

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

(要約)

2016

柳本 真弥

目 次

総論の部

緒言	1
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 <i>in vitro</i> 抗炎症効果の評価	2
第一節 各種グリコサミノグリカン-ステアシルアミン結合体の物理化学的 性質	3
1-a 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	
1-b 粒子径およびゼータ電位の測定	
1-c 臨界ミセル濃度の測定	
第二節 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	5
2-a 各種グリコサミノグリカン-ステアシルアミン結合体の細胞傷害性の 評価	
2-b LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生に対する抑制効果の評価	
2-c 各種 Toll 様受容体リガンド刺激によるサイトカイン産生に対する抑制 効果の評価	
第三節 考察	10
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- ステアシルアミン結合体の治療効果の評価	13
結論	14
謝辞	16
実験の部	17

総論の部

緒言

Toll 様受容体 (Toll like receptor: TLR) は自然免疫を担う受容体の一種であり、細菌成分やウイルス由来 DNA、タンパク質などに含まれる一定の配列を認識するパターン認識受容体である¹⁻³⁾。これまでに、1-13 までのサブタイプが同定されているが、そのうちの TLR4 はグラム陰性菌の外膜構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) を認識することが知られている^{1, 4, 5)}。TLR4 が LPS により刺激されると、アダプタータンパクである MyD88 が活性化され、腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor: TNF)- α や interleukin (IL)-6 などの炎症性サイトカインの産生が亢進し炎症反応が惹起される。近年、LPS 以外にも生体内のタンパク質や脂肪酸が TLR4 の内因性リガンドとして働くことが明らかにされており、種々の炎症性疾患や自己免疫性疾患に関与することが示唆されてきた⁶⁻⁹⁾。TLR4 アンタゴニストはそれら疾患に対する有効な治療薬になり得るとされ、これまでも resatorvid (TAK-242) や eritoran (E5564) などが開発されており、様々な *in vivo* 疾患モデルでの治療効果が報告されている¹⁰⁻¹³⁾。

著者の所属する薬品動態制御学分野では、ヘパリン (HP) の糖鎖の一部を切断した低抗凝固作用 HP に D-エリスロスフィンゴシンを縮合させた HP 誘導体が LPS 活性化マクロファージからの炎症性サイトカインの産生を通常の HP に比べ強力に阻害することを明らかにした^{14, 15)}。また、ヘパリン誘導体は LPS の刺激に対し TLR4 の下流にある IRAK-1 のリン酸化や I κ B α の分解および、NF- κ B の核内への移行を抑制したことから、TLR4 シグナル伝達経路を抑制すると考えている¹⁴⁾。さらに、LPS 刺激に対する炎症性サイトカイン産生抑制効果の構造活性相関に関する検討から、その効果は HP 骨格中の一部の硫酸基の有無に左右され、主鎖骨格の構造が効果発現の決定因子になると考えられた。そこで著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^{16, 17)}、GAG に脂肪族アミンを縮合させた結合体を合成し、これらの炎症性サイトカイン産生抑制作用増強の有無と構造活性相関について検討することで、より効果的な GAG 誘導体の探索を行うとともに、*in vivo* 治療応用として接触性皮膚炎モデルマウスにおける治療効果の評価を行った。

以下、2章にわたり得られた知見を論述する。

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

グリコサミノグリカン(GAG)は直鎖状の高分子であり、生体内では細胞の接着やシグナル伝達など重要な役割を担っている¹⁸⁾。HPはD-グルクロン酸もしくはL-イズロン酸とD-グルコサミンの繰り返し構造からなる直鎖状の高分子であり、糖鎖OH基が高度に硫酸化されている¹⁹⁾。HPの主な生理作用としてはアンチトロンビンの活性化による抗凝固作用がよく知られているが²⁰⁾、血管新生抑制作用や抗炎症作用があることも明らかにされている¹⁹⁾。また、コンドロイチン硫酸(CS)はD-グルクロン酸とNアセチルD-ガラクトサミンが繰り返し結合したGAGであり^{19, 21)}、主に変形性関節炎に対し痛みの軽減や機能改善を目的に臨床で使用されている^{22, 23)}。ヒアルロン酸(HA)は、D-グルクロン酸とNアセチルD-グルコサミンが繰り返し結合しており^{19, 21)}、滑膜保護や創傷治癒効果があることが報告されている^{24, 25)}。このようにGAGはそれぞれに固有の生理活性を持つものの、共通して抗炎症効果を持つことが明らかにされている。実際、HPやCS、HAがLPSの刺激によって起こるMyD88やp38MAPK、NF- κ Bの活性化を抑制し炎症性サイトカインの産生を抑制することが種々の細胞²⁶⁻³⁰⁾や動物モデル^{31, 32)}で明らかにされている。

Babazadaらは、HP糖鎖のウロン酸部位を開環したHPにD-エリスロスフィンゴシンを縮合させたHP誘導体(Non-anticoagulant heparin nanoparticle: NAHNP)が通常のHPより遥かに強力にLPS刺激による炎症性サイトカインの産生を抑制することを報告している¹⁴⁾。さらに、その構造活性相関に関する検討で、HP骨格中における2位またはN位の硫酸基を脱硫酸化しても炎症性サイトカイン産生抑制効果に大きな変化が認められないものの、6位の硫酸基を脱硫酸化した際にはその効果が顕著に低下することを明らかにした。従って、炎症性サイトカインの産生抑制効果は主鎖骨格であるGAGの構造に大きく影響を受けると考えられた。これらの知見を基に著者は、HP同様にLPS刺激に対し抗炎症効果を持つ他のGAGに脂肪鎖を導入することで、より効果の優れたGAG誘導体を開発できるのではないかと考えた。そこで、第一章では、HPに加えCS、HAに脂肪鎖としてステアシルアミンを導入したGAG-ステアシルアミン結合体を新たに合成し、その*in vitro* 抗炎症効果について検討を行った。さらに低分子量ヘパリン(LH)を用いて、分子量が及ぼす影響についても併せて検討を行った。

第一節 各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の物理化学的性質

GAG を薬物キャリアとして利用するにあたっては、GAG に疎水基を導入することで両親媒性とし自己会合性のミセルを形成させる例が多数報告されている³³⁻³⁸)。Babazada らは NAHNP が直径 110 nm 程度の粒子を形成し、HP 由来の負電荷を帯びていることを報告している¹⁴)。GAG-ステアリルアミン結合体はその表面を主鎖骨格である GAG に覆われるため、その物理化学的性質は GAG の種類間で異なる可能性も考えられた。そこで本節では、各種 GAG-ステアリルアミン結合体の合成を行うとともに、粒子径ならびに表面電荷に関する評価を行った。

1-a 各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の合成

Babazada らは、NAHNP の合成にあたり、ウロン酸のジオール結合を切断すると炎症性サイトカインの産生抑制効果が増大することを報告した¹⁴)。そこで本検討でも同様にグリコール結合の開裂を行うこととし、まず各種 GAG を過ヨウ素酸によりウロン酸のジオール結合を酸化開裂させた後、水素化ホウ素ナトリウムにより還元した。さらに、これらグリコール開裂 GAG のカルボキシル基を 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸(EDC)により活性化させた後、ステアリルアミンと反応させることで、各種 GAG-ステアリルアミン結合体を合成した(Fig. 1.2)。

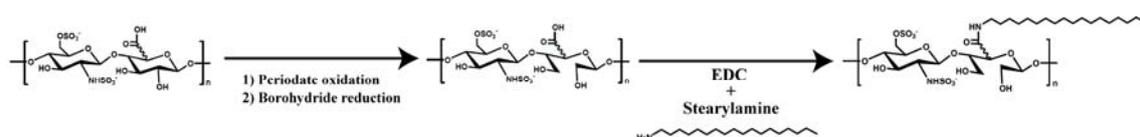


Fig.1 Schematic illustration of the preparation of glycol-split glycosaminoglycan-stearylamine conjugate.

Glycol-split heparin stearylamine conjugate is illustrated as an example.

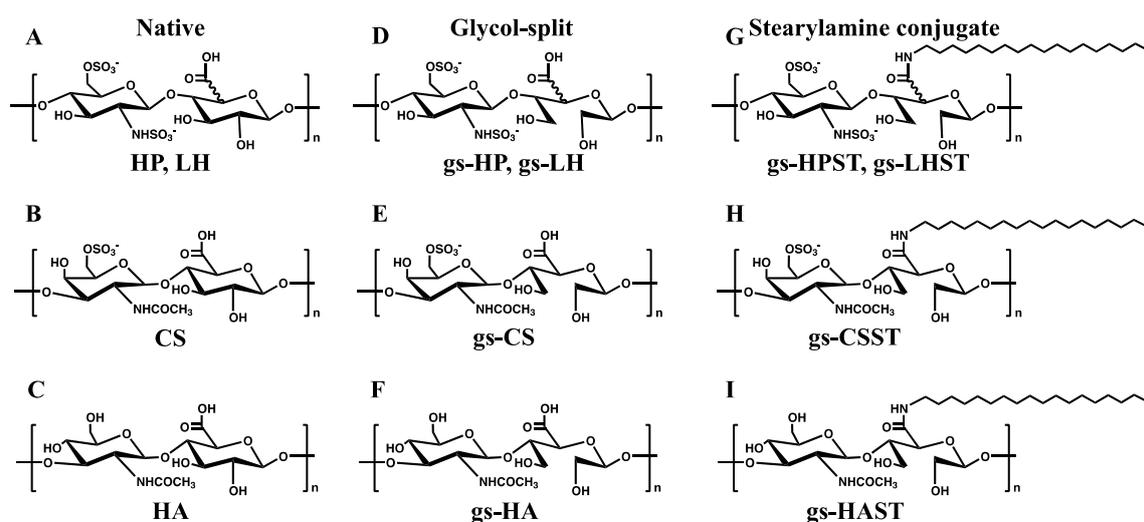


Fig. 2. Chemical structure of native glycosaminoglycans (GAGs), glycol-split GAGs, and glycol-split GAG-stearylamine conjugates.

(A-C) Disaccharide unit of heparin (HP) or low molecular weight heparin (LH), chondroitin 6-sulfate (CS), and hyaluronic acid (HA). (D-F) Glycol-split HP (gs-HP) or LH (gs-LH), CS (gs-CS) and HA (gs-HA). (G-I) stearylamine conjugates of gs-HP (gs-HPST) or gsLH (gs-LHST), gs-CS (gs-CSST), and gs-HA (gsHAST).

1-b 粒子径およびゼータ電位の測定

各種 GAG-ステアリルアミン結合体を水に懸濁し、超音波を照射することにより微粒化を行った後、粒子径およびゼータ電位をゼータサイザーにて測定した。全ての GAG-ステアリルアミン結合体の粒子径は 100~150 nm 程度であり、ゼータ電位は -20~-40 mV であることが確認され、各結合体間で大きな差は認められなかった (Table 1)。

Table 1. Physicochemical properties of nanoparticles comprised of self-assembling glycol split glycosaminoglycan (GAG)-stearylamine conjugates^{a)}

	Particle size (nm)	PdI ^{b)}	Zeta potential (mV)
gs-HPST ^{c)}	107.6 ± 3.4	0.19 ± 0.01	-33.4 ± 0.7
gs-LHST ^{c)}	93.9 ± 0.8	0.15 ± 0.02	-39.9 ± 2.0
gs-CSST ^{c)}	147.3 ± 16.7	0.25 ± 0.03	-27.5 ± 0.6
gs-HAST ^{c)}	153.4 ± 24.0	0.31 ± 0.03	-20.7 ± 1.0

a) Data represent mean ± S.D.

b) Polydispersity index.

c) Stearylamine conjugates of glycol-split glycosaminoglycans: heparin (gs-HPST), low-molecular-weight heparin (gs-LHST), chondroitin sulfate (gs-CSST), and hyaluronic acid (gs-HAST).

1-c 臨界ミセル濃度の測定

ピレンを用いた蛍光プローブ法により各種 GAG-ステアリルアミン結合体の臨界ミセル濃度(c.m.c)を測定した。339 nm で励起されたピレンの 371 nm に現れる蛍光ピーク (I_1)と 382 nm に現れるピーク (I_3)の比 (I_1/I_3)は、ピレン分子の置かれる環境が疎水的であるほど低値を示すことが知られている³⁹⁾。そこで、GAG-ステアリルアミン結合体がミセル形成するとピレンがその内部に取り込まれると仮定し、ピレンの I_1/I_3 比と結合体濃度のプロットにおける屈曲点から各 GAG-ステアリルアミン結合体の c.m.c を算出した (Table 2)。結果として、全ての GAG-ステアリルアミン結合体の c.m.c は 0.014-0.018 mg/mL とほとんど違いが認められなかった。

Table 2. Critical micelle concentration (c.m.c) of self-assembling glycol split glycosaminoglycan (GAG)-stearylamine conjugates^{a)}

	gs-HPST ^{a)}	gs-LHST ^{a)}	gs-CSST ^{a)}	gs-HAST ^{a)}
c.m.c (mg/mL)	0.014	0.015	0.018	0.014

a) Stearylamine conjugates of glycol-split glycosaminoglycans: heparin (gs-HPST), low-molecular-weight heparin (gs-LHST), chondroitin sulfate (gs-CSST), and hyaluronic acid (gs-HAST).

第二節 グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の抗炎症効果

2-a 各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の細胞傷害性の評価

in vitro 抗炎症効果を確認するに先立って、GAG、グリコール開裂 GAG、GAG-ステアリルアミン結合体のマクロファージに対する in vitro 細胞傷害性を WST-1 アッセイ法により評価した (Fig. 3)。いずれの GAG およびその結合体においても強い細胞傷害性は認められなかった。しかし、通常の GAG、グリコール開裂体、ステアリルアミン結合体の順に細胞毒性が高くなる傾向が認められた。GAG-ステアリルアミン結合体が比較的高い細胞毒性を示したことは脂肪鎖の導入に伴って親油性が増大し細胞との相互作用が増大したことによるものと考えられる。各種 GAG-ステアリルアミン結合体の LC₅₀ を算出したところ gs-HPST で 0.91 mg/mL、gs-LHST で 2.12 mg/mL、gs-CSST で 1.32 mg/mL、gs-HAST で 3.50 mg/mL であった。

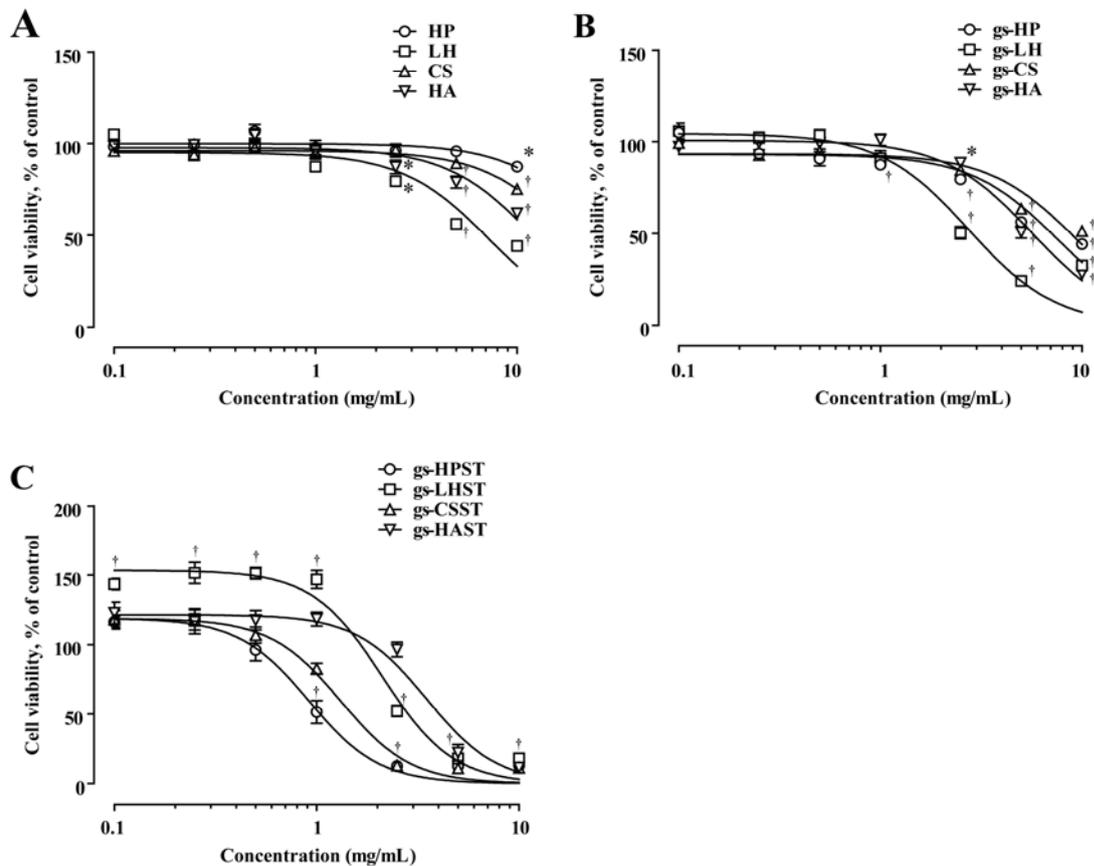


Fig. 3. WST-1 cytotoxicity assay for (A) native glycosaminoglycans (GAGs), (B) glycol-split GAGs, and (C) glycol-split GAG-stearylamine conjugates in mouse peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages isolated from ICR mice were seeded on 96-well plate at density of 5.0×10^4 cells/well. Cells were treated with (A) native heparin (HP), or low molecular weight heparin (LH), chondroitin 6-sulfate (CS), and hyaluronic acid (HA), (B) glycol-split HP (gs-HP), or LH (gs-LH), CS (gs-CS), and HA (gs-HA), or stearylamine conjugates of gs-HP (gs-HPST), or gs-LH (gs-LHST), gs-CS (gs-CSST), and gs-HA (gs-HAST) at the concentration of 0.1–10 mg/mL for 24 h. After incubation, cell viability was estimated by WST-1 assay. Each value represents the mean \pm S.E. (n = 4). *P < 0.05 †P < 0.01

2-b LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生に対する抑制効果の評価

次に、通常の GAG およびそのステアリルアミン結合体の炎症性サイトカイン産生抑制効果について評価を行った。LPS 刺激時にマクロファージから産生される TNF- α の量を ELISA 法により定量したところ、CS を除く GAG の存在下 TNF- α の産生がわずかに減少し、過去の報告通りこれら GAG で抗炎症作用が認められた (Fig. 4)。また、GAG をグリコール開裂しただけでは TNF- α の産生抑制効果にはほとんど影響が認められなかったが、ステアリルアミンを縮合させた結合体とすることにより、通常の GAG に比べて強力に TNF- α の産生を抑制することが明らかとなった。続いて、各種 GAG-ステアリルアミン結合体間の LPS 刺激に対する TNF- α の産生抑制効果の違いを定量的に比較するために、各結合体の用量依存性を評価した (Fig. 5)。得られた用量—反応曲線から IC₅₀ を算出したところ、gs-LHST で最も効果が高く (0.010 mg/mL)、次いで gs-HPST (0.018 mg/mL)、gs-CSST (0.033 mg/mL)、gs-HAST (0.113 mg/mL) の順となった。

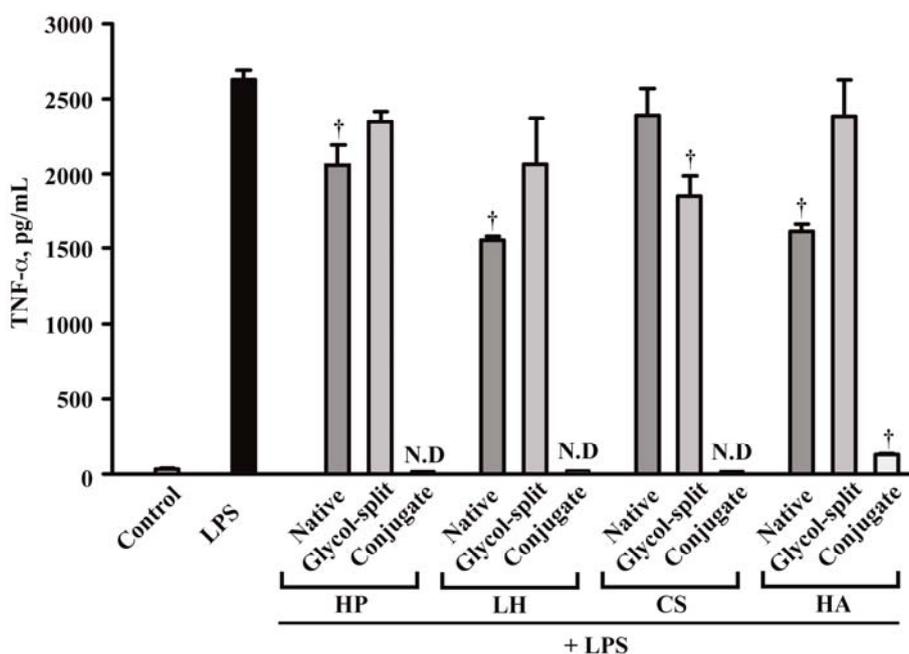


Fig. 4. Effect of native glycosaminoglycans (GAGs), glycol-split GAGs, and glycol-split GAG-stearylamine conjugates on TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse peritoneal macrophages. Isolated macrophages were seeded on a 96-well plate at a density of 1.0×10^5 cells/well. The cells were treated with 0.5 mg/mL native GAGs, glycol-split GAGs, or glycol-split GAG-stearylamine conjugates, together with 20 ng/mL LPS for 24 h. Concentration of TNF- α in the culture medium was measured by ELISA. Each value represents the mean \pm S.E. (n = 3). [†]P < 0.01. N.D., not detected (<16 pg/mL).

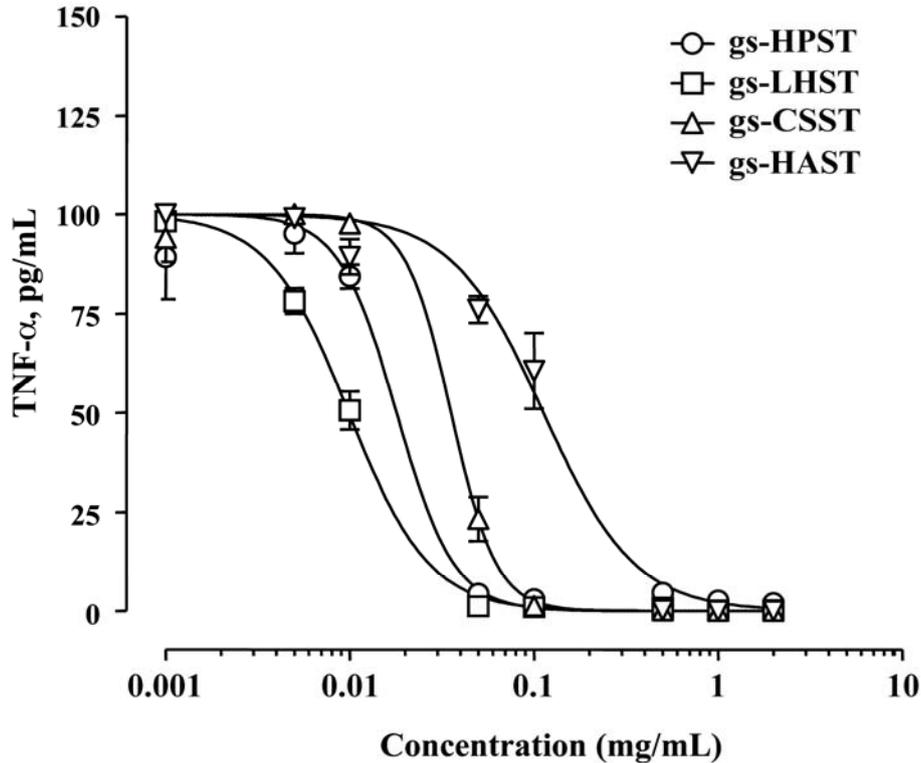


Fig. 5. Concentration-dependent effect of glycol-split glycosaminoglycan (GAG)-stearylamine conjugates on TNF- α production from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse peritoneal macrophages.

Isolated macrophages were seeded on a 96-well plate at a density of 1.0×10^5 cells/well. Cells were treated with varying concentrations of glycol-split heparin (gs-HPST), low-molecular-weight heparin (gs-LHST), chondroitin sulfate (gs-CSST), and hyaluronic acid (gs-HAST) at the concentration of 0.001–2 mg/mL together with 20 ng/mL LPS for 24 h. Concentration of TNF- α in the culture medium was measured by ELISA. Each value represents the mean \pm S.E. (n = 3) relative to the non-treated group.

2-c 各種 Toll 様受容体リガンド刺激によるサイトカイン産生に対する抑制効果の評価

前項の検討により、各種 GAG-ステアリルアミン結合体が LPS 刺激マクロファージにおける TNF- α の産生を強力に抑制することが明らかにされた。そこで、各結合体が LPS 特異的に作用するかどうか検討すべく、TLR2 のリガンドである Pam2CSK4 と TLR3 のリガンドである Poly(I:C)を用いて、前項と同様の実験を行った。Pam2CSK4 の刺激に対しては、LPS の場合とは異なり、いずれの GAG-ステアリルアミン結合体も TNF- α 産生抑制効果を示さなかった(Fig. 6A)。Poly(I:C)の刺激に対しては gs-HAST 以外の GAG-ステアリルアミン結合体により TNF- α の産生が抑制される傾向にあった。しかし、Poly(I:C)の添加により細胞毒性が認められたことから(Fig. 6B)、この TNF- α 産生抑制は Poly(I:C)の細胞傷害性と関連する

可能性もあり、各種 GAG-ステアリルアミン結合体が TLR3 シグナル経路に対して影響するかどうかを結論づけることは困難であった。

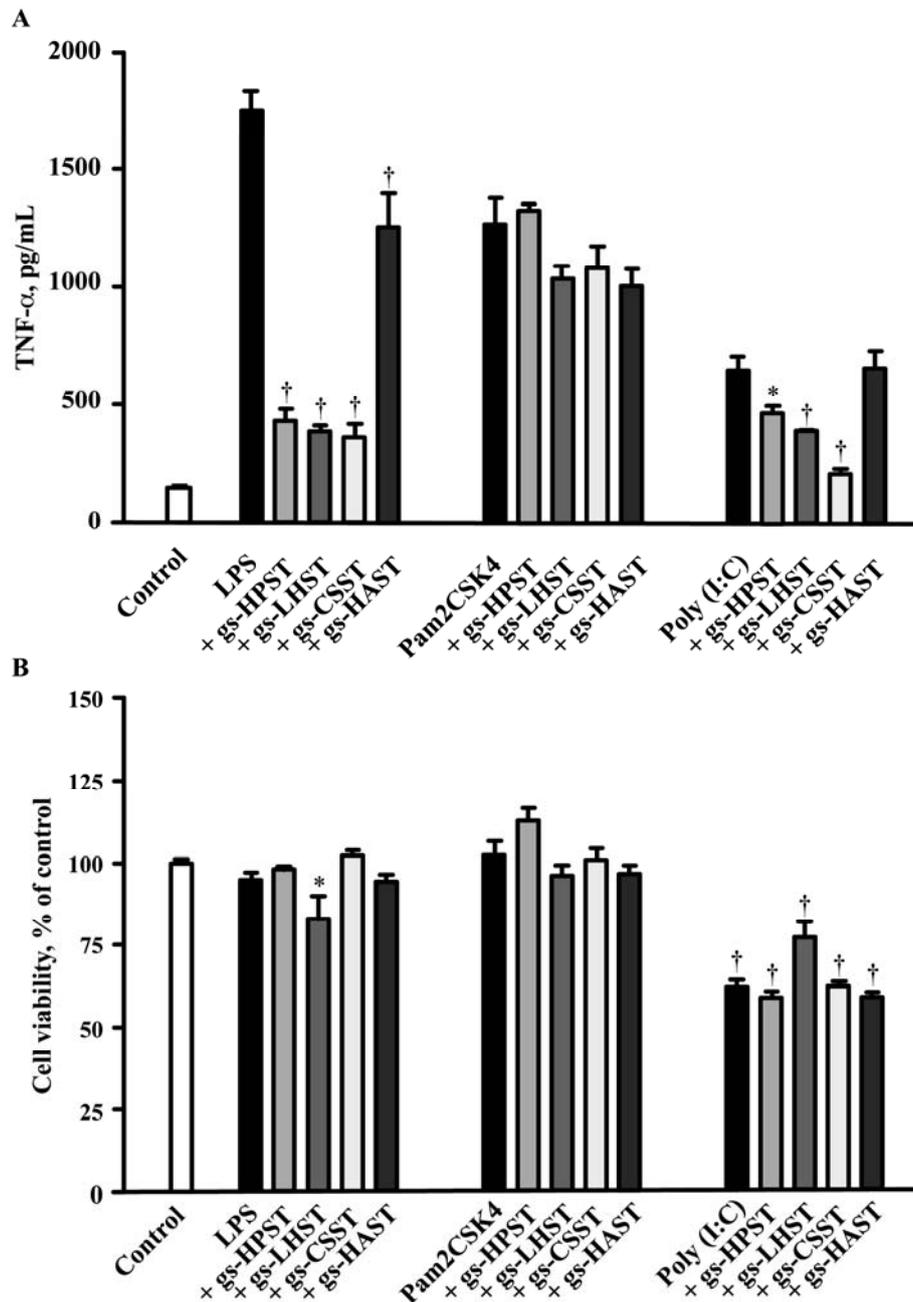


Fig. 6. Effect of glycol-split glycosaminoglycan (GAG)-stearylamine conjugates on (A) TNF- α production from and (B) viability of macrophages stimulated by agonists of various Toll-like receptors.

Isolated macrophages were seeded on a 96-well plate at a density of 1.0×10^5 cells/well. Cells were incubated with 20 ng/mL LPS, 20 ng/mL Pam2CSK4, or 10 μ g/mL poly(I:C) in the absence or presence of glycol-split heparin (gs-HPST), low-molecular-weight heparin (gs-LHST), chondroitin sulfate (gs-CSST), and hyaluronic acid (gs-HAST) at 0.1 mg/mL for 24 h. Each value represents the mean \pm SEM (n = 3). *P < 0.05. [†]P < 0.01.

第三節 考察

本章では、より効果の高い抗炎症効果を持った GAG 誘導体を開発すべく、HP 同様に LPS 刺激に対し抗炎症効果を持つ LH、CS、および HA にステアリルアミンを縮合させた GAG-ステアリルアミン結合体を新規に合成した(Fig. 1, 2)。まず、得られた GAG-ステアリルアミン結合体の物理化学的性質について評価したところ、全て水中で自己組織化によるナノミセルを形成し、その粒子径は 100~150 nm であることが確認され、Babazada らが報告した NAHNP と同程度の大きさであることが認められた(Table 2)。一方で、今回合成した GAG-ステアリルアミン結合体の c.m.c は NAHNP と比較し非常に大きい値を示した。この理由としては、D-エリスロスフィンゴシンとステアリルアミンの物性の違いによる影響や、脂肪鎖の修飾量の違いによる影響が考えられるが、導入した脂肪鎖の数を推定する方法がなく現時点では詳細な議論が困難である。

続いて、*in vitro* で LPS 刺激マクロファージからの炎症性サイトカイン産生に対する GAG-ステアリルアミン結合体の抑制効果について検討を行った。通常の GAG では LH、HA が他の GAG に比べて比較的 TNF- α の産生を抑制していることが観察された(Fig. 4)。HA は 4~8000 kDa と幅広い分子量分布を持ち、その分子量により生理活性が異なることが知られている^{21, 40, 41)}。高分子量の HA は抗炎症作用や血管新生抑制作用をもつが^{32, 41)}、一方で低分子量 HA は炎症性サイトカインやケモカイン、増殖因子などの産生を促すことが知られている^{40, 41)}。本検討では未分画の HA を使っていたので、HA 自体が炎症作用を持っていないか確認したところ、HA をマクロファージに添加した時の上清中の TNF- α 量はコントロールと同程度であった(Fig. 7)。

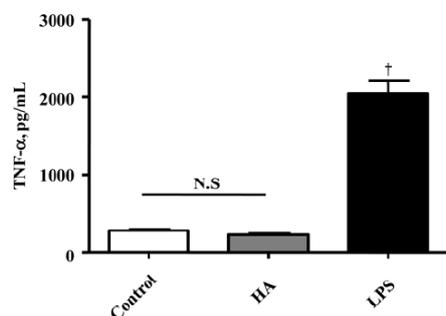


Fig. 7. Effect of native hyaluronic acid on TNF- α production in mouse peritoneal macrophages.

Isolated macrophages were seeded on 96-well plate at density of 1.0×10^5 cells /well. The cells were treated with native 0.5 mg/mL hyaluronic acid (HA) and 20 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) for 24 h. Concentration of TNF- α in the culture medium was measured by ELISA. Each value represents the mean \pm S.E. (n = 3).

各種 GAG の TNF- α 産生抑制効果はグリコール開裂しただけではほとんど影響を受けなかったが、ステアリルアミンとの結合体にすることでその効果が顕著に増強されることが明らかになった(Fig. 4)。Babazada らによる構造活性相関の検討では、NAHNP の脂肪鎖を D-エリスロスフィンゴシンからステアリルアミンに変更しても、炎症性サイトカインの産生抑制効果が得られることを明らかにしてい

たが、その効果が D エリスロスフィンゴシンを用いた場合と同じかどうかは不明であった。今回合成した gs-HPST の IC₅₀ は NAHNP の報告された IC₅₀ の値¹⁴⁾とほぼ一致する値を示したことから、構造的に簡単で安価なステアリルアミンで十分 D-エリスロスフィンゴシンを代替できることが示された。一方で、主鎖骨格に LH を用いた gs-LHST では未分画の HP を用いた gs-HPST よりも LPS 刺激に対する TNF- α の産生抑制効果が高いことが示された (Fig. 4)。LH は HP 同様、LPS 刺激に対し抗炎症作用を示すことが *in vitro*⁴²⁾ と *in vivo*⁴³⁾ の両方で報告されている。さらに、LH は腫瘍血管内皮細胞等の増殖を促す血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) に対して HP よりも結合しやすく^{44, 45)}、臨床研究でも LH は HP に比べてがん患者の 3 ヶ月生存率を有意に改善することが明らかにされている⁴⁶⁾。そのため、一般的に LH は HP よりも高い生理活性を有しているのではないかと推察された。

次に主鎖骨格の GAG の種類による各結合体間の効果の違いを比較したところ、HP を主鎖骨格とした時に最も効果が高く、CS や HA を主鎖骨格とした時にはその効果が低下することが観察された (Fig. 5)。この要因としてはまず、各種 GAG における硫酸化度の違いが挙げられる。HP は高度に硫酸化された GAG であり 2 糖繰り返し構造あたり平均 2~3 分子硫酸化されているが、一方、CS は HP と比べ硫酸化度が低く 2 糖繰り返し構造あたり平均 0~2 分子しか硫酸化されておらず、HA は硫酸化されていない¹⁹⁾。GAG の硫酸化度は GAG とタンパクとの相互作用に影響することが明らかにされており、CS や HA のトランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor-1 β : TGF-1 β) に対する結合力はこれら GAG の硫酸化度が上昇するにつれて増大することが報告されている⁴⁷⁾。今回の検討でも LPS 刺激に対する GAG-ステアリルアミン結合体の TNF- α 産生抑制効果は、GAG の硫酸化度とよく対応していることが認められた。一方で、GAG における硫酸化の位置も GAG の生理活性を決定する重要な因子と考えられている。Babazada らは位置選択的に脱硫酸化した HP 誘導体に対する構造活性相関研究により、HP 骨格中の 6 位の硫酸基を脱硫酸化した際にはその効果が減弱することを明らかにしている¹⁴⁾。このほか、HP の 6 位の硫酸基が L または P セレクチンの阻害にも重要であることも明らかにされている⁴⁸⁾。HA は 6 位の硫酸基を持っておらず、そのため gs-HAST の TNF- α 産生抑制効果が gs-LHST や gs-CSST に比べ特に弱かったのではないかと推察された。

いずれの GAG-ステアリルアミン結合体も、TLR2 リガンドである Pam2CSK4 の刺激に対しては抑制的に働かず、LSP 刺激に対して選択性を示すことが明らかとなったが (Fig. 6)、これら結合体が LPS 刺激を抑制するメカニズムについては現時

点では不明である。TLR4 に対する選択的なアンタゴニストとして、Eritoran や resatorvid、CRX-526 が報告されており^{13, 49-52)}、Eritoran では TLR4 の補助分子である MD2 の疎水ポケットに Eritoran の疎水性側鎖が相互作用することによって TLR4 の二量体や多量体の形成を阻害し、TLR4 シグナル経路の活性化を阻害することが明らかにされている⁵³⁾。NAHNP や今回開発した GAG-ステアリルアミン結合体は糖鎖に長鎖アルキル基が結合している点で、Eritoran や CRX-526、リピド IVa などの TLR4 アンタゴニストと非常に構造が類似しているため、これらと同様に MD2 に対して作用するのではないかと推測している。

以上、本章では各種 GAG に脂肪鎖を導入することで、通常の GAG よりも強力に LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生を抑制できることを明らかにした。しかし、その効果は主鎖骨格である GAG の種類によって異なり、6 位に硫酸基を持たない HA を主鎖骨格とした場合特に効果が弱かったことから、過去の検討同様に GAG 骨格中の 6 位の硫酸基が炎症性サイトカイン産生抑制効果に重要であることが示唆された。また、主鎖に LH を用いることでより高い炎症性サイトカイン産生抑制効果を持った GAG 誘導体が得られた。

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

(要約)

接触性皮膚炎は種々の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る⁵⁴⁾。その症状は丘疹や発赤など外見の変化を伴うため、患者の Quality of Life (QOL)を大きく損なうことも少なくない。接触性皮膚炎が発症する詳細なメカニズムは依然説明されていないが、その一部で TLR や NLR などの自然免疫の活性化が炎症に関与していることが示唆されている^{54, 55)}。そこで本章では、前章で高い抗炎症効果が見出された低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体 (gs-LHST)が接触性皮膚炎治療に有用であるかどうか検討を行うべく DNFB 誘発接触性皮膚炎モデルマウスを用いて検討を行った。

gs-LHST を DNFB による再感作の 2 時間前にマウス耳介に投与したところ DNFB 刺激により誘発される耳介肥厚はプラセボ群と比較して有意に軽減された。また耳介組織中の各種遺伝子の mRNA 発現に対する効果について検討を行ったところ、炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β および酸化ストレス応答遺伝子である HO-1 遺伝子の発現が有意に抑制されることが明らかとなった。また、gs-LHST のこれらの抑制効果は TLR4 変異型マウスである C3H/HeJ マウスでは認められなかったことから TLR4 を介した炎症を抑制したものであることが推察された。一方で DNFB による皮膚肥厚や炎症反応は C3H/HeJ マウスでも観察された。従って、DNFB 誘発接触性皮膚炎はいくつかのメカニズムが複合的に合わさって生じており、TLR4 が一部関与していること、gs-LHST はその TLR4 を介する炎症を選択的に抑制することが推察された。

結 論

(要約)

以上、著者は二章にわたり、各種 GAG-ステアシルアミン結合体を合成し、その *in vitro* における抗炎症効果及び DNFB 接触性皮膚炎に対する治療効果に関して検討を行い、以下の結論を得た。

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

HP 同様に LPS 刺激に対する抗炎症効果を持つ CS や HA にステアシルアミンを縮合させた GAG-ステアシルアミン結合体を合成し *in vitro* 抗炎症効果について検討を行った。ステアシルアミンを縮合させることで炎症性サイトカイン産生抑制効果が増強するのは HP に限られたことではなく、他の GAG でも認められる共通の現象であることを見出した。しかし、その効果は主鎖骨格の GAG の種類によって異なり主鎖を HP とした時に最も高く、CS、HA を主鎖骨格とした際にはその効果が小さかった。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、LH を主鎖に用いた場合、未分画の HP を用いた時よりも高い炎症性サイトカイン産生抑制効果が得られたことから、GAG の分子量も効果に影響している可能性が考えられた。

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-ステアシルアミン結合体の治療効果の評価

前章で最もサイトカイン産生抑制効果の高かった低分子量ヘパリン-ステアシルアミン結合体(gs-LHST)を用いて接触性皮膚炎治療への応用に関する基礎的な検討を行った。gs-LHST を投与することにより、DNFB 刺激によって誘発されるマウス耳介肥厚および、耳介中の TNF- α や IL-1 β 遺伝子発現が有意に抑制された。また、gs-LHST は TLR4 変異型の C3H/HeJ マウスで惹起される DNFB 誘発接触性皮膚炎に対しては抗炎症効果を示さず、耳介肥厚も炎症性サイトカイン mRNA 発現も抑制しなかった。従って DNFB 誘発接触性皮膚炎には TLR4 が部分的に関与すること、また、gs-LHST はこの経路に対してのみ抑制効果を示すことが推察された。

以上、著者は各種グリコサミノグリカンに対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抗炎症効果の増強について、構造活性相関的視点からの解析とその治療応用を行った。本研究で得られた知見は、TLR4 が関与する炎症性疾患への GAG 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られる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究の実施にあたり終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 橋田 充教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 山下 富義教授に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに、多くの有益な御助言を賜りました京都大学大学院薬学研究科 樋口 ゆり子講師、京都大学物質-細胞統合システム拠点 橋田 泰彦博士、Hasan Babazada 博士、並びに京都大学大学院薬学研究科 薬品動態制御学分野教室員一同に深謝致します。

最後に、研究に専念できる環境を与えてくださった父 誠、母 清美に深く感謝致します。

実験の部

第一章 実験の部

第一節

【1】 試薬

ヘパリン (HP) (平均分子量 15,000)、コンドロイチン硫酸塩 (CS) (平均分子量 15,000)は Nacalai Tesque 社より購入した。ヒアルロン酸 (HA) (平均分子量 20,000)は Lifecore 社より購入した。低分子量ヘパリン (LH) (平均分子量 5,000)はキッセイ社より購入した。ステアリルアミン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸(EDC)、過ヨウ素酸ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウム、ホルムアミド(Sigma)、超脱水テトラヒドロフランは和光純薬株式会社より購入した。

【2】 各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の合成

各種グリコサミノグリカン(GAG) 1g を 0.1 M 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 (pH=5.0, 0.05M 酢酸緩衝液)20 mL に溶解し 4 °C で 72 時間反応させ、ウロン酸における C2-C3 結合のジオール部位を酸化開環させた。反応液に過剰量のグリセロールを加えることで、未反応の過ヨウ素酸ナトリウムを反応させた後、反応液を蒸留水中で 2 日間透析し凍結乾燥した。得られた白色粉末を 0.2 M 水素化ホウ素ナトリウム溶液 (pH=9.5, 0.25 M 炭酸緩衝液)にて 4 °C で 72 時間還元した。反応終了後に残存する水素化ホウ素ナトリウムは pH を酸性(pH=5.0)にすることにより分解した。反応液を蒸留水中で 2 日間透析した後、凍結乾燥することで各種グリコール開裂 GAG を得た。グリコール開裂 GAG 20 mg をホルムアミド 1.5 mL に溶解し、EDC 10mg を加え 25 °C で 30 分間反応させることにより、GAG 中のカルボキシル基を活性化させた。そこにステアリルアミン 5 mg を溶解したテトラヒドロフラン 1 mL を加え 25 °C で 24 時間反応させた。反応終了後、反応液に貧溶媒としてエタノール 10 mL を加え生成物を沈殿させ、4 °C、15,000×g で 10 分間遠心することで沈殿物を回収し、再度エタノールに懸濁する洗浄操作を 3 回繰り返すことで未反応のステアリルアミンおよび EDC を除去した。エタノールによる洗浄後、デシケーター中で生成物を乾燥させ、水で再懸濁した後に、蒸留水中で 2 日間透析することによりさらに生成物を精製した。透析終了後、凍結乾燥することで、各種 GAG-ステアリルアミン結合体を得た。

【4】 粒子径およびゼータ電位の測定

各種 GAG-ステアリルアミン結合体を水に 0.01 mg/mL となるように溶解し、As one 社製のバス型ソニケーターにて 37 °C で 5 分間、42 KHz の超音波を照射することで微細化を行った。粒子径およびゼータ電位は Malvern 社製のゼータサイザーナノ ZS を用いて測定した。

【5】 臨界ミセル濃度(c.m.c)の測定

各種 GAG-ステアリルアミン結合体の c.m.c はピレンによる蛍光プローブ法により測定した。各種 GAG-ステアリルアミン結合体の最終濃度を 6.25×10^{-4} mg/mL から 3.20×10^{-1} mg/mL になるようにピレン溶液と混和した。ピレンの最終濃度は 7.5×10^{-8} M となるように調整した。混合液は測定 12 時間前から静置し平衡化し、蛍光測定に供した。蛍光スペクトルは Horiba 社製の Fluoremax-4 蛍光スペクトルメーターにて励起および発光波長はそれぞれ 339 nm、390 nm で、積分時間が 1 nm/s の条件で測定した。

第二節 実験の部

【1】 試薬・マウス

マウスは 5 週齢の ICR 系雌性マウスは日本エスエルシー社より購入した。lipopolysaccharide (LPS)は *Escherichia coli* 0111:B4(Sigama)は和光純薬工業より購入した。

【2】 マウス腹腔マクロファージの回収および培養

5 週齢の ICR 系雌性マウスに 2.9%チオグリコレート培地(日水製薬株式会社)を 1mL 腹腔内投与し、4 日後に RPMI1640 培地(日水製薬株式会社)5 mL を用いて採取した。採取された腹腔マクロファージは 10% FBS、penicillin G (100 U/mL)、streptomycin (100 µg/mL)、2mM L-glutamine 含有 RPMI1640 培地に再懸濁した後、96 well マイクロプレートに播種し 37 °C、5% CO₂ の条件で培養した。2 時間後に培地交換することで、非接着細胞を取り除いた。

【3】 細胞毒性評価

第 1 章第 2 節実験の部【2】に順じ、5 週齢の ICR 系雌性マウスから腹腔マクロファージを採取した後、 5.0×10^4 個/well になるように細胞を播種した。24 時間後、培地を OptiMEM (Life Technologies 社)に交換し、各種 GAG-ステアリルアミン結合体を最終濃度が 0.1 mg/mL から 10 mg/mL になるように培地に添加し、24 時

間培養した。細胞毒性の評価は WST-1 試薬(Roche 社)により評価した。

【4】 サイトカイン分泌量評価

第1章第2節実験の部【2】に順じ、5週齢の ICR 系雌性マウスから腹腔マクロファージを採取した後、96 穴マイクロプレートに 1.0×10^5 個/well になるように細胞を播種した。2 時間後に培地交換することで、非接着細胞を取り除いてからさらに 24 時間後、培地を OptiMEM に交換し、各種 GAG-ステアリルアミン結合体を最終濃度が 0.5 mg/mL もしくは 0.1 mg/mL になるように添加し、そこに LPS の最終濃度が 20 ng/mL になるように添加した。24 時間培養後、上清中の TNF- α 量を murine TNF-a ELISA Kit(Peprotech 社)を用いて定量した。

【5】 統計学的解析

有意差検定は GraphPad prism 5,0 により Analysis of variance(ANOVA)を行った。ポストテストは Dunett's 法を用い検定を行った。両側 p 値により評価することとし、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

第二章 実験の部

第一節

(要約)

【1】 試薬・マウス

6週齢の BALB/c 系雌性マウス、C3H/HeN 系雌性マウス、C3H/HeJ 系雌性マウスは日本エスエルシー社より購入した。

【2】 2,4-dinitrofluorobenzen(DNFB)誘発性接触性皮膚炎モデルマウスの作成

DNFB はアセトンとオリーブオイルを 4:1 の割合で混合した(AOO)溶液に溶解した。0、1 日目に除毛したマウス腹部に 0.5%DNFB 溶液 25 μ L を塗布することで感作した。5 日目から 3 日間に渡って 0.3%DNFB 溶液 10 μ L をマウスの右耳介に塗布することで再感作した。Control 群は DNFB を含まない AOO 溶液のみを塗布した。

【3】 マウス耳介肥厚の評価

第二章第一節【2】に従い接触性皮膚炎マウスを作成し、0.3% DNFB による再感作 2 時間前に低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体を投与した。DNFB 刺激 24 時間後の耳介厚を 6、7、8 日目にデジタルシックネスゲージ(PEACOCK 社)により測定した。

【4】 マウス耳介中の遺伝子発現評価

第二章第一節【2】に従い接触性皮膚炎マウスを作成し、8 日目の耳介厚の測定後マウス耳介を摘出した。マウス耳介中の TNF- α 、IL-1 β 、IL-12、HO-1、NQO-1、HDC mRNA 発現量は定量的 PCR により測定した。

【5】 統計学的解析

有意差検定は第一章第二節【5】と同様の方法で行った。

引用文献

- 1) Vogel, S. N., Fitzgerald, K. A., Fenton, M. J., *Mol. Interv.*, **3**, 466-477 (2003).TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression
- 2) Beutler, B., *Nature*, **430**, 257-263 (2004).Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling
- 3) Takeda, K., Akira, S., *Int. Immunol.*, **17**, 1-14 (2005).Toll-like receptors in innate immunity
- 4) Raetz, C. R., Whitfield, C., *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 635-700 (2002).Lipopolysaccharide endotoxins
- 5) Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., Gusovsky, F., *J. Biol. Chem.*, **274**, 10689-10692 (1999).Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction
- 6) Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R., Coyle, A. J., *Annu. Rev. Immunol.*, **28**, 367-388 (2009).HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer
- 7) Lucas, K., Maes, M., *Mol. Neurobiol.*, **48**, 190-204 (2013).Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway
- 8) Testro, A. G., Visvanathan, K., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **24**, 943-954 (2009).Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease
- 9) Liu, Y., Yin, H., Zhao, M., Lu, Q., *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **47**, 136-147 (2014).TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review
- 10) Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J., *Cell*, **130**, 906-917 (2007).Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran
- 11) Shimamoto, A., Chong, A. J., Yada, M., Shomura, S., Takayama, H., Fleisig, A. J., Agnew, M. L., Hampton, C. R., Rothnie, C. L., Spring, D. J., Pohlman, T. H.,

- Shimpo, H., Verrier, E. D., *Circulation*, **114**, 1270-4 (2006). Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury
- 12) Kawamoto, T., Ii, M., Kitazaki, T., Iizawa, Y., Kimura, H., *Eur. J. Pharmacol.*, **584**, 40-48 (2008). TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain
- 13) Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., Ii, M., *Mol. Pharmacol.*, **79**, 34-41 (2011). TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules
- 14) Babazada, H., Yamashita, F., Yanamoto, S., Hashida, M., *J. Controlled Release*, **194**, 332-340 (2014). Self-assembling lipid modified glycol-split heparin nanoparticles suppress lipopolysaccharide-induced inflammation through TLR4–NF- κ B signaling
- 15) Babazada, H., Yamashita, F., Hashida, M., *J. Controlled Release*, **194**, 295-300 (2014). Suppression of experimental arthritis with self-assembling glycol-split heparin nanoparticles via inhibition of TLR4–NF- κ B signaling
- 16) Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Traina, P., Samà, D., Calatroni, A., *J. Cell. Biochem.*, **106**, 83-92 (2009). Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes
- 17) Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Traina, P., D'Ascola, A., Calatroni, A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **491**, 7-15 (2009). Glycosaminoglycans reduced inflammatory response by modulating toll-like receptor-4 in LPS-stimulated chondrocytes
- 18) Hook, M., Kjellen, L., Johansson, S., Robinson, J., *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 847-869 (1984). Cell-surface glycosaminoglycans
- 19) Page, C., *ISRN pharmacology*, **2013**, (2013). Heparin and related drugs: Beyond anticoagulant activity

- 20) Jin, L., Abrahams, J. P., Skinner, R., Petitou, M., Pike, R. N., Carrell, R. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 14683-14688 (1997).The anticoagulant activation of antithrombin by heparin
- 21) Gandhi, N. S., Mancera, R. L., *Chemical biology & drug design*, **72**, 455-482 (2008).The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins
- 22) Mazieres, B., Combe, B., Phan Van, A., Tondut, J., Grynfeldt, M., *J. Rheumatol.*, **28**, 173-181 (2001).Chondroitin sulfate in osteoarthritis of the knee: a prospective, double blind, placebo controlled multicenter clinical study
- 23) McCord, J. M., *Science*, **185**, 529-531 (1974).Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase
- 24) Namiki, O., Toyoshima, H., Morisaki, N., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **20**, 501-507 (1982).Therapeutic effect of intra-articular injection of high molecular weight hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee
- 25) King, S. R., Hickerson, W. L., Proctor, K. G., *Surgery*, **109**, 76-84 (1991).Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing
- 26) Li, X., Zheng, Z., Li, X., Ma, X., *Cytokine*, **60**, 114-121 (2012).Unfractionated heparin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through blocking p38 MAPK and NF- κ B activation on endothelial cell
- 27) Anastase-Ravion, S., Blondin, C., Cholley, B., Haeffner-Cavaillon, N., Castellot, J. J., Letourneur, D., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **66**, 376-384 (2003).Heparin inhibits lipopolysaccharide (LPS) binding to leukocytes and LPS-induced cytokine production
- 28) Canas, N., Gorina, R., Planas, A., Vergés, J., Montell, E., García, A., López, M., *Neuroscience*, **167**, 872-879 (2010).Chondroitin sulfate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rat astrocytes by preventing nuclear factor kappa B activation
- 29) Jomphe, C., Gabriac, M., Hale, T. M., Héroux, L., Trudeau, L., Deblois, D., Montell, E., Vergés, J., Du Souich, P., *Basic & clinical pharmacology &*

- toxicology*, **102**, 59-65 (2008). Chondroitin Sulfate Inhibits the Nuclear Translocation of Nuclear Factor- κ B in Interleukin-1 β -Stimulated Chondrocytes
- 30) Tan, G., Tabata, Y., *Acta biomaterialia*, **10**, 2684-2692 (2014). Chondroitin-6-sulfate attenuates inflammatory responses in murine macrophages via suppression of NF- κ B nuclear translocation
- 31) Li, X., Li, Z., Zheng, Z., Liu, Y., Ma, X., *Inflammation*, **36**, 1201-1208 (2013). Unfractionated heparin ameliorates lipopolysaccharide-induced lung inflammation by downregulating nuclear factor- κ B signaling pathway
- 32) Xu, C., Chen, G., Yang, W., Xu, Y., Xu, Y., Huang, X., Liu, J., Feng, Y., Xu, Y., Liu, B., *Int. Immunopharmacol.*, **28**, 1050-1058 (2015). Hyaluronan ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice via Toll-like receptor (TLR) 4-dependent signaling pathways
- 33) Park, K., Kim, K., Kwon, I. C., Kim, S. K., Lee, S., Lee, D. Y., Byun, Y., *Langmuir*, **20**, 11726-11731 (2004). Preparation and characterization of self-assembled nanoparticles of heparin-deoxycholic acid conjugates
- 34) Li, L., Kim, J. K., Huh, K. M., Lee, Y., Kim, S. Y., *Carbohydr. Polym.*, **87**, 2120-2128 (2012). Targeted delivery of paclitaxel using folate-conjugated heparin-poly (β -benzyl-L-aspartate) self-assembled nanoparticles
- 35) Choi, K. Y., Chung, H., Min, K. H., Yoon, H. Y., Kim, K., Park, J. H., Kwon, I. C., Jeong, S. Y., *Biomaterials*, **31**, 106-114 (2010). Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting
- 36) Upadhyay, K. K., Bhatt, A. N., Mishra, A. K., Dwarakanath, B. S., Jain, S., Schatz, C., Le Meins, J., Farooque, A., Chandraiah, G., Jain, A. K., *Biomaterials*, **31**, 2882-2892 (2010). The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly (γ -benzyl L-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes
- 37) Lee, C., Huang, C., Lee, Y., *Biomacromolecules*, **7**, 1179-1186 (2006). Preparation of amphiphilic poly (L-lactide)-graft-chondroitin sulfate copolymer self-aggregates and its aggregation behavior

- 38) Lee, J., Chung, S., Cho, H., Kim, D., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **94**, 532-541 (2015). Bile acid-conjugated chondroitin sulfate A-based nanoparticles for tumor-targeted anticancer drug delivery
- 39) Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J., Ruiz, C. C., *J. Colloid Interface Sci.*, **258**, 116-122 (2003). On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method
- 40) McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C., Noble, P. W., *J. Clin. Invest.*, **98**, 2403-2413 (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44
- 41) Montesano, R., Kumar, S., Orci, L., Pepper, M. S., *Lab. Invest.*, **75**, 249-262 (1996). Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro
- 42) Hochart, H., Vincent Jenkins, P., Smith, O. P., White, B., *Br. J. Haematol.*, **133**, 62-67 (2006). Low-molecular weight and unfractionated heparins induce a downregulation of inflammation: decreased levels of proinflammatory cytokines and nuclear factor- κ B in LPS-stimulated human monocytes
- 43) Li, R., Tong, J., Tan, Y., Zhu, S., Yang, J., Ji, M., *International journal of clinical and experimental pathology*, **8**, 8881 (2015). Low molecular weight heparin prevents lipopolysaccharide induced-hippocampus-dependent cognitive impairments in mice
- 44) Soker, S., Goldstaub, D., Svahn, C. M., Vlodavsky, I., Levi, B., Neufeld, G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 1339-1347 (1994). Variations in the size and sulfation of heparin modulate the effect of heparin on the binding of VEGF 165 to its receptors
- 45) Jayson, G. C., Gallagher, J. T., *Br. J. Cancer*, **75**, 9-16 (1997). Heparin oligosaccharides: inhibitors of the biological activity of bFGF on Caco-2 cells
- 46) Hettiarachchi, R. J., Smorenburg, S. M., Ginsberg, J., Levine, M., Prins, M. H., Büller, H. R., *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*-, **82**, 947-952

- (1999).Do heparins do more than just treat thrombosis? The influence of heparins on cancer spread
- 47) Hintze, V., Miron, A., Moeller, S., Schnabelrauch, M., Wiesmann, H., Worch, H., Scharnweber, D., *Acta biomaterialia*, **8**, 2144-2152 (2012).Sulfated hyaluronan and chondroitin sulfate derivatives interact differently with human transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)
- 48) Wang, L., Brown, J. R., Varki, A., Esko, J. D., *J. Clin. Invest.*, **110**, 127-136 (2002).Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins
- 49) Peri, F., Piazza, M., *Biotechnol. Adv.*, **30**, 251-260 (2012).Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists
- 50) Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B., Lee, H., Lee, J., *Nature*, **458**, 1191-1195 (2009).The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex
- 51) Fort, M. M., Mozaffarian, A., Stover, A. G., Correia Jda, S., Johnson, D. A., Crane, R. T., Ulevitch, R. J., Persing, D. H., Bielefeldt-Ohmann, H., Probst, P., Jeffery, E., Fling, S. P., Hershberg, R. M., *J. Immunol.*, **174**, 6416-6423 (2005).A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease
- 52) Leon, C. G., Tory, R., Jia, J., Sivak, O., Wasan, K. M., *Pharm. Res.*, **25**, 1751-1761 (2008).Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases
- 53) Botos, I., Segal, D. M., Davies, D. R., *Structure*, **19**, 447-459 (2011).The structural biology of Toll-like receptors
- 54) Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., Gaspari, A. A., *Nature Reviews Immunology*, **12**, 114-124 (2012).Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis

55) Martin, S., Esser, P., Weber, F., Jakob, T., Freudenberg, M., Schmidt, M., Goebeler, M., *Allergy*, **66**, 1152-1163 (2011).Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis