

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14193

研究課題名(和文)長軸対称型双極性ピレン誘導体の系統的合成と生体深部観察用蛍光プローブへの応用

研究課題名(英文)Synthesis of long-axially symmetric dipolar pyrenes and their application to in vivo fluorescence imaging

研究代表者

仁子 陽輔(Niko, Yosuke)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・助教

研究者番号：20782056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 蛍光イメージングによって生体深部を観察する場合、近赤外領域で高効率に発光する蛍光プローブを利用することが望ましい。本研究では、そうした色素を得るために長軸対称型双極性ピレン誘導体に着目し、その合成法の確立と応用を目指した。結果としては、長軸対称型双極性ピレン誘導体は得られなかったものの、同ピレン誘導体を得るための有効な原料分子となる1,3-ジプロモピレンの合成法を見出すことができた。また、ピレン含有ナノエマルジョンの作成と生体深部イメージング、ナノエマルジョンの表面修飾技術の開発など、長軸対称型双極性ピレン誘導体を用いた将来の応用に関する要素技術については多数の成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた1,3-ジプロモピレンを原料とすることで、本研究の当初の目的であった長軸対称型双極性ピレンなど、これまでにはない様々なピレン誘導体の合成が可能となる。もし近赤外領域において高効率に発光するピレン誘導体を得られた場合、筆者らが達成したマウス大脳皮質全層の血管イメージングだけでなく、脳のさらに深い領域、すなわち海馬領域の血管イメージングも可能となる。これが実現すれば、脳神経と血管の機能マッピングが可能となり、様々な難治性神経疾患の病態解明に繋がるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Fluorescent dyes exhibiting efficient near-infrared (NIR) emission is useful for in vivo imaging using animals. In this work, we focused on the long-axially symmetric dipolar pyrenes as potential NIR dyes, and investigated their synthetic procedure. Unfortunately objective pyrene derivatives have not been obtained objective pyrene derivatives, on the other hand, we successfully established the practical synthetic schemes to obtain 1,3-dibromopyrene, which is expected to be a starting material toward long-axially symmetric dipolar pyrenes. Moreover, we have developed several techniques toward future application where long-axially symmetric dipolar pyrenes are used. For example, we have established the procedure to prepare the pyrene-loaded nanoemulsions, which are very useful for in vivo imaging. In addition, we have developed the way of surface functionalization of nanoemulsions.

研究分野：光機能性物質

キーワード：ピレン 蛍光 二光子吸収 ナノ粒子 蛍光イメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体蛍光イメージングは、生きている動物の体内を高い時空間分解能で可視化する特徴を有しているため、生細胞や生体組織・器官の動態理解、あるいは病巣の発見、病理機構の解明などといった生命科学的研究において極めて重要な光学技術となっている。他方、生体蛍光イメージングで観測できるものは、併用する蛍光プローブ(蛍光色素、蛍光タンパク質、蛍光性ナノ粒子)の性能に強く依存する。例えば、蛍光プローブの輝度(モル吸光係数×蛍光量子収率)が十分に高い場合、生体深部の観察や、動態解明に有効な高速画像取得が可能になる。さらに、蛍光波長が赤から～近赤外域である場合、同領域の光は生体透過性が高いためやはり深部観察や高速画像取得に有利となる。しかし、一般的に蛍光イメージングで使用される蛍光色素の多くは可視光領域に光吸収・蛍光性が示す。また、例外的に赤～近赤外で駆動する蛍光色素の多くは輝度が非常に低いという問題があった。

これまで研究代表者は、ピレンと呼ばれる多環式芳香族を組み込んだ  $\pi$  電子共役系を構築することで、赤～遠赤領域において極めて高い輝度や大きな二光子吸収性を示す蛍光プローブが得られることを示してきた。先述の背景を考慮すると、次なる課題はそうしたピレン誘導体の光吸収・蛍光波長のさらなる長波長化であると言え、この場合ピレン誘導体の双極性化(電子ドナー・アクセプター型構造化、push-pull 型構造化)が基本的な分子設計指針となる。しかし、push-pull 型構造へ誘導化された色素群は光吸収・蛍光波長の長波長化と同時に蛍光量子収率が大幅に低下する傾向にあり、実際、ピレンに対し点対称構造になるよう電子ドナー・アクセプター基を二つずつ配置した場合も蛍光量子収率は大きく低下する。他方、研究代表者は、ピレンに対して「長軸対称」になるよう電子ドナー・アクセプター基を配置した場合、例外的に高い蛍光量子収率が維持されることがあることを見出しつつある(Figure 1)<sup>[1]</sup>。したがって、長軸対称構造に着目した色素設計を行うことで、高輝度かつ近赤外蛍光性のピレン誘導体を得られると考えた。

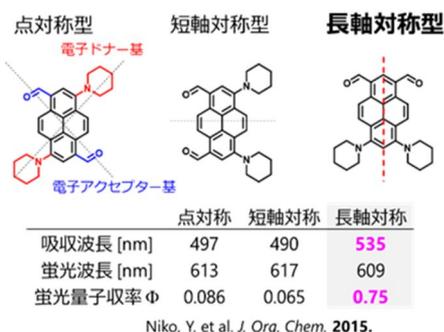


Figure 1. 点対称型・短軸対称型・長軸対称型双極性ピレン誘導体

### 2. 研究の目的

本研究課題では、まず長軸対称型に着目したピレンの電子ドナー・アクセプター型誘導体の合成法を確立する。そして、様々な誘導体の系統的合成を実施し、高い輝度と近赤外蛍光性の二点を両立した新規色素を創成することを目的とする。最終的には、それらの色素を包摂した超高輝度ナノ粒子を作成し、生体深部イメージングを実施することを達成目標とする。

### 3. 研究の方法

ピレンはその電子的性質上、1位 → 6もしくは8位 → 3位 → 8もしくは6位の順で芳香族求電子置換反応が進行する。したがって、長軸対称の push-pull 型ピレン誘導体を構築する上で不可欠と考えられる1,3-二置換体を得ることが極めて難しい。実際、長軸対称の push-pull 型ピレン誘導体の合成に成功しているのは研究代表者<sup>[1]</sup>と大和(佐賀大)<sup>[2]</sup>のみである。本研究ではまず、こうした長軸対称型 push-pull 型ピレン誘導体の合成法確立から目指すこととした。また、それらピレン誘導体の将来の活用に備え、ピレン誘導体のナノ粒子化技術開発、ナノ粒子の表面修飾技術開発、さらにそれら蛍光性ナノ粒子を用いた蛍光イメージングも実施した。

### 4. 研究成果

#### A. 1,3-ジプロモピレン誘導体の合成

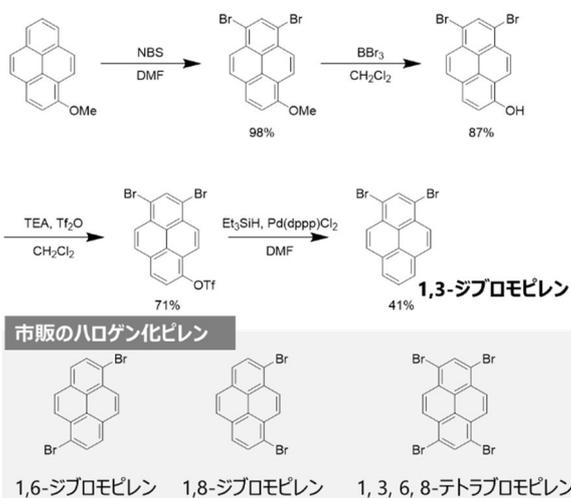
ピレンのプロモ体はクロスカップリング反応などによって容易に誘導化されるため、ピレンを基盤とした機能性物質、特に有機エレクトロニクス材料開発において重要な基質とされてきた。実際、東京化成工業株式会社をはじめとする様々な試薬会社により、1-プロモピレン、1,6-ジプロモピレン、1,8-ジプロモピレン、そして1,3,6,9-テトラプロモピレンが配売されている。しかし、先述の通りピレンはその電子的性質上1,3-ジプロモ体を得ることが殆ど不可能であった。言い換えると、1,3-ジプロモピレンを効率的に合成できれば、その後の長軸対称ピレン誘導体の合成に非常に有利になると期待される。

ピレンの1位に予め電子アクセプター基を入れておくことにより、そのメタ位(3位)が活性化されるために1,3-二置換体を得られることが知られている。そこで研究代表者は、この1-ホルミルピレンの場合とは逆、すなわち電子ドナー基を1位に入れておくことで、6,8位に選択的にプロモ化が可能であると着想した(Scheme 1)。その後電子ドナー基を脱離できれば、実質的には1,3-ジプロモ体を得られることとなる。

まず、1-メトキシピレンに対し2当量のN-プロモスクシンイミドを加えることにより、1,3-ジプロモ-6-メトキシピレンが得られた。メトキシ基のメタ位は殆ど置換されず、非常に位置選択性の高い反応であることが判明した。これは、1位に電子アクセプターを入れた場合とは対照的な結果である。次に、三臭化ホウ素により脱メチル化し、続いてトリフラート化を行った。最終的には、パラジウム触媒を用いた還元的脱トリフラート反応を行うことにより、1,3-ジプロモ

ピレンを得た。脱トリフラートにおいては、ブロモ基もある程度脱離してしまうため温度や反応時間がある程度制御する必要があるが、最終的には同反応における収率は41%、全工程での収率は25%となった。

一見単純な化合物に見えるが、1,3-ジブロモピレンの合成例は極めて少なく、1,6-ジブロモピレンを合成するときの微量副生成物としての報告例しかない。また、ピレンの9位に嵩高いアルキル基を入れることで1,3-位の選択的ブロモ化が可能となることが知られているが、9位のアルキル基の脱離は容易ではないため、同手法では得られる四置換体の種類が限られている。以上のことから、様々なピレン誘導体の基質になるであろう1,3-ジブロモピレン誘導体の合成法を発見したことは非常に重要な成果であると言える。



Scheme 1. 1,3-ジブロモピレンの合成

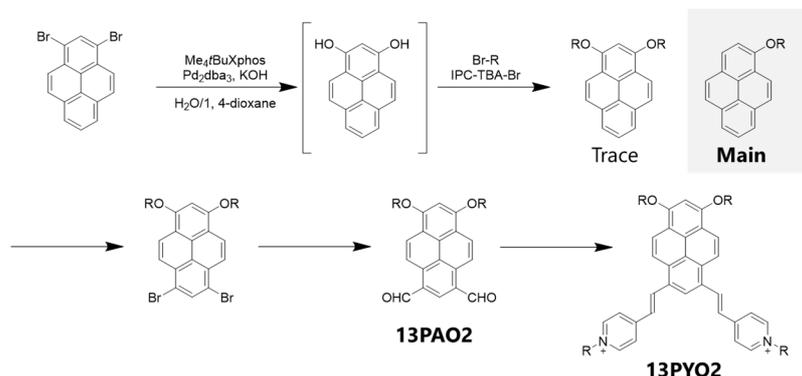
#### B. 四置換「長軸対称型」双極性ピレン誘導体の合成

本研究では、電子ドナー基としてアルコキシ基、電子アクセプターとしてはホルミル基を配置した長軸対称ピレン誘導体 13PAO2 の合成を目指した (Scheme 2)。同分子が得られれば、その後のクネーフェナーゲル縮合により、近赤外蛍光性のピレン誘導体 13PYO2 が得られると考えたためである。<sup>[3]</sup>

##### (1) 1,3-ジブロモピレンを原料とした 13PAO2 合成

1,3-ジブロモピレンを原料とする場合、ホルミル基よりも先にアルコキシ基を導入することが重要となる。先にホルミル基を二つ導入した場合、経験上、その化合物の有機溶媒への溶解性は著しく低下してしまい、その後の誘導化 (特にブロモ化) が非常に困難となることが判明しているためである。

ブロモ体をヒドロキシ基に変換し、さらにワンポッドでアルコキシ基へと変換しうる反応として Buchwald-Hartwig etherification を試みた (Scheme 2)。<sup>[4]</sup> 様々な反応条件で検討したものの、アルコキシ基が一つだけ導入された一置換が主生成物であり、本スキームを遂行し得る十分な量の二置換体を得ることができなかった。なお、1,6-ジブロモピレンや 1,8-ジブロモピレンを用いた場合には問題なく二置換体が得られていたことから、1,3-ジブロモピレンは他の位置異性体とは異なる反応性を有していることがわかる。一置換体が得られたということは、1位のヒドロキシ化が進行した後、もう一方のブロモ基の藩王性が著しく低下し、還元的脱ハロゲン化反応が進行したのだと考えられる。他方、1,3-ジブロモ体においても、Buchwald-Hartwig amination によるジアルキルアミノ基の導入には成功している。したがって、アルコキシ化においても、十分な反応性を示す触媒系 (パラジウム源やリガンドなど) が登場することで将来可能になると考えられている。



Scheme 2. 13PAO2 および 13PYO2 の合成

#### C. 多量のピレン誘導体を包摂した超高輝度ナノ粒子の作成

本研究では、長軸対称型双極性ピレン誘導体の合成後、それらを有機ナノ粒子 (ナノエマルジョン: NE) に高密度集積させた「超高輝度蛍光ナノプローブ」を作成する予定であった。しかし、先述の通り 13PYO2 の合成には至らなかったため、事前検討として赤色蛍光性ピレン誘導体 LipoPYF5 を用いてナノプローブを作成した (Figure 2)。得られたナノプローブはローダミン

B の約 10,000 倍、赤色量子ドットの約 20 倍に相当する極めて巨大な二光子励起蛍光性 ( $\sigma^{(2)}$ ) を示した。これを用いてマウスの脳血管イメージングを実施したところ、大脳皮質全層の血管を可視化することに成功し、さらに 120 fps という高速画像取得に基づく「血流」観察にも成功した。本成果は近日、学術誌にて報告する予定である。

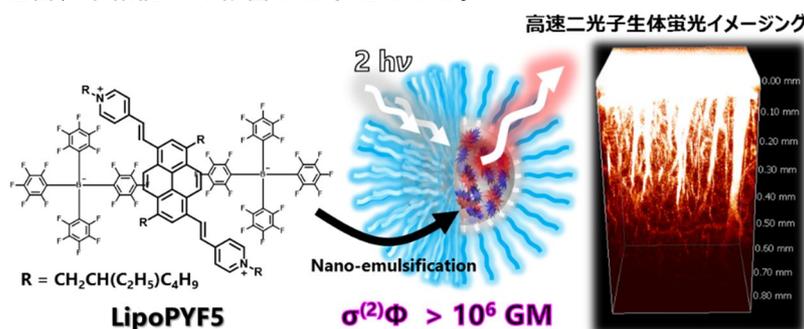


Figure 2 . 脂溶性ピレン誘導体 LipoPYF5 を含有した超高輝度ナノプローブと二光子生体蛍光イメージング

以上の結果から、ピレン誘導体のナノ粒子化は生体蛍光イメージング用プローブの作成において極めて有効な方策であることが判明し、また 13PYO2 の合成によってさらなる深部観察が可能になることが示唆された。

#### D. 多量のピレン誘導体を包摂した超高輝度ナノ粒子の作成

ピレンを包摂させた NE を生体蛍光イメージングへと活用するにあたって、NE の機能化が極めて重要となる。そこで本研究では、NE の表面修飾技術開発にも着手した (Figure 3)。具体的には、NE を構成する界面活性剤の中に、アジド基を有する補助界面活性剤 (Cremophor<sup>®</sup> ELP-N<sub>3</sub>) を添加することで、アジド - アルキン環化付加反応を通じて NE 表面に様々な機能性分子を修飾できることを明らかにした。本実験では、NE 表面に細胞膜透過性ペプチド (オリゴアルギニン: R8) を導入することで、従来細胞透過性の低い NE を容易に細胞内へと取り込ませることに成功した。なお、本成果は日本化学会が発行する国際学術誌 Bulletin of the Chemical Society of Japan に掲載された。<sup>[5]</sup>

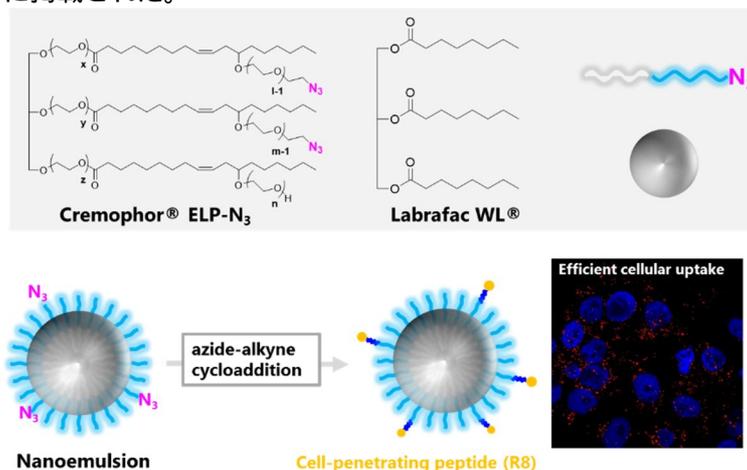


Figure 3. 新規補助界面活性剤 Cremophor<sup>®</sup> ELP-N<sub>3</sub> を活用したナノエマルジョンの表面修飾

#### 5 . まとめ

以上、長軸対称型双極性ピレン誘導体の合成については、その基質となる 1, 3-ジプロモピレンの効率的合成法を明らかにしたものの、想定外の反応性によって未だ実現できていない。他方、同色素群が得られた場合の未来、すなわちナノ粒子化による生体蛍光イメージングに関しては、極めて良好な結果が得られている。そのため、今後も 1, 3-ジプロモピレンの誘導化技術について継続的に研究していく予定である。

#### 6 . 参考文献

- [1] Niko, Y.\*; Sasaki, S.; Narushima, K.; Sharma, D. K.; Vacha, M.; Konishi, G.\* “1-, 3-, 6-, and 8-Tetrasubstituted Asymmetric Pyrene Derivatives with Electron-Donors and -Acceptors: High Photostability and Regioisomer-Specific Photophysical Properties” *J. Org. Chem.*, 80, 10794-10805 (2015).

- [2] Feng, X.; Tomiyasu, H.; Hu, J-Y.; Wei, X.; Redshaw, C.; Elsegood, M. R. J.; Horsburgh, L.; Teat, S. J.; Yamato, T., "Regioselective Substitution at the 1,3- and 6,8-Positions of Pyrene for the Construction of Small Dipolar Molecules" *J. Org. Chem.* 80, 10973–10978 (2015).
- [3] Seki, H.; Onishi, S.; Asamura, N.; Suzuki, Y.; Kawamata, J.; Kaneno, D.; Hadano, S.; Watanabe, S.; Niko, Y.\*, "Bright and Two-Photon Active Red Fluorescent Dyes that Selectively Move Back and Forth between the Mitochondria and Nucleus upon Changing the Mitochondrial Membrane Potential" *J. Mater. Chem. B*, 6, 7396-7401 (2018).
- [4] Anderson, K. W.; Ikawa, T.; Tundel, R. E.; Buchwald, S. L.\*, "The Selective Reaction of Aryl Halides with KOH: Synthesis of Phenols, Aromatic Ethers, and Benzofurans" *J. Am. Chem. Soc.* 128, 10694-10695 (2006).
- [5] Saito, A.; Yamamoto, S.; Ochi, R.; Inoue, K.; Hadano, S.; Watanabe, S.; Nakayama, T.\*; Niko, Y.\*, "An Azide-Tethered Cremophor<sup>®</sup> ELP Surfactant Allowing Facile Post-Surface Functionalization of Nanoemulsions" *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 93, 568-575 (2020).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seki Hitomi, Onishi Shozo, Asamura Naoya, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, Kaneno Daisuke, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke	4. 巻 6
2. 論文標題 Bright and two-photon active red fluorescent dyes that selectively move back and forth between the mitochondria and nucleus upon changing the mitochondrial membrane potential	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7396 ~ 7401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8TB02415D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Airi, Yamamoto Shinkuro, Ochi Rika, Inoue Keiji, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Nakayama Taku, Niko Yosuke	4. 巻 93
2. 論文標題 An Azide-Tethered Cremophor? ELP Surfactant Allowing Facile Post-Surface Functionalization of Nanoemulsions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 568 ~ 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1246/bcsj.20200014">https://doi.org/10.1246/bcsj.20200014</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Valanciunaite Jurga, Kempf Emilie, Seki Hitomi, Danylchuk Dmytro I., Peyri?ras Nadine, Niko Yosuke, Klymchenko Andrey S.	4. 巻 92
2. 論文標題 Polarity Mapping of Cells and Embryos by Improved Fluorescent Solvatochromic Pyrene Probe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6512 ~ 6520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00023">https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00023</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関仁望, 大西省三, 浅村直哉, 鈴木康孝, 川俣純, 金野大助, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 ピレンを基盤としたミトコンドリア膜電位応答性二光子蛍光プローブの開発
3. 学会等名 2018年光化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関仁望, 大西省三, 浅村直哉, 鈴木康孝, 川俣純, 金野大助, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 ミトコンドリア膜電位応答性二光子励起蛍光プローブの開発とその機能発現のメカニズム解明
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関仁望, 大西省三, 浅村直哉, 鈴木康孝, 川俣純, 金野大助, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 ミトコンドリア膜電位応答性二光子蛍光プローブの開発とその構造-機能関係の検討
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹崎陽, 大西省三, 鈴木康孝, 川俣純, 川上良介, 今村健志, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 二光子励起発光性に優れた高輝度ナノエマルションの開発と in vivo イメージングへの応用
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤愛梨, 中山沢, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 イミノポロネート形成による蛍光性ナノエマルションの表面修飾法
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤愛梨, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 イミノポロネート形成による表面修飾を可能とした蛍光性ナノエマルションの開発
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹崎陽, 大西省三, 鈴木康孝, 川俣純, 川上良介, 今村健志, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 脂溶性ビレン誘導体を高密度集積させた高輝度ナノエマルションの開発と応用
3. 学会等名 第34回中国四国地区高分子若手会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤愛梨, 中山沢, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 第一級アミンを捕捉する新規界面活性剤の開発とその応用
3. 学会等名 第34回中国四国地区高分子若手会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤愛梨, 中山沢, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 第一級アミンとの無触媒表面修飾を可能とする蛍光性ナノエマルションの開発
3. 学会等名 2019年日本化学会中四国支部大会徳島大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹崎陽, 大西省三, 鈴木康孝, 川俣純, 川上良介, 今村健志, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 脂溶性ピレン誘導体を導入した高輝度性ナノ粒子の創成および in vivo イメージングへの応用
3. 学会等名 2019年日本化学会中四国支部大会徳島大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁子陽輔, 鈴木康孝, 川俣純
2. 発表標題 ピレンを基盤とする蛍光色素合成とその超高輝度ナノプローブへの展開
3. 学会等名 日本化学会「低次元系光機能材料研究会」第9回サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁子陽輔
2. 発表標題 ピレンを基盤とする高輝度蛍光プローブの開発と生命科学への応用
3. 学会等名 第26回次世代医工学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁子陽輔
2. 発表標題 ピレンを基盤とする高機能性色素群の開発とその細胞・生体蛍光イメージングへの応用
3. 学会等名 第16回バイオオプティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ミトコンドリア膜電位応答性蛍光性化合物	発明者 川俣純，鈴木康孝， 浅村直也，仁子陽 輔，関仁望	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/041417	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	波多野 慎悟  (Hadano Shingo)		
研究協力者	渡辺 茂  (Watanabe Shigeru)		
研究協力者	鈴木 康孝  (Suzuki Yasutaka)		
研究協力者	川俣 純  (Kawamata Jun)		
研究協力者	川上 良介  (Kawakami Ryosuke)		
研究協力者	今村 健志  (Imamura Takeshi)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中山 沢  (Nakayama Taku)		
研究協力者	金野 大助  (Kaneno Daisuke)		