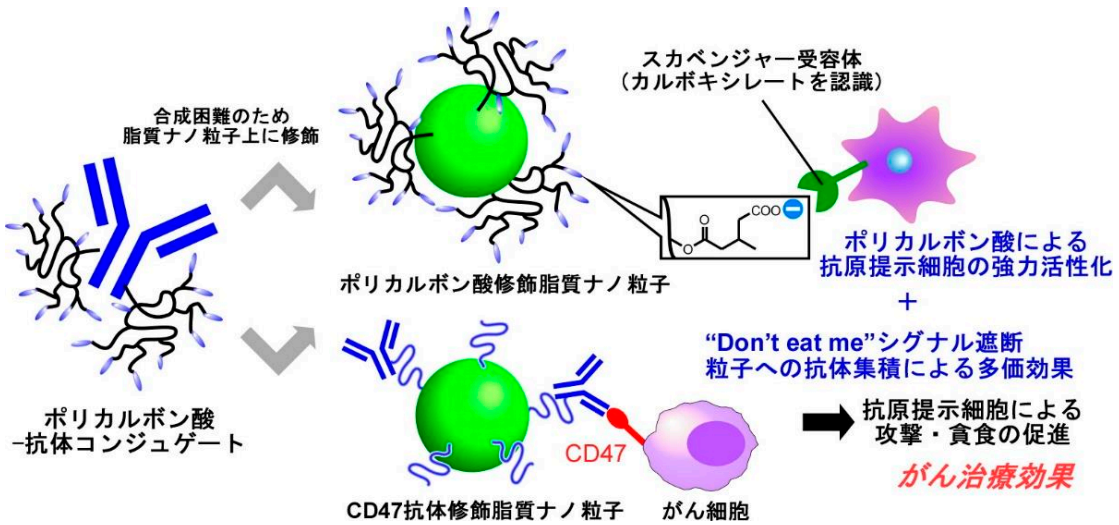
212　腫瘍免疫活性化のためのポリカルボン酸結合抗体の創製	弓場　英司

【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に由来する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



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

大阪府立大学 大学院工学研究科 応用化学分野 生体高分子化学研究グループ

Key words：チェックポイント阻害抗体，ポリカルボン酸，アジュバント，CD47，リポソーム

緒　言

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に注目が集まっている。しかし、現在実用化されている免疫チェックポイント阻害剤で治療効果が得られる患者は 30%程度とされている［1］。この事実は、多くのがん患者において CTLA-4 や PD-1 とは異なる免疫チェックポイント分子ががん免疫を抑制していることを強く示唆している。新たに提案されている免疫チェックポイント分子として CD47 が挙げられる。がん細胞に発現する CD47 は、マクロファージ上の SIRPα と相互作用することで、マクロファージに対して“Don't eat me”シグナルを与え、マクロファージはがん細胞を貪食したり、攻撃したりすることができない。この現象を踏まえ、CD47 に対する抗体を用いてマクロファージによるがん細胞の貪食・攻撃を促進しようという試みが行われ、現在臨床試験が行われている［2〜4］。

著者らはこれまで、ポリグリシドールや多糖をベースにしたポリカルボン酸の開発を精力的に行ってきた。これらのポリカルボン酸は、弱酸性 pH でカルボキシ基がプロトン化されると高分子が疎水化し、脂質膜を不安定化する性質をもつ。これまでの検討において、ポリカルボン酸を修飾したリポソームががん抗原を抗原提示細胞の内部に効果的に導入し、細胞性免疫を誘導できることを明らかにしてきた［5〜7］。また、ポリカルボン酸が樹状細胞やマクロファージ上のスカベンジャー受容体に効果的に認識されることも見出している。さらには、多糖をベースとしたポリカルボン酸が、樹状細胞やマクロファージを極めて効果的に成熟化させ、サイトカインの産生を促すことがわかっている［7］。

これらの背景を踏まえ、本研究では、CD47 などの新規免疫チェックポイント分子に対する抗体医薬の治療作用をさらに高めることを目的に、抗体医薬へのポリカルボン酸の結合を検討した。ポリカルボン酸はマクロファージに効果的に認識されるため、ポリカルボン酸結合抗体ががん細胞上の免疫チェックポイント分子に結合したあと、ポリカルボン酸が認識されることでマクロファージをがん細胞近傍へ誘引することができる。さらに、ポリカルボン酸のもつ抗原提示細胞の成熟化作用によって、集まってきたマクロファージを活性化することで、がん細胞を貪食したあとの抗原提示やがん免疫応答の促進が期待される。

本研究ではまず、ポリカルボン酸誘導体の合成を行うとともに、これらをコンジュゲートした抗体医薬の合成を行った。しかしながら、種々の合成反応の検討の結果、主としてその高分子量（抗体医薬の 5 倍以上）のために、ポリカルボン酸を直接抗体医薬にコンジュゲートすることは困難であることが明らかとなった。そこで、抗体医薬とポリカルボン酸を一つの粒子上に修飾させることで、当初の設計と同様の効果が得られるのではと考え、代表的な脂質ナノ粒子であるリポソームに両者を修飾した。ところが、この場合は主としてポリエチレングリコール（PEG）による立体障害によってポリカルボン酸に由来する免疫活性化作用が減弱することがわかった。そこで、抗体医薬・ポリカルボン酸をそれぞれ修飾したリポソームを用いた評価を行ったところ、ポリカルボン酸修飾リポソームは免疫担当細胞を強力に活性化するとともに、抗体医薬修飾リポソームはフリーの抗体医薬に比べて効果的にがん細胞へと結合したことから、両者を組み合わせることでチェックポイント分子の効果的な阻害によるがん細胞の貪食促進と、がん免疫応答の強力活性化を実現できることが示唆された。

方　法

1. ポリカルボン酸誘導体の合成

アジュバント作用をもつ多糖として知られるβグルカン（カードラン、およびアクアβ）[8] をポリカルボン酸主鎖として利用した。βグルカンの水酸基と 3-メチルグルタル酸無水物を反応させることで、カルボキシ基を導入した。続いて、エチレンジアミンまたはヘキサメチレンジアミンを一部カルボキシ基と反応させることで、アミノ基の導入を行った。各化合物の同定は^{1}H NMR により行った。

2. ポリカルボン酸結合タンパク質の作製と機能評価

抗体へのポリカルボン酸結合条件を調査するため、まずはモデルタンパク質（オボアルブミン : OVA）を用いて検討を行った。2-イミノチオランを OVA のリシン残基に反応させ、脱塩精製することで、チオール基の導入を行った。一方、ポリカルボン酸誘導体に一部導入したアミノ基に、ヘテロ 2 官能性リンカー（Sulfo-KMUS または Sulfo-SMCC）を反応させることで、マレイミド基を導入した。その後、チオール基導入 OVA を混合することで両者を反応させ、SDS-PAGE によって結合の確認を行った。

3. 抗体医薬とポリカルボン酸を修飾したリポソームの作製と機能評価

卵黄ホスファチジルコリン（EYPC）、コレステロール、ポリエチレングリコール（PEG）脂質、マレイミド基修飾 PEG 脂質、ポリカルボン酸誘導体からなるリポソームを、薄膜水和法により作製した。2-イミノチオランによってチオール基を導入した抗体医薬をリポソーム分散液に加え、マレイミド基との反応により修飾を行った。得られたリポソームの脂質濃度、抗体修飾量、粒子サイズ、ゼータ電位を測定した。また各種リポソームをマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞に添加し、所定時間インキュベーションしたあと、培養液中の炎症性サイトカイン量を ELISA 法により定量した。また、蛍光ラベル化した抗体医薬を修飾したリポソームまたはフリーの抗体医薬をマウスメラノーマ B16F10 細胞に添加し、4℃で 30 分混和した。洗浄後、細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーにより評価した。

結果および考察

1. ポリカルボン酸結合タンパク質の作製と機能評価

βグルカンへのカルボキシ基、アミノ基の導入（図 1a）については、^{1}H NMR より多糖主鎖由来のプロトンピークとともに、カルボキシ基ユニット、アミノ基ユニットに由来するプロトンが確認されたことから、各官能基の導入を確認した。各ピーク比から導入率を求め、水酸基の 70%にカルボキシ基ユニット、約 10%にアミノ基ユニットがそれぞれ導入されたことを確認した。このアミノ基に対して sulfo-NHS 基とマレイミド基を一分子中に有するヘテロ 2 官能性リンカーを反応させることでマレイミド基を導入したのち、チオール基を導入したタンパク質と混合することで、両者のコンジュゲーションを試みた。しかし、SDS-PAGE の結果によると、一部の実験条件において高分子量側のバンドが多少濃くなったことが観察されるものの、フリーのタンパク質由来のバンドのシグナルがフリーの場合に比べてほとんど変化がなく、コンジュゲーションがほとんど進行していないことが明らかとなった（図 1b）。アミノ基のリンカー構造（エチレンジアミン／ヘキサメチレンジアミン）、ヘテロ 2 官能性リンカーの鎖長などの反応条件を調整しても改善は認められなかった。この原因として、今回使用したβグルカンの分子量が 200 kDa 以上と、タンパク質の分子量（43 kDa）に比べて極めて大きいことが挙げられる。既存研究において、タンパク質より数倍大きな高分子とのコンジュゲートの作製は前例がなく、反応自体が難しいものと考えられる［9］。改善策として、酸などを利用してβグルカンの分子量をコンジュゲーションに適した値まで小さくすることが考えられたが、分子量の制御が困難であるとともに、低分子量のβグルカン誘導体が従来報告通りのアジュバント作用を有するかについても予め検証する必要があったことから、本研究期間中における検討は困難と判断した。各種合成の検討自体は引き続き実施していくが、ここでは代替案として、次項に示す抗体医薬とポリカルボン酸誘導体を修飾したナノ粒子を用いた検討を行った。

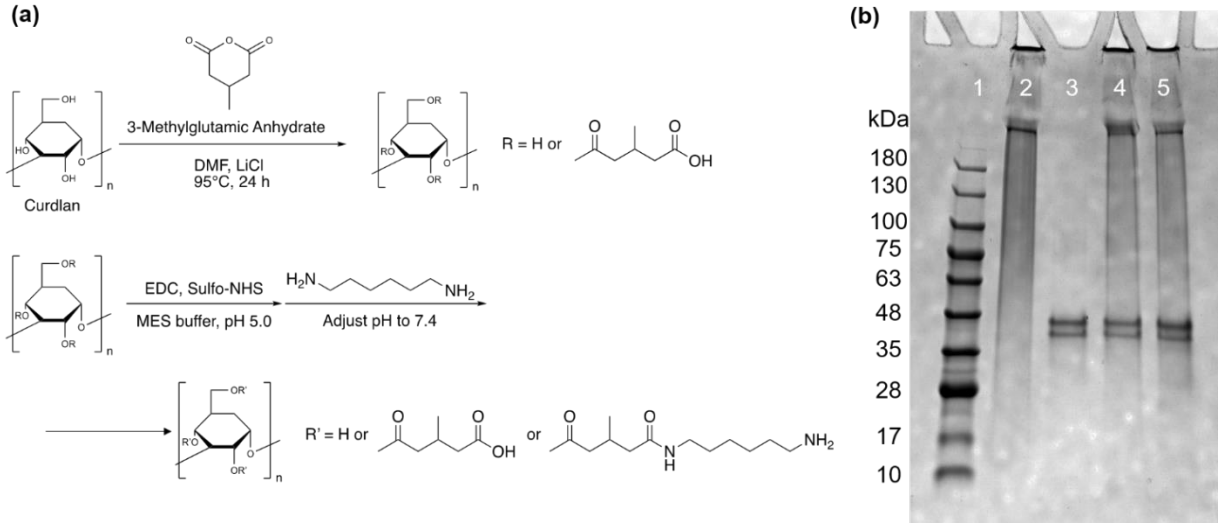


図 1. ポリカルボン酸結合タンパク質の合成と機能評価

a) βグルカンへのカルボキシ基ユニット導入とそれに続くアミノ基ユニット導入の合成スキーム。ここでは代表としてカードランを多糖主鎖に用いたポリカルボン酸誘導体の例を示す。

b) ポリカルボン酸誘導体とタンパク質の結合の SDS-PAGE を用いた確認。レーン 1:分子量マーカー、レーン 2 : アミノ基導入カードラン誘導体、レーン 3 : OVA、レーン 4 : sulfo-KMUS を用いた OVA とアミノ基導入カードラン誘導体の反応溶液、レーン 5 : sulfo-SMCC を用いた OVA とアミノ基導入カードラン誘導体の反応溶液。アミノ基導入カードラン誘導体（分子量 200 kDa 以上）も CBB 染色された。レーン 4 の高分子量側のバンドが若干濃くなり、一部の OVA が結合したことが示唆されるが、ほとんどの OVA はフリーの状態で泳動されているため、コンジュゲーションの反応効率は極めて低いことがわかった。

2. 抗体医薬とポリカルボン酸を修飾したリポソームの作製と機能評価

本研究のコンセプトは、抗体医薬とポリカルボン酸を利用してがん細胞と抗原提示細胞を近接させ、チェックポイント分子の阻害と抗原提示細胞の活性化を同時に実現することである。そこで、抗体医薬とポリカルボン酸を直接結合するのではなく、一つのナノ粒子上に修飾することによっても同様の効果が得られるのではないかと考えた。そこで、EYPC とコレステロールを基盤とするリポソームに、抗体医薬とポリカルボン酸誘導体を修飾した。両分子のリポソームへの修飾は、タンパク質定量と、リポソームのゼータ電位がポリカルボン酸修飾によって低下したことから確認した。また、作製したリポソームは 100 nm 程度の粒子サイズであり、細胞同士の近接を起こせるサイズに収まっていた。このリポソームのアジュバント作用を調べるため、リポソームで処理した樹状細胞株からのサイトカイン産生量を ELISA 法により定量したところ、ポリカルボン酸誘導体・抗体医薬両方を修飾したリポソームはサイトカイン産生をほとんど誘導しなかった（図 2a）。これは、リポソーム上に PEG が修飾されていることで、ポリカルボン酸誘導体が樹状細胞上の活性化受容体に認識されなくなったことを示唆している。一方、ポリカルボン酸誘導体だけを修飾したリポソームは、有意に高いサイトカイン産生能を示した（図 2a）。したがって、抗体医薬とポリカルボン酸誘導体がその機能を発現するためには、異なるリポソームに修飾する必要があることがわかった。

最後に、抗体医薬を修飾したリポソームのターゲットがん細胞との相互作用について検討を行った。蛍光ラベル化した抗体医薬、または抗体医薬を修飾したリポソームを、CD47 を発現するがん細胞（B16F10 細胞）に添加し、その結合量を評価した。まず、フリーの CD47 抗体は、アイソタイプコントロールよりも高い蛍光強度を示したことから、この抗体医薬ががん細胞上の CD47 分子と相互作用したことが示唆された（図 2b）。さらに、CD47 抗体を修飾したリポソームはさらに高い蛍光強度を示したことから（図 2b）、ナノ粒子上に抗体医薬を修飾することで、多価効果によりターゲット分子との相互作用を有意に高められることが判明した。

以上のように、当初計画のポリカルボン酸ー抗体医薬コンジュゲートの作製は計画期間中に実現できなかったが、①抗体医薬をナノ粒子上に修飾することによるがん細胞との相互作用の向上、②ポリカルボン酸修飾リポソームによる免疫担当細胞の活性化、という点を新たな知見として得ることができた。今後、ポリカルボン酸ー抗体医薬コンジュゲートの合成法の検討を進めるとともに、二つの修飾リポソームを併用することで、がん細胞上のチェックポイント分子を効果的に阻害すると同時に、免疫担当細胞を強力に活性化してがん免疫を誘導する、新たな免疫誘導システムの開発に向けて検討を行っていく。

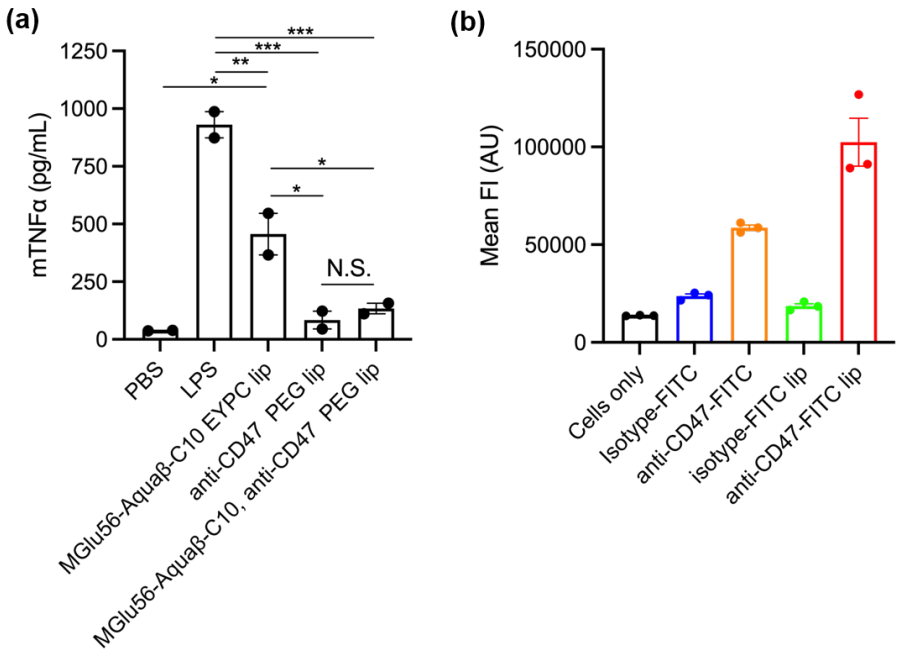


図 2. ポリカルボン誘導体・抗体医薬修飾リポソームの機能評価

a) 樹状細胞からのサイトカイン（TNF-α）の産生量。リポ多糖（LPS）処理によってサイトカイン産生が誘導されたことから、系が動いていることを確認した。アクアβ誘導体（MGlu56-Aquaβ-C10）を修飾した EYPC リポソームは PBS 処理群に比べ、有意に高いサイトカイン産生を促進した。しかしながら、CD47 抗体を同じリポソームに修飾するとサイトカイン産生能が減弱した。CD47 抗体修飾リポソーム自体はサイトカイン産生促進能を持たない。GraphPad Prism 8 を用いた one-way ANOVA と Tukey's HSD post hoc test により統計処理した。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001。

b) 蛍光ラベル化した抗体の B16F10 細胞への結合量。FITC で蛍光ラベル化した CD47 抗体、アイソタイプコントロール、およびそれらを結合したリポソームと細胞を 4℃で 30 分混和し、洗浄後、フローサイトメトリーにより細胞の蛍光強度を測定した。サンプル毎の蛍光強度は別途蛍光分光光度計により測定し、補正した。CD47 抗体は B16F10 細胞に結合するとともに、その効果はリポソームに結合することでさらに促進された。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人 上原記念生命科学財団よりご支援を賜りました。心から感謝申し上げます。また、コロナ禍にともなう実験制限の中にもかかわらず本研究を精力的にサポートいただいた、大阪府立大学大学院工学研究科生体高分子化学研究グループの佐々木光一博士（現・インペリアルカレッジロンドン博士研究員）にこの場を借りて御礼申し上げます。

文　献

1) Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 2014 Nov 27;515(7528):568-71. PMID: 25428505 DOI: 10.1038/nature13954

2) Chao MP, Takimoto CH, Feng DD, McKenna K, Gip P, Liu J, Volkmer JP, Weissman IL, Majeti R. Therapeutic targeting of the macrophage immune checkpoint CD47 in myeloid malignancies. Front Oncol. 2020 Jan 22;9:1380. PMID: 32038992 DOI: 10.3389/fonc.2019.01380

3) Zhang W, Huang Q, Xiao W, Zhao Y, Pi J, Xu H, Zhao H, Xu J, Evans CE, Jin H. Advances in anti-tumor treatments targeting the CD47/SIRPα axis. Front Immunol. 2020 Jan 28;11:18. PMID: 32082311 DOI: 10.3389/fimmu.2020.00018

4) Liu X, Pu Y, Cron K, Deng L, Kline J, Frazier WA, Xu H, Peng H, Fu YX, Xu MM. CD47 blockade triggers T cell–mediated destruction of immunogenic tumors. Nat Med. 2015 Oct;21(10):1209-15. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26322579 DOI:10.1038/nm.3931

5) Yuba E. Development of functional liposomes by modification of stimuli-responsive materials and their biomedical applications. J Mater Chem B. 2020 Feb 14;8(6):1093-1107. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31960007 DOI: 10.1039/c9tb02470k

6) Yuba E, Harada A, Sakanishi Y, Watarai S, Kono K. A liposome-based antigen delivery system using pH-sensitive fusogenic polymers for cancer immunotherapy. Biomaterials. 2013 Apr;34(12):3042-52. Epub 2013 Jan 30. PMID: 23374704 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.031

7) Yuba E, Yamaguchi A, Yoshizaki Y, Harada A, Kono K. Bioactive polysaccharide-based pH-sensitive polymers for cytoplasmic delivery of antigen and activation of antigen-specific immunity. Biomaterials. 2017 Mar;120:32-45. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28027502 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.12.021

8) Li X, Luo H, Ye Y, Chen X, Zou Y, Duan J, Xiang D. β-glucan, a dectin-1 ligand, promotes macrophage M1 polarization via NF-κB/autophagy pathway. Int J Oncol. 2019 Jan;54(1):271-282. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30431070 DOI: 10.3892/ijo.2018.4630

9) Flanary S, Hoffman AS, Stayton PS. Antigen delivery with poly(propylacrylic acid) conjugation enhances MHC-1 presentation and T-cell activation. Bioconjug Chem. 2009 Feb;20(2):241-8. PMID: 19125614 DOI: 10.1021/bc800317a