

の分子設計を行った。分子設計においては、天然のレクチンの細胞活性化誘導の機構を模倣した。天然のレクチンは細胞膜上の糖鎖と多点で結合し、そのレセプターの架橋によりリンパ球の活性化を誘導する。そこで人工レクチンは一分子中に糖鎖認識部位を多数有している事が必要となる。本研究では、糖鎖認識部位としてはフェニル硼酸を選択し、高分子側鎖に多数導入した（図1）。

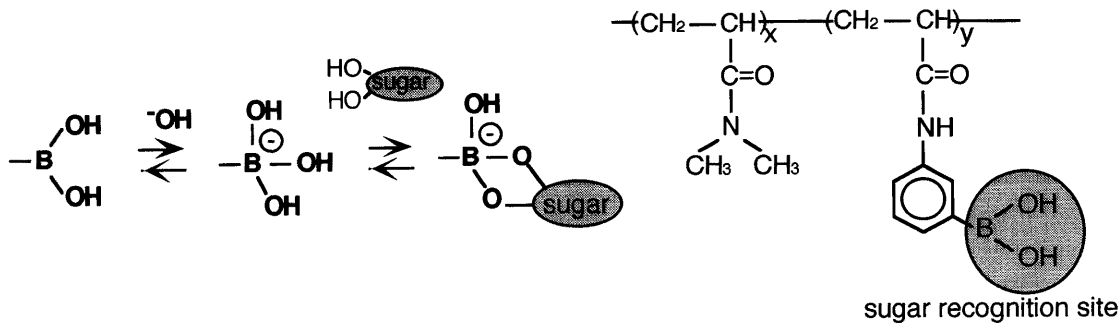


図1 水溶液中における糖などの多価水酸化化合物と硼酸基との平衡状態図及び硼酸基含有ポリマー（DBポリマー）の構造式

フェニル硼酸基を選択した理由は、水溶液中において糖などの多価水酸化化合物と可逆的な結合を形成することが知られているからである。そして、硼酸基含有ポリマーの分子設計及び合成、続いて、特に人工レクチンの機能として、免疫療法のための抗腫瘍活性を有するリンパ球の誘導についての評価、及びその結合特性について検討した。

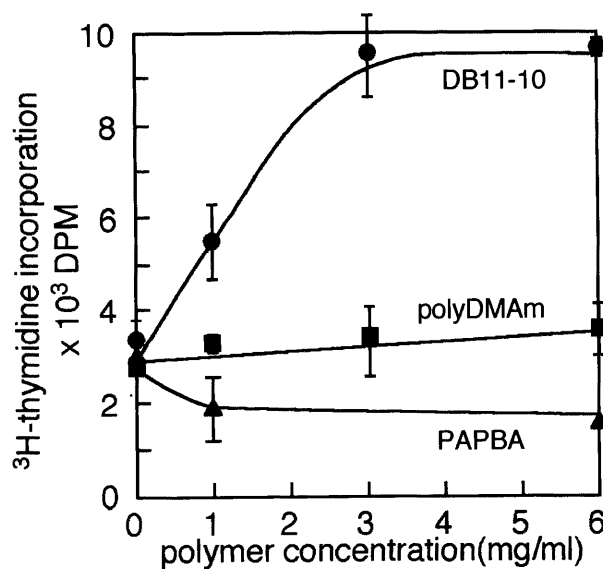


図2 DB11-10によるマウスリンパ球刺激における 3H -チミジンの取り込み

癌免疫療法に於いてリンパ球の増殖誘導は重要な課題となっている。人工レクチンとしての基本的な機能評価として、リンパ球増殖活性試験を行った。本評価においては人工レクチンとして合成した硼酸基含有ポリマー(DB11-10)を用いてマウスリンパ球に対する増殖活性誘導の性能について検討を行ったところ、図2より、 3H -チミジン取り込み量を示すDPMは、ポリマー濃度依存的に上昇し、6mg/mlの濃度において

はチミジン取り込みの上昇はほぼ頭打ちとなりDPM値はコントロール（PBSのみ、また、ボロン酸基有していないポリマーを播種し培養した場合）に比べて5～7倍となる。この増殖誘導に於いては、ボロン酸のポリマー化が必要である事が示された。また、臨床に於いては癌免疫における主要リンパ球であるTリンパ球を生体由来の蛋白質にて増殖の誘導を行う。それは主にTリンパ球増殖因子であるインターロイキン2（IL-2）と呼ばれるサイトカインで、IL-2によって誘導された抗腫瘍活性を持つリンパ球はLAK細胞（LAK：Lymphokine Activated Killer）と呼ばれており免疫療法に於いては、このLAK細胞の投与を行っている。また、天然のレクチンはLAK細胞を誘導することが知られているが、同時にIL-2の産生及びIL-2に対するレセプターの発現を誘導する事が知られている。この様な作用は、細胞自らが自身の活性を増強する複合刺激（アジュバント）として知られている。

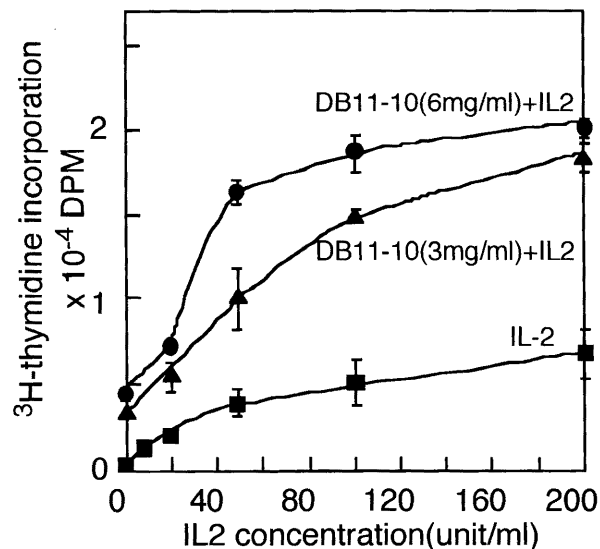


図3 IL-2共存下におけるDB11-10によるマウスリンパ球の増殖活性評価

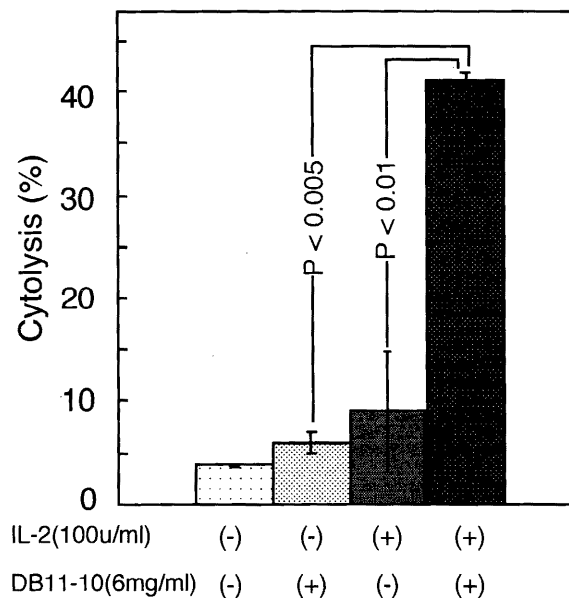


図4 DB11-10及びIL-2により誘導されたLAK (Lymphokine Activated Killer)細胞によるYAC-1にたいする抗腫瘍活性の評価

そこで、この人工レクチンによるアジュバント活性及びLAK細胞の誘導について検討を行った。その結果、マウスリンパ球においてのIL-2と人工レクチンであるDB11-10によるアジュバント活性の評価を行ったところ、リンパ球をDB11-10とIL-2共存下で培養した結果、非常に顕著な³H-チミジン取り込みの増加が観察された(図3)。DB11-10(6mg/ml)と同時にIL-2を添加した結果、IL-2(100u/ml)のみを添加した場合の5倍近い増殖活性の増加が観察された。このIL-2による増殖活性の顕著な増強は、DB11-10によるリンパ球のIL-2に対する感受性が亢進するため、つまり、天然レクチンで見られるリンパ球細胞表面上のIL-2レセプター(IL-2R)の発現が亢進されたためであると考え、IL-2Rの発現を調べたところ、DB11-10は天然レクチン同様に、IL-2Rの発現を亢進させる機能を有している事が明らかとなった。以上の結果より、この条件にて抗腫瘍活性を有するLAK細胞の誘導及び抗腫瘍活性の評価を行った結果、IL-2とDB11-10を同時に添加して培養している系においてはIL-2のみを添加して培養した場合の約4倍という顕著な癌細胞傷害性の上昇が見られる(図4)。このアジュバント活性時と同等の癌細胞傷害性を示すには1000u/ml以上のIL-2濃度が必要となる。つまり、人工レクチンであるDB11-10は約1/10の低いIL-2濃度において効率的にLAK細胞を誘導することが可能である事が示された。

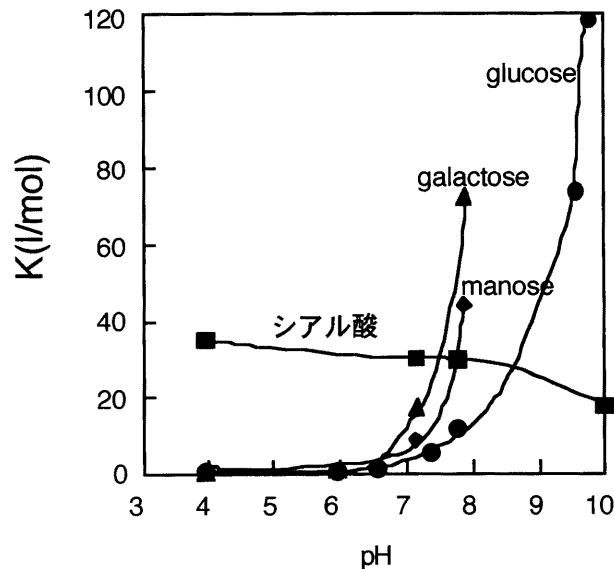


図5 PAPBAと細胞膜上に存在する糖との結合定数とpH変化

更に、人工レクチンとしての特性評価について詳細に検討を行った。天然のレクチンは糖に対する結合特異性を有している。そこで、糖鎖結合部位としてのポロン酸基のレクチンとしての特性について検討を行った。細胞膜上の糖鎖を構成している主要な単糖の中でポロン酸基と結合していると考えられる、グルコース、ガラクトース、マンノース、シアル酸について、これらの単糖と糖鎖認識部位であるフェニルポロン酸基との結合定数を¹¹B-NMRを用いることによって測定した。その結果、シアル酸のみがpKaによらず低いpHに於いて高い結合定数を示している(図5)。これは、シアル酸の分子中に存在しているN-アセチル基の窒素がポロン酸基に配位することによってアニオン化していないポロン酸基と低いpH条件下においても安定な結合が形成されるためである事が明らかとなった。つまり、人工レクチンであるポロン酸基含有ポリマーは、生理条件下(pH7.4)に於いて、高い選択性をもって細胞膜上のシアル酸を認識している可能性が示唆

される。そこで天然のレクチンでシアル酸に対して特異性を有するLimax Flavus (LFA)を用いて、人工レクチンと天然レクチンであるLFAとのリンパ球細胞膜上のシアル酸残基に対する競争結合阻害について検討を行った結果、DB11-10共存下においてはLFAのリンパ球への結合は顕著に阻害されている事が明らかとなった(図6)。つまり、シアル酸がDB11-10の結合サイトである事が強く示唆される結果となった。更に、ガラクトース特異性の高いレクチンで同様の評価を行った結果、結合はDBポリマーによってほぼ阻害されない事が明らかとなった。すなわち、DBポリマーによるLFAレクチンの結合阻害は、細胞表面にDBポリマーが存在することによる立体反発効果ではなく、シアル酸への結合が主要な原因であることがわかる。また、人工レクチンとしてのポロン酸基含有ポリマーは、分子設計の精密な最適化によって、特に分子量を制御する事により、更に効率的な活性の誘導が可能であることが示された。更に、新規分子設計によって、糖鎖認識部位としてのポロン酸基のイオン化状態を制御することにより、顕著な増殖活性の増強が可能である事が示された。

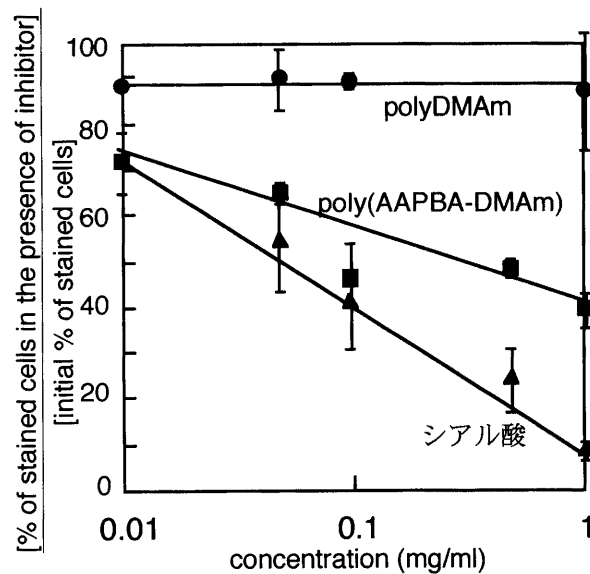


図6 LFAレクチンのマウスリンパ球に対する結合における人工レクチンDB11-10添加時の競争阻害

結論として、本研究に於いてポロン酸基含有ポリマーは人工レクチンとしてリンパ球の増殖を誘導し、更に、IL-2レセプター発現を亢進させ、その結果、IL-2とポロン酸基含有ポリマーによるリンパ球への複合刺激において増殖活性及びそこから誘導されるLAK活性は著しく上昇する事を明らかとした。そして、ポロン酸基含有ポリマーは、シアル酸に結合する人工レクチンとして機能している事が示された。更に、この比較的simpleな人工レクチンとしてのポリマーは、分子設計の最適化によって更に効率的な活性の増強が可能であることが示され、また、様々なモノマーを選択する事により固定化の分子設計が可能である。レクチンに啓発された糖認識能を有する合成高分子はバイオマテリアルの新しいコンセプトを提唱するという観点からも非常に重要である。Immunomodulationやtissue engineeringと言った分野において細胞の機能を調整出来る人工のバイオマテリアルとして広い利用が期待される。