

自己と非自己の認識に関わる糖鎖と複合糖質の機能解析と免疫調節への利用：リピド A 研究を中心に

深瀬 浩一¹⁾, 下山 敦史¹⁾, 藤本ゆかり²⁾

¹⁾大阪大学大学院理学研究科, ²⁾慶應義塾大学理工学部

はじめに

細菌の感染により、癌が治癒したり縮小したりすることは 300 年以上前から報告されているなど、細菌の免疫増強作用は古くから知られている^{1,2)}。Coley は *Streptococcus pyogenes* と *Serratia marcescens* を用いた抗腫瘍治療を 1893 年に実施しており、これは世界で最初の癌の免疫療法として知られる。これらの作用は、多細胞生物の持つ種々の自然免疫受容体（パターン認識受容体）が、病原体や微生物に特徴的な分子を認識して免疫系を活性化するために起こることが明らかにされている。

自然免疫活性化因子としては、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS)、細菌細胞壁ペプチドグリカン、DNA、二重鎖 RNA、一重鎖 RNA、細菌の鞭毛タンパク質フラジェリン、リポタンパク質、 β -グルカンなどが知られている。これらの自然免疫活性化因子は、抗原-抗体反応や細胞性免疫などの獲得免疫を活性化するので、ワクチンアジュバントとしての開発研究が進められてきた³⁾。なかでも LPS やその活性本体であるリピド A は強力な免疫増強作用を有するので、炎症作用を減弱し、顕著な毒性を消失させることにより、リピド A 誘導体である MPL がアジュバントとして開発され、認可された。本稿では、LPS の活性本体であるリピド A の構造と活性の相関を中心に、リピド A 類をアジュバントとして使用するための免疫増強作用の制御法について紹介する。

1. 自然免疫活性化因子としてのリピド A

内毒素 (エンドトキシン) は、1892 年に Pfeiffer らによって外毒素 (エキソトキシン) とともにコレラ菌から見出された。内毒素研究は、第二次大戦後に発展し、Westphal は 1945 年に内毒素の本体がグラム陰性菌の外膜を構成する LPS であること、1957 年には LPS の末端に存在するリピド A が活性中心であることを報告した。筆者の師匠にあたる芝、楠本らは Westphal 門下の Lüderitz, Galanos らと共同研究を開始し、大腸菌リピド A (1) (図 1) の正しい構造を提出し、1985 年には大腸菌リピド A の全合成に成功して、リピド A が内毒

素の本体であることを示した。同時期に高山らもリピド A の構造を明らかにした。

LPS ならびにリピド A は、極めて強力な免疫増強作用と炎症惹起作用を有し、サイトカイン産生、一酸化窒素 (NO) 産生、活性酸素産生、白血球遊走、抗菌ペプチド産生、リンパ球活性化などさまざまな免疫応答を誘導することで、細菌からの生体防御に働いている。一方で内毒素は、敗血症の原因の一つであり、多臓器不全、血圧低下、ショックなどの症状を引き起こす⁴⁾。その活性発現機構の解明に向けたブレークスルーがアンタゴニストの発見である。芝、楠本らは生合成前駆体型リピド A (リピド IVa (2)) の合成に成功し、さらにリピド IVa がマウスに対しては免疫増強作用を示すが、ヒトにおいてはアンタゴニスト作用を示すことが明らかにされた。同時期に *Rhodobacter sphaeroides* lipid A (RSLA) (3) がヒト、マウスともにアンタゴニスト作用を示すことが明らかにされた⁵⁾。これらの発見は LPS 受容体の存在を示すものであり、その探索研究が行われた結果、1996 年に Hoffmann らによりブレークスルーがもたらされた。彼らはショウジョウバエの Toll 遺伝子が真菌に対する生体防御機構に必須であることを見出し、さまざまな自然免疫受容体発見の契機となった。1997 年には哺乳類のホモログとして Toll 様受容体 (TLR) の存在が指摘され、1998 年には Beutler らが、TLR4 が LPS 受容体であることを明らかにした。

TLR は、細胞外にロイシンリッチリピート (LRR) が複数個並ぶ分子構造を持ち、細胞内にはインターロイキン 1 (IL-1) 受容体細胞内ドメインと相同性の高い TIR (Toll/IL-1 receptor) ドメインをもつ。TLR4 の下流では TIR ドメインにさまざまなアダプター分子 (MyD88, TIRAP, TRAM, TRIF など) が結合してシグナルを伝達する (図 2)。MyD88 を介したシグナルは、転写因子 NF- κ B を活性化し、TNF α や IL-1, IL-6 といった炎症性サイトカインが誘導される。一方で、TRIF を介したシグナルは、転写因子 IRF3 の活性化へとつながり、インターフェロン (IFN) の産生が誘導される。最近では TLR4 を経ない non-canonical 経路として、カスパーゼを活性化し、IL-1 β や IL-18 を誘導する経路も明らかにされた。

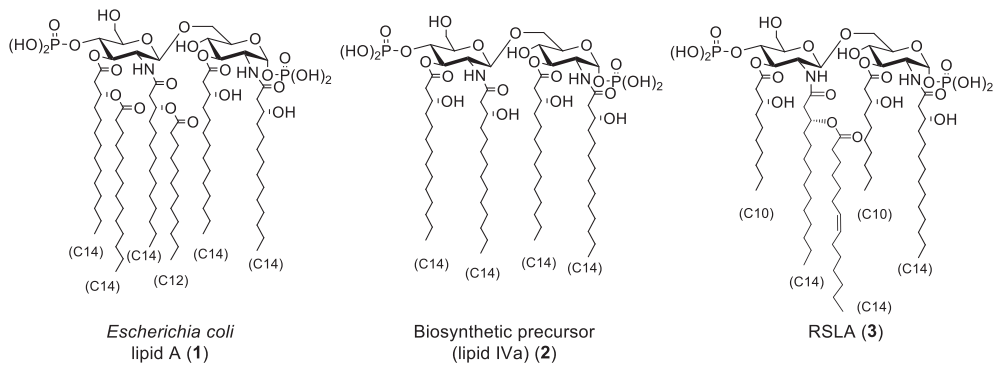


図 1 リピド A の化学構造

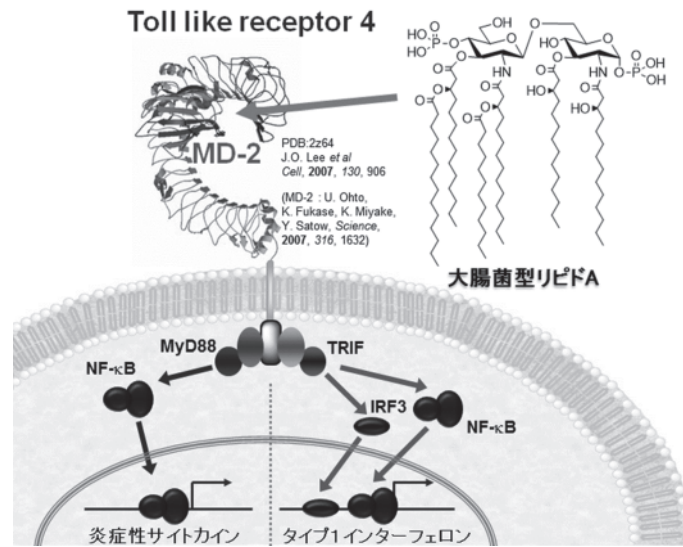


図 2 TLR4 を介した自然免疫活性化機構

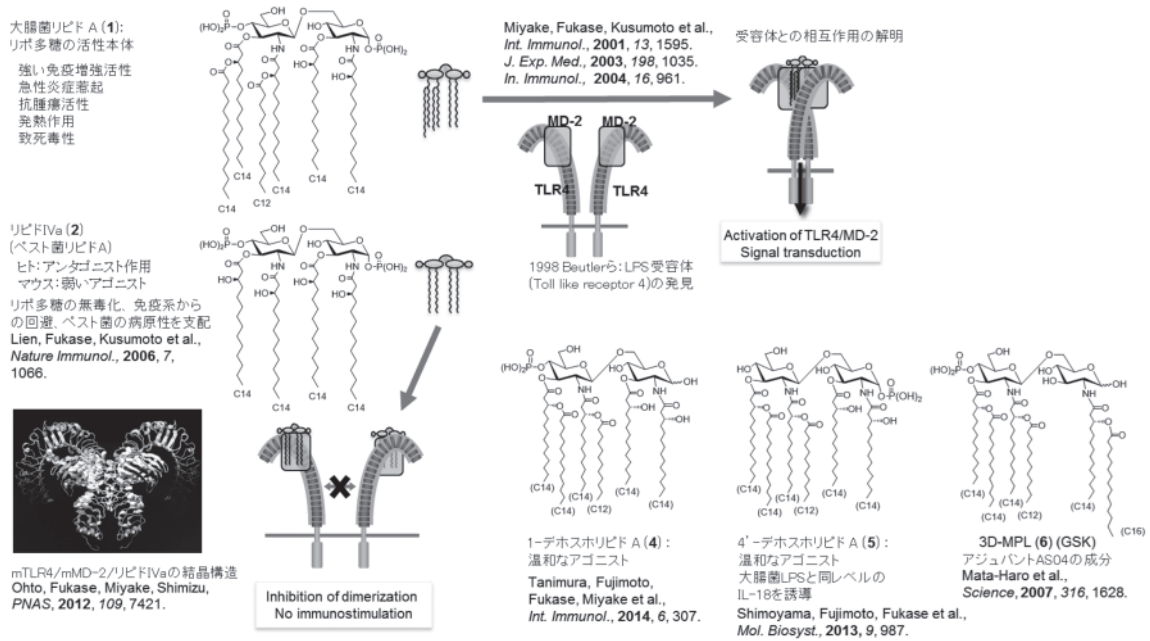


図 3 リピド A の機能研究

続いて、TLR4によるLPSおよびリピドAの認識が解明された。三宅らはTLR4の結合タンパク質であるMD-2がシグナルの伝達に必須であることを明らかにした。われわれの合成した放射性標識リピドA類縁体等を用いて、三宅らは種特異性がMD-2によるリピドAの認識の違いにより生じることなど、TLR4/MD-2複合体とリピドAの相互作用を解明した(図3)⁶⁾。さらにX線結晶構造解析が行われ、大戸、佐藤らは、リピドIVaとヒトMD-2複合体の3次元構造を解明し⁷⁾、続いてLiらは、エーザイの開発したアンタゴニストであるエリトランとマウスTLR4/MD-2複合体の3次元構造を明らかにし⁸⁾、アンタゴニストがMD-2に結合する様子が解かれた。2009年にはLiらによってリポ多糖/ヒトTLR4/MD-2のX線結晶構造解析が行われた⁹⁾。大腸菌型リピドA部の5本のアシル基はMD-2の疎水性ポケットに収容され、残りの一本が隣接するTLR4の疎水性面と相互作用することが引き金になって受容体の二量体化が引き起こされることが見出された。さらに大戸らにより、リピドIVa/マウスTLR4/MD-2複合体の3次元構造が解明され¹⁰⁾、マウス場合はリピドAのアシル基の数が4本であっても、一つのアシル基が隣のTLR4に提示され、二量体化が起こることが明らかとなった。なおアンタゴニストの場合は、リピドA部が180°回転した形でMD-2に結合しており、二量体化は起きない。このようにリピドAのMD-2への結合様式の違いにより、受容体活性化あるいはアンタゴニスト作用が発現することが明らかとなった。

2. リピドAの構造活性相関研究とアジュバントとしての展開

リピドAのアシル基の数や構造は、活性に大きな影響を及ぼす。またリン酸基の数も活性に大きな影響を与える。われわれはさまざまな類縁体を合成し、免疫増強作用やアンタゴニスト作用の強度を制御できることを明らかにしてきた¹¹⁾。例えば1位リン酸を欠くモノホスホリルリピドA(MPL)(504)(4)(図3)は、リピドAに比較すると活性が大きく低下し、温和な免疫増強作用を示す¹²⁾。モノホスホリルリピドAはCD14依存性が低く、TLR4/MD2の二量体化能が大腸菌LPSに比べると大きく低下するが、CD14非依存的で、MyD88-依存的なTNF α 産生能、TRIF-依存的なCD86 up-regulation and IFN β 誘導能を有する¹³⁾。一方4'リン酸を欠くMPL505(5)は、504(4)と同様に温和な免疫増強作用を示す。504(4)のIL-18誘導能が大腸菌LPSよりも低下するのに対して、505(5)のIL-18誘導能は大腸菌LPSと同様レベルに保たれており¹⁴⁾、異なったアジュバント能が予想され、今後の展開が期待される。

グラクソ・スミスクラインは同様の化合物として3D-

MPL(6)(図3)を開発した。3D-MPLは、サルモネラ菌より単離したリピドAのアシル基とリン酸基の構造を最適化することで弱毒化に成功している。この分子は、前述したTLR4/MD2に由来する2つのシグナル経路(図2)のうち、TRIF依存経路を選択的に活性化すると報告された¹⁵⁾。

LPS刺激により、TLR4シグナルに加え、カスパーゼ経路が誘導されるが、これらをすべて過剰に活性化すると、さまざまな毒性が発現される。MPLのようなリピドA誘導体のアジュバントは、LPSに比べ炎症性サイトカインの誘導は抑えつつ、抗原提示の際の共刺激分子CD80とCD86を誘導する¹⁶⁾。このように、リピドAのわずかな構造変換によってシグナル伝達を制御することにより、免疫制御が可能になる。

3. 研究が進むリピドAアジュバント

胃に生息し胃潰瘍の起因菌となるヘリコバクター・ピロリや口腔細菌であり歯周病の要因の一つとして知られるポルフィロモナス・ジンジバリスなどの寄生性細菌のLPSは、弱い免疫刺激活性を示す。その詳細は本誌P.15の「協奏的に作用するTLR4/MD-2制御因子の機能」に記載しており、寄生性細菌由来のリピドAは、TLR4シグナルはほとんど活性化しないが、IL-18誘導能は強力である¹⁴⁾。またこれらのリピドAは、IL-12を誘導する。IL-12とIL-18の共刺激はTh1細胞からIFN- γ 産生を促し、NK細胞を活性化することから、現在アジュバントとしての可能性を検討している。

近年、清野、國澤らは、腸管における免疫誘導組織であるパイエル板に共生している非常にユニークな細菌群(*Alcaligenes*属)を新たに発見し、組織内共生細菌として報告している¹⁷⁾。*Alcaligenes faecalis*由来の菌体成分は宿主に対して、粘膜面獲得免疫の代表格であるIgA産生応答を誘導するが、炎症惹起能力が低い。さらにパイエル板に共生する*A. faecalis*は、自然免疫から獲得免疫への移行に深く関わる樹状細胞内に共生することも明らかにしており、細胞内共生菌としての性質も有している。*Alcaligenes*属はグラム陰性菌であることから、このような共生細菌群に由来するLPS、リピドAもアジュバント候補化合物として大変興味深い。われわれは最近*A. faecalis* LOSの構造を決定し、そのリピドA部の全合成も達成した。合成リピドAは*A. faecalis* LOSと同等の活性を示し、現在アジュバントとしての開発研究を進めている。

また、リピドAアジュバントに抗原分子を共有結合により直接連結させ、化学合成のみで製造される複合化ワクチンの開発も始まっている。Guoらは、脂肪鎖パターンは大腸菌と同じであるが4'位のみリン酸基を有するリピドAと髄膜炎菌抗原である α -2,9-オリゴシアル酸をリンカーを介して結合させた化合物(図4A)

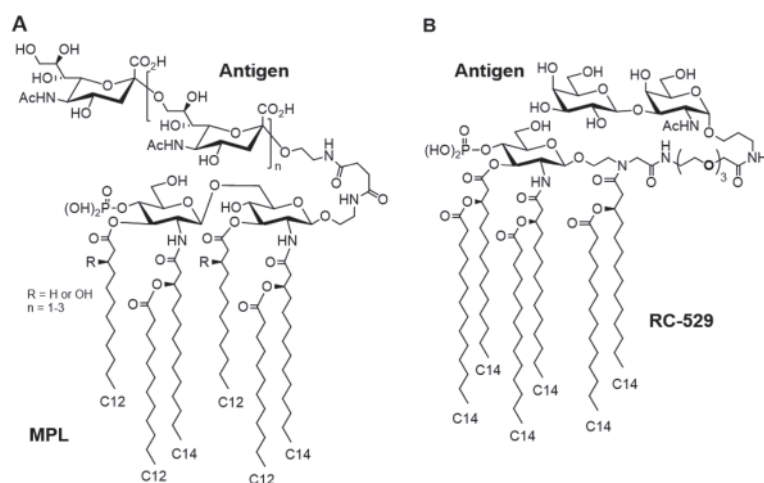


図 4 抗原-アジュバント複合体の化学構造

を合成し、抗体産生増強作用（とくに IgG2b, 2c）を確認している¹⁸⁾。また、Jiang らは、RC-529 と腫瘍関連糖鎖抗原の一種である Thomsen-Freidenreich (TF) 抗原の複合体 (図 4B) の合成を行っており¹⁹⁾、今後の生物活性試験の結果が期待される。

リポド A の活性発現・制御には、親水性部と疎水性部のボリュームの微妙なバランス、疎水部と酸性官能基の空間配置が重要であり、構造修飾によって、受容体活性化の制御、細胞内シグナルの選択の制御が可能である。このことはさまざまなリポド A 誘導体を用いることにより細胞性免疫や液性免疫、あるいは粘膜免疫の応答の制御が可能であることを示している。3D-MPL のように、リポド A 誘導体はすでに安全性の高いアジュバントとして実用されており、今後は抗マラリアワクチンなどの抗原虫ワクチンや抗がんワクチンなどのさまざまな新規ワクチンの開発において、対象となる疾患に応じて、安全性の高いアジュバントが開発されるものと期待される。

文 献

- 1) Kusumoto S, Fukase K, Shiba T : Key structures of bacterial peptidoglycan and lipopolysaccharide triggering the innate immune system of higher animals : chemical synthesis and functional studies. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86 : 322-337, 2010
- 2) Wei MQ, Mengesha A, Good D, et al. : Bacterial targeted tumour therapy—dawn of a new era. *Cancer Lett* 259 : 16-27, 2008
- 3) Leroux-Roels G : Unmet needs in modern vaccinology : adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 28 Suppl 3 : C25-36, 2010
- 4) Molinaro A, Holst O, Di Lorenzo F, et al. : Chemistry of lipid A : at the heart of innate immunity. *Chemistry* 21 : 500-519, 2015
- 5) Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, et al. : Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem* 266 : 19490-19498, 1991
- 6) Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, et al. : Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2 : higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med* 198 : 1035-1042, 2003
- 7) Ohto U, Fukase K, Miyake K, et al. : Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* 316 : 1632-1634, 2007
- 8) Kim HM, Park BS, Kim JI, et al. : Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130 : 906-917, 2007
- 9) Park BS, Song DH, Kim HM, et al. : The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 : 1191-1195, 2009
- 10) Ohto U, Fukase K, Miyake K, et al. : Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 : 7421-7426, 2012
- 11) 深瀬浩一, 藤本ゆかり, 下山敦史, 他 : 細菌由来複合糖質の合成と自然免疫研究. *有機化学協会誌* 70 : 113-130, 2012
- 12) Yoshizaki H, Fukuda N, Sato K, et al. : First Total Synthesis of the Re-Type Lipopolysaccharide This work was supported by the Research for the Future Program (No. 97L00502) from the Japan Society for the Promotion of Science. H. Y. is grateful for a JSPS Research Fellowship for Young Scientists (No. 1241) from the Japan Society for the Promotion of Science. The authors are grateful to Mr. Seiji Adachi for his skillful measurement of NMR spectra. *Angew Chem Int Ed Engl* 40 : 1475-1480, 2001
- 13) Tanimura N, Saitoh S, Ohto U, et al. : The attenuated

- inflammation of MPL is due to the lack of CD14-dependent tight dimerization of the TLR4/MD2 complex at the plasma membrane. *Int Immunol* 26:307-314, 2014
- 14) Fujimoto Y, Shimoyama A, Saeki A, et al. : Innate immunomodulation by lipophilic termini of lipopolysaccharide : synthesis of lipid As from *Porphyromonas gingivalis* and other bacteria and their immunomodulative responses. *Mol Biosyst* 9 : 987-996, 2013
- 15) Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, et al. : The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 316 : 1628-1632, 2007
- 16) Martin M, Michalek SM, Katz J : Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infect Immun* 71 : 2498-2507, 2003
- 17) Obata T, Goto Y, Kunisawa J, et al. : Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 : 7419-7424, 2010
- 18) Liao G, Zhou Z, Suryawanshi S, et al. : Fully Synthetic Self-Adjuvanting α -2,9-Oligosialic Acid Based Conjugate Vaccines against Group C Meningitis. *ACS Cent Sci* 2 : 210-218, 2016
- 19) Lewicky JD, Ulanova M, Jiang ZH : Synthesis of a TLR4 Agonist-Carbohydrate Antigen Conjugate As A Self-Adjuvanting Cancer Vaccine. *ChemistrySelect* 5 : 906-910, 2016