

研究終了報告書

「抗体-核酸結合体による immunogenic cell death 誘導法の開発」

研究期間： 2021 年 4 月～2024 年 3 月

研究者： 田良島 典子

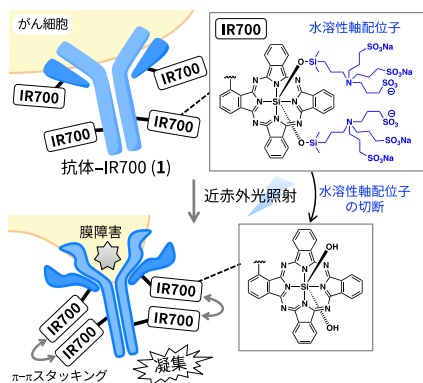
1. 研究のねらい

本研究では、グアニン四重鎖 (G4) 構造の形成をトリガーとした antibody-oligonucleotide conjugate (AOC, 抗体-核酸結合体) の凝集を利用する標的細胞特異的 immunogenic cell death (ICD) 誘導法の開発に取り組んだ。

ICD とは、免疫応答を誘発しやすいタイプの細胞死であり、2005 年にその概念が提唱されて以来、がん免疫療法への応用を目指して盛んに研究が展開されてきた。ICD の人為的誘導法としては、アントラサイクリン系などの一部の抗がん剤の投与あるいは放射線照射などが報告されているが、これらは標非特異的な作用であり、副作用も甚大である。したがって、狙った細胞に対して特異的に ICD を誘導する手法の確立が強く求められている。このような背景の下、本研究では、近年注目を集める光線免疫療法 (photoimmunotherapy, PIT) に着想を得て、新しい概念に基づく AOC の設計により、狙った細胞に対して特異的に ICD を誘導する方法論を提案する。

PIT とは、フタロシアニン誘導体 IR700 を結合させた抗体 (抗体-IR700, 1) を用いた新しいがん治療法である (図 1a) (Mitsunaga *et al.*, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1685)。抗体-IR700 を投与し標的部位へと送達後に近赤外光を照射すると、IR700 の水溶性軸配位子が切断される (Sato *et al.*, *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4*, 1559-1569)。この IR700 の構造変化がフタロシアニン環の π - π スタッキング相互作用に基づく抗体-IR700 の凝集を引き起こし、凝集した抗体-IR700 が細胞の膜を障害することで、がん細胞特異的な ICD が誘発されると考えられている。

a PIT の作用メカニズム (推定)



b 本研究が提案する標的細胞特異的 ICD 誘導法

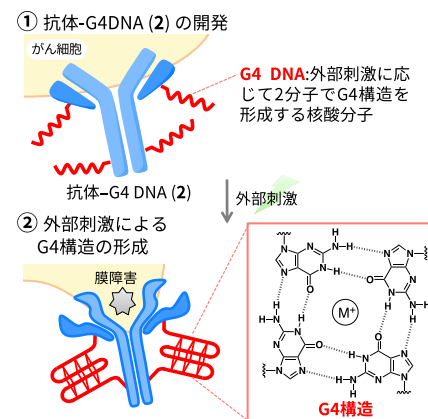


図 1 抗体-IR700 による PIT の作用メカニズム (a) と本研究戦略の概要 (b)

この PIT の作用メカニズムに着想を得て、本研究が提案する G4 構造の形成をトリガーとした AOC の凝集を利用する標的細胞特異的 ICD 誘導法 (図 1b) を以下に記す。

- ① 抗体と任意の外部刺激に応じて 2 分子で G4 構造を形成する核酸分子 (G4 DNA) からなる AOC (抗体-G4 DNA, 2) を開発する。

- ② 抗体-G4 DNA からなる AOC が標的細胞と結合した後、任意の外部刺激（光）を加えると、2 分子の G4 DNA が互いに集合して G4 構造を形成し、これに伴い AOC の高次構造変化（凝集）が生じる。
- ③ AOC が結合した細胞において細胞膜の障害に起因した ICD が誘発される。

という戦略である。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではまず、外部刺激に応じた G4 構造の形成をトリガーとした AOC の凝集を誘起するため、天然型グアノシンの O6 位にクマリン型光分解性保護基を導入したグアノシンアナログを含む G4 DNA を数種合成した。G4 DNA はいずれも設計通りの光応答性を示し、光照射に伴うクマリン基の除去と G4 構造の形成を確認することが出来た。

G4 DNA の 5'-末端にリンカーを導入した後、抗体と結合させることで AOC を獲得した。得られた AOC について、光刺激に応じた AOC の凝集誘導効果を試験管内にて評価した結果、光刺激に応じた沈殿性凝集体の形成が観察された。この時、AOC における G4 DNA と抗体の結合比 (oligonucleotide-antibody ratio, OAR) は、AOC 全体に占める凝集体の形成割合に影響を与えないものの、生成する凝集体の大きさと正の相関を示した。また、G4 DNA と抗体の結合様式が異なる AOC の間では、凝集挙動に顕著な差異は見られなかった。

細胞において、抗体-G4 DNA からなる AOC を添加し、光照射後の細胞挙動を評価した。その結果、AOC 添加後に光照射を行った群では、優位な細胞死誘導が観察された。さらに、それらの膜挙動を免疫染色により観察した結果、AOC 添加後に光照射を行った場合においてのみ、細胞膜の障害ならびにそれに伴う核損傷が観察された。これらの結果は、当初の研究計画通り、G4 構造の形成をトリガーとした AOC の凝集が標的細胞の膜を障害し、それに伴う ICD を誘導し得ることを示すものである。

(2) 詳細

研究課題 1 光刺激により G4 構造を形成する DNA の合成

天然型グアノシンの O6 位にクマリン型光分解性保護基を導入したグアノシンアナログを化学合成した後、G4 DNA (ODN1) へ導入した。ODN1 は、光照射によるクマリン基の除去により、G4 構造を形成する。得られた ODN1 を含む水溶液に対して光照射 (365 nm) を行い、HPLC 解析により反応を経時的に追跡し結果、光照射に伴うクマリン基の除去が進行し、天然型配列へ変換される事が確認された (図 2a)。また、図 2b に示したように、光照射前後における ODN1 の CD スペクトル解析の結果、光刺激に応じたオリゴ核酸の高次構造変化が認められた。また、ODN1 に対する光照射後の CD スペクトルは、290 nm 付近に極大、275 nm 付近に肩のあるスペクトルを示した。

続いて、リンカーを介して ODN1 を抗体へと結合させることで AOC とした後、光照射による AOC の凝集誘導を評価した (研究課題 2 参照)。しかし、AOC の明らかな凝集挙動は認められなかった。これは、ODN1 における高次構造変化が、より大きな分子である抗体 (AOC) の凝集を誘起するのに不十分であるためであると考え、疎水性凝集効果を付与した ODN2-5 を

得られた AOC に対して試験管内で光照射を実施し、その凝集挙動を観察した結果、期待通り、AOC 群においてのみ凝集体の生成が認められた(図 3b: 光照射により生じた沈殿性の凝集殿生成物を顕微鏡にて観察)。また、AOC の OAR が大きい程、大きな凝集体を形成する傾向が認められた。一方、AOC の OAR と凝集体の形成比の間には相関が認められなかった。

(図 3c)。また、凝集体においても依然、オリゴ核酸上のクマリン基に由来すると想定される蛍光シグナルが観察されたことから、光照射によりある程度の凝集体が形成されると、以降の光反応が進行しづらい状況にあると想定される。

研究課題 (3) 細胞系における細胞死・膜障害性および ICD 誘導評価

細胞系において、抗体-G4 DNA からなる AOC を添加し、光照射後の細胞挙動を評価した。実験にあたり、抗体への G4 DNA の結合が、抗体自身の標的結合能を損なわないことを確認している。

まず、細胞死誘導能を評価した結果、抗体単独、G4 DNA 単独あるいは非結合状態にある抗体と G4 DNA を添加後に光照射を行った群では細胞死誘導が観察されないのに対し、AOC (OAR=2) 添加後に光照射を行った群では、濃度依存的な細胞死誘導が観察された (図 4a)。さらに、それらの細胞挙動を免疫染色により観察した結果、AOC 添加後に光照射を行った場合においてのみ、細胞膜の障害ならびにそれに伴う核損傷が観察された (図 4b)。これらの結果は、当初の研究計画通り、G4 構造の形成をトリガーとした AOC の凝集が標的細胞の膜を障害し、それに伴う細胞死を誘導し得ることを示すものである*。さらに、AOC の OAR が大きくなるにつれて、細胞死誘導能は向上する傾向が観察された。

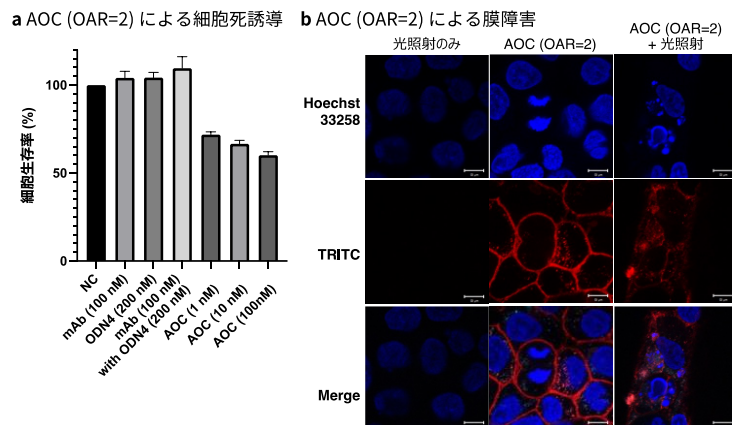


図 4 G4 構造の形成をトリガーとした AOC の凝集による標的細胞の膜障害と細胞死誘導

*図 4b に示した免疫染色の結果は、厳密には、標的受容体の局在変化を示唆するものである。ただし、本資料に掲載した画像は、光照射後速やかに免疫染色を実施した場合に得られた結果であり、光照射 24 時間経過後に免疫染色を実施した場合、あるいは、光照射を数回に分けて実施することで凝集誘導効率を高めた場合には、より顕著な細胞死が進行するために、免疫染色そのものが実施出来なかった。したがって、観察された標的受容体の局在変化は細胞膜の障害と同義であり、細胞死を誘起するものであると判断した。

3. 今後の展開

設計した AOC の物性を理解し、制御出来る技術確立のために多くの時間を要したため、AOC の OAR と対比した挙動・性質解析が未完了の部分がある。また、AOC の OAR 拡大が膜障害効率の向上につながることを示唆するデータを得ているものの、これまでのような免疫染色では、OAR の大きい AOC ほど、効果的な細胞死というイベントの進行により膜状態の変化を解析することが困難である。直近の課題として、ライブセルイメージングを活用する細胞挙動解析による研究コンセプトの実証に取り組む必要がある。また、ICD 誘導の実証についてもデータを整備する。

研究期間内に得られた成果は、G4 構造の形成をトリガーとした AOC の凝集を利用する細胞死誘導という基盤技術に過ぎない。社会実装（創薬応用）へ向けて、3 年を目処に、G4 DNA 配列への化学修飾の導入を初めとする AOC の drag-likeness 向上を図るとともに、実験モデルマウスにおける in vivo 評価を進める必要がある。また、本研究課題と並行して、AOC による ICD 誘導の効果を強化するヌクレオチドアナログの開発にも取り組んできた。In vivo における両者の併用療法の検証も実施する。

ACT-X 研究期間に試行錯誤を重ねたことにより、当初想定していた以上に、抗体-G4 DNA からなる AOC の OAR と凝集を含む AOC の構造変化の間には、幅広いダイナミックレンジがあることが分かってきた。本研究のコンセプトを発展させ、AOC を用いて細胞死を起こす手前の弱い相互作用を誘起し、生命現象操作する技術へ展開することも計画中である。

4. 自己評価

外部刺激に応じた G4 構造の形成をトリガーとした AOC の凝集誘導技術を確立し、これを利用して標的細胞特異的な ICD を誘導するという当初の研究目的（コンセプト）を概ね実証・達成することが出来た。がん治療における PIT および ICD 誘導に対する期待は極めて高く、本研究成果を基盤技術とした創薬展開をより一層強化したい。ただし、研究期間内において、用いる外部刺激として光刺激の検討しか実施出来なかった。本研究課題が提案する AOC を用いた ICD 誘導は、オリゴ核酸の適切なデザインによって多様な外部刺激を利用出来る点が特徴である。これまで得られた研究成果の学術的意義及び社会・経済への波及効果をより一層高めるために、利用可能な外部刺激の早期拡大を図る。

研究実施体制に関しては、研究代表者が主体的に研究を進めることが出来た。研究費の執行については、「出産・子育て・介護」支援を受けた他は、概ね計画通りである。

研究期間内において、ACT-X 領域内での共同研究による成果を得ることは出来なかったものの、ACT-X に参画する他の研究者の支援を受け、細胞系での光操作技術を数多く身につけることが出来た。また、第 144 回 日本薬学会年会（横浜）において ACT-X 領域内の研究者との協働によるシンポジウムを企画準備中であり、研究ネットワークの拡大を図ることが出来た。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

1. Noriko Saito-Tarashima, Mao Kinoshita, Yosuke Igata, Yuta Kashiwabara, Noriaki Minakawa, Replacement of oxygen with sulfur on the furanose ring of cyclic dinucleotide enhances the immunostimulatory effect by STING activation, *RSC Med. Chem.* 12, 1519–1524 (2021).
2. Noriko Saito-Tarashima, Yusuke Kumanomido, Katsuaki Nakashima, Yoshiaki Tanaka, Noriaki Minakawa, Synthesis of a cyclic dinucleotide analogue with ambiguous bases, 5-aminoimidazole-4-carboxamide, *J. Org. Chem.* 86, 15004–15010 (2021).
3. Kou Motani, Noriko Saito-Tarashima, Kohei Nishino, Shunya Yamauchi, Noriaki Minakawa, Hidetaka Kosako, The Golgi-resident protein ACBD3 concentrates

STING at ER-Golgi contact sites to drive export from the ER, *Cell Rep.* 41, 111868 (2022).

AOCによるICD誘導効果を強化するヌクレオチドアナログの開発に関する研究成果報告を取り上げた。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数： 0 件 (特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

- ・ 田良島 典子、南川 典昭、セントラルドグマを化学し、新しい創薬モダリティを提案する、日本薬剤学会第 36 年会、2021 年 5 月 14 日 (招待講演)
- ・ Noriko Saito-Tarashima, Noriaki Minakawa, Chemical challenge to the central dogma with 4'-thionucleotides, 15th International Symposium on Nanomedicine, 2022 年 12 月 6 日 (招待講演)

受賞

- ・ 2021 RSC Medicinal Chemistry Emerging Investigator, RSC Medicinal Chemistry (2022.12)
- ・ 徳島県科学技術大賞 若手研究者部門 (2022. 10)

著作物

- ・ Noriko Saito-Tarashima, Akiho Murai, Noriaki Minakawa*, Chemistry of cyclic dinucleotides and analogs, *Handbook of Chemical Biology of Nucleic Acids*, 10.1007/978-981-16-1313-5_20-1.