

# Th2 バイアス型脂質改変 CD1d リガンド開発と機能解析

竝河 悦子<sup>1)</sup>, 柏原 瑛美<sup>1)</sup>, 平田 菜摘<sup>1)</sup>, 井貫 晋輔<sup>1,2)</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>京都大学大学院薬学研究科

## Development and functional evaluation of Th2-biased CD1d ligands containing modified lipid moiety

Etsuko Nabika<sup>1)</sup>, Emi Kashiwabara<sup>1)</sup>, Natsumi Hirata<sup>1)</sup>, Shinsuke Inuki<sup>1,2)</sup>, Yukari Fujimoto<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University

<sup>2)</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

### Abstract

CD1d, one of the lipid antigen-presenting proteins, binds to a glycolipid ligand and forms CD1d-ligand complex, which is recognized by NKT cells and induces the secretion of various cytokines including Th1 and Th2 cytokines. The cytokines are known to control immune responses: Th1 cytokines (e.g. IFN- $\gamma$ ) are involved in cell-mediated immunity such as tumor clearance and protection against infection, and Th2 cytokines (e.g. IL-4) are associated with humoral immunity such as allergies and promotion of antibody production. Recent studies revealed that the balance of the cytokines released by NKT cells depends on the CD1d ligand structures.  $\alpha$ -GalCer (KRN7000) is a representative ligand and has potent activity to induce both Th1 and Th2 cytokines. On the other hand, OCH is known as a Th2-selective CD1d ligand, and several clinical trials for the ligand in patients with multiple sclerosis and Crohn's disease are ongoing. However, few studies of potent Th2-selective CD1d ligands have been reported compared with Th1-selective ones, and the detailed mechanism of cytokine balance regulation remains unclear. Therefore, the development of potent Th2-selective ligands and elucidation of their biasing mechanism are required. In this article, we review the reported Th2-biased CD1d ligands and the cellular imaging with Th2-biased lipid-modified CD1d ligands for understanding of Th1/Th2 selectivity.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 43~48, 2019

**Key words** : 脂質抗原, CD1d,  $\alpha$ -GalCer, 脂質改変, Th1/Th2

### はじめに

抗原提示タンパク質である CD1d は、免疫反応にかかわる細胞のなかでも樹状細胞などの抗原提示細胞に存在し、糖脂質リガンドと結合して複合体を形成する。この複合体は、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞表面の T 細胞抗原受容体 (TCR) によって認識され、IFN- $\gamma$  のような Th1 サイトカインや、IL-4 のような Th2 サイトカインなどさまざまなサイトカインを誘導する。これらのサイトカインはそれぞれ異なる免疫反応にかかわっており、Th1 サイトカインは腫瘍排除や感染防御などの細胞性免疫、Th2 サイトカインはアレルギー性炎症や抗体産生の促進などの液性免疫にかかわることが知られている。これまでの研究から、NKT 細胞が放出するサイトカインの誘導量や選択性は CD1d リガンドの構造に影響を

受けることが明らかになってきており、免疫応答のバランスを制御し得るリガンドの創製が望まれている。

代表的な CD1d リガンドとして知られている  $\alpha$ -GalCer (KRN7000)<sup>1)</sup> は、海綿由来の糖脂質であり、Th1 および Th2 サイトカインの双方を強く誘導する。また、Wongらによって開発された  $\alpha$ -GalCer 誘導体(図1の1)<sup>2)</sup> は、アシル鎖末端にアリアル基が導入されており、Th1 選択的なサイトカイン誘導能を示すことが報告されている。一方、OCH<sup>3)</sup> は Th2 選択的な CD1d リガンドとして知られており、現在、多発性硬化症やクローン病に対する治療薬として開発が進められている。しかしながら、Th1 選択的リガンドと比較して、高活性な Th2 選択的リガンドの報告例は少なく、そのサイトカインバランス制御に関する知見は限られている。そのため、活性の高い Th2 選択的リガンドの創製や選択性発現メカニズムの解

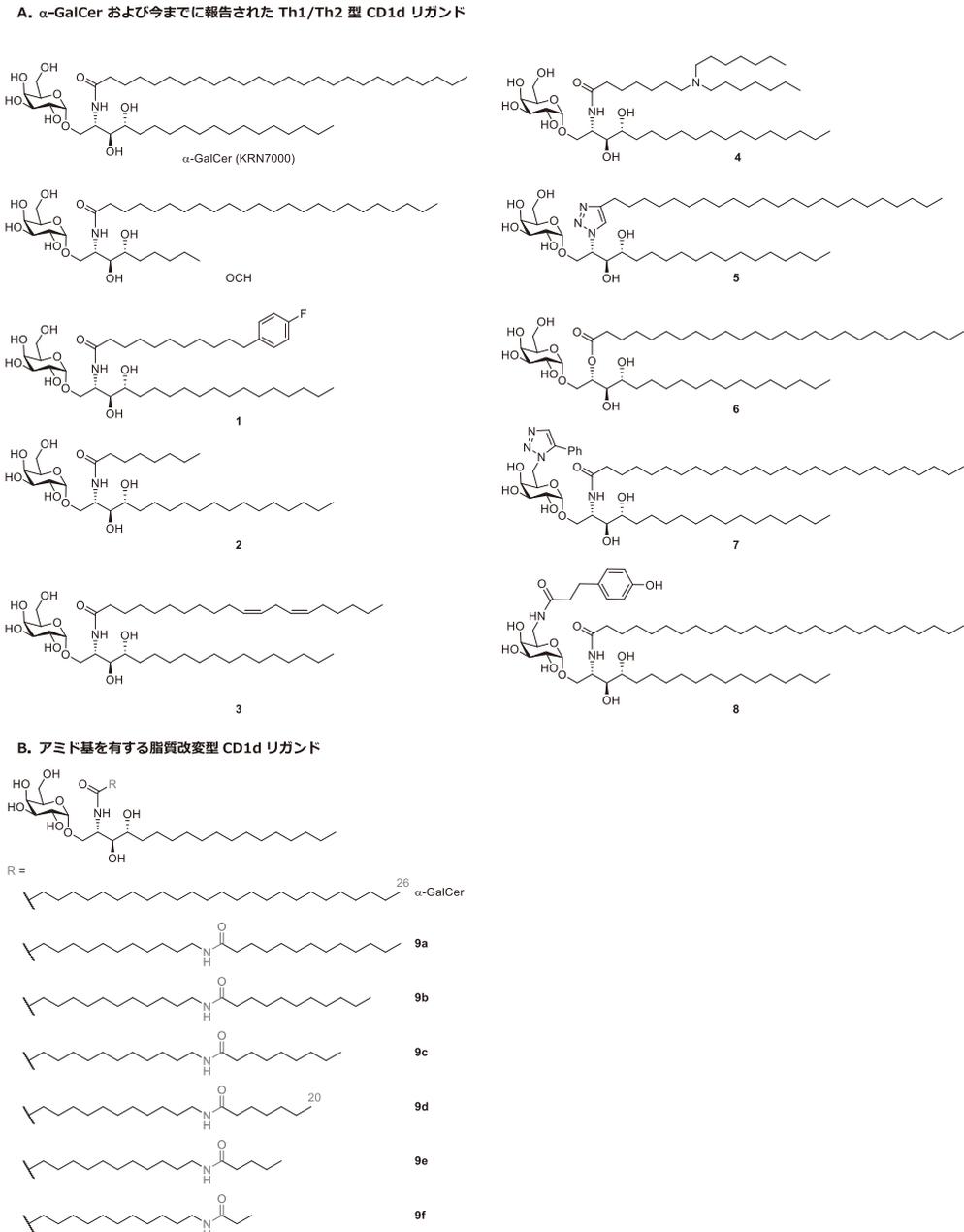


図 1  $\alpha$ -GalCer (KRN7000) およびその誘導体の構造

明は重要な研究課題である。

これまでに、いくつかのグループにより、 $\alpha$ -GalCer の構造変換が行われ、さまざまな選択性を持つ脂質改変型  $\alpha$ -GalCer 誘導体が開発されてきた。本稿では、これまでに報告されている Th2 選択的 CD1d リガンドとしての  $\alpha$ -GalCer 誘導体および Th1/Th2 選択性発現メカニズムについて概説するとともに、われわれの最近の知見を紹介する。

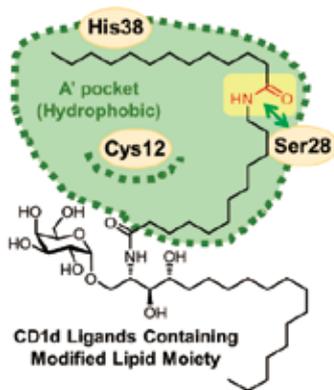
## 1. Th2 選択的 CD1d リガンド

代表的な Th2 選択的リガンドとしては、前述の OCH が知られている。Yamamura らによって開発されたこの

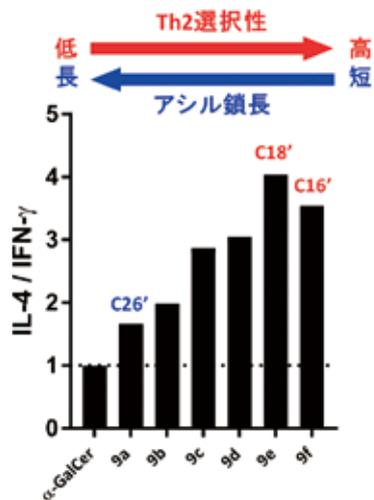
化合物は、 $\alpha$ -GalCer のスフィンゴシン鎖およびアシル鎖の鎖長を短くした誘導体であり、臨床研究が進められている。また、Goff らにより、 $\alpha$ -GalCer と比較して短いアシル鎖を持つリガンド (図 1 の 2)<sup>4)</sup> が報告されているほか、Yu らによって、短いアシル鎖に不飽和結合が導入されたリガンド (図 1 の 3)<sup>5)</sup> も見出されており、どちらも Th2 選択的なサイトカイン誘導活性を有することが報告されている。しかし、アシル鎖長を短くすると Th2 選択性が向上する反面、CD1d との結合親和性が低下し、サイトカイン誘導活性が大幅に低下することが知られている。

また、他の構造変換を行った例として、アシル鎖中に

## A. CD1d の疎水性ポケット



## B. マウス脾臓細胞を用いた Th1/Th2 サイトカイン誘導バランスの評価



## C. AlphaScreen を用いたリガンドと CD1d の結合能評価

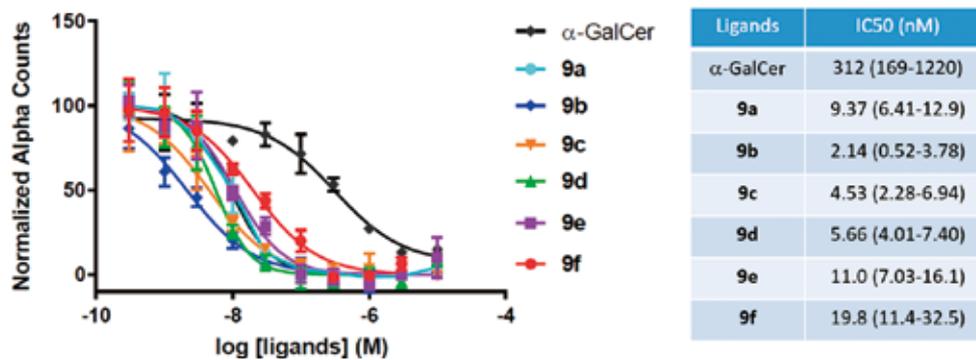


図 2 CD1d の疎水性ポケット, マウス脾臓細胞を用いた Th1/Th2 サイトカイン誘導バランスの評価, AlphaScreen を用いたリガンドと CD1d の結合能評価

Reprinted by permission from RightsLink : John Wiley and Sons, *Angewandte Chemie International Edition*, Potent Th2 Cytokine Bias of Natural Killer T Cell by CD1d Glycolipid Ligands : Anchoring Effect of Polar Groups in the Lipid Component, Shinsuke Inuki ; Emi Kashiwabara ; Natsumi Hirata ; Junichiro Kishi ; Etsuko Nabika ; Yukari Fujimoto, Copyright © 2018 [一部改変]

ジアルキルアミノ基を導入したりガンド (図1の4)<sup>6)</sup>や、アミド基を1,2,3-トリアゾール基 (図1の5)<sup>7)</sup>やエステル基 (図1の6)<sup>8)</sup>に変換したりガンドについても、Th2型のサイトカイン産生を誘導することが明らかになっている。

また、セラミド部位の変換のみならず、ガラクトースの6位を修飾したTh2選択的CD1dリガンドも開発されており、Jervisらはトリアゾール (図1の7)<sup>9)</sup>を、Huらは $p$ -ヒドロキシフェニルプロピオニルアミド (図1の8)<sup>10)</sup>を導入した誘導体を報告している。

## 2. アミド基を有する脂質改変型CD1dリガンド

われわれは最近、CD1dの疎水性ポケット中に存在するSer28に着目し、この極性アミノ酸残基と水素結合を介して相互作用可能なアミド基を $\alpha$ -GalCerのアシル鎖に導入することで、大幅にサイトカイン誘導活性が向上することを見出した (図2A)<sup>11)</sup>。とくに、アシル鎖長を短くした $\alpha$ -GalCer誘導体にアミド基を導入することで、Th2選択性を有しつつもCD1dとの結合親和性が高いリ

ガンドが得られ、これまでに報告例が少ない特異な活性を持つCD1dリガンドとなることを報告している (図1の9d)。

われわれが開発したアミド基含有リガンド9a-fのTh1/Th2サイトカイン誘導バランスの評価として、マウス脾臓細胞を用いたサイトカイン誘導アッセイを行った。INF- $\gamma$ およびIL-4を定量し、その比率をTh1/Th2選択性の指標としたところ、アシル鎖長が短くなるにつれてTh2選択性が向上する傾向が示唆された (図2B)。

また、AlphaScreen<sup>TM</sup> (PerkinElmer Life Sciences) を用いて各リガンドのCD1dとの結合親和性を評価した結果、アミド基を持つ9b-fは $\alpha$ -GalCerよりも強くCD1dと結合し、そのなかでも9b-dは高い結合親和性を有することが分かった (図2C)<sup>12)</sup>。

## 3. Th1/Th2 選択性発現メカニズム

先述したように、さまざまなグループによりTh2選択的リガンドの開発が行われているが、その選択性発現メカニズムについてはいまだに明らかになっていない部分

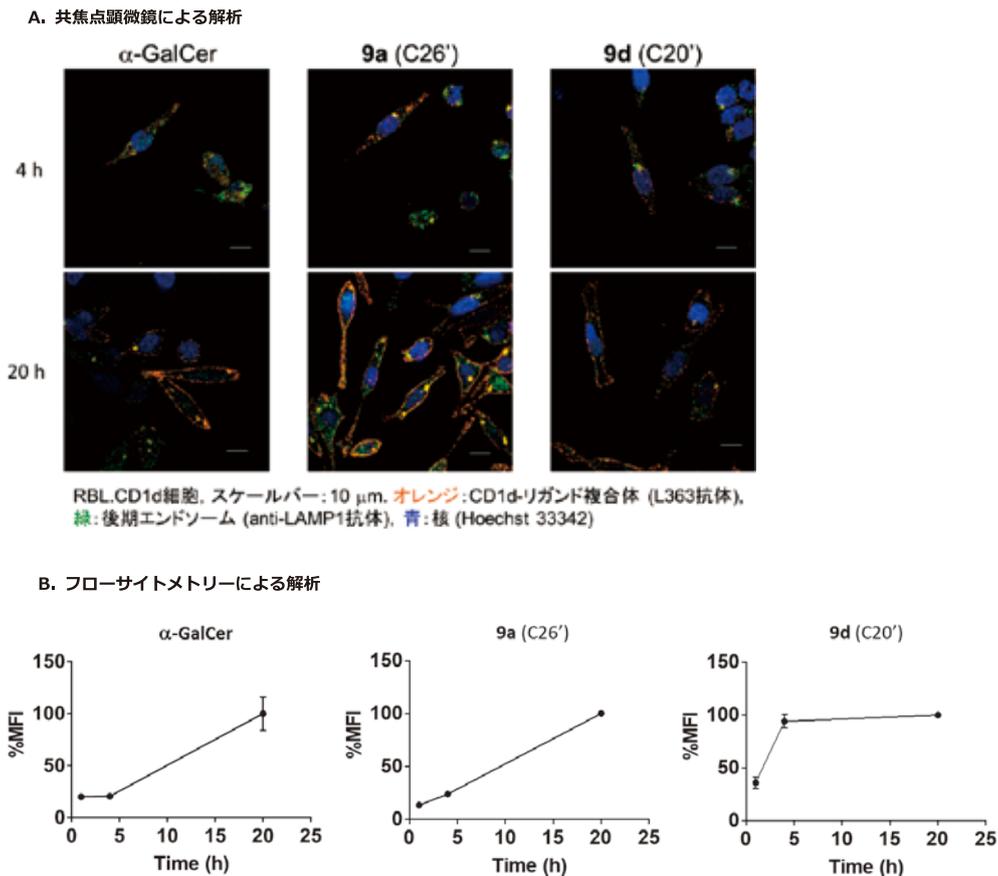


図 3 リガンド-CD1d 複合体の細胞内挙動解析

Reprinted by permission from RightsLink : John Wiley and Sons, Angewandte Chemie International Edition, Potent Th2 Cytokine Bias of Natural Killer T Cell by CD1d Glycolipid Ligands : Anchoring Effect of Polar Groups in the Lipid Component, Shinsuke Inuki ; Emi Kashiwabara ; Natsumi Hirata ; Junichiro Kishi ; Etsuko Nabika ; Yukari Fujimoto, Copyright © 2018 [一部改変]

が多い。Th1/Th2 選択性を説明するメカニズムとして、現在までにいくつかの説が提唱されており、Wong らは、CD1d との結合が強いリガンドは Th1 選択的であると考察している<sup>2)</sup>。一方 Porcelli らは、CD1d リガンドは 2 つの経路で CD1d に結合し、その経路の違いによりサイトカインのバランスがコントロールされるという説を唱えており、Th2 選択的なりガンドは細胞表面上の CD1d に直接結合すると提唱している<sup>13)</sup>。

しかし、前項で述べたように、われわれが開発したアミド基含有リガンド **9d** は CD1d との結合親和性が高いものの Th2 選択的なりガンドであり、Wong らの報告とは異なる結果を示している。また、Th2 選択的かつ高活性な CD1d リガンドの報告例は少なく、Th1/Th2 選択性と細胞内挙動との関連性を示す研究は限られている。そこでわれわれは、Th1/Th2 選択性発現メカニズムの解明を目指し、開発したアミド基含有 CD1d リガンドを用いたリガンド-CD1d 複合体の細胞内挙動解析に着手した。

#### 4. リガンド-CD1d 複合体の細胞内挙動解析<sup>12)</sup>

まず、共焦点顕微鏡を用いた観察を行った。CD1d を高発現させた RBL CD1d 細胞に対してリガンドを添加し、4 時間または 20 時間培養した後、リガンド-CD1d 複合体を認識する L363 抗体を用いて染色し、観察した。その結果、長いアシル鎖を持つ  $\alpha$ -GalCer や **9a** の場合、リガンド-CD1d 複合体 (図 3A, 橙色) は 20 時間後においてのみ細胞表面に観察されたのに対し、アシル鎖長の短い **9d** では、4 時間後の時点で細胞表面に複合体の局在が観察された。

同様の現象は、フローサイトメトリーを用いた解析でも観察された。すなわち、RBL CD1d 細胞にリガンドを添加し、L363 抗体を用いて、各時間における細胞表面上の複合体を定量した。その結果、アシル鎖長の長い  $\alpha$ -GalCer や **9a** では時間経過とともに徐々に細胞表面上の複合体が増加したのに対し、アシル鎖長の短い **9d** では、より早い時間において最大値に到達することが示された (図 3B)。

これらの結果から、Th2 選択的な短鎖のアミド基含有リガンド **9d** は細胞表面上の CD1d に直接結合することが推測された。これは Porcelli らの説と一致する結果であり、Th1/Th2 選択性はリガンドの細胞表面への提示の速さに影響を受けることが見出された。

#### 5. CD1d リガンドの細胞内挙動解析

さらに、CD1d リガンド自体の挙動についても観察するため、蛍光基を導入した脂質改変型 CD1d リガンドを合成した。それらを RBL CD1d 細胞に添加し、共焦点顕微鏡を用いたライブセルイメージングを行った結果、アシル鎖の違いによってリガンド自体の細胞内での挙動が

異なることが分かった。とくに、Th2 選択的である **9d** の蛍光標識体は細胞膜上への局在が速く、細胞膜上への局在が速いリガンドは Th2 選択的であることが示唆された。

#### おわりに

われわれは、Th2 選択的かつ高活性な CD1d リガンドを開発し、リガンドの細胞表面への提示速度が Th1/Th2 選択性に影響を与えることを見出した。これらのリガンドの開発により、Th1/Th2 選択性発現メカニズムの解明が進展し、選択性をコントロールすることで自己免疫疾患などの治療薬やワクチンアジュバントの開発へとつながることが期待される。

#### 文 献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T : A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413 : 531-534, 2001
- 4) Goff RD, Gao Y, Mattner 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
- 5) 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 U S A* 102 : 3383-3388, 2005
- 6) Baek DJ, Lee YS, Lim C, et al. : Rational design and evaluation of a branched-chain-containing glycolipid antigen that binds to CD1d. *Chem Asian J* 5 : 1560-1564, 2010
- 7) Lee T, Cho M, Ko SY, et al. : Synthesis and evaluation of 1,2,3-triazole containing analogues of the immunostimulant alpha-GalCer. *J Med Chem* 50 : 585-589, 2007
- 8) Shiozaki M, Tashiro T, Koshino H, et al. : Synthesis and biological activity of ester and ether analogues of alpha-galactosylceramide (KRN7000). *Carbohydr Res* 345 : 1663-1684, 2010
- 9) Jervis PJ, Graham LM, Foster EL, et al. : New CD1d agonists : synthesis and biological activity of 6"-triazole-substituted  $\alpha$ -galactosyl ceramides. *Bioorg Med Chem Lett* 22 : 4348-4352, 2012

- 10) Hu L, Zhao C, Ma J, et al. : Design, synthesis, and evaluation of  $\alpha$ -galactopyranosylceramide mimics promoting Th2 cytokines production. *Bioorg Med Chem Lett* 29 : 1357-1362, 2019
- 11) 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
- 12) Inuki S, Kashiwabara E, Hirata N, et al. : Potent Th2 Cytokine Bias of Natural Killer T Cell by CD1d Glycolipid Ligands : Anchoring Effect of Polar Groups in the Lipid Component. *Angew Chem Int Ed Engl* 57 : 9655-9659, 2018
- 13) 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