

# 14. 糖脂質 $\alpha$ -GalCer を基盤とした脂質改変型 CD1d リガンドの創製研究

井貫 晋輔<sup>1)</sup>, 相羽 俊彦<sup>1,2)</sup>, 平田 菜摘<sup>1)</sup>, 柏原 瑛美<sup>1)</sup>, 喜多 俊介<sup>3)</sup>  
前仲 勝実<sup>3)</sup>, 深瀬 浩一<sup>2)</sup>, 藤本ゆかり<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>慶應義塾大学理工学部化学科, <sup>2)</sup>大阪大学大学院理学研究科, <sup>3)</sup>北海道大学大学院薬学研究院

## はじめに

脂質抗原の提示を担う CD1d は樹状細胞などに存在し T 細胞の分化, 活性化を制御することが知られている。CD1d は糖脂質リガンドと結合すると, ナチュラルキラー T (NKT) 細胞上の T 細胞抗原受容体 (TCR) に認識され, IFN- $\gamma$  などの Th1 サイトカインや, IL-4 などの Th2 サイトカインを含むさまざまなサイトカイン産生を誘導する<sup>1)</sup>。これらのサイトカインは免疫応答のバランス制御にかかわっており, 制御を可能とする CD1d リガンドの創製は重要な研究課題である。これまでの研究において, CD1d リガンドの構造によって, 誘導されるサイトカインの量やバランスを制御可能であることが報告されている<sup>2)</sup>。既知の CD1d リガンドとしては海洋天然物を基盤に開発された糖脂質  $\alpha$ -GalCer (KRN7000)<sup>3)</sup> や OCH<sup>4)</sup> が知られている (図 1)。 $\alpha$ -GalCer は INF- $\gamma$  や IL-4 を強力に誘導することが知られており, 現在, 頭頸部腫瘍に対する iNKT 細胞免疫療法 (先進医療 B) に用いられている。一方, OCH は IL-4 選択的なりガンドであり, 多発性硬化症やクローン病に対する治療薬として, 臨床試験が行われている。これまでの  $\alpha$ -GalCer の構造活性相関研究により CD1d に対するリガンド結合様式の解明が精力的に進められてきたが<sup>2)</sup>, CD1d の疎水性ポケットにおける脂質リガンド認識機構の詳細な解析はあまり行われていない。本稿では,  $\alpha$ -GalCer の長鎖脂肪酸部位の変換によるサイトカイン誘導活性制御に焦点をあて, これまでに報告されている脂質改変型  $\alpha$ -GalCer 誘導体を概説するとともに, われわれの最近の知見を紹介する。

## 1. 脂質改変型 CD1d リガンド

$\alpha$ -GalCer は, ガラクトース部位, スフィンゴシン部位, 長鎖脂肪酸部位からなる糖脂質であり, NKT 細胞を介して, 強力なサイトカイン誘導能を有することが知られている。これまでに, いくつかのグループによって,  $\alpha$ -GalCer の長鎖脂肪酸部位の構造変換によりサイトカインの誘導量やバランスが変化することが報告されている (図 1)。Goff らは  $\alpha$ -GalCer と比較して短い

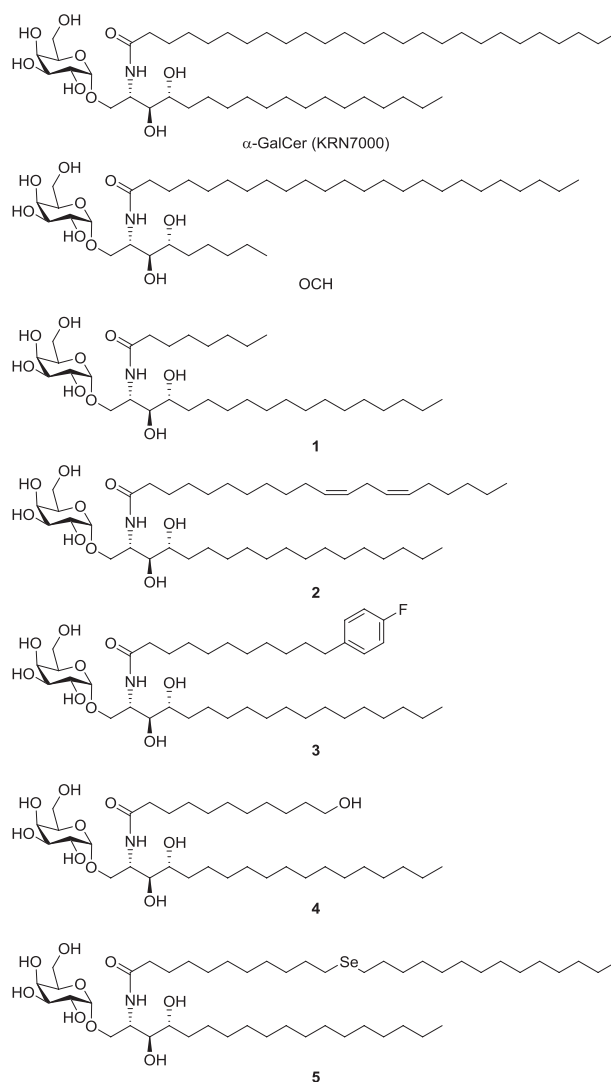


図 1  $\alpha$ -GalCer (KRN7000) およびその誘導体の構造

脂肪酸部位を有するリガンドを用いた場合, IL-4 選択的なりガンドを示すことを報告している (1)<sup>5)</sup>。Yu らは, 脂肪酸部位に不飽和結合を導入すると IL-4 選択的なりガンドとなることを見出している (2)<sup>6)</sup>。また Im らは, これらの Th2 選択性の発現は, リガンドの細胞内挙動の違いによって制御されていると報告している<sup>7)</sup>。Fujio らは, Ar 基を脂肪酸末端に有

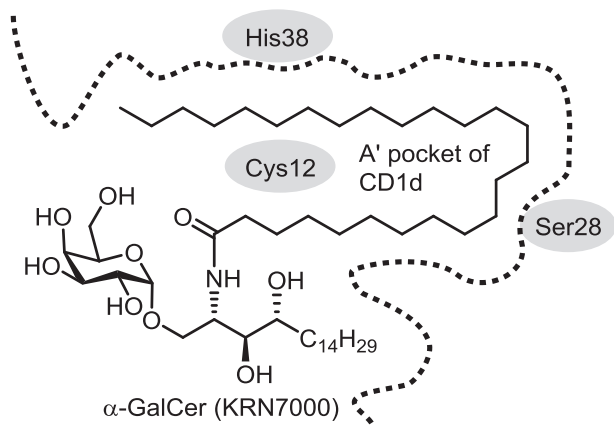


図2 CD1dの疎水性ポケット

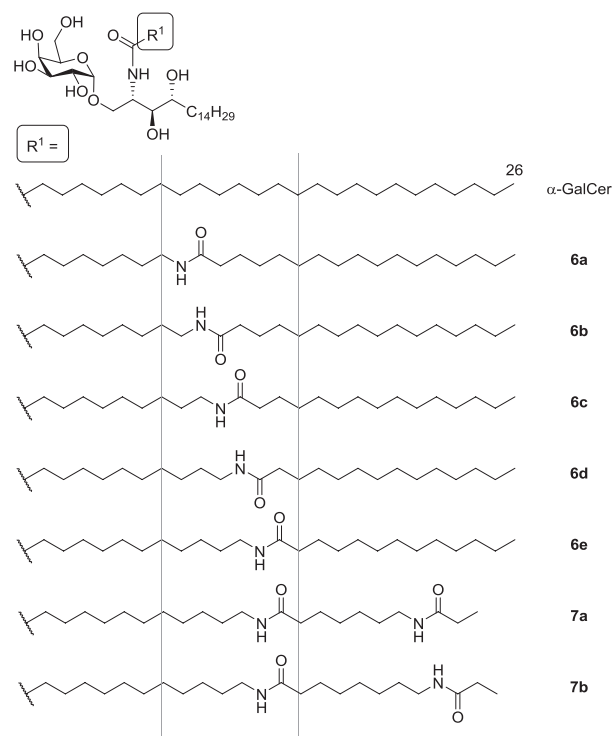
するリガンドがIFN- $\gamma$ などのTh1サイトカイン選択的な活性を示すことを報告するとともに(3)<sup>8)</sup>, CD1dとの結合親和性の高さとTh1サイトカイン選択的との間に相関関係があることを明らかにしている<sup>9,10)</sup>。Limらは、脂肪酸末端に水酸基を有するリガンドを用いると、 $\alpha$ -GalCerと比較して活性は低下するもののサイトカイン誘導活性を保持することを報告している(4)<sup>11)</sup>。また最近、Hossainらは、セレン原子を脂肪酸に導入した $\alpha$ -GalCer誘導体がTh1サイトカイン選択的誘導活性を示すことを報告している(5)<sup>12)</sup>。このように長鎖脂肪酸部位の構造変換が誘導されるサイトカインの量やバランスに影響を与えることが明らかとなっているが、詳細な誘導メカニズムなどの知見は限られており、現在も解析が進められている。

## 2. アミド基を有する脂質改変型CD1dリガンドの開発

このような背景のもと、われわれは $\alpha$ -GalCerの長鎖脂肪酸部位の構造展開を基に、NKT細胞を介したサイトカイン誘導制御を可能とする新規CD1dリガンドの創製を目指すとともに、CD1dの脂質結合部位におけるリガンド認識機構の解明とその制御を目的として、研究に着手した<sup>13)</sup>。

### 2-1. リガンドデザイン

糖脂質やリン脂質など生体関連脂質分子は、主に糖やリン酸基などの親水性ヘッドグループと長鎖アルキル基などの疎水性領域から構成されている。長鎖アルキル基などは、脂質認識タンパク質中の非極性アミノ酸から構成される疎水性ポケットによって疎水性相互作用を介して認識される。しかしながら、いくつかの脂質認識タンパク質において、これらの疎水性ポケット中の限定的な領域に、極性アミノ酸を見出すことができる。疎水性領域における水素結合はタンパク質表面などの親水性領域における水素結合と比較し、より

図3 アミド基を有する $\alpha$ -GalCer誘導体

安定な結合を形成することが報告されているが<sup>14,15)</sup>, 脂質認識において疎水性ポケット中の親水性アミノ酸残基に着目して、水素結合形成を狙う試みは限られている。われわれは、これらの親水性残基に着目し、水素結合形成可能なリガンドをデザインすることを計画した。これまでに報告されているCD1d- $\alpha$ -GalCer複合体のX線結晶構造(PDB:3G08)<sup>16)</sup>を精査した結果、 $\alpha$ -GalCerの長鎖アルキル基との相互作用領域である疎水性ポケット(A'pocket)中に、限定した範囲で存在する水素結合可能な親水性領域(Ser28およびCys12, His38周辺部)を見出した(図2)。われわれは親水性領域に対して水素結合などを介して相互作用可能なアミド基を $\alpha$ -GalCerの脂肪酸部位に導入することを計画した(図3)。そこで、CD1dのSer28との相互作用が予想される部位近傍にアミド基を導入した5数種のリガンド(6a-e)を合成した。またCys12, His38との相互作用を意図したリガンド(7a, 7b)も併せて合成した。

### 2-2. 生物活性評価

活性評価としては、CD1dタンパク質とNKTハイブリドーマ(2E10)<sup>17)</sup>を用いたサイトカイン誘導能評価を最初に行った(APC-free assay)<sup>18)</sup>。すなわち、CD1dをプレートに固定化し、各リガンドを加えた後、NKTハイブリドーマを加え、誘導されるサイトカイン(IL-2)の量を定量した(図4a, 4b)。リガンド6a, 6bは $\alpha$ -GalCerと比較し、ほぼ同等のサイトカイン誘導能を示

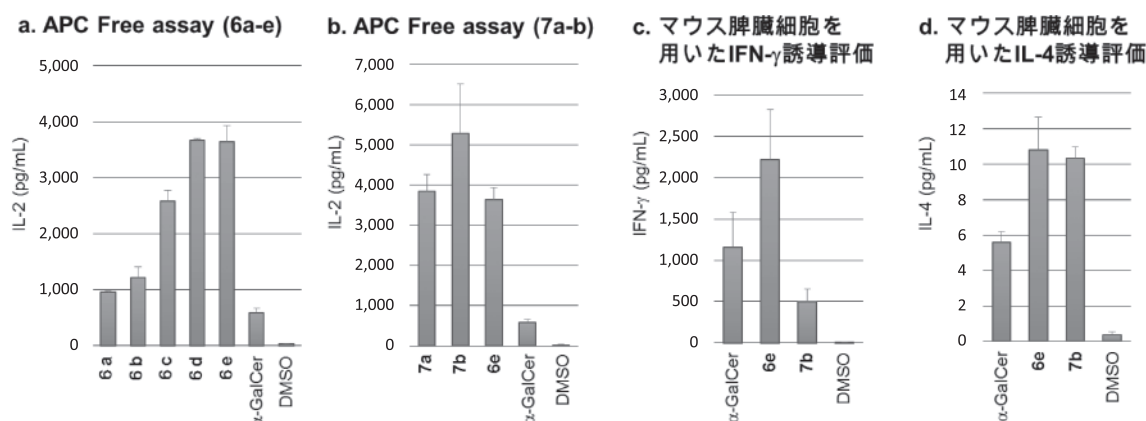


図 4 NKT ハイブリドーマ (2E10 cell) と CD1d タンパク質を用いた APC Free assay, マウス (C57BL/6NCrSlc) 脾臓細胞を用いたサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-4) 誘導評価

した。一方, 6c を用いた場合, 活性が向上した。さらに 6d, 6e は, より高いサイトカイン誘導を示した。このように, アミド基の導入位置が活性発現に大きな影響を与えることから, CD1d タンパク質とリガンド間の特定の相互作用が示唆された。また, 2つのアミド基を有する 7a, 7b を用いて活性評価を行った結果, 7b において活性が向上した。

続いて 6e, 7b に関して, マウス脾臓細胞を用いたサイトカイン誘導評価を行った (図 4c, 4d)。本評価系では, NKT 細胞, CD1d を発現する樹上細胞など, 複数種の細胞が混在する脾臓細胞にリガンドを添加し, 誘導されるサイトカイン INF- $\gamma$  および IL-4 の量を定量した。6e は,  $\alpha$ -GalCer と比較して, INF- $\gamma$  と IL-4 ともに誘導能が向上した。一方で, 7b は, INF- $\gamma$  の誘導能は低下したが, IL-4 の誘導能は向上した。リガンド 7b の IL-4 選択性発現メカニズムの詳細な解析は今後の課題である。

## おわりに

われわれは, CD1d の脂質認識部位に存在する特定の極性アミノ酸残基が, 親和性向上のための新たな作用点となることを見出した。本結果は単純な構造変換により脂質リガンドの活性向上が可能であることを示しており, 脂質認識タンパク質に対する高親和性リガンド設計に重要な指針を与えると期待される。また, これら CD1d リガンドは, 自己免疫疾患などの治療薬や, ワクチンアジュバントとしての展開が期待される。

## 文 献

- 1) Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB : Invariant natural killer T cells : an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* 13 : 101-117, 2013
- 2) Laurent X, Bertin B, Renault N, et al. : Switching

invariant natural killer T (iNKT) cell response from anticancerous to anti-inflammatory effect : molecular bases. *J Med Chem* 57 : 5489-5508, 2014

- 3) Morita M, Motoki K, Akimoto K, et al. : Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem* 38 : 2176-2187, 1995
- 4) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T : A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Science* 413 : 531-534, 2001
- 5) Goff RD, Gao Y, Matther J, et al. : Effects of lipid chain lengths in  $\alpha$ -galactosylceramides on cytokine release by natural killer T cells. *J Am Chem Soc* 126 : 13602-13603, 2004
- 6) Yu KO, Im JS, Molano A, et al. : Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 3383-3388, 2005
- 7) Im JS, Arora P, Bricard G, et al. : Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation. *Immunity* 30 : 888-898, 2009
- 8) Fujio M, Wu D, Garcia-Navarro R, et al. : Structure-based discovery of glycolipids for CD1d-mediated NKT cell activation : tuning the adjuvant versus immunosuppression activity. *J Am Chem Soc* 128 : 9022-9023, 2006
- 9) Liang PH, Imamura M, Li X, et al. : Quantitative microarray analysis of intact glycolipid-CD1d interaction and correlation with cell-based cytokine production. *J Am Chem Soc* 130 : 12348-12354, 2008
- 10) Li X, Fujio M, Imamura M, et al. : Design of a potent CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 13010-13015, 2010
- 11) Lim C, Kim JH, Baek DJ, et al. : Design and Evaluation

- of  $\omega$ -Hydroxy Fatty Acids Containing  $\alpha$ -GalCer Analogues for CD1d-Mediated NKT Cell Activation. ACS Med Chem Lett 5 : 331-335, 2014
- 12) Hossain MI, Hanashima S, Nomura T, et al. : Synthesis and Th1-immunostimulatory activity of  $\alpha$ -galactosylceramide analogues bearing a halogen-containing or selenium-containing acyl chain. Bioorg Med Chem 24 : 3687-3695, 2016
- 13) Inuki S, Aiba T, Hirata N, et al. : Isolated Polar Amino Acid Residues Modulate Lipid Binding in the Large Hydrophobic Cavity of CD1d. ACS Chem Biol 11 : 3132-3139, 2016
- 14) Schmidtke P, Luque FJ, Murray JB, et al. : Shielded hydrogen bonds as structural determinants of binding kinetics : application in drug design. J Am Chem Soc 133 : 18903-18910, 2011
- 15) Gao J, Bosco DA, Powers ET, et al. : Localized thermodynamic coupling between hydrogen bonding and microenvironment polarity substantially stabilizes proteins. Nat Struct Mol Biol 16 : 684-690, 2009
- 16) Sullivan BA, Nagarajan NA, Wingender G, et al. : Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by V $\alpha$ 14i NKT cells. J Immunol 184 : 141-153, 2010
- 17) Nyambayar D, Iwabuchi K, Hedlund E, et al. : Characterization of NKT-cell hybridomas expressing invariant T-cell antigen receptors. J Clin Exp Hematop 47 : 1-8, 2007
- 18) Zeissig S, Olszak T, Melum E, et al. : Analyzing antigen recognition by Natural Killer T cells. Methods Mol Biol 960 : 557-572, 2013