



Title	Development of Antibody-recruiting Strategy to Enhance the Immune Responses
Author(s)	Milawati, Hersa
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/89559
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (HERSA MILAWATI)	
Title	Development of Antibody-recruiting Strategy to Enhance the Immune Responses (効率的な免疫誘導を目指した抗体リクルート戦略の開発)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Antibody-recruiting molecules (ARMs) are bifunctional molecules capable of recruiting endogenous antibodies that are naturally found in human blood stream to induce immune responses against disease-relevant proteins, cells, or organisms, ARMs typically consist of two covalently-linked units: target-binding terminus (TBT), possessing the ability to recognize disease-associated protein target, and antibody-binding terminus (ABT), binding to endogenous antibodies. Simultaneous interaction of TBT to cell surface receptors and ABT to antibodies allows the formation of a ternary complex of target cells, ARMs and antibodies, subsequently eliciting antibody-dependent immune responses to promote cell destruction by various mechanisms.</p> <p>In this report, the author investigated the antibody-recruiting strategy using the interaction between carbohydrate antigens and their corresponding antibodies to develop a potential novel cancer immunotherapy with high selectivity and potency. The development of antibody-recruiting molecules (ARM) using human serum albumin (HSA) as protein scaffold were described in this research, as well as the synthesis of α-gal epitope. The synthesis of HSA-based ARM with α-gal epitope as ABT and sialyl glycan as TBT was successfully achieved. However, the binding affinity between the synthesized HSA conjugate and lymphoma cells was inadequate to induce immune responses. These results attributed to the weak non-covalent <i>trans</i> interaction between Siglec-2 and sialyl glycan and the fierce competition with <i>cis</i> interaction.</p> <p>An alternative strategy has been developed to attach ABT onto the membrane of target cells. Metabolic labeling, an effective and facile method to label cell membrane, has been employed in this research to covalently bind α-gal, B antigen, and rhamnose onto the surface of Raji cells. The display of α-gal, B antigen, and rhamnose on the surface of Raji cells has successfully recruit their natural antibodies to the target cells to induce cytotoxicity through Complement- Dependent Cytotoxicity (CDC). Based on CDC assay result, rhamnose induced an extremely high cytotoxicity, compared to α-gal and B antigen. In addition, the position of azide group expression in glycocalyx was also investigated and revealed to influence the CDC activity. Azide introduction on non-reducing terminus using Ac4ManNAz showed higher CDC activity compared to reducing terminus using Ac4GalNAz.</p> <p>Metabolic glycan labeling, however, can take place in both healthy and cancerous cells. Therefore, to achieve cancer cell selective antibody recruitment, the caging of carbohydrate antigen was investigated. Rha-DBCO was successfully modified with the photocaging group, 2-nitrobenzyl group, to give caged-rha-DBCO. This photocaging-antigen strategy is expected to prevent the trapping of natural antibody in blood stream. Moreover, it can also be used to markedly improved targeting efficiency of immune responses by the combination application with cancer-targeted metabolic labeling.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (Hersa Milawati)		氏名
論文審査担当者	主査	教授 深瀬 浩一
	副査	教授 梶原 康宏
	副査	特任教授 島本 啓子

論文審査の結果の要旨

ヒトは、血液型糖鎖（A型、B型）、 α -gal エピトープ、ラムノースといった糖鎖抗原に対して、大量の自然抗体を持つ。これらの糖鎖抗原をがん細胞に導入し、血清を作用させることにより、自然抗体をがん細胞にリクルートして、免疫反応である補体依存性細胞傷害（CDC）活性を誘導し、がん細胞を殺傷することが可能である。Hersa Milawati は新たな自然抗体リクルート法について検討し、以下の成果を挙げた。

1) Hersa Milawati は、代謝標識とクリック反応を用いて、糖鎖抗原を細胞表層に導入し、CDC を誘導する手法について検討した。アジド糖を用いて代謝標識により、細胞表層にアジド基を発現させ、ここに、dibenzocyclooctyne group (DBCO) という環歪みを有するアルキン誘導体を結合させて合成糖鎖抗原とアジド基の間で、歪み解消型クリック反応により、B型抗原、 α -gal、ラムノース糖鎖抗原を細胞表層に導入した。CDC 活性を調べたところ、ラムノースが最も強力な細胞傷害活性を誘導することを示した。さらに、アジド基取り込みに利用するアジド糖の種類を検討し、ガラクトサミンのアジド体を用いて糖鎖の付け根にアジド基を導入するよりも、マンノサミンのアジド体を用いて糖鎖の外側のシアル酸にアジド基を導入するほうが有効に CDC 活性を誘導できることを明らかにした。

2) 続いて糖鎖抗原としてラムノースを用い、その一つのヒドロキシ基に選択的に光応答性の保護基を導入することに成功し、このケージド化合物をがん細胞表層に導入した後、光刺激によりラムノースを露出させ、がん細胞に選択的に免疫応答を誘導するシステムを構築した。

3) アルブミンタンパクをキャリアとして標的認識部位と抗体認識部位をもつ分子の合成として、複数の α -gal エピトープならびに複数の Sia α (2-6)Gal をアルブミンに導入した複合体を合成した。Sia α (2-6)Gal とシグレックの相互作用により、この複合体が免疫細胞と相互作用をすることを示したが、CDC を誘導するには十分な親和性がないことが示された。一方で、本複合体はウイルス等を標的とした抗体リクルート分子として有望である。

以上のように Hersa Milawati は新たな自然抗体リクルート法を見出した。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。