

# 有機合成で挑む免疫制御

大阪大学大学院理学研究科

深瀬 浩一

免疫とは、微生物やウイルスなどの異物を認識し排除する生体防御機構であり、脊椎動物の免疫は、先天的に備わる自然免疫と抗原認識により活性化される獲得免疫からなる。自然免疫は、多細胞生物のもつ種々の自然免疫受容体（パターン認識受容体：pattern recognition receptors (PRRs)）が病原体や微生物に特徴的な分子を認識することで活性化される。一方、獲得免疫は、病原体由来の抗原を異物として記憶することで獲得される特異的な防御システムである。獲得免疫は、抗体を基盤とする液性免疫と、細胞傷害性 T 細胞などにより、異常細胞（がん細胞、ウイルス感染細胞など）を認識して殺傷する細胞性免疫からなる。有効な免疫を獲得するためには、自然免疫の活性化が必須であるが、過剰な自然免疫の活性化は、必要以上の炎症を惹起し、さらに免疫カスケードが制御不能となり、サイトカインストーム、敗血症などの致死的な応答を引き起こす。自己免疫疾患、がん、アレルギーなどの疾患も免疫制御の不全によるものである。

免疫の基盤は、自己と非自己ならびに変性自己（がん細胞、ウイルス感染細胞など）の分子認識である。従って、分子レベルで起きていることは化学現象そのものである。我々は、有機合成の力によって、免疫系に働きかける分子を合成し、それらを用いて免疫系を解析し、さらにはその成果を医療への応用に展開するべく、研究を行ってきた。本稿ではその一部を紹介したい。

## 1. 免疫制御分子の創製：リポド A 由来アジュバントの開発

免疫システムを利用した医薬品としてワクチンがある。ワクチンは、病原体由来の抗原を主成分とする生物製剤であり、抗原に対する免疫応答を誘導して記憶することにより、特定の病原体に対する抵抗性を高める。

生ワクチン、死菌ワクチン（細菌）、不活化ワクチン（ウイルス）などは病原体由来の自然免疫活性化物質が含まれており、それらは抗体産生を増強させるアジュバントとして働く（アジュバント：ワクチンの効果（免疫原性）を高めるために使用される物質）。mRNA ワクチンにおいては、自然免疫活性化能は抑制されるようにデザインはされているが、十分なアジュバント能を有しており、炎症を惹起するのはよく知られている通りである。

一方、ワクチンの安全性を向上させるために、精製抗原ワクチンや有効成分を取り出したコンポーネントワクチンが開発されてきた。抗原の投与のみでは有効な免疫応答を惹起できないことから、これらのワクチンには、抗原とともにその効果を高めるアジュバントが含まれている。近年、様々な自然免疫活性化物質をアジュバントとして用いる試みが進められている。しかしながら、多くの自然免疫活性化物質は有用なアジュバント作用に加え強い炎症惹起作用に代表される副作用を有するものが多いため、適切な免疫制御を行える分子が必要とされる。

筆者の研究室では、自然免疫を活性化する免疫増強物質について、合成と機能研究を進めてきた。例えば、グラム陰性菌の産生する複合糖質リポ多糖について、活性

本体であるリポド A を合成して、受容体 TLR4/MD-2 複合体との詳細な相互作用解析研究を可能とした<sup>1)</sup>。リポ多糖は、代表的な自然免疫受容体リガンドであり、内毒素としてよく知られており、極めて強い免疫刺激活性を示す一方で、強力な炎症惹起作用を有する。我々はリポド A の構造活性相関研究を行い、TLR4/MD-2 シグナルの制御が可能であることを明らかにしてきた。大腸菌リポド A (1) は TLR4/MD-2 の 2 量体化を促進し、強力な免疫増強作用と炎症惹起作用を有する (図 1)。アシル基の数が 4 本のリポド IVa (2) はヒト TLR4/MD-2 に結合して 2 量体化を阻害することによりアンタゴニスト作用を示す。一方 1 位リン酸を欠くモノホスホリルリポド A (MPL) (3) の 2 量体化能は低下し、TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生はマイルドになる。MPL (4) も同様に活性はマイルドになるが、3 とは異なったサイトカイン誘導パターンを示す<sup>2)</sup>。一方、グラクソ・スミスクライン社は、サルモネラ菌リポド 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た 3D-MPL (5) を開発した<sup>3)</sup>。3, 5 とともに抗ウイルス作用を誘導する IFN- $\beta$  産生能は保たれており、5 とアルミニウム塩の混合剤である AS04 は、子宮頸がん予防ワクチンであるヒトパピローマウイルス (HPV) ワクチン Cervarix ならびに HBV ワクチン (Fendrix) のアジュバントとして用いられている。

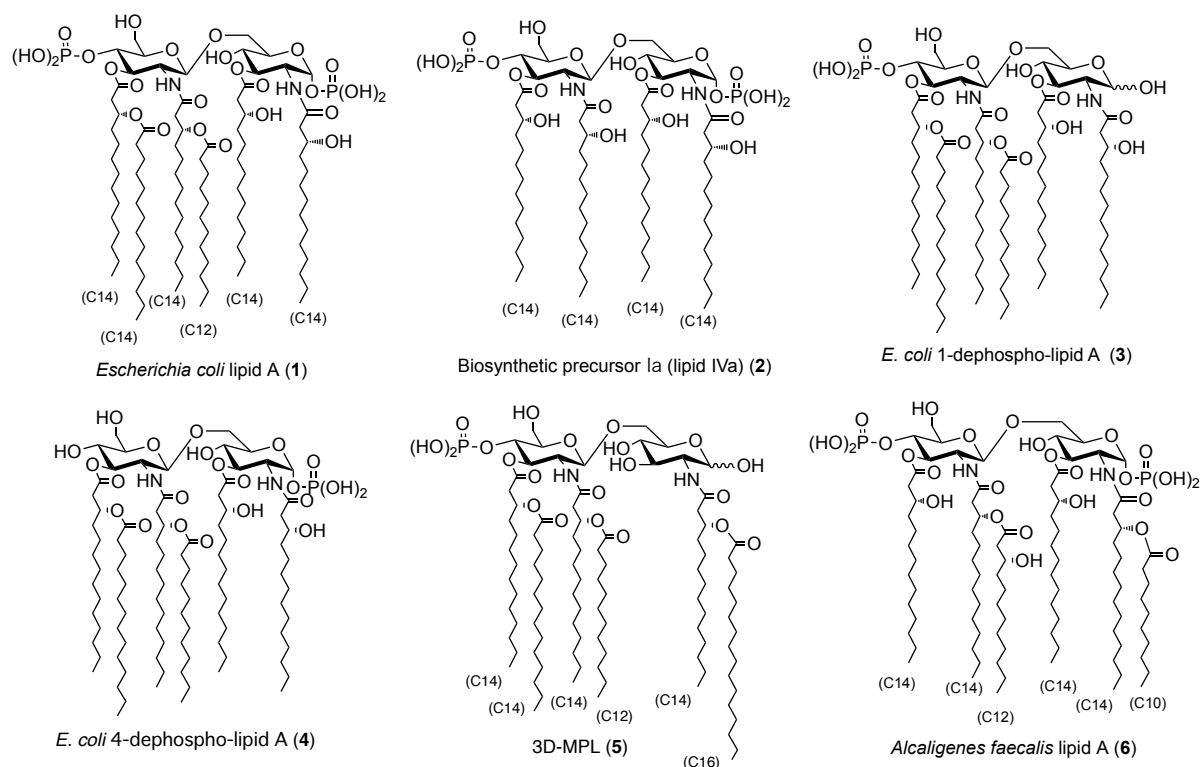


図 1. 様々なリポド A と誘導體

リポド A の活性発現・制御には、親水性部と疎水性部の体積の微妙なバランス、疎水部と酸性官能基の空間配置が重要で、構造修飾により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。このことは様々なリポド A 誘導體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が、活性の予測は容易ではない。そこで、我々は、共生菌の中には宿主の自然免疫システムを適度に活性化して、免疫調節を行えるものがあると考え

た。清野、國澤らは、*Alcaligenes* 属が、腸管における免疫組織であるパイエル板の樹状細胞内に共生することを見出した。我々は、清野、國澤らとの共同研究により、*Alcaligenes faecalis* 由来のリポ多糖は、TLR4/MD-2 を介して温和な免疫増強作用を示し、粘膜免疫の代表格である IgA 産生応答を誘導するが、ほとんど炎症を惹起しないことを見出した<sup>4)</sup>。続いて Molinaro らと協力して、*A. faecalis* リポ多糖ならびにそのリポド A (6) の構造解析を行い、さらに 6 の全合成を行なって (図 2)、リポド A が活性中心であることを確定させた<sup>5)</sup>。

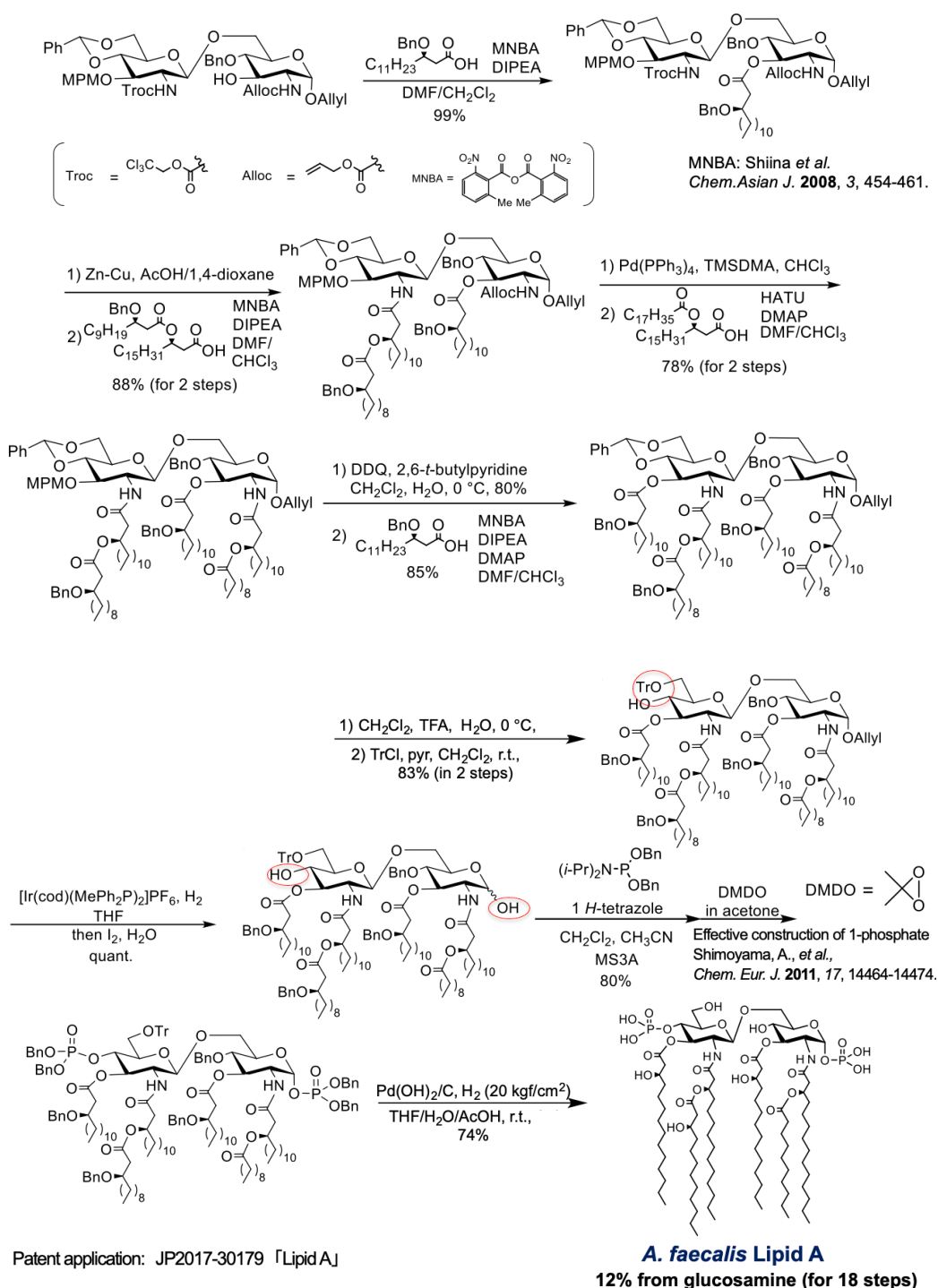


図 2. *A. faecalis* lipid A の合成

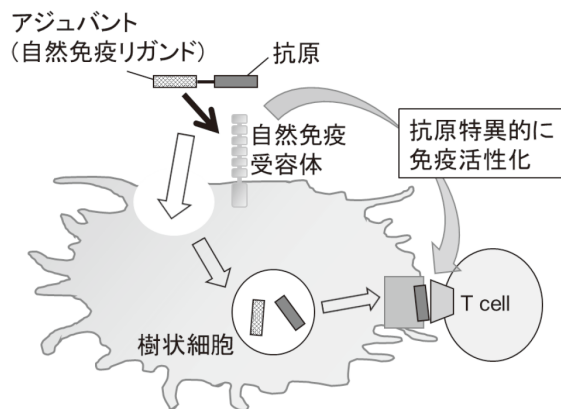
さらに、化学合成した **6** について、アジュバントとして用いた際の免疫系に対する作用を調べた結果、以下のようなアジュバントとしての優れた効果が示された<sup>6,7)</sup>。

- 注射型と経鼻ワクチンの両方に使用可能である
- IgG 抗体や分泌型 IgA 抗体だけではなく、Th17 細胞も誘導できる
- 炎症などの副反応が少なく、安全性に優れている
- 単一化合物の化学合成品であるため、天然由来の不純物を含まない

なお *A. faecalis* リピド A の合成技術は、株式会社ペプチド研究所に導出され、研究用試薬として販売されており、アジュバントとしての実用化が促進されると共に、研究用試薬としてワクチンやアジュバント研究への貢献が期待される。

## 2. セルフアジュバンティングワクチンの開発

ワクチン開発の新たな戦略としてセルフアジュバンティングストラテジーに注目した。既存のワクチンが、抗原と免疫アジュバントの混合物であるのに対して、セルフアジュバンティングワクチンは、共有結合（あるいは物理的な会合）により連結した抗原-アジュバント複合体を用いる。抗原-アジュバント複合体は、自然免疫リガンドを介して抗原提示細胞に取り込まれ、アジュバントが免疫系を活性化することでサイトカインの産生を誘導し、効率的な抗体産生を誘導する。また本手法では、化学的に均一な抗原-アジュバント複合体を供給可能である。この点は高品質製品の生産を可能とし、その品質管理を容易にするものである。



Sialyl-Tn (STn) 抗原はムチンタンパク質由来のがん関連糖鎖抗原 (TACA) であり、乳がん、肺がん、大腸がん、胃がん、卵巣がんなどに高発現しているが、正常細胞にはほとんど発現していない。そこで STn をキャリヤタンパク質である KLH に複合化した Theratope が転移性乳がんのワクチンとして開発されたが、第 III 相臨床試験において十分な効果が認められなかった。Theratope 投与患者には、STn を認識する抗体や KLH を認識する抗体は多量に誘導されたがムチンを認識する抗体はわずかであった。

我々は、自然免疫受容体 TLR2 のリガンドであるリポペプチドをアジュバントとして利用した STn がんワクチンの開発に取り組んだ<sup>8)</sup>。STn 構造が 3 残基連続して配列した TriSTn は膵がんや卵巣がんを高発現しているため、TriSTn にリポペプチドアジュバント (Pam3CSK4) と T セルエピトープを複合化したがんワクチン候補 **13** を合成した (図 3)。シアル酸の 5 位アセチル基をプロピオニル基に変換することで STn の抗原性が向上することが見出されていたので、プロピオニル修飾体 **14** も合成した。アジドシアル酸 **7** を糖供与体を用いてガラクトサミニルスレオニン誘導体 **8** とのグリコシル化を行った。我々が見出した反応性の高い ICl と In(OTf)<sub>3</sub> の組み合わせを用いて -78°C でグリコシル化を行い、目的の **9** を得た。これをアジド基を有する TriSTn **10, 11** に導いた後、銅触媒存在下でのクリック反応を行って T セルエピトープ (**12**) をカップリングさせ、さらにチオエーテルカップリングにより Pam3CSK4 (**13**) との複合化を行って **14, 15** に導いた。

得られた **14**, **15** をマウスに対して免疫したところ、天然型の TriSTn を認識する IgG 抗体が顕著に誘導された。誘導された抗体は STn モノマーも認識したが TriSTn をより強力に認識した。また得られた IgG 抗体 (抗血清) は STn を高発現したがん細胞を強く認識した。このように、TriSTn ワクチン **14**, **15** は、クラスター化 STn を発現するがん細胞を認識する抗 TriSTn IgG 抗体を誘導し Theratope の弱点を回避することに成功した。

一方で、TriSTn 抗原と、Pam3CSK4 アジュバント、T セルエピトープの混合物は全く抗体を誘導せず、Pam3CSK4 アジュバントと TriSTn 抗原の二者複合体はわずかに抗体産生を誘導した。T セルエピトープと TriSTn 抗原の二者複合体も全く抗体産生を誘導しなかった<sup>9)</sup>。

さらに TriSTn ワクチン **14** について、免疫学的解析を行った結果、**14** は炎症応答をほとんど惹起することなく、特定の抗原に対する免疫応答のみを惹起可能であることを示す結果が得られた<sup>9)</sup>。この結果はセルフアジュバンティングワクチンは、ほとんど副反応を惹起することなく、目的の抗原に対する免疫応答を誘導可能であることを示すものである。

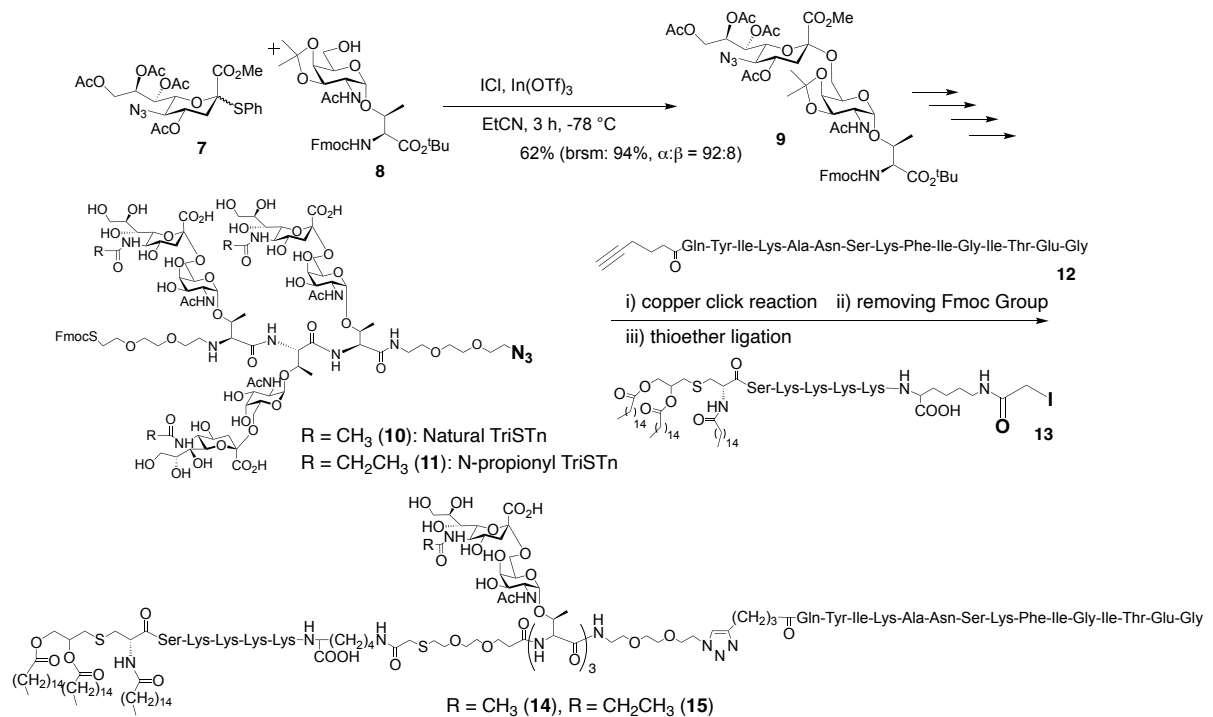


図 3. セルフアジュバンティングワクチンの合成

ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) の過剰発現は、乳がんの発生、転移、予後不良と関連しており、HER2 を標的とする抗体医薬であるトラスツズマブ(ハーセプチン)は乳がんや胃癌などの治療薬として用いられる。トラスツズマブの標的部位とは異なる部位に結合する CH401mAb 抗体は HER2 陽性ヒト腺がんに対して効率的な抗体依存性細胞傷害作用を示したことから、CH401 mAb のエピトープ (CH401 ペプチド: YQDTILWKDIFHKNNQLALT) が同定された。さらに最小エピトープとして、アミノ酸 9 残基のペプチド MFCH401 (N:165-173: DTILWKDIF) MFCH401 が予測された。そこで Pam3CSK4 を MFCH401 ならびに CH401 ペプチドに結合させたセル

フアジュバンティングワクチンを合成した。両ワクチンともに特異的な免疫応答を誘導し、HER2 を過剰発現するヒト BT474 細胞に対する抗体を効果的に誘導した<sup>10, 11)</sup>。これらの結果は、CH401 や MFCH401 が有望なエピトープであることを明確に示すとともに、セルフアジュバンティングワクチンの有用性を示すものである。

以上のように、免疫制御分子として、自然免疫シグナルを制御して温和な免疫増強作用を有するリポド A、標的とする免疫細胞を特異的に活性化するセルフアジュバンティングワクチンを開発した。現在、実用化に向けて、有効性、安全性の確認とともに、複合化ワクチンの効率的な調製法の開発に向けた検討を行っている。

ワクチンやワクチンアジュバントだけでなく、クローン病などの炎症疾患、アレルギーや自己免疫疾患など根本的な治療法が開発されていない疾患が多数あり、有機合成により様々な免疫制御分子を創製して、新たな治療法に結びつけることが望まれる。

#### 参考文献

1. Kusumoto, S.; Fukase, K.; Shiba, T. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2010**, *86*, 322.
2. Fujimoto, Y.; Shimoyama, A.; Saeki, A.; Kitayama, N.; Kasamatsu, C.; Tsutsui, H.; Fukase, K. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 987.
3. Mata-Haro, V.; Cekic, C.; Martin, M.; Chilton, P. M.; Casella, C. R.; Mitchell, T. C. *Science*, **2007**, *316*, 1628.
4. Shibata, N.; Kunisawa, J.; Hosomi, K.; Fujimoto, Y.; Mizote, K.; Kitayama, N.; Shimoyama, A.; Mimuro, H.; Sato, S.; Kishishita, N.; Ishii, K. J.; Fukase, K.; Kiyono, H. *Mucosal Immunol.* **2018**, *11*, 693.
5. Shimoyama, A.; Di Lorenzo, F.; Yamaura, H.; Mizote, K.; Palmigiano, A.; Pither, M. D.; Speciale, I.; Uto, T.; Masui, S.; Sturiale, L.; Garozzo, D.; Hosomi, K.; Shibata, N.; Kabayama, K.; Fujimoto, Y.; Silipo, A.; Kunisawa, J.; Kiyono, H.; Molinaro, A.; Fukase, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 10023.
6. Yoshii, K.; Hosomi, K.; Shimoyama, A.; Wang, Y.; Yamaura, H.; Nagatake, T.; Suzuki, H.; Lan, H.; Kiyono, H.; Fukase, K.; Kunisawa, J. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1102.
7. Liu, Z.; Hosomi, K.; Shimoyama, A.; Yoshii, K.; Sun, X.; Lan, H.; Wang, Y.; Yamaura, H.; Kenneth, D.; Saika, A.; Nagatake, T.; Kiyono, H.; Fukase, K.; Kunisawa, J. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 763657.
8. Chang, T.-C.; Manabe, Y.; Fujimoto, Y.; Ohshima, S.; Kametani, Y.; Kabayama, K.; Nimura, Y.; Lin, C.-C.; Fukase, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, *57*, 8219.
9. Chang, T.-C.; Manabe, Y.; Ito, K.; Yamamoto, R.; Kabayama, K.; Ohshima, S.; Kametani, Y.; Fujimoto, Y.; Lin, C.-C.; Fukase, K. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 18985.
10. Feng, Q.; Manabe, Y.; Kabayama, K.; Aiga, T.; Miyamoto, A.; Ohshima, S.; Kametani, Y.; Fukase, K. *Chem. Asian J.*, **2019**, *14*, 4268.
11. Aiga, T.; Manabe, Y.; Ito, K.; Chang, T.-C.; Kabayama, K.; Ohshima, S.; Kametani, Y.; Miura, A.; Furukawa, H.; Inaba, H.; Matsuura, K.; Fukase, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2020**, *59*, 17705.