

Fig. 4. The effects of C₆₀ fullerene derivatives on eIF4E, p70 S6K, MNK1 phosphorylation and expression in IL-1 β -stimulated Caco-2 cells. Caco-2 cells were pretreated with C₆₀ fullerene derivatives (100 μ M) for 30 min or rapamycin (10 μ M) for 1 hours, and then, stimulated with IL-1 β (125 ng/ml) for indicated time. The cell lysates were subjected to Western blotting, using antibodies for the phosphorylated form and total protein of p70 S6K (a), MNK1 (b), eIF4E (c). Amounts of eIF4E, p70 S6K, MNK1, phosphorylated eIF4E, p70 S6K, MNK1 and β -actin in each time was determined by western blotting. Band intensity was quantified from western blotting images using ImageJ. eIF4E, p70 S6K, MNK1 phosphorylation was corrected by eIF4E, p70 S6K, MNK1. β -actin was used as an endogenous control.

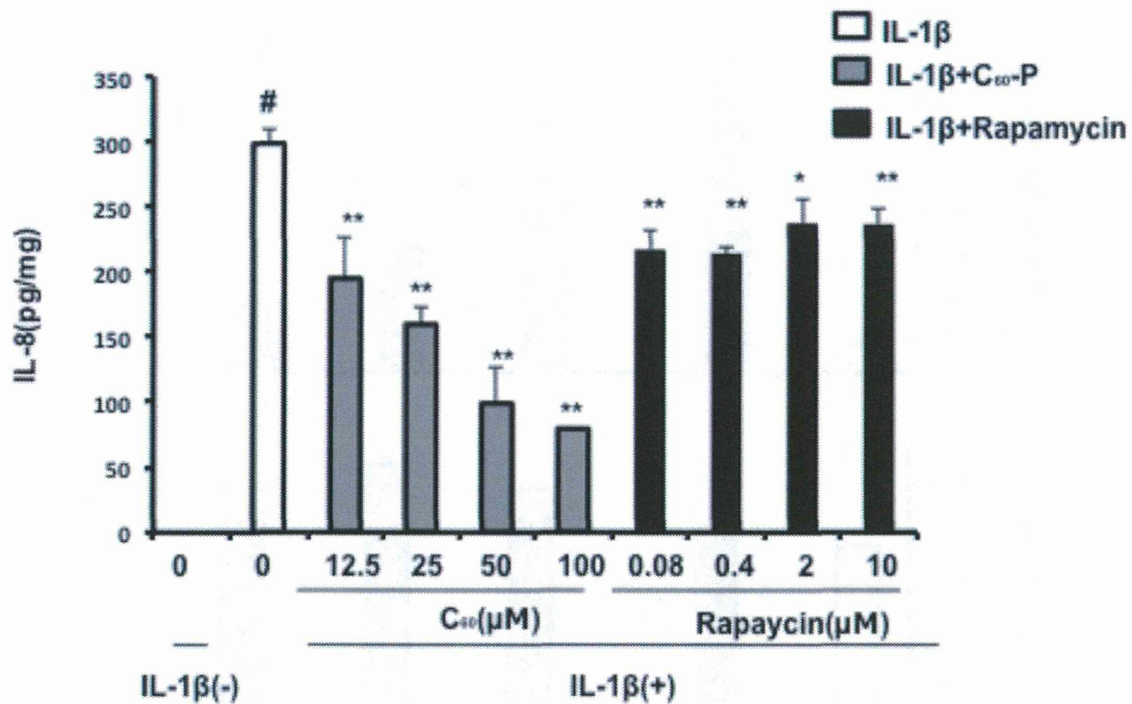


Fig. 5. The effects of C60 fullerene derivatives and rapamycin on IL-8 production in IL-1 β -stimulated Caco-2 cells. Caco-2 cells were pretreated with C60 fullerene derivatives (100 μ M) for 30 min or rapamycin (10 μ M) for 1 hours, and then, stimulated with IL-1 β (125 ng/ml) for 24h. IL-8 production level in the culture supernatant and was measured by IL-8 ELISA kit. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n = 3; #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)

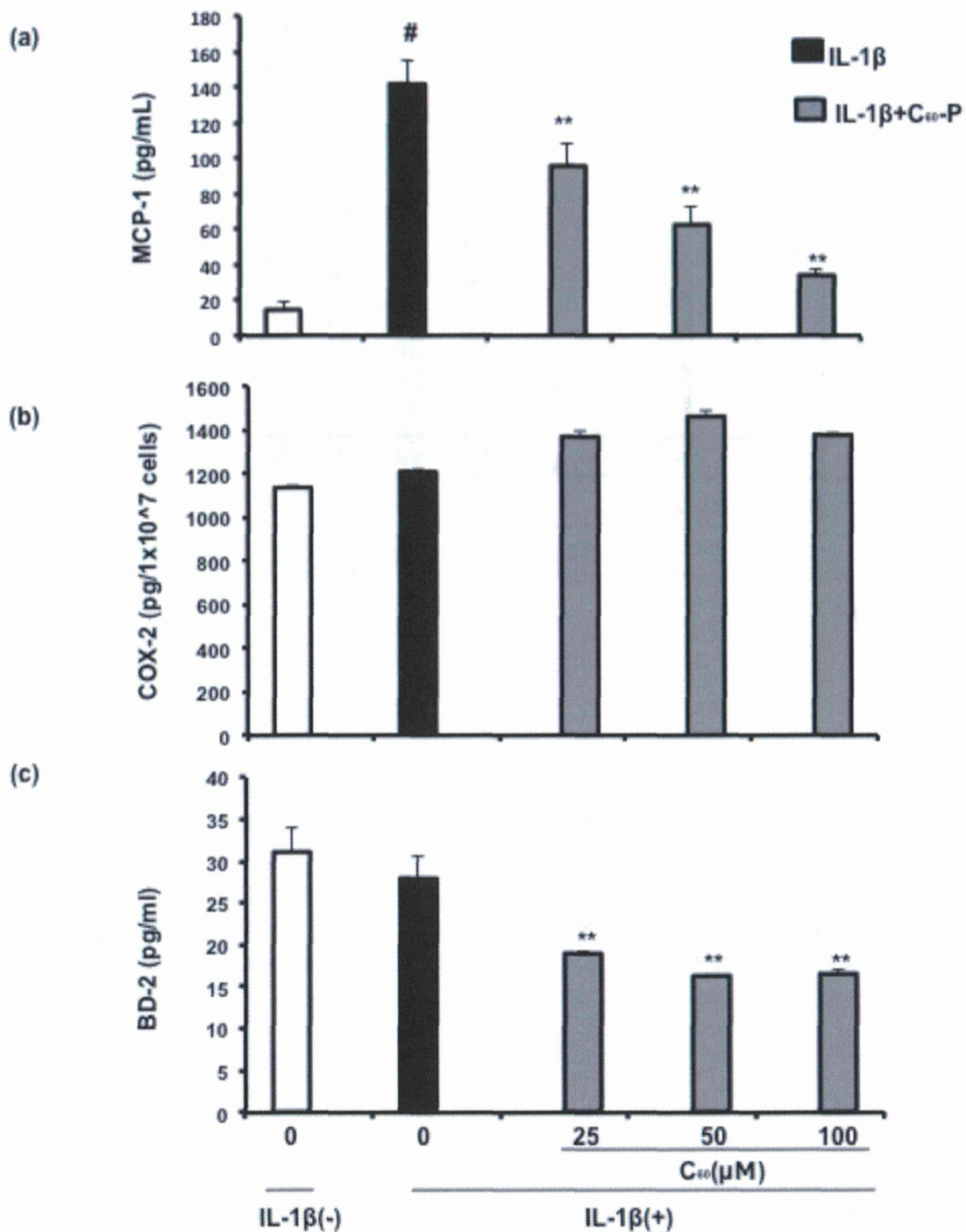


Fig. 6. The effects of C₆₀ fullerene derivatives on production of MCP-1, COX-2, BD-2 in IL-1 β -stimulated Caco-2 cells. Caco-2 cells were pretreated with C₆₀ derivatives for 30 min, and then, stimulated with IL-1 β (125 ng/ml) for 24 h. MCP-1 and BD-2 production level in the culture supernatant was measured by MCP-1 (a) and BD-2 (b) ELISA kit. COX-2 production level in the cell lysate was measured by COX-2 ELISA kit. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n = 3; #*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)

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

研究分担者 吉岡靖雄 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

研究要旨

60 個の炭素原子から成るサッカーボール型の分子である C₆₀ フラーレンは、多数のπ電子に起因する強力な活性酸素消去作用を有し、活性酸素による DNA 傷害や細胞障害などを回避できるとして、医療分野への応用が期待されている。さらに、抗ウイルス作用・抗がん作用などの新たな効果が見出され、C₆₀ フラーレンの未だ知られざる有用機能への期待が高まっている。研究代表者はこれまでに、C₆₀ フラーレン誘導体を用い、その強力な抗酸化作用に基づく抗炎症効果を利用した、炎症性疾患治療薬としての可能性を検討してきた。その中で、C₆₀ フラーレン誘導体が、抗酸化作用とは異なるメカニズムによっても自然免疫性の炎症に対して高い抑制効果を示すことなどを見出してきた。我々は平成 25 年度研究において、これまで解析した C₆₀ フラーレン誘導体の中で、最も強い抗炎症活性を有する C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) を用いて、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。その結果、オキサゾロン誘発性腸疾患モデル (Th2 型の免疫応答を呈する潰瘍性大腸炎モデル) および TNBS 誘発性腸疾患モデル (Th1 型の免疫応答を呈するクローン病モデル) に対するプロリン型 C₆₀ フラーレンの治療効果を検討したところ、TNBS 誘発性腸疾患モデルでは治療効果が認められない一方で、オキサゾロン誘発性腸疾患モデルにおいて強い治療効果が認められることを明らかとした。平成 26 年度には、C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) の他の疾患への適用可能性を検討すると共に、異なる誘導体の抗炎症作用に関して検討した。

A. 研究目的

サッカーボールの形で知られる C₆₀ フラーレンは、1985 年、炭素蒸気から選択的に凝縮して得られる、非常に安定なクラスターとして発見された。現在では、安定で芳香族系溶媒に溶解性を持つ、全て炭素でできた（水素分子を含まない）分子として知られている。フルーレンは、優れた強度・超伝導性・電気伝導性などの性質を有することが明らかになっており、有機薄膜太陽電池など、電子工学分野での需要形成が期待されている。さらに、医療分野への応用にも注目が集まっており、世界中で精力的に研究が推進されている。

生体内シグナル伝達物質である活性酸素種 (Reactive Oxide Species; ROS) は、生体内酸化ストレス物質としても知られている。ROS は反

応性が極めて高く、非特異的に分子と反応するという特徴から、DNA 傷害や脂質の過酸化、タンパク質の変性など、多くの組織傷害に関与し、がん・アルツハイマー病・心筋梗塞などの悪化にも繋がると考えられている。フルーレンは、分子内の二重結合を形成するπ電子により、ほぼエネルギーロス無しで電子の授受を行うことが可能であり、ROS を除去する作用、つまり抗酸化作用を有することが知られている。C₆₀ フラーレンの抗酸化作用は、臨床応用されている抗酸化剤であるビタミン E よりも数倍強いという、ビタミン E では除去できないスーパーオキシドアニオン (O₂⁻) などの幅広い種類の ROS に効果を発揮する。また、ビタミン E やビタミン C などの抗酸化剤は、生体内で鉄や銅といった金属イオンの還元を介

して、逆に ROS の生成を誘導してしまう「プロオキシダント作用」を示すことが知られている。一方で C₆₀ フラーレンは、プロオキシダント作用を示さないことも明らかとなっており、従来までの抗酸化剤の欠点を克服し得る新たな抗酸化剤として期待されている。

炎症性疾患とは、炎症応答によって正常な組織が傷害されてしまう疾患の総称である。その多くが発熱や痛みを伴うため、患者の QOL の低下にも繋がる。近年問題視されている病態の中でも炎症が関わる疾患は多く、例えば国民の 3 人に 1 人が有すると報告されている気管支喘息・アトピーなどのアレルギー疾患や、近年患者数が増加している歯周病、リウマチ、円形脱毛症なども全て炎症性疾患である。さらに炎症性疾患の中には、慢性化することでがんへの進展リスクが高まる疾患も一部報告されており、炎症性疾患そのものだけでなく、炎症性疾患によって誘発される重篤な疾患があることにも目を向けるべきであろう。また、現代における炎症性疾患の中には、厚生労働省指定の難治性疾患に指定されているものも存在する。難治性の炎症性疾患には、潰瘍性大腸炎やクローン病といった炎症性腸疾患 (IBD; Inflammatory Bowel Disease) や、悪性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなどが挙げられる。特に IBD 患者数は、発症年齢の拡大も相俟って近年急増しており、平成 24 年度の特定疾患医療受給者証交付件数は 18 万人にも達した。本疾患の治療薬として 5-アミノサリチル酸 (5-ASA) 製剤や副腎皮質ステロイド、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、治療不応例も多く、高薬価、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。

研究代表者はこれまでに、C₆₀ フラーレンの有する未知の作用を探索する中で、*in vitro* において C₆₀ フラーレン誘導体が、抗酸化剤である N-Acetyl-L-cysteine (NAC) と比較して、強力

な抗炎症作用を示すことを見出してきた。また、C₆₀ フラーレン誘導体 (水酸化フルーレン) の炎症性疾患に対する治療効果を、炎症性腸疾患のモデルマウスを用いて検討し、既に C₆₀ フラーレン誘導体 (水酸化フルーレン) による顕著な治療効果を確認している。さらに、C₆₀ フラーレン誘導体 (水酸化フルーレン) よりも優れた抗炎症活性を有する C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) の同定にも成功している。

我々は平成 25 年度研究において、これまで解析した C₆₀ フラーレン誘導体の中で、最も強い抗炎症活性を有する C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) を用いて、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。その結果、オキサゾロン誘発性腸疾患モデル (Th2 型の免疫応答を呈する潰瘍性大腸炎モデル) および TNBS 誘発性腸疾患モデル (Th1 型の免疫応答を呈するクローン病モデル) に対するプロリン型 C₆₀ フラーレンの治療効果を検討したところ、TNBS 誘発性腸疾患モデルでは治療効果が認められない一方で、オキサゾロン誘発性腸疾患モデルにおいて強い治療効果が認められることを明らかとした。

平成 26 年度には、C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) の他の疾患への適用可能性を検討すると共に、異なる誘導体の抗炎症作用に関して検討した。

A. 研究方法

試薬

本検討では、研究分担者である小久保 研先生よりご供与頂いた 3 種類のフルーレン誘導体を実験に供した。各フルーレン誘導体分散液は ULTRASONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、さらに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後に用いた。

培養細胞

ヒト肺胞基底上皮がん細胞株 (A549 細胞) およびヒト腸管上皮細胞 (Caco-2 細胞) は、American

Type Culture Collection (ATCC) より購入した。

細胞傷害性評価

96 穴培養プレート (Nunc) に A549 あるいは Caco-2 細胞を播種し、一晚培養した後、各フラーレン誘導体分散液を各濃度に希釈し、24 時間培養した。リポ多糖 (LPS ; *Escherichia coli* O111:B4 ; Sigma Aldrich) を前処置した検討では、各フラーレン誘導体分散液を同様に調製し、0.5 時間前処置した後に、LPS 溶液を加え 24 時間培養した。その後、生細胞測定試薬 SF (Nacal Tesque) のプロトコルに準じ、培養細胞のミトコンドリアの脱水素酵素活性を指標として、細胞傷害性を評価した。

ELISA による培養上清中サイトカイン量の測定

96 穴培養プレートに A549 あるいは Caco-2 細胞を播種し、一晚培養した後、各フラーレン誘導体分散液を各濃度に希釈し、24 時間培養した。LPS を前処置した検討では、各フラーレン誘導体分散液を同様に調製し、0.5 時間前処置した後に、LPS 溶液を加えた。24 時間後、培養上清中の Interleukin (IL)-6 (BD OptEIA) および IL-8 量 (eBioscience) を ELISA により測定した。操作はプロトコルに準じて行った。

(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

本検討では、小久保先生より新たにご供与頂いた 3 種類の C₆₀ フラーレン誘導体を実験に供した (Fig. 1)。各 C₆₀ フラーレン誘導体の安全性を細胞傷害性および起炎性を指標に *in vitro* にて評価した。

まず、各種 C₆₀ フラーレン誘導体の細胞傷害性を評価する目的で、各種 C₆₀ フラーレン誘導体 (12.5、25、50、100 μM) をヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞に添加し、24 時間培養した。その後、細胞傷害性を WST-8 アッセイにより解析した。その結果、本作用条件下では、いずれの C₆₀ フラーレン誘導体においても、細胞傷害性は認められなかった (Fig. 2)。なおこの時、各種 C₆₀ フラーレン誘導体による起炎性を評価する目的で、培養上清中の炎症性サイトカイン (IL-8、IL-6) 量を ELISA により測定したところ、いずれの群においても、対照群と比較し、有意な変動は認められないことを確認している。次に、これまでと同様に、IL-1beta で刺激した際の、細胞培養上清中の IL-8 量を ELISA により測定した (Fig. 3)。その結果、これまでの C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) は非常に強い IL-8 産生抑制作用を発揮するものの、これら誘導体は、全く産生抑制を誘導しないことが明らかとなった。以上の結果が

ら、これら3種類の誘導体は、我々の目的とする炎症性疾患に対する治療薬としては適用できない可能性が示された。

我々はこれまで、炎症性腸疾患に対するC₆₀フラレン誘導体の探索を目的として、主に、ヒト腸管上皮細胞株Caco-2を用いて、抗炎症作用をスクリーニングしてきた。一方で、炎症性疾患としては、他の臓器で誘発されるものも多数存在する。そこで、ヒト肺胞上皮細胞株であるA549を用いて、C₆₀フラレン誘導体の有用性を評価した。A549をLPS、IL-1beta、TNF-alphaで刺激し、培養上清中のIL-6、IL-8をELISAにより測定した。これまでに見出したC₆₀フラレン誘導体(C₆₀pro)の抗炎症作用を確認したところ、いずれの刺激においてもIL-8の産生抑制は誘導するものの、IL-6産生は抑制しないことが示された(Fig. 4)。IL-6とIL-8はNF-kappaBを介したほぼ同様のシグナル伝達で産生誘導されることが予想されるものの、なぜ、異なる抑制パターンを示すのかは、現段階では不明である。次に、先ほどの3種類のC₆₀フラレン誘導体の抗炎症作用を検討した。まず、各種C₆₀フラレン誘導体の細胞傷害性を評価する目的で、各種C₆₀フラレン誘導体(12.5、25、50、100 μM)をA549細胞に添加し、24時間培養した。その後、細胞傷害性をWST-8アッセイにより解析した。その結果、本作用条件下では、いずれのC₆₀フラレン誘導体においても、細胞傷害性は認められなかった(Fig. 5)。なおこの時、各種C₆₀フラレン誘導体による起炎性を評価する目的で、培養上清中の炎症性サイトカイン(IL-8、IL-6)量をELISAにより測定した(Fig. 6)。その結果、IL-6については、いずれのC₆₀フラレン誘導体においても、産生誘導は認められなかった。一方で、IL-8については、未処理群でも若干の産生がベースラインとして確認されたが、いずれの誘導体も産生を抑制することが明らかとなった。これら誘導体は細胞傷害性を示さないことから、ベースラインの産生をも抑制する作用を有していることが判

明した。そこで、A549細胞をLPSで刺激した際に産生誘導されるIL-8やIL-6を抑制するかについて評価した(Fig. 7)。その結果、IL-8については、いずれの誘導体も産生抑制することが判明した。一方で、IL-6については、特にHEE誘導体が強く産生誘導することが判明した。以上の結果から、これら新規の3種類の誘導体は、1) これまでのC₆₀フラレン誘導体(C₆₀pro)において抗炎症作用が認められたCaco-2細胞においては、抗炎症作用を示さないこと、2) C₆₀proではA549細胞においてIL-6の産生抑制を誘導しない一方で、特に、HEE誘導体はIL-6の産生抑制をも誘導することが判明した。従って、C₆₀フラレン誘導体(C₆₀pro)とHEE誘導体の抗炎症作用は異なるメカニズムで誘導される可能性が示された。

E. 結論

本検討では、新たな誘導体の抗炎症作用を検討した。その結果、炎症性腸疾患を標的とした場合には、これまでに見出したC₆₀フラレン誘導体(C₆₀pro)が優れていることが明らかとなった。一方で、他の炎症性疾患を見据えた場合、新たな誘導体であるHEE誘導体が優れている可能性が示された。研究代表者の本年度の報告書において、C₆₀フラレン誘導体(C₆₀pro)の抗炎症メカニズムが検討されているが、異なる誘導体においては、全く異なる機序で抗炎症作用を示す可能性も考えられる。今後の益々の検討が必要であろう。

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

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（出願）

該当なし

② 実用新案登録

該当なし

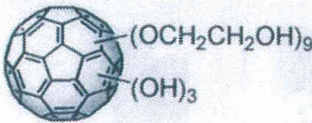
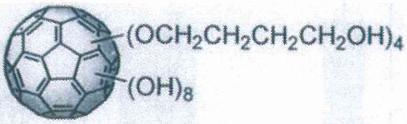
名称	ヒドロシキエチル エーテル化フラーレン	ヒドロキシシブチル エーテル化フラーレン	エチルエーテル化 フラーレン
構造式	 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH})_9$ $(\text{OH})_3$	 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_4$ $(\text{OH})_8$	
表記	HEE	HBE	ETO

Fig. 1. 本検討で実験に供した C_{60} フラーレン誘導体

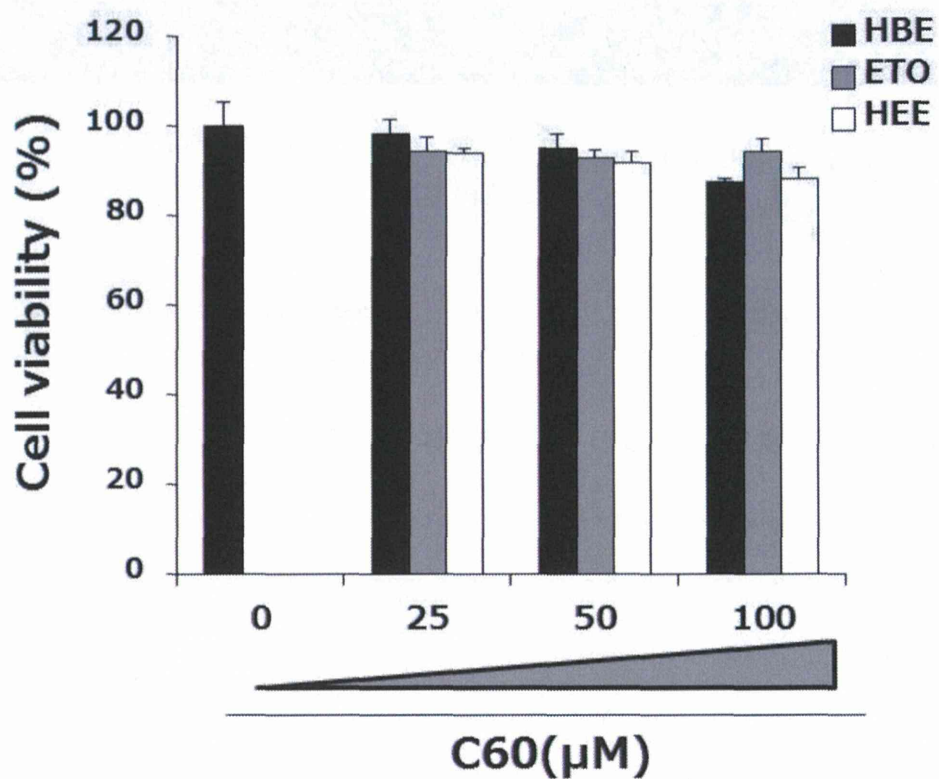


Fig. 2. 各種 C₆₀ フラーレン誘導体の細胞傷害性

各種 C₆₀ フラーレン誘導体を Caco-2 細胞に 24 時間作用させ、WST-8 アッセイにより細胞傷害性を評価した。

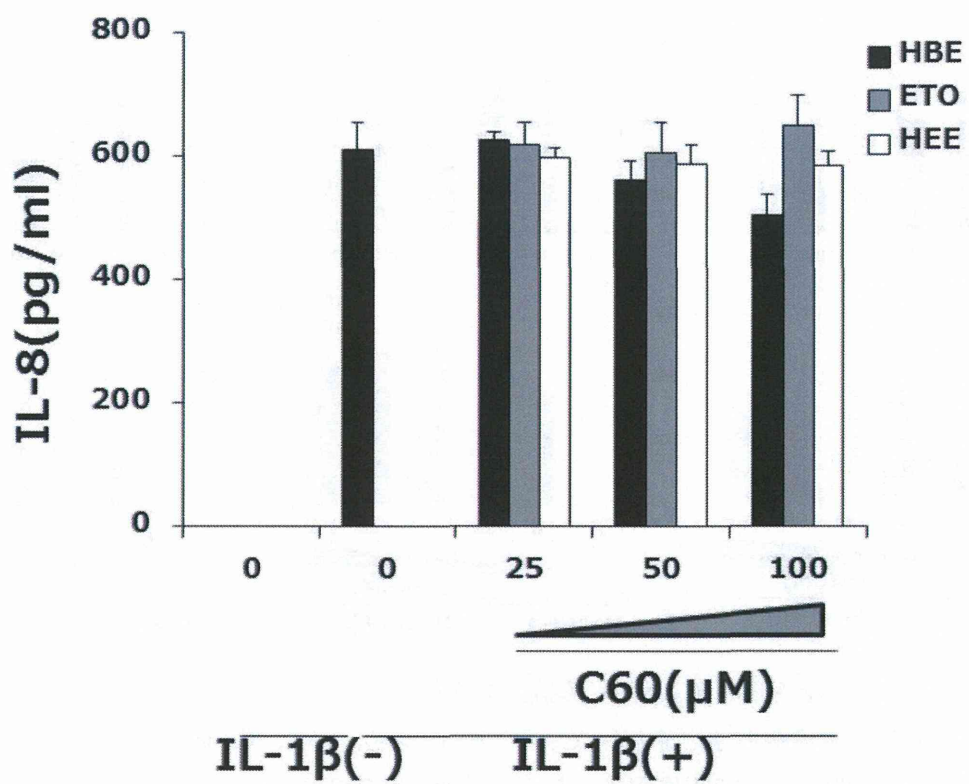


Fig. 3. 各種 C₆₀ フラーレン誘導体の抗炎症作用

各種 C₆₀ フラーレン誘導体および IL-1beta を Caco-2 細胞に 24 時間作用させた後、培養上清中の IL-8 量を ELISA により評価した。

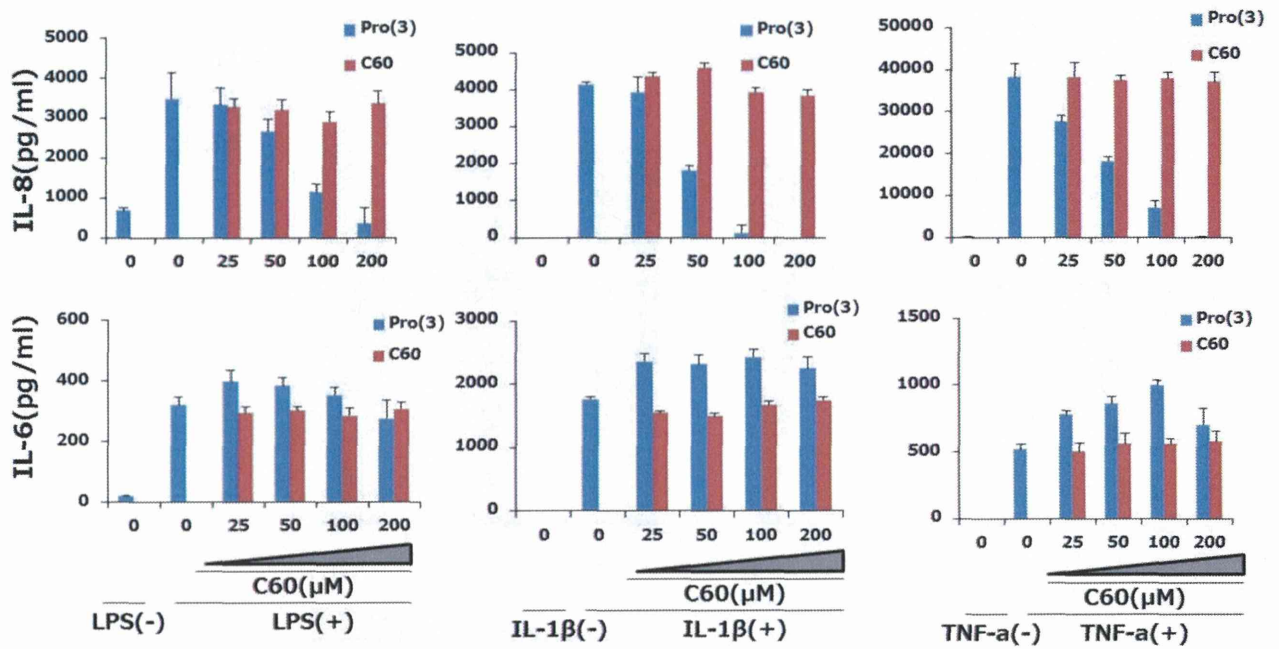


Fig. 4. C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) の抗炎症作用

各種 C₆₀ フラーレン誘導体および未修飾 C₆₀ フラーレンを、LPS、IL-1beta もしくは TNF-alpha 存在下で Caco-2 細胞に 24 時間作用させた後、培養上清中の IL-6、IL-8 量を ELISA により評価した。

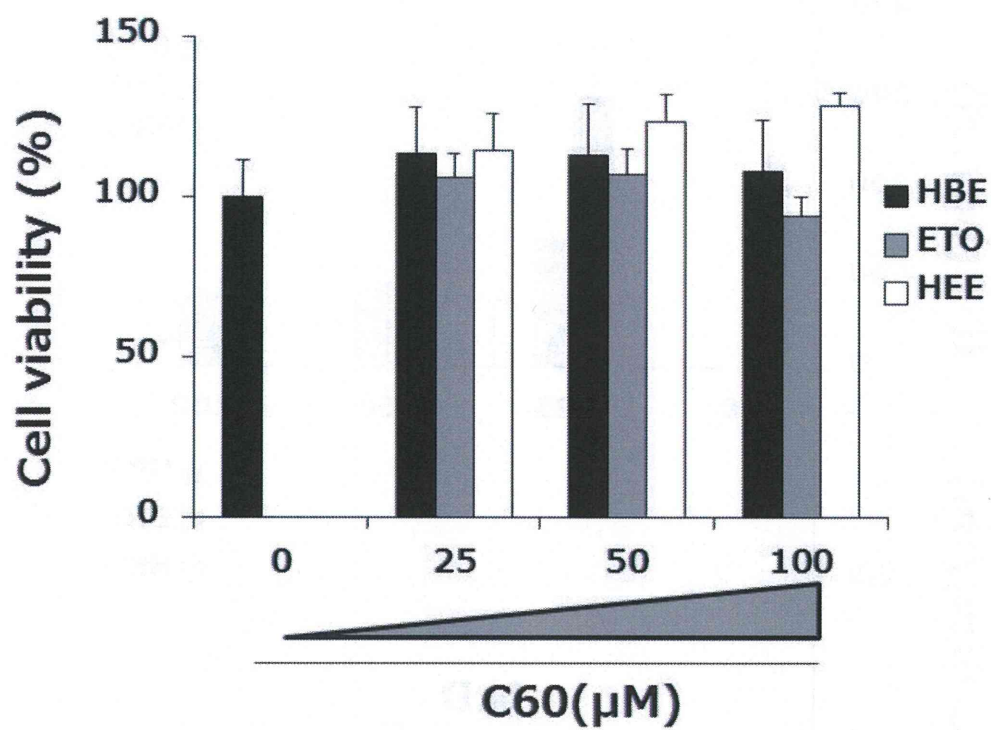


Fig. 5. 各種 C₆₀ フラーレン誘導体の細胞傷害性

各種 C₆₀ フラーレン誘導体を A549 細胞に 24 時間作用させ、WST-8 アッセイにより細胞傷害性を評価した。

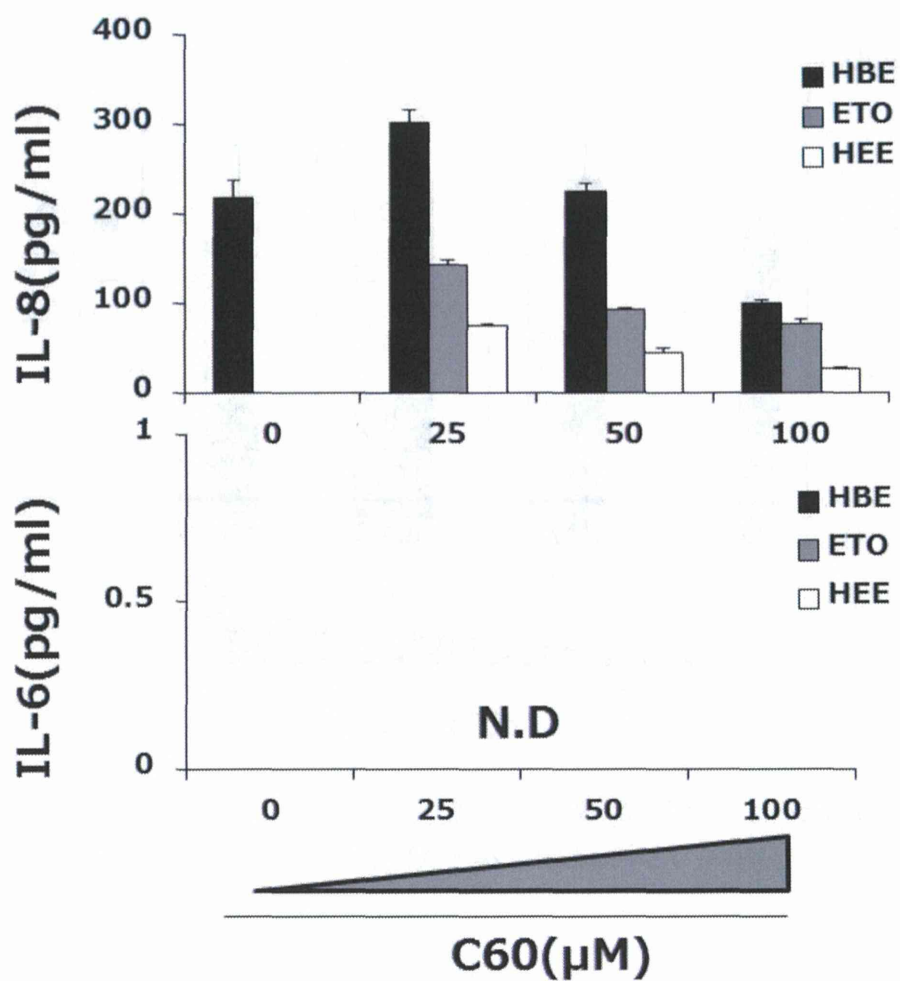


Fig. 6. 各種 C₆₀ フラーレン誘導体の抗炎症作用

各種 C₆₀ フラーレン誘導体を A549 細胞に 24 時間作用させた後、培養上清中の IL-6、IL-8 量を ELISA により評価した。

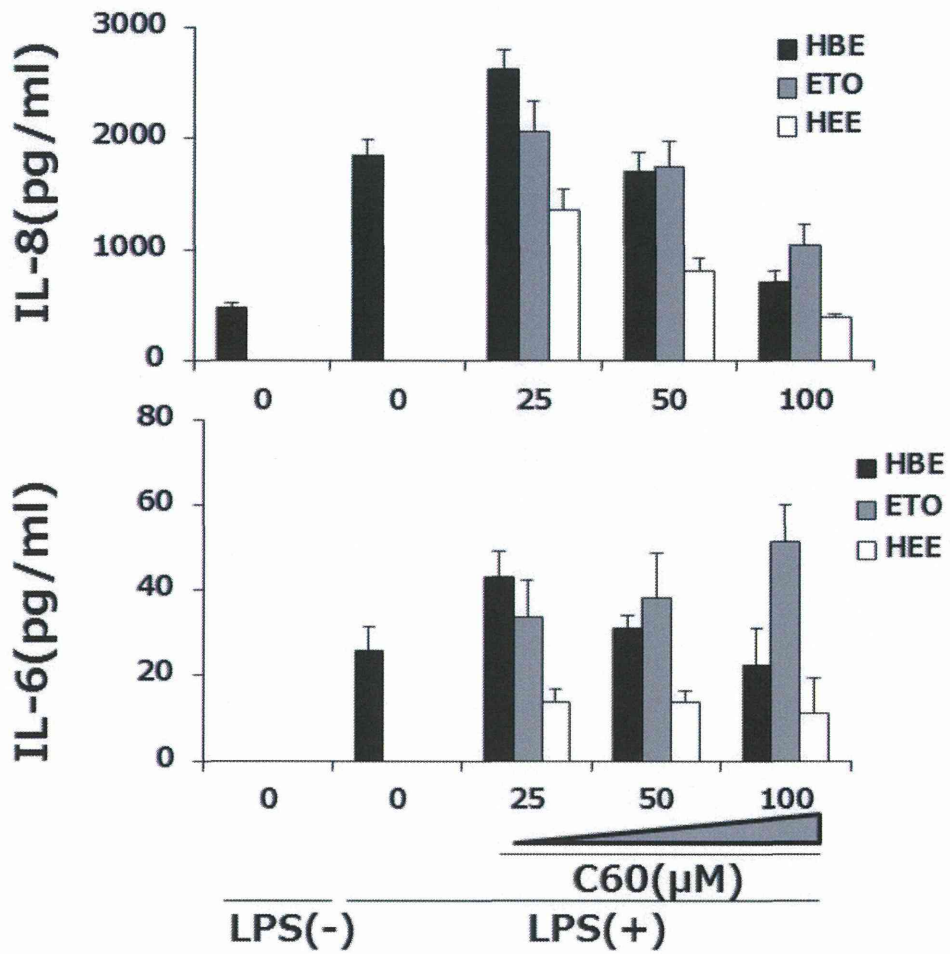


Fig. 7. 各種 C₆₀ フラーレン誘導体の抗炎症作用

各種 C₆₀ フラーレン誘導体を、LPS 存在下で Caco-2 細胞に 24 時間作用させた後、培養上清中の IL-6、IL-8 量を ELISA により評価した。

フラレンによる細胞保護機構に関する研究

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。さらに、フラレンを用いたドラッグデリバリーの候補分子を検討するべく、細胞死に関連する報告のある P2X7 受容体チャネルの病態的意義を検討する。

【方法と結果】心筋細胞において、内因性のアドレナリン受容体刺激により惹起される活性酸素種による心肥大に対する C60-36OH の抑制効果を検討した。その結果、C60-36OH の前投与は、心肥大反応を抑制する傾向を認めた。さらに、生体における C60-36OH の有用性を、マウス圧負荷モデルにおいて、C60-36OH の経口投与により検討した。その結果、圧負荷による心肥大は悪化をきたさなかった。

【結論】フラレン C60-36OH は、心筋細胞肥大を抑制する。生体においては、圧負荷による心肥大は抑制しないが、病態を悪化させる事もなく、炎症性腸疾患を合併した心不全患者に対しても安全に使用しうる。

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、今後も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、フラレンによる炎症性腸疾患の治療法確立の過程で、活性酸素種の関連する細胞死及び心筋細胞肥大に及ぼす影響を詳

細に解析し、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。第二に細胞死に関連するイオンチャネルの意義を検討し、フラレンを担体とした細胞死抑制の治療を構築する際の標的を検討する。

B. 研究方法

1. フラレンの心筋細胞病態制御の検討

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、フラレンは強力な活性酸素消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や細胞肥大に対するフラレンの抑制効果を検討した。ラット新生仔心筋細胞を調整し、活性酸素種を介して心筋細胞肥大を惹起

する事が報告されている、 α アドレナリン受容体刺激に対する肥大抑制効果を C60-36OH を用いて検討した。検討項目として、ラット新生仔心筋細胞より、メッセンジャーRNA を調整し、心筋細胞肥大の分子マーカーである atrial natriuretic factor (ANF) と brain natriuretic peptide (BNP) の発現を検討した。また、心筋細胞をフアロイジンにて染色し細胞面積を測定した。さらに生体において心病態に及ぼす影響を、野生型マウスにおいて大動脈縮窄モデルを用いて、心臓に圧負荷を加えた状態で、C60-36OH もしくは溶媒の経口投与を施行した。心肥大の指標として、心重量/体重比を計測し算出すると共に、心エコーによる心機能評価を行い、心病態に及ぼす影響を検討した。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考察

1. フラーレンの心筋細胞病態制御の検討

前年度の検討において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ている。本年度は、ラット新生仔心筋細胞において、活性酸素種が、心筋細胞肥大に必須と考えられている α アドレナリン受容体刺激におけるフラレンの抑制効果を検討した。C60-36OH の前投与が、活性酸素種を介する心筋細胞肥大に及ぼす影響を評価した。その結果、アドレナリン受容体刺激による BNP のメッセンジャーRNA の発現上昇は、抑制される傾向を認めた。さらに、細胞面積の増大は有意に抑制され、フラレンが細胞肥大を抑制する可能性が示唆された。そこで、生体における圧負荷による心肥大にフラレンの及ぼす効果を、経口投与を用いて検討した。野生型 C57BL6 マウスに、大動脈縮窄術を施し、圧負荷を作製した。心エコーにより測定した圧格差はコントロール群とフラレン群において有意な差を認めず、同等の負荷がかかっていると考えられた。圧負荷後 2 週間の心重量についてはコントロール群と比較して有意な差を認

めず、フラレン C60-36OH の経口投与は、心肥大を抑制しない事が示唆された。一方で、心肥大を増悪させなかった事より、心疾患を有する症例に対しても、心不全を増悪させることなく使用しうる可能性が示唆された。

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ンの抗酸化により抑制されないが、 α アドレナリン受容体刺激による心筋細胞肥大を抑制する。
2. フラレンの投与は生体において、圧負荷による心肥大に有意な影響を及ぼさない。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Matsuo R, Morihara H, Mohri T, Murasawa S, Takewaki K, Nakayama H, Maeda M, Fujio Y. The Inhibition of N-Glycosylation of Glycoprotein 130 Molecule Abolishes STAT3 Activation by IL-6 Family Cytokines in Cultured Cardiac Myocytes. PLoS One. 9(10): e111097, 2014.
2. Shintani Y, Drexler HC, Kioka H, Terracciano CM, Coppin SR, Imamura H, Akao M, Nakai J, Wheeler AP, Higo S, Nakayama H, Takashima S, Yashiro K, Suzuki K. Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2. EMBO Rep. 15(4): 438-45, 2014.

【総説・その他】

該当なし