

整理番号	2024-J-021	報告者氏名	土井直樹
------	------------	-------	------

研究課題名

双性イオンポリマーと pH 感受疎水性鎖から成る未踏共重合体の設計とがんエンドソームからの効率的脱出を目指した高分子ミセルの開発

<代表研究者>	機関名：岐阜薬科大学	職名：講師	氏名：土井直樹
<共同研究者>	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：

<研究内容・成果等の要約>

本研究では、近年当研究グループが新たに合成した pK_a が 7.1 の疎水性モノマーである 4-(Diethylaminophenethyl) methacrylamide (DPMA) を導入した高分子ミセルを開発することで、PDPMA のセグメントがプロトン化を受けることでプロトンスポンジ効果が惹起され、エンドソームからの脱出と効率的なミセル崩壊が可能となることを目指し研究を推進した。

まず、転化により生体適合性ポリマーとして振る舞う、Sulfobetaine methacrylate (SBMA) の単独固相重合を高速ボールミル振動処理により実施し、PSBMA の生成とともに機械的エネルギーを受けた PSBMA の主鎖の切断により発生した炭素中心ラジカルが熱力学的に安定であることを、粉砕試料の ESR スペクトル及びスペクトルシミュレーション解析により明らかにした。次に、主鎖切断型ラジカルを発生させた PSBMA の粉末を、DPMA の単独重合が進行しない環境下にて DPMA 粉末へと移し、混合粉末の高速ボールミル振動処理を行い、PSBMA の主鎖切断型ラジカルを開始剤とした DPMA の固相重合が進行しブロック共重合体が得られることを、生成物の $^1H/DOSY-NMR$ スペクトル測定により見出した。さらに、容器硬さと振動数に依存した機械的エネルギーの調整により、ブロック共重合体を構成する PSBMA と PDPMA の鎖長制御が可能であった。

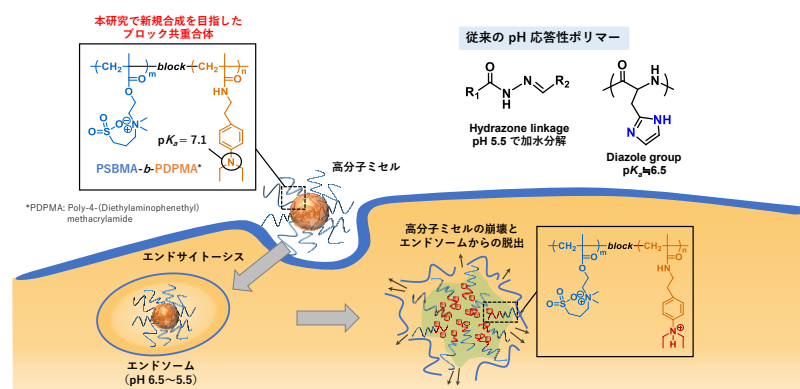


図 1. 本研究により見出した新たな pH 応答性高分子ミセルの概略図

得られた 2 種類のブロック共重合体を薄膜法により、イリノテカン塩酸塩を内包した微粒子を形成させ、粒子サイズが 120~160 nm のポリマーソームと高分子ミセルを調製した。フレキシブルな構造特性を有するポリマーソームは、がんエンドソームを模倣した pH 5.5 の環境下にて 24 時間で 90% 以上の薬物放出とミセル崩壊が認められた。さらに、得られたポリマーソームと高

分子ミセルはいずれも、ヒト肝がん細胞株 (HepG2) への投与から 2 時間後には、微粒子の崩壊とともにエンドソームからの脱出により放出されたイリノテカンが、細胞質ならびに核へと移行した様子が共焦点レーザー顕微鏡観察により認められた。また、アルブミンとの相互作用の高いイリノテカンによる細胞障害性 ($IC_{50}=11.8 \mu g mL^{-1}$) は、本微粒子キャリアへの搭載により約 3 倍亢進 ($IC_{50}=4.0 \mu g mL^{-1}$) することを実証した。以上の成果は、がんエンドソームからの高効率な脱出と、イリノテカンの高濃度な細胞内デリバリーを実現する微粒子キャリアの構築に関する非常に有用な知見である。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

【口頭発表】

- 1) 第 74 回高分子学会年次大会 「固相重合技術により疎水性鎖を導入したスルホベタインポリマーのがん細胞内デリバリー」
- 2) 第 74 回高分子学会年次大会 「カンプトテシンの高効率がん細胞内送達に向けた生体適合性ボトルブラシの設計」
- 3) 第 42 国際フォトポリマーコンファレンス 「疎水性鎖にピリジル基を有する両親媒性ブロック共重合体の構築とその pH 応答性高分子ミセルへの応用」
- 4) 第 71 日本薬学会東海支部総会・大会 「固相重合技術を用いた天然ポリアミノ酸から成るグラフトコポリマーの開発と DDS への応用」
- 5) 第 71 日本薬学会東海支部総会・大会 「大気中におけるモノマーの固相重合による転化率と生成高分子の物性に関する基礎研究」
- 6) 若手のためのフィジカル・ファーマ・フォーラム(PPF) 2025 (招待講演) 「天然多糖類の利活用による革新的機能性ナノ材料の創出に向けた固相重合技術基盤の構築」
- 7) 若手のためのフィジカル・ファーマ・フォーラム(PPF) 2025 「ドキシソルビシンの内包量に基づき疎水性コアを調整した生体適合性ナノ粒子の物性評価」
- 8) 日本病院薬剤師会・日本薬学会東海支部合同学術大会 2025 (特別講演) 「グリーンサステナブルな固相重合技術が拓く難治がん治療に資する薬物送達キャリア開発」
- 9) 第 47 回日本バイオマテリアル学会学術集会 「大気圧プラズマ処理ポリスチレン基材の表面改質による細胞接着制御と過酸化水素水添加の有用性」
- 10) 第 47 回日本バイオマテリアル学会学術集会 「Biocompatible nanoparticles from poly(γ -glutamic acid)-PMPC graft copolymer for doxorubicin delivery into cancer cells」
- 11) The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2025 「Sulfobetaine polymer-based bottlebrushes for boosting internalization into cancer cells」
- 12) 日本薬学会第 146 年会 「固相重合技術によるカンプトテシン修飾スルホベタインポリマーの開発」
- 13) 日本薬学会第 146 年会 (招待講演) 「固相重合技術による機能性共重合体の合理的設計に基づく DDS キャリア開発」
- 14) 日本薬学会第 146 年会 「フェナム酸系の非ステロイド性抗炎症薬の徐放性製剤の開発に関する基礎研究」

【ポスター】

- 1) 第 41 回日本 DDS 学会学術集会 「Temperature-responsible bottlebrushes for boosting internalization into cancer cells」
- 2) 第 41 回日本 DDS 学会学術集会 「固相重合技術によるカンプトテシン修飾スルホベタインポリマーの開発」

【原著論文】

- 1) Naoki Doi, Yukinori Yamauchi, Yasushi Sasai, Tsukasa Ide, Hiroya Ishizuka, Taiyo Inagaki, Miyu Sato, Masayuki Kuzuya, Shin-ichi Kondo, Amphiphilic Sulfobetaine Copolymer for Boosting Internalization into Cancer Cells: Synthesis by Green Innovative Solid-State Copolymerization and Characterization, *Macromolecules*, 2025, 58(22), 12163-12180.
- 2) Naoki Doi, Yukinori Yamauchi, Yasushi Sasai, Ryosuke Nagai, Madoka Ikawa, Masayuki Kuzuya, Shin-ichi Kondo, Characterization of Mechanochemical Solid-State Polymerization for Development of Sulfobetaine Polymer-Drug Conjugates: Design and Synthesis of Artemisinin-Conjugated Novel Methacrylamide Derivatives, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2026, 74(3), 260-268.

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

【目的】

粒子サイズを 10~100nm 程度に制御した高分子ミセルは、血液中に投与されると正常組織へ移行しにくく、がんへ選択的に抗がん剤を送達可能な微粒子として注目を集めている。一般的に高分子ミセルは、エンドサイトーシスと呼ばれる経路を介してがん細胞内に取り込まれ、エンドソームと呼ばれる膜に包まれ細胞内を輸送される。エンドソーム内の高分子ミセルは、その環境から脱出しなければ、種々の分解酵素を豊富に有するリソソームと最終的に融合してしまい、高分子ミセルに内包した抗がん剤ともども分解を受けてしまう。したがって、エンドソームからの脱出はがん治療を目的とした高分子ミセルにとって不可欠である。

pH 範囲が 6.5~5.5 であるがんエンドソームでは、本研究で開発する高分子ミセルの PDEPMA 部位が、高効率にプロトンを受けるとプロトンスポンジ効果 (塩濃度の増大に伴い浸透圧が上昇し、水分子の流入によってエンドソーム膜が破裂する効果) が惹起され、エンドソームからの高分子ミセルの脱出が期待できる。さらに、高分子ミセルを形成している PDEPMA はカチオン性を帯びるため、PDEPMA 間の疎水性相互作用が弱まり、共重合体間に静電的反発が生じ、高分子ミセルの崩壊ならびに内包した抗がん剤をがん細胞内にて選択的に放出できる。

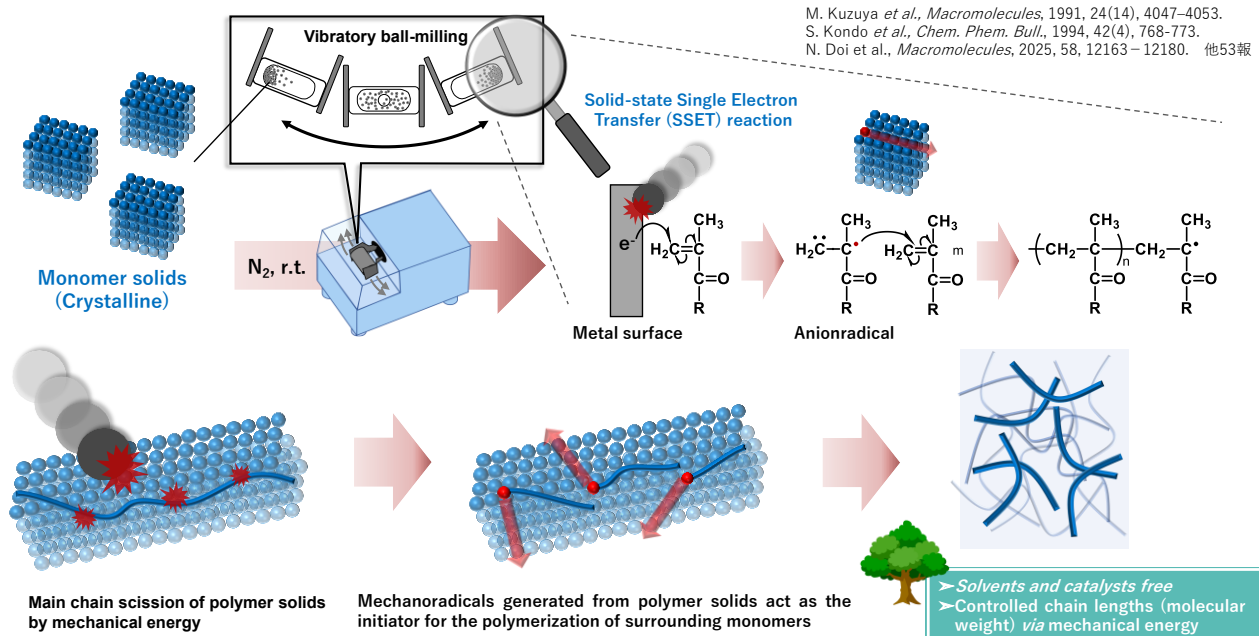


図2 メカノケミカル固相重合のメカニズム

ところで、室温窒素雰囲気下にてステンレス製容器とボールを用いた固体モノマーの高速ボールミル振動処理を行うと、容器とボールの衝突によって金属表面から自由電子が放出されることを本研究グループは実験的に証明しており、固相電子移動として知られている。したがって、固相電子と固体モノマーを構成する末端の分子の LUMO との相互作用によりアニオンラジカルが生じ、その後アニオンラジカルの SOMO と隣接する分子の HOMO-LUMO との相互作用に伴い、固相重合が進行することを見出している。しかしながら、本重合の主反応は、生成した高分子固体が粉碎による機械的エネルギーを受けることで、その主鎖の切断が惹起され、生じた主鎖切断型ラジカルが熱力学的に安定であれば、周囲のモノマーの重合に寄与することが明らかとなっている。本重合は、溶媒ならびに触媒を一切必要とせず、容器硬さや振動数に依存した機械的エネルギーの調整によって高分子固体の主鎖の破断、すなわち分子量の制御が可能である。従来、汎用性の高い液相重合法では、親水性の高い SBMA のような双性イオンモノマーと疎水性のモノマーを共に十分な濃度で溶解させた重合を実施することが困難であり、両者が溶解してもその後のポリマー析出等によって不均一な組成の共重合体を得られてしまうことが Roth らの研究グループによって指摘されている。[P. J. Roth et al., *Macromolecules*, 47, 750-762 (2014)]

そこで本研究では、図 3 に示すように、まず SBMA の単独固相重合を行い、生成した PSBMA

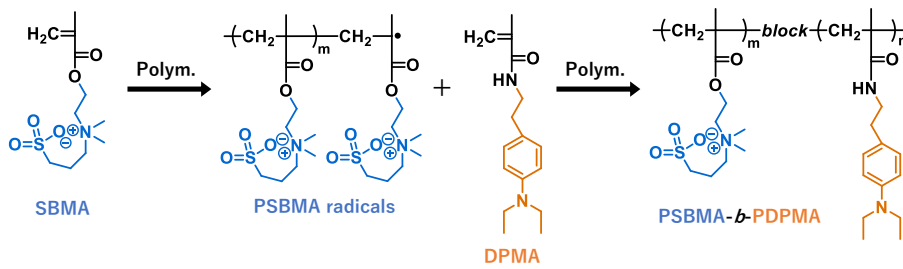


図3 新規 pH 応答性ブロック共重合体の合成スキーム

が機械的エネルギーを受けることで発生するメカノラジカルが熱力学的に安定な主鎖切断型ラジカルであれば、DPMA の重合開始剤としての利用によりブロック共重合体の合成が可能になると考えた。さらに、固相

重合では、振動数と容器硬さに依存した機械的エネルギーの調整により、生成高分子の鎖長を制御可能であるため、図4 に示すように、生成する PSBMA の鎖長をあらかじめ制御した後、DPMA の重合を行うことで、親水性鎖と疎水性鎖の組成が異なるブロック共重合体を設計することとした。

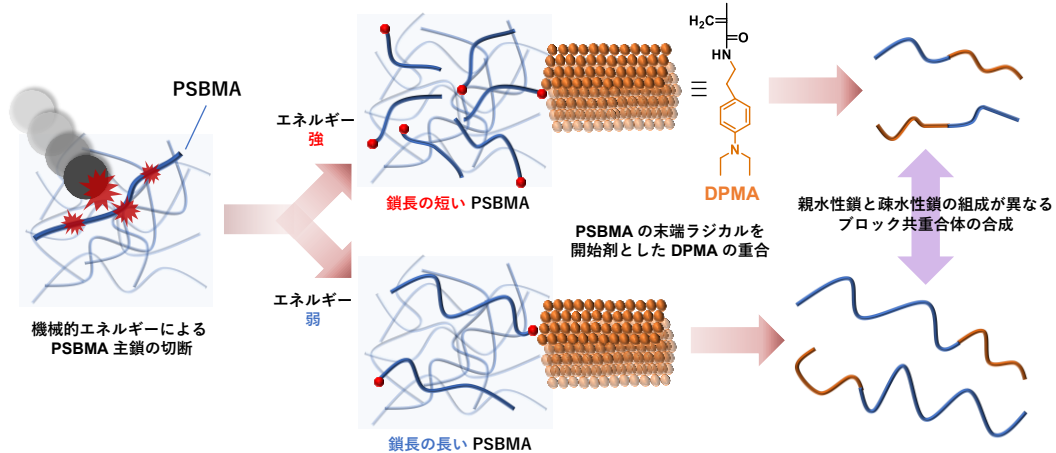


図4 機械的エネルギーを駆使した高分子固体の鎖長制御による共重合体開発

【結果・考察】

まず、SBMA の単独重合時の粉碎試料について、ESR スペクトル測定を行ったところ、図5 左下に示すような 5+4 本線のポリメタクリル酸誘導体の特徴的なスペクトルが認められ、スペクトルシ

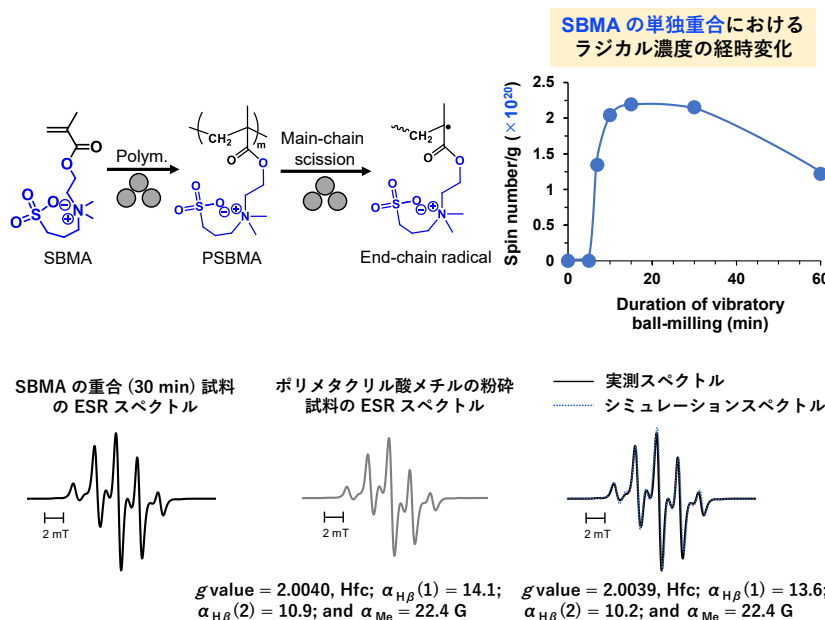


図5 SBMA の単独重合による生成試料の ESR スペクトル測定とそのシミュレーション解析

ミュレーションの結果から、g 値が 2.0039 の炭素中心ラジカルであり、超微細結合定数がいずれも既報のポリメタクリル酸メチルと同様の値を示したことから、主鎖切断型ラジカルを優位に発生していることを明らかにした。また、SBMA の重合時に発生したメカノラジカルの濃度推移は、図5 右上に示すように 15 分で最大値をむかえ、その後の不均化反応によってややラジカル濃度は低減したものの、10 の 20 乗個と非常に安定したラジカル濃度を示した。

そこで、振動数 60 Hz にて 30 分間の SBMA の重合を行い、得られた粉末を DPMA を含んだテフロン製容器へ移し、90 分間の固相重合を行うことで、PSBMA の鎖長が短いブロックコポリマーの合成を検討した。図6 に示すように、粉碎前後の試料の ¹H-NMR 測定により、SBMA のオレフィン由来のプロトンピーク b, b' の積分値の減少率より、SBMA の転化率は 97% であることが明らかとなった。その後の DP

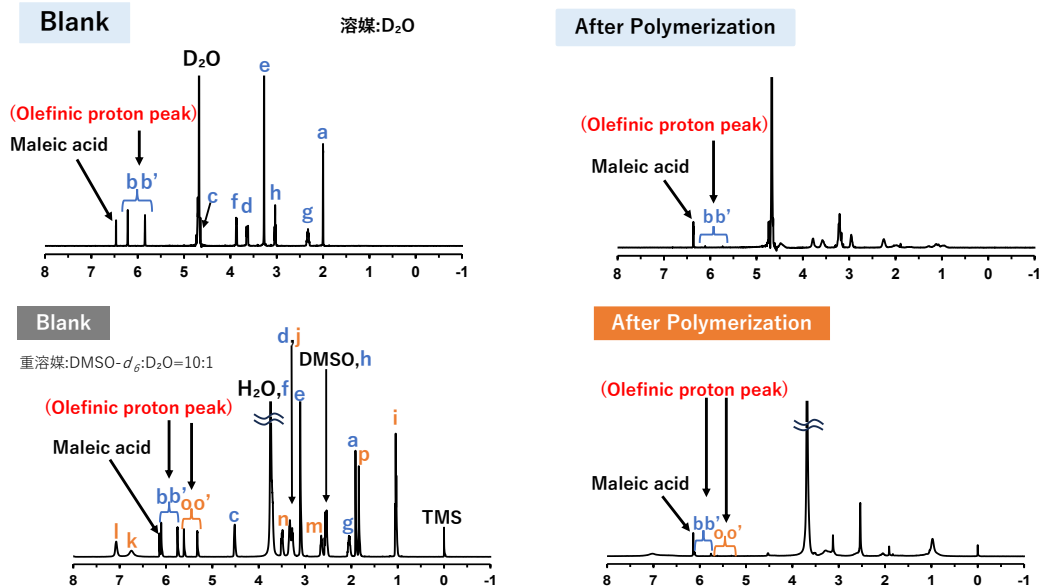
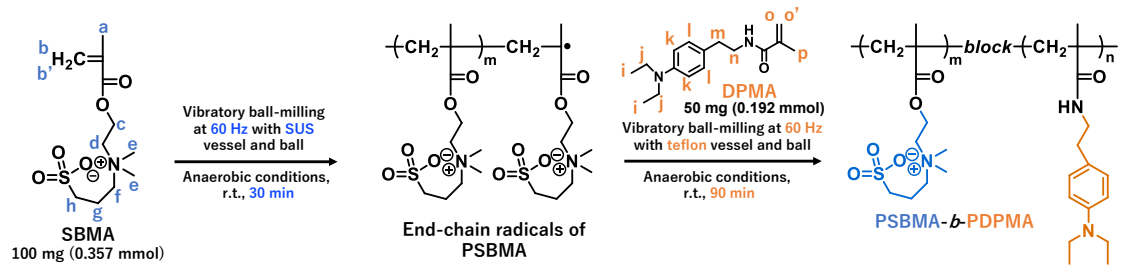


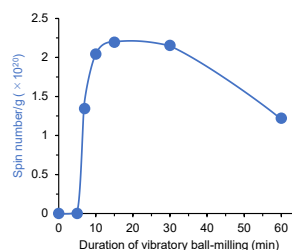
図 6 SBMA と DPMA の段階的な固相共重合による生成物の $^1\text{H-NMR}$

MA の重合についても同様に検討したところ、DPMA の転化率は 98% を示した。また、DPMA の重合前に残存していた SBMA は、DPMA の重合後においても 3% に維持されており、これは PSBMA の高分子固体の深部に SBMA が残存しているため、その後の DPMA の重合では重合に寄与していないことが考えられる。したがって、ジブロック以外の不均一な組成の共重合体の生成が生じにくいことが示唆された。

次に、振動数 25 Hz にて 6 時間の SBMA の重合を行った後、先で示した同様の条件にて DPMA を重合させることで、PSBMA の鎖長の長いブロックコポリマーの合成を検討した。SBMA と DPMA の転化率はそれぞれ 71% と 62.5% であり、先で示した重合に比べいずれも転化率が低いことが明らかとなった。この要因として、重合時の機械的エネルギーが弱ければ、PSBMA の主鎖の切断が抑制され、それに伴った主鎖切断型ラジカルの発生が減少していることが考えられる。そこで実際に、振動数 60 Hz あるいは 25 Hz のステンレス製容器とボールを用いた SBMA の単独重合により得られた粉砕試料の ESR スペクトル測定により、それぞれのラジカル濃度について算出したところ、振動数 60 Hz では 10 の 20 乗個のラジカル濃度を示したのに対し、振動数 25 Hz では 10 の 19 乗個と 10 倍近い差が認められたことから、その後の DPMA の転化率への影響が生じたと考えられる。

以上の合成により得られた、親水性鎖の鎖長の異なる 2 種のブロックコポリマーについて、図 8 に示すスキームに従い分離精製を行い、得られたブロックコポリマーについて $^1\text{H-NMR}$ 測定を実施した (図 9)。まず、機械的エネルギーの強い重合条件で得られたブロックコポリマーについて、PSBMA のメチレン由来のプロトンピーク h と PDPMA の芳香族由来のプロトンピーク e' を比較したところ、それぞれのコンポジションが 1:2.3 であることを明

振動数 60 Hz の SBMA の固相重合で発生したラジカル濃度の経時変化



振動数 25 Hz の SBMA の固相重合で発生したラジカル濃度の経時変化

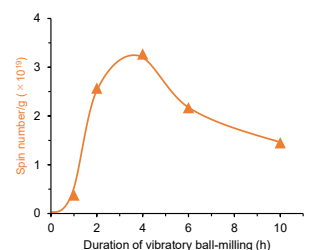


図 7 振動数の異なる重合条件における PSBMA のラジカル濃度の推移

示したところ、振動数 60 Hz あるいは 25 Hz のステンレス製容器とボールを用いた SBMA の単独重合により得られた粉砕試料の ESR スペクトル測定により、それぞれのラジカル濃度について算出したところ、振動数 60 Hz では 10 の 20 乗個のラジカル濃度を示したのに対し、振動数 25 Hz では 10 の 19 乗個と 10 倍近い差が認められたことから、その後の DPMA の転化率への影響が生じたと考えられる。以上の合成により得られた、親水性鎖の鎖長の異なる 2 種のブロックコポリマーについて、図 8 に示すスキームに従い分離精製を行い、得られたブロックコポリマーについて $^1\text{H-NMR}$ 測定を実施した (図 9)。まず、機械的エネルギーの強い重合条件で得られたブロックコポリマーについて、PSBMA のメチレン由来のプロトンピーク h と PDPMA の芳香族由来のプロトンピーク e' を比較したところ、それぞれのコンポジションが 1:2.3 であることを明

らかにした。また、機械的エネルギーの弱い重合条件で得られたブロックコポリマーでは、PSBMA と PDPMA のコンポジションが 1:1 であり、期待通りに親水性鎖の鎖長が調整されていた。また、

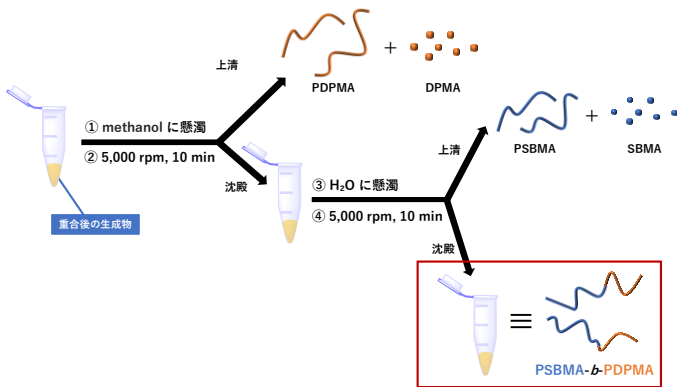


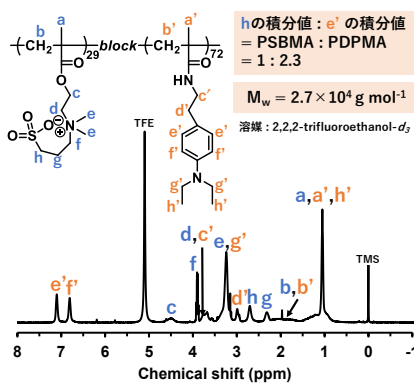
図 8 SBMA と DPMA の段階的な固相共重合により得られたブロック共重合体の分離精製

PSBMA と PDPMA のミクスチャーと、本重合により得られたブロックコポリマーについて、それぞれ ¹H/DOSY-NMR 測定を行ったところ、両者のミクスチャーでは PSBMA と PDPMA のプロトンピークとともに、2 つの拡散分布が認められたのに対し、ブロックコポリマーでは、1 つの拡散分布を示したことから、PSBMA と PDPMA のセグメントが結合していることを明らかにした。

そこで、得られたブロックコポリマーと、

トポイソメラーゼ I 阻害を示す抗がん剤であるイリノテカン塩酸塩をそれぞれトリフルオロエタノールに溶解後、薄膜法を用い微粒子を調製し、その後の透析によってイリノテカンを内包した微粒子を得た。得られた各微粒子の薬物内包量 DLC と内包効率 DLE を図 10 に示す式に基づき算出したところ、疎水性セグ

機械的エネルギーの強い重合条件で合成



機械的エネルギーの弱い重合条件で合成

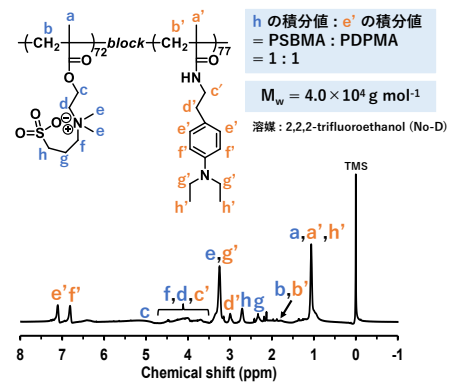
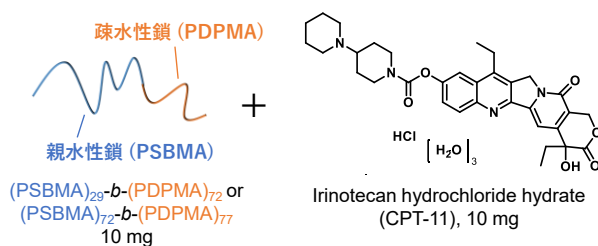


図 9 分離精製により得られた各ブロック共重合体の ¹H-NMR スペクトル

メントの鎖長が同様であるために、いずれのブロックコポリマーも同様の DLC と DLE の値を示した。また、得られた微粒子の粒子サイズを DLS 測定により評価したところ、PSBMA の鎖長の短いコポリマーと長いコポリマーでは、それぞれ 160 nm と 120 nm の粒子サイズを示し、透過型電子顕微鏡観察により、親水性鎖に比べ疎水性鎖の鎖長の長い微粒子は、多層であるポリマーソームの形成が認められた。一方、親水性鎖と疎水性鎖の重合度が同等の微粒子では、コアシェル構造の形成が認められた。



	(PSBMA) ₂₉ -b-(PDPMA) ₇₂	(PSBMA) ₇₂ -b-(PDPMA) ₇₇
DLC (%)	38.3	37.8
DLE (%)	62.0	60.7

$$DLC = \frac{\text{Weight of encapsulated CPT-11}}{\text{Weight of PSBMA-b-PDPMA encapsulated and CPT-11}} \times 100\%$$

$$DLE = \frac{\text{Weight of encapsulated CPT-11}}{\text{Weight of total CPT-11}} \times 100\%$$

- 【薄膜法】**
 1) Carbonate-Bicarbonate Buffer (pH 10) で透析
 2) PBS (pH 7.4) で透析

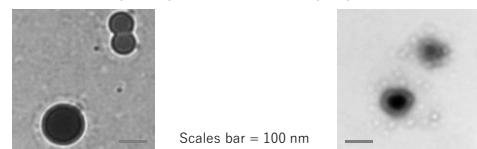
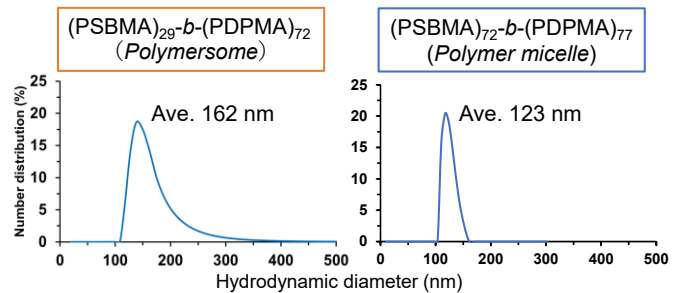
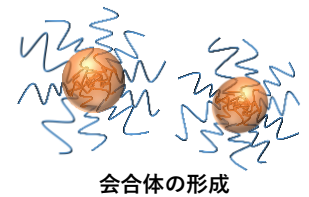


図 10 PSBMA-b-PDPMA により形成される微粒子の調製とその物性評価

次に、がん細胞の初期及び後期エンドソームを模倣した、pH 6.5 あるいは 5.5 における各微粒子の薬物放出性と粒子サイズ変化について検討した。(図 11) いずれも pH6.5 の環境下にて顕著な薬物放出が認められ、左側に示すポリマーソームは、右側に示すコアシェル構造を有する高分子ミセルに比べ、流動性の高い構造であるために、より効率的な微粒子の崩壊と薬物放出が認められた。

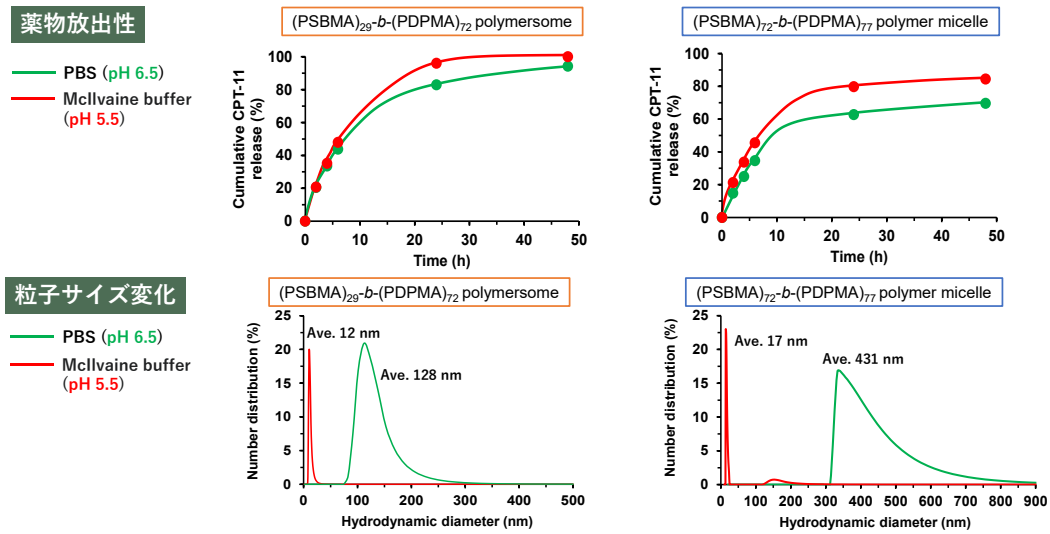


図 11 pH 変化における各微粒子の挙動変化

そこで、得られたポリマーソームをヒト肝がん細胞株 (HepG2) へ投与後、各時間インキュベートを行った細胞について、共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、30 分後にはエンドソームとポリマーソーム由来の青色蛍光の多くが一致していたことから、細胞取込の初期にはポリマーソームがエンドソームによって輸送されることが明らかとなった。(図 12) また、2 時間移行には放出されたイリノテカンの細胞質ゾルならびに核への移行が認められたことから、pH 変化に応じてポリマーソームがエンドソーム内にて崩壊および脱出したことが示唆された。

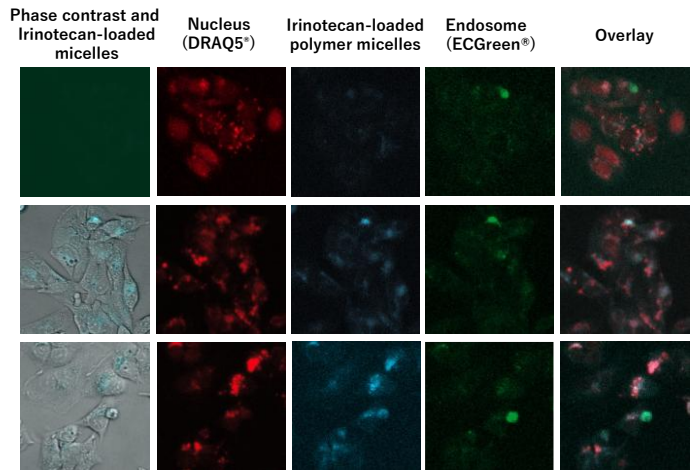
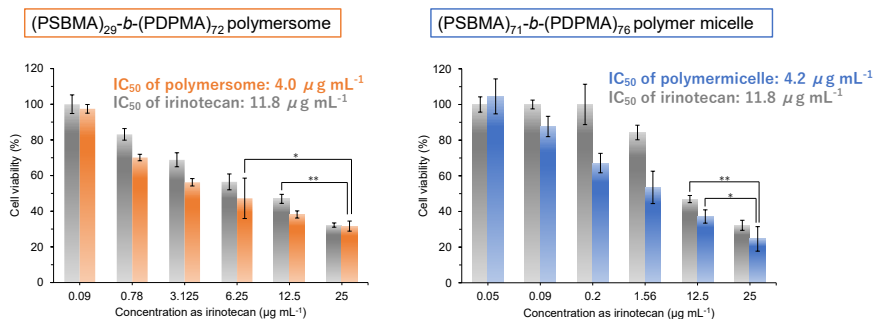


図 12 得られた (PSBMA)₂₉-*b*-(PDPMA)₇₂ から成るポリマーソームの細胞内動態



Data are shown as the mean ± S.D (n = 6).
Statistical significance was measured between two groups using unequal variances Welch's t-test. **p<0.01, *p<0.05.

図 13 カンボトシン内包微粒子の HepG2 に対する細胞障害性 (WST-1 assay)

さらに、各微粒子を HepG2 へ投与後、2 日間インキュベートを行った細胞の生存率について、WST-1 アッセイを用い評価したところ、いずれも IC₅₀ 値は約 4 µg/mL であり、アルブミンの吸着性に伴い細胞内移行が抑制されるイリノテカン (IC₅₀=11.8 µg/mL) が効率良く細胞内送達されていることが示唆された。

以上の研究成果は、固相重合技術による双性イオンポリマーと pH 感受疎水性鎖から成る共重合体の設計とがんエンドソームからの効率的脱出を目指した高分子ミセルの開発に向けた有用な知見であり、研究助成を賜りました泉科学技術振興財団に心より御礼申し上げます。