

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) ラミニン結合性機能糖鎖を応用した筋ジストロフィー治療薬の開発
(英語) Development of therapeutic agents for muscular dystrophy applying functional laminin-binding glycan

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) 萬谷 博
(英語) Hiroshi Many

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・老化機構研究チーム・研究副部長
(英語) Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology・
Research team for Mechanism of Aging・Theme Leader

II 研究開発の概要

筋ジストロフィーは進行性の筋力低下を認める遺伝性疾患群であり有効な治療法は存在しない難病である。最重篤型に分類される疾患群 (α -ジストログリカノパチー) は、基底膜ラミニンの受容体である α -ジストログリカンの糖鎖異常を原因とし、日本で症例数の多い福山型筋ジストロフィーなどが含まれる。本疾患群は α -ジストログリカンに特徴的な O-マンノース型糖鎖の合成不全による“ラミニン-ジストログリカン糖鎖複合体”の形成障害を起因とする。 α -ジストログリカン糖鎖の構造は長年不明であり病態解明や治療法開発の障壁になっていた。申請者らは α -ジストログリカンから哺乳類で初めて O-マンノース型糖鎖を発見、その合成酵素が α -ジストログリカノパチーの原因遺伝子産物であることを解明し、「糖鎖異常による筋ジストロフィー」という病態概念を提唱した。 α -ジストログリカノパチー原因遺伝子はこれまでに 18 種報告されており、申請者らはそのうち 7 種 (POMT1/2, POMGNT1, FKTN, FKRP, RXYL1, CRPPA) の機能を同定し、 α -ジストログリカノパチーで欠損する O-マンノース型糖鎖 (コア M3 糖鎖) の完全な構造と生合成経路の解明に大きく貢献した。

ラミニンは α -ジストログリカンに特徴的なコア M3 糖鎖上に形成されるキシロースとグルクロン酸のユニットからなる糖鎖リピート構造 (XG リピート) を介して α -ジストログリカンに結合する。即ち、 α -ジスト

ログリカノパチーではコア M3 糖鎖の合成不全により XG リピートが消失し、ラミニンと糖鎖との直接の結合が障害されている。

本計画では、XG リピートを介したラミニン-ジストログリカン複合体の形成を α -ジストログリカノパチーに対する薬物標的とし、XG リピート糖鎖療法の有効性を明らかにすることを目的とする。具体的には、ラミニン結合能をもつ機能的な XG リピート糖鎖を人工合成し、抗 α -ジストログリカン抗体とカップリングさせることで、 α -ジストログリカンとラミニンの生理的な結合を模倣し、その破綻をバイパスできるような薬剤候補分子を創出する。さらに、本バイパス療法戦略をより強固にする概念検証 (POC) を確保するため、 α -ジストログリカンとラミニンの両者に特異性をもつ二重特異性抗体を作出し、 α -ジストログリカンとラミニンの複合体形成による治療効果を確認する。これまでに我々が開発してきた疾患モデル細胞やモデル動物を用いて、ラミニン結合活性の回復や筋ジストロフィー症の治療効果を明らかにすることで、ラミニン結合性機能糖鎖を応用した α -ジストログリカノパチー治療法の提唱を目指した。

本計画では、3つの研究計画項目、①治療応用を視野にいたしたラミニン結合性 XG リピートの人工合成、②ラミニン結合性 XG リピートカップリング抗体の開発、③抗体カップリング法を用いた二重特異性抗体による本治療戦略の POC の確保、を設定し研究を進めた。

① 治療応用を視野にいたしたラミニン結合性 XG リピートの人工合成

コア M3 糖鎖 [(3G1cA β 1-3Xy1 α 1)_n-3G1cA β 1-4Xy1 β 1-4RboP-1RboP-3GalNAc β 1-3G1cNAc β 1-4(phospho-6)Man α 1-Thr]においてラミニンとの結合に必要な構造は(3G1cA β 1-3Xy1 α 1)_nで表される XG リピート糖鎖である。また、コア M3 糖鎖に特徴的なリビトールリン酸のタンデム構造 (RboP-1RboP-) は、哺乳類ではこれまでに α -ジストログリカンのコア M3 糖鎖のみでしか検出されておらず、 α -ジストログリカンにおけるコア M3 糖鎖の形成と機能に必要な構造であると考えられている。分担研究者の田村 (鳥取大) は、RboP 以降の糖鎖構造の有機化学合成法の確立を目指し、これまでに、XG リピート糖鎖の合成において、XG 二糖 (Xy1 α 1-3G1cA) および XG 四糖 (Xy1 α 1-3G1cA β 1-3Xy1 α 1-3G1cA) の立体選択的かつ位置選択的な合成に成功し、現在、XG 六糖 (Xy1 α 1-3G1cA β 1-Xy1 α 1-3G1cA β 1-3Xy1 α 1-3G1cA) の合成を進めている。また、XG リピート糖鎖はタンデムリビトールリン酸の非還元末端側に修飾されることから、リビトールリン酸を含む糖鎖構造が必要であると考え、XG リピートの合成開始点となるキシロシルリビトールリン酸 (Xy1 β 1-4RboP-1RboP) の合成を試み、立体選択的かつ位置選択的な合成に成功した。

天然由来の XG リピートは 20 糖以上あると考えられており、長鎖リピート糖鎖は有機化学合成だけでは困難な場合も想定されることから、XG リピート糖鎖合成酵素 LRAGE を利用した酵素法による糖鎖合成を検討した。研究代表者の萬谷 (都健康長寿医療セ) は、膜貫通領域を除いて分泌シグナルと myc-tag を融合した分泌型 LARGE-myc を HEK293T 細胞に発現させ、培養上清から抗 myc-tag 抗体結合アガロースビーズを用いて精製した。分担研究者の田村より提供された XG 四糖を基質として、LARGE-myc と UDP-G1cA および UDP-Xy1 を反応させることで XG リピート糖鎖の伸長を試みた。UDP-G1cA および UDP-Xy1 を単独で反応させることで 1 糖ずつ伸長させ、7 糖まで高効率で伸長させる反応条件を確立した。

このように有機化学合成法および酵素法で合成した XG リピート糖鎖、あるいは最終目標産物である XG リピート糖鎖を結合した抗体については、ラミニンへの結合活性や安定性、鎖長 (糖数) による結合活性への影響などを物理化学的に評価する必要がある。こうしたラミニン結合活性などの評価方法を開発するため、分担研究者の山口 (東北医科薬科大学) は、分担研究者の田村より提供された XG 二糖と XG 四糖を用いて、NMR によるラミニン結合活性の測定を試みた。研究開始当初は市販のラミニンを使用していたが、合成糖鎖とラミニンの分子量の差が大きく、測定に大量のラミニンが必要となったため、哺乳動物細胞を用いたラミニンの大量発現系を構築し、ヘパリンカラムを用いた精製法を確立した。既報 (Briggs DC et al, Nat. Chem., 12, 810-814, 2016: ラミニン G ドメインの構造解析) の通り XG 二糖とラミニンの結合は認められな

ったが、今回の山口の測定において、XG 四糖とラミニンの相互作用が観察され、高感度にラミニン結合活性を測定することが可能となった。今後作製される六等以上の長鎖 XG リピート糖鎖やカップリング抗体の機能評価における本結合活性測定法の活用が期待される。

②ラミニン結合性 XG リピートカップリング抗体の開発

分担研究者の林（東京薬科大）と小林（神戸大学）は、XG リピート糖鎖を結合するための抗体開発およびカップリング方法の検討を行った。XG リピート糖鎖と抗体のカップリング方法の一つとして、小林が開発したラット抗 α -ジストログリカン抗体を用いて Fc 領域のジスルフィド基を還元することでチオール基を露出させマレイミドとカップリングさせる方法を採用した。XG リピート糖鎖が未完成であったことから、トラスツズマブとフルオレセイン-5-マレイミドを用いたモデル実験により条件検討を進めた。ラット抗 α -ジストログリカン抗体はマウス腹水採取法により生産し IgG の大量精製を行なった。

現在使用している抗 α -ジストログリカン抗体は、上述の通りラット由来であるため、今後の医薬品化を検討し、抗 α -ジストログリカン抗体のヒト化を行った。ラット抗 α -ジストログリカン抗体の可変領域シーケンシングから scFV をクローニングし、ヒト IgG-Fc との融合タンパク質（scFV-Fc）を作製した。アフィニティスクリーニングにより α -ジストログリカン反応性の scFV-Fc クローンを得ることができたが、発現効率が非常に低かったことから、配列の最適化を行ったがあまり改善されなかった。そこで、ラット由来抗体の可変領域配列とヒト IgG-Fc 領域を融合したキメラ抗体を作製した。アフィニティスクリーニングにより α -ジストログリカン反応性のクローンが得られ、細胞染色による α -ジストログリカンの染色も観察された。現在大量調製を試みている。

③抗体カップリング法を用いた二重特異性抗体による本治療戦略の POC の確保

α -ジストログリカンとラミニンに対する二重特異性抗体については、本事業期間中に海外企業から筋疾患治療効果（POC）が報告され（Gumlaw N. et al, Mol. Therapy, 28, 411-421, 2020）、本計画の実効性は証明された。しかしながら、生体内における α -ジストログリカン糖鎖（XG リピート糖鎖）のリガンドはラミニンだけではなく、アグリンやニューレキシンなど多数のタンパク質が報告されている。したがって α -ジストログリカン糖鎖不全疾患の治療には抗二重特異性抗体では不十分な可能性がため、本計画における XG リピート糖鎖を利用することで、より生理的に近い治療効果が得られる可能性が期待される。

また現在、ラミニン結合性タンパク質と抗 α -ジストログリカン抗体を利用した二重特異性抗体の作製を進めている。これまでに、ラミニン結合性が報告されているいくつかのタンパク質と IgG-Fc 領域との融合タンパク質を作製し、ラミニンに対する反応性を確認している。

最終年度は新型コロナウイルス感染症の影響により研究活動が一時中断したため、全ての研究項目に遅延が発生し最終目標の達成には至らなかったが、糖鎖合成法、ラミニン結合活性の評価方法、抗 α -ジストログリカン抗体、ラミニン結合タンパク質など、本計画を今後進めるための基盤となる技術やツールなどの重要な成果を得ることができた。

We previously reported that a defect in *O*-mannosyl glycan is the primary cause of α -dystroglycanopathy, a group of congenital muscular dystrophies caused by aberrant α -dystroglycan (α -DG) glycosylation. In the skeletal muscle, α -DG is a component of the dystrophin-glycoprotein complex that serves as a transmembrane linker to connect extracellular matrix and intracellular cytoskeleton. This linker from the outside to inside cells is thought to stabilize the sarcolemma. *O*-mannosyl glycans of α -DG have a role in binding to extracellular matrix component laminin. Recent studies have revealed the various structures of *O*-mannosyl glycan, these structures can be classified into core M1, core M2, and core M3. It was reported that the defective GlcA-Xyl repeat (XG-repeat, laminin binding epitope) on core M3 structure is associated with dystroglycanopathy. To date, 18 genes have been identified as causative in dystroglycanopathies. We have revealed that 7 gene products (POMT1/2, POMGNT1, FKTN, FKRP, RXYLT1, CRPPA) of them are glycosyltransferases involved in core M3 *O*-mannosyl glycan biosynthesis, and contributed to elucidate the complete structure of core M3 *O*-mannosyl glycan and its biosynthetic pathway.

In this study, to develop therapeutic agents for dystroglycanopathy applying functional laminin-binding glycan, we were planning to carry out following projects: (1) Synthesis of functional XG-repeat by organic and enzymatic synthesis methods, (2) Production of anti- α -DG antibodies coupled to the synthetic functional XG-repeat, (3) Generation of bispecific antibodies against α -DG and laminin using antibody coupling method. The drug efficiencies of the prepared antibodies, such as laminin accumulation and muscle restoration activities, are evaluated using model cells and model animals of dystroglycanopathies. These functional assessments also demonstrate a proof-of-concept of therapeutic effect on dystroglycanopathy by accumulating laminin to α -DG on sarcolemma.

We achieved the following results in this study.

(1) Synthesis of functional XG-repeat by organic and enzymatic synthesis methods.

- The synthesis methods of XG-repeat glycans and tandem RboP structure were established.
- We produced XGXG structure and xylosyl tandem RboP structures by organic synthesis methods.
- We obtained GXGXGXG structure from XGXG structure by enzymatic synthesis methods.
- We examined the evaluation method for laminin binding activity of synthetic XG-repeat by using NMR spectroscopy.

(2) Production of anti- α -DG antibodies coupled to the synthetic functional XG-repeat

- The humanized scFv-Fc and the rat (Fab)-human(Fc) chimeric antibody against α -DG core protein were constructed, expressed, and confirmed reactivities to α -DG by Western blotting and cell staining.

(3) Generation of bispecific antibodies against DG and laminin.

- Several laminin-binding peptides of human Fc fusion proteins were constructed to generate bispecificity by coupling with anti- α -DG
- These laminin-binding fusion proteins were confirmed reactivities to laminin by overlay assay.

Last year, our research activities were temporarily suspended due to the COVID-19 pandemic, which caused delays in all research progress. However, our results, technologies, and tools obtained from this study will be essential for our project. This study will significantly contribute to develop novel glycotherapeutic strategies for dystroglycanopathies.