

Title	重症筋無力症の新規治療法の開発：BiTE技術の神経-筋疾患への応用
Sub Title	Development of novel therapeutic strategies for myasthenia gravis
Author	森脇, 康博(Moriwaki, Yasuhiro)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2021
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>抗CD3抗体のscFv (OKT) からリンカーを介しα1サブユニットの細胞外領域(α1nAChR_{ex})を接続したα1-OKTを恒常的に発現するRK13細胞を樹立した。得られたα1-OKTを、抗α1抗体mAb35を産生するハイブリドーマTIB-175、ヒトCD3を発現するJurkatを用いてフローサイトメトリーでの結合性の評価を行った。Jurkatとの結合は確認できたが、TIB-175との結合は確認できなかった。また、細胞傷害活性を確認できるほど十分な量のα1-OKTを得ることはできなかった。そこで、リンカー一長の変更やα1nAChR_{ex}構造の変更等を行い、α1改変-OKTの作製を進めた。十数種類の変異体を作製し、タンパク質医薬品産生に多用されているCHO DG44細胞で安定的に産生されるα1改変-OKTの作製に成功した。現在、α1改変-OKTのTIB175への結合性について解析を進めている。</p> <p>α1-OKTの有効性を最終的に評価するには、In vivoでのアッセイが必要である。重症筋無力症モデルラットは電気ウナギから精製したα1nAChRタンパクを免疫することで作製されていることから、本年度は、α1nAChタンパクの精製系の確立を行った。α1nAChのアンタゴニストであるα-ブンガロトキシンをCNBR-アガロースに架橋した担体を用いて、デンキウナギの電気器官からのα1nAChRのアフィニティー精製を行う系を確立した。現在、ラットへの免疫の準備を進めている。</p> <p>重症筋無力症モデルラットでのα1-OKTの薬効評価ではOKTではなく、ラットに対するCD3抗体を用いる必要がある。抗ラットCD3作製にあたり、大腸菌からrat CD3タンパクを精製、マウスに免疫し、抗血清の産生まで確認している。引き続き、常法に従いモノクローナル抗体を樹立して行く予定である。</p> <p>We established RK13 cells that constitutively express α1-OKT which linking the extracellular region of the nicotinic acetylcholine receptor α1 subunit (α1nAChR) with single chain Fv of the anti-human CD3 antibody (OKT) via a linker. The binding property of the obtained α1-OKT was evaluated by flow cytometry using the hybridoma TIB-175 that produces the anti-α1nAChR antibody mAb35 and Jurkat that expresses human CD3. The binding with Jurkat was confirmed, but the binding with TIB-175 could not be confirmed. In addition, it was not possible to obtain a sufficient amount of α1-OKT to confirm the cytotoxic activity. Therefore, we changed the linker length and the α1nAChR extracellular structure, and proceeded with the production of α1 modified-OKT. We prepared more than a dozen mutants and succeeded in producing α1 modified-OKT that is stably produced in CHO DG44 cells, which are widely used in protein drug production. We are currently analyzing the binding of α1 modified-OKT to TIB175.</p> <p>An in vivo assay is required for the final assessment of the efficacy of α1-OKT. Since myasthenia gravis model rats are produced by immunizing the α1nAChR protein purified from electric eels, we established a purification system for the α1nACh protein this year. We have established a system for affinity purification of α1nAChR from the electrical organs of electric eels using a carrier in which α-bungarotoxin, which is an antagonist of α1nACh, is cross-linked to CNBR-agarose. Currently, we are preparing to immunize rats.</p> <p>In the evaluation of the efficacy of α1-OKT in myasthenia gravis model rats, it is necessary to use CD3 antibody against rats instead of OKT. In the production of anti-rat CD3 antibody, rat CD3 protein was purified from Escherichia coli, immunized with mice, and the production of antiserum was confirmed. We will continue to establish monoclonal antibodies according to the conventional method.</p>
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-00002020-0018

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	薬学部	職名	専任講師	補助額	1,500 千円
	氏名	森脇 康博	氏名 (英語)	YASUHIRO MORIWAKI		
研究課題 (日本語)						
重症筋無力症の新規治療法の開発: BITE 技術の神経一筋疾患への応用						
研究課題 (英訳)						
Development of novel therapeutic strategies for myasthenia gravis.						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
森脇康博 (Yasuhiro Moriwaki)		薬学部・薬科学科・専任講師				
1. 研究成果実績の概要						
<p>抗 CD3 抗体の scFv (OKT) からリンカーを介し $\alpha 1$ サブユニットの細胞外領域 ($\alpha 1nAChR_{ex}$) を接続した $\alpha 1$-OKT を恒常的に発現する RK13 細胞を樹立した。得られた $\alpha 1$-OKT を、抗 $\alpha 1$ 抗体 mAb35 を産生するハイブリドーマ TIB-175、ヒト CD3 を発現する Jurkat を用いてフローサイトメトリーでの結合性の評価を行った。Jurkat との結合は確認できたが、TIB-175 との結合は確認できなかった。また、細胞傷害活性を確認できるほど十分な量の $\alpha 1$-OKT を得ることはできなかった。そこで、リンカー長の変更や $\alpha 1nAChR_{ex}$ 構造の変更等を行い、$\alpha 1$ 改変-OKT の作製を進めた。十数種類の変異体を作製し、タンパク質医薬品産生に多用されている CHO DG44 細胞で安定的に産生される $\alpha 1$ 改変-OKT の作製に成功した。現在、$\alpha 1$ 改変-OKT の TIB175 への結合性について解析を進めている。</p> <p>$\alpha 1$-OKT の有効性を最終的に評価するには、In vivo でのアッセイが必要である。重症筋無力症モデルラットは電気ウナギから精製した $\alpha 1nAChR$ タンパクを免疫することで作製されていることから、本年度は、$\alpha 1nACh$ タンパクの精製系の確立を行った。$\alpha 1nACh$ のアンタゴニストである α-ブングアロトキシンを CNBR-アガロースに架橋した担体を用いて、デンキウナギの電気器官からの $\alpha 1nAChR$ のアフィニティー精製を行う系を確立した。現在、ラットへの免疫の準備を進めている。</p> <p>重症筋無力症モデルラットでの $\alpha 1$-OKT の薬効評価では OKT ではなく、ラットに対する CD3 抗体を用いる必要がある。抗ラット CD3 作製にあたり、大腸菌から rat CD3 タンパクを精製、マウスに免疫し、抗血清の産生まで確認している。引き続き、常法に従いモノクローナル抗体を樹立して行く予定である。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>We established RK13 cells that constitutively express $\alpha 1$-OKT which linking the extracellular region of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 1$ subunit ($\alpha 1nAChR$) with single chain Fv of the anti-human CD3 antibody (OKT) via a linker. The binding property of the obtained $\alpha 1$-OKT was evaluated by flow cytometry using the hybridoma TIB-175 that produces the anti-$\alpha 1nAChR$ antibody mAb35 and Jurkat that expresses human CD3. The binding with Jurkat was confirmed, but the binding with TIB-175 could not be confirmed. In addition, it was not possible to obtain a sufficient amount of $\alpha 1$-OKT to confirm the cytotoxic activity. Therefore, we changed the linker length and the $\alpha 1nAChR$ extracellular structure, and proceeded with the production of $\alpha 1$ modified-OKT. We prepared more than a dozen mutants and succeeded in producing $\alpha 1$ modified-OKT that is stably produced in CHO DG44 cells, which are widely used in protein drug production. We are currently analyzing the binding of $\alpha 1$ modified-OKT to TIB175.</p> <p>An in vivo assay is required for the final assessment of the efficacy of $\alpha 1$-OKT. Since myasthenia gravis model rats are produced by immunizing the $\alpha 1nAChR$ protein purified from electric eels, we established a purification system for the $\alpha 1nACh$ protein this year. We have established a system for affinity purification of $\alpha 1nAChR$ from the electrical organs of electric eels using a carrier in which α-bungarotoxin, which is an antagonist of $\alpha 1nACh$, is cross-linked to CNBR-agarose. Currently, we are preparing to immunize rats.</p> <p>In the evaluation of the efficacy of $\alpha 1$-OKT in myasthenia gravis model rats, it is necessary to use CD3 antibody against rats instead of OKT. In the production of anti-rat CD3 antibody, rat CD3 protein was purified from Escherichia coli, immunized with mice, and the production of antiserum was confirmed. We will continue to establish monoclonal antibodies according to the conventional method.</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)			