

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

理学研究科化学専攻 山口和夫研究室 山本 翔太 (201370193)

高分子架橋によるゲル形成[*Adv. Mater.* **1998**, *10*, 827]や、抗体-薬物複合体に基づくガン治療薬[*Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3796]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[*Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004]、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(crosslinking reagent)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)のための高分子集合体の原材料や有機-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。

我々の研究グループは、このコンジュゲート材料の接合部に光分解性を付与すべく、2-ニトロベンジル骨格を含む光分解性ヘテロ二価性架橋剤 **A** [*Coll. Surf. B.* **2010**, *76*, 88], **B** [*J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3822], **D** [*Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 4051]を報告してきた(Fig. 1)。これにより、光という外部刺激に対して時空間応答を示す材料へと劇的な進化を遂げた。しかし先に開発された架橋剤 **A**, **B**, **D**は無機材料表面の修飾用に設計されたものであり、有機高分子・生体分子間の光応答性コンジュゲート材料の開発には適していなかった。

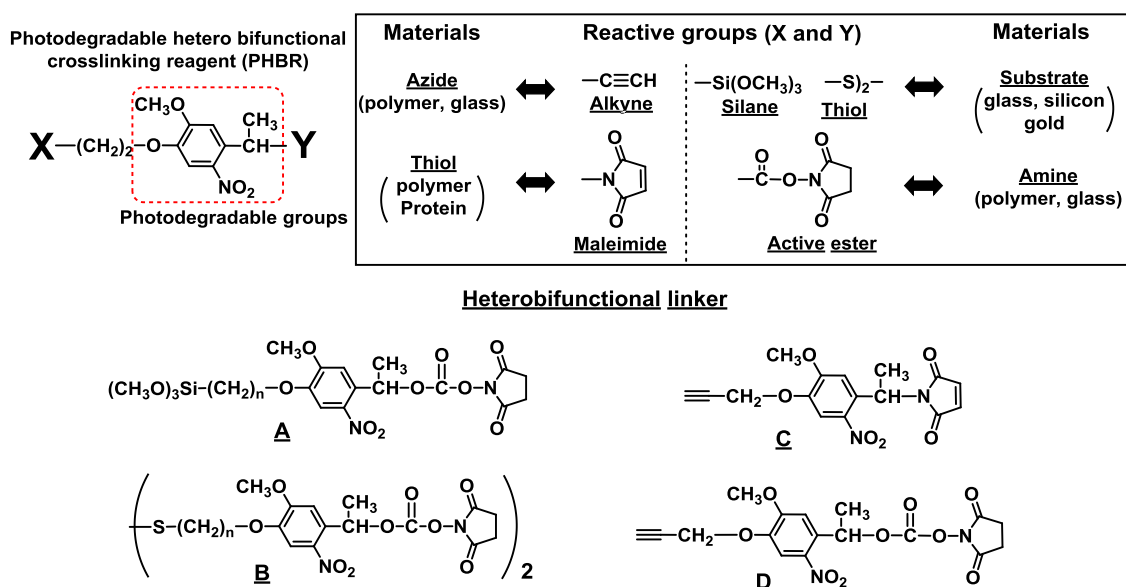


Fig. 1. Various types of photodegradable heterobifunctional linker (PHBL).

そこで本論文では、第2章として、クリック反応を原理とする光分解性ヘテロ二価性架橋剤 **C** を新規合成し、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。**C** は、光分解性 *N*-(2-ニトロベンジルイミド) を介して片末端に Huisgen 付加環化反応を受けるアルキニル基、反対末端に Michael 付加反応を受けるマレイミド基を有し二種類のクリック反応の基質となる。さらにこの **C** へのクリック反応効率を向上させるために、マレイミドをフラン付加体として保護した **1a** およびアルキニル基をトリメチルシリル体として保護した **1b** 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 (Fig. 2)、各ポリマー鎖が精密に制御された光分解性ジブロック共重合体 (**2a** – **2c**, **3**, **4a**, **4b**, **5a** and **4b**) が合成できた (Fig. 3)。さらに得られた共重合体は、THF 溶液中において近紫外光 ($\lambda=320$ 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。

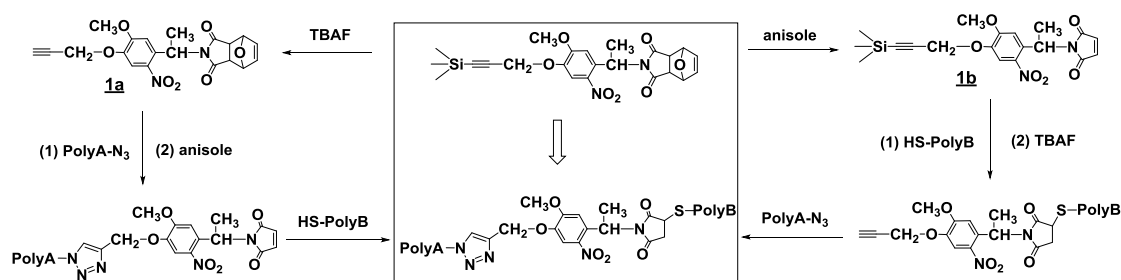


Fig. 2. Synthetic scheme of photodegradable diblock copolymer using two different photodegradable heterobifunctional linkers (PHBLs).

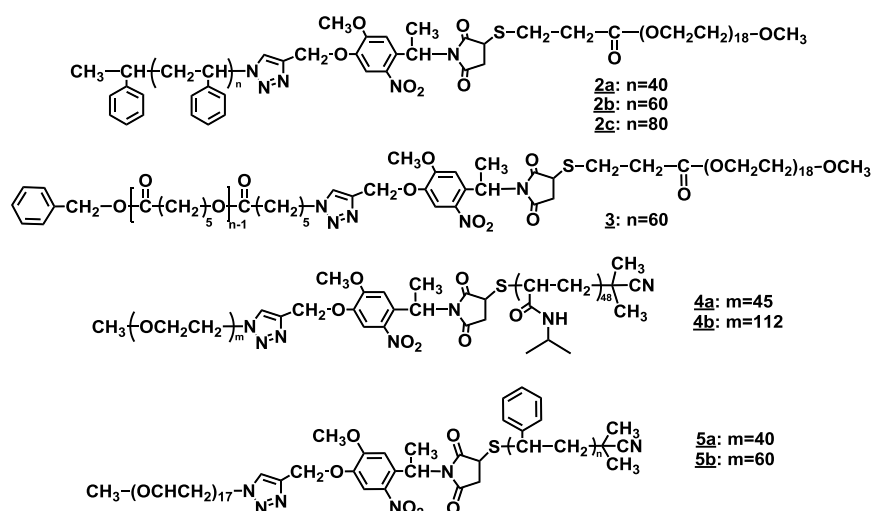


Fig. 3. Chemical structure of photodegradable diblock copolymer (**2a** – **2c**, **2**, **4a**, **4b**, **5a** and **5b**)

第3章では、第2章で合成した光開裂型両親媒性ジブロック共重合体を用いて高分子集合体的一种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)と分子量を変えた polystyrene(PS)からなる PS-*b*-PEG (**2a**: Mn = 5700, **2b**: Mn = 7600, **2c**: Mn = 9300)のジブロック共重合体を用いることで疎水性鎖長が、高分子種の異なる poly(ϵ -caprolactone) (PCL)と PEG からなる PCL-*b*-PEG (**3**: Mn = 7700)を用いることで高分子種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。ポリマーソームの構造は、Field Flow Fractionation 法から中空球構造を形成していることがわかり、そのサイズは、動的光散乱(DLS)法より疎水性鎖長の伸展に伴い大きくなる傾向を示した(**2a**: 150 nm, **2b**: 190 nm, **2c**: 220 nm, **3**: 240 nm)。さらにポリマーソームは、光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(Fig. 4(a))。さらに、同様の放出実験を 37°Cで行うと、放出速度が格段に速くなることも見出している(Fig. 4(b))。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、その解決策として疎水性鎖長を短くすることや、熱(光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。

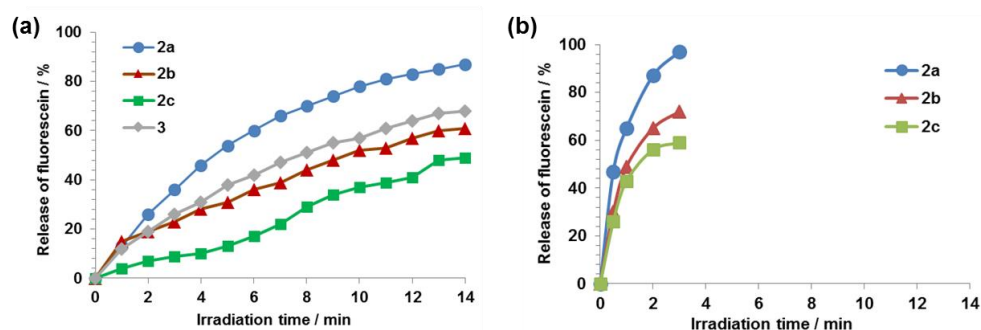


Fig. 4. Release of fluorescein from polymersome of **2a** - **2c** and **3**. at rt (A), at 37°C (B)

第4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、既存の分子 **B** 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。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)と上皮成長因子(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、光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(Fig. 5)。

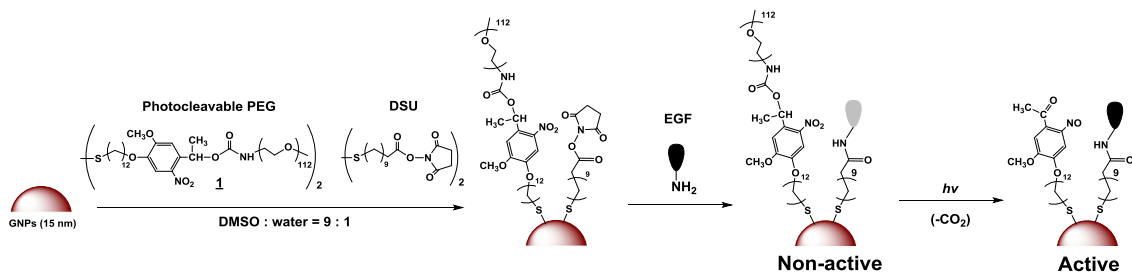


Fig. 5. Photoactivatable EGF-GNP conjugates activation by photoreleasing PEG.

実際に、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(酵素 ERK)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(Fig. 6)。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。

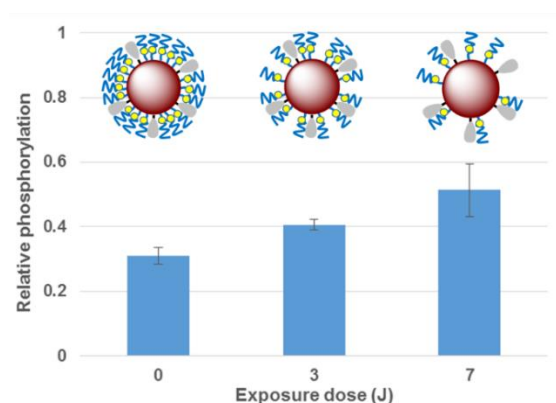


Fig. 6. Photoactivation of biological activity of EGF-GNP conjugates. All phosphorylation levels are normalized to the reference condition: 5 min of incubation with 1000 ng/mL free EGF.

以上、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)。これら光応答性ナノ材料は、光により望みの場所や時間、必要量を制御することができるため、光応答性 DDS や薬剤の新しい標的部位の探索などの応用展開に期待が持たれる。