

Caco-2 cells.

	Proline (1)'	Proline C ₆₀ (1)	Proline C ₆₀ (2)	Proline C ₆₀ (3)	Proline C ₆₀ (4)	C ₆₀ (OH) ₃₆	C ₆₀	NAC
Cytotoxicity	—	—	—	—	—	—	—	—
Antioxidant effect	—	+	+	++	++	+++	—	+++
IL-8	→	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	→	↓

RAW cells.

	Proline (1)'	Proline C ₆₀ (1)	Proline C ₆₀ (2)	Proline C ₆₀ (3)	Proline C ₆₀ (4)	C ₆₀ (OH) ₃₆	C ₆₀	NAC
Cytotoxicity	—	—	—	—	+	—	—	—
Antioxidant effect	→	+	++	++	++	+++	+	+++
IL-6	→	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓	↓	→
TNF-α	→	↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑	→	→
IL-1β	→	↓	↓	↓	↓	→	→	↑
IFN-β	→	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓	↓	→
IP-10	→	↓	↓	↓	→	→	→	→

Fig 22. The cytotoxicity, antioxidant effect and anti-inflammatory effect of proline-modified fullerene C₆₀ derivatives in the Caco-2 cells and RAW264.7 cells.

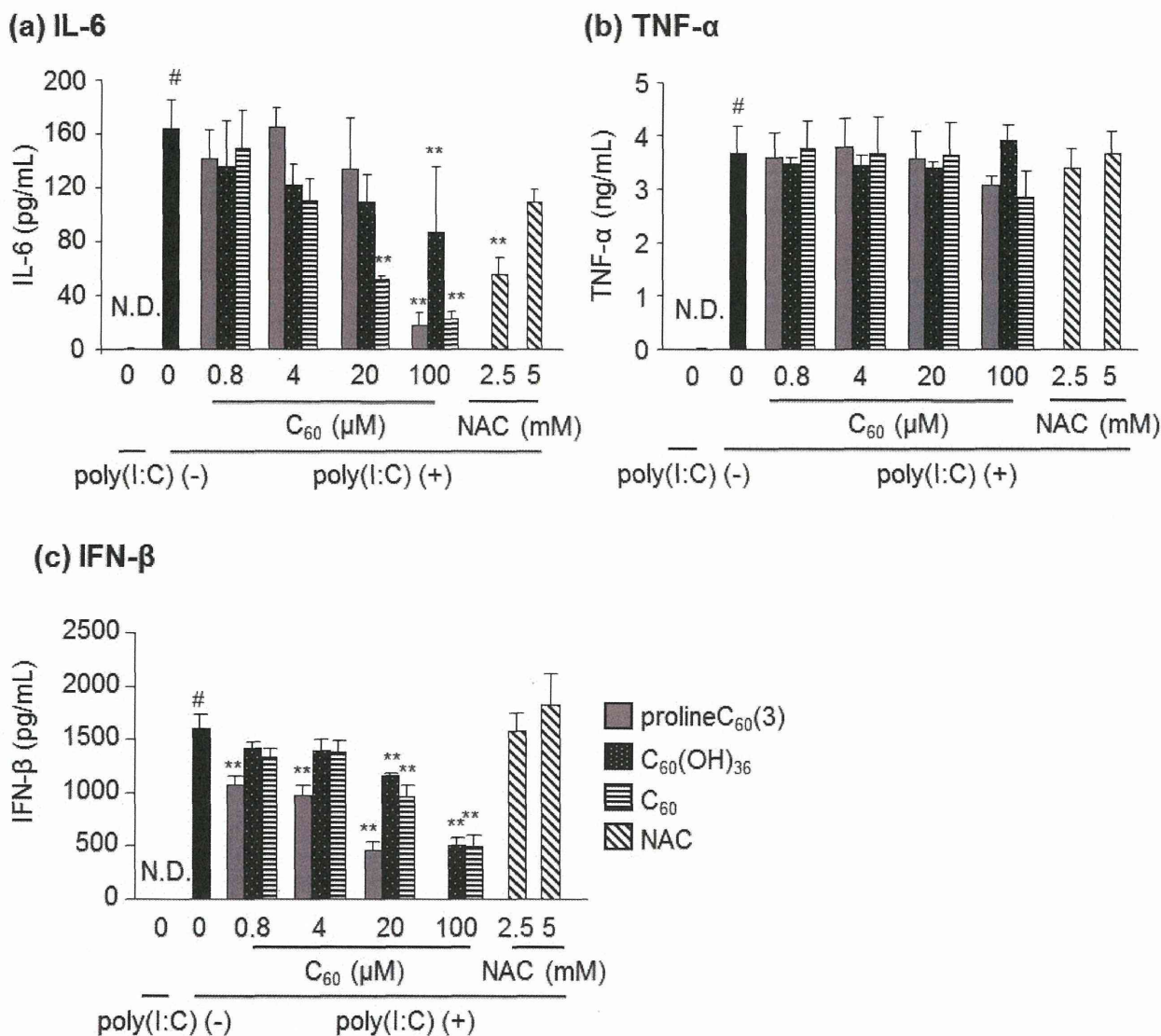


Fig 23. Inhibitory effects or cytotoxicity of proline-modified fullerene C₆₀ derivatives on poly(I:C)-induced IL-6, TNF- α or IFN- β secretion in the RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with proline C₆₀(3), C₆₀(OH)₃₆, C₆₀ or NAC for 30 min, and then, stimulated with poly(I:C) (20 μ g/ml) for 24 h. Secreted IL-6 (a), TNF- α (b) or IFN- β (c) protein level in the culture supernatant was measured by IL-6, TNF- α or IFN- β or ELISA kit. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n = 4; #*P* < 0.01 versus value for control group by Bonferroni ; ***P* < 0.01, **P* < 0.05 versus value for poly(I:C) group by Bonferroni)

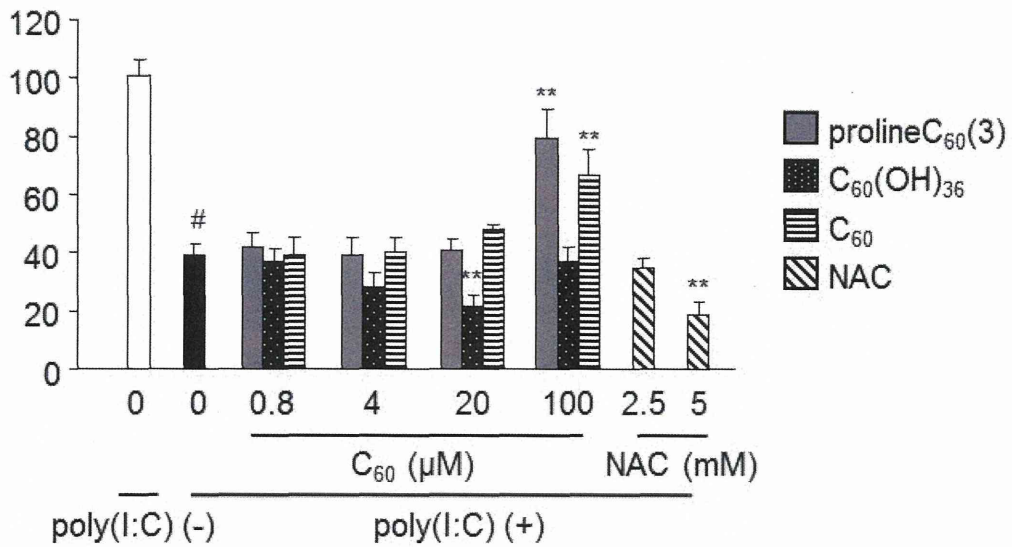
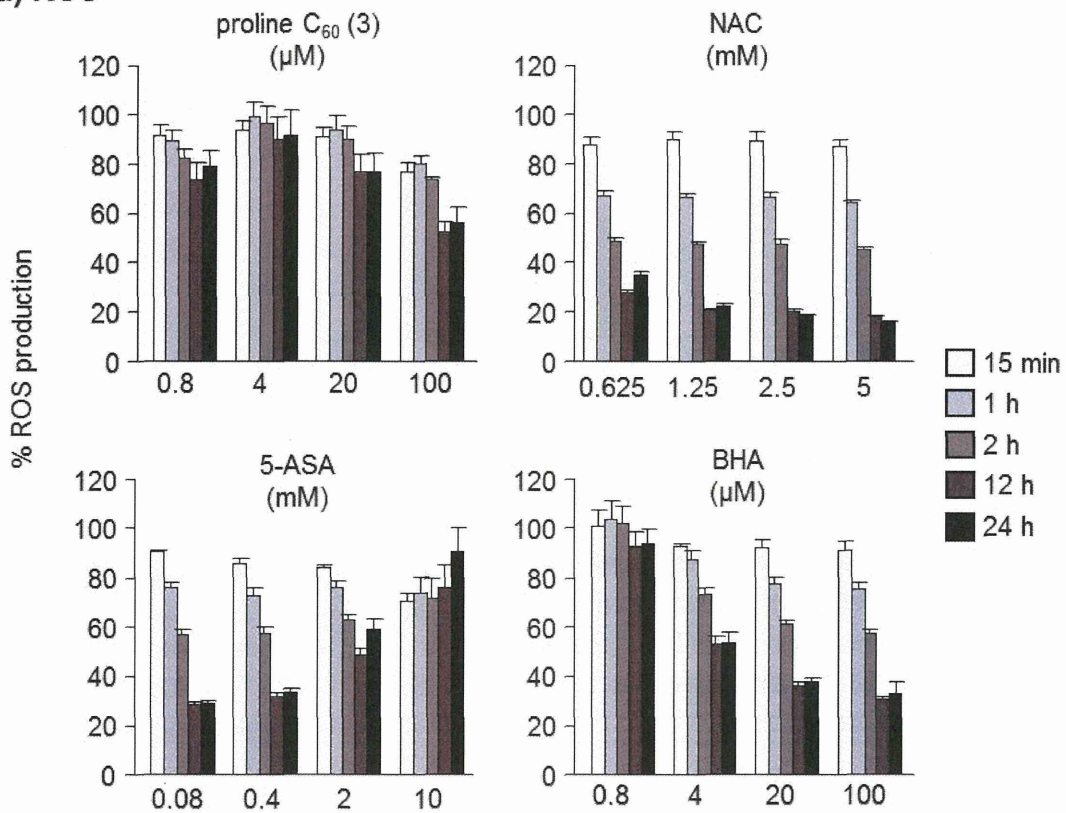


Fig 24. Cytotoxicity of proline-modified fullerene C₆₀ derivatives in the RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with proline C₆₀(3), C₆₀(OH)₃₆, C₆₀ or NAC for 30 min, and then, stimulated with poly(I:C) (20 μg/ml) for 24 h. Cell viabilities were assessed by LDH Assay kit. Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 4; #P < 0.01 versus value for control group by Bonferroni ; **P < 0.01, *P < 0.05 versus value for poly(I:C) group by Bonferroni)

(a) ROS



(b) IL-8

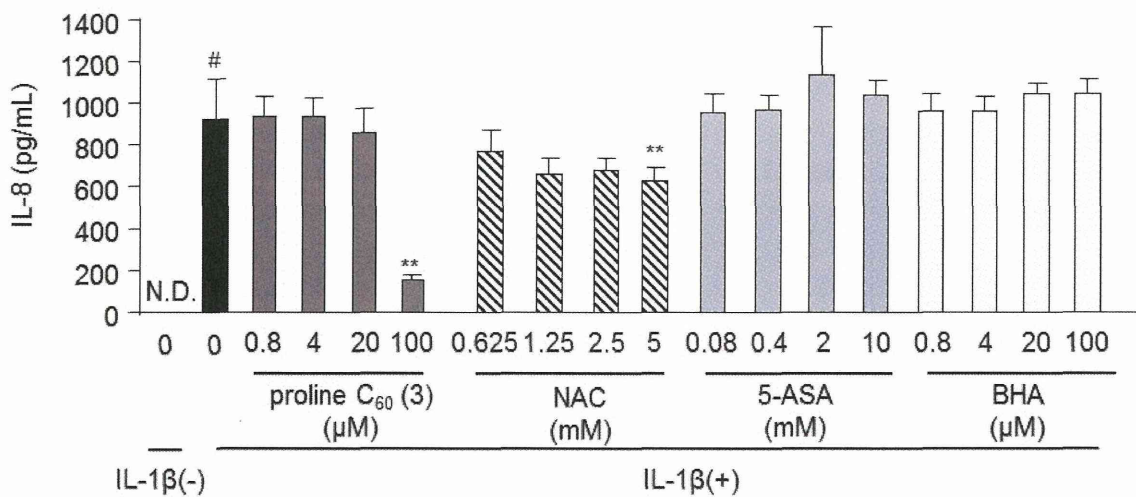


Fig 25. Inhibitory effects of proline-modified fullerene C₆₀ derivatives and antioxidants on intracellular ROS production and IL-1β-induced IL-8 secretion in the Caco-2 cells. Intracellular ROS production was measured as DCF-fluorescence intensity. Caco-2 cells were treated with 20 μM of DCFH-DA for 20 min then treated with proline C₆₀(3), NAC, 5-ASA or BHA for 15 min, 1h, 2h, 12h or 24h(a). Caco-2 cells were treated with proline C₆₀(3), NAC, 5-ASA or BHA for 30 min, and then, stimulated with IL-1β(125 ng/ml) for 24 h. Secreted IL-8 (b) protein level in the culture supernatant was measured by IL-8 ELISA kit. Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 4; [#]P < 0.05 versus value for control group by Bonferroni ; ^{**}P < 0.01, *P < 0.05 versus value for IL-1β group by Bonferroni)

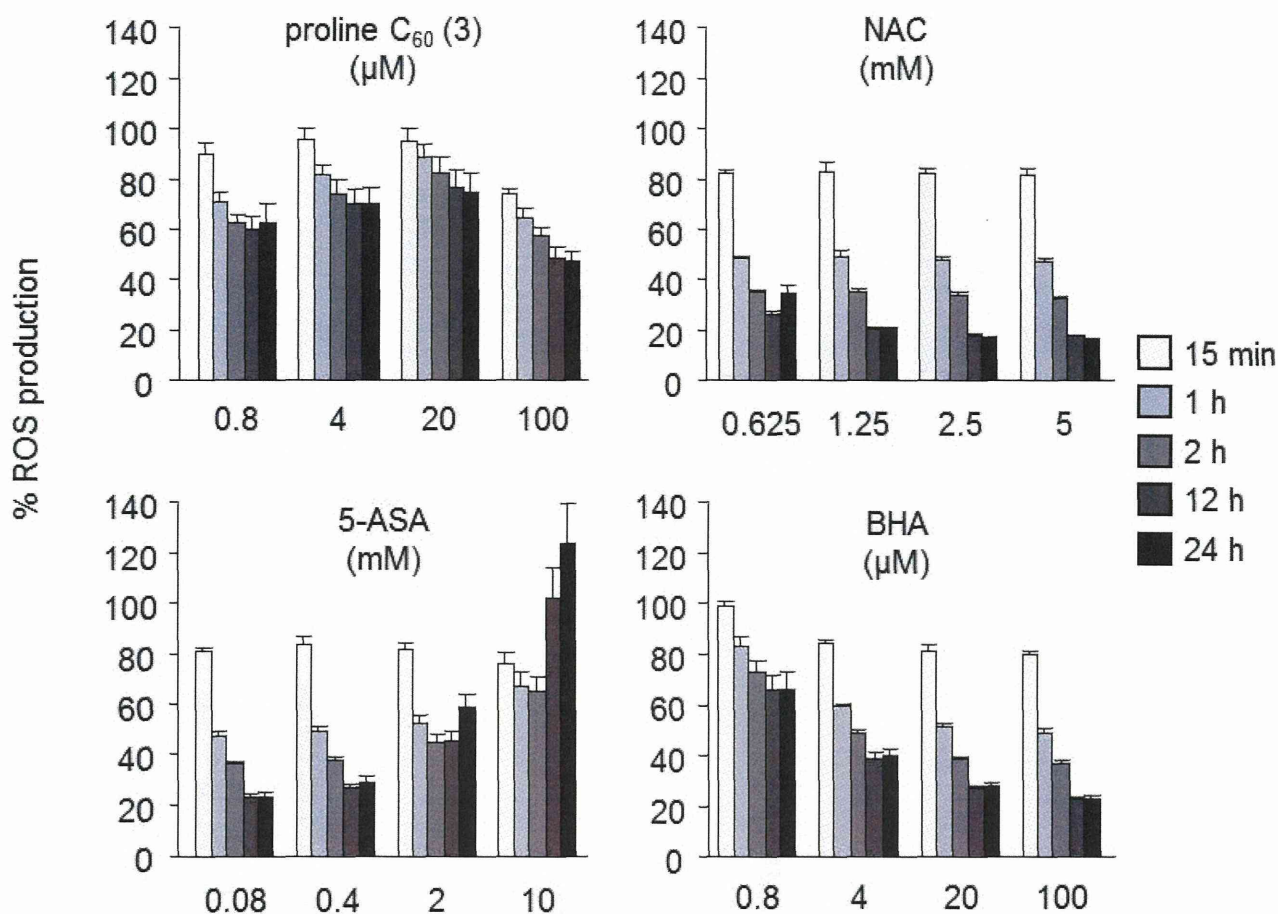


Fig 26. Inhibitory effects of proline-modified fullerene C₆₀ derivatives on intracellular ROS production in the RAW264.7 cells. Intracellular ROS production was measured as DCF-fluorescence intensity. RAW264.7 cells were treated with 20 μM of DCFH-DA for 20 min then treated with proline C₆₀(3), NAC, 5-ASA or BHA for 15 min, 1h, 2h, 12h or 24h. Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 4; #P < 0.01 versus value for control group by Bonferroni ; **P < 0.01, *P < 0.05 versus value for LPS group by Bonferroni)

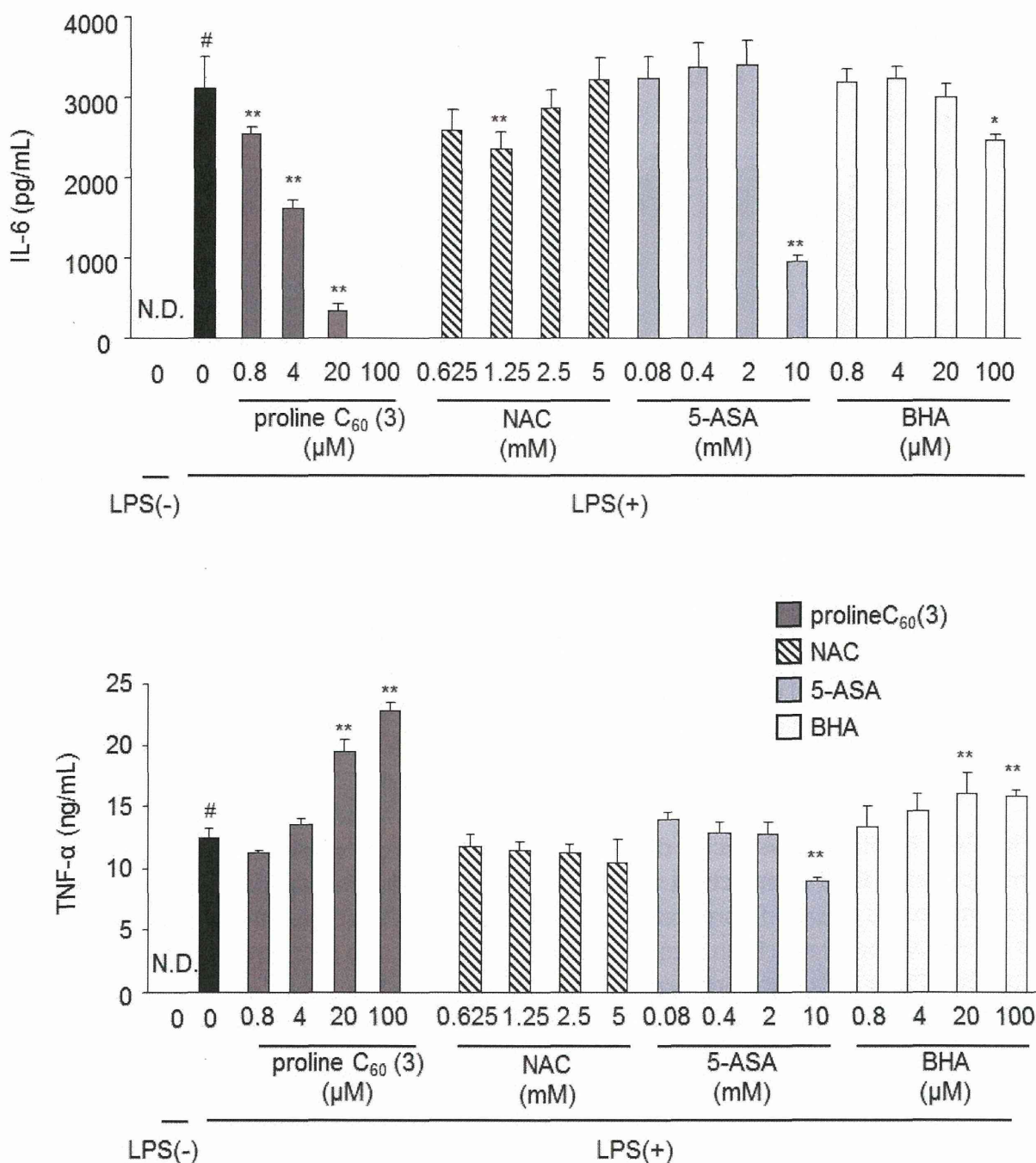


Fig 27. Inhibitory effects of proline-modified fullerene C₆₀ derivatives on LPS-induced IL-6 or TNF-α secretion in the RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with proline C₆₀(3), NAC, 5-ASA or BHA for 30 min, and then, stimulated with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Secreted IL-6 or TNF-α protein level in the culture supernatant was measured by IL-6 or TNF-α ELISA kit. Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 4; #P < 0.01 versus value for control group by Bonferroni ; **P < 0.01, *P < 0.05 versus value for LPS group by Bonferroni)

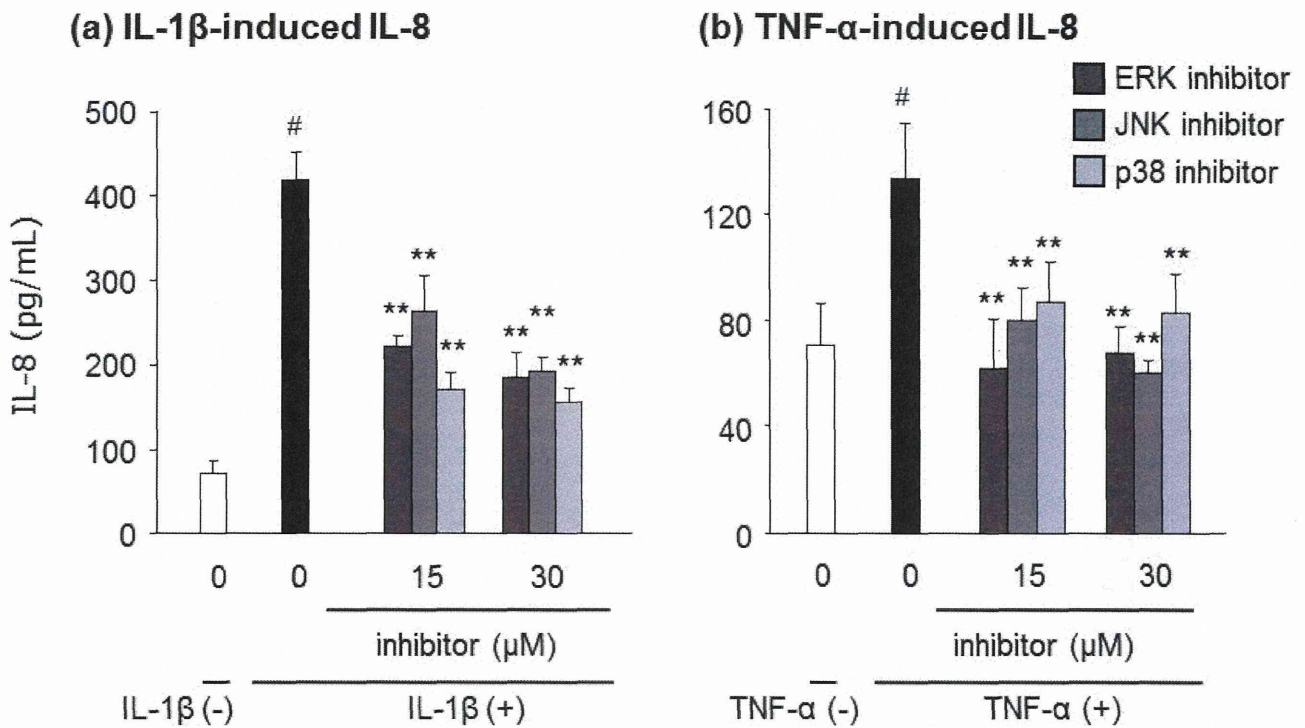


Fig 28. Inhibitory effects of MAPK inhibitor IL-1 β or TNF- α -induced IL-8 secretion in the Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with ERK inhibitor (μ 0126), JNK inhibitor (SP600125) or p38 inhibitor (SB203580) for 30 min, and then, stimulated with IL-1 β (125 ng/mL) (a) or TNF- α (10 ng/ml) (b) for 6 h. Secreted IL-8 protein level in the culture supernatant was measured by IL-8 ELISA kit. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n = 4; [#]*P* < 0.01 versus value for control group by Bonferroni ; ^{**}*P* < 0.01 versus value for IL-1 β group by Bonferroni)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
A																							
B																							
C																							
D																							
E																							
F																							

Coordinate	Target/Control	Alternative Nomenclature	Phosphorylation Site Detected
A1, A2	Reference Spots	—	—
A21, A22	Reference Spots	—	—
B3, B4	Akt1	PKB α , RAC α	S473
B5, B6	Akt2	PKB β , RAC β	S474
B7, B8	Akt3	PKB γ , RAC γ	S472
B9, B10	Akt pan	—	S473, S474, S472
B11, B12	CREB	—	S133
B13, B14	ERK1	MAPK3, p44 MAPK	T202/Y204
B15, B16	ERK2	MAPK1, p42 MAPK	T185/Y187
B17, B18	GSK-3 α/β	GSK3A/GSK3B	S21/S9
B19, B20	GSK-3 β	GSK3B	S9
C3, C4	HSP27	HSPB1, SRP27	S78/S82
C5, C6	JNK1	MAPK8, SAPK1 γ	T183/Y185
C7, C8	JNK2	MAPK9, SAPK1 α	T183/Y185
C9, C10	JNK3	MAPK10, SAPK1 β	T221/Y223
C11, C12	JNK pan	—	T183/Y185, T221/Y223
C13, C14	MKK3	MEK3, MAPK2K3	S218/T222
C15, C16	MKK6	MEK6, MAPK2K6	S207/T211
C17, C18	MSK2	RSK β , RPS6KA4	S360
D3, D4	p38 α	MAPK14, SAPK2A, CSBP1	T180/Y182
D5, D6	p38 β	MAPK11, SAPK2B, p38-2	T180/Y182
D7, D8	p38 δ	MAPK13, SAPK4	T180/Y182
D9, D10	p38 γ	MAPK12, SAPK3, ERK6	T183/Y185
D11, D12	p53	—	S46
D13, D14	p70 S6 Kinase	S6K1, p70 α , RPS6KB1	T421/S424
D15, D16	RSK1	MAPKAPK1 α , RPS6KA1	S380
D17, D18	RSK2	ISPK-1, RPS6KA3	S386
D19, D20	TOR	—	S2448
E19, E20	PBS	Control(-)	—
F1, F2	Reference Spots	—	—

Fig 29. The Human-Phospho-MAPK Array coordinates.

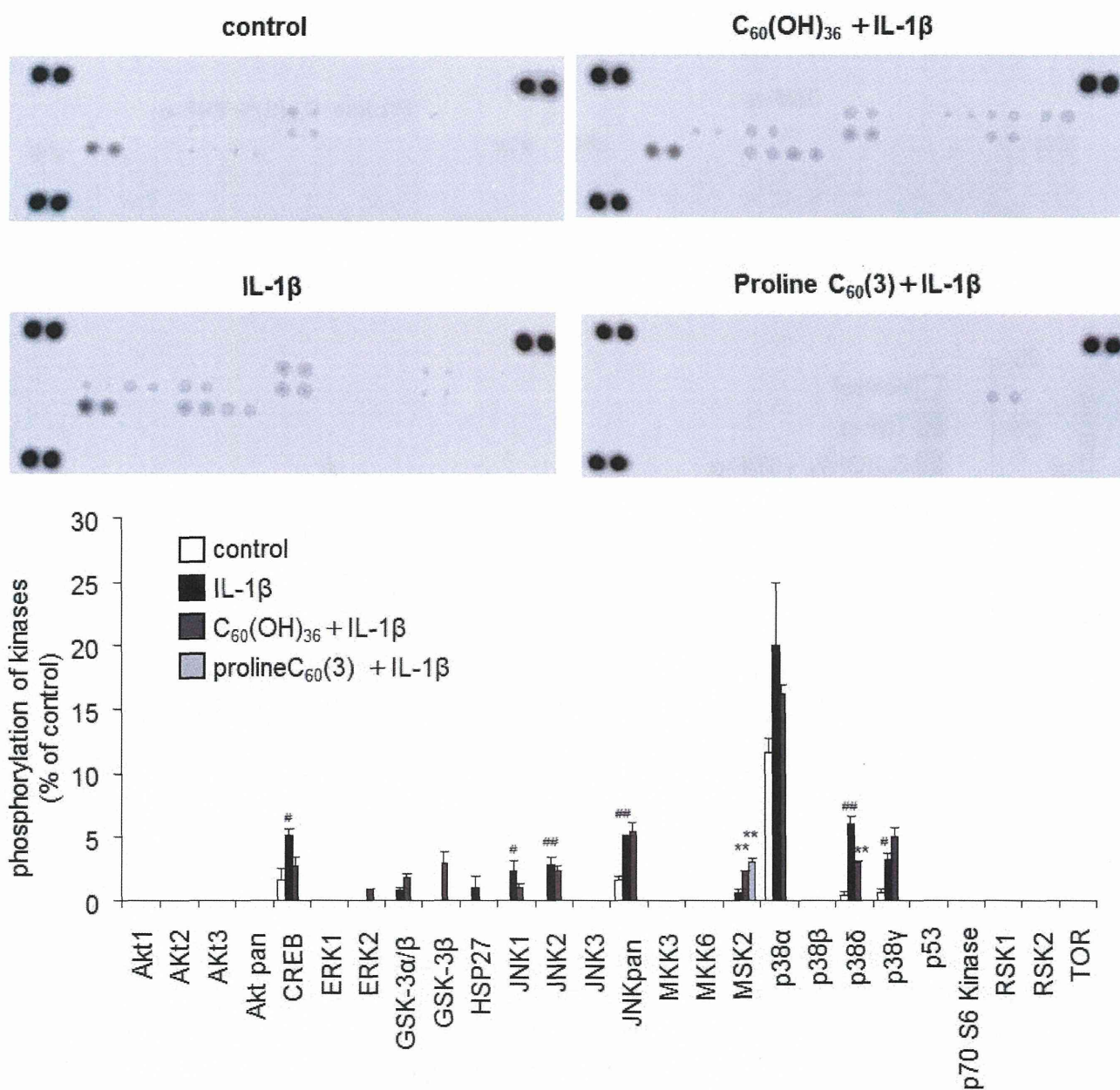


Fig 30. Inhibitory effects of proline-modified fullerene C_{60} derivatives on phosphorylation of various kinases in the caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with $C_{60}(OH)_{36}$ or proline C_{60} (3) for 30 min, and then, stimulated with $IL-1\beta$ (125 ng/ml) for 1 h. The whole-cell lysate was analyzed by array kit of phosphorylation for phosphorylated various kinase. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n = 4; # P < 0.01 versus value for control group by Bonferroni ; ** P < 0.01, * P < 0.05 versus value for $IL-1\beta$ group by Bonferroni)

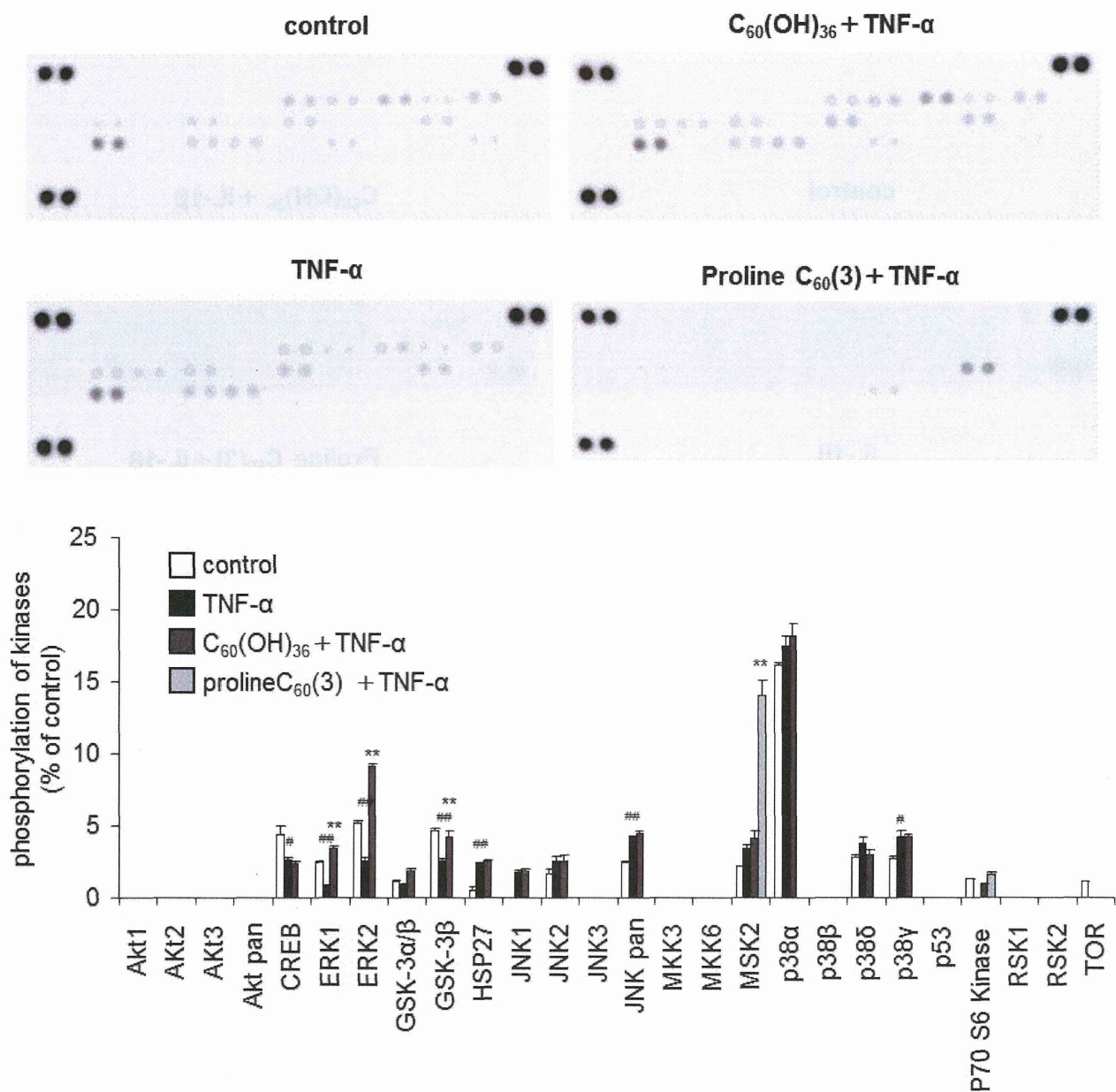


Fig 31. Inhibitory effects of proline-modified fullerene C_{60} derivatives on phosphorylation of various kinase in the caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with $C_{60}(OH)_{36}$ or proline C_{60} (3) for 30 min, and then, stimulated with $TNF-\alpha$ (10 ng/ml) for 1 h. The whole-cell lysate was analyzed by array kit of phosphorylation for phosphorylated various kinase. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n = 4; # P < 0.01 versus value for control group by Bonferroni ; ** P < 0.01, * P < 0.05 versus value for IL-1 β group by Bonferroni)

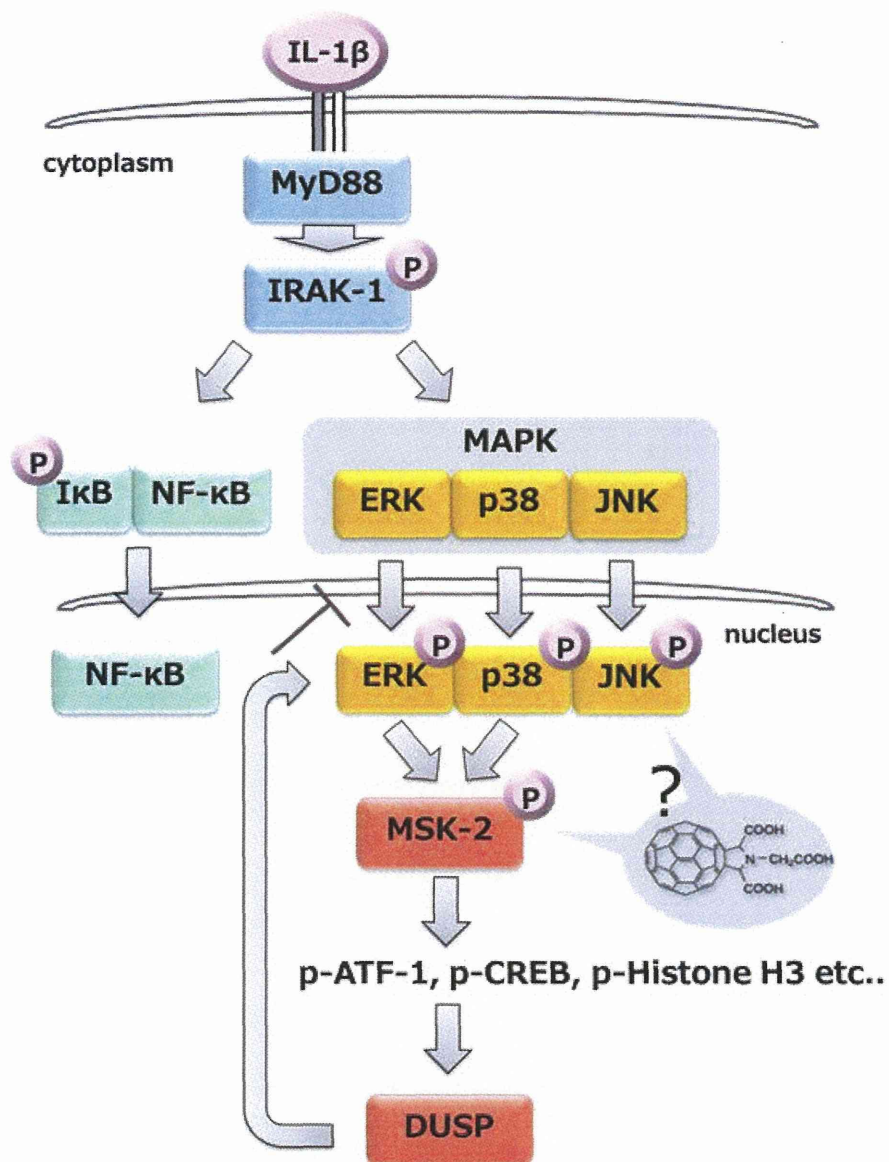


Fig 32. A prospective model of proline-modified fullerene C₆₀ derivatives on IL-1β-induced IL-8 secretion in the Caco-2 cells.

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

研究分担者 大島 巧 大阪大学大学院工学研究科

研究要旨

これまでに我々は、独自に開発した、水溶性の高い水酸化 C₆₀ フラーレン C₆₀(OH)₃₆ の経口投与が、炎症性腸疾患モデルマウスにおいて、顕著な治療効果を発揮することを明らかとしている（特願 2011-231446）。一方で、今後、C₆₀ フラーレンをナノ医薬として開発していくためには、①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の開発、②医用工学的に C₆₀ 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、③DDS 化 C₆₀ フラーレンの体内吸収性や体内動態といった ADME 情報の収集が必要不可欠となる。そこで本研究では、上記①②③の克服に向けた下記の取り組みを実施した。

水酸化 C₆₀ フラーレンに DDS 機能が期待されるグルコース部位を導入する目的で、前駆体フラーレン誘導体に α-D-グルコースを様々な条件下で反応させた結果、グルコースがいくつか導入されたグルコース修飾水酸化 C₆₀ フラーレン誘導体を得ることに成功した。

β-カロテン退色法を用い、種々水酸基数の異なる水酸化 C₆₀ フラーレンについて、ロット間でのばらつきや劣化に注目しながら抗酸化能（ラジカル捕捉能）を評価した。その結果、抗酸化メカニズムは、水酸基数の数によって異なることを明らかにした。また、興味深いことに、水酸化 C₆₀ フラーレンの 120℃までの加熱では抗酸化能が徐々に減少し、それ以上の温度での加熱では逆に向上し、最終的に 190℃以上の高温加熱では未加熱時の抗酸化能を上回ることを見出した。

フラーレン専用 HPLC カラムとして知られる Buckyprep カラムを用い、プロリン誘導体の HPLC 分析条件を確立することができた。これにより、この誘導体の体内動態が追跡可能となった。

リチウムをプローブとして体内動態の追跡が可能なりチウム内包水酸化 C₆₀ フラーレンを合成した。⁷Li NMR では内包 Li⁺ のピークを低磁場領域に観測した。I G 法を用いて粒径分布を調べたところ、DMSO 中では分子サイズにほぼ等しい約 1 nm 程度で分散していた。HPLC 分析では、C₆₀(OH)₁₂ とは大きく異なり、異性体が少ないことがわかった。これは、内包リチウムの影響により生じるフラーレンカチオン中間体が異なるため、位置選択的に反応が進行したためであると考察された。

新規 58n 系フラーレン誘導体の創出を目指し、Diels-Alder 反応により簡便に得られるシクロヘキサノン誘導体を合成中間体としてさらにアセタール化を行い、非環状ならびに環状アセタール誘導体を計 6 種類合成した。また、アジドとの 1,3-双極子付加反応では、トリアゾリノ誘導体ならびに続く酸触媒によるアジリジノ誘導体をそれぞれ 6 種類ずつ合成した。

A. 研究目的

C₆₀ フラーレンは、高度に広がった球状パイ共役電子構造を有するナノサイズの炭素材料であり、様々なラジカル種と高い反応性を示すことが

知られている。一方、活性酸素種と呼ばれる酸素ラジカル種は、外部刺激等により人体の内部においても発生し、種々の病気の原因に関連していると考えられている。そこで、C₆₀ フラーレンを親

水化して生体適合性を付与したうえで、DDS 機能を導入できれば、有用なナノ DDS 医薬としての応用が大いに期待される。

これまでの研究において、我々のグループが開発した水溶性の高い水酸化 C₆₀ フラーレン C₆₀(OH)₃₆ の経口投与が、炎症性腸疾患モデルマウスにおいて、治療効果を発揮することを明らかにしている(特願 2011-231446)。一方で、今後、C₆₀ フラーレンをナノ医薬として開発していくためには、①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の開発、②医用工学的に C₆₀ 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、③DDS 化 C₆₀ フラーレンの体内吸収性や体内動態といった ADME 情報の収集が必要不可欠となる。

そこで本研究では、この水酸化 C₆₀ フラーレンの改良および医用工学的に化学修飾した新規 C₆₀ フラーレン誘導体を開発すると共に、その抗酸化能の評価、体内動態評価を目指し、以下の 5 つの項目についてそれぞれ検討した。

B. 研究方法

1. 水酸化 C₆₀ フラーレンの DDS 化

1.1. C₆₀ のシクロ硫酸エステル化

30 mL ナスフラスコに C₆₀ を 200 mg 投じ、30% 発煙硫酸 10 mL を加えて窒素雰囲気下、60 °C で 24 時間攪拌した。室温まで放冷した後、赤褐色の反応液を氷浴中のジエチルエーテルに滴下した。遠心分離により得た固体をジエチルエーテルで洗浄し、真空乾燥することでシクロ硫酸エステル化フララーレン CS を赤橙色固体として 339 mg 得た。

1.2. グルコースの導入

100 mL ナスフラスコに上記で合成した CS (339 mg) と α-D-グルコース (942 mg、20 当量) を

投じ、dryDMF (20 mL) を加えて窒素雰囲気下、室温で攪拌した。7 日後、溶媒を留去したところへ水 (20 mL) を加え、遠心分離により褐色固体を取り出したあと、THF (20 mL) で抽出を行った。溶媒を留去し、ペンタンおよびジエチルエーテルで洗浄を行い、真空乾燥することでグルコース化水酸化フララーレン **3** を褐色固体として 162 mg 得た。

2. β-カロテン退色法による抗酸化能評価

2.1. β-カロテン退色法

Tween40 (200 mg/mL)、β-カロテン (1 mg/mL)、リノール酸 (100 mg/mL) のクロロホルム溶液を調製し、冷凍庫に保存した。サンプル溶液は、250 μM の水溶液となるよう調製した。C₆₀(OH)₁₀ の場合は水に不溶なため、同濃度の DMSO 溶液を調製した(サンプル量は β-カロテンに対して 1.2 当量)。UV 用石英セルに Tween40、β-カロテン、リノール酸溶液をそれぞれ 22 μL、11 μL、8.8 μL 加え混合した後、減圧下にてクロロホルムを留去した。これに、サンプル溶液 0.5 mL およびリン酸緩衝溶液 (pH = 6.93) 2.0 mL を加え、50 °C に保ちながら、460 nm における吸光度の時間変化を測定した。解析の際、サンプル物質由来の吸光度を差し引いた後に、擬一次速度定数 k_{obs} の値を算出した。

3. プロリン誘導体の HPLC 分析

以下の分析条件を用いてプロリン誘導体の HPLC 分析を行った。

カラム: Buckyprep-M (4.6 φ × 250 mm)

移動相: 0.1% TFA-DMF/Methanol = 1/1

流速: 1.0 mL/min

カラム温度: 40 °C

検出器: UV 310 nm

サンプル溶液: 0.1% TFA-DMF

サンプル濃度: 0.1 wt%

4. リチウム内包水酸化フララーレンの合成

4.1. Li⁺@C₆₀O⁻(OH)₇ の合成

[Li⁺@C₆₀](PF₆⁻) (10 mg) に 30% 発煙硫酸 (0.5 mL) を加え、アルゴン雰囲気下、60 °C で 48 時

間反応させた。反応後、室温まで放冷し、氷冷したジエチルエーテル (100 mL) 中に投じて橙褐色固体を得た。得られた固体をジエチルエーテル (約 10 mL) で 3 回洗浄し、30°C で 3 時間真空乾燥させた。この固体を水 (3 mL) 中に投じ、70°C で 48 時間攪拌した。反応後、室温まで冷却した後、濾過にて固体を回収し、濾液が中性になるまで水で洗浄した。さらに、アセトニトリルおよびジエチルエーテル (約 40 mL) でそれぞれ 3 回ずつ洗浄した後、40°C で 24 時間真空乾燥させ、目的化合物を褐色粉末として 9.2 mg 得た (収率 83%)。

5. 新規 58n 系フラレーンの合成

5.1. アセタール化フラレーン 3b の合成

文献既知の方法により合成した 1,2-(4'-オキシシクロヘキサノ)[60]フラレーン (100 mg) を *o*-ジクロロベンゼン/THF の 1:1 混合溶媒 (20 mL) に溶解させ、1,3-プロパンジオール (2 mL) ならびに TiCl_4 (300 μL , 22 当量) を加え、アルゴン雰囲気下、室温にて 20 時間攪拌した。トリエチルアミン (500 μL) 加えて反応を止め、水で洗浄後、溶媒を減圧下で留去した後、得られた固体はシリカゲルクロマトグラフィにより精製し、目的のアセタール化フラレーンを褐色固体として 77 mg 得た (収率 65%)。

5.2. アジリジノ化フラレーンの合成

C_{60} (100 mg) を *o*-ジクロロベンゼン (20 mL) に溶解させ、アルキアルアジド溶液 (10 当量) を加えて室温または 50~60°C で 12~96 時間攪拌した。反応後、飽和食塩水で 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。得られた固体はシリカゲルクロマトグラフィにより精製し、トリアゾリノ化フラレーンを 30~40% の収率で与えた。

このトリアゾリノ化フラレーンの *o*-ジクロロベンゼン (20~30 mL) 溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸または BF_3 エーテル錯塩 (0.1~1 当量) を加え、0.1~24 時間攪拌した。炭酸水素ナトリウム水溶液でクエンチした後、飽和食塩水

で 3 回洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた固体はシリカゲルクロマトグラフィにより精製し、アジリジノ化フラレーンを 95% 以上の収率で与えた。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. 水酸化 C_{60} フラレーンの DDS 化

高い水溶性を有し、凝集せずに分子サイズのまま水に分散可能な C_{60} フラレーン誘導体として、我々のグループではこれまでに水酸化 C_{60} フラレーン $\text{C}_{60}(\text{OH})_{36}$ ならびに $\text{C}_{60}(\text{OH})_{44}$ を開発してきた。これまでの予備的な研究で、これらの水酸化 C_{60} フラレーンが炎症性腸疾患モデルマウスに対して、抗炎症効果を発揮することを明らかとしている。そこで、治療効果の増大を目的に、腸管からの吸収を促進する糖を水酸化 C_{60} フラレーンに結合させた DDS 化水酸化 C_{60} フラレーンの合成を試みた。

水酸化 C_{60} フラレーン $\text{C}_{60}(\text{OH})_{12}$ (1) にグルコース部位を導入するため、その前駆体である $\text{C}_{60}(\text{OSO}_3)_6$ (CS) に α -D-グルコース (Glc) を様々な条件下で反応させた (図 1)。反応溶媒を検討した結果、DMF 中、室温で攪拌することにより、1 時間で CS、Glc ともに溶解した。さらに 7 日間反応を継続させ、水を用いた洗浄により残留 Glc を除去し、粗生成物を得た。粗生成物を NMR で解析したところ、 ^1H NMR スペクトルにおいて、ピラノース環のプロトンが観察されたことから、Glc の導入が確認できた (図 2A)。また、1 位の水酸基のピークが消失していたことから、Glc の 5 つの水酸基のなかで最も酸性度の高い 1 位のものが CS 部位に求核攻撃したと予想された。

また、IR スペクトルは水酸化フラレーンの特徴をよく表しており、さらに異なるピークも出現していることから、分子内に水酸基とグルコース部位の両方を有する C_{60} フラレーン誘導体が合成されたという結果を支持した (図 2B)。元素分析

の結果は、若干の窒素分が検出されたことより、溶媒として用いた DMF が幾分残っていることが示唆された (図 2C)。その結果、 $C_{60}(OH)_6(OGlc)_6$ もしくは $C_{60}(OH)_{11}(OGlc)_9$ と同定される新規グルコース修飾水酸化フラーレン誘導体を得ることができた。一方で今後、さらなる精製検討の必要があると考えられる。

2. β -カロテン退色法による抗酸化能評価

C_{60} フラーレン誘導体の抗炎症活性は、抗酸化能 (ラジカル捕捉能) に一部由来すると考えられる。そこで、水酸化 C_{60} フラーレンの過酸化脂質ラジカルに対する抗酸化能について、これまでに確立している、化学的手法を用いた β -カロテン退色法を用いて評価した。水酸基数、合成ロットの違いによるばらつき、加熱劣化による物性変化の3点に着目し、それぞれのサンプルについて抗酸化能を測定した。

種々水酸基数の異なる水酸化 C_{60} フラーレンについて、抗酸化能 (%AOA) を評価した (図 3)。その結果、水酸基数が 12 と 44 の水酸化 C_{60} フラーレンにおいて、抗酸化能の極大値が見られた。一般的に、 C_{60} フラーレンの抗酸化能 (ラジカル捕捉能) は、 C_{60} フラーレンの高度なパイ共役に由来すると考えられている。すなわち、二重結合が多数残っている、水酸基数の少ない誘導体のほうが、高い抗酸化能を示すはずである。しかしながら、水酸基数が 30 以上付加した誘導体において抗酸化能がさらに増加したことは、1) 水溶性の増加に伴い分散性が向上したため、2) フェノール性水酸基と同様に若干酸性度のあるフラーレン性水酸基もラジカル捕捉に関与するため、3) 置換基数が増加することによってフラーレン骨格の歪みが大きくなり、残留する二重結合も平面性から大きく歪み、反応性が増大したため、などの理由が考えられる。結論としては、抗酸化能 (ラジカル捕捉能) メカニズムは、水酸基数が少ない水酸化フラーレンと多いもので異なる可能性があると考えられる。

次に、水酸化 C_{60} フラーレンの合成ロット間でのばらつきや劣化について調べるため、加速試験として加熱処理した水酸化 C_{60} フラーレンについても抗酸化能を評価した (図 4)。予想通り、用いた $C_{60}(OH)_{36}$ は、ロットによって抗酸化能が変動した。そこで、2つのロット A,B それぞれについて、80°C~210°Cまでの温度にて、各 2.5 時間加熱処理を施したサンプルの抗酸化能を測定した。興味深いことに、いずれのロットにおいても、120°Cの加熱までは抗酸化能が減少し、それ以上の温度での加熱により徐々に向上した。また、190°C以上の高温加熱では、未加熱時の抗酸化能を上回った。

これらの実験結果を踏まえ、水酸化 C_{60} フラーレンの抗酸化挙動を以下のように考察した。まず、これまでの我々の研究において、 β -カロテン退色法による評価で高い抗酸化能を示す C_{60} フラーレン誘導体は、より低い LUMO (反結合性分子軌道) を有していることがわかっている。一般に、LUMO は、共役が拡張するか電子求引基が付加することにより低下する。水酸基数が増えることにより共役は切断されるが、導入される酸素原子の電子求引効果により、水酸化 C_{60} フラーレンの LUMO はもとの C_{60} と比べて同程度であると考えられる。また、一般に電子供与基のついたフェノール性の水酸基はその σ O-H 分子軌道が高く、水素供与メカニズムによりラジカル捕捉能が高い。水酸化 C_{60} フラーレンの水酸基もフェノールと同程度の酸性度を示すことから、同様に水酸化 C_{60} フラーレンの水酸基もラジカル捕捉能を幾分有していると考えられる。そのため、加熱により徐々に脱水反応が進行することで、120°C程度までは有用な水酸基の脱離により抗酸化能が低下する。しかし、140°C以上の加熱では酸化反応が進行し、電子求引性のカルボニル基が導入されることで LUMO が大きく低下し、 β -カロテン退色法においてより高い抗酸化能を示したと考えられる。実際、カルボニル基の導入は加熱後サンプルの IR 測定によって確認されており、分子モデル計算を行っ

て求めた LUMO の変化もこの仮説を支持している。

3. プロリン誘導体の HPLC 分析

C₆₀ フラーレン誘導体の体内動態を解析することは、ナノ医薬において必須の課題である。しかしながら、異性体混合物である水酸化 C₆₀ フラーレンでは、その分析の信頼性が欠ける。従って、水酸化 C₆₀ フラーレンよりも明確に構造が確定しているプロリン誘導体を用い、定量分析が可能な方法を確立する必要がある。そこで、まずは最も簡便な HPLC 法による分析条件の確立を検討した。

フルーレン専用 HPLC カラムとして開発された Buckyprep (ナカライテスク社製) もしくは Buckyprep-M カラムを用い、移動相に極性の高いフルーレン誘導体が可溶性 DMF/DMSO を流すことで、プロリン誘導体を分析することが可能な HPLC 条件を確立することができた (図 5)。カルボキシル基を 2 つ有するプロリン 1 では、主生成物のピークと異性体や不純物のピークをきれいに分離することができた。また、異なるロットで分析を行ったところ、再現性よく分析が行えることも確認した。カルボキシル基が 3 つあるプロリン 3 でも、ほぼ同様の分析結果を得ることができた。この化合物については、ロットによって異性体の混合比率が大きく異なり、ロット 3-a については、主生成物の後ろに異性体と考えられるピークの増加が観察されたことから、エステル誘導体の加水分解処理時に異性化が起こったという知見を得た。

このような分離分析条件を見出したことにより、これらの誘導体の体内動態を追跡することが可能であると考えられる。さらに検出感度を向上させること、ならびにより決定的な LC-MS 分析まで可能にすることが今後の課題と考えられる。

4. リチウム内包フルーレンの合成

上述した HPLC 法は、検出感度にある程度の限界があると懸念される。また、異性体が存在する

水酸化 C₆₀ フラーレンのような誘導体についても体内動態を追跡できる手段を開発することは必要不可欠である。そこで、微量高感度分析が可能な ICP-MS 分析を用い、リチウムイオンを高感度検出することによりこれを達成すべく、リチウムカチオンを内包した水酸化フルーレンの合成を検討した。

C₆₀ フラーレン炭素ケージ内にリチウムカチオンを閉じ込めたリチウム内包 [60] フラーレンを出発とし、発煙硫酸を用いて炭素ケージの外側を水酸化することに成功した (図 6A)。得られた化合物は IR、NMR、元素分析、UV、TGA、MALDI-TOF-MS などによって同定され、平均構造 Li⁺@C₆₀(O⁻)(OH)₇ であると同定された (図 6B)。また、リチウムが炭素ケージ内に内包されていることは、⁷Li NMR で内包 Li のピークが -17 ppm 付近とかなり低磁場に観測されたことから確認された (図 6C)。このスペクトルからは、1 つの主生成物ピークの他に、異性体の存在を示唆する 2 つの小さなピークの存在が観測された。同様に ¹H NMR を測定したところ、通常の水酸化フルーレンではブロードにしか現れないプロトンのシグナルが、シャープに 7 本観測された (図 6D)。このことは、水酸基数が 7 つの水酸化 C₆₀ フラーレンが、C₁ 対称ながら位置選択的に生成していることを示唆する。さらに、小さい 4 本のシグナルも観測され、これらは異性体に対応すると考えられた。すなわち、リチウムを内包させたことにより、医薬品に望まれる単一異性体の水酸化フルーレンを合成できる可能性を示した。また、IG 法を用いて粒径分布を調べたところ、極性有機溶媒 DNSO 中において、分子サイズにほぼ等しい約 1 nm 程度にまで分散していることも判明した。

続いて、プロリン誘導体の分析と同じ条件下で HPLC 分析を行った (図 7)。⁷Li NMR の結果を支持するように、1 つの主生成物と 2 つの副生成物のピークが観測された。一方で、比較として同条件下でリチウムを内包していない C₆₀(OH)₁₂ の HPLC 分析も行ったところ、Li が内包されたもの

とは大きく異なり、多数の異性体から構成されると思われる、ブロードに多数のピークが重なったチャートが得られた。現段階では、発煙硫酸との反応段階において生じるフラーレンカチオン中間体の価数が、リチウムカチオンの電気求引性のためにリチウム内包と空の C₆₀ とで異なることがこの位置選択性に影響を及ぼしており、内包フラーレンの場合は 1 価のカチオンから反応が起こることによって比較的 positionally 生成物を与えたものと考察される。

5. 新規 58n 系フラーレンの合成

C₆₀ フラーレンの抗炎症能の作用機序を解明し、より効果の高い C₆₀ フラーレン誘導体をスクリーニングするために、修飾置換基の種々異なる C₆₀ フラーレン誘導体を比較検討する必要がある。予備検討において、水酸化 C₆₀ フラーレンとプロリン誘導体については、これら修飾方法の違いをみる事ができたが、さらにこれらの検討を拡張する必要がある。まずは、抗炎症効果の高かったプロリン誘導体は、その残されたパイ共役 (58n) の広がり由来するためとの仮説に基づき、種々の新規 58n 系 C₆₀ フラーレン誘導体の開発について検討を行う。

これまでに開発されている 58n 系 C₆₀ フラーレン誘導体の多くは、Bingel 反応や Prato 反応と呼ばれる反応を利用したものがほとんどであり、前者では三員環を形成し、後者では窒素を含む五員環を形成して、フラーレンケージ上に置換基が導入される。一般に C₆₀ フラーレンへの付加反応では、一付加目よりも二付加目のほうが反応は速く進行するため、一付加体で反応が止まらずに多付加体生成物を与えることが多い。しかし、これら 2 つの反応については一付加選択性が高いため、様々な誘導体合成に汎用されている。

本研究では、これら以外の反応を利用して、目的となる、1) 水溶性もしくは高い分散性、2) 共役を残した構造 (58n 系)、3) 熱的・化学的に安定な構造、を目指した結果、シリルエノール

エーテルと C₆₀ との Diels-Alder 反応によりシクロヘキサノン誘導体 1 を合成中間体として合成し、さらに四塩化チタンと種々のアルコールを用いて非環状ならびに環状アセタール誘導体を計 6 種類合成することに成功した (図 8)。

構造は、¹H および ¹³C NMR、HRMS によって同定した。さらに、TGA により、5 員環の環状アセタール 3a では 350°C までの熱安定性を有することも確認できた。今回用いた単純脂肪族アルコール/ジオールを、エチレンオキシ鎖を伸ばしたアルコールや末端を四級アンモニウム塩に変換可能なジアミンに置き換えることで、今後、水溶性の獲得を目指す。

もう一つ別の手法として、反応性の高い種々アジドと C₆₀ との 1,3-双極子付加反応によりトリアゾリノ誘導体 1a-f を合成中間体として合成し、さらに酸触媒を用いてアジリジノ化誘導体 2a-f へと定量的に変換した (図 9)。本反応では、現時点では水溶性の置換基の導入には成功していないが、もし合成できればプロリン誘導体と比較し、窒素原子を含む五員環または三員環の構造の違いによる抗炎症能の違いを検討することが可能となる。さらに、アジリジノ誘導体の前駆体であるトリアゾリノ誘導体との比較も期待される。

E. 結論

異なる 6 タイプの新規フラーレン誘導体 (グルコース修飾水酸化 C₆₀ フラーレン、加熱活性化水酸化 C₆₀ フラーレン、リチウム内包水酸化 C₆₀ フラーレン、アセタール化フラーレン、トリアゾリノフラーレン、アジリジノフラーレン) を合成することができた。前者 4 つの誘導体は極性有機溶媒には溶解するが、水溶性は乏しいため、今後、分散性を改良する工夫が必要である。特に、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 C₆₀ フラーレン誘導体を既に合成しており、現在、薬効評価を進めている。

さらに、C₆₀ 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 C₆₀ フラーレ

ンの創製に成功した。また、プロリン修飾 C₆₀ 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 C₆₀ 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。今後は、薬学・化学 2 つの手法の相関を見ながら、より高い抗炎症能を有するフラレン誘導体をより具体的に設計していく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. Ikuma N., Mikie T., Doi Y., Nakagawa K., Kokubo K., Oshima T.: Facile and Exclusive Formation of Aziridinofullerenes by Acid-catalyzed Denitrogen of Triazolinofullerenes, *Org. Lett.*, 14(23):6040-43, 2012.
2. Ueno H., Kokubo K., Kwon E., Nakamura Y., Ikuma N., Oshima T.: Synthesis of a New Class of Fullerene Derivative Li⁺@C₆₀O⁻(OH)₇ as a "Cation-Encapsulated Anion Nanoparticle", *Nanoscale*, 5, 2317-21, 2013.
3. Kokubo K., Masuda H., Ikuma N., Mikie T., Oshima T.: Synthesis and Characterization of New Acetalized [60]Fullerenes, *Tetrahedron Lett.*, 2013, in press.

【総説・Proceedings】

1. Kokubo K.: Water-Soluble Single-Nano Carbon Particle: Fullerenols and its Derivatives, In "The Delivery of Nanoparticles", Ed., Hashim A. A., Intech; chap. 15, pp. 317-332, ISBN 978-953-51-0615-9, 2012.

2. Ueno H., Nakamura Y., Ikuma N., Kokubo K., Oshima T.: Synthesis of a New Class of Molecule Li⁺@C₆₀O⁻(OH)₇ as a "Cation-Encapsulated Anion Nanoparticle" by Multihydroxyaltion of Li-Encapsulated Fullerene, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 1529, DOI: 10.1557/opl.2013.49, 2012.

② 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当なし

② 実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

研究協力者

小久保 研 (大阪大学大学院工学研究科)
伊熊 直彦 (大阪大学大学院工学研究科)
上野 裕 (大阪大学大学院工学研究科)
中村 友治 (大阪大学大学院工学研究科)
山倉 静佳 (大阪大学工学部)

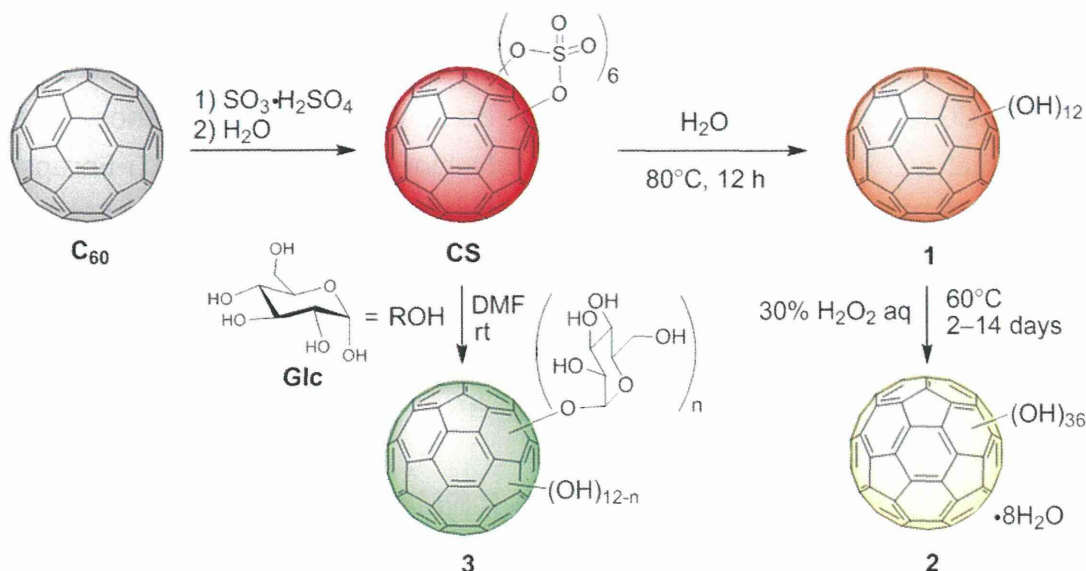


図1. グルコース修飾水酸化フラーレンの合成経路. 水酸化フラーレンOH12 (1) およびOH36 (2) の合成中間体であるシクロ硫酸化エステルフラーレン (CS) にα-D-グルコース (Glc) を作用させることで部分グルコース化水酸化フラーレン (3) を得た。

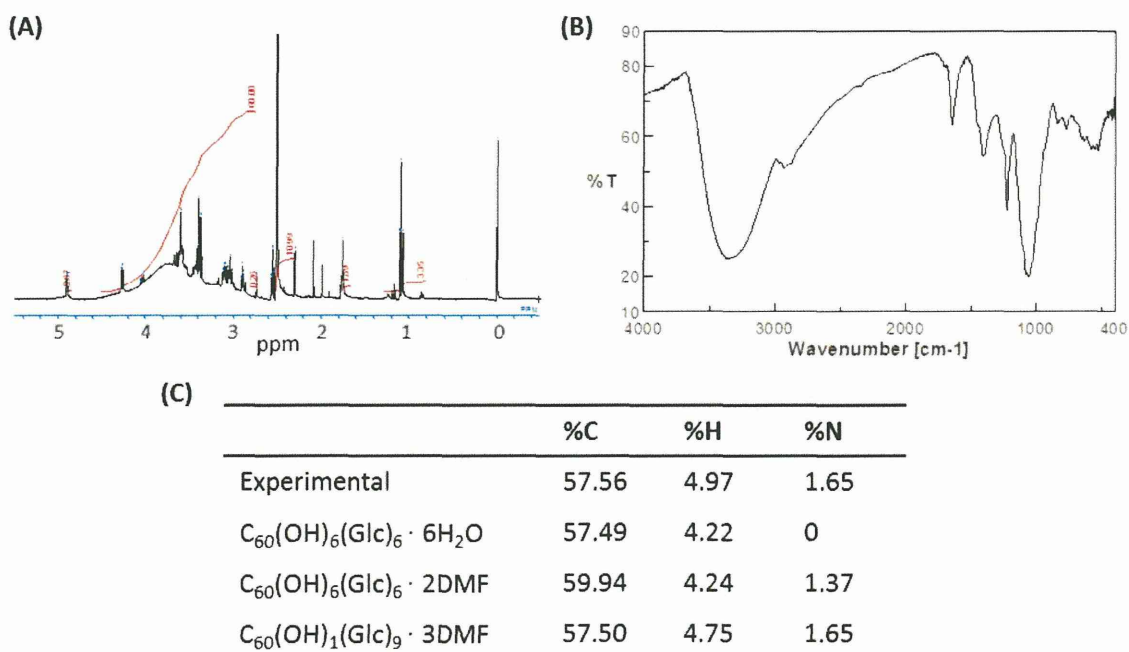


図2. グルコース修飾水酸化フラーレンの同定. (A) ¹H NMR: グルコース由来のピークを確認した。また、1位のプロトンが消失していることから、1位にて結合したことが示唆された。(B) IR: 水酸化フラーレンに特徴的な4つのピークを確認した。さらに、それ以外のピークが存在することも確認された。(C) 元素分析: 組成比から、グルコース部位導入されたことが確認され、平均6~9個と見積もられた。しかし、溶媒DMFの残留が幾分見られた。

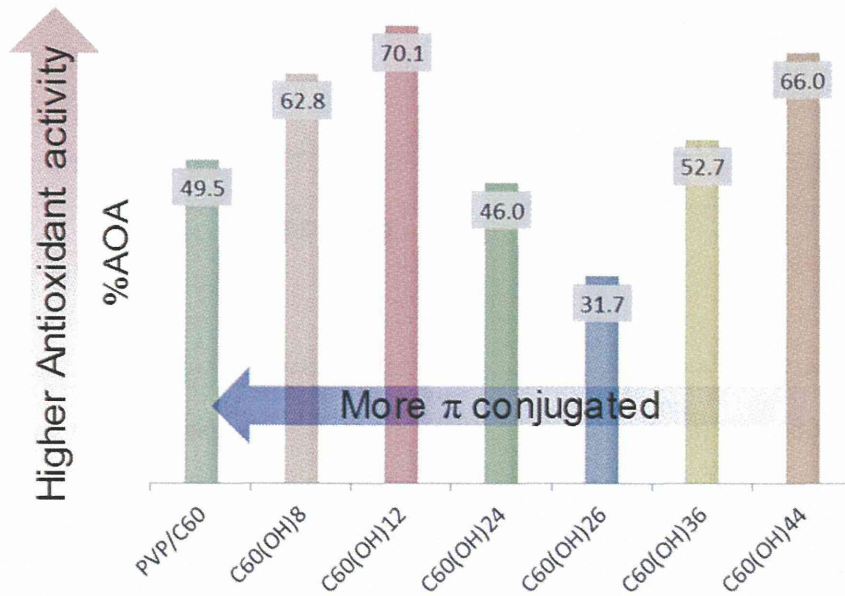


図3. β-カロテン退色法による水酸化フラーレンの抗酸化能評価。フラーレンC₆₀ (PVPにより包摂して水溶化したもの) に比べて、水酸化フラーレンC₆₀(OH)₁₂やC₆₀(OH)₄₄ではより高い抗酸化能(%AOA)を示した。水酸基数の増加に伴い、C₆₀(OH)₂₆までは一旦抗酸化能は減少し、さらなる増加で再び向上した。このように二か所で極大値を示したことから、抗酸化能(ラジカル捕捉能)メカニズムは、水酸基数が少ないものと多いもので異なる可能性があることが示唆された。

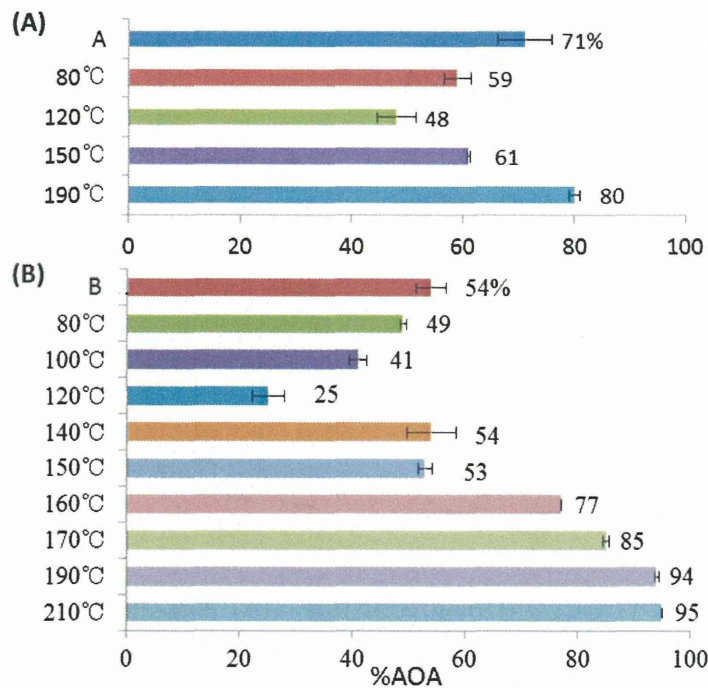


図4. 水酸化フラーレンC₆₀(OH)₃₆の加熱による抗酸化能の変化。(A) lot Aの水酸化フラーレンを各温度にて2.5時間加熱後に抗酸化能を測定した(%AOA at 20 μM)。(B) lot Bの水酸化フラーレンも同様に加熱後に抗酸化能を測定した(%AOA at 100 μM)。いずれのlotにおいても、120℃の加熱までは抗酸化能が減少し、それ以上の温度での加熱により徐々に向上した。また、190℃以上の高温加熱では、未加熱時の抗酸化能を上回った。