

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020年度～2024年度
課題番号：20H05675
研究課題名：合成糖鎖と糖鎖再構築モデルによる糖鎖機能の解析と免疫制御

研究代表者氏名（ローマ字）：深瀬 浩一（FUKASE Koichi）
所属研究機関・部局・職：大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：80192722

研究の概要：

糖鎖は自然免疫と獲得免疫の両方において、自己と非自己の認識の鍵物質として機能している。本研究では、化学的手法と生物学的手法を統合した合成生物学手法により、新たな糖鎖認識分子を明らかにし、炎症や免疫応答における糖鎖の新機能を解明する。さらに、以上の基礎研究の成果を、新規免疫制御法の開発につなげる。

研究分野：生物分子科学

キーワード：糖鎖、免疫、中分子、イメージング、アジュバント

1. 研究開始当初の背景

自己と非自己の認識は生体防御の根幹をなすものであり、脊椎動物においては獲得免疫と自然免疫からなる精緻な機構が自己と非自己の認識を担っている。糖鎖は細胞表層を覆っており、様々な認識に関与するため、獲得免疫と自然免疫の両方において自己と非自己の認識の鍵物質として機能している。糖鎖は構造上の多様性や不均一性を特徴とし、しばしば複数の活性ユニットを含むため、分子レベルで構造に基づいた生物機能解析は容易ではない。申請者は、均一な糖鎖を化学合成し、それらを生物活性試験に供することにより、認識に関与する糖鎖構造（活性ユニット）を明らかにし、さらには糖鎖認識に関与する受容体との相互作用解析を行うという戦略により、特に細菌由来複合糖質の自然免疫機能解析に大きく貢献してきた。

2. 研究の目的

本研究では、研究対象を自己由来糖鎖にまで拡大し、自己ならびに非自己糖鎖を利用した免疫制御法の開発を目指し、免疫制御機能を有する糖鎖の合成研究と自然免疫受容体や糖鎖認識タンパク質と糖鎖との相互作用解析研究を行う。自己糖鎖としてはアスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖（N-グリカン）を、非自己糖鎖としては細菌由来複合糖質を主な対象として、それらの免疫制御機構を解析する。さらに糖鎖を利用した免疫ならびに炎症制御法を開発し、がんならびに炎症性疾患を対象にして、がんワクチンや糖転移酵素阻害剤など、糖鎖を基盤とする免疫制御分子の開発を目指す。

多くの天然糖鎖は、複数の活性ユニットを有することから、それぞれのユニットが同時あるいは経時的に認識イベントに関わることにより、より高次の認識や細胞制御が可能である。活性ユニットを複合化した再構築モデルを用いることで、より高次の機能分子とする。本研究では、糖鎖 dendrimer、糖鎖ナノ粒子、糖鎖-ペプチド複合体などの糖鎖再構築モデルを用いることで、優れた免疫応答を誘導できる実用的がんワクチンや新規ながん標的分子を開発する。

本研究では、生細胞上における糖鎖相互作用を観測し、さらには糖鎖認識タンパク質を同定する手法として、再構築モデルを生細胞へ展開した合成糖鎖提示細胞を開発する。さらに、この手法に光親和性標識法や EMARS 法を組み合わせることで、細胞表層において糖鎖との相互作用分子を探索する。

3. 研究の方法

本研究では合成を基盤とし、複合化・再構成系の構築を行うことで、糖鎖による免疫制御の機構解明、新規免疫療法の開発を目指す。以下の項目について研究する。

1. N-グリカンの免疫制御機構の解析とその利用
1) Fut8 阻害剤の探索とそれらの分子標的薬化、2) T 細胞を標的とする炎症性腸疾患治療薬の開発、3) コアフコース認識の解析と新規コアフコース認識タンパク質の探索、4) 糖鎖認識を基盤にした新規ながんの分子標的薬の創製
2. 細菌由来複合糖質の免疫制御機構の解析とその利用
1) 免疫アジュバントの開発、2) アジュバント-がん抗原複合体のがんワクチンへの適用

4. これまでの成果

本研究の肝は、Fut8 阻害剤、N-グリカン、リポド A といった中分子化合物である。そのためには、これらの化合物の安定供給が必須であり、その合成が極めて重要である。我々の独自の方法で合成したこれらの分子群の生物活性評価も積極的に進めている。Fut8 阻害剤に関しては細胞レベルでも有効に機

能することを確認した。さらにこの化合物をT細胞の活性制御に利用したところ、細胞および *in vivo* 系において狙い通りその活性を抑えることができることを示した。N-グリカンに関しては、合成糖鎖を生細胞表面に提示する手法を確立し、この糖鎖がレクチンと相互作用して膜タンパク質の動態を調節することを示した。免疫やがん化と深く関連があるガレクチン-3 と糖鎖の相互作用によるタンパク質の動態を1分子イメージングにより可視化し、ガレクチン-ラティスの存在を生細胞系で明確に示すことに成功した。また、リポドAに関しては、細胞レベルでの機能評価に加え、ワクチンアジュバントとして有望であることを *in vivo* での実験によっても示している。さらに、糖鎖と免疫調節分子を複合化することで、効果的に免疫を誘導することに成功しており、革新的ながん免疫療法を提案しつつある。

加えて、 α 線を用いた新規核医学療法に関しても積極的に検討を進めている。複数の α 線標識分子標的薬を合成し、これをマウスに投与した。何れの化合物も極めて高い抗がん活性を示し、本手法の有効性を明確に示すことができた。特に特筆すべきは、研究代表者が開発に関わった α 線標識薬の臨床試験がスタートしたことである。現在、第2、第3の矢となる α 線標識薬の開発を次々と進めており、マウスを用いた *in vivo* 試験では極めて良好な結果を得ている。

5. 今後の計画

1. N-グリカンの免疫制御機構の解析とその利用

- 1) Fut8 阻害剤の探索とそれらの分子標的薬化：特定の細胞や特定のタンパク質の糖鎖を標的として、それらの糖鎖機能を解析する分子を開発する。すでに複数の Fut8 阻害剤を見出しており、その活性と選択性の向上を目指し、阻害剤を分子内さらにはコアフコース生合成の場であるゴルジ体に送達する手法を開発する。
- 2) T細胞を標的とする炎症性腸疾患治療薬の開発：T細胞のコアフコースを標的とし、IBD治療薬のリード化合物を創製する。
- 3) コアフコース認識の解析と新規コアフコース認識タンパク質の探索：研究代表者の開発した糖鎖提示システムと EMARS 法を組み合わせることでコアフコース認識分子を探索する。加えて、そのほかの N-グリカン認識分子の同定も検討する。
- 4) 糖鎖認識を基盤にした新規ながんの分子標的薬の創製：難治性の膵臓がんなどでは、がん微小環境の影響で抗体薬をがん細胞にデリバリーすることは難しい。本研究では、がん細胞の糖鎖を主な標的として、高度ながんの分子標的薬として開発する。加えて、免疫細胞を標的とする糖鎖も用いることで、新たながん免疫療法の開発も検討する。

2. 細菌由来複合糖質の免疫制御機構の解析とその利用

- 1) 免疫アジュバントの開発：合成 *A. faecalis* リポドAのアジュバント効果を、MPL やリポチドの効果と比較し、がんワクチンに利用するアジュバントを適切に選択するための情報を得る。
- 2) アジュバント-がん抗原複合体のがんワクチンへの適用：がんワクチンは、他の治療後の残存がん細胞の殺傷、がんの再発の予防、転移や増殖の抑制を目指し、多くの研究が行われているが、未だ標準的治療としては確立されていない。これまでに、アジュバントとがん抗原を結合させた複合がんワクチンを開発してきた。複合化により、アジュバントを介した抗原提示細胞への効率的な抗原デリバリーとアジュバントによる免疫活性化を同時に実現することが可能となる。今後は、自己集積分子やリポソームなども利用して、より最適なワクチン設計について探る。また、我々は、がんワクチンは放射線療法と併用することで、有効な治療法になると考えている。放射線療法のなかでも α 線核医学治療は、強力な抗がん効果を持ち、細胞死したがん細胞から放出される DAMPs (damage-associated molecular patterns) によって免疫活性化が生じている可能性がある。DAMPs の効果を検証するとともに、その効果を利用することで実用的ながんワクチンとする計画である。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Manabe, Y.; Matsumoto, T.; Ikinaga, Y.; Tsutsui, Y.; Sasaya, S.; Kadonaga, Y.; Konishi, A.*; Yasuda, M.*; Uto, T.; Dai, C.; Yano, K.; Shimoyama, A.; Matsuda, A.; Fukase, K.* *Org. Lett.* **2022**, *24*, 6-10.
2. Shirakawa, A.; Manabe, Y. Marchetti, R.; Yano, K.; Masui, S.; Silipo, A.; Molinaro, A.; Fukase, K.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*(46), 24686-24693.
3. Shimoyama, A., Lorenzo, F.D., Yamaura, H., Mizote, K., Palmigiano, A., Pither, M.D., Speciale, I., Uto, T., Masui, S., Sturiale, L., Garozzo, D., Hosomi, K., Shibata, N., Kabayama, K., Fujimoto, Y., Silipo, A., Kunisawa, J., Kiyono, H., Molinaro, A., Fukase, K.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*(18), 10023-10031.
4. Kaneda-Nakashima, K.; Zhang, Z.; Manabe, Y.; Shimoyama, A.; Kabayama, K.; Watabe, T.; Kanai, Y.; Ooe, K.; Toyoshima, A.; Shirakami, Y.; Yoshimura, T.; Fukuda, M.; Hatazawa, J.; Nakano, T.; Fukase, K.; Shinohara, A. *Cancer Sci.*, **2021**, *112*(3), 1132-1140.
5. Aiga T., Manabe Y., Ito K., Chang TC., Kabayama K., Ohshima S., Kametani Y., Miura A., Furukawa H., Inaba H., Matsuura K., Fukase K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2020**, *59*, 17705-17711.

(合計：49報)

7. ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/fukase/>