

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) ケラタン硫酸二糖とそのアナログによる COPD 治療効果に関する研究  
(英語) Therapeutic effects of keratan sulfate disaccharide and its analog against COPD

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) 谷口直之  
(英語) Naoyuki Taniguchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター 糖鎖オンコロジー部・部長  
(英語) Osaka International Cancer Institute, Department of Glyco-Oncology and Medical Biochemistry・  
Head

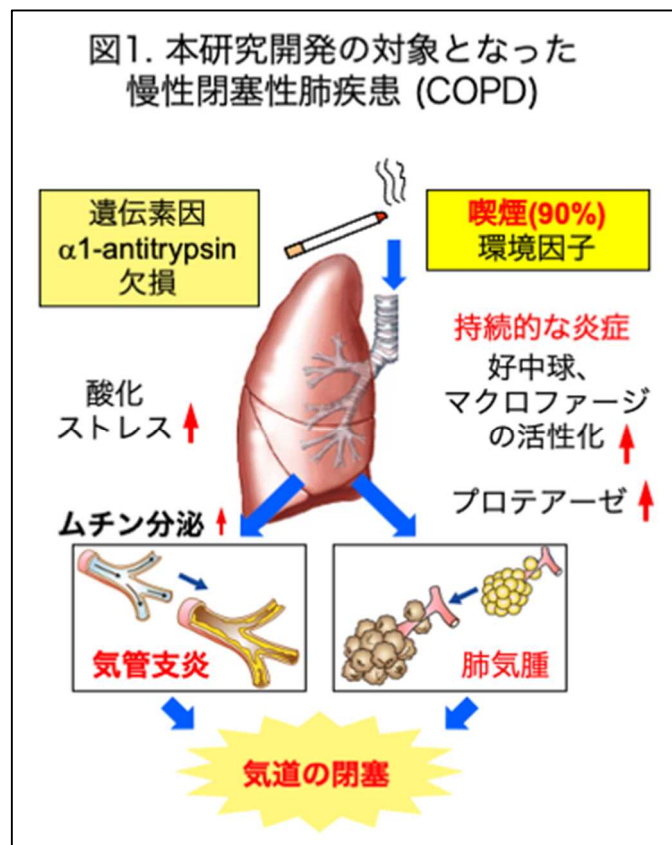
## II 研究開発の概要

<研究の背景と概要>

慢性閉塞性肺疾患 (COPD: chronic obstructive pulmonary disease) は喫煙や環境汚染物質が主原因となる、難治性の肺機能障害である。気管支や肺胞の破壊により呼吸機能が低下し、また慢性的な炎症症状がみられる。またウイルス感染や細菌感染により増悪することが特徴で、それにより救急医療などが必要なことから医療費は莫大になっているとされている。世界の推定患者数は 2015 年において約 6,500 万人であり、日本では年間約 2 万人が COPD が原因で亡くなっている。今後、患者数の増加と医療費の増大が懸念されているが、未だ有効な治療法は開発されておらず、気管支拡張剤の投与や酸素吸入などの対症療法の実施が治療の中心となっている (図 1)。

これら現状を受けて、現在、COPD に対するより有効な新規治療法の開発が求められている。特に、発症メカニズムに基づいた、既存の概念に囚われない革新的な治療法の開発が求められている。

本研究課題では、糖鎖を利用した、より有効な COPD 治療法の開発をめざした。特に、代表者らの先行研究により抗炎症作用と COPD の抑制効果が示されたケラタン硫酸二糖 L4 とそのアナログについて、その治療効果を、COPD マウスモデルで実証することを目的とした。また、その分子作用メカニズムを *in vitro* および *in vivo* で解明することで、より安全で効果的な創薬シーズとしての開発をめざした。



## <研究計画>

本研究開発の目的を達成するため、以下の 4 点を計画し、実施した。

### 1. L4 誘導体および多量体化 L4 による COPD 治療効果の検証

L4 の三量体や多量体を有機合成により得る。また新たな L4 アナログを有機合成する。これら化合物を COPD モデルマウスへ投与し、抗炎症作用、抗 COPD 作用について検証する。

### 2. L4 投与による免疫細胞シグナルの解析

ヒトおよびマウスから炎症性細胞を単離(もしくは誘導)する手法を確立する。それら炎症性細胞を L4 および L4 誘導体で刺激し、プロテオーム解析およびトランスクリプトーム解析を行い、L4 により引き起こされるシグナル伝達経路を明らかにする。

### 3. ランジェリン欠損マウスを用いた L4 受容体としての検証

ランジェリン欠損マウスを得る。ランジェリン欠損細胞へ L4 および L4 誘導体添加により引き起こされる変化を、炎症性サイトカインの産生量を中心に解析する。またランジェリン欠損マウスに COPD を誘発し、L4 の治療効果を検証する。

### 4. 患者肺試料を用いたランジェリンの COPD 病態への関与の解析

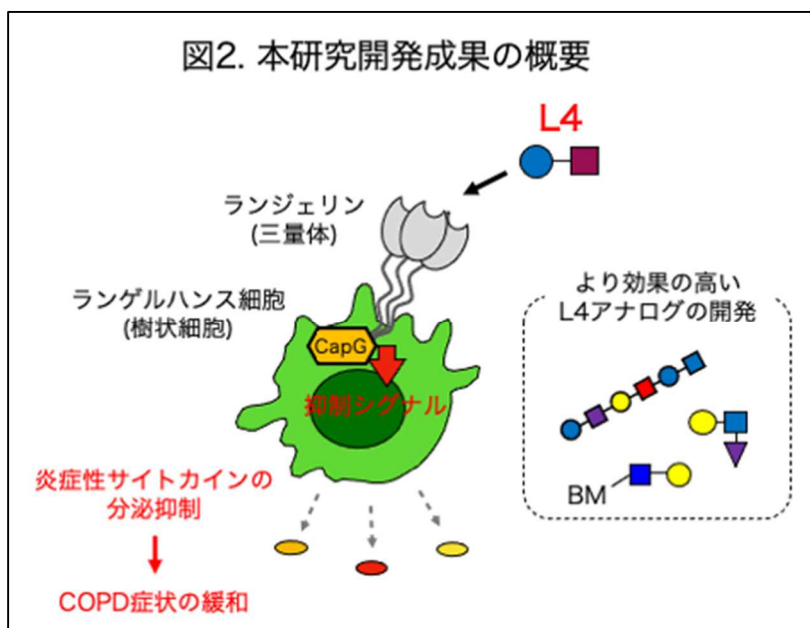
患者試料中のランジェリン陽性細胞の分布やランジェリンの発現量を免疫染色やウェスタンブロッティングで解析し、生体の COPD 病態におけるランジェリンの寄与の度合いを検証する。

<研究開発成果について>

L4 と L4 誘導体が、マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC: Bone marrow-derived dendritic cell) に作用し、炎症性サイトカインの発現抑制を起こすことを明らかにした。また、L4 のより詳細な分子作用機構を解明するために、L4 のターゲットタンパク質と考えられる C 型レクチン受容体の一つ、ランジェリンと相互作用する分子群を同定した。それら分子群の中から、CapG (Macrophage capping protein) に注目し、解析を進めた結果、CapG の一部は核に局在し DNA のプロモーター領域に結合することによって、炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。このことは、L4 がランジェリンと CapG を介して炎症性サイトカインの発現分泌を抑制することで抗炎症作用を引き起こし、COPD 様症状の緩和につながることを示しており、L4 の分子作用メカニズムの解明を達成した (図 2)。

一方で、ゲノム編集の技術を用いて、ランジェリンの発現を欠損するノックアウトマウスを作製した。このマウスに L4 を投与後、COPD を誘発したところ、野生型マウスでは COPD 様症状の改善がみられた一方、ランジェリンノックアウトマウスでは、症状の改善がみられなかった。このことは、L4 が生体においても、実際にランジェリンを介して抗炎症作用を発揮し、COPD 症状の改善につながることを示唆していた。なお、ランジェリンノックアウトマウスから樹立した骨髄由来樹状細胞では、L4 と L4 誘導体による、炎症性サイトカインの発現抑制は観察されなかった。

より効果が高いと期待される L4 アナログの開発については、複数の候補分子の合成経路の確立に成功し、mg 単位での合成を達成した。



<今後の展望>

本研究開発において、L4 の COPD マウスモデルに対する症状緩和の実証およびその作用メカニズムがほぼ解明されたことから、L4 および L4 誘導体の効果および安全性が証明された。これらの結果は、未だ開発されていない、糖鎖を基盤とした新規の革新的な COPD 治療薬開発につながるものである。今後は、ヒト検体を用いた解析を実施し、ヒトにおける効果の検証を行いたい。

< Background and goals of this research project >

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has been the third most common cause of death in the world. The development of chronic bronchitis in the lung caused by long-term tobacco smoke exposure leads to bronchial obstruction and respiratory failure that is not fully reversible. Approximately 20,000 people die each year from COPD in Japan, although no essential therapy is now available. Our research group previously reported that intratracheal administration of keratan sulfate disaccharide L4 mitigated the symptoms of elastase-induced COPD model mice. Based on these data, we planned to develop L4 and derivatives thereof as novel drug candidates for COPD in this research project. For this, we challenged to clarify the molecular mechanisms by which L4 exhibits the protective

effects against COPD-like phenotypes in mice and to produce more effective derivatives from L4 by using the chemical synthetic approach.

< Main results >

We observed that L4 and derivatives thereof suppressed the expression of inflammatory cytokines in mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). We also demonstrated a C-type lectin receptor; langerin was a receptor for L4 and identified langerin-associated molecules by a combination of immunoprecipitation and mass spectrometry analysis. Among these identified molecules, we performed further experiments about macrophage-capping protein (CapG). Interestingly, CapG functioned as an inhibitory transcription factor to suppress the gene expression of an inflammatory cytokine. These data indicated that the L4-langerin-CapG axis was the mechanism to exhibit an anti-inflammatory effect of L4.

On the other hand, we generated a langerin-deficient mutant mouse by genome editing technology. Then, we induced COPD-like phenotypes in this mutant mouse by intratracheal administration of elastase and assessed the effects of L4. Interestingly, the protective effect of L4 was observed in wild-type mice, but not in langerin-deficient mice, which indicates that langerin is a target molecule of L4 in *in vivo*. In addition, we generated new L4 derivatives in anticipation of more effectiveness.

< Future perspective >

In this project, a protective effect of L4 and derivatives thereof against COPD-like phenotypes was demonstrated in both *in vitro* and *in vivo*. We are now planning to assess L4 effects for COPD in human beings in the future.