

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19201

研究課題名(和文)免疫細胞リクルート分子を利用した新規抗原虫療法の開発

研究課題名(英文) Development of new antiprotozoal therapy using molecules that recruit immune cells

研究代表者

深瀬 浩一 (Fukase, Koichi)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：80192722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん細胞やウイルス、原虫に対して、ヒト体内に大量に存在する自然抗体を利用し、強力な免疫応答反応を引き起こす新しい免疫療法の開発を目指した。自然抗体としては、 α -gal糖鎖を抗原とする抗 α -Gal抗体を選んだ。 α -galは、多くの哺乳類で広く発現しているものの、ヒトはこの糖鎖を持たない。その代わりにヒトは大量の抗 α -Gal抗体を持ち、抗 α -Gal抗体と α -galエпитオプの免疫反応に起因する超急性拒絶反応を引き起こす。そこで、 α -galエпитオプをがん抗体と複合化し、がん抗体特異的に免疫反応を誘起した。この α -gal-がん抗体複合体の細胞障害活性は α -gal導入量依存的に向上した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん抗体と α -galエピトープを複合化し、がんに対して自然抗体をリクルートし、抗体の細胞障害活性を大幅に向上させることに成功した。本手法の適用範囲は極めて広く、がんに限らず、ウイルスや原虫などの感染症に対しても有効であることが期待される。現在、抗体は医薬品の主流となっているが、その効果が十分でないものも多い。また、抗体医薬品の開発途中でドロップしたものも多い。これらの抗体に対して本コンセプトを適用することで、有効な治療法を提供しうる。加えて、糖鎖を利用してがん細胞に対して急性拒絶反応を起こすというコンセプトは、新たな免疫療法の可能性を示すもので、学術的な新規性、独創性も高い。

研究成果の概要(英文)：Antibody drugs are one of the most important molecular targeted drugs having high specificity. Conversely, their insufficient efficacy has been a critical issue in many cases. Here, we developed α -gal antibody conjugates as next-generation antibody drugs. α -Gal, Gal 1-3Gal 1-4GlcNAc, is widely expressed in nature, but humans do not have this trisaccharide. Instead, humans have large amounts of antibodies against α -gal (anti-Gal antibodies, 1-2% of total serum IgG and 3-8% of total IgM), which cause an acute immune response, such as hyperacute rejection induced by xenotransplantation from pig to baboon. Therefore, α -gal antibody conjugates can show strong cytotoxicity by recruiting anti-Gal antibodies. Many antibody drugs exhibit a low response rate. Moreover, a number of antibodies have failed in clinical trials due to low potency. We expect that our method will enable re-development of therapeutic antibodies and their candidates to improve potency.

研究分野：天然物化学, ケミカルバイオロジー, 糖質化学

キーワード：糖鎖 免疫 抗体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

α -gal エピトープ (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R, Fig. 1) は、多くの哺乳類で広く発現しているものの、ヒトではその合成酵素である α 1,3galactosyltransferase (α 1,3GT) が変異を受け、活性を持たず、この糖鎖構造を持たない。代わりにヒトは、抗 α -gal 抗体 (抗 Gal 抗体) を持ち、その量はヒトの自然抗体の中で最も多い。ブタなどの異種臓器には大量の α -gal が発現しており、ブタ-ヒト間の臓器移植でみられる超急性拒絶反応は、 α -gal と抗 Gal 抗体の免疫反応に起因する。

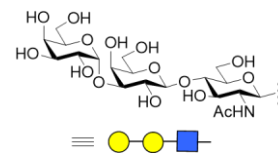


Fig. 1 α -gal エピトープ

抗体医薬品は、高い特異性を有することから、さまざまな疾病に対する分子標的薬として実用化が進み、現在では医薬品の主流となっている。抗体-薬物複合体 (Antibody-drug conjugate, ADC) は抗体に低分子医薬品を複合化したハイブリッド分子で、抗体による高い特異性と、複合化した低分子薬による高い薬効を両立できる。そのため、現在 ADC が次世代の医薬品として注目を集め、実用化も進みつつある。

2. 研究の目的

本研究では、ADC の概念を応用し、がんに対して α -gal による超急性拒絶反応を誘導する新規がん免疫療法の開発を目的とした (Fig. 2)。すなわち、低分子薬の代わりに α -gal を複合化することで、がんに対して免疫細胞をリクルートし、細胞障害を誘導する。 α -gal の引き起こす超急性拒絶反応は極めて激しい免疫反応であることから、高い抗がん作用が期待できる。加えて、本手法は、がんに限らず、ウイルスや原虫などの感染症に対する抗体でも有効であると考えられ、汎用性の高い手法の開発を目指した。

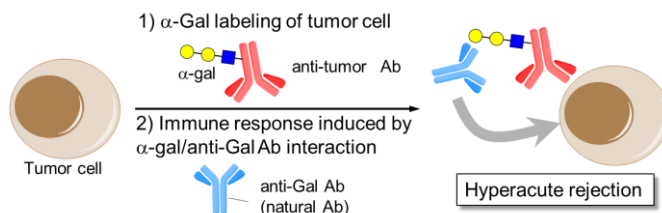


Fig. 2 α -gal-抗体複合体による超急性拒絶反応の誘導

3. 研究の方法

α -gal を化学合成し、合成 α -gal を抗体と複合化した。この際、 α -gal の導入量の異なる複合体を調製した。続いて、調製した α -gal-抗体複合体のがん細胞に対する補体依存性細胞傷害 (Complement-Dependent Cytotoxicity, CDC) 活性を測定した。この CDC 活性が α -gal の導入量に依存したことに着目し、より多量の α -gal を抗体に導入するために、 α -gal デンドリマーを作成し、これを抗体に導入することで、均一性を保ちつつ、多量の α -gal を持つ α -gal-抗体複合体を調製した。この α -gal-抗体複合体についても CDC 活性を測定した。

4. 研究成果

α -gal を化学合成した (Fig. 3)。効率的な 3 糖骨格の構築を実現するために、ワンポットでのグリコシル化を検討した。この際、グルコサミンのアセトアミド基をジアセチルアミドに変換することで劇的に反応性が向上することを見出し、効率的なグリコシル化を実現した。さらに、マイクロフロー系を適用することで再現性良く高収率で α -gal 保護体を得ることができた。さらに、保護基を除去して、還元末端を活性エステルへと誘導することで、抗体のアミノ基に対して α -gal を導入する際に利用可能な α -gal 活性エステルを調製した。

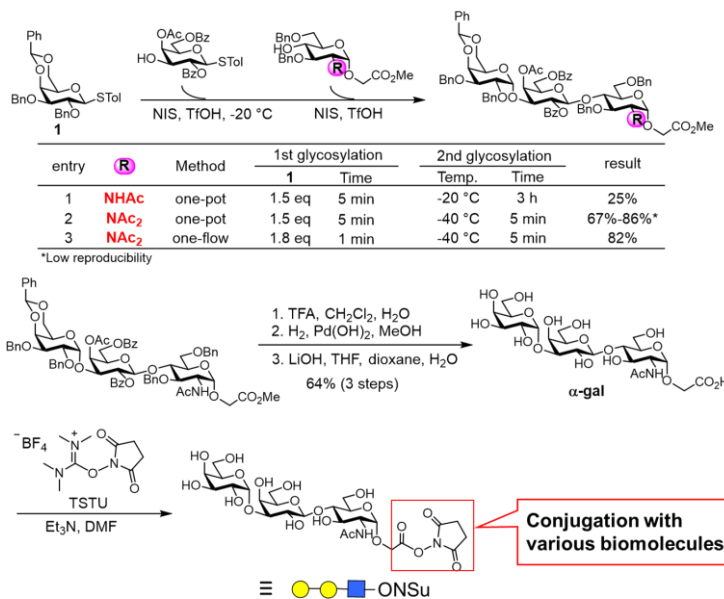


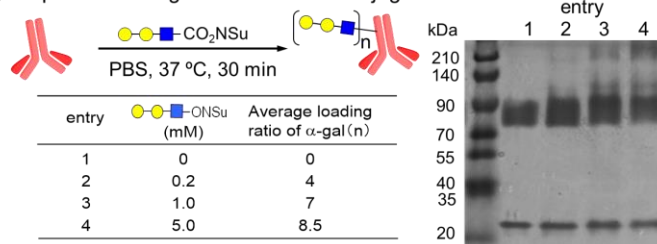
Fig. 3 α -gal の合成

続いて、 α -gal-抗体複合体を調製した。ここでは、B 細胞リンパ腫の治療に使用される抗 CD20 抗体を使用した。抗 CD20 抗体を、様々な濃度 (0、0.2、1.0、および 5.0 mM) の α -gal 活性エステルで処理した後、 α -gal の導入量を SDS-PAGE で分析した (Fig. 4A)。その結果、活性エステルの濃度が増加するにつれて、IgG のバンドはより高分子量の領域にシフトし、 α -gal の平均導入量 (n) は、それぞれ約 3.5、7、10 個と見積もることができた。これらの α -gal-抗体複合体により誘導される免疫応答を調べた (Fig. 4B)。Raji 細胞を α -gal-抗体複合体で処理した後、ヒト血清とウサギ補体を加え、細胞生存率を測定することで、CDC 活性を評価した (Fig. 4C)。細胞生存率は、細胞を HS および RC の両方で処理した場合にのみ減少したことから、観察された細胞毒性が CDC によるものであることが分かる。CDC 活性は、 α -gal 導入量依存的に向上した。この結果は、 α -gal-抗体複合体が、 α -gal/抗 Gal 抗体の相互作用を介して標的細胞に対して強力な免疫応答を誘発し得ることを明確に示している。

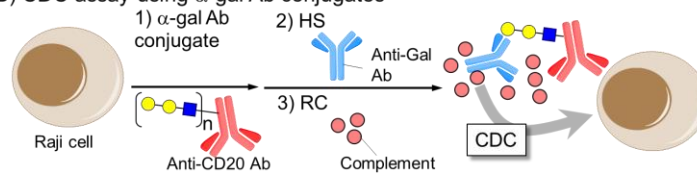
さらに、第二世代の α -gal-抗体複合体を設計・合成した。上記の実験では、我々は α -gal 活性エステルを用いて α -gal をランダムに導入した。そのため、 α -gal-抗体複合体は不均一であった (Fig. 4A)。一方で、医薬品としての利用を考慮した際には均一性の高い材料が望まれている。また、大量の α -gal を導入することで、 α -gal-抗体複合体の細胞障害活性は向上した。これらのことを考慮し、我々はチオール-マレイミド反応を介して、 α -gal デンドリマー (8-mer および 16-mer) を半抗体のヒンジ領域に導入した (Fig. 5A)。この方法では、抗体の標的に対する親和性を低下させることなく、大量の α -gal を抗体に導入できる。なお、 α -gal デンドリマーは我々のグループによって開発された自己活性化クリックケミストリーを用いて容易に合成できる。合成したデンドリマーは

リンカーを介して、抗 CD20 抗体の半抗体とチオール-マレイミド反応により複合化し、第二世代の α -gal-抗体複合体の合成を達成した。さらに、新たに合成した第二世代の α -gal-抗体複合体により誘導される免疫応答を調べた (Fig. 5B)。期待通り、導入した α -gal の数が多いほど、CDC 活性は向上した。この結果は、 α -gal の多価効果を利用することで α -gal-抗体複合体の CDC 活

A) Preparation of α -gal anti-CD20 Ab conjugates



B) CDC assay using α -gal Ab conjugates



C) Results of CDC assay using α -gal Ab conjugates

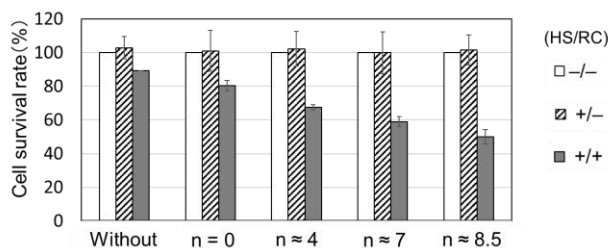
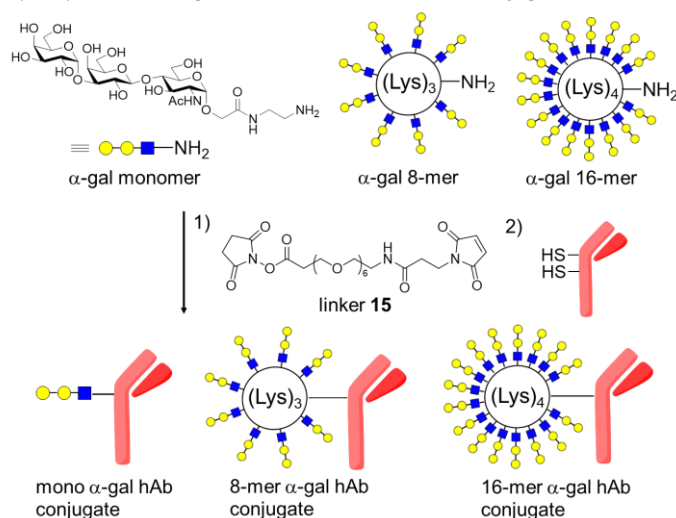


Fig. 4 α -gal-抗体複合体の調製と CDC 活性

A) Preparation of α -gal dendrimer anti-CD20 hAb conjugates



B) Results of CDC assay using α -gal dendrimer hAb conjugates

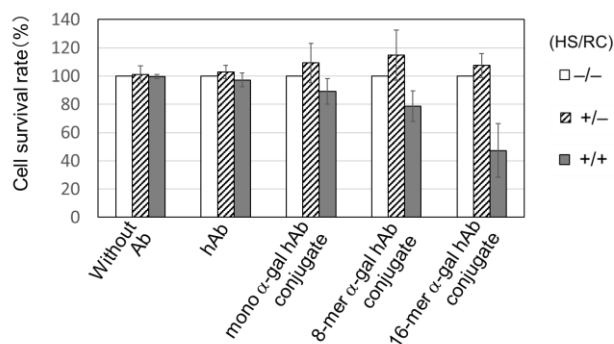


Fig. 5 第二世代 α -gal-抗体複合体の調製と CDC 活性

性を増強できたことを明確に示している。

本研究では、 α -gal-抗体複合体が抗 Gal Ab を標的細胞にリクルートし、急性免疫応答を誘発することができることを実証した。これまでに、様々な抗体医薬が開発されてきたが、その有効性が十分でないがん患者が多数いることが重大な問題である。加えて、多くの抗体が十分な効力を示さないために、臨床試験においてドロップしている。ここで開発した手法は抗体医薬の効力を増加させる一般性の高い手段となりうると期待できる。現在、がん細胞のみでなくインフルエンザやトリパノソーマといったウイルスや原虫に対しても本手法が適用可能であるかを検証中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- 1) Sianturi, J.; Manabe, Y.; Li, H-S.; Chiu, L-T.; Chang, T-C.; Tokunaga, K.; Kabayama, K.; Tanemura, M.; Takamatsu, S.; Miyoshi, E.; Hung, S-C.; Fukase, K. Development of α -Gal Antibody Conjugates for Increasing Immune Response by Recruiting Natural Antibodies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *131*, 4574-4578. 査読有り
- 2) Masui, S.; Manabe, Y.; Hirao, K.; Shimoyama, A.; Fukuyama, T.; Ryu, I.; Fukase, K. Kinetically controlled Fischer glycosidation under flow conditions: A new method for preparing furanosides. *Synlett*, **2019**, *30(4)*, 397-400. 査読有り
- 3) Yeh, C.-J.; Ku, C.-C.; Lin, W.-C.; Fan, C.-Y.; Zulueta, M.M.L.; Manabe, Y.; Fukase, K.; Li, Y.-K.; Hung, S.-C. Single-Step Per-O-Sulfonation of Sugar Oligomers with Concomitant 1,6-Anhydro Bridge Formation for Binding Fibroblast Growth Factors, *ChemBioChem*, **2019**, *20(2)*, 237-240. 査読有り
- 4) Handa-Narumi, M.; Yoshimura, T.; Konishi, H.; Fukata, Y.; Manabe, Y.; Tanaka, K.; Bao, G.-M.; Kiyama, H.; Fukase, K.; Ikenaka, K. Branched sialylated N-glycans are accumulated in brain synaptosomes and interact with Siglec-H, *Cell Struct. Funct.* **2018**, *43(2)*, 141-152. 査読有り
- 5) Chang, T.-C.; Manabe, Y.; Fujimoto, Y.; Ohshima, S.; Kametani, Y.; Kabayama, K.; Nimura, Y.; Lin, C.-C.; Fukase, K. Syntheses and Immunological Evaluation of Self-Adjuvanting Clustered N-Acetyl and N-Propionyl Sialyl-Tn Combined with A Thelper Cell Epitope as Antitumor Vaccine Candidates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 8219-8224. 査読有り
- 6) Manabe, Y.; Shomura, H.; Minamoto, N.; Nagasaki, M.; Takakura, Y.; Tanaka, K.; Silipo, A.; Molinaro, A.; Fukase, K. Convergent synthesis of a bisecting GlcNAc-containing N-glycan. *Chem. Asian. J.* **2018**, *13*, 1544-1551. 査読有り

〔学会発表〕(計 38 件)

- 1) Fukase, K. Synthetic Studies of Immunostimulating Glycoconjugates: Development of New Adjuvants and Application to New Cancer Immunotherapies. 3th International Symposium on Organic Reactions (ISOR-13), 2018, Invited
- 2) Fukase, K. Synthetic Studies of Immunostimulating Glycoconjugates toward Cancer Immunotherapies. The Ninth International Forum on Chemistry of Functional Organic Chemicals (IFOC-9), 2018, Invited

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 下山敦史, 真鍋良幸, 深瀬浩一, ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術 第10章 6節 “セルファジュバンティングストラテジーによる合成ワクチン開発”, ペプチド医薬品, 技術情報協会, **2017**, 395-402.

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：真鍋 良幸

ローマ字氏名：MANABE Yoshiyuki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。