

免疫調整分子 Dectin-1 のアンタゴニストである水溶性 β グルカンの集積化による免疫活性化分子の開発

名古屋工業大学 大学院工学研究科

准教授 宮川 淳

1. はじめに

多糖 β グルカンが免疫細胞の細胞膜上に存在する免疫調整分子 Dectin-1 と結合することで、免疫を活性化するメカニズムが明らかになった[1]。さらに近年、その免疫活性化に関わるサイトカインの産生が誘導されるためには、複数の Dectin-1 が β グルカンと同時に結合する必要があることが明らかになってきた(図 1)[2]。また β グルカンが Dectin-1 との結合に必要なグルコースの繰り返し単位として、6~16 残基程度であることが報告されている[3,4]。

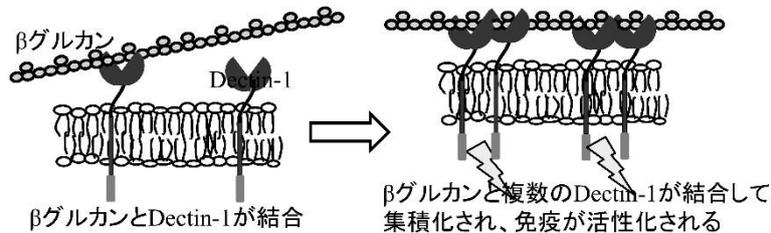


図 1. β グルカンによる免疫活性化メカニズム

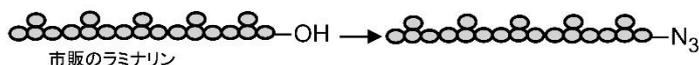
そこで本研究では、このメカニズムを利用して Dectin-1 と結合できる低分子量の水溶性 β グルカンを高分子化によって複数配列させ、 β グルカンが形成する 3 重らせん構造とは異なり、柔軟に動ける高分子鎖のため、効率よく Dectin-1 と結合することができる高い免疫活性化能を有する分子の構築を目指す。天然の β グルカンは高分子量である上に構造が不均一であり、活性化の再現性に問題がある点を解決するため、分子を構築する際に低分子量の β グルカンの配列を調整することで、複数の Dectin-1 と β グルカンが結合する箇所を細胞上に、複数作り出して高効率なサイトカインの放出を誘導し、確実な免疫活性化を可能にする。その結果、 β グルカン模倣分子に必要な構造が明らかになり、再現性の高い免疫活性化分子が構築可能になり、自己免疫による抗腫瘍活性を生み出すことを可能にする。

2. 合成設計

低分子量の β グルカンであるラミナリンの高分子への導入手法を確立する。そのため、まずラミナリンの 1 位に選択的にアジド基を導入する。その後、高分子骨格として、 β グルカンの疎水性を模倣したノルボルネンを用い、重合の検討を行う。またラミナリンのアジド基とクリック反応を行うためのプロパルギル基を高分子に導入するため、ノルボルネンカルボン酸をスクシンイミド化して活性化し、プロパルギルアミンを反応させる。そのプロパルギル基を有する高分子と、アジド基をもつラミナリンをクリック反応することで、高分子にラミナリンを導入する。このプロパルギル基の数やラミナリンの当量を検討することで、導入

量の異なる高分子が得られ、βグルカンを集積化した高分子とする(図2)。その後、免疫活性化試験を行い、βグルカンの導入量や分子量など免疫活性化に必要な分子設計を明らかにする。

1. 無保護糖に対してアジド基の導入



2. βグルカンの模倣分子の合成

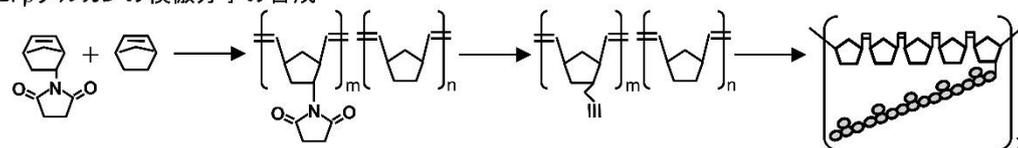


図2. βグルカンの模倣分子の合成

3. ラミナリンの精製

各メーカーから販売されているラミナリンを、透析による精製を行い、質量分析を行った。また純度の記載がないものは、透析後の回収率の検討も行い、使用する試薬の選定を行った。分画分子量1000の透析膜を用いて、一日透析を行った後、凍結乾燥を行い、重量を測定した。その結果、Nacalai、Sigma-Aldrich、TCIのラミナリンの回収率は、48、29、44%であった。SCBTのラミナリンは純度の記載があり、96%以上と高かったため、MALDI-TOF-MS測定を直接行った。その結果を図3にまとめた。

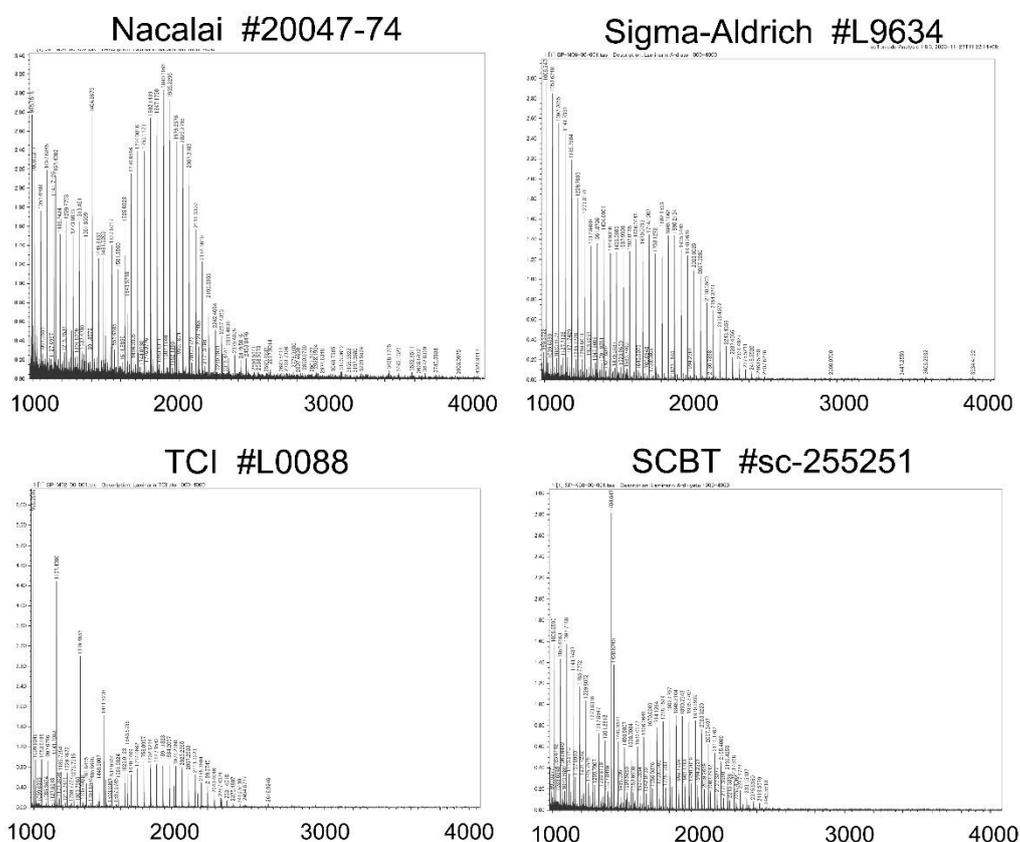
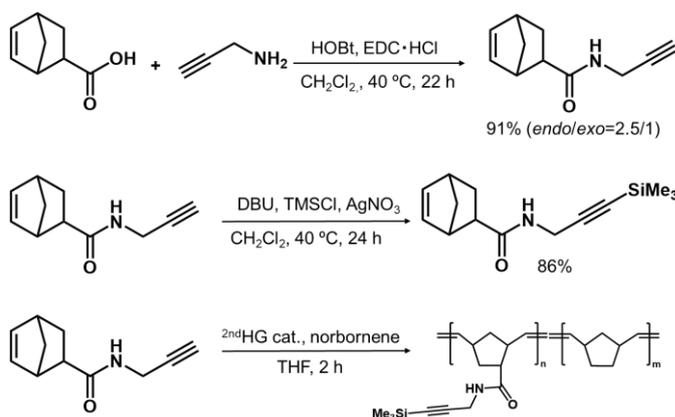


図3. 各メーカーのラミナリンの透析後のMSスペクトル

質量分析の結果から、Nalacai と SCBT は分子量が 2000 に分布の大きな山があり、その透析の回収率および販売価格から Nacalai から販売されているラミナリンを用いて、研究を進めることとした。そのため、反応に使用する前には透析操作を行い、質量分析を行ってから使用した。

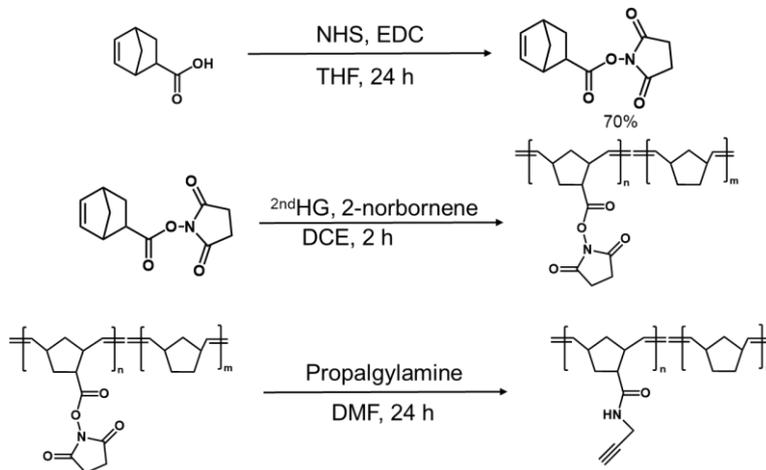
4. 高分子の合成

まずノルボルネンカルボン酸を用いて、プロパルギルアミンと反応を行い、アルキンをもつノルボルネンを収率 91%で合成した。次に重合の際にアルキンが反応しないように保護を行うため、末端にトリメチルシリル基を導入した。そのモノマーとノルボルネンの共重合を行い、条件検討を行ったが、分子量が大きく数十万となり、不溶物が多くできてしまった。そのため、架橋反応が起きていることが考えられたため、合成ルートを変更することとした。



Scheme 1. ノルボルネンモノマーの合成と重合反応

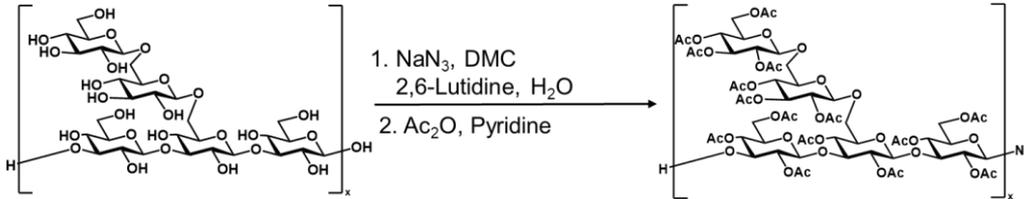
そこで、架橋反応を確実に防ぐために重合を行った後に、アルキンを導入することとした。ノルボルネンカルボン酸とヒドロキシスクシイミドを反応させ、モノマーとした。先ほどと同様にルテニウム触媒を用いて重合の検討を行った結果、数万～10万程度の分子量となった。その後、合成した高分子に対して、プロパルギルアミンを反応させることによって、アルキンの導入を行った。反応終了後、再沈殿により精製した後、NMR 測定により導入を確認することができた。この合成ルートにより高分子を合成した後、アルキンとのクリック反応によりラミナリンを導入する合成ルートに変更することとした。



Scheme 2. 高分子へのアルキンの導入

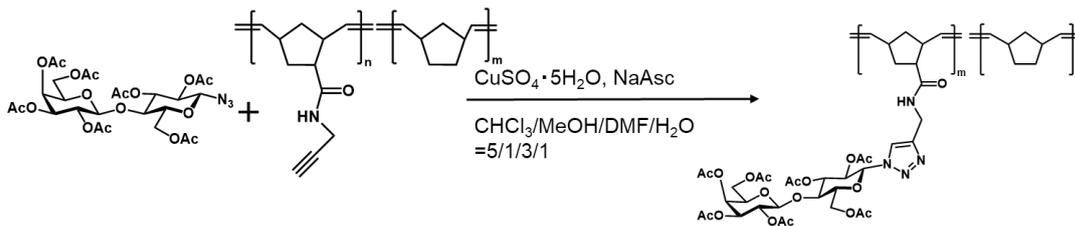
5. ラミナリンの導入反応の検討

透析を行って精製したラミナリンを用いて、1位を選択に活性化してアジド基を導入するために、縮合剤 DMC とアジ化ナトリウムを用いて反応を行った。その後、精製を行うためにアセチル化をした。精製後に得られたラミナリンを、赤外分光計により測定した結果、アジド基の存在を確認することができた。同様の方法で、ラクトースにもアジド基の導入を行った。



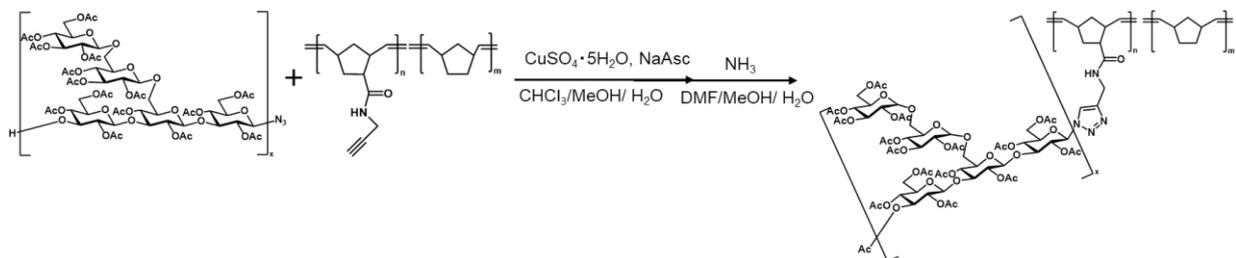
Scheme 3. ラミナリンへのアジド基の導入

まずモデル実験として、アルキンを導入した高分子に対してアジド基をもつラクトースのクリック反応を検討した。しかし、ラクトースと高分子の溶解する溶媒が異なり、その検討が必要だったが、混合溶媒を用いることで両方が溶解する溶媒を見つけることができた。その後、ラクトースの当量や銅触媒の検討を行い、ラクトースの導入を NMR により確認することができた。アルキンに対して、約 40% の導入を積分値により確認した。



Scheme 4. 高分子へのラクトースの導入

続いて、ラミナリンに対しても同様の反応を行い、導入の検討を行った。ラクトースの場合と同様にラミナリンと高分子の溶解する溶媒が異なり、その十分な検討の後、反応を行った。ゲルろ過により精製を行った後、NMR を測定したところ、ラミナリンと高分子のピークが重なってしまい、導入率を求めることができなかった。そのため、重合反応終了後に脱アセチル化を行った後、透析により精製を行い、ラミナリンが導入された高分子を得た。NMR の積分値により導入を確認することができたが、約 15% であったため、再度クリック反応の条件検討を行っている。しかし、ラミナリンの導入率が異なる高分子が得られたため、導入検討を行いながら、今後は免疫活性化能について評価を行い、導入率やラミナリンを用いた効果について明らかにしていく予定である。



Scheme 5. 高分子へのラミナリンの導入

6. まとめ

本研究では、天然由来の低分子量 β グルカンであるラミナリンを用いた免疫活性化分子の開発を目的として、合成を行った。その結果、高分子へのラミナリンの導入を達成したが、いくつか問題点が明らかとなった。1つ目として高分子の合成制御が困難で高重合度となり、溶解性が低くなったため、重合度を抑える必要がある。2つ目として、ラミナリンの分散が予想よりも大きいものしか市販されておらず、反応・精製において、その追跡が困難であったため、分子量分布を更に狭める検討を行う必要がある。3つ目として、ラミナリンの導入の高効率化および精製方法の簡便化が必要である。高分子の分子量が数万以上であったため、分子量数千のラミナリンが導入されても高分子としては、分子量が大きく変化せず、精製が困難であり、問題点 1、2 を解決するとともに分離が行いやすい溶解性と生成物との分子量の差を生み出す必要がある。以上の問題点が発見されたが、ラミナリンを導入した高分子は得ることができたため、細胞を用いた免疫活性化試験を行うことにより、ラミナリンを集積させることによる免疫活性化への効果を明らかにしていく。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- [1] Brown, G.D., and Gordon, S. "A new receptor for β -glucans", *Nature* **413**, 36-37 (2001).
- [2] Goodridge, H. S., Reyes, C. N., Becker, C. A., Katsumoto, T. R., Ma, J., Wolf, A. J., Bose, N., Chan, A. S. H., Magee, A. S., Danielson, M. E., Weiss, A., Vasilakos, J. P., and Underhill, D. M. "Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'", *Nature*, **472**, 471-475 (2011).
- [3] Adams, E. L., Rice, P. J., Graves, B., Ensley, H. E., Yu, H., Brown, G. D., Monteiro, M. A., Papp-Szabo, E., Lowman, D. W., Power, T. D., Wempe, M. F., and Williams, D. L. "Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **325**, 115-123 (2008).
- [4] Hanashima, S., Ikeda, A., Tanaka, H., Adachi, Y., Ohno, N., Takahashi, T., and Yamaguchi, Y. "NMR study of short β (1-3)-glucans provides insights into the structure and interaction with Dectin-1", *Glycoconjugate journal*, **31**, 199-207 (2014).