

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01914

研究課題名(和文) 自己免疫疾患発症機構解明を目指したジアミノ二糖骨格を有するリポオリゴ糖の合成

研究課題名(英文) Synthesis of lipooligosaccharides partial structures including 2,3-diaminoglucose disaccharide skeleton for the elucidation of autoimmune disease onset mechanism

研究代表者

下山 敦史 (Shimoyama, Atsushi)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：90625055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Campylobacter jejuniの外膜成分リポオリゴ糖(LOS)は、オリゴ糖末端に糖脂質リピドAが結合した構造からなる。C. jejuni由来オリゴ糖はヒト神経組織ガングリオシドと分子相同性があるため、一定の確率で免疫交差反応が誘発し、自己免疫疾患を惹起させる。しかし、C. jejuniと同様の分子相同性を有するHelicobacter pyloriは免疫交差反応を誘発しないことから、分子相同性以外の要因としてLOSの免疫亢進作用に着目した。本研究では、C. jejuniリピドAの化学合成を世界で初めて達成し、その機能評価によりC. jejuni LOSの活性中心を同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リピドAは、抗原の免疫原性を高め抗体産生等の獲得免疫系の活性化を促進するアジュバント作用を有しており、C. jejuniリピドAが、自己免疫疾患発症における免疫交差反応の誘導に関与していることは確実である。しかしながら、特殊な2,3-ジアミノグルコース骨格を含むC. jejuniリピドAの合成例はこれまでになく、その機能は未解明であった。本研究において世界初の合成が達成されたC. jejuniリピドAの機能解析研究は、自己免疫疾患発症機構の解明や新規ワクチンアジュバント開発へと発展する可能性が高く、学術的にも社会的にも意義深く十分な貢献が期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)： A Gram negative bacteria, Campylobacter jejuni produces lipooligosaccharide (LOS) as an extracellular membrane component. LOS is composed of oligosaccharide and glycolipid "lipid A", which is recognized by TLR4/MD-2 complex to regulate innate immunity. Since C. jejuni oligosaccharides have molecular homology with gangliosides in human nervous tissues, they can induce cross-reaction to cause autoimmune diseases. However, Helicobacter pylori having the same molecular homology does not induce cross-reaction. Therefore, we focused on the immune activity of LOS as other factor related to autoimmune diseases, and thus synthesized its lipid A and identified the active core structure of C. jejuni LOS.

研究分野：天然物化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：リピドA Campylobacter jejuni 自己免疫疾患 2,3-ジアミノグルコース アジュバント ケミカルエ  
コロジ- リポオリゴ糖

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

*C. jejuni* は、家畜の腸管に広く存在しており、特に鶏の保菌率が高く、生や加熱不足の鶏肉を食べることによって急性腸炎であるカンピロバクター症を惹き起こす。カンピロバクター症患者の約0.1%が、その後、自己免疫疾患の一種であるギランバレー症候群を発症するが、これは健常者の約100倍の発症リスクを有していることになる<sup>1)</sup>。

*Escherichia coli* に代表される一般的な細菌はリポ多糖 (LPS、糖残基数は数十~数百) を産生するが、菌種によっては糖鎖の短いリポオリゴ糖 (LOS) を産生するものもある。*C. jejuni* の細胞外膜は LOS で構成されているが、その多糖部分は GM1, GD1a といったヒトの神経組織に含まれるガングリオシドと分子相同性がある。そのため、*C. jejuni* 感染により、一定の確率で免疫交差反応が誘発し、産生した抗体が自己組織のガングリオシドを攻撃することで、自己免疫疾患を発症すると考えられている<sup>2)</sup>。

### 2. 研究の目的

LPS やリポド A は、抗原の免疫原性を高め、抗体産生等の獲得免疫系の活性化を促進するアジュバント作用を有しており、*C. jejuni* LOS およびそのリポド A が、ギランバレー症候群発症における免疫交差反応の誘導に関与していることは確実である。しかしながら、*C. jejuni* LOS やリポド A の自然免疫調節作用ならびにそのアジュバント効果が解析されたことはなく、本研究では、*C. jejuni* リポド A の初めての化学合成と機能解析に取り組んだ。*E. coli* 型に代表される一般的なリポド A (Figure 1) はグルコサミン骨格 (GlcN) のみで構成されるが、*C. jejuni* リポド A は特殊な 2,3-ジアミノグルコース骨格 (GlcN3N) を含むなど、糖骨格自体に構造多様性<sup>3)</sup>を有している。これまでに GlcN3N 骨格を含むリポド A の合成例は皆無であるため、新規合成戦略 (Scheme 1) により *C. jejuni* リポド A 群 1-4 を系統的に合成し、糖骨格の多様性に基づく構造活性相関研究を行った。

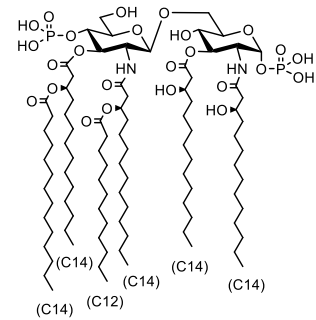
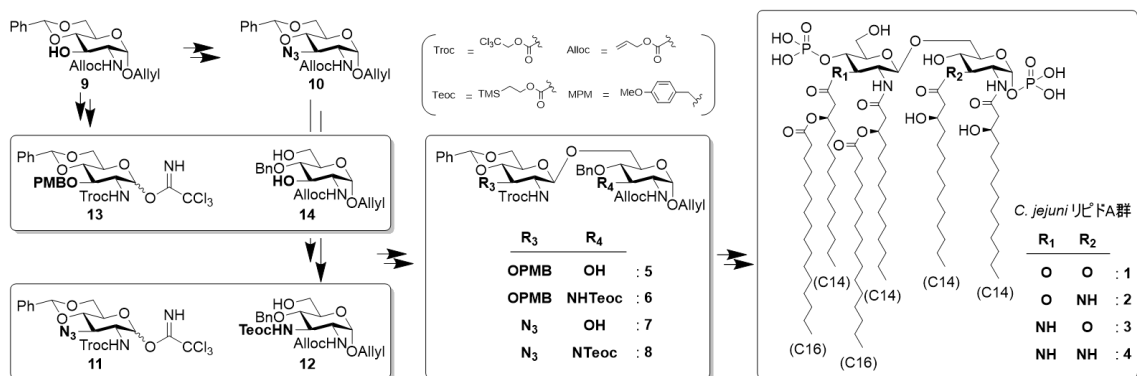


Figure 1. *E. coli* リポド A

### 3. 研究の方法

リポド A 群 1-4 に対して、二糖中間体群 5-8 を經由する合成戦略を展開した。Scheme 1 に示したようにまず、既知の GlcN 誘導体 9<sup>4)</sup> に対して 2 度の S<sub>N</sub>2 反転を施して立体保持アジド化を行い、2-アミノ-3-アジドグルコース骨格を有する 10 を合成した。得られた 10 を共通中間体としてグリコシルドナー 11 およびアクセプター 12 へと分岐させ、それらを GlcN フラグメント 13、14<sup>4)</sup> と組み合わせてグリコシル化させることで二糖中間体群 5-8 を構築した。これらに対してアシル鎖とリン酸基を順次導入し、最終脱保護を経て、世界初となる *C. jejuni* リポド A 群 1-4 の系統的合成を達成した。

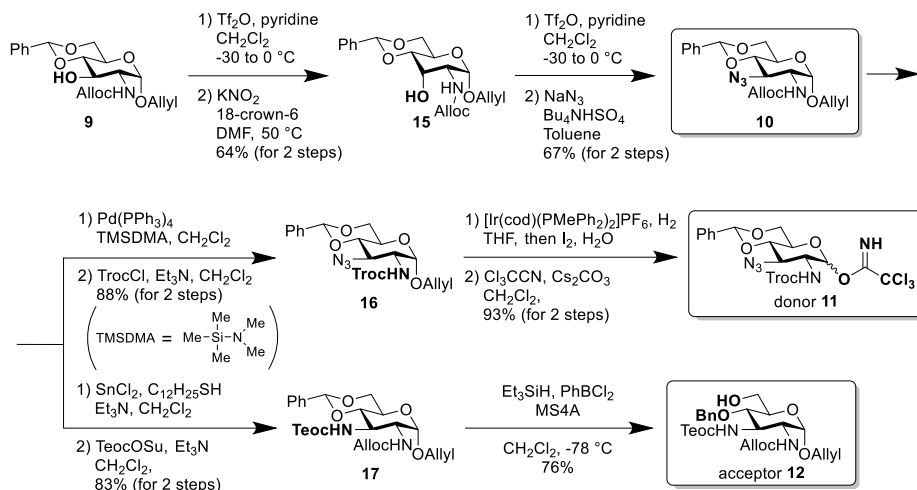


Scheme 1. *C. jejuni* リポド A 群(1-4)の系統的合成

### 4. 研究成果

まず、Scheme 2 に示したように、D-グルコサミン塩酸塩から導かれる既知の化合物 9<sup>4)</sup> を経て、単糖中間体 10 へと導き、これをグリコシルドナー 11、アクセプター 12 へと分岐させた。

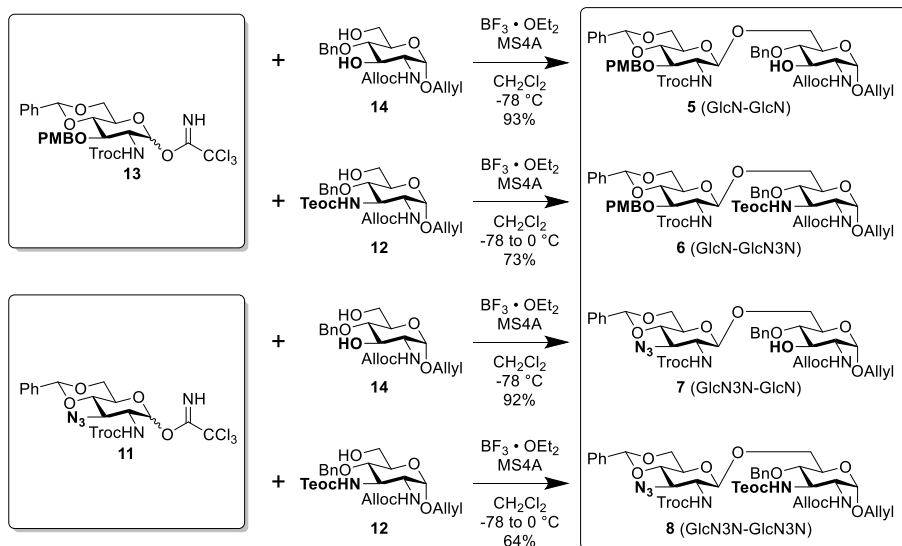
具体的には、9 の 3 位のヒドロキシ基をトリフラート基で活性化させ、亜硝酸カリウムを用いた条件<sup>5)</sup>で立体反転を施して 15 へと誘導した。得られた 15 のヒドロキシ基を再びトリフラート基で活性化させてアジド化を行い、共通中間体 10 を得た。続いて、グリコシルドナー 11 の合成を行った。共通中間体 10 の Alloc 基を Pd 触媒と TMSDMA を用いた条件で切断し、Troc 基で保護し直して 16 へと誘導した。続いて 16 のアノマー位 Allyl 基を Ir 触媒により切断し、トリクロロアセトイミデート基に変換してグリコシルドナー 11 を合成した。さらには、グリコシルアクセプター 12 を調製するため、共通中間体 10 のアジド基の還元を試みた。種々条件検討の結果、Vilarrasa らの条件<sup>6)</sup>を参考に塩化スズとドデカンチオールを用いることで反応が良好に進行することを見いだした。遊離となったアミノ基を Teoc 基で保護し 17 とした後、ベン



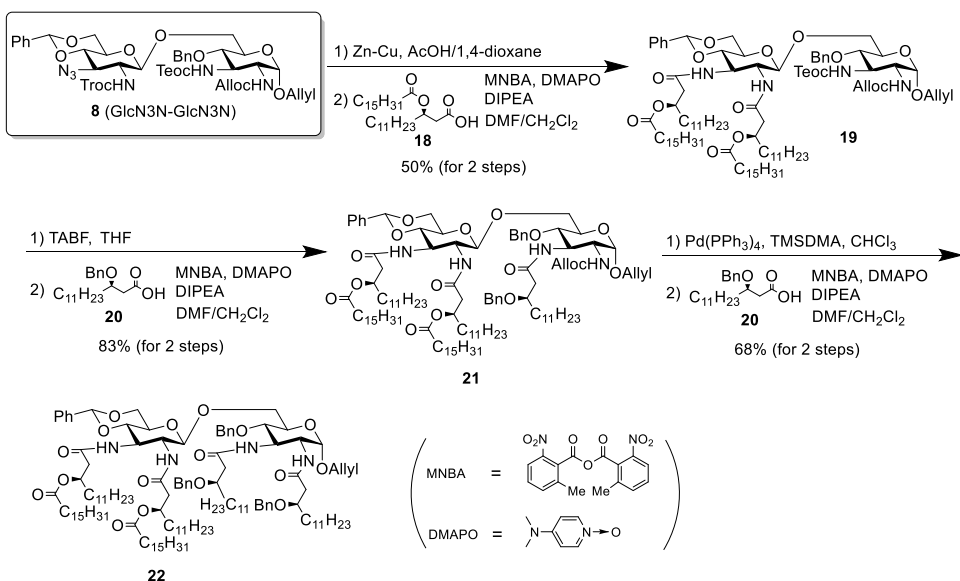
Scheme 2. グリコシルドナー11、グリコシルアクセプター12の合成

ジリデン基の選択的開裂を検討した。今回は嵩高いジクロロフェニルボランをルイス酸、トリエチルシランを還元剤として用いる条件<sup>7)</sup>により選択的な切り分けに成功し、アクセプター12を得ることができた。

続いて、得られたグリコシルドナー11、グリコシルアクセプター12に、合成法を報告済みのグリコシルドナー13、グリコシルアクセプター14<sup>4)</sup>を組み合わせ、2位 Troc 基による隣接基関与を利用したβ-選択的グリコシル化を行い、鍵二糖中間体群 5-8 を合成した (Scheme 3)。



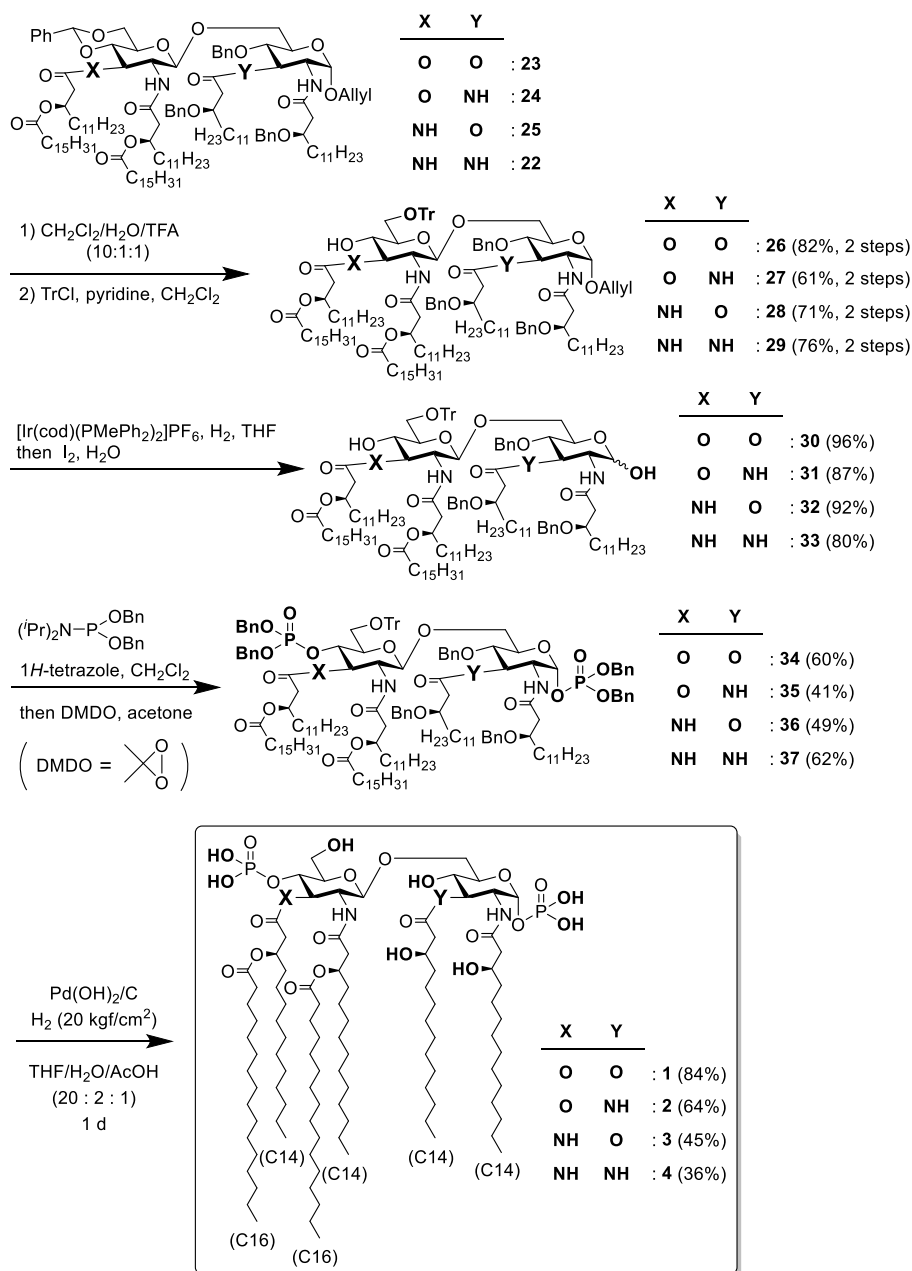
Scheme 3. 鍵二糖中間体群 5-8 の合成



Scheme 4. 鍵二糖中間体 8 への長鎖脂肪酸の縮合

得られた二糖中間体 **8** に対し、長鎖脂肪酸の導入を行った (Scheme 4)。これまでに、長鎖脂肪酸に由来する対称酸無水物の低反応性が問題となったことがあるが、椎名法<sup>8)</sup>を適用し MNBA を過剰に用いることでこれを解決できることを報告している<sup>4)</sup>。まず、Zn-Cu を用いて二糖中間体 **8** の 2'位の Troc 基の除去と 3'位のアジド基の還元を行った後、遊離となった 2', 3' 位のアミノ基へ長鎖脂肪酸 **18** を縮合し、長鎖脂肪酸が二本同時に導入された **19** を効率的に得ることができた。続いて、2, 3 位への長鎖脂肪酸の同時導入を試みたが、種々条件検討の結果、困難であると判断し、逐次的な縮合を行った。まず、**19** の 3 位 Teoc 基を TBAF で除去した後、長鎖脂肪酸 **20** を縮合し **21** を得た。続いて、**21** の 2 位 Alloc 基を Pd 触媒を用いて除去した後、再度、長鎖脂肪酸 **20** を縮合することでヘキサアシル型の糖脂質保護体 **22** へと導いた。二糖中間体 **5-7** についても、同様の条件で長鎖脂肪酸の縮合を行い、化合物 **23-25** へと導いた。

最後に、アシル化された中間体 **22-25** にリン酸基を導入しリポド A へと導いた (Scheme 5)。まず、**22-25** の 4', 6'位ベンジリデン基を TFA を用いて切断した後、6'位選択的なトリチル保護を行い、それぞれ **26-29** へと誘導した。得られた **26-29** のアノマー位 Allyl 基を Ir 触媒で切断して **30-33** とした後、ホスホロアミダイト法を用いて 2ヶ所同時にリン酸化を行い、ジリン酸体 **34-37** を得た。この際、アノマー位のジベンジルリン酸基の脱離を防ぐため、DMDO を用いて中性条件下で酸化を行った<sup>4)</sup>。得られた **34-37** を THF/H<sub>2</sub>O/AcOH 混合溶媒中、接触水素化条件下に付すことですべての保護基の除去を行い、目的とする *C. jejuni* リポド A 群 **1-4** の世界初の合成に成功した。

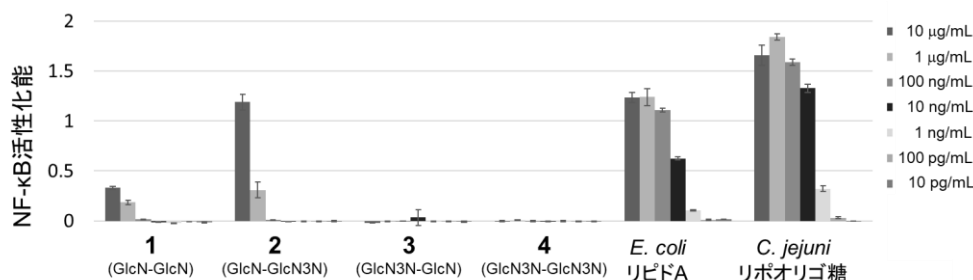


Scheme 5. *C. jejuni* リポド A 群 1-4 の系統的合成

合成したリポド A 群 **1-4** を HEK-Blue<sup>TM</sup>TLR4 細胞に作用させて NF- $\kappa$ B 活性化能を測定した (Figure 2)。**1** (GlcN-GlcN 型) および **2** (GlcN-GlcN3N 型) はアゴニスト活性を示した一方で、**3** (GlcN3N-GlcN 型) および **4** (GlcN3N-GlcN3N 型) は活性を示さなかった。この際、一般的

な GlcN 骨格のみで構成される **1** よりも特殊な GlcN3N 骨格を含む **2** の方が強い免疫活性化能を示すことを確認し、糖骨格の僅かな差異がリポド A の免疫調節作用に大きく影響を及ぼすことを初めて明示できた。また、本研究により *C. jejuni* リポオリゴ糖の活性中心と思われる分子種が明らかになった。なお、*C. jejuni* と同様の分子相同性を有する *H. pylori* は免疫交差反応を誘発しない<sup>9)</sup>。我々は、*H. pylori* リポド A が、LPS 受容体である TLR4/MD-2 のアンタゴニストとして作用する一方で、慢性炎症シグナルである IL-12, 18 を誘導することを合成化学的に解明した<sup>4)</sup>。以上の結果は、リポド A 構造の違いに起因する免疫調節作用やアジュバント効果の差異により免疫交差反応が制御されていることを示すものである。

一方で *E. coli* リポド A と **1** を比較した場合、その化学構造は非常に類似しているが、**1** の方が百倍程度弱い活性を示したことから、アシル鎖長の僅かな差異が、受容体との親和性に大きな影響を与えることも示唆された。また、すべての *C. jejuni* リポド A (**1-4**) が天然抽出物の *C. jejuni* リポオリゴ糖よりも顕著に弱い活性を示した。我々はこれまでに、*E. coli* リポド A に Kdo (リポド A と多糖部分とを繋ぐ特異な酸性糖) を付加することで、活性が 10 倍程度強くなること<sup>10)</sup>、複数種のリポド A を混合することで活性が相乗的に向上するケースがあることを報告しており<sup>11)</sup>、*C. jejuni* リポド A の場合においても、多糖部分が活性に大きく関与する可能性とリポド A の構造不均一性に由来する相乗的な免疫活性化作用が存在する可能性が示唆された。



**Figure 2.** 合成 *C. jejuni* リポド A 群(**1-4**)、合成 *E. coli* リポド A ならびに *C. jejuni* リポオリゴ糖(天然抽出物)による NF-κB 活性化能: HEK-Blue™TLR4 細胞に対し、化合物を添加後 SEAP レポーターアッセイにより評価

#### <引用文献>

- ① McCarthy, N.; Giesecke, J. *Am J Epidemiol* **2001**, *153*, 610.
- ② Yuki, N. *Lancet Infectious Diseases*, **2001**, *1*, 29.
- ③ Moran, A. P. et al., *Eur. J. Biochem.*, **1991**, *198*, 459.
- ④ Shimoyama, A.; Fujimoto, Y.; Fukase, K. et al., *Chem Eur J*, **2011**, *17*, 14464.
- ⑤ (a) Minuth, T.; Boysen, M. M. *Beilstein J Org Chem* **2010**, *6*, 23. (b) Ren, B.; Dong, H.; Ramstrom, O. *Chem Asian J* **2014**, *9*, 1298.
- ⑥ Bartra, M.; Romea, P.; Urpi, F.; Vilarasa, J. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 587.
- ⑦ Zhang, Y.; Gaekwad, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Chem Eur J* **2008**, *14*, 558.
- ⑧ Shiina, I.; Ushiyama, H.; Yamada, Y.-k.; Kawakita, Y.-i.; Nakata, K. *Chem.-Asian J.* **2008**, *3*, 454.
- ⑨ Sack, D. A. et al., *J. Clin. Microbiol.*, **1998**, *36*, 2043.
- ⑩ Yoshizaki, H.; Fukase, K.; Kusumoto, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 1475.
- ⑪ Mueller, M.; Fukase, K.; Kusumoto, S.; Seydel, U. et al., *J Biol Chem.* **2004**, *279*, 26307.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

すべて査読有り

- ① **A. Shimoyama**, Gut Microbial Lipopolysaccharide Interacts with Host Immune System, *TIGG* **2019**, *31* (179), E55-E56, J55-J56, doi.org/10.4052/tigg.1951.6E
- ② S. Masui, Y. Manabe, K. Hirao, **A. Shimoyama**, T. Fukuyama, I. Ryu, K. Fukase, Kinetically controlled Fischer glycosidation under fluidic conditions: A new method for preparing furanosides, *Synlett* **2019**, *30*, 397-400. DOI: 10.1055/s-0037-1611643
- ③ R. Hu, **A. Shimoyama**, K. Fukase, Synthesis of *Helicobacter pylori* peptidoglycan fragments, *PEPTIDE SCIENCE* **2018**, in press.
- ④ L. Lembo-Fazio, J.-M. Billod, F. Di Lorenzo, I. Paciello, M. Pallach, S. Vaz Francisco, A. Holgado, R. Beyaert, M. Fresno, **A. Shimoyama**, K. Fukase, E. Giraud, S. Martín Santamaría, M.-L. Bernardini, A. Silipo, Bradyrhizobium Lipid a: Immunological Properties and Molecular Basis of its Binding to the Myeloid Differentiation Protein-2/Toll-like receptor 4 complex, *Frontiers in Immunology* **2018**, *9*, 1888. doi: 10.3389/fimmu.2018.01888
- ⑤ Y. Arai, K. Yokoyama, Y. Kawahara, Q. Feng, I. Ohta, **A. Shimoyama**, S. Inuki, K. Fukase, K. Kabayama, and Y. Fujimoto, Time-lapse Monitoring of TLR2 Ligand Internalization with Newly Developed Fluorescence Probes, *Org Biomol Chem* **2018**, *16*, 3824-3830. DOI: 10.1039/c7ob03205f

- ⑥ T. Suzuki, Y. Ishigaki, K. Sugawara, Y. Umezawa, R. Katoono, **A. Shimoyama**, Y. Manabe, K. Fukase, T. Fukushima, Narrower HOMO-LUMO gap attained by conformational switching through peripheral polyarylation in 1,4,5,8-tetraaza-9,10-anthraquinodimethanes, *Tetrahedron* **2018**, 74, 2239-2244, doi.org/10.1016/j.tet.2018.03.041
- ⑦ **A. Shimoyama**, Development of Chemically Synthesized Self-Adjuvanting Vaccine, *TIGG* **2018**, 30 (173), E41-E43, J19-J21, doi.org/10.4052/tigg.1747.6E
- ⑧ N. Shibata, J. Kunisawa, K. Hosomi, Y. Fujimoto, K. Mizote, N. Kitayama, **A. Shimoyama**, H. Mimuro, S. Sato, N. 5 Kishishita, K. J. Ishii, K. Fukase, and H. Kiyono, Lymphoid tissue-resident Alcaligenes LPS induces IgA production without excessive inflammatory responses via weak TLR4 agonist activity, *Mucosal Immunology* **2018**, 11, 693-702. DOI:10.1038/mi.2017.103.
- ⑨ K. Murata, Y. Motomura, T. Tanaka, S. Kanno, T. Yano, M. Onimaru, **A. Shimoyama**, H. Nishio, Y. Sakai, M. Oh-hora, H. Hara, K. Fukase, H. Takada, S. Masuda, S. Ohga, S. Yamasaki, T. Hara, Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis via the MyD88 signaling pathway in a murine model of Kawasaki disease, *Clinical & Experimental Immunology* **2017**, 190, 54-67. DOI: 10.1111/cei.13002.

〔学会発表〕（計 90 件）

- ① **A. Shimoyama**, Synthesis and Function of Symbiotic Bacterial Lipid A, Kick-off meeting for BRuSH "Oral Bacteria as Determinants for Respiratory Health", Os, Norway (March 13-14, 2019), invited talk.
- ② **A. Shimoyama**, K. Mizote, T. Uto, N. Shibata, F. D. Lorenzo, A. Molinaro, J. Kunisawa, H. Kiyono, Y. Fujimoto, K. Fukase, Synthesis and Function of Symbiotic Bacterial Lipopolysaccharide Partial Structures, Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology (SLB) & the International Endotoxin and Innate Immunity Society(IEIIS), Chandler, USA, Oct 13-16, 2018, Selected Talk.
- ③ O.S. Nakagawa, **A. Shimoyama**, K. Fukase, Chemical synthesis and function of Campylobacter jejuni lipid A, 14<sup>th</sup> The International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-14), Kyoto, Nov. 12-16, 2018.
- ④ O.S. Nakagawa, **A. Shimoyama**, K. Fukase, SYNTHESIS AND IMMUNE FUNCTION OF CAMPYLOBACTER JEJUNI LIPID A, 29<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium (ICS2018), Lisbon, Portugal, July 15-19, 2018.
- ⑤ **A. Shimoyama**, Synthesis and Function of Bacterial Glycoconjugates for Regulation of Immune System, 2017 Bilateral Symposium Genomics Research Center, Academia Sinica & School of Science, Osaka University, Taipei, Taiwan (October 12-13, 2017), invited talk.
- ⑥ **A. Shimoyama**, Synthesis and Function of Bacterial Glycoconjugates for Regulation of Immune System, The 1st CMU-Osaka Science Mini Symposium, Chiang Mai, Thailand (September 28, 2017), invited talk.
- ⑦ **A. Shimoyama**, K. Fukase, Synthesis and Function of Bacterial Glycoconjugates for Regulation of Immune System, TOLLerant Workshop: Glycoscience at the interface between Chemistry and Biology, Milano, Italy (July 12, 2017), invited talk.

他 83 件

〔図書〕（計 4 件）

- ① **下山敦史**, 真鍋良幸, 深瀬浩一, セルフアジュバントングストラテジーによる合成ワクチン開発、ペプチド医薬品、技術情報協会、**2017**, Chapter 10-6, 395-402.
- ② **下山敦史**, 藤本ゆかり, 深瀬浩一, 協奏的に作用する TLR4/MD-2 制御因子の機能～免疫調節作用を有する寄生菌由来リポド A を中心に～, エンドトキシン・自然免疫研究 20~, 隅田恭生他 監修, 医学図書出版, **2017**, 20, 15-18.
- ③ 深瀬浩一, **下山敦史**, 藤本ゆかり, 自己と非自己の認識に関わる糖鎖と複合糖質の機能解析と免疫調節への利用：リポド A 研究を中心に, エンドトキシン・自然免疫研究 20~, 隅田恭生他 監修, 医学図書出版, **2017**, 20, 1-5.
- ④ **下山敦史**, 深瀬浩一, アジュバントとしてのリポド A、次世代アジュバント開発のためのメカニズム解明と安全性評価、石井 健 監修、シーエムシー出版、**2017**, Chapter 3, 64-75.

## 6 . 研究組織

研究分担者なし

※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。