

氏名（本籍）	矢野 慎也	（高知県）
学位の種類	博士（工学）	
学位記番号	甲第 201 号	
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学位論文題目	光反応性基を結合した糖誘導体の合成と生体材料への応用に関する研究	
論文審査委員	（主査） 教授	柴田 充弘
	（副査） 教授	橋本 和明
	教授	筑紫 格
	准教授	寺本 直純
	准教授	柴田 裕史

学位論文の要旨

光反応性基を結合した糖誘導体の合成と生体材料への応用に関する研究

本論文は、多数のヒドロキシ基を有する糖に光反応性基であるシンナモイル基または液晶を発現するメソゲン基を結合した誘導体の合成、および、その薄膜の新規細胞培養基材としての応用について記述したものであり 4 章で構成される。

近年、材料の最表面層の物性制御と、これを利用した新しいデバイスの作製が課題とされている。特に生体材料においては、材料表面の性質が重要であり、材料表面をコーティングするための新規素材の開発が進められている。以前当研究室で、トレハロースの桂皮酸エステルを合成し、その光重合による薄膜の作製について報告した。シンナモイル基を有する桂皮酸誘導体は、紫外光(UV)照射により二量化し、分子間で結合することが知られている。この性質により、材料表面上で安定な架橋薄膜を容易に作製できるという利点があるが、一方で桂皮酸誘導体の光架橋生成物に関しては表面に高密度で存在する状態での毒性や細胞適合性がこれまで研究されていない。さらに、桂皮酸誘導体と液晶を組み合わせた材料が、近年、光配向性材料として注目されているが、このような材料の細胞適合性に関しても、これまでほとんど研究がなされていない。そこで、本論文では、第 1 章および第 2 章で、それぞれ、トレハロースおよびヒドロキシプロピルセルロース(HPC)を骨格とする桂皮酸誘導体を合成し、その光架橋薄膜での線維芽細胞の培養を行った。また、第 3 章および第 4 章では、液晶性を発現するメソゲンとシンナモイル基を有し、構造の異なる二種のトレハロース誘導体に対して、それぞれの液晶性を確認した上で、それらの薄膜上で線維芽細胞の培養を行い、細胞の形態観察を行った。

第 1 章では、まず、トレハロースと桂皮酸クロリドを、モル比 1:4、1:8 として混合しトレハロー

ス桂皮酸エステル(TC)を合成した。¹H-NMRスペクトルをもとに、1分子のトレハロースに結合したシンナモイル基の数(置換度)を調べたところ、概ね化学量論通りの反応が進行したことが確認された。その後、薄膜を作製し、所定時間UVの照射を行い、紫外可視分光光度計(UV-Vis)によりUV吸収スペクトルの時間依存性の測定を行った。照射時間が増加するにつれて283 nmに極大を有する吸収が減少したことから、UV照射によるシンナモイル基の光反応が進行していることが確認できた。置換度の異なるTC架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、細胞数計測およびMTT試験より、いずれの薄膜上においても接着細胞数の経時的な増加が確認できた。さらに、置換度の低いTCに比べ、置換度の高いTCにおいて、接着細胞数が多いことが分かった。

第2章では、TCにおいて見られた良好な細胞適合性がシンナモイル基かその二量体に起因するのかを調査するため、架橋なしでも薄膜を形成できるHPCを用いて桂皮酸エステルを合成し、その薄膜およびUV架橋薄膜上での細胞培養を行った。まず、仕込み比を変えてHPCと桂皮酸クロリドを反応し、異なる置換度を有するHPC桂皮酸エステル(HPC-C)を合成した。¹H-NMRスペクトルより、無水グルコースユニット一つにつき結合したシンナモイル基の数(置換度)が1.3、2.0、3.0のHPC-Cがそれぞれ生成していることが分かった。その後、薄膜を作製し、所定時間UVを照射した。置換度の異なる各HPC-Cの薄膜およびその架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、置換度が最も高いHPC-Cにおいて、接着細胞数が多く、UV架橋後においてより増殖しやすい傾向にあることが分かった。これより、細胞数の増加はシンナモイル基の二量体が起因する可能性があることが分かった。

第3章では、部分的にシンナモイル基を結合したトレハロース誘導体とメソゲン基として4-(4-ヘキシルオキシベンゾイルオキシ)フェノキシ-6-オキソヘキサン酸(HBPHA)を反応し、メソゲン基含有光反応性トレハロース誘導体(TC-HBPHA)を合成した。その後、薄膜を作製し、所定時間UVを照射した。UV照射前のTC-HBPHAについて、温度を変化させて偏光顕微鏡による観察を行ったところ、昇温時は153-180°C、降温時は168-127°Cの範囲で部分的な液晶相が確認された。UV照射後のTC-HBPHAでは、液晶の流動性が減少しているものの、UV照射前と近い温度範囲で部分的な液晶相が確認された。TC-HBPHAの架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、一部の領域で細胞がある方向に沿って連なり、増殖・伸展していた。これは、TCにメソゲン基を導入したことによって、メソゲン基の自己集積化により、マクロな領域でメソゲン基が高い密度で存在し、その領域を避けるように細胞が接着・増殖するため、このような形態になった可能性が考えられる。

第4章では、トレハロースに光反応性のメソゲン基である8-(4'-(シンナモイルオキシ)-1,1'-ビフェニル-4-イル)オキシ-8-オキソオクタン酸(CBOA)を反応させたトレハロース誘導体(T-CBOA)を合成した。第3章のTC-HBPHAと異なり、メソゲン基にシンナモイル基が結合しているため、これらがトレハロース1分子に結合している数(置換度)は互いに等しい。その後、薄膜を作製し、所定時間UVを照射した。UV吸収スペクトルの変化より、光反応が進行していることを確認した。偏光顕微鏡にて温度変化の観察を行ったところ、UV照射前のT-CBOAでは、液晶相が確認されたが、UV照射後のT-CBOAでは、流動性がなくなり、液晶相が見られなかったが、全体的なマイクロスケールのドメインが観察された。液晶状態での光架橋において、マクロな領域で生じたメソゲン基の集積部分が固定されていると考えられる。T-CBOAの架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、細胞が細長く伸展し接着しているのが観察された。メソゲン基が光反応性のシンナモイル基に直接結合していることの影響により、メソゲン基がほぼ全面に存在するため、細胞が接着する箇所が限定され、このような形態になった可能性を考えている。このような細胞の細長い伸展は、繊維上の材料や微細パ

ターン化された材料で見られることが多いが、本研究のように、均一な塗布と均一な光照射によって得られる材料を用いた例では、報告例がなく、新しい発見である。

以上、シンナモイル基を有するトレハロース、HPC 誘導体の架橋薄膜を用いた細胞培養より、シンナモイル基の二量体が多く存在する表面において良好な細胞接着性が見られ、トレハロース骨格の誘導体にメソゲン基を導入した場合には、架橋薄膜上にて細胞の形態が変化することが明らかとなった。本材料はいずれも細胞毒性を示さず、新規な生体材料への応用が期待される。

審査結果の要旨

病気や事故により機能不全に陥った組織や、その機能を再生する再生医療が発展しつつある。このような生体材料において、細胞と接触する材料表面の性質が重要であり、材料表面をコーティングするための新規素材の開発が進められている。そのなかで、光反応性基を有する材料が、最表面層の物性制御および架橋による材料の安定化により注目されている。中でも天然物由来である桂皮酸およびその誘導体は、紫外光(UV)照射により二量化し、分子間で結合することが知られている。この性質により、材料表面上で安定な架橋薄膜を容易に作製できるという利点がある一方で、桂皮酸誘導体の光架橋薄膜に関してはその毒性や細胞適合性があまり研究されていない。さらに、桂皮酸誘導体と液晶を組み合わせた材料が光配向性材料として注目されているが、このような材料の細胞適合性に関しても、これまでほとんど研究がなされていない。本論文は、多数のヒドロキシ基を有する糖に光反応性基であるシンナモイル基または液晶を発現するメソゲン基を結合した誘導体の合成、および、その薄膜の新規細胞培養基材としての応用について記述したものであり 4 章で構成される。

第 1 章では、トレハロースと桂皮酸クロリドを異なるモル比で混合し、トレハロース桂皮酸エステル(TC)を合成し、薄膜を作製した。その薄膜に対して所定時間 UV の照射を行い、UV 吸収スペクトルの時間変化の測定を行った。照射時間が増加するにつれて 283 nm に極大を有する吸収が減少したことから、UV 照射によるシンナモイル基の光反応が進行していることが確認できた。置換度の異なる二種の TC の架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、細胞数計測および MTT 試験より、いずれの薄膜上においても接着細胞数の経時的な増加が見られ、置換度の高い TC において、接着細胞数が多いことが分かった。これより、TC 薄膜に毒性はなく、シンナモイル基が多く置換している薄膜上でより細胞が増殖しやすい傾向にあることを明らかにした。

第 2 章では、TC において見られた良好な細胞適合性がシンナモイル基かその二量体に起因するのかを調査するため、架橋なしでも薄膜が作製できるヒドロキシプロピルセルロース(HPC)を用いて桂皮酸エステルを合成し、UV 照射前、照射後の薄膜上での細胞培養を行った。まず、仕込み比を変えて HPC と桂皮酸クロリドを反応し、異なる置換度を有する HPC 桂皮酸エステル(HPC-C)を合成した後、薄膜をそれぞれ作製した。その薄膜に対して所定時間 UV を照射し、UV 吸収スペクトルより、283 nm に極大を有する吸収の減少を確認したことから、HPC-C の光反応が進行していることが分かった。また、置換度の異なる各 HPC-C の架橋薄膜

上で細胞培養を行い、細胞数計測および MTT 試験による評価を行ったところ、TC と同様に、置換度が最も高い HPC-C において、接着細胞数が多く、UV 架橋後においてより増殖しやすい傾向にあることが分かった。これより、接着細胞数の増加はシナモイル基の二量体が起因する可能性が高いことを明らかとした。

第3章では、シナモイル基とメソゲン基を異なる位置に結合したトレハロース誘導体を合成して、その薄膜上での細胞挙動の観察を行った。部分的にシナモイル基を結合したトレハロース誘導体とメソゲン基として4-(4-ヘキシルオキシベンゾイルオキシ)フェノキシ-6-オキソヘキサン酸(HBPHA)を反応し、メソゲン基含有光反応性トレハロース誘導体(TC-HBPHA)を合成した後、薄膜を作製した。その薄膜に対して所定時間UVを照射し、UV吸収スペクトル測定より、シナモイル基の二量化と同時にわずかに異性化が起こっていることが示唆された。UV照射前のTC-HBPHAについて、温度を変化させて偏光顕微鏡による観察を行ったところ、部分的な液晶相が確認された。UV照射後のTC-HBPHAでは、液晶の流動性が減少しているものの、UV照射前と近い温度範囲で部分的な液晶相が確認された。TC-HBPHAの架橋薄膜上で細胞培養を行った結果、部分的に細胞が分布し、少し細長く揃って並ぶ傾向が観察された。

第4章では、トレハロースに光反応性のメソゲン基である8-(4'-(シナモイルオキシ)-1,1'-ビフェニル-4-イル)オキシ-8-オキソオクタン酸(CBOA)を反応させたトレハロース誘導体(T-CBOA)を合成し、薄膜を作製した。その薄膜に対して所定時間UVを照射し、UV吸収スペクトルの変化より、光二量化が進行していることを確認した。偏光顕微鏡にて温度変化の観察を行ったところ、UV照射前は全体的な液晶相が確認された。UV照射後のT-CBOAでは、流動性がなくなり、液晶相が見られなかった。T-CBOAの架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、細胞が細長く伸展し接着しているのが観察された。このような細胞の細長い伸展は、繊維上の材料や微細パターン化された材料で見られることが多いが、本研究のように、均一な塗布と均一な光照射によって得られる材料を用いた例は、報告例がなく、新しい発見である。

以上、本論文は光反応性基を結合した糖誘導体の合成とその光架橋薄膜についての研究を記したものであり、シナモイル基の二量体の存在が良好な細胞接着につながること、シナモイル基とメソゲン基の導入により細胞が接着しつつも特殊な挙動を示すことを明らかにし、新しい生体材料の創製につながる知見を得ており、当分野に寄与するところが非常に大きいと判断される。

従って、学位申請者の矢野慎也は、博士(工学)の学位を得る資格があると認める。

氏名(本籍) ルイス ブリト ルイス アルトゥーロ (メキシコ合衆国)