

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
神経免疫疾患領域における難病の医療水準と患者の QOL 向上に資する研究
分担研究報告書

トリプトファン固定化カラムは IgG のヒンジ部を介して IgG を精製できる

演者・共同演者：○本村 政勝^{1,4}、池 浩司¹、清水 悦郎¹、赤石 哲也^{2,3}、吉村 俊祐⁴、青木 正志³、松尾 秀徳⁵

演者・共同演者の所属：¹長崎総合科学大学工学部工学科医療工学コース、²東北大学病院 総合診療科、³東北大学大学院 神経内科、⁴長崎大学病院脳神経内科、⁵国立病院機構長崎病院脳神経内科

研究要旨

本研究は、トリプトファン(Trp)固定化カラムがどのようにして免疫グロブリン G(IgG)を吸着するかを解明する。本年度は、抗体結合タンパク質である Protein A と Trp で固定化カラムを作成し、精製 IgG を断片化し、アフィニティークロマトグラフィー法で吸着・溶出実験を行った。その結果、ペプシン消化 IgG 断片（約 13mg）で Protein A と Trp カラムの IgG 溶出量(n=3)の平均±標準偏差は、それぞれ、7.91 ± 0.55 mg と 7.47 ± 1.27 mg で差はなかった。一方、パパイン消化 IgG 断片（約 17mg）で Protein A と Trp カラムの溶出量(n=3)の平均±標準偏差は、それぞれ、15.37 ± 0.84 mg と 3.85 ± 0.48 mg で、Trp カラムでは溶出率が 23.1%に低下した。免疫電気泳動検査では、ヒンジ部が保たれているペプシン消化 IgG 断片 {F(ab')₂}の溶出分画で Protein A と Trp カラムでバンドの濃さに差はなかった。一方、ヒンジ部が切断されたパパイン消化 IgG 断片(2Fab+Fc)の溶出分画で、Protein A カラムより、Trp カラムでは Fab と Fc のバンドが薄くなった。以上の結果より、Trp 固定化カラムの吸着機序には、IgG のヒンジ部位が重要であることが示唆された。

A. 研究目的

アミノ酸を固定化したアガロース担体カラムと神経筋接合部に対する病原性自己抗体を用いた in vitro・基礎的研究を行い、アミノ酸固定化カラムがどのようにして病原性自己抗体を除去するかを解明する。今日、20 種類のアミノ酸のなかで L-トリプトファン(Trp)固定化カラムである選択的血漿成分吸着器イムソーバ TR350 が、重症筋無力症(MG)患者の血漿交換治療に臨床応用されている(Hirata et al, *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 2003)。その作用機序は、Trp が有する疎水性がアセチルコリン受容体(AChR)抗体を選択的に吸着すると推測されてきた(Sato et al, *Progress in Artificial Organs*, 1983)。本研究で、20 種類のアミノ酸のなかで、Trp 固定化カラムが最も免疫グロブリンを吸着できることが分かった。本年度は、抗体結合タンパク質である Protein A と Trp で固定化カラムを作成し、精製 IgG を断片化し、アフィニティークロマトグラフィー法で吸着・溶出実験を行った。

B. 研究方法

本研究は、長崎総合科学大学の倫理委員会の承認を得て行われた。以下に研究方法を示す。

1) アミノ酸固定化カラム作成：Trp と Protein A（富士フイルム和光純薬工業株式会社）をアガロース担体、CNBr-activated sepharose 4B

(Cytiva) に固定化させて、容量 1ml カラムを作成した。

2) アミノ酸固定化カラムの評価：上記の 1ml カラムでアフィニティークロマトグラフィー法を行い、IgG の吸着能力を評価した。具体的な方法は、健常者血清(A)サンプル 1ml ずつをセファロース担体 xml カラムに通して (B1, B2, B3, , Bx)、その後、洗浄液 1ml を y 回洗い (C1, C2, C3, , Cy)、最後に、溶出液 1ml で z 回溶出した (D1, D2, D3, , Dz)。それぞれの分画液で IgG の濃度を免疫比濁法で測定した。吸着量(mg) = IgG 濃度(A-B1-B2-B3-Bx-C1-C2-C3-Cy)、吸着率 = IgG 濃度(A-B1-B2-B3-Bx-C1-C2-C3-Cy) / A x 100、溶出量(mg) = IgG 濃度(D1+D2+D3+Dz)、及び、溶出率(mg) = IgG 濃度(D1+D2+D3+Dz) / A x 100 と定義した。

3) 免疫電気泳動検査

上記のアフィニティークロマトグラフィー実験で得られた分画の免疫グロブリン精製度を精査すべく、Mタンパク質などの血清タンパク質異常性症のスクリーニング検査に用いられる免疫電気泳動法（抗ヒト全血清使用）を行った。

4) 免疫グロブリンGの断片化：以下の方法で、IgGを、F(ab')₂、FabとFcに断片化した。

①ペプシン消化の方法

IgG50mg/ml, 2mlを0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)3mlに溶かし、ペプシン(Pepsin 1:10000, from Porcine Stomach Mucosa, FUJIFILM WAKO PURE CHEMICAL CORPORATION)2mgを加え、37度氏で一晩反応させる。その後、5mMリン酸緩衝液(PBS)で透析する。

②パパイジン消化の方法

IgG50mg/ml, 2mlを5mMリン酸緩衝液(pH7.2)3mlに溶かし、EDTAとシステインを加え、夫々の最終濃度をそれぞれ10mMと2mMにする。次に、Papain(FUJIFILM WAKO PURE CHEMICAL CORPORATION)1mgを加え、37度氏で一晩反応させる。その後、PBSで透析する。

C. 研究結果

図1に示すように、ペプシン消化IgG断片{F(ab')₂領域}で、Protein AとTrp固定化カラムのIgG溶出量(n=3)の平均±標準偏差は、それぞれ、7.91±0.55 mgと7.47±1.27 mgで差はなかった。一方、パパイジン消化IgG断片(2Fab+Fc)でProtein AとTrp固定化カラムのIgG溶出量(n=3)の平均±標準偏差は、それぞれ、15.37±0.84 mgと3.85±0.48 mgで、Trpカラムで、溶出率が23.1%に低下した。図2にProtein A固定化カラムとTrp固定化カラムのAとD2分画の免疫電気泳動法の結果を示す。ペプシン消化IgG断片{F(ab')₂領域}は、Protein A固定化カラムとTrp固定化カラムでほぼ同じ濃さのバンドであった。一方、パパイジン消化の溶出D2分画で、Protein A固定化カラムはFabとFcが確認されたが(Poulik MD.: F'c fragment of immunoglobulins. Nature. 1966)、TrpカラムのD2分画では、FabとFcのバンドの濃さが低下した。以上の結果より、Trp固定化カラムの吸着機序には、IgGのヒンジ部位が重要であることが推測された。

D. 考察

今回は、IgGを断片化してアフィニティークロマトグラフィー法で吸着・溶出実験を行うことにより、Protein A固定化カラムとTrp固定化

カラムで、それぞれの吸着機序が異なることが示された。基礎研究において、プロテインAは、プロテインG、プロテインA/GおよびプロテインLなどと同じく、哺乳類の免疫グロブリンのFc領域と結合する微生物由来の天然タンパク質および組換えタンパク質で、免疫グロブリン結合タンパク質と呼ばれている。今回の研究結果で、Protein Aは、IgGのFc領域だけでなく、Fabにも結合するという以前の報告(Choe W et al, Materials, 2016)を追試することができた。IgGをタンパク質分解酵素のパパイジンで消化すると、H鎖-H鎖を繋ぐジスルフィド結合(ヒンジ部位)の間が切断され、抗体は3つの断片に分かれ、N末端側の2つの断片をFab領域、C末端側の断片をFc領域という。一方、IgGを別のタンパク質分解酵素であるペプシンで消化すると、N末端側にヒンジ部位を含んだ状態で切断される。これをF(ab')₂領域と言う。今回の結果は、パパイジン消化でヒンジ部がなくなるとIgGの吸着・溶出量が著明に低下することより、Trp固定化カラムの吸着機序には、IgGのヒンジ部位が重要であることが推測された。この結果は、以前の班会議の報告と一致した(Shibuya N, et al. 1988)。今後は、ヒトIgG-Fc断片抗体、ヒトIgG-Fab断片抗体、および、ヒトIgG-F(ab')₂断片抗体を用いて、その確認を行う予定である。

E. 結論

Trp固定化カラムは、IgGのヒンジ部を介して、血清から免疫グロブリンGを精製できることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 本村政勝, 入岡隆. [ランバート・イートン筋無力症候群: 病原性自己抗体の臨床的意義. Brain Nerve. ;75巻7号:837-845, 2023
- 2) 北之園寛子, 吉村俊祐, 白石裕一, 本村政勝. ランバート・イートン筋無力症候群(LEMS)の診療. Brain Nerve. ;76巻1号:33-40, 2024

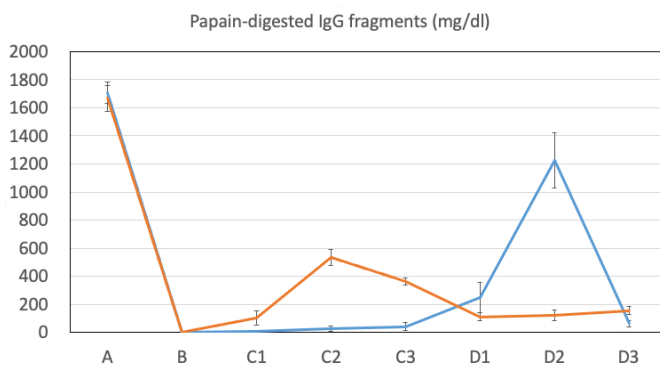
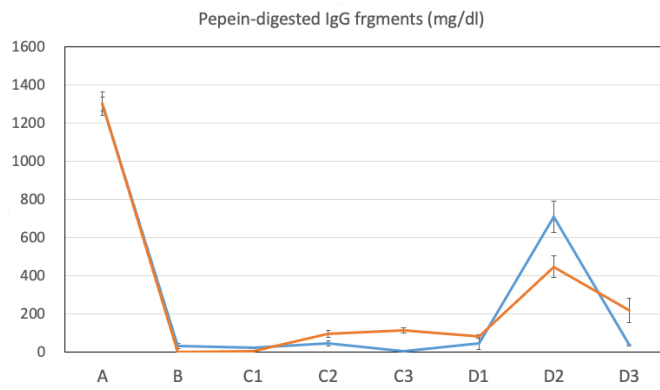
2. 学会発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | 無し |
| 2. 実用新案登録 | 無し |
| 3. その他 | 無し |

☒ 1



☒ 2

