

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) ポリシアル酸認識機構を基盤とする精神疾患と癌の診断・治療の技術革新研究  
(英語) Innovative research for the diagnostic and therapeutic techniques of the mental disorder and cancer based on the recognition for polySia structure

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) 佐藤ちひろ  
(英語) Chihiro SATO

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
(英語) Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Professor

## II 研究開発の概要

人々が心身ともに健康的な生活を送ることは重要なことである。その生活を脅かすこととなる病気の罹患は、患者の心身を共に不全に陥れ、その人にとっても社会にとっても大きな問題となる。そこで疾患を早期に発見し、治療を行うことは古くから重要な課題と認識され、世界中でさまざまな疾患に対する診断や治療法の開発が行われてきている。そのような開発にはこれまでも基礎的な研究から疾患に関わる様々な遺伝子やタンパク質の重要性やそのメカニズムが明らかになり、それらの分子をターゲットに研究開発が行われてきている。近年ではワクチン開発のパラダイムが変換する薬が開発・利用され世間を席卷している。例えば COVID-19 に対するワクチンである。COVID-19 の予防薬としてのワクチンに用いられた物質は、これまでワクチン開発で広く用いられてきた弱毒化や不活化ウイルスタンパク質や組換え体ウイルスタンパク質ではなく、ウイルスのスパイクタンパク質をコードする RNA(遺伝子)であった。その遺伝子を細胞へ送達しその細胞に発現させたウイルスタンパク質に対する抗体の産生による疾患の予防を行うという戦略に基づいている。その有効性は目を見張るものである。しかしこの遺伝子ワクチンに関する研究の端緒は 1990 年代から始まり、30 年後の現在ようやく花開いている状態であるといえる。

上記のように次世代の治療・診断のための創薬の開発には、新たなターゲット分子を用いた基盤研究と応用研究が必要であり、現在その可能性が最も高いターゲットとなる生体分子は糖鎖である。従って糖

鎖の創薬研究を今開始することが重要であり、必須である。糖鎖は、ゲノム、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖といわれており、その重要性は示唆されているが、解析が他の2つの生命鎖であるゲノムやタンパク質に比べてかなり遅れている。それには理由がある。構造解析が他の生体分子と比較にならないほど難解という点、遺伝子からの直接産物ではないために、ゲノム解析では構造を知ることが不可能である点、認識されるものと認識するもの間がタンパク質同士の様な単純なものではなく、水酸基や負電荷のパターン認識が主流であるためにその解析が複雑であることが底流にあり、研究がなかなか進まない現状がある。しかし糖鎖研究もプローブ開発やその解析法が進むことでようやくその解析が他の分子と同程度に行える状態になってきた。そのため、疾患に関与する糖鎖を利用し、診断や治療の可能性を明らかにしていく研究は現在益々盛んになってきており、本研究課題もその流れを汲むものであり、今開始しなくてはならない重要な課題である。特に癌や精神疾患は現代社会において大きな社会問題であり、その診断法や治療法を開発することは多くの人が豊かで健康な社会生活を送るために重要かつ喫緊の課題である。これまでに数多くのアプローチが知られているが、糖鎖をターゲットした診断・治療法の開発は上述した理由により他の領域に比べて大変遅れている。しかしながら糖鎖は細胞表面に存在し、その細胞の性質を司ることから、正常時から疾患時によって劇的に変化することが知られている分子でもある。本研究では癌や精神疾患で変化する疾患関連糖鎖、特にポリシアル酸をターゲット糖鎖として、その糖鎖に対する有用プローブを開発すること目的としていた。将来的にそれらのプローブを応用することで、癌や精神疾患への診断治療へと展開できることを考えている。本研究期間では有用プローブの開発に対して具体的には「項目(1) ポリシアル酸の多様性を識別する抗体」と「項目(2) ポリシアル酸結合低分子化合物の作製」を行った。

項目(1) ポリシアル酸の多様性を識別する抗体に対する研究では、世界でも当研究室にしかない多様なポリシアル酸鎖を認識する抗ポリシアル酸抗体について、癌検出に資する可能性を大規模かつ網羅的に解析し、検出や治療に最も資する抗体を選抜した。本研究では北島健教授(名古屋大学糖鎖生命コア)と協力して行った。また、その後の組換え体抗体の作製を鑑み、cDNAの調整、CDRのクローニングも同時に行った。その後、完全ヒト化抗体、高機能化抗体の作製、高感度検出方法の確立を行った。プラスミドの作製に関しては中野秀雄教授(名古屋大学大学院生命農学研究科)と一部協力して行っている。また本研究にて開発したこれらの抗体は既存の癌検出に用いられる神経芽細胞腫に対するGD2抗体や肺癌細胞に対するシアリルルイスX抗体よりも高感度での検出が可能であること、ポリシアル酸依存的な内在化効果があることもわかった。一方、ポリシアル酸の癌の悪性形質メカニズムを明らかにするために、癌のモデル細胞細胞を用いてポリシアル酸鎖を生合成するとされる生合成酵素の安定発現株を作製し、それらのモデル細胞を用いて、細胞増殖、コロニー形成能、浸潤、移動などの癌形質の悪性化について詳細に検証した。その結果、ポリシアル酸およびポリシアル酸転移酵素特異的な悪性形質の存在が明らかになった。このことは本研究で開発した抗体が癌治療に資する抗体であることを示している。

項目(2) ポリシアル酸結合低分子化合物の作製では、ポリシアル酸に結合する既知の低分子をリードとして、新規なポリシアル酸結合分子を化学合成することが当初の計画であった。またそれに加えてFDA-approvedライブラリーよりランダムスクリーニングを行うことで、ポリシアル酸に結合する新規な構造を明らかにすることも行った。前者は東京工業大学 田中浩士博士の協力のもと行った。これまで多糖と低分子の相互作用解析はほとんど行われていなかったため、アッセイ系には我々が行ってきたポリシアル酸と神経伝達物質とのフロンタルアフィニティークロマトグラフィー(FAC)を用いた相互作用解析法を用いた。まずカラムの低容量化、ポンプ流量等の改良、オートサンプラーを用いた多検体の解析系を立ち上げ、少量で多検体を解析できるように改良した。次に、ポリシアル酸との結合が明らかになっているドーパミンをリードとして、新規化合物を35種類程度化学合成した。これらの化合物との結合性をFACにより解析し、3-10倍程度結合力が強い化合物の作製が確認された。これらの解析した化合

物の中にはアミロイドタンパク質の非破壊検出用に作製された分子も含まれていたが、この分子もポリシアル酸と結合しうることが明らかになった。一方、ランダムスクリーニングでは、一次スクリーニングから3次スクリーニングを行い、1200個の既知物質のサンプルから18個のポリシアル酸に結合できる化学構造が明らかになった。これらの構造はモデリングソフトの解析から、ポリシアル酸の立体構造が結合に重要であることが示唆された。また、FACの結合性から結合するモードが複数種類存在することが示唆された。

今後、本項目1および、本項目2の研究課題ともにさらなる展開が大きく見込まれる。いずれも疾患関連糖鎖としてのポリシアル酸の重要性が明らかになってきている今、いずれも重要かつ有効なプローブとなりうることが予想され、今後研究を継続していくことにより、糖鎖に関わる癌および精神疾患でのバイオマーカー、非破壊的検出法、治療など、重要な課題が解決する可能性が高い。

It is important that people can lead a healthy life both physically and mentally. A disease that causes physical and mental health problems is a serious threat not only for the patient, but also for the society. Therefore, it has long been recognized that an early diagnosis and a treatment of diseases are important, and diagnostic and therapeutic methods for various diseases have been developed around the world. Basic researches have revealed that various genes and proteins are significantly involved in diseases and their pathogenic mechanisms, and those research and development that target those molecules have been conducted. In recent years, drugs that transform the paradigm of vaccine development have been developed and utilized, and they have taken the world by storm. For example, a vaccine against COVID-19 was developed using RNAs (genes) encoding viral spike proteins, without using weakened or inactivated viral proteins or recombinant viral proteins that have been widely used in vaccine development. It was RNA (gene) that encodes the viral spike protein. The strategy includes a first step to deliver the gene to cells, a second step to induce antibodies against the viral protein that the cells express, and a final step to prevent disease by the produced antibodies. We have found that this strategy was remarkably effective. However, who could imagine the effectiveness of this strategy when the gene vaccines began in the 1990s? We should know that 30 years have already passed until now when this strategy flourishes.

As mentioned above, the development of new drugs for treatment and diagnosis of next generation requires a long basic and applied research to find new target molecules. The glycan chain can be recognized as a new target biomolecule with the highest potential, because it has not investigated so far. Therefore, it is now important and essential to start drug discovery research, focusing on glycans. Glycans are considered to be the third life chain after genomes and proteins, which are the first and second life chains, respectively. Biological importance of glycans has been suggested, but the knowledge of them has lagged far behind, compared with that of two other life chains. There are three reasons for this: (1) structural analysis of glycans is incomparably difficult, compared with two other biomolecules; (2) it is impossible to know the glycan structures by genome sequences, because they are not a direct product from genes; (3) a glycan-mediated interaction does not follow the lock-and-key theory which is typical for protein-protein interactions, but rather mainly follow the pattern recognition of hydroxyl and negative charged groups of glycans. Eventually, the analysis of glycans is complicated, and it is difficult to make a rapid progress in this field. However, along with the development of probes and their analytical methods, glycan research has finally reached a point where it can be performed at the same level as other molecules, and those researches to develop the diagnosis and treatment using diseases-involved glycans are becoming more and more popular. Thus, the subject of this research is in line with this trend, and is also an important subject that must be started now. In particular, cancer and psychiatric disorders are major social problems today, and the development of diagnostic and

therapeutic methods for them is an important and urgent issue for many people to lead a fruitful and healthy social life. The development of glycan-targeted diagnostic and therapeutic methods has lagged behind as mentioned above; however, a number of approaches are possible, because glycan structures change dramatically on the cell surface, depending on normal to impaired conditions, to control the properties of the cells. Thus, the aim of this study is to develop useful probes for disease-related glycans, especially acidic glycans, which are altered in cancer and psychiatric diseases. In the future, we hope to apply these probes to the diagnosis and treatment of cancer and psychiatric diseases. In this research period, we have sought to develop useful probes: specifically, " (1) antibodies to discriminate diversified structures of polysialic acid" and " (2) preparation of polysialic acid-binding small compounds".

In the research of (1), we conducted a large-scale and comprehensive analysis of anti-polysialic acid antibodies that recognize a variety of polysialic acid chains to detect cancers. We could actually select antibodies that were most useful for detection and treatment. This feature is unique to our laboratory that owns the largest collection of anti-polysialic acid antibodies in the world. In addition, in view of the subsequent production of recombinant antibodies, we carried out cDNA preparation and CDR cloning simultaneously. After that, we produced fully humanized antibodies and highly functionalized antibodies, and also established a highly sensitive detection method<sup>0</sup>. The antibodies developed in this study were found to be more sensitive than the existing antibodies against neuroblastoma and lung cancers, and to have a polysialic acid-dependent internalizing effect. On the other hand, in order to clarify the mechanism of polysialic acid-induced malignant transformation of cancer, we generated stable expression cell lines with biosynthetic enzymes that are known to biosynthesize polysialic acid chains, based on the cancer model cells. We also examined the malignant phenotypes of the cancer cells such as cell proliferation, colony-forming ability, invasion, and migration in detail using these model cells. The results revealed there are both polysialic acid-specific and polysialic acid-biosynthesizing enzyme-specific malignant phenotypes. Taken together, our results indicate that the antibodies developed in this study are useful for cancer therapy.

The initial plan for the preparation of polysialic acid-binding small molecules was to chemically synthesize new molecules using the known small molecules that bind to polysialic acid as a lead compound. However, in addition, we conducted random screening of FDA-approved libraries to identify novel structures that bind to polysialic acids. Since the interaction analysis between polysaccharides and small molecules has not been established so far, we used our previously established method of frontal affinity chromatography (FAC) for polysialic acid-neurotransmitter interaction analysis as the assay system. First of all, we improved the column capacity, pump flow rate, etc., and set up a multi-sample analysis system using an autosampler so that we could analyze many samples in a small volume. Next, we chemically synthesized about 35 new compounds that stemmed from dopamine as a lead compound, which has been shown to bind to polysialic acid. The binding properties of these compounds were analyzed by FAC, and it was confirmed that the compounds with 3-10 times stronger binding affinity could be synthesized. Some of these compounds were prepared for the non-destructive detection of amyloid proteins, and it was found that these molecules could also bind to polysialic acid. On the other hand, in the random screening, from the primary screening to the tertiary screening, 18 chemical structures that could bind to polysialic acid were identified from 1200 samples of known substances. These structures were analyzed by the modeling software, suggesting that the steric structure of the polysialic acid is important for binding. In addition, the binding properties of FACs suggest that there are multiple binding modes.

Further development of both of these research topics is expected in the future. As the importance of polysialic acid as the disease-related glycans has become clearer, both of them are expected to be important and effective probes, and there is a high possibility that continuing research will solve important issues such as

biomarkers, non-destructive detection methods, and treatment of cancer and psychiatric diseases related to glycans, based on the glycan and glycan recognition molecules.