

平成 22 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790108
 研究課題名（和文）
 ナチュラルキラーT細胞を活性化して抗腫瘍活性を誘導する新規糖脂質の創製
 研究課題名（英文）
 Development of novel glycolipids which activate natural killer T cells to induce antitumor activity
 研究代表者
 田代 卓哉 (Tashiro Takuya)
 独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・研究員
 研究者番号：20339104

研究成果の概要（和文）：糖脂質 KRN7000 は、ナチュラルキラーT細胞を活性化して抗腫瘍活性を誘導する。ガルバガラクトース類縁体 RCAI-56 は、免疫細胞に対して多量の IFN-gamma の産生を誘導する。そこで、CD1d-KRN7000-TCR 複合体の X 線結晶構造に基づいて更なる構造活性相関研究を行ったところ、5a-デオキシシクリトール類縁体 RCAI-59 等が、さらに強力に IFN-gamma を産生誘導することを見出した。

研究成果の概要（英文）：KRN7000, an alpha-Galactosylceramide, stimulates natural killer T cells to induce antitumor activity. RCAI-56, a carba-galactose analog of KRN7000, induces a larger amount of IFN-gamma production than KRN7000. Based on the X-ray crystallographic analysis, further structure-activity relationship study was performed on RCAI-56, and it was found that RCAI-59, the 5a-deoxycyclitol analog of KRN7000, and its relatives induce potent IFN-gamma production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 ・創薬化学

キーワード：alpha-GalCer, CD1d, carba-galactose, cyclitol, glycosphingolipid, IFN-gamma, KRN7000, NKT cell

1. 研究開始当初の背景

海綿の一種 *Agelas mauritianus* から単離された糖脂質 *agelasphin* 類は、マウスに対して強い抗腫瘍活性を示す。天然物としては特異な alpha-ガラクトシルセラミド構造を有しており、キリンビール（株）はこの強力な活性

に着目して構造活性相関研究を行い、KRN7000 を開発した。KRN7000 はマウス、およびヒトに対して強い抗腫瘍活性を示す。その活性発現の機構は、1997年に谷口らによって解明された。体内に存在する、免疫細胞の一種であるナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、T細胞受容体 (TCR) を用いて抗原提示細胞の膜上タンパク質である CD1d と、

KRN7000 の複合体を認識することによって活性化する。活性化された NKT 細胞は IFN-gamma を産生し、抗腫瘍活性を誘導する。しかし、KRN7000 により活性化された NKT 細胞は、免疫賦活活性を担う IFN-gamma ばかりではなく、相反する活性を示す、免疫抑制活性を誘導する IL-4 も産生誘導してしまう。また、KRN7000 を連続的に投与すると IFN-gamma が産生されなくなり、抗腫瘍効果が低下してしまうため、医薬品として使用するには問題があった。そこで、より選択的かつ多量に IFN-gamma を産生誘導するような、新規な糖脂質の開発が望まれていた。

2003 年に Franck らによって開発された alpha-C-GalCer は、KRN7000 の糖とセラミドの結合部位の酸素原子をメチレン基で置き換えたエーテル類縁体である。エーテル類縁体は、生体内で酵素による分解を受けにくいいため、NKT 細胞に対して長時間、強い刺激を与えることが出来ることから、強力に IFN-gamma の産生を誘導する。マウスでは強い抗腫瘍活性を誘導するものの、しかしヒトでは殆ど活性を示さない。一方で研究代表者らは、類似のエーテル類縁体であるカルバ糖類縁体 RCAI-56 を 2007 年に開発した。RCAI-56 は、マウスでもヒトでも強力に IFN-gamma の産生を誘導する。RCAI-56 は新規医薬品のリード化合物となりうる可能性が示唆された。

またこの結果から、2005 年に報告された humanCD1d-KRN7000 複合体の X 線結晶構造解析で示された糖とセラミドの結合部分の酸素原子と CD1d の Threonine との水素結合は、活性発現に重要な役割を担っていることが示唆された。なお研究代表者らは、肝ミクロソーム試験によって、エーテル類縁体 RCAI-56 が KRN7000 と比較して代謝されにくいことを確認している。

さらに、2008 年に Wong らは KRN7000 のアシル側鎖上に芳香環を導入した類縁体を開発した。この類縁体もまた、NKT 細胞に対して大量の IFN-gamma の産生を誘導する。その活性発現の理由として Wong らは、彼らの開発した類縁体の芳香環は、CD1d の疎水性ポケット内の Tyrosine と π - π スタッキング相互作用するために CD1d との複合体が安定化され、その結果、長時間 NKT 細胞を刺激することが出来るため、多量の IFN-gamma の産生を誘導することができると説明している。

これらの知見より、CD1d および TCR との親和性が高く、NKT 細胞を長時間刺激できる糖脂質は、多量の IFN-gamma を産生誘導できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

カルバ糖類縁体 RCAI-56 の構造を基に、NKT

細胞を活性化して、より多量の IFN-gamma を産生させて強力に抗腫瘍活性を誘導する新規糖脂質を開発する。

3. 研究の方法

2005 年に報告された CD1d-KRN7000 複合体の X 線結晶構造解析の結果より、KRN7000 の 2 本のアルキル鎖は CD1d 内部の疎水性ポケット内に収まっており、一方でガラクトース部位はポケットの外に提示されているため、TCR は糖部位を認識していると思われていた。2007 年、ヒトの CD1d-KRN7000-TCR の X 線結晶構造解析結果が報告され、予想通り TCR は主に糖部分と水素結合を形成して CD1d-KRN7000 複合体を認識していることが明らかとなった。従って、糖部分を修飾することによって、活性を大きく変化させて多量の IFN-gamma を産生させることが出来るのではないかと考えた。

ところで X 線結晶構造解析の報告によると、糖のピラン環状の酸素原子は TCR の疎水性アミノ酸残基である Proline の近傍に位置している。よって、この親水性の酸素原子が疎水性のメチレン基によって置き換えられたカルバ糖類縁体 RCAI-56 では、疎水性相互作用によって TCR と CD1d-RCAI-56 複合体との結合力が増大したため、多量の IFN-gamma の産生を誘導したものと考えた。なお研究代表者は、この CD1d-RCAI-56 複合体と TCR との結合力は、CD1d-KRN7000 の場合と比較して約 2 倍増大していることを Biacore 実験によって確認している。

ところで、糖部分を修飾した様々な類縁体とその活性に関して、多くのグループによって多数報告されている。それらを調べると、X 線結晶構造解析において CD1d あるいは TCR 上のアミノ酸残基と水素結合を形成しているガラクトース上の水酸基を修飾した類縁体は、活性無し~KRN7000 と同程度の活性しか発現しないとされている。しかし一方で、水素結合を形成していない 6-位水酸基に関する構造活性相関研究の報告例は少なく、報告されている類縁体のいずれもが活性の低下を招いていない。

そこでこれら 2 点の研究背景から研究代表者は、特にガラクトースの 6-位水酸基周辺の構造変換に着目して構造活性相関研究を行い、CD1d および TCR との相互作用を強めた類縁体を開発することを計画した。なお、TCR と強く相互作用する RCAI-56 をリード化合物として、新規類縁体を設計、合成する。

4. 研究成果

まず始めに研究代表者は、RCAI-56 の活性試験を行い、アジュバント効果を示すことを確認した。

これにより RCAI-56 は、医薬品として十分な有用性を有していることが明らかとなった。

次に、RCAI-56 の 6-位水酸基に関して構造活性相関研究を行った。RCAI-56 を開発した際には、親水性である酸素原子を疎水性であるメチレン基へと置換したことで IFN-gamma に偏ったサイトカイン産生を誘導できたことから、この 6-位水酸基部分に関しても、疎水性官能基へと変換することによって RCAI-56 よりも強力に IFN-gamma を産生誘導する類縁体が開発できるのではないかと考えた。

先ず始めに、6-位水酸基を除去したカルバフコース類縁体 RCAI-60 を合成した。その活性を調べたところ、KRN7000 よりも強力に IFN-gamma の産生を誘導するものの、RCAI-56 よりも活性が弱かった。研究代表者はさらに、6-位水酸基をメチルエーテルへと変換した類縁体 RCAI-101 を合成したが、この場合も活性は RCAI-60 と同程度であった。その理由として、RCAI-60 および RCAI-101 では、疎水性が高まりすぎてしまったために溶解度が低下していることが考えられた。リポソーム化など投与方法を改良することによって溶解性の問題は解決することが可能であろうと考えられるが、本研究では、化合物の官能基変換を通して溶解性を変化させることを試みることにした。

次に研究代表者は、RCAI-56 の 6-位のヒドロキシメチル基を水酸基へと変換した類縁体 RCAI-59 の合成に着手した。RCAI-59 は、RCAI-56 合成の際の中間体であるシクロヘキサノンの水素化ホウ素ナトリウムによる立体選択的な還元反応を行うことによって水酸基を導入することで容易に合成できた。えられた RCAI-59 は、RCAI-56 よりも多量の IFN-gamma の産生を誘導した。なお、RCAI-59 のメチルエーテル類縁体 RCAI-92 も、RCAI-59 と同程度の強い活性を示すことを明らかにした。

さらに、RCAI-59 および RCAI-92 は、いずれもヒトの NKT 細胞に対しても強い活性を示すことがわかっている。

RCAI-59 ならびに RCAI-92 の溶解性は、いずれも RCAI-56 と同程度であったことから、これらは RCAI-56 に次ぐ新たな医薬リード化合物となりうる可能性が示唆された。

ところで、これらの類縁体はいずれもガラクトースの 5a-位の酸素原子をメチレン基で置き換えたものである。この 5a-位に水酸基を導入したイノシトール類に関する類縁体の合成および活性調査に関しては、これまでに報告例がない。そこで研究代表者は、5a-位に水酸基を導入したイノシトール類縁体の合成に着手した。岸らにより報告されている myo-イノシトールのオルトエステル保護体を出発原料として、5a-位に alpha-水酸基を導入したイノシトール類縁体 RCAI-37 (糖の

4-位水酸基が beta-配置のもの) および RCAI-102 (糖の 4-位水酸基が alpha-配置のもの) を合成した。RCAI-37 および RCAI-102 はいずれも全くサイトカインの産生を誘導しなかった。その理由としては、CD1d と糖脂質とのドッキングモデルを計算したところ、5a-位周辺には疎水性アミノ酸残基である valine および methionine が存在していることから、5a-位に導入した親水性の水酸基がこれらのアミノ酸残基と反発し、安定な CD1d-糖脂質複合体を形成できなかったものと考えられる。

一方で、RCAI-56 と CD1d とのドッキングモデルを算出したところ、結合状態に大きな違いは認められなかった。このことから、RCAI-56 が強い活性を示す理由は、TCR との相互作用力が向上したことと、生体内での酵素による分解を受けにくいために長時間 NKT 細胞を刺激できるためであろうと考えられる。

RCAI-59 や RCAI-92 では RCAI-56 以上に IFN-gamma を多量に産生する理由に関しては、今後さらに詳細に調査を行う必要があるが、現時点では、RCAI-56 に比べて抗原提示細胞へ効率よく運ばれるためであろうと考えられる。

以上本研究を通して、新規医薬品候補化合物 RCAI-59 および RCAI-92 の開発に成功した。今後は、これら新規類縁体の生体内での作用機構に関する研究を行って、免疫の力でガンを治療する新規医薬品の開発に繋げていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Takuya Tashiro (15人中1番目) Induction of Th1-biased cytokine production by α -carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for NKT cells, *Int. Immunol.*, 22, 319-328, 2010 (査読: 有)

Takuya Tashiro (15人中8番目) Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant $V\alpha 14-J\alpha 18$ TCR α gene, *Blood*, 115, 230-237, 2010 (査読: 有)

Takuya Tashiro (5人中2番目) The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy, *Int. Immunology*, 22, 1-6, 2010 (査読: 有)

Takuya Tashiro (7人中1番目) RCAI-37, 56, 59, 60, 92, 101, and 102, cyclitol and carbasugar analogs of KRN7000: Their synthesis and bioactivity for mouse lymphocytes to produce Th1-biased cytokines, *Bioorg. Med. Chem.* 17, 6360-6373, 2009 (査読: 有)

Takuya Tashiro (7人中1番目) RCAI-61, the 6'-O-methylated analog of KRN7000: its synthesis and potent bioactivity for mouse lymphocytes to produce interferon- α in vivo, *Tetrahedron Lett.*, 49, 6827-6830, **2008** (査読: 有)

Takuya Tashiro (8人中1番目) RCAI-17, 22, 24-26, 29, 31, 34-36, 38-40 and 88, the analogue of KRN7000 with a sulfonamide linkage: their synthesis and bioactivity for mouse natural killer T cells to produce Th2 biased cytokines, *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 8896-8906, **2008** (査読: 有)

[学会発表] (計6件)

田代卓哉、免疫細胞に対してIFN- α の産生を誘導する新規スフィンゴ糖脂質の開発、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月28日、東京大学

田代卓哉、免疫細胞を活性化する新規糖脂質の合成研究、理研シンポジウム、2010年1月29日、理化学研究所

田代卓哉、マウス免疫細胞に対してIFN- α の産生を誘導する新規スフィンゴ糖脂質類縁体の開発、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009年3月29日、福岡マリンメッセ

田代卓哉、免疫細胞の一種であるナチュラルキラーT細胞を活性化する新規糖脂質の探索研究、第44回天然物談話会、2009年7月9日、つくばグランドホテル

Takuya Tashiro、Newly synthesized glycolipids potentiate to produce large amount of IFN- α in vivo、The 5th International Symposium on CD1/NKT Cells、2009年3月24日、鎌倉プリンスホテル

田代卓哉、ナチュラルキラー(NK)T細胞を活性化し、IFN- α の産生を強力に誘導する新規糖脂質 RCAI-61 の合成、第50回天然有機化合物討論会、2008年9月30日、福岡国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 新規合成糖脂質およびその用途
発明者: 田代卓哉 (5人中1番目)
権利者: 理化学研究所
種類:
番号: 2010-024859

出願年月日: 2010年2月5日
国内外の別: 国内

名称: 新規糖脂質及びその用途
発明者: 田代卓哉 (6人中1番目)
権利者: 理化学研究所
種類:

番号: 2008-079265
出願年月日: 2008年3月25日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
田代 卓哉 (Tashiro Takuya)
独立行政法人 理化学研究所・免疫制御研究グループ・研究員
研究者番号: 20339104

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
森 謙治 (Mori Kenji)
東京大学名誉教授
理化学研究所 研究顧問
研究者番号: 20011843

広川 貴次 (Hirokawa Takatsugu)
独立行政法人 産業技術総合研究所・分子設計チーム
研究者番号: 20357867