

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06938

研究課題名（和文）T細胞応答に関わる分子基盤の解明を目指したケミカルツールの創製研究

研究課題名（英文）Development of chemical tools to elucidate the molecular basis of T cell responses

研究代表者

井貫 晋輔（Inuki, Shinsuke）

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：70736272

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）：本研究では、様々な疾患への関与が指摘されているmucosa-associated invariant T（MAIT）細胞とCD1a拘束性T細胞に着目し、それらの制御を担うMR1やCD1aタンパク質に作用するリガンド分子の探索を実施した。MR1リガンド探索のためのハイスループットスクリーニング系を開発し、化合物スクリーニングを行った。得られたヒット化合物の構造展開と分子シミュレーションによる結合モード解析を実施した。CD1aリガンドについてもリガンド探索のための評価系を構築し、微生物由来リポペプチドの構造活性相関研究を行い、活性に重要な部分構造の同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MAIT細胞やCD1a拘束性T細胞は、感染防御に加えて、がんや自己免疫疾患など様々な疾患に関与するため、その機能を制御するリガンドの開発は重要な研究課題である。本研究では、MAIT細胞やCD1a拘束性T細胞を制御するリガンドの探索のために、ハイスループットスクリーニング系の開発と、有機合成化学的アプローチによる構造展開を実施した。本研究で見出した新たなリガンドは、T細胞の機能を解析するためのケミカルツール、ワクチンアジュバントや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）：In this study, we explored MR1 and CD1a ligands that regulate the function of mucosa-associated invariant T (MAIT) cells and CD1a-restricted T cells involved in various diseases. A high-throughput screening system was established and compound screening was conducted. We synthesized various derivatives of identified hit compounds and analyzed their interaction with MR1 using docking simulations. In terms of CD1a ligands, we developed an evaluation system for ligand discovery and performed structure-activity relationship studies on lipopeptides derived from microorganisms to identify key structures responsible for the regulation of activity.

研究分野：生物有機化学

キーワード：構造展開 医薬品探索 ケミカルツール 免疫応答 T細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫系は、T細胞、B細胞、樹状細胞などを含めた多様な細胞が関与する複雑なネットワークから成り立っている。これらのネットワークには様々な小分子化合物が関わっており、異物排除や免疫寛容などの免疫応答を制御している。Mucosa-associated invariant T (MAIT) 細胞や CD1a 拘束性 T 細胞は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しを行い、免疫の初期応答に加えて、がんや自己免疫疾患など様々な疾患への関与が指摘されている。例えば、粘膜に多く存在する MAIT 細胞は、炎症性腸疾患などへの関与が指摘されている。CD1a 拘束性 T 細胞は、主に皮膚において、乾癬等の皮膚疾患に関わるとされている。これらの細胞は、T 細胞受容体 (TCR) を介して、抗原提示細胞に存在するリガンドが結合した MHC-Ib タンパク質 (MR1、CD1a) を認識して活性化される。活性化された MAIT 細胞や CD1a 拘束性 T 細胞は、サイトカイン誘導を惹起することで、様々な免疫応答に関わる。これらの T 細胞応答をリガンド分子で制御することができれば、様々な疾患に対する新たな治療戦略の確立に貢献できると考えられる。

MAIT 細胞、CD1a 拘束性 T 細胞を制御するリガンドとしては、それぞれ、微生物由来のビタミン B2 合成中間産物 5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylaminoouracil (5-OP-RU) やリポペプチド didehydroxymycobactin 838 (DDM-838) 等が報告されている。しかしながら、リガンド分子の探索は、上記の微生物由来リガンド分子とその誘導体において進められているのみで、その多様性は限定的であった。

2. 研究の目的

本研究は、MAIT 細胞や CD1a 拘束性 T 細胞などの様々な免疫応答を分子レベルから理解し制御するためのケミカルツールの創製を目的としている。多様な小分子化合物によって制御されている複雑な免疫システムを統合的に理解するためには、分子生物学的手法 (組み換え DNA 技術など) を用いた細胞や個体レベルからの解析に加えて、分子レベルからの解析が必要不可欠である。一方、これまで MAIT 細胞や CD1a 拘束性 T 細胞の免疫応答を分子レベルから解析する試みは、天然由来の限られたリガンド分子に頼っていた。本研究では、有機合成化学を基盤とした構造展開により、多様な活性および物性プロファイルを有するリガンド分子を創出することを目的とし、リガンド探索のためのスクリーニング手法の確立、有機合成を基盤とした構造展開、分子シミュレーションソフトを用いた結合モード解析を実施した。

3. 研究の方法

(1) MR1 リガンド探索のためのスクリーニング手法の確立

多様な MR1 リガンドを探索するためのハイスループットスクリーニング系の確立を検討した。スクリーニング系の確立後、所属研究室で保有する化合物ライブラリーを用いて、スクリーニングを実施した。

(2) MR1 リガンドの構造展開と分子認識機構の解析

化合物スクリーニングで得られたヒット化合物の構造展開を実施した。各種類緑化合物の合成を行い、構造活性相関情報を取得した。さらにヒット化合物と MR1 との分子間相互作用に関して、分子シミュレーションソフトを用いて解析した。

(3) CD1a リガンドの評価系の確立

CD1a リガンドを探索するための評価系の確立を行った。CD1a 拘束性 T 細胞のモデル細胞株を樹立し、抗原提示細胞との共培養系により、活性を評価する系を構築した。

(4) CD1a リガンドの合成法確立と構造活性相関研究

CD1a リガンドとして知られる微生物由来リポペプチド DDM-838 の合成ルートの確立を行った。合成ルートを元に、各種誘導体を合成し、構造活性相関情報を取得した。

4. 研究成果

(1) MR1 リガンド探索のためのスクリーニング手法の確立

迅速に MR1 リガンドを探索するためのハイスループットスクリーニング系構築の検討を行った。各種検討を行った結果、MR1 がリガンドと結合すると細胞表面に集積することを検出指標としたハイスループットスクリーニング系を開発した。本評価系を用いて、所属研究室で保有する化合物ライブラリーに対してスクリーニングを行ったところ、新たな骨格を有する MR1 リガンドの取得することができた。ヒット化合物の一部は、食用植物や生薬に含まれる化合物であっ

た。MAIT 細胞が腸管をはじめとする粘膜組織に豊富に存在することを踏まえると、食用植物や生薬に由来する化合物が MR1 リガンドとして機能することは非常に興味深い。本研究で開発したスクリーニング系は、今後、内因性・外因性抗原を含む幅広い MR1 リガンドの同定に貢献し、MAIT 細胞の機能解明にも寄与ことが期待される。

(2) MR1 リガンドの構造展開と分子認識機構の解析

上述のハイスループットスクリーニング系を用いて取得したヒット化合物について、構造展開を行った。ヒット化合物の各種誘導体を合成し、評価することで、活性に重要な部分構造の同定を行った。また、得られた構造活性相関情報を元に、新たな誘導体を合成した結果、幾つかの化合物がヒット化合物と同等の活性を示した。さらにヒット化合物と誘導体に対して、分子動力学計算を用いて結合モードの解析を行い MR1 との相互作用に関する情報を得た。特にヒット化合物は水分子を介して、MR1 と相互作用することが示唆された。

スクリーニング系で見出した化合物以外にも、既知リガンド 5-OP-RU と MR1 タンパク質の X 線結晶構造解析を基にしたドッキングシミュレーションを行い、新規リガンドのデザインと合成を行った。特に MR1 との結合に重要なヘテロ環骨格構造について、既知リガンドと異なる骨格を複数種類デザインし、活性評価を行った。その結果、活性リガンドを複数取得し、それらの一部は既知リガンドである 5-A-RU に匹敵する活性を示した。

(3) CD1a リガンドの評価系の確立

CD1a リガンドを評価するためのアッセイ系の構築を検討した。遺伝子導入により CD1a 拘束性 T 細胞のモデル細胞株を樹立した。樹立した T 細胞モデルと CD1a を発現する抗原提示細胞との共培養系を確立し、CD1a を介した T 細胞活性化を評価する系を構築した。また、ELISA 法を用いた CD1a とリガンドとの分子間相互作用を検出する評価系の構築も併せて検討した。系の構築のために、最適なトレーサーの合成を検討するとともに、相互作用検出のために buffer 組成などの最適化を検討した。

(4) CD1a リガンドの合成法確立と構造活性相関研究

リポペプチド DDM-838 の合成ルートを確立した。これまでに報告されていた合成ルートでは、合成ルートの中盤で低収率の工程があり、化合物供給の障害となっていた。本研究において、低収率の原因を特定し、適切な保護基の選択、精製手法の改良を行うことで、合成効率を大幅に改善した。確立した合成ルートを用いて各種誘導体の合成ルートも確立した。合成した誘導体について、上述の評価系を用いて活性評価を行った。その結果、DDM-838 について活性発現に関わる鍵構造を同定することができた。

以上のように、本研究において報告者らは、MAIT 細胞や CD1a 拘束性 T 細胞を制御する種々のリガンドを開発した。また、構造活性相関研究や結合モード解析によりリガンドの分子認識機構に関する情報を得た。これらの知見は、MAIT 細胞や CD1a 拘束性 T 細胞の機能解析ツールの開発に大きく貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6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 井貫 晋輔、藤本 ゆかり	4. 巻 51
2. 論文標題 脂質改変型CD1dリガンドの創製	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊ファインケミカル	6. 最初と最後の頁 12~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inuki Shinsuke, Tabuchi Hitomi, Matsuzaki Chiaki, Yonejima Yasunori, Hisa Keiko, Kimura Ikuo, Yamamoto Kenji, Ohno Hiroaki	4. 巻 70
2. 論文標題 Chemical Synthesis and Evaluation of Exopolysaccharide Fragments Produced by <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Strain NTM048	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 155~161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inuki Shinsuke, Ohno Hiroaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Total Syntheses of Myriocin, Mycestericins and Sphingofungin E: Sphingosine Analogues Containing a , -Dihydroxy -Amino Acid Framework	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1313~1324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka Takuro, Motozono Chihiro, Hattori Akira, Kakeya Hideaki, Yamasaki Sho, Oishi Shinya, Ohno Hiroaki, Inuki Shinsuke	4. 巻 22
2. 論文標題 The effects of 5 OP RU stereochemistry on its stability and MAIT MR1 axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 672~678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Haruka, Inuki Shinsuke, Nakagawa Kohei, Kawabe Takaaki, Ichimura Atsuhiko, Oishi Shinya, Ohno Hiroaki	4. 巻 59
2. 論文標題 Total Synthesis of Zephyrcarinatines via Photocatalytic Reductive Radical Cyclization ipso	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 21210 ~ 21215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202009399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inuki Shinsuke, Hirata Natsumi, Kashiwabara Emi, Kishi Junichiro, Aiba Toshihiko, Teratani Toshiaki, Nakamura Wataru, Kojima Yoshimi, Maruyama Toru, Kanai Takanori, Fujimoto Yukari	4. 巻 10
2. 論文標題 Polar functional group-containing glycolipid CD1d ligands modulate cytokine-biasing responses and prevent experimental colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15766 ~ 15766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72280-4	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 -

1. 著者名 Matsuoka Takuro, Inuki Shinsuke, Miyagawa Takashi, Oishi Shinya, Ohno Hiroaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Total Synthesis of (+)-Polyoxamic Acid via Visible-Light-Mediated Photocatalytic α -Scission and 1,5-Hydrogen Atom Transfer of Glucose Derivative	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 8271 ~ 8278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c00910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 高崎 亮助、松岡 巧朗、有地 法人、山崎 晶、大野 浩章、井貫 晋輔
2. 発表標題 MAIT細胞活性化作用を示す二環性5-OP-RU誘導体の創製研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口 亞由太、井貫 晋輔、有地 法人、大石 真也、大野 浩章
2. 発表標題 Avionin構造における -アミノ不斉四置換炭素構築法の開発とMicrovioninの合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田 悠生、井貫 晋輔、竹内 春佳、中川 航平、有地 法人、大石 真也、大野 浩章
2. 発表標題 可視光レドックス触媒を用いた脱芳香化反応によるピシクロ[2.2.2]オクテン骨格構築反応の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井貫 晋輔
2. 発表標題 免疫機構の調節に関わる古細菌脂質の合成と機能解析研究
3. 学会等名 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) 第4回合成勉強会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井貫 晋輔
2. 発表標題 常在古細菌が有する糖脂質の機能解析研究
3. 学会等名 生理化学研究ユニット第12回シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡 詩織、渡邊 美幸、伊東 瑛美、武山 亜美、松岡 巧朗、有地 法人、大野 浩章、山崎 晶、井貫晋輔
2. 発表標題 C-type lectin受容体に作用するアーキア脂質の構造活性相関研究
3. 学会等名 第39回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡 巧朗、服部 明、大石 真也、有地 法人、掛谷 秀昭、山崎 晶、大野 浩章、井貫 晋輔
2. 発表標題 スプリットルシフェラーゼを利用したスクリーニング法による新規MR1リガンドの同定とその構造活性相関研究
3. 学会等名 第39回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayuta Yamaguchi, Shinsuke Inuki, Norihito Arichi, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno
2. 発表標題 Synthetic study on microvionin for stereochemical assignment of avionin moiety
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井貫 晋輔、竹内 春佳、中川 航平、川邊 隆彰、市村 敦彦、大石 真也、大野 浩章
2. 発表標題 可視光レドックス触媒を用いたスピロ環化反応を鍵とするzephycarinatine CおよびDの全合成
3. 学会等名 第64回天然物有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡 巧朗、本園 千尋、服部 明、掛谷 秀昭、山崎 晶、大石 真也、大野 浩章、井貫 晋輔
2. 発表標題 MAIT細胞の活性化を担うMR1リガンドの構造活性相関研究
3. 学会等名 創薬懇話会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井貫 晋輔
2. 発表標題 免疫系の制御に関わるケミカルツールの創製研究
3. 学会等名 第55回天然物化学談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡 詩織、伊東 瑛美、武山 亜美、松岡 巧朗、有地 法人、大野 浩章、山崎 晶、井貫 晋輔
2. 発表標題 免疫調節活性を有するアーキア膜脂質の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinsuke Inuki, Takuro Matsuoka, Takashi Miyagawa, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno
2. 発表標題 Total Synthesis of (+)-Polyoxamic Acid via Visible-Light-Mediated Photocatalytic α -Cleavage and 1,5-Hydrogen Atom Transfer of Glucose Derivative
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinsuke Inuki, Takashi Miyagawa, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno
2. 発表標題 Total Synthesis of Myriocin via Site-Selective C-H Functionalization of Tris Derivatives
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井貫 晋輔
2. 発表標題 Innate-like T cellの機能制御を目指したリガンド創製研究
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 微生物代謝物由来5-OP-RUの構造活性相関研究
2. 発表標題 松岡 巧朗、本園 千尋、服部 明、掛谷 秀昭、山崎 晶、大石 真也、大野 浩章、井貫 晋輔
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 巧朗、本園 千尋、服部 明、掛谷 秀昭、山崎 晶、大石 真也、大野 浩章、井貫 晋輔
2. 発表標題 MAIT細胞活性化剤5-OP-RUの構造活性相関研究
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井貫 晋輔
2. 発表標題 Structure-activity relationship study of microbial-derived MAIT cell modulators
3. 学会等名 The Fourth A3 Young Scientist Meeting (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井貫 晋輔
2. 発表標題 Innate-like T cellを制御する機能性分子の創製研究
3. 学会等名 生理化学研究ユニット第10回シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井貫 晋輔, 竹内 春佳, 中川 航平, 川邊 隆彰, 市村 敦彦, 大石 真也, 大野 浩章
2. 発表標題 可視光レドックス触媒を用いたラジカルlipso環化反応を鍵とするZephycarinatine CおよびDの全合成
3. 学会等名 反応と合成の進歩2020特別企画シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡 巧朗, 本園 千尋, 服部 明, 掛谷 秀昭, 山崎 晶, 大石 真也, 大野 浩章, 井貫 晋輔
2. 発表標題 MAIT細胞アゴニスト5-OP-RUの立体化学がその安定性・活性に及ぼす効果
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡 巧朗, 井貫 晋輔, 宮川 貴吏, 大石 真也, 大野 浩章
2. 発表標題 可視光レドックス触媒による 開裂・C(sp ³)-C(sp ³) _{1,5} -HAT連続反応を利用した(+)-polyoxamic acidの全合成
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 亞由太, 井貫 晋輔, 時水 勇輔, 大石 真也, 大野 浩章
2. 発表標題 金触媒による連続環化反応を用いた八員環縮環インドールとプロペラン型インドリンの選択的構築法の開発
3. 学会等名 第18回次世代を担う有機化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 化合物、MAIT細胞賦活剤、ワクチンアジュバント及び医薬組成物	発明者 井貫 晋輔、高崎 亮 助、松岡 巧朗、大野 浩章	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2023-031822	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究室ホームページ http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizo/
--

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
---------	---------