

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	2022
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>第一膜貫通領域の23アミノ酸上流までの$\alpha 1nAChR$細胞外領域 ($\alpha 1nAChRex$) をPGGGGSリンカーでOKTに接続した$\alpha 1nAChRex$-OKTを恒常的に発現するRK13細胞を樹立した。得られた$\alpha 1nAChRex$-OKTタンパク質を、抗$\alpha 1$抗体 (mAb35) を産生するハイブリドーマTIB-175細胞、ヒトCD3を発現するJurkat細胞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細胞との結合は確認できたが、TIB-175細胞との結合は確認できなかった。TIB-175細胞が形質膜上にラット抗体を発現していることは、ラット抗体の軽鎖を認識する抗体 (MRK-81) を用いたフローサイトメトリーによる解析で確認しているため、TIB-175細胞との結合が確認できなかった一因として、$\alpha 1nAChRex$-OKTタンパク質のタンパク質濃度が低いことが考えられた。そこで、$\alpha 1nAChRex$-OKTタンパク質の産生効率などを改善すべく、リンカー長の変更や$\alpha 1nAChRex$構造の変更を行った。$\alpha 1nAChRex$構造の変更に関しては、主要免疫原性領域を含む$\alpha 1nAChRex$の最小化や、分子構造に影響を与えると考えられる配列の変異導入、nAChRが5量体を形成することから、抗体の重鎖定常域1 (constant heavy 1 : CH1) と軽鎖定常域 (constant light : CL) を用いた2量体化などを試みた。結果、主要免疫原性領域を含む最小配列で、2つのエピトープの中間部位に変異を導入した$\alpha 1nAChRex$をDKTHTGSリンカーでOKTに接続した融合タンパク質 ($\alpha 1nAChRex$改変-OKT) で培養上清への高いタンパク産生と、Jurkat細胞への結合を確認することができた。次に、タンパク質医薬品産生に多用されているCHO DG44細胞を用いて、$\alpha 1nAChRex$改変-OKTを安定的に産生される細胞を樹立した。この細胞の培養上清より精製した$\alpha 1nAChRex$改変-OKTを用いて、TIB-175細胞への結合をフローサイトメトリーにより確認した結果、結合を確認するに至らなかった。今回、作製した主要免疫原性領域を含む$\alpha 1nAChRex$改変-OKTタンパクでは、タンパク質濃度による問題では無く、mAb35により認識されない可能性が高いと考えられる。既に実用化が検討されている$\alpha 1nAChRex$-Fcに関しては、TIB-175細胞への結合と細胞障害活性が確認されている。抗体によるエピトープ認識には立体構造が大きく影響しているため、更なる$\alpha 1nAChRex$配列の改変を進める予定である。また、細胞障害活性の比較、TIB-175細胞への結合の参考のため$\alpha 1nAChRex$-Fcタンパク質の精製も合わせて行なう予定である。</p> <p>RK13 cells were established that constantly express $\alpha 1nAChRex$-OKT, in which the $\alpha 1nAChR$ extracellular region up to 23 amino acids upstream of the first transmembrane region ($\alpha 1nAChRex$) is connected to OKT with a PGGGS linker. The resulting $\alpha 1nAChRex$-OKT protein was evaluated for binding by flow cytometry using hybridoma TIB-175 cells producing anti-$\alpha 1$ antibody (mAb35) and Jurkat cells expressing human CD3. binding to Jurkat cells was confirmed, but binding to TIB-175 Since the fact that TIB-175 cells express rat antibodies on their plasma membrane was confirmed by flow cytometry analysis using an antibody that recognizes the light chain of rat antibodies (MRK-81), one reason for the failure to confirm binding to TIB-175 cells was that low protein concentration of $\alpha 1nAChRex$-OKT protein was considered. To improve the production efficiency of the $\alpha 1nAChRex$-OKT protein, the linker length and the $\alpha 1nAChRex$ structure were changed. Mutations were introduced, and since nAChR forms a pentamer, dimerization using the constant heavy 1 (CH1) and constant light (CL) regions of the antibody was attempted. As a result, we confirmed high protein production in culture supernatants and binding to Jurkat cells by a fusion protein ($\alpha 1nAChRex$-modified-OKT) in which $\alpha 1nAChRex$, a minimal sequence containing the major immunogenic region and a mutation in the intermediate site of two epitopes, was connected to OKT with a DKTHTGS linker. Next, using CHO DG44 cells, which are frequently used for protein drug production, we established cells that stably produce $\alpha 1nAChRex$-modified-OKT. The $\alpha 1nAChRex$-modified-OKT purified from the culture supernatant of these cells was confirmed by flow cytometry for binding to TIB-175 cells, but binding was not confirmed. The $\alpha 1nAChRex$-modified-OKT protein containing the major immunogenic region prepared in this study is not likely to be recognized by mAb35, not because of a problem with the protein concentration. As for $\alpha 1nAChRex$-Fc, which is already being considered for commercialization, binding to TIB-175 cells and cytotoxic activity have been confirmed. Since the three-dimensional structure has a significant effect on epitope recognition by antibodies, further modification of the $\alpha 1nAChRex$ sequence is planned. We also plan to purify $\alpha 1nAChRex$-Fc protein for comparison of cytotoxic activity and binding to TIB-175 cells.</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=KO12003001-20210002-0016

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>第一膜貫通領域の 23 アミノ酸上流までの $\alpha 1nAChR$ 細胞外領域 ($\alpha 1nAChR_{ex}$) を PGGGS リンカーで OKT に接続した $\alpha 1nAChR_{ex}$-OKT を恒常的に発現する RK13 細胞を樹立した。得られた $\alpha 1nAChR_{ex}$-OKT タンパク質を、抗 $\alpha 1$ 抗体 (mAb35) を産生するハイブリドーマ TIB-175 細胞、ヒト CD3 を発現する Jurkat 細胞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 細胞との結合は確認できたが、TIB-175 細胞との結合は確認できなかった。TIB-175 細胞が形質膜上にラット抗体を発現していることは、ラット抗体の軽鎖を認識する抗体 (MRK-81) を用いたフローサイトメトリーによる解析で確認しているため、TIB-175 細胞との結合が確認できなかった一因として、$\alpha 1nAChR_{ex}$-OKT タンパク質のタンパク質濃度が低いことが考えられた。そこで、$\alpha 1nAChR_{ex}$-OKT タンパク質の産生効率などを改善すべく、リンカー長の変更や $\alpha 1nAChR_{ex}$ 構造の変更を行った。$\alpha 1nAChR_{ex}$ 構造の変更に関しては、主要免疫原性領域を含む $\alpha 1nAChR_{ex}$ の最小化や、分子構造に影響を与えると考えられる配列の変異導入、nAChR が 5 量体を形成することから、抗体の重鎖定常域 1 (constant heavy 1: CH1) と軽鎖定常域 (constant light: CL) を用いた 2 量体化などを試みた。結果、主要免疫原性領域を含む最小配列で、2 つのエピトープの中間部位に変異を導入した $\alpha 1nAChR_{ex}$ を DKTHGTGS リンカーで OKT に接続した融合タンパク質 ($\alpha 1nAChR_{ex}$ 改変-OKT) で培養上清への高いタンパク質産生と、Jurkat 細胞への結合を確認することができた。次に、タンパク質医薬品産生に多用されている CHO DG44 細胞を用いて、$\alpha 1nAChR_{ex}$ 改変-OKT を安定的に産生される細胞を樹立した。この細胞の培養上清より精製した $\alpha 1nAChR_{ex}$ 改変-OKT を用いて、TIB-175 細胞への結合をフローサイトメトリーにより確認した結果、結合を確認するに至らなかった。今回、作製した主要免疫原性領域を含む $\alpha 1nAChR_{ex}$ 改変-OKT タンパク質では、タンパク質濃度による問題ではなく、mAb35 により認識されない可能性が高いと考えられる。既に実用化が検討されている $\alpha 1nAChR_{ex}$-Fc に関しては、TIB-175 細胞への結合と細胞障害活性が確認されている。抗体によるエピトープ認識には立体構造が大きく影響しているため、更なる $\alpha 1nAChR_{ex}$ 配列の改変を進める予定である。また、細胞障害活性の比較、TIB-175 細胞への結合の参考のため $\alpha 1nAChR_{ex}$-Fc タンパク質の精製も合わせて行なう予定である。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>RK13 cells were established that constantly express $\alpha 1nAChR_{ex}$-OKT, in which the $\alpha 1nAChR$ extracellular region up to 23 amino acids upstream of the first transmembrane region ($\alpha 1nAChR_{ex}$) is connected to OKT with a PGGGS linker. The resulting $\alpha 1nAChR_{ex}$-OKT protein was evaluated for binding by flow cytometry using hybridoma TIB-175 cells producing anti-$\alpha 1$ antibody (mAb35) and Jurkat cells expressing human CD3. binding to Jurkat cells was confirmed, but binding to TIB-175. Since the fact that TIB-175 cells express rat antibodies on their plasma membrane was confirmed by flow cytometry analysis using an antibody that recognizes the light chain of rat antibodies (MRK-81), one reason for the failure to confirm binding to TIB-175 cells was that low protein concentration of $\alpha 1nAChR_{ex}$-OKT protein was considered. To improve the production efficiency of the $\alpha 1nAChR_{ex}$-OKT protein, the linker length and the $\alpha 1nAChR_{ex}$ structure were changed. Mutations were introduced, and since nAChR forms a pentamer, dimerization using the constant heavy 1 (CH1) and constant light (CL) regions of the antibody was attempted. As a result, we confirmed high protein production in culture supernatants and binding to Jurkat cells by a fusion protein ($\alpha 1nAChR_{ex}$-modified-OKT) in which $\alpha 1nAChR_{ex}$, a minimal sequence containing the major immunogenic region and a mutation in the intermediate site of two epitopes, was connected to OKT with a DKTHGTGS linker. Next, using CHO DG44 cells, which are frequently used for protein drug production, we established cells that stably produce $\alpha 1nAChR_{ex}$-modified-OKT. The $\alpha 1nAChR_{ex}$-modified-OKT purified from the culture supernatant of these cells was confirmed by flow cytometry for binding to TIB-175 cells, but binding was not confirmed. The $\alpha 1nAChR_{ex}$-modified-OKT protein containing the major immunogenic region prepared in this study is not likely to be recognized by mAb35, not because of a problem with the protein concentration. As for $\alpha 1nAChR_{ex}$-Fc, which is already being considered for commercialization, binding to TIB-175 cells and cytotoxic activity have been confirmed. Since the three-dimensional structure has a significant effect on epitope recognition by antibodies, further modification of the $\alpha 1nAChR_{ex}$ sequence is planned. We also plan to purify $\alpha 1nAChR_{ex}$-Fc protein for comparison of cytotoxic activity and binding to TIB-175 cells.</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)			