

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



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 糖鎖抗原を創薬ターゲットとする病原性抗酸菌感染症予防および治療法の開発
(英語) Development of Prevention and Treatment of Pathogenic mycobacteria Infections Using Glycoconjugate Antigens as Drug Targets

研究開発実施期間: 平成30年11月15日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 岩渕和久
(英語) Kazuhisa Iwabuchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 学校法人順天堂 順天堂大学・大学院医療看護学研究科・教授
(英語) Juntendo University Graduate School of Healthcare and Nursing Professor

II 研究開発の概要

結核は、2020年のWHOの集計によると全世界で2019年だけで1,000万人が罹患、140万人が死亡する、単一の感染症としてはCOVID-19を除いて死者数が最も多い感染症である。さらに近年、途上国を中心に多剤耐性結核菌による感染が顕著に増加している。さらに結核に対しては、BCGが小児に対して有効であるが、成人となるとBCGの効果が失われる場合が多いため、新たな作用機序に基づく新規結核予防薬・治療薬の開発が急務とされている。一方、NTM症患者も近年急増しており、日本は患者数が最も多く(IASR 38:245-247, 2017)、近い将来には死亡者数が結核よりも多くなると予想されている。NTM症は有効な治療法がほとんど無く、長期にわたり治療が必要となる。したがって、結核やNTM症など病原性抗酸菌感染症に対する新たな作用機構に基づく予防法・治療法の開発は喫緊の課題である。

本事業は、結核菌とNTMが好中球やマクロファージ・樹状細胞に貪食される(侵入する)際に用いる共通のLAMの糖鎖構造を標的とすることで、全ての病原性抗酸菌に対する有効なワクチン開発や治療薬開発を目指す従来には無い事業である。本事業では、化学合成した構造の明らかなLAMおよびManCapの部分構造のヒト貪食細胞に対する影響を、超解像顕微鏡解析等により明らかにする。さらに、ゲノム編集を用いて貪食細胞側の分子を改変することにより、受容体およびそのシグナル伝達の機構を明らかにする。そして、構造活性解析に基づいて作出するLAM誘導体人工糖鎖を抗原とした結核菌やNTMの非オプソニン経路を遮断してFc受容体を介した貪食を促すIgG抗体の作出を目指す。本事業による感染・殺菌回避に関与す

るファーマコファを基に、宿主細胞による病原性抗酸菌の殺菌を促進する方法が発見されれば、画期的な薬剤標的となり、その意義は非常に大きい。

本研究は、結核菌や各種非結核性抗酸菌 (NTM) 等病原性抗酸菌の被貪食及び殺菌回避 (持続感染) に必須な糖鎖モチーフに着目し、この糖鎖を創薬ターゲットとする抗酸菌感染症の予防・治療法の開発を目指す。具体的には、(1) 様々な ManLAM 誘導糖鎖を化学合成し、好中球・マクロファージ・樹状細胞の貪食誘導・殺菌回避に重要な ManLAM のマンナンコアおよびマンノースキャップ構造を明らかにし、(2) ManLAM がターゲットとする好中球・マクロファージ・樹状細胞の分子群を同定し、(3) ManLAM の病原性をミミックすると考えられた人工糖鎖をエピトープとする抗体の作製を試み、得られた抗体が ManLAM を認識することを確認すると共に、感染阻害作用を検証することを目指した。

まず、病原性抗酸菌の貪食・殺菌回避過程に重要と考えられているマンナンの部分構造の合成とその誘導糖鎖を合成し、その機能評価を行うことにより、高機能性の糖鎖誘導糖鎖および、抗体産生用および産生抗体の選択性バリデーション用のオリゴ糖の合成を試みた。そのために、機能化に適した官能基を有する糖鎖部の合成とそれを用いた機能化について検討した。まず、分岐鎖を有するマンナン誘導糖鎖の合成に適切な糖鎖ユニットの合成法の開発を行った。その結果、環状の保護基を用いることにより、単段階で糖鎖伸長に必要な水酸基とそれ以外の水酸基を区別する条件を見出した。それを用いることにより、短工程で分岐 2 糖の合成に成功した。得られた 2 糖を用いて、ブロックカップリングによる 10 糖合成を検討した。その結果、隣接基効果を用いることなく、分岐鎖をもった糖鎖の立体選択的な伸長が可能であることを見出した。その結果、標的糖鎖である分岐 10 糖の効率的な合成に成功した。続いて、得られた糖鎖に導入した官能基化用の官能基であるアジド基を用いてさらなる修飾化を検討した。その結果、温和な条件下、高効率で 10 糖の修飾化に成功した。本合成は、共通中間体として合成したアジド基を有する 10 糖の末端のアジド基を還元した後、アミド化することにより合成した。また、10 糖多量体は、標的受容体への親和性を向上させることにより、標的 10 糖の好中球の抗酸菌の貪食における役割を解明することを目的とした。殺菌回避関連糖鎖については、(1, 2) マンノシド 3 糖の合成を行った。化学選択的グリコシル化を行うことにより、各種誘導糖鎖の合成への共通中間体として機能するアジド基を有する 3 糖の合成を達成した。

ManLAM の被貪食及び殺菌回避 (持続感染) に必須な糖鎖モチーフに対する宿主因子の関与を明らかにするため、マクロファージ様細胞株 THP-1 及び好中球系細胞 HL-60 に対し、遺伝子編集法を用いて種々の宿主因子の遺伝子破壊株を試みた。そのうち、THP-1 細胞において、前年度に確立した方法に従って、病原性抗酸菌の侵入に関与する $\alpha_M\beta_2$ インテグリンのサブユニット CD11b の遺伝子 KO 細胞を作製した。CD11b ゲノムの全アレルにおいてフレームシフト変異が見られ、また未分化時及び PMA 刺激による分化時における細胞表面発現の CD11b が完全に欠損していた。この細胞の貪食能を解析したところ、ManLAM コートビーズを貪食出来なかった。従って、ヒト貪食細胞には既知の ManLAM 受容体以外に病原性抗酸菌の貪食に関与する受容体は存在しないと考えられた。

また別の遺伝子として、貪食や食菌に関与すると考えられるマイクロドメインの構成成分であるスフィンゴ脂質に関して、脂肪酸の長さが影響するか調べるため、6 種類あるセラミド合成酵素のうち主に C24 の長さの脂肪酸を基質として使用するセラミド合成酵素 2 (CERS2) の KO 細胞を作製した。CERS2 ゲノムの全アレルにおいて変異を確認した。さらに、C24 含有スフィンゴ脂質の生合成が消失し、大部分が C16 含有スフィンゴ脂質の組成になっていることを確認した。CerS2^{-/-}THP-1 を用いて、PMA 及びインターフェロン γ 処理による分化マーカー発現量への影響について調べた。CERS2 依存的な細胞表面タンパクの変化は観察されなかったものの、細胞内の膜動態に関する分子の発現量に変化が観察された。

合成した人工糖鎖に対する抗体を作成することで、非結核性抗酸菌を効率よく貪食させる抗体の作成に成功した。

Tuberculosis (TB) is the deadliest single infectious disease except for COVID-19, with 10 million cases and 1.4 million deaths worldwide in 2019 alone, according to the WHO tally for 2020. In recent years, the number of infections caused by multidrug-resistant *M. tuberculosis* has increased markedly, especially in developing countries. BCG is effective against TB in children, but in many cases, BCG loses its efficacy in adults. In addition, there are few effective treatments for NTM disease, and it requires long-term treatment. Therefore, the development of preventive and therapeutic methods based on new mechanisms of action against pathogenic mycobacterial infections such as tuberculosis and NTM disease is an urgent issue.

This project aims to develop effective vaccines and therapeutic agents against all pathogenic Mycobacteria by targeting the glycan structure of lipoarabinomannan (LAM), which is commonly used by *M. tuberculosis* and NTM for phagocytosis (invasion) by neutrophils, macrophages and dendritic cells. In this project, we will clarify the effects of chemically synthesized substructures of LAM and ManCap on human phagocytes by STED microscopy. Furthermore, by modifying the phagocytes' molecules using genome editing, we will elucidate the receptor and its signaling mechanism. Based on the structure-activity analysis, we aim to produce specific antibodies that block the non-opsonin pathway of *M. tuberculosis* and NTM and promote phagocytosis via Fc receptors by using LAM-derived artificial glycans as antigens. Based on the pharmacophores involved in the avoidance of infection and sterilization, the discovery of a method to promote the sterilization of pathogenic antibiotics by host cells would be an epoch-making drug target, which would be of great significance.

First, we synthesized the partial structure of mannan, which is thought to be important in the phagocytosis and bactericidal evasion processes of pathogenic antibiotics, and its derivatives, and evaluated their functions to synthesize highly functional glycan derivatives and oligosaccharides for antibody production and selectivity validation of the produced antibodies. we succeeded in synthesizing the partial structure of mannan core structure. For bactericidal evasion-related glycans, $\alpha(1,2)$ mannoside saccharides were synthesized.

In order to elucidate the involvement of host factors in the glycan motifs essential for phagocytosis and bactericidal evasion (persistent infection) of ManLAM, we attempted gene disruption of various host factors in the macrophage-like cell line THP-1 using gene editing methods. In THP-1 cells, we generated gene knockout cells of CD11b, a subunit of $\alpha M\beta 2$ integrin, which is involved in the invasion of pathogenic mycobacteria, according to the method established in the previous year. The cells were completely deficient in the cell surface expression of CD11b when undifferentiated and when differentiated by PMA stimulation. The phagocytosis of these cells showed that they could not phagocytose ManLAM-coated beads. Therefore, it is considered that there are no receptors involved in phagocytosis of pathogenic mycobacteria other than the known ManLAM receptors in human phagocytes.

By creating antibodies against the synthesized artificial glycans, we succeeded in creating antibodies that efficiently phagocytose non-tuberculous mycobacteria.