

## 医療分野研究成果展開事業/戦略的イノベーション創出推進プログラム（S-イノベ）

### 平成 27 年度成果報告書（公開）

プロジェクトマネージャー（研究リーダー）	京都大学 大学院工学研究科 木村 俊作
開発リーダー（企業責任者）	旭化成（株）ヘルスケア研究開発センター 安武 幹智
参加機関	大阪大学、国立がん研究センター
研究開発課題	免疫制御を目的とした体外循環治療の基盤技術の創製と応用

#### 1. 研究開発の目的

本研究開発は、坂口、木村、西川、安武の各研究グループが独自に実施してきた研究を、免疫制御を目的としたフィルターモジュールの開発という横糸で結びつけ、新しい癌免疫治療法を提供することを目的とする。癌免疫療法は、侵襲的な治療方法とは異なり、免疫により癌組織を特異的に治療することから、副作用の少ない治療方法として多くの期待を集めてきた。しかしながら、最近になっても奏効率は低く、期待外れの結果となっている。一方、近年に発見された Treg が、免疫反応を負に制御しており、癌免疫療法の低い奏効率も、Treg が原因と考えられるようになった。このことに基づき、本研究開発では、Treg 除去フィルターモジュールを開発目標に置く。現在、Treg 以外に、免疫反応を負に制御できる他の機構として、免疫チェックポイントリガンドである PD-1 リガンドによる免疫細胞の抑制が知られており、現在、治療効果が集積されつつあるが、あらゆる癌に有効とは言えず、また、重篤な自己免疫疾患の発症例も示されつつある。従って、本研究開発の目標であるフィルターモジュールを用いての Treg 除去による癌免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤による治療と相補的關係にあると期待される。さらに、本研究開発では、自然免疫系の直接賦活化を体外循環モジュールを用いて行う方法も検討する。本研究開発では、T 細胞非依存性抗原である癌関連糖鎖抗原を用いて、免疫系を賦活化する。具体的には、体外循環モジュールに癌関連糖鎖抗原を固定化し、血液中の B1a 細胞を体外のモジュールにて活性化して体内に戻すシステムを開発する。つまり、T 細胞依存型の機構である Treg 除去と、T 細胞非依存型機構である癌関連糖鎖抗原による免疫賦活化、とを両輪として、癌免疫療法にアプローチするのが本研究開発の目標である。

#### 2. 研究開発の概要

ヒト末梢血等を用いて、Treg 除去機器の技術的検討を進め、生物学的安全性試験のうち適切な試験項目を選定して実施し細胞処理サポーター機器としての基本的な安全性を予備的に確認する。また、上市されている抗 CCR4 抗体については、Treg への親和性が低いことから、新規抗 CCR4 抗体の探索を行う。探索取得した新規抗体を固定化したフィルターモジュールを試作検討し、Treg 除去機器の性能の改善を図る。抗ヒト Treg 抗体を固定した Treg 除去機器を用いて T 細胞養子免疫療法の有効性を *in vivo* で評価するため、モデル動物実験系を確立し、実施する。この際、投与する細胞数や Treg 除去効率を変えることで処理細胞数や目標とする除去性能を設定し、がんの T 細胞療法へのフィルターモジュールの適用の可能性を検討する。さらに、固形癌について悪性黒色腫、大腸癌、食道癌のがん組織検体に浸潤している Treg の解析を通して、TIL 細胞療法への本フィルターモジュールの展開も検討する。

不織布へのリガンドの固定化について、繊維表面を単分子膜でコーティングする新規な単分子膜固定化技術を確立する。単分子膜の固定化は、光反応により行うが、繊維への被覆率、被覆表面のラフネスなどを評価し、血液成分の非特異的吸着を抑制できる条件を見出す。さらに、繊維表面を被覆した単分子膜への抗体固定化方法を検討する。

癌関連糖鎖抗原の合成方法を確立する。抗原性を高めるため、繰り返し構造および非天然糖に注目した新規な癌関連糖鎖抗原の合成を行う。これらの癌関連糖鎖抗原を結合した単分子膜を調製し、不織布の繊維表面への光固定化方法を検討する。

### 3. 研究開発の成果（平成 27 年度）

(1)研究項目:不織布繊維表面への単分子膜固定化の実施（京都大学）

フルオレセインで標識化したペプチドナノシートを作製し、不織布に光固定化した後、体外循環デバイスにセットして、デバイスから放出される両親媒性ポリマーの定量を行った。その結果、非特異的吸着物を洗浄できる条件を見出し、不織布表面へのペプチドナノシートの特異的修飾が可能となった。

(2)研究項目:不織布繊維表面への糖鎖抗原組込の実施（京都大学）

Ley を末端に結合した両親媒性ペプチドと右巻きらせんペプチド、左巻きらせんペプチドを混合して、ペプチドナノシートを作製できることを確認した。

(3)研究項目:癌関連糖鎖抗原を結合したナノシートによる抗体産生評価試験（京都大学）

Ley の含量を変えたペプチドナノシートを作製し、マウスに静脈投与し、血清中の IgM 抗体産生を ELISA 測定した。その結果、Ley の含量の多いナノシートほど、IgM 抗体産生が多くなった。

(4)研究項目:不織布の製造工程の立上げを実施（旭化成（株））

研究実施場所の変更に伴い、従来と同様に活性基（エポキシ基）導入不織布を作製できるかを確認した。

(5) 研究項目:新規抗 CCR4 抗体の作製の実施（大阪大学）

新規抗 CCR4 抗体の作製を試みた。ハイブリドーマ法では hCCR4 ペプチド (SNYYLYESIPKPCTKEGIKAFGE)をマウスに免疫後、脾臓細胞からハイブリドーマを作製した。その結果 CCR4 ペプチドに特異的に反応する新規モノクローナル抗体 38-2B を得た。ファージディスプレイ法では hCCR4 ペプチド(SNYYLYESIPKPSTKEGIKAFGE)に対して結合能を有する Fab ドメインをスクリーニングし、モノクローナル抗体 294-05 を得た。

(6) 研究項目:Treg 除去フィルターの前臨床試験の実施（国立がん研究センター、旭化成(株)）

健康人 PBMC を用い、抗 CD3 抗体による CD8 陽性 T 細胞への TCR 刺激による活性化実験系に CCR4 陽性細胞を追加する実験をおこなった。その結果、CCR4 陽性細胞が含まれない条件下を 100%としたとき、CCR4 陽性細胞が 2.5%以上すなわち Foxp3 陽性 Tregs の割合が 0.5%以上含まれる状況下において、CD8 陽性 T 細胞の増殖率とサイトカイン産生能が 90%に低下することがわかった。その結果、CD8 陽性 T 細胞の活性化を 90%以上に維持するためには Treg 除去フィルター処理後の細胞集団に CCR4 陽性細胞が 2.5%以下の存在率になるよう設定することが必要であることを示した。

腫瘍移植マウスへの細胞移入療法の実験系の確立をおこなった。CD25 陽性細胞を除去した DUC18 マウス由来脾細胞を腫瘍接種マウスへ移入することで未処理細胞移入よりも腫瘍退縮効果が向上した。また、CMS5a 接種 SCID マウスへ DUC18 マウス由来脾臓細胞を移入する際に、CD25 陽性 Treg を 共移入した。その結果、Tregs を移入することで細胞移入療法の効果が減弱することを示した。