

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06976

研究課題名(和文) 新型糖脂質マンノシルオキシステアレートの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a new glycolipid consists of mannosyl-oxystearates

研究代表者

宮本 智文 (Miyamoto, Tomofumi)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：40182050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：真菌マラセチアより発見したMincleリガンド44-2は、L-マンニトールに10-0-β-マンノピラノシルオキシステアリン酸がエステル結合した糖脂質である。44-2の構造情報をもとに、13種グリコシルオキシステアレート誘導体を合成し、リガンド活性を評価した結果、及び誘導体に強いリガンド活性が確認された。これらの知見をもとに、グリセロールやマンニトールをコアとする5種のエステル化体を調製しリガンド活性を評価した。その結果、2種の誘導体に、TDBより強力なリガンド活性が確認されたことから、グリコシルオキシステアリルマンニトールはアジュバントとして十分な資質を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コアアルコールにD-マンニトールを用いた天然型糖脂質44-2の2種の合成誘導体のMincleリガンド活性は、TDBより強力であり、さらに、TDBがマウス型のMincleに強いリガンド活性を示すのに対し、本研究成果である2種の合成誘導体は、ヒト型Mincleに対してより強いリガンド活性を示すことが明らかとなった。本研究の目的である“マンノシルオキシステアレートの機能解析”に関し、非常に重要な知見が得られ、さらに、これらグリコシルオキシステアリルマンニトールが、ワクチン開発のためのアジュバントとして十分な資質を有することを明らかにしたことの学術的意義及び社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要(英文)：The Mincle ligand 44-2 discovered by the applicant from the pathogenic fungus *Malassezia* has 10-0-β-mannopyranosyloxystearic acid ester-bonded to the 1,3 and 4 of L-mannitol. It is a completely new type of glycolipid. As a result of synthesizing 13 kinds of glycosyloxystearate derivatives based on the structural information of glycolipid 44-2 and evaluating Mincle ligand activity, strong ligand activity of di-β and di-α was confirmed. Based on these findings, five types of esterified compounds having glycerol or mannitol as core alcohol were prepared and the Mincle ligand activity was evaluated. As a result, two mimics of the natural glycolipid 44-2 using D-mannitol as the core alcohol [1,3,4-tri-(di-α-D-mannosyl-stearyl)-D-mannitol and 3,4-di-(di-α-D-mannosyl-stearyl)-D-mannitol] was confirmed to have a stronger Mincle ligand activity than TDB, so glycosyl-oxystearyl-mannitol has sufficient qualities as a new adjuvant.

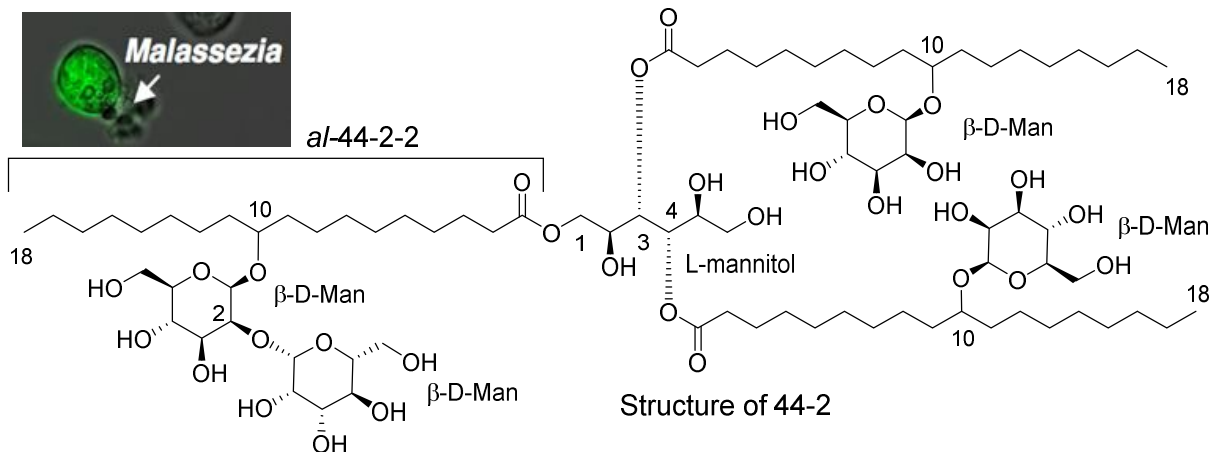
研究分野：天然物化学

キーワード：Mincle マラセチア 糖脂質 アジュバント グリコシルオキシステアリルマンニトール 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Mincle (macrophage inducible C-type lectin)に認識される **TDM** (trehalose 6,6-dimycolate)は、結核菌に含まれる免疫賦活化物質であり、マウスやウサギに投与すると急性炎症や肺胞肉芽腫形成などを引き起こす。また、TDM はワクチンアジュバントとしても使用されているが、ワクチン投与後も局所炎症性が高く、TDM に代わるアジュバント候補の実用化に向けての精力的な研究が進められている。申請者は病原性真菌であるマラセチアに新たな Mincle リガンドの存在を確認し、マラセチア菌体より、これまでに全く報告例のないβ-マンノース結合型糖脂質 **44-2** の分離、構造決定に成功した (T. Miyamoto, S. Yamasaki et. al., Cell Host & Microbe, 2013)。糖脂質 **44-2** の構成ユニットは糖 (β-マンノース)、脂肪酸 (10-ヒドロキシステアリン酸)、アルコール (L-マンニトール) であり、糖-脂肪酸-多価アルコールの組合せにより創出される新型糖脂質ライブラリーの構築は、新しいワクチンアジュバント開発の基礎研究として極めて意義が高いと考えた。



2. 研究の目的

44-2のMincleリガンド活性はTDMとほぼ同等であり、興味深いことに、**44-2**をアルカリ加水分解して得られる、β-ジマンノシルオキシステアレート (*al-44-2-2*) にも**44-2**の1/100程度のMincle受容体へのアゴニスト活性が確認された。

本研究の目的は、申請者が発見したマンノース結合型糖脂質**44-2**の構造情報をもとに、13種のグリコシルオキシステアレート誘導体を合成し、これに、グリセロールやマンニトールをコアとするエステル化体を調製し、Mincleリガンドアナログ体の合成を行う。さらに、合成したアナログ体のリガンド活性を評価し、新型ワクチンアジュバント開発を目指すことである。

3. 研究の方法

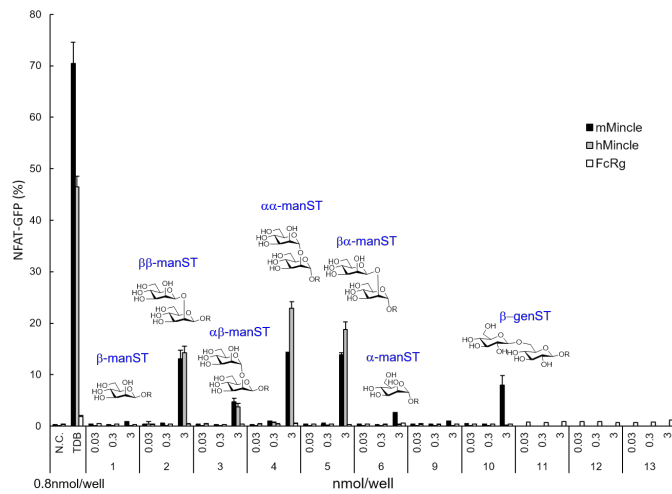
Crich等が開発したスルフォキシドナーを利用する4,6-benzylidene法により、*al-44-2-2*とその立体異性体3種、更に、構造活性相関解析のため、各種グリコシルオキシステアレート誘導体を調製する。また、脂肪酸は、安価に入手可能な12-ヒドロキシステアリン酸、コアのアルコールにはD-マンニトール及びグリセロールを利用し、短工程かつ安価に**44-2**アナログ体を合成する。合成した各種グリコシルオキシステアレート体について、研究協力者山崎とNFAT-GFPレポーターセルを用い、フローサイトメトリー法によりアゴニスト活性を評価する。

4. 研究成果

*al-44-2-2*の構造を基に立体異性体である4種のジマンノシル体をKonigs-Knorr法とCrich法を組合せ合成した。9種のグリコシルオキシステアレート誘導体はマンノース、グルコース、ガラクトースを利用し、各種α-,β-体を調製した。ジグリコシル体には、イソマルトース、ゲンチオピオース、メリピオース、セロピオース、マルトピオースを利用した。合成した誘導体

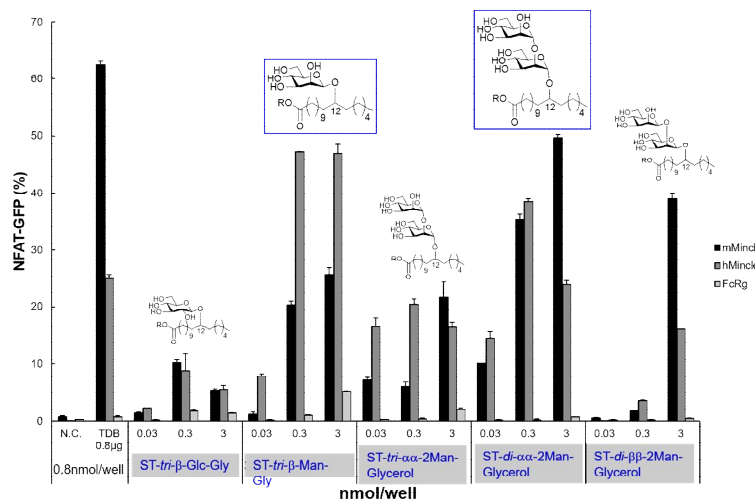
について、ヒト型およびマウス型 Mincle リガンド活性を評価した。その結果、*al-44-2-2* (β,β -) の立体異性体である、 α,α -ジマンノシルオキシステアレートに最も強いリガンド活性が確認された。また、モノグリコシルオキシステアレート体は β -マンノシル体にのみ弱い活性が確認されたことから、Mincle リガンドとしてマンノースが必須であることが明らかとなった。

NFAT-GFP Reporter Assay of Analogues 1-13



次に、Mincle リガンド活性が認められた、 β,β -ジマンノシルオキシステアレート、 α,α -ジマンノシルオキシステアレート、及び β -モノマンノシルオキシステアレート誘導体をグリセロールにエステル化した3種の誘導体およびコアルコールにD-マンニトールを用いた天然型糖脂質 44-2 のミミック体 2 種[1,3,4-tri-(di- α -D-mannosyl-stearyl)-D-mannitol 及び 3,4-di-(di- α -D-mannosyl-stearyl)-D-mannitol]のを合成し、Mincle リガンド活性を評価した。その結果、これらミミック体に、TDB より強力な Mincle リガンド活性を見出した。また、TDB がマウス型の Mincle に強いリガンド活性を示すが、今回合成した化合物はヒト型 Mincle に対してより強いリガンド活性を示すことが明らかとなった。以上、マンノシルオキシステアレートの機能解析にとって、非常に重要な知見が得られ、これらグリコシルオキシステアリルマンニトールはアジュバントとして十分な資質を有し、今後、ワクチン開発の新しいアジュバントとして開発されることが期待された。

NFAT-GFP Reporter Assay of Synthetic Analogues



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Van Huy, L., Tanaka, C., Imai, T., Yamasaki, S., Miyamoto, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Synthesis of 12-0-mono- and diglycosyl-oxystearates, a new class of agonists for the C-type lectin receptor Mincle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 44-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmchemlett.8b00413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomofumi Miyamoto
2. 発表標題 Synthesis of a New Class of Agonist for the C-type Lectin Receptor Mincle
3. 学会等名 The 6th Japan-Taiwan Joint Symposium for Pharmaceutical Sciences（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------