

(続紙 1)

京都大学	博 士（薬学）	氏 名	柳本 真弥
論文題目	グリコサミノグリカン-ステアシルアミン結合体の抗炎症効果と接触性皮膚炎治療への応用に関する研究		
（論文内容の要旨） 接触性皮膚炎は化学物質や金属などのハプテンにより引き起こされる遅延型のアレルギーであり、その症状は掻痒感に加え紅斑や丘疹など外見の変化を伴うため、患者のQOLを大きく損なうことも少なくない。接触性皮膚炎に対する現在の治療としてはステロイド外用療法が主であるが、長期連用による皮膚の菲薄化などの副作用が問題となっている。接触性皮膚炎の発症メカニズムは依然として未解明であるが、Toll様受容体(TLR)やNod様受容体などを介した自然免疫の活性化とそれに伴う過剰な炎症反応の関与が近年の研究から示唆されている。 申請者が所属する研究室では、ヘパリン(HP)糖鎖のウロン酸部位を開環したHP誘導体と脂肪族アミンの結合体が、通常のHPよりも強力にTLR4の活性化を阻害し、コラーゲン誘発性関節リウマチモデルマウスにおいて関節炎の進行を顕著に遅らせることを明らかにした。申請者は、種々のグリコサミノグリカン(GAG)がHPと同様に抗炎症作用を有する点に着目し、自己組織化する脂肪族アミンとの結合体への誘導による作用増強の可能性の有無と構造活性相関について検討するとともに、最も高い効果を示した低分子量ヘパリン-ステアシルアミン結合体の接触性皮膚炎に対するin vivo治療効果を評価した。以下、これらの研究成果について2章にわたって論述する。			
第一章 各種グリコサミノグリカン-ステアシルアミン結合体の合成とin vitro抗炎症効果の評価 コンドロイチン硫酸(CS)やヒアルロン酸(HA)は、HPと同様に、TLR4リガンドであるリポポリサッカライド(LPS)の刺激による炎症反応に対して抑制効果を示すことが知られている。これらのGAGに対しても脂肪族アミンとの結合体化による抗炎症効果の増強を期待し、ウロン酸部位を酸化的開環したのち疎水性側鎖としてステアシルアミンを縮合させた結合体を合成した。CSおよびHAの結合体は、HPの場合と同様自己組織化によるナノミセルを形成し、得られた粒子の大きさや電荷はいずれの結合体でもほぼ同等であった。一方、LPS刺激したマウス腹腔マクロファージからのTNF-α産生を指標に各結合体の抗炎症効果を評価したところ、HP結合体の場合に最も高く、CS、HA結合体の順に弱くなった。この傾向はGAGの硫酸化度と対応しており、過去の検討において			

HPの6位硫酸基を脱硫酸化した際に抗炎症効果が減弱したことと併せて考えると、GAGの硫酸化度が抗炎症効果の発現に関与する可能性が示された。また、低分子量HP(LMWH)を用いて同様の結合体化を行ったところ、未分画HPの結合体に比べ高いTNF- α 産生抑制効果が得られ、GAGの分子量も抗炎症作用を決定する因子の一つとなることが示唆された。

第二章 接触性皮膚炎モデルマウスにおける低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体の治療効果の評価

接触性皮膚炎の発症にはTNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインの産生に伴う炎症反応に関わり、その原因の一つとしてTLRの関与が示唆されている。実際TLR4を刺激するLPSや熱ショックタンパク質が接触性皮膚炎モデルマウスにおける炎症を増悪させること、抗菌ペプチドであるカテリシジンがTLR4阻害により接触性皮膚炎に対する治療効果を示すことが報告されてきた。そこで、GAG誘導体の接触性皮膚炎への治療応用の可能性を評価するため、前章の検討で最も抗炎症効果が高かったLMWH-ステアリルアミン結合体を対象とし、2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)により誘発される接触性皮膚炎モデルマウスを用いて検討を行った。0.3% DNFB溶液で耳介部を再感作する2時間前に0.5% LMWH結合体含有マクロゴール軟膏を塗布したマウスにおいては、炎症によるマウス耳介の肥厚がプラセボ群に比べ有意に減少した。また、耳介組織中のTNF- α やIL-1 β 、および酸化ストレスマーカーであるHO-1のmRNA発現量が有意に低下することも観察された。一方、TLR4に変異のあるC3H/HeJマウスにおいて同様の検討を行ったところ、DNFBによる炎症は惹起されるもののLMWH結合体による有意な抑制効果は観察されず、LMWH結合体がTLR4の刺激に関与するDNFB誘発性接触性皮膚炎を抑制していることが示唆された。

以上、申請者は、自己組織化する脂肪族アミンとの結合体への誘導による抗炎症効果の増強がHPに限らず種々のGAGで観察されること、またその効果はGAGの主鎖構造や分子量に依存することを明らかにした。さらに、DNFB誘発性接触性皮膚炎モデルマウスを用いた検討により新たな治療応用の可能性を開拓した。以上で得られた知見は、TLR4が関与する炎症性疾患へのGAGおよびその誘導体の治療応用について有益な基礎的情報を提供するものと考えている。

(論文審査の結果の要旨)

接触性皮膚炎は化学物質や金属などのハプテンにより引き起こされる遅延型のアレルギーであり、患者のQOLを大きく損なうことも少なくない。接触性皮膚炎の発症メカニズムは未解明であるが、Toll様受容体(TLR)やNod様受容体などを介した自然免疫の活性化とそれに伴う過剰な炎症反応の関与が示唆されている。申請者は、ヘパリン(HP)糖鎖のウロン酸部位を開環したHP誘導体と脂肪族アミンの結合体が通常のHPよりも強力にTLR4の活性化を阻害するという過去の知見を踏まえ、HPと同様に抗炎症作用を有する種々のグリコサミノグリカン(GAG)を脂肪族アミンと結合させ、その抗炎症作用を検討するとともに接触性皮膚炎に対するin vivo治療効果を評価した。

コンドロイチン硫酸(CS)やヒアルロン酸(HA)は、HPと同様にTLR4リガンドであるリポポリサッカライド(LPS)の刺激による炎症反応に対して抑制効果を示すことが知られている。そこで、これらのGAGに対してもウロン酸部位を酸化的開環したのち疎水性側鎖としてステアリルアミンを縮合させた結合体を合成した結果、CSおよびHAの結合体はHPの場合と同様自己組織化によるナノミセルを形成し、得られた粒子の大きさや電荷はいずれの結合体でもほぼ同等であった。一方、LPS刺激したマウス腹腔マクロファージからのTNF- α 産生を指標に各結合体の抗炎症効果を評価したところ、HP結合体の場合に最も高く、CS、HA結合体の順に弱くなった。この傾向はGAGの硫酸化度と対応しており、過去の知見と併せてGAGの硫酸化度が抗炎症効果の発現に関与する可能性が示された。また、低分子量HP (LMWH)を用いて同様の結合体化を行ったところ、未分画HPの結合体に比べさらに高いTNF- α 産生抑制効果が得られ、GAGの分子量も抗炎症作用を決定する因子の一つとなることが示唆された。

次に、以上で最も抗炎症効果が高かったLMWH-ステアリルアミン結合体を対象とし、2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)により誘発される接触性皮膚炎モデルマウスを用いて治療効果の検討を行った。0.3% DNFB溶液で耳介部を再感作する2時間前に0.5% LMWH結合体含有マクロゴール軟膏を塗布した結果、炎症によるマウス耳介の肥厚がプラセボ群に比べ有意に減少した。また、耳介組織中のTNF- α やIL-1 β 、および酸化ストレスマーカーであるHO-1のmRNA発現量が有意に低下することも観察された。一方、TLR4に変異のあるC3H/HeJマウスにおいて同様の検討を行ったところ、DNFBによる炎症は惹起されるもののLMWH結合体による有意な抑制効果は観察されず、LMWH結合体がTLR4の刺激が関与するDNFB誘発性接触性皮膚炎を抑制していることが示唆された。

以上、申請者は、自己組織化する脂肪族アミンとの結合体への誘導による抗炎

症効果の増強が種々の GAG で観察されること、またその効果は GAG の主鎖構造や分子量に依存することを明らかにした。さらに、DNFB 誘発性接触性皮膚炎モデルマウスを用いた検討により新たな治療応用の可能性を証明した。以上で得られた知見は、TLR4 が関与する炎症性疾患への GAG およびその誘導体の治療応用について有益な基礎的情報を提供するものと考ええる。

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 29 年 2 月 23 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。