高伸展性および自己修復性を発現するヒドロゲル作製のための水素結合性高分子の開発

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所
秋山 義勝

１． はじめに

温度応答性高分子は、温度変化によって溶液中で溶解、凝集する特性を示し、下限臨界溶解温度(Lower Critical Solution Temperature (LCST))型の相分離を示すものと、上限臨界溶解温度(Upper Critical Solution Temperature, (UCST))型の相分離を示すものの 2 種類に分類される [1]。LCST 型の温度応答性高分子は水溶液中で低温では水和、溶解し、高温では脱水和、凝集する性質を有する [2]。32℃で相転移温度を示す LCST 型の温度応答性高分子、poly(*N*-isopropylacrylamide)(PIPAAm)はヒトの体温に近い LCST を持つことから、細胞培養、生体分子の分離、ドラッグデリバリーなどのバイオメディカル分野の研究で数多く報告されている [3]。一方、UCST を示す温度応答性高分子、特に生理条件下で UCST を発現する温度応答性高分子の報告は極めて少ない。UCST 型の温度応答性高分子は高分子鎖間で形成される静電的相互作用や水素結合の形成、解離によって発現することから、LCST 型の温度応答性高分子とは異なり、UCST よりも低い温度で高分子が凝集し、高温側では高分子が溶解する。バイオメディカル分野での、UCST 型の温度応答性高分子の特徴を利用した応用研究も高まりつつある。

一方、本研究提案者の予備的検討から、一般的なラジカル重合で合成した poly(*N*-acryloyl-piperidine-3-carboxamide) (PNAP3CAm)が広い温度変化の範囲ではあるが UCST 型の温度応答性高分子の挙動が示唆されている [4]。PNAP3CAm の UCST の発現はピペリジン環状に存在するカルボキサミド基を介した高分子鎖間で形成される水素結合の形成、解離によって UCST が発現すると考えている。

このような背景のもと、本研究では PNAP3CAm の UCST 型の相転移温度の発現を詳細に評価するとともに PNAP3CAm の温度変化による水素結合形成および解離現象を調べた。さらに、その高分子鎖内で形成される水素結合性能を利用した PNAP3CAm の物理架橋ゲル合合成への応用を試みた。より分子量分布が狭い PNAP3CAm の合成を目的に Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization (RAFT)（可逆付加-開裂連鎖移動）重合法を用いた。PNAP3CAm の水素結合形成能を調べる際、高分子側鎖の piperidine-carboamide の異なる異性体を合成し、それぞれの物性を比較することで高分子側鎖内での水素結合形成能についても議論した。

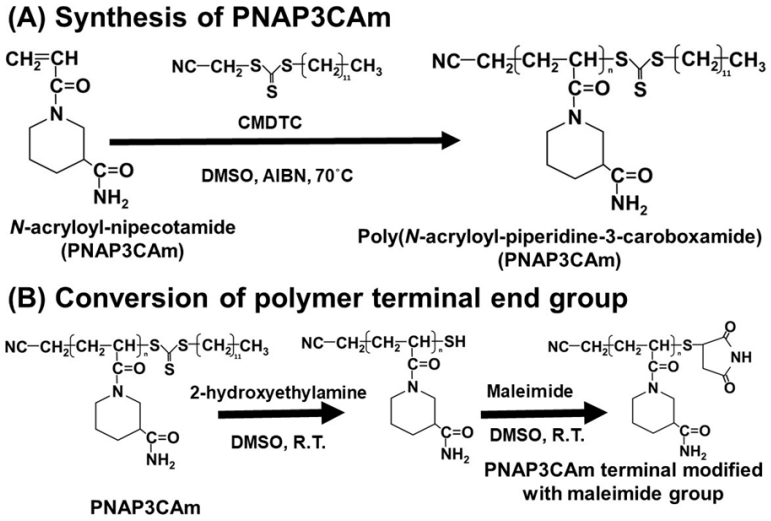
２． 実験方法

2.1. 試薬

Acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO; super dehydrated), ethanol, 2,2’-azobisisobutyronitrile (AIBN), 2-aminoethanol は富士フィルム和光純薬から購入した。 Cyanomethyl dodecyl trithiocarbonate (CMDTC), 4-((((2-carboxyethyl)thio)carbonothioyl)thio)-4-cyanopentanoic acid (CTCCA) and 4-cyano-4-(((ethylthio)carbonothioyl)thio)pentanoic acid (CECTPA)は Sigma-Aldrich から購入したものをそのまま使用した。 AIBN は methanol 溶媒で再結晶したものを利用した。

2.2. RAFT 重合による PNAP3CAm の合成

NAP3CAm（1.0 g, 5.49 × 10^{-3} mol）、連鎖移動剤（CTA）として CMDTC（8.7 mg, 2.74 × 10^{-5} mol）、開始剤として AIBN（0.9 mg, 5.49 × 10^{-6} mol）を DMSO（10 mL）に溶解した。混合溶液は 3 回の凍結・融解法によって脱気した後、減圧下環境下で重合を行った（70 ℃、4 時間）(Scheme 1(A))。重合後、反応溶液をアセトン/メタノール混合液(70:30(vol/vol))中に滴下してポリマーを沈殿させ、沈殿物をろ過、乾燥することで目的の PNAP3CAm を合成した（収率 = 91.3%）(Code 1 in Table 1)。同様に NANAm/CMDTC/AIBN のモル比および反応条件



Scheme 1. 疎水性および親水性末端基を有する PNAP3CAm の合成(A) RAFT 重合による疎水性末端基を有する PNAP3CAm の合成。(B) (A)で得られた疎水性末端基をアミノリシス反応により変換し、親水性末端基を有する PNAP3CAm を合成。疎水性の dodecyl 基は、親水性の maleimide 基へと変換された。

Table 1. 疎水性および親水性末端基を有する **PNAP3CAm** の数平均分子量（***Mn***）

Code	Molar ratio			Time (h)	*Mn*	PDI (*Mw*/*Mn*)	Temperature responsive character
	Monomer	CTA (CDTC)	Initiator (AIBN)				
1	1000	5	1	4	17800	1.38	UCST[a]
2	850	5	1	4	14100	1.36	UCST[a]
3	700	5	1	3	12400	1.35	UCST[b]
4	400	5	1	1	7500	1.32	UCST[a]
5	200	5	1	24	4100	1.27	UCST[c]
1_M	1000	5	1		18200	1.36	UCST[d]
2_M	850	5	1		14800	1.32	UCST[d]
3_M	700	5	1		13200	1.30	UCST[e]
4_M	400	5	1		7500	1.29	Soluble
5_M	200	5	1		3900	1.29	Soluble

CDTC: Cyanomethyl dodecyl trithiocarbonate, AIBN: 2,2'-azodiisobutyronitrile; [a] 0.1–0.3 wt%, [b] 0.1 wt%, [c] 0.5–6.0 wt%, [d] 6.0–1.0 wt%, [e] 8.0–2.0 wt%.

を変化させ分子量の異なる PNAP3CAm を合成した。また、異なる CTA(CTCCA や CECTPA)を用いて末端にカルボキシル基を有する PNAP3CAm も合成した。

2.3. PNAP3CAm のトリチオカルボネート末端基の修飾

既報を参考に合成した PNAP3CAm(0.5 g(Run 4 in Table 1)を DMSO(3.5mL)に溶解させ 2-aminoethanol (1.2 mL)を添加し、窒素ガスで脱酸素処理を行った[5]。DMSO(5.0 mL)に溶解した maleimide (3.9 g)を添加した。その後、窒素雰囲気下で 25 ℃、120 時間撹拌し(Scheme 1(B))、反応後、高分子溶液を acetone/methanol 混合液(40:10(vol/vol))中に滴下し高分子を沈殿、ろ過、乾燥させに目的の高分子を得た（収率 = 84.0%）。同様な方法で末端基を修飾した PNAP3CAm を合成した(Code 1_M, 2_M, 3_M, 5_M in Table 1)も同様の方法で末端基修飾を行った。

2.4.PNAP3CAm の物性評価

PNAP3CAm の末端基の修飾は ^{1}H-NMR により評価した。数平均分子量(*Mn*)は示差屈折率検出器および紫外検出器を備えた GPC システムを用いて測定した。カラムは TSKgel SuperAW4000（6.0 mm × 150 mm, 東ソー社製）を使用した。Mn の較正には、プルラン標準品およびフルクトースを使用した。溶離液には 10 mM LiBr の DMSO(HPLC grade)を使用した。カラム温度および流速は、それぞれ 45 ℃および 0.2 mL/min とした。PNAP3CAm の水溶液の温度依存的な透過率変化は UV-VIS 分光計を用いて測定した。加熱および冷却速度は 0.3 ℃/min に設定した。相転移温度(CP)は、ポリマー溶液が 90%の透過率を示した温度として定義した。

2.5 物理架橋型の PNAP3CAm ヒドロゲルの合成

光開始剤である Irgacure 2959 を 0.01wt%、モノマーである NAP3CAm がそれぞれ 10, 20, 30, 40, 50 wt%の濃度となるよう水溶液を調製した。これら水溶液を 2 cm 四方、0.5 mm 厚の型に入れ、1 時間 UV を照射して光重合した。得られたサンプルは、過剰量の水に一日浸した。また NANAm を 40 wt%とした水溶液については、1 mm 厚のハイドロゲルを作製し、10 mm/min の速さで引っ張り強度試験を行った。さらに切断したゲルについて低温処理を行い、その再接着性（自己修復性）を評価した。

３． 実験結果および考察

3.1. 疎水性末端基を有する PNAP3CAm の合成と物性評価

NAP3CAm/CTA のモル比を変化させることで、分子量(*Mn*)の異なる PNAP3CAm (*Mn*=4,100～17,800)を合成することに成功した(Table 1)。PDI は比較的狭く RAFT 重合で合成した高分子の特徴を示している。Dodecyl 基を末端に有する PNAP3CAm はリン酸緩衝液に対する溶解性が低かったが、CP を示すことが確認された(Figure 1(A))。分子量が高い PNAP3CAm の場合（*Mn* = 14,100, Run 2 in Table 1, Figure 1(A)）、CP は 0.6 wt%で 71.0 ℃(0.6 wt%)、65.6 ℃(0.3wt%)で 20.6 ℃(0.1wt%)であった。同様に *Mn* = 12,400 の PNAP3CAm(Run 3 in Table 1, Figure 1(c))では、68.9 ℃(0.4 wt%), 58.1 ℃(0.3 wt%), 50.0 ℃(0.1 wt%)の CP であった。これに対して *Mn*=4,100 未満の PNAP3CAm(Run 5 in Table 1)では、高分子は溶解し CP を示さなかった。PNAP3CAm の溶解性が低いのは、分子量がある閾値を超えると高分子鎖間で強い水素結合が形成され、溶解し

にくくなるためであると考えた。分子量が高い場合、高分子鎖は、水和よりもむしろ分子間および分子内の水素結合を優先的に形成する傾向があると考えた。

3.2. 親水性末端基を有するPNAP3CAmの合成および高分子水溶液の温度依存的な光透過率変化

末端官能基が PNAP3CAm の凝集および CP に与える影響を評価するために、親水性末端基をもつ PNAP3CAm を合成し、疎水性末端基をもつ PNAP3CAm と比較した。ここでは、既報を参考に PNAP3CAm の dodecyl 末端基をアミノリシス反応によって maleimide 基へと変換した(Scheme 1(B))。^{51}H-NMR スペクトルから、PNAP3CAm(Run 4 in Table 1)の疎水性末端基に由来するメチル基のシグナル(δ（ppm）＝0.81、Figure 2 中の赤矢印およびアスタリスク）は、アミノリシス後に消失した。このことは、dodecyl 基から maleimide 基に変換されたことを示している。マレイミド末端基を有する PNAP3CAm(Codes 2_M and 3_M in Table 1)は 1.0 wt%以上の高濃度でも PBS 溶液中に溶解した(Figure 1(B) and (D))。Dodecyl 末端基から Maleimide 基に変換させることで、PNAP3CAm の溶解性は向上した。*Mn* が 7,500 未満の場合(Code 4_M and 5_M in Table 1)、マレイミド末端基を有する PNAP3CAm は、温度に関係なく PBS 中で溶解し

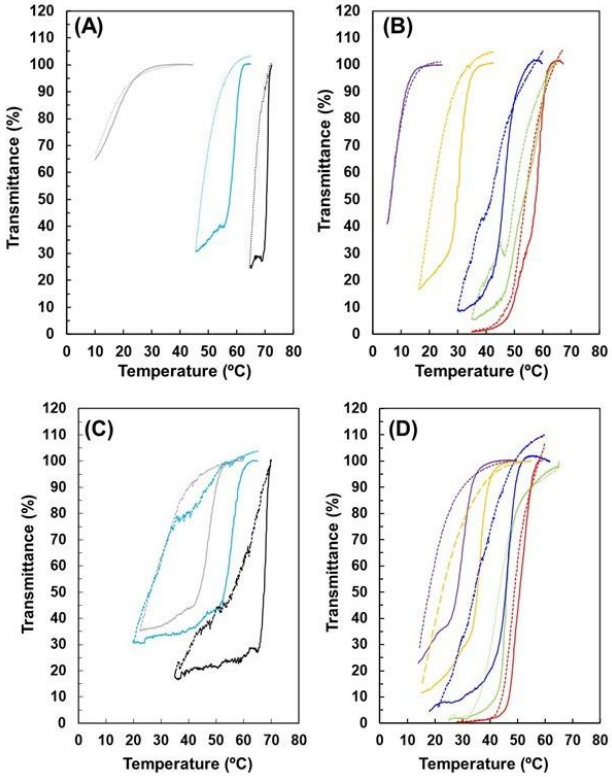


Figure 1. PNAP3CAms (Codes 2 and 3 in Table 1)の水溶液(PBS 溶液)中の温度変化にともなう透過率の変化。(A, C)：疎水性末端基(dodecyl 基)を有する PNAP3CAm、(B, D)：親水性末端基(carboxyl 基)を有する PNAP3CAm。(A) PNAP3CAm(Code 2)：0.6 wt%（黒）、0.3 wt%（シアン）、0.1 wt%（灰色）。(B) PNAP3CAm：6.0 wt%（赤）、4.0 wt%（緑）、3.0 wt%（青）、2.0 wt%（黄）、1.0 wt%（紫）。(C) PNAP3CAm(Code 3)：0.4 wt%（黒）、0.3 wt%（シアン）、0.1 wt%（灰色）。(D) PNAP3CAm：8.0 wt%（赤）、6.0 wt%（緑）、4.0 wt%（青）、3.0 wt%（黄）、2.0 wt%（紫）。実線は冷却、点線は加熱過程を示す。A と B, C と D のそれぞれの Mn は同程度のものを使用。

た。この結果は、高分子末端の maleimide 基が高分子鎖間の水素結合形成よりも高分子鎖の水和を促進することを示唆している。

3.3. PNAP3CAm の末端基および分子量（*Mn*）が温度依存的な高分子の凝集および分散に与える影響

上記の結果を踏まえ、PNAP3CAm の末端官能基や分子量(*Mn*)の違いが PNAP3CAm の温度依存的な凝集および溶解にどのように影響するかについて考察する(Figure 2)。先行研究では、RAFT 重合で合成された dodecyl 末端基を有する PIPAAm が、疎水性末端基をコアとして自己集合しミセルを形成することが示されている[6]。同様に *Mn* が 12,400 を超え、かつ疎水性末端基を有する PNAP3CAm(Codes 1, 2 , and 3 in Table 1)では、疎水性末端基がコアとして凝集するミセル構造を形成しうると考えた(Figure 2, left)。コアとなる疎水性末端基はアンカーのように機能することで PNAP3CAm の分子運動が制限され、高分子鎖同士の分子間・分子内距離は短くなる。その結果、鎖間に形成される水素結合は強くなり、CP は上昇する。この強い水素結合により、高温でも PNAP3CAm 鎖は水和されにくく、水溶液への溶解性は低くなると考えられる(Figure 1(A), 1(C) and Figure 2(A))。一方で、maleimide 基や carboxyl 基のような親水性末端基を持ち、かつ中程度の *Mn*(>13,200)を有する PNAP3CAm では高分子鎖は溶液中でより自由に運動することができる(Figure 2(B))。その結果、高分子鎖間の距離は長くなり、高分子鎖間の水素結合性も弱められる(Figure 2(B))。結果として CP は低下し 70 ℃よりも低い温度に下がると考えられる。

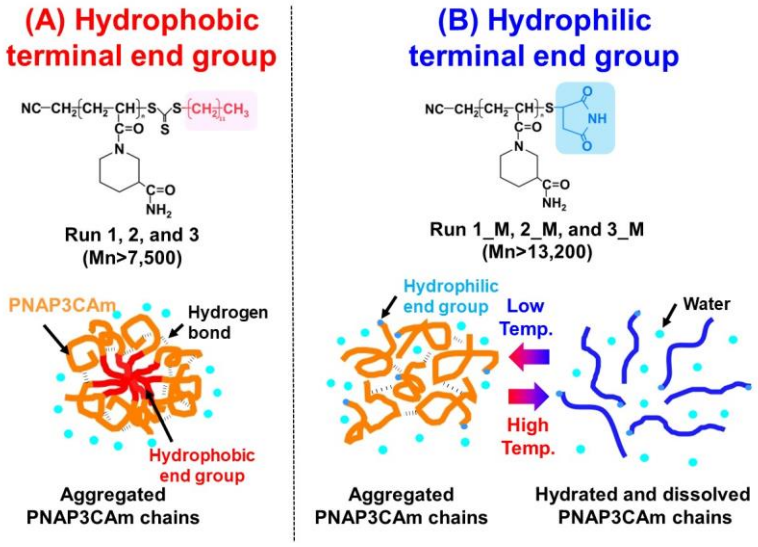


Figure 2. 高分子量 PNAP3CAm の末端官能基が CP に与える影響。(A) 疎水性末端基（赤色セグメント，(Mn > 7,500)）および (B) 親水性末端基（シアンセグメント (Mn > 13,200)）を有する PNAP3CAm。(A) 疎水性末端基が疎水性コアとして機能し、ミセル様構造を形成する。PNAP3CAm 鎖（オレンジセグメント）は互いに近接し、強い水素結合を容易に形成する。このため、疎水性末端基を持つ PNAP3CAm は、高温においても水に溶解しない。(B) マレイミドやカルボン酸などの親水性末端基は高分子鎖間で水素結合を形成する。これらの水素結合は温度変化に応じて可逆的に切断・再形成される。

Maleimide 基(Codes_4_M and 5_M in Table 1)を高分子末端に有する低分子量(Mn > 7,500)の PNAP3CAm は温度にかかわらず水に溶解した。この現象から、低分子量の場合、高分子鎖間に水素結合は形成されにくく水和されやすいと考察した(Figure 3 upper)。一方、maleimide 基(Codes 1_M, 2_M, 3_M, and 4_M in Table 1)を有し、高分子量(*Mn* < 7,500)の PNAP3CAm では、ポリマー鎖間に強い水素結合が形成されるため、高温においても完全には水に溶解しない(Figure 3、bottom)。*Mn* および末端官能基を適切に制御した場合(Codes 5, 1_M, 2_M, and 3_M in Table 1)、PNAP3CAm は高分子側鎖間における温度依存的な水素結合形成と解離を示した(Figure 3、middle)。すなわち、低温ではポリマー鎖が水素結合により凝集し、高温ではその水素結合が解離して鎖が水和される。これらの結果から PNAP3CAm の分子量を高くすることで高分子鎖間の水素結合形成能が向上することが示唆された。さらに、分子量が増加することで、高分子鎖間で形成される水素結合が強くなり、物理架橋点としてヒドロゲルが形成できるのではないかと考えた。これらの成果は以下の論文にまとめた [7]。

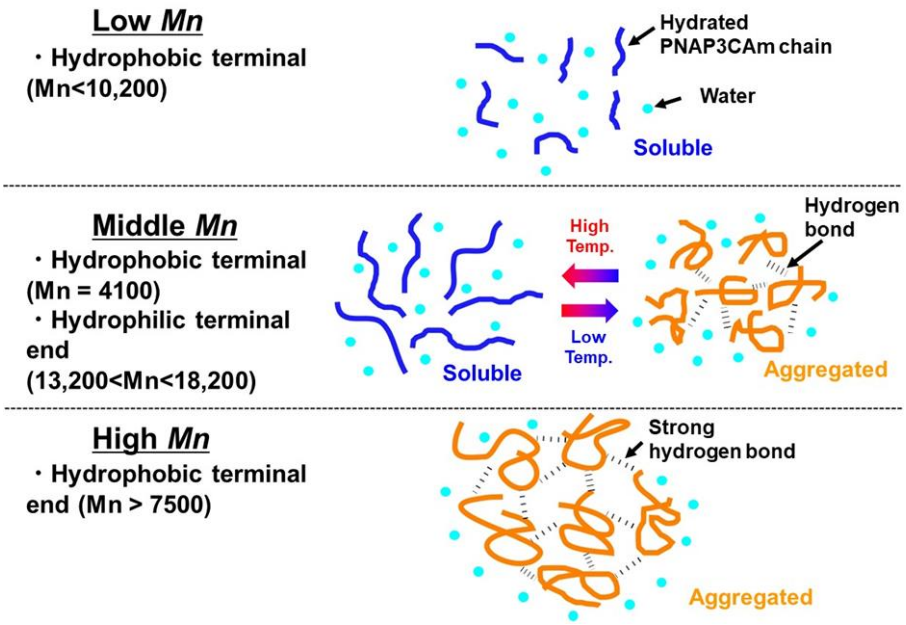


Figure 3. PNAP3CAm の相転移温度（CP）の分子量（Mn）依存性。（上段）低分子量の PNAP3CAm 鎖は、温度に関係なく良好に水和される。（中段）中程度の分子量をもつ PNAP3CAm は、高分子鎖間で分子間および分子内の水素結合を形成し、低温で凝集する。温度上昇により水素結合が解離するため、PNAP3CAm 鎖は水溶液中で可溶となる。（下段）高分子量の PNAP3CAm は鎖間で強い水素結合を形成するため、温度変化に対しても解離せず、水に溶解しない。

3.4.物理架橋型 PNAP3CAm ヒドロゲルの評価

Figure 4 に PNAP3CAm ヒドロゲルの特性を示す。合成したヒドロゲルは透明かつ 1,500%以上の伸展性を示した。さらに、切断したヒドロゲルを密着させ、低温処理を行うことでヒドロゲル同士が再接着する温度刺激による自己修復能を示した。これらの特徴は水素結合を架橋点とする物理架橋ヒドロゲルの特徴を示している。PNAP3CAm ヒドロゲルに一定の力学的な負荷を与えることで変形するが、水溶液の変形したヒドロゲルを浸漬させることで元の形状に戻る形状記憶性も示した。PNAP3CAm の異性体である、poly(*N*-acryloyl-piperidine-2-caroboxamide) (PNAP2CAm)や poly(*N*-acryloyl-piperidine-4-caroboxamide) (PNAP4CAm)はこのような性質は確

認できなかった。PNAP2CAm は水に対して難溶であり、PNAP4CAm は易溶であったことから、高分子側鎖間で水素結合を容易に形成する高分子側鎖構造として piperidine-3-caroboxamide が重要であることが示唆された。

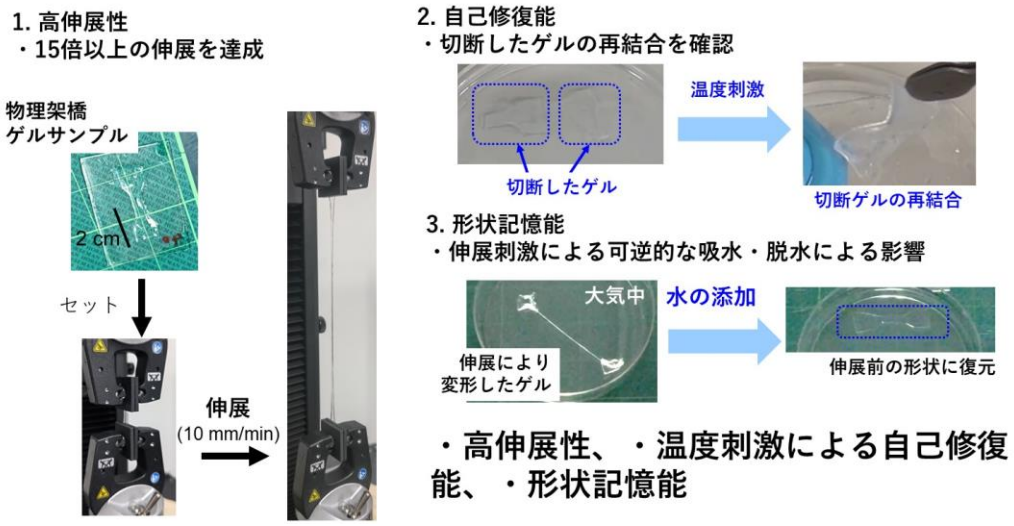


Figure 4. 物理架橋によって形成した PNAP3CAm ヒドロゲルの特徴（40wt%濃度のモノマー条件で合成した PNAP3CAm ヒドロゲル）。高分子鎖間の強い水素結合がドライビングフォースとなり高伸展性、自己修復性、形状記憶性を示す。

4. まとめ

本研究では、上限臨界溶解温度（UCST）型の温度応答性を示す新規高分子、poly(*N*-acryloyl-piperidine-3-carboxamide)（PNAP3CAm）の合成とその物性評価を行い、水素結合による温度応答性と自己修復性を備えた物理架橋ヒドロゲルへの応用を行った。RAFT 重合法を用いて分子量や末端基を精密に制御した PNAP3CAm を合成し、その高分子水溶液の温度応答性の挙動および相転移温度（CP）を評価した。その結果、分子量および末端基の親水性・疎水性が水素結合形成および CP に大きく影響することを明らかにした。また、高分子鎖間の水素結合を物理的架橋点としたヒドロゲルは、高い伸展性（1500%以上）、温度応答性の自己修復性、および形状記憶特性を示した。これらの成果は、UCST 型温度応答性高分子の新たな応用例であり、次世代のスマートバイオマテリアル開発への可能性を示すものである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人　天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

(1) Seuring, J.; Agarwal, S. Polymers with Upper Critical Solution Temperature in Aqueous Solution. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (22), 1898-1920. DOI: 10.1002/marc.201200433.

(2) Akiyama, Y. Design of Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces for Cell Sheet Engineering. *Cyborg and Bionic Systems* **2021**, *2021*, 5738457. DOI: 10.34133/2021/5738457.

(3) Akiyama, Y.; Okano, T. Temperature-Responsive Cell Culture Surface for Cell-Sheet Tissue Engineering and Its Design to Express Temperature-Dependent Cell Attachment/Detachment Character. *KOBUNSHI RONBUNSHU* **2018**, *75* (2), 174-186. DOI: 10.1295/koron.2017-0078.
(4) Akiyama, Y. Synthesis of Temperature-Responsive Polymers Containing Piperidine Carboxamide and N,N-diethylcarbamoly Piperidine Moiety *via* RAFT Polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **2021**, 2100208. DOI: https://doi.org/10.1002/marc.202100208.
(5) Akimoto, J.; Nakayama, M.; Sakai, K.; Okano, T. Molecular design of outermost surface functionalized thermoresponsive polymeric micelles with biodegradable cores. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46* (21), 7127-7137. DOI: https://doi.org/10.1002/pola.23017.
(6) Hossain, M. D.; Grandes Reyes, C. F.; Zhang, C.; Chen, S.-P. R.; Monteiro, M. J. Nonionic Polymer with Flat Upper Critical Solution Temperature Behavior in Water. *Biomacromolecules* **2022**, *23* (1), 174-181. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c01198.
(7) Akiyama, Y.; Osawa, S.; Masamune, K.; Muragaki, Y. Alteration of the upper critical solution temperature (UCST) behavior of the nonionic polymer poly(N-acryloyl-nipecotamide) by its terminal group. *Eur. Polym. J.* **2024**, *220*, 113454. DOI: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.113454.