

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560447

研究課題名(和文) α -Galエピトープによる超急性拒絶反応を利用した新規抗がん療法の開発研究課題名(英文) Development of novel cancer immunotherapy utilizing hyperacute rejection induced by α -gal epitope

研究代表者

深瀬 浩一 (Fukase, Koichi)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80192722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：3糖構造 α -Galエピトープは、多くの哺乳類で広く発現しているものの、ヒトはこの糖鎖構造を持たない。その代わりに、ヒトは大量の抗Gal抗体を持つ。本研究では、化学合成した α -Galエピトープとがん抗体を複合化させることで、がん細胞を特異的に α -Gal標識し、超急性拒絶反応を引き起こすことにより、がん細胞を排除する全く新しいがん免疫療法の開発を目指した。

まず、 α -Galの効率的な化学合成を行った。さらに、合成した α -Galをリンパ腫細胞に発現するCD20に対する抗体と複合化し、全く新しい抗体薬物複合体の調製に成功した。また、 α -Galのアジュバント(抗原性補強剤)としての利用も検討した。

研究成果の概要(英文)：The α -Gal epitope is composed of trisaccharide structure produced in most mammals, however humans are deficient in that structure. On the other hand, humans produce a large amount of anti-Gal antibodies that specifically interact with the α -Gal epitope. Therefore, if pig organ expressing α -Gal is transplanted to human, the organ is heavily injured by hyper acute rejection. The purpose of this research is the development of the novel cancer therapy utilizing the α -Gal / anti-Gal antibody interaction: hyperacute rejection to tumor cell is induced by the labeling of tumor cell with α -Gal.

First, efficient synthesis of α -Gal epitope was achieved via one-pot glycosylation using imidate glycosyl donor and thioglycoside. Synthesized α -Gal was conjugated with anti-CD20 antibody, which is specifically recognize lymphoma cell. Cytotoxic assay using this antibody drug conjugate is under investigation. We also investigated the utilization of α -Gal as an adjuvant.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：がん免疫療法 抗体薬物複合体(ADC) 糖鎖 糖鎖合成 α -gal がんワクチン アジュバント

1. 研究開始当初の背景

α -Gal エピトープは、多くの哺乳類で広く発現しているものの、ヒトはその合成酵素が変異を受け、この糖鎖構造を持たない。その代わりに、ヒトは抗 α -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 α -Gal エピトープが発現しており、ブタ ヒト間の異種臓器移植において、抗 α -Gal 抗体と α -Gal エピトープの免疫反応に起因する超急性拒絶反応を引き起こす。本研究では、化学合成した α -Gal エピトープでがん細胞を特異的に標識し、超急性拒絶反応を引き起こすことによりがん細胞を排除する新しい抗がん療法の開発を目指す。がんの免疫療法は手術、抗がん剤、放射線療法の3大療法に続く第4の治療と期待され、副作用のない転移や再発を完全に抑えた理想的な治療となる可能性を秘めているものの、未だ標準的治療としては確立されていない。これは、がんの持つ免疫回避機構のために免疫系が十分に機能しないことが大きな要因である。本研究は、大量の抗 α -Gal 抗体を利用して、がん細胞に強制的に強い免疫反応を引き起こすという従来にない免疫療法を提案する。

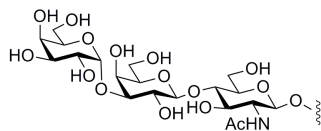


Fig. 1 α -Gal エピトープ

2. 研究の目的

まず、 α -Gal の大量合成法を確立し、化学合成した α -Gal を用いて(1)がん抗体と α -Gal の複合体、(2)がんワクチンと α -Gal の複合体を合成する。(1)のがん抗体と α -Gal の複合体ではがん抗体ががん細胞特異的に結合することで、がん細胞を α -Gal 標識することができる。がん細胞を α -Gal で標識することにより、生体内に大量に存在する抗 Gal 抗体を介した超急性拒絶反応が誘導でき、がん細胞を殺傷できる。(2)ではがんワクチンを α -Gal で複合化することにより、 α -Gal のアジュバントとしての利用を検討する。このような α -Gal のアジュバントとしての利用は有効性が報告されているが、遺伝子導入や酵素合成により α -Gal を形成していたため、実用化にはいたっていない。化学合成した α -Gal がアジュバントとして利用できることで、本手法の適用範囲を大幅に広げるとともに、実用化への大きな一歩となる。

3. 研究の方法

α -Gal の大量合成に関しては、ワンポット反応により3糖構造を一挙に構築することを検討した。また、マイクロフロー反応装置を用いることで大量合成が可能な合成ルートを確認することを目指した。合成した α -Gal を用いた実験はそれぞれ伊かのように行うこととした。

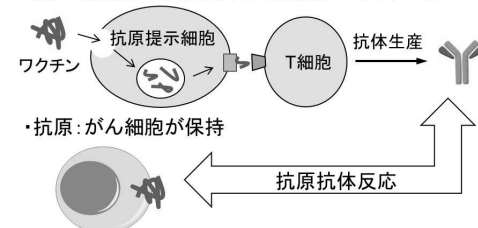
(1)がん抗体と α -Gal の複合体

従来のがんワクチンを用いた免疫療法では、がん抗原をワクチンとして接種することで、抗原

提示細胞を介して、抗体が産生され、この抗体ががん細胞に存在する抗原を認識し、攻撃する (Fig. 2a)。しかし、全身状態不良のがん患者は、免疫機能が低下し、腫瘍抗原に対する抗原提示能が低いことが大きな要因となり、期待するほどの効果が得られない。そこで、本研究で開発する手法は、がん細胞に α -Gal を直接結合させ、がん細胞を“抗原化”させ、がん細胞の排除を狙うという全く新しい手法である (Fig. 2b)。本研究で開発する手法は、ワクチンを用いる免疫療法と異なり、抗体産生の段階を経ず、既に体内に大量に存在する抗 α -Gal 抗体を利用するため、従来のがん免疫療法における上記の問題は起こらず、大きな効果が期待できる。

a) がんワクチンを用いた手法

・抗体: 抗原提示細胞を介して抗原提示され、生産



b) α -Galを用いた手法

・抗体: 自然抗体を保持

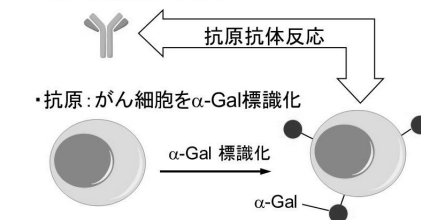


Fig. 2 従来の免疫療法と α -Gal を用いる手法

(2)がんワクチンと α -Gal の複合体

ヒトは大量の抗 Gal 抗体を持つため、 α -Gal で標識したがんワクチンを投与すると、抗 Gal 抗体を介して抗原提示細胞への取り込みが促進され、結果として α -Gal はワクチンの抗原性を増強する抗原性増強剤 (アジュバント) として働く。これまでに検討されてきた α -Gal をワクチンに導入する方法としては、 α -Gal 生合成酵素の発現ベクター導入による発現と、*in vitro* で生合成酵素を作用させる方法であるが、ベクター導入を行う方法は臨床応用に持ち込めず、酵素を用いた方法はそのコストに問題があった。そのため、本手法はその効果が約束された有効な手法で、一刻も早い臨床応用が望まれているにもかかわらず、現時点では実用に至っていない。そこで本研究では、化学合成により α -Gal を大量に供給し、これを化学反応によりワクチンに導入することで、上記の問題を解決し、 α -Gal をアジュバントとして用いる新規がんワクチンの臨床応用への道を開く。

4. 研究成果

まず、 α -Gal を合成した (Fig. 3)。骨格の構築に利用する単糖 1, 2, 3 を合成した。これらの単糖調製については大量合成を指向し、ほとんど

カラム精製を必要としない合成ルートを確認した。続いて、グリコシル化を検討した。1段階目の1と2のグリコシル化においては、反応性の高いチオ糖1のみを選択的に活性化する必要があり、活性化剤、反応温度、溶媒等を徹底的に検討した結果、活性化剤としてNIS (1.2 eq), TFOH (1.5 eq)を用い-78 °Cで目的の二糖4を82%の収率で得た。一方、本反応のスケールアップを行ったところ収率は57%まで低下し、再現性に課題を残した。この問題を解決するために、マイクロフロー系で本反応を検討した。マイクロフロー系とは反応溶液をポンプで送液し、マイクロメーターサイズの流路内で混合する反応系で、送液時間を延ばすことで小スケールの際と同じ条件でのスケールアップが可能となる。マイクロフロー系においても、活性化剤の当量、反応時間などを精査した結果、バッチ系よりもTFOH当量を減らし昇温することにより収率60% (BRSM:98%)で4を得ることに成功した。本系が良好な結果を与えたのは、厳密な反応温度の制御が可能かつ生成した4がオーバーリアクションにより分解する前に反応を停止できるためであると考察している。得られた4と3をグリコシル化により連結することでα-Gal保護体5を合成した。また、これらの3糖をワンポットのグリコシル化で一挙に構築する検討も行った。この際は、はじめのグリコシル化をグリコシルイミデートを用いることで効率的に目的の3糖5が得られた。最後に保護基を除去してα-Gal エピトープ6の合成を達成した。合成した糖鎖を用いて以下2つの実験を行った。

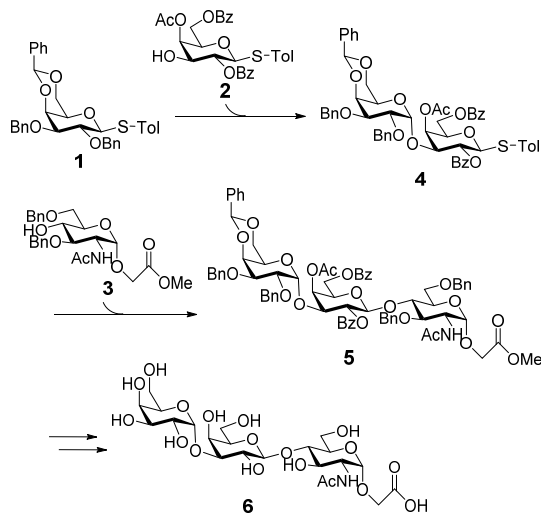


Fig. 3 α-gal の合成

(1) がん抗体とα-Gal の複合体

得られた三糖6の還元末端に導入したカルボン酸を活性エステルへと誘導した後、リンパ腫に特異的に発現するタンパク質 CD20 を認識する抗体に対して標識し、全く新しい抗体薬物複合体の調製に成功した。この抗体薬物複合体の細胞障害活性は現在検討中である。

(2) がんワクチンとα-Gal の複合体

α-Gal のアジュバントとしての利用を検討した。

まず、Fig. 3 のようにして化学合成したα-gal を上記と同様に活性エステル体へと誘導し、この化合物を用いて、さまざまな抗原を標識した。本手法を用いることで、ペプチド、タンパク質、糖鎖、さらに、細胞そのものにもα-gal を導入することができた。さらに合成したワクチン-アジュバント複合体に対して、マウスを用いた *in vivo* の実験を行った。その結果、α-Gal 標識により抗体の産生量は大幅に増加した。すなわち、化学合成したα-Gal を用いてワクチンを標識することで、抗α-Gal 抗体を介した抗原提示細胞への取り込みを促進し、免疫反応を賦活化することができることを示した。

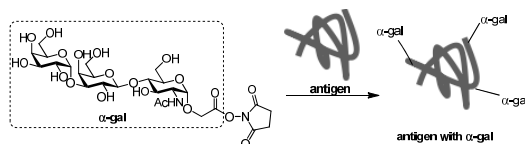


Fig.1 α-Gal の化学合成と抗原との複合化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 6 件)

- Zhou, J.; Manabe, Y.; Tanaka, K.; Fukase, K. Efficient synthesis of the disialylated tetrasaccharide motif in *N*-glycan via an amide protection strategy. *Chem. Asian. J. in press*.
- Manabe, Y.; Chang, T-C.; Li, H-S.; Terao, N.; Takamatsu, S.; Tanemura, M.; Miyoshi, E.; Fukase, K. Synthesis of the Conjugates of Tumor Antigens with Adjuvants for the Efficient Cancer Immunotherapy. *Peptide Science* **2015**, 77-78.
- Fukase, K.; Shimoyama, A.; Manabe, Y. Effective Synthesis of Oligosaccharide under Microfluidic Conditions. *Journal of synthetic Organic Chemistry, Japan* **2015**, 73, 452-459.
- Salmasan, R. M.; Manabe, Y.; Kitawaki, Y.; Chang, T-C.; Fukase, K. Efficient Glycosylation Using In(OTf)₃ as a Lewis Acid: Activation of *N*-Phenyltrifluoroacetimidate or Thioglycosides with Halogenated Reagents or PhIO. *Chem. Lett.* **2014**, 43, 956.
- Uchinashi, Y.; Tanaka, K.; Manabe, Y.; Fujimoto, Y.; Fukase, K. Practical and Efficient Method for α-Sialylation with an Azide Sialyl Donor Using a Microreactor. *J. Carbohydrate Chem.*, **2014**, 33, 55.

(学会発表) (計 27 件)

- Development of New Generation Cancer Vaccines: Conjugation of Antigens with Adjuvants. Yoshiyuki Manabe, HaoSheng Li, Kento Tokunaga, Naoko Terao, Shinji

- Takamatsu, Masahiro Tanemura, Eiji Miyoshi, Koichi Fukase, The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Osaka, 2016.1.21-22.
2. A Novel Approach in Cancer Immunotherapy: Using Synthetic α -gal Epitope to Increase the Immunogenicity of Tumor Antigens. HaoSheng Li, Yoshiyuki Manabe, Kento Tokunaga, Naoko Terao, Shinji Takamatsu, Masahiro Tanemura, Eiji Miyoshi, Koichi Fukase, PACIFICHEM2015, Hawaii, the U.S., 2015.12.15-20.
 3. Development of Novel Tumor Vaccine Using Synthetic α -Gal as an Adjuvant. Yoshiyuki Manabe, HaoSheng Li, Kento Tokunaga, Naoko Terao, Shinji Takamatsu, Masahiro Tanemura, Eiji Miyoshi, Koichi Fukase, the 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13), Kyoto, 2015.11.9-13.
 4. Fully synthetic self-adjuvanting antitumor vaccine candidate consisting of N-modified TriSTn antigen combined with lipopeptide and T-helper-cell-epitope. CHANG, Tsung-che; MANABE, Yoshiyuki; FUJIMOTO, Yukari; FUKASE, Koichi, the 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13), Kyoto, 2015.11.9-13.
 5. Synthetic and biofunctional studies of glycoconjugates toward immunoregulation. Fukase, K., 18th European Carbohydrate Symposium (Eurocarb18), Moscow, Russia, 2015, 8.2-6.
 6. Synthetic and biofunctional studies of microbial and animal glycan. Fukase, K. Centro de Investigaciones Biologicas, CIB-CSIC, Madrid Spain, 2015.6.29.
 7. Synthetic and biofunctional studies of microbial and animal glycans toward immunoregulation. Koichi Fukase, CIC Biogune, Bizkaia Spain, 2015.6.22.
 8. Synthetic study of glycoconjugates toward immunoregulation. Koichi Fukase, 2015 Glyco Retreat, Great Roots Forestry Spa Resort, Taiwan. 2015.4.14-15.
 9. Synthesis and Bio-imaging Study of Glycans. Koichi Fukase, 2015 Yonsei International Symposium on Nano-Bio Molecular Assembly, Seoul, Korea, 2015.1.9.
 10. Efficient Glycosylation Using In(OTf)₃ as an Acid Catalyst for The Activation of N-Phenyltrifluoroacetimidate or Thioglycosides, Yuriko Kitawaki, Yoshiyuki Manabe, Regina M. Salmasan, Tsung-Che Chang, Koichi Fukase, The Ninth International Symposium on Integrated Synthesis (ISIS9) , Hyogo, Japan, 2014.11.14-15.
 11. An Efficient Synthesis of α -Gal epitope.

Kento Tokunaga, Yoshiyuki Manabe and Koichi Fukase, The Ninth International Symposium on Integrated Synthesis (ISIS9), Hyogo, Japan, 2014.11.14-15.

6. 研究組織

(1)研究代表者

深瀬浩一 (FUKASE, Koichi)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号:80192722

(2)研究分担者

真鍋良幸 (MANABE, Yoshiyuki)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号:00632093