

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22350048

研究課題名(和文) デンドリマーの精密構築に基づく分解制御型ナノカプセルの設計

研究課題名(英文) Design of nano-capsules having controlled degradability by dendrimer precision synthesis.

研究代表者

青井 啓悟 (Aoi, Keigo)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30222467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,800,000円、(間接経費) 2,940,000円

研究成果の概要(和文)：ナノカプセルとしてのデンドリマーの表面構造を規制し、その内部に低分子化合物を内包して、徐放性などの放出制御が可能な機能性新素材の開発、すなわち新しい分解制御・放出システムを創出することを目的として研究を行った。その結果、デンドリマー精密分子構築法に基づいて新規ポリエステルデンドリマーならびに、新規ポリアミドアミン星形デンドリマー、三元ブロック共重合体をもつ新規星形デンドリマーの合成に成功した。低分子化合物の包摂挙動を解析し、積載量、除放性などを調べ、分子形状を制御した新しい機能性ナノ材料としての応用が期待できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present project, we successfully synthesized an aliphatic polyester dendrimer using AB₂-type building blocks prepared by Michael addition of benzyl acetoacetate to t-butyl acrylate, followed by reduction and by deprotection of the t-butyl groups. The aliphatic polyester dendrimer is a candidate of smart nano-materials having controlled degradability and release function of low-molecular-weight compounds.

We also synthesized a new type of thermoresponsive star-type dendrimers having oligo(2-isopropyl-2-oxazoline) side chains and oligo(2-alkyl-2-oxazoline) terpolymer side chains, by precision polymer syntheses. Lower critical solution temperatures (LCSTs) and release profiles of the loaded low-molecular-weight compounds of the resulting star-type dendrimers are successfully controlled with changing the chemical structure, especially the arm structure. These star-type dendrimers are useful functional nano-materials in biochemical and biomedical fields.

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：高分子化学

キーワード：デンドリマー リビング重合 超分子化学 ナノ材料 構造制御 精密高分子 分子カプセル 感温特性

1. 研究開始当初の背景

dendリマーは、規則的な分岐構造からなる高分子化合物で、理想的には単一の分子量をもち、高世代のものは球状となるなど既存の高分子化合物からは一線を画した特色をもつため、ナノ科学や医学における新しい素構造として高い注目を集めてきた。我々はこれまでに、細胞認識能をもつ糖を dendリマー表層に配したシュガーボールや、両親媒性 dendリマーなどの精密合成と高機能化に関する一連の研究を展開してきた。 dendリマーに関する研究は広く行われているものの（例えば、「 dendリティック高分子」青井啓悟、柿本雅明監修, NTS, 2005年10月, 総504頁）、カプセル化に関する研究はまだ少なく、E. W. Meijer (Science, 266, 1226(1994)), T. Aida (Angew. Chem. Int. Ed., 37, 1531(1998)), M. W. Grinstaff (J. Am. Chem. Soc., 125, 15485(2003)) などごく限られており10報にみえない。

2. 研究の目的

ナノカプセルとしての dendリマーの内部に低分子化合物を内包し、新しい分解制御・放出システムを創出することを目的としている。球状の dendリマーの表面構造を精密に構築することで、 dendリマー内部のナノ空間に孤立化させた低分子化合物の放出速度を制御することができると考えられる。そのために、 dendリマーの構造ならびに、 dendリマー表面の構造を変えた高分子合成を行い、低分子化合物の包摂挙動や放出挙動の解析を行い、新しいタイプの生医学材料ならびに電子材料などの機能性材料を創出する分子設計の指針を得ることを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 脂肪族ポリエステル dendリマーを Convergent 法による精密合成により得る。 dendリマーへの低分子化合物のカプセル化を検討する。さらに、 dendリマーの分解性について検討し分解制御型のナノ粒子の創出と、 dendリマー精密構築法に基づいて、一次構造と放出挙動の相関を克明に探る。

(2) 感温特性を有する擬似ペプチドとし

てのポリオキサゾリンをアーム鎖にもつ星型 dendリマーの構築を行い、同様に低分子化合物の捕捉能を調べる。

(3) オキサゾリンのリビング重合性を活かして合成したブロック共重合体を dendリマー表面に導入することで、より強固な疎水性の層ブロックを形成した星型 dendリマーの構築を行う。低分子化合物の積載率と放出挙動について紫外可視分光光度計を用いて解析する。

4. 研究成果

当初、脂肪族ポリエステル dendリマーの合成を計画にしたがって行っていたが、研究の途中で星型 dendリマーを構築することで、より効率よく、また分子設計の自由度が高いことがわかり、星型 dendリマーについてもあわせて研究を行った。

(1) 脂肪族ポリエステル dendリマーの構築と包摂挙動 申請計画にしたがって、新規の脂肪族ポリエステル dendリマーの合成を行った。選択的な分解が起こるように、 dendリマーのエステル構造 (*meso*-エリトリールとコハク酸から調製) と、コアのエステル構造が異なる dendリマーを、図1, 2にしたがい Convergent 法により精密に合成した。

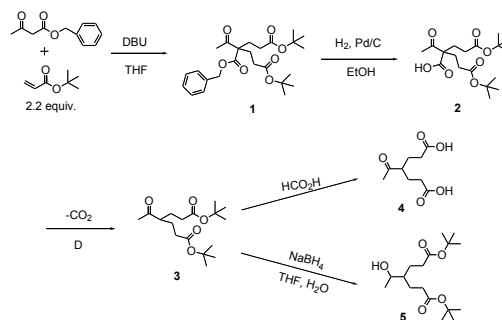


図1 脂肪族ポリエステル dendリマー構築におけるビルディングブロックの合成

表面は、疎水性のブチル基でブロックした。まず、脂肪族ポリエーテル dendリマーを構築する基本単位である AB₂ 型ビルディングブロックを図1に示す合成経路にしたがい合成した。すなわち、アセト酢酸ベンジルと2当量のアクリル酸 *t*-ブチルの Michael 付加反応により2分岐型の化合物 1 を得た。還元してカルボン酸誘導体 2 とし、続く加熱による脱炭酸

によりケトン **3** に誘導した。この化合物 **3** は、ギ酸を用いた酸加水分解により *t*-ブチル基を除去してジカルボン酸型のビルディングブロック **4** に誘導した。一方で、化合物 **3** のケトンを還元することでヒドロキシル基をもつビルディングブロック **5** を得ることができた。これらの化合物 **4** および **5** を用いて、以降の dendroliamer-**5**~**9** の合成を効率よく行った (図 2)。

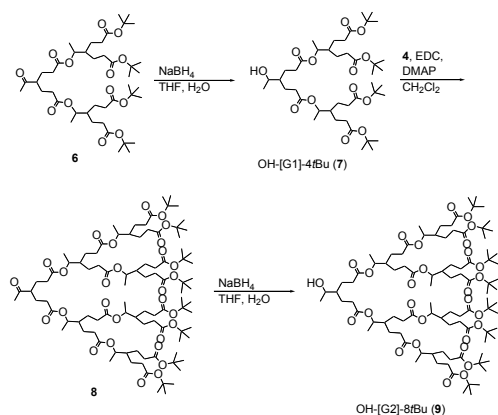


図2 Convergent法による脂肪族ポリエステル dendroliamer の合成

meso-エリトリールとコハク酸からなるコア **10**、そのコアに 4 当量の dendroliamer **5** を導入し *t*-ブチル基の脱保護を行った化合物 **11**、ならびにそのコアに 4 当量の dendroliamer **7** を導入し *t*-ブチル基の脱保護を行った化合物 **12** を合成した。これらの化学構造は、¹H NMR や MALDI-TOF MS 測定により克明に解析し、それぞれ 1 分子あたり 4 個、8 個、ならびに 12 個のカルボキシル基をもった dendroliamer であることを確認した。

薬剤モデルとして食用色素のローズベンガルを使用して化合物 **10**~**12** の基礎的な包摂挙動を解析した。**10**~**12** はリン酸緩衝液に優れた溶解性を示した。ローズベンガルとの複合化には溶媒として THF を用いた。ローズベンガルと dendroliamer を 1:2, 1:3, 1:4 の重量比で混合し、低分子化合物の導入率と複合化効率を算出した。例えば、1:4 の比で混合した場合の **10**~**12** の複合化効率は、それぞれ 19%, 34%, 31% と良好な値を示した。37 度、pH7.4 で低分子化合物の放出挙動を解析したところ、100 分後に、

化合物 **10** および **11** は 47% のローズベンガルを放出していたが、**12** は 39% であり、dendroliamer を用いないローズベンガルのみでの対照実験では 64% であったので除放性が認められた。

(2) ポリオキサゾリンをアーム鎖にもつ星型 dendroliamer の構築と包摂挙動 感温特性をもつことが知られている 2-イソプロピル-2-オキサゾリンオリゴマー **13** 活性末端に、第 5 世代ポリアミドアミン (PAMAM) dendroliamer の末端アミノ基を付加させて、新規星型 dendroliamer **14** の合成を行った (図 3)。

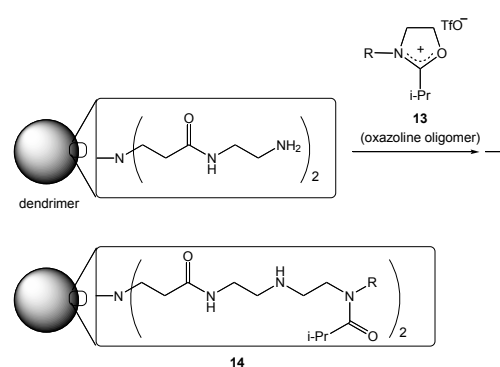


図3 オキサゾリンリビングオリゴマーと PAMAM dendroliamer の反応による星型 dendroliamer の合成

この星型 dendroliamer の 0.67 重量% の緩衝溶液を調製して、温度による透過率の変化を紫外可視分光光度計で測定した。導入したオリゴマー鎖の重合度が 4.5 から 115 へと大きくなるにつれて、下限臨界溶液温度 (LCST) が低温側へ系統的にシフトすることが明らかになった。dendroliamer 表面のオリゴマー鎖が長くなることで、セグメント間の相互作用が起りやすくなり、その結果、脱水和が容易に進行してより低温で白濁するようになったと考えられる。すなわち、オリゴオキサゾリン鎖はもともとある温度で脱水和を起し白濁するのであるが、dendroliamer という足場の上に高密度に縛り付けられることで、効率よく相互作用して、低温で白濁したと考えられ、分子形態を制御しやすい dendroliamer ならではの挙動である。なお、対照実験として、オリゴエチレングリコール鎖を表面に導入した星型 PAMAM dendroliamer は測定した範

囲内で LCST が観測されなかった。

オキサゾリンオリゴマーをもつ星型 dendrimer のローズベンガル分子複合可能を調査したところ、LCST よりも低い温度で複合化した方が効率のよい複合化が行われることが明らかになった。

(3) ブロックアーム鎖をもつ星型 dendrimer による層ブロック形成と包摂挙動より幅広い感温特性の調節と、ゲスト分子の放出制御を目的として、疎水性ブロックをアーム鎖の dendrimer 側に導入した新規星型 dendrimer **15** の合成を行った (図 4)。つまり、2-イソプロピル-2-オキサゾリンとオリゴ (2-ブチル-2-オキサゾリン) からなる AB 型ブロック共重合体を PAMAM dendrimer 表面に導入し、その感温特性を評価した。トリフルオロメタンスルホン酸メチルを開始剤として用いた 2-イソプロピル-2-オキサゾリンおよび 2-ブチル-2-オキサゾリンのカチオン開環重合を 1Pot 2Stage 法で行い、その活性末端を PAMAM dendrimer の表面アミノ基と反応させることにより合成した。

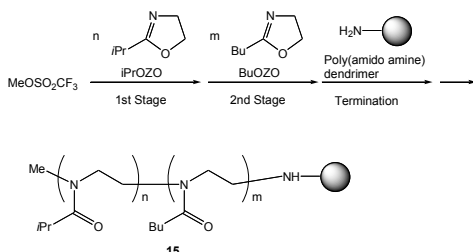


図 4 オキサゾリンの AB 型ブロック共重合体の合成と PAMAM dendrimer との反応による星型 dendrimer の合成

ポリ (2-イソプロピル-2-オキサゾリン) およびポリ (2-ブチル-2-オキサゾリン) の重合度がそれぞれ 4.6 および 2.5 のブロック共重合体を第 4 世代ポリ (アミドアミン) dendrimer に導入した星型 dendrimer (導入率, 92%) は、16°C に LCST を示した。比較対照のため、重合度 4.6 のポリ (2-イソプロピル-2-オキサゾリン) 鎖のみを導入し、ポリ (2-ブチル-2-オキサゾリン) セグメントをもたない PAMAM dendrimer (導入率, 78%) の LCST を測定したところ 54°C であった。導入率の違いはあるものの、疎水性のポリ (2-ブチル-2-オキサゾリン)

鎖を分子内の層ブロックとして組み込むことで、LCST の調節が可能であることがわかった。ポリ (2-イソプロピル-2-オキサゾリン) の鎖長を変えた場合についても検討を加え、分子構造と感温特性の相関を調べた。さらに、2-メチル-2-オキサゾリン、2-イソプロピル-2-オキサゾリン、2-ブチル-2-オキサゾリンを順に重合させた三元共重合体を導入することで、ナノ粒子表面の親水性を高めつつ、疎水性の層ブロックをより強固に形成できるため、内包したローズベンガルの放出を効率的に制限することができるとわかった。星型 dendrimer のアーム鎖を AB 型ブロック共重合体や ABC 型三元共重合体とすることにより、疎水性の層ブロックを分子内部にもつ新しい機能材料設計が展開できることがわかった。

本研究では、低分子化合物の包摂挙動を調べる関係から、イオン液体を用いた材料設計と、イオン伝導特性についての応用研究もあわせて行った。研究を進める過程で、適切な糖誘導体を dendrimer に導入することによって、低分子化合物の輸送に関わる新たな高分子設計ができるとわかった。また、球状 dendrimer だけでなく、シリンダー状の重合体についても合成を検討した。これらの研究を通して、dendrimer に基づく材料設計は、三次元構造までを見据えた分子設計ができるので、層ブロック構造など異分子を内部に取り込む、他に類をみないナノ材料の構築ができ、革新的な機能材料設計に展開できることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) 青井啓悟 糖を用いた機能材料, 化学と教育, 査読有, **60**(10), 422-425 (2012).
- (2) Matsumi, N., Yoshioka, N. and Aoi, K. Synthesis of boric ester type ion-gels by dehydrocoupling of cellulose with hydroboranes in ionic liquid. *Solid State Ionics*, 査読有, **226**, 37-40 (2012).
- (3) Matsumi, N., Kagata, A. and Aoi, K. Synthesis of Supramolecular Solid

Polymer Electrolytes via Self-Assembly of Diborylated Ionic Liquid. *Journal of Power Sources*, 査読有, **195**, 6182-6186 (2010).

[学会発表] (計 22 件)

(1) 丹羽高浩、青井啓悟、層ブロック構造をもつ星型 dendrimer の低分子捕捉能、第 7 回 バイオ関連化学シンポジウム (2013 年 9 月、名古屋)

(2) 丹羽高浩、青井啓悟、三元ブロック共重合体をもつ星型 dendrimer による層ブロック形成と感温特性、第 62 回 高分子討論会 (2013 年 9 月、金沢)

(3) 河野大輔、青井啓悟、PAMAM dendrimer に基づく星型 dendrimer の感温特性におけるアーム構造の効果、第 62 回 高分子学会年次大会 (2013 年 5 月、京都)

(4) Aoi, K., Takano, Y. and Kawano, D. Synthesis and thermoresponsive properties of a star-shaped dendrimer having pseudopeptide arms. The Second Asian Chemical Biology Conference (ACBC2012) (July, 2012, Itoman, Okinawa)

(5) 丹羽高浩、梅木あゆみ、青井啓悟、ブロックアーム鎖をもつ星型 dendrimer の合成と感温特性、第 61 回 高分子学会年次大会 (2012 年 5 月、横浜)

(6) 梅木あゆみ、高野雄真、青井啓悟、分岐状ポリエチレンイミンに基づく星型ポリマーの構造と感温特性の制御、第 60 回 高分子討論会 (2011 年 9 月、岡山)

(7) 田中佑二、柴田貴広、内田浩二、青井啓悟、ポリエステル dendrimer を用いた三元遺伝子導入システム、第 59 回 高分子討論会 (2010 年 9 月、札幌)

(8) 高野雄真、青井啓悟、星型 dendrimer の合成と感温特性、第 59 回 高分子討論会 (2010 年 9 月、札幌)

(9) Tanaka, Y., Nakamura, T. and Aoi, K. Synthesis and Biochemical Applications of an Aliphatic Polyester Dendrimer. 1st Asian Chemical Biology Conference (June, 2010, Seoul, Korea)

(10) Aoi, K. Hierarchical Molecular Architecture using Amphiphilic Bio-based Dendrimers. 1st Asian Chemical Biology Conference (June, 2010, Seoul,

Korea)

[図書] (計 1 件)

(1) 青井啓悟 糖質. “基礎生化学—健康・疾病とのつながり”, アイ・ケイコーポレーション, 第 4 章, pp. 34-51 (2013).

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~kobunshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青井 啓悟 (AOI, Keigo)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：30222467

(2) 研究分担者

松見 紀佳 (MATSUMI, Noriyoshi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：40323745

(平成 22 年度まで研究分担者)