

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：脂質抗原受容体の機能を利用した新規糖脂質アジュバントの創製研究

Development of novel glycolipid adjuvant allowing regulation of lipid antigen presenting protein

研究開発実施期間：平成 29 年 5 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：井貫 晋輔

Shinsuke Inuki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人京都大学 大学院薬学研究科 助教

Kyoto University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Assistant Professor

II 研究開発の概要

本研究では、研究代表者らが発見した疎水性ポケット深部での強い相互作用制御を利用した脂質改変糖脂質型 CD1d リガンドの機能解析と構造展開により、サイトカイン誘導制御を可能とするリガンドの取得を目指して研究を行った。さらに糖脂質を含めた脂質リガンドの物性や ADME 特性の評価と、アジュバントとしての実用化に向けた基礎データの取得を行った。

革新的アジュバントの創製を目指して、分担研究者：藤本ゆかり教授（慶応大）との共同研究により、下記項目（１）～（３）について相互に連携しながら研究を進め、成果を得た。

（１）脂質改変型 α -GalCer によるサイトカイン誘導制御の機構解析

研究代表者らは、アミドを α -GalCer の脂質鎖部位に導入すると、ナチュラルキラーT（NKT）細胞からのサイトカイン誘導活性が向上すること、また、アミドを導入した一部のリガンドが Th2 サイトカイン誘導選択性を示すことを見出していた。これらの Th2 サイトカイン誘導型 CD1d リガンドの選択性発現メカニズムの機構解明を行うために、タンパク質-リガンド間分子間相互作用解析装置、フローサイトメーター等を用いて Th2 制御型リガンドの機能解析を行った。特に、リガンドと CD1d との結合親和性とリガンドの細胞内挙動の変化を解析した。種々のリガンドを用いて測定を行った結果、研究代表者らが開発した Th2 サイトカイン誘導型 CD1d リガンドにおける選択性発現は、結合親和性とは相関関係を示さないことが明らかとなった。続いて、リガンドの細胞内挙動に着目して検討を行った。フローサイトメーターや共焦点顕微鏡を用いて解析を行った結果、Th2 選択性の高いリガンドは、他のリガンドと比較して、より速く細胞表面の CD1d タンパク質と複合体を形成することが分かった。このように、開発した脂質改変型リガンド間における細胞内挙動の違いがサイトカイン誘導選択性に影響を与えることを見出した。

(2) 選択的なサイトカイン誘導活性を示す免疫機能制御リガンドの創製

アジュバント開発のため、選択的サイトカイン誘導活性を指向して、分子設計を行い、化合物を合成、評価した。これまでに見出していた脂質改変型リガンドの脂質部位の炭素鎖の長さを短くすると Th2 選択性が向上した。特に脂質部位について、炭素鎖 20 相当の長さを持つリガンドは、高いサイトカイン誘導活性を示すとともに、Th2 選択性を示した。また、改変型リガンドの脂質部位に導入する官能基として、アミドの代わりに、アミノ基やカルボニル基などを導入した結果、一部のリガンドにおいて Th2 選択性が向上した。さらに、糖脂質リガンド中の脂質部位にベンズアミド基を導入すると、Th2 選択性を示すことが明らかとなった。ベンズアミド基上の置換基を検討することによって、複数の Th2 選択的リガンドを取得することができた。また、ベンズアミド基を導入したリガンドについて、分子動力学シミュレーションを用いて解析を行った。その結果、ベンズアミド基と CD1d の脂質認識部位に存在する Phe70 が相互作用することが示唆された。取得した Th2 選択的リガンドの一部は既知の Th2 選択的リガンドである OCH よりも高いサイトカイン誘導活性を示した。

さらに、これまでに得た脂質改変型 CD1d リガンドを用いて様々なサイトカインに対する誘導活性を評価した。その結果、一部のリガンドが、Th17 サイトカイン誘導活性を示すことを見出した。

強力なサイトカイン誘導活性を有するリガンドを取得するために、CD1d と安定な結合形成が可能な共有結合型のリガンドを設計した。CD1d の脂質認識部位に存在する Cys12 との共有結合を狙い、糖脂質リガンドの長鎖アシル鎖末端に反応性官能基を導入した共有結合型リガンドをデザインした。化合物デザインにおいては、シュレーディンガー株式会社との連携によって、CD1d タンパク質とリガンドとのドッキングシミュレーションを行い、最適な反応性官能基の導入位置を推定した。質量分析装置を用いた解析の結果、合成したリガンドが想定通り Cys12 と共有結合を形成することを確認した。続いて、サイトカイン誘導活性評価を行った結果、これらの合成リガンドは Th2 選択性を示した。また、サイトカイン誘導活性は、同じ長さのアシル鎖を有する非共有結合性リガンドと比較して、大幅に向上した。これらのリガンドは、生理的条件下において CD1d と共有結合を形成する初のリガンドである。

サイトカイン誘導活性を示す“新規 CD1d リガンド”の創製を目指し、天然由来脂質リガンドの合成を行った。CD1d リガンドの候補化合物として、特徴的な脂質構造を有する複合脂質に着目した化合物合成とライブラリ構築を行い、上記の α -GalCer 関連構造とは異なる骨格を持つ新たな活性化合物、特に強い CD1d との結合親和性を示し選択的サイトカイン誘導能を示す化合物を見出した。

(3) 糖脂質リガンドの物性、ADME 特性の評価とアジュバント機能評価

これまでに取得した糖脂質リガンドの一部に関して、物性と ADME データの取得を行った。マウスやラットを用いて、薬物動態試験を行った結果、脂質改変型リガンドは良好な体内動態を示した。また、これらのリガンドについてアジュバントとしての機能評価を行った。その結果、新たな特性を有するアジュバント候補化合物を複数見出すことに成功した。

One of the most important factors in the development of adjuvants is the selective enhancement of cytokine production. In this project, involving the development of novel adjuvants, one of our goals was to identify CD1d glycolipid ligands that can activate NKT (natural killer T) cells leading to the selective secretion of various cytokines. Additionally, we collected data on the physical and ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) properties of these glycolipid ligands, and evaluated the relationship between their structures and properties because such information is likely required for their practical use.

In a previous study, we focused on CD1d ligands involved in the regulation of cytokine secretion, such as the Th1 and Th2 cytokines (e.g. IFN- γ and IL-4), through NKT cell activation, and we developed several potent CD1d glycolipid ligands containing a modified lipid part.

In the present project, based on the functional analysis of these ligands, we first identified a series of novel CD1d ligands characterized by their Th2 cytokine-biasing responses. Compared with known ligands, these ligands induce higher levels of Th2 cytokine secretion. We also found that the length of the polar group-containing acyl chain and the type of polar functional groups had influence on the cytokine polarization. In particular, the length was markedly correlated with Th2-biasing response. Imaging studies revealed that differences in the ligand presentation rate on the cell surface affected the degree of the biasing responses. Further investigation also revealed that some of the developed ligands displayed Th17-biasing profiles. These newly developed Th2-/Th17- biasing compounds will contribute toward the development of new adjuvants, and these compounds may also be utilized as chemical tools for elucidating the cytokine-biasing mechanism of the CD1d-NKT system.

Next, we focused on the Cys residue of the lipid binding pocket of CD1d, and we developed α -GalCer derivatives containing groups that can form covalent bonds. The assay results revealed that these ligands induced higher levels of cytokine production and Th2 cell-type cytokine polarization response. To our knowledge, these are the first ligands that allow covalent bond formation to CD1d under physiological conditions.

Finally, we obtained data on the physical and ADME properties of CD1d glycolipid ligands and examined the relationship between their structures and properties. We also evaluated the function of these glycolipid ligands as vaccine adjuvants. These investigations led to the identification of potential candidates for vaccine adjuvants.