

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05602

研究課題名(和文) グルカンを模倣した高分子の合成とそれを用いた免疫活性化に必要な分子構造の解明

研究課題名(英文) Synthesis of beta-glucan mimic polymers and elucidation of the molecular structure required for the immunological activation

研究代表者

宮川 淳 (Miyagawa, Atsushi)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60469921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： グルカンによる免疫活性化に関わる膜タンパク質であるDectin-1に結合する最小単位の β -グルカンオリゴ糖の合成において、ベンジリデン類保護基を2種類用いた分岐鎖を導入可能なオルトゴナルな合成方法を開発した。そこで合成した β -グルカンオリゴ糖を高分子化し、さらにその高分子主鎖を修飾することで物性の異なる高分子群を構築した。マウスのマクロファージを用いて、この高分子群の免疫活性化能を評価し、天然 β -グルカンの生物活性を模倣した結果を得ることができた。本手法は中性多糖の模倣として、有効な手段となり、 β -グルカンのもつ免疫活性化能を人工的に模倣した分子を生み出すことが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではベンジリデン類保護基を活用して、分岐鎖を有するオリゴ糖の合成を達成した。この成果はベンジリデン保護基の利用範囲を拡大し、オルトゴナルな合成への選択肢を増やしたことで、複雑な化合物の合成に利用できる。

また多様な構造をもつ天然の β -グルカンを模倣するため、 β -グルカンオリゴ糖を有する高分子を合成し、その高分子修飾を行うことで物性が異なるが、基本構造が同じ高分子ライブラリー化を行った。それを用いて、対象となるDectin-1との結合およびマクロファージの活性化に最適な構造を明らかにした。この成果により免疫を活性化する分子設計に指針を示すことができ、合成分子による抗腫瘍薬の開発につながる。

研究成果の概要(英文)： In synthesizing the smallest β -glucan oligosaccharide that binds to Dectin-1, a membrane protein involved in immune activation by β -glucan, we have developed an orthogonal synthesis method that allows the introduction of branched chains using two types of benzylidene protecting groups. Then, by polymerizing the synthesized β -glucan oligosaccharides and modifying the main chain of the polymers, we constructed a library of polymers with different physical properties. Moreover, for mouse macrophages, we evaluated the ability of the library of polymers to activate the immune system, and the results exhibited that the synthetic polymers mimicked the biological activity of natural β -glucans.

This method has become an effective method of mimicking neutral polysaccharides and has made it possible to create molecules that artificially mimic the immune-stimulating ability of β -glucan.

研究分野：糖質化学、高分子化学

キーワード： グルカン 免疫賦活化 オリゴ糖 ノルボルネン 高分子修飾 マクロファージ シゾフィラン

1. 研究開始当初の背景

グルカンは、グルコースが 1,3 結合で連結した主鎖に、1,6 結合の分岐鎖を有する多糖である。2001 年に グルカンを特異的に認識するタンパク質 Dectin-1 が免疫系細胞で発見された。その研究により、高分子量の グルカンを Dectin-1 と結合して集積化し、免疫が活性化されることが示唆された(図 1)。しかし、グルカンの分子構造に基づく詳細な免疫活性化機構は明らかにされていない。それは研究に供される グルカンの天然由来の混合物であり、構造単一なもの入手が困難であることに起因する。それ故に構造単一のグルカンを得るため、化学合成が行われているが、主鎖を形成する 1,3 糖連結反応の収率と立体選択性が低く、さらに分岐鎖による 1,3 糖連結反応への立体障害もあり、高分子量化が困難である。そのため、免疫療法として確立するために、効果的に免疫を活性化できる グルカンの分子構造を解明する新しい方法が必要である。

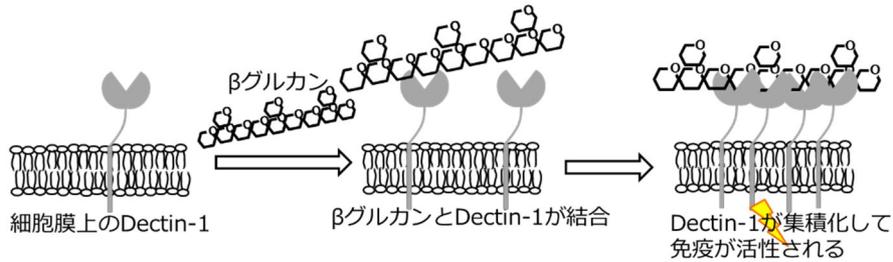


図1. β-グルカンによる免疫活性化

2. 研究の目的

本研究では Dectin-1 を介した免疫活性化に必要な グルカンの分子構造を明らかにするため、Dectin-1 に結合する グルカンオリゴ糖を合成し、それを用いて高分子を合成する。その後、高分子主鎖を修飾することにより、グルカンの分子構造を模倣した高分子群を構築し、それらを用いた Dectin-1 との結合および免疫活性化に関する構造活性相関研究を行う。そして、グルカンの Dectin-1 に結合して免疫を活性化するために必要な構造要素を明らかにする。

3. 研究の方法

研究方法として、図 2 に示すように計画した。グルカンの要素として、(A) 最小結合単位の グルカンオリゴ糖の合成、(B) 結合に必要な高分子量の分子の合成、を調整するために以下の手順研究を行った。

(1) Dectin-1 との結合の最小単位となる分岐鎖を有する グルカンオリゴ糖の合成

グルカンオリゴ糖を合成するために、単糖グルコースを連結して構築する。主鎖に対して分岐鎖を導入するために、選択的に脱保護可能な保護基を導入する必要がある。そこで、直鎖の 1,3 グリコシドを効率よく形成するため、4,6 -ベンジリデン保護基を用い、分岐鎖の導入を効率よく行うために、アニシリデン基を用いて、ベンジリデン基と区別して、新たなオルトゴナルな合成手法とする(図 3)。

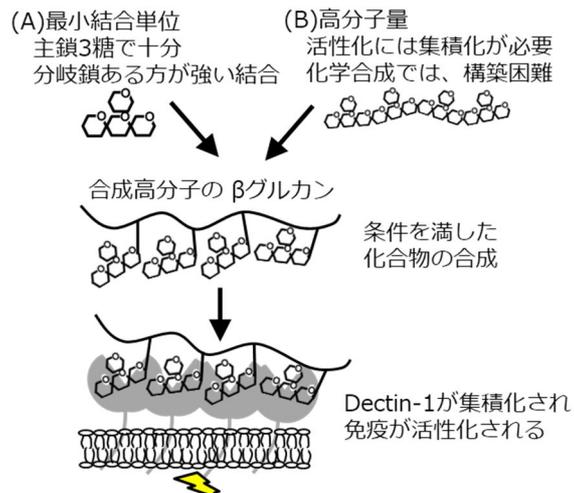
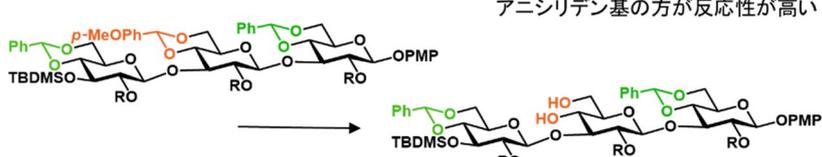


図2. 研究方法

【4,6 位のアセタール保護基】



- ・ 比較的立体障害が小さい
- ・ 3 位に水酸基を持つアクセプターの反応性をあげる
- ・ ベンジリデン基と比較するとアニシリデン基の方が反応性が高い



2つのアセタール保護基の反応性の差を利用し、選択的な脱保護が可能となる

図3. ベンジリデン基とアニシリデン基の併用による効果

(2) グルカンの免疫活性に必要な構造を解明するための高分子群の構築

グルカンの疎水性を模倣するため、合成した グルカンオリゴ糖にノルボルネンを導入して、糖モノマーとする。この グルカンオリゴ糖モノマーとノルボルネンを開環重合を行い、グルカンオリゴ糖を有する高分子を合成する。開環重合後の二重結合を残した高分子は、剛直な三重らせんの グルカンを模倣し、また水素添加反応を行った高分子は、主鎖が柔軟なために凝集して粒子状の グルカンを模倣した構造、そして二重結合に対して、ジヒドロキシ化反応を行った親水性の構造はランダム構造の水溶性 グルカンを模倣したものとす(図4)。同じ原料を修飾するため、同じ分子量、糖密度であるが、形態のみが異なるものを用意できる。得られた高分子群の溶液中での構造は、動的光散乱光度計を利用して分子サイズを解析し、水溶液中で形態が異なる高分子群を構築する。

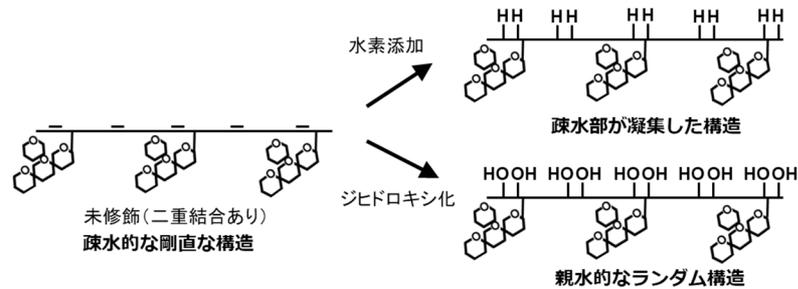


図4. 高分子の修飾による構造変化

(3) 合成高分子群による Dectin-1 との結合評価

細胞表面での相互作用を再現して結合評価を行うために水晶振動子マイクロバランス法(QCM)の基板上に異なる密度で Dectin-1 を固定化し、構造が異なる高分子群の Dectin-1 に対する親和性の評価を行い、結合に必要な構造を明らかにする(図5)。

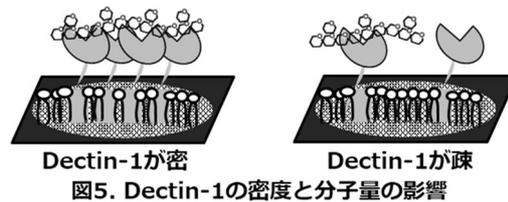


図5. Dectin-1の密度と分子量の影響

(4) 合成高分子群による免疫活性評価

免疫細胞 RAW264 に対して、合成した高分子群を加えることによる免疫活性化を、サイトカインの産生量から評価する。Dectin-1 に対する結合親和性と免疫活性化能を解析し、どのような高分子が Dectin-1 と結合して、免疫を活性化するかを明らかにし、必要な分子構造を示す。

4. 研究成果

(1) Dectin-1 との結合の最小単位となる分岐鎖を有する グルカンオリゴ糖の合成

アニシリデン基を導入した糖供与体とベンジリデン基を有する糖受容体とのグリコシル反応を行った結果、95%の収率で 選択的に進行させることに成功した。またアニシリデン基をもつ残基を糖受容体とし、ベンジリデン基を有する糖供与体を用いたグリコシル化では、70%の収率で 選択的に直鎖3糖を構築することができた。その直鎖3糖の1つだけあるアニシリデン基の選択的に脱保護を行うために検討を行った結果、61%の収率で選択的に脱保護可能であり、その後、分岐鎖の導入にも成功し、分岐鎖1糖、直鎖3糖からなる グルカン4糖オリゴ糖の合成を達成した。本成果より、これまでグリコシル化基質に対してほとんど利用されていないアニシリデン基の有用性を示すことに成功し、糖の4位、6位に対するベンジリデン基と区別可能な保護基として利用され、分岐糖鎖の合成の新しい合成手法となる。

(2) グルカンの免疫活性に必要な構造を解明するための高分子群の構築

合成した グルカンオリゴ糖のアグリコンにノルボルネンを導入して、糖モノマーを合成した。この グルカンオリゴ糖モノマーとノルボルネンを、比率を変えて開環重合を行い、 グルカンオリゴ糖を有する高分子を合成した。重合後に残った二重結合に対して水素添加反応を行い、二

重結合を無くした高分子の合成を達成し、また二重結合に対してジヒドロキシ化反応を行い、水酸基を2つ付与した親水性の高分子を得た。得られた高分子群の溶液中での構造を、動的光散乱光度計を利用して解析した結果、分子サイズがジヒドロキシ化した高分子、水素添加した高分子、無修飾の高分子の順となった。SECによる分子量測定では、数万程度の分子であることが分かり、Dectin-1との結合には十分な大きさのものであった。多糖を模倣した高分子として、高分子化後に修飾を行い、物性の異なる高分子構造を調整可能にしたことにより、多糖模倣高分子の構築につながることを期待できる。

(3) 合成高分子群による Dectin-1 との結合評価

Dectin-1 を水晶振動子の金基板上に最密に固定化したものと、その1/50の量を用いて固定化したものを準備して、結合能の評価を行い、比較検討した。最密に固定化した場合には、糖モノマーのみからなる高分子では結合が観測されなかった。またノルボルネンと共重合した高分子では、ジヒドロキシ化した高分子が最も結合が強く、次に未修飾の高分子、水素化した高分子の順となった。この結果から親水性が高い グルカンの方が Dectin-1 との結合には適していることが明らかになった。分子量が4倍程度の高分子も評価したが、大きな違いは生じなかった。また分岐鎖をもたない直鎖3糖をもつ高分子について評価を行った結果、Dectin-1 との結合については、分岐鎖有のものとは大きな違いが確認されず、同等の親和性を示した。Dectin-1 の固定化量を1/50にした場合には、未修飾の高分子では親和性が2倍程度に上がり、親水性の高分子では、2倍程度減少する結果となった。更にシゾフィランでは、結合が観測されなくなった。そのため、1/15に固定化量を変えて、シゾフィランの測定を行った結果、2倍程度に親和性が増加したため、適した結合距離が存在することが明らかとなった。以上から、シゾフィランでは結合が届かない距離に Dectin-1 が存在しても合成した高分子では、結合することが可能となり、シゾフィランのような剛直な構造よりも合成した高分子のような自由度がある高分子の方が結合には有利であることがわかった。

(4) 合成高分子群による免疫活性評価

マウスのマクロファージ細胞 RAW264 にして、合成した高分子を添加することにより、生さるサイトカイン TNF- と IL-6、IL-1 の量を、ELISAを用いて定量した。その結果、高分子主鎖が未修飾または水素添加した糖とノルボルネンの比が1:3.5の高分子が TNF- の生を高く誘導した。TNF- の産生量に関しては、シゾフィランの3~7倍となり、非常に高い免疫活性化能を示し、天然物を超える分子の構築に成功した。また IL-6、IL-1 については、高分子主鎖が未修飾である糖とノルボルネンの比が1:3.5の高分子が高い誘導能を示した。疎水的な高分子がサイトカインの誘導を促す結果となった。一方、分岐鎖をもたない直鎖3糖を有する高分子は、TNF- をほとんど誘導することがなく、わずかに IL-6、IL-1 の産生を誘導した。以上の結果から、Dectin-1 に結合する最小単位は分岐鎖をもたない3糖オリゴ糖であるが、免疫を活性化するためには分岐鎖が重要であり、Dectin-1 との結合と免疫活性化には、完全な相関はないことが明らかとなった。この結果は、カードランの免疫活性化能が低いことと、一致しており分岐鎖を有するシゾフィランやレンチナンなどが活性を示す有効な グルカンとして利用されてきたことと一致するものである。また高分子の構造として、未修飾の2重結合が残る高分子が最も高い免疫活性化能を示したことから、先行研究でも示されている通り、疎水的な グルカンが強い免疫活性化能を示すものと一致した。更に、シゾフィランよりも数倍の高い免疫活性化能を創生することができ、高分子に導入した糖鎖構造を更に詳細に検討することでより活性の高い分子の構築が可能であることを示唆するものとなった。

以上の成果から、Dectin-1 に結合できる最小単位のオリゴ糖を用いて高分子化することで、天然 グルカンの生物活性を模倣することができることを示した。中性多糖の模倣として、有効な手段となり、グルカンのもつ免疫活性化能を人工的に模倣した分子を生み出すことが可能となり、より高活性な分子の研究につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyagawa Atsushi, Ohno Shinya, Hattori Tomohiko, Yamamura Hatsuo	4. 巻 33
2. 論文標題 Antimicrobial activities of amphiphilic cationic polymers and their efficacy of combination with novobiocin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition	6. 最初と最後の頁 299 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09205063.2021.1985243	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 Miyagawa Atsushi, Ohno Shinya, Yamamura Hatsuo	4. 巻 2021
2. 論文標題 N,N-Bis(hexyl -d-acetylmannosyl) Acrylamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molbank	6. 最初と最後の頁 M1255 ~ M1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/M1255	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 Yamamura Hatsuo, Hagiwara Tatsuya, Hayashi Yuma, Osawa Kayo, Kato Hisato, Katsu Takashi, Masuda Kazufumi, Sumino Ayumi, Yamashita Hayato, Jinno Ryo, Abe Masayuki, Miyagawa Atsushi	4. 巻 6
2. 論文標題 Antibacterial Activity of Membrane-Permeabilizing Bactericidal Cyclodextrin Derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 31831 ~ 31842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c04541	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 Miyagawa Atsushi, Yamamura Hatsuo	4. 巻 227
2. 論文標題 Synthesis of -1,3-glucan mimics by -1,3-glucan trisaccharyl monomer polymerization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 115105 ~ 115105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2019.115105	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 Miyagawa Atsushi, Toyama Sanami, Ohmura Ippei, Miyazaki Shun, Kamiya Takeru, Yamamura Hatsuo	4. 巻 85
2. 論文標題 One-Step Synthesis of Sugar Nucleotides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 15645 ~ 15651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c01943	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 Atsushi Miyagawa, Shinya Ohno, Hatsuo Yamamura	4. 巻 61
2. 論文標題 Synthesis of antimicrobial polymers with mannose residues as binders for the FimH adhesin of Escherichia coli	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Polymer Science	6. 最初と最後の頁 277-288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pol.20220540	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 Atsushi Miyagawa, Saki Kamikawa, Shun Miyazaki, Takeru Kamiya, Hatsuo Yamamura	4. 巻 103
2. 論文標題 Synthesis of UDP-glucose with 1,2-trans glycoside in a one-step reaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2022.153995	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 宮川淳, 宮崎舜, 神谷岳児, 山村初雄
2. 発表標題 糖ヌクレオチドの一段階合成を利用したUDP-G1cN3/G1cNAcの合成
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮川淳, 神谷岳児, 山村初雄
2. 発表標題 UDP-ガラクトースの合成反応における立体選択性に対する塩添加の効果
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一段階反応によるUDP-グルコースの効率的な合成
2. 発表標題 神川 早希、神谷 岳児、山村 初雄、宮川 淳
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点第17回「若手の力」フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Miyagawa
2. 発表標題 Synthesis of α -1,3-glucan mimics with Immunostimulant Activity
3. 学会等名 The 7th Global Conference on Polymer and Composite Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮川淳, 宮崎舜, 山村初雄
2. 発表標題 縮合反応を用いたUDP-HexN3の1段階合成
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Miyagawa
2. 発表標題 Synthesis of Sugar Nucleotides in One-Step Reaction
3. 学会等名 Asian Carbohydrate Chemistry and Glycobiology Webinar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Miyagawa
2. 発表標題 Synthesis of amphiphilic antimicrobial polymers and their combined use with novobiocin
3. 学会等名 Polymers-eCon2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Miyagawa
2. 発表標題 Combination Usage of Antimicrobial Polymers with Novobiocin
3. 学会等名 The 6th International Conference on Materials Engineering and Nanotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮川 淳, 山本 菜未, 山村 初雄
2. 発表標題 マルトースを担持した糖鎖高分子の合成およびMBPに対する親和性の評
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮川淳, 神川早希, 神谷岳, 山村初雄
2. 発表標題 一段階反 によるUDP-グルコースの効率的な合成
3. 学会等名 第17回糖鎖科学中部点若手のカフォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮川淳、山本菜未、大野綾音、山村初雄
2. 発表標題 高分子主鎖の修飾による -グルカン模倣高分子群の合成 およびDectin-1に対する親和性評
3. 学会等名 第17回糖鎖科学中部点若手のカフォーラム
4. 発表年 2023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

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