

201408001A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 27 (2015) 年 5 月

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 27 (2015) 年 5 月

## 目 次

<b>I. 研究報告</b>	
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-----	23
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--	37
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-----	43
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-----	51
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-----	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
<b>II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----</b>	<b>79</b>
<b>III. 研究成果の刊行物・別刷-----</b>	<b>81</b>

## 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、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 26 年度は、平成 24、25 年度の検討において最も優れた抗炎症活性を有することを見出したプロリン型 C60 フラーレンに焦点を絞り、①高度な品質保証を目指し、プロリン型 C60 フラーレンの作製条件の最適化および精製度の向上を図った。②平成 25 年度に引き続き、抗炎症活性や獲得免疫抑制作用のメカニズム解明など、プロリン型 C60 フラーレンの作用点を明確にすることを図った。③グルコース修飾プロリン型 C60 フラーレンなどの DDS 化プロリン型 C60 フラーレンを新規合成すると共に、確立済みの評価系を用いて体内動態を精査した。さらに、当初計画は勿論のこと、特に C60 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、①プロリン型 C60 フラーレンの従来の合成法では、最終段階で原料や副生成物が残存し、それらを取り除くのは極めて困難であったが、将来的な医薬品化を念頭に、保護基を変更した合成経路を開発することで、純度の高いプロリン型 C60 フラーレンの合成に成功した。また、②プロリン型 C60 フラーレンに関して、異性体の解析や製造ロットによる品質の違いの解析などを進めており、安定した品質のプロリン型 C60 フラーレンを提供できる準備が整いつつある。③プロリン型 C60 フラーレンは、炎症性サイトカインの翻訳に関わる eIF4E や p70 S6K などのリン酸化を抑制するのみならず、eIF4E や p70 S6K の総タンパク質量をも低下させることを見出した。即ち、IL-8 や MCP-1 といった炎症性サイトカイン・ケモカインの mRNA からタ

ンパク質への翻訳を選択的に阻害するという、これまでに無い新たな作用により抗炎症活性を發揮する可能性を先駆けて見出した。④平成 25 年度に創製した  $^{14}\text{C}$  標識 C60 フラーレンを原料に、 $^{14}\text{C}$  標識プロリン型 C60 フラーレンの合成に先駆けて成功した。さらに、⑤プロリン型 C60 フラーレンの体内動態評価の 1 つとして、以前よりご指摘いただいていた代謝産物について、肝ミクロソームを用いて in vitro で評価した。シトクロム P450 の化学モデルおよびラット肝ミクロソームで代謝反応を実施したところ、複数の代謝物の生成を確認し、現在、構造解析を進めている。今後の臨床展開に向けては、⑥GMP 設備を有し、かつプロリン型 C60 フラーレンの製造技術を有する委託先を選定するなど、臨床展開に向けた取組みも着実に進めている。以上、平成 26 年度には、重点課題として挙げた項目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。

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、数多くなされておられ、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 (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、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、平成 24、25 年度の検討において最も優れた抗炎症活性を有することを見出したプロリン型 C60 フラーレンに焦点を絞り、①高度な品質保証を目指し、プロリン型 C60 フラーレンの作製条件の最適化および精製度の向上を図った。②平成 25 年度に引き続き、抗炎症活性や獲得免疫抑制作用のメカニズム解明など、プロリン型 C60 フラーレンの作用点を明確にすることを図った。③グルコース修飾プロリン型 C60 フラーレンなどの DDS 化プロリン型 C60 フラーレンを新規合成すると共に、確立済みの評価系を用いて体内動態を精査した。さらに、当初計画は勿論のこと、特に C60 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 フラワーレンの DMSO 分散液を使用直前に ULTRASONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、さらに 1 分間ポ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 フラワ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 フラワーレン 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 回ポ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. 細胞

ヒト腸管上皮細胞株である Caco-2 は American Type Culture Collection より購入した。Caco-2 細胞は 20 %ウシ胎児血清 (FBS; GIBCO)、1 % 非必須アミノ酸 (NEAA; GIBCO)、1 % Antibiotics (Ab; GIBCO) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM; 和光純薬工業株式会社) を用い、37°C、飽和蒸気圧、5 %CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

## 3. ウェスタンブロットによる MAPK 及び IκB における C60-P の影響評価

6 well プレートに 4.5x10<sup>5</sup> cells/3 ml/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。その後、終濃度 100 μmol/L となるように培地で希釈した C60-P を 1.5 mL/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125 ng/ml に調製した IL-1β を 1.5 ml で添加した。0、5、10、20、30、60、120 分後の細胞を cold phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、1 well あたり 200 μL の Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo Fisher Scientific K.K.) を添加した M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific K.K.) で可溶化し、タンパク質を回収した。試料は BCA

Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific K.K.) のプロトコールに従い、タンパク量を測定した。総タンパク量が 2 μg になるように各試料を取り、5 % 2-mercaptoethanol (2-ME; GIBCO) 含有 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を等量混合し、95°C で 5 分処理した後、各試料を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) した。電気泳動後のゲルを PolyVinylidene DiFluoride (PVDF 膜) (GE Healthcare) に転写し、1 % Bovine Serum Albumin (BSA)/PBST (0.05 % Tween 20 を含む Phosphate buffered saline) を添加してブロッキングした。1 % BSA/PBST で 1,000 倍希釈した一次抗体 (anti-β-actin のみ 10,000 倍希釈) を添加し、緩やかに振とうさせながら 4°C で一晩反応させた。PBST で洗浄後、1 % BSA/PBST で 2,000 倍希釈した HRP/anti-rabbit IgG、50,000 倍希釈した HRP/anti-mouse IgG を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、PVDF 膜を SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific K.K.) で処理し、発光像を LAS-3000 (富士フイルム) により撮影した。

## 4. リアルタイム PCR による C60-P が IL-8 の mRNA 産生に与える影響評価

6 well プレートに 4.5x10<sup>5</sup> cells/3 ml/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、終濃度 100 μmol/L となるように C60-P を培地で希釈し、1.5 mL/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125 ng/ml に調製した IL-1β を 1.5 ml で添加した。2、6、12、24 時間後、RNeasy min Plus kit (QIAGEN) のプロトコールに準じて total RNA を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Life technologies) により cDNA に逆転写した。得られた cDNA をテンプレ

トに TaqMan Probe (Human IL-8: Hs00174103\_m1、Human GAPDH:Hs03929097\_g1) と TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life technologies)により反応溶液を調整し、StepOne Plus real-time PCR system (Life technologies)を用いてリアルタイム PCR を行った。各試薬添加群の IL-8 発現量の比較は、各時間の IL-8 発現量を各時間の GAPDH 量で補正した後、コントロールとして用いた IL-1β非添加群で除すことで解析した。また、eBioscience ELISA Kit のプロトコールに従って各時間の培養上清中の IL-8 を測定した。

## 5. C60-P による IL-8 の細胞内蓄積性への影響評価

96well プレートに 1.5x10<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、終濃度 100 μmol/L となる C60-P と終濃度 1mg/ml となる Brefelzin A (Sigma-Aldrich)を培地で希釈し、50 μL/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125 ng/ml になるように培地で調製した IL-1βを 50 μL/well で添加した。24 時間後、培養上清を回収、M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagen で細胞を可溶化し、細胞内タンパク質を回収した。それぞれ回収した試料を eBioscience ELISA Kit のプロトコールに従って培養上清中と細胞内中の IL-8 を測定した。

## 6. C60-P による MCP-1、COX-2、BD-2 産生の影響評価

< Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)>

96 well プレートに 1.5x10<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、終濃度 25、50、100 μmol/L となる C60-P を培地で希釈し、50 μL/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125ng/ml になるように培地で調整し

た IL-1βを 50 μL/well で添加した。24 時間後、培養上清を回収し、eBioscience ELISA Kit のプロトコールに従って培養上清中の MCP-1 を測定した。

<Cyclooxygenase-2(COX-2)>

6 well プレートに 4.5x10<sup>5</sup> cells/3 ml/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、終濃度 100 μmol/L となる C60-P を培地で希釈し、1.5 mL/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125 ng/ml に調整した IL-1βを 1.5 ml で添加した。24 時間後、M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagen で細胞を可溶化し、細胞内タンパク質を回収し、R&D systems ELISA Kit のプロトコールに細胞内溶解液中 COX-2 従って測定した。

<Beta-defensin-2(BD-2)>

6 well プレートに 4.5x10<sup>5</sup> cells/3 ml/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、終濃度 25、50、100 μmol/L となる C60-P を培地で希釈し、1.5 mL/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125 ng/ml に調整した IL-1βを 1.5 ml で添加した。24 時間後、培養上清を回収した。培養上清中の BD-2 は Peprotech ELISA Kit のプロトコールに従って測定した。

(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

我々はこれまでに、C60 フラーレンの炎症性腸疾患に対する治療薬としての応用を視野に入れ、C60 フラーレンの表面を多様な修飾体により修飾した C60 フラーレン誘導体を作製し、その抗酸化作用と抗炎症作用について検討を進めてきた。炎症性腸疾患では、病態の中心である腸管上皮において、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、といった炎症性サイトカインの過剰産生が確認されている。これらサイトカインによる刺激が腸管上皮から炎症性サイトカインである IL-8 の産生を誘導し、結果として、好中球を主とした免疫細胞の遊走・活性化等を誘発することが炎症性腸疾患の発症の一因と考えられている。これまでに我々は、C60 フラーレン誘導体の炎症性腸疾患に対する薬効を評価する目的で、ヒト腸管上皮細胞株（Caco-2 細胞）を用い、IL-1 $\beta$ 刺激により誘導される IL-8 の産生に C60 フラーレン誘導体を与える影響を検討してきた。その中で、緒論にも記述したように、プロリン骨格を含む官能基で表面修飾した C60-P が、抗酸化作用とは異なる作用メカニ

ムによる強力な IL-8 産生の抑制作用を示すことを明らかとした。そこで本研究では、C60-P による未知の抗炎症作用メカニズムを解明するために、C60-P による IL-8 産生の抑制メカニズムを解析した。

### 1. C60-P が MAPK の活性化及び I $\kappa$ B の分解に与える影響

IL-8 は、Toll-like Receptor (TLR)ファミリーをはじめとするパターン認識受容体や IL-1 $\beta$ 、及び TNF- $\alpha$ の受容体に各種リガンドが結合することでシグナルが伝わり産生される。受容体からのシグナルは主に以下のような二つの経路に集約される。一つ目は、Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)のリン酸化によるシグナル伝達であり、MAPK には ERK (extracellular signal-regulated kinase)、JNK (c-jun N-terminal kinase)、p38 の 3 つの分子が存在し、最終的にこれらの分子が AP-1 (Activator protein 1)などの転写因子を活性化することで IL-8 の産生が誘導される。もう一つの経路は、転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)に依存して IL-8 が誘導される経路である。本経路は NF- $\kappa$ B の核内移行を制御する inhibitor of transcription factor NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)が上流からのシグナル伝達によりリン酸化され、ユビキチンプロテアソーム系により分解されることで活性化される。I $\kappa$ B から遊離し、活性化された NF- $\kappa$ B は、核内に移行し、IL-8 の産生に向けて転写を促進する。実際に、Caco-2 細胞において IL-1 $\beta$ で刺激することで産生される IL-8 は、MAPK (ERK、JNK、p38) の活性化 (ERK、JNK、p38 のリン酸化)、及び I $\kappa$ B の分解に依存することが報告されている。そこで、本検討では、IL-1 $\beta$ 刺激で誘導される IL-8 の産生を C60-P が抑制するメカニズムを評価する目的で、IL-8 の産生を制御しているシグナル分子である MAPK と I $\kappa$ B に着目して評価した。

まず、MAPK の各分子 (ERK、JNK、p38) の

リン酸化に関して、Western blotting 法を用い、経時的に解析することで、IL-1 $\beta$ 刺激による MAPK の活性化に C60-P が与える影響を評価した。その結果、p38、JNK は IL-1 $\beta$ 刺激後 20 分でリン酸化のバンドが最も強く検出され、ERK は 20 分後と 120 分後にリン酸化のバンドが強く検出される二峰性のリン酸化を受けることが確認された (Fig. 1a, b, c)。C60-P 前処置群は、C60-P 未処置群と同様の経時的なバンドの変動が確認された。さらに、ImageJ を用いてそれぞれのバンド強度を数値化した場合においても、各 MAPK の Total に対するリン酸化の割合は IL-1 $\beta$ 単独刺激と比べて MAPK のリン酸化に変化が無かったことが確認された (Fig. 1a, b, c)。従って、C60-P は、MAPK の活性化に影響を与えることなく、IL-8 産生の抑制作用を発揮することが示唆された。

次に、IkB の分解性に関して、Western blotting 法を用い、経時的に解析することで、IL-1 $\beta$ 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化に C60-P が与える影響を評価した。上記のように IkB は分解されることで NF- $\kappa$ B を遊離・活性化し、IL-8 の産生を誘導し、再び合成されることで NF- $\kappa$ B を抑制する。従って、IL-1 $\beta$ 刺激後、IkB は 5 分の時点で速やかにバンドが消失し (分解された)、60 分で再びバンドが検出される (再合成された) ことが確認された (Fig. 1d)。また、C60-P 前処置群においても、IL-1 $\beta$ 刺激後、同様にバンドが分解され、再び検出される経時的な変動が確認された (Fig. 1d)。従って、C60-P による IL-8 産生の抑制作用は、IkB の分解によるものではないことが示唆された。以上の結果を考え合わせると、本検討で評価した経路以外にも作用点がある可能性も考えられるが、C60-P の作用点は、IL-8 の産生を制御するシグナル分子である MAPK の活性化や IkB の分解以降にある可能性が示された。

## 2. C60-P による IL-8 の mRNA 発現に与える影響

次に、MAPK、NF- $\kappa$ B 以降の作用点に関してよ

り詳細に評価する目的で、C60-P が IL-8 の mRNA 発現に与える影響を、リアルタイム PCR により経時的に測定した。C60-P が、転写因子の活性化や、核内への移行、転写領域への結合といった過程に作用し、IL-8 産生を抑制している場合、いずれにおいても、C60-P の作用により、IL-8 の mRNA 量は低下すると考えられる。また、IL-8 の mRNA は転写された後、tristetraprolin (TTP) と KH-type splicing regulatory protein (KSRP) の二つの分子により分解と安定化を制御されることが知られている。C60-P が、これら IL-8 の mRNA の安定化を担う分子の発現変動、あるいは活性化等に作用点を持ち、IL-8 産生を抑制している場合においても、C60-P により IL-8 の mRNA 量が減少することが予想される。一方で、上記のような転写後制御以降の、翻訳や細胞外への分泌といった過程に C60-P が作用している場合は、IL-8 の mRNA 量には変動は認められないと予想される。従って、IL-8 の mRNA 量を評価することで、C60-P の作用点が、IL-8 の mRNA の転写以前や転写後制御にあるのか、もしくは転写後制御以降にあるのかを判断することができると考えられる。

本検討では、p38 のリン酸化を阻害することで IL-8 の mRNA の発現を抑制する SB203580 をポジティブコントロールとして用いた。リアルタイム PCR による測定の結果、IL-1 $\beta$ 刺激後、2 時間で IL-8 の mRNA の発現が最も高くなり、6、12、24 時間と経時的に発現の低下が確認された (Fig. 2a)。また、培養上清中の IL-8 量を測定すると、2、6、12、24 時間と経時的にその産生量が增大することが確認された (Fig. 2b)。ポジティブコントロールとして用いた SB203580 前処置群では、IL-1 $\beta$ 刺激後、2 時間で IL-8 の mRNA 量が、C60-P 未処置群と比較して減少しており、6、12、24 時間の各時間においても同様に減少していることが確認された (Fig. 2a)。また、SB203580 添加により、いずれの測定時間においても C60-P 未処置群と比較し、培養上清中の IL-8 の産生が

抑制されていることも確認された (Fig. 2b)。一方で C60-P 前処置群では、培養上清中の IL-8 は、各時間において SB203580 前処置群と同程度にまで産生が抑制されているものの、全ての測定時間において、C60-P 未処置群と同程度の mRNA 量が検出された (Fig. 2a, b)。従って、C60-P は IL-1 $\beta$  刺激により誘導される IL-8 の mRNA 産生を減少させることなく、IL-8 の産生を抑制していることが示唆された。即ち、C60-P の作用点は、IL-8 の mRNA の発現に関わる転写因子や、mRNA の安定化に関わる分子ではなく、mRNA の転写後調整以降の過程にあると考えられた。

### 3. C60-P による IL-8 の細胞内蓄積性への影響

転写後制御以降の経路として、mRNA からタンパク質への翻訳、および IL-8 タンパク質の細胞外への分泌の過程が IL-8 産生の制御を担っていることから、C60-P がこれら経路に与える影響を解析した。まず、分泌過程に着目し、C60-P が IL-8 の分泌を阻害している可能性を評価する目的で、細胞内の IL-8 量を測定した。IL-8 などのサイトカインをはじめとする分泌タンパク質は、小胞体で翻訳され、膜輸送によりゴルジ体を経て、細胞膜まで輸送され、最終的に分泌される。本検討では、小胞体からゴルジ体に至る小胞輸送の過程を阻害することで IL-8 の細胞外への分泌を阻害する Brefelzin A を IL-8 の細胞内蓄積を亢進させるポジティブコントロールとして用いた。測定の結果、IL-1 $\beta$  刺激後 24 時間において、Brefelzin A 前処置群では細胞内に高い IL-8 量が認められ、細胞内に蓄積している様子が観察された (Fig. 3a)。また、C60-P 未処置群では、24 時間における細胞内の IL-8 量は Brefelzin A 前処置群と比べ、圧倒的に少なく、培養上清中の IL-8 量は圧倒的に多かった (Fig. 3a, b)。従って、細胞内で産生された IL-8 は速やかに細胞外へ分泌されることが確認された (Fig. 3a, b)。一方で、C60-P 前処置群では、C60-P 未処置群と比べ、C60-P の濃度

依存的に細胞内 IL-8 量が減少することが示された (Fig. 3a)。以上の結果より、C60-P は、IL-8 の産生を、細胞内で既に抑制しており、分泌の過程には影響を与えていない可能性が示された。

### 4. C60-P が翻訳制御分子の活性化に与える影響

Caco-2 細胞では、細胞内シグナル伝達に関するタンパク質キナーゼの一種である mammalian target of rapamycin (mTOR) を作用点とする免疫抑制剤、rapamycin により、TNF- $\alpha$  誘導性の IL-8 産生が抑制されることが報告されている。mTOR は、①リボソーム関連タンパク質 Ribosomal protein S6(rpS6)のリン酸化を介して、翻訳過程の開始、及び伸長反応を制御する p70 ribosomal protein S6 kinase (p70-S6K) のリン酸化、②mRNA の 5'末端キャップ構造に結合し、翻訳開始複合体形成の起点として働くことで、翻訳の開始反応を制御する eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)の遊離に関わる eIF-4E-binding protein (4E-BP1)のリン酸化、の二つの反応を直接制御することで、mTOR を頂点とした翻訳制御系を形成している。実際に、Caco-2 細胞において eIF4E の抑制により IL-8 の産生が抑制されること、THP-1 細胞における検討ではあるものの、p70-S6K が抑制された際に、IL-8 の産生が抑制されることが、それぞれ報告されている。従って、本実験系において、mTOR を介する翻訳経路が IL-8 の産生に寄与していると予想され、C60-P の作用として、これら翻訳経路が抑制されていることが考えられた。そこで本検討では、C60-P が mTOR を頂点とする翻訳制御系に与える影響を評価するため、mTOR が制御する二つの翻訳制御分子である p70-S6K と eIF4E の活性化を、それぞれのリン酸化を指標に、Western blotting 法を用いて解析した。なお、eIF4E は最終的にリン酸化されることで翻訳複体の形成を開始するため、eIF4E のリン酸化を担う MNK1 の活性化に関しても、同様にリン酸化を

指標として評価した。また、C60-P の作用における比較対象として、本実験系における rapamycin の作用も同時に解析した。

p70-S6K について、C60-P による前処置の有無と、IL-1 $\beta$ 刺激後のリン酸化状態の変動の関連を経時的に評価した。C60-P 未処置群において、リン酸化された p70-S6K のバンドは、IL-1 $\beta$ 刺激前から観察され、IL-1 $\beta$ 刺激後少なくとも 180 分までの時点において、刺激前と比べて変動しなかった (Fig. 4a)。また、mTOR への作用により、p70-S6K のリン酸化を抑制する rapamycin 作用群においても、リン酸化 p70-S6K のバンドがほとんど観察されなかった (Fig. 4a)。以上のことから、mTOR を介した p70-S6K のリン酸化経路は、本実験系において、定常時より一定の活性があることに加え、IL-1 $\beta$ 刺激による制御はほとんど受けないことが示唆された。一方で、C60-P 前処置群では、C60-P 未処置群と比べて、IL-1 $\beta$ 刺激後 120、180 分においてリン酸化のバンドが減弱する様子が観察された (Fig. 4a)。さらに、p70-S6K の総量を検出するバンドについても、C60-P 前処置により、C60-P 未処置群と比べてが減弱している様子が観察された (Fig. 4a)。ImageJ を用いて、p70-S6K の総量に対するリン酸化の割合、 $\beta$ -actin に対する p70-S6K の総量の割合を評価した結果、C60-P 未処置群と比べて、C60-P 前処置群において、IL-1 $\beta$ 刺激後 120 分以降の p70-S6K の総量、並びにリン酸化される割合の双方が減少している様子が確認された (Fig. 4a)。これら、p70-S6K のリン酸化の割合低下、並びに総量の減少の二つの効果が、p70-S6K によるリン酸化シグナルの伝達に総合的に与える影響を評価するため、 $\beta$ -actin に対するリン酸化された p70-S6K 量を同様に解析した。その結果、C60-P 未処置群と比べて、C60-P 前処置群において、約半分となることが示された (Fig. 4a)。従って、C60-P は、p70-S6K のリン酸化を阻害すると共に、その総量を減少させる機序により、p70-S6K を介したリン酸化シグナル伝達を阻害

し、IL-8 の翻訳を抑制していることが示唆された。次に、eIF4E を介する翻訳経路に C60-P が与える影響を、eIF4E と共に、そのリン酸化に関わる MNK1 のリン酸化の変動を指標に、経時的に評価した。C60-P 未処置群において、IL-1 $\beta$ 刺激後 30 分で MNK1 のリン酸化が、60 分で eIF4E のリン酸化のバンドが最も強く検出され、共に、IL-1 $\beta$ 刺激により一過性のシグナル伝達が引き起こされることが示された (Fig. 4b, c)。また、rapamycin 前処置群では、本実験系において、4E-BP1 を介して、mTOR による間接的なリン酸化の制御を受ける eIF4E に関しても、C60-P 未処置群と比べてリン酸化バンドの強度の変動は観察されなかった (Fig. 4c)。従って、本条件下において、eIF4E のリン酸化における mTOR の寄与は少ないことが示唆された。本観点に関して、リン酸化により eIF4E から解離し、eIF4E のリン酸化を可能とする 4EB-P1 が、mTOR 非依存的な経路によりリン酸化されることや、rapamycin は 4EB-P1 の一部のリン酸化しか抑制できない可能性が報告されている。これらの報告を加味すると、4EB-P1 のリン酸化に対する、mTOR の寄与が低いことが、本検討において、rapamycin により eIF4E のリン酸化が抑制されなかった理由として考えられる。一方で、C60-P 前処置群では、MNK1 のリン酸化が全ての時間帯で強く減弱している様子が観察された (Fig. 4b)。また、eIF4E のリン酸化は、120、180 分で顕著に減弱している様子が観察された (Fig. 4c)。これらのバンド強度を ImageJ により数値化し、p70-S6K と同様に、MNK1、eIF4E のそれぞれに対し、総量に対するリン酸化の割合、 $\beta$ -actin に対する総量の割合をそれぞれ解析した。まず、MNK1 に関して、C60-P 未処置群と比べて、C60-P 前処置群において、IL-1 $\beta$ 刺激前を含めた全ての時間において、顕著にリン酸化の割合が減少することが示された (Fig. 4b)。特に IL-1 $\beta$ 刺激後 120 分以降の時点において、MNK1 の総量も大きく減少していることが示された (Fig. 4b)。また、eIF4E のリン酸化の割

合は、C60-P 前処置群において、IL-1 $\beta$ 刺激前の時点で増加が観察されたが、IL-1 $\beta$ 刺激後は、C60-P 未処置群と比べて目立った変動は観察されなかった (Fig. 4c)。総量に関しては、IL-1 $\beta$ 刺激前の状態で、リン酸化の割合同様に、C60-P 前処置群による増加が認められた一方で、IL-1 $\beta$ 刺激後 60 分からは、逆に減少する様子が観察された (Fig. 4c)。従って、C60-P の、MNK1、及び eIF4E に対する作用をそれぞれ整理すると、C60-P は、MNK1 の総量、及びリン酸化の割合を下げると共に、eIF4E の総量を抑制することが明らかとなった。

C60-P 前処置群において、MNK1 のリン酸化の割合、さらには総量が低下しているにも関わらず、eIF4E のリン酸化の割合が低下していなかった。このことから、本実験系における eIF4E のリン酸化における MNK1 の寄与が低いことが考えられる。本観点に関しては、MNK2 が eIF4E のリン酸化に関わるとする報告も存在するため、本実験系では、MNK1 以外の、MNK2 などの分子が eIF4E のリン酸化を担っている可能性が考えられる。以上の観点を考え合わせると、C60-P による IL-8 の抑制という観点では、C60-P による eIF4E の総量の減少が引き起こされることで、リン酸化された eIF4E の総量も減少することが考えられた。一方で、C60-P 前処置群において、IL-1 $\beta$ 刺激後 MNK1 の直接の上流である、p38、ERK のリン酸化に影響が無かったにも関わらず、MNK1 のリン酸化が抑制されたことは非常に興味深い結果である。p38、ERK による MNK1 の活性化には分子間相互作用が必要であることから、C60-P によりこれらの分子の相互作用が阻害された可能性が考えられる。近年の報告で、C60 フラーレンが細胞内に存在する分子と直接相互作用する可能性が示唆されていることから、C60-P が p38、ERK、あるいは MNK1 に直接的に作用することで、MNK1 のリン酸化を抑制した可能性も視野に、MNK1 のリン酸化抑制の機序を探っていく必要があると考えられる。

以上の結果をまとめると、C60-P は翻訳制御分子である p70-S6K のリン酸化低下と、総量の減少による p70-S6K を介した翻訳制御系の抑制、さらには eIF4E の総量の低下による eIF4E を介した翻訳制御系の抑制の二つの機序により、IL-8 の翻訳を抑制していることが示唆された。rapamycin は、本実験系において、p70-S6K を介したシグナルを抑制する一方、eIF4E を介したシグナルは減弱できないことが示された。この結果と相関し、少なくとも本実験系において、C60-P による IL-8 の抑制作用は、rapamycin による IL-8 の抑制作用と比べて強いことを確認している (Fig. 5)。また、現在、C60-P が翻訳制御分子の総量を減少させる機序に関して、発現が低下することによるものであるのか、あるいは分解が促進された結果であるのかは明らかではない。本観点に関して、翻訳制御分子、中でも eIF4E 及び p70-S6K に関しては、その発現が様々な miRNA の発現より影響を受けることが報告されている。従って、C60-P がこれら翻訳制御分子の総量を減少させる機序は、miRNA の発現誘導による発現量の抑制による可能性も考えられる。C60 フラーレンと miRNA の誘導に関する報告は現在無く、これら現象の追求は C60 フラーレンの新規作用メカニズムの発見に繋がることも期待されるため、今後重要であると予想される。

## 5. C60-P による IL-8 以外の産生分子への影響

C60-P による翻訳への影響が、IL-8 特異的に認められる現象なのか、もしくは他の分子の翻訳にも影響を与えるのか評価した。Caco-2 において IL-1 $\beta$ 刺激により誘導されることが報告される、炎症性ケモカインの monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、炎症反応を促進する cyclooxygenase-2 (COX-2)、抗菌ペプチドの beta-defensin-2 (BD-2) の誘導に、C60-P が与える影響を評価した。Caco-2 細胞を IL-1 $\beta$ で刺激後 24 時間における、それぞれ

の分子の産生を測定した。その結果、MCP-1 では産生が増大することが確認されたものの、COX-2、BD-2 では、これまでの報告とは異なり産生の変動は観察されなかった。一方で、C60-P 前処置群、IL-1 $\beta$ 刺激後 24 時間において、MCP-1、BD-2 の産生は抑制される一方で、COX-2 の産生には影響が認められなかった (Fig. 6)。産生が抑制された MCP-1 は、翻訳過程において、mTOR 及び p70 S6K の活性化により制御されることから、mTOR の下流に位置する eIF4E の活性化が関与する可能性が考えられる。従って、C60-P による eIF4E、p70 S6K の総量の減少及びリン酸化の低下が、MCP-1 の翻訳に影響を与えた可能性が考えられる。一方で、産生が抑制されなかった COX-2 の翻訳は、eIF4E を過剰にリン酸化させた条件においても、影響を受けないことが報告されていることより、COX-2 の翻訳は eIF4E 非依存的な経路によって翻訳されていることが考えられる。従って、COX-2 は、C60-P が影響を与えた翻訳制御分子とは異なる翻訳過程を持つ可能性が示唆された。BD-2 の翻訳に関しては、eIF4E、p70 S6K と関連を見たものが無く、今後、この作用に関しては、eIF4E、p70 S6K の総量の低下との相関を詳細に検討する必要がある。一方で、本検討では、COX-2、BD-2 の産生が 24 時間では確認されなかったことから、本結果に関しては今後詳細に検討する必要がある。実際、COX-2 は短時間の IL-1 $\beta$ 作用により誘導される一方で、BD-2 に関しては IL-1 $\beta$ の長時間作用で初めて誘導されることを確認しており、現在、C60-P がこれら分子の翻訳に与える影響について検討を進めている。

## E. 結論

自己免疫疾患の一つである炎症性腸疾患 (クローン病、潰瘍性大腸炎：共に厚労省指定の難病) は、特に若年者が多く罹患し、頻繁に再燃・寛解を繰り返すと共に、大腸癌のリスクファクターでもある。またステロイドの常用 (ムーンフェイス・不妊など)、腹痛・軟便・血便・食欲不振な

ど、社会生活における QOL が著しく障害され、大きな社会問題となっている。本邦でも既に約十万人が罹患しており、今後も爆発的に罹患者が増大することが推定され、欧米では日本よりも 10 倍以上も高い罹患率を示すことから、全世界的に早急な予防・治療法の確立が待望されている。炎症性腸疾患の発症・悪化は、遺伝子要因と共に、生活習慣・医薬品や食品といった環境因子による腸管の酸化的ストレスにも大きく起因しており、これが慢性化し、自己免疫系が破綻することで、発症・悪化に至るものと推定されている。しかし未だ有効な治療法は無く、ステロイド療法などが対処療法として、やむなく利用されている。当該申請研究で開発・実用化・事業化を目指す「炎症性腸疾患等に対する経口投与型ナノ DDS」は、独自の基盤技術・特許を発展・融合させ、炎症性腸疾患に対する新たなコンセプト・作用機序に基づく医薬品開発を目指すものであり、社会的ニーズは非常に広範であり、国民の健康と福祉の向上に大きく貢献可能である。また、我が国発の非侵襲性ナノ DDS を事業化することは、ナノ産業・製薬産業に圧倒的な開発競争力を提供するなど、経済界への波及効果も期待でき、我が国の国益にも叶うものである。また昨今、当該領域での抗体医薬の開発が進展しているが、高額かつ侵襲的であり、安全性にも一部懸念を残していることを考えると、安価かつ安全で有効な経口投与型ナノ DDS 化 C60 フラーレンの併用療法あるいは予防投与は、医療経済的にも波及効果に優れている。さらに、本研究成果は、難治性腸疾患にとどまらず、世界で計 6000 万人以上もの患者が存在する関節リウマチなど、数多くの炎症性難病の克服にも横断的な共通治療基盤を提供可能であり、今後の薬効 (抗炎症) メカニズムや動態の解明、そしてその制御 (ナノ DDS) が鍵を握るものの、心不全や慢性腎炎などへの広範な展開も期待される。以上、本取組は、新たな方法論・基盤技術・医療体系を提供することで大きな社会効果が期待されると共に、「健康立国」としての国際的地位の向上に

も繋がることが期待できる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ①論文発表

該当なし

#### 【総説・その他】

該当なし

### ②学会発表

#### 【シンポジウム等：合計 0 件】

該当なし

#### 【国内学会発表：合計 7 件】

1. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の免疫抑制剤としての有効性評価～in vitro における評価～., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
2. 高橋秀樹, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 青島央江, 上野 裕, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の体内動態解析に向けた基礎的検討., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
3. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 宇高麻子, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の免疫抑制剤としての有効性評価～in vivo における評価～., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
4. 佐上公一, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の抗炎症メカニズムに関する基礎的検討.,

第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.

5. 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 植村瑛一郎, 高橋秀樹, 佐上公一, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の炎症性腸疾患に対する医薬品応用に向けた検討～in vivo における獲得免疫抑制作用の検討～., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
6. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 高橋秀樹, 佐上公一, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の炎症性腸疾患に対する医薬品応用に向けた検討～in vitro における抗体産生抑制能のメカニズム解明～., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
7. 佐上公一, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 高橋秀樹, 植村瑛一郎, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: MAPK に注目した C60 フラーレン誘導体による抗炎症作用メカニズムの検討., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.

#### 【国際学会発表：合計 3 件】

1. Yoshioka Y., Udaka A., Hirai T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Ohe T., Mashino T., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Fullerene C60 derivatives suppress the acquired immune responses., Immunology 2014., Pittsburgh (USA), 2-6 May, 2014.
2. Uemura E., Yoshioka Y., Hirai T., Takahashi H., Sagami K., Tsunoda S., Ohe T., Mashino T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Improvement of dispersibility of

fullerene C60 derivative by Pluronic F-127 and the potential to enhance anti-inflammatory effect of C60 derivative., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah (Malaysia), 9-12 October, 2014.

3. Sagami K., Yoshioka Y., Hirai T., Takahashi H., Uemura E., Tsunoda S., Ohe T., Mashino T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Anti-inflammatory mechanism of C60 pyrrolidine tris-acid (C60-P) on Caco-2 cells., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah (Malaysia), 9-12 October, 2014.

#### 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

**大阪大学薬学研究科毒性学分野（職員 4 名・大学院生/学生 24 名）**：東阪和馬助教、三浦直樹研究員、長橋里佐子、村山香理、畑 勝友、平井敏郎、森下裕貴、今井峻司、小椋健正、高橋秀樹、永野貴士、三里一貴、青山道彦、森 宣瑛、岩原有希、植村瑛一郎、佐上公一、瀧村優也、田中康太、西 嘉伸郎、山口真奈美、石本里緒、難波佑貴、西川雄樹、半田貴之、和泉夏実、清水雄貴、真木彩花

**独立行政法人医薬基盤研究所（職員 7 名・大学院**

**生 2 名）**：角田慎一プロジェクトリーダー、鎌田春彦サブプロジェクトリーダー、長野一也研究員、井上雅己研究員、國丸亜記、細野恵里佳、ソムブ ンタム プラニー、瀧慎太郎、安藤大介

**独立行政法人医薬基盤研究所抗体スクリーニングプロジェクト（職員 1 名）**：向 洋平サブリーダー

**日立ハイテクノロジーズ（職員 1 名）**：

中澤英子統括主管技師

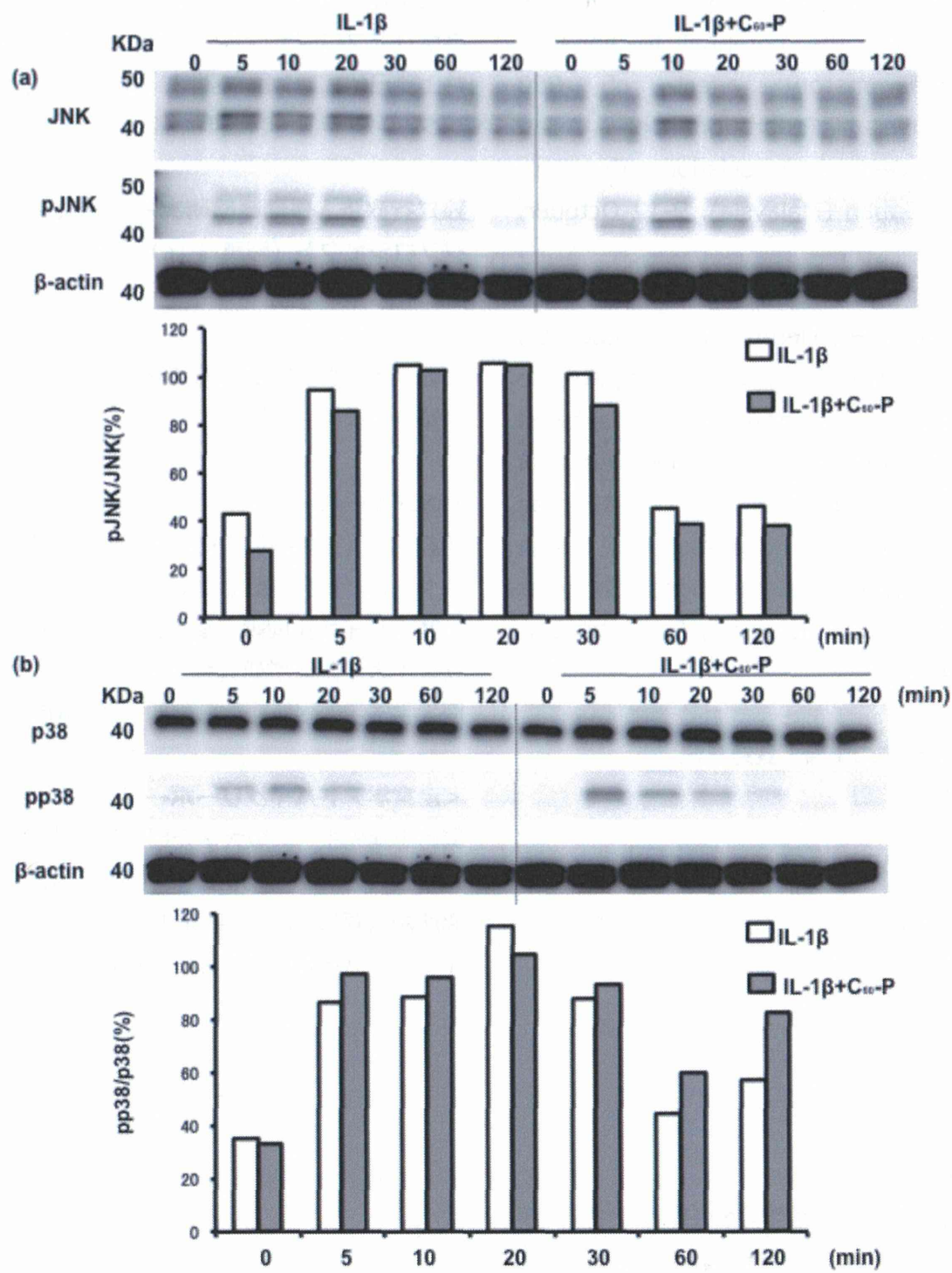
#### <オブザーバー>

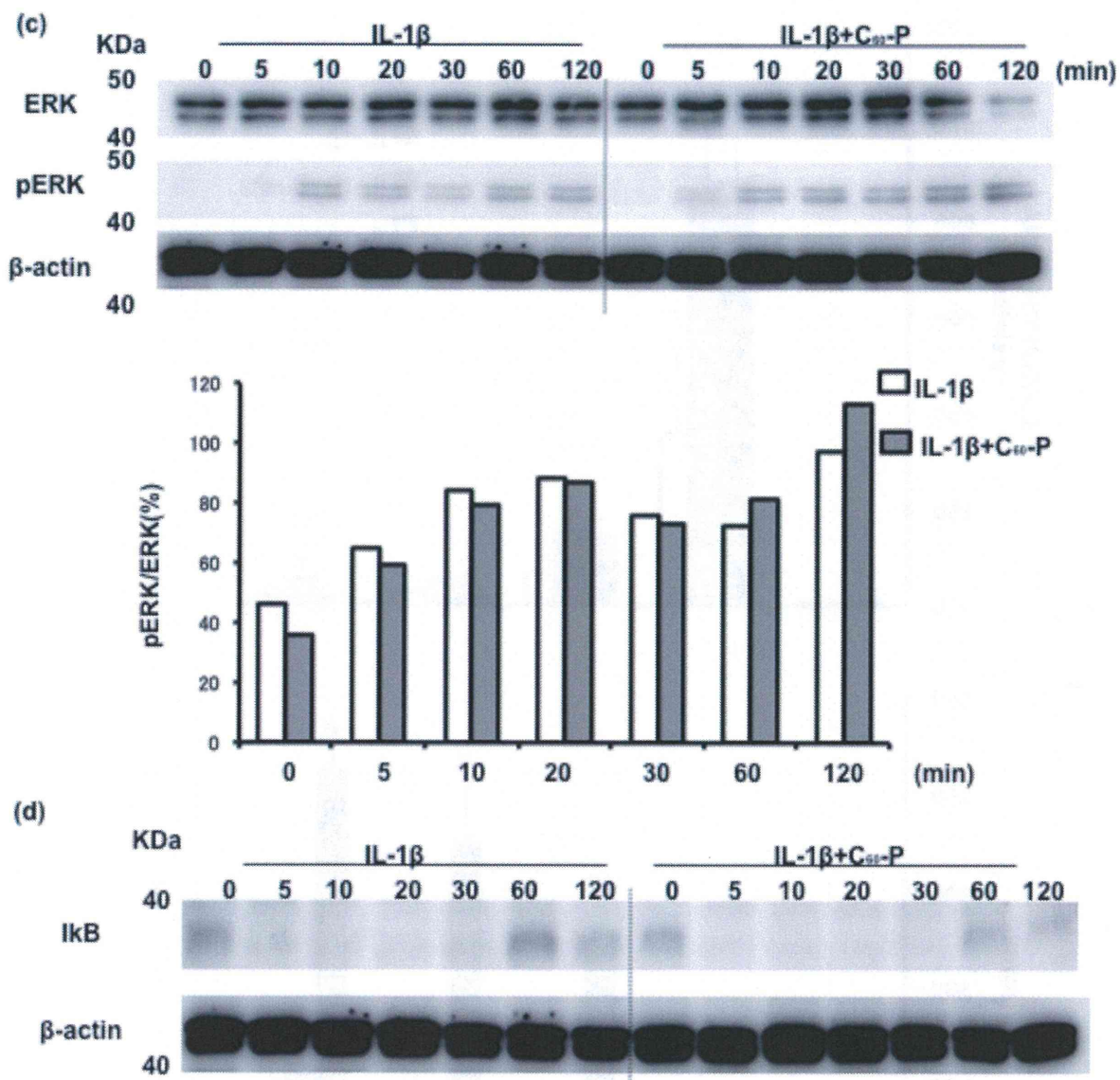
高島重和（三菱商事株式会社ナノテクチーム・リーダー）、河野 裕（大阪府商工労働部成長産業振興室バイオ振興課・参事）、富永俊義（大阪市立大学大学院医学研究科・教授）、槇本博雄（神戸大学医学部附属病院薬剤部・副薬剤部長）

#### <産官学アドバイザーボード（外部評価）>

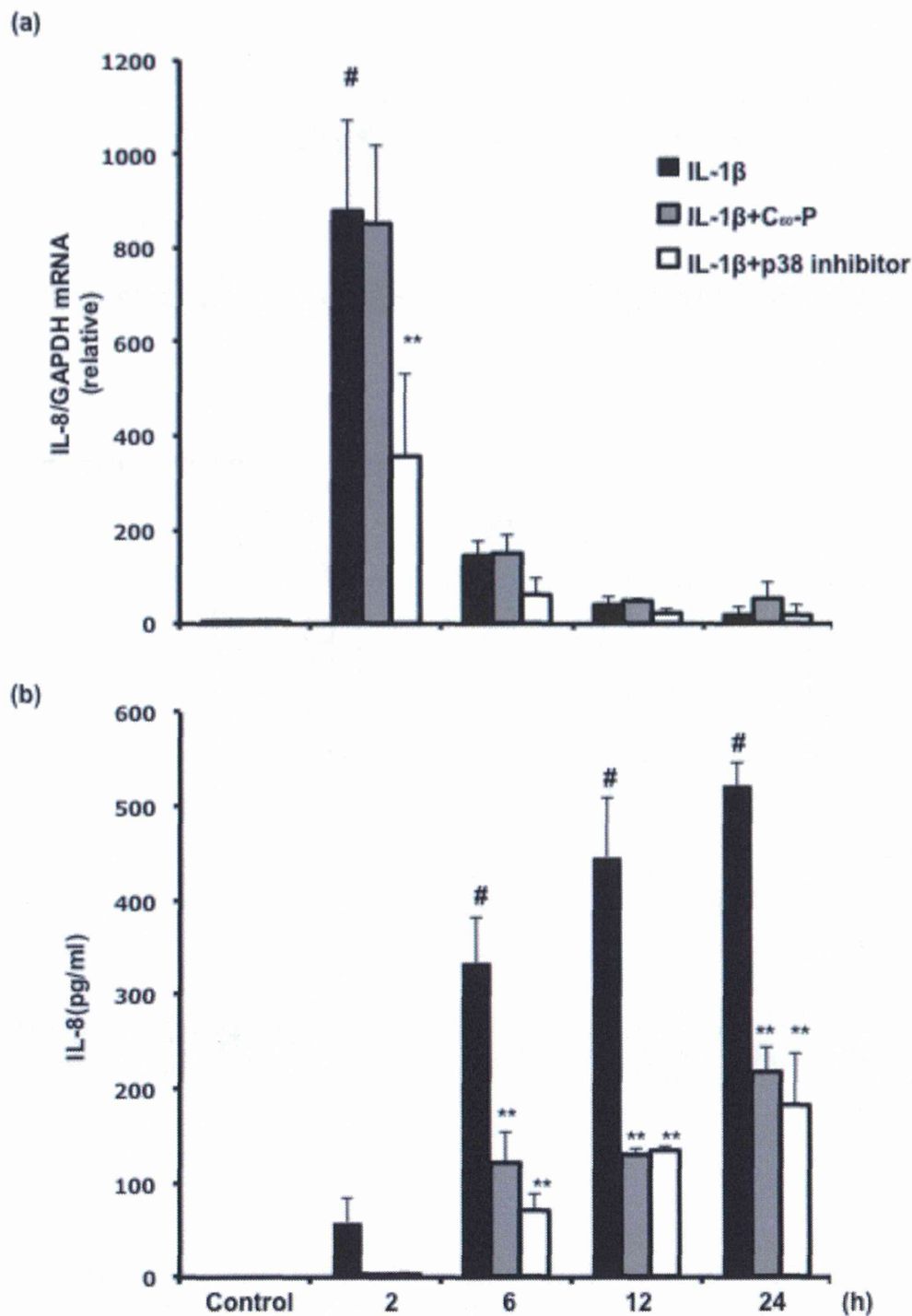
眞弓忠範先生（大阪大学元副学長・神戸学院大学元学長）、川西 徹先生（国立医薬品食品衛生研究所副所長）、萬年成泰先生（日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社元所長）



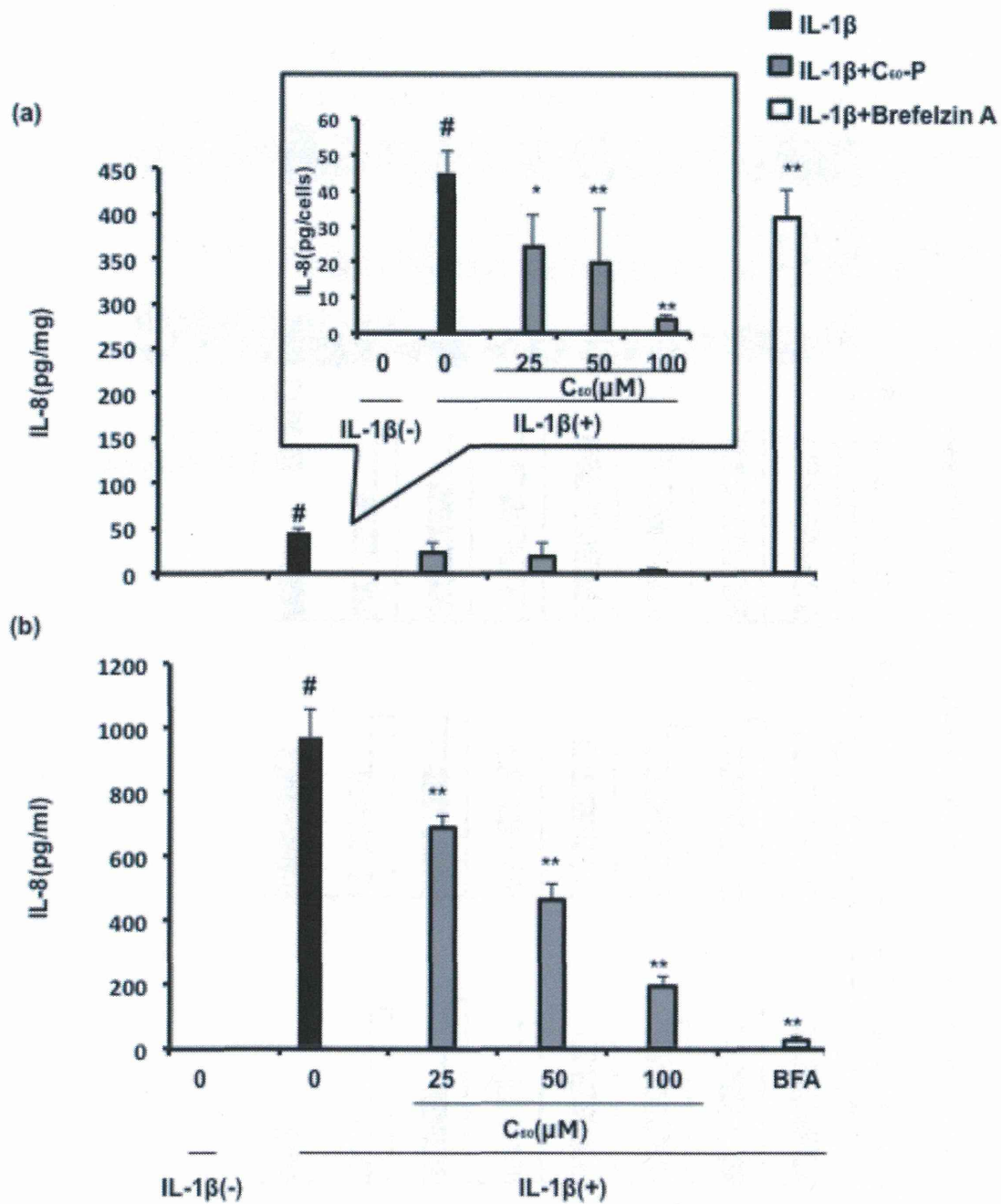




**Fig. 1. The effects of C60 fullerene derivatives on JNK, p38 and ERK phosphorylation and I $\kappa$ B degradation in IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cells.** Caco-2 cells were pretreated with C60 fullerene derivatives (100  $\mu$ M) for 30 min and then, stimulated with IL-1 $\beta$  (125 ng/ml) for indicated time. The cell lysates were subjected to Western blotting, using antibodies for the phosphorylated form and total protein of JNK (a), p38 (b), ERK (c) and I $\kappa$ B (d). Amounts of JNK, p38, ERK, phosphorylated JNK, p38, ERK and  $\beta$ -actin in each time was determined by western blotting. Band intensity was quantified from western blotting images using ImageJ. JNK, p38, ERK phosphorylation was corrected by JNK, p38, ERK.  $\beta$ -actin was used as an endogenous control.



**Fig. 2. The effects of C<sub>60</sub> fullerene derivatives on IL-8 mRNA expression and IL-8 production in IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cells.** Caco-2 cells were pretreated with C<sub>60</sub> derivatives (100  $\mu$ M) or SB203580 (20  $\mu$ M) for 30 min, and then, stimulated with IL-1 $\beta$  (125 ng/ml) for indicated time. Relative levels of IL-8 mRNA was measured by realtime PCR. IL-8 production level in the culture supernatant was measured by IL-8 ELISA kit. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3; <sup>#</sup>*P* < 0.01 versus value for control group by Bonferroni ; <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01, <sup>\*</sup>*P* < 0.05 versus value for IL-1 $\beta$  group by Bonferroni)



**Fig. 3. The effects of C<sub>60</sub> fullerene derivatives on intracellular and extracellular IL-8 production in IL-1β-stimulated Caco-2 cells.** Caco-2 cells were pretreated with C<sub>60</sub> derivatives (100 μM) and brefelzin A (1 μg/ml) for 30 min, and then, stimulated with IL-1β (125 ng/ml) for 24h. IL-8 production level in the culture supernatant and cell lysate was measured by IL-8 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 IL-1β group by Bonferroni)