

|         |                                                                                                                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名     | はやし ひろ つぐ<br>林 洋 次                                                                                                                                    |
| 学位の種類   | 博 士 (農 学)                                                                                                                                             |
| 学位記番号   | 論 農 博 第 2504 号                                                                                                                                        |
| 学位授与の日付 | 平 成 15 年 11 月 25 日                                                                                                                                    |
| 学位授与の要件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当                                                                                                                               |
| 学位論文題目  | Potential of selectin inhibitors for the treatment of lipopolysaccharide-induced acute inflammation<br>(リポポリサッカライド誘発性急性炎症反応におよぼすセレクトイン阻害剤の作用機序に関する研究) |
| 論文調査委員  | (主 査)<br>教 授 今 井 裕 教 授 宮 本 元 教 授 矢 野 秀 雄                                                                                                              |

### 論 文 内 容 の 要 旨

セレクトインは、シアリルルイスXと呼ばれる糖鎖を認識する接着タンパク質ファミリーで、白血球の炎症部位への接着、集積に関与することが知られている。特にP-セレクトインは、様々な炎症刺激により急速に血管内皮細胞表面に発現し、好中球の血管内皮細胞への接着、炎症局所への浸潤を経て組織破壊等の激しい炎症反応を引き起こすと考えられている。またL-セレクトインは、こうした接着反応のみならず白血球の活性化に関与することが報告されている。このような知見に基づき、本論文では、リポポリサッカライドによる急性炎症反応モデルを用いて、セレクトイン阻害剤の抗炎症作用を検討し、その薬効を評価すると共にその作用機序の解明を目的とした。

まず、セレクトイン阻害剤であるシアリルルイスXオリゴサッカライドが炎症性刺激による白血球活性化を抑制するか否かを検討する目的で、リポポリサッカライド刺激によるヒト単球・マクロファージ由来 THP-1細胞からの炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ ) 分泌に対する影響を検討した。その結果、オリゴサッカライドは、濃度依存的にリポポリサッカライド刺激による炎症性サイトカイン分泌を抑制した。また、その抑制作用は、リポポリサッカライドのTHP-1細胞への結合を直接的に阻害するのではなく、L-セレクトインを介したチロシンキナーゼの活性化が部分的に関与していることが示された。これらの結果から、シアリルルイスXオリゴサッカライドは、従来報告されてきた白血球接着・浸潤抑制のみならず、細胞からの炎症性サイトカイン分泌抑制によって抗炎症作用を発揮することが明らかとなった。

次に、リポポリサッカライド誘発性ウサギ急性腎障害モデルを用いてセレクトイン阻害剤 (シアリルルイスXオリゴサッカライドおよび抗P-セレクトイン抗体) を評価した。その結果、いずれのセレクトイン阻害剤も腎組織への白血球浸潤を抑制し、急性腎障害の指標である血清クレアチニンおよび血中尿素窒素の上昇を阻害した。また、フィブリン重合阻害、尿細管障害抑制といった組織学的な改善も認められた。以上の結果から、リポポリサッカライド誘発性急性腎障害にセレクトイン、特にP-セレクトインが関与していること、また、セレクトイン阻害剤が急性腎障害に対し有効であることを明らかにした。

同様に、リポポリサッカライド誘発性ウサギ急性肺障害モデルを用いてセレクトイン阻害剤 (シアリルルイスXオリゴサッカライドおよび抗P-セレクトイン抗体) を評価した。その結果、いずれの阻害剤もリポポリサッカライドによる肺ガス交換能の低下を抑制し、また組織学的解析においてリポポリサッカライドによる肺組織への白血球浸潤、肺胞壁の肥厚および出血を抑制した。さらに、急性肺障害惹起後にシアリルルイスXオリゴサッカライドを投与しても、肺組織への白血球浸潤を抑制し、肺ガス交換能の低下を抑制した。これらの結果から、リポポリサッカライド誘発性急性肺障害にセレクトイン、特にP-セレクトインが関与していること、また、セレクトイン阻害剤が急性肺障害に対し有効であることを明らかにした。

以上、本論文において、セレクトイン阻害剤は、リポポリサッカライド刺激による急性炎症部位 (腎臓および肺) への白血球浸潤を抑制することにより抗炎症作用を発揮し、その臓器の機能を保持することが明らかとなった。また、シアリルルイスXオリゴサッカライドは、急性肺障害惹起後の投与においても抗炎症作用を示し、予防効果のみならず、治療効果もあることが示され、急性腎障害、急性肺障害を含めた急性炎症に対し、新たな抗炎症薬となる可能性が示唆された。さらに、シ

アリルルイスXオリゴサッカライドは白血球接着阻害作用のみならず、白血球の活性化に伴う炎症性サイトカイン分泌を抑制し、その抑制作用がさらに抗炎症作用を高めている可能性を示した。

## 論文審査の結果の要旨

セレクチンファミリーは、シアリルルイスXと呼ばれる糖鎖を認識する糖タンパク質であり、炎症部位への白血球の接着や集積に関与する。3種のセレクチンの中で、特にP-セレクチンは種々の炎症刺激によって血管内皮細胞表面に急速に発現し、白血球の一種、好中球のシアリルルイスXと結合して炎症局所への浸潤を誘導し、激しい炎症反応を引き起こす。またL-セレクチンは、前述の接着反応に加えて、白血球の活性化に関与することが報告されている。本論文では、リポポリサッカライドによって誘発される急性炎症反応モデルを用いて、セレクチン阻害剤の抗炎症作用を検討するとともに、その作用機序の解明を試みたものである。本研究によって得られた成果は、以下のように要約できる。

1. セレクチン阻害剤であるシアリルルイスXオリゴサッカライドを用いて、炎症性刺激後のヒト単球・マクロファージ由来THP-1細胞からのサイトカイン（IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ ）分泌に及ぼす影響について検討した。その結果、オリゴサッカライドは、濃度依存的に炎症性サイトカイン分泌を抑制することを明らかにした。

2. セレクチン阻害剤のサイトカイン分泌に対する抑制作用は、リポポリサッカライドのTHP-1細胞への結合を直接的に阻害するのではなく、L-セレクチンを介したチロシンキナーゼの活性化が部分的に関与していることを示した。

3. リポポリサッカライド誘発性の急性腎障害モデルを用いて、2種類のセレクチン阻害剤（シアリルルイスXオリゴサッカライドおよび抗P-セレクチン抗体）の作用機序を検討した結果、いずれの阻害剤も腎組織への白血球浸潤を抑制し、急性腎障害の指標である血清クレアチニンおよび血中尿素窒素の上昇を阻害した。また、フィブリン重合阻害、尿細管障害抑制にも有効であることを示した。このことから、急性腎障害にはセレクチンが関与しており、セレクチン阻害剤は急性腎障害に対し有効な薬効作用を示すことが明らかとなった。

4. リポポリサッカライド誘発性の急性肺障害モデルを用いて、2種類のセレクチン阻害剤（シアリルルイスXオリゴサッカライドおよび抗P-セレクチン抗体）の作用機序を検討した結果、いずれの阻害剤も肺ガス交換能の低下を抑制し、肺組織への白血球浸潤、肺胞壁の肥厚および出血を抑制した。以上のことから、急性肺障害にはセレクチンが関与しており、セレクチン阻害剤は急性肺障害に対し有効な薬効作用を示すことが明らかとなった。

以上のように、本論文は、セレクチンを介した種々の急性炎症に対する抗セレクチン阻害剤の効果と作用機序を解明し、その急性炎症治療薬としての新たな可能性を示したものであり、動物薬理学および実験動物学の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年10月23日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。