

10. THF・飽和食塩水での抽出条件の検討

血液 500 μ L に DMSO にて 100 μ g/mL に調製したプロリン型フラレンを 100 μ L 加え、飽和食塩水、少量の塩酸を加え、pH 試験を用いて溶液が酸性になっていることを確認した。そこへ THF を加え超音波処理を行った。これに少量のメタノール、又はアセトニトリルを加えて抽出操作を行い、THF 層を回収した。溶媒を取り除き、DMSO にて 500 μ L に定容した後に HPLC にて分析した。

11. 血中フラレン抽出物を用いた検量線の作製

血液 500 μ L に DMSO にて溶解したプロリン型フラレンを加え、飽和食塩水、少量の塩酸、THF を加え超音波処理を行った。これに少量のメタノールを加えて抽出操作を行い、THF 層を回収した。溶媒を取り除き、DMSO にて 1 mL に定容した後に HPLC にて分析した。

(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

C₆₀pro の炎症性腸疾患モデルマウスにおける治療効果

代表研究者はこれまでに、C₆₀ フラレン誘導体である水酸化フラレンの炎症性腸疾患に対する治療効果について、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性モデルマウスを用いて検討し、顕著な治療効果を発揮可能であることを見出している。本検討では、水酸化フラレンよりも強い抗炎症活性を有する C₆₀pro を用いて、2 種類の炎症性腸疾患モデルマウスにおける治療効果を検討した。

まず、TNBS を直腸投与することで構築する TNBS 誘発性腸疾患モデルを用いて検討した (図 1)。本モデルは、Th1 型の免疫を誘導することが知られており、クローン病のモデルマウスとして汎用されている。C₆₀pro を経口投与し、体重減少を指標として治療効果を検討したところ、TNBS 投与群で未処理群と比較して顕著な体重減少が観察されると共に、C₆₀pro 投与群においても、治療効果は観察されなかった。

次に、オキサゾロンを直腸投与することで構築するオキサゾロン誘発性腸疾患モデルを用いて検討した (図 2)。本モデルは、Th2 型の免疫を誘導することが知られており、潰瘍性大腸炎のモデルマウスとして汎用されている。C₆₀pro を経口投与し、体重減少を指標として治療効果を検討したところ、オキサゾロン投与群で未処理群と比較して顕著な体重減少が観察された。また、C₆₀pro 投与群においても、若干の体重減少抑制効果は観察されたものの、顕著な治療効果とは言い難いも

のであった。以上の結果から、C₆₀pro の経口投与においては、両モデルでは治療効果を発揮することは、現段階では困難であることが示された。

次に、オキサゾンモデルを用いて、C₆₀pro の腹腔内投与における治療効果を検討した(図 3)。その結果、経口投与時とは異なり、C₆₀pro は高濃度(15 mg/kg, 5 mg/kg)投与群において顕著な体重回復が認められ、それ以下の濃度においても対照群よりも早期に体重が回復するなど、強い治療効果が認められた。以上の結果から

C₆₀pro の体内動態解析に資する解析手法の確立

現段階において、C₆₀pro の体内動態に関しては全く情報が無い。そのため、体内動態を解析するための、分析法を確立することが急務となっている。そこで本研究では、C₆₀pro の体内動態を解析するための、解析法の確立を試みた。

C₆₀pro の体内動態を解析するにあたり、組織から C₆₀pro を抽出する必要がある。そこでまず、C₆₀pro を生体試料から抽出するのに適した溶媒を探索した。水、メタノール、酢酸エチル、アセトン、クロロホルムに C₆₀pro を加えたところ、全ての溶媒において、1 mg/mL では分散せず沈殿が生じた。100 µg/mL においては、メタノール、酢酸エチル、アセトン、クロロホルムを加えた検体において、若干沈殿物が残る程度であった。さらに 10 µg/mL まで希釈すると、メタノール、酢酸エチル、クロロホルムにおいて、完全に分散していることが判明した。そこで、クロロホルム中において、C₆₀pro が分散しやすい傾向にあると考えられたため、次にクロロホルムを用いて HPLC 解析した。

DMSO に分散させた C₆₀pro を HPLC 解析した結果、濃度依存的にピーク面積が変動し、100 µg/mL から 1 µg/mL まで直線性の高い検量線を作製することができた($R^2=0.9983$) (図 4a, b)。本結果から、HPLC を用いることでプロリン型フラレンは 1 µg/mL まで定量分析できることが明らかとなった。また、今後検量線を作製する際

には DMSO に分散させたものを使用することとした。一方で、クロロホルムに分散させたプロリン型フラレンは、23.99 µg/mL から 1 µg/mL まで分析可能であることが示された(図 1c)。そこで次に、生体試料からの抽出方法について予備検討した。生体試料は有機溶媒ではなく、水系溶媒から構成されるため、生体試料にクロロホルムを加えた際、C₆₀pro が有機層(クロロホルム)に濃縮させる必要がある。しかし、プロリン型フラレンにクロロホルムを加えた後、水を加えて浸透攪拌したところ、クロロホルムは水層と有機層の中間へと移行することが判明した。本結果から、クロロホルムを用いた C₆₀pro の抽出は困難であることが明らかとなった。

これまでに、C₆₀pro が有機溶媒である THF に溶解することが明らかとなっていたことから、次に THF を用いて検討した。しかし、THF に水を加えた際、THF と水が混合してしまい、THF と水を用いて C₆₀pro を抽出することは困難であると考えられた。一方で、水のかわりに飽和食塩水を用いることで、THF 層と水層に分離し、C₆₀pro を THF 層にのみ抽出することが可能であった。本結果から、今後抽出作業には THF と飽和食塩水を用いることとした。

血液中から C₆₀pro を分液抽出する際に、血液中のタンパク質や脂質も同様に抽出され、C₆₀pro の定量分析を阻害することが考えられた。そこで次に、C₆₀pro と共に抽出されるタンパク質や脂質が C₆₀pro の分析に影響を与えるのかを検討した。血液に THF と飽和食塩水を加えて分液操作を行い、得られた THF 相に DMSO に溶解した C₆₀pro を加え、HPLC 解析を行った。検出されたピーク面積から C₆₀pro の濃度を算出したところ、回収率は 101.8%となった(表 1)。本結果から、血液中に存在する THF に溶解するタンパク質や脂質は C₆₀pro の定量分析を邪魔しないことが明らかとなった。血液に検出したプロリン型フラレンのピークから溶液中のプロリン型フラレンの濃度を算出したところ、回収率は 101.8%とな

った(表1)。本結果から、血液中に存在する THF に溶解する物質はプロリン型フラレンの定量分析を邪魔しないことが明らかとなった。

次に、実際に血液中に存在する C₆₀pro を THF と飽和食塩水を用いて分液抽出できるかを検討した。血液に DMSO に溶解した C₆₀pro を加え、THF と飽和食塩水を用いて分液抽出を行った。抽出された THF 相中の C₆₀pro を HPLC にて測定し、抽出されたピーク面積から抽出された C₆₀pro の収率を算出したところ約 7-8%であった(表2)。本結果を受け、C₆₀pro のカルボキシ基が分液環境中で水素を放出し、アニオンとなることで血液中のタンパク質などに結合し、分液抽出で絵は有機層に抽出されなくなるのではないかと予想された。次に、分液抽出による C₆₀pro の抽出効率を高めるため、分液操作の条件検討を行った。C₆₀pro は疎水部分と親水部分のどちらをも有している。そのため、どちらか一方が血液中のタンパク質と結合することで抽出効率が低下している可能性が考えられた。また C₆₀pro はカルボキシル基を有しており、これが血液中ではプロトンを放出することで親水性が高まることで、THF への移行率が低下していると考えられた。そこで、これらのタンパク質を極性の高いアルコールを加えることで立体構造を変化させ、C₆₀pro との結合を断ち切ると同時に、溶媒を酸性に傾けることで C₆₀pro の疎水性を高め、THF 層への抽出効率の向上を図った。今回はアルコールとしてメタノール、及びアセトニトリルを、溶媒の酸性化には塩酸を用いて検討を行った。血液に DMSO に溶解した C₆₀pro を加え、THF、飽和食塩水、少量の塩酸、アルコールを加えて分液抽出を行い、得られた THF 相中の C₆₀pro を HPLC を用いて分析した。抽出されたピーク面積から THF 層に抽出された C₆₀pro の収率を算出したところ、メタノールを加えた検体では約 30%、アセトニトリルを加えた検体では約 44%であった(表3)。

上記の検討により、抽出効率の向上は認められた一方で、抽出率は依然として低いままであった。

そこで、血液に既知濃度の C₆₀pro を加え、これを抽出したものをを用いて検量線を作製することで、抽出効率を無視した定量分析が可能であるのではないかと考え以下の検討を行った。本検討では既知濃度の C₆₀pro を血液に加え、THF、飽和食塩水、少量の塩酸、メタノールを用いて分液抽出を行い、得られた THF 相中の C₆₀pro を、HPLC を用いて定量分析した。抽出された C₆₀pro のピーク面積値と濃度とで検量線を作製した。その結果、加えた C₆₀pro の濃度依存的にピーク面積が変動し、C₆₀pro の添加濃度とピーク面積との間で直線性の高い相関が観察された ($R^2=0.9937$) (図5)。

E. 結論

本検討では、C₆₀pro 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とした。現段階では、経口投与においては、治療効果が認められなかったことから、今後、腸管吸収性を改善する方法が必要と考えられた。その点、研究代表者らは、グルコース修飾したフラレンが有効であるという知見を得つつあり、今後の検討課題といえる。さらに、炎症性腸疾患の治療薬として汎用させるアサコールも、大腸への薬物送達を可能とする DSS 技術が応用されたものであり、リポソームや高分子キャリアーなどに、C₆₀pro を封入することで、大腸への効率的な送達が可能になるものと予想される。また、本検討で用いたモデルマウスは、獲得免疫誘導がほとんど誘導されていないモデルである。一方で、実際の炎症性腸疾患においては、獲得免疫が誘導されている。その点、研究代表者は、C₆₀pro が獲得免疫をも強く抑制することを本年度の成果として見出していることから、今後、他のモデルマウスを用いることで、自然免疫のみならず獲得免疫をも抑制することで、より強い治療効果を発揮できる可能性もあると考えられる。

さらに本検討では、C₆₀pro の体内動態解析を可能とする解析法を構築した。現在、本方法を用い

て体内動態を解析中であり、未だ感度の点で問題があると予想されるが、体内動態に関する基礎情報を来年度取得できるものと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

無し

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 4 件】

1. 吉岡靖雄, 堤 康央：ナノ粒子の安全使用に向けた検討：免疫毒性学の観点から., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
2. 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアルの物性-動態-生体影響の連関評価., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
3. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : The importance of systemic nanotoxicological and toxicokinetic analysis for ensuring the safety of nanomaterials., The XIII International Congress of Toxicology, Seoul (Korea), 30 June-4 July, 2013.
4. Yoshioka Y., Hirose A. : Recent developments in risk assessment of nanomaterials and nano safety science., 49th Congress of the European Societies of Toxicology, Interlaken (Switzerland), 1-4 September, 2013.

【国内学会発表：合計 4 件】

1. 吉岡靖雄, 平 菜由, 山下浩平, 青島央江, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤康央：新規経口ナノ DDS 医薬の開発に向けた C₆₀ フラーレン誘導体の Nano-Safety Design., 第 29 回日本 DDS 学会学術集会., 京都 (京都),

2013 年 7 月.

2. 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 佐上公一, 植村瑛一郎, 角田慎一, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央：新規ナノ医薬の開発に向けた C60 フラーレンの T 細胞への影響評価., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
3. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 宇高麻子, 佐上公一, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央：エンドトキシンショックモデルマウスにおける水酸化 C60 フラーレンの抗炎症効果., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
4. 佐上公一, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 宇高麻子, 植村瑛一郎, 角田慎一, 青島央江, 中村友治, 小久保 研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: グルコース修飾 C60 フラーレンの in vitro における抗炎症作用の解析., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.

【国際学会発表：合計 4 件】

1. Udaka A., Yoshioka Y., Hirai T., Tsunoda S., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Ohe T., Mashino T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The effect of fullerene C60 derivatives on acquired immune system., The XIII International Congress of Toxicology 2013, Seoul (Korea), 30 June-4 July, 2013.
2. Nagano T., Yoshioka Y., Yamashita K., Taira M., Aoyama M., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Fullerenol C60 for developing nanomedicine Part 2 -Assessment of therapeutic effect of fullerenol C60 for

- inflammatory bowel disease-, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.
3. Aoyama M., Yoshioka Y., Yamashita K., Taira M., Nagano T., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.: Fullerol C60 for developing nanomedicine Part. 1 -Assessment of anti-inflammatory effect of fullerol C60 -, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.
 4. Higashisaka K., Nagano T., Taira M., Yamashita K., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Fullerol C60 as a new therapeutic nanomedicine for inflammatory bowel disease., International Conference and Exhibition on Personalized Medicine and Molecular Diagnostics, Chicago (USA), 5-7 August, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得（出願）

発明の名称：潰瘍性大腸炎の予防または治療剤と新規フラーレン誘導體

出願日：平成 26 年 2 月 19 日

国際特許出願番号：PCT/JP2014/053950

発明者：堤 康央、吉岡 靖雄、東阪 和馬、増野 匡彦、大江 知之、山名 修一、青島 央江

出願人：国立大学法人大阪大学、ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社、増野匡彦、大江知之

② 実用新案登録

該当無し

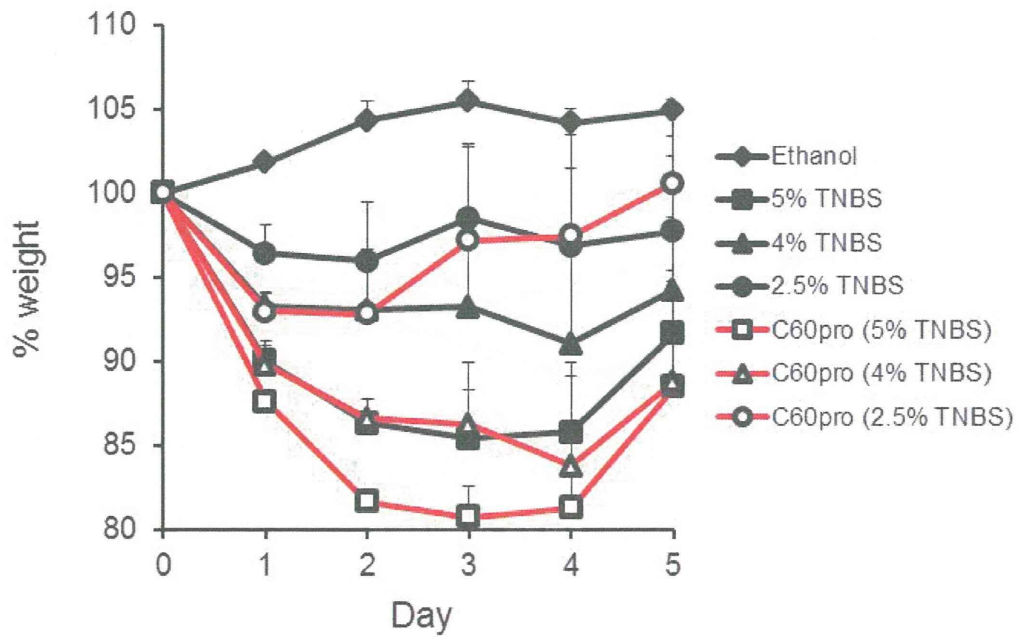


図 1. C₆₀pro の TNBS 誘発性腸疾患モデルへの適用. TNBS をマウスに直腸投与することで、炎症性腸疾患モデルを作製した。その際、C₆₀pro を経口投与し、体重推移を指標として治療効果を検討した。

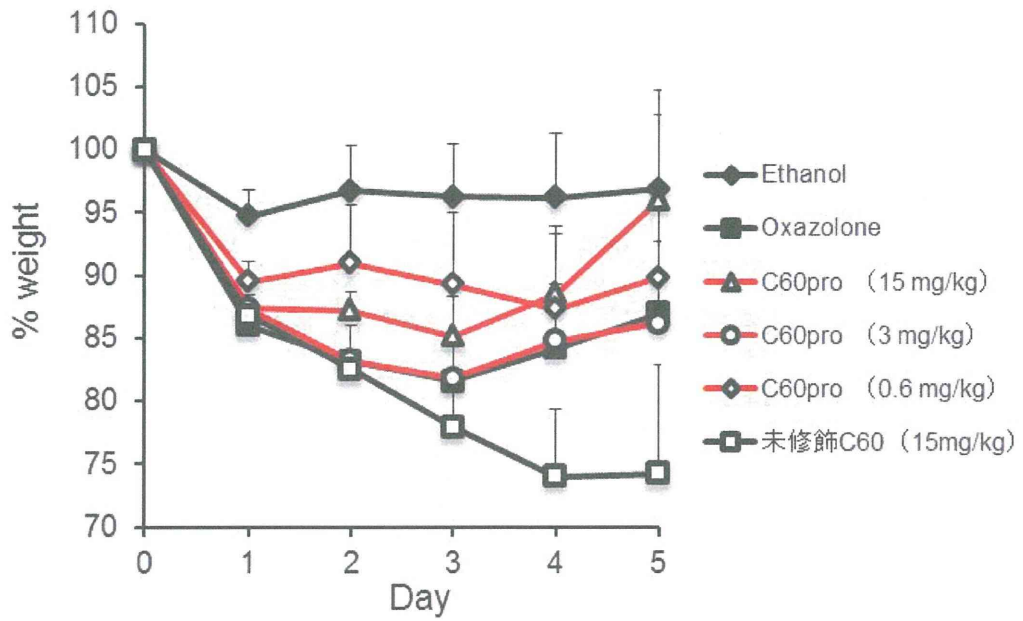


図 2. C₆₀pro のオキサゾロン誘発性腸疾患モデルへの適用（経口投与）．オキサゾロンをマウスに直腸投与することで、炎症性腸疾患モデルを作製した。その際、C₆₀pro を経口投与し、体重推移を指標として治療効果を検討した。

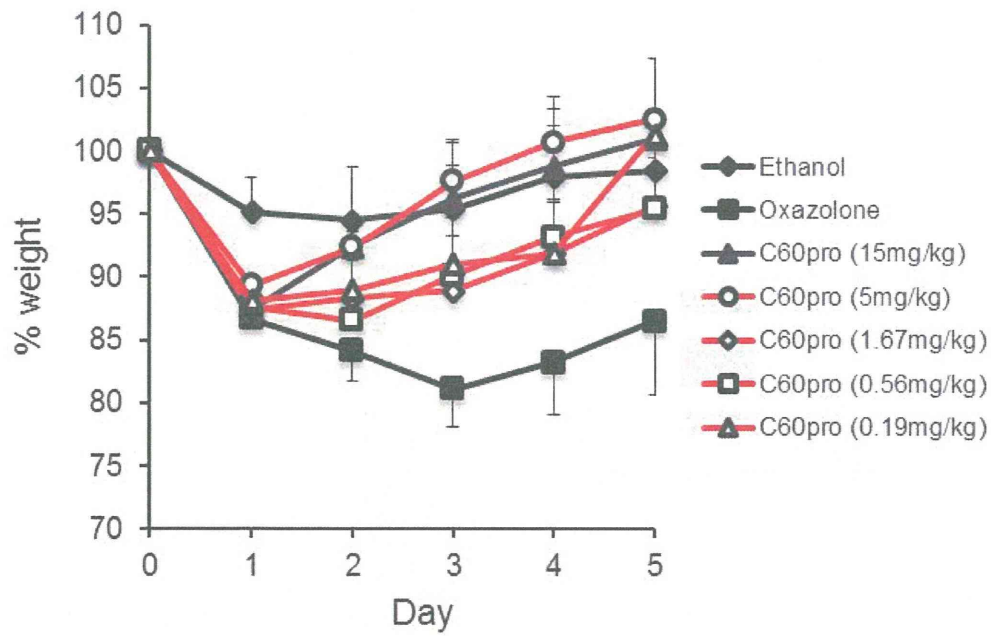


図 3. C₆₀pro のオキサゾロン誘発性腸疾患モデルへの適用（腹腔投与）。オキサゾロンをマウスに直腸投与することで、炎症性腸疾患モデルを作製した。その際、C₆₀pro を腹腔投与し、体重推移を指標として治療効果を検討した。

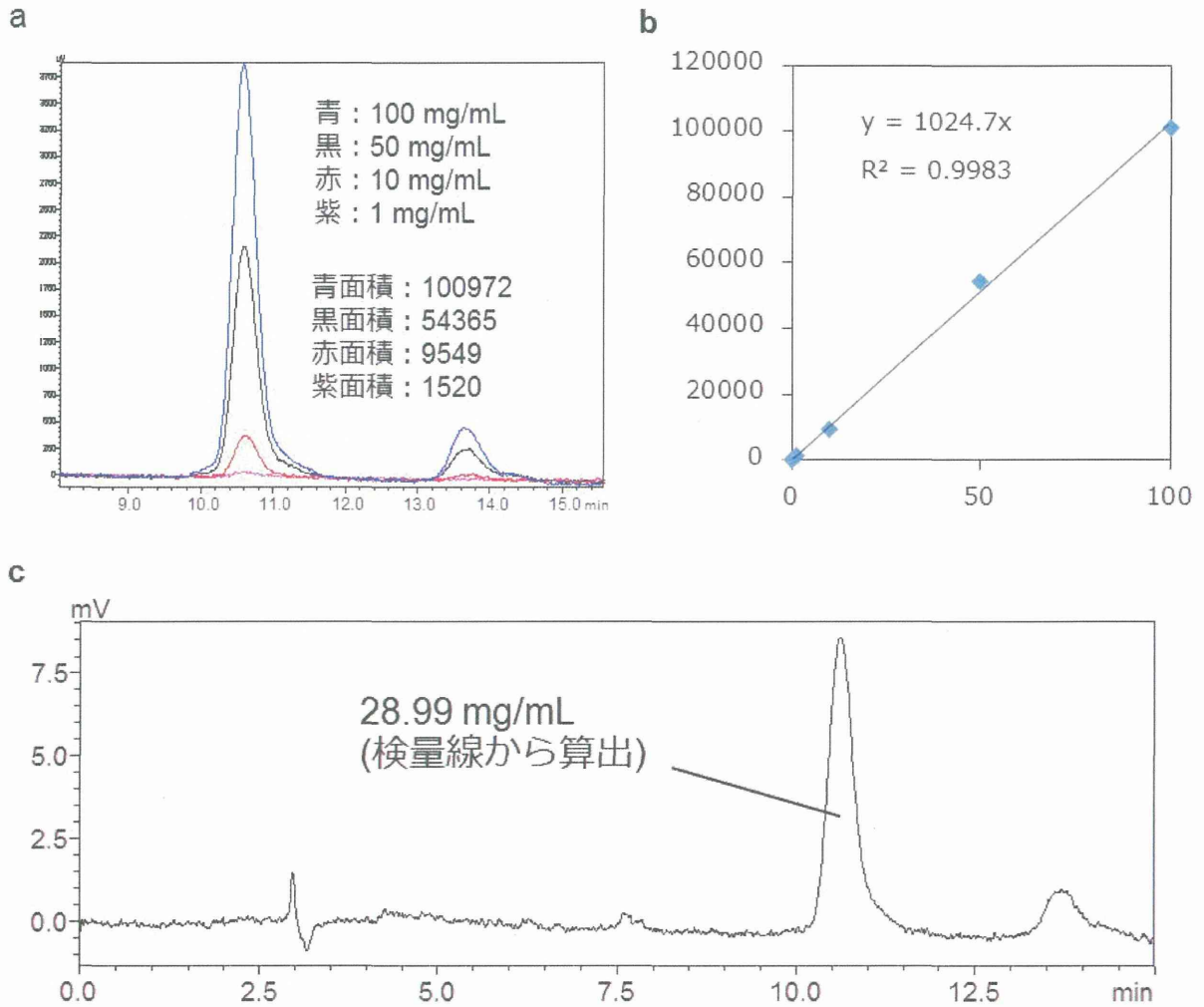


図4. プロリン型フラバーレンのHPLCを用いた定量解析。プロリン型フラバーレンをDMSO、水、クロロホルムにて1 mg/mLとなるように調整した。これらを超音波処理後ボルテックスにて攪拌し、それぞれ10 ng/mLとなるまで10倍ずつ段階希釈した。これらのサンプルをHPLCにて分析した。HPLCの展開溶媒にはDMF：メタノール=8：2（0.1%TFA含有）を流速1 mL/minで流し、検出波長は300 nm、カラムにはBuckeyprepカラムを用いた。検出したプロリン型フラバーレンのピーク面積を求め、これを用いて検量線を作製した（A, B）。また、クロロホルム中のプロリン型フラバーレンは最高濃度のサンプル中の上清のみを測定した（C）。なお、プロリン型フラバーレンは水には溶解しなかったため測定していない。

表1. 血液中THF溶解画分の分析への干渉の確認

面積	μg/mL	予定 μg/mL	回収率%
123647	16.8	16.6	101.4

表2. 血液中からのプロリン型フラールの抽出

面積	μg/mL	予定μg/mL	回収率%
8079	1.1	20	6.6
10285	1.4	20	8.4

表3. THF・飽和食塩水での抽出条件の検討

	area	μg/mL	回収率%
MeOH	52769.38	6.039829	30.2
CH3CN	77519.86	8.872696	44.4
無し	38000	4.349369	43.5

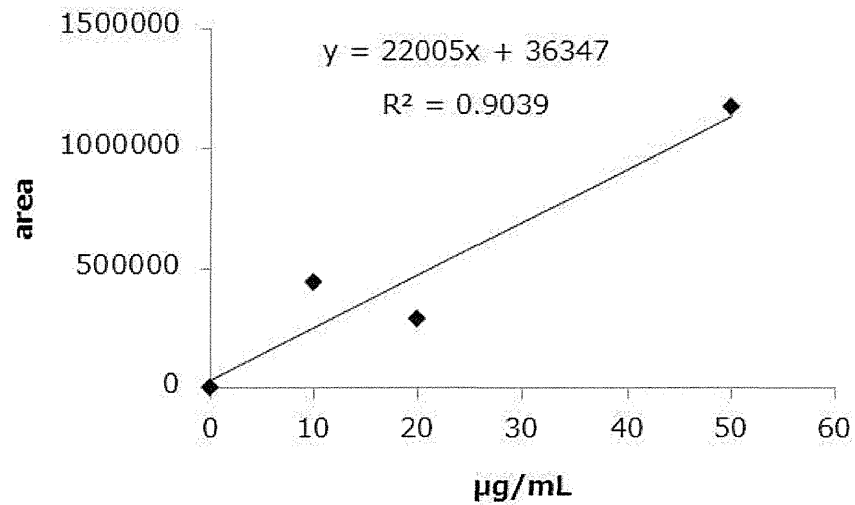


図 5. 血中フラレン抽出物を用いた検量線の作製. 血液 500 µL に DMSO にて溶解したプロリン型フラレンを加え、飽和食塩水、少量の塩酸、THF を加え超音波処理を行った。これに少量のメタノールを加えて抽出操作を行い、THF 層を回収した。溶媒を取り除き、DMSO を用いて 1 mL に定容した後に HPLC により分析した。

C60フラレー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

研究分担者 藤尾 慈 大阪大学大学院薬学研究科 臨床薬効解析学分野

研究要旨

【背景】近年 TNF α を標的とした生物製剤が炎症性腸疾患に対する治療法として確立されているが、抗 TNF α 抗体が心不全の予後を悪化させる可能性が報告されており、心不全を合併する炎症性腸疾患症例での使用はリスクが伴う。

【目的】本研究は、フラレーンによる炎症性腸疾患の治療法確立の過程で細胞死の抑制と活性酸素種の関連を詳細に解明し、その知見を炎症性腸疾患以外の疾患への展開の可能性を探ると共に、活性酸素種による細胞死に関与すると報告されているイオンチャネルの一つである P2X7 受容体の心臓における病態的意義を明らかにする事を目的とする。

【方法と結果】心筋細胞において過酸化水素刺激により活性酸素種による心筋細胞死を誘導する系を用いて C60-360H の細胞死抑制効果を検討したが、コントロールと比較して有意差を認めなかった。一方、P2X7 受容体の遺伝子欠失マウスは心筋梗塞後のリモデリングの増悪を認めた。かかる病態と細胞死の関連をリガンドの一つである Cathelicidin antimicrobial peptide を用いて検討したところ心筋細胞死を誘導する直接効果ではなく、心線維芽細胞の遊走を介して梗塞後リモデリングの増悪を惹起している事が明らかとなった。

【結論】フラレーン C60-360H は過酸化水素による心筋細胞死を抑制しない。また、P2X7 受容体刺激は心筋細胞死の誘導ではなく、心線維芽細胞の遊走を介して心筋梗塞後リモデリングの増悪に寄与する。

A. 研究目的

我が国の潰瘍性大腸炎・クローン病をはじめとする炎症性腸疾患の症例数は 15 万人を超え、今後増加する事が予想されている。これまで炎症性腸疾患に対してアミノサリチル酸製剤・副腎皮質ステロイド・免疫抑制剤等が治療薬として使用されてきた。近年 TNF α を標的とした生物製剤が炎症性腸疾患に対する治療法として確立され、非常に優れた寛解導入・寛解維持効果を示し汎用されつつある。しかしながら、抗 TNF α 抗体が心不全の予後を悪化させる可能性が報告されており、心不全を合併する炎症性腸疾患症例での使用はリスクが伴う。本研究は、フラレーンによる炎症性腸疾患の治療法確立の過程で細胞死の抑制と活

性酸素種の関連を詳細に解明し、その知見を炎症性腸疾患以外の疾患への展開の可能性を探る事を第一の目的とする。第二に細胞死に関与するイオンチャネルの病態的意義を検討する。

B. 研究方法

1. フラレーンの心筋細胞死抑制効果の検討

心筋細胞において活性酸素種は細胞肥大や細胞死を惹起し心不全の病態形成に寄与する事が報告されている。一方、フラレーンは強力な活性酸素除去作用を有している。心筋細胞の活性酸素種による細胞死に対するフラレーンの抑制効果を検討した。細胞の生存を還元能を指標とした Cell viability assay により評価し、過酸化水素刺

激による細胞死について検討した。

2. プリン受容体の細胞傷害における病態的意義

ATP により活性化されるイオンチャネルのプリン受容体のひとつである P2X7 受容体の心臓における細胞死・炎症・線維化の各病態での意義を明らかにする事を目的に以下の実験を施行した。

1) P2X7 受容体遺伝子欠失マウスにおいて心筋梗塞を作成し心エコーを用いた心機能解析及び組織学的解析を施行した。

2) P2X7 受容体のリガンドの一つである Cathelicidin antimicrobial peptide(以下 CAMP) を用いて心筋細胞及び心線維芽細胞における P2X7 受容体活性化による細胞死・肥大・増殖・遊走等の細胞機能変化を検討する。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. フラーレンの心筋細胞死抑制効果の検討

心筋細胞を過酸化水素(100 μ M)により刺激し 24 時間後に細胞死が誘導される事を確認した。かかる細胞死が非特異的な現象であるかどうかを検討するため細胞内カルシウムキレーターである BAPTA-AM を用いて細胞死の抑制を検討したところ細胞死が約 60%抑制された (図 1)。また、抗酸化剤である N-Acetyl Cysteine にても細胞死が抑制された事より、活性酸素種による刺激によりカルシウムイオンを介して細胞死が誘導されていると考えられた。かかる系においてフラレーン (C60-360H) の抗酸化作用による細胞死抑制効果を検討した。しかしながら、フラレーン 50 μ M、100 μ M、200 μ M のいずれの濃度においても細胞死の抑制効果は認めなかった (図 2)。今後、フラレーンの心筋細胞における活性酸素種除去の確認が必要であると考えられた。また、活性酸素の産生機序によりその作用が限定される可能性が示唆された。

2. プリン受容体の細胞傷害における病態的意義

1) まず、野生型マウスにおいて左冠動脈の結紮により心筋梗塞を作成した。野生型マウスにおい

て梗塞後 4 日目から 14 日目において著明な P2X7R の遺伝子発現の上昇を認めた。続いて P2X7 受容体遺伝子欠失マウスにおいて心筋梗塞を作製したところ、野生型と比して有意な線維化領域の拡大と心機能の低下を認め梗塞後リモデリングに対し P2X7R シグナルが保護的に働く事が示唆された。かかる保護作用の機序として既報によりインフラマソーム関与が示唆されている。本研究においてもインフラマソームの活性化を検討したが、IL-1 β の発現や caspase-1 の活性化において P2X7 受容体遺伝子欠失マウスは野生型と比して有意な差を認めなかった。一方野生型マウスにおいて心筋梗塞後 CAMP の発現の著明な上昇を認めた。

2) P2X7 受容体のリガンドの一つである CAMP を用いて心筋細胞における P2X7 受容体活性化による細胞死を検討したが、明らかな細胞死は認めなかった。また、受容体刺激による ERK の活性化を検討するも活性化は認められず心筋細胞においては P2X7 受容体の病態的意義は乏しいと考えられた。一方、心線維芽細胞において CAMP 刺激により ERK の活性化が認められ、また線維芽細胞の遊走が著明に抑制された。これらの抑制効果は P2X7 受容体遺伝子欠失マウスの心臓より調整した心線維芽細胞においては認められなかった。以上の結果より心臓において P2X7 受容体は心筋細胞死ではなく心線維芽細胞における遊走に関与する事が明らかとなった。

E. 結論

1. 心筋細胞において、過酸化水素刺激による細胞死はフラレーンの抗酸化により抑制されない。
2. 心臓において P2X7 受容体は、心筋細胞死の誘導ではなく線維芽細胞の遊走の活性化を介して心筋梗塞後リモデリングの病態形成に寄与する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

無し

【総説・その他】

無し

② 学会発表

【国内学会発表：合計 2 件】

1. 吉岡靖雄, 平 菜由, 山下浩平, 青島央江, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤康央:新規経口ナノ DDS 医薬の開発に向けた C₆₀ フラーレン誘導体の Nano-Safety Design., 第 29 回日本 DDS 学会学術集会., 京都(京都), 2013 年 7 月.
2. 熊谷渉平、中山博之、宮脇昭光、毛利友美、藤尾慈: 心筋梗塞後リモデリングにおける P2X7 受容体の病態学的意義の解明, 第 10 回宮崎サイエンスキャンプ, 宮崎, 2014 年 2 月

【国際学会発表：合計 4 件】

1. Shohei Kumagai, Hiroyuki Nakayama, Akimitsu Miyawaki, Tomomi Mohri, Yasushi Fujio: Inhibition of P2X7 Receptor Signaling Promote Adverse Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction thorough Enhanced Cardiac Fibroblast Migration, American Heart Association, Dallas , 17-19 November, 2013.
2. Nagano T., Yoshioka Y., Yamashita K., Taira M., Aoyama M., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.: Fullerenol C60 for developing nanomedicine Part 2 -Assessment of therapeutic effect of fullerenol C60 for

inflammatory bowel disease-. , 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.

3. Aoyama M., Yoshioka Y., Yamashita K., Taira M., Nagano T., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.: Fullerenol C60 for developing nanomedicine Part. 1 -Assessment of anti-inflammatory effect of fullerenol C60 -, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.
4. Higashisaka K., Nagano T., Taira M., Yamashita K., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Fullerenol C60 as a new therapeutic nanomedicine for inflammatory bowel disease., International Conference and Exhibition on Personalized Medicine and Molecular Diagnostics, Chicago (USA), 5-7 August, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

なし

② 実用新案登録

なし

その他

なし

研究協力者

中山博之

森原啓文

土山大介

熊谷渉平
舎川洸太

早水菜穂

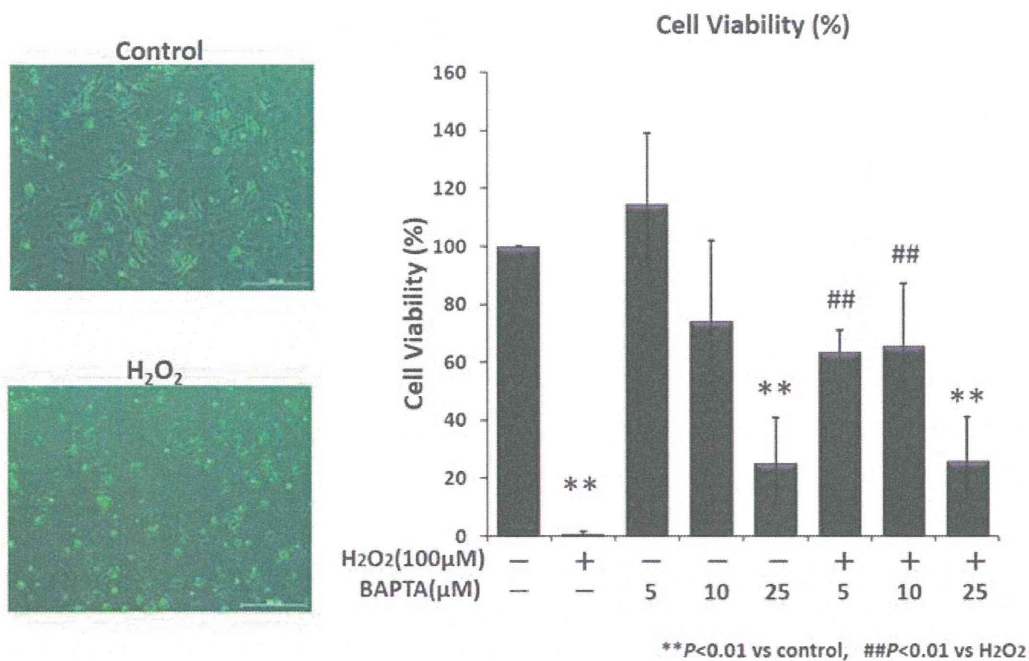


図 1. 過酸化水素により誘導される心筋細胞死。 ラット新生仔心筋細胞を調整し過酸化水素 100 μM にて刺激による細胞死の誘導を検討した。20 時間後著明な心筋細胞死が観察された (右図)。細胞死を細胞の還元能を指標に、Cell Viability として生化学的な評価を行った (左図)。これらの結果より過酸化水素刺激により 95%以上の心筋細胞が死滅するが、カルシウムキレーターである BAPTA の前処置により細胞死の抑制を認めた。

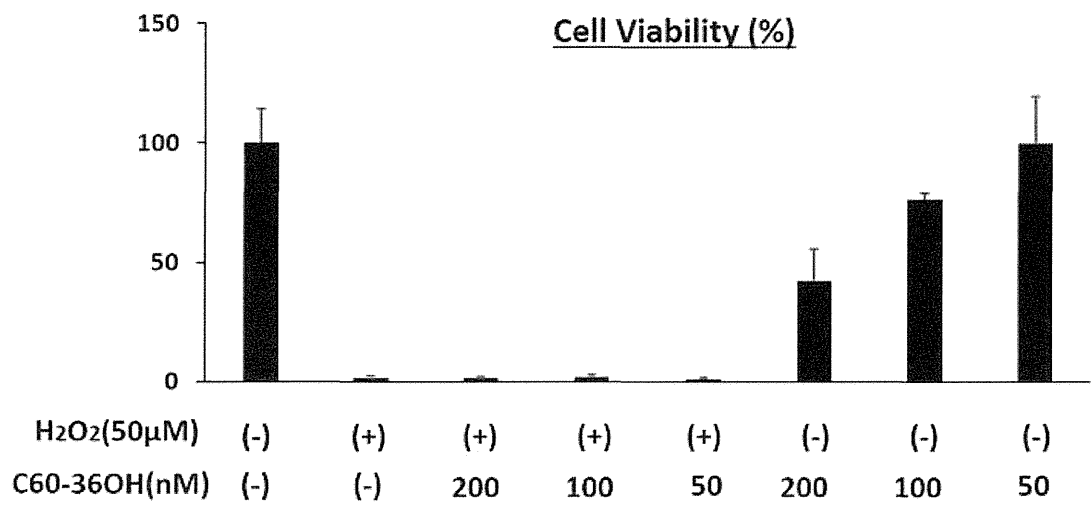


図 2. 過酸化水素により誘導される心筋細胞死はフラレン (C60-36OH) により抑制されない. ラット新生仔心筋細胞を調整し過酸化水素刺激 (50µM) により細胞死を誘導し、C60-36OH 前処置による細胞死抑制効果を検討した C60-36OH の前処置は、50nM、100nM、200nM の各濃度において心筋細胞死を抑制しなかった。また、C60-36OH は 200nM の濃度では過酸化水素刺激がなくとも細胞死を誘導し細胞毒性を示した。

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 小久保 研 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻物理有機化学領域

研究要旨

水酸化フラーレンにグルコース部位を導入したグルコース化水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_9(Glc)_3$ ($Glc = C_6H_6O_6$) を合成し、DMSO 中での粒径測定ならびに濃度や極性を変化させたときの凝集挙動について観察した。シングルナノ領域の精度が高い IG 法によってこのフラーレン誘導体の平均粒径は 2.26 nm と見積もられ、DMSO 中においては分子サイズで単分散することを確認した。また、対応する水酸化フラーレンの粒径 1.02 nm に比べて増大していることから、NMR や IR、TGA、元素分析の結果と共に、グルコース部位の導入を確認した。

フラーレン類の体内動態を HPLC で分析可能かどうか、生体内組織（肝臓および血液）に添加したプロリン誘導体の抽出方法について検討を行った。最適条件下、HPLC にて検出できることを確認したが、生体内組織とフラーレン誘導体の親和性が強く、著しい抽出効率の低下が見られた。

単一異性体の水酸化フラーレンやアルコキシ化フラーレンの合成を目指し、臭素化フラーレンまたはシクロ硫酸エステル化フラーレンとエチレングリコールとの反応を行った。位置選択的に求核置換反応が進行すると期待された前者では目的生成物は得られなかったものの、位置ランダム的に進行する後者では、エタノールと水の両方に溶解する誘導体を得ることに成功した。

生理活性に直接影響すると考えられるフラーレン骨格の電子構造を変化させることで、その向上や新たな性質の発現を期待して新規フラーレン誘導体の創成についても様々な検討を行った。リチウムイオン内包フラーレンからは、電解還元法により、フラーレン表面に負電荷ならびにスピンの非局在化したリチウムイオン内包フラーレンラジカルアニオンの合成に成功した。 C_{60} と 1,3-ジアザ-2-アゼニアアレンとの[3+2]環化付加反応からは、ペリ共役を有する新奇トリアゾリウムフラーレンを合成した。また、DDS 化を念頭に、中空の三角錐型炭素繊維カーボンナノホーン内への水酸化フラーレンの内包挙動を調べ、親水性の増加と内包率の低下に関する相関を見いだした。

A. 研究目的

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よく知られている。一方、活性酸素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、フラーレンを親水化して生体適合性を付与し、さらに DDS 機能を導入できれば、有用なナノドラッグとしての応用が

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フラーレン $C_{60}(OH)_{36}$ が、潰瘍性腸疾患のモデルに対して有効であるという知見を得ている。

そこで本研究では、この水酸化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フラーレン誘導体を開発するとともに、その抗酸化能評価、体内動態評価などを目指し、今年度は主に以下の4つの項目について検討を行った。

B. 研究方法

1. グルコース化水酸化フラーレンの凝集挙動

高い水溶性を有し、凝集せずに分子サイズのままで水に分散できるフラーレン誘導体として、我々のグループではこれまでに水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_{36}$ ならびに $C_{60}(OH)_{44}$ を開発している。これまでの予備的な研究で、これらの水酸化フラーレンが潰瘍性大腸炎に対して抗炎症効果があると示唆される実験結果を得ている。そこで、腸管からの吸収を促進するような糖（グルコース）を水酸化フラーレンに結合させたグルコース化水酸化フラーレンの合成ならびに構造同定を行い、様々な溶媒条件における溶液中の凝集挙動について検討した。

2. プロリン誘導体の体内動態分析

フラーレン誘導体の体内動態を追うことは、創薬において必須の課題である。しかしながら、フラーレン誘導体は通常の有機化合物と比べ、その分析手段などに様々な制限がある。そこで、最も高い抗炎症効果を示したプロリン誘導体を用い、生体内組織からの定量分析が可能な方法を模索した。まずは生体内組織（肝臓および血液）に添加したプロリン誘導体の抽出方法の検討と昨年度分析条件を確立した HPLC により分析した。

3. 位置選択的水酸化フラーレン合成

初期評価に用いて比較的良好な結果を与えた水酸化フラーレンの大きな問題点は、これらが異性体の混合物であるということである。一方、近年、異性体のない水酸化フラーレンの合成が2例ほど報告されている。しかし、これらは水酸基数が8個または6個と少ないため、ナンドラッグとして応用するには水溶性に乏しい。そこで、置換基を改良することで同程度の導入置換基数でも水溶性を改善できるかどうか検討した。

4. その他：新規水溶性ナノ物質創成検討

さらにより多くの水溶性フラーレン誘導体候

補を創出するため、リチウムイオン内包フラーレンラジカルアニオン、ペリ共役トリアゾリウムフラーレンについての合成を検討した。また、水酸化フラーレンをモデル分子として用い、種々の水-アルコール混合溶媒条件下における凝集挙動や、DDS 化への足掛かりとしてカーボンナノホーン内への水酸化フラーレンの包摂挙動についても検討した。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考察

1. グルコース化水酸化フラーレンの凝集挙動

水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_{12}$ (1) にグルコース部位を導入するため、その前駆体である $C_{60}(OSO_3)_6$ (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)。構造同定は 1H NMR、IR、TGA ならびに元素分析により行った(図2)。その結果、 $C_{60}(OH)_9(Glc)_3$ (Glc = $C_6H_{10}O_6$) と同定される新規グルコース修飾水酸化フラーレンを5水和物として得ることができた。

得られたグルコース化フラーレンの溶解度を調べたところ、水には溶解しないものの DMSO には良好に溶解したため、DLS ならびに IG 法を用いて粒径分布測定を行った。シングルナノ領域(1-10 nm)において測定精度が高い IG 法を用いた場合、水酸化フラーレンの平均粒径が 1.02 nm であったのに対し、グルコース化水酸化フラーレンでは 2.26 nm とわずかに増大していた(図3)。この値は、分子モデル計算により予想された分子長とよく一致していた。次に、ナノ~マイクロ領域まで幅広い測定が可能な DLS 法を用いて測定を行ったところ、高濃度(20 mg/mL)の DMSO 溶液中ではグルコース化水酸化フラーレンは約 100 nm 程度まで凝集することがわかった(図4a)。さらに、この DMSO 溶液に水を加えて DMSO/H₂O = 1/9 溶液とした場合も水酸化フラーレンと同様な挙動が観察され、約 60nm 程度まで凝集していた(図4b)。

2. プロリン誘導体の体内動態分析

プロリン誘導体を用い、生体内組織（肝臓および血液）に添加したプロリン誘導体の抽出方法の検討を行った。プロリン誘導体の溶解度から、THF を抽出溶媒として用いることが最も適することがわかった。しかしながら、肝臓組織から抽出する場合は肝臓に含まれる脂質成分も多量に抽出されてしまい、そのままでは HPLC 分析に適さないサンプルであった。

そこで、次に血液中からのプロリン誘導体の抽出方法について検討した。この場合は分析に影響する不要成分はさほど混入されなかったが、検量線作成により求めたプロリン誘導体の抽出効率は予想以上に低い結果となった。これは血液内の蛋白質の塩基性部位とプロリン誘導体が非常に強固に結合したためと考えられ、蛋白質構造を破壊して抽出する必要があると思われる。そこで有機溶媒を用いて蛋白質を変性させたり、強酸性条件下での抽出を試みたりしたが、抽出効率は半分程度にとどまった。今後、類似化合物の抽出例を参考に、さらなる改良が望まれる。また、より低濃度のプロリン誘導体でも高感度に分析ができる HPLC を探す必要があると思われる。

3. 位置選択的水酸化フラーレン合成

最近、森山らは塩素化フラーレンや臭素化フラーレンを用いた位置選択的求核置換反応 (S_N1) により、単一異性体の水酸化フラーレンやアルコキシ化フラーレンが合成できることを報告している。しかし、これらに用いられるハロゲン化フラーレンは、置換基数が 6 個または 8 個であるため、すべて水酸化したとしてもその水溶性は著しく乏しく、実用的には好ましくない。そこで、求核剤として PEG アルコールのようなオキシエチレン鎖を有する誘導体の合成を試みた (図 5)。まずはエチレングリコールを用いて $C_{60}Br_8$ との反応を検討したが、単純アルコールとの反応と同じ条件では反応が進行しなかった。おそらくアルコール中での臭素化フラーレンの溶解度が重要

であるため、今後さらに反応条件を模索する必要がある。一方、グルコース化水酸化フラーレンの合成に用いた出発原料の CS 誘導体とエチレングリコールを反応させても、同様な求核置換反応による生成物を得ることができると考えた (図 5)。予備的な検討において、置換位置はランダムではあるが、ヒドロキシエトキシ基が導入されたと考えられる生成物が得られ、エタノールおよび水に溶解することを確認した。今後、さらなる構造同定ならびに生理活性の評価を行う。

4. その他：新規水溶性ナノ物質創成検討

フラーレンの生理活性は、その特殊な球状パイ共役電子構造に由来すると考えられる。この電子構造を変化させることで、その向上や新たな性質の発現も期待される。そこで、まったく新しい電子構造を有するフラーレン誘導体の創成についても様々な検討を行った。まずは昨年度に水酸化に成功したりチウムイオン内包フラーレンを用い、フラーレン表面に負電荷ならびにスピンを分散させたリチウムイオン内包フラーレンラジカルアニオンの合成を検討した (図 6 a)。出発原料のリチウムイオン内包フラーレン PF_6 塩もしくは NTf_2 塩自身が有機溶媒中で高いイオン伝導率を示したことから、そのもの自身を電解質として電解還元を試みたところ、目的の物質を得ることに成功した。NIR、ESR ならびにラマン分光分析により、構造の確認を行った。この物質は現時点では水溶性は示さないが、フラーレン骨格に電子が一つ多く入っているため還元力が高く、親水性の化合物で包摂するなどすれば、還元力とラジカル捕捉能に優れた誘導体へと発展させることが期待される。

また、新規 58n 系フラーレンを合成する一貫として、昨年度合成したトリアゾリノ誘導体の窒素原子上にさらに置換基を導入した誘導体を設計することで、新奇な電子構造を有するペリ共役トリアゾリウムフラーレンの合成にも成功した (図 6 b)。この物質は、窒素原子上のパイ共役構造に