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	第一膜貫通領域の23アミノ酸上流までのα1AAChR細胞外領域(a1AAChRex)をPGGGGSリンカ でOKTに接続したα1AAChRex-OKTを恒常的に発現するRK13細胞を樹立した。得られたα1AAC hRex-OKTタンパク質を、抗α1抗体(mAD35)を産生するハイブリトーマTIB-175細胞とトCD3 を発現するJurka4細胞をDNマフローサイトメトリーでの結合性の評価を行った。Jurka4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、ラット抗体の整領を認識する抗体(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 α1AAChRex-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、a1AAChRex- OKTタンパク質の産生効率などを改善すく、リンカー長の変更やa1AAChRex構造の変更を行った。 a1AAChRex-構造の変更に関しては、主要免疫原性領域を含むa1AAChRexの最小化や、分子 構造に影響を与えるえる配列の変異導入、AAChRが5量体を形成することから、抗体の重 頻定常率(1 constant heavy 1: CH1)と整頻定常道(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つのエビトーブの中間部位に変異是導入した な1AAChRex考慮がのモジリンカーでOKTL接続した記含シンパク質(a1AAChRex改要OKTを)いた で培養上青への高いタンパク産生と、Jurka4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CHC DE44細胞を用いて、a1AChRex改要OKTを力いて、TBL- 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合がRex改要OKTを定いのに 生される細胞を物立した。この細胞の結差上清より構築したa1AChRex改要OKTを定いに産 生される細胞を物立した。この細胞の結差上清より構築した1AChRex改要OKTを定いに定 生される細胞を物たした。この細胞の結差上清もり構築した1AChRex改要OKTをを知いすで、TBL- 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合のFRex改要OKTを定めに定 がる1AAChRexFに提供するを含む1AAChRex改要OKTをのかった。 今回、作製した主要免疫原性領域を含む1AAChRex改要OKTをのかった。 502、小製とすりの構築したわてるため。既実用化が検討され ているa1AAChRexFにし関しては、TBL-175細胞への結合の参考のためa1AAChRex たる3TEVーブITX酸にはは体構造が大きく影響しているため、更なa1AAChRex型のの近姿を 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a1AAChRex FCタンパク質の構築もわせて行なう予定である。 KK13 cells were established that constantly express a1AAChRex-OKT Frotein was evaluated for binding by flow cytometry using hybridoma TIB-175 cells mach CMRez ADF Cメスンパク質の 特徴もわせて行なう予定である。 FK13 cells was that 1UB-175 cells producing anti-a1 antibody (mAChRex) is connected to OKT with a PGGS linker. The resulting a1AChRex-OKT protein was evaluated for binding by flow cytometry using hybridoma TIB-175 cells mach forms a pentamer, dimerization using the constant heavy 1(CH1) and constant light (CL) regions of the a1hbody was attempted. As a result, we confirmed high protein production in utiture supernatants and binding to Jurkat cells was confirmed by flow cytometry

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.

2021 年度 福澤基金研究補助研究成果実績報告書

研究代表者	所属	薬学部	職名	専任講師	L-D m L dat	1,500 1	тп
	氏名	森脇 康博	氏名(英語)	YASUHIRO MORIWAKI	補助額		ΤI
		-	研究課題(日本語	告)		8	
重症筋無力症の	の新規治療法の	の開発 : BiTE 技術の神経一節	筋疾患への応用				
			研究課題(英訴	()			
Development o	f novel therap	eutic strategies for myasther	nia gravis.				
			研究組織				
氏	名 Name		所属・学科・	職名 Affiliation, department, an	d position		
森脇康博(YA	SUHIRO MORI						
			研究成果実績の	D概要 (α InAChRex)を PGGGGS リ			
は、ラット抗体の 確認できなかっ ンパク質の原性 することから、 果ま続した感じ に接続した感ど た。次に、タン	の軽鎖を認識すった一因として、 た一因として、 たの率などを改 領域を含む。α 抗体の重を含む 航体の重を含む 気という なったので、 たて、 たつ たつ たつ として、 たつ として、 たつ として、 たつ として、 たつ として、 たつ として、 として、 として、 として、 として、 として、 として、 として、	よる抗体 (MRK-81)を用いた 、α InAChRex-OKT タンパク 善すべく、リンカー長の変更 InAChRex の最小化や、分子 常域 1 (constant heavy 1 : C こ最小配列で、2 つのエピトー α InAChRex 改変-OKT)で培	フローサイトメトリ- ク質のタンパク質 や α 1nAChRex を構造に影響を与 CH1)と軽鎖定常 -プの中間部位に 養上清への高い	。TIB-175 細胞が形質膜上に ーによる解析で確認しているた 豊度が低いことが考えられた。。 構造の変更を行った。α1nACP えると考えらえる配列の変異 或(constant light : CL)を用い 変異を導入した α1nAChRex タンパク産生と、Jurkat 細胞へ	:め、TIB-175 新 そこで、α 1nA nRex 構造の変 導入、nAChR か た 2 量体化なる を DKTHTGS!	間との結 ChRex-O 更に関して 5 量体を ごを試みた レンカーで	合か KT ク C は 、 形 の K
認した結果、結 ク質濃度による に関しては、TI ため、更なる	合を確認する 5問題では無く B-175 細胞へ α 1nAChRex 酉	清より精製した α 1nAChRex に至らなかった。今回、作製 、mAb35 により認識されない の結合と細胞障害活性が確認 己列の改変を進める予定で D精製も合わせて行なう予定	< 改変-OKT を用 した主要免疫原 い可能性が高いと 認されている。抗 ある。また、細胞	Nて、α InAChRex 改変-OKT いて、TIB-175 細胞への結合 生領域を含む α InAChRex 改 考えられる。既に実用化が検討 体によるエピトープ認識には立 順 書活性の比較、TIB-175 新 要(英訳)	をフローサイトメ 変-OKT タンパ 討されている α Σ体構造が大き	トリーによ クでは、タ 1nAChRe く影響して	胞 ち い x-Fo て い
認した結果、結 ク質濃度による に関しては、TI ため、更なる α 1nAChRex-F RK13 cells wer acids upstrear	合を確認する 問題では無く B-175 細胞へ α 1nAChRex 面 c タンパク質の re established n of the first	清より精製した α 1nAChRex に至らなかった。今回、作製 、mAb35 により認識されない の結合と細胞障害活性が確 ご列の改変を進める予定で D精製も合わせて行なう予定 2.研 that constantly express α1 transmembrane region (α	 、改変-OKT を用した主要免疫原性 ・可能性が高いとき 認されている。抗 ある。また、細胞である。 究成果実績の概要 nAChRex-OKT, i 1nAChRex) is of 	いて、TIB-175 細胞への結合で 生領域を含む α 1nAChRex 改 考えられる。既に実用化が検討 体によるエピトープ認識には立 」障害活性の比較、TIB-175 新	をフローサイトメ 変-OKT タンパ 討されている α Z体構造が大き 細胞への結合 cellular region u PGGGS linker.	トリーによ クでは、タ 1nAChRe く影響して の参考の up to 23 a The res	胞 り ン 下 る を 確 バ 下 る を ー mining
認した結果、結 ク質濃度による に関しては、TI ため、更なる α 1nAChRex-F RK13 cells wer acids upstrear α 1nAChRex-C (mAb35) and J TIB-175 cells recognizes the protein concern protein, the lir pentamer, dime we confirmed H OKT) in which two epitopes, v production, we culture superna α 1nAChRex-r mAb35, not be commercializat significant effe	合を確認する う問題では無く B-175 細胞へな α 1nAChRex Trope of the first of the first OKT protein w urkat cells express rat arr light chain of tration of α 1 hker length and erization using high protein pri- α 1nAChRex, vas connected established ca atant of these nodified-OKT cause of a pr ion, binding to ct on epitope	清より精製した α 1nAChRex に至らなかった。今回、作製 、mAb35 により認識されない の結合と細胞障害活性が確 ご列の改変を進める予定で つ精製も合わせて行なう予定 2. 研 that constantly express α 1 : transmembrane region (α as evaluated for binding by pressing human CD3. binding thibodies on their plasma mo rat antibodies (MRK-81), o nAChRex-OKT protein was id the α 1nAChRex structu the constant heavy 1 (CH1) oduction in culture supernation a minimal sequence containing to OKT with a DKTHTGS line ells that stably produce α 1 cells was confirmed by flow protein containing the major roblem with the protein con TIB-175 cells and cytotoxic recognition by antibodies, fu in for comparison of cytotoxi	は な変-OKT を用 した主要免疫原 で可能性が高いとき 認されている。抗 ある。また、細胞 である。 究成果実績の概 nAChRex-OKT, i nAChRex-OKT, i nAChRex) is o flow cytometry u g to Jurkat cells embrane was cor ne reason for the considered. To ir ir were changed and constant light ants and binding ing the major immunes nAChRex-modified cytometry for bi immunogenic reg centration. As for activity have be rther modification ic activity and bin	いて、TIB-175 細胞への結合で 生領域を含む α 1nAChRex 改 考えられる。既に実用化が検討 体によるエピトープ認識には立 障害活性の比較、TIB-175 分 要 (英訳) n which the α 1nAChR extract connected to OKT with a F sing hybridoma TIB-175 cells was confirmed, but binding to nfirmed by flow cytometry an e failure to confirm binding to nprove the production efficient d. Mutations were introduced int (CL) regions of the antibod to Jurkat cells by a fusion pro- bunogenic region and a mutati CHO DG44 cells, which are free ad-OKT. The α 1nAChRex-mod nding to TIB-175 cells, but bin ion prepared in this study is no or α 1nAChRex-Fc, which is en confirmed. Since the three on of the α 1nAChRex sequence ding to TIB-175 cells.	をフローサイトメ 変-OKT タンパ 対されている α Z体構造が大き 細胞への結合 Cellular region u GGGS linker. TIB-175 Since alysis using and TIB-175 cells ney of the α1 I, and since nu y was attempted the internet equently used for on in the internet equently used for odified-OKT put not likely to be already being e-dimensional s	トリーによ クでは、 クでは、 のでは、 の る か の 参 考 の か す た の 参 考 の の 参 考 の の 参 考 の の 参 考 の の 参 考 の の 参 考 の の 参 考 の の の 参 考 の の の 参 考 の の の の	I胞を確かった。 Image: State
認した結果、結 ク質濃度による に関しては、TI ため、更なる α 1nAChRex-F RK13 cells wer acids upstrear α 1nAChRex-G (mAb35) and J TIB-175 cells recognizes the protein concern protein, the lir pentamer, dime we confirmed H OKT) in which two epitopes, v production, we culture superna α 1nAChRex-r mAb35, not be commercializat significant effe	合を確認する う問題では無く B-175 細胞へ α 1nAChRex 暫 c ϕ γ γ ϕ ϕ re established n of the first DKT protein w urkat cells exp express rat ar light chain of tration of α 1 aker length an erization using nigh protein pri α 1nAChRex, vas connected established co atant of these nodified-OKT cause of a pri ion, binding to ct on epitope akex-Fc protei	清より精製した α 1nAChRex に至らなかった。今回、作製 、mAb35 により認識されない の結合と細胞障害活性が確 ご列の改変を進める予定で つ精製も合わせて行なう予定 2. 研 that constantly express α 1 : transmembrane region (α as evaluated for binding by pressing human CD3. binding thibodies on their plasma mo rat antibodies (MRK-81), o nAChRex-OKT protein was id the α 1nAChRex structu the constant heavy 1 (CH1) oduction in culture supernation a minimal sequence containing to OKT with a DKTHTGS line ells that stably produce α 1 cells was confirmed by flow protein containing the major roblem with the protein con TIB-175 cells and cytotoxic recognition by antibodies, fu in for comparison of cytotoxi	は な変-OKT を用 した主要免疫原 いている。抗 ある。また、細胞 である。 完成果実績の概 れている。抗 ある。また、細胞 である。 完成果実績ので れている。 の の たてある。 完成果実績ので れている。 た の れている。 た の れている。 た の れた れている。 た の れた れている。 た の れた れている。 た の れた れている。 た の れた れている。 た の れた れた れた れた れた れた れた れた れた れた	いて、TIB-175 細胞への結合で 生領域を含む α 1nAChRex 改 考えられる。既に実用化が検討 体によるエピトープ認識には立 障害活性の比較、TIB-175 分 要 (英訳) n which the α 1nAChR extract connected to OKT with a F sing hybridoma TIB-175 cells was confirmed, but binding to nfirmed by flow cytometry an e failure to confirm binding to nprove the production efficient d. Mutations were introduced int (CL) regions of the antibod to Jurkat cells by a fusion pro- bunogenic region and a mutati CHO DG44 cells, which are free ad-OKT. The α 1nAChRex-mod nding to TIB-175 cells, but bin ion prepared in this study is no or α 1nAChRex-Fc, which is en confirmed. Since the three on of the α 1nAChRex sequence ding to TIB-175 cells.	をフローサイトメ 変-OKT タンパ 対されている α Z体構造が大き 細胞への結合 Cellular region u GGGS linker. TIB-175 Since alysis using and TIB-175 cells ney of the α1 I, and since nu y was attempted the internet equently used for on in the internet equently used for odified-OKT put not likely to be already being e-dimensional s	トリーによ クでは、 クでは、 のでは、 のでは、 のでする の の か の の の の の の の の の の の の の の の の	胞をないた mining where the set of