

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 11 件】

1. 熊谷渉平, 中山博之, 早水菜緒, 松浪佐知, 大塚航, 藤尾 慈: Phosphorylation of $\beta_2\alpha$, a subunit of L-type calcium channel, localizes at caveolae, and exaggerates cardiac hypertrophy in vitro and in vivo., The 8th SKO symposium Program., 大阪, 2014年6月.
2. 榎本大智, 尾花理徳, 宮脇昭光, 毛利友美, 前田真貴子, 中山博之, 藤尾 慈: 心筋梗塞慢性期における心筋特異的 STAT3 の欠損は心筋リモデリングを悪化させる., 生体機能と創薬シンポジウム., 大阪, 2014年8月.
3. 大谷勇太, 竹脇佳那, 宮本香織, 尾花理徳, 中山博之, 藤尾 慈: the overexpression of CD93 in myeloid cells attenuated the cardiac fibrosis after myocardial infarction., 第18回日本心不全学会学術集会., 大阪, 2014年10月.
4. 森原啓文, 中山博之, 大岩晴矩, 土山大介, 山本剛史, 小比賀聡, 藤尾 慈: Administration of phospholamban-antisense locked nucleic acid improves cardiac contractility in a murine heart failure model., 第18回日本心不全学会学術集会., 大阪, 2014年10月.
5. 熊谷渉平, 中山博之, 松浪佐知, 早水菜緒, 舎川洸太, 大塚航, 藤尾 慈: Caveolae-specific phosphorylation of L-type calcium channel $\beta_2\alpha$ subunit exaggerates cardiac hypertrophic responses after α_1 adrenergic stimulation in mice., International Society of Heart Research 日本部会総会., 名古屋, 2014年11月.
6. 松原由実, 宮脇昭光, 榎原正貴, 尾花理徳, 前田真貴子, 中山博之, 藤尾 慈: The properties of cardiac Sca-1+ resident stem cells are altered in response to myocardial inflammation., 第88回日本薬理学会年会., 名古屋, 2015年3月.
7. 五十嵐裕美, 中山博之, 松浪佐知, 早水菜穂, 舎川洸太, 尾花理徳, 前田真貴子, 藤尾 慈: Adrenergic receptors β_2 and β_3 transduce differential signals in cardiac fibroblasts., 第88回日本薬理学会年会., 名古屋, 2015年3月.
8. 古谷知佳, 宮脇昭光, 大谷勇太, 尾花理徳, 前田真貴子, 中山博之, 藤尾 慈: IL-27 negatively regulates murine experimental autoimmune myocarditis (EAM)., 第88回日本薬理学会年会., 名古屋, 2015年3月.
9. 土山大介, 中山博之, 森原啓文, 石田瑛子, 尾花理徳, 前田真貴子, 藤尾 慈: Elucidation of molecular mechanism of cardiomyocyte necrosis induced by reactive oxygen species., 第88回日本薬理学会年会., 名古屋, 2015年3月.
10. 田中智大, 尾花理徳, 前田真貴子, 中山博之, 藤尾 慈: Interleukin 27 induces endothelial differentiation in murine cardiac stem cells., 第88回日本薬理学会年会., 名古屋, 2015年3月.
11. 熊谷渉平, 松井一樹, 中山博之, 尾花理徳, 藤尾 慈: P2X7 受容体シグナルの阻害は心線維芽細胞の遊走を促進することにより、心筋梗塞後の心不全病態を増悪させる., 第135回日本薬学会年会., 神戸, 2015年3月.

【国際学会発表：合計 2 件】

1. Nakayama H., Kumagai S., Matsunami S.,

Hayamizu N., Tonegawa K., Otsuka W., Fujio Y. : Caveolae-specific phosphorylation of L-type calcium channel β 2a subunit exaggerates cardiac hypertrophic responses after α 1 adrenergic stimulation in mice., American Heart Association, Basic Cardiovascular Sciences., Las Vegas (USA), 13-18 July, 2014.

2. Kumagai S., Nakayama H., Hayamizu N., Matsunami S., Otsuka W., Sakata Y., Fujio Y. : Caveolae-Specific Phosphorylation of L-type Calcium Channel β 2a Subunit Exacerbates Cardiac Hypertrophy., American Heart Association Scientific Sessions., Chicago (USA), November 15-19, 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臨床薬効解析学分野（職員 3 名・大学院生/学生 8 名）：中山博之准教授、前田真貴子特任講師、尾花理徳助教、森原啓文、土山大介、熊谷渉平、舎川洸太、早水菜穂、松浪佐知、大塚航、松井一樹

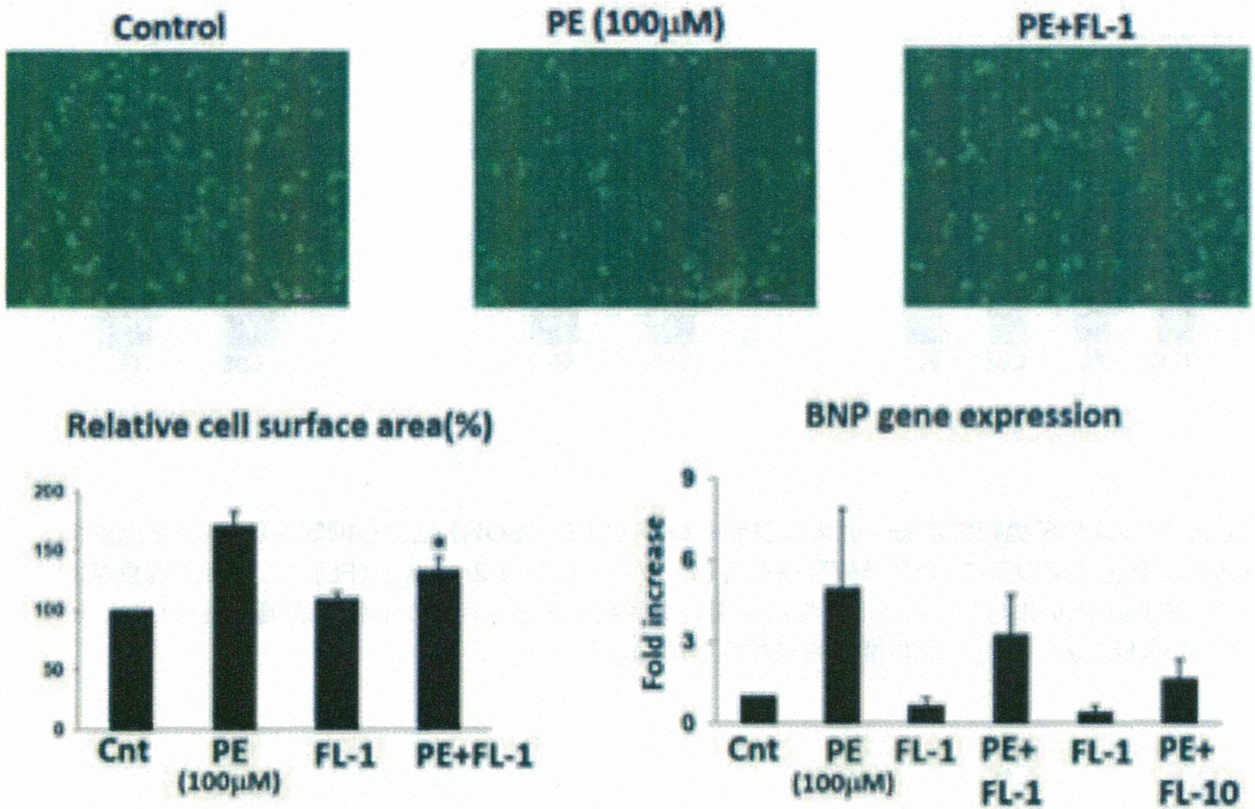


図 1. a アドレナリン受容体刺激により誘導される心筋細胞肥大。ラット新生仔心筋細胞を調整し、C6036OH フラーレン 1 及び 10 μ M (FL-1, FL-10)の前処置の後に a アドレナリン受容体刺激薬であるフェニレフリン(PE) 100 μ M にて刺激し、24 時間後の細胞肥大の誘導を、細胞面積と BNP の発現を指標に検討した。PE 刺激 24 時間に、後著明な心筋細胞肥大が観察された(上図)が、フラーレン前投与により、細胞面積の増大は有意に抑制された(下図左)。また心筋細胞肥大の分子マーカーである BNP の発現も用量依存性の低下傾向を認めた(下図右)。* $p < 0.05$ vs PE。

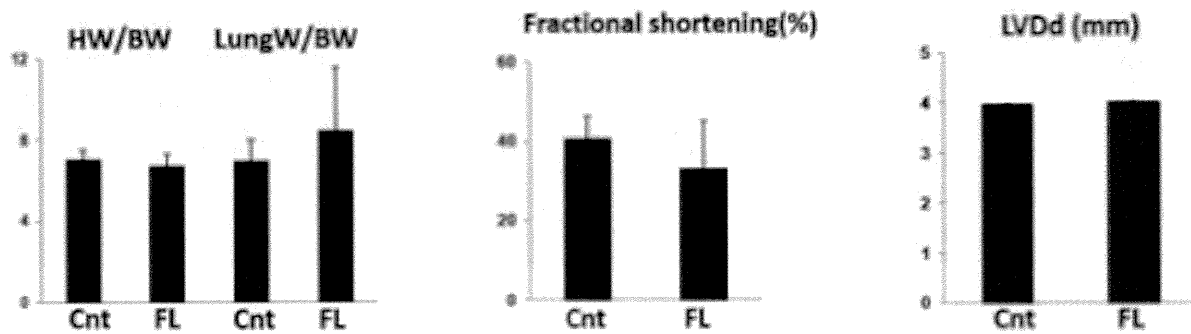


図 2. マウスの圧負荷による心肥大はフラレーン (C60-360H) により抑制されない. 8 週齢の C57BL 野生型マウスに 大動脈縮窄術を施し、フラレーン 0.2mg/kg (FL)もしくは生理食塩水 (Cnt)を腹腔内に投与し、2 週間後に心重量と心臓超音波法を用いた心機能評価を施行した。いずれの指標においても、両群間に有意な差を認めなかった。

医用工学的に DDS 機能を導入した新規フラーレン誘導体の創製と化学分析手法による抗酸化能評価に関する研究

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

これまでに開発している抗炎症能を示す水酸化フラーレン誘導体のさらなる改良ならびに凝集や親和性といった化学的物性が細胞障害性や抗炎症能に与える影響を検討するため、異なる 4 タイプの新規フラーレン誘導体（ヒドロキシアルキルエーテル化フラーレン、PVP 包接リチウムイオン内包フラーレン、水酸化フラーレン保護金属ナノ粒子、含窒素環状フラーレン）を新たに開発した。

ヒドロキシアルキルエーテル化フラーレンでは、多様なアルコールを用いて簡便に水酸化フラーレンのヒドロキシ基をエーテル基へと変換し、3 種類の異なる溶解特性を示す誘導体を合成した。アルキル鎖の種類によって溶解度を調整することができ、特に、水およびエタノールの両方に可溶性腸管吸収能の向上が期待されるヒドロキシエチルエーテル化フラーレン HEE においては、*in vitro* の評価により低い細胞障害性および高い抗炎症能が見られた。

活性酸素のようなラジカル種とより高い反応性を示すことが期待されるリチウムイオン内包フラーレンの反応性について、シクロヘキサジエンとの Diels-Alder 反応をモデル反応として反応速度定数を定量的に評価し、空の C_{60} に比べてリチウムカチオンの内包により反応が約 2,400 倍加速されることを見いだした。また、水溶性高分子 PVP を用いてこのリチウムイオン内包フラーレンを簡便に水溶化できることも確認した。

これまでの誘導体とは全く異なる使い方をするフラーレン複合体として、水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_{36}$ を保護剤として用いた平均粒径約 3~4 nm 程度の安定な金、白金、銀ナノ粒子を水溶液として調製することができた。さらに、リード化合物であるプロリン型フラーレン類似の含窒素環状誘導体である新規ピロリジノフラーレンやテトラヒドロキノリノフラーレンの合成も行った。

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、有用なナン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、昨年度はグルコース修飾水酸化フラーレンの合成等に成功した。今年度はさらにそれを発展させた以下の 4 つの項目について検討を行った。

B. 研究方法

1. ヒドロキシアルキルエーテル化フラレーンの合成と溶解度測定

高い水溶性を有し、凝集せずに分子サイズのまま水に分散できるフラレーン誘導体として、我々のグループではこれまでに水酸化フラレーン $C_{60}(OH)_{36}$ を開発している。これまでに、この水溶性水酸化フラレーンが潰瘍性大腸炎に対して抗炎症効果を示すという実験結果を得ている。また、昨年度の本研究において、腸管からの吸収を促進するように糖（グルコース）を水酸化フラレーンに結合させたグルコース化水酸化フラレーンを合成し、未修飾の誘導体よりも高い抗炎症効果が見られることを明らかにしている。

そこで今年度は、グルコースより簡便に導入でき、鎖長や末端官能基により溶解度を制御でき、より系統的な評価が可能なアルキルエーテル化水酸化フラレーン、特に水溶性を維持させたヒドロキシアルキルエーテル化水酸化フラレーン誘導体を合成し、その構造同定ならびに溶解度や抗炎症効果等の物性評価を行う。

2. リチウムイオン内包フラレーンの反応性定量評価と簡便水溶化の検討

これまでに我々は、 β -カロテン退色法によって様々なフラレーン誘導体のラジカル種に対する反応性の評価を行ってきた。その結果、リノール酸ラジカルもしくはリノール酸過酸化ラジカルに対しては、フラレーン誘導体の最低被占分子軌道(LUMO)のエネルギー準位が深くなるほど、反応性が向上することを明らかにしている。一般に、このLUMO準位を深くする方法として、電子求引基を導入することが知られている。一方、最近開発された、フラレーン炭素ケージの内部にリチウムカチオンを有する「リチウムイオン内包フラレーン $[Li^+@C_{60}](PF_6^-)$ 」は、カチオンの強い電子求引効果により、さらに高い反応性を示すことが期待される。

そこで、本研究ではこのリチウムイオン内包フ

レーンの反応性を空の C_{60} と比べるため、同様に LUMO 準位によって反応性が決まるジエンとの Diels-Alder 反応をモデル反応として反応速度を求め、定量的に比較した。また、バイオ応用に強く求められる水溶化についても検討を行った。

3. 金および白金ナノコロイド-水酸化フラレーン複合体の創製

フラレーンの高い抗酸化能は抗炎症能とも関連していると考えられている。同様な抗酸化剤として、白金ナノコロイドが知られている。これは、白金原子が直径数 nm に集合した金属クラスターであり、ナノサイズに分散させるためにポリビニルピロリドン (PVP) のような水溶性ポリマーなどで保護している。そこで、本研究では保護剤として PVP の代わりに親水性水酸化フラレーンを用いて金、白金、銀などの金属ナノ粒子との複合体の形成を試み、ややタイプが異なる抗酸化能どうしの相乗効果が得られることを期待し、新しいナノドラッグ候補を目指す。

4. その他：新規フラレーン誘導体の探索

昨年度までの本研究において、構造がきちんと同定され、高い抗炎症能を示すフラレーン誘導体として、プロリン型フラレーンが開発されている。この誘導体の特徴として、水溶化を高めるための3つのカルボキシル基の存在に加え、フラレーン骨格に直接結合した含窒素5員環構造が挙げられる。そこで、これまでに最も抗炎症能の高いプロリン型フラレーンのより広範な構造類似体スクリーニングを目的に、以下の2つの新規な含窒素環状フラレーン誘導体合成の検討を行った。

(1) ジエナミンとフラレーンとの熱的電子移動経由[2+3]環化付加反応を行ったところ、従来の1,3-双極子環化付加とは異なる官能基化法で、含窒素5員環を有するプロリン型フラレーン類似化合物の合成に成功した。

(2) ベンジル基が置換したアザフレロイドを出発化合物とし、酸触媒存在下、分子内骨格転位

反応を行ったところ、含窒素6員環を有する新規プロリン型フラレン類似化合物の合成に成功した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. ヒドロキシアシルエーテル化フラレンの合成と溶解度測定

水酸化フラレン $C_{60}(OH)_{12}$ (**1**) にアルキル基を導入するため、その前駆体である $C_{60}(OSO_3)_6$ (**CS**) に様々なアルコール(ROH)を反応させた。その結果、エチレングリコールとの反応ではヒドロキシルエチルエーテル化フラレン (HEE) **2a** が、ブチレングリコールとの反応ではヒドロキシルブチルエーテル化フラレン (HBE) **2b** が、エタノールとの反応ではエトキシ化フラレン (ETO) **2c** が、それぞれ得られた (図 1)。

これらの構造同定は、 1H NMR、IR、TGA ならびに元素分析により行い、それぞれの平均構造は **2a**: $C_{60}(OCH_2CH_2OH)_9(OH)_3 \cdot 2H_2O$ 、**2b**: $C_{60}(OC_4H_8OH)_4(OH)_8 \cdot 10H_2O$ 、**2c**: $C_{60}(OEt)_5(OH)_7$ と同定された (図 2 A)。

得られたフラレン誘導体の水、エタノール、DMSO 中での溶解度を調べたところ、HEE が最も水に溶解し、ETO が最も水には溶けにくいだがエタノールには良く溶解することを見いだした (図 2 B)。また、HEE と HBE については、DMSO に非常に良く溶解することを確認した。

これらの誘導体を薬学研究科にて細胞障害性ならびに抗炎症効果の評価を行ったところ、HEE はこれまでに評価したフラレン誘導体と同程度の抗炎症効果ならびに低い細胞障害性を有することが確認された。

2. リチウムイオン内包フラレンの反応性定量評価と水溶化の検討

リチウムイオン内包フラレン PF_6 塩と大過剰のジクロヘキサジエンとの Diels-Alder 反応を、

ジクロロメタン中、 $-20 \sim 0^\circ C$ の温度範囲で行った (図 3)。反応は HPLC にて追跡し、原料消費量の時間変化から、二次反応速度定数 k_2 を求めた。303K における k_2 を空の C_{60} のものと比較したところ、リチウムの内包により、約 2,400 倍反応が加速されていることを見いだした。これは、分子内に内包されたリチウムカチオンによってフラレンの LUMO が低下したためであることが計算化学からも支持され、世界で初めて「分子内封入触媒効果」を定量的に立証した。

続いて、この高い反応性を有するリチウムイオン内包フラレンを水溶化させることを目的に、水溶性高分子 PVP による包接化を検討した。その結果、調製条件を最適化することで、クリアな水溶液を調製することができた (図 4)。その UV-vis スペクトルから、フラレン骨格に由来する紫外領域の吸収が確認されたが、330 nm 付近のピークがブロードに変化していたことから、 $Li@C_{60}$ -PVP では C_{60} -PVP に比べてリチウムイオン内包フラレンがより強く PVP と電荷移動錯体を形成していることが示唆された。

3. 金および白金ナノコロイド-水酸化フラレン複合体の創製

水酸化フラレン $C_{60}(OH)_{36}$ 存在下、塩化金酸 $HAuCl_4$ を水溶液中、 $NaBH_4$ により還元したところ、金原子と水酸化フラレンのモル比が 1 : 1 ~ 1 : 2 のときに、安定な金ナノ粒子 (Au^0)_n の生成が確認された (図 5 A)。この試料を透過型電子顕微鏡にて観察したところ、金ナノ粒子の金属コア部が黒点として観測され、ヒストグラム解析により平均直径が 3.72 ± 0.71 nm であると求められた (図 5 B)。また、この水溶液の UV-vis スペクトルを測定したところ、金の表面プラズモン共鳴 (SPR) に由来する吸収が 526 nm に観察されたことから、数 nm 程度のナノ粒子の形成が電子的性質の発現として確認された (図 5 C)。

さらに、同様の手法により、水酸化フラレン保護白金ナノ粒子、水酸化フラレン保護銀ナノ

粒子の調製にも成功した。

4. その他：新規フラレン誘導体の探索

高い抗炎症能を有するプロリン型フラレンは、1,3-双極子であるアゾメチンイリドとフラレンの環化付加反応によって合成される。この方法は効率が高く簡便であるが、さらに多様な置換パターンを目指した反応開発は重要である。

そこで、出発原料にモルホリノジエナミン **1a** を用いてフラレン C₆₀ との反応を行ったところ、従来の 1,3-双極子環化付加とは異なる置換パターンで、含窒素 5 員環を有するプロリン型フラレン類似体であるピロリジノフラレン **2a** が生成することを見いだした (図 6 A)。計算化学を用いて中間体について考察したところ、熱的な電子移動を経由して生じたラジカルカチオン中間体の環化付加により、生成物を与える反応機構が支持された。

一方、同様な含窒素環状誘導体であるベンジル基が置換したアザフレロイド **1b,c** を出発化合物とし、過剰のトリフルオロメタンスルホン酸と作用させたところ分子内骨格転位反応が進行し、含窒素 6 員環を有する新規プロリン型フラレン類似体であるテトラヒドロキノリノフラレン **3b**、**3c** の生成を見いだした (図 6 B)。

E. 結論

異なる 4 タイプ計 9 種の新規フラレン誘導体 (ヒドロキシアルキルエーテル化フラレン 3 種、PVP 包接リチウムイオン内包フラレン、水酸化フラレン保護金属ナノ粒子 3 種、含窒素環状フラレン 2 種) を新たに開発することができた。

ヒドロキシアルキルエーテル化フラレンでは、アルキル鎖の種類によって溶解度を調整することができ、水およびエタノールの両方に可溶なフラレン誘導体を得ることが出来た。特にヒドロキシエチルエーテル化フラレン HEE においては、低い細胞障害性および高い抗炎症能が見ら

れた。

リチウムイオン内包フラレンの高い反応性についてシクロヘキサジエンとの Diels-Alder 反応をモデルとして定量的に評価し、空の C₆₀ に比べて反応が約 2,400 倍加速されることを見いだした。また、水溶性高分子 PVP を用いて水溶化できることも確認した。

水酸化フラレン C₆₀(OH)₃₆ を保護剤として用い、安定な金、白金、銀ナノ粒子を水溶液中で調製することができた。金の場合、コアサイズの平均粒径は約 3.7 nm であった。

さらに、プロリン型フラレンと構造が類似した含窒素環状誘導体である新規ピロリジノフラレンや新規テトラヒドロキノリノフラレンの合成も行った。

最後に、本研究を遂行するにあたり多大なるご指導ご協力を賜った堤康央先生、吉岡靖雄先生を始めとする共同研究者の方々、プロジェクトをご支援いただいている顧問の諸先生方、そして研究協力者の学生諸氏に心より御礼申し上げたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Ueno H, Kawakami H, Nakagawa K, Okada H, Ikuma N, Aoyagi S, Kokubo K, Matsuo Y, Oshima T. Kinetic study of the Diels-Alder reaction of Li⁺@C₆₀ with cyclohexadiene: Greatly increased reaction rate by encapsulated Li⁺. J. Am. Chem. Soc. 136: 11162-67, 2014.
2. Ueno H, Yamakura S, Arastoo R. S, Oshima T, Kokubo K. Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullereneols using β-carotene bleaching assay. J. Nanomater. 2014(802596) :1-8, 2014.

3. Ikuma N, Yamamoto H, Kokubo K, Oshima T. Unexpected [3 + 2] cycloaddition of diphenyldienamine with C₆₀ via single electron transfer and hydrogen shift of the radical cation intermediate. Chem. Lett. 43: 1648-50, 2014.
4. Ikuma N, Doi Y, Fujioka K, Mikie T, Kokubo K, Oshima T. Dramatic mechanistic change in acid-catalyzed arylation of azafulleroids depending on their ambident N/C basicity: Formation of cyclopentene centered pentakisadduct. Chem. Asian J. 9: 3084-88, 2014.
5. Ikuma N, Yamamoto H, Kokubo K, Oshima T. Synthesis of pyrrolidinofullerenes via single electron transfer reaction of aryldienamines with C₆₀. Heterocycles. 90: 1168-78, 2015.

【総説・その他】

1. 小久保研：水酸化フラーレンの合成と応用、フラーレンの内包技術，シーエムシー出版，第4章5節，198-210，2014.
2. 上野 裕，小久保研：リチウム内包フラーレン電解還元、フラーレンの内包技術，シーエムシー出版，第3章4節，117-25，2014.
3. 小久保研：アセタール化フラーレンの設計と合成、フラーレンの内包技術，シーエムシー出版，第2章3節，50-9，2014.
4. 上野 裕，伊熊直彦，小久保研：球面反応場に着目したフラーレンケージ内外の制御による新規機能分子の創製と応用，有機合成化学協会誌，72: 1348-59，2014.
5. 小林慶太，上野 裕，小久保研，湯田坂雅子，保田英洋：官能基の極性に依存した C₆₀ 誘導体の中空状ナノ炭素物質内部空間への内包の傾向，New Diamond，31: 28-30，2015.

② 学会発表

【国内学会・シンポジウム：合計2件】

1. 小久保研，青島央江，吉岡靖雄，堤 康央，乾 重樹，脇本 哲，柳原 格，遊道和雄，石井亜紀子，斉藤靖和，三羽信比古：高水溶性水酸化フラーレンのバイオメディカル応用.，第1回ナノカーボンバイオシンポジウム.，名古屋，2014年9月.
2. 上野 裕，川上裕貴，中川晃二，岡田洋史，伊熊直彦，青柳 忍，小久保研，松尾 豊，大島 巧：Li⁺@C₆₀ とシクロヘキサジエンの Diels-Alder 反応における内包 Li⁺による反応加速効果.，第47回フラーレン・ナノチューブ・グレフェン総合シンポジウム.，名古屋，2014年9月.

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

東京大学・大阪大学・名古屋市立大学共同プレスリリース：リチウムイオンがフラーレンの反応性を2400倍向上、各大学HP（2014年7月17日）、マイナビニュース（7月22日）、アメリカ化学会C&EN誌（7月21日）

研究協力者

大島 巧（大阪大学名誉教授）
 櫻井 英博（大阪大学大学院工学研究科）
 伊熊 直彦（大阪大学大学院工学研究科）
 山崎 優（大阪大学大学院工学研究科）
 佐藤 希（大阪大学工学部）

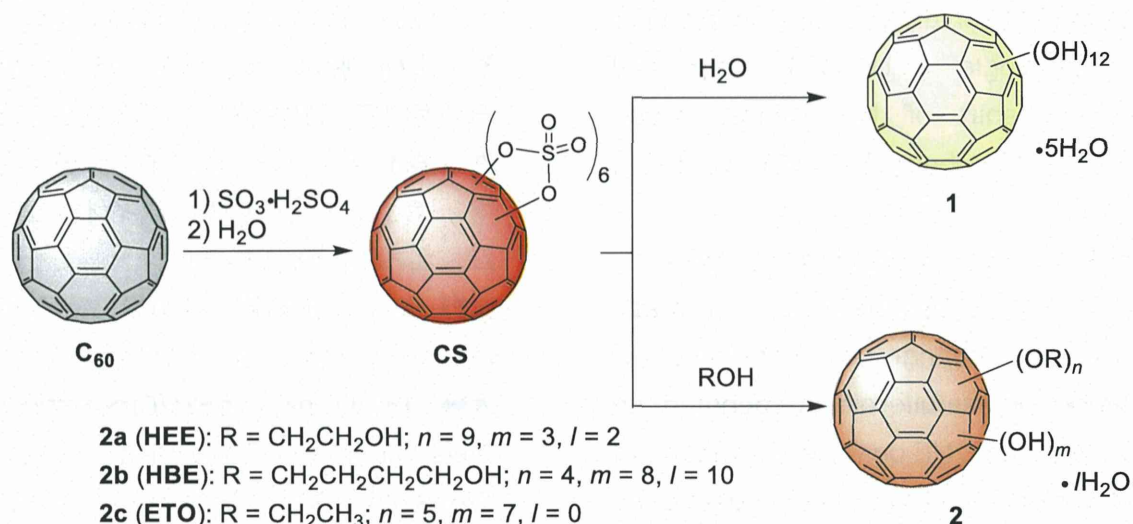


図1. ヒドロキシアルキルエーテル化水酸化フラーレンの合成. 水酸化フラーレンC₆₀(OH)₁₂ (1)の合成中間体であるシクロ硫酸化フラーレン (CS) にアルコール (エチレングリコール、ブチレングリコール、またはエタノール) を作用させ、(ヒドロキシ) アルキルエーテル化水酸化フラーレンC₆₀(OR)_n(OH)_m (2a-c) を得た。

(A)

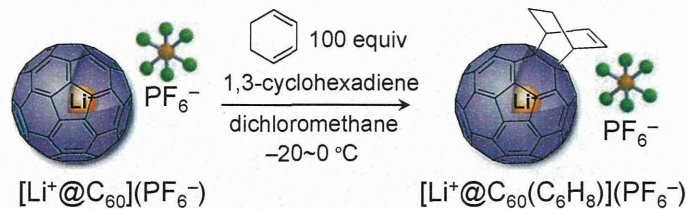
	%C	%H	%N	H ₂ O/wt%
Experimental for 2a	68.90	3.35	0.00	1.2
C ₆₀ (OCH ₂ CH ₂ OH) ₉ (OH) ₃ · 2H ₂ O	69.03	3.86	-	2.9
Experimental for 2b	65.87	4.38	0.21	13.7
C ₆₀ (OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH) ₄ (OH) ₈ · 10H ₂ O	65.51	4.63	-	14.7
Experimental for 2c	78.20	3.93	0.00	<1
C ₆₀ (OCH ₂ CH ₃) ₅ (OH) ₇	78.20	3.94	-	0

(B)

	Solubility (mg/mL)		
	H ₂ O	EtOH	DMSO
2a (HEE)	0.33	1.00	>10
2b (HBE)	0.27	1.27	>10
2c (ETO)	0.13	3.81	-

図2. ヒドロキシアルキルエーテル化水酸化フラーレンの平均推定構造ならびに溶解度測定. (A) 元素分析: 組成比およびTGA測定により求めた水分測定値から、アルキル部位の平均導入数ならびに二次結合水の数を見積もった。

(B) 溶解度: 誘導体2a-cそれぞれの水、エタノール、DMSO中における溶解度を測定し、HBEよりも鎖長の短いHEEがより親水的であり、末端にヒドロキシ基がないETOが最も疎水的であることを確認した。



$[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$		empty C_{60}	
Temp. / K	$10^5 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	Temp. / K	$10^5 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
253	1344	353	1187
263	3129	363	2167
273	6714	373	4302
303	52300^{a)}	303	21.3^{a)}

2,400 times accelerated!

a) Estimated by extrapolation in Arrhenius plot.

図3. リチウムイオン内包フラーレンの反応性比較. リチウムイオンが内包されていない空の C_{60} に比べ、内包されたフラーレン $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$ では、303 KにおけるシクロヘキサジエンとのDiels-Alder反応が約2,400倍加速された。

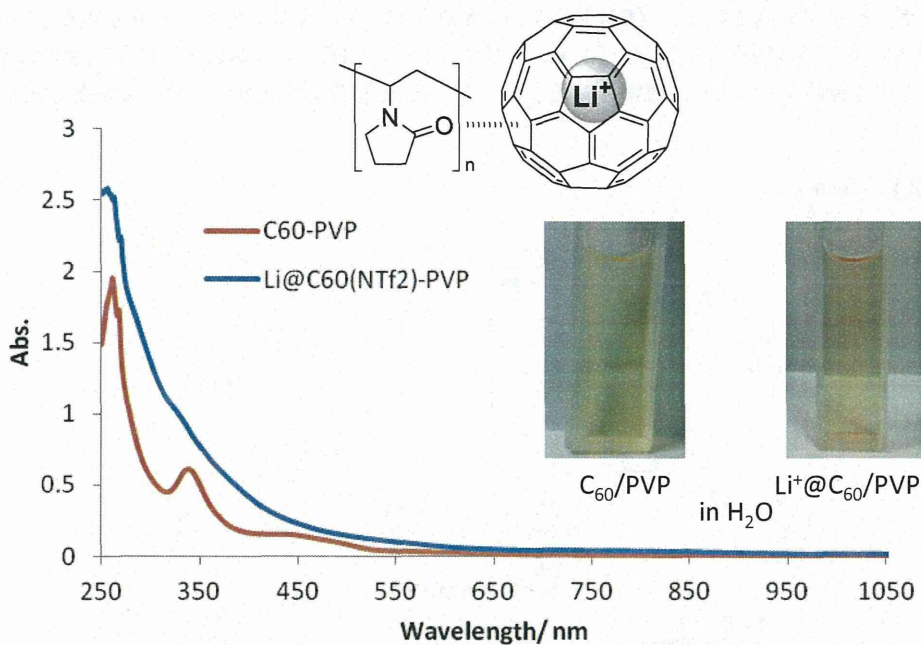


図4. PVP包接リチウムイオン内包フラーレンのUV-visスペクトル. ポリビニルピロリドン (PVP) により包接することでリチウムイオン内包フラーレン $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{NTf}_2^-)$ を水溶化することに成功した。この $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$ -PVP水溶液のUV-visスペクトルにおいてフラーレンの共役π電子に由来する紫外領域の吸収が観測されたが、空の C_{60} を用いた C_{60} -PVPで得られたスペクトルに比べて大きくブロード化しており、反応性・物性の違いが示唆された。

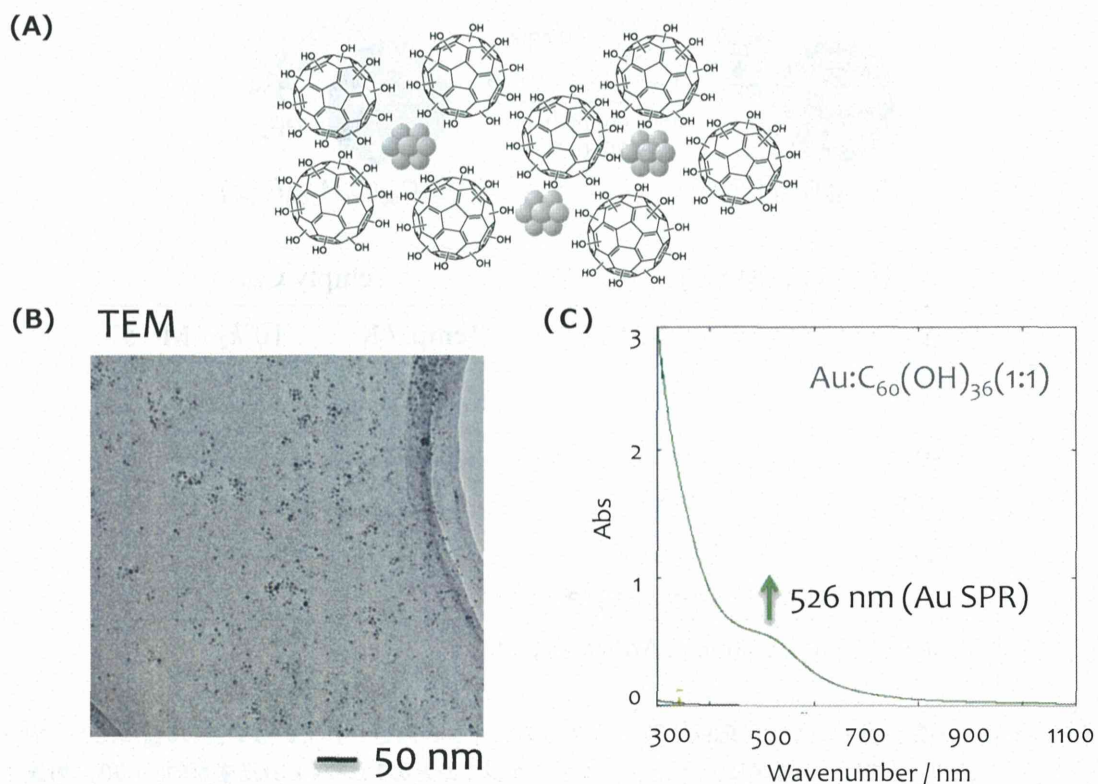


図5. 水酸化フラーレン保護金ナノ粒子の合成。(A)模式図：Au原子と水酸化フラーレンのモル比が1：1～1：2のときに、安定な金ナノ粒子が形成された。(B)透視型電子顕微鏡 (TEM) 写真：金ナノ粒子の金属コア部が観測され、ヒストグラム解析により平均直径は 3.72 ± 0.71 nm と求められた。(C)UV-visスペクトル：金の表面プラズモン共鳴 (SPR) に由来する吸収が526 nm に観察されたことから、数nm 程度のナノ粒子の形成が分光学的に確認された。

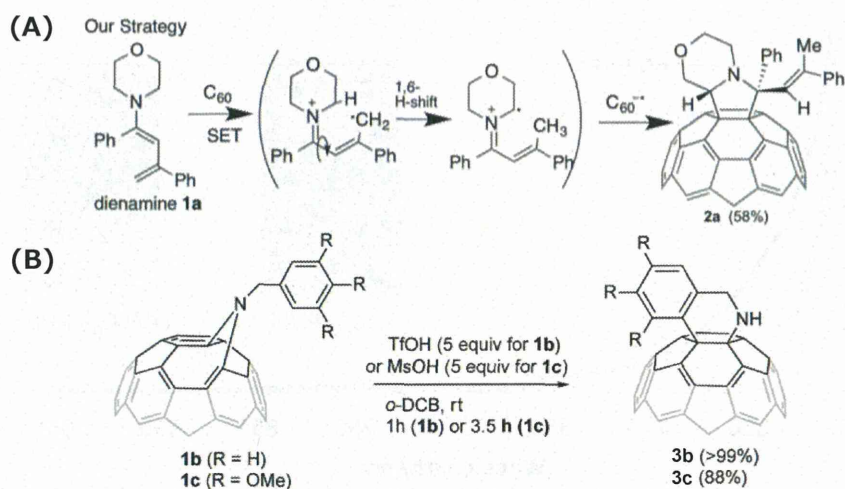


図6. 新規含窒素環状フラーレン誘導体2,3の合成スキーム。(A) ジエナミン1との熱的電子移動経由[2+3]環化：従来の1,3-双極子環化付加と異なる手法により、含窒素5員環を有するプロリンフラーレン類似化合物を合成した。(B) アザフレロイドの酸触媒骨格転位反応：ベンジル基が置換したアザフレロイドを出発化合物とし、酸触媒存在下、分子内骨格転位反応により含窒素6員環を有する新規プロリンフラーレン類似化合物を合成した。

医薬品原体候補の新規フラレン誘導体創製

研究分担者 大江 知之 慶應義塾大学薬学部 医薬品化学講座

研究要旨

医薬品原体候補のフラレン誘導体を創製するため、これまで最も抗炎症効果の強かったプロリン型誘導体 **3** (trans 体) を基盤として、特徴的な構造を有する新規フラレン誘導体 **13** - **15** をデザインし化学合成を行った。いずれの化合物も複数のステップを経て合成に成功し、各種機器分析により構造が同定された。これらの化合物は、当研究室で本事業とは別目的で合成した誘導体とともに抗酸化作用や抗炎症作用の評価のために提供された。また、現在最有力候補品である **3-trans** の高次評価のための準備として、高純度体の合成経路の開発および ^{14}C 標識体の合成に成功した。さらに、**3-trans** はシトクロム P450 により代謝されることが示唆された。

A. 研究目的

これまでの研究により、プロリン型フラレン誘導体 **1** - **3** は抗炎症作用を示し、中でも誘導体 **3** (trans 体) は特に優れた効果を示すことが明らかにされている (図 1)。昨年度、新規に **7** - **12** の合成を行ったが、**3** を越える効果を示す誘導体はなかった (図 1)。そこで本年度は、抗酸化活性を高めることを目的に硫黄原子を含むプロリン型誘導体など **13** - **15** の合成を行った (図 2)。

現在最有力候補品である **3-trans** は純度が低いことが判明したため、合成法を改良し純度の高い誘導体を合成することに成功した。また、医薬候補品として開発するために将来的に行う必要があると考えられる薬物動態試験の準備として、 ^{14}C 標識体のテスト合成を行った。さらに、**3-trans** の薬物代謝研究の一環として、シトクロム P450 化学モデルや肝ミクロソームによる反応により生成する代謝物の構造同定を行った。

B. 研究方法

1. プロリン型誘導体 **13** の合成 (図 3)

1-1. **13a** の合成

C_{60} (400 mg, 0.556 mmol) を CS_2 (210 mL) に溶解させ、アミノマロン酸ジエチル塩酸塩

(150 mg, 0.709 mmol, 1.25 当量)、トリエチルアミン (5 mL) を加えて室温で攪拌した。TLC により反応を追跡し、3 時間後に攪拌を止めた。精製水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗い無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (トルエン → トルエン : 酢酸エチル = 20 : 1) により精製した。

1-2. **13** の合成

13a (116 mg, 0.124 mmol) をトルエン (80 mL) に溶解させ、NaH (400 mg, 66 当量) を加えた。室温で攪拌し 1 時間後にメタノール (2 mL) を加えて反応を止めた。1M-塩酸を水層が酸性になるまで加えて、生じた茶褐色析出物を吸引濾過により得た。精製水 → トルエン → *n*-ヘキサンの順に洗浄した。室温で真空乾燥をした。

2. プロリン型誘導体 **14** の合成 (図 4)

2-1. **14a** の合成

C_{60} (400 mg, 556 μmol) を CS_2 (50 mL) に溶解させ、グリシン *tert*-ブチル塩酸塩 (186 mg, 1.11 mmol, 2.0 当量)、トリエチルアミン (5 mL) を加えて室温で攪拌した。TLC で反応を追跡し、18 時間後に反応を止めた。1M 塩酸 → 飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶

媒を減圧留去した。得られた固体をアセトンに懸濁し吸引濾過をすることで副生成物を取り除いた。濾取した茶色固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン → トルエン : 酢酸エチル = 50 : 1) により精製した。

2-2. 14b の合成

14a (30 mg, 0.034 mmol) を CS₂/ THF (25 mL/5 mL) に溶解させ、精製水(5.0 mL)を加えて室温で攪拌し、24 時間後に反応を止めた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(トルエン : 酢酸エチル = 20 : 1)により精製した。

2-3. 14 の合成

14b (19 mg, 0.022 mmol) をジクロロメタン(10 mL) に溶解させ、トリフルオロメタンスルホン酸(33 mg, 0.22 mmol, 10 当量) を加えて 0°C で攪拌した。10 分後に精製水を加えて反応を止め、生じた茶褐色析出物を吸引濾過により得た。NaHCO₃ 水溶液と精製水とトルエンで洗浄した。室温で真空乾燥をした。

3. プロリン型誘導体 15 の合成 (図 5)

3-1. 15b の合成

14a (28.7 mg, 0.0321 mmol) を CS₂ (10 mL) に溶解させ、プロモ酢酸 *tert*-ブチル (25.0 mg, 0.128 mmol, 4.0 当量) 、トリエチルアミン (0.2 mL) を加えて室温で攪拌した。TLC で反応を追跡し、20 分後に攪拌を止めて溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン) で精製した。

3-2. 15 の合成

15b (30 mg, 0.030 mmol) を CH₂Cl₂ (3.0 mL) に溶解させ、トリフルオロメタンスルホン酸 (89 mg, 0.60 mmol, 10 当量) を加えた。0°C で攪拌し、10 分後に精製水を加えて反応を止め、生じた茶褐色析出物を吸引濾過により得た。精製水と *n*-ヘキサンで洗った。室温で真空乾燥をした。

4. 高純度プロリン型誘導体 3-*trans* の合成 (図 6)

4-1. *tert*-Butyl glyoxylate の合成

L-(+)-酒石酸ジ-*tert*-ブチル(0.720 mmol,

189 mg) とヨードベンゼンジアセテート (1.04 mmol, 1.4 当量, 223 mg) をジクロロメタン (9.0 mL) に溶解した。室温で 75 分攪拌後、減圧留去することで、酢酸臭を発するオイルを得た。オイルをヘキサンに懸濁、吸引濾過し、白色固体を取り除いた。母液から溶媒を減圧留去後、得られた粗生成物 320 mg について中圧分取液体クロマトグラムシステム (EPCLC-AI-580S, 山善株式会社, 自動カラム) (ヘキサン:酢酸エチル = 72:28 → 51:49 <グラジエント>) で精製した。

4-2. 3a の合成

C₆₀ (0.920 mmol, 665 mg) をトルエン (665 mL) に溶解した。イミノニ酢酸ジ *tert*-ブチル (1.82 mmol, 2.0 当量, 448 mg) と **4-1** で合成したグリオキシル酸 *tert*-ブチル (1.82 mmol, 2.0 当量, 237 mg) を秤量しトルエンで洗いこみながら C₆₀ のトルエン溶液に加え、還流攪拌した。3 時間後、反応液の色が濃紫色から茶褐色に変化し、さらに、19 時間後に反応を停止した。水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、得られた粗生成物についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル粒子径 63~200 mm, トルエン 100 %) で *trans* 体と *trans* 体/*cis* 体混合物を得た。さらに、混合物に関しては、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー (フラッシュクロマトグラフィー用シリカゲル 40~50 mm, トルエン 100 %) で精製した。

4-3. 3-*trans* の合成

化合物 **3a-*trans*** (0.40 mmol, 431.3 mg) を脱水トルエン 76 mL に溶解し、室温で攪拌しながらトリフルオロメタンスルホン酸 126 mL (215 mg, 1.2 当量, 1.43 mmol) を滴下したところ、速やかに茶褐色固体が析出した。塩化カルシウム管を装着してそのまま 10 分攪拌したところで、水 1 mL を加えて反応を停止した。析出した固体を吸引濾過し、水、メタノール、トルエン、メタノール、水の順で洗浄した。

4-4. 3-*trans* の純度確認

合成した **3-trans** を 0.1 %TFA-DMF に溶解し HPLC によって分析した。HPLC の測定条件を以下に示す。カラムは Buckyprep-M (4.6 mm f-250 mm)を用いた。Buckyprep-M はフラーレンとその誘導体を効率良く分離するために開発されたカラムであり、充填剤としてフェノチアジール基で修飾されたシリカゲルが使われている。

HPLC : Agilent 1200 シリーズ
カラム : Buckyprep-M (4.6 f-250 mm)
カラム温度 : 40 °C

移動相 :

A = 40 % 0.1%TFA in MeOH
B = 60 % 0.1%TFA in DMF

カラム流量 : 1.0 mL/min
サンプル注入量 : 30 mL
測定サイクル : 30 min
UV 条件 (検出波長) : 310 nm

5. [¹⁴C]プロリン型誘導体 **3-trans** の合成 (図 8)

5-1. [¹⁴C]3a-trans の合成

[¹⁴C]C₆₀ 10 mg (14 mmol) を MS 4A で脱水したトルエン 7.5 mL に溶解し、イミノ二酢酸ジ tert-ブチル 7 mg (30 mmol, 2.1 当量)、グリオキシル酸 tert-ブチル 5 mg (37 mmol, 2.7 当量)の各トルエン溶液 1.4 mL を加え (溶液量 10.3 mL)、高温 (>110°C) の油浴上で還流撹拌を始めた。反応液の色は反応開始から 5 分程度で濃紫色から茶褐色に変化した。10 分経過後、TLC (トルエン : 酢酸エチル = 10:1) にて [¹⁴C]3a-trans の生成を確認した後、溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物 20 mg について、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (エアープンプ, 30-40 mm, 15 g, トルエン 100%) にて精製し、[¹⁴C]C₆₀、[¹⁴C]3a-trans 4 mg、[¹⁴C]3a-cis を得た。

5-2. [¹⁴C]3-trans の合成

[¹⁴C]3a-trans 4 mg (3.2 mmol) を脱水トルエン約 2 mL に溶解して試験管に移し、撹拌しながらトリフルオロメタンスルホン酸 10 mL (13 mg, 89 mmol, 9.1 当量) を滴下した。速やかに茶褐色固体が析出したが撹拌を続けた。10 分後、遠心分離 (2000 rpm, 3 min) して上清を

除いた。次にトルエンを 2 mL 加えて超音波照射して懸濁した後、再度遠心分離して上清を除いた。次いで水 2 mL を加えたところ水 2 mL を加えて超音波照射し、遠心分離後に上清を除く操作を 3 回繰り返した。最後に得られた茶褐色沈殿について、濃縮装置で水を留去した。

6. プロリン型誘導体 **3-trans** の薬物代謝研究

6-1. プロリン型誘導体 **3-trans** のシトクロム P450 化学モデル系による反応 (図 9)

3-trans の DMF 溶液 (1.0 mM)、tetrakis(2,6-difluorophenyl)porphinatoiron (触媒 : Fe(III)TDFPPCl)の CH₂Cl₂ 溶液 (0.01 mM)、mCPBA(酸化剤)の CH₂Cl₂ 溶液 (2.0 mM) を加え、室温で 1 時間撹拌した。N₂ フラッシュで乾固した後、0.1 %TFA-DMF を 0.1 mL 加え LC-MS 測定(negative モード、SCAN および SIM)を行った。SIM 測定においては、未変化体 *m/z* 908 ([M-H]⁻)およびエポキシ体、ジエポキシ体を予想し、それぞれ *m/z* 924 ([908+O]⁻)、940 ([908+2O]⁻) をイオンとして選択した。HPLC 条件は 4-4 と同様に行った。Complete サンプルの他に、control サンプルとして、触媒 (-) および酸化剤 (-)の LC-MS 測定も行った。

6-2. プロリン型誘導体 **3-trans** の肝ミクロソームによる反応

ラット、マウス及びヒト肝ミクロソーム (XENOTECH, 1.0 mg protein/mL)にそれぞれ **3-trans** の DMSO 溶液 (0.1 mM)、G6P (10 mM)、G6PDH (1.0 unit/ mL)、MgCl₂ (3.0 mM)、NADP (1.0 mM) を含む 0.1 M K-Pi buffer (pH 7.4) 0.5 mL を加え 37 °C で 3 時間インキュベーションした。その後、酢酸エチル 2.0 mL、1 M 塩酸を 100 mL 加え 1 分間振盪し、遠心分離 (4°C、10000 rpm、10 min) し、上清を回収した。酢酸エチルでの抽出操作を 3 回行った後、N₂ フラッシュで乾固させ、0.1 % TFA-DMF を 0.1 mL 加え、LC-MS 測定を行った。LC-MS 条件は 6-1 と同様に行った。

C. 研究結果

1. プロリン型誘導体 13 の合成 (図 3)

1-1. 13a の合成

茶褐色固体 (170 mg, 収率 37%) を得た。ESI-TOF-MS と $^1\text{H-NMR}$ を測定し、文献値との比較から **13a** と同定した。

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	1.32 (<i>t</i> , $J=7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 4.26~4.39 (<i>m</i> , 4H, CH_2CH_3), 12.21 (<i>s</i> , 1H, NH)
MS	m/z	937 ($[\text{M-H}]^-$)

1-2. 13 の合成

茶褐色固体 (90.0 mg, 収率 87%) を得た。ESI-TOF-MS と $^1\text{H-NMR}$ を測定し **13** と同定した。

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	6.51 (<i>s</i> , 1H, $\text{C}_{60}\text{-CH}$), 12.28 (<i>s</i> , 1H, NH)
MS	m/z	836 ($[\text{M-H}]^-$) 792 ($[\text{M-COOH}]^-$)

2. プロリン型誘導体 14 の合成 (図 4)

2-1. 14a の合成

ESI-TOF-MS と $^1\text{H-NMR}$ を測定し、**14a** と同定した。

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	1.44 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> -Bu), 6.28 (<i>s</i> , CH), 12.05 (<i>s</i> , NH)
MS	m/z	892 ($[\text{M-H}]^-$)

2-2. 14b の合成

茶褐色固体 (19 mg, 収率 64%) を得た。ESI-TOF-MS と $^1\text{H-NMR}$ を測定し、**14b** と同定した。

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	1.59 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> -Bu), 5.63 (<i>s</i> , CH), 9.89 (<i>s</i> , NH)
MS	m/z	876 ($[\text{M-H}]^-$)

2-3. 14 の合成

茶褐色固体 (16 mg, 収率 90%) を得た。

ESI-TOF-MS と $^1\text{H-NMR}$ を測定し、**14** と同定した。

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	5.73 (<i>s</i> , CH), 9.72 (<i>s</i> , NH)
MS	m/z	820 ($[\text{M-H}]^-$)

3. プロリン型誘導体 15 の合成 (図 5)

3-1. 15b の合成

茶褐色固体 (27.1 mg, 収率 84%) を得た。ESI-TOF-MS と $^1\text{H-NMR}$ を測定し、**15b** と同定した。

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	1.49 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> -Bu), 1.57 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> -Bu), 4.30 (<i>d</i> , 1H, $J = 16.2$ Hz, S-CH), 4.43 (<i>d</i> , 1H, $J = 16.2$ Hz, S-CH), 6.42 (<i>s</i> , 1H, $\text{C}_{60}\text{-CH}$)
MS	m/z	1007 ($[\text{M}]^+$)

3-2. 15 の合成

茶褐色固体 (24 mg, 収率 97%) を得た。ESI-TOF-MS と $^1\text{H-NMR}$ を測定し、**15** と同定した。

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	4.40 (<i>d</i> , 1H, $J = 16.3$ Hz, S-CH), 4.44 (<i>d</i> , 1H, $J = 16.3$ Hz, S-CH), 6.68 (<i>s</i> , 1H, $\text{C}_{60}\text{-CH}$)
MS	m/z	894 ($[\text{M-H}]^-$)

4. 高純度プロリン型誘導体 3-*trans* の合成 (図 6)

4-1. *tert*-Butyl glyoxylate の合成

無色オイル 237 mg を得た。 $^1\text{H-NMR}$ を測定し、グリオキシル酸 *tert*-ブチルと同定した。

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	1.52 (<i>s</i> , 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 9.30 (<i>s</i> , 1H, $-\text{CHO}$)
------------------	----------------	---

4-2. 3a の合成

1 回目のシリカゲルカラムクロマトグラフィーで *trans* 体 414 mg と *trans* 体と *cis* 体の混合物 77.3 mg を得た。*Trans* 体と *cis* 体の混合物につ

いては、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、*trans* 体 16.9 mg、*cis* 体 44.2 mg を得た。それぞれについて $^1\text{H-NMR}$ を測定し、**3a-trans** および **3a-cis** と同定した。

3a-trans 体

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	1.49 (<i>s</i> , 18H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.61 (<i>s</i> , 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.99 (<i>d</i> , 1H, $J=16.9$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 4.25 (<i>d</i> , 1H, $J=16.9$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 6.03 (<i>s</i> , 2H, $-\text{CH}-$)
------------------	----------------	--

3a-cis 体

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	1.47 (<i>s</i> , 18H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.63 (<i>s</i> , 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.34 (<i>s</i> , 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.57 (<i>s</i> , 2H, $-\text{CH}-$)
------------------	----------------	--

4-3. 3-trans の合成

茶褐色固体(282.4 mg, 収率 78%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ を測定し、**3-trans** と同定した。

3-trans 体

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	3.89 (<i>d</i> , $J=17.1$ Hz 1H, $-\text{CH}_2-$), 4.23 (<i>d</i> , $J=17.1$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-$), 5.98 (<i>s</i> , 2H, $-\text{CH}-$)
------------------	----------------	---

4-4. 3-trans の純度確認

2- *trans* の HPLC クロマトグラムを図 7 に示す。従来のエチルエステルを経由する方法で合成したロットに比べて、不純物のピークの数が少なくなっており、純度が高いことが示された。

5. [^{14}C]プロリン型誘導体 3-trans の合成 (図 8)

5-1. [^{14}C] 3a-trans の合成

放射活性測定値から算出した回収率および収率は [^{14}C]C₆₀ 1.9%、[^{14}C]3a-*trans* 26%、[^{14}C]3a-*cis* 2.7%であった。

5-2. [^{14}C]3-trans の合成

同定は逆相 TLC (メタノール:DMF=2:3 [TFA 0.1%]) を用い標品との R_f 値比較により行った。

6. プロリン型誘導体 3-trans の薬物代謝研究

6-1. プロリン型誘導体 3-trans のシトクロム P450 化学モデル系による反応 (図 9)

Complete サンプルの UV および SIM クロマトグラムを図 10 に示す。SIM の 924 (*m/z*) で、保持時間 12.8 分付近に見られたピークは complete の方が control サンプルよりも明らかに大きかったことからこのピークは P450 モデル系により生成したモノエポキシ体由来であることが示唆された。実際に、このピークを分取濃縮後 ESI-TOF-MS 測定を行った。その結果、推定される元素組成は **3-trans** に酸素原子 1 個が付いたものであることから、12.8 分のピークは **3-trans** のモノエポキシ体であることが確かめられた。機器データを以下に示す。

ESI-TOF-MS : Calcd. for C₆₆H₆N₁O₆ 924.01443, found 924.01368

同様の解析から、SIM の 940 (*m/z*) で保持時間 12.5 分に見られたピークは、モノエポキシ体がさらに酸化されたジエポキシ体であることが示唆された。

6-2. プロリン型誘導体 3-trans の肝ミクロソームによる反応

P450 化学モデル系で生成が確認されたモノエポキシ体およびジエポキシ体はラット、マウス及びヒト肝ミクロソームによる代謝反応系では検出されなかった。一方で、それとは別のピークが complete サンプルでのみ検出された。

D. 考察

1. プロリン型誘導体 13 の合成

新規プロリン型誘導体 13 の合成に成功した。

2. プロリン型誘導体 14 の合成

新規プロリン型誘導体 14 の合成に成功した。

3. プロリン型誘導体 15 の合成

新規プロリン型誘導体 15 の合成に成功した。

4. 高純度プロリン型誘導体 3-trans の合成

従来の **3-trans** の合成法であるエチルエステルを経由する方法では、最後の脱保護のステップ

で複数の副生成物の混入が見られたが、*tert*-ブチルを経由する本法ではほとんど定量的に脱保護が可能であり、高純度の **3-trans** を得る合成法として相応しいと考えられる。

5. [¹⁴C]プロリン型誘導体 **3-trans** の合成

[¹⁴C]標識フラレン誘導体を [¹⁴C]C₆₀ から合成することに世界で初めて成功した。少量合成だったため、洗浄操作が困難で総収率は 10-20% 程度と低くなったが、今後はスケールを大きくすることで効率的な合成が可能と考えられる。

6. プロリン型誘導体 **3-trans** の薬物代謝研究

3-trans の薬物代謝研究の一環として、まず、シトクロム P450 化学モデルで反応を行ったところ、モノエポキシ体及びジエポキシ体の生成が確認された。一方、肝ミクロソーム系ではこれらのエポキシドは検出されなかった、しかし、それとは別のピークが complete サンプルでのみ検出された。構造については現在解析中であるが、フラレン類における新規代謝様式である可能性がある。

E. 結論

これまで最も抗炎症作用が強かったプロリン型 **3-trans** を基盤として、新規フラレン誘導体 **13 - 15** の合成を行った。いずれの化合物も複数のステップを経て合成に成功し、各種機器分析により構造が同定された。以上の化合物は抗酸化作用や抗炎症作用の評価のために提供された。また、現在最有力候補品である **3-trans** の高次評価のための準備として、高純度体の合成経路の開発および ¹⁴C 標識体の合成に成功した。さらに、**3-trans** はシトクロム P450 により代謝されることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Watanabe T, Nakamura S, Ono T, Ui S, Yagi S, Kagawa H, Watanabe H, Ohe T, Mashino T, Fujimuro M. Pyrrolidinium fullerene induces apoptosis by activation of procaspase-9 via suppression of Akt in primary effusion lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 451: 93-100, 2014.

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

該当無し

【国内学会発表：合計 6 件】

1. 大江知之, 片岡裕樹, 安野拓実, 秋葉智紘, 篠原 舞, 高橋恭子, 中村成夫, 増野匡彦: HIV 関連疾患治療薬を目指した多標的型フラレン誘導体の開発., 第 1 回ナノカーボンバイオシンポジウム., 名古屋, 2014 年 9 月.
2. 安野拓実, 高橋恭子, 大江知之, 藤田美歌子, 中村成夫, 増野匡彦: HIV 増殖抑制効果を有する新規ピリジン型フラレン誘導体の創製., 第 58 回日本薬学会関東支部大会., 東京, 2014 年 10 月.
3. 安野拓実, 高橋恭子, 大江知之, 中村成夫, 増野匡彦: AIDS 関連疾患治療薬を目指した多標的型新規ピリジニウム型フラレン誘導体の創製., 第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム., 神戸, 2014 年 11 月.
4. 安野拓実, 高橋恭子, 大江知之, 中村成夫, 増野匡彦: 多標的型 AIDS 関連疾患治療薬を目指した 5-(methylpyridinium)proline 型フラレン誘導体の構造変換., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
5. 於本 崇, 片岡裕樹, 高橋恭子, 大江知之, 中村成夫, 増野匡彦: チオラクタム構造を経由した新規水溶性フラレン誘導体の合成

とその脂質過酸化抑制効果., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.

6. 片岡裕樹, 高橋恭子, 大江知之, 中村成夫, 増野匡彦: HCV RNA ポリメラーゼ阻害活性を有する新規プロリン型フラレン誘導体の創製., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.

【国際学会発表: 合計 0 件】

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

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レン誘導体

出願日: 平成 26 年 2 月 19 日

公開日: 平成 26 年 8 月 28 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

該当なし

その他

該当なし

研究協力者

慶應義塾大学薬学部 医薬品化学講座 増野匡彦 教授、高橋恭子 助教

慶應義塾大学薬学部 衛生化学講座 多胡めぐみ 准教授

日本医科大学 中村成夫 教授

首都大学東京大学院理工学研究科 分子物質科学専攻 秋山和彦 助教

熊本大学創薬研究センター 藤田美歌子 准教授

京都薬科大学 生命薬科学系・細胞生物学分野 藤室雅弘 教授、渡部匡史 助教

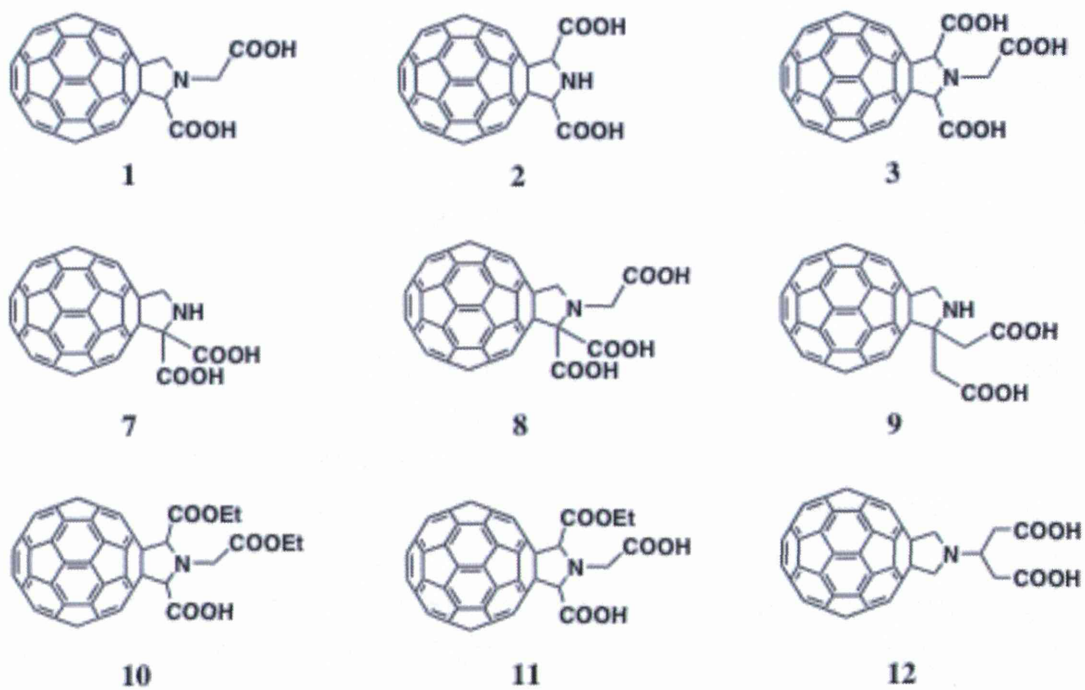


図1. 様々なプロリン型フラーレン誘導体の構造



図2. 新規プロリン型誘導体