

2015 年度 博士論文

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

Development of photoresponsive nanoparticles using polymers connected
by photodegradable heterobifunctional reagent

神奈川大学大学院 理学研究科 化学専攻

山本 翔太 (YAMAMOTO Shota)

指導教授 山口 和夫

論文目次

第一章 諸論

- 1-1 はじめに
- 1-2 ドラッグデリバリーシステム
- 1-3 光分解性ジブロック共重合体と光応答性高分子集合体
- 1-4 ケージド化合物
- 1-5 本研究の目的と概要

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

- 2-1 緒言
- 2-2 実験項
- 2-3 結果および考察
- 2-4 結論

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

- 3-1 緒言
- 3-2 実験項
- 3-3 結果および考察
- 3-4 結論

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

- 4-1 緒言
- 4-2 実験項
- 4-3 結果および考察
- 4-4 結論

第五章 総括

論文付録

第一章 諸論

1-1 はじめに

高分子架橋によるゲル形成[1]や、抗体-薬物複合体に基づくガン治療薬[2]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[3]、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、薬剤送達システム(Drug Delivery System)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[4, 5]。

1-2 ドラッグデリバリーシステム (DDS)

ドラッグデリバリーシステム(DDS)は、時間や場所を精密に制御して薬剤を運搬する手法である[6]。この薬物運搬体に用いられる材料として、両親媒性高分子からなるポリマーミセルやポリマーソームといった高分子集合体[7, 8]、リン脂質からなるリポソーム[9]、無機ナノ粒子を用いた複合体[10]、高分子鎖の三次元架橋により形成されるナノゲル[11]などが挙げられる。これら運搬体は、主に血液注射により投与され、血管を通じて損傷部位まで薬剤を運搬する。この際求められる性能として、血液内での構造安定性、異物として排出されることを防ぐステルス効果などがある。さらに損傷部位近くの血管壁には僅かな隙間があり、ナノオーダーである運搬体は、その隙間を通り抜け患部に集中して薬剤を届けることができる (Fig. 1-1)。その効果を enhanced permeability and retention effects (EPR 効果) と呼ばれ、優れた DDS において最も重要な効果である[12]。

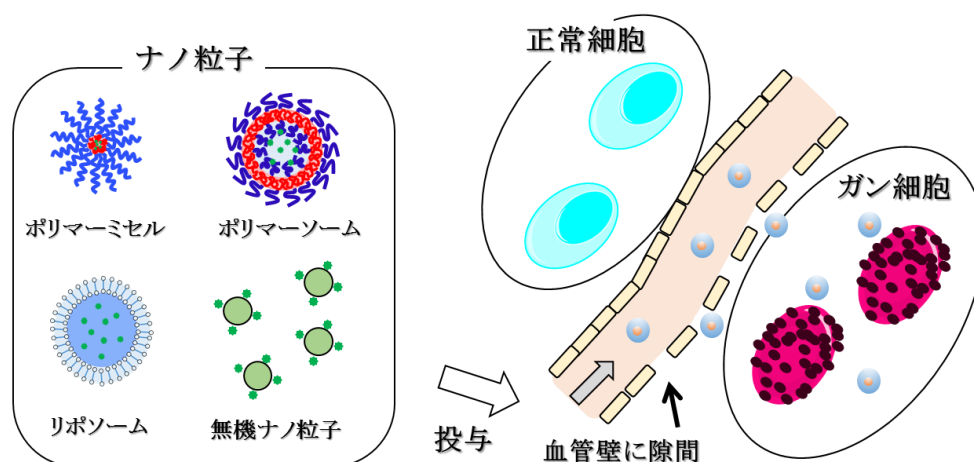


Fig. 1-1. Conceptual diagram of DDS using nanoparticles.

その運搬体の中でもナノサイズの粒径を持つ高分子集合体であるポリマーミセルやポリマーソームは、ブロック共重合体の疎水性高分子が水溶液中で自己集合し、親水性高分子を水中に伸ばした形態をとり、熱力学的に安定であることから DDS 研究によく用いられている(Fig. 1-2)。さらにポリマー種を変えることで生体適合性や安定な構造を持つナノ粒子が調製できる。一般的に両親媒性ブロック共重合体の親水性鎖長が疎水性鎖長より長い場合は、疎水性コアを持つポリマーミセルを形成し、反対に疎水性鎖長が長い時、中空球構造のポリマーソームを形成する。さらに各高分子鎖長をコントロールすることで、高分子集合体の粒径を制御することも可能である。

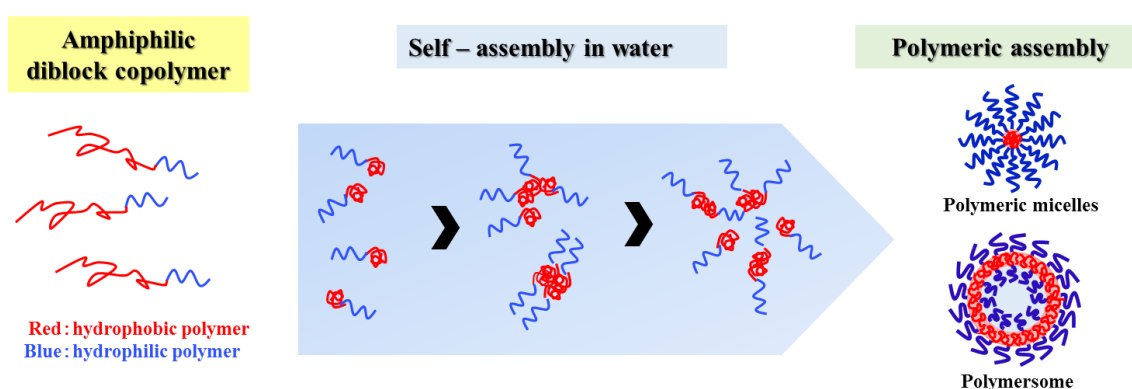


Fig. 1-2. Preparation of polymeric assembly using amphiphilic diblock copolymers.

両親媒性高分子を用いた DDS 研究の発展とともに、熱、光、pH といった外部刺激により集合体の構造や性質を変化させることで薬剤の放出を制御する、刺激応答性高分子集合体も多く報告された [13 - 16]。この技術の発展により、腫瘍部位に正確に運搬し、その後の放出の On と OFF を外部刺激により制御することが報告された(Fig. 1-3)。さらに薬剤放出の微調整のために、一分子中に二種類以上の刺激応答性部位を有するマルチ刺激応答性高分子も開発され、多種多様な高分子を使い DDS 研究を行っている。

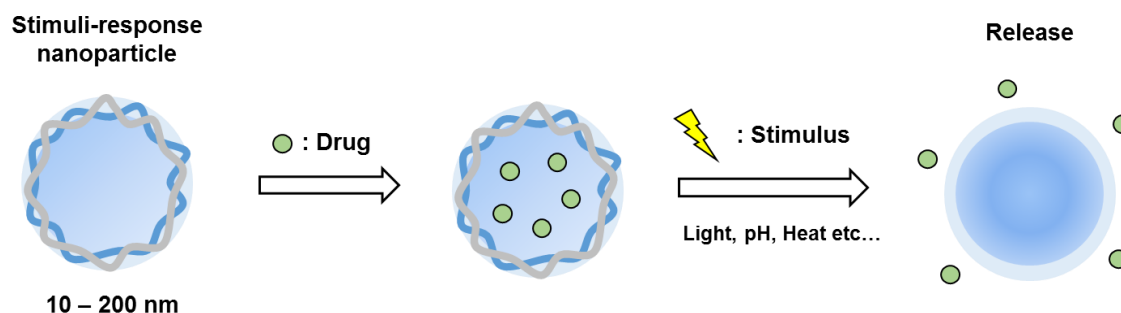
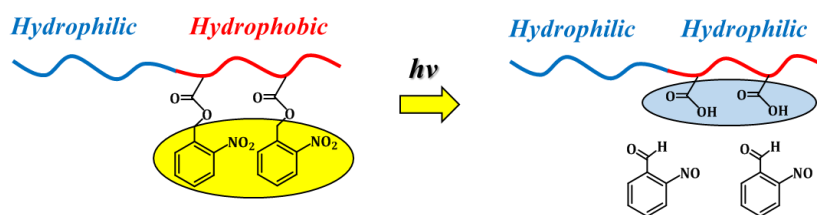


Fig. 1-3. General scheme of a stimuli-responsive nanocarrier for the transport of active compounds.

1-3 光分解性ジブロック共重合体と光応答性高分子集合体

多くの刺激応答性基の中で、2-ニトロベンジル誘導体、シナモイル誘導体、アゾベンゼン骨格、クマリン骨格のような光応答性構造は、「光」に対してその特性を劇的に変化させることができるため、ケージド化合物や生体材料として幅広く用いられている [17 - 20]。その中で、近紫外光で効率よく切断できる光分解性 2-ニトロベンジル基は、局所的に分解を誘導するため時間空間分解能が高く、有機・無機・生体材料のコンジュゲート材料と相性が良いとされ、2-ニトロベンジル基を含む両親媒性ジブロック共重合体は、高分子集合体や薄膜などの応用に用いられている[21, 22]。光分解性ジブロック共重合体の構造としてポリマー側鎖にニトロベンジルエステル構造を導入した修飾型(coordinate type)とブロック間に挿入したリンカー型(linker type)が挙げられる(Fig. 1-4)。修飾型は主にポリマーの側鎖の末端を光分解性基で保護しており、光照射に伴う脱保護により両親媒性のバランスを変える構造である[23, 24]。一方で、リンカー型は、光照射によりブロック間を切断し、親水部位と疎水部位を切り離すことで性質を変化させる構造である[25]。

Coordinate type



Linker type

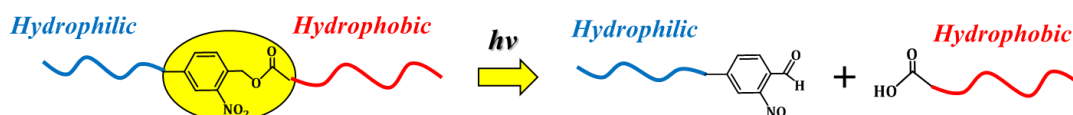


Fig. 1-4. Structural of diblock copolymer connected 2-nitrobenzyl groups.

その性質を利用して、光開裂型両親媒性ジブロック共重合体から調製された高分子集合体は、光をトリガーとし封入した薬剤の放出制御を行う光応答性 DDS への応用が期待されている[19, 25]。修飾型の場合、光照射による脱保護により両親媒性のバランスが崩れるとともに、高分子集合体の構造が崩れ薬剤を放出し、リンカー型では光切断により高分子の秩序構造を崩すことで放出を促進する[Fig. 1-5]。さらに 2-ニトロベンジル基は、ベンジル位に嵩高い置換基を導入することで光分解速度が向上することや[26]、光分解後のポリマー末端に様々な官能基を生成させることができるため、DDS への適応が高いとされている。

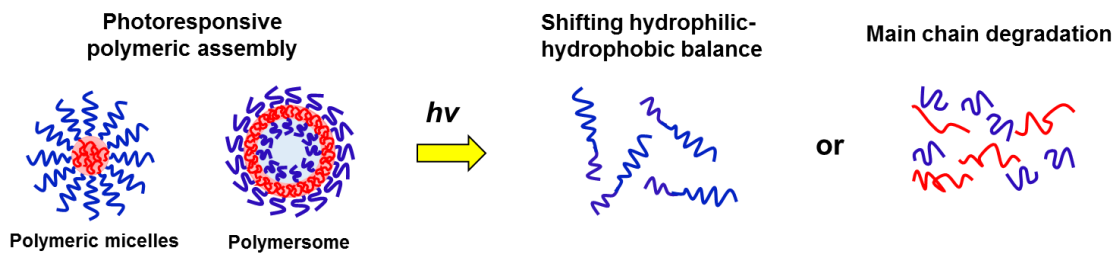


Fig. 1-5. Schematic illustration of various types of photoresponsive polymeric assembly.

1-4 ケージド化合物

ケージド化合物とは、生理活性物質を光で脱保護できる保護基で一時的に活性を抑制している分子のことであり[27 - 29]、この生理活性は光照射による脱保護に伴い回復する(Fig. 1-6.)。この分子を細胞または生体に加え光照射することで、その生理機能は必要なタイミングで必要量与えることができるため、シグナル伝達に関与する分子の時空間動態をリアルタイムで制御することができる。このケージド化合物は、1978年にKaplanらによって報告された生体分子であるアデノシン三リン酸(ATP)を2-ニトロベンジルエステルで保護した「caged ATP」が最初であり[30]、現在までに様々なケージド化合物が開発され、生命現象の解明への研究に用いられている。

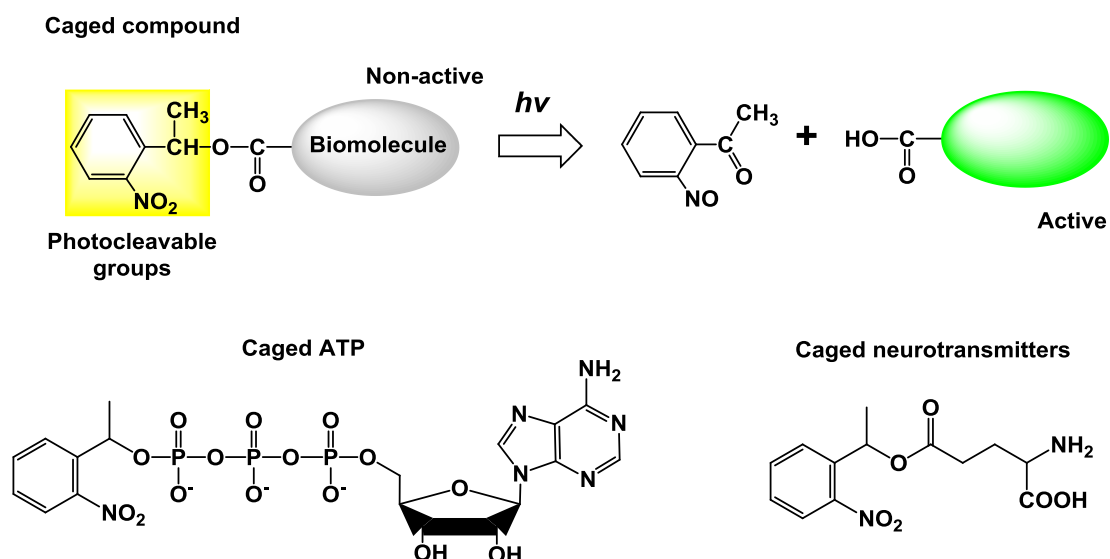


Fig. 1-6. List of caged compound.

さらに近年、ケージド化合物の原理を利用したナノ粒子としてケージド粒子が報告された[31]。この粒子は、金ナノ粒子表面上に poly(ethylene glycol) (PEG) と活性エステルを 2-ニトロベンジル基で連結された、末端アミン化合物を反応させることで一度その化合物を捕捉し、照射によりそのアミンを光放出することができる(Fig. 1-7)。さらに共固定されている PEG が、アミン化合物を覆うことでその活性を阻害し、未照射の段階では活性を抑制することに成功している。さらにタンパク質などの生体分子は、末端にアミノ基を有する化合物が多いために、同様の方法でケージド粒子を調製することが可能であり、新たな薬剤としての応用展開が期待できる。

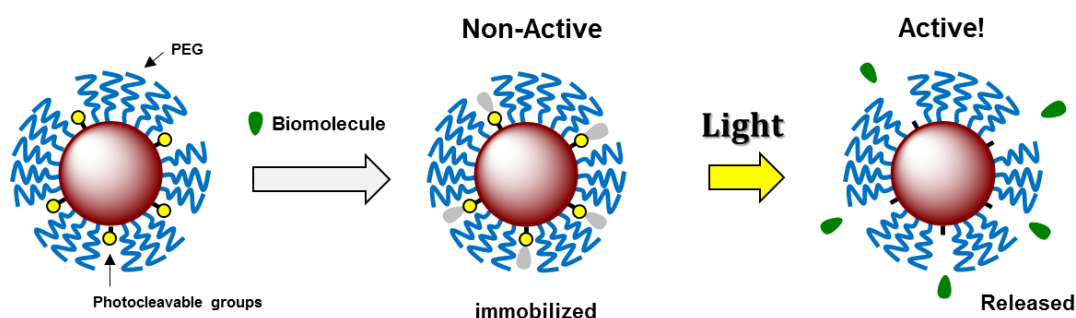


Fig. 1-7. Capture and release of amines on GNPs having a photocleavable succinimidyl ester.

1-5 本研究の目的および概要

これまで述べてきたように、両親媒性ジブロック共重合体から調製された高分子集合体や、無機ナノ粒子は薬剤運搬体として現在でも DDS へ向けた研究が盛んに行われている。その際、異種分子を効率よく複合することのできる架橋剤は、さまざまな有機・無機・生体材料のコンジュゲート材料を調製するために用いられている。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**, **B**, **D** を報告してきた[31 - 33] (Fig. 1-8)。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。

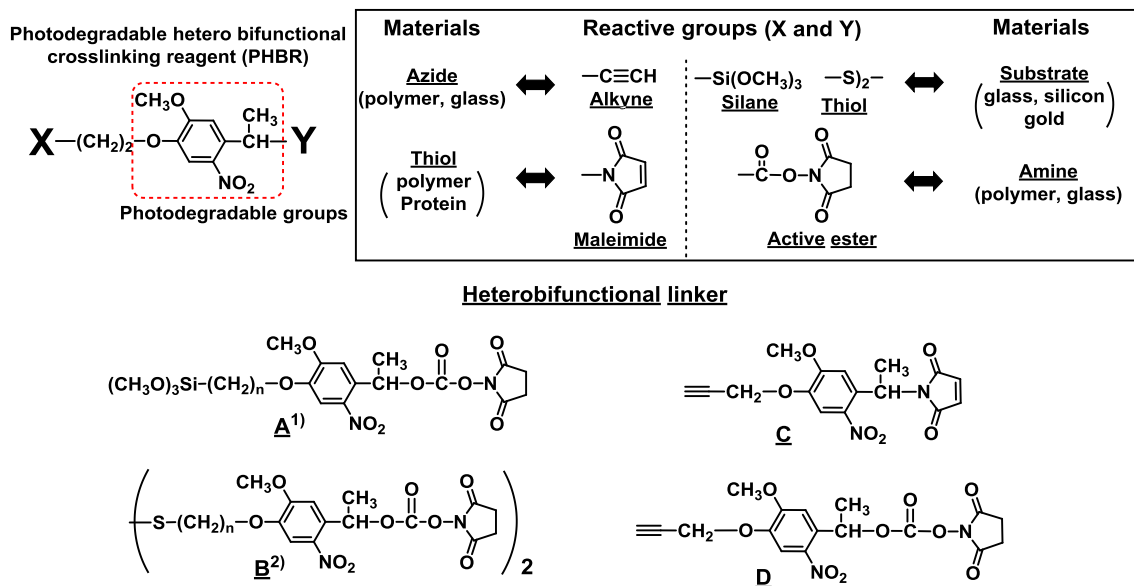


Fig. 1-8. Various types of photodegradable heterobifunctional linker (PHBL) .

そこで本論文では、第二章として、クリック反応を利用して光分解性ヘテロ二価性架橋剤 **C** を新規に合成し、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基で保護した **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、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が合成可能となった(Fig. 1-9)。

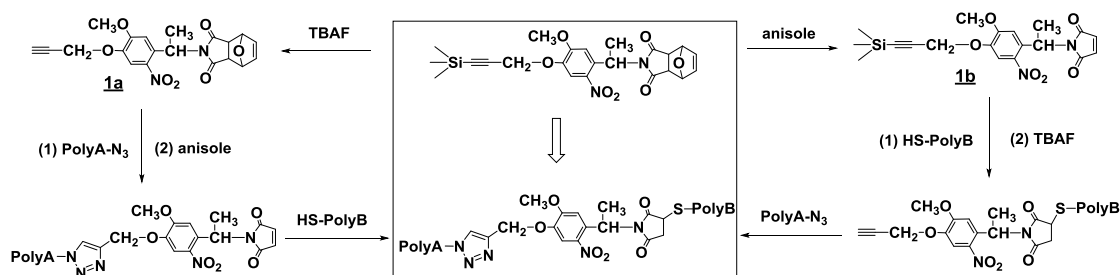


Fig. 1-9. Synthetic scheme of photodegradable diblock copolymer using two different photodegradable heterobifunctional linkers (PHBLs).

第三章では、第二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。既に、我々と同様に接続部に 2-ニトロベンジル基を有するポリマーソームはいくつか報告されてきた[24, 34]。その際、親水・疎水ブロックの分子鎖長が高分子集合体の構造や放出効率を大きく左右することが演繹的に予想されるが、2-ニトロベンジル基の存在がリビングラジカル重合を妨害し[35]、分子鎖長の精密合成を困難にするため、親水・疎水ブロックの分子鎖長が高分子集合体の構造や放出効率に与える影響を実験的に示した研究はなされていない(Fig. 1-10)。そこで前述した架橋剤 **C** を用いて、分子設計を厳密に制御することで疎水性鎖長または高分子種の異なる精密合成光分解性ジブロック共重合体を合成し、そこから調製されたポリマーソームの評価を行った。各ポリマーソームの光照射前後の粒径は、動的光散乱(DLS)法、Field Flow Fractionation(FFF)法、透過型顕微鏡(TEM)の三種類の測定により厳密に評価し、モデル薬剤としてフルオレセインを用いた放出実験を行うことで、疎水性鎖長や高分子種が影響する光放出挙動を調べた。

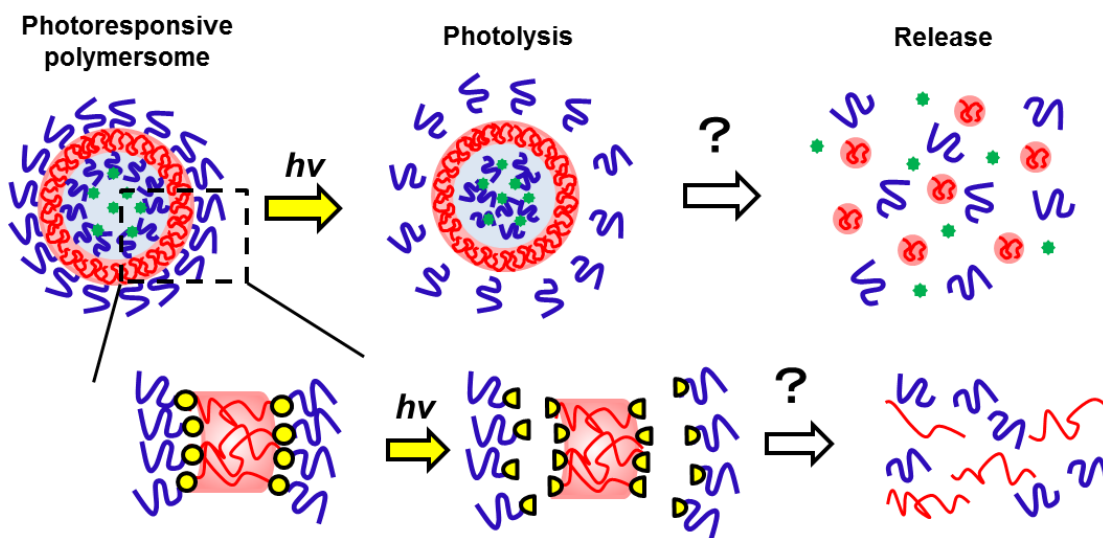


Fig. 1-10. Release of model drugs from polymersome

第四章では、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の程度を光で制御することが可能な新しいコンジュゲート材料の開発に取り組んだ。本研究で用いる上皮成長因子(EGF: Epidermal Growth Factor)は、細胞の増殖や伸展に重要なたんぱく質である。さらに

材料に固定化された EGF は、通常の溶液状態と異なる細胞応答を惹起することも知られている[36, 37]。そこで我々は、細胞応答の際、粒子上の EGF はその表面状態の分子込み合いに起因するとの仮説を立て、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。その粒子は **B** に poly(ethylene glycol) (PEG) を連結させた光分解性 PEG と EGF との金ナノ粒子コンジュゲート(photoactivatable EGF-GNP conjugates)であり、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. 1-11)。このコンジュゲートは、照射前では EGF が PEG の隙間に隠れることで活性が抑制され、照射による PEG の放出に伴い EGF が表面に露出することで活性を示す。これを立証するため、照射前後の粒径測定を行うことで PEG の放出を確認し、細胞応答性を Cell ELISA によるリン酸化酵素 ERK の活性化量を調べ、将来的な DDS への応用を目指した。

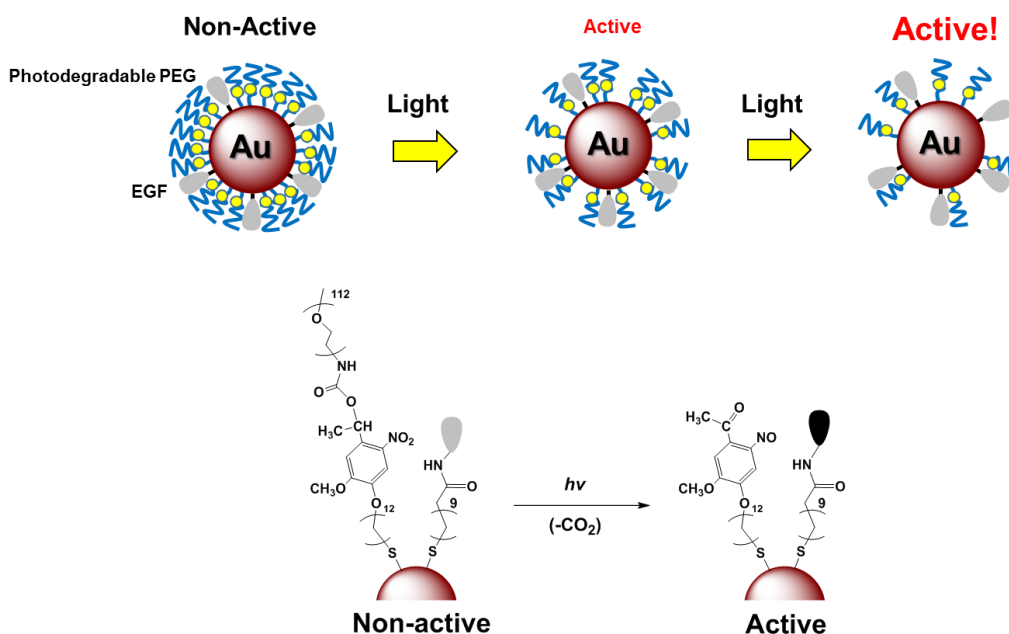


Fig. 1-11. Photoactivatable EGF-GNP conjugates activation by photoreleasing PEG.

上述のように本研究では、光分解性ヘテロ二価性架橋剤を用いて、光分解性ジブロック共重合体の合成(第二章)、そのジブロック共重合体から調製されたポリマーソームの評価(第三章)、最後に光応答性金ナノ粒子を用いた細胞応答性に関する評価(第四章)についての研究成果を述べている(Fig. 1-12)。それぞれ異なるアプローチから光応答性 DDS へ向けた、ナノキャリアーとしての利用を検討した。最後に第 5 章として、博士論文の研究成果についての総括を行った。

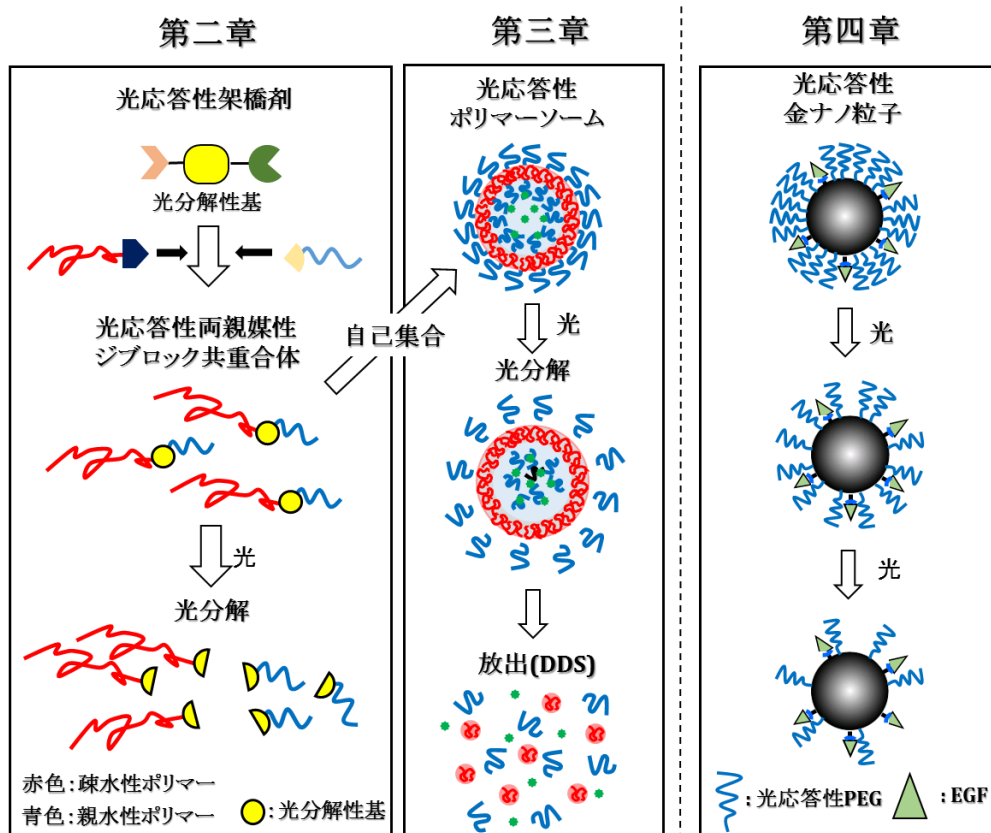


Fig. 1-12. Doctoral thesis Contents.

引用文献

- 1) Y. Osada, J.-P. Gong, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 827.
- 2) R. V. J. Chari, M. L. Miller, W. C. Widdison, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3796.
- 3) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- 4) W. H. Binder, R. Sachsenhofer, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 15.
- 5) P. Wu, M. Malkoch, J. N. Hunt, R. Vestberg, E. Kaltgrad, M. G. Finn, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C. J. Hawker, *Chem. Commun.* **2005**, 5775.
- 6) Y. Bae, K. Kataoka, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 768.
- 7) K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, **2001**, *47*, 113.
- 8) J. S. Lee, J. Feijen, *J. Control Release* **2012**, *161*, 473.
- 9) A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, L. Huang, *FEBS. Letters* **1990**, *268*, 235.
- 10) M.A. Nash, J.J. Lai, A.S. Hoffman, P. Yager, P.S. Stayton, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 85.

- 11) T. Vermonden, R. Censi, W. E. Hennink, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2853.
- 12) Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387.
- 13) E. Fleige, M. A. Quadir, R. Haag, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 866.
- 14) Q. Yin, J. Shen, Z. Zhang, H. Yu, Y. Li, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1699.
- 15) R. Cheng, F. Meng, C. Deng, H.-A. Klok, Z. Zhong, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3647.
- 16) M. Motornov, Y. Roiter, I. Tokarev, S. Minko, *Progress in Polymer Science* **2010**, *35*, 174.
- 17) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900.
- 18) J.-M. Schumers, O. Bertrand, C.-A. Fustin, J.-F. Gohy, *J. Polym. Sci. A. Polym. chem.* **2012**, *50*, 599.
- 19) Y. Zhao, *Macromolecules* **2012**, *45*, 3647–3657
- 20) P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119.
- 21) H. Zhao, E. S. Sterner, E. B. Coughlin, P. Theato, *Macromolecules* **2012**, *45*, 1723.
- 22) H. Zhao, W. Gu, E. Sterner, T. P. Russell, E. B. Coughlin, P. Theato, *Macromolecules* **2011**, *44*, 6433.
- 23) J. Jiang, X. Tong, D. Morris, Y. Zhao, *Macromolecules* **2006**, *39*, 4633.
- 24) X. Jiang, C. A. Lavender, J. W. Woodcock, B. Zhao, *Macromolecules* **2008**, *41*, 2632.
- 25) E. Cabane, V. Malinova, W. Meier, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1847.
- 26) B. P. Stupi, H. Li, J. Wang, W. Wu, S. E. Morris, V. A. Litosh, J. Muniz, M. N. Hersh, M. L. Metzker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1724.
- 27) G. Bort, T. Gallavardin, D. Ogden, P. I. Dalko, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4526.
- 28) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900.
- 29) P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119.
- 30) J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929.
- 31) J. Nakanishi, H. Nakayama, T. Shimizu, H. Ishida, Y. Kikuchi, K. Yamaguchi, Y. Horiike, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3822.
- 32) H. Nakayama, J. Nakanishi, T. Shimizu, Y. Yoshino, H. Iwai, S. Kaneko, Y. Horiike, K. Yamaguchi, *Colloid Surf B Biointerfaces.* **2010**, *76*, 88.
- 33) S. Kaneko, H. Nakayama, Y. Yoshino, D. Fushimi, K. Yamaguchi, Y. Horiike, J. Nakanishi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 4051.
- 34) E. Cabane, V. Malinova, S. Menon, C. G. Palivan, W. Meier, *Soft Matter* **2011**, *7*, 9167.
- 35) J.-M. Schumers, C.-A. Fustin, A. Can, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, J.-F. Gohy, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **2009**, *47*, 6504.
- 36) Y. Ito, *Soft matter*, **2008**, *4*, 46.
- 37) L. Wu, X. Yu, A. Feizpour and B. M. Reinhard, *Biomater. Sci.*, **2014**, *2*, 156.

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

2-1 緒言

光照射によってその構造や性質を変化させる、2-ニトロベンジル誘導体、シナモイル誘導体、アゾベンゼン骨格、クマリン骨格のような光応答性基を含むブロック共重合体は、ドラッグデリバリーシステム(DDS)、薄膜、ハイドロゲル材料のような科学的に高度で多くの学問領域にまたがる興味ある題目である[1 - 4]。その中でも光分解性の2-ニトロベンジル誘導体は、光照射により中性条件下で除去できる化合物として、Patchornik らによって開発された。最初、この2-ニトロベンジル誘導体は、ペプチド合成のアミノ基を2-ニトロベンジルカルバメートとして保護するために初めて開発されたものである[5]。その後、ペプチドの固相合成法のための保護基を兼ねた光切断可能なリンカーとしても利用されるようになり、様々なものが報告されている[6]。また1978年には、アデノシントリリン酸(ATP)の γ 位のリン酸基が2-ニトロベンジルエステルとして保護された、いわゆるケージドATPが開発された[7]。さらに、アミノ基、カルボキシ基、ヒドロキシ基などの官能基を2-ニトロベンジル誘導体として保護した様々なケージド化合物が報告されている。ケージド化合物では、ケージに閉じ込められた化合物の放出を時間的空間的に制御できるので、それらの化合物の生理作用を含めた生物科学的研究に幅広く用いられており、現在では数多くのケージド化合物が市販されている。ケージド化合物だけではなく、生物化学的な研究に用いる光応答性の分子の合成に、様々な光切断可能なリンカーが、報告されている[8]。

一方、1990年代半ばに、Matyjaszewski、Sawamoto らにより見出された原子移動ラジカル重合(ATRP)をはじめとするリビングラジカル重合は、末端官能基化ポリマーや、ブロックコポリマーをはじめとする多様な構造のポリマーの合成を容易にした[9 - 11]。さらに、2002年にSharplessらによって提唱されたクリックケミストリー[12]を組み合わせることによって、多種多様なポリマー材料の合成や機能材料に関する報告が多数なされている[13 - 15]。このような進歩により、2-ニトロベンジル基は有機合成における保護基だけではなく、高分子材料としても用いられるようになった[16]。たとえば、2-ニトロベンジル基をポリマーの側鎖に持つ両親媒性ジブロックコポリマーは、光照射により分解され、ジブロック共重合体の性質を変えることでその構造を壊すことを報告している[17]。さらに近年では、2-ニトロベンジル骨格で連結されたブロックコポリマーも、いくつか報告されている[18]。たとえば、2-ニトロベンジル基を接続部に有するジブロック共重合体は、ATRPと開環重合により合成されたと報告されている[19, 20]。このような知見の下、光分解性2-ニトロベンジル基を含み、光照射により性質を変えることが出来るブロック共重合体は、薬物運搬システム(DDS)やハイドロゲル素材、薄膜フィルムなど多種多様な応用の可能性が報告されている[21 - 23]。しかしながら、2-ニトロベンジル基は、リビングラジカル重合を阻害するため、ジブロック共重合体のポリマー鎖長の分子量を正確に制御することが難しい[24]。近年では、single electron transfer-living radical polymerization(SET-LRP)も提唱され[25, 26]、2-ニトロベンジル基を有するポリマーも多く報告されているが、依然としてポリマーの種類や2-ニトロベンジル骨格の構造に制限がある[27]。それゆえ

に、光分解性ジブロック共重合体が、重合法だけではなく高分子反応によっても合成されるようになった[28]。

そこで本研究では、リビングラジカル重合とクリックケミストリーを組み合わせることによって 2-ニトロベンジル構造に基づく種々の光切断性ブロック共重合体を合成する試薬として、ヘテロ二価性光切断性リンカー (PHBL) **1a**, **1b**を開発した。**1a**はアルキンとフラン付加体として保護したマレイミドを持ち、**1b**はマレイミドとアルキンをトリメチルシリル基で保護した構造を持つ。さらに **1a**, **1b**に含まれる 2 つの反応性基は、クリックケミストリーに用いられている代表的な構造であり、アルキンはアジド化合物との Huisgen 環化付加反応によりカップリングでき、もう一つの反応性基であるマレイミドは、チオールとの Michael 付加反応によりスルフィドを生成する。そのカップリング反応を Scheme 1 に示す。架橋剤 **1a**を用いた経路では、ATRP、開環重合(ROP)、末端変換反応を経て合成したアジド化ポリマーを、1価の銅とアミンを触媒とする Huisgen 環化付加反応によりトリアゾールとして結合させ、retro Diels-Alder 反応により脱保護させる。その後、RAFT 重合や末端変換反応で得られたチオール化ポリマーをアミン触媒下で Michael 付加反応を行い、光分解性ジブロック共重合体 (PolyA-*b*-PHBL-*b*-PolyB) を合成した。架橋剤 **1b**を用いた経路では、チオール化ポリマーを **1b**に Michael 付加反応させ、その後 TBAF、酢酸存在下でトリメチルシリル基を脱保護し、生成したアルキンにアジド化ポリマーを Huisgen 環化付加反応によりカップリングさせることで光分解性ジブロック共重合体を得た。合成したジブロック共重合体の構造を、Fig. 2-2 に示す。最後に合成した光分解性ジブロック共重合体の溶液中の光分解過程は UV 測定により調べた。

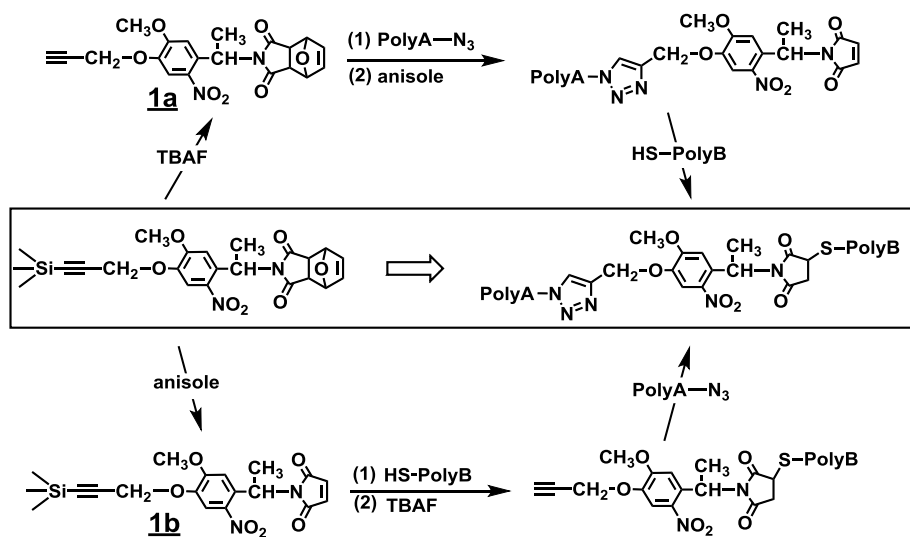


Fig. 2-1 Synthetic scheme of photodegradable diblock copolymer using two different photodegradable heterobifunctional crosslinking linker (PHBL).

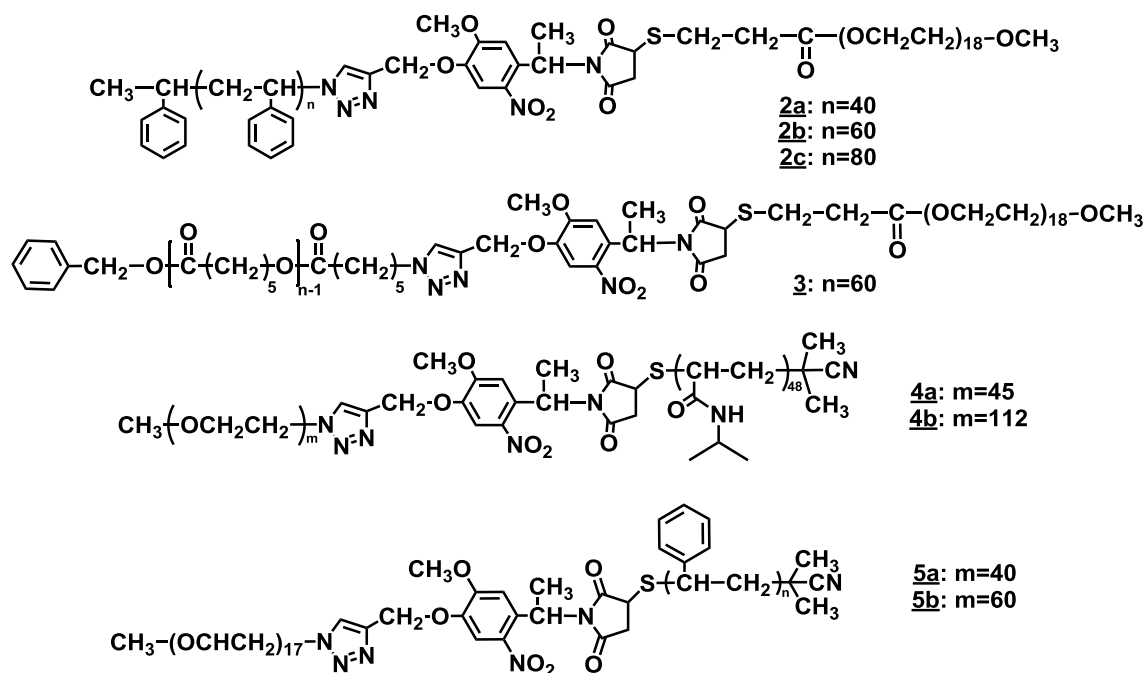


Fig. 2-2. Chemical structure of photodegradable diblock copolymer (**2a** – **2c**, **2**, **4a**, **4b**, **5a** and **5b**)

2-2 実験項

2-2-1 試薬・前処理方法

全ての試薬は、Wako、TCI、Sigma-Aldrich で購入したものを使用した。スチレンモノマーは塩基性アルミナカラムに通し、減圧蒸留することで禁止剤を除去した。2,2'-ビピリジンと *N*-isopropylacrylamide はヘキサンで、AIBN はメタノールで再結晶をした。 ϵ -caprolactone、ベンジルアルコールは蒸留により精製した。

光分解性ヘテロ二価性架橋剤 **1a** の合成

2-2-2 4-benzyloxy-3-methoxyacetophenone **6** の合成

300 ml ナスフラスコに、4-hydroxy-3-methoxyacetophenone 20.0 g (0.121 mol)、acetone 160 ml、 K_2CO_3 16.6 g (0.120 mol)を加え 30 分攪拌後、benzyl bromide 22.7 g (0.133 mol)を加えた。80°C で 4 時間還流を行い TLC で反応の進行を確認した。濃縮し、 H_2O 150 ml を加え、chloroform (100 ml×3 times)で抽出を行った。anhydrous MgSO_4 で乾燥し、ろ過を行い濃縮した。残渣に 50°C の ethyl acetate を 20 ml 加え再結晶し、吸引ろ過、得られた第一結晶、第二結晶を真空乾燥し、白色結晶を得た。(収量: 29.0 g (0.113 mol), 収率: 94 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{TMS, ppm})$: 7.21-7.62 (7H, m), 6.89 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 5.23 (2H, s), 3.94 (3H, s), 2.55 (3H, s).

IR (KBr): 1670 cm^{-1} .

2-2-3 4-benzyloxy-5-methoxy-2-nitroacetophenone 7の合成

500 ml ナスフラスコに、4-benzyloxy-3-methoxyacetophenone 16.8 g (65.6 mmol)を加え、acetic acid 100 mLで溶かした。氷浴上で攪拌しながら fuming nitric acid 20 mLをゆっくりと加えていき、7時間攪拌した。反応溶液を water 230 mLが入った 1000 mLビーカーに移し、得られた固体を吸引ろ過し、 50°C の acetone を加え再結晶し、吸引ろ過、得られた第一結晶、第二結晶を真空乾燥することで、黄色結晶を得た。(収量: 16.6 g (55.1 mmol), 収率: 84%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{TMS, ppm})$: 7.67 (1H, s), 7.26-7.46 (5H, m), 6.77 (1H, s), 5.22 (2H, s), 3.98 (3H, s), 2.49 (3H, s).

IR (KBr): 1699, 1518, 1336 cm^{-1} .

2-3-4 4-hydroxy-5-methoxy-2-nitroacetophenone 8の合成

300 mL ナスフラスコに、4-benzyloxy-3-methoxy-2-nitroacetophenone 5.01 g (16.6 mmol)入れ、trifluoroacetic acid (TFA) 75 mL 加え 18 時間(終夜)攪拌した。TLC で反応の進行を確認して濃縮を行い、5% NaHCO_3 aq. 92 mL、2N HCl 10 mLを加え、ethyl acetate (100 mL \times 3 times)で抽出した。anhydrous MgSO_4 で乾燥後、ろ過し、濃縮した。残渣に 50°C の ethyl acetate を 20 mL 加え再結晶し、吸引ろ過、得られた第一結晶、第二結晶を、真空乾燥し、黄色結晶を得た。(収量: 3.08 g (14.6 mmol), 収率: 88%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{TMS, ppm})$: 7.67 (1H, s), 6.80 (1H, s), 5.92 (1H, s), 4.02 (3H, s), 2.49 (3H, s).

IR (KBr): 3150, 1658, 1530, 1335 cm^{-1} .

2-3-5 5-methoxy-2-nitro-4-prop-3-ynoxyacetophenone 9の合成

200 mL 二口ナスフラスコに 4-hydroxy-5-methoxy-2-nitroacetophenone 4.82 g (22.8 mmol, 1.0 eq)、dry CH_3CN 70 mL、 K_2CO_3 4.72 g (34.2 mmol, 1.5 eq)、を加え窒素下室温 30 分攪拌した。攪拌後、3-bromoprop-1-yne 4.07 g (34.2 mmol, 1.5 eq)加え、窒素下 80°C で 1 時間半還流した。濃縮し、残渣に water 150 mL を加え、chloroform (150 mL \times 3 times)で抽出し、sat. NaCl 150 mL \times 3 で洗浄、有機層を anhydrous MgSO_4 で乾燥し、ろ過、濃縮を行い真空乾燥し、黄色固体を得た。(収量: 5.21 g (20.9 mmol), 収率: 92%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{TMS, ppm})$: 7.80 (1H, s), 6.78 (1H, s), 4.87 (2H, d, $J = 2.4$ Hz), 3.98 (3H, s), 2.61 (1H, t, $J = 2.4$ Hz), 2.51 (3H, s).

IR (KBr): 3249, 2130, 1701, 1521, 1324 cm^{-1} .

2-3-6 1-(5-methoxy-2-nitro-4-prop-2-ynyloxyphenyl)ethanol **10** の合成

200 mL ナスフラスコに、5-methoxy-2-nitro-4-prop-2-ynyloxyacetophenone 4.89 g (19.6 mmol, 1.0 eq)を加え攪拌しながら、THF 80 mL、methanol 80 mL で溶かした。氷浴で攪拌しながら、NaBH₄ 1.04 g (27.4 mmol, 1.5 eq)を加え氷浴で 1 時間攪拌した。濃縮し、残渣に water 100 mL を加え、chloroform (100 mL×3 times)で抽出し、sat. NaCl 150 mL で洗浄、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥し、ろ過、濃縮を行い真空乾燥し、黄色固体を得た。(収量:4.86 g (19.3 mmol), 収率:99%)
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.75 (1H, s), 7.34 (1H, s), 5.56 – 5.62 (1H, m), 4.83 (2H, d, J = 2.4 Hz), 4.00 (3H, s), 2.58 (1H, t, J = 2.4 Hz), 2.24 (1H, t, J = 3.6 Hz), 1.57 (3H, d, J = 6.4 Hz).

IR (KBr): 3298, 2128, 1510, 1327 cm⁻¹.

2-3-7 1-(4-methoxy-2-nitro-4-prop-2-ynyloxyphenyl)ethyl bromide **11** の合成

500 mL 三口ナスフラスコに 1-(5-methoxy-2-nitro-4-prop-2-ynyloxyphenyl)ethanol 3.00 g (11.9 mmol, 1.0 eq)、dry benzene 250 mL、dry pyridine 10 滴加え、氷浴上において PBr₃ 4.83 g (17.9 mmol, 1.5 eq) / dry benzene 100 mL を滴下漏斗にいれ、20 分かけて滴下し、その後 2.5 時間攪拌した。濃縮し、残渣に water 150 mL を加え、chloroform (100 mL×3 times)で抽出し、sat. NaCl 150 mL で洗浄、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥した。ろ過、濃縮後、カラムクロマトグラフィー (hexane:ethyl acetate = 4:1)で精製し、濃縮、真空乾燥し、黄色固体を得た。(収量:3.16 g (10.1 mmol), 収率:85%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.52 (1H, s), 7.33 -7.44 (5H, m), 7.29 (1H, s), 6.02 (1H, q, J = 6.4 Hz), 5.15 – 5.21 (2H, m), 4.01 (3H, s), 2.06 (3H, d, J = 6.4 Hz).

IR (KBr): 3288, 2135, 1516, 1325 cm⁻¹.

2-3-8 3-(2-methoxy-5-nitro-4-(1-(oxabicyclo[2,2,1]hept-5-enedicarboxyimide)ethylphenoxy)-1-propyne **1a** の合成

窒素気流室温において、50 mL 三口ナスフラスコに、7-oxabicyclo[2,2,1]hept-5-ene-dicarboxyimide [29] 0.134 g (0.822 mmol, 1.1 eq)、dry DMF 8 mL 入れ溶かし、K₂CO₃ 0.569 g (4.11 mmol, 5.6 eq)を加え 30 分攪拌した。1-(5-methoxy-2-nitro-4-prop-2-ynyloxyphenyl)ethyl bromide 0.306 g (0.731 mmol, 1.0 eq)加え、窒素下 50°C で 3 時間攪拌した。減圧留去を行い、残渣に water 50 mL、ethyl acetate (50 mL×3 times, 30 ml)で抽出し、sat. NaCl (25 mL×4 times)で洗浄し、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥、ろ過、濃縮後、カラムクロマトグラフィー (hexane:ethyl acetate = 1:1)で精製し、濃縮、凍結乾燥し、黄色固体を得た。(収量:0.265 g (0.664 mmol), 収率:91%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.71 (1H, s), 7.15 (1H, s), 6.51 (2H, s), 6.04 (1H, q, J = 7.2 Hz), 5.29 (1H, s), 5.22 (1H, s), 4.80 (2H, d, J = 2.4 Hz), 3.92 (3H, s), 2.88 (1H, d, J = 6.5 Hz), 2.79 (1H, d, J = 6.6 Hz), 2.57 (1H, t, J = 2.4 Hz), 1.84 (3H, d, J = 7.1 Hz).

IR (KBr): 3276, 2125, 1703, 1522, 1348 cm^{-1} .

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 154, 146, 140, 137, 136, 131, 111, 110, 81.4, 81.2, 56.9, 56.3, 48.1, 47.4, 46.9, 17.9

Anal. Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7$: C, 60.30; H, 4.55; N, 7.03. Found: C, 60.36; H, 4.55; N, 6.82.

光分解性ヘテロ二価性架橋剤 **1b** の合成

2-3-9 1-(4-benzyloxy-5-methoxy-2-nitrophenyl)ethanol **12** の合成

200 mL ナスフラスコに、4-benzyloxy-5-methoxy-2-nitroacetophenone 1.50 g (4.98 mmol, 1.0 eq) を加え攪拌しながら、THF 60 mL、methanol 60 mL で溶かした。氷浴で攪拌しながら、 NaBH_4 0.565 g (14.9 mmol, 3.0 eq) 加え 30 分攪拌し、室温で 2 時間攪拌した。濃縮し、残渣に water 75 mL を加え、chloroform (75 mL \times 3 times)、水層が酸性になるまで 2N HCl を加え抽出し、有機層を anhydrous MgSO_4 で乾燥し、ろ過、濃縮を行い真空乾燥し、黄色固体を得た。(収量: 1.48 g (4.88 mmol), 収率: 99%)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (TMS, ppm): 7.63 (1H, s), 7.31 - 7.46 (6H, m), 5.49 - 5.62 (1H, m), 5.18 (2H, s), 4.00 (3H, s), 2.26 (1H, d, $J = 3.7$ Hz), 1.55 (2H, s).

IR (KBr): 3300, 1512, 1329 cm^{-1} .

2-3-10 1-(4-benzyloxy-5-methoxy-2-nitrophenyl)ethyl bromide **13** の合成

200 mL ニロナスフラスコに 1-(4-benzyloxy-5-methoxy-2-nitrophenyl)ethanol 1.30 g (4.29 mmol, 1.0 eq)、dry benzene 80 mL、dry pyridine 5 滴加え、氷浴上において PBr_3 2.90 g (10.7 mmol, 2.5 eq) / dry benzene 30 mL を滴下漏斗にいれ、20 分かけて滴下し、その後 4 時間攪拌した。その後濃縮し、残渣に water 100 mL を加え、chloroform (100 mL \times 3 times) で抽出し、sat NaCl (150 mL \times 3 times) で洗浄、有機層を anhydrous MgSO_4 で乾燥した。ろ過、濃縮後、カラムクロマトグラフィー (hexane:ethyl acetate = 1:1) で精製し、濃縮、真空乾燥し、黄色固体を得た。(収量: 1.35 g (3.69 mmol), 収率: 86%)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (TMS, ppm): 7.52 (1H, s), 7.33 - 7.44 (5H, m), 7.29 (1H, s), 6.02 (1H, q, $J = 6.4$ Hz), 5.15 - 5.21 (2H, m), 4.01 (3H, s), 2.06 (3H, d, $J = 6.4$ Hz).

IR (KBr): 1519, 1339 cm^{-1} .

2-3-11 1-(4-benzyloxy-2-methoxy-5-nitro-4-)phenyl-1-(oxabicyclo[2,2,1]hept-5-ene-dicarboxyimide)ethane **14** の合成

窒素気流室温において、50 mL ニロナスフラスコに、7-oxabicyclo[2,2,1]hept-5-ene-dicarboxyimide 0.538 g (3.30 mmol, 1.1 eq)、dry DMF 7 mL 入れ溶かし、 K_2CO_3 2.07 g (15.0 mmol, 5.0 eq) を加え 30 分攪拌した。1-(4-benzyloxy-5-methoxy-2-nitrophenyl)ethyl bromide 1.10 g (純度: 88%, 2.64 mmol, 1.0 eq) 加え、窒素下 60°C で 5 時間攪拌した。減圧留去を行い、残渣に water 100 mL、chloroform (100 mL \times 3

times)、2N HCl 10 mL で抽出し、sat. NaCl (150 mL×4 times)で洗浄し、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥、ろ過、濃縮後、カラムクロマトグラフィー (hexane:ethyl acetate = 1:1)で精製し、濃縮、凍結乾燥し、黄色固体を得た。(収量:0.800 g (1.78 mmol), 収率:68%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.60 (1H, s), 7.33 -7.44 (5H, m), 7.14 (1H, s), 6.51 (2H, s), 6.02 (1H, q, *J* = 7.2 Hz), 5.29 (1H, s), 5.21 (1H, s), 5.16 (1H, s), 3.92 (3H, s), 2.87 (1H, d, *J* = 6.4 Hz), 2.78 (1H, t, *J* = 6.4 Hz), 1.83 (3H, d, *J* = 7.2 Hz).

IR (KBr): 1699, 1518, 1337 cm⁻¹.

2-3-12 2-methoxy-5-nitro-4(1-(oxabicyclo[2,2,1]hept-5-ene-dicarboxyimide))ethylphenol 15 の合成

50 mL ナスフラスコに、1-(4-benzyloxy-2-methoxy-5-nitro-4-)phenyl-1-(oxabicyclo[2,2,1]hept-5-ene-dicarboxyimide)ethane 0.782 g (1.74 mmol)入れ、trifluoroacetic acid (TFA) 8 mL 加え 20 時間攪拌した。その後、濃縮を行い、残渣に water 50 mL、chloroform (50 mL×3 times)で抽出し、sat. NaCl (150 mL×4 times)で有機層を洗浄し、anhydrous MgSO₄ で乾燥、ろ過、濃縮、真空乾燥を行った。(収量:0.620 g (1.72 mmol), 収率:99%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.56 (1H, s), 7.13 (1H, s), 6.50 (2H, s), 5.98 (1H, q, *J* = 7.2 Hz), 5.7 (1H, s), 5.29 (1H, s), 5.12 (1H, s), 3.95 (3H, s), 2.87 (1H, d, *J* = 6.4 Hz), 2.78 (1H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.83 (3H, d, *J* = 7.2 Hz).

IR (KBr): 3266, 1693, 1525, 1351 cm⁻¹.

2-3-13 1-(5-methoxy-2-nitro-4-trimethylsilylprop-2-ynyloxyphenyl)-1-(oxabicyclo[2,2,1]hept5-ene-dicarboxyimide)ethane 16 の合成

50 mL ニロナスフラスコに 2-methoxy-5-nitro-4(1-(oxabicyclo[2,2,1]hept-5-ene-dicarboxyimide)) ethylphenol 1.28 g (3.56 mmol)、dry CH₃CN 10 mL、K₂CO₃ 1.48 g (10.7mmol, 2.9 eq)、を加え窒素下室温で 30 分攪拌した。攪拌後、3-bromo-1-(trimethylsilyl)-1-propyne 0.820 g (4.29 mmol)加え窒素下 60℃で 1 時間還流した。反応後、濃縮し、残渣に water 50 mL を加え、chloroform (50 mL×3 times)で抽出し、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥し、ろ過、濃縮、カラムクロマトグラフィー (hexane:ethyl acetate = 1:1)、濃縮、真空乾燥を行った。(収量:0.0730 g (0.156 mmol), 収率:62%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.77 (1H, s), 7.14 (1H, s), 6.51 (2H, s), 6.05 (1H, q, *J* = 7.2 Hz), 5.29 (1H, s), 5.21 (1H, s), 4.77 (2H, s), 3.91 (3H, s), 2.88 (1H, d, *J* = 6.4 Hz), 2.79 (1H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.83 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 0.15 (9H, s).

IR (KBr): 2125, 2179, 1704, 1523, 1357 cm⁻¹.

2-3-14 3a,4,7,7a-tetrahydro-2-[1-(4-hydroxy-5-methoxy-2-nitrophenyl)ethyl]-4,7-epoxy-1H-isoindole-1,3(2H)-dione **1b** の合成

20 mL フラスコに、1-(5-methoxy-2-nitro-4-trimethylsilylprop-2-ynyloxyphenyl)-1-(oxabicyclo[2,2,1]hept5-ene-dicarboxyimide)ethane 0.526 g (0.890 mmol)を加え、anisole 10 mL に溶解させ、120°C、7 時間攪拌した。攪拌後、減圧留去にて anisole を除去し、残渣に water 50 mL を加え、chloroform (50 mL×3 times)で抽出し、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥し、ろ過、濃縮、カラムクロマトグラフィー(hexane:ethyl acetate = 2:1)、濃縮、真空乾燥を行った。(収量:1.22 g (2.58 mmol), 収率:95%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.71 (1H, s), 7.32 (1H, s), 6.66 (2H, s), 6.08 (1H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.78 (2H, s), 3.94 (3H, s), 1.88 (3H, d, *J* = 8.0 Hz), 0.15 (9H, s).

IR (KBr): 2180, 1710, 1523, 1362 cm⁻¹.

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ171, 154, 147, 141, 135, 132, 112, 111, 99, 96, 59, 57, 48, 20, 0.28.

モデル化合物の合成

2-3-15 2-(1-(5-methoxy-2-nitro-4-((1-(1-phenylethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)ethyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindole-1,3(2H)-dione **17** の合成 (Method A)

30 mL ニロナスフラスコに、**1a** 0.365 g (0.915 mol, 1.0 eq), Cu(I)Br 1.36 mg (0.0915 mmol, 0.1 eq), *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA) 192 μL (0.0915 mmol, 0.1 eq), 1-ethylazidobenzene 0.135 g (0.915 mmol, 1.0 eq)を、6.0 mL の dry DMF で溶かし、窒素化室温で 20 時間攪拌した。攪拌後、減圧留去を行い、残渣に sat. NaCl 25 mL, chloroform (25 mL×3 times)で抽出し、0.065 M EDTA-Na aq 50 mL で洗浄し、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥、ろ過、濃縮後、真空乾燥し、黄色固体を得た。(収量: 0.479 g (0.878 mmol), 収率: 96%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.71 (1H, s), 7.53 (1H, s), 7.28 - 7.37 (5H, m), 7.12 (1H, s), 6.51 (2H, s), 6.02 (1H, q, *J*=7.1 Hz), 5.87 (1H, q, *J*=7.0 Hz), 5.28 (1H, s), 5.24 (2H, s), 5.20 (1H, s), 3.87 (3H, s), 2.87 (2H, d, *J*=6.6 Hz), 2.78 (2H, d, *J*=6.6 Hz), 1.99 (3H, d, *J*=7.1 Hz), 1.83 (3H, d, *J*=7.2 Hz).

2-3-16 1-(1-(5-methoxy-2-nitro-4-((1-(1-phenylethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)ethyl)-1H-pyrrole-2,5-dione **18** の合成 (Method A)

20 mL ニロナスフラスコに、**17** 0.120 g (0.220 mmol)を anisole 2.0 mL に溶かし、窒素化 120°C、1.5 時間攪拌した。その後、減圧留去を行い、黄色固体を得た。(収量: 0.104 g (0.218 mmol), 収率: 99%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.65 (1H, s), 7.53 (1H, s), 7.28 - 7.39 (5H, m), 7.12 (1H, s), 6.56 (2H, s), 6.06 (1H, q, *J*=7.1 Hz), 5.81 (1H, q, *J*=7.0 Hz), 5.24 (2H, s), 3.89 (3H, s), 1.99 (3H, d, *J*=7.1 Hz), 1.86 (3H, d, *J*=7.2 Hz).

2-3-17 1-(1-(5-methoxy-2-nitro-4-((1-(1-phenylethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)ethyl)-3-(octylthio)pyrrolidine-2,5-dione 19 の合成 (Method A)

30 mL ニロナスプラスチックに、**18** 0.140 g (0.293 mmol, 1.0 eq) 入れ、dry CH₃CN 3.5 mL、Et₃N 0.0356 g (0.352 mmol, 1.2 eq)、1-octanethiol 66.4 μL (0.381 mmol, 1.3 eq) を加え、1 時間攪拌した。その後、濃縮、残渣に water 30 mL を加え、ethyl acetate (30 mL×3 times) で抽出し、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥した。ろ過、濃縮後、凍結乾燥を行い、カラムクロマトグラフィー(hexane: ethyl acetate = 1:1)、濃縮し、真空乾燥を行い、黄色固体を得た。(収量: 0.154 g (0.247 mmol), 収率: 84%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm): 7.67 (1H, s), 7.54 (1H, s), 7.28-7.40 (6H, m), 6.01 (1H, q, *J*=7.2 Hz), 5.81 (1H, q, *J*=7.1 Hz), 5.25 (2H, s), 3.91 (3H, d, *J*=2.1 Hz), 3.65 (1H, d, t, d, *J*=3.7 Hz, *J*=3.8 Hz, *J*=3.1 Hz), 3.03 - 3.13 (1H, m), 2.63 - 2.90 (2H, m), 2.44 and 2.49 (1H, d, d, *J*=3.3 Hz, *J*=3.3 Hz), 1.99 (3H, d, *J*=7.1 Hz), 1.84 (3H, t, d, *J*=9.4 Hz, *J*=4.4 Hz), 1.53 - 1.62 (2H, br), 1.26 - 1.36 (10H, br), 0.87 (3H, t, d, *J*=7.6 Hz, *J*=1.5 Hz).

Anal. Calculated for C₃₂H₄₁N₅O₆S: C, 61.62; H, 6.63; N, 11.23. Found: C, 61.11; H, 6.71; N, 10.99. UV measurement (in 0.10 mM THF solution): λ_{max} = 341 nm, ε = 4130.

2-3-18 1-[1-(5-methoxy-2-nitro-4-trimethylsilylprop-2-ynyloxyphenyl)-ethyl]-3-octylsulfanylpyrrolidine-2,5-dione 20 の合成 (Method B)

30 mL ニロナスプラスチックに **1b** 0.160 g (0.398 mmol)、1-octanethiol 80 μL (0.461 mmol)、Et₃N 49 μL (0.353 mmol)、dry acetonitrile 5 mL 入れ、窒素下室温で 3 時間攪拌した。攪拌後、濃縮し、残渣に water 30 mL 加え ethyl acetate (30 mL×3 times) で抽出し、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥した。ろ過、濃縮後、凍結乾燥を行い、カラムクロマトグラフィー(hexane: ethyl acetate = 3:1)、濃縮し、真空乾燥を行い、黄色粘体を得た。(収量: 0.196 g (0.357 mmol), 収率: 90%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ7.77 (1H, s), 7.34 (1H, m), 6.03 (1H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.78 (2H, s), 3.91 (3H, s), 3.62-3.69 (1H, m), 3.04-3.15 (1H, m), 2.66-2.91 (2H, m), 2.44-2.50 (1H, m), 1.79-1.88 (3H, m), 1.52-1.64 (2H, m), 1.26-1.36 (10H, m), 0.86-0.89 (3H, m), 0.15 (9H, s).

2-3-19

1-[1-(5-methoxy-2-nitro-4-prop-2-ynyloxyphenyl)ethyl]-3-octylsulfanylpyrrolidine-2,5-dione 21 の合成 (Method B)

20 mL ナスプラスチックに **20** 0.101 g (0.184 mmol)、THF containing 0.276 mmol tetrabutyl ammonium fluoride 2.0 mL、acetic acid 11 μL (0.184 mmol) を加え、0°C で 15 分攪拌した。攪拌後、濃縮し、カラムクロマトグラフィー(hexane: ethyl acetate = 3:1)、濃縮し、真空乾燥を行い、黄色粘体を得た。(収量: 0.0820 g (0.172 mmol), 収率: 94%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ7.66 (1H, s), 7.34 (1H, m), 6.03 (1H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.03 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 3.96 (3H, s), 3.59-3.72 (1H, m), 3.01-3.18 (1H, m), 2.63-2.93 (2H, m), 2.57 (1H, t, *J* = 2.4

Hz), 2.44-2.50 (1H, m), 1.82-1.90 (3H, m), 1.51-1.68 (2H, m), 1.26-1.36 (10H, m), 0.86-0.89 (3H, m).

2-3-20 1-(1-(5-methoxy-2-nitro-4-((1-(1-phenylethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)ethyl)-3-(octylthio)pyrrolidine-2,5-dione **19** の合成 (Method B)

30 mL ニロナスフラスコに **21** 0.0820 g (0.172 mmol)、CuBr 2.60 mg (0.0179 mmol)、PMDETA 37.4 μ L (0.172 mmol)、1-azidoethylbenzene 0.0296 g (0.172 mmol)、dry DMF 5.0 mL 加え、窒素下室温で 20 時間攪拌した。攪拌後、減圧留去にて DMF 取り除き、残渣に sat NaCl 20 mL を加え、chloroform (20 mL \times 3 times) で抽出し、有機層を 0.065 M EDTA aq で洗浄、anhydrous MgSO₄ で乾燥した。ろ過後、濃縮し、カラムクロマトグラフィー(hexane:ethyl acetate = 2:1)、濃縮、真空乾燥により黄色粘体を得た。(収量 : 0.0821 g (0.132 mmol), 収率 : 74%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (TMS, ppm) : 7.66 (1H, s), 7.53 (1H, s), 7.28-7.41 (6H, m), 6.01 (1H, q, $J=7.2$ Hz), 5.80 (1H, q, $J=7.1$ Hz), 5.25 (2H, s), 3.91 (3H, d, $J=2.1$ Hz), 3.60 (1H, d, t, d, $J=3.7$ Hz, $J=3.8$ Hz, $J=3.1$ Hz), 3.02 - 3.14 (1H, m), 2.61 - 2.91 (2H, m), 2.46 and 2.49 (1H, d, d, $J=3.3$ Hz, $J=3.3$ Hz), 2.00 (3H, d, $J=7.1$ Hz), 1.84 (3H, t, d, $J=9.4$ Hz, $J=4.4$ Hz), 1.53 - 1.62 (2H, br), 1.26 - 1.36 (10H, br), 0.87 (3H, t, d, $J=7.6$ Hz, $J=1.5$ Hz).

アジドおよびチオールを有するポリマーの合成

2-3-21 ATRP を用いた末端ブロモ化 polystyrene **22b** の合成 (PS₆₀₀₀-Br)

20 mL ニロナスフラスコに前処理を行った styrene monomer 5.00 g (48.0 mmol) を入れ、開始剤として 1-bromoethylbenzene 0.0808 g (0.436 mmol)、2,2'-bipyridyl 0.204 g (1.31 mmol)、Cu(I)Br 0.0625 g (0.436 mmol) 加え、窒素下で凍結脱気を 3 回行った。窒素下 110°C で 12 時間攪拌を行った。攪拌後、再沈殿(THF 15 mL に溶かし、methanol (200 mL \times 2) に滴下)し、吸引ろ過、真空乾燥し白色固体を得た。(収量 : 2.85 g, Conversion = 57%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (TMS, ppm) : 5.97 - 7.45 (300H, m), 4.23 - 4.73 (1H, br), 1.11 - 2.64 (180H, m), 0.92 - 1.11 (3H, m)

2-3-22 末端アジド化 polystyrene **23b** の合成 (PS₆₀₀₀-N₃)

20 mL ニロナスフラスコに、**22b** 2.50 g (0.417 mmol) 入れ、窒素下室温において dry-DMF 10 mL で溶かした。その後 NaN₃ 0.271 g (4.17 mmol) 入れ、窒素下 100°C で 7 時間攪拌した。その後、減圧留去を行い再沈殿(THF 20 mL に溶かし、methanol 400 mL に滴下)し、吸引ろ過、凍結乾燥を行い、白色固体を収率 95% で得た。(2.38 g, 0.396 mmol) ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (TMS, ppm) : 5.97 - 7.45 (300H, m), 3.70 - 4.10 (1H, br), 1.11 - 2.64 (180H, m), 0.92 - 1.11 (3H, m)

2-3-23 開環重合による末端ベンジルオキシカルボニル化 poly(ϵ -caprolactone) **24** の合成

20 mL ニロナスフラスコに、 ϵ -caprolactone 5.00 g (43.8 mmol) を入れ、開始剤として water 3.5 μ L (0.194 mmol)、methanesulfonic acid 0.0370 g (0.390 mmol)、dry toluene 2.0 mL 加え、窒素下で凍結脱気を 3 回行い、窒素下室温で 4 時間攪拌した。攪拌後、再沈殿(THF 7 mL に溶かし、methanol 200 mL に滴下)し、吸引ろ過、真空乾燥し白色固体を得た。(収量 : 2.24 g, Conversion = 45%) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{TMS, ppm})$: 3.63 – 4.35 (120H, m), 2.63 – 2.69 (2H, t), 2.07 - 2.58 (129H, m), 1.11 – 1.93 (357H, m)

2-3-24 末端ベンジルーエテル化 poly(ϵ -caprolactone) **25** の合成

10 mL ナスフラスコに benylidenehydrazine 0.0763 g (0.635 mmol)、chloroform 2 mL、 MnO_2 0.276 g (3.18 mmol) 加え、15 分間攪拌した。攪拌後、ろ過し、0.1 M NaHCO_3 aq 4 mL で洗浄、anhydrous MgSO_4 で乾燥、ろ過し、diazomethylbenzene のクロロホルム溶液を得た。この溶液で、**24** 2.00 g (0.318 mmol) を溶解し、室温で 22 時間攪拌した。攪拌後、再沈殿(methanol 200 mL に滴下)し、吸引ろ過、真空乾燥して白色固体を収率 87% で得た。(1.89 g, 0.277 mmol) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{TMS, ppm})$: 7.37 – 7.64 (5H, m), 5.12 (2H, s), 3.63 – 4.35 (120H, m), 2.63 – 2.69 (2H, t), 2.07 - 2.58 (129H, m), 1.11 – 1.93 (357H, m)

2-3-25 末端トシル化 poly(ϵ -caprolactone) **26** の合成

30 mL ニロナスフラスコに、**25** 1.60 g (0.239 mmol)、tosyl chloride 0.821 g (4.30 mmol)、trimethylamine hydrochloride 0.108 g (1.19 mmol)、triethylamine 2.30 g (22.7 mmol)、dry THF 4.0 mL 加え、窒素下室温で 20 時間攪拌した。攪拌後、再沈殿(THF 7 mL に溶かし methanol 200 mL)し、吸引ろ過、真空乾燥して白色固体を収率 92% で得た。(1.49 g, 0.219 mmol) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{TMS, ppm})$: 7.79 (2H, d), 7.30 – 7.64 (7H, m), 5.12 (2H, s), 3.63 – 4.35 (120H, m), 2.63 – 2.69 (2H, t), 2.07 - 2.58 (129H, m), 1.11 – 1.93 (357H, m)

2-3-26 末端アジド化 poly(ϵ -caprolactone) **27** の合成 ($\text{PCL}_{6000}\text{-N}_3$)

30 mL ニロナスフラスコに、**26** 1.40 g (0.206 mmol) を加え、dry DMF 15 mL で溶解させた。その後、 NaN_3 0.134 g (2.06 mmol) 入れ、窒素下室温で 72 時間攪拌した。攪拌後、減圧留去し、再沈殿(THF 10 mL に溶かし、methanol 200 mL に滴下)、吸引ろ過、真空乾燥して白色固体を収率 96 % で得た。(1.35 g, 0.199 mmol) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{TMS, ppm})$: 7.30 – 7.54 (5H, m), 5.12 (2H, s), 3.63 – 4.35 (120H, m), 2.63 – 2.69 (2H, t), 2.07 - 2.58 (129H, m), 1.11 – 1.93 (357H, m)

2-3-27 末端トシル化 poly(ethylene glycol) **28b** の合成

200 mL ニロナスフラスコに、PEG₂₀₀₀-OH 5.58 g (2.79 mmol, 1.0eq)、dry THF 80 mL 入れ、温風を当てながら攪拌し、溶かした。その後室温に戻し、TsCl 17.5 g (92.0 mmol, 33 eq)、Me₃N · HCl 2.93 g (30.7 mmol, 11 eq)、Et₃N 11.6 g (114 mmol, 47 eq) 入れ、窒素下室温にて 22 時間攪拌した。その後、濃縮し、残渣を dichloromethane 30 mL に溶かし、再沈殿(氷浴 : diethyl ether 400 mL)、吸引濾過、抽出(chloroform 150 mL×3, water : 100 mL)、洗浄(sat. NaCl : 100 mL×3)、乾燥、濾過、濃縮、dichloromethane 30 mL に溶かし、再沈殿(氷浴 : diethyl ether 400 mL)、吸引濾過、真空乾燥を行い、白色固体を得た。(収量 : 5.53 g (2.57 mmol), 収率 : 92%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.80 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.34(2H, d, J = 8.0 Hz), 4.16 (2H, t, J = 4.8), 3.42 – 3.85 (177H, m), 3.38 (3H, s), 2.45 (3H, s)

2-3-28 末端アジド化 poly(ethylene glycol) **29b** の合成 (PEG₂₀₀₀-N₃)

200 mL ニロナスフラスコに **28b** 4.75 g (2.21 mmol, 1.0eq)、dry DMF 80 mL、NaN₃ 0.717 g (11.1 mmol, 5.0 eq) 入れ、窒素下室温にて 117 時間攪拌した。その後、減圧留去を行い、残渣に water 150 mL 加え、抽出(chloroform 150 mL×3)、洗浄(sat. NaCl 100 mL×7)、乾燥、ろ過、濃縮、真空乾燥を行った。(収量 : 3.13 g (0.506 mmol), 収率 : 71%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 3.40 - 3.87 (174H, m), 3.38(3H, s)

2-3-29 RAFT 重合を用いた polystyrene **30b** の合成

30 mL ニロナスフラスコに styrene 10.0 g (96.1 mmol)、2-cyanopropan-2-yl benzodithioate 0.0720 g (0.325 mmol) を入れ、凍結脱気を 3 回行い、窒素下 110°C で攪拌した。攪拌後、THF 15 mL に溶解させ、400 mL のメタノールに再沈殿、吸引ろ過、真空乾燥し桃色固体を得た。(2.41 g, conversion = 24%, Mn = 6200)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ7.84 (2H, m), 6.28 - 7.57 (294H, m), 1.20 - 2.60 (180H, m), 1.10 - 1.18 (3H, m), 0.85 - 0.93 (3H, m).

2-3-30 末端チオール化 polystyrene **31b** の合成

30 mL ニロフラスコに **30b** 1.00 g (0.161 mmol)、ヘキシルアミン 0.311 g (3.08 mmol)、dry THF 10 mL 入れ、凍結脱気を 3 回行い、窒素下室温で 1 時間攪拌した。攪拌後、THF 5 mL に溶解させ、200 mL のメタノールに再沈殿、吸引ろ過を行い白色固体を得た。その固体を 5 mL の酢酸で溶解させ、亜鉛パウダーを加え窒素下室温で 3 時間攪拌した。攪拌後、ろ過、濃縮し、THF 10 mL に溶解させ、200 mL のメタノールに再沈殿、吸引ろ過、真空乾燥し桃色固体を収率 99% で得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ6.28 - 7.57 (300H, m), 3.40 - 3.60 (1.0H, br), 1.20 - 2.60 (185H, m), 1.05 - 1.13 (3H, m), 0.89 - 0.94 (3H, m)

2-3-32 末端チオール化 poly(ethylene glycol) **32** の合成 (PEG₇₅₀-SH)

300 mL ニロナスフラスコに、PEG-H 75.0 g (0.1 mol, 1.0 eq)、3-Mercaptpropionic acid 13.8 g (0.13 mol, 1.3 eq)を加え、窒素雰囲気下 50°Cで 15 分攪拌した。その後、HfCl₄・2THF 10.0 mg (0.0216 mmol)を toluene 22 mL で溶かしながら入れ、140°Cで 18 時間、共沸蒸留を行った。減圧留去を行い、生成物の重量が多かったため、反応物から 10 g 取り、methanol 10 mL で溶かし、再沈殿(diethyl ether : 300 ml)をし、吸引濾過、真空乾燥を行い、白色固体を得た。(収量 : 5.03 g, 収率 : 50%)

2-3-31 RAFT 重合を用いた poly(N-isopropylacrylamide) **33** の合成 (PNIPAM)

窒素下にて、30 mL ニロナスフラスコに、N-isopropylacrylamide 10.0 g (88.3 mmol)、2-cyanopropan-2-yl benzodithioate 0.257 g (1.16 mmol)、AIBN 0.0381 g (0.232 mmol)、dry DMF 9 mL 入れ、氷浴で 30 分攪拌した。その後、70°Cで 48 時間攪拌し、重合を行った。攪拌後、減圧留去を行い、再沈殿(methanol 1 mL で溶かし、氷浴で冷やした diethyl ether 250 mL に滴下)をし、吸引濾過、真空乾燥を行い、白色固体を得た。(収量 : 1.28 g, Conversion = 13%)
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.34 - 8.02 (5H, m), 5.39 - 7.05 (48H, m), 3.87 - 4.16 (48H, m), 0.75 - 2.72 (444H, m).

光分解性ジブロック共重合体の合成

2-3-33 PS₆₀₀₀-PHBL maluimide protected as adduct furan **2b'** の合成 (Method A)

窒素下室温で、30 mL ニロナスフラスコに、**23b** 0.994 g (0.166 mmol)、**1a** 0.0600 g (0.151 mmol)、Cu(I)Br 0.0238 g (0.166 mmol)、dry-DMF 6.5 mL 加え、15 分攪拌し、その後、PMDETA 95 μl 入れ、18 時間攪拌した。減圧留去し、残渣に THF 10 mL を加え再沈殿(methanol : 200 mL に滴下)、吸引濾過、洗浄(chloroform : 50 mL、EDTA-Na aq : 50 mL×3)し、有機層を anhydrous MgSO₄ で乾燥した。ろ過、濃縮後、カラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 2 : 1)を行い、濃縮、凍結乾燥を行い、白色固体を得た。(収量 : 0.812 g (0.129 mmol), 収率 : 85%, Mn = 6300).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ7.62 - 7.77 (1H, m), 6.22 - 7.40 (300H, m), 5.92 - 6.13 (1H, m), 5.19 - 5.39 (2H, m), 4.87 - 5.19 (2H, m), 3.84 (3H, s), 2.69 - 2.92 (2H, m), 1.16 - 2.51 (180H, m), 0.86 - 1.10 (3H, m).

2-3-34 maleimide-terminated PS₆₀₀₀-PHBL **2b''** の合成 (Method A)

30 mL ナスフラスコに、**2b'** 0.980 g (0.209 mmol)、anisole 3.5 mL 加え、窒素下 120 °Cで 3 時間攪拌した。その後減圧留去により anisole を完全に除去、THF 5 mL に溶かし再沈殿(methanol : 100 mL)し、凍結乾燥により白色固体を得た。(収量 : 0.910 g (0.196 mmol), 収率 : 94%, Mn = 6400)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.55 - 7.70 (1H, m), 6.18 - 7.36 (220H, m), 5.97 - 6.14

(1H, m), 5.10 - 5.23 (2H, m), 3.86 (3H, s), 2.68 - 2.87 (2H, m), 1.16 - 2.41 (129H, m), 0.87 - 1.14 (3H, m).

2-3-35 PS₆₀₀₀-*b*-PHBL-*b*-PEG₇₅₀ **2b** の合成 (Method A)

窒素下において 30 mL ニロナスフラスコに、**30b'** 0.0800 g (0.0123 mmol)、dry THF 1.5 mL、PEG₇₅₀-SH **32** 0.110 g (0.123 mmol)、Et₃N 5 滴加え、室温で 16 時間攪拌した。濃縮後、再沈殿(THF 1 mL に溶かし methanol : 35 mL に滴下)、吸引濾過、凍結乾燥し、白色固体を得た。(収量 : 0.114 g (0.0158 mmol), 収率 : 78%, Mn = 7100)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(TMS, ppm) : 7.62 - 7.73 (1H, m), 6.37 - 7.53 (210H, m), 5.91 - 6.07 (1H, m), 4.91 - 5.30 (2H, m), 4.24 - 4.26 (2H, m), 3.88 (3H, s), 3.56 - 3.80 (73H, m), 3.38 (3H, s), 2.87 - 3.23 (4H, m), 2.70 - 2.73 (2H, m), 2.39 - 2.44 (1H, m), 1.42 - 2.33 (131H, m), 0.89 - 1.06 (3H, m).

2-3-36 trimethylsilyl-protected PHBL-PS₆₀₀₀ の合成 **5b'** (Method B)

窒素下において 30 mL ニロナスフラスコに、**1b** 0.0306 g (0.0758 mmol)、dry THF 5.0 mL、**31b** 0.504 g (0.0833 mmol)、Et₃N 0.129 g (1.27 mmol)を加え、室温で 16 時間攪拌した。濃縮後、再沈殿(THF 1 mL に溶かし methanol : 35 mL に滴下)、吸引濾過、凍結乾燥し、白色固体を得た。(収量 : 0.501 g (0.0789 mmol), 収率 : 96%, Mn = 6100).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ7.54 - 7.77 (1H, m), 6.26 - 7.36 (300H, m), 5.74 - 6.02 (1H, m), 5.25 (2H, s), 4.87 - 5.19 (2H, m), 3.84 (3H, s), 2.69 - 2.92 (2H, m), 1.16 - 2.51 (180H, m), 1.05 - 1.20 (3H, m), 0.86 - 1.01 (3H, m), 0.10 (9H, s)

2-3-37 alkyne-terminated PHBL-PS₆₀₀₀ の合成 **5b''** (Method B)

氷浴上において 20 mL ナスフラスコに、**5b'** 0.500 g (0.0789 mmol)を 0.261 mmol tetra-*n*-butyl ammonium fluoride と 10 μL (0.174 mmol) 酢酸を含んだ THF に溶解させ 15 分攪拌した。濃縮後、再沈殿(THF 1 mL に溶かし methanol : 35 mL に滴下)、吸引濾過、カラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 2 : 1)を行い、凍結乾燥し、白色固体を得た。(収量 : 0.450 g (0.0725 mmol), 収率 : 92%, Mn = 6100)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ7.56 - 7.70 (1H, m), 6.25 - 7.26 (330H, m), 5.84 - 6.03 (1H, m), 4.77 (2H, s), 3.96 (3H, s), 1.26 - 2.51 (200H, m), 1.02 - 1.33 (3H, m), 0.84 - 0.98 (3H, m).

2-3-38 PEG₇₅₀-*b*-PHBL-*b*-PS₆₀₀₀ **5b** の合成 (Method B)

窒素下において 30 mL ニロナスフラスコに、**5b''** 0.100 g (0.0167 mmol)、**29a** 0.0267 g (0.0333 mmol)、CuBr 0.00264 g (0.0184 mmol), PMDETA 0.0112 g (0.0501 mmol)を 3.0 mL dry DMF に溶解させ、40°C で 3 時間攪拌した。攪拌後、減圧留去により DMF を取り除き、再沈殿(THF 5mL に溶かし methanol : 100 mL に滴下)、吸引ろ過し、カラムクロマトグラフィー

一(hexane : ethyl acetate = 2 : 1)により単離し、凍結乾燥により白色固体を得た。(収量 : 0.0900 g (0.0134 mmol), 収率 : 80%, Mn = 6800)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.78 - 7.94 (1H, m), 7.59 - 7.73 (1H, m), 6.17 - 7.41 (330H, m), 5.81 - 6.03 (1H, m), 5.25 (2H, s), 3.84 (3H, s), 3.55 - 3.66 (71H, m), 3.38 (3H, s), 1.25 - 2.31 (180H, m), 1.05 - 1.20 (3H, m), 0.82 - 0.99 (3H, m).

2-4 結果と考察

2-4-1 光分解性ヘテロ二価性架橋剤(**1a**, **1b**)の合成

Fig. 2-3 に **1a** の合成経路を示す。4-hydroxy-3-methoxyacetophenone を出発原料として、*p* 位のヒドロキシ基をベンジルエーテル保護するため、ベンジルブロミドを反応させ **6** を収率 94% で得た。この保護により次のニトロ化は、置換基であるメキシのオルト-パラ配向性により選択的に 2 位がニトロ化され、**7** を収率 84% で得た。その後、TFA によりベンジルエーテルの脱保護により **8** を収率 81% で得て、Williamson のエーテル合成によりアルキンの導入し **9** を収率 80%、 NaBH_4 による還元反応により **10** を定量的に得た。ブロモ化剤として、温和な条件で反応が進行する $\text{Ph}_3\text{P}\cdot\text{CBr}_4$ が知られているが、 Ph_3P が **10** のニトロ基と反応してしまうため、三臭化リン(PBr_3)を用い収率 76% で **11** を得た。この反応において、副生成物として脱離反応が進行したスチレン誘導体が生成する。低温(0°C)で反応を試みたが、スチレン誘導体の副生を完全に抑制することはできなかった。このブロモ体 **11** とスチレン体は、カラムによる単離精製が難しいため、精製せずに次の反応へと進んだ。得られたブロモ化体 **11** とマレイミドのフラン付加体のカップリングにより光分解性ヘテロ二価性架橋剤 **1a** を収率 91% で合成した。この **1a** と先の反応で生じたスチレン体は極性が大きく異なるため、カラムクロマトグラフィーによりスチレン体を除去することができた。すべての化合物は、 $^1\text{H NMR}$ 、IR 測定により同定した。さらに最終生成物である **1a** は元素分析でも計算値と良く一致した。この反応の特徴として、ほとんどの化合物は再結晶により精製でき簡単に合成できる。さらにこの反応における全体収率は 35% となり高収率で得られることもわかった。

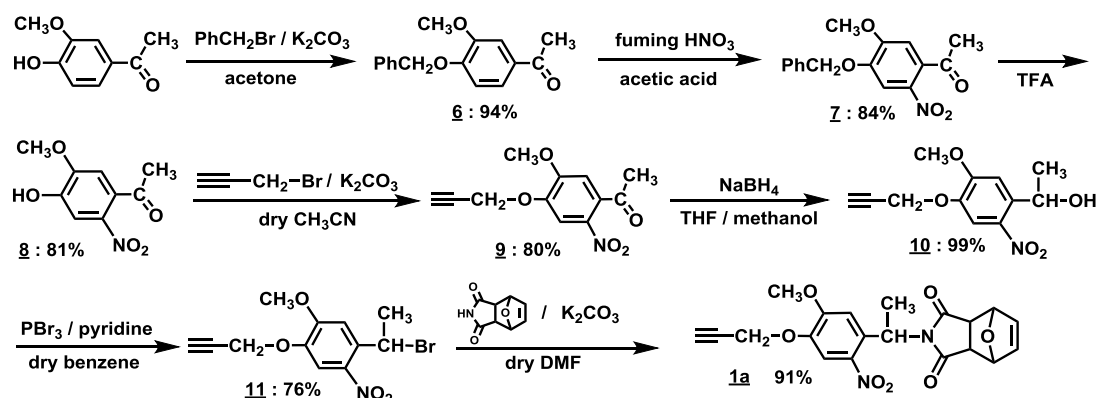


Figure 2-3. Synthetic route of photodegradable heterobifunctional crosslinking linker (PHBL) **1a**

Fig. 2-4 に **1b** の合成経路を示す。ニトロ化体 **7** までは **1a** と同様の方法で合成した。最初に **1a** に従い **8** から 3-bromo-1-(trimethylsilyl)-1-propyne を反応させ、得られた化合物を NaBH_4 による還元を行ったが、トリメチルシリル基の脱保護も同時に進行してしまったため、3-bromo-1-(trimethylsilyl)-1-propyne の導入を還元後に行う合成経路で **1b** を合成することにした。ニトロ化体 **7** を NaBH_4 による還元により **12** を収率 98% で得た。その後ブロモ化し収率 86% で **13** を得て、マレイミドのフラン付加体とのカップリングにより **14** を収率 68% で合成した。この際、フランで保護していないマレイミドのみで **13** とのカップリングを試みたが、マレイミドの重合が起こり目的物を得ることができなかった。ベンジルエーテルの脱保護(収率 99%)、トリメチルシリル基で保護されたアルキンの導入(収率 62%)、最後に anisole と加熱によるフランの脱保護により **1b** を収率 95% で合成した。すべての化合物は、 ^1H NMR、IR 測定により同定され、Figure 2-3 に示す合成経路で **1b** を得た。さらに反応における全体収率は 26% となり、こちらも高収率で得られたことがわかる。

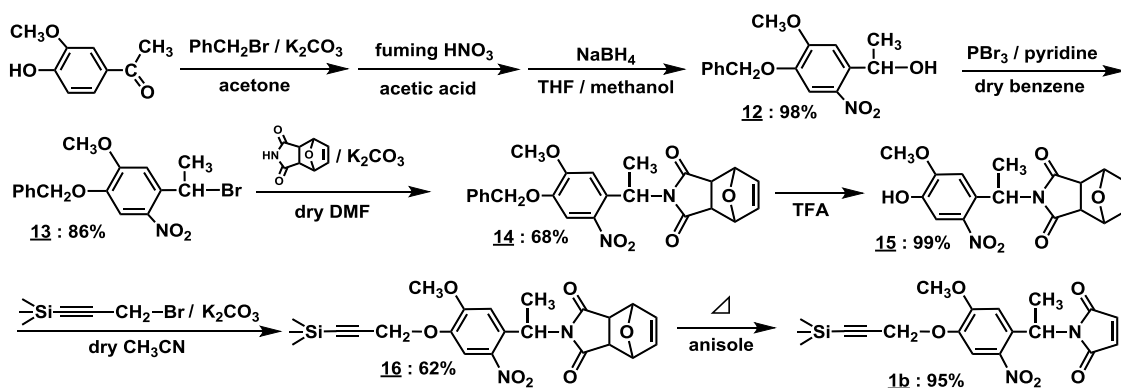


Figure 2-4. Synthetic route of photodegradable heterobifunctional crosslinking linker (PHBL) **1b**

2-4-2 低分子モデル化合物の合成

1a, **1b** を用いた光分解性ジブロック共重合体の合成に先駆け、低分子のモデル化合物による合成方法の検討、および得られた化合物のニトロベンジル化合物由来のモル吸光係数、 λ_{max} の UV-vis による測定を行った。モル吸光係数、 λ_{max} は実験項に記載した。Fig. 2-5 に合成経路を示す。1-アジドエチルベンゼンと **1a** のアルキンは、 Cu(I)Br と PMDETA 存在下における Huisgen 環化付加反応により **17** を収率 96% で得た。次いでアニソール溶媒を用いた retro Diels-Alder 反応によりフラン付加体を脱保護することで定量的に **18** を得て、得られた **18** のマレイミドと 1-オクタンチオールとの Michael 付加反応によりモデル化合物 **19** を収率 84% で合成した。Method A において、フランの保護のない構造で Huisgen 環化付加反応を行

ったが、マレイミドが露出されていることにより反応中にマレイミド同士が重合し、反応の進行を確認できなかったため、フラン付加体として保護した **1a** の必要がある。

架橋剤 **1b** を用いた Method B では、**1b** と 1-オクタンチオールを Michael 付加反応により反応させ、**20** を収率 90% で合成できた。アルキンをトリメチルシリル基で保護していない場合、1-オクタンチオールとの反応は、副生成物を生じ収率は 60% であったが、アルキンを保護していたことで、副生成物無く反応が進行した。トリメチルシリル基の脱保護は、様々な反応条件を検討した。まず TBAF を用いた方法で行った[30]。しかし、TBAF のみを用いた反応は、トリメチルシリル基の脱保護だけではなく、スルフィド結合を切断することがわかった。そこで、反応を穏やかにするために、酢酸の添加および温度コントロールにより脱保護を行った。**20** に対して 1.5 eq TBAF と 1.0 eq 酢酸中で、4℃、15 分間で反応させることにより、化合物 **21** を収率 94% で得た。最後に、臭化銅、*N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA) 下で化合物 **21** と 1-アジドエチルベンゼンの Huisgen 付加反応により、**15** は、収率 74% で得られた。これにより **1a** および **1b** を用いることで、2 種類の方法でモデル化合物を合成できることがわかった。

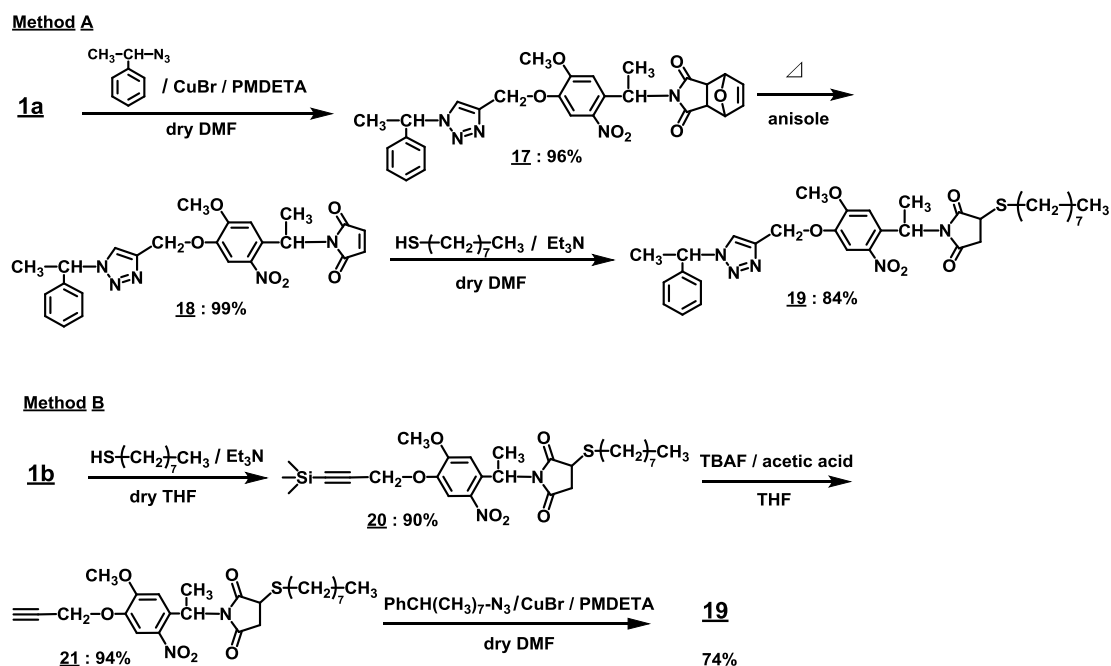


Figure. 2-5. Synthetic route of model compound. (Method A and Method B)

2-4-2 末端官能基化高分子の合成

我々は、両親媒性ジブロック共重合体の合成のために、ブロック成分として疎水性ポリマーであるポリスチレン(PS)、ポリ(ϵ -カプロラクトン)と親水性ポリマーのポリエチレング

リコール、熱応答性ポリマーのポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM)を合成した。アジド化 PS は、ATRP により合成した (Fig. 2-6)。一般的な ATRP は、配位子として PMDETA を用いることが多く、1-bromoethylbenzene と PMDETA を用いた PS の合成は、約 80%の末端ブロモ基が導入されることも報告されている。PMDETA は、配位子としての作用が強く、高分子量のポリマーの合成には適してはいるが、停止反応もまた起こりやすくなっており、末端ブロモ基の導入率が分子量の増加とともに減少することがわかっている[31]。そこで、配位子として PMDETA の代わりにビピリジン(bpy)を用いた[32]。試薬量、攪拌時間、分子量および末端ブロモ基の導入率は、Table 2-1 に示す。末端ブロモの導入率は、末端メチル基の 1.0 ppm 付近のピークを基準にしたときの、末端ブロモ基に隣接する 4.5 ppm 付近のメチンのピークの積分比により見積もった。その結果、bpy を用いることで末端ブロモ基の導入率は、ほぼ 100%であるとわかった。さらに攪拌時間の増加により分子量も増えることがわかり、分子量 8000 まで分子量分布の狭い(1.1 以下)末端ブロモ化 PS(**22a** - **22c**)を得られることがわかった。得られた末端ブロモ化 PS は、アジ化ナトリウムと反応させることで **23a** - **23b** を得られた[33]。アジド基の導入は、IR のアジド基由来の吸収(2093 cm⁻¹)、¹H-NMR ではブロモ基に隣接するメチンのピークが消失し、アジドに隣接するピーク(4.0 ppm 付近)のシフトにより確認し、導入率もほぼ定量的であることより確認した。

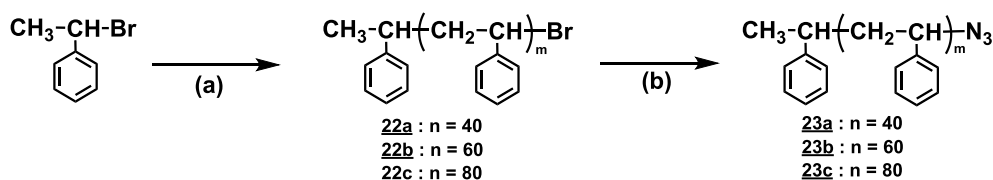


Figure 2-6. Synthetic scheme of terminally-functionalized polystyrene using ATRP and RAFT polymerization : (a)styrene, CuBr, 2,2'-bipyridyl, 110°C; (b) NaN₃, dry DMF, rt.

Table 2-1. Reaction conditions and conversion for atom transfer radical polymerization of styrene.

BEB : St : L : CuBr ^{a)} (mol)	Time (h)	Mn ^{b)} (GPC)	Mn / Mw ^{b)} (GPC)	Conversion (%)	Br - terminated ^{c)} (%)
1 : 80 : 3 : 1	1	4300	1.08	61	99
1 : 110 : 3 : 1	7	6100	1.10	57	95
1 : 150 : 3 : 1	12	8000	1.09	48	93

(a) BEB represents 1-bromoethylbenzene, St represents styrene, and L represents 2, 2' bipyridyl. (b) The column set was calibrated by a series of narrow polydispersity polystyrene standards. (c) Br-terminated determined by ¹H NMR.

末端アジド化 PCL **27** は、 ϵ -caprolactone をモノマーとし、水を開始剤、*p*-toluenesulfonic acid を触媒にした開環重合により合成した(Fig. 2-6) [34]。窒素下室温にて 4 時間攪拌することで、分子量 6500 の重合体 **24** を得て、GPC から求めたその分子量分布も 1.04 と非常に狭いことがわかった。得られた PCL の末端カルボキシル基は (diazomethyl)benzene を用いてベンジルエステルとして保護した。¹H NMR より 5.2 ppm 付近のベンジル位のメチレンピークと 7.3 ppm 付近のフェニル基のピークが出現し、ほぼ定量的に導入できていることが確認できた。**25** の末端ヒドロキシ基をトシル化し[35]、こちらも ¹H NMR より 7.8 ppm 付近のトシル基由来のピークの出現により導入を確認した。最後に、得られたトシル体 **26** を、NaN₃ と反応させることで **27** を得た(Fig. 2-7)。¹H NMR より 7.8 ppm 付近のトシル基由来のピークが消失すると共に、メチレンピークが 2.6 ppm 付近にシフトし、さらに IR からアジド基由来の吸収 (2093 cm⁻¹) が出現したことで、アジドの定量的な導入を確認した。

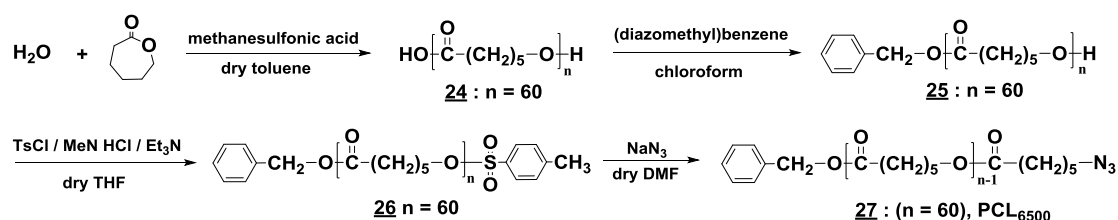


Fig. 2-7. Synthetic scheme of azido-terminated poly(ϵ -caprolactone)

末端アジド化 PEG は、PCL と同様に PEG-OH をトシル化し(**28a** – **28c**)、その後アジ化ナトリウムと反応させることで **29a** – **29c** を得た(Fig. 2-8)。得られた化合物は、¹H NMR および IR 測定にて同定し、どれも定量的に末端官能基が導入されていることがわかった。

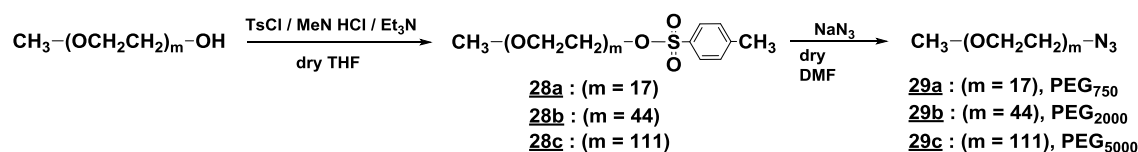


Fig. 2-8. Synthetic scheme of azido-terminated poly(ethylene glycol)

つぎにジチオエステルを有する PS は、RAFT 重合により合成した(Fig. 2-9) [36]。RAFT 重合は、2-cyanopropan-2-yl benzodithioate とスチレンを混ぜ、110°C、3 時間攪拌することで行い、分子量 6000 の PS を得た。残存するスチレンと RAFT 試薬は、メタノールで再沈殿することで全て取り除いた。分子量分布も 1.04 と非常に狭かった。得られたジチオベンゾエート化 PS (**30a**, **30b**) は、ヘキシルアミン存在下で攪拌することでアミノリシスさせ、

目的物の末端チオール化 PS へ変換したが、GPC から酸化されたと考えられるジスルフィドが多少含まれていることがわかった。酸化されたジスルフィド体は、酢酸存在下で亜鉛パウダーにより還元したところ末端チオール化 PS (**31a**, **31b**)にすることができた(Fig. 2-9)。二量体は GPC より約 2%まで減少したことがわかった。

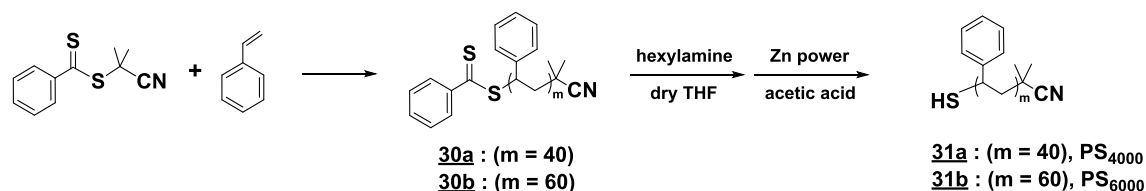


Fig. 2-9. Synthetic scheme of thiol-terminated polystyrene using RAFT polymerization.

末端チオール化 PEG **32** は、PEG-OH と 3-mercaptopropionic acid との脱水縮合により得られた(Fig. 2-10)。この際、触媒として $\text{HfCl}_4 \cdot 2\text{THF}$ を用いることで効率よく縮合反応が進行した[37]。粗成生物は、 0°C に冷却した diethyl ether に再沈殿させることで未反応の 3-mercaptopropionic acid と $\text{HfCl}_4 \cdot 2\text{THF}$ を取り除くことで精製した。しかし、分子量 750 の PEG は、冷却した diethyl ether にも一部溶解してしまうため、収率は 50%と低くなってしまっている。 $^1\text{H NMR}$ より **32** が合成できることがわかった。

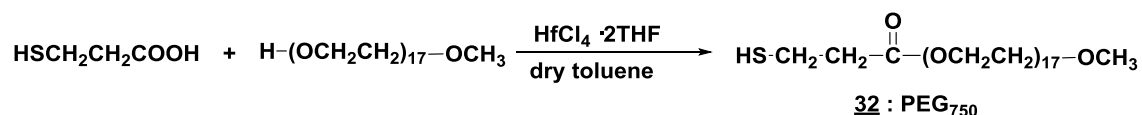


Fig. 2-10. Synthetic scheme of thiol-terminated poly(ethylene glycol)

チオエステル基を有する PNIPAM は、RAFT 重合により合成した(Fig. 2-11) [38]。RAFT 重合には、*N*-isopropylacrylamide をモノマーとし、2-cyanopropan-2-yl benzodithioate を RAFT 試薬、ラジカル開始剤として AIBN を用いた重合体 **30a**, **30b** の場合とは異なり、AIBN を存在させ、 70°C で反応させることで重合が進行した。精製は、冷えた diethyl ether に再沈殿することで単離した。得られた **33** は、 $^1\text{H NMR}$ で同定した。

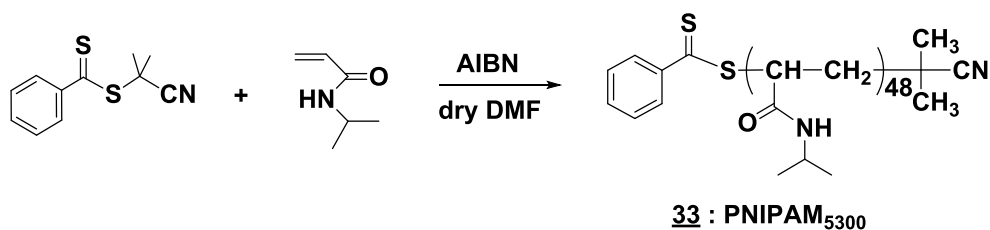


Fig. 2-11. Synthetic scheme of poly(*N*-isopropylacrylamide) using RAFT polymerization.

2-4-3 光分解性ジブロックコポリマーの合成

この研究の目的は、異なる光分解性リンカーを用いた両親媒性ジブロック共重合体の合成である。特に、2-ニトロベンジル基を含む光分解性ジブロック共重合体は、ATRP などのリビング重合を阻害するため分子量を制御したジブロック共重合体を得るために、高分子反応による合成は進められている。しかし、異なる種類の高分子を有するブロック共重合体は、分子量が大きくなるほどカラムクロマトグラフィーなどによる精製が困難になる。そこで我々は、高分子反応でも効率よく反応が進行するクリック反応の一種である Huisgen 環化付加反応と Michael 付加反応の両方に適応できる架橋剤を用いて光分解性ジブロック共重合体を合成した。さらに各反応性基を保護した異なる二種類の架橋剤を使うことで、反応させる順番は、ポリマーの溶解度に応じて変えることができる。

最初に Method A として、マレイミドをフラン付加体として保護した架橋剤 **1a** を用いたジブロックコポリマーの合成経路を示す (Figure 2-12)。さらに各反応における収率および精製方法を Table 2-2 に示す。フラン付加体 **1a** と末端アジド化 PS, PCL または PEG の Huisgen 環化付加反応は、Cu(I)Br と PMDETA 存在下で反応を行い、PS 誘導体(**2a'** - **2c'**)、PCL 誘導体(**3'**)、PEG 誘導体(**4a'**, **4b'**)は高収率で得られた。得られた **2a'** - **2c'** および **3'** は、メタノールで再沈殿することで Cu(I)Br と PMDETA を取り除き、その後のカラムクロマトグラフィーにより未反応のポリマーを取り除いた。**4a'**, **4b'** は、0.065 M EDTA-Na aq による洗浄により、CuBr を取り除き、その後、冷却したジエチルエーテルに再沈殿することで単離精製した。合成されたフラン付加体(**2a'** - **2c'**, **3'**, **4a'** and **4b'**)は、アニソール存在下 120°C の条件で行う retro-Diels-Alder 反応による脱保護により、定量的に末端 *N*-マレイミドポリマー(**2a''** - **2c''**, **3''**, **4a''** and **4b''**)を得た。*N*-マレイミドポリマー **2a''** - **2c''**, **3''** と過剰量の末端チオール化 PEG の Michael 付加反応は、トリエチルアミン存在下で反応させ、メタノールによる再沈殿により **2a** - **2c**, **3** を得た。末端チオール化 PEG は、空気酸化によってジスルフィドを形成するが、PS と PCL 成分を含む両親媒性ジブロック共重合体は、メタノールに再沈殿することで未反応の PEG を容易に除くことができる。PEG と PNIPAM 成分を含むブロック共重合体は、ヘキシルアミンによる末端ジチオベンゾエート PNIPAM のアミノリシスと生成した末端チオール化 PNIPAM とフラン付加体を脱保護して得た末端 *N*-マレイミド化 PEG **4a''** と **4b''** の Michael 付加反応をワンポット反応により **4a** と **4b** を合成した[39]。 **4a** と **4b** は冷却したジエチルエーテルに再沈殿することで単離した(Table 2-2)。このジブロック共重合体は、熱応答性ポリマーである PNIPAM 成

分を有しているため下限臨界溶液温度(LCST)を持ち、LCST 以下では **4a** と **4b** は水溶性であるが LCST 以上で両親媒性の性質を持つ。光分解性ジブロック共重合体は、二つのクリック反応を適応させることにより高収率で得られることがわかった。**2b** を一例として結果を考察する。CDCl₃ 中の **2b** の ¹H NMR を Fig. 2-14 (a) に示す。PS、PEG および **1a** 由来のピークがそれぞれ 0.64 – 2.74, 3.42 – 3.91, 5.48 – 7.18 ppm に確認できたため、構造を同定し、**2b** の分子量は、PS と PEG 由来の積分比から決定し、GPC から非常に狭い分子量分布を有することがわかった。そのほかのジブロック共重合体も同様に評価した。

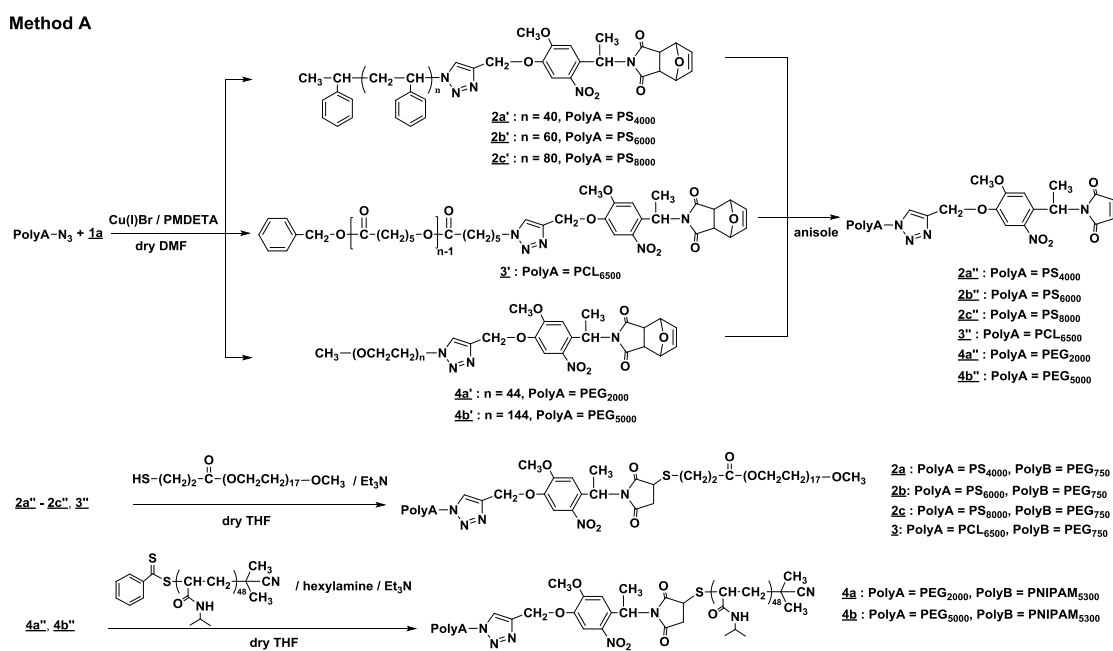


Figure 2-12. Synthetic scheme of photodegradable diblock copolymer at Method A

次に Method B として、アルキンをトリメチルシリル基で保護した **1b** を用いたジブロック共重合体の合成を示す(Fig. 2-13)。Michael 付加反応は、**5a** と **5b** の合成と同様にワンポット反応を試みたが、ヘキシルアミンによりトリメチルシリル基の脱保護も同時に進行してしまい、目的物を得ることができなかった、そのため、**1b** と末端チオール化 PS との Michael 付加反応を行い、メタノールに再沈殿することで **5a'** と **5b'** を得た。この反応では、約 2% 程度空気酸化されたジスルフィド PS を副生するが、単離精製せずに次の反応へと進んだ。トリメチルシリル基の脱保護は、**21** と同様の方法で、TBAF と酢酸存在下で進行させた。Michael 付加反応時に生成した PS のジスルフィド体は、この段階でカラムクロマトグラフィーにより除去して、**5a''** と **5b''** を収率 85%、92% で得た。末端アジド化 PEG **29a** と **5a''** または **5b''** は、Huisgen 環化付加反応により **5a** と **5b** を得た。**5b** は精製後に約 2% のアルキンダイマーを含んでいたが、低分子量を有する **5a** はカラムクロマトグラフィーに

より完全に単離できた。各反応の収率を Table 2-3 に示す。光分解性ジブロック共重合体は、架橋剤 **1b** を使用しても収率良く得ることができた。**5b** の $^1\text{H NMR}$ は Fig. 2-14(b) に示す。PS、PEG および **1b** に由来するピークが 0.68 – 2.66, 3.38 – 3.98, 5.48 – 6.18 ppm に観測され、**5b** を同定した。ジブロック共重合体の分子量は、 $^1\text{H NMR}$ より決定され、GPC から非常に狭い分子量分布を持つことがわかった。

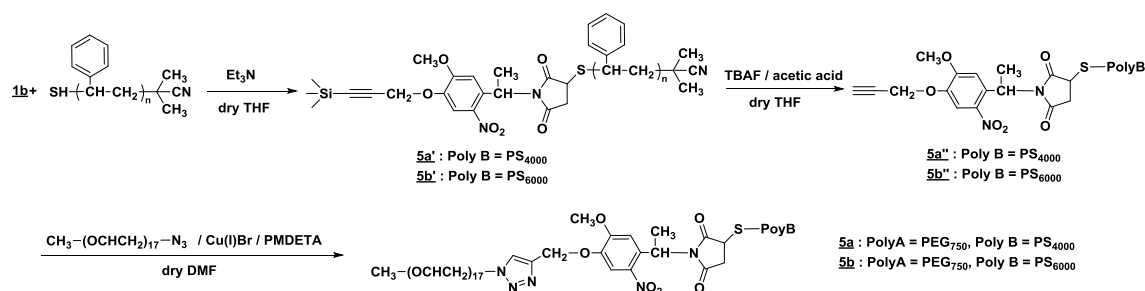


Figure 2-13. Synthetic scheme of photodegradable diblock copolymer at Method B

2a – 2c, 3, 4a, 4b, 5a, 5b の分子量は、 $^1\text{H NMR}$ 、UV、GPC 測定によって決定し、分子量分布は GPC 測定により調べた (Table 2-4)。**19** のモル吸光係数は、UV 測定により分子量を求めるために用いた。分子量は三種類の方法ともよく一致する結果となった。さらにカップリングによる合成法により、親水性ポリマーの PEG の含有率は、正確に制御することができた。**4a** と **4b** の LCST は、文献に従い測定し [40, 41]、 39°C となった。これは、光分解性基を含まない PEG-*b*-PNIPAM の文献値である 38°C とよく一致した [42]。

Table 2-2. Results of Click reaction in Method A

Huisgen cycloaddition reaction			Michael addition reaction		
PolyA	PolyA-PHBR	Yield (%)	PolyB	PolyA-PHBR-PolyB	Yield (%)
PS ₄₀₀₀	2a'	93 ^{a)}	PEG ₇₅₀	2a	83 ^{b)}
PS ₆₀₀₀	2b'	89 ^{a)}	PEG ₇₅₀	2b	78 ^{b)}
PS ₈₀₀₀	2c'	91 ^{a)}	PEG ₇₅₀	2c	93 ^{b)}
PCL ₆₅₀₀	3'	85 ^{a)}	PEG ₇₅₀	3	92 ^{b)}
PEG ₂₀₀₀	4a'	82 ^{b)}	PNIPAM ₅₃₀₀	4a	94 ^{b)}
PEG ₅₀₀₀	4b'	73 ^{b)}	PNIPAM ₅₃₀₀	4b	94 ^{b)}

The product was isolated (a) by column chromatography, (b) by reprecipitation.

Table 2-3. Results of Click reaction in Method B

Michael addition reaction			Huisgen cycloaddition reaction		
PolyB	PHBR-PolyB	Yield (%)	PolyA	PolyA-PHBR-PolyB	Yield (%)
PS ₄₀₀₀	<u>5a'</u>	91 ^{a)}	PEG ₇₅₀	<u>5a</u>	45 ^{b)}
PS ₆₀₀₀	<u>5b'</u>	98 ^{a)}	PEG ₇₅₀	<u>5b</u>	80 ^{b)}

The product was isolated (a) by reprecipitation, (b) by column chromatography.

Table 2-4. Results for diblock copolymers

	NMR	\overline{M}_n UV	GPC ^{a)}	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$ GPC ^{a)}	PEG wt%	Exposure dose (J/cm ²)
<u>2a</u>	5700	5340	5500	1.05	14.7	15
<u>2b</u>	7600	7300	7800	1.07	11.1	13
<u>2c</u>	9300	8740	9100	1.05	9.0	15
<u>3</u>	7700	8000	11000	1.03	11.7	16
<u>4a</u>	7600	7800	—	—	26.0	13
<u>4b</u>	10600	10400	—	—	47.0	13
<u>5a</u>	5400	5300	4900	1.02	13.9	16
<u>5b</u>	6500	6200	6800	1.03	11.5	17

(a) Determined by GPC using PS standards.

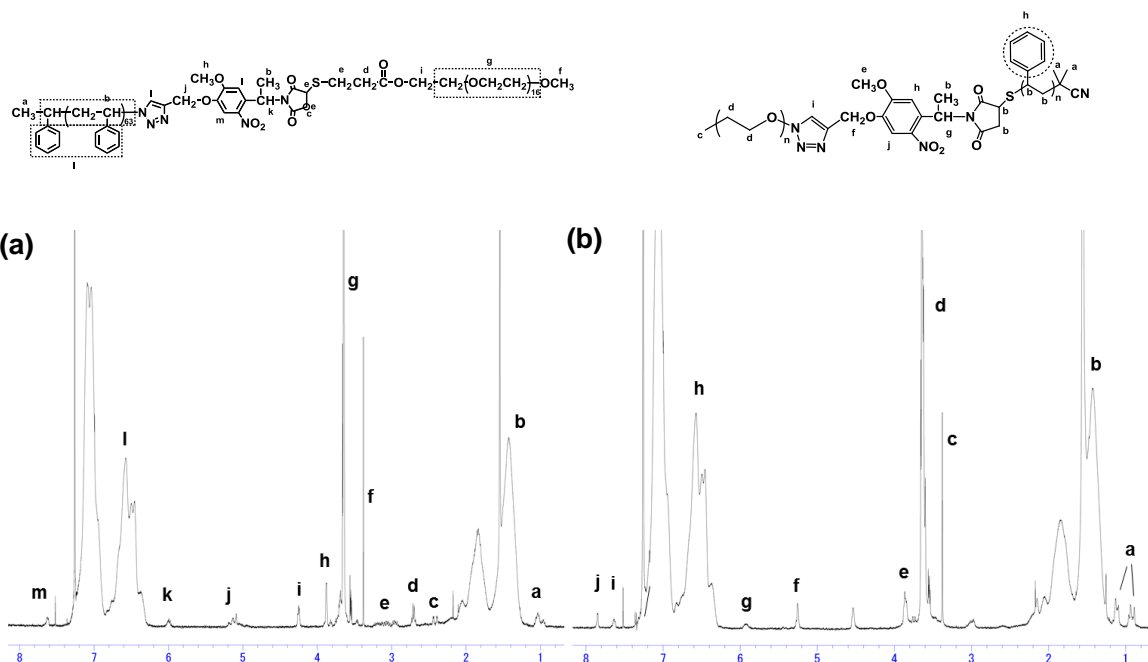


Fig. 2-14. ^1H NMR spectra of (a) **2b**, (b) **5b**.

2-4-4 光分解性ジブロックコポリマーの光分解

Fig. 2-15 に、**2b**と**5b**の光照射における UV スペクトル変化を示す。得られたジブロック共重合体(**2b**, **5b**)および同じ UV スペクトル変化を示した **2a**, **2c**, **3**, **4a**, **4b**, **5a** (data not shown)は、分子量や分子種に関わらずニトロ基由来の最大吸収は、340 – 345 nm であった。ジブロック共重合体(**2b**と**5b**)の THF 溶液における光照射に伴う UV-Vis スペクトル変化は、340 nm 付近のニトロ化合物由来の吸収が減少し、371 nm の吸収が増加した。この 371 nm の吸収は、**19**から単離したニトロ化合物のスペクトルと一致したことから、ニトロ化合物由来のものである。このスペクトル変化は、**2a**, **2c**, **3**, **4a**, **4b**, **5a**でも確認できた。**2b**と**5b**の光分解速度は、ほぼ変わらず、光分解に必要な露光量もまた、13 – 17 J/cm²となりこちらも分子量や分子種に関わらず、ほぼ同程度の値であった(Table 2-4)。

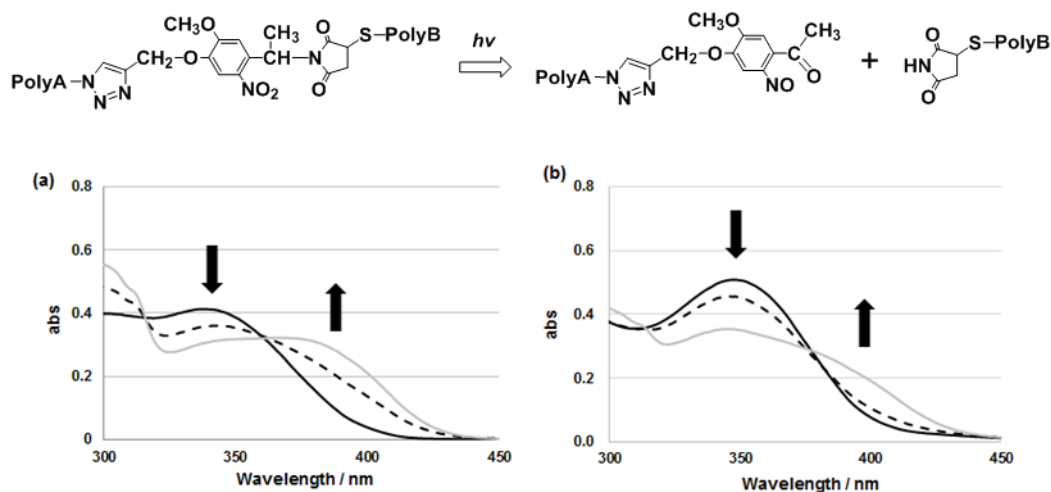


Fig. 2-15. Change of UV-Vis spectral by photoirradiation in THF (a) **2b**, (b) **5b**. The polymer solution were irradiated with near-UV light for (bold line) 0 s, (dotted line) 20 s and (thin line) 60s irradiation.

2-5 結論

我々は、光分解性ジブロック共重合体を合成するための材料として、二種類の異なる光分解性リンカー(PHBL)を開発した。分子量を精密の制御された光分解性ジブロック共重合体(PS-*b*-PEG, PCL-*b*-PEG および PEG-*b*-PNIPAM)は、二種類のクリック反応により容易に合成することができた。さらに **2b** と **5b** のような光分解性リンカーに接続されたジブロック共重合体は、**1a** および **1b** を用いることで合成できた。すべての THF 溶液中におけるジブロック共重合体は、分子量や分子種に関わらず同程度の露光量でブロック間が切断できることがわかった。このような系統的に設計された光分解性ジブロック共重合体は、光応答性 DDS や新規バイオ材料の開発に役に立つことを期待している。

参考文献

- 1) Y. Li, Y. Qian, T. Liu, G. Zhang, S. Liu, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3877.
- 2) D. R. Griffin, J. T. Patterson, A. M. Kasko, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107*, 1012.
- 3) H. Zhao, E. S. Sterner, E. B. Coughlin, P. Theato, *Macromolecules* **2012**, *45*, 1723.
- 4) J.-M. Schumers, O. Bertrand, C.-A. Fustin, J.-F. Gohy, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **2012**, *50*, 599.
- 5) A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333.
- 6) R. Rodebaugh, B. Fraser-Reid, H. M. Geysen, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 7635.

- 7) J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929.
- 8) W. E. Georgianna, H. Lusic, A. L. McIver, A. Deiters, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1404.
- 9) K. Matyjaszewski, T. E. Patten, J. Xia, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 674.
- 10) K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921.
- 11) M. Kamigaito, T. Ando, M. Sawamoto, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3689.
- 12) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- 13) R. K. Iha, K. L. Wooley, A. M. Nyström, D. J. Burke, M. J. Kade, C. J. Hawker, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5620.
- 14) W. H. Binder, R. Sachsenhofer, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 15.
- 15) P. Wu, M. Malkoch, J. N. Hunt, R. Vestberg, E. Kaltgrad, M. G. Finn, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C. J. Hawker, *Chem. Commun.* **2005**, 5775.
- 16) S. Mehawed A. Soliman, C. Nouvel, J. Babin, J.-L. Six, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **2014**, *52*, 2192.
- 17) J. Jiang, X. Tong, D. Morris, Y. Zhao, *Macromolecules* **2006**, *39*, 4633.
- 18) P. Theato, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5804.
- 19) E. Cabane, V. Malinova, S. Menon, C. G. Palivan, W. Meier, *Soft Matter*, **2011**, *7*, 9167.
- 20) E. Cabane, V. Malinova, W. Meier, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1847.
- 21) Yue Zhao, *Macromolecules* **2012**, *45*, 3647.
- 22) A. M. Kloxin, A. M. Kasko, C. N. Salinas, and K. S. Anseth, *Science*, **2009**, *324*(5923), 59.
- 23) H. Zhao, W. Gu, E. Sterner, T. P. Russell, E. B. Coughlin, and Patrick Theato, *Macromolecules* **2011**, *44*, 6433.
- 24) J.-M. Schumers, C.-A. Fustin, A. Can, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, J.-F. Gohy, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **2009**, *47*, 6504.
- 25) F. Nyström, A. H. Soeriyadi, C. Boyer, P. B. Zetterlund, M. R. Whittaker, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **2011**, *49*, 5313.
- 26) V. Percec, T. Guliashvili, J. S. Ladislaw, A. Wistrand, A. Stjerndahl, M. J. Sienkowska, M. Monteiro, S. Sahoo, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14156.
- 27) B. M. Rosen, V. Percec, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5069.
- 28) S. Nakagawa, T. Ishizone, S. Nojima, K. Kamimura, K. Yamaguchi, S. Nakahama, *Macromolecules* **2015**, *48*, 7138.
- 29) H. Kwart, I. Burchuk, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3094.
- 30) A. Hasneen, H. S. Han, H.-J. Paik, *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 681.
- 31) Aleya Hasneen, Ho Seok Han, Hyun-Jong Paik, *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 681.
- 32) M. Hikita, K. Tanaka, T. Nakamura, T. Kajiyama, A. Takahara, *Langmuir* **2004**, *20*, 5304
- 33) S. Arseniyadis, A. Wagner, C. Mioskowski, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 9717.

- 34) N. Susperregui, D. Delcroix, B. Martin-Vaca, D. Bourissou, L. Maron, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6581.
- 35) Y. Yoshida, Y. Sakakura, N. Aso, S. Okada, Y. Tanabe, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2183.
- 36) J. Chiefari, Y. K. (Bill) Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559.
- 37) D. Wan, H. Pu, G. Yang, *React. Funct. Polym.* **2008**, *68*, 431.
- 38) B. Yu, J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **2009**, *47*, 3544.
- 39) X. Huang, C. Boyer, T. P. Davisb, V. Bulmus, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1505.
- 40) J.-F. Lutz, Ö. Akdemir, A. Hoth, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13046.
- 41) C. D. Jones, L. A. Lyon, *Macromolecules* **2003**, *36*, 1988
- 42) K. H. Kima, J. Kimb, W. H. Jo, *Polymers* **2005**, *46*, 2836.

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

3-1 緒言

高分子集合体やハイドロゲル、リポソームといったナノ粒子は、ドラッグデリバリーシステム(DDS)などの生物学的材料への応用が報告されている[1 - 3]。特に、両親媒性ジブロック共重合体から調製された高分子集合体は、親水/疎水の含有量に伴い様々な超分子構造を形成するため注目を集めている[4]。その中でもポリマーソームは、中空球構造であり内部に親水性化合物を封入できるため、DDS への応用に適している[5]。その構造は、リン脂質から形成されるリポソームと類似しているが、高分子鎖で構築するポリマーソームはより強固であり、生体内安定性も高いとされている。さらに近年この基本的な高分子集合体を用いた DDS は、ブロック共重合体の構造に pH、光、熱などの刺激応答性基の導入で放出制御を可能とし、さらなる発展を見せている[6 - 9]。

様々な刺激応答の中で、光により局所的な応答を示す光応答性ポリマーソームは、高い時間空間分解能と生体直交性の性質を持つため、積極的に研究されている[10 - 13]。特に、光分解性 2-ニトロベンジル誘導体は、環境に左右されず近紫外光のみで効率よく分解するため用いられることが多い[14 - 16]。この方法の狙いは、光照射によりポリマーソームを構成する成分を切断または性質変化させることによる膜の不安定化である。そのためにこれまで多くのポリマーソームの材料となる、光分解性ジブロック共重合体は開発されてきた。たとえば、側鎖を 2-ニトロベンジル基で保護したポリメタクリル酸(PMA)とポリエチレングリコール(PEG)からなる両親媒性ジブロックコポリマーから調製されたポリマーミセルは、光照射による 2-ニトロベンジル基の脱保護により両親媒性のバランスを崩し、そのミセル構造を壊すことを報告している[17]。さらに近年、光応答性ジブロック共重合体の応答には、一分子中に一つの応答性基があるだけで十分機能を発揮すると報告されて以来[18]、2-ニトロベンジル基を接続部に有するジブロック共重合体が報告されている。たとえば、親水性のポリアクリル酸(PAA)と疎水性のポリメチルカプロラクトン(PMCL)の接続部に 2-ニトロベンジル基を導入した光開裂型ジブロック共重合体を材料とした光応答性ポリマーソームの光放出原理が報告された[19, 20]。この成果によると、光応答性ポリマーソームの内包物放出は、光分解後に疎水性鎖が新たな集合体を形成しそれに伴い封入物を放出する。しかし、構造以外にも親水・疎水ブロックの分子鎖長が高分子集合体の構造や放出効率を大きく左右することが演繹的に予想されるが、2-ニトロベンジル基の存在がリビングラジカル重合を妨害し、分子鎖長の精密合成を困難にすることから[21]、高分子集合体の構造や分子種が放出効率に与える影響を実験的に示した研究はなされていない。そのことを念頭に、我々は、二種類のクリック反応に適応できる光分解性ヘテロ二価性架橋剤(PHBL)を開発し、分子量を精密制御した光分解性ジブロック共重合体の合成法を報告した[22]。これにより、疎水性鎖の分子量をシステムティックにコントロールできるため、鎖長や高分子種が与える光放出挙動を調べることが可能となった。

そこで本研究では、疎水性の分子鎖長および分子種が与えるポリマーソームの構造および内包物光放出に対する影響を調べるため、親水性ポリマーである poly(ethylene glycol) (PEG)の分子量を 750 と固定化し、疎水性ポリマーである polystyrene (PS)の分子量のみを変えた PS-*b*-PHBL-*b*-PEG (**2a** – **2c**)および疎水性部位を poly(ϵ -caprolactone) (PCL)を有する PCL-*b*-PHBL-*b*-PEG **3**を用いてポリマーソームを調製した。調製したポリマーソームの構造は、動的光散乱法(DLS)、Field Flow Fractionation (FFF) 法および透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて構造解析を行った。さらに光照射後の構造も同様の分析手法により測定し、モデル薬剤としてフルオレセインをポリマーソームの内部に封入し、光放出挙動の解析を行った。

3-2 実験項

3-2-1 試薬・化合物

全ての試薬は、Wako、Sigma - Aldrich、関東化学およびTCIで購入した。使用する光分解性ジブロック共重合体(PS-*b*-PHBL-*b*-PEG **2a** - **2c**、PCL-*b*-PHBL-*b*-PEG **3**)は、第二章で合成したものを使用した。

3-2-2 光応答性ポリマーソームの調製

光分解性ジブロック共重合体を THF に溶解させ、攪拌している 10 mM リン酸緩衝液(pH = 7.4)にゆっくりと滴下した。この溶液濃度は 0.8 mg/mL である。二時間攪拌後、THF を取り除くため透析チューブ(Spectra/Por molecular porous membrane tubing MWCO : 3500)を用いて 24 時間透析を行った。透析チューブは使用する前に、10%イソプロピルアルコール水溶液で 30 分、超純水で 15 分、10 mM リン酸緩衝液(pH = 7.4)に 30 分浸漬させることで、保存剤として使用されているアジ化ナトリウムを取り除いた。

3-2-3 光応答性ポリマーソームへの光照射

水、10 mM リン酸緩衝液およびフルオレセインを封入したポリマーソームは、超高压水銀灯(USHIO, BA-H250)、Optical Modulex (USHIO, H250)と硫酸銅フィルター($\lambda > 320$ nm)で適当量の光照射を行った。照度は、紫外線積算光量計(USHIO, UIT-250)で測定した。光照射は 0.8 mg/mL の濃度のサンプル溶液を石英セルに、照度 25 mW/cm²の光量で行った。

3-2-4 光応答性ポリマーソームの粒径測定と形態解析

0.8 mg/mL の濃度で調製されたポリマーソーム(内包物無し)の水和半径とその粒度分布は、動的光散乱(DLS)法(Beckman Coulter)により室温の状態での測定した。

透過型電子顕微鏡(TEM)は、高分子集合体の構造を真空中で確認できる技術である。0.8 mg/mL の濃度で調製されたポリマーソーム(内包物無し)を、親水化させたカーボン膜をコートした銅グリッドの上に滴下し 5 分間静置させ、その後過剰のリン酸緩衝液を吸い取った。

次にそのグリッド上のサンプルに、燐タングステン酸溶液を滴下し、15 分間染色した。最後に染色液をリン酸緩衝液で洗浄し、銅グリッドを乾燥させ観察を行った。

Field Flow Fractionation (FFF)は、高分子集合体やナノコロイド、タンパク質などの固定相を持たない特殊な分離チャンネルを用いて分離・分析を行うことのできる分析手法である。Eclipse 3+ asymmetric-flow field-flow fractionation 分離システム(Wyatt)は、Agilent HPLC ポンプ(Agilent)によって送達された液流を detector flow および cross flow の二種類の流れに変えて測定した。この分離チャンネルは、8 チャンネルの多角度光散乱を有する DAWN8+ HELEOS 光散乱検出器に接続され、動的光散乱(DLS)から算出した水和半径(Rh)および静的光散乱(SLS)から算出した回転半径(RMS)のヒストグラム化することができる。測定前に FFF 分離システムを、10 mM リン酸緩衝液(pH=7.4)で循環させ、0.8 mg/mL の濃度で調製されたポリマーソーム(内包物無し)は FFF インジェクターに 20 μ L 注入された。このときの分離プログラムは、Detector Flow 1.0 mL/min、Cross Flow 0.6 mL/min (Elution、1 分間)、Focus Flow 0.6 mL/min (Focus、1 分間)、Detector Flow 1.0 mL/min、Cross Flow 0.6 mL/min、Inject Flow 0.2 mL/min (Focus + Injection、5 分間)、Detector Flow 1.0 mL/min Focus Flow 0.6 mL/min (Focus、4 分間)、Detector Flow 1.0 mL/min、Cross Flow 0.6 mL/min – 0.0 mL/min (Elution、25 分間)、Detector Flow 1.0 mL/min、Cross Flow 0.0 mL/min (Elution、8 分間)、Detector Flow 1.0 mL/min、Cross Flow 0.6 mL/min、Inject Flow 0.2 mL/min (Focus + Injection、3 分間)で測定を行った。光散乱の測定データは、ASTRA V software (Wyatt)で解析した。

3-2-5 フルオレセインを封入した光応答性ポリマーソームの調製

自己消光するフルオレセインの濃度である 100 mM フルオレセイン入り 10 mM リン酸緩衝液(pH = 7.4)を調製し、THF に溶解したジブロック共重合体溶液をゆっくり滴下した。2 時間攪拌し、封入されていないフルオレセインを除くため、透析チューブ(Spectra/Por molecular porous membrane tubing MWCO : 3500)を用いて 3 日間透析を行った。この際、ポリマーソーム内部と透析溶液の浸透圧を同じにするため、78 mM NaCl を加えた 10 mM リン酸緩衝液(pH = 7.4)を透析溶液として用いた。

3-2-6 光照射によるフルオレセインの放出実験

ポリマーソームから放出されたフルオレセインの量は、蛍光光度計 (F-7000、日立ハイテクノロジー)を用いて室温にて測定した。封入されたポリマーソームの光照射されたサンプル溶液を四面石英セルに入れ、そのまま測定した。励起波長(Excitation wavelength)は、485 nm に設定し、発光スペクトルは、450 nm から 650 nm の範囲で記録した。Band width (Excitation) 、 Band width (Emission)は、ともに 3.0 nm で設定した。

透析後のサンプルの測定を行ない、その時の強度を F_0 とし、逐次光照射した後の強度を F_t 、最後に、TriotoX-100 を石英セルに加え、ポリマーソームを全て壊し、その時の強度を F_{100} とした。フルオレセインの放出量は、 $[(F_t - F_0) / (F_{100} - F_0)] \times 100$ の式で算出した。

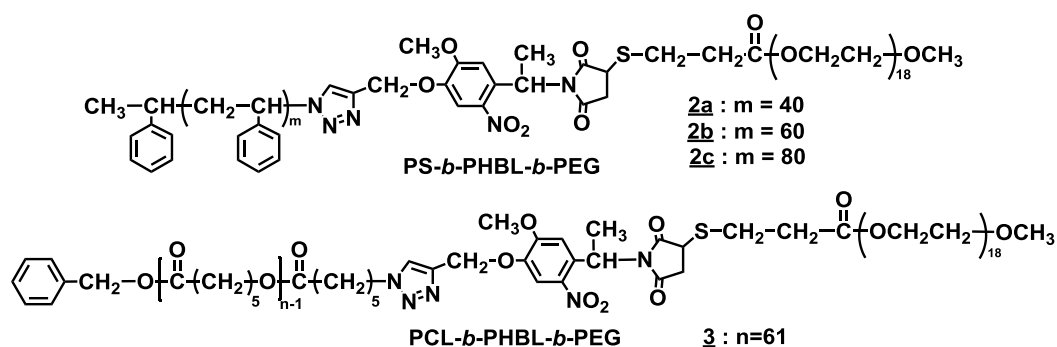


Fig. 3-1. Chemical structure of polystyrene-*b*-PHBL-*b*-poly(ethylene glycol) and poly(ϵ -caprolactone)-*b*-PHBL-*b*-poly(ethylene glycol).

Table 3-1. Photodegradable diblock copolymers analytical by **2a** – **2c**, **3**.

	\overline{M}_n	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$	PEG	k^b	
	NMR	GPC ^{a)}	wt%	(s ⁻¹)	
2a	5700	5500	1.05	14.7	0.032
2b	7600	7800	1.07	11.1	0.030
2c	9300	9100	1.05	9.0	0.032
3	7700	11000	1.03	11.7	0.034

(a) Determined by GPC using PS standards. (b) Photolysis rate constant (k) in THF solution were determined by UV spectral change.

3-3 結果と考察

3-3-1 光分解性ジブロック共重合体の解析

PS-*b*-PHBL-*b*-PEG **2a** – **2c** および PCL-*b*-PHBL-*b*-PEG **3** は、疎水性と親水性の間に光分解性 *N*-(2-ニトロベンジル)イミドを有する構造であり (Fig. 3-1)、第二章で合成した。このブロック共重合体から調製された高分子集合体は、近紫外光照射によりブロック間を切断し、それが引き金となり内包物を放出することができる。Table 3-1 に **2a** – **2c** および **3** の分子量、分子量分布、PEG 含有量および THF 溶液中での光分解速度定数を示す。**2a** – **2c** および **3** の分子量は、二種類の方法で求めたものがよく一致し、分子量分布も全て 1.1 以下と非常に狭いジブロック共重合体であることがわかった。さらに **2a** – **2c** は、PS の分子量をそれぞれ 4000, 6000, 8000 のポリマーを用いていることから、ジブロック共重合体 (**2a** – **2c**) の PEG 含有量をそれぞれ制御できた。さらに **2b** と同程度の分子量を持ち、ブロック鎖を PCL に変え

た **3** の PEG 含有量は、11.7 となり **2b** とほぼ同程度の値となった。**2a - 2c** および **3** の THF 溶液中における光分解速度定数は、0.030 から 0.034 s^{-1} となり、分子量や分子種に関わらず同程度の速度で分解することがわかった。

3-3-2 ポリマーソームの調製および評価

Fig. 3-2 に **2a - 2c** および **3** から調製したポリマーソームの DLS ヒストグラムを示す。親水性ポリマーである PEG 成分の含有率が、9.0 - 11.7 wt% と低く抑えているため、ポリマーソームを形成することが予想される。バッチ法による DLS 測定のサイズ分布ヒストグラムから、**2a - 2c** と **3** から形成されたポリマーソームは全て単分散で存在し、その **2a - 2c** の平均粒径は、それぞれ 155 nm、190 nm、220 nm と疎水性鎖長の伸展に伴い平均粒径も増加する傾向が見られた。さらに、**3** の平均粒径は、240 nm となり、分子量が同じである **2b** より大きい粒径を持つことがわかった。

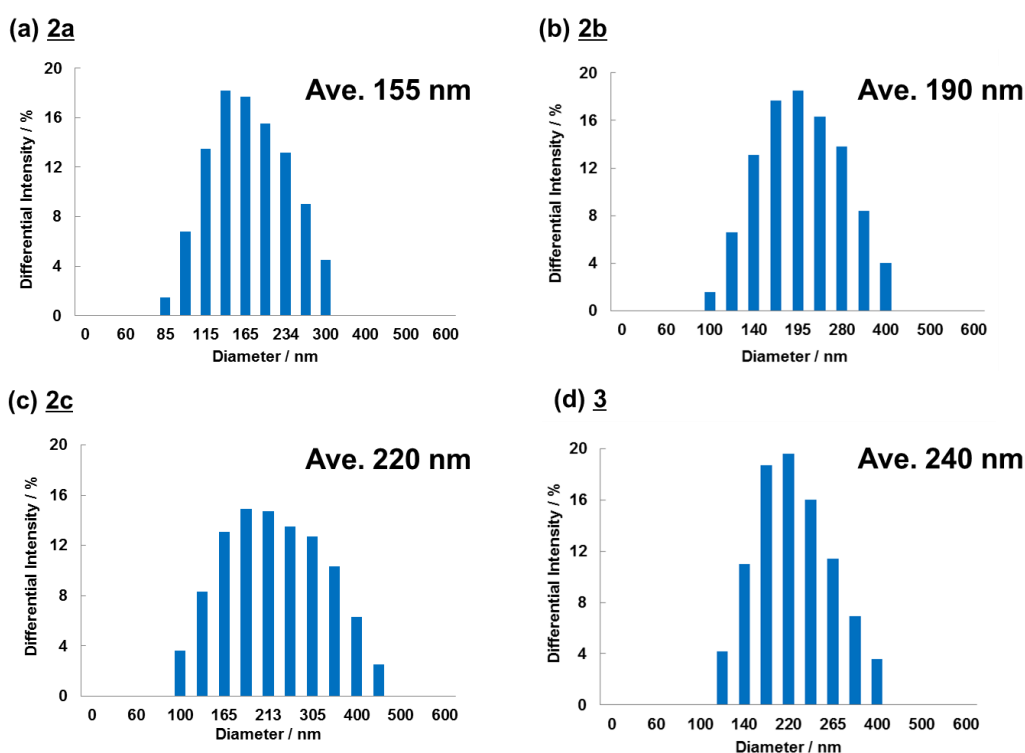


Fig. 3-2, DLS study on the change in the particle distribution of polymersomes, (a) **2a**, (b) **2b**, (c) **2c**, (d) **3**.

次に、FFF 測定による **2b** および **3** の構造解析を行った(Fig. 3-3(a, b), Fig. 3-4 (a, b))。ポリマーソーム(**2b**)の多角度光散乱(LS)および水和半径(Rh)プロファイルを、Fig. 3-3(a)に示す。その結果、バッチ法の DLS 測定では単一であったポリマーソームが、FFF 測定により、二種類の異なる光散乱特性を持つ集合体(peak A および B)を形成していることがわかった。さらに peak A は、80 – 300 nm の粒径を持ち、peak B は、300 から 500 nm と大きい粒径を持つことがわかった。動的光散乱および静的光散乱から得られた平均二乗回転半径(RMS)と流体力学半径(Rh)のプロット (RMS/Rh プロット) の傾きから peak A と peak B の形態を調べた結果(Fig. 3-3(b))、それぞれの傾きは peak A は 1.1、peak B は 4.8 となり、中空球の示す値(1.0) [23]に近い前者は一重膜構造の形成が示唆され、後者は凝集塊あるいは多重膜構造と考えられる。これらの結果は、分子種の異なる **3** でも、同様の結果が得られた(Fig. 3-4 (a, b))。

2b の TEM 画像より、ポリマーソームの形状を調べた。真空状態でのポリマーソーム(**2b**)は、50 - 200 nm の粒径範囲の球形の構造を持つことがわかった(Fig. 3-3(c))。さらに、わずかな凝集体も観察され、FFF と同様の結果が得られた。このように、DLS、FFF および TEM を組み合わせて分析することで、調製した高分子は、DLS 測定より 150 から 200 nm の粒径を有し、TEM 観察により球体であることを確認し、FFF 測定より中空球構造を持つポリマーソームであることがわかった。

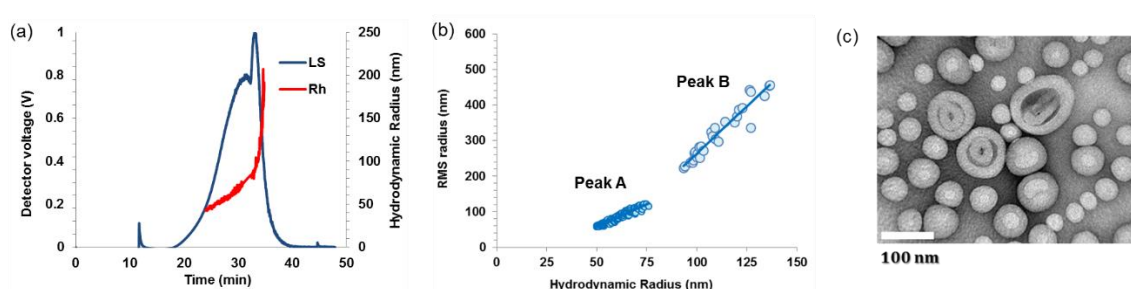


Fig. 3-3. Characterization of polymersome **2b** before photoirradiation. (A) FFF fractogram, (B) RMS- R_H plot (C) TEM image.

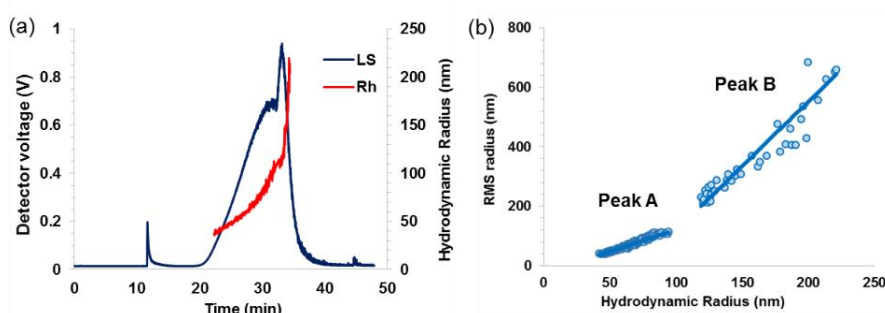


Fig. 3-4. Characterization of polymersome **3** before photoirradiation. (A) FFF fractogram, (B) RMS- R_H plot

3-3-3 光照射による光応答性ポリマーソームの光分解

調製した光応答性ポリマーソームは、光をトリガーとし内包物の放出制御を可能とし、光応答性 DDS への応用が期待されている。そこでポリマーソームに含まれる 2-ニトロベンジル基の光分解を調べるために、 ^1H NMR を用いて光分解終了時間を調べた(Fig. 3-5)。実験は 0.8 mg/mL のポリマーソーム水溶液を調製し、照度 25 mW/cm²、波長 $\lambda > 320$ nm で行った。その後、ポリマーソーム溶液を濃縮し、凍結乾燥したサンプルを ^1H NMR 測定した。調製したポリマーソーム **2b** は、2 分間光照射することで、 $\delta = 6.0$ ppm 付近のメチンのピーク (b) が消失、さらに $\delta = 7.6$ ppm 付近のピーク (a) は、ニトロソ基に変換されたことにより高磁場シフトしていることから、2 分以内で分解が終了していることがわかった。

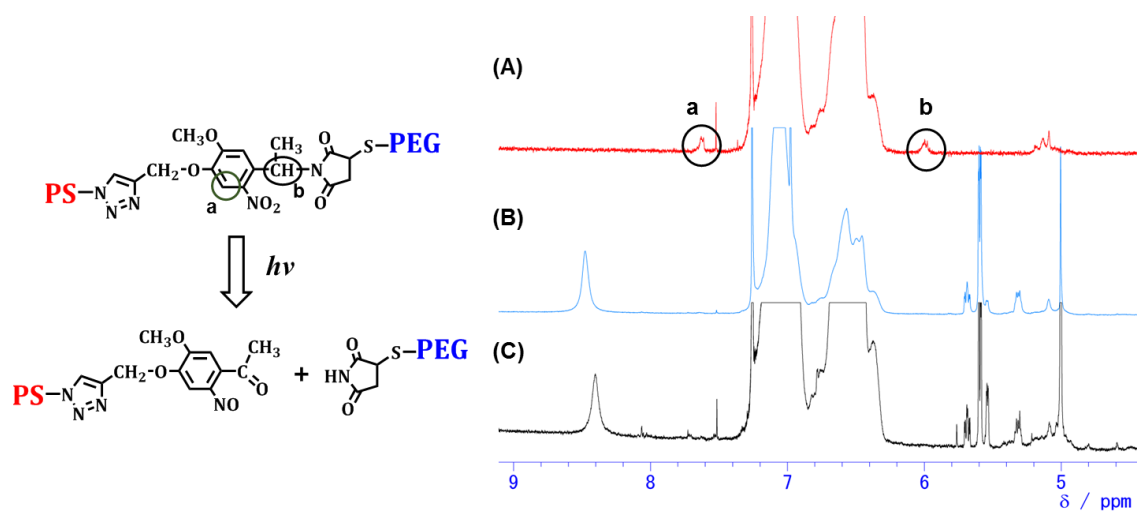


Fig. 3-5. ^1H NMR of **2b** (A) before irradiation, (B) 2min irradiated, (C) 10 min irradiated.

次に、2分間照射後のポリマーソームの構造を FFF 測定および DLS 測定により解析した。最初、**2b** から調製したポリマーソームを用いて光照射後の FFF 測定を試みたが、分離チャンネル内のメンブレンにサンプルが吸着してしまったため測定できなかった。そのため、**3** を用いて光照射後の FFF 測定を行なった。その結果、十分量照射したのにも関わらず、照射前の peak A と peak B の比率はほとんど変わらず(Fig. 3-6 (a))、peak A の RMS/Rh プロットの傾きは、1.08 となり光分解後も中空球構造を維持していることを示唆した(Fig. 3-6 (b))。これは、光照射前の Fig. 3-4 とほぼ変わらない結果であった。さらに、DLS 測定からでも、光照射後の粒径は、未照射のもの(Fig. 3-3(d))と比べてもほとんど変化はなかった。

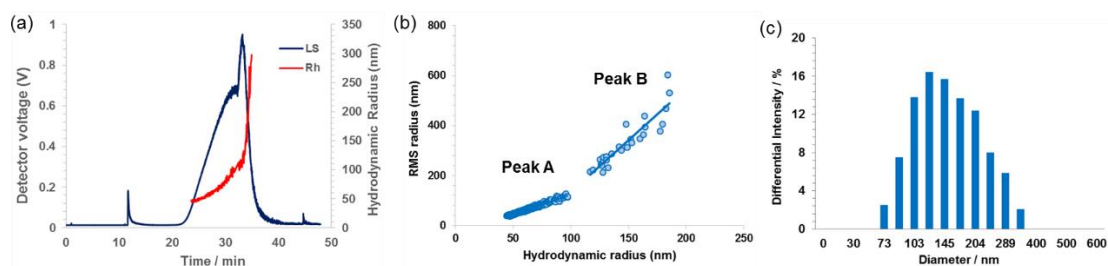


Fig. 3-6. Characterization of polymersome **3** after photoirradiation. (a) FFF fractogram, (b) RMS- R_H plot, (c) DLS histogram

最後に、光照射後のポリマーソーム **2b** の TEM 観察を行った(Fig. 3-7)。 $^1\text{H NMR}$ より求めた光分解が終了している 2 分(Fig. 3-7 (a))と 15 分(Fig. 3-7 (b))の結果を示す。光照射 2 分のポリマーソームは、ブロック間が切断されているのにもかかわらず、球形を維持していた。さらに十分量照射した 15 分のサンプルでも、その構造に変化は見られなかった。この結果より、光照射を行った後でも、ポリマーソームは球形構造を維持していた。これら三種類の測定結果より、今回開発したポリマーソームは光照射後も中空球構造を維持していることがわかった。

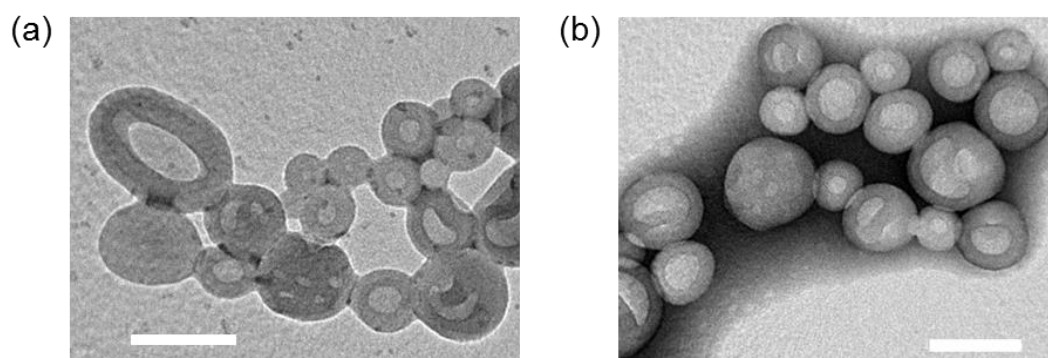


Fig. 3-7. TEM images of polymersome **2b**. The polymersome was irradiated with near-UV light for (a) 2 min, (b) 15 min. Scale bar is 100 nm.

3-3-4 光応答性ポリマーソームのフルオレセイン光放出実験

光応答性ポリマーソームの光放出機能を確認するため、ポリマーソーム内部に蛍光試薬であるウラン(フルオレセインナトリウム)を封入させ、光放出実験を行った。今回、放出量の測定は、フルオレセインの自己消光と消光解消から算出した[24]。Fig. 3-8(a)に、室温での光照射に伴う内包物放出挙動を示す。今回、疎水性の分子鎖長の異なる **2a** - **2c** および分子種の異なる **3** を用いて放出実験を行なった。この放出挙動を PS 分子量の異なる **2a-2c** で比較すると、鎖長の伸長とともに放出速度が低下していることが分かる。また、分子量が同程度で、疎水性ポリマーの種類が異なる **2b** と **3** を比較しても、放出量に大きな違いが見られなかった。しかし、先述した ^1H NMR の解析から、2-ニトロベンジル基の光分解は2分間で完了することが分かっているが、この時点でも放出が完了しておらず、さらなる内包物の放出には継続した光照射が必要であった。これは、光照射後もポリマーソームが中空球構造を維持しているためであると推測できる。また、このポリマーソームは、未照射ではほぼフルオレセインの漏れ出しは見られず、2分間照射後に静置していてもさらなる放出は確認されなかった(data not shown)。さらに、同様の放出実験を 37°C で行くと、放出速度が格段に速くなることも見出しており (Fig. 3-8 (b))。その際の光放出速度の序列は、室温時と同じであった。以上の結果より、推測できるポリマーソームの光照射放出挙動を Fig. 3-9 に示す。今回開発した光応答性ポリマーソームは、光照射によりブロック間を切断した後でも疎水性カプセルとして安定に存在するため、内包物が閉じ込められている。そのため、2-ニトロベンジル基の光分解と光放出が一致しない結果となった。さらに疎水性の分子量が増すことで疎水性膜が厚くなるため、鎖長の伸長とともに放出速度が低下する原因となっている。その後、光照射により生じた熱や外部からの発生する熱により放出が促進される結果となった。加熱により放出速度が速まる理由は、疎水性膜が熱により揺らぐことで内包物が漏れ出しやすくなっているためである。

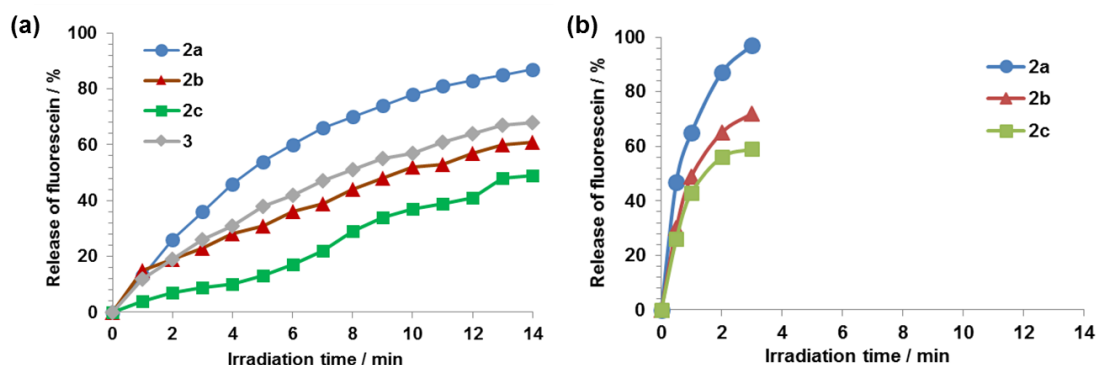


Fig. 3-8. Release of fluorescein from polymersome of **2a** - **2c** and **3**. at rt (A), at 37°C (B)

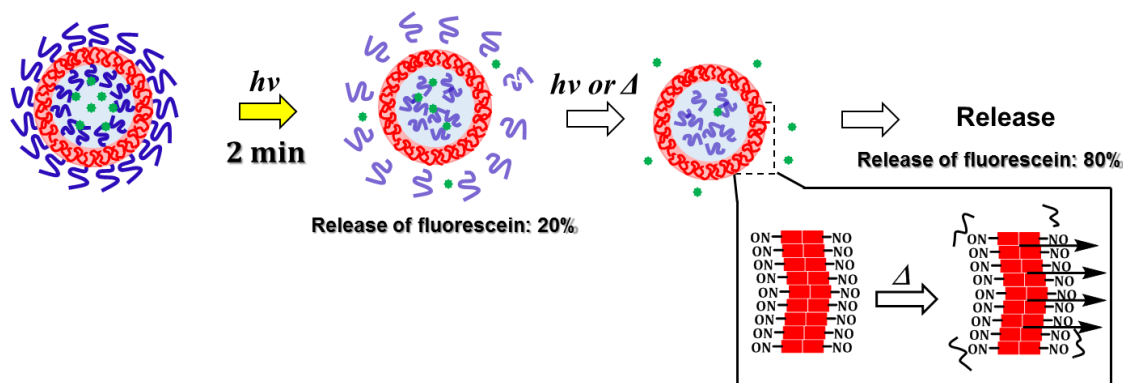


Fig. 3-9. Expected mechanism of fluorescein photorelease from polymersome

3-4 結論

我々は、親水性高分子と疎水性高分子の間に光分解性基を有する両親媒性ジブロック共重合体からポリマーソームを調製した。このポリマーソームは近紫外光を照射した時、ブロック間が切断される設計である。ポリマーソームの光照射前後の構造を、DLS、FFF および TEM により解析した結果、照射前だけでなく光照射後でも中空球構造を維持していることが分かった。この光応答性ポリマーソームにフルオレセインを封入し光放出能力を検証した結果、内包物放出速度は疎水性鎖長の縮小により増加した。これは、光照射後にも疎水性膜を維持しているため、鎖長が短いものほど漏れ出しやすくなっているためである。さらに加熱によりその放出速度はさらに増加した。今回の実験において各分子鎖長や PEG 含有量を精密に制御したことで、光応答性ポリマーソームの内包物放出速度の増加には、ブロック間の光分解速度だけではなく、疎水性鎖の長さや外部刺激、さらに光分解後の構造も重要であることを明らかにした。

参考文献

- 1) Y. Bae, K. Kataoka, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 768.
- 2) A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, L. Huang, *FEBS. Lett.* **1990**, *268*, 235.
- 3) A. S. Hoffman, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 10.
- 4) K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, *47*, 113.
- 5) J. S. Lee, J. Feijen, *J. Control Release* **2012**, *161*, 473.
- 6) R. Cheng, F. Meng, C. Deng, H.-A. Klok, Z. Zhong, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3647.
- 7) M. Motornov, Y. Roiter, I. Tokarev, S. Minko, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 174.
- 8) E. Fleige, M. A. Quadir, R. Haag, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 866.

- 9) Q. Yin, J. Shen, Z. Zhang, H. Yu, Y. Li, *Adv Drug Deliv Rev.* **2013**, *65*, 1699.
- 10) N. Fomina, J. Sankaranarayanan, A. Almutairi, *Adv Drug Deliv Rev.* **2012**, *64*, 1005.
- 11) Y. Zhao, *Macromolecules* **2012**, *45*, 3647.
- 12) C. Alvarez-Lorenzo, L. Bromberg, A. Concheiro, *Photochem Photobiol* **2009**, *85*, 848.
- 13) Y. Zhao, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 4887.
- 14) X. Jiang, C. A. Lavender, J. W. Woodcock, B. Zhao, *Macromolecules* **2008**, *41*, 2632.
- 15) G. Liu, C.-M. Dong, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1573.
- 16) O. Bertrand, J.-M. Schumers, C. Kuppan, J. Marchand-Brynaert, C.-A. Fustin, J.-F. Gohy, *Soft Matter*, **2011**, *7*, 6891.
- 17) J. Jiang, X. Tong, D. Morris, Y. Zhao, *Macromolecules* **2006**, *39*, 4633.
- 18) P. Theato, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5804.
- 19) E. Cabane, V. Malinova, S. Menon, C. G. Palivan, W. Meier, *Soft Matter* **2011**, *7*, 9167.
- 20) E. Cabane, V. Malinova, W. Meier, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1847.
- 21) J.-M. Schumers, C.-A. Fustin, A. Can, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, J.-F. Gohy, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **2009**, *47*, 6504.
- 22) S. Yamamoto, S. Nakahama, K. Yamaguchi, *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 791.
- 23) J. Hotz, W. Meier, *Langmuir* **1998**, *14*, 1031.
- 24) K. Yamaguchi, Y. Tsuda, T. Shimakage, A. Kusumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 1923.

第四章 光解離性高分子を固定化したタンパク質担持金ナノ粒子の開発と評価

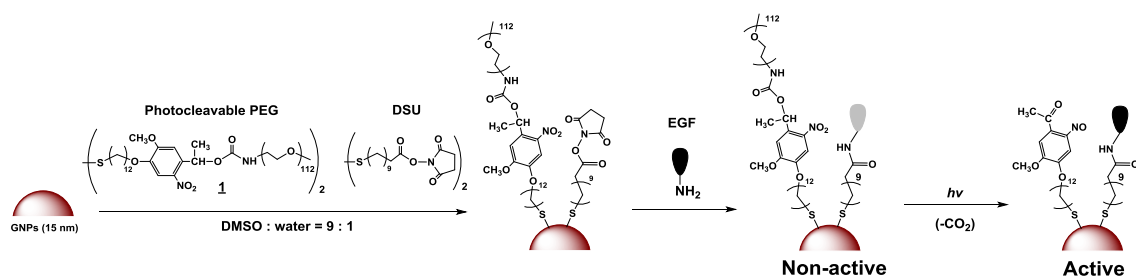
4-1 緒言

DDS の担体として高分子集合体以外に、無機ナノ粒子を用いた報告されている[1, 2]。これら無機ナノ粒子の特徴として、大きな比表面積を持つことや、有機化合物や高分子、生体分子など様々な化合物を表面上に修飾することができる事が挙げられる。我々もこの特徴を活かし、金ナノ粒子に上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)と poly(ethylene glycol) (PEG)を組み合わせたコンジュゲート材料の開発とその応用研究を行ったため、その成果を報告する。

材料に固定化された成長因子やサイトカインは、固定化していない通常の状態の液性因子とは拡散性や細胞内トラフィックが変化するため、特異な細胞応答を示すことが多い[3, 4]。たとえば、Reinhard らは、金ナノ粒子(GNPs)に固定化した EGF は、ガン細胞表面に多く発現するその当該受容体(EGFR)に作用させ、アポトーシスを引き起こすことを報告している[5]。それゆえに、このようなコンジュゲート材料は、生物学的な基礎実験だけではなくその応用のための重要なツールである。しかしながらこれまでの研究において、そのコンジュゲーションがどのように作用するかは報告はなされていない。

一方で、ケージド化合物は生体分子の活性が光分解性保護基の結合により一時的に抑制される生体分子であり、その保護基が光照射により開裂することでその分子は活性を取り戻すメカニズムを有する[6 - 9]。このケージド化合物を用いる最大の利点は、生体分子の活性を高い時間空間分解能で応答することである。そのケージド化合物の有用性を示した新たなプラットフォームとして、我々の研究室ではこれまでに、PEG と光分解性活性エステル基を共固定した金ナノ粒子を開発した[10]。この光機能化された金ナノ粒子は、一級アミンを反応させることができ、光照射によりそのアミンを放出することが可能となる。さらに反応させた一級アミンは、高密度の PEG 鎖の中に覆われることで、細胞への作用をブロックされるため、光照射前では活性を示さない。そのアミンは光照射によりナノ粒子から放出させることができる。我々の過去の研究において、この原理は、モデル薬剤として用いたヒスタミンの細胞内シグナルにより光放出されていることを証明された。

そこで本研究では、表面に固定化された EGF の活性メカニズムを明らかにすることを目標とし、過去の報告を参考にして光分解性 PEG と EGF を共固定させた photoactivatable EGF-GNP conjugates を開発した(Scheme 4-1)。我々は、金ナノ粒子に固定化された EGF の生物学的活性は、光照射前では共固定された PEG の影響で抑制されており、その後の光照射により PEG が外れることで活性を取り戻すことを期待している。そこでこの概念を立証するために、光照射により引き起こされる PEG の放出を動的分散測定(DLS)測定により明らかにし、photoactivatable EGF-GNP conjugates の生物学活性の光照射に伴う変化を、Cell enzyme-linked immunosorbent assay (Cell ELISA)によるリン酸化酵素 ERK の活性変動により明らかにした。



Scheme 4-1. Synthetic route of photoactivatable EGF-GNP conjugates and their activation by photoreleasing PEG.

4-2 実験項

4-2-1 試薬・化合物

試薬は Wako から購入し、そのままの状態で使用した。 ω -Methoxy-poly(ethylene glycol) amine (mPEG-NH₂, Mw = 5,000)は Sunbright、11,11'-dithiobisundecanoate (DSU)は Dojindo のものを使用した。金ナノ粒子は、BBI solutions から購入したものをそのまま使用した。photocleavable 2-nitrobenzyl group, bis(12-(4-(1-(succinimidyloxycarbonyloxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)dodecyl) disulfide **1**は、文献を参考にして合成した[10]。光分解性 PEG **1**は、5 mM の末端アミノ化 PEG と、5 mM の光分解性リンカー **B**、10 mM の triethylamine を、DMSO 中で 2:1:1 で混合させ、室温で終夜反応させることで合成した。その溶液は、精製を行わずにそのまま金ナノ粒子との反応に用いた。

4-2-2 Photoactivatable EGF-GNP conjugates の調製

6.0 mL の 15 nm GNPs 溶液 (OD₅₂₀ = 1)は、Vivaspin 20 (GE Healthcare, MWCO 30,000)に入れ、9,000 rpm、30 分間 spin-filtration することで濃縮した。その濃縮溶液を 1.5 mL エッペンチューブに移し、5 mM の **1**と DSU を 8:2 の割合で混合させ、DMSO : water = 9 : 1 の溶媒において、室温で終夜反応させた。反応させた GNPs 溶液は、DMSO 中で遠心分離(16,000 rpm、60 分、室温、3 回)により洗浄した。最後の遠心後、GNPs は 20 μ L の DMSO で分散させた。この溶液に対して、317 μ L の phosphate buffer saline (0.02% Tween 20 入り) (PBST)と 22 μ L の EGF 溶液 (0.6 mg/mL)を加え、4°Cで終夜反応させた。反応後、PBST を用いた遠心分離 (14,000 rpm、30 分、4°C、6 回)により洗浄した。各洗浄過程における残存する EGF は、anti-EGF rabbit antibody (Abcam)、anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (Sigma)、基質として 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)を用いた ELISA 法によって決定した。このシグナルは、plate reader (Biorad)によって測定した。

4-2-3 Photoactivatable EGF-GNP conjugates の評価

金ナノ粒子(GNPs)に固定化された EGF 分子の平均個数(化学量論)は、GNPs に反応させる前と後の EGF 濃度の減少値から算出した。photoactivatable EGF-GNP conjugates の水和半径と分散値は、DLS 測定により求めた。光照射は、以前に報告された方法で行った[10]。GNPs 溶液($OD_{520} \approx 1$)を、石英ガラスセルに入れ、Hg arc lamp (USHIO, BA-H250)、Optical Modulex (USHIO, H250)と band-pass filter ($\lambda = 300\text{--}400$ nm, HOYA)を用いて光照射(3J および 7J)した。

4-2-4 Cell ELISA

HeLa 細胞は、American type culture collection (ATCC)より購入したものを使用し、10% Fetal Bovine Serum (FBS)、100 units/mL の penicillin と、100 mg/mL の streptomycin を含む Minimum Essential Medium Eagle (MEM)中で、インキュベーター中で培養した。その際、5% CO₂ を含む 37°C で湿気のある環境において培養した。その細胞は、2-3 日の間隔で trypsin で継代した。

Cell ELISA の実験方法を記す。細胞は、前夜に 96 well plate の各 well に 20,000 cells/well で培養させた。翌日、50 μ L の無血清培地に変え、4 時間スタベーションした。その後、各時間光照射された(0, 3, 7 J) 5 μ L の photoactivatable EGF-GNP conjugates を含む 50 μ L の無血清培地で細胞を 5 分間インキュベーター内で刺激し、その後、4% paraformaldehyde を含む PBS を 200 μ L 加えることで反応を終了させた。30 分後、細胞は、0.5% Triton X を含む PBS で 20 分間処理し、続いて 2% Bovine Serum Albumin (BSA)を含む PBS 溶液でブロッキングした。Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) rabbit monoclonal antibodies (CST)と anti-rabbit IgG alkaline phosphatase (Sigma)は、それぞれ一次抗体と二次抗体として使用した。それぞれの抗体は、2% BSA を含む PBS 溶液で希釈され、一次抗体は 1:1000、二次抗体は 1:3000 の希釈率で調製し、それぞれ 1 時間室温で反応させた。最後に、反応した抗体の濃度は、基質として 4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (Sigma)を用いることにより検出した。

4-3 結果と考察

4-3-1 Photoactivatable EGF-GNP conjugates の調製

Scheme 4-1 に photoactivatable EGF-GNP conjugates の合成経路および、その光活性反応について示す。1と DSU の混合溶液(8:2, v/v)は、濃縮された GNPs と反応させ、その後 EGF は、EGF 分子の末端アミノ基と *N*-スクシンイミジルエステル基との反応により GNPs 表面上に固定化した。反応後、未反応 EGF 分子は、遠心分離によって系から除去し、それぞれの上清の EGF 濃度の変化をモニタリングした(Figure 4-1)。未反応 EGF の完全な除去は、注目している EGF-GNP conjugates の細胞応答を見るために、重要な工程であるので注意深く調べた。その結果、Direct ELISA より 5 - 6 回の遠心後、上清に含まれる EGF の変化は見られなかった。さらにその濃度は、0.1 ng/mL よりも低い数値となり、ほぼ除去できているこ

とがわかった。これにより、EGF-GNP conjugates が起因する細胞応答を調べることができる。また GNPs に固定化されている EGF 分子の平均数を、最初に得られた上清の EGF 濃度と UV 測定により求めた GNPs 濃度から算出した。反応前後における EGF 濃度の減少は 1.7×10^4 ng/mL、GNPs 濃度は 4.0×10^{-11} mol/mL であると測定でき、そこから算出した、1 粒子あたりに固定化された EGF の分子数は、58 分子であると算出した。

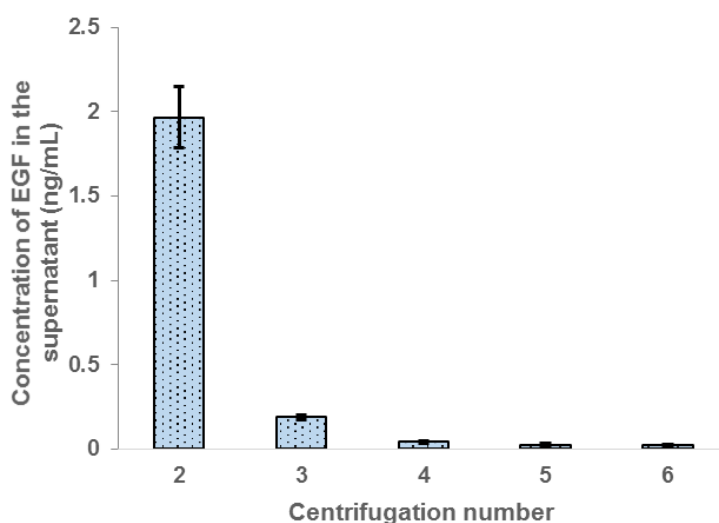


Fig. 4-1. Direct ELISA study on the concentration of free EGF after each centrifugation. The data of the first supernatant is not shown because of its extremely high concentration. Error bars represent standard deviations of data from 3 wells.

4-3-2 Photoactivatable EGF-GNP conjugates の評価.

photoactivatable EGF-GNP conjugates の粒子分布は、DLS 測定によって解析した(Figure 4-2)。反応に使用した未修飾の GNPs の平均粒径は 16 nm であり (date not shown)、その後、光分解性 PEG 1 と EGF を固定化させることで、46 nm の photoactivatable EGF-GNP conjugates が調製できたとわかった(Figure 4-2, blue line)。さらに我々は、photoactivatable EGF-GNP conjugates に対して近紫外光照射することで起こる粒子サイズの減少を観測した。3 J 照射した後、平均粒子サイズは 37 nm となり(Figure 4-2, green line)、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(Figure 4-2, red line)。これらの結果は、粒子表面から PEG が放出され光照射により、粒子表面上の PEG 密度を変化させることを意味している。これ以上の光照射をしなかった理由として、過去の結果より 7J で十分な露光量であるとわかっていたためである。

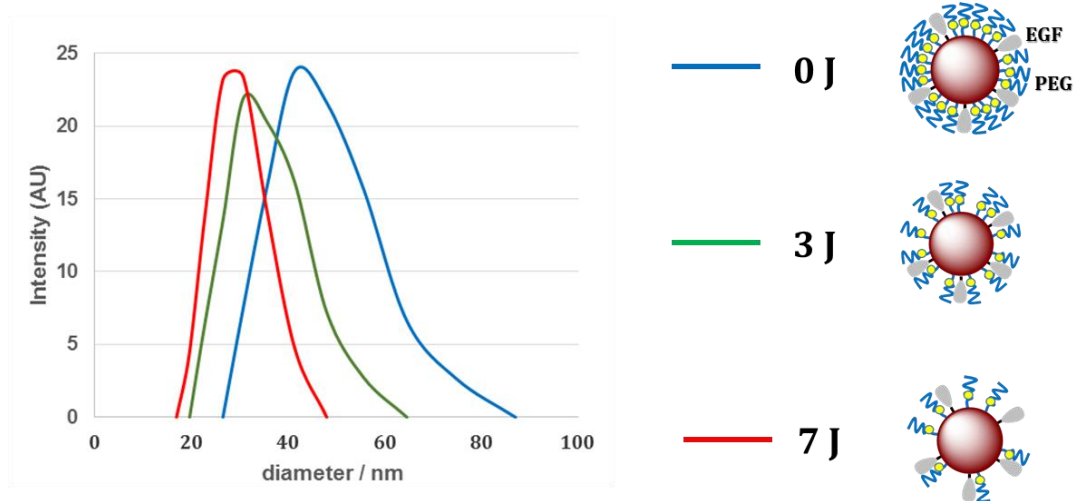


Fig. 4-2. DLS study on the change in the particle distribution of photoactivatable EGF-GNP conjugates upon photoirradiation. The conjugates were irradiated with near-UV light for (blue line) 3 J, (green line) 7 J and (red line) without irradiation.

4-3-3 Cell ELISA

最後に、我々は近紫外光照射により応答する photoactivatable EGF-GNP conjugates の生物活性の変化を調べた。調べた細胞応答として、細胞外シグナル調節キナーゼである ERK を選んだ。ERK は必須セリントレオニンキナーゼであり、EGF と細胞の相互作用により活性化する。その活性は、ERK1/2 サブタイプの Thr202/Yyr204 残基でリン酸化量を調べた。光照射に応じた photoactivatable EGF-GNP conjugates を作用させた際の HeLa 細胞の生物活性変化は、Thr202/Yyr204 残基のリン酸化に対応する抗体を用いた Cell ELISA によって測定した。Figure 4-3 に、溶液中の EGF の 1000 ng/mL の活性化量で規格化した photoactivatable EGF-GNP conjugates の結果を示す。光照射前では、ERK の活性化量は小さかったが、露光量の増大に伴い、リン酸化量もそれに応じて増加する傾向が見られた。これらの結果は、光照射前では、GNPs 表面上の EGF が PEG 鎖の中に埋もれているために活性が低く、光照射により PEG 密度が減少することで活性を取り戻すことを示唆している。これは、ナノ粒子表面上の分子クラウディングの重要性を示している。さらに光照射前後における活性の完全な制御には、粒子表面上の PEG 分子量を変えることや、PEG 密度をより高くすることなどの検討が必要である。

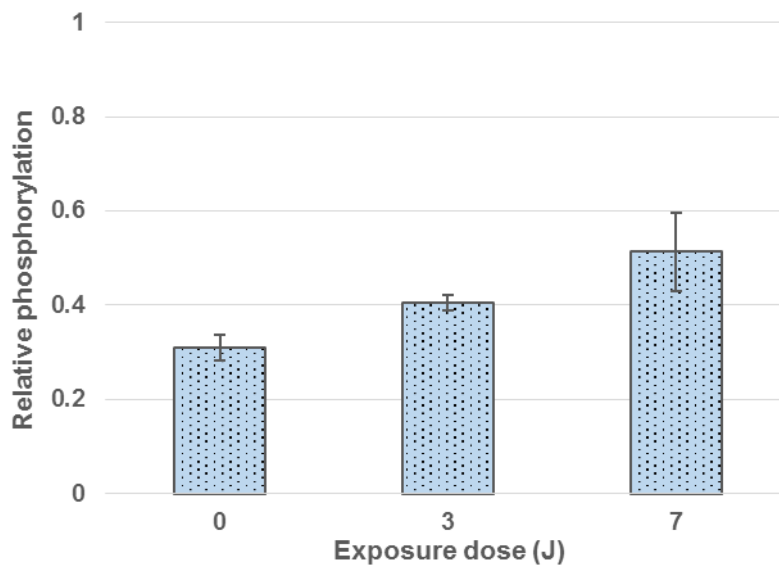


Fig. 4-3. Photoactivation of biological activity of EGF-GNP conjugates. The conjugates were exposed to HeLa cells after near-UV irradiation for a given energy (0, 3 and 7 J) and the phosphorylation of level of ERK was evaluated by cell ELISA. Error bars represent standard deviations of data from 3 wells. All phosphorylation levels are normalized to the reference condition: 5 min of incubation with 1000 ng/mL free EGF.

4-4 結論

我々は金ナノ粒子表面上に、光分解性 PEG と EGF を共固定した photoactivatable EGF-GNP conjugates を開発した。DLS 測定により、photoactivatable EGF-GNP conjugates は光照射に伴い粒子サイズの減少を示した。これは、表面に固定化された PEG が光照射により放出されていることを示唆している。この結果は、ナノ粒子表面上に固定化された EGF の周囲の分子クラウディングを減少させていることを示している。近紫外光照射におけるコンジュゲートの生物活性の増加は、HeLa 細胞を用いた Cell ELISA によるリン酸化レベルのモニタリングにより検証した。これらの結果は、caging/uncaging EGF-GNP conjugates を用いた戦略の有用性を提案し、この時間空間的に応答するコンジュゲートの能力は、バイオコンジュゲーションなどの応答メカニズムの検証に大きく貢献できる。

参考文献

- 1) M.A. Nash, J.J. Lai, A.S. Hoffman, P. Yager, P.S. Stayton, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 85.
- 2) A.L. Golden, C.F. Battrell, S. Pennell, A.S. Hoffman, J.J. Lai, P.S. Stayton, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1820.
- 3) Y. Ito, *Soft Matter* **2008**, *4*, 46.
- 4) W. R. Harrington, S. H. Kim, C. C. Funk, Z. Madak-Erdogan, R. Schiff, J. A. Katzenellenbogen and B. S. Katzenellenbogen, *Mol. Endocrinol* **2006**, *20*, 491.
- 5) L. Wu, X. Yu, A. Feizpour and B. M. Reinhard, *Biomater. Sci.*, **2014**, *2*, 156.
- 6) G. Mayer and A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 900.
- 7) G. Bort, T. Gallavardin, D. Ogden, P. I. Dalko, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4526.
- 8) P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119.
- 9) J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929.
- 10) J. Nakanishi, H. Nakayama, T. Shimizu, H. Ishida, Y. Kikuchi, K. Yamaguchi and Y. Horiike, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3822.

第5章 総括

親水性高分子と疎水性高分子を有する両親媒性ジブロック共重合体から調製された高分子集合体や無機ナノ粒子と有機分子からなるナノコンジュゲートなどは、薬剤を封入または結合させ、損傷部位に運搬させるドラッグデリバリーシステムへの応用が期待されている。これらナノ粒子は、高分子種や高分子鎖長をコントロールすることで、様々な機能性ナノ粒子を調製することが可能となる。さらに近年、熱、光、pHなどの外部刺激により分解や変性する応答性基の導入により、多機能な高性能粒子が創生されている。このように、2つ以上の同一もしくは異種分子を同一分子内に持たせることで、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。その際、両末端に異なる反応性基を持つヘテロ二価性架橋剤は、異種分子をうまく複合化させるために用いられる材料である。我々の過去の研究において、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-ニトロベンジル基を含む光分解性ヘテロ二価性架橋剤を報告してきた。この架橋剤で修飾された無機材料は、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。そこで本研究は、この光分解性ヘテロ二価性架橋剤を用いて有機高分子・生体分子間の光応答性コンジュゲート材料を調製するための新規架橋剤の開発し、それを用いて光開裂型両親媒性ジブロック共重合体を合成および高分子集合体の評価を行った。さらに、既存の金表面を修飾する光分解性カップリング剤を用いて、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。

第二章では、二種類の新規光分解性ヘテロ二価性架橋剤の開発を行い、その架橋剤を用いて、分子量を精密に制御した光分解性ジブロック共重合体の合成を行った。この架橋剤は *N*-(2-ニトロベンジルイミド) を有し、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、このクリック反応の効率を格段に向上させることにも成功した。この架橋剤に対し、リビングラジカル重合や末端変換反応などで各々合成した高分子を反応させることで、容易かつ高収率で光分解性ジブロック共重合体を得ることができた。さらに得られた共重合体は、THF 溶液中において近紫外光($\lambda > 320 \text{ nm}$)に高感度で応答し、ブロック間を切断できることがわかった。

第三章では、第二章で合成したジブロック共重合体を用いてポリマーソームを調製し、内包物の光放出挙動の測定を行った。この研究では、polystyrene (PS)の分子量のみを変えた PS-*b*-PEG 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 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、そのジブロック共重合体を用いても、中空球構造を形成していることがわかり、そのサイズは、疎水性鎖長の伸展に伴い大きくなることがわかった。さらにモデル薬剤として封入

したフルオレセインの放出速度は、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。これにより内包物放出の促進には光分解反応の速さだけでなく疎水性鎖長の設計も重要であることがわかった。そのためより高度な光応答性 DDS の実現には、その分子設計も軽視すべきではない結論に至った。

第四章では、ケージド粒子についての研究を行った。材料に固定化された上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) やサイトカインは、通常の液性因子の状態と異なる細胞応答を惹起すると知られているため、我々は、細胞応答の際、粒子上の EGF はその表面状態の分子込み合いに起因するものと仮説を立て、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、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。実際に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。この結果は、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。

以上のことから、光分解性ヘテロ二価性架橋剤の開発により、近紫外光に応じた高分子集合体の分解やケージド粒子としてナノ粒子表面上の分子クラウディングを変化させることを可能にした。さらにシステムティックに構成された光分解性ジブロック共重合体から調製されたポリマーソームはモデル薬剤を光放出でき、ケージド粒子は、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た。これら光応答性ナノ材料は、光により望みの場所や時間、必要量をコントロールすることができるため、薬剤の新しい標的部位の探索など、創薬研究での応用展開に期待が持たれる。

論文目録

主要論文

- 1) Shota Yamamoto, Seiichi Nakahama, Kazuo Yamaguchi.

“A Heterobifunctional Linker Bearing Azide-reactive Alkyne and Thiol-reactive Maleimide Connected with *N*-(2-Nitrobenzyl)imide to Synthesize Photocleavable Diblock Copolymers”
Chemistry Letters, **2013**, 42, 791–793.

—第二章 引用—

- 2) Shota Yamamoto, Hidemi Tochigi, Shuya Yamazaki, Seiichi Nakahama, Kazuo Yamaguchi.

“Synthesis of amphiphilic diblock copolymer using heterobifunctional linkers, connected by a photodegradable *N*-(2-nitrobenzyl)imide structure and available for two different click chemistries”
The Bulletin of the Chemical Society of Japan, in press (2016)

—第二章 引用—

- 3) Shota Yamamoto, Jun Nakanishi, Kazuo Yamaguchi.

“Development and characterization of protein-gold-nanoparticle conjugates bearing photocleavable polymers”
Journal of Photopolymer Science and Technology, **2015**, 28(2), 269 – 272.

—第四章 引用—

関連論文

- 1) Masao Kamimura, Olivia Scheideler, Yoshihisa Shimizu, Shota Yamamoto, Kazuo Yamaguchi, Jun Nakanishi

“Facile preparation of a photoactivatable surface on a 96-well plate: a versatile and multiplex cell migration assay platform”
Physical Chemistry Chemical Physics, **2015**, 17(21), 14159-14167

特許

- 1) シャーレ型細胞培養容器

特願：2015-167060

発明者：山口和夫 (神奈川大学)、伊藤倫子 (神奈川大学)、山本翔太 (神奈川大学)、中西淳 (物質・材料研究機構)、山本浩司 (ニイガタ株式会社)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました本学 山口和夫教授に甚大なる感謝の意を表します。

本論文の審査に際しまして、貴重な御意見を頂きました本学 加部義夫教授、木原伸浩教授、菅原正教授に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、国立研究開発法人 物質・材料研究機構での研究活動で御指導、御鞭撻、御協力を賜りました物質・材料研究機構 中西淳 MANA 独立研究者に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御指導、御協力を賜りました神奈川大学光機能性材料研究所 中濱精一先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、御助言、御協力頂きました本学 力石紀子助教、ポスドク研究員 伊藤倫子氏に厚くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御助言、御協力を頂きました公益財団法人 実験動物中央研究所 清水善久研究員、東京理科大学 上村真生助教に厚く御礼申し上げます。

本研究における透過型電子顕微鏡(TEM)測定をお引き受けくださった物質・材料研究機構 武井俊朗研究員に厚くお礼申し上げます。

研究生活において多大な御協力、御助言を賜りました本学 山口和夫研究室 小西翼氏に厚く御礼申し上げます。

研究活動を行う上で、様々な場面にわたって御助言、御協力頂きました本学部理学部化学科 山口和夫研究室 入江花風氏、斉藤佑典氏、栃木秀美氏、山田智也氏、上田優一朗氏、小栗あずさ氏、上村航平氏、長堂一仁氏、岡村直道氏、山崎周哉氏、新井大樹氏、猪狩拓真氏、池上皓稀氏をはじめとする研究室生活でお世話になった方々、物質・材料研究機構の研究員の方々に厚く御礼申し上げます。

山本翔太