

京都大学	博士 (工学)	氏名	山崎 悠司
論文題目	Investigation on Chemical and Enzymatic Synthesis of Tumor Associated Carbohydrate Antigens Triggering Immune Responses (癌関連糖鎖抗原の化学および酵素合成と惹起される免疫応答に関する研究)		
<p>本論文は、癌関連糖鎖抗原 (TACAs) を有機化学的ならびにケラタナーゼ II (KSase II) による酵素触媒的な合成法を構築するとともに、分子集合体上の TACAs に対する免疫応答を調査した研究成果を纏めたものであり、序論、本文 6 章、および結論からなっている。</p> <p>序論では、本研究における歴史的な背景と目的および本研究の概要について述べている。</p> <p>第 1 章では、ルイス x (Le^x)、硫酸化ルイス x ($suLe^x$)、ルイス y (Le^y) の 2 型ルイス抗原に分類される TACAs の新規かつ効率的な合成法を開発した。最初に、直交した保護基を有する 3,2'-ジオール型ラクトサミン誘導体を、ヘインズ転位を介してラクツロースから合成した。このジオール誘導体をグリコシル受容体として、フェニル 2,3,4-トリ-O-ベンジル-1-チオ-β-L-フコピラノシドをグリコシルドナーとして用いるグリコシル化反応を行うと、ジオール誘導体は特殊な位置選択の様式でグリコシル化され、良好な収率で Le^x および Le^y 誘導体を生成した。このグリコシル化反応において、ジオール受容体中の 2 つのヒドロキシ基の反応性は 3-OH > 2'-OH であることを明らかにした。また、反応温度および供与体と受容体の当量を制御することによって、Le^x および Le^y 誘導体を選択的あるいは反応系中で同時に合成した。さらに Le^x 誘導体は、構造中のグルコサミン 6 位へ硫酸基を導入し、$suLe^x$ 誘導体へ変換できることを示した。加えて、$suLe^x$、Le^x および Le^y 誘導体の還元末端に末端アジド化オリゴエチレンオキシドリンカーを導入し、TACAs を他の分子システムと組み合わせることによる機能化を可能にしている。</p> <p>第 2 章では、<i>Bacillus</i> sp. KS36 および <i>Bacillus circulans</i> KsT202 由来である 2 種類のケラタン硫酸加水分解酵素 KSase II が、それぞれ $suLe^x$ オキサゾリン誘導体を遷移アナログ基質モノマーとして効率的に認識して糖転移反応を触媒し、$su-Le^x$ 二量体を良好な収率で生成することを明らかにしている。さらに、この KSase II 触媒糖転移反応における最適な反応温度ならびに pH を見出した。KSase II 触媒糖転移反応によって得られた反応生成物の核磁気共鳴 (NMR) および質量 (MS) 分析から、$su-Le^x$ 二量体は $su-Le^x$ 構造が β (1\rightarrow3) グリコシド結合で結合していることを明確にした。またこれらの結果により、<i>Bacillus circulans</i> KsT202 由来の KSase II の触媒メカニズムが基質支援機構 (Substrate-Assisted Mechanism) であることを示唆している。</p> <p>第 3 章では、ケラタン硫酸の繰り返し単位構造を有する種々のオキサゾリン誘導体と糖受容体を組み合わせることにより、KSase II によって触媒される糖転移反応の反応特異性を解明している。まず、KSase II 触媒糖転移反応は $suLe^x$ 二量体のようなかさ高い糖受容体を用いた場合では進行しなかった。また、$suLe^x$ オキサゾリン誘導体と硫酸化ラクトサミン ($suLacNAc$) を組み合わせただけの場合では、連続的な糖転移反応が進行せず、5 糖 $suLe^x$-$suLacNAc$ のみが生成した。さらに、ジ硫酸化ラクトサミン ($disuLacNAc$) オキサゾリン誘導体の KSaseII 触媒反応は、$disuLacNAc$ 二量体のみを生成していた。これらの結果から、KSaseII の触媒中心およびアクセプターサイト (+3+4 サブサイト) の構造がトンネル状であることを考察している。</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	山崎 悠司
<p>第4章は、シアル酸含有オリゴ糖を結合したポリサルコシン (Psar) とポリ乳酸 (PLLA) で構成した両親媒性ブロックポリマー (Psar-PLLA) で調製した高分子ミセル (ラクトソーム) を用い、シアル酸含有オリゴ糖がラクトソームに対する免疫応答を抑制することを示している。ラクトソームを被覆した糖鎖には、5-<i>N</i>-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) あるいは 5-<i>N</i>-アセチルノイラミニル-α (2\rightarrow6) - ガラクトシル- β (1\rightarrow4) <i>N</i>-アセチルグルコサミン (Neu5Ac α (2\rightarrow6)Gal β (1\rightarrow4)GlcNAc β) を用いている。調製した2種類のシアル酸を提示したラクトソームは、シアル酸糖鎖を持たないラクトソームよりも抗 PSar IgM 産生が減少した。その結果、シアル酸提示ラクトソームはマウス (BALB/C nu nu) 中でのラクトソームに対する accelerated blood clearance (ABC) 現象を減少させることを示した。特に Sigkec-G および CD22 のリガンドである Neu5Ac α (2\rightarrow6)Gal β (1\rightarrow4)GlcNAc β で被覆したラクトソームを用いるとその免疫抑制効果が大きいことを明らかにしている。</p> <p>第5章では、Le^y 抗原を表面に提示した形態の異なる分子集合体を作製し、分子集合体上の Le^y の抗原性を評価した。まず、Le^y を親水部末端に有する PSar-PLLA (Le^y-PSar-PLLA) および、PSar と疎水性ヘリックスブロックにロイシン (D-or L-Leu) とアミノイソ酪酸 (Aib) との交互配列 12 量体あるいは 16 量体を用いた両親媒性分子ポリペプチドを合成した (Le^y-PSar-(D-or L-LeuAib)_{6 or 8})。これらの Le^y を提示する両親媒性ポリペプチドを組み合わせることにより、Le^y を表面に提示するカーブシート、ナノチューブ、ベシクル、試験管状構造、およびナノシート状の分子集合体を形成することを透過型顕微鏡 (TEM) によって確認した。球状ミセル、カーブシート、ナノチューブ、および試験管状構造の分子集合体をマウスへの投与することによって、抗 PSar IgM が大量に産生したが、抗 Le^y IgM 産生は少量であった。一方で、Le^y を提示するナノシートは、効率的に抗 Le^y IgM の産生を誘導し、抗 PSar IgM 産生を抑制した。さらに、産生した抗 Le^y IgM の特異性は、分子集合体表面の抗原密度によって異なることを明らかにしている。したがって Le^y の抗原性は、分子集合体表面上の抗原の環境に依存することを考察している。</p> <p>第6章では、異なる表面密度でナノキャリアに提示された Le^y 抗原に対する免疫応答を評価した。まず、Le^y 抗原を高密度に提示するナノキャリアを得るために、分子中に2つの Le^y 抗原を末端に有する A2B 型両親媒性ポリペプチド ((Le^y-PSar)₂-(D-or L-LeuAib)₆) を合成した。(Le^y-PSar)₂-(D-LeuAib)₆ と (Le^y-PSar)₂-(L-LeuAib)₆ の等モル混合物は、Le^y を高密度に提示するようなシート状の分子集合体を形成することを TEM および原子間力顕微鏡 (AFM) によって同定した。このシート型の分子集合体は抗 Le^yIgM の産生を誘導したが、2度目の投与後にその抗体産生は抑制されていた。さらに、このシート状分子集合体を2回投与した後の抗体産生量は、Le^y 量及び密度が低いシート状の分子集合体を投与した場合よりも低下した。結合活性に関しても、2回の Le^y を超高密度に有するナノシートによって産生した抗体は、1度目の投与によって産生した抗体の結合活性よりも低下した。つまり、超高密度の TACAs を提示するナノキャリアを投与した場合、免疫応答が抑制するようなメカニズムが働いていると推測している。このように、B細胞を介した TACAs の免疫応答はナノキャリア上の Le^y 抗原の幾何学的配置に敏感に影響を受けることを示唆している。</p> <p>結論では、本論文で得られた成果について要約している。</p>			