

2Ap13 動物細胞を用いた高機能性組換え型治療抗体の調製と機能評価

○浅野 竜太郎, 熊谷 泉
(東北大院・工・バイオ工)

我々は、がん免疫療法への応用を目指して二重特異性抗体に着目、特に大腸菌でも調製可能な、その最小形態の1つであるdiabodyの構築に取り組んできた。がん関連抗原EGFRとリンパ球表面抗原CD3を標的としたEx3と名付けたdiabodyは、顕著な腫瘍の縮退効果を示し、既にヒト型化も終了している。一方、上市されている抗体医薬は抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)等のFcが介する効果が、その主な作用機序とされている。そこで我々は、Fc領域を有するIgG様の二重特異性抗体を開発することで、さらに高活性の治療抗体の構築を目指した。古典的なハイブリッド-ハイブリドーマ法では、目的のIgG型の二重特異性抗体以外に副産物が多く産生されてしまう。我々は、Ex3を構成するヒト型化抗EGFR抗体、ヒト型化抗CD3抗体それぞれの可変領域、およびヒトIgG1のFc領域を用いて、均一な調製が可能、かつ各々の抗原に二価で結合可能なIgG様二重特異性抗体を設計し、発現ベクターを構築した。CHO細胞を用いて調製したIgG様抗体は、両標的抗原に対して、結合価数の増加によるものと思われるEx3に対する強い結合能がフローサイトメトリーにより確認され、Fc領域を有さないEx3には見られない末梢血リンパ球の増殖効果が見られた。細胞傷害試験においてもエフェクター細胞として活性化リンパ球、末梢血リンパ球のどちらを用いてもEx3を凌駕する、がん細胞の殺傷効果が見られた。親抗体による阻害試験により抗原特性も保持していることを確認するなど、十分に高機能性組換え型治療抗体の創製に成功したといえる。現在、さらなる構造フォーマットの変更等、有用性を高める検討を進めている。

Functional analysis of effective recombinant therapeutic antibody prepared from mammalian cell

○Ryutaro ASANO, Izumi KUMAGAI
(Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody, protein engineering, antitumor activity

2Ap15 新規レクチンESA 固定化ベシクルを薬物運搬体とする悪性骨軟部腫瘍のDDS治療

○林 啓太¹, 坂山 憲史², 宮崎 龍彦³, 亀井 節也², 宮脇 城二², 相澤 淳一², 稲田 明宏⁴, 加藤 敬一¹
(¹愛媛大院・理工・生物工学, ²愛媛大院・医・運動器学, ³愛媛大院・医・病理・ゲノム病理, ⁴ヤマキ(株))

1.【背景・目的】悪性骨軟部腫瘍は若年層に多く、その治療法開発が強く望まれており、Drug Delivery System (DDS)を用いた治療が有望視されている。我々はこれまでに、がん細胞を標的とする新規レクチン*Eucheuma Serra agglutinin* (ESA)を、非イオン性界面活性剤Span80を主成分とするベシクルに固定化し、薬物キャリアーとして大腸癌のDDS治療を検討してきた。その結果、高い制癌効果を発現した。本研究では、このベシクルを用いて骨腫瘍のDDS治療への利用を検討した。2.【方法・結果】*in vitro*において、(1)62.0 $\mu\text{g/ml}$ のESAをヒト骨肉腫細胞株OST (osteosarcoma Takase, (2.0 $\times 10^5$ cells/ml))と2時間インキュベートした結果、OST細胞を約75%殺傷した。さらに、(2)その細胞殺傷性がアポトーシスに起因することを確認した。また、(3)Endoglycosidase HによるOST細胞の糖鎖切断の有無によるESA-OST細胞間の特異結合性を検討した。その結果、(4)ESAがOST細胞の表面糖鎖と特異結合し、さらに、(5)前述のESA固定化ベシクルもOST細胞に特異結合することが判明した。次に、*in vivo*実験で、抗がん剤Ifomideを内包したESA固定化ベシクルをOST担がんヌードマウスに投与した結果、(6)高い抗がん活性の発現を確認した。

Chemotherapy of osteosarcoma in drug delivery system by using vesicle immobilized with novel lectin ESA as a drug carrier

○Keita HAYASHI¹, Kenshi SAKAYAMA², Tatuhiro MIYAZAKI³, Setuya KAMEI², Jyouzi MIYAWAKI², Jyunichi AIZAWA², Akihiro INADA⁴, Keiichi KATOU¹
(¹Depty. Mate. Sci. and Biotech. Fac. of Grad. Sch. Sci & Eng., Ehime Univ., ²Depty. Bone & Joint Sur. of Grad. Sch. Med., Ehime Univ., ³Depty. Pathogen. Patholo. of Grad. Sch. Med., Ehime Univ., ⁴Yamaki Co.Ltd.)

Key words lectin, Span80 vesicle, DDS, osteosarcoma

2Ap14 脂質ラフトドメインの動的構造と安定性

○山口 健太郎, 鈴木 えり子, 濱田 勉, 高木 昌宏
(北陸先端院・材料)

＜背景・目的＞細胞膜の構造は従来、構成分子が膜面内を自由に拡散し移動している「流動モザイクモデル」が考えられてきていたが、近年、飽和脂質とコレステロールが多く含まれたドメイン構造(ラフト構造)を形成していると示唆されている。ラフト構造はある種の膜タンパク質を選択的に取り込むことで、重要な細胞内プロセスに関与していると考えられる。本研究では、細胞を模倣した巨大リポソームのラフト構造を観察し、外部から添加した脂肪酸がその安定性に与える影響を評価することを目的とした。＜方法＞リポソームの脂質組成として、飽和脂質(DPPC)、不飽和脂質(DOPC)、コレステロールの3成分に、蛍光色素 rhodamine-red X-DHPEを混合させ、巨大リポソームを得た。ラフト領域の標識には、コレラ毒素サブユニットB(CT-B)の緑色蛍光Alexa Fluor488 コンジュゲートを使用した。外部から添加する脂肪酸はリノール酸を選択した。＜結果＞ラフト構造を有するリポソームにリノール酸を添加すると、ラフトドメインの不安定化、膜構造の揺動・出芽が見られ、後に破裂した。飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸それぞれ単独で作製したリポソームの場合、飽和脂肪酸リポソームでは添加直後に破裂するのにに対し、不飽和脂肪酸リポソームでは揺らぎ・出芽が見られ、後に破裂した。この破裂するまでの時間はラフト構造を有するリポソームよりも短かく、リノール酸は不飽和脂肪酸部分(ラフトではない部分)に作用していることがわかった。

Characterization of membrane lipids raft domein.

○Kentaro YAMAGUCHI, Eriko SUZUKI, Tsutomu HAMADA, Masahiro TAKAGI
(Sch. Mat. Sci., JAIST)

Key words raft, liposome, linoleic acid

2Ap16 ヒト由来急性骨髄性白血病細胞系から分離したナノバクテリア様微粒子の特性 (第3報)

○近藤 景子¹, 塩田 節子², 小原 有広², 水澤 博², 原澤 亮³, 青柳 秀紀¹
(¹筑波大院・生命環境, ²医薬基盤研・生物資源, ³岩手大・農)

【目的】我々は、細胞バンクに登録されているヒト由来急性骨髄性白血病細胞系(Kasumi)の培養液中に、サイズが1 μm 以下のナノバクテリア様微粒子(NBP)が共存していることを見出し、NBPの分離、培養に成功した⁽¹⁾。しかしながらNBPの諸特性に関しては依然として不明な点が多い。本研究では、NBPの諸特性を明らかにする事を目指し、NBPの効率的培養を試みた。【方法・結果】分離したNBPは、RPMI 1640培地(+ FBS)を用いて37℃、静置条件下で継代培養を行った (Control)。種々の培地について検討した結果、RPMI 1640培地の代わりに、Schneider' s培地(+ FBS)を用いてNBPの培養を行ったところ、Controlと比べて培養5 dの増殖量が2倍に増大した。また、NBPの増殖にはFBSが必須である点にも着目し、FBS以外の血清がNBPの増殖に及ぼす影響を検討した結果、血清の種類によりNBPの増殖量が大きく異なった。特にヒト血清を用いた場合、(Schneider' s + ヒト血清)で最も増殖が促進され、培養5 dの増殖量が、Controlの約8倍に増大した。さらに、実験の過程で、微小重力環境下でNBPの増殖が促進される現象を見出した。以上の知見に基づき設定した最適培養条件下 (Schneider' s + ヒト血清 + 擬似体液培地を用い、微小重力培養を行う)でNBPを培養した結果、増殖速度が著しく増大し、3 dの培養でControl(培養10 d)の約10倍のNBPを得る事ができ、NBPの効率的培養が可能となった。(1) H19 生物工学会要旨 P219

Characteristics of nanobacteria-like particles isolated from a human leukemia cell line. (Part 3)

○Keiko KONDOU¹, Setsuko SHIODA², Arihiro KOHARA², Hiroshi MIZUSAWA², Ryo HARASAWA³, Hideki AOYAGI¹
(¹Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, ²Nat. Inst. Biomed. Innov., ³Depty. Vet. Med., Iwate Univ.)

Key words Kasumi (JCRB1024), nanobacteria-like particle, nanobacteria