薬 剤 学, **68** (3), 196–201 (2008)

≪若手研究者紹介≫

エンドトキシンショック抑制剤としての ジメチルアセチル-β-シクロデキストリンの有効利用

本 山 敬 一 Keiichi Motoyama
熊本大学薬学部製剤設計学

1. は じ め に

製剤学は製剤設計及びその調製方法並びにその製品について考究する学問と定義される．近年，薬が低分子からペプチド･タンパク質へ，そして遺伝子･機能性核酸・細胞性製剤へと進化することと相俟って，その薬の薬効発現・副作用のキーテクノロジーとなる製剤設計の重要性は高まっている．一方，新剤形医薬品やジェネリック医薬品の開発においては，薬自体は同一成分であるため，製剤設計こそが製品価値を決定する最大の因子である．このような背景の下，筆者は，熊本大学大学院医学薬学教育部製剤設計学分野にて上釜兼人教授（現崇城大学），平山文俊教授（現崇城大学），有馬英俊教授のご指導のもと製剤学の基礎を学習した．現在，有馬教授率いる同研究室は，上釜教授のライフワークであるシクロデキストリン（CyD，図1）の医薬への応用に関する研究を更に発展させるとともに，遺伝子・機能性核酸・細胞性製剤といった次世代の医薬品開発に貢献すべく，CyDをコア分子として，デンドリマー，リポソーム，ポリエチレングリコールなどの既存のドラッグキャリアを薬物の個々の特性に応じて，適切に組み合わせたインテグレイテッドDDS（iDDS）の構築を目指した研究を展開している．

本稿では，筆者が大学院在籍中に行ったジメチルアセチル-β-シクロデキストリン（DMA7-β-CyD）によるエンドトキシンショック抑制作用に関する研究について紹介させて頂きたい．

エンドトキシンショックとは，グラム陰性菌外膜構成成分の一つであるエンドトキシンすなわちリポポリサッカライド（LPS）に起因するショック症状である．このLPSは疎水性のリピドAを活性中心とし，それと共有結合したオリゴ糖および親水性のO抗原で構成される（図2）．細菌感染時におけるLPS認識は，白血球，単球，マクロファージ上の

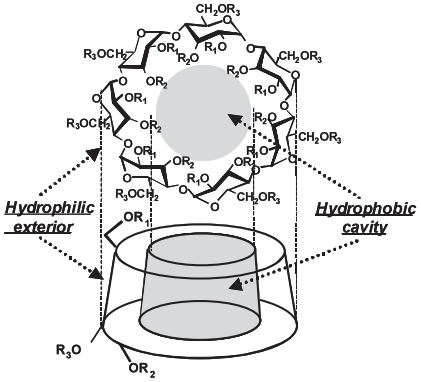

図1 シクロデキストリンの構造（β-CyD）

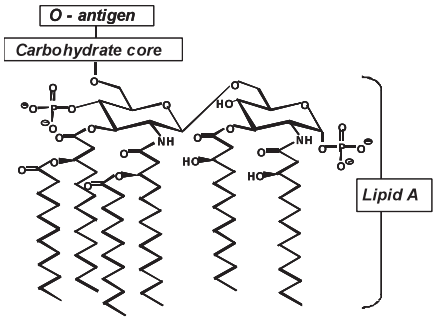

図2 大腸菌由来LPSの構造

著者紹介：2001年3月熊本大学薬学部卒業．2006年3月熊本大学大学院薬学教育部博士後期課程修了，薬学博士の学位を取得．大学院在籍中，degussaにて半年間のドイツ海外研修を修了．2006年4月より万有製薬株式会社創薬技術研究所に勤務．2008年4月より現職．趣味：映画鑑賞，テニス．

CD14 や toll-like receptor 4（TLR4)/MD2 複合体などのレセプターを介して行われ，生体は病原体の処理に努める．LPS はナノグラムレベルという極めて微量でマクロファージを活性化し，炎症性サイトカイン（TNF-α，IL-1，IL-6 など），一酸化窒素（NO），プロスタグランジン，血小板活性化因子などを産生するとともに，その過程で，補体系，凝固系，キニン系，副腎皮質刺激ホルモン/エンドルフィン系も活性化するため，多量のグラム陰性菌が全身循環系に移行すると，全身性炎症反応症候群や敗血症を経て，重篤な場合は多臓器不全を誘発し，死に至る．

CyD は，種々の薬物をその疎水空洞内に取り込んで包接複合体を形成する単分子的ホスト分子に分類され，その CyD の超分子的な包接特性は，食品，化粧品，臨床検査薬，繊維，樹脂など多方面で利用されており，薬剤学・製剤学領域では，医薬品の安定化，溶解性や放出性の制御，バイオアベイラビリティの向上，揮散性の防止，苦味・悪臭および局所刺激性の軽減などに利用されている．一方，CyD はその空洞径に応じて赤血球膜などの生体膜から主な構成成分であるリン脂質やコレステロールなどの脂質類を熱力学的平衡に基づいて可溶化し，溶血や生体膜の形態変化を惹起すること，またその際，CyD は赤血球や生体膜からタンパク質を二次的に遊離させることが報告されている[1]．さらに近年，赤血球膜を含む生体膜にはリピッドラフトと呼ばれるコレステロールやスフィンゴ脂質が豊富な脂質マイクロドメインが存在し，メチル-β-CyD（M-β-CyD）やヒドロキシプロピル-β-CyD（HP-β-CyD）は細胞膜表面上のリピッドラフトからコレステロールを引き抜き，そのドメイン構造を破壊することが報告されている[2]．このリピッドラフト画分には，シグナル伝達に関与する種々のタンパク質が局在しており，β-CyD 誘導体を用いてリピッドラフト構造を破壊すると，局在したタンパク質を介するシグナル伝達が阻害される．また，β-CyD より空洞径の小さな α-CyD やジメチル-α-CyD（DM-α-CyD）は，細胞膜からコレステロールよりもむしろリン脂質を選択的に可溶化することから，M-β-CyD や HP-β-CyD とは異なる機構でリピッドラフトに影響する可能性が考えられる．また近年，GPI アンカータンパク質の一つであり，LPS レセプターとしても知られる CD14 もリピッドラフトに局在することから，LPS シグナルの足場としてリピッドラフトは機能していることが報告された．このことから我々は，CyD 誘導体が脂質マイクロドメインと相互作用することにより，LPS レセプターの活性やそのシグナル伝達を抑制するという作業仮説を立てるに至った．

一方，CyD はその包接特性から，LPS の疎水性部位であるリピド A と相互作用することが予想される．そこで筆者らは，作業仮説として CyD が LPS と複合体を形成することにより LPS の細胞表面への結合を抑制すると推察した．最近，同研究室において新規に合成したジメチルアセチル-β-CyD は，分子内アシル基数の増大にともない，生体膜との相互作用が著しく低下する一方，長鎖アシル基を有する安息香酸エステル類とは強く相互作用することを報告した[3]．このことから，DMA7-β-CyD は LPS リピド A の長鎖アシル基と相互作用して LPS レセプターによる認識を抑制する可能性が考えられる．

このような仮説の下，筆者らは検討を重ね，DMA7-β-CyD は LPS 刺激によるマクロファージからの NO および TNF-α 産生を抑制すること，さらにエンドトキシンショックモデルマウスに対して延命効果を有することを明らかにした．以下に得られた知見を概説する．

2. 各種 TLR リガンド刺激によるマクロファージからの NO および TNF-α 産生に及ぼす各種 CyDs の影響

敗血症において，LPS は炎症性サイトカインの強力な inducer であり，重症の細菌感染による浸襲は，サイトカインの遊離を介して誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）を誘導し，ハイパーダイナミクスを惹起する．このように NO は敗血症において重要な役割を担っていることから，マクロファージからの過剰な NO 産生を抑制する方策を検討することは敗血症性ショックの改善を企図する上で有用である．

そこで筆者らは，LPS（O111:B4，O55:B5）または LPS の活性本体であるリピド A で刺激後の各種マウスマクロファージからの NO 産生に及ぼす CyDs の影響を検討した．NO は培養上清中に放出されると，速やかに nitrite（NO_2^-）に代謝されることから，この nitrite を Griess 法により測定し，CyDs による NO 産生抑制効果の指標とした．実験

はマウスマクロファージ様株化細胞 RAW264.7 細胞に，1,000 ng/mL LPS および 10 mM CyDs 含有培地を添加し，1 時間処理し，細胞を洗浄後，さらに 24 時間インキュベート後の培養用上清中の nitrite を測定し，LPS 単独で刺激した場合の nitrite を 100% とした．用いた 15 種類の CyDs のうち，DM-α-CyD および DMA7-β-CyD は nitrite レベルを約 50% まで抑制したが，他の CyDs は統計学的に有意差はあるものの抑制効果は小さかった[4]．また，その抑制効果は DM-α-CyD および DMA7-β-CyD の添加濃度依存的であった．さらに，これら CyDs による NO 産生抑制効果は，J774.1，PU5-18 細胞においても 認められ，マクロファージ細胞種に依存しないことが示唆された．

TNF-α は感染初期にマクロファージから産生され，敗血症性ショックを誘発する代表的なサイトカインである．そこで筆者らは，LPS 刺激によるマクロファージからの TNF-α 産生に及ぼす CyDs の影響を検討した．実験は RAW264.7 細胞を種々の濃度の LPS および 10 mM の CyDs で 1 時間処理し，細胞を洗浄後，培地中で 15 時間インキュベート後，培養上清中の TNF-α を ELISA 法により定量した．TNF-α の産生は，天然 CyD，HP-α-CyD および HP-β-CyD では抑制されなかったが，DM-α-CyD および DMA7-β-CyD では，30 ～ 40% の NO 産生抑制が観察された[5]．

これらの結果より，DM-α-CyD および DMA7-β-CyD は，LPS 刺激後のマクロファージからの NO だけでなく TNF-α の産生も有意に抑制することが示唆された．

3. DM-α-CyD および DMA7-β-CyD によるマクロファージからの NO および TNF-α 産生抑制機構

DMA7-β-CyD は，マクロファージ細胞表面における LPS 認識過程，あるいは細胞内における LPS シグナルや転写過程などを抑制することにより，マクロファージからのサイトカイン産生を抑制する可能性が考えられる．そこで筆者らは，細胞内における LPS シグナルや転写過程に対する CyDs の影響を検討するために，LPS 刺激による iNOS タンパク質誘導に及ぼす CyDs の影響を検討後，NF-κB の核内移行および LPS シグナル伝達（チロシンリン酸化）に及ぼす CyDs の影響を検討した．DMA7-β-CyD は，LPS 刺激後のマウスマクロファージにおける iNOS タンパク質，*iNOS* および *TNF*-α mRNA の誘導ならびに NF-κB の核内移行を抑制することが示唆された[5]．また，これら CyDs は LPS 刺激により誘導されるチロシンリン酸化シグナルを有意に抑制することが示唆された．これらの結果は，DMA7-β-CyD が，LPS の細胞表面への結合を阻害することにより，マクロファージからの NO や TNF-α の産生を抑制するという結果を支持するものであった．また，DMA7-β-CyD は，同様の機構により IL-1，IL-6，IL-10 などの炎症性サイトカインの産生ならびに MyD88 非依存的経路より誘導される INF-β の産生も抑制するものと推察される．

次に，マクロファージ細胞表面における LPS 認識過程に対する CyDs の影響を明らかにするために，LPS の細胞表面への結合および細胞表面の LPS レセプターの発現に及ぼす CyDs の影響をフローサイトメトリーにより検討した．その結果，DMA7-β-CyD は，LPS レセプターの発現には影響することなく，LPS のマクロファージ細胞表面への結合を抑制することが確認された．このことから，DMA7-β-CyD による LPS 刺激後のマクロファージからのサイトカイン産生抑制は，LPS の細胞表面への結合が抑制されたことに起因するものと推察された[4]．

近年 LPS レセプターである CD14 は，リピッドラフトと呼ばれるスフィンゴ脂質やコレステロールが集積した直径数十 nm の脂質マイクロドメインに局在していること，また，CD14/TLR4 過剰発現細胞を LPS で刺激すると TLR4 が非ラフト画分からラフト画分へ移行し，CD14 に近接することが報告された．一方，M-β-CyD はリピッドラフトなどの脂質マイクロドメインから，コレステロールを遊離させ，そこに集積したシグナル伝達分子の細胞膜局在性を変化させたり，シグナル伝達に影響を与えたりすることが知られている．これらのことから，リピッドラフトはマクロファージによる LPS 認識や LPS シグナル伝達において極めて重要な役割を担うものと考えられる．そこで筆者らは，リピッドラフトに対する DMA7-β-CyD の影響を明らかにするため，コレステロール，リン脂質およびスフィンゴミエリンなどの細胞膜脂質成分の漏出の有無を検討した．DMA7-β-CyD は，コレステロールやリン脂質などの細胞膜脂質成分に対する漏出作用は弱く，

CD14 や TLR4/MD2 複合体の発現に対する影響はほとんど見られなかった[6]．これは，DMA7-β-CyD の空洞径がアセチル基の導入に伴い減少し，DMA7-β-CyD とコレステロールやリン脂質などの細胞膜脂質成分との相互作用が低下したためであると考えられる．これらのことは，DMA7-β-CyD の細胞傷害性や溶血活性が極めて低いという結果とよく符合する[6]．

そこで筆者らは，LPS と DMA7-β-CyD との相互作用についてスペクトル解析により検討した．競合阻害実験および UV スペクトル法による解析から，DMA7-β-CyD は LPS と強く相互作用することが確認された[6]．LPS は，疎水性のリピド A とオリゴ糖および親水性の O 抗原と呼ばれる糖鎖からなるが，一般に CyD は糖よりも脂質と強く相互作用すること，また，DMA7-β-CyD は長鎖アシル基と強く相互作用することから[3]，DMA7-β-CyD は LPS のリピド A 部分と特異的に相互作用するものと推察される．これらのことは，DMA7-β-CyD が種々の TLR リガンドの中でも分子内に長鎖アシル基を有する LPS とリポタイコ酸（LTA）で刺激後のマクロファージからの NO 産生を有意に抑制するという結果を支持する[6]．また，LPS の活性はリピド A の分子内アシル基の数や構造に著しく左右されることから，リピド A の分子内アシル基のうち 1 本を DMA7-β-CyD が包接するだけでもその活性は著しく変化する可能性が考えられる．これらの結果より，DMA7-β-CyD による LPS 刺激後のマクロファージからのサイトカイン産生抑制は，DMA7-β-CyD と LPS の相互作用により，LPS の細胞表面への結合が抑制されたためであろうと推定された（図 3）．

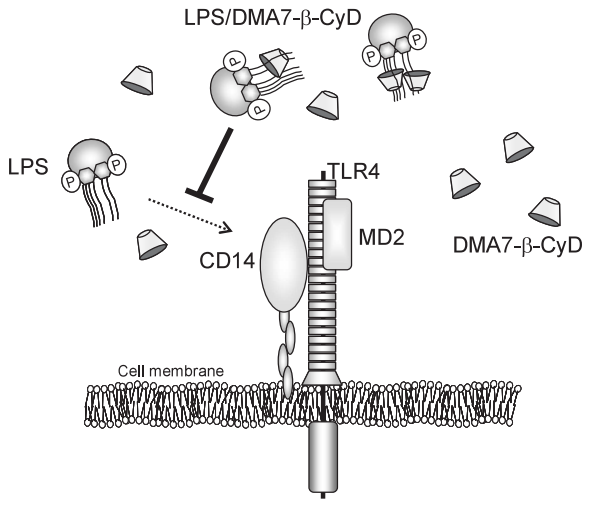

図 3　DMA7-β-CyD による LPS の細胞表面への結合抑制機構（推定）

4. DMA7-β-CyD によるエンドトキシンショック抑制効果の検討

一般に，マウスはエンドトキシンに対して感受性が低く，大量の LPS を投与しても死に至らない場合が多い．そのため，LPS に対する感受性を高めるための補助剤が併用され，中でも D-ガラクトサミンを負荷した実験モデルは作製が容易なことからエンドトキシンショックモデルとして汎用されている．そこで筆者らは，Freudenberg らの報告をもとに LPS/D-ガラクトサミンをマウス腹腔内投与して作製したエンドトキシンショックモデルマウスを用いて，その生存率に及ぼす DMA7-β-CyD の影響について検討をした．また，エンドトキシンショックマウスの血清中 TNF-α，AST および ALT 濃度についても検討を加えた[6,7]．

DMA7-β-CyD が LPS/D-ガラクトサミン誘導エンドトキシンショックモデルマウスの血清中 TNF-α 濃度の上昇を有意に抑制し，延命効果を示すことを明らかにした．また，DMA7-β-CyD はエンドトキシンショックマウスの血清中 AST および ALT 濃度の上昇を著しく抑制するとともに肝組織傷害を減弱することが確認された（図 4）．

DMA7-β-CyD はエンドトキシンショックマウスの生存率を有意に改善し，その効果は DMA7-β-CyD の添加濃度に依存した[6]．このエンドトキシンショック抑制作用は，LPS/DMA7-β-CyD 複合体形成により LPS の反応性が低下し，マクロファージからの NO や TNF-α などの炎症性サイトカインの産生が抑制されたためと推察される．しかしながら，DMA7-β-CyD によるエンドトキシンショック抑制効果は時間の経過に伴い徐々に低下し，60 時間後の生存率は 40% であった．これは，生体成分との競合包接により LPS/DMA7-β-CyD 複合体から徐々に LPS が解離し，マクロファージを活性化したためであると推察される．本実験で用いた LPS/D-ガラクトサミン負荷によるエンドトキシンショックモデルは，劇症肝炎のモデルとしても知られている．D-ガラクトサミンは，肝細胞内において uridine diphosphate（UDP）-グルコースを消費して UDP-ガラクトサミンを生成するため，uridine triphosphate

(UTP)の減少が起こりRNA合成低下やタンパク質合成障害が生じ，肝細胞壊死により肝傷害を惹起するものと考えられている．さらに，LPS/D-ガラクトサミンによる肝炎発症には網内系がきわめて重要であり，特にLPSによって活性化された肝Kupffer細胞がTNF-αなどのサイトカインや活性酸素，NO，ロイコトリエンD_4，アポトーシスなどを誘導することによりエンドトキシンショックおよび肝傷害を惹起するものと考えられている．一般に，CyDsとアミノ酸との相互作用は弱いことから，DMA7-β-CyDによる肝炎発症抑制はD-ガラクトサミンとの相互作用よりもむしろLPSとの相互作用に起因するものと推察される．さらに，肝傷害時には小腸粘膜の透過性が亢進して，消化管内の細菌やエンドトキシンが血中に出現する細菌性トランスロケーションによりエンドトキシンショックが誘発されるが，DMA7-β-CyDはこの血中に流出してきた内因性LPSとも複合体を形成するものと考えられる．また，血中のLPSはLBP（LPS-binding protein）やsCD14（soluble CD14）により補足された後，HDL（high density lipoprotein）と結合し，肝臓で速やかに除去されて胆汁排泄を受けることが知られている．しかしながら，DMA7-β-CyD処理マウスの血中LPS濃度は，投与後6時間においてもコントロールマウスに比べて著しく高い値を示したことから，血中のLPS/DMA7-β-CyD複合体はマクロファージからのLPS認識を阻害するだけではなく，LPSの肝臓への取り込みを回避するものと推察される．今後，エンドトキシンショックマウスに対するさらなる延命効果を企図してDMA7-β-CyD反復投与などの検討が必要である．また，LPSにより誘導される臓器内のサイトカインや活性酸素に及ぼすDMA7-β-CyDの影響についても検討を加える必要がある．また，本研究においてDMA7-β-CyDは生体膜脂質成分との相互作用が極めて弱いことから，溶血活性や細胞傷害性は低いものとされたが，生体内ではエステラーゼなどの酵素によりDMA7-β-CyDのアセチル基が切断されて，DM-β-CyDにみられる強い組織傷害性を示す可能性がある．そのため，DMA7-β-CyDを生体内に投与後の生分解性ならびに体内動態についても検討を加える必要がある．

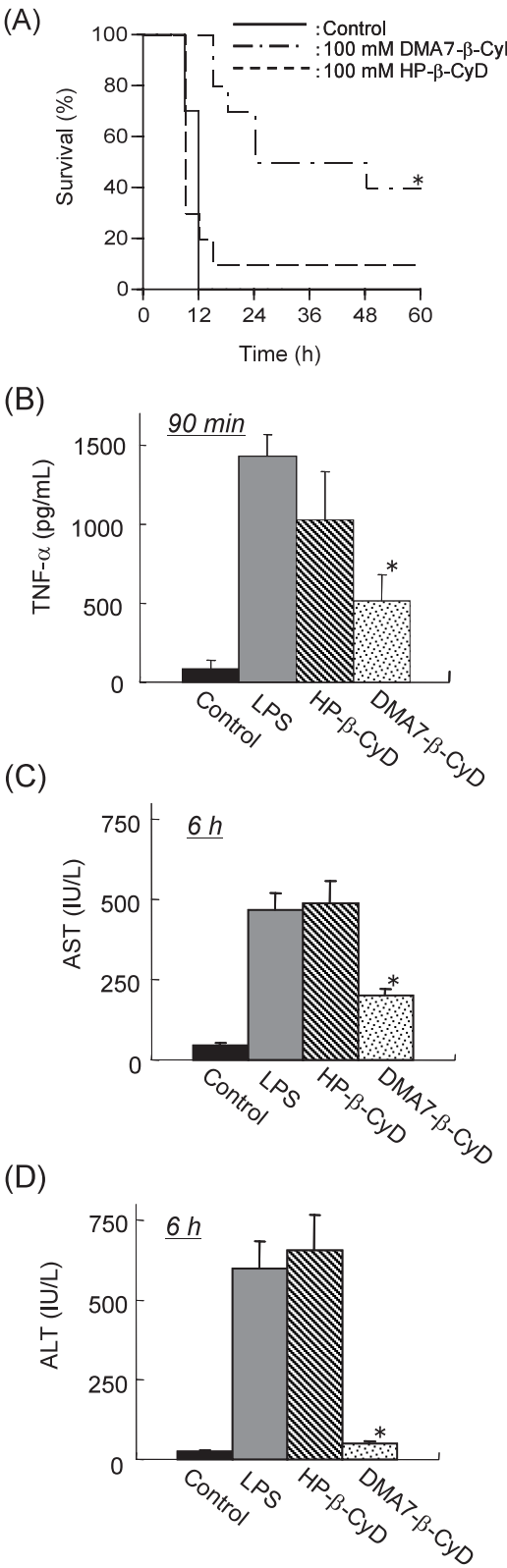

図4　DMA7-β-CyDによるLPS誘導エンドトキシンショック抑制効果
(A)生存率，(B)血清中TNF-α，(C)血清中AST，(D)血清中ALT

敗血症に対する基本的な治療は，感染臓器から起炎菌を検出後，薬剤感受性検査を施行し適切な抗菌薬投与を行うことが望ましいとされる．しかしながら，起炎菌の同定に数日を要することからempiric

therapy が重要であり，感染初期にはいくつかの抗菌スペクトルを有する抗菌薬が投与される．DMA7-β-CyD は，グラム陰性菌由来の LPS 以外にグラム陽性菌由来の LTA に対してもマクロファージからのサイトカイン産生抑制効果が期待できることから，感染初期において抗菌薬との併用が有効であると考えられる．その他，DMA7-β-CyD を固定化したカラムを血液透析に応用することで，血中 LPS の吸着除去ができるものと考えられる．また，LPS は敗血症以外にも種々の疾患との関係が報告されている．たとえば，胃・十二指腸潰瘍などの消化性疾患では *Helicobacter pylori*（Hp）の胃内感染が高率に起こっており，Hp 由来の LPS が原因と考えられている．また，歯槽膿漏や歯肉炎は歯周病菌由来の LPS により惹起される．一方，DMA7-β-CyD は，その効果の発現に LPS 活性部位であるリピド A のアシル基との相互作用が重要であると考えられるため，菌種を問わず LPS と相互作用する可能性があり，Hp や歯周病菌由来の LPS を補足してその活性を抑制することが考えられる．これらのことから，DMA7-β-CyD の応用範囲は敗血症に限らず，LPS を介した種々の疾患に対しても応用できる可能性を秘めている．また，DMA7-β-CyD は LPS アンタゴニストの開発にあたりリード化合物となりうるものと考えられ，今後，アセチル基やメチル基の置換部位や置換度の種類を変更することで，より薬効および安全性に優れた CyD 誘導体の開発が期待される．

5. 最　後　に

以上述べたように，DMA7-β-CyD は LPS/D-ガラクトサミン誘導エンドトキシンショックモデルマウスの血清中 TNF-α 濃度の上昇を有意に抑制し，延命効果を有することが確認された．また，DMA7-β-CyD はエンドトキシンショックマウスの血清中 AST および ALT 濃度の上昇を著しく抑制するとともに肝組織傷害を減弱することが確認された．これらのことから，DMA7-β-CyD は LPS 誘導エンドトキシンショック抑制剤としての可能性が強く示唆された．これらの知見は，敗血症性ショック治療薬の開発を行う上で，有用な基礎資料となるものと考える．

本稿で紹介した研究を行うに際して，終始ご指導，ご鞭撻を賜りました上釜兼人教授，平山文俊教授，有馬英俊教授に深甚なる謝意を表すとともに，有益なるご助言とご協力を頂きました他の先生方に心より深謝いたします．また，数々のご協力を頂きました先輩・後輩に深く感謝いたします．

引　用　文　献

1) H. Arima, K. Yunomae, T. Morikawa, F. Hirayama, K. Uekama, Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of dimethyl-β-cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers, *Pharm. Res*., **21**, 625–634 (2004).
2) S. Parpal, M. Karlsson, H. Thorn, P. Stralfors, Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control, *J. Biol. Chem*., **276**, 9670–9678 (2001).
3) F. Hirayama, S. Mieda, Y. Miyamoto, H. Arima, K. Uekama, Heptakis (2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-acetyl)-β-cyclodextrin: A water-soluble cyclodextrin derivative with low hemolytic activity, *J. Pharm. Sci*., **88**, 970–975 (1999).
4) H. Arima, Y. Nishimoto, K. Motoyama, F. Hirayama, K. Uekama, Inhibitory effects of novel hydrophilic cyclodextrin derivatives on nitric oxide production in macrophages stimulated with lipopolysaccharide, *Pharm. Res*., **18**, 1167–1173 (2001).
5) K. Motoyama, H. Arima, Y. Nishimoto, K. Miyake, F. Hirayama, K. Uekama, Involvement of CD14 in the inhibitory effects of dimethyl-α-cyclodextrin on lipopolysaccharide signaling in macrophages, *FEBS Lett*., **579**, 1707–1714 (2005).
6) H. Arima, K. Motoyama, A. Matsukawa, Y. Nishimoto, F. Hirayama, K. Uekama, Inhibitory effects of dimethylacetyl-β-cyclodextrin on lipopolysaccharide-induced macrophage activation and endotoxin shock in mice, *Biochem. Pharmacol*., **70**, 1506–1517 (2005).
7) K. Motoyama, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama, Inhibitory effects of 2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-acetyl-β-cyclodextrins with various degrees of substitution of acetyl group on macrophage activation and endotoxin shock induced by lipopolysaccharide, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem*., **56**, 75–79 (2006).