

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410126

研究課題名(和文) マクロファージ指向性キャリアのための特異構造糖質高分子の精密合成

研究課題名(英文) Precision Synthesis of Block Glycopolymers for DDS Carrier targeting Macrophages

研究代表者

小幡 誠 (OBATA, Makoto)

山梨大学・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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージや樹状細胞といった免疫系細胞へのDDSを目的として、糖質高分子を親水性セグメントとするブロックコポリマーの合成方法について検討した。疎水性薬剤DDS用ブロックコポリマーには生分解性を有するポリ乳酸を、核酸DDS用ブロックコポリマーには生分解性を有するポリ(L-リシン)を用いた。それぞれカップリング法および二官能性開始剤法による合成が有望であることが分かった。ただし、ポリ(L-リシン)を用いる場合には糖質高分子側に酸加水分解耐性が求められることが分かった。またマウスマクロファージ様細胞RAW264.7を用いて糖質高分子の取り込み量の亢進を確認した。

研究成果の概要(英文)：We have studied synthetic strategy of block copolymers consisting glycopolymer as a hydrophilic segment to develop drug deliver system for immune cells such as macrophages and dendritic cells. We designed two types of block copolymers. One contains poly(lactic acid) as a hydrophobic segments for hydrophobic drug delivery, and the other has poly(L-lysine) as a cationic segments for nucleic acid delivery. We found that coupling method and bifunctional initiator method are promising strategies for synthesis of amphiphilic and cationic block glyco-copolymers, respectively. It should be noted that glycopolymer segments must have stability against acid hydrolysis for use in cationic block copolymer having poly(L-lysine). In addition, we demonstrate an enhanced cellular uptake of glycopolymer presenting mannose by RAW264.7 cells, showing targeting ability of glycopolymers.

研究分野：高分子合成化学

キーワード：糖質高分子 精密重合 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫療法の重要性の拡大

自然免疫の精緻なメカニズムの解明や、腫瘍関連マクロファージの理解の深化、ガン抗原による免疫療法の進展など近年、免疫学は著しい成果を挙げている。このような状況のなかマクロファージや樹状細胞などの免疫系細胞への薬剤送達技術(ドラッグデリバリーシステム, DDS)の開発が重要性を増してきている。

親水性セグメントを有するブロックコポリマーの自己組織化により生じるコア-シェル構造を有する高分子ミセルは DDS キャリアとして有望である。これまで様々な高分子ミセルが合成され DDS への応用が検討されている。シェルを形成する親水性セグメントは高分子ミセルの安定化の他に細胞内皮系 (RES) 細胞による貪食の回避や目的組織・細胞・細胞内小器官へのターゲティングなどの機能が求められる。低毒性で抗原抗体反応を惹起しないこと、さらに RES に認識されづらいことなどの理由から親水性セグメントとしてはポリエチレングリコール(PEG)がデファクトスタンダードとして用いられている。しかし PEG は生分解性の欠如やターゲティング能力がないこと、また ABC 効果など好ましくない効果が発現することがあるなどの問題点があり、世界中で PEG の代替材料の探索が続けられている。

2. 研究の目的

本研究ではマクロファージや樹状細胞といった免疫系細胞への取り込みの亢進が期待できるマンノースを側鎖に有する糖質高分子(PManEMA)を親水性セグメントとして利用する DDS の開発を目的としている。高分子ミセルのコアを形成する疎水性セグメント(疎水性薬剤用 DDS)もしくはカチオン性セグメント(核酸用 DDS)には生分解性を有する高分子を利用する。このため重合機構の異なるコアセグメントとシェルセグメントからなるブロックコポリマーを合成する必要がある。このように重合機構の異なるブロックコポリマーの合成は現在の高分子合成技術をもってしても挑戦的なテーマである。本研究ではこのような特異構造糖質高分子の精密合成技術の開発と高分子ミセルの作製を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 生分解性疎水性セグメントとしてポリ乳酸を有する特異構造糖質高分子の合成

生分解性を有する疎水性セグメントとしてポリ乳酸(PLLA)を有する特異構造糖質高分子の合成には、エチニル基を有する PLLA とアジド基を有する PManEMA をそれぞれ合成し、この2つのセグメントを銅触媒を用いた1,3-双極子環化付加反応でカップリングすることとした。またブロックコポリマーの構造確認は¹H NMR 分光法、サイズ排除クロマ

トグラフィー(SEC)で行った。さらに高分子ミセル形成は選択溶媒を用いた¹H NMR 分光法、およびピレン蛍光プローブ法により行った。

(2) 生分解性カチオン性セグメントとしてポリ(L-リシン)を有する特異構造糖質高分子の合成

生分解性を有するカチオン性セグメントとしてポリ(L-リシン)(PLL)を有する特異構造糖質高分子の合成は当初、エチニル基を有する PLL とアジド基を有する PManEMA をそれぞれ合成し、この2つのセグメントを銅触媒を用いた1,3-双極子環化付加反応でカップリングする方法を検討した。しかし、この反応経路での合成が困難であることが明らかとなったため、二官能性開始剤によるブロックコポリマーの合成を検討した。この合成法においても最終段階のZ基の脱保護において糖質高分子が分解するという問題が生じたため、エステル構造を持たない糖質高分子の利用を前提とした合成法の検討を行った。

(3) マクロファージによる糖質高分子の取り込み亢進に関する基礎研究

合成した特異構造糖質高分子のマクロファージによる取り込み亢進を検討するために、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を用いた培養技術を確立し、蛍光色素を導入した糖質高分子の取り込み量計測の予備的な検討を行った。

4. 研究成果

(1) 生分解性疎水性セグメントとしてポリ乳酸を有する特異構造糖質高分子の合成

リビングラジカル重合により合成される糖質高分子とリビング開環重合により合成されるポリ乳酸(PLLA)からなるブロックコポリマーの合成には、主にカップリング法、生長末端の変換を伴う鎖伸長法、二官能性開始剤法の3つの手法がある。本研究で用いる糖質高分子 PManEMA は側鎖に開環重合の開始点となる水酸基をもつため、鎖伸長法や二官能性開始剤法は適用困難であると予想される。そこで、本研究ではカップリング法の適用を検討した。カップリング反応としては高いカップリング効率が期待できる、銅触媒を用いたエチニル基とアジド基の1,3-双極子環化付加反応を用いることとした。

はじめにプロパルギルアルコールを開始剤に、2-エチルヘキサン酸スズ(Sn(Oct)₂)を触媒として、乾燥トルエン中でL-ラクチドの開環重合により開始末端にエチニル基を有する PLLA の合成を行った(図1)。モノマー/開始剤比を変化させることにより、数平均分子量(M_n 、標準 PMMA 換算)が4500~10000の PLLA を得ることができた。また開始末端のエチニル基の存在はMALDI TOF MSにより確認した。一方、糖質高分子 PManEMA の合成は、モノマー-ManEMA を水中で、触媒にCuBr₂、配位子にトリス(ピリジルメチル)ア

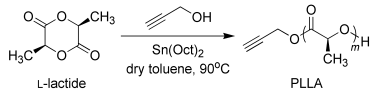


図 1 開始末端にエチニル基を有する PLLA の合成

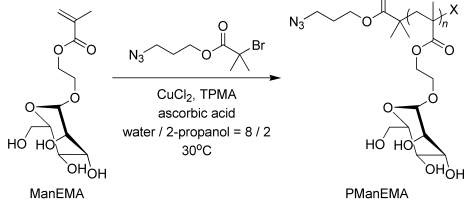


図 2 開始末端にアジド基を有する PManEMA の合成

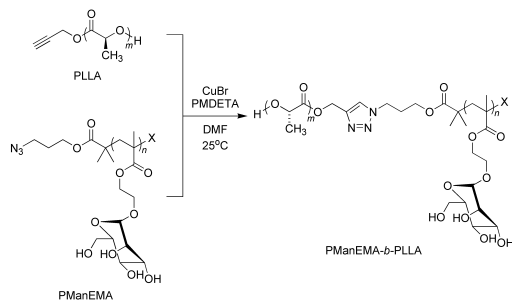


図 3 PManEMA-*b*-PLLA の合成

ミン(TPMA)、還元剤にアスコルビン酸ナトリウムを用いた電子移動による活性化原子移動ラジカル重合 (Activator Generated by Electron Transfer Atom Transfer Radical Polymerization, AGET ATRP) により合成した (図 2)。開始剤としてアジド基を有する ATRP 開始剤(2-ブロモ-2-メチルプロピオン酸 2-アジドプロピル)を用いることにより開始末端にアジド基を導入した。開始末端へのアジド基の導入は IR 分光法により確認した。得られた PManEMA の M_n (標準 PMMA 換算) は 16000 であった。エチニル基を有する PLLA とアジド基を有する PManEMA のカップリングは DMF 中、触媒に CuBr、配位子にペンタメチルジエチレントリアミン(PMDETA)を用いて、室温で攪拌することにより行った (図 3)。反応粗生成物を透析により精製し、凍結乾燥により白色固体を得た。得られた白色固体の ^1H NMR スペクトルより PLLA および PManEMA の両セグメントが存在すること、SEC により原料の PManEMA および PLLA よりも分子サイズが大きくなっていることから、ブロックコポリマー PManEMA-*b*-PLLA の構造を確認した (図 4)。ただし、SEC において主ピークの低分子量側および高分子量側に不純物ピークが確認された。低分子量側の不純物ピークは原料の PLLA と保持容量が一致することから未反応の PLLA であると考えられる。一方、高分子量側の成分は不明であるが、ATRP 停止末端を処理していないため、カップリング反応の際にラジカルカッ

リングが併発した可能性がある。SEC 溶出曲線のピーク面積から見積もられる主ピークの割合は 86 ~ 92% であった。

得られたブロックコポリマー PManEMA-*b*-PLLA のミセル形成を選択溶媒を用いた ^1H NMR 分光法およびピレン蛍光プローブ法で検討した。選択溶媒である重水中で PLLA 由来のシグナルが消失していることから、疎水部が凝集体を形成していることが示唆された。ピレン蛍光プローブ法により臨界ミセル濃度(CMC)は約 40 mg/L であることが明らかとなった。

今後、この PManEMA-*b*-PLLA への疎水性薬剤の内包とマクロファージ細胞への取り込みの亢進などの実証を行う必要がある。

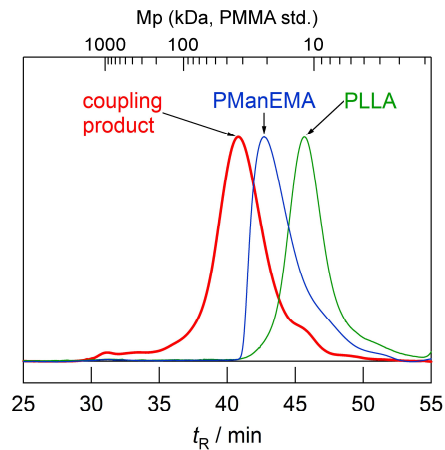


図 4 PLLA、PManEMA およびカップリング生成物の SEC 溶出曲線

(2) 生分解性疎水性セグメントとしてポリ(L-リシン)を有する特異構造糖質高分子の合成

このブロックコポリマーは当初、開始剤にプロパルギルアミンを用いて、Z 基で保護された L-リシン N-カルボン酸無水物(NCA)をリビング開環重合することによりエチニル基を有する PLL を合成し、アジド基を有する PManEMA とのカップリング反応で合成することを試みた。開始末端にエチニル基を有する PLL (図 5) は特に問題なく合成することができたが、銅触媒を用いた 1,3-双極子環化付加反応が進行せずブロックコポリマーを得ることができなかった (図 6)。カップリング反応が進行しなかった理由は不明であるが、PLL がアミノ基を多く持つ基質であることや用いた PZLL の分子量が比較的高かった点が問題であった可能性がある。またこの研究過程で糖質高分子 PManEMA が Z 基の脱保護条件 (HBr/CH₃CO₂H) に耐えられないことが明らかとなった。

以上の知見から、対応策として エステル結合を持たない糖モノマー (MAG) を用いて、二官能性開始剤法によるブロックコポリマーの合成を行うこととした。まず高価な糖モノマーの代わりに同じアクリルアミドモノマーである N-イソプロピルアクリルアミド

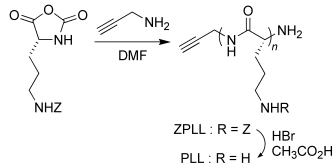


図5 開始末端にエチニル基を有する PLL の合成

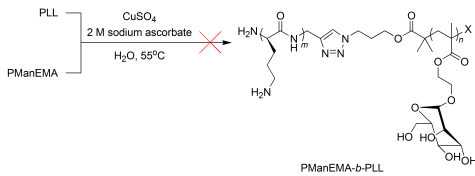


図6 カップリング法による PManEMA-*b*-PLL の合成の試み

(NIPAM)を用いて二官能性開始剤法によるブロックポリマーの合成の実証実験を行うこととした。二官能性開始剤としてアミノ基を Boc 保護した *N*-(2-アミノエチル)-2-クロロプロピオナミドを2段階で合成した。この化合物は ATRP 開始剤として用いた後、Boc 保護基を除去することによりアミノ基を再生し、開環重合のマクロ開始剤として使用することができる設計になっている。そこで、まずはじめにこの開始剤を用いて NIPAM の ATRP を行った(図7)。重合は触媒に CuCl/Me₆TREN を、溶媒に DMF を用いて 20°C で3時間攪拌することにより行った。得られたポリマー PNIPAM-NHBoc の SEC 溶出曲線は単峰性であり、*M_n*(標準 PMMA 換算)が 7300、分散度(*M_w*/*M_n*)が 1.14 であった。比較的分子量分布の狭いポリマーが得られたことから ATRP 機構で重合が進行していると考えられる。このポリマーをジクロロメタンに溶かし、トリフルオロ酢酸を加えて室温で24時間攪拌することにより Boc 保護基を除去した。開始末端に一分子しかない Boc 保護基の除去の確認はできなかったが、SEC 溶出曲線は特に変化していないことから副反応は起きていないことが示唆された。このポリマー PNIPAM-NH₂ を用いて NCA の開環重合を溶媒に DMF を用い、40°C で3日間攪拌することにより行った(図8)。得られたポリマーの SEC 溶出曲線は明確に高分子量側にシフトしておりブロックポリマー PNIPAM-*b*-ZPLL の合成が確認された(図9)。ただし、高分子量側に若干の肩が確認された。最後に PNIPAM-*b*-ZPLL をトリフルオロ酢酸に溶かし HBr を作用させて Z 基の脱保護を行った。得られたポリマーの ¹H NMR スペクトルから Z 基の脱保護を確認した。ただし SEC 溶出曲線がやはり高分子量側に肩が見られた。今後、糖モノマーへ適用し、PMAG-*b*-PLL の合成と核酸とのポリプレックス形成ならびにマクロファージへのトランスフェクションを検討する必要がある。

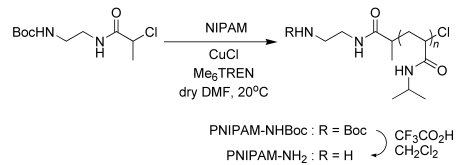


図7 二官能性開始剤による NIPAM の ATRP とマクロ開始剤への誘導

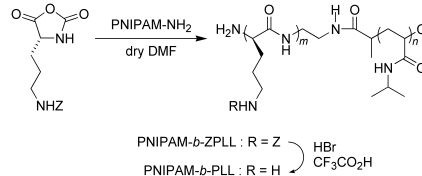


図8 二官能性開始剤法による PNIPAM-*b*-PLL の合成

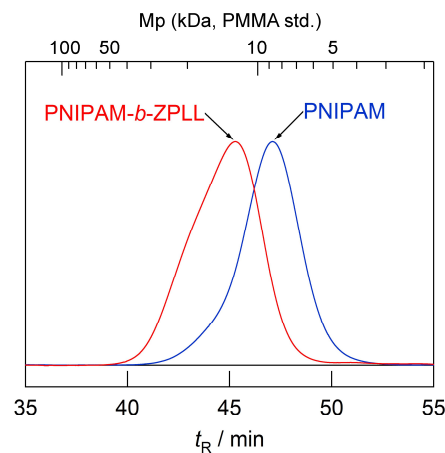


図9 PNIPAM と PNIPAM-*b*-ZPLL の SEC 溶出曲線

(3)マクロファージによる糖質高分子の取り込みに関する基礎研究

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 の培養技術の修得を行った。取り込み量を定量するために蛍光色素として NBD を連結したメタクリル酸 2-アミノエチル(NBD-AEMA)を合成した。この NBD-AEMA を ManEMA と *N*-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド(HPMA)のラジカル共重合系に少量加えることにより NBD ラベルした PManEMA-*co*-PHPMA を合成した(図10)。RAW264.7 による取り込み挙動は、24 穴プレートに 4×10⁵ cells/well で細胞播種し、一定量の NBD ラベル化ポリマーを添加後、37°C、5% CO₂ インキュベーターで24時間培養した。これを PBS で洗浄後、DMSO を加えて、励起波長 485 nm、検出波長 538 nm で蛍光強度を求めた。一方、各ポリマーの DMSO 中における蛍光強度と濃度の関係を求め、この検量線からポリマーの取り込み量を定量した(図11)。その結果、PManEMA が最も高い取り込み量を示すことが明らかとなった。この結果は ManEMA がマクロファージへのターゲティング素子として有望であることを示唆している。

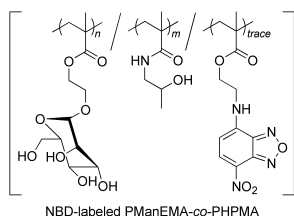


図 10 NBD で蛍光ラベルした PManEMA-*b*-PHPMA

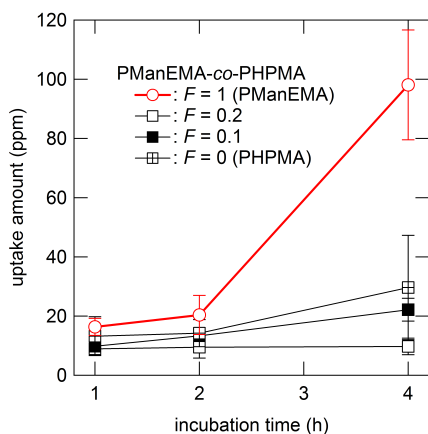


図 11 マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 による NBD ラベルした PManEMA-*b*-PHPMA の取り込み挙動

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

Makoto Obata, Ryo Asato, Shiho Hirohara, Kazunori Mitso, “Effect of polymer matrix on the performance of pressure-sensitive paint comprising 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrato platinum(II) and poly(1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropyl-*co-tert*-butyl methacrylates)”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2016**, 掲載決定, DOI: 10.1002/APP.43316, 査読有

Shiho Hirohara, Chio Oka, Masayasu Totani, Makoto Obata, Junpei Yuasa, Hiromu Ito, Masato Tamura, Hirofumi Matsui, Kiyomi Kakiuchi, Tsuyoshi Kawai, Masashi Kawaichi, Masao Tanihara, “Synthesis, Photophysical Properties, and Biological Evaluation of Trans-Bisthioglycosylated Tetrakis(fluorophenyl)chlorin for Photodynamic Therapy”, *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 8658-8670, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01262, 査読有

Makoto Obata, Tomoya Kobori, Shiho Hirohara, Masao Tanihara, “RAFT Synthesis of Statistical and Block Copolymers of 2-(α -D-Mannopyranosyloxy)ethyl Methacrylate with 2-(*N,N*-Dimethylamino)ethyl Methacrylate and Application for Nonviral Gene Delivery”, *Polym. Chem.*, **2015**, 6, 1793-1804, DOI:

10.1039/c4py01652a, 査読有

Makoto Obata, Ryo Asato, Kazunori Mitsuo, Shiho Hirohara, “Radical Polymerization of Trifluoromethyl-substituted Methyl Methacrylates and Their Application for Use in Pressure-Sensitive Paint”, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2014**, 52, 963-972, DOI: 10.1002/pola.27076, 査読有

[学会発表](計 11件)

水越洋, 小幡誠, “RAFT 重合とクリック反応によるポリ(L-リシン)と糖質高分子のブロックコポリマーの合成”, 第 64 回高分子討論会, 東北大学川内キャンパス(宮城県, 仙台市), 2015 年 9 月 15 日~17 日

音淵良太, 小幡誠, “DDS キャリアのためのポリ乳酸と糖質高分子からなるブロックコポリマーの合成”, 第 63 回高分子討論会, 長崎大学文教キャンパス(長崎県, 長崎市), 2014 年 9 月 24 日~26 日

森越洋行, 小幡誠, “核酸キャリアのためのポリ(L-リシン)と糖質高分子からなるブロックコポリマーの合成”, 第 63 回高分子討論会, 長崎大学文教キャンパス(長崎県, 長崎市), 2014 年 9 月 24 日~26 日

張磊, 小幡誠, “RAFT 重合法によるカチオン性セグメントと糖質高分子からなるブロックコポリマーの合成”, 第 63 回高分子討論会, 長崎大学文教キャンパス(長崎県, 長崎市), 2014 年 9 月 24 日~26 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~mobata/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小幡 誠 (OBATA, Makoto)
山梨大学 総合研究部 准教授
研究者番号: 70343267

(2)研究分担者

廣原 志保 (HIROHARA, Shiho)
宇部工業高等専門学校 物質工学科
准教授
研究者番号: 70413804