

201212019A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

**難治性腸疾患等に対する安全かつ有効な  
非侵襲性経口ナノDDSの開発**

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 25 (2013) 年 5 月

## 目 次

### I. 研究報告

1. 非侵襲性の経口投与型ナノ DDS 化 C60 フラーレンの腸疾患等に対する有効性・安全性  
評価-----1

大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

研究代表者 堤 康央

2. 医用工学的に DDS 機能を導入した C60 フラーレン誘導体 (ナノ DDS 化 C60 フラー  
レン) の創製-----51

大阪大学大学院工学研究科

研究分担者 大島 巧

3. 薬学的 DDS 機能を付与した C60 フラーレン誘導体 (ナノ DDS 化 C60 フラーレン) の  
創製と、安定的製造と供給体制の整備-----63

ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社

研究分担者 青島央江

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----79

### III. 研究成果の刊行物・別刷-----81

## 非侵襲性の経口投与型ナノ DDS 化 C<sub>60</sub> フラーレンの 腸疾患等に対する有効性・安全性評価

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

### 研究要旨

超微細加工技術を活用した疾患の予防・治療戦略/技術の確立は、知財技術立国・健康立国を目指す我が国の最重要課題であり、特に原因不明で、根本的な治療法が確立されていない難治性疾患への応用はライフ/医療イノベーション 5 ヶ年戦略の観点からも期待されている。炭素原子 60 個が切頂二十面体構造に結合した C<sub>60</sub> フラーレン (直径 1 nm) は、従来薬とは全く異なった作用点での抗ウイルス活性や抗菌活性、さらには圧倒的な抗炎症活性 (抗酸化活性; 活性酸素・ラジカル消去活性) を有するなど、エイズや肝炎、がん、炎症性疾患に対する画期的ナノ医薬として期待されている。しかし、主薬としての C<sub>60</sub> フラーレンを実用化するには、分散性・吸収性の改善や標的指向性の付与、さらには薬効メカニズムの解明といった多くの克服課題が残されている。そこで本研究では、医用工学的に C<sub>60</sub> フラーレンの腸内放出型プロドラック化や糖・アミノ酸修飾など、腸管デリバリーの最適化に叶う「ナノ薬物送達システム (ナノ DDS)」を新規開発し、これを難治性炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎・クローン病) を標的とした、非侵襲的 (経口投与) で、しかも安全かつ有効な予防・治療戦略/技術の確立へと展開する。平成 24 年度には当初計画に沿って、① C<sub>60</sub> フラーレンの有用機能を損なうことなく分散性を改善できる 4 種類の水酸化フルラーレン誘導体に加え、抗酸化・抗炎症活性を向上可能な 7 種類の官能基修飾誘導体をも創製し、粒子径・凝集性といった物性を精査したうえで、抗酸化・抗炎症活性を *in vitro* で評価した。その結果、② 従来型より「20 倍以上もの抗炎症活性を有する C<sub>60</sub> フラーレン誘導体」を見出し、平成 25 年 2 月 19 日 (火) に特許出願した (特願 2013-030455)。また、③ 炎症性腸疾患に対する治療効果を発揮可能な投与量において、一般毒性や遺伝毒性などが認められないことを初めて確認した。さらに、PMDA での事前面談・PDCA サイクル・実地調査での指摘を鑑み、研究計画を前倒しして、④ 体内動態評価を可能にする RI 標識 C<sub>60</sub> フラーレンやリチウム内包 C<sub>60</sub> フラーレンの創製や LC-MS による体内動態評価系の構築、⑤ 腸管吸収性を改善させるためのグルコース修飾体の合成といったナノ DDS 化、⑥ C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の抗炎症活性として、抗酸化活性以外のメカニズムが存在する可能性を先駆けて発見するなど、当初目標を超える特筆すべき成果が得られた。以上、本年度は、C<sub>60</sub> フラーレンを最適粒子設計することで、難治性炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎・クローン病) を標的とした、非侵襲的 (経口投与) で、しかも安全かつ有効な予防・治療戦略/技術を創成可能であることを見出した。平成 25 年度は、当初計画は勿論のこと、特に C<sub>60</sub> フラーレンの体内動態評価・抗炎症メカニズムの解明に注力しつつ、研究をさらに加速推進し、ナノ医薬の開発・実用化に資することを目指す。

## 研究分担者

大島巧：大阪大学大学院工学研究科・教授

青島央江：ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社  
社・マネージャー

### A. 研究目的

1985 年、ハロルド・クロトー、リチャード・スモーリー、ロバート・カールらにより C<sub>60</sub> フラーレンが発見された。サブナノ素材(10 nm 以下)の一つである C<sub>60</sub> フラーレン(直径 0.7 ~1 nm) は、炭素原子 60 個により形成されるサッカーボール型構造を持った同素体である(他にダイヤモンド・グラファイトなど)。なお、1996 年には、C<sub>60</sub> フラーレンを発見した 3 名がノーベル化学賞を受賞するに至っている。C<sub>60</sub> フラーレンは、単に美しい形状を持つだけでなく、高強度、超伝導性、光吸収性、低熱・電気伝導性などの性質から、各種触媒、磁性体、電子部品などへの応用が期待されている。現在では、C<sub>60</sub> フラーレンの工業的製造法が確立しており、磁性体、光学材料、超電導材料、化粧品、二次電池、潤滑剤など、既に実用化されているものも多く存在する。例えば、既に 1000 種類以上の C<sub>60</sub> フラーレン配合化粧品が実用化されており、抗酸化作用、メラニンインデックスの低下、シワ面積率の減少、炎症性皮膚の低下など、様々な作用を発揮することが知られている。さらに C<sub>60</sub> フラーレンは、ラジカルスポンジと称されるほどの強い抗酸化活性を始めとして、抗ウイルス活性や抗がん活性も有することから、未だ作用メカニズムは殆ど不明であるにも関わらず、エイズ・肝炎・がんや自己免疫疾患に対する新たな治療薬として、医薬品分野においても期待されている。

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は、厚生労働省指定の難治性疾患、いわゆる難病に指定されている。近年、患者数は増加の一途を辿り、平成 23 年度特定疾患受給者証交付件数で、潰瘍性大腸炎 13 万人、クローン病 3 万人、合わせて 16 万人にも達しており、社会問題とな

っている。本疾患は、男性でかつ、30 歳代に多く分布しており、頻繁に再燃と寛解を繰り返す。本疾患の病因は、未だ特定されていないが、遺伝的要因や環境的要因、さらに免疫異常が複雑に絡み合った多因子疾患と考えられている。中でも、粘膜面における免疫系の異常な活性化が炎症性腸疾患の病態に深く関与していることに異論はない。本疾患に対する治療薬として、5-アミノサリチル酸製剤(5-ASA)や副腎皮質ステロイド、さらには抗 Tumor Necrosis Factor (TNF) - $\alpha$ 抗体などの分子標的医薬が実用化されているものの、治療不応例の多さ、高薬価、結核といった感染症へのリスクが高まるなど、未だ普遍的な治療薬にはなり得ておらず、新たな治療戦略が待望されている。すなわち、炎症性腸疾患に対する画期的治療法の開発は、緊急性と社会的ニーズ、学術的・経済的メリットの高い取組となっており、他の自己免疫性難病の克服にも横断的な共通基盤を提供するものと期待されている

炎症性腸疾患患者は、腸管内において、好中球による活性酸素種(ROS)産生の亢進、抗酸化機能の低下、酸化的 DNA 損傷マーカーの増加が報告されており、酸化ストレスにより炎症病態が修飾されていることが明らかとなっている。炎症性腸疾患における酸化ストレスの関与が明らかになるにつれ、この悪玉の ROS を消去あるいは制御する薬剤が本疾患の治療に応用できるのではないかと考えられるようになり、実際いくつかの薬剤が臨床応用に向けて研究開発されてきた。現在、炎症性腸疾患の主要な治療薬となっている 5-ASA 製剤は、好中球やマクロファージの遊走・活性化因子である LTB<sub>4</sub> の生合成の抑制や、肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用、血小板活性化因子(PAF)の生合成抑制作用、IL-1 $\beta$ の抑制作用に加え、好中球による ROS の産生を抑制することが報告されている。また、未だ研究段階ではあるものの、N-Acetyl-L-cysteine (NAC) やビタミン E などの抗酸化剤を用いた検討が、数多くなされており、炎症性腸疾患モデルマウスに対

し、有効な治療効果を示すことが数多く報告されている。

本観点から我々は、炎症性腸疾患に対する新規治療薬として、強力な抗酸化活性や抗炎症活性を有する C<sub>60</sub> フラーレンに着目した。C<sub>60</sub> フラーレンは、臨床で応用されている抗酸化剤（ビタミン E）の数倍もの抗酸化活性を有するのみならず、ビタミン E では消去できないスーパーオキシドアニオン（O<sub>2</sub><sup>-</sup>）など、幅広い種類の ROS に抗酸化活性を発揮する。また、他の抗酸化剤と比較して、ROS 消去の持続性も高く、熱・光・pH 安定性にも優れている。さらに、我々の共同研究者である増野らの報告によると、C<sub>60</sub> フラーレンは、既存の抗酸化剤の致命的欠点である「プロオキシダント作用」を示さないことが明らかとなっている。プロオキシダント作用とは、抗酸化剤が逆に ROS の生成を誘発する現象であり、抗酸化作用の減弱や抗酸化剤による副作用の発生に繋がると考えられている。従って、プロオキシダント作用を示さない C<sub>60</sub> フラーレンは、他の抗酸化剤とは、一線を画す副作用の少ない優れた抗酸化剤となり得ると考えられる。

C<sub>60</sub> フラーレンを、非侵襲性および汎用性の観点で最も優れた経口投与ナノ医薬として開発しようと考えた場合、克服すべき課題は、1) C<sub>60</sub> フラーレンの水溶性や分散性、安定性を改善すること、2) 腸管送達・吸収効率を改善すること、3) 徐放化や標的指向化を含め、有効性と安全性を高度に担保すること、4) 低価格化等、実用化・事業化への道筋を立てることなどとなる。このうち、1) の難溶性の克服と 4) の超高純度フラレンの低価格化（純度 > 99.9% で数万円/g を実現）・大量生産系に関しては研究分担者などが既に確立している。また我々は、上記観点からは不十分ではあるものの、現状の C<sub>60</sub> フラーレンでさえ、経口投与において炎症性腸疾患モデルマウスで既存薬よりも優れた有効性を発揮し得ることを明らかとし特許出願するなど、当該研究の基盤を既に有している（特願 2011-231446）。

そこで本研究では、3 年の研究期間内で、①抗ウイルス活性や抗菌活性、抗炎症活性（抗酸化活性）を損なうことなく、医用工学的に C<sub>60</sub> フラーレンを DDS 修飾する技術を開発し、その凝集性の改善、胃内安定性[酸抵抗性・加水分解抵抗性]の付与、腸管上皮細胞や腸管内炎症性細胞への送達性（到達性）やその後の吸収性（取り込み性）の向上などを達成すること、②我々の従来研究で未修飾 C<sub>60</sub> フラーレンの安全性は高度に担保されているものの、①で創出した新規剤形としての DDS 化 C<sub>60</sub> フラーレンの安全性評価（ハザード評価と曝露実態【動態】評価によるリスク評価）を新たに実施し、有効性と共に、安全性をも高度に保証すること、③市場調査や臨床試験の準備を当該研究期間に実施し、期間終了後、速やかに実用化・事業化できるロードマップを具現化することに焦点を絞るものである。

## B. 研究方法

### 1. 水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン

本検討では水酸基数の異なる 4 種の水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン（C<sub>60</sub>(OH)<sub>12</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>44</sub>）を用いた。C<sub>60</sub>(OH)<sub>12</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> は FLOX 株式会社（Kanagawa, Japan）から供与して頂いた。C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>44</sub> は大阪大学大学院工学研究科の大島巧先生、小久保研先生より供与して頂いた。本検討では、水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、さらに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後に用いた。

### 2. 粒径分布およびゼータ電位の測定

超純水で 0.25 mg/mL に調整した各水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン粒子を Size & Zeta キャピラリーセル（Malvern Instruments, UK）に 1 mL 注入し、Zetasizer Nano-ZS（Malvern Instruments）を用いて粒径分布ならびにゼータ電位を測定した。

### 3. 細胞

ヒト腸管上皮細胞株である Caco-2 細胞は、

American Type Culture Collection (ATCC; VA, USA) より購入した。Caco-2 細胞は 10%ウシ胎仔血清 (FBS)、1%非必須アミノ酸 (NEAA) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM、和光純薬工業株式会社; Osaka, Japan) を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC; VA, USA) より購入した。RAW264.7 細胞は 10%FBS、1%Ab 含有 D-MEM を用い、37°C、飽和蒸気圧、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

#### 4. 活性酸素種 (ROS) 除去活性評価

細胞内 ROS 量は蛍光プローブである 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; Cell Biolabs In, USA) を用いて測定した。DCFH-DA は、細胞内エステラーゼにより脱アセチル化し、非蛍光型 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) に変化する。さらに ROS により素早く酸化され、強く蛍光する 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) に変化する。1.5×10<sup>4</sup> cells となるように 96 穴プレートに予め播種しておいた Caco-2 細胞に対して、培地を除去し、DCFH-DA (20 μM) を含有した phenol red free の D-MEM を添加し、37°C で 30 分間培養した。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄し、各濃度に希釈した各種水酸化フラレン (C<sub>60</sub>(OH)<sub>12</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>44</sub>) 及び NAC (Sigma-Aldrich; MO, USA) を 50 μL/well 加えた。30 分後、D-MEM で 125 ng/mL に調整した IL-1β を 50 μL/well 加えた。24 時間後、励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm の蛍光量を測定した。

#### 5. ELISA による IL-8 産生量の測定

96 穴プレートに 1.5×10<sup>4</sup> cells/100 μL/well で Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した後、各種水酸化フラレン (C<sub>60</sub>(OH)<sub>12</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>44</sub>) 及び NAC を 10%FBS、1% NEAA

含有 D-MEM で各濃度に希釈し、50 μL/well ずつ加えた。30 分後、D-MEM で 10 ng/mL に調整した TNF-α、または、125 ng/mL に調整した IL-1β を 50 μL/well 加えた。24 時間後、培養上清中の IL-8 量を BD OptEIA ELISA kit のプロトコールに準じて測定した。

6. 水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンの一週間連続経口投与  
C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> と C<sub>60</sub>(OH)<sub>44</sub> を超純水で希釈し、分散液を調整した。水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、さらに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後に用いた。C57BL/6 マウスに 375 μM に調製した水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン分散液をそれぞれ 500 μL ずつ一週間連続で強制経口投与し、最終投与量を 187.5 nmol/day とした。投与期間中、毎日体重を測定した。

#### 7. 血液回収

最終投与から 24 時間後、マウスに 64.8 mg/mL のペントバルビタール (ソムノペンチル; Schering-plough Animal Health, Netherlands) を 50 μL 腹腔内投与することにより麻酔をした後、心臓より採血を行った。採血は、5 IU/mL のヘパリン溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。この溶液を全血として血球検査に用い、残りを 1750 g、15 分間、遠心分離して血漿を回収した。

#### 8. 血液生化学試験

血漿中のアラントランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、血中尿素窒素 (BUN) を比色法にて測定した。ALT および AST 活性は、それぞれの基質である L-アラニンおよび L-アスパラギン酸と α-ケトグルタル酸のアミノ基転移反応によって生じたピルビン酸が、ピルビン酸オキシダーゼと反応することで生じる過酸化水素とジアリールイミダゾールロイコ色素の反応によって生成した青色色素を測定した。BUN はウレアーゼの作用により生成したアンモニアとブロムクレゾールグリーンとの

反応によって生じた緑色色素を測定した。測定には、生化学分析装置 FUJI DRI-CHEM 7000 (FUJIFILM; Tokyo, Japan) を用いた。

#### 9. 血球検査

水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンを投与したマウスから採取した全血を多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis, Union City, CA) を用いて、赤血球数、総白血球数、リンパ球数、顆粒球数、単球数、血小板数を電気抵抗法により測定した。

#### 10. C<sub>60</sub> フラーレン誘導体

本検討ではプロリン類似の骨格を持つ、4種類の置換様式の異なるプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンを用いた。プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは慶應義塾大学薬学部の増野匡彦先生および、FLOX 株式会社より供与して頂いた。

#### 11. 細胞

ヒト腸管上皮細胞株である Caco-2 細胞、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC; VA, USA) より購入した。Caco-2 細胞は 10%ウシ胎仔血清 (FBS)、1%非必須アミノ酸 (NEAA)、1%Ab 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM、和光純薬工業株式会社; Osaka, Japan) を用い、37°C、飽和蒸気圧、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。RAW264.7 細胞は 10%FBS、1%Ab 含有 D-MEM を用い、37°C、飽和蒸気圧、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

#### 12. LDH アッセイによる細胞傷害性評価

96 穴プレートに  $1.5 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L/well で Caco-2 細胞または RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した後、各種プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレン、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub> および、NAC を 10%FBS、1% NEAA 含有 D-MEM で各濃度に希釈し、100  $\mu$ L/well ずつ加えた。24 時間後、培養上清中の LDH 活性を指標として、LDH-Cytotoxic Test (Wako) のプロトコールに準じて、細胞傷害性を評価した。

#### 13. リン酸化アレイ

150  $\phi$ dish に  $6.0 \times 10^4$  cells/20 mL/dish で

Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した後、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、プロリン C<sub>60</sub>(3) を 10%FBS、1% NEAA 含有 D-MEM で 100  $\mu$ M に希釈し、10 mL/dish ずつ加えた。30 分後、D-MEM で 125 ng/ml に調製した IL-1 $\beta$ 、または、10 ng/ml に調製した TNF- $\alpha$  を 10 mL/dish 加えた。1 時間後、細胞を PBS で洗浄したあと、細胞を回収して  $1.0 \times 10^7$  cells/mL となるようにライシスバッファーを添加し、セルライセートを調製した後、タンパク量を Nano drop により定量した。セルライセート中のリン酸化タンパク量を Human Phospho-MAPK array Kit (R&D) のプロトコールに準じて測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得なかったが、動物愛護の精神を遵守しつつ実施した。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文科省の指針)」に準拠し、大阪大学および大阪大学薬学研究科、(独) 医薬基盤研究所等の各所属機関の動物実験規程に則り実施した。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属機関の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受けた。さらに本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月、厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」(基発第 0207004 号)【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号) が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進

した。

### C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

#### D. 考 察

C<sub>60</sub> フラーレンを主薬 (主剤) とした、本邦初・発のナノ・サブナノ医薬開発に向けては、乗り越えなければならない課題が大きく 3 つ存在する。C<sub>60</sub> フラーレンの医薬品化に向けた第一の課題は、ナノ・サブナノ医薬の品質管理である。医薬品には、極めて厳密な品質管理が要求される。ICH (日米 EU 医薬品規制会議) で合意された不純物ガイドラインによると、投与量 2 g/day 以下の原薬中 0.05% 以上の不純物は報告を要し、0.10% 以上で構造決定、0.15% 以上の場合はその安全性の確認が必要である。先述したように、未修飾 C<sub>60</sub> フラーレンは凝集性が高いことから、生体内への適用に向けては、親水性の置換基による化学修飾や、PEG などの親水性高分子修飾による分散性の向上が必要不可欠である。一方で、骨格に多数の二重結合が存在する C<sub>60</sub> フラーレンは、多くの付加位置が存在するため、付加する置換基の位置制御が困難であり、しばしば構造異性体の生成を伴う。我々が先行的に研究を行なっている水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンに関しても、水酸基の数や位置異性体の制御が困難であり、医薬品化に耐え得る品質を保証するのは容易ではない。また、C<sub>60</sub> フラーレンは、その凝集状態により薬効や体内動態が変化する可能性が考えられ、安定した品質のナノ・サブナノ医薬の供給に向けては、異性体の少ない合成方法や異性体の分離・分析技術、さらには分散性の向上や安定した分散技術が必要不可欠である。

第二の課題は、ナノ・サブナノ医薬の ADME (吸収・分布・代謝・排泄) と Toxicity (毒性) の連関情報の収集、即ち ADMET の精査である。近年、これら 5 種類のパラメータの把握は薬理活性と並んで医薬品開発において極めて重要な位置付けとなっている。ナノ素材に関しては、我々のグループも少しずつ情報を収集しているものの、体内吸収性や

体内動態などの ADME に関する情報は未だ乏しい。例えば、C<sub>60</sub> フラーレンは、静脈内投与により、肺や脾臓に多く集積することが報告されている一方で、放射性同位元素で標識した C<sub>60</sub> フラーレンが肝臓や脾臓に多く集積するといった報告があるなど、未だ体系的な情報は得られておらず、詳細な検討が望まれている。さらに、有効性を向上させた C<sub>60</sub> フラーレン誘導体に関しては、動態情報は一切存在しない。また、C<sub>60</sub> フラーレンの安全性情報に関しても多くの議論が飛び交っているのが現状である。経口・腹腔・静脈内投与により、未修飾 C<sub>60</sub> フラーレンの安全性を示唆する報告が多数存在する一方で、遺伝毒性や神経毒性といった安全性を懸念する報告も存在するの事実である。即ち、早期に C<sub>60</sub> フラーレンの ADMET を精査することが、医薬品化に向けた近道であることに異論はない。

最後の課題は、C<sub>60</sub> フラーレンの薬効メカニズムの解明に向けた検討である。C<sub>60</sub> フラーレンは、歪んだ骨格とπ電子共役系を持つ特徴的な構造から、ラジカルスカベンジャーとして働き、強力な抗酸化作用を示すことから、化粧品など、既に多くの分野で実用化されている。我々のこれまでの検討においても、水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンが、強力な抗酸化作用を示すことを明らかとしている一方で、抗酸化剤である NAC と比較して、顕著に炎症性サイトカインの産生を抑制するという興味深い知見も得ている。本知見は、抗酸化作用に起因しない C<sub>60</sub> フラーレンの抗炎症メカニズムを予期させる大変興味深いものであるが、これら薬効の発現メカニズムは全く分かっていないのが現状である。また、リスクとベネフィットのバランスの上に成り立つ医薬品開発においては、薬効メカニズムの解明は副作用予測にも繋がる。主剤がナノ・サブナノ素材である新規医薬品の副作用を事前に予測し、さらに安全性が担保された医薬品の開発に向けても、薬効メカニズムの解明に向けた検討は急務であると言える。

本観点から我々は、安全かつ有用なナノ・サブ



ナノ医薬の開発に向けて、様々な官能基が付加された C<sub>60</sub> フラーレンの中から、医薬品化に最適な C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を探索する、Nano-Efficacy/Safety design (ナノ最適デザイン) を推進している。これまでに我々は、C<sub>60</sub> フラーレンの強力な抗酸化作用を利用した、炎症性腸疾患に対する新規ナノ・サブナノ医薬の開発に向け、水酸基を導入し、分散性を向上させた水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンを用い、分散性とその抗酸化・抗炎症活性に関して検討を進めてきた。その結果、水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンは、*in vitro* において分散性や安全性に優れ、かつ強力な抗酸化作用や抗炎症作用を示すこと、*in vivo* において、炎症性疾患の一つである炎症性腸疾患に対する安全かつ有効な治療薬となり得ることを明らかとしており、平成 23 年度に特許出願している (特願 2011-231446)。

以上の結果は、C<sub>60</sub> フラーレンの表面修飾を最適化することで、安全性や有効性に優れた C<sub>60</sub> フラーレンを創製可能であることを意味している。従って、C<sub>60</sub> フラーレンの医薬品化に向けては、表面修飾と薬効や毒性との構造活性相関を明らかにし、粒子表面を適切に制御する Nano-Efficacy/Safety design の推進が何よりも重要であると考えられる。さらに上記 3 つの課題を克服可能な C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を探索することで、有効かつ安全なナノ医薬の開発に向けた Nano-Efficacy/Safety Design に資する情報の収集に繋がると確信している。本観点から、本年度は、当初計画に沿って、①C<sub>60</sub> フラーレンの有用機能を損なうことなく分散性を改善できる 4 種類の水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体に加え、抗酸化・抗炎症活性を向上可能な 7 種類の官能基修飾誘導体をも創製し、粒子径・凝集性といった物性を精査したうえで、抗酸化・抗炎症活性を *in vitro* で評価した (大島の分担報告書も参照)。その結果、②従来型より「20 倍以上もの抗炎症活性を有する C<sub>60</sub> フラーレン誘導体」を見出し、平成 25 年 2 月 19 日 (火) に特許出願した (特願

2013-030455)。また、③炎症性腸疾患に対する治療効果を発揮可能な投与量において、一般毒性や遺伝毒性などが認められないことを初めて確認した。さらに、PMDA での事前面談・PDCA サイクル・実地調査での指摘を鑑み、研究計画を前倒して、④体内動態評価を可能にする RI 標識 C<sub>60</sub> フラーレン (青島の分担報告書を参照) やリチウム内包 C<sub>60</sub> フラーレンの創製 (大島の分担報告書を参照) や LC-MS による体内動態評価系の構築 (大島の分担報告書を参照)、⑤腸管吸収性を改善させるためのグルコース修飾体の合成といったナノ DDS 化 (大島の分担報告書を参照)、⑥C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の抗炎症活性として、抗酸化活性以外のメカニズムが存在する可能性を先駆けて発見するなど、当初目標を超える特筆すべき成果が得られたので、下記で詳細に報告する。

## 1. 様々な数の水酸基を有する水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンの有効性評価

本検討では、水酸基数の異なる 4 種の水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン (C<sub>60</sub>(OH)<sub>12</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>44</sub>) を用い、抗酸化活性・抗炎症活性を比較検討した。まず、各種水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンの物性に関する基礎的情報を収集した。C<sub>60</sub> フラーレンの理論的な 1 次粒子径は 0.7 nm であるが、溶媒中では凝集し、数百 nm 程度の凝集塊を形成することが知られている。各水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンを水または培養液に懸濁すると、C<sub>60</sub>(OH)<sub>12</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> は、凝集塊が認められ、完全には分散していないことが明らかとなった。一方で、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>44</sub> は、懸濁させても凝集塊は認められず、C<sub>60</sub>(OH)<sub>12</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> と比較して分散性が高いと考えられた。そこで、動的光散乱法により分散媒中の粒子径分布を評価したところ、C<sub>60</sub>(OH)<sub>12</sub> (図 1a)、C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> (図 1b) は数百 nm 付近に 2 次粒子径のピークが観察され、1 次粒子径はサブナノサイズであるものの、溶媒中ではサブミクロンサイズとして存在することが判明した。一方で、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> (図

1c)、 $C_{60}(OH)_{44}$  (図 1d) は 1 nm 付近に 2 次粒子径のピークが観察され、水酸基数の増加に伴い、2 次粒子径が小さくなる傾向が認められた。

次に、ヒト腸管上皮細胞株 (Caco-2 細胞) を用いて、各種水酸化  $C_{60}$  フラーレン及びポジティブコントロールとして用いた NAC の細胞毒性を LDH アッセイにより評価した (図 2)。検討に用いた水酸化  $C_{60}$  フラーレンの濃度は、培養上清中に分散可能な濃度から設定した。また、NAC の濃度は、*in vitro* で抗酸化作用が報告されている濃度から設定した。その結果、 $C_{60}(OH)_{12}$ 、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、及び NAC は、高濃度作用させることで有意な細胞毒性が認められた。一方で、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  は、培養上清中で分散可能な最高濃度でも細胞毒性が認められなかったことから、安全性に優れている可能性が示された。

Caco-2 細胞を炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  で刺激することで、ROS 産生量が増加する。さらに ROS は、ERK1/2 や p38 などの MAPK 経路の活性化を引き起こし、最終的に TNF- $\alpha$ 、IL-8、IL-1 $\beta$  といった炎症性サイトカインが産生される。これらの分子反応機構は、炎症性腸疾患の病態をよく反映していることから、本実験系を用いて水酸化  $C_{60}$  フラーレンの抗炎症作用を比較検討した。まず、水酸化  $C_{60}$  フラーレンの *in vitro* における抗酸化作用を評価するため、ROS の産生に及ぼす影響を検討した (図 3)。Caco-2 細胞を播種し、IL-1 $\beta$  で刺激すると、顕著な ROS 産生の増加が認められた。一方で、いずれの水酸化  $C_{60}$  フラーレンを作用させた群でも、濃度依存的に IL-1 $\beta$  刺激による ROS の産生が抑制された。特に、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  を作用させることで、ポジティブコントロールとして用いた NAC の 1/30 の作用濃度にも関わらず、NAC 作用群と同等の ROS 産生の抑制が認められた。以上の結果から、水酸化フラーレンは強力な抗酸化作用を有することが明らかとなった。次に、水酸化フラーレンの抗炎症作用を、炎症性サイトカイン IL-8 の産生を指標として評価した (図 4)。先

ほどと同様に、Caco-2 細胞に水酸化フラーレンおよび NAC を作用させた後に、IL-1 $\beta$  で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した。その結果、IL-1 $\beta$  刺激によって IL-8 産生が有意に増加したものの、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  作用群で、濃度依存的に IL-8 の産生が有意に抑制された。NAC 作用群においても、IL-8 の有意な産生抑制が認められたが、その効果は水酸化  $C_{60}$  フラーレンと比較して非常に弱いものであった。また、異なる炎症性サイトカイン刺激における水酸化  $C_{60}$  フラーレンの抗炎症作用を検討するため、Caco-2 細胞を TNF- $\alpha$  で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した (図 5)。その結果、IL-1 $\beta$  刺激と同様に、TNF- $\alpha$  刺激により IL-8 産生が有意に増加した。一方で、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  を作用させることで、有意に IL-8 の産生が抑制され、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  が、優れた抗炎症活性を有することが明らかとなった。特に、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  は、優れた抗炎症活性を有すると共に、分散性が高く、かつ細胞毒性を示さないことが明らかとなった。従って、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  は、分散性-細胞毒性-抗炎症活性 (抗酸化活性、炎症性サイトカイン産生抑制能) の観点から、安全かつ有用な抗炎症薬となる可能性が示された。そこで以降は、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  を用いて検討を進めた。

## 2. 水酸化 $C_{60}$ フラーレンの安全性評価

次に水酸化  $C_{60}$  フラーレンの安全性に関する基礎情報の収集を試みた。まず、水酸化  $C_{60}$  フラーレンを 1 週間反復投与した際の一般毒性を評価するため、水に分散可能な最高濃度で各種水酸化  $C_{60}$  フラーレン ( $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$ ) を懸濁し、C57BL/6 マウスに 375  $\mu$ M/500  $\mu$ L/mouse の投与量で経口投与した。マウスの体重を経日的に測定したところ、いずれの水酸化  $C_{60}$  フラーレン投与群でも、コントロール群と同様の体重変動を示し、1 週間投与後も体重変化に影響は認めら

れなかった (図 6)。次に、マウスから主要臓器である肝臓、大腸、腎臓、脾臓、胃、小腸、脳、肺、心臓を回収し、臓器重量を測定した (図 7)。その結果、 $C_{60}(OH)_{44}$  投与群で、小腸重量の低下が認められたが、その他の臓器重量に影響は認められなかった。また、 $C_{60}(OH)_{36}$  投与群では、どの臓器重量にも影響は認められなかった。従って、病理学的な評価など、より詳細な検討は必要とされるものの、 $C_{60}(OH)_{36}$  は組織傷害を示さないと考えられた。

次に、各マウスから回収した血漿を用いて、肝障害マーカーである ALT、AST、腎障害マーカーである BUN を測定した (図 8)。その結果、 $C_{60}(OH)_{44}$  投与により、ALT、AST に影響は認められなかった。また、BUN の減少が認められたものの、正常範囲内での変化であり、組織障害マーカーに顕著な影響は無いと考えられた。 $C_{60}(OH)_{36}$  投与群では、ALT、AST、BUN に変動は認められなかったことから、顕著な肝毒性、腎毒性を示さないことが明らかとなった。そこで、血球成分の変動を解析した結果、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  の投与により若干の変動は認められるものの、白血球、顆粒球、リンパ球、単球、赤血球にコントロール群と有意な変化は認められなかった (図 9)。また、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$  投与群において、血小板の値は有意な上昇は示したが、正常範囲内の変化であったことから、臨床学的な意義はないものと考えられた。以上の結果から、水酸化フラーレンは経口投与により、血液成分にも影響を示さないことが明らかとなった。

次に、 $C_{60}(OH)_{36}$  を静脈内投与後の、急性毒性発現における閾値を検討した。種々投与量の  $C_{60}(OH)_{36}$  を投与した後、臓器重量と臓器障害マーカーを測定したところ、750 nmol/マウス (2.5 mg/マウス) の投与量において、腎重量の増加および ALT・BUN の増加が観察された。以上の結果から、単回静脈内投与において、 $C_{60}(OH)_{36}$  が毒性を発現しない最大量は、375 nmol/マウス (1.25 mg/マウス) であることが判明した。さ

らに、Caco-2 細胞を用いて、コメットアッセイにより、DNA 傷害性を評価した。その結果、検討した最大量においても、全く傷害性は観察されないことが明らかとなった。

### 3. プロリン型 $C_{60}$ フラーレン以外の $C_{60}$ フラーレン誘導体に関する検討

上述した通り我々は、 $C_{60}$  フラーレンの圧倒的な抗酸化作用や抗炎症作用を利用した炎症性腸疾患治療薬の開発に向けて、水酸基を導入し、分散性を向上させた水酸化  $C_{60}$  フラーレンを用い、安全かつ有効な炎症性腸疾患治療薬に向けた検討を進めている。一方で、本邦発のナノ・サブナノ医薬の開発に向けては、さらなる有効性の向上と共に、品質管理に必須である異性体の分離や分析、体内動態や安全性との関連情報の収集、薬効メカニズムの解明など、克服すべき課題が多くある。特に、水酸化  $C_{60}$  フラーレンは、水酸基の位置制御が困難であり、医薬品に必須である安定した品質を保証することが容易ではない。

そこで我々は、異性体が存在しない、もしくは分離が可能な  $C_{60}$  フラーレンを創成し、その有用性評価を推進した。まず、2 種類の  $C_{60}$  フラーレン誘導体と未修飾の  $C_{60}$  フラーレンの抗炎症作用を、炎症性サイトカインである IL-8 の産生量を指標に評価した (図 11)。図 11 に示すメチルマロン酸  $C_{60}$  フラーレンや脂環式  $C_{60}$  フラーレンには、水酸化  $C_{60}$  フラーレンの医薬品化を目指した際に問題となる構造異性体が存在しない。従って、品質保証の問題を克服する可能性があるため、これら誘導体の抗炎症作用を評価した。Caco-2 細胞に各種  $C_{60}$  フラーレン誘導体および  $C_{60}$  を作用させた後に、IL-1 $\beta$  で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した。その結果、未修飾  $C_{60}$  フラーレンやメチルマロン酸  $C_{60}$  フラーレンでは、IL-8 の産生抑制が全く認められなかった。また、脂環式  $C_{60}$  フラーレンでは、IL-8 の産生促進が認められ、起炎性を示すことが示唆された。従って、メチルマロン酸  $C_{60}$  フラーレン、脂環式  $C_{60}$  フラ

ーレンは、炎症性腸疾患治療薬としては適さない可能性が示された。そこで、次に、構造異性体の分離や分析が容易なプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンに着目した。

#### 4. プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの物性評価

C<sub>60</sub> フラーレンの炭素骨格表面にプロリン類似骨格を有しているプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、カルボン酸やイミン骨格を有しているため、未修飾 C<sub>60</sub> フラーレンと比較して水溶性が向上している。また、分担研究者である大島は、フラレン分離用のスタンダードカラムである Buckyprep を用い、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの光学異性体の分離や分析が可能であることを明らかとしており、安定した品質のプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンを供給可能であることを見出している（大島の分担報告書を参照）。また、抗酸化作用に関しても、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンと比較して、強力な OH ラジカル消去作用を示すことを、分担研究者である青島らが明らかとしている（青島の分担報告書を参照）。従って、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンよりも安定した品質と有効性が高度に担保されたナノ・サブナノ医薬として期待できる。

そこで、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの強力な抗酸化活性を利用した炎症性腸疾患治療薬の開発に向けて、置換様式の異なる 4 種類のプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの物性情報（分散性や表面電荷）と、細胞毒性や抗炎症作用（抗酸化活性、炎症性サイトカイン産生抑制能）を *in vitro* で比較検討し、医薬品化に最適な C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を探索した。

本検討では、置換様式の異なる 4 種類のプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレン（プロリン C<sub>60</sub> (1)、プロリン C<sub>60</sub> (2)、プロリン C<sub>60</sub> (3)、プロリン C<sub>60</sub> (4)) を用いた（図 12）。図 12 に示すように、本検討で使用したプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの構造は、カルボキシル基の付加位置や数がそれぞれ異なるプロリン C<sub>60</sub> (1)-(3) と、アンモニウムカチオン

になっているプロリン C<sub>60</sub> (4) に大きく分けられる。また、コントロールとしてプロリン C<sub>60</sub> (1) の官能基部分のみの構造（プロリン(1)' と表記）も使用した。さらに、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の比較対象として、水酸基を 36 個導入し、分散性やハンドリング性を向上させた水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン【C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>】や、全く修飾を施さない未修飾 C<sub>60</sub> フラーレン（C<sub>60</sub>）を使用した。

まず、各種プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの物性情報を収集した。プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンと比較して水溶性に乏しいため、各プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンを DMSO に溶かした後に、水に懸濁し、分散媒中の平均二次粒子径を Zetasizer で測定した（図 13）。その結果、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> は 1 nm 付近に、C<sub>60</sub> は 300 nm 付近にそれぞれ 2 次粒子径のピークが観察された。C<sub>60</sub> フラーレンの 1 次粒子径は 1 nm 程度であるので、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> は分散性が高く、ほぼ単分散している一方で、C<sub>60</sub> は溶媒中で凝集していることが明らかとなった。プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンに関しては、プロリン C<sub>60</sub> (1) およびプロリン C<sub>60</sub> (2) は 100 nm 付近に、プロリン C<sub>60</sub> (3) およびプロリン C<sub>60</sub> (4) は 50 nm 付近に 2 次粒子径のピークが観察された。従って、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、C<sub>60</sub> よりも分散性が高い一方で、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> よりも凝集していることが明らかとなった。中でも、プロリン C<sub>60</sub> (3)、プロリン C<sub>60</sub> (4) は、プロリン C<sub>60</sub> (1)、プロリン C<sub>60</sub> (2) と比較して分散性が高いことが示された。さらに Zetasizer を用いて表面電荷を測定したところ、C<sub>60</sub>、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、プロリン C<sub>60</sub> (1)-(3) は負に荷電しており、カルボン酸の数の増加に伴い負に荷電している傾向が観察された。一方で、プロリン C<sub>60</sub> (4) はアンモニウムカチオンの構造からも明らかであるように正に荷電していた。

#### 5. 腸管上皮におけるプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの抗炎症作用

Caco-2 細胞を用いて、各種プロリン型 C<sub>60</sub> フ

ラーレン、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}$  および、NAC の細胞毒性を LDH アッセイにより評価した (図 14)。その結果、各種  $C_{60}$  フラーレン誘導体および NAC の添加により、コントロール群と比較して有意な差はみられるものの、90%以上の細胞が生存していた。従って、プロリン型  $C_{60}$  フラーレンは本濃度においてほとんど細胞毒性を示さず、安全性に優れている可能性が示された。

Caco-2 細胞における  $C_{60}$  フラーレン誘導体の抗酸化作用を、細胞内に定常状態で産生されている ROS 産生量を指標として評価した (図 15)。その結果、 $C_{60}$  やプロリン  $C_{60}$  (1)の官能基部分のみでは、全く ROS の抑制が認められなかった。一方で、各種プロリン型  $C_{60}$  フラーレン、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、NAC 作用群において、作用時間や濃度依存的に細胞内 ROS の産生が抑制された。24 時間後における、これらの抗酸化作用の順を比較すると、プロリン  $C_{60}$  (1)、プロリン  $C_{60}$  (2) < プロリン  $C_{60}$  (4) < プロリン  $C_{60}$  (3) <  $C_{60}(OH)_{36}$  < NAC の順に抗酸化作用が強くなる傾向が確認された。

次に、プロリン型  $C_{60}$  フラーレンの *in vitro* における炎症性サイトカインの産生抑制能を、炎症性サイトカインである IL-8 の産生量を指標として評価した (図 16)。Caco-2 細胞に各種プロリン型  $C_{60}$  フラーレン、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}$ 、NAC を作用させた後に、IL-1 $\beta$ で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した。その結果、IL-1 $\beta$  刺激によって IL-8 産生が有意に増加したものの、いずれのプロリン型  $C_{60}$  フラーレンを作用させた群においても、濃度依存的に IL-8 の産生が抑制された。また、 $C_{60}(OH)_{36}$  作用群や NAC 作用群においても、IL-8 の産生を抑制する傾向が認められたが、その効果はプロリン型  $C_{60}$  フラーレン作用群と比較して非常に弱いものであり、抗酸化作用とは全く異なる傾向が認められた。特に、プロリン  $C_{60}$  (3)は、ポジティブコントロールとして用いた NAC や  $C_{60}(OH)_{36}$  と比較して、約 20 倍もの強い抗炎症作用を示すことが明らかとなっ

た。また、プロリン  $C_{60}$  (1)の官能基部分のみや、未修飾  $C_{60}$  フラーレンでは、IL-8 の産生抑制は認められなかった。

そこで、異なる炎症性サイトカイン刺激におけるプロリン型  $C_{60}$  フラーレンの炎症性サイトカイン抑制能を評価するため、Caco-2 細胞を TNF- $\alpha$  で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した (図 17)。その結果、IL-1 $\beta$ で刺激した検討と同様に、TNF- $\alpha$ 刺激により IL-8 産生が有意に増加した。一方で、各種プロリン型  $C_{60}$  フラーレンを作用させることで、有意に IL-8 の産生が抑制され、その抑制傾向は IL-1 $\beta$ 刺激時と同様の傾向が認められた。また、 $C_{60}(OH)_{36}$  作用群や NAC 作用群においても、IL-8 の産生を抑制する傾向が認められたが、その効果はプロリン型  $C_{60}$  フラーレン作用群と比較して非常に弱いものであった。特に、プロリン  $C_{60}$  (3)は、NAC や  $C_{60}(OH)_{36}$  と比較して、約 5 倍もの強い抗炎症作用を示すことが明らかとなった。また、先程の検討と同様に、プロリン  $C_{60}$ (1)の官能基部分のみや未修飾  $C_{60}$  フラーレンでは、IL-8 の産生抑制は認められなかった。

以上の腸管上皮細胞における結果をまとめると、抗酸化作用は NAC や  $C_{60}(OH)_{36}$  より劣るものの、プロリン型  $C_{60}$  フラーレンは、優れた IL-8 産生抑制能を有することが明らかとなった。特に、プロリン  $C_{60}$  (3)、プロリン  $C_{60}$  (4)は、他のプロリン型  $C_{60}$  フラーレンと比較して、分散性が高く、優れた抗酸化作用や抗炎症作用を有することが明らかとなったことから、安全かつ有用な抗炎症薬となる可能性が示された。また、強い抗炎症作用は、抗酸化作用以外のメカニズムに起因する可能性が示唆された。

## 6. マクロファージにおけるプロリン型 $C_{60}$ フラーレンの抗炎症作用

炎症性腸疾患の病態においては、腸管上皮が傷害され、腸管粘膜へ大量の腸内細菌が侵入し、Toll-like 受容体 (TLR) を介した自然免疫系が活

性化する。そこで、次に、貪食細胞であるマウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7 細胞) を、グラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分である LPS で刺激し、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体が自然免疫系に与える影響を評価した。

まず、RAW264.7 細胞に対する各種プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレン、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub> および、NAC の細胞毒性を LDH アッセイにより評価した (図 18)。その結果、腸管上皮細胞と同様に、プロリン C<sub>60</sub> (1)-(3)、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub> 作用群では、コントロール群と比較して、90%以上の細胞が生存しており、細胞毒性はほとんど認められなかった。一方で、プロリン C<sub>60</sub> (4)は、腸管上皮細胞では細胞毒性が認められなかった濃度にも関わらず、細胞毒性が約 20%認められた。

次に、RAW264.7 細胞における C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の抗酸化作用を、ROS 産生量を指標として評価した (図 19)。腸管上皮細胞と同様に、プロリン C<sub>60</sub> (1)の官能基部分のみを作用させても、全く ROS の抑制が認められなかった一方で、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレン、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> および NAC 作用群において、濃度依存的に細胞内 ROS の産生が抑制された。24 時間後における、これらの抗酸化作用の順を比較すると、プロリン C<sub>60</sub> (1)、プロリン C<sub>60</sub> (4) < プロリン C<sub>60</sub> (2) < プロリン C<sub>60</sub> (3) < C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> < NAC の順に抗酸化作用が強くなる傾向が確認され、腸管上皮細胞における検討と同様の傾向が認められた。一方で、腸管上皮細胞とは異なり、未修飾 C<sub>60</sub> フラーレンを作用させることで、僅かではあるものの ROS の産生抑制が認められると共に、プロリン C<sub>60</sub> (4)作用群では、作用時間 2 時間以降から徐々に ROS の産生上昇が認められ、プロリン C<sub>60</sub> (4)はプロオキシダント作用を示す可能性が明らかとなった。

TLR4 のリガンドである LPS で RAW264.7 細胞を刺激すると、炎症性サイトカインの産生を誘導する MyD88 依存的な経路および、TRIF 経路を介して I 型 IFN の産生に参与する MyD88 非依存的な経路が活性化される。炎症性腸疾患の病態に

は、過剰産生された炎症性サイトカイン、とりわけ TNF- $\alpha$ が重要な役割を担っており、抗 TNF- $\alpha$  製剤は、現在の炎症性腸疾患治療になくなくてはならないものとなっている。さらに近年、IL-6R 抗体がクローン病の治療薬として有効であるという報告もある。また、TRIF KO マウスは、MyD88 KO マウスや WT と比較し、DSS 誘発性大腸炎の病態が悪化しにくいことが報告されていることから、I 型 IFN の産生に参与する MyD88 非依存的な経路も炎症性腸疾患の病態において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、各種プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンのサイトカイン産生抑制能を、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  の産生や、MyD88 非依存的な経路により産生される IFN- $\beta$ 、IP-10 の産生量を指標として評価した。先ほどと同様に、RAW264.7 細胞に各種プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレン、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub> および、NAC を作用させた後に、LPS で刺激し、24 時間後に培養上清中の炎症性サイトカインである IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 量を測定した (図 20)。まず、IL-6 や IL-1 $\beta$ の産生量を評価した。その結果、LPS 刺激によって IL-6 や IL-1 $\beta$ の産生が有意に増加したものの、各種プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレン作用群で、濃度依存的に IL-6 や IL-1 $\beta$ の産生が抑制された。特に、IL-6 に関しては、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> 作用群や C<sub>60</sub> 作用群においても IL-6 の産生を抑制する傾向が認められたが、その産生抑制はプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンよりも弱く、特にプロリン C<sub>60</sub> (3)は、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> と比較して、約 20 倍以上の強い抗炎症作用を示すことが明らかとなった。一方で、NAC 作用群においては、IL-6 の産生には影響を与えないと共に、IL-1 $\beta$ の産生を促進する傾向が認められ、先程の抗酸化作用の結果とは全く異なる傾向が認められた。また、本検討においても、プロリン C<sub>60</sub> (1)の官能基部分のみの構造では、IL-6 や IL-1 $\beta$ の産生抑制は認められなかった。

次に、TNF- $\alpha$ 産生量を評価した。その結果、LPS 刺激によって TNF- $\alpha$ の産生が有意に増加すると共に、いずれのプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンおよび

C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> を作用させた群においても、濃度依存的に TNF-α の産生が促進され、IL-6 とは全く異なる傾向が認められた。また、プロリン C<sub>60</sub>(1)-(3) は、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> 作用群と同等の TNF-α 産生促進が認められた。一方で、プロリン C<sub>60</sub> (4) はその細胞毒性のためか、100 μM の濃度において TNF-α の産生上昇は、他のプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンと比較して低かった。また、本検討において、プロリン C<sub>60</sub> (1) の官能基部分のみや C<sub>60</sub> 作用群では、TNF-α の産生促進は認められず、NAC 作用群においては、産生抑制傾向が認められた。

次に、MyD88 非依存的な経路により産生される IFN-β、IP-10 の産生量を測定した (図 21)。I 型 IFN である IFN-β は、抗ウィルス、増殖抑制および免疫調節活性を有するサイトカインである。また、IP-10 (CXCL10) は、IFN の産生により誘導され、単球やマクロファージ、T 細胞・NK 細胞などの多くの免疫担当細胞の遊走に参与する。その結果、LPS 刺激によって、IFN-β や IP-10 の産生が有意に増加したものの、いずれのプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンを作用させた群においても、濃度依存的に IFN-β や IP-10 の産生が強く抑制され、特に 100 μM においては、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、コントロール群以下にまで INF-β や IP-10 の産生を抑制した。各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体は、どちらのサイトカイン産生に対しても同様の傾向を示すことが確認された。しかしながら、プロリン C<sub>60</sub>(4) でのみ、IP-10 産生には影響を与えない一方で、IFN-β の産生を強く抑制するなど、異なる傾向が認められた。また、本検討において、プロリン C<sub>60</sub> (1) の官能基部分のみや C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> を作用させても、IFN-β や IP-10 の産生抑制は認められなかった。

以上の結果より、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、マクロファージに対して優れた抗酸化作用を示すと共に、TNF-α を除く MyD88 依存的な経路および、MyD88 非依存的な経路の両経路におけるサイトカインの産生を強く抑制することが明らかとなった。TRIF KO マウスは、MyD88 KO マ

ウスや WT と比較し、DSS 誘発性大腸炎の病態が悪化しにくいことが報告されている。従って、炎症性サイトカインの産生抑制と共に、MyD88 非依存的経路を介するサイトカインである IFN-β や IP-10 を抑制したプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、炎症性腸疾患の有効な治療薬となり得ると考えられる。一方で、TNF-α の産生促進も認められたため、医薬品化に向けては注意が必要である。以上の結果より、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンと比較して、分散性や抗酸化作用は劣るものの、腸管上皮やマクロファージにおいて、顕著な炎症性サイトカイン抑制能を示すことが明らかとなった (図 22)。中でも、プロリン C<sub>60</sub> (3) は、他のプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンと比較して、優れた抗酸化作用や抗炎症作用を有することから、炎症性腸疾患に対する有効な治療薬となり得る可能性が示された。

次に、他の TLR リガンド刺激におけるプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの抗炎症作用を検討した。poly(I:C) は、二本鎖 RNA の合成アナログであり、ウィルス感染と関連した分子パターンである。TLR3 を認識する poly(I:C) は、LPS 同様、MyD88 依存的な経路もしくは、MyD88 非依存的な経路を介して、NF-κB の活性化、炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、TLR4 のリガンドである LPS や TLR9 のリガンドである CpG よりも、ROS の産生が低いという報告がある。そこで、RAW264.7 細胞におけるサイトカインの産生抑制能が、抗酸化作用に起因するのか解析するために、炎症性サイトカインである TNF-α、IL-6 の産生や、MyD88 非依存的な経路により産生される IFN-β の産生量を指標として評価した。また、本検討においては、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの中でも、LPS 刺激した際に、顕著なサイトカイン抑制能を示したプロリン C<sub>60</sub> (3) を用いて検討した。RAW264.7 細胞に、プロリン C<sub>60</sub> (3)、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub> 及び NAC を作用させた後に poly(I:C) で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-6、TNF-α、IFN-β 量を測定した (図 23)。ま

ず、IL-6 と IFN- $\beta$  の産生量を評価した。その結果、LPS 刺激と同様に、poly(I:C) 刺激によって、IL-6 や IFN- $\beta$  の産生が有意に増加した。一方で、プロリン C<sub>60</sub>(3)、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>、C<sub>60</sub> を作用させたいずれの群においても、濃度依存的に IL-6 や IFN- $\beta$  の産生が抑制された。特に、IL-6 に関してはプロリン C<sub>60</sub>(3) や C<sub>60</sub> が、IFN- $\beta$  に関してはプロリン C<sub>60</sub>(3) が他の C<sub>60</sub> フラーレン誘導体よりも、強くサイトカイン産生を抑制した。また、本検討において、NAC 作用群では、濃度依存的な IL-6 や IFN- $\beta$  の産生抑制は認められなかった。次に、TNF- $\alpha$  の産生量を評価した。その結果、poly(I:C) 刺激によって TNF- $\alpha$  の産生が有意に増加したものの、いずれの C<sub>60</sub> フラーレン誘導体や NAC を作用させた場合においても、TNF- $\alpha$  の産生抑制は認められず、LPS 刺激とは異なる傾向が認められた。また、本検討における細胞毒性を LDH アッセイにより評価した (図 24)。その結果、poly(I:C) 作用により、強い細胞毒性が認められた一方で、プロリン C<sub>60</sub>(3) または、C<sub>60</sub> を共作用させることで、RAW264.7 細胞の細胞死が抑制されている傾向が認められた。一方で、NAC や C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> 作用による細胞死の抑制は認められなかった。プロリン C<sub>60</sub>(3) や C<sub>60</sub> を作用させることで、細胞死が抑制された理由に関しては不明であるが、今後精査していく必要がある。

以上の結果をまとめると、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体は、ROS の産生を誘発しないとされる poly(I:C) による刺激を顕著に抑制することが明らかとなった。また、poly(I:C) 作用による細胞死の抑制も同時に観察された。

## 7. 他の抗酸化剤と C<sub>60</sub> フラーレンの抗酸化作用および、炎症性サイトカイン抑制能の比較検討

これまでの検討において、フラレンの強力なサイトカイン抑制能は決して抗酸化作用のみに起因しない可能性が考えられた。従って、NAC 以外の抗酸化剤である 5-ASA および BHA を用いて、

C<sub>60</sub> フラーレンの抗酸化作用およびサイトカイン産生抑制能をより詳細に比較検討した。5-ASA は、現在、炎症性腸疾患の主要な治療薬となっており、その薬効の 1 つとして抗酸化作用が有名である。また、BHA は食品を保存する際の酸化防止剤としても使用されている代表的な合成抗酸化剤である。

まず、Caco-2 細胞におけるプロリン C<sub>60</sub> (3)、NAC、5-ASA および BHA の抗酸化作用を細胞内に定常状態で産生されている ROS 産生量を指標として、比較検討した (図 25)。その結果、いずれの抗酸化剤および、プロリン C<sub>60</sub> (3) 作用群においても、ROS 産生量の抑制が認められた。特に、NAC、5-ASA、BHA 作用群では、プロリン C<sub>60</sub> (3) と比較して、顕著に細胞内の ROS の産生が抑制された。一方で、5-ASA 作用群においては、その作用濃度や作用時間依存的に、ROS の生成促進が認められた。すなわち、5-ASA は Caco-2 細胞に高濃度作用させることで、プロオキシダント作用を示す可能性が示された。次に、caco-2 細胞におけるプロリン C<sub>60</sub> (3)、NAC、5-ASA および、BHA の炎症性サイトカイン抑制能を、炎症性サイトカインである IL-8 の産生量を指標として評価した (図 25)。Caco-2 細胞にプロリン C<sub>60</sub> (3)、NAC、5-ASA および、BHA を作用させた後に、IL-1 $\beta$  で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した。その結果、これまでの検討と同様に、IL-1 $\beta$  刺激によって IL-8 産生が有意に増加したものの、プロリン C<sub>60</sub> (3) 作用により、IL-8 の産生が抑制された。一方で、5-ASA や BHA を作用させても、IL-8 の産生抑制は全く認められなかった。従って、プロリン C<sub>60</sub> (3) は、抗酸化剤である NAC や BHA、炎症性腸疾患治療薬である 5-ASA よりも抗酸化作用は弱い一方で、強い IL-8 産生抑制能を示すことが明らかとなった。従って、本検討からも、決して抗酸化作用のみでプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの抗炎症作用を議論することはできないと考えられる。



次に、RAW264.7 細胞を用いて、抗酸化剤とプロリン C<sub>60</sub> (3)の抗酸化作用を先程と同様に、比較検討した(図 26)。その結果、いずれの抗酸化剤および、プロリン C<sub>60</sub> (3)作用群においても、ROS 産生量の抑制が認められた。特に、NAC、5-ASA、BHA いずれの作用群においても、プロリン C<sub>60</sub> (3)作用群と比較して、顕著に細胞内の ROS の産生が抑制された。一方で、腸管上皮細胞の検討と同様に 5-ASA 作用群においては、その作用濃度や作用時間依存的に、ROS の生成促進が認められた。すなわち、5-ASA は腸管上皮のみならず、マクロファージに対しても高濃度作用させることで、プロオキシダント作用を示す可能性が示された。次に、RAW264.7 細胞におけるプロリン C<sub>60</sub> (3)、NAC、5-ASA および、BHA の炎症性サイトカイン抑制能を、炎症性サイトカインである IL-6 や TNF- $\alpha$ の産生量を指標として評価した(図 27)。その結果、これまでの検討と同様に、LPS 刺激によって IL-6 産生が有意に増加したものの、プロリン C<sub>60</sub>(3)作用により、IL-6 の産生が抑制された。また、5-ASA や BHA を高濃度作用させることでも、IL-6 の産生抑制は認められたが、その抑制量はプロリン C<sub>60</sub> (3)よりも弱いものであった。また、TNF- $\alpha$ の産生量を評価した結果、これまでの検討と同様に、LPS 刺激によって TNF- $\alpha$ 産生が有意に増加すると共に、プロリン C<sub>60</sub>(3)作用により、TNF- $\alpha$ の産生が有意に上昇した。BHA を高濃度作用させた場合においても、TNF- $\alpha$ の産生上昇傾向が認められた。一方で、5-ASA は高濃度作用させることで、TNF- $\alpha$ の産生抑制傾向が認められた。従って、プロリン C<sub>60</sub> (3)は、抗酸化剤である NAC のみならず、BHA や炎症性腸疾患治療薬である 5-ASA よりも抗酸化作用は弱い一方で、強く IL-6 産生抑制能を示すことが明らかとなった。

以上の結果より、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、腸管上皮細胞やマクロファージにおいて、5-ASA や BHA などの NAC 以外の抗酸化作用をもつ物質と比較して、強く炎症性サイトカインの産生を抑

制することが明らかとなった。特に、炎症性腸疾患治療薬である 5-ASA と比較して、顕著に IL-8 や IL-6 の産生を抑制しており、プロオキシダント作用が見られなかったことから、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは炎症性腸疾患に対する有効な治療薬となり得る可能性がある。従って、本知見は、抗酸化作用のみに起因しないプロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの抗炎症作用の存在を、改めて強く示唆すると共に、抗酸化作用の面でも、プロオキシダント効果のない(副作用の少ない)炎症性腸疾患に対する有効な治療薬となり得る可能性が示された。

## 8. 各種プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの抗炎症メカニズムの基礎的解析

細胞内の ROS 生成系の主要な機序としては、ミトコンドリア電子伝達系における電子の漏出と、膜貫通型酵素 NADPH oxidase ファミリー分子の活性化による生成が挙げられ、近年では細胞内のシグナル伝達物質としての ROS に注目が集まっている。一方で ROS の過剰産生は、直接あるいは間接的に転写因子である NF- $\kappa$ B や AP-1 を活性化し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、炎症性サイトカインなどの刺激によって、活性化された細胞も、大量の ROS を放出する。従って、ROS の生成抑制(抗酸化作用)と炎症性サイトカイン産生抑制(抗炎症作用)を切り離して考えることは難しい。上述した通り我々は、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体が強力な抗酸化作用を示すと共に、抗酸化作用のみに起因するとは思えないほど、様々なサイトカインの産生を強く抑制する可能性があることを明らかとした。特に、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、強力な抗酸化作用を示した NAC や水酸化 C<sub>60</sub> フラーレンと比較して、顕著に炎症性サイトカインの産生を抑制した。従って、抗酸化作用に起因しない C<sub>60</sub> フラーレンの抗炎症メカニズムが想起されるが、これら薬効発現メカニズムは全く分かっていないのが現状である。

例えば、C<sub>60</sub> フラーレンは、その大きさから、

酵素活性部位にはまりこむことができる。Friedman らは、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体が、HIV プロテアーゼの酵素活性部位のポケットにはまりこむことで、HIV プロテアーゼを阻害し、抗 HIV 活性を示すことを報告している。また、我々の共同研究者である増野らのグループは、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンが HIV 逆転写酵素に結合し、そのタンパク構造を変化させることで、基質との結合を妨げ、抗 HIV 活性を示すことや C 型肝炎ウイルス RNA ポリメラーゼの阻害活性を示すことを見出している。従って、C<sub>60</sub> フラーレンが、抗酸化作用による抗炎症作用のみならず、プロテインキナーゼの ATP 結合部位あるいは調節サブユニットや調節領域に直接結合することで、プロテインキナーゼ阻害剤のように働き、サイトカインの産生を抑制する可能性も考えられる。そこで、C<sub>60</sub> フラーレンの抗炎症メカニズムを解明するための第一歩として、炎症刺激のシグナル分子である、MAPK などのリン酸化酵素に着目して解析した。

Mitogen-activated Protein Kinase(MAPK)は、真核生物に高度に保存されているセリン/スレオニンキナーゼであり、外界刺激を伝達するシグナル分子の一つであり、細胞増殖、分化、遺伝子発現、アポトーシスなどへの関与が明らかにされている。哺乳類では 4 つの MAPK ファミリー分子に分類されており(ERK1/2 (古典的 MAPK)、ERK5、JNK/SAPK、p38)、それぞれが独立したカスケードを形成していることが知られている。これら、MAPK ファミリーのリン酸化状態を解析することは、疾病の根本的なメカニズムにおけるシグナル分子の役割を理解するうえで、非常に重要であると考えられる。MAPK のうち ERK が細胞増殖因子の刺激などにより活性化するのに対し、p38 および、JNK はストレス応答性シグナルとして知られ、サイトカイン、紫外線照射、酸化などのストレスにより活性化されることが知られている。特に、Caco-2 細胞においては、IL-1 $\beta$ で刺激すると、p38 経路が活性化することが報告されている。

まず、Caco-2 細胞を IL-1 $\beta$ および、TNF- $\alpha$ で刺激した際の IL-8 の産生に、MAPK 経路が関与するのかを解析した。各 MAPK 阻害剤存在下で、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ を Caco-2 細胞に添加し、IL-8 の産生量を ELISA により評価した(図 28)。その結果、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ を Caco-2 細胞に単独で作用させた場合、有意な IL-8 量の増加が認められるのに対し、p38 阻害剤(SB203580)、JNK 阻害剤(SP600125) および、ERK1/2 阻害剤(U0126) いずれの作用条件下においても、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ 刺激による IL-8 量の増加は有意に抑制された。本結果より、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ は、p38、JNK、ERK1/2 を活性化し、IL-8 の産生を誘導することが明らかとなった。

次に、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体が炎症刺激時のリン酸化に及ぼす影響を評価するため、MAPK を含む各種キナーゼのリン酸化をリン酸化アレイにより、網羅的に解析した(図 29、30、31)。本アレイは図 29 に示すように、MAPK を含む 26 種類のセリン/スレオニンキナーゼに対する抗体を二重にメンブレンにスポットしてある。本検討では、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの中でも、これまでの検討で強く IL-8 の産生を抑制したプロリン C<sub>60</sub>(3)と C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> を使用した。その結果、Caco-2 細胞を IL-1 $\beta$ で 1 時間刺激することにより、リン酸化 CREB、JNK、p38 量の増加傾向が認められた。C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> を前処置してもこれらリン酸化の抑制は認められなかった一方で、プロリン C<sub>60</sub> (3)を前処置することで、リン酸化 CREB、JNK、p38 量の抑制傾向が認められた。また、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を前処置した群においてのみ、リン酸化 MSK-2 の増加傾向が認められ、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体作用により、MSK-2 が活性化している可能性が示唆された。以上の結果より、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンは、CREB、JNK、p38 のリン酸化の抑制、または、MSK-2 のリン酸化の増加を介して、Caco-2 細胞を IL-1 $\beta$ 刺激した際の IL-8 の産生を抑制している可能性が示された。

次に、異なる炎症性サイトカイン刺激における

各種キナーゼのリン酸化を調べるため、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を前処置した Caco-2 細胞を、TNF- $\alpha$  で刺激した。その結果、Caco-2 細胞を TNF- $\alpha$  で 1 時間刺激することにより、リン酸化 HSP27、JNK、p38 量の増加傾向、リン酸化 ERK、CREB 量の減少傾向が認められた。C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> を前処置してもこれらリン酸化の抑制は認められなかった一方で、プロリン C<sub>60</sub>(3) を前処置することで、HSP27、JNK、p38 のリン酸化が有意に抑制された。また、IL-1 $\beta$  で刺激した時と同様に、C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を作用させた群において、リン酸化 MSK-2 の増加傾向が認められた。以上の結果より、Caco-2 細胞を TNF- $\alpha$  で刺激した際の IL-8 産生抑制メカニズムに、HSP27、JNK、p38 のリン酸化の抑制、または、MSK-2 のリン酸化の促進が関与している可能性が示された。以上の結果から、プロリン型 C<sub>60</sub> フラーレンの IL-8 産生抑制メカニズムに MAPK である p38・JNK および、MSK-2 が関与している可能性が示された。

## E. 結論

本研究の目的は、C<sub>60</sub> フラーレンの腸管デリバリーの最適化に叶う「ナノ薬物送達システム (ナノ DDS)」を新規開発し、これを難治性炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎・クローン病) を標的とした、非侵襲的 (経口投与) で、しかも安全かつ有効な予防・治療戦略/技術の確立へと展開することである。さらに、本研究期間内に、医薬品化に向けたリード化合物となる DDS 化 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を新規創成したうえで、げっ歯類での有効性・安全性を評価し、本研究終了後に霊長類での前臨床試験を実施することを目指している。本年度は、当初計画を上回り、下記 1~6 について達成した。

1. C<sub>60</sub> フラーレンの問題点を克服可能な C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の創製 : C<sub>60</sub> フラーレンの医薬品化に向けては、分散性の向上や有効性・安全性のさらなる改善が必要となる。そこで、C<sub>60</sub> フラーレンの有用機能を損なうことなく分散性を改善で

きる 4 種類の水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体に加え、異性体が存在しない、もしくは分離可能であり、抗酸化・抗炎症活性を向上可能な 7 種類の官能基修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体 (メチルマロン酸修飾体やプロリン修飾体など) を創製した。

2. C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の物性・品質、有効性評価 : 1 の各種誘導体について、粒子径・凝集性といった物性を精査したうえで、抗酸化・抗炎症活性を *in vitro* で評価した。その結果、4 種類の水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体に関して、修飾水酸基数の違いにより、分散性や抗酸化・抗炎症活性が異なることを見出し、特に、水酸基が 36 個付与された水酸化 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体 (C<sub>60</sub>OH<sub>36</sub>) が、分散性や抗酸化・抗炎症活性に優れることを明らかとした。さらに、我々の検討で、これまで最も強い抗炎症活性を有していた C<sub>60</sub>OH<sub>36</sub> よりも、20 倍以上も強い抗炎症活性を有するプロリン修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を見出した。本知見に関して、平成 25 年 2 月 19 日 (火) に特許出願した (特願 2013-030455)

3. C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の安全性評価 : C<sub>60</sub> フラーレン誘導体 (C<sub>60</sub>OH<sub>36</sub> など) の経口投与・静脈内投与における一般毒性試験を実施した。単回投与であるものの、静脈内投与により、臓器毒性が誘発されない最高投与量は 1.25 mg/マウスであることを明らかとした。また、1 週間連続経口投与試験により、炎症性腸疾患に対して治療効果を発揮し得る投与量 (1.25 mg/マウス) において、一般毒性を誘発せず、安全に使用可能であることが示された。さらに、コメットアッセイによる遺伝毒性試験の結果、抗炎症活性を発揮可能な約 10 倍の作用量においても、全く遺伝毒性を誘発しないことを明らかとした。

4. 抗炎症メカニズムの検討 : C<sub>60</sub> フラーレンの抗炎症メカニズムについて、次年度計画を前倒し、最も強い抗炎症活性を有するプロリン修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を用いて検討した。その結果、プロリン修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体は、汎用されている NAC などの抗酸化剤と同等以上の抗酸化活

性を有することを見出した。さらに、腸管上皮細胞や免疫細胞を炎症刺激した際に産生されるサイトカイン産生を指標に抗炎症活性を評価したところ、NACをはじめとする抗酸化剤では全くサイトカイン産生が抑制されないにも関わらず、プロリン修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体は顕著なサイトカイン産生抑制効果を示した。また、シグナル伝達分子の活性化を網羅的に評価したところ、プロリン修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体により、MAP キナーゼの活性化が抑制されることが判明した。以上の結果から、プロリン修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体は、MAP キナーゼの活性化抑制を介して、抗酸化活性非依存的に抗炎症活性を示す可能性が明らかとなった。

5. 体内動態評価（大島・青島の分担報告書を参照）：C<sub>60</sub> フラーレンの体内動態評価に向け、次年度計画を前倒し、リチウム内包 C<sub>60</sub> フラーレンと RI 標識 C<sub>60</sub> フラーレンの創製に成功した。また、プロリン修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体について、LC-MS により定量的に検出し得ることを明らかとした。なお、LC-MS により、プロリン修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の異性体を分離可能であることも明らかとした。

6. DDS 化 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の創製（大島・青島の分担報告書を参照）：次年度計画を前倒し、水溶性や大腸送達性を改善可能なグルコース修飾 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の創製に成功した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

Yamashita K, Yoshioka Y, Pan H, Taira M, Ogura T, Nagano T, Aoyama M, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda SI, Aoshima H, Nabeshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y. Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone-wrapped fullerene C<sub>60</sub>

after oral administration. Pharmazie. 68(1): 54-7, 2013.

### ② 学会発表

#### 【シンポジウム等：合計 4 件】

1. 堤 康央：薬学への誘い ～安全と安心について～, 三丘カレッジ, 堺（大阪）, 2012 年 6 月.
2. 堤 康央：創薬は何故難しいか., 大阪大学トランスプロフェッショナル・リテラシー科研:第3回拡大ワークショップ., 吹田(大阪), 2012 年 7 月.
3. 堤 康央：ナノマテリアルの開発動向と安全性評価., 『ナノバイオテクノロジーの開発と標準化』, 東京（東京）, 2013 年 2 月.
4. 堤 康央：Conclusion ～Sustainable Nanotechnology に向けて～., 日本薬学会第 133 年会., 横浜（神奈川）, 2013 年 3 月.

#### 【国内学会発表：合計 7 件】

1. 山下浩平, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 小椋健正, 平 茉由, 青山道彦, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央：水酸化フラーレンの安全性確保に向けた経口投与時の生体影響評価., 第 39 回日本毒性学会学術年会., 仙台（宮城）, 2012 年 7 月.
2. 平 茉由, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 山下浩平, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 吉川友章, 堤 康央：水酸化フラーレンのナノ安全科学評価と経口サブナノ医薬への展開 1～in vitro における抗炎症作用の評価～., 第 28 回日本 DDS 学会学術集会., 札幌（北海道）, 2012 年 7 月.
3. 青山道彦, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 山下浩平, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 吉川友章, 堤 康央：水酸化フラーレンのナノ安全科学評価と経口サブナノ医薬への展開 2～炎症性腸疾患に対する治療効果の検討