

量子構造化された高分子ミセルの構築

Constructing Structurally Quantized Polymeric Micelles

研究代表者 北九州市立大学 環境技術研究所 櫻井研究室 特任研究員 藤井翔太*

Shota Fujii

Micelles normally has a distribution in their aggregation number (N_{agg}). However, we have recently demonstrated the formation of perfectly monodisperse micelles whose N_{agg} always coincide with the face or vertex number of regular polyhedral structures (i.e., Platonic solids). We named them Platonic micelles due to their characteristic structures. The concept of Platonic micelles could be applied for all micellar system including polymeric micelles. In this study, we synthesized bottle brush based amphiphiles to prepare that kind of micelles and characterized them using small angle scattering measurements. Further, we also tried to prepare polyion complex (PIC) micelles using bottle brush polymers and investigate the structure.

要旨

両親媒性高分子が形成する高分子ミセルは、塗料や印刷、薬物輸送など工業的応用も検討されているナノ材料である。しかし、その応用において最も高い障壁となっているのが、高分子特有の性質の一つである分子量分布から生じるミセル粒径の分布である。この問題を解決するために、これまで様々な分子量制御重合反応が開発され報告されてきたが、厳密に分子量分布が単分散な高分子を得ることは未だ困難とされており、この問題の解決が急務となっている。これまででは重合法の改良によりミセル粒径分布の制御を試みてきたが、本申請課題は、プラトニックミセルというミセル科学において新しい概念を用いることで、高分子ミセル構造の精密制御の達成を試みる。

1. 緒言

両親媒性化合物が水中で自発的に自己集合して形成するミセルに関する基礎研究は古くから行われており、これまでに実験的かつ理論的にミセル科学、特に球状ミセルに関してはほとんど深く理解されている。¹⁻⁴まず、基本的にミセル形状はパッキングパラメータ ($a_e V/l$, a_e は平衡界面面積、 V は疎水部の体積、 l は疎水部の長さ) と呼ばれるタンフォードによって提案された非常に単純化したモデルによって予想することができる。またこの予想は実験結果と良く一致することも、多くの研究例によって、その理論を再現する結果が報告されてきた。また、球状ミセルの会合数についても、実験および理論的にそのミセルの熱力学的安定性について関係づけられ

ており、よく理解されている。基本的に、ミセル会合数と界面面積には、

$$N_{agg} = 4\pi l^2/a_e$$

の関係が成り立つ。さらに、ミセル会合数は SDS などの例で知られるように 60 程度と大きな値となることが多く、ほとんど単分散に近いが、必ず若干は分布があることが知られている。

しかしながら、これまでのミセルの常識とは大きく逸脱したミセルに関して最近報告された。そのミセルは、カリクサレンと呼ばれるベンゼン環がメチレンスパーサーによってつながった分子を骨格に有する両親媒性化合物からなり、その会合数は 20 以下と非常に小さく、面白いことに完全に単分散である。さらに大変興味深いことに、そのミセル会合数は必ずプラトンの正多面体の頂点数と一致する。⁵⁻⁸その理由として、表面被覆率とミセルの熱力学的安定性が密接に関係していることが考えられる。表面被覆率とは、ミセルの疎水性コアに当たる部分を球とすると、その球を同一の球帽がどれだけ効率的にカバーできるかを表すものである。表面被覆率が高いほど、その界面自由エネルギーが小さくなり、より安定なミセル構造となる。図 1 に表面被覆率と球帽の数つまりミセル会合数の関係を示す。会合数が小さい範囲では、プロファイルはある特定の値のときに表面被覆率は極大値を与え、その値はプラトンの正多面体の頂点と一致する。今のところ、この被覆率と会合数の関係によりプラトニックミセルが形成されていると考えている。

このプラトニックミセルの概念は、全てのミセルにおいても適応できると考えられており、実際に

* 北九州市立大学 国際環境工学部 櫻井研究室 特任研究員

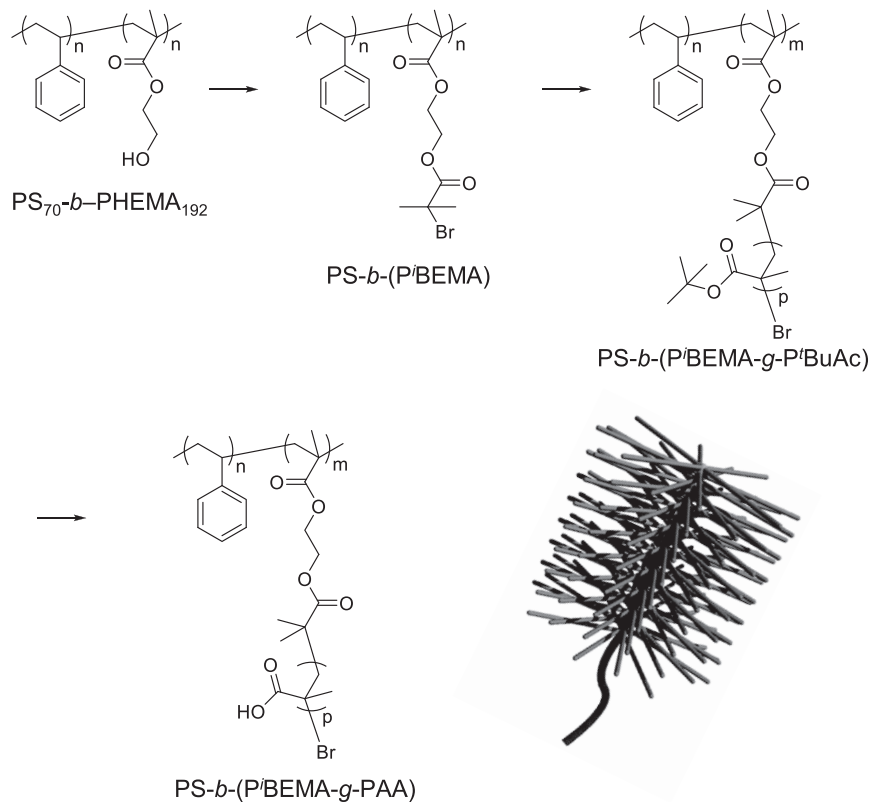


図1 ATRPを用いた Grafting From法によるボトルブラシポリマー[PS-*b*-(P'BEMA-*g*-L-PAA)]の合成

サーファクチンと呼ばれる脂質も同様の単分散でかつその会合数が正多面体の頂点数と一致するミセルを形成することが報告されている。しかし、これまで報告されてきたプラトニックミセルは、低分子系のものであり、高分子系における同様のミセルの報告はないのが現状である。

高分子ミセルについての研究は30年ほど前から国内及び国外で行われおり、主に薬剤キャリアとしての応用として着目されてきた。⁹その理由として、高分子ミセルの粒径がおよそ30~100ナノメートルであり、癌細胞特異的に集積しやすいものであるためである。しかし、実際その薬理効果は未だ低く、その理由としてミセル粒径の精密制御が完全でないためであると考えられており、現在もより単分散な高分子ミセルを創製するために様々な手法による試みがなされている。精密重合法の開発や、単分散粒子として良く知られているウイルス模倣をペプチドにより構築する研究などが報告されているが、いずれも完全に単分散な高分子ミセルではなく、さらに高い技術やコストの問題がある。そこで本研究では、プラトニックミセルの概念を用いて、高分子ミセル構造

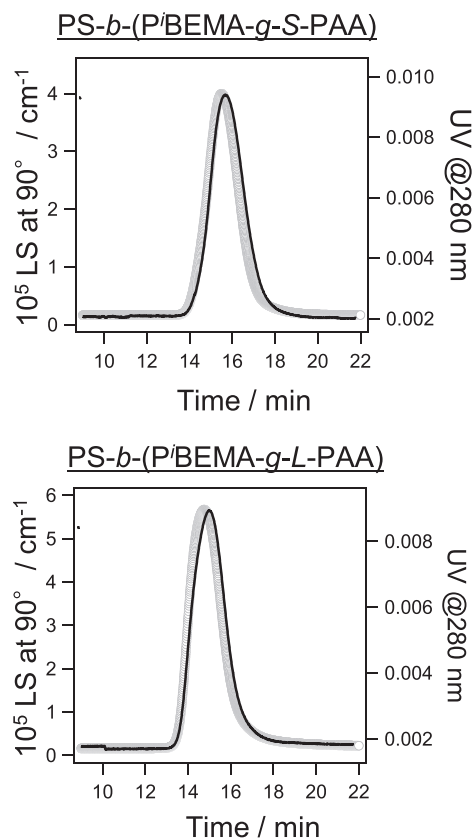


図2 [PS-*b*-(P'BEMA-*g*-L-P'BuAc)]と[PS-*b*-(P'BEMA-*g*-L-P'BuAc)]のGPC-MALS 溶出曲線

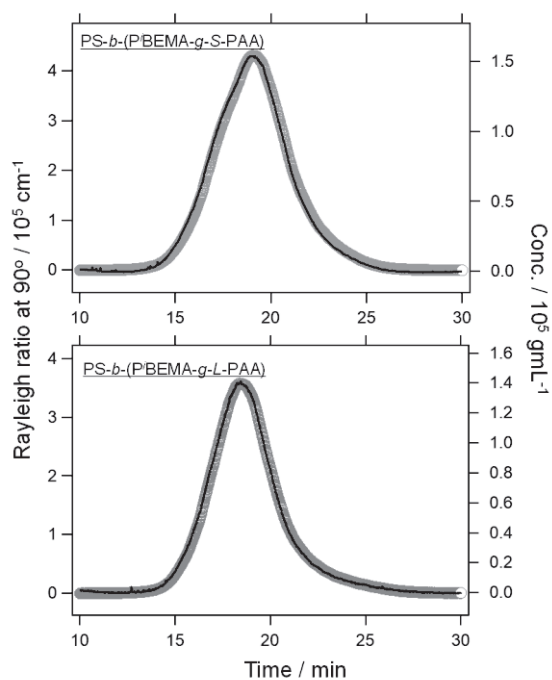


図 3 ボトルブラシポリマー [PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-L-PAA)] と PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-S-PAA)] から成るミセルの FFF-MALS 溶出曲線 (黒線: UV 吸光度から算出したミセル濃度、グレイ点: 光散乱強度)

を精密制御することを試みる。

この目標を達成するために採用した高分子骨格として、ボトルブラシ型ポリマーに着目した。ボトムブラシ型ポリマー中では、高分子主鎖から側鎖高分子が高密度に生えているため、側鎖間の排除体積効果により主鎖が伸張した構造を示す。そのため、その構造は直鎖状高分子に比べてより明確化されたものとなっている。本研究では、このボトルブラシ型ポリマーを親水部として採用したミセルの創製を試み、得られるミセル構造をボトムブラシポリマー構造に基づき制御することを目的とする。

2. ボトルブラシ型ポリマーからなるミセルの創成と構造評価

2.1 ボトルブラシ型両親媒性ポリマーの合成

ボトルブラシ型両親媒性ポリマー [PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-PAA)] を図 1 に示す合成法にて合成した。まず、スチレン (S) とヒドロキシ (HEMA) から成るジブロック共重合体をアニオン重合に基づいて合成し、その後、アクリル酸部位に原子移動ラジカル重合 (ATRP) における反応開始点となる PS-*b*-(P(BE)MA) を付加した。その後、tert-ブチル基で保護されたアクリル酸 (AA-

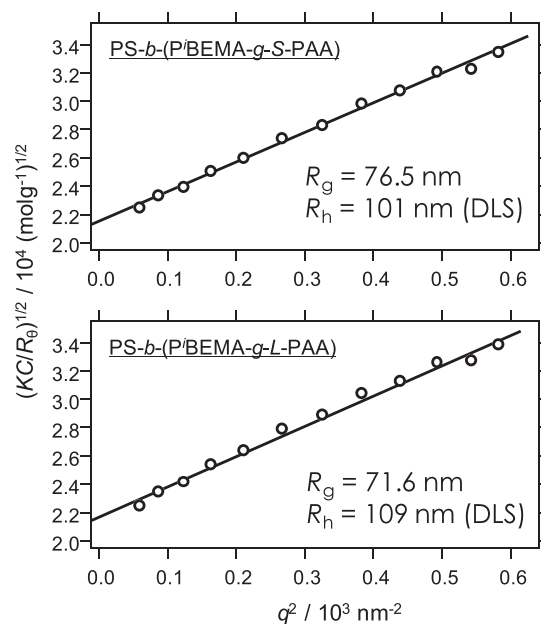


図 4 ボトルブラシポリマー [PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-L-PAA)] と PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-S-PAA)] から成るミセルの FFF-MALS 溶出曲線のピークトップにおける Berry プロット

tBu) を ATRP に基づき重合した。このとき、重合反応を制御することでブラシ部位の高分子鎖が長いもの [PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-L-P(Bu)Ac)] と短いもの [PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-S-P(Bu)Ac)] を合成した。最後に酸処理により脱保護し、目的物質である PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-PAA) を得た。最終生成物は両親媒性ポリマーであるため、ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) の際にカラムに吸着してしまう。そのため、ボトルブラシポリマーの分子量は、最終生成物の前駆体である PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-P(Bu)Ac) の分子量から見積もられる計算分子量が決定した。図 2 に PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-P(Bu)Ac) の GPC-MALS 溶出曲線を示す。得られたポリマーの分子量は、PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-L-P(Bu)Ac)、PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-S-P(Bu)Ac) でそれぞれ $6.16 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ 、 $1.76 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$ であった。つまり、最終生成物の計算分子量は、PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-L-PAA) と PS-*b*-(P(BE)MA-*g*-S-PAA) のそれぞれ $3.43 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ 、 $9.94 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ であった。さらに、どちらのポリマーも比較的狭い分子量分布 ($M_w/M_n < 1.2$) であった。

2.2 ボトルブラシ型両親媒性ポリマーが形成するミセルの構造評価

図 3 にボトルブラシ型両親媒性ポリマーが形成す

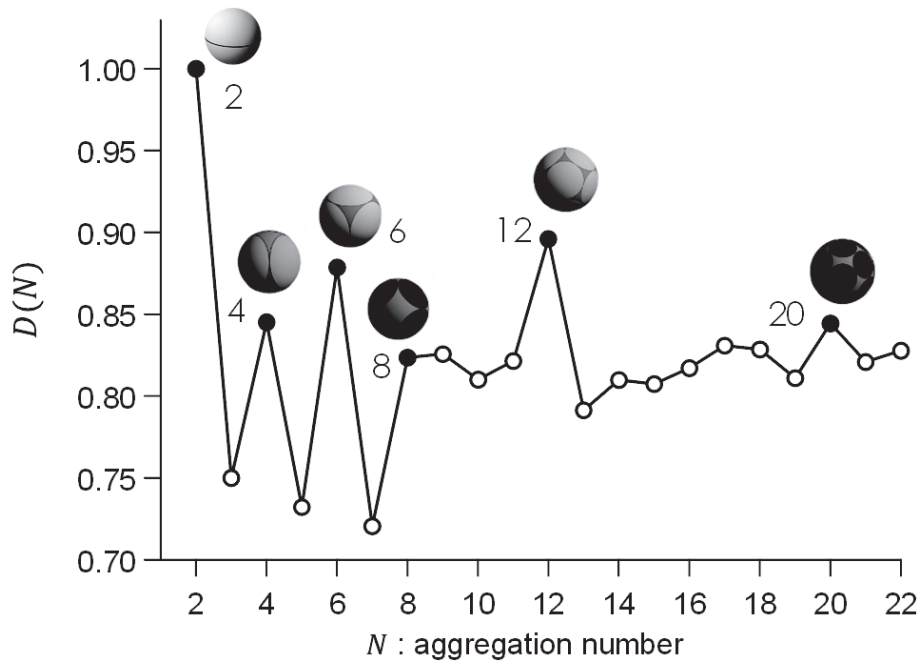


図5 テーマス問題における $D(N)$ vs N のプロフィール

るミセルのFFF-MALS 測定結果を示す。ピークの形状はややいびつではあるが、UV プロファイルと光散乱強度プロファイルがほぼ完全に重なっていることが分かる。UV 吸収はサンプルの濃度に依存し、光散乱強度はサンプル濃度とサンプル分子量に依存する。つまり、この重なっている領域においてミセル分子量が一定であることを示している。ピークトップにおける Berry プロットの結果を図4に示す。傾きから見積もられるミセルの回転半径 (R_g) は、PS-*b*-(P \dot{B} EMA-*g*-S-PAA)、PS-*b*-(P \dot{B} EMA-*g*-L-PAA) でそれぞれ 76.5 nm、71.6 nm であった。DLS 測定から見積もられたミセルの流体力学的半径 (R_h) は、PS-*b*-ミセルのそれぞれで $N_{agg} = 6.0$ と 2.0 であった。また、得られたミセルの分子量分布 M_w/M_n はどちらも 1.02 であり、ミセルは単分散であることが分かった。

緒言で述べたように、プラトニックミセルはミセル会合数が 30 以下のとき、特に 20 以下のときに単分散性を伴いながら会合数がプラトンの正多面体の頂点数と一致するという性質を示す。本研究で示したボトルブラシ型ポリマーが形成するミセルの会合数のうち $N_{agg} = 6.0$ はプラトニックナンバを満たしている。このプラトニックミセルが形成される理由の一つに数学の未解決問題の一つであるテーマス問題が深く関わっていると考えられている。テ

(P \dot{B} EMA-*g*-S-PAA)、PS-*b*-(P \dot{B} EMA-*g*-L-PAA) でそれぞれ 101 nm、109 nm であった。内部コアが密に満たされた球状粒子において R_g/R_h はおよそ 0.77 となる。本研究で得られたミセル系についても R_g と R_h の関係がおよそ 0.77 付近となったことから、ミセル構造は従来のミセル系同様のコアシェル型であることが示唆された。また Berry プロットの切片から求められるミセルのモル質量は、PS-*b*-(P \dot{B} EMA-*g*-S-PAA)、PS-*b*-(P \dot{B} EMA-*g*-L-PAA) でそれぞれ 2.06×10^7 g mol $^{-1}$ 、 1.97×10^7 g mol $^{-1}$ であった。ユニマー分子量を使って、各ミセルの会合数を酸シユルすると、PS-*b*-(P \dot{B} EMA-*g*-S-PAA) ミセル、PS-*b*-(P \dot{B} EMA-*g*-L-PAA) ミセル問題は、ある球面上にある数の球帽を最密充填するように配置した際のカバー率を考える数学問題である。図5に球帽の数 (N) に対して最密充填の際に得られるカバー率 $[D(N)]$ をプロットした結果を示す。図5に示すように、 $D(N)$ プロファイルは $N < 20$ の領域でジグザクのプロファイルとなり、プラトンの正多面体の頂点数のとき極大値を示す。界面活性剤がミセルを形成する際に、その親水性部位は疎水性部位を効率よく覆うように自己集合する。界面活性剤の親水-疎水の界面面積は、テーマス問題で考える球帽と同等である。つまり、幾何学的観点から、ミセル形成とテーマス問題は関係しており、テ

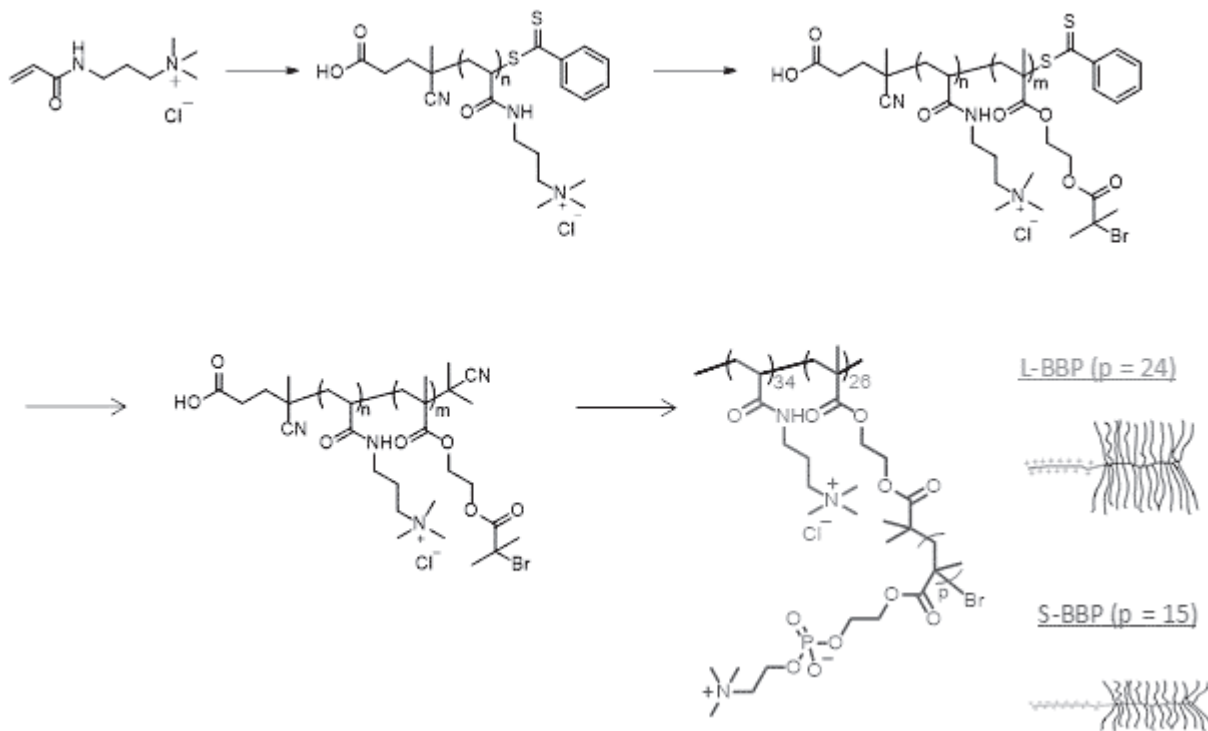


図6 RAFT および ATRP 重合法を用いたカチオン性ポリマー含有 MPC 系ボトルブラシポリマー [pAPTAC-*b*-(P'BEMA-*g*-pMPC)] の合成スキーム

ス問題で示すような高い $D(N)$ を示す会合数 N は、疎水-水界面の界面自由エネルギーを最小化できていると考えられるため、このとき得られるミセルは熱力学的に安定であると言える。さらに、図5のプロファイルを見て分かるように、 $N=2$ のときは、 $D(N)$ は最も高い値を示す。このため、 $N_{\text{opt}} = 2.0$ はプラトニックナンバーではないが、 $D(N)$ の観点から高いカバー率が期待でき、ミセル構造がより安定となるため、プラトニックミセルとして振舞うことが出来る考える。

3. ボトルブラシ型ポリマーからなるポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルの創成と構造評価

3.1 DDS における PIC ミセル

ドラッグキャリアとして、疎水性の薬剤だけでなく親水性の核酸医薬や遺伝子 (DNA) の送達も求められている。通常ミセルは疎水性の薬剤をその疎水コアに内包するため、核酸を運ぶことはできない。この問題を解決する方法として、ポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルを利用する方法が多数報告されている。¹⁰⁻¹² カチオン性と中性のポリマーからなるジブロック共重合体とアニオン性ポリマーである DNA を混ぜると、カチオン-アニオン間の静電相互作用に

よって電荷が打ち消しあうことで PIC が形成される。このとき、形成された PIC の疎水部-水界面の界面自由エネルギーを下げるため、中性ポリマー鎖がその周りを覆い、ミセル様構造を形成し、粒子構造を安定化する。このようなミセルは PIC ミセルと呼ばれ、核酸などのアニオン性ポリマーを腫瘍幹部送達でき

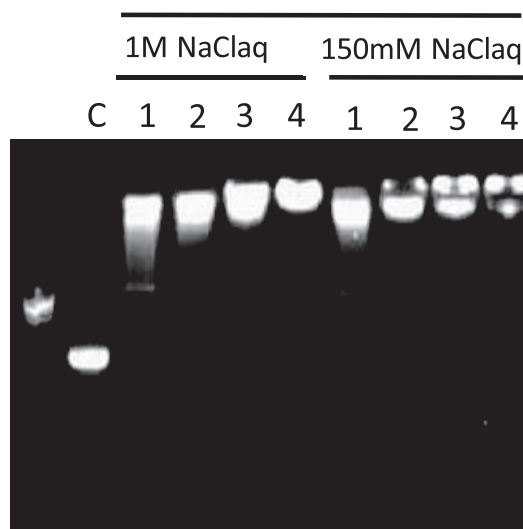


図7 150 mM および 1.0 M における BBP/DNA 複合体のアクリルアミドゲル電気泳動の結果 (C: DNA のみ、ナンバー: N/P 比)

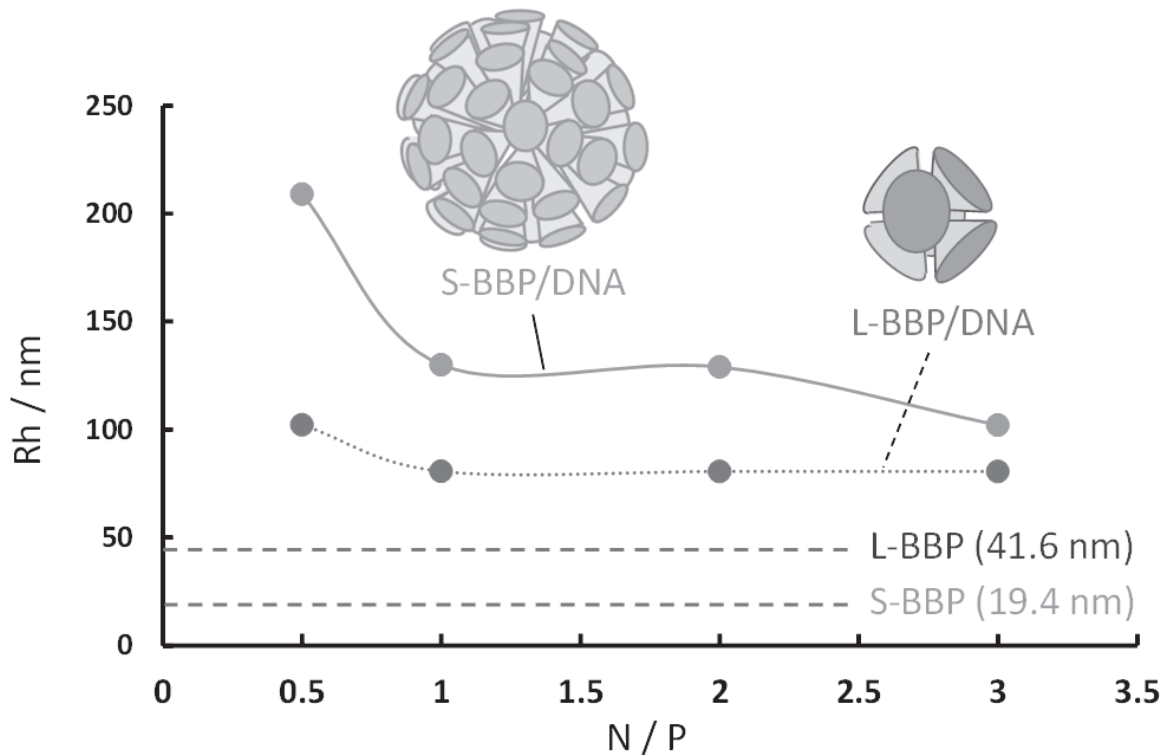


図8 BBP/DNA 複合体の粒径測定結果と N/P 比依存性

るキャリアとして注目されている。これまで報告されてきた PIC ミセルはどれも分布が広く、その形状も使用する核酸の形状やコンフォメーションに依存するなどといった構造制御の面で未だ課題が残っている。そこで本研究で提案するプラトニックミセル性の付与によりより構造制御された PIC ミセルが調製可能であると考えた。具体的には前項と同様に、ポトルブラシポリマーを親水部に導入したカチオン性鎖含有ブロック共重合体を合成し、核酸や DNA と混ぜることで PIC ミセルを調製する。得られたミセル構造は、光散乱法により解析する。

3.2 カチオン性ポリマー含有 MPC 系ポトルブラシポリマーの合成

図6にカチオン性ポリマー含有 MPC 系ポトルブラシポリマーの合成スキームを示す。まず、可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合法により (3-Acrylamidopropyl)trimethylammonium Chloride (APTAC) を重合し、pAPTAC を得た。続いて、得られた pAPTAC の末端から、2-(2-Bromoisobutyryloxy)ethyl methacrylate (BIEM) を重合し、pAPTAC-*b*-

pBIEM を得た。pAPTAC-*b*-pBIEM は、両親媒性ポリマーであるため、GPC カラムに吸着してしまい、その分子量を正確に求めることが出来なかった。最後に pAPTAC-*b*-pBIEM から 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) を ATRP に基づき重合し、目的生成物である pAPTAC-*b*-(p⁺BEMA-*g*-pMPC) を得た。このとき、MPC 鎖の分子量が短いものと長い物をそれぞれ *S*-BBP と *L*-BBP とした。

得られた最終生成物の分子量を GPC-MALS 測定により決定したところ、重合時のコンバージョン率から求められる計算分子量ではおよそ $M_n = 1.2 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ (*S*-BBP), $2.2 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ (*L*-BBP) のポリマーが出来ているはずであるが、実際の実測分子量は *S*-BBP は $M_n = 2.2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ 、*L*-BBP は $1.0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ であり、それぞれ会合数 $N_{agg} = 10$ 程度に相当する集合体を形成していることが分かった。合成したブロック共重合体のどちらのブロックも水可溶性成分であるため、自己集合体を形成するとは考えづらいが、おそらく MPC 部位に含まれる両性イオンのリン酸基と APTAC のカチオン性基が静電的に相互作用し、凝集体を形成してしまっていると考えられる。

3.2 BBP と DNA からなる PIC ミセルの調製とキャラクタリゼーション

図8にBBP/DNA複合体のアガロースゲル電気泳動の結果を示す。使用したDNAはpGL4.76 (5121bp)であった。N/P = 1.0以上のサンプルはほとんどウェルにとどまっていた。これはN/P = 1.0以上において加えたDNAが全て複合体に取り込まれていることを示唆している。また溶媒のNaCl濃度を1.0 Mに変化させても複合体は壊れることなく形成されたままであり、非常に安定性の高い複合体が形成されていることが示唆された。

BBP/DNA複合体の粒径のN/P依存性を図9に示す。まず、BBPだけで分子構造から見積もられるサイズより大きな粒子が検出され、S-BBPでは19.4 nm、L-BBPでは41.6 nmの複合体を形成していることが分かった。これにDNAを加えるとどちらも非常に大きな粒径 (>100 nm)へと変化したことから複合体の形成が示唆された。また興味深いことに、どのN/PにおいてもS-BBP/DNAの方がL-BBP/DNAより大きな複合体を形成していた。

この原因としてミセル構造決定に重要なパッキングパラメータが関わっていると考えられる。ミセルの会合数は親水-疎水の界面面積 (a_e) に強く依存し ($N_{agg} = 4\pi R^2/a_e$)、界面面積が大きいほど会合数は小さくなり、界面面積が小さいほど会合数は大きくなる。ここでボトルブラシポリマーの構造を考えると、より長い側鎖を付加したL-BBPはS-BBPに比べて、界面面積が大きくなると考えられる。これにより形成されるPICミセルの会合数は小さくなり、それに伴い得られる粒子径は小さくなったと考えられる。

4. まとめ

本研究では、プラトニックミセルの概念を利用して、ミセル構造の精密制御を試みた。このときミセルの会合数や形状を決定する重要なパラメータの一つである親水-疎水の界面面積を制御する目的としてボトルブラシポリマーを親水部に有するジブロック共重合体を新規に合成した。疎水部ブロックに親水性ボトムブラシポリマーを付加した系では、ミセル会合数は非常に小さくどれもプラトンの正多面体の頂点数もしくはプラトニックミセルの概念に一致する会合数となった。さらに、どのミセルも単分散であ

った。またこれらミセル会合数はボトルブラシポリマーのブラシ部位に相当する高分子鎖の分子量に強く依存したものであった。つまり、ブラシ部位の分子量が大きくなると、それに伴い界面面積も大きくなり、会合数は小さくなる。また反対にブラシ部位の分子量が小さいと界面面積は小さくなり、ミセル会合数は大きくなる。

さらに、このボトルブラシポリマーの特徴はPICミセルにおいても現れた。カチオン性ブロック鎖に親水性ボトルブラシポリマーを付加した共重合ポリマーに、DNAを混合することでPICミセルを調製した。このPICミセル系においてもボトルブラシポリマーのブラシ部位の重合度によってミセル粒径を制御可能であることを示した。今後は、このPICミセルの会合数や内部構造を明らかにし、遺伝子キャリアとしての機能を評価していく予定である。

発表論文

[1] Shota Fujii, Maho Ogata, and Kazuo Sarakui, "Synthesis and characterization of bottle brush polymer-based polyion complex micelles", in preparation

参考文献

1. Nagarajan, R., Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail. *Langmuir* **2002**, *18*(1), 31-38.
2. Jusufi, A.; LeBard, D. N.; Levine, B. G.; Klein, M. L., Surfactant Concentration Effects on Micellar Properties. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*(3), 987-991.
3. Vincent, B., McBain and the centenary of the micelle. *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, *203*, 51-54.
4. Hartley, G. S., Organised Structure in Soap Solutions. *Nature* **1949**, *163*, 767.
5. Fujii, S.; Sanada, Y.; Nishimura, T.; Akiba, I.; Sakurai, K.; Yagi, N.; Mylonas, E., A Stimulus-Responsive Shape-Persistent Micelle Bearing a Calix[4]arene Building Block: Reversible pH-Dependent Transition between Spherical and Cylindrical Forms. *Langmuir* **2012**, *28*(6), 3092-3101.
6. Fujii, S.; Yamada, S.; Matsumoto, S.; Kubo, G.; Yoshida, K.; Tabata, E.; Miyake, R.; Sanada, Y.; Akiba, I.; Okobira, T.;

Yagi, N.; Mylonas, E.; Ohta, N.; Sekiguchi, H.; Sakurai, K., Platonic Micelles: Monodisperse Micelles with Discrete Aggregation Numbers Corresponding to Regular Polyhedra. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 44494.

7. Kellermann, M.; Bauer, W.; Hirsch, A.; Schade, B.; Ludwig, K.; Böttcher, C., The First Account of a Structurally Persistent Micelle. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*(22), 2959-2962.

8. Miyake, R.; Fujii, S.; Lee, J. H.; Takahashi, R.; Sakurai, K., Dual and multiple stimuli-responsive platonic micelles bearing disaccharides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2019**, *535*, 8-15.

9. Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y., Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 37-48.

10. Kanayama, N.; Fukushima, S.; Nishiyama, N.; Itaka, K.; Jang, W.-D.; Miyata, K.; Yamasaki, Y.; Chung, U.-i.; Kataoka, K., A PEG-Based Biocompatible Block Cationic Copolymer with High Buffering Capacity for the Construction of Polyplex Micelles Showing Efficient Gene Transfer toward Primary Cells. *ChemMedChem* **2006**, *1* (4), 439-444.

11. Oba, M.; Demizu, Y.; Yamashita, H.; Kurihara, M.; Tanaka, M., Plasmid DNA delivery using fluorescein-labeled arginine-rich peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23* (15), 4911-4918.

12. Florinas, S.; Liu, M.; Fleming, R.; Van Vlerken-Ysla, L.; Ayriss, J.; Gilbreth, R.; Dimasi, N.; Gao, C.; Wu, H.; Xu, Z.-Q.; Chen, S.; Dirisala, A.; Kataoka, K.; Cabral, H.; Christie, R. J., A Nanoparticle Platform To Evaluate Bioconjugation and Receptor-Mediated Cell Uptake Using Cross-Linked Polyion Complex Micelles Bearing Antibody Fragments. *Biomacromolecules* **2016**, *17*(5), 1818-1833.