease and increase of the gel weight was observed. It was revealed that this gel showed repeated responsiveness of shrinking and swelling. The shrinking mechanism of the gel is thought to be due to the electrostatic attraction of amphoteric ions, the decrease of gel osmotic pressure by charge offset, and cross-linking with glucose. By changing the configuration of the functional groups introduced on the main chain, it was shown that gels can be prepared to respond to glucose by swelling or to respond to glucose by shrinking. Moreover, it was shown that machines such as glucose meters and gel valves can be made using these gels.

In chapter three, I prepared a glucose-responsive slide-ring gel (PBA-SRgel) by introducing PBA at a cross-link point. The PBA-SRgel was prepared by cross-linking a PRX composed of PEG and α -CyD with PBA-modified cyanuric chloride. The PBA-SRgel increased its weight when immersed in an HEPES buffer with glucose or fructose. It was shown that a glucose-responsive swelling gel can also be prepared even changing the moiety where PBA is introduced to a cross-link point. In addition, in structural disorder, it was revealed that unique behavior was shown that was considered to be relevant to slide-ring cross-linkage.

In chapter four, I prepared gels for a cross-link moiety to slide, and to expand and contract aiming for improvements of glucose-responsiveness and cyclic responsiveness. By incorporating an RX structure composed of γ -CyD and PEG modified with a vinyl group at one end and a bulky moiety at the other, gels with an expanding cross-linked structure were prepared. By immersing these gels in an HEPES buffer with glucose, an increase or decrease of these weights was observed. Moreover, it was shown that the responsiveness (swelling or shrinking) was improved at a low glucose concentration over the gels of chapter two. Gels having a PRX structure at a cross-link point were also prepared using vinyl-modified PRX. In these gels, an increase or decrease of the gel weights was also observed by immersing the gels in an HEPES buffer with glucose. A cyclic increase and decrease of the gel weights was observed by repeatedly immersing them in the HEPES buffer with and without glucose. It was shown that cyclic responsiveness was improved over the gels having RX structures at cross-link points by adding the effect of restoring the strain to its lower value.

Based on these results, it is thought that a stimuli-responsive gel with a higher performance can be prepared by improving the affinity to glucose and optimizing the cross-link density. The gels obtained in this study are thought to have applications in pharmaceutical fields as follows by improving their performance. A blood sugar measurement machine combining a glucose-responsive shrinking gel and swelling gel as a sensor to know the rise of blood sugar, and a drug release machine including a gel valve composed of a glucose-responsive disintegration gel or shrinking gel having a hypoglycemic agent such as insulin.

論文審査の結果の要旨

糖尿病患者におけるインスリン (Ins) の自己注射は、血糖値の変動に合わせた精密な投与速度の制御ができないため、血糖値を十分に下げることができないことや、逆に低血糖を誘発する。これらの問題点を克服するために、血糖値をモニターし、Ins を必要なときに放出する人工膵臓システムの開発が行われてきた。そのうち、糖応答性の高分子ゲルを調製し、糖濃度に依存したゲルの膨潤と収縮による内封した Ins の放出を制御するシステムの研究が数多く報告されている。しかし、糖センサーに対する Ins の on-off 制御という優れたアイデアに基づくこれらの研究は、これまで十分な Ins 放出の制御に至っていない。ゲルは、溶媒に不溶の三次元網目構造を持つ高分子およびその膨潤体と定義され、このゲルに刺激応答性分子を修飾したものを刺激応答性ゲルという。例えば、刺激に応答して崩壊するゲル、刺激に応答して膨潤するゲル、あるいは、刺激に応答して収縮するゲルが挙げられる。

本研究では、ゲルに糖応答性を持たせるために、糖応答性分子であるフェニルボロン酸 (PBA) を用いた。PBA は、糖を含めたポリオール構造を有する化合物と可逆的にエステル結合を形成し、負電荷を帯びる性質を持つ。この PBA を、ゲルを構成する高分子鎖の末端、ゲルの主鎖構造中、またはゲルの架橋点に導入することで刺激応答性ゲルを調製した。さらに、ゲルの高機能化 (糖に応答して精緻に膨潤と収縮の繰り返すことが可能な機能等) を期待してシクロデキストリン (CyD) を組合せたグルコース応答性のゲルの作製を試みた。本研究は、このような刺激応答性ゲルの調製を 4 章に分けて評価した。

第 1 章では、ポリエチレングリコール (PEG) 高分子鎖の末端に PBA を導入した PBA-PEG を用いて、刺激応答性材料の調製を行った。ゲルの主鎖分子として選択したポリビニルアルコールと PBA-PEG を組合せることにより、グルコースに応答して崩壊するゲルが得られた。また、グルコースの添加濃度に依存してゲルの溶解性を制御できる PBA-PEG と CyD を組合せたシュードポリロタキサン (pPRX) の調製を試みた。しかし、得られた pPRX 固体から pPRX をゲル化させることは、溶解性の制御が困難であったことから、達成できなかった。

第 2 章では、ゲルの主鎖構造中に PBA を導入したグルコース応答性ゲルの調製を行った。まず、ゲルを架橋する架橋剤を合成した。分子量 1000 の PEG に 3,5-ジメチルフェニルイソシアネート (DPI) を反応させ、次に 2-メタクリロイルオキシエチルイソシアネート (MA) を反応させて、DPI-PEG1000-MA を得た。ゲルの主鎖分子としてアクリルアミド (AAM) を選択し、合成した 3-アクリルアミドフェニルボロン酸 (3-AAmPBA) と重合し、PBA-PAAm-PEGgel を得た。本ゲルは、グルコース濃度に依存して膨潤した。また、グルコースを含有する緩衝液と含有しない緩衝液に交互に浸すと膨潤と収縮が繰り返されたが、元のゲルの大きさには戻らなかった。次に、糖存在時に収縮するゲルの作成を行った。AAM、3-AAmPBA、DPI-PEG1000-MA と *N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド (DMAPAAM) を混合して重合し、PBA-DMAP-PAAm-PEGgel を得た。本ゲルは、グルコース濃度に依存して収縮した。また、グルコースを含有する緩衝液と含有しない緩衝液に交互に浸すと収縮と膨潤が繰り返された。このようにグ

ルコース濃度に対応して膨潤と収縮を繰り返す 2 種類のゲルが調製できたので、グルコースセンサーの調製を行った。更なる検討が必要なもののグルコースメーターやゲルバルブに利用する刺激応答型のゲルの作製が可能であることが示唆された。

第 3 章では、ゲルの架橋点に PBA を導入したグルコース応答性のスライドラングゲル (SRgel) の調製を行った。架橋点にそのまま PBA を導入してもグルコースに応答して膨潤するゲルが調製可能であることが示された。また、ゲルの粘弾特性 (流動曲線) にみられるゲルの構造破壊において、スライドラング架橋に関連すると思われる特異な挙動を示すことを明らかとした。

第 4 章では、応答性の向上やより良い繰り返し応答性を目指して、 γ -CyD を利用して架橋の稼働領域を広げ、ゲルの膨潤—収縮応答を改善したゲルの調製を行った。 γ -CyD に DPI-PEG-MA を加え攪拌し、ロタキサン架橋剤を調製した。これに、AAM、PBA モノマーを加えて重合し、PBA-PAAm-RXgel を得た。また、架橋部分をポリロタキサン (PRX) 構造とする PBA-PAAm-PRXgel を得た。調製した PBA-PAAm-RXgel の膨潤と収縮の応答性は向上した。さらに、ポリロタキサン構造を架橋点に用いた PBA-PAAm-PRXgel の膨潤と収縮の繰り返し応答性は著しく改善された。

以上、本研究で PBA を導入する部位を変化させ、グルコースに応答して膨潤と収縮が可能なゲルの調製に成功した。このように、本研究は新規性の高いものと判断される。加えて、これらのゲルは、血糖の上昇を知らせるセンサーに利用するグルコースに応答して収縮するゲルと膨潤するゲルを組合せた血糖測定マシンや Ins などの血糖降下薬を含有または保持させておき、グルコースに応答して崩壊もしくは収縮するゲルから薬物を制御放出するシステムなどへの応用が期待される。よって、本論文は、本研究科課程による博士 (薬学) 論文に十分値するものと判定した。