



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | エンドトキシン活性に対して阻害作用を示す物質の作用機序及びその抑制方法の研究  |
| Author(s)    | 藤田, 優   |
| Citation     | 大阪大学, 2017, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/69235">https://hdl.handle.net/11094/69235</a>   |
| rights       |   |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

|  |  |
|--|--|
| 氏 名 （ 藤 田 優 ）  |  |
| 論文題名   | エンドトキシン活性に対して阻害作用を示す物質の作用機序及びその抑制方法の研究 |
| <p>論文内容の要旨</p> <p>エンドトキシンはグラム陰性細菌の外膜成分であるリポポリサッカライド (Lipopolysaccharide: LPS) の集合体であり、LPSはO抗原、コア多糖及び活性中心であるリピドAの主に3つの部位から構成される。さらに、リピドAはリン酸基が付加したグルコサミン2つにヒドロキシ脂肪酸及びアシロキシアシル脂肪酸等の脂肪酸が複数結合した構造をとっており、このような特徴的な構造がエンドトキシンの生物活性に重要となり、脱リン酸化、脂肪酸の遊離、又はグリコシド結合の切断により著しく生物活性が低下する。また、LPSは親水性部分であるO抗原及びコア多糖と疎水性部分であるリピドAを持つ両親媒性物質であるため、エンドトキシンは水中ではミセルとして存在しており、このミセルのサイズ及び均一性等が活性に影響する。エンドトキシンは発熱性、致死活性・ショック、血液凝固亢進、顆粒球・血小板減少、サイトカイン及びケミカルメディエーターの産生誘導等多くの生物活性を有し、生体内に混入することにより重篤な障害を引き起こされる。現在広く用いられているLPS測定法の測定原理はLPSの生物活性の一つであるリムルス反応に基づいたLimulus amoebocyte lysate (LAL) 測定である。この測定法はLPSそのものを検出するのではなく、LPSのリムルス反応を指標とした測定法であるため、評価対象である製剤中に含まれる主成分及び添加剤、環境中に多く含まれる金属などの反応干渉作用によりLPS活性及びリムルス反応が阻害され、偽陰性が生じることが大きな問題となる。また、グラム陰性菌を起因菌とする感染症の診断の際に行われる血漿中LPS測定においても、血漿中に含まれるタンパク質の阻害作用により正確にLPSを検出できず、偽陰性が生じる危険性が指摘されている。</p> <p>一方、LPS、ペプチドグリカン、鞭毛及び菌由来のRNA等の菌体成分(Pathogen associated molecular patterns: DAMs)により生体内の炎症反応が過剰に誘発されることで引き起こされる敗血症において、血中LPSが検出された敗血症患者の方が検出されなかった患者より予後が悪化することが報告されており、血管内に侵入したLPSの活性を抑える方法は敗血症治療における選択肢の一つとなる。実際に、敗血症治療方法としてLPS活性を中和する結合ペプチド又はLPSの除去カラムの開発等が行われている。血管内に侵入したエンドトキシンは、LPS結合タンパク質 (LBP) と結合し、LBPによりLPS単量体がCluster of differentiation 14 (CD14) に輸送された後にToll-like receptor 4 (TLR4) とMyeloid differentiation factor 2 (MD2) の複合体と結合し、2量体となったTLR4/MD2複合体により細胞内シグナル伝達が惹起される。その結果、LPSにより活性化された単球又はマクロファージにより炎症性サイトカインであるTumor necrosis factor (TNF)-<math>\alpha</math>、Interleukin (IL)-1、IL-6等が産生誘導され、また血管内皮細胞ではE-selectin等の接着分子等の産生が促される。生体内LPS活性において、LBP、CD14及びTLR4/MD2複合体による認識が重要となるため、LPS活性を抑える手法としてLPSアンタゴニストが有効となり、そのようなLPSアンタゴニストを用いたLPS活性の抑制効果について研究されてきた。しかし、臨床応用されているLPSアンタゴニストは現在のところ存在していない。</p> <p>本博士論文では、LPSのLAL測定において生じる反応干渉作用の抑制を目的に、LPSのLAL測定におけるリムルス活性に影響を及ぼす物質の作用機序を解明し、その影響（反応干渉作用）を抑制する方法を考案した。さらに、その中で見出された血漿中タンパク質のLPSに対する影響を抑制したグルコース6リン酸 (G6P) について、LPS-LBP結合に対する阻害作用、細胞又は生体内LPS活性に対する抑制効果について検証し、他の糖のリン酸化体であるグルコース1リン酸 (G1P) 及びフルクトース6リン酸 (F6P) 、及びグルコースの酸化体であるグルクロン酸 (GcUA) と比較した。</p> <p>まず、金属、キレート剤、アミノ酸、抗生物質及び抗がん剤等の予め阻害作用を示すことが知られている物質について干渉作用を示す濃度及び生理食塩水又は緩衝液による干渉作用抑制効果の有無を基にグループ分けを行い、低濃度で強い干渉作用を示す物質はLPSに直接作用し、そのLPSへの直接的作用に対して生理食塩液又は緩衝液が抑制効果を示すことを明らかとした。さらに、その中で特に強い干渉作用を示す硫酸鉄の作用機序についてゲルろ過HPLC及びLC-MSを用いて解析した結果、鉄イオンによりリピドAのグリコシド結合が切断され、その結果としてリピドAの複合体形成が阻害され、リムルス活性の低下が生じることが明らかとなった。また、鉄イオンの反応干渉作用にはリピドAのリン酸基が重要であり、阻害物質がリン酸基へ配位すると推察された。</p> |  |

次に、阻害物質のリン酸基への相互作用を介した反応干渉作用を抑制する方法の開発を目的に、リピドAのグルコサミン骨格と類似した構造を有するグルコースのリン酸化体であるG1P及びG6Pの反応干渉抑制効果について検証した。その結果、金属、抗生物質及び抗がん剤等の低分子の阻害物質の干渉作用に対してはG1P又はG6Pを添加することで阻害物質溶液中のLPS回収率が上昇し、G1P及びG6Pともに反応干渉抑制効果が認められた一方で、血漿中LPS測定においてはG6Pのみ血漿中LPSの回収率及び感度上昇が認められた。これらの結果より、医薬品等の低分子由来の反応干渉作用に対してはG1P及びG6Pともに抑制作用を示したが、血漿中タンパク質由来の反応干渉作用に対しては、G6Pのみ抑制効果を示すことが明らかとなった。

最後に、血漿中タンパク質のLPS活性に対する反応干渉作用を抑制したG6Pについて、LPS-LBP結合に対する阻害作用及び細胞又は生体内LPS活性に対する抑制効果を評価し、G1P、F6P及びGlcUAとの比較を行った。G6PはG1Pと比較してリン酸基が付加している炭素の位置が異なるだけで、物質としての特性は非常に近い物質同士であるにも関わらず、G6Pの方がLPS活性に対する強い抑制効果を示す結果となった。また、同じ6位の炭素にリン酸基が付加したフルクトースであるF6PよりもG6PにおいてLPS活性に対する強い抑制効果が認められ、グルコース骨格であり、且つ、6位の炭素にリン酸基が付加しているG6Pの構造的特徴がLPS活性の抑制に重要であることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 藤 田 優 ) |     |     |       |
|---------------|-----|-----|-------|
|               | (職) | 氏 名 |       |
| 論文審査担当者       | 主 査 | 教授  | 八木 清仁 |
|               | 副 査 | 教授  | 土井 健史 |
|               | 副 査 | 教授  | 高木 達也 |

## 論文審査の結果の要旨

エンドトキシンはLipopolysaccharide: (LPS) の集合体であり、発熱性、致死活性・ショック、血液凝固亢進、顆粒球・血小板減少、サイトカイン及びケミカルメディエーターの産生誘導等多くの生物活性を有し、生体内に混入することにより重篤な障害が引き起こされることから、製剤に混入しているLPSの測定は品質評価の上で重要項目となっている。LPSのリムルス反応を指標とした測定法は製剤中に含まれる主成分及び添加剤、環境中に多く含まれる金属などの阻害物質由来の反応干渉作用によりLPS活性及びリムルス反応が阻害され、偽陰性が生じることが最も大きな問題となっている。

本研究において、申請者はLPSのリムルス活性に影響を及ぼす物質の作用機序、およびその影響を抑制する方法について検討を行った。さらに、その中で見出された血漿中タンパク質のLPSに対する影響を抑制したグルコース-6-リン酸 (G6P) について、LPS-LBP結合に対する阻害作用、細胞又は生体内LPS活性に対する抑制効果について検証を行っている。学位論文としてまとめた成果を以下に示す。

第一章はLAL測定におけるリムルス反応に対する阻害物質の反応干渉作用の機序について解析した結果をまとめている。まず阻害作用を示す様々な物質について干渉作用を示す濃度及び生理食塩水又は緩衝液による干渉作用抑制効果の有無を基にグループ分けを行い、低濃度で強い干渉作用を示す物質はLPSに直接作用し、そのLPSへの直接的作用に対して生理食塩液又は緩衝液が抑制効果を示すことを明らかとした。さらに、その中で特に強い干渉作用を示す硫酸鉄の作用機序についてゲルろ過HPLC及びLC/MSを用いて解析した結果、鉄イオンがリピドAのグリコシド結合を切断し、その結果として複合体形成が阻害されることでリムルス活性の低下が生じており、そのグリコシド結合の切断にはリピドAのリン酸基への鉄イオンの配位が重要であることを明らかとした。

第二章ではリピドAのリン酸基への配位を効果的に抑える方法として、グルコースのリン酸化体の反応干渉抑制効果について検証した結果をまとめている。低分子の阻害物質の干渉作用に対して、グルコースの1位の炭素にリン酸基が付加したG1P及び6位の炭素にリン酸基が付加したG6Pにおいて抑制効果が認められ、リン酸基が重要であることを明らかとした。さらに血漿中LPS測定では、G6Pを用いて血漿サンプルを調製することで、血漿中タンパク質のLPS活性への阻害作用が抑制され、血漿中LPS測定の正確性及び感度が上昇することを明らかとした。

第三章はG6Pについて、LPS-LPS binding protein(LBP)結合に対する阻害作用及び細胞又は生体内LPS活性に対する抑制効果を評価し、G1P、F6P及びG1cUAと比較検討した結果をまとめている。まずELISA法によるLPS-LBP結合アッセイによりLPS-LBP結合に対するG6Pの阻害効果を確認した。またPMA-differentiated THP-1細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞を用いてLPS活性評価を行いG6Pに阻害効果があることを明らかとした。さらにLPS/ガラクトサミン誘発マウス敗血症モデルを用いてG6Pの治癒効果を検討したところG6P投与により血清中TNF- $\alpha$ 、IL-10及びIL-6濃度、血清中ALT活性及び肝臓内カスパーゼ3/7活性の上昇を有意に抑制し、生存率を有意に上昇することが明らかとなった。

以上の結果は医薬品の品質評価の信頼性向上、エンドトキシン血症、敗血症の治療薬開発につながる重要な成果であり、博士(薬学)論文に値するものと認める。