

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05877

研究課題名(和文) 精密高分子合成技術によるホウ素中性子捕捉療法用ホウ素キャリアの創製

研究課題名(英文) Development of Boron Carrier for BNCT by Precision Polymerization Technique

研究代表者

小幡 誠 (OBATA, Makoto)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：70343267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は中性子とホウ素薬剤を利用したがん治療法です。この治療法ではホウ素が中性子を吸収したときにおこる反応を利用してがん細胞を破壊します。近年、加速器中性子源の開発により注目を集めています。しかし、ホウ素薬剤の方は利用できるものが限られており、その開発が望まれています。本研究ではBNCT用ホウ素薬剤への応用を目的として最新の高分子合成技術を用いて大量のホウ素を内包した高分子ミセルの開発を行いました。その結果、当初の分子設計とは異なる結果とはなりましたが、大量のホウ素クラスターを内包できる高分子ミセルを見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではBNCTへの応用を目指したホウ素クラスターを内包した高分子ミセルを合成することに成功しました。研究当初の分子設計通りの高分子を合成し、高分子ミセル溶液を調製することができましたが、残念ながら初期設計の高分子では細胞毒性が顕著となることを見出しました。そこで分子構造を見直し、さらに分子間力でホウ素クラスターを保持できる両親媒性ブロックコポリマーを探索したところ、高効率でホウ素クラスターを内包し、かつ細胞毒性を示さない高分子ミセルを見出しました。これはBNCT用ホウ素ドラッグデリバリーシステムの非常に有効な材料として期待されます。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) is a promising cancer treatment using neutron and boron-containing drug. This modality uses a nuclear reaction of boron with neutron to destroy malignant cells. Recently, accelerator-based neutron source have been developed, but boron-containing drug is very limited. Hence new boron-containing drug and drug delivery system are highly desired. In this study, we have developed polymer micelles containing many boron clusters by means of sophisticated polymer synthesis technique. Finally, we found novel amphiphilic block copolymer which can holds plenty of boron clusters.

研究分野：高分子合成化学

キーワード：精密重合 高分子ミセル ホウ素中性子捕捉療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は高い中性子捕獲断面積を有するホウ素(^{10}B)を薬剤とし、中性子捕捉反応で生じる粒子と ^7Li 反跳核により腫瘍細胞を破壊する治療法である。近年の加速器中性子源の開発により再び脚光を浴び始めている。中性子源の開発が進む一方、ホウ素薬剤はボロカプタイト(BSH)やボロノフェニルアラニン(BPA)しか選択肢がなく、新たなホウ素薬剤の開発が望まれている。特に、BNCTは腫瘍組織における必要な薬剤濃度が $20\sim 35\ \mu\text{g}\ ^{10}\text{B}/\text{g}$ と極めて高いことから、大量のホウ素薬剤を腫瘍組織に運搬する必要があるため、ホウ素ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が重要である。これまでにいくつかのホウ素クラスターのDDS用ポリマーが報告されているが、構造が不明確であったり重金属イオンを使用しているなどの問題を抱えていた。

2. 研究の目的

本研究では『活性エステルモノマーの制御ラジカル重合によるブロックコポリマーの合成と重合後修飾』という合成戦略により、疎水性セグメントの側鎖にホウ素クラスターを有する両親媒性ブロックコポリマーを合成し、この自己集積化により高度にホウ素を集積した高分子ミセルの創製を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アミノ基を有する *m*-カルボラン誘導体の合成

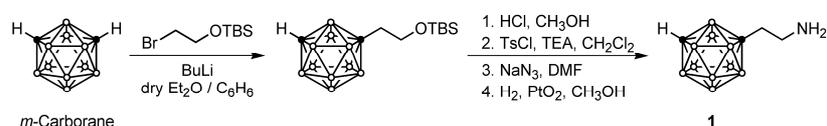


図1 アミノ基を有する *m*-カルボラン誘導体の合成

アミノ基を有する *m*-カルボラン誘導体 1 の合成は図1に示した合成経路で行った。まずホウ素クラスターとして国内で比較的安価に入手できる *m*-カルボランを用い、これをリチオ化してTBS保護した2-プロモエタノールを反応させた。得られた生成物から酸性条件でTBS基を除去し、トシル化後、アジ化ナトリウムでアジド化した。これを PtO_2 触媒を用いた水素化によりアミノ基に変換し目的物を得た。

(2) 反応性セグメントを有するブロックコポリマーPPFPA-*b*-PPEGA の合成

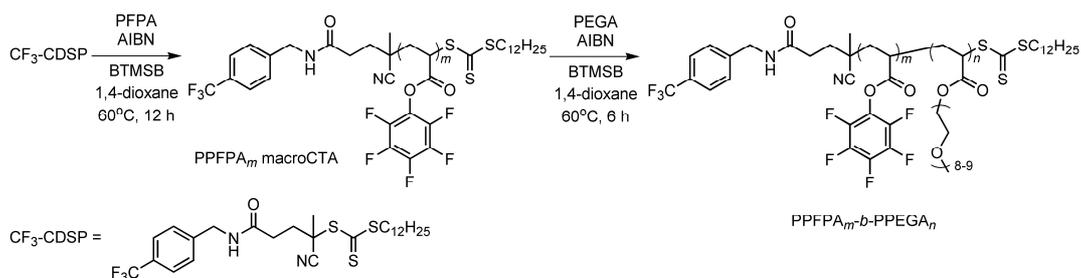


図2 PPFPA_{*m*}-*b*-PPEGA_{*n*} の合成

反応性モノマーとしてアクリル酸ペンタフルオロフェニル(PFPFA)、水溶性モノマーとしてアクリル酸ポリエチレングリコール(PEGA)を用いた。これを図2に示した重合法で重合し、目的とするブロックコポリマーPPFPA_{*m*}-*b*-PPEGA_{*n*}を得た。絶対数平均分子量 $M_{n,NMR}$ は定量 ^1H NMRおよびCHORUSパルスシーケンスを用いた定量 ^{19}F NMRスペクトルより求めた。分子量分布は標準ポリスチレンで校正したサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により求め、数平均分子量 $M_{n,SEC}$ と分散度 M_w/M_n を計算した。

(3) ブロックコポリマーPPFPA_{*m*}-*b*-PPEGA_{*n*} への *m*-カルボランの導入

ブロックコポリマーPPFPA_{*m*}-*b*-PPEGA_{*n*} への *m*-カルボランの導入は図3のように行った。PPFPA_{*m*}-*b*-PPEGA_{*n*} とアミノ基を導入した *m*-カルボラン 1 をジメチルホルムアミド(DMF)に溶かし、 40°C で24時間攪拌することにより反応を行った。得られた反応混合物を透析により精製し、凍結乾燥して *m*-カルボランを疎水性セグメントの側鎖に有する両親媒性ブロックコポリマーP(mCarA)_{*m*}-*b*-PPEGA_{*n*} を合成した。得られたポリマーのキャラクタリゼーションは ^1H 、 ^{19}F および ^{11}B NMR およびSEC測定により行った。

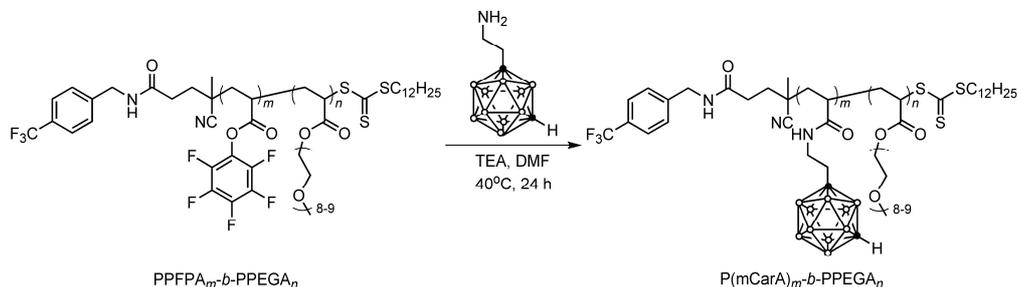


図3 ブロックコポリマーPPFPA_m-b-PPEGA_nへの *m*-カルボランの導入

(4) P(mCarA)_m-b-PPEGA_n 高分子ミセル溶液の調製とキャラクタリゼーション

合成した P(mCarA)_m-b-PPEGA_n を DMF に溶かし、これにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を等量加えてから透析チューブに移して PBS で 3 日間透析してミセル溶液を調整した。高分子ミセルの臨界ミセル濃度(CMC)はピレン蛍光プローブ法により評価した。また ICP 発光分光光度法によりミセル溶液中のホウ素濃度を定量した。

4. 研究成果

(1) アミノ基を有する *m*-カルボラン誘導体の合成

図1に示した合成経路で目的物を合成した。アジドの PtO₂ 触媒による水素化の際、*nido* 型と推測される *m*-カルボランが分解した副生物が生成するが、反応条件を最適化することにより副生成物の生成を抑制することに成功した。また微量の PtO₂ 触媒の除去が困難であったが、メルカプト基を結合したポリマービーズを用いてスカベンジすることにより除去することに成功した。これによりアミノ基を有する *m*-カルボラン誘導体の合成に成功した。

(2) 反応性セグメントを有するブロックコポリマーPPFPA-*b*-PPEGA の合成

はじめに PFFPA を CF₃-CDSP を連鎖移動剤として用いた RAFT 重合により重合した(図2)。得られた PFFPA の絶対数平均重合度 DP_n は Morris らが開発した CHORUS パルスシーケンスを用いてオフセット効果を低減した ¹⁹F NMR スペクトルにより 22 と決定した。これにより NMR から求めた絶対数平均分子量 M_{n,NMR} は 5800 と見積もられた。標準ポリスチレンで校正されたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により求めた数平均分子量 M_{n,SEC} は 4700、分散度 M_w/M_n は 1.06 であった。DP_n はモノマーと連鎖移動剤の仕込み比とモノマー転換率より予想される値に近く、また分子量分布の狭いポリマーが得られていることから重合が RAFT 機構で進行したことを確認した。この PFFPA を高分子連鎖移動剤として用いて PEGA の RAFT 重合を行い、収率 61% で薄黄色粘稠体のポリマーを得た。¹H-¹⁹F 相互参照物質を添加して定量情報を共有した ¹H および ¹⁹F NMR スペクトルにより、得られたポリマーの PFFPA の DP_n 値は 19、PEGA の DP_n 値は 79 であることが分かった(図4)。したがって M_{n,NMR} は 43000 と見積もられた。一方、M_{n,SEC} は 14300、M_w/M_n は 1.35 であった。M_{n,NMR} 値と M_{n,SEC} 値が大きく乖離しているが、これは SEC の校正に用いた標準ポリスチレンが線状高分子であるのに対し、PPFPA-*b*-PPEGA は PPEGA セグメントがグラフトポリマーに近い形状をしているためであると推測される。

(3) ブロックコポリマーへの *m*-カルボランの導入

次に、PPFPA-*b*-PPEGA への *m*-カルボランの導入を図3のように行った。ポリマーとアミノ基を導入した *m*-カルボランを DMF に溶かし、40°C で 24 時間攪拌することにより反応を行った。*m*-カルボランは PFFPA ユニットの 3 倍量を加えた。得られた反応混合物を透析法により精製し、凍結乾燥して *m*-カルボランを疎水性セグメントの側鎖に有する両親媒性ブロックコポリマーを合成した。得られたポリマーの ¹⁹F NMR スペクトルよりペンタフルオロフェニル基が消失していること、また ¹¹B NMR スペクトルより *m*-Carborane が存在することを確認した(図4)。また定量 NMR 法により PEGA unit の重量分率を求めたところ、定量的に *m*-Carborane が導入されたとして計算される値に近い値が得られた。

(4) P(mCarA)-*b*-PPEGA 高分子ミセル溶液の調製とキャラクタリゼーション

P(mCarA)-*b*-PPEGA の高分子ミセルは透析法により調製した。得られた高分子ミセルの臨界ミセル濃度をピレン蛍光プローブ法で評価したところ、25 mg L⁻¹ であった。この値はほぼ疎水性置換基を有するアクリルアミドと PEGA のブロックコポリマーの値(発表準備中)とほぼ同程度であった。P(mCarA)₂₂-*b*-PPEGA₉₄ の高分子ミセル/PBS 溶液はホウ素濃度が 650 ppm に達した。これにより高濃度にホウ素を集積した高分子ミセルを創製することは達成した。しかし、残念ながら、T98G 細胞を用いた細胞毒性試験において高濃度条件では顕著な細胞毒性が現れてしまうことが判明した。これは疎水性セグメントがポリアクリルアミド構造であることに起因すると予想される。そこで、[1]生理活性リガンドを付与することにより集積性を向上させて高濃度を回避する方法、および[2]分子間力による *m*-カルボランの保持の可能性を検討した。

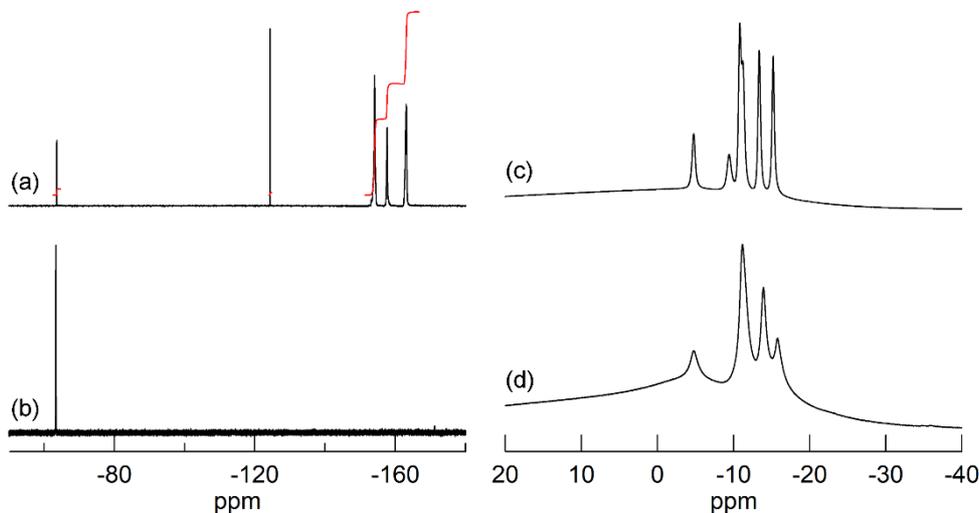


図4 反応性ブロックコポリマーPPFPA_n-b-PPEGA_m(a)、アミノ基を有する *m*-カルボラン(c)および P(mCarA)_n-b-PPEGA_m((b)および(d))の ¹⁹F(左)および ¹¹B(右) NMR スペクトル。

(5) 親水性セグメントの停止末端側への生理機能性分子の導入の試み

RAFT 重合の停止末端は容易にメルカプト基に変換可能である。このメルカプト基とプロモアセチル基は容易にカップリング反応を起こすことから、生理活性リガンドにプロモアセチル基を導入することにより容易に親水性セグメントの停止末端に生理活性リガンドを導入可能である。しかし、親水性セグメントがアクリル酸エステル構造であるためバックバイティングによるチオラクトン構造形成が生じ、生理活性リガンドの導入率が低下する。実験の再現性を確保するために生理活性リガンドの導入率の定量が必須である。そこで、¹⁹F NMR で容易に導入率の定量が可能なグルコース修飾剤 **2**(図5)を開発し、PPEGA において導入率の定量が可能であることを実証した。今後、両親媒性ブロックコポリマーに応用する。

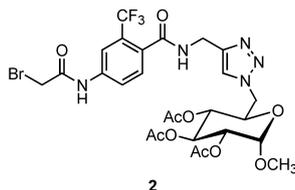


図5 ¹⁹F NMR で導入率の定量が可能なグルコース修飾剤

(6) *m*-カルボランの PSt-*b*-PPEGA への高い内包効率の発見

残念ながら重合後修飾後のアクリルアミド構造が高濃度において細胞毒性を示すことが示唆された。研究開始当初は *m*-カルボランのような低極性でかつ π - π 相互作用が有効に働かないと予想される分子は高分子ミセルの良いペイロードにはならないと考えられた。実際、ほとんどの研究がポリマーにカルボランを共有結合で結合させる戦略をとっている。しかし、我々の研究グループでは偶然、ある両親媒性ブロックコポリマーが高濃度の *m*-Carborane を安定に内包することを見出した。この方法は特別な化学合成が必要ではないことからより有用なアプローチであると考えられる。現在、我々の研究グループで実用化に向けて研究中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fadlan Arif, Tanimoto Hiroki, Ito Tatsuya, Aritomi Yusuke, Ueno Maho, Tokuda Masaya, Hirohara Shiho, Obata Makoto, Morimoto Tsumoru, Kakiuchi Kiyomi	4. 巻 26
2. 論文標題 Synthesis, photophysical properties, and photodynamic activity of positional isomers of TFPP-glucose conjugates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1848 ~ 1858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Masaki, Enami Yusuke, Ninagawa Hayato, Obata Makoto	4. 巻 43
2. 論文標題 A novel approach to white-light emission using a single fluorescent urea derivative and fluoride	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 New Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 3265 ~ 3268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1039/c8nj05105d	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Obata Makoto, Tanaka Shuto, Mizukoshi Hiroshi, Ishihara Eika, Takahashi Masaki, Hirohara Shiho	4. 巻 56
2. 論文標題 RAFT synthesis of polystyrene-block-poly(polyethylene glycol monomethyl ether acrylate) for zinc phthalocyanine-loaded polymeric micelles as photodynamic therapy photosensitizers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 560 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pola.28929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Obata Makoto, Yamai Kouta, Takahashi Masaki, Ueno Shintaro, Ogura Hiroya, Egami Yasuhiro	4. 巻 191
2. 論文標題 Synthesis of an oxygen-permeable block copolymer with catechol groups and its application in polymer-ceramic pressure-sensitive paint	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer	6. 最初と最後の頁 122281 ~ 122281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.polymer.2020.122281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yazaki Kohei, Takahashi Masaki, Miyajima Naoya, Obata Makoto	4. 巻 44
2. 論文標題 Construction of a polyMOF using a polymer ligand bearing the benzenedicarboxylic acid moiety in the side chain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 5182 ~ 5185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9NJ06394C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 桑田薫、小幡誠
2. 発表標題 重合後修飾によるアミノクリル酸エステル構造を有する両親媒性ブロックコポリマーの合成
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>高分子合成化学研究室 http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~mobata/index.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	廣原 志保 (HIROHARA Shiho) (70413804)	宇部工業高等専門学校・物質工学科・教授 (55501)	