

Title	視神経脊髄炎関連疾患の新規治療法の開発
Sub Title	Development of new therapy for neuromyelitis optica spectrum disorders
Author	阿部, 陽一郎(Abe, Yoichiro)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2023
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>ハイブリドーマのクローニングを行い、抗ヒトアクアポリン4 (AQP4) に対する結合活性のある5クローン (①-⑤) 得た。ハイブリドーマを増幅する過程においてその上清から抗体を精製し、AQP4の2つのアイソフォームであるM1 (アレイ構造を形成しない) あるいはM23 (アレイ構造を形成する) を発現するCHO細胞、およびM1とM23を共に発現するCHO細胞を用いてELISA法により平衡状態における結合特性を確認したところ、2クローン (①と⑤) はほぼ同一のパターンを示したため、抗体遺伝子クローニング、シーケンス解析を行ったところ、H鎖に2残基の置換が見られたものの、ほぼ同一の抗体であることが確認された。また残りの3クローンのうち1クローン (④) は他のクローンと比較するとAQP4に対する親和性が低かった。よってこの2クローンについては以後の解析には用いなかった。</p> <p>選択した3クローン (①、②、③) のうち、②が最もM1に対する結合活性が強い一方、③はM1にはほぼ結合しなかった。これら3クローンをHRPで標識し、M1とM23を共に発現する細胞を用いて解離実験を行ったところ、①と②は、溶液中の抗体濃度を上昇させても溶液中の抗体を除去した場合と同様ゆっくりとした速度で解離したため、一度アレイ構造上で二価結合が形成されるとその状態が長く維持されることが示唆された。一方、③は他の2クローンと比較すると、溶液中の抗体濃度を上昇させることにより解離が促進されたが、既存抗体と比較すると長時間結合が維持された。</p> <p>AQP4ヒト化ラットから初代培養アストロサイトを採取し、上記3抗体によるAQP4のエンドサイトーシス誘導を調べたところ、①と②は極めて強くAQP4のエンドサイトーシス・ライソゾームでの分解を誘導したのに対し、③はほとんど誘導しなかった。</p> <p>以上より既存抗体と比較してヒトAQP4に対する親和性の高い、結合特性の異なる3種類の抗体を得ることができた。次年度以降、これらの抗体を用いて現在開発を進めているモデルによりNMO SDの新規治療薬の開発を進める。</p> <p>We obtained five hybridoma clones and purified monoclonal antibodies from their culture media. We examined their binding properties against the extracellular domains of human AQP4 by ELISA using CHO cells expressing either M1, which does not form orthogonal arrays of particle (OAPs); M23, which forms OAPs; or both M1 and M23. Two clones (① and ⑤) showed almost the same binding patterns. Cloning and sequencing their cDNAs for heavy chains revealed that they are almost the same molecules except for the difference in two amino acids. Among other three clones, one (④) showed relatively low affinity against the extracellular domains of AQP4. Thus, we did not use clones ④ or ⑤ for further analysis.</p> <p>We found that clone ② has the greatest capacity to bind to the M1 isoform. In contrast, ③ little bound to M1. We labeled clones ①, ②, and ③ with HRP and performed dissociation experiments by ELISA using CHO cells expressing both M1 and M23. Binding of ① and ② to AQP4 lasted for long time even in the presence of high concentration of antibody in the buffer, which was comparable to the dissociation rate in the absence of antibody. The result indicates that for these antibodies, once bivalent binding to AQP4 is achieved on AQP4 OAPs, the state will last for long period. On the other hand, high concentration of antibody in the buffer enhanced dissociation of ③ from AQP4; however, the binding of ③ to AQP4 maintained longer as compared with that of another antibody established previously.</p> <p>We also examined an ability of the antibodies to induce endocytosis of AQP4 using primary cultured astrocytes collected from brains of newborn AQP4-humanized rats. We found that ① and ② strongly induced endocytosis and transportation of AQP4 to lysosomes to be degrade, whereas ③ did not.</p> <p>Taken together, we established three new monoclonal antibodies strongly bind to the extracellular domains of human AQP4 having different binding properties. Using these antibodies, we will proceed with establishment of a new therapeutic drug for neuromyelitis optica spectrum disorder using a new models we have established.</p>
Notes	
Genre	Research Paper

URL

https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000011-20220001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	助教	補助額	1,100 千円
	氏名	阿部 陽一郎	氏名（英語）	Yoichiro Abe		
研究課題（日本語）						
視神経脊髄炎関連疾患の新規治療法の開発						
研究課題（英訳）						
Development of new therapy for neuromyelitis optica spectrum disorders						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
阿部陽一郎（Yoichiro Abe）		医学部・薬理学・助教				
中原仁（Jin Nakahara）		医学部・神経内科・教授				
三澤日出巳（Hidemi Misawa）		薬学部・薬理学・教授				
1. 研究成果実績の概要						
<p>ハイブリドーマのクローニングを行い、抗ヒトアクアポリン4 (AQP4) に対する結合活性のある5クローン(①~⑤)を得た。ハイブリドーマを増幅する過程においてその上清から抗体を精製し、AQP4の2つのアイソフォームであるM1(アレイ構造を形成しない)あるいはM23(アレイ構造を形成する)を発現するCHO細胞、およびM1とM23を共に発現するCHO細胞を用いてELISA法により平衡状態における結合特性を確認したところ、2クローン(①と⑤)はほぼ同一のパターンを示したため、抗体遺伝子クローニング、シーケンス解析を行ったところ、H鎖に2残基の置換が見られたものの、ほぼ同一の抗体であることが確認された。また残りの3クローンのうち1クローン(④)は他のクローンと比較するとAQP4に対する親和性が低かった。よってこの2クローンについては以後の解析には用いなかった。選択した3クローン(①、②、③)のうち、②が最もM1に対する結合活性が強い一方、③はM1にはほぼ結合しなかった。これら3クローンをHRPで標識し、M1とM23を共に発現する細胞を用いて解離実験を行ったところ、①と②は、溶液中の抗体濃度を上昇させても溶液中の抗体を除去した場合と同様ゆっくりとした速度で解離したため、一度アレイ構造上で二価結合が形成されるとその状態が長く維持されることが示唆された。一方、③は他の2クローンと比較すると、溶液中の抗体濃度を上昇させることにより解離が促進されたが、既存抗体と比較すると長時間結合が維持された。</p> <p>AQP4ヒト化ラットから初代培養アストロサイトを採取し、上記3抗体によるAQP4のエンドサイトーシス誘導を調べたところ、①と②は極めて強くAQP4のエンドサイトーシス・ライゾームでの分解を誘導したのに対し、③はほとんど誘導しなかった。</p> <p>以上より既存抗体と比較してヒトAQP4に対する親和性の高い、結合特性の異なる3種類の抗体を得ることができた。次年度以降、これらの抗体を用いて現在開発を進めているモデルによりNMOSDの新規治療薬の開発を進める。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>We obtained five hybridoma clones and purified monoclonal antibodies from their culture media. We examined their binding properties against the extracellular domains of human AQP4 by ELISA using CHO cells expressing either M1, which does not form orthogonal arrays of particle (OAPs); M23, which forms OAPs; or both M1 and M23. Two clones (① and ⑤) showed almost the same binding patterns. Cloning and sequencing their cDNAs for heavy chains revealed that they are almost the same molecules except for the difference in two amino acids. Among other three clones, one (④) showed relatively low affinity against the extracellular domains of AQP4. Thus, we did not use clones ④ or ⑤ for further analysis.</p> <p>We found that clone ② has the greatest capacity to bind to the M1 isoform. In contrast, ③ little bound to M1. We labeled clones ①, ②, and ③ with HRP and performed dissociation experiments by ELISA using CHO cells expressing both M1 and M23. Binding of ① and ② to AQP4 lasted for long time even in the presence of high concentration of antibody in the buffer, which was comparable to the dissociation rate in the absence of antibody. The result indicates that for these antibodies, once bivalent binding to AQP4 is achieved on AQP4 OAPs, the state will last for long period. On the other hand, high concentration of antibody in the buffer enhanced dissociation of ③ from AQP4; however, the binding of ③ to AQP4 maintained longer as compared with that of another antibody established previously.</p> <p>We also examined an ability of the antibodies to induce endocytosis of AQP4 using primary cultured astrocytes collected from brains of newborn AQP4-humanized rats. We found that ① and ② strongly induced endocytosis and transportation of AQP4 to lysosomes to be degrade, whereas ③ did not.</p> <p>Taken together, we established three new monoclonal antibodies strongly bind to the extracellular domains of human AQP4 having different binding properties. Using these antibodies, we will proceed with establishment of a new therapeutic drug for neuromyelitis optica spectrum disorder using a new models we have established.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			