

特異的リンパ球の回収を目指した抗体修飾基材の開発

Specific collection of lymphocyte cells using antibody-immobilized materials

○ 木村剛(東医歯大生材研)、中村奈緒子(東医歯大生材研)、岩田拓也(東医歯大生材研)、南広祐(東医歯大生材研)、木村俊作(京大工)、坂口志文(大阪大免疫)、岸田晶夫(東医歯大生材研)

Tsuyoshi KIMURA, Naoko NAKAMURA, Takuya IWATA, Kwangwoo NAM, Tokyo Medical and Dental University
Shunsaku KIMURA, Kyoto University
Shimon SAKAGUCHI, Osaka University
Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental University

Abstract: Recently studies have shown that regulatory T cells (Tregs) suppress antitumor immune responses. Also, it suggests that transplantation of Treg cells have therapeutic potential for autoimmune disease. Therefore, it is necessary to collect intact Treg cells effectively. In the present study, we synthesized antibody-immobilized materials for specific capture of Treg. Polyethylene (PE) film was pretreated with plasma generated by corona discharge in the presence of air and subjected to graft polymerization of acrylic acid (PAA-g-PE). When HeLa cells were seeded on PE, PAA-g-PE, the cell adhesion was decreased for PAA-g-PE compared to PE. Furthermore, anti-mouse CD45 antibody was covalently immobilized on the surface of PAA-g-PE (CD45-PAA-g-PE). Mouse peripheral blood and bone marrow cells expressing CD45 was effectively adhered on CD45-PAA-g-PE. These results suggest that CD45 immobilized PAA-g-PE could capture CD45 expressing cells effectively and specifically.

Key Words: graft polymerization, antibody immobilized surface, cell capture

1. 緒言

がんの特異的に発現しているがん抗原が存在し、それらに対する免疫応答がヒトで誘導されるということが報告された。それ以降、がん抗原を、ペプチド、タンパク、DNA等の形態で投与し、これらに対する免疫応答を増強することにより、がんを駆逐することを試みるがん免疫療法が行われている。しかしながら、多くの免疫療法でがん抗原特異的免疫応答が誘導されるにもかかわらず、十分に臨床効果が認められていない。その原因は、多くのがん抗原が自己抗原由来であるために、がんに対する免疫応答が免疫寛容すなわち免疫抑制状態になっているためと考えられる。その免疫抑制の機序として、腫瘍細胞内に浸潤し、自己抗原を認識して免疫反応を負に制御する制御性 T 細胞(Treg)が、抗腫瘍免疫応答を抑制している。Treg 細胞を担癌生体から除去すると抗腫瘍免疫応答が増強し、がんを拒絶できることが明らかとなっている^{1,2)}。

また、Treg 細胞は、移植免疫、自己免疫疾患において重要な役割を果たすと考えられる。Treg 細胞の移植により、自己免疫疾患治療が可能であることが示唆されており、薬剤による Treg 細胞の誘導とともに、Treg 細胞の採取技術が注目されている。しかし、用いる Treg 細胞の選別、採取量に問題があることが指摘されており、Treg 細胞を効率よく、intact な状態で採取する技術の確立が望まれている。

我々は、Treg 細胞を intact な状態で特異的・高効率に捕捉・回収する技術開発を行っており、本研究では、特定の細胞を選択的に接着する細胞選択的接着性界面の開発についてモデル界面・細胞を用いて原理の検証について研究を実施した(図1)。具体的には、細胞接着性の基材に細胞非接着性のポリマーをグラフト重合し、さらに、目的細胞に特異的な抗体の化学固定により選択的に細胞を接着させるモデル界面を構築した。

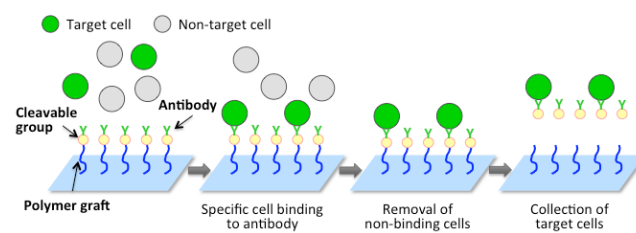


Fig. 1 Strategy of specific capture and release of lymphocyte using antibody-immobilized materials.

2. 実験

2-1 PE へのアクリル酸のグラフト重合^{3,4)}

基材としてポリエチレン (PE)、細胞非接着性分子にアクリル酸を用いた。PE へのアクリル酸のグラフト重合は、コロナ放電処理した PE をアクリル酸溶液に浸漬し、熱重合により行った。この際、アクリル酸濃度、重合温度を変化させて重合条件の最適化を行った。

2-2 ポリアクリル酸グラフト PE への CD45 抗体の固定化

モデル抗体として抗マウス CD45 抗体を用いた。ポリアクリル酸グラフト PE(PAA-g-PE)への CD45 抗体の固定化は、縮合剤として 1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) を用いて行った。具体的には、調製した PAA-g-PE を ϕ 15mm の成形し、セルカルチャープレートに設置し、CD45(5 μ g/ml (in MES buffer)) 200 μ l を添加後、EDC(10mg/ml) 200 μ l を添加し、4°Cにて 2 時間反応させた。

2-3 CD45 抗体固定化 PE への特異的細胞接着

得られた CD45-PAA-g-PE への選択的な細胞接着を検討した。まず、PAA グラフトによる細胞非接着性の付与について、PE、コロナ放電処理 PE、PAA-g-PE に培養細胞 (HeLa

細胞)を播種し、24時間後の細胞接着を顕微鏡下で観察した。

次に、マウス血液および骨髄細胞を用いて、CD45-PAA-g-PEへの選択的な細胞接着を検討した。ここでは、蛍光顕微鏡下にて細胞接着を検討するためEGFPマウスより採集した細胞を使用した。血液細胞、骨髄細胞のCD45発現を確認するため、蛍光標識CD45(APC-CD45)を用いてフローサイトメトリー(FACS)解析を行った。その後、血液細胞および骨髄細胞をPAA-g-PE、CD45-PAA-g-PEに播種し、リンス後に蛍光顕微鏡にて観察した。

3. 結果と考察

3-1 PEへのアクリル酸のグラフト重合とCD45抗体の固定化

PEフィルムへのグラフト重合は、アクリル酸濃度、重合温度を変化させて行った。その結果、アクリル酸濃度5w/v%、重合温度60°Cの重合条件にて適度にグラフト重合されたPE(PAA-g-PE)が得られた(表1)。

Table 1 Polymerization of acrylic acid on polyethylene with corona discharge

Sample	Conc. of acrylic acid (w/v%)	Temp.	Outer solution	Surface property
1	5	60	Low viscosity	slimy
2	10	50	High viscosity	gel
3	10	60	High viscosity	gel
4	10	70	gel	gel

PAA-g-PEへのCD45抗体の固定化は、EDCを用いた縮合反応にて行った。PAA-g-PEおよびCD45固定化PAA-g-PEをATR FT-IR測定した結果、PAAのグラフト・抗体固定過程での特徴的ピークが示され、CD45固定化PAA-g-PEが得られた。

3-2 CD45抗体固定化PEへの特異的細胞接着

まず、PAA-g-PEの細胞非接着性について、ヒト由来子宮頸ガン細胞(HeLa)を用いて検討した(図2)。PEでは、細胞の接着と伸展が観察され、洗浄による非接着細胞除去後も伸展した接着細胞は観察された。コロナ放電処理PEでは、PEに比して多数の接着・伸展細胞が観察された。一方、PAA-g-PEでは、伸展した細胞は観察されず、洗浄後には接着細胞は観察されなかった。これらより、PEへのPAAグラフトによる細胞非接着性付与が確認された。

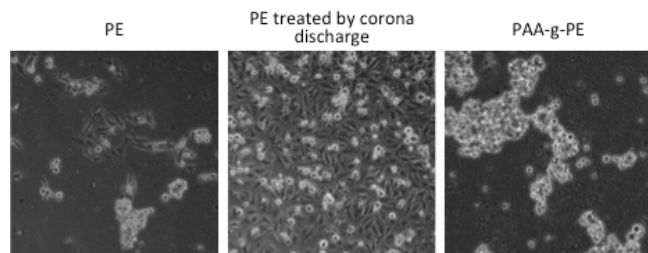


Fig. 2 Cell adhesion on various surface modified polyethylene films

次に、CD45-PAA-g-PEの特異的細胞接着について、EGFPマウス由来の血液・骨髄細胞を用いて検討した。血液・骨髄細胞のCD45発現をフローサイトメトリー(FACS)にて解析した結果、APC-CD45の反応前後にて細胞分布が変化し、多数のCD45ポジティブ、EGFPポジティブ細胞を確認できた。血液・骨髄細胞をPAA-g-PE、CD45-PAA-g-PEに播種し、リンス後に蛍光顕微鏡にて観察した(図3)。PAA-g-PEおよびPAA-g-PEに縮合剤(EDC)を添加せずにCD45を添加させた表面(CD45+PAA-g-PE)では、ほとんど接着細胞が観察されず、CD45-PAA-g-PEにて接着細胞が観察された。以上より、本モデル界面での選択的細胞接着が可能であることが明らかとなった。

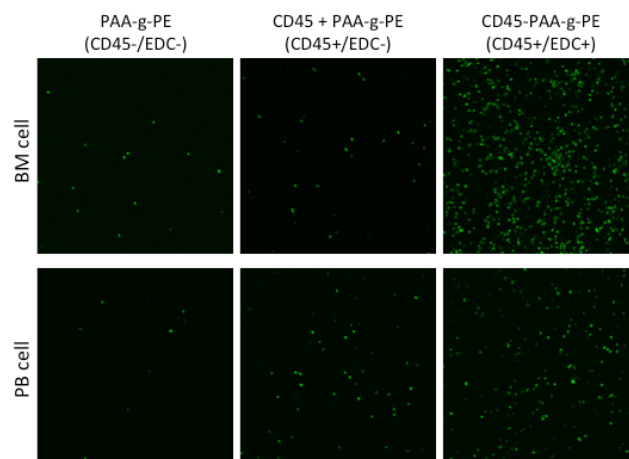


Fig. 3 Specific adhesion of bone marrow (BM) cells and peripheral blood (PB) cells on CD45 antibody immobilized polyethylene films.

参考文献

- (1) Hiroyoshi Nishikawa, Shimon Sakaguchi, Regulatory T cells in tumor immunity, International Journal of Cancer, vol. 127, pp. 759-767, 2010.
- (2) Zoltán Fehérvári and Shimon Sakaguchi, CD4+ regulatory cells as a potential immunotherapy, Philosophical Transactions the Royal Society B, vol. 360, no. 1461, 1647-1661, 2005
- (3) Toshiyuki Okada and Yoshito Ikada, Modification of silicone surface by graft polymerization of acrylamide with corona discharge, Die Makromolekulare Chemie, vol. 192, no. 8, pp. 1705-1731, 1991
- (4) Hideji Ichijima, Toshiyuki Okada, Yoshikimi Uyama, Yoshito Ikada, Surface modification of poly(methyl methacrylate) by graft copolymerization, Die Makromolekulare Chemie, vol. 192, no. 5, pp. 1213-1221, 1991