

令和元年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16638

研究課題名(和文) 免疫におけるサイトカインバランスの制御を指向した脂質抗原受容体リガンドの創製研究

研究課題名(英文) Development of lipid antigen recognition protein ligands modulating cytokine balance in immune system

研究代表者

井貫 晋輔 (Inuki, Shinsuke)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70736272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナチュラルキラーT (NKT) 細胞を活性化するCD1d受容体に注目し、免疫系におけるサイトカインバランスの制御を可能とする強力かつ選択的なCD1dリガンドの開発を行った。CD1dと結合する糖脂質リガンドのアシル鎖部位に様々な官能基を導入したリガンドを設計、合成、評価を行うことで、複数の選択的リガンドを取得した。また、分子動力学計算によって、リガンドに導入した官能基とCD1dとの相互作用様式を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫系におけるサイトカインバランスの制御は、創薬研究などにおいて重要な課題である。本研究では、NKT細胞を活性化するCD1dリガンドの構造展開によって、強力かつ選択的なサイトカイン誘導活性を有するリガンドの創製に成功した。本研究で見出した選択的リガンドは、サイトカインバイアス解析のツールとして関連分野に大きな進展をもたらすとともに、自己免疫疾患等に対する治療薬シーズとしての展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on CD1d protein involved in activation of NKT cells, and developed novel potent and selective CD1d glycolipid ligands that can modulate cytokine balance in immune system. The glycolipid derivatives containing various functional groups in their acyl chain parts were designed, synthesized and evaluated to identify a number of selective ligands. The binding mode analysis between the functional groups of lipid ligands and CD1d were also performed by using molecular dynamics simulation.

研究分野：生物有機化学

キーワード：サイトカインバランス 糖脂質 NKT細胞 CD1d 免疫調節 分子動力学計算

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂質抗原受容体として知られる CD1d は、抗原提示細胞などに存在し、T 細胞の分化や活性化に関わっている。CD1d は細胞内に取り込まれた糖脂質リガンドと結合すると、細胞膜上に移動し、ナチュラルキラーT (NKT) 細胞上の T 細胞抗原受容体 (TCR) に認識され、様々な種類の細胞間情報伝達物質 (サイトカイン) を誘導する。誘導されるサイトカインとしては、主に  $\text{INF-}\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17 などが知られており、様々な免疫応答に関わっている。しかしながら、これらのサイトカインは、互いに相反する活性を示すため、免疫システムを制御するためのケミカルプローブの創製や疾患治療法開発の観点からすると、誘導されるサイトカインの選択性制御が重要な課題となる。これまでの CD1d リガンドの構造活性相関研究から、リガンド構造の違いによってサイトカイン誘導選択性が変化することが知られていた。特に  $\text{INF-}\gamma$  など Th1 サイトカインに対する誘導選択性を示すリガンドの開発については、幾つかの選択的リガンドが報告されていた。一方で、IL-4 など Th2 サイトカイン選択性を示すリガンドについては、高活性なりガンドがほとんど報告されておらず、また、選択的なサイトカイン誘導メカニズムの詳細については不明であった。

### 2. 研究の目的

多様な免疫調節を担う脂質抗原受容体の機能解析を行うため、NKT 細胞を活性化する CD1d に注目し、免疫系におけるサイトカイン誘導選択性制御を可能とする高活性リガンドの開発を目指す。特に Th1/Th2 ( $\text{INF-}\gamma$ /IL-4) 経路選択的なりガンド、抑制性免疫シグナルを誘導するリガンドの取得を目指し、新規 CD1d リガンドの探索、合成を行う。また取得したリガンドを用いた機能解析により、免疫制御機構の理解と共に疾患治療の基盤となる免疫制御分子の創製を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) サイトカイン誘導選択的リガンドの創製を指向した構造展開

報告者らが以前までに見出していたアミド基を脂質部位に導入した脂質改変型糖脂質リガンドを基盤として、新たに様々な官能基を導入したりガンドを設計し、合成および活性評価を行った。

#### (2) 脂質改変型リガンドに関する分子認識機構の解析

活性や選択性の向上を目的とした新規リガンド創製のための分子設計指針に関する知見を得るために、分子動力学 (MD) 計算を用いて、脂質改変型リガンドと CD1d タンパク質間における相互作用の解析を行った。

#### (3) サイトカイン誘導選択性発現に関わるメカニズムの解析

取得したサイトカイン誘導選択的リガンドを用いて、選択性発現機構の解析を試みた。特に、リガンド-CD1d 間の結合親和性、リガンドの細胞内挙動に関して調査を行い、選択性発現との関わりを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) サイトカイン誘導選択的リガンドの創製を指向した構造展開

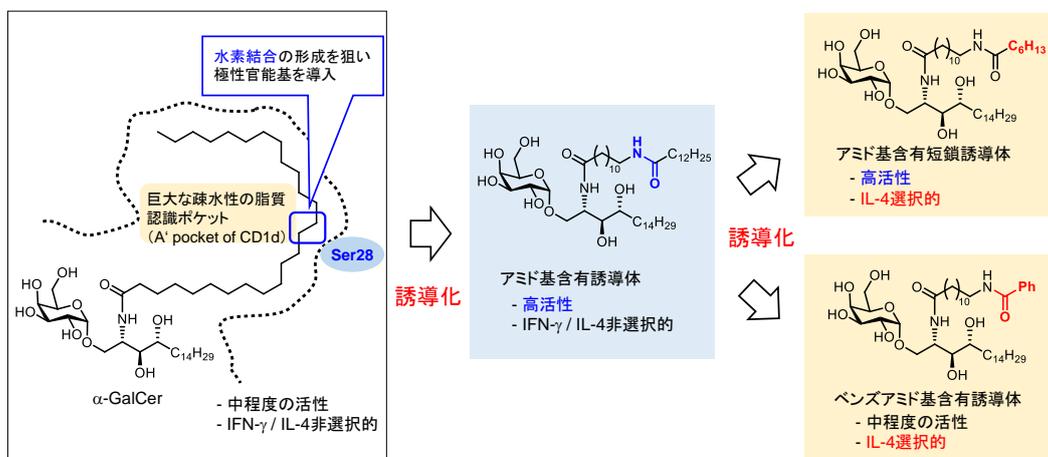


図 1.  $\alpha$ -GalCer を基盤とした構造展開

報告者らは以前までに、CD1d タンパク質の巨大な疎水性脂質認識ポケット中に含まれる極性アミノ酸残基 (Ser28 など) と相互作用可能なリガンドの開発を行ってきた。これらの検討の

中で、既知 CD1d リガンドである $\alpha$ -GalCer の脂質部位にアミド基を導入した脂質改変型リガンドが、 $\alpha$ -GalCer と比較して高いサイトカイン誘導活性を示すことを見出していた (図 1、アミド基含有誘導体)。一方で、 $\alpha$ -GalCer のアシル鎖について、鎖長を短くするとサイトカイン誘導活性が大幅に低下するものの、IL-4 選択性を示すことが報告されていた。そこで、短い鎖長を有する $\alpha$ -GalCer 誘導体のサイトカイン誘導活性の向上を狙い、脂質部位にアミド基を導入し、活性を評価することとした。その結果、IL-4 選択性を保ったまま、サイトカイン誘導活性が大幅に向上した (図 1、アミド基含有短鎖誘導体)。また、これらのリガンドについて、導入する官能基をアミド基からアミノ基へと変換したところ、IL-4 誘導選択性がさらに向上することが明らかとなった。引き続き、アシル鎖末端にベンズアミド基を有するリガンドを設計し、合成を行った (図 1、ベンズアミド基含有誘導体)。ベンズアミド基を有するリガンドに関しても、IL-4 選択性を示した。そこで、様々な官能基をベンゼン環に有する誘導体の合成も行った。その結果、メトキシ基を有するリガンドが最も高いサイトカイン誘導活性を示すことを見出した。これらの脂質改変型リガンドに関して、IL-10 や IL-17 の誘導活性についても調査を行った。その結果、一部のリガンドが IL-10 や IL-17 に対する産生活性を有することが分かった。このように、 $\alpha$ -GalCer のアシル鎖部分の構造活性相関研究の結果、高活性かつ選択的なリガンドを取得することに成功した。

## (2) 脂質改変型リガンドに関する分子認識機構の解析

上記に示したアミド基導入によるサイトカイン誘導活性向上について、CD1d-リガンド間の分子認識機構の解析を行った。アミド基を導入したリガンドについて種々の誘導体を合成し、活性評価を行った結果、特定の位置にアミド基を導入した場合において、活性が大幅に向上することが明らかとなった。そこで、これらの結果を基に、MD 計算を用いた解析を行うこととした。計算を行った結果、導入したアミド基は CD1d の疎水性脂質認識ポケット中の Glu14 と Ser28 と水素結合を介した相互作用をしていることが示唆された。また MD 計算に基づいた結合ポケットにおける水和状態の解析を行ったところ、導入したアミド基が水分子を介した水素結合ネットワークを形成することによって、周辺部の水和状態を大きく改善することで、リガンド-CD1d 複合体を安定化していることが示唆された。またベンズアミド基導入に関しても、MD 計算を用いて相互作用の解析を行った。その結果、CD1d の脂質認識部位に存在する Phe70 とベンズアミド基が相互作用していることが示唆された。以上のように、CD1d の脂質認識部位に存在する特定のアミノ酸残基が親和性向上のための新たな作用点となることを見出した。

## (3) サイトカイン誘導選択性発現に関わるメカニズムの解析

上記(1)において取得したサイトカイン誘導選択的リガンドを用いて、選択性発現機構の解析に取り組んだ。特にリガンド-CD1d 間の親和性、リガンドの細胞内挙動に着目し、評価系の構築を行うとともに、解析を行った。リガンド-CD1d 間の親和性評価に関しては、種々の分子間相互作用解析手法を応用して、評価系を構築した。本研究では、これまでに報告されていたリガンド-CD1d 間の親和性評価法に加えて、AlphaScreen システムを用いた簡便な相互作用解析手法を開発し、評価に用いた。種々の IL-4 選択的なリガンドを用いて解析を行った結果、リガンド-CD1d 間の結合親和性と IL-4 選択性との間には、明確な相関関係を見出すことはできなかった。一方、誘導されるサイトカインの選択性は、リガンドの細胞内挙動の違いにより制御されるということが報告されていたが、高活性な IL-4 選択的なリガンドに限られていたために詳細な解析は行われていなかった。そこで報告者らは、今回取得した高活性な IL-4 選択的リガンドを用いて細胞内挙動の解析を行った。リガンド-CD1d 複合体を認識する抗体を用いて、共焦点顕微鏡やフローサイトメーターを用いた解析を行った結果、IL-4 選択的なリガンドは他のリガンドとは異なる細胞内挙動を示すことを明らかにした。

以上のように、本研究において報告者らは、サイトカイン誘導選択性を示す種々のリガンドを開発した。これらのリガンドは、サイトカインバイアス解析のツールとして関連分野に大きな進展をもたらすものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① J. Kishi, S. Inuki, N. Hirata, E. Kashiwabara, D. Yoshidome, O. Ichihara, Y. Fujimoto, Structure-activity relationship studies of Bz amide-containing  $\alpha$ -GalCer derivatives as natural killer T cell modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有、29 巻、2019、970-973  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.02.018
- ② S. Inuki, E. Kashiwabara, N. Hirata, J. Kishi, E. Nabika, Y. Fujimoto, Potent Th2 Cytokine-bias of natural killer T cell by CD1d glycolipid ligands based on “anchoring effect” of polar groups in their lipid component. *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有、57 巻、2018、9655-9659  
DOI: 10.1002/anie.201802983

- ③ Y. Arai, S. Inuki, Y. Fujimoto, Site-specific effect of polar functional group modification in lipids of TLR2 ligands for modulating the ligand immunostimulatory activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有、28巻、2018、1638-1641  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.03.042
- ④ S. Inuki, J. Kishi, E. Kashiwabara, T. Aiba, Y. Fujimoto, Convergent synthesis of digalactosyl diacylglycerols. *Org. Lett.* 査読有、19巻、2017、6482-6485  
DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03043
- ⑤ S. Inuki, I. Ohta, S. Ishibashi, M. Takamatsu, K. Fukase, Y. Fujimoto, Total synthesis of cardiolipins containing chiral cyclopropane fatty acids. *J. Org. Chem.* 査読有、82巻、2017、7832-7838  
DOI: 10.1021/acs.joc.7b00945
- ⑥ S. Inuki, T. Aiba, S. Kawakami, T. Akiyama, J. Inoue, Y. Fujimoto, Chemical synthesis of D-glycero-D-manno-heptose 1,7-bisphosphate and evaluation of its ability to modulate NF- $\kappa$ B activation. *Org. Lett.* 査読有、19巻、2017、3079-3082  
DOI: 10.1021/acs.orglett.7b01158
- ⑦ S. Inuki, K. Sato, T. Fukuyama, I. Ryu, Y. Fujimoto, Formal total synthesis of L-ossamine via decarboxylative functionalization using visible-light-mediated photoredox catalysis in a flow system. *J. Org. Chem.* 査読有、82巻、2017、1248-1253  
DOI: 10.1021/acs.joc.6b02531
- ⑧ 井貫晋輔、相羽俊彦、平田菜摘、柏原瑛美、喜多俊介、前仲勝実、深瀬浩一、藤本ゆかり、糖脂質 $\alpha$ -GalCerを基盤とした脂質改変型CD1dリガンドの創製研究、エンドトキシン・自然免疫研究20、査読有、2017、64-67
- ⑨ S. Inuki, T. Aiba, N. Hirata, O. Ichihara, D. Yoshidome, S. Kita, K. Maenaka, K. Fukase, Y. Fujimoto, Isolated polar amino acid residues modulate lipid binding in the large hydrophobic cavity of CD1d. *ACS Chem. Biol.* 査読有、11巻、2016、3132-3139  
DOI: 10.1021/acscchembio.6b00674
- ⑩ Z. Shiokawa, E. Kashiwabara, D. Yoshidome, K. Fukase, S. Inuki, Y. Fujimoto, Discovery of novel scaffold as indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor based on pyrrolpiperazinone alkaloid, longamide B. *ChemMedChem*, 査読有、11巻、2016、2682-2689  
DOI: 10.1002/cmdc.201600446

[学会発表] (計 47 件)

- ① 岸惇一郎、井貫晋輔、藤本ゆかり、脂質改変による相互作用調節を指向した CD1d リガンドの合成とその免疫調節作用解析、日本化学会第 99 春季年会、2019 年
- ② 井貫晋輔、免疫機構の調節に関わる複合脂質・糖質の合成と構造展開による生物有機化学研究、第 53 回天然物化学談話会、2018 年
- ③ 平田菜摘、竝河悦子、柏原瑛美、井貫晋輔、藤本ゆかり、脂質改変型 CD1d リガンドの蛍光標識体合成および細胞イメージングによる解析、第 37 回日本糖質学会年会、2018 年
- ④ 井貫晋輔、柏原瑛美、平田菜摘、岸惇一郎、藤本ゆかり、Th2 サイトカイン選択的誘導活性を有する新規 CD1d リガンドの創製、日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会、2018 年
- ⑤ 竝河悦子、井貫晋輔、藤本ゆかり、Th2 バイアス型脂質改変 CD1d リガンド開発と機能解析、第 24 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2018 年
- ⑥ S. Inuki, T. Aiba, N. Hirata, O. Ichihara, D. Yoshidome, S. Kita, K. Maenaka, K. Fukase, Y. Fujimoto, Development of novel CD1d ligands containing modified lipid moieties, The Second A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub、2017 年
- ⑦ 井貫晋輔、柏原瑛美、平田菜摘、岸惇一郎、藤本ゆかり、脂質部位の構造展開を基盤とする Th2 サイトカイン選択的 CD1d リガンドの創製研究、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2017 年
- ⑧ 井貫晋輔、相羽俊彦、平田菜摘、市原収、吉留大輔、喜多俊介、前仲勝実、深瀬浩一、藤

本ゆかり、CD1d の脂質認識部位への高親和性を指向した新規リガンドの創製研究、第 58 回天然有機化合物討論会、2016 年

- ⑨ 平田菜摘、相羽俊彦、内梨洋介、市原収、吉留大輔、喜多俊介、前仲勝実、深瀬浩一、井貫晋輔、藤本ゆかり、脂質認識部位を制御する新規リガンドを用いた CD1d の機能解析、第 35 回日本糖質学会年会、2016 年
- ⑩ 平田菜摘、相羽俊彦、井貫晋輔、藤本ゆかり、脂質抗原受容体 CD1d の新規リガンドの創製を目指したタンパク-リガンド相互作用解析法の開発研究、新規素材探索研究会第 15 回セミナー、2016 年

他 37 件

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：化合物又はその塩、ナチュラルキラーT細胞活性化剤、および医薬組成物

発明者：井貫晋輔、平田菜摘、相羽俊彦、柏原瑛美、岸惇一郎、藤本ゆかり

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2017/008381

出願年：2017

国内外の別：国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizo/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

(2) 研究協力者：なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。