

氏名	山本翔太		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第208号		
学位授与の日付	2016年3月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文の題目	光分解性架橋剤で連結された高分子の合成と光応答性ナノ粒子の開発		
論文審査委員	主査	神奈川大学	教授 山口和夫
	副査	神奈川大学	教授 加部義夫
	副査	神奈川大学	教授 木原伸浩
	副査	神奈川大学	教授 菅原正

【論文内容の要旨】

高分子架橋によるゲル形成や、抗体-薬物複合体に基づくガン治療薬のように、二つ以上の同一もしくは異種分子をうまく複合化すると、各々が単独で存在する時と決定的に異なる機能の創発や機能性の向上が起こる。さらに近年では、反応選択性・効率・速度を格段に向上させるクリック反応の進歩が加わり、さまざまな有機・無機・生体材料のコンジュゲート材料が生み出されている。このような異種分子を効率よく結合させ、新たな性質や高機能を有する材料を創り出すための接合部位を架橋剤と呼んでいる。さらに、水溶性や外部刺激などに応答する架橋剤なども開発され、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の担体として用いられる高分子集合体の原材料であるブロック共重合体や有機-無機ハイブリット材料など多種多様な応用が報告されている。そこで本論文では、コンジュゲート材料の表面に光分解特性を付与すべく 2-ニトロベンジル基を含む光分解性ヘテロ二価性架橋剤を新規開発し、この構造を母体とした光分解性両親媒性ジブロック共重合体の合成を行った。次に同高分子より高分子集合体の一種である光分解性ポリマーソームを形成し、その構造の評価および光応答的な内包物放出挙動の解析を行った。またこの研究と並行して、既存の光分解性架橋剤で金ナノ粒子の表面を修飾することで、タンパク質周辺の分子込み合いを光制御可能な新しいコンジュゲート材料の開発に取り組んだ。

第一章 諸論

本章では、本研究の背景と目的について詳しく述べる。

第二章 光分解性ジブロック共重合体合成のための *N*-(2-ニトロベンジル)イミドを有するヘテロ二価性架橋剤の開発

本章では、架橋剤に 2-ニトロベンジルイミドを導入した光分解性ヘテロ二価性架橋剤を開発し、その架橋剤を用いて光分解性両親媒性ジブロック共重合体を合成した。さらにそのジブロック共重合体に近紫外光を照射し、ブロック間の切断を確認した報告をしている。この架橋剤は、片末端にアルキン、もう片末端にマレイミドを持つ構造であり、Huisgen 環化付加反応と Michael 付加反応

の二種類のクリック反応に適応できる。さらにアルキンはトリメチルシリル基でマレイミドはフランで保護それぞれ保護した二種類の架橋剤を用いることで、別途精密合成した疎水性および親水性ポリマーをカップリングさせることができ、高収率・高純度で各ポリマー鎖が精密に制御された多種の光分解性ジブロック共重合体の合成に成功した。得られたブロック共重合体の 0.1 mM THF 溶液を調製し、光分解反応を UV 測定によるスペクトル変化で追跡した結果、分子量や分子種に関わらず、近紫外光($\lambda > 320$ nm)に高感度で応答し、同程度のエネルギー(12 - 17 J/cm²)でブロック間を切断できることがわかった。

第三章 光応答性ポリマーソームの構造解析と内包物放出挙動

本章では、第二章で合成した光分解性ジブロック共重合体を用いて高分子集合体の一種であるポリマーソームを調製し封入物の光放出実験を行った。この研究では、分子量を 750 と固定化した poly(ethylene glycol) (PEG) と分子量を 4000、6000、8000 と変えた polystyrene(PS) からなる PS-*b*-PEG(Mn = 5700, Mn = 7600, Mn = 9300) のジブロック共重合体、poly(ϵ -caprolactone) (PCL) と PEG とのジブロック共重合体(PCL-*b*-PEG (Mn = 7700))を用いることにより、疎水性鎖長とブロックの種類がポリマーソーム構造や光放出にどのような影響を与えるかを調べた。ポリマーソームは、ジブロック共重合体の THF 溶液(0.8 mg/mL)を 10 mM リン酸緩衝液(pH=7.4)に滴下し、二時間攪拌することで調製した。バッチ法の動的光散乱(DLS)、多角度光散乱(MALS)および動的光散乱測定モジュールを付属した Field Flow Fractionation (FFF)による解析、ならびに透過型顕微鏡(TEM)によりポリマーソーム構造を観察した結果、疎水性鎖長の伸展に伴い粒径も増加する傾向を示した。さらにポリマーソームは、照射後も疎水性カプセルとして中空球構造を維持していることがわかった。最後にモデル薬剤として封入したフルオレセインの室温での光放出速度は、疎水性鎖長の伸展に伴い減少し、高分子種の違うポリマーソームでは放出速度に大きな変化がなかった。さらに、同様の放出実験を 37°Cで行うと、放出速度が格段に大きくなることも見出している。以上の結果から、今回開発した光応答性ポリマーソームは、2-ニトロベンジル基の光分解後も疎水性膜が内包親水性物質の放出を妨げており、疎水性鎖長を短くすることや、熱(照射で発生する熱も)を与えることが放出促進に有効であるということが明らかになった。

第四章 光解離性高分子を固定化した上皮成長因子(EGF)担持金ナノ粒子の開発と評価

本章では、先に述べた光応答性ポリマーソームの研究と並行して、既存の光分解性架橋剤で金ナノ粒子の表面を修飾することで、上皮成長因子(EGF)周辺の分子込み合いを光制御可能な新しいコンジュゲート材料の開発に取り組んだ。材料に固定化された上皮成長因子(EGF)は、通常の液体状態と異なる細胞応答を示すことが知られている。そこで我々は、細胞応答の際、粒子上の EGF はその表面状態の環境で変化すると仮説を立て、分子クラウディングを制御できる材料を開発し、新しい光制御法を探求した。金ナノ粒子に光分解性 poly(ethylene glycol) (PEG) と EGF を共固定させたケージド粒子の開発を行い、その細胞応答性について調べた。その粒子は、照射量を変えることで分子クラウディングを変化させることができる。ケージド粒子の照射による PEG の放出を DLS 測定により調べた結果、未照射時に 47 nm であった粒径が、3 J 照射した後、平均粒子サイズは 37 nm となり、さらに 7 J 照射することで、29 nm まで減少することがわかった。これらの結果は、粒子表面から PEG が放出され照射により、粒子表面上の PEG 密度を変化させることを意味している。次に、細胞の活性化を調べるために、Cell ELISA により ERK1/2 サブタイプである Thr202/Tyr204 残基でリン酸化を調べた。照射量を変えたコンジュゲートの HeLa 細胞の応答性は、未照射では僅かであった応答が 3J、7J と照射するにつれて徐々に応答を示した。この結果は、光

照射により分子を完全に光切断させるだけでなく、表面状態の分子クラウディングも制御できる新たな光応答性粒子として、将来的な DDS への応用が期待できる可能性を示した。

第五章 総括

本章では、以上の結果をまとめている。

【論文審査の結果の要旨】

本論文では始めに諸論(第一章)、光分解性ヘテロ二価性架橋剤を用いたジブロック共重合体の合成(第二章)とそれを用いた高分子集合体の調製および封入したモデル薬剤の光放出測定を行った(第三章)。さらに光照射によりナノ粒子表面上の分子クラウディングを変化させるケージド粒子の開発も行い、光照射に依存してガン細胞応答をコントロールすることに成功し(第四章)、最後に総括として以上の結果をまとめている(第五章)。

筆者は、第二章において光分解性ジブロック共重合体を合成するための架橋剤の開発を行った。その架橋剤は、2-ニトロベンジルイミドを介し、二種類のクリック反応に適応できるアルキンとマレイミドを末端に有する構造である。さらにその反応効率を高めるためにそれぞれの反応性を保護した架橋剤を合成し、高収率・高純度で光分解性ジブロック共重合体を合成することに成功した。この合成法は、別途合成した高分子をカップリングにより結合させるため、これまで合成が困難とされてきた光分解性ジブロック共重合体を容易に得られる手法として有用である。

第三章においては自身で合成したジブロック共重合体から高分子集合体を調製し、その光放出機能を調べた。ポリマーソームの構造は三種類の分析方法で精密解析しており、信頼性の高いデータが得られている。さらに光照射により内包物を放出でき、分子構造により放出速度が大きく変化するを見出し、分子設計の重要性を明らかにしたことが評価できる。

第四章では、すでに開発された光分解性架橋剤を用いて合成した光分解性 poly(ethylene glycol) (PEG) と上皮成長因子(EGF)を金ナノ粒子表面に共固定させたケージド粒子の開発を行った。この粒子は、光照射前は EGF が PEG に覆い隠される状態となり EGF 活性が低く、光照射に伴う PEG の放出により EGF が表面に露出し活性を示す特性を持つ。実際に光照射に応じてガン細胞である HeLa 細胞の応答性を変えることにも成功しており、新たな光応答性粒子として、DDS や創薬研究への応用展開が期待できる。

以上、本論文はわが国のみならず世界における光分解性高分子化学に関する研究や細胞生物学への応用に関する研究に貢献するものと認められ、博士(理学)に相応しいと思量するものである。