

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：16401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07030

研究課題名(和文) 架橋と表面修飾による高次機能化を可能とする新奇ミセルの開発とその生命科学的応用

研究課題名(英文) Development of novel multi-functionalized micelles and their biological application

研究代表者

仁子 陽輔 (NIKO, Yosuke)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・助教

研究者番号：20782056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、病巣の診断かつ治療を同時に行う「セラノスティクス材料」への応用を志向した新しいミセルの開発に取り組んだ。具体的には、親水部に多数の化学反応点を有する界面活性剤を合成し、それを用いてミセルを作成することで、架橋剤等を使って「(がん細胞などへの)標的性」、「刺激応答型内包物徐放性および蛍光 OFF-ONスイッチング」といった機能を付与することを目指した。成果としては、親水部にポリ(2-エチル 2-オキサゾリン)、化学反応点としてヒドラジド基、疎水部として四角酸誘導体を有する界面活性剤を用いることで、ミセルの形成と、架橋剤による蛍光 OFF-ON 機能を付与させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we synthesized a novel surfactant based on poly(2-ethyl-2-oxazoline). The surfactant has a lot of hydrazide groups at water soluble part, therefore, it could undergo cross-link reaction with glutaraldehyde in micelles form. In addition, the surfactant possesses squarain dyes at hydrophobic part. The dyes in micelles core were normally not fluorescent due to H-aggregation but showed turn on fluorescence in response to the collapse of micelles triggered by acid. These features of the micelles would be expected to be useful for theranostics.

研究分野：光機能性物質

キーワード：高分子合成 ミセル 蛍光 ポリ(2-エチル 2-オキサゾリン)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ミセル、リポソームなどといった有機ナノ粒子は、その内部に種々の分子を内包できるため、生命科学研究における利用が検討されている。中でも、特定の病巣に対する標的性や、外部環境に応じて内包物質を放出、あるいは発光性を示すといった刺激応答性を有するようなナノ粒子は、癌をはじめとする種々の病巣の診断(可視化)・治療を同時に実現する「セラノスティクス材料」としての利用が期待されている。しかし、そうした多彩な機能を有する有機ナノ粒子は、その調整のために多段階的かつ複雑な有機合成手法が要求されることが一般的であった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、親水部に多数の可逆的化学反应点を有する界面活性剤を作成することを着想した。同材料は、自己組織化した後、その反応点を利用して自由自在に機能付与(リガンドの導入、架橋など)ができると期待されるためである(図1)。さらに、疎水部に有機色素を導入することで、界面活性剤の凝集・分散に伴う色素の蛍光 OFF/ON 機能の発現を狙った。

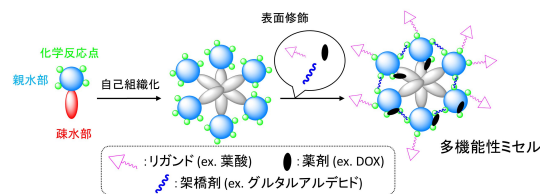


図1. 本研究課題の概略

### 3. 研究の方法

先の項に述べたような界面活性剤を開発するため、以下三つの観点から分子設計を行った。

親水性部位として、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)(POZO)に注目した。同材料は水溶性で生体適合性も高く、リビングカチオン開環重合による分子量制御も容易なためである。さらに、主鎖構造の一部を加水分解することで、3級アミンを作り出すことができる。また、末端修飾も可能であるため、疎水部の導入も行きやすいという利点がある。

可逆的化学反应点として、ヒドラジドに注目した。ヒドラジドは、に述べた3級アミンを通じて、POZO骨格に容易に導入できる上、アルデヒドと反応し、ヒドロゾンと呼ばれる可逆的な結合を形成するためである。さらに、ヒドラジドはアミンとしての求核性を有するため、活性エステルなどとも反応し、不可逆的なアミド結合も形成できる。

疎水性色素としては四角酸誘導体に着目

した。同色素は、遠赤領域(650 nm付近)に強力な発光性を有し、かつミセル形成に適した直線性の高い構造を有することが特徴である。また、凝集状態では蛍光が OFF 状態になることも知られているため、上述した界面活性剤の凝集・分散に伴う OFF/ON 機能を実現する上で最適であると考えられる。

以上の ~ に基づいた界面活性剤合成を行い、その自己組織化構造の検討、架橋剤その他による自己組織化構造の機能化が本研究課題の主たる実施事項である。

### 4. 研究成果

#### 界面活性剤の合成

先の項に示した ~ に従い、図2に示す界面活性剤 POZO-SQCx を合成した。POZO部分はおよそ30量体、ヒドラジド導入部位は5量体程度であることが<sup>1</sup>H NMRより確認された(図3)。四角酸には種々のアルキル鎖を導入し、自己組織化構造に与える影響を評価することとした。

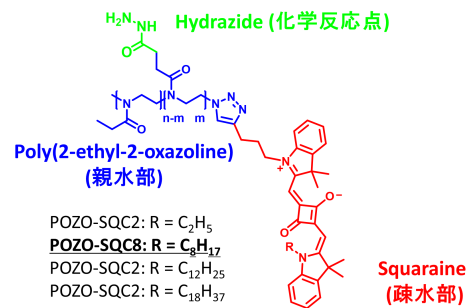


図2. 蛍光性界面活性剤 POZO-SQCx

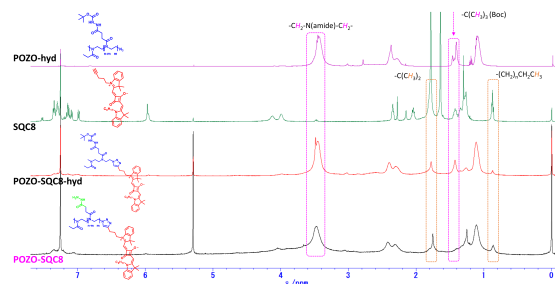


図3. POZO-SQC8の<sup>1</sup>H NMRスペクトル(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, TMS)

#### 界面活性剤の自己組織化

緩衝溶液中に対する POZO-SQCx の滴下実験を行った。その結果、POZO-SQC8 のみ、濃度変化に応じて明確な吸収スペクトル形状の変化(H会合体の形成を示唆するブルーシフト)を示し、およそ1 μM程度の臨界ミセル濃度を有することが明らかになった(図3)。また、POZO-SQC8は濃度の増加に伴う蛍光強度の増加を示したが、臨界ミセル濃度以降はそうした蛍光の増加は見られなかった。そのため、臨界ミセル濃度以降滴下された POZO-SQC8 はミセル形成に使用され、ミ

セル内部で色素が H 会合体を形成（凝集）したことにより、蛍光の増加が観測されなかったと考えられる。

なお、POZO-SQC2 に関しては、吸収スペクトルの測定限界まで濃度を高めた場合 (> 20  $\mu\text{M}$ ) においてもスペクトル形状や蛍光増大の様子に変化はなかった。一方、POZO-SQC12 や C18 に関しては 0.02  $\mu\text{M}$  以下の低濃度領域で既に非発光性の自己組織化構造を形成していることが示唆されたが、時間経過と共に沈殿物が生じたため、本研究課題の目的には適していないと判断した。

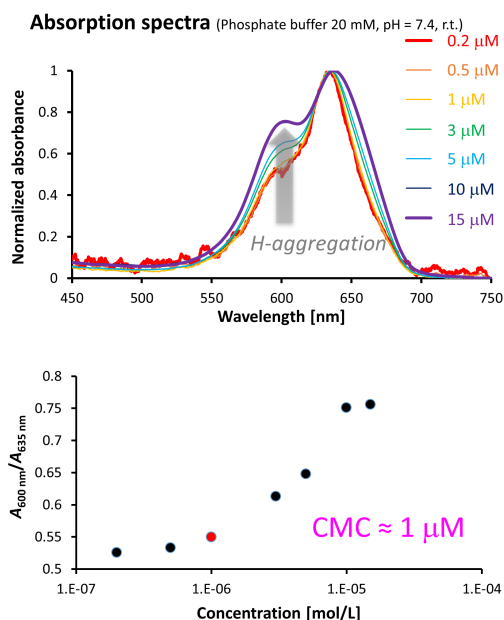


図4. POZO-SQC8 の滴定実験

#### 架橋によるミセルの機能化

界面活性剤親水部にある反応点（ヒドラジド）を活用した機能化の一例として、第二項に述べた外部刺激応答型蛍光 OFF ON 機能の獲得を目指した。具体的には、界面活性剤をミセル化した後、グルタルアルデヒドを用いて架橋を行う。これにより、ミセルの構造が安定化されるとともに、ミセル内部で色素が H 会合体を形成するため、蛍光 OFF 状態となる。一方で、このグルタルアルデヒドとヒドラジド間で形成されるヒドラゾン結合は、酸性条件（= 外部刺激、癌細胞内部を想定）下にて開裂するため、それに伴いミセルが分散し、蛍光 ON 状態となる、という仕組みである。

実験としてはまず、緩衝液に対し 30  $\mu\text{M}$  の POZO-SQ8 を溶解させた溶液を調整した。臨界ミセル濃度は 1  $\mu\text{M}$  なので、大半の分子がミセル形成に利用されていると考えられる。次に、30  $\mu\text{M}$  の POZO-SQ8 に含まれるヒドラジドに対して 1.2 等量のグルタルアルデヒドを加え、室温にて 24 時間攪拌した。得られた溶液を 1  $\mu\text{M}$  まで希釈し、吸収・蛍光スペクトルを測定した（図 4）。

グルタルアルデヒドを加えていない、コントロール 1  $\mu\text{M}$  との蛍光強度の比較を行うと、架橋反応を行ったものは 45% 程度の蛍光の減少が見られた。このことから、30 mM に含まれていた POZO-SQ8 のうち、55% が架橋ミセル形成に使用され、残りはフリーの状態であるか、二量体、三量体などのような構造をとっていると考えられる。

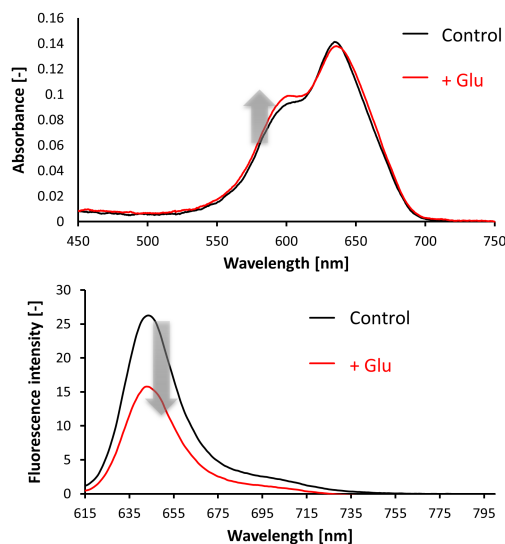


図5. POZO-SQC8 の架橋反応

#### 今後の課題～ミセルの精製～

得られた架橋ミセルが、酸性環境化において蛍光 ON 状態になることは既に確認されている。しかしながら、フリーの界面活性剤が多く残っているため、劇的な蛍光 OFF ON 転換は観測されていない。従って、次なる課題は、フリーの界面活性剤の除去、すなわちミセルの精製である。これに関して報告者は、既に透析、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を試みている。しかし、どちらの手法も、実行後に非発光性、しかし酸による開裂不可能なナノ構造体が得られてしまっている。したがって、透析チューブ等に使用されている物質と、未反応のヒドラジドがなんらかの相互作用を起こしている可能性が高い。

今後、透析チューブの素材を変更してみる、未反応のヒドラジドを他の反応剤でキャップするなどといった方策により、この問題の解決に取り組む予定である。結果が得られ次第、ミセルのさらなる機能化（標的性獲得、薬剤の内包など）を執り行い、国内学会および学術誌にて報告する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

仁子陽輔・波多野慎悟・渡辺茂 「ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)を基盤とした刺激応答蛍光性ミセルの開発」 第 66 回高分子討論会

(2017/9/21、愛媛大学城北キャンパス)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁子 陽輔 (NIKO Yosuke)

高知大学教育研究部総合科学系複合領域  
科学部門・助教

研究者番号：20782056