

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業  
(革新的中分子創薬技術の開発)  
事後報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) タンパク質-脂質間相互作用 (PLI) の解析と制御を基盤とした免疫調節性中分子の創製

(英語) Study of immunomodulatory millamolecules based on the analysis and modulation of protein-lipid interaction (PLI)

研究開発実施期間: 平成30年6月4日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 藤本 ゆかり  
(英語) Yukari Fujimoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 学校法人慶應義塾・慶應義塾大学理工学部・教授  
(英語) Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

(和文)

近年、タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction: PPI) の理解が進むとともに、PPI の阻害剤探索において中分子を基盤としたアプローチが用いられるようになってきている。また、種々の脂質分子とタンパク質との相互作用の理解が進み、脂質についても非常に構造特異的な認識が行われていることが明らかになりつつある。しかしながら、特にタンパク質-脂質間相互作用 (PLI) については、その脂質部位の構造とタンパク質結合部位のアミノ酸残基との詳細な相互作用や構造活性相関の解析研究は非常に限られており、創薬を指向した分子設計も含め未解明な部分が多い。一方、我々は最近、複合脂質認識におけるタンパク質-脂質間の相互作用において、非常にシールドされた疎水性の結合部位における特定の極性アミノ酸と脂質リガンドとの相互作用が、分子間相互作用さらには活性増強に寄与することを見出している。これらの現象は、親水性領域と比較し疎水性領域における、より安定な水素結合形成、あるいは、結合ポケットの深い位置における強い水素結合によっても説明できると考えられる。

本研究では、PPI と類似の状況にあるタンパク質-脂質間相互作用 (PLI) に注目し、タンパク質受容体と中分子脂質についての解析を基に活性分子の設計・創製を目指した。非特異的な認識と信じられていた脂質

の疎水性部位の認識について、タンパク質側の特定の残基との相互作用制御を基にした高選択的な相互作用誘導により、脂質認識の活性分離の手法としても用いることとした。また、基盤技術として、有機化学的手法により得られる脂質中分子群をコア構造として用いることにより、詳細な分子認識の基盤の解明を目指した。特に、種々の構造活性相関の結果と分子動力学 (MD) 計算の結果を連携させることによる、効果的な活性分子設計手法を確立を行った。他の計算手法では分子のシミュレーションが難しい脂質構造について、分子動力学 (MD) 計算の強みを活かす分子設計手法を確立することとした。

上記の方針に基づき、本研究においては、まず研究開発担当者らの複雑な複合脂質合成を可能とする技術を基盤とした中分子化合物の合成とライブラリ構築を行った。

中分子複合脂質の合成については、中分子複合脂質として、糖脂質型、イノシトールリン脂質型、グリセロ脂質型について、網羅的合成を可能とする合成法を確立し、脂質部位のバリエーションに注目したライブラリ構築を進めた。特に複雑な糖脂質型としても知られる結核菌由来の中分子である PIM 骨格含有のグリセロ型分子 (PIM 関連分子は自然免疫受容体 TLR2、DCAR および脂質抗原提示を担う CD1d の 3 種のタンパク質に認識される例が知られている) の合成にも成功し、多様な構造展開を行った他、トレハロース含有型複合脂質の合成、セラミド含有型複合脂質構造の合成に成功し、中分子複合脂質について合成化合物ライブラリを構築した。

中分子複合脂質化合物ライブラリについては、分子群ごとに、ターゲットとなるタンパク質因子の活性あるいは結合親和性を評価し、脂質部位の構造と活性への影響を解析することにより、分子認識に強く関わる "hot spot" 探索を行い、脂質の特定部位における構造変換の影響を見出した。また、マウス脾臓細胞を用いたサイトカイン誘導の評価を行い、選択的なサイトカイン誘導および免疫調節の選択性を評価した。以上の機能評価により、各分子群ごとに脂質部位の構造改変により活性増強する分子を見出した。また、合成ライブラリ構造の中で、特にスフィンゴ糖脂質関連の高選択的なサイトカイン誘導能をもつ構造を見出した。

複合脂質の設計に際しては、極性官能基導入により免疫調節活性の制御と同時に溶解性等の物性への影響も想定された他、特にターゲットのタンパク質因子の活性化に伴う T 細胞分化に関わるサイトカイン誘導選択性 (Th1/Th2/Th17/Treg 細胞などの分化誘導に関わるサイトカイン) に分子の物理化学的因子が関連する可能性が考えられたため、有望な分子について、バイオイメージングと体内動態の解析についても行った。バイオイメージングについては、各々のターゲットタンパク質とともに解析を行い、細胞での受容体-リガンド複合体の形成と構造活性相関との関係を観測することに成功した。

本研究の中分子複合脂質については、創薬のために確認が必要な基礎物性と体内動態の解析についても、一部の特徴的な活性を示す化合物について解析を行った。特に脂質構造への特定の官能基導入により、活性制御と同時に溶解度の改善が見られた。また、*in vivo* での薬効評価とあわせ、化合物の血中濃度およびサイトカイン誘導量の測定を行った。本研究で開発し薬効が示された中分子型の複合脂質分子について、適当な血中半減期をもつ化合物も多いことを明らかにした。また、薬効とサイトカイン誘導量変化の相関についても観測・確認を行った。

一部の化合物については、炎症性腸疾患の疾患モデルマウスとして DSS 腸炎モデルマウスを用いた *in vivo* での試験を行い、明確な抗炎症作用を示す化合物を見出すことに成功した。また、DSS 腸炎モデルマウスで効果が観測された化合物と同様の、非常に選択的なサイトカイン誘導が観測された化合物については、さらに、治療の難しい他の自己免疫疾患への展開を行うため、該当の自己免疫疾患モデルマウスを用いた *in vivo* での評価を進めた。モデルマウスにおける治療効果を観測するとともに、特徴的な血中サイトカイン誘導量変化も観測され、非常に有望な結果を得ることに成功した。

以上、本プロジェクトの成果により、中分子複合脂質の創薬展開のための分子設計の基盤となる知見

を構築することに成功したと考えている。今後は本プロジェクトで得られた有望な分子を用いさらなる創薬展開を推進する。

(英文)

In this study, we developed middle-size lipid-conjugate molecules, with focusing on the protein-lipid interaction (PLI), which resembles PPI in the view of wider interaction surface. We aimed to design and create active molecules based on the analysis of protein receptors and middle-size lipid-conjugate molecules. Regarding the recognition of hydrophobic sites of lipids, which was believed to be non-specific recognition, we searched special and highly selective interaction, “hot spot”, in the hydrophobic area on the receptor protein, to control the lipid ligand’s activity.

As one of the key basis of the project, we aimed to elucidate the detailed molecular recognition by using a focused molecule library (immunomodulatory middle-size lipid-conjugate molecules) obtained by an organic chemical method as a core structure. In order to design the lipid modification of the molecules for stronger binding, we have established a method by linking the results of various structure-activity relationships with the results of molecular dynamics (MD) calculations. Because of the difficulties of protein-lipid interaction simulation with other calculation methods, we decided to utilize the way to include molecular dynamics (MD) simulation.

Regarding the synthesis of middle-size lipid-conjugate molecules, we established synthetic methods that enabled the comprehensive synthesis of glycolipid-type, inositol phospholipid-type, and glycerolipid-type molecules as the compound library focusing on variations in their lipid moieties. Utilizing the synthesized compound library, the molecules were analyzed on the immunological functions (e.g. cytokine induction with mouse splenocytes) and molecular interaction with the target receptor proteins. The structure-activity relationships were also analyzed with the MD simulation for feedback the results to the molecular design, and very selective immunomodulatory compounds were found among the synthesized middle-size molecule library.

Having several promising immunomodulatory compounds, further analyses for drug discovery process were performed. Namely, some compounds were tested in vivo using DSS enterocolitis model mice as a disease model for inflammatory bowel disease, and succeeded in finding compounds showing a clear anti-inflammatory effect. The pharmacokinetics of the active compounds were also analyzed. In addition, compounds in which highly selective cytokine induction was observed, were further developed into other autoimmune diseases that are difficult to treat. We proceeded with the in vivo evaluation with the autoimmune disease mouse model, and succeeded in obtaining promising results.

The results of this project for the middle-size lipid-conjugate molecules have succeeded in constructing the knowledge that will be the basis of molecular design for drug discovery development of the middle-size lipid molecules.