

212 腫瘍免疫活性化のためのポリカルボン酸結合抗体の創製	弓場 英司
-------------------------------	-------

【目的】 近年、免疫チェックポイント阻害剤の成功によって、がん免疫療法が大きな注目を集めている。現在臨床開発が進んでいる免疫チェックポイント阻害剤の一つ、CD47 抗体は、がん細胞上の CD47 に結合し、マクロファージに対する Don't eat me シグナルを遮断することで免疫細胞によるがん細胞の攻撃を誘導する。そこで本研究では、CD47 抗体に、抗原提示細胞に認識され、かつ活性化する機能をもつポリカルボン酸を結合させることで、免疫細胞を活性化すると同時にがん細胞と免疫細胞の相互作用を高め、その治療効果の増強をねらった。しかし、ポリカルボン酸と抗体の結合が困難であることが実験の過程で判明したため、それぞれを脂質ナノ粒子上に結合させ、機能評価を行った。

【方法】 アジュバント作用をもつβグルカン（カードランまたはアクアβ）に、3-メチルグルタル酸無水物を反応させることで、アジュバント作用と抗原提示細胞への特異性をもつポリカルボン酸誘導体を合成した。導入した一部カルボキシ基にジアミンを EDC/Sulfo-NHS を用いて縮合し、アミノ基を導入した。このアミノ基と、チオール基を導入したモデルタンパク質（オボアルブミン：OVA）を、ヘテロ 2 官能性リンカーを介した結合を試みた。得られたサンプルは SDS-PAGE を用いて評価した。脂質ナノ粒子（リポソーム）への CD47 抗体の修飾は、ポリエチレングリコール脂質先端に導入したマレイミド基と、CD47 抗体に導入したチオール基との反応によって行った。また、ポリカルボン酸誘導体にデシルアミドアンカーを導入し、デシル基と脂質膜との疎水性相互作用を介してリポソームへ修飾した。得られた修飾リポソームの諸物性を測定するとともに、リポソーム処理した抗原提示細胞からのサイトカイン産生能を ELISA 法により、がん細胞への結合をフローサイトメトリーにより評価した。

【結果】 アミノ基を導入したポリカルボン酸誘導体と OVA との反応物を SDS-PAGE により分析したところ、フリーのタンパク質に相当するバンドに比して明確な変化が認められず、結合反応がうまく進行していないことが示唆された。ポリカルボン酸誘導体の主鎖、リンカー構造などを変化させて検討を行ったが、結合の進行は観察されなかった。そこで、両者を一つの粒子上に結合することで当初の設計と同様の効果が得られると考え、抗体とポリカルボン酸誘導体を導入したリポソームの作製を試みた。ところが、抗体とポリカルボン酸誘導体を同じリポソームに修飾すると、ポリカルボン酸誘導体由来のアジュバント作用が阻害されることが明らかとなった。ポリカルボン酸誘導体を修飾したリポソームは抗原提示細胞からのサイトカイン産生を強力に促進した。さらに、CD47 抗体を修飾したリポソームは、フリーの抗体やアイソタイプコントロール抗体を修飾したリポソームに比べ、がん細胞に有意に効率よく結合したことから、ナノ粒子上に抗体を修飾することで、がん細胞上のチェックポイント分子をより効率良く阻害できることが示唆された。

ポリカルボン酸・チェックポイント阻害抗体を組み合わせた免疫誘導システムの設計

