

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19360376

研究課題名（和文）

リウマチ治療を目的とした TNF alpha に対する「スーパー抗体酵素」の開発

研究課題名（英文）

Development of super catalytic antibodies against human TNF alpha

研究代表者

一二三恵美（HIFUMI EMI）

大分大学・全学研究推進機構・教授

研究者番号：90254606

研究代表者の専門分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：抗体酵素，TNF alpha，リウマチ

1. 研究計画の概要

TNF alpha は、慢性関節リウマチを引き起こす主要な因子の一つである。自己免疫疾患やストレスによって関節に炎症細胞が浸潤すると、産生された TNF alpha によって生理的バランスを超えるレベルまで活性化された各種細胞によって骨破壊が進行し、関節の変形が起こる。リウマチ治療薬としては、TNF alpha の機能を消失させる中和抗体が開発されていて、一定の効果を示している。本研究では、TNF alpha が引き起こすカスケード反応の抑制を目的として、TNF alpha に対するスーパー抗体酵素を作製する。スーパー抗体酵素は中和抗体と異なり、次々と抗原分子を入れ替えながら分解が進むので、投与量を抑えられる点が、中和抗体には無い特徴である。

2. 研究の進捗状況

(1) TNF alpha に対するモノクローナル抗体の作製

Recombinant human TNF alpha を Balb/c マウスに免疫後、脾細胞と myeloma を PEG 法によって融合させ、15 種類の抗 TNF alpha モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立した。この中には 4 種類の IgM 抗体が含まれるという特徴があった。続いてこれらのハイブリドーマから mRNA を抽出して cDNA に変換後、抗体の Leader sequence 部分と定常領域部分の primer を使って抗体可変領域の遺伝子を増幅させた。引き続き TOPO vector にサブクローニングし、シーケンスを解析した。得られた配列をもとに抗体分子構造計算ソフトウェア（AbM）を用いて可変領域の構造を予測し、

抗原認識部位近傍に触媒三ツ組残基様構造を持つ抗体を選び出した。

(2) 抗体サブユニットの調製

ハイブリドーマをマウスに投与して得た腹水より抗体を精製後、2-ME による還元とヨードアセトアミドによるアシル化を行って重鎖と軽鎖を分離した。続いて変性条件化のサイズ排除クロマトグラフィーにより精製し、PBS に対して透析して精製抗体鎖を得た。

(3) 酵素活性の評価

詳細は省略するが、IgM 抗体は完全抗体の状態でも酵素活性を示す可能性が高いと考えられることから、IgM 抗体と触媒三ツ組残基を持つと考えられる抗体鎖について、Peptidyl-MCA 基質を用いた Amidase 活性試験や TNF alpha に対する分解試験を進めている。

3. 現在までの達成度

やや遅れている。

（理由）

いくつかの抗体（鎖）について TNF alpha に対する分解実験を行うと、TNF alpha は僅かに低分子化するものの、大きな変化は認められなかった。僅かに低分子化した断片を N 末端アミノ酸配列解析すると、TNF alpha の N 末端が 2 残基だけ外れた断片であった。この分解生成物の親和性が、TNF alpha よりも強く、抗体鎖に保持されて分解が進行していないと考えられた。このレベルの分解では、TNF alpha の機能消失は難しいと思われるので、より抗原分解活性の強い抗体鎖を探索

している。

4. 今後の研究の推進方策

TNF-alpha に対する分解活性を發揮する抗体や抗体鎖の取得には成功したが、初期の段階で反応が停止してしまうことから、抗体鎖が intact な TNF-alpha よりも分解断片と強く結合していると考えられる。そこで、遺伝子工学的な手法による改変を可能にするために、一部の抗体鎖について遺伝子をクローニングして大腸菌で発現する用意を開始した。

TNF-alpha に対する分解実験を行っていない抗体鎖に加えて、大腸菌発現させた抗体鎖の評価を進めていく。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

TNF-alpha に対するモノクローナル抗体 ETNF series の酵素活性, 東教平, 宇田泰三, 一二三恵美, 第90春季日本化学会年会, 2010年3月

TNF-alpha に対する IgM モノクローナル抗体の免疫学的性質と酵素活性, 東教平, 宇田泰三, 一二三恵美, 日本化学会バイオテクノロジー部会, 2009年9月

TNF-alpha に対する IgM モノクローナル抗体 ETNF series の酵素活性の検討, 東教平, 宇田泰三, 一二三恵美, 第89春季日本化学会年会, 2009年3月

酵素活性の視点から見た IgM 抗体の意味 ~ サイトカイン TNF-alpha に対する天然型抗体酵素の探索 ~, 東教平, 宇田泰三, 一二三恵美, 第3回バイオ関連合同シンポジウム, 2008年9月