

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	Hasan Babazada
論文題目	Development of heparin nanoparticles: synthesis, physicochemical/biochemical characterization and application to arthritis therapy (へパリンナノ粒子の開発：合成、物理化学的・生物学的評価と関節炎治療への応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>Toll-like receptor 4 activated transcription factor nuclear factor κB (TLR4–NF-κB) signaling pathway was shown to play a critical role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis mediated by pro-inflammatory cytokines in arthritic synovium. Signaling stimulated by TLR4 ligands induces proinflammatory cytokine expression from TLR4-overexpressing cells such as macrophages, dendritic cells and fibroblasts in arthritic joints. Systemic inhibition of these cytokines with biologic drugs is effective as a short-term treatment but might also suppress the whole immune system and increase infection risk. Thus targeting TLR4 might be more selective approach to suppressing inflammation. Self-assembling heparin nanoparticles have attracted much attention as promising drug carriers for various drugs, genes and imaging agents. In addition to low toxicity and high biocompatibility like other materials, heparin has a variety of biological activities beyond the anticoagulation. The biological properties of heparin can provide additional activity towards the particulate carrier systems. This study demonstrates that self-assembling nanoparticles composed of heparins conjugated with D-erythro-sphingosine are selective TLR4 antagonists and have much greater anti-inflammatory activity than native heparin <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>. This implicates that the heparin nanoparticles are not only expected as a drug carrier but also as an anti-inflammatory drug itself.</p> <p>Chapter I Synthesis and physicochemical characterization of heparin/D-erythro-sphingosine nanoparticles</p> <p>Self-assembling nanoparticles composed of glycol-split heparin/D-erythro-sphingosine conjugates (NAHNP) were synthesized by carbodiimide cross-linking chemistry. Chemical structure of the conjugates was confirmed by ^1H NMR. The conjugates provided spherical self-assemblies in water with mean diameters in a range of 110-160 nm. Size of particles tends to decrease with increasing degree of substitution of D-erythro-sphingosine. Nanoparticles had a highly negative zeta-potential presumably due to sulfo groups of heparins. The critical micellization concentration was relatively lower depending on the degree of substitution. Partitioning coefficient of pyrene between the micellar and aqueous phases indicated that increasing degree of substitution of D-erythro-sphingosine makes an inner core of self-assemblies more hydrophobic. Nanoparticles comprising higher substituted lipid conjugates could form more stable self-assemblies, and thus might be more promising candidates for <i>in vivo</i> drug delivery and therapeutics.</p>			

Chapter II

Characterization and implications for anti-inflammatory effect of heparin nanoparticles *in vitro*

Unlike native heparin, nanoparticles significantly inhibited *E. coli* lipopolysaccharide (LPS)-induced production of pro-inflammatory cytokines in both primary mouse macrophages and DC2.4 dendritic cell line. *In vitro* experiments of the underlying mechanism using mouse macrophages suggested the inhibitory effect of nanoparticles was due to downregulation of MyD88-dependent NF- κ B signaling via TLR4 but not other TLRs. Effect of NAHNP was higher than native heparin nanoparticles (HPNP) indicating that glycol-splitting of non-sulfated uronic acids increases anti-inflammatory activities of particles. Experiments using nanoparticles of desulfated heparins suggested that 6-O-sulfate groups of D-glucosamine residue was essential for effective inhibition, while removal of 2-O-sulfo and 3-O-sulfo groups as well as replacement of N-sulfo groups with N-acetyl unaltered anti-inflammatory activity. In addition, comparisons among different aliphatic amine-heparin conjugates suggested that decrease in alkyl chain length of NAHNP resulted in loss of inhibitory activity.

Chapter III

Anti-inflammatory effect of heparin/D-erythro-sphingosine nanoparticles on type II collagen-induced arthritis in mice

Rheumatoid arthritis is a chronic, systemic inflammatory disease, which damages synovium and leads to destruction of cartilage and bone loss. In arthritis synovium the generation of cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β regulated by NF- κ B is pivotal in the pathogenesis of the disease. Type II collagen (CII)- induced arthritis was developed in DBA/1J mice by subcutaneous immunization with CII emulsified in complete Freund's adjuvant and boosted intraperitoneally with CII emulsified in incomplete Freund's adjuvant. Heparin nanoparticles were administered by intraarticular injections once per day starting from onset of the disease. Intraarticular administration of NAHNP to type II collagen-induced arthritis mice significantly suppressed progression of the disease from the onset of arthritis symptoms. Pharmacological activity of the nanoparticles was associated with suppression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in joints and sera, as well as decreased levels of circulating auto-antibodies. Nuclear localization of RelA *in vivo* was significantly inhibited in NAHNP treatment. These results suggest that selective inhibition of TLR4–NF- κ B signaling with hydrophobically modified heparin derivatives composited to nanostructures provides an effective therapeutic approach to inhibit chronic inflammation in an animal model of rheumatoid arthritis.

In conclusion, novel heparin derivatives with self-assembling properties were developed, demonstrating their anti-inflammatory effects mediated through the inhibition of the TLR4–NF- κ B pathway. This is the first research showing the hydrophobically modified heparin derivatives function as TLR4 antagonists, in addition to uncovering their structure-activity relationship. Moreover, heparin nanoparticles were found to suppress inflammation of CII-induced murine arthritis model. These results provide a new option of drug delivery and therapeutics against rheumatoid arthritis.

(論文審査の結果の要旨)

toll-like receptor 4 (TLR4)シグナルで活性化されるnuclear factor κ B (TLR4—NF- κ B)経路は、炎症性サイトカインによって惹起されるリウマチ性関節炎の発症に重要な役割を果たしている。実際に、TLR4リガンドが関節内のマクロファージ、樹状細胞、線維芽細胞などTLR4過剰発現細胞を刺激し炎症性サイトカインの発現を誘導することが知られている。現在のリウマチ治療では、全身的に炎症性サイトカインを抑える生物学的製剤が有効とされているが、免疫系の抑制による感染の誘導などの危険性を孕んでいる。これに対し、TLR4を標的とするアプローチは炎症性関節炎に対してより選択性の高い治療法となることが期待される。自己会合したヘパリンナノ粒子は、これまで薬物、遺伝子或いはイメージングプローブのキャリアとして注目されてきたが、ヘパリンは、抗凝固作用以外にも多様な生物活性を有しており、キャリアとしての応用を超えた新規活性の創出につながる可能性を秘めている。申請者は、ヘパリンとD-erythro-sphingosine (D-ES)の結合体が自己組織化して形成するナノ粒子が、TLR4の特異的アンタゴニストとして作用し、ヘパリンを上回る抗炎症作用を示すことを明らかにし、薬物キャリアとしてのみならず、抗炎症薬としても優れた機能を持つことを証明した。

本研究では、グリコール結合を開裂させて抗凝固活性を低下させたヘパリンに、D-ESをカルボジイミド法により縮合させた結合体を水中で自己会合させて直径110-160 nmのナノ粒子 (NAHNP)を調製した。本ナノ粒子は、硫酸基の存在により負のゼータ電位を示し、ヘパリンに対するD-ESの置換度を上げると、粒子径は縮小、内核の疎水性は増大し、臨界ミセル濃度は低下した。以上の結果より、D-ES置換度の高いヘパリン-脂質結合体を素材とした用いたナノ粒子が優れた安定性を示し、薬物キャリアあるいは新規薬理活性材料として有望であることが示唆された。

次に、NAHNPの抗炎症活性をin vitroでマウスの誘導マクロファージあるいは樹状細胞株を用い評価した。NAHNPは、lipopolysaccharide (LPS)による炎症性サイトカインの誘導を著しく阻害し、その機構がTLR4を介したMyD88依存的なNF- κ B経路のダウンレギュレーションであり、他のタイプの toll-like receptor (TLRs)は関与しないことが示された。また、NAHNPの効果は未修飾ヘパリンD-ES結合体から成るナノ粒子 (HPNP)よりも大きく、ウロン酸の1,2-グリコールの開裂が、抗炎症効果を増大させることが示された。また、硫酸基の位置と活性の相関を検討した結果、D-グルコサミンの6-O位の硫酸基は活性発現に必須であるが、2-O位あるいは3-O位の硫酸基、さらにN-硫酸基は抗炎症活性に影響しないことが明らかとなった。また、脂質部分の構造の影響を検討した結果、アルキル鎖の短縮が活性低下につながることを示された。

続いて、II型コラーゲン誘発マウス関節炎モデルにおいてNAHNPの治療効果を評価した。リウマチ性関節炎では、NF- κ Bの関与のもとに滑膜において産生されるTNF- α 、IL-6、及びIL-1 β が重要な役割を果たしている。NAHNPの関節内注射は、DBA/1Jマウスに

type II collagenで免疫感作して発症させたリウマチ性関節炎の発症及び進展を著しく抑制し、その効果は関節内及び血漿中の炎症性サイトカインの産生の抑制とよく対応した。また、NAHNPの投与が核内RelA量を減少させたことから、TLR4—NF- κ Bシグナル伝達の抑制が、NAHNPのリウマチ性関節炎の抑制に大きく関与していることが証明された。

以上、申請者は自己会合によりナノサイズの粒子を形成するヘパリン脂質結合体に着目し、その構造を最適化して、リウマチ性関節炎の抑制に優れた活性を示す新規ナノ粒子製剤を開発するとともに、その作用機序がTLR4—NF- κ B経路の抑制によることを証明した。これらは、リウマチ性関節炎の治療を目指した治療薬あるいは薬物送達システムの開発に有用な基礎的知見を提供するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年8月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降