

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19194

研究課題名（和文）アナジー誘導回避により免疫賦活性を持続する光活性化糖脂質の開発

研究課題名（英文）The synthesis of a photoactivatable alpha-GalCer derivative that maintains immunostimulative activity by evading anergy induction

研究代表者

湯浅 英哉（YUASA, HIDEYA）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：90261156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：ガラクトシルセラミド（GalCer）は、Cerが抗原提示細胞上のCD1dに認識され、GalがiNKT細胞に提示され免疫賦活化が起こる。しかし、GalCerの頻回投与による免疫抑制が抗癌剤として課題であった。抗原提示の時空間的抑制によりこれを克服するため、光異性化アゾベンゼン（AzB）を含むGalCer類似体を合成し、CD1dへの結合に対する光免疫抑制効果を検証した。その結果、光照射により結合能が向上することを見出した。ドッキングシミュレーションにより、光照射効果を大きくするためには、AzB部分をもっと大きくすべきであることが判明した。そこで、より大きなAzBを含む誘導体の設計と合成を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遠隔で薬品の活性を制御する方法論の開拓は近年始まった新しい学術領域の一つである。その中で、光異性化する化合物を生物活性調節に機能させる課題がある。本研究では、光異性化合物そのものをリガンド認識部位に取り込ませて制御しようとする試みを行い、一定の成果を得た。一般に光異性化合物は大きいので、認識部位に直接入り込めないが、本研究では、CD1dが脂質鎖全体を円形にして取り込むためにアゾベンゼンのシス体とフィットすることを利用した。この方法論をさらに進展させ、光異性化による完全な活性制御が可能となれば、時空間的に免疫系を制御する新しい方法論を構築するとともに、新たな抗癌治療につながる。

研究成果の概要（英文）：Galactosylceramide (GalCer) is recognized by the CD1d proteins on antigen-presenting cells at the ceramide moiety and the galactose moiety is presented to iNKT cells, which stimulates the immune responses. However, the immune suppression by repeated injection of GalCer has discouraged its development as an anti-cancer agent. To overcome the shortcoming by spatiotemporal restriction of its exposure, we synthesized the photochromic azobenzene-incorporated analogues and tested the photo-immunoregulation effect of in its binding to CD1d. FACS analyses indicated that some of these analogues enhanced the affinity to CD1d on photo-irradiation by about 20%. A docking simulation suggests that the photochromic molecule should be bulkier for a clearer discrimination between on and off states. We thus started the design and synthesis of bulkier azobenzene-incorporated analogues.

研究分野：生物有機化学

キーワード：光免疫療法 アナジー誘導 ガラクトシルセラミド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、研究開始当初までに光線力学治療 (PDT) の基礎的研究を行っていた。PDT では、光増感剤を患部組織に投与し、これに光照射して生成する活性酸素により患部細胞を破壊する。その中で、低分子光増感剤の設計・合成および組織深達性の高い近赤外光を短波長光に変換できる LNP の合成・表面修飾を行い、癌選択性のより高い PDT の開発を行っていた。さらに、我々は癌細胞標的リガンドとして糖化合物の合成も行っていた。いっぽう、研究協力者の石井保之博士は GalCer を用いた抗アレルギー剤開発を行う免疫学者である。GalCer は比較的 low molecular weight でありながら現代人の悩みの一つであるアレルギーを完治させる可能性を秘めている。GalCer は抗癌剤としても以前開発されていたが、頻回投与によるアナジー誘導が起き抗癌活性が消失するため開発が断念された経緯を持つ。両者で議論するうちに、「光スイッチで短時間・局所的に GalCer 活性を ON にできればアナジー誘導を回避できる可能性」について検討する価値があり、共同研究することで意見が一致した。石井博士の研究仲間には、より分子論的に免疫現象を研究する渡会浩志教授 (金沢大学、当時東大准教授) がおり、GalCer と CD1d および TCR との相互作用における構造活性相関研究において協力が得られることになった。また、抗癌剤として種々の誘導体を試すうちにセレンディピティ的に抗アレルギー剤としてより優れた化合物を発見できる可能性についても検討することでも意見が一致した。

上記の頻回投与によるアナジー誘導については次のような経緯がある。GalCer は、ある条件の下では免疫抑制とは真逆の免疫賦活性を示す。この免疫賦活性を利用した抗癌剤が 1990 年代に開発され治験まで行われたが、芳しい結果は得られず開発が断念されている。免疫賦活性は、GalCer 投与により NKT が産生するインターフェロン γ (IFN- γ) がヘルパー T 細胞の 1 つである Th1 を分化誘導することにより惹起される。しかし GalCer を頻回投与すると、IL-10 が IFN- γ を上回り、免疫抑制するため免疫賦活性が消失してしまう。このような免疫不応性 (アナジー) の理由はまだわかっていないが、GalCer のガラクトースをグルコースに変換した類似体 (GlcCer) では TCR への親和性が低くなる一方、頻回投与しても弱いながら免疫賦活性が保たれることから、GalCer では TCR による抗原認識が強すぎるためにアナジーが生じるものと推察されている。

2. 研究の目的

本研究では、光で活性を調節できる GalCer 誘導体を合成し、腫瘍患部局所的に短時間だけ光照射することにより、薬剤の頻回投与によるアナジーを回避することを目標とする。GalCer-CD1d-TCR の結晶構造 (Borg N et al. Nature 2007) ではセラミドのアシル鎖がカーブして疎水的に認識されている (図 1A)。このアシル鎖の一部をベンゼンで置き換えたものも IFN- γ 産生能が保持される (Wong C.H. et al. JACS 2006)。そこで、光照射で trans-cis 異性化が可能なアゾベンゼン (AzoPh) をアシル鎖に結合させた分子 GalCer(Cn)AzoPh を設計した (図 2B)。AzoPh は光照射前は直線的な構造 (trans 体) を持つため、CD1d にうまく収まらないが (図 2C)、紫外線照射で cis 体に異性化することによりカーブ状となり CD1d に収まることが予想される (図 2D)。この作業仮説は、複合体の結晶構造座標を用いた予備的ドッキングシミュレーションでも妥当であることが支持された。

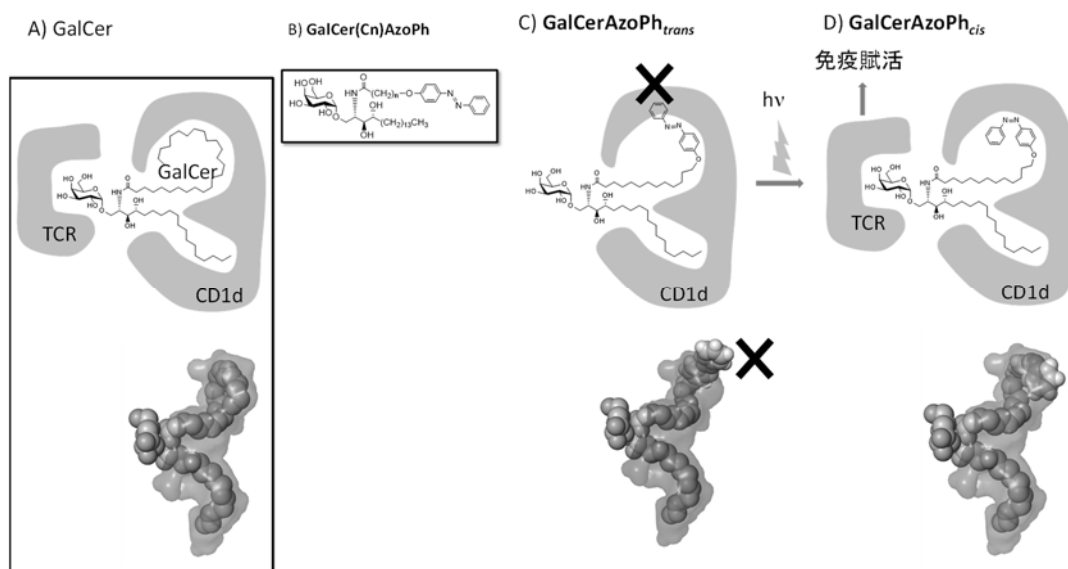


図 1.

A: GalCer-CD1d-TCR 複合体の模式図 (上) と結晶構造から得られる GalCer-CD1d のポケット部分 (下)。

B: GalCer(Cn)AzoPh

C: GalCerAzoPh_{trans} と CD1d 複合体の模式図 (上) と CD1d ポケットへのドッキング (下)。

D: GalCerAzoPh_{cis} と CD1d 複合体の模式図 (上) と CD1d ポケットへのドッキング (下)。

3. 研究の方法

(1)合成： 応募者は、 $n = 4 \sim 15$ の GalCer(Cn)AzoPh を合成する。また、ドッキングシミュレーションの精度を上げてアゾベンゼンの置換基導入位置変更、メチレン鎖内に二重結合導入などの新たな GalCer 誘導体設計を行い、適切と判断された化合物を合成する。

(2)免疫賦活： 石井博士は、マウス脾臓の抽出液に GalCer(Cn)AzoPh を添加し、光 (340 nm) 照射有無での IFN- γ 、IL-10 などのサイトカイン産生量を ELISA 法により定量する。この際、頻回投与によるアナジー誘導についての知見も得る。さらに、光照射位置とそれ以外におけるサイトカイン等の時系列での産生変化を追跡し、GalCer のアナジー誘導機構の解明を試みる。これらの知見からアナジー誘導の少ない GalCer(Cn)AzoPh の構造を定め、動物実験へと進める。タンパク質そのものを扱う渡会教授により、構造活性相関の研究も行う。

(3)アップコンバージョン： AzoPh の光異性化で用いる紫外光 (340 nm) は組織深達性が低いため、実用的には皮膚表面の癌組織や感染組織にしか適用できない。そこで、組織深達性が高い近赤外光 (980 nm) を紫外光にアップコンバージョンできるランタニドナノ粒子 (LNP) を併用した治療法の確立を行う。ナノ粒子は、リンパ管が未発達で血管壁の隙間が大きい癌組織に選択的に蓄積しやすく (EPR 効果)、レーザーによる局所照射を併用することで腫瘍標的能が大きい。癌細胞をさらに選択的に標的化できるリガンド (糖など) により LNP を表面修飾する検討も行う。

(4)免疫抑制： 以上の検討は、GalCer(Cn)AzoPh と光の併用による抗癌活性に関する検討を行うものであるが、この手法が抗アレルギー活性に与える影響についても検討を行い、セレンディピティックに高活性の抗アレルギー薬剤が発見される可能性を追う。

4. 研究成果

α -GalCer の脂質部位に光異性化を起こすアゾベンゼン (AzoPh) を導入した誘導体 (α -GalCerAzoPh: $n = 4, 6, 8, 10$) を合成した。アシル鎖の長さの異なる α -GalCerAzoPh ($n = 4, 6, 8, 10$) を用いて、光照射有無や、アゾベンゼンの位置の違いによる CD1d 分子への結合性、つまり iNKT 細胞への拘束性の変化を FACS により検証した結果 (図 2)、炭素数 C6 以上の誘導体で、iNKT 細胞への拘束性を示すことがわかった。さらに、E 体より光照射で生成した Z 体の方が iNKT 細胞への拘束性を 1.2 倍程強く示すことがわかった。また、計算的手法による α -GalCerAzoPh の E-Z 異性体と CD1d 分子の結合性の変化を検証するため、ドッキングシミュレーションを行い、ドッキングスコア計算した (図 3)。計算した結果、E 体より光照射で生成した Z 体の方が CD1d 分子への結合性を 1.1 倍程強く示すことがわかった。

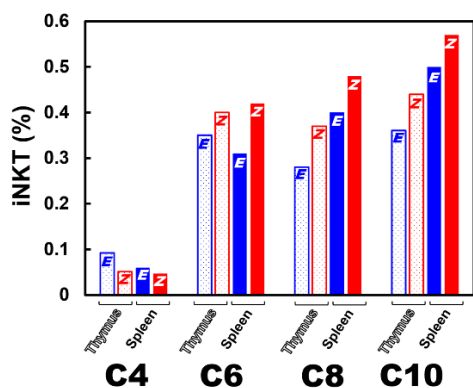


図 2. α -GalCerAzoPh の光異性化と iNKT 拘束

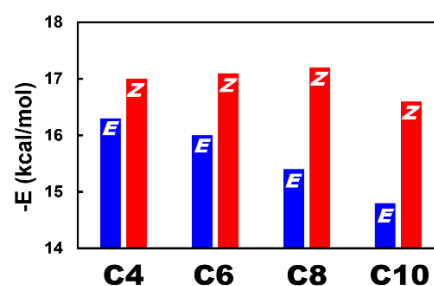


図 3. CD1d 結合のドッキングスコア

以上の結果から、本研究で合成したアゾベンゼン誘導体では光異性化の前後で CD1d への結合性が 20%しか変化せず、この原因が、光照射前の E 体でもある程度 CD1d に取り込まれるためであることが示唆された。

以上の研究成果は論文として発表された (T. Kanamori, T. Numata, S. Kuwabara, Y. Ishii, H. Watarai, H. Yuasa, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2020, 30, 126960) .

上記の他、GalCer のガラクトース部分を 5 員環の糖に置き換えた類似体の合成を行い、CD1d との結合性を検討したが、この化合物は全く CD1d に結合しなかった。

さらに、上記の検討結果から光異性化による CD1d 結合性の違いが大ききは得られなかった反省点としてアゾベンゼンの高さが不十分で、光異性化前の E 体でも CD1d に取り込まれてしまう点が挙げられた。そこで、嵩が高いアゾベンゼン誘導体、およびアゾベンゼンを複数個直列につなげた誘導体の合成も行っている。現在、これらの合成は完成し、金沢大学との共同研究による FACS アッセイを準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 akeshi Inde, Shuhei Nishizawa, Yuusaku Hattori, Takashi Kanamori, Hideya Yuasa, Kohji Seio, Mitsuo Sekine, Akihiro Ohkubo	4. 巻 26
2. 論文標題 Synthesis of and triplex formation in oligonucleotides containing 2'-deoxy-6-thioxanthosine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 3785-3790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1016/j.bmc.2018.06.004	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 Takashi Kanamori, Akira Matsuyama, Hidenori Naito, Yuki Tsuga, Yoshiki Ozako, Shun-ichiro Ogura, Shigetoshi Okazaki, and Hideya Yuasa	4. 巻 83
2. 論文標題 Water-Soluble Glucosyl Pyrene Photosensitizers: An Intramolecularly Synthesized 2-C-Glucoside and an O-Glucoside	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 13765-13775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.joc.8b02066	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 Toh Miyazaki, Srikanta Chowdhury, Takayuki Yamashita, Takanori Matsubara, Hiromu Yawo, Hideya Yuasa and Akihiro Yamanaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Large Timescale Interrogation of Neuronal Function by Fiberless Optogenetics Using Lanthanide Micro-particles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1033-1043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.001	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 M. Katou, S. Kuwabara, T. Kanamori, S.-i. Ogura, S. Okazaki, H. Ohtani, H. Yuasa	4. 巻 14
2. 論文標題 A Twist-Assisted Biphenyl Photosensitizer Passable Through Glucose Channel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Asian J.	6. 最初と最後の頁 2067-2071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/asia.201900378	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 Tanasak Kaewsomboon, Shuhei Nishizawa, Takashi Kanamori, Hideya Yuasa,	4. 巻 83
2. 論文標題 Base Pairs Using Artificial Nucleobases with Carboxyl Groups	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 1320-1327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.7b02828	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 Hideya Yuasa and Shinichi Kuno	4. 巻 91
2. 論文標題 Intersystem Crossing Mechanisms in the Room Temperature Phosphorescence of Crystalline Organic Compounds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bull. Chem. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 223-229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1246/bcsj.20170364	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 久野信一、湯浅英哉	4. 巻 48
2. 論文標題 室温燐光を発する有機化合物結晶とその項間交差メカニズム	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 光化学	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) なし	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13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hideya Yuasa
2. 発表標題 Photosensitizers in Photodynamic Therapy
3. 学会等名 The 2nd US-Japan-China Collaborative Workshop on Advanced Medical Technologies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideya Yuasa
2. 発表標題 A small photosensitizer with a novel intersystem-crossing mechanism
3. 学会等名 The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research Program (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金森功史・松山央・小倉俊一郎・岡崎茂俊・湯浅英哉
2. 発表標題 光増感剤応用を指向した水溶性グルコシルピレン：分子内グリコシル化反応を利用した2-C-グルコシドおよび0-グルコシド
3. 学会等名 GlycoTOKYO2018シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Tsuga, Shigetoshi Okazaki, Hiroyuki Ohtani, Hideya Yuasa
2. 発表標題 Development of a small photosensitizer for pPhotodynamic therapy using biphenyl derivatives with an intramolecular charge transfer character
3. 学会等名 10th Asian Photochemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoki Numata, Satoshi Kuwabara, Takashi Kanamori, Hiroshi Watarai, Yasuyuki Ishii, and Hideya Yuasa
2. 発表標題 Development of Novel Photoactivatable Glycolipid Analogues Controlling the Immune Activity of iNKT Cells
3. 学会等名 6th International Conference on Chemical and Biological Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津賀雄輝、趙奕靖、金森功史、小倉俊一郎、大谷弘之、湯浅英哉
2. 発表標題 Development of low molecular-weight photosensitizer by intramolecular charge transfer
3. 学会等名 2017年光化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金森功史、松山央、内藤秀則、尾迫佳樹、小倉俊一郎、湯浅英哉
2. 発表標題 ビレンC-グリコシド誘導体の合成と光増感剤への応用
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西澤周平、橋本律、三宅優、金森功史、湯浅英哉、大窪章寛
2. 発表標題 5' および3' 末端にアシル基を有する環状オリゴヌクレオチドの合成と性質
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大西達也、西村ゆり、金森功史、湯浅英哉、大窪章寛
2. 発表標題 2-アミノキノリン誘導体を含む三重鎖形成核酸の合成と性質
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 湯浅英哉
2. 発表標題 光による生命機能の制御と治療への応用
3. 学会等名 BioJapan2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内藤秀則、尾迫佳樹、金森功史、小倉俊一郎、湯浅英哉
2. 発表標題 グルコース修飾ピレン誘導体を用いた光増感剤の開発
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稻田宏太郎・金森功史・大窪章寛・小倉俊一郎・湯浅英哉
2. 発表標題 GFP色素誘導体を用いた糖鎖受容体のturn-on型蛍光プローブの設計と合成
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森保 太貴・宮川 まどか・金森 功史・林 宣宏・湯浅 英哉
2. 発表標題 ピレン誘導体を用いた無洗浄タンパク質ゲル染色剤
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----