

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



I 基本情報

研究開発課題名: 多様なグライコプロテオームおよび捕捉分子作製技術開発とその創薬への応用
Technology development to produce and utilize diverse glycoproteomes and their recognition molecules

研究開発実施期間: 平成28年10月1日～令和3年3月31日
From Oct 1, 2016 to March 31, 2021

研究開発代表者: 入村達郎
Tatsuro Irimura

研究開発代表者所属機関・部署・役職:
学校法人順天堂 順天堂大学大学院医学研究科・難病の診断と治療研究センター・糖鎖
創薬研究室・特任教授
Division of Glycobiologics, Intractable Disease Research Center, Juntendo University Graduate
School of Medicine, Project Professor

II 研究開発の概要

(目的)

現在世界で90兆円の市場を形成している抗体医薬の標的の多くは糖タンパク質であるが、糖鎖変化を利用した創薬開発は進んでいない。分子標的薬の開発では創薬標的の枯渇が深刻な課題となっており、タンパク質以外の創薬標的として糖鎖を含む分子が期待されている。糖タンパク質分子を標的とした分子標的薬開発のためには、詳細にデザインされた糖鎖とペプチドの複合体およびこれを産生する細胞を簡便自在に作製し、これまでは偶発的に得られていた糖鎖ペプチド複合体を認識する捕捉分子（現状では全てモノクローナル抗体）を確実に得る材料の調製と手法を確立すること、さらに臨床的に重要性の高い実例について検証し評価することが必要である。

本提案では、医薬品として役立つ糖鎖ペプチド複合体標的を製造するための技術開発、これらに対する捕捉分子作製のための技術開発、およびこれらの捕捉分子の治療薬としての重要性の評価を達成することを目的とした。

(実施内容)

研究開発課題「多様なグライコプロテオームおよび捕捉分子作製技術開発とその創薬への応用」は公募要領に基づき3項目について実施した。

研究開発項目[3] 糖鎖標的を製造するための技術開発

・糖鎖ペプチド複合体に対する抗体の作製やスクリーニングに必要なさまざまな糖ペプチドや糖タンパク質類を供給可能とするため、目的とする糖ペプチドや糖タンパク質類を安定的に製造できる合成技術を開発し、その周辺技術を確立する。

研究開発項目[4] 糖鎖標的に対する捕捉分子作製のための技術開発

・糖鎖ペプチド複合体捕捉分子について、従来技術だけでは取得の困難な糖鎖を含む分子構造を認識するモノクローナル抗体を効率よく取得する技術を開発する。

研究開発項目[5] 発見された糖鎖標的の創薬意義の解明

・臨床的なデマンドに基づき、糖鎖ペプチド複合体を認識するモノクローナル抗体により、臨床的な問題の解決が可能である事を検証する。

(成果)

開発項目[3]の糖ペプチド合成では、O型糖アミノ酸や複雑なN型糖鎖が付加した糖アミノ酸を中心に合成する技術を確立、また酵母や大腸菌を用いて糖鎖関連酵素38種を発見し、精製プロトコルを構築した。シアル酸以外の糖水酸基を脱保護した糖アミノ酸を用いた糖ペプチド合成の条件を確立するとともに、マイクロ波照射下で温和な温度での反応の検討が進められ、安価かつ高効率でのO型糖鎖を含む糖ペプチド合成が可能となった。糖ペプチド合成装置については全自動装置化の開発を終了した。

開発項目[4]の糖鎖標的を認識する抗体の取得については、ラット、糖転移酵素ノックアウトマウス、高抗体産生トランスジェニック (Tg) マウスの利用、ファージライブラリーの利用について検証し、より迅速な抗体作製が可能になった。合成糖ペプチド、糖鎖を改変し均一化した精製糖タンパク質、糖鎖改変分子を発現する培養細胞を組み合わせ免疫原として用い、さらに、合成糖ペプチドと細胞で発現した標的糖タンパク質の連続的免疫、蛍光標識した糖ペプチドや糖タンパク質を使ったハイブリドーマのソーティング技術、Biacoreや組織染色による評価により、迅速かつ確実に糖鎖ペプチド複合体に特異的な抗体取得が可能となった。また取得した抗体Aについては、マウスへの免疫では得られなかったエピトープ部位に対する抗体がラット免疫により得られた。これらの技術開発と実際に利用することによる検

証は、プロジェクト内の協力関係に基づいて加速度的に進み、様々な糖タンパク質分子について多様な特異性を持つ抗体が作製された。いくつかの標的に対する抗体ではがん組織に染色性が高い結果が得られている。また開発したファージライブラリーとスクリーニングシステムを用い、順天堂大学の供給による糖鎖にバリエーションを持つ抗原を用いたスクリーニングにより糖鎖ペプチド複合体認識性の抗体も取得された。

創薬意義の解明[5]においては、既存の抗体医薬として広く用いられている抗HER2抗体が持つ重篤な副作用が心毒性である事を臨床研究によって明らかにし、その際問題となる心筋細胞と乳がん細胞に発現する標的糖タンパク質HER2の糖鎖の違いを明らかにした。この違いに基づき乳がん細胞に結合し、患者および健常人由来のiPS細胞から分化させた心筋細胞に結合しない抗体を開発項目[4]と協力して作製した。ヒト化した抗体を、薬物コンジュゲートとすると乳がん細胞に傷害性を持つことを明らかにした。

トリプルネガティブ乳がんは治療オプションが限られており生存率が他のタイプの乳がんより低いが、一部の患者亜集団では特に薬物治療に対する抵抗性が高く早期に再発し、現状有効な治療薬が存在しない。そこでこの亜集団のがん細胞に特徴的なグライコプロテオームを明らかにして、治療標的とすることを目指し、2つのアプローチを行った。第一のアプローチでは、MUC1に対する13種の抗体群が、[3]で作製した糖ペプチドを用いた解析により、認識する糖鎖の構造、結合位置、関与の仕方によってカテゴリー分けできることを証明した。早期再発群に対して特定の特異性を持つ抗MUC1抗体に強い結合性が確認され、診断ツールとして有用であることがわかった。しかし、治療用抗体としては使用可能な特異性を目指して、新たな糖鎖ペプチド複合体に特異的な抗体の開発を行った。MUC1の特定のアミノ酸残基に特定の糖鎖が付加している構造に特異的なモノクローナル抗体の作製を複数の方法で試み、筑波集中研と順天堂で異なる特性を持つ抗体群が作製され、治療薬としての有用性を検証中である。第二のアプローチでは、術前化学療法を行わなかったTNBC30例の手術標本から単離したがん細胞の糖鎖プロファイルをレクチンアレイ解析により明らかにし、早期の再発をきたした5例とその他の25例を比較することにより、再発症例に特徴的な糖鎖を見出し、この糖鎖が付加している糖タンパク質5種類を同定した。

臨床病理標本を用いた解析により、上皮型中皮腫に発現する腫瘍抗原ERC/Mesothelinの特定の部位（388番目のアスパラギン）にユニークな糖鎖が付加することを見出した。この糖鎖を持つERC/Mesothelinに特異的なモノクローナル抗体の取得を目指している。さらに肉腫型中皮腫の表面糖鎖の網羅的な解析により、O型糖鎖に正常中皮との大きな違いを見出した。

（開発の意義）

成果は着実に得られ、GalNAc-O-Ser/Thrの調製法、エステラーゼによる脱保護と糖転移酵素を組み合わせた糖ペプチドのワンポット合成法、糖ペプチド自動合成装置、糖転移酵素KOマウスや高抗体産生マウスの利用による抗体作製、蛍光標識糖ペプチドを利用した抗体産生細胞の取得技術の確立など、多くの新しい技術が創出された。課題①「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」では、疾患組織に特徴的な糖鎖修飾を有する糖タンパク質を見出し、その設計図を作ることを目的としたので、その結果をもとに糖タンパク質を免疫原とし、特徴的な糖アミノ酸を特定の位置有する構造に特異的な抗体を作製すべく、開発された方法を用いて糖ペプチドを合成し、それを免疫原として抗体を作製し、スクリーニングを行った。取得された多くの抗体は糖鎖ペプチド複合体に特異的であり、糖タンパク質に強く反応しただけでなく、組織染色でもユニークな特異性を有することが明らかとなった。また抗ポドプラニン抗体の一つでは糖ペプチドとの共結晶が得られ、構造情報をもとに抗体のヒト化が行われた。また、抗MUC1抗体の一つと合成糖ペプチドの相互作用をNMRにより解析した結果より、ペプチド部分と糖鎖部分を共に認識する事を明らかにした。これらの結果から、抗糖鎖ペプチド複合体抗体の取得とその特性解析における糖鎖ペプチド複合体の有用性が示され

た。様々な技術を組み合わせたプラットフォームが構築されたことから、疾患特異的な糖鎖ペプチド複合体をエピトープとする抗体の取得が更に加速されることが期待でき、分子標的薬の標的の枯渇という課題を打ち破る新たな概念と技術を提供し、糖鎖ペプチド複合体を標的とした創薬に先鞭をつけた。臨床的なデマンドに基づいて開発された乳がん細胞に結合して殺傷し、心筋細胞には全くその作用のない抗HER2抗体が、次世代の医薬に求められる「副作用のない、患者に優しい治療薬」という社会的ニーズに応えるものである事は明白である。同様なアプローチを広く適用することにより、満たされていない臨床的なデマンドに対応できる特性を有する新たな抗体医薬を開発することが可能になった。開発された方法を用いて今後開発される抗体は、現在用いられている抗体医薬に置き換わる可能性が高い。

Background and long-term goal: Target molecules of almost all currently used drugs, such as receptors, transporters, enzymes, ligands to the receptors, and signal transducers, are glycoproteins. The patterns of glycosylation of these molecules depend on the lineage, the stage of differentiation, and the pathological status of the cells producing these glycoproteins. Furthermore, the glycans often modulate the biological function of these glycoproteins. For the effective use of diverse glycans and glycan-binding molecules as drugs, new technical platforms are necessary to synthesize diverse glycan-peptide complexes, to develop antibodies specific for these complexes, and to establish these antibodies to meet clinical demands. In the present project we aimed to achieve these goals.

Specific aims: The research and development subject "Technology development to produce and utilize diverse glycoproteomes and their recognition molecules" had three specific aims.

Specific aim [3]: Technology development to manufacture glycoproteome targets.

Specific aim [4]: Technology development to manufacture binding molecules specific for glycoproteome targets.

Specific aim [5]: Technology development to assess drugability of binding molecules specific for glycoproteome targets.

Outcomes: We established a technology to synthesize any given sugar-amino acid complexes, particularly those with *O*-glycosylation. Rapid and high-yield synthesis of glycopeptides with these sugar-amino acid complexes was accomplished by the use of a newly developed automated synthesizer. Extensions of glycans were achieved by the use of enzymes produced in yeast or *Escherichia coli*. Rapid and cost-effective preparations of sugar nucleotides also became possible.

A variety of new technologies to efficiently develop antibodies specific for glycoproteome epitopes were established. These include the use of glycosyltransferase knockout mice, transgenic mice capable of producing highly diverse antibodies, and phage libraries. Synthetic glycopeptides, purified glycoproteins with defined glycans, and cultured cells expressing defined glycans were used as immunogens and tools for antibody screening. Through the combined use of these new tools and technologies, antibodies recognizing glycoproteome epitopes were obtained.

Drugability of antibodies which recognized glycoproteome epitopes were assessed by proving clinical demands. Differential glycosylation of HER2, a widely used target for therapeutic anti-HER2 antibodies, between breast cancer cells and iPS cell-derived cardiomyocytes was identified using lectin array. An anti-HER2 antibody which strongly binds to breast cancer cells but not to cardiomyocytes was obtained. The antibody was proven to kill breast cancer cells when it was conjugated with a cytotoxic drug. Unique glycoproteomes characteristic to cancer cells from the relapse-prone subset of triple-negative breast cancer patients were identified using lectin arrays. Glycans recognized by a group of lectins with similar carbohydrate specificity and unique glycoproteome epitopes expressed on MUC1 were proven diagnostically useful in identifying relapse-prone patients. Therapeutic antibodies based on these results are currently being sought. Analysis using cell lines and clinical pathological specimens revealed that a unique sugar chain was linked to a specific site (388th asparagine) of the tumor antigen ERC/Mesothelin expressed on epithelial mesothelioma. We are aiming to obtain a monoclonal antibody specific for this mesothelioma-specific ERC/Mesothelin glycoproteome epitope.

Significance: The outcomes of our endeavors as listed above demonstrate that glycoproteome-specific drugable antibodies were obtained through the application of new tools and new technologies developed in the present project. All the elements have been essential in the process. The new anti-HER2 antibody, which binds to and kills breast cancer cells but shows no reactivity with cardiomyocytes, was developed based on glycan differences. Similar approaches will succeed to generate highly effective and harmless therapeutic antibodies, and these glycoproteome-specific antibodies are expected to be superior to currently existing antibody drugs.