

27AB-am059

関節リウマチ治療薬創製を目的とした抗 TNF- α 抗体の機能改変に関する試み
○加藤 芳徳¹, 山方 俊介¹, 阿部 研太¹, 大貫 智弘¹, 片岡 加奈¹, 松本 准¹, 廣澤 伊織¹,
山田 治美¹ (¹国際医福大薬)

【目的】関節リウマチは全身の小関節のこわばりや痛み、腫れなどを主症状とする全身性の自己免疫疾患であり、その治療には抗 TNF- α 抗体製剤が用いられている。当研究室では、安価で有用な抗 TNF- α 抗体の新規創製を目的として、TNF- α に親和性を示す一本鎖 Fv フラグメント (scFv) の獲得に成功した。しかし、親和性および安定性に乏しく、各種試験を行うには十分な機能を有していなかった。今回、本抗体を出発物質とし、親和性、安定性の向上した変異分子種の獲得を試みた。【方法】抗 TNF- α scFv である scFv#3T1-8 の H 鎖、L 鎖可変部 (V_H , V_L) 遺伝子に対し、マンガンイオン濃度 0.25 mM または 0.5 mM の条件で error-prone PCR を行い、変異 V_H , V_L 群を得た。この変異 V_H , V_L 遺伝子群をチェーンシャッフリング法により連結して変異 scFv 遺伝子群を調製した。その後、pComb3X ベクターへと連結し、大腸菌 XL1-Blue 株に導入することで、合計で 4×10^6 種のライブラリーを構築した。形質転換菌にヘルパーファージに感染させて scFv 提示ファージを調製し、TNF- α 固相化チューブを用いて選別した。【結果】ファージ提示および TNF- α を用いる選別過程を 2 サイクル繰り返し行った。得られたクローンについて、scFv-ファージを用いる ELISA により抗 TNF- α 活性を確認したところ、複数のクローンで抗 TNF- α 活性が確認できた。本ファージを大腸菌 XL0LR 株に感染させたのち、IPTG 存在下にて scFv タンパク質を発現させた。得られる scFv タンパク質を用いて ELISA を行った結果、10 種のクローンで TNF- α に対する反応性を確認できた。【考察】現在、得られた変異分子種について、競合 ELISA を行い、その機能の解析を進めている。また、各クローンの遺伝子配列およびアミノ酸配列を解析している。