

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17890

研究課題名(和文) 化学修飾フラーレンナノ構造体による高機能性ワクチン輸送キャリアの構築

研究課題名(英文) Functional Vaccine Carriers by using Chemically Modified Fullerene Nanostructures

研究代表者

南 皓輔 (MINAMI, KOSUKE)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・NIMSポスドク研究員

研究者番号：10747463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ワクチンは、重篤な疾患の予防のみならず、がんの予防および治療にも有用であることから、近年では着目されている。従来の弱毒化した抗原では、疾患を誘発することに加え、がんの治療においては困難である。そこで、ワクチンの輸送試薬の開発が求められている。申請者は、抗酸化作用を有するとともに薬剤輸送能を有するフラーレンナノ構造に着目した。申請者は、化学修飾したフラーレン誘導体ライブラリを構築し、種々のナノ構造体の制御を行った。液液界面析出法を用いて様々な構造体を調製した。これらナノ構造体の一部は、細胞の足場材料として展開した結果、毒性を示さないことを明らかにした。ワクチン応用へ向けた生物実験へと展開している。

研究成果の概要(英文)：Vaccine has an emerging field for preventing serious diseases as well as for preventing and curing cancers. However, conventional vaccines have limitations for further applications. It is required that the carrier vehicles for effectively delivery of vaccines. We focused on the chemically functionalized fullerene nanostructures because of their properties as anti-oxidant and carrier for DDS. We synthesized the molecular libraries of chemically functionalized fullerene derivatives and precisely tuned their nanostructures. We used the liquid-liquid interfacial precipitation method for controlling fullerene nanostructures. We revealed that some of the fullerene library have applied for cellular scaffolds and showed no cytotoxicity. We are further investigating their properties to apply for vaccine carrier vehicles.

研究分野：有機合成化学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム フラーレン ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

エボラ出血熱が西アフリカで大流行する中、当該諸国のみならず我が国においても有効なワクチンの開発が急務となっている。その中で、生ワクチンや不活化ワクチンでは、病原ウイルス・細菌を用いるため、副作用など安全性において課題が多い。近年ではウイルスや細胞から抗原となる成分（コンポーネント）を抽出してワクチンとして応用する研究が広く進められているが、単独での投与では効果が期待されない。そこで、抗原を直接細胞質内へと送達するナノキャリアの開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、ナノキャリアの開発を目的として、毒性のない炭素材料、フラーレンに着目した。フラーレンは、歪んだπ共役系に由来する抗酸化作用により炎症を抑え、高い疎水性・凝集力による自己組織化能によりナノ構造体を形成することが期待されている。

3. 研究の方法

申請者は、フラーレンのナノ構造体を制御することに加え、高機能化した抗原輸送材料を開発するために、有機合成的に化学修飾したフラーレン誘導体ライブラリを構築する。置換基数や親水基の長さなどの異なる種々の両親水性フラーレン誘導体を合成し、それらの物理化学特性について詳細に評価する。また、超分子化学的手法により、そのナノ構造体制御と評価を行う。

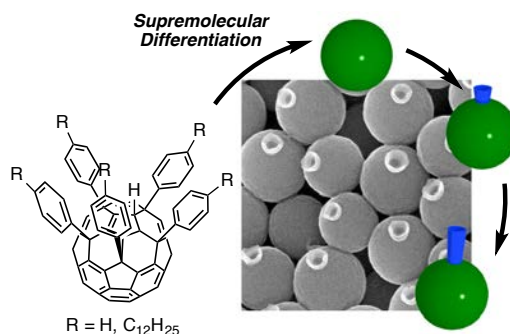
生体応用においては、まずフラーレン誘導体ライブラリの細胞毒性と細胞との相互作用について *in vitro* の系にて評価する。

4. 研究成果

[化学修飾フラーレンの階層的自己組織化制御]

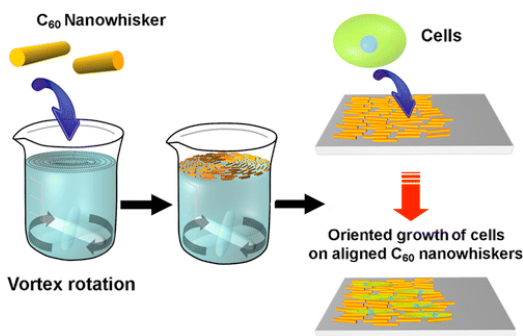
まず申請者は、置換基数や親水基の長さ・性質の異なる置換基を導入したフラーレン誘導体ライブラリを有機合成化学により構築した。その中で、中村らが報告している有機銅試薬を用いた二種類の五重付加型フラーレン (Nakamura E *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6364; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12850.)を合成し、そのナノ構造体の制御を検討した。ナノ構造体制御には、液液界面析出法を用いた。その結果、二種の混合比を変化させることにより、ナノ構造体の大きさを、液液界面での成長過程を制御することにより、階層的自己組織化機構をそれぞれ制御することに成功した。このような階層的自己組織化によるナノ構造体制御は、種々の機能を発揮させられることから、生体応用のみならず、種々の材料への展開が期待されている。

この研究成果は、既に国際雑誌に報告しており、国内学会にて発表している（「5. 主な発表論文等」内の雑誌論文2, 学会発表2）。



[フラーレンナノ構造体の配向制御とその生体応用]

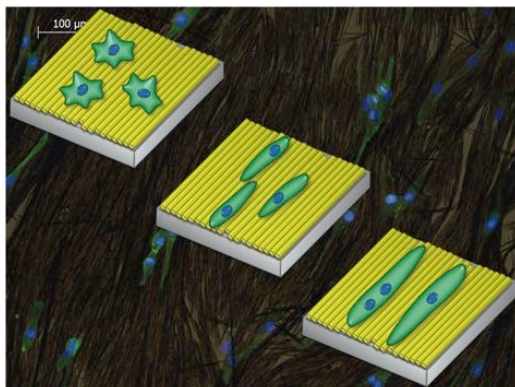
申請者は、フラーレンの一次元結晶を効果的に配向させることで、細胞足場材料へと応用した。高い疎水性を有しているフラーレンの自己組織化体は、気液界面において浮遊するため、ラングミュア・プロジェクト法を模倣することにより、ナノ構造体の配向を制御することが可能であることを見いだした。先の液液界面析出法により調製した分散の少ない一次元結晶 FNW の IPA 分散液を、気液界面にゆっくりと播くことにより FNW の膜を作成した。作成した膜を圧縮することにより配向を整え、ガラス基板へと転写した。各種顕微鏡観察により、FNW が転写した基板上面にて均質なパターンをもって配向していることを見いだした。一方で、ラングミュア・プロジェクト法は、簡便で汎用性の高い技術ではあるものの、専用の装置等を用いる必要があった。そこで、申請者はさらに簡便な Vortex 法というフラーレンナノ構造体の配向制御を開発した。攪拌した気液界面上に、FNW を播くことにより、界面の水流によりナノ構造体自体が配向するというもので、ガラス基板上に転写することにより、中心と円周とで異なる配向を作成することにも成功した。



これら均質な配向基板を用いることにより、細胞培養の足場として毒性がなく有用であることを示した。さらに、この配向基板が高い分化誘導能を有していることを明らかにした。この結果は、フラーレンナノ構造体

の生体応用可能性を高めるのみならず、再生医療・生体組織工学分野への応用可能性を示したものである。

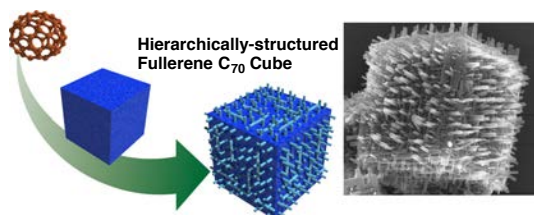
これらの研究成果は、すでに国際雑誌として報告しており、複数の国内外の学会にて発表している（「5. 主な発表論文等」内の雑誌論文4および6、学会発表1,3,4,5,6およびその他多数）。



#### [C70 フラーレンの階層的自己組織化制御]

申請者は C60 フラーレンのみならず、C70 フラーレンのナノ構造体制御についても行った。液液界面析出法により、溶媒を変化させることで、C60 の球状構造と異なり、楕円体構造を持つ C70 フラーレンの安定な結晶状態を変化させることで、階層的ナノ構造体形成制御を可能とした。立方体構造を有した準安定状態の C70 フラーレンのナノ構造を、異なる溶媒に再分散させると、表面において構造を変化させ、針状の構造を法線方向へと伸長させることを見いだした。この階層的自己組織化による複雑な C70 フラーレン結晶は、その表面積を著しく増加させ、種々の揮発性分子認識へと応用が可能であることも明らかにした。このような、高い表面積を有する構造体は、ドラッグデリバリーシステムにおいて、様々な分子を輸送することが可能であると考えられ、当初の目的であるワクチンのコンポーネント輸送材料としての応用へと展開している。

さらに、液液界面析出法の条件を変化させることにより、立方体構造に空孔を有するナノ構造体の構築にも成功した。液液界面析出法によるナノ構造体制御は、様々な応用面に対応して制御することが可能であることから、フルーレンを用いた生体応用への展開が期待されている。



この研究成果の一部は、既に国際雑誌に報告しており、残りの部分も現在投稿中である（「5. 主な発表論文等」内の雑誌論文1）。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 10 件）

1. Partha Bairi, Kosuke Minami, Jonathan P Hill, Waka Nakanishi, Lok Kumar Shrestha, Chao Liu, Koji Harano, Eiichi Nakamura, Katsuhiko Ariga  
“Supramolecular Differentiation of Constructing Anisotropic Fullerene Nanostructures by Time- Programmed Control of Interfacial Growth”  
*ACS Nano* 査読有, 2016, 10, 8796–8802.  
DOI: 10.1021/acsnano.6b04535
2. Partha Bairi, Kosuke Minami, Waka Nakanishi, Jonathan P Hill, Katsuhiko Ariga, Lok Kumar Shrestha,  
“Hierarchically- Structured Fullerene C<sub>70</sub> Cube for Sensing Volatile Aromatic Solvent Vapors”  
*ACS Nano* 査読有り, 2016, 10, 6631–6637.  
DOI: 10.1021/acsnano.6b01544
3. Venkata Krishnan, Yuki Kasuya, Qingmin Ji, Marappan Sathish, Lok Kumar Shrestha, Shinsuke Ishihara, Kosuke Minami, Hiromi Morita, Tomohiko Yamazaki, Nobutaka Hanagata, Kun’ichi Miyazawa, Somobrata Acharya, Waka Nakanishi, Jonathan P. Hill, Katsuhiko Ariga,  
“Vortex-Aligned Fullerene Nanowhiskers as a Scaffold for Orienting Cell Growth,”  
*ACS Applied Materials and Interfaces* 査読有り 2015, 7, 15667–15673.  
DOI: 10.1021/acsami.5b04811
4. Kosuke Minami, Yuki Kasuya, Tomohiko Yamazaki, Qingmin Ji, Waka Nakanishi, Jonathan P. Hill, Hideki Sakai, Katsuhiko Ariga,  
“Highly Ordered 1D Fullerene Crystals for Concurrent Control of Cellular Orientation and Differentiation Towards Large-Scale Tissue-Engineering,”  
*Advanced Materials* 査読有り 2015, 27, 4020–4026.  
DOI: 10.1002/adma.201501690
5. Hirohisa Nitta, Kosuke Minami, Koji Harano, Eiichi Nakamura  
“DNA Binding of Pentaamino[60]fullerene Synthesized using Click Chemistry,”  
*Chemistry Letters* 査読有り, 2015, 44, 378–380.

6. Katsuhiko Ariga, Kosuke Minami, Mitsuhiro Ebara, Jun Nakanishi  
“What are the emerging concepts and challenges in NANO? Nanoarchitectonics, hand-operating nanotechnology and mechanobiology,”  
*Polymer Journal* 査読有り 2016, 48, 371–389.  
10.1038/pj.2016.8

[学会発表] (計 12 件)

1. Kosuke Minami, Yuki Kasuya, Tomohiko Yamazaki, Qingmin Ji, Waka Nakanishi, Hideki Sakai, Katsuhiko Ariga,  
“Highly Ordered One-Dimensional Fullerene Whisker for Concurrent Control of Macroscopic Cellular Orientation and Differentiation,”  
The 2016 E-MRS Spring Meeting and Exhibit, P.2.3, Lille, France, 3 May 2016.
2. Kosuke Minami, Partha Bairi, Jonathan P. Hill, Waka Nakanishi, Lok Kumar Shrestha, Liu Chao, Koji Harano, Eiichi Nakamura, Katsuhiko Ariga  
“Supramolecular Differentiation for Construction of Anisotropic C<sub>60</sub> Nanostructures by Time-Programmed Control of Interfacial Growth”  
第 51 回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム, ポスター 2P-2, かでる 2・7, 北海道札幌市, Japan, 2016 年 9 月 8 日.
3. Kosuke Minami, Venkata Krishnan, Yuki Kasuya, Qingmin Ji, Tomohiko Yamazaki, Somobrata Acharya, Waka Nakanishi, Jonathan P. Hill, Katsuhiko Ariga  
“Vortex-directed alignment of one-dimensional fullerene crystals for orientation of cell growth,”  
The 2nd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, Poster No. 44, NIMS, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 29 July 2016.
4. Kosuke Minami, Yuki Kasuya, Tomohiko Yamazaki, Qingmin Ji, Waka Nakanishi, Jonathan P. Hill, Hideki Sakai, Katsuhiko Ariga  
“Concurrent control of macroscopic cellular orientation and differentiation by highly ordered 1D fullerene crystals”  
The 1st International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, Poster, NIMS, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 29 July 2016

5. Kosuke Minami, Yuki Kasuya, Tomohiko Yamazaki, Qingmin Ji, Waka Nakanishi, Hideki Sakai, Katsuhiko Ariga,  
“Highly ordered one-dimensional fullerene crystals for concurrent control of macroscopic cellular orientation and differentiation towards large-scale tissue engineering,”  
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), MTL5 1754, Honolulu, USA, 16 December 2015.

6. Kosuke Minami, Yuki Kasuya, Tomohiko Yamazaki, Qingmin Ji, Waka Nakanishi, Hideki Sakai, Katsuhiko Ariga,  
“Highly Ordered One-Dimensional Fullerene Crystals for Concurrent Control of Cellular Orientation and Differentiation,”  
The 6th Symposium on Carbon Nanomaterials Biology, Medicine and Toxicology (Satellite Symposium on The 16th International Conference on the Science and Application of Nanotubes (NT15)), Nagoya University, Nagoya, Japan, 2 June 2015.

[図書] (計 1 件)

“Drug Safety Monitoring for Liposomal Amphotericin B,” Eisei Noiri, Kosuke Minami, in *Kala Azar in South Asia*, Eisei Noiri, T. K. Jha Eds.; Springer, New York, 2017, 249–255.

[産業財産権]  
該当なし

[その他]  
ホームページ等

プレスリリース: 「超分子カーボン材料のパターン化による細胞の分化制御に成功～再生医療の実現にむけて、足場材料の大量積化を可能にする技術の開発～」

URL:  
[http://www.nims.go.jp/mana/jp/news\\_room/press/2015/2015060301.html](http://www.nims.go.jp/mana/jp/news_room/press/2015/2015060301.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 皓輔 (MINAMI, Kosuke)  
国立研究開発法人 物質・材料研究機構  
国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・  
NIMS ポスドク研究員  
研究者番号: 10747463