

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業)  
事後報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 糖鎖分子による自然免疫受容体制御を介した免疫・骨代謝異常治療法の開発  
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation

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) 岩倉洋一郎  
(英語) Yoichiro Iwakura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 学校法人東京理科大学・研究推進機構 生命医科学研究所 実験動物学研究部門・教授  
(英語) Professor, Department of Experimental Animal Immunology, Tokyo University of Science

## II 研究開発の概要

炎症や代謝異常の場で糖鎖修飾の変化が起こり、免疫制御に影響を及ぼすことが近年注目されているが、医学的に有意なグライコフォームの定義や、そのグライコフォームを特異的にターゲットしたり、制御したりすることが未だ困難であるため、治療法の開発に至った例は極めて少ない。我々は自然免疫受容体の一つが樹状細胞や破骨細胞の恒常性維持能を有し、その欠損マウスが自己免疫や骨代謝疾患を自然発症することを明らかにした。また、この受容体分子が糖鎖リガンドを持つ可能性を見出しており、この自然免疫受容体・糖鎖リガンド軸は免疫・骨代謝疾患の新治療法開発につながる強力なシーズであると考えた。

近年、関節リウマチなどの自己免疫疾患は抗 TNF $\alpha$  や抗 IL-6 受容体、抗 IL-17 抗体など、多くの生物製剤が開発され、治療に格段の進歩をもたらした。しかしながら、これらの治療薬は必ずしも全ての患者に有効であるわけではなく、また、治療中に徐々に有効性を失うことも知られており、異なるメカニズムの新規治療薬の開発が求められている。そこで、従来と異なった作用機構および治療標的が求められており、本研究ではこれまでにない試みとして、自然免疫受容体・糖鎖リガンド軸を標的とした治療薬の開発を試みた。

本研究開発プロジェクトの前半では、1) 自然免疫受容体分子のナチュラルリガンド糖蛋白質の同定、2) リガンド糖タンパク質を特異的に制御する抗体の作製、3) 自然免疫分子を特異的に制御する抗体の作製、4) 糖鎖修飾酵素の投与による体内リガンド糖鎖の人為的制御により、自然免疫分子の糖鎖認識を制御する治療法の開発を研究開発目標とした。以下詳細を述べる。

1) 自然免疫分子のナチュラルリガンド糖蛋白質の同定: 糖鎖修飾が特定蛋白質上に見られる例はまだ前例が少ないが、本研究開発では可溶化自然免疫受容体分子を用いて、骨芽細胞上にナチュラルリガンド糖蛋白質が存在することを見出した。

2) リガンド糖タンパク質を特異的に制御する抗体の作製: 特定糖鎖の検出は従来植物由来レクチンなどで可能ではあるが、より特異的で、生体内投与が可能なほどの特異性およびアフィニティを持ったツールは開発されていない。本研究開発では免疫宿主にリガンド欠損マウスを用い、また抗原として用いたリガンド糖タンパク質の体内安定性を高める工夫をした結果、リガンド糖鎖を特異的に検出可能な抗体の樹立に成功した。なお獲得したハイブリドーマのBCR可変領域配列も取得した。

3) 自然免疫受容体分子を特異的に制御する抗体の作製: 自然免疫受容体分子を特異的に検出する抗体は市販されているが、自然免疫受容体分子を介するシグナルを入力できるアゴニスティックな抗体は存在しなかった。我々は破骨細胞の分化を抑制する抗体を選定する戦略により、アゴニスト抗体の樹立に成功した。この抗体産生ハイブリドーマに関しても、BCR可変領域配列を取得した。

4) 糖鎖修飾酵素の投与による体内リガンド糖鎖の人為的制御: リガンド糖鎖の体内存在量を増加させる糖鎖修飾酵素の投与により、自己免疫疾患の実験モデルの重症度が軽減されることを見出した。

このようにして開発したツールを用いて、研究開発期間後半は、5) 自然免疫受容体 およびその糖鎖リガンドの体内局在の解析、6) リガンドおよび抗体を用いた治療法の開発、を研究開発目標とした。

5) 自然免疫受容体 およびその糖鎖リガンド糖鎖の体内局在の解析: 自然免疫受容体分子特異的抗体によっては、リンパ組織内自然免疫受容体の発現細胞を検出できた。一方リガンド糖タンパク質特異的抗体により、リンパ組織および関節内リンパ球におけるリガンド糖タンパク質の発現を検出することができた。最終的に

6) 自然免疫受容体、およびその糖鎖リガンドに対する抗体を用いた治療法の開発: まず自然免疫受容体に対する抗体をコラーゲン誘導関節炎誘導時投与し、重症度の低下傾向を見出した。またリガンド糖タンパク質に対する抗体の投与により、DSS誘導腸炎の重症度が緩和されることを見出した。

本研究開発で取得した自然免疫受容体アゴニスト抗体および糖鎖リガンド抗体は世界に先駆けたものであり、特に糖鎖リガンド抗体は特異性の優れた抗体である。また自然免疫受容体アゴニスト抗体はヒトの自然免疫受容体蛋白質にも親和性を示すものであり、糖鎖リガンド抗体作製に用いた免疫抗原の糖鎖リガンドはヒト自然免疫受容体蛋白質も親和性を示すことから、治療薬の開発に利用できるものと考えている。またそれぞれの抗体のBCR可変領域配列を取得しており、リコンビナント抗体の作製やヒト化抗体の作製も容易であると期待される。また、本研究により、免疫組織内での糖鎖リガンド発現制御機構が存在する可能性を見出しており、さらなる科学的発見や治療薬の開発につながる可能性がある。

本研究では世界に先駆け自然免疫受容体分子-糖鎖リガンドを標的として新たな治療法を開発することを目指して研究を進め、新たな治療法のコンセプトを樹立することに成功した。研究開発過程で遅延が生じた場面があったが、研究班内での緊密な研究協力により、困難を乗り越え、研究開発目標を達成することができた。この過程で得られた成果は論文として発表するとともに、特許を申請する予定である。また、研究インフラおよび研究手法も本研究開発の成果の一つである。

Glycoforms could be a good therapeutic target, but lacks of specific targeting strategy and technology made this field to be a remaining frontier. We previously found that knockout mice of an innate immune receptor spontaneously develop autoimmune diseases and bone disorder similar to human rheumatoid arthritis and osteopetrosis, indicating that the innate immune receptor plays an important role for the regulation of the immune system and bone metabolism. Furthermore, we found that this immune receptor has a carbohydrate ligand. Based on these findings, the innate immune receptor – glycoprotein axis is suggested to be a good therapeutic target for immune and bone metabolic diseases. Therefore, we aimed to develop new therapeutics to treat immune/bone disorders by engineering this innate immune receptor–glycoprotein axis. For this, we have proceeded 4 research projects; 1) identification of carrier glycoproteins of the glycoligand; 2) development of specific antibodies to detect the glycoligand; 3) development of antibodies against the innate immune receptor which can modify the innate immune receptor signaling; 4) establishment of a therapeutics using a carbohydrate modification enzyme to increase the functional activity of the glycoligand. After 5 years research, 1) we have identified natural carrier glycoproteins in osteoblasts; 2) we have succeeded in producing anti-glycoligand antibodies, and determined the BCR VDJ sequence of this antibody; 3) we have developed anti-innate immune receptor antibody which can regulate differentiation of osteoclasts, and determined the BCR VDJ sequence; 4) we have found that treatment with a carbohydrate modification enzyme can regulate the development of experimental models of autoimmune diseases. Using these tools, 5) we also tried to analyze the localization of the glycoligand and the innate immunoreceptor in the immune system, and found positive cells to these anti- glycoligand/ anti-innate immunoreceptor antibodies in lymphatic organs and synovial tissues. Finally, 6) we treated rheumatoid arthritis model mice with anti-immunoreceptor antibody, and found that this antibody tended to suppress disease scores. Furthermore, we treated colitis model mice with anti-glycoligand antibody, and found that disease severity was significantly suppressed. Thus, we have successfully accomplished these projects, and established antibodies for the development of new therapeutics