

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

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ー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ー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ー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ー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ー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ー ステアシルアミン結合体の治療効果の評価	13
--	----

第一節 DNFB 誘発性接触性皮膚炎モデルマウスに対する治療効果	
----------------------------------	--

- 1-a マウス耳介肥厚抑制効果の評価
- 1-b マウス耳介中の炎症性サイトカイン mRNA 発現抑制効果の評価
- 1-c マウス耳介中の酸化ストレス応答性遺伝子の mRNA 発現抑制効果の評価
- 1-d LPS 刺激 DC2.4 細胞に対する *in vitro* 酸化ストレス抑制効果の評価
- 1-e マウス耳介中のヒスチジン脱炭酸酵素 mRNA 発現抑制効果の評価
- 1-f 耳介の組織学的評価

1-g TLR4 変異型 C3H/HeJ マウスにおける DNFB 誘発接触性皮膚炎に対する
LHP 軟膏の効果

第二節 考察	23
結論	26
謝辞	28
実験の部	29

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-ステアシ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-ステアシ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-ステアシ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-ステアシ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、ステアシルアミンと反応させることで、各種 GAG-ステアシルアミン結合体を合成した(Fig. 1.2)。

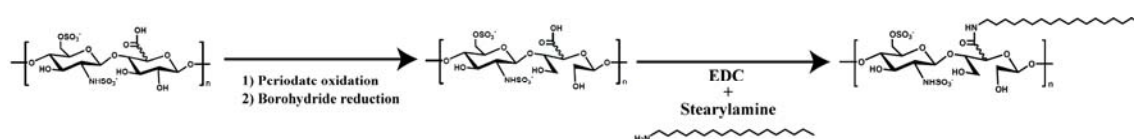


Fig.1 Schematic illustration of the preparation of glycol-split glycosaminoglycan-stearylamine conjugate.

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

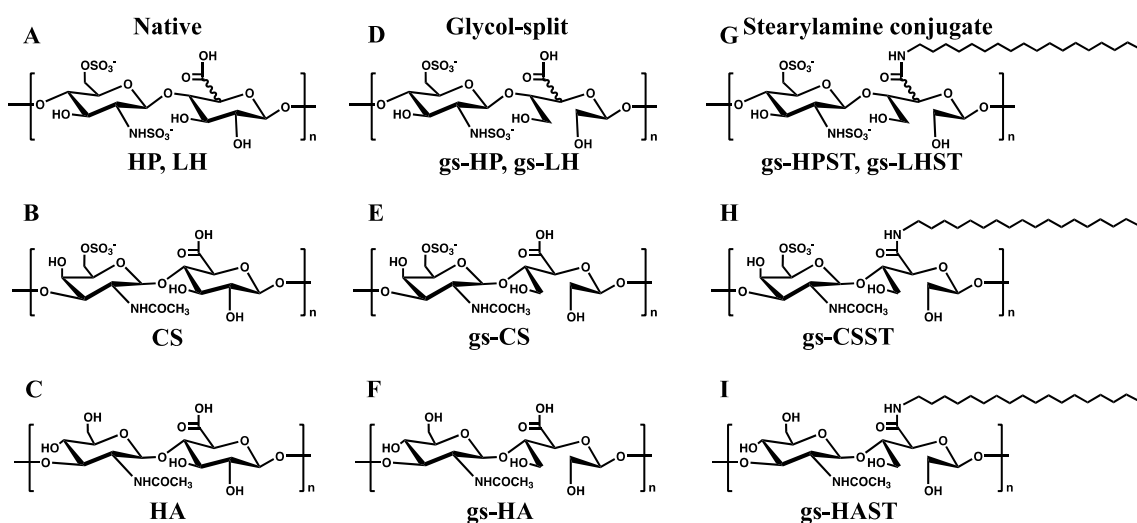


Fig. 2. Chemical structure of native glycosaminoglycans (GAGs), glycol-split GAGs, and glycol-split GAG-stearylamine conjugates.

(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子化を行った後、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。

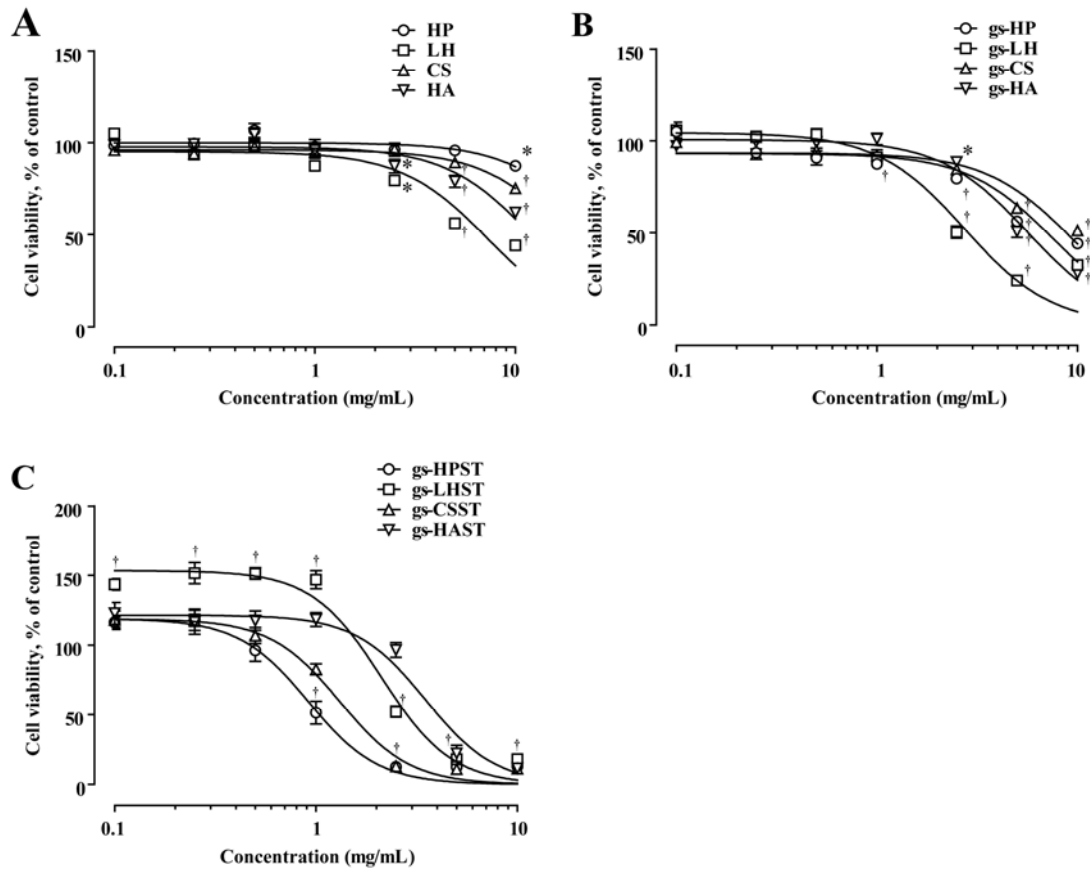


Fig. 3. WST-1 cytotoxicity assay for (A) native glycosaminoglycans (GAGs), (B) glycol-split GAGs, and (C) glycol-split GAG-stearylamine conjugates in mouse peritoneal macrophages.

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。

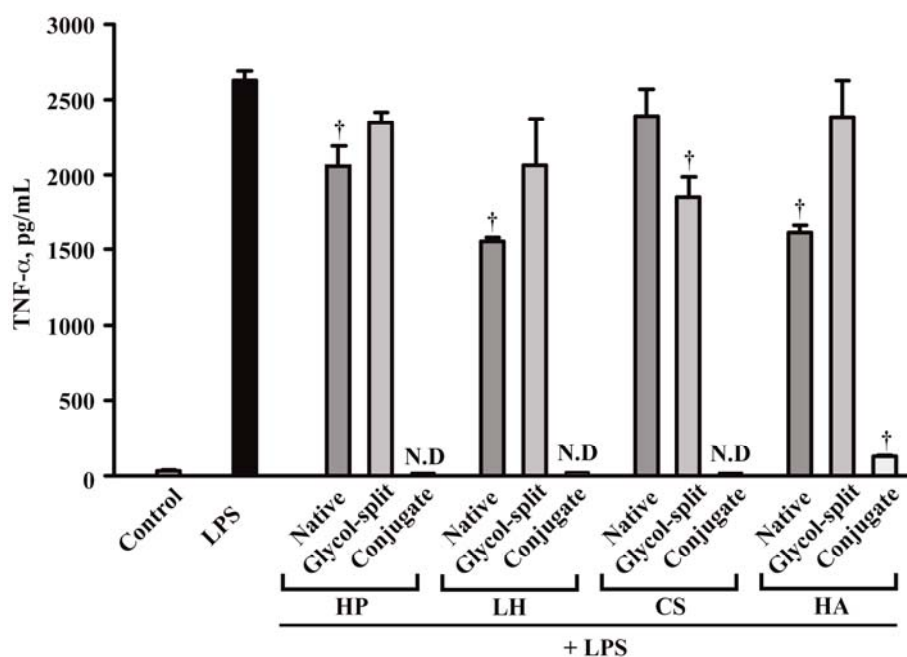


Fig. 4. Effect of native glycosaminoglycans (GAGs), glycol-split GAGs, and glycol-split GAG-stearylamine conjugates on TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse peritoneal macrophages. Isolated macrophages were seeded on a 96-well plate at a density of 1.0×10^5 cells/well. The cells 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).

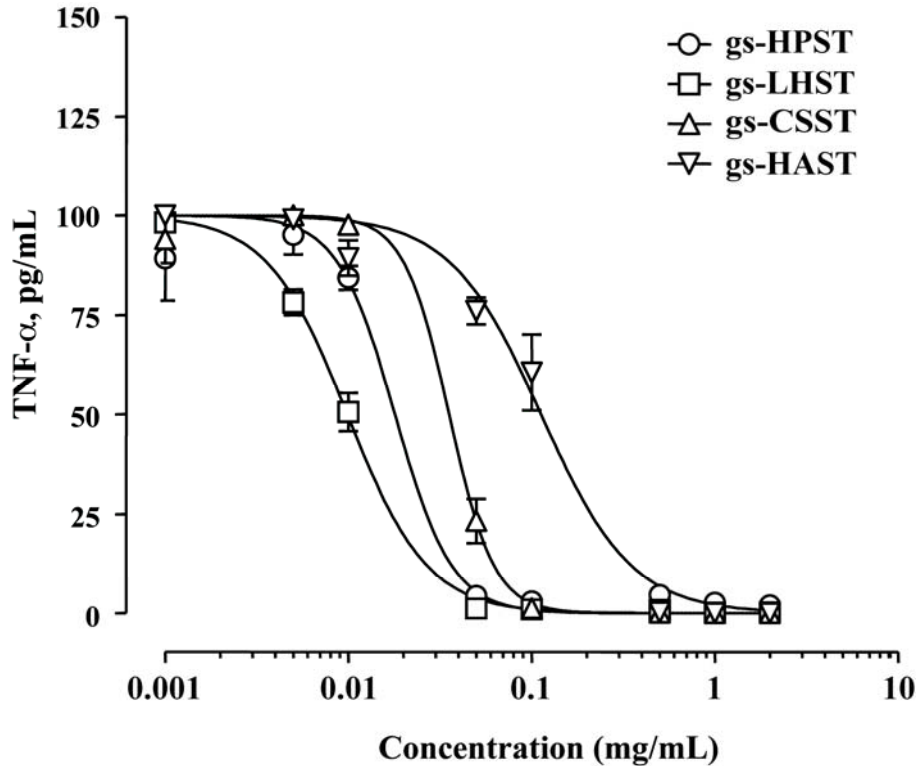


Fig. 5. Concentration-dependent effect of glycol-split glycosaminoglycan (GAG)-stearylamine conjugates on TNF- α production from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse peritoneal macrophages.

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。

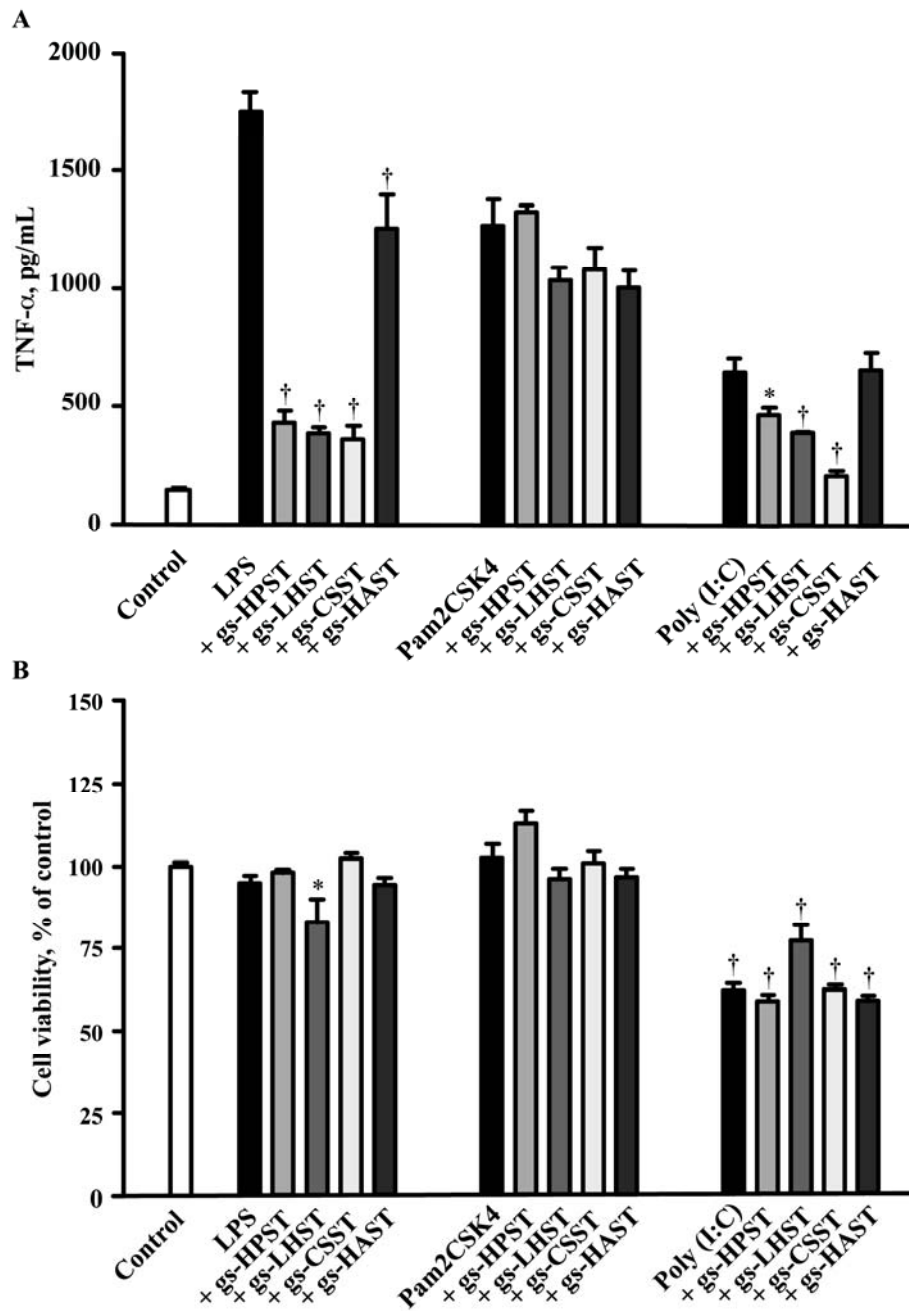


Fig. 6. Effect of glycol-split glycosaminoglycan (GAG)-stearylamine conjugates on (A) TNF- α production from and (B) viability of macrophages stimulated by agonists of various Toll-like receptors.

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)。

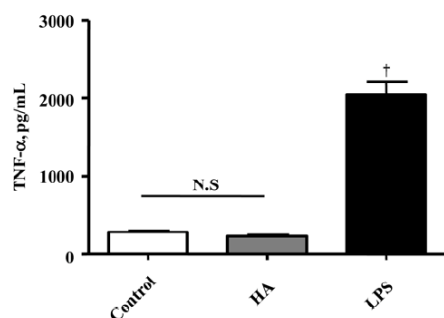


Fig. 7. Effect of native hyaluronic acid on TNF- α production in mouse peritoneal macrophages.

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 IV a 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

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⁵⁵⁾。近年、インフリキシマブやアダリムマブが尋常性乾癬に適応されるなど皮膚疾患に対し生物学的製剤の応用が試みられているが、これらの製剤は強力な効果が得られる一方で、全身性の免疫抑制作用による日和見感染や高額な医療費が課題となる^{56, 57)}。

接触性皮膚炎が発症する詳細なメカニズムは依然として不明であるが、その一部で TLR や Nod 様受容体(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor: NLR)などを介した自然免疫の活性化と、それに伴う炎症反応の関与が近年の研究から示唆されている^{54, 58-60)}。具体的には、TLR4 リガンドである LPS や熱ショックタンパク質により接触性皮膚炎が増悪することや^{61, 62)}、接触性皮膚炎を引き起こす代表的な金属であるニッケルがヒトの TLR4 を直接刺激することが報告されてきた⁶³⁾。また、TLR の刺激により産生される TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインは、接触性皮膚炎において角化細胞の増殖や T 細胞の浸潤に関与することが明らかにされている⁶⁴⁾。そのため、TLR シグナル経路を遮断することで炎症性サイトカインの産生を抑制し、接触性皮膚炎による炎症反応を抑制することが可能であると考えられる。

前章では、各種 GAG にステアリルアミンを導入することで、通常の GAG よりも強力に LPS 刺激による TNF- α の産生を抑制することを *in vitro* で明らかにした。従って、今回開発した GAG-ステアリルアミン結合体が TLR4 シグナル経路を遮断することで接触性皮膚炎の治療に有効である可能性が考えられた。そこで本章では、前章で最も抗炎症効果が高かった低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体 (gs-LHST)による接触性皮膚炎の治療を試みた。接触性皮膚炎ではハプテンに接触した部位特異的に炎症が起こるため、副作用回避の観点から考えても局所投与できる経皮投与が望ましい。そのため、本章では gs-LHST を分散させたマクロゴール軟膏を調製し、その接触性皮膚炎に対する治療効果について検討を行った。

第一節 DNFB 誘発性接触性皮膚炎モデルマウスに対する治療効果

接触性皮膚炎は感作と惹起の 2 つのステップにより成立する⁶⁵⁻⁶⁷⁾。感作相では表皮を通過して侵入したハプテンがタンパクと結合し、ランゲルハンス細胞などの抗原提示細胞により捕捉され、抗原提示細胞がリンパ節へ遊走することで感作リンパ球を誘導する。惹起相では、再び侵入したハプテンに対し T 細胞による抗原依存的な炎症と、ハプテンの刺激による抗原非依存的な炎症が起こることが知られている⁶⁸⁾。接触性皮膚炎を起こすモデル化合物としては、オキサゾラン、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、2,4,6-トリニトロクロロベンゼン (TNBC)、2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) などが汎用されている⁵⁴⁾。Rose らは DNFB の塗布回数や濃度を変えることにより接触性皮膚炎モデルとして急性モデル、亜急性モデル、亜慢性モデルを作成し、それぞれにおける耳介肥厚の変化や、炎症性サイトカイン産生の変化について検討したところ、再感作時に DNFB を 3 回耳介に塗布する亜急性モデルが単回塗布する急性モデルよりも接触性皮膚炎におけるアレルギー状態をより良く再現できることを報告している⁶⁹⁾。そのため、本章では Rose らの提唱する亜急性モデルを用いて検討を行った。

1-a マウス耳介肥厚抑制効果の評価

接触性皮膚炎の惹起相では、ハプテンによる再感作により T 細胞や顆粒球の浸潤、角化細胞の増殖が起こり、ハプテンが接触した部位で肥厚が生じる⁶⁴⁾。そこで、まず DNFB 刺激により誘発されるマウス耳介肥厚に対する gs-LHST を経皮投与後の抑制効果を検討した (Fig. 8)。DNFB を含まないアセトン：オリーブ油 (4:1) 溶液で再感作しても、マウスの耳介厚はほとんど変化しなかったが、0.3% DNFB 溶液で再感作すると経日的にマウス耳介の肥厚が生じた。一方、0.3% DNFB 溶液で再感作する 2 時間前に 0.2% gs-LHST 軟膏を耳介部に塗布したマウスにおいては、炎症によって起こる耳介の肥厚が薬物を含まない vehicle 軟膏塗布群に比べ有意に軽減されることが明らかになった。軟膏中の gs-LHST 濃度を 0.5% に増加させたところ、0.2% に比べやや炎症による肥厚が抑制される傾向にあったが、両者の差は有意なものではなかった。また、耳介肥厚に対する 0.2% gs-LHST の抑制効果は、外用ステロイドとして臨床で用いられる 0.5% プレドニゾロン軟膏と同程度であることが示された。

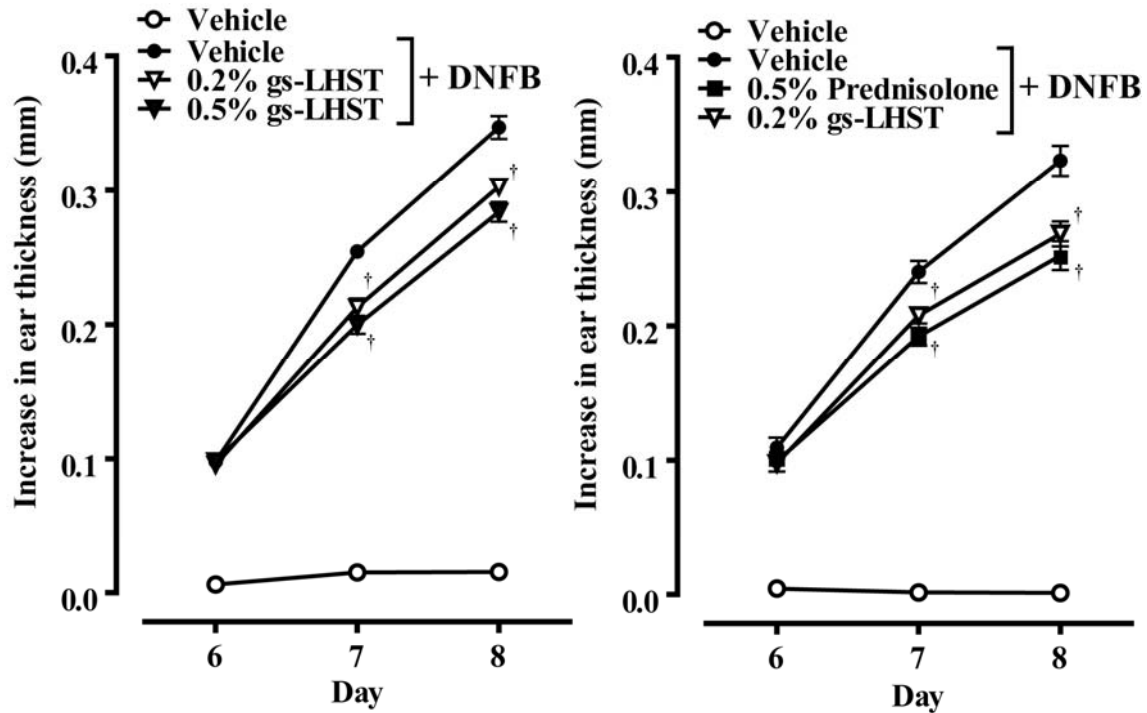


Fig. 8 Inhibitory effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) ointment on the 2,4-dinitrofluorebenzen (DNFB)-induced increase in ear thickness in mice.

Mouse pinnae were treated with (left) 0.2% or 0.5% gs-LHST ointment, (right) 0.2% gs-LHST or 0.5 % prednisolone ointment. The vehicle group was treated with the drug-free ointment base. After 2 h, mouse pinnae were stimulated with solution containing 0.3 % DNFB. After 24 h, the increase in ear thickness was measured with thickness gage. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n = 7-8). $^{\dagger}P < 0.01$.

1-b マウス耳介中の炎症性サイトカイン mRNA 発現抑制効果の評価

前項で gs-LHST の経皮投与により DNFB 炎症誘発時に起こる耳介肥厚を抑制できることが示されたので、続いて炎症反応に対する抑制効果について各種サイトカイン遺伝子の mRNA 発現量を指標に評価した。接触性皮膚炎では炎症性サイトカインの産生が重要であり、ハプテンの刺激により角質細胞やランゲルハンス細胞などから産生される TNF- α や IL-1 β により、T 細胞や顆粒球の浸潤、角化細胞の増殖などの続発するイベントを引き起こすことが知られている^{65, 67)}。また、DNFB による接触性皮膚炎ではヘルパー1 型(Th1)細胞優位のアレルギーが起こることが報告されており⁷⁰⁾、Th1 優位のアレルギーでは抗原提示細胞から IL-12 が産生され T 細胞の分化が制御されている⁷¹⁾。そこで、これら炎症性サイトカイン mRNA の発現が gs-LHST により抑制されるか検討を行った。実験の結果、TNF- α の mRNA 発現に対し gs-LHST 軟膏塗布群における含量依存的な発現抑制が認められた(Fig. 9A)。同様に IL-1 β の発現量も gs-LHST 軟膏塗布群で有意に抑制される

ことが確認された (Fig. 9B)。一方で、IL-12 の mRNA 発現に対しては gs-LHST による有意な mRNA 発現抑制は認められなかった (Fig. 9C)。

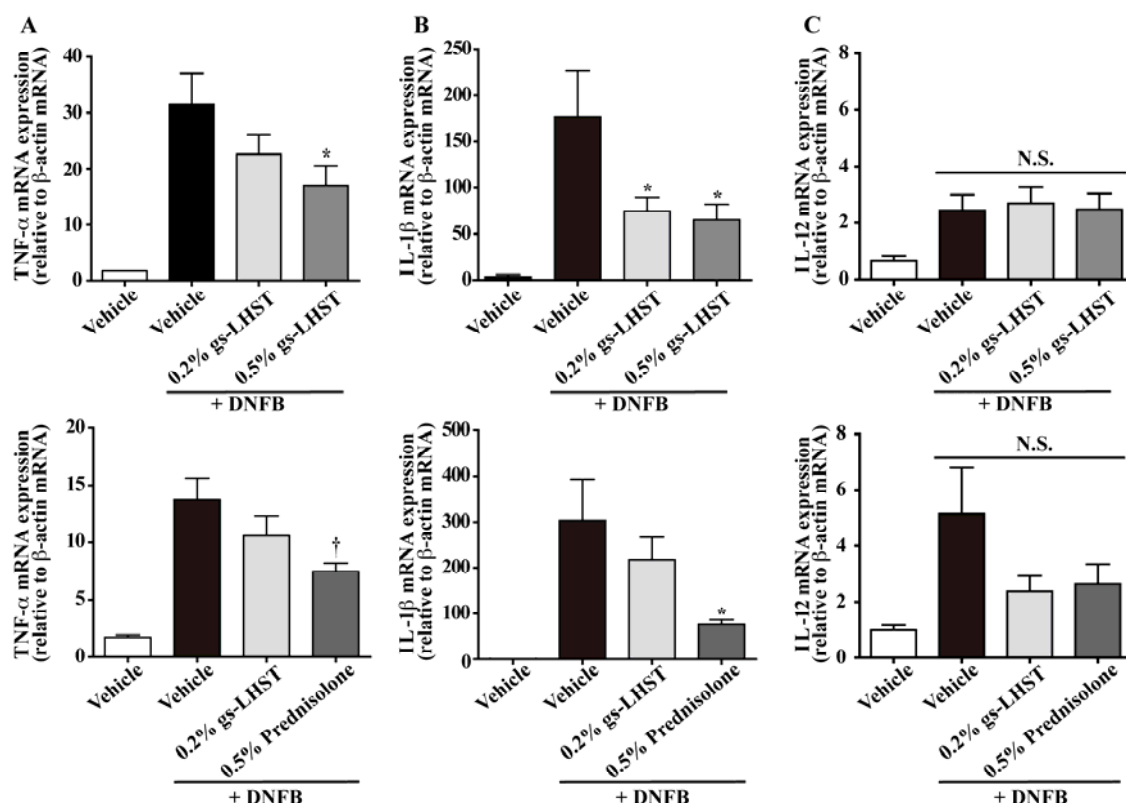


Fig. 9 Effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) on (A) TNF- α , (B) IL-1 β , and (C) IL-12 mRNA expression in 2,4-dinitrofluorebenzene (DNFB) stimulated mouse pinnae.

Mouse pinnae were treated daily for three days with (upper) 0.2% or 0.5% gs-LHST ointment, (lower) 0.2% gs-LHST or 0.5 % prednisolone ointment. The vehicle group was treated with the drug-free ointment base. After 2 h mouse pinnae were stimulated with solution containing 0.3 % DNFB. At 24 h post the last stimulation with DNFB, mRNA in mouse pinna was extracted and analyzed by quantitative reverse transcription PCR. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n = 7-8). *P < 0.05. †P < 0.01.

1-c マウス耳介中の酸化ストレス応答性遺伝子の mRNA 発現抑制効果の評価

ハプテンの刺激により産生される活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) は、酸化ストレスの亢進や傷害関連分子 (Damage associated molecular patterns: DAMPs) の産生を介して、接触性皮膚炎での炎症を進行させることが示唆されている^{54, 60)}。ROS により産生された DAMPs は TLR のリガンドとして働くことが知られており、一方で ROS の産生は TLR4 が刺激されることでも亢進されることが明らかにされている⁷²⁾。そのため、gs-LHST により TLR4 シグナル経路を遮断することで ROS による酸化ストレスの軽減ができるのではないかと考えた。ROS

による酸化ストレスに対する生体防御機構としては Nrf2/Keap1 経路の活性化を介し、転写因子である Nrf2 が核内移行することで種々の抗酸化タンパク質の発現が誘導されることが知られている^{73, 74)}。そこで、本検討では酸化ストレスマーカーとして、Nrf2 により転写活性が制御されるヘム分解酵素(Heme oxygenase-1: HO-1)および、NAD(P)H キノン還元酵素(NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1: NQO-1)の mRNA 発現量について評価した。その結果、0.5% gs-LHST 軟膏を塗布することで軽微であるが有意に DNFB 刺激時のマウス耳介中の HO-1 mRNA の発現が抑制されることが認められた(Fig. 10A)。しかし、NQO-1 については gs-LHST 軟膏塗布による有意な抑制は認められなかった(Fig. 10B)。

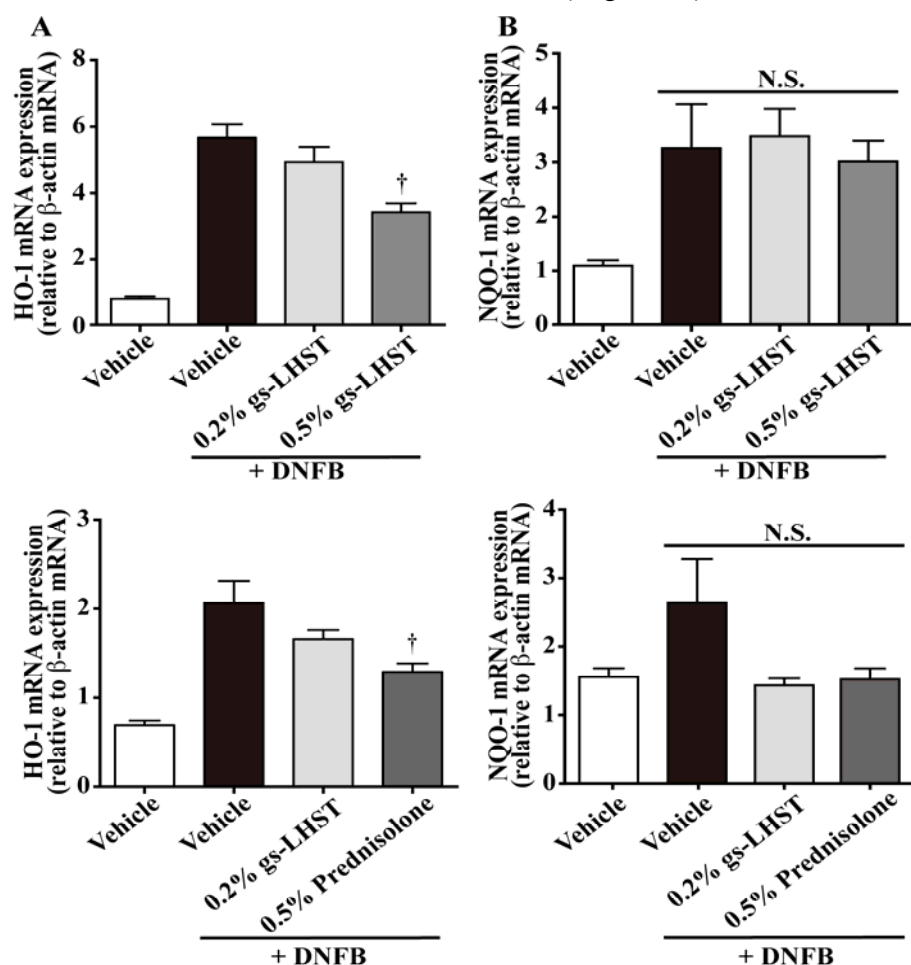


Fig. 10 Effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) on (A) hemeoxganase-1 (HO-1) and (B) NAD(P)H quinone dehydrogenase (NQO-1) mRNA expression in 2,4-dinitrofluorebenzen (DNFB)-stimulated mouse pinnae.

Mouse pinnae were treated daily for three days with (upper) 0.2% or 0.5% gs-LHST ointment, (lower) 0.2% gs-LHST or 0.5 % prednisolone ointment. The vehicle group was treated with the drug-free ointment base. After 2 h, mouse pinnae were stimulated with solution containing 0.3 % DNFB. At 24 h post the last stimulation with DNFB, mRNA in mouse pinna was extracted and analyzed by quantitative reverse transcription PCR. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n = 7-8). [†]P < 0.01.

1-d LPS 刺激 DC2.4 細胞に対する *in vitro* 酸化ストレス抑制効果の評価

前項の検討において、gs-LHST が酸化ストレスを抑制することが示唆された。そこで、前項での結果を裏付けるべく、マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞を用いて *in vitro* による確認実験を行った。まず、LPS 刺激時の DC2.4 細胞における TNF- α の mRNA 発現量について評価したところ、gs-LHST および N-アセチル-L-システイン(NAC)処置により有意にその発現が抑制されることが確認された(Fig 11A)。続いて、酸化ストレス応答因子である HO-1 および NQO-1 の mRNA 発現に対する影響を評価したところ、HO-1 に対しては遺伝子発現が有意に抑制されたが、NQO-1 の mRNA 発現は抑制されず、*in vivo* 実験と対応する結果となった(Fig. 11B, C)。

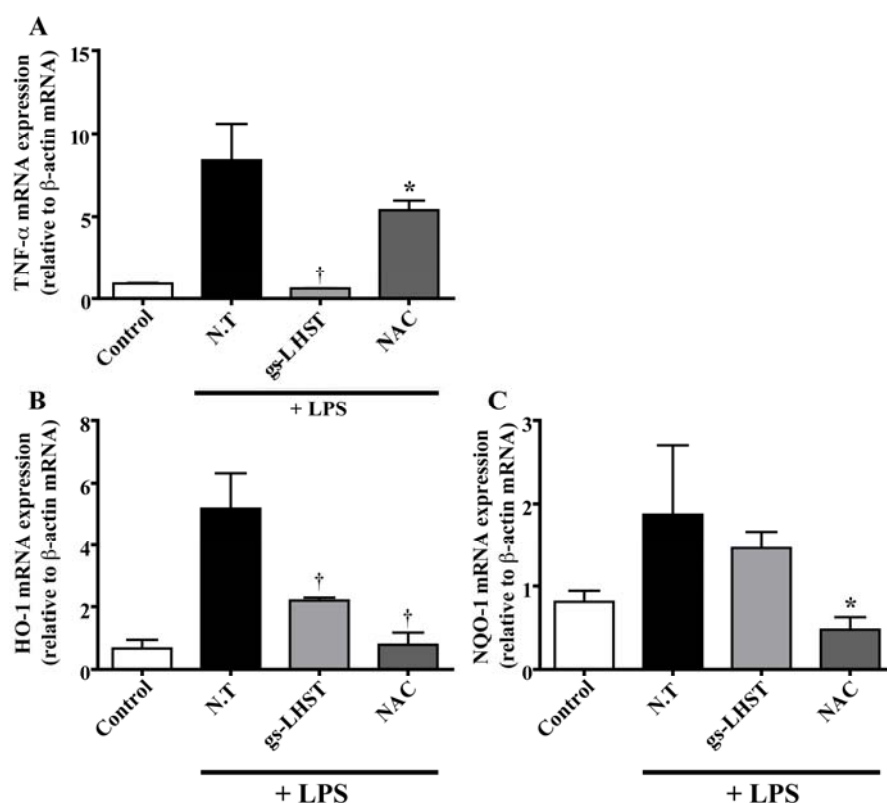


Fig. 11 Effect of low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) and N-acetyl-L-cysteine (NAC) on (A) TNF- α , (B) hemeoxganase-1 (HO-1), and (C) NAD(P)H quinone dehydrogenase (NQO-1) mRNA expression in lipopolysaccharide (LPS) stimulated DC2.4 cells.

DC2.4 cells were seeded on a 24-well pate at a density of 2.5×10^5 cells /well. Cells were incubated with 20 ng/mL LPS in the absence or presence of 0.1 mg/mL gs-LHST or 10 mM NAC for 24 h. After incubation, the mRNAs were extracted and analyzed by quantitative reverse transcription PCR. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n = 3). *P < 0.05. [†]P < 0.01.

1-e マウス耳介中のヒスチジン脱炭酸酵素 mRNA 発現抑制効果の評価

接触性皮膚炎などのアレルギー疾患の多くは搔痒感を伴い、その内因性因子として肥満細胞から放出されるヒスタミンが重要な役割を担っている。ヒスタミンはヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)によりヒスチジンから合成されるが、HDCは炎症性サイトカインにより誘導されることが知られている⁷⁵⁻⁷⁷⁾。そこで、gs-LHSTがHDCのmRNA発現量に対し影響を与えているかどうか検討を行ったところ、gs-LHST軟膏の投与によりVehicle軟膏塗布群に比べて抑制傾向が認められたものの、統計学的には有意差は認められなかった(Fig. 12)。

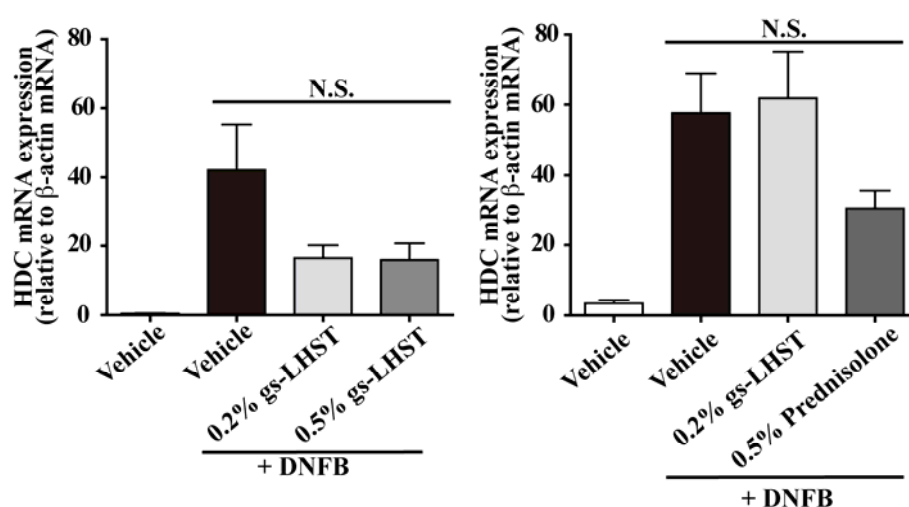


Fig. 12 Effect of prednisolone and glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) on histidine decarboxylase (HDC) mRNA expression in 2,4-dinitrofluorebenzen (DNFB) stimulated mouse pinnae.

Mouse pinnae were treated daily for three days with (upper) 0.2% or 0.5% gs-LHST ointment, (lower) 0.2% gs-LHST or 0.5 % prednisolone ointment. The vehicle group was treated with the drug-free ointment base. After 2 h, mouse pinnae were stimulated with solution containing 0.3 % DNFB. At 24 h, post the last stimulation with DNFB, mRNA in mouse pinna was extracted and analyzed by quantitative reverse transcription PCR. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n = 7-8).

1-f 耳介の組織学的評価

マウス耳介の組織学的評価を行うために、8日目のマウス耳介を摘出しパラフィン包埋切片を作成した。得られた切片をヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色し、耳介組織を観察したところ、DNFBで感作することによって、表皮・真皮の厚みが増し、細胞の浸潤が認められた。一方、0.2% gs-LHST軟膏を前投与した群では、0.5%プレドニゾロン軟膏塗布群と同様、DNFBによる組織学的異常が軽減されることが確認された(Fig. 13)。

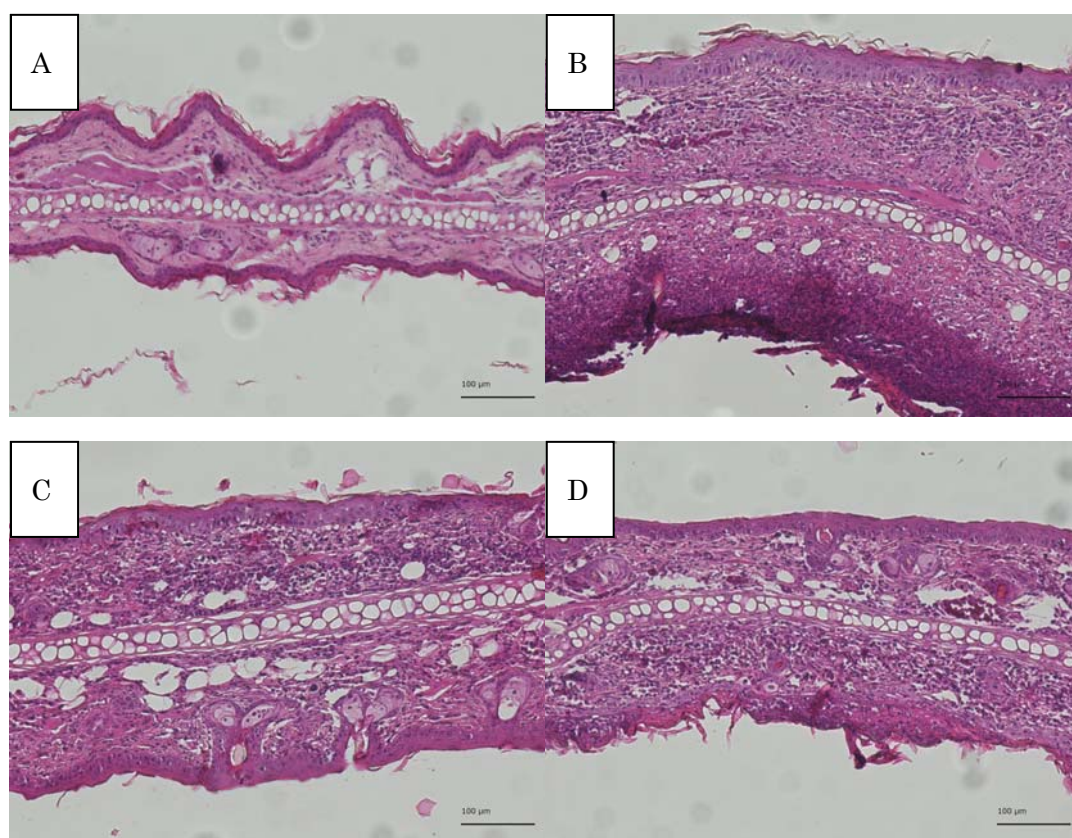


Fig. 13 Histological assessment of prednisolone and glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) on 2,4-dinitrofluorebenzen(DNFB) stimulated mouse pinnae.

At 24 h post the last DNFB stimulation, mouse pinnae were excised and fixed with 10 % formalin neutral buffer solution and embedded in paraffin. Paraffin-embedded pinnae were sectioned at 5 µm and stained with hematoxylin and eosin. Images were displayed as (A) Control (stimulate with solvent without DNFB), (B) DNFB plus drug-free ointment base, (C) DNFB plus 0.5% prednisolone, and (D) DNFB plus 0.2% gs-LHST.

1-g TLR4 変異型 C3H/HeJ マウスにおける DNFB 誘発接触性皮膚炎に対する LHP 軟膏の効果

前項までの検討で、gs-LHST が DNFB 誘発接触性皮膚炎モデルマウスに対し抗炎症効果を示すことが明らかにされた。gs-LHST はこれまでの検討により TLR4 を介して抗炎症効果を発揮すると考えられるが、今回の接触性皮膚炎における TLR4 の関与は不明である。そこで、遺伝子変異型の TLR4 が発現している C3H/HeJ マウスを用いて同様の検討を行った。野生型の TLR4 が発現している C3H/HeN マウスでは、これまでの BALB/c マウスを用いた検討と同様、0.5% gs-LHST 軟膏が DNFB 刺激により誘発される耳介肥厚を抑制する効果が認められた。一方で C3H/HeJ マウスでも DNFB 感作による耳介肥厚は観察されたが、gs-LHST による抑制作用は認められなかった(Fig. 14)。

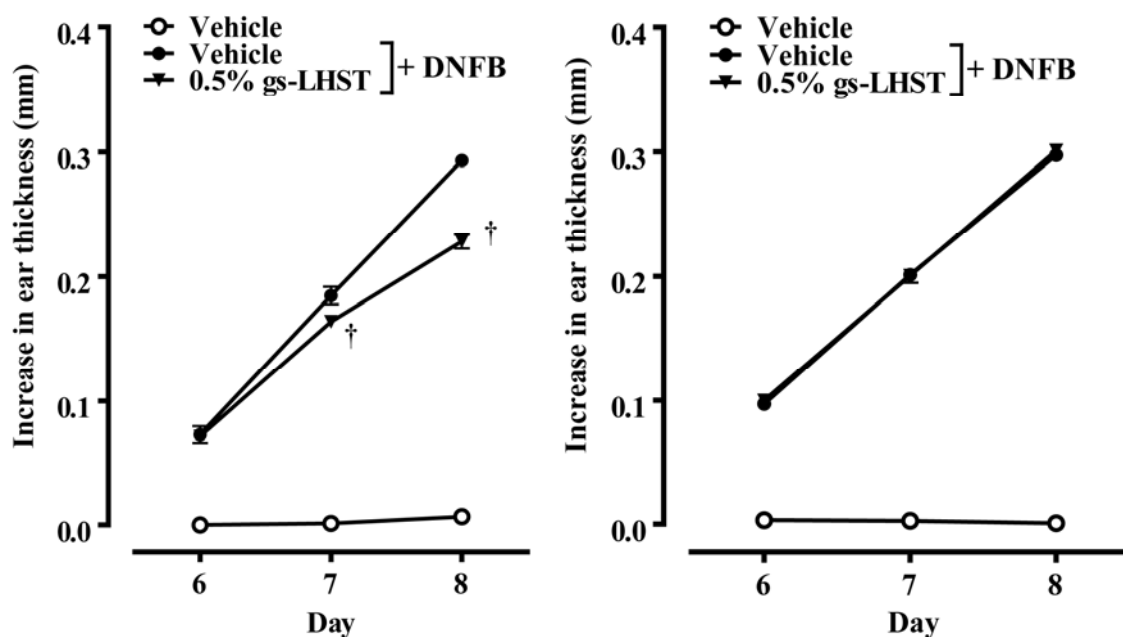


Fig. 14 Inhibitory effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) ointment on the 2,4-dinitrofluorebenzen (DNFB)-induced increase in ear thickness in C3H/HeN (left) and C3H/HeJ (right) mice.

Mouse pinnae were treated with 0.5% gs-LHST ointment. The vehicle group was treated with the drug-free ointment base. After 2 h, mouse pinnae were stimulated with solution containing 0.3 % DNFB. After 24 h, the increase in ear thickness was measured by thickness gage. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n = 8). [†]P < 0.01.

また前項までと同様に耳介中の炎症性サイトカイン mRNA として TNF- α 、IL-1 β および酸化ストレス応答性遺伝子として HO-1 の mRNA 発現量について検討を行った。その結果、C3H/HeN マウスでは 0.5% gs-LHST 軟膏塗布群においていずれの mRNA 発現も Vehicle 軟膏塗布群に比べ有意にその発現が抑制されていたのに対し、C3H/HeJ マウスでは gs-LHST による mRNA の発現抑制は全く認められなかった (Fig. 15)。

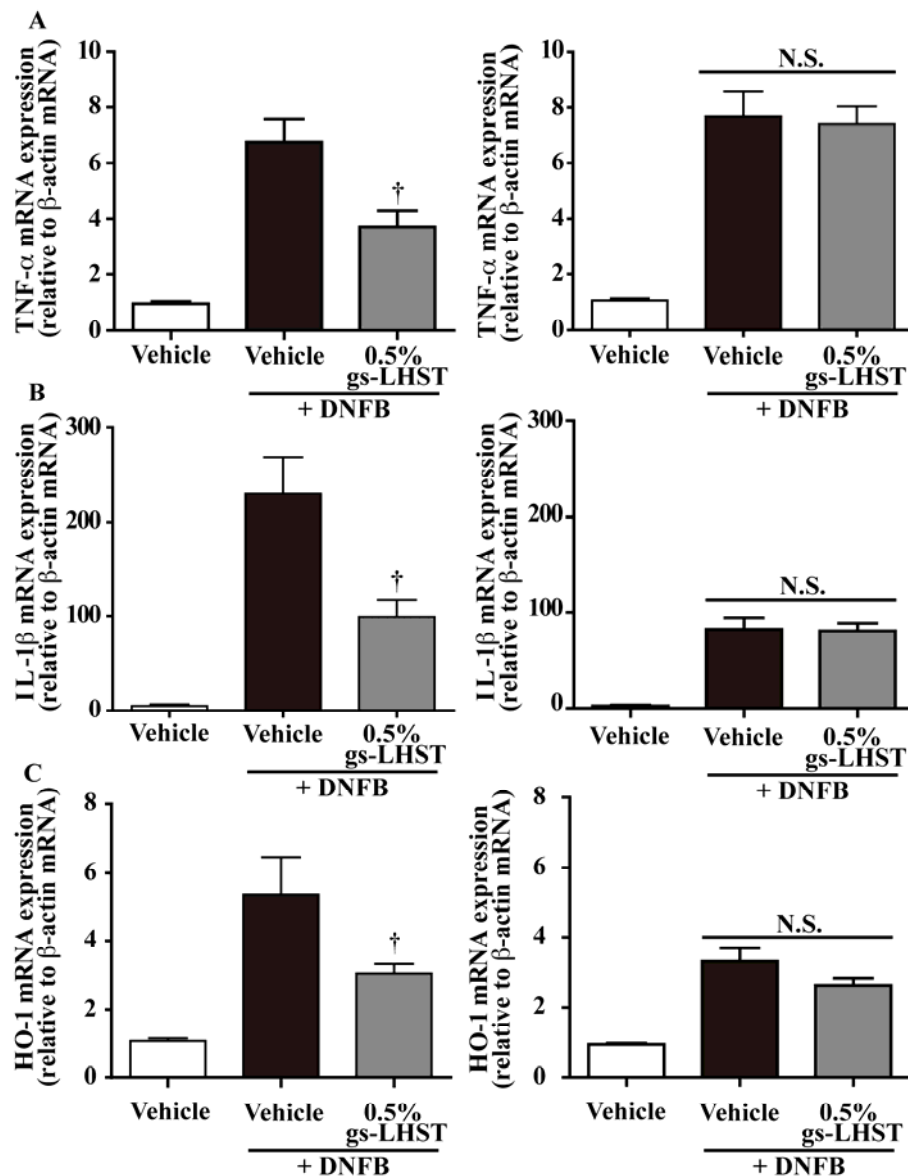


Fig. 15 Effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) on (A) TNF- α , (B) IL-1 β and (C) hemoxygenase-1 (HO-1) mRNA expression of 2,4-dinitrofluorebenzen (DNFB) stimulated mouse pinnae.

Mouse pinnae of (left) C3H/HeN and (right) C3H/HeJ were treated with 0.5% gs-LHST ointment. Vehicle group was treated with ointment without adding any drug. After 2 h, mouse pinnae were stimulated solution with or without 0.3 % DNFB. After 24 h from the last DNFB stimulation, mRNA in mouse pinna was extracted. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). † P < 0.01.

第二節 考察

本章では、低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体(gs-LHST)の接触性皮膚炎に対する抗炎症効果を評価することを目的として、gs-LHST を分散させた軟膏剤を調製した。しかし、gs-LHST は主鎖骨格である LH の平均分子量が 5 kDa と高分子であるため皮膚最大のバリア層である角質層の透過は困難であることが予想される。一般に薬物の経皮吸収を促進させる方法としては、吸収促進剤を用いる方法や、ソノポレーションやイオントフォレシスなどの物理化学的な方法が知られている⁷⁸⁾。吸収促進剤は適用が簡便であり HP の経皮吸収性が向上することも既に報告されている^{78, 79)}。本検討では代表的な溶媒性吸収促進剤であるプロピレングリコールを選択し軟膏剤に 10%配合させることで経皮吸収性の向上を図った。調製した軟膏をマウス耳介に塗布しても耳介肥厚が認められなかったことから、これらの皮膚刺激性は少ないと考えられた(Fig. 16)。

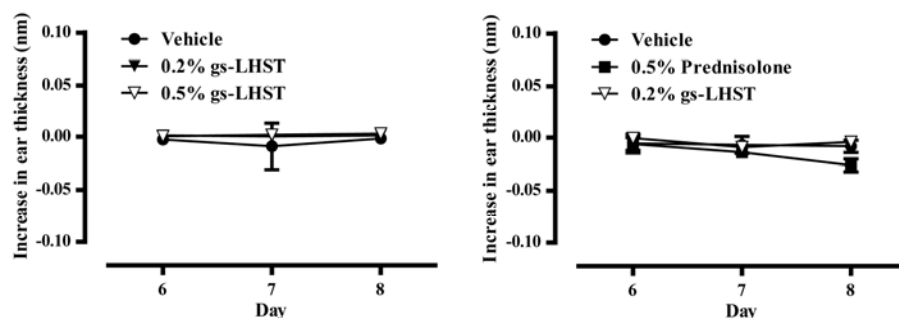


Fig. 16 Ear thickness following the prepared ointments.

Mouse pinnae were treated with the ointment base, 0.2 or 0.5% gs-LHST ointment, or 0.5% prednisolone ointment. After 24 h, the increase in ear thickness was measured by thickness gage. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n = 7-8).

続いて、DNFB 誘発接触性皮膚炎モデルマウスに対する gs-LHST 軟膏の抗炎症効果を評価した。その結果、DNFB による再感作の 2 時間前に gs-LHST 軟膏をマウス耳介に塗布することにより、DNFB 刺激により誘発される耳介肥厚および炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β 遺伝子発現が有意に抑制されることが明らかとなった(Fig. 8, 9)。皮膚疾患では、皮膚中の常在菌が皮膚中へと侵入し、TLR や NLR により認識されることで炎症を引き起こすことが示唆されている。事実、NC/Nga マウスは通常飼育ではアトピー様症状を自然発症するが、無菌環境ではその症状が観察されないことが報告されている⁸⁰⁾。一方で、Martin らは DNFB や TNCB などのハプテン刺激による接触性皮膚炎は無菌状態下でも発症することから、ハプテンの刺激により生成される低分子量ヒアルロン酸などの内在性 TLR リガンドが炎症に関与することを述べている^{81, 82)}。これら TLR リガンドによる刺激などを介して産生される炎症性サイトカインは、角化細胞の増殖や、好中球

の浸潤、T細胞の遊走を促すため接触性皮膚炎での炎症反応において重要な役割を果たしていると考えられている^{65, 67, 83})。実際、TNF- α やIL-1 β の欠損マウスにハプテンにより感作された野生型マウスのT細胞を移植しても接触性皮膚炎が惹起されないことや、ハプテンによる再感作前に炎症性サイトカインに対する中和抗体を投与することで、ハプテンの刺激による耳介肥厚が抑制されることが報告されている^{69, 84, 85})。本検討においてgs-LHSTの経皮投与により、DNFBによって誘発される耳介中の炎症性サイトカイン遺伝子のmRNA発現の抑制が確認でき、これがマウス耳介肥厚の抑制に関係しているものと推察された。さらに、その抑制効果は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(Fig. 14、15)、TLR4の阻害を介したものであることが推察された。しかしながら、MarinらやDi Nardoの報告と同様^{81, 86})、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ている。DNFB刺激時には、TLR2のリガンドとなる低分子量ヒアルロン酸が産生されることも知られている⁸⁷)。こうした複合的なメカニズムがDNFB誘発接触性皮膚炎において働くため、C3H/HeJマウスでも炎症が観察されたものと考えられる。また、gs-LHSTの炎症抑制効果が限定的であったことに対しては、TLR4に対して選択性が高いことが一部関係しているものと思われる。

ROSによる酸化ストレスは炎症性サイトカイン同様に接触性皮膚炎において重要な因子であると考えられてきた^{54, 60})。EsserらはROS除去剤によりハプテンの刺激により誘発される耳介肥厚が抑制できることを報告している⁸²)。これまでの報告^{7, 60})では、ROSによって生じる酸化ストレスにより熱ショックタンパク質や酸化脂質などのDAMPsが産生され、DAMPsがTLR4を刺激し再びROSが産生するという炎症サイクルが提唱されている。そこで、DNFB刺激時の耳介中におけるHO-1およびNQO-1のmRNA発現に対するgs-LHSTの効果を評価したところ、HO-1遺伝子のみ発現が有意に抑制され(Fig. 10)、in vitroでも同様の結果が得られることが確認された(Fig. 11)。NQO-1に対しgs-LHSTが有効でない理由については現時点で不明であるが、gs-LHSTは酸化ストレスに対しても一部有効である可能性が示唆された。また、C3H/HeJマウスでは野生型のTLR4を発現するC3H/HeNマウスに比べDNFBによるHO-1遺伝子の発現誘導が低く、gs-LHSTによる効果も認められなかったことから、DNFB刺激による酸化ストレスにTLR4が関与していること、gs-LHSTはその経路を抑制し酸化ストレス抑制効果を示すことが推察された。

以上本章では、gs-LHSTがDNFB刺激によって誘発される耳介肥厚および耳介中の炎症性サイトカインmRNAの発現を抑制することで接触性皮膚炎に対し治療

効果が得られることを明らかにした。また、TLR4 変異型のマウスでは gs-LHST の抗炎症効果が認められなかったことから、gs-LHST は TLR4 を介する炎症を限定的に抑制していることが明らかにされた。本検討では gs-LHST によるマクロゴール軟膏によるのみ評価を行ったが、gs-LHST は両親媒性物質であるため、ローション剤やクリーム剤など皮膚の状態に合わせて他の剤形にも容易に応用できる。また、皮膚適用製剤では他の薬物を配合することも可能であり、gs-LHST とは異なる機序を持つ薬物との併用によって治療効果を高めることも可能と考えられる。

結 論

以上、著者は二章にわたり、各種 GAG-ステアリ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-ステアリ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 にステアリルアミンを縮合させた GAG-ステアリ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。ステアリ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から併せて考えると、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- ステアリ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-ステアリルアミン結合体 (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 軟膏を経皮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える。

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 社製のゼーターサイザーナノ 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-ステアシ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

【1】 試薬・マウス

ポリエチレングリコール 4000、ポリエチレングリコール 400、プロピレングリコール、プレドニゾロン(Sigma)は和光純薬株式会社より購入した。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】 グリコール開裂 LH-ステアリルアミン結合体(gs-LHST)軟膏の調製

gs-LHST は第 1 章第 1 節【2】と同様の方法で合成した。gs-LHST 軟膏はポリエチレングリコール 4000:ポリエチレングリコール 400:プロピレングリコール:水を 4:4:1:1 の割合で混合しホモジナイザーで攪拌しながら徐々に冷却することにより調製した。

【3】 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炎症を惹起させた。Control 群は DNFB を含まない AOO 溶液のみを塗布した。

【4】 DNFB 誘発性接触性皮膚炎モデルマウスへの薬物投与

第二章第一節【3】に従い接触性皮膚炎マウスを作成し、0.3%DNFB 刺激 2 時間前に、第二章第一節【3】に従い調製した 0.2%もしくは 0.5% gs-LHST 軟膏 10 ミリグラム、0.5%プレドニゾロン軟膏をマウス右耳介に塗布した。Vehicle 群は軟膏基剤のみを塗布した。

【5】 マウス耳介厚の測定

第二章第一節【3】に従い接触性皮膚炎マウスを作成し、0.3%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。

【6】マウス耳介中の遺伝子発現評価

第二章第一節【3】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。ホモジナイザーにてマウス耳介の組織ライセートを調製し、GeneElute[®] Mammalian Total RNA Miniprep Kit(Sigma 社)を用いて耳介中の全 RNA を抽出し、PrimeScript[®] RT reagent Kit(タカラバイオ社)により逆転写反応を行った。各 mRNA 量は SYBR[®] Premix Ex Taq(タカラバイオ社)を用いて、Lightcycler[®] 2.0(Roche diagnostics 社)による定量的 PCR により測定した。尚、定量的 PCR におけるプライマーは下記の表の通りである。

gene		sequence
B-actin	sense	TGCTGACAGGATGCAGAAGG
	antisense	ACAGTGAGGCCAGGATGGAG
TNF- α	sense	CCTCCCTCTCATCAGTTCTA
	antisense	ACTTGGTGGTTTGCTACGAC
IL-1 β	sense	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATC
	antisense	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
IL-12	sense	ACTCTGCGCCAGAAACCTC
	antisense	CACCCTGTTGATGGTCACGAC
HO-1	sense	TCCCTGTGTTTCCTTTCTCTG
	antisense	TGGATGTGCTTTTGGTGAGG
NQO1	sense	TTCTGTGGCTTCCAGGTCTT
	antisense	AGGCTGCTTGGAGCAAAATA
HDC	sense	GATCAGATTTCTACCTGTGG
	antisense	GTGTACCATCATCCACTTGG

【7】細胞株

マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞は 10% FBS、penicillin G (100 U/mL)、streptomycin (100 μ g/mL)、L-glutamine(2 mM)、1%非必須アミノ酸(Nacalai Tesque 社)、1%モノチオグリコレート(和光純薬株式会社)を添加した RPMI1640 培地で 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で培養した。

【8】 DC2.4 細胞における遺伝子発現評価

24 穴プレートに DC2.4 細胞を 1.0×10^5 個/well になるように細胞を播種した。24 時間後、培地を OptiMEM に交換し gs-LHST を最終濃度が 0.1 mg/mL となるように添加した。一方、酸化ストレスに対するポジティブコントロールとして N-アセチル-L-システイン(NAC)を最終濃度が 10 mM となるように添加した。そこに LPS が最終濃度として 20 ng/mL になるように添加した。24 時間培養後、DC2.4 細胞中の遺伝子発現評価は第二章一節【6】と同様の方法で行った。

【9】 接触性皮膚炎マウス耳介の組織学的観察

第二章一節【3】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、10%中性ホルマリン緩衝液中で一晩中、4 °C で固定を行った後、パラフィン包埋切片を作成した。パラフィン切片はミクロトーム(大和光機工業株式会社製)で 5 μ m になるように薄切し、H&E 染色を行った。組織観察は Biozero Bz-8000(キーエンス社製)を用いて行った。

【10】 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**, I270-4 (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-Bolivar, 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) Hengge, U. R., Ruzicka, T., Schwartz, R. A., Cork, M. J., *J. Am. Acad. Dermatol.*, **54**, 1-15 (2006). Adverse effects of topical glucocorticosteroids
- 56) Tovey, M. G., Lallemand, C., *Therapeutic advances in drug safety*, 2042098611406318 (2011). Immunogenicity and other problems associated with the use of biopharmaceuticals
- 57) 田中榮一, 山中寿, *臨床リウマチ*, **26**, 251-259 (2014). 生物学的製剤の医療経済学的評価—日常診療におけるトシリズマブの有効性と安全性との関連を中心に—
- 58) Ptak, W., Bryniarski, K., Ptak, M., Majewska, M., Gamian, A., Lobo, F. M., Szczepanik, M., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **139**, 188-200 (2006). Toll-like receptor ligands reverse suppression of contact hypersensitivity reactions induced by epicutaneous immunization with protein antigen
- 59) Nakamura, N., Tamagawa-Mineoka, R., Ueta, M., Kinoshita, S., Katoh, N., *J. Invest. Dermatol.*, **135**, 411-417 (2015). Toll-like receptor 3 increases allergic and irritant contact dermatitis
- 60) 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
- 61) Yusuf, N., Nasti, T. H., Huang, C. M., Huber, B. S., Jaleel, T., Lin, H. Y., Xu, H., Elmets, C. A., *J. Immunol.*, **182**, 675-683 (2009). Heat shock proteins HSP27 and HSP70 are present in the skin and are important mediators of allergic contact hypersensitivity
- 62) Yokoi, S., Niizeki, H., Iida, H., Asada, H., Miyagawa, S., *J. Dermatol. Sci.*, **53**, 120-128 (2009). Adjuvant effect of lipopolysaccharide on the induction of contact hypersensitivity to haptens in mice
- 63) Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P. J., Galanos, C., *Nat. Immunol.*, **11**, 814-819 (2010). Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel

- 64) Grabbe, S., Schwarz, T., *Immunol. Today*, **19**, 37-44 (1998).Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity
- 65) Christensen, A. D., Haase, C., *APMIS*, **120**, 1-27 (2012).Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice
- 66) Erkes, D. A., Selvan, S. R., *J. Immunol. Res.*, **2014**, 175265 (2014).Hapten-induced contact hypersensitivity, autoimmune reactions, and tumor regression: plausibility of mediating antitumor immunity
- 67) Honda, T., Egawa, G., Grabbe, S., Kabashima, K., *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 303-315 (2013).Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis
- 68) Grabbe, S., Steinert, M., Mahnke, K., Schwartz, A., Luger, T. A., Schwarz, T., *J. Clin. Invest.*, **98**, 1158-1164 (1996).Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis
- 69) Röse, L., Schneider, C., Stock, C., Zollner, T. M., Döcke, W., *Exp. Dermatol.*, **21**, 25-31 (2012).Extended DNFB-induced contact hypersensitivity models display characteristics of chronic inflammatory dermatoses
- 70) Suga, H., Sugaya, M., Miyagaki, T., Ohmatsu, H., Okochi, H., Sato, S., *J. Immunol.*, **190**, 6059-6070 (2013).CXCR3 deficiency prolongs Th1-type contact hypersensitivity
- 71) Riemann, H., Schwarz, A., Grabbe, S., Aragane, Y., Luger, T. A., Wysocka, M., Kubin, M., Trinchieri, G., Schwarz, T., *J. Immunol.*, **156**, 1799-1803 (1996).Neutralization of IL-12 in vivo prevents induction of contact hypersensitivity and induces hapten-specific tolerance
- 72) Park, H. S., Jung, H. Y., Park, E. Y., Kim, J., Lee, W. J., Bae, Y. S., *J. Immunol.*, **173**, 3589-3593 (2004).Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B

- 73) Kaspar, J. W., Niture, S. K., Jaiswal, A. K., *Free Radical Biology and Medicine*, **47**, 1304-1309 (2009).Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress
- 74) Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C. B., *J. Biol. Chem.*, **284**, 13291-13295 (2009).The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress
- 75) Endo, Y., Tabata, T., Kuroda, H., Tadano, T., Matsushima, K., Watanabe, M., *J. Physiol. (Lond.)*, **509**, 587-598 (1998).Induction of histidine decarboxylase in skeletal muscle in mice by electrical stimulation, prolonged walking and interleukin-1
- 76) Wood, G. W., Hausmann, E. H., Choudhuri, R., Dileepan, K. N., *Cytokine*, **12**, 622-629 (2000).Expression and regulation of histidine decarboxylase mRNA expression in the uterus during pregnancy in the mouse
- 77) Dy, M., Pacilio, M., Arnould, A., Machavoine, F., Mayeux, P., Hermine, O., Bodger, M., Schneider, E., *Exp. Hematol.*, **27**, 1295-1305 (1999).Modulation of histidine decarboxylase activity and cytokine synthesis in human leukemic cell lines: relationship with basophilic and/or megakaryocytic differentiation
- 78) Lanke, S., Strom, J., Banga, A. K., *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **26**, (2009).Enhancement of transdermal delivery of heparin by various physical and chemical enhancement techniques
- 79) Bonina, F., Montenegro, L., *Int. J. Pharm.*, **82**, 171-177 (1992).Penetration enhancer effects on in vitro percutaneous absorption of heparin sodium salt
- 80) Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G. P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P. W., Ra, C., *Int. Immunol.*, **9**, 461-466 (1997).Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice
- 81) Martin, S. F., Dudda, J. C., Bachtanian, E., Lembo, A., Liller, S., Durr, C., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., Fejer, G., Vassileva, R., Jakob, T., Freudenberg, N., Termeer, C. C., Johner, C., Galanos, C., Freudenberg, M. A., *J.*

- Exp. Med.*, **205**, 2151-2162 (2008).Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity
- 82) Esser, P. R., Wölfe, U., Dürr, C., von Loewenich, F. D., Schempp, C. M., Freudenberg, M. A., Jakob, T., Martin, S. F., *PloS one*, **7**, e41340 (2012).Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation
- 83) Corsini, E., Galli, C. L., *Toxicol. Lett.*, **102**, 277-282 (1998).Cytokines and irritant contact dermatitis
- 84) Piguet, P. F., Grau, G. E., Hauser, C., Vassalli, P., *J. Exp. Med.*, **173**, 673-679 (1991).Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions
- 85) Nakae, S., Komiyama, Y., Narumi, S., Sudo, K., Horai, R., Tagawa, Y., Sekikawa, K., Matsushima, K., Asano, M., Iwakura, Y., (2003).IL-1-induced tumor necrosis factor- α elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing IFN- γ -inducible protein 10 in the elicitation phase of the contact hypersensitivity response
- 86) Di Nardo, A., Braff, M. H., Taylor, K. R., Na, C., Granstein, R. D., McInturff, J. E., Krutzik, S., Modlin, R. L., Gallo, R. L., *J. Immunol.*, **178**, 1829-1834 (2007).Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization
- 87) Scheibner, K. A., Lutz, M. A., Boodoo, S., Fenton, M. J., Powell, J. D., Horton, M. R., *J. Immunol.*, **177**, 1272-1281 (2006).Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2