

# 海洋天然物と免疫作動性物質～ $\alpha$ -GalCer の基礎について～

名取 威徳

帝京平成大学薬学部

## Marine natural products and immune-acting substances, basic research of $\alpha$ -galactosylceramides

Takenori Natori

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University

### Abstract

Marine organisms produce second metabolites with unique chemical structures because of their complexed symbiotic systems different from that of land organisms.

Unique glycosphingolipids with  $\alpha$ -galactosylceramide structure, agelasphins, were obtained from Okinawan marine sponge *Agelas mauritanus* by the *in vivo* antitumor substance screening system. Agelasphins and the developmental candidate, KRN7000 ( $\alpha$ -GalCer), markedly showed antitumor activity against tumor bearing mouse by activating host's immune system. The discovery of agelasphins and the development of KRN7000 revealed the detail of NKT cell functions. Unfortunately, development of KRN7000 intended to the antitumor drug by the systemic injection was abandoned because of several limitations. Now it is strongly expected that agelasphin or its derivative to be developed as a novel immunomodulator by conquering the limitations.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 21~24, 2019

**Key words** : agelasphin,  $\alpha$ -galactosylceramide,  $\alpha$ -GalCer, KRN7000, NKT cell

### はじめに

海洋生物は、地上や淡水域の生物とは異なる複雑な共生機構のため、ユニークな構造をもつ二次代謝産物を生産することが知られ、それを利用した創薬の試みが多くなされてきた。

ナチュラルキラー T 細胞 (NKT 細胞) は、自然免疫と獲得免疫を橋渡しする免疫担当細胞であり、強力に Th1 型サイトカイン産生を誘導する一方、同時に Th2 型サイトカイン誘導も行うことのできるユニークな細胞である。これらの免疫誘導はいずれも脂質部分にセラミドをもち、これに糖鎖が特定の立体配位で結合したスフィンゴ糖脂質 (GSL) が樹状細胞上の CD1d 分子に提示され、TCR を発現するインバリエントな NKT 細胞がこれを認識・活性化することにより発動される。

このような GSL のうち、非常に強力な NKT 細胞活性化剤として知られる  $\alpha$ -GalCer (KRN7000) は、キリンビール (株) のチームが海洋生物からの創薬スクリーニ

ングで見出した沖縄産海綿動物由来の GSL であるアゲラスフィン類 (agelasphins : AGLs) に由来する。AGLs は中性糖を糖鎖にもつが、その後 *Sphingomonas* 属のグラム陰性菌からは酸性糖を構成糖として有する GSL も単離され、類似の活性を示すことが明らかとなった。

AGLs の「真の生産者」が海綿動物に共生する微生物である可能性は高く、一部の GSL は脂質二重層ラフトを構成し細菌類と宿主の相互作用に関与するとの報告もあることから、AGLs の宿主中での存在意義などにも興味もたれる。近年さまざまな AGLs 誘導体の化学合成が進められており、そのユニークな作用を自在に制御することにより、免疫疾患やがん・感染症の治療・予防に資することが期待される。

### 1. アゲラスフィンの発見

1980 年代をピークとして世界中の製薬会社では放線菌などの微生物の二次代謝産物研究を基盤とする天然物化学による創薬研究が行われていた。さらにそれまで主

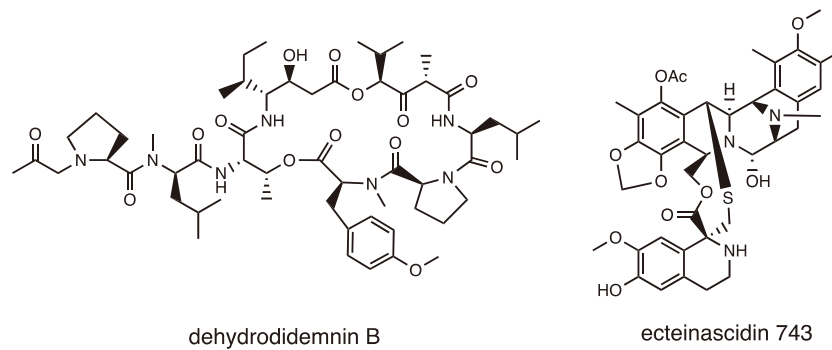


図 1 海洋生物由来の医薬品の例

に用いられてきた細胞毒性を指標とした抗がん剤探索とは異なる手法がスクリーニングに用いられたことにより、さまざまなユニークな構造と生理活性をもつ物質が見出されるようになった。

一方で海洋生物は陸上の生物とは異なるタイプの代謝物を生産する可能性が古くから示唆されてきた。とくにサンゴ礁域のスキューバダイビングで採取可能な海域の生物についての研究が進むとその複雑な共生様式が明らかとなった。太陽光が届く領域では光合成を行うシアノバクテリアを頂点とする複雑な一次共生、二次共生が形成され、オルガネラの連結が進み細胞内共生が成立する過程で、共生体と宿主細胞のゲノムが統合してオルガネラ間の代謝産物輸送システムに変化すると考えられている。この複雑な共生関係により、多様な代謝物生産が可能となることで海洋生物の代謝物は、陸上生物の代謝モデルにあてはまらない例が多いと考えられており、このことが天然物化学者たちの興味を海洋に引き付けた<sup>1,2)</sup>。

この期待に応えるように海洋生物からは実に多彩な代謝物が見出されてきて、さらにその真の生産者に関する研究も進んだ。残念ながらいくつかの課題により実際に医薬品として臨床に供されるまでに至った化合物は少ないが、dehydrodidemnin B (plitidepsin (Aplidin<sup>®</sup>)) や ecteinascidin 743 (trabectedin (Yondelis<sup>®</sup>)) などが主にその抗腫瘍作用を期待されている (図 1)。

われわれはキリンビール (株) 医薬探索研究所 (当時) において、この流れを汲んで抗腫瘍性物質のスクリーニングを実施した。当初は海洋生物のエキスを調製し、細胞毒性など明確な指標を頼りにスクリーニングを実施したもののなかなか期待するような医薬品としての候補物質をヒットすることができなかった。そこである時から B16 マウスメラノーマを移植した C57BL/6 系担がんマウスの腹腔内に直接海洋生物のエキスを注入し、その延命効果を検討することで、エキスのもつポテンシャル全体を見極めることとした。するとある日動物飼育を担当するテクニシャンから「このエキスを投与したマウスは、延命効果はさほどではないものの、いつまでも毛艶がとても良い」との報告を受けたことからスクリーニングの

流れが変わった。通常がん細胞を移植した黒色系のマウスは体毛が逆立って極端に毛艶が悪化するのだが、このエキスを投与されたマウスは死亡する直前まで良好な毛艶を保っていたのである。それまでは抗腫瘍剤という強い毒性をもって増殖の早い腫瘍細胞を優先的に死滅させることをイメージしていたが、この海綿のエキスの投与により明らかに *in vivo* でマウス自身のもつ免疫系を強化して腫瘍を排除することが可能であることが確認されたのであった。その後はこの「毛艶」を指標とした活性物質の探索を行い、結果的に沖縄産の海綿 *Agelas mauritianus* より一連の新規  $\alpha$ -galactosylceramide を単離・構造解析してアゲラスフィン類 (agelasphins) と命名した。最も含有量の多かった agelasphin-9b の構造を図 2 に示す。なお本稿では詳説しないが、海洋生物由来の天然物については先述の通り共生関係が複雑なため、アゲラスフィン類の「真の生産者」が本当に海綿動物なのか共生微生物なのかなどの解明はなされていない。

## 2. アゲラスフィンの関連化合物と誘導体合成

アゲラスフィンとは  $\alpha$ -ヒドロキシ脂肪酸と phytosphingosine より成るセラミド部と D-ガラクトースより構成されたスフィンゴ糖脂質であり、その構造上の最大の特徴はセラミドに対してガラクトースが  $\alpha$  配位で結合していることであった。一連のモノグリコシルセラミドはセレプロシドと呼ばれ、古くから知られた分子種であり、当然ながら化学合成も多く行われてきたにもかかわらず、 $\alpha$  配位の糖を結合させたセレプロシドはそれまでに報告例がなく、その生理活性も未知であった。

一方その後、別の *Agelas* 属や *Stylissa* 属の海綿よりアゲラスフィンおよびさらに高度に糖が結合した化合物群が単離され、アゲラスフィンは必ずしも珍しい化合物ではなく海綿動物に比較的広く分布している化合物であることがわかった。しかしながらスフィンゴ糖脂質がそのような強い抗腫瘍効果を示すことはそれまでに報告されたことはなく、精製したアゲラスフィンに残存する極微量で未知の不純物、例えば LPS のような物質による薬理作用も疑われたこともあり精製品のリムルステストまで

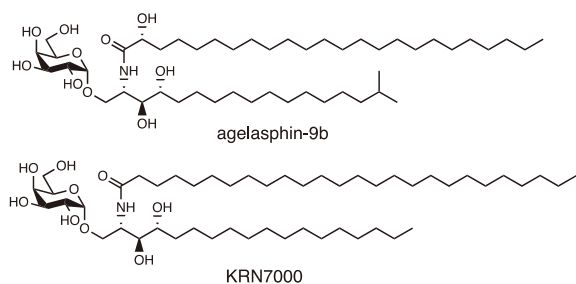


図2 アゲラスフィン (agelasphin-9b) と KRN7000 の化学構造

実施したこともあった。しかしながら最終的にはアゲラスフィンのなかでも構造が単純な AGL-9a と -9b の 13 工程をかけた立体特異的な全合成を達成した結果、これらが天然由来の化合物と同一な物理化学的性質を示すとともに、同等の生理活性を示したことから、アゲラスフィンが海綿の抽出液が示した抗腫瘍活性の活性本体であることが確認され、またその絶対立体配置を含めた構造が確定された。

さらにわれわれは医薬品としての開発にかなう低コストで合成可能な誘導体を見出すべく 100 種以上の誘導体を合成した。誘導体は糖の種類や数、結合の様式やセラミド部の立体化学と水酸基の数などを含む多方面にわたって精力的に検討・合成された。またその後われわれ以外のグループによっても多くの誘導体の合成と生理活性の検討が行われたが、そのオリジナルの構造がいずれも高度に水酸化された糖、長鎖塩基および脂肪酸の 3 つのパーツで構成され、それらがグリコシド結合とアミド結合で結合していたことから修飾部位はあまりにも多かったことから構造の最適化は容易ではなかった。最終的にわれわれのグループとしては生理活性を優先し、マウスでの抗腫瘍活性とヒト臍帯血由来の細胞に対する分化誘導能を指標として KRN7000 と命名した化合物を開発候補物質として選定したものの、このことにより後述の通りいくつかの課題を抱えることとなった (図 2)<sup>3,4)</sup>。

### 3. アゲラスフィンの作用機序解明

アゲラスフィンは *in vitro* での細胞毒性や *in vivo* での動物に対する毒性をほとんど示さないにもかかわらず担がんマウスに対して顕著な延命効果を示したことから、何らかの宿主の免疫系に作用していることが推定され、当時知られていた抗腫瘍性を担う T 細胞や NK 細胞への作用が検討された。その結果 *in vivo*, *in vitro* のいずれでも脾臓細胞を活性化して増殖誘導が起こることが確認され、脾臓細胞の中のどのような細胞がアゲラスフィンの抗腫瘍作用に寄与しているかが興味の対象となった。

そのようななか開発候補物質として大量調製に成功した KRN7000 は世界中の共同研究者に提供されるようになり、精力的にその作用機序の解明と応用研究が行われ

た。その結果わかってきたことは、抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) がもつ CD1d 分子を介して免疫細胞を活性化させること、さらにその抗原提示を受ける寄与度の最も大きい細胞は natural killer T (NKT) 細胞であることが判明した。当時 NKT 細胞は活性化メカニズムなどその実態が未解明な細胞の系統であったが、KRN7000 が DC を介して極めて強く NKT 細胞を活性化するリガンドであることが判明したことで、一気に NKT 細胞の研究が加速することとなった<sup>5)</sup>。

今日では KRN7000 あるいは類似の  $\alpha$ -glycosylceramide 構造を有するスフィンゴ糖脂質やそのアナログによって NKT 細胞が活性化することで IFN- $\gamma$  や IL-12 分泌が亢進することで Th1 細胞の活性化が誘導されることや、同時に IL-4 の分泌も促されることで Th2 細胞の活性化も可能であることが示されるようになった。今後はこのような NKT 細胞の特異的な性質を利用した免疫賦活作用を高めることによる抗腫瘍、抗感染症などの薬剤やワクチンアジュバントの開発、あるいは免疫抑制作用に基づく抗アレルギー、抗自己免疫疾患、臓器移植時の抗 GVHD を目的とした薬や治療法の開発が期待される。

### 4. KRN7000 の製剤化と初期の臨床試験

われわれは 1999 年当時、KRN7000 の静脈内全身投与による抗腫瘍効果に期待して、臨床試験を企画した。まず必要となったのは必要量の治験原薬の合成である。当時の治験原薬 GMP 基準に則った原薬が準備されたが、前述の通りその工程数が極めて長かったことから非常に難航した。

さらに静脈内投与にあたっては当然ながら注射剤として投与可能な溶剤に可溶化することが必須であるが、KRN7000 の水やアルコール系に対する溶解度は悲観的なほどに低かった。動物試験時には dimethylsulfoxide (DMSO) などの有機溶媒に溶解後バッファーに希釈するというのが一般的な動物実験用の投与液調製の手法であるが、臨床では当然そのような手法が使えないため製剤化には大きな困難が伴った。

最終的にはいくつかの界面活性剤と賦形剤を用いて KRN7000 原薬を溶解し、これを凍結乾燥した製剤が開発された。1 本の中に 200  $\mu$ g の KRN7000 を含み、1 mL の注射用蒸留水を加えてふり混ぜるだけで容易に溶解可能な小さなバイアル製剤である (図 3)。現在もこの処方では試薬として販売されている KRN7000 の溶解法に採用されており、また KRN7000 の臨床試験実施においてこの製剤の開発は大きなブレイクスルーとなった。多くの薬剤開発において大量合成や製剤化に払われた研究者たちの努力とその結果は、薬物治療における大きな貢献をしてきたことは間違いなく、個人的にはもっと広く知られるところとなって良いと思うのだが、これらの技術には感覚的、職人技的なところが多いためかあまり表に出



図 3 KRN7000 の臨床試験用に開発された静脈内投与用製剤

てこないのは残念なことである。

初期の臨床試験はオランダにて計画された。First-in-man の試験であったことから極めて低用量から慎重に投与するスケジュールが組まれ、週に 1 回点滴とともに投与され、3 週続けた上で 2 週間休薬するサイクルを 1 コースとして、最大 6 コースが固形癌の患者に対して実施された。最大投与量の  $4,800 \mu\text{g}/\text{m}^2$  まで安全性の問題はなく増量され、KRN7000 の高い忍容性が確認された。また効果については一部の癌種では NC (不変) あるいは部分奏功 (PR) の患者が確認されたものの、全体にはマウスで示されたような著効を認めるには至らなかった<sup>6)</sup>。さらにわれわれを大きく落胆させたことは、KRN7000 の 1 回目投与時に各種サイトカインの分泌が認められた反応性のよかった患者においても、2 回目以降の投与において、その反応が全く認められなくなることであった。これは免疫反応におけるいわゆるアナジー (anergy, 免疫不応性) が発生しているものと考えられたが、現在でもそのメカニズムなどには不明点が多い。

その後なんとか KRN7000 を薬として世に出すことを目指して、いずれも海外での臨床試験が健常人や肝炎患者を対象に計画・実施されたが、全身投与における KRN7000 のヒトでの効果は限定的であると結論付けられ、その開発は中断となった。

通常であれば開発の中断の決定とともに KRN7000 やアゲラスフィンに対する科学的な興味は失われるところであるが、現在においても KRN7000 は NKT 細胞を活性化する「最強」のリガンドである点が評価され、NKT 細胞研究のための試薬として広く販売されるとともに、誘導体化や DDS (薬物送達)、さらには細胞移入療法の *ex vivo* での細胞の活性化剤などとして開発の対象となっ

ている。アゲラスフィンの発見から 30 年近くが経過する 2018 年末の時点においてもこのようなアクティビティがあることには驚かされるとともに、いかに NKT 細胞を介したさまざまな疾患を対象とした治療法の開発が魅力的で期待されているかを物語っている。

## おわりに

初期の臨床試験の実施により明らかとなった KRN7000 の医薬品としてのいくつかの欠点は、今日においても克服されてはいない。しかしながら KRN7000 によりその詳細な機能が明らかとなった NKT 細胞とこの細胞を利用した免疫関連疾患治療法の開発という目標に対する魅力はいささかも失われてはおらず、むしろさらに魅力を増したと言える。

今後もこの領域への多くの科学者の参入により NKT 細胞関連の研究が活発化し、いつの日か何らかの形で NKT 細胞を用いた医療が確立することを強く期待したい。その時に海洋生物由来の agelasphin が再び脚光を浴び、同時に海洋天然物化学の領域も活発化することを願いたい。

## 文 献

- 1) 白岩善博：海洋微細藻類の光合成・物質生産と地球環境, Photosynthetic biomass production by marine microalgae and its impact on global environment. *Chemical Times* 238 : 2-9, 2015
- 2) 松永是, 竹山春子, 横内裕子：マリゲノム研究の今後の展望, Prospective of Marinegenome Research. *日本海水学会誌* 59 : 4-11, 2005
- 3) Uchimura A, Shimizu T, Morita M, et al. : Immunostimulatory activities of monoglycosylated  $\alpha$ -D-pyranosylceramides. *Bioorg Med Chem* 5 : 2245-2249, 1997
- 4) Tashiro T, Mori K : Fifteen years since the development of KRN7000-structure-activity relationship studies on novel glycosphingolipids which stimulate natural killer T cells. *Trends Glycosci Glycotechnol* 22 : 280-295, 2010
- 5) Koezuka Y, Motoki K, Sakai T, et al. : Antitumor activity of KRN7000 ( $\alpha$ -galactosylceramide) and its novel immunostimulatory mechanism. *Recent Res Devel Cancer* 1 : 341-354, 1999
- 6) Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, et al. : A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 8 : 3702-3709, 2002