

201308007A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 26 (2014) 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. 経口投与型ナノ DDS 化 C60 フラーレンの体内動態評価及び腸疾患等に対する有効性評価 -----	37
大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野	研究分担者 吉岡靖雄
3. C60 フラーレンの抗炎症作用のメカニズム解明及び臨床試験に向けた企画・推進 --	51
大阪大学大学院薬学研究科 臨床薬効解析学分野	研究分担者 藤尾 慈
4. 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 -----	57
大阪大学大学院工学研究科	研究分担者 小久保研
5. 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 -----	67
慶應義塾大学 薬学部 医薬品化学講座	研究分担者 大江知之
6. ナノ DDS 化 C60 フラーレンの安定的製造と供給体制の整備 -----	77
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 -----	95
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	97

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

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 C₆₀ 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 C₆₀ 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 C₆₀ フラーレンのプロドラッグ化や糖修飾など、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、分散性を改善できる水酸化 C₆₀ フラーレンに加え、抗酸化・抗炎症活性を向上可能な官能基修飾誘導体を創製することで、従来までの「20 倍以上もの抗炎症活性を有する C₆₀ フラーレン誘導体（プロリン型 C₆₀ フラーレン）」を見出した。また一般毒性試験や遺伝毒性試験などを実施し、安全性にも優れていることを明らかとした。さらに、C₆₀ フラーレンの物性評価系の構築に成功するなど、品質保証・動態解明の足掛かりを掴んだ。平成 25 年度には、平成 24 年度の成果を基盤としつつ、当初計画に沿って、①官能基修飾誘導体や DDS 化 C₆₀ フラーレン誘導体を新規合成したうえで、②それら C₆₀ フラーレン誘導体の物性・品質を含めた、抗酸化・抗炎症活性の評価、③C₆₀ フラーレン誘導体の体内動態を定量的に解析し得る評価法の確立、④炎症性腸疾患モデルマウスを用いた、C₆₀ フラーレン誘導体の経口投与型ナノ DDS としての有効性評価、⑤C₆₀ フラーレン誘導体の作用メカニズムの解明を目指した。特に、平成 24 年 11 月 6 日(火)に実施された PD/PO による実地調査や平成 25 年度の中間・事後評価結果において、「我が国発のナノ医薬への期待、広範な慢性炎症全般に対する画期的治療法としての期待、充実した研究体制」を評価頂いた一方で、C₆₀ フラーレン誘導体の体内動態評価、抗炎症活性のメカニズム解明、異性体の解析といった物性・品質保証をより一層重点的に検討するようにご指導頂いたことから、上記ポイントに注力した。その結果、平成 24 年度に見出した、強い抗炎症活性を有するプロリン型 C₆₀ フラーレンを鋳型として、①4 種類の官能基修飾誘導体（大江の項を参照）と共に、腸管吸収性を改善可能なグルコース修飾 C₆₀ フラーレン（小久保の項を参照）とプロドラッグ化に資するエチルエステル化 C₆₀ フラーレン（大江の項を参照）の 2 種類の DDS 化 C₆₀ フラーレンを新規合成した。②これら C₆₀ フラーレンの抗炎症活性を in vitro で評価した結果、新規合成した官能基修飾誘導体の中には、プロリン型 C₆₀ フラーレンと同等の強い抗炎症活性を有するものが存在することが明らかとなった。さらに、③グルコース修飾 C₆₀ フラーレンは、プロリン型 C₆₀ フラーレ

ンに匹敵する抗炎症活性を有していたことから、グルコース修飾の有効性を明らかとした。以上の結果から、プロリン型C₆₀フラレーンの有用性が実証されたことから、将来的な医薬品化を念頭においた検討も開始しており、④プロリン型C₆₀フラレーンの大量合成に向けて、物性・品質を保持しつつ、合成系のスケールアップに成功すると共（青島の項を参照）に、⑤GMP設備を有し、かつC₆₀フラレーン誘導体の製造技術を有する委託先を検討中である。また、平成24年度に構築したLC-MSによるプロリン型C₆₀フラレーンの定量解析系を用い、⑥生体内のプロリン型C₆₀フラレーンを定量的に解析し得る方法の構築に成功し、現在、体内動態を精査中である（吉岡の項を参照）。さらに、⑦2種類の炎症性腸疾患モデルマウスを用いた検討などにおいて、プロリン型C₆₀フラレーンが、Th2型の免疫応答を抑制されることで、炎症性腸疾患の病態が改善することを見出し、潰瘍性大腸炎（Th2型の病態）に対する治療薬になり得る可能性を明らかとした（吉岡の項を参照）。また、⑧プロリン型C₆₀フラレーンは、T細胞やB細胞といった獲得免疫を担う細胞の活性化をも抑制することを見出すと共に、その抗炎症活性は、MAPキナーゼやNFkappaBの活性化抑制ではないことなど、プロリン型C₆₀フラレーンの免疫抑制作用・抗炎症活性メカニズムの一端を明らかとした。以上のように、平成25年度には、重点課題についても有益な結果を得るなど、当初の予定以上に進捗した。なお、上記検討なども含有されている内容で平成25年2月19日（火）に特許出願したが（特願2013-030455）、平成26年2月19日（水）にPCT出願した。また、平成26年2月20日（木）にPMDAへの事前面談を実施済みであると共に（平成24年4月4日（水）にも実施しており、今後も随時、事前相談を行う予定）、平成26年3月18日（火）に創薬支援戦略室（医薬基盤研究所）にも相談しており、実用化に向けた取組を着実に推進していることを申し添える。

研究分担者

吉岡靖雄：大阪大学大学院薬学研究科・准教授
藤尾 慈：大阪大学大学院薬学研究科・教授
小久保 研：大阪大学大学院工学研究科・講師
大江知之：慶應義塾大学薬学部・准教授
青島央江：ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社・マネージャー

A. 研究目的

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 C₆₀ フラレーン（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。

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）-α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 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、実際いくつも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 LTB₄ 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-1β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 C₆₀ フラーレンに着目した。C₆₀ 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（O₂⁻）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、C₆₀ 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 C₆₀ 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。

C₆₀ 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) C₆₀ 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) の超高純度フララーレンの低価格化（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 C₆₀ 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、医用工学的に C₆₀ フラーレンのプロドラッグ化や糖修飾など、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、分散性を改善できる水酸化 C₆₀ フラーレンに加え、抗酸化・抗炎症活性を向上可能な官能基修飾誘導体を創製することで、従来までの「20 倍以上もの抗炎症活性を有する C₆₀ フラーレン誘導体（プロリン型 C₆₀ フラーレン）」を見出した。また一般毒性試験や遺伝毒性試験などを実施し、安全性にも優れていることを明らかとした。さらに、C₆₀ フラーレンの物性評価系の構築に成功するなど、品質保証・動態解明の足掛かりを掴んだ。平成 25 年度には、平成 24 年度の成果を基盤としつつ、当初計画に沿って、①抗酸化・抗

炎症活性を向上可能な官能基修飾誘導体や DDS 化 C₆₀ フラーレン誘導体を新規合成したうえで、②それら C₆₀ フラーレン誘導体の物性・品質を含めた、抗酸化・抗炎症活性の評価、③C₆₀ フラーレン誘導体の体内動態を定量的に解析し得る評価法の確立、④炎症性腸疾患モデルマウスを用いた、C₆₀ フラーレン誘導体の経口投与型ナノ DDS としての有効性評価、⑤C₆₀ フラーレン誘導体の作用メカニズムの解明を目指した。

B. 研究方法

1. 試薬

本検討ではプロリン類似骨格を持つ、プロリン型 C₆₀ フラーレン【C₆₀ Pyrrolidine tris-acid ; C₆₀pro】および、未修飾 C₆₀ フラーレン【C₆₀】を用いた。C₆₀pro は FLOX 株式会社より購入した。C₆₀ はビタミン C60 バイオリサーチ株式会社より供与して頂いた。本検討では、各 C₆₀ フラーレンの DMSO 分散液を使用直前に ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE, Osaka, Japan) 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。なお、以下の全ての操作において、C₆₀ フラーレンを溶媒で希釈する際には、一度に希釈すると凝集するため、徐々に希釈した。具体的には、溶媒に C₆₀ フラーレン DMSO 懸濁液を 1:1 の液量で加えたのちに、30 秒以上の超音波処理または 5 秒間 3 回ボルテックスミキサーにて攪拌する希釈操作を 3 回以上行い、段階的に希釈を行った。

2. 実験動物

6-8 週齢の C57BL/6 NCr マウス（雌性）は、日本エスエルシー (Kyoto, Japan) より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は医薬基盤研究所の実験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

3. マウスへの免疫方法

ニワトリ卵白アルブミン (OVA ; Ovalbumin)

は Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。マウスへの腹腔内投与は、週 1 回、3 週間行った。投与溶液はすべて生理食塩水で希釈し、OVA を単独 (10 µg/mouse)、あるいは OVA と C₆₀ フラーレンの混合溶液として 200 µL を腹腔内投与した。投与には 27G-3/4 注射針 (TERUMO CORP.; Tokyo, Japan) を用いた。

マウスへの C₆₀ フラーレン経口投与は、1、3、4 週目に週 5 回、計 15 回行った。C₆₀ フラーレンは超純水で希釈し、テフロン製フレキシブル経口ゾンデ (夏目製作所; Tokyo, Japan) を用いて 200 µL 経口投与した。1、3、4 週目の 3 日目には、生理食塩水で希釈した OVA (10 µg/mouse) 200 µL を腹腔内投与した。

マウスへのコレラトキシン (CT; Cholera Toxin) アジュバントを用いた OVA 経口投与は、週 1 回、3 回行った。CT は List Biological laboratories (California, USA) から購入した。OVA (1 mg/mouse) と C₆₀ フラーレンおよび CT (10 µg/mouse) の混合液は超純水で希釈し、上述のゾンデを用いて 200 µL 経口投与した。

4. マウスからの採血方法

最終免疫から 7 日後、ペントバルビタールによる麻酔下において、マウスの心臓より採血を行った。採血は、終濃度で 15-20 U/mL となるようヘパリンをあらかじめ含ませたシリンジおよび 26G-1/2 注射針 (TERUMO CORP.) を用いて行った。さらに 3000xG、15 分間の遠心分離後、血漿を回収した。得られた血漿は -80℃ で凍結して保存し、各実験に供した。

5. 脾細胞の調製方法

最終免疫から 7 日後のマウスから脾臓を無菌的に摘出した後、70 µm セルストレイナー (BD Biosciences; San Diego, USA) 上で細胞を分散させ、1500 rpm、10 分、4℃ の条件で遠心することで、脾細胞を回収した。細胞の回収には、56℃、30 分間の非働化処理を行った 10 % fetal bovine

serum (FBS)、1 % antibiotics (Anti-Anti; Invitrogen, Carlsbad, CA)、50 μ M 2-Mercaptoethanol (2-ME; GIBCO, Japan)、1 \times MEM Non-Essential Amino Acids (GIBCO)、0.2 mM L-グルタミンを含む Roswell Park Memorial Institut (RPMI) 1640 培養液 (Wako, Osaka, Japan)を用いた。回収した脾細胞は 155 mM NH₄Cl (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) /10 mM KHCO₃ (Nacalai Tesque) /100 μ M EDTA \cdot 2Na \cdot 2H₂O (Nacalai Tesque) 溶液で懸濁することで赤血球を除去した。

6. 脾細胞の抗原再刺激方法

上述の方法で調製した脾細胞は、上述の RPMI 培養液で懸濁し、96 well round bottom assay plate (Nunc.; USA) に 1×10^6 cells/well で播種し、100 μ g/mL の OVA の存在下、37°C、5 % CO₂ 条件下で 3 日間培養した。1500 rpm、5 分間遠心分離して回収した培養上清は、-80°C で凍結し、各実験に供した。

7. OVA 特異的抗体価・サイトカインの測定方法 <血中 OVA 特異的 IgG、IgG1、IgG2c の測定>

10 μ g/mL OVA (in PBS) を 96 well immune plate (Maxisorp, eBioscience; San Diego, CA, USA) に添加し、4°C で一晩静置し固相化した。PBS で 2 % に調製したブロックエース (DS Pharma Biomedical; Osaka, Japan) で室温にて 2 時間反応させることでブロッキングし、その後、ブロックエースにて各濃度に調製したサンプルを加えて室温にて 2 時間、または 4°C で一晩反応させた。これらのプレートを 0.05 % Tween 含有 PBS で洗浄後、ブロックエースにて 5000 倍希釈した Horse Radish Peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体、HRP 標識抗マウス IgG1 抗体、HRP 標識抗マウス IgG2c 抗体 (すべて Southern Biotechnology Associates; Birmingham, AL, USA) を加え、室温にて 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行った後、TMB

(TMBE, MOSS, Inc.; Pasadena, MD, USA) 基質液を 100 μ L 添加し発色させた。2N H₂SO₄ を 50 μ L 添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、対照波長 620 nm における吸光度を測定した。

<血中 OVA 特異的 IgM の測定>

2 μ g/mL mouse IgM (BD Pharmingen; San Diego, CA, USA) (in PBS) を 96 well immune plate (Maxisorp) に添加し、4°C で一晩放置し固相化した。上述の方法でブロッキング・洗浄を行ったのちブロックエースにて各濃度に調製したサンプルを添加し室温で 1 時間反応させた。洗浄操作を行ったのち、ブロックエースにて 5 μ g/mL に調製した Biotin 標識 OVA を添加し室温で 2 時間反応させた。再度洗浄を行い、上述の方法で発色させ吸光度を測定した。

<血中 OVA 特異的 IgE の測定>

DS マウス IgE ELISA (OVA) キット (DS pharma biomedical; Osaka, Japan) を使い、キットの使用 방법에準じて測定を行った。

<脾臓細胞培養上清中 IL-4、IL-5、IL-13 の測定>

ELISA Ready-Set-Go![®] キット (affimetrix; San Diego, USA) を使い、キットの使用 방법에準じて測定を行った。

<脾臓細胞培養上清中 IFN- γ の測定>

BD OptEIA[™] ELISA キット (BD Pharmingen) を使い、キットの使用 방법에準じて測定を行った。

8. 粒径分布およびゼータ電位の測定

前述の方法で調製した C₆₀ および C₆₀pro の DMSO 分散液を再度 5 分間超音波処理し、1 分間攪拌した後に生理食塩水で徐々に希釈し、in vivo における投与試薬濃度帯を含む 6.8~440 μ M に調製した。各サンプルは Size & Zeta キャピラリー

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。

9. MLR (混合リンパ球反応)

未処置の BALB/c マウスの脾臓細胞 (応答細胞) および、未処置の C57BL/6 マウスの脾臓細胞 (刺激細胞) を用いた。細胞回収方法は前述の脾臓細胞の調製方法に準じた。刺激細胞には、細胞増殖を停止させるためにマイトマイシン C (和光純薬工業、終濃度 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、37°C で 30 分間処理したのち、培養液で 3 回洗浄操作を行ったものを実験に供した。応答細胞は、前節の脾臓細胞回収に用いた RPMI 培養液にて 1×10^7 cell/mL に、刺激細胞は 6×10^7 cells/mL に調整した。応答細胞懸濁液 100 μL を 96 well flat-bottom assay plate (Nunc.) に播種し、培養液で各濃度に調整した $C_{60}\text{pro}$ 、 C_{60} 、CsA、Dex 懸濁液 50 μL を添加して 37°C、5 % CO_2 条件下で 30 分間反応させたのち、刺激細胞懸濁液 50 μL を添加した。37°C、5 % CO_2 条件下で 4 日間培養し、1500 rpm、5 分間遠心して培養上清を回収した。培養上清は -80°C で凍結して保存し、各実験に供した。

10. マウスへの Alum 免疫方法

C57BL/6 マウスに 1 mg/mouse Imject Alum (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan) および 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ OVA を腹腔内に週 1 回、3 週間投与し、最終投与から 1 週間後に脾臓細胞を回収した。

11. Alum 免疫したマウスの脾臓細胞調整・抗原再刺激方法

調整した脾臓細胞を、前述の培養液で懸濁し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の OVA および各サンプル懸濁液の存在下、37°C、5 % CO_2 条件下で 3 日間培養した。遠心分離した培養上清は -80°C で凍結し、各実験

に供した。

12. CD4 陽性 T 細胞の回収・精製方法

C57BL/6 マウスの脾臓細胞を前述の方法にて回収・調製した。CD4⁺ T cell isolation kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いた磁気ソーティング (magnetic cell sorting; MACS) により CD4 陽性 T 細胞を精製した。精製は、キットの添付文書に沿って以下の手順で行った。まず、脾臓細胞を MACS buffer (Miltenyi Biotech) にて懸濁し、10 μL Biotin-antibody cocktail / 1×10^7 cells を添加して 4°C、10 分間インキュベートした。これを 50 μL MACS buffer / 1×10^7 cells に懸濁後、20 μL anti-biotin micro beads / 1×10^7 cells を添加して 4°C、15 分間インキュベートした。MACS buffer 2-3 mL を添加して 300×G、10 分間遠心分離し、上清を除去したのちに、回収細胞を MACS buffer 500 μL に懸濁した。3-5 mL MACS buffer にて平衡化した MACS LS カラムに上述の細胞懸濁液を供した。目的の精製画分を回収し、先述の培養液に懸濁したものを未刺激 CD4 陽性 T 細胞懸濁液とした。

13. CD4 陽性 T 細胞の刺激培養方法

抗マウス CD3 ϵ (クローン 145-2C11)、抗マウス CD28 (クローン 37.51) は Biolegend (San Diego, USA) から購入した。滅菌 PBS により 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した抗マウス CD3 ϵ を 96 well flat-bottom assay plate (Nunc.) に添加したのち 4°C で一晩静置し固相化した。滅菌 PBS で 3 回洗浄操作を行ったのち、上述の未刺激 CD4 陽性 T 細胞懸濁液を 1×10^6 cells/mL に調整し、100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で播種した。培養液で目的濃度に調整した $C_{60}\text{pro}$ 、 C_{60} 、CsA、Dex 懸濁液 50 μL を添加して 37°C、5 % CO_2 条件下で 30 分間反応させたのち、培養液で 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した抗マウス CD28 を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。37°C、5 % CO_2 条件下で 4 日間培養し、1500 rpm、5

分間遠心して培養上清を回収した。培養上清は-80℃で凍結して保存し、実験に供した。

14. B 細胞クラススイッチアッセイ

C57BL/6 マウスの脾細胞を前述の方法にて回収した。脾細胞を調製したのち、CD19 micro Beads (Miltenyi Biotec) を用いて MACS により B 細胞を精製した。脾細胞を MACS buffer (Miltenyi Biotec) にて懸濁し、10 µL Biotin-anti-CD19 cocktail / 1×10^7 cells を添加して 4℃、15 分間インキュベートした。これに 1 mL MACS buffer / 1×10^7 cells を添加して 300×G、10 分間遠心分離し、上清を除去したのちに、回収細胞を MACS buffer 500 µL に懸濁した。3-5 mL MACS buffer にて平衡化した MACS LS カラムに上述の細胞懸濁液を供して B 細胞以外の細胞を除去した。カラムに捕捉された B 細胞は、カラムに MACS buffer 5 mL を添加して付属のシリンジを押し込むことにより回収した。MACS buffer を遠心除去したのち培養液に懸濁したものを未刺激 B 細胞懸濁液とした。 2×10^6 cells/mL に調製した未刺激 B 細胞懸濁液を 50 µL/well で 96 well flat-bottom assay plate (Nunc.) に播種したのち、各サンプル懸濁液 50 µL を添加して 37℃、5 % CO₂ 条件下で 30 分間反応させた。培養液で 12 µg/mL に調製した anti-CD40 (クローン: HM40-3, Biolegend)、および 400 U/mL に調製した recombinant mouse IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, USA) を 50 µL/well で添加した。37℃、5 % CO₂ 条件下で 10 日間培養し、1500 rpm、5 分間遠心して培養上清を回収した。培養上清は-80℃で凍結して保存し、実験に供した。

15. マウスへの胸腺非依存性抗原 (Thymus-Independent Antigen; TI) 抗原免疫方法

LPS (055 : B5 株由来) は Sigma-Aldrich から購入した。NP⁽⁴⁹⁾-AECM-Ficoll

(4-Hydroxy-3-nitrophenylacetic hapten conjugated to AminoEthylCarboxy Methyl-Ficoll) および NP⁽³⁰⁾-BSA は BIOSEARCH Technologies (California, USA) から購入した。C57BL/6 マウスに LPS (30 µg/mouse) もしくは NP⁽⁴⁹⁾-AECM-Ficoll (50 µg/mouse) を週 1 回 200 µL を、2 週間にわたって腹腔内投与した。最終投与から 7 日後に血液を回収し、3000×G、15 分間の遠心分離後、血漿を回収した。得られた血漿は-80℃で凍結して保存し、各実験に供した。

16. 脾細胞培養上清サイトカイン測定
IL-2 ELISA Ready-Set-Go![®] キット (affimetrix) を用い、キットの使用方法に準じて測定を行った。

17. Flow cytometry (FCM) による細胞精製度確認
anti-mouse CD16/32 (クローン : 93)、APC (Allophycocyanin) -conjugated anti-mouse CD3 ε (Clone: 145-2C11)、PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD4 (Clone: RM4.5)、PE-conjugated anti-mouse B220 (CD45) (Clone: RA3-6B2) はすべて affimetrix から購入した。前述の MACS 法により精製した CD4 陽性 T 細胞画分または B 細胞画分 ($1-2 \times 10^7$ cells/mL) 100 µL に、1 µg の anti-mouse CD16/32 を加え、4℃、5 分間インキュベートした。400×G、5 分間遠心分離し、上清を除去したのちに 1 mL の FACS buffer (2 % FBS、0.02 % NaN₃ in PBS) を加えた。同条件で遠心分離し、上清を除去したのちに、各細胞を FACS buffer 100 µL に懸濁した。CD4 陽性 T 細胞の染色には、APC-conjugated anti-mouse CD3 ε 抗体および PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD4 抗体を用いた。B 細胞の染色には、PE-conjugated anti-mouse B220 (CD45) 抗体を用いた。各細胞サンプルに、抗体を 1 µg ずつ添加し 4℃、1 時間インキュベートして細胞

を染色したのち、FACS buffer 1 mL を加えた。同条件で遠心分離し、上清を除去したのちに FACS buffer 1 mL を加えた。本洗浄操作を 3 回行った後、各サンプルを FACS Canto フローサイトメーター (BD Bioscience) を用いて解析した。なお、CD4 陽性 T 細胞画分または B 細胞画分の精製度を評価するため、各々の精製操作を行う前の脾臓細胞も上記と同様に染色し、解析を行った。

18. 抗 TI 抗原抗体測定

25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS (in PBS) または 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP⁽³⁰⁾-BSA (in PBS) を 96 well immune plate (Maxisorp) に添加し、4°C で一晩静置し固相化した。LPS を固相化したプレートは 0.5 % BSA、を加えた PBS で、NP⁽³⁰⁾-BSA を固相化したプレートは 1 % BSA を加えた PBS で 37°C、1 時間インキュベートすることでブロッキングし、その後、各濃度に調製したサンプルを加えて室温にて 2 時間、または 4°C で一晩反応させた。これらのプレートを 0.05 % Tween 含有 PBS で洗浄後、各濃度に調整した HRP 標識抗マウス抗体を加え、室温にて 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行った後、前述の方法で発色させ吸光度を測定した。

19. 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 20% 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% CO₂ 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% CO₂ 条件下で培養した。

20. ELISA による IL-8 産生量の測定

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 $\mu\text{l}/\text{well}$

で Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、各種 C₆₀ フラワーレンを 20% FBS、1% NEAA 含有 D-MEM で各濃度に希釈し、50 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加えた。30 分後、D-MEM で 125 ng/ml に調製した IL-1 β を 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 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。

21. ELISA による IL-6 産生量の測定

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、各種 C₆₀ フラワーレンを 10% FBS 含有 D-MEM で各濃度に希釈し、50 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加えた。30 分後、D-MEM で 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した LPS を 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加えた。24 時間後、培養上清中の IL-6 量を BD OptEIA ELISA kit のプロトコールに準じて測定した。

22. LDH アッセイによる細胞傷害性評価

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で Caco-2 細胞または RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、各種 C₆₀ フラワーレンを 10% FBS、1% NEAA 含有 D-MEM で各濃度に希釈し、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 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。

23. 統計解析

個々の実験ごとに、多重比較検定 (Dunnett 法) を行うことにより、溶媒投与群に対する各群の統計学的有意差を検定した。なお、解析ソフト (エクセル統計 2008, SSRI, Japan) を用い、統計学的有意差は $p < 0.05$ の場合を有意であるとした。

(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

炎症とは、免疫に関与する一連の細胞群が、生体外異物や毒素、傷害を受けた細胞などを認識し、それを排除するべく引き起こされる、炎症性サイトカインの分泌や貪食細胞の遊走、感染細胞のアポトーシス誘導といった一連の生体防御機構を指す。本来、炎症応答は、生体外異物や異常細胞に対して適切に惹起され、対象異物が排除された後に適切なタイミングで収束するように制御されている。しかし、この制御が破綻し、免疫応答の活性化が持続することで、正常組織への傷害や慢性炎症を伴った状態が炎症性疾患である。免疫応答は、自然免疫担当細胞による異物認識が引き金となって起こる。しかし、炎症性疾患の全てが自然免疫のみによって誘発されるわけではない。

例えば、関節リウマチや多発性硬化症などに代表される炎症性自己免疫疾患は、異常な獲得免疫応答が惹起された結果、全身もしくは特定臓器に慢性炎症が起こる疾患である。前述の炎症性腸疾患も自己免疫疾患であると言われており、自己応答性 T 細胞による自己組織の傷害が一因であると報告されている。またアレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎は、花粉やダニなどのアレルゲンに対して特異的な IgE 抗体が産生されることで引き起こされる、典型的な獲得免疫応答による疾患である。さらに、動脈硬化性疾患のリスク要因となるメタボリックシンドロームにおいては、脂肪組織の炎症の発症および慢性化に CD8 陽性 T 細胞が重要であることや、脂肪組織に存在する B 細胞が、T 細胞の活性化や IgG 産生を介して、慢性炎症やインスリン抵抗性を惹起することも報告されている。以上のように、炎症性疾患においては、自然免疫だけでなく、獲得免疫系がその発症および悪化・慢性化に関与している例が多く存在する。即ち、炎症性疾患における炎症は、自然免疫と獲得免疫の双方によって構成されているのである。

我々の研究室では、これまでに、C₆₀ フラーレンを炎症性疾患の治療薬として適用すべく、*in vitro* において、C₆₀ フラーレンが自然免疫の誘導に与える影響について検討してきた。その結果、C₆₀ フラーレン誘導体が、自然免疫により誘導される炎症を抑制することを見出した。また、炎症性腸疾患モデルマウスにおいて、C₆₀ フラーレン誘導体が顕著な治療効果を示すなど、詳細な作用機序は不明ながらも有効性が確認できつつある。一方で、C₆₀ フラーレンが獲得免疫の誘導過程へおよぼす作用に関しては、我々を含め、世界的にもほとんど知見がないのが現状である。我々は、C₆₀ フラーレン誘導体が獲得免疫におよぼす作用を解析することが、疾患モデルマウスにおいて有効性を発揮したメカニズム解明の糸口となり、ひいては C₆₀ フラーレン誘導体の炎症性疾患治療薬としての道を開く可能性があると考えた。そこで C₆₀ フラーレン誘導体が *in vivo* において獲得免疫

を誘導する過程に与える抑制効果について評価した。

本研究では、プロリン骨格を有する修飾基を付与した C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) を用いた。未修飾の C₆₀ フラーレン (C₆₀) は疎水性が高く、生体へ適用するには親水性修飾基の付加などによる分散性の向上が必須である。しかし、分子内に多数の二重結合を有する C₆₀ は、修飾基の制御が困難であり、実際に、我々が先行的に研究してきた水酸化 C₆₀ フラーレンは、水酸基数の違いや位置異性体の存在が問題であった。医薬品開発においては、極めて厳密な品質管理が要求されるため、水酸化 C₆₀ フラーレンが医薬品化に耐え得る品質を保證するのは困難であると考えられた。そこで本研究では、分散性の向上と異性体の問題を解消するため、カルボン酸を有する親水性置換基を 1 カ所導入した C₆₀pro を用いた (Fig. 1)。

1. C₆₀ フラーレン誘導体が外来性タンパク抗原に対する免疫応答におよぼす影響

本検討では、外来性モデル抗原としてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を用いた。C₆₀ フラーレン誘導体を OVA と共にマウスに腹腔投与した際に、C₆₀ フラーレン誘導体が獲得免疫応答の誘導に与える影響を評価した。C₆₀pro は 0.25、0.5、1、2、4 mg/kg の投与量、C₆₀ は 1、2、4 mg/kg の投与量で検討を行った。まず、血液中の IgG 抗体価を測定した結果、OVA 単独投与によって OVA 特異的 IgG が上昇する一方で、OVA と 0.25 mg/kg の C₆₀pro を共投与すると、OVA 特異的 IgG が有意に抑制されていた。また、C₆₀pro は 0.5 mg/kg 以上の投与量では投与量依存的に IgG 産生を増強しており、0.25 mg/kg 群とは逆に、免疫活性化剤 (アジュバント) として作用していることが示された。一方で、C₆₀ 投与群では、IgG 産生を増強させる傾向が認められた。なお、C₆₀ による IgG 産生誘導活性は、同投与量の C₆₀pro と比較して差は認められなかった (Fig. 2a)。

次に、IgG サブクラスである IgG1、IgG2c を測定した。産生される IgG のサブクラスは、どのような獲得免疫応答が働いているのかを知る手がかりとなる。Th2 型の免疫が活性化すると IgG1 が、Th1 型の免疫が活性化すると IgG2c が産生される (IgG2a と IgG2c はアミノ酸配列が約 16%異なるものの、アイソタイプとしては同一の作用を示す。今回使用した C57BL/6 では、IgG2a の代わりに IgG2c を産生するため、本検討では IgG2a ではなく IgG2c を測定した)。まず、Th1 型応答の指標である IgG2c を測定した。その結果、OVA 単独投与群での IgG2c 産生が非常に弱く、Th1 型の免疫応答がほとんど誘導されていないことが示唆された。また C₆₀pro および C₆₀ を作用させると、濃度依存的に IgG2c を誘導する傾向が認められたが、ばらつきが大きく、有意な差は観察されなかった (Fig. 2b)。次に、Th2 型免疫応答の指標として、OVA 特異的 IgG1 産生量を測定した。C₆₀pro を投与すると、OVA によって誘導された IgG1 が、0.25 mg/kg 投与群で有意に抑制された。一方で、0.5、1、2、4 mg/kg 投与群では、投与量依存的に IgG1 産生量の増加が観察された。C₆₀ 投与群では、今回検討したいずれの投与量においても、IgG1 の有意な産生亢進が認められた (Fig. 2c)。また、同じく Th2 型免疫応答の指標として、アレルギー発症に関与する抗原特異的 IgE も測定した。OVA 単独投与によって、OVA 特異的 IgE が上昇したが、0.25、0.5、1 mg/kg の C₆₀pro 投与によって、IgE が抑制される傾向が観察された。また興味深いことに、今回検討した投与量では、併用する C₆₀pro の濃度が低いほど IgE 抑制効果が強いことが示された。なお、C₆₀pro 高用量投与群および C₆₀ 投与群では、C₆₀pro 低用量群とは逆に、IgE 産生を増強する傾向が観察された (Fig. 2d)。

以上の結果より、C₆₀pro は、低用量では Th2 型免疫応答 (IgG1 および IgE) の誘導を抑制し、高用量では促進に働くことが示された。一方で C₆₀ は、今回検討した投与量では Th2 型免疫応答

を促進することが示された。

2. 抗原再刺激時の脾臓細胞からのサイトカイン 産生評価

次に、C₆₀pro による獲得免疫制御に関してより詳細に評価するため、免疫後のマウスから回収した脾臓細胞を抗原で再刺激した際のサイトカイン産生を測定した。抗原投与によって免疫が成立したマウスの脾臓細胞は、抗原で再刺激すると、Th1 型・Th2 型免疫それぞれに応じたサイトカインを産生する。Th1 型サイトカインとして IFN- γ 、Th2 型サイトカインとして IL-4、IL-5、IL-13 の産生を評価した。

まず、Th1 型サイトカインである IFN- γ を測定した。その結果、OVA 免疫した脾細胞を OVA で再刺激した際に IFN- γ は誘導されず、C₆₀pro 投与群および C₆₀ 投与群のいずれにおいても IFN- γ の産生量を変化させなかった。このことから、IgG2c の結果と同様に、C₆₀pro、C₆₀ のいずれも Th1 型免疫応答に影響を与えないことが示唆された (Fig. 3a)。

次に、Th2 型免疫応答の指標として IL-4、IL-5、IL-13 を測定した。その結果、C₆₀pro 0.25、0.5、1 mg/kg 投与群においては、OVA 免疫によって誘導された IL-4、IL-5、IL-13 をいずれも抑制する傾向が認められた。なお、OVA 単独投与群と比較して、C₆₀pro 2、4 mg/kg 投与群では、これら Th2 型サイトカインの産生に有意な変化を与えず、C₆₀ 投与群では投与量依存的に産生誘導する傾向が観察された。IL-4 により IgE が誘導されることから、C₆₀pro によって血液中 IgE 抗体産生量が抑制された結果とも相関すると考えられる。一方で、先述の IgG1 では、0.5、1 mg/kg の C₆₀pro 投与群は、抗体産生を抑制しておらず、同投与量で Th2 型サイトカインが抑制された結果と一致しなかった (Fig. 3b, c, d)。

本現象に関して、例えば、IgE の誘導に IL-4 は必須であるが、IgG1 の誘導に IL-4 が必ずしも必要ではないことが報告されているなど、IgG1

と IgE は同じ Th2 型免疫応答として分類されているが、これら 2 者の産生誘導機構は異なることが示唆されている。そのため、Th2 型サイトカインの抑制現象と、IgE および IgG1 の抑制現象が単純には相関しなかった可能性が考えられる。さらに IgE 産生は、炎症刺激によって誘導される炎症性樹状細胞が所属リンパ節へ遊走することが必須である一方で、IgG1 産生にはこれら遊走は必要でないことも報告されている。そのため、C₆₀pro の炎症抑制作用によって、炎症性樹状細胞が誘導されず、IgE が産生されなかった可能性が考えられる。また、C₆₀pro が B 細胞に直接作用して、Th2 型サイトカインを介した作用とは別に抗体産生を制御した可能性も考えられる。

以上の結果より、低用量の C₆₀pro には、Th2 型免疫応答抑制作用および抗体産生抑制作用があること、高用量の C₆₀pro には、逆に抗体産生促進作用があることが示唆された。現在、C₆₀pro をより低用量で作用させた際の生体応答を評価しているところである。一方で C₆₀ では、今回検討した投与量において、C₆₀pro のような Th2 抑制効果は認められず、抗体産生も促進していた。C₆₀ が獲得免疫誘導に与える影響を結論付けるには、C₆₀pro 同様、より低用量での作用を解析する必要がある。仮に、C₆₀ の投与量を下げること、C₆₀pro 低用量群のように抗体産生抑制に働けば、C₆₀ フラーレンという素材そのものに抗体産生抑制作用が秘められている可能性が考えられる。また C₆₀ は、その構造式から容易に推測できる通り、疎水性が高い分子であることから、仮に C₆₀ の投与量を下げても抗体抑制作用が認められなかった場合、疎水性の高さに起因して体内で凝集体を形成した結果、逆に、炎症応答を誘導している可能性が考えられる。

3. C₆₀ フラーレン誘導体の物性評価

粒子状物質は、特有の起炎性を有し、マクロファージ等を活性化することでアジュバント活性を発揮することが知られている。そのため、C₆₀

や高用量の C₆₀pro が凝集塊を形成しているのであれば、凝集塊としての性質によりアジュバント効果を発揮した可能性が考えられた。そこで、C₆₀pro および C₆₀ の各濃度における物性情報を収集した (Fig. 4)。各 C₆₀ フラーレンを DMSO に懸濁した後に溶媒に懸濁し、分散媒中の平均 2 次粒子径を Zetasizer で測定した。その結果、C₆₀pro、C₆₀ 共に、有機溶媒である DMSO に一旦分散させたとしても、親水溶媒中では凝集することが示された。また、C₆₀pro は高濃度では凝集していたものの、濃度を低下させるにつれて平均 2 次粒子径が減少しており、濃度と 2 次粒子径に相関が認められた。一方で、C₆₀ は、濃度を低下させても 2 次粒子径に変化がなく、相関が見られなかった。なお Zetasizer を用いて表面電荷を測定したところ、C₆₀、C₆₀pro 共に負に荷電しており、ほとんど差を認めなかった。以上の結果を、前述の *in vivo* の結果と照らし合わせて考察すると、C₆₀pro そのものには獲得免疫抑制作用があるものの、高濃度にすることで凝集して起炎性を発揮し、その起炎性が抑制作用を上回ったという仮説が考えられる。本結果は、あくまでも投与試薬の凝集状態を評価した結果であり、今後、体内での分散状態も評価する必要はあるが、抑制作用を起炎性が上回るのは、3000 nm 程度の凝集体を生じているときであると推察される。この仮説が正しければ、C₆₀pro の効果を最大限に享受するためには、より分散性を高めることが重要であるかもしれない。C₆₀ に関しては、先述のとおり、現段階では、獲得免疫抑制効果をもつか否かは定かではないが、生体内で凝集してアジュバント活性を発揮した可能性が考えられる。上記仮説に基づくならば、仮に C₆₀ の濃度を C₆₀pro と同程度まで薄めて実験に供したとしても、凝集状態が変わらないため起炎性を発揮し、C₆₀pro のような獲得免疫抑制作用が見られないのではないかと推察される。

4. C₆₀ フラーレン誘導体の抗炎症メカニズムの

基礎的解析

獲得免疫とは、外来異物による刺激に応じて形成される後天的な免疫機構である。自然免疫よりも厳密で、なおかつ、あらゆる抗原に対応可能な特異的認識能と、一度出会った抗原に対する免疫記憶による、二度目以降の応答の大幅な効率化を特徴とする。

病原体が体内に侵入した場合、病原体のタンパク質などの抗原に対して特異的な抗体が産生される。さらに、病原体が排除された後も、B 細胞や T 細胞の一部が免疫記憶細胞として体内に残る (免疫記憶) ことで、同一の病原体が再度侵入した際には、迅速かつ強力な抗原特異的免疫応答が誘導される。この免疫記憶機構に着想した戦略がワクチン接種であり、予め抗原を接種して免疫記憶を成立させておくことで、病原体に感染しても、感染が拡大する前に速やかに収束させることができる。獲得免疫における抗原特異性は非常に厳密である。例えばインフルエンザワクチンでは、ワクチン接種したウィルスと同じウィルスが侵入してきた場合は、免疫記憶により強力な抗体産生応答が起こる。しかし、同一の株であったとしても、亜型の異なるウィルスや変異ウィルスが侵入してきた場合は、初めての抗原として認識してしまい、免疫記憶が働かず、期待するような効果が得られない。

また、獲得免疫系の複雑なシステムの破綻によって誘発される疾患もあることを忘れてはならない。例えば、花粉症や食物アレルギーなどでは、抗原に対する免疫記憶が一旦作られると、抗原の再侵入のたびに炎症応答が誘発されるため、一生に渡って、抗原の再侵入を警戒し続けなければならない。また、自己免疫疾患では、自己反応性の T 細胞・B 細胞 (および抗体) が発生する。これらによる免疫反応は、大量に存在する自己抗原を排除すべく長期間持続し、その結果、慢性炎症や組織障害の誘発、最悪の場合は生命を脅かすこともある。このように、獲得免疫の異常によって発症した疾患は、慢性化・重症化する可能性を常

に孕んでいるともいえるだろう。そのため、炎症性疾患治療においても、過剰な獲得免疫応答を抑制することは大変重要である。

獲得免疫の主たる担い手は、抗体を産生する B 細胞や、特異的な抗原のみを認識し、活性化する T 細胞、およびこれらの働きを支える樹状細胞 (DC) である。細菌などの病原体が体内に侵入すると、まず DC が病原体を取り込み、分解する。DC は、リンパ節へ移動し、ナイーブヘルパー T 細胞集団に病原体断片を提示する。抗原に特異的な認識能を有する T 細胞クローンは活性化・増殖反応を開始し、記憶細胞や、抗原排除に適した働きを示す特定のヘルパー T 細胞へ分化していく。一方、同じ病原体上のエピトープを認識する B 細胞は、自身の認識可能な抗原を取り込んで、DC と同様に提示し、それを認識する同系のヘルパー T 細胞に出会うと、活性化・増殖して抗体を産生するようになる。従って、T 細胞、B 細胞、DC のいずれが阻害されても、獲得免疫応答は抑制されると言える。そこで、獲得免疫機構を構成する各細胞群に着目し、C₆₀ フラーレン誘導体が獲得免疫誘導におよぼす抑制作用に関して検討した。

5. MLR における C₆₀ フラーレン誘導体の効果

まず、混合リンパ球反応 (Mixed Lymphocytes Reaction; MLR) により、C₆₀ フラーレン誘導体の獲得免疫抑制作用を評価した。MLR は、系統の異なる 2 種類のマウス由来のリンパ球を混合培養した時に惹起されるリンパ球活性化反応であり、移植片拒絶反応を *in vitro* で簡便に再現することができる。応答細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex; MHC) を認識し、MHC の異なる刺激細胞を非自己として識別する。その結果、NK 細胞、キラー T 細胞、マクロファージなどの免疫担当細胞が活性化・増殖し、刺激細胞を排除すべく攻撃する。獲得免疫系を抑制する免疫抑制剤の多くが本実験系にて顕著な抑制作用を示すことから、MLR は免疫抑制剤のスクリーニングとして広く用いら

れている。なお本検討では、刺激細胞にマイトマイシン C による増殖停止処理を行い、応答細胞の増殖反応のみを評価する MLR (一方向 MLR) を行った。本実験系では、CD8 陽性 T 細胞が非自己の細胞を直接認識する経路と、DC による非自己抗原の取り込みおよび抗原提示を介して CD4 陽性 T 細胞が活性化される経路がはたらくと考えられる。T 細胞や DC は活性化に伴って IL-2 を産生するため、本検討では、IL-2 産生を指標に、T 細胞および DC の活性化を評価した。刺激細胞非存在下では、IL-2 はほとんど産生されないが、刺激細胞を添加することによって IL-2 の産生が有意に上昇する。C₆₀pro 添加群では、C₆₀pro の濃度依存的に IL-2 産生が抑制されることが確認された。一方で、C₆₀ 添加群では、高濃度作用群においても、IL-2 の抑制は認められなかった (Fig. 5a)。しかし、強力な T 細胞抑制剤として知られる Cyclosporine A (CsA) では 100 nM で、ステロイド系抗炎症薬である Dexamethasone (Dex) では 10 nM でそれぞれ IL-2 の産生を完全に抑制することが確認された (Fig. 5b)。これは、IL-2 抑制が認められた C₆₀pro の作用濃度と比べると、物質質量計算で、CsA はおよそ 1000 倍、Dex はおよそ 10000 倍の効果を示したことになる。以上のように、C₆₀pro を作用させることで、MLR における IL-2 産生抑制作用、即ち T 細胞あるいは DC の活性化抑制作用を示したことは事実であるが、本実験系においては、一般的に臨床で用いられている免疫抑制剤よりも作用は弱いことが示された。

6. 抗原特異的 T 細胞増殖反応における C₆₀ フラーレン誘導体の効果

次に、抗原特異的 T 細胞増殖反応における C₆₀ フラーレン誘導体の効果を解析した。抗原特異的な T 細胞が、自身が認識する抗原を DC から提示された際には、激しい増殖を繰り返し、抗原に特異的な T 細胞集団を形成する。これが、獲得免疫応答の礎となる反応である。本検討では、あらか

じめ OVA を免疫したマウスの脾臓細胞を、*in vitro* において OVA で再刺激し、その際のサイトカイン産生を指標として特異的 T 細胞の増殖反応を評価した。なお、本実験系においては、T 細胞への影響と共に、DC が実際に抗原を捕食し、T 細胞へ提示する過程も重要な要素を占める。

抗原特異的 T 細胞の増殖反応において、Th1 細胞の増殖に際しては IFN- γ の産生が、Th2 細胞の増殖に際しては IL-4、IL-5 などのサイトカインが主に産生される。そこで本検討では、Th1 細胞の増殖の指標として IFN- γ の産生を、Th2 細胞の増殖の指標として IL-4 の産生を指標として C₆₀pro の作用を解析した。抗原再刺激によって産生された IFN- γ は、C₆₀pro 100 μ M を添加することによって有意に産生が抑制された。一方で、C₆₀ では C₆₀pro のような抑制効果は観察されなかった (Fig. 6a)。次に、IL-4 産生を評価した。抗原再刺激によって産生上昇した IL-4 は、C₆₀pro を添加することで、C₆₀pro の濃度依存的に産生が抑制された。一方で、C₆₀ では濃度を高めても IL-4 の産生抑制効果は見られなかった (Fig. 6b)。以上の結果より、C₆₀pro が IFN- γ および IL-4 の産生抑制作用を発揮することが明らかとなった。本結果は、C₆₀pro が *in vivo* で示した獲得免疫応答の抑制効果が、*in vitro* においても発揮されたことを示唆している。また、免疫抑制剤のコントロールとして用いた CsA および Dex は、濃度依存的に IFN- γ と IL-4 の両方を抑制し、C₆₀pro と比較しておよそ 100~10000 分の 1 の濃度でその効果を示していた。

7. CD4 陽性 T 細胞におよぼす C₆₀ フラーレン誘導体の効果

次に、C₆₀pro が T 細胞そのものに与える抑制効果をより詳細に検討するため、精製した T 細胞集団を用いた検討を試みた。本検討では、獲得免疫の司令塔ともいえる役割を果たす CD4 陽性 T 細胞に、C₆₀pro がおよぼす抑制効果を評価した。

本実験系は、anti-CD3 によって T 細胞受容体

(TCR; T cell receptor) を介した抗原提示刺激と、anti-CD28 によって共刺激分子を介した刺激を模倣することで、T 細胞が、活性化した DC から特異的な抗原提示を受けた状態を再現する系である。まず、目的とする CD4 陽性 T 細胞画分が精製できているかを確認した。その結果、CD3 陽性-CD4 陽性細胞がおよそ 90%にまで精製・濃縮されたことを確認した (Fig. 7a)。次に、T 細胞の活性化を、T 細胞増殖時に産生される IL-2 を指標として評価した (Fig. 7b)。精製した CD4 陽性 T 細胞に、anti-CD3 および anti-CD28 両方の刺激を与えた群では、IL-2 の産生が有意に上昇した。ここに、C₆₀pro を添加することで、C₆₀pro の濃度依存的な IL-2 産生の抑制が観察された。一方で、C₆₀ 添加群では、いずれの濃度においても IL-2 抑制は認められなかった。なお、CsA および Dex は、IL-2 を強力に抑制し、その効果を示した濃度は C₆₀pro と比べて 1000~10000 分の 1 であった。以上の結果より、C₆₀pro は、CsA や Dex といった免疫抑制剤よりも作用が弱いものの、CD4 陽性 T 細胞が抗原提示を受けた際の活性化応答を抑制する作用があることが明らかとなった。また、C₆₀ には、CD4 陽性 T 細胞の活性化抑制作用は認められなかった。即ち、C₆₀pro は *in vitro* において、T 細胞、少なくとも CD4 陽性 T 細胞への抑制作用があることが示された。

8. B 細胞に C₆₀ フラーレン誘導体がおよぼす影響

先ほどまでの検討では、T 細胞や DC を含む経路における C₆₀pro の抑制効果を評価してきたが、これらに着目した検討では、*in vivo* で C₆₀pro が示した顕著な抗体産生抑制作用を十分に説明するには至らなかった。

そこで次に、B 細胞からの抗体産生に C₆₀pro が与える抑制効果に関して評価を試みた。まず、目的とする B 細胞画分が精製できているか確認した。その結果、B 細胞がおよそ 90%にまで精製・濃縮されたことを確認した (Fig. 8a)。精製した

B 細胞を播種し、C₆₀ フラーレン誘導体を添加したのち、抗 CD40 抗体および IL-4 によって刺激を与えた。抗 CD40 抗体は B 細胞上の CD40 に結合し、T 細胞の CD40L を介したシグナルを模倣することで B 細胞の分化増殖を誘導する。また、IL-4 は B 細胞に作用して、IgE へのクラススイッチを誘導する。これら 2 者が共存した状態で B 細胞を培養した。本実験では、C₆₀ フラーレン誘導体が抗体産生におよぼす抑制効果について、培養上清中の IgE 産生を指標に評価した。その結果、抗 CD40 抗体と IL-4 を添加することによって、多量の IgE が誘導されることが確認され、C₆₀pro 添加群では 4、20、100 μM で有意に IgE の産生抑制が認められた。一方で、未修飾の C₆₀ では、高濃度で IgE の抑制傾向が観察されたものの、有意な抑制効果は認められなかった。なお免疫抑制剤である CsA は、1 μM を添加することで IgE の有意な産生抑制が認められた (Fig. 8b)。なお、CsA は主に T 細胞を阻害する選択的阻害剤だが、高濃度では、B 細胞に対する抑制作用も発揮することが知られている。先の検討で、T 細胞応答を抑制した濃度の方がより低濃度であり、CsA は B 細胞に比べて T 細胞への抑制作用が強いことが、本検討からも確認された。以上の結果より、C₆₀pro は、T 細胞活性化に対して抑制効果を示した濃度よりも低い濃度で、B 細胞からの抗体産生に対する抑制効果を発揮することが示された。従って、C₆₀pro による抑制作用は、T 細胞よりも B 細胞に対する方が強い可能性が示された。

9. TI 抗原による抗体産生に C₆₀ フラーレン誘導体がおよぼす効果

以上の *in vitro* の実験では、免疫応答抑制のコントロールとして用いた CsA や Dex のサイトカイン抑制作用と比較して、C₆₀pro の作用は弱いことが示されてきた。一方で、一節の *in vivo* の検討において、CsA を OVA 抗原と共にマウス腹腔に投与すると、CsA が C₆₀pro よりも物質重量計算で高用量であったにもかかわらず、抗体産生抑制効

果を示さなかったことを確認している (Fig. 2f, g)。また、前検討までの結果から、C₆₀pro による作用は、T 細胞よりも B 細胞に強い可能性が示されている。そこで次に、C₆₀pro が B 細胞への直接作用を介して *in vivo* において抗体産生抑制効果を発揮した可能性を検証した。一節の検討で用いた OVA は、特異的抗体の産生誘導に OVA 特異的 T 細胞による補助シグナルが必須であり、胸腺依存性 (Thymus-Dependent; TD) 抗原と呼ばれる。即ち、TD 抗原に対する抗体産生応答には、B 細胞の活性化のみならず、DC による抗原の捕捉と抗原提示、および抗原特異的 T 細胞の誘導が必須である。従って、C₆₀pro が OVA に対する抗体産生を抑制したことは一節において述べた通りであるが、C₆₀pro の *in vivo* における主な作用点、DC、T 細胞、B 細胞いずれの細胞群に作用した結果であるのかは明らかでない。本項では、B 細胞の活性化のみで抗体が誘導される、胸腺非依存性 (Thymus-Independent; TI) 抗原を用いた検討を実施した。TI 抗原は大きく 2 種類に分類することができ、それぞれ TI-1 抗原、TI-2 抗原と呼ばれる。TI-1 抗原の例としては、LPS や細菌 DNA が挙げられ、Toll 様受容体など、細胞表面受容体に結合して B 細胞を活性化し、B 細胞増殖および形質細胞への分化を誘導する。TI-2 抗原は、同じタンパク質もしくは糖鎖エピトープを連続して多数有する抗原であり、B 細胞受容体を架橋することで強力にシグナルを伝え、形質細胞への分化を誘導できる。なお、通常のクラススイッチに必要な T 細胞由来のサイトカインが供給されないため、産生される抗体は自然抗体である IgM および IgG3 である。

まず、TI-1 抗原として LPS を用いて実験を行った。その結果、LPS 接種により、LPS 特異的 IgM および IgG3 の産生が見られた。しかし、C₆₀pro 投与によって、これら産生量が有意に変動することはなかった。一方で、興味深いことに、T 細胞選択的抑制剤であり、B 細胞への抑制作用は弱い CsA 投与群で、IgM や IgG を亢進する結果が得ら

れた (Fig. 9a, b, c)。次に、TI-2 抗原として NP-Ficoll を用いて同様の評価を行った。その結果、NP-Ficoll 接種により、NP 特異的 IgM および IgG3 の産生が認められたが、こちらも C₆₀pro 投与による有意な変動は認められなかった。また、CsA 投与群では、IgG3 抗体の産生が促進する結果が得られた (Fig. 9d, e, f)。このことから、一節において OVA 特異的抗体産生を抑制した濃度帯では、C₆₀pro は、T 細胞の関わらない経路における B 細胞からの抗体産生を抑制しないことが示された。なお CsA の結果に関して、B 細胞にも作用点をもつことは先述のとおりだが、自然抗体の産生促進がみられた例は未だ報告がなく、CsA は自然抗体の産生に関わる B 細胞 (B-1 細胞等) に対して、未知の効果を有する可能性がある。

以上の結果より、一節において示した C₆₀pro の抗体産生抑制効果は、T 細胞や DC も関わる経路において発揮された可能性がある。つまり、単に B 細胞のみに着目した実験系では評価しきれなかったような作用によって誘発された可能性が考えられた。二節では、主に T 細胞、B 細胞に着目した系において実験を行ってきた。なお MLR や抗原特異的 T 細胞増殖反応においては、DC を介した T 細胞の応答を評価したが、現在、DC そのものに着目し、C₆₀pro が抗原プロセッシングの過程や抗原提示過程に与える抑制効果について検討中である。

in vitro における各種実験系において、C₆₀pro は、幅広い免疫抑制作用を示している一方で、既存の免疫抑制剤に匹敵する作用を示す点は発見できなかった。一方で、C₆₀pro は、CsA のような T 細胞応答抑制効果をもつと共に、CsA では認められなかった TD 抗原に対する強い抗体抑制能を有すると考えられる。本節で用いた実験系はいずれも、臨床応用が進む免疫抑制剤で顕著な薬効を確認できることから、免疫抑制剤のスクリーニング系として重要な実験系であった。本観点から考えると、C₆₀pro が、本節で実施した実験系において、他の免疫抑制剤と比較して非常に弱い作用

しか示さなかった一方で、*in vivo* において強い効果を示したことから、C₆₀pro は既存の免疫抑制剤とは異なる、未知の獲得免疫抑制機構を有している可能性が考えられる。

10. グルコース修飾フラレンに関する検討

分担研究者の吉岡の報告書において記載している通り、平成 25 年度には、C₆₀pro の炎症性腸疾患モデルマウスにおける治療効果をも検討した。その結果、腹腔投与において、顕著な治療効果を発揮可能であるものの、経口投与においては、治療効果が減弱することが明らかとなった。現在、C₆₀pro の体内動態解析を実施しつつあるものの、詳細は不明である一方で、経口投与においては、腸管吸収性の乏しさにより、C₆₀pro が体内に移行することができず、経口投与における治療効果が減弱した可能性も考えられる。医薬品の腸管吸収性を向上させる一つの戦略として、グルコース修飾に期待が寄せられている。腸管上皮細胞にはグルコーストランスポーターが強く発現しており、グルコースを吸収している。そのため、薬物をグルコース修飾することで、腸管吸収性を高める試みが試みられている。そこで、C₆₀pro の腸管吸収性向上を目的に、グルコース修飾 C₆₀ フラレンの創製を試みた。グルコース修飾 C₆₀pro の創製を最終目標としているが、本年度は、合成法の確立を第一目標に、水酸化 C₆₀ フラレンを用いた検討した。分担研究者の小久保の報告書に記載している通り、グルコース修飾水酸化 C₆₀ フラレンの合成に成功したことから、次に、抗炎症活性を評価した。まず初めに、ヒト腸管上皮細胞株 (Caco-2 細胞) を用いてグルコース修飾 C₆₀ フラレンおよび、鑄型として用いた C₆₀(OH)₁₂ を加え、細胞毒性を LDH アッセイにより評価した (Fig. 10)。

その結果、グルコース修飾 C₆₀ フラレンは 100 μM では細胞傷害性を示さない一方で、C₆₀(OH)₁₂ は 100 μM で有意に細胞生存率が減少することが明らかとなった。

次に、Caco-2 細胞を用いてグルコース修飾 C₆₀ 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 (Fig. 11)。Caco-2 細胞にグルコース修飾 C₆₀ フラーレン及び C₆₀(OH)₁₂ を作用させた後に、IL-1β 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-1β 刺激によって IL-8 産生が有意に増加し、C₆₀(OH)₁₂ は IL-8 の産生をさらに亢進することが示された。一方で、グルコース修飾 C₆₀ フラーレンを作用させた群において、100μM において IL-8 の産生が抑制されることが判明した。以上の結果から、グルコース修飾することで、細胞毒性を低減しつつ、抗炎症活性を向上可能であることが示された。このメカニズムとして、Caco-2 細胞に発現するグルコーストランスポーターを介して、グルコース修飾 C₆₀ フラーレンが効率良く取り込まれた可能性を考えており、現在、細胞内取り込み量を検討しているところである。

また、大腸上皮細胞には、アミノ酸トランスポーターである ATB(0,+)¹² が発現しており、特に、アルギニンに高い特異性を示すことが知られている。さらに大腸炎の大腸では、ATB(0,+)¹² が発現増強することが知られている。そのため、大腸炎治療において、薬物をアルギニン修飾することで、薬物を大腸組織からより多く吸収可能であることが判明している。そこで現在、C₆₀ フラーレンをアルギニン修飾することで、大腸を標的とした DDS が可能になると考え、アルギニン修飾 C₆₀ フラーレンの創製も進めているところである。

11. C₆₀pro の構造活性相関に関する検討

現在、C₆₀pro が、炎症性腸疾患に対する優れた C₆₀ フラーレン誘導体であると考え、検討を進めている。一方で、より有効かつ安全性に優れた C₆₀ フラーレン誘導体の探索を随時進めることが、第二世代の C₆₀pro の創製に必要不可欠と考えられる。そこで、C₆₀pro を鋳型として、6 種類の官能基修飾誘導体を新規合成し (Fig. 12 および分担

研究者の大江の報告書を参照)、抗炎症活性を評価した。本結果については、まだ再現性の必要があると考えているものの、現段階のデータについて、報告させていただく。Caco-2 細胞に各種 C₆₀ フラーレン(A)~(F)及び C₆₀pro を作用させた後に、IL-1β で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した (Fig. 13)。その結果、IL-1β 刺激によって IL-8 産生が有意に増加したものの、C₆₀ フラーレン(A)~(F)を作用させた群において、濃度依存的に IL-8 の産生が抑制された。特に、C₆₀ フラーレン(D)および(E)においては、C₆₀pro と比較しても、より強い抗炎症活性を発揮し得ることが明らかとなった。

12. まとめ

我々はこれまでに、炎症性疾患に対する安全かつ有効なナノ医薬の開発に向けた検討を行う中で、腸管上皮細胞を IL-1β 刺激した際に誘導される自然免疫系の炎症性サイトカイン (IL-8) 産生を、C₆₀pro が抑制することなどを示してきた。我々は現在、炎症性サイトカイン産生抑制の作用点の探索に向け、分子レベルでの検討を行っているところである。IL-1β 刺激による IL-8 産生は、シグナル伝達経路である Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 経路を介することが知られる。IL-1β による刺激を受けた細胞では、IL-1 受容体、MyD88、IRAK、TRAF6 の順に活性化が進む。TRAF6 からは、シグナルが MAPK 経路と NF-κB 経路とに分岐し、MAPK 経路では ERK、JNK、p38 といった MAPK ファミリー分子が、NF-κB 経路では不活性型 NF-κB が、それぞれリン酸化を受けて活性化した後核内へ移行し、炎症性サイトカインの転写を促す。MAPK 経路の中心分子である ERK、JNK、p38 は、阻害することで炎症が抑制されることから、各阻害剤を利用した炎症性疾患治療研究がなされている。例えば、ERK 阻害によって、DC からの IL-23 や IL-1β などの産生を抑えることで、自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の治療効果が見られることなどが既に報告され

ている。そして、NF- κ B は、言わずと知れた抗炎症薬の雄であり免疫抑制剤でもあるステロイド剤のターゲット分子の一つである。そこで、MAPK 経路、および NF- κ B の核内移行を制御する I κ B に C₆₀pro がおよぼす影響を評価したが、IL-1 β 刺激によって誘導された ERK、JNK、p38、I κ B のリン酸化は、C₆₀pro によって変動していなかった。C₆₀pro の炎症性サイトカイン抑制の作用点が、mRNA の転写後修飾、翻訳阻害、サイトカイン放出阻害など、他の部分にある可能性を考慮し、現在鋭意検討中である。本知見は、上記のような、現在注目されている炎症性疾患治療の作用点とは異なった作用点で、C₆₀pro が炎症性サイトカイン抑制作用を有することを示唆する興味深い結果であると言えよう。

また、C₆₀pro はナノ素材としても興味深い作用を示している。多くのナノ素材は、免疫担当細胞を活性化することが報告されている。例えば、表面をアミノ酸で修飾した C₆₀ フラーレンをマウスに投与することで、OVA に対する抗体産生が促進されることや、マロン酸で修飾した C₆₀ フラーレンを投与することで好中球が活性化し、化膿レンサ球菌による感染を抑制することが報告されているのに対し、C₆₀pro は逆に、免疫応答抑制効果を示した。このことから C₆₀pro は、他のナノ素材とも異なる作用点をもつ、面白みのある素材であると考えられる。

我々のグループでは、現在、炎症性腸疾患の疾患モデルマウスを用いて、C₆₀pro の有効性を確認している。ハプテンであるオキサゾロンを直腸に投与して IBD 様病態を発症させると、急激な体重減少が誘導される。しかし、C₆₀pro を腹腔に投与した結果、オキサゾロンおよび C₆₀pro を投与していないコントロール群と同程度まで回復するなど、顕著な治療効果が観察されている。さらにその作用は、顕著な薬効を示した投与量のおよそ 100 分の 1 という少ない投与量でもなお、観察されることを確認している。以上のように、我々は有効性の検討において、既に C₆₀pro の炎症性疾

患に対する治療効果を確認しつつある。炎症性腸疾患の病態形成には、さまざまなサイトカインや、自己応答性 T 細胞による組織傷害、自己抗体の産生などが複雑に絡み合っているとされ、より効果的な炎症性腸疾患治療には、これら過剰な免疫応答を広範囲に抑制することが理想的であろう。現在 IBD 治療において研究開発が進展しているのは、抗 TNF- α 抗体や、IL-12 p40、IFN- γ などのサイトカイン、 α_4 インテグリンなどの接着分子を標的とした分子標的治療薬であり、これらは 1 種類の分子のみに作用を発揮する。一方で本研究では、C₆₀pro が T 細胞や B 細胞に抑制効果を示すことを明らかとし、また、上述の *in vitro* の検討では IL-8 以外の炎症性サイトカインも抑制することを明らかとしている。このように複数の作用点から、一度に多くの経路を抑制する可能性のある C₆₀pro は、炎症性腸疾患治療に対する革新的な薬となり得ると期待している。

さらに、フラレンは、他の炎症性疾患に対する治療効果に関する報告も一部なされており、C₇₀ フラーレン誘導体による検討ではあるが、喘息モデルマウスに対し、高い予防効果と共に、治療効果を発揮することが示されている。この治療効果には、C₇₀ フラーレン誘導体による抗炎症性エイコサノイドの誘導による効果が示唆されている他、同著者らは、C₆₀ フラーレン誘導体が、マスト細胞からの脱顆粒を抑制することも過去に報告している。我々の研究においても、C₆₀pro が、IgE 産生を *in vivo*、*in vitro* の双方で抑制することや、Th2 型サイトカインの産生を抑制する傾向を確認しており、フラレンのアレルギー治療薬としての応用は有望である可能性がある。一方で、アレルギー応答成立に重要な IgE 産生には、B 細胞への Th2 細胞による補助が重要であり、C₆₀pro が B 細胞に直接作用する経路だけでなく、Th2 細胞を抑制したことによる IgE 抑制作用を示した可能性も考えられる。現在、CD4 陽性 T 細胞のサブタイプである Th1 細胞・Th2 細胞への分化に C₆₀pro が抑制効果を与えるかについて検討