

| | |
|--------------|---|
| Title | 相乗的免疫応答の制御を目指した免疫アジュバント複合体の合成研究 |
| Author(s) | 加治木, 泰範 |
| Citation | 大阪大学, 2014, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/34059 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (加治木 泰範)

論文題名

相乗的免疫応答の制御を目指した免疫アジュバント複合体の合成研究

論文内容の要旨

多細胞生物全般が持つ生体防御機構である自然免疫は、微生物由来の分子群を多様な自然免疫受容体により認識し、獲得免疫系の活性化を誘起する。哺乳類においては、代表的な自然免疫受容体としてToll様受容体 (TLRs) あるいはNod様受容体 (NLRs) 等を持ち、細菌のリポタンパク質/リポペプチド (TLR1、2および6) あるいはリポ多糖 (TLR4)、細胞壁ペプチドグリカン (Nod1、Nod2) 等の分子を認識して、核転写因子NF- κ Bを介した炎症反応を誘導する。近年、TLRsやNLRsを含む複数の自然免疫受容体を、同時に刺激することで免疫系の相乗的な増強作用が起こることが見出されていることから、本研究では、細菌細胞表層分子である細胞壁ペプチドグリカン (Nod2リガンド) あるいはリポペプチド (TLR2リガンド) が相乗的に免疫を活性化する機構をミミックしたシステムとして、TLR2およびNod2のリガンドを化学的に結合させた複合型分子を創製し、抗体産生増強を行う免疫アジュバントとしての開発を行うとともに、その詳細な生物活性を得ることを目指した。本研究では特に、強い活性を持つMDPを含むPGN部分構造 (Nod2リガンド) とリポペプチドとしてPam2CSK4 (TLR2リガンド) を、機能性リンカーを介して結合した2種リガンド複合体の合成を行った。複合体合成に際しては、リガンドの認識機構を推定し、複合化に用いるリンカー構造の部分構造として細胞内酵素 (エステラーゼまたはリゾチーム) により分解され得る構造を導入することで、相乗効果を効率的に誘導可能な数種の免疫アジュバント複合体の合成を行った。

TLR2リガンドであるPam2CSK4誘導体合成は、リンカーを含む各構成残基を液相条件で調製後、ペプチド固相合成により各残基を縮合することでPam2CSK4誘導体を合成した。Nod2リガンドであるMDPの誘導体の合成は、MDP保護体の1位アシル基とのクロスメタセシス反応によってエステル基含有リンカーを導入した。合成したリガンド誘導体同士を縮合反応により連結し、酸性条件下で全保護基の除去を行うことでエステル型MDP-Pam2CSK4複合体の合成を達成した。また、対照化合物としてエステル基を持たないアミド型複合体も合成した。合成化合物の活性試験の結果、エステル型リンカーを持つ複合体について、Pam2CSK4単独刺激と比較して、強い免疫増強作用を見出した。また、アミド型複合体には免疫活性の低下が見られたことから、エステル基のような切断可能なリンカー構造の導入が複合体の相乗効果誘起に必要であることが示唆された。

合成したエステル型複合体は化学的安定性が低かったことから、安定なリンカー構造の設計が望まれた。そこで分解酵素としてPGNの糖鎖間 β 1-4結合を選択的に開裂できるリゾチームに着目して新たな分子設計を行った。Nod2リガンドとして、MDP成分のアノマー位におけるリンカー結合様式の異なる2種の複合体 (MDP- β -Pam2CSK4およびMDP- α -Pam2CSK4)、また、PGN部分構造を模倣した2糖MG- (MurNAc(1-4) β -GlcNAc(1-4) β -) Pam2CSK4および、4糖体MGMG- ((MurNAc(1-4) β -GlcNAc(1-4) β -)₂) Pam2CSK4の計4種類の複合体を合成した。また、リゾチームに対する反応性を検討するために各PGN部分構造のリンカー体も合成した。各リンカー含有PGN部分構造に対して、卵白由来リゾチームによる切断活性を測定した結果、2糖リンカー体において複合化に最適な切断活性を示した。また、合成した各アジュバント複合体の免疫活性を評価した結果、MG-Pam2CSK4に相乗的な免疫増強活性を見出した。以上より、これらの結果は、自然環境において細菌細胞の部分的分解とその後の宿主細胞の複数の自然免疫受容体による認識により、相乗的に免疫系が活性化する現象のモデル機構を示したものと考えられるとともに、免疫アジュバントとしての展開が可能な新規制御性分子の開発に成功した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (加 治 木 泰 範)

| | (職) | 氏 名 |
|---------|-----|---------------|
| 論文審査担当者 | 主 査 | 教授 深 瀬 浩 一 |
| | 副 査 | 教授 村 田 道 雄 |
| | 副 査 | 教授 中 谷 和 彦 |
| | 副 査 | 准教授 藤 本 ゆ か り |

論文審査の結果の要旨

加治木泰範は、「相乗的免疫応答の制御を目指した免疫アジュバント複合体の合成研究」という研究題目で以下の研究を実施した。

自然免疫は、微生物に特徴的な分子構造を自然免疫受容体を介して認識することにより生体を防御する機構である。Toll 様受容体 (TLRs) や Nod 様受容体 (NLRs) は脊椎動物の代表的な自然免疫受容体であり、TLR2 は細菌のリポタンパク質/リポペプチドを、Nod1、Nod2 は細胞壁ペプチドグリカンを認識して、免疫系を活性化する。近年、TLRs や NLRs を含む複数の自然免疫受容体を、同時に刺激することで免疫系の相乗的な増強作用が起こることが見出されている。そこで本研究では、Nod2 と TLR2 を介した相乗的な免疫活性化機構を利用して、免疫系を効率的に活性化して抗体産生増強作用を誘導する化合物として、TLR2 および Nod2 のリガンドを化学的に結合させた免疫アジュバント複合体の開発を行った。そこで、強い活性を持つ MDP を含むペプチドグリカン部分構造 (Nod2 リガンド) とリポペプチドとして Pam2CSK4 (TLR2 リガンド) を、リンカーを介して結合したリガンド複合体を合成した。複合体合成に際しては、リガンドの認識機構を推定し、複合化に用いるリンカー構造の部分構造として細胞内酵素 (エステラーゼまたはリゾチーム) により分解され得る構造を導入することで、相乗効果を効率的に誘導可能な数種の免疫アジュバント複合体の合成を行った。

TLR2 リガンドである Pam2CSK4 誘導体は、ペプチド固相合成により合成した。Nod2 リガンドである MDP の誘導体は、MDP 保護体の 1 位アシル基とのクロスメタセシス反応によってエステル基含有リンカーを導入して合成した。合成したリガンド誘導体同士を縮合反応により連結し、酸性条件下で全保護基の除去を行うことでエステル型 MDP-Pam2CSK4 複合体の合成を達成した。また、対照化合物としてエステル基を持たないアミド型複合体も合成した。合成化合物の活性試験の結果、エステル型リンカーを持つ複合体について、Pam2CSK4 単独刺激と比較して、強い免疫増強作用を見出した。また、アミド型複合体には免疫活性の低下が見られたことから、エステル基のような切断可能なリンカー構造の導入が複合体の相乗効果誘起に必要であることが示唆された。

合成したエステル型複合体は化学的安定性が低かったことから、次により安定なアジュバント複合体を合成した。そこで分解酵素としてリゾチームに着目し、Nod2 リガンドにリゾチームで切断される構造を導入した。そこで MDP 成分のアノマー位におけるリンカー結合様式の異なる 2 種の複合体 (MDP- β -Pam2CSK4 および MDP- α -Pam2CSK4)、また、PGN 部分構造を模倣した 2 糖 MG- (MurNAc(1-4) β -GlcNAc(1-4) β -) Pam2CSK4 および、4 糖体 MGMG- (MurNAc(1-4) β -GlcNAc(1-4) β -)₂ Pam2CSK4 の計 4 種類の複合体を合成した。また、合成した各アジュバント複合体は、化学的な安定性が向上しており、その免疫活性を評価した結果、MG-Pam2CSK4 に相乗的な免疫増強活性を見出した。以上より、これらの結果は、自然環境において細菌細胞の部分的分解とその後の宿主細胞の複数の自然免疫受容体による認識により、相乗的に免疫系が活性化する現象のモデル機構を示したものと考えられるとともに、免疫アジュバントとしての展開が可能な新規制御性分子の開発に成功した。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。