

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(糖鎖利用による革新的創薬技術開発)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：(日本語) 我が国の技術の強みと密接な医工連携体制を活かした標的分子探索・検証のための多角的糖鎖解析システムの構築

(英語) Construction of a multifaceted analysis system of protein glycosylation for discovering and validating drug target molecules utilizing the strengths of Japan's technology and close medical-engineering collaboration system

研究開発実施期間：平成28年9月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 坂元 亨宇

(英語) Michiie Sakamoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 学校法人慶應義塾 慶應義塾大学医学部 病理学教室 教授

(英語) Department of Pathology, Keio University School of Medicine, Professor

II 研究開発の概要

(和文)

生体内の糖タンパク質は疾患に関連して糖鎖の付加部位やその構造を変化させることが知られている。このことから、がん疾患領域での創薬標的候補分子の精密糖鎖構造解析が可能となり、取得データを設計図と例え、それをもとにした免疫原（合成糖ペプチド、リコンビナント糖タンパク質）の生産、および抗体の開発が可能になれば、より確実に標的分子のレパートリーの拡充につながられ、かつ（糖鎖とタンパク質の両方の部分を認識する）特異性の高い抗体が開発できると考えた。そこで本提案では、糖鎖標的の探索、検証に資する新しい糖鎖標的探索開発プラットフォームを3年以内に構築し、プロジェクト内オープンリソースとして申請課題内メンバーのみならず、参画メンバーやユーザーフォーラム内企業等との共同研究等にも積極的に活用し、人材のみならず技術の“On the Job training”を実行し、より多くの糖鎖標的的成果物を提供することで、プラットフォーム実効性を証明することを目的とした。

まず、探索プラットフォームを形成するそれぞれの技術の開発について述べる。相互作用ベース解析技術の開発では、産総研（岡谷・久野）、広島大（堀）、慶大（杉浦）、グライコテクニカ（山田）が、外部協力機関との連携により、病理組織等から（100を超えない）極微量の病変細胞を単離し、固有の糖鎖変化を検出するために必要な技術並びに分析装置（超高感度糖鎖プロファイリング技術および迅速自動糖鎖プロファイリング技術）を開発した。また産総研（鈴木・久野）、広島大（堀）は、外部協力機関との連携により、糖鎖標的の候補分子を試料中から特異的に濃縮、調製する技術（糖タンパク質濃縮効率定量評価技術）を開発し、それぞれ目標を達成した実機開発に成功した。

質量分析ベースの解析技術開発では、産総研（梶・梶谷内）、北大（古川）、国衛研（橋井）、慶大（佐藤）は、微量のサンプルで標的糖鎖のキャリアを大規模に同定し、試料間の相対量を定量する技術、ならびに創薬候補となった標的糖タンパク質を精密に構造解析し、糖鎖付加部位、糖鎖構造、その不均一性（各糖鎖の相対量比）を迅速に解析する技術の開発を、連携して進めた。また産総研（梶谷内・梶）、創価大（木下）は連携し、多数同定された標的糖鎖キャリア群から、さらなる構造検証を試みる候補タンパク質の絞り込みを促進するソフトウェアを開発した。また産総研（梶）と慶大（洪・合田）は、外部協力機関との連携により、詳細構造解析を加速させ、また得られた候補構造情報を利用しやすいように表示するソフトウェアを開発した。

これらの開発により、相互作用ベース解析技術開発者により見いだされた疾患関連糖鎖変化を反映するレクチンに結合する糖鎖キャリアタンパク質が質量分析技術開発者により多数同定され、その中から標的糖タンパク質候補として有望な分子が選別され、さらにその候補糖タンパク質の詳細な構造解析が進められ、これを標的化する分子作成のための標的分子設計図として提供されるまでの過程が、シームレスに実施可能になった。

次に、上記技術からなるプラットフォームの実効性評価を裏付けるための集中研を活用した医工連携型の糖鎖標的分子探索について述べる。ここでは、臨床ニーズの抽出とそれを解決する課題設定が技術側に明確に伝わること、および開発される（ないし可能な）技術の応用フィールドが臨床側に伝わることが重要であり、初期に潜在する2者の乖離をいかに早期に埋めることが、より多くの成果を生むための手段と考えた。その早期達成のために、JBA（服部）が中心となり、疾患別、実務担当者研究ミーティングをプロジェクト開始当初より開催し、初年度（9月～）は半年で7回実施した。その結果、実務者間での能動的な開発協力が早い段階から進められ、中間評価時点で7課題、最終年度までには10課題が本研究課題内臨床拠点（坂元、金井（隆）、金井（弥）、竹内）から提案された。他の研究課題からの課題を加えると、12課題の糖鎖解析が集中研・慶大分室内にて同時進行で開発がすすめられた。結果、9種疾患で標的候補分子のリスト化に成功し、これは当初の最終目標5種疾患を大きく上回る。創薬の観点での絞り込みにも注力し、6種疾患での絞り込みを終えた（図1）。糖鎖標的薬として最も期待されるAntibody-drug conjugate (ADC)薬開発の上での標的分子としてのポテンシャルをもとに、質量分析でリスト化された分子群はFirst in ClassやBest in Classに分類し、かつその中

での優先順位も付すことができた。開始当初は既存情報による糖鎖標的候補分子の抽出と、精密解析の実施が主として行われていたが、上記取り組みにより格段に候補分子数が増加し、最終的には 81 分子が糖鎖標的候補分子として挙げられ、一部において以後の設計図作成までの開発を進めた。

探索実務者である集中研・慶大分室メンバーと技術開発を掌握している産総研研究分担者との定期的かつ頻度の高いミーティングを含めての密な連携により、組織標本中の 51 分子の膜糖タンパク質についてレクチンアレイ解析の系が構築され、うち 32 分子について疾患特異的な糖鎖変化が確認できた。変化が認められた分子については、質量分析により精密構造解析がなされ、25 分子の詳細構造（設計図）が作成され、抗原作製担当に提供された。これら一連の実験では 600 検体以上の組織標本が分析に利用された。プロジェクト終了後、ユーザーフォーラム参画企業との橋渡し研究を継続する際にもこれら検体が使用されることが期待される。

探索研究がこれだけ大規模に実施されたことは、別の視点からみると、それだけ分析技術の信頼性、効率を高めることを可能にしたと言える。実際、プロジェクト開始当初より現在に至るまで、集中研・慶大分室には多くの糖鎖解析技術の導入・改良が繰り返され、結果として最適化された「統合的糖鎖標的探索システム」が構築出来、探索が効率よく実施された。また選択された標的候補分子の解析時に発生した量的な困難さ、分子物性の問題など、多様な課題は、上記と同様に“探索実務者である集中研・慶大分室メンバーと産総研技術開発研究分担者との定期的かつ頻度の高いミーティングを含めての密な連携”により 1 つ 1 つクリアし、5 年間経験することで、莫大な量の前処理から分析のトラブルシューティングが確立したことも、上記数値目標達成を成し遂げた一因と考えている。そしてその 1 つ 1 つの達成により、課題解決から多くの技術論文発表がなされ、当初のプロジェクト策定時において目論んでいた、真に利用価値の高い技術開発のスキームの確立を体現する結果となった。

本研究課題における開発体制及び掲げた最終目標は、糖鎖を活用した新しい創薬の在り方を技術開発から臨床検体を用いた検証を通じて示すために特化したものであり、かつそれが設定した数値目標をすべて達成する過程で実践できたと自己評価する。今後はこの国際的にも新しい開発戦略を企業へ橋渡しし新薬開発に貢献していく。

(英文)

Glycoproteins are known to alter their glycosylation sites and glycan structures along with changing cell types and environments related to disease, and thus have been investigated as targets for IVDs and therapeutic drugs for cancers.

Now we have supposed that if the exact glycan structure analysis of the drug discovery target candidate molecule in cancer was enabled, production of the immunogen (as synthetic glycopeptide, recombinant glycoprotein) could be made, which allows us to develop more effective antibody drugs with fewer side-effects, which is based on the concept of the use of a special antibody recognizing both glycan part and peptide part of a glycopeptide fragment on a protein.

Therefore, we have started to construct the new multifaceted analysis system of protein glycosylation for discovering and validating drug target molecules within three years and aimed to derive drug discovery target seeds within the project period.

As a result, two distinct technologies for glyco-target analysis have been accomplished as described below.

[1] Development of ultra-sensitive analysis technologies for glyco-target based on the interaction analysis technique. We re-developed a lectin microarray-based system to explore inherent glycosylation alteration to analyze a tiny amount of lesion cells isolated from the pathological tissues.

[2] Development of a comprehensive and precise glycosylation analysis system for glyco-target discovery. Mass spectrometry-based analysis technology was sophisticated to analyze structures, sites of glycans and their heterogeneity precisely and quickly.

Then, the above-mentioned technologies were introduced into the branch laboratory at Keio University to complete a platform integrated by the two different technologies just for the discovery of drug candidate molecules. For the technological verification, more than 600 tissue specimens of 12 diseases were provided and effectively used for "glycoproteomic analysis", resulting in making the list of glyco-target candidates in 9 diseases. Based on the lists with rating possible molecules, disease-specific glycan alteration on each target was confirmed at 32 of 81 molecules tried. Twenty-five molecules of them were successfully analyzed with exact structure analysis by in-depth GlycoRIDGE. All data were provided as the "design drawings" for making immunogen by the other project party. Finally, pathological and biochemical validation confirmed some antibodies to be glycopeptide-recognizing ones. We assume that the key technology for discovering and validating glyco-target drugs for cancerous diseases utilizing human specimens established in this project and the results were expected to contribute to new medicine development by expanding the repertoire of drug targets.