

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790148

研究課題名（和文） 免疫細胞による抗腫瘍活性を誘導する新規糖脂質の創製研究

研究課題名（英文） Development of novel glycolipids that activates lymphocytes to induce anticancer activity

研究代表者

田代 卓哉 (TASHIRO TAKUYA)

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・研究員

研究者番号：20339104

研究成果の概要（和文）：スフィンゴ糖脂質 KRN7000 は、ナチュラルキラーT細胞を活性化して抗腫瘍活性を誘導する。報告されている CD1d/KRN7000/TCR 三体複合体の X 線結晶構造解析に基づき、KRN7000 の糖部分 6-位水酸基の構造活性相関研究を行い、6-位水酸基をカルバメートへと変換した類縁体が、マウス *in vivo* において強力に IFN- γ を産生誘導することを見出した。

研究成果の概要（英文）：KRN7000, an alpha-galactosylated sphingolipid, stimulates natural killer T cells to induce antitumor activity. Based on the X-ray crystallographic analysis of CD1d/KRN7000/TCR, structure-activity relationship study on the 6-hydroxyl group of the galactose part of KRN7000 was performed. We synthesized several 6"-carbamate analogs of KRN7000. It was found that these analogs were potent immunostimulants, and induced a large amount of IFN- γ production *in vivo* (mouse).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：alpha-GalCer, CD1d, glycosphingolipid, IFN- γ , Natural killer T cell

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞の一種であるナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、NK 細胞受容体と T 細胞受容体 (T cell receptor、以下 TCR) の両方を併せ持つ免疫細胞である。T 細胞とは異なり、NKT 細胞の TCR には多様性が無く、糖脂質を認識して活性化され、様々な免疫反応を引き起こす。多様性が無いということは、ヒトであればヒト、マウスであればマウス全ての個体の NKT 細胞を、同一の抗原 (糖脂質) によって活性化することができることを意味している。従って、NKT 細胞を活性化する糖脂質は、全てのヒトに適用可能な医薬品の開発ターゲットとなりうる。

NKT 細胞は、抗腫瘍活性を誘導する免疫賦活型サイトカインである IFN- γ と、それと相反する免疫抑制活性を誘導する IL-4 の両方を産生する能力を有している。NKT 細胞に対して IFN- γ のみを多量に産生誘導させることのできる糖脂質は、患者本人の免疫力によって癌を治療できる、副作用の少ない新規な抗癌剤候補化合物となりうる。1995 年 キリンビール (株) は、NKT 細胞を活性化してマウス *in vivo* で強い抗腫瘍活性を誘導するスフィンゴ糖脂質、KRN7000 を開発した。しかしながら、1 回の投与で IFN- γ と IL-4 の両サイトカインを同時かつ多量に産生誘導するため、IFN- γ による抗腫瘍活性の効果を十分に引き出すことが出来ない

という問題を抱えており、医薬としての利用は制限されているのが現状である。そのため国内外の多くの研究グループによって、KRN7000 よりも IFN-gamma を効率良く産生誘導する新規糖脂質の開発研究が精力的に行われている。

NKT 細胞の TCR は、抗原提示細胞の膜上タンパク質 CD1d と糖脂質との複合体を認識する。ヒトおよびマウスの TCR-KRN7000-CD1d 複合体の X 線結晶構造解析が 2007 年、2009 年にそれぞれ報告された。KRN7000 のガラクトース部位の 2-, 3-, 4-位水酸基は複体内で水素結合ネットワークを形成しており、これまでの知見から、これら水酸基の除去や官能基変換は活性を低下させる。一方で、糖の 6-位水酸基およびピラン環内の酸素原子は水素結合に関与していない。

2007 年に研究代表者らはピラン環内酸素原子をメチレンで置き換えたカルバ糖類縁体糖脂質 RCAI-56 を開発した。RCAI-56 は生体内で酵素による分解を受けにくいエーテル結合を有しており、KRN7000 と比較して mouse in vivo で 4 倍の IFN-gamma 産生を誘導する。同じくエーテル結合を有する類縁体である *C*-ガラクトシド体 alpha-*C*-GalCer では、NKT 細胞を介して IFN-gamma の大量産生者である NK 細胞を強く活性化することが報告されている。従って RCAI-56 も同様に NK 細胞の活性化によって多量の IFN-gamma 産生を誘導したと考えられる。alpha-*C*-GalCer はヒトの系では全く活性を発現しないのに対して、RCAI-56 はマウス、ヒトいずれの系においても強力な活性を発現することから、リード化合物として相応しいと考えた。

2008 年、6-位水酸基をメチルエーテルへと変換した類縁体 RCAI-61 が、mouse in vivo で KRN7000 の 8 倍もの IFN-gamma 産生を誘導できることを見出した。その後、6-位水酸基をアミド結合、あるいはウレイド結合に変換した類縁体においても IFN-gamma に偏ったサイトカイン産生を誘導することが報告されている。

2. 研究の目的

新規抗腫瘍活性化化合物の開発を目的として、ヒトの系において、NKT 細胞の活性化を介して NK 細胞に対し抗腫瘍活性サイトカインである IFN-gamma を多量に産生誘導させることのできる糖脂質を開発する。具体的には、KRN7000 あるいは RCAI-56 の糖部分 6-位水酸基の構造活性相関を調査し、免疫細胞を強力に活性化させる糖脂質を開発する。さらに、その活性化機構を調査する。

3. 研究の方法

これまでに (1) 糖脂質-CD1d 複合体が安定であるほど多量の IFN-gamma が産生される、(2) 糖脂質のガラクトース部位 6-位水酸基は構造修飾可能である、という知見が得られている。これらから、研究代表者らが開発したヒトの系でも強い活性を示す糖脂質 RCAI-56 のカルバガラクトース部位 6-位水酸基に、Trp153 との π - π スタッキング相互作用を期待して芳香族 (複素) 環を導入した類縁体では、高い免疫賦活効果と多量の IFN-gamma 産生が期待される。類縁体を種々合成し、mouse in vivo ならびに human in vitro での活性を評価する。さらに投与方法の検討や、ドッキングモデルの算出による結合状態や安定性の調査を行う。

4. 研究成果

(1) 6-位水酸基へアミド結合により芳香環を導入する例は報告されているが、官能基変換に多段階を必要とする。本研究では、1 段階で変換できるカルバメート結合によって芳香環を導入することを試みた。一方で、カルバガラクトースは合成が容易ではないことから、まずは糖部分をガラクトースとして 6-位水酸基を修飾し、活性を調査した。

アニリンおよびパラ-位に官能基を有する様々なアニリン誘導体のカルバメート類縁体を合成した。さらに、脂環式アミンあるいは非環状アミン、ヒドロキシアミン由来のカルバメートも合成した。

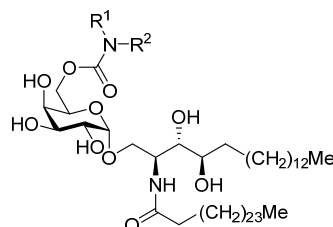


図 1. カルバメート類縁体の構造

合成した糖脂質を mouse in vivo において活性評価したところ、KRN7000 と比較して、IFN-gamma に偏ったサイトカイン産生が誘導された。マウスの系では芳香環を有する類縁体では活性が低下し、ヒドロキシアミンやジメチルアミンから調製した類縁体において強い活性が確認された。

(2) 糖脂質を効率よく細胞内に取り込ませて高い活性を引き出すために、投与方法の検討を行った。DMSO 溶液とした後に PBS で希釈したものを静脈注射するという従来手法では、時として再現性の良くない結果が得られることがある。そこで、現在糖脂質を予め強制的に提示させた樹状細胞 (DC) を投与方法 (DC-pulse 法) を用いて mouse in vivo

での活性を調査した。本方法は、現在ヒトでの臨床試験において用いられている手法である。その結果、KRN7000 よりも遥かに多量の IFN-gamma 産生が産生誘導されることを見出した。また、KRN7000 ではヒスチジンや Tween20 等の添加剤を加えると活性が向上するが、6-位水酸基を修飾した類縁体では界面活性剤等の添加により活性が低下してしまうことが観察された。

これらの結果より、6-位水酸基をカルバメート基へと変換すると IFN-gamma に偏った強い Th1 型免疫反応を誘導できることが明らかとなった。一方で、アミド結合を有する化合物とは異なり、6-位にカルバメート基を導入した類縁体では水への溶解性が低下した。水溶性と産生誘導される IFN-gamma/IL-4 バランスとの相関関係は明らかになっていないことから、調査を行った。

(3) KRN7000 の 6-位水酸基に n-プロピル基、メトキシメチル基、およびヒドロキシエチル基を導入した 3 種の類縁体 (それぞれ RCAI-86、113 および 125) を合成し、その活性を調査した。これら置換基は、ほぼ同程度の鎖長であるが極性は大きく異なっている。

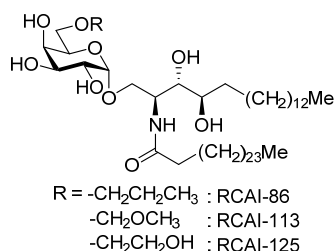


図 2. RCAI-86、113、125 の構造

活性試験の結果、RCAI-86 > 113 > 125 の順に IFN-gamma 産生量が低下した。いずれの類縁体も同程度の IL-4 を産生誘導したことから、上記の順で疎水性が低下するのに伴い、より Th2 型の免疫応答を誘導する傾向が確認された。メトキシエトキシメチル基を導入した類縁体もまた IL-4 に偏ったサイトカイン産生を誘導した。

(4) 6-位を修飾したスフィンゴ糖脂質中で最も IFN-gamma 産生誘導活性が強い化合物は、現時点では 6-位がメトキシ基へと変換された RCAI-61 である。そこで、この化合物と CD1d ならびに TCR との結合状態を算出した。産業技術総合研究所の広川貴次博士との共同研究によりドッキングモデルとモレキュラーダイナミクスシミュレーションを行い解析したところ、RCAI-61 は KRN7000 よりも強固な CD1d/糖脂質/TCR 複合体を形成していることが明らかとなった。Surface plasmon

resonance を解析したところ、CD1d/RCAI-61 複合体は CD1d/KRN7000 よりも TCR に対して親和性が高かったことから、このモデルを裏付ける結果を得ている。

以上、本研究を通して新規医薬候補化合物となりうる 6-カルバメート類縁体を開発した。これらはマウスの試験系において強力に IFN-gamma 産生を誘導した。今後、同様の変換をカルバガラクトースを有する糖脂質に対して施し、その活性を調査する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Takuya Tashiro (6 人中 1 番目), RCAI-61 and related 6'-modified analogs of KRN7000: their synthesis and bioactivity for mouse lymphocytes to produce interferon-gamma in vivo, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 3066-3079. (査読有)
- ② Takuya Tashiro, Kenji Mori, Synthesis of Sphingolipids with an omega-Esterified Long Acyl Chain, Ceramide Components of the Human Epidermis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2012**, *76*, 1715-1720. (査読: 有)
- ③ Takuya Tashiro (5 人中 1 番目), RCAI-84, 91, and 105-108, ureido and thioureido analogs of KRN7000: Their synthesis and bioactivity for mouse lymphocytes to produce Th1-biased cytokines, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 4540-4548. (査読: 有)
- ④ Takuya Tashiro (7 人中 1 番目), RCAI-39, 41, 53, 100, 127 and 128, the analogues of KRN7000, activate mouse natural killer T cells to produce Th2-biased cytokines by their administration as liposomal particles, *MedChemComm*, **2011**, *2*, 620-625. (査読: 有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 田代卓哉、天然型スフィンゴ糖脂質による免疫細胞の活性化、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学
- ② 田代卓哉、天然型スフィンゴ糖脂質による免疫細胞の活性化、第 54 回天然有機化合物討論会、2012 年 9 月 19 日、東京農業大学
- ③ 田代卓哉、ヒトの表皮に含まれるセラミドの合成、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学

- ④ 田代卓哉、化学生態学と免疫学に関連する生体機能分子の合成、日本農芸化学会関東支部 2011 年度第 2 回支部例会、2012 年 1 月 21 日、筑波大学

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称：アレルギー疾患治療薬
発明者：石井保之、田代卓哉、谷口克
権利者：理化学研究所
種類：特許
番号：特願 2013-038047
出願年月日：2013 年 2 月 27 日
国内外の別：国内

名称：水酸化KRN7000類縁体及びその用途
発明者：汐崎正生、田代卓哉、森謙治、重浦智邦、渡会浩志、谷口克
権利者：理化学研究所
種類：特許
番号：特願 2012-173278
出願年月日：2012 年 8 月 3 日
国内外の別：国内

名称：新規カルバメート糖脂質およびその用途
発明者：田代卓哉、森謙治、汐崎正生、谷口克、渡会浩志
権利者：理化学研究所
種類：特許
番号：特願 2012-101384
出願年月日：2012 年 4 月 26 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 5 件)

① 名称：新規擬似糖脂質及びその用途
発明者：田代卓哉、森謙治、富宿賢一、谷口克、中川竜介、渡会浩志
権利者：理化学研究所
種類：特許
番号：8299223
取得年月日：2012 年 10 月 30 日
国内外の別：米国

② 名称：新規糖脂質及びその用途
発明者：田代卓哉、森謙治、富宿賢一、谷口克、清野研一郎
権利者：理化学研究所
種類：特許
番号：5126684
取得年月日：2012 年 11 月 9 日
国内外の別：国内

③ 名称：環状構造を有する化合物及びその

用途

発明者：富宿賢一、森謙治、田代卓哉、谷口克、清野研一郎
権利者：理化学研究所
種類：特許
番号：5099343
取得年月日：2012 年 10 月 5 日
国内外の別：国内

④ 名称：経鼻ワクチン
発明者：清野研一郎、谷口克、田代卓哉、富宿賢一、森謙治、長谷川秀樹
権利者：理化学研究所
種類：特許
番号：4909264
取得年月日：2012 年 1 月 20 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 卓哉 (TASHIRO TAKUYA)

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・研究員

研究者番号：20339104

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし