

用いて、各種水酸化 C60 フラーレン及びポジティブコントロールとして用いた NAC の細胞毒性を LDH アッセイにより評価した (図 43)。検討に用いた水酸化 C60 フラーレンの濃度は、培養上清中に分散可能な濃度から設定した。また、NAC の濃度は、in vitro で抗酸化作用が報告されている濃度から設定した。その結果、 $C_{60}(OH)_{12}$ 、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、及び NAC は、高濃度作用させることで有意な細胞毒性が認められた。一方で、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$ は、培養上清中で分散可能な最高濃度でも細胞毒性が認められなかったことから、安全性に優れている可能性が示された。

Caco-2 細胞を炎症性サイトカインである IL-1 β で刺激することで、ROS 産生量が増加する。さらに ROS は、ERK1/2 や p38 などの MAPK 経路の活性化を引き起こし、最終的に TNF- α 、IL-8、IL-1 β といった炎症性サイトカインが産生される。これらの分子反応機構は、炎症性腸疾患の病態をよく反映していることから、本実験系を用いて水酸化 C60 フラーレンの抗炎症作用を比較検討した。まず、水酸化 C60 フラーレンの *in vitro* における抗酸化作用を評価するため、ROS の産生に及ぼす影響を検討した (図 44)。Caco-2 細胞を播種し、IL-1 β で刺激すると、顕著な ROS 産生の増加が認められた。一方で、いずれの水酸化 C60 フラーレンを作用させた群でも、濃度依存的に IL-1 β 刺激による ROS の産生が抑制された。特に、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$ を作用させることで、ポジティブコントロールとして用いた NAC の 1/30 の作用濃度にも関わらず、NAC 作用群と同等の ROS 産生の抑制が認められた。以上の結果から、水酸化フララーレンは強力な抗酸化作用を有することが明らかとなった。次に、水酸化フララーレンの抗炎症作用を、炎症性サイトカイン IL-8 の産生を指標として評価した (図 45)。先ほどと同様に、Caco-2 細胞に水酸化フララーレンおよび NAC を作用させた後に、IL-1 β で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した。その結果、IL-1 β 刺激によって IL-8 産生が有意に増

加したものの、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$ 作用群で、濃度依存的に IL-8 の産生が有意に抑制された。NAC 作用群においても、IL-8 の有意な産生抑制が認められたが、その効果は水酸化 C60 フラーレンと比較して非常に弱いものであった。また、異なる炎症性サイトカイン刺激における水酸化 C60 フラーレンの抗炎症作用を検討するため、Caco-2 細胞を TNF- α で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した (図 46)。その結果、IL-1 β 刺激と同様に、TNF- α 刺激により IL-8 産生が有意に増加した。一方で、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$ を作用させることで、有意に IL-8 の産生が抑制され、 $C_{60}(OH)_{24}$ 、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$ が、優れた抗炎症活性を有することが明らかとなった。特に、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$ は、優れた抗炎症活性を有すると共に、分散性が高く、かつ細胞毒性を示さないことが明らかとなった。従って、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$ は、分散性-細胞毒性-抗炎症活性 (抗酸化活性、炎症性サイトカイン産生抑制能) の観点から、安全かつ有用な抗炎症薬となる可能性が示された。そこで以降は、 $C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$ を用いて検討を進めた。

水酸化 C60 フラーレンの安全性評価

次に水酸化 C60 フラーレンの安全性に関する基礎情報の収集を試みた。まず、水酸化 C60 フラーレンを 1 週間反復投与した際の一般毒性を評価するため、水に分散可能な最高濃度で各種水酸化 C60 フラーレン ($C_{60}(OH)_{36}$ 、 $C_{60}(OH)_{44}$) を懸濁し、C57BL/6 マウスに 375 μ M/500 μ L/mouse の投与量で経口投与した。マウスの体重を経日的に測定したところ、いずれの水酸化 C60 フラーレン投与群でも、コントロール群と同様の体重変動を示し、1 週間投与後も体重変化に影響は認められなかった (図 47)。次に、マウスから主要臓器である肝臓、大腸、腎臓、脾臓、胃、小腸、脳、肺、心臓を回収し、臓器重量を測定した (図 48)。その結果、 $C_{60}(OH)_{44}$ 投与群で、小腸重量の低下

が認められたが、その他の臓器重量に影響は認められなかった。また、C₆₀(OH)₃₆ 投与群では、どの臓器重量にも影響は認められなかった。従って、病理学的な評価など、より詳細な検討は必要とされるものの、C₆₀(OH)₃₆ は組織傷害を示さないと考えられた。

次に、各マウスから回収した血漿を用いて、肝障害マーカーである ALT、AST、腎障害マーカーである BUN を測定した (図 49)。その結果、C₆₀(OH)₄₄ 投与により、ALT、AST に影響は認められなかった。また、BUN の減少が認められたものの、正常範囲内での変化であり、組織障害マーカーに顕著な影響は無いと考えられた。C₆₀(OH)₃₆ 投与群では、ALT、AST、BUN に変動は認められなかったことから、顕著な肝毒性、腎毒性を示さないことが明らかとなった。そこで、血球成分の変動を解析した結果、C₆₀(OH)₃₆、C₆₀(OH)₄₄ の投与により若干の変動は認められるものの、白血球、顆粒球、リンパ球、単球、赤血球にコントロール群と有意な変化は認められなかった (図 50)。また、C₆₀(OH)₃₆、C₆₀(OH)₄₄ 投与群において、血小板の値は有意な上昇は示したが、正常範囲内の変化であったことから、臨床学的な意義はないものと考えられた。以上の結果から、水酸化フラレーンは経口投与により、血液成分にも影響を示さないことが明らかとなった。

次に、C₆₀(OH)₃₆ を静脈内投与後の、急性毒性発現における閾値を検討した。種々投与量の C₆₀(OH)₃₆ を投与した後、臓器重量と臓器障害マーカーを測定したところ、750 nmol/マウス (2.5 mg/マウス) の投与量において、腎重量の増加および ALT・BUN の増加が観察された (図 51a)。以上の結果から、単回静脈内投与において、C₆₀(OH)₃₆ が毒性を発現しない最大量は、375 nmol/マウス (1.25 mg/マウス) であることが判明した。さらに、Caco-2 細胞を用いて、コメットアッセイにより、DNA 傷害性を評価した。その結果、検討した最大量においても、全く傷害性は観察されないことが明らかとなった (図 51b)。

プロリン型 C60 フラレーン以外の C60 フラレーン誘導体に関する検討

上述した通り我々は、C60 フラレーンの圧倒的な抗酸化作用や抗炎症作用を利用した炎症性腸疾患治療薬の開発に向けて、水酸基を導入し、分散性を向上させた水酸化 C60 フラレーンを用い、安全かつ有効な炎症性腸疾患治療薬に向けた検討を進めている。一方で、本邦発のナノ・サブナノ医薬の開発に向けては、さらなる有効性の向上と共に、品質管理に必須である異性体の分離や分析、体内動態や安全性との関連情報の収集、薬効メカニズムの解明など、克服すべき課題が多くある。特に、水酸化 C60 フラレーンは、水酸基の位置制御が困難であり、医薬品に必須である安定した品質を保証することが容易ではない。

そこで我々は、異性体が存在しない、もしくは分離が可能な C60 フラレーンを創成し、その有用性評価を推進した。まず、2 種類の C60 フラレーン誘導体と C60 の抗炎症作用を、炎症性サイトカインである IL-8 の産生量を指標に評価した (図 52)。図 52 に示すメチルマロン酸 C60 フラレーンや脂環式 C60 フラレーンには、水酸化 C60 フラレーンの医薬品化を目指した際に問題となる構造異性体が存在しない。従って、品質保証の問題を克服する可能性があるため、これら誘導体の抗炎症作用を評価した。Caco-2 細胞に各種 C60 フラレーン誘導体および C₆₀ を作用させた後に、IL-1β で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した。その結果、C60 やメチルマロン酸 C60 フラレーンでは、IL-8 の産生抑制が全く認められなかった。また、脂環式 C60 フラレーンでは、IL-8 の産生促進が認められ、起炎性を示すことが示唆された。従って、メチルマロン酸 C60 フラレーン、脂環式 C60 フラレーンは、炎症性腸疾患治療薬としては適さない可能性が示された。そこで、次に、構造異性体の分離や分析が容易なプロリン型 C60 フラレーン (C60-P) に着目した。

C60-P の物性評価

C60 フラーレンの炭素骨格表面にプロリン類似骨格を有している C60-P は、カルボン酸やイミン骨格を有しているため、C60 と比較して水溶性が向上している。また、分担研究者である大島は、フルーレン分離用のスタンダードカラムである Buckyprep を用い、C60-P の光学異性体の分離や分析が可能であることを明らかとしており、安定した品質の C60-P を供給可能であることを見出している(大島の分担報告書を参照)。また、抗酸化作用に関しても、C60-P は水酸化 C60 フラーレンと比較して、強力な OH ラジカル消去作用を示すことを、分担研究者である青島らが明らかとしている(青島の分担報告書を参照)。従って、C60-P は、水酸化 C60 フラーレンよりも安定した品質と有効性が高度に担保されたナノ・サブナノ医薬として期待できる。

そこで、C60-P の強力な抗酸化活性を利用した炎症性腸疾患治療薬の開発に向けて、置換様式の異なる 4 種類の C60-P の物性情報(分散性や表面電荷)と、細胞毒性や抗炎症作用(抗酸化活性、炎症性サイトカイン産生抑制能)を *in vitro* で比較検討し、医薬品化に最適な C60 フラーレン誘導体を探索した。

本検討では、置換様式の異なる 4 種類の C60-P (プロリン C₆₀ (1)、プロリン C₆₀ (2)、プロリン C₆₀ (3)、プロリン C₆₀ (4))を用いた(図 53)。Fig. 12 に示すように、本検討で使用した C60-P の構造は、カルボキシル基の付加位置や数がそれぞれ異なるプロリン C₆₀ (1)-(3)と、アンモニウムカチオンになっているプロリン C₆₀ (4)に大きく分けられる。また、コントロールとしてプロリン C₆₀ (1)の官能基部分のみの構造(プロリン(1)′と表記)も使用した。さらに、C60 フラーレン誘導体の比較対象として、水酸基を 36 個導入し、分散性やハンドリング性を向上させた水酸化 C60 フラーレン [C₆₀(OH)₃₆] や、全く修飾を施さない C60 を使用した。

まず、各種 C60-P の物性情報を収集した。

C60-P は、水酸化 C60 フラーレンと比較して水溶性に乏しいため、各 C60-P を DMSO に溶かした後に、水に懸濁し、分散媒中の平均二次粒子径を Zetasizer で測定した(図 54)。その結果、C₆₀(OH)₃₆ は 1 nm 付近に、C60 は 300 nm 付近にそれぞれ 2 次粒子径のピークが観察された。C60 フラーレンの 1 次粒子径は 1 nm 程度であるので、C₆₀(OH)₃₆ は分散性が高く、ほぼ単分散している一方で、C60 は溶媒中で凝集していることが明らかとなった。C60-P に関しては、プロリン C₆₀(1)およびプロリン C₆₀(2)は 100 nm 付近に、プロリン C₆₀(3)およびプロリン C₆₀(4)は 50 nm 付近に 2 次粒子径のピークが観察された。従って、C60-P は、C60 よりは分散性が高い一方で、C₆₀(OH)₃₆ よりは凝集していることが明らかとなった。中でも、プロリン C₆₀ (3)、プロリン C₆₀ (4)は、プロリン C₆₀ (1)、プロリン C₆₀ (2)と比較して分散性が高いことが示された。さらに Zetasizer を用いて表面電荷を測定したところ、C60、C₆₀(OH)₃₆、プロリン C₆₀ (1)-(3)は負に荷電しており、カルボン酸の数の増加に伴い負に荷電している傾向が観察された。一方で、プロリン C₆₀ (4)はアンモニウムカチオンの構造からも明らかであるように正に荷電していた。

腸管上皮における C60-P の抗炎症作用

Caco-2 細胞を用いて、各種 C60-P、C₆₀(OH)₃₆、C60 および、NAC の細胞毒性を LDH アッセイにより評価した(図 55)。その結果、各種 C60 フラーレン誘導体および NAC の添加により、コントロール群と比較して有意な差はみられないものの、90%以上の細胞が生存していた。従って、C60-P は本濃度においてほとんど細胞毒性を示さず、安全性に優れている可能性が示された。

Caco-2 細胞における C60 フラーレン誘導体の抗酸化作用を、細胞内に定常状態で産生されている ROS 産生量を指標として評価した(図 56)。その結果、C60 やプロリン C₆₀ (1)の官能基部分のみでは、全く ROS の抑制が認められなかった。

一方で、各種 C60-P、C₆₀(OH)₃₆、NAC 作用群において、作用時間や濃度依存的に細胞内 ROS の産生が抑制された。24 時間後における、これらの抗酸化作用の順を比較すると、プロリン C₆₀ (1)、プロリン C₆₀ (2) < プロリン C₆₀ (4) < プロリン C₆₀ (3) < C₆₀(OH)₃₆ < NAC の順に抗酸化作用が強くなる傾向が確認された。

次に、C60-P の *in vitro* における炎症性サイトカインの産生抑制能を、炎症性サイトカインである IL-8 の産生量を指標として評価した(図 57)。Caco-2 細胞に各種 C60-P、C₆₀(OH)₃₆、C60、NAC を作用させた後に、IL-1β で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した。その結果、IL-1β 刺激によって IL-8 産生が有意に増加したものの、いずれの C60-P を作用させた群においても、濃度依存的に IL-8 の産生が抑制された。また、C₆₀(OH)₃₆ 作用群や NAC 作用群においても、IL-8 の産生を抑制する傾向が認められたが、その効果は C60-P 作用群と比較して非常に弱いものであり、抗酸化作用とは全く異なる傾向が認められた。特に、プロリン C₆₀ (3) は、ポジティブコントロールとして用いた NAC や C₆₀(OH)₃₆ と比較して、約 20 倍もの強い抗炎症作用を示すことが明らかとなった。また、プロリン C₆₀ (1) の官能基部分のみや、C60 では、IL-8 の産生抑制は認められなかった。

そこで、異なる炎症性サイトカイン刺激における C60-P の炎症性サイトカイン抑制能を評価するため、Caco-2 細胞を TNF-α で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した(図 58)。その結果、IL-1β で刺激した検討と同様に、TNF-α 刺激により IL-8 産生が有意に増加した。一方で、各種 C60-P を作用させることで、有意に IL-8 の産生が抑制され、その抑制傾向は IL-1β 刺激時と同様の傾向が認められた。また、C₆₀(OH)₃₆ 作用群や NAC 作用群においても、IL-8 の産生を抑制する傾向が認められたが、その効果は C60-P 作用群と比較して非常に弱いものであった。特に、プロリン C₆₀ (3) は、NAC や C₆₀(OH)₃₆ と比較し

て、約 5 倍もの強い抗炎症作用を示すことが明らかとなった。また、先程の検討と同様に、プロリン C₆₀(1) の官能基部分のみや C60 では、IL-8 の産生抑制は認められなかった。

以上の腸管上皮細胞における結果をまとめると、抗酸化作用は NAC や C₆₀(OH)₃₆ より劣るものの、C60-P は、優れた IL-8 産生抑制能を有することが明らかとなった。特に、プロリン C₆₀ (3)、プロリン C₆₀ (4) は、他の C60-P と比較して、分散性が高く、優れた抗酸化作用や抗炎症作用を有することが明らかとなったことから、安全かつ有用な抗炎症薬となる可能性が示された。また、強い抗炎症作用は、抗酸化作用以外のメカニズムに起因する可能性が示唆された。

マクロファージにおける C60-P の抗炎症作用

炎症性腸疾患の病態においては、腸管上皮が傷害され、腸管粘膜へ大量の腸内細菌が侵入し、Toll-like 受容体 (TLR) を介した自然免疫系が活性化する。そこで、次に、貪食細胞であるマウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7 細胞) を、グラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分である LPS で刺激し、C60 フラーレン誘導体が自然免疫系に与える影響を評価した。

まず、RAW264.7 細胞に対する各種 C60-P、C₆₀(OH)₃₆、C60 および、NAC の細胞毒性を LDH アッセイにより評価した。その結果、腸管上皮細胞と同様に、プロリン C₆₀ (1)-(3)、C₆₀(OH)₃₆、C60 作用群では、コントロール群と比較して、90%以上の細胞が生存しており、細胞毒性はほとんど認められなかった。一方で、プロリン C₆₀ (4) は、腸管上皮細胞では細胞毒性が認められなかった濃度にも関わらず、細胞毒性が約 20%認められた(図 59)。

次に、RAW264.7 細胞における C60 フラーレン誘導体の抗酸化作用を、ROS 産生量を指標として評価した。腸管上皮細胞と同様に、プロリン C₆₀ (1) の官能基部分のみを作用させても、全く ROS の抑制が認められなかった一方で、C60-P、

C₆₀(OH)₃₆ および NAC 作用群において、濃度依存的に細胞内 ROS の産生が抑制された(図 60)。24 時間後における、これらの抗酸化作用の順を比較すると、プロリン C₆₀ (1)、プロリン C₆₀ (4) < プロリン C₆₀ (2) < プロリン C₆₀ (3) < C₆₀(OH)₃₆ < NAC の順に抗酸化作用が強くなる傾向が確認され、腸管上皮細胞における検討と同様の傾向が認められた。一方で、腸管上皮細胞とは異なり、C60 を作用させることで、僅かではあるものの ROS の産生抑制が認められると共に、プロリン C₆₀ (4)作用群では、作用時間 2 時間以降から徐々に ROS の産生上昇が認められ、プロリン C₆₀ (4)はプロオキシダント作用を示す可能性が明らかとなった。

TLR4 のリガンドである LPS で RAW264.7 細胞を刺激すると、炎症性サイトカインの産生を誘導する MyD88 依存的な経路および TRIF 経路を介して I 型 IFN の産生に参与する MyD88 非依存的な経路が活性化される。炎症性腸疾患の病態には、過剰産生された炎症性サイトカイン、とりわけ TNF- α が重要な役割を担っており、抗 TNF- α 製剤は、現在の炎症性腸疾患治療になくてはならないものとなっている。さらに近年、IL-6R 抗体がクローン病の治療薬として有効であるという報告もある。また、TRIF KO マウスは、MyD88 KO マウスや WT と比較し、DSS 誘発性大腸炎の病態が悪化しにくいことが報告されていることから、I 型 IFN の産生に参与する MyD88 非依存的な経路も炎症性腸疾患の病態において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、各種 C60-P のサイトカイン産生抑制能を、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6、IL-1 β の産生や、MyD88 非依存的な経路により産生される IFN- β 、IP-10 の産生量を指標として評価した。先ほどと同様に、RAW264.7 細胞に各種 C60-P、C₆₀(OH)₃₆、C60 および、NAC を作用させた後に、LPS で刺激し、24 時間後に培養上清中の炎症性サイトカインである IL-6、TNF- α 、IL-1 β 量を測定した。まず、IL-6 や IL-1 β の産生量を評価した。その結果、LPS

刺激によって IL-6 や IL-1 β の産生が有意に増加したものの、各種 C60-P 作用群で、濃度依存的に IL-6 や IL-1 β の産生が抑制された。特に、IL-6 に関しては、C₆₀(OH)₃₆ 作用群や C60 作用群においても IL-6 の産生を抑制する傾向が認められたが、その産生抑制は C60-P よりも弱く、特にプロリン C₆₀ (3)は、C₆₀(OH)₃₆と比較して、約 20 倍以上の強い抗炎症作用を示すことが明らかとなった。一方で、NAC 作用群においては、IL-6 の産生には影響を与えないと共に、IL-1 β の産生を促進する傾向が認められ、先程の抗酸化作用の結果とは全く異なる傾向が認められた。また、本検討においても、プロリン C₆₀ (1)の官能基部分のみの構造では、IL-6 や IL-1 β の産生抑制は認められなかった(図 61)。

次に、TNF- α 産生量を評価した。その結果、LPS 刺激によって TNF- α の産生が有意に増加すると共に、いずれの C60-P および C₆₀(OH)₃₆ を作用させた群においても、濃度依存的に TNF- α の産生が促進され、IL-6 とは全く異なる傾向が認められた。また、プロリン C₆₀(1)-(3)は、C₆₀(OH)₃₆ 作用群と同等の TNF- α 産生促進が認められた。一方で、プロリン C₆₀ (4)はその細胞毒性のためか、100 μ M の濃度において TNF- α の産生上昇は、他の C60-P と比較して低かった。また、本検討において、プロリン C₆₀ (1)の官能基部分のみや C60 作用群では、TNF- α の産生促進は認められず、NAC 作用群においては、産生抑制傾向が認められた。

次に、MyD88 非依存的な経路により産生される IFN- β 、IP-10 の産生量を測定した。I 型 IFN である IFN- β は、抗ウイルス、増殖抑制および免疫調節活性を有するサイトカインである。また、IP-10(CXCL10)は、IFN の産生により誘導され、単球やマクロファージ、T 細胞・NK 細胞などの多くの免疫担当細胞の遊走に参与する。その結果、LPS 刺激によって、IFN- β や IP-10 の産生が有意に増加したものの、いずれの C60-P を作用させた群においても、濃度依存的に IFN- β や IP-10 の

産生が強く抑制され、特に 100 μ M においては、C60-P は、コントロール群以下にまで INF- β や IP-10 の産生を抑制した。各種 C60 フラーレン誘導体は、どちらのサイトカイン産生に対しても同様の傾向を示すことが確認された。しかしながら、プロリン C₆₀(4)でのみ、IP-10 産生には影響を与えない一方で、IFN- β の産生を強く抑制するなど、異なる傾向が認められた。また、本検討において、プロリン C₆₀ (1)の官能基部分のみや C₆₀(OH)₃₆ を作用させても、IFN- β や IP-10 の産生抑制は認められなかった (図 62)。

以上の結果より、C60-P は、マクロファージに対して優れた抗酸化作用を示すと共に、TNF- α を除く MyD88 依存的な経路および、MyD88 非依存的な経路の両経路におけるサイトカインの産生を強く抑制することが明らかとなった。TRIF KO マウスは、MyD88 KO マウスや WT と比較し、DSS 誘発性大腸炎の病態が悪化しにくいことが報告されている。従って、炎症性サイトカインの産生抑制と共に、MyD88 非依存経路を介するサイトカインである IFN- β や IP-10 を抑制した C60-P は、炎症性腸疾患の有効な治療薬となり得ると考えられる。一方で、TNF- α の産生促進も認められたため、医薬品化に向けては注意が必要である。以上の結果より、C60-P は、水酸化 C60 フラーレンと比較して、分散性や抗酸化作用は劣るものの、腸管上皮やマクロファージにおいて、顕著な炎症性サイトカイン抑制能を示すことが明らかとなった(図 63)。中でも、プロリン C₆₀ (3) は、他の C60-P と比較して、優れた抗酸化作用や抗炎症作用を有することから、炎症性腸疾患に対する有効な治療薬となり得る可能性が示された。

次に、他の TLR リガンド刺激における C60-P の抗炎症作用を検討した。poly(I:C)は、二本鎖 RNA の合成アナログであり、ウイルス感染と関連した分子パターンである。TLR3 を認識する poly(I:C)は、LPS 同様、MyD88 依存的な経路もしくは、MyD88 非依存的な経路を介して、NF- κ

B の活性化、炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、TLR4 のリガンドである LPS や TLR9 のリガンドである CpG よりも、ROS の産生が低いという報告がある。そこで、RAW264.7 細胞におけるサイトカインの産生抑制能が、抗酸化作用に起因するのか解析するために、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 の産生や、MyD88 非依存的な経路により産生される IFN- β の産生量を指標として評価した。また、本検討においては、C60-P の中でも、LPS 刺激した際に、顕著なサイトカイン抑制能を示したプロリン C₆₀ (3)を用いて検討した。RAW264.7 細胞に、プロリン C₆₀ (3)、C₆₀(OH)₃₆、C60 及び NAC を作用させた後に poly(I:C)で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-6、TNF- α 、IFN- β 量を測定した。まず、IL-6 と IFN- β の産生量を評価した。その結果、LPS 刺激と同様に、poly(I:C)刺激によって、IL-6 や IFN- β の産生が有意に増加した。一方で、プロリン C₆₀(3)、C₆₀(OH)₃₆、C60 を作用させたいずれの群においても、濃度依存的に IL-6 や IFN- β の産生が抑制された。特に、IL-6 に関してはプロリン C₆₀(3)や C₆₀ が、IFN- β に関してはプロリン C₆₀(3)が他の C60 フラーレン誘導体よりも、強くサイトカイン産生を抑制した。また、本検討において、NAC 作用群では、濃度依存的な IL-6 や IFN- β の産生抑制は認められなかった。次に、TNF- α の産生量を評価した。その結果、poly(I:C)刺激によって TNF- α の産生が有意に増加したものの、いずれの C60 フラーレン誘導体や NAC を作用させた場合においても、TNF- α の産生抑制は認められず、LPS 刺激とは異なる傾向が認められた(図 64)。また、本検討における細胞毒性を LDH アッセイにより評価した (図 65)。その結果、poly(I:C)作用により、強い細胞毒性が認められた一方で、プロリン C₆₀(3)または、C60 を共作用させることで、RAW264.7 細胞の細胞死が抑制されている傾向が認められた。一方で、NAC や C₆₀(OH)₃₆ 作用による細胞死の抑制は認められなかった。プロリン C₆₀(3)や C₆₀ を作用させることで、細胞死

が抑制された理由に関しては不明であるが、今後精査していく必要がある。

以上の結果をまとめると、C60 フラーレン誘導体は、ROS の産生を誘発しないとされる poly(I:C)による刺激を顕著に抑制することが明らかとなった。また、poly(I:C)作用による細胞死の抑制も同時に観察された。

他の抗酸化剤と C60 フラーレンの抗酸化作用および、炎症性サイトカイン抑制能の比較検討

これまでの検討において、フラーレンの強力なサイトカイン抑制能は決して抗酸化作用のみに起因しない可能性が考えられた。従って、NAC 以外の抗酸化剤である 5-ASA および BHA を用いて、C60 フラーレンの抗酸化作用およびサイトカイン産生抑制能をより詳細に比較検討した。5-ASA は、現在、炎症性腸疾患の主要な治療薬となっており、その薬効の 1 つとして抗酸化作用が有名である。また、BHA は食品を保存する際の酸化防止剤としても使用されている代表的な合成抗酸化剤である。

まず、Caco-2 細胞におけるプロリン C₆₀ (3)、NAC、5-ASA および BHA の抗酸化作用を細胞内に定常状態で産生されている ROS 産生量を指標として、比較検討した。その結果、いずれの抗酸化剤および、プロリン C₆₀ (3)作用群においても、ROS 産生量の抑制が認められた。特に、NAC、5-ASA、BHA 作用群では、プロリン C₆₀ (3)と比較して、顕著に細胞内の ROS の産生が抑制された。一方で、5-ASA 作用群においては、その作用濃度や作用時間依存的に、ROS の生成促進が認められた (図 66a)。すなわち、5-ASA は Caco-2 細胞に高濃度作用させることで、プロオキシダント作用を示す可能性が示された。次に、Caco-2 細胞におけるプロリン C₆₀ (3)、NAC、5-ASA および、BHA の炎症性サイトカイン抑制能を、炎症性サイトカインである IL-8 の産生量を指標として評価した。Caco-2 細胞にプロリン C₆₀ (3)、NAC、5-ASA および、BHA を作用させた後に、

IL-1 β で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した。その結果、これまでの検討と同様に、IL-1 β 刺激によって IL-8 産生が有意に増加したものの、プロリン C₆₀ (3)作用により、IL-8 の産生が抑制された。一方で、5-ASA や BHA を作用させても、IL-8 の産生抑制は全く認められなかった (図 66b)。従って、プロリン C₆₀ (3)は、抗酸化剤である NAC や BHA、炎症性腸疾患治療薬である 5-ASA よりも抗酸化作用は弱い一方で、強い IL-8 産生抑制能を示すことが明らかとなった。従って、本検討からも、決して抗酸化作用のみで C60-P の抗炎症作用を議論することはできないと考えられる。

次に、RAW264.7 細胞を用いて、抗酸化剤とプロリン C₆₀ (3)の抗酸化作用を先程と同様に、比較検討した。その結果、いずれの抗酸化剤および、プロリン C₆₀ (3)作用群においても、ROS 産生量の抑制が認められた。特に、NAC、5-ASA、BHA いずれの作用群においても、プロリン C₆₀ (3)作用群と比較して、顕著に細胞内の ROS の産生が抑制された。一方で、腸管上皮細胞の検討と同様に 5-ASA 作用群においては、その作用濃度や作用時間依存的に、ROS の生成促進が認められた (図 67)。すなわち、5-ASA は腸管上皮のみならず、マクロファージに対しても高濃度作用させることで、プロオキシダント作用を示す可能性が示された。次に、RAW264.7 細胞におけるプロリン C₆₀ (3)、NAC、5-ASA および、BHA の炎症性サイトカイン抑制能を、炎症性サイトカインである IL-6 や TNF- α の産生量を指標として評価した。その結果、これまでの検討と同様に、LPS 刺激によって IL-6 産生が有意に増加したものの、プロリン C₆₀(3)作用により、IL-6 の産生が抑制された。また、5-ASA や BHA を高濃度作用させることでも、IL-6 の産生抑制は認められたが、その抑制量はプロリン C₆₀ (3)よりも弱いものであった (図 68)。また、TNF- α の産生量を評価した結果、これまでの検討と同様に、LPS 刺激によって TNF- α 産生が有意に増加すると共に、プロリ

ン C₆₀(3)作用により、TNF- α の産生が有意に上昇した。BHA を高濃度作用させた場合においても、TNF- α の産生上昇傾向が認められた。一方で、5-ASA は高濃度作用させることで、TNF- α の産生抑制傾向が認められた。従って、プロリン C₆₀ (3) は、抗酸化剤である NAC のみならず、BHA や炎症性腸疾患治療薬である 5-ASA よりも抗酸化作用は弱い一方で、強く IL-6 産生抑制能を示すことが明らかとなった。

以上の結果より、C60-P は、腸管上皮細胞やマクロファージにおいて、5-ASA や BHA などの NAC 以外の抗酸化作用をもつ物質と比較して、強く炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。特に、炎症性腸疾患治療薬である 5-ASA と比較して、顕著に IL-8 や IL-6 の産生を抑制しており、プロオキシダント作用が見られなかったことから、C60-P は炎症性腸疾患に対する有効な治療薬となり得る可能性がある。従って、本知見は、抗酸化作用のみに起因しない C60-P の抗炎症作用の存在を、改めて強く示唆すると共に、抗酸化作用の面でも、プロオキシダント効果のない（副作用の少ない）炎症性腸疾患に対する有効な治療薬となり得る可能性が示された。

各種 C60-P の抗炎症メカニズムの基礎的解析

細胞内の ROS 生成系の主要な機序としては、ミトコンドリア電子伝達系における電子の漏出と、膜貫通型酵素 NADPH oxidase ファミリー分子の活性化による生成が挙げられ、近年では細胞内のシグナル伝達物質としての ROS に注目が集まっている。一方で ROS の過剰産生は、直接あるいは間接的に転写因子である NF- κ B や AP-1 を活性化し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、炎症性サイトカインなどの刺激によって、活性化された細胞も、大量の ROS を放出する。従って、ROS の生成抑制（抗酸化作用）と炎症性サイトカイン産生抑制（抗炎症作用）を切り離して考えることは難しい。上述した通り我々は、C60

フラレン誘導体が強力な抗酸化作用を示すと共に、抗酸化作用のみに起因するとは思えないほど、様々なサイトカインの産生を強く抑制する可能性があることを明らかとした。特に、C60-P は、強力な抗酸化作用を示した NAC や水酸化 C60 フラレンと比較して、顕著に炎症性サイトカインの産生を抑制した。従って、抗酸化作用に起因しない C60 フラレンの抗炎症メカニズムが想起されるが、これら薬効発現メカニズムは全く分かっていないのが現状である。

例えば、C60 フラレンは、その大きさから、酵素活性部位にはまりこむことができる。Friedman らは、C60 フラレン誘導体が、HIV プロテアーゼの酵素活性部位のポケットにはまりこむことで、HIV プロテアーゼを阻害し、抗 HIV 活性を示すことを報告している。また、我々の共同研究者である増野らのグループは、C60-P が HIV 逆転写酵素に結合し、そのタンパク構造を変化させることで、基質との結合を妨げ、抗 HIV 活性を示すことや C 型肝炎ウイルス RNA ポリメラーゼの阻害活性を示すことを見出している。従って、C60 フラレンが、抗酸化作用による抗炎症作用のみならず、プロテインキナーゼの ATP 結合部位あるいは調節サブユニットや調節領域に直接結合することで、プロテインキナーゼ阻害剤のように働き、サイトカインの産生を抑制する可能性も考えられる。そこで、C60 フラレンの抗炎症メカニズムを解明するための第一歩として、炎症刺激のシグナル分子である、MAPK などのリン酸化酵素に着目して解析した。

Mitogen-activated Protein Kinase(MAPK)は、真核生物に高度に保存されているセリン/スレオニンキナーゼであり、外界刺激を伝達するシグナル分子の一つであり、細胞増殖、分化、遺伝子発現、アポトーシスなどへの関与が明らかにされている。哺乳類では 4 つの MAPK ファミリー分子に分類されており〔ERK1/2 (古典的 MAPK)、ERK5、JNK/SAPK、p38〕、それぞれが独立したカスケードを形成していることが知られている。これら、

MAPKファミリーのリン酸化状態を解析することは、疾病の根本的なメカニズムにおけるシグナル分子の役割を理解するうえで、非常に重要であると考えられる。MAPKのうちERKが細胞増殖因子の刺激などにより活性化するのに対し、p38および、JNKはストレス応答性シグナルとして知られ、サイトカイン、紫外線照射、酸化などのストレスにより活性化されることが知られている。特に、Caco-2細胞においては、IL-1 β で刺激すると、p38経路が活性化することが報告されている。

まず、Caco-2細胞をIL-1 β および、TNF- α で刺激した際のIL-8の産生に、MAPK経路が関与するのかを解析した。各MAPK阻害剤存在下で、IL-1 β (図69a)およびTNF- α (図69b)をCaco-2細胞に添加し、IL-8の産生量をELISAにより評価した。その結果、IL-1 β およびTNF- α をCaco-2細胞に単独で作用させた場合、有意なIL-8量の増加が認められるのに対し、p38阻害剤(SB203580)、JNK阻害剤(SP600125)および、ERK1/2阻害剤(U0126)いずれの作用条件下においても、IL-1 β およびTNF- α 刺激によるIL-8量の増加は有意に抑制された。本結果より、IL-1 β およびTNF- α は、p38、JNK、ERK1/2を活性化し、IL-8の産生を誘導することが明らかとなった。

C60-PがMAPKの活性化及びI κ Bの分解に与える影響

本検討では、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。IL-8は、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 β 、及びTNF- α 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、MAPKのリン酸化によるシグナル伝達であり、MAPKにはERK、JNK、p38の3つの分子が存在し、最終的にこれらの分子がAP-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NF- κ Bに依存してIL-8が誘導される経路である。本経路はNF- κ Bの核内移行を制御するinhibitor of transcription factor NF- κ B(I κ 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する。I κ Bから遊離し、活性化されたNF- κ 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 β 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 κ 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 β 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 κ 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 β 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、JNK(図70a)、p38(図70b)はIL-1 β 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(図70c)。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 β 単独刺激と比べてMAPKのリン酸化に変化がなかったことが確認された。従って、C60-Pは、MAPKの活性化に影響を与えず、IL-8産生の抑制作用を発揮することが示唆された。

次に、I κ B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 β 刺激によるNF- κ 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I κ Bは分解されることで

NF- κ 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- κ B を抑制する。従って、IL-1 β 刺激後、I κ B 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（図 70d）。また、C60-P 前処置群においても、IL-1 β 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。従って、C60-P による IL-8 産生の抑制作用は、I κ B 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 I κ B の分解以降にある可能性が示された。

C60-P による IL-8 の mRNA 発現に与える影響

次に、MAPK、NF- κ 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 β 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（図 71a）。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増大することが確認された（図 71b）。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 β 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（図 71a）。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（図 71b）。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（図 71a, b）。従って、C60-P は IL-1 β 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。

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 β 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. 35 a)。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 (図 72a, 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 (図 72a, 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 (図 72a)。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。

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- α 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合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 β 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 β 刺激前から観察され、IL-1 β 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 (図 73a)。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 (図 73a)。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 β 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 β 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 (図 73a)。さらに、p70-S6K の総量を検出するバンドに関しても、C60-P 前処置により、C60-P 未処置群と比べて減弱している様子が観察された (図 73a)。

ImageJ を用いて、p70-S6K の総量に対するリン酸化の割合、 β -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 β 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 (図 73a)。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、 β -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 (図 73a)。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 β 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 β 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 (図 73b, 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 未処置群と比べたリン酸化バンドの強度の変動は観察されなかった (Fig. 36c)。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 4E-BP1 が、mTOR 非依存的な経路によりリン酸化されることや、rapamycin は 4E-BP1 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、4E-BP1 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 (図 73b)。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 (図 73c)。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、 β -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 β 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. 36b)。特に IL-1 β 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 (図 73b)。また、eIF4E のリン酸化の割合は、C60-P 前処置群において、IL-1 β 刺激前の時点で増加が観察されたが、IL-1 β 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 (図 73c)。総量に関しては、IL-1 β 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 β 刺激後 60 分からは、逆に減少の様子が観察された (図 73c)。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 β 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 (図 74)。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。

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 β 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 β 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 β 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 (図 75)。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 β 作用により誘導される一方で、BD-2 に関しては IL-1 β 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。

C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) の抗炎症作用

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 (図 76)。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 μ M) 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 (図 77)。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-1 β 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 (図 78)。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。以上の結果から、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 フラー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 フラーレン誘導体の有用性を評価した。A549 を LPS、IL-1 β 、TNF- α 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 フラーレン誘導体 (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 (図 79)。IL-6 と IL-8 は NF- κ B 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 フラーレン誘導体の抗炎症作用を検討した。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 μ M) 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 (図 80)。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 (図 81)。その結果、IL-6 については、いずれの C₆₀ フラー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 (図 82)。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 フラーレン誘導体 (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 フラーレン誘導体 (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。

C60-P 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 フラーレン誘導体である水酸化フラー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、水酸化フラー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 83)。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。C60-P 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、C60-P 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 84)。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。C60-P 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、C60-P 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、C60-P 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、オキサゾロンモデルを用いて、C60-P の腹腔内投与における治療効果を検討した (図 85)。その結果、経口投与時とは異なり、C60-P 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

C60-P 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、C60-P 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、C60-P の体内動態を解析するための、解析法の確立を試みた。

C60-P の体内動態を解析するにあたり、組織から C60-P を抽出する必要がある。そこでまず、C60-P 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 C60-P 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、C60-P 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 C60-P 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 86a, b)。本結果から、HPLC を用いることでプロリン型フラーレンは 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、C60-P 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間へ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 C60-P の抽出は困難であることが明らかとなった。

これまでに、C60-P 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 C60-P 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、C60-P 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 C60-P 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、C60-P の定量分析を阻害することが考えられた。そこで次に、C60-P と共に抽出されるタンパク質や脂質が C60-P 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 C60-P を加え、HPLC 解析を行った。検出されたピーク面積から C60-P の濃度を算出したところ、回収率は 101.8%となった (表 4)。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 4)。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 C60-P 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 C60-P 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 C60-P を HPLC にて測定し、検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 5)。本結果を受け、C60-P 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 C60-P の抽出効率を高めるため、分液操作の条件検討を行った。C60-P 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 C60-P 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、C60-P 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 C60-P 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 C60-P 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 C60-P を HPLC を用いて分析した。検出されたピーク面積から THF 層に抽出された C60-P 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 6)。

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 C60-P 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 C60-P を血液中に加え、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 C60-P を、HPLC を用いて定量分析した。検出された C60-P 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 C60-P の濃度依存的にピーク面積が変動し、C60-P 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 87)。

C60 フラーレン誘導体が外来性タンパク抗原に対する免疫応答におよぼす影響

炎症とは、免疫に関与する一連の細胞群が、生体外異物や毒素、傷害を受けた細胞などを認識し、それを排除するべく引き起こされる、炎症性サイトカインの分泌や貪食細胞の遊走、感染細胞のアポトーシス誘導といった一連の生体防御機構を指す。本来、炎症応答は、生体外異物や異常細胞に対して適切に惹起され、対象異物が排除された後に適切なタイミングで収束するように制御されている。しかし、この制御が破綻し、免疫応答の活性化が持続することで、正常組織への傷害や慢性炎症を伴った状態が炎症性疾患である。免疫応答は、自然免疫担当細胞による異物認識が引き金となって起こる。しかし、炎症性疾患の全てが自然免疫のみによって誘発されるわけではない。例えば、関節リウマチや多発性硬化症などに代表される炎症性自己免疫疾患は、異常な獲得免疫応答が惹起された結果、全身もしくは特定臓器に慢性炎症が起こる疾患である。前述の炎症性腸疾患も自己免疫疾患であると言われており、自己応答性 T 細胞による自己組織の傷害が一因であると報告されている。またアレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎は、花粉やダニなどのアレルゲンに対し

て特異的な IgE 抗体が産生されることで引き起こされる、典型的な獲得免疫応答による疾患である。さらに、動脈硬化性疾患のリスク要因となるメタボリックシンドロームにおいては、脂肪組織の炎症の発症および慢性化に CD8 陽性 T 細胞が重要であることや、脂肪組織に存在する B 細胞が、T 細胞の活性化や IgG 産生を介して、慢性炎症やインスリン抵抗性を惹起することも報告されている。以上のように、炎症性疾患においては、自然免疫だけでなく、獲得免疫系がその発症および悪化・慢性化に関与している例が多く存在する。即ち、炎症性疾患における炎症は、自然免疫と獲得免疫の双方によって構成されているのである。

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

本研究では、プロリン骨格を有する修飾基を付与した C60 フラーレン誘導体 (C60-P) を用いた。未修飾の C60 フラーレン (C60) は疎水性が高く、生体へ適用するには親水性修飾基の付加などによる分散性の向上が必須である。しかし、分子内に多数の二重結合を有する C60 は、修飾基の制御

が困難であり、実際に、我々が先行的に研究してきた水酸化 C60 フラーレンは、水酸基数の違いや位置異性体の存在が問題であった。医薬品開発においては、極めて厳密な品質管理が要求されるため、水酸化 C60 フラーレンが医薬品化に耐え得る品質を保証するのは困難であると考えられた。そこで本研究では、分散性の向上と異性体の問題を解消するため、カルボン酸を有する親水性置換基を 1 カ所導入した C60-P を用いた (図 88)。

本検討では、外来性モデル抗原としてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を用いた。C60 フラーレン誘導体を OVA と共にマウスに腹腔投与した際に、C60 フラーレン誘導体が獲得免疫応答の誘導に与える影響を評価した。C60-P は 0.25、0.5、1、2、4 mg/kg の投与量、C60 は 1、2、4 mg/kg の投与量で検討を行った。まず、血液中の IgG 抗体価を測定した結果、OVA 単独投与によって OVA 特異的 IgG が上昇する一方で、OVA と 0.25 mg/kg の C60-P を共投与すると、OVA 特異的 IgG が有意に抑制されていた。また、C60-P は 0.5 mg/kg 以上の投与量では投与量依存的に IgG 産生を増強しており、0.25 mg/kg 群とは逆に、免疫活性化剤 (アジュバント) として作用していることが示された。一方で、C60 投与群では、IgG 産生を増強させる傾向が認められた。なお、C60 による IgG 産生誘導活性は、同投与量の C60-P と比較して差は認められなかった (図 89a)。

次に、IgG サブクラスである IgG1、IgG2c を測定した。産生される IgG のサブクラスは、どのような獲得免疫応答が働いているのかを知る手がかりとなる。Th2 型の免疫が活性化すると IgG1 が、Th1 型の免疫が活性化すると IgG2c が産生される (IgG2a と IgG2c はアミノ酸配列が約 16%異なるものの、アイソタイプとしては同一の作用を示す。今回使用した C57BL/6 では、IgG2a の代わりに IgG2c を産生するため、本検討では IgG2a ではなく IgG2c を測定した)。まず、Th1 型応答の指標である IgG2c を測定した。そ

の結果、OVA 単独投与群での IgG2c 産生が非常に弱く、Th1 型の免疫応答がほとんど誘導されていないことが示唆された。また C60-P および C60 を作用させると、濃度依存的に IgG2c を誘導する傾向が認められたが、ばらつきが大きく、有意な差は観察されなかった (図 89b)。次に、Th2 型免疫応答の指標として、OVA 特異的 IgG1 産生量を測定した。C60-P を投与すると、OVA によって誘導された IgG1 が、0.25 mg/kg 投与群で有意に抑制された。一方で、0.5、1、2、4 mg/kg 投与群では、投与量依存的に IgG1 産生量の増加が観察された。C60 投与群では、今回検討したいずれの投与量においても、IgG1 の有意な産生亢進が認められた (図 89c)。また、同じく Th2 型免疫応答の指標として、アレルギー発症に関与する抗原特異的 IgE も測定した。OVA 単独投与によって、OVA 特異的 IgE が上昇したが、0.25、0.5、1 mg/kg の C60-P 投与によって、IgE が抑制される傾向が観察された。また興味深いことに、今回検討した投与量では、併用する C60-P の濃度が低いほど IgE 抑制効果が強いことが示された。なお、C60-P 高用量投与群および C60 投与群では、C60-P 低用量群とは逆に、IgE 産生を増強する傾向が観察された (図 89d)。

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

抗原再刺激時の脾臓細胞からのサイトカイン産生評価

次に、C60-P による獲得免疫制御に関してより詳細に評価するため、免疫後のマウスから回収した脾臓細胞を抗原で再刺激した際のサイトカイン産生を測定した。抗原投与によって免疫が成立したマウスの脾臓細胞は、抗原で再刺激すると、Th1 型・Th2 型免疫それぞれに応じたサイトカインを産生する。Th1 型サイトカインとして IFN- γ 、

Th2 型サイトカインとして IL-4、IL-5、IL-13 の産生を評価した。

まず、Th1 型サイトカインである IFN- γ を測定した。その結果、OVA 免疫した脾細胞を OVA で再刺激した際に IFN- γ は誘導されず、C60-P 投与群および C60 投与群のいずれにおいても IFN- γ の産生量を変化させなかった。このことから、IgG2c の結果と同様に、C60-P、C60 のいずれも Th1 型免疫応答に影響を与えないことが示唆された (図 90a)。

次に、Th2 型免疫応答の指標として IL-4、IL-5、IL-13 を測定した。その結果、C60-P 0.25、0.5、1 mg/kg 投与群においては、OVA 免疫によって誘導された IL-4、IL-5、IL-13 をいずれも抑制する傾向が認められた。なお、OVA 単独投与群と比較して、C60-P 2、4 mg/kg 投与群では、これら Th2 型サイトカインの産生に有意な変化を与えず、C60 投与群では投与量依存的に産生誘導する傾向が観察された。IL-4 により IgE が誘導されることから、C60-P によって血液中 IgE 抗体産生量が抑制された結果とも相関すると考えられる。一方で、先述の IgG1 では、0.5、1 mg/kg の C60-P 投与群は、抗体産生を抑制しておらず、同投与量で Th2 型サイトカインが抑制された結果と一致しなかった (図 90b, c, d)。

本現象に関して、例えば、IgE の誘導に IL-4 は必須であるが、IgG1 の誘導に IL-4 が必ずしも必要ではないことが報告されているなど、IgG1 と IgE は同じ Th2 型免疫応答として分類されているが、これら 2 者の産生誘導機構は異なることが示唆されている。そのため、Th2 型サイトカインの抑制現象と、IgE および IgG1 の抑制現象が単純には相関しなかった可能性が考えられる。さらに IgE 産生は、炎症刺激によって誘導される炎症性樹状細胞が所属リンパ節へ遊走することが必須である一方で、IgG1 産生にはこれら遊走は必要でないことも報告されている。そのため、C60-P の炎症抑制作用によって、炎症性樹状細胞が誘導されず、IgE が産生されなかった可能性が

考えられる。また、C60-P が B 細胞に直接作用して、Th2 型サイトカインを介した作用とは別に抗体産生を制御した可能性も考えられる。

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

C60 フラーレン誘導体の物性評価

粒子状物質は、特有の起炎性を有し、マクロファージ等を活性化することでアジュバント活性を発揮することが知られている。そのため、C60 や高用量の C60-P が凝集塊を形成しているのであれば、凝集塊としての性質によりアジュバント効果を発揮した可能性が考えられた。そこで、C60-P および C60 の各濃度における物性情報を収集した (図 91)。各 C60 フラーレンを DMSO に懸濁した後に溶媒に懸濁し、分散媒中の平均 2 次粒子径を Zetasizer で測定した。その結果、C60-P、C60 共に、有機溶媒である DMSO に一旦分散させたとしても、親水溶媒中では凝集することが示された。また、C60-P は高濃度では凝集していたものの、濃度を低下させるにつれて平均

2次粒子径が減少しており、濃度と2次粒子径に相関が認められた。一方で、C60は、濃度を低下させても2次粒子径に変化がなく、相関が見られなかった。なおZetasizerを用いて表面電荷を測定したところ、C60、C60-P共に負に荷電しており、ほとんど差を認めなかった。以上の結果を、前述の*in vivo*の結果と照らし合わせて考察すると、C60-Pそのものには獲得免疫抑制作用があるものの、高濃度にすることで凝集して起炎性を発揮し、その起炎性が抑制作用を上回ったという仮説が考えられる。本結果は、あくまでも投与試薬の凝集状態を評価した結果であり、今後、体内での分散状態も評価する必要はあるが、抑制作用を起炎性が上回るのは、3000 nm程度の凝集体を生じているときであると推察される。この仮説が正しければ、C60-Pの効果を最大限に享受するためには、より分散性を高めることが重要であるかもしれない。C60に関しては、先述のとおり、現段階では、獲得免疫抑制効果をもつか否かは定かではないが、生体内で凝集してアジュバント活性を発揮した可能性が考えられる。上記仮説に基づくならば、仮にC60の濃度をC60-Pと同程度まで薄めて実験に供したとしても、凝集状態が変わらないため起炎性を発揮し、C60-Pのような獲得免疫抑制作用が見られないのではないかと推察される。

C60 フラーレン誘導体の抗炎症メカニズムの基礎的解析

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

病原体が体内に侵入した場合、病原体のタンパク質などの抗原に対して特異的な抗体が産生される。さらに、病原体が排除された後も、B細胞やT細胞の一部が免疫記憶細胞として体内に残る

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

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

獲得免疫の主たる担い手は、抗体を産生するB細胞や、特異的な抗原のみを認識し、活性化するT細胞、およびこれらの働きを支える樹状細胞(DC)である。細菌などの病原体が体内に侵入すると、まずDCが病原体を取り込み、分解する。DCは、リンパ節へ移動し、ナイーブヘルパーT細胞集団に病原体断片を提示する。抗原に特異的な認識能を有するT細胞クローンは活性化・増殖