

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) 病原体糖脂質を介する新たな宿主免疫賦活機構の解明と感染症治療への応用
(英語) Development of novel anti-infective drugs targeting lipid metabolism

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人九州大学生体防御医学研究所 教授 山崎 晶
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Professor, Sho Yamasaki

実施期間： 平成28年10月1日～平成29年3月31日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

山崎グループは、免疫賦活脂質として知られる結核菌の phosphatidylinositol mannosides (PIM)を認識する新たな受容体 DCAR を同定し、宿主の Th1 応答を増強させる働きがあることを明らかにした (Toyonaga et al. Immunity, 2016)。また、レクチン受容体 Mincle が認識する内因性脂質リガンドとして、 β -GlcCer を同定した (Nagata et al. PNAS 2017)。通常は細胞内代謝物として働く β -GlcCer は、細胞の損傷に伴って放出され、Mincle を介して免疫活性化能を発揮する、内因性アジュバントとして機能することが強く示唆された。

伊東グループは、クリプトコッカス症原因菌の *Cryptococcus neoformans* (Cn)のエルゴステリルグルコシド分解酵素 (EGCrP2) を同定し、EGCrP2 遺伝子欠損株が EG 蓄積を主因とする細胞分裂不全を惹起することを見出した (Watanabe et al., JBC, 2015)。また、EG が自然免疫系の駆動分子の1つである C-type レクチン、ミンクルのリガンドであることを示した。また、Cn の EGCrP2 阻害剤を探索するにあたり、EGCrP 活性の high-throughput screening (HTS) 系の構築を行った。Cn の EGCrP2 遺伝子は大腸菌に導入し、リコンビナントタンパク質を大量発現させた後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製 EGCrP2 の取得に成功した。

馬場グループは、脂質類の精密な解析を実施するための分離手法の開発を実施した。超高速液体クロマトグラフィー四重極・オービトラップ型質量分析 (UHPLC/QExactive) を用いて、山崎 G によって単離されたミンクル免疫受容体に結合する脂質分子の同定に成功した。また、超臨界クロマトグラフィー三連四重極型質量分析により脂質分子を網羅的かつ定量的に測定するための新規の分析技術の開発に成功した。さらに、脂質サブフラクションを微量レポーター細胞アッセイ系に供するための微量分画システムの構築に着手した。

石田グループは、免疫賦活活性を有する β -グリセロ糖脂質の効率的化学合成における、最も重要な課題である立体選択的なグリコシド結合の形成において、脱保護時に収率が低下するといった問題を解決するため、 β -選択的グリコシド化法として、新たな保護基を利用した β -選択的グリコシド化を開発し、効率化に成功した。

The Yamasaki group identified DCAR as a new receptor that recognizes lipids from *Mycobacterium tuberculosis* called phosphatidylinositol mannosides (PIMs) and enhances the host Th1 response (Toyonaga et al. Immunity, 2016). In addition, β -GlcCer was identified as an endogenous ligand for the C-type lectin receptor Mincle (Nagata et al. PNAS 2017). β -GlcCer functions as an intracellular metabolite in the healthy state, but can be released after cell damage and then exerts its role as an endogenous adjuvant through Mincle.

The Ito group identified the steryl- β -glucosidase EGCrP2 in *Cryptococcus neoformans* (Cn), a pathogen that causes the infectious disease Cryptococcosis. They showed that the ergosteryl-3 β -glucoside (EG) accumulation in EGCrP2 mutant strain leads to dysfunction of cell budding (Watanabe et al., JBC, 2015). Previously, together with Yamasaki group, it was shown that EG is a ligand of the C-type lectin receptor Mincle. In order to identify EGCrP2 inhibitors that may be used as potential antibiotics of Cn, they developed a high-throughput

screening (HTS) system based on EGCrP activity. The purified EGCrP2 was successfully obtained using affinity chromatography after high amounts of recombinant protein was acquired using E.coli transformed with CGCrP2 from Cn.

The Bamba group developed an isolation method allowing precise analyses of lipids. Using Ultra high performance liquid chromatography-quadrupole Orbitrap mass spectrometer (UHPLC/QExactive), they identified the lipid isolated by Yamasaki group that acts as a ligand for the immunoreceptor Mincle. In addition, they developed a new technique for comprehensive and quantitative analyses of lipid molecules using supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. Further more, they started the development of a micro-extraction system for applying the lipid sub-fraction to the micro-reporter cell assay.

The Ishida group developed the Cyclic silylene protective (TIPDS) group-based β -selective glycosylation method. This method solved the problem of low yield from deprotection after the formation of the stereoscopic selective glycosidic bond, thus provided an efficient approach for the chemosynthesis of β -glycerol lipoprotein with immunoactivating activity.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 10件)

1. Kottom TJ, Hebrink DM, Jenson PE, Nandakumar V, Wüthrich M, Wang H, Klein B, Yamasaki S, Lepenies B, Limper AH. The Interaction of Pneumocystis with the C-Type Lectin Receptor Mincle Exerts a Significant Role in Host Defense against Infection. *J. Immunol.* 2017, in press.
2. Nagata M, Izumi Y, Ishikawa E, Kiyotake R, Doi R, Iwai S, Omahdi Z, Yamaji T, Miyamoto T, Bamba T, Yamasaki S. Intracellular metabolite β -GlucosylCeramide is an endogenous Mincle ligand possessing immunostimulatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017, in press.
3. Mori D, Shibata K, Yamasaki S. C-Type Lectin Receptor Dectin-2 Binds to an Endogenous Protein β -Glucuronidase on Dendritic Cells. *PLoS One.* 2017, 12, e0169562.
4. Behler-Janbeck F, Takano T, Maus R, Stolper J, Jonigk D, Tort Tarrés M, Fuehner T, Prasse A, Welte T, Timmer MS, Stocker BL, Nakanishi Y, Miyamoto T, Yamasaki S, Maus UA. C-type Lectin Mincle Recognizes Glucosyl-diacylglycerol of Streptococcus pneumoniae and Plays a Protective Role in Pneumococcal Pneumonia. *PLoS Pathog.* 2016, 12, e1006038.
5. Toyonaga K, Torigoe S, Motomura Y, Kamichi T, Hayashi JM, Morita YS, Noguchi N, Chuma Y, Kiyohara H, Matsuo K, Tanaka H, Nakagawa Y, Sakuma T, Ohmuraya M, Yamamoto T, Umemura M, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Yano I, Miyamoto T, Yamasaki S. C-Type Lectin Receptor DCAR Recognizes Mycobacterial Phosphatidyl-Inositol Mannosides to Promote a Th1 Response during Infection. *Immunity.* 2016, 45, 1245-1257.

6. Kimura Y, Inoue A, Hangai S, Saijo S, Negishi H, Nishio J, Yamasaki S, Iwakura Y, Yanai H, Taniguchi T. The innate immune receptor Dectin-2 mediates the phagocytosis of cancer cells by Kupffer cells for the suppression of liver metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016, 113, 14097-14102.
7. Zhou H, Yu M, Zhao J., Martin BN, Roychowdhury S, McMullen MR, Wang E, Fox PL, Yamasaki S, Nagy LE, Li X. IRAKM-Mincle axis links cell death to inflammation: Pathophysiological implications for chronic alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2016, 64, 1978-1993.
8. Iborra S, Martínez-López M, Cueto FJ, Conde-Garrosa R, Del Fresno C, Izquierdo HM, Abram CL, Mori D, Campos-Martín Y, Reguera RM, Kemp B, Yamasaki S, Robinson MJ, Soto M, Lowell CA, Sancho D. Leishmania Uses Mincle to Target an Inhibitory ITAM Signaling Pathway in Dendritic Cells that Dampens Adaptive Immunity to Infection. *Immunity*. 2016, 45, 788-801.
9. van der Peet PL, Nagata M, Shah S, White JM, Yamasaki S, Williams SJ. Lipid structure influences the ability of glucose monocorynomycolate to signal through Mincle. *Org Biomol Chem*. 2016, 14, 9267-9277.
10. Clément M, Basatemur G, Masters L, Baker L, Bruneval P, Iwawaki T, Kneilling M, Yamasaki S, Goodall J, Mallat Z. Necrotic Cell Sensor Clec4e Promotes a Proatherogenic Macrophage Phenotype Through Activation of the Unfolded Protein Response. *Circulation*. 2016, 134, 1039-1051.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 免疫系による死細胞認識機構とその応答, 口頭, 山崎晶, 第 31 回日本 Shock 学会総会 (日本 Cell Death 学会合同シンポジウム), 2016/10/6, 国内.
2. 結核菌を認識するレクチン受容体ファミリーの発見とその免疫応答, 口頭, 山崎晶, 第 135 回臨床化学セミナー, 2016/10/14, 国内.
3. レクチン受容体群による結核菌アジュバントの認識と免疫応答, 口頭, 山崎晶, 千里ライフサイエンスセミナー, 2016/11/15, 国内.
4. Recognition of mycobacterial glycolipids through lectin receptors, 口頭, 山崎晶, IUBMB Meeting, 2016/12/12-14, 国外.
5. レクチン受容体を介する脂質認識と免疫応答, 口頭, 山崎晶, アレルギークリニカルカンファレンス, 2017/1/11, 国内.
6. 結核菌アジュバント認識機構と免疫応答, 口頭, 山崎晶, 第 10 回次世代アジュバント研究会, 2017/1/23-24, 国内.
7. Recognition of mycobacterial glycolipids by C-type lectin receptors, 口頭, 山崎晶, Glyco-Immunology 2017, 2017/1/25, 国内.
8. Immune Responses against Mycobacteria through C-type Lectin Receptors, 口頭, 山崎晶, US-Japan Cooperative Medical Science Program Mycobacterial Panel Meeting, 2017/ 2/7-10, 国外.

9. C型レクチン受容体を介する免疫応答, 口頭, 山崎晶, 「感染、免疫、がん、炎症」研究集会, 2017/3/13-14, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当無し

(4) 特許出願
該当無し

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) 病原体糖脂質を介する新たな宿主免疫賦活機構の解明と感染症治療への応用
(英語) Development of novel anti-infective drugs targeting lipid metabolism

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人九州大学生体防御医学研究所 教授 山崎 晶
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Professor, Sho Yamasaki

実施期間： 平成 28年10月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 免疫賦活化糖脂質の代謝酵素の同定と機能解析
開発課題名： (英語) Identification and functional analyses of fungal enzymes for metabolizing glycolipids involved in the activation of host innate immunity

研究開発分担者 (日本語)：国立大学法人九州大学大学院農学研究院 教授 伊東 信
所属 役職 氏名： (英語) Kyushu University, Professor, Makoto Ito

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： 国立大学法人九州大学生体防御医学研究所 山崎 晶 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌1件）

OKINO N, ITO M. Molecular mechanism for sphingosine-induced *Pseudomonas* ceramidase expression through the transcriptional regulator SphR. *Scientific Report*. 2016, 6:38797. DOI:10.1038/srep38797

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* は EGCrP2 によって免疫賦活糖脂質を分解することで宿主免疫系から逃避する、渡辺 昂、藤田 実花、今井 崇史、永田 雅大、谷 元洋、本田 智美、角田 佳充、石橋 洋平、沖野 望、山崎 晶、伊東 信、日本農芸化学会2017年度大会、2017/3/17、国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当無し。

(4) 特許出願
該当無し。

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) 病原体糖脂質を介する新たな宿主免疫賦活機構の解明と感染症治療への応用
(英語) Development of novel anti-infective drugs targeting lipid metabolism

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人九州大学生体防御医学研究所 教授 山崎 晶
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
Professor Sho Yamasaki

実施期間： 平成28年10月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 高分離クロマトグラフィー質量分析システムを基盤とした脂質解析
開発課題名： (英語) Lipid analysis based on high-resolution chromatographic separation and mass spectrometry

研究開発分担者 (日本語)： 国立大学法人九州大学生体防御医学研究所 教授 馬場 健史
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Professor Takeshi Bamba

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立大学法人九州大学生体防御医学研究所 山崎 晶 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 3件）

1. Takeda H, Izumi Y, Tomita A, Koike T, Shiomi M, Fukusaki E, Matsuda F, Bamba T. Lipoprotein profiling methodology based on determination of apolipoprotein concentration. *Bioanalysis*. 2017, 9(1), 9-19.
2. Suzuki M, Nishiumi S, Kobayashi T, Sakai A, Iwata Y, Uchikata T, Izumi Y, Azuma T, Bamba T, Yoshida M. Use of on-line supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry to analyze disease biomarkers in dried serum spots compared with serum analysis using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2017, 31(10), 886-894 .
3. Nagata M, Izumi Y, Ishikawa E, Kiyotake R, Doi R, Iwai S, Omahdi Z, Yamaji T, Miyamoto T, Bamba T, Yamasaki S. Intracellular metabolite β -GlucosylCeramide is an endogenous Mincle ligand possessing immunostimulatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, 114(16), E3285-E3294.
4. 中谷航太, 和泉自泰, 福崎英一郎, 馬場 健史. メタボローム解析の現状と新規分析技術の開発. *G.I.Research*. 2016, 24(4): 228-33.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Wide-targeted and quantitative lipidome analysis by supercritical fluid chromatography coupled with fast-scanning triple quadrupole mass spectrometry, Poster, Hiroaki Takeda, Yoshihiro Izumi, Thanai Paxton, Noriko Kato, Shinnosuke Horie, Katsutoshi Nagase, Takeshi Bamba, SFC 2016, 10th International Conference on Packed-Column SFC, 2016/10/6-7, 国外.
2. SFC-QqQMS を用いたワイドターゲット定量リピドーム解析, ポスター, 竹田 浩章, 和泉 自泰, Thanai Paxton, 加藤 紀子, 堀江 真之介, 長瀬 勝敏, 馬場 健史, 第10回 メタボロームシンポジウム, 2016/10/19-21, 国内.
3. 超臨界流体抽出分離技術を用いた代謝プロファイリング手法の開発と応用, 口頭, 馬場 健史, 第19回 日本質量分析学会北海道談話会・講演会, 2017/2/10, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当無し

(4) 特許出願
該当無し

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”
- 研究開発課題名： (日本語) 病原体糖脂質を介する新たな宿主免疫賦活機構の解明と感染症治療への応用
(英語) Development of novel anti-infective drugs targeting lipid metabolism
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人九州大学生体防御医学研究所 教授 山崎 晶
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
Professor Sho Yamasaki
- 実施期間： 平成 28年10月 1日 ~ 平成29年 3月31日
- 分担研究 (日本語) 免疫賦活活性を有する合成糖脂質及び酵素阻害活性を有する合成化合物の開発
開発課題名： (英語) Development of glycolipids possessing immunostimulating activity and inhibitors of glycan processing enzymes.
- 研究開発分担者 (日本語)： 国立大学法人岐阜大学応用生物科学部 教授
兼 生命の鎖統合研究センター センター長 石田秀治
所属 役職 氏名： (英語) Hideharu Ishida,
Professor of Department of Applied Bio-organic Chemistry,
and Director of Center for Highly Advanced Integration of Nano and
Life Sciences (G-CHAIN), Gifu University.

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立大学法人九州大学生体防御医学研究所 山崎 晶 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

該当無し

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 2,3-環状保護糖供与体を用いた立体選択的グリコシル化の検討

八神 なほ子, 小西 美紅, 玉井 秀樹, 植木 章晴, 今村 彰宏, 安藤 弘宗, 石田 秀治,
木曾 真 (2016) 糖鎖科学中部拠点 第13回 「若手の力」フォーラム (岐阜県)
ポスター発表 P22

2. 2,3-環状保護糖供与体を用いた 1,2-*trans*-選択的グリコシド化の検討

八神 なほ子, 小西 美紅, 玉井 秀樹, 植木 章晴, 今村 彰宏, 安藤 弘宗, 石田 秀治, 木曾
真 (2017) 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都府) 口頭発表 2C12p10

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

該当無し