

免疫療法を目指したターゲット細胞捕獲表面の設計

Design of capture device for Tregs

○木村剛 (医科歯科大), 中村奈緒子 (医科歯科大), 伊東愛 (医科歯科大), 岩田拓也 (医科歯科大), 佐々木直 (医科歯科大), 梅田貫史 (医科歯科大), 南広祐 (医科歯科大), 木村俊作 (京都大), 坂口志文 (大阪大), 岸田晶夫 (医科歯科大)

Tsuyoshi KIMURA, Naoko NAKAMURA, Ai ITO, Takuya IWATA, Nao SASAKI, Kanji UMEDA, Kwangwoo NAM, Shunsaku KIMURA, Shimon SAKAGUCHI, Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental Univ., Kyoto Univ., Osaka Univ.

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) and polypropylene (PP) film was pretreated with plasma generated by corona discharge in the presence of air and subjected to graft polymerization of acrylic acid (PAA-g-film). 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-film (CD45-PAA-g-film). Mouse peripheral blood and bone marrow cells expressing CD45 was effectively adhered on CD45-PAA-g-film. These results suggest that CD45 immobilized PAA-g-PE could capture CD45 expressing cells effectively and specifically.

Key Words: Tregs, cell capture device, antibody, cancer immunotherapy

1. 緒言

がん抗原に対してがん特異的に発現する免疫応答が誘導されることが報告され、それ以降、ペプチド、タンパク、DNA等の形態でがん抗原を投与し、免疫応答を増強するがん免疫療法が行われている。しかし、多くの免疫療法ではがん抗原特異的に免疫応答が誘導されるにもかかわらず、十分な臨床効果が認められていない。原因の一つとして、多くのがん抗原が自己抗原由来であるため、がんに対する免疫応答が免疫抑制状態になっているためと考えられている。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ことが考えられる^{1,2)}。これまで、担癌生体からTreg細胞を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^{3,4)}。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^{5,6)}、Treg細胞移植により、自己免疫疾患治療が可能であることが示唆されている。これらのことから、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が、用いるTreg細胞の選別、採集量に問題が残っており、Treg細胞を効率よく、intactな状態で採集する技術の確立が望まれている。

我々は、Treg細胞の特異的・高効率な捕獲・回収に関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。

2. 実験

2-1. 表面改質

基材として、ポリエチレン(PE)フィルム、ポリプロピ

レン(PP)フィルムを用いた。細胞非接着性分子としてアクリル酸、抗体として抗マウスCD45抗体(mCD45)、CD25抗体(mCD25)を用いた。フィルムをコロナ放電処理(15kV, 1~10min)した後、アクリル酸溶液に浸漬し、熱重合によりフィルムへのアクリル酸のグラフト重合を行った。ポリ

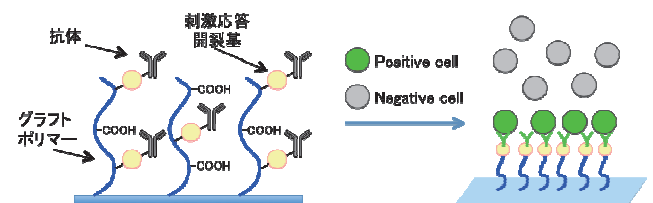


Fig. 1 Figure caption

アクリル酸グラフトフィルム(PAA-g-PE, PAA-g-PP)へのmCD45抗体あるいはmCD25抗体の固定化は、1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)を用いた縮合反応により行った。具体的には、PAA-g-フィルム(φ15mm)をセルカルチャープレートに設置し、mCD45(5μg/ml in 0.1M MES buffer)を200μl、EDC(10mg/ml in 0.1M MES buffer)を200μl添加し、4℃にて2時間反応した後、洗浄し、mCD45-PAA-g-フィルムを得た。

抗体特異的に捕獲した細胞を回収するために、抗体に還元開裂基を導入した。mCD45あるいはmCD25とN-[[2-(Biotinylamino)ethyl] dithiopropanoyloxy] sulfosuccinimide, sodium salt (Biotin-SS-Sulfo-OSu)を反応させ、ゲル濾過にて精製し、Biotin-SS-mCD45、Biotin-SS-mCD25を得た。PAA-g-フィルム(φ15mm)をセルカルチャープレートに設置し、Biotinyl-3,6-dioxaoctanediamine (Amine-PEG2-biotin, 7.7mg/ml in 0.1M MES buffer) 200μlを添加後、EDC (10mg/ml in 0.1M MES

buffer) 200 μ l を添加し、4°Cにて2時間反応し、洗浄した。得られた Biotin-PEG2-PAA グラフトフィルムに NeutrAvidin および Biotin-SS-mCD45 あるいは Biotin-ss-mCD25 を添加し、4°Cにて一晩反応後、洗浄し、mCD45-SS-PAA-グラフトフィルム、mCD25-SS-PAA-グラフトフィルムを得た。

2-1. ターゲット細胞の特異的接着試験

mCD45 抗体と反応しない浮遊細胞としてヒト白血病細胞株である HL60 を、赤色蛍光細胞染色剤である Cyto-red にて染色し用いた。mCD45 抗体と反応する骨髄細胞は緑色蛍光を有する EGFP マウスより採取し用いた。

3. 結果と考察

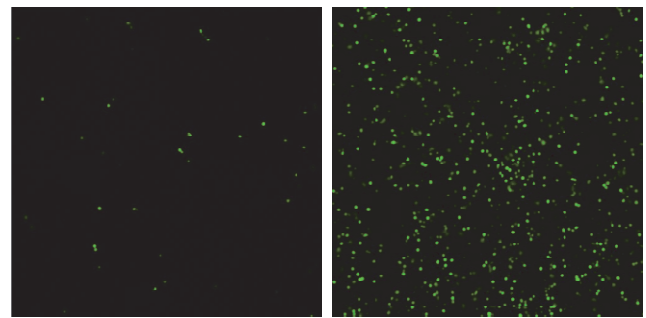
ポリアクリル酸のフィルムへのグラフト重合をアクリル酸モノマー濃度、重合温度を変化させて行った。モノマー濃度 5w/v%、重合温度 60°Cの重合条件にて適度にグラフトされた PAA-g-PE、PAA-g-PP が得られた。PAA-g-PE あるいは PAA-g-PP および mCD45 抗体を固定化した mCD45-PAA-g-PE、mCD45-PAA-g-PP の ATR FT-IR 測定では各修飾・固定化過程での特徴的ピークが示され、フィルムへの PAA グラフト鎖の導入、PAA グラフトフィルムへの mCD45 の固定化が示された。

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 を用いて培養細胞 (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。PE では、細胞の接着と伸張が観察され、洗浄後も伸張した接着細胞は観察された。コロナ放電処理 PE では、PE に比べて多数の接着・伸張細胞が観察された。一方、PAA-g-PE では、伸張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。以上より、基材への PAA グラフトによる細胞非接着性付与が確認された。

マウス骨髄細胞を用いて、mCD45-PAA-g-PE、mCD45-PAA-g-PP における抗体を介した細胞接着について検討した。ここでは、蛍光顕微鏡下にて細胞接着を検討するため緑色蛍光の EGFP マウスより骨髄細胞を採集し、使用した。まず、骨髄細胞の mCD45 抗体との反応性を確認するため、蛍光標識 mCD45 (APC-CD45) を用いて FACS 解析を行った。APC-mCD45 の反応前後にて細胞分布が変化し、多数の mCD45、EGFP ダブルポジティブ細胞を確認できた。上記の骨髄細胞を PAA-g-PE、mCD45-PAA-g-PE および PAA-g-PP、mCD45-PAA-g-PP に播種し、リンス後に蛍光顕微鏡にて観察した (図 2)。PAA-g-PE および PAA-g-PE に縮合剤 (EDC) を添加せずに mCD45 を添加させた表面 (PAA-g-PE+mCD45) では、ほとんど接着細胞が観察されず、mCD45-PAA-g-PE にて接着細胞が観察された。これらの結果は、本モデル表面での選択的細胞接着が可能であることを示している。

mCD45-SS-PAA-g-PE の細胞選択的捕獲を検討するため、mCD45 抗体と反応しない HL60 細胞 (1×10^6 cells/well, Cyto-red 染色) および EGFP マウス骨髄細胞 (1×10^5 cells/well) を播種し、洗浄後に蛍光顕微鏡下で各細胞の接着細胞数をカウントし、それぞれの接着率を導出した (図 3)。未処理 PE では、HL60 細胞および骨髄細胞の非特異的な高い細胞接着率が示され、PAA-g-PE では細胞接着は示されなかった。一方、mCD45-SS-PAA-g-PE では、HL60 の細胞接着は示されなかったが、骨髄細胞の高い接着細胞率が示され、mCD45 抗体を介した細胞接着による高い細胞選択性を示唆している。次に、還元剤添加による捕獲した

骨髄細胞の回収を試みたが、十分な細胞解離・回収はなされなかった。



mCD45 + PAA-g-PE
(CD45+/EDC-)

mCD45-PAA-g-PE
(CD45+/EDC+)

Fig. 2 Specific cell adhesion on CD45 modified surface

参考文献

- (1) Palucka, K., Banchereau, J., Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines., *Immunity* 39(1): 38-48, 2013
- (2) 2. Savage. P.A., Malchow. S., Leventhal. D.S. Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology., *Trends Immunol.* 34(1): 33-40, 2013.
- (3) 3. Fehervari. Z., and Sakaguchi. S., CD4+ regulatory cells as a potential immunotherapy. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 360: 1647-1661, 2005.
- (4) 4. Nishikawa. H., Sakaguchi. S., Regulatory T cells in tumor immunity, *International Journal of Cancer*, 127: 759-7678, 2010.
- (5) 5. Jiang. S., Tsang. J., Tam. P., Regulatory T cell immunotherapy for transplantation tolerance: step into clinic., *Int Immunopharmacol.* 10(12): 1486-1490, 2010
- (6) 6. Safinia. N., Leech. J., Hernandez-Fuentes. M., Lechler. R., Lombardi. G., Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy, *Clin Exp Immunol.* 172(2): 158-68, 2013