

# TLR7 リガンド複合体の合成と免疫増強活性

若尾 雅広<sup>1)</sup>, 新地 浩之<sup>1)</sup>, 馬場 暁士<sup>1)</sup>, Michael Chan<sup>2)</sup>, 林 公子<sup>2)</sup>,  
Howard B. Cottam<sup>2)</sup>, Dennis A. Carson<sup>2)</sup>, 隅田 泰生<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大学大学院理工学研究科, <sup>2)</sup>カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター

## Synthesis and immunostimulatory activity of TLR7 ligand conjugate

Masahiro Wakao<sup>1)</sup>, Hiroyuki Shinchi<sup>1)</sup>, Akihito Baba<sup>1)</sup>, Michael Chan<sup>2)</sup>, Tomoko Hayashi<sup>2)</sup>,  
Howard B. Cottam<sup>2)</sup>, Dennis A. Carson<sup>2)</sup>, Yasuo Suda<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

<sup>2)</sup>Moore's Cancer Center, University of California, San Diego

### Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane proteins classified into pattern recognition receptors (PRRs). TLRs are found in cell surface and/or endocytic vesicles in immune cells. TLRs activate innate immunity by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) derived from bacteria and viruses and damage-associated molecular patterns (DAMPs) produced by damaged tissue. The activation of innate immunity induces adaptive immunity that plays an important role in the host defense against pathogenic infection. On the other hand, abnormal activation of innate immunity causes immune disorders such as autoimmune disease. Therefore, TLRs are important molecules in the immune system. So far, 10 types of TLRs (TLR1 to TLR10) in humans and 12 types of TLRs (TLR1 to TLR9, TLR11 to TLR13) in mice have been found. TLR1, TLR2, TLR4, and TLR6 are found on the cell surface, and TLR3, TLR7, TLR8, and TLR9 are found in the endosomal compartment. Each TLR recognizes specific PAMPs and DAMPs; lipopeptides for TLR1/2 and TLR2/6; nucleic acid structures for TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9; lipopolysaccharide (LPS) structures and heat-shock proteins for TLR4. In recent years, various ligands activating TLRs signal have also been chemically synthesized and have been utilized as effective adjuvants in antiviral and anticancer therapy. Regarding TLR7 ligand (TLR7L), conjugates with peptides, polymers, proteins, glycans, and nanoparticles have attracted much attention because they have great potencies on the humoral and cellular immune response. In this paper, we describe recent progress in the synthesis and biological property of TLR7 ligand conjugate containing our recent study.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 28~33, 2020

**Key words** : Toll-like receptor, TLR7, conjugate, immunostimulant

### はじめに

Toll様受容体 (Toll-like receptors : TLRs)<sup>1)</sup>は、パターン認識受容体 (pattern recognition receptor : PRRs) に分類される膜貫通型タンパク質で、自然免疫を活性化する受容体の一つとして知られる。TLRsは、主に免疫細胞にみられ、ウイルスやバクテリアなどの病原体由来の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) や、自己細胞の損傷などによって生じる内因性の分子パターン (damage-associated molecular patterns : DAMPs) を認識することで自然免疫を活

性化する。自然免疫の活性化は、獲得免疫を誘導し、病原体などの異物を排除する生体防御において重要な役割を担う。一方、異常な自然免疫の活性化は、自己免疫疾患などの免疫異常を引き起こすため、TLRsは免疫システムにおいて重要な分子として捉えられている。

TLRsは、これまでに、ヒトでは10種類 (TLR1からTLR10)、マウスでは12種類 (TLR1からTLR9, TLR11からTLR13) が明らかにされている。TLR1, TLR2, TLR4, TLR6は細胞表層に、TLR3, TLR7, TLR8, TLR9は細胞内オルガネラの小胞体 (ER) やエンドソームにみられ、それぞれのTLRは特定のPAMPs, DAMPs

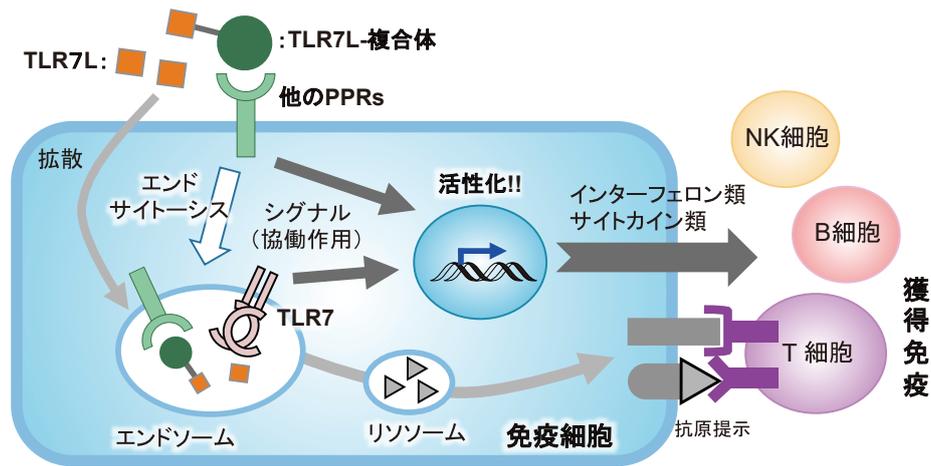


図1 TLR7のシグナル伝達経路

を認識する。すなわち、TLR1/2, TLR2/6 はリポペプチド構造を、TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は核酸構造を、TLR4 は細菌由来のリポ多糖構造や熱ショックタンパク質などを認識する。近年、合成化学的手法によってもTLRに作用するさまざまなリガンド分子 (TLR-L) が開発されており、これらを活用した抗ウイルス療法や抗がん療法が注目されている<sup>2)</sup>。TLR7のリガンド分子 (TLR7L) においては、ペプチド鎖やポリマー、タンパク質、糖類、ナノ粒子などとの複合体化が、抗体産生などの免疫応答を大きく増強できることから、感染症やがんなどのワクチン開発において有用なアジュバントとして期待されている。本稿では、TLR7 リガンド複合体に焦点をあて、最近の研究について概説する。

## 1. TLR7のシグナル伝達

TLR7は、細胞内小胞であるERやエンドソームに局在しており、病原体由来の一本鎖RNA (ssRNA) を認識し二量化することで活性化される。TLR7の活性化は、アダプタータンパク質であるMyD88を介してNF- $\kappa$ BまたはIRF7に作用し、炎症性サイトカインやI型インターフェロン類の産生を誘導する (図1)。これらのサイトカインやインターフェロン類は、NK細胞やT細胞などの他の免疫細胞を活性化し、獲得免疫を誘導する。TLR7は細胞内小胞に局在するため、TLR7を効果的に活性化するためには、TLR7Lの細胞内小胞への輸送が重要である。薬物輸送システム (DDS) で応用されている、細胞の食作用の一つであるエンドサイトーシスを介した輸送は、TLR7Lの輸送においても有用であり、細胞接着分子との複合体化やナノサイズ効果などを利用したTLR7L複合体の設計が行われている。PRRsの一つであるC型レクチン受容体 (C-type lectin receptors : CLR) に認識されるリガンドとの複合体化は、複数のPRRsを共刺激する病原体ミメティック分子であり、シグナルのクロストーク (協働作用) による免疫増強が期待される。

またペプチドやタンパク質などの抗原との複合体化は、TLR7の刺激に加え、抗原提示が可能になるため、セルフ・アジュバント機能による免疫増強が期待される。

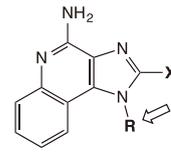
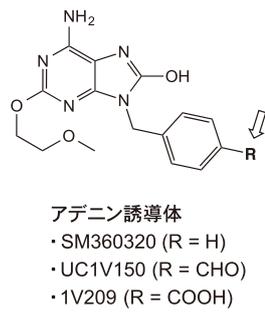
## 2. TLR7L複合体

これまでに低分子化合物のTLR7Lとして、抗ウイルス、抗がん薬として使われているイミダゾキノリン類 (イミキモド<sup>3)</sup>、レシキモド<sup>4)</sup>: TLR8活性も有する)をはじめ、グアノシン骨格を持つロキソリビン<sup>5)</sup>やアデニン様骨格を持つSM360320<sup>6)</sup>、UC-1V150<sup>7)</sup>、1V209<sup>8)</sup>などが開発されている (図2)。これらのTLR7Lは、アゴニスト作用を保持させたまま複合体化が可能で、置換基Rにアミノ基やカルボキシル基などの種々の官能基を導入し、脂質や糖質、ペプチド、タンパク質、ポリマーなどと縮合することによって、さまざまな複合体が合成できる。これらの複合体では、複合体化していないTLR7Lに比べ、生理条件下での薬物動態の改善による全身性炎症反応の低減、免疫応答の増強などが報告されている<sup>9)</sup>。例えば、TLR7Lとアルブミンなどのタンパク質複合体では、TLR7Lの免疫刺激活性を10倍から100倍程度増強することが報告されている<sup>8)</sup>。また、pH応答性ポリマーやアルブミン結合性ポリマーとの複合体では、リンパ節選択的な輸送とがん組織周辺での免疫細胞の活性化が達成されている<sup>9)</sup>。さらに、がん抗原ペプチドとの複合体では、複合体のサイズを制御することによって、細胞性免疫の誘導とがん細胞の増殖抑制ができることが報告されている<sup>10)</sup>。

## 3. TLR7L-糖鎖複合体

糖鎖は、すべての細胞上に発現しており、細胞接着やタンパク質輸送に関与する。免疫細胞においては、CLRなどの受容体を介して病原体などの異物糖鎖の認識に関与する。免疫細胞に特異的に結合する糖鎖は、TLR7Lを免疫細胞へ選択的に輸送するための有用なキャリアとな

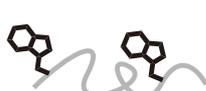
## TLR7に結合するリガンド(TLR7L)



## イミダゾキノリン類

- ・イミキモド (R = , X = H)
- ・レシキモド (R = , X = エトキシエチル)
- ・N1-ベンジル誘導体 (R = アミノメチルベンジル, X = ブチル)

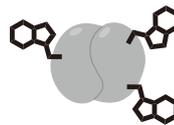
## TLR7L 複合体



- ポリマー複合体  
・PEG  
・糖類  
・ポリ乳酸



- ポリマーナノ粒子複合体  
・ブロックコポリマー  
・ポリペプチド



- タンパク質複合体  
・アルブミン  
・糖タンパク



- ナノ粒子複合体  
・シリカゲル粒子  
・リポソーム  
・金属ナノ粒子

TLR7L

図 2 TLR7L および TLR7L 複合体

ることから、TLR7Lと糖鎖とを複合化したワクチンアジュバントの開発が進んでいる。TLR7Lとデキストランなどの多糖との複合体では、元のTLR7Lに比べ、免疫増強活性の大きな向上がみられた<sup>11)</sup>。また、マンノースを固定化した金ナノ粒子との複合体では、免疫増強活性に加え、抗体産生などの液性免疫の向上がみられた<sup>12)</sup>。さらに、マンノースを複合化したTLR7L-抗原タンパク質複合体においては、セルフ・アジュバント活性により効果的に抗原提示が行われ、液性免疫と細胞性免疫が向上することが報告されている<sup>13)</sup>。一方、キャリアとして用いる糖鎖の構造やサイズについては、免疫細胞の活性化にどのように関与しているかほとんど分かっていない。本節では、低分子量から中分子量の糖鎖を持つ糖鎖複合体の免疫増強作用<sup>14)</sup>について紹介する。

### 3-1. TLR7L-糖鎖複合体の合成

TLR7Lには1V209を用い、糖鎖成分には市販のグルコサミンやガラクトサミン、3A-アミノシクロデキストリン(CD)類、また簡便に合成できる単糖と二糖のアミノ糖、6A-アミノCD類を使用した。TLR7L-糖鎖複合体は図3に示す経路で合成した。1V209とアミノ糖の複合体化は、HATUを用いたアミド化反応によって行った。合成したTLR7L-糖鎖複合体は、親水性の糖鎖の導入によって1V209に比べ高い水溶性を示した。

### 3-2. TLR7L-糖鎖複合体の免疫増強活性評価

合成した複合体の免疫増強活性は、マウスマクロファージ様細胞株(RAW264.7)、マウス骨髄由来樹状細胞(murine Bone Marrow Derived Dendritic Cells :

mBMDC)、ヒト末梢血単核細胞(human Peripheral Blood Mononuclear Cells : hPBMC)を用いて評価した。RAW細胞とhPBMCでは腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )の産生活性を、mBMDCではインターロイキン-6 (IL-6)の産生活性を指標にした。結果を図4と表1に示す。単糖成分を有する糖鎖複合体1~5では活性の向上がみられなかったが、二糖成分を導入した糖鎖複合体6, 7においては、2~4倍程度の活性の向上がみられた(図4A, B, E, F)。またCDを導入した糖鎖複合体8~13では、全体的に活性の向上が観察されたが、6位複合体8~10に比べ3位複合体11~13の活性が高かった(図4C, D, G, H)。とくに、CD複合体11においては、IL-6の産生活性において約15倍の増強がみられた。糖鎖の構造とサイズによって活性の強弱があることから、細胞表面の受容体を経由して取り込まれると考えられる。続いて、糖鎖構造の異なる単糖複合体1, 二糖複合体6, CD複合体11を用いて、hPBMCでのTNF- $\alpha$ 産生能を評価した。その結果、CD複合体11が1V209に比べ3倍のTNF- $\alpha$ 産生能を持つことがわかった(図4I)。

次に、TLR7L-糖鎖複合体の活性の増強がエンドソーム移行性に起因するか調べるため、エンドサイトーシスを阻害するサイトカラシンDを用いて活性評価を行った。糖鎖複合体には単糖複合体3, 二糖複合体6, CD複合体11を用いた。細胞には、RAW細胞を用いた。免疫増強活性は、サイトカラシンD存在下、または非存在下でTNF- $\alpha$ 産生量を指標にEC<sub>50</sub>値で評価した。結果を表2に示す。糖鎖複合体では、サイトカラシンDの添加により、EC<sub>50</sub>値が大きくなり活性化能が低下することがわかった。とくに、糖鎖構造が大きいCD複合体11では活



性が大きく低下した。一方、複合体化していない 1V209 では、サイトカラシン D の添加の有無にかかわらず同程度の  $EC_{50}$  値を示した。本結果から、1V209 は受動拡散により細胞内移行し（エンドソームに移行し）TLR7 を活性化すること、また糖鎖複合体は、エンドサイトーシスを介してエンドソームに移行し TLR7 を活性化すると考えられる。

### 3-3. TLR7L-糖鎖複合体のドッキング解析

TLR7 に対して糖鎖複合体がどのように作用するか調べるため、分子モデリングによる評価を行った（図 5）。TLR7 にはサル由来の TLR7（PDB：5GMH<sup>15)</sup> の結晶

構造を、糖鎖複合体には単糖複合体 3、二糖複合体 6 を用いた。MOE によるドッキング解析を行ったところ、どちらの複合体においても、1V209 成分は共結晶中の TLR7L であるレシキモドと同様の結合ポケットに位置し、レシキモドに類似した配向をとることがわかった。また糖鎖成分は、結合ポケットの外側に位置しており、TLR7 二量体との相互作用はほとんどみられなかった。したがって、糖鎖成分は TLR7 の二量化にはほとんど関与しておらず、活性化にも影響しないと考えられる。糖鎖複合体の免疫増強活性は、細胞表層の糖鎖結合性受容体を介してエンドサイトーシスにより、エンドソームに取り込まれ、TLR7 を活性化すると考えられる。

### おわりに

本稿では、TLR7L 複合体に焦点をあて最近の研究について紹介した。イミダゾキノリン類やグアノシン類、アデニン類の低分子 TLR7L は、他の TLR-L に比べ、簡便かつ容易で安価に複合体化が可能である。われわれはアデニン類の 1V209 を利用して、低分子量から中分子量の糖鎖を有する TLR7L-糖鎖複合体を合成し、その免疫

表 1 糖鎖複合体の免疫増強活性評価

化合物	TNF- $\alpha$		IL-6	
	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%) <sup>a</sup>	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%) <sup>a</sup>
1V209	252	100	434	100
1	234	103	239	139
2	153	83	210	139
3	230	87	198	118
4	316	115	258	118
5	252	121	303	116
6	136	157	99	159
7	80	177	110	142
8	128	126	71	127
9	287	135	153	127
10	132	97	108	130
11	57	96	27	104
12	40	106	40	113
13	107	113	56	109

<sup>a</sup>  $E_{max}$  は 1V209 を基準に算出した。

表 2 サイトカラシン D 存在下/非存在下での TNF- $\alpha$  産生活性

化合物	TNF- $\alpha$ ( $EC_{50}/\mu M$ )	
	サイトカラシン D (-)	サイトカラシン D (+)
1V209	2.15	2.11
3	0.490	0.909
6	0.277	0.585
11	0.186	1.06

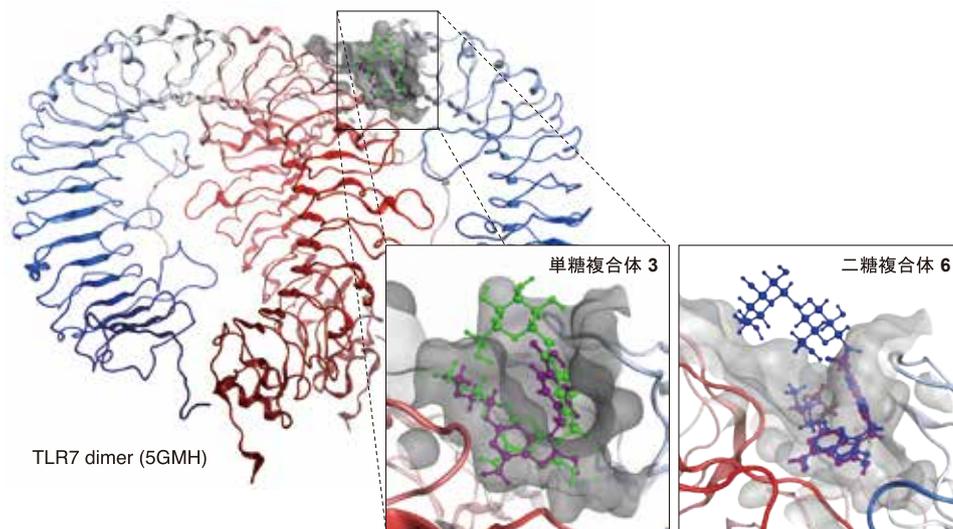


図 5 サル由来 TLR7 構造（PDB：5GMH）を用いた分子モデリング  
紫：レシキモド，緑：単糖複合体 3，青：二糖複合体 6。

増強活性を評価した。糖鎖複合体は1V209に比べ高い免疫増強活性を示した。分子モデリングでは、糖鎖部分がTLR7の二量化に関与しないことが示唆されたことから、エンドサイトーシスによるエンドソーム移行性の向上によって活性が増強すると考えられた。糖鎖複合体の作用機構の解明が今後の課題である。

## 謝 辞

本研究の一部は、「[知]の集積と活用場による研究開発モデル事業」、「公益財団法人高橋産業経済研究財団研究助成事業」、「公益財団法人米盛誠心育成会研究助成事業」の支援を受けて行われた。

## 文 献

- 1) Kawai T, Akira S : The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11 : 373-384, 2010
- 2) Ignacio BJ, Albin TJ, Esser-Kahn AP, et al. : Toll-like Receptor Agonist Conjugation : A Chemical Perspective. *Bioconjug Chem* 29 : 587-603, 2018
- 3) Dockrell DH, Kinghorn GR : Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *J Antimicrob Chemother* 48 : 751-755, 2001
- 4) Meyer T, Surber C, French LE, et al. : Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 22 : 149-159, 2013
- 5) Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, et al. : The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 sub-family. *Eur J Immunol* 33 : 2987-2997, 2003
- 6) Lee J, Wu CC, Lee KJ, et al. : Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 1828-1833, 2006
- 7) Wu CC, Hayashi T, Takabayashi K, et al. : Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 3990-3995, 2007
- 8) Chan M, Hayashi T, Kuy CS, et al. : Synthesis and immunological characterization of toll-like receptor 7 agonistic conjugates. *Bioconjug Chem* 20 : 1194-1200, 2009
- 9) Nuhn L, De Koker S, Van Lint S, et al. : Nanoparticle-Conjugate TLR7/8 Agonist Localized Immunotherapy Provokes Safe Antitumoral Responses. *Adv Mater* 30 : e1803397, 2018
- 10) Lynn GM, Sedlik C, Baharom F, et al. : Peptide-TLR-7/8a conjugate vaccines chemically programmed for nanoparticle self-assembly enhance CD8 T-cell immunity to tumor antigens. *Nat Biotechnol* 38 : 320-332, 2020
- 11) Shinchi H, Crain B, Yao S, et al. : Enhancement of the immunostimulatory activity of a TLR7 ligand by conjugation to polysaccharides. *Bioconjug Chem* 26 : 1713-1723, 2015
- 12) Shinchi H, Yamaguchi T, Moroishi T, et al. : Gold Nanoparticles Coimmobilized with Small Molecule Toll-Like Receptor 7 Ligand and  $\alpha$ -Mannose as Adjuvants. *Bioconjug Chem* 30 : 2811-2821, 2019
- 13) Wilson DS, Hirose S, Raczky MM, et al. : Antigens reversibly conjugated to a polymeric glyco-adjuvant induce protective humoral and cellular immunity. *Nat Mater* 18 : 175-185, 2019
- 14) Baba A, Wakao M, Shinchi H, et al. : Synthesis and immunostimulatory activity of sugar-conjugated TLR7 ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 30 : 126840, 2020
- 15) Zhang Z, Ohto U, Shibata T, et al. : Structural analysis reveals that Toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA. *Immunity* 45 : 737-748, 2016