

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

筋特異的チロシンキナーゼ (MuSK) 抗体を活用した IgG4 選択的免疫吸着カラムの基礎研究

演者・共同演者：○本村 政勝<sup>1,4</sup>、池 浩司<sup>1</sup>、清水 悦郎<sup>1</sup>、赤石 哲也<sup>2,3</sup>、吉村 俊祐<sup>4</sup>、青木 正志<sup>3</sup>、松尾 秀徳<sup>5</sup>

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

研究要旨

本研究の目的は、抗ヒト IgG4 モノクロナル抗体をアガロース担体に固定化し、MuSK 抗体陽性 MG 患者検体を活用し、IgG4 選択的免疫吸着カラムを開発することである。方法は、IgG4 モノクロナル抗体をアガロース担体、CNBr-activated sepharose 4B (cytiva) に固定化させて、容量 1ml のオープンカラムを作成する。次に、アフィニティークロマトグラフィー法を用いて IgG4 量と MuSK 抗体の吸着・溶出能を評価した。その結果、健常者血清 (n=4) の IgG4 濃度 (mg/ml) の平均±標準偏差は  $0.64 \pm 0.38$  mg/ml で、それらの血清 3ml から IgG4 溶出量 (mg) の平均±標準偏差は  $0.81 \pm 0.14$  mg であった。さらに、MuSK 抗体陽性 IgG と血清でも、ほぼ同じ結果が得られた (図 2, 3)。以上より、IgG4 モノクロナル固定化カラムで IgG4 と MuSK 抗体を選択的に吸着し、溶出できることが示された。本研究は、MuSK 抗体陽性 MG だけでなく、他の IgG4 介在性自己免疫疾患の治療に応用できるため、臨床治験へ向けた基礎研究として重要である。

A. 研究目的

本研究の目的は、抗ヒト IgG4 モノクロナル抗体をアガロース担体に固定化し、MuSK 抗体陽性 MG 患者検体を活用し、IgG4 選択的免疫吸着カラムを開発することである。本研究は、MuSK 抗体陽性 MG だけでなく、他の IgG4 介在性自己免疫疾患の治療に応用できるため、臨床治験へ向けた基礎研究として重要である。

B. 研究方法

以下に研究方法を簡潔に示す。

1) 抗ヒト IgG4 モノクロナル抗体のスクリーニング：数種類の市販されている抗ヒト IgG4 モノクロナル抗体を用いて、MuSK 抗体サブクラス解析を行う。具体的には以下の方法で、

① MuSK 抗体陽性血清  $1 \mu\text{l}$  に  $^{125}\text{I}$ -MuSK、20,000cpm を添加する。

② 次に、市販の抗ヒト IgG4 モノクロナル抗体 ( $x=2.5 \mu\text{g}$ ) を添加して、一晚インキュベーションする。

③ 抗マウス IgG 抗体で免疫沈降し、3 回遠心・洗浄し、cpm を測定する。

上記の測定で、x のモノクロナル抗体量を希釈して、最も高い cpm、すなわち抗体価が高い IgG4

抗体をスクリーニングする。

2) IgG4 選択的免疫吸着カラムの作成：上記のスクリーニングで最適な IgG4 モノクロナル抗体をアガロース担体、CNBr-activated sepharose 4B (cytiva) に固定化させて、容量 1ml のオープンカラムを作成する。

3) IgG4 選択的免疫吸着カラムの評価：アフィニティークロマトグラフィー法を用い、カラム担体量 1ml に当量の検体 (A) 1ml を 3 回カラムに通して (B1, B2, B3)、その後、洗浄液  $1-2 \text{ ml} \times 3$  回で洗い (C1, C2, C3)、最後に、溶出液  $1 \text{ ml} \times 3$  回で溶出する (D1, D2, D3)。それぞれの分画液で免疫グロブリン IgG (免疫比濁法)、IgG4 濃度 (ラテックス凝集比濁法、基準値：11~121 mg/dl)、及び、放射性免疫沈降法 (RIA)-MuSK 抗体を測定する。吸着量、吸着率、溶出量、および、溶出率を以下の式で定義した。吸着量 (mg) =  $Ax3 - B1 - B2 - B3 - C1 - C2 - C3$ , 吸着率 (%) =  $(Ax3 - B1 - B2 - B3 - C1 - C2 - C3) / Ax3 \times 100$   
溶出量 (mg) =  $D1 + D2 + D3$ , 溶出率 (%) =  $(D1 + D2 + D3) / A \times 100$

C. 研究結果

1) 健常者血清 (n=4) を用いた IgG4 選択的免疫

吸着カラムの評価：健常者血清 (n=4) の IgG4 濃度(mg/dl)は、それぞれ、52.0, 119.0, 32.0, 54.0 mg/dl であった。それらの血清 3ml から、吸着量/(吸着率);0.77mg/(49.4%), 0.70mg/(19.6%), 0.51mg/(53.1%), 0.75mg/(46.3%) で、溶出量/(溶出率);0.81mg/(51.9%), 1.00mg/(28.0%), 0.66mg/(68.8%), 0.75mg/(46.3%) で、明らかにこのカラムで IgG4 を選択的に取り除けることが判明した(図 1a)。IgG 濃度でみると、ほとんど吸着せずに、IgG 溶出量(mg)はそれぞれ、0.89, 0.89, 0.83, 0.87 mg で、それらの量は IgG4 の溶出量とほぼ一致した(図 1b)。以上より、IgG4 選択性免疫吸着カラム 1ml で、約 0.8mg の IgG4 を吸着・溶出できることが分かった。

2) MuSK 抗体陽性患者の精製免疫グロブリン (n=3) を用いた IgG4 選択的免疫吸着カラムの評価：次に MuSK 抗体陽性患者由来の精製免疫グロブリン(n=3)で、同じ実験を行った。IgG4 のカラム前の IgG4 濃度(mg/dl)は、それぞれ、483.0, 240.0, 211.0 mg/dl であった。1ml の精製免疫グロブリンから吸着量/(吸着率); 0.84mg/(17.4%), 0.74mg/(30.8%), 0.98mg(46.4%) で、溶出量/(溶出率); 1.06mg(44.2%), 1.09mg(22.6%), 0.98mg(51.2%) で、健常者血清と同じようにこの 1ml カラムで約 1mg の IgG4 を選択的に取り除けることが判明した(図 2a)。MuSK 抗体価は、IgG4 とほぼ同じ動きをして、MuSK 抗体がこのカラムで吸着・溶出された(図 2b)。

3) MuSK 抗体陽性患者の血清と精製免疫グロブリン Ig (n=3) を用いた IgG4 選択的免疫吸着カラムの評価：上記の結果に追加して、MuSK 抗体陽性患者の血清と精製免疫グロブリン(n=3)で、再度、同じ実験を行った。IgG4 のカラム前の IgG4 濃度(mg/dl)は、それぞれ、42.0, 75.0, 88.0 mg/dl であった。3ml の検体から吸着量/(吸着率);0.75mg/(59.5%), 0.82mg/(36.4%), 0.98mg(37.1%) で、溶出量/(溶出率);0.98mg(77.8%), 1.01mg(44.9%), 0.75mg(28.4%) で、健常者血清と同じようにこの 1ml カラムで約 1mg の IgG4 を選択的に取り除けることが判明した(図 3a)。MuSK 抗体価は、IgG4 とほぼ同じ動きをして、MuSK 抗体がこのカラムで吸着・溶出された(図 3b)。

#### D. 考察

IgG4 モノクロナル固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで IgG4 を

選択的に吸着し、溶出できることが示された。そのことは、IgG4 が主体である MuSK 抗体陽性血清と IgG を用いた実験でも証明された。本研究の重要な点は、IgG4 モノクロナル抗体のスクリーニングだと考えている。この段階で、最も効率的に IgG4 を吸着・溶出できるモノクロナル抗体を見つけることが出来れば、本研究は実りある成果が得られる。

#### E. 結論

IgG4 モノクロナル固定化カラムで IgG4 と MuSK 抗体を選択的に吸着し、溶出できることが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 本村政勝, 入岡隆. [ランバートン・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 |

図1a

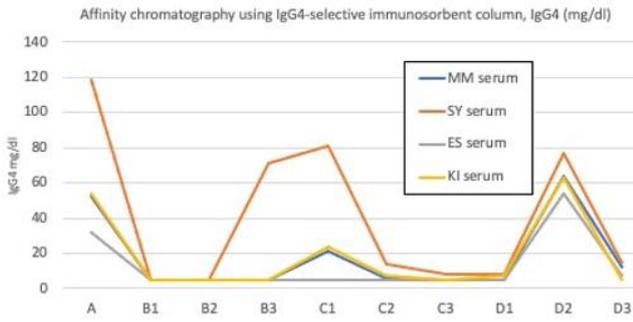


図1b

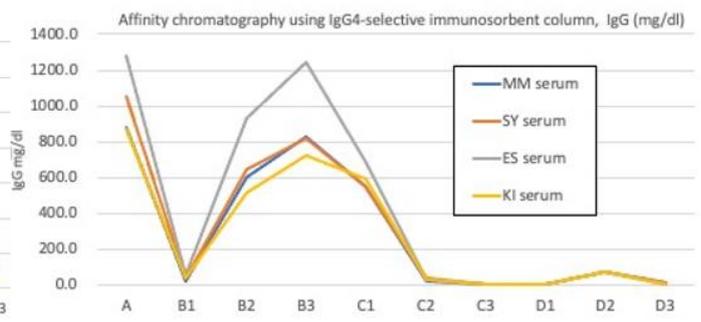


図2a

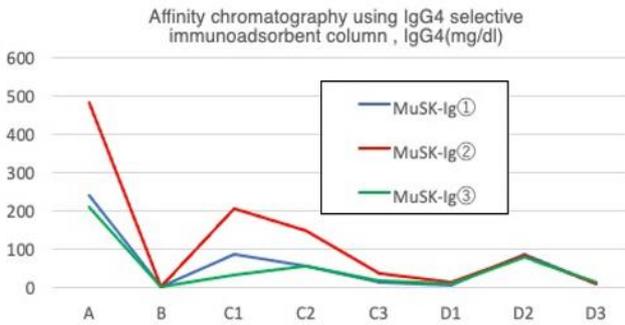


図2b

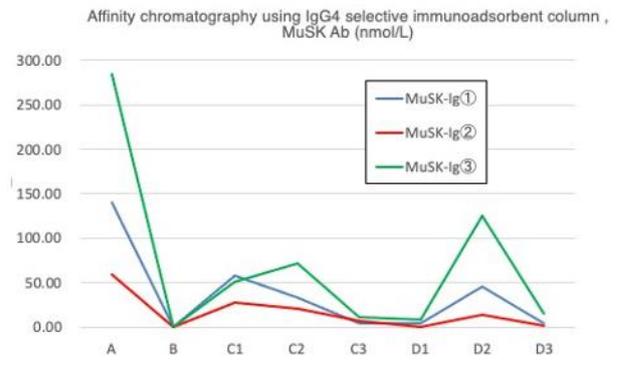


図3a

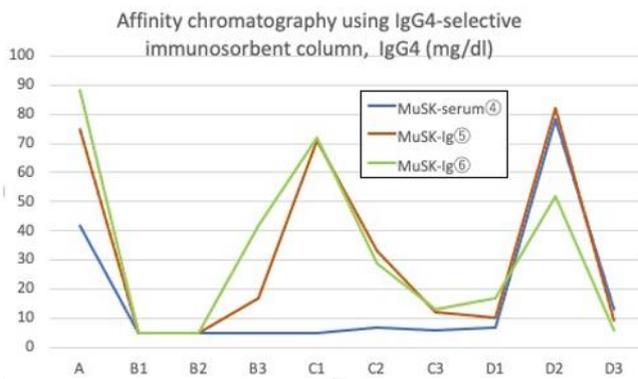


図3b

