

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24680053

研究課題名(和文)メタボリック症候群の克服を目指した新規ナノメディシンの開発と有効性・安全性評価

研究課題名(英文)Development of novel nanomedicine for metabolic syndrome

## 研究代表者

吉岡 靖雄 (Yoshioka, Yasuo)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：00392308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ナノマテリアルの医療応用による、ナノメディシンとも言うべき新たな治療戦略に注目が集まっている。その中でも、C60フラレーンは、圧倒的な抗酸化活性に起因する抗炎症作用を有しており、ナノメディシンの筆頭として注目されている。本研究では、独自のC60フラレーンを用いて、メタボリックシンドロームを標的とした、非侵襲的(経口投与)で、しかも安全かつ有効なナノメディシンを開発することを試みた。その結果、C60フラレーン誘導体の経口投与により、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の症状が改善し得ること、そのメカニズムとして、抗炎症作用が起因している可能性を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Fullerene C60 derivatives are the most promising nanomaterials because of its unique ability to scavenge large numbers of free radicals. Therefore fullerene C60 derivatives with antioxidant effects have been expected to apply to the medicine for inflammatory disease. Here I showed that Fullerene C60 derivatives might be useful preventive therapeutics for metabolic syndrome.

研究分野：ナノ医薬

キーワード：ナノ粒子 フラレーン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ナノメートルサイズの物質(ナノマテリアル)が夢の新素材として続々と新規開発されている。ナノマテリアルは、従来までのサブミクロンサイズの物質には無い革新的機能を発揮するため、工学・薬学・医学分野において、21世紀産業の根幹を担う素材として期待されている。特に、ドラッグデリバリーシステムへの応用による、ナノメディシンとも言うべき新たな治療戦略に注目が集まっている。その中でも、炭素原子60個が切頂二十面体構造に結合したC60フラレーン(直径1 nm程度)は、“ラジカルスポンジ”とよばれるほど圧倒的な抗酸化活性に起因する抗炎症作用を有しており、ナノメディシンの筆頭として注目されている。申請者はこれまでに、C60フラレーンの経口投与が炎症性腸疾患に対して既存薬よりも圧倒的に優れた治療効果を発揮可能であることを先駆け明らかとしており、慢性炎症疾患に対する非侵襲的治療戦略となり得ることを提唱し、既に特許出願している。一方で近年、ナノマテリアル特有の物性に起因する革新的機能が、予期しにくい未知の毒性を発現してしまうことが世界的に強く危惧されており、ナノメディシン開発の足枷となっている。従って、C60フラレーンの医薬品化に向けては、いかに安全性を高度に確保するかが最大の焦点となっている。本観点から申請者は、ナノマテリアルの体内動態・安全性を詳細に評価することで、有効かつ安全なナノメディシンの開発支援に資する基盤情報の集積を図ってきた。その過程で、ナノマテリアルの表面電荷など物性を制御することで、ナノマテリアルの有用機能を保持しつつ、安全性の高いナノマテリアルを創製可能であることなどを先駆け見出ししており、有効かつ安全なナノメディシンの開発に資する基盤情報と捉えている。さらに、C60フラレーンは、過剰量の静脈内投与や経口投与においても、一般毒性や生殖発生毒性など特殊毒性を全く誘発しないなど安全性に優れていることをも既に見出ししている。

糖尿病、高血圧症、高脂血症が様々な組み合わせで同一個体に重積する症例が新しい疾患概念として問題視され、代謝異常症候群(メタボリック症候群/メタボリックシンドローム)と定義付けられている。メタボリックシンドロームは、本邦の全死亡者数の30%を占める脳血管障害、心血管障害といった動脈硬化性疾患の最大の原因であるばかりか数多くの成人病の元凶でもあり、日本においても約1000万人が罹患していると考えられている。近年、肥満が体内に微弱な慢性炎症を惹起し、全身のインスリン抵抗性に引き続き、メタボリックシンドロームを次々と誘発することが示唆され、メタボリックシンドロームを慢性炎症疾患として捉える必要性が

提唱されている。即ち、肥満時の脂肪組織においては、マクロファージなどの免疫細胞が多数浸潤しており、活性酸素の産生を起点として、炎症性サイトカインが産生されることで、脂肪組織の恒常性破綻を誘発するとともに、インスリン抵抗性を惹起している。従って、強力な抗酸化剤、抗炎症剤が有効な治療薬になり得ると期待されているが、未だにメタボリックシンドロームに適用した報告は無い上、慢性炎症疾患として捉えた研究開発も乏しいのが現状である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、メタボリックシンドロームを慢性炎症疾患として捉える新たな概念のもと、申請者ら独自のC60フラレーンの慢性炎症疾患に対する非侵襲的治療戦略を進展させることで、『メタボリックシンドロームを標的とした、非侵襲的(経口投与)で、しかも安全かつ有効なナノメディシン』を開発することを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物モデル

Balb/c マウスにコリン欠乏食(CDAA 食)を自由に摂食させることで、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)を誘導した。CDAA 食は、肝臓で脂肪をリポ蛋白に変えるのに必要なコリンを欠損した餌である。そのため、肝臓に脂肪が蓄積し、脂肪肝を誘発することから、NAFLD モデルマウスの作成に頻りに用いられる。

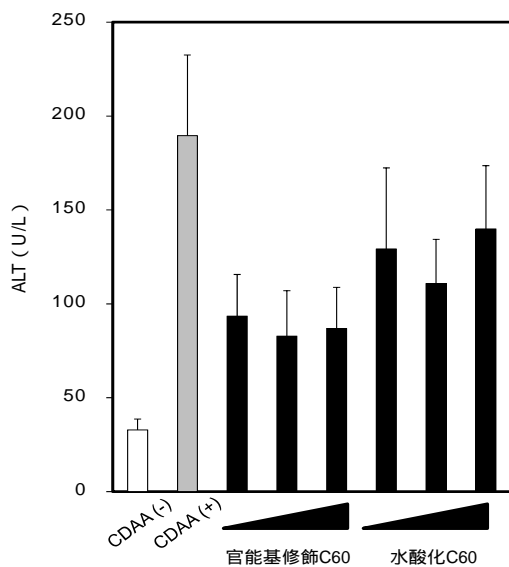
### (2) C60 フラレーンの投与

NAFLD を誘導する際、C60 フラレーンをマウスに連日、強制経口投与した。なお、C60 フラレーンは、1、5、25 mg/kg で投与した。また、水酸基が修飾された水酸化C60 フラレーンと共に、ある官能基で修飾されたC60 フラレーンを用いた。官能基修飾C60 フラレーンについては、溶解性は水酸化C60 フラレーンには劣るものの、マクロファージを用いた炎症抑制評価、獲得免疫抑制評価などにより、強い抗炎症作用、免疫抑制作用を有することを本研究で明らかとしている(本報告書ではその詳細は割愛)。また、官能基修飾C60 フラレーンの溶解性を向上させる目的で、実用化されている様々な可溶化剤を用いた検討も本研究で実施したが、現段階では、官能基修飾C60 フラレーンの溶解性を十分に向上させることはできていない。そのため、若干凝集してしまい、その粒子径は数百 nm であろうと考えている(本報告書ではその詳細は割愛)。その後、体重推移、肝臓重量、血球検査、生化学検査などを実施することで、C60 フラレーンの効果を検証した。

#### 4. 研究成果

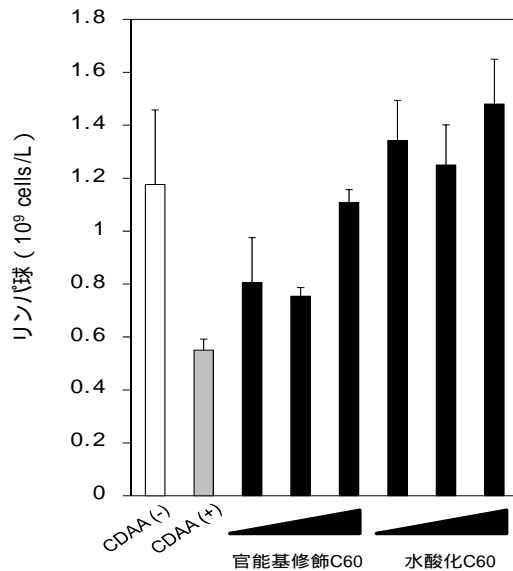
本検討では、上述した通り、水酸化 C60 フラーレンと官能基修飾 C60 フラーレンを用いて検討した。個々に、溶解性や炎症抑制効果などでメリット、デメリットがあり、本研究においても詳細な検討を実施したが、本報告書では詳細は割愛させて頂く。

マウスに CDAA 食を摂食させると共に、C60 フラーレンを強制経口投与し、体重推移を観察した。その結果、いずれの群においても有意な差は観察されなかった。また、摂餌量の検討も試みたが、CDAA 食の形状の問題もあり、正確な解析をすることができなかった。次に、解剖し、組織重量を測定した。その結果、C60 フラーレン投与群において、有意差は認められないものの、若干、肝臓重量が増加する傾向が認められた。C60 フラーレンを単独で経口投与した場合には、肝臓重量の増加は認められないことを明らかとしていることから、C60 フラーレンの毒性とは考えにくい。そのため、詳細は今後、検討する必要があると考えられた。肝毒性の指標である ALT、AST を測定したところ、CDAA 食群では、未処理群と比較して有意な増加が観察された。一方で、C60 フラーレン投与群においては、いずれの群においても、CDAA 食投与群と比較して、有意な減少が観察された。また、BUN についても、同様に減少が観察された。また、ALT については、官能基修飾 C60 フラーレン投与群において、水酸化 C60 フラーレン投与群と比較して、減少傾向が認められた。以上の結果から、C60 フラーレンが脂質のラジカル化を抑制することにより、脂肪酸ラジカルによる肝臓細胞の障害を抑制した等の可能性が示唆された。



次に、血中の生化学検査を実施したところ、群間の総ビリルビン、直接ビリルビンに有意な変化は認められなかった。また、血球検査

を実施したところ、CDAA 食群でリンパ球数の減少が観察されたが、C60 フラーレン投与群で、回復することが認められた。以上の結果から、C60 フラーレンの経口投与により、CDAA 食による NAFLD 様症状が改善される傾向が観察された。一方で、C60 フラーレンは、溶解性に乏しく、サンプル調整法により、実験の再現性が取れにくいことも多々ある。本検討においても、そのような結果を得ており、水溶性の改善が必須と考えている。本観点から、実用化されている複数の試薬を用いて、C60 フラーレンの水溶性改善を試みたが、未だ、完全に分散可能な試薬を見出すには至っていない。今後、溶解性・凝集性の改善が、課題になると考えている。



C60 フラーレンが NAFLD モデルマウスに対して効果を発揮するものと予想されたことから、C60 フラーレンの抗炎症効果が起因したと仮定し、*in vivo* においてその抗炎症効果を検証した。C60 フラーレンを C57BL/6 マウスの腹腔内へ前処置し、30 分後に LPS を腹腔内投与することにより、エンドトキシンショックを誘導した。LPS 投与時から経時的に採血し、血中の TNF- $\alpha$ 、IL-6 量を指標として水酸化フラーレンの抗炎症効果を評価した。その結果、水酸化フラーレン投与群において、2 時間後の血中 TNF- $\alpha$  量が、未処置群や未修飾フラーレン投与群と比較して有意に減少することが明らかとなった。一方で、IL-6 産生量に有意な差は認められなかった。以上の結果から、今後、他のサイトカインについても評価する必要があるものの、水酸化フラーレンは、*in vivo* においても抗炎症作用を発揮可能であることが示された。

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2件)

Yamashita K, Yoshioka Y, Pan H, Taira M, Ogura T, Nagano T, Aoyama M, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda SI, Aoshima H, Nabeshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y. Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone-wrapped fullerene C60 after oral administration. Pharmazie. 2013 Jan;68(1):54-7. (査読有)

Yamashita T, Yamashita K, Nabeshi H, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Carbone nanomaterials: efficacy and safety for nanomedicine. Materials. 5: 350-363, 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計13件)

スペースの関係で、5件のみを記載する。

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(東京), 2014年7月.

吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 佐上公一, 植村瑛一郎, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: 新規ナノ医薬の開発に向けた C60 フラーレンの T細胞への影響評価., 日本薬学会第134年会., 熊本(熊本), 2014年3月.

吉岡靖雄, 平 茉由, 山下浩平, 青島央江, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: 新規経口ナノ DDS 医薬の開発に向けた C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の Nano-Safety Design., 第29回日本 DDS 学会学術集会., 京都(京都), 2013年7月.

平 茉由, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 山下浩平, 小椋健正, 青山道彦, 加藤美保, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 水酸化フラーレンのナノ安全科学評価と経口サブナノ医薬への展開 1 in vitro における細胞毒性及び抗炎症作用の検討 ., 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮(兵庫), 2012年10月.

平 茉由, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 山下浩平, 角田慎一, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 吉川友章, 堤 康央: 水

酸化フラーレンのナノ安全科学評価と経口サブナノ医薬への展開 1～in vitro における抗炎症作用の評価～., 第28回日本 DDS 学会学術集会., 札幌(北海道), 2012年7月.

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 靖雄 (YOSHIOKA, Yasuo)  
大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤)  
研究者番号: 00392308

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し